

文章编号:1002-2694(2009)03-0214-06

猪链球菌 2 型二元信号转导系统 *ciaR* 基因敲除突变株的构建及生物学功能研究*

冯晓丹^{1,2},程 功²,王 晶²,王长军²,潘秀珍²,唐家琪^{1,2}

摘要:目的 构建猪链球菌 2 型强毒株 05ZYH33 二元信号转导系统 1094HK/1095RR 的反应调节因子 *ciaR* 基因敲除突变株(Δ *ciaR*),并研究 Δ *ciaR* 的生物学功能。方法和结果 基于同源重组原理筛选 *ciaR* 基因缺失株,PCR 分析及 Southern 杂交结果均显示突变株构建成功。通过检测 OD₆₀₀ 值绘制生长曲线,发现突变株在 37℃ 和 40℃ 其 OD₆₀₀ 值均明显低于野生株;与 40mmol/L 过氧化氢共作用 15min 后涂板计数,突变株存活率明显低于野生株;不同 pH 值的培养基中培养,发现在 pH5.0 的酸性环境中突变株 OD₆₀₀ 值明显低于野生株;野生株与突变株对 BALB/c 小鼠攻毒(约 1×10⁹CFU/只),各 10 只,两组 16h 后均死亡 9 只。结论 成功获得 05ZYH33*ciaR* 基因敲除突变株;发现删除 *ciaR* 基因会导致细菌的生长繁殖能力减弱,抗氧化应激能力下降,在酸性环境生存能力下降;但对小鼠毒力无差别。

关键词:猪链球菌 2 型;二元信号转导系统;基因敲除;生物特性

中图分类号:R378.1 **文献标识码:**A

Construction and characterization of a two-component signal transduction system *ciaR* gene knock-out mutant of *Streptococcus suis* serotype 2

FENG Xiao-dan, CHENG Gong, WANG Jing, WANG Chang-jun, PAN Xiu-zhen, TANG Jia-qi

(Department of Pathogenic Biology of Basic Medical Sciences, Nanjing Medical University, Nanjing 210029, China)

ABSTRACT: To construct *ciaR* gene deletion strain(Δ *ciaR*) which encodes the response regulator of the two-component signal transduction system 1094HK/1095RR in *Streptococcus suis* serotype 2 virulent strain 05ZYH33, and to investigate biological functions of the Δ *ciaR*. Recombinant gene knock-out vector was constructed consisting of *Spc*^R cassette with flanking homology regions to the *ciaR* gene, and the *ciaR* gene deletion mutant was screened by homologous recombination. The Δ *ciaR* mutant was confirmed by PCR analysis and Southern hybridization. The Δ *ciaR* mutant was found to grow more slowly than the wild type strain at 37℃ and 40℃, as judged by OD₆₀₀. The sensitivity of cells to peroxide was test by the exposure of aliquots of cultures to 40mmol/L H₂O₂ for 15min. Viable cells were counted by plating them onto THB agar plates and the results were expressed as percentage of survival. The Δ *ciaR* strain was significantly more sensitive to peroxide than the wild type. No obvious differences were observed at different pHs except at pH5.0, in which the Δ *ciaR* mutant presented growth and survival defects. Nine of ten mice infected with the wild type or mutant(1×10⁹CFU/mouse) died at 16hours post-infection. It is evident that lack of the *ciaR* gene reduces the proliferative ability of *S. suis* 2 05ZYH33, tolerance to the oxidative stresses and survival at acid environment *in vitro*, but no differences of virulence to mice.

KEY WORDS: *Streptococcus suis* serotype 2; two-component signal transduction system; gene knock-out; biological characteristics

猪链球菌 2 型(*Streptococcus suis* serotype 2)是一种呈全球分布的人兽共患病病原体。*S. suis* 2 型感染不仅可致猪急性败血症、脑膜炎、关节炎、心内膜炎及急性死亡,并且可通过伤口和呼吸道等传播途径,导致人的感染发病和死亡,对养猪业及相关从业人员均造成严重威胁^[1-2]。1998 年和 2005 年我国江苏省和四川省分别暴发大规模 *S. suis* 2 型

感染疫情,患者出现链球菌中毒性休克综合征

* 国家 863 项目(2006AA02Z455);国家自然科学基金资助项目(30600533、30670105、3073008);江苏省自然科学基金资助项目(BK2007013)

