

猪链球菌 ZKHY 株 *gdh* 基因的克隆与序列分析

刘春生¹, 王新娟¹, 徐耀辉^{2*}, 王川庆¹, 杨霞¹, 陈陆¹, 徐雪¹

(1. 河南农业大学 牧医工程学院, 河南 郑州 450002; 2. 郑州牧业工程高等专科学校, 河南 郑州 450011)

摘要: 对猪链球菌 ZKHY 株的谷氨酸脱氢酶基因(*gdh*)进行克隆和序列分析,以 ZKHY 株的基因组 DNA 为模板,采用 PCR 方法扩增出谷氨酸脱氢酶基因片段,克隆于 pMD-18T 载体,转化宿主菌 JM109 中进行序列测定。将测序结果与 GenBank 已登录序列进行核苷酸和氨基酸的同源性分析。序列分析显示,成功克隆了猪链球菌 ZKHY 株的 *gdh* 基因, ZKHY 与已报道的猪链球菌 *gdh* 基因有密切的亲缘关系,核酸序列与血清 2、7、9 型的同源性为 97.2%~98.4%,其中与 2 型菌株同源性为 97.2%~97.3%;与 7 型菌株同源性为 98.4%;与 9 型菌株同源性为 97.6%。其编码的氨基酸序列同源性则更高,与 GenBank 中已收录的序列同源性在 98.9%以上。ZKHY 株可能是属于 2、7、9 型之外的其他血清型;所克隆的基因在猪链球菌之中非常保守,可以进行表达以用作免疫学方面的相关研究。

关键词: 猪链球菌; 谷氨酸脱氢酶基因; 克隆; 序列分析

中图分类号: S852.61 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-3268(2010)02-0097-05

Cloning and Sequence Analysis of the Gene Encoding Glutamate Dehydrogenase of *Streptococcus suis* Strain ZKHY

LIU Chun-sheng¹, WANG Xin-juan¹, XU Yao-hui^{2*}, WANG Chuan-qing¹,
YANG Xia¹, CHEN Lu¹, XU Xue¹

(1. College of Animal Husbandry and Veterinary Medicine, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China;

2. Zhengzhou College of Animal Husbandry Engineering, Zhengzhou 450011, China)

Abstract: In order to study the function of the protein of glutamate hydrogenase (GDH), the glutamate dehydrogenase gene of *Streptococcus suis* strain ZKHY was cloned and analyzed in this paper. The *gdh* gene was amplified by polymerase chain reaction (PCR) and cloned into pMD-18T vector. After transformed into *E. coli* JM109 competent cells, the recombinant plasmid was sequenced and compared with the nucleotide and deduced amino acid sequences of previous reported strains in GenBank. The results showed that the sequence has close relationship to the *gdh* gene of *Streptococcus suis* published in GenBank, which has sequence homology of 97.2%—97.3%, 98.4% and 97.6% with serotype 2, 7 or 9 strains respectively. Especially, the homology of amino acid sequence was even higher than that of nucleotide sequence, which is above 98.9%. This indicates that strain ZKHY may be out of serotypes 2, 7 and 9. The gene cloned in this study is very conservative and it can be expressed in prokaryotic or eukaryotic cells for immunology-concerned researches.

Key words: *Streptococcus suis*; Glutamate dehydrogenase gene; Cloning; Sequence analysis

收稿日期: 2009-10-14

基金项目: 河南省重大科技攻关项目(072102130009)

