

范汝慧, 白乾坤, 泮欣铭, 等. 猪链球菌 WapA 毒素功能鉴定 [J]. 畜牧与兽医, 2024, 56 (7): 85-94.

FAN R H, BAI Q K, PAN X M, et al. Functional identification of WapA toxins in *Streptococcus suis* [J]. Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2024, 56 (7): 85-94.

猪链球菌 WapA 毒素功能鉴定

范汝慧, 白乾坤, 泮欣铭, 刘嘉楠, 马家乐, 于勇, 姚火春*

(南京农业大学动物医学院/南京农业大学猪链球菌病 OIE 参考实验室, 江苏 南京 210095)

摘要: 胞壁相关蛋白 A (WapA) 广泛存在于革兰阳性菌中, 在细菌致病过程中发挥重要作用。为探究 WapA 的致病机制和致病作用, 本研究对猪链球菌 WUSS351 株基因组进行分析, 发现了 2 个编码 WapA 毒素的基因簇, 编码的毒素分别命名为 WapA1 和 WapA2, 在 GenBank 数据库中检索到更多的 WapA1 和 WapA2 同源体, 通过对它们的 C 端和 N 端结构域的系统进化分析, 发现猪链球菌中广泛存在编码该毒素的基因簇, 提示其可能具有重要的功能。后续通过构建多个 WapA 毒素的 pBAD-His 和 pBAD-pleB 重组质粒在大肠杆菌中表达 WapA, 结合生长曲线与活菌计数结果发现, WapA1-1 对大肠杆菌具有周质毒性, 而 WapA1-2、WapA1-3、WapA2-1、WapA2-3 对大肠杆菌具有胞质毒性, 初步确定了 WapA 的毒性作用。进一步构建 *wapA1-1*、*wapA1-2*、*wapA2-1*、*wapA2-3* 基因缺失株 ($\Delta wapA1-1$ 、 $\Delta wapA1-2$ 、 $\Delta wapA2-1$ 、 $\Delta wapA2-3$), 并通过竞争试验和动物感染试验发现, WapA 可介导猪链球菌 WUSS351 株的竞争生长, 并在猪链球菌致病过程中发挥重要作用。本研究结果对于猪链球菌的致病机理研究具有指导意义, 为后续疾病治疗和预防提供参考。

关键词: 猪链球菌; WapA; 毒性; 致病力

中图分类号: S855.1+1 **文献标志码:** A **文章编号:** 0529-5130(2024)07-0085-10

Functional identification of WapA toxins in *Streptococcus suis*

FAN Ruhui, BAI Qiankun, PAN Xinming, LIU Jia'nan, MA Jiale, YU Yong, YAO Huochun*

(College of Veterinary Medicine/OIE Reference Laboratory for *Streptococcosis suis*,
Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract: WapA is widely found in Gram-positive bacteria and plays an important role in bacterial pathogenesis. To explore the pathogenic mechanism and role of WapA, we analyzed the genome of the *Streptococcus suis* strain WUSS351 and identified two gene clusters encoding WapA toxins, named WapA1 and WapA2, respectively. Additional WapA1 and WapA2 homologs were retrieved in the Genbank database, and phylogenetic analysis of their C-terminal and N-terminal domains revealed a widespread cluster of genes encoding this toxin in *S. suis*, suggesting that it might have important functions. Subsequently, recombinant plasmids pBAD-His and pBAD-pleB containing multiple WapA toxins were constructed to express WapA in *E. coli*. Combined with the growth curve and viable count results, we found that WapA1-1 was periplasmic toxic to *E. coli*. However, WapA1-2, WapA1-3, WapA2-1 and WapA2-3 were cytosolic toxic to *E. coli*, and the toxic effect of WapA was preliminarily determined. The deletion strains of *wapA1-1*, *wapA1-2*, *wapA2-1* and *wapA2-3* genes ($\Delta wapA1-1$, $\Delta wapA1-2$, $\Delta wapA2-1$ and $\Delta wapA2-3$) were further constructed. WapA could mediate the competitive growth of *S. suis* strain WUSS351 and play an important role in the pathogenesis of *S. suis*. The identification of two new toxins, WapA1 and WapA2, in *S. suis* in this study provided guidance for future study of the pathogenesis of *S. suis*, and would serve as reference for the subsequent treatment and prevention of diseases.

Keywords: *Streptococcus suis*; WapA; toxicity; pathogenicity

猪链球菌 (*Streptococcus suis*, SS) 是一种常见的革兰阳性人兽共患病原菌, 它不仅可导致猪等动物的脑膜炎、关节炎、肺炎、心内膜炎和败血症等多种病症^[1], 而且部分菌株还可感染人, 引起人的中毒性

休克综合征或细菌性脑炎^[2]。1954 年首次报道人感染猪链球菌^[3], 人感染猪链球菌的死亡率约为 12%^[4]。脑膜炎是人感染猪链球菌的重要表现之一, 约占报告病例的 50% 到 60%^[5]。据同源性和 *recN* 系统发育分析, 目前有 29 个猪链球菌传统血清型, 其中 2 型 (SS2) 毒力最强, 分布最广。

已鉴定的 SS 毒力因子中, 1/3 以上为表面或分泌蛋白, 它们通过不同的转运途径释放至胞外, 从而发挥致病作用。胞壁相关蛋白 A (WapA) 是一种携

收稿日期: 2024-01-20; 修回日期: 2024-04-18

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31972650)

第一作者: 范汝慧, 女, 硕士研究生

* 通信作者: 姚火春, 博士, 教授, 研究方向为兽医微生物学与

免疫学, E-mail: yaohch@njau.edu.cn。

带 C 端毒素的表面大蛋白, 其全长普遍在 3 000 个氨基酸以上, 是潜在的致病因子, 但对于其功能的研究报道很少, 值得深入探索。

已有研究发现, YD-肽重复蛋白家族在革兰阴性和阳性细菌中普遍编码^[6-8], 并证实其介导细菌间接接触依赖竞争的功能。这类蛋白在革兰阴性菌中被命名为重排热点 (Rhs) 蛋白^[9], 在革兰阳性菌中被命名为 WapA 蛋白。Rhs 和 WapA 蛋白均携带多态的 C 末端毒素结构域 (Rhs-CT/WapA-CT), 这些毒素具有被分泌至胞外而抑制邻近细胞生长的潜能。此外, WapA 蛋白下游还普遍编码同质的免疫蛋白, 从而特异性地中和同源毒素的毒性, 以保护 Rhs⁺/WapA⁺ 菌体细胞免受自身抑制^[10]。基于上述报道, 本研究利用生物信息学方法发掘和分析了 SS 分离株 WUSS351 的 WapA 蛋白, 并以生长曲线测定与活菌计数试验^[11]鉴定 WapA 在大肠杆菌中异位表达所发挥的毒性作用, 同时构建相应的缺失株进一步验证 WapA 在革兰阳性菌中是否发挥与 Rhs 蛋白在阴性菌中相似的功能, 最后通过动物感染试验验证其在猪链球菌致病过程中的潜在作用。

