

## 猪霍乱沙门氏菌递送的双启动子表达载体的构建

陈弟诗<sup>1</sup>, 郭万柱<sup>1</sup>, 徐志文<sup>1</sup>, 陈杨<sup>1</sup>, 李雯<sup>2</sup>, 王印<sup>1</sup>, 朱玲<sup>1</sup>, 王小玉<sup>1</sup>

1 四川农业大学 动物生物技术中心, 雅安 625014

2 四川省畜牧科学研究院, 成都 610066

**摘要:** 猪霍乱沙门氏菌 C500 株不仅可以作为预防猪沙门氏菌病的活疫苗, 还可作为运送其他 DNA 疫苗的优良载体, 并通过粘膜免疫诱导产生针对特定抗原的各种免疫应答。为增强其携带的 DNA 疫苗的免疫效力, 本研究以真核表达载体 pEGFP-C1 为基础, 将其真核启动子 CMVie 与原核启动子 P<sub>trc</sub> 串联, 并在其多克隆位点 MCS 下游引入 rnbT1T2 转录终止序列, 构建了真、原核双启动子表达载体 pEGFP<sub>trc</sub>R。用 1×TSS 法将其转化 C500, 得到工程菌 C500/pEGFP<sub>trc</sub>R, 通过 SDS-PAGE 和 Western blotting 鉴定了报告基因 EGFP 的原核表达, 该菌在荧光显微镜下能发出强烈绿色荧光, 被证明在体外至少能稳定遗传 20 代; 采用脂质体介导法将 pEGFP<sub>trc</sub>R 转染 Vero 细胞, EGFP 在胞核和胞浆内表达, 24 h 后观察可观察到明显绿色荧光。结果表明, 双启动子表达载体 pEGFP<sub>trc</sub>R 构建成功, 预示其携带的外源基因既可在 C500 中表达, 又可在体细胞中表达, 为研制以 C500 为载体的新型 DNA 疫苗的发展开辟了一个新的途径。

**关键词:** 猪霍乱沙门氏菌, 启动子, 绿色荧光蛋白表达载体 C1, DNA 疫苗

## Construction of a dual-promoter expression plasmid delivered by *Salmonella choleraesuis* C500

Dishi Chen<sup>1</sup>, Wanzhu Guo<sup>1</sup>, Zhiwen Xu<sup>1</sup>, Yang Chen<sup>1</sup>, Wen Li<sup>2</sup>, Yin Wang<sup>1</sup>, Ling Zhu<sup>1</sup>, and Xiaoyu Wang<sup>1</sup>

1 College of Animal Science and Veterinary Medicine, Sichuan Agricultural University, Ya'an 625014, China

2 Sichuan Academy for Animal Sciences, Chengdu 610066, China

**Abstract:** *Salmonella choleraesuis* C500 strain is an attenuated vaccine preventing piglet from paratyphoid and can also be used as a live vector of other DNA vaccines. Through mucosal immunization, immune response to specific antigens carried by it can be induced. To enhance the immune efficiency of DNA vaccine it carried, promoter P<sub>trc</sub> was inserted into the down stream of the human cytomegalovirus (CMV) immediate early promoter of eukaryotic expression plasmid pEGFP-C1. Then transcription terminator rnbT1T2 was inserted into down stream of the multiple clone sites of pEGFP-C1, and the dual-promoter expression vector pEGFP<sub>trc</sub>R was constructed. Using 1×TSS method, we transformed the recombinant plasmid into C500, and obtained C500/pEGFP<sub>trc</sub>R. We used SDS-PAGE and Western blotting to detect the expression of report gene EGFP. Strong green fluorescence was observed under fluorescent microscope. The stable passages of this recombinant bacterium were at least 20 generations *in vitro*. Using liposome we transfected plasmid pEGFP<sub>trc</sub>R into Vero cell. After 24 h, green fluorescent was observed, showing the expression of EGFP in nuclei and endochylema. The construction of dual-promoter expression vector pEGFP<sub>trc</sub>R was successful. The foreign gene was expressed in *Salmonella* strain C500 and somatocytes, resulting in increased antigen expression.

**Received:** October 20, 2008; **Accepted:** December 30, 2008

**Supported by:** Program for Changjiang Scholars and Innovative Research Team in University (No. IRT0555).

**Corresponding author:** Wanzhu Guo. E-mail: wzguo@126.com

教育部长江学者和创新团队发展计划(No. IRT0555)资助。

This research provides a foundation for the research of new DNA vaccines which use *Salmonella* C500 as carrier.