作者简介: 刘春生(1983-), 男, 河南南阳人, 在读硕士研究生, 研究方向: 动物传染病发病机理及其防治。

*通讯作者: 徐耀辉(1974-), 男, 河南平顶山人, 副教授, 博士, 主要从事动物传染病学的教学和研究工作。

猪链球菌(*Streptococcus suis*)分为35个血清型,是一种重要的人兽共患病病原,可引起猪的脑膜炎、关节炎、败血症、心内膜炎、脑炎、流产、多发性浆膜炎和支气管肺炎^[1,2],发病猪群的死亡率可达80%,给养殖业造成很大的经济损失。人也可以感染发病而导致败血症、脑膜炎、心内膜炎和永久性耳聋等^[3,4]。猪链球菌致病的分子基础是多种毒力因子,目前已报道的毒力因子主要有荚膜多糖(CPS)、猪溶血素(suily sin)、溶菌酶释放蛋白(MRP)、胞外因子(EF)、谷氨酸脱氢酶(GDH)、纤连结合蛋白(FBN)以及粘附素(adhesin)等^[5-7]。其中,GDH是一种新近发现的猪链球菌进化上极其保守的种特异性抗原成分(分子量约48.8 kD),暴露于菌体的细胞壁上^[7]。猪链球菌不同血清型之间,编码GDH的核苷酸序列的同源性约为96%~100%,其氨基酸序列的同源性高达99%~100%,其中血清2型之中,其核苷酸同源性高达99%~100%^[8]。该蛋白抗原是一种极好的诊断抗原,可准确地检测猪链球菌感染,对于该病的流行病学研究具有重要意义。同时,它也是一种具有免疫原性的保护性抗原^[9],可以用于猪链球菌的防治。本研究通过PCR扩增出*gdh*基因,并对其进行克隆和序列分析,旨在为进一步研究其功能提供依据。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒 猪链球菌 ZKH Y 株由河南农业大学传染病实验室分离保存。JM109感受态细胞,pMD-18T载体购自宝生物工程(大连)有限公司。

1.1.2 工具酶和主要试剂 限制性内切酶 *Ban*II、*Bam*HI、*Sal*I、DL 2000 DNA Marker、*rTaq* DNA 聚合酶、氨苄西林,均为宝生物工程(大连)有限公司产品;蛋白酶 K 为 Merck 公司产品;DNA 胶回收试剂盒购自北京百泰克生物技术有限公司。

1.1.3 主要仪器设备 PCR 仪(EASTWIN 公司);Alpha Inotech 凝胶成像系统(美国 Bio-Ra 公司);台式冷冻离心机(德国 Hettich 公司);HZS-H 型水浴振荡器(哈尔滨市东联电子技术开发有限公司);XW-80A 型旋涡混合器(上海青浦沪西仪器厂)。

1.2 方法

1.2.1 引物的设计与合成 以 GenBank 中猪链球菌 2 型菌株 *gdh* 基因序列(序列号: AF229683)为参考,利用 Primer 5.0 和 Oligo 6.0 设计 1 对引物,预期扩增片段 1362 bp,包括 *gdh* 基因全部 ORF 1347 bp,上下游引物分别为: P1 5'-AATCAGGT-GATCCCATGTCAAATGC-3'; P2 5'-CTTAT-

ACCAAACCTTGGGCAATCATGC-3'。

引物由上海生工生物工程技术有限公司合成。

1.2.2 基因组 DNA 的提取 基因组提取方法参照文献[10]描述的方法稍加改动。将猪链球菌 ZKH Y 株接种于 5 mL LB 液体培养基中,37℃恒温水浴培养过夜;取 1 mL 菌液于 1.5 mL Eppendorf 管中,4℃12000 r/min 离心 1 min;弃上清液,并将残余液滴吸净,加入 200 μ L DNA 提取液(10 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0), 100 mmol/L KCl, 2.5 mmol/L MgCl₂, 1% Triton X-100, 0.01% NP 40, 120 μ g/mL 的蛋白酶 K, 1% Tween-20(V/V))60℃水浴 1 h;之后 95℃水浴 10 min,冷却至室温,12000 r/min 离心 5 min,取上清保存于-20℃冰箱备用,即为 PCR 反应的模板。

1.2.3 *gdh* 基因的 PCR 扩增 按下列顺序和条件依次加入各反应物进行扩增: 10 \times Buffer 5 μ L、MgCl₂ 5 μ L、dNTPs 1 μ L、上下游引物(20 μ mol/L)各 1 μ L、模板 DNA 5 μ L、*rTaq* DNA 聚合酶 0.5 μ L,加 ddH₂O 至 50 μ L。反应参数为 95℃预变性 5 min; 94℃变性 30 s, 57℃退火 30 s, 72℃延伸 1 min,共 35 个循环; 72℃终延伸 7 min。取 10 μ L PCR 扩增产物于 1.2% 琼脂糖凝胶中进行电泳后于紫外检测仪下观察,并用凝胶成像仪拍照保存。

