



## 无乳链球菌 GD201008-001 二元调控系统 RscSR 的鉴定及其对细菌应激适应性和毒力特性的影响

聂蒙, 马可, 曹青, 黄昊, 姬姝婷, 刘永杰\*

(南京农业大学动物医学院, 江苏南京 210095)

**摘要:** 为鉴定鱼源无乳链球菌 GD201008-001 二元调控系统 (two-component system, TCS) RscSR 并探究其功能, 实验利用生物信息学方法预测到可能的 RscSR, 对其组成成分 RscS 和 RscR 的三维结构和保守结构域进行分析; 构建基因缺失株  $\Delta rscSR$  与互补株  $C\Delta rscSR$ , 测定细菌的生长曲线, 检测其耐酸应激、耐氧化应激、抗巨噬细胞吞噬和胞内存活能力, 同时测定其对巨噬细胞的毒性和对小鼠的毒力。结果显示, RscSR 具有典型的 TCS 结构特点, 其中 RscS 具有组氨酸激酶结构域, RscR 具有反应调节子结构; 其编码基因缺失后, 菌株耐酸、耐氧化、抗巨噬细胞吞噬和胞内存活能力及对巨噬细胞毒性均显著降低, 而将该基因回补后各项能力均有所恢复; 动物实验结果显示, 野生株感染小鼠 19 h 内全部死亡, 而  $\Delta rscSR$  缺失株感染小鼠全部死亡时间为 48 h。研究表明, RscSR 在无乳链球菌应激适应性以及毒力方面发挥重要作用。

**关键词:** 无乳链球菌; 二元调控系统; 耐酸应激; 耐氧化应激; 抗吞噬能力; 毒力

**中图分类号:** S 941.4

**文献标志码:** A

无乳链球菌 (*Streptococcus agalactiae*) 又称 B 群链球菌 (group B *Streptococcus*, GBS), 可引起人 (*Homo sapiens*)、牛、鱼等多宿主感染<sup>[1]</sup>。自 2009 年以来, 我国南方多地区暴发罗非鱼 (*Oreochromis*) 链球菌病, 给罗非鱼养殖业造成了严重的经济损失, 其主要病原即为 GBS<sup>[2]</sup>。GBS 感染罗非鱼可引发脑膜炎, 有着较高的发病率和致死率<sup>[3]</sup>。目前, 虽然对无乳链球菌毒力因子进行了大量研究, 但其确切的致病机制尚不清楚。

二元调控系统 (two-component system, TCS) 是细菌用来应对环境变化的一种信号转导装置, 主要由一个组氨酸激酶和一个反应调节子组成<sup>[4]</sup>。组氨酸激酶可以感受特定刺激信号, 通过自磷酸化方式将反应调节子激活, 激活的反应调节

子通过直接与特定 DNA 序列结合等方式参与基因的转录调控。有研究报道, 无乳链球菌模式菌株 A909 中至少存在 22 种不同的 TCS, 按照其在基因序列 (NCBI 登录号: NC\_007432.1) 中出现的顺序依次命名为 TCS-1~TCS-22, 虽然 TCS-13(CovRS)、TCS-17(RgfAC) 和 TCS-4(LiaSR) 等 13 种 TCS 已被证实在该菌致病过程中发挥重要作用, 但仍然有 9 种 TCS 功能尚不清楚<sup>[5]</sup>。值得注意的是, Faralla 等<sup>[6]</sup>发现, TCS-21 的转录水平在细菌生长平台期早期相对对数期早期上调 20 倍左右, 推测其可能与无乳链球菌的应激适应性有关, 但具体功能尚不清楚。细菌在巨噬细胞内存活能力对其突破宿主血脑屏障、引发脑膜炎至关重要<sup>[7]</sup>。实验室前期研究发现, 无乳

收稿日期: 2020-10-13 修回日期: 2020-12-30

资助项目: 江苏省自然科学基金 (BK20171376); 江苏高校优势学科建设工程项目 (PAPD)

第一作者: 聂蒙 (照片), 从事兽医微生物学研究, E-mail: 2018107055@njau.edu.cn

通信作者: 刘永杰, E-mail: liuyongjie@njau.edu.cn



链球菌 GD201008-001 可被小鼠 (*Mus musculus*) 巨噬细胞内化, 并在细胞内存活超过 24 h<sup>[8]</sup>。巨噬细胞吞噬体内为高酸性、高活性氧和高活性氮环境<sup>[9]</sup>。Cumley 等<sup>[10]</sup>报道, 吞噬体的酸化有利于无乳链球菌的胞内存活。因此, 适应酸性 pH、高活性氧等应激条件对无乳链球菌的胞内存活具有重要意义。

为了阐明无乳链球菌在巨噬细胞内存活机制, 实验以 TCS-21(本实验命名为 RscSR) 为研究靶标, 利用生物信息学手段分析其蛋白三维结构与保守结构域; 进一步研究敲除 *rscSR* 后, 无乳链球菌对酸性 pH、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 等应激条件的耐受能力, 以及抗巨噬细胞吞噬能力和胞内存活能力, 为深入揭示无乳链球菌致病机制奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌株与质粒

无乳链球菌 GD201008-001 株为 2010 年由广东地区罗非鱼发病渔场分离<sup>[11]</sup>; 大肠杆菌 DH5 $\alpha$  购自北京擎科新业生物技术有限公司; 热敏自杀性质粒 pSET4s<sup>[12]</sup>、穿梭质粒 pSET2<sup>[13]</sup> 由日本学者 Daisuke Takamatsu 馈赠。

### 1.2 试剂

Green *Taq*<sup>TM</sup> Mix DNA 聚合酶、2  $\times$  Phanta<sup>®</sup>

Master Mix 高保真 DNA 聚合酶、DNA Marker、反转录试剂盒 [HiScript<sup>®</sup> II Q RT SuperMix for qPCR (+gDNA wiper)]、荧光定量检测试剂盒 [AceQ<sup>®</sup> qPCR SYBR Green Master Mix (High ROX Premixed)]、重组克隆试剂盒 (ClonExpress<sup>®</sup> II One Step Cloning Kit) 均购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司; 限制性核酸内切酶 (QuickCut<sup>TM</sup>) 及 DNA 片段回收试剂盒购自宝日医生物技术(北京)有限公司; 细菌质粒提取试剂盒、E.Z.N.A.<sup>TM</sup> 细菌总 RNA 提取试剂盒购自 OMEGA Bio-Tek 公司; 壮观霉素 (Spc) 购自北京鼎国生物技术有限公司; 青霉素 G 购自赛默飞世尔科技公司; 实验所需引物(表 1) 由苏州金唯智生物科技有限公司合成。

