

# 罗非鱼无乳链球菌 $\Delta essA$ 、 $\Delta essB$ 、 $\Delta essC$ 敲除菌株的构建及其特性分析

马艳平, 郝乐, 冯国清, 梁志凌, 马江耀, 柯浩, 刘振兴

广东省农业科学院动物卫生研究所/广东省畜禽疫病防治重点实验室/农业农村部兽药与诊断技术广东科学观测实验站, 广东广州 510640

**摘要:** VII型分泌系统存在于无乳链球菌 (*Streptococcus agalactiae*) 中, 其组成膜蛋白对底物蛋白的分泌转运至关重要。为此利用热敏型自杀质粒, 构建了含氯霉素筛选标签的膜蛋白重组敲除载体 pSET4s- $\Delta essA$ 、pSET4s- $\Delta essB$ 、pSET4s- $\Delta essC$ , 经同源重组后, 利用PCR技术筛选到了其缺失突变株-无乳链球菌 $\Delta essA$ 、 $\Delta essB$ 、 $\Delta essC$ 。通过菌株生长曲线分析,  $\Delta essA$ 、 $\Delta essB$ 、 $\Delta essC$ 敲除株均较野生株 (WT) 生长过程变慢, 其中 $\Delta essA$ 、 $\Delta essB$ 敲除株在生长早期有显著性差异 ( $P<0.01$ )。对ESAT6蛋白分泌影响分析显示, 与WT株相比,  $\Delta essA$ 、 $\Delta essB$ 、 $\Delta essC$ 敲除株ESAT6的表达量均显著下调 ( $P<0.01$ )。结果显示,  $\Delta essA$ 、 $\Delta essB$ 、 $\Delta essC$ 敲除株均较WT株毒力显著降低 ( $P<0.01$ )。研究表明, *essA*、*essB*、*essC*为无乳链球菌VII型分泌系统重要的膜蛋白, 其基因缺失造成了分泌蛋白ESAT6 mRNA表达水平下降, 影响了菌株毒力。

**关键词:** 罗非鱼; 无乳链球菌; VII型分泌系统膜蛋白; 敲除菌株构建; 生物学特性分析

中图分类号: S 943.116.2

文献标志码: A

开放科学 (资源服务) 标识码 (OSID):



## Construction and characterization research of *essA*, *essB* and *essC*-deleted mutants in *Streptococcus agalactiae* from tilapia

MA Yanping, HAO Le, FENG Guoqing, LIANG Zhiling, MA Jiangyao, KE Hao, LIU Zhenxing

Institute of Animal Health, Guangdong Academy of Agricultural Sciences/Key Laboratory of Livestock Disease Prevention of Guangdong Province/Scientific Observation and Experiment Station of Veterinary Drugs and Diagnostic Techniques of Guangdong Province, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Guangzhou 510640, China

**Abstract:** The membrane proteins are critical to substrate protein secretion in VII secretion system existing in *Streptococcus agalactiae*. In this study, we constructed the membrane proteins knockout vectors with chloramphenicol tag including pSET4s- $\Delta essA$ , pSET4s- $\Delta essB$  and pSET4s- $\Delta essC$ , and after the homologous recombination, we screened the mutant *S. agalactiae*  $\Delta essA$ ,  $\Delta essB$  and  $\Delta essC$  via PCR assays. Based on the growth curve analysis, *S. agalactiae*  $\Delta essA$ ,  $\Delta essB$  and  $\Delta essC$  strains showed significantly slower growth process than the wild type strain (WT).  $\Delta essA$  and  $\Delta essB$  strains had significant difference in early stage of growth compared with WT strain ( $P<0.01$ ). According to the secretion product analysis of ESAT6 protein, *S. agalactiae*  $\Delta essA$ ,  $\Delta essB$  and  $\Delta essC$  strains showed significantly lower ESAT6 product than WT ( $P<0.01$ ). According to challenge test analysis, the deletion of *essA*, *essB* or *essC* gene significantly reduced virulence of *S. agalactiae*  $\Delta essA$ ,  $\Delta essB$  and  $\Delta essC$  compared with WT ( $P<0.01$ ). The results suggest that *essA*, *essB* and *essC* proteins are important component membrane proteins of VII secretion

收稿日期: 2021-08-26; 修回日期: 2021-12-14

基金项目: 广东省自然科学基金项目 (2021A1515010498); 广东省农业科学院水产研究中心课题 (XT202232); 佛山市财政专项资金—2021年度共建广东农业科技示范市项目

作者简介: 马艳平 (1984—), 女, 副研究员, 博士, 从事水产病害与防控研究。E-mail: mayanping@gdaas.cn

通信作者: 刘振兴 (1981—), 男, 副研究员, 博士, 从事水产病害与防控研究。E-mail: liuzhenxing@gdaas.cn

system in *S. agalactiae*, and these genes deletions cause ESAT6 mRNA expression and virulence decline.

**Keywords:** *Oreochromis sp.*; *Streptococcus agalactiae*; Membrane proteins of VII secretion system; Knockout strains construction; Biological characteristic analysis

无乳链球菌 (*Streptococcus agalactiae*) 属于 B 族链球菌 (GBS), 宿主范围广泛, 能感染人类、哺乳动物、爬行动物和鱼类等, 对全球公共卫生和人体健康造成了严重的安全隐患<sup>[1-2]</sup>。中国是罗非鱼 (*Oreochromis sp.*) 养殖大国, 也是链球菌病高流行地区, 其发病率和死亡率居高不下, 居罗非鱼传染病之首, 因抗生素滥用或过量添加, 造成耐药率也越来越高<sup>[3-5]</sup>。

近年来研究发现, 在放线杆菌门和厚壁菌门等革兰氏阳性细菌中存在一种新型分泌系统, 即 VII 型分泌系统 (Type 7 secretion system, T7SS)<sup>[6-8]</sup>。VII 型分泌系统由多种组分构成, 分泌早期分泌性抗原靶 6 (Early secretory antigenic target 6, ESAT6) 和培养滤液蛋白 10 (Culture filtrate protein 10, CFP10) 两种免疫原性胞外蛋白。VII 型分泌系统具有改变细胞信号转导、促进细菌从巨噬细胞吞噬体逃逸、抑制吞噬体溶酶体融合、影响细胞凋亡及裂解细胞等生物学功能, 与致病性密切相关<sup>[9-10]</sup>。分枝杆菌 VII 型分泌系统与菌株毒力密切相关, 正是由于 ESAT6 蛋白的缺失, 才使得牛型结核菌毒力缺失, 成为卡介苗。目前为止, 众多研究聚焦结核分枝杆菌 (*Mycobacterium tuberculosis*) VII 型分泌系统, ESAT-6 基因的缺失会导致结核分枝杆菌丧失分泌其他 ESX-1 分泌蛋白的能力, 甚至丧失结核分枝杆菌致病性<sup>[9]</sup>。金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) 缺失 ESAT6 和 CFP-10 编码基因, 造成金黄色葡萄球菌毒力下降, 影响了该菌的持续感染<sup>[11]</sup>。

无乳链球菌研究显示, ESAT6 蛋白以同源二聚体形式发挥作用<sup>[12-13]</sup>。VII 型分泌系统单个基因各自编码具有特定功能的蛋白质, 决定着 ESAT6/CFP10 及其毒力蛋白分泌转运, 并与细菌的毒力和致病机制存在重要联系<sup>[8,14-17]</sup>, 因此对 VII 型分泌系统的研究有助于了解无乳链球菌毒力蛋白分泌机制, 有助于阐明无乳链球菌的生存、增殖和扩散的分子基础, 更可为寻找抗无乳链球菌基因蛋白药物的作用靶点提供关键性线索, 进而为从根本上控制无乳链球菌病提供可能性。前期研究对无乳链球菌的基因组检索发现了与 VII 型/ESAT-6 分泌系统同源性较高的基因簇, 由 11 个基因组成的基因簇构

