

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2017.17131

尼罗罗非鱼无乳链球菌基因缺失株 $\Delta cpsE$ 和 $\Delta neuA$ 的构建及其生物学特性

师红亚^{1,2}, 董浚键¹, 张德锋¹, 孙成飞¹, 田园园¹, 曾庆凯¹, 卢迈新¹, 叶星¹

1. 中国水产科学研究院 珠江水产研究所, 农业部热带亚热带水产资源利用与养殖重点实验室, 广东 广州 510380;

2. 上海海洋大学 水产与生命学院, 上海 201306

摘要: 为探究尼罗罗非鱼无乳链球菌(GBS)荚膜多糖合成基因 *cpsE* 和 *neuA* 对菌株生物学特性的影响, 本研究利用同源重组的方法, 构建了 GBS 的 *cpsE* 与 *neuA* 的单基因缺失突变株。具体方法为: 用 Infusion-PCR 的方法分别构建带有氯霉素抗性基因的 *cpsE* 与 *neuA* 基因敲除重组质粒 pSET4s-*cpsE* 和 pSET4s-*neuA*。将构建好的质粒电转化入 GBS 感受态细胞中, 通过改变培养温度实现双交换和质粒丢失, 最后经氯霉素抗性筛选获得疑似敲除株。通过菌落 PCR、RT-PCR 及 DNA 测序等方法对疑似敲除株进行验证。结果显示 GBS 的两个突变株 $\Delta cpsE$ 和 $\Delta neuA$ 被成功构建。在此基础上, 通过生物学功能分析比较基因缺失突变株 $\Delta cpsE$ 、 $\Delta neuA$ 与野生株在菌株生长速率、荚膜多糖厚度、唾液酸含量和毒力方面的差异。结果发现缺失突变株 $\Delta cpsE$ 和 $\Delta neuA$ 的生长速度与野生株无显著差异, 但荚膜多糖厚度、唾液酸含量和菌株毒力均显著低于野生株。进一步研究显示, *cpsE* 是鱼源 GBS 荚膜多糖合成的关键基因, *neuA* 基因则是荚膜多糖唾液酸化的关键基因, 它们的缺失导致了 GBS 荚膜唾液酸含量的降低, 且显著降低了菌株的毒力。

关键词: 尼罗罗非鱼; 无乳链球菌; 荚膜多糖合成基因; 基因敲除; 生物学特性

中图分类号: S917

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2017)05-0977-11

无乳链球菌(*Streptococcus agalactiae*)为兼性厌氧革兰氏阳性菌, 又被称为 B 群链球菌(group B *Streptococcus*, GBS)。它可引起人类的败血症、肺炎及脑膜炎等疾病, 也是引起猪、牛等陆生脊椎动物和鱼类等水生动物链球菌病的主要病原菌^[1-2]。根据 GBS 荚膜多糖的特性已鉴定出 10 种血清型, 分别为 Ia, Ib, II-IX, 其中对鱼类具有较强致病性的为 Ia^[3]、Ib^[4-5]和 III 型^[6]。近年来, 无乳链球菌病诱发的养殖罗非鱼疾病发病率和死亡率极高, 严重影响到养殖经济效益, 并威胁着罗非鱼养殖业的健康发展^[7-8]。

已知 GBS 重要的毒力因子有荚膜多糖(capsular

polysaccharides, CPs)、CAMP 因子、表面免疫原性蛋白 Sip、C 抗原 α 蛋白(*bca* 基因编码蛋白)和 C5a 肽酶(ScpB)等^[9-12]。绝大多数 GBS 的荚膜多糖由 4 种单糖组成, 分别为葡萄糖、半乳糖、N-乙酰葡萄糖胺和一个末端保守的唾液酸。唾液酸化的荚膜多糖对 GBS 的毒力起着重要作用^[13]。GBS 荚膜多糖的合成受 16 个 *cps* (capsular polysaccharide synthesis)基因的控制, 包括 *cpsA~cpsL* 和 *neuA~neuD* 基因。其中 *cpsA~cpsJ* 和 *cpsL* 编码蛋白负责合成及转运葡萄糖、半乳糖、N-乙酰葡萄糖胺至脂质载体上, *cpsK* 基因则编码唾液酸转移酶, 负责将由 *neuA~neuD* 编码蛋白合成的唾液酸单糖衍生物转移至多糖的末端^[14]。*cpsE* 编码半乳糖转

收稿日期: 2017-03-29; 修订日期: 2017-04-11.

基金项目: 国家自然科学基金项目(NSFC)(31272688); 现代农业产业技术体系建设专项资金项目(CARS-48); 中国水产科学研究院中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金项目(2017YH-ZC06).

作者简介: 师红亚(1990-), 女, 硕士研究生, 从事水产生物技术研究. E-mail: 839782122@qq.com; 董浚键(1987-), 并列第一作者, 男, 助理研究员, 从事水产生物技术研究. E-mail: dongjj@prfri.ac.cn; shantoumaliugan@gmail.com

通信作者: 叶星, 女, 研究员, 博士生导师, 从事水产生物技术研究. E-mail: gzyexing@163.com

移酶,负责催化第一个单糖与脂质载体的偶联,从而启动多糖重复单位的合成^[15]。对 GBS、肺炎链球菌与 2 型猪链球菌的研究均发现,当 *cpsE* 基因发生突变或缺失时将导致无荚膜表型性状或唾液酸化荚膜多糖含量及菌株毒力的显著降低^[15, 16-18],说明 *cpsE* 是荚膜多糖合成的关键基因。在人源 GBS 和大肠杆菌 K1 中, *neuA* 编码胞苷酸唾液酸合成酶 (cytidine monophosphate N-acetylneuraminic acid synthetase, CMP-Sia-synthetase), 此酶具有双官能团,包括 N 端的 CMP-唾液酸转移酶合成酶和 C 端的酯酶,能催化游离的唾液酸合成 CMP-唾液酸和 O-乙酰唾液酸的脱乙酰化^[19-20]。在人源 III 型 GBS 基因缺失突变株 $\Delta neuA$ 中未检测到荚膜唾液酸的含量,而在突变株 $\Delta neuA$ 中转入 *neuA* 过表达质粒 pDCneuA 后,荚膜唾液酸的含量恢复到野生株的水平^[21],说明 *neuA* 是影响荚膜多糖唾液酸化的重要基因。

关于荚膜多糖合成基因 *cpsE* 和 *neuA* 的研究主要集中在人源 GBS, 鱼源 GBS 中这两个基因的作用尚不明确。本课题组前期克隆了 GBS 致病株 WC1535 的 *cpsE* 和 *neuA* 基因,生物信息学分析

显示, *CpsE* 具有参与催化糖基元转运的糖基转移酶超级家族结构域, *NeuA* 具有与唾液酸催化激活相关的核苷磷酸-糖基转移酶结构域;并发现在较高温度下,鱼源 GBS 荚膜唾液酸的高含量与细菌的强致病性相关。本研究以鱼源致病株 WC1535 为对象,利用同源重组技术构建基因缺失突变株 $\Delta cpsE$ 和 $\Delta neuA$, 并对其生物学特性进行分析,以揭示鱼源 GBS *cpsE* 和 *neuA* 基因对荚膜唾液酸含量及菌株致病性的影响,以促进对鱼源 GBS 致病机制的了解。

1 材料与方法

1.1 GBS 菌株和质粒

如表 1 所示,GBS 菌株为 WC1535(16S rRNA 基因序列 GenBank 登录号为 NZ_CP016501),其分子血清型为 Ia,由本所水产养殖与营养研究室罗非鱼课题组分离与保存。大肠杆菌 DH5 α 购自 Takara 公司,温敏型自杀质粒 pSET4s 和 pSET1s 由日本动物卫生研究所(National Institute of Animal Health, NIAH-Japan) Daisuke Takamatsu 博士惠赠^[22-23]。

