

肠炎沙门氏菌鸡源株 *ompR* 基因缺失株的构建及生物学特性与亲本株的比较

董洪燕, 彭大新*, 焦新安*, 张小荣, 陈素娟, 卢艳, 耿士忠, 刘秀梵

扬州大学兽医学院, 农业部畜禽传染病学重点开放实验室, 扬州 225009

摘要:【目的】为了探讨 *ompR* 基因在肠炎沙门氏菌生物被膜形成及毒力中的作用。【方法】以肠炎沙门氏菌作为母本, 运用自杀性载体 *pGMB151* 构建了 *ompR* 基因缺失株, 结晶紫染色法和扫描电镜观察测定缺失株的生物被膜形成能力, 细胞的吸附和侵入及小鼠攻毒试验测定缺失株的毒力。【结果】RT-PCR 和蛋白表达证明了 *ompR* 基因缺失株构建成功; 该缺失株不表达纤维素和菌毛, 不形成生物被膜; 上皮细胞吸附和侵入试验表明缺失株与野生株具有相同的吸附和侵入率; BALB/c 鼠腹腔感染性试验表明, 缺失株的半数致死量为 $10^{6.67}$ CFU, 而野生株的半数致死量小于 2 CFU。【结论】*ompR* 基因既是肠炎沙门氏菌生物膜形成的调控基因, 又是重要的毒力基因。

关键词: 肠炎沙门氏菌, 生物被膜, *ompR* 基因, 缺失, 毒力

中图分类号: R392 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2011)08-1256-07

沙门氏菌是人和动物的重要致病菌, 不但可引起多种畜禽疾病, 造成全身性感染、腹泻和胃肠炎, 有的还能造成人的食物中毒, 在公共卫生上十分重要。肠炎沙门氏菌主要污染蛋类和禽肉类食品, 已替代鼠伤寒沙门氏菌成为引起食物中毒最常见的病原菌之一^[1]。肠炎沙门氏菌可形成生物被膜^[2], 而细菌处于生物被膜状态可增强细菌对不利条件如干燥、极端的温度、抗菌素和消毒剂的抵抗力^[3]。这不仅使得沙门氏菌在家禽饲养环境和体内长期存在而不易被消灭, 而且以生物被膜形式存在的细菌在肉食品加工过程中不能被正常的清洗程序所去除, 这也是造成人的食物中毒的重要原因^[4]。

沙门氏菌生物被膜主要成分为菌毛和纤维

素^[5-9], 其中心调控基因为 *csgD*。该基因既可转录激活 *csgBAC* 操纵子编码合成卷曲的菌毛, 也可刺激 *AdrA* 转录间接调节纤维素的合成, 而纤维素的合成是由 *besABZC-besEFG* 操纵子调控的^[10]。虽然已鉴定出多个影响中心调控基因进而影响生物被膜形成的基因^[9-10], 但肠炎沙门氏菌生物被膜形成调节机制目前仍不清楚。前期研究我们通过转座子随机插入法鉴定了鸡肠炎沙门氏菌的生物被膜形成相关基因^[11]。本研究选择了 *ompR* 基因为靶基因, 运用自杀性载体 *pGMB151* 构建了 *ompR* 基因缺失株, 测定了该缺失株的生物被膜形成能力、细胞的吸附和侵入能力及对小鼠的感染能力, 探讨了 *ompR* 基因在肠炎沙门氏菌生物被膜形成及毒力中的作用。

基金项目: 国家自然科学基金 (30871872); 国家十一五科技支撑计划 (2009BADB9B01); 青蓝工程

* 通信作者。彭大新, E-mail: daxinpeng@yahoo.com; 焦新安, E-mail: jiao@yzu.edu.cn

作者简介: 董洪燕 (1983-), 女, 江苏盐城人, 博士研究生, 主要从事细菌性病原微生物致病机理研究。E-mail: www1956@gmail.com

收稿日期: 2011-02-14; **修回日期:** 2011-03-12

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌种和质粒: 鸡肠炎沙门氏菌 (*Salmonella enteritidis*) 参考株 C50041、自杀载体 pGMB151 ($\text{Amp}^R \text{Sm}^R$) 均由扬州大学农业部畜禽传染病学重点开放实验室收集并保存。克隆用细菌 *E. coli*. $\chi 7213$ 、S17- λpir (Sm^+) 分别由 Roy Curtiss III 博士和 Geider 教授馈赠, pUC18、pMD18-T、pBluescript SK (-)、pEM7/zeo 购于 Fermentas 和 Invitrogen 公司。

1.1.2 主要试剂和仪器: DNA 限制性内切酶、连接酶、Taq 酶、高保真酶、Genomic DNA Extraction Kit 等购自宝生物工程(大连)有限公司; PCR 产物纯化