1 材料与方法

1.1 菌株及培养条件

猪链球菌 WUSS351 于 2017 年分离自南京栖霞区河东里屠宰场猪扁桃体, 其血清型为 NCL-4 型。猪链球菌可于 37 °C THB 培养基中培养, 需要时按下述浓度加入抗生素, 工作浓度分别为: 壮观霉素 (Spc) 100 μg/mL, 氯霉素 (Cm) 5 μg/mL, 氨苄青霉素 (AMP) 50 μg/mL, 卡那霉素 (Kana) 50 μg/mL。大肠杆菌 TOP10 购自南京诺唯赞生物科技有限公司, 大肠杆菌 BTH101 购自上海玉博生物有限公司。

1.2 实验动物

6 周龄 SPF 级 BALB/c 雌性小鼠购自扬州大学实验动物中心。动物试验在南京农业大学实验动物中心进行 [许可批号: SYXK (SU) 2017-0007]。

1.3 主要试剂和质粒

THB 方平板、2×Taq PCR Master Mix, 购自南京诺唯赞生物公司; BACTH System Kit 购自 Euromdex 公司; 2×Phanta Max Master Mix 高保真酶、20% L-阿拉伯糖、质粒提取试剂盒、琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒、DNA 标记、限制性内切酶、T4 DNA 连接酶, 购自 TaKaRa 公司; 所有引物由苏州金唯智生物公司合成。含氨苄青霉素抗性 (Amp^R) 基因的 pBAD-His, 含 Amp^R 基因的 pBAD-pelB, 含卡那霉素抗性 (Kana^R) 基因的 pKT25, 含 Amp^R 基因的 pUT18C, 含壮观霉素抗性 (Spc^R) 基因的 pSET-4s, 质粒均来

自本实验室。

1.4 生物信息学分析

蛋白质序列数据库搜索显示, WapA 蛋白基序与大肠杆菌的 Rhs 蛋白质组的核心多肽中的一个基序基本相同, 通过 NCBI 中 BLAST 的方式逐一进行同源性比对, 以初步确定猪链球菌 WUSS351 株 WapA 基因簇。

利用 SWISS-MODEL 平台 (<https://swissmodel.expasy.org/interactive>) 对 WapA1-1、WapA1-3 蛋白分别进行同源建模分析。将已有的 WapA1-1、WapA1-3 蛋白序列同资源库中序列进行比对分析, 以寻找同源度最高的选项。利用 PyMOL Molecular Graphics System 软件将上述同源性最高的选项同原蛋白序列进行同源建模, 并对建模结果进行分析。

从 NCBI 数据库下载并获取所有的猪链球菌 WapA 蛋白的氨基酸序列, 使用 MEGA (v. 5.0.3) 软件进行 Clustal W 氨基酸多序列比对, 并构建系统进化树。

1.5 WapA 诱导表达对大肠杆菌生长的影响

1.5.1 生长曲线测定

分别复苏培养来自本试验的大肠杆菌菌株 pBAD-Pleb-WapA1-1C、pBAD-Pleb-WapA1-1C-I、pBAD-His-WapA1-2C、pBAD-His-WapA1-2C-I、pBAD-His-WapA1-3C、pBAD-His-WapA2-1C、pBAD-His-WapA2-3C 以及来自本实验室的 pBAD-Pleb 和 pBAD-His, 转接至 20 mL Amp^R 的 LB 液体培养基中。每株菌各加入 20% L-阿拉伯糖诱导, 每隔 2 h 测定一次 OD₆₀₀ 值, 共持续 12 h。

1.5.2 菌落计数试验

分别复苏培养 1.5.1 中大肠杆菌菌株, 转接至 OD₆₀₀ 值为 0.2 左右, 加入 20% L-阿拉伯糖, 诱导 4 h, 利用 LB 液体培养基 10 倍倍比稀释滴板, 37 °C 过夜培养后观察菌落生长差异。以相同的方法, 诱导 8 h, 重新稀释滴板, 过夜培养后观察结果。

1.6 基因缺失株的构建

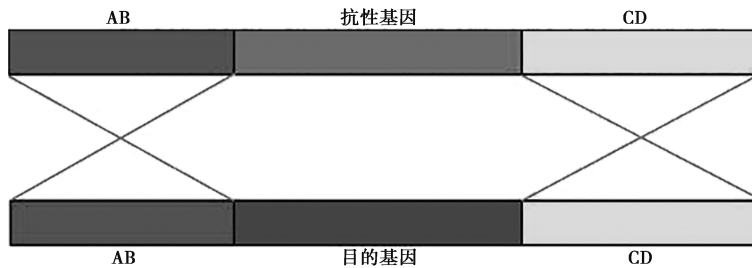
利用 2 × Phanta Max Master Mix 高保真酶, 以 pSET-4s 为模板 PCR 扩增目的基因 *spc*。以猪链球菌 WUSS351 株基因组为模板扩增上游臂 *wapA1-1* (1-2) 和下游臂 *wapA1-1* (3-4), 通过融合 PCR 将 *spc*、*wapA1-1* (1-2) 和 *wapA1-1* (3-4) 3 段融合。同样地, 将 Δ *wapA1-1-I* 替换为氯霉素抗性 (Cm^R), 见表 1。复苏猪链球菌 WUSS351 株, 转接后于培养箱静置培养至 OD₆₀₀ 值在 0.038~0.058 之间, 从该管中取出 100 μL 菌液加入 WUSS351 信号肽、3 段融合产物。再将其放置在培养箱中培养 2 h。培养完毕后, 将菌液转移至含相应抗性的 THB 固体选择培养基中,

过夜培养，鉴定后保存。

表 1 缺失株的构建

缺失株	3 段融合片段
$\Delta wapA1-1$	<i>spc</i> 、 <i>wapA1-1</i> (1-2) 和 <i>wapA1-1</i> (3-4)
$\Delta wapA1-1-I$	<i>cm</i> 、 <i>wapA1-1</i> (1-2) 和 <i>wapA1-1</i> (3-4)

$\Delta wapA1-1$ (缺失 *wapA1-1* 毒性基因)、 $\Delta wapA1-1-I$ (毒性蛋白与免疫蛋白双缺失株)、 $\Delta wapA1-2$ 、 $\Delta wapA1-2-I$ 、 $\Delta wapA2-1$ 、 $\Delta wapA2-1-I$ 、 $\Delta wapA2-3$ 和 $\Delta wapA2-3-I$ 基因缺失株的构建如图 1 所示。



注：AB 表示目的基因上游臂 (1-2)，CD 表示目的基因下游臂 (3-4)。

图 1 缺失株的构建示意

1.7 WapA 介导细菌间生存竞争试验

1.7.1 $\Delta wapA1-1$ 竞争试验

复苏培养已有的 WUSS351、 $\Delta wapA1-1$ 和 $\Delta wapA1-1-I$ 这 3 株菌株，转接培养至对数期 (OD_{600} 值至 0.6)。以 WUSS351、 $\Delta wapA1-1$ 为供体菌， $\Delta wapA1-1-I$ 为受体菌，按照 10 : 1 混合供体菌与受体菌。离心后加入 100 μ L 培养液重悬。吸取 4 μ L 滴于 LB 固体小圆板上，重复 1 次，置于温箱中培养。另外每种混合液进行 10 倍倍比稀释，滴板计数。互作后，用无菌 PBS 将小圆板上的菌落洗脱，进行 10 倍倍比稀释，滴板计数。