表 1 本实验中使用的菌株和质粒
Tab. 1 Strains and plasmids used in this study

菌种和质粒 strain or plasmid	特征或功能 features or functions	参考文献或来源 reference or source
菌株 strain		
无乳链球菌 <i>Streptococcus</i>		
WT	无乳链球菌 WC1535 野生株 <i>S. agalactiae</i> WC1535 wild-type	[5]
$\Delta cpsE$	无乳链球菌突变株 $\Delta cpsE$ <i>S. agalactiae</i> mutant $\Delta cpsE$	本研究 this study
$\Delta neuA$	无乳链球菌突变株 $\Delta neuA$ <i>S. agalactiae</i> mutant $\Delta neuA$	本研究 this study
大肠杆菌 <i>Escherichia coli</i>		
<i>E. coli</i> DH5 α	感受态细胞 <i>E. coli</i> 用于质粒转染及克隆 competent <i>E. coli</i> for plasmid transformation and cloning	TaKaRa
质粒 plasmid		
pSET4s	温敏自杀型质粒 temperature-sensitive suicide plasmid	[22]
pSET1s	温敏自杀型质粒 temperature-sensitive suicide plasmid	[23]

1.2 实验用鱼

实验用尼罗罗非鱼购于广东罗非鱼良种场,体重为 6~8 g,实验前在室内养殖条件下暂养观察 2 周。实验前抽样检测确认实验鱼不携带 GBS、寄生虫等病原。随机分为 4 组(3 个处理组和 1 个对照组,每组 3 个重复,每个重复 30 尾鱼)。隔天换水约 1/3,溶氧保持在 5.0 mg/L 以上, pH 7.0~

8.0,水温(30 $\pm$ 2) $^{\circ}$ C,每天投喂饲料 2 次,每次约为鱼体质量的 3%。

1.3 引物的设计与合成

运用生物软件(<http://www.clontech.com>)设计构建重组质粒所用的引物对(表 2),采用生物软件 Primer 5.0 设计筛选基因缺失突变株所用的引物对(表 3),本研究所用的引物均由上海生工生物工

表 2 重组质粒构建所用引物表
Tab. 2 List of oligonucleotide primers used in the construction of recombinant plasmid

引物名称 primer	引物序列 (5'-3') primer sequence (5'-3')
cpsE-up-F	TACCGAGCTCGAATTTATTAATTGATGCGGATACTAGGAAC
cpsE-up-R	AGCTCTAGTTTCGGTGTACAAGAGCCCCCTTACTTCCTT
cat-F1	CACCGAACTAGAGCTTGATGA
cat-R1	TTTCAAACCTTACCTTAATTCGATGGGTTCCGAG
cpsE-down-F	AGGTAAGGTTTGAAAAGGAATATAATG
cpsE-down-R	GACGGCCAGTGAATTGTCTGAGTAACCCGTTTGAATGA
neuA-up-F	TACCGAGCTCGAATTAATAAATTTATGATGTGCTACC
neuA-up-R	AGCTCTAGTTTCGGTGAACATATCCTTTATTTTATTTTTTTT
cat-F2	CACCGAACTAGAGCTTGAT
cat-R2	TTGGTGTCTGGAACTAATTCGATGGGTTCCGAG
neuA-down -F	GTTCCAGAACACCAAGCTA
neuA- down -R	GACGGCCAGTGAATTACGGACTACGACTGGATAT

注: 下划线处为 In-fusion PCR 的目的片段; 无下划线处为接头片段。
Note: Nucleotide sequence underlined represents the purpose fragments of In-fusion PCR, while others represent the joint fragments of In-fusion PCR.

表 3 基因缺失突变株筛选所用引物表
Tab. 3 List of oligonucleotide primers used in the screening of the strains with *cpsE* and *neuA* knocked out

引物名称 primer	引物序列(5'-3') primer sequence (5'-3')
LcpsE-F	CCTCTGTTAGGGAAGGGGAAG
LcpsE-R	GCATTCATAAACGTCGCTGG
ScpsE-F	AATGTAGAGGCACCTTAGCTTTG
ScpsE-R	CATCAACTGTGGGAGGGCGTG
LneuA-F	CTCTTGTGTATGATTTCGTAGG
LneuA-R	TGTCGTAGGTATTCTTAGTGTCT
SneuA-F	GTGATGAGAAAACCGGAACCTT
SneuA-R	ATGTTACACCACCTTGGAAT

程公司合成。

1.4 基因缺失突变株的构建

以 GBS 野生株全基因组 DNA 为模板, 分别用引物对 *cpsE*-up-F/R、*cpsE*-down-F/R 和 *neuA*-up-F/R、*neuA*-down-F/R 扩增 *cpsE* 和 *neuA* 基因上、下游 500 bp 的 DNA 序列; 同时以 pSET1s 质粒为模板, 分别用引物对 *cat*-F1/R1 和 *cat*-F2/R2 扩增氯霉素抗性基因(*cat*)。采用 Infusion-PCR 的方法将扩增到的 *cpsE* 和 *neuA* 基因上、下游序列(各 500 bp), pSET1 的 *cat* 基因序列及经 *EcoR* I 和 *Bam*H I 双酶切后的线性化载体 pSET4s 进行连接, 方法参照说明书。简述如下: 10 μ L 反应体系包括 5 $\times$ In-Fusion HD Enzyme Premix 2 μ L, Linearized Vector pSET4s 1 μ L, *cpsE*-up/*neuA*-up 1 μ L, *cat*1/*cat*2 1 μ L, *cpsE*-down/*neuA*-down 1 μ L,

ddH₂O 4 μ L。反应条件为: 15 $^{\circ}$ C 反应 50 min, 反应结束后将离心管置于冰上, 将上述 10 μ L 连接产物转化至 DH5 α 大肠杆菌感受态细胞中, 将培养物涂布在含有氯霉素(25 μ g/mL)的 LB 平板上, 筛选阳性克隆并进行菌落 PCR 鉴定。鉴定后的阳性质粒送广州艾基技术有限公司测序。

参照 Wu 和 Xu 等^[24-25]的方法制备 GBS 感受态细胞, 在 100 μ L GBS 感受态细胞中加入 1 μ g 重组质粒, 轻轻混匀后加入电转杯内, 冰浴 30 min 后电击(2250 V, 500 Ω , 25 μ F), 电击 4~6 ms 后, 迅速加入 800 μ L 含 10%蔗糖的 BHI 培养基, 转移混合液至无菌离心管中, 28 $^{\circ}$ C 200 r/min 孵育 2~3 h。将培养物涂布在含有氯霉素 (5 μ g/mL)的 BHI 平板上, 28 $^{\circ}$ C 下过夜培养至长出单菌落。

1.5 基因缺失突变株的筛选和鉴定

1.5.1 基因缺失突变株的筛选 通过温度和氯霉素抗性筛选基因缺失突变株。未整合到基因组的质粒会在 37 $^{\circ}$ C 下失活, 而基因组中不含整合质粒的野生菌株在氯霉素中无法生存, 所以经过含氯霉素的培养基 37 $^{\circ}$ C 培养可以筛选到基因缺失突变株(图 1)。

pSET4s 是温敏型自杀性质粒载体, 37 $^{\circ}$ C 时能在大肠杆菌中复制, 28 $^{\circ}$ C 时能在链球菌中复制, 但是高于 28 $^{\circ}$ C 时该质粒在链球菌中逐渐丢失。挑

