

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2020.20089

cel-EIIB 蛋白调控罗非鱼无乳链球菌强毒、弱毒株毒力相关基因的表达模式

苏友禄^{1,2}, 王宝屯^{2,3}, 谢云丹², 李薇¹, 江飏¹, 冯娟², 林鑫¹

1. 仲恺农业工程学院, 健康养殖创新研究院, 广东 广州 510225;
2. 中国水产科学研究院南海水产研究所, 农业农村部南海渔业资源开发利用重点实验室, 广东 广州 510300;
3. 上海海洋大学水产与生命学院, 上海 201306

摘要: 罗非鱼无乳链球菌纤维二糖-磷酸转移酶系统(*cel*-PTS)的 EIIB 蛋白对强毒株毒力影响有限, 但对弱毒株毒力似乎存在潜在的影响, 但具体机制仍不清晰, 有必要弄清该蛋白调控强、弱毒株的毒力相关基因表达模式。在前期研究中, 通过同源重组技术, 构建了无乳链球菌强毒株 *cel-EIIB* 基因缺失株, 本研究通过类似的方法, 获得弱毒株该基因的缺失株。用无乳链球菌强毒、弱毒株及它们的 *cel-EIIB* 缺失株分别感染斑马鱼, 结果显示, *cel-EIIB* 缺失后, 导致弱毒株毒力明显返强, 而强毒株毒力则轻微减弱。qPCR 检测发现, *cel-EIIB* 缺失可致 *cel*-PTS 系统的 *cel-EIIA*、双组分信号转导系统(TCS)的 *DltR* 和 *CiaH* 以及毒力基因 *sodA*、*cpsD* 和 *cpsG* 在强、弱毒株中呈现相反的表达模式; 此外, TCS 系统的 *RgfC*、*DltS* 和 *CsrR* 以及毒力基因 *cspA* 和 *pavA* 在强毒突变株中表达未受影响, 但在弱毒突变株中的表达却显著上调。研究揭示, EIIB 蛋白可能通过调控上述毒力相关基因表达而负调控弱毒菌株的毒力。

关键词: 无乳链球菌; 纤维二糖-磷酸转移酶系统; *cel-EIIB*; 基因表达; 罗非鱼

中图分类号: S941

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2020)11-1360-11

无乳链球菌(*Streptococcus agalactiae*)是兼性革兰氏阳性球菌, 其宿主范围广, 能感染人、哺乳动物及鱼类, 是重要的人兽鱼共患病原菌^[1-2]。罗非鱼为重要的世界性养殖鱼类, 是联合国粮农组织向全球推广养殖的优良鱼类, 最新统计, 我国罗非鱼养殖产量约为 162 万 t, 占世界罗非鱼总产量的 1/3^[3]。近年来, 罗非鱼链球菌病日益严重, 无乳链球菌作为其主要病原, 传染力强, 致死率高, 给罗非鱼养殖产业带来巨大经济损失。由于罗非鱼无乳链球菌多重耐药菌株增多^[3-4]和缺乏商品化的疫苗, 该病尚未得到有效控制, 弄清无乳链球菌致病机制已经成为研究的焦点^[5-6]。

磷酸转移酶系统(phosphotransferase system,

PTS)被视为细菌的“神经系统”, 其通过精细的代谢通路, 感应胞内代谢水平和胞外刺激, 催化多种糖类及其衍生物转运和磷酸化, 参与分解物代谢阻遏、调节胞内诱导物水平和协调碳氮代谢平衡。PTS 是由非专一性能量耦合蛋白酶 EI、磷酸载体蛋白 HPr 和糖类专一蛋白酶 EIIs 组成, 其中, EIIs 为 EIIA、EIIB 和 EIIC 构成的多结构域蛋白, 对底物代谢具有专一性^[7]。细菌内常有数十套不同的 PTS: 如单核细胞增多性李斯特菌(*Listeria monocytogenes*)内有 30 多种 PTS^[8], 无乳链球菌基因组内至少含有 14 种 PTS^[9]。已有实验证实 PTS 参与信号调节网络而调控细菌毒力, 如炭疽杆菌(*Bacillus anthracis*)的葡萄糖-PTS (glu-PTS)

收稿日期: 2020-03-31; 修订日期: 2020-06-26.

基金项目: 国家自然科学基金项目(31502210); 广东省教育厅重点项目(2019KZDXM043).

作者简介: 苏友禄(1981-), 男, 博士, 副研究员, 从事鱼类细菌病及防治技术研究. E-mail: youlusu@zhku.edu.cn

通信作者: 林鑫, 教授, 从事水产病害防治研究. E-mail: linli@zhku.edu.cn

通过与毒力调节因子 AtxA 作用,来控制细菌毒力基因表达,影响细菌的毒力^[10]。

细菌的双组分信号转导系统(two-component signal transduction systems, TCS)由组氨酸蛋白激酶(HK)和反应调节因子(RR)两部分组成: HK 拥有一个识别特定刺激的 N 端输入域,可以通过分子内构象变化转导信息,导致 C 末端发射结构域的磷酸化和活化,又会激活由 RR 的 N 末端域编码的同源接收器,RR 通过 C 末端效应子结构域产生细胞内反应,调节下游基因的表达^[11]。研究发现,粪肠球菌(*Enterococcus faecalis*)通过 PTS 与 TCS 作用而调控毒力基因,从而增强对宿主细胞的黏附力和侵袭力^[12]。无乳链球菌基因组编码 21 对 TCS, 其中的 *RgfC/A*、*CiaH/R*、*Sak188/189*、*DltR/S*、*BgrR/S* 和 *CsrR/S* (又称为 *CovR/S*) 等被证实参与对无乳链球菌毒力基因的调控^[13-17]。

目前,已有 20 多种无乳链球菌毒力基因编码的产物被证实与其毒力有关^[18],包括与穿孔毒素有关的 β -血溶素/细胞毒素(β -H/C)和 CAMP 因子;参与免疫逃逸的唾液酸荚膜多糖(CPS)、超氧化物歧化酶(SodA)、C5 α 肽酶(ScpB)和丝氨酸蛋白酶(CspA);对抗抗菌肽的脂磷壁酸、青霉素结合蛋白(PBP1a)和菌毛抗原(PI-1/2);促进黏附和侵袭宿主细胞的纤维蛋白原结合蛋白(FbsA/FbsB)、免疫原性细菌黏附素(BibA)、透明质酸酶(HAase)、 α C 蛋白和侵染相关蛋白(IagA)等^[19-20]。

通过开展罗非鱼无乳链球菌强毒株 THN0901 和弱毒株 TFJ0901 的比较蛋白组学和转录组学研究,发现纤维二糖-PTS(*cel*-PTS)的 EIIB 蛋白基因在弱毒株中表达水平显著升高^[21],当无乳链球菌强毒株 *cel-EIIB* 基因缺失后,可导致细菌的生物膜形成和定植能力降低,菌株的毒力仅发生轻微减弱^[22],而 EIIB 蛋白在弱毒株中所发挥的作用仍不清晰。为全面了解无乳链球菌 EIIB 蛋白对毒力相关基因表达的影响,本研究在已构建的无乳链球菌强毒株 THN0901 *cel-EIIB* 基因缺失株基础上^[22],制备弱毒株的该基因缺失株 Δ *cel-EIIB* TFJ0901,比较 *cel-EIIB* 基因缺失前后无乳链球菌强毒、弱毒株毒力变化,以及对 PTS 系统基因、TCS 系统基因和毒力基因表达的影响,为阐明

cel-EIIB 蛋白调控无乳链球菌毒力的分子机制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 菌株、质粒和实验动物