通讯作者:唐家琪,Email: tjq85@hotmail.com

作者单位:1. 南京医科大学基础医学院病原生物学系,南京 210029;

2. 南京军区军事医学研究所,南京 210002

(Streptococcal toxic shock syndrome, STSS),病情凶险,病死率高(62.7%~81.3%)^[3],具体致病机制尚不清楚。二元信号转导系统(two-component signal transduction systems, TCSTS)是广泛存在于细菌中的调控单元,由膜上的组氨酸激酶(histidine kinase, HK)和胞内的反应调节因子(response regulator, RR)两部分组成,在致病菌感染宿主的过程中能调控多种毒力因子的表达以完成其致病过程^[4]。本课题组完成了 *S. suis* 2 型强致病株 98HAH12、05ZYH33(均分离自 STSS 病人)的全基因组测序,并对基因组进行注释^[5]。结果显示,05ZYH33 中存在 11 个 TCSTS 和 5 个孤儿反应调控因子,根据其编码基因所在阅读框的位置,选取其中一个 TCSTS,命名为 1094HK/1095RR,同源比对发现 1095RR 与多种链球菌(肺炎链球菌、化脓

链球菌、变形链球菌等)的 *CiaR* 氨基酸序列一致性高达 80%以上。现已证实在肺炎链球菌中,*CiaRH* 对维持细菌的完整性、感受性、毒性等生物活性发挥重要作用^[6]。本研究拟以猪链球菌强致病株 05ZYH33 为对象,通过构建 *ciaR* 基因敲除突变株,探讨其生物学功能的改变,为进一步研究该调控单元在 *S. suis* 2 型致病性方面的作用奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株、质粒、引物及实验动物 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。BALB/c 品系小鼠购自中国人民解放军军事医学科学院实验动物中心,雌性,4 周龄,SPF 级。

表 1 实验所用的菌株、质粒及引物
Table 1 Bacterial strains, plasmids and primers used in this study

Strains/plasmids	Characteristics/function *	Source/Reference	
Strains			
05ZYH33	Virulent strain isolated from a dead patient with STSS	Lab collection	
Δ <i>ciaR</i>	05ZYH33 with replacement of <i>ciaR</i> with <i>Spc^R</i> gene cassette	This study	
mutant1	single cross-over mutant with pUC:: <i>ciaR</i> integrated into the chromosome of 05ZYH33	This study	
<i>E. coli</i> DH5a	Cloning host for maintaining the recombinant plasmids	Promega	
Pasmids			
pMD18-T	TA cloning vector, Amp ^R	TaKaRa	
pUC18	Cloning vector; Amp ^R	Promega	
pSET2	<i>E. coli</i> - <i>S. suis</i> shuttle vector, <i>Spc^R</i>	[7]	
pUC:: <i>ciaR</i>	A recombinant vector with the background of pUC18, designed for knockout of <i>ciaR</i> ; Amp ^R ;		
<i>SpcR</i>	This study		
Primers			
	Sequence(5'-3')	Restriction sites * Functions	
LA-F	GAATTCGGGTTGGACATCGATCAT	<i>EcoR</i> I	Upstream border of <i>ciaR</i>
LA-R	GGATCCCTAAGCGAATCGGAAAAT	<i>Bam</i> H I	
RA-F	CTGCAGACACTTCCTTACGTTTCG	<i>Pst</i> I	Downstream border of <i>ciaR</i>
RA-R	AAGCTTTGAACTTGCCTTACTCAC	<i>Hind</i> III	
SPC-F	GGATCCGTTTCGTGAATACATGTTATA	<i>Bam</i> H I	SpcR gene cassette
SPC-R	CTGCAGGTTTTCTAAAATCTGAT	<i>Pst</i> I	
IN-F	TGTAGTATCACTGTCAAAGCCCCA	/	an internal fragment of <i>ciaR</i>
IN-R	GCGGAAACAGGCGTTTATGATTTG	/	
OUT-F	GACGTGTTCTAGCCTTGCAACTC	/	For PCR assay
OUT-R	CTAGAAAAGTTTGGAGACGGCGAG	/	

1.1.2 主要试剂和仪器 *Ex Taq* DNA 聚合酶、各种限制性内切酶、T4 DNA 连接酶、质粒 DNA 抽提试剂盒均购于 TaKaRa 公司;胶回收试剂盒、基因

