

鼠伤寒沙门氏菌 SL7207 *SifA*⁻ 突变株的构建和鉴定

张晓明 焦新安* 唐丽华 潘志明 殷月兰

(扬州大学 农业部畜禽传染病学重点开放实验室 扬州 225009)

摘 要 鼠伤寒沙门氏菌 *SifA*⁻ 基因突变株的特点是能进入真核细胞的胞液。利用 P22 噬菌体转导技术构建了鼠伤寒沙门氏菌疫苗株 SL7207 的 *SifA*⁻ 突变株 SL7207* ,该突变株与 SL7207 有着相似的体外生长曲线和细胞侵袭力, SL7207* 在 MDCK 上皮细胞中的增殖能力增强,但在 RAW264.7 巨噬细胞中的生存能力减弱。小鼠毒力试验显示 SL7207* 在 BALB/c 小鼠体内毒力下降。仅 SL7207* 在体外可向 RAW264.7 巨噬细胞递送真核表达质粒。SL7207* 的构建为重组沙门氏菌疫苗载体的研制提供了一个新的选择。

关键词 鼠伤寒沙门氏菌, P22 噬菌体, *SifA* 基因, 疫苗载体

中图分类号: Q78 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209(2005)03-0349-06

鼠伤寒沙门氏菌是一种能够感染多种动物的革兰氏阴性兼性胞内菌,它侵入细胞后存在于独特的囊膜结构——含沙门氏菌囊泡(Salmonella containing vacuole, SCV)中,沙门氏菌通过毒力岛 2(SPI-2)的 III 型分泌系统分泌效应分子干扰宿主细胞的杀菌机制,修饰 SCV 使其适合沙门氏菌的生存,目前已有近 20 个效应分子被鉴定,它们在沙门氏菌感染的不同阶段起作用^[1-2]。*SifA* 是 SPI-2 III 型分泌系统分泌的一个效应分子,SCV 膜的稳定依赖于 *SifA*,*SifA* 基因突变的沙门氏菌不能维持 SCV 膜的完整性,从而易被释放至细胞胞液中^[3-4]。

利用减毒细菌作为载体是新型疫苗的发展方向之一,减毒沙门氏菌遗传背景清楚,易于操作和控制,因此减毒沙门氏菌作为载体有很大的优势。减毒沙门氏菌可被用来作为原核表达各种外源抗原的载体,但减毒沙门氏菌的一个特点是被细胞吞噬后不能逃逸至细胞胞液,因此细菌胞内表达的抗原不能有效进入 MHC I 类抗原途径,从而不能诱导有效的 CTL 效应^[5-7]。近年来还发现,减毒沙门氏菌可作为 DNA 疫苗的载体,但一些研究发现,减毒沙门氏菌作为其运送载体效果并不十分理想,一个主要的因素可能是细菌不能进入胞液。*SifA* 作用的发现使得构建主动进入细胞胞液的减毒沙门氏菌疫苗载体成为可能。SL7207 为 *aroA* 基因缺失的鼠伤寒沙门氏菌疫苗株,本研究利用 P22 噬菌体转导技术构建

了减毒鼠伤寒沙门氏菌 SL7207 *SifA*⁻ 突变株,比较了它与 SL7207 在体外和体内的生长特性,并且发现 SL7207 *SifA*⁻ 突变株在体外能有效向小鼠 RAW264.7 巨噬细胞递送真核表达质粒。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株、噬菌体、质粒、细胞株和小鼠 鼠伤寒沙门氏菌 P3HC(*sifA* : Δ mTn5[Kmr]in 12023)由英国皇家学院 Dr. Holden 惠赠^[4],鼠伤寒沙门氏菌 LB5000 和 P22(Ht int)噬菌体由美国 Loma Linda 大学 Dr. Bullas 惠赠,鼠伤寒沙门氏菌 SL7207(*aroA*⁻)由美国 Stanford 大学 Dr. Stocker 惠赠。真核表达质粒 pEGFP-N1 购自美国 BD Biosciences Clontech 公司。小鼠巨噬细胞系 RAW264.7(ATCC TIB71)由法国巴斯德研究所的 Dr. Leclerc 惠赠,犬肾上皮细胞株 MDCK(ATCC CCL-34)购自中国科学院生物化学与细胞生物研究所。BALB/c 小鼠购自扬州大学比较医学中心,体重 20~25g。