罗非鱼无乳链球菌强毒株 THN0901 及其 *cel-EIIB* 基因缺失株 Δ *cel-EIIB* THN0901、弱毒株 TFJ0901、质粒 PUC18、温敏自杀质粒 pSET4s、pSET5s 和穿梭质粒 pSET2 由本实验室保存^[22]。各无乳链球菌菌株活化后,挑取单菌落接种到 BHI 液体培养基中,在 28 °C、200 r/min 条件下振荡培养 10~16 h,参照细菌 DNA 提取试剂盒说明书提取基因组 DNA;含质粒的菌株接种于无抗生素的 LB 平板上,37 °C 过夜培养,挑取单菌落加入到 5 mL 的 LB 液体培养基(含相应抗生素)中,在 37 °C、200 r/min 条件下振荡培养 10~16 h,然后参照 E.Z.N.A.[®] Plasmid Mini Kit I 试剂盒说明书提取质粒。健康 AB 系斑马鱼(*Danio rerio*) (3.2~3.6 cm)购自广州市黄沙水产品市场。

1.2 菌株构建

参照 Xu 等^[22]的方法,如图 1 所示,采用同源重组方法构建无乳链球菌弱毒株 *cel-EIIB* 基因缺失株,以提取无乳链球菌 TFJ0901 基因组 DNA 为模板,分别用 *cel-EIIB* 基因上下游同源臂特异性引物(表 1) Ust-F/R 和 Dst-F/R 扩增出相应片段,通过融合 PCR 将上下游片段融合并与质粒连接,用抗氯霉素基因 *cat* 引物(表 1) *cat*-R/F 从质粒 pSET5s 获得 *cat* 基因,用 *cat* 代替 *cel-EIIB* 基因,同时与抗壮观霉素温敏自杀质粒 pSET4s 连接获得重组质粒 pSET4s-Ust-*cat*-Dst,进行测序验证。用电转染的方法将其转入 TFJ0901 感受态细胞中,28 °C 下,在加入氯霉素的 BHI 培养基中经数次培养以促进同源重组,选择对氯霉素产生抗性且对壮观霉素敏感的菌株,获得缺失株 Δ *cel-EIIB* TFJ0901,用 *cel-EIIB* 基因特异性引物 EIIB-F/R (表 1)进行 PCR 扩增和测序验证,连续传代检测突变株的遗传稳定性。

1.3 无乳链球菌对斑马鱼毒力的测定

将 THN0901、 Δ *cel-EIIB* THN0901、TFJ0901、 Δ *cel-EIIB* TFJ0901 菌液按照 1 : 100 的比例转接

表 1 构建目标菌株所用引物^[22]
Tab. 1 Primers used for the construction of purpose strains^[22]

| 引物名称 primer | 正向引物(5'-3') forward primer | 反向引物(5'-3') reverse primer |
|-------------|-------------------------------------|-------------------------------|
| Ust-F/R | CCGGAATTCATTGTGGGCGTTGGTGGTA | CGCGGATCCATTGTATCCCCTTTACTTAT |
| Dst-F/R | TGCACTGCAGTATGTCAAAGTTTGATAGTCAGAAA | CCCAAGCTTAAGGCAGAAACATCACAG |
| cat-F/R | CGGATCCCACCGAACTAGAGCTTGATGA | TGCACTGCAGTAATTCGATGGGTTCCGAG |
| EIIB-F/R | CGCCATATGATGATAAAAAATTGGTTATTCTGTGC | ATTTGCGGCCGCTCAAGCCTCTTTTCTTG |

于 BHI 液体培养基中, 在 28 °C、200 r/min 振荡培养 10 h。将上述 4 株菌在 4 °C、5000 r/min 离心 5 min, 用 PBS 洗涤 3 次并重悬菌液, 调整菌浓度约为 5×10^6 cfu/mL、 5×10^5 cfu/mL、 5×10^4 cfu/mL、 5×10^3 cfu/mL, 并将菌液分别涂板计数。把暂养 1 周的斑马鱼随机分为 4 组, 每组 150 尾; 每组分 4 个浓度梯度小组和 1 个 PBS 对照小组, 每个小组设置 3 个平行, 腹腔注射剂量为 20 μ L/尾, 每天换水, 连续观察 14 天, 记录斑马鱼发病症状和死亡率, 用改良寇氏法计算 LD₅₀^[23]。

1.4 RNA 的提取和 cDNA 的合成

将过夜体外培养的各无乳链球菌菌液按照 1 : 100 接种于 30 mL 新鲜的 BHI 液体培养基中,

28 °C, 200 r/min 振荡培养 10 h (为菌生长的平台前期)。参照 Thermo 公司 TRIzolTM reagent 提取无乳链球菌总 RNA, 使用 NanoDrop 分光光度计测定其浓度, 在反转录前, 统一定量为 1000 ng/ μ L, 并将 RNA 进行琼脂糖凝胶电泳, 检测 RNA 的质量。参照 TaKaRa 公司 cDNA 合成试剂盒进行 cDNA 合成, -80 °C 保存备用。

1.5 荧光定量 PCR

根据 Gene Bank 上无乳链球菌的 TCS 系统、PTS 系统及毒力基因序列信息, 使用 Primer 3.0 软件设计特异性引物(表 2), 采用 TB GreenTM Premix Ex TaqTM (Tli RNaseH Plus) 试剂盒, 在实时荧光定量仪 LightCycler 480 进行荧光定量

表 2 荧光定量 PCR 引物信息
Tab. 2 The information of primers for qPCR

| 基因名称 gene | 正向引物(5'-3') forward primer | 反向引物(5'-3') reverse primer | 基因归类 ^[24] gene classification ^[24] |
|-----------------|-------------------------------|-------------------------------|---|
| <i>16s rRNA</i> | TTATGACCTGGGCTACAC | CCTACAATCCGAACTGAGA | a |
| <i>cel-EIIA</i> | AGCACTCTTATTCATTCTCAG | TATGTAATTCCTGGCGTAAATC | b |
| <i>cel-EIIB</i> | GATAGAGGCACATATTGAAGC | TTACACCATCCAACATACCA | b |
| <i>cel-EIIC</i> | GCTTAGTAGTTGGTGCTATC | TTGCTATTGCCTGTGGTA | b |
| <i>manA</i> | AGAAGATGGTGAGATTGGTA | ACTGGGACAGAGTTAATGAT | b |
| <i>manM</i> | ATTCTTGGTGGTAGTCTCC | AATAATAGCAGCAGCAACAG | b |
| <i>gluA</i> | AAGTAGAAGCATTGGATGTTGT | GTAAGTGTACCTGAAACTGGAA | b |
| <i>gluB</i> | ACTTGGTGGTCGTGATAACATT | AGGTCCGTAATAGCTTGAACA | b |
| <i>gluC</i> | CGGTTGTCAATCAGGTATC | TGCGTGTAGTTCAATTGGA | b |
| <i>ascA</i> | ACATTAACAGAGCCAGTAGT | AGCAACAGAAGTATGAATAGC | b |
| <i>ascB</i> | CGTCAATTAGGCGTTAGC | TGTCATCCATAAGGTTATCAAG | b |
| <i>ascC</i> | TGAAGCCATTGTAGCAGTA | TGAGCGAGAACGAAGTAA | b |
| <i>rgfC</i> | CACAAGCGATAGACAATCATAT | AGAAGCCTCAATAGCGTTA | c |
| <i>rgfA</i> | GCATTTAGCAGAAGGATTGA | AGGACAACCTCTATGTGACC | c |
| <i>ciaH</i> | TACTGCTGCCTACCTAGA | GTTAATTCACATAATGCCACCTA | c |
| <i>ciaR</i> | CGACTTAGGTGCTGATGA | AACAAAGGTTGAGTTAGTAGAC | c |
| <i>sak188</i> | GTGTAGCGAGACCTTGAT | CTTATCCAATGCCTTGAGAC | c |

