



研究报告

肠炎沙门氏菌 *ssrAB*、*hilA*、*hilD* 基因缺失菌株的构建及其生物学特性唐正露^Δ 曹堃^Δ 张丽 韩敏敏 罗聪玉 李郁*

安徽农业大学动物科技学院 安徽 合肥 230036

摘要:【背景】沙门氏菌(*Salmonella*)是重要的人畜共患病原菌,由于耐药菌株的不断出现,新型防治方法的研究迫在眉睫。【目的】探究 *ssrAB*、*hilA*、*hilD* 基因对肠炎沙门氏菌致病作用的影响,筛选安全可靠的沙门氏菌减毒活疫苗或载体用菌株。【方法】采用自杀性质粒介导的同源重组技术,分别构建 *ssrAB*、*hilA*、*hilD* 单基因缺失株($\Delta ssrAB$ 、 $\Delta hilA$ 、 $\Delta hilD$)、双基因缺失株($\Delta ssrABhilA$ 、 $\Delta ssrABhilD$ 、 $\Delta hilAhilD$)和三基因缺失株($\Delta ssrABhilAhilD$),并比较上述缺失菌株与亲本菌株间生物学特性的差异。【结果】基因缺失后菌株的生长速率无显著变化($P>0.05$);除 $\Delta hilD$ 生物膜形成能力最强外,其他基因缺失菌株生物膜形成能力变化不显著($P>0.05$); $\Delta ssrABhilAhilD$ 和 $\Delta ssrABhilA$ 的 LD_{50} 值最高, $\Delta ssrAB$ 、 $\Delta hilA$ 、 $\Delta hilD$ 次之;亲本菌株引起的小鼠十二指肠的病变程度较所有缺失菌株明显严重;在所有缺失菌株中, $\Delta ssrABhilAhilD$ 对 HeLa 细胞的黏附力最低, $\Delta hilD$ 在小鼠体内的定殖率最高;而机体分泌 IL-1、IL-18、IFN- γ 的能力与沙门氏菌 *ssrAB*、*hilA*、*hilD* 基因无显著相关性($P>0.05$)。【结论】构建的 7 株基因缺失株中, $\Delta ssrAB$ 、 $\Delta hilA$ 、 $\Delta hilD$ 、 $\Delta ssrABhilA$ 和 $\Delta ssrABhilAhilD$ 有致病力低、生长速率良好、能有效刺激细胞因子产生等特性,具备作为沙门氏菌减毒活疫苗或载体的潜质。

关键词: 肠炎沙门氏菌, *ssrAB*, *hilA*, *hilD*, 缺失菌株, 构建, 生物学特性

Foundation items: Key Project of National Spark Program of China (2014GA710002); Natural Science Foundation of Anhui Province (1508085MC44); Key Research and Development Plan of Anhui Province (201904a06020013); Science and Technology Project of the Yangtze River Delta in Anhui Province (1101c0603065); Pig Industry System Fund of Anhui Province ([2016] 84)

^ΔThese authors equally contributed to this work

*Corresponding author: E-mail: liyouer@163.com

Received: 13-07-2020; **Accepted:** 29-09-2020; **Published online:** 24-12-2020

基金项目: 国家星火计划重点项目(2014GA710002); 安徽省自然科学基金(1508085MC44); 安徽省重点研究与开发计划面上攻关项目(201904a06020013); 安徽省长三角联合科技攻关项目(1101c0603065); 安徽省生猪产业体系基金(皖农科[2016] 84 号)

^Δ对本文贡献相同

*通信作者: E-mail: liyouer@163.com

收稿日期: 2020-07-13; 接受日期: 2020-09-29; 网络首发日期: 2020-12-24

Construction and characterization of *ssrAB*, *hila*, *hilD*-deficient mutants of *Salmonella enteritidis*

TANG Zhenglu^Δ CAO Kun^Δ ZHANG LI HAN Minmin LUO Congyu LI Yu^{*}

College of Animal Science and Technology, Anhui Agriculture University, Hefei, Anhui 230036, China

Abstract: [Background] *Salmonella* is an important zoonotic pathogen, due to the continuous emergence of drug-resistant strains, research on new prevention methods is imminent. [Objective] In order to investigate the effect of *ssrAB*, *hila*, *hilD* genes on the pathogenicity of *Salmonella enteritidis* and screen safe and reliable strains for *Salmonella* live attenuated vaccines or vectors. [Methods] Using suicide plasmid-mediated homologous recombination technology to construct the single ($\Delta ssrAB$, $\Delta hila$, $\Delta hilD$), double ($\Delta ssrABhila$, $\Delta ssrABhilD$, $\Delta hila hilD$) and triple ($\Delta ssrABhilAhilD$) gene deletion strains, then comparing the differences in biological characteristics between the above-mentioned deletion strains and the parent strain. [Results] The growth rate of the mutant strains was not significantly different from the parent strains ($P>0.05$). The biofilm formation ability of $\Delta hilD$ was the strongest, and the other gene deletion strains had no significant changes ($P>0.05$). The LD_{50} of $\Delta ssrABhilAhilD$ and $\Delta ssrABhila$ were the highest, $\Delta ssrAB$, $\Delta hila$ and $\Delta hilD$ were the second, and the degree of duodenal lesions in mice caused by the parent strain is significantly more serious than deleted strains. Among all the deleted strains, the adhesion of $\Delta ssrABhilAhilD$ to HeLa cells was the lowest, while the colonization rate of $\Delta hilD$ in mice was the highest. Besides, the body's ability to secrete IL-1, IL-18 and IFN- γ has no significant correlation with *ssrAB*, *hila* and *hilD* genes of *Salmonella* ($P>0.05$). [Conclusion] Among the 7 gene deletion strains constructed in this study, $\Delta ssrAB$, $\Delta hila$, $\Delta hilD$, $\Delta ssrABhila$ and $\Delta ssrABhilAhilD$ had the characteristics of low pathogenicity, well growth rate, and they could effectively stimulate cytokine production, which had the potential to be *Salmonella* live attenuated vaccines or vectors.

Keywords: *Salmonella enteritidis*, *ssrAB*, *hila*, *hilD*, deletions strains, construct, biological characteristic

沙门氏菌(*Salmonella*)是一种兼性细胞内寄生的人畜共患病原菌,可通过水、食物等进入人和动物肠道内,引起腹泻、伤寒、副伤寒、败血症等病症,对人和动物的健康造成巨大危害,具有广泛的医学、兽医学和公共卫生学研究价值。随着耐药沙门氏菌的不断出现,传统抗生素疗法在预防和治疗沙门氏菌病中效果不佳,而且残留的抗生素严重影响食品安全,因此疫苗免疫对预防和治疗沙门氏菌感染更加安全有效,其中沙门氏菌基因工程减毒活疫苗抗原性良好、风险性较低,已成为预防沙门氏菌病的重要手段。

沙门氏菌的致病作用与其毒力岛(*Salmonella* Pathogenicity Island, SPI)基因的表达密切相关, SPI 是位于沙门氏菌染色体或质粒上成簇分布的用于编码毒力相关基因的特定区域,其中, SPI1 和 SPI2 分别编码一套与沙门氏菌入侵细胞及在胞