**Keywords:** *Salmonella choleraesuis* C500, promoter, vector, DNA vaccine

减毒沙门氏菌由于其可以利用粘膜途径免疫(口服或滴鼻),在激发宿主针对自身免疫反应的同时还能诱导对它所携带抗原的各种特异性免疫反应,而且它本身兼备优秀免疫佐剂(脂多糖 LPS 和 CpG DNA 序列等)的素质,加之制备简单、易于储存和运输、抗原不需提纯、生产成本低廉等原因,成为 DNA 疫苗的优良载体并以其独特的魅力受到医学与兽医学的广泛重视<sup>[1]</sup>。利用鼠伤寒减毒沙门氏菌作为载体的研究已成为一个热点,而猪霍乱沙门氏菌(*Salmonella choleraesuis*)报道甚少。我国的猪霍乱沙门氏菌 C500 是在含醋酸铊的培养基中传代至弱的免疫原性良好的菌株<sup>[2]</sup>,理论上可作为一个非常有潜力的载体。而用于沙门氏菌携带并表达外源抗原的常用质粒都是真核表达质粒<sup>[3-5]</sup>或平衡致死质粒<sup>[6,7]</sup>,真核表达质粒不能在原核细胞中表达,在从减毒沙门氏菌中释放到进入宿主细胞之前相当长时间不表达抗原,势必影响诱导免疫反应的强度;而平衡致死质粒则需要特殊营养缺陷型工程菌株<sup>[5-7]</sup>,构建和筛选相对困难。同时,绿色荧光蛋白(GFP)基因作为一种可定量的报告基因已在细菌监测中大量应用<sup>[8,9]</sup>,其原核表达可使转化菌在荧光显微镜下发出绿色荧光<sup>[10,11]</sup>,为重组子的筛选及其他方向的研究提供直观手段。为此,本研究对绿色荧光蛋白表达载体 pEGFP-C1 进行改进,在其人巨噬细胞病毒早前启动子 CMvie 的下游增加 1 个原核启动子 P<sub>trc</sub><sup>[12]</sup>,使抗原能够在减毒沙门氏菌中高效表达,为保证原核表达的稳定性,加入来自大肠杆菌 *rrnB* 操纵元的 T1 和 T2 强转录终止序列<sup>[13-15]</sup>,构建成新型双启动子表达载体 pEGFP<sub>trcR</sub>,并将其转化

C500 构建工程菌,以期在真核和原核细胞中分别表达抗原,提高减毒沙门氏菌携带的外源抗原的表达量和在体内诱导免疫应答的能力,对以猪霍乱沙门氏菌为外源抗原的载体在兽医研究中的应用做出新的探索。

## 1 材料与方法

### 1.1 质粒、菌株和细胞

原核表达质粒 pBV220 和真核表达质粒 pEGFP-C1 由本实验室保存,克隆载体 pMD18-T simple Vector 购自 TaKaRa 公司;宿主菌 *E. coli* DH5 $\alpha$ 由本实验室繁殖保存。猪霍乱沙门氏菌 C500 标准株由中牧实业股份有限公司成都药械厂提供;Vero 细胞由本实验室保存传代。

### 1.2 酶和其他试剂

限制性内切酶 *Apa* I、*Bam*H I、*Eco*R I 购自 TaKaRa 公司,*Nhe* I、*Age* I 购自上海生工(Fermentas 产品);标准核酸 marker:  $\lambda$ -EcoT14 marker, DL2000 Marker 购自 TaKaRa 公司;OXYGEN 凝胶回收试剂盒, DNA Ligation Kit, 脂质体转染试剂盒 LIPOFECTINE Reagent 2000 购自 TaKaRa 公司;2 $\times$ Taq PCR Master Mix 购自北京天为时代公司;兔抗 EGFP 抗体由本实验室制备;HRP 标记的羊抗兔 IgG 购自 Promega 公司;溶液和缓冲液除特殊标注外,均按萨姆布鲁克等编写的《分子克隆实验指南》(第 2 版)提供的方法配制<sup>[16]</sup>。

### 1.3 引物设计与合成

用于扩增和鉴定的引物见表 1,本实验中所使用的引物均为 TaKaRa 公司合成。

表 1 本研究中 PCR 扩增所用引物序列

Table 1 The primer sequences for PCR amplification in this study

Gene	Primer name	Sequence(5'-3')	Restriction site	Length (bp)
rrnBT1T2	R1	TTTgggcccTAAATGAGAGAAGATTTTCAGCC	<i>Apa</i> I	420
	R2	CTCgcatccGTAGAAACGCAAAAAGG	<i>Bam</i> H I	
P <sub>trc</sub> test	T1	CTTTCCAAAATGTCG		202
	T2	TGGTCTGTTTCCTGTG		
P <sub>trc</sub>		gctagcAAATGAGCTGTTGACAATTAATCATCCGGCTCGTATAATGT GTGGGTGGAATTGTGAGCGGATAACAATTTACACAGGAAACA GACCATGGAaccggt	<i>Nhe</i> I <i>Age</i> I	106
EGFP	E1	ATGGTGAGCAAGGGCG		718
	E2	ACTTGTACAGCTCGTCC		

#### 1.4 双启动子表达载体 pEGFPPtrcR 的构建

首先用引物 R1/R2 从原核表达质粒 pBV220 中扩增出强转录终止序列 *rrnBT1T2*, 连接入 pMD18-T simple Vector, 经 PCR 鉴定, 用 *Apa I/BamH I* 双酶切回收。将回收的 *rrnBT1T2* 基因插入 pEGFP-C1 的多克隆位点下游的相应酶切位点处, 构建成重组质粒 pEGFP-*rrnBT1T2*, 经酶切和 PCR 鉴定。根据 Ptrc 启动子的结构及载体酶切位点, 人工合成一段双链启动子 Ptrc, 两端含有 *Nhe I* 和 *Age I* 酶切位点, 将其插入重组质粒 pEGFP-*rrnBT1T2* 的相应酶切位点处, 使 Ptrc 定向位于人类巨细胞病毒立即早期启动子 (CMVie) 的下游及 EGFP 基因上游处, 从而构建成双启动子表达载体 pEGFPPtrcR, 使用单双酶切以及 Ptrc test 引物 T1/T2 进行 PCR 鉴定 Ptrc 的插入(构建策略见图 1)。上述过程中所涉及到的酶切, 连接, 转化, 筛选和质粒提取均按照《分子克隆实验指南》(第 2 版)<sup>[16]</sup>进行。

