

文章编号: 1000-0615(2018)02-0291-12

DOI: 10.11964/jfc.20170110680

尼罗罗非鱼无乳链球菌荚膜多糖合成基因的表达及其与荚膜唾液酸含量、菌株致病性的关系

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

(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: 为了解尼罗罗非鱼无乳链球菌(GBS)荚膜多糖合成基因的表达及其与荚膜唾液酸含量、菌株致病性的关系, 本实验克隆了尼罗罗非鱼荚膜多糖合成基因 *cpsE*、*cpsK* 和 *neuA*, 通过 qRT-PCR 方法分析了这3个基因在不同培养温度下表达水平的变化, 同时通过比色法测定了不同培养温度下 GBS 荚膜唾液酸含量的变化, 通过人工感染实验分析了不同水温条件下 GBS 对罗非鱼的致病性。结果显示, *cpsE*、*cpsK* 和 *neuA* 编码的氨基酸序列均具有保守的与荚膜多糖合成相关的酶活性位点, CpsE、NeuA 与已知鱼源 GBS (Ia 和 Ib 型) 和人源 GBS (Ia、Ib 和 II~IX 型) 相应序列的同源性均达到 97% 以上, 而 CpsK 与鱼源、人源的序列同源性则分别为 56%~100% 和 27%~100%。在不同培养温度下 GBS *cpsK* 和 *neuA* 基因表达水平的变化与荚膜唾液酸含量的变化一致; 在较高温度(28 和 34 °C) 下培养的 GBS 荚膜唾液酸含量及菌株攻毒后罗非鱼的死亡率均随温度的升高而递增, 而在 22 °C 下培养的 GBS 唾液酸含量最高, 攻毒后罗非鱼的死亡率却最低。本研究结果表明, GBS CpsK 和 NeuA 在 GBS 荚膜多糖的唾液酸化中起重要作用, 较低温度下 GBS 荚膜唾液酸的高含量有助于其在宿主体内的潜伏, 而较高水温条件下细菌的强致病性可能还与除荚膜唾液酸外的某些重要的毒力因子的表达有关。

关键词: 尼罗罗非鱼; 无乳链球菌(GBS); 温度; 荚膜多糖合成基因; 荚膜唾液酸; 致病力

中图分类号: Q 786; S 917.1

文献标志码: A

无乳链球菌(*Streptococcus agalactiae*)为革兰氏阳性菌, 又被称为B群链球菌(group B *Streptococcus*, GBS)。它的宿主广泛, 包括新生儿、猪、牛等陆生脊椎动物和鱼类等水生动物^[1]。GBS是温水性鱼类的重要病原菌, 受感染的鱼类包括海水和淡水鱼类^[2-3]。根据GBS荚膜多糖的特性已鉴定出10种血清型Ia、Ib、II~IX, 其中对鱼类具有较强致病性的为Ia^[4]、Ib^[5]和III型^[6]。近年来, 我国罗非鱼主产区连年暴发链球菌病, 其病原主要是Ia型无乳链球菌^[7-8]。中国是世界罗非

鱼生产和出口大国^[9], 根据农业部渔业渔政管理局统计数据, 2016年我国罗非鱼养殖总产量已达187万t。但自2009年起GBS感染给中国养殖罗非鱼产业造成了重大的损失, 其发病率为20%~50%, 死亡率高达50%~70%, 目前尚无有效的防治措施^[4]。

在能引起脑膜炎细菌的致病机制中, 荚膜唾液酸是其重要的致病因子, 如2型猪链球菌(*S. suis* Serotype 2)、大肠杆菌K1(*Escherichia coli* K1)、脑膜炎奈瑟氏菌(*Neisseria meningitidis*)和人

收稿日期: 2017-01-07 修回日期: 2017-05-15

资助项目: 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(2017HY-ZC06); 国家自然科学基金(31272688); 现代农业产业技术体系建设专项(CARS-46)

通信作者: 叶星, E-mail: gzyexing@163.com

源III型GBS^[10]。所有血清型GBS的荚膜多糖(capsular polysaccharides, CPS)都含有葡萄糖、半乳糖、N-乙酰葡萄糖胺和一个末端保守的唾液酸^[11]。已有研究表明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,抑制宿主下游免疫信号转导,从而实现“免疫逃逸”^[12-14]。

GBS荚膜多糖的合成受16个*cps* (capsular polysaccharide synthesis)基因(*cpsA~L*和*neuA~D*)控制,其生物合成主要过程:①在糖基转移酶类(CpsE/F/G、CpsI/J)和聚合酶类(CpsH)的作用下,寡糖单元在脂质载体上逐渐聚合,组装成多糖;②在唾液酸转移酶(CpsK)作用下催化唾液酸单糖衍生物(由NeuA~D合成)转移至多糖末端;③多糖复合体经跨膜被动运输至细胞外,并锚定于细胞表面最终形成具有生物学活性的荚膜多糖^[15-16]。已有报道证明*cpsE*编码半乳糖转移酶,负责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。对人源GBS、肺炎链球菌(*S. pneumoniae*)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^[17-20],说明*cpsE*是链球菌荚膜多糖合成的关键基因。某些病原菌荚膜多糖的唾液酸化在逃避宿主补体旁路免疫防御中起着重要作用,其中*cpsK*和*neuA~D*编码蛋白分别负责GBS荚膜唾液的转移及合成^[21]。*cpsK*在大部分血清型GBS中编码唾液酸转移酶,负责寡糖重复单位的唾液酸化,敲除*cpsK*基因会导致GBS突变株的荚膜多糖唾液的缺失^[11],说明*cpsK*是GBS荚膜多糖唾液酸化的关键基因。*neuA*编码保守的胞苷酸唾液酸合成酶(cytidine monophosphate N-acetylneuraminic acid synthetase, CMP-Sia-synthetase),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,能催化游离唾液酸合成CMP-唾液酸和O-乙酰唾液的脱乙酰化^[21]。在人源III型GBS基因缺失突变株 $\Delta neuA$ 中未检测到荚膜唾液的含量,而在突变株 $\Delta neuA$ 中转入*neuA*过表达质粒pDC*neuA*后,荚膜唾液的含量恢复到野生株的水平^[21-22],说明*neuA*也是影响荚膜多糖唾液酸化的重要基因。

目前关于荚膜多糖合成基因*cpsE*、*cpsK*和*neuA*的研究主要集中在人源GBS,关于鱼源GBS荚膜多糖合成基因*cpsE*、*cpsK*和*neuA*与细菌

