

动物及兽医生物技术

## 减毒鼠伤寒沙门菌三型分泌表达系统的构建及其特性

郁川<sup>1\*</sup>, 翟崇凯<sup>1\*</sup>, 廖成水<sup>1</sup>, 余祖华<sup>1</sup>, 何雷<sup>1</sup>, 贾艳艳<sup>1</sup>, 李静<sup>1</sup>, 张春杰<sup>1</sup>, 程相朝<sup>1,2</sup>

1 河南科技大学 动物科技学院 动物疫病与公共卫生重点实验室, 河南 洛阳 471003

2 洛阳职业技术学院, 河南 洛阳 471003

郁川, 翟崇凯, 廖成水, 等. 减毒鼠伤寒沙门菌三型分泌表达系统的构建及其特性. 生物工程学报, 2016, 32(12): 1664–1675.

Yu C, Zhai CK, Liao CS, et al. Construction and characterization of type III secretion system of attenuated *Salmonella typhimurium*. Chin J Biotech, 2016, 32(12): 1664–1675.

**摘要:** 为开发新型重组减毒鼠伤寒沙门菌口服活疫苗载体, 本研究以 pYA3493 质粒为基础, 用鼠伤寒沙门菌 *sopE*<sub>Nt100</sub> 基因及其启动子替代原有的 *P<sub>irc</sub>* 启动子, 构建沙门菌三型分泌表达载体 pYA-*sopE*<sub>Nt100</sub>; 再将质粒 pYA-*sopE*<sub>Nt100</sub> 电转入沙门菌  $\Delta$ *crp* $\Delta$ *asd*SL1344, 构建减毒鼠伤寒沙门菌  $\Delta$ *crp* $\Delta$ *asd*SL1344 (pYA-*sopE*<sub>Nt100</sub>) 三型分泌表达系统, 研究其生物学特性, 进一步将报告基因 *egfp* 克隆入 *sopE* 基因下游, 构建重组菌株  $\Delta$ *crp* $\Delta$ *asd*SL1344 (pYA-*sopE*<sub>Nt100</sub>-*egfp*), 感染 Vero 细胞, 用 Western blotting 分析该系统递呈外源抗原的能力。PCR、酶切及测序结果表明, 减毒鼠伤寒沙门菌  $\Delta$ *crp* $\Delta$ *asd*SL1344 (pYA-*sopE*<sub>Nt100</sub>) 三型分泌表达系统构建成功; 生物学特性鉴定结果表明, 其血清型与亲本株  $\Delta$ *crp* SL1344 及野生株 SL1344 保持一致; 其生化特性与亲本株基本相近, 但与野毒株相比发生明显变化; 生长速度也更为缓慢; 重组菌株  $\Delta$ *crp* $\Delta$ *asd*SL1344 (pYA-*sopE*<sub>Nt100</sub>) 的 *LD*<sub>50</sub> 较野生株 SL1344 降低了  $7.0 \times 10^4$  倍; Western blotting 结果发现, 重组菌培养上清中能检测到 *SopE*<sub>Nt100</sub>-*egfp* 融合蛋白 (37 kDa); 重组菌株感染 Vero 细胞后, 可以同时检测到 *SopE*<sub>Nt100</sub>-*egfp* 融合蛋白 (37 kDa) 和 EGFP 蛋白 (27 kDa)。以上结果证实, 本研究成功构建了新型减毒鼠伤寒沙门菌  $\Delta$ *crp* $\Delta$ *asd* (pYA-*sopE*<sub>Nt100</sub>) 三型分泌表达系统, 其能够有效递呈外源抗原, 该重组菌株有潜力作为安全、稳定、高效表达外源基因的口服重组活疫苗载体。

**关键词:** 减毒鼠伤寒沙门菌, 三型分泌系统, *sopE* 基因, 平衡致死系统, 活疫苗载体

**Received:** April 7, 2016; **Accepted:** June 28, 2016

**Supported by:** National Natural Science Foundation of China (Nos. 31302059, 31572489), Scientific and Technological Project of Henan Province (No. 152102110078), Doctor Foundation of Henan University of Science and Technology (No. 4025-13480064).

**Corresponding author:** Xiangchao Cheng. Tel/Fax: +86-379-64179396; E-mail: chengxch@126.com

\*These authors contributed equally to this study.

国家自然科学基金 (Nos. 31302059, 31572489), 河南省科技攻关项目 (No. 152102110078), 河南科技大学博士启动基金 (No. 4025-13480064) 资助。

网络出版时间: 2016-09-12

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1998.Q.20160912.1112.001.html>

# Construction and characterization of type III secretion system of attenuated *Salmonella typhimurium*

Chuan Yu<sup>1\*</sup>, Chongkai Zhai<sup>1\*</sup>, Chengshui Liao<sup>1</sup>, Zuhua Yu<sup>1</sup>, Lei He<sup>1</sup>, Yanyan Jia<sup>1</sup>, Jing Li<sup>1</sup>, Chunjie Zhang<sup>1</sup>, and Xiangchao Cheng<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> The Key Laboratory of Animal Disease and Public Health, College of Animal Science and Technology, Henan University of Science and Technology, Luoyang 471003, Henan, China

<sup>2</sup> Luoyang Vocational & Technical College, Luoyang 471003, Henan, China

**Abstract:** In order to develop a recombinant attenuated *Salmonella typhimurium* as oral live vaccine vector, we constructed recombinant plasmid pYA-*sopE*<sub>Nt100</sub> by replacing the *trc* promoter with the *sopE* promoter and secretion signal sequence *sopE*<sub>Nt100</sub> of *Salmonella typhimurium* on the basis of plasmid pYA3493. Then, the complementary plasmid pYA-*sopE*<sub>Nt100</sub> was transformed into  $\Delta$ *crp* $\Delta$ *asd*SL1344 by electroporation to generate attenuated *Salmonella typhimurium* type III secretion system  $\Delta$ *crp* $\Delta$ *asd*SL1344 (pYA-*sopE*<sub>Nt100</sub>). We further characterized  $\Delta$ *crp* $\Delta$ *asd*SL1344 (pYA-*sopE*<sub>Nt100</sub>). We also constructed a recombinant strain  $\Delta$ *crp* $\Delta$ *asd*SL1344 (pYA-*sopE*<sub>Nt100</sub>-*egfp*) that harbored the reporter gene-enhanced green fluorescent protein (*egfp*) gene. Vero cells were infected with  $\Delta$ *crp* $\Delta$ *asd*SL1344 (pYA-*sopE*<sub>Nt100</sub>-*egfp*) and the ability of delivery foreign antigens was tested via Western blotting analysis. The results of PCR, enzyme digestion and sequencing showed that the  $\Delta$ *crp* $\Delta$ *asd*SL1344 (pYA-*sopE*<sub>Nt100</sub>) type III secretion system was constructed successfully. The serotype of  $\Delta$ *crp* $\Delta$ *asd*SL1344 (pYA-*sopE*<sub>Nt100</sub>) was identical to  $\Delta$ *crp* $\Delta$ *asd*SL1344 and SL1344. Compared with wild strain SL1344, the biochemical characteristics of  $\Delta$ *crp* $\Delta$ *asd*SL1344 (pYA-*sopE*<sub>Nt100</sub>) had obvious change, but it was basically the same with  $\Delta$ *crp* $\Delta$ *asd*SL1344. The growth speed was much slower than that of the wild strain SL1344. The chicken virulence test ( $LD_{50}$ ) showed that the virulence of  $\Delta$ *crp* $\Delta$ *asd*SL1344 (pYA-*sopE*<sub>Nt100</sub>) was  $7 \times 10^4$  times lower than SL1344. In addition, we observed the 37 kDa *SopE*<sub>Nt100</sub>-*egfp* protein in the cultured supernatant of  $\Delta$ *crp* $\Delta$ *asd*SL1344 (pYA-*sopE*<sub>Nt100</sub>-*egfp*) strain by Western blotting analysis. However, both the 37 kDa *SopE*<sub>Nt100</sub>-*egfp* protein and 27 kDa EGFP protein were detected in  $\Delta$ *crp* $\Delta$ *asd*SL1344 (pYA-*sopE*<sub>Nt100</sub>-*egfp*)-infected Vero cells. These results demonstrated that the recombinant *Salmonella typhimurium* type III secretion system  $\Delta$ *crp* $\Delta$ *asd*SL1344 (pYA-*sopE*<sub>Nt100</sub>) was successfully constructed, and it should be used as a live vaccine vector for expressing foreign genes.

