

董子璇, 孙俊杰, 代兴杨, 等. 猪链球菌 SSU0468 基因缺失株的构建及其对菌株形态和抗氧化能力的影响 [J]. 畜牧与兽医, 2025, 57 (3): 111-117.

DONG Z X, SUN J J, DAI X Y, et al. Construction of SSU0468 deletion strain and its effect on strain morphology and antioxidant capacity in *Streptococcus suis* [J]. Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2025, 57 (3): 111-117.

猪链球菌 SSU0468 基因缺失株的构建及其对菌株形态和抗氧化能力的影响

董子璇, 孙俊杰, 代兴杨, 赵文斌, 王晓明, 王丽平*

(南京农业大学动物医学院, 江苏 南京 210095)

摘要: 旨在初步探究猪链球菌 *mutT-like* 家族基因 SSU0468 的功能。采用无痕缺失方法构建猪链球菌 P1/7 的 SSU0468 基因缺失株, 通过测定菌株的菌体形态、菌落溶血环大小、药物敏感性、生长速率, 以及利福平突变频率和 H₂O₂ 处理下的细菌存活率, 比较野生株 P1/7 和缺失株 ΔSSU0468 的基本生物学特性差异。结果: 经 PCR 和测序验证, SSU0468 基因被成功敲除; 与野生型菌株相比, SSU0468 缺失后对菌株的溶血活性、药物敏感性无影响, 但会使菌株生长变慢, 并使菌体链长增加, 发生丝状化; SSU0468 缺失后还会导致菌株在对数期末期的突变频率显著下降 ($P < 0.01$), 并且缺失株用不同浓度的 H₂O₂ 处理后的存活率显著低于野生株 ($P < 0.01$)。试验结果提示 SSU0468 基因与猪链球菌形态以及生长相关, 并可增强菌株的抗氧化能力。研究结果为揭示猪链球菌 *mutT-like* 家族的基因功能奠定基础。

关键词: 猪链球菌; *mutT-like* 基因; 菌体形态; 突变; 存活率

中图分类号: S859.7 文献标志码: A 文章编号: 0529-5130(2025)03-0111-07

Construction of SSU0468 deletion strain and its effect on strain morphology and antioxidant capacity in *Streptococcus suis*

DONG Zixuan, SUN Junjie, DAI Xingyang, ZHAO Wenbin, WANG Xiaoming, WANG Liping*

(College of Veterinary Medicine, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract: This study was to preliminarily investigate the functions of the *mutT-like* gene SSU0468 in *Streptococcus suis*. The SSU0468 gene deletion strain of *Streptococcus suis* P1/7 was constructed using the markerless genetic manipulation method. The basic biological characteristics of the mutant strain ΔSSU0468 and the wild strain P1/7 were compared by determining their bacterial morphology, colony haemolysis ring size, antimicrobial agent sensitivity, growth rates, rifampicin mutation frequency, and the survival rates of the bacteria under H₂O₂ treatment. The results were that SSU0468 gene was successfully knocked out proved by PCR and sequencing. Compared with the wild-type strain, the deletion of SSU0468 had no effect on the haemolytic activity and drug sensitivity of the strain. However, it decreased the growth rate of the strain, but increased its chain length and resulted in a filamentous morphology. In addition, the deletion of SSU0468 resulted in a significant decrease in the mutation frequency of the strain at the end of the logarithmic phase ($P < 0.01$), and the survival rate of the deletion strain was significantly lower than that of the wild strain following the treatment with H₂O₂ ($P < 0.01$). The present results suggested that the SSU0468 gene was associated with the morphology and growth of *Streptococcus suis* and enhanced the antioxidant capacity of the strain. This finding would facilitate our initial understanding of the function of the *mutT-like* family in *Streptococcus suis*.

Keywords: *Streptococcus suis*; *mutT-like* gene; morphology; mutant resistance; survival rate

猪链球菌 (*Streptococcus suis*) 是重要的人兽共患病病原, 近年来在世界范围内广泛传播给养猪业造成巨大的经济损失, 此外, 我国也暴发过两起大规模人感

染猪链球菌事件, 导致人出现中毒性休克综合征^[1], 故需引起高度重视。现有的猪链球菌疫苗免疫效果不理想, 因此, 采用抗菌药进行预防和治疗仍然是控制猪链球菌病最有效的手段^[2]。然而, 由于大量抗菌药在养殖业中的不合理使用, 导致猪链球菌对常用抗菌药产生耐药并快速传播, 使临床治疗陷入困境^[3], 对人和动物健康造成巨大威胁, 故对其致病机制和耐药性产生机制开展深入研究具有重要的理论和实践

收稿日期: 2024-04-28; 修回日期: 2025-02-02

基金项目: 国家自然科学基金项目 (32072915)

