

猪链球菌 2 型新的感染相关因子自溶素的鉴定与分析

顾宏伟, 陆承平*

(南京农业大学动物医学院, 农业部动物疫病诊断与免疫重点开放实验室, 南京 210095)

摘要: 根据 Sanger 研究所公布的猪链球菌 2 型(SS2)P1/7 株的自溶素序列, 设计检测引物, 取 SS2 我国 2 次流行株、其它临床分离株和参考株, 及猪链球菌 1 型、1/2 型、7 型和 9 型, 共 33 株, 分别以其 DNA 为模板, PCR 扩增。结果表明, SS2 除无毒株 T15 阴性外, 其他临床分离株 27 株 (含人源 2 株)均阳性; 其它猪链球菌为, SS7 阳性, SS1、SS1/2 和 SS9 均阴性。同时设计引物向两侧扩增, 以四川流行株 ZY05719 和江苏流行株 HA9801 的 DNA 为模板, 扩增自溶素 ORF 完整的编码基因, 软件分析结果显示, 该基因含有 6 个重复的“GBS_Bsp-like”域和 1 个“N-乙酰胞壁酰-L-丙氨酸酰胺酶”域, 与 SS2 欧洲株有较高同源性(99.8%), 但与 SS2 加拿大株差异较大。在 DNASTAR 分析所编码蛋白的抗原性的基础上, 另设计引物, 以 ZY05719 株 DNA 为模板, PCR 扩增具有良好免疫原性的片段基因, 并定向克隆至表达载体 pET30a(+)中, 进行重组表达, SDS-PAGE 和 Western blot 表明, 所获得重组自溶素具有良好反应原性。

关键词: 猪链球菌 2 型; 感染相关因子; 自溶素

中图分类号: Q93, S852 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209(2008)01-0068-05

猪链球菌(*Streptococcus suis*)是一种重要的人兽共患病病原, 可引起脑膜炎、关节炎、心内膜炎、败血症、肺炎、休克和突然死亡等^[1]。该菌按表面多糖抗原差异可分为 35 血清型(1~34, 1/2), 其中 2 型(*Streptococcus suis* type 2, SS2)是公认的流行最广、致病性最强、猪群携带率较高的病原。1998 年江苏和 2005 年四川相继暴发猪链球菌疫情, 倍受世人关注^[2]。目前 SS2 已知的毒力因子如溶菌酶释放蛋白(MRP)、胞外因子(EF)、溶血素(suilysin)、荚膜多糖(CPS)等^[3, 4]。

革兰氏阳性菌的胞壁是由各种各样的分子构成, 在细菌的定殖和侵袭等方面发挥着重要作用, 其表面有一层较厚的肽聚糖层。细菌肽聚糖水解酶(peptidoglycan hydrolase)又称胞壁水解酶/自溶素(cell wall hydrolase/autolysin), 通过水解菌壁肽聚糖的特定的糖苷键, 进而溶解细菌壁, 在细菌分裂、细胞壁翻转、胞壁重构及细菌自溶等过程中发挥着

重要作用^[5]。另有报道, 自溶素有助于加强革兰氏阳性菌的致病性, 如自溶素是肺炎链球菌致病性必需的因子之一, 对该基因突变后毒力明显下降^[6]。目前仅对几种细菌的自溶素编码基因进行了研究, 如结核分枝杆菌(*Mycobacterium tuberculosis*)、肺炎链球菌(*Streptococcus pneumoniae*)、山羊葡萄球菌(*Staphylococcus caprae*)、表皮葡萄球菌(*S. epidermidis*)和产单细胞李氏杆菌(*Listeria monocytogenes*)等^[5, 7-9]。迄今为止, 国内外尚未有关于 SS2 自溶素报道。本试验通过 PCR 检测我国 SS2 两次流行株和其它临床分离株是否存在自溶素, 并分析该基因在其它猪链球菌的分布, 另扩增其 ORF 全基因, 分析比较两次疫情代表株与国外分离株之间的差异。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株: 猪链球菌共 33 株, 其中 HA9801 为猪

基金项目: 国家“973 项目”(2006CB504403)

*通讯作者。Tel: +86-25-84396517; E-mail: lucp@njau.edu.cn

作者简介: 顾宏伟(1978-), 男, 江苏如东人, 博士研究生, 从事兽医微生物与免疫学研究。E-mail: hongweigu999@yahoo.com.cn