**Keywords:** attenuated *Salmonella typhimurium*, type III secretion system, *sopE* gene, balance-lethal system, live vaccine vector

鼠伤寒沙门菌属肠杆菌科沙门菌属的 B 血清群成员, 具有广泛感染的宿主谱, 也是一种重要的人畜共患病原菌, 在医学、兽医学和公共卫生上均具有十分重要的意义<sup>[1-2]</sup>。通过基因工程减毒的鼠伤寒沙门菌毒力降低, 但能保持良好的免疫原性, 能有效地刺激机体产生粘膜、细胞和体液免疫应答<sup>[3-4]</sup>。另外, 减毒沙门菌 LPS 作为内在佐剂, 可以刺激宿主细胞释放各种细胞因子以及增强树突状细胞捕获和加工 MHC-I 类抗原的能力, 有利于将重组沙门菌的抗原呈

递给特异性的 B、T 细胞<sup>[5-6]</sup>。因此, 减毒鼠伤寒沙门菌是携带抗原的良好载体和天然粘膜免疫佐剂, 这已受到医学与兽医学的广泛关注<sup>[7-8]</sup>。

沙门菌质粒平衡致死载体系统的建立有效解决了外源质粒的不稳定携带和表达以及耐药基因潜在的生物安全性问题<sup>[9-10]</sup>。*asd* 质粒平衡致死系统是基于缺失载体菌的编码二氨基庚二酸 (DL- $\alpha$ ,  $\epsilon$ -Diaminopimelic acid, DAP) 合成酶的基因而开发的载体表达系统。*asd* 基因 (Aspartic semialdehyde dehydrogenase) 编码的

天冬氨酸  $\beta$ -半乳糖脱氢酶是 DAP 生物合成途径中的必需酶, *asd* 突变株在无外源 DAP 条件下不能形成完好的细胞壁, 最终溶菌死亡。然而外源的抗原基因可被克隆至 *asd*<sup>+</sup> 的质粒中与突变菌形成互补, 使重组菌在无外源 DAP 存在的条件下仍能存活<sup>[11-12]</sup>。本实验室为开发新型鼠伤寒沙门菌口服活疫苗载体, 在缺失编码 cAMP 受体蛋白 (cAMP receptor protein, *crp*) 基因<sup>[13]</sup>的沙门菌基础上成功构建出减毒鼠伤寒沙门菌平衡致死系统  $\Delta crp\Delta asd$ SL1344 (pYA-3493)<sup>[14]</sup>。

鼠伤寒沙门菌 III 型分泌系统 (type III secretion system, T3SS) 与细菌的定殖、侵染以及在宿主细胞内的存活有着密切的关系<sup>[15]</sup>。T3SS 通过一个复杂的针头复合物将外源蛋白注入宿主细胞内, 从而调节细胞的功能。沙门菌外膜蛋白 E (Salmonella outer protein E, *sopE*) 是 T3SS 的一种重要的功能蛋白, 它通过与 Cdc42 和 Rac1 相互作用, 激活 Rho GTPase, 从而导致膜波动和肌动蛋白细胞骨架重组, 促进沙门菌内化到宿主细胞<sup>[16]</sup>。此外, 已经证实 *SopE* 氨基末端 100 个氨基酸 (*sopE*<sub>Nt100</sub>) 是分泌和转位区域, 能够作为一种外源蛋白运输工具, 可以高效输送异源蛋白到真核细胞胞质<sup>[17]</sup>。另外, 在真核细胞内 *SopE* 蛋白能够迅速地被泛素化处理和被蛋白酶体降解, 不仅有利于外源抗原的递呈, 而且对宿主细胞自身的毒性较小<sup>[18]</sup>。

综上所述, 本试验在减毒鼠伤寒沙门菌平衡致死系统的基础上, 利用鼠伤寒沙门菌 III 型分泌系统高效递呈外源抗原的优势, 构建减毒鼠伤寒沙门菌  $\Delta crp\Delta asd$ SL1344 (pYA-*sopE*<sub>Nt100</sub>) 三型分泌表达系统, 进一步研究该系统递呈外源抗原的能力及其生物学特性, 进而为研发更加安全、有效、稳定的新型重组减毒鼠伤寒沙门菌口服活疫苗载体奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌株、质粒、细胞及培养条件

鼠伤寒沙门菌 SL1344 强毒株购自中国兽医药品监督所, 质粒 pEGFP-N1 购自 Invitrogen 公司, 无抗性原核表达载体 pYA3493 (*asd*<sup>+</sup>, pBRori,  $\beta$ -lactamase signal sequence) 及其宿主菌  $\chi$ 6097 (*ara* $\Delta$ (lac-pro) rPsl $\Delta$ *asdA4* $\Delta$ [zhf-2::Tn10] thi $\phi$ 80d/lacZ $\Delta$ M15) 由美国华盛顿大学 Dr. Roy Curtiss III 教授惠赠, 鼠伤寒沙门菌  $\Delta crp\Delta asd$ SL1344 由本室构建保存<sup>[14]</sup>, 大肠杆菌和鼠伤寒沙门菌在各种培养基中 37 °C 静置或振荡培养, 各培养基根据需要加入终浓度为 50  $\mu$ g/mL DAP、50  $\mu$ g/mL 的庆大霉素。

### 1.2 主要试剂、培养基和实验动物

沙门菌属诊断血清及各种单因子血清购自宁波天润生物药业有限公司; DAP 购自 Sigma-Aldrich 公司; *Taq* DNA 聚合酶、琼脂糖、dNTPs、DNA marker、T4 DNA 连接酶和各种限制性内切酶购自大连宝生物工程有限公司; 胰蛋白酶、酵母提取物购自英国 Oxoid 公司; 鼠抗 EGFP 单抗及 HPR 标记兔抗鼠 IgG 购自 Abcam; 质粒小量提取试剂盒购自北京鼎国昌盛生物技术有限公司; 凝胶回收试剂盒购自生工生物工程有限公司; 麦康凯琼脂和生化鉴定试剂均购自杭州天和微生物试剂有限公司; 胎牛血清和 DMEM 培养基购自 Gibco; 1 日龄健康罗曼雏鸡, 按常规方法检测均为沙门菌抗体阴性<sup>[19]</sup>。

