

猪霍乱沙门氏菌 $\Delta asdC500$ 株的生物学特性及作为活疫苗表达载体的应用

赵战勤^{1,2}, 徐引弟², 吴斌², 程相朝¹, 李银聚¹, 汤细彪², 张春杰¹, 陈焕春²

1 河南科技大学动物科技学院 动物病原微生物学实验室, 洛阳 471003

2 华中农业大学动物医学院 农业微生物学国家重点实验室, 武汉 430070

摘要: 为了评价猪霍乱沙门氏菌 $\Delta asdC500$ 株作为沙门氏菌 Asd^+ 平衡表达系统的可行性, 对 $\Delta asdC500$ 株和其亲本菌株 C500 的生物表型、生长特性、毒力、生物安全性、表达特性等进行比较研究。结果表明: $\Delta asdC500$ 缺失株的生化特性和血清型与亲本菌株 C500 一致, 符合猪霍乱沙门氏菌的表型特征; 携带平衡表达质粒 pYA3493 的重组菌株 $\Delta asdC500(pYA3493)$ 与 C500 的生长速度没有明显差别; 根据 Reed-Muench 法, 测定 $\Delta asdC500(pYA3493)$ 腹腔感染 BALB/c 小鼠的 LD_{50} 为 1.1×10^7 CFU, 毒力稍低于 C500; 口服接种 $\Delta asdC500(pYA3493)$ 和 C500 的所有仔猪未见任何发病症状, 两者没有显著差别; 携带重组质粒 pYA-F1P2 (含有支气管败血波氏杆菌抗原基因 *phaB* 的 Type I 区域和 *prn* 的 R2 区域) 的重组菌株 $\Delta asdC500(pYA-F1P2)$ 能够稳定遗传重组质粒及其外源基因片段, 并能稳定、高效、分泌性表达外源保护性抗原。由此表明, $\Delta asdC500$ 保留了亲本菌株 C500 的一系列生物学特征, 并可高效表达外源抗原, 可作为沙门氏菌 Asd^+ 平衡表达系统开发基因工程重组疫苗。

关键词: 沙门氏菌, 活疫苗载体, Asd^+ 平衡表达系统, 支气管败血波氏杆菌

Characterization of attenuated *Salmonella* C500 strain with a Δasd mutant and use as an Asd^+ balanced-lethal host-vector system

Zhanqin Zhao^{1,2}, Yindi Xu², Bin Wu², Xiangchao Cheng¹, Yinju Li¹, Xibiao Tang², Chunjie Zhang¹, and Huanchun Chen²

1 Laboratory of Veterinary Microbiology, College of Animal Science and Technology, Henan University of Science and Technology, Luoyang 471003, China

2 State Key Laboratory of Agricultural Microbiology, College of Veterinary Medicine, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China

Abstract: *Salmonella enterica* serovar Choleraesuis strain C500 is a live, attenuated vaccine that has been used in China for over 40 years to prevent piglet paratyphoid. The objective of this study was to evaluate the potential of attenuated *Salmonella enterica* serovar Choleraesuis C500 strain with a Δasd mutant as an effective live vaccine vector by the Asd^+ balanced-lethal host-vector system. Here, we compared the characteristics of *S. enterica* serovar Choleraesuis $\Delta asdC500$ strain with the parent C500 strain,

Received: August 7, 2008; **Accepted:** October 27, 2008

Supported by: National High-tech Research and Development Programs of China (863 Program) (No. 2006AA10A206), and Doctor Foundation of Henan University of Science and Technology (No. 090001337).

Corresponding author: Zhanqin Zhao. Tel: +86-379-64282905; E-mail: zhaozhanqin@126.com

国家高技术研究发展计划(“863 计划”)(No. 2006AA10A206)和河南科技大学博士基金项目(No. 090001337)资助。

including phenotype, growth rate, virulence, safety, and expression for heterologous antigen. The mean generation times of $\Delta asdC500$ mutant, the vector control $\Delta asdC500$ (pYA3493), and the parent avirulent C500 vaccine strain in Luria broth were 30.7, 28.1, and 27.9 min, respectively. The fermentation patterns of these three strains on different carbohydrates, and the levels of production of H_2S , were similar. The O and H antigens of $\Delta asdC500$ mutant, $\Delta asdC500$ (pYA3493) and $\Delta asdC500$ (pYA-F1P2) were 6,7:C:1,5, identical to the parent strain C500. By the method of Reed and Muench, groups of mice were challenged by the intraperitoneal route with different amounts of $\Delta asdC500$ (pYA3493) or the parent C500 strain, and the virulence of $\Delta asdC500$ (pYA3493) with LD_{50} of 1.1×10^7 CFU was a little lower than C500 with LD_{50} of 4.4×10^6 CFU. All piglets inoculated with $\Delta asdC500$ (pYA3493) or C500 survived, and no signs of disease were observed during the entire experimental period. No major differences were found in these two groups. In addition, the recombinant pYA-F1P2 plasmid was very stable in the recombinant $\Delta asdC500$ (pYA-F1P2) strain, which expressed secretorily a large amount of the recombinant filamentous hemagglutinin type I domain and pertactin region 2 domain antigen (rF1P2) of *Bordetella bronchiseptica*. In this study, we have shown that the $\Delta asdC500$ mutant had a series of biological characteristics similar to the parent vaccine strain C500. Furthermore, the strain could express secretorily a large amount of heterologous antigen. It is likely that this *Salmonella* expression and delivery system could be easily adapted to develop multivalent recombinant *Salmonella* vaccines against infectious agents using the Asd^+ balanced-lethal host-vector system.