致病性关系的研究尚不多见。本课题组前期通过细胞凝集实验及ELISA实验证实了GBS是通过唾液酸化的荚膜多糖与罗非鱼唾液酸结合型免疫球蛋白凝集素样受体(Siglecs)结合,并抑制下游免疫信号^[23]。进一步研究有哪些毒力基因影响罗非鱼源GBS荚膜多糖的唾液酸化,以及GBS荚膜多糖唾液酸化对细菌致病性的影响,将有助于对罗非鱼与GBS相互作用分子机制的了解。因此,本研究分析不同培养温度下GBS荚膜多糖合成基因*cpsE*、*cpsK*和*neuA*的表达水平与GBS荚膜唾液酸含量,以及GBS荚膜唾液酸含量与细菌致病性之间的关系,为深入了解鱼源GBS的致病机制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 GBS菌株与实验用鱼

实验中的GBS菌株为WC1535,其分子血清型为Ia,由珠江水产研究所水产养殖与营养研究室罗非鱼课题组分离与保存。实验前先在脑心浸出液固体培养基(BHIA)平板上进行GBS的活化,再在脑心浸出液(BHI)液体培养基中扩大培养。

实验用尼罗罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)购于广东罗非鱼良种场,体质量为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6组(3个处理组和3个对照组,每组3个重复,每个重复30尾鱼)。隔天换水约1/3,溶解氧保持在5.0 mg/L以上,pH 7.0~8.0,水温(30±2) °C,每天投喂饲料2次,每次约为鱼体质量的3%。

1.2 GBS *cpsE*、*cpsK*和*neuA*的克隆与序列分析

将GBS接种于BHI液体培养基中活化,用细菌DNA抽提试剂盒(Magen)提取GBS基因组DNA,于-20 °C冰箱保存备用。根据GenBank中GBS WC1535株(GenBank登录号为NZ_CP016501)*cpsE*、*cpsK*和*neuA*基因全序列,采用生物软件Primer 5.0设计其引物(表1),由上海生工生物工程有限公司合成。采用50 μL PCR反应体系进行PCR扩增:LA *Taq* 0.5 μL, DNA模板1.0 μL,上、下游引物(10 μmol/L)各1.0 μL, 10 × LA *Taq* Buffer 5.0 μL, dNTP 8.0 μL, ddH₂O 33.5 μL。反应条件:94 °C预变性3 min; 94 °C 30 s, 68 °C 2 min, 30个循环;最后72 °C延伸10 min。PCR产物分别经胶回收纯化后,与pEASY-T1 Cloning Vector连接获得重组质粒pEASY-T1-*cpsE*、pEASY-T1-

表 1 无乳链球菌荚膜多糖合成基因扩增引物

Tab. 1 Primers used in cloning of capsular polysaccharide synthetic genes of *S. agalactiae*

引物名称 primer	引物序列(5'-3') primer sequence (5'-3')	碱基数/bp length	产物/bp product
cpsE-F	5'-CGCTAATGCTTGCGATGG-3'	18	1885
cpsE-R	5'-CTGCTACAGCGGCACCAG-3'	18	
cpsK-F	5'-GTAATGTGAGTGACCACGAATTG-3'	23	1203
cpsK-R	5'-GCTCGTCTGAAGGCCAATAA-3'	20	
neuA-F	5'-GTGCTACCTTACCTTGAAGATGGCTCA-3'	27	2124
neuA-R	5'-CCATTCTTCTACAATAGCCAGAGCCT-3'	26	

*cpsK*和*pEASY-T1-neuA*, 转化至DH5 α 大肠杆菌感受态细胞、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。

用BLAST软件(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>)对*cpsE*、*cpsK*和*neuA*序列进行同源性搜索分析。使用Bio Edit软件分析氨基酸序列同源性, InterPro (<http://www.ebi.ac.uk/interpro>)分析序列结构和功能域。MEGA 5.2软件构建系统进化树, 采用邻接法(Neighbor-joining, NJ)进行计算, 1000次重复计算自展分析值。

1.3 不同培养温度条件下GBS生长的比较

将GBS划线接种于BHIA平板上, 在28 °C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 °C 200 r/min下振荡过夜。然后按1:50(V/V)的比例将上述菌液接种于BHI液体培养基中, 分别置于22、28和34 °C恒温摇床中, 200 r/min振荡培养, 每个温度设置3个重复。每隔2 h用酶标仪(BioTek)检测1次菌液吸光值(OD₆₀₀), 直至菌液吸光值稳定, 绘制生长曲线。

根据OD₆₀₀值比较GBS在不同温度下的生长速率, 发现28和34 °C下GBS的生长速率较快, 分别在5 h和3 h时达到对数生长期(OD₆₀₀=0.50), 10 h均达到稳定期(OD₆₀₀=0.90); 而22 °C时GBS 24 h才达到对数生长期, 30 h达稳定期(图1)。后续实验选用培养至稳定期的GBS用于荚膜多糖合成相关基因表达水平检测、荚膜唾液酸含量测定及细菌致病性的研究。

1.4 GBS荚膜多糖合成基因和其他毒力基因的实时荧光定量检测

分别从22、28和34 °C培养的处于稳定期的GBS菌液中取约10⁹ cfu细菌量置于1.5 mL离心管中, 12 000 r/min离心5 min, 收集菌体沉淀, 于-80 °C冰箱中冻存备用。参照EasyPure RNA

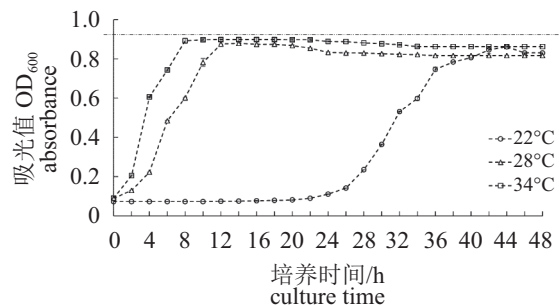


图 1 不同培养温度下无乳链球菌的生长曲线

Fig. 1 Growth curves of *S. agalactiae* cultivated at different temperatures

Kit (TransGen)试剂盒抽提细菌RNA, 用RNase-Free DNase (Promega)去除RNA中残留的DNA, 步骤均参照试剂盒说明书。最后用2%琼脂糖凝胶电泳检测所提取RNA的质量, 酶标仪测定RNA浓度。以内参基因*gyrA* (DNA gyraseA)的序列设计引物对, 对RNA样品进行PCR扩增(表2), 若扩增结果为阴性, 则说明DNA去除完全。取1 μ g RNA, 用Roche反转录试剂盒对其进行反转录, 具体步骤参照说明书, 反转录后的cDNA检测后于-20 °C保存备用。

