

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
51(2):276–281; 4 February 2011
ISSN 0001–6209; CN 11–1995/Q
<http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>

SEF14 菌毛基因操纵子在肠炎沙门氏菌和 D-群沙门氏菌的变异分析

朱春红^{1,2#}, 陆广富^{1,3#}, 陈雯雯¹, 李慧芳², 胡艳², 刘学贤², 徐步², 陈宽维², 朱国强^{1*}

¹扬州大学兽医学院, 扬州 225009

²江苏省家禽科学研究所, 扬州 225003

³江苏畜牧兽医职业技术学院, 泰州 225300

摘要:【目的】本文旨在探索 SEF14 菌毛特异性表达于 D-群沙门氏菌, 特别是肠炎沙门氏菌以及都柏林沙门氏菌的原因。【方法】应用 PCR 扩增以及序列测定检测了 18 株鸡白痢沙门氏菌, 11 株肠炎沙门氏菌以及 1 株都柏林沙门氏菌标准株中 *sefA*, *sefD* 和 *sefR* 基因序列, 并分析比对其序列变异。【结果】以 11 株肠炎沙门氏菌以及 1 株都柏林沙门氏菌染色体 DNA 为模板能成功扩增 *sefA*, *sefD* 以及 *sefR* 基因; 从 18 株鸡白痢沙门氏菌中均能成功扩增 *sefA* 基因, 但只有分离于 1980 年之前的 7 株分离菌能成功扩增 *sefD* 和 *sefR* 基因, 而另 11 株 1980 年后分离菌 PCR 扩增 *sefD* 和 *sefR* 基因却无任何产物。比对 PCR 扩增产物测序结果发现, 11 株肠炎沙门氏菌以及 1 株都柏林沙门氏菌株中 *sefA*, *sefD* 以及 *sefR* 基因序列和已发表的序列 (GenBank 登录号为 L11008, U07129 和 AF233854) 100% 同源; 7 株鸡白痢沙门氏菌 *sefD* 基因测序结果表明, 在 196 位点处发生碱基缺失, 造成移码突变, 提前于氨基酸残基 71 位点处产生终止密码子。优化菌毛表达条件, 体外抽提和纯化菌毛并进一步试验证明: 肠炎沙门氏菌以及都柏林沙门氏菌体外能很好表达 SEF14 菌毛, 但鸡白痢沙门氏菌在相同培养条件下却无任何表达迹象。【结论】SEF14 菌毛操纵子亚单位基因 *sefA*, *sefD* 以及调节基因 *sefR* 在不同沙门氏菌中的变异情况可能是 SEF14 菌毛局限性表达的原因之一。

关键词: 肠炎沙门氏菌, 鸡白痢沙门氏菌, *sef14* 基因操纵子, 变异

中图分类号: Q933 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2011) 02-0276-06

沙门氏菌菌体表面表达多种菌毛结构, 如 SEF14, SEF17, I 型菌毛 (SEF21), 钝端菌毛 (the bundle-forming pilus, BFP), 长极性菌毛 (long polar fimbriae, LPF), 质粒编码菌毛 (plasmid-encoded fimbriae, PEF) 等^[1-4]。SEF14 菌毛首先在临床分离的一株人源肠炎沙门氏菌中发现, 其结构纤细, 直

径小于 3 nm, 由 14.3 kDa 的蛋白质亚单位组成, 但是, 因其没有凝集红细胞的能力, 加之体积大小的差异, 而且和已经鉴定的其他菌毛蛋白没有同源性, 所以不能归于现有沙门氏菌菌毛分类中的任何一种^[5]。目前, 关于 SEF14 菌毛功能仍在探讨之中, 有研究报道 SEF14 菌毛蛋白能引起全身强烈的保

基金项目: 国家自然科学基金 (30771603, 31072136); 江苏省属高校自然科学重大基础研究项目 (08KJA230002); 科技部转基因生物新品种培育重大专项 (2009ZX08006-004B)

* 通信作者。Tel: +86-514-87972590; E-mail: yzgzhu@hotmail.com, yzgzhu@yzu.edu.cn

作者简介: 朱春红 (1982-), 女, 江苏东台人, 博士, 主要研究方向为病原微生物致病机理及免疫机理研究。E-mail: zhuch_081110@yahoo.cn; 陆广富 (1964-), 男, 江苏高邮人, 在职博士, 主要从事病原微生物致病机理及免疫机理研究。E-mail: jsmyxylgf@sina.com