收稿日期: 2007-05-09; 修回日期: 2007-08-20

链球菌病 1998 年江苏流行株；ZY05719 为 2005 年四川流行株；260 和 266 为 2005 年四川人源株，由四川省疾病预防控制中心罗隆泽惠赠；ATCC43765，11611，由德国 Giessen 大学 Baljer 教授惠赠，T15 由荷兰动物健康研究所 Smith 博士惠赠，SH28(SS1) 和 26S(SS1/2) 由中国动物流行病学中心提供，其他菌株的来源见表 1。DH5 α ，BL21(DE3)，均由本室保存。

表 1 猪链球菌的自溶素基因的 PCR 检测

Table 1 Detection of the *cwh* gene in swine *Streptococcus suis* by PCR

Strains	Serotype	Origin	Region	Year	PCR results
HA9801	2	pig	Jiangsu (江苏)	1998	+
ZY05719	2	pig	Sichuan (四川)	2005	+
ATCC43765	2	pig	Netherlands	N	+
260	2	human	Sichuan (四川)	2005	+
266	2	human	Sichuan (四川)	2005	+
11611	2	N	German	N	+
SS2-N	2	pig	German	1996	+
LD06816	2	pig	Hunan (湖南)	2006	+
YY06821	2	pig	Hunan (湖南)	2006	+
XT06821	2	pig	Hunan (湖南)	2006	+
GZ061128	2	pig	Guangdong (广东)	2006	+
S50	2	pig	Guangdong (广东)	2005	+
HZ0615	2	pig	Jiangsu (江苏)	2006	+
HA9802	2	pig	Jiangsu (江苏)	1998	+
HA05729	2	pig	Jiangsu (江苏)	2005	+
LA21	2	pig	Jiangsu (江苏)	2005	+
YZ	2	pig	Jiangsu (江苏)	2005	+
JR05730	2	pig	Jiangsu (江苏)	2005	+
SS2-H	2	pig	Jiangsu (江苏)	1998	+
YZ06720	2	pig	Jiangsu (江苏)	2006	+
HA06827	2	pig	Jiangsu (江苏)	2006	+
SS2/6	2	pig	Shanghai (上海)	1999	+
JDZ05802	2	pig	Jiangxi (江西)	2005	+
ZY05720	2	pig	Sichuan (四川)	2005	+
ZY05722	2	pig	Sichuan (四川)	2005	+
05-464	2	pig	Sichuan (四川)	2005	+
05-465	2	pig	Sichuan (四川)	2005	+
SH28	1	N	Canada	N	-
26S	1/2	N	Canada	N	-
SH040805	7	pig	Shanghai (上海)	2004	+
SH040917	9	pig	Jiangxi (江西)	2004	-
JX041226	9	pig	Shanghai (上海)	2004	-
T15	2	pig	Netherlands	N	-

*N, no detailed information.

1.1.2 主要试剂：Taq 酶，BamH I ，Xho I ，T4DNA 连接酶，DNA 快速纯化回收试剂盒，T 载体，DNA marker，均购自大连宝生物工程有限公司；辣根

化物酶标记的 SPA(HRP-SPA，武汉博士德)；IPTG，卡那霉素(Kan)，蛋白酶 K 均为 Amresco 产品；质粒抽提试剂盒(天根生物技术有限公司)；质粒 pET30a(+) 为 Novagen 公司产品。

1.2 DNA 的提取和 PCR 检测

1.2.1 模板提取：将各菌株于 THB 平板划线，挑取单个菌落经鉴定后，接种 THB 肉汤，37 $^{\circ}\text{C}$ 振荡培养过夜，根据常规方法提取基因组 DNA，溶于 TE 缓冲液中，-20 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

1.2.2 引物设计与合成：根据作者前期的研究结果，结合 Sanger 研究所已报道的相应的基因序列，利用 Primer5.0 软件自行设计引物。检测引物，上游引物(P1)：5'-TATCAAATCCGTCGGCACAG-3'，下游引物(P2)：5'-ACTTTCCTCAACAGCACCATAC-3'，产物为 630bp；完整 ORF 扩增引物，上游引物(P5)：5'-GTTGAATGCTCAGCTTGTT-3'，下游引物(P2)：5'-TCCCTCAACAGCACCATAC-3'，产物为 3043bp。重组表达引物，上游引物(P3)：5'-GCAGGATCCTCCTACACAGTCTATATTGA-3' (下划线部分为酶切位点)，下游引物(P4)：5'-ATAGAGCTCCTACTTTCCTCAACAGCA-3' (下划线部分为酶切位点)，产物为 606bp；引物由 Invitrogen 公司合成。