根据GBS WC1535株荚膜多糖合成相关基因*cpsE*、*cpsK*和*neuA*, 毒力基因*cylE* (cytolysin)、*hylB* (hyaluronidase)、*bca* (alpha antigens of the C protein)及内参基因*gyrA*序列^[24], 分别设计qPCR引物(表2)。qPCR反应体系(20 μ L)包括SY-BR Permixon Ex Taq II (TaKaRa) 10 μ L, 上游引物和下游引物各0.8 μ L (10 μ mol/L), cDNA模板2 μ L, 无菌双蒸水6.4 μ L。反应程序: 95 °C预变性30 s; 95 °C变性5 s, 60 °C退火30 s, 40个循环。

1.5 GBS荚膜唾液酸含量的测定

将在22、28和34 °C培养的处于稳定期的

表2 无乳链球菌荚膜多糖合成基因和毒力基因qPCR引物

引物名称 primer	引物序列(5'-3') primer sequence(5'-3')	碱基数/bp length	产物/bp product
QgyrA-F	5'-TGTTACTACACGGGAGTTAATGG-3'	23	111
QgyrA-R	5'-GATCCCTTCCCAGTTTCATAGG-3'	22	
QcpsE-F	5'-TTTGAGATCGTGGCTATCTTG-3'	21	122
QcpsE-R	5'-GGAAAGTCGTGTCGTTGTAAATG-3'	23	
QcpsK-F	5'-CCAAATTGCCGGTAGAGCTATT-3'	22	104
QcpsK-R	5'-CGCAGTGGACGAATGTGTTAT-3'	21	
QneuA-F	5'-CCCTGGTCTGTTTACGACATT-3'	21	116
QneuA-R	5'-AAATAGCGCCGTTCCGATAG-3'	20	
QcylE-F	5'-GCAACTGTGGAAACCCTTATG-3'	22	133
QcylE-R	5'-GGCTGCCATTGGAGAGATA-3'	20	
QhylB-F	5'-CCGAGGTGACACTTGAACCTTA-3'	22	102
QhylB-R	5'-GTGGATGCTCTGAGTCTTTAGG-3'	22	
Qbca-F	5'-GTTGTTGGTGATCGTCCAGATA-3'	22	113
Qbca-R	5'-GGTGTACATGAACCGTTACT-3'	21	

GBS培养物分别于8500 r/min 4 °C离心30 min, 收集菌体; 用80 mL预冷的PBS (33 mmol/L)洗涤菌体; 重复上述步骤, 离心并称取净重, 加入30 mL预冷的PBS重悬菌体。120 °C 75 min高压灭菌^[25]。待冷却至室温, 用1.5 mL无菌离心管分装, 每管加入20 μL唾液酸苷酶(0.488 U/μL, NRH, 南京建成), 37 °C 50 r/min孵育10 h; 酶解后的反应液8500 r/min 4°C离心50 min, 取上清液。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, 使用酶标仪分别对对照品(水)、标准品(SA)和样品的OD₅₆₀进行测量, 并计算GBS荚膜唾液酸含量(荚膜唾液酸分子量=309.3, SA标准品浓度=1 mmol/L), 其公式:

$$\text{GBS荚膜唾液酸(SA)的含量(mg/g)} = \frac{\text{OD}_{\text{样品}} - \text{OD}_{\text{对照}}}{\text{OD}_{\text{标准}} - \text{OD}_{\text{对照}}} \times 309.3 \times \frac{\text{重悬体积} \times \text{SA标准品浓度}}{\text{菌量}}$$

1.6 GBS感染实验

挑取BHIA平板上的GBS菌株置于1.5 mL离心管中过夜培养后, 以1:50(V/V)的比例将GBS接种于3个100 mL新鲜的BHI培养基锥形瓶中, 分别在22、28和34 °C条件下, 200 r/min振荡培养至稳定期(OD₆₀₀=0.9)。4000 r/min离心, 并用灭菌的10 mmol/L PBS缓冲液洗涤菌体。根据预

实验获得的LD₅₀, 用PBS调节菌液浓度至7.5×10⁷ cfu/mL。实验组用此菌悬液对罗非鱼进行腹腔注射感染, 每尾100 μL, 对照组注射等量无菌PBS缓冲液。观察并记录7 d内实验组和对照组罗非鱼的累积死亡率。

1.7 数据处理与分析

采用2^{-ΔΔC_T}法, SPSS 17.0软件对定量数据进行分析。采用单因素方差分析法(One-Way ANOVA)对不同培养温度下的GBS荚膜多糖合成基因和其他毒力表达、荚膜唾液酸含量及感染GBS后罗非鱼累积死亡率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

2.1 GBS *cpsE*、*cpsK*和*neuA*的序列与进化关系

罗非鱼源GBS *cpsE*、*cpsK*和*neuA*核苷酸序列的大小分别为1389、957和1242 bp, 各编码462、318和413个氨基酸。InterPro分析显示CpsE具有1个参与催化糖基元转运的糖基转移酶(bacterial sugar transferase)超级家族结构域, 位于第269~462位氨基酸, 且存在5个跨膜区, 分别位于第12~35、41~61、73~91、103~123、271~279位氨基酸(图2-a); CpsK仅有一个糖基转移酶(glycosyl-

transferases)超家族结构域, 位于第22~315位氨基酸(图2-b); NeuA具有一个与唾液酸催化激活相关的核苷酸—糖基转移酶(nucleotide-diphospho-

sugar transferases)和SGNH水解酶类酯酶超家族结构域(SGNH hydrolase-type esterase domain), 分别位于第1~217位和第243~413位氨基酸(图2-c)。