#### 1.5 pEGFPPtrcR 转化猪霍乱沙门氏菌 C500 株

采用 1×TSS 方法制备 C500 感受态并进行转化, 构建工程菌 C500/pEGFPPtrcR, 根据载体中 EGFP 基因设计检测引物 E1/E2, 进行菌落 PCR 鉴定, 同时提取质粒进行酶切鉴定。主要步骤: 挑取用 SS 平板复壮后的 C500 单菌落, 接种到 10 mL LB 肉汤中, 37°C 培养过夜(12~16 h)。将过夜培养的菌液(400 μL)加入到新鲜的 10 mL LB 肉汤中, 于 37°C 振荡培养至  $OD_{600}$  约为 0.4(2 h 40 min~3 h)。冰浴 10 min 后, 2500 r/min 4°C 离心 10 min, 弃上清, 加入原体积 1/10(1 mL)冰预冷的 1×TSS 液悬浮细胞, 然后分装成 100 μL/管, 全部冰上操作。转化时取 1 管(100 μL), 缓慢加入 10 μL 重组质粒 pEGFPPtrcR DNA, 混匀后冰浴 30 min。加入 0.9 mL 含 20 mmol/L 葡萄糖的 37°C 预热的 LB 肉汤, 振荡培养 1 h, 取 200 μL 涂布于含 Kan(50 μg/mL)的 LB 琼脂平板, 培养 17~20 h。缓冲液 1×TSS 的配制: 1 g 蛋白胨, 0.5 g 酵母抽提物,

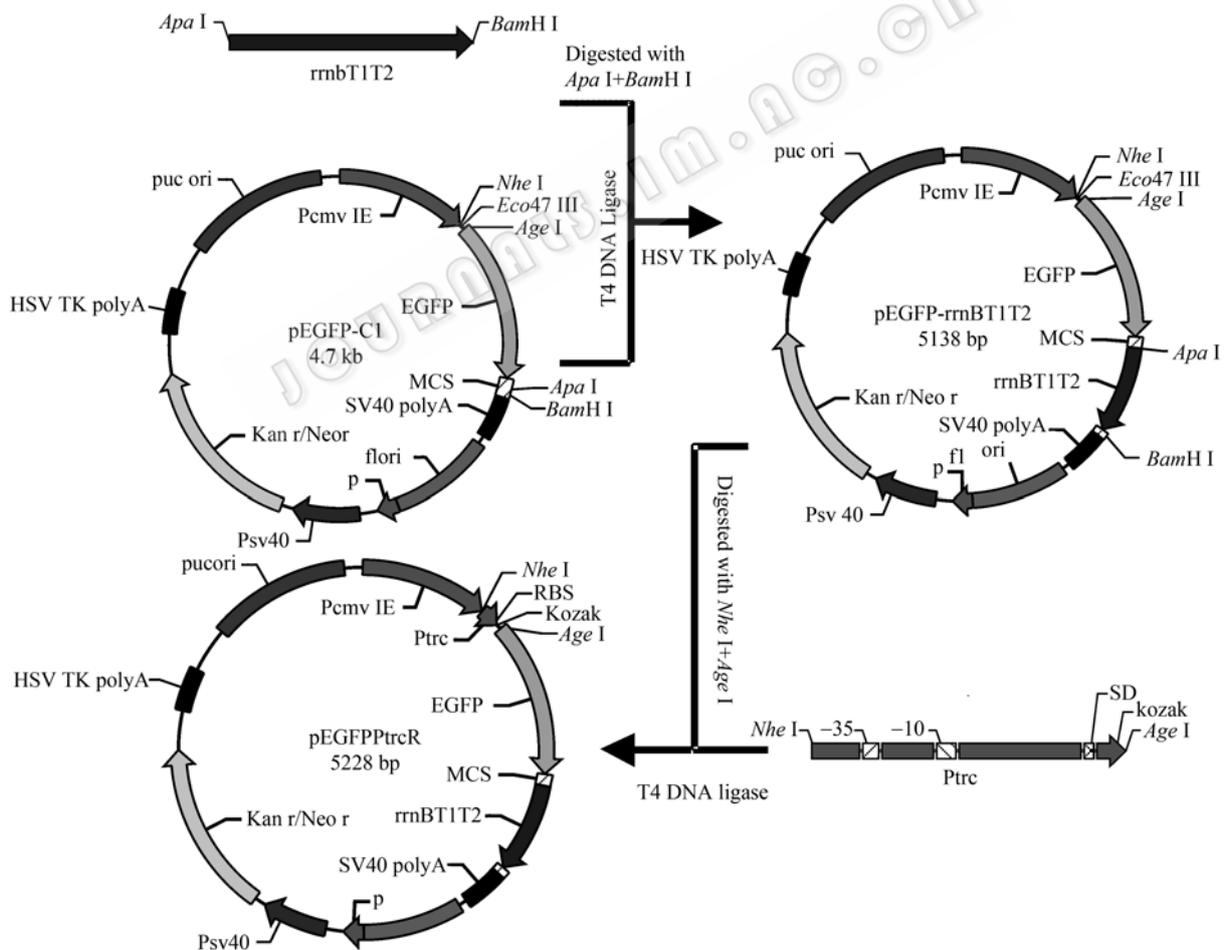


图 1 双启动子表达载体 pEGFPPtrcR 的构建  
Fig. 1 Construction of dual-promotor pEGFPPtrcR.

