

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
55 (9) :1154-1159; 4 September 2015
ISSN 0001-6209; CN 11-1995/Q
<http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>
doi: 10.13343/j.cnki.wsxb.20140621

鸡白痢沙门菌 S06004 株致病岛-2 缺失株的构建及其生物学特性

殷俊磊, 吴颖斐, 蔺志杰, 王晓春, 胡亚辰, 李求春, 耿士忠, 焦新安*

扬州大学, 江苏省人兽共患病学重点实验室, 江苏省动物重要疫病与人兽共患病防控协同创新中心, 江苏 扬州 225009

摘要: 【目的】了解致病岛-2 (*Salmonella* Pathogenicity Island 2, SPI-2) 对鸡白痢沙门菌致病性的影响, 初步探讨研制安全有效的鸡白痢沙门菌减毒株的可行性。【方法】采用 λ -red 同源重组系统构建鸡白痢沙门菌 S06004 株的 SPI-2 (约 40 kb) 缺失株 S06004 Δ SPI2。并与野生型相比较, 对该缺失株的生长特性、生化特性、遗传稳定性和致病性等基本生物学特性进行鉴定。【结果】成功构建 SPI-2 缺失株 S06004 Δ SPI2, SPI-2 的缺失不影响鸡白痢沙门菌的生长特性和生化特性, 且该缺失株具有良好的遗传稳定性, 其对 2 日龄雏鸡的 LD_{50} 是野生株的 252 倍。【结论】SPI-2 的缺失引起鸡白痢沙门菌毒力的明显下降, 这为进一步研究鸡白痢沙门菌 SPI-2 的功能及制备减毒疫苗奠定了基础。

关键词: 鸡白痢沙门菌, λ -red 同源重组, 致病岛-2, 生物学特性

中图分类号: Q933 **文章编号:** 0001-6209 (2015) 09-1154-06

鸡白痢沙门菌 (*Salmonella* Pullorum) 是鸡白痢的病原菌, 呈革兰氏阴性, 需氧或兼性厌氧, 无芽孢, 无荚膜, 无鞭毛、不能运动, 具有高度适应专一宿主的特点。它可引起雏鸡的急性败血症, 多侵害 3 周龄以内幼雏, 发病率和死亡率相当高; 成年鸡亦可感染, 常导致母鸡产蛋减少, 生殖道畸形, 体重下降, 并能垂直传播, 也导致孵化率和出雏率明显下降, 火鸡和其它鸟类也可感染, 给养鸡业带来了巨大危害, 引起严重的经济损失^[1-2]。

目前, 对该病的有效防控对策是进行生物安全控制和采取净化措施, 主要是淘汰发病鸡 (群), 持续性监测非感染鸡群, 切断传播途径。但由于社会发展水平的限制, 这些措施在很多国家实施起来还有很大难度。抗菌药物的使用因易产生耐药性和药

物残留等公共卫生问题已不能作为防控该病的理想选择^[3]。免疫接种可作为防控该病的手段, 相对于传统的灭活疫苗, 减毒活疫苗能提供更加高效的保护, 且能诱导较高的细胞免疫反应^[4-5]。因此, 需要研制安全高效的鸡白痢沙门菌减毒活疫苗来防控鸡白痢。

致病岛-2 (*Salmonella* Pathogenicity Island 2, SPI-2) 是位于沙门菌基因组上的一个约 40 kb 的致病岛, 其编码的 III 型分泌系统 (T3SS2) 可以分泌多种功能不同的效应蛋白, 这些效应蛋白对沙门菌在宿主细胞内的生存和增殖起着重要作用, 为进一步引起全身性的感染提供必要条件^[6]。目前, 与 SPI-2 功能相关的研究报道已有很多, 但关于 SPI-2 缺失的沙门菌作为疫苗的研究报道却比

基金项目: 国家自然科学基金重点项目 (31230070); 国家公益性行业 (农业) 科研专项 (201403054); 江苏省普通高校研究生科研创新计划项目 (CXZZ13_0917)