1.2.3 PCR 反应和检测

在 0.2mL 薄壁 PCR 反应管中依次加入 10 \times buffer、25mmol/L Mg $^{2+}$ 、2.5mmol/L dNTPs、10 $\mu\text{mol/L}$ 上下游引物、模板 DNA 及 Taq 酶，最后加水定容至 25 μL ，混匀后立即进行 PCR 反应。PCR 循环参数：94 $^{\circ}\text{C}$ 5min；94 $^{\circ}\text{C}$ 30s；50 $^{\circ}\text{C}$ 40s；72 $^{\circ}\text{C}$ 40s；30 个循环；72 $^{\circ}\text{C}$ 10min；4 $^{\circ}\text{C}$ 10min，电泳检测。扩增完整 ORF 的 PCR 循环参数：94 $^{\circ}\text{C}$ 5min；94 $^{\circ}\text{C}$ 30s；53 $^{\circ}\text{C}$ 40s；72 $^{\circ}\text{C}$ 3min；30 个循环；72 $^{\circ}\text{C}$ 10min；4 $^{\circ}\text{C}$ 10min。PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳后，用 DNA 胶回收试剂盒回收目的片段。其中用于表达的 PCR 产物以 BamH I 和 Xho I 进行双酶切，酶切完成后 65 $^{\circ}\text{C}$ 作用 15min，电泳纯化双酶的 PCR 产物，溶于 TE 缓冲液中，-20 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

1.3 重组质粒的构建与鉴定分析

1.3.1 测序用质粒的构建：将经回收的 PCR 产物直接与 T-载体连接，转化进 DH5 α 感受态细胞，感受态细胞的制备按照分子克隆提供的 CaCl $_2$ 法，经 PCR 鉴定阳性的送公司测序。

1.3.2 重组表达质粒的构建：将含有 pET30a(+) 的 DH5 α 单菌落接种 kan/LB 肉汤，37 $^{\circ}\text{C}$ 振荡培养过夜，以质粒抽提试剂盒抽提质粒 DNA，以 BamH I 和 Xho I 进行双酶切，电泳回收线性化的质粒 DNA，

将质粒双酶切回收产物与双酶切的PCR产物进行连接,转化进DH5 α 感受态细胞,感受态细胞的制备方法同上,经PCR和双酶切鉴定后,将重组表达质粒转化进表达宿主菌BL21(DE3),进一步鉴定,挑取阳性克隆测序。经鉴定后的阳性克隆送由上海Invitrogen公司测序,将所测序列拼接,参考Sanger研究所提供的SS2全基因组序列,确定出完整的ORF,并将推导出蛋白质序列在NCBI数据库进行比对,软件分析所编码蛋白的结构域及与其它蛋白之间的进化关系。

1.4 重组质粒的诱导表达

重组表达菌接种LB培养液,37 $^{\circ}$ C振荡培养3~4h后,加入IPTG至终浓度1mmol/mL,继续振荡培养3~4h,离心收集沉淀,加入SDS-PAGE上样缓冲液煮沸5min,含pET30a(+)的非重组质粒菌也同样处理。用12% SDS-PAGE检测表达情况。

1.5 免疫转印

免疫转印按常规方法^[10]进行,重组表达的胞壁水解酶经SDS-PAGE后以0.65mA/cm恒流转移2h,待蛋白转多到硝酸纤维素滤膜后,以5%脱脂奶粉PBS溶液封闭,封闭后与1:500稀释的康复血清结合,随之加入1:1000稀释的HRP-SPA作用1h,最后以DAB显色。

2 结果

2.1 PCR扩增

两次疫情代表株和人源株的PCR产物琼脂糖凝

胶电泳后,均出现一条630bp的条带,大小与预期的一致,阴性对照组没有条带出现。

2.2 自溶素基因的检测

本试验共检测了33株猪链球菌,其中2型27株,PCR检测结果表明,临床SS2分离株均出现630bp条带,7型检测到630bp的条带,1型,1/2型,9型的均未出现条带,另SS2无毒株T15也没有该条带(见表1)。

2.3 序列分析

将测序片段进行拼接后,两株SS2的自溶素编码基因全长均为3108bp,序列号分别为EF563970(ZY05719)和EF563971(HA9801)。在基因组上是呈反向编码的,起始密码子为TTG,终止密码子为TAG,与欧洲株P1/7同源率为99.8%。

编码蛋白由1035氨基酸组成,软件分析其分子量为113kDa,其等电点为7.27。分析该蛋白结构时发现,其内部含7个结构域,6个重复的GBS_Bsp-like域,另一个为N-乙酰胞壁酰-L-丙氨酸酰胺酶结构域(图1)。



图1 ZY05719株自溶素的结构分析

Fig. 1 Analysis of structure of autolysis from SS2 strain ZY05719. Gray, GBS_Bsp-like domain; Black, N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase.