成 (*esaABCDEF*、*essABC*、*esxAB*)<sup>[18-20]</sup>。分子生物学显示 *essA*、*essB*、*essC* 基因编码膜蛋白, 但是其功能研究还未见文献报道。

笔者课题组前期扩增到了罗非鱼无乳链球菌 *essA*、*essB*、*essC* 全长基因, 生物信息学分析显示 *essA*、*essB* 基因编码膜蛋白, *essC* 基因编码蛋白含有典型的 FtsL-Spo III E 结构, 前期研究重组表达了 *essA*、*essB*、*essC* 蛋白, 免疫罗非鱼后, 对无乳链球菌的相对免疫保护率分别为 82.57%、85.29%、91.60%, 是良好的免疫原性蛋白<sup>[21]</sup>。在此基础上, 本研究以罗非鱼源无乳链球菌致病株 GDZX1 为研究对象, 利用热敏性自杀载体 pSET4S 构建基因缺失突变株  $\Delta essA$ 、 $\Delta essB$ 、 $\Delta essC$ , 并对其生物学特性进行分析, 以揭示无乳链球菌 *essA*、*essB*、*essC* 对 ESAT6 蛋白 mRNA 表达水平、对菌株致病性的影响, 以为无乳链球菌 VII 型分泌系统编码基因功能研究提供理论数据。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌株与试验用鱼

野生型无乳链球菌强毒力菌株 GDZX1 (Wild type, Serotype Ia), 由广东省农业科学院动物卫生研究所水产病害研究室分离并保存。温敏型自杀质粒 pSET4S 和 pSET5S 由日本国立动物卫生研究所 Daisuke Takamatsu 博士惠赠。试验用罗非鱼购自广东省罗非鱼良种场, 体质量约为 10 g, 实验前在室内玻璃缸暂养 2 周, 随机抽检 5 尾, 做病原分离试验, 确保试验用鱼不携带无乳链球菌病原。随机分为 13 组 (12 个攻毒组和 1 个对照组)。保持溶解氧  $>5.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ , 每天换水, 保持水质良好。试验前每天饱饲 2 次。

### 1.2 引物设计与合成

运用 Oligo 7.0 和 Primer 6.0 软件设计引物, 试验用引物序列见表 1, 由北京擎科生物科技有限公司合成。

### 1.3 基因敲除用重组载体的构建

#### 1.3.1 *essA* 基因敲除重组载体的构建

以提取的无乳链球菌 GDZX1 基因组 DNA 为模板, *essA*up-FBamHI/*essA*up-R 引物对扩增 *essA*

表1 试验用引物  
Table 1 Primers in this study

引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequence 5'-3'
重组质粒构建用引物 Primers for recombinant plasmid construction	
<i>essAup</i> -FBamHI	5'-GCGGATCCGCCGTAGGCACAGTAGCGACT-3' <i>Bam</i> HI
<i>essAup</i> -R	5'-GAGTGAGACTTTAGATTGACGG-3'
<i>essA</i> down-F	5'-ACGTTGAGCCTCGGAACCCATCGAATTAGAATACACATATTAACATTACT-3'
<i>essA</i> down-REcoRI	5'-GCGAATTCGATAGAGCGTGCCTTCTGTCTG-3' <i>Eco</i> RI
<i>essBup</i> -FBamHI	5'-GCGGATCCGGACCAGATTTTTGGCAGTTATC-3' <i>Bam</i> HI
<i>essBup</i> -R	5'-CAGCCTGAATAGTTTCTGCATGAT-3'
<i>essB</i> down-F	5'-GACGTTGAGCCTCGGAACCCATCGAATTATAAAGTTGATTATAATCAAGTGA-3'
<i>essB</i> down-REcoRI	5'-GCGAATTCAGAAGATGTACTTGTGTAGTAC-3' <i>Eco</i> RI
<i>essCup</i> -FSalI	5'-GCGTCGACAAACGGCAAGTCGCCAATACCAG-3' <i>Sal</i> I
<i>essCup</i> -R	5'-TGCTGACTCCAATCATCACTAG-3'
<i>essC</i> down-F	5'-GACGTTGAGCCTCGGAACCCATCGAATTACAGGAAATGGCTGATACTTATCAC-3'
<i>essC</i> down-REcoRI	5'-GCGAATTCCTTAACCTTTTCATCAGTTACAAT-3' <i>Eco</i> RI
<i>Cat(essA)</i> -F	5'-ATGAAAACCGTCAATCTAAAGTCTCACTCCACCGAACTAGAGCTTGATG-3'
<i>Cat(essB)</i> -F	5'-TATCATGCAGAACTATTCAGGCTGCACCGAACTAGAGCTTGATGAAAA-3'
<i>Cat(essC)</i> -F	5'-CCTCCTCTAGTGATGATTGGAGTCAGCACACCGAACTAGAGCTTGATGAA-3'
<i>Cat</i> -R	5'-TAATTCGATGGGTTCCGAGGCTC-3'
基因缺失突变株筛选所用引物 Primers for gene deletion mutant strains screening	
<i>essA</i> 验证-F	5'-GCCGTAGGCACAGTAGCGACTG-3'
<i>essA</i> 验证-R	5'-ACATTCAAGGCTAATCGTAA-3'
<i>essB</i> 验证-F	5'-TGGAAACAGATTCGTTTGTA-3'
<i>essB</i> 验证-R	5'-TACCTACTTTTAGTTTTAG-3'
<i>essC</i> 验证-F	5'-CGTCCTCGTGGTATCTATATC-3'
<i>essC</i> 验证-R	5'-CAATATCATCCTGACCACGTAAG-3'
<i>essA</i> -F	5'-ATGAAGTTGAAACGATTTTTAG-3'
<i>essA</i> -R	5'-TTAATATGTGTATTCATCCT-3'
<i>essB</i> -F	5'-TGGAAACAGATTCGTTTGTA-3'
<i>essB</i> -R	5'-TACCTACTTTTAGTTTTAGA-3'
<i>essC</i> -F	5'-TCGTGGTATCTATATCATTGCAAC-3'
<i>essC</i> -R	5'-GATAAACAATATCATCCTGACCAC-3'
Real-time PCR所用引物 Primers for real-time PCR	
ESAT6-F	5'-ATACTGCTGGTTCTCAACAA-3'
ESAT6-R	5'-GTCAATAACTGCTTGCTCTT-3'
16S-rRNA-F	5'-CGACGATACATAGCCGACC-3'
16S-rRNA-R	5'-CCGTCACCTGGTAGATTTTCC-3'

注：下划线为限制性内切酶位点。

Note: The underlined are restriction endonuclease sites.

