

DOI:10.13350/j.cjpb.220706

• 论著 •

2型猪链球菌酪氨酸激酶 Cps2C 基因过表达株的构建*

王悄悄^{1,2}, 郑峰¹, 刘旭苗^{1,2}, 林苗^{1,2}, 倪华³, 王怡雯¹, 曹祥荣², 汪春晖^{1**}, 潘秀珍^{1,2**}

(1. 东部战区疾病预防控制中心, 江苏南京 210002; 2. 南京师范大学 生命科学学院;
3. 新疆帕米尔高原生物资源与生态重点实验室, 喀什大学生命与地理科学学院)

【摘要】 **目的** 构建 2 型猪链球菌酪氨酸激酶 Cps2C 基因过表达株, 为 cps2C 基因功能研究提供实验材料。 **方法** 使用重叠延伸 PCR 技术将延伸因子 TufA(又名 EF-Tu, 编码基因为 SSU05_0530)的启动子(命名为 P0530)与 cps2C 基因连接为 P0530cps2C 片段, 将 P0530cps2C 酶切后连接至猪链球菌-大肠埃希菌穿梭质粒 pSET2, 构建过表达质粒 pSET2::P0530cps2C。将 pSET2::P0530cps2C 电转化导入 S. suis 2 野生毒株 05ZYH33 感受态细胞, 抗性及组合 PCR 筛选得到 cps2C 过表达株。qRT-PCR 检测过表达株 cps2C 基因的转录水平。 **结果** 重叠延伸 PCR 成功将 P0530 启动子片段(300 bp)和 cps2C 基因片段(696 bp)拼接为 P0530cps2C (996 bp), 片段及载体经 BamH I 和 EcoR I 酶切后连接, 成功构建出过表达质粒 pSET2::P0530cps2C; 将 pSET2::P0530cps2C 电转化导入 S. suis 2 05ZYH33 感受态细胞, 抗性筛选及组合 PCR 检测结果显示 cps2C 过表达株构建成功。提取野生株 05ZYH33 和 cps2C 过表达株总 RNA 后进行 qRT-PCR 实验, 结果显示过表达株 cps2C 基因的相对表达水平较 05ZYH33 株上调 2.4 倍。 **结论** 本研究选用 S. suis 2 05ZYH33 的延伸因子 TufA 强启动子 P0530 作为启动子, 成功构建过表达质粒 pSET2::P0530cps2C 并导入 S. suis 2 感受态细胞, 成功获得 cps2C 过表达株, 为进一步研究酪氨酸激酶 Cps2C 功能提供实验材料。

【关键词】 2 型猪链球菌; 酪氨酸激酶 Cps2C; 过表达株

【中图分类号】 R378.12

【文献标识码】 A

【文章编号】 1673-5234(2022)07-0770-04***

[Journal of Pathogen Biology. 2022 Jul. ;17(7):770-773,778.]

Construction of Tyrosine Kinase Cps2C Overexpression Strain in Streptococcus suis serotype 2

WANG Qiao-qiao^{1,2}, ZHENG Feng¹, LIU Xu-miao^{1,2}, LIN miao^{1,2}, Ni Hua³, WANG Yi-wen¹, CAO Xiang-rong², WANG Chun-hui¹, PAN Xiu-zhen^{1,2} (1. Hua Dong Research Institute for Medicine and Biotechnics, Nanjing 210002, China; 2. College of Life Sciences, Nanjing Normal University; 3. Key Laboratory of Biological Resources and Ecology of Pamirs Plateau in Xinjiang Uygur Autonomous Region, College of Life and Geographic Sciences, Kashi University)