内复制相关的 III 型分泌系统(T3SS)^[1]。研究表明, *ssrAB* 具有激活 SPI2-T3SS 的调控作用, *hila* 参与 SPI1 的表达, *hilD* 则通过对 *hila* 和 *ssrAB* 的调控实现其对 SPI1 和 SPI2 的调节^[2-5]。然而有关 SPI *ssrAB*、*hila* 和 *hilD* 调控基因在沙门氏菌感染过程中的作用机制研究尚不深入,关于沙门氏菌 *ssrAB*、*hila*、*hilD* 基因缺失菌株的生物学特性及其对小鼠致病力的研究也未见报道。

为了解 *ssrAB*、*hila*、*hilD* 基因对沙门氏菌致病力的作用,筛选更为安全有效的减毒株,本研究以肠炎沙门氏菌 G9 菌株为研究对象,通过自杀质粒介导的同源重组技术^[6],分别构建 *ssrAB*、*hila*、*hilD* 单基因缺失株($\Delta ssrAB$ 、 $\Delta hila$ 、 $\Delta hilD$)、双基因缺失株($\Delta ssrABhila$ 、 $\Delta ssrABhilD$ 、 $\Delta hila hilD$)和三基因缺失株($\Delta ssrABhilAhilD$),并对其生物学特性进行研究,包括各菌株的生长速率

和生物膜形成能力、对小鼠的 LD_{50} 及在小鼠体内的定殖能力, 以及对 HeLa 细胞的黏附性及机体感染后细胞因子 IL-1、IL-18、IFN- γ 的分泌水平等, 以期为沙门氏菌基因工程减毒活疫苗或载体的研制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 菌株、质粒和细胞

本研究亲本菌株 G9^{Str^R} 由肠炎沙门氏菌 G9 菌株诱导而成, 具有链霉素(Str)抗性的同时对氨苄青霉素(Amp)敏感, G9 菌株由安徽农业大学动物传染病实验室保存, pWM91 自杀质粒、大肠杆菌 SM10 λ pir 细胞、HeLa 细胞均由安徽农业大学动物传染病实验室保存。

1.2 主要试剂和仪器及实验动物

重组 *Taq* DNA 聚合酶、*Not* I 和 *Xho* I 限制性核酸内切酶、T4 连接酶、高保真 PrimeSTAR DNA 聚合酶, 宝生物工程(大连)有限公司; 琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒, 天根生物科技(北京)有限公司; 酵母提取物、胰蛋白胨, OXID 公司;

胎牛血清、胰酶细胞消化液、DMEM 培养基, 杭州四季青生物工程材料有限公司; 氨苄青霉素(Amp)、链霉素(Str), Biosharp 公司。PCR 仪, Biometra 公司; 恒温培养振荡器、电热恒温水槽, 上海智城分析仪器制造有限公司; CO₂ 培养箱, 赛默飞世尔科技公司。920 只体重为 18–20 g 清洁级 KM 系雌性小鼠, 安徽医科大学实验动物中心。

1.3 引物设计

根据 GenBank 上公布的 *ssrAB*、*hilA*、*hilD* 基因序列设计 7 对引物, 分别用于 *ssrAB*、*hilA*、*hilD* 基因的敲除与验证, 引物序列见表 1。引物由上海金斯瑞生物有限公司合成。

1.4 肠炎沙门氏菌 G9^{Str^R} 菌株 *ssrAB*、*hilA*、*hilD* 基因缺失菌株的构建及鉴定

1.4.1 *ssrAB*、*hilA*、*hilD* 上下游同源臂的扩增

SDS 法^[7]提取 G9^{Str^R} 基因组 DNA 作为模板, 利用引物 *pssrAB*-1/2、*pssrAB*-3/4、*philA*-1/2、*philA*-3/4、*philD*-1/2 和 *philD*-3/4 分别进行 PCR 扩增, 获得 *ssrAB*、*hilA*、*hilD* 上、下游同源臂片段并经 0.8% 凝胶电泳后回收。PCR 反应体系(50 μ L):

表 1 *ssrAB*、*hilA*、*hilD* 基因敲除引物的信息

Table 1 Primer information for *ssrAB*, *hilA*, *hilD* gene knockout

引物名称 Primers name	序列 Sequences (5'→3')	用途 Usage
<i>pssrAB</i> -1	ATAGCGGCCCGCTGAGCGAGCTAACAAAC	<i>ssrAB</i> 基因敲除、验证 <i>ssrAB</i> gene knockout and verification
<i>pssrAB</i> -2	TATCCAGGCCCAACTGCCAGGGTGGTAACA	
<i>pssrAB</i> -3	CTGGCAGTTGGGCCTGGATATCATTCTCA	
<i>pssrAB</i> -4	GCGCTCGAGAGCGCTTGTCGAATATCGTC	
<i>pssrAB</i> -5	GCGGAATTCCGCCGTTTGCTTGCGTATAG	
<i>pssrAB</i> -6	ATACTGCAGACGCCGCTGTTTGCAATGAG	
<i>philA</i> -1	ATAGCGGCCGCTAGCTTTCTGCCAGGCATAC	<i>hilA</i> 基因敲除、验证 <i>hilA</i> gene knockout and verification
<i>philA</i> -2	TCGTAAGGCTTCGAGCAGGATGACCAGAA	
<i>philA</i> -3	CCTGCTCGAAGCCTTACCGACGATAAGAGA	
<i>philA</i> -4	GCGCTCGAGCGGGATTACGGAACAATAG	
<i>philD</i> -1	ATAGCGGCCGCTCCGGGCGAATCAGGATAAG	<i>hilD</i> 基因敲除、验证 <i>hilD</i> gene knockout and verification
<i>philD</i> -2	AAGCTTCACTTGCTGCCGGGTATTTGTCA	
<i>philD</i> -3	CCGGCAGCAATGGAAGCTTACGGATGTTGC	
<i>philD</i> -4	GCGCTCGAGAAAGGCAGGAGGGTTATGAG	

注: 下划线表示限制性内切酶位点

Note: The underline indicates the restriction endonuclease site

10×PCR Buffer 5 μ L, $MgCl_2$ (25 mmol/L) 3 μ L, dNTP Mix 4 μ L, 重组 *Taq* DNA 聚合酶(5 U/ μ L) 0.2 μ L, PrimeSTAR 高保真酶 DNA 聚合酶(1 U/ μ L) 0.8 μ L, 上、下游引物(10 mmol/L)各 1 μ L, DNA 模板 1 μ L, ddH₂O 34 μ L。PCR 反应条件: 95 $^{\circ}C$ 5 min; 94 $^{\circ}C$ 30 s, 55 $^{\circ}C$ 30 s, 72 $^{\circ}C$ 1 min, 30 次循环; 72 $^{\circ}C$ 5 min。

