

# 猪链球菌 2 型血清混浊因子基因的鉴定及其结构特征分析

冯亚莉<sup>1,2</sup>, 冉雪琴<sup>1</sup>, 王嘉福<sup>1\*</sup>, 钱 龙<sup>1</sup>

(1. 贵州大学动物科学学院, 贵阳 550025; 2. 石药集团恩必普药业有限公司, 石家庄 052160)

**摘要:** 猪链球菌是猪的主要病原, 也可导致人感染, 其致病机理尚未明确。作者设计了 1 对特异性引物, 采用特异性 PCR 从 2 株猪链球菌血清 2 型 606 中国分离株和 607 日本分离株的基因组中, 分离出 2 种血清混浊因子 (*ofs*) 基因, 全长 3 016 bp, 编码 938 个氨基酸, 其中日本分离株 607 的 *ofs* 基因序列与已知基因完全相同。中国分离株 606 的 *ofs* 基因与已知基因相差 7 个碱基, 导致 3 个氨基酸替换, 其中 1 个突变 (Asp353Gly) 位于蛋白的 N 端功能区, 可能影响其血清混浊功能; 另外 2 个氨基酸突变位于蛋白的 C 端重复区内。从 2 种 OFS 蛋白中, 找出了细菌黏附因子共有的结构特征, 2 种 OFS 蛋白 C 端区含有保守的 LPXTG 结构, 使 OFS 蛋白可固定于细菌的表面, 但其中的 3 个重复序列与纤黏蛋白结合蛋白 A 等的相似性很低, 两种 OFS 蛋白可能通过特殊的途径协助猪链球菌的黏附。猪链球菌 *ofs* 基因中重复序列和突变使得编码的蛋白表现出丰富的长度多态性。本研究获得的 2 种 OFS 属于中等长度的蛋白, 均来自强毒力型猪链球菌。这些结果提示菌株 606 和 607 携带的 *ofs* 基因可能是猪链球菌的毒力基因, 对猪链球菌的致病机理及其防治具有重要的意义。

**关键词:** II 型猪链球菌; 血清混浊因子; 多态性

中图分类号: S852.61

文献标识码: A

文章编号: 0366-6964(2012)02-0282-08

## Identification and Structure Features of Opacity Factor Genes from Two *Streptococcus suis* 2 Strains Originated from China and Japan

FENG Ya-li<sup>1,2</sup>, RAN Xue-qin<sup>1</sup>, WANG Jia-fu<sup>1\*</sup>, QIAN Long<sup>1</sup>

(1. College of Animal Science, Guizhou University, Guiyang 550025, China;

2. Shijiazhuang Pharmaceutical Group Co., Ltd., Shijiazhuang 052160, China)

**Abstract:** *Streptococcus suis* is a swine pathogen which causes serious inflammation of piglets. It can infect people in contact with diseased pig or its by-products. The mechanisms of *S. suis* pathogenesis are poorly understood. Taking two *S. suis* serotype 2 strains 606 isolated from China and 607 from Japan as samples, opacity factor of *S. suis* (*ofs*) genes were amplified from the genomic DNA of these bacteria by PCR method. The *ofs* genes contained 3 016 bp which encoded for 938 aa based on alignment analysis. The identity of nucleotide sequence of *ofs* gene from SS<sub>2</sub> strain 607 was 100% to the reported SS<sub>2</sub> genes while seven nucleotides in *ofs* of SS<sub>2</sub> strain 606 were different and resulted in three amino acids substitution. One of the substitutions located at the N-terminal region of OFS protein in which glycine (without charge) was changed to be aspartic acid (with negative charge). It was proposed that the change would have an effect on the OFS ability to opacify serum of mammals. The other two substitutions were found from the repeats in C-terminal region of OFS in SS<sub>2</sub> strain 606. Furthermore, the length and amino acid constitute of

收稿日期: 2011-04-24

基金项目: 国家科技支撑计划 (2008BADB5B02); 贵州省科技创新人才团队建设专项 (黔科合人才团队 2009-4006); 贵州省科学技术基金 (黔科合 J 字 (2006) 2026 号)

作者简介: 冯亚莉 (1980-), 女, 河北人, 硕士, 主要从事微生物学研究, E-mail: fengyali110@tom.com

\* 通讯作者: 王嘉福, 教授, Tel: 0851-3863510, Fax: 0851-8298005, E-mail: jfwang@gzu.edu.cn

three repeats in OFS of SS<sub>2</sub> strain 606 and 607 was very divergent from that of fibronectin-binding protein A (FnBA) of *Streptococcus dysgalactiae*. It was suggested that the pathway of OFS protein binding to fibronectin of host cells might be different from that of FnBA. However, OFS proteins did carry the typical structural elements of MSCRAMMs (microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules) with a large N-terminal region, specific repeats and LPX-TG domain elements in the C-terminal region. It could be presumed that OFS of SS<sub>2</sub> strain 606 and 607 function as an adhesin combined on the surface of bacteria and bind the fibronectin with its repeats at the C-terminus. The correlation between the OFS with moderate size (938 aa) and the high virulence of streptococci implied that *ofs* gene was a pivotal virulent gene of SS<sub>2</sub> strain 606 and 607.