(待续 to be continued)

(续表 2 Tab. 2 continued)

| 基因名称 gene | 正向引物(5'-3') forward primer | 反向引物(5'-3') reverse primer | 基因归类 ^[24] gene classification ^[24] |
|---------------|-------------------------------|-------------------------------|---|
| <i>sak189</i> | GCGTTACTATGTTGTGGAG | ACCTGGTTCTTATGTTGGA | c |
| <i>dltS</i> | CCTATCAACGGACGCTAT | TGCCTATCGCTTACTTCAA | c |
| <i>dltR</i> | GGCTTAACACAGATTACAT | CCCAAACCTTAGAAATCAACT | c |
| <i>csrR</i> | GTGGAGCAGATGATTATATTGT | CGCTGAACGATTATGAGTATT | c |
| <i>csrS</i> | GACAGTTGCTTGGATACG | GGACGAACAATACGCTTAG | c |
| <i>cfb</i> | TAGCTTAGTTATCCCAAATCCC | TAAAGACTTCATTGCGTGCC | d |
| <i>ponA</i> | GCTCCTGATGAAAACCTTGTGCG | AGAGCCCTTCTGGCATTGTC | d |
| <i>cspA</i> | TGCACGTAACCAGTATCGCA | GCACCGAGTTAACGGCATC | d |
| <i>sodA</i> | TCAACTGCCAATCAAGATACTCC | GCTTTGATGTAGTTAGGACGAACA | d |
| <i>sip</i> | AATTCAGTACATACCGTGCGGGAGA | GTTATTTGCTGCCATATTTTGTG | d |
| <i>cpsD</i> | GTAGGTCGTAATGGTAGGAT | TTCTAGGATCATCGTCTAACTT | d |
| <i>cpsG</i> | TAGAGATTTGATTGGGTCAGA | AGTTACCACTGTCATAGGAAT | d |
| <i>hylB</i> | GAATAACTACTTCACTGACGCTG | AACGCGCCCCATATCTACTA | d |
| <i>bca</i> | AATACTATGGGGATGTTTCTCAG | TAACTTCTCAATCTTATCCCTC | d |
| <i>fbsB</i> | AGTTGCGCAAACCTTCTGTCC | TTTCCGCAGTTGTTACACCG | d |
| <i>Srr-1</i> | TCATTCCCAGTTTTATCGCTTGC | TCGGAGTTACAGACTTCCAAAAT | d |
| <i>bibA</i> | CAAGTCCATCAACTTGACTCTTA | TAGGCACATGGCTCAAAATGACG | d |
| <i>pavA</i> | TACGGAAAATACAATCACCTACC | GCTTATGTTGTTATCATGTGCGCG | d |
| <i>cylE</i> | ATTCTCCTCCTGGCAAAGCC | TGACGCTTGGTAGTTGCTGT | d |
| <i>bac</i> | TTGGACAAGCAGTATTTACATCA | ACTCTTTCGTCGTTACTTCCTTG | d |

注: a 为 16S rRNA 基因; b 为 PTS 系统的基因; c 为 TCS 系统的基因; d 为毒力基因。

Note: a indicates 16S rRNA genes; b indicates PTS system related genes; c indicates TCS system related genes; d indicates virulence genes.

PCR。反应总体系(10 μ L)为: TB Green Premix Ex Taq (Tli RNaseH Plus) (2 \times) 5 μ L, PCR forward primer 0.2 μ L, PCR reserve primer 0.2 μ L, cDNA 模板 1 μ L, ddH₂O 4.6 μ L。每个样品设置 3 个生物学重复。

1.6 数据分析

根据 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算基因相对表达量, 利用 SPSS 19.0 软件进行单因素方差分析, 用*表示显著性水平, *表示 $P < 0.05$, **表示 $P < 0.01$ 。

2 结果与分析

2.1 无乳链球菌弱毒株 *cel-EIIB* 基因缺失株制备

按照图 1a 所示的技术路线获得重组菌株, 经 PCR 检测和测序, 结果显示重组菌株不含 *cel-EIIB* 基因(图 1b); 用 UstF 和 DstR 的引物 PCR 检测和测序发现, 菌株的 *cel-EIIB* 基因被 *cat* 基因所取代(图 1c)。结果证实, 无乳链球菌 TFJ0901 的 *cel-EIIB*

基因缺失株 Δ *cel-EIIB* TFJ0901 成功构建。

2.2 无乳链球菌 *cel-EIIB* 基因缺失前后对斑马鱼的毒力差异

以斑马鱼为感染模型, 分别用不同浓度梯度的 TFJ0901、 Δ *cel-EIIB* TFJ0901、THN0901 和 Δ *cel-EIIB* THN0901 腹腔注射斑马鱼, 结果显示, 斑马鱼死亡时间集中在感染无乳链球菌后的 1~6 d, 之后趋于稳定。 Δ *cel-EIIB* TFJ0901 在不同浓度下所致的斑马鱼死亡率均高于相对应的野生株 TFJ0901, 二者的 LD₅₀ 分别为 5.1×10^2 cfu/尾和 3.8×10^7 cfu/尾, 表明无乳链球菌弱毒株 *cel-EIIB* 基因缺失后对斑马鱼的毒力增强(图 2a)。而在较高浓度下, Δ *cel-EIIB* THN0901 对斑马鱼的死亡率均低于野生株 THN0901, LD₅₀ 分别为 3.8×10^2 cfu/尾和 2.0×10^2 cfu/尾(图 2b), 但毒力减弱不显著。总体来看, 无乳链球菌弱毒株在 *cel-EIIB* 基因缺失后毒力返强。

