

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*  
55(7):942-948; 4 July 2015  
ISSN 0001-6209; CN 11-1995/Q  
<http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>  
doi: 10.13343/j.cnki.wsxb.20140559

## 鼠伤寒沙门菌 SL1344 株环化腺苷酸合成酶缺失株平衡致死系统的构建及其雏鸡免疫保护试验

李静<sup>#</sup>, 陈松彪<sup>#</sup>, 余祖华, 何雷, 李小康, 贾艳艳, 郁川, 张春杰<sup>\*</sup>, 程相朝, 李银聚, 吴庭才, 赵战勤

河南省动物疫病与公共安全院士工作站, 河南科技大学动物疫病与公共卫生重点实验室, 河南 洛阳 471003

**摘要:**【目的】为构建鼠伤寒沙门菌环化腺苷酸合成酶缺失株平衡致死系统, 并对其生物学特性进行检测。【方法】以鼠伤寒沙门菌 SL1344 $\Delta$ *cya* 株为亲本株, 利用重组自杀性质粒 (pRE $\Delta$ *asd*) 介导的同源重组技术, 经两步法缺失并筛选 *asd* 基因缺失株 (SL1344 $\Delta$ *cya*  $\Delta$ *asd*)。将含 *asd* 基因且无抗性的 pYA3493 质粒电转化至缺失株 SL1344 $\Delta$ *cya* $\Delta$ *asd*, 构建重组菌株 SL1344 $\Delta$ *cya* $\Delta$ *asd* (pYA3493)。【结果】试验结果表明, 重组菌株 SL1344 $\Delta$ *cya* $\Delta$ *asd* (pYA3493) 生化特性和生长速度与参考株 SL1344 相比差异较大, 与亲本株 SL1344 $\Delta$ *cya* 基本一致, SL1344 $\Delta$ *cya* $\Delta$ *asd* (pYA3493) 失去了利用麦芽糖、乳糖、山梨醇等碳源的能力, 也不能分解 H<sub>2</sub>S、半乳糖和鼠李糖, 但仍保留了利用葡萄糖的能力。对 1 日龄雏鸡攻毒试验表明, SL1344 $\Delta$ *cya* $\Delta$ *asd* (pYA3493) 毒力较参考株 SL1344 降低了约 10<sup>4</sup> 倍。免疫保护试验显示, 1 日龄雏鸡免疫 SL1344 $\Delta$ *cya* $\Delta$ *asd* (pYA3493) 后第 17 天, 利用鼠伤寒沙门菌参考株攻毒, 保护率为 62.5%。【结论】鼠伤寒沙门菌 SL1344 株环化腺苷酸合成酶缺失株平衡致死系统构建成功, 且具有较好的免疫保护性, 为深入研究以鼠伤寒沙门菌为载体的口服疫苗奠定基础。

**关键词:** 鼠伤寒沙门菌, 缺失株, *asd* 平衡致死系统, 免疫保护

**中图分类号:** Q939.94      **文章编号:** 0001-6209(2015)07-0942-07

沙门菌 (*Salmonella*) 是一种兼性厌氧的无芽孢直杆菌, 至今已有 2500 个血清型被鉴定<sup>[1]</sup>。沙门菌的分布非常广泛, 可通过直接或间接的方式感染动物和人类。由沙门菌引起的食物中毒在世界各地的食物中毒中占首位或第二位, 因此, 我国已将沙门菌列为食品从业人员和公共场所从业人员体检中的必检项目<sup>[2]</sup>。

由于沙门菌可通过黏膜途径感染机体, 因此通过

疫苗接种进行防治是最适宜的解决策略。近年来, 通过基因工程技术构建安全可靠的减毒鼠伤寒沙门菌载体已引起人们的广泛关注, 目前已有多个毒力相关基因被鉴定, 并在此基础上构建了一系列毒力基因突变的减毒沙门菌<sup>[3]</sup>。编码环化腺苷酸合成酶 (adenylate cyclase, AC) 的 *cya* 基因是沙门菌的毒力调节基因, 该类减毒株能有效刺激机体产生黏膜免疫、细胞免疫和

**基金项目:** 河南科技大学博士启动基金项目 (09001580); 河南科技大学青年科学基金项目 (2012QN009); 河南省高等学校重点科研项目 (15A230010)

<sup>\*</sup> 通信作者。E-mail: cjzhang@sina.com

**作者简介:** <sup>#</sup> 对本文有同等贡献。李静 (1982 -), 女, 河南焦作人, 博士, 讲师, 主要从事分子病理与免疫病理学研究, Tel: +86-379-64282905, E-mail: lijing5221@126.com; 陈松彪 (1990 -), 男, 河南信阳人, 硕士研究生, 主要从事分子病理与免疫病理学研究, E-mail: chensongbiao@126.com