1.1.2 试剂 *Taq* 酶、dNTP、卡那霉素、庆大霉素购自华美生物工程有限公司,蛋白胨和酵母提取物为 Oxoid 公司产品,用其配制成 LB 液体培养基以及含 1.5% 琼脂的 LB 固体培养基。DMEM 培养基购自 Sigma 公司。细菌 DNA 提取试剂盒购自大连 TaKaRa 公司。常规生化试剂均为国产分析纯。

基金项目 国家自然科学基金项目(30170700,30425031),全国优秀博士学位论文作者专项基金资助项目(FANEDD 200358)

* 通讯作者。Tel: 86-514-7979091; Fax: 86-514-7311374; E-mail: xajiao@yahoo.com

作者简介 张晓明(1977-)男,江苏如东人,博士研究生,主要从事新型疫苗分子免疫学研究。E-mail: zxmzysj@yahoo.com

其他作者 刘秀梵

收稿日期 2004-11-09,修回日期 2005-03-08

1.2 P22 介导 *sifA* : λ mTn5 向 SL7207 的转导试验

1.2.1 P22 噬菌体的繁殖:挑取 LB5000 单个菌落接种 2mL LB 培养液,37℃ 振荡培养过夜。取该过夜培养物接种到 4mL P22 肉汤中,37℃ 振荡培养 5~8h,然后加入数滴氯仿,振荡数秒混匀,4000r/min 离心 20min,弃去细胞和细胞碎片,吸取上清液,4℃ 保存备用。以文献 [8] 的方法测定 P22 裂解液中噬斑形成单位 (pfu)。

1.2.2 制备转化菌 P22 裂解液:以沙门氏菌 P3H6 为裂解对象,方法同上。

1.2.3 P3H6 P22 裂解液对 SL7207 的转导:将 SL7207 接种至 4mL LB 培养液,37℃ 振荡培养过夜。取等体积 SL7207 培养物和经过适当稀释的 P3H6 P22 裂解液混合均匀,于室温下放置 1~2h,然后均匀涂布含 50 μ g/mL 卡那霉素的 LB 平板,37℃ 培养 24h,筛选卡那霉素抗性的转导子菌落。

1.2.4 SL7207 *SifA*⁻ 突变株的鉴定:将卡那霉素抗性的转导子细菌接种 EBU 平板(含埃文思蓝 1% 荧光素钠盐 1%),挑选出浅绿色菌落。进一步采用 PCR 鉴定 *sifA* 基因是否被插入突变。根据沙门氏菌 *SifA* 基因(GenBank 登录号 U51867)设计引物,正义引物:5'-ACTCCAGTATAAGTGAGATTAATATGCC-3',反义引物:5'-CCTGAAACGTCTTATCCGCTAGTA-3'。PCR 反应条件 94℃ 30s,62℃ 30s,72℃ 50s,共 30 个循环。观察是否出现 843bp 的目的条带。SL7207 *SifA*⁻ 突变株命名为 SL7207*。

1.3 沙门氏菌体外生长试验

从 LB 平板上挑取 SL7207 和 SL7207* 单菌落,接种 2mL LB 培养液 200r/min 振荡培养过夜,第 2 天移种 10mL LB 培养液,并将菌液调整至相同的吸光度 ($OD_{600} = 0.1$),在不同的时间点吸取菌液测定 OD_{600} 的吸光度。

1.4 沙门氏菌 SL7207* 突变株的遗传稳定性试验

1.4.1 体外遗传稳定性试验:SL7207* 单菌落接种 2mL LB 培养液培养至指数后期,然后按 1:100 的比例再接种新鲜的培养液,如此连续接种 50 次,在第 10,20,30,40,50 次取 0.1mL 菌液系列稀释后涂布含和不含卡那霉素的 LB 平板,培养 24h 后计数菌落数,随机挑取 10 个菌落进行 *SifA* 基因的 PCR 扩增。

1.4.2 体内遗传稳定性试验:BALB/c 小鼠腹腔接种 SL7207* 1.0×10^6 CFU,在感染后第 7 天无菌取小鼠的脾脏,加 1mL 0.1% Triton X-100 的 PBS 研磨,然后用 PBS 作梯度稀释,方法同体外试验,涂布含和不含卡那霉素的 LB 平板,培养 24h 后菌落计数和