* 通信作者。Tel: +86-514-87971803; Fax: +86-514-87311374; E-mail: jiao@yzu.edu.cn

作者简介: 殷俊磊 (1984-), 男, 河南许昌人, 博士研究生, 主要从事畜禽传染病和人兽共患病研究。E-mail: lyin22@163.com

收稿日期: 2014-12-30; **修回日期:** 2015-02-10

较少,尤其是以鸡白痢沙门菌为模型对 SPI-2 的相关研究更少^[7]。

因此,本文拟利用 λ-red 同源重组系统构建鸡白痢沙门菌 S06004 株的 SPI-2 缺失株 S06004ΔSPI2,并对其生长特性、生化特性、遗传稳定性和致病性等基本生物学特性进行初步研究,为进一步研究鸡白痢沙门菌 SPI-2 的功能及制备减毒疫苗的可行性提供条件。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株、质粒、实验动物及细菌培养方法:鸡白痢沙门菌 S06004 (Nal^R) 由本实验室于 2006 年从某养鸡场发病鸡体内分离、鉴定和保存; S06004/pkD46 (Nal^R Amp^R) 和质粒 pKD3 (Cm^R)、pCP20 (Amp^R Cm^R) 等均由本实验室保存。根据需要加入终浓度 100 μg/mL 的氨苄青霉素 (Amp)、34 μg/mL 的氯霉素 (Cm)、40 μg/mL 的萘啶酮酸 (Nal)。9 日龄海兰白蛋鸡鸡胚购自江苏省仪征市大巷永康种鸡场,由本实验室自行孵化。所用菌株均培养于 LB 培养基。

1.1.2 主要试剂和仪器:Taq DNA 聚合酶、高保真 DNA 聚合酶、dNTP、DNA Marker 和 Agarose Gel DNA Extraction Kit 购自宝生物工程 (大连) 有限公司。细菌微量生化发酵管购自杭州天和微生物试剂有限公司。L-阿拉伯糖购自 Sigma 公司。其余常规试剂均为国产或进口分析纯产品。电穿孔仪及电转杯购自德国 Eppendorf 公司。

1.2 引物设计

根据 GenBank 中公布的鸡白痢沙门菌 S06004 株基因组序列 (accession No. CP006575.1), 利用软件 Primer 5.0 设计出特异性引物 (表 1)。P1/P2 为用于同源重组的一对引物,该引物分别有两部分组成,5'端粗体部分序列与 SPI-2 序列同源/互补序列,3'端斜体部分序列与质粒 pKD3 上的氯霉素序列同源/互补序列; CX1/CX2 为缺失株构建后的 PCR 验证及测序引物序列; N1/N2、N3/N4 分别为两对 SPI-2 内部靠近两端的 PCR 验证引物序列。由南京金斯瑞生物科技有限公司合成。

表 1. PCR 扩增的引物序列

Table 1. Primers used in this study

Primers	Sequences (5'→3')	Size/bp
P1	ATGTCAATCGAGCAACTTTTGCCTTCCAGG	1093
	TCGATGCTGCTGTAAGCTGGAGCTGCTTCG	
P2	TTATGCTGTTTCGGTAGAATGCCGATAATCT	
	ATCTTCATCCATATGAATATCTCTCCTTAG	
CX1	TGATGATGCCTCGCTCTAAG	842
CX2	TGCGGTTGTGACGCTAATA	
N1	ACCAGAACAGGACAGCGTAT	651
N2	GCTATCGGATTTATGGAGACA	
N3	GACTCAAATACAGGACCAAAC	840
N4	ATCAGGAGCGTCAGTAGAAC	

1.3 鸡白痢沙门菌 SPI-2 缺失株 S06004ΔSPI2 的构建

以 pKD3 质粒 DNA 为模板,用含有 SPI-2 同源臂的引物 P1 和 P2 对 SPI-2 同源重组片段进行 PCR 扩增,采用 1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定 PCR 产物,用胶回收试剂盒纯化并测定浓度,回收片段作为打靶片段。将打靶片段电转化到诱导表达了重组蛋白的感受态细胞 S06004/pKD46 中,通过 λ-red 同源重组系统^[8]产生鸡白痢沙门菌 SPI-2 缺失株 S06004ΔSPI2。

