

无乳链球菌(*Streptococcus agalactiae*) 荚膜多糖合成基因研究进展*

汪开毓^{1,2} 黄锦炉¹ 肖丹³ 王均¹ 黄凌远¹

(1. 四川农业大学鱼病研究中心 雅安 625014; 2. 动物疫病与人类健康四川省重点实验室
雅安 625014; 3. 通威股份有限公司 成都 610041)

摘要 无乳链球菌是一种人畜鱼共患的重要病原菌, 菌体表面的荚膜多糖是公认的毒力因子, 其合成过程受荚膜多糖合成基因的调控。荚膜多糖合成基因存在于荚膜多糖操纵子中, 参与无乳链球菌荚膜多糖的合成启动、寡糖和多糖的聚合以及外输并锚定于菌体表面, 在新型诊断技术和减毒突变株的构建方面取得良好的应用。本文首次就 *cps* 基因的基本属性、转录调节、编码蛋白及其生物功能、对荚膜多糖合成的调控机理、在血清分型和突变株构建的应用这六个方面进行深入分析和讨论, 以期对 GBS *cps* 基因的新功能研究和创新应用提供理论参考。

关键词 无乳链球菌, 荚膜多糖合成基因, 作用机制, 应用

中图分类号 Q7

无乳链球菌(*Streptococcus agalactiae*), 又称 B 组链球菌(group B streptococci, GBS), 在全世界范围内均有分布, 是新生儿败血症和脑膜炎(Schuchat, 1998)和奶牛乳腺炎(Trigo *et al*, 2008)的主要病原。GBS 也是一种水产动物的重要致病菌, 可感染包括虹鳟、海鲷、罗非鱼、黄鲈鱼、鲷鱼、石首鱼、鲱鱼、鲑鱼和银鲑在内的多种淡水鱼类和海水鱼类, 其发病率和死亡率高, 全球每年因此造成的经济损失十分严重(Amal *et al*, 2011; Suanyuk *et al*, 2008; 张新艳等, 2008; 柯剑等, 2010; 汪开毓等, 2011)。近年来, 由 GBS 感染引起的罗非鱼链球菌病在世界各地均有发生, 对红罗非鱼和尼罗罗非鱼等养殖品种具有严重危害性, 种鱼和成鱼均可发生感染, 死亡率超过 30% (Suanyuk *et al*, 2008); 我国南方地区养殖罗非鱼也因 GBS 感染而大规模暴发了链球菌病, 其发病率为 20%—50%, 死亡率为 50%—70%, 严重危害了我国罗非鱼养殖业的稳定发展(汪开毓等, 2011)。

荚膜多糖(capsular polysaccharides, CPs)是 GBS 的主要的毒力因子, 能阻止宿主补体因子 C3b 的沉积

及抑制其调理吞噬作用(Zlotkin *et al*, 2003)。荚膜多糖并非荚膜多糖合成(capsular polysaccharide synthesis, *cps*)基因编码产物的复合物, 而是在 *cps* 基因的调控下, 由糖基转移酶通过糖基化作用, 将糖基从其供体转移到受体上, 经特化修饰后运输至细胞外, 并锚定于细胞表面形成荚膜多糖。GBS *cps* 基因是一组具有重要研究价值的基因, 通过对 GBS *cps* 基因的研究, 有助于阐明 *cps* 基因的作用机制、建立新型 GBS 诊断技术、构建无/弱毒力 GBS 突变株并应用于预防鱼类链球菌病的新型渔用疫苗的研发。目前, 许多学者在 GBS *cps* 基因的功能揭示和应用研发方面取得了很大突破(Rubens *et al*, 1993; Yamamoto *et al*, 1999; Chaffin *et al*, 2002; Gutekunst *et al*, 2003), 然而这方面的综述报道在国内外文献中至今仍未发现。作者认为, 关于 GBS *cps* 基因的研究进展很值得关注。因此, 本文首次对 *cps* 基因的基本属性、转录调节、编码蛋白及其生物功能、对 CPs 合成的调控机理、在血清分型的应用和在突变株构建的应用这六个方面进行综述, 旨在为 GBS *cps* 基因的功能的深入研究和创新应

* 教育部“长江学者和创新团队发展计划”创新团队项目, IRT0848 号; 通威股份有限公司重点资助项目, 2006—2009。汪开毓, 教授, 博导, E-mail: kywang@sicau.edu.cn

收稿日期: 2012-07-14, 收修改稿日期: 2012-09-15

用提供理论参考。

1 *cps* 基因的命名和序列特点

1.1 *cps* 基因的命名

GBS *cps* 基因是指在荚膜多糖合成过程中发挥重要生物学作用的一组功能基因。这些功能基因在 GBS *cps* 操纵子上前后相连成串, 由一个共同的调节区进行转录的控制, 每个功能基因编码具有特定生物学功能的产物。为了更好地研究和区别功能基因, 人们根据基因在 *cps* 操纵子上的位置, 习惯上以 *cps*+英文字母的方式对其进行命名, 如 *cpsA*、*cpsB*、……、*cpsL* 分别代表荚膜多糖合成基因 A、荚膜多糖合成基因 B、……、荚膜多糖合成基因 L, 而这些基因对应的编码产物则以

CpsA、CpsB 和 CpsL 表示。随着不同血清型的 GBS 菌株在临床上逐渐被发现和分离到, 为了更好地区别不同血清型 GBS 菌株 *cps* 基因, 人们对 GBS *cps* 基因的命名方法也进行了完善, 并以 *cps*+血清型+英文字母的新方式对不同血清型 GBS *cps* 进行命名, 如 *cps_{Ia}A*、*cps_{III}B*、……、*cps_{IX}L* 分别代表血清 Ia 型菌株荚膜多糖合成基因 A、血清 III 型菌株荚膜多糖合成基因 B、……、血清 IX 型菌株荚膜多糖合成基因 L, 而这些基因对应的编码产物则以 Cps_{Ia}A、Cps_{III}B 和 Cps_{IX}L 表示。对于某些血清型未知或是待测定的 GBS 菌株而言, 人们习惯上仍以 *cps*+英文字母的方式来命名该菌株荚膜多糖合成基因。对 *cps* 基因进行命名, 可以极大地方便人们了解这些基因在 *cps* 操纵子上的空间位置, 但单纯从 *cps* 基因的命名上看却无法推断相应基因编码产物的生物属性及生物学功能。