0.5 g 氯化钠, 1 g 葡萄糖, 10 g PEG6000, 5 mL 二甲基亚砜(DMSO), 5 mL 1 mol/L 氯化镁, 先用去离子水 80 mL 溶解后用盐酸或者氢氧化钠调整 pH 为 6.5, 再用去离子水定容 100 mL, 用 0.22  $\mu\text{m}$  滤器过滤除菌、分装。4°C 储存, 保质期约 6 个月。

## 1.6 重组质粒 pEGFPtrcR 在猪霍乱沙门氏菌 C500 中的表达

### 1.6.1 工程菌 C500/pEGFPtrcR 的荧光检测

将单个工程菌接种到含 Kan(50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 的 LB 琼脂平板和含 Kan(50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )、IPTG (50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 的 LB 琼脂平板, 培养过夜。挑取单个菌落稀释后的菌液置于载玻片上, 在正置荧光显微镜下观察。

### 1.6.2 双启动子表达载体 pEGFPtrcR 的表达及表达产物的鉴定

挑取单菌落到含 Kan(50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 的 LB 中过夜培养, 1:20 转接培养至  $OD_{600}$  约为 0.6, 加入终浓度为 1.0 mmol/L 的 IPTG, 诱导 6 h, 分别在加入后 1 h、2 h、4 h 和 6 h 各取样品进行 SDS-PAGE 电泳检测, 分离胶 12%, 浓缩胶用 5%。设 C500 标准株和未诱导, 以及 DH5 $\alpha$  和 DH5 $\alpha$ /pEGFPtrcR 诱导的对照样品。之后, 用 Western blotting 进行鉴定, 一抗为兔抗 EGFP 抗体, 二抗为 HRP 标记的羊抗兔 IgG。

## 1.7 重组质粒 pEGFPtrcR 在 Vero 细胞中的表达

采用脂质体介导法将 pEGFPtrcR 质粒 DNA 瞬时转染 Vero 细胞, 并设立对照, 具体操作参照脂质体转染试剂盒 LIPOFECTINE Reagent 2000 说明书进行。在转染 18 h 后, 在正置荧光显微镜下观察结果。

## 1.8 工程菌 C500/pEGFPtrcR 中质粒的体外遗传稳定性试验

用连续传代和抗生素选择培养法鉴定质粒在转化菌 C500/pEGFPtrcR 中的遗传稳定性。挑取其单个菌落分别划线接种于含卡那霉素和无卡那霉素的 SS 琼脂平板上, 37°C 培养 16~18 h, 分别连续传代 20 代。每 5 代每种平板随机挑取 5 个菌落用特异性引物 E1/E2 进行菌落 PCR 检测 EGFP 基因, 并观察荧光。

## 2 结果

### 2.1 双启动子表达载体 pEGFPtrcR 的构建

用引物 R1/R2 从 pBV220 中扩增出 420 bp 的 rrbnT1T2 经鉴定后, 用 *Apa* I/*Bam* H I 双酶连接入大

小为 4.7 kb 的 pEGFP-C1, 构建成重组质粒 pEGFP-rrnBT1T2, 约为 5.1 kb。筛选 Kan 阳性重组子, 经 rrbnT1T2 基因的质粒 PCR, 扩增出约 420 bp 的条带; 经 *Bam* H I 进行单酶切出现约 5.1 kb 的条带; 经 *Apa* I/*Bam* H I 进行双酶切, 出现约 4.7 kb 载体条带和约 420 bp 的插入条带, 与预期一致, 表明重组质粒 pEGFP-rrnBT1T2 正确(图 2)。