**Key words:** *Streptococcus suis* type 2; serum opacity factor; polymorphisms

猪链球菌是重要的人畜共患病病原之一,共分为 35 个血清型<sup>[1]</sup>,其中猪链球菌血清 2 型存在于健康成年动物体内,特别是扁桃腺中,经身体接触传给仔猪,易引起仔猪的猪链球菌病,表现为多个组织器官的炎症,感染仔猪常因脑膜炎、败血症等死亡;病原也可经过皮肤表面的创口传染人,使人出现脑膜炎、败血症、关节炎、耳聋等症状<sup>[2]</sup>。猪链球菌 2 型携带的毒力因子与菌株的致病力直接相关。已知猪链球菌 2 型的毒力因子有荚膜多糖(Capsular polysaccharide, CPS)、溶菌酶释放蛋白(Muramidase released protein, MRP)、溶血素(Suilyisin, SLY)等<sup>[3]</sup>,但迄今为止只有荚膜多糖是唯一证明的主要毒力因子<sup>[4]</sup>。猪链球菌混浊因子(Opacity factor of *S. suis*, OFS)是新近鉴定的毒力因子,感染仔猪后能产生明显的病变,基因的突变体使菌株的致病力明显下降,提示 OFS 与猪链球菌 2 型的致病力直接有关<sup>[5]</sup>。本文对中国和日本来源的 2 株猪链球菌 2 型的 *ofs* 基因进行分离鉴定和对比研究。

## 1 材料与方 法

### 1.1 实验菌株及克隆载体

2 株 R 群猪链球菌血清 2 型(*Streptococcus suis* serotype 2, SS<sub>2</sub>)606 和 607 购自中国兽药药品监查所(中国微生物菌种信息网 <http://www.mum800.com/>),其中,菌株 606(C55604)自上海市嘉定县发生脑膜炎的仔猪心血中分离,菌株 607(C55953,735,NCTC102)由日本家畜卫生试验场从败血症猪体内分离。克隆载体 pMD-T19 simple 购自 TaKaRa 公司;大肠杆菌 TG1 由本实验室保存。引物的合成和核苷酸序列测定均由上海捷瑞生物工程有 限 公 司 完 成。

### 1.2 猪链球菌 2 型 *ofs* 基因的克隆

以已知 *ofs* 基因序列为依据,设计 1 对特异性引物, uofs: 5'-CGTCCTATTGCTGTTGAAGACCC-3', dofs:5'-TCTGCAGCTATTGCGAATGGC-3'。

细菌基因组 DNA 的提取采取煮沸法。细菌于 5% 小牛血清-THB 液体培养基中培养 8 h,取 1.0 mL 经 10 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 5 min 收集细菌,以裂解液(0.25% SDS, 0.05 mol·L<sup>-1</sup> NaOH)40 μL 重悬,沸水浴 10 min;10 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 5 min;取上清作为基因扩增的模板。设置 20 μL 的 PCR 反应体系,其中含 10× *Taq* DNA polymerase buffer 2.0 μL, 2.5 mmol·L<sup>-1</sup> dNTPs 1.6 μL, 0.1 μg·μL<sup>-1</sup> 引物各 0.4 μL, *Taq* DNA polymerase 0.5 IU(天根,北京),基因组模板 1 μL。PCR 反应条件:94 ℃ 预变性 5 min;94 ℃ 1.5 min, 55~58 ℃ 30 s, 72 ℃ 2.5 min, 30 个循环;72 ℃ 延伸 10 min。PCR 产物以 1% 琼脂糖凝胶电泳检测。参照柱式 DNA 胶回收试剂盒(Omega)说明书回收目的片段,与载体 pMD-19 T vector (TaKaRa)连接,转化感受态大肠杆菌 TG1,涂布于含氨苄青霉素、X-gal 和 IPTG 的 LB 琼脂平板上,挑取白色菌落,经菌落和质粒 PCR 鉴定为阳性的重组子进行核苷酸序列测定。

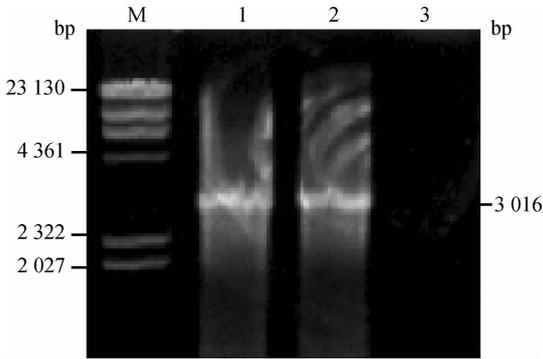
菌株 606 和 607 分离出的 *ofs* 基因在 GenBank 数据库的登录号分别为 EF195770.1 和 EF195771.1。应用 DNStar(v5.01)软件进行碱基序列分析,基因编码蛋白的二级结构分析采用 Dundee University 开发的 Jpred3 软件(<http://www.compbio.dundee.ac.uk/www-jpred/>),信号肽序列经 SignalP v3.0(<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>)软件分析,蛋白的聚类分析采用 Mega4.0 软件中的邻接法(Neighbor-Joining method),并进行 1 000 次自举检验,以枝

长表示遗传距离。

## 2 结果

### 2.1 基因的克隆

以猪链球菌 SS<sub>2</sub> 606(上海株)和 607(日本株)基因组 DNA 为模板,经扩增获得 1 条 3 016 bp 条带,与预期片段的大小一致(图 1)。目的片段经克隆后,随机挑取 2 个克隆子测定碱基序列,每个克隆子测定 2 次,获得插入片段的碱基序列。



M.  $\lambda$  DNA/*Hind* III 相对分子质量标准; 1. 606 菌株; 2. 607 菌株; 3. 对照  
M.  $\lambda$  DNA/*Hind* III marker; 1. Strain 606; 2. Strain 607; 3. Control