以回收后的 *ssrAB*、*hilA*、*hilD* 上、下游同源臂片段为模板, *pssrAB*-1/4、*philA*-1/4 和 *philD*-1/4 为引物分别进行 Overlap PCR 反应。其中第 1 轮 PCR 反应体系(47 μ L): 10×PCR Buffer 5 μ L, $MgCl_2$ (25 mmol/L) 3 μ L, dNTP Mix 4 μ L, 重组 *Taq* DNA 聚合酶(5 U/ μ L) 0.3 μ L, 高保真 PrimeSTAR 酶(1 U/ μ L) 0.7 μ L, 模板 1 μ L, ddH₂O 33 μ L。PCR 反应条件: 95 $^{\circ}C$ 5 min; 94 $^{\circ}C$ 30 s, 60 $^{\circ}C$ 30 s, 72 $^{\circ}C$ 90 s, 循环 10 次; 72 $^{\circ}C$ 5 min。第 2 轮反应体系: 第 1 轮产物 48 μ L, 上、下游引物(10 mmol/L)各 1 μ L, 重组 *Taq* DNA 聚合酶(5 U/ μ L) 0.1 μ L, 高保真 PrimeSTAR DNA 聚合酶(1 U/ μ L) 0.2 μ L。PCR 反应条件: 95 $^{\circ}C$ 5 min; 94 $^{\circ}C$ 30 s, 55 $^{\circ}C$ 30 s, 72 $^{\circ}C$ 90 s, 循环 30 次; 72 $^{\circ}C$ 5 min。Overlap PCR 产物经 0.8% 琼脂糖凝胶电泳回收。

1.4.2 重组自杀质粒 pWM91-*ssrAB*、pWM91-*hilA*、pWM91-*hilD* 的构建

CaCl₂ 法^[8]制备大肠杆菌 SM10 λ pir 感受态细胞, 用 *Not* I 和 *Xho* I 这 2 种限制酶对 Overlap PCR 胶回收产物与自杀质粒 pWM91 同时双酶切, 乙醇沉淀法回收酶切产物, 用 T4 DNA 连接酶连接 2 个双酶切产物, 将酶连产物转化入大肠杆菌 SM10 λ pir 感受态细胞中。随机挑取 10 个转化子, 分别以 *pssrAB*-1/4、*philA*-1/4、*philD*-1/4 为引物采用 PCR 方法验证上述转化子。PCR 反应体系(20 μ L): 2×PCR Mix 10 μ L, 上、下游引物(10 mmol/L)各 0.5 μ L, 菌液模板 1 μ L, ddH₂O 8 μ L。PCR 反应条件: 95 $^{\circ}C$ 5 min; 95 $^{\circ}C$ 30 s, 95 $^{\circ}C$ 30 s, 72 $^{\circ}C$ 90 s, 循环 25 次; 72 $^{\circ}C$ 5 min。回收 1 500 bp 的 PCR 产物, 转化入大肠杆菌 SM10 λ pir 感受态细

胞, 提取转化子阳性克隆质粒, 用 *Not* I 和 *Xho* I 这 2 种限制性内切酶验证并送至上海金斯瑞生物有限公司测序。

1.4.3 重组自杀质粒与 G9^{StrR} 菌株的接合

将 1.4.2 重组自杀质粒转入大肠杆菌感受态细胞 SM10 λ pir 中, 将转化产物和 G9^{StrR} 菌株分别在抗生素浓度为 100 μ g/mL (下同)的 LB/Amp、LB/Str 琼脂培养基上四区划线纯化, 挑取单菌落分别转接种于 LB/Amp、LB/Str 肉汤, 37 $^{\circ}C$ 、180 r/min 培养过夜, 获得供体菌和受体菌, 滤膜接合法^[9]获得所需 3 种接合子。

1.4.4 *ssrAB*、*hilA*、*hilD* 单基因、双基因和三基因缺失菌株的构建

将 1.4.3 获得的 3 种接合子在 LB/Amp、LB/Str 琼脂培养基上纯化并转接至 LB 固体培养基, 置于 37 $^{\circ}C$ 恒温培养箱培养过夜, 挑取单菌落接种至含 25% 蔗糖的 LB 固体培养基, 22 $^{\circ}C$ 培养 40 h, 再挑取单菌落分别转接于 LB 固体培养基和 LB/Amp 固体培养基, 置于 37 $^{\circ}C$ 恒温培养箱过夜。选择在 LB 固体培养基上正常生长而在 LB/Amp 固体培养基上无法生长的菌落为模板, 以 *pssrAB*-5/6、*philA*-1/4、*philD*-1/4 分别作为上、下游引物, 对缺失菌株进行验证(方法同 1.4.2), 目的条带变短表示 *ssrAB*、*hilA*、*hilD* 基因缺失菌株(Δ *ssrAB*、 Δ *hilA*、 Δ *hilD*)构建成功。双基因、三基因缺失菌株则分别以单基因、双基因缺失菌株为受体菌, 以重组自杀性质粒 SM10 λ pir 大肠杆菌为供体菌进行同源重组, 构建双基因、三基因缺失菌株并进行 PCR 验证(方法同上)。

1.5 G9^{StrR} 菌株 *ssrAB*、*hilA*、*hilD* 基因缺失菌株的生物学特性分析

将亲本菌株 G9^{StrR} 和 7 株基因缺失菌株于 LB 琼脂培养基上四区划线进行纯化, 挑取各组单菌落分别接种于 5 mL LB 肉汤培养基, 37 $^{\circ}C$ 、180 r/min 培养过夜备用, 同步进行后续试验。

1.5.1 生长曲线的测定

将上述 1.5 的培养物按 5% 的比例转接至 LB 肉

汤培养基中, 37 °C、180 r/min 培养, 分别测定培养 0、2、4、6、8、10 h 时培养物的 OD_{600} 值。以时间为横坐标、吸光度为纵坐标, 绘制 8 株细菌的生长曲线。

1.5.2 生物膜形成能力的测定

将上述 1.5 的培养物按 5% 的比例转接至 800 μ L LB 肉汤培养基中, 37 °C、180 r/min 培养, 结晶紫法^[10]测定 8 株细菌在培养 24、48、72、96、120 h 时的成膜能力。以时间为横坐标、 OD_{570} 值为纵坐标, 绘制 8 株细菌生物膜形成曲线。

1.5.3 对小鼠的致病力测定

将上述 1.5 的培养物按 5% 的比例转接至 LB 肉汤培养基, 37 °C、180 r/min 培养 8 h 至稳定期(下同)。每株菌设置 5 个稀释度(稀释 1、4、16、64 和 256 倍), 分别以口腔和腹腔注射两种方式对实验组进行攻毒(10 只/组, 0.2 mL/只), 对照组以同样方式注射等剂量的灭菌生理盐水(共 6 只)。统计攻毒后一周内每组小鼠死亡情况, 采用寇氏改良法计算 8 株细菌对小鼠的 LD_{50} 。

1.5.4 小鼠病理组织切片的制作

解剖 1.5.3 中各组死亡的小鼠, 选取十二指肠完成石蜡切片的制作, HE 染色后观察小鼠小肠上皮绒毛的病理组织变化。

1.5.5 在小鼠体内定殖能力的测定

将上述 1.5 的培养物按 5% 的比例转接至 LB 肉汤培养基, 培养至稳定期。将 45 只小鼠随机分为 9 组(8 组试验组和 1 组对照组), 采用口腔攻毒方式, 试验组每只小鼠 0.5 mL 菌液, 对照组给予同等剂量灭菌生理盐水。攻毒 48 h 解剖小鼠, 取小肠研磨并进行 10 倍比稀释(10、100 倍), 再取 100 μ L 的原液、10 倍稀释液及 100 倍稀释液分别涂布于 LB/Str 固体培养基, 37 °C 培养过夜, 计算每株细菌在小鼠体内的定殖率: 定殖率=攻毒后菌落总数/攻毒前菌落总数。