收稿日期: 2010-07-16; **修回日期:** 2010-09-30

护性免疫反应^[6],也有研究表明 SEF14 菌毛与细菌和鼠源或者人源肠道上皮细胞的起始的接触以及黏附作用无关^[7-8]。同时仍有报道称 SEF14 菌毛和肠炎沙门氏菌在动物机体内的毒力有关,它介导了肠炎沙门氏菌与巨噬细胞之间的作用^[9]。

完整的 *sef* 基因操纵子至少由 *sefA*, *sefB*, *sefC*, *sefD* 4 个基因组成,四者共同完成 SEF14 菌毛的合成、输出以及分泌表达^[9]。其中 *sefA* 编码 SEF14 菌毛的主要亚单位蛋白,*sefD* 基因作为 *sef* 基因操纵子的组成部分,编码了 SEF14 菌毛的顶端结构,而 *sefB* 编码伴侣蛋白亚单位,和大肠杆菌菌毛的外周伴侣蛋白类似,*sefC* 则编码推进蛋白,这种蛋白位于外膜中,负责将菌毛亚单位组织和装配到聚合的菌毛结构上^[10]。*sefR* 是紧连 *sefD* 的一个反向调节基因,活化 *sef14* 基因操纵子的转录。目前,*sefA* 基因已被克隆和测序,并证实该编码基因仅有限地分布于血清 D 群沙门氏菌中,但在某些沙门氏菌,如鸡沙门氏菌,鸡白痢沙门氏菌和伤寒沙门氏菌均具有完整的 *sefA* 基因,并不表达出 SEF14 菌毛,已有研究证实 SEF14 菌毛仅表达在肠炎沙门氏菌和都柏林沙门氏菌菌体表面,这是很有趣的现象^[11]

本试验利用 PCR 方法结合序列分析方法检测了 SEF14 菌毛操纵子亚单位基因 *sefA*, *sefD* 以及调控基因 *sefR* 在肠炎沙门氏菌,鸡白痢沙门氏菌以及都柏林沙门氏菌中的存在和变异情况,在基因序列上分析探讨 SEF14 菌毛特异性表达的原因。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 细菌菌株以及来源:18 株不同年代禽源鸡白痢沙门氏菌临床分离株由江苏省家禽科学研究所(扬州)友情提供,具体分离年份以及菌株标号见表 1;人源肠炎沙门氏菌临床分离株 SE20, SE43, SE51 和 SE57 由扬州市疾病控制中心巢国祥博士提供;禽源肠炎沙门氏菌临床分离株 MY, XJ 以及参考菌株 3378 和 50014 由四川农业大学程安春老师友情赠送;肠炎沙门氏菌标准株 50336 由扬州大学生物科学和技术学院焦新安老师友情赠送;SD-2 为美国宾夕法尼亚大学 Dr. Schifferli 友情赠送;S. O9 禽源肠炎沙门氏菌分离株为本实验室由海安某发病家禽养殖场分离、鉴定与保存;都柏林沙门氏菌标准株

C79-84 购自中国兽药研究所。

表 1 鸡白痢沙门氏菌 *sefA*, *sefD* 以及 *sefR* 基因频率

Table 1 Prevalence of <i>sefA</i> , <i>sefD</i> and <i>sefR</i> genes in <i>S. pullorum</i>				
<i>S. pullorum</i>	year	<i>sefA</i>	<i>sefD</i>	<i>sefR</i>
SP68	1968	+	+	+
SP681	1968	+	+	+
SP73	1973	+	+	+
SP75	1975	+	+	+
SP76	1976	+	+	+
SP78	1978	+	+	+
SP79	1979	+	+	+
SP80	1980	+	-	-
SP82	1982	+	-	-
SP85	1985	+	-	-
SP88	1988	+	-	-
SP90	1990	+	-	-
SP93	1993	+	-	-
SP96	1996	+	-	-
SP97	1997	+	-	-
SP99	1999	+	-	-
SP00	2000	+	-	-
SP02	2002	+	-	-

+, positive; -, negative; year, when the strain was isolated.