取电转化的含氯霉素(5 $\mu\text{g/mL}$)BHIA 平板上生长的单菌落,接种到含氯霉素抗性的 BHI 液体培养基中,于 28 $^{\circ}\text{C}$ 200 r/min 摇床震荡培养。待其生长到对数中期后,按 1:100 比例转接到新鲜的氯霉素抗性 BHI 培养基中,37 $^{\circ}\text{C}$ 200 r/min 震荡培养 9~12 h, 倍比稀释后涂布于含氯霉素的 BHIA 平板,37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温箱培养过夜。最后在 28 $^{\circ}\text{C}$ 和 37 $^{\circ}\text{C}$ 下交替培养 10~20 代,直至筛选到对氯霉素不敏感的菌落。

1.5.2 菌落 PCR 鉴定基因缺失突变株 在上下游同源臂的中间和目的基因 *cpsE* 和 *neuA* 的内部分别设计长引物对(LcpsE-F/R 和 LneuA-F/R)和短引

物对(ScpsE-F/R 和 SneuA-F/R),再分别以筛选到的对氯霉素不敏感的菌落和野生株 GBS 为模板进行 PCR 检测(引物见表 3),根据扩增产物片段大小初步判断菌落是否为基因缺失突变株。预期如下:若用长引物对扩增疑似基因缺失突变株 $\Delta cpsE$ 和 $\Delta neuA$ 获得的条带分别约为 2500 bp 和 2200 bp,而野生株 WT 扩增获得的条带分别约为 2700 bp 和 2400 bp;若用短引物对扩增疑似基因缺失突变株 $\Delta cpsE$ 和 $\Delta neuA$ 不能扩增出任何条带,而野生株 WT 扩增获得的条带分别约为 500 bp 和 600 bp,初步说明获得了基因缺失突变株 $\Delta cpsE$ 和 $\Delta neuA$ (图 2)。

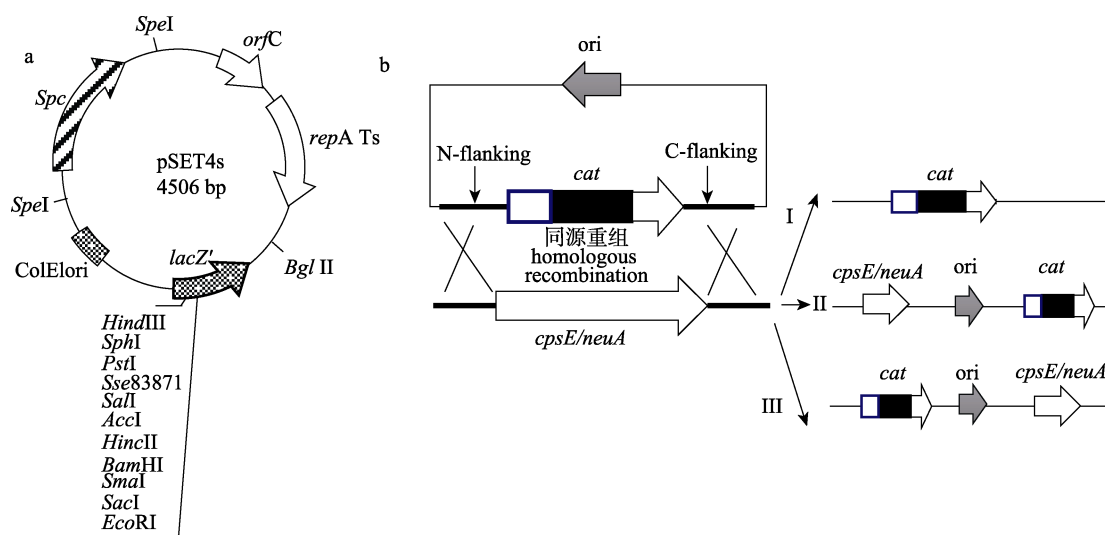


图 1 pSET4s 质粒图谱与基因敲除载体 pSET4s-*cpsE/neuA* 的构建示意图

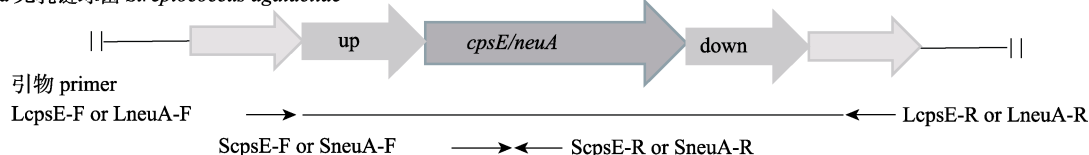
a. pSET4s 质粒图谱; b. 基因敲除载体 pSET4s-*cpsE/neuA* 的构建示意图. I: 双交换; II: 3'单交换; III: 5'单交换.

Fig. 1 pSET4s plasmid profile and schematic diagram of knock-out vector pSET4s-*cpsE/neuA*

a. pSET4s plasmid profile; b. schematic diagram of the knock-out vector pSET4s-*cpsE/neuA*.

I: double cross-over; II: 3' single cross-over; III: 5' single cross-over.

a 无乳链球菌 *Streptococcus agalactiae*



b 敲除株 *cpsE/neuA* knock out of *cpsE/neuA*

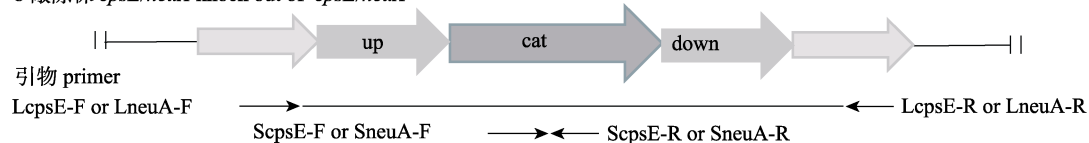


图 2 突变株 $\Delta cpsE$ 和 $\Delta neuA$ 引物鉴定示意图

Fig. 2 Primers identification of the mutants $\Delta cpsE$ and $\Delta neuA$

1.5.3 RT-PCR 鉴定基因缺失突变株 分别从28℃培养、处于稳定期的 GBS 基因缺失突变株 $\Delta cpsE$ 和 $\Delta neuA$ 与野生株 WT 菌液中取约 10^9 CFU 细菌量各置于1.5 mL离心管中, 12000 r/min 离心5 min, 收集菌体沉淀, -80℃冰箱中冻存备用。参照 EasyPure[®] RNA Kit (TransGen)试剂盒抽提细菌RNA, 2%琼脂糖凝胶电泳检测RNA质量, 酶标仪测定RNA浓度。

取1 μ g RNA, 用Roche反转录试剂盒进行反转录, 具体步骤参考说明书, 反转录后的cDNA检测后于-20℃保存备用。采用20 μ L PCR反应体系进行PCR扩增: Premix Taq 10 μ L, 菌液 2.0 μ L, 上、下游引物 ScpsE-F/R 和 SneuA-F/R(10 μ mol/L)各1.0 μ L, ddH₂O 6.0 μ L。反应条件: 94℃预变性3 min; 94℃ 30 s, 58℃ 2 min, 30个循环; 最后72℃延伸10 min。PCR反应结束后, 取4 μ L扩增产物经1%琼脂糖凝胶电泳检测, 凝胶成像系统记录结果并照相。预期如下: 若用短引物对(ScpsE-F/R 和 SneuA-F/R)扩增疑似基因缺失突变株 $\Delta cpsE$ 和 $\Delta neuA$ 不能扩增出任何条带, 而野生株 WT 扩增获得的条带分别约为500 bp 和 600 bp (图2)。

经上述 PCR、RT-PCR 筛选到的阳性基因缺失株送广州艾基技术有限公司测序, 确认 GBS $\Delta cpsE$ 和 $\Delta neuA$ 序列是否正确。