1.4 生化特性测定

挑取在固体 LB 培养基上培养的鸡白痢沙门菌株 S06004 和 SPI-2 缺失株 S06004ΔSPI2,分别接种于葡萄糖、蔗糖、麦芽糖、甘露糖、甘露醇、山梨醇、卫矛醇、侧金花醇、乳糖、丙二酸盐、鸟氨酸脱羧酶、赖氨酸脱羧酶、尿素、L-阿拉伯糖和硫化氢等生化鉴定管,37 ℃ 过夜,观察生化鉴定结果。

1.5 生长特性测定

在固体 LB 培养基上挑取鸡白痢沙门菌株 S06004 和 SPI-2 缺失株 S06004ΔSPI2,分别接种于 LB 液体培养基中培养过夜,次日分别转接入 15 mL 的 LB 液体培养基 (调节 OD₆₀₀ = 0.05) 中。37 ℃、180 r/min 振荡培养;连续 16 h,每隔 1 h 测定培养物的 OD₆₀₀ 值,并绘制细菌的生长曲线,观察其生长速度。

1.6 遗传稳定性分析

将鸡白痢沙门菌株 S06004 和 SPI-2 缺失株 S06004ΔSPI2 在液体 LB 培养基连续传代培养至 30 代,选取第 10、20、30 代细菌,SPI-2 内部特异性引物 N1/N2、N3/N4 进行 PCR 扩增,若均未在 S06004ΔSPI2 中扩增出条带,而在 S06004 中扩增出条带,则证明 S06004ΔSPI2 具有良好的遗传稳定性。

1.7 S06004ΔSPI2 对雏鸡的毒力试验

分别接种鸡白痢沙门菌株 S06004 和 SPI-2 缺失株 S06004ΔSPI2 于 LB 液体培养基中培养过夜，以 PBS 洗涤细菌 3 次并悬浮，调整细菌浓度。将 110 只 2 日龄雏鸡随机分为 3 组，A 组为 50 只，分别以 1×10^5 、 1×10^6 、 1×10^7 、 1×10^8 、 1×10^9 CFU 的剂量肌肉注射 S06004，每一剂量攻 10 只；B 组为攻 S06004ΔSPI2 组，分别以 1×10^6 、 1×10^7 、 1×10^8 、 1×10^9 、 1×10^{10} CFU 的剂量肌肉注射，每一剂量攻 10 只；C 组为 PBS 对照组，10 只。连续观察 2 周并统计死亡情况，根据 Karber-Behrens 法计算细菌的 LD_{50} ，评价菌株对雏鸡的毒力。

2 结果和分析

2.1 鸡白痢沙门菌 SPI-2 缺失株 S06004ΔSPI2 的鉴定

以 P1 和 P2 为引物、pKD3 为模板进行 PCR 扩增，扩增产物为含有 SPI-2 上、下游同源臂序列和 Cm 抗性基因序列的打靶片段，约为 1093 bp (图 1)。扩增结果与预期结果一致。经抗性筛选丢失 pCP20 后，用内部引物 N1/N2、N3/N4 和测序引物 CX1/CX2 进行 PCR 验证 (图 2)，并对 CX1/CX2 的扩增产物进行测序。以 S06004ΔSPI2 基因组为模板，内部引物 N1/N2、N3/N4 均未扩出条带，CX1/CX2 扩增出了 842 bp 的条带。扩增结果和测序结果与预期结果一致，证实了鸡白痢沙门菌 SPI-2 缺失株 S06004ΔSPI2 的成功构建。

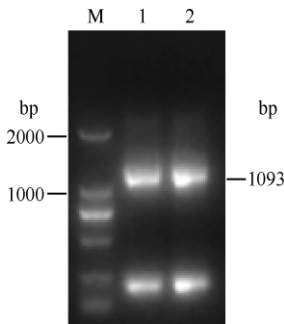


图 1. P1/P2 扩增 pKD3 产物的 PCR 鉴定
Figure 1. PCR identification of pKD3 with P1/P2. M, DL2000 DNA ladder; lane 1–2, PCR products from pKD3.