**收稿日期:** 2014-11-26; **修回日期:** 2015-03-02

体液免疫应答,已被证明是携带外源基因的良好载体<sup>[4]</sup>。

在将沙门菌作为疫苗载体研究过程中,其所携带的外源基因的稳定性就显得至关重要,抗生素的抗性选择压力可以解决这一问题,但是在构建疫苗载体时存在一定的风险,近年来发展起来的宿主平衡致死的方法能有效解决质粒携带外源基因表达不稳定性问题<sup>[5]</sup>。*asd* 基因编码天冬氨酸 β-半乳糖脱氢酶,是细菌苏氨酸、赖氨酸、蛋氨酸和二氨基庚二酸(diaminopimelic acid, DAP)生物合成途径的关键酶,*asd* 缺失菌株在无外源 DAP 存在的条件下会发生死亡,在这个系统中使用携带有 *asd* 基因的质粒与鼠伤寒沙门菌染色体 *asd* 突变菌株形成互补,使重组菌在无外源 DAP 存在的条件下仍能存活<sup>[6]</sup>。本实验室廖成水等在 SL1344 基础上构建的减毒株 SL1344Δ*cya*,与参考株 SL1344 相比其毒力降低显著,并且具有良好的免疫效果<sup>[7]</sup>。本研究中,进一步缺失编码天冬氨酸 β-半乳糖脱氢酶的 *asd* 基因,构建 *asd* 平衡致死系统,对于构建减毒鼠伤寒沙门菌菌株及用于高效稳定表达外源基因的疫苗活载体均具有十分重要的意义。

## 1 材料和方法

### 1.1 细菌菌株、质粒和培养条件

鼠伤寒沙门菌参考株 SL1344 由南京农业大学

惠赠;减毒鼠伤寒沙门菌菌株 SL1344 Δ*cya*<sup>[7]</sup> 和缺失 315 bp *asd* 基因的重组自杀性质粒 pREΔ*asd*<sup>[8]</sup> 由本室构建并保存; pYA3493 (*asd*<sup>+</sup>, pBRori, β-lactamase signal sequence) 及其宿主菌 χ7213 由美国华盛顿大学 Dr. Roy 教授惠赠;大肠杆菌和鼠伤寒沙门菌在各种培养基中恒温培养,根据需要加入终浓度为 25 μg/mL 的氯霉素(chloramphenicol, Cm), 50 μg/mL 的 DAP 及其它所需物质。

### 1.2 试剂和实验动物

生化鉴定试剂由杭州天和微生物试剂有限公司生产;沙门菌属诊断血清(11 种)及各种单因子血清由宁波天润生物药业有限公司生产;蔗糖、DAP 由美国 Sigma-Aldrich 公司生产; *Taq* DNA 聚合酶、dNTPs、DNA Marker 和各种限制性内切酶均由宝生物工程(大连)有限公司生产;质粒小量提取试剂盒、DNA 胶回收试剂盒由生工生物工程(上海)有限公司生产。胰蛋白胨、酵母浸出物由 OXOID(英国)公司生产,SS 固体培养基和麦康凯固体培养基由广东环凯微生物科技有限公司生产。1 日龄健康且沙门菌检测为阴性的罗曼雏鸡购自洛阳公华种鸡场。

### 1.3 引物

根据 GenBank 上公布的鼠伤寒沙门菌 LT2 *asd* 基因序列(GenBank No. AE006468.1)设计引物,根据鼠伤寒沙门菌 *invA* 基因序列设计特异性引物用于沙门菌的鉴定,引物由生工生物工程(上海)有限公司合成(表 1)。

表 1. PCR 扩增所用的引物序列

Table 1. The primer sequences for PCR amplification

Gene amplified	Primer	Sequence (5'→3')	Size/bp
<i>asd</i> / Δ <i>asd</i>	Pa1	TTGCTTTCCTCAACTGCTGAGC	1803 (wt)
	Pa2	TCCTATCTGCGTCGTCCTAC	315 (Δ <i>asd</i> )
	Pa3	TTGGACAATGTTACCGATAA	3717 (wt)
<i>asd</i> / Δ <i>asd</i>	Pa2	TCCTATCTGCGTCGTCCTAC	2229 (Δ <i>asd</i> )
	Pi1	CAGGATACCTATAAGTGTGTC	580
<i>invA</i>	Pi2	CGCACCGTCAAAGGAACCGT	

### 1.4 鼠伤寒沙门菌重组菌株 SL1344Δ*cya*Δ*asd* (pYA3493) 的构建及鉴定

参考文献[7-8]中缺失菌株的构建方法并加以改进,通过重组自杀性质粒介导的细菌基因等位交换技术两步法筛选出基因突变株。以 χ7213 (pREΔ*asd*) 为供体菌,SL1344Δ*cya* 为受体菌进行接合转移。供体菌和受体菌分别培养过夜,各取

100 μL 细菌悬液混合,补充含有 DAP 的 LB 培养液 1 mL, 37℃、180 r/min 振摇过夜,取适量菌液涂布于含 Cm 和 5% 蔗糖的 LB 固体平板上培养,挑取 Cm 抗性 (Cm<sup>r</sup>) 蔗糖敏感 (SUC<sup>s</sup>) 菌落,利用引物 pa1/pa2 进行扩增鉴定,同时设供体菌和受体菌对照。阳性接合子在含 5% 蔗糖无抗性无 NaCl 的 LB (NB) 液体培养基中培养过夜,连续 10 倍稀释,选取

