

周俊明,何孔旺,倪艳秀,等. 次黄嘌呤核苷酸脱氢酶对猪链球菌 2 型 ZY05719 基因转录谱的影响[J]. 江苏农业科学,2017,45(6):27-29.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2017.06.005

次黄嘌呤核苷酸脱氢酶对猪链球菌 2 型 ZY05719 基因转录谱的影响

周俊明,何孔旺,倪艳秀,祝昊丹,俞正玉,茅爱华,吕立新

(江苏省农业科学院兽医研究所/农业部兽用生物制品工程技术重点实验室/国家兽用生物制品工程技术研究中,江苏南京 210014)

摘要:次黄嘌呤核苷酸脱氢酶(IMPDH)是猪链球菌 2 型的毒力相关因子,该基因的丢失降低了猪链球菌 2 型菌株 ZY05719 黏附 HEp-2、PK15 细胞的能力。为全面掌握 IMPDH 对 ZY05719 致病力的影响机制,采用定制的 Agilent 猪链球菌 2 型基因表达谱芯片,比较了亲本菌株 ZY05719(ZY)和 *impdh* 敲除菌株(Δ ZY)的基因转录情况。结果显示,*impdh* 的丢失影响了 254 个基因的转录,其中包括 *impdh* 的下调基因 177 个,上调基因 77 个。对差异基因进行同类群聚类(Clusters of Orthologous Groups, COG)分析,显示差异基因主要集中于氨基酸、碳水化合物的转运代谢,以及核糖体、细胞壁、细胞膜的生物合成和防御机制。本研究较为全面地分析了 *impdh* 对猪链球菌 2 型基因转录谱的影响,为解释 *impdh* 在猪链球菌致病中发挥的作用提供了数据支持。

关键词:猪链球菌 2 型;表达谱芯片;同类群聚类;次黄嘌呤核苷酸脱氢酶;基因转录谱

中图分类号: S858.285.1⁺1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2017)06-0027-03

猪链球菌(*Streptococcus suis*)是有荚膜的革兰氏阳性球菌,是世界范围内流行的一种重要的猪病原菌^[1],该菌往往引起保育猪或断奶仔猪发生脑膜炎、败血症、关节炎^[2]。依据荚膜多糖抗原可将 *S. suis* 分为 33 个血清型(包括 1~31、33、1/2 型)^[3],其中 *S. suis* 2 致病力最强、流行范围最广,并且能够引起人发生脑膜炎和严重的毒性休克综合征^[4-6]。1998、2005 年分别在我国江苏省、四川省部分地区暴发了人感染猪链球菌病,病原菌即为猪链球菌 2 型^[7]。*S. suis* 已成为越南南部地区成人细菌性脑膜炎的主要病因^[8],人可通过与发病猪的直接接触感染 *S. suis*,而人与人之间的传播目前尚未得到证实。对 *S. suis* 2 的研究陆续发现了荚膜、溶血素、纤连蛋白结合蛋白、血清浑浊因子等毒力相关因子^[9]。笔者所在研究室的前期工作中,对 SS2-H、ZY05719 菌株的 *impdh* 基因进行敲除,发现与亲本株相比,缺失株对猪的致病力均有所下降,提出 IMPDH 为 *S. suis* 2 的毒力相关因子^[10-11],但 IMPDH 对 *S. suis* 2 致病力的影响还缺少系统性认识。本研究采用猪链球菌 2 型的表达谱芯片,比较了亲本菌株 ZY05719(ZY)和 *impdh* 敲除菌株(Δ ZY)的基因转录谱,并对差异基因进行了归类分析。

1 材料与方法

1.1 细菌培养

本研究涉及 2 株猪链球菌 2 型菌株,包括强毒菌株 ZY、

Δ ZY。ZY 为 2005 年分离自四川省资阳市发生猪链球菌病的猪组织(由南京农业大学动物医学院微生物组惠赠); Δ ZY 为敲除 *impdh* 的 ZY 菌株,由笔者所在研究室构建获得。