1.1.2 培养基、主要试剂和抗体:胰蛋白酶(Tryptone)、酵母提取物(Yeast extract)购自 Oxoid 公司;水解酪蛋白、氨苄青霉素为上海生物工程公司产品;*Taq* DNA 聚合酶、DNA 琼脂糖凝胶回收试剂盒(离心柱型)、DNA Marker DL2000 均购自 TaKaRa 公司;pGEM-T Easy Vector, T4 DNA 连接酶购自美国 Promega 公司。蛋白质预染 maker 购自 Fermentas 公司,其他常规试剂均为国产分析纯级产品。羊抗鼠 HRP-IgG(Horseradish peroxidase,辣根过氧化物酶)抗体购自武汉博士德公司,抗 rSEFA 抗体为本实验室制备^[12]。

1.1.3 引物:根据已发表的 *sef14* 操纵子各结构基因序列以及调控基因序列和 GenBank 中 *sef14* 操纵子的部分片段序列信息,用 DNASTAR 软件分析设计出 3 对引物,分别扩增 *sefA*, *sefD* 和 *sefR* 基因片断。引物由上海基康生物工程公司合成(表 2)。

表 2 检测 *sefA*, *sefD* 和 *sefR* 基因的引物序列

Table 2 primers for detective <i>sefA</i> , <i>sefD</i> and <i>sefR</i> genes		
primers	sequences (5' → 3')	sizes/bp
<i>sefA</i> F	CGCATATGGCTGGCTTGTTGGTAAC	498
<i>sefA</i> R	CGACTAGTTTGAAGTTTGATACTGCTGAA	
<i>sefD</i> F	GAATCAGTATAATTCGTCAATACCTAAG	450
<i>sefD</i> R	ATTCAATTTCTGTCGCATATATGCTTTAT	
<i>sefR</i> F	ATGTTGAAAAAAAACGCCATAA	660
<i>sefR</i> R	AGCATAAATGCAGCTTTTTCTC	

1.2 PCR 扩增和序列测定

按常规方法过夜培养的细菌经煮沸裂解法制备

成PCR模板^[13],进行 PCR 扩增。循环条件分别为:94℃ 4min;94℃ 50sec,53℃ 50sec(*sefA*)/50℃ 50sec(*sefD*)/52℃ 50sec(*sefR*),72℃ 50sec,25 个循环;72℃ 8min。琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 扩增产物大小,与预期大小相符的 PCR 扩增产物经 DNA 琼脂糖凝胶回收试剂盒进行回收纯化,并与 pGEM-T Easy 载体连接过夜,转化 DH5α 感受态,根据抗性和蓝白斑筛选阳性克隆,将阳性克隆送上海生工测序服务部测序鉴定。

1.3 SEF14 菌毛的提取与鉴定

SEF14 菌毛的抽提与纯化按报道方法进行并适当改进^[14]。具体操作为,接种单菌落过夜培养做种子液,第 2 天以 1:100 比例转接于 200mLCFA 培养液(pH6.0)37℃ 静置培养 50h 左右,离心取沉淀,适量 0.15 M 乙醇胺(pH10.5)悬浮菌泥,10000 × g 机械匀浆处理上述悬浮液 3 × 1min(室温条件)后,12000 × g,4℃ 离心 15min 取上清,此上清中包括大量经机械处理脱落的菌毛,可认为是菌毛粗提物。根据 SEF14 菌毛的生化特性,将此上清经进一步透析处理(10 mM Tris-Cl,0.2% SDS,pH 7.5)以沉淀目的蛋白。透析处理 24h 后,15000 × g,4℃ 离心 30min 取沉淀,并用适量 PBS 悬浮。

1.4 SEF14 菌毛提取物的鉴定

上述提取物经 15% SDS-PAGE 和考马斯亮蓝染色^[15],观察主要蛋白条带并鉴定蛋白纯度。上述提取物经 SDS-PAGE 后,用 BIO-RAD 转印系统将凝胶中蛋白条带电转移到 NC 膜上,10% BSA,4℃ 封闭过夜。PBST 洗涤 NC 膜后依次加入 1:200 稀释的抗 rSEFA 多抗^[12],1:500 稀释的羊抗鼠 IgG-HRP 孵育,DAB 底物显色。上述 SDS-PAGE 以及 Western-blotting 操作主要参照《分子克隆实验指南》^[13]。