1.2 *cps* 基因序列的特点

目前, 已有 9 种血清型的 GBS 菌株 *cps* 基因序列得到了测定, 这些基因在 GenBank 的登录号如下: AB028896(*cps_{Ia}*)、AB050723(*cps_{Ib}*)、AY375362(*cps_{II}*)、AF163833(*cps_{III}*)、AF355776(*cps_{IV}*)、AF349539(*cps_V*)、AF337958(*cps_{VI}*)、AY376403(*cps_{VII}*) 和 AY375363 (*cps_{VIII}*), 而血清 IX 型菌株 *cps* 基因序列只完成了部分测序(如 GQ499301)。经过对 *cps* 基因序列进行比对, 发现血清 Ia、Ib、II—VIII 这 9 种血清型菌株 *cpsA*—*cpsE* 和 *cpsL* 基因序列高度保守。不同血清型菌株的

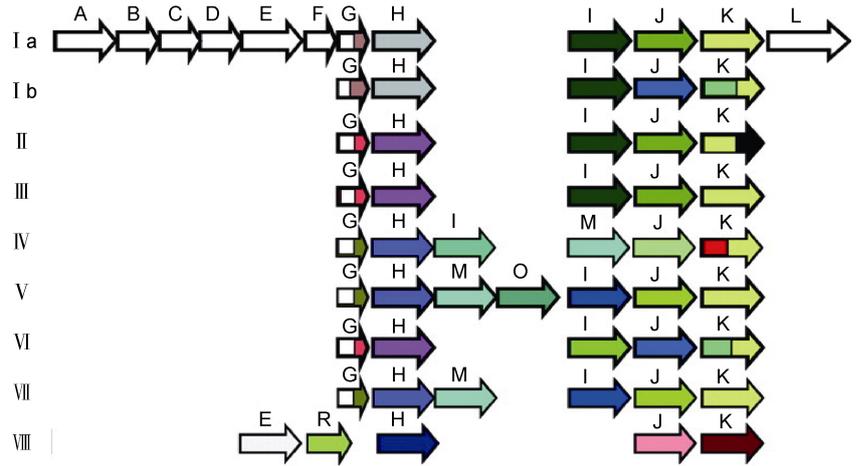


图 1 9 种血清型 GBS 荚膜合成基因的序列分析图

Fig.1 Sequence analysis of all nine GBS capsular serotype genes

注: 引自文献(Cieslewicz *et al.*, 2005)。(1) 9 种血清型 GBS 菌株的 *cpsA*—*cpsE* 和 *cpsL* 基因序列高度保守; (2) 这些基因只在血清 Ia 型栏显示, 其它血清型对应栏省略; (3) 每个箭头的颜色代表这个基因与其它编码基因的相似程度; (4) *cpsH* 和 *cpsI* 基因之间的间隙允许存在相关的开放阅读框

cpsGHIJK 基因序列之间进化关系较远, 如 *cps_VO* 基因序列是血清 V 型菌株特有的, 血清 Ia、Ib 型菌株 *cpsH* 基因序列与其它血清型 *cpsH* 基因序列相似性很低(图 1)。经过序列分析, 血清 III 型 *cpsK* 基因与杜克雷嗜血杆菌(*Haemophilus ducreyi*) *lst* 基因的密码子使用偏爱性和 G+C 含量具有一定相似性, 而其极有可能是由 G+C 含量低的祖先水平迁移进化而来的(Chaffin *et al.*, 2002)。

2 *cps* 基因的转录调节机制

2.1 RogB 的调节机制

RogB 是一种 RofA 样蛋白家族的转录调控因子, 负责调控 *cps* 基因的转录水平, 是一种荚膜多糖抑制剂或是负效应调节因子, 因为当血清 III 型 GBS 6313 株的 RogB 缺乏时, *cps* 操纵子第一个基因 *cpsA* 的转录明显升高(Gutekunst *et al.*, 2003)。RogB 调控 *cpsA* 基因转录的结果是否会改变荚膜多糖的表达水平, 或者这种调控与 GBS 感染是否具有关联性等问题, 仍需进行深入的研究。有趣的是, 编码 RogB 的基因在所有的 GBS 菌株中并不保守, 如编码 RogB 的基因在血清 Ia 型 GBS A909 株或是血清 III 型 GBS COH1 株中就不存在(Tettelin *et al.*, 2005)。由此推断, RogB 对荚膜多糖的调控作用具有菌株特异性。

2.2 CovR/S 的调节机制

CovR/S 也是一种 *cps* 基因转录的调控因子。在

血清 III GBS NEM316 株中, CovR/S 可以激活 *cps* 基因的表达水平升高两倍(Lamy *et al*, 2004), 而这种现象在血清 V 型 GBS 2603v/r 株和血清 Ia 型 GBS 515、A909 株中却不一致(Jiang *et al*, 2008)。这表明, CovR/S 对 GBS 荚膜多糖的调节也具有菌株特异性。

2.3 通适型调节机制

在已知 10 种血清型 GBS 菌株中, 是否存在一种通用的调控因子来控制菌株荚膜多糖的表达, 以使菌株更好地适应外部环境呢? 例如在转录期间, 是否有一种荚膜多糖低表达水平的共生状态过渡到一种荚膜多糖高表达水平的入侵状态呢, 这依然是个