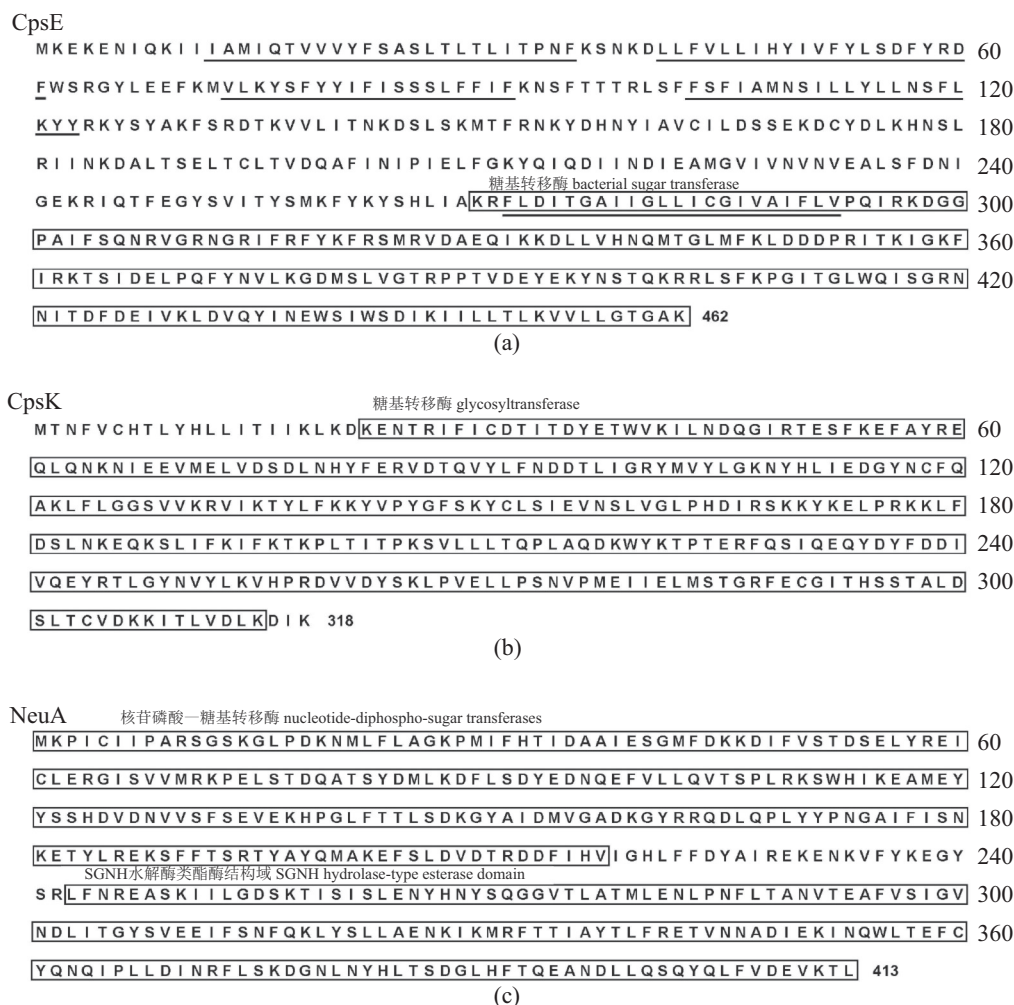


图2 无乳链球菌CpsE、CpsK和NeuA氨基酸序列分析

单下划线表示跨膜区域, □表示与荚膜多糖合成相关的酶活性位点

Fig. 2 Analysis of the amino acid sequence of CpsE, Cpsk and NeuA of *S. agalactiae*

Transmembrane domains, single underline; □. enzyme active site related to synthesis of capsular polysaccharide

Blast分析显示所克隆的罗非鱼GBS CpsE和NeuA氨基酸序列与NCBI上已登录的鱼源和人源GBS CpsE和NeuA序列同源性均较高, 相似度均达97%以上; 所克隆的GBS CpsK序列与NCBI上已登录的鱼源(Ia和Ib型)和人源(Ia、Ib和II~IX型)的序列同源性分别为56%~100%和27%~100%。根据鱼源和人源的多种血清型GBS CpsE、CpsK和NeuA序列分别构建系统进化树, 结果显示在3个进化树中罗非鱼源Ia型GBS与人源Ia型GBS均聚为一支; 鱼源Ia型GBS CpsK首先与人源Ia型聚为一支, 再与人源III、V和IX型GBS聚为一大支(图3)。

2.2 GBS荚膜多糖合成基因及其他毒力基因的表达变化

qPCR检测显示22 °C时GBS *cpsK*和*neuA*的表达水平最高; 28 °C时GBS荚膜多糖合成基因*cpsE*、*cpsK*和*neuA*的表达水平最低; 34 °C时GBS *cpsE*、*cpsK*和*neuA*的表达水平显著高于28 °C(图4-a)。毒力因子*cylE*、*hylB*和*bca*分别在34、22和28 °C时达到最高表达水平(图4-b)。

