

制备禽致病性大肠杆菌菌蜕的三种方法比较

胡剑刚^{1,2}, 董洪亮², 付立霞³, 左佳坤², 吴小卡², 米荣升², 黄燕²,
陆珂², 陈兆国², 韩先干², 胡世君¹

1 西南大学动物科学学院, 重庆 402460

2 中国农业科学院上海兽医研究所, 上海 200241

3 扬州大学 动物科学与技术学院 江苏省人畜共患病学重点实验室, 江苏 扬州 225009

胡剑刚, 董洪亮, 付立霞, 等. 制备禽致病性大肠杆菌菌蜕的三种方法比较. 生物工程学报, 2017, 33(12): 2009–2016.

Hu JG, Dong HL, Fu LX, et al. Comparison of three methods for preparation of bacterial ghosts from avian pathogenic *Escherichia coli*. Chin J Biotech, 2017, 33(12): 2009–2016.

摘要: 菌蜕 (Bacterial ghosts) 是一种只含有细菌内、外膜结构的细菌空壳, 可作为新型疫苗和传递载体。本研究通过 3 种方式制备禽致病性大肠杆菌 (Avian pathogenicity *Escherichia coli*, APEC) 分离株 DE17 的菌蜕, 评价不同的菌蜕制备方法。结果表明, 利用噬菌体 PhiX174 的裂解基因 *E* 构建的溶菌质粒 pBV220-E 制备 DE17 菌蜕, 对 DE17 菌株裂解率可达 99.9%, 扫描电镜观测结果表明, 在 DE17 两端或中部形成可见的跨膜孔道, 呈现典型的菌蜕结构。利用合成的细胞穿透肽 MAP (KLALKLALKALKALKLA) 作用于 DE17 制备菌蜕, 结果表明, 10 $\mu\text{mol/L}$ 的 MAP 可实现对 $OD_{600}=0.1$ 的 DE17 完全灭活, 扫描电镜虽未看到明显的跨膜孔道, 但细菌的膜结构呈现沟壑状, 而构建的可表达 MAP 的溶菌质粒 pBV220-MAP 并不能实现对 DE17 的裂解作用。本研究通过比较分析不同 APEC 菌蜕的制备方式, 为进一步研究菌蜕疫苗和提高菌蜕疫苗的生物安全性提供参考。

关键词: 裂解基因 *E*, 菌蜕, 细胞穿透肽, 禽致病性大肠杆菌

Received: March 7, 2017; **Accepted:** June 9, 2017

Supported by: Shanghai Key Project on Agricultural Development through Science and Technology (No. 2015HNG1-9), National Natural Science Foundation of China (No. 31370045), The Open Project Program of Jiangsu Key Laboratory of Zoonosis (No. R1510).

Corresponding authors: Shijun Hu. Tel: +86-23-46751732; E-mail: chhjj006@163.com

Xian'gan Han. Tel: +86-21-54225517; E-mail: hanxgan@163.com

上海市科技兴农重点攻关项目 (No. 2015HNG1-9), 国家自然科学基金 (No. 31370045), 江苏省人兽共患病学重点实验室项目 (No. R1510) 资助。

网络出版时间: 2017-06-19

网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1998.Q.20170619.1547.004.html>

Comparison of three methods for preparation of bacterial ghosts from avian pathogenic *Escherichia coli*

Jian'gang Hu^{1,2}, Hongliang Dong², Lixia Fu³, Jiakun Zuo², Xiaoka Wu²,
Rongsheng Mi², Yan Huang², Ke Lu², Zhaoguo Chen², Xian'gan Han², and Shijun Hu¹

1 College of Animal Science, Southwest University, Chongqing 402460, China

2 Shanghai Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Shanghai 200241, China

3 Jiangsu Key Laboratory of Zoonosis, College of Animal Science and Technology, Yangzhou University, Yangzhou 225009, Jiangsu, China