第一作者: 董子璇, 女, 硕士

* 通信作者: 王丽平, 女, 博士, 教授, 主要从事兽医药理学与

毒理学研究, E-mail: wlp71@163.com。

意义。

细菌耐药产生方式主要是耐药基因的获得和基因突变两种途径,其中,基因突变与细菌的 DNA 损伤修复系统密切相关,如甲基导向的碱基错配修复系统和防止氧化鸟嘌呤掺入的 GO 修复系统等。目前研究显示 GO 修复系统主要由 MutT、MutM 和 MutY 组成,其主要功能是水解核苷酸池中由活性氧 (ROS) 诱导的 DNA 氧化损伤产物 8-oxo-dGTP,或者切除 DNA 链中 8-oxo-dGTP^[4]。其中, MutT 负责将核苷酸池中的 8-oxo-dGTP 水解为 8-oxo-dGMP,以防止 DNA 合成时掺入 8-oxo-dGTP, MutM 切除 DNA 链中与胞嘧啶 (C) 配对的 8-oxo-dGTP, MutY 精确切除 DNA 复制时与 8-oxo-dGTP 错配的腺嘌呤 (A),然后再由 MutM 切除 DNA 链中的 8-oxo-dG^[5]。

猪链球菌中 GO 修复系统相关研究较少,基因组注释显示猪链球菌中有 13 个编码 MutT/Nudix 及其相关结构域的基因,但各基因功能尚不明确^[6]。为此,采用无痕缺失的方法对该家族 13 个基因进行缺失拟进一步探讨各基因功能,在进行表型测定时,发现 SSU0468 基因缺失后,细菌形态发生显著变化,值得进一步探究。SSU0468 基因编码蛋白被注释为黄素依赖性氧化还原酶,研究显示大多数细菌能够产生核黄素,同时所有的细菌都能将核黄素转化为黄素单核苷酸 (FMN) 和黄素腺嘌呤二核苷酸 (FAD)^[7]。黄素类化合物作为酶的辅助因子,在氧化还原反应中用于完成单、双电子和氢的转移,在分解和合成代谢中起关键作用,甚至它们参与的催化反应还可扩展到一系列不同的生化反应,包括 DNA 光修复、卤化和去卤化、抗生素合成、二氧活化、群体信号等^[8]。氧化还原反应对细菌的生存影响重大,细菌为了存活会产

生氧化应激反应,可能会改变生活状态甚至发生突变从而保证菌体的活性。但是有关猪链球菌的类似基因功能研究尚较缺乏,因此,本研究拟通过比较野生型和基因缺失株的表型变化,初步探讨猪链球菌 SSU0468 基因的功能,为后续系统研究 *mutT-like* 基因在猪链球菌耐药突变株形成过程中的作用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 菌株和质粒

猪链球菌 2 型菌株 P1/7,质粒为温敏性自杀质粒 pSET4s,均为本实验室保存。大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞购自南京诺唯赞生物科技有限公司。

1.2 培养基和抗菌药物

Todd-Hewitt 肉汤 (THB)、Todd-Hewitt 琼脂 (THA)、Muller-Hinton 肉汤 (MHB) 购自青岛海博生物技术有限公司;小牛血清购自杭州四季青公司;琼脂粉 (Agar powder) 购自 Oxoid 公司;氯霉素、氟苯尼考、青霉素购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司;四环素、红霉素、替米考星、林可霉素、克林霉素、壮观霉素、庆大霉素、阿莫西林、利奈唑胺购自上海麦克林生化科技有限公司;利福平购自源叶生物有限公司;恩诺沙星、麻保沙星、头孢噻唑购自德国 Dr. Ehrenstorfer 公司。根据纯度换算制备成储备液,浓度为 2 560 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 或 320 $\mu\text{g}/\text{mL}$,药物储备液经过 0.22 μm 的滤器过滤后, -80 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

1.3 SSU0468 基因缺失株的构建

根据猪链球菌 P1/7 菌株的全基因组序列 (NCBI 登录号: NC_012925),设计 SSU0468 基因上下游同源臂引物^[9],引物序列见表 1。

表 1 基因敲除引物信息

引物名称	引物序列 (5'→3')
0468-a	CAGGTCGACTCTAGAGGATCCTGAACCATAATCCGAAGACCC
0468-b	AAAACGACGGCCAGTGAATTCCTTTAAAGTAACTCCTTTTACACACTGAGC
0468-c	CAGGTCGACTCTAGAGGATCCGAGTAACTCTTTGATTTATTTAGATAATGCA
0468-d	AAAACGACGGCCAGTGAATTCCTTTTCAAGTATTTCTTTAGTTCGATGATAAGAG
0468-f	TAAAATGGTACAACCACTCGG
0468-r	CTCCTAGTTTTCTTTTCAGGACTAG

PCR 扩增 SSU0468 基因上下游同源臂,切胶回收后立即使用或 -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。质粒 pSET4s 经酶切后直接回收产物,立即使用或 -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。使用无缝克隆方法,对上下游同源臂以及线性化的质粒 pSET4s 进行同源重组连接,构建缺失重组质粒。将

连接好的重组质粒转化至大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞,筛选阳性克隆并测序验证,提取质粒备用^[10]。