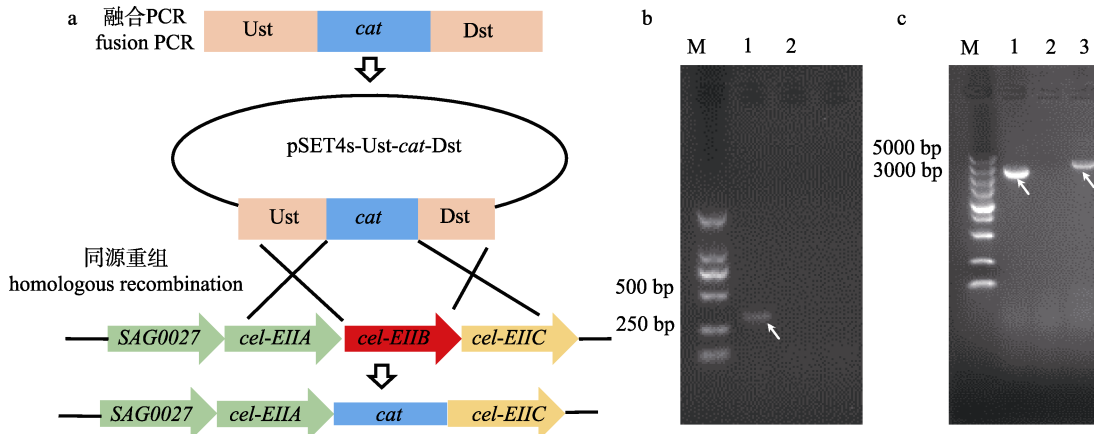


图 1 无乳链球菌 TFJ0901 的 *cel-EIIB* 基因缺失株构建

同源重组方法构建无乳链球菌 TFJ0901 的 *cel-EIIB* 基因缺失株示意图(a); 用引物对 EIIB-F 和 EIIB-RPCR 验证 *cel-EIIB* 基因被敲除(b: 泳道 M, DL2000 DNA maker; 泳道 1, TFJ0901; 泳道 2, $\Delta cel-EIIB$ TFJ0901)和引物对 Ust-F and Dst-R (c: 泳道 M, DL5000 DNA maker; 泳道 1, TFJ0901; 泳道 2, 阴性对照; 泳道 3, $\Delta cel-EIIB$ TFJ0901).

Fig. 1 Construction of *cel-EIIB* gene deletion in a *Streptococcus agalactiae* strain TFJ0901

Schematic representation of in-frame allelic-exchange mutagenesis of the *cel-EIIB* gene in *S. agalactiae* strain TFJ0901 (a); knockout of the *cel-EIIB* gene was confirmed by PCR using the primers EIIB-F and EIIB-R (b: lane M, DL2000 DNA marker; lane 1, TFJ0901; lane 2, $\Delta cel-EIIB$ TFJ0901), and the primers Ust-F and Dst-R (c: lane M, DL5000 DNA marker; lane 1, TFJ0901; lane 2, negative control; lane 3, $\Delta cel-EIIB$ TFJ0901).

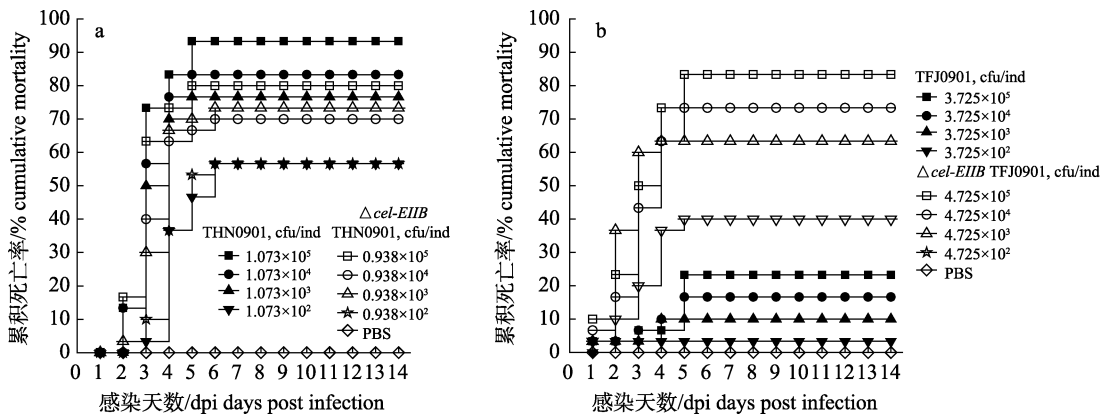


图 2 不同剂量的菌株对斑马鱼累计致死率

a. 无乳链球菌 TFJ0901 及其 *cel-EIIB* 基因缺失株; b. 无乳链球菌 THN0901 及其 *cel-EIIB* 基因缺失株.

Fig. 2 Cumulative mortality of *Danio rerio* challenged with different doses of *Streptococcus agalactiae* strains a. *S. agalactiae* TFJ0901 and $\Delta cel-EIIB$ TFJ0901; b. *S. agalactiae* THN0901 and $\Delta cel-EIIB$ THN0901.

2.3 *cel-EIIB* 基因缺失对无乳链球菌强毒、弱毒株的 PTS 系统基因表达影响

cel-EIIB 基因缺失株相对于各自的野生株, *manA*、*gluA*、*gluB*、*gluC*、*ascB*、*ascC* 和 *ascA* 基因表达均显著上调($P < 0.05$), 而对 *manM* 基因表达影响不显著; *cel-EIIB* 上游的基因 *cel-EIIA* 呈现相反的表达模式: 在 $\Delta cel-EIIB$ THN0901 中, *cel-EIIA* 表现为极显著性下调($P < 0.01$), 而在 $\Delta cel-EIIB$ TFJ0901 中则表现为极显著性上调($P < 0.01$) (图 3)。

2.4 *cel-EIIB* 基因缺失对无乳链球菌强毒、弱毒株 TCS 系统基因表达的影响

cel-EIIB 基因缺失株相对于各自的野生株, *RgfA*、*sak188* 和 *sak189* 基因表达均显著下调($P < 0.05$), 而对 *CiaR* 和 *CsrS* 基因表达影响不显著; *RgfC*、*DltS*、*CsrR* 在 $\Delta cel-EIIB$ THN0901 中表达未受影响, 但在 $\Delta cel-EIIB$ TFJ0901 中均表现为显著性上调($P < 0.05$); *DltR* 和 *CiaH* 基因呈现相反的表达模式: *DltR* 在 $\Delta cel-EIIB$ THN0901 中表现为

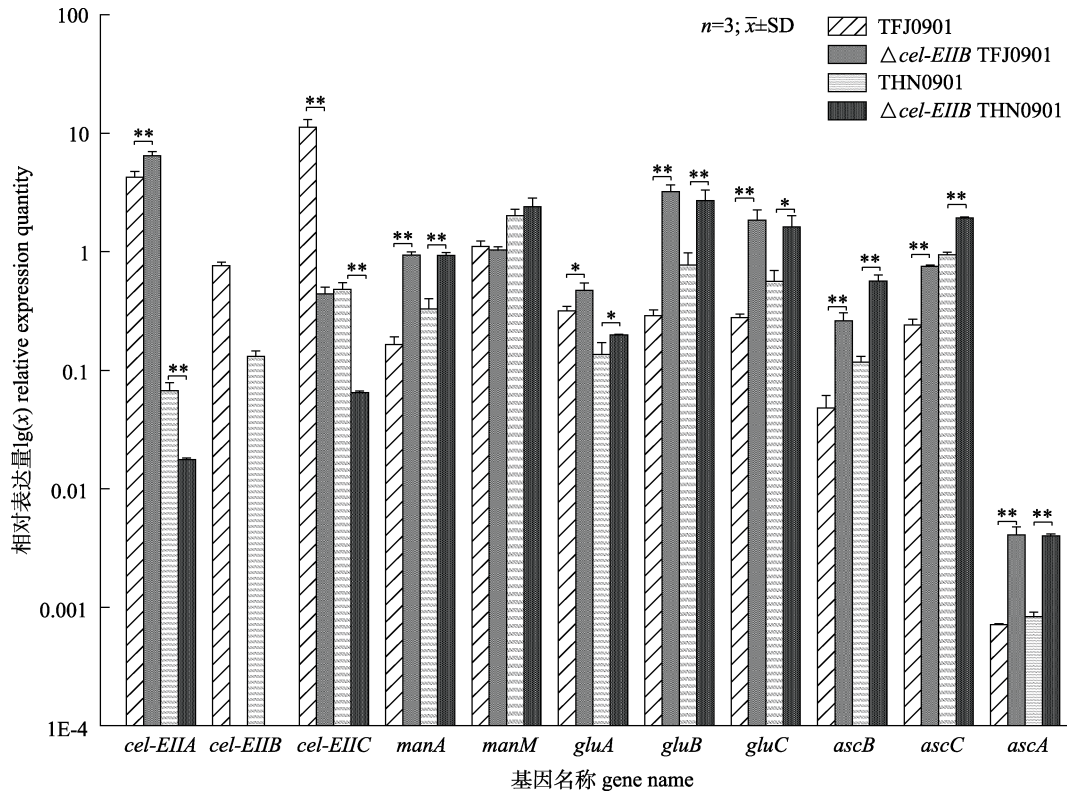


图 3 无乳链球菌强毒和弱毒株在 *cel-EIIB* 基因缺失前后其磷酸转移酶系统(PTS)基因 mRNA 相对表达水平
“*”和“***”分别表示野生株与其基因缺失株之间存在的差异显著($P<0.05$)或差异极显著($P<0.01$)。