Keywords: *Salmonella*, live vaccine vector, Asd^+ balanced-lethal host-vector system, *Bordetella bronchiseptica*

近年来,以减毒沙门氏菌作为活疫苗表达载体的研究受到广泛关注^[1]。沙门氏菌为胞内寄生菌,疫苗株能有效呈递抗原,在激发抗沙门氏菌免疫反应的同时诱导产生针对外源抗原的特异性体液和细胞免疫反应。而且,口服、滴鼻等免疫途径具有操作方便、对动物损伤小、能同时诱导广泛的粘膜免疫与全身免疫等优势。另外,沙门氏菌载体本身具有免疫佐剂作用,其LPS作为一种内在佐剂可以刺激宿主细胞释放各种细胞因子。鉴于此,以减毒沙门氏菌作为粘膜免疫用基因工程活疫苗表达载体具有无可比拟的优越性^[2]。目前,基因工程方法致弱的沙门氏菌已被用作活细菌载体广泛表达外源基因,应用于肿瘤、病毒病、细菌病、寄生虫病等的疫苗研究^[2,3]。

为使沙门氏菌在体内稳定携带并高效表达外源基因,重组沙门氏菌疫苗常需要使用遗传选择标记。以前,普遍采用携带抗性基因的表达质粒作为重组菌在体内生长的主要遗传选择标记。近年来,出于生物安全性的考虑,抗生素等抗性质粒选择系统已不被人们所接受。目前,已经研制出多种策略替代抗生素等抗性标记来控制外源基因的稳定表达,如将外源抗原稳定整合到沙门氏菌染色体^[4],或用能筛选重组菌但不需要抗生素的质粒平衡表达系统等。质粒平衡表达系统主要有 Asd^+ 平衡表达系统(Asd^+ balanced lethal vector system)、*ThyA*平衡表达系统、*hok-sok*平衡表达系统、TetC融合表达拯救等多种表达系统^[5-8]。其中,效果最稳定,应用最多的

是 Asd^+ 平衡表达系统。 Asd^+ 平衡表达系统由沙门氏菌的 *asd* 基因缺失株与含有 *asd* 基因的 Asd^+ 质粒构成。沙门氏菌 *asd* 基因编码天冬氨酸 β -半乳糖脱氢酶,该酶是DAP生物合成途径中的必需酶。只有含 Asd^+ 质粒的沙门氏菌 *asd* 缺失株才能在无DAP存在的条件下存活,并在体内或体外稳定表达外源抗原。因此,质粒在宿主菌中的稳定性显著升高。另外,由于 Asd^+ 平衡表达系统中 *asd* 基因代替了抗生素抗性标记,也更加安全^[7]。

猪霍乱沙门氏菌(*Salmonella enterica* serovar Choleraesuis) C500弱毒株是我国广泛使用的预防仔猪副伤寒的标准疫苗株^[9,10],徐引弟等以C500为亲本菌株构建了 *asd* 基因缺失株 $\Delta asdC500$ ^[11]。本研究旨在进一步对该缺失株 $\Delta asdC500$ 的生物表型、生长特性、毒力、生物安全性等生物学特性进行研究,并尝试把猪源支气管败血波氏杆菌(*Bordetella bronchiseptica*, Bb)免疫原性基因 *fhaB*(编码丝状血凝素, filamentous hemagglutinin)的 Type I 区域和 *prn*(编码百日咳杆菌黏附素, pertactin)的 R2 区域在该菌株中进行表达以探讨其作为沙门氏菌活疫苗表达载体的可行性。

1 材料与方法

1.1 菌株、质粒、试剂和试验动物

猪霍乱沙门氏菌弱毒疫苗株 C500 购自中国兽医药品监察所国家兽医微生物保藏中心。C500 的 *asd* 基因缺失株 $\Delta asdC500$ ^[11]、*asd* 和 *crp* 双基因缺失

株 $\Delta asd\Delta crpC500$ ^[12]由徐引弟等构建。猪源支气管败血波氏杆菌 HH0809 株和 pET-28a 质粒由华中农业大学农业微生物学国家重点实验室保存。无抗性、Asd⁺原核表达质粒 pYA3493^[13]及其宿主菌大肠杆菌 $\chi 6097$ ^[14]由美国华盛顿大学 Dr. Roy Curtiss III 教授惠赠。生化鉴定管、麦康凯琼脂培养基购自杭州天和微生物试剂有限公司。沙门氏菌属标准血清因子购自兰州生物制品所。LB 液体或固体培养基购自美国 BD 公司。DAP 购自美国 Sigma-Aldrich 公司。DNA Marker、Pyrobest DNA Polymerase、T4 DNA Ligase 和限制性内切酶购自大连 TaKaRa 公司。DNA 回收试剂盒购自上海 Sangon 公司。所有引物由上海 Sangon 公司合成。5~6 周龄、SPF 级、雌性 BALB/c 小鼠购自湖北省医学科学院实验动物中心。22~25 日龄、6.0~7.0 kg、沙门氏菌阴性、长大系断奶仔猪由河南科技大学试验牧场提供。

1.2 $\Delta asdC500$ 缺失株的表型鉴定

将含有 *asd* 基因, 用于外源抗原表达的无抗性质粒 pYA3493^[13] 分别电转化 $\Delta asdC500$ ^[11] 和 $\Delta crp\Delta asdC500$ ^[12], 获得空载体菌株 $\Delta asdC500$ (pYA3493) 和 $\Delta crp\Delta asdC500$ (pYA3493)。按厂家说明书对 $\Delta asdC500$ (pYA3493) 与亲本菌株 C500 进行生化试验和 O、H 抗原鉴定。

1.3 $\Delta asdC500$ 缺失株的生长特性

将 $\Delta asdC500$ (pYA3493)、 $\Delta crp\Delta asdC500$ (pYA3493) 和 C500 亲本菌株在 LB 液体培养基中培养 12 h 后, 以平板表面涂布法进行活菌计数(CFU/mL), 然后转接 LB 液体培养基使终浓度约为 10^6 CFU/mL, 37°C 200 r/min 培养, 每 1 h 取样进行活菌计数, 绘生长曲线^[15]。