1.5.6 对 HeLa 细胞黏附性的测定

将上述 1.5 的培养物按 5% 的比例转接至 LB 肉汤培养基, 培养至稳定期, 同时培养 HeLa 细

胞至贴壁状态。按照 MOI 为 100:1 将 8 株菌分别接种至 HeLa 细胞, 37 °C 孵育 30 min, 弃菌液并用 PBS 洗涤, 0.2% 结晶紫溶液染色 5 min, 再用 10% SDS 溶解结晶紫, 测定 OD_{550} 值, 以此反映每株细菌对 HeLa 细胞的黏附作用。

1.5.7 感染小鼠后相关细胞因子的测定

将上述 1.5 的培养物按 5% 的比例转接至 LB 肉汤培养基, 培养至稳定期。将 45 只小鼠随机分为 9 组(8 组实验组和 1 组对照组), 采取口腔攻毒方式, 试验组每只小鼠 0.5 mL 菌液, 对照组给予同等剂量灭菌生理盐水, 分别于攻毒后 24、48、72 h 时眼球采血。再按 ELISA 商品试剂盒说明分别测定各组细菌对小鼠 IL-1、IL-18 以及 IFN- γ 分泌量的影响。

1.5.8 数据统计分析

试验数据采用 SAS 9.0 单因素方差分析(Anova)进行显著性检验, $P < 0.05$ 具有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 肠炎沙门氏菌 G9^{StrR} 菌株 *ssrAB*、*hilA*、*hilD* 基因缺失菌株的构建及鉴定结果

通过对构建的单基因(*ssrAB*、*hilA*、*hilD*)、双基因(*ssrABhilA*、*ssrABhilD*、*hilAhilD*)和三基因(*ssrABhilAhilD*)缺失菌株进行 PCR 验证, 以 G9^{StrR} 菌株作为对照, 分别获得了预期的扩增片段大小(图 1), 表明缺失菌株构建成功。

2.2 G9^{StrR} 菌株 *ssrAB*、*hilA*、*hilD* 基因缺失菌株的生物学特性分析结果

2.2.1 生长曲线的测定结果

在绘制的 8 株细菌生长曲线中, 各菌生长曲线基本保持一致, 基因缺失菌株生长速度较亲本菌株并无明显变化(图 2)。

2.2.2 生物膜形成能力的测定结果

在 8 株细菌中, 除 Δ *hilD* 和 Δ *ssrABhilAhilD* 在培养 48 h 时生物膜形成能力最强外, 其余 6 株菌均在培养 96 h 后生物膜形成能力最强, 而且所有菌株在培养后 120 h 生物膜形成能力持下降趋势(图 3)。

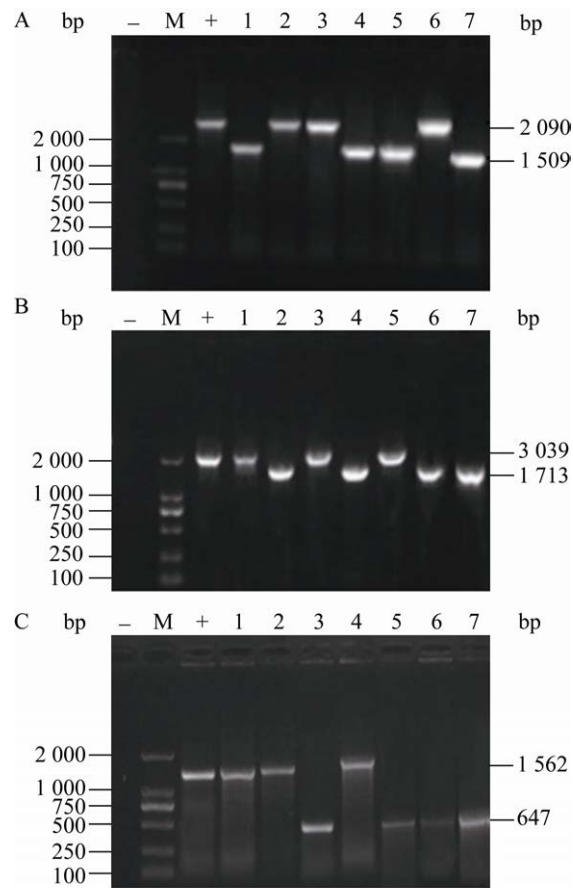


图 1 各缺失菌株的 PCR 鉴定结果
Figure 1 PCR identification result of each deletion strain
注: A: 引物为 *phlA*-1/4 引物对; B: 引物为 *phlD*-1/4 引物对; C: 引物为 *pssrAB*-5/6 引物对。-: 阴性对照; M: DL2000 DNA Marker; +: G9^{StrR} 菌株; 1: *ΔhilA* 菌株; 2: *ΔhilD* 菌株; 3: *ΔssrAB* 菌株; 4: *ΔhilA hilD* 菌株; 5: *ΔssrABhilA* 菌株; 6: *ΔssrABhilD* 菌株; 7: *ΔssrABhilA hilD* 菌株
Note: The primers in Figure A are *phlA*-1/4 primer pairs; the primers in Figure B are *phlD*-1/4 primer pairs; The primers in Figure C are *pssrAB*-5/6 primer pairs. -: Negative control; M: DL2000 DNA Marker; +: G9^{StrR} strain; 1: *ΔhilA* strain; 2: *ΔhilD* strain; 3: *ΔssrAB* strain; 4: *ΔhilA hilD* strain; 5: *ΔssrABhilA* strain; 6: *ΔssrABhilD* strain; 7: *ΔssrABhilA hilD* strain

2.2.3 对小鼠致病力的测定结果

8 株细菌对小鼠的 LD_{50} 值见表 2、3, 腹腔攻毒时 *ΔssrABhilA hilD* 和 *ΔhilA* 的 LD_{50} 值较亲本菌株差异显著($P<0.05$), 口腔攻毒时仅 *ΔssrABhilD*、*ΔhilA hilD* 的 LD_{50} 值与亲本菌株无显著差异($P>0.05$), 而且 2 种攻毒方式中 *ΔssrABhilA hilD* 和 *ΔhilA* 的 LD_{50} 值均显著高于亲本菌株($P<0.05$)。

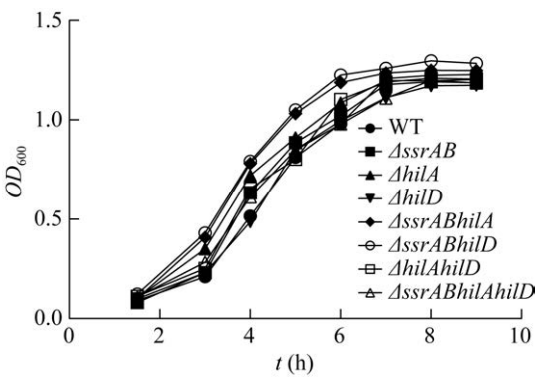


图 2 8 株细菌的体外生长曲线
Figure 2 The growth curve of 8 strains *in vitro*

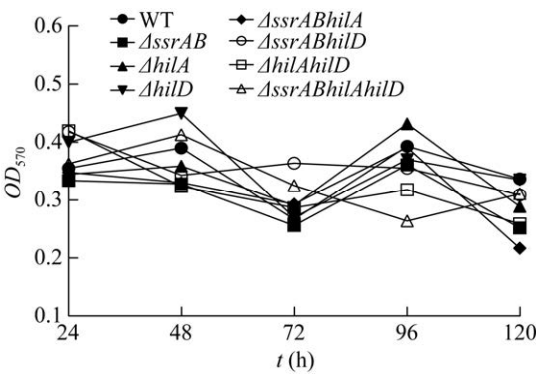


图 3 8 株细菌的生物膜形成能力
Figure 3 The biofilm formation ability of 8 strains

表 2 8 株细菌腹腔攻毒小鼠的 LD_{50}
Table 2 The LD_{50} of 8 strains intraperitoneally challenged mice