待解之谜。然而, 为了更好地理解在 GBS 入侵期间, RogB 和 CovR/S 在荚膜多糖表达时的作用, 下一步工作可以围绕 RogB 和 CovR/S 的环境刺激因子展开研究。

3 *cps* 基因编码蛋白及其生物功能

GBS *cps* 基因编码蛋白发挥糖链长度的调节、糖基的聚合、多糖的运输和特化修饰等重要生物学功能(图 2)。*Cps* 基因编码蛋白主要包括糖基转移酶类、寡糖聚合酶、唾液酸转移酶类、转录激活因子、多糖链长度调节因子等(Yamamoto *et al*, 1999; Cieslewicz *et al*, 2001; Rubens *et al*, 1993)(表 1)。

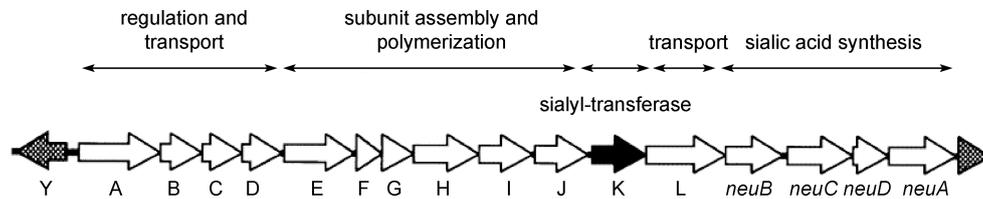


图 2 GBS *cps* 操纵子功能组成示意图

Fig.2 Schematic diagram of the functions of GBS *cps* operon

注: 引自文献(Chaffin *et al*, 2002)。(1) 单向箭头代表对应的开放性阅读框(ORFs), 基因名称与箭头下对应字母相同;

(2) 带格子的单向箭头与荚膜多糖合成基因无关

3.1 糖基转移酶类

糖基转移酶类最常见的主要为 α -糖基转移酶类和 β -糖基转移酶类(Breton *et al*, 1999), 在细菌荚膜多糖、脂多糖和表多糖合成过程中发挥重要的作用(Keenleyside *et al*, 1996), 负责转移糖类物质, 并将其从活性供体分子催化成特定受体分子(如脂质载体、蛋白质载体或其它碳水化合物载体), 促进糖苷键的形成(Tettelin *et al*, 2002)。 α -糖基转移酶类在糖结构区域含有 DXD 基序(Saxena *et al*, 1995; Shibayama *et al*, 1998), 而 β -糖基转移酶类在糖结构区域则含有一组 DXD 和 DXS 基序, 部分蛋白在糖结构区域有时也同时含有 ED 基序(Kolkman *et al*, 1997)。血清 Ia、Ib、II-VII 型 GBS 菌株 *cps* 操纵子上, *cpsE*、*cpsF*、*cpsG*、*cpsI* 和 *cpsJ* 基因均编码糖基转移酶类, 协同调节缺乏唾液酸基的荚膜多糖前体糖基或寡糖的聚合(Chaffin *et al*, 2000)。*CpsE* 基因编码蛋白是一种半乳糖转移酶, 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, 当 *cpsE* 基因发生钝化突变时将导致 GBS 无荚膜表型的出现(Yamamoto *et al*, 1999; Rubens *et al*, 1993)。

CpsF 基因推导氨基酸序列与 *CpsIII*F 及肺炎链球菌 *cps14*F 基因具有同源性, 由于 *cps14*F 能增强 *cps14*G 基因编码的半乳糖基转移酶活性, 由此推断 *cpsF* 基

因编码蛋白可能也是一种半乳糖基转移酶增强子。*CpsIa*G 基因推导氨基酸序列与肺炎链球菌编码 β -1,4-半乳糖基转移酶的 *cps14*G 序列的相似性达 53.2%, 序列中也缺乏 β -糖基转移酶类保守结构 DXD、DXS 和(或)ED 基序, 由此推断 *cpsIa*G 基因编码蛋白可能具有相似的酶活性, 且极有可能属于一种不同于 β 超家族的糖基转移酶类。血清 Ia、Ib、II、III、VI 和 VII 型 GBS 菌株 *cpsI* 和 *cpsJ* 基因虽然都编码糖基转移酶类, 但前四种血清型菌株的 *cpsI* 基因编码 β -1,3-乙酰葡萄糖氨基转移酶, 后两种血清型菌株 *cpsI* 基因则分别编码 β -1,3-葡萄糖基转移酶和 β -1,6-葡萄糖氨基转移酶(Kolkman *et al*, 1997)。不同血清型 GBS 菌株 *cpsJ* 基因编码产物也存在很大差异, 如 *cpsIa*J 和 *cpsIb*J 基因虽然都编码 β 半乳糖基转移酶, 分别负责催化荚膜多糖寡聚糖侧链第三和第四个糖基的连接, 然而前者编码产物的作用位点是(1, 4)位点, 而后者编码产物作用位点却是(1, 3)位点(Yamamoto *et al*, 1999)。

3.2 糖基聚合酶类

在 10 种血清型 GBS 菌株中, 血清 Ia、Ib 型菌株 *cpsH* 基因推导氨基酸序列与弗氏志贺菌和鼠伤寒沙门氏菌 O 抗原聚合酶(Rfc)氨基酸序列具有较高相似性, 二级结构包含 12 个跨膜结构域(membrane-spanning domains), 从功能上分析可以推断血清 Ia、Ib 型菌株

表 1 荚膜多糖合成基因及其编码蛋白
Tab.1 The capsular polysaccharide synthesis genes and their coding proteins