【Abstract】 **Objective** To construct type 2 *Streptococcus suis* tyrosine kinase Cps2C gene overexpression strain and provide experimental materials for the study of Cps2C gene function. **Methods** The promoter of TufA (also known as EF-TU, encoded by SSU05_0530, named P0530) was connected with cps2C gene as P0530cps2C fragment by overlapping stretch PCR. P0530cps2C was digested by enzyme and ligated to shuttle plasmid pSET2 to construct overexpression plasmid pSET2::P0530cps2C. PSET2::P0530cps2C was electrically transformed into S. suis 2 05ZYH33 strain receptor cells, and cps2C overexpressed strain was screened by resistance and combined PCR. The transcription level of cps2C gene was detected by qRT-PCR. **Results** The p0530 promoter fragment (300 bp) and cps2C gene fragment (696 bp) were successfully spliced into p0530cps2C (996 bp) by overlapping extended PCR. The fragment and vector were digested by BamH I and EcoR I and ligated to construct the overexpressed plasmid pSET2::p0530cps2C. The pSET2::P0530cps2C was electrically transformed into S. suis 2 05ZYH33 cells, and the results of resistance screening and combined PCR showed that cps2C overexpressed strain was successfully constructed. Total RNA was extracted from wild strain 05ZYH33 and cps2C overexpressed strain, respectively. qRT-PCR results showed that the relative expression level of cps2C gene in overexpressed strain was 2.4 times higher than that of 05ZYH33. **Conclusion** In this study, the TufA promoter P0530 of S. suis 2 05ZYH33 was selected as the strong promoter, and the overexpression plasmid pSET2::P0530cps2C was successfully constructed and cps2C overexpression strain was successfully obtained. It provides good material support for further study of cps2C gene function.

【Key words】 *Streptococcus suis* serotype 2; BY-kinases Cps2C; overexpression strain

* **【基金项目】** 国家自然科学基金项目(No. 82072256, 81571965); 江苏省自然科学基金项目(No. BK20201129, BK20151091)。

** **【通讯作者】** 潘秀珍, E-mail: panxiuzhen_2004@163.com; 汪春晖, E-mail: 13912966353@139.com

【作者简介】 王悄悄(1994-), 女, 江苏徐州人, 硕士研究生。主要研究方向: 猪链球菌致病机制。E-mail: 1004153507@qq.com
王悄悄和郑峰同为第一作者。

2型猪链球菌(*Streptococcus suis* serotype 2, *S. suis* 2)是重要的人兽共患病病原菌,荚膜多糖(Capsular Polysaccharide, CPS)是 *S. suis* 2 的重要毒力因子^[1]。*cps* 基因簇与 CPS 合成密切相关,该基因簇包含 *cps2A-cps2K* 等众多基因,编码糖基转移酶、CPS 聚合酶及 CPS 合成调控相关蛋白^[2]。前期研究发现细菌酪氨酸激酶编码基因 *cps2C* 缺失后,细菌典型荚膜结构缺失、链长变短、对小鼠致病性显著减弱。表明酪氨酸激酶 Cps2C 参与细菌荚膜合成调控,但该基因过表达对荚膜多糖合成是否具有正向激活作用尚不清楚。本研究拟构建酪氨酸激酶 Cps2C 基因过表达株,为进一步研究 Cps2C 功能奠定基础。

有效驱动蛋白表达的内源强启动子是重要的遗传操作工具。Wu 等^[3]报道,在实验室培养条件下转录延伸因子 TufA(又名 EF-Tu)是猪链球菌中表达量最高的蛋白之一。刘冉等^[4]从 *S. suis* 2 05ZYH33 株的 3 种不同菌体组分中筛选了 5 个高丰度蛋白,分别是分泌蛋白(SSU05_1815 和 SSU05_0177)、胞壁蛋白(SSU05_1868)、胞内蛋白(SSU05_1503 和 SSU05_0530),其中 SSU05_0530 正是转录延伸因子 TufA。本实验选用 *S. suis* 2 05ZYH33 株 TufA 蛋白的启动子 P0530,使用重叠延伸 PCR 和电转化技术构建 *cps2C* 基因过表达株,为 *cps2C* 基因功能研究奠定基础。

材料与方法

1 材料

1.1 菌株和质粒 *S. suis* 2 中国强毒株 05ZYH33 分离自 2005 年四川资阳中毒性休克病人^[5],实验室保存;MC1061F-感受态细胞购自上海唯地生物技术有限公司;pSET2 质粒由 Daisuke Takamatsu 教授惠赠^[6]。

1.2 主要试剂与仪器 高保真酶 PrimeSTAR Max Premix,PCR 产物回收试剂盒, *Bam* H I, *Eco* R I, T4 DNA ligase,质粒抽提试剂盒, RNAiso Plus 及 Prime-Script RT Master Mix 购自日本 Takara 公司;氯霉素购自上海生工公司。