PCR 鉴定,并任意取一菌落,细菌扩增后继续感染小鼠,如此进行 6 次感染和鉴定。

1.5 沙门氏菌感染细胞试验

1.5.1 细菌侵袭力和胞内生存试验:MDCK 细胞培养于不含抗生素的 DMEM 完全培养基(含 10% 小牛血清),感染前 16h 按每孔 10^5 个细胞接种 24 孔板。另取单菌落沙门氏菌接种 2mL LB 培养液,静置培养至晚指数期 ($OD_{600} = 1.3 \sim 1.5$),用无抗生素的不完全 DMEM 培养基(不含小牛血清)洗涤 3 次并悬浮于该培养基中,按 30:1 的细菌细胞比例感染细胞,1000g 室温离心 10min,然后 37℃ 5% CO_2 放置 20min, PBS (pH7.4) 洗涤 3 次,换含 80 μ g/mL 庆大霉素的 DMEM 完全培养基作用 1h,之后再将培养基中庆大霉素的浓度调至 10 μ g/mL。RAW264.7 细胞在感染前 16h 接种量为每孔 2.5×10^5 个细胞,沙门氏菌培养至中指数期 ($OD_{600} = 0.8 \sim 1.0$),其余步骤与感染 MDCK 细胞相同。在感染的不同时间点计数细胞内的细菌,将感染细胞用含 0.1% Triton X-100 的 PBS 洗涤 3 次,每孔加入 1mL,室温作用 10min,然后吹打均匀, PBS 作梯度稀释后涂布 LB 平板,培养 24h 后计数菌落数。

1.5.2 体外真核表达质粒递送试验:用携带 pEGFP-N1 的 SL7207 和 SL7207* 感染 RAW264.7 细胞,方法同上面的感染试验,在感染后的 24h,48h,72h 用荧光显微镜(Leica MPS 60)观察是否有发绿色荧光的细胞并拍照。

1.6 沙门氏菌感染小鼠试验

1.6.1 混合感染试验^[9]:经静脉或腹腔接种 8~10 周龄 BALB/c 小鼠,每只小鼠接种 200 μ L PBS 悬浮的菌液。细菌悬液的制备程序如下:SL7207 和 SL7207* 培养至指数期,用 PBS 洗涤两次,测定、调整细菌浓度,感染前将两种细菌悬液混合,静脉接种的剂量为每种细菌 2.5×10^5 CFU,腹腔接种的剂量为每种细菌 5.0×10^5 CFU,接种剂量均经平板计数确认。在感染后的不同时间点,无菌取小鼠的脾脏,加 1mL 0.1% Triton X-100 的 PBS 研磨,然后用 PBS 作梯度稀释,涂布含和不含卡那霉素的 LB 平板,培养 24h 后计数菌落数。SL7207* 为卡那霉素抗性,在含卡那霉素的 LB 平板上生长,而在 LB 平板上生长的菌落数为 SL7207 和 SL7207* 的总数。每个时间点扑杀 3 只小鼠。竞争指数(C.I.)的计算如下:

$$C.I. = \frac{\text{免疫后 SL7207* 菌数} / \text{SL7207* 接种菌数}}{\text{免疫后 SL7207 菌数} / \text{SL7207 接种菌数}}$$

1.6.2 单独感染试验:BAI/R/c 小鼠分为两组,分别

腹腔接种 SL7207 或 SL7207* 1.0 × 10⁶ CFU,在感染后的不同时间点每组扑杀 3 只小鼠,用 LB 平板计数脾脏中的细菌数,同时称取脾脏的重量。统计学分析采用 Student's *t* 检验。

2 结果

2.1 SL7207 *SifA*⁻ 突变株的获得和鉴定

鼠伤寒沙门氏菌 P3H6 中的 *SifA* 基因被转座子 mTn5 插入突变,mTn5 的插入位点被定位于 *SifA* 基因 ORF 的 44 和 139 核苷酸之间^[3]。采用沙门氏菌噬菌体 P22 转导技术将 P3H6 中的 *SifA* 基因 mTn5 插入突变转入鼠伤寒沙门氏菌疫苗株 SL7207,用卡那霉素 LB 平板筛选出抗性菌落,并经 EBU 平板鉴定,最后 PCR 确认 *SifA* 基因被突变,新的 *SifA*⁻ 突变株命名为 SL7207*。PCR 鉴定结果显示 SL7207 可扩增出 843bp 的目的片段,转导后的 SL7207* 因 *SifA* 基因中插入了 mTn5 转座子而不能扩增出相应的片段。