合适的稀释度涂布于含有 1% 麦芽糖的麦康凯固体平板, 筛选 SL1344 $\Delta$ *cya* $\Delta$ *asd* 缺失菌株。将细菌划线接种于含 Cm 的 LB 固体平板中检测其抗性, 提取细菌基因组, 利用引物 pa1/pa2、pa2/pa3 进行 PCR 扩增鉴定, 并将引物为 pa2/pa3 的 PCR 扩增产物送至生工生物工程(上海)有限公司进行序列测定。

挑取含 *asd* 基因的无抗性质粒 pYA3493 阳性菌落接种于 3 mL 相应的 LB 液体培养基中, 37°C、200 r/min 振荡培养过夜, 参照生工生物工程(上海)有限公司的质粒(小量)提取试剂盒的步骤提取质粒。取 10  $\mu$ L 该质粒加入 100  $\mu$ L 感受态细菌液中, 小心混匀, 冰浴 30 min, 使 DNA 吸附到细菌上, 然后移入电击杯, 电转化条件: 2000 V 电压、25  $\mu$ F 电容、200  $\Omega$  放电时间 5 ms。电击后迅速加入预热的 500  $\mu$ L LB 培养液, 37°C、100 r/min 振荡培养 90 min, 涂布在预热的 LB 固体平板上。挑取单菌落于 LB 液体培养基中培养过夜, 利用引物 pa2/pa3 进行 PCR 扩增鉴定, 并将扩增产物送至生工生物工程(上海)有限公司进行序列测定。

### 1.5 重组菌株 SL1344 $\Delta$ *cya* $\Delta$ *asd* (pYA3493) 的表型鉴定

利用玻片凝集试验对 SL1344 $\Delta$ *cya* $\Delta$ *asd* (pYA3493) 重组菌株进行血清型鉴定, 同时将重组菌株 SL1344 $\Delta$ *cya* $\Delta$ *asd* (pYA3493)、缺失株 SL1344 $\Delta$ *cya* 与参考株 SL1344 分别接种于含和不含 1% 麦芽糖的麦康凯固体平板上, 然后将细菌转接至麦芽糖、蔗糖、半乳糖等生化鉴定管中, 检测其生化特性情况。

### 1.6 重组菌株 SL1344 $\Delta$ *cya* $\Delta$ *asd* (pYA3493) 遗传稳定性测定

将重组菌株 SL1344 $\Delta$ *cya* $\Delta$ *asd* (pYA3493) 于 LB 液体培养基中连续传代 60 代, 以 10、20、30、40、50、60 代细菌为模板, 利用 pa2/pa3 引物进行 PCR 扩增鉴定, 以研究 *asd* 基因在 SL1344 $\Delta$ *cya* $\Delta$ *asd* (pYA3493) 中的稳定性。

### 1.7 重组菌株 SL1344 $\Delta$ *cya* $\Delta$ *asd* (pYA3493) 生长特性的鉴定

将重组菌株 SL1344 $\Delta$ *cya* $\Delta$ *asd* (pYA3493)、缺失株 SL1344 $\Delta$ *cya* 与参考株 SL1344 在 LB 液体培养基中 37°C 培养过夜, 无菌生理盐水连续 10 倍稀释, 取 100  $\mu$ L 适当稀释度菌液均匀涂布于 LB 固体平板上, 每个稀释度做 3 个重复, 37°C 培养过夜, 计数, 取平均值计算原液的 CFU。然后以终浓度约为 10<sup>6</sup>

CFU/mL 转接于相同液体培养基, 37°C、200 r/min 培养, 每 1 h 取样并进行涂板计数, 绘制生长曲线。

### 1.8 重组菌株 SL1344 $\Delta$ *cya* $\Delta$ *asd* (pYA3493) 的毒力测定

将重组菌株 SL1344 $\Delta$ *cya* $\Delta$ *asd* (pYA3493)、缺失株 SL1344 $\Delta$ *cya* 和参考株 SL1344 分别接种至 LB 液体培养基中 37°C 培养过夜后, 以 5000  $\times$  g, 离心 10 min, 收集菌体, 利用无菌生理盐水重悬菌体至预期浓度, 具体浓度值见表 2。1 日龄雏鸡 160 只, 10 只/组, 每组口服感染预期浓度, 500  $\mu$ L/只, 同时设无菌生理盐水对照组。观察其临床症状及鸡只死亡情况, 剖检观察死亡雏鸡的病理变化, 无菌采集其肝脏并接种至 SS 培养基和含有麦芽糖的麦康凯固体平板, 利用引物 Pi1/Pi2 进行菌株鉴定, 根据 Bliss 法计算雏鸡的半数致死量 ( $LD_{50}$ )。

### 1.9 重组菌株 SL1344 $\Delta$ *cya* $\Delta$ *asd* (pYA3493) 毒力稳定性的测定

将重组菌株 SL1344 $\Delta$ *cya* $\Delta$ *asd* (pYA3493) 于 LB 液体培养基中连续传代 60 代, 收集原代、10、20、30、40、50、60 代细菌, 稀释至预期浓度后感染 1 日龄雏鸡, 具体步骤同 1.9, 同时设无菌生理盐水对照组。利用引物 Pi1/Pi2 对分离菌株进行 PCR 鉴定, 同时计算雏鸡的  $LD_{50}$ 。