试剂盒购自 Axygen 公司; 麦康凯琼脂购自杭州天和生物公司; 氨苄青霉素 (Amp)、链霉素 (Sm)、博莱霉素 (Zeocin)、5-溴-4-氯- β -D-半乳糖苷 (X-gal) 和异丙基硫代- β -D-半乳糖苷 (IPTG) 购自 Promega 公司; DAP、Congo red、brilliant blue G 和 calcofluor 购自 Sigma 公司; 其余常规试剂均为国产或进口分析纯产品; 台式离心机、台式冷冻离心机、核酸蛋白检测仪 (德国 eppendorf 公司); 超速离心机、高速离心机 (日本 Hitachi 公司); 恒温金属浴 CHB-100 型 (杭州大和热磁电子有限公司); PCR 仪 2400 型、BIO-RAD3000XI 型电泳仪 (美国 BIO-RAD 公司); 超净工作台 (苏净集团安泰公司)。

1.1.3 引物设计: 引物由上海生工生物工程有限公司合成 (表 1)。

表 1 PCR 扩增所用的引物序列

Table 1 The primers for PCR in this study

Primers	Prime sequences (5'→3')	Size/bp	Restriction site
ompR1	CTCGGATCCCAGACTCGCAGCCCAGGTCA	1193	<i>Bam</i> HI
ompR2	CTCGTCGACCTGCTGGAGGCTCGGCAAA		<i>Sal</i> I
ompR3	CTCGAATTCAACCTGGAAGCCCTGCTCG	3785	<i>Eco</i> RI
ompR4	CTCGAATTCCGATGAACCGATGCCGCTG		<i>Eco</i> RI
ompR5	CTCGGATCCCTGCTGGAGGCTCGGCAAA		<i>Bam</i> HI
ompR6	CGCAGGAAGAGGCCGTTAT		
ZeocinF	CACGCTGTGACAATTAAT	500	
ZeocinR	TCAGTCCTGCTCCTCGGC		
envZF	ACACGCTGGCGATCATGCTCCT	319	
envZR	CGACTCCGCGAGATAACCGTC		
ompRF	CGCTAACGCCGAGCAGATG	310	
ompRR	TAACGGCCTCTTCCTGCGA		
greBF	GTGTTGACCACGCCAGATCG	294	
greBR	CAGCGAGAATGCCGACTATCAG		

1.2 *ompR* 基因缺失株的构建

1.2.1 *ompR* 基因缺失片段构建: 以 C50041 染色体 DNA 为模板, 经 ompR1/2 引物 PCR 扩增全长 *ompR* 基因, *Bam*HI + *Sal*I 酶切后克隆至 SK 载体中获得质粒 pSK-*ompR*; 以 pEM7/zeo 为模板经 ZeocinF/R 引物 PCR 扩增 Zeocin 抗性基因, 与 T 载体连接获得 pT-Zeocin, 再以 pSK-*ompR* 为模板, ompR3/4 反向 PCR 扩增片段, 使 *ompR* 基因中间缺失 408 bp, 并接入 *Eco*RI 位点, *Eco*RI 酶切后与 pT-Zeocin 经 *Eco*RI 酶切后的 Zeocin 抗性基因连接, 获得 pSK-*ompR*-Zeocin 质粒。

1.2.2 *ompR* 基因自杀性质粒构建: 以 pSK-*ompR*-Zeocin 质粒为模板, 经 ompR1/5 引物 PCR 扩增后用 *Bam*HI 酶切克隆至 pGMB151 载体中, 转化 S17-

λpir (Sm^R) 后在含有链霉素 (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 和博莱霉素 (25 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 的固体 LB 上进行培养, 挑取抗性菌落培养后提取质粒进行酶切鉴定, 正确的重组质粒命名为 pGMB151-*ompR*-Zeocin。

1.2.3 *ompR* 基因缺失株的筛选与鉴定: 用试剂盒从 S17- λpir 中提取重组质粒 pGMB151-*ompR*-Zeocin, 并将质粒电转入 $\chi 7213$ 细菌, 获得重组菌 $\chi 7213$ (pGMB151-*ompR*-Zeocin)。以 C50041 作为受体菌, $\chi 7213$ (pGMB151-*ompR*-Zeocin) 为供体菌进行接合转移。将细菌涂布于含 3 种抗生素的 LB 平板 (Amp 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、Zeocin 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、Sm 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$), 37°C 培养过夜, 即完成将第 1 次同源重组。将第 1 次选择培养获得的菌落再次进行抗生素鉴定,