1.4 $\Delta asdC500$ 缺失株对小鼠的毒力试验

将 85 只 BALB/c 小鼠均分为 17 组(5 只/组)。第 1~4 组小鼠以腹腔注射途径分别接种含有 2.2×10^5 CFU、 2.2×10^6 CFU、 2.2×10^7 CFU 和 2.2×10^8 CFU $\Delta asdC500$ (pYA3493) 的 LB 培养物(0.2 mL); 5~8 组小鼠进行口服途径接种, 免疫前 4 h, 小鼠禁水禁食, 免疫前 5 min 口服 30 μL 10% NaHCO_3 中和胃酸, 然后用 12 号灌胃针口服接种含有 2.1×10^7 CFU、 2.1×10^8 CFU、 2.1×10^9 CFU 和 2.1×10^{10} CFU $\Delta asdC500$ (pYA3493) 的 LB 培养物(0.2 mL), 30 min 后恢复饮水和饲料^[13]。第 9~16 组以同样的方法接种

亲本菌株 C500。第 17 组小鼠不做任何处理为空白对照。观察、记录发病及死亡情况 30 d, 死亡者立即剖检, 取其内脏和脑组织进行细菌分离鉴定, 并根据 Reed-Muench 法^[16]计算小鼠半数致死剂量(50% lethal dose, LD₅₀)。

1.5 $\Delta asdC500$ 缺失株对猪的安全性试验

以亲本菌株 C500 的免疫剂量(3.0×10^9 CFU)为参考数据^[9,10], 分别通过肌肉注射和口服 2 种途径将 $\Delta asdC500$ (pYA3493) 接种 22~25 日龄断奶仔猪, 测定重组菌株 $\Delta asdC500$ (pYA3493) 对猪的安全性。将 30 头仔猪均分为 5 组(6 头/组)。第 1 组仔猪每头口服接种 4 mL 含有 3.6×10^9 CFU $\Delta asdC500$ (pYA3493) 的 PBS; 第 2 组仔猪每头在颈部浅层肌肉注射 2 mL 含有 3.6×10^9 CFU $\Delta asdC500$ (pYA3493) 的 10% 铝胶生理盐水; 第 3、4 组以同样的方法接种亲本菌株 C500。第 5 组不做任何处理。另设一组仔猪(3 头)口服接种 1.0×10^9 CFU 强毒株 C78-1 为对照。接种后观察发病及死亡情况 30 d, 并测定接种后 1~3 d 的直肠平均温度和 3~6 d 的平均日增重(Average daily gain, ADG)。对相关数据采用 Fisher's exact test 进行检验, $P < 0.05$ 为差异有显著性。

1.6 重组菌株 $\Delta asdC500$ (pYA-F1P2) 的构建与鉴定

提取支气管败血波氏杆菌 HH0809 株的基因组为模板, 用 1 对引物 *fha1*(5'-TTTAAGAATTCCTGACTGCCCTGGACAAT-3', 含有 *EcoR* I 酶切位点) 和 *fha2* (5'-TTTAAGTCGACTCGCAGATCCGCGCAA A-3', 含有 *Sal* I 酶切位点) 进行 PCR, 扩增 *fhaB* 基因中编码丝状血凝素免疫原性片段 type I 区域的 DNA 片段(命名为 F1), 大小为 465 bp, 将其克隆到 pET-28a 质粒的 *EcoR* I 和 *Sal* I 位点构建重组质粒 pET-F1。用另 1 对引物 *prn1*(5'-TAATTGTCGACAA CACCATGCTGCTGGTG-3', 含有 *Sal* I 酶切位点) 和 *prn2* (5'-TTTAACTGCAGGGCGGACAACCTCCCTG CC-3', 含有 *Hind* III 酶切位点) 扩增 *prn* 基因中编码百日咳杆菌黏附素免疫原性片段 R2 区域的 DNA 片段(命名为 P2), 大小为 300 bp, 将其克隆到 pET-F1 质粒的 *Sal* I 和 *Hind* III 位点构建重组质粒 pET-F1P2。最后, 用 *EcoR* I 和 *Hind* III 酶切 pET-F1P2 质粒, 回收 765 bp 的“F1+P2”片段并将其克隆到 pYA3493 的 *Sal* I 和 *Hind* III 位点构建重组质粒 pYA-F1P2; 将连接产物电转化缺失 *asd* 基因的大肠

杆菌 χ 6097, 筛选阳性克隆, 提取 pYA-F1P2 质粒进行酶切鉴定和序列测定后将其电转化 $\Delta asdC500$ 感受态细胞, 在不含 DAP 的 LB 平板上筛选阳性克隆, 挑取单菌落进行培养, 并分别用 3 对引物 *fha1/fha2*、*prn1/prn2* 和 *pa7/pa6* ($5'$ -TTGGACAATGTTACCGAT AA-3'和 $5'$ -TCCTATCTGCGTCGTCCTAC-3')^[12]进行 PCR 鉴定, 重组菌株命名为 $\Delta asdC500$ (pYA-F1P2)。

1.7 外源抗原在重组菌株 $\Delta asdC500$ (pYA-F1P2) 中的表达

挑取重组菌株 $\Delta asdC500$ (pYA-F1P2) 单菌落到 LB 液体培养基中, 37°C 、200 r/min 摇床培养 12 h, 4°C 放置 12 h, 按 1:100 的比例转接 LB 培养基再培养 6 h, 8000 r/min 离心 10 min 收集菌体。上清液经 $0.22\ \mu\text{m}$ 滤膜过滤, 加等体积冰冷 20% 三氯乙酸冰浴 20 min, 12 000 r/min 离心 20 min, 沉淀用 1 mL 无水乙醇洗涤, 12 000 r/min 离心 5 min, 重复洗涤 1 次。将两者进行 SDS-PAGE^[17], 并使用重组百日咳杆菌黏附素白的兔抗血清^[18]进行 Western blotting 分析^[17]。同时设含空质粒 pYA3493 的 $\Delta asdC500$ 为对照。进一步使用 Bio-Rad Quantity One (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) 软件对融合蛋白的表达量进行分析。