图 1 II 型猪链球菌 SS<sub>2</sub> 606 和 607 的 *ofs* 基因扩增  
Fig. 1 Amplification of *ofs* gene taking the genomic DNA of SS<sub>2</sub> strain 606 and 607 as templates

### 2.2 *ofs* 基因及编码蛋白的序列分析

2 株菌的 *ofs* 基因长度一样,均为 3 016 bp,经 NCBI 在线同源比对,据荷兰分离株 SS<sub>2</sub> 10 (AY819647.1)的 *ofs* 基因结构,确定分离的 2 个基因(3 016 bp)的开放读码框位于 41—2 857 bp 区段,

编码 938 个氨基酸。与已知序列相比,SS<sub>2</sub> 日本分离菌株 607 的 *ofs* 基因与强毒型中国江苏分离株 SS<sub>14</sub> JS14 (CP002465.1)、中国贵州分离株 GZ1 (CP000837.1)、英国分离株 P1/7 (AM946016.1)、日本分离株 NIAH11433 (AB325706.1)、荷兰分离株 SS<sub>2</sub> 10 (AY819647.1) 5 个基因的碱基序列完全相同,相似性为 100%;上海分离菌株 SS<sub>2</sub> 606 的 *ofs* 基因与上述基因的相似性为 99%,之间有 7 个碱基不同,导致 353、708、743 位点的 3 个氨基酸变异(表 1)。经 SignalP v3.0 软件分析,2 种蛋白都有信号肽,信号肽切割位点于 A22-E23 间(图 2),之后的氨基酸至 P672 为蛋白的 N 端区,K673 至 K938 区域为蛋白的 C 端区(图 3)。从菌株 SS<sub>2</sub> 606 的 OFS 蛋白 C 端区找到 3 个重复序列 R1、R2 和 R3(图 4),以 49~50 个氨基酸为重复单位,分别位于 674—723、728—777、782—831 氨基酸区段,其中 R1 与 R2 均由 50 个氨基酸残基组成,之间的相似性较高,为 84%;R3 较 R1 少 1 个氨基酸,之间的相似性仅 40%;菌株 SS<sub>2</sub> 607 的 OFS 蛋白中 3 个重复区的特点与 SS<sub>2</sub> 606 相近,R1 与 R2 的相似性为 82%,R3 与 R1 的相似性为 42%。对菌株 SS<sub>2</sub> 606 的 OFS 蛋白二级结构进行分析(图 3),共有 13 个  $\alpha$  螺旋、16 个  $\beta$  片层,多数分布在蛋白的 N 端区;蛋白的 C 端区(673-938)只有 1 个  $\alpha$  螺旋,位于蛋白的 C 端末尾,由 T917—K932 共 16 个氨基酸残基组成。在 OFS 蛋白 N 端结构域的末尾有脯氨酸富集区(K616—K673),57 个氨基酸中脯氨酸占 19.3%,接近 1/5。在蛋白 C 端结构域中有细胞壁结合域 LPXTG,位于最后 1 个  $\alpha$  螺旋的 N 端。

表 1 2 株 II 型猪链球菌 *ofs* 基因序列的碱基差异

Table 1 The different sites of *ofs* genes from two *S. suis* serotype 2 strains

菌株 Strains	<i>ofs</i> 基因序列的碱基差异(变异氨基酸) Different nucleotide sites in <i>ofs</i> genes (related amino acid mutation) *						
	412	1 098	1 402	1 834	2 162	2 267	2 786
SS <sub>2</sub> 606	G	A(Asp <sub>353</sub> )	T	G	G(Ala <sub>708</sub> )	G(Val <sub>743</sub> )	C
SS <sub>2</sub> 607	A	G(Gly <sub>353</sub> )	C	A	A(Thr <sub>708</sub> )	A(Ile <sub>743</sub> )	T

\*. 核苷酸和氨基酸的位置据登录序列;II 型猪链球菌上海分离株 606(EF195770.1);日本分离株 607(EF195771.2)

\*. Location of nucleotide and amino acid were based on the accession number in GenBank with SS<sub>2</sub> strain 606 from China of EF195770.1 and SS<sub>2</sub> strain 607 from Japan of EF195771.2

