

猪霍乱沙门菌菌蜕的制备及免疫保护效力研究

单晓枫,陈 龙,李茂辉,康元环,孙武文,张 伟,钱爱东*

(吉林农业大学动物科学技术学院,长春 130118)

[收稿日期] 2016-07-15 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2016) 09-0022-04 [中图分类号] S852.61

[摘 要] 为制备猪霍乱沙门菌菌蜕并研究其免疫保护效力,克隆噬菌体 phiX174 裂解基因 E,与 pBV220 连接,构建温控溶菌表达载体,将该载体转入猪霍乱沙门菌 TTB1 中,制备菌蜕并对其裂解率、安全性以及对小鼠的免疫保护效力进行了研究。结果显示:成功克隆了裂解基因 E、片段大小 274bp,构建了温控溶菌质粒载体 pBVE,制备了猪霍乱沙门菌菌蜕,其裂解率最高为 99.46%、经冻干灭活残余活菌,安全性试验检测证实其安全后,对小鼠进行了免疫保护试验,其保护率为 70%、与弗氏佐剂灭活苗保护率相当、优于甲醛灭活苗。研究为猪霍乱沙门菌感染的防治奠定了基础。

[关键词] 猪霍乱沙门菌;菌蜕;免疫保护效力;裂解基因 E;裂解效率

Preparation and Immune Efficacy of *Salmonella choleraesuis* Ghost

SHAN Xiao-feng, CHEN Long, LI Mao-hui, KANG Yuan-huan,

SUN Wu-wen, ZHANG Wei, QIAN Ai-dong*

(College of Animal Science and Technology, Jilin Agricultural University, Changchun, Jilin 130118, China)

Abstract: In order to develop a *Salmonella choleraesuis* bacterial ghost vaccine and investigate its protective immunity. This study, we cloned the lysis gene E from phage phiX174 and inserted into an temperature-induced expression plasmid pBV220 vector, and then wastransformed into *Salmonella* TTB1. We created the *Salmonella choleraesuis* ghost and studied its lytic efficiency and protective immunity. The results showed that the lysisgene E about 274 bp was clone, the temperature-induced lytic plasmid pBVE and *Salmonella choleraesuis* bacterial ghost were created. The lysis rate can be 99.46% and no life bacteria survived after freeze drying, The results of protective immunity showed that *Salmonella* ghost group providethe protection rate of 70%, The protection rate ofplasmid-type *Salmonella* ghost vaccine strain was comparable with that of *Salmonella* inactivated vaccine with adjuvant, which was better than that of the inactivated vaccine. The research provides a foundation for the prevention and treatment of diseases caused by *Salmonella choleraesuis*.

Key words: *Salmonella choleraesuis*; bacterial ghost; protective immunity; lysis gene E; lysis efficiency

基金项目: 吉林省现代农业产业技术体系建设项目(201634)

作者简介: 单晓枫,博士,副教授,从事动物细菌学方面的研究;陈龙,博士研究生,从事动物分子细菌学方面研究,与单晓枫为共同第一作者。

通讯作者: 钱爱东. E-mail: qianaidong0115@163.com

猪霍乱沙门菌(*Salmonella choleraesuis*)是沙门菌属的一个代表种,其可以感染2~4月龄的仔猪,引起败血症计肠炎,是仔猪副伤寒的主要病原菌之一^[1-2]。此外,该菌也侵害其他动物,还引起人类的食物中毒、伤寒、败血症等,是典型的人兽共患病原菌^[3-4]。预防猪霍乱沙门菌感染的有效手段是疫苗接种,目前,国内已有减毒疫苗使用^[5],但减毒活疫苗存在毒力返强以及与野毒株发生重组而出现新毒菌株的危险。

菌蛻(bacterial ghost)是近年来新发展起来的一种新型死菌苗,其一般是由 phiX174 噬菌体的裂解蛋白 E,在格兰阴性菌表面形成一种特异性跨膜通道,胞内物质通过通道排出,从而形成一个菌体完好、表面抗原结构完整的细菌空壳^[6]。由于菌蛻的各种表面抗原结构完整,因此具有良好的免疫原性;而且,抗原蛋白、核酸等均可导入菌蛻中,因此菌蛻是良好的递送系统具有很好的佐剂功能^[7-8]。

目前,我国沙门菌菌蛻的研究并不多见^[9-10],而有关猪霍乱沙门菌菌蛻的研究更未见报道,鉴于此,研究通过构建猪霍乱沙门菌菌蛻,并对其免疫保护效力进行研究,为猪霍乱沙门菌引发疾病的预防奠定基础。