1.8 外源基因在重组菌株 $\Delta asdC500$ (pYA-F1P2) 中的遗传稳定性

将 $\Delta asdC500$ (pYA-F1P2) 在 LB 液体培养基中连续传 50 代, 分别取含有相同 CFU 的第 1、10、20、30 和 50 代的培养物为模板, 用引物 *fha1/fha2* 进行 PCR 检测重组质粒 pYA-F1P2 在 $\Delta asdC500$ 中的遗传稳定性; 分别取不同代次的含有相同 CFU 的培养物进行 SDS-PAGE, 检测融合蛋白表达量的变化。

2 结果

2.1 $\Delta asdC500$ 突变株的表型鉴定

$\Delta asdC500$ 突变株, 即缺失了 *asd* 基因的 C500 菌株, 不能在 LB 培养基上生长, 当添加了 DAP (50 ng/mL) 后则能生长。这说明仔猪副伤寒弱毒疫苗菌株 C500 缺失了 *asd* 基因后失去了合成 DAP 的能力, 只能在含有 DAP 的培养基上进行培养。将含有 *asd* 基因的原核表达质粒 pYA3493 电转化 $\Delta asdC500$, 构建的空载体菌株 $\Delta asdC500$ (pYA3493) 恢复了在不

含 DAP 培养基上生长的能力, 这说明含有 pYA3493 质粒的 $\Delta asdC500$ 菌株能够表达 DAP 并与缺失 *asd* 基因的 C500 菌株形成互补。生化鉴定结果表明, 菌株 $\Delta asdC500$ 和 $\Delta asdC500$ (pYA3493) 不产生 H_2S , 不能利用乳糖、蔗糖、阿拉伯糖、半乳糖醇和尿素作为唯一碳源, 但能利用麦芽糖、葡萄糖、鼠李糖、甘露糖和木糖作为唯一碳源, 这些生化指标与亲本菌株 C500 相同。血清因子鉴定结果表明菌株 $\Delta asdC500$ 和 $\Delta asdC500$ (pYA3493) 的血清型为 6,7:C:1,5, 与 C500 一致。这表明 $\Delta asdC500$ 缺失株和重组菌株 C501 (pYA3493) 的生化特性和血清型与亲本菌株 C500 一致, 符合猪霍乱沙门氏菌的表型特征。

2.2 $\Delta asdC500$ (pYA3493) 菌株的生长特性

在 LB 固体培养基上 37°C 培养 24 h 后, $\Delta asdC500$ (pYA3493)、 $\Delta crp\Delta asdC500$ (pYA3493) 与亲本菌株 C500 的平均菌落直径分别为 1.9 mm、1.0 mm 和 2 mm。经过计算, $\Delta asdC500$ (pYA3493)、 $\Delta crp\Delta asdC500$ (pYA3493) 与亲本菌株 C500 的世代间隔 (Mean generation time) 分别为 28.1 min、41.3 min 和 27.9 min。 $\Delta asdC500$ (pYA3493) 较 $\Delta crp\Delta asdC500$ (pYA3493) 的世代间隔减少了 13.2 min, 且与亲本菌株 C500 的生长速度没有明显差别。从 $\Delta asdC500$ (pYA3493)、 $\Delta crp\Delta asdC500$ (pYA3493) 和亲本菌株 C500 的生长曲线 (图 1) 也可以看出, $\Delta asdC500$ (pYA3493) 的生长速度与亲本菌株 C500 相似, 但 C500 双缺失株 $\Delta crp\Delta asdC500$ (pYA3493) 的生长速度明显偏慢。

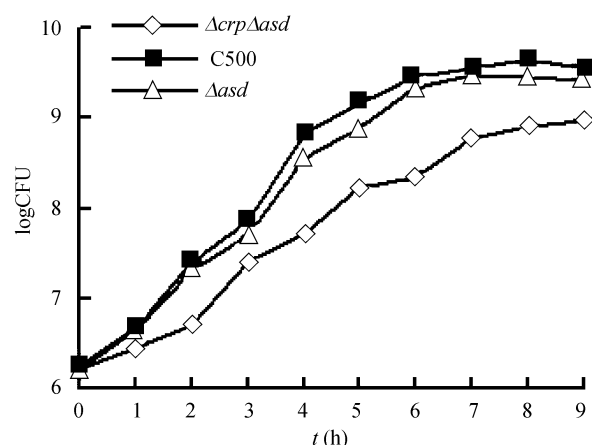


图 1 菌株 $\Delta asdC500$ (pYA3493)、亲本菌株 C500 和 $\Delta crp\Delta asdC500$ (pYA3493) 的生长曲线

Fig. 1 Growth curves of $\Delta asdC500$ (pYA3493), parent strain C500 and $\Delta crp\Delta asdC500$ (pYA3493).

2.3 $\Delta asdC500$ 缺失株对小鼠的毒性试验结果

$\Delta asdC500$ (pYA3493)和亲本菌株 C500 的高剂量腹腔感染组均出现了死亡, 死亡小鼠心血接种麦康凯平板, 分离到无色透明中等大小的均一菌落, $\Delta asdC500$ (pYA3493)组分离的菌落与亲本菌株 C500 组相当。用引物 pi1/pi2 扩增沙门氏菌属特异性 *invA* 基因, 均扩出预期 580 bp 的特异性 DNA 条带。血清型鉴定表明细菌的抗原式为 6,7,C:1,5, 表明小鼠是因感染猪霍乱沙门氏菌而死亡。根据 Reed-Muench 法计算^[16], $\Delta asdC500$ (pYA3493)腹腔感染小鼠的 LD₅₀ 为 1.1×10^7 CFU, 毒力较亲本菌株 C500(LD₅₀ 为 4.4×10^6 CFU)稍低。当口服感染时, 所有小鼠均没有发生死亡; 甚至当口服高达 2.2×10^{10} CFU $\Delta asdC500$ (pYA3493)时, 所有小鼠也没有出现任何发病症状; 口服感染 2.1×10^{10} CFU C500 的小鼠中有 1 只出现了短时的腹泻, 但 2 d 内症状消失。在观察 30 d 后进行解剖观察, 发现腹腔和口服感染的小鼠与空白对照组小鼠相比没有明显的病理变化。这说明 $\Delta asdC500$ (pYA3493)与已被证明安全的亲本菌株 C500 相比毒力稍低, 应更安全。

