



李鑫椿,王硕玥,吴宗福. 纤维二糖利用基因簇对巴氏链球菌生长及毒力的影响[J]. 南京农业大学学报,2024,47(5):923-931.

LI Xinchun, WANG Shuoyue, WU Zongfu. The effect of cellobiose-utilization gene cluster on the growth and virulence of *Streptococcus pasteurianus* [J]. Journal of Nanjing Agricultural University, 2024, 47(5): 923-931.

纤维二糖利用基因簇对巴氏链球菌生长及毒力的影响

李鑫椿¹, 王硕玥¹, 吴宗福^{1,2*}

(1.南京农业大学动物医学院/农业农村部动物细菌学重点实验室/世界动物卫生组织猪链球菌病参考实验室,江苏南京 210095;
2.广东省养猪与猪病防控技术研究企业重点实验室,广东广州 511400)

摘要: [目的]本研究旨在明确纤维二糖利用基因簇对巴氏链球菌生长及毒力的影响。[方法]以肺炎链球菌基因组中纤维二糖利用基因簇为参考, 同源性比对分析猪源巴氏链球菌 WUSP067 中纤维二糖利用基因簇, 通过荧光定量 PCR (RT-qPCR)、RT-PCR、缺失株构建、不同条件下的生长曲线测定、小鼠毒力试验等评价其对巴氏链球菌生长及毒力的影响。[结果]巴氏链球菌 WUSP067 基因组中存在 2 个潜在的纤维二糖利用相关基因簇 (cellobiose locus, CL), 将其分别命名为 CL1 和 CL2, 它们均包括编码磷酸转移酶系统和 β -葡萄糖苷酶的基因。RT-qPCR 结果显示, 与添加 $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 葡萄糖的 DMEM 培养基相比, 在添加 $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 纤维二糖的 DMEM 培养基中, CL1 中的 *BglPI_{up}* 和 *BglA_{up}* 基因表达量无显著差异, 而 CL2 中 *celA_{up}* 和 *celB_{up}* 基因表达极显著上调 ($P < 0.0001$), 分别上调 49 倍和 33 倍, 提示其参与利用纤维二糖。选择 CL2 深入研究, RT-PCR 结果显示, 该基因簇由 2 个操纵子组成。构建编码 β -葡萄糖苷酶的 *celA_{up}* 基因缺失株, 生长曲线分析表明, 野生株和 *celA_{up}* 基因缺失 ($\Delta celA_{up}$) 株在 THB、DMEM+ $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 葡萄糖条件下生长情况无明显差异, 但在 DMEM+ $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 纤维二糖条件下, 野生株能以纤维二糖为唯一碳源生长, 而 $\Delta celA_{up}$ 表现出明显的生长缺陷, 生长 12 h 时 D_{600} 仍低于 0.5。以断奶仔猪为感染模型, 比较野生株和 $\Delta celA_{up}$ 株的毒力, 每鼠攻毒剂量为 3×10^8 CFU, 野生株攻毒组小鼠 3 日内全部死亡, 而 $\Delta celA_{up}$ 株攻毒组的小鼠死亡趋势较缓, 14 d 后存活率为 20% ($P < 0.05$)。[结论]猪源巴氏链球菌 WUSP067 能以纤维二糖为唯一碳源生长, CL2 是纤维二糖利用相关基因簇, 其中 *celA_{up}* 基因不仅促进该菌利用纤维二糖, 而且还影响该菌的毒力, 在巴氏链球菌致病过程中发挥作用。

关键词: 巴氏链球菌; 纤维二糖; 生长; 毒力

中图分类号: S852.61[†]

文献标志码: A

文章编号: 1000-2030(2024)05-0923-09

The effect of cellobiose-utilization gene cluster on the growth and virulence of *Streptococcus pasteurianus*

LI Xinchun¹, WANG Shuoyue¹, WU Zongfu^{1,2*}

(1.College of Veterinary Medicine/Key Laboratory of Animal Bacteriology, Ministry of Agriculture and Rural Affairs/WOAH Reference Lab for Swine Streptococcosis, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China;
2.Guangdong Provincial Key Laboratory of Research on the Technology of Pig-breeding and Pig-disease Prevention, Guangzhou 511400, China)

Abstract: [Objectives] This study aimed to clarify the effect of a cellobiose-utilization gene cluster on the growth and virulence of *Streptococcus pasteurianus*. [Methods] A similarity search was performed based on the cellobiose-utilization gene cluster of *S. pneumoniae* to analyze the homologous gene cluster in *S. pasteurianus* WUSP067. RT-qPCR, deletion mutant construction, RT-PCR, growth curve determination under different conditions, and mice infection experiments were performed to evaluate the effect of the cellobiose-utilization gene cluster on the growth and virulence of *S. pasteurianus*. [Results] Two potential cellobiose-utilization gene clusters (CL) were found in the WUSP067, named CL1 and CL2, respectively. Both of them included the phosphotransferase system and β -glucosidase. RT-qPCR results showed no significant difference in the expression of *BglPI_{up}* and *BglA_{up}* genes in CL1 in DMEM medium with $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ cellobiose. In contrast, the expression of *celA_{up}* and *celB_{up}* genes in CL2 were significantly up-regulated ($P < 0.0001$) in DMEM medium with $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ cellobiose, with 49-fold and 33-fold, respectively, suggesting that they were involved in utilizing cellobiose. CL2 was chosen for further study, and RT-PCR results showed that it comprised two operons. A deletion mutant strain of the gene *celA_{up}* encoding β -glucosidase was generated. Growth curves analysis showed no significant difference in the growth of wild-type

收稿日期: 2023-09-24

基金项目: 龙岩学院动物源性人兽共患病防控福建省高校工程研究中心开放基金课题 (2021ZW001)

*通信作者: 吴宗福, 教授, 博导, 研究方向为兽医微生物与免疫, E-mail: wuzongfu@njau.edu.cn。

strain and $\Delta celA_{wp}$ in THB medium or DMEM medium supplemented with $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ glucose. However, in the presence of $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ cellobiose as the sole carbon source, compared with the wild-type strain, the growth of $\Delta celA_{wp}$ was severely impaired. Its D_{600} value of 12 h growth was lower than 0.5 ($P < 0.0001$). The virulence of the wild-type strain and $\Delta celA_{wp}$ was compared using a weaned mouse infection model. Mice infected with the wild-type strain with the dose of 3×10^8 CFU per mouse died in three days, while the survival rate of mice infected with the same dose of $\Delta celA_{wp}$ was 20% on the 14th day post-infection ($P < 0.05$). [Conclusions] *S. pasteurianus* was able to grow in the cellobiose as a single carbon source, and CL2 was related to cellobiose utilization, among which $celA_{wp}$ gene not only helped to promote the utilization of cellobiose but also contributed to *S. pasteurianus* virulence.