组提取试剂盒为 Promega 公司产品;Todd-Hewitt Broth(THB)培养基购于 Difco 公司;North&South DNA 随机引物生物素标记和化学发光检测试剂盒

为 Pierce 公司产品。Gene Pulser Xcell™ 型电穿孔仪及电转杯均为 BIO-RAD 公司产品; Ultra-spec2000 型紫外分光光度计为 Pharmacia 公司产品。

1.2 $\Delta ciaR$ 的构建与鉴定

1.2.1 构建重组敲除质粒 pUC::*ciaR* 以 05ZYH33 基因组 DNA 为模板, 分别用引物 LA-F/LA-R、RA-F/RA-R 进行 PCR, 扩增 *ciaR* 的上、下游片段 LA 和 RA; 同时以 pSET2 质粒为模板, 用引物 SPC-F/SPC-R 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 *ciaR* 上下游同源序列的重组敲除质粒 pUC::*ciaR*。

1.2.2 筛选基因敲除突变株 $\Delta ciaR$ 在 2150V/cm、200 Ω 和 25 μ F 电转参数下, 用重组质粒 pUC::*ciaR* 电转化 05ZYH33 感受态细菌, 菌液涂布于含 100 μ g/mL *Spc^R* 的 THB 平板上进行初步筛选, 37 $^{\circ}$ C 孵育 48h 后, 增殖培养所有的单菌落。先用位于 *ciaR* 内部的引物 IN-F/IN-R 进行 PCR 初次筛选, 疑似阳性菌进一步用引物 SPC-F/SPC-R、OUT-F/SPC-R、SPC-F/OUT-R 和 OUT-F/OUT-R 进行组合 PCR 鉴定。

为进一步验证敲除株的正确性, 提取基因组进行 Southern 杂交分析。实验探针为 *ciaR* 基因的中间片段(引物 IN-F/IN-R 的 PCR 产物), 采用随机引物法进行生物素标记。将各基因组 DNA 用 *Hind* III 酶切过夜后, 0.8% 琼脂糖凝胶电泳分离各片段, 用毛细管法将凝胶中的 DNA 转印至尼龙膜, 80 $^{\circ}$ C 烘烤 2h 固定。预杂交、洗膜及曝光显影均严格按照说明书上操作步骤进行。

1.3 生物学功能研究

1.3.1 37 $^{\circ}$ C 和 40 $^{\circ}$ C 生长实验 为了对比敲除株与野生株在正常及偏高的温度生长状态有无差异, 分别取相同数量的细菌置于 THB 液体培养基中(约 10⁶ CFU/mL) 37 $^{\circ}$ C 及 40 $^{\circ}$ C 振荡培养, 每间隔 1h 测取 OD₆₀₀ 值, 重复实验 3 次并绘制生长曲线。

1.3.2 过氧化氢敏感实验 活化的敲除株和野生株分别与 40mmol/L 的 H₂O₂ (细菌的 OD₆₀₀ > 0.4) 室温下共作用 15min, 离心收菌并用超纯水清洗 1 次, 后稀释涂板(包括未与 H₂O₂ 作用的菌液), 37 $^{\circ}$ C 孵育 36~48h 后计数, 计算细菌在强氧化剂作用下的存活率。

1.3.3 不同 pH 值 THB 中的生长实验 取相同数

量的敲除株和野生株分别转接于 pH 4、5、6、6.5、7.5、8、8.5、9、12 的 THB 中 37 $^{\circ}$ C 振荡培养, 6h、8h、12h、24h 后取样测 OD₆₀₀ 值。

1.4 小鼠感染实验 从 THB(含 5% 羊血)平板上挑取单菌落, 转接于 THB(含 10% 灭活小牛血清)液体培养基中振荡培养 2 代, 取 1mL 活化的敲除株和野生株分别腹腔注射小鼠各 10 只(约 1 \times 10⁹ CFU/只), 并设 THB 阴性对照组 10 只(1mL/只)。每日两次观察记录小鼠发病及死亡情况。