2.2 SL7207 和 SL7207* 的体外生长曲线

SL7207 和 SL7207* 等量接种 LB 液体培养基,在不同的时间动态测定菌液的光密度,结果显示 SL7207 和 SL7207* 在体外 LB 液体中具有相似的生长曲线(图 1),说明 *SifA* 基因的突变不影响 SL7207* 的生长。

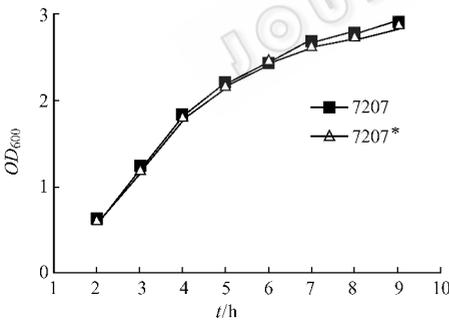


图 1 鼠伤寒沙门氏菌 SL7207 和 SL7207* 的体外生长曲线

Fig.1 The growth curve of *Salmonella typhimurium* SL7207 and SL7207*

2.3 沙门氏菌 SL7207* 突变株的体内、外遗传稳定性

沙门氏菌 SL7207* 突变株在体外进行 50 次传种,均未发现卡那霉素抗性丢失或 *SifA* 基因的回突变;体内试验也得到了相同的结果,这说明 SL7207* 的 *SifA* 基因转座子插入突变是稳定的。

2.4 鼠伤寒沙门氏菌感染细胞试验结果

2.4.1 SL7207 和 SL7207* 对 MDCK 和 RAW264.7 细胞的侵袭力:从图 2 可见,SL7207 和 SL7207* 都能有效侵入 MDCK 上皮细胞和 RAW264.7 巨噬细胞,两

种细菌的侵袭力无明显差异。

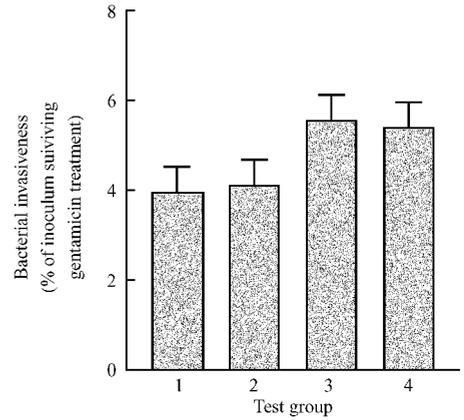


图 2 鼠伤寒沙门氏菌 SL7207 和 SL7207* 对 RAW264.7 和 MDCK 细胞的侵袭力

Fig.2 Invasiveness of *Salmonella typhimurium* SL7207 and SL7207* for RAW264.7 cell and MDCK cell

Bacterial invasiveness was quantified as the percent of the inoculum that could enter cell and thus survive subsequent treatment of gentamicin. Each strain was infected in triplicate and the SDs from the means were shown. 1. RAW264.7 cell infected with SL7207; 2. RAW264.7 cell infected with SL7207*; 3. MDCK cell infected with SL7207; 4. MDCK cell infected with SL7207*.

2.4.2 SL7207 和 SL7207* 在 MDCK 和 RAW264.7 细胞中的生存能力:SL7207 和 SL7207* 感染 MDCK 细胞和 RAW264.7 细胞后,呈现出不同的生存和增殖能力。SL7207* 在 MDCK 上皮细胞中的增殖能力超过了 SL7207,在感染后 8h,SL7207* 增殖倍数达到 28 倍,而 SL7207 仅增殖 6~7 倍(图 3-A),在感染后的 10~12h,SL7207* 感染孔有超过 50% 的细胞死亡、脱落,因此感染 MDCK 细胞的试验截止时间选为