Keywords: *Streptococcus pasteurianus*; cellobiose; growth; virulence

巴氏链球菌 (*Streptococcus pasteurianus*) 是一种革兰阳性球菌, 曾属于牛链球菌生物型 II/2, 后通过 *sodA* (编码超氧化物歧化酶) 基因系统发育树将其划分为一个新的物种即巴氏链球菌^[1-2]。该菌能感染包括鸽子、火鸡、鹅、牛、犬、猴和亚洲象等多种动物, 主要引起败血症和脑膜炎症状^[3-4], 具有较高的死亡率。该菌也是人畜共患病原菌, 可引致新生儿、老人和免疫缺陷患者心内膜炎、尿路感染和孕妇的宫内感染等症状, 甚至死亡, 还可能与人的胃肠道恶性肿瘤、肝癌有关^[5-9]。本课题组首次证实该菌可引致猪的脑膜炎, 是猪链球菌病的新病原, 由此建立了该菌的小鼠感染模型, 且明确荚膜是重要的毒力因子^[10]; 此外, 该菌还可定殖在表观健康猪的扁桃体和肺门淋巴结, 且在不同地区检出率存在差异^[11]。目前, 关于巴氏链球菌的报道主要是少量的流行病学数据, 对其致病机制的了解十分有限。因此, 深入研究巴氏链球菌致病机制具有重要科学意义。

纤维二糖是一种常见的 β -葡萄糖苷, 由 2 个葡萄糖构成, 以 β -1,4 糖苷键连接, 广泛存在于植物中, 哺乳动物的日常饮食中含有纤维素, 摄入后经肠道微生物降解产生纤维二糖^[12-13]。另外, 哺乳动物胞外基质富含糖胺聚糖, 当它降解时, 会释放出纤维二糖的类似物。在大肠杆菌中, 这些类似物会诱导纤维二糖相关基因的表达^[14-15]。病原菌在感染宿主过程中, 纤维二糖是潜在的碳源, 其有助于病原菌在宿主体内存活与增殖, 肺炎克雷伯菌和艰难梭菌在感染过程中可以利用纤维二糖促进它们在肠道中的竞争优势进而增强毒力^[16-17]。肺炎链球菌中缺失纤维二糖利用相关基因 *BglA3* (编码 β -葡萄糖苷酶) 导致该菌对小鼠的致病性下降^[18]。由此可见, 纤维二糖利用在细菌感染致病过程中发挥重要的作用, 而关于巴氏链球菌对纤维二糖利用的研究尚未见报道。

本研究以肺炎链球菌基因组中纤维二糖利用基因簇为参考, 分析猪源巴氏链球菌 WUSP067 基因组中纤维二糖利用基因簇, 通过荧光定量 PCR、缺失株的构建、不同条件下生长曲线的测定、小鼠毒力试验等, 评价其对巴氏链球菌生长及毒力的影响, 为深入了解巴氏链球菌致病机制及该类疫病防控提供参考。

1 材料与方法

1.1 菌株及培养条件

猪源巴氏链球菌 WUSP067 由本课题组保存, 分离自患脑膜炎的断奶仔猪脑部^[10]。巴氏链球菌在 THB (Todd-Hewitt Broth) 液体培养基或 THB 固体培养基中于 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 培养箱 ($5\% \text{ CO}_2$) 或摇床 ($180 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$) 中培养, 需要时添加终浓度为 $100 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的壮观霉素 (spectinomycin, Spc); 测定细菌对糖的利用时用无糖的 DMEM (Dulbecco's modified Eagle medium) 培养基, 需要时加入 $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的葡萄糖 (glucose, Glu) 或 $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 纤维二糖 (cellobiose, Cel)。

1.2 主要试剂和试验动物

THB 培养基购自青岛海博生物公司; 绵羊血购自北京鼎国生物科技有限公司; DMEM 培养基购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司; $2 \times$ Rapid Taq Master Mix、 $2 \times$ Phanta Flash Master Mix、Taq Pro Universal SYBR qPCR Master Mix、逆转录试剂盒 (HiScript II QRT SuperMix)、胶回收试剂盒 (FastPure Gel DNA Extraction Mini Kit) 购自南京诺唯赞生物科技有限公司; SPF 级 ICR 仔鼠 (18 日龄) 购自斯贝福生物技术有限公司。

1.3 生物信息学分析

参照文献 [19] 利用 NCBI 网站中 tBLASTn 方法, 以肺炎链球菌 (NZ_AKBW01000001.1) 为参照, 分析纤维二糖利用基因簇 *CN52_RS0111090—CN52_RS0111095* 和 *CN52_RS0100970—CN52_RS0101000* 中各个基因编码氨基酸序列与 WUSP067 的同源性, 评判标准为覆盖率超过 70%, 氨基酸同源性超过 30%。比

对结果利用 Chiplot 网站绘图。

1.4 RT-PCR 测定基因共转录

利用 Oligo 软件设计引物,由南京擎科生物科技有限公司合成,引物信息见表 1。引物 1-1-F/R、1-2-F/R、1-3-F/R、1-4-F/R 分别用于确定 *E8M05_RS06225—E8M05_RS06230*、*E8M05_RS06235—E8M05_RS06250*、*E8M05_RS06250—E8M05_RS06255* 是否在同一转录本上;引物 1-5-F/R、1-6-F/R、1-7-F/R、1-8-F/R 分别用于确定 *E8M05_RS011050—E8M05_RS06265*、*E8M05_RS06265—E8M05_RS06270* 是否在同一转录本上。挑取 WUSP067 单菌落于 THB 液体培养基中,37 °C、5% CO₂ 条件下培养至 D_{600} 值为 0.6,提取细菌总 RNA,用反转录试剂盒反转录 500 ng RNA 成 cDNA。用上述引物检测反转录生成的 cDNA,以提取的 RNA 为阴性对照。RT-PCR 反应体系:2× Rapid Taq Master Mix 12.5 μL,10 μmol·L⁻¹ 上、下游引物各 1.0 μL,ddH₂O 9.5 μL,模板 1.0 μL。反应条件:95 °C 3 min;95 °C 15 s,50 °C 15 s,72 °C 30 s,30 个循环;72 °C 5 min。反应结束后用 10 g·L⁻¹ 琼脂糖凝胶进行电泳,通过凝胶成像仪观察扩增产物大小。