### 1.3 引物设计与合成

根据鼠伤寒沙门菌 (GenBank Accession No. AE008859) *sopE* 基因的启动子和分泌信号序列以及质粒 pEGFP-N1 中 EGFP 的全基因序列, 运用 Primer 5.0 引物设计软件设计引物并由北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司合成

(表 1, 引物中的斜体部分为酶切位点)。

### 1.4 沙门菌三型分泌表达载体的构建及鉴定

以质粒 pYA3493 为基础, 用鼠伤寒沙门菌 *sopE* 基因的启动子及分泌信号序列替代原有的  $P_{trc}$  启动子, 构建沙门菌三型分泌表达载体 pYA-*sopE*<sub>Nt100</sub> (图 1); 将 *egfp* 报告基因插入

表 1 PCR 扩增所用的引物序列

Table 1 The primer sets for PCR in this study

| Primer name                 | Primer sequence (5'-3')                   |
|-----------------------------|---|
| Fw- <i>P<sub>sopE</sub></i> | CCGGAATTAATTCTTCAATGCCAGAA<br>CGGCAAGGCTC |
| Rw- <i>P<sub>sopE</sub></i> | CCGGAATTCCGCACTACCTCTAATATC               |
| Fw- <i>egfp</i>             | CGGAATTCATGGTGAGCAAGGGCG                  |
| Rw- <i>egfp</i>             | CCCAAGCTTTTACTTGTACAGCTC                  |

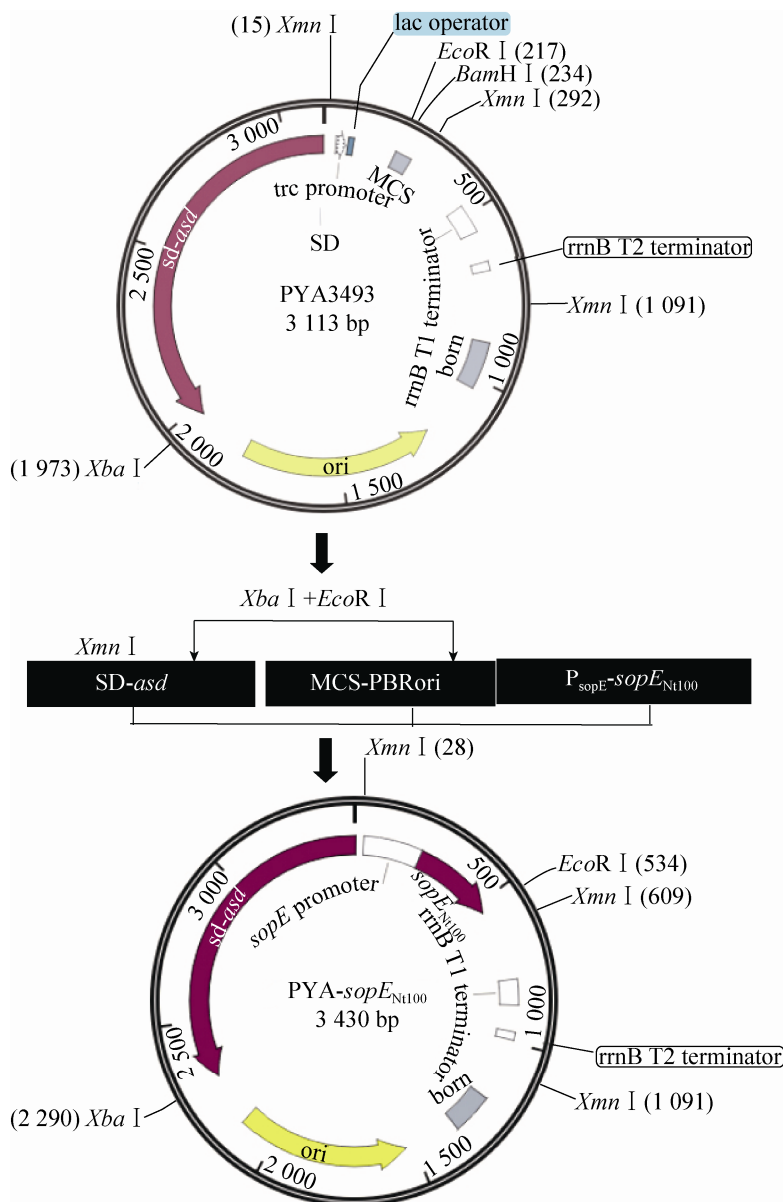


图 1 重组质粒 pYA-*sopE*<sub>Nt100</sub> 构建示意图

Fig. 1 Construction of the recombinant plasmid pYA-*sopE*<sub>Nt100</sub>.

pYA-*sopE<sub>Nt100</sub>* 下游, 构建重组标记载体 pYA-*sopE<sub>Nt100</sub>-egfp*。然后分别将质粒 pYA-*sopE<sub>Nt100</sub>* 和 pYA-*sopE<sub>Nt100</sub>-egfp* 转化大肠杆菌  $\chi$ 6097, 取 100  $\mu$ L 涂布于 LB 平板上。15–18 h 后挑取无色单菌落接种于 LB 液体培养基进行扩大培养, 用碱裂解法提取质粒进行 PCR、酶切和测序鉴定。

### 1.5 重组菌株的构建及鉴定

10  $\mu$ L pYA-*sopE<sub>Nt100</sub>* 和 pYA-*sopE<sub>Nt100</sub>-egfp* 质粒加入 100  $\mu$ L  $\Delta$ *crp* $\Delta$ *asd*SL1344 的电转化感受态中混合均匀, 冰浴 30 min, 将混合物迅速转移至电极杯中, 然后进行电击; 电击后迅速加入 400  $\mu$ L 预热的 LB 液体培养基, 37  $^{\circ}$ C、180 $\times$ g 振荡培养 3 h, 取出 100  $\mu$ L 涂布于不含 DAP 的 LB 平板上。15–24 h 后挑取无色单菌落接种于 LB 液体培养基中, 用碱裂解法提取质粒进行 PCR 和酶切鉴定。

### 1.6 重组菌株 $\Delta$ *crp* $\Delta$ *asd*SL1344 (pYA-*sopE<sub>Nt100</sub>-egfp*) 生物学特性

#### 1.6.1 重组菌株的表型及生化鉴定

重组菌株  $\Delta$ *crp* $\Delta$ *asd*SL1344 (pYA-*sopE<sub>Nt100</sub>-egfp*) 及其亲本株  $\Delta$ *crp*SL1344、双缺失株  $\Delta$ *crp* $\Delta$ *asd*SL1344 和野生株 SL1344 分别划线接种于含 1% 麦芽糖的麦康凯琼脂培养基和 LB 琼脂培养基, 培养 15 h 后进行 O 和 H 抗原等血清型鉴定, 然后将各菌株分别转接于各生化管中培养研究其生化特性。

#### 1.6.2 重组质粒在菌株中的稳定性检测

重组菌株  $\Delta$ *crp* $\Delta$ *asd*SL1344 (pYA-*sopE<sub>Nt100</sub>-egfp*) 在 LB 固体板上划线培养, 挑取单菌落于 LB 液体培养基中培养, 按 1 : 100 的比例转接到 LB $\pm$ DAP 液体培养基中培养, 连续培养 50

代。培养产物每 10 代挑取 50 个单菌落提取质粒, 并进行 PCR 扩增鉴定和计算质粒丢失率<sup>[20]</sup>, 以研究重组质粒在菌株中的遗传稳定性。