细菌在 THB(Todd-Heitt broth, BD)平板上进行培养,无菌挑取菌落进入 THB 液体培养基中,于 37℃ 下培养过夜。将此培养物按照 1% 的接种比例接入新的 THB 液体培养基中,于 37℃ 下培养至细菌对数生长期,革兰氏染色观察细菌形态。

1.2 RNA 提取和纯化

采用 TRIzol Reagent(Life technologies, US)并根据生产厂商提供的标准操作流程进行样品的细菌总 RNA 抽提。采用 Biomate 3S 型微量紫外可见分光光度计(Thermo, US)测定抽提所得总 RNA 样品的浓度及 $D_{260\text{ nm}}/D_{280\text{ nm}}$ 比值,另外经 Agilent Bioanalyzer 2100 型电泳(Agilent technologies, US)质检合格后使用 RNeasy mini kit(Qiagen, Germany)和 RNase-Free DNase Set(Qiagen, Germany),纯化总 RNA。

1.3 样品 RNA 的放大和标记

采用 Agilent 表达谱芯片配套试剂盒、Low RNA Input Linear Amplification kit(Agilent technologies, US)、5-(3-aminallyl)-UTP(Ambion, US)、Cy3 NHS ester(GE healthcare Biosciences, US),按照标准操作流程对样品总 RNA 中的 mRNA 进行放大和标记,并用 RNeasy mini kit(QIAGEN, Germany)纯化标记后的 cRNA。

1.4 芯片杂交

依据 SS2-05ZYH33 菌株基因序列,定制 Agilent 公司的 8×15 kbp 表达谱芯片,该芯片包含 2 178 个探针(每个探针含 60 个碱基)。按照 Agilent 表达谱芯片配套提供的杂交标准流程和配套试剂盒,采用 Gene Expression Hybridization Kit(Agilent technologies, US),在 Hybridization Oven 型滚动杂交炉(Agilent technologies, US)中以 65℃、10 r/min 滚动杂交

收稿日期:2016-02-15

基金项目:公益性行业(农业)科研专项(编号:201303041);江苏省自主创新探索性研究项目(编号:CX[11]2060)。

作者简介:周俊明(1983—),男,江苏东台人,硕士,助理研究员,主要从事动物细菌疫病防治研究。Tel:(025)84390988;E-mail:zhoujm075@163.com。

17 h,杂交 cRNA 上样量为 1.65 μg,并在 staining dishes 型洗缸(Thermo Shandon,US)中洗片,洗片所用试剂为 Gene Expression Wash Buffer Kit(Agilent technologies,US)、Stabilization and Drying Solution(Agilent technologies,US)。

1.5 结果扫描

完成杂交的芯片采用 Agilent Microarray Scanner(Agilent technologies,US)进行扫描,用 Feature Extraction software 10.7 软件(Agilent technologies,US)读取数据,最后采用 Gene Spring Software 11.0 软件(Agilent technologies,US)对数据进行 Quantile 算法的归一化处理。每个菌株设 3 个重复,比较亲本株与缺失株之间差异 2 倍以上且具有统计学意义($P < 0.05$)的基因。以上内容均由上海伯豪生物技术有限公司完成。

1.6 差异基因的同类群聚类(COG)

参照文献[12]中的方法,将上述筛选的差异基因进行同源群聚类(clusters of orthologous groups,COG)分析。

1.7 数据统计方法

对 ZY、ΔZY 2 组样品的 3 个重复分别采用随机方差 t -检验,测算 2 组样品间每个转录本差异表达的显著性强程度,差异基因 $P < 0.05$ 有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 细菌形态