菌株 Strains	LD_{50}	95% 上限 95% upper limit	95% 下限 95% lower limit
WT	5.466×10^8 cd	1.45×10^9	2.07×10^8
<i>ΔssrAB</i>	5.507×10^8 cd	1.14×10^9	2.66×10^8
<i>ΔhilD</i>	7.75×10^8 bc	1.68×10^9	3.57×10^8
<i>ΔssrABhilD</i>	4.10×10^8 d	7.39×10^8	2.28×10^8
<i>ΔhilA</i>	1.07×10^9 ab	1.07×10^9	1.07×10^9
<i>ΔssrABhilA</i>	8.17×10^8 bc	1.58×10^9	4.22×10^8
<i>ΔhilA hilD</i>	5.50×10^8 cd	1.26×10^9	2.34×10^8
<i>ΔssrABhilA hilD</i>	1.34×10^9 a	2.60×10^9	6.92×10^8

注: 表中字母相同表明组间毒力差异不显著($P>0.05$), 字母不同表明组间毒力差异显著($P<0.05$)
Note: The same letter in the table indicates that the difference in virulence between the groups is not significant ($P>0.05$), the different letter indicates that is significant ($P<0.05$)

表 3 8 株细菌口腔攻毒小鼠的 LD_{50}
Table 3 The LD_{50} of 8 strains orally challenge mice

菌株 Strains	LD_{50}	95% 上限 95% upper limit	95% 下限 95% lower limit
WT	$6.51 \times 10^{10}d$	1.27×10^{11}	5.07×10^{10}
$\Delta ssrAB$	$3.27 \times 10^{11}b$	5.77×10^{11}	1.21×10^{11}
$\Delta hilD$	$2.99 \times 10^{11}b$	6.77×10^{11}	9.57×10^9
$\Delta ssrABhilD$	$9.10 \times 10^{10}cd$	1.84×10^{11}	4.67×10^{10}
$\Delta hilA$	$1.22 \times 10^{11}c$	2.97×10^{11}	5.73×10^{10}
$\Delta ssrABhilA$	$5.87 \times 10^{11}a$	1.73×10^{12}	2.99×10^{11}
$\Delta hilAhilD$	$8.92 \times 10^{10}cd$	2.87×10^{11}	2.43×10^{10}
$\Delta ssrABhilAhilD$	$5.32 \times 10^{11}a$	1.89×10^{12}	2.14×10^{11}

注: 上表中字母相同表示组间毒力差异不显著 ($P>0.05$), 字母不同表明组间毒力差异显著 ($P<0.05$)

Note: The same letter in the above table indicates that the difference in virulence between the groups is not significant ($P>0.05$), the different letter indicates that is significant ($P<0.05$)

2.2.4 感染小鼠病理组织切片的观察结果

取未攻毒小鼠的十二指肠制作病理切片作为空白对照, 对 8 株细菌感染小鼠的病理切片进行观察。其中, 亲本菌株毒力最强, 感染小鼠的肠绒毛结构较为松散, 表现有出血、充盈、脱落等沙门氏菌感染的典型病理变化; $\Delta ssrAB$ 攻毒组肠绒毛轻微出血、脱落, $\Delta hilD$ 攻毒组肠绒毛仅表现轻度出血, 两组均比亲本菌株攻毒组病变程度轻; $\Delta ssrABhilA$ 攻毒组肠道绒毛仅可见轻度出血和充盈的病变, 较 $\Delta ssrAB$ 和 $\Delta hilD$ 攻毒组的病变程度弱; $\Delta ssrABhilD$ 攻毒组小肠绒毛仅表现轻度出血的病变, 未见充盈、脱落等病理变化, 较 $\Delta ssrABhilA$ 攻毒组弱; $\Delta hilA$ 、 $\Delta hilAhilD$ 攻毒组肠道绒毛仅可见轻度充盈, 而且绒毛状态基本恢复; $\Delta ssrABhilAhilD$ 毒力最弱, 该组小鼠肠道绒毛仅轻微出血, 而且已基本恢复正常形态; 空白对照组肠道绒毛结构正常, 未见出血、充盈、脱落等病理变化(图 4)。

2.2.5 在小鼠体内定殖能力的测定结果

如图 5 所示, 定殖能力测定结果中, 8 株菌的定殖能力均显著高于空白对照组(无定殖) ($P<0.05$), 其中亲本菌株的定殖率最高, 显著高

于 7 株基因缺失菌株($P<0.05$), 而缺失菌株中, $\Delta hilD$ 的定殖率最高, $\Delta hilA$ 和 $\Delta ssrABhilA$ 次之, 而且 3 株缺失菌株的定殖率均显著高于剩余 4 株 ($P<0.05$)。

2.2.6 对 HeLa 细胞黏附性的测定结果

图 6 结果显示, 攻毒组对 HeLa 细胞的黏附力均显著高于空白对照组($P<0.05$), 其中 $\Delta ssrABhilAhilD$ 的黏附力最低, 显著低于其他各缺失菌株($P<0.05$)。

2.2.7 感染小鼠后细胞因子分泌的测定结果

8 株细菌感染小鼠后的细胞因子分泌量均显著高于空白对照组($P<0.05$), 各攻毒组之间 IL-1 的含量无显著差异($P>0.05$), 而且各攻毒组分泌 IL-1 的能力不随时间的变化而变化; 各攻毒组之间 IL-18 的含量无显著差异 ($P>0.05$), 其中 $\Delta ssrABhilAhilD$ 攻毒组的 IL-18 分泌量较其他 7 组略少, 且在攻毒后 72 h 达到峰值; 感染后 24 h 时, $\Delta hilA$ 、 $\Delta hilD$ 、 $\Delta ssrABhilA$ 、 $\Delta hilAhilD$ 以及 $\Delta ssrABhilAhilD$ 攻毒组的 IFN- γ 分泌量均显著高于亲本菌株($P<0.05$), 感染后 48 h 和 72 h 时, 所有攻毒组的 IFN- γ 含量无显著差异($P>0.05$) (图 7-9)。

3 讨论与结论

沙门氏菌作为一种常见的人畜共患病原菌, 其疫苗的研究正日渐成熟。弱毒活疫苗较常规的灭活疫苗免疫效果良好, 已成为目前预防沙门氏菌病的主要手段, 其中基因工程减毒疫苗的研究是一大热点^[11]。本研究采用 pWM91 自杀性质粒介导的同源重组法成功构建出 $\Delta ssrAB$ 、 $\Delta hilA$ 、 $\Delta hilD$ 、 $\Delta ssrABhilA$ 、 $\Delta ssrABhilD$ 、 $\Delta hilAhilD$ 、 $\Delta ssrABhilAhilD$ 这 7 株肠炎沙门氏菌 G9^{StrR} 的单基因、双基因及三基因缺失菌株, 该方法既能快速准确地敲除目的基因, 又不易对缺失菌株造成外源污染, 在国内外构建基因缺失菌株的研究中多被运用。Shippy 等^[12]利用 pKD46 系统进行沙门氏菌 *stdA* 基因的缺失; Mayola 等^[13]利用 pKOBEGA 自杀质粒构建沙门氏菌 RecA 蛋白的基因缺失菌株, 研究 RecA 蛋白在肠炎沙门氏菌生长过程中的

