南京农业大学学报 2026,49(3):578-586
Journal of Nanjing Agricultural University
http://nauxb.njau.edu.cn
DOI:10.7685/jnau.202412013

孙亚茹,聂蒙,徐婷,等. 罗非鱼源无乳链球菌Ⅶ型分泌系统膜蛋白 EssC 的生物学功能研究[J]. 南京农业大学学报,2026,49(3):578-586.
Sun Y R,Nie M,Xu T,et al. Biological function of type Ⅶ secretion system membrane protein EssC of *Streptococcus agalactiae* from *Tilapia*[J]. Journal of Nanjing Agricultural University,2026,49(3):578-586.

罗非鱼源无乳链球菌Ⅶ型分泌系统膜蛋白 EssC 的生物学功能研究

孙亚茹,聂蒙,徐婷,陈书睿,董雨豪,刘永杰*

(南京农业大学动物医学院,江苏 南京 210095)

摘要:[**目的**]本文旨在探究罗非鱼源无乳链球菌Ⅶ型分泌系统(type Ⅶ secretion system,T7SS)膜蛋白 EssC 的生物学功能。[**方法**]以 GD201008-001 菌株为研究对象,通过生物信息学分析、预测该菌株的 T7SS 基因簇及其潜在底物,并构建基因缺失株 Δ*essC* 和互补株 CΔ*essC*,测定菌株的生长曲线,制备 T7SS 底物多克隆抗体并检测 T7SS 底物的分泌,同时测定菌株抗巨噬细胞吞噬能力以及对罗非鱼脑细胞的毒性和对小鼠的毒力。[**结果**]成功构建了 T7SS 膜蛋白 EssC 的基因缺失株 Δ*essC* 和互补株 CΔ*essC*,并制备了 4 种预测的 WXG 家族底物多克隆抗体,通过蛋白免疫印迹法用多克隆抗体对提取的野生株和缺失株分泌蛋白进行检测。结果显示:野生株的分泌蛋白中能检到预测的 T7SS 底物,说明该菌株的 T7SS 是具有功能性的,而 Δ*essC* 株的分泌蛋白中未检测到 T7SS 底物,说明 *essC* 基因影响了 T7SS 底物的分泌;细胞感染试验显示,与野生株相比,Δ*essC* 株的抗巨噬细胞吞噬能力显著下降($P<0.01$),对罗非鱼脑细胞的毒性也极显著降低($P<0.001$),而基因互补株又能恢复至野生株水平;动物攻毒试验结果显示,*essC* 基因缺失能延缓小鼠死亡。[**结论**]*essC* 基因在无乳链球菌 GD201008-001 的 T7SS 底物分泌中发挥重要作用,并对细菌的毒力产生影响。

关键词:无乳链球菌;Ⅶ型分泌系统;*essC* 基因;细胞毒性
中图分类号:S852.61+1　　**文献标志码**:A　　**文章编号**:1000-2030(2026)03-0578-09

Biological function of type Ⅶ secretion system membrane protein EssC of *Streptococcus agalactiae* from *Tilapia*

SUN Yaru,NIE Meng,XU Ting,CHEN Shurui,DONG Yuhao,LIU Yongjie*

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

Abstract:[**Objectives**]Exploring the biological function of the type Ⅶ secretion system(T7SS) EssC component of *Streptococcus agalactiae* from tilapia. [**Methods**]This study predicted the T7SS gene cluster and potential substrates of the GD201008-001 strain through bioinformatics analysis,and constructed the gene deficient strain Δ*essC* and the gene complementary strain CΔ*essC*. The growth curve of the strain was determined,substrate polyclonal antibodies were prepared,and the secretion of T7SS substrate was detected. At the same time,the strain's ability to resist macrophage phagocytosis,toxicity to tilapia brain cells,and toxicity to mice were also measured. [**Results**]The gene deletion strain Δ*essC* and complementary strain CΔ*essC* of T7SS membrane protein EssC were successfully constructed,and four predicted WXG family substrate polyclonal antibodies were prepared. The extracted wild-type and deletion strain secreted proteins were detected by Western blot using polyclonal antibodies. The results showed that the predicted T7SS substrate could be detected in the secreted proteins of the wild-type strain,indicating that the T7SS in this strain was functional. However,T7SS substrate wasn't detected in the secretion protein of Δ*essC*,indicating that *essC* affects the secretion of T7SS substrate. Cell infection experiments showed that the anti-macrophage phagocytic ability($P<0.01$) and the toxicity($P<0.001$) to tilapia brain cells of Δ*essC* were also significantly reduced,while the gene complementary strain was able to recover to the level of the wild strain. Animal experiments showed that the deletion of the *essC* gene could delay death in mouse. [**Conclusions**]The *essC* gene played an important role in the secretion of T7SS substrate and also had impact on the virulence of the bacteria.

Keywords:*Streptococcus agalactiae*;type Ⅶ secretion system;*essC* gene;cytotoxicity

无乳链球菌(*Streptococcus agalactiae*)又称 B 群链球菌(group B Streptococcus,GBS),是一种分布广泛的人畜共患致病菌,能引起人和多种动物感染发病。GBS 是罗非鱼链球菌病的主要病原之一,感染罗非

收稿日期:2024-12-15
基金项目:国家自然科学基金-区域创新发展联合基金项目(U23A20254);江苏省重点行业领域人才项目
*通信作者:刘永杰,教授,博导,主要从事兽医微生物学研究,E-mail:liuyongjie@njau.edu.cn。