1.7.2 $\Delta wapA1-2$ 、 $\Delta wapA2-1$ 、 $\Delta wapA2-3$ 竞争试验

以 WUSS351、 $\Delta wapA1-2$ 为供体菌， $\Delta wapA1-2-I$ 为受体菌，其他操作同 1.7.1， $\Delta wapA2-1$ 、 $\Delta wapA2-3$ 竞争试验同理。

1.8 WapA-CT 与 WapA-I 蛋白互作试验

为了避免引起自身中毒，细菌毒素基因的下游通常编码一个免疫蛋白基因，将 *WapA1-1* 下游潜在免疫蛋白命名为 1-1-I，以此类推。利用 BACTH System Kit 进行细菌双杂交试验以研究毒素与免疫蛋白间的相互作用。将 *wapA1-1C* 和 *wapA1-2C* 分别连至酶切 pKT25 质粒，*wapA1-1-I* 和 *wapA1-2-I* 分别连至酶切 pUT18C 质粒，每 2 个为 1 组电转至大肠杆菌 BTH101 中，并以卡那霉素和氨苄霉素双抗在 LB 固体培养基进行筛选培养，加入 IPTG 诱导从而进行

共转化，并以 X-gal 为指示剂添加至培养基中，培养 48 h 左右后，同阴阳性对照进行比对，观察互作试验结果。

1.9 小鼠致病性试验

复壮 WUSS351、 $\Delta wapA1-1$ 、 $\Delta wapA1-2$ ，将鉴定正确的菌液转接 100 mL THB 培养液，无菌 PBS 洗 2 遍，浓缩至 5 mL，分别腹腔注射小鼠，每组 10 只，每只注射 500 μ L，菌量约 3×10^8 CFU，每隔 12 h 观察动物的症状和死亡情况。

重复上述步骤，分别腹腔注射小鼠，每组 5 只，每只注射 500 μ L，菌量约 3×10^8 CFU，攻毒 12 h 后，脱颈处死后，立即解剖，心脏取血，再分别取肝、脾和脑组织，置于含钢珠的 2 mL 无菌离心管中，添加 PBS，匀浆仪破碎，稀释至合适梯度后，取 10 μ L 滴于 THB 方平板，于 CO_2 培养箱 37 $^{\circ}C$ 培养 12 h 后细菌计数，统计分析各攻毒组小鼠脏器细菌载量差异。

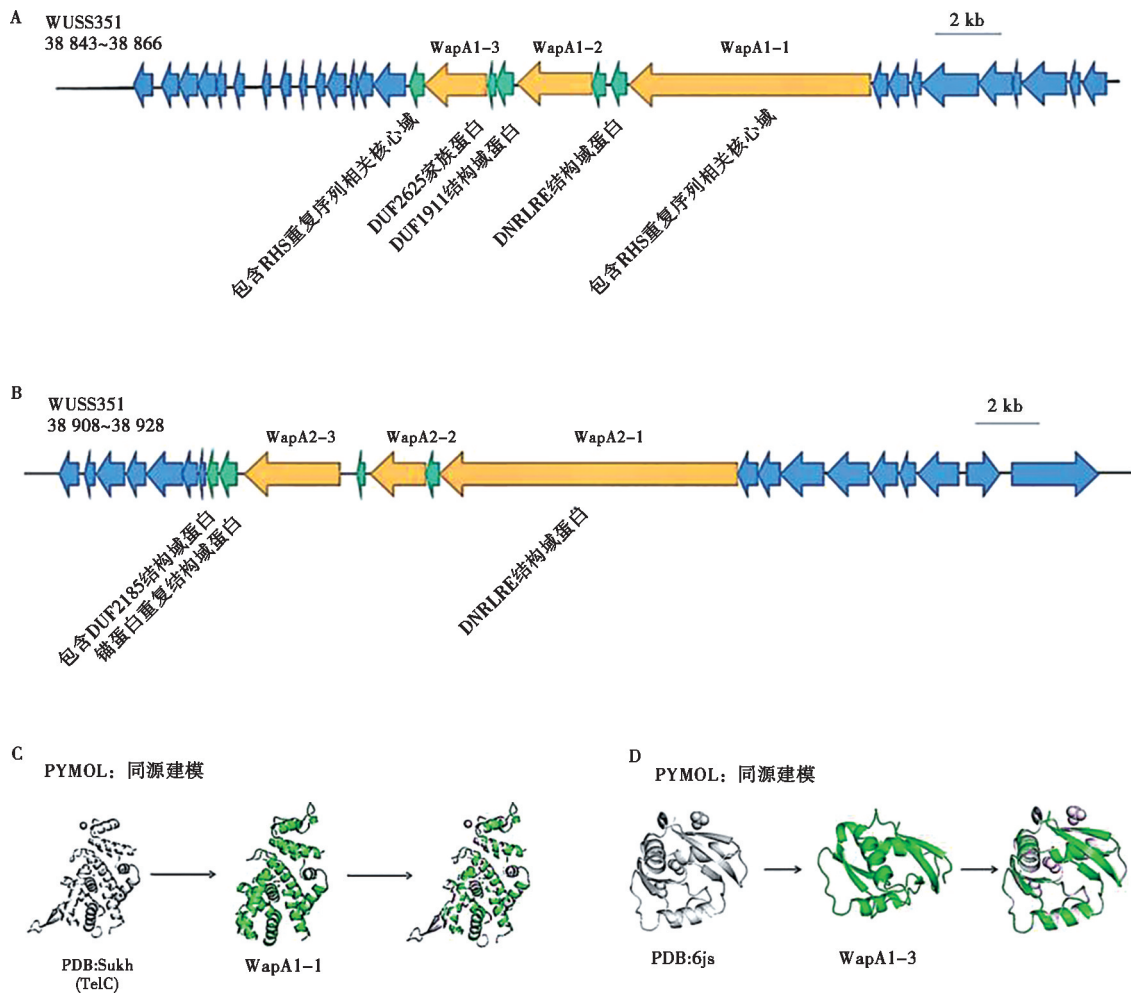
2 结果与分析

2.1 猪链球菌 WapA 毒素鉴定

通过 BLAST 比对，发现猪链球菌 WUSS351 株基因组中存在 2 个 WapA 相关基因簇。其中 1 个位于 38 843~38 866 位碱基之间，编码了 3 个 WapA 相关基因 (全长或截短同源体)，依次将其命名为 *wapA1-1*、*wapA1-2*、*wapA1-3*。另 1 个位于 38 908~38 928 位碱基之间，也编码 3 个相关基因，依次将其命名为

wapA2-1、wapA2-2、wapA2-3。通过生物信息学分析发现(图2A、B), WapA1-1蛋白C端编码脂质II磷酸酶毒性结构域, 其与5ukh(TelC)编码的lipid II phosphatase序列部分具有较高的同源性, 在此基础上又以PyMOL Molecular Graphics System进行

同源建模, 从3D结构上可更加直观地观察二者具有较高的结构相似性(图2C)。同样, 对WapA1-3蛋白C端序列进行PyMOL Molecular Graphics System同源建模, 发现其与6ejs具有较高的同源性, 为生物膜降解内切酶NucB的潜在同源体(图2D)。