Zeocin^rSm^rAmp^r 的细菌进行第 2 次同源重组,即将菌液用无菌 10 mmol/L MgSO₄ 溶液洗两遍后悬浮,稀释涂布于含 Zeocin、10% 蔗糖、DAP 的无盐 LB (NA) 平板,37℃ 培养 24 h,通过此平板多次传代(6-8 代)后,取单菌落接种于含 Zeocin 的 NA 液体培养基中,37℃,200 r/min 培养过夜,再次用无菌 10 mmol/L MgSO₄ 溶液洗两遍后悬浮,稀释涂布于含 Zeocin、10% 蔗糖的 NA 平板,抗生素筛选出 Zeocin 抗性的细菌^[12]。阳性重组菌提取基因组,用 ompR1/5 以及 ompR2/6 鉴定。

1.3 RT-PCR 扩增

采用常规的热酚法提取 RNA,用 DNase I 处理残余的 DNA,再进行反转录。以 ompRF/R、envZF/R 和 greBF/R 为引物分别扩增 ompR、上游 envZ 基因和下游 greB 基因,观察基因是否表达。PCR 采用 50 μL 体系,扩增条件为:94℃ 5 min;94℃ 45 s,55℃ 45 s,72℃ 1 min,30 个循环;72℃ 10 min。1.5% 琼脂糖凝胶电泳后紫外灯下观察结果。

1.4 ompR 基因缺失株生长曲线的测定

挑取缺失株和野生株的单个菌落分别接种 LB 中 37℃ 培养过夜;将细菌悬浮液用 10 mL LB 稀释为 OD₆₀₀ = 0.1,37℃ 200 r/min 振荡培养,每隔 1 h 取 200 μL 细菌悬液测 OD₆₀₀ 值,连续测定 8 h。

1.5 ompR 基因缺失株外膜蛋白的测定

挑取缺失株和野生株的单个菌落分别接种于 3 mL LB,37℃ 振荡培养 15 h。取该培养物 2 mL 接种于 200 mL LB 中,37℃ 培养 15 h,于 4℃ 11700 × g 离心 10 min,沉淀悬浮于 6 mL 10 mmol/L HEPES (PH7.4) 中,75 W 超声波裂解 60 s,裂解物于 4℃ 16400 × g 离心 10 min,收集上清,加入 8 倍 2% Sakosyl 溶液,室温作用 20 min 后,于 10℃、280000 × g 离心 1 h。沉淀悬浮于 10 mmol/L HEPES,测定蛋白含量后于 10% 的分离胶进行 SDS-PAGE。

1.6 ompR 基因缺失株生物被膜的测定

1.6.1 生物被膜结晶紫染色定量法:按 Pratt 等方法进行^[13]。

1.6.2 电镜观察:细菌于聚苯乙烯玻片上(5 mm × 5 mm)28℃ 培养 48 h;取出后 3% 戊二醛固定 2 h,PBS 洗 3 次;30%、50%、70%、80%、90%、100% 无水乙醇梯度脱水,再用含有无水 Na₂SO₄ 的 100% 无水乙醇脱水;用戊酯:乙醇(1:1 以及 2:1)分别洗涤 30 min,再用纯戊酯洗涤 30 min 后进行扫描电镜观察。

1.6.3 生物被膜主要成分的测定:将过夜培养细菌取 10 μL 滴于含有 40 mg/L 的 Congo red 和 20 mg/L 的 brilliant blue G 的无盐 LB 平板及含有 200 mg/L 的 calcofluor 的无盐 LB 平板,28℃ 培养 48 h,分别于自然光和 366 nm 的紫外灯下观察。

1.6.4 菌毛蛋白的测定:细菌按 1:10 接种于细胞瓶内,28℃ 培养 48 h,离心收集细菌及生物被膜,将细菌调至 OD₆₀₀ = 3,离心后加入 100 μL SDS 加样缓冲液,煮沸 10 min,离心后用超纯水洗两遍,加 97% 的甲酸,冻干后,100 μL SDS 加样缓冲液溶解并超声波裂解 5 s,于 15% 的分离胶进行 SDS-PAGE。

1.7 ompR 基因缺失株对上皮细胞吸附和侵入试验

吸附试验按 Peng 等方法进行^[14],感染前 16 h 按每孔 1 × 10⁵ 细胞接种于 24 孔板;将细菌调至 OD₆₀₀ = 0.4,用无抗生素的 RPMI 1640 培养基洗 3 次并悬浮于该培养基中,按 100:1 的细菌/细胞比例调整细菌浓度,加入 1 mL/孔至细胞培养板,1300 × g 离心 10 min,37℃ 5% CO₂ 作用 2 h;PBS 洗 3 次,加入 300 μL 的胰酶作用 5 min,再加入 700 μL 5% BSA-PBS 吹匀,稀释涂板,培养 24 h 后计数,以粘附的细菌数/接种细菌数计算粘附率。侵入试验其它步骤同前,在 PBS 洗 3 次后,换含 100 μg/mL 庆大霉素的 RPMI 1640 培养基作用 90 min;PBS 洗 3 次,再加入 1 mL 0.1% TritonX-100 的 PBS,吹匀,PBS 稀释涂板,培养 24 h 后计数,以侵入的细菌数/接种细菌数计算侵入率。每次试验重复 2 孔,每个试验重复 3 次。