### 1.3 生物信息学分析

将 RscS 与 RscR 的蛋白序列上传至 I-TASSER 在线服务器进行蛋白的三维结构预测<sup>[14]</sup>; 利用 SMART 对 RscS 与 RscR 进化保守结构域进行分析<sup>[15]</sup>, 对蛋白三维结构进行注释。

### 1.4 基因缺失株构建

基因缺失重组质粒 pSET4s-rscSR 的构建。以 GD201008-001 株基因组为模板, 使用引物 rscSR-P1/rscSR-P2 扩增上游同源臂, 使用引物 rscSR-P3/rscSR-P4 扩增下游同源臂; 通过融合 PCR, 以

表 1 引物信息

Tab. 1 Primer information

目的基因 target genes	基因序列号 locus tag	片段长度/bp product length	引物 primers	序列(5'-3') sequence (5'-3')
<b><i>rscSR</i>基因缺失株构建引物 primers for construction of <i>rscSR</i> deletion mutant</b>				
<i>rscSR</i> 上游片段 <i>rscSR</i> upstream		350	rscSR-P1	AAAACGACGGCCAGTTGACTGCCTGTTGGACCT
			rscSR-P2	TAAACAAGTCACAAATGTCC TAAAGTTTTT
<i>rscSR</i> 下游片段 <i>rscSR</i> downstream		449	rscSR-P3	GGACATTTGTGACTTGTTTAAGCATGGCCT
			rscSR-P4	CCGGGTACCGAGCTCTAACCAGTTTCTAAGCGTAAT
<i>rscSR</i> 内部片段 <i>rscSR</i> internal		532	rscSR-A	GGAATCATATTAAGTATCGCTG
			rscSR-B	TCTTAACTTCGTGAACGTCC
<b><i>rscSR</i>基因互补株构建引物 primers for construction of <i>rscSR</i> complemented strain</b>				
<i>rscSR</i>		2 578	CrscSR-F CrscSR-R	GAGCTCGGTACCCGGACTGCCTGTTGGACCTAA CAGGTCGACTCTAGAACACCTTGCCGTAGACAA
<b>荧光定量PCR引物 primers for qRT-PCR</b>				
16S <i>rRNA</i>	A964_RS00075	210	q16s-F q16s-R	CGACGATACATAGCCGACCT CCGTCACCTGGTAGATTTTCC
<i>rscS</i>	A964_RS10045	173	qrscS-F qrscS-R	AGTATCGACGTTCTGTGAT TGCCAACCTTGAGAAAT
<i>rscR</i>	A964_RS10050	191	qrscR-F qrscR-R	GCATTTTCGATAGTATCAGT CGGTGTAACATTAGTCCA

上下游同源臂 PCR 扩增回收片段为模板,使用引物 rscSR-P1/rscSR-P4 扩增,融合上下游同源臂。使用重组克隆试剂盒将融合 PCR 产物与经过 *EcoR* I 酶切消化处理的 pSET4s 载体连接、转化至大肠杆菌 (*Escherichia coli*)DH5 $\alpha$  感受态内,利用抗性平板和 PCR 鉴定筛选出阳性克隆,提取质粒、测序无突变之后置于 -20 °C 保存待用。

无乳链球菌感受态细胞制备。将过夜培养的 GD201008-001 菌液按照 1 : 100 (体积比) 接种于含有 40 mmol/L DL-苏氨酸的 THY 培养液 (含 0.2% 酵母提取物的 THB 培养液) 中,待细菌于 37 °C 180 r/min 培养至对数期 (OD<sub>600</sub> 约为 0.6) 后将细菌置于冰上冰浴 30 min,待充分预冷后,4 °C 8 000×g 离心 10 min 收集菌体,弃掉培养基,用 EB 缓冲液和 15% 甘油先后各洗 2 次,最后重悬于 1 mL 15% 甘油中,按照 100  $\mu$ L/管分装后保存于 -80 °C 待用。

基因缺失重组质粒 pSET4s-rscSR 电转化入无乳链球菌 GD201008-001。将 10  $\mu$ L 150 ng/ $\mu$ L 的重组质粒加入已提前置于冰上融化的无乳链球菌感受态细胞中,轻轻吹打混匀,转移至已在 -20 °C 预冷过的无菌电击杯中,冰浴 30 min。之后,将电击杯放入电转仪,以 2 300 V/cm 200  $\Omega$  25  $\mu$ F 电击 4~5 ms 后,立即吸取 1 mL 电转复苏液 (含有 30 mmol/L 蔗糖的 THY 培养液) 加入电击杯中重悬菌液,并转移至含有 3 mL 电转复苏液的离心管中,待细菌于 28 °C 180 r/min 培养 4 h 后加入壮观霉素至终质量浓度为 100  $\mu$ g/mL,继续培养 12 h 以上。

筛选无乳链球菌基因缺失株。取电转化后培养 12 h 以上菌液均匀涂布于含 100  $\mu$ g/mL 壮观霉素的抗性平板,37 °C 培养。挑取单菌落接种于含壮观霉素的 THB 液体培养基中,37 °C 180 r/min 培养约 8 h,以诱导基因缺失重组质粒与无乳链球菌 GD201008-001 的基因组发生单交换,随后通过 PCR 验证确定阳性菌液。将阳性菌液于 28 °C 180 r/min 培养 8 h 以上传代 10 次以上,以诱导同源重组双交换。将传代 10 次以上的菌液稀释后均匀涂布于壮观霉素抗性和普通 THB 平板上 37 °C 过夜培养。若普通 THB 平板上菌落数明显多于壮观霉素抗性平板,则将普通 THB 平板上的菌落先后涂布于壮观霉素抗性平板和普通

