

猪源 2 型链球菌福建株 *cps2j* 基因 PCR 检测及序列分析

俞伏松¹, 郭长明¹, 车勇良², 林天龙¹, 陈少莺²

(¹福建省农业科学院生物技术研究所, 福州 350013; ²福建省农业科学院畜牧兽医研究所, 福州 350013)

摘要:设计并合成一对扩增 2 型猪链球菌 *cps* 基因的特异性引物, 以猪 2 型链球菌福建株 (SS2PFJ07) DNA 为模板, 筛选最佳反应条件, 建立检测 *cps2j* 基因的 PCR 方法, 并对 PCR 扩增产物进行序列测定和同源性比较分析。结果如下: 应用该方法对猪 2 型链球菌福建株和标准阳性株进行扩增, 均获得与预期大小一致的 675bp 特异性目的片段, 而对 8 株非 2 型猪链球菌的扩增结果均呈阴性; 敏感性测定最低可检出 100cfu 细菌量或 50pg 细菌 DNA; SS₂PFJ07 *cps2j* 基因部分核苷酸及其推导的氨基酸序列与猪链球菌 2 型不同菌株的同源性分别达 98.7%~100% 和 97.8%~100%。上述结果表明建立并优化的猪 2 型链球菌 *cps2j* 基因的 PCR 检测方法敏感性好、特异性高, 能用于 2 型猪链球菌的分子流行病学调查和快速检测; 序列分析表明猪 2 型链球菌福建株与国内外 8 株标准株之间同源性高、亲缘关系密切。

关键词:猪链球菌 2 型; 福建株; *cps2j* 基因; PCR

中图分类号: S852.61

文献标识码: A

论文编号: 2009-0619

PCR Detection and Sequence Analysis of *cps2j* Gene for Fujian Strain *Streptococcus Suis* Serotype 2

Yu Fusong¹, Guo Changming¹, Che Yongliang², Lin Tianlong¹, Chen Shaoying²

(¹Biotechnology Research Institute, Fujian Academy of Agricultural Sciences, Fuzhou 350013)

(²Institute of Animal Husbandry and Veterinary Medicine, Fujian Academy of Agricultural Sciences, Fuzhou 350013)

Abstract: To synthesize a pair of specific primers, the PCR method was established to detect the *Streptococcus suis* serotypes 2 (SS2) *cps2j* partial gene by means of the SS2 Fujian (PFJ07) strain DNA as a template, and the product (*cps2j* partial gene) of PCR was sequenced and blasted. The results were as follows: The 675bp target fragment was amplified by the PCR from the SS2 PFJ07 strain and the standard positive SS2. but other 8 strains *Streptococcus suis* but not SS2 were not amplified. The sensitive test indicated the PCR less can detect 100cfu of bacterium quantity or 50pg of genic DNA. The sequence of PCR product achieved to 98%–100% nucleotide homology with that of SS2 other strains, amino acid sequence achieved to 91.6%–93.3%. The results revealed the PCR developed was sensitive and specific and can be applied to the SS2 diagnosis and epidemiology investigation. Sequence analysis indicated homology between the SS2 PFJ07 strain and 8 SS2 at home and abroad was high and genetic relationship was close.

Key words: *Streptococcus suis* serotype 2 (SS2), Fujian strain, *cps2j* gene, PCR

0 引言

猪链球菌是一种兼性厌氧的革兰氏阳性球菌, 根

据荚膜抗原的差异, 可分为 35 个血清型, 分别为 1-34 型和 1/2 型^[1]。其中猪链球菌 2 型 (SS2) 属于 R 群, 是一

基金项目: 福建省科技项目 (编号: 2006N0021) 和福建省畜牧重大专项 (编号: 2006NZ003-2)。

第一作者简介: 俞伏松, 男, 1961 年出生, 高级兽医师, 主要从事动物传染病研究。通信地址: 350003 福州市五四北路 247 号福建农科院生物所, Email: yufusong58@163.com。

通讯作者: 陈少莺, 女, 1957 年出生, 研究员, 主要从事畜禽传染病病原学诊断学与防制研究。通信地址: 350003 福州市五四北路 247 号福建农科院生物所, E-mail: chensy58@163.com。