挑取猪链球菌 P1/7 单菌落至 5 mL THB 肉汤中,37 $^{\circ}\text{C}$ 培养至 OD_{600} 值约为 0.6。将菌悬液按 1 : 50 比例转接至预热的 THB 肉汤中,37 $^{\circ}\text{C}$ 培养至菌液

OD_{600} 值增长到 0.03 ~ 0.05, 取出 100 μL 菌液至 1.5 mL 无菌 EP 管中, 加入 5 μL 信号肽 (终浓度为 250 $\mu\text{mol/L}$) 和 DNA 模板。混匀后, 37 $^{\circ}\text{C}$ 静置培养 2 h, 将挑取的猪链球菌 P1/7 单菌落的菌悬液涂布于含有大观霉素 (100 $\mu\text{g/mL}$) 抗性的 THA 平板, 置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养约 12 h, 挑取单菌落于含有 100 $\mu\text{g/mL}$ 大观霉素的 THB 肉汤中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 振荡培养约 12 h^[11]。

按 1 : 100 转接上述含有 100 $\mu\text{g/mL}$ 大观霉素的 THB 肉汤中的菌液至不含抗性的 THB 肉汤中, 28 $^{\circ}\text{C}$ 振荡培养约 12 h。连续传代, 从第 6 代开始, 将菌悬液稀释后涂布于含有大观霉素抗性和无抗性的 THA 平板。当无抗性平板上的菌落数量明显多于抗性平板上的菌落数量时, 挑取无抗性平板上的菌落, 分别在大观霉素抗性和无抗性平板上点样, 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养约 12 h。挑取在抗性平板上不生长而在无抗性平板上生长的菌落, 进行 PCR 鉴定是否为缺失株, 并进行测序鉴定。将构建成功的缺失株命名为 $\Delta\text{SSU0468}$ 。

1.4 SSU0468 缺失前后菌体形态观察

分别挑取猪链球菌 P1/7 及缺失株 $\Delta\text{SSU0468}$ 单菌落至 2 mL THB 培养基中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 过夜培养, 用一次性接种环接取菌液涂布到载玻片上, 待菌液自然风干后进行革兰染色, 并在光学显微镜下 (1 000 \times) 观察细菌形态同时拍照记录。

将上述菌液 3 000 r/min 离心 10 min, 弃上清液, 并用 1 \times PBS 清洗 2~3 次, 最后 1 次离心后的菌体沉淀中加入 1 mL 2.5% 的戊二醛溶液, 充分混合, 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜静置后送至镇江专博检测有限公司进行扫描电镜和透射电镜观察。

1.5 菌株溶血性测定

将猪链球菌 P1/7 和 $\Delta\text{SSU0468}$ 分别划线接种于 THA 血平板上 (含 5% 绵羊血), 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵箱培养 48 h, 观察菌株 SSU0468 缺失前后溶血环是否存在显著差异。

1.6 药物敏感性测定

采用美国临床和实验室标准协会 (CLSI) 推荐的微量肉汤稀释法, 测定常见抗菌药物对猪链球菌 P1/7 和缺失株 $\Delta\text{SSU0468}$ 的最小抑菌浓度 (MIC), 质控菌株为金黄色葡萄球菌 ATCC29213。

1.7 生长曲线测定

分别挑取猪链球菌 P1/7 及缺失株 $\Delta\text{SSU0468}$ 单菌落至 2 mL THB 培养基中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 150 r/min 过夜培养, 次日调整菌液至浓度为 $OD_{600} = 0.1$ 。以 1 : 100 的比例将调定好浓度的菌液与 THB 培养基混合, 在不同时间点测定菌液 OD_{600} 值, 然后以时间为横坐标, OD_{600} 的值为纵坐标, 绘制菌株生长曲线, 重复 3 次。

1.8 细菌突变频率测定

分别挑取猪链球菌 P1/7 及缺失株 $\Delta\text{SSU0468}$ 单菌落至 2 mL THB 培养基中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 150 r/min 过夜培养。然后转接 10 μL 至 1 mL 的 THB 培养基中, 每个菌设置 15 个平行, 在猪链球菌 P1/7 及缺失株 $\Delta\text{SSU0468}$ 的生长迟缓期、对数期、稳定期各选取一时间点, 即培养至 6、9、12 h 时取 1 mL 菌液 4 000 r/min 离心 10 min, 弃上清液, 将沉淀混匀后涂于含 1 $\mu\text{g/mL}$ 利福平的 THA 平板, 培养 16 h 后进行菌落计数并进行统计, 同时在不含利福平的平板上计数。突变频率 = 含利福平平板的菌落数 / 不含利福平平板的菌落数 $\times 100\%$ 。数据采用 Graphpad Prism 5 进行统计分析, 比较不同生长阶段的缺失株和野生株的突变频率差异。

1.9 细菌存活率测定

分别挑取猪链球菌 P1/7 及缺失株 $\Delta\text{SSU0468}$ 单菌落至 2 mL THB 培养基中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 150 r/min 过夜培养。第二天取 10 μL 转接至 1 mL 的 THB 培养基中, 每个菌设置 12 个平行, 培养 9 h 后, 分别加入不同浓度的 H_2O_2 (5 和 10 mmol/L) 后于 37 $^{\circ}\text{C}$ 150 r/min 条件下处理 30 min, 然后梯度稀释后涂布平板于 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 12 h 后进行菌落计数, 计算存活率, 数据采用 Graphpad Prism 5 进行统计分析, 比较不同生长阶段的缺失株和野生株在 H_2O_2 处理后的存活率差异。