比对加拿大89/1589株,发现其自溶素基因仅有923氨基酸,进化关系表明,它与ZY05719和05ZYH33在同一个分支上,与其他链球菌相差较远(图2)。氨

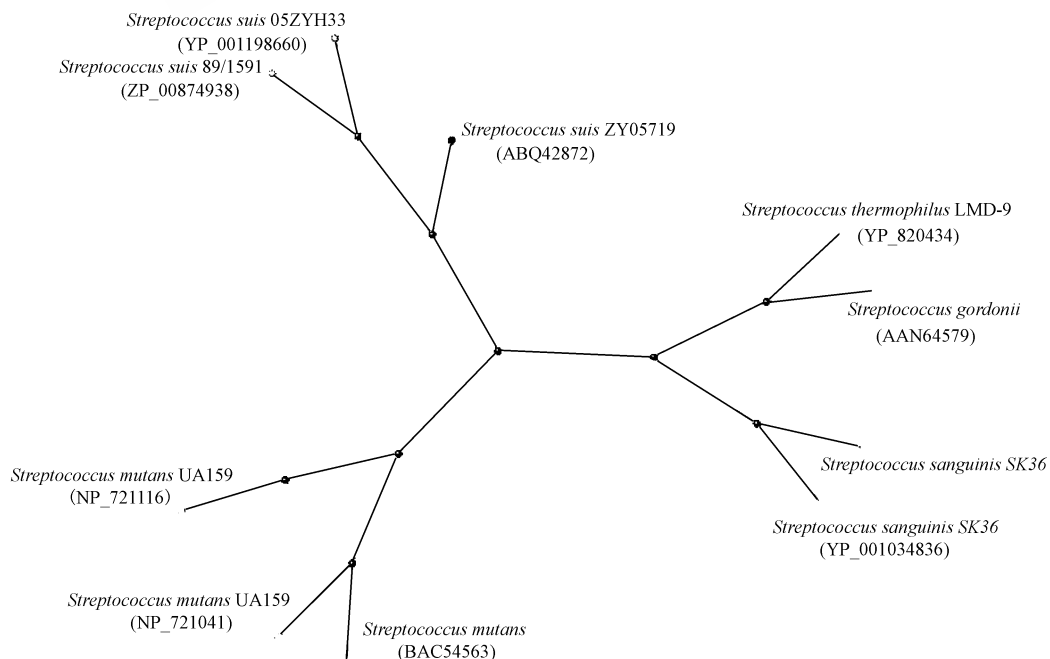


图2 链球菌自溶素的进化关系树

Fig. 2 Phylogenetic tree from analysis of autolysins of streptococcus.

氨基酸序列与国内 05ZYH33 和 98HAH33 *N*-乙酰胞壁酰-L-丙氨酸酰胺酶同源性为 99%。

2.4 重组表达质粒的鉴定

根据上述自溶素 ORF 全基因序列,用 DNASTAR 软件进行分析,选择具有良好免疫原性的区域设计引物,以 ZY05719 的基因组为模板,PCR 扩增后,经双酶切、纯化,定向克隆到经 *Bam*HI 和 *Xho*I 双酶切的 pET30a(+)载体中,得到重组表达质粒 pET30a-cwh,转化到大肠杆菌 DH5 α 后,首先用 PCR 检测,挑取阳性克隆提取质粒经 *Bam*HI 和 *Xho*I 双酶切得到约 606bp 片段,这表明目的片段已成功插入到表达质粒中。

2.5 自溶素的重组表达

将含自溶素部分基因片段的重组质粒 pET30a-cwh 转化到大肠杆菌 BL21(DE3),经 IPTG 诱导后,SDS-PAGE 分析,出现目的融合蛋白,其分子量大小约为 28kDa,与预期的一致(图 3)。空白对照的(空表达载体)相应位置未见相应的大小的蛋白条带,表明重组自溶素蛋白得到高效表达。