### 1.10 重组菌株 SL1344 $\Delta$ *cya* $\Delta$ *asd* (pYA3493) 免疫保护率的测定

将鼠伤寒沙门菌 SL1344 $\Delta$ *cya*、SL1344 $\Delta$ *cya* $\Delta$ *asd* (pYA3493) 突变株在 LB 液体培养基中, 37°C 200 r/min 振荡培养 16 h, 无菌生理盐水洗涤细菌并悬浮, 调整细菌浓度, 试验分为 4 组, 分别是 SL1344 $\Delta$ *cya* 免疫组、SL1344 $\Delta$ *cya* $\Delta$ *asd* (pYA3493) 免疫组、未免疫雏鸡参考株攻毒组和空白对照组, 每组 10 只 1 日龄雏鸡, 分别以口服的方式免疫, 口服剂量 10<sup>8</sup> CFU/500  $\mu$ L/只, 空白对照组口服相同剂量的无菌生理盐水。在免疫后第 17 天, 将参考株 SL1344 以口服方式分别对免疫雏鸡进行攻毒, 攻毒剂量口服 1.7  $\times$  10<sup>7</sup> CFU/500  $\mu$ L/只, 攻毒细菌的处理方法同 1.9。攻毒后连续观察记录免疫雏鸡生长及死亡情况, 以评价减毒沙门菌的免疫保护作用。

### 1.11 统计学处理

采用 SPSS17.0 软件进行分析。按照 Bliss 法计算  $LD_{50}$ 。组间比较采用单因素方差分析, 相关性分析采用 Pearson 相关系数分析。以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 重组菌株 SL1344 $\Delta$ *cya* $\Delta$ *asd* (pYA3493) 的构建及鉴定

大肠杆菌  $\chi$ 7213 (pRE $\Delta$ *asd*) 与 SL1344 $\Delta$ *cya* 在含 Cm 的 LB 液体培养基中混合培养后,由于自杀性质粒 pRE $\Delta$ *asd* 整合到 SL1344 $\Delta$ *cya* 染色体上,会得到缺失型和野生型 2 个 *asd* 拷贝且表型呈 Cm 抗性的阳性结合子。因此利用上臂内部引物 pa1 和下臂内部引物 pa2 扩增结合子,可以得到缺失型 315 bp 和野生型 1803 bp 的两个条带。pRE $\Delta$ *asd* 含有负向选择基因 (*sacB*, 蔗糖敏感基因), 阳性结合子在含 5% 蔗糖和 DAP 无 NaCl 的 LB (NB) 培养基连续传代培养中发生第二次同源重组,为了进一步加大筛选力度,利用 DAP 选择培养基涂板培养更加快速便捷。挑取单菌落,利用引物 pa1/pa2 扩增产生 315 bp 突变型和 1803 bp 恢复野生型两种结果。为了证明扩增缺失片段是发生在染色体而不是重组自杀性质粒上,阳性缺失株进一步用下臂内部引物 pa2 和上臂以外染色体上的引物 pa3 进行扩增鉴定,缺失型可获得 2229 bp 的片段,野生型获得 3717 bp 的片段,pRE $\Delta$ *asd* 则扩增不出任何条带。此时筛选所得到的菌株呈 Cm 敏感 (Cm<sup>r</sup>) 和蔗糖抗性 (SUC<sup>r</sup>),表明 SL1344 $\Delta$ *cya* $\Delta$ *asd* 缺失株构建成功。

挑取含 *asd* 基因的无抗性质粒 pYA3493 阳性菌落接种于 LB 液体培养基中,37℃、200 r/min 振荡培养过夜后提取质粒。经电转将质粒转入感受态细菌液中,37℃、100 r/min 振荡培养 90 min 后,涂布在预热的 LB 固体平板上。挑取单菌落于 LB 液体培养基中培养过夜。利用引物 pa2/pa3 进行 PCR 扩增鉴定,结果发现,所挑取菌落可扩增出 2229 bp 的片段,且能在不含 DAP 的 LB 固体平板上生长,由此说明重组菌株 SL1344 $\Delta$ *cya* $\Delta$ *asd* (pYA3493) 构建成功。

### 2.2 重组菌株 SL1344 $\Delta$ *cya* $\Delta$ *asd* (pYA3493) 的生物学特性研究

**2.2.1 重组菌株 SL1344 $\Delta$ *cya* $\Delta$ *asd* (pYA3493) 的表型:**血清型鉴定结果表明,SL1344 $\Delta$ *cya* $\Delta$ *asd* (pYA3493) 的血清型与亲本株 SL1344 $\Delta$ *cya*、参考株 SL1344 相同,均为 1,4,5,12:i:1,2。参考株 SL1344 可以利用麦芽糖,在含有麦芽糖的麦康凯固体平板上菌落呈红色;重组菌株 SL1344 $\Delta$ *cya* $\Delta$ *asd* (pYA3493) 不