2 方法

2.1 引物设计与合成 分析 *S. suis* 2 05ZYH33 菌株的全基因组注释,发现酪氨酸激酶基因 *cps2C* 编号为 SSU05_0566,转录延伸因子基因 TufA 编号为 SSU05_0530。根据重叠延伸 PCR 原理设计引物 P0530-F/P0530-R (*cps2C*) 和 *cps2C*-F (P0530)/*cps2C*-R,使扩增后 *cps2C* 基因可与 TufA 基因启动子 P0530 无缝连接。另外,在 *cps2C* 基因上下游设计引物 L-F 和 R-R,在猪链球菌-大肠埃希菌穿梭质粒

pSET2 多克隆位点上下游设计引物 pSET2-F/pSET2-R,用以验证 05ZYH33 和 *cps2C* 基因过表达株。引物序列见表 1,由苏州金唯智公司合成。

表 1 PCR 引物
Table 1 Primers used in this study

引物 Primer	序列 Sequence(5'-3') ^a
P0530-F	CGGGATCCGCTTGTGACTACCAGCTGT (<i>Bam</i> H I)
P0530-R(<i>cps2C</i>)	GCAATTTCTAACATCGCCATCACTTAATTATAC CATAGAG
<i>cps2C</i> -F(P0530)	CTCTATGGTATAATTAAGTGATGGCGATGTTA GAAATTGC
<i>cps2C</i> -R	CGGAATTCTTATGTTATCTGAGAAATTAGG (<i>Eco</i> R I)
pSET2-F	GCAAGCGATTAAGTTGG
pSET2-R	TGGAATTGTGAGCGGATAA
L-F	AGTGATTGCTGCCTTGAT
R-R	TTGAAAGTGCAGAAATTATCTC

^a单下划线为限制性酶切位点,双下划线为引物结合位点(The restriction sites are single-underlined and the primer binding sites are double-underlined).

2.2 过表达质粒 pSET2::*P0530cps2C* 的构建 以 05ZYH33 基因组 DNA 为模板,以 P0530-F/P0530-R (*cps2C*)和 *cps2C*-F(P0530)/*cps2C*-R 为引物,参照说明书使用高保真酶 PrimeSTAR Max Premix PCR 扩增 P0530 启动子和 *cps2C* 基因,经 1%琼脂糖凝胶电泳检测后回收 P0530 和 *cps2C* 基因片段,混合后作模板和引物,再加入 PrimeSTAR Max Premix,进行重叠延伸 PCR 以特异性扩增 P0530*cps2C* (P0530 和 *cps2C* 的连接产物,命名为 P0530*cps2C*)。反应结束后向上述体系中加入 P0530-F/*cps2C*-R 继续扩增 30 个循环,电泳检测后回收 P0530*cps2C* 片段。重叠延伸 PCR 示意图见图 1。用 *Bam* H I/*Eco* R I 双酶切 P0530*cps2C* 及 pSET2 质粒,回收 P0530*cps2C* 片段及 pSET2 线性载体,在 T4 DNA Ligase 作用下连接,连接产物转化 MC1061F-感受态细胞,转化菌涂布于含 Cm^R 抗性的 LB 平板进行培养。