Abstract: Bacterial ghosts are bacterial cell envelopes devoid of cytoplasmic contents while maintaining their cellular morphology, which can be used as a new vaccine and delivery vector. In this study, a clinical isolate of avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) strain DE17 was used to prepare bacterial ghost through three different ways. The results showed that the cleavage efficiency of DE17 bacterial ghost was 99.9% with the lysis plasmid containing the PhiX174 lysis gene *E*. Scanning electron microscopy showed that transmembrane tunnels were formed in the middle or both ends of the cell envelope of DE17. Furthermore, the DE17 bacterial ghost was prepared with one of cell penetrating peptides (CPPs) named MAP (KLALKLALKALKALKLA), which will completely inactivate DE17 ($OD_{600}=0.1$) by 10 $\mu\text{mol/L}$ MAP. The cell envelope showed a gully-like structure and obvious transmembrane tunnels were not found through the SEM. However, the DE17 could not be lysed by importing the lysis plasmid (pBV220-MAP), which was used to express MAP. The present study will benefit for research on bacterial ghost preparation methods and provide a reference for biosafety of bacterial ghost vaccines.

Keywords: lysis gene *E*, bacterial ghost, cell-penetrating peptide, avian pathogenic *Escherichia coli*

细菌菌蛻是应用噬菌体 PhiX174 的裂解基因 *E* 在革兰氏阴性菌中表达后形成不含细胞质及细胞器的细菌空壳,通常是对裂解基因 *E* 的严格温度调控实现^[1-3]。裂解基因 *E* 编码一种含 91 个氨基酸的膜蛋白,该蛋白能够融合在革兰氏阴性菌的内外膜并使菌膜形成 1 个直径 40–200 nm 的特异性跨膜通道^[4-5]。在渗透压的作用下,使菌体内容物排出,但内外膜结构和成分基本不变,细菌菌蛻作为一种优良的新型疫苗及佐剂正受到越来越多的关注^[6-7]。

细胞穿透肽 (Cell penetrating peptides, CPPs) 是一些能穿透细胞膜的小分子肽,它们一般不超过 30 个氨基酸,总体多带正电荷,具有两性^[8]。CPPs 可以充当药物分子的运载工

具,并且有些本身就具有一定的生物学功能^[9-10]。发现最早的细胞穿透肽是人免疫缺陷病毒的反式转录激活 (Trans-activator of transcription, Tat) 蛋白,随后又在自然界发现和人工合成了各种细胞穿透肽,这些细胞穿透肽不受细胞类型的限制,共价或非共价结合一些核酸、蛋白或颗粒性物质穿过细胞膜进入细胞^[11]。细胞穿透肽的研究多集中于对真核细胞的作用,对细菌等原核细胞研究较少。有研究表明,由于原核生物不存在膜修复机制,一些具有抗微生物作用的细胞穿透肽作用于细菌后,能产生类似菌蛻的结构;模型两亲肽 (Model amphipathic peptide, MAP) 是一个大小为 18 个氨基酸的细胞穿透肽^[12]。为了验证 MAP 是否能裂解离致病性大肠杆菌

(Avian pathogenic *Escherichia coli*, APEC) 形成菌蜕, 本研究通过利用噬菌体 PhiX174 的裂解基因 *E* 构建的溶菌质粒 pBV220-E、合成细胞穿透肽 MAP 以及构建表达 MAP 的 pBV220-MAP, 分别作用于 APEC 分离株 DE17 制备菌蜕, 分析比较它们的差异, 为进一步研究菌蜕疫苗、提高菌蜕疫苗的安全性研究提供参考。

1 材料与方 法

1.1 菌株、载体及试剂

APEC DE17 株分离于大肠杆菌感染鸭, 由本实验室保存^[13]; 大肠杆菌 DH5 α 感受态、质粒抽提试剂盒购买自天根 (Tiangen) 公司; pBV220 温度敏感型载体由本实验室保存^[14], PhiX174 DNA、DNA marker、Ligation mix 试剂盒、PCR mix、限制性内切酶 *EcoR* I 和 *Pst* I 均购自 TaKaRa 公司; DNA 纯化回收试剂盒购自 Thermo Fisher 公司。所用引物 (表 1) 均由上海华津生物科技有限公司合成。

1.2 溶菌质粒 pBV220-E 的构建

根据 GenBank 上的噬菌体 PhiX174 的裂解基因 *E* 序列 (Accession No. 9626372), 设计 1 对引物 E-F、E-R 扩增 *E* 基因的 ORF, 跨幅为 276 bp。在引物 5'端分别引入限制性酶切位点