2.2 S06004ΔSPI2 的生化特性鉴定

SPI-2 缺失株 S06004ΔSPI2 和野生株 S06004 的

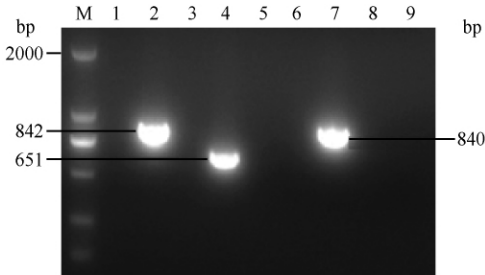


图 2. S06004ΔSPI2 的 PCR 鉴定
Figure 2. PCR identification of S06004ΔSPI2. M, DL2000 DNA ladder; lanes 1–3 with CX1/CX2, lanes 4–6 with N1/N2, lanes 7–9 with N3/N4. lanes 1, 4, 7: genomic DNAs from S06004; lanes 2, 5, 8: S06004ΔSPI2; lanes 3, 6, 9: negative control.

生化特性一致 (表 2)，均能发酵葡萄糖、甘露糖、甘露醇、鸟氨酸脱羧酶和赖氨酸脱羧酶，而不能发酵蔗糖、麦芽糖、山梨醇、卫矛醇、侧金花醇、乳糖、丙二酸盐、尿素、L-阿拉伯糖和硫化氢等。说明 SPI-2 的缺失不影响鸡白痢沙门菌 S06004ΔSPI2 的生化特性。

2.3 S06004ΔSPI2 的生长特性鉴定

SPI-2 缺失株 S06004ΔSPI2 和野生株 S06004 的生长特性一致 (图 3)。说明 SPI-2 的缺失不影响鸡白痢沙门菌 S06004ΔSPI2 的生长特性。

表 2. 鸡白痢沙门菌 S06004 株和缺失株 S06004ΔSPI2 的生化特性比较

Biochemical characterization	Strains	
	S06004	S06004ΔSPI2
Glucose	+	+
Sucrose	–	–
Maltose	–	–
Mannose	+	+
Mannitol	+	+
Sorbitol	–	–
Dulcitol	–	–
Adonitol	–	–
Lactose	–	–
Malonate	–	–
Ornithine decarboxylase	+	+
Lysine decarboxylase	+	+
Urea	–	–
L-Arab alcohol	–	–
H ₂ S	–	–

+ : Positive; – : Negative.

2.4 S06004ΔSPI2 的遗传稳定性

分别以传至第 10、20、30 代的缺失株

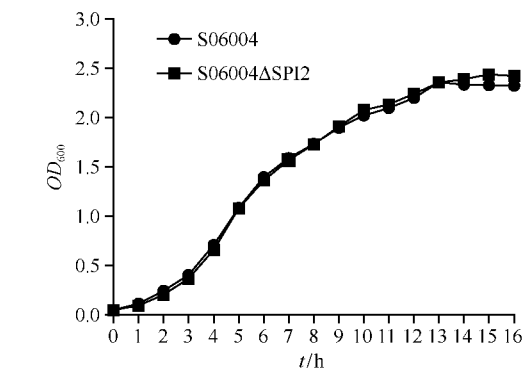


图 3. S06004 和 S06004ΔSPI2 的生长曲线

Figure 3. Growth curves of S06004 and S06004ΔSPI2.

S06004ΔSPI2 和野生型 S06004 的基因组为模板,用 SPI-2 内部特异性引物 N1/N2、N3/N4 进行 PCR 扩增,均未在 S06004ΔSPI2 中扩增出条带,而在 S06004 中则扩增出相应大小条带(图 4),证明 S06004ΔSPI2 具有良好的遗传稳定性。

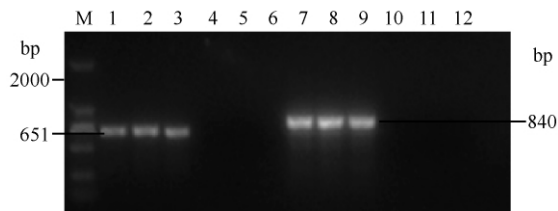


图 4. S06004ΔSPI2 的遗传稳定性鉴定

Figure 4. Stability of S06004ΔSPI2. M, DL2000 DNA ladder; lanes 1 – 3 and lanes 7 – 9: the 10th, 20th, 30th generation of S06004 with N1/2 and N3/N4, respectively; lanes 4 – 6 and lanes 10 – 12: the 10th, 20th, 30th generation of S06004ΔSPI2.