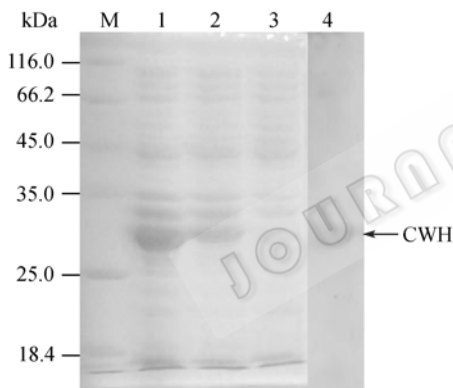


图 3 重组自溶素表达的 SDS-PAGE 及免疫转印

Fig. 3 SDS-PAGE and Western blots of expression of recombinant autolysin CWH in BL21(DE3). M, Protein molecular weight maker; 1~2, recombinant plasmid pET30a-cwh transformants was induced by IPTG at 4h and 2h; 3, pET30a(+) transformants induced by IPTG; 4, Western blot with convalescent sera.

2.6 免疫转印

经 IPTG 诱导表达的重组自溶素蛋白从 PAGE 胶转移到硝酸纤维素滤膜后,与康复血清充分反应后,经显色表明,在重组表达蛋白的位置上有显色条带(图 3),从而进一步证实了重组自溶素蛋白具有良好反应原性。

3 讨论

自溶素在细菌的致病性方面有着重要的作用,对自溶素致病机理研究尚处于探索阶段,目前对链球菌的自溶素研究仅限于变异链球菌(*S. mutans*)和

肺炎链球菌(*S. pneumoniae*)等。自溶素有助于启动细菌吸附功能,一些细菌菌体表面的肽聚糖经自溶素作用后可作为黏附分子,如表皮葡萄球菌(*Staphylococcus epidermidis*)和乳酸乳球菌(*Lactococcus lactis*)。另自溶素自身活性及其调控作用在金黄色葡萄球菌的致病性方面有着重要作用^[5,11]。对 SS2 自溶素研究,国内外还未有报道,作者采用 IVIAT 技术,用 SS2 康复猪血清从表达文库中筛选获得该基因(文章待发)。本试验首次 PCR 扩增出我国 SS2 两次流行株的自溶素 ORF 的全基因,并分析了该基因在猪链球菌上的分布情况。同时还确定了位于“*N*-乙酰胞壁酰-L-丙氨酸酰胺酶”结构域内的片段具有良好的反应原性,从而为今后 SS2 免疫提供了新的思路。

根据所裂解的底物上的化学键的不同自溶素可分为以下几种: β -1,4-*N*-乙酰胞壁质糖苷聚糖水解酶(β -1,4-*N*-acetylmuramidases, lysozymes)、 β -1,4-*N*-乙酰氨基葡萄糖苷酶(β -1,4-*N*-acetylglucosaminidases)、*N*-乙酰胞壁酰-L-丙氨酸酰胺酶(*N*-acetylmuramyl-L-alanine amidases)、内肽酶(endopeptidases)及转糖苷酶(transglycosylases)^[5,12]。本试验结果表明,SS2 的自溶素属于 *N*-乙酰胞壁酰-L-丙氨酸酰胺酶,其功能是切割肽聚糖中连接 *N*-乙酰胞壁酰残基与 *L*-氨基酸残基间的化学键。SS2 编码的 *N*-乙酰胞壁酰-L-丙氨酸酰胺酶与其它细菌的同源性较差。6 次重复的“GBS_Bsp-like”域的功能目前尚不清楚。

在 NCBI 的数据库比对其氨基酸序列时发现,江苏流行株 HA9801 和四川流行株 ZY05719 的自溶素与加拿大株 89/1589 的差异较大,前两者均为 1035 个氨基酸,含有 6 个重复的“GBS_Bsp-like”域,后者 923 个氨基酸,仅含有 5 个重复的“GBS_Bsp-like”域,另 N 端序列也存在较大差异。综上所述,我国 SS2 株的自溶素亲缘关系可能更接近于欧洲株,而与加拿大株差异较大。欧洲学者提出 *mrp*、*ef* 和 *sty* 等 SS2 毒力基因存否与菌株毒力强弱相关,早期对此持有异议的加拿大学者近期也承认了 SS2 菌株间的地理性差异^[13],本试验结果则再次提供了二者差异的佐证。

参 考 文 献

- [1] 陆承平. 兽医微生物学. 第四版. 北京: 中国农业出版社, 2007, 83-96.
- [2] Yu H, Jing H, Chen Z, et al. Human *Streptococcus suis* outbreak, Sichuan, China. *Emerg Infect Dis*, 2006, 12(6): 914-920.
- [3] Esgleas M, Lacouture S, Gottschalk M. *Streptococcus suis* serotype 2 binding to extracellular matrix proteins. *FEMS*