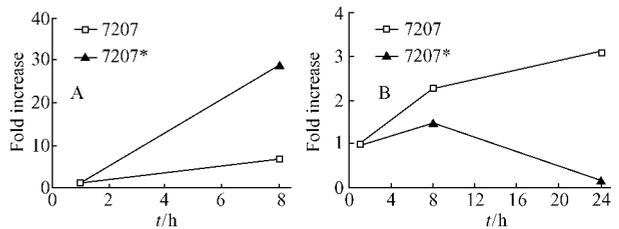


图 3 鼠伤寒沙门氏菌 SL7207 和 SL7207* 在 MDCK 和 RAW264.7 细胞内的增殖曲线

Fig.3 Growth curve of *Salmonella typhimurium* SL7207 and SL7207* within RAW264.7 cell and MDCK cell

The values shown represent the fold increase calculated as a ratio of intracellular bacteria between 1 and 8/24 h post-take. Each strain was infected in triplicate and the SDs from the means were shown. The results shown are representative of three independent experiments. A. MDCK cell infected with SL7207 and SL7207*; B. RAW264.7 cell infected with SL7207 and SL7207*.

8h。两种细菌在 RAW264.7 巨噬细胞中的生存能力与在 MDCK 细胞中的却不相同,在 24h 感染试验中,SL7207 在 RAW264.7 细胞中有小幅度的增殖(约 3 倍)而 SL7207* 在 RAW264.7 细胞中生存力下降,约有 80% 的细菌死亡(图 3-B)。

2.5 SL7207 和 SL7207* 感染小鼠试验结果

2.5.1 混合感染试验结果 混合感染试验是将两种沙门氏菌混合后再感染小鼠,通过测定两种细菌数量在体内的相对变化来判断毒力的变化^[9],这种方法的优点是能克服小鼠的个体差异,所需试验小鼠数量也较少。SL7207 和 SL7207* 混合感染 BALB/c 小鼠的结果见图 4,可见 SL7207* 在小鼠体内的毒力降低,腹腔接种和静脉接种所得结果类似。

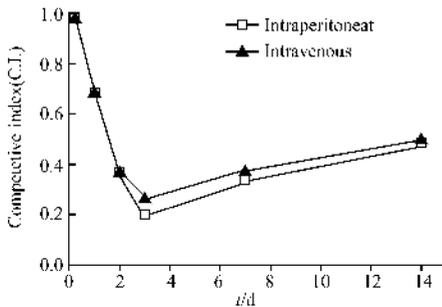


图 4 SL7207* 在 BALB/c 小鼠体内毒力降低(混合感染试验)

Fig. 4 Reduced virulence of *Salmonella typhimurium* SL7207* in BALB/c mice detected by mixed infection

The competitive index (C.I.) was calculated by the method indicated in material and method. BALB/c mice were inoculated with mixed SL7207 and SL7207* intraperitoneally or intravenously. At each time point the SDs from the means were shown.

2.5.2 单独感染试验结果 :为进一步测定沙门氏菌的毒力变化,分别以 SL7207 和 SL7207* 腹腔接种 BALB/c 小鼠。与 SL7207 相比,SL7207* 在小鼠体内的生存能力下降(图 5-A),与此对应的是,SL7207 感染组的小鼠脾脏重量在 14d 内不断增加,而 SL7207* 感染组的小鼠脾脏重量在感染初期(前 3d)增加,随后保持稳定。两组小鼠脾脏重量在 14d 时有显著差异($P < 0.05$) (图 5-B)。

2.6 SL7207* 能在体外向 RAW264.7 细胞递送真核表达质粒

将质粒 pEGFP-N1 分别转化进 SL7207 和 SL7207*,然后感染 RAW264.7 细胞。在感染 24h 后,在荧光显微镜下就可以观察到 SL7207* (pEGFP-N1) 感染孔中有少量细胞表达 EGFP,发出强烈的绿色荧光(图 6),细胞的荧光可持续至 72h;SL7207 (pEGFP-N1) 感染孔未发现发荧光的细胞。

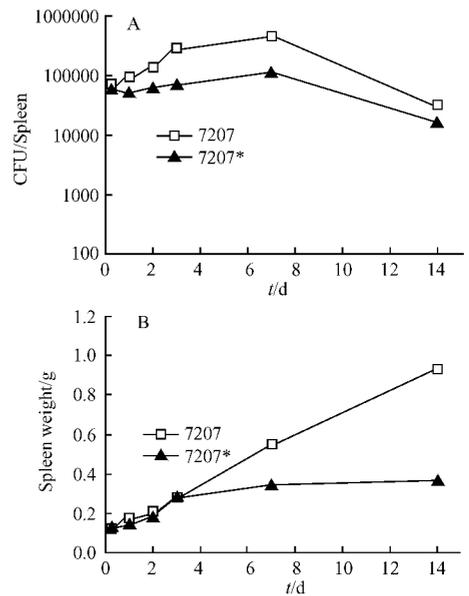


图 5 SL7207* 在 BALB/c 小鼠体内毒力降低(单独感染试验)