2 结果

2.1 *ciaR* 基因在 05ZYH33 全基因组中的发现 同源性分析发现强毒株 05ZYH33 与 98HAH12 基因组中均含有 *CiaR* 近似序列, 且氨基酸序列一致性为 100%, 并与 GenBank 上的 *S. mutants* UA159 (GENE ID: 1028441)、*S. pneumoniae* R6 (GENE ID: 934251)、*S. agalactiae* 2603V/R (GENE ID: 901338) 氨基酸序列一致性分别为 90%、88%、87%、82%。用 Clustal W 软件分析 *CiaR* 氨基酸序列进化关系, 结果见图 1。

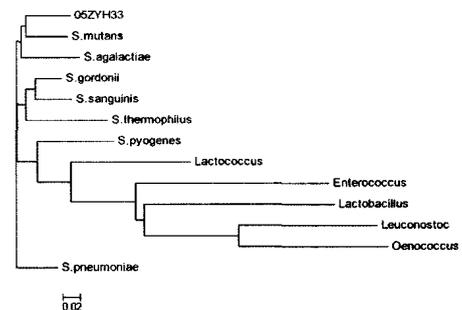


图 1 05ZYH33 *CiaR* 蛋白进化树

Fig. 1 Phylogenetic analysis of the response regulator *CiaR*, with some related members known at the level of amino acids

2.2 $\Delta ciaR$ 的构建与鉴定

2.2.1 重组敲除质粒 pUC::*ciaR* 的鉴定 对重组敲除质粒进行组合 PCR 及交叉双酶切验证, 结果见图 2A、2B, 各条带大小均与理论值相符。测序结果亦显示 3 个片段序列及连接顺序正确。

2.2.2 敲除突变株 $\Delta ciaR$ 的 PCR 鉴定 对于引物 IN-F/IN-R 的 PCR 产物为阴性者, 考虑 *ciaR* 基因已经不存在, 认为是疑似阳性株, 提取基因组进行组合 PCR 验证。如果发生双向同源重组, *Spc^R* 基因将替代 *ciaR*, 用引物 SPC-F/SPC-R 进行 PCR 能扩增出 *Spc^R* 基因, 引物 OUT-F/SPC-R 进行 PCR 能扩增出约 2.2kp 的片段, 引物 SPC-F/OUT-R 进行



图2 重组敲除质粒 pUC::ciaR 的组合 PCR 及交叉酶切鉴定

Fig. 2 Multiple-PCR analysis and crossing restriction enzyme digesting of the recombinant plasmid pUC::ciaR

A) Gel electrophoresis of PCR products. The 1 kb DNA ladder marker is shown to the left (M). 1: PCR products with LA-F/LA-R; 2: PCR products with SPC-F/SPC-R; 3: PCR products with RA-F/RA-R; 4: PCR products with LA-F/SPC-R; 5: PCR products with SPC-F/RA-R; 6: PCR products with LA-F/RA-R.

B) Restriction enzyme digestion of pUC::ciaR 1: digested by *EcoR* I and *Bam*H I; 2: digested by *Bam*H I and *Pst* I; 3: digested by *Pst* I and *Hind* III; 4: digested by *EcoR* I and *Pst* I; 5: digested by *Bam*H I and *Hind* III; 6: digested by *EcoR* I and *Hind* III

PCR 能扩增出 2.1kp 的片段;而在 05ZYH33 中,用以上引物进行 PCR 都应得到阴性结果,而用引物 IN-F/IN-R 能扩增出 440bp 的目的片段,结果如图 3 所示。

2.2.3 敲除突变株 Δ *ciaR* 的 Southern 杂交鉴定
使用 *ciaR* 基因中间片段所标记的探针,理论上可以与 05ZYH33 基因组杂交出 4 982bp 的 *Hind* III 单酶切片段,与双向同源重组的 Δ *ciaR* 应没有杂交条带,与 LA 或 RA 单交换的突变体应杂交出 4 980bp 或 4 373bp 的条带。结果与预期大小相符,如图 4 所示。

2.3 生物学功能研究

2.3.1 37℃和 40℃生长实验 测取 Δ *ciaR* 在 37℃(正常生长温度)及 40℃(偏高温度)生长情况。结果如图 5 所示,不论在 37℃还是在 40℃,敲除株 Δ *ciaR* 均比野生株 05ZYH33 生长明显缓慢,且生长能力减弱。



图3 Δ *ciaR* 的组合 PCR 验证

Fig. 3 Multiple-PCR analysis of Δ *ciaR* and 05ZYH33

Genomic DNA from the following strains were used as templates: wild type strain 05ZYH33 (lane 1, 3, 5, 7, 9 and 11); Δ *ciaR* (lane 2, 4, 6, 8, 10, and 12); The primer combinations used in PCR are as following: multiple PCR detection primers for *S. suis* 2 (lane 1 and 2); IN-F/IN-R (lane 3 and 4); SPC-F/SPC-R (lane 5 and 6); OUT-F/SPC-R (lane 7 and 8); SPC-F/OUT-R (lane 9 and 10); OUT-F/OUT-R (lane 11 and 12). The 1 kb DNA ladder marker is shown to the right (M).