2.5 S06004ΔSPI2 对雏鸡的毒力试验

根据 Karber-Behrens 法计算,S06004ΔSPI2 对 2 日龄雏鸡的 LD₅₀为 1.74 × 10⁸ CFU,S06004 对雏鸡的 LD₅₀为 6.90 × 10⁶ CFU(表 3)。S06004ΔSPI2 的 LD₅₀是其亲本野生型 S06004 的 252 倍,说明 SPI-2 缺失后,其毒力明显下降。

3 讨论

鸡白痢沙门菌属肠杆菌科沙门菌属,引起禽的鸡白痢。它和鸡伤寒沙门菌是沙门菌属中仅有的无鞭毛、不能运动的细菌,给养禽业带来很大的经济损失。目前,该病在西方发达国家已基本被消除,仅偶有少数鸡群发生该病,而该病在广大发展中国家依

然危害严重^[9-10]。但是与鸡白痢沙门菌的致病机理及其防治相关研究的报道却比较少见。新型减毒沙门菌活疫苗的研究已成为防控沙门菌病的一个热点,并取得了较好的效果^[5]。

表 3. 鸡白痢沙门菌 S06004 株和缺失株 S06004ΔSPI2 的 LD₅₀测定结果

Table 3. LD₅₀ of S06004 and S06004ΔSPI2

Strains	Challenge dose /CFU	No. of deaths /total No. of chicken	LD ₅₀ /CFU
S06004	1 × 10 ⁵	0 /10	6.90 × 10 ⁶
	1 × 10 ⁶	1 /10	
	1 × 10 ⁷	6 /10	
	1 × 10 ⁸	9 /10	
	1 × 10 ⁹	10 /10	
	1 × 10 ¹⁰	10 /10	
S06004ΔSPI2	1 × 10 ⁶	0 /10	1.74 × 10 ⁹
	1 × 10 ⁷	0 /10	
	1 × 10 ⁸	0 /10	
	1 × 10 ⁹	4 /10	
	1 × 10 ¹⁰	9 /10	
	1 × 10 ¹¹	10 /10	
PBS	—	0 /10	—

近年来,基因工程技术已成为我们研究病原微生物致病机理及其防控措施的重要手段。λ-red 同源重组技术便是其中之一,它是一种基于 λ 噬菌体 Red 操纵子和 Rac 噬菌体 RecE/RecT 重组系统的 DNA 工程技术^[11]。这种技术可简单、快速地在 DNA 靶标分子的目的位点进行基因敲除、敲入、点突变等操作,且不易发生碱基突变,重组效率高。目前,该技术已被广泛地用于基因组 DNA 等的遗传修饰研究以及基因工程药物的研究和开发中。

作为一个约 40 kb 的毒力基因簇,SPI-2 在沙门菌的致病过程中起着重要作用,其编码的 T3SS2 在沙门菌侵入宿主细胞后才开始组装合成,通过该装置分泌的效应蛋白与沙门菌在宿主细胞内生成的赖以生存的沙门菌囊泡(SCV)密切相关,T3SS2 分泌的效应蛋白可修饰 SCV,保持 SCV 的稳定性及其膜的完整性,阻止溶酶体对其融合,使其适合沙门菌的生存并干扰宿主细胞的杀菌作用,这是沙门菌对宿主全身性的感染所必需的^[12-13]。到目前为止,已有 30 多个 T3SS2 效应蛋白被发现和鉴定^[14]。

因此,本实验以 SPI-2 作为研究对象,利用 λ-red 同源重组系统成功构建了鸡白痢沙门菌 S06004 株的 SPI-2 缺失株 S06004ΔSPI2,并对其基本生物学特性进行了初步研究。生化特性和生长特性鉴定结果表明,SPI-2 的缺失不影响鸡白痢沙门菌的生化特