收稿日期: 2009-03-24, 修回日期: 2009-04-20。

种重要的人畜共患病原菌,其致病性与它的毒力因子溶菌酶释放蛋白(MRP)、细胞外因子(EF)、溶血素和荚膜等关系密切^[2-3]。近年来,猪2型链球菌病在规模化养猪场中呈现不断上升趋势,不仅给养猪业造成严重经济损失,也给公共卫生安全构成了一定的威胁^[4-5]。

猪链球菌鉴定一般采用镜检和生化鉴定方法,虽然在形态上很好辨认,但由于链球菌的生化特性差异较大,仅以形态、培养、生化等表型特征难以鉴定其为何种血清型。随着分子生物学技术的发展,应用PCR方法可快速进行链球菌的鉴定和分型^[6],此研究参照文献合成一对特异性引物,以猪2型链球菌福建株DNA为模板,筛选最佳反应条件,建立了检测 *cps2j* 基因的PCR方法,并对PCR扩增产物进行序列测定和同源性比较分析。现将结果报道如下。

1 材料与方法

1.1 菌株及试剂

猪源链球菌2型福建株^[7](SS₂PFJ07,作者分离鉴定并保存);猪链球菌2型YY株(SS₂YY,南京农业大学赠送);DH5 α 和表达载体PGEX-6P-1由该研究室保存;限制性内切酶 *Bam*H I /*xho* I、2000 bp DNA Ladder、DNA胶回收试剂盒等分子生物学试剂均购自TaKaRa公司;绵羊鲜血购自福州富利达生物实验制品有限公司;脑心浸出液、酵母抽提液、胰蛋白胨均购自OXIOD公司;氨苄青霉素(Amp,工作浓度为100 μ g/ml)购自上海生物工程有限公司。

1.2 *cps2j* PCR检测方法的建立

1.2.1 引物合成 根据Marois C等人的方法^[6]合成一对特异性引物,扩增的预期片段为675 bp,上下游引物分别位于 *cps2j* 基因的13791-13813和14465-14443, str1: 5'-CAAACG CAA GGA ATT ACG GTA TC-3', str2: 5'-GAG TAT CTA AAG AAT GCC TAT TG-3',由TaKaRa有限公司合成。

1.2.2 SS₂ DNA制备 将SS₂PFJ07在脑心汤液体培养基增殖后,用CTAB/NaCl法,苯酚/氯仿抽提细菌DNA,沉淀溶解于适量TE中(同法制备SS₂YY DNA),-20 $^{\circ}$ C保存备用。

1.2.3 PCR扩增 以SS₂PFJ07 DNA为模板进行PCR扩增,反应体积为20 μ l,加样量如下:10 \times LATaq buffer(含2.0 mmol/L Mg²⁺) 2 μ l, str1(10 μ mol/L) 0.4 μ l, str2(10 μ mol/L) 0.4 μ l, dNTP(10 mmol/L) 1.6 μ l, LATaq酶(5U/ μ l) 0.2 μ l, 高压灭菌ddH₂O 13.4 μ l, SS₂PFJ07 DNA 2 μ l。PCR反应条件:95 $^{\circ}$ C预变性5 min, 94 $^{\circ}$ C变性1 min, 56 $^{\circ}$ C退火1 min, 72 $^{\circ}$ C延伸1 min, 35个循环, 72 $^{\circ}$ C最后延伸10 min。取PCR产物5 μ l,加入1 μ l 6 \times

DNA Loading buffer,混匀后,1%琼脂糖80V恒压电泳,自动凝胶成像系统拍照保存。

1.3 PCR特异性检测

以优化的PCR条件同时对SS₂PFJ07、阳性对照SS₂YY株、4株鱼链球菌、4株非猪链球菌2型进行扩增,检测其特异性。

1.4 PCR敏感性检测

采用二种方法,其一是先将SS₂PFJ07菌液进行平板计数,然后从10万个细菌起连续10倍稀释至10个细菌,稀释后菌液无需再进行基因组DNA的提取,直接以细菌为模板进行PCR检测;其二是用CTAB/NaCl法提取SS₂PFJ07 DNA,测定DNA的浓度为240 μ g/ml,将其系列稀释后为模板进行PCR检测,以测定其敏感性。