1.10 细菌分裂相关基因 mRNA 表达量测定

分别挑取猪链球菌 P1/7 及缺失株 $\Delta\text{SSU0468}$ 单菌落至 5 mL THB 培养基中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 150 r/min 过夜培养。按照 RNA 提取试剂说明书提取猪链球菌 P1/7 及基因缺失株 $\Delta\text{SSU0468}$ 的 RNA, 并参照诺唯赞反转录试剂盒将 RNA 反转成 cDNA。检测与细菌分裂相关的基因 *murD* (编码 UDP-N-乙酰胞壁酰基-EI-Alanina-D-谷氨酸连接酶), *ftsQ*、*ftsZ*、*ftsA*、*ftsW*、*ftsL* (编码细菌细胞分裂蛋白), *sepF* (编码细菌分裂蛋白), *mraY* (催化细菌细胞壁生物合成) 的 mRNA 表达水平, 内参基因为 *parC* (编码肺及活化调节趋化因子)。按照表 2 依次加入反应体系, 涡旋混匀后离心, 并注意避光操作。目的基因的 mRNA 相对表达量采用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法计算。qPCR 的反应体系为: 0.4 μL 上游引物、0.4 μL 下游引物、1 μL cDNA、8.2 μL ddH₂O、10 μL 2 \times ChamQ SYBR qPCR, 总反应体系为 20 μL 。

1.11 数据统计及与分析

本文中的数据采用 Graphpad Prism 5 进行统计分析并绘图。试验组数据与 P1/7 比较, $P < 0.05$ 表示差异显著, $P < 0.01$ 和 $P < 0.001$ 表示差异极显著。

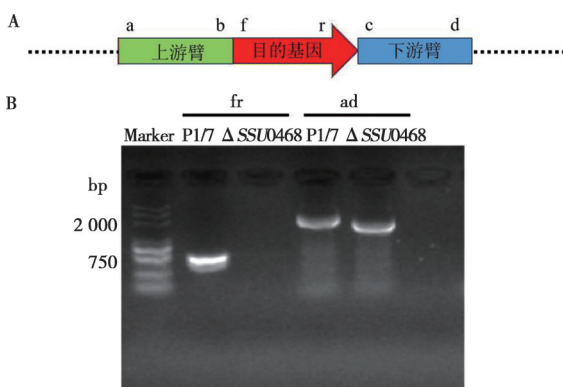
表 2 目的基因及内参基因的引物序列

基因	引物序列 (5'→3')
<i>fisZ</i>	F: CTCACAGAGTTGGTCTGAT
	R: CGGGCGTTCGTCAAGATACT
<i>fisQ</i>	F: TCCGCGTCACTTTACTTGG
	R: GGAAGTGGCCATTGAATTGGG
<i>fisA</i>	F: CAGGCCACGTACCAATTCTT
	R: CGAGTTAGTCCAACGGAGA
<i>fisW</i>	F: AGTAACGGTGGATGGCTTGG
	R: CGAAAACGCCAAAGTCGGTGT
<i>fisL</i>	F: TGACAGCTTGCTTAGCATCG
	R: AACGCGGCTTTTGCAACTTC
<i>murD</i>	F: GCGACCGAAGATGCTGGATA
	R: GCAAGACAACGACAACGACC
<i>sepF</i>	F: TCGTCTAAAATGCGTGTGTGC
	R: TTTCTGAACGTGCTTCCCGA
<i>marY</i>	F: AGAGCCAAGCTTCCCACATC
	R: TGTGACCATGATTGGTGGCT
<i>parC</i>	F: AGGACTGGAAGAACC GCGAGATTT
	R: TCCGTATCGTCAAAGTTCCAGGCA

2 结果与分析

2.1 SSU0468 基因缺失株的构建和验证

采用无痕缺失的方法构建了猪链球菌 *mutT-like* 基因 *SSU0468*, PCR 扩增和产物测序结果表明成功构建出 *SSU0468* 基因的缺失株, 命名为 $\Delta SSU0468$ (图 1)。



fr 为 *SSU0468* 目的基因片段, ad 为上游臂+目的基因+下游臂的片段。

图 1 *SSU0468* 基因缺失株的验证示意图 (A) 和 PCR 情况 (B)

2.2 SSU0468 缺失对菌株生长和形态的影响

在相同的培养条件下, 分别绘制猪链球菌 P1/7

及 $\Delta SSU0468$ 基因缺失株的生长曲线。与 P1/7 野生型菌株相比, *SSU0468* 缺失株到达平台期时间推迟 4 h, 生长明显变慢 (图 2)。