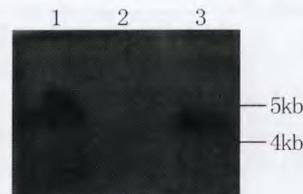


图4 Δ *ciaR* 的 Southern 杂交分析

Fig. 4 Southern hybridization analysis of Δ *ciaR*

Southern hybridization analysis of the *ciaR* region of wild type strain 05ZYH33 (lane 1), Δ *ciaR* (lane 2), and a RA single cross-over mutant with pUC::ciaR integrated into the chromosome of 05ZYH33 (lane 3).

2.3.2 过氧化氢敏感实验 结果如图 6 所示,发现敲除株 Δ *ciaR* 对于强氧化剂很敏感,存活率明显低于野生株 05ZYH33。

2.3.3 不同 pH 值 THB 中的生长实验 将活化的敲除株和野生株分别转接于不同 pH 值的 THB(约 10^7 CFU/mL)中振荡培养,结果除 pH5.0,其余 pH 条件下所测得两者 OD₆₀₀ 值差别均与正常状态下敲除株与野生株生长差别相似(数据未列);故取相同数量的敲除株和野生株(约 10^7 CFU/mL)分别转接于 pH5.0 的 THB 中再次培养,选取 6h、8h、12h、24h 后取样,结果如图 7 所示。虽然之前生长曲线结果显示敲除株的生长能力弱于野生株,但 12h 后两者均进入生长静止期,仍发现敲除株的 OD₆₀₀ 值只有野生株的 1/2,这个差别明显的大于正常生长条件下敲除株与野生株的差别,而且随着时间的推移,敲除株自动死亡率增加,相比之下野生株的 OD₆₀₀ 值并无明显变化。

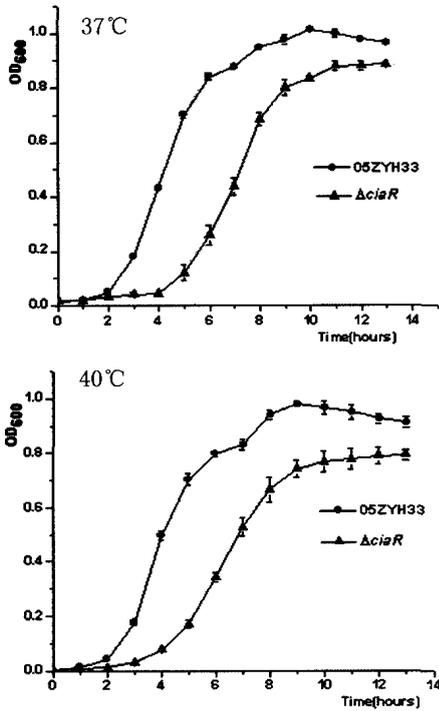


图5 Δ *ciaR* 37°C 及 40°C 生长曲线
Fig. 5 Growth curves of Δ *ciaR* at 37°C and 40°C

A total of 10^6 CFU/mL of each strain was used to inoculate THB broth prewarmed at the indicated temperatures, and samples were withdrawn at 1-h intervals to measure the OD₆₀₀ values.

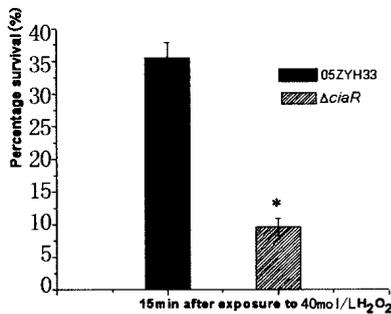


图6 过氧化氢敏感试验
Fig. 6 H₂O₂ sensitivity assay for 05ZYH33 and Δ *ciaR*

H₂O₂ (40mmol/L) was added to 1-mL aliquots of culture (OD₆₀₀ > 0.4). Viable counts were performed on THB plates before and after the addition of peroxide, and the survival rates were calculated. Values are expressed as the means plus SEM of the experiment. *, P < 0.05 for lower survival rate of Δ *ciaR* than that of the wild type 05ZYH33.