THB 平板上 37 °C 过夜培养。选取仅于普通平板上生长的菌落,通过 PCR 验证是否为缺失株  $\Delta$ rscSR。

### 1.5 基因互补株构建

构建互补重组质粒 pSET2-CrscSR。以 GD 201008-001 株基因组为模板,使用引物 CrscSR-F/CrscSR-R,通过 PCR 扩增含有目的基因的片段。使用重组克隆试剂盒将 PCR 扩增产物与经过 *Bam*H I 酶切消化处理的 pSET2 载体连接,并转化至大肠杆菌 DH5 $\alpha$  内,利用抗性平板和 PCR 鉴定筛选出阳性克隆,提取质粒、测序无突变之后置于 -20 °C 保存待用。

制备  $\Delta$ rscSR 感受态细胞。将互补重组质粒 pSET2-CrscSR 电转化入  $\Delta$ rscSR 感受态细胞中,并通过 100  $\mu$ g/mL 壮观霉素的抗性平板筛选、PCR 验证互补株 C $\Delta$ rscSR。

### 1.6 荧光定量 PCR(qRT-PCR) 检测目的基因转录水平

使用总 RNA 提取试剂盒分别提取对数生长期的无乳链球菌 GD201008-001 野生株、 $\Delta$ rscSR 和 C $\Delta$ rscSR 总 RNA,使用反转录试剂盒将总 RNA 反转录为 cDNA,使用荧光检测试剂盒进行 qRT-PCR,采用两步法分析基因相对转录水平,以 16S *rRNA* 为内参,使用 2<sup>- $\Delta\Delta$ CT</sup> 法计算<sup>[16]</sup>。

### 1.7 生长曲线绘制

野生株、 $\Delta$ rscSR 和 C $\Delta$ rscSR 生长至对数期,将其 OD<sub>600</sub> 调至同一浓度,按照 1 : 100 (体积比) 转接至 THB 培养液中,置于 37 °C 180 r/min 振荡培养,每 30 min 测一次 OD<sub>600</sub>。

### 1.8 细菌耐酸应激能力检测

按照文献 [17] 的方法进行细菌耐酸实验,稍作改变。将生长至对数期的野生株、 $\Delta$ rscSR 和 C $\Delta$ rscSR 以 8 000 r/min 离心 5 min,吸弃上清液,加入 pH 5.0 THB 培养液重悬,37 °C 180 r/min 作用 30 min,作用前后分别通过平板计数菌落形成单位 (CFU),以计算存活率。

### 1.9 细菌耐氧化应激能力检测

按照文献 [18] 的方法进行细菌耐氧化应激实验,稍作改变。将生长至对数期的野生株、 $\Delta$ rscSR 和 C $\Delta$ rscSR 加入终浓度为 20 mmol/L 的

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 于 37 °C 180 r/min 作用 20 min, 再加入终浓度为 2 000 U/mL 的过氧化氢酶作用 10 min, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 作用前、过氧化氢酶作用后分别通过平板计数 (CFU), 以计算存活率。

### 1.10 细菌抗吞噬与胞内存活能力检测

按照文献 [8] 的方法进行细菌抗吞噬能力检测。将生长至对数期的野生株、 $\Delta rscSR$  和  $C\Delta rscSR$  离心收集, 并用无菌磷酸缓冲盐溶液 (PBS) 洗涤 2 次, 重悬于 DMEM 中, 以感染比 (MOI) 为 1 接种至形成单层的 RAW264.7 细胞中, 800×g 室温离心细胞板 10 min, 然后将细胞板置于细胞培养箱内培养 1 h, 每孔用 PBS 洗 3 次并加入 1 mL 含终浓度 100 μg/mL 青霉素的 DMEM 继续培养 1 h, 以杀死胞外细菌。每孔用 PBS 洗 3 次, 加入 1 mL ddH<sub>2</sub>O 室温静置 10 min, 随后剧烈吹打混匀, 稀释后平板计数以计算细菌吞噬率。

细菌胞内存活能力测定与抗吞噬实验类似, 区别在于加入青霉素后, 分别于 1、4、7、10、13 h 加入 ddH<sub>2</sub>O 裂解细胞, 梯度稀释后平板计数, 并以 1 h 为 0 时间点, 以相对于 1 h 的吞噬率为对应

时间点的胞内存活率。

### 1.11 细菌细胞毒性检测

采用乳酸脱氢酶释放法测定细菌对 RAW264.7 的细胞毒性, 使用 CytoTox 96® Non-Radioactive Cytotoxicity Assay (Promega) 试剂盒进行实验。细胞培养如前所述, 实验前一天接种于 96 孔板中。按照试剂盒说明设置实验组、细菌自发 LDH 释放组 (无靶细胞)、靶细胞自发 LDH 释放组、靶细胞最大 LDH 释放组、体积校正组 (无靶细胞)、培养基对照孔 (无靶细胞), 每组设置 4 个重复孔。在实验组、细菌自发 LDH 释放组中加入一定菌量, 使 MOI 为 1。800×g 室温离心细胞板 10 min 后, 将细胞板置于细胞培养箱内培养 4 h, 在培养 3 h 25 min 时, 向靶细胞最大 LDH 释放组和体积校正组 (无靶细胞) 中加入 10 μL 裂解液继续培养。然后, 800×g 室温离心细胞板 10 min, 每孔取出 50 μL 上清液至新的 96 孔细胞培养板中, 每孔加入 50 μL 配制好的底物, 避光室温作用 30 min。每孔加入 50 μL 终止液, 测量 490 nm 处吸光值, 按照公式计算细胞毒性:

$$\text{细胞毒性 (\%)} = \frac{\text{实验组 OD}_{490} - \text{细菌自发 LDH 释放组 OD}_{490} - \text{靶细胞自发 LDH 释放组 OD}_{490}}{\text{靶细胞最大 LDH 释放组 OD}_{490} - \text{靶细胞自发 LDH 释放组 OD}_{490}} \times 100\%$$

### 1.12 对小鼠毒力测定

按照文献 [16] 的方法进行小鼠毒力测定。实验前期将 5 周龄雌性 ICR 小鼠随机分成 4 组, 即野生株、 $\Delta rscSR$  和  $C\Delta rscSR$  和 PBS 组, 每组 10 只。以 1 : 100 (体积比) 转接过夜菌液, 待细菌生长至对数期, 离心收集菌液, 并用无菌 PBS 洗 3 次, 重悬于 PBS 中, 调整浓度至  $1.0 \times 10^3$  CFU/mL。每只小鼠腹腔注射 100 μL 对应组别菌液, 对照组注射 100 μL PBS, 每 1 h 观察 1 次, 记录小鼠死亡情况。

