

# 重组质粒在减毒沙门氏菌中的稳定性及其对细菌侵袭力的影响

陈雪燕 JOHN M. Dikki 江玲丽 帅江冰 方维焕\*

(浙江大学动物预防医学研究所 浙江省动物预防医学重点实验室 杭州 310029)

**摘 要** 将含有外源基因的重组真核表达质粒 pcDNA3-F 和 pCI-F 转化减毒鼠伤寒沙门氏菌,探讨质粒类型和插入片段对重组质粒在细菌内的稳定性和细菌侵袭力的影响。结果表明,外源质粒可降低减毒沙门氏菌在体外的增殖能力和侵袭力,也影响细菌在鸡体内的存活力,就质粒类型而言,pCI 的影响大于 pcDNA3,而以携带外源基因的重组质粒影响较为显著;外源基因插入也影响质粒在宿主菌内的稳定性。提示利用减毒鼠伤寒沙门氏菌为载体传递 DNA 疫苗研究时,要考虑质粒类型与其在宿主菌内稳定性的关系、携带外源基因重组质粒对载体菌侵袭力和存活力的影响等问题。

**关键词** 减毒沙门氏菌 侵袭力 重组真核表达质粒 稳定性

中图分类号 S852 文献标识码 A 文章编号 0001-6209(2005)05-0744-04

以侵袭性胞内细菌为 DNA 疫苗载体是基因免疫的一个研究热点。鼠伤寒沙门氏菌(*Salmonella typhimurium*)是一种可产生局部或全身感染的胞内病原体,通过基因工程方法减毒可降低其对宿主的致病性,但仍然保持良好的侵袭力,并对粘膜组织有很强嗜性<sup>[1]</sup>。减毒沙门氏菌已被试验性地用作外源抗原基因载体,并已初步证明能直接将真核表达质粒携带进入动物细胞内,表达相应的蛋白而诱导免疫反应<sup>[2,3]</sup>。

减毒沙门氏菌的侵袭力是其作为 DNA 疫苗载体的基本要素,而外源抗原基因的稳定表达对于持续有效地激发机体的免疫应答也十分重要。目前已有研究对重组减毒菌的稳定性和侵袭力提出了质疑<sup>[3]</sup>。影响重组质粒在宿主菌内的稳定性和宿主菌的侵袭力有多种因素,如侵袭相关蛋白(三型分泌系统)<sup>[4]</sup>、细菌的培养条件(pH、渗透压和含氧量等)<sup>[5-7]</sup>、质粒类型<sup>[8]</sup>等,其中质粒类型与质粒在宿主菌内的稳定性直接相关<sup>[9]</sup>。本研究将含有外源基因(鸡新城疫病毒 F 基因)的重组真核表达质粒 pcDNA3-F 和 pCI-F 转化减毒鼠伤寒沙门氏菌,探讨重组质粒类型和外源基因插入对宿主菌稳定性和侵袭力的影响。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 质粒、菌株和细胞系 真核表达载体 pcDNA3

和 pCI、大肠杆菌(*Escherichia coli*)DH5 $\alpha$  和 HeLa 细胞系本实验室保存,真核表达质粒 pcDNA3-F 和 pCI-F 由本实验室构建<sup>[10]</sup>。减毒沙门氏菌 *Salmonella enterica* serovar Typhimurium ZJ111 株为强毒株 SL1344 的 *dam*<sup>-</sup> 和 *phoP*<sup>-</sup> 双突变株,系本室与西班牙 Sevilla 大学遗传学系 Josep Casadesus 教授合作构建而成。

**1.1.2 试剂** DMEM 培养基和胎牛血清购自 GIBICO 公司;庆大霉素硫酸盐、氨苄青霉素钠盐、*Taq* Plus 和 T4 DNA 快速连接酶等购自上海 Sangon 公司;DNA 片段快速纯化和回收试剂盒购自北京鼎国生物有限公司;*EcoR* I、*Xba* I 和 *Xho* I 等各种限制性内切酶购自大连 TaKaRa 公司;胆硫乳琼脂购自北京陆桥技术责任有限公司;其余试剂均为国产分析纯。

