

· 实验室研究 ·

猪链球菌 2 型反应调控因子 *RevS*
突变株的构建

鞠爱萍 王长军 李明 程功 郑峰 潘秀珍 陆承平 唐家琪

【摘要】 目的 构建猪链球菌 2 型强毒株 05ZYH33 反应调控因子 *RevS* 基因敲除突变体, 研究基因敲除后对细菌基本生物学性状及对小鼠和猪的致病性的影响。方法 构建中间为壮观霉素抗性基因, 两侧为 *RevS* 编码基因上、下游同源序列的基因敲除载体, 通过同源重组和 PCR 法鉴定, 获得 *RevS* 编码基因完全被壮观霉素抗性基因替代的突变株。体外观察基因敲除后细菌的稳定性、生长曲线、菌落形态、溶血性、染色情况、镜下形态及蛋白表达等基本生物学性状有无发生明显改变。以 10^8 CFU 野毒株和缺失株分别感染 BALB/c 小鼠和 20 日龄仔猪, 观察致病性有无明显区别。结果 PCR 分析显示 *RevS* 编码基因完全被壮观霉素抗性基因替代, 基因敲除后细菌的基本生物学性状无明显改变。动物感染实验显示, *RevS* 缺失株对小鼠的致病性显著减弱, 但对其主要宿主猪的致病性未见显著改变。结论 成功构建了猪链球菌 2 型强毒株 05ZYH33 反应调控因子 *RevS* 基因敲除突变株, 基因敲除后未明显影响细菌的基本生物学性状, 但对小鼠和猪的致病性有所减弱。

【关键词】 猪链球菌 2 型; 反应调控因子; 基因敲除; 致病性

Construction of *RevS* gene knock-out mutant of *Streptococcus suis* serotype 2 JU Ai-ping*, WANG Chang-jun, LI Ming, CHENG Gong, ZHENG Feng, PAN Xiu-zhen, LU Cheng-ping, TANG Jia-qi. *Institute of Military Medical Sciences, Nanjing Command, Nanjing 210002, China

【Abstract】 Objective To construct a gene knock-out mutant of response regulator named *RevS* in *Streptococcus suis* serotype 2 virulent strain 05ZYH33, and to investigate the effects of its deletion on the biological characters of this pathogen and the pathogenesis to mice and piglets. **Methods** Recombinant gene knock-out vector consisting of *Spc*^r cassette was constructed and flanking was constructed consisting of *Spc*^r cassette with flanking homology regions to the *RevS* genes while the isogenic *RevS*-deficient mutant was screened by allelic replacement. The effects of *RevS* deletion on the basic biological characters of 05ZYH33 including growth stability, colonial morphology, haemolysis, Gram staining, growth curve and protein expression were examined *in vitro*. The mice and piglets were infected with 10^8 CFU wild virulent and mutant isolates. **Results** PCR analysis confirmed that the coding genes of *RevS* were replaced completely by *Spc*^r cassette and the basic biological characters of 05ZYH33 did not undergo any apparent change. Balb/c mice infection assay indicated that *RevS* play a role in the pathogenesis of *Streptococcus suis* infections, while no remarkable difference was observed in the piglets' pathogenesis infection rates between mutant isolates Δ 05ZYH33 and wild-type isolates 05ZYH33. **Conclusion** The mutant of *Streptococcus suis* 05ZYH33 response regulator was successfully constructed, while the mutation did not obviously affect the bacterial biological characters, while the knock-out mutant of *RevS* was shown to be attenuated in pathogenesis to mice and piglets.

【Key words】 *Streptococcus suis* serotype 2; Response regulator; Gene knock-out; Pathogenesis

1998 年和 2005 年, 我国江苏省和四川省先后发生猪链球菌病暴发感染猪和人的公共卫生事件, 感染者出现了链球菌中毒性休克综合征 (STSS)^[1]。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30600533, 30670105); 江苏省自然科学基金资助项目 (BK2006014)

作者单位: 210002 南京军区军事医学研究所 (鞠爱萍、王长军、李明、程功、郑峰、潘秀珍、唐家琪); 南京农业大学动物医学院 (陆承平)