#### 1.6.3 重组菌株的生长特性鉴定

分别挑取重组菌株  $\Delta$ *crp* $\Delta$ *asd*SL1344 (pYA-*sopE<sub>Nt100</sub>-egfp*) 及其亲本株  $\Delta$ *crp*SL1344、双缺失株  $\Delta$ *crp* $\Delta$ *asd*SL1344 和野生株 SL1344 单菌落培养过夜, 菌液用无菌 PBS 连续 10 倍稀释, 选取合适稀释度涂板计数, 计算母液细菌浓度。然后菌液以终浓度均为  $1 \times 10^6$  CFU/mL 进行转接, 连续培养 18 h, 每隔 1 h 测定波长 600 nm 的光密度 ( $OD_{600}$ ) 值, 绘制 4 种菌株的生长曲线。

#### 1.6.4 重组菌株对雏鸡的毒力试验

无菌挑取重组菌株  $\Delta$ *crp* $\Delta$ *asd*SL1344 (pYA-*sopE<sub>Nt100</sub>-egfp*) 及其亲本株  $\Delta$ *crp*SL1344 和野生株 SL1344 单菌落, 培养至对数生长期时选择合适稀释度, 每个稀释度口服 10 只鸡, 每只 200  $\mu$ L, 另设 PBS 对照组, 观察 30 d, 记录鸡死亡情况, 运用生物软件 (Bliss) 计算各组  $LD_{50}$ 。

### 1.7 *SopE<sub>Nt100</sub>-egfp* 融合基因在重组菌株中的表达情况鉴定

挑取减毒鼠伤寒沙门菌  $\Delta$ *crp* $\Delta$ *asd*SL1344 (pYA-*sopE<sub>Nt100</sub>-egfp*) 的单菌落于 LB 液体培养基中, 37  $^{\circ}$ C 培养 12 h; 然后按 1 : 100 的体积比转接 LB 培养基继续培养 8 h, 8 000 $\times$ g 离心 10 min 收集沉淀和上清。沉淀用超声波进行破碎, 上清液经 0.22  $\mu$ m 滤膜过滤, 加等体积预冷的 20% 三氯乙酸冰浴 20 min, 8 000 $\times$ g 离心 30 min; 然后将浓缩后上清用 1 mL 无水乙醇洗涤, 12 000 $\times$ g 离心 5 min; 重复洗涤 2 次, 向上清和沉淀中加入 5 $\times$ SDS 上样缓冲液进行

SDS-PAGE 分析,并进一步进行 Western blotting 分析。第一抗体为鼠抗 EGFP 单抗 (1 1 000 稀释),第二抗体为 HPR 标记兔抗鼠 IgG (1 3 000 稀释),同时设对照组  $\Delta crp\Delta asdSL1344$  (pYA-*sopE*<sub>Nt100</sub>)。

### 1.8 重组减毒沙门菌侵染 Vero 细胞及表达蛋白的 Western blotting 分析

培养 Vero 细胞生长至 80%–90%时,按细菌/细胞感染比 500 1 分别将重组减毒鼠伤寒沙门菌  $\Delta crp\Delta asdSL1344$  (pYA-*sopE*<sub>Nt100</sub>-*egfp*) 和  $\Delta crp\Delta asdSL1344$  (pYA-*sopE*<sub>Nt100</sub>) 加入六孔板中,培养 4 h 后,用无菌 PBS 洗涤 3 次,加入含有 10%胎牛血清及 50  $\mu$ g/mL 庆大霉素的 DMEM 培养基,继续培养 24 h 后,收集细胞,用细胞裂解液裂解细胞,4  $^{\circ}$ C、12 000 $\times$ g 离心 5 min 收集上清液,加入等体积的 2 $\times$ SDS 上样缓冲液,混匀后煮沸 5 min 进行 SDS-PAGE,并进一步进行 Western blotting 分析,其中一抗为鼠抗 EGFP 单抗 (1 1 000 稀释),二抗为 HPR 标记的兔抗鼠 IgG (1 3 000 稀释)。

## 2 结果与分析

### 2.1 沙门菌三型分泌表达载体的构建及鉴定

对 pYA-*sopE*<sub>Nt100</sub> 进行 PCR 和酶切鉴定,PCR 扩增出大小约为 500 bp 的目的条带 (图 2A); 经 *Acc* III 和 *Eco*R I 双酶切后出现大小分别为 500 bp 和 2 900 bp 的两条目的条带 (图 2B); pYA-*sopE*<sub>Nt100</sub>-*egfp* 可扩增出约 800 bp 的 *egfp* 片段 (图 2C), 经 *Eco*R I 和 *Hind* III 双酶切后出现大小分别约 800 bp 和 3 400 bp 两条带 (图 2D)。测序结果表明, *P*<sub>sopE</sub>-*sopE*<sub>Nt100</sub> 和 *egfp* 基因序列与预期标准核酸序列的同源性均为 100%。重组质粒可在大肠杆菌  $\chi$ 6097 (*asd*<sup>-</sup>) 菌株中稳定存

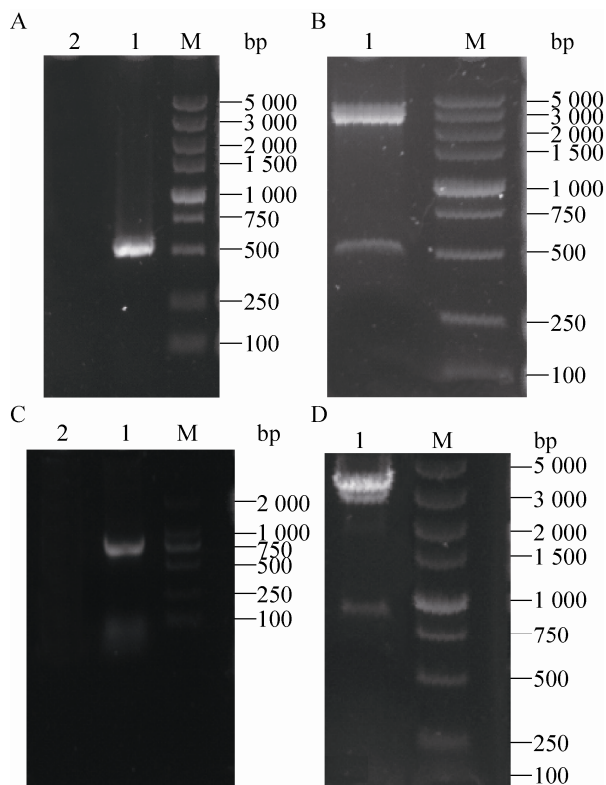


图 2 重组质粒的鉴定

Fig. 2 Identification of the recombinant plasmid. (A) PCR identification of recombinant plasmid pYA-*sopE*<sub>Nt100</sub>. M: DNA marker ladder (DL 5 000); 1: recombinant plasmid pYA-*sopE*<sub>Nt100</sub>; 2: ddH<sub>2</sub>O control. (B) Restriction endonuclease digestion of recombinant plasmid pYA-*sopE*<sub>Nt100</sub>. M: DNA marker ladder (DL 5 000); 1: pYA-*sopE*<sub>Nt100</sub>. (C) PCR identification of recombinant plasmid pYA-*sopE*<sub>Nt100</sub>-*egfp*. M: DNA marker ladder (DL 2 000); 1: pYA-*sopE*<sub>Nt100</sub>-*egfp*; 2: ddH<sub>2</sub>O control. (D) Restriction endonuclease digestion of recombinant plasmid pYA-*sopE*<sub>Nt100</sub>-*egfp*. M: DNA marker ladder (DL 5 000); 1: recombinant plasmid pYA-*sopE*<sub>Nt100</sub>-*egfp*.