表 1 引物序列

Table 1 Primers sequences

引物名称 Primers name	引物对序列 Primer pairs sequences(5'→3')	用途 Purpose
CelA-A/B	CGCAAGCAATGATTACTTTT/ TTCAAATATATCCTCCTCACAACATAACCTCCTCGATTAA	扩增 <i>celA</i> 上游臂 AB Amplification of the upstream of <i>celA</i>
CelA-C/D	ACAGATTAATAAAAAATTATAATCGGTTTAGAACTTTTATGA/ TTGATGATGACATAACCACC	扩增 <i>celA</i> 下游臂 CD Amplification of the downstream of <i>celA</i>
CelA-F/R	TATTCAGGGGTTCTTATTA/TTCCTGAATGAATTTGACACA	融合 AB- <i>spc</i> -CD Fusion of homologous arms AB- <i>spc</i> -CD
CelA-X/Y	CACCAAGATAAGCAATGCGAT/TCTTTGTCCGTTTTGCCGAAA	检测 <i>celA</i> 基因 Detection of <i>celA</i>
CelA-M/N	AAAATCGTATTAAGACCGTCA/CCAAAGTAACATTCCCGTCA	鉴定 Δ <i>celA</i> Identification of Δ <i>celA</i>
Spc-F/R	GTGAGGAGGATATATTGAA/TTATAATTTTTTTAATCTGT	扩增 <i>spc</i> 基因片段 Amplification of <i>spc</i> gene fragment
BglP-qp-F/R	TGGAGCTTCTACTGCGATTTC/GCCGATACTGCCATTCTATAA	检测 <i>BglP_{qp}</i> 表达 Detection the expression of <i>BglP_{qp}</i>
BglA-qp-F/R	GGAAATGGCTCAACAGAGAATG/AGCGTAACCAAAGGCTCTATATC	检测 <i>BglA_{qp}</i> 表达 Detection the expression of <i>BglA_{qp}</i>
CelB-qp-F/R	CACTACCACCTGAACCAACATAG/GGCCTGCCATCTTCAATATCA	检测 <i>celB_{qp}</i> 表达 Detection the expression of <i>celB_{qp}</i>
CelA-qp-F/R	GATAGCTTCGGTGAGCGTTTA/AAGTTGAGGCTGATGGTATGG	检测 <i>celA_{qp}</i> 表达 Detection the expression of <i>celA_{qp}</i>
1-1-F/R	CACTTTAATAATATGACGGAA/ATTCTGGCTATATGATTCGG	检测基因 <i>E8M05_RS06225—E8M05_RS06230</i> Detection of genes <i>E8M05_RS06225—E8M05_RS06230</i>
1-2-F/R	CATCCCGAGTTGATTTCCGTA/TGCCGTTTATACTTGACCA	检测基因 <i>E8M05_RS06230—E8M05_RS06235</i> Detection of genes <i>E8M05_RS06230—E8M05_RS06235</i>
1-3-F/R	GGAATACTTGCCATACCAG/TTATCTTTGGTGACCGCATT	检测基因 <i>E8M05_RS06235—E8M05_RS06250</i> Detection of genes <i>E8M05_RS06235—E8M05_RS06250</i>
1-4-F/R	ATCATCCGAAATACCTAGCTT/ACCGATTGTGCAAATCCCA	检测基因 <i>E8M05_RS06250—E8M05_RS06255</i> Detection of genes <i>E8M05_RS06250—E8M05_RS06255</i>
1-5-F/R	ATTTCAATGTCTTCGCCTT/AGATTTAAGCCAAAATACCAAG	检测基因 <i>E8M05_RS06255—E8M05_RS11050</i> Detection of genes <i>E8M05_RS06255—E8M05_RS11050</i>
1-6-F/R	CCAAATCTTAGCGTGAAA/AATTGCTGCTTCATTAACCA	检测基因 <i>E8M05_RS11050—E8M05_RS06265</i> Detection of genes <i>E8M05_RS11050—E8M05_RS06265</i>
1-7-F/R	AATGAAGCAGCAATTATTCCA/ATATGTATCATTTACCGCTCT	检测基因 <i>E8M05_RS06265—E8M05_RS06270</i> Detection of genes <i>E8M05_RS06265—E8M05_RS06270</i>
1-8-F/R	CAACGCTTAGACCTTTACCG/TAAGACCGTCAGTCAAATAGCC	检测基因 <i>E8M05_RS06270—E8M05_RS06275</i> Detection of genes <i>E8M05_RS06270—E8M05_RS06275</i>

1.5 RT-qPCR 检测纤维二糖基因簇相关基因表达水平

1.5.1 引物设计 利用网站 Integrated DNA Technologies 设计检测巴氏链球菌 WUSP067 纤维二糖基因簇的 RT-qPCR 的引物,由南京擎科生物有限公司合成,引物信息见表 1。

1.5.2 样品制备 挑取 WUSP067 单菌落接种于 THB 液体培养基中,37 °C、180 r·min⁻¹ 下培养至 D_{600} 值为 0.6;4 °C、5 000 r·min⁻¹ 离心 5 min,弃上清液,PBS 清洗 1 次。分别用含 10 g·L⁻¹ Glu 和 10 g·L⁻¹ Cel 的 DMEM 培养基重悬至 D_{600} 值为 0.6,37 °C、180 r·min⁻¹ 培养 2 h。提取细菌总 RNA,再用反转录试剂盒反转录为 cDNA,将所得的 cDNA 稀释 10 倍,于 -20 °C 保存。每个处理组 3 个生物学重复。

1.5.3 RT-qPCR 以稀释后的 cDNA 为模板,使用表 1 中的引物进行 RT-qPCR。反应体系:2 × Taq Pro Universal SYBR qPCR Master Mix 10.0 μL,10 μmol·L⁻¹ 上、下游引物各 0.4 μL,ddH₂O 8.2 μL,模板 1.0 μL。阴性对照为 ddH₂O,内参基因为 *gyrA*。RT-qPCR 反应条件:95 °C 30 s;95 °C 10 s,60 °C 30 s,40 个循环;

95 °C 15 s, 60 °C 60 s, 95 °C 15 s。采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法分析基因的相对表达水平。