1.8 小鼠致病性试验

将细菌在 LB 固体培养基上密集划线后 37℃ 静置培养 4 h,刮下后用 PBS 稀释至预定浓度,将 72 只 6 周龄 BALB/c 小鼠随机分成 12 组,每组 6 只,腹腔接种 200 μL/只,观察两周,根据 Reed 和 Muench^[15] 的方法计算半数致死量。将 24 只 6 周龄 BALB/c 小鼠随机分成 4 组,每组 6 只,腹腔接种 10⁷ CFU 细菌,200 μL/只,分别在 6 h 和 48 h 扑杀,取血液和各个脏器研磨并稀释涂板计数测定细菌在体内的分布情况。

2 结果

2.1 ompR 基因缺失株的筛选和鉴定

以 C50041 作为受体菌,χ7213 (pGMB151-ompR-Zeocin) 为供体菌进行接合转移,通过多次传代筛选,获得 Zeocin 抗性重组菌。提取重组菌的基

基因组,用 *ompR1/5* 扩增,重组菌为 1.3 kb,野生株为 1.2 kb;用 *ompR2/6* 扩增重组菌,因 *ompR6* 设计于缺失部位,没有扩增条带,而野生株为 456bp。PCR 产物的序列测定也证明了 *Zeocin* 抗性基因已插入至细菌染色体 *ompR* 基因。

提取野生株和重组菌的总 RNA,定量后反转录,以获得的 cDNA 为模板进行 RT-PCR 扩增,野生株可扩增 319bp *envZ* 基因、310bp *ompR* 基因和 296bp *greB* 基因,而重组菌仅可扩增出 *envZ* 和 *greB* 基因,不能扩增 *ompR* 基因(图 1)。结果表明 *ompR* 基因的上游基因 *envZ* 和下游基因 *greB* 的转录并未受到影响,*ompR* 基因缺失株构建成功。

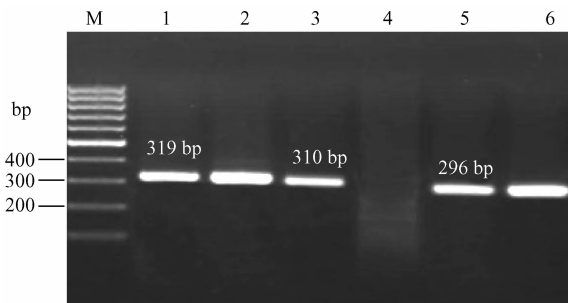


图 1 RT-PCR 扩增 *envZ*, *ompR*, *greB* 基因

Fig. 1 Amplification of *envZ*, *ompR*, *greB* genes by RT-PCR. 1, 2: *envZ* genes of C50041 and *ompR* mutant; 3, 4: *ompR* genes of C50041 and *ompR* mutant; 5, 6: *greB* genes of C50041 and *ompR* mutant.

2.2 *ompR* 基因缺失株生长特性

由生长曲线测定可知 *ompR* 基因缺失株与野生株的生长速度无明显差异

2.3 *ompR* 基因缺失株的外膜蛋白

沙门氏菌的外膜蛋白主要包括 3 种微孔蛋白 OmpF、OmpC、OmpA^[16], *ompR* 基因缺失后不能再分泌 OmpF 蛋白(图 2)。

2.4 *ompR* 基因缺失株的生物被膜形成能力

2.4.1 生物被膜表型测定: 结晶紫染色定量法显示野生株 C50041 的 OD_{550} 值为 0.75 ± 0.005 , 而 *ompR* 基因缺失株的 OD_{550} 值为 0.216 ± 0.013 , 形成生物被膜的能力显著降低。扫描电镜观察显示野生株形成密集细菌聚集和生物被膜, 而缺失株只有少量的细菌粘附, 无明显的生物被膜形成(图 3)。

2.4.2 生物被膜主要成分的测定: 在刚果红和考马斯亮蓝的无盐 LB 平板上培养后, 野生株 C50041 呈红色粗糙型菌落, 而 *ompR* 缺失株呈白色光滑型菌落(图 4-A), 说明缺失株的菌毛和纤维素的表达减少。纤维素易与荧光增白剂结合, 并且纤维素的量