Fig. 3 Relative mRNA expression level of phosphotransferase system (PTS) genes in virulent and attenuated strains of *Streptococcus agalactiae* before or after *cel-EIIB* gene deletion
Asterisk symbol (“*” or “***”) indicate significant difference ($P<0.05$) or extremely significant difference ($P<0.01$) between wild-type strains and their gene-deleted strains, respectively.

显著性下调($P<0.05$), 而在 $\Delta cel-EIIB$ TFJ0901 中表现为显著性上调($P<0.05$), *CiaH* 在 $\Delta cel-EIIB$ THN0901 中表现为显著性上调($P<0.05$), 而在 $\Delta cel-EIIB$ TFJ0901 中表现为显著性下调($P<0.05$) (图 4)。

2.5 *cel-EIIB* 基因缺失对无乳链球菌强毒、弱毒株毒力基因表达的影响

cel-EIIB 基因缺失株相对于各自的野生株, *bca*、*srr-1*、*cppA* 和 *psaA* 基因表达均显著上调($P<0.05$), *spb1*、*fsbB* 和 *cylE* 基因表达均显著下调($P<0.05$), 而对 *cfb*、*ponA* 和 *bac* 基因表达影响不显著; *hlyB*、*bibA* 在 $\Delta cel-EIIB$ THN0901 中表达未受影响, 但在 $\Delta cel-EIIB$ TFJ0901 中均表现为显著性下调($P<0.01$); 而 *sip* 在 $\Delta cel-EIIB$ TFJ0901 中表达无显著性差异, 但在 $\Delta cel-EIIB$ THN0901 中呈极显著性上调。*sodA*、*cpsD* 和 *cpsG* 基因呈现相反的表达模式: *sodA* 在 $\Delta cel-EIIB$ THN0901 中表现

为极显著性上调($P<0.01$), 而在 $\Delta cel-EIIB$ TFJ0901 中表现为显著性下调($P<0.05$), *cpsD* 和 *cpsG* 在 $\Delta cel-EIIB$ THN0901 中表现为极显著性下调($P<0.01$), 而在 $\Delta cel-EIIB$ TFJ0901 中表现为极显著性上调($P<0.01$); 此外, *cspA* 和 *pavA* 基因在 $\Delta cel-EIIB$ TFJ0901 中表现为极显著性上调($P<0.01$), 而在 $\Delta cel-EIIB$ THN0901 中表达未受影响(图 5)。

3 讨论

无乳链球菌可以通过多种途径感染罗非鱼, 能在宿主血液内增殖, 并穿越血脑屏障, 侵入脑组织, 导致典型的临床症状; 在自然条件下, 罗非鱼容易经口感染无乳链球菌, 造成较高的死亡率^[25]。把无乳链球菌强毒株的 *cel-EIIB* 基因缺失后, 生物膜形成能力降低, 攻毒实验显示, 其对罗非鱼的毒力轻微减弱, 但未进一步检测该基因缺失对弱毒株毒力的影响^[22]。斑马鱼体型小、生

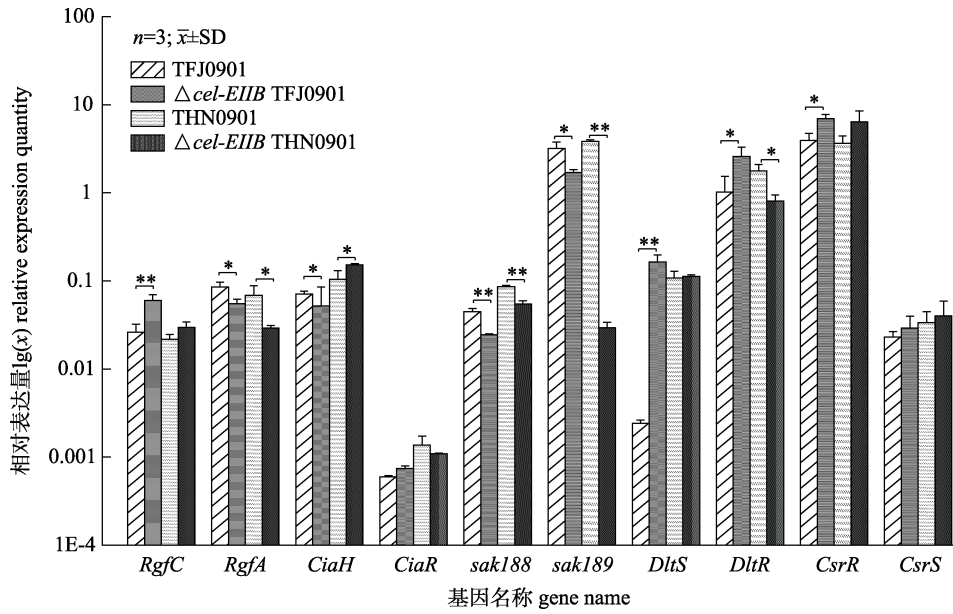


图 4 无乳链球菌强毒和弱毒株 *cel-EIIB* 基因缺失前后其双组分信号转导系统(TCS)基因 mRNA 相对表达水平
 “*”和“**”分别表示野生株与其基因缺失株之间存在的差异显著($P < 0.05$)或差异极显著($P < 0.01$)。

Fig. 4 Relative mRNA expression level of two-component signal transduction systems (TCS) genes in virulent and attenuated strains of *Streptococcus agalactiae* before or after *cel-EIIB* gene deletion
 Asterisk symbol (“*” or “**”) indicate significant difference ($P < 0.05$) or extremely significant difference ($P < 0.01$) between wild-type strains and their gene-deleted strains, respectively.