基因上游同源臂, *essA*down-F/*essA*down-REcoRI 引物对扩增 *essA* 基因下游同源臂, 反应程序为 98 °C 预变性 5 min; 98 °C 10 s, 58 °C 10 s, 72 °C 15 s, 35 个循环; 72 °C 延伸 5 min。以 pSET5S 质粒为模板, *Cat* (*essA*)-F/*Cat*-R 引物对扩增氯霉素表达框 (*Cat*), 反应程序为: 98 °C 预变性 5 min; 98 °C 10 s, 56 °C 10 s, 72 °C 30 s, 35 个循环; 72 °C 延伸 5 min。

PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳, 将扩增的片段切胶纯化, 等体积 (8  $\mu$ L) 混合, 进行第 1 轮融合 PCR 扩增, 反应程序为: 98 °C 预变性 5 min; 98 °C 15 s, 62 °C 15 s, 72 °C 90 s, 16 个循环; 72 °C 延伸 5 min。然后以第 1 轮融合后的 PCR 产物为模板, 以 *essA*up-FBamHI/*essA*down-REcoRI 为正、反向引物, 进行第 2 轮融合 PCR 扩增, 反应程序为 98 °C 预变性 5 min; 98 °C 15 s, 62 °C 15 s, 72 °C 90 s, 35 个循环; 72 °C 延伸 5 min, PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳分析。

符合预期的片段切胶纯化, BamHI 和 EcoRI 双酶切, 与同样双酶切后的线性化载体 pSET4s 连接, 连接产物转化至大肠杆菌 DH5 $\alpha$  感受态细胞, 然后将培养物涂布在含有氯霉素 (25  $\mu$ g·mL<sup>-1</sup>) 和壮观霉素 (50  $\mu$ g·mL<sup>-1</sup>) 的 LB 固体平板上, 37 °C 倒置培养过夜, 挑取单克隆, 利用 *essA*up-FBamHI/*essA*down-REcoRI 引物对进行 PCR 鉴定, 反应程序为 98 °C 预变性 5 min; 98 °C 15 s, 60 °C 15 s, 72 °C 90 s, 35 个循环; 72 °C 延伸 5 min, PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳分析, 鉴定后的阳性质粒送北京擎科生物科技有限公司测序。

### 1.3.2 *essB* 基因敲除重组载体的构建

以提取的无乳链球菌 GDZX1 基因组 DNA 为模板, *essB*up-FBamHI/*essB*up-R 引物对扩增 *essB* 基因上游同源臂, *essB*down-F/*essB*down-REcoRI 引物对扩增 *essB* 基因下游同源臂, 反应程序为: 98 °C 预变性 5 min; 98 °C 10 s, 58 °C 10 s, 72 °C 15 s, 35 个循环; 72 °C 延伸 5 min。按 1.3.1 *Cat* 扩增程序, *Cat* (*essB*)-F/*Cat*-R 扩增 *Cat* 表达框。按 1.3.1 融合 PCR 程序, 进行第 1 轮融合 PCR 扩增, 以 *essB*up-FBamHI/*essB*down-REcoRI 为正、反向引物, 进行第 2 轮融合 PCR 扩增, PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳分析。并按 1.3.1 重组载体构建步骤, 构建并鉴定重组质粒。

### 1.3.3 *essC* 基因敲除重组载体的构建

以提取的无乳链球菌 GDZX1 基因组 DNA 为模板, *essC*up-FSalI/*essC*up-R 引物对扩增 *essC* 基因上游同源臂, *essC*down-F/*essC*down-REcoRI 引物对扩增 *essC* 基因下游同源臂, 反应程序为 98 °C 预变性 5 min; 98 °C 10 s, 56 °C 10 s, 72 °C 30 s, 35 个循环; 72 °C 延伸 5 min。按 1.3.1 *Cat* 扩增程序, *Cat* (*essC*)-F/*Cat*-R 扩增 *Cat* 表达框。PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳, 将扩增的片段切胶纯化, 等体积 (8  $\mu$ L) 混合, 进行第 1 轮融合 PCR 扩增。反应程序为 98 °C 预变性 5 min; 98 °C 15 s, 48 °C 15 s, 72 °C 90 s, 16 个循环; 72 °C 延伸 5 min。然后以第 1 轮融合 PCR 产物为模板, 以 *essC*up-FSalI/*essC*down-REcoRI 为正、反向引物, 进行第 2 轮融合 PCR 扩增, 反应程序为 98 °C 预变性 5 min; 98 °C 15 s, 60 °C 15 s, 72 °C 90 s, 35 个循环; 72 °C 延伸 5 min, PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳分析。并按 1.3.1 重组载体构建步骤, 构建并鉴定重组质粒。

### 1.4 基因缺失突变株的构建

参照 Takamatsu 等<sup>[22]</sup>的方法, 制备 GDZX1 株电转化感受态细胞。分别取 5  $\mu$ L pSET4S- $\Delta essA$ 、pSET4S- $\Delta essB$ 、pSET4S- $\Delta essC$  阳性质粒分别加入到 100  $\mu$ L GDZX1 电转化感受态细胞中, 轻微混匀后将混合物加入 0.2 cm 电转杯内, 冰浴 10 min, 在 2.25 kV·cm<sup>-1</sup>, 200  $\Omega$ 、25  $\mu$ F 电转参数下电击, 迅速加入 1 mL SOC 培养基, 30 °C, 160 rpm 振荡摇动 3~4 h; 随后将 300  $\mu$ L 菌液涂布于 THB Spc<sup>+</sup> Cm<sup>+</sup> 平板, 在 30 °C 培养箱内培养 48 h。挑取小菌落至 Cm<sup>+</sup> THB 培养基上, 30 °C 培养 6~7 h, 转 37 °C 培养 24 h。转移菌落分别至 Cm<sup>+</sup> 抗性和 Spc<sup>+</sup> 抗性的 THB 培养基中, 继续培养。其中在 Cm<sup>+</sup> 抗性培养基能生长、但在 Spc<sup>+</sup> 抗性培养基不能生长的为疑似阳性菌落, 继续稳定传代, PCR 鉴定并测序, 菌株保种至 -80 °C 冰箱。

### 1.5 基因缺失突变株 $\Delta essA$ 、 $\Delta essB$ 、 $\Delta essC$ 特性分析

#### 1.5.1 生长曲线分析

划线接种 -80 °C 冻存的无乳链球菌野生株 (WT)、 $\Delta essA$ 、 $\Delta essB$ 、 $\Delta essC$  株至 THB 固体培养基, 30 °C 培养 24 h。挑取单菌落至 5 mL THB 液体培养基, 30 °C 振荡 24 h。测定各菌株光密度 (OD<sub>600</sub>), 调整各菌株 OD<sub>600</sub> 均为 1.80, 然后以体积比 1 : 100 接种至 100 mL THB 液体培养基, 30 °C 振

摇,每隔2 h取样2 mL,测定 $OD_{600}$ ,SPSS软件进行统计学分析。

### 1.5.2 基因缺失对ESAT6蛋白表达量的研究

1) ESAT6基因qPCR检测方法的建立:利用Primer 6.0软件,设计ESAT6 qPCR检测引物,引物序列见表1。依实验室前期构建的ESAT6-pMD18T载体为模板,测定质粒浓度,10倍梯度稀释7个梯度。分别以原液、 $10^{-1}$ 、 $10^{-2}$ 、 $10^{-3}$ 、 $10^{-4}$ 、 $10^{-5}$ 、 $10^{-6}$ 稀释质粒为模板,利用Vazyme AceQ qPCR SYBR Green Master Mix试剂盒,配制20  $\mu$ L qPCR反应体系,其中 $2 \times$  AceQ qPCR SYBR Green Master Mix 10  $\mu$ L,上游引物( $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 1  $\mu$ L,下游引物( $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 1  $\mu$ L,模板2  $\mu$ L,ddH<sub>2</sub>O 6  $\mu$ L。按95  $^{\circ}\text{C}$  5 min; 95  $^{\circ}\text{C}$  10 s, 55  $^{\circ}\text{C}$  10 s, 72  $^{\circ}\text{C}$  20 s, 40个循环进行qPCR反应; 95  $^{\circ}\text{C}$  15 s, 60  $^{\circ}\text{C}$  60 s, 95  $^{\circ}\text{C}$  15 s进行熔解曲线采集。