1.5 SS₂PFJ07 *cps2j*部分基因的序列测定与分析

1.5.1 PCR产物回收、转化克隆 利用TaKaRa公司DNA胶回收试剂盒纯化PCR产物,将PCR产物与pMD18-T Simple Vector于16 $^{\circ}$ C连接30 min,转化入感受态细菌DH5 α 中,铺于LB(含Amp)平板上,倒置于37 $^{\circ}$ C培养17~24 h,随机挑取3个单菌落接种于LB培养基扩大培养。

1.5.2 酶切鉴定及测序 参照文献[8]操作,取上述单菌落培养液提取质粒,经*Bam*H I /*xho* I双酶切鉴定重组质粒。反应体系20 μ l,加样如下:10 \times K buffer 2 μ l、*Bam*H I 1.5 μ l、*xho* I 1.5 μ l、重组质粒5 μ l、灭菌ddH₂O 10 μ l,37 $^{\circ}$ C水浴作用1 h,电泳检测结果。将酶切鉴定为阳性的克隆,送TaKaRa公司测序。

1.5.3 序列同源性分析 应用DNASTAR序列分析软件进行序列同源性分析,将测序结果与GenBank中收录的国内外8株2型链球菌进行多序列比对,分析其同源性并绘制系统进化树。GenBank中收录的8株标准株的登录号分别为:AF118389(荷兰)、EF520109(日本)、DQ256427(ZYS8中国南京)、EU000465(HA0609中国江苏)、EU000466(HA0610中国江苏)、EF520108(中国贵州)、DQ410854(SC22中国北京)、DQ410856(98015中国北京)。