#### 1.2 重组质粒电转化减毒沙门氏菌

重组质粒 pcDNA3-F 和 pCI-F 电转入宿主菌减毒沙门氏菌 ZJ111 株,分别命名为 ZJ111/pcDNA3-F 和 ZJ111/pCI-F,含空质粒的 ZJ111 株分别命名为 ZJ111/pcDNA3 和 ZJ111/pCI。

#### 1.3 重组质粒体外培养减毒沙门氏菌中的稳定性

将 ZJ111/pcDNA3-F 和 ZJ111/pCI-F 以 1:1000 的比例在不含 Amp 的 LB 培养液中连续传 120 代(37 $^{\circ}$ C 震荡培养 12h 为 10 代),每隔 20 代分别在含和不含 Amp 的胆硫乳(DHL)琼脂平板上进行细菌计数,以分析其稳定性(即在含 Amp 平板上生长的细菌数/在不含 Amp 平板上生长的细菌数  $\times$  100%)。

基金项目 浙江省自然科学基金重大项目(ZA0105)

\* 通讯作者。Tel/Fax 86-571-86971242; E-mail: whfang@zju.edu.cn

作者简介 陈雪燕(1979-),女,浙江台州人,博士研究生,主要从事分子细菌学和 DNA 疫苗载体研究。E-mail: icychen231@sohu.com

收稿日期 2005-02-01,修回日期 2005-06-06

### 1.4 携带重组质粒沙门氏菌对 HeLa 细胞的粘附、侵袭力和增殖试验

参考 Gamory 等<sup>[11]</sup>的方法并加以改进。将 HeLa 细胞接种于 12 孔细胞培养板,培养液为 DMEM(含 5% 胎牛血清),37℃、5% CO<sub>2</sub> 培养至 60% ~ 80% 的细胞融合度后,用 0.01mol/L PBS(pH7.4)洗涤一次。细菌于 37℃ 静置过夜,调节 OD<sub>600</sub> 至 0.1 ~ 0.12 (10<sup>8</sup> cfu/mL),以 1:10 比例与 DMEM 培养液混合,每孔接种 0.3mL 细菌混合液,置 37℃、5% CO<sub>2</sub> 培养 1h 后,用 PBS 洗涤菌体 4 次,用 200μg/mL 庆大霉素作用 1h(37℃、5% CO<sub>2</sub>)。PBS 洗涤两次后,再换用含 10μg/mL 庆大霉素的 DMEM 培养液(2% 胎牛血清)培养至 10h、20h 和 30h,每一时间点的相应孔经 PBS 洗涤一次后,加入 1% Triton-X 100 室温 5min。侵袭率计算公式为:CFU<sub>intra</sub>/CFU<sub>added</sub> × 100 方法(其中 CFU<sub>intra</sub> 表示细胞内的细菌数,CFU<sub>added</sub> 表示加入孔中的细菌数)。而细菌粘附力的测定则在感染后 1h 经 PBS 洗涤 4 次后直接裂解。细胞裂解液经 10 倍连续稀释后,分别在含和不含 Amp 的 DHL 琼脂平板上进行细菌计数。粘附率计算公式为:CFU<sub>rec</sub>/CFU<sub>added</sub> × 100(其中 CFU<sub>rec</sub> 表示细胞裂解后的细菌数)。

### 1.5 雏鸡体内侵袭力和存活试验

将 ZJ111/pcDNA3-F、ZJ111/pCI-F、ZJ111/pcDNA3 和 ZJ111/pCI 分别以 10<sup>8</sup> cfu 口服免疫 3 日龄非免疫来航鸡,在免疫后第 3、6、10 天进行人工剖杀,用含和不含 Amp 的 DHL 平板分离肝脏和脾脏内的细菌。