能利用麦芽糖,在含麦芽糖和 DAP 的麦康凯固体平板上菌落呈无色,该表型与亲本株 SL1344 $\Delta$ *cya* 一致。生化鉴定结果表明,重组菌株 SL1344 $\Delta$ *cya* $\Delta$ *asd* (pYA3493) 与参考株 SL1344 相比,其生化特性发生了明显变化,与亲本株 SL1344 $\Delta$ *cya* 保持一致。SL1344 $\Delta$ *cya* $\Delta$ *asd* (pYA3493) 失去了利用乳糖、麦芽糖、山梨醇等碳源的能力,也不能分解 H<sub>2</sub>S、半乳糖和鼠李糖,但仍保留了利用葡萄糖的能力。

**2.2.2 重组菌株 SL1344 $\Delta$ *cya* $\Delta$ *asd* (pYA3493) 的遗传稳定性:**将重组菌株 SL1344 $\Delta$ *cya* $\Delta$ *asd* (pYA3493) 在含 DAP 和麦芽糖麦康凯板固体平板上连续培养 60 代,挑取第 10、20、30、40、50、60 代单菌落,利用引物 pa1/pa2 进行 PCR 扩增鉴定,均能扩增出 315 bp 的 *asd* 缺失型片段,而亲本株 SL1344 $\Delta$ *cya* 则扩增出 1803 bp 的 *asd* 野生型片段 (图略),这表明重组菌株 SL1344 $\Delta$ *cya* $\Delta$ *asd* (pYA3493) 能够稳定遗传 315 bp 的 *asd* 缺失片段。

**2.2.3 重组菌株 SL1344 $\Delta$ *cya* $\Delta$ *asd* (pYA3493) 的生长特性:**将重组菌株 SL1344 $\Delta$ *cya* $\Delta$ *asd* (pYA3493)、亲本株 SL1344 $\Delta$ *cya* 及参考株 SL1344 菌液浓度以约 1 × 10<sup>6</sup> CFU/mL 为起始浓度开始振荡培养,然后每 1 h 取 50  $\mu$ L 菌液稀释相应的倍数涂板,过夜培养计数,结果表明重组菌株 SL1344 $\Delta$ *cya* $\Delta$ *asd* (pYA3493) 生长速度明显比参考株 SL1344 缓慢,与亲本株 SL1344 $\Delta$ *cya* 基本一致 (图 1)。

**2.2.4 重组菌株 SL1344 $\Delta$ *cya* $\Delta$ *asd* (pYA3493) 的毒力测定:**1 日龄健康雏鸡经口感染不同浓度参考株 SL1344,鸡只发生死亡或呈现不同程度的临床症

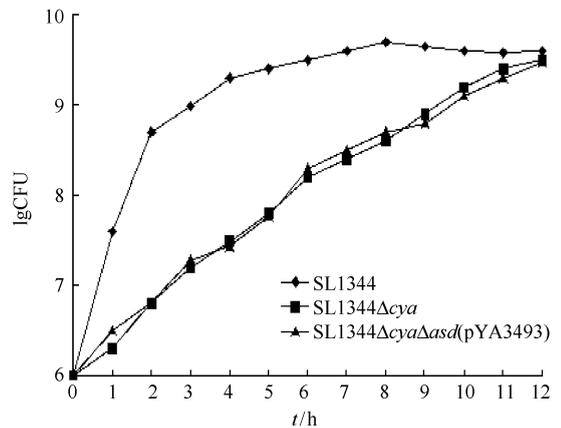


图 1. 重组菌株 SL1344 $\Delta$ *cya* $\Delta$ *asd* (pYA3493)、亲本株 SL1344 $\Delta$ *cya* 与参考株 SL1344 的生长曲线

Figure 1. The growth curves of SL1344 $\Delta$ *cya* $\Delta$ *asd* (pYA3493), SL1344 $\Delta$ *cya* and SL1344.

状。无菌生理盐水对照组雏鸡未发生死亡。剖检观察死亡雏鸡的病理变化,无菌采集其肝脏并接种至含麦芽糖的麦康凯固体平板,利用引物 pi1/pi2 对分离到的细菌进行 PCR 扩增,可得到约 580 bp 的特异性 DNA 片段。应用 Bliss 法计算,参考株 SL1344 的

口服感染半数致死量为  $3.39 \times 10^5$  CFU, SL1344 $\Delta$ *cya* 的口服感染半数致死量为  $3.58 \times 10^9$  CFU,重组菌株 SL1344 $\Delta$ *cya* $\Delta$ *asd* (pYA3493) 的口服感染半数致死量为  $3.46 \times 10^9$  CFU,其毒力较参考株 SL1344 约降低了  $10^4$  倍(表 2)。

表 2. 重组菌株 SL1344 $\Delta$ *cya* $\Delta$ *asd* (pYA3493)、缺失株 SL1344 $\Delta$ *cya* 和参考株 SL1344 的毒力测定

Table 2. Mortality of chicks after orally infection with SL1344 $\Delta$ *cya* $\Delta$ *asd* (pYA3493), SL1344 $\Delta$ *cya* and SL1344