在,以上结果表明,鼠伤寒沙门菌三型分泌表达载体 pYA-*sopE*<sub>Nt100</sub> 及其重组载体 pYA-*sopE*<sub>Nt100</sub>-*egfp* 构建成功。

### 2.2 重组菌株的构建及鉴定

重组菌株  $\Delta crp\Delta asdSL1344$  (pYA-*sopE*<sub>Nt100</sub>)

和  $\Delta crp\Delta asdSL1344$  (pYA-*sopE<sub>Nt100</sub>-egfp*) 能够在不含 DAP 的 LB 固体培养基上生长, 初步说明重组质粒 pYA-*sopE<sub>Nt100</sub>* 和 pYA-*sopE<sub>Nt100</sub>-egfp* 导入了宿主菌  $\Delta crp\Delta asdSL1344$ 。重组质粒 pYA-*sopE<sub>Nt100</sub>* 经 PCR 可以扩增出 500 bp 的目的条带, 经 *Acc* III 和 *Eco*R I 双酶切后出现大小分别为 500 bp 和 2 900 bp 的两条带, 而重组质粒 pYA-*sopE<sub>Nt100</sub>-egfp* PCR 可以扩增出 800 bp 的目的条带, 经 *Eco*R I 和 *Hind* III 双酶切后出现大小分别约为 800 bp 和 3 400 bp 的两条带。以上结果可说明重组质粒 pYA-*sopE<sub>Nt100</sub>* 和 pYA-*sopE<sub>Nt100</sub>-egfp* 被成功导入了宿主菌株  $\Delta crp\Delta asdSL1344$ 。

### 2.3 $\Delta crp\Delta asdSL1344$ (pYA-*sopE<sub>Nt100</sub>-egfp*) 重组菌株的生物学特性

#### 2.3.1 重组菌株的表型及生化鉴定

血清型鉴定表明, 重组菌  $\Delta crp\Delta asdSL1344$  (pYA-*sopE<sub>Nt100</sub>-egfp*) 的血清型同亲本株和野生株相比没有发生变化, 血清型仍为 O<sub>1,4,5,12</sub>:Hi<sub>1,2</sub>。野生株 SL1344 能够利用麦芽糖, 在含有麦芽糖的麦康凯琼脂培养基上呈红色菌落; 而重组菌株  $\Delta crp\Delta asdSL1344$  (pYA-*sopE<sub>Nt100</sub>-egfp*) 不能利用麦芽糖, 因此在含麦芽糖的麦康凯琼脂培养基上呈无色菌落, 这与亲本株  $\Delta crpSL1344$  保持一致。生化鉴定结果显示, 重组菌株的生化特性与野生株 SL1344 相比发生了明显改变, 其失去了利用丙三醇、阿拉伯糖、麦芽糖、山梨醇和木糖碳源的能力, 也不能分解 H<sub>2</sub>S, 但仍保留了利用葡萄糖、甘露醇的能力, 这些都与亲本株  $\Delta crpSL1344$  基本保持一致。

#### 2.3.2 重组质粒在菌株中的稳定性检测

将重组菌株  $\Delta crp\Delta asdSL1344$  (pYA-*sopE<sub>Nt100</sub>-egfp*) 在 LB±DAP 液体培养基中连续培养 50 代,

培养产物每隔 10 代挑取 50 个单菌落进行 PCR 扩增鉴定并计算质粒丢失率。质粒稳定性结果表明, 重组菌株连续培养 50 代后, LB 组菌株均可扩增出约 800 bp 的 *egfp* 目的条带 (图 3), 质粒保存率为 100%, 而 LB+DAP 组菌株的质粒丢失率为 48% (图 4)。

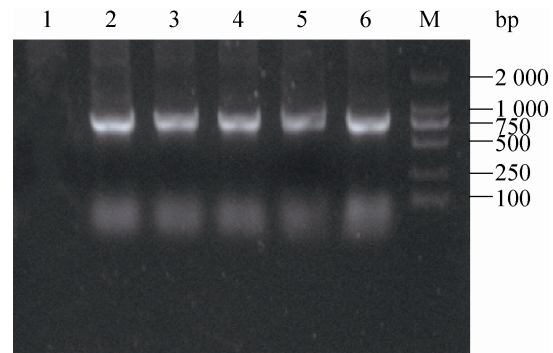


图 3 重组沙门菌体外稳定性 PCR 鉴定结果

Fig. 3 PCR identification of the stabilities of recombinant plasmid in recombinant strains. M: DNA marker ladder (DL 2 000); 1: ddH<sub>2</sub>O control; 2-6: the 10th, 20th, 30th, 40th and 50th generation of  $\Delta crp\Delta asdSL1344$  (pYA-*sopE<sub>Nt100</sub>-egfp*).

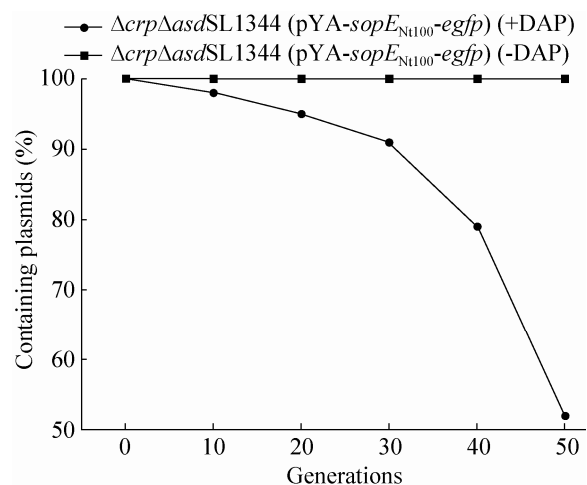


图 4 重组质粒在沙门菌中的稳定性鉴定结果

Fig. 4 The plasmid stabilities in recombinant strains.



### 2.3.3 重组菌株的生长特性鉴定

重组菌株  $\Delta crp\Delta asdSL1344$  (pYA-sopE<sub>Nt100</sub>-egfp)、缺失菌  $\Delta crp\Delta asdSL1344$  和亲本株  $\Delta crpSL1344$  的菌落大小明显小于野生株 SL1344, 其平均菌落直径大小分别为 0.39 mm、0.36 mm、0.42 mm 和 0.79 mm。以取样时间为横坐标, 以每小时所测菌液 OD<sub>600</sub> 值为纵坐标, 绘制 4 种细菌的生长曲线 (图 5)。结果表明, 重组菌株的生长速度低于强毒株, 而与缺失菌株和亲本株相比没有明显变化。

### 2.3.4 重组菌株对雏鸡的毒力试验

各试验组 1 日龄雏鸡接种后连续观察 30 d, 计算各组死亡情况和半数致死量(LD<sub>50</sub>)。由表 2 可知, 口服感染  $\Delta crp\Delta asdSL1344$  (pYA-sopE<sub>Nt100</sub>-egfp) 的 LD<sub>50</sub> 是 2.28×10<sup>10</sup> CFU,  $\Delta crpSL1344$  的 LD<sub>50</sub> 是 1.14×10<sup>10</sup> CFU, 野生菌株 SL1344 的 LD<sub>50</sub> 是 3.25×10<sup>5</sup> CFU, 重组菌株  $\Delta crp\Delta asdSL1344$