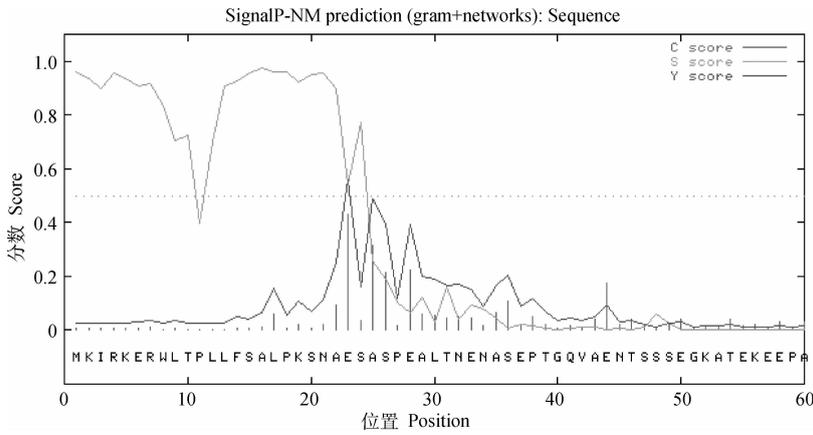
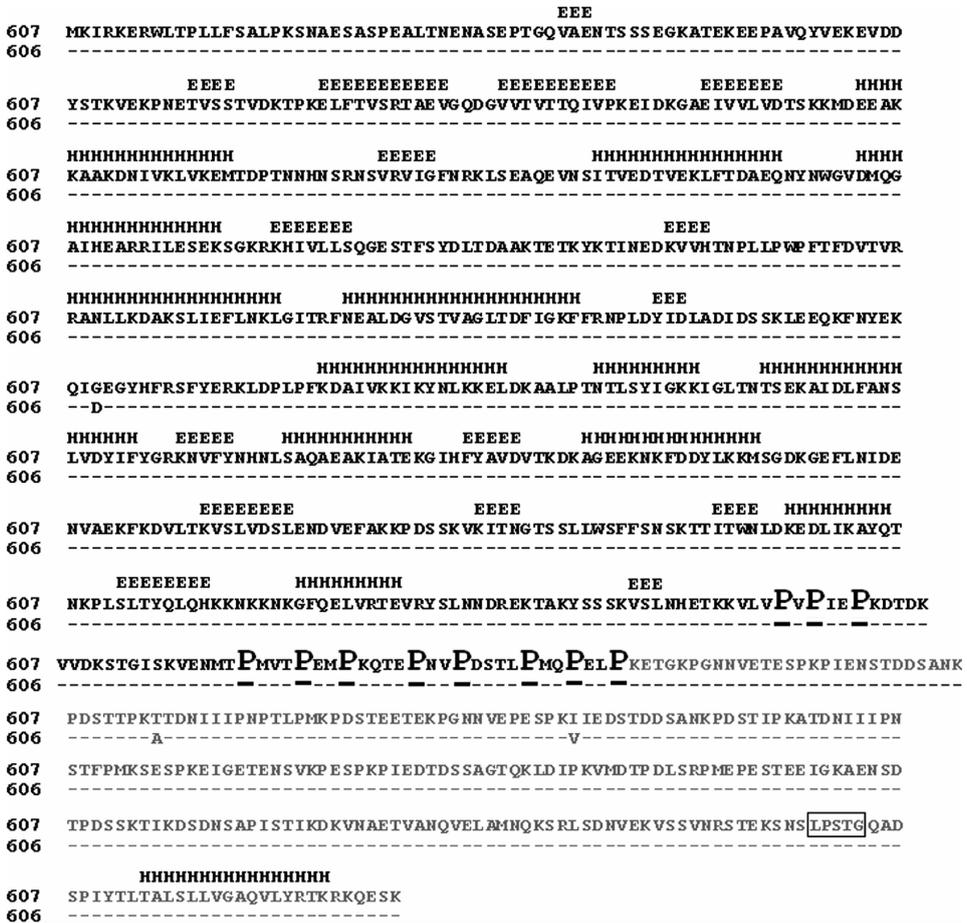


图 2 菌株 SS<sub>2</sub> 606 的 *ofs* 基因编码蛋白的 N 端信号肽分析

Fig. 2 Prediction of signal site of protein coded by *ofs* gene of SS<sub>2</sub> strain 606 using neural networks model (NN)



H 代表  $\alpha$ -螺旋, E 代表  $\beta$ -片层结构;蛋白的 N 端自成熟肽的第 1 个氨基酸 E23 至 P672, N 端末尾的富 Pro 区(K616-K673)中的脯氨酸 P 以大号字突出显示;蛋白的 C 端起自 K673 至 K938, 以浅色字母突出显示。细胞壁结合区 LPSTG 以方框突出显示

The alpha helix was showed as "H" and beta sheet as "E". The N-terminal region of OFS protein started from E23 to P672. The proline was highlighted as a larger "P" in the proline-rich region of N-terminal region. The C-terminal region was denoted by light color letters and started from K673 to K938. The LPSTG was framed in square box which was the cell wall-associated motif

图 3 SS<sub>2</sub> 606 与 607 菌株 OFS 蛋白的二级结构比较

Fig. 3 Comparison of the second structure of OFS protein in SS<sub>2</sub> strains 606 and 607

<b>FnBA</b>	R1	829	***	*	*	*	*
<b>606</b>	R1	674	ETGKPGNNVETESPKP	IENSTDD	SANKPDS	TTPKATDNI	IPNPTLPMKP
	R2	728	--E-----P---V-D-----	-----I-----	-----S-F---S		
	R3	782	-I-ETE-S-KP-----D	--S-GTQKLDI-VM-TPDL	SR-ME-EST		
<b>607</b>	R1	674	ETGKPGNNVETESPKP	IENSTDD	SANKPDS	TTPKTTDNI	IPNPTLPMKP
	R2	728	--E-----P---I-D-----	-----I-A-----	-----S-F---S		
	R3	782	-I-ETE-S-KP-----D	--S-GTQKLDI-VM-TPDL	SR-ME-EST		