鱼后会引起眼球突起、腹水、脑膜炎以及内脏出血等症状,导致罗非鱼死亡,对水产养殖行业造成严重威胁[1]。

无乳链球菌致病机制目前尚不清楚,这极大地限制了对该菌防控药物的开发。细菌通过分泌系统向外界环境中输出蛋白质,这一过程在细菌生态位建立中发挥着重要作用。细菌的分泌系统大多存在于革兰阴性菌中,Ⅶ型分泌系统(type Ⅶ secretion system,T7SS)是个例外,它是革兰阳性菌特有的分泌系统。T7SS 最早发现于分枝杆菌中,是一种特殊的细菌分泌途径,能使细菌分泌不带典型信号肽的蛋白质[2]。T7SS 通过分泌的底物发挥功能,目前在 GBS 中发现的底物是 WXG 家族蛋白和 LXG 家族蛋白[3]。WXG 家族蛋白长度约 100 个氨基酸,有 1 个保守的色氨酸-可变氨基酸-甘氨酸(WXG)基序,是 T7SS 的常见分泌底物[4]。LXG 家族蛋白 N 端含有保守的亮氨酸-可变氨基酸-甘氨酸(LXG)结构域,是与细菌竞争有关的多态毒素家族[5],常被称为 T7SS 效应子。T7SS 功能多样,主要与细菌毒力、宿主毒性或细菌竞争等有关,但在不同细菌中发挥的功能可能不同。在结核分枝杆菌中,T7SS 在毒力中发挥作用[6];在中间链球菌和金黄色葡萄球菌中,T7SS 与细菌竞争有关[7-8];但在单核细胞增生李斯特菌中,T7SS 不利于其体内感染[9];另外 T7SS 也可能调节与毒力和细菌竞争无关的表型,例如金黄色葡萄球菌的 T7SS 能在铁稳态中起作用[10]。目前有关鱼源无乳链球菌 T7SS 研究极为有限。

T7SS 基因簇上的膜蛋白基因 *essC* 对许多底物的分泌至关重要。EssC 属于 FtsK/SpoIIIE 家族 ATP 酶,能够特异性识别 T7SS 底物,并为底物的分泌提供能量,*essC* 基因缺失会导致一些底物分泌受阻[11-12]。本研究以罗非鱼源无乳链球菌 GD201008-001 为研究对象,提取其分泌蛋白并检测 T7SS 底物,同时构建 *essC* 基因缺失株,评估其在 T7SS 底物分泌、宿主毒性及毒力中的作用,为揭示无乳链球菌 T7SS 的 *essC* 基因功能,深化该菌致病机制奠定基础。

1　材料与方法

1.1　菌株、质粒及引物

无乳链球菌 GD201008-001 菌株,2010 年由广东地区罗非鱼发病渔场分离[13];大肠杆菌 DH5α 和 BL21(DE3)感受态细胞,购自吐露港生物科技有限公司;热敏自杀性质粒 pSET4s[14] 由日本学者 Daisuke Takamatsu 馈赠;pTVC-lac 质粒由本课题组保存。本研究中所需引物(表 1)由擎科生物科技有限公司或金斯瑞生物科技有限公司合成。

表 1　引物信息

Table 1　Primer information

引物 Primes	引物(对)序列 Primes(pairs)sequence(5′→3′)	目的 Purpose
essC-P1	AAAACGACGGCCAGTGAATTCCTTCAATCCGTTCCAGTTC	*essC* 基因缺失株、互补株引物 Primers for *essC* gene deletion strain and complementary strain
essC-P2	GTAGGTGGATAGAGGAGAGAGAATGGCAAA	
essC-P3	TCTCTCCTCTATCCACCTACCTACTTTTAGTTTTA	
essC-P4	CCGGGTACCGAGCTCGAATTCAAACAATGTTACGCTCAAGAC	
essC-A/B	GGTAGCCACGGTTGAGGTA/CAGGGAAGTCAGAAATTATCCAG	
C*essC*-F	GTTCGGGATCACAGATGAGGAATCCAAATCGAAAAATAGCA	
C*essC*-R	ATTAGGATCCCCGGGAATTCCTAGTCTATGCTGAGTTTTAGTTTTTGATAGTTTTTTCTAT	
CP25-F	TAGATATGAACAAATGAATTCGCTTTGGCAGTTTATTCTTGACATGTAG	
CP25-R	CCTCATCTGTGATCCCGAACAGTACTATTTTATTATACCAGC	
q*essC*-F/R	GAAAGCTCTCAGTCGCTACAA/CTTCCCGTAGCCCTTCATAAC	
q*recA*-F/R	ATTCAGGCGCAGTTGATTTAGTT/TCAATCTCAGCACGAGGAACA	RT-qPCR 引物 Primers for RT-qPCR
pET32a-*esxA1*-F	GCCATGGCTGATATCGGATCCATGGCACAAATTAAATTAACACCAGAAGA	
pET32a-*esxA1*-R	ACGGAGCTCGAATTCGGATCCTTATCCACCAATTTGTGAAGCGATATCAGA	
pET32a-*esxA2*-F	GCCATGGCTGATATCGGATCCATGGCACAAATTAAATTAACACCAGAAGA	
pET32a-*esxA2*-R	ACGGAGCTCGAATTCGGATCCCTATCCACTAATTTGAGAAGCAATATCTGCA	蛋白表达引物 Primers for protein expression
pET32a-*esxA3*-F	GCCATGGCTGATATCGGATCCATGTCACAAATTAAACTAACACCTGAAGAAC	
pET32a-*esxA3*-R	ACGGAGCTCGAATTCGGATCCTTATTTATTAATTTGTGAGGCAATATCTGAGTCTGT	
pET32a-*esxA4*-F	GCCATGGCTGATATCGGATCCATGTCACAAATTAAATTAACTCCTGAAGTACT	
pET32a-*esxA4*-R	ACGGAGCTCGAATTCGGATCCTTACTGATAATCTGAGAAGCAATATCAGAGTCT	

1.2　试剂

2 × Phanta Max Master Mix(Dye Plus)高保真 DNA 聚合酶、Green *Taq* Mix DNA 聚合酶、重组克隆试剂盒、DNA Marker、荧光定量 PCR(RT-qPCR)检测试剂盒,均购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司;乳酸