性,且对其生长特性也没有影响,说明其对鸡白痢沙门菌的生长代谢没有影响。遗传稳定性实验表明,SPI-2 缺失后,缺失株 S06004 Δ SPI2 具有良好的遗传稳定性。毒力试验结果表明,SPI-2 的缺失引起鸡白痢沙门菌毒力明显下降,进一步证明了 SPI-2 在沙门菌致病性方面的重要作用。有研究显示,SPI-2 功能性丧失的突变可导致鼠伤寒沙门菌、伤寒沙门菌和肠炎沙门菌毒力的显著下降,且这些突变株具有作为减毒活疫苗的潜质^[15-16]。SPI-2 与鸡伤寒沙门菌和鸡白痢沙门菌在鸡体内的长期定殖密切相关,当 SPI-2 功能性失活后,鸡伤寒沙门菌和鸡白痢沙门菌均不能在鸡体内长期定殖,很快就会被机体清除^[13,17]。当鸡白痢沙门菌 T3SS2 的一个重要效应蛋白基因 *spiC* 缺失后,其对鸡白痢沙门菌生长特性和生化特性均没有影响,但也引起其对雏鸡的毒力显著下降,且具有良好的遗传稳定性^[18]。

综上所述,本研究成功构建了鸡白痢沙门菌 S06004 株的 SPI-2 缺失株 S06004 Δ SPI2,为进一步研究鸡白痢沙门菌的致病机理及制备减毒疫苗可行性提供了基础数据,也为更深入的相关研究奠定了基础。

参考文献

- [1] Shivaprasad HL. Fowl typhoid and pullorum disease. *Revue Scientifique et Technique (International Office of Epizootics)*, 2000, 19 (2): 405-424.
- [2] Lutful Kabir SM. Avian colibacillosis and salmonellosis: a closer look at epidemiology, pathogenesis, diagnosis, control and public health concerns. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 2010, 7 (1): 89-114.
- [3] Jiao X, Liu X. Prevalence and control strategies of avian salmonellosis. *Guide to China Poultry*, 1998, 15 (1): 23-24. (in Chinese)
焦新安, 刘秀梵. 禽沙门氏菌病流行现状与防控对策. *中国禽业导刊*, 1998, 15 (1): 23-24.
- [4] Nandre R, Matsuda K, Lee JH. Efficacy for a new live attenuated *Salmonella* Enteritidis vaccine candidate to reduce internal egg contamination. *Zoonoses and Public Health*, 2014, 61 (1): 55-63.
- [5] Barrow PA, Freitas Neto OC. Pullorum disease and fowl typhoid—new thoughts on old diseases: a review. *Avian Pathology*, 2011, 40 (1): 1-13.
- [6] Galan JE. *Salmonella* interactions with host cells: type III secretion at work. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 2001, 17: 53-86.
- [7] Matulova M, Havlickova H, Sisak F, Rychlik I. Vaccination of chickens with *Salmonella* pathogenicity island (SPI) 1 and SPI2 defective mutants of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis. *Vaccine*, 2012, 30 (12): 2090-2097.
- [8] Datsenko KA, Wanner BL. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *The Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2000, 97 (12): 6640-6645.
- [9] Orji MU, Onuigbo HC, Mbata TI. Isolation of *Salmonella* from poultry droppings and other environmental sources in Awka, Nigeria. *International Journal of Infectious Diseases*, 2005, 9 (2): 86-89.
- [10] Prakash B, Krishnappa G, Muniyappa L, Kumar BS. Epidemiological characterization of avian *Salmonella enterica* serovar infections in India. *International Journal of Poultry Science*, 2005, 4: 388-395.
- [11] Murphy KC. Use of bacteriophage λ recombination functions to promote gene replacement in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 1998, 180 (8): 2063-2071.
- [12] Moest TP, Meresse S. *Salmonella* T3SSs: successful mission of the secret (ion) agents. *Current Opinion in Microbiology*, 2013, 16 (1): 38-44.
- [13] Jones MA, Wigley P, Page KL, Hulme SD, Barrow PA. *Salmonella enterica* serovar Gallinarum requires the *Salmonella* pathogenicity island 2 type III secretion system but not the *Salmonella* pathogenicity island 1 type III secretion system for virulence in chickens. *Infection and Immunity*, 2001, 69 (9): 5471-5476.
- [14] Waterman SR, Holden DW. Functions and effectors of the *Salmonella* pathogenicity island 2 type III secretion system. *Cellular Microbiology*, 2003, 5 (8): 501-511.
- [15] Khan SA, Stratford R, Wu T, Mckelvie N, Bellaby T, Hindle Z, Sinha KA, Eltze S, Mastroeni P, Pickard D, Dougan G, Chatfield SN, Brennan FR. *Salmonella typhi* and *S. typhimurium* derivatives harbouring deletions in aromatic biosynthesis and *Salmonella* Pathogenicity Island-2 (SPI-2) genes as vaccines and vectors. *Vaccine*, 2003, 21 (5-6): 538-548.
- [16] Bohez L, Ducatelle R, Pasmans F, Haesebrouck F, Van Immerseel F. Long-term colonisation-inhibition studies to protect broilers against colonisation with *Salmonella* Enteritidis, using *Salmonella* pathogenicity island 1 and 2