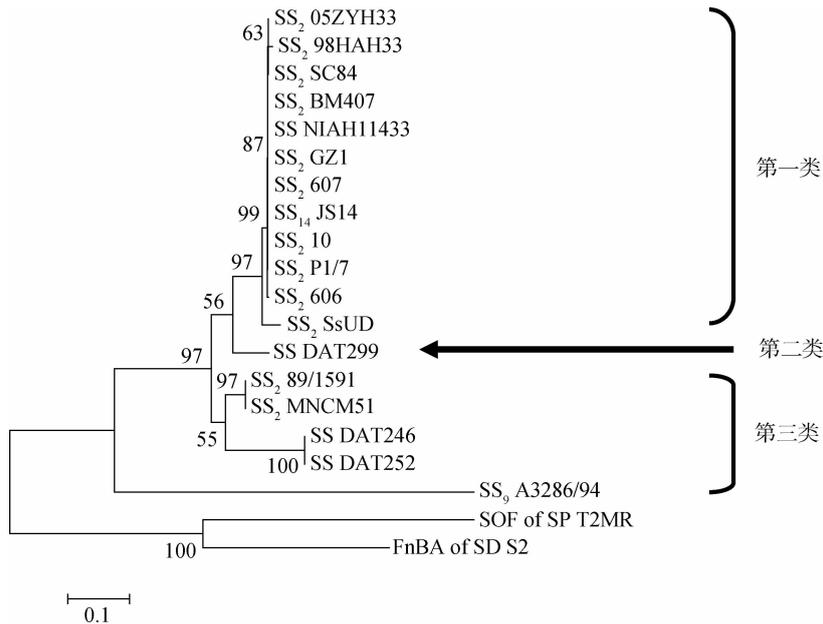
The accession numbers of OFS proteins in GenBank were: FnBA of *S. dysgalactiae* strain S2 (CAA80121.1). The conserved amino acids in the first repeats region (829-864) of FnBA were highlighted with stars (\*)

图 4 菌株 SS<sub>2</sub> 606 和 607 的 OFS 蛋白 C 端 3 个重复序列的对比

Fig. 4 Compare of three peptide repeats on the C-terminus of OFS protein in strain 606 and 607 and FnBA

以停乳链球菌 (*S. dysgalactiae*) 的纤黏蛋白结合蛋白 A (Fibronectin-binding protein A, FnBA)、化脓性链球菌 (*S. pyogenes*) 的血清混浊因子 (Serum opacity factor, SOF) 蛋白为外群, 将 SS<sub>2</sub> 606 和 607 的 OFS 蛋白与已知蛋白进行比对, 共获得 18 种猪链球菌 OFS 蛋白, 表现出 3 类长度多态性 (图

5), 第 1 类蛋白含有完整的 N 端结构, 在 GenBank 中记录的长度有 830、930、938、949 aa 4 种。其中, 830 aa (CAR35441.1) 由意大利分离株 SS<sub>2</sub> SsUD 的 *ofs* 基因编码, 与菌株 SS<sub>2</sub> 607 和 SS<sub>2</sub> 10 等的 OFS 相比, 缺失了 108 个氨基酸, 使蛋白 C 端的第 2 重复区 R2 不完整, 第 3 重复区 R3 全部缺失; 菌株 SS<sub>14</sub>



The cited protein sequences in GenBank were as following. SS<sub>2</sub> strain 05ZYH33 (949aa): YP\_001199029.1; SS<sub>2</sub> strain 98HAH33 (949): YP\_001201232.1; OFS in SS<sub>2</sub> strain SC84 (938aa), SS<sub>2</sub> strain BM407 (938aa) and SS<sub>2</sub> strain P1/7 (938aa) were deduced based on *ofs* gene with accession number FM252031, FM252032.1, and AM946016.1 in GenBank, respectively; strain NIAH11433 (938aa): BAF96965.1; SS<sub>2</sub> strain GZ1 (949aa): ADE31950.1; SS<sub>2</sub> 607 (938aa): ABM88720.2; SS<sub>14</sub> JS14 (938aa): ADV70693.1; SS<sub>2</sub> strain 10 (938aa): AAX56334.1; SS<sub>2</sub> 606 (938aa): ABM88719.1; SS<sub>2</sub> strain SsUD (830aa): CAR35441.1; SS strain DAT299 (1058aa): BAF96966.1; SS<sub>2</sub> stain 89/1591 (564aa): EEF63642.1; SS<sub>2</sub> strain MNCM51 (564aa): BAF96969.1; SS strain DAT246 (216aa): BAF96967.1; SS strain DAT 252 (216aa): BAF96968.1; SS<sub>9</sub> strain A3286/94 (205aa): ACT66660.1. SOF of *S. pyogenes* strain T2MR (1046aa, AAC32596.1) and FnBA of *S. dysgalactiae* strain S2 (1091aa, CAA80121.1) were taken as outgroup

图 5 链球菌 *ofs* 基因编码蛋白的聚类分析

Fig. 5 The phylogenetic tree of proteins encoded by *ofs* genes using Neighbor-Joining method of MEGA4.0 program

JS14 的 OFS(ADV70693.1)为 930 aa;SS<sub>2</sub> GZ1、SS<sub>2</sub> 98HAH33 和 SS<sub>2</sub> 05ZYH33 三株菌的 OFS 为 949 aa,后 4 种蛋白的氨基酸序列由细菌全基因组测序结果推导产生。菌株 SS<sub>14</sub> JS14 和 SS<sub>2</sub> GZ1 的 *ofs* 基因与 SS<sub>2</sub> 607 的 3 016 bp 碱基序列完全一样,4 种 OFS 蛋白与 SS<sub>2</sub> 607 菌株 OFS 的差异源自信号肽起始位置的确定,故将这 4 种蛋白的氨基酸序列均调整为 938 aa 进行聚类分析;第 2 类的蛋白最大,由 1 058 aa 组成,主要在蛋白的信号肽区和 C 端分别插入了 79 和 59 个氨基酸,其中 C 端多出的 59 个氨基酸使菌株 DAT299 有 4 个重复区;蛋白 N 端区比 SS<sub>2</sub> 606 的 OFS 少 3 个氨基酸;第 3 类蛋白由于编码基因中的碱基突变或 IS 元件(Insertion sequence element,IS)的插入使终止码提前,产生较短的蛋白,有 205、216、564 aa 3 种类型。