2)  $\Delta$ essA、 $\Delta$ essB、 $\Delta$ essC敲除对ESAT6蛋白mRNA表达水平影响分析:划线接种无乳链球菌WT株、 $\Delta$ essA株、 $\Delta$ essB株、 $\Delta$ essC株至THB固体培养基,30  $^{\circ}\text{C}$ 培养24 h。挑取单菌落至5 mL THB培养基,30  $^{\circ}\text{C}$ 振摇24 h,调整 $OD_{600}=1.80$ 后,按1:100接种至100 mL THB液体培养基,30  $^{\circ}\text{C}$ 振摇,分别于4、8、12和24 h取样5 mL,利用OMEGA RNA提取试剂盒,提取细菌RNA,并反转录成cDNA,稀释10倍,以无乳链球菌16SrRNA基因为内参基因<sup>[23]</sup>,按95  $^{\circ}\text{C}$  5 min; 95  $^{\circ}\text{C}$  10 s, 55  $^{\circ}\text{C}$  10 s, 72  $^{\circ}\text{C}$  20 s采集荧光,40个循环进行qPCR反应; 95  $^{\circ}\text{C}$  15 s, 60  $^{\circ}\text{C}$  60 s, 95  $^{\circ}\text{C}$  15 s进行熔解曲线的采集。以WT株为对照, $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 方法计算敲除株ESAT6 mRNA相对表达量,并利用SPSS软件进行统计学分析。

### 1.5.3 毒力试验

取-80  $^{\circ}\text{C}$ 冻存的无乳链球菌WT株、 $\Delta$ essA、 $\Delta$ essB、 $\Delta$ essC菌株,划线接种THB固体培养基,30  $^{\circ}\text{C}$ 培养24 h,挑取单菌落,接种THB液体培养基,30  $^{\circ}\text{C}$ 培养24 h后,适度稀释,取100  $\mu$ L涂布在THB平板上,30  $^{\circ}\text{C}$ 培养24 h,计数。4株菌株均稀释至 $5 \times 10^8$ 、 $5 \times 10^7$ 、 $5 \times 10^6$  CFU $\cdot$ mL<sup>-1</sup> 3个剂量,0.1 mL $\cdot$ 尾<sup>-1</sup>腹腔注射健康罗非鱼各20尾,对照组设置20尾,注射等量PBS溶液。试验鱼放置于40 cm $\times$ 30 cm $\times$ 40 cm的水族箱,连续充气,水温维持在27~30  $^{\circ}\text{C}$ ,每天观察死亡情况并记录,死亡罗非鱼剖解,重新划线接种分离病原菌。利用

GraphPad Prism软件绘制生存率曲线,并进行显著性分析。

## 2 结果

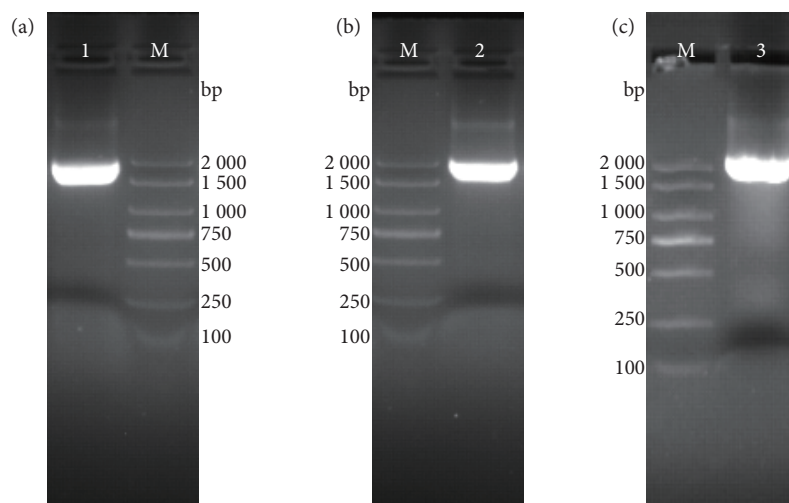
### 2.1 敲除载体的构建

以野生型菌株GDZX1基因组DNA为模板,采用表1引物序列,获得essA基因上游435 bp同源臂序列,下游502 bp同源臂序列;获得essB基因上游508 bp同源臂序列,下游508 bp同源臂序列;获得essC基因上游632 bp同源臂序列,下游571 bp同源臂序列。以pSET5S质粒为模板,采用表1引物序列,获得氯霉素表达框1056 bp片段。essAup片段、cat(essA)、essAdown片段,经融合PCR,获得1993 bp的融合片段(图1-a); essBup片段、cat(essB)、essBdown片段,经融合PCR,获得2072 bp的融合片段(图1-b); essCup片段、cat(essC)、essCdown片段,经融合PCR,获得2259 bp的融合片段(图1-c)。

以此为基础,将目的片段与酶切后的pSET4S质粒连接,转化E. coli DH5 $\alpha$ 菌株,37  $^{\circ}\text{C}$ 培养过夜,挑取单克隆菌株,进行PCR鉴定,并测序验证,获得基因敲除载体,分别命名为pSET4S- $\Delta$ essA质粒、pSET4S- $\Delta$ essB质粒、pSET4S- $\Delta$ essC质粒。

### 2.2 敲除菌株 $\Delta$ essA、 $\Delta$ essB、 $\Delta$ essC的筛选与鉴定

将2.1获得的pSET4S- $\Delta$ essA质粒、pSET4S- $\Delta$ essB质粒、pSET4S- $\Delta$ essC质粒电转化入野生型无乳链球菌电转化感受态中,30  $^{\circ}\text{C}$ 培养48 h,使质粒与野生型菌株发生同源重组,挑取对氯霉素具有抗性的单克隆菌株至cm<sup>+</sup> THB液体培养基中,30  $^{\circ}\text{C}$ 培养6 h,转至37  $^{\circ}\text{C}$ 继续培养12 h,以此传代培养,对第9代菌株筛选到的对氯霉素具抗性的菌株,提取细菌基因组DNA,分别利用essA验证引物、essB验证引物、essC验证引物进行PCR鉴定,结果见图2。利用essA验证引物,WT株扩增到479 bp的目的片段,而疑似essA敲除株扩增到1311 bp的目的片段,符合预期,对所获目的片段进行测序验证,essA基因插入了cat基因序列,证明敲除成功,敲除株命名无乳链球菌 $\Delta$ essA(图2-a);利用essB验证引物,WT株扩增到740 bp的目的片段,而疑似essB敲除株扩增到1702 bp的目的片段,符合预期,对所获目的片段进行测序验证,essB基因插入了cat基因序列,证明敲除成功,敲除株命名为无乳链球菌 $\Delta$ essB(图2-b);利

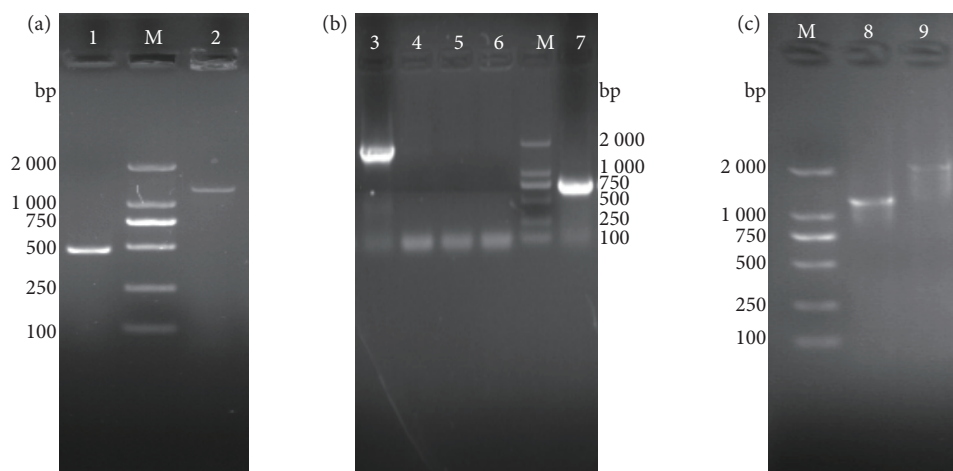


M. DNA Marker 2000; 1. *essA* 同源臂融合 PCR 结果; 2. *essB* 同源臂融合 PCR 结果; 3. *essC* 同源臂融合 PCR 结果。

1. Overlap extension PCR result of *essA* homologous arms; 2. Overlap extension PCR result of *essB* homologous arms; 3. Overlap extension PCR result of *essC* homologous arms.