1.6 缺失株 $\Delta celA_{wp}$ 的构建

巴氏链球菌缺失株的构建参照文献[10],引物由南京擎科生物有限公司合成,引物信息见表1。筛选壮观霉素耐受基因,构建有痕缺失株。以 WUSP067 基因组为模板,以引物 CelA-A/B 分别扩增待缺失基因的上游臂 *celA*-AB。以引物 CelA-C/D 分别扩增待缺失基因的下游臂 *celA*-CD,以 *Spc*-F/R 为引物扩增 *spc* 片段。以上、下游同源臂 AB、CD 和 *spc* 为模板,以 CelA-F/R 为引物进行融合 PCR。反应条件:95 °C 5 min;95 °C 15 s,50 °C 30 s,72 °C 3 min,30 个循环;72 °C 10 min。经 PCR 得到的 3 段融合产物,通过 $10 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 琼脂糖凝胶电泳分离,切胶后用 DNA 片段回收试剂盒回收 *celA*-AB-*spc*-CD 片段。挑取 WUSP067 单菌落于 37 °C、180 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 摇床中培养至细菌生长对数期,以 1:100(体积比)转接 5 mL THB 液体培养基中至 D_{600} 值为 0.02~0.07(约 40 min)。取 100 μL 菌液,加入 5 μL 信号肽 (IVLTGWWGV, $250 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$),加入 1.0 μg 融合片段 *celA*-AB-*spc*-CD,于 37 °C 下静置培养 2 h 后涂布 TS 平板(含 $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ *spc* 的 THB 固体培养基)。次日挑取单菌落,用引物 CelA-X/Y 和 CelA-M/N 分别鉴定有痕缺失株 $\Delta celA$ 。以鉴定结果为阳性的菌液为模板,使用引物 CelA-A/D 扩增片段,送生物公司测序并分析测序结果。

1.7 WUSP067 和 $\Delta celA_{wp}$ 菌株生长曲线的测定

1.7.1 在 THB 培养条件下的生长曲线 挑取巴氏链球菌 WUSP067 和缺失株 $\Delta celA_{wp}$ 单菌落于 37 °C、180 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 下培养至对数生长期,以 1:100(体积比)转接至 10 mL THB 液体培养基(50 mL 锥形瓶)。每隔 1 h 测量 D_{600} 值。每个菌株 3 个生物学重复,分别绘制各菌株生长曲线。

1.7.2 在添加 $10 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ Glu 或 $10 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ Cel 的 DMEM 培养条件下的生长曲线 挑取 WUSP067 和缺失株 $\Delta celA_{wp}$ 单菌落于 37 °C、180 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 摇床中培养至对数生长期,5 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 5 min,弃培养基,PBS 清洗 1 次,用等量的 DMEM 重悬后以 1:100(体积比)转接 5 mL DMEM+ $10 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ Glu 或 $10 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ Cel(纤维二糖)液体培养基中(10 mL EP 管),37 °C、180 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 摇床中培养,每隔 2 h 测量 D_{600} 值。每个菌株 3 个生物学重复,分别绘制各菌株生长曲线。

1.8 小鼠毒力试验

采用 18 日龄 ICR 级 SPF 仔鼠,在南京农业大学实验动物中心[许可证号 SYXK(苏)2021-0086]开展毒力试验。每个试验组 10 只小鼠。正式攻毒前先复壮菌株:挑取 WUSP067 野生株与缺失株 $\Delta celA_{wp}$ 单菌落接种于 THB 液体培养基中;37 °C、180 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 培养至 D_{600} 值约为 0.8,4 °C、5 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 5 min,弃上清液,PBS 清洗 1 次,用 200 μL PBS 重悬,腹腔注射小鼠 1 只,菌量为 3×10^8 CFU。10 h 后脱颈处死小鼠,心脏取血,取少量血液划线 THB 固体培养基,37 °C、5% CO_2 条件下培养 10 h。挑取单菌落,接种培养至对数生长期,经 PCR 鉴定为目的菌株。将鉴定正确的 WUSP067 野生株与缺失株 $\Delta celA_{wp}$ 转接 THB 液体培养基,37 °C、180 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 培养至 D_{600} 值约为 0.6,取 9 mL 菌液,4 °C、5 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 5 min,用 PBS 清洗 1 次,使用 3 mL PBS 重悬后采用腹腔注射的方式攻毒,每只小鼠注射 200 μL ,攻毒菌量 3×10^8 CFU,以注射 PBS 组作为阴性对照。攻毒后每天观察并记录小鼠死亡情况,共观察 14 d,绘制存活曲线。

1.9 数据处理与分析

RT-qPCR 和生长曲线测定的数据用非配对 *t* 检验分析其差异显著性;小鼠毒力试验数据使用 log-rank 检验来分析数据差异显著性。

2 结果与分析

2.1 巴氏链球菌与肺炎链球菌纤维二糖利用基因簇的同源性比对

如图 1 所示:以肺炎链球菌 TIGR4 两个纤维二糖相关的基因簇^[20-21]为参考,在猪源巴氏链球菌 WUSP067 中也存在 2 个潜在的纤维二糖相关的基因簇,将这 2 个基因簇分别命名为 CL1 和 CL2,即 *E8M05_RS02040—E8M05_RS02055* 和 *E8M05_RS06225—E8M05_RS06270*。CL1 和 CL2 都包含编码磷酸转移酶系统(phosphotransferase systems,PTS)中的酶 II 复合物和 β -葡萄糖苷酶的基因。如图 1-A,CL1 中包含 4 个基因,分别是 *LicT_{wp}*(编码抗终止子蛋白)、*BglPI_{wp}*(编码 PTS 中酶 II C)、*BglP2_{wp}*(编码 PTS 中酶 II A)、*BglA_{wp}*(编码 6-磷酸- β -葡萄糖苷酶)。CL2 包含 10 个基因,其中有 5 个基因据报道与纤维二糖利用相关^[20]。如图 1-B 所示,CL2 包括 *celR_{wp}*(编码转录调控因子)、*celA_{wp}*(编码 6-磷酸- β -葡萄糖苷酶),以及

celB_{wp}、*celC_{wp}*、*celD_{wp}* (分别编码 PTS 中酶 II C、酶 II B、酶 II A), 其余 5 个基因功能未知。在肺炎链球菌中, 酶 II C 特异性识别和捕获纤维二糖, 6-磷酸-β-葡萄糖苷酶则负责将纤维二糖水解为单糖供细菌利用^[20,24]。