2.3 GBS荚膜唾液酸含量的变化

比色法测定显示22 °C时GBS荚膜唾液酸含量最高, 为(1.58±0.047) mg/g; 28 °C时GBS荚膜

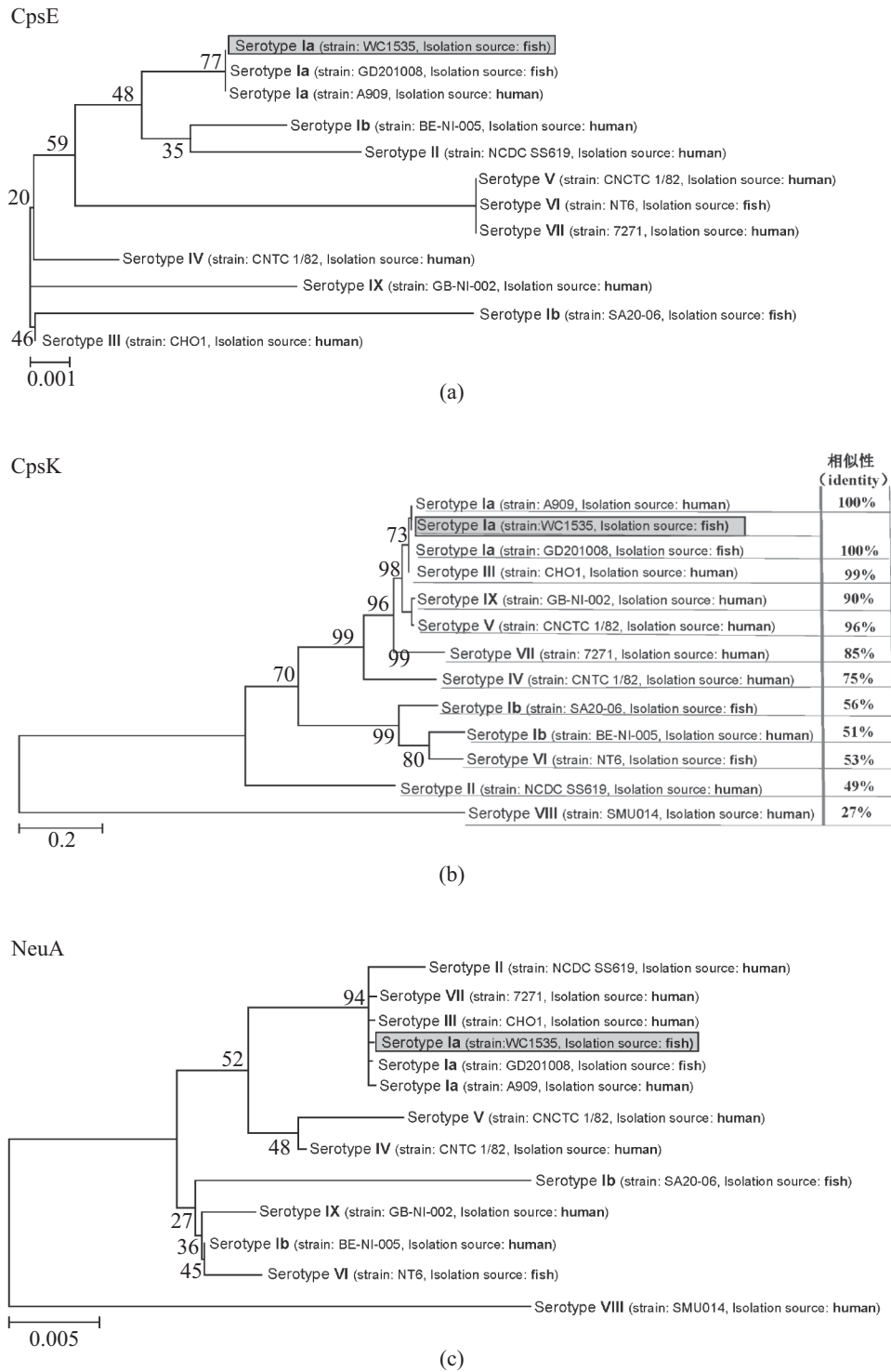


图3 无乳链球菌CpsE、CpsK和NeuA的系统进化树

(b)中右侧栏的相似性为菌株WC1535与其他株GBS的序列同源性

Fig. 3 Phylogenetic trees based on the amino acid sequences of CpsE, CpsK and NeuA of *S. agalactiae*

Identity(%) of WC1535 and other strains of *S. agalactiae* was showed in (b)

唾液酸含量最低, 为(1.37±0.09) mg/g; 34 °C时 GBS荚膜唾液酸含量为(1.55±0.058) mg/g, 显著高于28 °C(图5)。

2.4 GBS毒力的比较

在22、28和34 °C条件下分别对尼罗罗非鱼进行攻毒, 发现各组的累积死亡率分别为(3.33%±

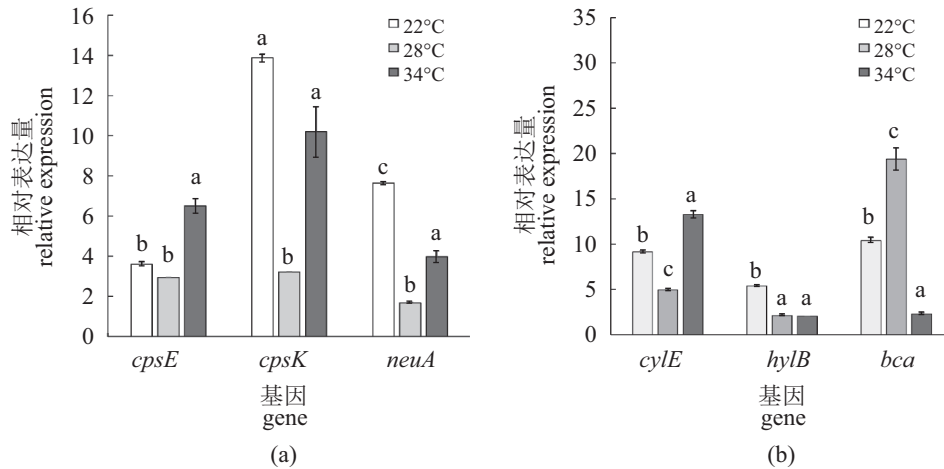


图 4 不同培养温度下的无乳链球菌荚膜多糖合成基因和毒力基因的表达(mean±SD, n=3)

字母不同表示各组之间差异显著, $P < 0.05$; 字母相同则表示各组之间无显著差异, $P > 0.05$, 下同

Fig. 4 Expression levels of capsular polysaccharide synthetic genes and virulence genes of *S. agalactiae* cultivated at different temperatures

Groups with the different letters showed significant difference, $P < 0.05$; groups with the same letter showed no significant difference, $P > 0.05$, the same below

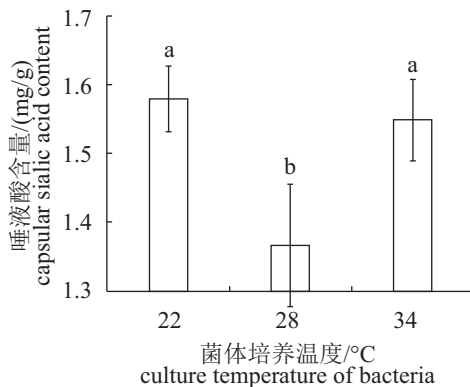


图 5 不同培养温度下的无乳链球菌荚膜唾液酸的含量 (mean±SD, n=3)

Fig. 5 Capsular sialic acid content of *S. agalactiae* cultivated at different temperatures

3.33%)、(62.22%±19.24%)和(99.00%±1.92%), 且每两组间均存在显著差异 ($P < 0.05$) (图6)。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、脾脏中可分离到GBS。不同水温条件下对照组均没有出现死亡或具有临床症状的罗非鱼。

3 讨论

3.1 GBS *cpsE*、*cpsK*和*neuA*的序列与进化关系

CpsE在启动荚膜多糖合成中起着重要的作用, 其序列保守性很高, 与肺炎链球菌 CpsE、嗜热链球菌 (*S. thermophilus*) EpsE和黄单胞菌

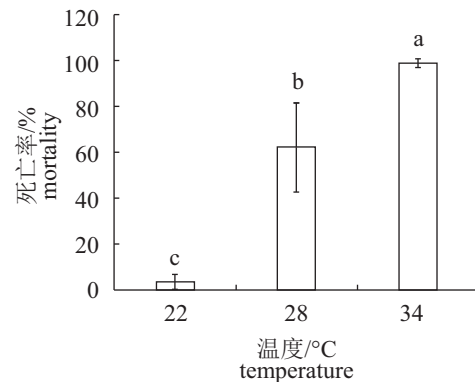


图 6 感染不同培养温度下的无乳链球菌后罗非鱼的死亡率

Fig. 6 Mortality rate of *O. niloticus* infected with *S. agalactiae* cultivated at different temperature