mutants. *Vaccine*, 2007, 25 (21) : 4235-4243.

- [17] Wigley P, Jones MA, Barrow PA. *Salmonella enterica* serovar Pullorum requires the *Salmonella* pathogenicity island 2 type III secretion system for virulence and carriage in the chicken. *Avian Pathology*, 2002, 31 (5) : 501-506.

- [18] Geng S, Liu N, Jiao X, Liu H, Guo R, Qian S, Li Y,

Pan Z. Development and identification of *spiC* gene-deleted *Salmonella* Pullorum mutant strain $\Delta spiC$. *Chinese Veterinary Science*, 2014, 44 (4) : 379-386. (in Chinese)

耿士忠, 刘男男, 焦新安, 刘欢, 郭荣显, 钱珊珊, 李昱辰, 潘志明. 鸡白痢沙门菌 S06004 $\Delta spiC$ 突变株的构建与鉴定. 中国兽医科学, 2014, 44 (4) : 379-386.

Construction and characterization of *Salmonella* Pathogenicity Island 2 (SPI-2) deletion mutant of *Salmonella* Pullorum S06004

Junlei Yin, Yingfei Wu, Zhijie Lin, Xiaochun Wang, Yachen Hu, Qiuchun Li, Shizhong Geng, Xinan Jiao*

Key Laboratory of Zoonoses in Jiangsu Province, Co-innovation Center for Prevention and Control of Important Animal Infectious Diseases and Zoonoses, Yangzhou University, Yangzhou 225009, Jiangsu Province, China

Abstract: [Objective] To research the pathogenicity of *Salmonella* Pathogenicity Island 2 (SPI-2) deletion mutant of *Salmonella* Pullorum and preliminary explore the feasibility of developing safe attenuated *Salmonella* Pullorum candidate vaccine strain. [Methods] The SPI-2 (–40 kb) deletion mutant of *Salmonella* Pullorum S06004 was constructed using the λ -red recombinant system. Then the biological characteristics such as growth rate, biochemical properties, genetic stability and virulence were evaluated between the deletion mutant strain S06004 Δ SPI2 and its parent strain S06004. [Results] S06004 Δ SPI2 was successfully constructed. The growth rate and biochemical properties of S06004 Δ SPI2 were consistent with those of its parent strain S06004. The mutant was stable with the deletion of SPI-2. Chicken lethal test showed that the LD_{50} of S06004 Δ SPI2 was 252 times higher than the parent strain S06004. [Conclusion] The virulence of S06004 Δ SPI2 was obviously attenuated. This study provided basic data for further study of the functions of SPI-2, and implied its potential to develop attenuated *Salmonella* vaccine.

Keywords: *Salmonella* Pullorum, λ -red recombinant system, *Salmonella* Pathogenicity Island 2 (SPI-2), biological characteristics

(本文责编:李磊,王晋芳)

Supported by the Key Program of National Natural Science Foundation of China (31230070), by the Special Fund for Agro-Scientific Research in the Public Interest (201403054) and by the Universities of Jiangsu Province Plans to Graduate Research and Innovation (CXZZ13_0917)

* Corresponding author. Tel: +86-514-87971803; Fax: +86-514-87311374; E-mail: jiao@yzu.edu.cn

Received: 30 December 2014 / Revised: 10 February 2015