2 结果

2.1 检测 *cps2j* 基因PCR方法的建立

2.1.1 PCR特异性试验 在同等条件下进行PCR扩增,SS₂YY与SS₂PFJ07均能出现675 bp的目的条带,而4株鱼链球菌和4株非2型猪链球菌均未扩增出任何条带,表明该方法具有特异性较好的重复性(图1)。

2.1.2 PCR重复性试验 经多次重复PCR试验,供试的猪链球菌2型均能扩增出与预期大小一致、长度675 bp

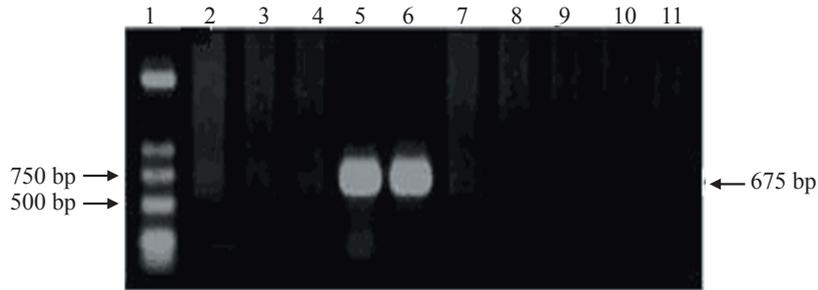


图1 *cps2j* PCR 特异性试验

1.Marker 2000; 2-4,5.鱼链球菌; 5.SS2YY;
6.SS2PFJ07; 8-10.非2型猪链球菌; 11.ddH₂O

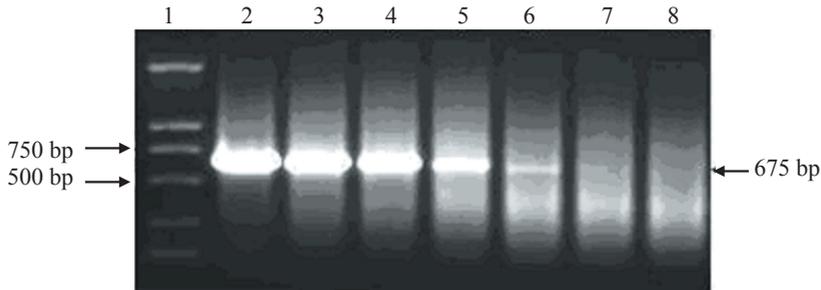


图2 *cps2j* 基因PCR的敏感性试验

1.Marker2000; 2-7 细菌个数分别为 110⁶、110⁵、110⁴、110³、110²、110¹; 8.ddH₂O

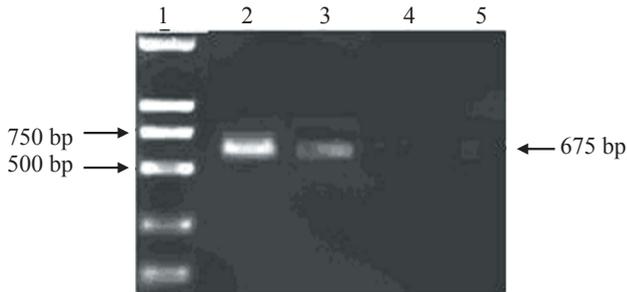


图3 *cps2j* 基因PCR的敏感性试验

1.Marker2000; 2.510²pg; 3.50pg; 4.5pg; 5.0.5pg

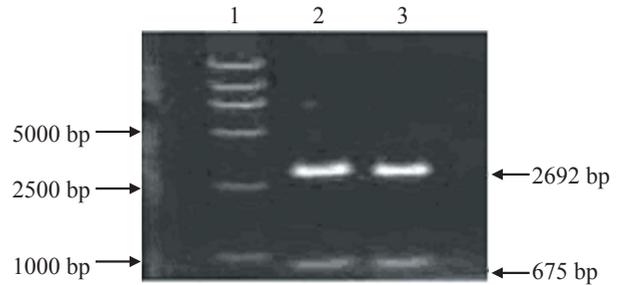


图4 重组质粒酶切鉴定

1.Marker 2000; 2-3.重组质粒

的特异性条带,表明该方法具有较好的重复性。

2.1.3 PCR 敏感性试验 以细菌数为指标测定该方法的敏感性,最低可检出 100 cfu(图2);以细菌 DNA 为指标则PCR 最低可检出 DNA 量 50 pg(图3)。

2.2 SS₂PFJ07 *cps2j* 基因酶切鉴定

将 *cps2j* 基因与 pMD18-T Simple Vector 连接,转化 DH5 α , 随机挑取 3 个克隆扩大培养,提取其质粒并经 *Bam*H I /*xho* I 双酶切后,得到 2692 bp 和 675 bp 基因片段(图4, Lane2-3)。表明 SS₂PFJ07 *cps2j* 基因已准确插入 pMD18-T Simple Vector 中。

2.3 SS₂PFJ07 *cps2j* 基因部分序列分析

2.3.1 核苷酸同源性比较 经 BLAST 分析表明: SS₂PFJ07 *cps2j* 部分基因序列包括 675 个碱基, A、T、G、C 四种碱基的比例分别为 A 37.3%、T 33.9%、C 10.8%、G 17.9%, 无缺失、无插入, 共编码 210 个氨基

酸。将 SS₂PFJ07 *cps2j* 基因与 GenBank 中收录的 8 株国内外标准 2 型链球菌株比较,发现 SS₂PFJ07 与 8 株标准株之间的核苷酸同源性为 98.7%~100%, 亲缘关系密切(见图5)。

氨基酸同源性比较

从图5可知, SS₂PFJ07 *cps2j* 部分序列所推导的氨基酸与 8 株标准株同源性在 97.8%~100% 之间, 差异不大, 亲缘关系密切。其中 SS₂PFJ07 *cps2j* 与 EF520109、EU000466、DQ410854、DQ410856 氨基酸同源性为 100%, 与 AF118389 和 DQ256427 同源性则为 97.8%。

2.3.2 SS₂PFJ07 *cps2j* 进化发育树 将 SS₂PFJ07 *cps2j* 基因通过 DNASTAR 中的 MegAlign 分子生物软件绘制了系统进化树, 从图6可知, 9 株 2 型链球菌大体上分为两支, SS₂PFJ07 与 EF520109、EU000465、EU000466、EF520108、DQ410854、DQ410856 在同一个分支上, 而

		percent identity										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9			
1	100	98.7	98.7	98.4	98.6	98.4	98.7	98.7	1	AF118389		
2	100	100	98.7	98.7	98.4	98.6	98.4	98.7	2	DQ256427 (ZY88 NJ)		
3	97.8	97.8	100	99.8	100	99.7	100	100	3	DQ410854 (SC22BJ)		
4	97.8	97.8	100	100	99.8	99.7	100	100	4	DQ410856 (98015BJ)		
5	97.6	97.6	100	100	100	99.8	99.5	99.8	5	EF520108 (GUIZHOU)		
6	97.6	97.6	100	100	100	100	99.7	100	6	EF520109 (JAPAN)		
7	97.3	97.3	99.6	99.6	99.5	99.5	100	99.7	7	EU000465 (HA0609JS)		
8	97.8	97.8	100	100	100	100	99.6	100	8	EU000466 (HA0619JS)		
9	97.8	97.8	100	100	100	100	99.6	100	9	SS2PFJ- <i>cps2j</i>		