为了对造成这两次公共卫生事件的猪链球菌 (*Streptococcus suis*, SS) 2 型流行菌株的致病性进行深入研究, 南京军区军事医学研究所对 1998 年江苏省流行的强致病株 98HAH12、2005 年四川省流行的强致病株 05ZYH33 (两株均分离自 STSS 患者) 及无毒株 05HAS68 (分离自江苏省健康猪) 进行了全基因组测序和功能注释, 发现 05ZYH33 基因组中存在 15 个二元信号转导系统 (two-component signal

transduction systems, TCSTS), 为开展基因功能研究奠定了基础^[2]。TCSTS 可在多种致病菌感染宿主的过程中调控细菌多种毒力因子的表达, 参与细菌的致病过程^[3]。de Greeff 等^[4]报道“孤儿”反应调节因子(orphan response regulator) *RevS* 基因敲除的 SS2 在猪的主要组织器官中的定植能力减弱, 作用机制不明。同源性分析发现, 国内毒力株 05ZYH33 的 *RevS* 基因与 de Greeff 等报道的猪链球菌反应调节因子 *RevS* 基因同源率为 100%。为探讨 *RevS* 基因对 05ZYH33 致病性的影响及其可能的机制, 本研究通过构建 *RevS* 基因敲除突变体, 对其进行系统的生物学研究。

材料与方 法

1. 菌株、质粒及引物: 本实验所用的菌株、质粒及引物见表 1。引物由上海赛百盛基因技术有限公司合成。

表 1 实验所用的菌株、质粒及引物

菌株、质粒及引物	表型及相关特征	来源
菌株		
05ZYH33	血清型 2 型, 强致病株, <i>RevS</i> ⁺	本室保存
Δ05ZYH33	血清型 2 型, <i>Spc</i> ⁺ , <i>RevS</i> ⁻	本研究构建
05ZYS68	血清型 2 型, 弱毒株	本室保存
<i>E. coli</i> DI15α	<i>deoR</i> , <i>recA</i> , <i>endA</i> , <i>hsdR</i> , <i>supE</i> , <i>thi</i> , <i>gyrA</i> , <i>relA</i>	本室保存
质粒		
pMD-18T	T 载体, <i>lacZ</i> , <i>Amp</i> ^r	TaKaRa
pUC18	<i>E. coli</i> 克隆载体, <i>lacZ</i> , <i>Amp</i> ^r	本室保存
pSET2	<i>E. coli</i> - <i>S. suis</i> 穿梭质粒, <i>Spc</i> ^r	Takamatsu, et al
pUC18- <i>RevS</i>	<i>RevS</i> 基因敲除质粒, <i>Amp</i> ^r , <i>Spc</i> ^r	本研究构建
引物		
LA1 ^a	<u>GAATTC</u> TTTCCCAATTTACGCTTTT	
LA2 ^b	GGATCCCATTTTCTAACCTGCTCTGC	
RA1 ^c	CTGCAGGTTTCTGGTCTGGCACTTTTTTC	
RA2 ^d	AAGCTTCTACCAACCCCCACCGCATAC	
Spc1 ^b	GGATCCGTTCTGTAATACAATGTTATA	
Spc2 ^c	CTGCAGGTTTCTAAAATCTGAT	
IN1	CAGGTTAGAAAATGCTAT	
IN2	AAATGACTTTATGAATCG	
OUT1	GAGGCAGGCAAGATGAACAAGTC	
OUT2	AAAACAGCCCAATAGAAAATGAGG	

注: 下划线分别引入^a*EcoR* I 酶切位点; ^b *Bam*H I 酶切位点; ^c *Pst* I 酶切位点; ^d *Hind* III 酶切位点

2. 实验动物: BALB/c 小鼠 15 只, 购自上海中科院动物中心; 20 日龄仔猪 9 头, 购自姜堰某猪场。

3. 主要试剂和仪器: Ex Taq DNA 聚合酶、DNA 限制性内切酶、T4 DNA 连接酶、质粒 DNA 抽提试剂盒均为 TaKaRa 公司产品; DNA marker、protein

marker SM0441 为晶美公司产品。胶回收试剂盒为 Promega 公司产品; Todd-Hewitt Broth (THB) 培养基购于 Difco 公司; Gene Pulser Xcell™ 型电穿孔仪为 Bio-Rad 公司产品; Ultrospec2000 型紫外分光光度计为 Pharmacia 公司产品。