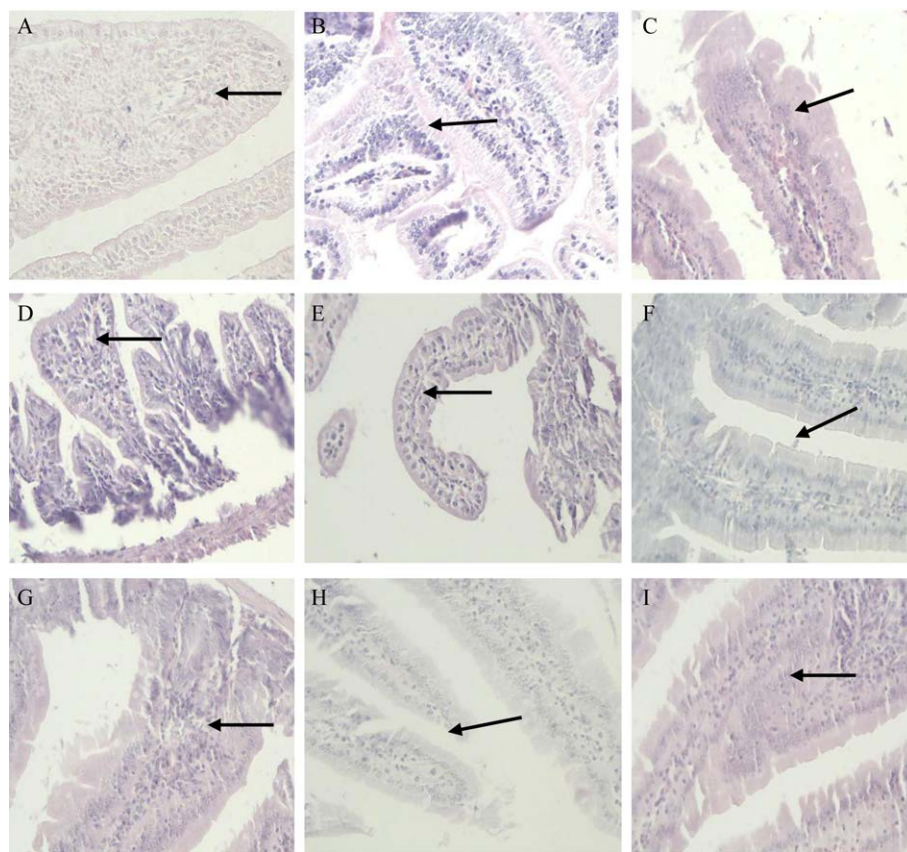


图4 小鼠十二指肠病理切片的显微观察结果(40×)

Figure 4 Microscopic observation results of murine duodenal pathological sections (40×)

注: A: 空白对照组; B: 亲本菌株攻毒组; C: $\Delta ssrAB$ 攻毒组; D: $\Delta hilA$ 攻毒组; E: $\Delta hilD$ 攻毒组; F: $\Delta ssrABhilD$ 攻毒组; G: $\Delta ssrABhilA$ 攻毒组; H: $\Delta hilAhilD$ 攻毒组; I: $\Delta ssrABhilAhilD$ 攻毒组。攻毒组图中箭头所指为组织病变部位

Note: A: Control group; B: Wild type challenge group; C: $\Delta ssrAB$ challenge group; D: $\Delta hilA$ challenge group; E: $\Delta hilD$ challenge group; F: $\Delta ssrABhilD$ challenge group; G: $\Delta ssrABhilA$ challenge group; H: $\Delta hilAhilD$ challenge group; I: $\Delta ssrABhilAhilD$ challenge group. The arrow in the figure above points to the tissue lesion

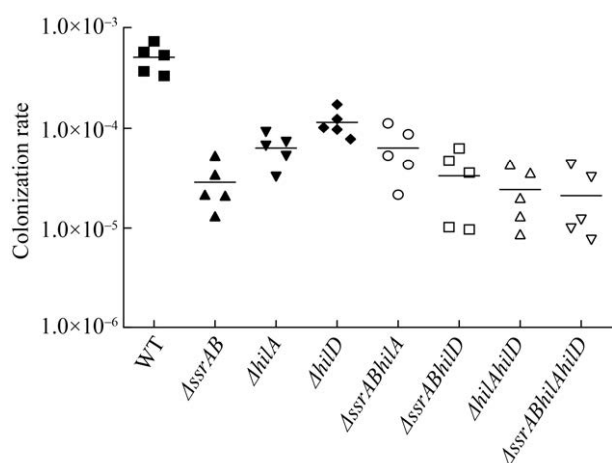


图5 8株细菌在小鼠体内的定殖率

Figure 5 The colonization rate of 8 strains in mice

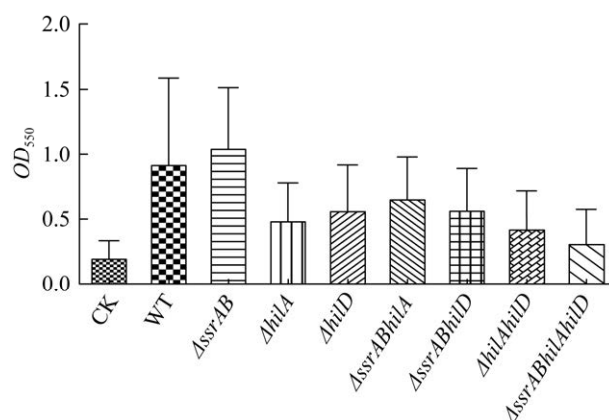


图6 8株细菌对HeLa细胞的黏附能力

Figure 6 The adhesion ability of 8 strains to HeLa cells

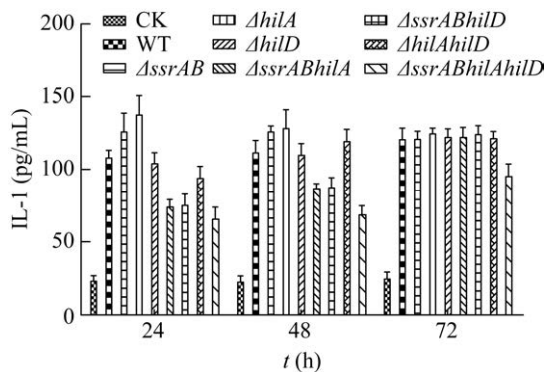


图 7 亲本菌株和缺失菌株感染小鼠后血清中 IL-1 的变化

Figure 7 The IL-1 level of murine blood after challenged by parent strain and deleted strains