A. wapA1 基因簇; B. wapA2 基因簇; C. WapA1-1 蛋白 C 端序列同源建模; D. WapA1-3 蛋白 C 端序列同源建模。

图2 WapA 毒素鉴定结果

2.2 猪链球菌 WapA 蛋白进化分析

2.2.1 N 端保守区进化分析

分析发现 WapA 蛋白 N 端编码保守序列, 包含 DNRLRE_dom、DUF6531、Rhs 等基序, 长度达到 2 600 aa 左右。N 端尽管保守, 但猪链球菌血清型众多, 不同菌株间也存在序列的差异。系统进化发育分析将 WapA - N 端序列划分 2 个大的进化群 (WUSS351 株编码的 2 个 WapA 蛋白正好处于 2 个不同的群), 分别命名为 WapA1 和 WapA2。WapA1 (图 3 红色系) 除了一个大分支外, 还有 2 个小分支。WapA2 (图 3 蓝色系) 划分为 2 个大分支, 以及 2 个小分支。

2.2.2 C 端毒素区进化分析

WapA 蛋白 C 端携带多种多样的毒素基序, 为了探究 C 端序列的变异规律, 统计编码毒素的种类, 对 WapA-C 序列进行进化分析。结果显示, 其可以分为 16 个不同的分支 (图 4), 个别分支成员极少, 重点关注编码率高的进化分支。上述结果证实 WapA-C 端具有多样性, 容易发生变异, 可以编码多种不同功能的毒素。

2.3 WapA 诱导表达对大肠杆菌生长的影响

2.3.1 生长曲线测定结果

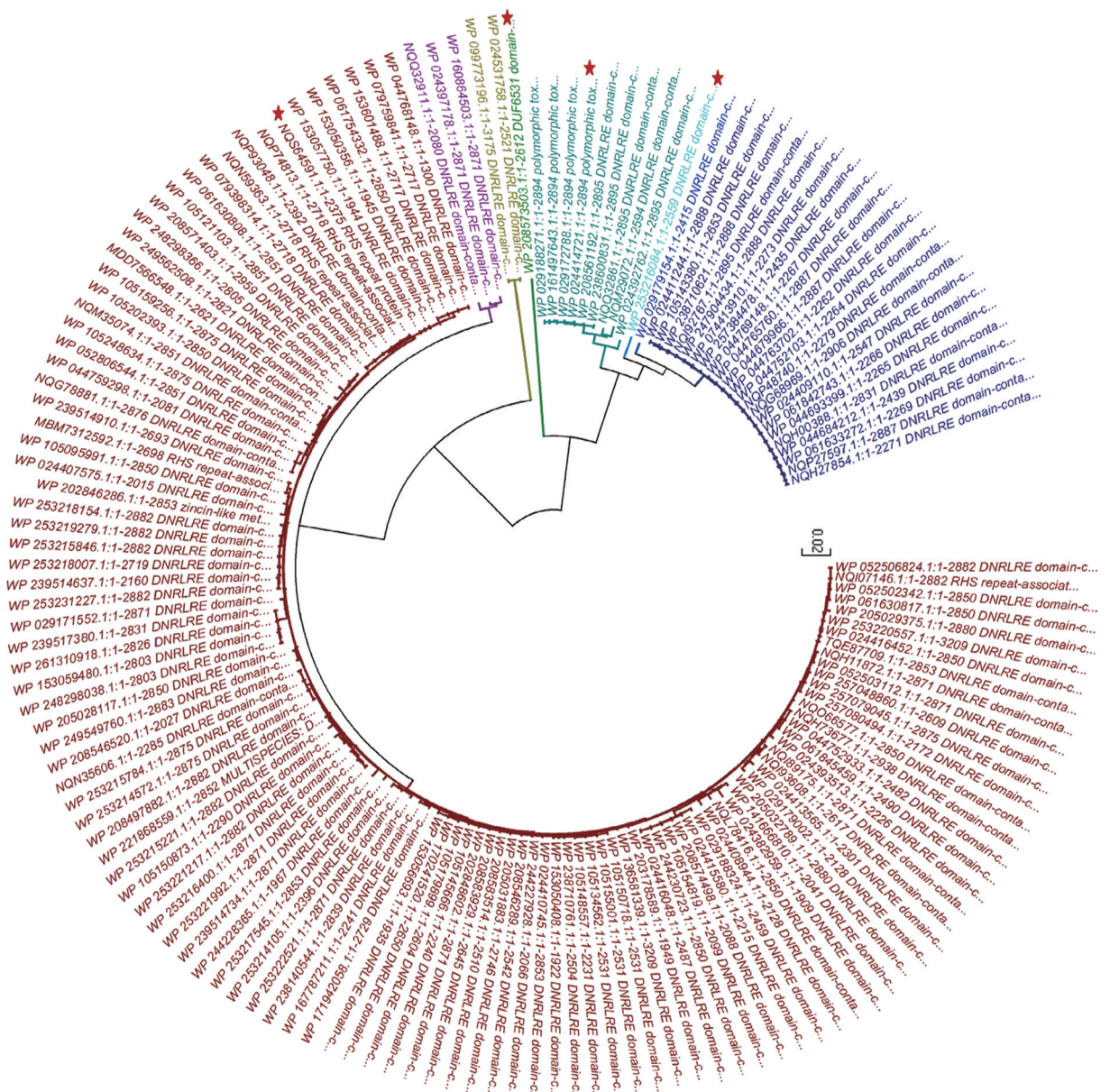
为了验证 WapA 蛋白 C 端毒素基序的毒性作用, 将 WUSS351 株中编码的相关毒素连接至 pBAD 表达

载体,经L-阿拉伯糖诱导后,测定对大肠杆菌工程菌生长特性的影响。当菌液浓度较高时,用LB液体培养基对待测菌液适当倍比稀释以确保数据的准确性。结果显示,导入pBAD-His-WapA1-2C的菌株在20%L-阿拉伯糖诱导后生长停滞(图5A);导入pBAD-His-WapA1-3C的菌株在诱导后10h内生长停滞,10h后逐渐恢复生长,但阴性对照正常生长(图5B);导入pBAD-His-WapA2-1C的菌株在诱导后出现了生长平缓的趋势(图5C);导入pBAD-His-WapA2-3C的菌株在诱导后生长抑制(图5D);导入pBAD-Pleb-WapA1-1C(Pleb引导周质表达)的菌株在诱导后生长缓慢(图5E)。上述结果说明,wapA1-2C、wapA1-3C、wapA2-1C、wapA2-3C基因

表达后对大肠杆菌具有胞质毒性,wapA1-1C具有周质毒性,并可显著抑制大肠杆菌生长。

2.3.2 WapA对细菌生长的影响

为了进一步验证大肠杆菌OD₆₀₀生长曲线结果的准确性,对诱导后各个时间点的菌液进行滴板计数。结果显示(图6),wapA1-2C、wapA1-3C、wapA2-1C、wapA2-3C基因表达导致大肠杆菌菌落数显著减少,对大肠杆菌具有胞质毒性,此外周质定位的WapA1-1C也可引起菌落数的显著减少。上述活菌计数试验的结果与生长曲线测定试验结果一致,再次证实WapA蛋白C端编码的毒素基序确实具有毒性作用。