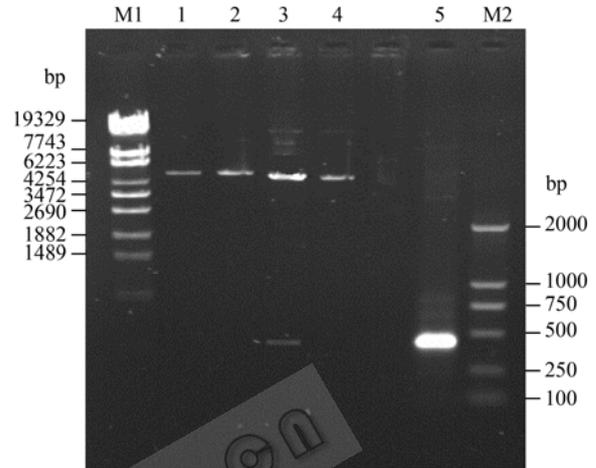


图 2 重组质粒 pEGFP-rrnBT1T2 的鉴定

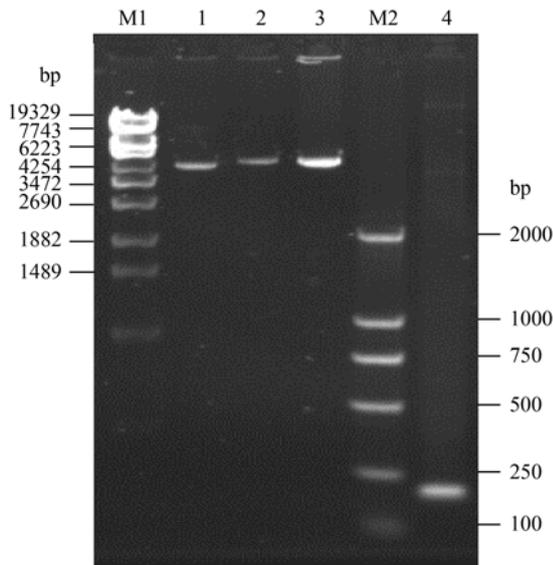
Fig. 2 Identification of pEGFP-rrnBT1T2. M1:  $\lambda$ -EcoT14 I digest DNA marker; M2: DNA marker DL2000; 1-2: pEGFP-rrnBT1T2/*Bam* H I; 3: pEGFP-rrnBT1T2/*Apa* I+*Bam* H I; 4: pEGFP-c1/*Bam* H I; 5: rrbnT1T2 PRC.

将人工合成的 94 bp 启动子 Ptrc 连接入经 *Nhe* I/*Age* I 双酶切的重组载体 pEGFP-rrnBT1T2, 构建成重组质粒 pEGFPtrcR, 约为 5.2 kb。筛选 Kan 阳性重组子, 用经特异性检测后的 Ptrc test 引物 T1/T2 扩增出约 200 bp 的条带; 用 *Nhe* I 单酶切, 出现约 5.2 kb 的条带; 用 *Age* I/*Nhe* I 进行双酶切出现条约 5.1 kb 条带, 并明显比单酶切小, 而理论上应有的 100 bp 插入条带, 由于其相对分子量太小不能被观察到(图 3)。PCR、酶切条带和测序结果与预期一致, 表明重组质粒 pEGFPtrcR 构建正确。

测序后软件分析 pEGFPtrcR 载体, 其携带 CMVie 和 Ptrc 杂合启动子, 绿色荧光蛋白基因, 多克隆酶切位点和真核、原核细胞转录终止信号等, Ptrc 杂合启动子包含了 -35 区、-10 区、SD 序列和 Kozak 保守序列。

### 2.2 重组质粒 pEGFPtrcR 在原核细胞 C500 中表达的检测

挑取在无 IPTG 和含有 IPTG 的 LB 琼脂平板上的工程菌 C500/pEGFPtrcR, 各自涂片于正置荧光



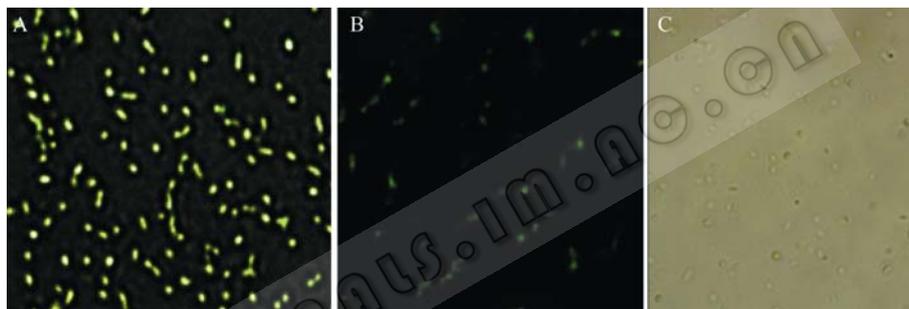
**图 3 重组质粒 pEGFPPtrcR**  
 Fig. 3 Identification of pEGFPPtrcR. M1: DL2000; M2: λ-EcoT14 I digest DNA marker; 1: pEGFP-c1/BamH I; 2: pEGFPPtrcR/Nhe I; 3: pEGFPPtrcR/Nhe I+Age I; 4: Ptrc test primer PCR.

显微镜下观察, 均能观察到发出绿色荧光的单个形态清晰的两端钝圆短杆状细菌, 两种平板上的无明显差别, 说明表达不需要诱导(图 4)。

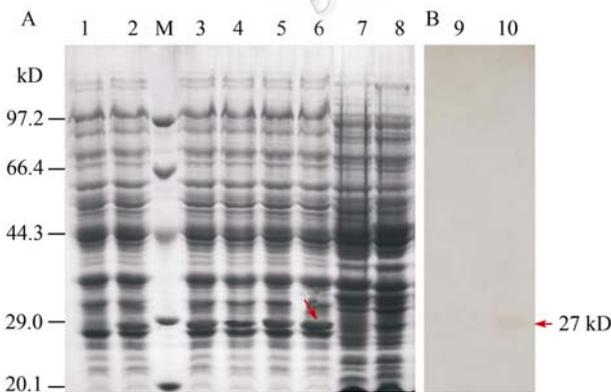
SDS-PAGE 电泳结果表明未诱导和诱导的重组菌 C500/pEGFPPtrcR 均比对照菌 C500 标准株多出了 1 条约 27 kD 的蛋白条带(图 5, 箭头所表示位置), 同样诱导后的 DH5α/pEGFPPtrcR 比诱导后的 DH5α 也多出相同条带, 与绿色荧光蛋白核苷酸序列推导的分子量大小相符。而经 IPTG 诱导的重组菌, 随着诱导时间增加表达量有所增加, 但增加不明显。Westren blotting 结果显示 SDS-PAGE 上出现的特异蛋白条带可被兔抗 EGFP 抗体识别, 说明 EGFP 得到表达。

**2.3 重组质粒 pEGFPPtrcR 在真核 Vero 细胞中的表达检测**

重组质粒 pEGFPPtrcR 转染到 Vero 细胞后 24 h 在荧光显微镜下可以观察细胞浆和细胞核乃至整个



**图 4 荧光显微镜下观察 C500/pEGFPPtrcR**  
 Fig. 4 Recombinant strain C500/pEGFPPtrcR observed under fluorescence microscopy. A: C500/pEGFPPtrcR with fluorescence; B: C500 control with fluorescence; C: un-stained C500/pEGFPPtrcR under fluorescence microscopy with visible light.