2 结果

2.1 PCR 扩增结果

PCR 扩增结果表明:以 11 株肠炎沙门氏菌以及 1 株都柏林沙门氏菌染色体 DNA 为模板均能成功扩增出 *sefA*,*sefD* 以及 *sefR* 基因,且 PCR 产物大小和预期相符。与上述肠炎沙门氏菌和都柏林沙门氏菌不完全一致,18 株鸡白痢沙门氏菌 *sefA*,*sefD* 以及 *sefR* 基因频率见表 3。18 株鸡白痢沙门氏菌中,从所有年代分离菌中都能成功扩增 *sefA* 基因,7 株 1980 年之前鸡白痢沙门氏菌分离株均能扩增出 *sefD* 和 *sefR* 基因,相同条件下以 11 株 1980 年之后鸡白痢沙门氏菌分离菌染色体 DNA 为模板,PCR 扩增 *sefD* 以及 *sefR* 基因无任何产物。18 株不同年代分离的鸡白痢沙门氏菌 3 个基因的详细 PCR 扩增结果见表 1。

表 3 各沙门氏菌 *sefA*,*sefD* 以及 *sefR* 基因频率

Salmonella strains			
Strains	No.	<i>sefA</i>	<i>sefD</i> / <i>sefR</i>
<i>S. enteritidis</i>	11	11/11	11/11
<i>S. pullorum</i>	18	18/18	7/18
<i>S. dublin</i>	1	1/1	1/1

2.2 测序结果

上述与预期大小相符的 PCR 产物经琼脂糖凝胶切胶回收后连接 T 载体,送生工测序服务部测序。测序结果表明,11 株肠炎沙门氏菌以及 1 株都柏林沙门氏菌中 *sefA*,*sefD* 以及 *sefR* 的基因序列和 GenBank 中报道的序列 100% 同源(其登录号分别为:L11008, U07129 和 AF233854)^[10,16]。但是 7 株分离于 1980 年之前的鸡白痢沙门氏菌 *sefD* 序列结果与报道序列比发现在 196 位点处发生碱基 A 缺失,造成阅读框移码,在氨基酸残基 71 位点处产生了终止密码子(图 1)。

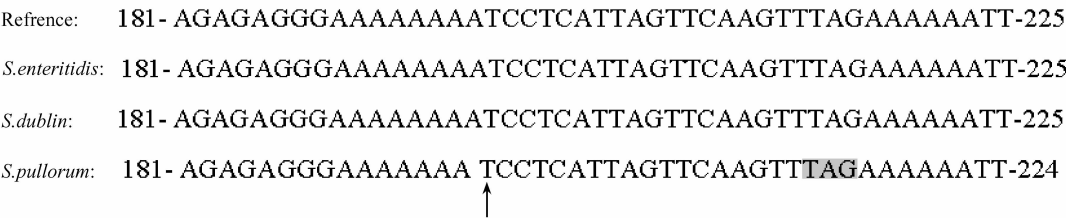


图 1 肠炎沙门氏菌,鸡白痢沙门氏菌,都柏林沙门氏菌 *sefD* 基因序列比对

Fig.1 Alignment of *sefD* sequences among *S. enteritidis*, *S. pullorum* and *S. dublin*. Reference, the reported sequence with the accession number AF233854; *S. pullorum* strain, isolated before 1980s, there is a missing A base pair at position 196 (arrow) and cause a stop code (TAG) at position 71 amino acid residual (shaded residues).

2.3 菌毛提取结果

优化 SEF14 菌毛表达条件和菌毛抽提结果表明,上述菌毛培养以及提取方法能成功从肠炎沙门氏菌和都柏林沙门氏菌中提取 SEF14 菌毛。SDS-PAGE 结果显示上述方法得到的蛋白大小约 14kDa 左右(图 2-A),和相关报道一致^[9,17],Western-blotting 结果进一步表明上述蛋白抽提物能被重组 SEF14 菌毛主要亚单位蛋白 SEFA 多抗血清识别(图 2-B),为 SEF14 菌毛。这一结果表明在上述培养条件下肠炎沙门氏菌以及都柏林沙门氏菌都能成功表达 SEF14 菌毛,但鸡白痢沙门氏菌却无任何表达产物。