### 1.13 统计分析

采用 GraphPad Prism 8.3.0 软件对实验数据进行分析处理, 使用 *t* 检验进行差异显著性分析。当  $P < 0.05$  时, 差异具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 二元调控系统 RscSR 的生物信息学分析

RscS 分析显示, N 端有 5 个跨膜区, 各跨膜区

间的链接区域很短, 分别为 14 aa、11 aa、9 aa 及 6 aa (图 1-a); C 端为 HATPase\_c 结构域, 此结构域是一种较为典型的组氨酸激酶结构域, 具有催化功能, 可与 ATP 结合, 并催化其磷酸基转移至 HisKA 结构域<sup>[19]</sup>。RscR 则具有典型的反应调节子结构, N 端为保守的 REC 结构域 (receiver domain), 包含一个磷酸化受体位点——天冬氨酸残基, 可被组氨酸激酶 (HK) 磷酸化; C 端为 YcbB 结构域, 是一种 DNA 结合结构域<sup>[20]</sup> (图 1-b)。

### 2.2 rscSR 基因缺失株、互补株鉴定

对野生株、 $\Delta rscSR$  和  $C\Delta rscSR$  进行 PCR 鉴定。使用引物 rscSR-P1/rscSR-P4 进行 PCR 扩增时, 在野生株中检测到 2 925 bp 的目的片段, 即由目的基因上游同源臂 (350 bp)、目的基因 (2 126 bp) 及目的基因下游同源臂 (449 bp) 组成, 而在  $\Delta rscSR$  和  $C\Delta rscSR$  中检测到 799 bp 的 PCR 扩增产物, 即由上游同源臂 (350 bp) 及下游同源臂 (449 bp) 组成; 同时, 使用 rscSR 内部引物 rscSR-A/rscSR-B 鉴定时, 在野生株和  $C\Delta rscSR$  中检测

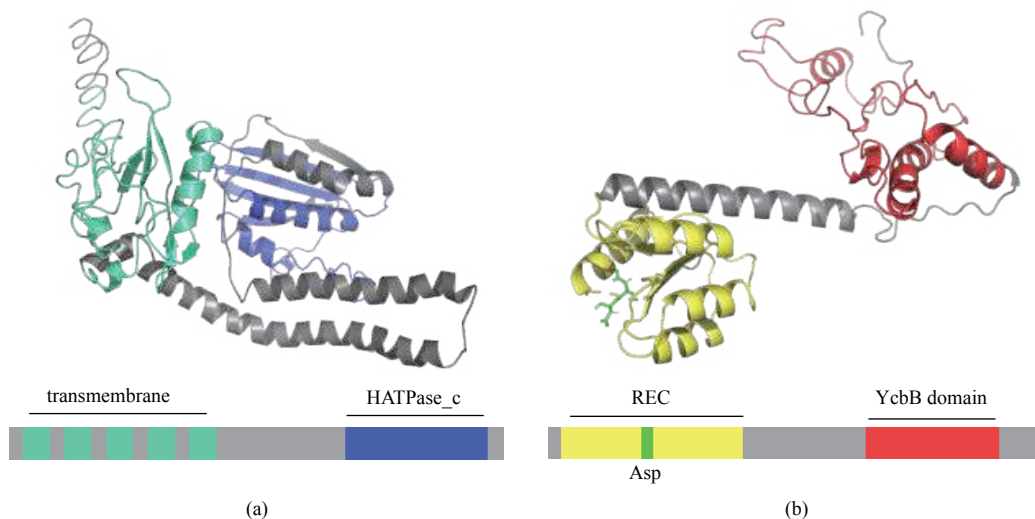


图 1 预测 RscS (a) 和 RscR (b) 三维结构和保守结构域

(a) 组氨酸激酶 RscS, 青绿色. 跨膜螺旋区域, 蓝色. 催化结构域; (b) 反应调控子 RscR, 黄色. 信号接收域, 绿色. 天冬氨酸残基, 红色. DNA 结合结构域

Fig. 1 Predicted 3-D structures and conserved domains of the RscS (a) and RscR (b)

(a) histidine kinase RscS, green. transmembrane region, blue. HATPase\_c; (b) response regulator RscR, yellow. receiver domain, green. aspartate residue, red. DNA-binding domain

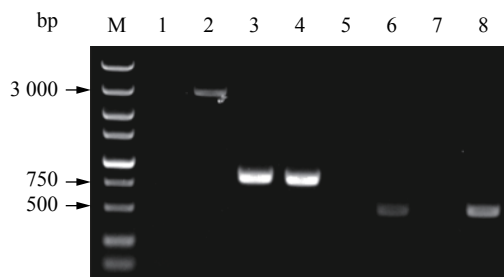
到 532 bp 的 PCR 扩增产物, 而在  $\Delta rscSR$  中未检测到相应片段 (图 2-a), 说明成功构建 *rscSR* 的缺失株和互补株。

使用 qRT-PCR 检测野生株、 $\Delta rscSR$  和  $C\Delta rscSR$  中 *rscSR* 转录水平, 结果显示,  $\Delta rscSR$  中无目的基因转录, 野生株与  $C\Delta rscSR$  均能检测

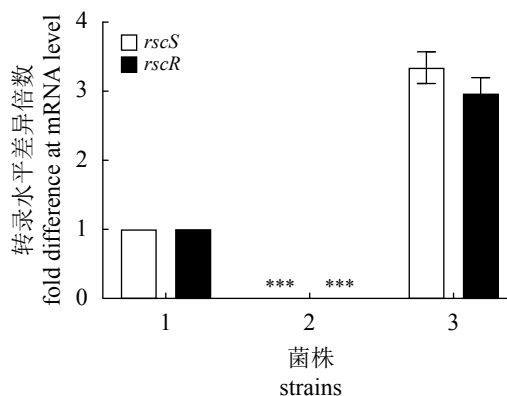
到目的基因的转录 (图 2-b)。

### 2.3 *rscSR* 缺失对无乳链球菌生长能力的影响

在 37°C 条件下, 野生株、 $\Delta rscSR$  和  $C\Delta rscSR$  的生长速率无明显差异 (图 3), 说明二元调控系统 RscSR 的缺失不影响该菌在 THB 培养基中的生长能力。