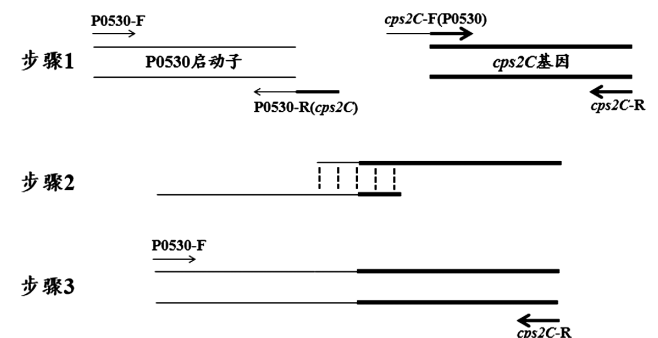


图 1 重叠延伸 PCR 示意图

Fig. 1 Schematic diagram of overlap extension PCR

2.3 过表达质粒 pSET2::*P0530cps2C* PCR 鉴定 挑取单菌落培养,以 pSET2-F/R 为引物 PCR 筛选阳

性转化子。提取质粒交由苏州金唯智公司测序,测序正确的质粒命名为 pSET2::P0530*cps2C*。

2.4 *S. suis* 2 05ZYH33 电转化感受态细胞的制备 于 1 mL THB 培养基中(含 10% FBS)过夜培养 05ZYH33 甘油菌,次日将活化的 05ZYH33 划线于哥伦比亚血平板于 37 °C 培养 48 h。挑取单菌落于 1 mL THB 培养基中(含 10% FBS)培养 12 h,取 80 μL 菌液转接于 4 mL THB 培养基(含 10% FBS)中过夜培养。次日,将上述 4 mL 培养液全部接种于 200 mL THY 培养基(不含 FBS)中,培养至 A₆₀₀ 值为 0.3-0.4 收集菌液,冰水浴 30 min,6 000 r/min(离心半径 9.8 cm),4 °C 离心 15 min,收集菌体,用 25 mL 预冷的 10% 甘油洗涤 3 次,离心速度分别为 8 000、9 000、10 000 r/min,时间均为 15 min。弃甘油,添加 200-500 μL 重悬液重悬菌体,使细胞密度为 2×10⁹ CFU/mL。将感受态细胞分装于-20 °C 预冷的 1.5 mL 离心管中,每管 50 μL,-80 °C 保存备用。

2.5 *cps2C* 过表达株的构建 取 20 ng pSET2::P0530*cps2C* 质粒加入 05ZYH33 感受态细胞中,于冰上轻轻吹吸混匀后冰浴 10 min。将上述混合物转移到预冷的电转杯中,使用 Bio-Rad 电转仪进行电转(2 150 V,200 Ω,25 μF)。电转后立即向电转杯中加入 950 μL 37 °C 预热的复苏液,吹吸 3-5 次使菌液悬浮。将菌液转移至 1.5 mL 离心管中,于 37 °C、160 r/min 摇床中振荡培养 2 h,5000 r/min 离心 5 min,弃上清 850 μL,将剩余上清与菌体吹吸混匀,涂布于含 Cm^R 和 Spc^R 抗性(100 μg/mL)的 THB 固体平板上,37 °C 培养 48 h。

2.6 *cps2C* 过表达株的组合 PCR 鉴定 在 *cps2C* 基因上、下游各设计一条引物 L-F 和 R-R,以 L-F/*cps2C*-R、*cps2C*-F/R-R 为引物 PCR 鉴定菌株本身含有的 *cps2C* 基因,以 P0530-F/*cps2C*-R、PSET2-F/R 为引物 PCR 鉴定菌株中含有已转化的 pSET2::P0530*cps2C* 质粒。

2.7 *cps2C* 过表达株的 qRT-PCR 鉴定 参照说明书使用 RNAiso Plus 产品提取 *cps2C* 过表达株的 RNA 并反转录成 cDNA,使用 Applied Biosystems QuantStudio 3 Real-time PCR System 进行 qPCR,检测细菌中 *cps2C* 的转录水平,以确认 *cps2C* 是否过表达成功。以甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase,GAPDH)基因 *gapdh* 转录水平作为内参除去实验误差,试验独立重复 3 次。每次反应均设置融解曲线分析,以证实无非特异性扩增发生。

结 果

1 过表达质粒 pSET2::P0530*cps2C* 的构建及验证

PCR 扩增 P0530 启动子(300 bp)和 *cps2C* 基因(696 bp),使用重叠延伸 PCR 技术将两片段连接为 P0530*cps2C*(996 bp),将其酶切后连接至 pSET2 质粒上构建过表达质粒 pSET2::P0530*cps2C*。结果如图 2A 和图 2B 所示,P0530、*cps2C* 和 P0530*cps2C* 扩增片段与预期大小一致,P0530 启动子与 *cps2C* 基因连接成功。使用 pSET2-F/R 引物对 pSET2::P0530*cps2C* 阳性转化子进行验证,扩增片段与预期大小(1 161 bp)一致(图 2C),pSET2::P0530*cps2C* 构建正确。