2.4 $\Delta asdC500$ 缺失株对猪的安全性试验结果

口服接种野生型强毒株 C78-1 的 3 头仔猪出现高热、精神沉郁、腹泻、食欲减退或废绝, 四肢末端及腹部发绀等临床症状(表 1)。接种后 5 d 和 9 d 分别死亡 1 头, 剖检后发现均具有急性仔猪副伤寒的病理变化。另一头猪在 30 d 的观察期内存活, 但是被毛粗糙、极度消瘦, 30 d 观察期后对其剖检发现也具有仔猪副伤寒的病理变化。口服接种 $\Delta asdC500$ (pYA3493)和 C500 的所有仔猪精神食欲均正常, 未见任何发病症状。肌肉注射接种 $\Delta asdC500$ (pYA3493)

的所有仔猪精神食欲也均正常, 虽然接种后 24 h 出现体温暂时升高的现象, 但与亲本菌 C500 组没有显著差异($P > 0.05$), 且未见其他发病症状(表 1)。口服或肌肉注射接种 $\Delta asdC500$ (pYA3493)组仔猪的平均日增重与 C500 组和空白对照组没有显著差异($P > 0.05$)。这说明 $\Delta asdC500$ (pYA3493)以亲本菌株 C500 的免疫剂量接种断奶仔猪是安全的。

2.5 表达支气管败血波氏杆菌免疫原性基因的重组菌株 $\Delta asdC500$ (pYA-F1P2)的构建与鉴定

将重组质粒 pYA-F1P2 电转化 $\Delta asdC500$ 缺失株, 在无 DAP 的 LB 平板上筛选阳性重组子, 获得携带表达质粒 pYA-F1P2 的重组菌株, 命名为 $\Delta asdC500$ (pYA-F1P2)。 $\Delta asdC500$ (pYA-F1P2)因含有与 *asd* 基因互补的原核表达质粒而获得表达 DAP 的能力, 所以不需要培养基再添加 DAP。用一对引物 pa7/pa6^[12] 进行 PCR 鉴定, $\Delta asdC500$ (pYA-F1P2)可以扩增出 Δasd 缺失型 2229 bp 的片段, 而亲本菌株 C500 则扩增出 3717 bp 的片段(图 2A); 引物 fha1/fha2 可扩增出 *fhaB* 基因上 465 bp 的特异性片段(图 2B), 引物 prn1/prn2 可扩增出 *prn* 基因上 300 bp 的特异性片段(图 2C), 而亲本菌株 C500 则不能扩增出这两种片段。

2.6 外源抗原在 $\Delta asdC500$ (pYA-F1P2)的分泌表达

SDS-PAGE 结果(图 3)显示, 重组菌株 $\Delta asdC500$ (pYA-F1P2)在约 30 kD 处有明显的表达带, 而空载体菌株 $\Delta asdC500$ (pYA3493)则没有对应的表达带(图 3A)。Western blotting 结果表明, 该重组蛋白(命名为 rF1P2)能够与重组百日咳杆菌黏附素蛋白的兔抗血清^[18]发生特异性反应, 而空载体菌株 $\Delta asdC500$ (pYA3493)则不能(图 3B)。通过生物学软件 Bio-Rad

表 1 $\Delta asdC500$ (pYA3493)对猪的安全性试验结果

Table 1 Inoculation safety: clinical signs of pigs following vaccination with different strains

Strain or group	Inoculation route	Dose (CFU)	Mortality (%)	Diarrhea (%)	ADG (g)	Mean temperature \pm SD ($^{\circ}$ C)	
						Pre	Post
C500	oral	6.0×10^9	0	0	137.3 \pm 5.3	39.6 \pm 0.12	39.8 \pm 0.14
C500	s.c.	6.0×10^9	0	0	153.2 \pm 11.4	39.7 \pm 0.10	40.2 \pm 0.12
$\Delta asdC500$ (pYA3493)	oral	6.2×10^9	0	0	147.6 \pm 12.8	39.4 \pm 0.14	39.5 \pm 0.15
$\Delta asdC500$ (pYA3493)	s.c.	6.2×10^9	0	0	140.4 \pm 9.9	39.6 \pm 0.08	40.0 \pm 0.20
C78-1	oral	1.0×10^9	66.7	100	NT	39.6 \pm 0.12	41.7 \pm 0.37*
Nonvaccinated	-	-	0	0	147.9 \pm 14.1	39.5 \pm 0.13	39.6 \pm 0.15

Results are expressed as mean \pm SD (standard deviation). "Pre" and "Post" values are the mean temperatures for the 3 days pre- or post-inoculation. NT: not tested. *: values in the same column are significantly different ($P < 0.05$).

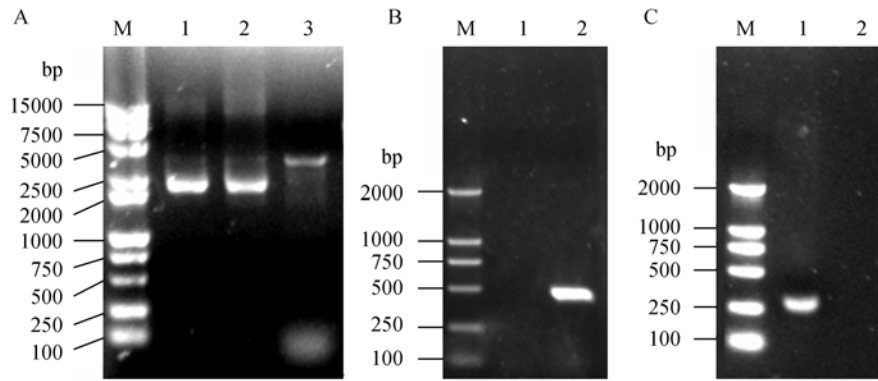


图2 重组菌 $\Delta asdC500(pYA-F1P2)$ 的PCR鉴定结果

Fig. 2 Identification of recombinant *S. choleraesuis* $\Delta asdC500(pYA-F1P2)$ strain by PCR. (A) Δasd identification. M: DNA marker (DL 15 000); 1, 2: $\Delta asdC500$ (pYA-F1P2); 3: C500. (B) *fhaB* gene (F1) identification. M: DNA marker (DL 2000); 1: C500; 2: $\Delta asdC500(pYA-F1P2)$. (C) *prn* gene (P2) identification. M: DNA marker (DL 2000); 1: $\Delta asdC500$ (pYA-F1P2); 2: C500.