图1 *essA*、*essB*、*essC*同源臂融合PCR结果

Fig. 1 Overlap extension PCR results of *essA*, *essB*, *essC* homologous arms



1. WT 株 (*essA* 验证-F/R); 2.  $\Delta essA$  株 (*essA* 验证-F/R); 3. WT 株 (*essB* 验证-F/R); 4.  $\Delta essB$  株 (*essB* 验证-F/R); 8. WT 株 (*essC* 验证-F/R); 9.  $\Delta essC$  株 (*essC* 验证-F/R)。

1. Wild type strain (*essA* test-F/R); 2.  $\Delta essA$  strain (*essA* test-F/R); 3.  $\Delta essB$  strain (*essB* test-F/R); 4. Wild type strain (*essB* test-F/R); 8. Wild type strain (*essC* test-F/R); 9.  $\Delta essC$  strain (*essC* test-F/R)。

图2 敲除株 $\Delta essA$ 、 $\Delta essB$ 、 $\Delta essC$  DNA水平PCR鉴定结果

Fig. 2 PCR identification results of  $\Delta essA$ ,  $\Delta essB$ ,  $\Delta essC$  knockout strains at DNA level

用 *essC* 验证引物, WT 株扩增到 1263 bp 的目的片段, 而疑似 *essC* 敲除株扩增到 2077 bp 的目的片段, 符合预期, 对所获目的片段进行测序验证, *essC* 基因插入了 *cat* 基因序列, 证明敲除成功, 敲除株命名为无乳链球菌  $\Delta essC$  (图 2-c)。

在此基础上, 对第 9 代菌株筛选到的对氯霉素具抗性的菌株, 提取菌体 RNA, 并反转录成 cDNA, 利用 RT-PCR 技术在 RNA 水平上验证基因缺失突变株  $\Delta essA$ 、 $\Delta essB$ 、 $\Delta essC$ 。利用 *essA*-F/*essA*-R 引物对  $\Delta essA$  敲除菌株进行 mRNA 水平验证, 利用 *essB*-F/*essB*-R 引物对  $\Delta essB$  敲除菌株

进行 mRNA 水平验证, 利用 *essC*-F/*essC*-R 引物对  $\Delta essC$  敲除菌株进行 mRNA 水平验证, 结果均未扩增到目的条带, 证明缺失菌株构建成功 (图 3)。

### 2.3 生长曲线分析

通过测定不同时间菌液 OD<sub>600</sub>, 比较  $\Delta essA$ 、 $\Delta essB$ 、 $\Delta essC$  与 WT 株的生长速度差异, 结果见图 4。与 WT 株生长速率相比,  $\Delta essA$ 、 $\Delta essB$ 、 $\Delta essC$  敲除株前期生长速率明显减慢, WT 株在第 8 小时 OD<sub>600</sub> 达到 1.282, 在第 18 小时 OD<sub>600</sub> 达到 1.878; 而  $\Delta essA$ 、 $\Delta essB$  在第 8 小时 OD<sub>600</sub> 仅为 0.2, 在第 18 小时 OD<sub>600</sub> 才达到 1.4, 生长速率明

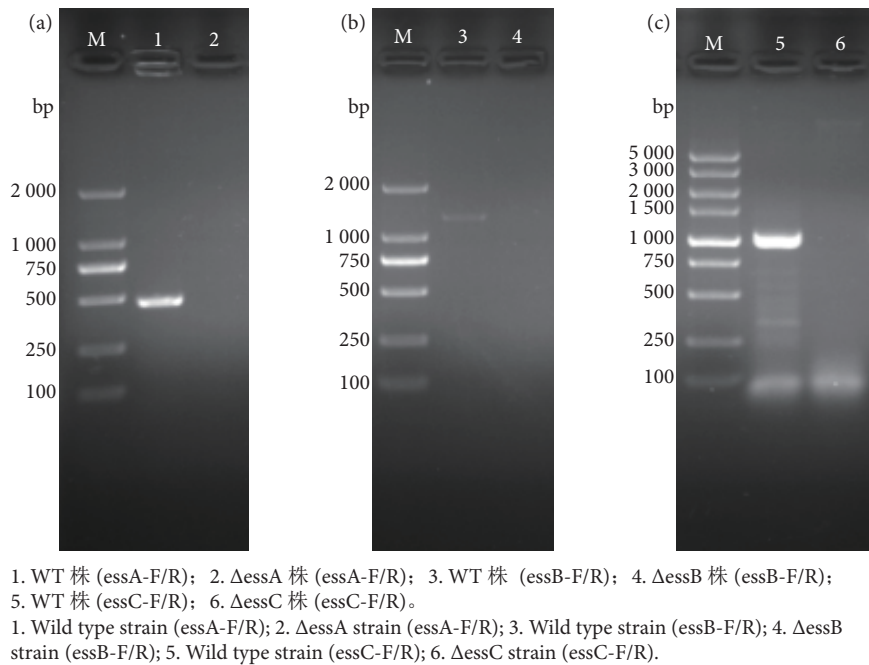


图3 敲除株 $\Delta$ essA、 $\Delta$ essB、 $\Delta$ essC RNA水平PCR鉴定结果

Fig. 3 PCR identification of  $\Delta$ essA,  $\Delta$ essB and  $\Delta$ essC knockout strains at RNA level

显减慢，经统计学分析，与 WT 株相比，0~18 h  $OD_{600}$  具有显著性差异 ( $P < 0.01$ )；而  $\Delta$ essC 株与 WT 株相比， $OD_{600}$  无显著性差异。

## 2.4 敲除株对底物蛋白 ESAT6 表达量的影响结果

### 2.4.1 ESAT6 基因 qPCR 检测方法的建立

以构建的 ESAT6-pMD18T 质粒为模板，经 10 倍梯度稀释，分别以原液、 $10^{-1}$ 、 $10^{-2}$ 、 $10^{-3}$ 、 $10^{-4}$ 、 $10^{-5}$ 、 $10^{-6}$  7 个剂量质粒为模板，配制 q-PCR 反应体系，经三步法 qPCR 扩增，得到 ESAT6 基因 qPCR 扩增曲线，扩增效率为 95.1%，符合要求 (图 5)；熔解曲线分析得出在 75 °C 左右出现单峰，证明扩增产物单一；扩增产物经琼脂糖凝胶电泳，结果得到 88 bp 的特异性条带。

### 2.4.2 敲除株对 ESAT6 蛋白 mRNA 表达水平的影响结果

以无乳链球菌 16S rRNA 基因为内参基因，在第 4、第 8、第 12 和第 24 小时，比较  $\Delta$ essA、 $\Delta$ essB、 $\Delta$ essC 敲除株与 WT 株 ESAT6 mRNA 表达水平差异，结果见图 6。第 4、第 8、第 12 小时，相较于 WT 株， $\Delta$ essA、 $\Delta$ essB、 $\Delta$ essC 敲除株 ESAT6 mRNA 表达水平均显著降低 ( $P < 0.01$ )，但在第 24 小时， $\Delta$ essA、 $\Delta$ essB、 $\Delta$ essC 敲除株 ESAT6 表达量与 WT 株无显著性差异。说明 *essA*、*essB*、*essC* 基因缺失在生长早期影响了 ESAT6 表达，导致 ESAT6 mRNA 表达水平显著性降低。