2.4 小鼠感染实验 感染后 16h 观察敲除组和野生组的小鼠各发生 9 只死亡, 20h 后全部死亡; 阴性对照组观察一周, 生存良好。说明敲除株 Δ *ciaR* 与野生株 05ZYH33 对 BALB/c 小鼠毒力无差异。

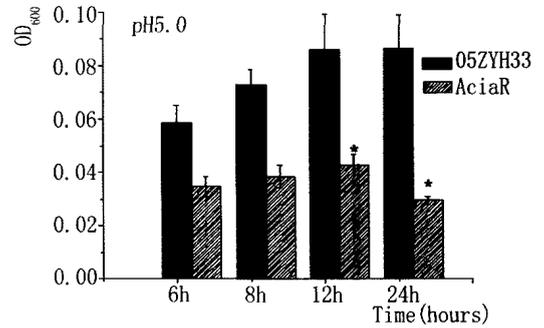


图7 pH5.0 生长实验
Fig. 7 Growth at pH5.0 of 05ZYH33 and Δ *ciaR*

Both of the mutant and wild type (about 10^7 CFU/mL) were incubation in the THB broth adjusted to pH5.0, and samples were withdrawn to measure the OD₆₀₀ values. Data presented are means \pm standard deviations (error bars) from two independent experiments. *, P < 0.05; Student's *t* test.

3 讨论

细菌的致病过程是细菌与宿主相互作用的复杂过程, 需要许多毒力基因的协调作用。在此过程中, 致病菌依靠复杂而精密的信号系统感受、传导和响应外界环境的变化, 进而调节相应的基因表达模式作出适应性反应^[8]。大量研究表明, 二元信号转导系统是普遍存在于细菌中的一种跨膜信号转导机制, 它所操纵的信号转导包括病原菌对宿主的识别和侵袭、致病或共生; 以及病原菌对环境的代谢性适应, 如碳源、氮源、磷源和电荷携带的变化, 渗透压的改变, 趋化性、应急性诱导分化等^[9]。毫无疑问, 猪链球菌在感染宿主的过程中, 必然会因体内外环境的变化调节多种毒力因子的表达, 而在这个过程中 TCSTS 发挥着重要的调控作用以完成其致病过程。

CiaRH 是在肺炎链球菌中第一个被发现的 TCSTS^[10], 通过介导一系列的抑制环境压力引起的细胞壁肽聚糖的分解, 并协助调节磷壁酸的合成, 对维持细胞壁完整性具有重要作用, 从而可以阻止许多环境下(高温、氧化压力、渗透压力、pH 值变化、抗生素作用等)细菌的溶解^[11-12]; 并在感染小鼠实验中证实是一种重要的毒力调节因子, 与细菌在小鼠肺部和大鼠的鼻咽部定植相关^[13-14]。也有研究发现 CiaRH 在细菌形成感受态的过程中被激活, 而感受态本身对细菌是一个暂时性的环境压力, 需要依赖包括 CiaRH 在内的多种调控元件来避免感受态引起的细菌溶解, 并且帮助细菌正常度过感受态阶段^[6]。

为了研究该 TCSTS 在 *S. suis* 2 型致病中所发挥的作用, 本课题成功构建了 05ZYH33 的 *ciaR* 基

因敲除突变株,并证明删除了 *ciaR* 基因,会引起细菌生长繁殖能力减弱,耐酸能力下降,耐氧化应激能力下降,但对小鼠的毒力却无明显变化。分析 CiaR 进化树表明,与变形链球菌亲缘关系最近,其次是无乳链球菌和肺炎链球菌。推测 CiaRH 在 *S. suis* 2 型中可能表现出类似变形链球菌中调控细菌的生长、分化及凋亡的作用;并且通过调控 *htrA* 基因的表达维持高温环境及氧化应激状态下细菌的正常生长^[14-15]。而实验中 Δ *ciaR* 所表现出的耐酸能力明显下降,推测可能如在肺炎链球菌中报道的是由于删除 *ciaR* 基因使细菌部分丧失了对不依赖 ComE 的信号通路的保护而引起酸性压力下诱导其溶解^[16],具体机制仍需进一步探讨。