Cps 基因	各种血清型荚膜多糖合成基因编码产物				
	Ia	Ib	II	III	IV
<i>cpsA</i>	转录弱化因子	同 Ia	同 Ia	同 Ia	同 Ia
<i>cpsB</i>	磷酸酶	同 Ia	同 Ia	同 Ia	同 Ia
<i>cpsC</i>	多糖链长度调节因子	同 Ia	同 Ia	同 Ia	同 Ia
<i>cpsD</i>	酪氨酸激酶	同 Ia	同 Ia	同 Ia	同 Ia
<i>cpsE</i>	半乳糖转移酶	同 Ia	同 Ia	同 Ia	同 Ia
<i>cpsF</i>	β -1,4-半乳糖转移酶增强子	同 Ia	同 Ia	同 Ia	同 Ia
<i>cpsG</i>	β -1,4-半乳糖转移酶	同 Ia	同 Ia	同 Ia	同 Ia
<i>cpsH</i>	荚膜多糖聚合酶	同 Ia	多糖重复单元聚合酶	同 II	同 II
<i>cpsI</i>	β -1,3-乙酰葡萄糖氨基转移酶	同 Ia	同 Ia	同 Ia	未知
<i>cpsJ</i>	β -1,4-半乳糖转移酶	β -1,3-半乳糖转移酶	同 Ia	同 Ia	糖基转移酶 ^b
<i>cpsK</i>	未知	唾液酸转移酶 ^a	α -2,3-唾液酸转移酶	同 II	糖基转移酶 ^b
<i>cpsL</i>	荚膜多糖重复单元运载子	同 Ia	同 Ia	同 Ia	同 Ia
<i>cpsO</i>	—	—	—	—	—
<i>cpsM</i>	—	—	—	—	糖基转移酶 ^b
<i>cpsN</i>	—	—	—	—	糖基转移酶 ^b
<i>cpsP</i>	—	—	糖基转移酶 ^b	—	—
<i>cpsQ</i>	—	—	糖基转移酶 ^b	—	—
<i>cpsR</i>	转录调节因子	—	—	—	—
<i>cpsS</i>	组氨酸蛋白酶	—	—	—	—
<i>cpsY</i>	—	—	—	转录调节因子	—

Cps 基因	各种血清型荚膜多糖合成基因编码产物				
	V	VI	VII	VIII	IX
<i>cpsA</i>	同 Ia	同 Ia	同 Ia	同 Ia	N
<i>cpsB</i>	同 Ia	同 Ia	同 Ia	同 Ia	N
<i>cpsC</i>	同 Ia	同 Ia	同 Ia	同 Ia	N
<i>cpsD</i>	同 Ia	同 Ia	同 Ia	同 Ia	N
<i>cpsE</i>	同 Ia	同 Ia	同 Ia	同 Ia	N
<i>cpsF</i>	同 Ia	同 Ia	同 Ia	—	N
<i>cpsG</i>	同 Ia	同 Ia	同 Ia	—	N
<i>cpsH</i>	同 II	同 II	同 II	同 II	同 II
<i>cpsI</i>	未知	β -1,3-葡萄糖基转移酶	β -1,6-葡萄糖氨基转移酶	—	N
<i>cpsJ</i>	糖基转移酶 ^b	同 II	同 Ia	同 Ia	糖基转移酶 ^b
<i>cpsK</i>	糖基转移酶 ^b	同 II	α -2,3-唾液酸合成酶	同 VII	糖基转移酶 ^b
<i>cpsL</i>	同 Ia	同 Ia	同 Ia	同 Ia	N
<i>cpsO</i>	β -1,6-葡萄糖氨基转移酶	—	—	—	N
<i>cpsM</i>	糖基转移酶 ^b	—	β -1,4-葡萄糖基转移酶	—	糖基转移酶 ^b
<i>cpsN</i>	糖基转移酶 ^b	—	—	—	未知
<i>cpsP</i>	—	—	—	—	N
<i>cpsQ</i>	—	—	—	—	N
<i>cpsR</i>	—	—	—	β -1,4-鼠李糖基转移酶	N
<i>cpsS</i>	—	—	—	—	N
<i>cpsY</i>	—	—	—	—	N

注: 上标^a表示该酶所属的超家族未知; ^b表示该糖基转移酶的作用底物和所属超家族未知; N表示尚无法确定该血清型菌株是否存在该基因及其编码产物; —表示该血清型菌株不存在此荚膜多糖合成基因

cpsH 基因可能编码一种荚膜多糖聚合酶。而血清 II-IX 型菌株 *cpsH* 基因编码产物都属于多糖重复单位聚合酶,但从图 1 可推测,这些血清型菌株的 *cpsH* 基因序列并没良好的保守性,因此对应基因的编码产物之间也可能存在结构或功能上的差异。

3.3 其它

CpsA 基因编码蛋白是一种 *cps* 基因转录弱化子,其 N-末端含有推导跨膜区域,参与调节 *cps* 基因转录水平。*CpsB* 基因编码蛋白是一种磷酸酶,功能上与糖类的运输与代谢有关,该基因若发生钝化突变将影响荚膜基因簇的正常表达(Lin *et al*, 2009)。*CpsC* 基因编码蛋白是一种多糖链长度调节因子,该基因发生钝化突变将会降低多糖偶联聚合或多糖运输效率。*CpsD* 基因编码蛋白是一种酪氨酸激酶,参与多糖链长度的调节和多糖的胞外运输,该基因发生钝化突变时也会降低多糖偶联聚合或多糖运输的效率(Rajagopal *et al*, 2003; Rajagopal *et al*, 2005)。*CpsL* 基因编码蛋白是一种假定重复单位运载因子,功能上可能与多糖的胞外运输有关。*CpsIIIK* 基因编码蛋白具有 -2,3-唾液酸转移酶活性,参与唾液酸的合成过程(Chaffin *et al*, 2002)。