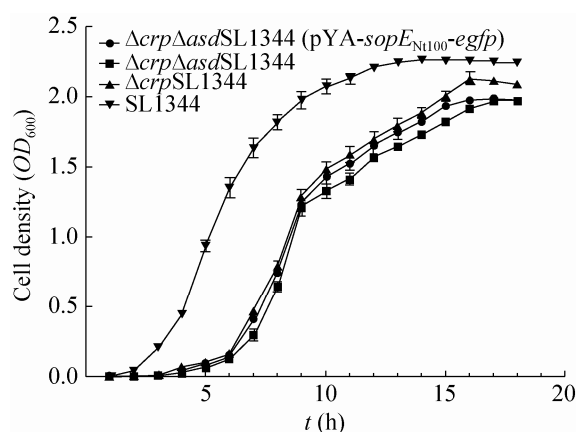


图 5  $\Delta crp\Delta asdSL1344$  (pYA-sopE<sub>Nt100</sub>-egfp)、 $\Delta crp\Delta asdSL1344$ 、 $\Delta crpSL1344$  和 SL1344 生长曲线  
Fig. 5 Growth curves of  $\Delta crp\Delta asdSL1344$  (pYA-sopE<sub>Nt100</sub>-egfp),  $\Delta crp\Delta asdSL1344$ ,  $\Delta crpSL1344$  and SL1344.

表 2 各实验组口服感染结果

Table 2 Oral infection results of each experimental group

| Strains   | Inoculating dose (CFU) | Death No./ Total chickens | LD <sub>50</sub> (CFU) |
|---|------------------------|---------------------------|------------------------|
| $\Delta crp\Delta asdSL1344$ (pYA-sopE <sub>Nt100</sub> ) | 4.8×10 <sup>10</sup>   | 6/10                      | 2.28×10 <sup>10</sup>  |
|   | 4.8×10 <sup>9</sup>    | 3/10                      |                        |
|   | 4.8×10 <sup>8</sup>    | 0/10                      |                        |
|   | 4.8×10 <sup>7</sup>    | 0/10                      |                        |
| $\Delta crpSL1344$  | 5.4×10 <sup>10</sup>   | 8/10                      | 1.14×10 <sup>10</sup>  |
|   | 5.4×10 <sup>9</sup>    | 3/10                      |                        |
|   | 5.4×10 <sup>8</sup>    | 0/10                      |                        |
|   | 5.4×10 <sup>7</sup>    | 0/10                      |                        |
| SL1344  | 5.1×10 <sup>8</sup>    | 10/10                     | 3.25×10 <sup>5</sup>   |
|   | 5.1×10 <sup>7</sup>    | 10/10                     |                        |
|   | 5.1×10 <sup>6</sup>    | 9/10                      |                        |
|   | 5.1×10 <sup>5</sup>    | 6/10                      |                        |
| PBS   | 500 μL                 | 0/10                      | /                      |

(pYA-sopE<sub>Nt100</sub>-egfp) 的 LD<sub>50</sub> 较野生株 SL1344 降低了 7.0×10<sup>4</sup> 倍, 与  $\Delta crpSL1344$  保持相当。试验结果表明重组菌  $\Delta crp\Delta asdSL1344$  (pYA-sopE<sub>Nt100</sub>-egfp) 毒力明显减弱, 作为疫苗载体安全性较好。

### 2.4 重组菌株的表达产物鉴定

重组减毒鼠伤寒沙门菌  $\Delta crp\Delta asdSL1344$  (pYA-sopE<sub>Nt100</sub>-egfp) 经过培养后, Western blotting 分析显示, 在约 37 kDa 处有 SopE<sub>Nt100</sub>-egfp 融合蛋白条带, 并且存在于过滤的上清和沉淀中 (图 6), 表明 SopE<sub>Nt100</sub>-egfp 融合蛋白能够在减毒鼠伤寒沙门菌  $\Delta crp\Delta asdSL1344$  中获得分泌表达。



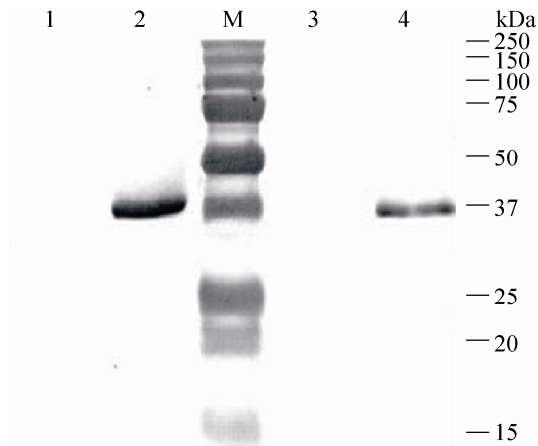


图6 重组菌株  $\Delta crp\Delta asdSL1344$  (pYA- $sopE_{Nt100}$ -egfp) 表达产物的 Western blotting 鉴定

Fig. 6 Western blotting identification of the expressed protein from recombinant attenuated strain  $\Delta crp\Delta asdSL1344$  (pYA- $sopE_{Nt100}$ -egfp). M: protein marker; 1: supernatant of  $\Delta crp\Delta asdSL1344$  (pYA- $sopE_{Nt100}$ ); 2: supernatant of  $\Delta crp\Delta asdSL1344$  (pYA- $sopE_{Nt100}$ -egfp); 3: precipitation of  $\Delta crp\Delta asdSL1344$  (pYA- $sopE_{Nt100}$ ); 4: precipitation of  $\Delta crp\Delta asdSL1344$ (pYA- $sopE_{Nt100}$ -egfp).

## 2.5 重组减毒沙门菌感染 Vero 细胞及 Western blotting 分析

重组减毒沙门菌  $\Delta crp\Delta asdSL1344$  (pYA- $sopE_{Nt100}$ -egfp) 感染 Vero 细胞 24 h 后, 收集细胞经处理后进行 Western blotting 反应。结果显示, 在约 37 kDa 处有  $SopE_{Nt100}$ -egfp 融合蛋白条带, 约 27 kDa 处出现 EGFP 蛋白条带, 而空载体菌株  $\Delta crp\Delta asdSL1344$  (pYA- $sopE_{Nt100}$ ) 在对应位置并未出现条带, 表明该重组三型分泌表达系统能够有效地将  $SopE_{Nt100}$ -egfp 融合蛋白递呈 Vero 细胞, 并且  $SopE_{Nt100}$ -egfp 融合蛋白能够被 Vero 细胞加工处理, 其分泌相关蛋白  $SopE_{Nt100}$  能够被进一步切除 (图 7)。

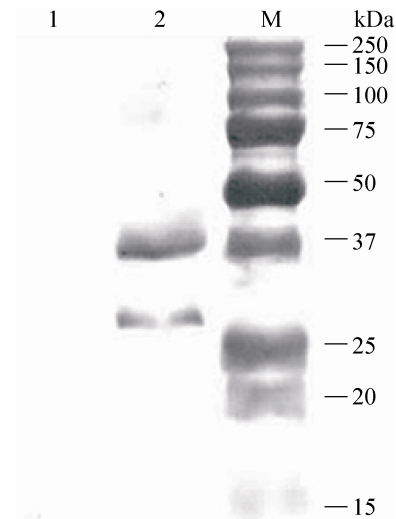


图7 重组菌株感染 Vero 细胞后 EGFP 蛋白的 Western blotting 鉴定

Fig. 7 Western blotting identification of the expressed EGFP protein from Vero cells infected by recombinant attenuated strain. M: protein marker; 1:  $\Delta crp\Delta asdSL1344$  (pYA- $sopE_{Nt100}$ ); 2:  $\Delta crp\Delta asdSL1344$  (pYA- $sopE_{Nt100}$ -egfp).