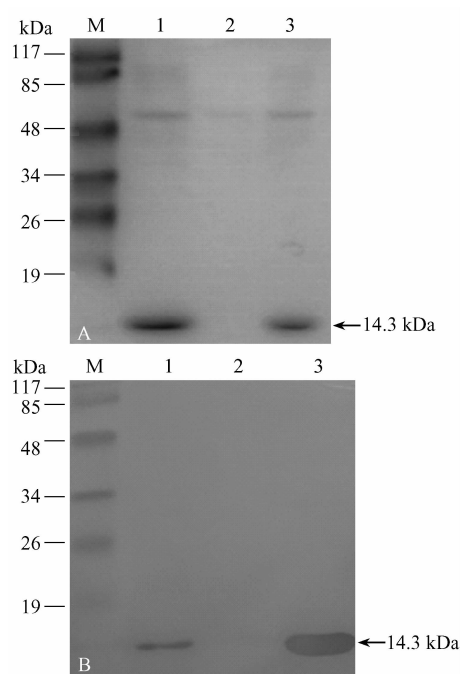


图2 菌毛抽提物 SDS-PAGE (A) 和菌毛抽提物 Western-blotting (B) 的分析结果

Fig. 2 SDS-PAGE analysis (A) and Western-blotting analysis (B) for SEF14 fimbriae and anti-rSEFA serum as the first antibody. M. Molecular weight of protein marker; 1. *S. enteritidis*; 2. *S. pullorum*; 3. *S. dublin*.

3 讨论

本试验利用 PCR 方法检测了 18 株鸡白痢沙门氏菌,11 株肠炎沙门氏菌以及 1 株都柏林沙门氏菌株中 *sefA*, *sefD* 以及 *sefR* 基因情况。结果表明:从 11 株肠炎沙门氏菌以及 1 株都柏林沙门氏菌都能成功扩增 *sefA*, *sefD* 以及 *sefR* 基因,且扩增产物大小和相关报道一致;从 18 株不同年代中分离的鸡白痢沙门

氏菌能成功扩增 *sefA* 基因,仅 7 株 1980 之前鸡白痢沙门氏菌分离株能成功扩增 *sefD* 和 *sefR* 基因,而相同条件下 11 株 1980 年后分离株的 PCR 扩增 *sefD* 和 *sefR* 基因时无任何产物,这一兴趣的结果发现是否有联系到病原相关毒力因子进化或任何生物学意义有待进一步探索。PCR 产物测序结果表明,11 株肠炎沙门氏菌以及 1 株都柏林沙门氏菌株中 *sefA*, *sefD* 以及 *sefR* 基因和已发表的序列 100% 同源(其登录号分别为: L11008, U07129 和 AF233854)^[10,16],但 7 株分离于 1980 之前鸡白痢沙门氏菌 *sefD* 基因测序结果表明,其在 196 位发生碱基缺失,造成移码突变,从而形成终止密码子,提前终止基因表达。而且体外菌毛抽提试验结果表明,肠炎沙门氏菌以及都柏林沙门氏菌在体外条件下能很好表达 SEF14 菌毛,但鸡白痢沙门氏菌在相同培养条件下却检测不到表达。

菌毛蛋白以及其它菌体表面附属物可以利用多种方式展呈于菌体表面,其中重要的途径之一即伴侣蛋白-推进蛋白方式^[18]。Edwards 等(2000)利用插入突变方式构建了关于肠炎沙门氏菌 SEF14 菌毛亚单位基因 *sefA* 和 *sefD* 突变株以探索 SEF14 菌毛组装与分泌表达过程。在体外表达检测试验中发现,在肠炎沙门氏菌 $\Delta sefA$ 突变株中,亚单位 SEFD 能以菌毛类似物表达于菌体表面,但是在肠炎沙门氏菌 $\Delta sefD$ 突变株中,亚单位 SEFA 不能成功展呈于菌体表面。Edwards 等(2000)分析 SEF14 菌毛次要亚单位蛋白 SEFD 位于 SEF14 菌毛结构的顶端,亚单位蛋白 SEFD 的成功展呈是亚单位蛋白 SEFA 结合伴侣蛋白,在推进蛋白作用下成功通过细胞间质,表达于菌体表面的关键。在菌毛蛋白组装和展呈过程中,SEFD 蛋白首先结合于伴侣蛋白,在推进蛋白的作用下表达于菌体表面,SEFD 的成功展呈为 SEF14 菌毛蛋白主要亚单位蛋白 SEFA 分泌出周质间隙提供了前提条件,如此在伴侣蛋白和推进蛋白共同作用下,成功组装 SEFD 和 SEFA 形成功能性 SEF14 菌毛^[9]。