脱氢酶(LDH)释放法细胞毒性检测试剂盒购自 Promega 公司;限制性核酸内切酶购自宝日医生物技术(北京)有限公司;琼脂糖凝胶回收及细菌质粒提取试剂盒购自 OMEGA Bio-Tek 公司;胎牛血清(FBS)购自赛默飞世尔科技公司;青霉素-链霉素-两性霉素 B 溶液(100×)三抗、青霉素-链霉素(100×)双抗购自碧云天生物技术有限公司;壮观霉素(Spc)购自北京鼎国生物技术有限公司;三氯乙酸购自上海麦克林生化科技股份有限公司;丙酮购自上海凌峰化学试剂有限公司;双色预染蛋白 Marker、PAGE 凝胶(12.5%)快速制备试剂盒及 Omni-ECL™超灵敏化学发光检测试剂盒购自上海雅酶生物科技有限公司;辣根过氧化物酶(HRP)标记的山羊抗小鼠 IgG 购自 Bioshap 公司;GroEL 多克隆抗体由实验室前期制备。

1.3 试验动物

5~6 周龄雌性 ICR 小鼠来自扬州大学比较医学实验动物中心;尼罗罗非鱼(体重约 300 g)来自中国水产科学研究院淡水渔业研究中心。试验过程中严格遵守南京农业大学实验动物管理规范,并按照南京农业大学实验动物管理委员会和南京农业大学实验动物福利与伦理委员会制定的规章制度执行。

1.4 生物信息学分析

参考已有文献报道的无乳链球菌 T7SS 基因序列及基因簇组成[3],找到 GD201008-001 菌株中 T7SS 基因簇位置,并用 InterPro 预测其结构域、分类及功能。

1.5 基因缺失株构建

基因缺失株的构建参考文献[15]进行。以 GD201008-001 基因组为模板,分别使用引物对 *essC*-P1/P2、*essC*-P3/P4 扩增 *essC* 基因上、下游同源片段并融合,与经 *Eco*R Ⅰ酶切处理的 pSET4s 载体连接并转化 DH5α 感受态细胞,构建基因缺失重组质粒 pSET4s-*essC*,然后将其电击转化 GD201008-001 感受态细胞,转化后的菌液先在 28 ℃振荡培养 4 h,然后涂布含有 100 μg·mL^{-1}壮观霉素的 THB 平板,28 ℃过夜培养。挑取单菌落接种在含有 100 μg·mL^{-1}壮观霉素的 THB 液体培养基中,37 ℃振荡培养 8 h 以上,然后用 PCR 鉴定挑选出的阳性菌落,在 28 ℃培养条件下传 10 代以上。将菌液稀释后分别涂布含有 100 μg·mL^{-1}壮观霉素的 THB 平板和不加抗生素的普通 THB 平板,37 ℃过夜培养。若普通平板上长出的菌落远多于含抗生素平板上长出的菌落,则再将普通平板上的菌落分别划线至含有 100 μg·mL^{-1}壮观霉素的 THB 平板和普通 THB 平板,取只在普通 THB 上生长的菌落进行 PCR 鉴定并测序验证缺失株 Δ*essC* 是否构建成功。

1.6 基因互补株构建

以 GD201008-001 基因组为模板,用引物对 C*essC*-F/R 扩增 *essC* 基因片段;以 pSL5.28 质粒为模板,用引物对 CP25-F/R 扩增启动子片段,将 2 种片段融合后与 pTCV 载体连接并转化 DH5α 感受态细胞,构建出基因互补重组质粒 pTCV-*essC*,并将其电击转化 Δ*essC* 感受态细胞,然后利用抗性筛选并通过 PCR 验证互补株 CΔ*essC* 是否构建成功。

1.7 RT-qPCR 检测 *essC* 基因的转录

将无乳链球菌 GD201008-001 野生株(WT)、基因缺失株 Δ*essC* 和互补株 CΔ*essC* 培养至对数生长期,提取菌株 RNA 并将其反转录为 cDNA,然后进行 RT-qPCR 检测 *essC* 基因的转录。以重组酶 *recA* 基因为内参[16],WT 菌株为对照,利用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$法[17]计算 Δ*essC* 和 CΔ*essC* 菌株中 *essC* 基因转录情况。

1.8 生长曲线测定

分别挑取无乳链球菌 WT、Δ*essC* 和 CΔ*essC* 的单菌落于 THB 液体培养基,37 ℃、180 r·min^{-1}培养过夜。将各菌株培养液 D_{600}值调至 1,以 1∶100 比例转接 1 mL THB 液体培养基,37 ℃、180 r·min^{-1}振荡培养。每隔 1.5 h 取 3 个平行样本,测定其 D_{600}值并绘制生长曲线。

1.9 T7SS 底物的表达纯化与抗体制备

以 GD201008-001 基因组为模板,分别使用引物对 pET32a-*esxA1*-F/R、pET32a-*esxA2*-F/R、pET32a-*esxA3*-F/R、pET32a-*esxA4*-F/R 扩增 WXG 底物 *esxA1*、*esxA2*、*esxA3*、*esxA4* 基因片段,与经过 *Bam*H Ⅰ酶切的 pET32a 载体连接并转化大肠杆菌 DH5α 感受态细胞,分别构建表达质粒 pET32a-*esxA1*/*esxA2*/*esxA3*/*esxA4*,然后分别将质粒转化 BL21(DE3)感受态细胞,筛选出阳性克隆,再将阳性克隆转接 1 L LB 培养基后 37 ℃培养。当培养液 D_{600}值达到 0.8 左右时按 1∶1 000 比例避光加入 IPTG,并在 16 ℃、90 r·min^{-1}条件下诱导表达 17 h。之后将菌液离心,收集菌体并超声破碎,离心后收集上清液,用镍柱对上清液进行纯化,纯化完成后通过 SDS-PAGE 鉴定纯化效果。

取纯化的蛋白与弗氏佐剂按体积比 1∶1 混合乳化,对 6 周龄的雌性 ICR 小鼠进行背部皮下多点注射免疫,每种蛋白免疫 4 只小鼠,每只小鼠每次免疫 100 μg,每 2 周免疫 1 次。第 3 次免疫后 7 d 取血,置于 37 ℃温箱静置 1 h 后放 4 ℃过夜,第 2 天离心后收集血清,完成抗 EsxA1、EsxA2、EsxA3、EsxA4 多克隆抗体制备,检测抗体效价。