EcoR I 和 *Pst* I, 用于构建表达质粒。

PCR 扩增条件为: 94 $^{\circ}$ C 4 min; 94 $^{\circ}$ C 40 s, 52 $^{\circ}$ C 40 s, 72 $^{\circ}$ C 30 s, 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。PCR 产物经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测扩增结果, PCR 扩增产物用 DNA 纯化试剂盒回收。

对 pBV220 和 *E* 基因进行 *EcoR* I 和 *Pst* I 双酶切, 用 Ligation mix 连接酶连接, 转化 DH5 α , 鉴定阳性克隆, 将鉴定正确的质粒命名为 pBV220-E。

1.3 运用溶菌质粒 pBV220-E 制备 DE17 菌蜕

分别将质粒 pBV220 和溶菌质粒 pBV220-E 与 100 μ L DE17 电转化感受态混合, 加入到 1 mm 的电转杯中, 用 BIO-RAD 电转仪进行电转, 电转电压 2.2 kV, 电转后立即加 SOC, 28 $^{\circ}$ C 摇菌 1 h, 涂布于 LB (100 μ g/mL 氨苄青霉素) 平板 28 $^{\circ}$ C 培养。挑取单菌落进行鉴定, 筛选阳性克隆。

将含有质粒 pBV220 或溶菌质粒 pBV220-E 的阳性克隆 DE17 接种于 LB (100 μ g/mL 氨苄青霉素) 液体培养基, 28 $^{\circ}$ C、200 r/min 摇床培养至 OD_{600} 值为 1, 分别接种于 2 份 100 mL LB (100 μ g/mL 氨苄青霉素) 液体培养基中, 28 $^{\circ}$ C、200 r/min 摇床培养至 OD_{600} 值约为 0.4。迅速将温度升高至 42 $^{\circ}$ C 进行诱导, 每 30 min 取一次样, 利用分光光度计测其 OD_{600} 值, 绘制溶菌曲线。

表 1 本研究中所用引物序列

Table 1 Primers sequence used in this study

Primer name	Sequences (5'-3')	Restriction site
E-F	CCGGA <u>AATTC</u> ATGGTACGCTGGACTTTGTGGGATACCCT	<i>EcoR</i> I
E-R	AAA <u>ACTG</u> CAGTCACTCCTTCCGCACGT	<i>Pst</i> I
MAP-F	<u>AATTC</u> ATGAAGCTGGCCCTGAACTGGCACTGAAAGC	<i>EcoR</i> I
MAP-R	ACTGAAAGCGGCACTGAACTGGCCTG <u>ACTGCA</u>	<i>Pst</i> I
MAP-R	GTCAGGCCAGTTTCAGTGCCGCTTTCAGTGCTTTCAGT	
	GCCAGTTTCAGGGCCAGCTTCATG	

The restriction enzyme sites are underlined.

分别取上述 42 °C 诱导 0 h 和 4 h 后的菌液 100 μ L, 用无菌 PBS 溶液进行梯度稀释后, 取 20 μ L 接种到 LB 固体培养基上。37 °C 恒温培养过夜后进行活菌计数, 统计各梯度活菌数 (CFU), 每个稀释度 3 个重复; 通过适当梯度 CFU 计算溶菌效率。计算细菌溶菌效率, 计算公式为: 溶菌率=(1-诱导后 CFU/诱导前 CFU) \times 100%。

1.4 细胞穿透肽 MAP 制备 DE17 菌蛻

参照文献[15], 经上海吉尔多肽有限公司合成细胞穿透肽 MAP, 其氨基酸序列 (从 N 端 \rightarrow C 端) 为 KLALKLALKALKALKLA, 分子式为 C₉₀H₁₇₀N₂₄O₁₈, 分子量大小 1 876.51, 纯度 \geq 90.60%。

用过滤除菌的 10 mmol/L 的 Na₂HPO₄ 溶解合成的细胞穿透肽 MAP, 配制成 10 μ mol/L 的 MAP 溶液备用。接种 DE17 于液体 LB 培养基, 37 °C 培养至对数生长期, 收集菌体, 用无菌 PBS 清洗 3 遍后, 分别用 10 μ mol/L 的 MAP 溶液稀释 DE17 菌体至 OD₆₀₀ 值为 0.1 和 0.2, 用 10 mmol/L 的 Na₂HPO₄ 溶液稀释 DE17 菌体至 OD₆₀₀ 值为 0.1 和 0.2, 作为对照组。将上述菌液接种于 96 孔板 (每孔 200 μ L, 3 个重复), 21 °C 作用 1 h。