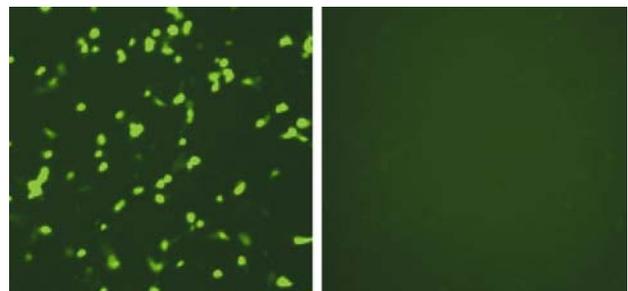


**图 5 SDS-PAGE(A) 和 Western blotting(B) 分析 pEGFPPtrcR 质粒在 C500 中的表达**  
 Fig. 5 SDS-PAGE (A) and Western blotting (B) analysis of expression products of pEGFPPtrcR in C500. (A) M: protein molecular weight marker (low); 1: C500 standardized strain control; 2: C500/pEGFPPtrcR none induced expression; 3-6: C500/pEGFPPtrcR induced with IPTG for 1 h, 2 h, 4 h, 6 h; 7: DH5α induced with IPTG; 8: DH5α/pEGFPPtrcR induced with IPTG. (B) 9: C500 control; 10: C500/pEGFPPtrcR Western blotting results.

细胞发出明显的绿色荧光(图 6)。

**2.4 工程菌 C500/pEGFPPtrcR 中质粒的体外遗传稳定性**

C500/pEGFPPtrcR 工程菌在含卡那霉素和无卡那霉素的 SS 琼脂平板上连续传代 20 代, 每代生长良好, 每 5 代随机菌落 PCR, 都能检测出 EGFP 基因,



**图 6 pEPR-apxIIA 转染 Vero 细胞后的绿色荧光**  
 Fig. 6 Green fluorescence of pEGFPPtrcR after transfection to Vero. Left: pEGFPPtrcR; Right: un-transfected Vero cells as control.

并观察到明显绿色荧光,表明该菌中的 pEGFP<sub>P<sub>trc</sub></sub>R 未丢失,能够稳定遗传。

### 3 讨论

目前,裸 DNA 作为核酸疫苗从被转移至宿主,

经过在细胞间质和细胞质的停留至转录,约有 60%~100% 被降解。而减毒沙门氏菌可保护 DNA 免受生物环境破坏,有效将其导入靶细胞。然而,沙门氏菌原核表达体系很难将异源抗原直接分泌到胞液中,且细菌在体内降解后原核表达载体丧失功能;而真核表达体系使减毒沙门氏菌携带的 DNA 疫苗进入真核细胞之前都不能表达外源抗原诱导免疫应答。因此,目前多数以减毒沙门氏菌为载体核酸疫苗的效果仍不理想。优化其核酸免疫,提高其免疫效率,是当前以减毒沙门氏菌为载体的核酸免疫研究面临的重要课题。通过改造现有载体以增强其表达水平和免疫应答反应是行之有效的方法,卞继峰<sup>[17]</sup>将细菌内源性厌氧诱导启动子 *nirB* 与 CMV<sub>ie</sub> 联合使用,构建了人乳头瘤病毒双启动子 DNA 疫苗载体 pCN-16L1E7,并导入减毒沙门氏菌 S.SL326,经小鼠实验证明免疫效果优于单一启动子。但利用常见细菌内源性启动子仍具条件性,如 *pagC* 需要低浓度  $Mg^{2+}$ , *nirB* 需要厌氧, *osmC* 需要渗透压等,从细菌培养至到达体内实现可启动环境这一过程均不能表达外源抗原。因此,本研究以含增强型绿色荧光蛋白(EGFP)报告基因的真核表达载体 pEGFP-C1 为基础,将其 CMV<sub>ie</sub> 启动子与由 Trp 与 Lac 启动子人工杂合成的 P<sub>trc</sub> 原核强启动子联合使用: P<sub>trc</sub> 启动子作用更于 Trp 与 Lac,其 -35 区和 -10 区间距 17 bp 使转录水平达最高,在大肠杆菌受 Lac 阻遏蛋白的负调节,可被 IPTG 诱导,但沙门氏菌中不具有大肠杆菌中的操纵子(Operon)调控机制,其外源基因可持续的高效表达;同时 CMV<sub>ie</sub> 为广谱启动子,不具组织及发育阶段特异性,在多类真核细胞内不需诱导可持续表达外源蛋白,因此该载体在沙门氏菌和真核细胞内无条件性限制均能持续表达外源基因,从而可大幅度提高目的基因的表达效率。本研究将 EGFP 的 ATG 与 P<sub>trc</sub> 的 SD 序列保留 8 bp 的适当距离,并设计 Kozak 序列 ACCATGG,保证了 mRNA 在细菌和真核细胞中的有效转译。