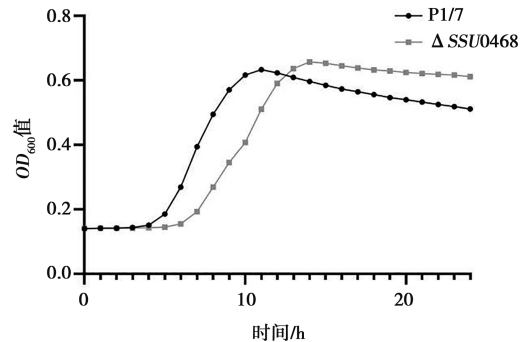


图 2 野生型和 *SSU0468* 缺失株生长曲线

猪链球菌 P1/7 及基因缺失株 $\Delta SSU0468$ 菌悬液涂片后进行革兰染色, 在油镜下观察细菌形态, 结果如图 3 显示猪链球菌 P1/7 菌株的 $\Delta SSU0468$ 缺失后, 菌体较野生型菌株明显变长, 呈梭形且链长有所增加。在扫描电镜下观察, 基因缺失株 $\Delta SSU0468$ 和野生株 P1/7 相比菌体形态明显细长, 呈梭状。在透射电镜下观察, 两株菌相比, 可观察到基因缺失株 $\Delta SSU0468$ 和野生株 P1/7 相比菌体形态变得细长, 呈梭状且荚膜厚度变薄。

2.3 SSU0468 缺失对菌株溶血性和药物敏感性的影响

SSU0468 缺失株和 P1/7 野生型菌株在绵羊血平板培养 48 h 后, 均可见明显的无色透明的 β 溶血环和草绿色 α 溶血环, 未呈现显著差异, 结果表明该 *SSU0468* 对溶血性不产生影响。

进一步测定了常见抗菌药对猪链球菌 P1/7 野生型和 *SSU0468* 缺失株的 MIC。结果显示 (表 3) 该基因缺失并不影响上述药物对菌株的 MIC, 表明该基因对药物敏感性并未产生影响。

2.4 SSU0468 缺失对菌株突变频率的影响

在细菌生长迟缓期、对数期和稳定期, 即各菌株分别培养 6、9 和 12 h 时, 对野生型猪链球菌 P1/7 及基因缺失株 $\Delta SSU0468$ 的突变频率进行统计分析, 图 4 显示, *SSU0468* 缺失株的突变频率在菌株培养迟缓期末期 (6 h) 和稳定期 (12 h) 与 P1/7 相比较无显著性差异 ($P > 0.05$), 但细菌处于对数期时 (9 h), 可见 $\Delta SSU0468$ 的突变率极显著低于野生型菌株 ($P < 0.001$), 表明该基因对对数期细菌的突变频率会产生显著影响。

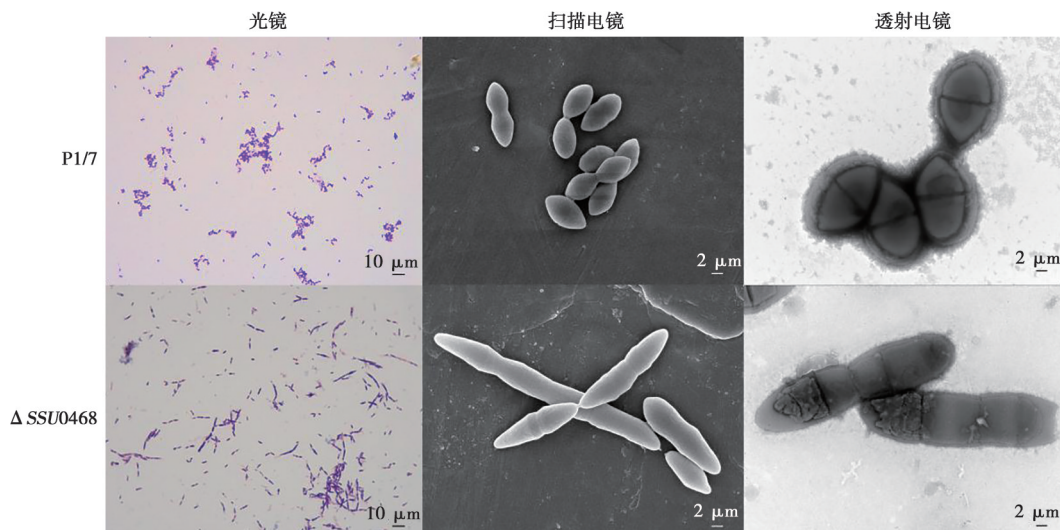
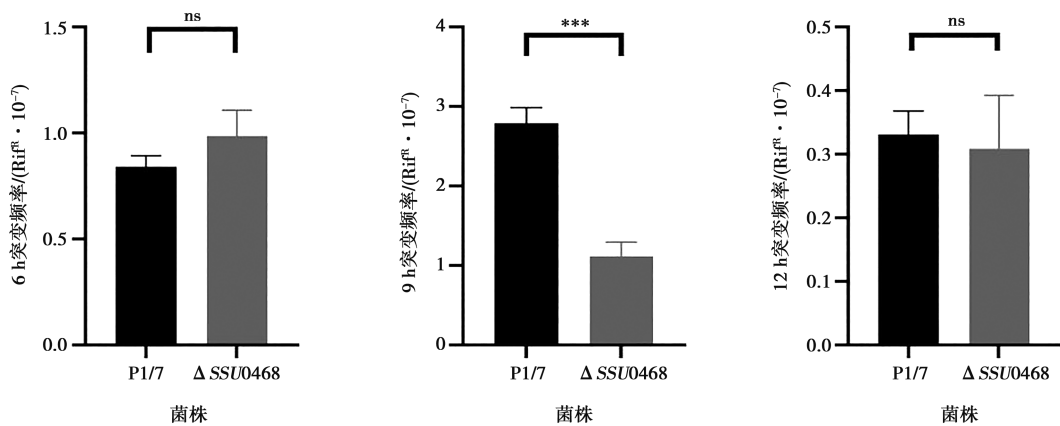