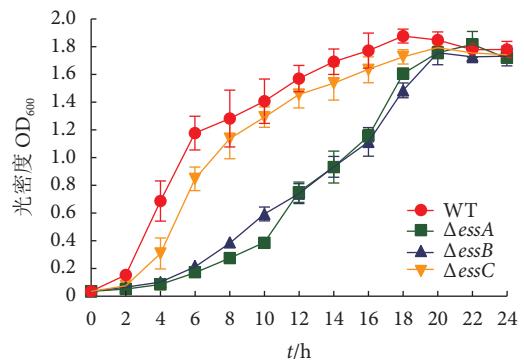


图4 敲除菌株 $\Delta$ essA、 $\Delta$ essB、 $\Delta$ essC 生长曲线测定结果

Fig. 4 Growth curve of  $\Delta$ essA,  $\Delta$ essB and  $\Delta$ essC knockout strains

## 2.5 毒力试验

$\Delta$ essA、 $\Delta$ essB、 $\Delta$ essC 敲除株与 WT 株分别稀释至  $5 \times 10^8$ 、 $5 \times 10^7$ 、 $5 \times 10^6$  CFU·mL<sup>-1</sup> 3 个剂量，分别对罗非鱼进行毒力试验，比较敲除株与 WT 株毒力差异 (图 7)。各组以  $5 \times 10^8$  CFU·mL<sup>-1</sup> 剂量 0.1 mL·尾<sup>-1</sup> 注射攻毒， $\Delta$ essA、 $\Delta$ essB、 $\Delta$ essC 敲除株累计死亡率分别为 90%、90%、70%，而 WT 株累计死亡率为 100%；各组以  $5 \times 10^7$  CFU·mL<sup>-1</sup> 剂量 0.1 mL·尾<sup>-1</sup> 注射攻毒， $\Delta$ essA、 $\Delta$ essB、 $\Delta$ essC 敲除株累计死亡率分别为 60%、90%、60%，而 WT 株累计死亡率为 100%；各组以  $5 \times 10^6$  CFU·mL<sup>-1</sup> 剂量 0.1 mL·尾<sup>-1</sup> 注射攻毒， $\Delta$ essA、 $\Delta$ essB、 $\Delta$ essC 敲除株累计死亡率分别为 50%、50%、30%，而 WT 株累计死亡率为 100%，经成活率曲线分

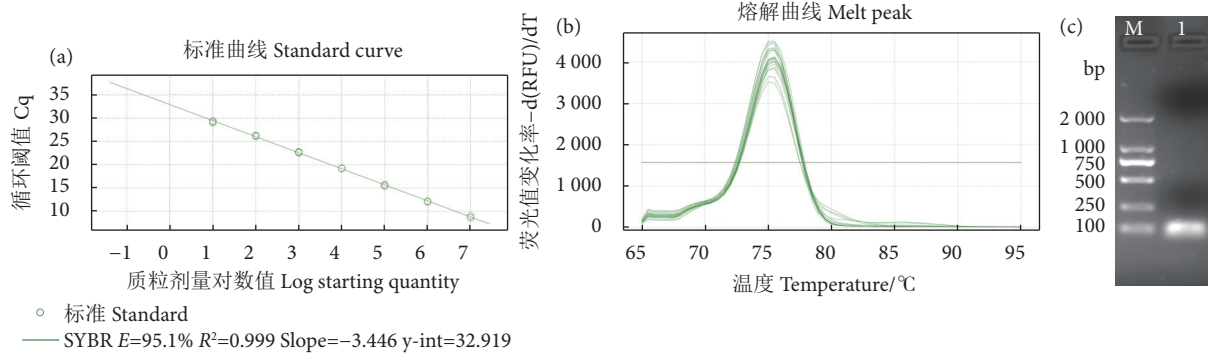


图5 ESAT6 qPCR检测方法的建立

注: a. 扩增效率分析结果; b. 熔解曲线分析结果; c. 扩增产物琼脂糖凝胶检测结果。

Fig. 5 qPCR detection method of ESAT6 gene

Note: a. Amplification efficiency analysis result; b. Melt curve analysis result; c. Amplification product detection result based on agarose gel.

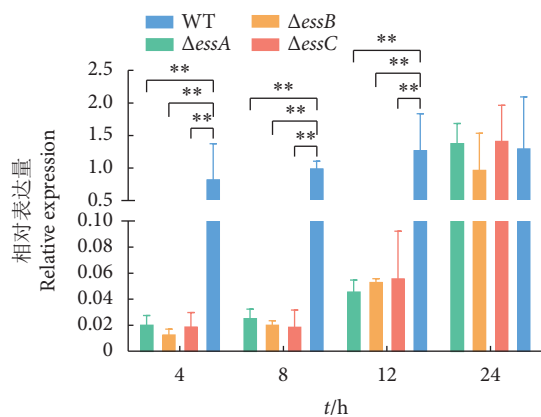


图6 敲除株 $\Delta essA$ 、 $\Delta essB$ 、 $\Delta essC$ 与野生株对底物蛋白 ESAT6表达量的影响结果

注: \*\*. 差异显著 ( $P<0.01$ )。

Fig. 6 Effect of substrate protein ESAT6 expression by knock-out strains  $\Delta essA$ ,  $\Delta essB$ ,  $\Delta essC$  and WT strain

Note: \*\*. Significant difference ( $P<0.01$ ).

析,  $5 \times 10^6$  CFU·mL<sup>-1</sup> 剂量攻毒时,  $\Delta essA$ 、 $\Delta essB$ 、 $\Delta essC$  敲除株累计死亡率均与 WT 株存在明显差异 ( $P<0.01$ )。死亡罗非鱼剖解, 可见鱼体肝脏充血、腹水、眼球突出等无乳链球菌感染典型症状 (图 8), 且从脑、肝、脾、肾组织取样, 划线接种血琼脂平板, 得到呈  $\beta$  溶血、针尖大小的灰白色小菌落, 经革兰氏染色和 PCR 鉴定, 为无乳链球菌。PBS 组在攻毒试验期内未发现死亡。随后又对回接到各个菌株, 以  $5 \times 10^8$  CFU·mL<sup>-1</sup> 剂量, 重复攻毒, 结果显示, WT、 $\Delta essA$ 、 $\Delta essB$ 、 $\Delta essC$  敲除株累计死亡率分别为 100%、90%、80%、70%, 证明回归试验成功。

### 3 讨论

VII 型分泌系统由多个膜蛋白、胞质蛋白及外分泌蛋白组成, 其分泌蛋白的稳定释放依赖于

VII 型分泌系统不同蛋白的共同作用<sup>[18,24]</sup>。对于 VII 型分泌系统的研究, 结核分枝杆菌研究最为清楚地显示出膜蛋白 Rv3871 识别分泌蛋白 ESAT-6/CFP-10 复合物, 与 CFP-10 的 C 端结合, 并与 Rv3870 在细胞内膜上相互作用形成有活性的 ATP 酶, 形成一个具有中央空洞的六环结构, 分泌蛋白通过六环分泌通道分泌出胞外。跨膜蛋白可能形成了转位通道, 促进分泌蛋白的分泌<sup>[25]</sup>。