本试验中检测发现鸡白痢沙门氏菌染色体中虽保存有完整的 *sefA* 基因序列,但是 *sefD* 基因发生缺失突变造成基因阅读框移码或者 *sefD* 以及 *sefR* 基因缺失。鉴于相同 PCR 体系以及循环条件下无产物,并进一步设计不同对引物扩增 *sefD* 和 *sefR* 基因前三分之一、前三分之二片段,后三分之一、后三分

之二片段,结果同前述,故判定 *sefD* 以及 *sefR* 基因在鸡白痢沙门氏菌基因组中缺失。但不管是上述何种情况,都说明鸡白痢沙门氏菌 *sefD* 以及 *sefR* 基因序列已经发生变化,不能表达 SEFD 蛋白,依据 Edwards 等(2000)文章中表述的 SEF14 菌毛组装与分泌方式,鸡白痢沙门氏菌不能成功表达 SEF14 菌毛,故在体外表达试验中鸡白痢沙门氏菌未检测到 SEF14 菌毛,这也可能解释了为何鸡白痢沙门氏菌以及其他 D 群沙门氏菌中虽然存在完整的 *sefA* 基因,却没有菌毛的表达。

参考文献

- [1] Bäumler AJ, Tsoli RM, Bowe FA, Kusters JG, Hoffmann S, Heffron F. The *pef* operon of *Salmonella typhimurium* mediates adhesion to murine small intestine and is necessary for fluid accumulation in the infant mouse. *Infection and Immunity*, 1996, 64(1):61-68.
- [2] Bäumler AJ, Heffron F. Identification and sequence analysis of *lpfABCDE*, a putative fimbrial operon of *Salmonella typhimurium*. *Journal of Bacteriology*, 1995, 177(8):2087-2097.
- [3] Collinson KS, Emody L, Müller KH, Trust TJ, Kay WW. Purification and characterization of thin aggregative fimbriae from *Salmonella enteritidis*. *Journal of Bacteriology*, 1991, 173(15):4773-4781.
- [4] Ewen SWB, Naughton PJ, Grant G, Sojka M, Allen-Vercoe E, Bardocz S, Thorns CJ, Pusztai A. *Salmonella enterica* var. *Typhimurium* and *Salmonella enterica* var. *Enteritidis* express type 1 fimbriae in the rat in vivo. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 1997, 18(3):185-192.
- [5] Feutrier J, Kay WW, Trust TJ. Purification and characterization of fimbriae from *Salmonella enteritidis*. *Journal of Bacteriology*, 1986, 168(1):221-227.
- [6] Ogunniyi A, Manning PA, Kotlarski I. A *Salmonella enteritidis* 11RX Pilin Induces Strong T-Lymphocyte Responses. *Infection and Immunity*, 1994, 62(12):5376-5383.
- [7] Ogunniyi AD, Kotlarski I, Morona R, Manning PA. Role of the SefA subunit protein of SEF14 fimbriae in the pathogenesis of *Salmonella enterica* serovar *Enteritidis*. *Infection and Immunity*, 1997, 65(2):708-717.
- [8] Dibb-Fuller MP, Allen-Vercoe E, Thorns CJ, Woodward MJ. Fimbriae-and flagella-mediated association with and invasion of cultured epithelial cells by *Salmonella enteritidis*. *Microbiology*, 1999, 145:1023-1031.
- [9] Edward RA, Schifferli DM, Maloy SR. A role for *Salmonella* fimbriae in intraperitoneal infections. *Proceeding of the National Academy of Science of the United States of America*, 2000, 97(3):1258-1262.
- [10] Clouthier SC, Müller KH, Doran JL, Collinson SK, Kay WW. Characterization of three fimbrial genes, *sefABC*, of *Salmonella enteritidis*. *Journal of Bacteriology*, 1993, 175(9):2523-2533.
- [11] Turcotte C, Woodward MJ. Cloning DNA nucleotide sequence and distribution of the gene encoding the SEF14 fimbrial antigen of *Salmonella enteritidis*. *J. Gen Microbiol.* 1993, 139(7):1477-1485.
- [12] 朱春红, 吴娟, 代保英, 张伟娟, 朱国强. 肠炎沙门氏菌 SEF14 菌毛 SEFA 亚单位的克隆表达以及间接 ELISA 检测方法的建立. 中国预防兽医学报(Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine), 2010, 32(1):44-48.
- [13] Sambrook J, Russell DW. 分子克隆实验指南. 黄培堂, 等译. 3rd eds. 北京:科学出版社, 2002:886-888.
- [14] Müller KH, Collinson SK, Trust TJ, Kay WW. Type 1 Fimbriae of *Salmonella enteritidis*. *Journal of Bacteriology*, 1991, 173(15):4765-4772.
- [15] Strindeli L, Degling Wikingsson, L, Sjöholm I. Extracellular antigens from *Salmonella enteritidis* induce effective immune response in mice after oral vaccination. *Infection and Immunity*, 2002, 70(3):1434-1442.
- [16] Clouthier SC, Collinson SK, Kay WW. Unique fimbriae-like structures encoded by *sefD* of the SEF14 fimbrial gene cluster of *Salmonella enteritidis*. *Molecular Microbiology*, 1994, 12(6):893-901.
- [17] Rajashekara G, Munir S, Alexeev MF, Halvorson DA, Wells CL, Nagaraja KV. Pathogenic role of SEF14, SEF17, and SEF21 fimbriae in *Salmonella enterica* serovar *enteritidis* infection of chickens. *Applied Environment Microbiology*, 2000, 66(4):1759-1763.
- [18] Bäumler AJ. Evolution of the Chaperone/Usher assembly pathway: fimbrial classification goes greek. *Microbiology and Molecular biology review*, 2007, 71(4):551-575.