Quantity One 对 SDS-PAGE 结果进行分析, 发现重组蛋白的总表达量占菌体总蛋白的 1.7%。其中, 重组蛋白 rF1P2 在菌体中的表达量约占总表达量的 71.4%, 分泌到上清液中的表达量(分泌性表达)占 28.6%(图 3C)。

2.7 重组菌株 $\Delta asdC500(pYA-F1P2)$ 的遗传稳定性

用引物 pa6/pa7 对 $\Delta asdC500(pYA-F1P2)$ 菌株的第 1、10、20、30、40 和 50 代模板进行 PCR, 均能扩增到预期 2229 bp 的 DNA 片段, 而 C500 菌株能扩增到未缺失 *asd* 基因的 3717 bp 的 DNA 片段, 表明 $\Delta asdC500(pYA-F1P2)$ 菌株能够稳定遗传 C500 基因组中缺失的 Δasd 基因片段。分别取含有相同 CFU 的第 1、10、20、30、40 和 50 代的培养物为模板, 用

引物 *fha1/fha2* 进行 PCR 均能扩增到预期 465 bp 的 DNA 片段(见图 4 A); 将第 50 代培养物稀释到合适浓度, 涂平板, 分别挑取 50 个单菌落为模板, 用引物进行 *fha1/fha2* 进行 PCR 也均能扩增到预期 465 bp 的 DNA 片段; 这两个试验结果表明重组菌株 $\Delta asdC500(pYA-F1P2)$ 能够稳定遗传重组质粒及其外源基因片段。分别取含有相同 CFU 的第 10、20、30、40 和 50 代的培养物进行 SDS-PAGE 和 Western blotting 分析, 发现 $\Delta asdC500(pYA-F1P2)$ 能够稳定表达猪源支气管败血波氏杆菌的保护性抗原(图 4 B)。

3 讨论

粘膜免疫与多价疫苗是未来免疫预防传染病的重要方向, 以细菌为载体的重组活疫苗是其最有发展前景的研究领域之一^[1,3]。减毒沙门氏菌作为基因

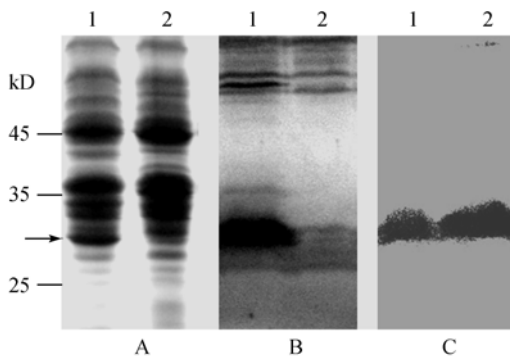


图3 rF1P2 在 $\Delta asdC500$ 突变株中的表达

Fig. 3 Expression of rF1P2 in *S. choleraesuis* $\Delta asdC500$ mutant (A) SDS-PAGE analysis. 1: $\Delta asdC500$ (pYA-F1P2); 2: $\Delta asdC500$ (pYA3493). (B) Western blotting analysis of the duplicated gel (A). (C) Western blotting analysis of $\Delta asdC500$ (pYA-F1P2) for secretory expression. 1: total-cell extract; 2: concentrated supernatant.

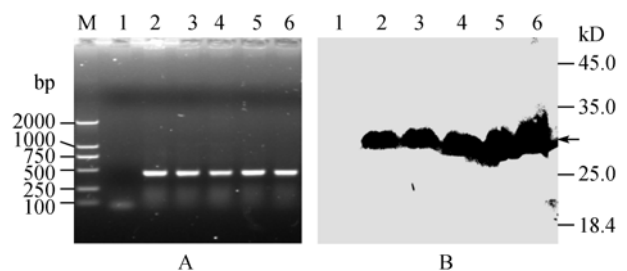


图4 重组菌 $\Delta asdC500(pYA-F1P2)$ 的遗传稳定性

Fig. 4 Stability of plasmids pYA-F1P2 in *Salmonella asdC500* (pYA-F1P2) strain. (A) Identification of stability of pYA-F1P2 plasmid in *Salmonella*. M: DNA marker (DL 2000); 1: H₂O; 2-6: $\Delta asdC500(pYA-F1P2)$ at 10-50 generations. (B) Identification of stable expression of rF1P2 by immunoblot. 1: $\Delta asdC500$ (pYA3493); 2-6: $\Delta asdC500(pYA-F1P2)$ at 10-50 generations.

工程活疫苗表达载体具有无可比拟的优越性,因此成为开发新型重组疫苗的研究热点^[2]。其中,效果最稳定,应用最多的是沙门氏菌 Asd^+ 平衡表达系统^[3]。*asd* 基因编码天冬氨酸 β -半乳糖脱氢酶,该酶是 DAP 生物合成途径中的必需酶, DAP 是革兰氏阴性菌细胞壁主要化学成分肽聚糖四肽侧链的一个组分, Δasd 缺失株在无外源 DAP 条件下不能形成完整细胞壁,最终溶菌死亡。由于哺乳动物组织中不含 DAP,因此 Δasd 突变株在不含 DAP 的培养基中或动物体内均被降解。构建含 *asd* 基因的质粒,将目的基因插入该质粒的多克隆位点,转化 Δasd 宿主菌后可形成互补,从而维持宿主菌的生长、繁殖并稳定表达外源基因。此外,用 Asd^+ 平衡系统代替抗生素抗性标记,因而更加安全。目前,利用 Asd^+ 平衡表达系统构建高效基因工程二价疫苗在鼠伤寒沙门氏菌中已有较多报道^[19,20],但在猪霍乱沙门氏菌中尚未见相关报道。