## 2 结果

### 2.1 pcDNA3-F 和 pCI-F 的稳定性

在不含 Amp 的培养基中,ZJ111/pcDNA3 经 60

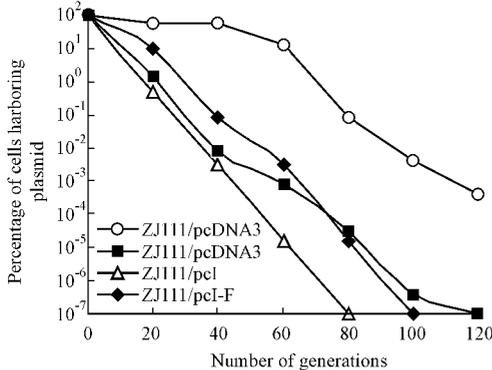


图 1 不同质粒在减毒沙门氏菌内的体外传代稳定性

Fig. 1 In vitro stability of plasmids in attenuated Salmonella typhimurium ZJ111 strain

ZJ111/pcDNA3, ZJ111/pcDNA3-F, ZJ111/pCI and ZJ111/pCI-F were passaged for approximately 120 generations in antibiotic-free LB broth. The percentage of bacteria containing the plasmids was determined by viable count on DHL agar with and without ampicillin.

代后含重组质粒菌的比例仍在 20% 以上,而 ZJ111/pCI-F 经 20 代后的比例约为 10%;ZJ111/pCI 和 ZJ111/pcDNA3-F 最不稳定,20 代时的稳定性在 1% 以下。20 代后 ZJ111/pCI-F、ZJ111/pCI 和 ZJ111/pcDNA3-F 含重组质粒菌的比例仍持续下降(图 1)。

### 2.2 携带重组质粒沙门氏菌对 HeLa 细胞的粘附、侵袭力和增殖

不含质粒的 ZJ111 株粘附率和侵袭率分别达到 59% 和 16%,均显著高于各含质粒的 ZJ111 株(P < 0.05)(图 2),而携带不同质粒(包括重组质粒)的 ZJ111 株之间无显著性差异(P > 0.05)。图 3 表明,细菌在细胞内的增殖能力因其携带的质粒的不同而有所差异,ZJ111 株在 20h 后出现了明显的增殖,而 ZJ111/pCI 和 ZJ111/pCI-F 在细胞内培养 20h 后的细菌数也明显增加,但 ZJ111/pcDNA3 和 ZJ111/pcDNA3-F 在整个培养过程中未见增殖。提示了质粒类型会影响细菌在 HeLa 细胞内的繁殖。重组质粒在细菌中的稳定性也随着培养时间的延长而逐渐降低,ZJ111/pcDNA3-F、ZJ111/pCI 和 ZJ111/pCI-F 的稳定性在 20h 后急剧下降;相比之下,ZJ111/pcDNA3 的下降程度不明显,30h 后为 51.2%,而 ZJ111/pcDNA3-F、ZJ111/pCI 和 ZJ111/pCI-F 分别只有 2.6%、0.6% 和 0.6%。表明质粒类型和插入片段会影响质粒在 HeLa 细胞内细菌中的稳定性。

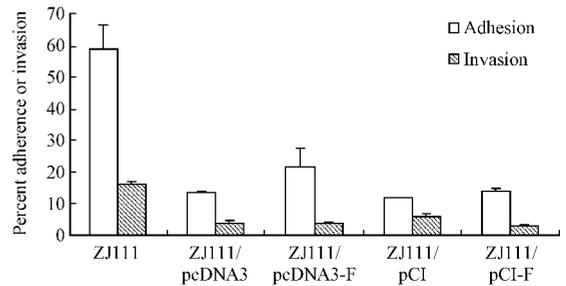


图 2 减毒沙门氏菌对 HeLa 细胞的粘附力和侵袭性

Fig. 2 Adhesion and invasion of attenuated Salmonella typhimurium containing plasmids to HeLa cells