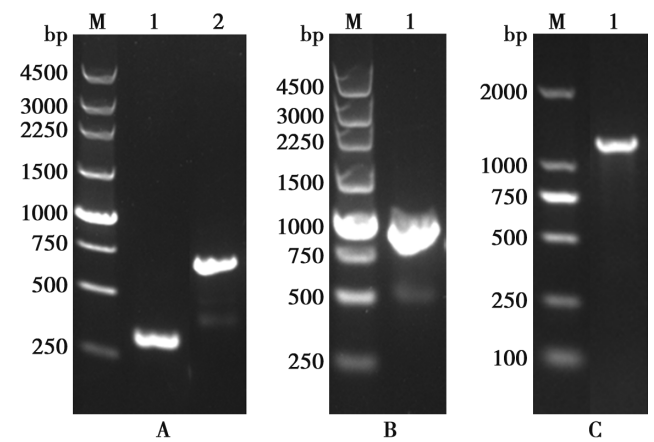


图 2 pSET2::P0530*cps2C* 的构建及验证
A P0530 和 *cps2C* 的 PCR 扩增 M DNA 标志物 1 P0530 PCR 产物 2 *cps2C* PCR 产物 B P0530*cps2C* 的重叠延伸 PCR 扩增 M DNA 标志物 1 P0530-F/*cps2C*-R 引物扩增结果 C pSET2::P0530*cps2C* 的 PCR 验证 M DNA 标志物 1 pSET2-F/R 引物扩增结果

图 2 pSET2::P0530*cps2C* 的构建及验证

A PCR amplification of P0530 and *cps2C* M DNA maker 1 P0530 2 *cps2C* B Overlap extension PCR amplification of P0530*cps2C* M DNA maker 1 P0530-F/*cps2C*-R C PCR verification of pSET2::P0530*cps2C* plasmid M DNA maker 1 pSET2-F/R

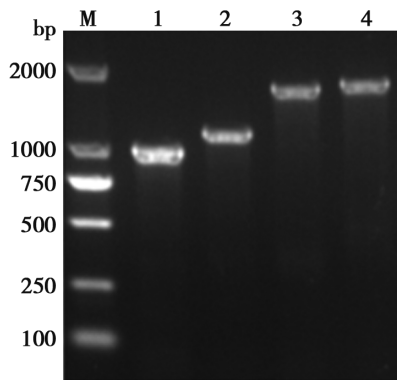
Fig. 2 Construction and identification of pSET2::P0530*cps2C* plasmid

2 *cps2C* 过表达株的组合 PCR 验证

将 pSET2::P0530*cps2C* 过表达质粒电转化 *S. suis* 2 05ZYH33 感受态细胞,涂布于含 Spc^R 抗性的 THB 固体平板进行培养,分别使用 P0530-F/*cps2C*-R (996 bp)、pSET2-F/R (1 161 bp)、L-F/*cps2C*-R (1 719 bp)和 *cps2C*-F/R-R (1 766 bp)引物对单菌落进行 PCR 鉴定,结果如图 3。扩增片段大小与理论值一致,表明 pSET2::P0530*cps2C* 已导入 *S. suis* 2 05ZYH33 株中。

3 *cps2C* 过表达株的 qRT-PCR 验证

提取 *cps2C* 过表达株 RNA,将其反转录成 cDNA 后进行 qRT-PCR,结果如图 4。使用 2^{-ΔΔCT} 计算 *cps2C* 基因的相对表达水平,与 05ZYH33 株相比过表达株中 *cps2C* 基因的相对表达水平上调 2.4±0.66 倍。



M DNA 标志物 1 P0530-F/*cps2C*-R 引物扩增 P0530*cps2C* 产物 2 PSET2-F/R 引物扩增 P0530*cps2C* 产物 3 L-F/*cps2C*-R 引物扩增 P0530*cps2C* 产物 4 *cps2C*-F/R-R 引物扩增 P0530*cps2C* 产物

图3 *cps2C* 过表达株的组合 PCR 验证

M DNA marker 1 P0530*cps2C* amplified by P0530-F/*cps2C*-R primer 2 Fragment amplified by PSET2-F/R primer 3 Fragment amplified by L-F/*cps2C*-R primer 4 Fragment amplified by *cps2C*-F/R-R primer