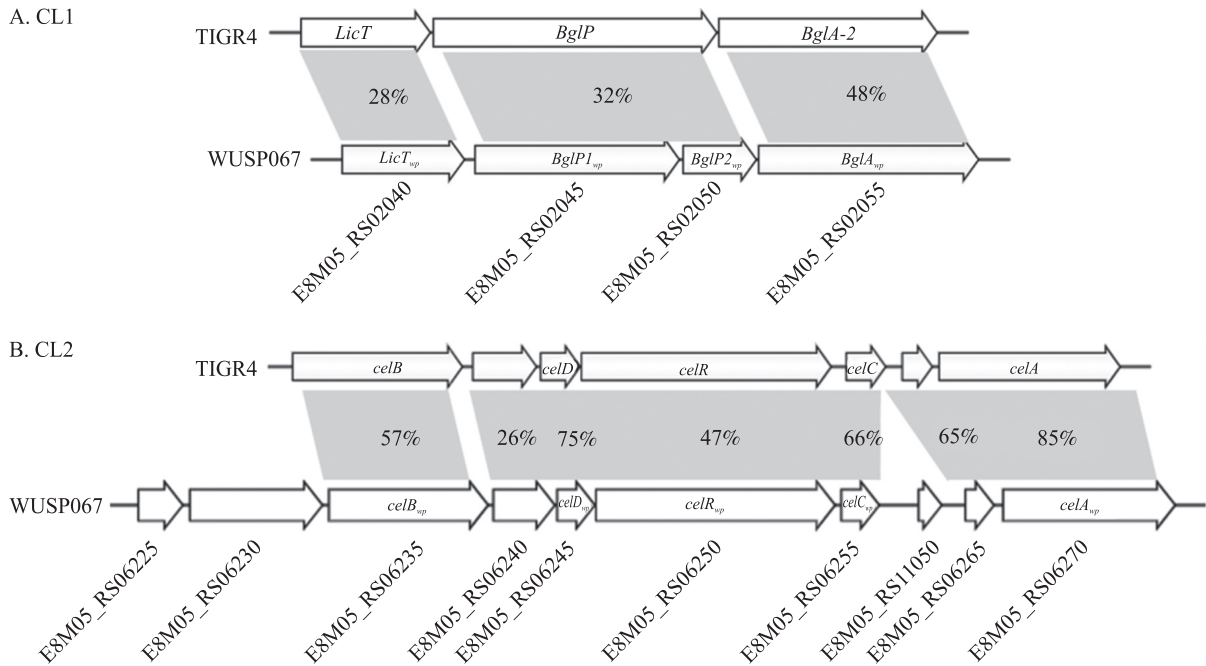


图 1 巴氏链球菌 WUSP067 与肺炎链球菌 TIGR4 纤维二糖利用相关蛋白氨基酸同源性比对
 Fig. 1 Amino acid identity of cellobiose-utilization proteins between *Streptococcus pasteurianus* WUSP067 and *S. pneumoniae* TIGR4

阴影部分数字表示其同源性。The numbers in the shadow part indicate identity.

2.2 纤维二糖对巴氏链球菌纤维二糖利用相关基因表达的影响

从图 2 可知, 以添加 10 g·L⁻¹ Glu 的 DMEM 培养基为对照组, 在添加 10 g·L⁻¹ Cel 的 DMEM 培养基中, *celB_{wp}* 和 *celA_{wp}* 的基因表达量分别上调 33 倍和 49 倍 ($P < 0.0001$), 而 *Bglp1_{wp}* 和 *BglA_{wp}* 表达量无显著变化。此结果表明 CL2 在纤维二糖转运和利用中发挥作用, 故选择 CL2 进行深入研究。

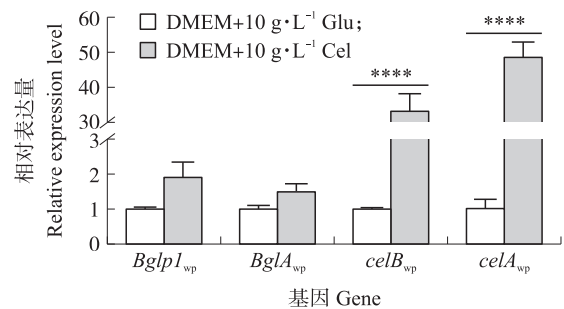


图 2 纤维二糖对巴氏链球菌纤维二糖利用相关基因表达的影响

Fig. 2 Effect of cellobiose on the gene expression in the cellobiose-utilization gene cluster in *S. pasteurianus*

**** $P < 0.0001$.

2.3 巴氏链球菌纤维二糖利用基因簇 CL2 结构

使用引物 1-1-F/R、1-2-F/R、1-3-F/R、1-4-F/R 扩增出长度分别为 451、494、1 280 和 350 bp 的片段(图 3-A、B); 使用引物 1-6-F/R 和 1-7-F/R 扩增出长度分别为 501 和 439 bp 的片段, 而使用引物 1-5F/R 和 1-8-F/R 不能扩增出相应的条带(图 3-C)。这表明 CL2 由 2 个操纵子组成, 即 E8M05_RS06225—E8M05_RS06255 和 E8M05_RS11050—E8M05_RS06270。

2.4 缺失株 Δ*celA_{wp}* 的构建和鉴定

采用信号肽同源重组的方法构建 Δ*celA_{wp}* (图 4-A)。使用引物 CelA-M/N, 以缺失株 Δ*celA_{wp}* 为模板, 扩增出大小为 1 262 bp 片段, 而以野生株为模板, 扩增出大小为 1 928 bp 片段; 使用引物 CelA-X/Y, 以缺失株 Δ*celA_{wp}* 为模板时, 不能扩增出相应片段, 而以野生株为模板时, 可以扩增出大小为 747 bp 的片段(图 4-B)。上述结果表明缺失株 Δ*celA_{wp}* 构建成功。