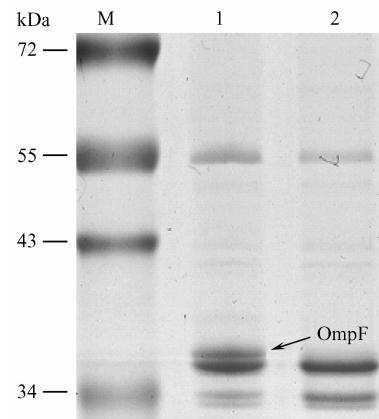


图 2 C50041 和 *ompR* 基因缺失株外膜蛋白的 SDS-PAGE 图谱

Fig. 2 Pattern of outer membrane proteins prepared from wild-type and *ompR* mutant by SDS-PAGE. 1: C50041; 2: *ompR* mutant.

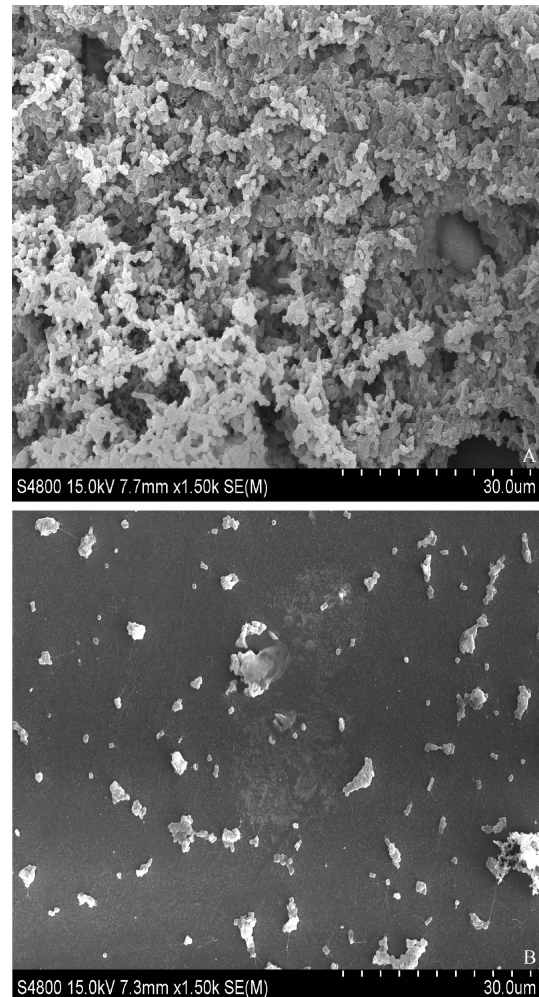


图 3 C50041 及 *ompR* 缺失株的生物被膜电镜观察

Fig. 3 Biofilm of C50041 (A) and *ompR* mutant (B) by scanning electron micrographs.

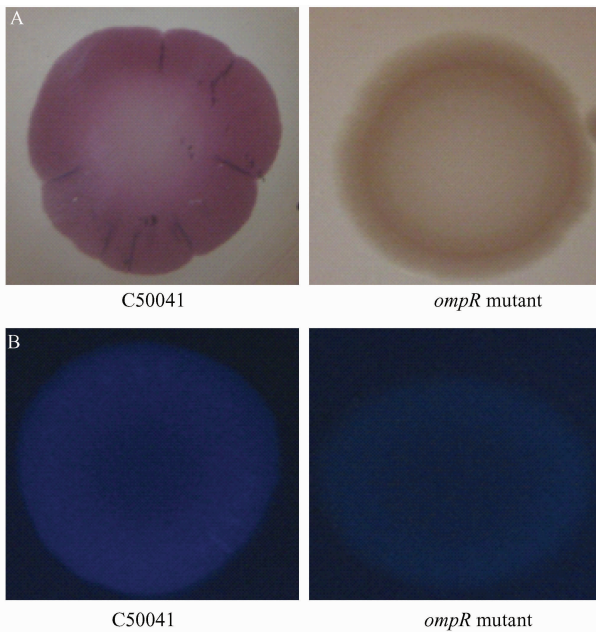


图4 C50041 和 *ompR* 基因缺失株在刚果红平板上的形态 (A) 以及在含荧光增白剂平板上的荧光 (B)
 Fig. 4 Morphotypes of C50041 and *ompR* mutant grown on plates of LB no-salt agar supplemented with Congo red and Coomassie brilliant blueG (A) or with Calcofluor (B).