1.10　分泌蛋白的提取

将过夜活化的 WT 株和 Δ*essC* 株分别转接 35 mL 含 10 $g\cdot L^{-1}$葡萄糖的 CDM 培养基,37 ℃、180 $r\cdot min^{-1}$培养 6 h 左右,10 000 $r\cdot min^{-1}$、4 ℃离心 10 min,分别收集上清液(分泌蛋白)和沉淀(菌体蛋白)。沉淀用 PBS 清洗 1 次后再用 3 mL PBS 重悬备用。上清液用 0.22 μm 滤器过滤后加入终浓度为 10%的三氯乙酸(TCA)溶液,4 ℃冰浴中过夜沉淀蛋白。10 000 $r\cdot min^{-1}$、4 ℃离心 10 min 后取沉淀,用 5 mL 丙酮洗 2 次,在通风橱风干后用 200 μL PBS 重悬,即分别得到 WT 株和 Δ*essC* 株的分泌蛋白。

1.11　T7SS 底物检测

用蛋白免疫印迹(Western blot)法进行底物的检测。分别将菌体蛋白和提取的分泌蛋白与 5 × SDS-PAGE 上样缓冲液混合后 99 ℃加热 10 min,然后进行 SDS-PAGE,再用半干转印的方式转移至 PVDF 膜上,用 50 $g\cdot L^{-1}$的脱脂奶粉常温封闭 2 h 后分别与多克隆抗体 anti-EsxA1、anti-EsxA2、anti-EsxA3、anti-EsxA4 以及 anti-GroEL 4 ℃孵育过夜,之后用 TBST 洗 3 次,再与 HRP 标记的山羊抗小鼠 IgG 室温孵育 2 h,TBST 洗 3 次后用 ECL 化学发光液进行检测。

1.12　细菌抗吞噬能力检测

细菌抗吞噬能力检测参考文献[18]进行。将 WT、Δ*essC* 和 CΔ*essC* 菌株培养至对数期,用 DMEM 洗 3 次后按感染比(MOI)为 1 的比例加入 RAW264.7 细胞中,室温离心 10 min,将细胞板放于 37 ℃细胞培养箱内 1 h,然后用 PBS 清洗 3 次,并加入 1 mL 含有青霉素-链霉素的 DMEM 中继续培养 1 h,再用 PBS 清洗 3 次后加入 1 mL ddH_2O,室温静置 15 min,吹打混匀后稀释,再进行滴板计数。按如下公式计算细菌吞噬率:吞噬率=培养孔胞内菌量/培养孔初始添加菌量×100%。

1.13　罗非鱼脑细胞的分离及培养

罗非鱼麻醉后无菌分离其脑组织,用添加青霉素-链霉素-两性霉素 B 三抗的 PBS 和 M199 培养基各洗 3 次,放入 2 mL 离心管中剪碎,加入 2 倍体积的胰酶 25 ℃消化 5 min,1 000 $r\cdot min^{-1}$离心 2 min,弃上清液,用原代培养基(含生长因子+10 $g\cdot L^{-1}$青霉素-链霉素+200 $g\cdot L^{-1}$ FBS 的 M199 培养基)重悬沉淀,2 000 $r\cdot min^{-1}$离心 1 min,取沉淀铺入细胞瓶,25 ℃培养。及时换液并连续传 10 代后换为传代培养基(含有 100 $g\cdot L^{-1}$ FBS 的 M199 培养基),获得罗非鱼脑细胞用于后续试验。

1.14　细胞毒性检测

采用 LDH 释放法测定细菌对罗非鱼脑细胞的毒性,具体操作参考试剂盒说明书进行,MOI 为 10,在 28 ℃温箱中作用 5.5 h,作用结束后测 490 nm 处吸光值 A_{490}。采用如下公式计算细胞毒性:

$$细胞毒性=\frac{反应孔释放值(A_{490})-细菌自发释放值(A_{490})-靶细胞自发释放值(A_{490})}{靶细胞最大释放值(A_{490})-靶细胞自发释放值(A_{490})}\times 100\%。$$

1.15　小鼠毒力试验

将 5 周龄雌性 ICR 小鼠分为 WT、Δ*essC* 两组,每组 15 只。将过夜复苏培养的 WT、Δ*essC* 株菌液按 1∶100 比例转接 THB 培养基,37 ℃、180 $r\cdot min^{-1}$培养至对数期。用 PBS 清洗 2 次,调细菌培养液的 D_{600}值为 0.2,再用 PBS 稀释 10^5 倍,每只小鼠腹腔注射 100 μL 菌液。每组 10 只小鼠观察生存情况,记录死亡时间;另外 5 只小鼠采血并取脑、脾称重后匀浆,稀释后进行滴板计数并计算细菌载量。

1.16　统计分析

用 GraphPad Prism 8.0.2 软件进行绘图,对试验数据平均值进行单因素方差分析(one-way ANOVA)和差异显著性检验。

2　结果与分析

2.1　无乳链球菌 T7SS 的生物信息学分析

根据已有文献报道以及预测网站(NCBI、InterPro)对无乳链球菌 GD201008-001 进行分析,在其基因组中发现 1 个 T7SS 基因簇,其核心成分包括 4 个膜蛋白基因(*esaA*、*essA*、*essB*、*essC*)、1 个胞质蛋白基因

(*esaB*),以及 2 种底物基因(WXG 家族和 LXG 家族)。预测到 1 个 LXG 家族底物 A964_RS05270,位于 T7SS 基因簇上;预测到 4 个 WXG100 家族底物,分别为 *esxA1*(A964_RS05315)、*esxA2*(A964_RS05310)、*esxA3*(A964_RS01420)和 *esxA4*(A964_RS09500),其中 *esxA1*、*esxA2* 相邻,位于 T7SS 基因簇上,*esxA3*、*esxA4* 存在于基因簇外(图 1)。

图 1 T7SS 基因簇示意

Fig. 1 Schematic diagram of T7SS gene cluster

2.2 *essC* 基因缺失株、互补株鉴定

基因缺失重组质粒 pSET4s-*essC* 经测序无突变,用引物对 *essC*-P1/P4 对 WT 和 Δ*essC* 株进行 PCR 鉴定,WT 株检测到 5 257 bp 产物,Δ*essC* 株检测到 847 bp 产物,即成功缺失了 4 410 bp 的 *essC* 基因。同时,用 *essC* 基因内部引物 *essC*-A/B 进一步验证,WT 株能检测到 841 bp 大小的产物,Δ*essC* 株检测不到,证明 Δ*essC* 株构建成功。互补株重组质粒 pTCV-*essC* 经测序无突变,用 *essC* 基因内部引物对 *essC*-A/B 对互补株进行 PCR 鉴定,检测到 841 bp 产物,证明互补株 CΔ*essC* 构建成功(图 2-A)。