Fig. 3 Combinatorial PCR verification of *cps2C* overexpression strain

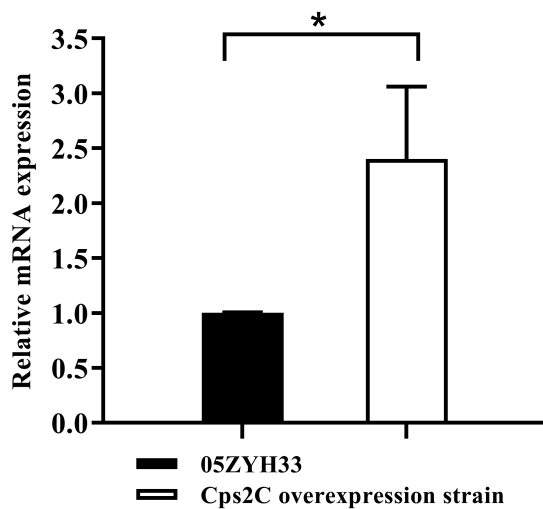


图4 *cps2C* 过表达株的 qRT-PCR 验证

Fig. 4 qRT-PCR detection of *cps2C* overexpression strain

讨论

在革兰阳性厚壁菌门中,细菌酪氨酸激酶(Bacterial protein-tyrosine kinases, BY-kinases)由跨膜激活蛋白和胞质激酶蛋白组成,只有跨膜激活蛋白的胞内尾部和胞质激酶蛋白的催化结构域之间发生相互作用时, BY-kinases 才具有完整活性^[7]。BY-kinases 在调节 CPS 生物合成中起重要作用,包括调节荚膜合成相关蛋白定位、磷酸化荚膜合成过程关键蛋白酶等。例如,在肺炎链球菌中,非磷酸化的酪氨酸激酶 CpsD 可能形成环状八聚体,跨膜激活蛋白 CpsC 的 C 末端,促进 CpsD 的 C 末端酪氨酸簇发生自磷酸化,磷酸化的 CpsD 解离成单体。CpsD 的磷酸化/去磷酸化调节环

状八聚体的解离和耦合,最终干扰染色体复制及分离,导致细胞分裂及荚膜合成异常^[8]。在金黄色葡萄球菌中,跨膜激活蛋白 Cap5A1 的 C 末端能够形成一个与酪氨酸激酶 Cap5B2 催化位点互补并稳定 ATP 分子的 α A- β A 基序,且 Cap5A1 的 C 末端 29 个氨基酸残基足以激活 Cap5B2 的激酶活性,激活的 Cap5B2 在自身酪氨酸簇上发生磷酸化并同时磷酸化参与 CPS 前体合成的 UDP-乙酰-甘露糖胺脱氢酶 Cap5O^[9]。此外,大肠埃希菌中的酪氨酸激酶 Wzc 和酪氨酸磷酸酶 Wzb 共同参与胞外多糖的合成^[10]。洋葱伯克霍尔德菌的酪氨酸激酶 BceF 有助于细菌对上皮细胞的破坏和囊性纤维化肺上皮细胞的侵袭^[11]。前期对 *S. suis* 2 *cps* 基因簇进行生物信息学分析,发现 *cps2B* 基因编码跨膜激活蛋白, *cps2C* 基因编码细菌酪氨酸激酶。进一步研究发现 Cps2B C 末端 23 个氨基酸残基可激活 Cps2C 激酶活性,融合表达蛋白 Cps2BctC 是自磷酸化激酶,不仅可磷酸化自身酪氨酸残基位点,还可磷酸化丝氨酸、苏氨酸残基位点。构建 *cps2C* 基因敲除株,发现 *cps2C* 缺失导致细菌典型荚膜结构丧失、链长变短、毒力显著减弱^[12-13]。

研究病原菌某基因功能最直观的方法是对该基因体内失活或过表达,通过观察病原菌表型变化或者生理生化特性的改变分析该基因可能的功能。目前已经基于同源重组原理搭建了较为完善的 *S. suis* 2 基因敲除技术平台,通过构建基因敲除株研究了孤儿调控因子 CovR、细菌分裂蛋白 DivIVA 和组氨酸三聚体蛋白 HtpsA 等重要因子^[14-16]。但是基因敲除技术也有很大局限性,某些重要基因敲除后可能导致细菌基本生命活动受创从而形成致死性突变。由于酪氨酸激酶 Cps2C 在 *S. suis* 2 中发挥重要作用,缺失后细菌荚膜显著减少、变薄,而该 Cps2C 过表达是否对荚膜合成具有正向激活作用尚不清楚。本实验通过将 TufA 强启动子 P0530 与 *cps2C* 基因融合表达构建过表达菌株,为研究 Cps2C 基因功能奠定了基础。