1.6 基因缺失突变株 $\Delta cpsE$ 和 $\Delta neuA$ 的生物学特性分析

1.6.1 生长特性分析 分别将 GBS $cpsE$ 基因和 $neuA$ 基因缺失突变株 (简称为 $\Delta cpsE$ 和 $\Delta neuA$) 与野生株 WT 划线接种于 BHIA 平板上, 在28℃恒温培养箱中过夜培养。用无菌牙签挑取单菌落于 BHI 液体培养基中, 28℃ 200 r/min 振荡过夜。按1:100(V/V)的比例将上述菌液接种于 BHI 液体培养基中, 28℃ 200 r/min 振荡培养, 每种菌体设置3个重复。每隔1 h用酶标仪(BioTek)检测一次菌液吸光值(OD₆₀₀), 直至菌液吸光值稳定, 绘制生长曲线。

1.6.2 透射电子显微镜观察 分别将突变株 $\Delta cpsE$ 、 $\Delta neuA$ 与野生株 WT 于28℃培养到对数生长后期, 用2.5%戊二醛固定2 h; 离心弃培养液加入电镜固定液4℃固定2~4 h; 然后用0.01 mol/L

PBS 磷酸缓冲液(pH 7.4)漂洗3次, 每次15 min; 用含有1%锇酸的PBS磷酸缓冲液20℃固定2 h, 再用PBS磷酸缓冲液漂洗3次, 每次15 min; 细菌经逐级酒精-丙酮脱水, 每次15 min; 脱水后的样品经渗透和包埋后, 进行切片、染色后透射电子显微镜下(HT7700)观察, 采集图像分析。最后, 采用ImageJ 软件测量2个突变株与野生株的荚膜厚度。

1.6.3 GBS 荚膜唾液酸含量的测定 将28℃培养且处于稳定期的 $\Delta cpsE$ 、 $\Delta neuA$ 与野生株 WT 培养物分别8500 r/min 4℃离心30 min, 收集菌体; 80 mL预冷的PBS(0.033 mol/L)洗涤菌体; 重复上述步骤, 离心并称取净重, 加入30 mL 0.05 mol/L PIPES 缓冲液 (pH 6.0)重悬菌体。120℃, 75 min 高压灭菌^[26]。冷却至室温后用1.5 mL 无菌离心管分装。每管加入20 μ L 唾液酸苷酶(0.25 U/ μ L, 上海抚生实业有限公司), 40℃ 50 r/min 孵育3 h; 酶解后的反应液8500 r/min 4℃离心50 min, 取上清。参照南京建成生物工程研究所的唾液酸(SA)测试盒说明书进行显色反应, 酶标仪读取对照品(水)、标准品(SA)和样品的OD₅₆₀, 计算GBS荚膜唾液酸含量(荚膜唾液酸分子量=309.3, SA标准品浓度=0.001 mol/L), 其公式如下:

GBS荚膜唾液酸(SA)的含量(mg/g)=

$$\left(\frac{OD_{\text{样品}} - OD_{\text{对照}}}{OD_{\text{标准}} - OD_{\text{对照}}} \times 309.3 \times \text{重悬体积} \times \text{SA标准品浓度} \right) / \text{菌量}$$

1.6.4 尼罗罗非鱼 GBS 感染实验 挑取BHIA平板上的GBS基因缺失突变株 $\Delta cpsE$ 、 $\Delta neuA$ 与野生株 WT 分别接种至1.0 mL BHI 液体培养基中过夜培养, 以1:50(V/V)的比例分别转接于100 mL新鲜BHI培养基的锥形瓶中, 28℃ 200 r/min 振荡培养至稳定期。4000 r/min 离心, 灭菌的0.01 mol/L PBS 缓冲液洗涤菌体。根据预实验获得的LD₅₀, 分别用PBS调节菌液浓度至 3.0×10^8 CFU/mL。实验组用此菌悬液对尼罗罗非鱼进行腹腔注射感染, 每尾100 μ L, 对照组注射等量无菌PBS缓冲液。观察并记录7天内实验组和对照组尼罗罗非鱼的累积死亡率。

1.7 数据处理与分析

$\Delta cpsE$ 、 $\Delta neuA$ 与野生株 WT 的荚膜厚度、唾液酸含量, 以及感染实验中罗非鱼的累计死亡率, 均采用 SPSS 17.0 软件单因素方差分析法(One-way ANOVA)进行差异显著性分析, $P<0.05$ 为显著性差异, $P<0.01$ 为极显著性差异。

2 结果与分析

2.1 基因缺失株 $\Delta cpsE$ 和 $\Delta neuA$ 的构建与鉴定

2.1.1 pSET4s- $\Delta cpsE$ 、pSET4s- $\Delta neuA$ 质粒的构建与鉴定 以提取 GBS 野生株和 pSET1s 的基因组为模板, 分别采用表 2 中所示引物对分别对 $cpsE$ 、 $neuA$ 和氯霉素 cat 基因进行 PCR 扩增, 获得 $cpsE$ 和 $neuA$ 基因上下游同源臂各 500 bp, 氯霉素 cat 基因 1056 bp。载体 pSET4s 经 *EcoR* I 和 *Bam* H I 双酶切后回收(4506 bp)。将目的基因与酶切后的载体通过 Infusion-PCR 连接后导入大肠杆菌感受态细胞, 提取重组质粒。分别使用引物对 $cpsE$ -up-F/ $cpsE$ -down-R 和 $neuA$ -up-F/ $neuA$ -down-R 对重组质粒 pSET4s- $cpsE$ 和 pSET4s- $neuA$ 进行 PCR 扩增, 获得的条带的大小均为 2056 bp。将重组质粒 pSET4s- $cpsE$ 和 pSET4s- $neuA$ 送测序, 结果显示插入序列是正确的。

2.1.2 基因缺失株 $\Delta cpsE$ 和 $\Delta neuA$ 的筛选与鉴定

将上述获得的重组质粒 pSET4s- $\Delta cpsE$ 、pSET4s- $\Delta neuA$ 电转化至 GBS 野生菌株内后, 使重组质粒与细菌基因组间发生同源重组。挑取对氯霉素具抗性的菌株在 28℃ 和 37℃ 下交替传代培养, 进一步提高重组频率。对第 10 代筛选到的对氯霉素具抗性的菌株进行 PCR 鉴定(引物见表 3)。长引物对 $LcpsE$ -F/R 和 $LneuA$ -F/R 在野生株 GBS(阳性对照)分别扩增出 2681 bp 和 2370 bp 条带, 而突变株 $\Delta cpsE$ 和 $\Delta neuA$ 分别扩增出 2348 bp 和 2184 bp 的条带。为进一步验证且方便后续实验前的菌株快速鉴定, 使用引物对 $ScpsE$ -F/R 和 $SneuA$ -F/R 分别对突变株与野生株进行 PCR 扩增。结果显示突变株均未扩增出条带, 而野生菌株扩增分别得到 484 bp 和 622 bp 条带(图 3), 从而确证目的基因 $cpsE$ 和 $neuA$ 的缺失。

进一步采用 RT-PCR 在 RNA 水平上验证基因

缺失突变株 $\Delta cpsE$ 和 $\Delta neuA$, 提取 RNA、反转录后用引物对 $ScpsE$ -F/R 和 $SneuA$ -F/R 分别对 GBS 基因缺失突变株 $\Delta cpsE$ 和 $\Delta neuA$ 与野生株 WT 进行 PCR 扩增。结果显示突变株 $\Delta cpsE$ 和 $\Delta neuA$ 均未扩增出条带, 而野生菌株扩增分别得到 484 bp 和 622 bp 条带。最终, 将筛选到的基因突变株 $\Delta cpsE$ 和 $\Delta neuA$ 送生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序, 测序结果证实 GBS 基因缺失突变株 $\Delta cpsE$ 和 $\Delta neuA$ 的构建成功。