本课题基于同源重组原理构建了 05ZYH33 *ciaR* 基因敲除突变株,为研究 CiaRH 在 *S. suis* 2 型菌株中的调控机制迈出了第一步,在此基础上我们将进一步通过研究 CiaR 结合 DNA 的序列,分析发现其调控的具体基因,以便能较全面的诠释该调控系统的生物学功能。

参考文献:

- [1] Staats JJ, Feder I, Okwumabua O, et al. *Streptococcus suis*: past and present[J]. Vet Res Commun, 1997, 21: 381-407.
- [2] Gottschalk M, Segura M. The pathogenesis of the meningitis caused by *Streptococcus suis*: the unresolved questions[J]. Vet Microbiol, 2000, 76: 259-272.
- [3] Tang J, Wang C, Feng Y, et al. Streptococcal toxic shock syndrome caused by *Streptococcus suis* serotype 2[J]. PLoS Med, 2006, 3: e151.
- [4] 李明, 胡福泉, 唐家琪. 二元信号转导系统与细菌的致病性[J]. 微生物学杂志, 2007, 27(1): 50-54.
- [5] Chen C, Tang J, Dong W, et al. A Glimpse of Streptococcal Toxic Shock Syndrome from Comparative Genomics of *S. suis* 2 Chinese Isolates[J]. PLoS ONE, 2007, 2: e315.
- [6] Dagkessamanskaia A, Moscoso M, Henard V, et al. Interconnection of competence, stress and CiaR regulons in *Streptococcus pneumoniae*: competence triggers stationary phase autolysis of *ciaR* mutant cells[J]. Mol Microbiol, 2004, 51(4): 1071-1086.
- [7] Takamatsu D, Osaki M, Sekizaki T. Construction and characterization of *Streptococcus suis*-*Escherichia coli* shuttle cloning vectors[J]. Plasmid, 2001, 45: 101-113.
- [8] Cotter PA, DiRita VJ. Bacterial virulence gene regulation: an evolutionary perspective[J]. Annu Rev Microbiol, 2000, 54: 519-565.
- [9] Appleby J L, Parkinson J S, Bourret R B. Signal transduction via the multi-step phosphorelay: not necessarily a road less traveled[J]. Cell, 1996, 86(6): 845-848.
- [10] Guenzi E, Gasc AM, Sicard MA, et al. A two-component signal-transducing system is involved in competence and penicillin susceptibility in laboratory mutants of *Streptococcus pneumoniae*[J]. Mol Microbiol, 1994, 12(3): 505-515.
- [11] Thorsten M, Manuel H, Dorothea Z, et al. The CiaRH System of *Streptococcus pneumoniae* prevents lysis during stress induced by treatment with cell wall inhibitors and by mutations in *pbp2x* involved in lactam resistance[J]. J Bacteriol, 2006, Mar, p. 1959-1968.
- [12] Yasser Musa Ibrahim. Role of HtrA in the Virulence and Competence of *Streptococcus pneumoniae* [J]. Infect Immun, 2004, June p. 3584-3591.
- [13] Marra A, J Asundi, M Bartilson, et al. Differential fluorescence induction analysis of *Streptococcus pneumoniae* identifies genes involved in pathogenesis [J]. Infect Immun, 2002, 70: 1422-1433.
- [14] Sebert M E, Palmer L M, Rosenberg M, et al. Microarray-based identification of *htrA*, a *Streptococcus pneumoniae* gene that is regulated by the CiaRH two-component system and contributes to nasopharyngeal colonization [J]. Infect Immun, 2002, 70: 4059-4067.
- [15] Sang-Joon A, Zezhang T, Robert A. Multilevel control of competence development and stress tolerance in *Streptococcus mutans* UA159[J]. Infect Immun Mar, 2006; 1631-1642.
- [16] Pi as GE, Cortes PR, Orio AG, et al. Acidic stress induces autolysis by a CSP-independent ComE pathway in *Streptococcus pneumoniae* [J]. Microbiology, 2008, 154: 1300-8.

收稿日期: 2008-10-06; 修回日期: 2008-12-18