1 材料与方法

1.1 菌株与质粒 猪霍乱沙门菌 TTB1,吉林农业大学预防兽医学实验室分离并保存;大肠杆菌 DH5 α , 全式金公司; pBV220, 上海北诺生物科技有限公司; 大肠杆菌噬菌体 phiX174 RFI DNA, BioLabs公司。

1.2 主要试剂 ExTaq DNA 聚合酶、dNTP、限制性内切酶(PstI 和 BamH I)、T4 连接酶、pMD18-T 载体等, TaKaRa 公司; 质粒提取试剂盒、氨苄西林(Amp)、胶回收试剂盒, 北京索莱宝生物公司; 其余均为国产或进口分析纯。

1.3 裂解基因 E 的克隆 依据 phiX174 RFI 裂解基因 E 序列设计一对引物: P1: GGATCCCATGG-TACGCTGGACTTTG(下划线为限制性酶切位点 *Bam*HI)、P2: CTGCAGTCACTCCTTCTGCACGTA(下

划线为限制性酶切位点 *Pst*I), 并送至华大基因公司合成。

以 phiX174 RFI 基因组为模板, PCR 扩增裂解基因 E, 扩增条件为: 94 $^{\circ}$ C 4min, 94 $^{\circ}$ C 1min, 53 $^{\circ}$ C 1 min, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 30 循环, 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测并回收, 与 pMD18-T 载体 16 $^{\circ}$ C 连接过夜, 构建重组质粒 pMD18T-E, 转入 DH5 α , 经 PCR 及双酶切鉴定, 阳性克隆送至华大基因公司测序。

1.4 溶菌质粒载体的构建 用 PstI 和 BamH I 双酶切 pMD18T-E 与 pBV220 质粒, 酶切反应条件: 37 $^{\circ}$ C 2h、30 $^{\circ}$ C 2 h, 分别回收目的片段, 16 $^{\circ}$ C 连接过夜, 并转化至 DH5 α 内, PCR 鉴定, 阳性者送至华大基因公司测序, 并将重组质粒命名为 pBVE。

1.5 猪霍乱沙门菌菌蛻的制备 将溶菌质粒 pBVE 转化入自制的猪霍乱沙门菌感受态细胞中, Amp 抗性筛选, 挑取白色菌落接种于 5 mL 含 Amp 的液体 LB 培养基中, 28 $^{\circ}$ C 过夜, 提取质粒, PCR 鉴定, 阳性克隆继续扩增培养, 并于次日取 100 μ L 转至 50 mL 液体 LB 中, 28 $^{\circ}$ C 170 r/min, 培养至 OD₆₀₀ 为 0.4 时, 升温 42 $^{\circ}$ C, 诱导 6 h, 测定 OD₆₀₀ 及活菌数, 以此观察裂解效果。

1.6 裂解率测定及电镜观察 分别计算 42 $^{\circ}$ C 诱导前后的活菌数, 依据公式: 裂解率 = (1 - 诱导后 CFU/诱导前 CFU) $\times$ 100%, 计算裂解率。

将收集的菌蛻按参考文献^[9]方法处理, 并使用扫描电镜观察。

1.7 菌蛻安全性试验 将制备的猪霍乱沙门菌菌蛻经冻干处理, 以破坏活菌菌体, 经无菌检验合格, 免疫注射健康小鼠 10 只, 每只 1.0 mL。连续观察 14 d 小鼠健康状况, 同时设 PBS 作为对照。

1.8 菌蛻免疫保护效力实验 分别制备猪霍乱沙门菌的甲醛灭活苗、弗氏佐剂灭活苗, 并无菌检验。

将 120 只 6~8 周龄昆明鼠随机分为灭活组、灭佐组、菌蛻 BG 组、PBS 组等 4 组, 30 只/组。其中, 灭活组、灭佐组、菌蛻 BG 组免疫剂量为 1×10^8 CFU/只, PBS 组每只注射 200 μ L 无菌 PBS。共

分为3免、两周免疫1次。将三免后的小鼠分别感染猪霍乱沙门菌 TTB1, 5×10^8 CFU/只, 连续观察14 d, 记录并计算免疫保护率。

2 结果

2.1 噬菌体 phiX174 裂解基因 E 的克隆 以 phiX174 基因组为模板, PCR 扩增裂解基因 E, 电泳结果显示: 在 300 bp 左右有目的条带(图 1) 连接 pMD18-T, 构建 pMD18T-E, 经双酶切与 PCR 鉴定, 阳性克隆者测序, 结果显示扩增的 DNA 片段长 274 bp, 经比对, 与 phiX174 裂解基因 E 同源性为 100%。