虽然转录终止子在表达质粒的构建过程中常被忽略,但有效的转录终止子是表达载体必不可少的元件,本研究引入来自大肠杆菌 *rrnB* 操纵元的 2 个终止子 T1 和 T2 串联的强转录终止序列 *rrnB*T1T2,

阻止 P<sub>trc</sub> 启动的强转录贯穿其他启动子,避免所谓的启动子封堵现象,最大限度地减小背景的转录;防止由于 P<sub>trc</sub> 在沙门氏菌中无可诱导性而导致的外源基因过量表达使宿主菌生长受阻以及即使在外源蛋白(EGFP)对宿主细胞没有毒性的情况下质粒的严重不稳定性;增强了 mRNA 的稳定性,从而提高外源蛋白的表达水平。经过初步体外遗传稳定性实验证实,所构建载体中 P<sub>trc</sub> 启动的持续原核表达对 C500 生长无阻碍,EGFP 的原核表达对 C500 的代谢无毒害作用,质粒在其中不易丢失可较稳定存在。

绝大多数研究中质粒成功转化沙门氏菌的方法都是电转化法,而本研究则首次采用了 1×TSS 法制备其感受态的方法简单高效地将质粒转化 C500。该方法将高分子 PEG6000 和氯化镁联合使用改变溶液的渗透压,更容易使富含脂多糖(LPS)的沙门氏菌细胞壁通透性增加,聚乙二醇结合 DNA 并吸附到细胞膜上,  $Mg^{2+}$  起稳定 DNA 的作用,在低温及二价离子的作用下,诱导细胞膜局部区域发生相变,促使跨外膜通道的形成及膜通透性的增大,使细胞可以摄取聚乙二醇 DNA 复合物,而聚乙二醇为大分子被排阻在膜外, DNA 进入膜内,同时二甲基亚砜对细胞的强力保护作用增加了细菌的存活率,从而提高转化效率。根据本研究发现, C500 的种子培养时间和扩大培养时间即初始数量和生长时期对该方法转化效率的影响至关重要:新鲜种子在 10 mL LB 中振荡培养约 12 h,而 4°C 冷藏保存的种子振荡培养约 15 h,进行扩大培养合适;扩大培养时间约 2 h 40 min,其感受态转化效率较高。

转化后从 C500 中提取的质粒没有大肠杆菌中提取的质粒那样典型清晰的电泳条带,往往伴有其他模糊条带,并且容易消散,这与以往报道是一致的<sup>[18]</sup>,不容易辨认超螺旋、线形、环状 3 种质粒形态。推测可能是弱毒猪霍乱沙门氏菌细胞内的各种酶类等或其他因素(遗传性状)导致转化的质粒 DNA 甲基化或形成不同拓扑结构<sup>[4]</sup>,以及质粒持续表达的缘故。本研究采用在增菌过程中细菌进入稳定期后加入适当氯霉素选择性地抑制细菌的蛋白合成和细菌分裂增加质粒拷贝以及多次酚/氯仿抽提纯化和较高量 RNase A 较长时间处理的方法,可很好观察到酶切后除其他模糊条带外的明亮线形 DNA 的正确位置,加上特异性的菌落 PCR 和质粒 PCR,使鉴定更为准确。

pEGFP<sub>P<sub>trc</sub></sub>R 在 C500 中和 Vero 细胞中表达均能很好观察到绿色荧光,说明该质粒能够同时也在原核和真核细胞内表达,预示将 EGFP 用作穿梭表达的报告基因,可准确检测基因表达量<sup>[11]</sup>,精确观察到

载体菌运送方式以及与活宿主细胞间的相互作用,并在活细胞里定位蛋白质,以期实现对体内免疫情况的实时定量监测。SDS-PAGE 结果显示,工程菌经 IPTG 诱导和未诱导均能表达 EGFP 蛋白,而经 IPTG 诱导随着时间增加表达量有不明增加,原因还不清楚,怀疑 C500 中可能含有具 P<sub>trc</sub> 阻遏蛋白的内源性质粒。pEGFP<sub>trc</sub> 在大肠杆菌 DH5 $\alpha$  中经 IPTG 诱导同样能高效表达绿色荧光,因此还作为一般的载体应用于原核、真核细胞的表达研究。

本研究成功构建了携带双启动子表达载体 pEGFP<sub>trc</sub>R 的猪霍乱沙门氏菌,提示该菌可经 MHC I 类和 II 类 2 种途径刺激机体产生免疫应答<sup>[19]</sup>,具备更优越的免疫效果。为从 DNA 疫苗本身作手改善其免疫应答机制和提高其免疫原性开辟了探索性道路,为进一步研究以弱毒猪霍乱沙门氏菌为载体的高效 DNA 疫苗提供了新的思路。