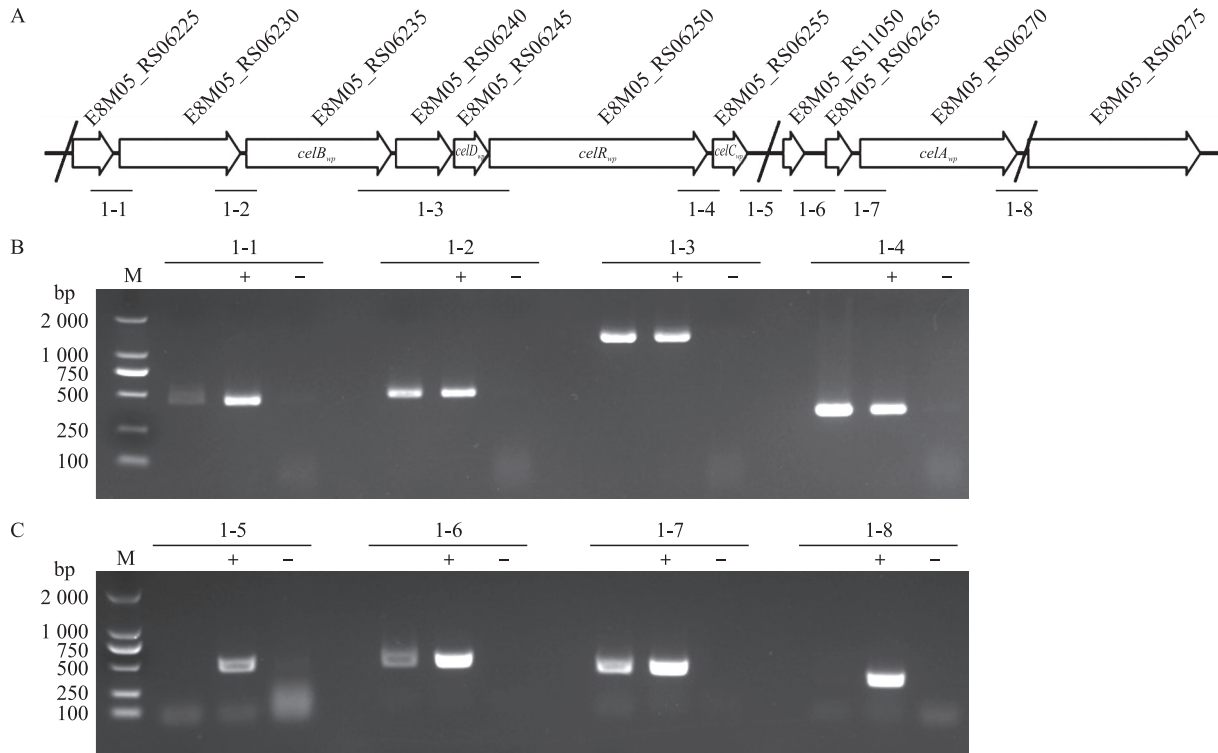


图 3 RT-PCR 验证 CL2 基因簇结构

Fig. 3 RT-PCR verification of gene cluster organization of CL2

A. CL2 基因簇结构(黑色横线表示 RT-PCR 中所用引物扩增的序列,相邻黑色斜线代表它们之间的基因为 1 个操纵子);
 B、C. RT-PCR 验证 CL2 基因簇结构(M. DNA 标准品;+, 阳性对照;- 阴性对照。1-1、1-2、1-3、1-4、1-5、1-6、1-7 和 1-8 指引物对)。

A. The gene cluster organization of CL2(The black line indicates the sequence amplified by primer pairs in RT-PCR,the adjacent black slash indicates an operon);B,C. RT-PCR verification of CL2(M. DNA marker;+. Positive control;- Negative control. 1-1,1-2, 1-3,1-4,1-5,1-6,1-7 and 1-8 mean primer pairs).

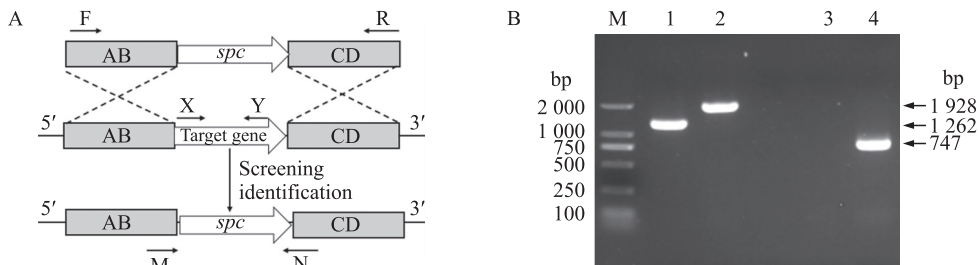


图 4 缺失株 $\Delta celA_{wp}$ PCR 鉴定

Fig. 4 PCR identification of $\Delta celA_{wp}$

A. 巴氏链球菌缺失株构建方法图;B. $\Delta celA_{wp}$ 的 PCR 鉴定(1.引物为 C_{elA}-M/N,模板为 $\Delta celA_{wp}$;2.引物为 C_{elA}-M/N,模板为野生株;3.引物为 C_{elA}-X/Y,模板为 $\Delta celA_{wp}$;4.引物为 C_{elA}-X/Y,模板为野生株)。

A. A deletion mutant method for *S. pasteurianus*; B. Identification of $\Delta celA_{wp}$ (1. Primer: C_{elA}-M/N, template: $\Delta celA_{wp}$; 2. Primer: C_{elA}-M/N, template: wild strain; 3. Primer: C_{elA}-X/Y, template: $\Delta celA_{wp}$; 4. Primer: C_{elA}-X/Y, template: wild strain).

2.5 $celA_{wp}$ 对巴氏链球菌 WUSP067 生长的影响

如图 5-A 所示,在 10 mL THB 液体培养基中,将 WUSP067 野生株和缺失株 $\Delta celA_{wp}$ 在 37 °C、180 r·min⁻¹ 摇床中培养,每隔 2 h 测定 D_{600} 值,结果表明缺失基因 $celA_{wp}$ 对 WUSP067 在 THB 中生长没有影响。

如图 5-B 和 5-C 所示:在以葡萄糖为唯一碳源的培养条件下,缺失株生长情况与野生株一致;在纤维二糖为唯一碳源的条件,野生株能够生长,而 $\Delta celA_{wp}$ 则表现出明显的生长缺陷,生长 12 h 时 D_{600} 低于 0.5。以上结果表明,巴氏链球菌 WUSP067 能以纤维二糖为唯一碳源生长, $celA_{wp}$ 基因参与纤维二糖的利用,缺失该基因影响巴氏链球菌对纤维二糖的吸收与利用。

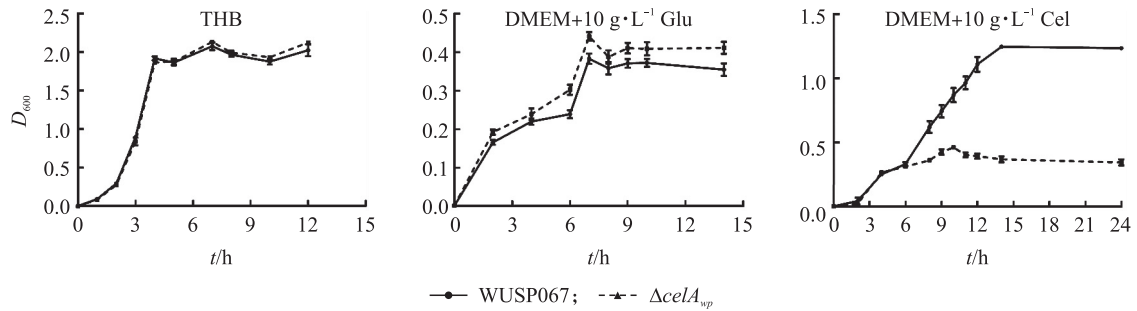


图5 WUSP067 和 $\Delta celA_{wp}$ 在不同培养基条件下的生长曲线

Fig. 5 Growth curve of WUSP067 and $\Delta celA_{wp}$ under different media conditions

A. THB 培养基; B. 以葡萄糖为唯一碳源的 DMEM 培养基; C. 以纤维二糖为唯一碳源的 DMEM 培养基。

A. THB medium; B. DMEM medium supplemented with $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ glucose as a sole carbon source; C. DMEM medium supplemented with $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ cellobiose as a sole carbon source.