图5 SS2PFJ07 *cps2j* 基因部分核苷酸和推导的氨基酸同源性比较
(右上方为核苷酸同源性,左下方为推导的氨基酸同源性)

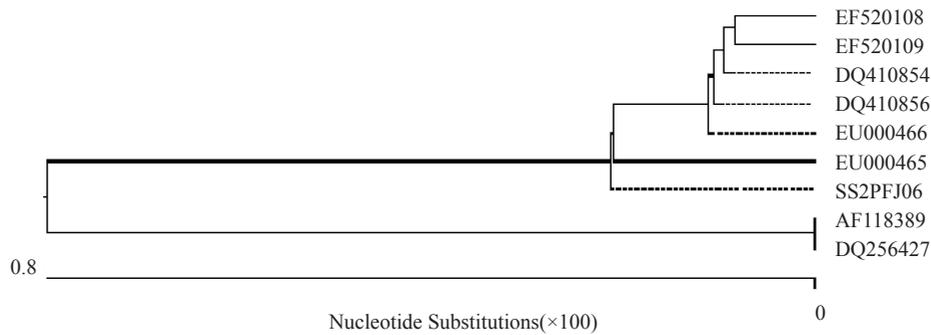


图6 SS2PFJ07 *cps2j* 基因部分序列进化发育树

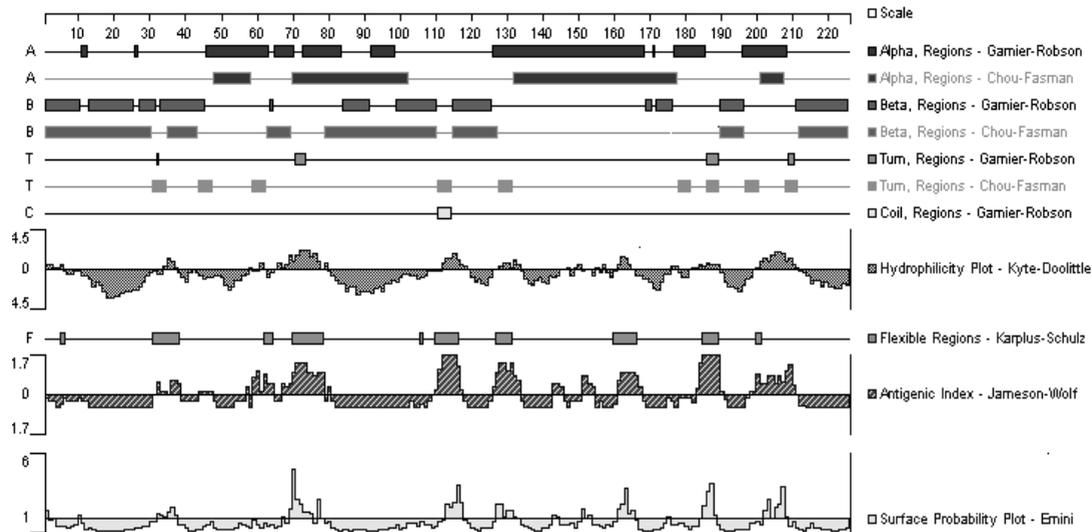


图7 SS2PFJ07 *cps2j* 基因蛋白亲水性和抗原表位

AF118389 和 DQ256427 组成了一个分支, SS₂PFJ07 与 DQ410854、DQ410856、EU000466 亲缘关系最近, 同源性达到 100%; 与 AF118389 和 DQ256427 亲缘关系相对较远。

2.3.3 SS₂PFJ07 *cps2j* 基因蛋白亲水性和抗原表位分析
SS₂PFJ07 *cps2j* 基因部分序列分子量为 24750.77 Daltons, 等电点为 9.987。SS₂PFJ07 的氨基酸在 71~77、112~117、161~164、202~210 位有较强的亲水性和抗原性(图7)。