1.2.4 PCR 产物的酶切鉴定 通过 DNASTar 中的 Mapdraw 分析, *gdh* 基因内部含有 *Ban* II 限制性内切酶单一酶切位点,酶切后应为 1253 bp 和 109 bp。应用该酶对 PCR 产物进行酶切鉴定。

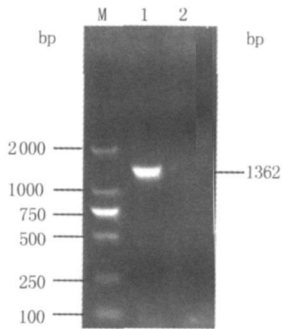
1.2.5 *gdh* 基因的克隆与鉴定 采用 DNA 凝胶回收试剂盒回收纯化扩增片段。将回收的扩增产物与 pMD-18T 载体于 16℃条件下连接过夜,然后转化 JM109 感受态细胞。通过蓝白斑筛选含有目的质粒的大肠杆菌菌落,挑取白色菌落扩大培养,碱裂解法提取质粒。对所提质粒进行 PCR 鉴定和 *Bam*HI 及 *Sal*I 双酶切鉴定。经鉴定为阳性的重组质粒送往上海生工生物工程技术有限公司进行序列测定。

1.2.6 *gdh* 基因序列及其推导的蛋白质序列分析 应用 DNASTar 软件中的 MegAlign,将所测 *gdh* 基因序列及其翻译后的氨基酸序列与 GenBank 中已收录序列进行同源性比较分析,并通过在线分析进行 *gdh* 蛋白的抗原性预测。在线分析网址: <http://bio.dfci.harvard.edu/Tools/antigenic.pl>。

2 结果与分析

2.1 *gdh* 基因的 PCR 扩增

经 PCR 扩增,电泳后出现 1 条约 1362 bp 的条带,与预期目的片段大小相符(图 1)。

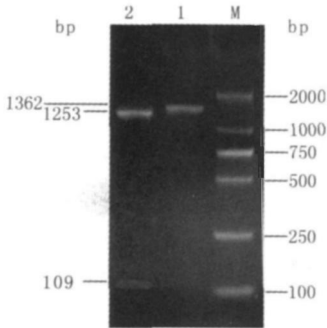


M. DL 2000 Marker; 1. PCR 产物; 2. 阴性对照

图 1 PCR 产物琼脂糖凝胶电泳图谱

2.2 PCR 产物的酶切鉴定结果

用限制性内切酶 *Ban* II 酶切后, 在 1200bp 和 100bp 处各出现 1 条 DNA 条带, 与预期一致(图 2)。



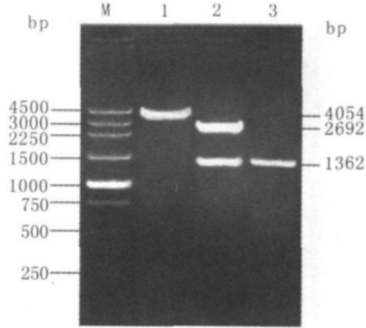
M. DL 2000 Marker; 1. PCR 产物; 2. PCR 产物 *Ban* II 单酶切

图 2 PCR 产物的酶切鉴定

2.3 重组质粒的酶切鉴定和 PCR 鉴定结果

凝胶电泳显示, PCR 产物与目的片段大小一致, 约 1362bp; 双酶切出现 2 条带, 1 条接近 1362bp,

为目的片段, 另 1 条约 2692bp, 与 pMD-18T 载体大小一致(图 3), 表明所克隆的目的基因已成功插入 pMD-18T 载体中。



M. DNA Marker; 1. 重组质粒 pMD-18T-gdh; 2. 重组质粒 pMD-18T-gdh 双酶切; 3. PCR 产物;

图 3 重组质粒的酶切鉴定和 PCR 鉴定

2.4 重组质粒测序鉴定结果

测序结果显示, 猪链球菌 ZKHY 菌株 *gdh* 基因全长为 1347bp, 编码 448 个氨基酸。推测其分子量为 48.8kD。序列已经递交到 GenBank, 基因登录号为 FJ428282。