(*Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis*) GumD等的结构相似性均较高, 它们的共同点均为N端有多个疏水性结构域(跨膜结构域), C端为胞内段保守的糖基转移酶结构域^[26-28]; 肺炎链球菌CpsE的糖基转移酶结构域发生点突变(R379G)后, 会导致链球菌荚膜的缺失^[19, 29]。同时, 人源Ia、II、III和V型GBS CpsE在糖基转移酶结构域(分别为R308G、R353I、P387S和R419K)发生错义突变后导致无荚膜表型GBS的出现^[30]。罗非鱼GBS和人源所有血清型的CpsE结构相似, 其N端也有5个疏水性跨膜区, C端具有保守的糖基转移酶结构域。因此, 推测罗非鱼GBS CpsE也具有糖基转

移酶活性,启动荚膜多糖的合成。

所有血清型GBS的*neuA*的碱基序列与氨基酸序列也较保守。已有研究表明人源GBS NeuA具有CMP-Sia合成酶/转移酶活性(CMP-Sia synthetase/transferase)和唾液酸O-乙酰酯酶(Sia-OAc esterase)活性, CMP-Sia synthetase/transferase可催化游离的唾液酸/O-乙酰唾液酸(Sia-OAc)转移到CMP上,合成CMP-Sia或CMP-Sia-OAc;而Sia-OAc esterase具有催化Sia-OAc和CMP-Sia-OAc的脱乙酰化功能^[21]。这2个酶活性位点协同调节荚膜多糖唾液酸化所需的CMP-Sia和CMP-Sia-OAc的供应。本研究通过尼罗罗非鱼GBS NeuA蛋白结构域预测,显示其具有保守的CMP糖基转移酶结构域和SGNH水解酶类酯酶(Sia-OAc esterase)结构域,推测NeuA可能通过调节唾液酸化所需原料供应影响荚膜多糖唾液酸化过程。

本研究中,罗非鱼GBS CpsK序列与人源GBS (Ia、III和V)的相似性达到96%~100%,但与其他血清型的序列同源性相对较低。在根据GBS CpsK构建的进化树上,鱼源的Ia与人源的Ia、III和V聚为一大支(图3-b)。CpsK在GSB大部分血清型中已确定具有唾液酸转移酶活性^[11],且通过在杜克雷嗜血杆菌(*Haemophilus ducreyi*)突变株中表达的人源III型GBS CpsK,证实其具有 α 2,3-唾液酸转移酶活性^[31]。罗非鱼GBS CpsK与人源III型CpsK的高相似性,因此推测罗非鱼GBS CpsK也具有与人源III型CpsK相似的催化唾液酸转移的功能。有实验证实人源Ia、III和V型GBS均可感染罗非鱼,导致罗非鱼链球菌病的发生^[32-33]。荚膜唾液酸作为重要的毒力因子可协助GBS逃避宿主免疫反应^[10],上述3种血清型GBS的跨宿主感染可能与其CpsK的高保守有关。

3.2 GBS荚膜多糖合成基因和其他毒力基因的表达变化

已有研究表明不同温度(28~40 °C)下GBS毒力基因的表达存在明显差异。qPCR和转录组分析发现温度越高(>28 °C),GBS溶血素基因*cylE*和促溶血因子*cfb*的表达水平越高^[24, 34-35]。本研究发现在较高温度(>28 °C)下培养的GBS,其*cpsE*、*cpsK*、*neuA*和*cylE*基因的表达随着温度的升高而升高,但*cpsK*、*neuA*和*hylB*最高的表达水平却出现在22 °C。而22 °C菌株的毒力最弱,因此这些基因的表达与GBS致病力的相关关系仍待进一步的分析。

3.3 GBS荚膜多糖合成基因的表达与荚膜唾液酸含量的关系

已有研究表明人源GBS NeuA和CpsK在细菌荚膜多糖唾液酸化过程中起重要作用。通过构建GBS突变株 $\Delta neu_{III}A$,发现其荚膜多糖中不包含唾液酸,而经回复突变后的GBS又重新形成唾液酸化的荚膜多糖^[22]。此外,通过敲除GBS的*cps_{III}K*基因,发现突变株荚膜多糖的唾液酸化受到严重影响^[11]。上述研究均证实了人源GBS NeuA和CpsK对荚膜多糖的唾液酸化过程起重要作用。本研究发现在不同培养温度下GBS *cpsK*和*neuA*基因的表达变化与其荚膜唾液酸含量变化一致(图4, 5)。说明鱼源GBS *cpsK*和*neuA*也与荚膜多糖的唾液酸化直接相关。*cpsE*具有启动荚膜多糖重复单位合成的功能,其突变或缺失后均导致无荚膜表型GBS的出现^[36],本研究中在22和28 °C下培养的GBS *cpsE*表达量没有显著性差异,34 °C时表达水平较高(图4-a),说明不同培养温度下鱼源GBS *cpsE*均保持有一定水平的表达,保证着整个荚膜多糖合成的启动。

3.4 GBS荚膜唾液酸含量与细菌致病力的关系

唾液酸化的荚膜多糖是GBS主要毒力因子之一^[10],对协助该菌逃避宿主防御机制至关重要,因为细菌在细胞内存活是其致病的关键环节,胞内存活的细菌在体内形成播散性感染,最终导致机体致病^[37]。已有研究发现人的嗜中性粒细胞对GBS突变株 $\Delta neu_{III}A$ 的体外杀伤作用显著高于野生株^[38]。流感嗜血杆菌(*Haemophilus influenzae*)的*lic3A*和*SiaB*对应于人源III型GBS *cpsK*和*neuA*,其荚膜唾液酸合成缺陷的突变株 $\Delta lic3A$ 和 $\Delta SiaB$ 的毒力显著低于野生株^[39]。同时,2型猪链球菌野生株对人单核细胞杀伤的抵御能力显著强于唾液酸缺失突变株 $\Delta neuB$ ^[37]。上述报道均证实唾液酸化的荚膜多糖是细菌的重要毒力因子。本实验中在较高培养温度(28和34 °C)下随着GBS荚膜唾液酸含量的增加,细菌的毒力也逐渐增强;但在低温(22 °C)时GBS荚膜唾液酸含量与34 °C时相近,感染GBS后罗非鱼的死亡率却显著低于34 °C(图5, 6),提示较高水温条件下细菌的强致病性可能还与除荚膜唾液酸外的某些重要毒力因子的表达有关。22 °C培养的GBS需要30 h才能增殖到稳定期,而在28和34 °C时均只需10 h(图1),说明低温下GBS的增殖能力