图3 野生型和 SSU0468 缺失株形态比较

表3 常见抗菌药对野生型和 SSU0468 缺失株的 MIC

药物	MIC/ (μg · mL ⁻¹)		药物	MIC/ (μg · mL ⁻¹)	
	P1/7	ΔSSU0468		P1/7	ΔSSU0468
红霉素	0.125	0.125	壮观霉素	32	32
替米考星	1	0.5	庆大霉素	16	16
林可霉素	1	1	恩诺沙星	0.5	0.5
克林霉素	≤0.5	≤0.5	麻保沙星	1	0.5
氯霉素	2	1	青霉素	0.031 25	0.031 25
氟苯尼考	1	1	阿莫西林	≤0.062 5	≤0.062 5
利奈唑胺	1	1	头孢噻吩	≤0.062 5	≤0.062 5
四环素	0.25	0.25	利福平	0.125	0.125



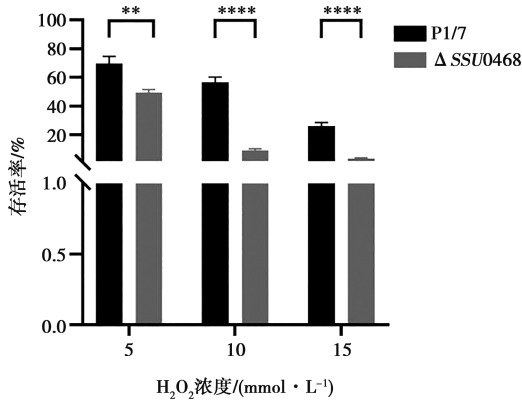
ns 表示 $P>0.05$, * * * 表示 $P<0.001$ 。下同。

图4 野生型和 SSU0468 缺失株突变频率比较

2.5 SSU0468 缺失对菌株存活率的影响

对猪链球菌 P1/7 及基因缺失株 ΔSSU0468 的存活率进行分析, 图5显示基因缺失株 ΔSSU0468 在浓

度为 5、10、15 mmol/L H₂O₂ 处理 30 min 后存活率均明显低于 P1/7 ($P<0.01$)。



** 表示 $P < 0.01$, **** 表示 $P < 0.0001$ 。下同。

图 5 野生型和 *SSU0468* 缺失株存活率比较

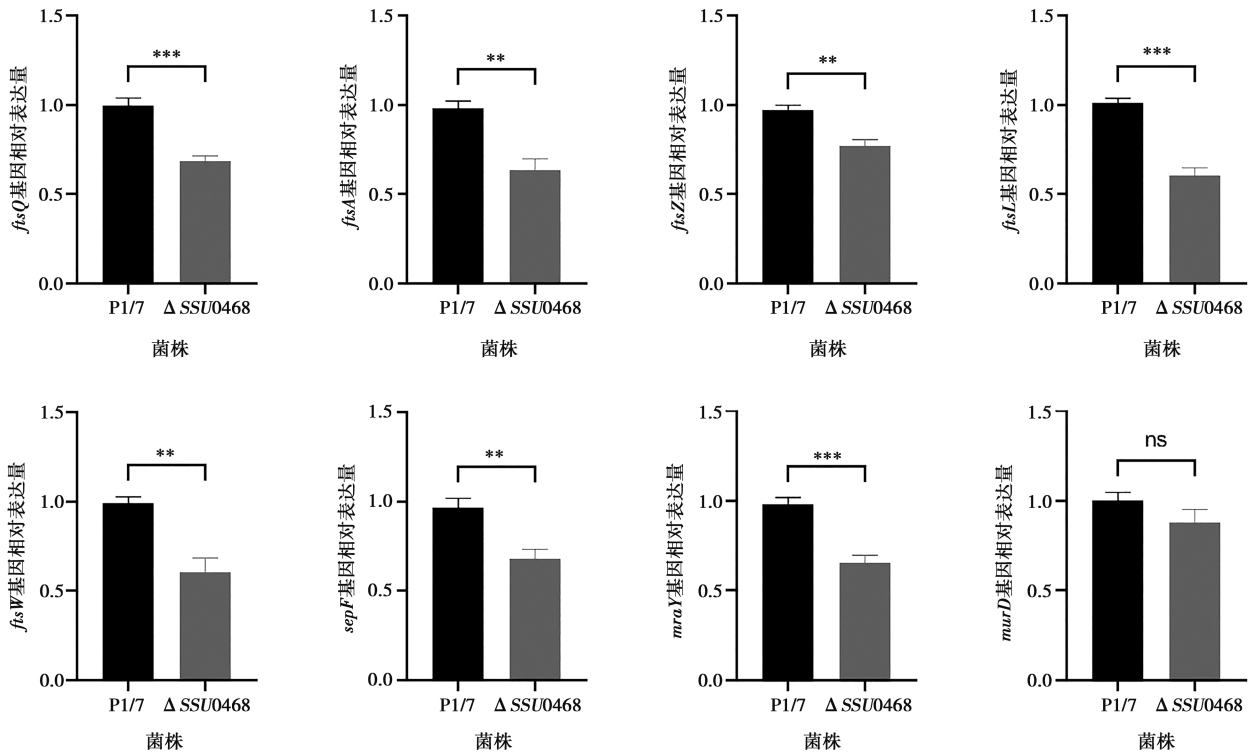


图 6 *SSU0468* 基因缺失前后细菌分裂相关基因 mRNA 表达量变化

3 讨论

研究表明, GO 修复系统可防止 8-oxo-dGTP 在 DNA 链合成中引发突变^[4], 该修复系统在大肠杆菌中已进行深入研究, 但其在猪链球菌中的作用却知之甚少。猪链球菌共有 13 个 MutT-like 同源物, 其 GO 修复系统可能更为复杂。在对猪链球菌 *mutT-like* 同源基因研究时, 发现基因缺失株 $\Delta SSU0468$ 的菌体形态发生了显著变化, 这表明 *SSU0468* 具有额外的功能。

细菌形态影响着细菌重要的生物功能, 包括营养物质的获取、运动、分散、抗压力和与其他生物体的

2.6 *SSU0468* 缺失对细菌分裂相关基因 mRNA 表达的影响