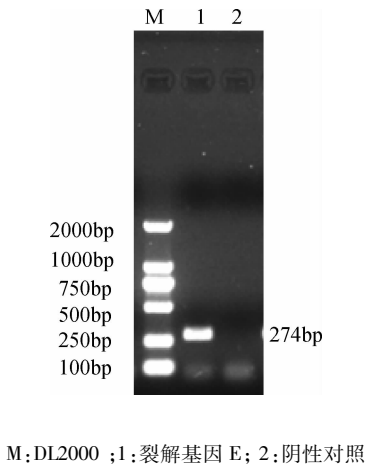


图 1 裂解基因 E PCR 扩增产物电泳图

2.2 溶菌质粒载体的构建 将重组质粒 pBVE 双酶切, 并电泳检测, 其出现两条目的条带, 与预期结果相符(图 2)。温控溶菌质粒载体构建成功。

2.3 猪霍乱沙门菌菌蛻株的鉴定

pBVE 转化至猪霍乱沙门菌感受态细胞中, Amp 抗性筛选, 出现白色单个菌落(图 3), 挑取并扩增培养, PCR 鉴定, 出现目的条带, 菌蛻株制备成功。将菌蛻株 28℃ 170 r/min 培养至 OD₆₀₀ 0.4 时, 开始 42℃ 诱导 6 h, 其 OD₆₀₀ 值上升、单活菌数下降。2.4 裂解率的测定与扫描电镜观察 通过活菌计数, 诱导前活菌数为 6.1×10^7 CFU/mL, 诱导后活菌数为 3.3×10^5 CFU/mL, 依据公式, 裂解率为 99.46%。冻干处理后, 无活菌存在。

经扫描电镜观察, 溶菌孔道位于细菌的两端, 有大量内容物排出, 细菌形态基本没有改变, 但有

明显皱缩(图 4)。

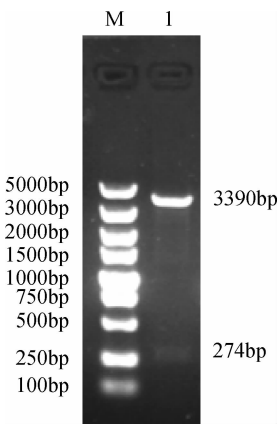


图 2 重组表达质粒 pBVE 酶切鉴定结果

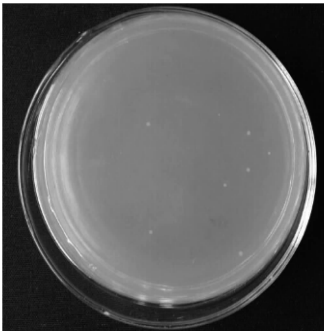


图 3 沙门氏菌重组菌株生长结果图

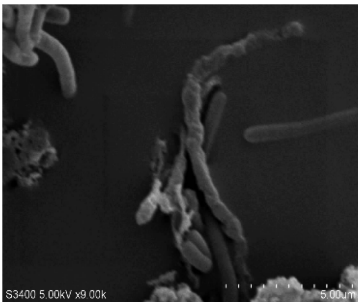


图 4 猪霍乱沙门菌 TTB1 菌蛻扫描电镜图片(20000 ×)

2.5 菌蛻安全性与免疫保护效力试验 将菌蛻与 PBS 分别免疫小鼠, 二组小鼠在一周内均出现体重略有下降、一周后恢复正常的现象, 其余无临床异常现象。

用猪霍乱沙门菌 TTB1 对免疫后的小鼠进行攻毒试验, 结果显示: 菌蛻 BG 组、甲醛灭活组、佐剂灭

活组的保护率分别是:70%、60%、70%,PBS 对照组发病死亡。

3 讨论

菌蛻是革兰阴性菌以物理化学方法制备的细菌空壳,其有多种制备方法。本研究是以温控表达系统控制 phiX174 裂解基因 E 的表达,在 42℃ 发挥最大裂解效应,从而实现猪霍乱沙门菌的裂解,进而制备菌蛻。