2.2 基因缺失突变株 $\Delta cpsE$ 和 $\Delta neuA$ 的生物学特性

2.2.1 生长特性 根据 OD_{600} 值比较 $\Delta cpsE$ 、 $\Delta neuA$ 与野生株 WT 在 28℃ 下的生长速度, 发现 GBS $\Delta cpsE$ 和野生株 WT 的生长速度较快, 在 7 h 时均达到中对数生长期($OD_{600}=0.60$), 12 h 时均达到稳定期(野生株 $OD_{600}=0.936$, $\Delta cpsE$ $OD_{600}=1.015$); 而 $\Delta neuA$ 在 8 h 才达到对数生长期, 13 h 达稳定期($OD_{600}=0.923$)。比较培养至 12 h 时突变株与野生株的 OD_{600} , 发现 3 种菌株两两间无显著差异($P>0.05$, 图 4)。

2.2.2 透射电镜观察 为观察 $cpsE$ 和 $neuA$ 的缺失对细菌形态及荚膜的影响, 选取生长对数后期的野生株与基因缺失突变株进行透射电镜观察。形态上 GBS $\Delta cpsE$ 和 $\Delta neuA$ 与野生株均以散在链状形式排列, 无明显差异。用 ImageJ 软件测量荚膜厚度, 结果显示 $\Delta cpsE$ 、 $\Delta neuA$ 与野生株荚膜厚度分别为 (27.51 ± 2.96) nm、 (28.70 ± 1.74) nm 和 (70.88 ± 3.37) nm。 $\Delta cpsE$ 和 $\Delta neuA$ 的荚膜厚度分别为野生株的 38.81% 和 40.49%, 均与野生株 WT 荚膜厚度存在极显著差异($P<0.01$), 且两缺失株间不存在显著差异($P>0.05$, 图 5)。

2.2.3 荚膜唾液酸含量的比较 比色法测定比较荚膜唾液酸含量, 结果显示野生株 WT 的荚膜唾液酸含量最高, 为 (3.972 ± 0.12) mg/g; 其次为 $\Delta neuA$, (3.35 ± 0.12) mg/g, 是野生株含量的 84.38%, 且与其存在显著差异; 最低为 $\Delta cpsE$, (2.14 ± 0.01) mg/g, 是野生株含量的 53.90%, 且与其存在极显著差异($P<0.01$)。 $\Delta neuA$ 荚膜唾液酸含量为 $\Delta cpsE$ 的 1.57 倍, 且两突变株间存在极显著差异($P<0.01$, 图 6)。

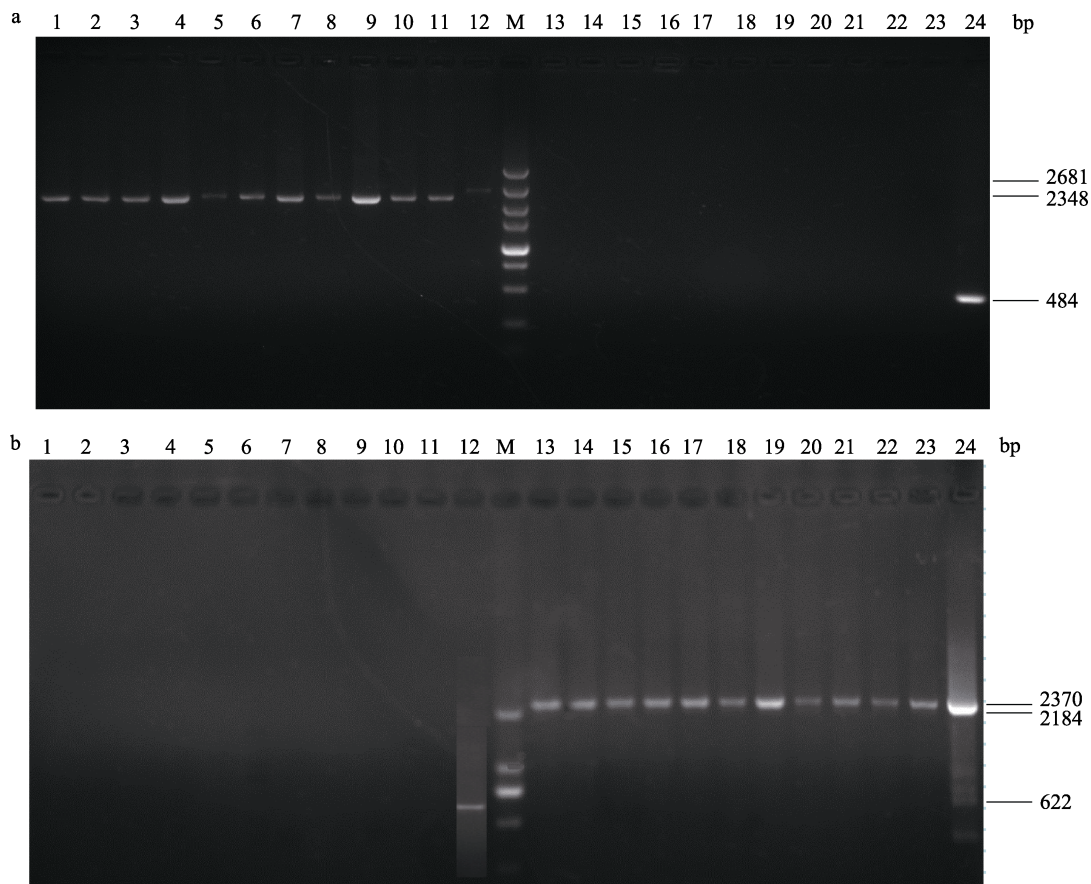


图 3 基因缺失株 $\Delta cpsE$ 和 $\Delta neuA$ 的 PCR 鉴定

a. 1~11: 基因缺失突变株 $\Delta cpsE$ (LcpsE-F/R); 12: 野生株 WT(LcpsE-F/R); M: DNA Marker (DL 5000); 13~23: 基因缺失突变株 $\Delta cpsE$ (ScpsE-F/R); 24: 野生株 WT (ScpsE-F/R). b. 1~11: 基因缺失突变株 $\Delta neuA$ (SneuA-F/R); 12: 野生株 WT(SneuA-F/R); M: DNA Marker (DL 2000); 13~23: 基因缺失突变株 $\Delta neuA$ (LneuA-F/R); 24: 野生株 WT(LneuA-F/R).

Fig. 3 PCR identification of gene deletion strains $\Delta cpsE$ and $\Delta neuA$

a. 1~11: gene knock-out mutant strain $\Delta cpsE$ (LcpsE-F/R); 12: wild-type strain (LcpsE-F/R); M: DNA marker (DL 5000); 13~23: gene knock-out mutant strain $\Delta cpsE$ (ScpsE-F/R); 24: wild-type strain (ScpsE-F/R). b. 1~11: gene knock-out mutant strain $\Delta neuA$ (SneuA-F/R); 12: wild-type strain (SneuA-F/R); M: DNA marker (DL 2000); 13~23: gene knock-out mutant strain $\Delta neuA$ (LneuA-F/R); 24: wild-type strain (LneuA-F/R).