注:★表示代表性菌株,下同。

图3 WapA蛋白N端保守区进化分析结果

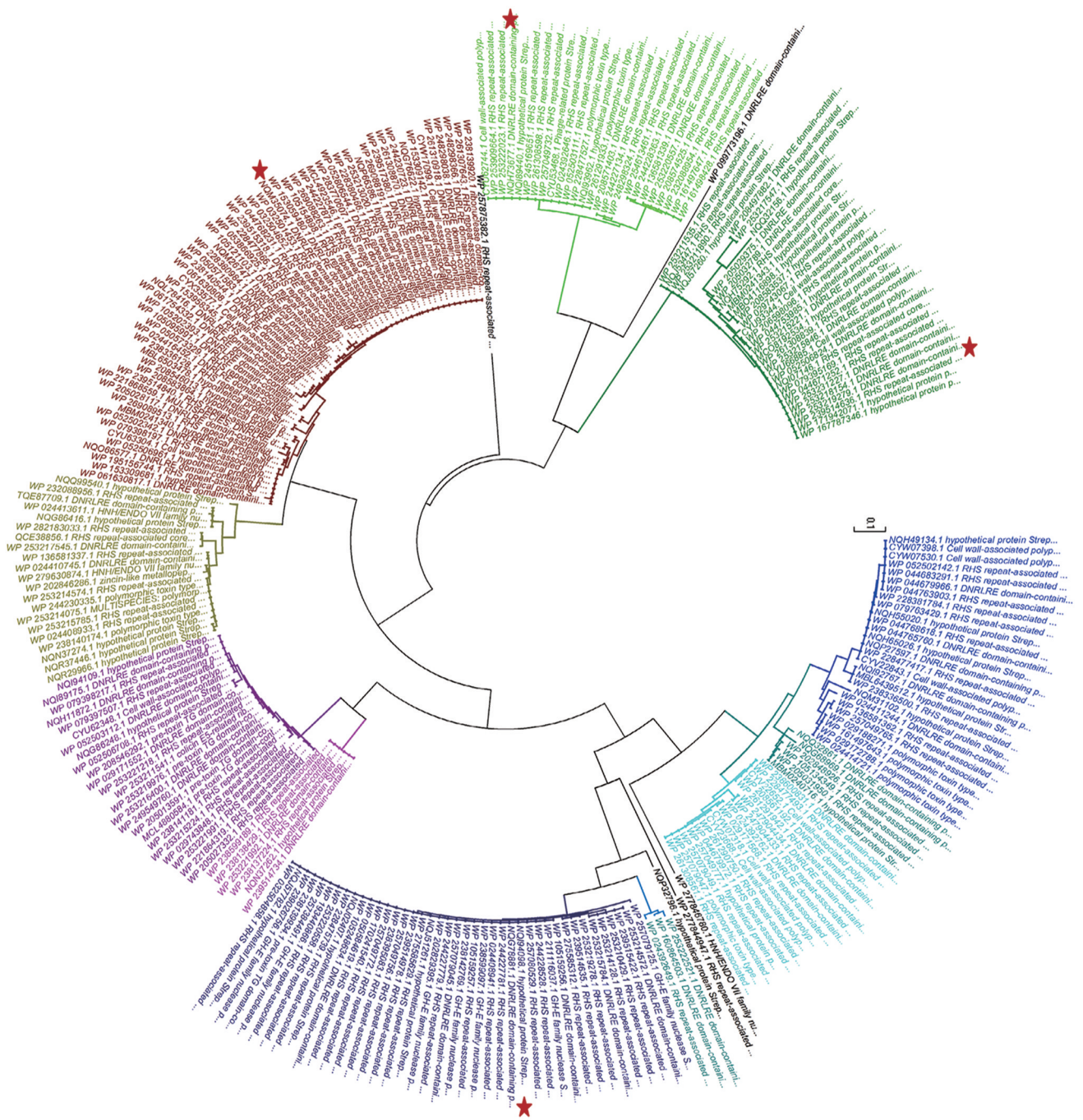
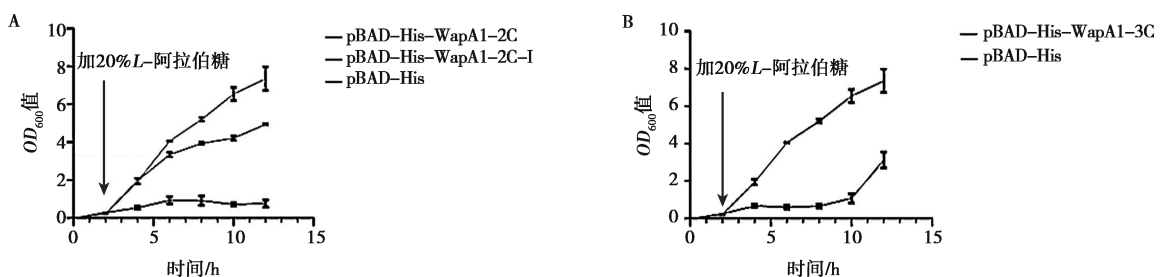
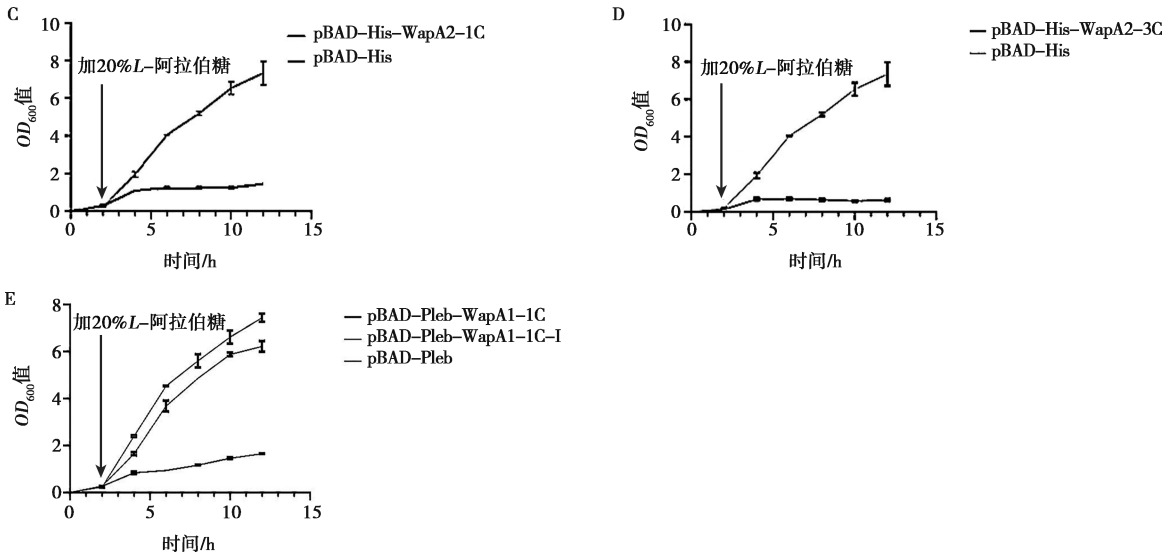