ZY 与 ΔZY 经过革兰氏染色,通过显微镜观察 1 000 倍放大下的形态,可见蓝紫色球菌排列成链状的细菌,ΔZY 成链稍长于 ZY(图 1)。

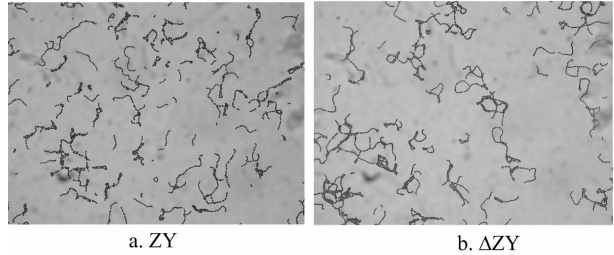


图1 显微镜下放大 1 000 倍的细菌形态

2.2 RNA 的质量检测

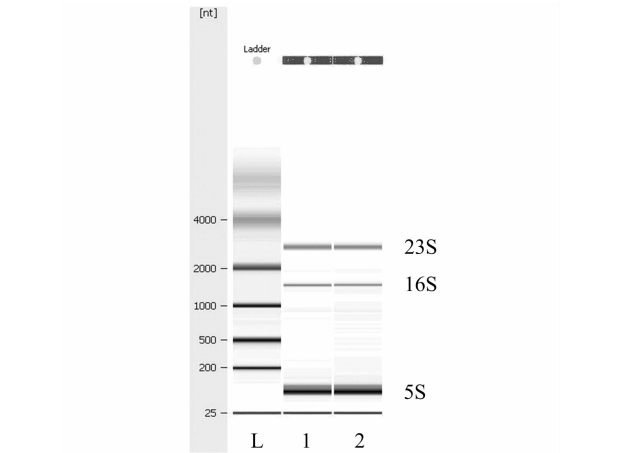
提取生长对数期细菌的 RNA,测定 $D_{260\text{ nm}}$ 、 $D_{280\text{ nm}}$,依据 $D_{260\text{ nm}} \times \text{稀释倍数} \times 40\text{ }\mu\text{g/mL}$ 计算 RNA 的浓度以及 $D_{260\text{ nm}}/D_{280\text{ nm}}$ 比值。每个 RNA 样品电泳后可见 3 条条带,由大到小依次为 23S、16S、5S,依据条带灰度值计算 23S/16S 比值。 $D_{260\text{ nm}}/D_{280\text{ nm}} \geq 1.8$ 、23S/16S > 0.7 为合格 RNA 样本,结果见表 1、图 2。

表 1 细菌 RNA 质量分析

样本	质量浓度 (μg/μL)	体积 (μL)	总量 (μg)	$D_{260\text{ nm}}/D_{280\text{ nm}}$	23S/16S
ZY	1.508	100	150.8	2.08	1.7
ΔZY	1.247	100	124.7	2.09	1.7

2.3 ZY 和 ΔZY 表达谱芯片的比较

利用定制的 Agilent 表达谱芯片比较 ZY 和 ΔZY 基因的转录情况。结果表明,有 254 个基因的转录发生 2 倍以上显



L—RNA marker; 1—ZY 菌株 RNA; 2—ΔZY 菌株 RNA
图2 RNA 电泳

著水平($P < 0.05$)的变化,ΔZY 菌株中 177 个基因下调,其中 *impdh* 转录下调了 99.97% 以上,另外 ΔZY 中上调基因有 77 个。对这些差异基因进行 COG 归类,发现 *impdh* 的丢失引起了 ZY 菌株多数基因的转录下调,主要集中于氨基酸、碳水化合物转运代谢,以及核糖体、细胞壁、细胞膜的生物合成和防御机制,结果见表 2。

表 2 亲本株和缺失株差异基因的 COG 归类

功能分类	ΔZY 转录下 调探针数	ΔZY 转录 上调探针数
染色质结构和动力学(B)	1	2
能量产生与转换(C)	0	2
细胞循环控制、细胞分裂、染色体组装(D)	2	0
氨基酸转运和代谢(E)	15	6
核苷酸转运和代谢(F)	5	0
碳水化合物转运和代谢(G)	18	6
辅酶转运和代谢(H)	0	1
脂类转运和代谢(I)	0	2
翻译、核糖体结构和合成(J)	24	5
转录(K)	8	4
复制、重组、修复(L)	6	5
细胞壁、细胞膜生物合成(M)	9	0
细胞能动性(N)	1	0
蛋白质翻译后修饰、蛋白转换、伴侣素(O)	3	4
无机离子转运和代谢(P)	2	3
一般性功能预测(R)	8	4
功能未知(S)	3	0
信号传导机制(T)	2	0
细胞内运输、分泌、囊泡运输(U)	2	3
防御机制(V)	6	0
胞外结构(W)	1	0
假象蛋白(-)	37	24
无记录	24	6
总计	174	77