(a)



(b)

图 2 *rscSR* 基因缺失株及互补株 PCR 鉴定和转录水平

(a) *rscSR* 缺失株与互补株 PCR 鉴定; M. marker 5000, 1. 阴性对照, 2. 野生株 GD201008-001, 3. 缺失株  $\Delta rscSR$ , 4. 互补株  $C\Delta rscSR$ , 5. 阴性对照, 6. 野生株 GD201008-001, 7. 缺失株  $\Delta rscSR$ , 8. 互补株  $C\Delta rscSR$ ; (b) qRT-PCR 检测 *rscS* 和 *rscR* 基因转录; 1. 野生株, 2. 缺失株  $\Delta rscSR$ , 3. 互补株  $C\Delta rscSR$ ; \*\*\*表示与野生株相比差异极显著 ( $P < 0.001$ ); 下同

Fig. 2 Identification and detection of the *rscSR* gene-deleted and gene-complemented strains

(a) PCR identification of the *rscSR* gene-deleted and gene-complemented strains; M. marker 5000, 1. negative control, 2. the wild-type strain GD201008-001, 3.  $\Delta rscSR$ , 4.  $C\Delta rscSR$ , 5. negative control, 6. the wild-type strain GD201008-001, 7.  $\Delta rscSR$ , 8.  $C\Delta rscSR$ ; (b) The transcription levels of *rscS* and *rscR* by qRT-PCR; 1. the wild-type strain (WT), 2.  $\Delta rscSR$ , 3.  $C\Delta rscSR$ ; \*\*\* represents significant difference compared with the wild-type strain ( $P < 0.001$ ); the same below

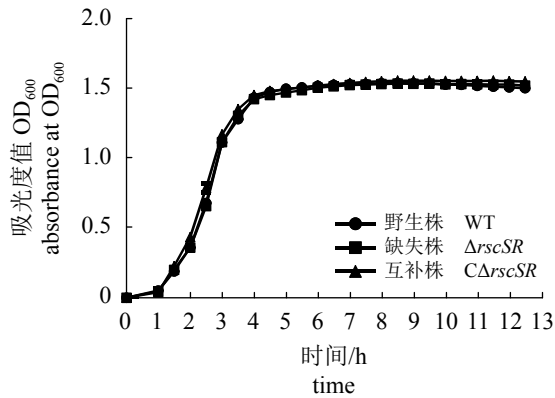


图3 野生株、 $\Delta rscSR$ 及 $C\Delta rscSR$ 生长曲线

Fig. 3 Growth curves of  $\Delta rscSR$ ,  $C\Delta rscSR$  and WT (the wild-type strain)

#### 2.4 $rscSR$ 缺失对细菌耐酸和耐氧化应激能力的影响

与野生株相比,  $\Delta rscSR$  株的耐酸应激能力极显著下调 ( $P < 0.001$ ),  $C\Delta rscSR$  株恢复至野生株水平 (图 4-a)。与野生株相比,  $\Delta rscSR$  株耐氧化应激能力也显著下调 ( $P < 0.01$ ),  $C\Delta rscSR$  株恢复至野生株水平 (图 4-b)。表明二元调控系统 RscSR 有助于无乳链球菌抵抗环境中的酸性应激和氧化应激。

#### 2.5 $rscSR$ 缺失对细菌抗吞噬能力和胞内存活能力的影响

与野生株相比,  $\Delta rscSR$  株的吞噬率显著上调 ( $P < 0.01$ ),  $C\Delta rscSR$  株恢复至野生株水平 (图 5-a);  $\Delta rscSR$  株在 3 和 6 h 的胞内存活率显著低于野生株

( $P < 0.001$ ),  $C\Delta rscSR$  株恢复至野生株水平 (图 5-b)。

#### 2.6 $rscSR$ 缺失对无乳链球菌细胞毒性的影响

与野生株相比,  $\Delta rscSR$  株的细胞毒性显著下调 ( $P < 0.05$ ),  $C\Delta rscSR$  株恢复至野生株水平 (图 6)。

#### 2.7 $rscSR$ 缺失对无乳链球菌致病力的影响

小鼠实验显示, 小鼠感染野生株 19 h 内全部死亡, 而感染  $\Delta rscSR$  全部死亡时间为 48 h, 小鼠感染  $C\Delta rscSR$  全部死亡时间为 21 h (图 7)。这表明 RscSR 对无乳链球菌毒力有一定影响, 可促进感染小鼠的死亡。

### 3 讨论

TCS 作为细菌响应外界环境压力的元件, 对细菌致病性和环境适应性起到关键的调控作用。目前按照信号感应结构域所处位置 (胞内、膜上和胞外) 将 HK 主要分为 3 类, 胞浆外感应 HK、跨膜感应 HK 和细胞质感应 HK<sup>[21]</sup>。本研究生物信息学分析结果显示, RscS 的 N 端为 5 个跨膜区, 跨膜区之间的链接区域非常短, 缺乏胞外感应结构域, 符合跨膜感应 HK 的特点, 推测可能存在相应的辅助感应蛋白, 感应细胞膜上相关信号, 如来源于胞外被膜的力学特性 (膨胀或机械压力)、来源于细胞膜结合酶或其他膜组成成分的信号, 也可能感应细胞膜相关的刺激信号, 如离子或电化学梯度变化、转运过程或影响胞外被膜完整性的化合物。值得注意的