4 *cps* 基因与荚膜多糖合成

细菌荚膜多糖的生物合成是一个与酶作用相关的复杂过程。该过程起始于对单糖的吸收或合成,以及单糖对核苷酸诱导剂的激活,接着由膜结合转移酶复合物将已成功耦联的单糖催化形成一种膜结合脂质载体,最后由聚合酶类催化寡糖亚基的聚合,聚合完成后由运输因子将其输出胞外,并将完整的荚膜多糖锚定于细胞表面(Boulnois *et al*, 1989, 1990)。对于 GBS 而言,由于参与荚膜多糖合成的多个功能基因序列结构存在差异,最终形成的荚膜多糖具有严格的型特异性,而且型特异性荚膜多糖种类已有 10 种,然而目前只有血清 Ia-VIII 型荚膜多糖合成基因序列及编码蛋白完成了测定,血清 IX 型荚膜多糖合成基因序列及编码蛋白只有部分完成了测定。

4.1 荚膜多糖的合成启动

血清 Ia、Ib、II—VIII 型 GBS 荚膜多糖合成时, *cpsE* 基因编码的糖基转移酶将第一个单糖转移到脂质载体上,从此启动了多糖的合成。

4.2 荚膜多糖的聚合和修饰

荚膜多糖合成启动后,细胞内单糖在糖基转移酶的作用下连接形成寡糖单位,寡糖单位经多糖聚

合酶的催化逐渐延伸形成多糖链,多糖链在 *cpsC*、*cpsD* 基因编码产物的协同调控下,最终形成链长度适合的主糖链骨架。在主糖链形成过程中,荚膜多糖的侧链结构也在逐渐形成,然而哪些 *cps* 基因及其编码蛋白在侧链形成过程是如何作用的还知之尚少。目前仅有报道指出, *cpsIaI* 基因编码的 -1,3-乙酰葡萄糖氨基转移酶和 *cpsIaJ* 基因编码的 -1,4-半乳糖基转移酶分别负责催化血清 Ia 型 GBS 荚膜多糖寡聚糖侧链上第三和第四个糖基的连接(Yamamoto *et al*, 1999)。荚膜多糖合成期间,其侧链寡糖单位仍需要唾液酸酶的修饰,这个修饰过程叫唾液酸化作用,只有发生唾液酸化作用的荚膜多糖才具有保护菌体逃避宿主补体旁路途径免疫防御的生物功能。

4.3 荚膜多糖的运输和形成

在 *cps* 操纵子上,具有血清型特异性的糖基转移酶类和聚合酶类的基因群位于编码一些合成和激活唾液酸的酶类基因群的周边,使 10 种血清型菌株的多糖侧链形成终极糖类(Haft *et al*, 1996; Suryanti *et al*, 2003); 具有血清型特异性的糖基转移酶基因也是一个基因群,这些基因编码产物负责将对应的寡糖单位向胞外运输(Cieslewicz *et al*, 2001)。换言之,当寡糖单位在细胞内糖基转移酶类和聚合酶类的作用下,在脂质载体逐渐聚合,随后组装完成的多糖跨膜被动运输至细胞膜,并锚定于细菌表面后最终形成具有生物学活性的荚膜多糖(Boulnois *et al*, 1989, 1990)。

5 *cps* 基因与血清分型

5.1 基于 *cps* 基因的血清分型与传统血清分型方法的比较

GBS 菌株的传统血清分型是根据将未知型菌株的抗血清与已知型 GBS 菌株的反应结果进行划分,常用方法主要有 Lance-field 分型法(Slotved *et al*, 2002; Slotved *et al*, 2003)。目前,利用 Lance-field 分型法可以将 GBS 菌株荚膜多糖抗原分成 10 种不同类型,并将对应 GBS 菌株划分为 Ia、Ib、II—IX 共 10 个血清型(Slotved *et al*, 2007)。然而由于部分分离菌株不表达荚膜多糖,或者菌株荚膜多糖与型特异抗血清无反应,无法应用传统方法进行血清分型的菌株数量也越来越多(Elliott *et al*, 2004)。因此,需要建立新的血清分型方法才能弥补传统分型方法的不足。

在 GBS*cps* 操纵子上, *cps* 基因簇中既存在保守的序列(如 *cpsA*、*cpsE*、*cpsL* 等),也存在亲缘关系较远的序列(如 *cpsI*、*cpsJ*、*cpsK* 等)(图 1)。因此,通过对

不同血清型菌株 *cps* 基因序列进行比对, 筛选出具有型特异性的基因序列, 并以这些特定的序列设计特异性引物, 建立 PCR 方法用于鉴定 GBS 的血清型 (Kong *et al*, 2002)。Ramaswamy 等(2006)以血清 V 型 GBS 的特异基因 *cps_vO* 基因为检测靶基因建立了 PCR 方法, 成功将 8 株传统血清分型方法无法鉴定的菌株划分至血清 V 型, 然而这种方法并不适合于对 GBS 其它血清型菌株的区别鉴定。当血清 IX 型 GBS 菌株被鉴定出来以后, Imperi 等(2010)根据型特异的荚膜多糖合成基因序列建立了一种多重 PCR 血清分型方法, 适用于现有 10 种血清型 GBS 菌株的鉴定; 在鉴定血清 Ib 型和血清 VII 型的 GBS 菌株时, 虽然多重 PCR 血清分型方法与传统血清分型方法检测结果的一致率分别只有 87.5% 和 33.3%, 但是在鉴定血清 Ia、Ib、II—VI、IX 型 GBS 菌株时, 两种鉴定方法的血清分型结果却完全一致。