和荧光亮度成正比。在含荧光增白剂的无盐 LB 平板上,野生株的荧光强度明显强于缺失株(图 4-B),表明 *ompR* 基因缺失后纤维素的表达量明显减少。提取的菌毛蛋白的 SDS-PAGE 显示,野生株于 15kDa 处有一条明显条带(图 5),与 15.3 kDa 的 CsgA 蛋白相对应,而缺失株则无此条带,表明 *ompR* 基因缺失后不表达菌毛蛋白。

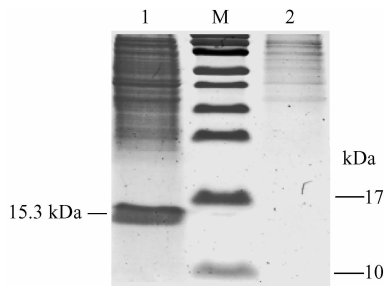


图5 C50041 和 *ompR* 基因缺失株菌毛蛋白的表达
 Fig. 5 Expression of curli protein by C50041 and *ompR* mutant.
 1. C50041; 2. *ompR* mutant.

2.5 *ompR* 基因缺失株的细胞吸附和侵入能力

当 A549 细胞或 HeLa 细胞形成单层后,以 100 MOI 的量接种野生株或缺失株细菌,吸附和侵入试验表明,不论是 A549 细胞还是 HeLa 细胞,

ompR 缺失株吸附和侵入能力与野生株相似(表 2)。

表 2 野生 C50041 和 *ompR* 突变株的细胞吸附和侵入

Table 2 The adherence and invasion assay to cells by C50041 and *ompR* mutant

Cell line	Bacteria	Adherence ratios	Invasion ratios
A549	C50041	0.40% ± 0.20%	0.40% ± 0.01%
	<i>ompR</i> mutant	0.38% ± 0.08%	0.50% ± 0.10%
Hela	C50041	0.06% ± 0.02%	0.01% ± 0.01%
	<i>ompR</i> mutant	0.06% ± 0.01%	0.05% ± 0.02%

2.6 *ompR* 基因缺失株的小鼠致病性试验

在预试验的基础上,使用不同剂量的 *ompR* 基因缺失株和野生株进行 BALB/c 小鼠腹腔攻毒,结果表明缺失株的半数致死量为 $10^{6.67}$ CFU,而野生株的半数致死量小于 2 CFU, *ompR* 基因缺失株的毒力显著降低。使用 1.9×10^6 CFU 的 *ompR* 基因缺失株和 2×10^6 CFU 野生株进行 BALB/c 小鼠腹腔攻毒,攻毒 6 h 后在血液、肝、脾、肺回收 *ompR* 基因缺失株的数量与回收的野生株的数量一致;而攻毒 48 h 后在血液、肝、脾、肺回收 *ompR* 基因缺失株的数量显著低于相应脏器中回收野生株的数量(图 6)。

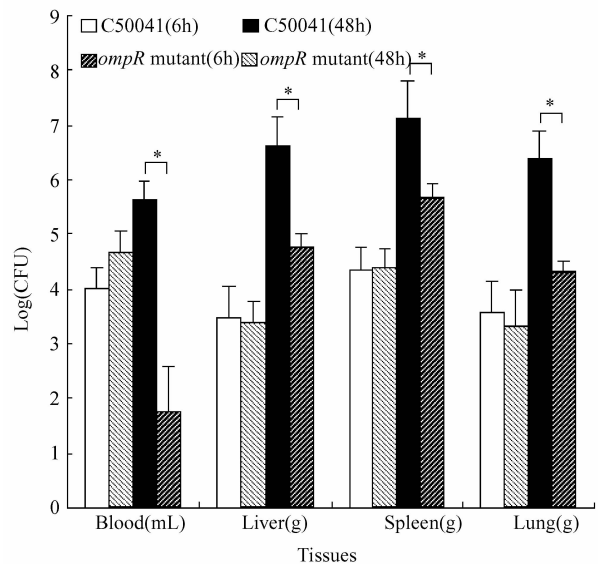


图6 攻毒后 6h 和 48 h 细菌在 BALB/c 小鼠的体内分布

Fig. 6 The distribution of bacteria in BALB/c mice at 6 h and 48 h postchallenge.

3 讨论

本研究运用自杀性载体 pGMB151 敲除肠炎沙门氏菌的 *ompR* 基因,PCR 显示所构建的缺失株于 *ompR* 基因中插入了 Zeocin 抗性基因;RT-PCR 在

mRNA 水平上显示缺失株不能表达 *ompR* 基因,也不影响 *ompR* 基因上游 *envZ* 和下游基因 *greB* 的转录; SDS-PAGE 显示缺失株的外膜蛋白模式与已构建伤寒沙门氏菌 *ompR* 基因缺失株一致^[17], 表明 *ompR* 基因缺失株已成功构建。运用结晶紫染色定量测定缺失株的生物被膜, 其 OD_{550} 值显著低于野生株, 表明缺失株生物被膜形成能力差; 扫描电镜观察野生株可形成典型的生物被膜形态, 而缺失株仅有少量细菌粘附, 不能形成生物被膜, 进一步证明 *ompR* 基因的缺失导致细菌不能形成生物被膜, 与转座子插入缺失该基因所获的表型是一致的。