### 3 讨论

以中国分离株 SS<sub>2</sub> 606 和日本分离株 SS<sub>2</sub> 607 2 株菌为研究材料,分离出 2 种 *ofs* 基因,长度均为 3 016 bp,其中菌株 607 的 *ofs* 基因与其它中国分离株、日本分离株、欧洲分离株等基因的碱基序列完全相同。将欧洲分离株 SS<sub>2</sub> 10 的 *ofs* 基因异源表达,证实 OFS 蛋白的 N 端区域从 P27 至 P672,能使人、马和猪的血清变混浊,为蛋白的功能区<sup>[5]</sup>,因此将菌株 SS<sub>2</sub> 606 和 607 的 *ofs* 基因编码区确定为 41—2 857 bp,编码 938 aa 的大分子蛋白 OFS。菌株 SS<sub>2</sub> 606 的 *ofs* 基因与 SS<sub>2</sub> 607 的相似性为 99%,之间有 7 个碱基发生了变化,导致 3 个氨基酸替换,其中 Asp<sub>353</sub> 突变位于蛋白的 N 端区,处于第 5~6 个  $\alpha$  螺旋之间(图 3),Asp<sub>353</sub> 的侧基带负电荷,其它 OFS 蛋白相应位点为不带电荷的 Gly<sub>353</sub>,因此这种突变可能导致 2 个菌株的 OFS 蛋白有一定的功能差异;另外 2 个变异位点 Ala708Thr 和 Val743Ile 位于蛋白的 C 端区,分别处于重复区 R1、R2 中,变异的氨基酸均为疏水性氨基酸,化学性质较为接近,对蛋白功能的影响可能不大。

猪链球菌 SS<sub>2</sub> 10 的 OFS 蛋白成熟肽的 N 端区序列与停乳链球菌(*S. dysgalactiae*)的 FnBP(CAA80121.1)、化脓性链球菌(*S. pyogenes*)的 SOF(AAC32596.1)之间的相似性分别为 39%、34%,三者都可以使哺乳动物的血清变混浊<sup>[5-6]</sup>,而且从菌株 SS<sub>2</sub> 606 和 607 2 株菌的 OFS 蛋白中,也找到了黏附因子保守的结构特征,即:有信号肽,成

熟肽 N 端结构域较大,有富脯氨酸区;C 端区域较小,并有重复序列和 LPXTG 结构域。因此 SS<sub>2</sub> 的 OFS 蛋白也是细菌表面识别黏附基质分子(Microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules,MSCRAMMs)的成员<sup>[7]</sup>。

OFS 等黏附因子的 C 端区介导细胞与宿主细胞间的黏附<sup>[7]</sup>。菌株 SS<sub>2</sub> 606 和 607 的 OFS 蛋白的 C 端结构域中有 3 个重复序列 R1、R2 和 R3,前 2 个重复区与其它猪链球菌 OFS 蛋白之间的相似性为 90%~98%,第 3 个重复区 R3 的相似性为 100%,说明猪链球菌 OFS 的重复区高度保守。FnBP 和 SOF 通过其 C 端的重复序列与宿主细胞的纤黏蛋白(Fibronectin)、纤维蛋白原(Fibrinogen)、纤蛋白-1(Fibulin-1)结合,这些因子广泛存在于哺乳动物的组织液、基质或细胞的外表面,是化脓性链球菌、停乳链球菌黏附和定植到宿主细胞表面的主要介质,因此这些黏附因子是链球菌入侵的重要毒力因子<sup>[8]</sup>,同时,SS<sub>2</sub> 10 的 *ofs* 基因敲除的突变体对仔猪的毒性明显下降<sup>[5]</sup>,说明 OFS 可能也是猪链球菌的毒力因子。然而菌株 SS<sub>2</sub> 606 和 607 的 OFS 蛋白的各重复序列与 FnBA 和 SOF 相应序列的差异较大,Western blot 试验还证实猪链球菌 SS<sub>2</sub> 10 的 OFS 蛋白的重复区片段不能与纤黏蛋白结合<sup>[5]</sup>,但从菌株 SS<sub>2</sub> 606 和 607 的 OFS 蛋白 C 端末尾都找到了 LPSTG 结构域,后者是分选酶(Sortase)作用的靶位点。分选酶可催化 SOF 等表面蛋白与细菌的细胞壁成份形成共价键<sup>[9]</sup>。因此推测猪链球菌 SS<sub>2</sub> 606 和 607 的 OFS 蛋白可能也是先结合到细菌的细胞壁上起黏附作用的,但具体方式可能与 SOF 等不同。此外,*ofs* 基因结构中的重复序列还有助于基因的重排,产生多样化的 OFS 蛋白,以逃避宿主免疫系统的监视,SS<sub>2</sub> 菌株中出现 1058、938、830、564、216、205 等多种长度的 OFS 蛋白(图 5,表 2),并广泛分布于 SS<sub>2</sub>、SS<sub>14</sub>、SS<sub>9</sub> 等多种血清型的猪链球菌细胞表面,也充分证实了这一点。