5.2 基于 *cps* 基因的血清分型的应用前景

据报道, 大多数 GBS 菌株可以根据传统血清分型方法划分至已知血清型中, 然而仍有 4%—7% 的菌株无法使用传统血清分型方法进行分型 (Slotved *et al*, 2003; Ferrieri *et al*, 2004)。这可能是由于菌株发生荚膜基因突变 (Sellin *et al*, 2000)、可逆非荚膜化位相变化 (Cieslewicz *et al*, 2001) 或是出现非典型荚膜类型 (Slotved *et al*, 2002)。未知血清型菌株逐渐增多已成为一个亟待解决的问题, 因此有学者指出, 利用分子生物学方法实现对 GBS 的血清分型已逐渐出现取代传统血清分型方法的趋势 (Luan *et al*, 2005)。然而, 对于当前未知血清型的菌株是否应该采用基于荚膜多糖合成基因的分子生物学分型, 或是采用基于抗血清反应的传统分型, 亦或是结合这两种方法同时进行分型, 还存在较大的争议 (Kong *et al*, 2006; Zhao *et al*, 2006; Poyart *et al*, 2007)。作为在批量检测方面具有操作简便、结果可靠和成本低廉的分子生物学血清分型方法, 尤其是基于型特异荚膜多糖合成基因的血清分型方法, 在鱼源 GBS 的流行血清型监测方面的应用空间十分广阔, 尤其是获得的 GBS 区域性流行血清型监测结果将对鱼类链球菌病预防性措施的制订提供重要的参考。

6 与 *cps* 基因相关的突变株的构建及生物特性

6.1 基于转座子突变技术的突变株的构建

转座子突变是基于转座子元件可在染色体上移

动并随机整合入基因组新位点的特性, 且整合位点下游基因不能正确表达, 产生随机突变, 常用于突变体库的构建。Rubens 等(1987)利用结合转化途径将粪便链球菌 CG110 的高频率供体转座子 Tn916 转入血清 III 型 GBSCOH31r/s 株, 筛选出缺乏荚膜多糖突变株 COH31-15; Southern 杂交结果显示, 发生突变的基因片段的核酸序列与其它血清型 GBS 的荚膜核酸序列有很高的同源性, 而且该基因可能是血清 III 型 GBS 荚膜表达的必须基因, 因为当转座子 Tn916 发生钝化突变时可致突变株毒力缺失。随后, Rubens 等(1993)利用转座子 Tn916 *E* 转入具有丰富荚膜的 III 型 GBS 野生株 COH1, 构建了缺乏荚膜的 COH1-13 突变株; 该突变株对人粒细胞的吞噬杀灭作用比野生株 COH1 更为敏感, 突变株的细胞表面或细胞质中明显缺乏荚膜多糖, 同时突变株的半乳糖基转移酶活性显著降低; 通过对突变株 COH1-13 插入位点一侧的 DNA 序列分析, 发现一个与鼠伤寒沙门氏杆菌的 *rfbP* 基因(编码半乳糖转移酶)具有很高的同源性的 ORF, 命名为 *cpsD* 基因。随着基因功能研究的深入, 未来可能将会在 *cps* 操纵子上发现更多的功能基因, 并获得良好的应用。因为通过转座子突变构建突变株的技术, 可以获得无/弱毒的 GBS 突变株, 这给鱼类链球菌病预防性疫苗的研发带来一个全新的研究思路, 然而这方面并未见相关研究报道。

6.2 基于同源重组技术的突变株的构建

转座子突变技术同样存在遗传背景不清晰的缺点, 而针对靶基因的同源重组技术则可以克服这个缺点。同源重组技术是一种以自杀质粒或温敏质粒介导的细菌等位基因交换的技术, 是基因工程领域细菌突变株构建的常用技术, 可用于基因的定点突变。

Chaffin 等(2000)使用温敏穿梭载体 pVE6007, 将一个 Km-2 抗性盒插入 *cps_{III}A*、*cps_{III}B*、*cps_{III}C*、*cps_{III}D* 及 *neu_{III}A*, 通过染色体同源重组, 等位基因发生交换, 构建了不同荚膜合成基因的插入失活突变体; 经血清 III 型 GBS 血清进行免疫印迹分析发现, 仅野生株 COH1 发生反应, 其余突变体均不反应, 这说明了突变株没有荚膜产生; RNA 斑点杂交发现探针只能够杂交 ΩKm-2 抗性盒前端的基因, 而其下游基因不能检测到, 由此可推断抗性盒的插入阻断了下游基因的转录。Chaffin 等(2005)为了探索 *cpsK* 在 GBS 荚膜多糖合成中的功能, 通过等位基因交换, 将一个 *cat* 基因与染色体上的 *cpsK* 基因进行交换, 构建了 *cpsK* 突变株; 通过抗血清 III 型 CPs 抗血清进行免疫印迹

分析和酶联免疫吸附试验分析,证明了缺失 *cpsK* 的突变株不具有唾液酸化功能,荚膜多糖产物不到其亲本菌株产物的 20%,然而却意外的发现突变株的荚膜多糖的链长却比亲本菌株有所增加。目前,基于同源重组技术的 GBS 突变株的应用也仅局限于血清 III 型的应用,在其它鱼类流行血清型(如 Ia、Ib 等)的功能基因方面的应用仍有待进一步的研究发现。

7 小结

在 GBS 荚膜多糖合成基因簇中,不同血清型菌株 *cps* 基因在荚膜多糖合成过程中的多糖的调节、加工和(或)胞外运输过程中发挥重要的作用,在新型应用性诊断技术和基因突变株的构建方面也获得了良好的应用。开展围绕 *cps* 基因编码的多糖聚合和外输复合物的分子特征鉴定的研究,将有助于阐明多糖分泌型的 GBS 的生理学特征,有助于抗荚膜化 GBS 的靶向药物作用位点的设计和筛选,更有助于抗 GBS 的新型基因缺失疫苗的靶基因筛选和插入位点的应用分析,从而进一步推动鱼类链球菌病的预防和治疗性药物的研发,同时也将为鱼类链球菌病新型预防性疫苗的研发引导新思路。