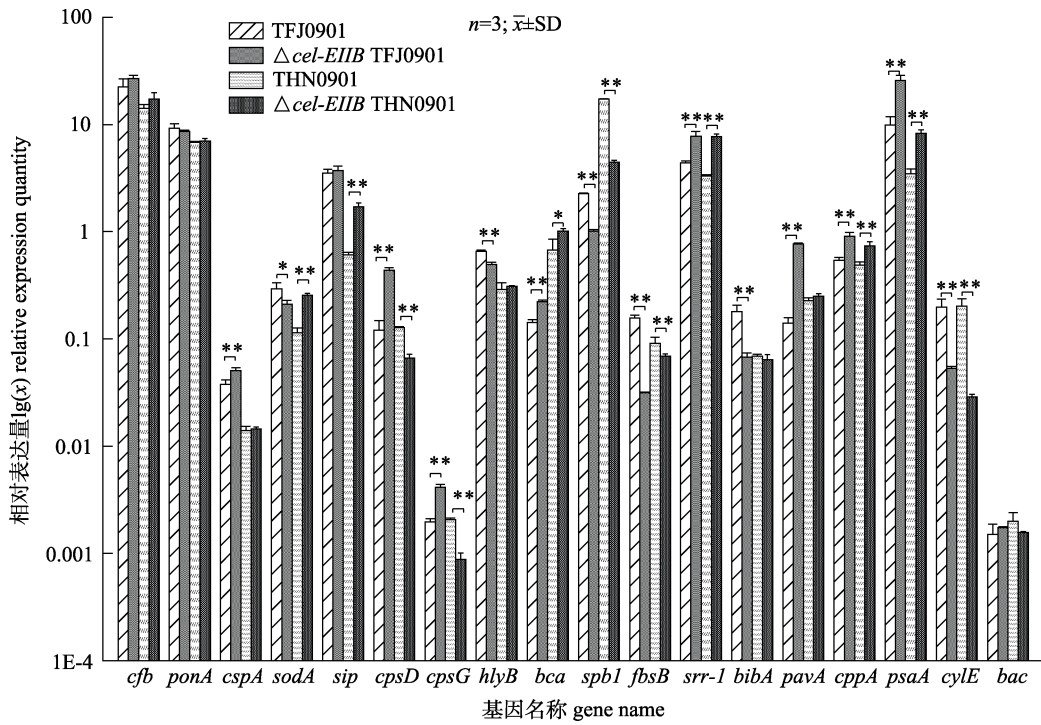


图 5 无乳链球菌强毒和弱毒株在 *cel-EIIB* 基因缺失前后其毒力基因 mRNA 相对表达水平
 “*”和“**”分别表示野生株与其基因缺失株之间存在的差异显著($P < 0.05$)或差异极显著($P < 0.01$)。

Fig. 5 Relative mRNA expression level of virulence genes in virulent and attenuated strains of *Streptococcus agalactiae* before or after *cel-EIIB* gene deletion
 Asterisk symbol (“*” or “**”) indicate significant difference ($P < 0.05$) or extremely significant difference ($P < 0.01$) between wild-type strains and their gene-deleted strains, respectively.

命周期短、繁殖力强,也是无乳链球菌的易感宿主,在感染过程中,无乳链球菌能导致斑马鱼出现典型的脑膜炎和败血症等临床症状,且死亡率跟感染的剂量呈明显的相关性,因此斑马鱼可作为评价无乳链球菌毒力的理想模式动物^[26]。本研究以斑马鱼为感染对象,发现 *cel-EIIB* 基因缺失后,同样会轻微降低无乳链球菌强毒株的毒力,却显著导致弱毒株的毒力返强,表明 *cel-EIIB* 基因在调控无乳链球菌强毒、弱毒株的毒力方面存在明显差异。

除了调节糖转运外,多个研究表明,PTS 还与生物膜形成、毒力、过氧化氢抗性和细菌素有关^[27-28]。对抗坏血酸-PTS (*asc*-PTS) 的糖代谢功能研究表明,编码 *EIIA*、*EIIB* 的基因缺失/双缺失株均比野生型菌株生长速度,产酸和生物膜形成能力降低^[29]。在甘露糖-PTS (*man*-PTS) 系统中,发现 *EIIC* 蛋白参与抑制单核细胞增多性李斯特菌的碳分解代谢物和毒力基因表达^[30]。Pridgeon 等^[31]对海豚链球菌减毒疫苗菌株和其强毒亲本菌株进行比较研究,发现强毒亲本菌株的果糖-PTS (*fru*-PTS) 的 *EII* 多结构域蛋白与该菌的毒力有关。本研究发现,无乳链球菌的强毒或弱毒株 *cel-EIIB* 基因缺失后,在所检测 *man*-PTS、*glu*-PTS 和 *asc*-PTS 系统内的相关基因表达模式一致,表明无乳链球菌的 *cel*-PTS 的 *EIIB* 基因未通过调控上述 PTS 来影响细菌毒力。Cao 等^[29]在单核细胞增多性李斯特菌中发现编码 *cel*-PTS 的 *EIIA* 蛋白基因缺失会抑制其毒力基因表达,揭示 *EIIA* 蛋白正向调控该菌毒力。本研究发现, *cel-EIIB* 基因缺失会导致 *cel*-PTS 自身的 *EIIA* 基因在弱毒株上表达水平显著上调,与在强毒株中呈现相反的表达模式,由此推测无乳链球菌弱毒株的毒力返强与 *EIIA* 基因的表达上调有关。

无乳链球菌 TCS 系统的 *DltS/R* 是 *dlt* 操纵子 *dltA* 上游两个调节基因,当 *dltA* 表达下调时,无乳链球菌形成团块的能力和对抗菌多肽黏杆菌素敏感性均增强^[14]。本研究中,当 *cel-EIIB* 缺失后,弱毒株中的 *DltR/S* 均显著性上调,可能通过调节下游毒力基因的表达而使菌株毒力返强。Gendrin 等^[15]研究无乳链球菌 *RgfC/A* 的调控功能时证实,

RgfC 的功能丧失,引起超过 200 个基因发生差异性表达,最终导致细菌的毒力增强。*CsrR/S* 调节部分无乳链球菌重要毒力因子的表达水平,在小鼠感染模型中,无乳链球菌 *CsrR* 缺失,溶血素的表达增加并导致小鼠败血症和脑膜炎^[16]。另有研究发现,无乳链球菌 *CiaH/R* 功能丧失时,导致菌株在体外细胞存活率降低以及对宿主的毒力降低,该 TCS 是无乳链球菌在细胞内存活和侵袭性致病机制的关键因子^[17]。在本研究中,当 *cel-EIIB* 缺失时,无乳链球菌弱毒株 *RgfC* 和 *CsrR* 显著性上调, *CiaH* 显著性下调,反而引起该菌株的毒力返强,这与上述的研究结果相矛盾,需进一步探明其具体机制。

透明质酸裂解酶(*HlyB*)是由 *hlyB* 基因编码的分泌性蛋白酶,可以裂解透明质酸,其有助于无乳链球菌侵入到宿主组织内^[32],有研究发现,血液循环系统感染的新生儿体内透明质酸裂解酶浓度比无症状感染的新生儿的要高^[33]。免疫原性细菌黏附蛋白(*BibA*)是一种保守的细胞壁锚定蛋白,该蛋白能促进无乳链球菌与人上皮细胞的黏附,还有助于细菌在宿主血液中存活^[34]。无乳链球菌的 *SodA* 能够催化超氧离子为分子态氧(O_2)和 H_2O_2 ,抵御氧化应激,降低超氧自由基对其造成的损害并及时修复受损菌体,在小鼠的感染模型中发现,无乳链球菌的 *sodA* 缺失株在血液和脑中的存活率显著降低^[35]。本研究发现, *cel-EIIB* 缺失会导致无乳链球菌弱毒株的 *hlyB*、*bibA* 和 *sodA* 基因表达显著下调,说明这些基因在该菌株毒力返强过程中可能未发挥作用。荚膜多糖(*CPS*)是无乳链球菌重要的毒力因子,其合成受 16 个 *cps* 基因(*cpsA-L* 和 *neuA-D*)控制,研究显示,无乳链球菌 *cps* 基因缺失株的 LD_{50} 比同源野生株提高 $10^3 \sim 10^5$ 倍^[36]。无乳链球菌具有裂解细胞外基质(*ECM*)功能,丝氨酸蛋白酶(*CspA*)在裂解宿主 *ECM* 过程中发挥重要作用,同时还会阻碍宿主免疫系统对无乳链球菌的识别和吞噬摄取;在感染的新生儿脓毒症模型中, *cspA* 表达缺陷的无乳链球菌毒力大大降低^[37]。纤维蛋白原结合蛋白(*PavA*)已被证明参与肺炎链球菌与纤维连接蛋白的结合,对细菌的定植起到促进作用,是一种重要的毒力因子^[38]。

