

• 技术与方法 •      doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2019.11.031

网络首发   http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.r.20190423.1149.014.html(2019-04-23)

伤寒沙门菌三基因敲除株的构建及其减毒效果分析

穆媛媛<sup>1</sup>,熊 坤<sup>2</sup>,刘 璐<sup>3</sup>,樊 佳<sup>3</sup>,张 丹<sup>3</sup>,余 玥<sup>3</sup>,邓 冲<sup>3</sup>,魏 聪<sup>3</sup>,赵 容<sup>3△</sup>

(1. 辽河油田中心医院消化科,辽宁盘锦 124010;2. 陆军军医大学微生物学教研室,重庆 400038;  
3. 西南医科大学附属中医医院检验科,四川泸州 646000)

**[摘要]** 目的 通过敲除伤寒沙门菌与体内生存相关的基因构建减毒株。方法 采用同源重组方法进行基因敲除,将涉及铁摄取的外膜转运蛋白编码基因 *iroN*、*fepA*、*cirA* 全部敲除。采用小鼠感染模型测定野生株和突变株的毒力水平,采用概率单位加权回归法计算半数致死量(LD<sub>50</sub>)。结果 采用同源重组方法将 3 个基因一一敲除,成功构建三基因敲除株。贫铁培养基中的生长曲线显示突变株生长较野生株明显缓慢;以动物模型检测的毒力水平显示,野生株和突变株的 LD<sub>50</sub> 分别为 3.64×10<sup>6</sup> CFU 和 3.56×10<sup>6</sup> CFU。结论 伤寒沙门菌外膜转运蛋白编码基因 *iroN*、*fepA*、*cirA* 敲除后病原菌毒力显著减低,为减毒疫苗的后续评价奠定了基础。

**[关键词]** 伤寒;减毒株;基因敲除

**[中图法分类号]** R516.3      **[文献标识码]** A      **[文章编号]** 1671-8348(2019)11-1919-04

Construction of three-gene-deletion mutant of Salmonella Typhi and preliminary safety assessment

MU Yuanyuan<sup>1</sup>,XIONG Kun<sup>2</sup>,LIU Lu<sup>3</sup>,FAN Jia<sup>3</sup>,ZHANG Dang<sup>3</sup>,YU Yue<sup>3</sup>,  
DENG Chong<sup>3</sup>,WEI Cong<sup>3</sup>,ZHAO Rong<sup>3△</sup>

(1. Department of Gastroenterology, Central Hospital of Liaoheyou tian, Panjin, Liaoning 124010, China; 2. Department of Microbiology, Army Medical University, Chongqing 400038, China;  
3. Department of Clinical Laboratory, Traditional Chinese Medicine Hospital Affiliated to Southwest Medical University, Luzhou, Sichuan 646000, China)

**[Abstract]** **Objective** Global incidence of typhoid fever remains high. Vaccine is one of the protective means against this infectious disease. Among various vaccines, attenuated vaccine has advantages of comprehensive immune protection, low cost, convenient use and high compliance. The present study aims to construct an attenuated strain from Salmonella Typhi Ty2 via deletion of three outer-membrane-transporter-encoding genes, *iron*, *fepA* and *cirA*. **Methods** The target genes, *iron*, *fepA* and *cirA*, were deleted from the chromosome of wild type one by one via homologous recombination. LD<sub>50</sub> of the mutant and the wild type was determined by using mouse infection model. **Results** In iron-limited medium, the growth rate of the mutant was lower than that of the wild type. The LD<sub>50</sub> of the wild type and the mutant was 3.64×10<sup>6</sup> CFU and 3.56×10<sup>6</sup> CFU, respectively. **Conclusion** The deletion of outer membrane transporter encoding genes, *iron*, *fepA* and *cirA*, led to significant attenuation. The resultant strain is suitable for subsequent assessment of immune protective efficacy.

**[Key words]** typhoid fever; attenuated strain; gene deletion

根据世界卫生组织最新数据,全球伤寒感染者约为 1 700 万<sup>[1]</sup>,是一个严重的公共卫生问题。针对伤寒的感染途径,减毒疫苗具有免疫机制全面、成本低廉、使用方便、顺应性高等优势,是控制伤寒的有效手段。本研究将伤寒沙门菌 3 个参与铁载体转运的基因 *iroN*、*fepA*、*cirA* 全部敲除,构建三基因敲除株,并采用动物模型对突变株的毒力进行检测。