通过前期试验摸索,当沙门菌 28℃ 生长至 OD₆₀₀ 为 0.4 左右时,开始 42℃ 诱导,可达到理想效果,但如果大于 0.4,则裂解效率较低。因此,本实验在沙门菌 28℃ 生长至 OD₆₀₀ 为 0.4 左右时 42℃ 诱导 6 h,裂解效率最高可达 99.46%。但在诱导 7 h 甚至更长时间时,仍可检测到活菌存在,这与温晶、吕敏娜等^[10-11] 研究结果类似。而未被裂解的活菌蛻株膜上存有裂解 E 蛋白,如果进行无保护剂的冻干,其要比没有携带 E 蛋白的菌株更易破裂^[12],因此,为保证菌蛻使用的安全性,本研究采用冻干法将残余活菌灭活。

在正式免疫试验之前,本研究对菌蛻以及其他 2 种疫苗进行动物安全性试验,结果显示,三种疫苗均安全可以进行下一步试验。而在安全性试验中,所有免疫小鼠(包括 PBS 组)均出现体重暂时下降,而后有恢复正常,出现这种现象的原因可能与免疫注射产生的应激有一定关联。虽然免疫保护效力试验显示,菌蛻组与佐剂灭活苗组的免疫保护效力相当,但是菌蛻不含有甲醛、对机体没有不良刺激,且菌蛻有佐剂功能、没有遗传物质^[13-15],因此,菌蛻与传统疫苗相比,其生物安全性更高,具有更好的应用前景。

本研究成功的构建了温控溶菌质粒载体 pBVE,制备了猪霍乱沙门菌菌蛻,小鼠试验表明,其具有一定的保护力。研究为猪霍乱沙门菌菌蛻的临床应用奠定基础。

参考文献:

[1] John S G, Joanna M M, Stephen B, *et al.* Salmonella chronic carri-

age: epidemiology, diagnosis, and gallbladder persistence [J].

Trends in Microbiology, 2014, 22(11): 648-655.

- [2] 王 蓓,杨 环,尚宏霞,等.三级综合医院 69 株沙门菌分布特征及耐药性分析[J].海南医学,2016,27(3):428-430.
- [3] 宗 萍,詹震泽.人血流感染猪霍乱沙门菌 8 例临床分析[J].吉林医学,2015,36(3):470.
- [4] 加春生,毛泽明,耿明杰,等.猪沙门菌分离株的毒力及耐药特征[J].中国兽医科学,2015,45(02):190-194.
- [5] 徐黎娟,李求春,刘 杰,等.猪霍乱沙门菌疫苗株 C500 毒力致弱的主要原因是 rpos 基因的缺失[J].中国人兽共患病学报,2015,31(10):908-913.
- [6] Gentschev I, Dietrich G, Spreng S, *et al.* Recombinant attenuated bacteria for the delivery of subunit vaccines [J]. Vaccine, 2001, 19(17-19): 2621-2628.
- [7] Nishikawa H, Tsuji T, Jager E, *et al.* Induction of regulatory T cell-resistant helper CD4+ T cells by bacterial vector [J]. Blood, 2008, 111(3):1404-1412.
- [8] Reschel T, Konak C, Oupicky D, *et al.* Physical properties and in vitro transfection efficiency of gene delivery vectors based on complexes of DNA with synthetic polycations [J]. J Control Release, 2002, 81(1-2):201-217.
- [9] 郭荣显,耿士忠,焦红梅,等.噬菌体裂解 E 蛋白介导鸡白痢沙门菌跨膜孔道的电镜观察[J].电子显微镜像,2014,33(1):80-83.
- [10] 温 晶,寇志华,于 虹,等.人伤寒沙门菌 Ty21a 菌蛻的制备 [J]. 中国人兽共患病学报,2011,27(6):479-483.
- [11] 吕敏娜,覃宗华,余劲术,等.鸭源大肠杆菌 O78 菌蛻的制备及免疫原性研究[J].中国预防兽医学报,2010,09(32):712-715.
- [12] 吴忆春.猪大肠杆菌 O139 菌影的制备及其裂解效率[J].中国兽医科学,2013,43(05):476-479.
- [13] Paukner S, Stiedl T, Kudela P, *et al.* Bacterial ghosts as a novel advanced targeting system for drug and DNA delivery [J]. Expert Opin DrugDeliv, 2006, 3(1):11-22.
- [14] Kudela P, Paukner S, Mayr U B, *et al.* Bacterial ghosts as novel efficient targeting vehicles for DNA delivery to the human monocyte-derived dendritic cells [J]. J Immunother, 2005, 28(2):136-143.
- [15] Ebensen T, Paukner S, Link C, *et al.* Bacterial ghosts are an efficient delivery system for DNA vaccines [J]. J Immunol, 2004, 172(11):6858-6865.

(编辑:陈 希)