### 2.3 携带重组质粒沙门氏菌对雏鸡的侵袭性和体内存活力

接种后 3 ~ 6d 脾脏未见有任何细菌,而只有在 10d 后的脾脏中才能分离到细菌,在不含 Amp 平板上的细菌数在 10 ~ 100 之间(黑色标记,图 4),以不含重组质粒的 ZJ111 组较高;在含 Amp 平板上的细菌数则更少(黑框标记)。肝脏则可在接种后 3d 分离到细菌,在不含 Amp 平板上的细菌数平均在 10 个以上,但除 ZJ111 株外,其余含质粒的菌株在第 6

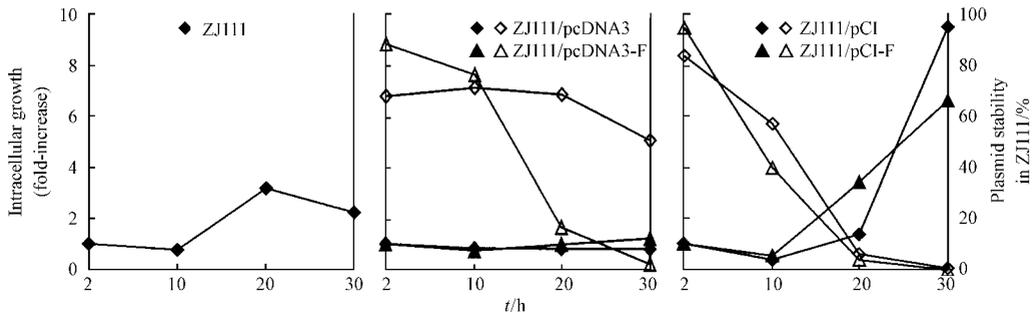


图3 含重组质粒减毒沙门氏菌在 HeLa 细胞内的增殖力和质粒稳定性

Fig.3 Growth in HeLa cells of attenuated *Salmonella typhimurium* ZJ111 containing recombinant plasmids and plasmid stability

Closed symbols represent bacterial growth and open symbols stand for plasmid stability in ZJ111. Intracellular growth was expressed as fold-increase by division of the number of bacteria recovered at 2, 10, 20 and 30h post-invasion by that of bacteria recovered at 2h post-invasion. Plasmid stability in ZJ111 was derived from division of the number of bacteria recovered on DHL agar plates containing ampicillin by that of bacteria recovered on DHL agar times 100.

天时细菌数下降,甚至未分离到细菌,而到第 10 天分离到的细菌数甚至高于第 3 天的菌数;与脾脏中的分离结果相似,肝脏中的细菌数以在不含 Amp 平板上较多,而在含 Amp 平板上较少。

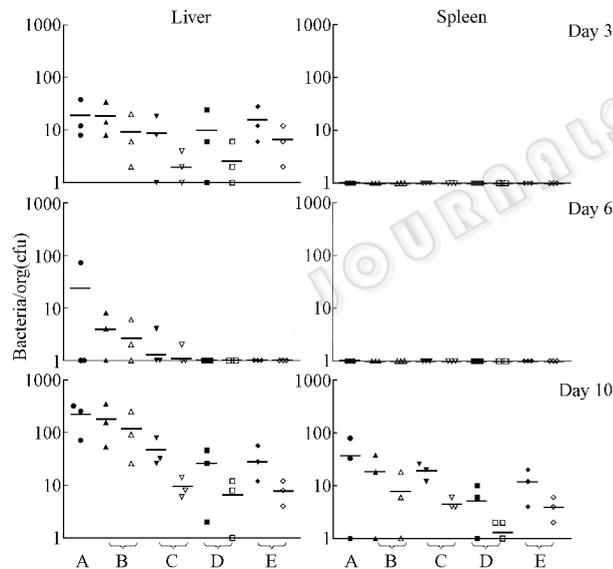


图4 含重组质粒减毒沙门氏菌在雏鸡体内的侵袭力和质粒稳定性

Fig.4 Invasion of attenuated *Salmonella typhimurium* containing plasmids in chickens and plasmid stability