1 材料与方法

1.1 菌株和培养基 研究使用的菌株、质粒和引物

见表 1。细菌采用 LB 培养基培养,如有需要,抗生素按以下浓度加入培养基:卡那霉素 50 μg/mL;氨苄西林 100 μg/mL。TMM 基本培养基:磷酸氢二钾 7 g/L,磷酸二氢钾 1 g/L;硫酸镁 0.2 g/L;柠檬酸钠 0.5 g/L;半胱氨酸 0.1 g/L;色氨酸 0.1 g/L;硫酸铵 0.1 g/L;葡萄糖 5 g/L;pH 7.6。贫铁培养基:以 TMM 培养基为基础,加入 180 μmol/L 铁螯合剂 2,2/-dipyridyl 制成,使用前加入氯化铁至终浓度为 5 μmol/L。

表 1 菌株、质粒和引物

菌株	质粒和引物	基因型、表型或序列	备注
大肠杆菌	DH5a	supE44 _lac U169 (_80 lacZ_M15) hsdR17 recA1 endA1,gyrA96 thi-1 re- lA1	实验室保藏
	SI7-1/ λpir	λ-pir lysogen of SI7-1 (thi pro hsdR hsdM+ recA RP4 2-Tc::Mu-Km:: Tn 7(TpR SmR))	实验室保藏
伤寒沙门菌	str. Ty2	野生株	中国医学培养物保藏中心
	ΔiroNΔfepAΔcirA	将伤寒沙门菌 Ty2 株的 iroN、fepA 和 cirA 3 个基因敲除获得的突变株	本研究构建
质粒	pYG4	自杀载体	参考文献 <sup>[2]</sup> 自制
引物	P11	5'-AAAAGTGCACGCCGGTCTTTGCTTTTGGAC-3'	用于扩增 cirA 的同源臂序列
	P12	5'-GTTATAAATTGGAGTGTGAAGGTTATTGCGTG TC- CATTTCCTCCATGAGGTAA -3'	
	P13	5'-CACGCAATAACCTTCACACTCCAAATTTA- TAACCAGAGACTGGCGACAGCCGCGTTTT -3'	
	P14	5'-AAAAAGATCTTTACCATTAAGATCGTCCC -3'	
	P21	5'-AAAAGTGCACCTCCATACGCGGCGGGAGTTA -3'	用于扩增 fepA 的同源臂序列
	P22	5'-GTTATAAATTGGAGTGTGAAGGTTATTGCGTG TGTATATC- CTGCTTTTCTTT -3'	
	P23	5'-CACGCAATAACCTTCACACTCCAAATTTA- TAAC TGGAACCTTCCCTCCCTCATT -3'	
	P24	5'-AAAAAGATCTTATCGGGGTATTGCGCTAAG -3'	
	P31	5'-AAAAGTGCACGTGGGTTATCCTGTCTTAT -3'	用于扩增 iroN 的同源臂序列
	P32	5'-GTTATAAATTGGAGTGTGAAGGTTATTGCGTG TGGGTTAT- GCCCCGCCGT -3'	
	P33	5'-CACGCAATAACCTTCACACTCCAAATTTATAAC TCCCTA- AATAATGTCTAAAG -3'	
	P34	5'-CCCCAGATCTAAGTGGATAGAGTTAAAGG -3'	

**1.2 伤寒沙门菌三基因敲除株的构建** 参考文献<sup>[2-3]</sup>,采用同源重组法将 cirA、fepA、iroN3 个基因从细菌染色体上一一敲除。以 cirA 基因的敲除为例说明如下:以伤寒沙门菌基因组 DNA 为模板,采用 crossover PCR 扩增伤寒沙门菌上下游序列并拼接在一起。即以 P11 和 P12 为引物扩增 cirA 基因上游序列,以 P13 和 P14 为引物扩增 cirA 基因下游序列,两次 PCR 产物混合作为模板,以 P11 和 P14 扩增,由于 P12 和 P13 引物序列中有一段 33bp 的互补序列(表 1),通过 PCR 扩增可使上下游序列拼接在一起。PCR 产物经 BglⅡ和 ApaⅠ双酶切后插入自杀质粒 pYG4 中,并测序验证。获得的 pYG4-ΔcirA 质粒电转化到伤寒沙门菌中,采用含有卡那霉素的 LB 平板筛选质粒整合株(pYG4 质粒含有卡那霉素耐药基因)。获得的整合株于液体 LB 培养基中培养过夜,取菌液涂布在含有 5%蔗糖的 LB 固体培养基上继续培养。pYG4 质粒上有 sacB 基因,该基因编码产物果聚糖合酶,可以分解蔗糖并合成高分子量的果聚糖,进而造成细菌死亡。因此带有该质粒的细菌无法在含有 5%蔗糖的 LB 平板上生长,只有该质粒通过同源重组从染色体上丢失后,细菌才能生长。同源重组的