沙门氏菌生物被膜的主要成分为菌毛和纤维素^[5-9], 而不同沙门氏菌在刚果红和考马斯蓝的无盐 LB 平板上培养可分为 4 种形态^[18]: (1) 红色干燥粗糙型 (RDAR), 表示该细菌可产生菌毛和纤维素; (2) 棕色干燥粗糙型 (BDAR), 表示该细菌只产生菌毛; (3) 粉色干燥粗糙型 (PDAR), 表示该细菌只产生纤维素; (4) 白色光滑型 (SAW), 表示该细菌都不产生菌毛和纤维素。我们所构建 *ompR* 基因缺失株在该平板上培养呈白色光滑型菌落, 说明其可能不表达纤维素和菌毛; 在含荧光增白剂的无盐 LB 平板上无荧光的特性和 SDS-PAGE 中无菌毛蛋白条带的特性, 进一步证明其不表达纤维素和菌毛。因此 *ompR* 基因的缺失是通过同时影响菌毛和纤维素的表达而导致其不能形成生物被膜。

已有研究表明, 伤寒沙门氏菌 *ompR* 基因缺失后毒力减弱了 10^5 倍^[19]。我们将所构建的肠炎沙门氏菌 *ompR* 基因缺失株腹腔注射小鼠, 其半数致死量为 $10^{6.67}$ CFU, 缺失后毒力减弱了 10^6 倍, 对肠炎沙门氏菌具有更强的致弱作用。细菌的粘附和侵入是病原微生物产生致病作用的关键环节之一, 但是体外试验显示缺失株和野生株对 A549 细胞或 HeLa 细胞有相似的粘附率和侵入率, 体内攻毒试验显示在攻毒后 6 h 缺失株和野生株在小鼠血液、肝、脾、肺中回收的细菌数量相近, 表明 *ompR* 缺失株的毒力下降并不是由于细菌的粘附和侵入能力变化而造成的。攻毒后 48 h, 野生株在血液、肝、脾、肺呈显著增殖趋势, 而缺失株在血液、肝、脾、肺的细菌数显著低于野生株, 说明 *ompR* 基因的缺失导致细菌更易被机体清除。因此, *ompR* 基因也是肠炎沙门氏菌重要的毒力基因。总之, *ompR* 基因不仅与肠炎沙门氏菌生物膜形成有关, 也与毒力有关, 该缺失株毒力显著下降, 却又不影响其粘附和侵入能力, 为研制减毒沙门氏菌疫苗或活载体疫苗提供了可能。

参考文献

- [1] Cogan TA, Humphrey TJ. The rise and fall of *Salmonella enteritidis* in the UK. *Journal of Applied Microbiology*, 2003, 94:114-119.
- [2] Romling U, Bokranz W, Rabsch W, Zogaj X, Nimtz M, Tschape H. Occurrence and regulation of the multicellular morphotype in *Salmonella serovars* important in human disease. *International Journal of Medical Microbiology*, 2003, 293(4):273-285.
- [3] Costerton JW, Lewandowski Z, Caldwell DE, Korber DR, Lappin-Scott HM. Microbial biofilms. *Annual Review of Microbiology*, 1995, 49:711-745.
- [4] Joseph B, Otta SK, Karunasagar I. Biofilm formation by *salmonella spp.* on food contact surfaces and their sensitivity to sanitizers. *International journal of food microbiology*, 2001, 64(3):367-372.
- [5] Danese PN, Pratt LA, Dove SL, Kolter R. The outer membrane protein, antigen 43, mediates cell-to-cell interactions within *Escherichia coli* biofilms. *Molecular Microbiology*, 2000, 37:424-432.
- [6] Kjaergaard K, Schembri MA, Hasman H, Klemm P. Antigen 43 from *Escherichia coli* induces inter- and intraspecies cell aggregation and changes in colony morphology of *Pseudomonas fluorescens*. *Journal of Bacteriology*, 2000a, 182:4789-4796.
- [7] Kjaergaard K, Schembri MA, Ramos C, Molin S, Klemm P. Antigen 43 facilitates formation of multispecies biofilms. *Environment Microbiology*, 2000b, 2:695-702.
- [8] Torres AG, Perna NT, Burland V, Ruknudin A, Blattner FR, Kaper JB. Characterization of Cah, a calcium-binding and heat-extractable autotransporter protein of enterohaemorrhagic *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology*, 2002, 45:951-966.
- [9] Latasa C, Roux A, Toledo-Arana A, Ghigo JM, Gamazo C, Penadés J, Lasa I. BapA, a large secreted protein required for biofilm formation and host colonization of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis. *Molecular Microbiology*, 2005, 58(5):1322-1339.
- [10] Anriany Y, Sahu SN, Wessels KR, McCann LM, Joseph SW. Alteration of the Rugose Phenotype in *waaG* and *ddhC* Mutants of *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium DT104 Is Associated with Inverse Production of Curli and Cellulose. *Applied and Environmental Microbiology*, 2006, 72(7):5002-5012.
- [11] Dong HY, Zhang XR, Pan ZM, Peng DX, Liu XF. Identification of genes for biofilm formation in a *Salmonella enteritidis* strain by transposon mutagenesis. *Wei sheng wu xue bao*, 2008, 48:869-873.