## 3 讨论

减毒鼠伤寒沙门菌可通过自然感染途径如口服或鼻内接种, 引起动物较强的黏膜、细胞和体液免疫应答, 具有培养条件简单、繁殖速度较快、免疫原性良好、制备及使用方便、经济等多种优点, 可以作为携带外源基因的良好载体, 具有广泛应用前景<sup>[12,17]</sup>。减毒沙门菌的生物安全性和稳定性直接决定着疫苗的安全性和适用性。我们前期的研究发现, 口服  $1.0 \times 10^9$  CFU 的减毒沙门菌  $\Delta crp\Delta asdSL1344$  (pYA3493) 对鸡只没有明显的毒性<sup>[14]</sup>。这表明减毒沙门菌  $\Delta crp\Delta asdSL1344$  具有作为疫苗活载体的潜能。

利用减毒沙门菌作为活载体表达外源抗原, 研制多价疫苗时, 常常出现减毒沙门菌在

体内恶劣环境压力下质粒丢失或表达不稳定的现象。目前,已报道多种方法来提高外源基因的稳定表达,其中,效果最稳定且应用最多的是 *asd<sup>+</sup>* 质粒平衡表达系统。*asd<sup>+</sup>* 质粒平衡表达系统由缺失其生存所必需的 *asd* 基因的亲本菌株和含有 *asd* 基因的互补质粒组成。*asd* 基因表达产物天冬氨酸  $\beta$ -半乳糖脱氢酶,是 DAP 合成的必需酶,而 DAP 又是革兰氏阴性菌细胞壁的主要成分。因此,*asd* 基因的缺失将导致突变菌株无法在 DAP<sup>-</sup> 条件下生存。沙门菌质粒平衡致死载体系统的建立有效解决了外源质粒的不稳定携带和表达以及耐药基因潜在生物安全性问题<sup>[11-12]</sup>。为保证该系统的稳定性,重组质粒 pYA-*sopE*<sub>Nt100</sub> 上的 SD-*asd* 基因为 *asd* 基因的部分片段,其缺少相应的启动子元件 (-10 区和 -35 区),仅保留了 SD 序列。同时,重组质粒 pYA-*sopE*<sub>Nt100</sub> 采用 pBR ori 低水平复制起始位点,这样一方面大大降低了 Asd 蛋白的表达水平,减少了 Asd 蛋白对宿主菌的毒性作用。另一方面能够适量增加质粒的拷贝数,从而提高外源蛋白的表达量<sup>[21]</sup>。质粒稳定性结果显示,重组菌株连续培养 50 代,LB 组菌株均可扩增出约 800 bp 的 *egfp* 目的条带,质粒保存率为 100%,而 LB+DAP 组菌株的质粒丢失率为 48%。这初步表明该分泌表达系统在 DAP<sup>-</sup> 环境下具有良好的稳定性。

减毒沙门菌通过利用细菌的分泌系统将外源抗原递呈给抗原递呈细胞。在疫苗载体设计的过程中,外源抗原的表达和递呈能力直接关系到疫苗的功效。鼠伤寒沙门菌进入宿主细胞后形成内化空泡而不能有效地将外源抗原呈递给 MHC 分子,从而直接影响着鼠伤寒沙门菌的抗原递呈能力<sup>[22]</sup>。T3SS 通过一个复杂的针头复

合物将外源蛋白注入宿主细胞内,从而发挥相应的生物学功能<sup>[23]</sup>。许多学者已经证实,利用鼠伤寒沙门菌三型分泌系统来递呈外源抗原能够有效的解决上述问题,具有更大的优越性和广泛的应用价值。将外源抗原与鼠伤寒沙门菌三型分泌蛋白 SopE 的分泌和转位信号进行融合,从而利用沙门菌三型分泌系统来实现外源蛋白的定向运输<sup>[17]</sup>。另外,在真核细胞内 SopE 蛋白能够迅速地被蛋白酶体降解,有利于外源抗原的递呈<sup>[18]</sup>。2011 年 Chen 等<sup>[24]</sup>通过构建 *sopE-Sj23LHD-GST* 表达载体来预防日本血吸虫,试验结果表明该载体能够有效地递呈 *sopE-Sj23LHD-GST*,对日本血吸虫具有良好的免疫保护力;2012 年 Juárez 等<sup>[25]</sup>构建 *sopE-ESAT-6* 等表达载体来预防结核分枝杆菌,结果表明该载体可以诱使机体产生较高的特异性抗体,可以有效地预防结核病。鉴于此,本研究将标记基因 *egfp* 插入 *sopE* 信号序列下游,初步探究构建的三型分泌表达载体 pYA-*sopE*<sub>Nt100</sub> 抗原递呈能力。结果显示,重组减毒沙门菌  $\Delta crp\Delta asd$ SL1344 (pYA-*sopE*<sub>Nt100-egfp</sub>) 成功表达了融合蛋白 SopE<sub>Nt100-egfp</sub>。此外,重组菌株  $\Delta crp\Delta asd$ SL1344 (pYA-*sopE*<sub>Nt100-egfp</sub>) 感染 Vero 细胞后,Western blotting 结果发现,在约 37 kDa 处有 SopE<sub>Nt100-egfp</sub> 融合蛋白条带,而在约 27 kDa 处出现 EGFP 蛋白条带。上述结果表明,本研究构建的减毒鼠伤寒沙门菌三型分泌系统  $\Delta crp\Delta asd$ SL1344 (pYA-*sopE*<sub>Nt100</sub>) 能够有效地递呈外源抗原,并且融合蛋白中的信号蛋白 SopE<sub>Nt100</sub> 能够被宿主细胞进一步切除。

本研究通过对重组减毒鼠伤寒沙门菌的生物学特性研究发现,该重组菌株与强毒株相比生长速度明显减慢,毒力明显降低,具有良好

的安全性,且遗传稳定。这说明 *sopE* 基因的表达对重组菌株的生物学特性没有明显的影响。同时,重组减毒鼠伤寒沙门菌  $\Delta crp\Delta asdSL1344$  (pYA-*sopE*<sub>Nt100</sub>-*egfp*) 表达的 SopE<sub>Nt100</sub>-egfp 融合蛋白可存在于过滤的上清中,说明重组菌株可分泌性表达该蛋白,避免了被胞内蛋白酶降解,利于表达蛋白的正确折叠及保持良好的生物学活性。以上结果表明将鼠伤寒沙门菌三型分泌系统引入沙门菌平衡致死系统可以作为安全、稳定、高效表达外源基因的口咽重组活疫苗载体,具有广阔的应用前景。

综上,本研究利用减毒鼠伤寒沙门菌三型分泌系统以及平衡致死系统成功构建了能稳定携带外源抗原的新型减毒鼠伤寒沙门菌三型分泌表达系统  $\Delta crp\Delta asdSL1344$  (pYA-*sopE*<sub>Nt100</sub>); 重组菌  $\Delta crp\Delta asdSL1344$  (pYA-*sopE*<sub>Nt100</sub>-*egfp*) 毒力降低,遗传稳定,能分泌性表达 SopE<sub>Nt100</sub>-egfp 融合蛋白,且能有效地向 Vero 细胞递呈 EGFP 蛋白,为开发减毒鼠伤寒沙门菌新型口服活疫苗载体奠定基础。