图 4 WapA 蛋白 C 端毒素区进化分析结果



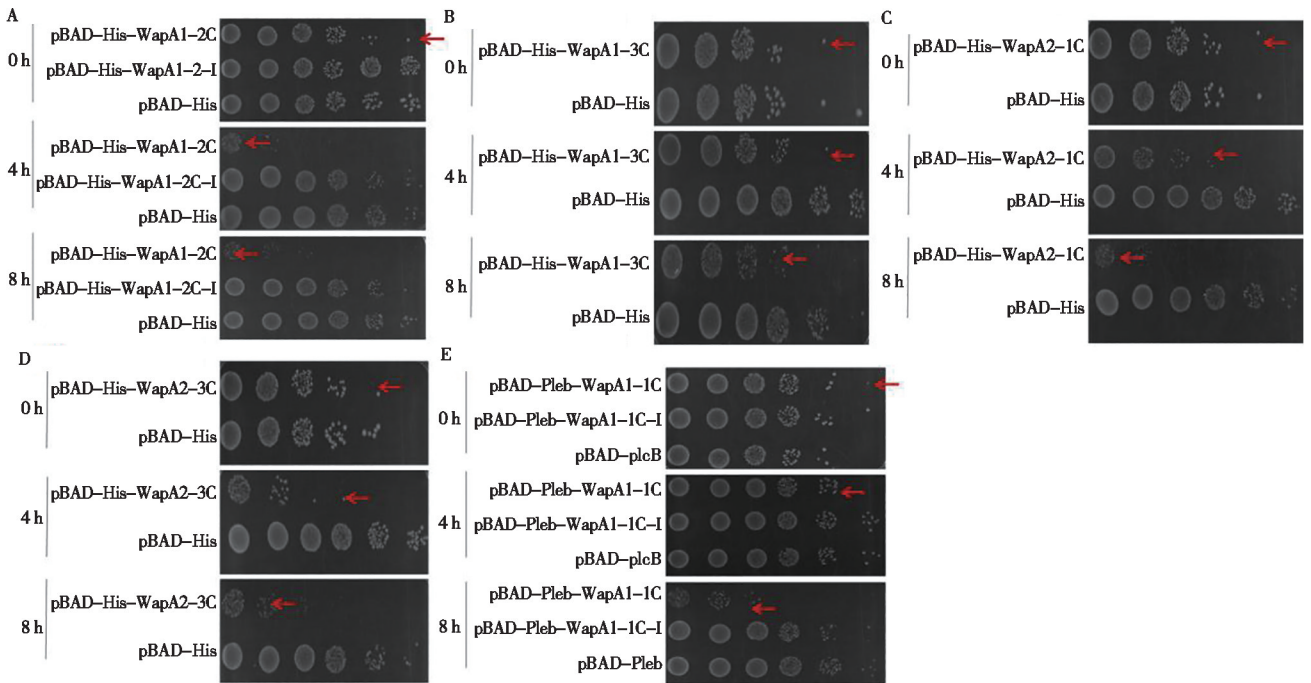
A~E. 分别为 *wapA1-2C*、*wapA1-3C*、*wapA2-1C*、*wapA2-3C* 胞质表达和 *wapA1-1C* 周质表达对载体菌生长曲线的影响。

图 5 生长曲线测定结果



A~E. 分别为 *wapA1-2C*、*wapA1-3C*、*wapA2-1C*、*wapA2-3C* 胞质表达和 *wapA1-1C* 周质表达对载体菌生长曲线的影响。

续图 5 生长曲线测定结果



A~E. *wapA1-2C*、*wapA1-3C*、*wapA2-1C*、*wapA2-3C* 胞质表达和 *wapA1-1C* 周质表达对菌落生长的影响。

图 6 细菌滴板试验结果

2.4 WapA 蛋白 C 端毒素与下游免疫蛋白互作验证

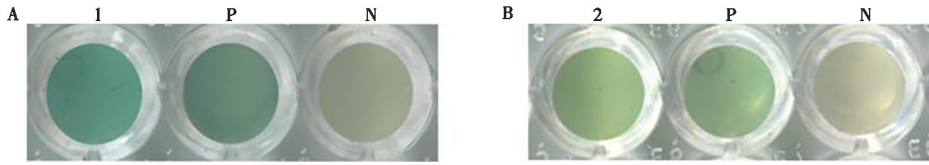
WapA1-1C 与 *WapA1-1-I* 蛋白互作后可以明显观察到亮蓝绿色，阳性对照为深蓝绿色，阴性对照无明显颜色（图 7A）。同样的 *WapA1-2C* 与 *1-2C-I* 蛋白互作后可以明显观察到蓝绿色，阳性对照也为蓝绿色，阴性对照无明显颜色（图 7B）。

生长曲线测定结果显示含有 pBAD - Pleb -

WapA1-1C-I（毒素和免疫蛋白共表达，图 5E）及 pBAD-His-*WapA1-2C-I*（图 5A）质粒的菌株，与含有 pBAD-Pleb-*WapA1-1C* 及 pBAD-His-*WapA2-1C* 质粒的菌株相比恢复生长，表明免疫蛋白的表达减弱了毒素的毒性作用。同样在菌落计数试验中，含有 pBAD-Pleb-*WapA1-1C-I*（图 6E）及 pBAD-His-*WapA2-1C-I*（图 6A）质粒菌株的菌落数明显多于

只表达 C 端毒素基序的组别, 说明毒素下游编码的免疫蛋白中和了毒性, 可以特异性保护菌体免受自身

抑制。然而, WapA1-3C、WapA2-1C、WapA2-3C 的免疫蛋白并未发挥明显的保护作用。



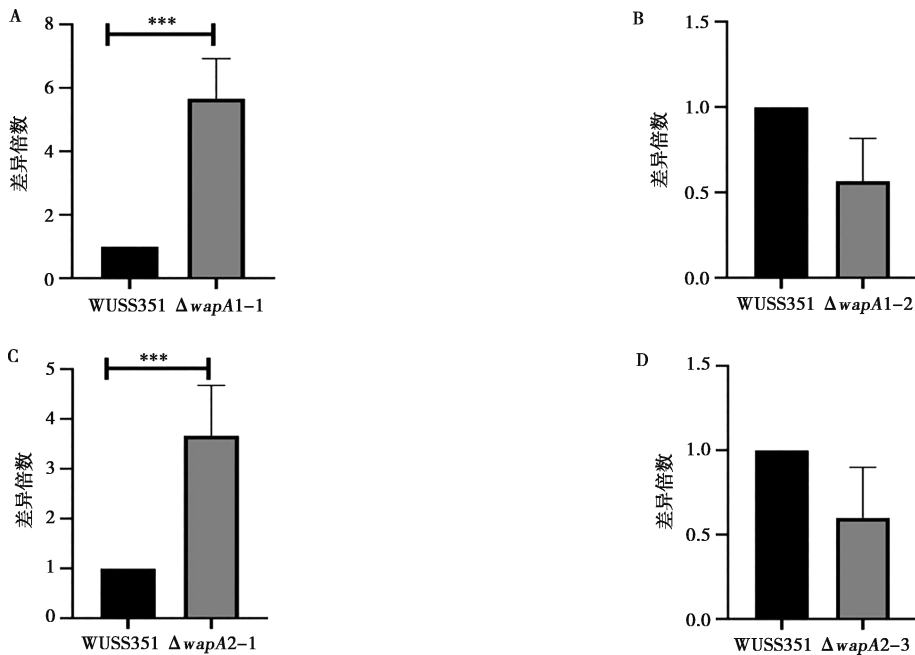
N. 阴性对照; P. 阳性对照; 1. WapA-1-1C 与 1-1C-1 双杂交互作; 2. WapA1-2C 与 1-2C-1 双杂交互作。