OFS 蛋白的 N 端区域具有使哺乳动物血清变混浊的功能。对 SS<sub>2</sub> 606 和 607 2 种 OFS 蛋白与已知序列进行的聚类分析表明,OFS 蛋白的长度多态性集中在蛋白的 N 端区,第 1、2 类蛋白中含有完整的 N 端区,第 3 类蛋白由于基因突变产生 N 端不完整的截短蛋白。试验证明只有第 1、2 类 OFS 蛋白可以使哺乳动物的血清变混浊,第 3 类蛋白则丧失了此功能<sup>[5]</sup>。OFS 蛋白使血清混浊的原理与脂质

油滴的形成有关。与 SOF 因子相似, OFS 也可以替换高密度脂蛋白 (High-density lipoprotein, HDL) 中的脂蛋白 Apo A-I (Apolipoprotein A-I), 使油滴的直径增大 10~60 倍, 血清因此变混浊<sup>[10]</sup>。进一步的研究证明 SOF 因子的 N 端不仅是血清混浊的活性中心, 也是破坏 HDL 分子的重要介质<sup>[10]</sup>, 已知 HDL 有明显的抗炎、抗氧化作用<sup>[11]</sup>。OFS 因子对 HDL 的破坏作用与其致病机理之间的关系还不清楚。在聚类分析中(图 5), 以 938 aa 为主的第 1 类 OFS 蛋白, 包括 SS<sub>2</sub> 606 和 607 及其它 8 个 SS<sub>2</sub> 菌株, 其间只相差 1~6 个氨基酸, 相似性为 99.4%~99.9%, 均为脑膜炎或败血症的病猪或病人中分离到的强毒力菌株<sup>[5,12-17]</sup>, 如菌株 SS<sub>2</sub> 05ZYH33 是从 2005 年在四川资阳暴发的猪链球菌 2 型事件中, 发生脑膜炎患者的脑脊液中分离获

得<sup>[12]</sup>; 第 2 类蛋白只有 1 株菌 DAT299, 其 OFS 最长, 为 1 058 aa, 自成年健康猪中分离到<sup>[16]</sup>。第 3 类蛋白中, 564aa 的 OFS 蛋白相应的菌株 MNM51 自泰国病人中分离<sup>[18]</sup>, 另一株菌 SS<sub>2</sub> 89/1591 自美国病猪中分离, 均为中等毒力; 2 株菌的 *ofs* 基因中都含有插入元件 IS, 产生的 OFS 的 N 端结构不完整<sup>[13,19]</sup>; 另外 2 株菌 DAT252 和 DAT246 的 *ofs* 基因编码的蛋白更短, 仅为 205 和 216 aa, 其中 DAT252 自猪肺中分离<sup>[16]</sup>。对大量样品 ( $n=36$ ) 的 OFS 与临床发病之间进行的相关性研究表明, 中等长度(938 aa) 的 OFS 的致病性明显高于其它类型的 OFS<sup>[16]</sup>。本文的研究结果提示中国分离株和日本分离株 SS<sub>2</sub> 606 和 607 具有中等长度的 OFS 蛋白, 结构完整, 可能是导致猪链球菌病的重要毒力因子。

表 2 猪链球菌 OFS 蛋白与其毒力之间的关系

Table 2 Relationship between OFS characteristics and the virulence of *S. suis* strains

菌株 Strains	来源和宿主 Origin and host	氨基酸 Amino acids	毒力 Virulence	登录号 Accession number (ref)
SS DAT299	Japan, swine	1 058	— (From a healthy pig)	BAF96966.1 <sup>[16]</sup>
SS <sub>2</sub> 98HAH33	Jiangsu, China, human	938 *	HP	YP_001201232.1 <sup>[12]</sup>
SS <sub>2</sub> 05ZYH33	Sichuan, China, human	938 *	HP (Meningitis)	YP_001199029.1 <sup>[12]</sup>
SS <sub>2</sub> GZ1	Guizhou, China, human	938 *	HP (Septicemia)	ADE31950.1 <sup>[14]</sup>
SS <sub>2</sub> 606	Shanghai, China, swine	938	HP (Meningitis)	ABM88719.1
SS <sub>2</sub> 607	Japan, swine	938	HP (Septicemia)	ABM88720.2
SS <sub>2</sub> 10	Holland, swine	938	HP	AAX56334.1 <sup>[5]</sup>
SS <sub>2</sub> P1/7	England, swine	938	HP (Meningitis)	AM946016.1 <sup>[17]</sup>
SS NIAH11433	Japan, swine	938	HP (Septicemia)	BAF96965.1 <sup>[16]</sup>
SS <sub>2</sub> BM407	Vietnam, human	938	HP (Meningitis)	FM252032.1 <sup>[15]</sup>
SS <sub>2</sub> SC84	Sichuan, China, human	938	HP (Meningitis)	FM252031.1 <sup>[13]</sup>
SS <sub>14</sub> JS14	Jiangsu, China, swine	938 *	P (Articulation)	ADV70693.1 <sup>[20]</sup>
SS <sub>2</sub> SsUD	Italy, human	830	P (Meningitis)	CAR35441.1 <sup>[21]</sup>
SS <sub>2</sub> MNM51	Thailand, human	564	MV (Septicemia)	BAF96969.1 <sup>[15,17]</sup>
SS <sub>2</sub> 89/1591	Canadian, swine	564	MV (Septicemia)	EEF63642.1 <sup>[13,19]</sup>
SS DAT252	Japan, swine	216	P (Lung)	BAF96968.1 <sup>[16]</sup>
SS DAT246	Japan, swine	216	P (Septicemia)	BAF96967.1 <sup>[16]</sup>
SS <sub>9</sub> A3286/94	German	206	—	ACT66660.1