对猪链球菌 P1/7 及基因缺失株 $\Delta SSU0468$ 主要检测了与细菌分裂相关的基因 *murD*、*ftsQ*、*ftsZ*、*ftsA*、*ftsW*、*ftsL*、*sepF*、*mraY* 的 mRNA 表达水平。图 6 显示, 所有基因 mRNA 表达均下降, 除 *murD* 的 mRNA 表达量未达到显著性差异外 ($P > 0.05$), *ftsQ*、*ftsZ*、*ftsA*、*ftsW*、*ftsL*、*sepF*、*mraY* 的 mRNA 表达量均较野生型菌株极显著下降 ($P < 0.01$ 或 $P < 0.001$)。

相互作用^[13]。*SSU0468* 基因缺失后, 猪链球菌菌体丝状化, 并且链长增加。正常细菌生长产生的子细胞具有相对稳定的分裂率、DNA 含量和大小^[14]。细胞的稳态控制会受到抑制细胞分裂压力的干扰, 导致细菌细胞出现丝状形态。丝状形态是细胞持续纵向生长而不分裂的结果, 通常被认为是一种“不太适合”生长的状态, 但也被认为是细菌细胞在抗生素和宿主免疫系统不利条件下采取的一种保守的生存策略^[15]。这种形态可塑性使细菌细胞能够发展出对抗生素、原生动捕食和巨噬细胞吞噬的抵抗力^[16-18]。研究报道多种致病菌在宿主体内可产生丝状形态, 有助于细菌附着到宿主细胞上, 减少脱落, 从而促进细

菌在宿主体内的滞留^[19]，表明丝状形态在致病作用机制中可能具有重要作用^[19-20]。该研究结果显示基因缺失株 $\Delta SSU0468$ 中与分裂相关基因的表达量多数呈显著或极显著下降趋势，表明该基因缺失会影响细菌分裂过程，使得分裂中的菌体延迟分离，进而导致菌体出现丝状化，而菌体丝状化是否会影响猪链球菌的黏附与定殖，进而影响其致病性，仍待进一步证实。

MutT 水解酶负责将核苷酸池中的 8-oxo-dGTP 水解为 8-oxo-dGMP，以防 DNA 合成时掺入 8-oxo-dGTP^[21]。研究显示 *mutT* 突变株可提高铜绿假单胞菌对环丙沙星的突变率^[22]。然而 *mutT-like* 基因 *SSU0468* 缺失后，菌株在对数生长期的突变频率显著降低，而在其他阶段无显著变化，推测该基因可能参与细菌自发突变频率的维持，提示 *SSU0468* 不同于 *mutT* 在 GO 修复系统中的作用，具体功能有待研究。同时发现，*SSU0468* 基因缺失后，菌株在 H_2O_2 环境中的存活率显著降低，表明 *SSU0468* 基因参与细菌的氧化应激，可以提高细菌的抗氧化能力。铜绿假单胞菌中已证实 MutT 在保护铜绿假单胞菌免受 ROS 诱导的杀伤过程中发挥关键作用^[23]。