结果有两个,细菌恢复为野生型,或者成为敲除株,可以通过 PCR 进行鉴定。故在培养 16 h 后,挑取菌落鉴定其卡那霉素敏感性,对卡那霉素敏感的菌落(染色体上的质粒序列丢失)进行 PCR 和测序鉴定,鉴定准确的敲除株 ΔcirA 保存于-80℃。接下来采用同样的方法,以 ΔcirA 作为亲本,将 fepA 基因敲除,进而将 iroN 基因敲除,最终获得的三基因敲除株保存-80℃备用。

**1.3 三基因敲除株生长特征分析** 将 10 μL 细菌新鲜培养物(约含 1×10<sup>4</sup> CFU/mL)接种于 10 mL 贫铁培养基中(3 个平行管),于 37℃震荡培养,每隔 2 h 取 1 mL 培养物测定 600 nm 吸光度,绘制生长曲线。

**1.4 三基因敲除株半数致死量(LD<sub>50</sub>)测定** 采用小鼠胃黏蛋白增毒模型测定三基因敲除株和野生株的 LD<sub>50</sub>。6~8 周龄的 BALB/c 小鼠随机分 5 组,每组 6 只。取细菌新鲜培养物经 PBS 洗涤后测定 OD 值,重悬于 10%的猪胃黏蛋白液中配制系列浓度(野生 5×10<sup>5</sup> CFU/mL;三基因敲除株 5×10<sup>3</sup>~5×10<sup>7</sup> CFU/mL)的菌悬液。取 0.5 mL 菌悬液进行腹腔注射,动物禁食喂水,观察记录 72 h 内小鼠的死亡情况,采用概率单位加权回归法(Bliss 法)计算 LD<sub>50</sub>。

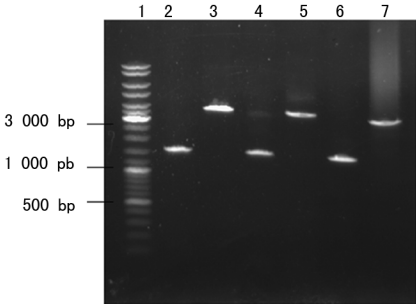
表 2 LD<sub>50</sub>测定结果

菌株	各剂量组小鼠死亡比例(死亡数/总数)								LD <sub>50</sub> (CFU)
	2.5×10	2.5×10 <sup>2</sup>	2.5×10 <sup>3</sup>	2.5×10 <sup>4</sup>	2.5×10 <sup>5</sup>	2.5×10 <sup>6</sup>	2.5×10 <sup>7</sup>	2.5×10 <sup>8</sup>	
野生株	2/6	6/6	6/6	6/6	6/6	NA	NA	NA	3.64×10 <sup>1</sup>
三基因敲除株	NA	NA	NA	0/6	0/6	2/6	6/6	6/6	3.56×10 <sup>6</sup>

NA:未做

2 结 果

2.1 构建并获得三基因敲除株 成功将伤寒沙门菌 Ty2 株的 3 个参与铁载体转运的基因 *iroN*、*fepA*、*ci-rA* 一一敲除,如图 1 所示,当以一对被敲除基因外围的引物分别扩增野生株和敲除株的基因组 DNA 时,敲除株由于目的基因被敲除,故扩增片段较野生株明显小。PCR 鉴定的结果显示,3 个基因均被有效敲除。



1:分子量标准;2:引物 P11 和 P14 PCR 扩增产物(三基因敲除株);3:引物 P11 和 P14 PCR 扩增产物(野生株);4:引物 P21 和 P24 PCR 扩增产物(三基因敲除株);5:引物 P21 和 P24 PCR 扩增产物(野生株);6:引物 P31 和 P34 PCR 扩增产物(三基因敲除株);7:引物 P31 和 P34 PCR 扩增产物(野生株)

图 1 敲除株 PCR 鉴定电泳图

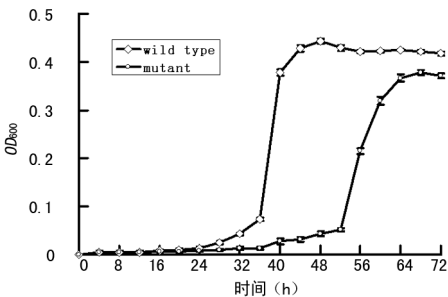


图 2 细菌在贫铁培养基中培养的生长曲线

2.2 三基因敲除株在贫铁培养基中生长较野生株缓慢 采用 2,2'-dipyridyl 将培养基中的铁离子螯合,然后在培养基中加入微量三价铁造成一个贫铁的环境。生长曲线测定显示,三基因敲除株在这种贫铁环境中的生长较野生株明显缓慢(图 2)。