明显降低; 本项目组的另一项研究也发现22 °C时GBS WC1535株在罗非鱼体内的滞留时间比高温(34 °C)下长10 dpi, 说明较低温度下GBS荚膜唾液酸的高含量可能有助于其在宿主体内的潜伏。

本实验克隆了尼罗罗非鱼GBS *cpsE*、*cpsK*和*neuA*序列, 它们均具有与荚膜多糖合成相关的保守的酶活性位点。不同培养温度下*cpsK*和*neuA*的表达变化与其唾液酸含量变化一致, 推测*cpsK*和*neuA*对GBS荚膜多糖的唾液酸化起重要作用。较低温度下GBS荚膜唾液酸的高含量可能有助于其在宿主体内的潜伏, 而较高水温下细菌的毒力可能还与某些重要的毒力因子有关。本研究结果可有助于对罗非鱼源GBS致病机理的了解。

参考文献:

- [1] Johri A K, Paoletti L C, Glaser P, *et al.* Group B *Streptococcus*: global incidence and vaccine development[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2006, 4(12): 932-942.
- [2] Amal M N A, Zamri-Saad M. *Streptococcosis* in tilapia (*Oreochromis niloticus*): a review[J]. *Pertanika Journal of Tropical Agricultural Science*, 2011, 34(2): 195-206.
- [3] 张德锋, 可小丽, 刘志刚, 等. 中国七种水生动物源无乳链球菌的分子特征及其对斑马鱼的致病性[J]. *水产学报*, 2017, 41(11): 1788-1797.
Zhang D F, Ke X L, Liu Z G, *et al.* Molecular characteristics and the pathogenicity to zebrafish of *Streptococcus agalactiae* strains isolated from seven aquatic animals in China[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2017, 41(11): 1788-1797(in Chinese).
- [4] 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.
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(in Chinese).
- [5] 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, 22(5): 1044-1054.
Zhang D F, Liu L H, Ren Y, *et al.* Isolation, identification, and molecular characteristics of a new geno-type of *Streptococcus agalactiae* from cultured tilapia in China[J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2015, 22(5): 1044-1054(in Chinese).
- [6] Li L P, Wang R, Liang W W, *et al.* Rare serotype occurrence and PFGE genotypic diversity of *Streptococcus agalactiae* isolated from tilapia in China[J]. *Veterinary Microbiology*, 2013, 167(3-4): 719-724.
- [7] Ye X, Li J, Lu M X, *et al.* Identification and molecular typing of *Streptococcus agalactiae* isolated from pond-cultured tilapia in China[J]. *Fisheries Science*, 2011, 77(4): 623-632.
- [8] 郭玉娟, 张德锋, 樊海平, 等. 中国南方地区罗非鱼无乳链球菌的分子流行病学研究[J]. *水产学报*, 2012, 36(3): 399-406.
Guo Y J, Zhang D F, Fan H P, *et al.* Molecular epidemiology of *Streptococcus agalactiae* isolated from tilapia in Southern China[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2012, 36(3): 399-406(in Chinese).
- [9] 祝璟琳, 李大宇, 邹芝英, 等. 高温应激下无乳链球菌感染对尼罗罗非鱼血清生化指标和组织病理的影响[J]. *水产学报*, 2016, 40(3): 445-456.
Zhu J L, Li D Y, Zou Z Y, *et al.* The impact of high temperature stress on serum biochemical parameters and histopathology of *Oreochromis niloticus* infected by *Streptococcus agalactiae*[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2016, 40(3): 445-456(in Chinese).
- [10] Lecours M P, Fittipaldi N, Takamatsu D, *et al.* Sialylation of *Streptococcus suis* serotype 2 is essential for capsule expression but is not responsible for the main capsular epitope[J]. *Microbes and Infection*, 2012, 14(11): 941-950.
- [11] Chaffin D O, Mentele L M, Rubens C E. Sialylation of group B streptococcal capsular polysaccharide is mediated by *cpsK* and is required for optimal capsule polymerization and expression[J]. *Journal of Bacteriology*, 2005, 187(13): 4615-4626.
- [12] 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 Pathogens*, 2014, 10(1): e1003846.
- [13] von Gunten S, Simon H U. Natural anti-Siglec autoantibodies mediate potential immunoregulatory mechanisms: Implications for the clinical use of intravenous immunoglobulins (IVIg)[J]. *Autoimmunity Reviews*, 2008, 7(6): 453-456.
- [14] 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]. *Biochemical Journal*, 2010, 428(2): 163-168.
- [15] Boulnois G J, Jann K. Bacterial polysaccharide capsule synthesis, export and evolution of structural diversity[J]. *Molecular Microbiology*, 1989, 3(12): 1819-1823.
- [16] Chaffin D O, Beres S B, Yim H H, *et al.* The serotype of type Ia and III group B streptococci is determined by the polymerase gene within the polycistronic capsule operon[J]. *Journal of Bacteriology*, 2000, 182(16): 4466-4477.
- [17] 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]. *Molecular Microbiology*, 1993, 8(5): 843-855.
- [18] 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 Microbiology*, 2014, 14: 210.
- [19] 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]. *Journal of Bacteriology*, 2015, 197(10): 1781-1791.
- [20] 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.
- Ding D D. Construction and characterization of *cps2E* deleted mutants of *Streptococcus Suis* Serotype 2[D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2014 (in Chinese).
- [21] Lewis A L, Nizet V, Varki A. Discovery and characterization of sialic acid O-acetylation in group B *Streptococcus*[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2004, 101(30): 11123-11128.
- [22] Lewis A L, Cao H Z, Patel S K, *et al.* NeuA sialic acid O-acetyltransferase activity modulates O-acetylation of capsular polysaccharide in group B *Streptococcus*[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2007, 282(38): 27562-27571.
- [23] Dong J J, Wei Y Z, 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]. *Molecular Immunology*, 2016, 73: 158-169.
- [24] Kayansamruaj P, Pirarat N, Hirono I, *et al.* Increasing of temperature induces pathogenicity of *Streptococcus agalactiae* and the up-regulation of inflammatory related genes in infected Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*)[J]. *Veterinary Microbiology*, 2014, 172(1-2): 265-271.
- [25] van Calsteren M R, Gagnon F, Lacouture S, *et al.* Structure determination of *Streptococcus suis* serotype 2 capsular polysaccharide[J]. *Biochemistry and Cell Biology*, 2010, 88(3): 513-525.
- [26] Guidolin A, Morona J K, Morona R, *et al.* Nucleotide sequence analysis of genes essential for capsular polysaccharide biosynthesis in *Streptococcus pneumoniae* type 19F[J]. *Infection and Immunity*, 1994, 62(12): 5384-5396.
- [27] Minic Z, Marie C, Delorme C, *et al.* Control of EpsE, the phosphoglycosyltransferase initiating exopolysaccharide synthesis in *Streptococcus thermophilus*, by EpsD tyrosine kinase[J]. *Journal of Bacteriology*, 2007, 189(4): 1351-1357.
- [28] Kemp B P, Horne J, Bryant A, *et al.* *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* *gumD* gene is essential for EPS production and pathogenicity and enhances epiphytic survival on cassava (*Manihot esculenta*)[J]. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 2004, 64(4): 209-218.
- [29] Shainheit M G, Mulé M, Camilli A. The core promoter of the capsule operon of *Streptococcus pneumoniae* is necessary for colonization and invasive disease[J]. *Infection and Immunity*, 2014, 82(2): 694-705.
- [30] Rosini R, Campisi E, De Chiara M, *et al.* Genomic analysis reveals the molecular basis for capsule loss in the group B *Streptococcus* population[J]. *PLoS One*, 2015, 10(5): e0125985.
- [31] Chaffin D O, McKinnon K, Rubens C E. CpsK of *Streptococcus agalactiae* exhibits α 2,3-sialyltransferase activity in *Haemophilus ducreyi*[J]. *Molecular Microbiology*, 2002, 45(1): 109-122.
- [32] Chen M, Wang R, Luo F G, *et al.* *Streptococcus agalactiae* isolates of serotypes Ia, III and V from human and cow are able to infect tilapia[J]. *Veterinary Microbiology*, 2015, 180(1-2): 129-135.
- [33] Pereira U P, Mian G F, Oliveira I C M, *et al.* Genotyping of *Streptococcus agalactiae* strains isolated from fish, human and cattle and their virulence potential in