猪霍乱沙门氏菌 C500 株是化学方法致弱的用于预防仔猪副伤寒的弱毒疫苗菌株,毒力较弱且免疫原性好。C500 在国内已经使用超过 30 年,在我国仔猪副伤寒的控制中发挥了重要作用^[9,10]。鉴于猪霍乱沙门氏菌 C500 的良好免疫原性,将其开发为多价疫苗的活载体具有广阔的应用前景。徐引弟等曾利用重组自杀性质粒介导的负向筛选技术构建了 $\Delta crp\Delta asdC500$ 双基因缺失株^[12]。但后续研究发现,由于 *crp* 基因是其重要的毒力调节基因,携带 pYA3493 的双缺失株 $\Delta crp\Delta asdC500$ 与亲本菌株 C500 相比,碳源利用特征改变,毒力明显减弱(对 BALB/c 小鼠的 LD_{50} 增加 22 倍),生长速度显著减缓(生长倍时 41.3 min,较亲本菌株 27.9 min 延长 13.4 min),在动物体内侵染能力很弱,导致其免疫效力较亲本菌 C500 显著下降^[11]。因此,徐引弟等^[11]又构建了 *asd* 基因的单缺失株 $\Delta asdC500$,以期利用 Asd^+ 平衡表达系统的原理将其开发为重组多价疫苗的活载体。本研究进一步对缺失株 $\Delta asdC500$ 的生物表型、生长特性、毒力、生物安全性等生物学特性与亲本菌株 C500 作了比较研究,并尝试把猪源支气管败血波氏杆菌免疫原性基因片段 *fhaB* 的 Type I 区域和 *prn* 的 R2 区域在该菌株中进行表达以探讨其作为沙门氏菌活疫苗表达载体的可行性。本研究结果证实,携带平衡表达质粒 pYA3493 的 $\Delta asdC500$ 缺失株仍

具有和亲本菌株 C500 一致的碳源利用特征和血清型,生长速度(生长倍时分别为 28.1 min 和 27.9 min)接近,毒力没有明显降低(LD_{50} 分别为 1.1×10^7 CFU 和 4.4×10^6 CFU)。另外, $\Delta asdC500$ (pYA3493)菌株高剂量(3.0×10^9 CFU)接种仔猪无任何不良反应,保留了弱毒疫苗菌株 C500 对猪的安全性。由于 $\Delta asdC500$ (pYA3493)菌株和亲本菌株 C500 具有一系列相似的生物学特征,因此推测该突变菌株具有和亲本菌株 C500 大致相当的针对沙门氏菌攻击的免疫保护力。

丝状血凝素是由支气管败血波氏杆菌 *fhaB* 基因编码的一种分泌型大蛋白,在细菌粘附宿主细胞的过程中起到关键作用^[21]。丝状血凝素具有良好的抗原保护性,含有 Type I 和 Type II 两个保护性抗原区域,其中 Type I 较 Type II 包含了更多的抗原表位而具有更好的免疫保护性^[22,23]。百日咳杆菌黏附素是由支气管败血波氏杆菌 *prn* 基因编码的一种外膜蛋白成分,是其重要的黏附因子和最主要的保护性抗原^[24]。百日咳杆菌黏附素包含 2 个重复性序列区域, R1 和 R2,其中 R1 与黏附相关,而 R2 是重要的抗原位点^[25,26]。因此,为进一步验证外源抗原能否在 $\Delta asdC500$ 的 Asd^+ 平衡载体表达系统中表达,我们选取 *fhaB* 的 Type I 区域和 *prn* 的 R2 区域片段构建重组质粒 pYA-F1P2,将其转入 $\Delta asdC500$ 缺失株,期望后续工作中据此开发的重组疫苗能很好的保护免疫动物抵抗支气管败血波氏杆菌攻击的效果。SDS-PAGE 和 Western blotting 分析结果表明:外源抗原基因的融合片段 F1P2 能在 $\Delta asdC500$ 的细胞质和培养基上清中高效表达重组蛋白 rF1P2。外源蛋白的分泌表达对于辅助抗原提呈,刺激免疫反应,提高免疫效力具有重要意义^[13]。将 $\Delta asdC500$ (pYA-F1P2)连续传代 50 代后 pYA-F1P2 质粒仍然稳定存在并高效表达 rF1P2。这说明外源抗原能通过 Asd^+ 平衡表达系统在 $\Delta asdC500$ 缺失株中高效表达,并具有良好的遗传稳定性。

总之,本研究对猪霍乱沙门氏菌缺失株 $\Delta asdC500$ 的一系列生物学特性进行研究,证实 $\Delta asdC500$ 保留了亲本菌株 C500 的生物表型、生长特性、毒力等生物学特征,并能通过 Asd^+ 平衡表达系统的原理分泌表达外源抗原基因,为开发以猪霍乱沙门氏菌 C500 为载体的基因工程重组疫苗奠定