2.3 三基因敲除株毒力显著下降 为了进一步测定和评价三基因敲除株及野生株的毒力,本研究采用小鼠急性感染模型测定了伤寒沙门菌野生株和敲除株的 LD<sub>50</sub>,分别为 3.64×10<sup>1</sup> CFU 和 3.56×10<sup>6</sup> CFU (表 2)。

3 讨 论

伤寒的自然感染途径是粪-口途径,其保护性免疫机制包括体液免疫、细胞免疫和黏膜免疫<sup>[4]</sup>,其中黏膜免疫可以有效阻止病原体在肠黏膜表面的定居和繁殖,对于阻断再次感染发挥了重要作用。因此,针对伤寒的疫苗设计,口服减毒疫苗方式具有很多优势:(1)减毒疫苗通过自然感染途径接种,除了诱导体液免疫、细胞免疫外,还可以有效诱导黏膜免疫,免疫机制全面,免疫效果好;(2)其次在接种方式上,口服方式比较方便、简单,不需要注射器和专业的医务人员。为非侵入性接种,接种者顺应性高,尤其适合儿童。(3)避免疫苗与全身循环的直接接触,减轻不良反应。(4)沙门菌减毒疫苗生产工艺简单,疫苗成本相对较低。沙门菌减毒疫苗的研制和应用已有很长的历史,例如伤寒沙门菌 Ty21a 和众多鼠伤寒沙门菌减毒株等,其良好的安全性得到大量实验和临床应用的证实<sup>[5-6]</sup>。另外,沙门菌是最早应用于疫苗载体的细菌之一,也是目前研究最深入的活菌疫苗载体,已被广泛用于病毒、细菌、寄生虫、肿瘤等疫苗的研制并展示了良好的应用前景<sup>[5-6]</sup>。

本研究通过敲除涉及铁载体转运的 3 个基因实现细菌的减毒,理论依据是铁摄取功能对于细菌生存至关重要。虽然自然界中有非常丰富的铁元素,然而对于细菌来说,却是个“贫铁”的环境。这是因为铁在有氧条件下主要以三价铁形式存在,在中性及偏碱性环境中,三价铁由于形成 Fe(OH)<sub>3</sub> 以及羟基氧化铁而几乎不溶,细菌很难直接从环境中获得游离铁的供应<sup>[7-9]</sup>。为了生存,多数细菌会通过合成并分泌铁载体(siderophores,一种与铁离子具有高亲和力的螯合剂)到环境中去争夺铁离子<sup>[7]</sup>;然而,结合了铁的铁载体并不能直接通过细菌外膜回到菌体内,必须借助外膜上 TonB 依赖的转运蛋白(TonB-dependent Transporters, TBDTs)的转运<sup>[7]</sup>。与之相似,在人和动物体内,铁元素主要以结合方式存在于转铁蛋白、乳铁蛋白等铁蛋白中而无法被自由利用,但细菌同样可以通过铁载体从这些含铁蛋白中争夺铁元素,再由转运蛋白转运到菌体内利用。既往研究显示,这些涉及铁摄取的 TBDTs 对病原菌在体内的生存和致病有重要作用<sup>[7-9]</sup>。

实验研究和生物信息学分析显示伤寒沙门菌一共有 6 个 TBDTs(FoxA、YncD、BtuB、IroN、FepA 和

CirA),其中 5 个涉及铁转运。FoxA 转运高铁氧胺铁载体;YncD 涉及转铁,但铁载体类型未知。IroN、FepA 和 CirA 主要涉及儿茶酚胺类铁载体,IroN 能转运 2,3-二羟苯甲酰基丝氨酸、肠菌素、沙门螯合素;FepA 能够转运 2,3-二羟苯甲酰基丝氨酸和肠菌素;而 CirA 只能转运 2,3-二羟苯甲酰基丝氨酸,三者在工作上具有一定互补性<sup>[10-12]</sup>。本研究结果表明,当 3 个基因被敲除后导致细菌毒力显著下降,表明以这 3 个基因作为减毒的敲除靶基因是适合的。当然,后续还需要对减毒株的免疫保护效能及其免疫机制进行全面而系统的研究,才有可能将该减毒株纳入伤寒疫苗株的候选。

参考文献

[1] RADHAKRISHNAN A, ALS D, MINTZ E D, et al. Introductory article on global burden and epidemiology of typhoid fever[J]. Am J Trop Med Hyg, 2018, 99(3): 4-9.