在本研究中,当 *cel-EIIB* 缺失后,无乳链球菌弱毒株的 *cpsD*、*cpsG*、*cspA* 和 *pavA* 基因显著上调,而在强毒株中则下调或下调不显著,由此推测,*cel-EIIB* 基因缺失导致无乳链球菌弱毒株毒力返强与这 4 种毒力基因的表达上调有关。

综上所述,无乳链球菌的 *cel-EIIB* 蛋白功能丧失,会导致弱毒株毒力返强,而对强毒株毒力影响轻微。*cel-PTS* 系统的 *cel-EIIA*、双组分信号转导系统(TCS)的 *DltR* 和 *CiaH* 以及毒力基因 *sodA*、*cpsD* 和 *cpsG* 在强、弱毒株中呈现相反的表达模式。*cel-EIIB* 缺失后,虽然 TCS 系统的 *RgfC*、*DltS* 和 *CsrR* 以及毒力基因 *cspA* 和 *pavA* 在强毒株中表达未受影响,但在弱毒株中的表达却显著上调。*EIIB* 蛋白可能通过调控上述毒力相关基因表达而负向影响弱毒菌株的毒力。

参考文献:

- [1] Patras K A, Nizet V. Group B streptococcal maternal colonization and neonatal disease: Molecular mechanisms and preventative approaches[J]. *Frontiers in Pediatrics*, 2018, 6: 27.
- [2] Zhang D F, Yuan W, Ke X L, et al. Molecular characteristics and transmission of *Streptococcus agalactiae* in a major tilapia culturing area of China[J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2017, 24(3): 606-614. [张德锋, 袁伟, 可小丽, 等. 中国罗非鱼主养区无乳链球菌的分子流行特征及其传播方式[J]. *中国水产科学*, 2017, 24(3): 606-614.]
- [3] Fishery and Fishery Administration of the Ministry of Agriculture and Rural Affairs, National Fisheries Technology Extension Center, China Society of Fisheries. *China Fisheries Statistics Yearbook 2019*[M]. Beijing: China Agriculture Press, 2019: 30-33. [农业农村部渔业渔政管理局, 全国水产技术推广总站, 中国水产学会. 2019 中国渔业统计年鉴[M]. 北京: 中国农业出版社, 2019: 30-33.]
- [4] Liu C, Feng J, Zhang D F, et al. Clustering analysis of antibiograms and antibiogram types of *Streptococcus agalactiae* strains from tilapia in China[J]. *Microbial Drug Resistance*, 2018, 24(9): 1431-1439.
- [5] Shi H Y, Dong J J, Zhang D F, et al. Construction and characterization of *cpsE*- and *neuA*-deleted mutants of *Streptococcus agalactiae* isolated from Nile tilapia[J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2017, 24(5): 977-987. [师红亚, 董浚键, 张德锋, 等. 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[J]. *中国水产科学*, 2017, 24(5): 977-987.]
- [6] Su Y L, Liu C, Deng Y Q, et al. Research on *Streptococcus agalactiae* disease in tilapia: A review[J]. *Journal of Dalian Ocean University*, 2019, 34(5): 757-766. [苏友禄, 刘婵, 邓益琴, 等. 罗非鱼无乳链球菌病的研究进展[J]. *大连海洋大学学报*, 2019, 34(5): 757-766.]
- [7] Galinier A, Deutscher J. Sophisticated regulation of transcriptional factors by the bacterial phosphoenolpyruvate: Sugar phosphotransferase system[J]. *Journal of Molecular Biology*, 2017, 429(6): 773-789.
- [8] Liu Y H, Ceruso M, Jiang Y J, et al. Construction of *Listeria monocytogenes* mutants with in-frame deletions in the phosphotransferase transport system (PTS) and analysis of their growth under stress conditions[J]. *Journal of Food Science*, 2013, 78(9): M1392-M1398.
- [9] Liu G J, Zhang W, Lu C P. Complete genome sequence of *Streptococcus agalactiae* GD201008-001, isolated in China from Tilapia with meningoencephalitis[J]. *Journal of Bacteriology*, 2012, 194(23): 6653.
- [10] Stülke J. Regulation of virulence in *Bacillus anthracis*: The phosphotransferase system transmits the signals[J]. *Molecular Microbiology*, 2007, 63(3): 626-628.
- [11] Bourret R B, Silversmith R E. Two-component signal transduction[J]. *Current Opinion in Microbiology*, 2010, 13(2): 113-115.
- [12] Snyder H, Kellogg S L, Skarda L M, et al. Nutritional control of antibiotic resistance via an interface between the phosphotransferase system and a two-component signaling system[J]. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2014, 58(2): 957-965.
- [13] Rozhdestvenskaya A S, Totolian A A, Dmitriev A V. Inactivation of DNA-binding response regulator Sak189 abrogates beta-antigen expression and affects virulence of *Streptococcus agalactiae*[J]. *PLoS ONE*, 2010, 5(4): e10212.
- [14] Poyart C, Lamy M C, Boumaila C, et al. Regulation of D-alanyl-lipoteichoic acid biosynthesis in *Streptococcus agalactiae* involves a novel two-component regulatory system[J]. *Journal of Bacteriology*, 2001, 183(21): 6324-6334.
- [15] Gendrin C, Lembo A, Whidbey C, et al. The sensor histidine kinase RgfC affects group B streptococcal virulence factor expression independent of its response regulator RgfA[J]. *Infection and Immunity*, 2015, 83(3): 1078-1088.
- [16] Lembo A, Gurney M A, Burnside K, et al. Regulation of CovR expression in Group B *Streptococcus* impacts blood-brain barrier penetration[J]. *Molecular Microbiology*, 2010, 77(2): 431-443.
- [17] Quach D, van Sorge N M, Kristian S A, et al. The CiaR response regulator in group B *Streptococcus* promotes intracellular survival and resistance to innate immune defenses[J].