综上，*SSU0468* 基因对猪链球菌的菌体形态、突变频率以及在 H_2O_2 条件下存活率有着重要的影响。该研究可为进一步探讨猪链球菌 *mutT-like* 基因家族在猪链球菌生命过程中的作用提供参考。

参考文献：

- GOTTSCHALK M, SEGURA M, XU J. *Streptococcus suis* infections in humans: the Chinese experience and the situation in North America [J]. *Anim Health Res Rev*, 2007, 8 (1): 29-45.
- URUÉN C, GARCÍA C, FRAILE L, et al. How *Streptococcus suis* escapes antibiotic treatments [J]. *Vet Res*, 2022, 53 (1): 91.
- 吕若一, 司晓慧, 孙志刚, 等. 猪链球菌耐药现状分析及感染防控措施 [J]. *畜牧兽医学报*, 2023, 54 (12): 4920-4933.
- ENDUTKIN A V, PANFEROVA E P, BARMATOV A E, et al. DNA glycosylases for 8-oxoguanine repair in *Staphylococcus aureus* [J]. *DNA Repair (Amst)*, 2021, 105: 103-160.
- ENDUTKIN A V, ZHARKOV D O. GO System, a DNA repair pathway to cope with oxidative damage [J]. *Mol Biol (Mosk)*, 2021, 55 (2): 223-242.
- BOITEUX S, COSTE F, CASTAING B. Repair of 8-oxo-7, 8-dihydroguanine in prokaryotic and eukaryotic cells: properties and biological roles of the Fpg and OGG1 DNA N-glycosylases [J]. *Free Radic Biol Med*, 2017, 107: 179-201.
- PIMVIRIYAKUL P, CHAIYEN P. Overview of flavin-dependent enzymes [J]. *Enzymes*, 2020, 47: 1-36.
- 吕红, 张欣, 周杨, 等. 细菌产黄素类化合物介导的电子传递及对环境污染物的厌氧生物转化研究进展 [J]. *微生物学通报*, 2020, 47 (10): 3419-3430.
- ZHENG X, ZHENG H, LAN R, et al. Identification of genes and genomic islands correlated with high pathogenicity in *Streptococcus suis* using whole genome tiling microarrays [J]. *PLoS One*, 2011, 6 (3): e17987.
- SMITH H E, WISSELINK H J, VECHT U, et al. High-efficiency transformation and gene inactivation in *Streptococcus suis* type 2 [J]. *Microbiology (Reading)*, 1995, 141: 181-188.
- JIANG X, ZHU L, ZHAN D. Deletion of *lacD* gene affected stress tolerance and virulence of *Streptococcus suis* serotype 2 [J]. *J Microbiol*, 2022, 60 (9): 948-959.
- HUANG KC, MUKHOPADHYAY R, WEN B, et al. Cell shape and cell-wall organization in Gram-negative bacteria [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105 (49): 19282-19287.
- HAJDUK I V, RODRIGUES C D, HARRY E J. Connecting the dots of the bacterial cell cycle: coordinating chromosome replication and segregation with cell division [J]. *Semin Cell Dev Biol*, 2016, 53: 2-9.
- BALABAN N Q, MERRIN J, CHAIT R, et al. Bacterial persistence as a phenotypic switch [J]. *Science*, 2004, 305 (5690): 1622-1625.
- JUSTICE S S, HUNSTAD D A, CEGELSKI L, et al. Morphological plasticity as a bacterial survival strategy [J]. *Nat Rev Microbiol*, 2008, 6 (2): 162-168.
- CORNO G, JÜRGENS K. Direct and indirect effects of protist predation on population size structure of a bacterial strain with high phenotypic plasticity [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2006, 72 (1): 78-86.
- PRASHAR A, BHATIA S, GIGLIOZZI D, et al. Filamentous morphology of bacteria delays the timing of phagosome morphogenesis in macrophages [J]. *J Cell Biol*, 2013, 203 (6): 1081-1097.
- JUSTICE S S, HUNSTAD D A, SEED P C, et al. Filamentation by *Escherichia coli* subverts innate defenses during urinary tract infection [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103 (52): 19884-19889.
- WEISER J N. The battle with the host over microbial size [J]. *Curr Opin Microbiol*, 2013, 16 (1): 59-62.
- SETOYAMA D, ITO R, TAKAGI Y, et al. Molecular actions of *Escherichia coli* MutT for control of spontaneous mutagenesis [J]. *Mutat Res*, 2011, 707 (1/2): 9-14.
- MORERO N R, ARGARAÑA C E. *Pseudomonas aeruginosa* deficient in 8-oxodeoxyguanine repair system shows a high frequency of resistance to ciprofloxacin [J]. *FEMS Microbiol Lett*, 2009, 290 (2): 217-226.
- SANDERS L H, SUDHAKARAN J, SUTTON M D. The GO system prevents ROS-induced mutagenesis and killing in *Pseudomonas aeruginosa* [J]. *FEMS Microbiol Lett*, 2009, 294 (1): 89-96.