- Microbiol Lett*, 2005, 244(1): 33–40.
- [4] Chabot-Roy G, Willson P, Segura M, *et al.* Phagocytosis and killing of *Streptococcus suis* by porcine neutrophils. *Microb Pathog*, 2006, 41(1): 21–32.
- [5] Shibata Y, Kawada M, Nakano Y, *et al.* Identification and characterization of an autolysin-encoding gene of *Streptococcus mutans*. *Infect Immun*, 2005, 73(6): 3512–3520.
- [6] Berry AM, Lock RA, Hansman D, *et al.* Contribution of autolysin to virulence of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun*, 1989, 57(8): 2324–2330.
- [7] Heilmann C, Hussain M, Peters G, *et al.* Evidence for autolysin-mediated primary attachment of *Staphylococcus epidermidis* to a polystyrene surface. *Mol Microbiol*, 1997, 24(5): 1013–1024.
- [8] Milohanic E, Jonquieres R, Glaser P, *et al.* Sequence and binding activity of the autolysin-adhesin Ami from epidemic *Listeria monocytogenes* 4b. *Infect Immun*, 2004, 72(8): 4401–4409.
- [9] Allignet J, Aubert S, Dyke KG, *et al.* *Staphylococcus caprae* strains carry determinants known to be involved in pathogenicity: a gene encoding an autolysin-binding fibronectin and the ica operon involved in biofilm formation. *Infect Immun*, 2001, 69(2): 712–718.
- [10] Sambrook J, Russell DW. *Molecular cloning: a laboratory manual*, 3rd ed Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N Y 2001.
- [11] Chatfield CH, Koo H, Quivey RG, Jr. The putative autolysin regulator LytR in *Streptococcus mutans* plays a role in cell division and is growth-phase regulated. *Microbiology*, 2005, 151(Pt 2): 625–631.
- [12] Garcia P, Paz GM, Garcia E, *et al.* The molecular characterization of the first autolytic lysozyme of *Streptococcus pneumoniae* reveals evolutionary mobile domains. *Mol Microbiol*, 1999, 33(1): 128–138.
- [13] Berthelot-Herault F, Gottschalk M, Morvan H, *et al.* Dilemma of virulence of *Streptococcus suis*: Canadian isolate 89-1591 characterized as a virulent strain using a standardized experimental model in pigs. *Can J Vet Res*, 2005, 69(3): 236–240.

Identification and characterization of a novel infection-related factor (cell wall hydrolase/autolysin) of *Streptococcus suis* serotype 2

Hongwei Gu, Chengping Lu*

(Key Lab Animal Disease Diagnostic & Immunology, Ministry of Agriculture, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract: *Streptococcus suis* serotype 2 (SS2) is an economically important, zoonotic agent causing death and disease in both human and swine. According to published SS2 European strain P1/7 complete genomic sequence, primers for detection and amplification autolysin were designed. Autolysin gene was detected by PCR with genomic DNA of HA9801 (Jiangsu isolate), ZY05719 (Sichuan isolate), ATCC43765 (reference strain), other SS2 isolates from different regions, and strains of other different serotypes (such as serotype 1, 1/2, 7 and 9). PCR results showed that all 27 SS2 virulent isolates harbored gene autolysin, but not in non-virulent SS2 strain. Among other serotypes, only serotype 7 strain had this gene. The complete autolysin genes of HA9801 and ZY05719 were respectively amplified by PCR and sequenced. Their putative protein sequences were analyzed through online software, results showed both had six repeated domain “GBS_Bsp-like” and one domain “N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase”. In addition, sequence similarity analysis demonstrated that autolysins of the two strains (HA9801 and ZY05719) showed high homologue to that of European strain P1/7(99.8%), but obviously differed from Canada strain 89/1589, the latter lacked one domain “GBS Bsp-like”. Software DNASTAR was used to analyze autolysin protein sequence and predicted its putative antigenicity. Then partial antigenic segment of autolysin was amplified, cloned and inserted into expression vector pET30a(+), and induced by IPTG to express recombinant autolysin. Its reactivity was analyzed by SDS-PAGE and western blot with swine convalescent sera, blot result showed that the recombinant protein had good reactivity and could be considered as a vaccine candidate.

Keywords: *Streptococcus suis* serotype 2; infection-related factor; cell wall hydrolase/autolysin