4. 05ZYH33 *RevS* 基因敲除突变株的构建和鉴定:

(1) 基因敲除质粒的构建: 以 05ZYH33 基因组 DNA 为模板, 分别用引物 LA1/LA2、RA1/RA2 进行 PCR, 扩增 *RevS* 的上、下游片段 LA 和 RA; 同时以 pSET2 质粒为模板, 用引物 Spc1/Spc2 进行 PCR, 扩增壮观霉素抗性基因 (*Spc*^r cassette)。在限制性内切酶和 T4 DNA 连接酶的作用下, 将它们依次克隆到 pUC18 载体的 *EcoR* I、*Bam*H I、*Pst* I 和 *Hind* III 4 个多克隆位点上, 形成一个 *Spc*^r 基因两侧具有与 *RevS* 上下游同源序列的基因敲除质粒 pUC18-*RevS*, 如图 1 所示。

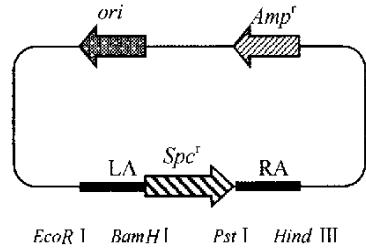


图 1 *RevS* 基因敲除质粒构建示意图

(2) 基因敲除突变体的筛选和鉴定: 参照 Smith 等^[5]的方法制备 05ZYH33 感受态细菌。在 22.5 kV/cm、200 Ω 和 25 μF 电转参数下, 用构建好的基因敲除质粒 pUC18-*RevS* 电转化感受态细菌, 电转结束后将菌液涂布于 THB 平板 (含 100 μg/ml 壮观霉素), 37℃ 培养 48 h, 挑取可疑单菌落进行增菌培养并取菌液 2 μl 作模板, 用引物 IN1/IN2 (位于 *RevS* 内部) 进行 PCR 初步筛选, 然后再对疑似阳性菌采用交叉引物进行 PCR 验证。

5. 突变株与野毒株 05ZYH33 生物学性状的比较:

(1) 生长稳定性的比较: 参照 Throup 等^[6]的方法进行, 略有改动。在相同培养条件下, 挑取突变株和野毒株单个菌落分别接种于 5 ml 含壮观霉素 (100 μg/ml) 和不含壮观霉素的 THB 培养基, 37℃ 振荡培养至 A₆₀₀ ≈ 0.3, 取 100 μl 菌液转接于 5 ml 新鲜的 THB 培养基, 继续振荡培养。重复 3 次后各取

100 μ l 菌液, 倍比稀释后通过平板计数比较二者的稳定性有无差异。

(2) 生长曲线的比较: 在相同培养条件下, 分别接种同等数量的突变株和野毒株于 5 ml THB 培养基中, 每隔 1 h 分别取样测定 600 nm 下的 A 值, 实验重复测定两次, 计算均值。以培养时间为横坐标, A_{600} 为纵坐标, 分别绘制突变株和野毒株的生长曲线, 比较二者有无显著差别。

(3) 革兰染色和镜下形态的比较: 根据突变株和野毒株的生长曲线, 分别于对数期取样进行革兰染色和镜下形态观察, 观察二者有无显著差异。

(4) 菌落形态和溶血性的比较: 取稳定生长期的突变株和野毒株菌液划线接种 5% 绵羊血新鲜琼脂平板, 比较二者的菌落形态和溶血情况有无明显差别。

(5) 蛋白表达水平的比较: 分别收集稳定生长期的突变株和野毒株的全菌裂解产物进行 SDS-PAGE 电泳, 考马斯亮蓝染色后观察突变株和野毒株的蛋白表达水平有无明显差异。

6. 突变株与野毒株 05ZYH33 动物致病性的比较:

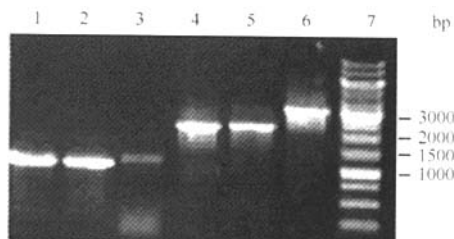
(1) 对 BALB/c 小鼠致病性的比较: 分别取 05ZYH33 和 *RevS* Δ 05ZYH33 THB 培养物, 腹腔接种 BALB/c 小鼠 5 只(体重 20 g 左右, 接种剂量含 1×10^8 CFU/只), 接种后动物隔离饲养, 观察发病及死亡情况。死亡动物立即解剖, 无菌采集肝脏、脾脏等病料, 涂片, 革兰染色, 镜检。病料在鲜血琼脂平板上划线分离培养。设 05ZYH33 THB 培养上清及 THB 培养基作为对照。

(2) 对 20 日龄仔猪致病性的比较: 20 日龄仔猪 9 头, 分成 3 组, 每组 3 头。A 组接种野毒株 05ZYH33, B 组接种突变株 *RevS* Δ 05ZYH33, C 组接种弱毒株 05ZYS68。每头耳缘静脉注射 0.3 ml PBS 悬液(约 10^8 CFU)。接种后每日 3 次观测受试动物呼吸、运动、饮食、体温和发病等情况。死亡猪立即进行病理解剖, 观察脏器病变情况。无菌取血液、淋巴结、脾脏、肺脏、肝脏、肾脏以及脑等器官和组织等病料在鲜血琼脂培养基上分别划线培养, 置 37 $^{\circ}$ C 恒温箱培养。

结 果

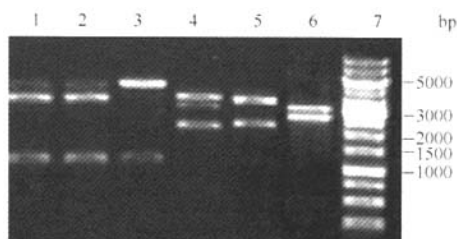
1. 05ZYH33 *RevS* 基因敲除突变株的构建和鉴定:

(1) *RevS* 基因敲除质粒的构建: 以 05ZYH33 基因组 DNA 为模板, 用引物 LA1/LA2、RA1/RA2 成功扩增出 *RevS* 的上游片段 LA(1009 bp) 和下游片段 RA(1093 bp), 同时用引物 *Spc1*/*Spc2* 从 pSET2 质粒中扩增出 *Spc'* 基因(1130 bp)。将这三个片段分别装入 T 载体后, 根据引入的相应酶切位点, 在限制性内切酶和 T4 DNA 连接酶的作用下, 将它们依次连接到 pUC18 载体的 *EcoR* I、*Bam*H I、*Pst* I 和 *Hind* III 4 个多克隆位点上, 形成基因敲除质粒 pUC18-*RevS*。对构建好的重组质粒进行 PCR 及双酶切验证, 结果见图 2、3, 对重组质粒进行测序, 结果均显示 3 个片段连接次序正确, 重组质粒构建成功。



注: 1: 以 LA1, LA2 扩增的 PCR 产物; 2: 以 RA1, RA2 扩增的 PCR 产物; 3: 以 *Spc1*, *Spc2* 扩增的 PCR 产物; 4: 以 LA1, *Spc2* 扩增的 PCR 产物; 5: 以 *Spc1*, RA2 扩增的 PCR 产物; 6: 以 LA1, RA2 扩增的 PCR 产物; 7: 1 kb DNA Ladder Marker

图2 PCR 扩增产物凝胶电泳



注: 1: 质粒 pUC18-*RevS* 以 *EcoR* I 和 *Bam*H I 酶切后产物; 2: 质粒 pUC18-*RevS* 以 *Bam*H I 和 *Pst* I 酶切后产物; 3: 质粒 pUC18-*RevS* 以 *Pst* I 和 *Hind* III 酶切后产物; 4: 质粒 pUC18-*RevS* 以 *EcoR* I 和 *Pst* I 酶切后产物; 5: 质粒 pUC18-*RevS* 以 *Bam*H I 和 *Hind* III 酶切后产物; 6: 质粒 pUC18-*RevS* 以 *EcoR* I 和 *Hind* III 酶切后产物; 7: 1 kb DNA Ladder Marker