参 考 文 献

- 汪开毓, 陈德芳, 黄凌远, 2011. 罗非鱼无乳链球菌病诊治. 水产前沿, (8): 55—58
- 张新艳, 樊海平, 钟全福等, 2008. 罗非鱼无乳链球菌的分离、鉴定及致病性研究. 水产学报, 32(5): 772—778
- 柯 剑, 赵 飞, 罗 理等, 2010. 广东省罗非鱼主养区无乳链球菌的分离、鉴定与致病性. 广东海洋大学学报, 30(3): 22—27
- Amal M N A, Zamri-Saad M, 2011. Streptococcosis in tilapia (*Oreochromis niloticus*): a review. Pertanika Journal of Tropical Agricultural Science, 32(2): 195—206
- Boulnois G J, Jann K, 1989. Bacterial polysaccharide capsule synthesis, export and evolution of structural diversity. Mol Microbiol, 3(12): 1819—1823
- Boulnois G J, Roberts I S, 1990. Genetics of capsular polysaccharide production in bacteria. Curr Top Microbiol Immunol, 150: 1—18
- Breton C, Imbert A, 1999. Structure/function studies of glycosyltransferases. Curr Opin Struct Biol, 9(5): 563—571
- Chaffin D O, Beres S B, Yim H H *et al*, 2000. The serotype of type Ia and III group B streptococci is determined by the polymerase gene within the polycistronic capsule operon. J Bacteriol, 182(16): 4466—4447
- Chaffin D O, Mckinnon K, Rubens C E, 2002. CpsK of *Streptococcus agalactiae* exhibits α 2,3-sialyltransferase activity in *Haemophilus ducreyi*. Molecular Microbiology, 45(1): 109—122
- Chaffin D O, Mentele L M, Rubens C E, 2005. Sialylation of group B streptococcal capsular polysaccharide is mediated by *cpsK* and is required for optimal capsule polymerization and expression. Journal of Bacteriology, 187(13): 4615—4626
- Cieslewicz M J, Chaffin D, Glusman G *et al*, 2005. Structural and genetic diversity of group B streptococcus capsular polysaccharides. Infect Immun, 73(5): 3096—3103
- Cieslewicz M J, Kasper D L, Wang Y, 2001. Functional analysis in type Ia group B *Streptococcus* of a cluster of genes involved in extracellular polysaccharide production by diverse species of streptococci. J Biol Chem, 276(1): 139—146
- Elliott J A, Thompson T A, Facklam R R *et al*, 2004. Increased sensitivity of a latex agglutination method for serotyping group B streptococcus. J Clin Microbiol, 42(8): 3907
- Ferrieri P, Baker C J, Hillier S L *et al*, 2004. Diversity of surface protein expression in group B streptococcal colonizing & invasive isolates. Indian J Med Res, 119(Suppl): 191—196
- Gutekunst H, Eikmanns B J, Reinscheid D J, 2003. Analysis of *RogB*-controlled virulence mechanisms and gene repression in *Streptococcus agalactiae*. Infect Immun, 71(9): 5056—5064
- Haft R F, Wessels M R, Mebane M F *et al*, 1996. Characterization of *cpsF* and its product CMP-N-acetylneuraminic acid synthetase, a group B streptococcal enzyme that can function in K1 capsular polysaccharide biosynthesis in *Escherichia coli*. Mol Microbiol, 19(3): 555—563
- Imperi M, Pataracchia M, Alfarone G *et al*, 2010. A multiplex PCR assay for the direct identification of the capsular type (Ia to IX) of *Streptococcus agalactiae*. Journal of Microbiological Methods, 80(2): 212—214
- Jiang S M, Ishmael N, Dunning Hotopp J *et al*, 2008. Variation in the group B *Streptococcus* CsrRS regulon and effects on pathogenicity. J Bacteriol, 190(6): 1956—1965
- Keenleyside W J, Whitfield C, 1996. A novel pathway for O-polysaccharide biosynthesis in *Salmonella enterica* serovar borreze. J Biol Chem, 271(45): 28581—28592
- Kolkman M A B, Wakarchuk W P, Nuijten J M *et al*, 1997. Capsular polysaccharide synthesis in *Streptococcus pneumoniae* serotype 14: molecular analysis of the complete *cps* locus and identification of genes encoding glycosyltransferases required for the biosynthesis of the tetrasaccharide subunit. Mol Microbiol, 26(1): 197—208
- Kong F, Brown M, Sabananthan A *et al*, 2006. Multiplex PCR-based reverse line blot hybridization assay to identify 23 *Streptococcus pneumoniae* polysaccharide vaccine serotypes. J Clin Microbiol, 44(5): 1887—1891
- Kong F, Gowan S, Martin D *et al*, 2002. Serotype identification of group B streptococci by PCR and sequencing. J Clin Microbiol, 40(1): 216—226