了理论基础。

REFERENCES

- [1] Spreng S, Dietrich G, Weidinger G. Rational design of *Salmonella*-based vaccination strategies. *Methods*, 2006, **38**(5): 133–143.
- [2] Sirard JC, Niedergang F, Kraehenbuhl JP. Live attenuated *Salmonella*: a paradigm of mucosal vaccines. *Immunol Rev*, 1999, **171**(2): 5–26.
- [3] Medina E, Guzman CA. Use of live bacterial vaccine vectors for antigen delivery: potential and limitations. *Vaccine*, 2001, **19**(13–14): 1573–1580.
- [4] Everest P, Frankel G, Li J, *et al.* Expression of LacZ from the *htrA*, *nirB* and *groE* promoters in a *Salmonella* vaccine strain: influence of growth in mammalian cells. *FEMS Microbiol Lett*, 1995, **126**: 97(10)–102.
- [5] Gálan JE, Nakayama K, Curtiss R III. Cloning and characterization of the *asd* gene of *Salmonella typhimurium*: use in stable maintenance of recombinant plasmids in *Salmonella* vaccine strains. *Gene*, 1990, **94**(5): 29–35.
- [6] Morona R, Yeaton J, Considine A, *et al.* Construction of plasmid vectors with a non-antibiotic selection system based on the *Escherichia coli* *ThyA*⁺ gene: application to cholera vaccine development. *Gene*, 1991, **107**(1): 139–144.
- [7] Galen JE, Nair J, Wang JY, *et al.* Optimization of plasmid maintenance in the attenuated live vaccine vector strain *Salmonella typhi* CVD 908-*htrA*. *Infect Immun*, 1999, **67**(6): 6424–6433.
- [8] Gomez-Duarte OG, Galen J, Chatfield SN, *et al.* Expression of fragment C of tetanus toxin fused to a carboxyl-terminal fragment of diphtheria toxin in *Salmonella typhi* CVD 908 vaccine strain. *Vaccine*, 1995, **13**(5): 1596–1602.
- [9] Kang K. The live vaccine of attenuated *Salmonella enterica* serovar Choleraesuis C500 against swine paratyphoid. *Chin J Vet Drug*, 2003, **37**(2): 49.
康凯. 仔猪副伤寒活疫苗. 中国兽药杂志, 2003, **37**(2): 49.
- [10] Huang CB, Feng WD, Xue MQ, *et al.* Oral administration of the live vaccine against swine paratyphoid. *Sci Agric Sin*, 1981, **6**(1): 89–94.
黄昌炳, 冯文达, 薛民权, 等. 仔猪副伤寒弱毒通气培养冻干苗口服免疫研究. 中国农业科学, 1981, **6**(1): 89–94.
- [11] Xu YD. Construction and application of *crp*⁻, *asd*⁻ deleted mutant host-vector balanced lethal system of *Salmonella choleraesuis* C500 strain. Doctor of Philosophy Degree Dissertation of Huazhong Agricultural University, 2006.
徐引弟. 猪霍乱沙门氏菌 C500 株 *crp*⁻/*asd*⁻ 缺失株平衡致死系统的构建及应用. 华中农业大学博士学位论文, 2006.
- [12] Xu YD, Guo AZ, Liu WH, *et al.* Construction and characterization of delta *crp* delta *asd* mutant host-vector balanced lethal system of *Salmonella choleraesuis* C500 strain. *Chin J Biotech*, 2006, **22**(3): 366–372.
徐引弟, 郭爱珍, 刘维红, 等. 猪霍乱沙门氏菌 C500 株 Δ *crp* Δ *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.
- [13] Kang HY, Srinivasan J, Curtiss R III. Immune responses to recombinant pneumococcal PspA antigen delivered by live attenuated *Salmonella enterica* serovar Typhimurium vaccine. *Infect Immun*, 2002, **70**(2): 1739–1749.
- [14] Nakayama K, Kelly SM, Curtiss R III. Construction of an *Asd*⁺ expression-cloning vector: stable maintenance and high level expression of cloned genes in a *Salmonella* vaccine strain. *Bio Technol*, 1988, **6**(1): 693–697.
- [15] Liao YX. A Laboratory Manual for Veterinary Microbiology. Beijing: China Agricultural University Press, 1995.
廖延雄. 兽医微生物实验诊断手册. 北京: 中国农业大学出版社, 1995.
- [16] Reed LJ, Muench H. A simple method of estimating fifty percent endpoints. *Am J Hyg*, 1938, **27**(3): 493–497.
- [17] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- [18] Zhao ZQ, Xue Y, Wu B, *et al.* Protecting mice from fatal *Bordetella bronchiseptica* infection by immunization with recombinant pertactin antigens. *Acta Microbiol Sin*, 2008, **48**(3): 337–341.
赵战勤, 薛云, 吴斌, 等. 重组百日咳杆菌黏附素蛋白免疫小鼠可完全抵抗支气管败血波氏杆菌的致死性感染. 微生物学报, 2008, **48**(3): 337–341.
- [19] Helen SG, Katherine AB, Richard WT. *Salmonella* vaccine for use in humans: present and future perspectives. *FEMS Micro Rev*, 2002, **26**(3): 339–353.
- [20] Roy Curtiss III. Bacterial infectious disease control by vaccine development. *J Clin Invest*, 2002, **110**(8): 1061–1066.
- [21] Mattoo S, Cherry J. Molecular pathogenesis, epidemiology, and clinical manifestations of respiratory infections due to *Bordetella pertussis* and other *Bordetella* subspecies. *Clin Microbiol Rev*, 2005, **18**(3): 326–382.
- [22] Leininger E, Bowen S, Renaud-Mongenie G, *et al.* Immunodominant domains present on the *Bordetella pertussis* vaccine component filamentous hemagglutinin. *J Infect Dis*, 1997, **175**(5): 1423–1431.
- [23] Knight JB, Huang YY, Halperin SA, *et al.* Immunogenicity and protective efficacy of a recombinant filamentous haemagglutinin from *Bordetella pertussis*. *Clin Exp Immunol*, 2006, **144**(3): 543–551.
- [24] Hellwig SM, Rodriguez ME, Berbers GA, *et al.* Crucial role of antibodies to pertactin in *Bordetella pertussis* immunity. *J Infect Dis*, 2003, **188**(10): 738–742.
- [25] Novotny P, Kobisch M, Cownley K, *et al.* Evaluation of *Bordetella bronchiseptica* vaccines in specific-pathogen-free piglets with bacterial cell surface antigens in enzyme-linked immunosorbent assay. *Infect Immun*, 1985, **50**(1): 190–198.
- [26] Hijnen M, Mooi FR, van Gageldonk PG, *et al.* Epitope structure of the *Bordetella pertussis* protein P.69 pertactin, a major vaccine component and protective antigen. *Infect Immun*, 2004, **72**(7): 3716–3723.