Strains	Inoculating dose (CFU)	Total No. of chicks	No. of death	$LD_{50}$ (CFU)
SL1344 $\Delta$ <i>cya</i> $\Delta$ <i>asd</i> (pYA3493)	$2.67 \times 10^9$	10	4	$3.46 \times 10^9$
	$8.46 \times 10^8$	10	1	
	$1.57 \times 10^8$	10	0	
	$3.38 \times 10^7$	10	0	
	$6.45 \times 10^6$	10	0	
SL1344 $\Delta$ <i>cya</i>	$2.83 \times 10^9$	10	3	$3.58 \times 10^9$
	$7.98 \times 10^8$	10	2	
	$1.32 \times 10^8$	10	0	
	$3.57 \times 10^7$	10	0	
	$7.18 \times 10^6$	10	0	
SL1344	$1.69 \times 10^7$	10	10	$3.39 \times 10^5$
	$3.58 \times 10^6$	10	8	
	$6.92 \times 10^5$	10	7	
	$1.45 \times 10^5$	10	4	
	$2.78 \times 10^4$	10	2	

**2.2.5 重组菌株 SL1344 $\Delta$ *cya* $\Delta$ *asd* (pYA3493) 毒力稳定性测定:** 将重组菌株 SL1344 $\Delta$ *cya* $\Delta$ *asd* (pYA3493) 第 10、20、30、40、50、60 代细菌经平板法培养计数后,用无菌生理盐水稀释至预期浓度后感染 1 日龄雏鸡,计算雏鸡的  $LD_{50}$ 。利用引物 pi1/pi2 对从死亡雏鸡肝脏分离到的细菌进行 PCR 扩增,可得到约 580 bp 的特异性 DNA 片段。应用 Bliss 法计算,重组菌株 SL1344 $\Delta$ *cya* $\Delta$ *asd* (pYA3493) 经传代后其口服感染  $LD_{50}$  差异不显著 ( $P > 0.05$ )。

### 2.3 缺失株 SL1344 $\Delta$ *cya* $\Delta$ *asd* 的免疫保护率的测定

经 SL1344 $\Delta$ *cya* $\Delta$ *asd* (pYA3493) 免疫的雏鸡口服感染参考株 SL1344 后,免疫保护率达到 62.5%, SL1344 $\Delta$ *cya* 免疫保护率达到 62.8%,而未免疫的参考株攻毒组雏鸡全部死亡,无菌生理盐水对照组雏鸡均未发生死亡。

## 3 讨论

近年来,由于重组 DNA 技术的发展和运用,给新型疫苗的制备提供了新的方法。其中,以基因工程减毒细菌活疫苗及其作为载体递呈外源抗原被认为是最有发展前景的研究领域之一<sup>[9]</sup>。目前,减毒

鼠伤寒沙门菌的应用最为广泛,并受到广大研究者的一致青睐。李正等在以鼠伤寒沙门菌 SL1344 $\Delta$ *cya* 的基础上进一步缺失了 *crp* 基因,该双缺失株生长速度更加缓慢,毒力进一步降低,而且免疫原性良好,可作为减毒沙门菌活疫苗的候选菌株<sup>[10]</sup>。Hassan 等通过接种雏鸡减毒鼠伤寒沙门菌  $\Delta$ *cya* $\Delta$ *crp* $\chi$ 3985,具有抵御雏鸡沙门菌感染的能力,结果表明其控制雏鸡的沙门菌感染具有重要作用<sup>[11]</sup>。但这些减毒鼠伤寒沙门菌菌株用于表达外源抗原时,需将编码外源抗原的基因克隆至抗生素标记的质粒载体上,在实际生产应用中就存在抗药性的风险,且抗生素重组质粒在人类和动物体内也不能稳定存在,因此抗性选择在实际生产应用中并不适用<sup>[12]</sup>。

为了在没有抗生素标记的情况下减毒鼠伤寒沙门菌能够稳定携带和表达外源抗原基因,近年来研究的 *asd* 载体-宿主平衡致死系统,通过接受 *asd*<sup>+</sup> 质粒携带外源抗原基因而表达相应抗原蛋白,为沙门菌活疫苗载体的研发开辟了新的途径。虽然国内对减毒沙门菌携带外源基因方面的研究已取得了一定的成果<sup>[13-14]</sup>,但仍没有自主研发并应用于临床的减毒鼠伤寒沙门菌缺失株 SL1344 $\Delta$ *cya* $\Delta$ *asd* 平衡致死

系统。因此,本研究以鼠伤寒沙门菌 SL1344 $\Delta$ *cya* 为亲本菌株,通过自杀性质粒介导的同源重组的方法构建得到 SL1344 $\Delta$ *cya $\Delta$ *asd* 缺失株,然后将含 *asd* 基因且无抗性的 pYA3493 质粒电转化至缺失株 SL1344 $\Delta$ *cya $\Delta$ *asd*,获得 SL1344  $\Delta$ *cya $\Delta$ *asd*(pYA3493) 重组菌株。生化特性研究表明,该菌株失去了利用麦芽糖、乳糖、山梨醇等碳源的能力,不能分解 H<sub>2</sub>S、半乳糖和鼠李糖,但保留了利用葡萄糖的能力,这些都与亲本株 SL1344 $\Delta$ *cya* 保持一致,说明 *asd* 基因并不影响 SL1344 $\Delta$ *cya* 的生化特性。***