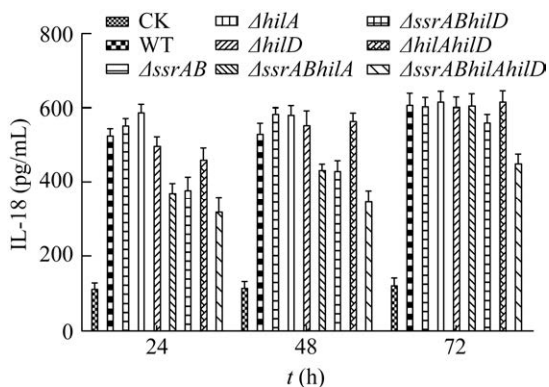


图 8 亲本菌株和缺失菌株感染小鼠后血清中 IL-18 的变化

Figure 8 The IL-18 level of murine blood after challenged by parent strain and deleted strains

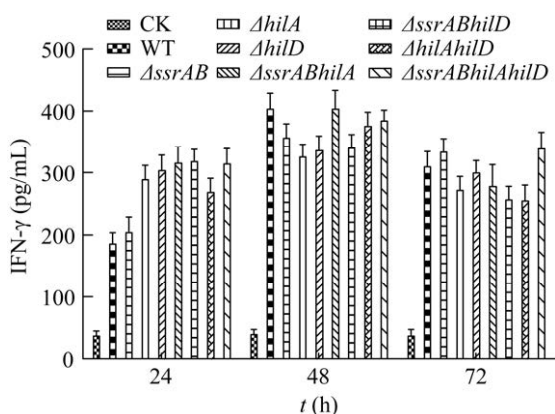


图 9 亲本菌株和缺失菌株感染小鼠后血清中 IFN- γ 的变化

Figure 9 The IFN- γ level of murine blood after challenged by parent strain and deleted strains

作用；杨亚东等^[14]利用重组自杀性质粒 PRE Δ seK1 成功构建了鼠伤寒沙门氏菌 SL1344 株 *sseK1* 基因缺失菌株。

ssrAB、*hilA*、*hilD* 是参与沙门氏菌毒力调控的基因，*hilA* 位于 SPI1 上，*ssrAB* 位于 SPI2 上，两者均可由沙门氏菌毒力调控中心 *hilD* 诱导表达，从而实现各毒力岛间的信息交流^[4]，但目前关于肠炎沙门氏菌 *ssrAB*、*hilA*、*hilD* 基因缺失菌株及其生物学特性的研究尚未见报道。

本研究首先对 7 株基因缺失菌株(Δ *ssrAB*、 Δ *hilA*、 Δ *hilD*、 Δ *ssrABhilA*、 Δ *ssrABhilD*、 Δ *hilAhilD*、 Δ *ssrABhilAhilD*)的生长速率和体外生物膜形成能力进行测定，发现缺失菌株的生长速率与亲本菌株无显著差异；对于体外生物膜形成能力，除 Δ *ssrAB* 和 Δ *hilD* 外，其余菌株与亲本菌株之间无显著差异，且 Δ *ssrAB* 的成膜能力显著低于亲本菌株，而 Δ *hilD* 则显著高于亲本菌株，提示基因 *ssrAB*、*hilA* 和 *hilD* 可能不参与细菌基础生长代谢过程，但 *ssrAB* 和 *hilD* 可能与肠炎沙门氏菌体外生物膜形成过程密切相关。生物膜形成能力越强，菌株对抗生素的耐药性越高，而且较容易形成持续感染^[15]， Δ *hilD* 生物膜形成能力强耐药性高，适于沙门氏菌减毒载体的研究；而 Δ *ssrAB* 生物膜形成能力弱，适合作为沙门氏菌减毒疫苗用菌株。

其次，通过对小鼠 LD_{50} 及十二指肠病理切片观察、细菌在小鼠体内定殖率、对 HeLa 细胞黏附性及细胞因子分泌水平的测定，分析基因缺失菌株与亲本菌株致病力的差异，结果显示，无论采取腹腔攻毒还是口腔攻毒， Δ *hilA* 和 Δ *ssrABhilAhilD* 的 LD_{50} 均显著高于亲本菌株，且攻毒后肠道病变不明显，而 Δ *ssrABhilD* 和 Δ *hilAhilD* 的 LD_{50} 值与亲本菌株差异不显著，但病理变化却明显减弱，推测基因 *hilA*、*hilD* 和 *ssrAB* 能增强沙门氏菌对宿主的致病力及对宿主免疫系统的抵抗力，而 Δ *ssrABhilD* 和 Δ *hilAhilD* 可能引起了持续性感染。小鼠首次感染沙门氏菌后可恢复正常肠道结构，但持续感染会造成机体多器官系统衰竭最终引起

死亡,而且急性感染较持续感染造成的肠道病理变化更明显,也解释了 LD_{50} 值与肠道组织病变程度不一致的现象^[16-18]。

沙门氏菌进入机体识别小肠后,能迅速吸附定殖引发感染,定殖后的沙门氏菌又可作为新的传染源,通过粪便排出体外感染其他易感动物,而黏附作为沙门氏菌定殖过程的关键一步,也可用于衡量菌株毒力的强弱^[19-21]。本研究中, $\Delta ssrAB$ 的定殖能力与黏附力表现不一致,其定殖能力低于亲本菌株而黏附力高于亲本菌株,其余 6 株基因缺失菌株保持一致,均低于亲本菌株,提示缺失 $ssrAB$ 、 $hilA$ 、 $hilD$ 基因后沙门氏菌的毒力降低,而且 $\Delta ssrAB$ 造成的感染可能为一过性的,在宿主体内无蓄积,适合制备沙门氏菌减毒疫苗,而 $\Delta ssrABhilAhilD$ 定殖率低且黏附能力也不强,对细胞的入侵能力不足,在制备沙门氏菌减毒疫苗或载体时应全面考虑。IL-1 和 IL-18 是由炎性小体分泌的调节先天性和适应性免疫的细胞因子,而 IL-18 又能促进 IFN- γ 的分泌^[22]。IL-18 的水平反映出宿主对沙门氏菌的细胞免疫水平,也能最真实地反映宿主的抵抗能力,而 IL-1 和 IFN- γ 的水平则反映出机体对沙门氏菌的总体免疫应答能力^[23]。7 株基因缺失菌株刺激小鼠分泌的 IL-1、IL-18 和 IFN- γ 水平与亲本菌株均无显著差异,满足作为沙门氏菌减毒疫苗或载体的必需条件。

综合 7 株肠炎沙门氏菌基因缺失株的生物膜形成能力、对小鼠的半数致死量及病理组织学观察、在小鼠体内的定殖率、对 HeLa 细胞的黏附性等测定结果, $\Delta ssrAB$ 、 $\Delta hilA$ 、 $\Delta hilD$ 、 $\Delta ssrABhilA$ 和 $\Delta ssrABhilAhilD$ 的毒力减弱,与亲本菌株间存在显著差异,具有制备沙门氏菌减毒疫苗或载体的潜质。