2.5 *gdh* 基因序列分析结果

应用 DNASTar 软件中的 MegAlign 将所测 *gdh* 基因序列及翻译后的氨基酸序列与 GenBank 中已收录序列进行同源性比较分析。

2.5.1 *gdh* 基因同源性分析 结果显示, 所测序列与 GenBank 中已收录序列同源性达 97.2%~98.4%, 其中与 2 型菌株同源性达 97.2%~97.3%, 与 7 型菌株达 98.4%, 与 9 型达 97.6%(图 4)。

| | | 同源率/% | | | | | | | | | | | | | | 差异/% | |
|------|----|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|------|------|------|------|------|----------------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | | | |
| 差异/% | 1 | | 100.0 | 100.0 | 100.0 | 100.0 | 100.0 | 100.0 | 100.0 | 100.0 | 100.0 | 99.9 | 97.6 | 96.9 | 97.3 | 1 | AF229683 type2 |
| | 2 | 0.0 | | 100.0 | 100.0 | 100.0 | 100.0 | 100.0 | 100.0 | 100.0 | 100.0 | 99.9 | 97.6 | 96.9 | 97.3 | 2 | EY853916 type2 |
| | 3 | 0.0 | 0.0 | | 100.0 | 100.0 | 100.0 | 100.0 | 100.0 | 100.0 | 100.0 | 99.9 | 97.6 | 96.9 | 97.3 | 3 | CP000407 type2 |
| | 4 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | | 100.0 | 100.0 | 100.0 | 100.0 | 100.0 | 100.0 | 99.9 | 97.6 | 96.9 | 97.3 | 4 | CP000408 type2 |
| | 5 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | | 100.0 | 100.0 | 100.0 | 100.0 | 100.0 | 99.9 | 97.6 | 96.9 | 97.3 | 5 | DQ256411 type2 |
| | 6 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | | 100.0 | 100.0 | 100.0 | 100.0 | 99.9 | 97.6 | 96.9 | 97.3 | 6 | DQ256414 type2 |
| | 7 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | | 100.0 | 100.0 | 100.0 | 99.9 | 97.6 | 96.9 | 97.3 | 7 | DQ256454 type2 |
| | 8 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | | 100.0 | 100.0 | 99.9 | 97.6 | 96.9 | 97.3 | 8 | DQ256455 type2 |
| | 9 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | | 100.0 | 99.9 | 97.6 | 96.9 | 97.3 | 9 | DQ256456 type2 |
| | 10 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | | 99.9 | 97.6 | 96.9 | 97.3 | 10 | EF539837 type2 |
| | 11 | 0.1 | 0.1 | 0.1 | 0.1 | 0.1 | 0.1 | 0.1 | 0.1 | 0.1 | 0.1 | | 97.6 | 96.8 | 97.2 | 11 | EU872184 type2 |
| | 12 | 2.4 | 2.4 | 2.4 | 2.4 | 2.4 | 2.4 | 2.4 | 2.4 | 2.4 | 2.4 | 2.5 | | 97.6 | 98.4 | 12 | EF539838 type7 |
| | 13 | 3.2 | 3.2 | 3.2 | 3.2 | 3.2 | 3.2 | 3.2 | 3.2 | 3.2 | 3.2 | 3.3 | 2.5 | | 97.6 | 13 | EF539839 type9 |
| | 14 | 2.8 | 2.8 | 2.8 | 2.8 | 2.8 | 2.8 | 2.8 | 2.8 | 2.8 | 2.8 | 2.9 | 1.7 | 2.5 | | 14 | FJ428282 |

图 4 *gdh* 基因同源比对结果

2.5.2 *gdh* 基因系统进化分析 结果表明, 所测序列与 7 型菌株亲缘关系较近, 与 2 型和 9 型亲缘关系较远, 与同源性分析结果一致(图 5)。

2.5.3 *gdh* 基因推导的氨基酸序列同源性分析 结果显示, 所测 *gdh* 基因编码的氨基酸序列与现有的猪

链球菌 GDH 蛋白氨基酸序列同源性在 98.9%~99.8%(图 6)。与 2 型菌株相比, 所测序列有 4 处氨基酸有差异。分别发生在 299aa 处的 Ser→Ala, 328aa 处的 Asn→Thr, 305 和 330aa 处的 Lys→Glu。与 7 和 9 型相比仅有 1 处氨基酸有差异, 在 328aa 处的 Asn→Thr。