## REFERENCES

- [1] Jawale CV, Lee JH. Characterization of a *Salmonella typhimurium* ghost carrying an adjuvant protein as a vaccine candidate for the protection of chickens against virulent challenge. *Avian Pathol*, 2014, 43(6): 506–513.
- [2] Bagheryan Z, Raof JB, Golabi M, et al. Diazonium-based impedimetric aptasensor for the rapid label-free detection of *Salmonella typhimurium* in food sample. *Biosens Bioelectron*, 2016, 80: 566–573.
- [3] Tang LH, Pan ZM, Cheng NN, et al. Construction and immunogenicity of attenuated *Salmonella typhimurium* harbouring stable DNA vaccine against H5 subtype of avian influenza virus. *Acta Microbiol Sin*, 2007, 47(4): 662–666 (in Chinese).
- [4] Cao J, Chen ZH, Ren YL, et al. Oral immunization with attenuated *Salmonella* carrying a co-expression plasmid encoding the core and E2 proteins of hepatitis C virus capable of inducing cellular immune responses and neutralizing antibodies in mice. *Vaccine*, 2011, 29(20): 3714–3723.
- [5] Nandre RM, Lee JH. Construction of a recombinant-attenuated *Salmonella enteritidis* strain secreting *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin B subunit protein and its immunogenicity and protection efficacy against salmonellosis in chickens. *Vaccine*, 2014, 32(3): 425–431.
- [6] Chen DS, Guo WZ, Xu ZW, et al. Construction of a dual-promoter expression plasmid delivered by *Salmonella choleraesuis* C500. *Chin J Biotech*, 2009, 25(3): 341–347 (in Chinese).  
陈弟诗, 郭万柱, 徐志文, 等. 猪霍乱沙门氏菌递送的双启动子表达载体的构建. *生物工程学报*, 2009, 25(3): 341–347.
- [7] Lin IYC, Van TTH, Smooker PM. Live-attenuated bacterial vectors: tools for vaccine and therapeutic agent delivery. *Vaccines*, 2015, 3(4): 940–972.
- [8] Zhang D, Huang XB, Zhang XH, et al. Construction of an oral vaccine for transmissible gastroenteritis virus based on the TGEV N gene expressed in an attenuated *Salmonella typhimurium* vector. *J Virol Methods*, 2016, 227: 6–13.
- [9] Zhang Q, Ma QL, Li Q, et al. Enhanced protection against nasopharyngeal carriage of *Streptococcus pneumoniae* elicited by oral multiantigen DNA vaccines delivered in attenuated *Salmonella typhimurium*. *Mol Biol Rep*, 2011, 38(2): 1209–1217.
- [10] Kim SW, Kang HY, Hur J, et al. Construction of a conditional lethal *Salmonella* mutant via genetic recombination using the *ara* system and *asd* gene. *J Microbiol Methods*, 2011, 87(2): 202–207.
- [11] Li J, Chen SB, Yu ZH, et al. Construction of host-vector balanced lethal system of *Salmonella typhimurium* SL1344 $\Delta$ *cya* mutant and immune

- protection test of chickling. *Acta Microbiol Sin*, 2015, 55(7): 942–948 (in Chinese).
- 李静, 陈松彪, 余祖华, 等. 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. *微生物学报*, 2015, 55(7): 942–948.
- [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 (in Chinese).
- 徐引弟, 郭爱珍, 刘维红, 等. 猪霍乱沙门氏菌 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.
- [13] Liao CS, Cheng XC, Zhao ZQ, et al. Construction and characterization of the cAMP receptor protein gene deletion mutant of *Salmonella typhimurium* SL1344 strain. *Chin J Vet Sci*, 2011, 31(12): 1711–1716 (in Chinese).
- 廖成水, 程相朝, 赵战勤, 等. 鼠伤寒沙门菌 SL1344 株 cAMP 受体蛋白基因缺失株的构建及其生物学特性. *中国兽医学报*, 2011, 31(12): 1711–1716.
- [14] Tian FH, Cheng XC, Zhang CJ, et al. Construction and characterization of a *Salmonella typhimurium* SL1344 $\Delta crp\Delta asd$  mutant strain. *Chin J Vet Sci*, 2013, 33(11): 1700–1706 (in Chinese).
- 田芳华, 程相朝, 张春杰, 等. 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.
- [15] Galán JE, Collmer A. Type III secretion machines: bacterial devices for protein delivery into host cells. *Science*, 1999, 284(5418): 1322–1328.
- [16] Friebel A, Iichmann H, Aepfelbacher M, et al. *SopE* and *SopE<sub>2</sub>* from *Salmonella typhimurium* activate different sets of Rho GTPases of the host cell. *J Biol Chem*, 2001, 276(36): 34035–34040.
- [17] Chen LM, Briones G, Donis RO, et al. Optimization of the delivery of heterologous proteins by the *Salmonella enterica* serovar *typhimurium* type III secretion system for vaccine development. *Infect Immun*, 2006, 74(10): 5826–5833.
- [18] Kubori T, Galán JE. Temporal regulation of *Salmonella* virulence effector function by proteasome-dependent protein degradation. *Cell*, 2003, 115(3): 333–342.
- [19] Ministry of Health of the People's Republic of China. GB/T 14926.1-2001 Laboratory animal-method for examination of *Salmonella* sp. Beijing: China Standards Press, 2002 (in Chinese).
- 中华人民共和国卫生部. GB/T 14926.1-2001 实验动物沙门菌检测方法. 北京: 中国标准出版社, 2002.
- [20] Nakayama K, Kelly SM, Curtiss R III. Construction of an *Asd<sup>+</sup>* expression-cloning vector: stable maintenance and high level expression of cloned genes in a *Salmonella* vaccine strain. *Nat Biotechnol*, 1988, 6(6): 693–697.
- [21] Wang SF, Kong QK, Curtiss R III. New technologies in developing recombinant attenuated *Salmonella* vaccine vectors. *Microb Pathog*, 2013, 58(5): 17–28.
- [22] Panthel K, Meinel KM, Sevil Domènech VE, et al. *Salmonella* type III-mediated heterologous antigen delivery: a versatile oral vaccination strategy to induce cellular immunity against infectious agents and tumors. *Int J Med Microbiol*, 2008, 298(1/2): 99–103.
- [23] Cangelosi C, Hannagan S, Santiago CP, et al. Transfer of the cloned *Salmonella* SPI-1 type III secretion system and characterization of its expression mechanisms in gram negative bacteria in comparison with cloned SPI-2. *Microbiol Res*, 2015, 180: 57–64.
- [24] Chen G, Dai Y, Chen JX, et al. Oral delivery of the Sj23LHD-GST antigen by *Salmonella typhimurium* type III secretion system protects against *Schistosoma japonicum* infection in mice. *PLoS Negl Trop Dis*, 2011, 5(9): e1313.
- [25] Juárez-Rodríguez MD, Yang J, Kader R, et al. Live attenuated *Salmonella* vaccines displaying regulated delayed lysis and delayed antigen synthesis to confer protection against *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun*, 2012, 80(2): 815–831.

(本文责编 陈宏宇)