\*. GenBank 中 4 株菌 OFS 的氨基酸数目记录为 949 或 930 aa, 此处进行了调整。HP. 高致病性; MV. 中等毒力; P. 可致病; —. 无资料

\*. The amino acids number of the four strains from GenBank were 949 or 930, the number in Table 2 were adjusted. HP. Highly pathogenic; MV. Moderate virulence; P. Pathogenic; —. No data

## 参考文献:

- [1] ALLGAIER A, GOETHE R, WISSELINK H J, et al. Relatedness of *Streptococcus suis* isolates of various serotypes and clinical backgrounds as evaluated by macrorestriction analysis and expression of potential virulence traits [J]. *J Clin Microbiol*, 2001, 39 (2): 445-453.
- [2] HUANG Y T, TENG L J, HO S W, et al. *Streptococcus suis* infection [J]. *J Microbiol Immunol Infect*, 2005, 38: 306-313.
- [3] 田云, 陆承平. 猪链球菌 2 型可能的毒力基因分布 [J]. 农业生物技术学报, 2004, 12(5): 530-533.
- [4] SMITH H E, DAMMAN M, VELDE JVD, 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]. *Infect Immun*, 1999, 67: 1750-1756.
- [5] BAUMS C G, KAIM U, FULDE M, et al. Identification of a novel virulence determinant with serum opacification activity in *Streptococcus suis* [J]. *Infect Immun*, 2006, 74(11): 6154-6162.
- [6] KATEROV V, LINDGREN P E, TOTOLIAN A A, et al. Streptococcal opacity factor: a family of bifunctional proteins with lipoproteinase and fibronectin-binding activities [J]. *Curr Microbiol*, 2000, 40: 149-156.
- [7] KREIKEMEYER B, OEHMCKE S, NAKATA M, et al. *Streptococcus pyogenes* fibronectin-binding protein F2: expression profile, binding characteristics, and impact on eukaryotic cell interactions [J]. *J Biol Chem*, 2004, 279: 15850-15859.
- [8] COURTNEY H S, HASTY D L, DALE J B. Molecular mechanisms of adhesion, colonization, and invasion of group A streptococci [J]. *Ann Med*, 2002, 34 (2): 77-87.
- [9] MARRAFFINI L A, DEDENT A C, SCHNEEWIND O. Sortases and the art of anchoring proteins to the envelopes of Gram-positive bacteria [J]. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2006, 70(1): 192-221.
- [10] COURTNEY H S, POWNALL H J. The structure and function of serum opacity factor: a unique streptococcal virulence determinant that targets high-density lipoproteins [J]. *J Biomed Biotechnol*, 2010, doi: 10.1155/2010/956071.
- [11] WADHAM C, ALBANESE N, ROBERTS J, et al. High-density lipoproteins neutralize C-reactive protein proinflammatory activity [J]. *Circulation*, 2004, 109: 2116-2122.
- [12] CHEN C, TANG J, DONG W, et al. A glimpse of streptococcal toxic shock syndrome from comparative genomics of *S. suis* 2 Chinese isolates [J]. *PLoS ONE*, 2007, 2 (3): e315. doi: 10.1371/journal.pone.0000315.
- [13] YE C, ZHENG H, ZHANG J, et al. Clinical, experimental, and genomic differences between intermediately pathogenic, highly pathogenic, and epidemic *Streptococcus suis* [J]. *J Infect Dis*, 2009, 199(1): 97-107.
- [14] YE C, ZHU X, JING H, et al. *Streptococcus suis* sequence type 7 outbreak, Sichuan, China [J]. *Emerg Infect Dis*, 2006, 12(8): 1203-1208.
- [15] MAI N T, HOA N T, NGA T V, et al. *Streptococcus suis* meningitis in adults in Vietnam [J]. *Clin Infect Dis*, 2008, 46(5): 659-667.
- [16] TAKAMATSU D, OSAKI M, THARAVICHITKUL P, et al. Allelic variation and prevalence of serum opacity factor among the *Streptococcus suis* population [J]. *J Med Microbiol*, 2008, 57: 488-494.
- [17] HOLDEN M T, HAUSER H, SANDERS M, et al. Rapid evolution of virulence and drug resistance in the emerging zoonotic pathogen *Streptococcus suis* [J]. *PLoS ONE*, 2009, 4(7): E6072.
- [18] TAKAMATSU D, WONGSAWAN K, OSAKI M, et al. *Streptococcus suis* in humans, Thailand [J]. *Emerg Infect Dis*, 2008, 14(1): 181-183.
- [19] ARANDA J, GARRIDO M E, CORTÉS P, et al. Analysis of the protective capacity of three *Streptococcus suis* proteins induced under divalent-cation-limited conditions [J]. *Infect Immun*, 2008, 76 (4): 1590-1598.
- [20] HU P, YANG M, ZHANG A, et al. Complete genome sequence of *Streptococcus suis* serotype 14 strain JS14 [J]. *J Bacteriol*, 2011, doi:10.1128/JB.00083-11.
- [21] PRINCIVALLI M S, PALMIERI C, MAGI G, et al. Genetic diversity of *Streptococcus suis* clinical isolates from pigs and humans in Italy (2003-2007) [J]. *Euro Surveill*, 2009, 14(33):pii: 19310.