Groups of chickens were orally inoculated with A: ZJ111 (●); B: ZJ111/pcDNA3 (▲△); C: ZJ111/pcDNA3-F (▼▽); D: ZJ111/pCI (■□); E: ZJ111/pCI-F (◆◇). 3, 6 and 10 days later, the chickens were killed and the numbers of bacteria (cfu) present in the liver and spleen were determined by viable counts on DHL agar plates (closed symbols) or on DHL agar containing ampicillin (open symbols). Each point represents a single chicken, three chickens per group. "—" indicates geometric mean cfu per group.

### 3 讨论

以减毒鼠伤寒沙门氏菌作为 DNA 疫苗载体是基因免疫研究的热点之一。鼠伤寒沙门氏菌通过基因工程方法减毒,在降低其毒力的同时,仍要有良好的侵袭力,才能发挥其基因疫苗的“载体”功能。

本试验探讨了含外源基因的重组质粒在减毒沙门氏菌中的稳定性以及质粒类型和外源基因插入对细菌侵袭力的影响。质粒 pcDNA3 的体外传代稳定性显著高于 pCI (图 1), pcDNA3 在 HeLa 细胞内和鸡体内的稳定性也高于 pCI (图 3, 4),可能与复制子的类型和拷贝数有关, pcDNA3 的复制子是 ColE 型,而 pCI 为 pUC 型,含 pUC 型的质粒拷贝数较高。Dunstan 等<sup>[9]</sup>通过比较不同表达质粒在沙门氏菌内的稳定性,发现低拷贝数的质粒具有较高的稳定性。而 Garmory 等<sup>[12]</sup>也通过降低拷贝数成功构建了高稳定性的表达质粒。另外,含外源基因的 pcDNA3-F 和 pCI 在 LB 培养基和 HeLa 细胞内的稳定性也显著低于不含外源基因的相应质粒,表明 F 基因的插入降低了质粒在宿主菌中的稳定性。

减毒沙门氏菌对动物细胞具有侵袭力是其作为 DNA 疫苗载体的前提条件。对 HeLa 细胞的体外侵袭力结果表明,携带质粒可影响宿主菌的侵袭力, ZJ111 的粘附力和侵袭性显著高于 ZJ111/pcDNA3-F 和 ZJ111/pCI-F (图 2)。从细胞内的增殖能力比较, ZJ111、ZJ111/pCI 和 ZJ111/pCI-F 在感染 20h 后见有显著增殖,但 ZJ111/pcDNA3 和 ZJ111/pcDNA3-F 在 30h 内未见生长 (图 3),说明细胞内的增殖能力也与质粒类型有关,携带 pCI 质粒菌在感染细胞 20h 后的快速生长是否与质粒的丢失有关值得进一步探讨。而将含或不含质粒的细菌口服感染 3 日龄非免

疫来航鸡,发现仅有少量细菌能侵入体内,并在肝脏中分离到,但在脾脏则只在接种后 10d 才能分离到(图 4)表明细菌进入体内后只有一小部分躲避免了机体免疫系统的作用而存活。同时携带质粒也可以影响细菌在体内的存活力,pcDNA3 的影响小于 pCI。

综上所述,外源质粒可影响减毒沙门氏菌对体外培养细胞的侵袭力和增殖能力,也影响细菌在鸡体内的存活力,而以携带外源基因的重组质粒影响较为显著,体内外试验结果基本一致。因此,在利用减毒鼠伤寒沙门氏菌为载体传递 DNA 疫苗研究时,要充分考质粒类型及其拷贝数与其在宿主菌内稳定性的关系、携带外源基因重组质粒对载体菌侵袭力和存活力的影响等问题,以提高免疫效果。