用 RT-qPCR 检测 WT、Δ*essC* 和 CΔ*essC* 株中 *essC* 基因转录水平,结果(图 2-B)显示,Δ*essC* 株中检测不到 *essC* 基因转录,WT 与 CΔ*essC* 株均能检到 *essC* 基因转录,从转录水平上进一步验证了 Δ*essC* 株构建成功。

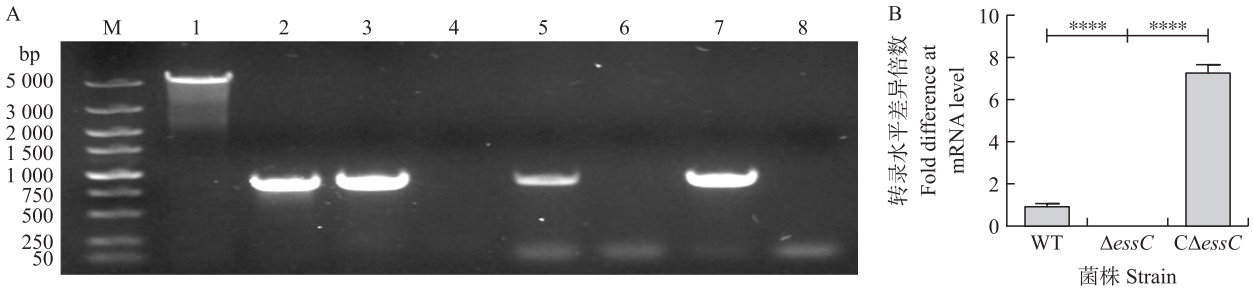

图 2 基因缺失株 Δ*essC* 和互补株 CΔ*essC* 的 PCR 鉴定(A)及其 *essC* 基因转录水平分析(B)

Fig. 2 PCR identification of the WT, Δ *essC*, and CΔ*essC* (A) and transcriptional level analysis of *essC* gene(B)

M. DNA marker 5000;1~4. P1/P4 引物分别检测野生株、缺失株 Δ*essC*、互补株 CΔ*essC* 和阴性对照(ddH_2O);5~8. 基因内部引物分别检测野生株、缺失株 Δ*essC*、互补株 CΔ*essC* 和阴性对照(ddH_2O)。

M. DNA marker 5000;1-4. P1/P4 primers were used to detect wide strain (WT), Δ*essC*, CΔ*essC*, and negative control (ddH_2O);5-8. Internal primers were used to detect WT, Δ*essC*, CΔ*essC*, and negative control (ddH_2O).

**** $P<0.001$.

2.3 *essC* 基因缺失对无乳链球菌生长能力的影响

在 37 ℃条件下,WT、Δ*essC* 和 CΔ*essC* 株的生长速率无明显差异(图 3),说明 *essC* 基因的缺失对该菌在 THB 培养基中的生长无明显影响。

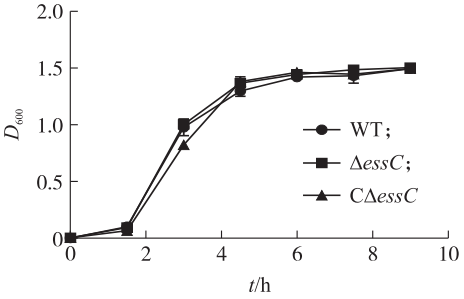

图 3 无乳链球菌 WT、Δ*essC* 和 CΔ*essC* 株生长曲线

Fig. 3 Growth curves of WT, Δ*essC* and CΔ*essC* strains

2.4 T7SS 底物表达的纯化及多克隆抗体制备

对表达的 WXG 家族底物 ExaA1、ExaA2、ExaA3、ExaA4 进行纯化,目的蛋白相对分子质量大小均在 28 k 左右,为可溶性表达。用镍柱对诱导表达的底物进行纯化,纯化后的蛋白进行 SDS-PAGE 检测,结果显示,条带比较单一(图 4)。用纯化后的蛋白免疫小鼠后制备的多克隆抗体效价达到 1∶100 000 以上。LXG 家族底物因有毒素活性,未能成功表达,后续的 T7SS 底物分泌试验主要测定 WXG 家族的 4 个底物蛋白。

2.5　EssC 对底物分泌的影响

由于 WXG 家族底物 EsxA1、EsxA2、EsxA3、EsxA4 之间的序列相似度较高,本试验检测了 4 种多克隆抗体的交叉反应性,证实它们之间确实存在交叉反应(图 5-A)。用制备的 4 种 T7SS WXG 底物多克隆抗体对 WT 和 Δ*essC* 的菌体蛋白及分泌蛋白进行 Western blot 检测。结果(图 5-B)显示,在菌体蛋白中,WT 和 Δ*essC* 株均能检测到 WXG 底物,而在分泌蛋白中,只有 WT 株检测到 WXG 底物,Δ*essC* 株中未检测到。鉴于检测到的交叉反应性(图 5-A),目前还不能确定这 4 种底物的分泌是否都受 EssC 影响,但可以明确的是,至少有 1 种 WXG 底物依赖于 EssC 分泌。同时,以胞内蛋白 GroEL 为对照,菌体蛋白中能检测到 GroEL,分泌蛋白中没有检测到 GroEL,说明提取的分泌蛋白不含胞内组分,试验结果可信。