- Lamy M C, Zouine M, Fert J *et al*, 2004. CovS/CovR of group B streptococcus: a two-component global regulatory system involved in virulence. *Mol Microbiol*, 54(5): 1250—1268
- Lin W J, Walthers D, Connelly J E *et al*, 2009. Threonine phosphorylation prevents promoter DNA binding of the Group B *Streptococcus* response regulator CovR. *Mol Microbiol*, 71(6): 1477—1495
- Luan S L, Granlund M, Sellin M *et al*, 2005. Multilocus sequence typing of Swedish invasive group B streptococcus isolates indicates a neonatally associated genetic lineage and capsule switching. *J Clin Microbiol*, 43(8): 3727—3733
- Poyart C, Tazi A, Réglis-Poupet H *et al*, 2007. Multiplex PCR assay for rapid and accurate capsular typing of group B streptococci. *J Clin Microbiol*, 45(6): 1985—1988
- Rajagopal L, Clancy A, Rubens C E, 2003. A eukaryotic type serine/threonine kinase and phosphatase in *Streptococcus agalactiae* reversibly phosphorylate an inorganic pyrophosphatase and affect growth, cell segregation, and virulence. *J Biol Chem*, 278(16): 14429—14441
- Rajagopal L, Vo A, Silvestroni A *et al*, 2005. Regulation of purine biosynthesis by a eukaryotic-type kinase in *Streptococcus agalactiae*. *Mol Microbiol*, 56(5): 1329—1346
- Ramaswamy S V, Ferrieri P, Madoff L C *et al*, 2006. Identification of novel *cps* locus polymorphisms in nontypable group B *Streptococcus*. *J Med Microbiol*, 55(6): 775—783
- Rubens C E, Heggen L M, Haft R F *et al*, 1993. Identification of *cpsD*, a gene essential for type III capsule expression in group B streptococci. *Molecular Microbiology*, 8(5): 843—855
- Rubens C E, Wessels M R, Heggen L M *et al*, 1987. Transposon mutagenesis of type III group B *Streptococcus*: correlation of capsule expression with virulence. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 84(20): 7208—7212
- Saxena I M, Brown R M Jr, Fevre M *et al*, 1995. Multidomain architecture of beta-glycosyl transferases: implications for mechanism of action. *J Bacteriol*, 177(6): 1419—1424
- Schuchat A, 1998. Epidemiology of group B streptococcal disease in the United States: shifting paradigms. *Clinical Microbiology Reviews*, 11(3): 497—513
- Sellin M, Olofsson C, Hakansson S *et al*, 2000. Genotyping of the capsule gene cluster (*cps*) in nontypable group B streptococci reveals two major *cps* allelic variants of serotypes III and VII. *J Clin Microbiol*, 38(9): 3420—3428
- Shibayama K, Ohsuka S, Tanaka T *et al*, 1998. Conserved structural regions involved in the catalytic mechanism of *Escherichia coli* K-12 WaaO (RfaI). *J Bacteriol*, 180(20): 5313—5318
- Slotved H C, Elliott J, Thompson T *et al*, 2003. Latex assay for serotyping of group B *Streptococcus* isolates. *J Clin Microbiol*, 41(9): 4445—4447
- Slotved H C, Kong F, Lambertsen L *et al*, 2007. Serotype IX, a proposed new *Streptococcus agalactiae* serotype. *J Clin Microbiol*, 45(9): 2929—2936
- Slotved H C, Sauer S, Konradsen H B, 2002. False-negative results in typing of group B streptococci by the standard Lancefield antigen extraction method. *J Clin Microbiol*, 40(5): 1882—1883
- Suanyuk N, Kong F, Ko D *et al*, 2008. Occurrence of rare genotypes of *Streptococcus agalactiae* in cultured red tilapia *Oreochromis* sp. and Nile tilapia *O. niloticus* in Thailand—Relationship to human isolates. *Aquaculture*, (284): 35—40
- Suryanti V, Nelson A, Berry A, 2003. Cloning, over-expression, purification, and characterisation of N-acetylneuraminase synthase from *Streptococcus agalactiae*. *Protein Expr Purif*, 27(2): 346—356
- Tettelin H, Masignani V, Cieslewicz M J *et al*, 2002. Complete genome sequence and comparative genomic analysis of an emerging human pathogen, serotype V *Streptococcus agalactiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99(19): 12391—12396
- Tettelin H, Masignani V, Cieslewicz M J *et al*, 2005. Genome analysis of multiple pathogenic isolates of *Streptococcus agalactiae*: implications for the microbial “pan-genome”. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102(39): 13950—13955
- Trigo G, Ferreira P, Ribeiro N *et al*, 2008. Identification of immunoreactive extracellular proteins of *Streptococcus agalactiae* in bovine mastitis. *Can J Microbiol*, 54(11): 899—905
- Yamamoto S, Miyake K, Koike Y *et al*, 1999. Molecular characterization of type-specific capsular polysaccharide biosynthesis genes of *Streptococcus agalactiae* type Ia. *J Bacteriol*, 181(17): 5176—5184
- Zhao Z, Kong F, Martinez G *et al*, 2006. Molecular serotype identification of *Streptococcus agalactiae* of bovine origin by multiplex PCR-based reverse line blot (mPCR/RLB) hybridization assay. *FEMS Microbiol Lett*, 263(2): 236—239
- Zlotkin A, Chilmonczyk S, Eyngor M *et al*, 2003. Trojan horse effect: phagocyte-mediated *Streptococcus iniae* infection of fish. *Infect Immun*, 71(5): 2318—2325

A REVIEW ON THE CAPSULAR POLYSACCHARIDE SYNTHESIS GENES OF *STREPTOCOCCUS AGALACTIAE*

WANG Kai-Yu^{1,2}, HUANG Jin-Lu¹, XIAO Dan³, WANG Jun¹, HUANG Ling-Yuan¹

(1. Fish Disease Research Center of Sichuan Agricultural University, Ya'an, 625014; 2. Key Laboratory of Animal Disease and Human Health of Sichuan Province, Sichuan Agricultural University, Ya'an, 625014;
3. Tongwei Co., Ltd., Chengdu, 610041)

Abstract *Streptococcus agalactiae* is an important zoonotic pathogen in human, animal and fish. The capsular polysaccharides on the cell surface have been recognized as virulence factors, of which the forming processes are regulated by the capsular polysaccharide biosynthesis (*cps*) genes. The capsular polysaccharide biosynthesis genes exist in capsular polysaccharide operon of *S. agalactiae* genome, which were predicted to participate in the origination of capsular polysaccharide synthesis, polymerization of oligosaccharides and polysaccharides, transport and anchor the product to the cell surface. Therefore, the *cps* genes achieve new applications of diagnostic techniques and the construction of attenuated mutant strains. In this paper, the basic properties of *cps* genes, as well as their transcription regulation, coding proteins and biological functions, regulation mechanism of capsular polysaccharide biosynthesis and serotyping, and application of construction of mutant strains are analyzed and discussed. We looked forward to providing a theoretical reference on the new functions research and innovative applications of *S. agalactiae cps* genes.

Key words *Streptococcus agalactiae*, *cps* genes, Regulating mechanism, Application