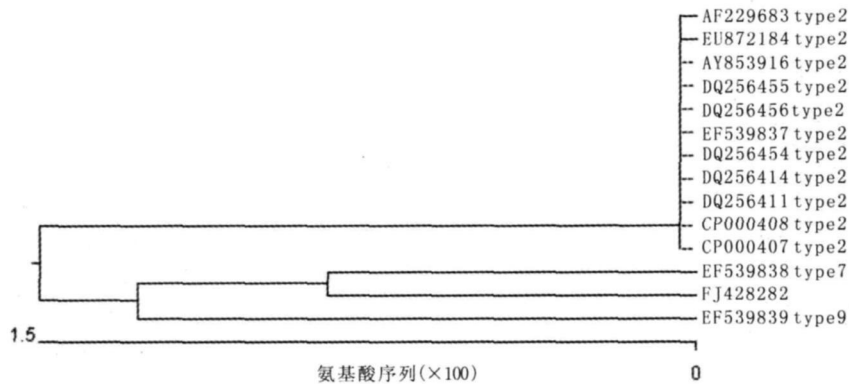


图 5 *gdh* 基因系统发育分析结果

| | | 同源率/% | | | | | | | | | | | | | | | |
|------|----|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|------|-------|------|------|----|----------------|
| 差异/% | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | | |
| | 1 | 100.0 | 100.0 | 100.0 | 100.0 | 100.0 | 100.0 | 100.0 | 100.0 | 100.0 | 100.0 | 99.8 | 99.3 | 99.3 | 99.1 | 1 | DQ256411 type2 |
| | 2 | 0.0 | 100.0 | 100.0 | 100.0 | 100.0 | 100.0 | 100.0 | 100.0 | 100.0 | 100.0 | 99.8 | 99.3 | 99.3 | 99.1 | 2 | DQ256414 type2 |
| | 3 | 0.0 | 0.0 | 100.0 | 100.0 | 100.0 | 100.0 | 100.0 | 100.0 | 100.0 | 100.0 | 99.8 | 99.3 | 99.3 | 99.1 | 3 | AF229683 type2 |
| | 4 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 100.0 | 100.0 | 100.0 | 100.0 | 100.0 | 100.0 | 100.0 | 99.8 | 99.3 | 99.3 | 99.1 | 4 | AY853916 type2 |
| | 5 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 100.0 | 100.0 | 100.0 | 100.0 | 100.0 | 100.0 | 99.8 | 99.3 | 99.3 | 99.1 | 5 | CP000407 type2 |
| | 6 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 100.0 | 100.0 | 100.0 | 100.0 | 100.0 | 99.8 | 99.3 | 99.3 | 99.1 | 6 | CP000408 type2 |
| | 7 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 100.0 | 100.0 | 100.0 | 100.0 | 99.8 | 99.3 | 99.3 | 99.1 | 7 | DQ256454 type2 |
| | 8 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 100.0 | 100.0 | 100.0 | 99.8 | 99.3 | 99.3 | 99.1 | 8 | DQ256455 type2 |
| | 9 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 100.0 | 100.0 | 99.8 | 99.3 | 99.3 | 99.1 | 9 | DQ256456 type2 |
| | 10 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 100.0 | 99.8 | 99.3 | 99.3 | 99.1 | 10 | EF539837 type2 |
| | 11 | 0.2 | 0.2 | 0.2 | 0.2 | 0.2 | 0.2 | 0.2 | 0.2 | 0.2 | 0.2 | 99.1 | 99.1 | 99.1 | 99.1 | 11 | EU872184 type2 |
| | 12 | 0.7 | 0.7 | 0.7 | 0.7 | 0.7 | 0.7 | 0.7 | 0.7 | 0.7 | 0.7 | 0.9 | 100.0 | 99.8 | 99.8 | 12 | EF539838 type7 |
| | 13 | 0.7 | 0.7 | 0.7 | 0.7 | 0.7 | 0.7 | 0.7 | 0.7 | 0.7 | 0.7 | 0.9 | 0.0 | 99.8 | 99.8 | 13 | EF539839 type9 |
| | 14 | 0.9 | 0.9 | 0.9 | 0.9 | 0.9 | 0.9 | 0.9 | 0.9 | 0.9 | 0.9 | 1.1 | 0.2 | 0.2 | 99.8 | 14 | FJ428282 |