Fig. 5 Reduced virulence of *Salmonella typhimurium* SL7207* in BALB/c mice detected by single infection

BALB/c mice were inoculated with SL7207 or SL7207* intraperitoneally. A: The bacterial number in spleen; B: The spleen weight ($\Delta P < 0.05$ at day 14). At each time point the SDs from the means were shown.



图 6 SL7207* (pEGFP-N1) 感染 RAW264.7 细胞后的 EGFP 表达

Fig. 6 EGFP expressed within RAW264.7 cell after *Salmonella typhimurium* SL7207* (pEGFP-N1) infection

RAW264.7 cell was infected with *Salmonella typhimurium* SL7207* (pEGFP-N1) and monitored by fluorescence microscope for 72 hours. The picture shown was taken at 24 hours post-infection.

3 讨论

鼠伤寒沙门氏菌的 *siA* 基因由 Stein 等^[10]于 1996 年首次报导,该研究小组发现 *siA* 基因突变的鼠伤寒沙门氏菌不能在上皮细胞中形成一种细丝状结构——SIF (*Salmonella* induced filament),并且突变株在上皮细胞中增殖能力增强。2000 年 Beuzon 等^[3]发现沙门氏菌 *siA* 基因与 SCV 膜的稳定性有关,*siA* 基因突变在鼠伤寒沙门氏菌感染上皮细胞

和巨噬细胞后部分失去 SCV 膜,沙门氏菌被释放至胞液中。2002 年 Brumell 等^[11]采用融合标签的方法确证 SifA 为 SPI-2 III 型分泌系统的效应分子。

虽然减毒鼠伤寒沙门氏菌已被广泛作为外源抗原的运送载体,但在 CTL 应答方面却不是很理想^[5-7]。这主要是因为减毒鼠伤寒沙门氏菌侵入抗原递呈细胞后通常不能进入胞液,进而外源抗原不能有效被胞液中的 MHC I 抗原处理途径递呈。而 CTL 效应在保护性免疫应答中占据了重要的地位。针对沙门氏菌的生物学特性,一些策略已被应用以提高 CTL 应答。第一种策略是利用沙门氏菌 III 型分泌系统直接将抗原分子运送至细胞胞液中^[12],第二种策略是改变沙门氏菌在细胞内的定位,沙门氏菌被吞噬后,利用大肠杆菌 α -溶血素分泌系统将李斯特菌溶血素分泌至吞噬膜内,破坏吞噬膜,进而沙门氏菌被释放至胞液^[13]。这两种方法都取得比较好的 CTL 应答,但前者对抗原分子大小有限制,后者系统相当复杂。随着沙门氏菌与细胞相互作用机制研究的不断深入,发现 SCV 膜的稳定性依赖于多个沙门氏菌的效应分子,其中 SifA 起关键作用^[14]。*SifA*⁻ 突变株易被释放至胞液,从疫苗载体的角度考虑这种特性将会有利于激活 CTL 应答。目前还没有用鼠伤寒沙门氏菌 *SifA*⁻ 突变株作为疫苗载体的报道,我们发现鼠伤寒沙门氏菌 *SifA*⁻ 突变株 P3H6 仅单个基因突变,对小鼠毒力很大,不适合作为疫苗载体。因此我们将 *SifA* 基因的突变转入疫苗株 SL7207,并比较了 *SifA* 基因突变前后毒力的变化,结果发现 *SifA*⁻ 突变株在体外的生长和侵袭细胞的能力没有发生变化,SL7207*SifA*⁻ 突变株在上皮细胞中增殖能力上升,在巨噬细胞中生存能力下降,对小鼠的毒力降低,这与鼠伤寒沙门氏菌单一 *SifA* 基因突变株的变化趋势一致^[3,4]。SL7207*SifA*⁻ 突变株对小鼠的毒力稍弱于 SL7207,这为 SL7207*SifA*⁻ 突变株作为理想疫苗载体提供了可行性。