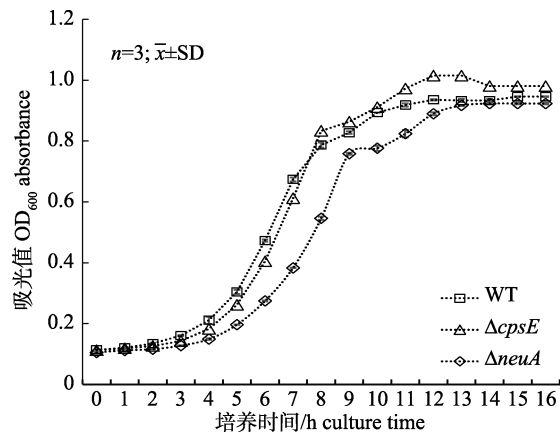


图 4 无乳链球菌野生株 WT 与基因缺失株 $\Delta cpsE$ 、 $\Delta neuA$ 的生长曲线

Fig. 4 The growth curves of *Streptococcus agalactiae* wild type (WT), mutants $\Delta cpsE$ and $\Delta neuA$

2.2.4 $\Delta cpsE$ 和 $\Delta neuA$ 与野生株毒力的比较 用 $\Delta cpsE$ 、 $\Delta neuA$ 与野生株 WT 分别对养殖在 28℃ 水温条件下的尼罗罗非鱼进行攻毒, 各组累计死亡率分别为(6.65±4.74)%、15%和(91.70±7.07)%, $\Delta cpsE$ 、 $\Delta neuA$ 的累计死亡率均与野生株 WT 存在极显著差异($P<0.01$), 而两突变株间不存在显著差异($P>0.05$, 图 7)。取刚死亡的鱼体解剖, 可见鱼体出现腹水、肝脏肿大充血和胆囊充盈等 GBS 感染典型症状, 且从脑、肝、脾中可分离到 GBS, 但对照组(PBS 组)没有出现死亡。

3 讨论

GBS *cpsE* 是荚膜多糖合成的关键基因, 它编

码的半乳糖转移酶可催化第一个单糖与脂质载体的偶联、启动多糖重复单位的合成。有研究显示,

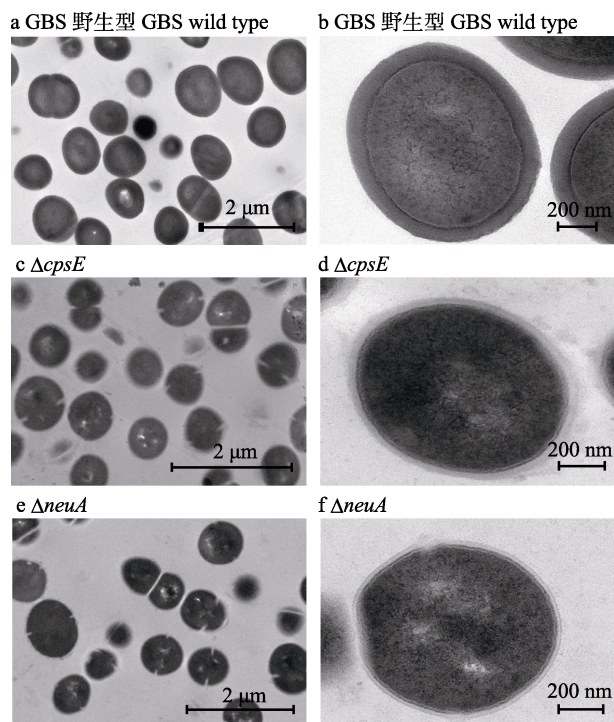


图 5 无乳链球菌野生株(WT)和突变株 $\Delta cpsE$ 、 $\Delta neuA$ 的透射电镜观察

Fig. 5 Transmission electron micrographs of *Streptococcus agalactiae* wild type (WT), mutants $\Delta cpsE$ and $\Delta neuA$

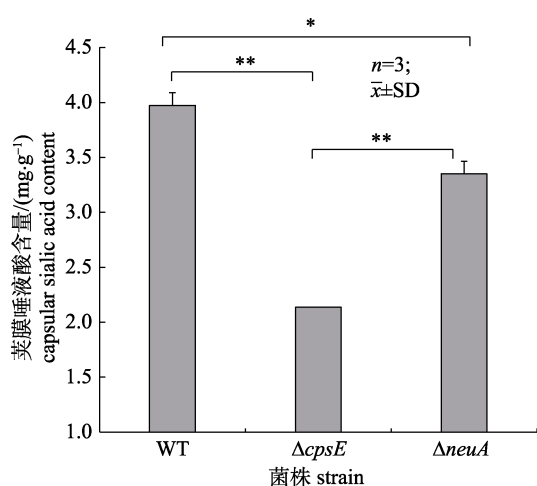


图 6 无乳链球菌野生株 WT 与突变株 $\Delta cpsE$ 、 $\Delta neuA$ 荚膜唾液酸的含量

*表示各组之间差异显著($P<0.05$); **表示各组之间差异极显著($P<0.01$).

Fig. 6 Capsular sialic acid content of *Streptococcus agalactiae* wild type (WT), mutants $\Delta cpsE$ and $\Delta neuA$
* indicates significant difference between the groups ($P<0.05$); ** indicates extremely significant difference between the groups ($P<0.01$).

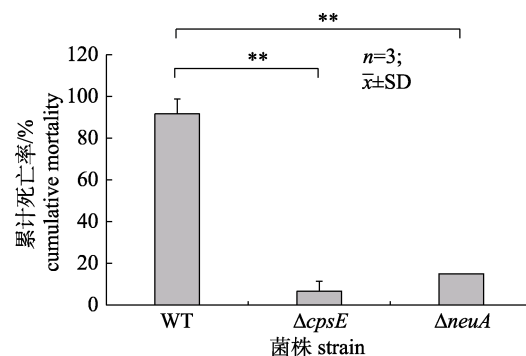


图 7 感染无乳链球菌野生株野生型(WT)和突变株 $\Delta cpsE$ 、 $\Delta neuA$ 后尼罗罗非鱼的死亡率

*表示各组之间差异显著($P<0.05$); **表示表示各组之间差异极显著($P<0.01$).

Fig. 7 The mortality rate of tilapia infected with *Streptococcus agalactiae* wild type (WT), and mutants $\Delta cpsE$ and $\Delta neuA$
* indicates significant difference between each other group ($P<0.05$); ** indicates extremely significant difference between each other group ($P<0.01$).

当肺炎链球菌 CpsE 的糖基转移酶结构域上的第 379 位氨基酸通过点突变从精氨酸变为甘氨酸后,可导致链球菌荚膜的缺失,证实 *cpsE* 基因在肺炎链球菌荚膜多糖的合成中起重要作用^[16-17]。2 型猪链球菌基因缺失突变株 $\Delta cpsE$ 荚膜粗多糖的提取率仅为野生株的 34.52%,且其毒力下降 4.47 倍,与野生株毒力存在显著差异,说明 *cpsE* 基因的缺失影响荚膜多糖的含量,进而影响细菌的毒力^[18]。本研究利用同源重组方法构建了鱼源 GBS 基因缺失突变株 $\Delta cpsE$,发现 $\Delta cpsE$ 与野生株 WT 在生长方面无显著差异,说明 *cpsE* 基因的缺失对细菌生长影响不大。与野生株相比,突变株 $\Delta cpsE$ 表面荚膜厚度和唾液酸含量均显著下降(分别为野生株的 38.81%和 53.90%),此结果与 2 型猪链球菌 *cpsE* 基因缺失后荚膜多糖部分缺失的结果是一致的。鱼源和猪源 GBS *cpsE* 基因缺失后荚膜唾液酸均未完全缺失,但人源 GBS *cpsE* 基因的缺失则导致荚膜多糖唾液酸的完全缺失。是否鱼源与猪源 GBS 菌株还存在其他控制荚膜多糖唾液酸化的基因,仍有待进一步研究。本研究 GBS 感染尼罗罗非鱼实验结果显示,突变株 $\Delta cpsE$ 的毒力较野生菌株显著降低(12.79 倍),此结果与人源 GBS $\Delta cpsE$ 的相似。本研究结果表明鱼源 *cpsE* 基因也是荚膜多糖合成的重要基因,并直接影响着 GBS 的毒力。