图 6 *gdh* 基因推导的氨基酸序列的同源性比对结果

2.5.4 ZKHY 株 GDH 蛋白抗原位点预测 结果表明 ZKHY 株 GDH 蛋白共含有 22 个抗原表位。对其

各个抗原表位进行 BLAST 分析表明: 第 1—4、6、8、10、13—15、17—18、20、22 为特异性抗原表位(图 7)。

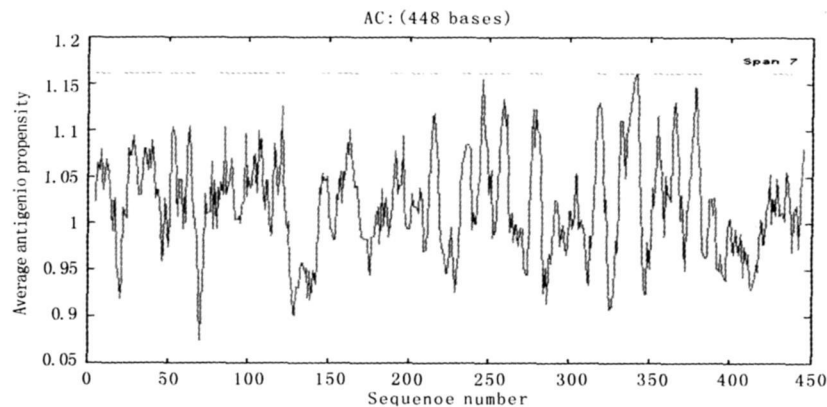


图 7 ZKHY 株 GDH 蛋白抗原位点预测

3 结论与讨论

GDH 是连接碳代谢和氮代谢的一个关键酶, 是细菌能量代谢过程中十分重要的功能分子, 对细菌致病性有重要意义。据报道, 在猪链球菌 35 个血清型中都存在该基因^[7, 11]。本研究对所测猪链球菌 ZKHY 株 *gdh* 基因序列及其推导的氨基酸序列分

析表明, 该基因在猪链球菌血清 2、7、9 型菌株中非常保守。与 GenBank 中已收录序列同源性 ≥ 97.2%。其编码的氨基酸序列更加保守, 同源性在 98.9% 以上, 与 2 型菌株相比有 4 个氨基酸的差异, 即分别是第 299 位(S→A), 第 305、330 位(K→E), 第 328 位(N→T); 与 7 型和 9 型仅有 1 个氨基酸的差异, 在第 328 位(N→T)。gdh 基因系统进化分析

表明: 所测 ZKHY 菌株很可能是属于血清 2、7、9 型之外的其他血清型。ZKHY 株 GDH 蛋白抗原性预测显示, 其共含 22 个抗原表位, 并且其氨基酸的变异位点不在预测的抗原表位区内, 因而不改变其抗原性, BLAST 分析显示, 有 14 个表位是特异性的抗原表位。下一步可以通过原核或真核表达其特异性的抗原表位, 进行免疫学诊断与防治方面的相关研究。

猪链球菌的 *gdh* 基因非常保守, 因此可用于建立针对该基因的分子检测方法。该基因在 2003 年由 Ogi 首次研究报道^[11], 并建立了针对 *gdh* 基因和 *cps2* 基因相结合的二重 PCR 方法。和以往 16S rRNA 与 *cps2* 基因相结合的二重 PCR 分型鉴定方法相比, 该法可以显著提高猪链球菌种的鉴定的准确性。目前, 该基因被广泛用于猪链球菌的 PCR 检测中^[12, 13]。

猪链球菌病是一种重要的细菌性人兽共患病, 如何能对其做出快速准确的诊断对于该病的防制及其流行病学研究具有重要意义^[14-16]。猪链球菌的 GDH 是一种新近发现的极其保守的种特异性抗原成分。GDH 相对于其他蛋白有很低的点突变率和高度保守性, 在艰难梭菌(*Clostridium difficile*) 的流行病学诊断中, 已经作为一种重要的诊断性抗原^[17]。猪链球菌的该蛋白也是一种极好的诊断抗原, 可用于检测猪链球菌感染^[7]。不足的是, 用它来检测不能区分不同的血清型, 但是这可以先用做临床上猪链球菌的初步筛选, 再配合血清分型和分子分型来定其血清型。同时, 该蛋白也是一种具有免疫原性的保护性抗原^[9, 18], 可以用于猪链球菌的防治。猪链球菌 *gdh* 基因的克隆为进一步研究其表达功能性 GDH 蛋白及其应用提供了重要依据, 从而有利于猪链球菌新型诊断方法和新型疫苗的研制。