将 96 孔板中作用 1 h 后的菌液取出 100 μ L, 作梯度稀释后, 接种到 LB 固体平板上, 37 °C 恒温培养 12 h。统计各组活菌数 (CFU), 计算 MAP 的溶菌效率。

1.5 pBV220-MAP 质粒的构建及 DE17 菌蛻的制备

根据细胞穿透肽 MAP 的氨基酸序列, 经优化后, 获得编码 MAP 的核苷酸序列, 设计引物 MAP-F 和 MAP-R, 在引物 MAP-F 的 5' 和 3' 端分别引入限制性酶切位点 *EcoR* I 和 *Pst* I, 扩增 MAP 的核苷酸序列, 引物序列见表 1。

用 STE 缓冲液 (10 mmol/L Tris-HCl, 50 mmol/L NaCl, 1 mmol/L EDTA) 分别溶解引物 MAP-F 与 MAP-R, 然后将溶解后的 MAP-F 与 MAP-R 等体积混合后于 94 °C 水浴 5 min, 冷却至室温。变性退火后的引物形成可与 *EcoR* I / *Pst* I 酶切产物互补的粘性末端, 用连接酶将其连入经 *EcoR* I / *Pst* I 酶切后的 pBV220 载体中, 得到重组质粒 pBV220-MAP。

构建的 pBV220-MAP 质粒送到上海华津生物科技有限公司测序。参照 1.3 中用质粒 pBV220-E 制备菌蛻的方法, 用质粒 pBV220-MAP 作用于 DE17 制备菌蛻。

1.6 扫描电镜观察

将正常培养的 DE17、溶菌质粒 pBV220-E 诱导后的 DE17 及细胞穿透肽 MAP 作用后的 DE17 菌体分别收集起来, 2.5% 戊二醛 4 °C 固定过夜, 用 PBS (pH 7.2) 洗涤 3 次后, 然后用四氧化锇 4 °C 固定 1.5 h。乙醇逐级脱水, 乙酸戊二酯置换, 干燥后喷金, 在扫描电镜下观察 (美国 FEI 公司, Tecnai G2 F30 S-TWIN)。

2 结果

2.1 溶菌质粒 pBV220-E 及 pBV220-MAP 的构建

用 *E* 基因特异性引物, 以 PhiX174 DNA 为模板, 扩增出一条约 276 bp 的条带, 与预期结果相符。电泳检测结果表明, 溶菌质粒 pBV220-E 经 *EcoR* I 和 *Pst* I 双酶切获得了与预期大小相同的片段。同时溶菌质粒 pBV220-E 测序结果表明, *E* 基因已被克隆至温控载体 pBV220 中, 且阅读框架正确, 证明已成功构建溶菌质粒 pBV220-E (图 1)。

测序结果表明,成功构建溶菌质粒 pBV220-MAP (图 2)。

2.2 溶菌质粒制备 DE17 菌蛻及其裂解效率

将含有溶菌质粒 pBV220-E 的 DE17 菌株, 28 °C 培养至 OD_{600} 为 0.4, 温度迅速升至 42 °C 开始诱导, 前 30 min, OD_{600} 值上升至 0.9, 然后开始下降, 60 min 后其 OD_{600} 值基本无变化。而含有质粒 pBV220 或 pBV220-MAP 的 DE17 菌株其 OD_{600} 值持续上升, 未见明显下降 (图 3)。

溶菌质粒 pBV220-E 对 DE17 的裂解效率检测表明, 溶菌前菌液的 CFU 为 2.63×10^7 , 而溶菌后的 CFU 为 2.5×10^4 , 溶菌效率达到 99.9%; 而 pBV220-MAP 对 DE17 诱导前和诱导后的菌液进行计数, 计算溶菌效果, 结果发现无溶菌效果。

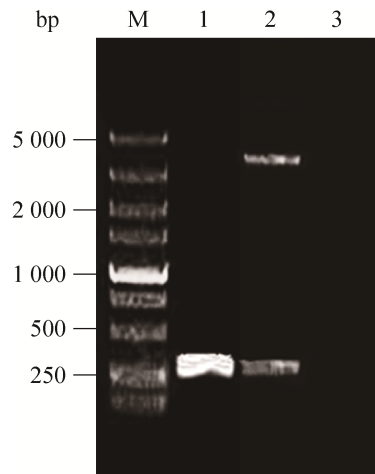


图 1 PCR 扩增 *E* 基因和溶菌表达载体酶切鉴定结果
Fig. 1 PCR amplification of *E* gene and endonuclease digestion identification of the lysis vector pBV220-E. M: DNA marker (DL5000); 1: PCR product of the *E* gene; 2: double endonuclease digestion of pBV220-E; 3: negative control.