2.6 $celA_{wp}$ 对巴氏链球菌 WUSP067 毒力的影响

以 ICR 断奶仔鼠为感染模型进行 WUSP067 野生株和缺失株 $\Delta celA_{wp}$ 的毒力试验。结果如图 6 所示,攻毒剂量为每鼠 3×10^8 CFU,攻毒后野生株攻毒小鼠 3 日内全部死亡,缺失株 $\Delta celA_{wp}$ 攻毒小鼠死亡时间延后,14 d 后存活率 20%,与野生株相比差异显著 ($P < 0.05$)。此结果表明, $celA_{wp}$ 基因影响巴氏链球菌 WUSP067 的致病性,缺失该基因其毒力减弱。

3 讨论

目前,在链球菌属中,只有肺炎链球菌和变异链球菌中有纤维二糖利用基因簇的报道^[22-23]。在变异链球菌中仅有纤维二糖利用基因簇 CL2,且未见其与致病性相关报道。猪源巴氏链球菌 WUSP067 中 CL2 与变异链球菌 CL2 各基因的覆盖率在 90% 以上,氨基酸同源性为 56%~90%。当前,猪源巴氏链球菌全基因组序列仅有 WUSP067 (GenBank ID: NZ_CP039457.1) 和 WUSP074 (GenBank ID: NZ_CP116958.1) 2 株菌, WUSP074 也有纤维二糖利用基因簇 CL1 和 CL2,其 CL1 与 WUSP067 的 CL1 覆盖率和氨基酸同源性均为 100%,其 CL2 与 WUSP067 的 CL2 覆盖率 90%,氨基酸同源性为 56%~100%。

在肺炎链球菌中,纤维二糖转运和利用的基因簇主要有 2 个,都包含编码 PTS 中的酶 II 复合物和 6-磷酸- β -葡萄糖苷酶的基因,前者负责纤维二糖的识别、磷酸化和转运,后者则将磷酸化后的纤维二糖水解为单糖供细胞利用^[20,24]。它们在调控方式上分为 2 种:一种是通过抗转录终止子蛋白调控,纤维二糖存在时被激活,抑制转录终止子的形成从而促进后续基因的表达^[21,25];另一种则是通过转录激活子 $celR$ 调控, $celR$ 被纤维二糖激活后结合在纤维二糖利用操纵子的启动子区域,促进相关基因的表达,这种正调控方式也存在于变异链球菌和嗜热杆菌中,而艰难梭菌中 $celR$ 是作为转录抑制子直接结合在纤维二糖操纵子的启动子区域来抑制基因的表达^[17,26-28]。本试验通过同源性分析发现巴氏链球菌 WUSP067 中预测存在 2 个潜在的纤维二糖利用基因簇 CL1 和 CL2,预测其调控方式分别与第 1 种和第 2 种类似。从本研究中发现, CL1 中 $BglP1_{wp}$ 、 $BglA_{wp}$ 基因不能感应纤维二糖,而 CL2 中的 $celB_{wp}$ 和 $celA_{wp}$ 基因能感应纤维二糖,表达量上调极显著,有助于巴氏链球菌 WUSP067 利用纤维二糖,表明 CL2 与纤维二糖利用相关。纤维二糖的利用与细菌的致病性相关:肺炎克雷伯菌中缺失 $celB$ 基因(编码酶 II C)后在肠道定殖能力减弱^[16];肺炎链球菌中,缺失 $BglA3$ (编码 β -葡萄糖苷酶)导致该菌对小鼠的致病性减弱^[18];艰难梭菌中, $celA$ (编码酶 II B)突变株因无法在肠道中获取纤维二糖而表现出定殖劣势^[17];李斯特菌中,纤维二糖通过抑制毒力基因激活子 PrfA 来抑制相关毒力基因的表达^[29]。本试验结果表明, $celA_{wp}$ (编码 6-磷酸- β -葡萄糖苷酶)缺失后,巴氏链球菌在纤维二糖为唯一碳源的培养条件下表现出明显生长缺陷,说明 $celA_{wp}$ 在纤维二糖的利用中发挥重要作用,随后通过小鼠致病性试验明确 $celA_{wp}$ 是巴氏链球菌 WUSP067 的毒力因子。

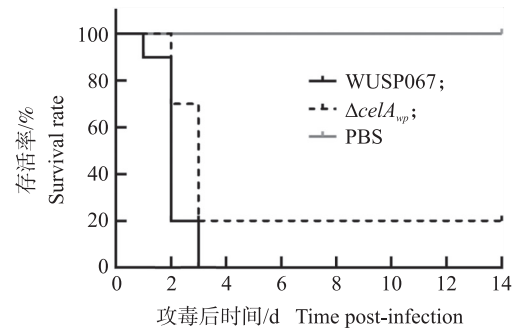


图6 小鼠存活曲线

Fig. 6 The survival curve of mice

目前,由于尚无巴氏链球菌互补株构建方法,本试验仅构建了 CL2 基因簇中 *celA_{wp}* 基因的缺失株,明确该基因与巴氏链球菌 WUSP067 纤维二糖的利用和其致病性相关,后续还应对 *celA_{wp}* 编码的 6-磷酸-β 葡萄糖苷酶的酶活性进行测定,进一步明确其功能。巴氏链球菌可存在于猪的肠道中^[30],故 *celA_{wp}* 基因是否能通过利用纤维二糖促进巴氏链球菌在肠道中的竞争优势,帮助该菌在肠道中定殖,从而增强其致病性有待后续深入研究。此外,关于 CL2 的调控方式及该基因簇中其他基因的功能也值得进一步的探究。

综上,本试验结果明确猪源巴氏链球菌 WUSP067 能以纤维二糖为唯一碳源生长,CL2 是纤维二糖利用相关基因簇,其中 *celA_{wp}* 基因促进该菌利用纤维二糖,对该菌生长和毒力有显著影响,表明其在巴氏链球菌致病过程中发挥作用。

参考文献 References:

- [1] Poyart C, Quesne G, Trieu-Cuot P. Taxonomic dissection of the *Streptococcus bovis* group by analysis of manganese-dependent superoxide dismutase gene (*sodA*) sequences; reclassification of '*Streptococcus infantarius* subsp. coli' as *Streptococcus lutetiensis* sp. nov. and of *Streptococcus bovis* biotype 11.2 as *Streptococcus pasteurianus* sp. nov.[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2002, 52(4): 1247-1255.
- [2] Schlegel L, Grimont F, Ageron E, et al. Reappraisal of the taxonomy of the *Streptococcus bovis*/*Streptococcus equinus* complex and related species: description of *Streptococcus gallolyticus* subsp. *gallolyticus* subsp. nov., *S. gallolyticus* subsp. *macedonicus* subsp. nov. and *S. gallolyticus* subsp. *pasteurianus* subsp. nov.[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2003, 53(3): 631-645.
- [3] Li M X, Gu C Q, Zhang W P, et al. Isolation and characterization of *Streptococcus gallolyticus* subsp. *pasteurianus* causing meningitis in ducklings[J]. Veterinary Microbiology, 2013, 162(2/3/4): 930-936.
- [4] Saumya D, Wijetunge S, Dunn P, et al. Acute septicemia caused by *Streptococcus gallolyticus* subsp. *pasteurianus* in Turkey poult[J]. Avian Diseases, 2014, 58(2): 318-322.
- [5] Gherardi G, Palmieri C, Marini E, et al. Identification, antimicrobial resistance and molecular characterization of the human emerging pathogen *Streptococcus gallolyticus* subsp. *pasteurianus*[J]. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease, 2016, 86(4): 329-335.
- [6] Matesanz M, Rubal D, Iñiguez I, et al. Is *Streptococcus bovis* a urinary pathogen? [J]. European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases, 2015, 34(4): 719-725.
- [7] Hede S V, Olarte L, Chandramohan L, et al. *Streptococcus gallolyticus* subsp. *pasteurianus* infection in twin infants[J]. Journal of Clinical Microbiology, 2015, 53(4): 1419-1422.
- [8] Takamura N, Kenzaka T, Minami K, et al. Infective endocarditis caused by *Streptococcus gallolyticus* subspecies *pasteurianus* and colon cancer[J]. Case Reports, 2014; bcr2013203476.
- [9] Tarakçı N, DağH T, Uğur A R, et al. Late-onset *Streptococcus pasteurianus* sepsis in a preterm baby in a neonatal intensive care unit[J]. Turk Pediatri Arsivi, 2014, 49(2): 157-159.
- [10] Wang S Y, Ma M H, Liang Z J, et al. Pathogenic investigations of *Streptococcus pasteurianus*, an underreported zoonotic pathogen, isolated from a diseased piglet with meningitis[J]. Transboundary and Emerging Diseases, 2022, 69(5): 2609-2620.
- [11] Ma M H, Wang S Y, Zhu X C, et al. The identification of *Streptococcus pasteurianus* obtained from six regions in China by multiplex PCR assay and the characteristics of pathogenicity and antimicrobial resistance of this zoonotic pathogen[J]. Pathogens, 2023, 12(4): 615.
- [12] Flint H J, Scott K P, Duncan S H, et al. Microbial degradation of complex carbohydrates in the gut[J]. Gut Microbes, 2012, 3(4): 289-306.
- [13] Nakamura S, Oku T, Ichinose M. Bioavailability of cellobiose by tolerance test and breath hydrogen excretion in humans[J]. Nutrition, 2004, 20(11/12): 979-983.
- [14] Kiliç A O, Tao L, Zhang Y S, et al. Involvement of *Streptococcus gordonii* beta-glucoside metabolism systems in adhesion, biofilm formation, and *in vivo* gene expression[J]. Journal of Bacteriology, 2004, 186(13): 4246-4253.
- [15] Keyhani N O, Roseman S. Wild-type *Escherichia coli* grows on the chitin disaccharide, *N,N'*-diacetylchitobiose, by expressing the *cel* operon[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1997, 94(26): 14367-14371.
- [16] Wu M C, Chen Y C, Lin T L, et al. Cellobiose-specific phosphotransferase system of *Klebsiella pneumoniae* and its importance in biofilm formation and virulence[J]. Infection and Immunity, 2012, 80(7): 2464-2472.
- [17] Hasan M K, Dhungel B A, Govind R. Characterization of an operon required for growth on cellobiose in *Clostridioides difficile*[J]. Microbiology, 2021, 167(8): 001079.
- [18] Terra V S, Zhi X Y, Kahya H F, et al. Pneumococcal 6-phospho-β-glucosidase (BglA3) is involved in virulence and nutrient metabolism[J]. Infection and Immunity, 2015, 84(1): 286-292.
- [19] Diagne A M, Pelletier A, Durmort C, et al. Identification of a two-component regulatory system involved in antimicrobial peptide resistance in *Streptococcus pneumoniae*[J]. PLoS Pathogens, 2022, 18(4): e1010458.
- [20] Bidossi A, Mulas L, Decorosi F, et al. A functional genomics approach to establish the complement of carbohydrate transporters in *Streptococcus pneumoniae*[J]. PLoS One, 2012, 7(3): e33320.
- [21] Yu W L, Jiang Y L, Pikis A, et al. Structural insights into the substrate specificity of a 6-phospho-β-glucosidase BglA-2 from *Streptococcus*

- pneumoniae* TIGR4[J]. The Journal of Biological Chemistry, 2013, 288(21):14949-14958.
- [22] Old L A, Lowes S, Russell R R B. Genomic variation in *Streptococcus mutans*; deletions affecting the multiple pathways of β -glucoside metabolism[J]. Oral Microbiology and Immunology, 2006, 21(1):21-27.
- [23] Bidossi A, Mulas L, Decorosi F, et al. A functional genomics approach to establish the complement of carbohydrate transporters in *Streptococcus pneumoniae*[J]. PLoS One, 2012, 7(3):e33320.
- [24] Deutscher J, Aké F M D, Derkaoui M, et al. The bacterial phosphoenolpyruvate:carbohydrate phosphotransferase system; regulation by protein phosphorylation and phosphorylation-dependent protein-protein interactions[J]. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 2014, 78(2):231-256.
- [25] Rothe F M, Wrede C, Lehnik-Habrink M, et al. Dynamic localization of a transcription factor in *Bacillus subtilis*; the LicT antiterminator relocates in response to inducer availability[J]. Journal of Bacteriology, 2013, 195(10):2146-2154.
- [26] Shafeeq S, Kloosterman T G, Kuipers O P. CelR-mediated activation of the cellobiose-utilization gene cluster in *Streptococcus pneumoniae*[J]. Microbiology, 2011, 157(10):2854-2861.
- [27] Boianelli A, Bidossi A, Gualdi L, et al. A non-linear deterministic model for regulation of diauxic lag on cellobiose by the pneumococcal multidomain transcriptional regulator CelR[J]. PLoS One, 2012, 7(10):e47393.
- [28] Zeng L, Burne R A. Transcriptional regulation of the cellobiose operon of *Streptococcus mutans*[J]. Journal of Bacteriology, 2009, 191(7):2153-2162.
- [29] Cao T, Joyet P, Aké F, et al. Studies of the *Listeria monocytogenes* cellobiose transport components and their impact on virulence gene repression[J]. Microbial Physiology, 2019, 29(1/2/3/4/5/6):10-26.
- [30] Holman D B, Kommadath A, Tingley J P, et al. Novel insights into the pig gut microbiome using metagenome-assembled genomes[J]. Microbiology Spectrum, 2022, 10(4):e0238022.

责任编辑:周广礼