本研究以 1 日龄健康雏鸡为实验动物,设计了 SL1344 $\Delta$ *cya $\Delta$ *asd*(pYA3493) 对雏鸡的致病性测定试验,结果显示,参考株 SL1344 的口服感染半数致死量为  $3.39 \times 10^5$  CFU,重组菌株 SL1344 $\Delta$ *cya $\Delta$ *asd* (pYA3493) 的口服感染半数致死量为  $3.46 \times 10^9$  CFU,其毒力较参考株 SL1344 降低了约  $10^4$  倍,初步说明重组菌株 SL1344 $\Delta$ *cya $\Delta$ *asd* (pYA3493) 作为疫苗载体具有良好的安全性,所构成的宿主载体平衡致死系统可用于外源基因的稳定表达,为开发安全高效的口服多价鼠伤寒沙门菌活载体疫苗奠定了基础。减毒鼠伤寒沙门菌载体作为基因疫苗运送载体的研究真正走入临床应用方面,还需进一步的完善,还需考虑到表达量低、毒力返强、表达产物对载体有危害等不足之处。相信对减毒鼠伤寒沙门菌载体研究的不断深入和分子生物学的不断发展,会逐步解决存在的问题,使完善的减毒鼠伤寒沙门菌载体真正应用到临床中。***

## 参考文献

[ 1 ] Zhao H, Fu L, Tang G. Main foodborn pathogens in our country. *Journal of Medical Pest Control*, 2012, 28 (11): 1212-1216. (in Chinese)  
赵怀龙,付留杰,唐功臣.我国主要的食源性致病菌. *医学动物防制*, 2012, 28(11): 1212-1216.

[ 2 ] Huang Z, Xi M. One salmonella strain of Khartoum was first detected from health physical examination in Shanghai. *Shanghai Journal of Preventive Medicine*, 2006, 18(11): 552-553. (in Chinese)  
黄峥,席美芳.上海市健康体检者中首次检出 1 株喀普斯塔德沙门菌. *上海预防医学杂志*, 2006, 18 (11): 552-553.

[ 3 ] Tamang MD, Gurung M, Nam HM, Moon DC, Jang GC, Jung SC, Lim SK. Antimicrobial susceptibility and virulence characteristics of *Salmonella enterica*

*Typhimurium* isolates from healthy and diseased pigs in Korea. *Journal of Food Protection*, 2014, 77 (9): 1481-1486.

[ 4 ] Pascual DW, Suo Z, Cao L, Avci R, Yang X. Attenuating gene expression (AGE) for vaccine development. *Virulence*, 2013, 4(5): 384-390.

[ 5 ] Xu Y, Guo A, Liu Y, Jia A, Chen H. Construction and characterization of  $\Delta$ *crp $\Delta$ *asd* mutant host-vector balanced lethal system of *Salmonella choleraesuis* C500 strain. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2006, 22 (3): 366-372. (in Chinese)  
徐引弟,郭爱珍,刘维红,贾爱卿,陈焕春.猪霍乱沙门菌 C500 株  $\Delta$ *crp $\Delta$ *asd* 缺失株平衡致死载体系统的构建及鉴定. *生物工程学报*, 2006, 22 (3): 366-372.**

[ 6 ] Zhao Z, Xu Y, Wu B, Cheng X, Li Y, Tang X, Zhang C, Chen H. Characterization of attenuated *Salmonella* C500 strain with a delta *asd* mutant and use as an Asd<sup>+</sup> balanced-lethal host-vector system. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2009, 25(1): 29-36. (in Chinese)  
赵战勤,徐引弟,吴斌,程相朝,李银聚,汤细彪,张春杰,陈焕春.猪霍乱沙门氏菌  $\Delta$ *asd*C500 株的生物学特性及作为活疫苗表达载体的应用. *生物工程学报*, 2009, 25(1): 29-36.

[ 7 ] 廖成水.鼠伤寒沙门氏菌  $\Delta$ *crp、 $\Delta$ *cya* 缺失菌株的构建及其生物学特性比较研究.河南科技大学硕士学位论文,2011.*

[ 8 ] Tian F, Cheng X, Zhang C, Li Y, Li J, Zhang M, Li X, Li Z, Zhao Z. Construction and characterization of a *Salmonella typhimurium* SL1344 $\Delta$ *crp $\Delta$ *asd* mutant strain. *Chinese Journal of Veterinary Science*, 2013, 33(11): 1700-1706. (in Chinese)  
田芳华,程相朝,张春杰,李银聚,李静,张明亮,李小康,李正,赵战勤.鼠伤寒沙门菌 SL1344 株  $\Delta$ *crp $\Delta$ *asd* 缺失株的构建及生物学特性初步研究. *中国兽医学报*, 2013, 33(11): 1700-1706.**

[ 9 ] Chorobik P, Marcinkiewicz J. Therapeutic vaccines based on genetically modified *Salmonella*: a novel strategy in cancer immunotherapy. *Polskie Archiwum Medycyny Wewnetrznej*, 2011, 121(12): 461-466.