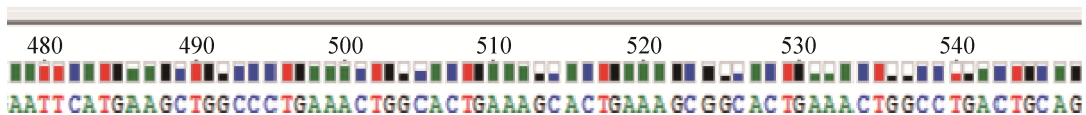


图 2 pBV220-MAP 测序结果

Fig. 2 The sequence result of pBV220-MAP.

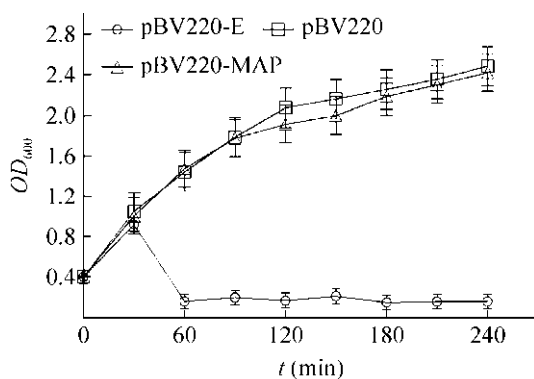


图 3 分别含有 pBV220、pBV220-E 或 pBV220-MAP 的 DE17 溶菌与生长曲线

Fig. 3 Growth and lysis curves of DE17 harboring the plasmid pBV220, pBV220-E or pBV220-MAP, respectively.

2.3 细胞穿透肽 MAP 作用 DE17 产生菌蛻

DE17 菌体用 10 $\mu\text{mol/L}$ 的细胞穿透肽 MAP 溶液稀释成 OD_{600} 为 0.1 和 0.2, 作用 1 h 后, CFU 统计如表 2 所示。

细胞穿透肽 MAP 对 DE17 的裂解作用表明, 10 $\mu\text{mol/L}$ 的细胞穿透肽 MAP 溶液作用 $OD_{600}=0.1$ 的 DE17 菌液后, 其溶菌效率达到 100%, 对 $OD_{600}=0.2$ 的 DE17 菌液也具有一定灭活作用。而对照组 10 mmol/L 的 Na_2HPO_4 溶液对 OD_{600} 为 0.1 和 0.2 的 DE17 作用 1 h 后不发生溶菌作用。

表 2 细胞穿透肽 MAP 灭活效果

Table 2 The inactivation efficiency of MAP

Group	OD_{600} value of DE17	Dilution	CFU	Cleavage efficiency (%)
Na_2HPO_4	0.1	10^{-3}	>300	—
	0.1	10^{-4}	68	—
	0.2	10^{-3}	>300	—
	0.2	10^{-4}	123	—
MAP	0.1	10^0	0	100
	0.1	10^{-1}	0	100
	0.2	10^0	>300	—
	0.2	10^{-1}	41	—

Notes: “—” indicates no statistics.

2.4 扫描电镜观察

扫描电镜观测结果如图 4 所示, 正常培养的 DE17 对照呈现完整的细胞表面结构。运用溶菌质粒 pBV220-E 制备的 DE17 菌蛻, 两端或中部形成可见的跨膜孔道 (箭头所示), 裂解细菌保存了基本完好的外膜结构, 呈现典型的菌蛻结构。细胞穿透肽 MAP 作用后的 DE17 并未看到明显的穿孔, 但表面膜形态结构形成一定的沟壑状 (图 4)。