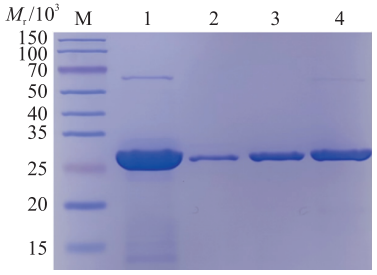

图 4　T7SS 底物蛋白纯化的检测

Fig. 4　Purification testing of T7SS substrates

M. Marker;1. EsxA1;2. EsxA2;3. EsxA3;4. EsxA4.

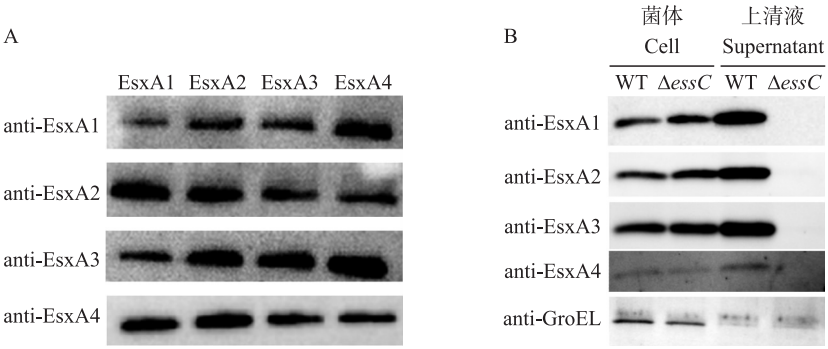

图 5　T7SS 底物蛋白的交叉反应(A)和 Western blot 检测(B)

Fig. 5　Cross reaction(A) and western blot detection(B) of T7SS substrates

2.6　*essC* 基因缺失对细菌抗巨噬细胞吞噬能力的影响

与 WT 相比,缺失株 Δ*essC* 的吞噬率显著增加($P<0.01$),互补株 CΔ*essC* 吞噬率降低至 WT 水平(图 6),表明 *essC* 基因缺失会降低菌株的抗巨噬细胞吞噬能力。

2.7　*essC* 基因缺失对细菌致细胞毒性的影响

分离培养的罗非鱼脑细胞形态见图 7-A,采用 LDH 释放法检测 *essC* 基因缺失对无乳链球菌致细胞毒性的影响。结果(图 7-B)发现,与 WT 相比,缺失株 Δ*essC* 对罗非鱼脑细胞的毒性极显著降低($P<0.001$),互补株 CΔ*essC* 恢复到 WT 水平,表明 *essC* 基因缺失能降低菌株对宿主细胞毒性。

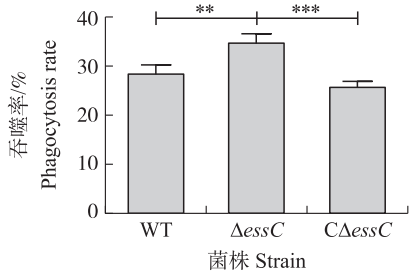

图 6　*essC* 基因对菌株抗巨噬细胞吞噬能力的影响

Fig. 6　The effect of the *essC* gene deletion on bacterial anti-phagocytic ability

** $P<0.01$, *** $P<0.001$。下同 The same below.

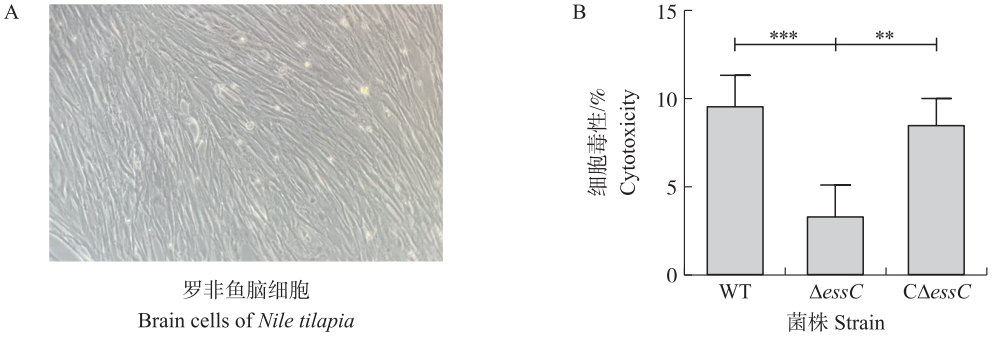

图 7　罗非鱼脑细胞的培养(A)和 Δ*essC* 对罗非鱼脑细胞的毒性(B)

Fig. 7　Culture of *Nile tilapia* brain cells(A) and toxic effect of Δ*essC* on the cells(B)

2.8 *essC* 基因缺失对细菌致病性的影响

分别用 WT、Δ*essC* 和 CΔ*essC* 株进行小鼠感染试验。结果(图 8-A)发现:从细菌载量上来看,与 WT 相比,Δ*essC* 株感染后血、脑、脾中细菌载量有所下降,但差异未达到显著水平;从小鼠生存曲线(图 8-B)上来看,WT 株在感染后 20 h 内死亡率为 100%,Δ*essC* 株从 21 h 开始死亡,死亡率为 90%,说明无乳链球菌缺失 *essC* 基因能延缓小鼠死亡。

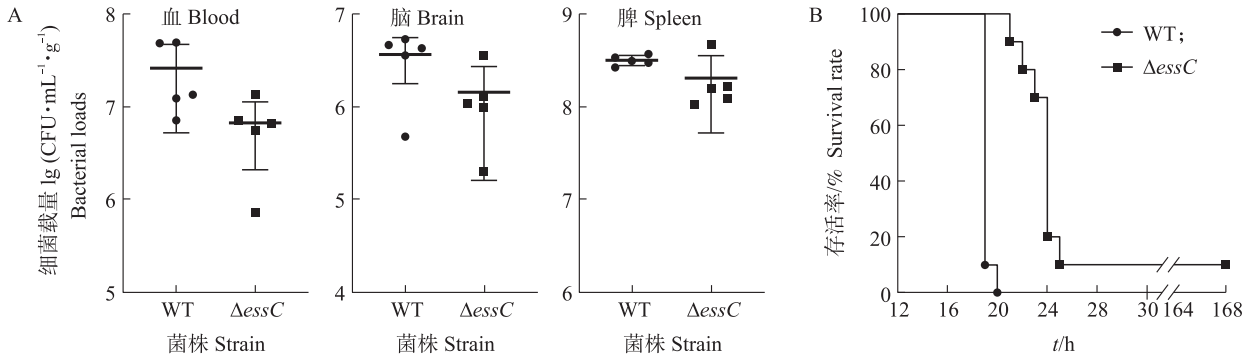

图 8 *essC* 基因缺失对细菌载量(A)和小鼠生存能力(B)的影响

Fig. 8 Effects of the *essC* gene deletion on bacterial loads(A) and mouse survival ability(B)