本研究选用 *S. suis* 2 05ZYH33 的延伸因子 TufA 启动子 P0530 作为强启动子,成功构建了过表达质粒 pSET2::P0530*cps2C* 并导入 *S. suis* 2 感受态细胞,筛选获得 *cps2C* 过表达株。经 qRT-PCR 检测, *cps2C* 过表达株中 *cps2C* 的相对表达水平较 05ZYH33 株上调 2.4 ± 0.66 倍。本研究为进一步研究酪氨酸激酶 Cps2C 功能提供实验材料。后续将通过 Western blot 检测过表达株中 Cps2C 蛋白的表达量、分析过表达株荚膜厚度、细菌链长和毒力变化等实验,进一步研究 Cps2C 相关功能。

(下转 778 页)

- treatment. [J]. *Endocr J*, 2007, 54(3):371-378.
- [6] Caetano C, Limbo O, Farmer S, et al. Tolerance of deregulated G1/S transcription depends on critical G1/S regulon genes to prevent catastrophic genome instability[J]. *Cell Rep*, 2014, 9(6):2279-2289.
- [7] Virtudazo EV, Suganami A, Tamura Y, et al. Towards understanding cell cycle control in *Cryptococcus neoformans*: Structure function relationship of G1 and G1/S cyclins homologue CnCl1 [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2011, 416(1-2):217-221.
- [8] 赵明. MiRNA137 和 miRNA29a 在非小细胞肺癌中的表达及其临床意义[D]. 南京: 南京大学, 2012.
- [9] Shimizu T, Suzuki H, Nojima M, et al. Methylation of a panel of microRNA genes is a novel biomarker for detection of bladder cancer[J]. *Eur Urol*, 2013, 63(6):1091-1100.
- [10] Bertoli G, Cava C, Castiglioni I. MicroRNAs: new biomarkers for diagnosis, prognosis, therapy prediction and therapeutic tools for breast cancer [J]. *Theranostics*, 2015, 5(10):1122-1143.
- [11] 马大昌, 陈诚, 吴多明, 等. miR-199a-3p 在乳腺癌中的表达及其作用[J]. *中国癌症杂志*, 2016, 26(06):481-486.
- [12] 齐海亮, 宋鑫亮, 齐科雷, 等. 食管鳞癌组织中 miR-199a 的表达变化及临床意义[J]. *山东医药*, 2016, 56(38):45-47.
- [13] Novak B, Csikasz-Nagy A, Gyorfy B, et al. Mathematical model of the fission yeast cell cycle with checkpoint controls at the G1/S, G2/M and metaphase/anaphase transitions [J]. *Biophys Chem*, 1998, 72(1):185-200.
- [14] 翟健, 胡万宁, 李军, 等. P21 基因过表达对甲状腺癌细胞增殖和凋亡的影响及其作用机制[J]. *癌症进展*, 2019, 17(3):280-283.
- [15] 罗雪慧, 范余娟, 杨开选, 等. FHIT 蛋白和 p21 蛋白在外阴癌和外阴尖锐湿疣中表达的研究[J]. *广西医科大学学报*, 2010, 27(1):29-31.
- [16] Baddour N, Farrag E, Zeid A, et al. Decreased apoptosis in advanced stage /high-grade hepatocellular carcinoma complicating chronic hepatitis C is mediated through the downregulation of p21 ras[J]. *Chin J Cancer Res*, 2013, 25(3):281-288.
- [17] 杨娟. 卵巢上皮癌中 HDAC2、p21、p53 的相关性[J]. *世界最新医学信息文摘*, 2019, 19(2):34-35.
- [18] Oncel S, Cosgul T, Calli A, et al. Evaluation of P53, P63, P21, P27, Ki-67 in paranasal sinus squamous cell carcinoma and inverted papilloma [J]. *Indian J Otolaryngol Head Neck Surg*, 2011, 63(2):172-127.
- [19] Grapsa D, Dokou A, Tsokanou-Kouli VA, et al. Immunohistochemical expression of p53, p63, c-myc, p21 (WAF1/cip1) and p27 (kiP1) proteins in urothelial bladder carcinoma: correlation with clinicopathological parameters [J]. *J BUON*, 2014, 19(4):1121-1124.
- [20] 宋文庆, 黄婷婷, 俞岚, 等. 子宫颈鳞状细胞癌中 Δ Np63 α 、DPC4/Smad4 和 P21 的表达及其临床意义[J]. *南方医科大学学报*, 2018, 38(7):850-855.