3 讨论

细菌菌蛻作为一种优良的新型疫苗及佐剂

正受到越来越多的关注, 菌蛻作为疫苗与传统的疫苗相比, 不存在毒力返强等问题, 保留了良好的免疫原性, 可刺激机体产生更强的免疫反应, 因此较常规疫苗具有更好的免疫保护效果, 同时还具有天然免疫佐剂效应和靶向性载体的作用^[16-19]。制备细菌菌蛻通常通过噬菌体 PhiX174 裂解基因 *E* 的可控性表达实现, 但一些细菌尤其是大肠杆菌不能实现完全灭活, 为了更好地提高溶菌效率, 往往共表达金黄色葡萄球菌核酸酶基因 (*SNA* 基因), 但仍难以达到 100% 的裂解效率^[20-23]。细胞穿透肽是近十几年来陆续发现的一些具有穿透细胞膜的小分子肽, 根据结构特点可以将 CPPs 分为阳离子型、两亲性型和疏水型。由于它们不受细胞类型的限制, 且能够结合携带一些难以进入细胞的物质穿过细胞膜发挥其作用, 所以其作为一种新型的载体也受到越来越多的重视。关于细胞穿透肽的研究主要集中于对真核细胞的作用, 对细菌等原核生物的研究较少, 有国外学者发现一些细胞穿透肽具有抗微生物的作用, 并能够快速作用大肠杆菌产生菌蛻结构。然而, 现在

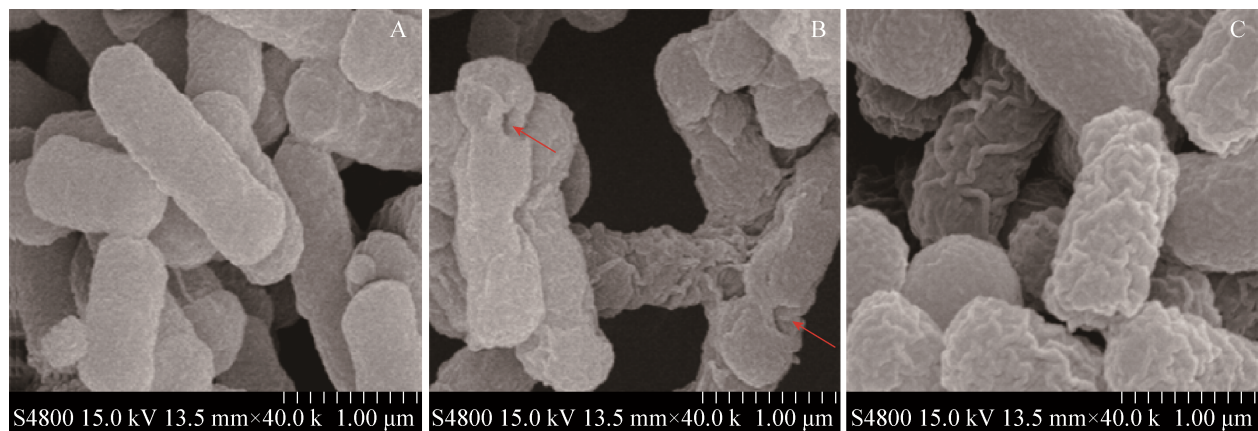


图 4 DE17 及其菌蛻扫描电镜图 (放大倍数为 40 000 倍)

Fig. 4 Scanning electron micrograph of DE17 and DE17 bacterial ghosts (40 000×). (A) DE17. (B) DE17 bacterial ghosts induced by the lysis plasmid pBV220-E. (C) DE17 bacterial ghosts induced by the cell penetrating peptide MAP.