无乳链球菌感染是危害罗非鱼养殖产业最为严重的细菌性传染病, 前期笔者课题组从患病罗非鱼中分离鉴定到一株高毒力菌株 GDZX1<sup>[26]</sup>, 对其毒力特征和致病机制的研究亟待开展。前期研究对无乳链球菌的基因组检索发现了与 VII 型/ESAT-6 分泌系统同源性较高的基因簇<sup>[11-12]</sup>, 由 11 个基因组成的基因簇构成 (esaABCDEF、essABC、esxAB)。essA、essB 蛋白均为跨膜蛋白, 可能对 VII 型分泌系统正常功能的发挥起着重要作用。essC 蛋白含有典型 FstK/SpoEIII 结构域 (FSD), 分泌蛋白的分泌需要 essC 调控的 ATP 水解作用提供能量<sup>[14]</sup>。本研究利用同源重组技术, 构建了罗非鱼无乳链球菌 *essA*、*essB*、*essC* 缺失突变株, 通过 DNA 水平和 RNA 水平鉴定, 均证明缺失突变成功。并对敲除菌株的 VII 型分泌系统可能的编码基因进行了测序分析, 均未造成 VII 型分泌系统其他基因的缺失或突变。对野生株和各基因敲除株进行了生长特性表型分析, 证明 *essA*、*essB* 基因缺失明显影响了细菌的生长, 证明 *essA* 和 *essB* 蛋白与细菌生长有关。随后对分泌蛋白 ESAT6 表达量的研究发现, *essA*、*essB*、*essC* 基因缺失均导致了分泌蛋白 ESAT6 mRNA 表达水平明显下降, 说明 *essA*、*essB*、*essC* 蛋白可以影响 ESAT6 mRNA 表达水平, 对于

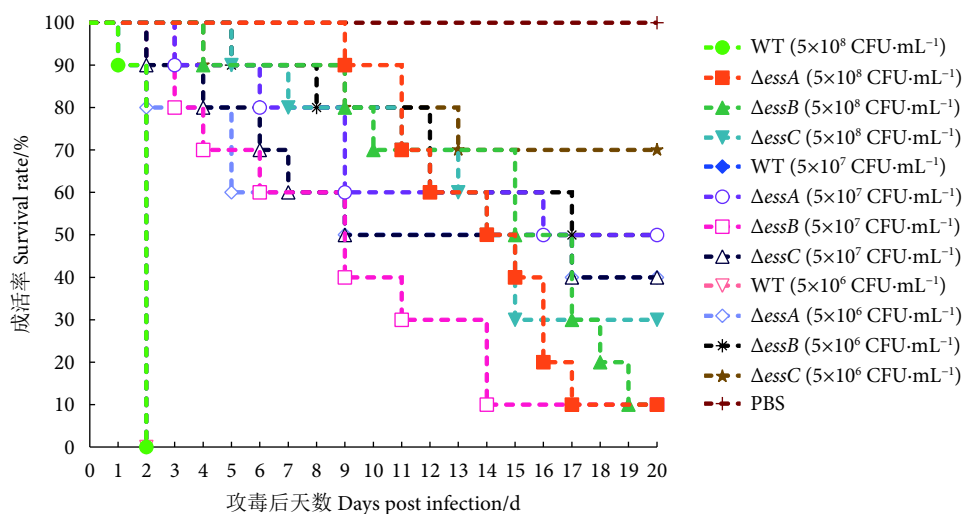


图7 敲除菌株 $\Delta essA$ 、 $\Delta essB$ 、 $\Delta essC$ 与野生株毒力试验结果

Fig. 7 Virulence test of  $\Delta essA$ ,  $\Delta essB$ ,  $\Delta essC$  knockout strains and WT strain

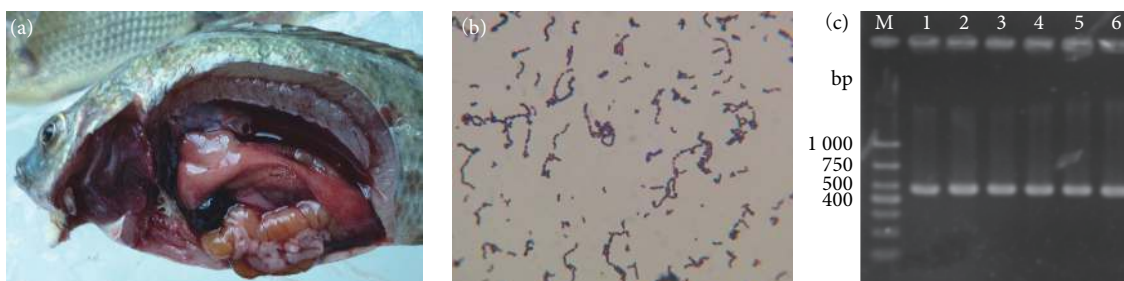


图8 攻毒死亡鱼解剖及其菌株鉴定结果

注: a. 攻毒死亡鱼解剖症状; b. 攻毒分离菌株革兰氏染色结果; c. 攻毒分离菌株 PCR 鉴定结果。

Fig. 8 Anatomical symptom result and identification of strains of infected dead tilapia

Note: a. Anatomical symptom result of infected dead tilapia; b. Gram staining result of isolated strain after infection; c. PCR identification of isolated strain after infection.

维持无乳链球菌 VII 型分泌系统的完整性起着重要作用。众多研究表明, VII 型分泌系统单个基因各自编码具有特定功能的蛋白质, 而这些基因以单个或多个形式相互作用, 使得由它们独立编码的多个蛋白质协同作用, 组成一个完整的毒力蛋白分泌系统。该分泌系统决定着 ESAT6/CFP10 及其毒力蛋白的分泌转运, 结核分枝杆菌其组分很有可能形成一个类似于细菌 I 型-VI 型分泌系统的多重跨膜结构, 酵母双杂交试验揭示, 膜蛋白 Rv3871 识别分泌蛋白 ESAT-6/CFP-10 复合物, 与 CFP-10 的 C 端结合, 并与 Rv3870 在细胞内膜上相互作用形成有活性的 ATP 酶。分子伴侣 Rv3868 与 Rv3870 和 Rv3871 相互作用促进 ESAT-6 和 CFP-10 蛋白的分泌。Rv3870/Rv3871 复合物形成具有活性的 ATP 酶, 形成一个具有中央空洞的六环结构, 底物分泌蛋白通过六环分泌通道分泌出胞外。膜蛋白 Rv3877 含有 11 个跨膜结构域, 可能形成了位于内膜上的

转位通道<sup>[23]</sup>。本研究挖掘到无乳链球菌 VII 型分泌系统重要的组成蛋白 *essA*、*essB*、*essC*, 其缺失均造成了 ESAT6 蛋白分泌障碍, 对无乳链球菌 VII 型分泌系统其他组成蛋白的挖掘, 以及组成蛋白的相互协同关系, 仍有待进一步研究。

本研究对  $\Delta essA$ 、 $\Delta essB$ 、 $\Delta essC$  敲除株和 WT 株, 选择 3 个梯度对罗非鱼进行攻毒试验, *essA*、*essB*、*essC* 基因缺失导致了无乳链球菌毒力明显下降,  $\Delta essA$ 、 $\Delta essB$ 、 $\Delta essC$  敲除株累计死亡率均与 WT 株存在明显差异 ( $P < 0.01$ ), 影响了菌株毒力, 可能与 *essA*、*essB*、*essC* 基因缺失造成的 ESAT6 分泌蛋白表达量降低有关。这与金黄色葡萄球菌的报道一致, 金黄色葡萄球菌 VII 型/ESAT6 分泌系统分泌蛋白需要 *essA*、*essB* 和 *essC* 蛋白的协同作用<sup>[11]</sup>, *essB* 蛋白全缺失导致 ESS 系统不能分泌底物蛋白<sup>[27]</sup>, 部分缺失导致 ESS 系统分泌底物蛋白表达量明显降低<sup>[28-29]</sup>, 证明 *essB* 是金黄色葡萄球菌

ESS 分泌系统的核心组件, 继而通过十二烷基麦芽糖苷萃取技术提取了金黄色葡萄球菌 essB 蛋白, 研究发现 essB 蛋白与 esaA、essA、essD 和 esxA 蛋白形成聚合体, 同时 essC 蛋白可为 ATP 水解作用提供能量, 才能使金黄色葡萄球菌 ESS 分泌功能正常发挥<sup>[15,30]</sup>, 而 esxA/ESAT6 蛋白是金黄色葡萄球菌 ESS 分泌系统的分泌蛋白, 与金黄色葡萄球菌毒力与脓肿形成密切相关<sup>[27]</sup>。蟾蜍分枝杆菌 (*Mycobacterium xenopi*) 研究也发现相似的膜蛋白, 组成 ESX-5 T7SS 分泌系统, 与毒力密切相关<sup>[31]</sup>。