[2] 熊坤, 陈志瑾, 李建华, 等. 甲型副伤寒沙门菌减毒株的构建与鉴定[J]. 免疫学杂志, 2015, 31(1): 27-31.

[3] XIONG K, CHEN Z J, ZHU C Y, et al. Safety and immunogenicity of an attenuated Salmonella enterica serovar Paratyphi A vaccine candidate[J]. Int J Med Microbiol, 2015, 305(6): 563-571.

[4] GUZMAN C A, BORSUTZKY S, GRIOT-WENK M, et al. Vaccines against typhoid fever[J]. Vaccine, 2006, 24(18): 3804-3811.

[5] ROLAND K L, BRENNEMAN K E. Salmonella as a vaccine delivery vehicle[J]. Expert Rev Vaccines, 2013, 12

(9): 1033-1045.

[6] LIN I Y, VAN T T, SMOOKER P M. Live-attenuated bacterial vectors; tools for vaccine and therapeutic agent delivery[J]. Vaccines (Basel), 2015, 3(4): 940-972.

[7] ELLERMANN M, ARTHUR J C. Siderophore-mediated Iron acquisition and modulation of host-bacterial interactions[J]. Free Radic Biol Med, 2017, 105(1): 68-78.

[8] LIU M, HUANG M, SHUI Y, et al. Roles of B739\_1343 in Iron acquisition and pathogenesis in *Riemerella anatipestifer* CH-1 and evaluation of the RA-CH-1ΔB739\_1343 mutant as an attenuated vaccine[J]. PLoS One, 2018, 13(5): e0197310.

[9] LI Y G, MA Q J. Iron acquisition strategies of vibrio anguillarum[J]. Front Cell Infect Microbiol, 2017(7): 342.

[10] B? UMLER A J, NORRIS T L, LASCO T, et al. IroN a novel outer membrane siderophore receptor characteristic of Salmonella enteric [J]. J Bacteriol, 1998(180): 1446-1453.

[11] RABSCH W, VOIGT W, REISSBRODT R, et al. Salmonella typhimurium IroN and FepA proteins mediate uptake of enterobactin but differ in their specificity for other siderophores[J]. J Bacteriol, 1999(181): 3610-3612.

[12] BEARSON B L, BEARSON S M, UTHE J J, et al. Iron regulated genes of Salmonella enterica serovar Typhimurium in response to norepinephrine and the requirement of fepDGC for norepinephrine-enhanced growth[J]. Microbes Infect, 2008, 10(7): 807-816.

(收稿日期: 2019-01-02 修回日期: 2019-03-16)

(上接第 1918 页)

技术建立 SD-Wistar 大鼠肾移植模型[J]. 医学研究杂志, 2016, 45(11): 133-135.

[4] 王竹林, 曹浩, 占贞贞, 等. 大鼠腹腔内工作型心脏移植模型的改进[J]. 中国实验动物学报, 2015, 23(2): 119-123.

[5] 胡定辉, 李鸿雁, 刘尊涛, 等. 大鼠腹腔异位心脏移植模型的建立与评价[J/CD]. 中西医结合心血管病(电子杂志), 2018, 6(2): 192-193.

[6] IBRAHIM M, NAVARATNARAJAH M, KUKADIA P, et al. Heterotopic abdominal heart transplantation in rats for functional studies of ventricular unloading[J]. J Surg Res, 2013, 179(1): 31-39.

[7] SCHAEFER A, SCHNEEBERGER Y, STENZIG J, et al. A new animal model for investigation of mechanical unloading in hypertrophic and failing hearts; combination of transverse aortic constriction and heterotopic heart trans-

plantation[J]. PLoS One, 2016, 11(2): e0148259.

[8] 张金敏, 张松林, 魏蕾. Tail-Cuff 技术改良大鼠颈部异位心脏移植模型的效果观察[J]. 山东医药, 2014, 54(28): 26-28.

[9] MA Y, WANG G D. Comparison of 2 heterotopic heart transplant techniques in rats; cervical and abdominal heart [J]. Exp Clin Transp, 2011, 9(2): 128-133.

[10] 周小兵, 蒋美芳, 徐三荣, 等. 大鼠心脏腹部和颈部移植模型的建立与比较[J]. 江苏大学学报(医学版), 2010, 20(1): 25-28.

[11] 余春俊, 王贤灿, 戴仕林, 等. 单术者制作大鼠腹腔异位心脏移植模型操作技巧[J]. 局解手术学杂志, 2017, 26(9): 638-643.

(收稿日期: 2018-11-20 修回日期: 2019-02-02)