图3 基因敲除质粒 pUC18-*RevS* 的双酶切鉴定

(2) *RevS* 基因敲除突变株的筛选: 取 5 μ l 基因敲除质粒 pUC18-*RevS* 电转化 05ZYH33 感受态细菌, 转化平板经 37 $^{\circ}$ C 培养 48 h 后, 从平板挑取单菌落摇菌培养, 使用引物 IN1/IN2 进行菌液 PCR。由于引物 IN1/IN2 位于 *RevS* 内部(产物大小 471 bp), 如果 *RevS* 被敲除, PCR 扩增应呈阴性结

果,否则说明 *RevS* 未被敲掉。通过上述筛选方法,在一组菌液 PCR 中,发现 2 株扩增结果为阴性(图 4,泳道 12、14),挑出第 12 泳道对应的菌株 mutant12,重命名为 $\Delta 05ZYH33$,并做进一步验证。

(3) *RevS* 基因敲除突变体 $\Delta 05ZYH33$ 的 PCR 鉴定:分别于 *RevS* 上、下游片段 LA 和 RA 的两侧再设计一对引物 OUT1/OUT2,引物的位置如(图 5A)所示。如果发生等位基因置换,*Spc^r* 基因将取代 *RevS*,用引物 OUT1/*Spc2*、*Spc1*/OUT2 进行 PCR 能够均能扩增出约 2200 bp 的片段,用引物 *Spc1*/*Spc2* 进行 PCR 能扩增出 *Spc^r* 基因,而在 05ZYH33 中,用以上引物进行 PCR 都应得到阴性结果。而原来以 05ZYH33 基因组为模板,用引物 IN1/IN2 能扩增出的 471 bp 的目的片段,在突变株中扩增为阴性,说明突变株中 *RevS* 已经缺失。各 PCR 产物的大小与理论值相符(图 5B)。

2. 突变株与野毒株 05ZYH33 生物学性状的比较:

(1) 生长稳定性的比较:在相同的培养条件下,突变株和野毒株经过 3 次连续稀释培养后,分别取 100 μ l 菌液进行倍比稀释并取 10^{-4} 稀释的菌液各 100 μ l 涂布于 THB 平板,37 $^{\circ}$ C 孵育 24 h 后,突变株和野毒株在平板上平均长出 105 个和 120 个菌落,表明 *RevS* 敲除后并未明显影响细菌的生长稳定。

(2) 生长曲线的比较:在相同培养条件下,以培养时间为横坐标, A_{600} 为纵坐标,绘制得到突变株 $\Delta 05ZYH33$ 和野毒株 05ZYH33 的生长曲线(图 6),结果发现二者并无显著差别。

(3) 革兰染色和镜下形态的比较:取对数生长期的突变株 $\Delta 05ZYH33$ 和野毒株 05ZYH33 菌液进行涂片和革兰染色,显微镜下观察发现,二者均为革兰染色阳性,菌体形态为圆形或椭圆形,呈链状或成双排列。

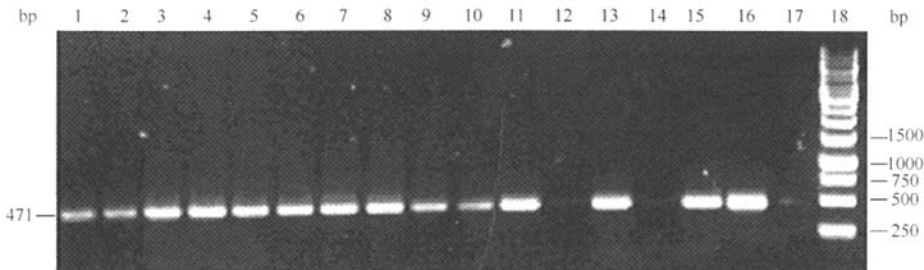
(4) 菌落形态和溶血性的比较:将稳定生长期的突变株 $\Delta 05ZYH33$ 和野毒株 05ZYH33 菌液接种于血平板并于 37 $^{\circ}$ C 孵育 24 h 后,可见二者均呈灰白色、圆形半透明、湿润、表面光滑的细小菌落,菌落周围有明显的 β -溶血环,直径约 2~3 mm。