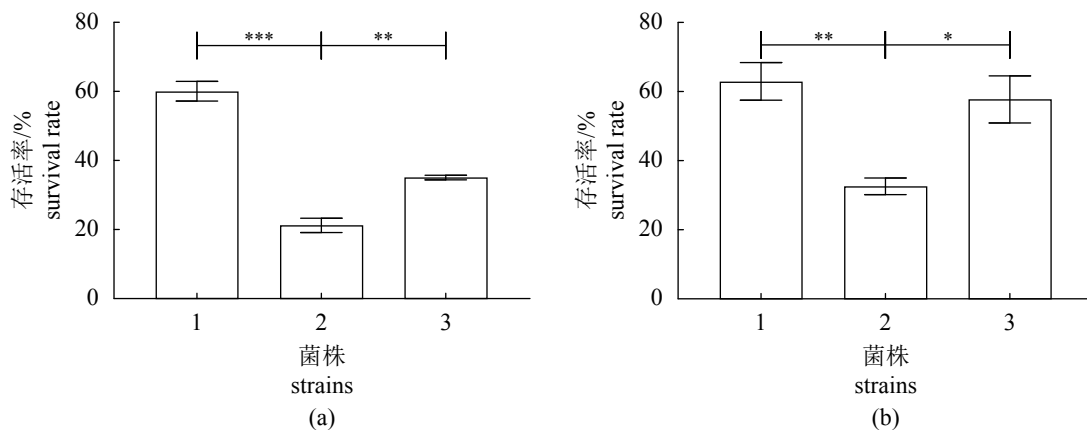


图4 野生株、 $\Delta rscSR$ 及 $C\Delta rscSR$ 耐酸应激 (a) 与耐氧化应激 (b) 能力

1. 野生株, 2. 缺失株  $\Delta rscSR$ , 3. 互补株  $C\Delta rscSR$ ; \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$ ; 下同

Fig. 4 Acid tolerance (a) and  $H_2O_2$  tolerance (b) ability of  $\Delta rscSR$ ,  $C\Delta rscSR$  and the wild-type strain

1. WT, 2.  $\Delta rscSR$ , 3.  $C\Delta rscSR$ ; \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$ ; the same below

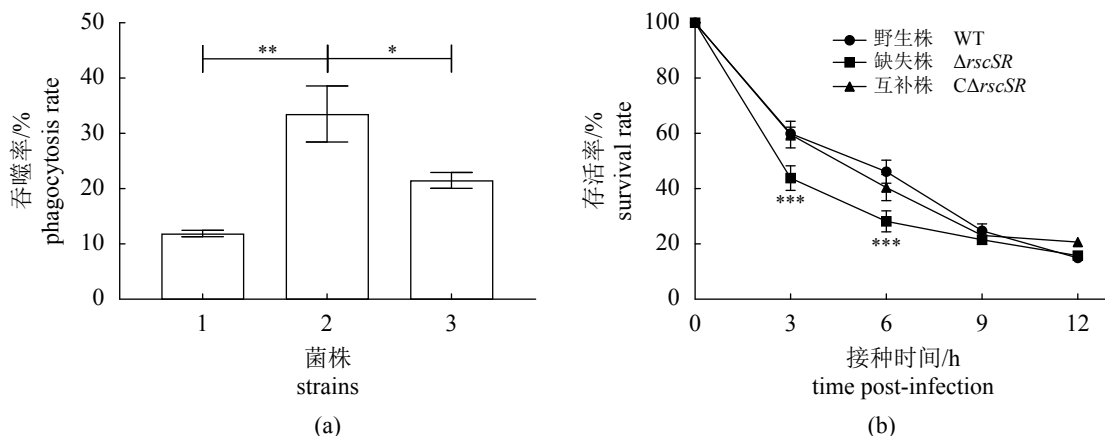


图 5 野生株、 $\Delta rscSR$  及  $C\Delta rscSR$  的抗吞噬与胞内存活能力

(a) 细菌抗巨噬细胞 RAW264.7 吞噬能力; (b) 细菌在巨噬细胞 RAW264.7 胞内存活能力

Fig. 5 Phagocytosis and intracellular survival of  $\Delta rscSR$ ,  $C\Delta rscSR$  and the wild-type strain

(a) phagocytosis rate of *S. agalactiae* strains by RAW264.7 macrophages; (b) intracellular survival of *S. agalactiae* strains in RAW264.7 macrophages

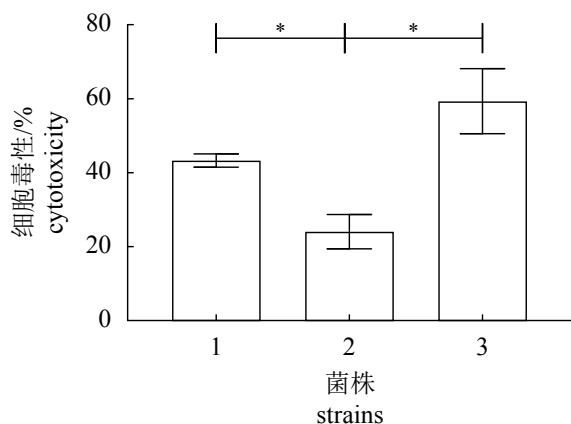


图 6 野生株、 $\Delta rscSR$  及  $C\Delta rscSR$  细胞毒性

Fig. 6 Cytotoxicity of  $\Delta rscSR$ ,  $C\Delta rscSR$  and the wild-type strain

是, 大多革兰阳性菌的密度感应器属于这一类<sup>[22]</sup>。RscR 则显示出典型的反应调节子结构, C 端为 YcbB 结构域, 是一种 DNA 结合结构域<sup>[20]</sup>, 这说明该 RscR 能够与 DNA 结合, 从而参与到转录调控之中去。

无乳链球菌对于酸性应激和氧化应激的耐受能力, 对于其定殖到罗非鱼胃肠道上皮细胞<sup>[23-24]</sup>以及突破血脑屏障<sup>[25-26]</sup>具有重要意义。本研究结果显示, *rscSR* 的缺失并没有影响无乳链球菌的生长能力, 但明显降低了细菌在酸性和氧化应激环境中的生存能力, 从而证实了 Faralla 等<sup>[6]</sup>的推测, 即 TCS-21(对应本实验中 RscSR) 可响应平台期出现的应激条件, 如营养物质匮乏、低 pH 和毒性代谢物的蓄积等。无乳链球菌在巨噬