- [12] Geng SZ, Jiao XA, Pan ZM, Chen XJ, Zhang XM, Chen X. An improved method to knock out the *asd* gene of *Salmonella enterica* serovar Pullorum. *Journal of biomedicine & biotechnology*, 2009;646-380.
- [13] Pratt LA, Kolter R. Genetic analysis of *Escherichia coli* biofilm formation: roles of flagella, motility, chemotaxis and type I pili. *Molecular microbiology*, 1998, 30(2): 285-293.
- [14] Peng DX, Hong WZ, Choudhury BP, Carlson RW, Gu XX. *Moraxella catarrhalis* Bacterium without Endotoxin, a Potential Vaccine Candidate. *Infection And Immunity*, 2005, 73(11):7569-7577.
- [15] Reed LJ, Muench H. A simple method for estimating fifty percent endpoints. *American Journal of Epidemiology*, 1938, 27:93-497.
- [16] Norioka S, Ramakishnan G, Ikenaka K, Inouye M. Interaction of a transcriptional activator, *ompR*, with reciprocally osmoregulated genes, *ompF* and *ompC*, of *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry*, 1986, 261(36):17113-17119.
- [17] Pickard D, Li J, Roberts M, Maskell D, Hone D, Levine M, Dougan G, Chatfield S. Characterization of Defined *ompR* Mutants of *Salmonella typhi*; *ompR* Is Involved in the Regulation of Vi Polysaccharide Expression. *Infection and Immunity*, 1994, 62(9): 3984-3993.
- [18] Jain S, Chen J. Antibiotic Resistance Profiles and Cell Surface Components of *Salmonella*. *Journal of food production*, 2006, 69(5):1017-1023.
- [19] Dorman CJ, Chatfield S, Higgins C, Hayward C, Dougan G. Characterization of porin and *ompR* mutants of a virulent strain of *Salmonella typhimurium*; *ompR* mutants are attenuated in vivo. *Infection and Immunity*, 1989, 57(7):2136-2140.

Construction and characterization of an *ompR* gene deletion mutant from *Salmonella enteritidis*

Hongyan Dong, Daxin Peng*, Xin'an Jiao*, Xiaorong Zhang, Sujuan Chen, Yan Lu, Shizhong Geng, Xiufan Liu

College of Veterinary Medicine; Animal Infectious Disease Laboratory, Ministry of Agriculture, Yangzhou University, Yangzhou 225009, China

Abstract: [Objective] To investigate the role of *ompR* gene from *Salmonella enteritidis* in biofilm formation and virulence. [Methods] We constructed an *ompR* mutant of *Salmonella enteritidis* by suicide plasmid pGMB151. Biofilm forming ability of the mutant was detected by crystal violet assay and scanning electron micrography. Virulence of the mutant was determined by assay of adherence to and invasion of epithelial cells, and mouse challenge experiments. [Results] The *ompR* mutant was confirmed by RT-PCR and the pattern of outer membrane protein. The mutant did not produce cellulose, curli, and biofilm, and showed similar adherence percentage to and invasion percentage of epithelial cells as wild type strain. In addition, intraperitoneal challenge of bacteria in BALB/c mice revealed that LD₅₀ of the mutant strain was 10^{6.67} CFU, while that of the wild type strain was less than 2 CFU. [Conclusion] These data indicate that the *ompR* gene is involved in both biofilm formation and virulence in *Salmonella enteritidis*.

Keywords: *Salmonella enteritidis*, biofilm, *ompR* gene, mutant, virulence

(本文责编:王晋芳)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (30871872), by the 11th Five Years Key Programs for Science and Technology Development of China (2009BADB9B01) and by the Qinglan Project.

* Corresponding authors. Daxin Peng, E-mail: daxinpeng@yahoo.com; Xin'an Jiao, E-mail: jiao@yzu.edu.cn

Received: 14 February 2011/ Revised: 12 March 2011