(5) 蛋白表达水平的比较:将突变株 $\Delta 05ZYH33$ 和野毒株 05ZYH33 的全菌裂解产物进行 SDS-PAGE 电泳,采用考马斯亮蓝进行染色,结果发现突变株 $\Delta 05ZYH33$ 和野毒株 05ZYH33 的蛋白表达条带并无明显差异(图 7)。

3. 突变株与野毒株 05ZYH33 动物致病性的比较:

(1) 对 BALB/c 小鼠致病性:5 只 BALB/c 小鼠感染 05ZYH33 后 8 h 开始死亡,至 12 h 全部死亡;而感染突变株组小鼠 3 只健活,2 只分别于 20 h、24 h 死亡。解剖病理显示,突变株组与野毒株组死亡小鼠没有明显区别,均可见肝、脾、肾淤血、肿大,涂片革兰染色镜检相似,均可见大量单个或成对的革兰阳性球菌。对照组小鼠均未见异常。

(2) 仔猪致病性的比较:A 组动物攻毒 24 h 后,先后出现全身颤抖、体温升高(达 42 $^{\circ}$ C)、呼吸困难、腿关节肿胀、不能站立等症状,其中 1 头双眼呈急性化脓性感染。B 组动物用突变株攻击 24 h 后,其中 1 头体温一过性升高,未出现明显的临床症状,精神状态正常,其余 2 头发生严重感染,有明显的神经系统损害表现,主要表现为体温升高(可高达 42 $^{\circ}$ C)、全身颤抖、呼吸困难、腿关节肿胀明显等,与野毒株相比,动物发病进程和病损程度方面均没有明显差异。C 组动物弱毒株攻击后,呈一过性体温升高,1 日后恢复正常。病理变化显示 A 组和 B 组发病动物的眼、嘴角有大量黏性分泌物。肺淤血、肿大,脾脏呈暗紫色,边缘暗黑色,肝脏可见灶性坏死,肾脏水肿淤血。喉头和气管环有黏液。脑回充血水肿。



注:1~16:以引物 IN1/IN2 进行 PCR 扩增结果;17:阴性对照;18:1 kb DNA Ladder Marker

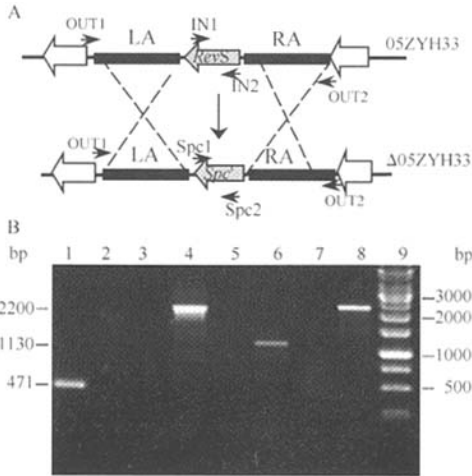
图 4 *RevS* 基因敲除突变体的部分 PCR 初步筛选结果

A 组和 B 组病死动物心血、脑、脾、肝脏、肾、淋巴结等样品接种绵羊鲜血琼脂平板上, 培养 24 h 后划线处可见灰白色、光滑、整齐、半透明、针尖大小的菌落。经 PCR 检测鉴定, 基因型特征均与接种菌株一致。

讨 论

TCSTS 是在细菌中普遍存在的一种跨膜信号传导系统, 由组氨酸激酶(histidine kinase)及其相邻的反应调节因子(response regulator)组成, 可感受外界环境变化并做出适应性反应, 广泛参与病原菌的信号传递及毒力因子表达调控过程, 在细菌致病过程中发挥着重要作用^[6,7]。研究显示, 部分 TCSTS 有时会缺失组氨酸激酶, 只以单个“孤儿”反应调节因子的形式存在, 但其在细菌致病过程中作用同样不可忽视。Throup 等^[6]运用生物信息学的方法, 从肺炎链球菌基因组中鉴定出 13 个 TCSTS 和 1 个“孤儿”反应调控因子, 通过基因敲除突变研究发现, “孤儿”反应调控因子在肺炎链球菌的黏附性及细胞信号转导方面发挥重要作用。