Difference and variation of the *sef14* operon gene clusters in *S. enteritidis* and closed serogroup-D *Salmonella*

Chunhong Zhu^{1,2#}, Guangfu Lu^{1,3#}, Wenwen Chen¹, Huifang Li², Yan Hu², Xuexian Liu², Bu Xu²,
Kuanwei Chen², Guoqiang Zhu^{1*}

¹ College of Veterinary Medicine, Yangzhou University, Yangzhou 225009, China

² Jiangsu Institute of Poultry Science, Yangzhou 225003, China

³ College of Jiangsu Animal Science and Veterinary Medicine, Taizhou 225300, China

Abstract: [**Objective**] In order to reveal why SEF14 fimbriae are restrictively expressed on strains of serogroup D *salmonella*, mainly *S. enteritidis* and *S. dublin*, the difference and variation of the *sef14* operon gene clusters in *S. enteritidis* and related serogroup-D *Salmonella* were analyzed. [**Methods**] The genes encoding subunits of *sefA*, *sefD* and *sefR* in *S. pullorum*, *S. enteritidis* and *S. dublin* were amplified by PCR method and then sequenced to analyze the the difference and variation, respectively. [**Results**] The results of PCR amplification showed that prevalence of *sefA*, *sefD* and *sefR* genes in *S. enteritidis* and *S. dublin* was 100%. In 18 isolates of *S. pullorum*, the prevalence of *sefA* gene was 100%, while the prevalence of *sefD* and *sefR* genes was 38.9% (7/18), and 11 strains isolated after 1980s did not contain any gene *sefD* or *sefR*. The sequencing data of PCR products revealed that sequences of *sefA*, *sefD* and *sefR* genes in *S. enteritidis* and *S. dublin* were identical with those those from NCBI GenBank data which accession number were L11008, U07129 and AF233854, respectively. Interestingly, among the 7 strains of *S. pullorum* before 1980s, the *sefD* sequence has a missing base pair at position 196 and caused open reading frame (ORF) shift, resulting in a stop codon (TAG) at position 71 amino acid residual (Leu of TTA at position 214 – 216 shift into stop codon of TAG at position 215 – 217). Unlike *S. pullorum*, all *S. enteritidis* and *S. dublin* tested could express SEF14 fimbriae in vitro. [**Conclusion**] Based on the data of the difference and variation of *sef14* operon gene clusters between *S. enteritidis* and *S. pullorum*, we may explain why SEF14 fimbriae in *S. pullorum* could not be expressed.

Keywords: *S. enteritidis*, *S. pullorum*, fimbriae, *sef14* operon gene clusters, variation

(本文责编:王晋芳)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (30771603, 31072136), by the Jiangsu High Education Key Basic Science Foundation (08KJA230002) and by the Genetically Modified Organisms Breeding Major Projects (2009ZX060006-004B)

* Corresponding author. Tel: +86-514-87972590; E-mail: yzqzhu@hotmail.com, yzqzhu@yzu.edu.cn

These authors contributed equally to this work.

Received: 16 July 2010 / Revised: 30 September 2010