## REFERENCES

- [1] Pasetti MF, Levine MM, Sztein MB. Animal models paving the way for clinical trials of attenuated *Salmonella enterica* serovar Typhi live oral vaccines and live vectors. *Vaccine*, 2003, **21**: 401–418.
- [2] Fang XW. The Research of Piglet Paratyphoid Attenuated Vaccine. Edition of Research. China Institute of Veterinary Drug Control, 1978: 1–11.  
房晓文. 仔猪副伤寒弱毒疫苗的研究. 中国兽医药品监察所研究报告汇编. 1978: 1–11.
- [3] Jiang P, Jiang WM, Li YF, et al. Humoral immune response induced by oral administration of *S. typhimurium* containing a DNA vaccine against porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Vet Immunol Immunopathol*, 2004, **102**(12): 321–328.
- [4] Qiao HW, Yu XL, Tu CC. *Salmonella choleraesuis* C500 delivering DNA immunization against classical swine fever virus. *Chin J Biotech*, 2005, **21**(6): 885–869.  
乔红伟, 余兴龙, 涂长春, 等. 猪霍乱沙门氏菌载体介导猪瘟病毒 DNA 免疫研究. 生物工程学报, 2005, **21**(6): 885–869.
- [5] Jiao FC, Jiao XA, Pan ZM, et al. The immune efficacy of attenuated *Salmonella typhimurium* harbouring DNA vaccine against H5 subtype of Avian influenza virus in commercial ISA brown chickens. *Chin J Virol*, 2006, **22**(1): 6–9.  
焦凤超, 焦新安, 潘志明, 等. 减毒鼠伤寒沙门氏菌介导的 H5 亚型禽流感病毒 DNA 疫苗的实验免疫效果研究. 病毒学报, 2006, **22**(1): 6–9.
- [6] Galan JE, Nakayama K, Curtiss R. Cloning and characterization of the *asd* gene of *Salmonella typhimurium*: use in stable maintenance of recombinant plasmids in *Salmonella* vaccine. *Gene*, 1990, **94**(1): 29–35.
- [7] Xu YD, Guo AZ, Chen HC. 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.
- [8] 徐引弟, 郭爱珍, 陈焕春, 等. 猪霍乱沙门氏菌 C500 $\Delta$ 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.
- [9] Cho JC, Kim SJ. Green fluorescent protein-based direct viable count to verify a viable but non-culturable state of *Salmonella typhi* in environmental samples. *J Microbiol Methods*, 1999, **36**(3): 227–235.
- [10] Zabala-Diaz IB, Chalova VI, Ricke SC. Generation of a green fluorescent protein gene chromosomal insertion containing *Escherichia coli* strain for gene inductionbased quantification of bioavailable lysine. *Sensing Instrum Food Qual Saf*, 2007, **1**(2): 55–61.
- [11] Feilmerier BJ, Iseminger G, Phillips GJ, et al. Green fluorescent protein functions as a reporter for protein localization in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, 2000, **182** (14): 4068–4076.
- [12] Hautefort I, Proença MJ, Hinton JCD. Single-copy green fluorescent protein gene fusions allow accurate measurement of *Salmonella* gene expression *in vitro* and during infection of mammalian cells. *Appl Environ Microbiol*, 2003, **69**(12): 7480–7491.
- [13] Kang HY, Srinivasan J, Curtiss R. Immune responses to recombinant pneumococcal PspA antigen delivered by live attenuated *Salmonella enterica* serovar typhimurium vaccine. *Infect Immun*, 2002, **70**(4): 1739–1749.
- [14] Hiroyuki Abe, Tatsuhiko Abo, Hiroji Aiba. Regulation of intrinsic terminator by translation in *Escherichia coli*: transcription termination at a distance downstream. *Genes Cells*, 2001, **4**(2): 87–97.
- [15] Uptain SM, Chamberlin MJ. *Escherichia coli* RNA polymerase terminates transcription efficiently a rho-independent terminators on single-stranded DNA templates. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, **94** (25): 13548–13553.
- [16] Orosz A, Boros I, Venetianer P. Analysis of the complex transcription termination region of the *Escherichia coli* *rrnB* gene. *Eur J Biochem*, 1991, **201**(3): 653–659.
- [17] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd Ed. Beijing: Science Press, 1996.  
萨姆布鲁克 J, 弗里奇 EF, 曼尼阿蒂斯 T. 分子克隆实验指南. 第 2 版. 北京: 科学出版社, 1996.
- [18] Bian JF. Construction and evaluation of dual-promoter DNA vaccine expression plasmid pCMVnir and its application in an intracellular bacteria-based DNA vaccine pCMVnir-16L1E7 of human papillomavirus. Ph. D Thesis. Shandong University, 2003.  
卞继峰. 新型双启动子 DNA 疫苗载体的研制及在人乳头瘤病毒疫苗研究中的应用. 山东大学博士学位论文, 2003.
- [19] Jin SQ, Lu SX, Peng Q, et al. Construction of a recombinant vaccine strain expressing E7 gene of human papilloma virus type 16. *Chin J Virol*, 1998, **14**(1): 38–41.  
金顺钱, 陆士新, 彭琼, 等. 人乳头瘤病毒 HPV16 E7 蛋白基因在沙门氏菌疫苗菌株 X4072 中的表达. 病毒学报, 1998, **14**(1): 38–41.
- [20] Zhang XM, Jiao XA, Liu XF. Characterization of novel DNA vaccine vector without antibiotic resistance gene, its transporting system based on *Salmonella* and characterization of a prokaryotic-eukaryotic double expression plasmid. Ph. D Thesis. Yangzhou University, 2003: 17–39.  
张晓明, 焦新安, 刘秀梵, 等. 非抗性筛选 DNA 疫苗载体及其沙门氏菌运送系统的研制和原核、真核双表达质粒的构建. 扬州大学博士学位论文, 2003: 17–39.