### 参 考 文 献

- [ 1 ] Darji A, zur Lage S, Garbe A I, et al. Oral delivery of DNA vaccines using attenuated *Salmonella typhimurium* as carrier. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 2000, **27**: 341 - 349.
- [ 2 ] Darji A, Guzman C A, Gerstel B, et al. Oral somatic transgene vaccination using attenuated *S. typhimurium*. *Cell*, 1997, **91**: 765 - 775.
- [ 3 ] Cochlovius B, Stassar M J, Schreurs M W, et al. Oral DNA vaccination: antigen uptake and presentation by dendritic cells elicits protective immunity. *Immunol Lett*, 2002, **80**: 89 - 96.
- [ 4 ] Galan J E. Molecular genetic bases of *Salmonella* entry into host cells. *Mol Microbiol*, 1996, **20**: 263 - 271.
- [ 5 ] Lee C A, Falkow S. The ability of *Salmonella* to enter mammalian cells is affected by bacterial growth state. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1990, **87**: 4304 - 4308.
- [ 6 ] Jones B D, Falkow S. Identification and characterization of a *Salmonella typhimurium* oxygen-regulated gene required for bacterial internalization. *Infect Immun*, 1994, **62**: 3745 - 3752.
- [ 7 ] Galan J E, Curtiss R. Expression of *Salmonella typhimurium* genes required for invasion is regulated by changes in DNA supercoiling. *Infect Immun*, 1990, **58**: 1879 - 1885.
- [ 8 ] Coulson N M, Fulop M, Titball R W. Effect of different plasmids on colonization of mouse tissues by the aromatic amino acid dependant *Salmonella typhimurium* SI3261. *Micro Pathog*, 1994, **16**: 305 - 311.
- [ 9 ] Dunstan S J, Simmons C P, Strugnell R A. *In vitro* and *in vivo* stability of recombinant plasmids in a vaccine strain of *Salmonella enterica* var. *typhimurium*. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 2003, **37**: 111 - 119.
- [ 10 ] 方维焕 梁雪芽. 减毒沙门氏菌为载体在 Vero 细胞中表达新城疫病毒融合蛋白. 生物化学与生物物理学报, 2002, **34**(4): 488 - 493.
- [ 11 ] Garmory H S, Griffin K F, Leary S C E, et al. The effect of recombinant plasmids on *in vivo* colonisation of *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* strains is not reflected by *in vitro* cellular invasion assays. *Vaccine*, 2002, **20**: 3239 - 3243.
- [ 12 ] 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**: 115 - 119.

## Stability of recombinant plasmids in attenuated *Salmonella typhimurium* and their effects on bacterial invasiveness and multiplication

CHEN Xue-yan JOHN M. Dikki JIANG Ling-li SHUAI Jiang-bing FANG Wei-huan\*

(Institute of Preventive Veterinary Medicine, Zhejiang University, Zhejiang Provincial Key Laboratory of Preventive Veterinary Medicine, Hangzhou 310029, China)

**Abstract:** Effects of plasmid type and insertion sequence on *in vitro* and *in vivo* multiplication and invasiveness of attenuated *Salmonella typhimurium* were examined following transformation of the bacteria with eukaryotic expression plasmids pcDNA3 and pCI with or without heterologous gene (Newcastle disease virus F gene). Exogenous plasmids had negative impacts on the replication or invasiveness of the attenuated *S. typhimurium* in LB broth and/or HeLa cell monolayers as well as on its survival in live chicks. The plasmid pCI had more significant effects than pcDNA3. Introduction of heterologous gene into the plasmids not only exhibited additional negative influence on the host strain but also on their own stability therein. All these results suggest that full consideration should be given to the types of plasmids and their stability within the host strain as well as to their effects on replication and invasiveness of attenuated bacteria as the DNA vaccine delivery vector for improved immune protection.

**Key words:** Attenuated *Salmonella typhimurium*, Invasiveness, Plasmid, Stability

Foundation item: Key Project of Zhejiang Provincial Natural Science Foundation (ZA0105)

\* Corresponding author. Tel/Fax: 86-571-86971242; E-mail: whfang@zju.edu.cn.

Received date: 02-01-2005