- Nile tilapia[J]. *Veterinary Microbiology*, 2010, 140(1-2): 186-192.
- [34] 刘志刚, 可小丽, 卢迈新, 等. 温度对尼罗罗非鱼无乳链球菌毒力的影响[J]. *水产学报*, 2013, 37(11): 1733-1741.
- Liu Z G, Ke X L, Lu M X, *et al.* Effect of temperature on the virulence of *Streptococcus agalactiae* from Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*)[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2013, 37(11): 1733-1741(in Chinese).
- [35] Mereghetti L, Sitkiewicz I, Green N M, *et al.* Remodeling of the *Streptococcus agalactiae* transcriptome in response to growth temperature[J]. *PLoS One*, 2008, 3(7): e2785.
- [36] Beaussart A, Péchoux C, Trieu-Cuot P, *et al.* Molecular mapping of the cell wall polysaccharides of the human pathogen *Streptococcus agalactiae*[J]. *Nanoscale*, 2014, 6(24): 14820-14827.
- [37] 石洁, 李先富, 张先云, 等. 荚膜唾液酸缺失对2型猪链球菌与人单核细胞相互作用的影响[J]. *免疫学杂志*, 2011, 27(11): 926-930.
- Shi J, Li X F, Zhang X Y, *et al.* The absence of sialylation effects the interactions between *Streptococcus suis* serotype 2 and human THP-1 monocytes[J]. *Immunological Journal*, 2011, 27(11): 926-930(in Chinese).
- [38] Carlin A F, Uchiyama S, Chang Y C, *et al.* Molecular mimicry of host sialylated glycans allows a bacterial pathogen to engage neutrophil Siglec-9 and dampen the innate immune response[J]. *Blood*, 2009, 113(14): 3333-3336.
- [39] Bouchet V, Hood D W, Li J J, *et al.* Host-derived sialic acid is incorporated into *Haemophilus influenzae* lipopolysaccharide and is a major virulence factor in experimental otitis media[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2003, 100(15): 8898-8903.

Expressions of capsular polysaccharide synthetic gene of *Streptococcus agalactiae* isolated from Nile tilapia(*Oreochromis niloticus*) and their effects on capsular sialic acid content and bacterial pathogenicity

SHI Hongya^{1,2}, DONG Junjian¹, ZHANG Defeng¹, SUN Chengfei¹,
TIAN Yuanyuan^{1,2}, LU Maixin^{1,2}, YE Xing^{1,2*}

(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: In order to understand the expressions of capsular polysaccharide synthetic gene of *Streptococcus agalactiae* (GBS) isolated from *Oreochromis niloticus* (Nile tilapia) and their effects on capsular sialic acid content and bacterial pathogenicity, capsular polysaccharide synthetic gene *cpsE*, *cpsK* and *neuA* of GBS from *O. niloticus* were cloned in the study. The expression levels of these genes at different temperature were detected by qPCR. Capsular sialic acid content was detected by colorimetric method. The mortality rate of *O. niloticus* infected with GBS cultured at different temperature was analyzed by artificial challenge test. The results showed that amino acid sequence analysis encoded by *cpsE*, *cpsK* and *neuA* of GBS had conservative enzyme active sites which were essential for the synthesis of capsular polysaccharide. *CpsE* and *NeuA* of GBS isolated from *O. niloticus* shared high homology with those of GBS isolated from human and other fish species (>97%). The identities of *cpsK* of GBS isolated from *O. niloticus* with those of other fish species (serotype Ia and Ib) and human (serotype Ia, Ib and II-IX) were 56%–100% and 27%–100%, respectively. The expression levels of *cpsK* and *neuA* of GBS cultivated at different temperature were consistent with that of capsular sialic acid content. Capsular sialic acid content and the mortality rate of tilapia infected with GBS cultivated at 28 and 34 °C were increased with the rise of temperature. The mortality rate of tilapia after artificial challenge at 22 °C was the lowest though the highest capsular sialic acid content was observed. The research suggested that the expression levels of *CpsK* and *NeuA* played an important role in the process of sialylation of capsular polysaccharide. Higher capsular sialic acid content of GBS cultivated at low temperature may provide protection for it to stay in the host. However, the expressions of some important virulence factors besides capsular sialic acid might be necessary for a strong bacteria pathogenicity for GBS cultivated at higher temperature.

Key words: *Oreochromis niloticus*; *Streptococcus agalactiae*; temperature; capsular polysaccharide synthetic gene; capsular sialic acid; pathogenicity

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

Funding projects: Central Public-interest Scientific Institution Basal Research Fund, CAFS (2017HY-ZC06); National Natural Science Foundation of China (NSFC) (31272688); China Agriculture Research System (CARS-46)