注:括号内为相应功能的简写代码。

3 结论与讨论

溶菌酶释放蛋白(MRP)和胞外因子(EF)早前被作为 *S. suis* 2 的毒力标记物^[13],后续研究发现,敲除这些因子的

S. suis 2 后仍对仔猪具有致病力^[14-15]。目前尚未明确 *S. suis* 2 关键的毒力标记物,从而限制了对 *S. suis* 2 致病机制的认识,同时也阻碍了该病的防控技术研究,因此对 *S. suis* 2 毒力因子的进一步研究非常重要。IMPDH 已被证实为 *S. suis* 2 一类重要的毒力相关因子,本研究通过定制 *S. suis* 2 表达谱芯片,比较了亲本株 ZY 和 *impdh* 缺失株 Δ ZY 之间转录本的差异。结果表明, Δ ZY 下调基因中直接关系到核糖体蛋白大、小亚基合成的相关基因有 18 个,占表达谱芯片此类基因总数的 32% 以上;而 Δ ZY 上调基因中没有关系到核糖体蛋白大、小亚基合成的基因。核糖体是蛋白质合成的机器,由蛋白质和 RNA 组成,提示 *impdh* 基因的丢失下调部分核糖体蛋白质编码基因的转录,可能干扰了核糖体的正常合成,影响细菌蛋白质的正常合成,前期试验表明猪链球菌 2 型菌株 GN061215 中也有类似发现^[16]。

荚膜为 *S. suis* 2 细胞壁外的结构,能够增强细菌抵抗吞噬细胞吞噬的能力,是目前较为公认的毒力因子^[17-18]。荚膜组成包括半乳糖、葡萄糖、*N*-乙酰葡萄糖胺、唾液酸,表达谱芯片中包含了荚膜合成基因(*cps2A*、*B*、*C*、*E*、*D*、*F*、*H*、*I*、*J*)和唾液酸合成基因。结果显示,与 ZY 相比, Δ ZY 中 *cps2F*、*H*、*I* 均出现 67% 以上的显著下调,提示 *impdh* 的丢失可能影响 Δ ZY 荚膜的合成。 Δ ZY 防御机制的相关基因中有 6 个下调,包括 ABC 多药转运系统、 β -内酰胺酶。ABC 系统能够摄取营养、信号分子,并能提供细菌产生耐药性,与细菌毒力密切相关^[19]; β -内酰胺酶能够水解一些药物 β -内酰胺环而使药物失活,这是病原菌常见的 β -内酰胺类抗生素(青霉素类、头孢菌素类)耐药的主要方式^[20],提示 ZY 可能比 Δ ZY 更容易产生针对此类药物的耐受力。

ZY 菌株丢失 *impdh* 基因后,引起较多基因的转录下调,且其中部分基因与细菌的致病力存在联系,较全面地解释了 Δ ZY 毒力下降的现象。

致谢:感谢华中农业大学金梅林教授提供猪链球菌 2 型 SS2-05ZYH33 基因表达谱芯片探针序列。

参考文献:

- [1] Gottschalk M. Streptococcocis [M]//Straw B E, Zimmerman J J, D'Allaire S, et al. Diseases of swine. Ames, IA, USA: Blackwell Publishing, 2012: 841-855.
- [2] Wertheim H F, Nghia H D, Taylor W A. *Streptococcus suis*: an emerging human pathogen[J]. Clinical Infectious Diseases, 2009, 48(5): 617-625.
- [3] Hill J E, Gottschalk M, Brousseau R, et al. Biochemical analysis, *cpn60* and 16S rDNA sequence data indicate that *Streptococcus suis* serotypes 32 and 34, isolated from pigs, are *Streptococcus orisratti*[J]. Veterinary Microbiology, 2005, 107(1/2): 63-69.
- [4] Wei Z G, Li R, Zhang A D, et al. Characterization of *Streptococcus suis* isolates from the diseased pigs in China between 2003 and 2007[J]. Veterinary Microbiology, 2009, 137(1/2): 196-201.
- [5] Kim D, Han K, Oh Y, et al. Distribution of capsular serotypes and virulence markers of *Streptococcus suis* isolated from pigs with polyserositis in Korea[J]. Canadian Journal of Veterinary Research - Revue Canadienne de Recherche Veterinaire, 2010, 74(4): 314-316.
- [6] Gottschalk M, Lacouture S, Bonifait L, et al. Characterization of *Streptococcus suis* isolates recovered between 2008 and 2011 from diseased pigs in Quebec, Canada[J]. Veterinary Microbiology, 2013, 162(2/3/4): 819-825.
- [7] Yu H J, Jing H Q, Chen Z H, et al. Human *Streptococcus suis* outbreak, Sichuan, China[J]. Emerging Infectious Diseases, 2006, 12(6): 914-920.
- [8] Mai N T, Hoa N T, Nga T V, et al. *Streptococcus suis* meningitis in adults in Vietnam[J]. Clinical Infectious Diseases, 2008, 46(5): 659-667.
- [9] Feng Y J, Zhang H M, Wu Z W, et al. *Streptococcus suis* infection an emerging/reemerging challenge of bacterial infectious diseases? [J]. Virulence, 2014, 5(4): 477-497.
- [10] Zhang X H, He K W, Duan Z T, et al. Identification and characterization of inosine 5-monophosphate dehydrogenase in *Streptococcus suis* type 2[J]. Microbial Pathogenesis, 2009, 47(5): 267-273.
- [11] Zhou J M, Zhang X E, He K W, et al. Characterization and proteome analysis of inosine 5-monophosphate dehydrogenase in epidemic *streptococcus suis* serotype 2[J]. Current Microbiology, 2014, 68(5): 663-669.
- [12] Willenborg J, Fulde M, de Greeff A, et al. Role of glucose and CcpA in capsule expression and virulence of *Streptococcus suis* [J]. Microbiology, 2011, 157(6): 1823-1833.
- [13] Vecht U, Wisselink H J, Jellema M L, et al. Identification of two proteins associated with virulence of *Streptococcus suis* type 2[J]. Infection and Immunity, 1991, 59(9): 3156-3162.
- [14] 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 [J]. Canadian Journal of Veterinary Research - Revue Canadienne de Recherche Veterinaire, 2005, 69(3): 236-240.
- [15] Smith H E, Vecht U, Wisselink H J, et al. Mutants of *Streptococcus suis* types 1 and 2 impaired in expression of muramidase-released protein and extracellular protein induce disease in newborn germfree pigs[J]. Infection and Immunity, 1996, 64(10): 4409-4412.
- [16] 周俊明, 何孔旺, 倪艳秀, 等. 次黄嘌呤核苷酸脱氢酶对猪链球菌 2 型 GN061215 生物学特性及蛋白质表达的影响[J]. 江苏农业学报, 2013, 29(1): 114-120.
- [17] Charland N, Harel J, Kobisch M, et al. *Streptococcus suis* serotype 2 mutants deficient in capsular expression [J]. Microbiology, 1998, 144(Pt 2): 325-332.
- [18] Smith H E, Damman M, van der Velde J, et al. Identification and characterization of the *cps* locus of *Streptococcus suis* serotype 2: the capsule protects against phagocytosis and is an important virulence factor[J]. Infection and Immunity, 1999, 67(4): 1750-1756.
- [19] Davidson A L, Chen J. ATP-binding cassette transporters in bacteria[J]. Annual Review of Biochemistry, 2004, 73: 241-268.
- [20] Fernandez-Rojas M A, Vaca S, Reyes-Lopez M A, et al. Outer membrane vesicles of *Pasteurella multocida* contain virulence factors [J]. MicrobiologyOpen, 2014, 3(5): 711-717.