图 7 蛋白互作试验结果

2.5 WapA 介导细菌间生存竞争试验

为了验证猪链球菌是否能够将 WapA 毒素转运至胞外发挥毒性作用, 开展了菌株间的竞争生长试验。结果表明, 受体菌 $\Delta wapA1-1-I$ (毒素和免疫蛋白双缺失株) 在与野生株 WUSS351、缺失株 $\Delta wapA1-1$ 分别竞争后, 受体菌 $\Delta wapA1-1-I$ 的数量存在差异。与猪链球菌 WUSS351 野生株竞争后 $\Delta wapA1-1-I$ 受体菌的数量小于与猪链球菌 $\Delta wapA1-1$ 竞争后的数量

($P < 0.001$), 说明野生株比 $\Delta wapA1-1-I$ 更具有生长优势 (图 8A)。受体菌 $\Delta wapA2-1-I$ 在与野生株、 $\Delta wapA2-1$ 分别竞争后, 受体菌的数量存在 4 倍差异 ($P < 0.001$), 说明野生株比 $\Delta wapA2-1-I$ 更具有生长优势, 表明 $wapA2-1$ 基因可介导猪链球菌 WUSS351 株的竞争生长 (图 8C)。然而 $wapA1-2$ 、 $wapA2-3$ 并没有在竞争试验中发挥功能 (图 8B、D)。



注: A~D 分别表示 $\Delta wapA1-1$ 、 $\Delta wapA1-2$ 、 $\Delta wapA2-1$ 、 $\Delta wapA2-3$ 竞争结果, * * * 表示差异极显著 ($P < 0.001$)。

图 8 WUSS351 与 WapA 缺失株竞争试验结果 (以 $\Delta wapA1-1-I$ 为受体菌)

2.6 小鼠致病性试验

WapA 毒素可以介导细菌间的竞争生长, 促进致病菌在定殖部位获得生存优势, 因此可能有利于致病作用的发挥。动物存活试验结果表明, 攻毒 24 h 后, $\Delta wapA1-1$ 、 $\Delta wapA2-1$ 及 WUSS351 都有不同程度的死亡, 其中 $\Delta wapA1-1$ 、 $\Delta wapA2-1$ 存活率分别为 40% 和 20%, 高于野毒株攻毒组, 表明 WapA1-1、

WapA2-1 可能在感染过程中发挥了重要作用(图 9A)。

感染 12 h 后, 野生株的脑组织载菌量约为 $\Delta wapA1-1$ 、 $\Delta wapA2-1$ 的 8 倍, 脾脏组织载菌量约为 3 倍, 血液中的载菌量约为 10 倍, 肝脏组织载菌量约为 2 倍 (图 9B、C、D、E)。试验结果表明, 野生株缺失 $wapA1-1$ 、 $wapA2-1$ 基因后, 对动物的感染能力显著降低, 尤其是脑组织和血液中的载菌量明显降

低,说明 WapA 蛋白在猪链球菌感染动物过程中发挥重要作用。



A. 动物存活试验结果; B. 脑组织载菌量; C. 脾组织载菌量; D. 血液载菌量; E. 肝组织载菌量。

图9 小鼠致病性试验

3 讨论

YD-肽重复蛋白在革兰阴性菌中被命名为 Rhs 蛋白,在革兰阳性菌中被命名为 WapA, Rhs 和 WapA 蛋白均携带多态的 C 端结构域 (Rhs-CT/WapA-CT)^[6-8]。根据已有研究报道, Rhs-CT 区域与接触依赖生长抑制 (CDI) 系统的毒性效应域具有相同序列^[12]。CDI 系统可以介导细菌间的竞争,编码 CdiA 大分子蛋白^[13-14],其具有高度可变 C-末端毒素结构域 (CdiA-CT)。CdiA 被输出到细胞表面且与相关细菌上的受体结合,并将其毒素传递到靶细胞^[15-16]。CdiA 下游还会编码 CdiI 免疫基因,这些基因共同形成了一个多态的毒素/免疫对家族。WapA 蛋白同样具有 N 端核心结构域以及可变 C 端,且在 N 端核心序列中包含 2 个 Rhs 基序,提示 WapA 蛋白也可以介导细菌间的竞争。

Rhs 蛋白包括 3 个结构:与分泌方式相关的 N-末端区域 (Rhs-NT),会折叠成一个壳样结构 (Rhs-Shell) 保守的中央结构域以及高度重复可变的由酪氨酸/天冬氨酸 (YD) 组成的 C-末端毒素结构域 (Rhs-CT)^[17-18]。Rhs-CT 结构域具有各种活性,包括核酸酶、金属多肽酶、ADPriBosylase 或脱氨酶^[17, 19]。这些 Rhs-CT 结构域具有不同于 Rhs-Shell 编码序列的 GC 含量和密码子偏向,这表明可能通过重组进行了复杂的重排^[20-22]。利用生物信息学方法对猪链球菌 WUSS351 株基因簇进行分析,发现了 2

簇编码 WapA 的毒性效应子 WapA1 和 WapA2,其中 WapA1、WapA2 差异性较大,且同一簇上的 WapA 蛋白逐渐截短重排。对 WapA1-1C、WapA1-3C 进行同源建模分析,WapA1-1C 与脂质 II 磷酸酶具有较高结构相似性,WapA1-3C 与生物膜降解内切酶 *NucB* 的晶体结构具有较高同源性,前者可以影响细胞壁的生物合成,后者可以降解细胞膜,这一结果显示 WapA 蛋白具有毒素功能。对 WapA 的 N 端以及 C 端进行进化树分析,结果显示其 N 端相对保守,C 端具有可变性且携带多样的毒素基序。

编码 Rhs 多态毒素的基因通常与编码一种特定免疫蛋白的基因相连,该基因可以对同源 Rhs-CT 进行保护^[23],这表明 Rhs-CT 毒素结构域具有抗菌作用。本研究通过生长曲线测定和活菌计数试验鉴定潜在毒性效应子在大肠杆菌中异位表达所发挥的毒性作用,结果表明 WapA 携带的 C 端毒素具有周质毒性或胞质毒性,可以抑制菌体生长,并结合细菌双杂交试验证明其下游编码的免疫蛋白可以特异性中和毒素。事实上,Rhs 蛋白已被证明对达旦提狄克氏菌、奇异变形杆菌、铜绿假单胞菌、黏质沙雷菌、阴沟肠杆菌、达克气单胞菌、荧光假单胞菌和几种致病性大肠杆菌菌株具有竞争抗菌的优势^[10, 12, 24-27]。本研究通过细菌竞争试验发现缺失 WapA 菌株与野生株竞争生长,野生株更具有生长优势,结果表明 WapA 蛋白可介导猪链球菌 WUSS351 株竞争生长。本研究探究了 WapA 蛋白在猪链球菌致病上的作用,通过小鼠感染模型发