GBS 等的荚膜多糖末端与哺乳动物体内糖蛋白末端的唾液酸相似, 能与宿主非特异性免疫细胞表面的免疫球蛋白样凝集素(sialic acid-binding immunoglobulin-like lectins, Siglecs)结合, 使其抑制下游免疫信号转导从而实现“免疫逃逸”^[27-29]。本课题组在前期对尼罗罗非鱼 Siglecs 分子的研究中证实了 Siglecs like 分子可与 GBS 结合; 通过细胞凝集实验及 ELISA 进一步证实了 GBS 是通过唾液酸化的荚膜多糖与 Siglecs like 结合^[30]。人源 GBS 荚膜多糖的唾液酸化受 $neuA$ ~ $neuD$ 的控制^[14]。 $neuA$ 基因编码的胞苷酸唾液酸合成酶具有双官能团, 即 N 端的 CMP-唾液酸转移酶合成酶和 C 端的酯酶, 能催化游离的唾液酸合成 CMP-唾液酸(CMP-Neu5Ac), 以及 O-乙酰唾液酸的脱乙酰化合成 CMP-Neu5,7(9)Ac^[21], 而这两种唾液酸单糖衍生物均为荚膜多糖唾液酸化过程的原料。人源 III 型 GBS 基因缺失突变株 $\Delta neuA$ 中未检测到荚膜唾液酸^[21], 说明 $neuA$ 基因是 GBS 荚膜多糖唾液酸化的重要基因。流感嗜血杆菌(*Haemophilus influenzae*)的 $SiaB$ 是 GBS $neuA$ 的同源基因, 其突变株 $\Delta siaB$ 会导致荚膜唾液酸合成缺陷, 且毒力显著低于野生型株^[31]。上述研究表明 $neuA$ 不但是细菌荚膜唾液酸合成的关键基因, 而且与细菌的致病性相关。本研究构建的鱼源 GBS 基因缺失突变株 $\Delta neuA$, 其生长速度与野生株无明显差异, 说明 $neuA$ 基因的缺失不影响细菌的生长。但突变株 $\Delta neuA$ 荚膜厚度和荚膜唾液酸含量均显著下降, 分别为野生株的 40.49%和 84.38%, 推测与人源的 NeuA 相似, 鱼源 NeuA 蛋白具有调节荚膜多糖唾液酸化所需原料的供应, 进而影响荚膜多糖唾液酸化过程。感染实验显示, 突变株 $\Delta neuA$ 的毒力较野生菌株 WC1535 显著下降(5.11 倍)。本研究证实了 $neuA$ 基因是细菌荚膜多糖唾液酸化过程中的关键基因, 且直接影响 GBS 的毒力。

本研究发现两个基因缺失突变株的荚膜唾液酸均比野生株显著下降, 但 $cpsE$ 和 $neuA$ 基因的缺失均没有导致鱼源 GBS 荚膜唾液酸的完全缺失。比较 2 个基因缺失突变株间荚膜唾液酸的含量, 发现 $\Delta neuA$ 的含量为 $\Delta cpsE$ 的 1.57 倍, 差异极显著, 推断 $cpsE$ 基因的缺失影响了荚膜多糖的

合成起始从而导致了总体合成水平的显著下降, 而 $neuA$ 基因主要影响唾液酸化, 而对其他 3 种单糖的合成影响不大。2 突变株的毒力均显著低于野生株, 而 2 突变株间无显著差异, 说明鱼源 GBS 的强致病性与荚膜唾液酸的高含量有关。此结果也与本课题组前期的发现一致, 在较高温度(28℃和 34℃)下, 鱼源 GBS 荚膜唾液酸的高含量与其毒力正相关。

本研究利用同源重组成功构建了鱼源 GBS 基因缺失突变株 $\Delta cpsE$ 和 $\Delta neuA$, 发现 $cpsE$ 和 $neuA$ 基因是 GBS 荚膜多糖合成及唾液酸化的关键基因, 其缺失不仅影响菌株荚膜唾液酸的含量, 而且直接影响致病性。

参考文献:

- [1] Chaiwarith R, Jullaket W, Bunchoo M, et al. *Streptococcus agalactiae* in adults at Chiang Mai University Hospital: a retrospective study[J]. BMC Infect Dis, 2011, 11(1): 149.
- [2] Delannoy C M J, Crumlish M, Fontaine M C, et al. Human *Streptococcus agalactiae* strains in aquatic mammals and fish[J]. BMC Microbiol, 2013, 13(1): 41.
- [3] Ye X, Li J, Lu M, et al. Identification and molecular typing of *Streptococcus agalactiae* isolated from pond-cultured tilapia in China[J]. Fisheries Sci, 2011, 77(4): 623-632.
- [4] Vandamme P, Devriese L A, Pot B, et al. *Streptococcus difficile* is a nonhemolytic group B, type Ib *Streptococcus*[J]. Int J Syst Bacteriol, 1997, 47(1): 81-85.
- [5] Zhang D F, Liu L H, Ren Y, et al. Isolation, identification, and molecular characteristics of a new genotype of *Streptococcus agalactiae* from cultured tilapia in China[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2015(5): 1044-1054. [张德锋, 刘礼辉, 任燕, 等. 我国罗非鱼源新型无乳链球菌的分离、鉴定及其分子特征[J]. 中国水产科学, 2015(5): 1044-1054.]
- [6] Li L, Wang R, Liang W, et al. Rare serotype occurrence and PFGE genotypic diversity of *Streptococcus agalactiae* isolated from tilapia in China[J]. Vet Microbiol, 2013, 167(3): 719-724.
- [7] Lu M X, Li J, Ye X, et al. Identification and characterizations of *Streptococcus agalactiae* isolated from tilapia cultured in Guangdong and Hainan provinces[J]. Microbiology China, 2010, 37(5): 766-774. [卢迈新, 黎炯, 叶星, 等. 广东与海南养殖罗非鱼无乳链球菌的分离、鉴定与特性分析[J]. 微生物学通报, 2010, 37(5): 766-774.]
- [8] Suanyuk N, Kong F, Ko D, et al. Occurrence of rare genotypes of *Streptococcus agalactiae* in cultured red tilapia