关于 CPPs 的穿膜机制仍然不是很清楚,自从有细胞穿透肽报道以来,转导机制就一直是研究热点,但是确切的机制目前仍不明确,国外学者提出了一些假说,多数学者赞同内吞介导的穿膜机制^[24-25],但仍然存在诸多争议。本研究通过构建温控敏感型溶菌质粒 pBV220-E、合成细胞穿透肽 MAP 和构建表达 MAP 的 pBV220-MAP 质粒,开展了对 APEC 分离株 DE17 菌蜕制备研究。通过实验结果可以看出,溶菌质粒构建费时,需要多个步骤导入 DE17,作用于 DE17 产生菌蜕需要较长时间,且无法达到 100% 的溶菌效率;与之相比,细胞穿透肽 MAP 作用于 DE17 产生菌蜕过程方法简便,只需要一定浓度的 MAP 与 DE17 共培养,且能快速产生菌蜕,对低浓度的菌量 ($OD_{600}=0.1$) 可以达到 100% 的溶菌效率,但是由于多肽合成成本较高,因此受到一定的限制。而构建的 pBV220-MAP 溶菌质粒无法在胞内发挥类似于裂解基因 *E* 的溶菌作用,推测可能的原因如下: 1) 有可能是在胞内不能正常表达或是表达的量不足,而不能起到溶菌作用; 2) 也有可能是 MAP 只能在胞外发挥作用,而在胞内表达的 MAP 不具有穿膜能力,不能有效分泌到胞外发挥作用,具体机制仍有待进一步研究。此外,研究表明,显示细胞穿透肽进入细胞可能有多个通路,具体哪一种通路占主导方式可能与细胞穿透肽本身、穿透肽浓度、其携带的载物及靶组织有关^[24, 26-27]。

对不同方法制备的 APEC 的菌蜕形态研究表明,温控溶菌质粒产生的菌蜕能形成典型的跨膜孔道,该膜蛋白能融合在革兰氏阴性菌的内外膜从而形成 1 个直径在 40–200 nm 的特异性跨膜通道^[4]。而细胞穿透肽 MAP 作用产生的菌蜕形成一定的沟壑状,研究表明,细胞穿透肽的穿膜

机制主要有直接转运、细胞内吞和通过形成某种跨膜结构发生转导的方式进行^[28],可能正是由于 *E* 基因与细胞穿透肽对细菌的作用机制不同,从而导致两者产生菌蜕的形态有明显差异,裂解效率也存在一定差距,但是两种方法产生的细菌菌蜕均保持了基本完整的外膜结构。

本研究通过研究不同的 APEC 菌蜕制备方式,分析比较其差异,为进一步研究菌蜕疫苗、提高菌蜕疫苗的安全性提供参考。

REFERENCES

- [1] Witte A, Bläsi U, Halfmann G, et al. Phi X174 protein E-mediated lysis of *Escherichia coli*. *Biochimie*, 1990, 72(2/3): 191–200.
- [2] Halfmann G, Götz F, Lubitz W. Expression of bacteriophage PhiX174 lysis gene *E* in *Staphylococcus carnosus* TM300. *FEMS Microbiol Lett*, 1993, 108(2): 139–143.
- [3] Lubitz W. Bacterial ghosts as carrier and targeting systems. *Expert Opin Biol Ther*, 2001, 1(5): 765–771.
- [4] Witte A, Brand E, Mayrhofer P, et al. Mutations in cell division proteins FtsZ and FtsA inhibit ϕ X174 protein-E-mediated lysis of *Escherichia coli*. *Arch Microbiol*, 1998, 170(4): 259–268.
- [5] Guo RX, Geng SZ, Jiao HM, et al. Evaluation of protective efficacy of a novel inactivated *Salmonella pullorum* ghost vaccine against virulent challenge in chickens. *Vet Immunol Immunopathol*, 2016, 173: 27–33.
- [6] Kudela P, Koller VJ, Lubitz W. Bacterial ghosts (BGs)—advanced antigen and drug delivery system. *Vaccine*, 2010, 28(36): 5760–5767.
- [7] Sadeyen JR, Wu ZG, Davies H, et al. Immune responses associated with homologous protection conferred by commercial vaccines for control of avian pathogenic *Escherichia coli* in turkeys. *Vet Res*, 2015, 46: 5.
- [8] Sebbage V. Cell-penetrating peptides and their therapeutic applications. *Biosci Horiz*, 2009, 2(1): 64–72.