- Journal of Bacteriology, 2009, 191(7): 2023-2032.
- [18] Morach M, Stephan R, Schmitt S, et al. Population structure and virulence gene profiles of *Streptococcus agalactiae* collected from different hosts worldwide[J]. European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases, 2018, 37(3): 527-536.
- [19] Lin F P Y, Lan R T, Sintchenko V, et al. Computational bacterial genome-wide analysis of phylogenetic profiles reveals potential virulence genes of *Streptococcus agalactiae*[J]. PLoS ONE, 2011, 6(4): e17964.
- [20] Kannika K, Pisuttharachai D, Srisapoome P, et al. Molecular serotyping, virulence gene profiling and pathogenicity of *Streptococcus agalactiae* isolated from tilapia farms in Thailand by multiplex PCR[J]. Journal of Applied Microbiology, 2017, 122(6):1497-1507.
- [21] Li W, Su Y L, Mai Y Z, et al. Comparative proteome analysis of two *Streptococcus agalactiae* strains from cultured tilapia with different virulence[J]. Veterinary Microbiology, 2014, 170(1-2): 135-143.
- [22] Xu J, Xie Y D, Liu L, et al. Virulence regulation of cel-EIIB protein mediated PTS system in *Streptococcus agalactiae* in Nile tilapia[J]. Journal of Fish Diseases, 2019, 42(1): 11-19.
- [23] Bai F, Chen J S, Cheng C Y, et al. Expression levels of major virulence genes in a low-pathogenicity isolate of *Listeria monocytogenes*[J]. Progress in Veterinary Medicine, 2010, 31(S1): 108-111. [白帆, 陈健舜, 程昌勇, 等. 单核细胞增生李斯特菌弱毒株主要毒力基因表达水平分析[J]. 动物医学进展, 2010, 31(S1): 108-111.]
- [24] Tettelin H, Masignani V, Cieslewicz M J, et al. Complete genome sequence and comparative genomic analysis of an emerging human pathogen, serotype V *Streptococcus agalactiae*[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2002, 99(19): 12391-12396.
- [25] Zhu J J, Shen X S, Luo W, et al. The distribution pattern for pathogenic bacteria of *Streptococcus agalactiae* infect *Oreochromis niloticus* in vivo by different ways[J]. Freshwater Fisheries, 2018, 48(4): 76-80. [朱佳杰, 沈夏霜, 罗伟, 等. 无乳链球菌不同途径感染吉富罗非鱼后病原菌在体内的分布规律研究[J]. 淡水渔业, 2018, 48(4): 76-80.]
- [26] Kim B J, Hancock B M, Del Cid N, et al. *Streptococcus agalactiae* infection in zebrafish larvae[J]. Microbial Pathogenesis, 2015, 79: 57-60.
- [27] Lin D S, Fan J M, Wang J J, et al. The fructose-specific phosphotransferase system of *Klebsiella pneumoniae* is regulated by global regulator CRP and linked to virulence and growth[J]. Infection and Immunity, 2018, 86(8): e00340-18.
- [28] 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.
- [29] Cao T N, Joyet P, Aké F M D, et al. Studies of the *Listeria monocytogenes* cellobiose transport components and their impact on virulence gene repression[J]. Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology, 2020, 29(1-6): 10-26.
- [30] Vu-Khac H, Miller K W. Regulation of mannose phosphotransferase system permease and virulence gene expression in *Listeria monocytogenes* by the EII_t^{Man} transporter[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2009, 75(21): 6671-6678.
- [31] Pridgeon J W, Li Y H, Yildirim-Aksoy M, et al. Fitness cost, gyrB mutation, and absence of phosphotransferase system fructose specific IIABC component in novobiocin-resistant *Streptococcus iniae* vaccine strain ISNO[J]. Veterinary Microbiology, 2013, 165(3-4): 384-391.
- [32] Gase K, Ozegowski J, Malke H. The *Streptococcus agalactiae* hylB gene encoding hyaluronate lyase: Completion of the sequence and expression analysis[J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Structure and Expression, 1998, 1398(1): 86-98.
- [33] Milligan T W, Baker C J, Straus D C, et al. Association of elevated levels of extracellular neuraminidase with clinical isolates of type III group B streptococci[J]. Infection and Immunity, 1978, 21(3): 738-746.
- [34] Santi I, Scarselli M, Mariani M, et al. BibA: a novel immunogenic bacterial adhesin contributing to group B *Streptococcus* survival in human blood[J]. Molecular Microbiology, 2007, 63(3): 754-767.
- [35] Poyart C, Pellegrini E, Gaillot O, et al. Contribution of Mn-cofactored superoxide dismutase (SodA) to the virulence of *Streptococcus agalactiae*[J]. Infection and Immunity, 2001, 69(8): 5098-5106.
- [36] Lemire P, Houde M, Lecours M P, et al. Role of capsular polysaccharide in Group B *Streptococcus* interactions with dendritic cells[J]. Microbes and Infection, 2012, 14(12): 1064-1076.
- [37] Harris T O, Shelver D W, Bohnsack J F, et al. A novel streptococcal surface protease promotes virulence, resistance to opsonophagocytosis, and cleavage of human fibrinogen[J]. The Journal of Clinical Investigation, 2003, 111(1): 61-70.
- [38] Manne K, Narayana S V L, Chattopadhyay D. Crystal structure of the N-terminal domain of the fibronectin-binding protein PavA from *Streptococcus pneumoniae*[J]. Acta Crystallographica Section F, 2019, 75(10): 657-662.

Analysis of expression patterns of virulence-related genes regulated by the cel-EIIB protein in virulent and attenuated strains of *Streptococcus agalactiae* in tilapia

SU Youlu^{1,2}, WANG Baotun^{2,3}, XIE Yundan², LI Wei¹, JIANG Biao¹, FENG Juan², LIN Li¹

1. Innovative Institute of Animal Healthy Breeding, Zhongkai University of Agriculture and Engineering, Guangzhou 510225, China;
2. Key Laboratory of South China Sea Fishery Resources Exploitation & Utilization, Ministry of Agriculture and Rural Affairs; South China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou 510300, China;
3. School of Aquatic Products and Life, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China

Abstract: *Streptococcus agalactiae* is an important pathogen associated with humans, animals, and fishes. Recently, it has spread globally, resulting in great economic losses in tilapia industries. The phosphotransferase system (PTS) is regarded as the “nervous system” of bacteria. The effect of the EIIB protein of cellobiose-PTS (cel-PTS) on *S. agalactiae* virulent strain virulence is limited, but it could potentially effect that of the attenuated strain; however, the specific mechanism is still unclear. Therefore, it is necessary to clarify the expression patterns of virulence-related genes regulated by the EIIB protein. In the previous study, the *cel-EIIB* gene deletion of the *S. agalactiae* virulent strain was constructed by homologous recombination technology. In this study, the *cel-EIIB* gene deletion of the *S. agalactiae* attenuated strain was obtained using a similar method. Zebrafish were infected with a *S. agalactiae* virulent strain, attenuated strain, and their *cel-EIIB* gene deleted strains, respectively. The results showed that *S. agalactiae* attenuated strain virulence was significantly stronger after *cel-EIIB* gene deletion, whereas *S. agalactiae* virulent strain virulence was only slightly reduced. It was confirmed by PCR detection that the deletion of *cel-EIIB* could cause *cel-EIIA* of the cel-PTS system, *DltR* and *CiaH* of the two-component signal transduction system (TCS), and *sodA*, *cpsD*, and *cpsG* of virulence genes showed opposite expression patterns in virulent and attenuated strains. In addition, the expression of *RgfC*, *DltS*, and *CsrR* of TCS and *cspA* and *pavA* of virulence genes were not affected in the mutant of the virulent strain, but up-regulated significantly in the mutant of the attenuated strain. It is speculated that the increased virulence of the *S. agalactiae* attenuated strain was related to the up-regulation of the expression of these virulence-related genes. To summarize, the EIIB protein may negatively regulate the virulence of attenuated strains by regulating the expression of the above virulence-related genes.

Key words: *Streptococcus agalactiae*; cellobiose-phosphotransferase system; cel-EIIB; gene expression; tilapia

Corresponding author: LIN Li. E-mail: linli@zhku.edu.cn