减毒鼠伤寒沙门氏菌另一用途是作为 DNA 疫苗的载体,SL7207 是被应用较多的一个菌株,并且取得了一定的免疫应答结果^[15,16],但一些报道结果存在着不一致^[17,18],说明利用沙门氏菌作为 DNA 疫苗的载体还需进一步改进和完善。沙门氏菌 *SifA*⁻ 突变株进入细胞胞液的这种特性将会有利于 DNA 疫苗释放进入细胞核。体外真核表达质粒递送试验显示,SL7207*SifA*⁻ 突变株可以将真核表达质粒运送给 RAW264.7 巨噬细胞并表达相应蛋白质,而 SL7207 在体外不能递送真核表达质粒至巨噬细胞

系,与 Darji 等^[15]报道一致。因此 SL7207*SifA*⁻ 突变株同时可望是一个运送 DNA 疫苗良好的候选载体。

参 考 文 献

- [1] Knodler L A, Steele-Mortimer O. Taking possession : biogenesis of the *Salmonella*-containing vacuole. *Traffic*, 2003, **4**(9): 587 - 599.
- [2] Brumell J H, Grinstein S. *Salmonella* redirects phagosomal maturation. *Curr Opin Microbiol*, 2004, **7**(1): 78 - 84.
- [3] Beuzon C R, M resse S, Unsworth K E, et al. *Salmonella* maintains the integrity of its intracellular vacuole through the action of SifA. *EMBO J*, 2000, **19**(13): 3235 - 3249.
- [4] Beuzon C R, Salcedo S P, Holden D W. Growth and killing of a *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium sifA* mutant strain in the cytosol of different host cell lines. *Microbiology*, 2002, **148**: 2705 - 2715.
- [5] Brett S J, Gao X M, Liew F Y, et al. Selection of the same major T cell determinants of influenza nucleoprotein after vaccination or exposure to infectious virus. *J Immunol*, 1991, **147**(5): 1647 - 1652.
- [6] Hess J, Gentschev I, Miko D, et al. Superior efficacy of secreted over somatic antigen display in recombinant *Salmonella* vaccine induced protection against listeriosis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, **93**(4): 1458 - 1463.
- [7] Hess J, Dietrich G, Gentschev I, et al. Protection against murine listeriosis by an attenuated recombinant *Salmonella typhimurium* vaccine strain that secretes the naturally somatic antigen superoxide dismutase. *Infect Immun*, 1997, **65**(4): 1286 - 1292.
- [8] Maloy S R, Stewart V J, Taylor R K. Genetic analysis of pathogenic bacteria : A laboratory manual. New York : Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1996.
- [9] Beuzon C R, Holden D W. Use of mixed infections with *Salmonella* strains to study virulence genes and their interactions *in vivo*. *Microbes Infect*, 2001, **3**(14 - 15): 1345 - 1352.
- [10] Stein M A, Leung K Y, Zwick M, et al. Identification of a *Salmonella* virulence gene required for formation of filamentous structures containing lysosomal membrane glycoproteins within epithelial cells. *Mol Microbiol*, 1996, **20**(1): 151 - 164.
- [11] Brumell J H, Goosney D L, Finlay B B. SifA, a type III secreted effector of *Salmonella typhimurium*, directs *Salmonella*-induced filament (Sif) formation along microtubules. *Traffic*, 2002, **3**(6): 407 - 415.
- [12] Russmann H, Shams H, Poblete F, et al. Delivery of epitopes by the *Salmonella* type III secretion system for vaccine development. *Science*, 1998, **281**(5376): 565 - 568.
- [13] Dietrich G, Hess J, Gentschev I, et al. From evil to good : a cytolyisin in vaccine development. *Trends Microbiol*, 2001, **9**(1): 23 - 28.
- [14] Ruiz-Albert J, Yu X J, Beuzon C R, et al. Complementary activities of SseJ and SifA regulate dynamics of the *Salmonella typhimurium* vacuolar membrane. *Mol Microbiol*, 2002, **44**(3): 645 - 661.