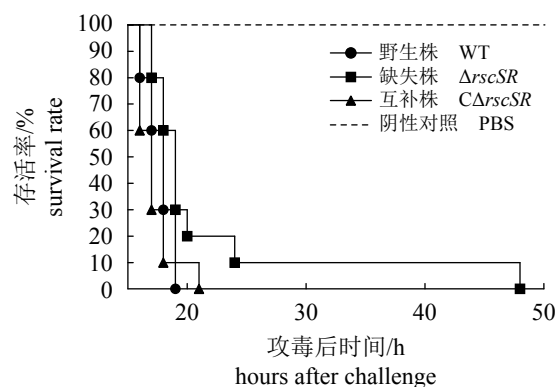


图 7 小鼠攻毒后存活曲线

Fig. 7 Survival curve of mice after challenge with different bacterial strains

细胞内的存活能力, 是诱导罗非鱼细菌性脑膜炎的关键因素<sup>[7]</sup>; 而巨噬细胞吞噬溶酶体的酸应激<sup>[27]</sup>和氧化应激<sup>[9]</sup>是宿主杀伤胞内菌的重要机制, 因此推测, RscSR 帮助细菌在酸性和氧化应激环境中生存有利于其胞内存活。为此, 本实验检测了野生株、*rscSR* 缺失株与互补株抗巨噬细胞吞噬与其在胞内存活能力, 结果显示,  $\Delta rscSR$  的吞噬率显著高于野生株和互补株, 说明 RscSR 有助于无乳链球菌抵抗巨噬细胞的吞噬;  $\Delta rscSR$  在 3 和 6 h 的胞内存活率显著低于野生株与互补株, 表明 RscSR 有助于无乳链球菌在巨噬细胞内存活, 该结果与 RscSR 有助于无乳链球菌的耐酸应激和耐氧化应激结果相呼应。同时, 研究还发现, *rscSR* 的缺失明显降低了无乳链球菌对巨噬细胞的毒性, 说明 RscSR 不仅有助于细菌

抵抗巨噬细胞的吞噬作用, 增强细菌在巨噬细胞内存活能力, 还能增强其对巨噬细胞的毒性, 这些研究结果为探究无乳链球菌与巨噬细胞的互作机制增添了新的证据。

小鼠实验发现, 野生株感染小鼠 19 h 内全部死亡, 而  $\Delta rscSR$  感染小鼠全部死亡时间为 48 h。尽管 RscSR 缺失对无乳链球菌的毒力影响有限, 主要是延迟了感染小鼠的死亡时间, 但在一定程度上也说明 RscSR 能够参与无乳链球菌毒力, 同时也反映无乳链球菌的致病机制是复杂的, 涉及多种因素。另外, 虽说小鼠是鱼源无乳链球菌公认感染模型<sup>[28-29]</sup>, 但毕竟不是实验动物本身感染模型, 后续将开展罗非鱼攻毒实验, 进一步证实 RscSR 在无乳链球菌毒力上的意义。

#### 参考文献 (References):

- [ 1 ] Furfaro L L, Chang B J, Payne M S. Perinatal *Streptococcus agalactiae* epidemiology and surveillance targets[J]. *Clinical Microbiology Reviews*, 2018, 31(4): e00049-18.
- [ 2 ] Liu G J, Zhu J L, Chen K M, *et al.* Development of *Streptococcus agalactiae* vaccines for tilapia[J]. *Diseases of Aquatic Organisms*, 2016, 122(2): 163-170.
- [ 3 ] Chen M, Li L P, Wang R, *et al.* PCR detection and PFGE genotype analyses of streptococcal clinical isolates from tilapia in China[J]. *Veterinary Microbiology*, 2012, 159(3-4): 526-530.
- [ 4 ] Groisman E A. Feedback control of two-component regulatory systems[J]. *Annual Review of Microbiology*, 2016, 70: 103-124.
- [ 5 ] Thomas L, Cook L. Two-component signal transduction systems in the human pathogen *Streptococcus agalactiae*[J]. *Infection and Immunity*, 2020, 88(7): e00931-19.
- [ 6 ] Faralla C, Metruccio M M, De Chiara M, *et al.* Analysis of two-component systems in group B *Streptococcus* shows that RgfAC and the novel FspSR modulate virulence and bacterial fitness[J]. *mBio*, 2014, 5(3): e00870-14.
- [ 7 ] Liu Y, Li L P, Huang T, *et al.* The interaction between phagocytes and *Streptococcus agalactiae* (GBS) mediated by the activated complement system is the key to GBS inducing acute bacterial meningitis of tilapia[J]. *Animals (Basel)*, 2019, 9(10): 818.
- [ 8 ] Guo C M, Chen R R, Kalhor D H, *et al.* Identification of genes preferentially expressed by highly virulent piscine *Streptococcus agalactiae* upon interaction with macrophages[J]. *PLoS One*, 2014, 9(2): e87980.
- [ 9 ] Weiss G, Schaible U E. Macrophage defense mechanisms against intracellular bacteria[J]. *Immunological Reviews*, 2015, 264(1): 182-203.
- [ 10 ] Cumley N J, Smith L M, Anthony M, *et al.* The CovS/CovR acid response regulator is required for intracellular survival of group B *Streptococcus* in macrophages[J]. *Infection and Immunity*, 2012, 80(5): 1650-1661.
- [ 11 ] 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.
- [ 12 ] Takamatsu D, Osaki M, Sekizaki T. Thermosensitive suicide vectors for gene replacement in *Streptococcus suis*[J]. *Plasmid*, 2001, 46(2): 140-148.
- [ 13 ] Takamatsu D, Osaki M, Sekizaki T. Construction and characterization of *Streptococcus suis*-*Escherichia coli* shuttle cloning vectors[J]. *Plasmid*, 2001, 45(2): 101-113.
- [ 14 ] Yang J Y, Zhang Y. I-TASSER server: new development for protein structure and function predictions[J]. *Nucleic Acids Research*, 2015, 43(W1): W174-W181.
- [ 15 ] Letunic I, Bork P. 20 years of the SMART protein domain annotation resource[J]. *Nucleic Acids Research*, 2018, 46(D1): D493-D496.
- [ 16 ] Ma K, Cao Q, Luo S, *et al.* Cas9 enhances bacterial virulence by repressing the regR transcriptional regulator in *Streptococcus agalactiae*[J]. *Infection and Immunity*, 2018, 86(3): e00552-17.
- [ 17 ] Ma Y P, Hao L, Ke H, *et al.* LuxS/AI-2 in *Streptococcus agalactiae* reveals a key role in acid tolerance and virulence[J]. *Research in Veterinary Science*, 2017, 115: 501-507.
- [ 18 ] Yang Y, Luo M J, Zhou H K, *et al.* Role of two-component system response regulator *bceR* in the antimicrobial resistance, virulence, biofilm formation, and stress response of group B *Streptococcus*[J]. *Front in Microbiology*, 2019, 10: 10.
- [ 19 ] Deng L W, Mu R, Weston T A, *et al.* Characterization of