de Greeff 等^[4] 2002 年首次报道反应调节因子 *RevS*, 该基因上游缺失组氨酸激酶, 是典型的“孤儿”反应调控因子, *RevS* 基因的缺失突变体毒力显著减弱, 证实该因子在 SS 致病性方面发挥重要作用。既往研究发现, 国内强毒力株 05ZYH33 在毒力和致病谱方面与国外菌株有显著的差异, 其感染所致独特的 STSS 机制尚不明确。本研究通过同源性分析发现, 国内强毒力株 05ZYH33 的 *RevS* 基因与 de Greeff 等报道完全相同(同源性 100%), 提示其对菌株的致病性可能发挥作用。此外, 该基因还与多种病原菌毒力调节因子具有一定的同源性, 如与化脓链球菌(*Streptococcus pyogenes*)的反应调节因子 *FasA* 基因同源性约 58%, 与金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)的 *AgrA* 基因也有一定的同源性。其中 *FasA* 负向调控链激酶(streptokinase)、链球菌溶素 S(streptolysin S)等毒力因子的表达^[8], 而 *AgrA* 为金黄色葡萄球菌二元信号传导通路中的反应调控蛋白, 该蛋白可激活靶基因启动子 P2 和 P3, 进而分别启动 RNA III 和 RNA II 的转录, 上调毒素的表达和分泌^[9,10]。基于以上分析, 本研究应用同源重组方法成功获得 05ZYH33 的 *RevS* 基因缺失突变体, 突变菌株的基本生物学性状无明显改变。动物感染实验显示, *RevS* 突变体对小鼠的致病性显著减弱, 但对其主要宿主猪的致病性未见显著改变, 一方面提示猪链球菌的致病性可能具有宿主特异性, 同一菌株的致病性与不同宿主的易感性相关, 另一方面也提示该



注: 1,2: 以 IN1/IN2 分别扩增 05ZYH33 和突变株 Δ 05ZYH33 基因组; 3,4: 以 OUT1/Spc2 分别扩增 05ZYH33 和突变株 Δ 05ZYH33 基因组; 5,6: 以 Spc1/Spc2 分别扩增 05ZYH33 和突变株 Δ 05ZYH33 基因组; 7,8: 以 Spc1/OUT2 分别扩增 05ZYH33 和突变株 Δ 05ZYH33 基因组; 9: 1 kb DNA Ladder Marker

图5 *RevS* 基因敲除突变体 Δ 05ZYH33 的 PCR 验证

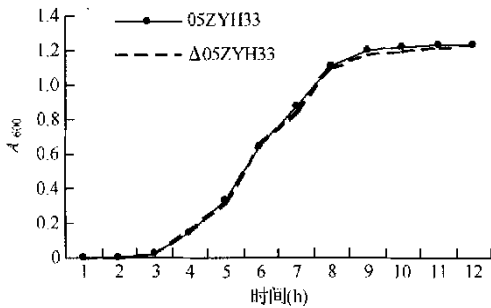
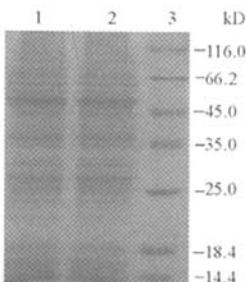


图6 突变株 Δ 05ZYH33 和野毒株 05ZYH33 的生长曲线



注: 1: 突变株 Δ 05ZYH33; 2: 野毒株 05ZYH33; 3: 蛋白 Marker

图7 全菌裂解蛋白 SDS-PAGE 分析

病原菌致病机制的复杂性。国内强毒株 *RevS* 突变体对猪致病性无明显减弱,这种差异可能与实验动物的种类、大小、接种途径和剂量的不同有关,同时不排除国内毒株存在独特的致病因子和致病机制的可能。

值得关注的是,除 *RevS* 基因外,05ZYH33 基因组中还有一“孤儿”反应调控因子,其氨基酸序列与化脓链球菌 *CsrR* 同源为 46%,而 *CsrR/S* (*CovR/S*)可负向调控化脓链球菌多种毒力因子如透明质酸荚膜(hyaluronic acid capsule)、链球菌溶素 S 及化脓性外毒素 B (pyrogenic exotoxin B) 的表达^[11],该反应调控因子的作用值得进一步探讨。

参 考 文 献

[1] Tang J, Wang C, Feng Y, et al. Streptococcal toxic shock syndrome caused by *Streptococcus suis* serotype 2. *PLoS Med*, 2006,3(5):e151.