- [15] Darji A , Guzman C A , Gerstel B , *et al.* Oral somatic transgene vaccination using attenuated *S. typhimurium*. *Cell* , 1997 , **91** (6) : 765 - 775 .
- [16] Loessner H , Weiss S. Bacteria-mediated DNA transfer in gene therapy and vaccination. *Expert Opin Biol Ther* , 2004 , **4** (2) : 157 - 168 .
- [17] Grillot-Courvalin C , Goussard S , Courvalin P. Wild-type intracellular bacteria deliver DNA into mammalian cells. *Cell Microbiol* , 2002 , **4** (3) : 177 - 186 .
- [18] Garmory H S , Titball R W , Brown K A , *et al.* Construction and evaluation of a eukaryotic expression plasmid for stable delivery using attenuated *Salmonella*. *Microb Pathog* , 2003 , **34** (3) : 115 - 119 .

Construction and characterization of *Salmonella typhimurium* SL7207 *SifA*⁻ mutant strain

ZHANG Xiao-ming JIAO Xin-an* TANG Li-hua PAN Zhi-ming YIN Yue-lan
(Animal Infectious Diseases Laboratory of Ministry of Agriculture , Yangzhou University , Yangzhou 225009 , China)

Abstract : One characteristic of *Salmonella typhimurium SifA*⁻ mutant strain is to enter the cytosol of eukaryotic cells. The *SifA*⁻ mutation of *S. typhimurium* P3H6 was transferred into *S. typhimurium* vaccine vector SL7207 by P22 phage transduction and the new strain was named as SL7207* . SL7207* had similar growth curve in LB medium and similar invasiveness for eukaryotic cells. It was found that SL7207* replicates within MDCK cells at a higher rate than SL7207 , but is defective for replication in macrophage cell line RAW264.7. SL7207* was more attenuated than SL7207 in BALB/c mice when inoculated intraperitoneally or intravenously. SL7207* , but not SL7207 , could transfer eukaryotic expression plasmid into RAW264.7 cells. These results showed that SL7207* could be a promising candidate vaccine vector to express foreign antigen or act as a eukaryotic expression plasmid carrier.

Key words : *Salmonella typhimurium* , P22 phage , *SifA* gene , Vaccine vector

Foundation item : National Natural Science Foundation of China (30170700 , 30425031) ; A Foundation for the Author of National Excellent Doctoral Dissertation of PR China (FANEDD 200358)

* Corresponding author. Tel 86-514-7979091 ; Fax 86-514-7991747 ; E-mail xajiao@yahoo.com

Other author : LIU Xiu-fan

Received date : 11-09-2004

生活垃圾综合处理原理与技术(专著)

郭长军 , 许传森 , 李泽泉 编著 2004 年 11 月黑龙江人民出版社出版

RSDNT-207-00678-3/X57 ; 字数 25 万字 , 开本 : 大 32 开 , 印数 3000 册 , 定价 28.00 元

读者对象

大专院校相关专业师生、市容环境卫生管理部门、从事城市垃圾处理的相关单位 , 以及所有关心城市垃圾处理工作的社会各界读者。

内容简介

环境保护是我国的基本国策 , 而城市垃圾处理是城市环境保护的重要内容 , 也是衡量城市文明程度和城市管理水平的标志之一。近几年来 , 我国的大部分城市都正在积极的进行城市生活垃圾处理工程的探索和实践 , 但由于国内无系统的垃圾处理理论和少有成功的实例 , 而从国外引进的卫生填埋、堆肥、焚烧发电三大处理方式均不合中国国情。照搬国外垃圾处理方式建设的处理厂 , 败多成少 , 造成不小的浪费。至今 , 全国城市垃圾无公害化处理率尚不足 20% , 在全球重视环保的今天 , 城市垃圾处理工作任务十分迫切 , 任重而道远。

为探索适合中国城市生活垃圾处理的科学方案 , 在省市有关领导支持和参与下 , 黑龙江高维企业集团于今年 6 月召开了全国首次“城市生活垃圾处理方案研讨会” 。来自中国科学院、清华大学、哈尔滨工业大学、国家发改委、机械部、中石化的专家进行了认真热烈的研讨 , 确定综合处理方式是适合中国国情的最佳方式 , 是与卫生填埋、堆肥、焚烧发电三大方式并列的第四种新方式。

本书将依据研讨会学术成果 , 系统论述生活垃圾综合处理方式的基本原理和使用技术 , 明确阐述其内涵和外延。全书共分七章 30 节。