- a two-component system transcriptional regulator, LtdR, that impacts group B Streptococcal colonization and disease[J]. *Infection and Immunity*, 2018, 86(7): e00822-17.
- [20] Satomura T, Shimura D, Asai K, *et al.* Enhancement of glutamine utilization in *Bacillus subtilis* through the GlnK-GlnL two-component regulatory system[J]. *Journal of Bacteriology*, 2005, 187(14): 4813-4821.
- [21] Mascher T. Bacterial (intramembrane-sensing) histidine kinases: signal transfer rather than stimulus perception[J]. *Trends in Microbiology*, 2014, 22(10): 559-565.
- [22] Mascher T, Helmann J D, Unden G. Stimulus perception in bacterial signal-transducing histidine kinases[J]. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2006, 70(4): 910-938.
- [23] Iregui C A, Comas J, Vásquez G M, *et al.* Experimental early pathogenesis of *Streptococcus agalactiae* infection in red tilapia *Oreochromis* spp.[J]. *Journal of Fish Diseases*, 2016, 39(2): 205-215.
- [24] Vásquez-Machado G, Barato-Gómez P, Iregui-Castro C. Morphological characterization of the adherence and invasion of *Streptococcus agalactiae* to the intestinal mucosa of tilapia *Oreochromis* sp. : an *in vitro* model[J]. *Journal of Fish Diseases*, 2019, 42(9): 1223-1231.
- [25] Barichello T, Lemos J C, Generoso J S, *et al.* Oxidative stress, cytokine/chemokine and disruption of blood-brain barrier in neonate rats after meningitis by *Streptococcus agalactiae*[J]. *Neurochemical Research*, 2011, 36(10): 1922-1930.
- [26] Walker E A, Port G C, Caparon M G, *et al.* Glutathione synthesis contributes to virulence of *Streptococcus agalactiae* in a murine model of sepsis[J]. *Journal of Bacteriology*, 2019, 201(20): e00367-19.
- [27] Korir M L, Laut C, Rogers L M, *et al.* Differing mechanisms of surviving phagosomal stress among group B *Streptococcus* strains of varying genotypes[J]. *Virulence*, 2017, 8(6): 924-937.
- [28] Deng L W, Spencer B L, Holmes J A, *et al.* The Group B Streptococcal surface antigen I /II protein, BspC, interacts with host vimentin to promote adherence to brain endothelium and inflammation during the pathogenesis of meningitis[J]. *PLoS Pathogens*, 2019, 15(6): e1007848.
- [29] Andrade E B, Magalhães A, Puga A, *et al.* A mouse model reproducing the pathophysiology of neonatal group B streptococcal infection[J]. *Nature Communications*, 2018, 9(1): 3138.

## Identification of two-component system RscSR in *Streptococcus agalactiae* GD201008-001 and its influence on the bacterial stress response and virulence

NIE Meng, MA Ke, CAO Qing, HUANG Hao, JI Shuting, LIU Yongjie\*

(College of Veterinary Medicine, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

**Abstract:** *Streptococcus agalactiae* infectious disease outbreaks have occurred continuously in *Oreochromis* spp. farms in China since 2009. In order to further explore the regulation mechanism of *S. agalactiae* virulence, the function of a putative two-component system (TCS) RscSR was investigated in a highly virulent strain GD201008-001, which was isolated from moribund cultured tilapia with meningoencephalitis in Guangdong Province of China in 2010. The 3-D structures and conserved domains of histidine kinase RscS and response regulator RscR were predicted using the I-TASSER server (<https://zhanglab.cmb.med.umich.edu/I-TASSER>) and SMART (<https://smart.embl.de>). The *rscSR* deletion mutant strain  $\Delta rscSR$  was constructed using homologous recombination. Bacterial tolerances to acid or oxidative stress were investigated by pre-exposing to pH 5.0 or 20 mmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. RAW264.7 macrophages were used as cell models to evaluate the bacterial anti-phagocytosis ability, intracellular survival ability and cytotoxicity. The bacterial pathogenicity was then tested in adult mice. The bioinformatics prediction showed that RscS and RscR were a typical histidine kinase and a response regulator, respectively. The stimuli sensed by RscS might be membrane-associated or occur directly at membrane interface; RscR was predicted to bind DNA to directly affect the transcription of the target gene. Compared with the wild-type and complemented strains, the resistance to acid (pH 5.0) of  $\Delta rscSR$  was significantly decreased (2.83 times and 1.65 times), and furthermore, its resistance to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> was also significantly decreased (1.93 times and 1.77 times). The  $\Delta rscSR$  mutant displayed significantly decreased resistance to being ingested by macrophages (2.81 times and 1.56 times) compared to that of the wild-type and complemented strains. Moreover, at 3 h after being taken up by the macrophages, the intracellular survival rate of the  $\Delta rscSR$  mutant was only approximately 44%; in contrast, it was 60% both for the wild type and complemented strains. After 6 h of phagocytosis, the intracellular survival rates of the wild type,  $\Delta rscSR$  and complemented strains were decreased to about 46%, 28% and 40%, respectively. The cytotoxicity assay indicated that the relative number of lysed RAW 264.7 cells infected with the  $\Delta rscSR$  mutant was significantly lower, exhibiting 1.8-fold and 2.5-fold decreases, respectively, compared to the wild-type and  $C\Delta rscSR$  strains. The mice infected with the wild strain all died within 19 hours, while mice infected with the  $\Delta rscSR$  strain all died within 48 hours. This study suggests RscSR plays an important role in stress response, intracellular survival and virulence of *S. agalactiae*, which will provide useful information for further exploration of pathogenic mechanism of this bacterium.

**Key words:** *Streptococcus agalactiae*; two-component system (TCS); acid tolerance; oxidative tolerance; anti-phagocytosis ability; virulence

**Corresponding author:** LIU Yongjie. E-mail: liuyongjie@njau.edu.cn

**Funding projects:** Nature Science Foundation of Jiangsu Province (BK20171376); Priority Academic Program Development of Jiangsu Higher Educational Institutions (PAPD)