- Oreochromis* sp. and Nile tilapia *O. niloticus* in Thailand—Relationship to human isolates?[J]. *Aquaculture*, 2008, 284(1): 35–40.
- [9] Lang S, Palmer M. Characterization of *Streptococcus agalactiae* CAMP factor as a pore-forming toxin[J]. *J Biol Chem*, 2003, 278(40): 38167–38173.
- [10] Li J, Ye X, Ke X L, et al. Cloning, expression and immunogenicity analysis of surface immunogenic protein (*sip*) of tilapia *Streptococcus agalactiae*[J]. *Acta Hydrobiol Sin*, 2012, 36(4): 626–633.
- [11] Lachenauer C S, Creti R, Michel J L, et al. Mosaicism in the alpha-like protein genes of group B streptococci[J]. *P Natl Acad Sci USA*, 2000, 97(17): 9630–9635.
- [12] Li Q Y, Ke X L, Lu M X, et al. Prokaryotic expression and immunogenicity analysis of C5a peptidase(*ScpB*) of *Streptococcus agalactiae* isolated from tilapia[J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2014, 21(1): 169–179. [李庆勇, 可小丽, 卢迈新, 等. 罗非鱼无乳链球菌 C5a 肽酶(*ScpB*)的原核表达及其免疫原性[J]. *中国水产科学*, 2014, 21(1): 169–179.]
- [13] Zlotkin A, Chilmonczyk S, Eyngor M, et al. Trojan horse effect: phagocyte-mediated *Streptococcus iniae* infection of fish[J]. *Infect Immun*, 2003, 71(5): 2318–2325.
- [14] Chaffin D O, McKinnon K, Rubens C E. CpsK of *Streptococcus agalactiae* exhibits α 2,3-sialyltransferase activity in *Haemophilus ducreyi*[J]. *Mol Microbiol*, 2002, 45(1): 109–122.
- [15] Rubens C E, Heggen L M, Haft R F, et al. Identification of *cpsD*, a gene essential for type III capsule expression in group B streptococci[J]. *Mol Microbiol*, 1993, 8(5): 843–855.
- [16] Schaffner T O, Hinds J, Gould K A, et al. A point mutation in *cpsE* renders *Streptococcus pneumoniae* nonencapsulated and enhances its growth, adherence and competence[J]. *BMC Microbiol*, 2014, 14(1): 210.
- [17] Shainheit M G, Valentino M D, Gilmore M S, et al. Mutations in pneumococcal *cpsE* generated via *in vitro* serial passaging reveal a potential mechanism of reduced encapsulation utilized by a conjunctival isolate[J]. *J Bacteriol*, 2015, 197(10): 1781–1791.
- [18] Ding D D. Construction and characterization of *cps2E* deleted mutants of *Streptococcus suis* Serotype 2[D]. Wuhan: Huazhong Agriculture University, 2014. [丁丹丹. 猪链球菌 2 型 *cps2E* 基因缺失株构建及生物学特性研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2014.]
- [19] Liu G, Jin C, Jin C. CMP-N-acetylneuraminic acid synthetase from *Escherichia coli* K1 is a bifunctional enzyme: identification of minimal catalytic domain for synthetase activity and novel functional domain for platelet-activating factor acetylhydrolase activity[J]. *J Biol Chem*, 2004, 279(17): 17738–17749.
- [20] Yu H, Ryan W, Yu H, et al. Characterization of a bifunctional cytidine 5'-monophosphate N-acetylneuraminic acid synthetase cloned from *Streptococcus agalactiae*[J]. *Bio-technol Lett*, 2006, 28(2): 107–113.
- [21] Lewis A L, Nizet V, Varki A. Discovery and characterization of sialic acid O-acetylation in group B *Streptococcus*[J]. *P Natl Acad Sci USA*, 2004, 101(30): 11123–11128.
- [22] Takamatsu D, Osaki M, Sekizaki T. Construction and characterization of *Streptococcus suis*-*Escherichia coli* shuttle cloning vectors[J]. *Plasmid*. 2001, 45(2): 101–113.
- [23] Takamatsu D, Osaki M, Sekizaki T. Thermosensitive suicide vectors for gene replacement in *Streptococcus suis*[J]. *Plasmid*. 2001, 46(2): 140–148.
- [24] Wu W, Zhang X Y, Tang Y L, et al. Construction and characterization of *Streptococcus suis* type 2 mutant strain with suilysin gene deletion[J]. *Progress in Veterinary Medicine*, 2012, 33(5): 22–26. [吴炜, 张晓燕, 唐宇龙, 等. 猪链球菌 2 型溶血素基因缺失株构建及其生物学特性分析[J]. *动物医学进展*, 2012, 33(5): 22–26.]
- [25] Xu H J. Construction and function study of the *glnA/ECE1* gene knock-out mutant of *Streptococcus suis* serotype 2 and preparation of monoclonal antibody against *ECE1*[D]. Wuhan: Huazhong Agriculture University, 2011. [徐海军. 2 型猪链球菌 *GlnA/ECE1* 双基因缺失株的构建和 *ECE1* 单克隆抗体的制备[D]. 武汉: 华中农业大学, 2011.]
- [26] Van Calsteren M R, Gagnon F, Lacouture S, et al. Structure determination of *Streptococcus suis* serotype 2 capsular polysaccharide[J]. *Biochem Cell Biol*, 2010, 88(3): 513–525.
- [27] Chang Y C, Olson J, Beasley F C, et al. Group B *Streptococcus* engages an inhibitory Siglec through sialic acid mimicry to blunt innate immune and inflammatory responses *in vivo*[J]. *PLoS Pathog*, 2014, 10(1): e1003846.
- [28] Von Gunten S, Simon H U. Natural anti-Siglec autoantibodies mediate potential immunoregulatory mechanisms: implications for the clinical use of intravenous immunoglobulins (IVIg)[J]. *Autoimmun Rev*, 2008, 7(6): 453–456.
- [29] Weiman S, Uchiyama S, Lin F Y C, et al. O-acetylation of sialic acid on group B *Streptococcus* inhibits neutrophil suppression and virulence[J]. *Biochem J*, 2010, 428(2): 163–168.
- [30] Dong J, Wei Y, Ye X, et al. Discovery and expression of 3 siglecs-like in *Oreochromis niloticus* neutrophil, and their interaction with group B streptococcal sialylated capsular polysaccharides[J]. *Mol Immunol*, 2016, 73: 158–169.
- [31] Bouchet V, Hood D W, Li J, et al. Host-derived sialic acid is incorporated into *Haemophilus influenzae* lipopolysaccharide and is a major virulence factor in experimental otitis media[J]. *P Natl Acad Sci USA*, 2003, 100(15): 8898–8903.

Construction and characterization of *cpsE*- and *neuA*-deleted mutants of *Streptococcus agalactiae* isolated from Nile tilapia

SHI Hongya^{1,2}, DONG Junjian¹, ZHANG Defeng¹, SUN Chengfei¹, TIAN Yuanyuan¹, ZENG Qingkai¹, LU Maixin¹, YE Xing¹

1. Key Laboratory of Tropical & Subtropical Fisheries Resource Application & Cultivation, Ministry of Agriculture; Pearl River Fisheries Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou 510380, China;
2. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China

Abstract: To investigate the functions of the capsular polysaccharide synthetic genes *cpsE* and *neuA* of *Streptococcus agalactiae* (GBS) isolated from Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*), two single-gene knockout mutant strains, namely $\Delta cpsE$ and $\Delta neuA$, were constructed by homologous recombination. Genomic DNA of GBS was used as a template to amplify the up and down homologous fragments of *cpsE* and *neuA*, whereas the pSET1 plasmid was used as a template to amplify the chromosomal chloramphenicol resistance gene (*cat*). Two recombinant gene knockout plasmids, pSET4s-*cpsE* and pSET4s-*neuA*, both containing *cat*, were constructed by the In-Fusion[®] polymerase chain reaction (PCR) method. The recombinant plasmids pSET4s-*cpsE* and pSET4s-*neuA* were transformed into wild-type GBS by electroporation. Double-crossover and plasmid loss strains were obtained by changing the culture temperature. Finally, $\Delta cpsE$ and $\Delta neuA$ were screened for chloramphenicol resistance and the mutations were confirmed by PCR, real-time PCR, and DNA sequencing. To characterize $\Delta cpsE$ and $\Delta neuA$, their growth rate, capsule thickness, capsular sialic acid content, and virulence were compared with those of wild-type GBS. The results showed that the growth rates of the wild-type, $\Delta cpsE$, and $\Delta neuA$ strains did not significantly differ. However, the capsule thickness, capsular sialic acid content, and virulence of $\Delta cpsE$ and $\Delta neuA$ were significantly lower than those of the wild-type strain. Further research suggested that *cpsE* is the critical synthetic gene of the capsular polysaccharide of GBS, whereas *neuA* is important for capsular polysaccharide sialylation. The deletion of *cpsE* and *neuA* not only significantly reduced the capsular sialic acid content of GBS isolated from fish, but also significantly impaired its virulence.

Key words: *Oreochromis niloticus*; *Streptococcus agalactiae* (GBS); capsular polysaccharide synthetic gene; knockout mutants; characterization

Corresponding author: YE Xing. E-mail: gzyexing@163.com