3 讨论

T7SS 是革兰阳性菌重要的分泌系统,在宿主毒性、细菌竞争或毒力等方面发挥作用。根据组成装置的不同,T7SS 分为 T7SSa 和 T7SSb[5],存在于无乳链球菌中的是 T7SSb[3],目前对于 T7SSb 的了解较少。T7SSb 的装置核心成分由胞质蛋白 EsaB 和 4 种膜蛋白 EsaA、EssA、EssB 和 EssC 组成[19]。虽然缺失这些核心成分中的任何一种都可能使 T7SSb 活性丧失,但六聚体膜结合的 ATP 酶 EssC 被推测是 T7SSb 的驱动因素,其 C 端的 ATP 结合结构域是特异性识别底物所必需的,也是底物分泌所必需的。无乳链球菌的 T7SS 目前已知的底物有 WXG 家族和 LXG 家族两类。WXG 家族蛋白在 T7SS 中分布较为广泛,如金黄色葡萄球菌中的 EsxA、EsxB、EsxC 和 EsxD[20],猪链球菌中的 EsxA[21] 及单核细胞增生李斯特菌中的 EsxA[9],并且功能多样。在金黄色葡萄球菌中,EsxA、EsxB 能调节金黄色葡萄球菌感染期间细胞因子的产生[22],EsxC 能在脂肪酸攻击金黄色葡萄球菌时起保护作用[20]。LXG 家族蛋白通常具有毒性,如金黄色葡萄球菌的 LXG 蛋白 TspA 具有膜去极化毒性,介导种内竞争[7];链球菌的 LXG 蛋白 TelB 具有 NAD 酶活性,TelC 具有磷酸酶活性,介导种内和革兰阳性菌种间竞争[8]。

本研究对无乳链球菌 GD201008-001 T7SS 的底物进行生物信息学预测,预测到 4 个 WXG 家族蛋白底物,并制备了这 4 个底物的多克隆抗体。用多克隆抗体对野生株的分泌蛋白进行检测,并检测到了预测的 WXG 底物,证明该菌株中 T7SS 是具有功能的。另外本研究也构建了基因缺失株 Δ*essC*,并提取了 Δ*essC* 的分泌蛋白,但在其分泌蛋白中无法检测到 WXG 底物,说明 WXG 家族底物的分泌依赖于 *essC* 基因,这与在金黄色葡萄球菌中的报道一致[7]。然而,由于多克隆抗体的交叉反应性,本研究尚不能确定 4 种 WXG 蛋白均依赖于 EssC 分泌,未来还需要通过在蛋白上添加标签进一步验证。除 4 个 WXG 家族底物外,该基因簇中还预测到 1 个 LXG 家族底物,但由于其具有毒性,没有表达纯化成功,故未能验证其分泌情况及 *essC* 基因对其分泌的影响。已有文献报道,金黄色葡萄球菌的 LXG 家族蛋白 TspA[7] 以及链球菌的 LXG 蛋白 TelA、TelB、TelC[8] 和人源无乳链球菌的 LXG 蛋白 BltA[23] 等均依赖于 EssC 分泌,BltA 与本研究无乳链球菌 GD201008-001 中预测的 LXG 底物蛋白相似度较高,因此推测菌株中预测的 LXG 家族蛋白很可能也依赖于 EssC 分泌。由此可见 EssC 对于 T7SS 底物的分泌至关重要,*essC* 基因的缺失能影响许多底物分泌,进而影响 T7SS 功能的发挥。

为了探究 EssC 的生物学功能,本研究分离了罗非鱼的脑细胞,并进行了细胞毒性试验,结果显示 *essC* 基因的缺失明显降低了无乳链球菌对罗非鱼脑细胞的毒性,说明 *essC* 基因在宿主毒性中发挥了重要作用。此外抗巨噬细胞吞噬能力检测结果表明,*essC* 基因缺失后菌株抗吞噬能力明显下降,推测可能是 *essC* 基因缺失导致 T7SS 失活,一些 T7SS 相关毒力因子无法分泌出去,进而导致免疫逃避能力的降低。有研究发现,人源无乳链球菌 CJB111 菌株的 T7SS 在细菌毒力中发挥重要作用,CJB111 的 *essC* 基因缺失

株感染小鼠后造成的死亡率较野生株更低,对人脑微血管内皮细胞的毒性更低,并且引发的脑部炎症程度也更低[24];也有研究表明,鱼源无乳链球菌的 *essC* 基因缺失后能显著降低罗非鱼死亡率[25]。然而,本试验结果显示,与 WT 相比,*essC* 基因缺失株感染小鼠的死亡速度有所减缓,死亡率略有降低,细菌的组织载量无明显差异,表明 *essC* 株缺失对小鼠的毒力影响不是很大,这一点与上述报道有所不同。分析差异的原因:一方面可能与使用的菌株宿主来源不同有关;另一方面可能与感染动物模型有关。虽然小鼠已被证实可用于鱼源无乳链球菌的毒力评价[26],但与本体动物罗非鱼的易感性可能存在一定的差异,下一步将通过罗非鱼感染试验证实 *essC* 基因在无乳链球菌毒力上的意义。

综上所述,本研究预测了罗非鱼源无乳链球菌 GD201008-001 的 T7SS 基因簇及其分泌底物,并证实该菌株的 T7SS 具有功能活性,能正常分泌底物。同时探究了 T7SS 关键蛋白 EssC 的功能,发现 EssC 是 WXG 底物分泌所必需的,*essC* 基因缺失会降低菌株的抗巨噬细胞吞噬能力以及菌株对罗非鱼脑细胞的毒性。本研究结果为进一步揭示鱼源无乳链球菌的致病机制提供参考。

参考文献 References:

[1] Chen S L. Genomic insights into the distribution and evolution of group B *Streptococcus*[J]. Frontiers in Microbiology,2019,10:1447.