参考文献:

- [1] Chanter N, Jones P W, Alexander T J L., Meningitis in pigs caused by *Streptococcus suis*— a speculative review [J]. Vet Microbiol, 1993, 36: 39-55.
- [2] 王自振, 陈丽颖, 杜君, 等. 河南省猪链球菌病原分群鉴定[J]. 河南农业科学, 2001(4): 28-30.
- [3] Arends J P, Zanen H C. Meningitis caused by *Streptococcus suis* in humans[J]. Rev Infect Dis, 1988, 10: 131-137.
- [4] Yu H, Jing H, Chen Z, et al. Human *Streptococcus suis* outbreak, Sichuan, China[J]. Emerging Infectious Diseases 2006, 6(12): 914-920.
- [5] Anton A C, Jacobs Peter L W, et al. Identification,

purification, and characterization of a thiol-activated hemolysin(suilsin) of *Streptococcus suis*[J]. Infection and Immunity, 1994(5): 1742-1748.

- [6] Astrid de Greeff, Herma Buys, Robin Verhaar, et al. Contribution of fibronectin-binding protein to pathogenesis of *Streptococcus suis* serotype 2[J]. Infection and Immunity, 2002(3): 1319-1325.
- [7] Ogi Okwumabua, Julia S Persaud P G, et al Cloning and characterization of the gene encoding the glutamate dehydrogenase of *Streptococcus suis* serotype 2 [J]. Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology, 2001(8): 251-257.
- [8] 谭世君, 汤明, 聂奎, 等. 猪链球菌谷氨酸脱氢酶基因的克隆和序列分析[J]. 中国动物检疫, 2007, 24 (4): 29-31
- [9] 潘秀珍, 赵华梅, 葛俊超, 等. *gdh* 基因在猪链球菌中的分布及重组 GDH 的抗原性研究[J]. 中国人兽共患病学报, 2008, 24(6): 522-525
- [10] Marois C, Bougeard S, Gottschalk M, et al. Multiplex PCR assay for detection of *Streptococcus suis* species and serotypes 2 and 1/2 in tonsils of live and dead pigs[J]. J Clin Microbiol, 2004, 42(7): 3169-3175.
- [11] Ogi Okwumabua, Michael O'Connor, Eileen Shull. A polymerase chain reaction (PCR) assay specific for *Streptococcus suis* based on the gene encoding the glutamate dehydrogenase [J]. FEMS Microbiology Letters, 2003, 218: 79-84
- [12] Luciana M G, Silva, Christoph G, et al. Virulence-associated gene profiling of *Streptococcus suis* isolates by PCR [J]. Veterinary Microbiology, 2006, 115: 117-127
- [13] Christoph G, Baums, Gerd Josef Verkuhlen, et al. Prevalence of *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Actinobacillus suis*, *Haemophilus parasuis*, *Pasteurella multocida*, and *Streptococcus suis* in representative Ontario swine herds [J]. The Canadian Journal of Veterinary Research, 2008, 72: 242-248.
- [14] 张宝华. 猪链球菌病的诊断与防治[J]. 现代农业科技, 2008(12): 258
- [15] 韩正田, 李芬, 辛春兰, 等. 猪链球菌病的发病特点与诊治[J]. 现代农业科技, 2007(19): 198-205
- [16] 张红英, 崔保安, 夏平安, 等. 7 种中草药提取物对猪链球菌的体外抑菌试验[J]. 河南农业科学, 2006(7): 113-114
- [17] Lyerly D M, Barroso L A, Wilkins T D. Identification of the latex test-reactive protein of *Clostridium difficile* as glutamate dehydrogenase[J]. J Clin Microbiol, 1991, 29: 2639-2642
- [18] 潘秀珍, 赵华梅, 葛俊超, 等. 信号肽与猪链球菌 GDH 融合的 DNA 疫苗构建及体液免疫研究[J]. 免疫学杂志, 2008, 24(3): 311-314