REFERENCES

- [1] Yin JL, Li QC, Jiao XA. Advances in *Salmonella* pathogenicity island 2 type III secretion system: a review[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2016, 56(4): 561-569 (in Chinese)
殷俊磊, 李求春, 焦新安. 沙门菌致病岛 2 III型分泌系统研究进展[J]. 微生物学报, 2016, 56(4): 561-569
- [2] Garmendia J, Beuzón CR, Ruiz-Albert J, Holden DW. The roles of SsrA-SsrB and OmpR-EnvZ in the regulation of genes encoding the *Salmonella typhimurium* SPI-2 type III secretion system[J]. Microbiology, 2003, 149(9): 2385-2396
- [3] Olekhovich IN, Kadner RJ. Role of nucleoid-associated proteins Hha and H-NS in expression of *Salmonella enterica* activators HilD, HilC, and RtsA required for cell invasion[J]. Journal of Bacteriology, 2007, 189(19): 6882-6890
- [4] Bustamante VH, Martínez LC, Santana FJ, Knodler LA, Steele-Mortimer O, Puente JL. HilD-mediated transcriptional cross-talk between SPI-1 and SPI-2[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2008, 105(38): 14591-14596
- [5] Golubeva YA, Sadik AY, Ellermeier JR, Schlauch JM. Integrating global regulatory input into the *Salmonella* pathogenicity island 1 type III secretion system[J]. Genetics, 2012, 190(1): 79-90
- [6] Huang C, Luo YL, Li P, Liu Q. Construction and biological characterization of a *rmlD* mutant of *Salmonella typhimurium*[J]. Journal of Biology, 2016, 33(6): 33-37 (in Chinese)
黄春, 罗雅莉, 李沛, 刘青. 鼠伤寒沙门菌 *rmlD* 缺失株的构建及生物学特性分析[J]. 生物学杂志, 2016, 33(6): 33-37
- [7] Yan Y, Luo YB, Wang WJ, Pan Y, Wan CB. Comparative study on three kinds of DNA extraction methods of *Salmonella* and *Staphylococcus aureus*[J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2015, 43(27): 41-43 (in Chinese)
颜瑛, 罗玉彬, 王文娟, 潘影, 万承波. 沙门氏菌和金黄色葡萄球菌 3 种 DNA 提取方法的比较[J]. 安徽农业科学, 2015, 43(27): 41-43
- [8] Li MC, He SH. An efficient and rapid method for the preparation and transformation of competent cells from *Escherichia coli*[J]. Journal of Shantou University Medical College, 2005, 18(4): 228-230,241 (in Chinese)
李明才, 何韶衡. 一种高效、快速的大肠杆菌感受态细胞制备及质粒转化方法[J]. 汕头大学医学院学报, 2005, 18(4): 228-230,241
- [9] Zhang DM, Hu J, Yu SY. Construction of the *ybtE* gene-deleting mutant of enteropathogenic *E. coli* 17-2 strain[J]. Chinese Journal of Zoonoses, 2007, 23(5): 433-437 (in Chinese)
张冬梅, 胡静, 俞守义. 肠聚集性大肠杆菌 *ybtE* 基因缺失突变株的构建[J]. 中国人兽共患病学报, 2007, 23(5): 433-437
- [10] Yahya MFZR, Alias Z, Karsani SA. Subtractive protein profiling of *Salmonella typhimurium* biofilm treated with DMSO[J]. The Protein Journal, 2017, 36(4): 286-298
- [11] Wang Z, Cheng J, Shen S, Song JL, Lu L. Prevention and control strategies of avian salmonellosis and the research of salmonellosis vaccine[J]. Journal of Beijing University of

- Agriculture, 2015, 30(2): 133-136 (in Chinese)
王真, 成杰, 沈思, 宋俊辽, 鲁琳. 禽沙门氏菌病防控策略及其疫苗研究概述[J]. 北京农学院学报, 2015, 30(2): 133-136
- [12] Shippy DC, Eakley NM, Mikheil DM, Fadl AA. Role of *StdA* in adhesion of *Salmonella enterica* serovar *enteritidis* phage type 8 to host intestinal epithelial cells[J]. Gut Pathogens, 2013, 5(1): 43
- [13] Mayola A, Irazoki O, Martinez IA, Petrov D, Menolascina F, Stocker R, Reyes-Darias JA, Krell T, Barbé J, Campoy S. *RecA* protein plays a role in the chemotactic response and chemoreceptor clustering of *Salmonella enterica*[J]. PLoS One, 2014, 9(8): e105578
- [14] Yang YD, Zhang CJ, Cheng XC, Ding K, Li YJ, Yu C, Liao CS, Chen SB, Wang EX, Zhang XJ. Construction and characterization of secreted effector K1 gene deleted mutant of *Salmonella typhimurium* SL1344 strain[J]. Chinese Veterinary Science, 2017, 47(9): 1087-1093 (in Chinese)
杨亚东, 张春杰, 程相朝, 丁轲, 李银聚, 郁川, 廖成水, 陈松彪, 王二鑫, 张晓洁. 鼠伤寒沙门菌 SL1344 株分泌性蛋白 K1 缺失株的构建及其生物学特性的初步研究[J]. 中国兽医科学, 2017, 47(9): 1087-1093
- [15] Ebrahimi A, Hemati M, Shabanpour Z, Habibian Dehkordi S, Bahadoran S, Lotfalian S, Khubani S. Effects of benzalkonium chloride on planktonic growth and biofilm formation by animal bacterial pathogens[J]. Jundishapur Journal of Microbiology, 2015, 8(2): e16058
- [16] Johannis TM, Law CY, Kalekar LA, O'Donnell H, Ertelt JM, Rowe JH, Way SS. Early eradication of persistent *Salmonella* infection primes antibody-mediated protective immunity to recurrent infection[J]. Microbes and Infection, 2011, 13(4): 322-330
- [17] Fàbrega A, Vila J. *Salmonella enterica* serovar typhimurium skills to succeed in the host: virulence and regulation[J]. Clinical Microbiology Reviews, 2013, 26(2): 308-341
- [18] Yao Y, Li XY, Xu YP, Jin LJ, Zong Y, Wang N, Wang LH. Kunming mouse model of intestinal infection induced by *Salmonella typhimurium*[J]. Progress in Modern Biomedicine, 2014, 14(28): 5401-5406 (in Chinese)
姚营, 李晓宇, 徐永平, 金礼吉, 宗颖, 王妮, 王林会. 鼠伤寒沙门氏菌诱导昆明小鼠肠道感染模型的建立[J]. 现代生物医学进展, 2014, 14(28): 5401-5406
- [19] Lustrì BC, Sperandio V, Moreira CG. Bacterial chat: intestinal metabolites and signals in host-microbiota-pathogen interactions[J]. Infection and Immunity, 2017, 85(12): e00476-17
- [20] Li XW, Venkitanarayanan K. New choice for the US poultry industry to improve the safety of poultry products[J]. Veterinary Orientation, 2016(13): 42-45, 47 (in Chinese)
黎先伟, Venkitanarayanan K. 美国养禽业提高家禽产品安全性的新选择[J]. 兽医导刊, 2016(13): 42-45, 47
- [21] Wiedemann A, Virlogeux-Payant I, Chaussé AM, Schikora A, Velge P. Interactions of *Salmonella* with animals and plants[J]. Frontiers in Microbiology, 2014, 5: 791
- [22] Zalinger ZB, Elliott R, Weiss SR. Role of the inflammasome-related cytokines Il-1 and Il-18 during infection with murine coronavirus[J]. Journal of Neuro Virology, 2017, 23(6): 845-854
- [23] Tsai PY, Ka SM, Chang JM, Lai JH, Dai MS, Jheng HL, Kuo MT, Chen P, Chen A. Anthraquinone differentially modulates T cell activity and reduces interleukin-18 production, but enhances Nrf2 activation, in murine accelerated severe lupus nephritis[J]. Arthritis Rheumatology, 2012, 64(1): 232-242