现, *wapA1-1* 和 *wapA2-1* 基因缺失株的致死率显著下降, 小鼠血液、脑、脾、肝中的载菌量显著下降, 进一步验证了 WapA 蛋白能够发挥毒力作用, 是猪链球菌的重要毒力因子。

综上, 本研究发现猪链球菌 WUSS351 株编码 2 个 *wapA* 基因簇, 同源建模验证其对细胞壁及细胞膜有毒性作用, 进化分析表明其具有 N 端保守区和 C 端毒素可变区。WapA 携带的 C 端毒素具有胞质或周质毒性, 可介导猪链球菌 WUSS351 株竞争生长, 同时在动物感染过程中发挥重要作用, 该结果可为后续猪链球菌致病机制研究提供参考。

参考文献:

- [1] FENG Y, ZHANG H, WU Z, et al. *Streptococcus suis* infection: an emerging/reemerging challenge of bacterial infectious diseases? [J]. *Virulence*, 2014, 5 (4): 477-497.
- [2] YU H, JING H, CHEN Z, et al. Human *Streptococcus suis* outbreak, Sichuan, China [J]. *Emerg Infect Dis*, 2006, 12 (6): 914-920.
- [3] WERTHEIM H F, NGHIA H D, TAYLOR W, et al. *Streptococcus suis*: an emerging human pathogen [J]. *Clin Infect Dis*, 2009, 48 (5): 617-625.
- [4] KERDSIN A, AKEDA Y, TAKEUCHI D, et al. Genotypic diversity of *Streptococcus suis* strains isolated from humans in Thailand [J]. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 2018, 37 (5): 917-925.
- [5] VAN SAMKAR A, BROUWER M C, SCHULTSZ C, et al. *Streptococcus suis* meningitis: a systematic review and meta-analysis [J]. *PLoS Negl Trop Dis*, 2015, 9 (10): e0004191.
- [6] TUCKER R P, BECKMANN J, LEACHMAN N T, et al. Phylogenetic analysis of the teneurins: conserved features and premetazoan ancestry [J]. *Mol Biol Evol*, 2012, 29 (3): 1019-1029.
- [7] MINET A D, RUBIN B P, TUCKER R P, et al. Teneurin-1, a vertebrate homologue of the *Drosophila* pair-rule gene *ten-m*, is a neuronal protein with a novel type of heparin-binding domain [J]. *J Cell Sci*, 1999, 112 (Pt 12): 2019-2032.
- [8] FOSTER S J. Molecular analysis of three major wall-associated proteins of *Bacillus subtilis* 168: evidence for processing of the product of a gene encoding a 258 kDa precursor two-domain ligand-binding protein [J]. *Mol Microbiol*, 1993, 8 (2): 299-310.
- [9] LIN R J, CAPAGE M, HILL C W. A repetitive DNA sequence, *rhs*, responsible for duplications within the *Escherichia coli* K-12 chromosome [J]. *J Mol Biol*, 1984, 177 (1): 1-18.
- [10] KOSKINIEMI S, LAMOUREUX J G, NIKOLAKAKIS K C, et al. *Rhs* proteins from diverse bacteria mediate intercellular competition [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2013, 110 (17): 7032-7037.
- [11] HARYANTI T, MARIANA N S, LATIFAH S Y, et al. Controlled expression of cholera toxin B subunit from *Vibrio cholerae* in *Escherichia coli* [J]. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 2008, 11 (13): 1718-1722.
- [12] POOLE S J, DINER E J, AOKI S K, et al. Identification of functional toxin/immunity genes linked to contact-dependent growth inhibition (CDI) and rearrangement hotspot (*Rhs*) systems [J]. *PLoS Genet*, 2011, 7 (8): e1002217.
- [13] AOKI S K, DINER E J, DE ROODENBEKE C T, et al. A widespread family of polymorphic contact-dependent toxin delivery systems in bacteria [J]. *Nature*, 2010, 468 (7322): 439-442.
- [14] AOKI S K, PAMMA R, HERNDAY A D, et al. Contact-dependent inhibition of growth in *Escherichia coli* [J]. *Science*, 2005, 309 (5738): 1245-1248.
- [15] AOKI S K, WEBB J S, BRAATEN B A, et al. Contact-dependent growth inhibition causes reversible metabolic downregulation in *Escherichia coli* [J]. *J Bacteriol*, 2009, 191 (6): 1777-1786.
- [16] DINER E J, BECK C M, WEBB J S, et al. Identification of a target cell permissive factor required for contact-dependent growth inhibition (CDI) [J]. *Genes Dev*, 2012, 26 (5): 515-525.
- [17] ZHANG D, DE SOUZA R F, ANANTHARAMAN V, et al. Polymorphic toxin systems: comprehensive characterization of trafficking modes, processing, mechanisms of action, immunity and ecology using comparative genomics [J]. *Biol Direct*, 2012, 7: 18.
- [18] PEI T T, LI H, LIANG X, et al. Intramolecular chaperone-mediated secretion of an *Rhs* effector toxin by a type VI secretion system [J]. *Nat Commun*, 2020, 11 (1): 1865.
- [19] JAMET A, NASSIF X. New players in the toxin field: polymorphic toxin systems in bacteria [J]. *mBio*, 2015, 6 (3): e00285-15.
- [20] HILL C W, SANDT C H, VLAZNY D A. *Rhs* elements of *Escherichia coli*: a family of genetic composites each encoding a large mosaic protein [J]. *Mol Microbiol*, 1994, 12 (6): 865-871.
- [21] ZHAO S, HILL C W. Reshuffling of *Rhs* components to create a new element [J]. *J Bacteriol*, 1995, 177 (5): 1393-1398.
- [22] JACKSON A P, THOMAS G H, PARKHILL J, et al. Evolutionary diversification of an ancient gene family (*rhs*) through C-terminal displacement [J]. *BMC Genomics*, 2009, 10: 584.
- [23] RUHE Z C, LOW D A, HAYES C S. Polymorphic toxins and their immunity proteins: diversity, evolution, and mechanisms of delivery [J]. *Annu Rev Microbiol*, 2020, 74: 497-520.
- [24] MA J, SUN M, DONG W, et al. PAAR-*Rhs* proteins harbor various C-terminal toxins to diversify the antibacterial pathways of type VI secretion systems [J]. *Environ Microbiol*, 2017, 19 (1): 345-360.
- [25] WENREN L M, SULLIVAN N L, CARDARELLI L, et al. Two independent pathways for self-recognition in *Proteus mirabilis* are linked by type VI-dependent export [J]. *mBio*, 2013, 4 (4): e00374-13.
- [26] JONES C, HACHANI A, MANOLI E, et al. An *rhs* gene linked to the second type VI secretion cluster is a feature of the *Pseudomonas aeruginosa* strain PA14 [J]. *J Bacteriol*, 2014, 196 (4): 800-810.
- [27] WHITNEY J C, BECK C M, GOO Y A, et al. Genetically distinct pathways guide effector export through the type VI secretion system [J]. *Mol Microbiol*, 2014, 92 (3): 529-542.