[ 10 ] Li Z, Cheng X, Zhang C, Li Y, Li J, Zhang M, Tian F, Yang N. Construction and characterization of a mutant *Salmonella typhimurium* SL1344 $\Delta$ *crp $\Delta$ *asd* strain, *Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine*, 2012, 34(7): 534-538. (in Chinese)  
李正,程相朝,张春杰,李银聚,李静,张明亮,田芳华,杨宁宁.鼠伤寒沙门氏菌 SL1344 株  $\Delta$ *crp $\Delta$ *cya***

缺失株的构建及其生物学特性初步研究. 中国预防兽医学报, 2012, 34(7): 534-538.

- [11] Hassan JO, Curtiss R 3rd. Development and evaluation of an experimental vaccination program using a live avirulent *Salmonella typhimurium* strain to protect immunized chickens against challenge with homologous and heterologous *Salmonella serotypes*. *Infection and Immunity*, 1994, 62(12): 5519-5527.
- [12] Curtiss R 3rd, Galan JE, Nakayama K, Kelly SM. Stabilization of recombinant avirulent vaccine strains in vivo. *Research in Microbiology*, 1990, 141(7-8): 797-805.
- [13] Zhao H, Xu X, Tong D, Luo X. Construction of the attenuated *Salmonella typhimurium* vaccine strains

expressing PRRSV GP3 antigen. *Acta Agriculturae Boreali-Occidentalis Sinica*, 2011, 20(10): 6-11. (in Chinese)

- 赵红妮, 许信刚, 童德文, 罗小毛. 表达 PRRSV GP3 蛋白减毒鼠伤寒沙门氏菌疫苗株的构建. 西北农业学报, 2011, 20(10): 6-11.
- [14] Yin J, Zhou B, Wen M, Fan C, Yang Y, Du H. Construction and indentification of eukaryotic expression vector of goat poxvirus P32 gene using attenuated *Salmonella typhimurium* as carrier. *Biotechnology*, 2010, 20(4): 3-5. (in Chinese)
- 殷俊磊, 周碧君, 文明, 樊翠华, 杨颖, 杜海燕. 以减毒沙门氏菌为载体山羊痘病毒 P32 基因真核表达载体的构建与鉴定. 生物技术, 2010, 20(4): 3-5.

## Construction of host-vector balanced lethal system of *Salmonella typhimurium* SL1344 $\Delta$ *cya* mutant and immune protection test of chickling

Jing Li<sup>#</sup>, Songbiao Chen<sup>#</sup>, Zuhua Yu, Lei He, Xiaokang Li, Yanyan Jia, Chuan Yu, Chunjie Zhang<sup>\*</sup>, Xiangchao Cheng, Yinju Li, Tingcai Wu, Zhanqin Zhao

Animal Disease and Public Security Academician Workstation of Henan Province, The Key Laboratory of Animal Disease and Public Health, Henan University of Science and Technology, Luoyang 471003, Henan Province, China

**Abstract:** [ **Objective** ] To develop a host-vector balanced lethal system of *Salmonella typhimurium* adenylate cyclase mutant, and detect its biological characteristics. [ **Methods** ] We constructed SL1344 $\Delta$ *cya* $\Delta$ *asd* mutant strain by recombinant suicide plasmid (pRE $\Delta$ *asd*), and screened by two-step method, transformed pYA3493 plasmid containing the *asd* gene without resistance electric into the lack of SL1344  $\Delta$ *cya* $\Delta$ *asd*, then the recombinant strains SL1344  $\Delta$ *cya* $\Delta$ *asd* (pYA3493) was constructed successfully. [ **Results** ] The biochemical characteristics and growth rate of the mutant were different from that of the wild strain SL1344, but almost the same as that of the parent strain SL1344 $\Delta$ *cya*. The mutant strain could neither ferment maltose, lactose, and sorbitol, nor decompose H<sub>2</sub>S, galactose and rat lee sugar, but still retained the ability to use glucose. The one-day chicken lethal test showed that SL1344 $\Delta$ *cya* $\Delta$ *asd* (pYA3493) mutant was at least 10<sup>4</sup> times lower than SL1344 strain. The protection rate induced by the SL1344 $\Delta$ *cya* $\Delta$ *asd* (pYA3493) mutant was 62.5%. [ **Conclusion** ] The SL1344 $\Delta$ *cya* $\Delta$ *asd* (pYA3493) mutant was successfully constructed, and had good immune protection, it laid a foundation for developing potential oral vaccines.

**Keywords:** *Salmonella typhimurium*, mutant, *asd* host-vector balanced lethal system, immunoprotection

(本文责编:王晋芳,李磊)

Supported by the Dr. Start-up Fund Projects of Henan University of Science and Technology (09001580), by the Youth science fund project of Henan university of science and technology (2012QN009) and by the Key Project of Scientific Research in Colleges and Universities of Henan Province (15A230010)

\* Corresponding author. E-mail: cjzhang@sina.com

<sup>#</sup>These authors contributed equally to this work.

Received: 26 November 2014/Revised: 2 March 2015