[2] Bottai D,Gröschel M I,Brosch R. Type Ⅶ secretion systems in gram-positive bacteria[J]. Current Topics in Microbiology and Immunology,2017,404:235-265.

[3] Spencer B L,Job A M,Robertson C M,et al. Heterogeneity of the group B streptococcal type Ⅶ secretion system and influence on colonization of the female genital tract[J]. Molecular Microbiology,2023,120(2):258-275.

[4] Poulsen C,Panjikar S,Holton S J,et al. WXG100 protein superfamily consists of three subfamilies and exhibits an α-helical C-terminal conserved residue pattern[J]. PLoS One,2014,9(2):e89313.

[5] Klein T A,Ahmad S,Whitney J C. Contact-dependent interbacterial antagonism mediated by protein secretion machines[J]. Trends in Microbiology,2020,28(5):387-400.

[6] Pym A S,Brodin P,Brosch R,et al. Loss of RD1 contributed to the attenuation of the live tuberculosis vaccines *Mycobacterium bovis* BCG and *Mycobacterium* microti[J]. Molecular Microbiology,2002,46(3):709-717.

[7] Ulhuq F R,Gomes M C,Duggan G M,et al. A membrane-depolarizing toxin substrate of the *Staphylococcus aureus* type Ⅶ secretion system mediates intraspecies competition[J]. Proc Natl Acad Sci USA,2020,117(34):20836-20847.

[8] Whitney J C,Peterson S B,Kim J,et al. A broadly distributed toxin family mediates contact-dependent antagonism between gram-positive bacteria[J]. eLife,2017,6:e26938.

[9] Pinheiro J,Reis O,Vieira A,et al. *Listeria monocytogenes* encodes a functional ESX-1 secretion system whose expression is detrimental to *in vivo* infection[J]. Virulence,2017,8(6):993-1004.

[10] Casabona M G,Kneuper H,Alferes de Lima D,et al. Haem-iron plays a key role in the regulation of the Ess/type Ⅶ secretion system of *Staphylococcus aureus* RN6390[J]. Microbiology,2017,163(12):1839-1850.

[11] Jäger F,Kneuper H,Palmer T. EssC is a specificity determinant for *Staphylococcus aureus* type Ⅶ secretion[J]. Microbiology,2018,164(5):816-820.

[12] Mietrach N,Damián-Aparicio D,Mielich-Süss B,et al. Substrate interaction with the EssC coupling protein of the type VIIb secretion system[J]. Journal of Bacteriology,2020,202(7):e00646-19.

[13] 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.

[14] Takamatsu D,Osaki M,Sekizaki T. Thermosensitive suicide vectors for gene replacement in *Streptococcus suis*[J]. Plasmid,2001,46(2):140-148.

[15] 聂蒙,马可,曹青,等. 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[J]. 水产学报,2021,45(9):1545-1554.
Nie M,Ma K,Cao Q,et al. Identification of two-component system RscSR in *Streptococcus agalactiae* GD201008-001 and its influence on the bacterial stress response and virulence[J]. Journal of Fisheries of China,2021,45(9):1545-1554(in Chinese with English abstract).

[16] Florindo C,Ferreira R,Borges V,et al. Selection of reference genes for real-time expression studies in *Streptococcus agalactiae*[J]. Journal of Microbiological Methods,2012,90(3):220-227.

[17] Livak K J,Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ Method[J]. Methods,2001,25(4):402-408.

[18] Guo C M,Chen R R,Kalhoro 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.

[19] Tran H R,Grebenc D W,Klein T A,et al. Bacterial type Ⅶ secretion:an important player in host-microbe and microbe-microbe interactions[J]. Molecular Microbiology,2021,115(3):478-489.

[20] Kengmo Tchoupa A, Watkins K E, Jones R A, et al. The type Ⅶ secretion system protects *Staphylococcus aureus* against antimicrobial host fatty acids[J]. Scientific Reports, 2020, 10(1): 14838.

[21] Lai L Y, Dai J, Tang H Y, et al. *Streptococcus suis* serotype 9 strain GZ0565 contains a type Ⅶ secretion system putative substrate EsxA that contributes to bacterial virulence and a vanZ-like gene that confers resistance to teicoplanin and dalbavancin in *Streptococcus agalactiae*[J]. Veterinary Microbiology, 2017, 205: 26-33.

[22] Cruciani M, Etna M P, Camilli R, et al. *Staphylococcus aureus* esx factors control human dendritic cell functions conditioning Th1/Th17 response [J]. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, 2017, 7: 330.

[23] Job A M, Doran K S, Spencer B L. A group B streptococcal type Ⅶ secreted LXG toxin mediates interbacterial competition and colonization of the murine female genital tract[J]. mBio, 2024, 15(10): e0208824.

[24] Spencer B L, Tak U, Mendonça J C, et al. A type Ⅶ secretion system in Group B *Streptococcus* mediates cytotoxicity and virulence[J]. PLoS Pathogens, 2021, 17(12): e1010121.

[25] 马艳平,郝乐,冯国清,等. 罗非鱼无乳链球菌 Δ*essA*、Δ*essB*、Δ*essC* 敲除菌株的构建及其特性分析[J]. 南方水产科学, 2022, 18(4): 76-86.
Ma Y P, Hao L, Feng G Q, et al. Construction and characterization research of *essA*, *essB* and *essC*-deleted mutants in *Streptococcus agalactiae* from *Tilapia*[J]. South China Fisheries Science, 2022, 18(4): 76-86(in Chinese with English abstract).

[26] 刘灵,徐俊,马盼,等. BALB/c 小鼠用于评价尼罗罗非鱼无乳链球菌毒力的研究[J]. 水产学报, 2019, 43(5): 1308-1316.
Liu L, Xu J, Ma P, et al. Virulence evaluation of *Streptococcus agalactiae* isolated from *Tilapia*(*Oreochromis niloticus*) using BALB/c mice[J]. Journal of Fisheries of China, 2019, 43(5): 1308-1316(in Chinese with English abstract).

责任编辑:周广礼