【收稿日期】 2022-04-13 【修回日期】 2022-06-22

(上接 773 页)

【参考文献】

- [1] Dutkiewicz J, Zajac V, Sroka J, et al. *Streptococcus suis*: a re-emerging pathogen associated with occupational exposure to pigs or pork products. Part I - Epidemiology [J]. *Ann Agric Environ Med*, 2018, 25(1):186-203.
- [2] Van Calsteren MR, Gagnon F, Lacouture S, et al. Structure determination of *Streptococcus suis* serotype 2 capsular polysaccharide [J]. *Biochem Cell Biol*, 2010, 88(3):513-525.
- [3] Wu Z, Wu C, Shao J, et al. The *Streptococcus suis* transcriptional landscape reveals adaptation mechanisms in pig blood and cerebrospinal fluid [J]. *RNA*, 2014, 20(6):882-898.
- [4] 刘冉, 黄萌萌, 陈平, 等. 猪链球菌 2 型 05ZYH33 菌株启动子的筛选和鉴定 [J]. *中国预防兽医学报*, 2019, 41(6):584-589.
- [5] Chen C, Tang J, Wei D, et al. A glimpse of streptococcal toxic shock syndrome from comparative genomics of *S. suis* 2 Chinese isolates [J]. *Plos One*, 2007, 2(3):e315.
- [6] Takamatsu D, Osaki M, Sekizaki T. Construction and characterization of *Streptococcus suis*-*Escherichia coli* shuttle cloning vectors [J]. *Plasmid*, 2001, 45(2):101-113.
- [7] Grangeasse C, Terreux R, Nessler S. Bacterial tyrosine-kinases: Structure-function analysis and therapeutic potential [J]. *Biochimica Et Biophysica Acta-Proteins and Proteomics*, 2010, 1804(3):628-634.
- [8] Nourikyan J, Kjos M, Mercy C, et al. Autophosphorylation of the bacterial tyrosine-kinase CpsD connects capsule synthesis with the cell cycle in *Streptococcus pneumoniae* [J]. *Plos Genetics*, 2015, 11(9):e1005518.
- [9] Olivares-Illana V, Meyer P, Bechet E, et al. Structural basis for the regulation mechanism of the tyrosine kinase CapB from *Staphylococcus aureus* [J]. *Plos Biology*, 2008, 6(6):1321-1331.
- [10] Wugeditsch T, Paiment A, Hocking J, et al. Phosphorylation of Wzc, a tyrosine autokinase, is essential for assembly of group 1 capsular polysaccharides in *Escherichia coli* [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2001, 276(4):2361-2371.
- [11] Ferreira AS, Silva IN, Fernandes F, et al. The tyrosine kinase beef and the phosphotyrosine phosphatase BeeD of *Burkholderia contaminans* are required for efficient invasion and epithelial disruption of a cystic fibrosis lung epithelial cell line [J]. *Infect Immun*, 2015, 83(2):812-821.
- [12] 吴倩倩. 猪链球菌酪氨酸磷酸化系统相关蛋白的制备及功能研究 [D]. 温州: 温州医科大学, 2018:15-45.
- [13] 王悄悄. 2 型猪链球菌酪氨酸磷酸酶基因 *cps2C* 对荚膜合成及细菌毒力的调控研究 [D]. 南京: 南京师范大学, 2021:25-33.
- [14] Pan X, Ge J, Li M, et al. The orphan response regulator CovR: a globally negative modulator of virulence in *Streptococcus suis* serotype 2 [J]. *J Bacteriol*, 2009, 191(8):2601-2612.
- [15] Ni H, Fan W, Li C, et al. *Streptococcus suis* DivIVA protein is a substrate of Ser/Thr kinase stk and involved in cell division regulation [J]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2018(8):85.
- [16] Ni H, Li M, Wang Q, et al. Inactivation of the *htpsA* gene affects capsule development and pathogenicity of *Streptococcus suis* [J]. *Virulence*, 2020, 11(1):927-940.

【收稿日期】 2022-03-10 【修回日期】 2022-05-26