[2] Chen C, Tang J, Wei D, et al. A glimpse of streptococcal toxic shock syndrome from comparative genomics of *S. suis* 2 Chinese isolates. *PLoS One*, 2007,2(3):e315.

[3] Beier D, Gross R. Regulation of bacterial virulence by two-component systems. *Curr Opin Microbiol*, 2006,9(2):143-152.

[4] de Greeff A, Buys H, van Alphen L, et al. Response regulator important in pathogenesis of *Streptococcus suis* serotype 2. *Microb Pathog*, 2002,33(4):185-192.

[5] Smith HE, Wisselink HJ, Vecht U, et al. High-efficiency

transformation and gene inactivation in *Streptococcus suis* type 2. *Microbiology*, 1995,141:181-188.

[6] Throup JP, Koretko KK, Bryant AP, et al. A genomic analysis of two-component signal transduction in *Streptococcus pneumoniae*. *Mol Microbiol*, 2000,35(3):566-576.

[7] maDziejn M, Mekalanos JJ. Two-component signal transduction and its role in the expression of bacterial virulence factors. *Am Soc Microbiol*, 1995,305-317.

[8] Kreikemeyer B, Boyle MD, Buttaro BA. Group A streptococcal growth phase associated virulence factor regulation by a novel operon (Fas) with homologies to two-component-type regulators requires a small RNA molecule. *Mol Microbiol*, 2001,39(2):392-406.

[9] Peng HL, Novick RP, Kreiswirth B, et al. Cloning, characterization, and sequencing of an accessory gene regulator (*agr*) in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol*, 1998,170:4365-4372.

[10] Zhang L, Gray L, Novick RP, et al. Transmembrane topology of *AgrB*, the protein involved in the post translational modification of *AgrD* in *Staphylococcus aureus*. *J Biol Chem*, 2002,277:34736-34742.

[11] Andrew H, Victor JD, Nell LB, et al. A two-component regulatory system, *CsrR-CsrS*, represses expression of three *Streptococcus pyogenes* virulence factors, hyaluronic acid capsule, streptolysin S, and pyrogenic exotoxin B. *Infect Immun*, 1999,67(10):5298-5305.

(收稿日期:2007-08-30)

(本文编辑:张林东)

· 征 订 启 事 ·

本刊 2008 年征订启事

《中华流行病学杂志》是由中华医学会主办的流行病学及其相关学科的高级专业学术期刊、国内预防医学和基础医学核心期刊、国家科技部中国科技论文统计源期刊,2004-2006 年被中国科学技术信息研究所定为“百种中国杰出学术期刊”,为美国国立图书馆医学文献联机数据库和美国化学文摘社收录。读者对象为预防医学、临床医学、基础医学及流行病学科研与教学工作者。征稿内容:重点或新发传染病现场调查与控制;慢性非传染病的病因学及流行病学调查(含社区人群调查)、干预与评价;环境污染与健康;食品安全与食源性疾病;流动人口与疾病;行为心理障碍与疾病;分子流行病学、基因学与疾病控制;我国西部地区重点疾病的调查与控制等。本刊设有述评、重点原著、现场调查、疾病监测、实验室研究、临床流行病学、疾病控制、基础理论与方法、国家课题总结、文献综述、问题与探讨等重点栏目。

全年出版 12 期,每期定价 9 元(含邮费),全年 108 元,由全国各地邮局统一订阅,邮发代号:2-73。本刊编辑部常年办理邮购。地址:北京昌平流字五号《中华流行病学杂志》编辑部,邮编:102206,电话(传真):010-61739449,投稿网址: <http://zhlxhb.medline.org.cn>, 查询事宜:Email:lxbonly@public3.bta.net.cn 欢迎广大读者踊跃投稿,积极订阅。

本刊编辑部