本研究证明无乳链球菌 essA、essB、essC 蛋白对 ESAT6 分泌蛋白的分泌至关重要, 维持无乳链球菌 VII 型分泌系统的完整性, 可能是无乳链球菌 VII 型分泌系统的关键膜蛋白, 其缺失不仅影响了 ESAT6 蛋白的表达, 而且直接影响了菌株毒力, 是潜在的无乳链球菌毒力因子。但是这些膜蛋白是如何控制分泌蛋白分泌的, 是否存在蛋白之间的相互作用, 膜蛋白仅控制分泌蛋白分泌还是可以自身参与入侵宿主过程, 这些问题有待进一步探索研究。

#### 参考文献:

- [1] VORNHAGEN J, ADAMS WALDORF K M, RAJAGOPAL L. Perinatal group B streptococcal infections: virulence factors, immunity, and prevention strategies[J]. Trends Microbiol, 2017, 25(11): 919-931.
- [2] FURFARO L L, CHANG B J, PAYNE M S. Perinatal *Streptococcus agalactiae* epidemiology and surveillance targets[J]. Clin Microbiol Rev, 2018, 31(4): e00049-18.
- [3] 张行, 李新圃, 杨峰, 等. 无乳链球菌研究进展 [J]. 中国兽医学报, 2020, 40(4): 864-872.
- [4] 苏友禄, 刘婵, 邓益琴, 等. 罗非鱼无乳链球菌病的研究进展 [J]. 大连海洋大学学报, 2019, 34(5): 757-766.
- [5] 张德峰, 袁伟, 可小丽, 等. 中国罗非鱼主养区无乳链球菌的分子流行特征及其传播方式 [J]. 中国水产科学, 2017, 24(03): 606-614.
- [6] FAMELIS N, RIVERA-CALZADA A, DEGLIESPOSTI G, et al. Architecture of the mycobacterial type VII secretion system[J]. Nature, 2019, 576(7786): 321-325.
- [7] BOTTAI D, GRÖSCHEL M I, BROSCHE R. Type VII secretion systems in Gram-positive bacteria[J]. Curr Top Microbiol, 2017, 404: 235-265.
- [8] LAI L, DAI J, TANG H, 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]. Vet Microbiol, 2017, 205: 26-33.
- [9] TIWARI S, CASEY R, GOULDING C W, et al. Infect and inject: how *Mycobacterium tuberculosis* exploits its major virulence-associated type VII secretion system, ESX-1[J]. Microbiol Spectr, 2019, 7(3): 10.1128.
- [10] CAO Z, CASABONA M G, KNEUPER H, et al. The type VII secretion system of *Staphylococcus aureus* secretes a nuclease toxin that targets competitor bacteria[J]. Nature Microbiol, 2016, 2: 16183.
- [11] 张保海, 姚学萍, 王印, 等. 金黄色葡萄球菌 VII 型分泌系统研究进展 [J]. 中国人兽共患病学报, 2019, 35(12): 1134-1138,1143.
- [12] SHUKLA A, PALLEEN M, ANTHONY M, et al. The homodimeric GBS1074 from *Streptococcus agalactiae*[J]. Acta Crystallogr F, 2010, 66(Pt 11): 1421-1425.
- [13] SCHNEEWIND O, MISSIAKAS D M. Protein secretion and surface display in Gram-positive bacteria[J]. Philos T R SOC B, 2012, 367(1592): 1123-1139.
- [14] JÄGER F, ZOLTNER M, KNEUPER H, et al. Membrane interactions and self-association of components of the Ess/Type VII secretion system of *Staphylococcus aureus*[J]. FEBS Lett, 2016, 590(3): 349-357.
- [15] ALY K A, ANDERSON M, OHR R J, et al. Isolation of a membrane protein complex for type VII secretion in *Staphylococcus aureus*[J]. J Bacteriol, 2017, 199(23): e00482-17.
- [16] CROSSKEY T D, BECKHAM K S H, WILMANN M. The ATPases of the mycobacterial type VII secretion system: structural and mechanistic insights into secretion[J]. Prog Biophys Mol Biol, 2020, 152: 25-34.
- [17] WANG S, ZHOU K, YANG X, et al. Structural insights into substrate recognition by the type VII secretion system[J]. Protein Cell, 2020, 11(2): 124-137.
- [18] POULSEN C, PANJIKAR S, HOLTON S J, et al. WXG 100 protein superfamily consists of three subfamilies and exhibits an  $\alpha$ -helical C-terminal conserved residue pattern[J]. PLOS ONE, 2014, 9(2): e89313.
- [19] ANNÉ J, ECONOMOU A, BERNAERTS K. Protein secretion in Gram-positive bacteria: from multiple pathways to biotechnology [J]. Curr Top Microbiol, 2017, 404: 267-308.
- [20] DAS C, GHOSH T S, MANDE S S. In silico dissection of Type VII Secretion System components across bacteria: new directions towards functional characterization[J]. J Biosci, 2016, 41(1): 133-143.
- [21] MA Y P, HAO L, LIANG Z L, et al. Characterization of novel antigenic vaccine candidates for Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) against *Streptococcus agalactiae* infection[J]. Fish Shellfish Immun, 2020, 105: 405-414.
- [22] TAKAMATSU D, OSAKI M, SEKIZAKI T. Thermosensitive suicide vectors for gene replacement in *Streptococcus suis*[J]. Plasmid, 2001, 46(2): 140-148.

- [23] MA Y, HAO L, KE H, et al. *LuxS/AI-2* in *Streptococcus agalactiae* reveals a key role in acid tolerance and virulence[J]. Res Vet Sci, 2017, 115: 501-507.
- [24] SUTCLIFFE I C. New insights into the distribution of WXG100 protein secretion systems[J]. Antonie van Leeuwenhoek, 2011, 99(2): 127-131.
- [25] YANG S, LI F, JIA S, et al. Early secreted antigen ESAT6 of *Mycobacterium Tuberculosis* promotes apoptosis of macrophages via targeting the microRNA155-SOCS1 interaction[J]. Cell Physiol Biochem, 2015, 35(4): 1276-1288.
- [26] MA Y P, KE H, LIANG Z L, et al. Protective efficacy of cationic-PLGA microspheres loaded with DNA vaccine encoding the *sip* gene of *Streptococcus agalactiae* in tilapia[J]. Fish Shellfish Immunol, 2017, 66: 345-353.
- [27] BURTS M L, WILLIAMS W A, DEBORD K, et al. EsxA and EsxB are secreted by an ESAT-6-like system that is required for the pathogenesis of *Staphylococcus aureus* infections[J]. P Natl Acad Sci USA, 2005, 102(4): 1169-1174.
- [28] CHEN Y H, ANDERSON M, HENDRICKX A P, et al. Characterization of EssB, a protein required for secretion of ESAT-6 like proteins in *Staphylococcus aureus*[J]. BMC Microbiol, 2012, 12: 219.
- [29] WARNE B, HARKINS C P, HARRIS S R, et al. The Ess/Type VII secretion system of *Staphylococcus aureus* shows unexpected genetic diversity[J]. BMC Genomics, 2016, 17(3): 222.
- [30] 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.
- [31] BECKHAM K S, CICCARELLI L, BUNDUC C M, et al. Structure of the mycobacterial ESX-5 type VII secretion system membrane complex by single-particle analysis[J]. Nat Microbiol, 2017, 2: 17047.