3 结论与讨论

荚膜多糖(CPS)的抗原性差异决定了猪链球菌侵袭力,也是猪链球菌血清分型的依据。Charland等构建了2株荚膜多糖缺失变异株,证实了荚膜多糖对2型菌株是重要的致病因子^[9]。猪链球菌2型CPS基因全长15 401 bp,有14个开放阅读框,*cps2j*位于荚膜基因组的13 583~14 579 bp之间,全长996 bp。在猪链球菌35个血型中,*cps2j*在2型与1/2型有较高的同源性外,与其他33个血清型的序列同源性均较低,是目前国内外研究者利用PCR技术鉴别诊断猪链球菌2型设计引物的主要基因之一^{[[10-11]]}。

此研究参照文献合成一对扩增2型猪链球菌CPS基因的特异性引物,以SS₂PFJ07 DNA为模板,优化了检测*cps2j*基因的PCR方法,不需提取SS₂PFJ07基因组DNA,而直接利用稀释菌液或菌落为模板进行PCR扩增,简化了细菌常规PCR需提取DNA的繁杂步骤,节省了病原检测时间。应用该方法对猪2型链球菌福建株和标准阳性株进行扩增,均获得与预期大小一致的675 bp特异性目的片段,而对7株非2型猪链球菌的扩增结果均呈阴性;敏感性可达到100cfu或50pgSS₂DNA;表明该方法能用于2型猪链球菌的分子流行病学调查和快速检测。

SS₂PFJ07是2005年分离自福建省某猪场发病猪淋巴结等器官中的一株链球菌,该菌对阿莫西林、复方新诺明、先锋霉素V敏感,但对卡那霉素、阿奇霉素、庆大霉素、洁霉素、多粘菌素、丁胺卡那、新霉素、红霉素等抗生素已产生了较强的耐药性^{[[11]]}。该研究*cps2j*基因序列分析表明,SS₂PFJ07*cps2j*基因部分序列编码的蛋白质分子量24.75 KD、等电点9.987,并在71~77、112~117、161~164、202~210位有较强的亲水性和抗原性;其核苷酸及其推导的氨基酸序列与猪链球菌2型不同菌株的同源性分别达98.7%~100%和97.8%~

100%,差异不大,亲缘关系密切。为进一步研究SS₂PFJ07的其他毒力基因奠定了基础。

参考文献

- [1] 陆承平,姚火春.猪链球菌与猪链球菌[A]//科学进步与学科发展(下册)[M].南京:东南大学出版社,1999,339-343.
- [2] Staats J J, Feder I, Okwumabua O, et al. Streptococcus suis: past and present[J]. Vet Res Commun, 1997, 21: 381-407.
- [3] Wisselink H J, Smith H E, Stockhofe-Zurwieden N, et al. Distribution of capsular types and production of muramidase released protein(MRP) and extracellular factor(EF) of Streptococcus suis strains isolated from diseased pigs in seven European countries [J]. Vet Microbiol. 2000, 74(3): 237-248.
- [4] Heidt M C, Monhamed W, Hain T, et al. Human infective endocarditis caused by Streptococcus suis serotype 2[J]. J Clin Microbiol, 2005, 43(9): 4898-4901.
- [5] 姚火春,陈国强,陆承平,等.猪链球菌1998分离株病原特性鉴定[J]. 南京农业大学学报, 1999, 22(2): 67.
- [6] Marois C, Bougeard S, Gottschalk M, et al. Multiplex PCR assay for detection of Streptococcus suis species and serotypes 2 and 1/2 in tonsils of live and dead pigs[J]. J Clin Microbiol, 2004, 42(7): 3169-3175.
- [7] 俞伏松,车勇良,郭长明,等.猪链球菌2型福建株的分离与鉴定[J]. 福建农林大学学报:自然科学版. 2008, 37(3): 290-294.
- [8] J萨姆布鲁克, D W拉塞尔著,黄培堂等译.分子克隆实验指南. 3版[M]. 北京:科学出版社, 2002.
- [9] Charland N, Harel J, Kobisch M, et al. Streptococcus suis serotype 2 mutants deficient in capsular expression[J]. Microbiology, 1998, 144(2): 325-332.
- [10] Smith H, Damman M, Dervelde J, 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]. Infection And Immunity, 1999: 4.
- [11] 韩雪清,林祥海,吴绍强.猪链球菌2型多重PCR快速检测方法的建立[J]. 中国兽医科学, 2006, 36(2): 112-117.