- [9] Taylor BN, Mehta RR, Yamada T, et al. Noncationic peptides obtained from azurin preferentially enter cancer cells. *Cancer Res*, 2009, 69(2): 537–546.
- [10] Johansson HJ, El-Andaloussi S, Holm T, et al. Characterization of a novel cytotoxic cell-penetrating peptide derived from p14ARF protein. *Mol Ther*, 2007, 16(1): 115–123.
- [11] Frankel AD, Pabo CO. Cellular uptake of the tat protein from human immunodeficiency virus. *Cell*, 1988, 55(6): 1189–1193.
- [12] Palm C, Netzereab S, Hällbrink M. Quantitatively determined uptake of cell-penetrating peptides in non-mammalian cells with an evaluation of degradation and antimicrobial effects. *Peptides*, 2006, 27(7): 1710–1716.
- [13] Chen WJ, Han XG, He L, et al. Characterization of duck pathogenic *Escherichia coli*. *Chin J Animal Infect Dis*, 2010, 18(2): 34–40 (in Chinese).
陈文静, 韩先干, 何亮, 等. 鸭致病性大肠杆菌的分离鉴定及其生物学特性分析. *中国动物传染病学报*, 2010, 18(2): 34–40.
- [14] Zhang ZQ, Yao LH, Hou YD. Construction and application of a high-level expression vector containing P_RP_L promoter. *Chin J Virol*, 1990, 6(2): 111–116 (in Chinese).
张智清, 姚立红, 侯云德. 含 P_RP_L 启动子的原核高效表达载体的组建及其应用. *病毒学报*, 1990, 6(2): 111–116.
- [15] Palm-Apergi C, Hällbrink M. A new rapid cell-penetrating peptide based strategy to produce bacterial ghosts for plasmid delivery. *J Control Release*, 2008, 132(1): 49–54.
- [16] Riedmann EM, Kyd JM, Cripps AW, et al. Bacterial ghosts as adjuvant particles. *Expert Rev Vaccines*, 2007, 6(2): 241–253.
- [17] Hajam IA, Dar PA, Appavoo E, et al. Bacterial ghosts of *Escherichia coli* drive efficient maturation of bovine monocyte-derived dendritic cells. *PLoS ONE*, 2015, 10(12): e0144397.
- [18] Jawale CV, Lee JH. Evaluation of immunogenicity and protective efficacy of adjuvanted *Salmonella typhimurium* ghost vaccine against salmonellosis in chickens. *Vet Q*, 2016, 36(3): 130–136.
- [19] Liu J, Wang WD, Liu YJ, et al. Mice vaccinated with enteropathogenic *Escherichia coli* ghosts show significant protection against lethal challenges. *Lett Appl Microbiol*, 2012, 54(3): 255–262.
- [20] May T, Gleiter S, Lilie H. Assessment of cell type specific gene transfer of polyoma virus like particles presenting a tumor specific antibody Fv fragment. *J Virol Methods*, 2002, 105(1): 147–157.
- [21] Haidinger W, Mayr UB, Szostak MP, et al. *Escherichia coli* ghost production by expression of lysis gene *E* and Staphylococcal nuclease. *Appl Environ Microbiol*, 2003, 69(10): 6106–6113.
- [22] Haidinger W, Szostak MP, Beisker W, et al. Green fluorescent protein (GFP)-dependent separation of bacterial ghosts from intact cells by FACS. *Cytometry*, 2001, 44(2): 106–112.
- [23] Langemann T, Koller VJ, Muhammad A, et al. The Bacterial ghost platform system: production and applications. *Bioeng Bugs*, 2010, 1(5): 326–336.
- [24] Gump JM, June RK, Dowdy SF. Revised role of glycosaminoglycans in TAT protein transduction domain-mediated cellular transduction. *J Biol Chem*, 2010, 285(2): 1500–1507.
- [25] Järver P, Langel Ü. Cell-penetrating peptides—a brief introduction. *Biochim Biophys Acta*, 2006, 1758(3): 260–263.
- [26] Jiao CY, Delaroche D, Burlina F, et al. Translocation and endocytosis for cell-penetrating peptide internalization. *J Biol Chem*, 2009, 284(49): 33957–33965.
- [27] Maniti O, Piao HR, Ayala-Sanmartin J. Basic cell penetrating peptides induce plasma membrane positive curvature, lipid domain separation and protein redistribution. *Int J Biochem Cell Biol*, 2014, 50: 73–81.
- [28] Guo ZR, Peng HY, Kang JW, et al. Cell penetrating peptides: research progress of a novel non-viral vectors. *China Biotechnol*, 2016, 36(6): 100–106 (in Chinese).
郭争荣, 彭焕彦, 亢继文, 等. 细胞穿透肽: 一种新型非病毒载体. *中国生物工程杂志*, 2016, 36(6): 100–106.

(本文责编 陈宏宇)