

表达 SLTEC 保护性抗原的重组猪霍乱沙门氏菌 C500 株的构建及生物学特性

满晓莹, 吴斌*, 罗勇, 余腾, 赵战勤, 徐引弟, 郭爱珍, 陈焕春

(华中农业大学, 农业微生物学国家重点实验室, 武汉 430070)

摘要【目的】利用平衡致死系统构建表达产类志贺氏毒素大肠杆菌(Shiga-like toxin *Escherichia coli*, SLTEC)保护性抗原的减毒猪霍乱沙门氏菌。【方法】构建表达 SLT-IIeB-FedF 的重组质粒, 再将其电转入终宿主菌减毒猪霍乱沙门氏菌 $\Delta asdC500$ 株中构建成口服活疫苗株, 经聚丙烯酰胺凝胶电泳检测 SLT-IIeB-FedF 融合蛋白的表达情况, 并观察重组菌体外培养的稳定性和传代。【结果】利用宿主-载体平衡致死系统构建了表达 SLTEC 保护性抗原的重组减毒猪霍乱沙门氏菌, 经 SDS-PAGE 电泳出现了 1 条蛋白质质量约为 37 kDa 的蛋白条带。且在无选择压力的条件下体外能稳定地繁殖、生长和传代。【结论】成功构建表达 SLTEC 保护性抗原的重组减毒猪霍乱沙门氏菌, 为发展猪水肿病-副伤寒的口服疫苗奠定了初步基础。

关键词: 减毒猪霍乱沙门氏菌; 平衡致死系统; 产类志贺氏毒素大肠杆菌(Shiga-like toxin *Escherichia coli*, SLTEC)

中图分类号 S852.65 文献标识码 A 文章编号 0001-6209(2009)04-0518-06

猪水肿病(Porcine Edema disease, ED)是仔猪常见的一种急性致死性传染病, 主要由某些特定血清型产类志贺毒素大肠杆菌(Shiga-like toxin *Escherichia coli*, SLTEC)引起的肠毒血症^[1-2]。该病主要感染断奶仔猪, 发病率通常为 10%~35%, 死亡率可达 90% 以上, 耐过者生长缓慢, 给养猪业造成了很大的经济损失。F18ab 菌毛与类志贺毒素 II 型变异体(SLT-IIe)是致仔猪水肿病的产类志贺毒素大肠杆菌的两个主要毒力因子^[3]。FedF 基因编码菌毛粘附素, 其抗血清则可阻断病原菌对离体猪小肠微绒毛的粘附作用^[4]。SLT-IIe 由一个分子量为 33 kDa 的 A 亚基和 5 个分子量为 7.6 kDa 的 B 亚基共同组成聚合体^[5], SLT-IIeB 不具有酶活性作用, 但

具有免疫原性, 是水肿病毒素的主要保护性抗原^[6]。两者融合表达对预防仔猪水肿病提供了新的思路^[7]。猪霍乱沙门氏菌(*Salmonella choleraesuis*)是导致 2~4 月龄仔猪患副伤寒的主要病原菌, 但同时沙门氏菌作为一种胞内侵袭菌, 能有效呈递抗原, 在激发抗沙门氏菌免疫反应的同时诱导产生针对外源蛋白的特异性体液与细胞免疫反应, 并能同时激发有效的粘膜免疫与全身免疫等。因此, 沙门氏菌作为一种口服疫苗载体越来越得到人们的重视并且得到广泛应用。基于以上考虑, 本试验以实验室已经构建的猪霍乱沙门氏菌 $\Delta asdC500$ 为载体^[8], 实现 SLT-IIeB 与 FedF 联合在 C500 平衡致死系统中的表达。最终为免疫防治猪水肿病与沙门氏菌病提供新

基金项目: 国家“863 计划”(2006AA10A206); 国家科技支撑计划(2006BAD06A18-2)

* 通信作者。Tel: +86-27-87286974; E-mail: wub@mail.hzau.edu.cn

作者简介: 满晓莹(1983-) 湖北人, 硕士研究生, 研究方向为细菌分子生物学和基因工程疫苗。E-mail: manxiaoying2002@yhaoo.com.cn

收稿日期: 2008-10-20; 修回日期: 2009-01-14

的选择。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 质粒、菌株和培养条件 :受体菌株大肠杆菌 (*Escherichia coli*) DH 5 α (F- ϕ 80dlacZ Δ M15 Δ lacZYA-argF) U169 ,deoR ,recA1 ,endA1 ,hsdR17(rk- ,mk +) ,phoA ,supE44 λ - ,lhi-1 ,gyrA96 ,relA1) ,表达菌株 BL21 (F- ,ompT ,hsdS(rBB-mB -) ,gal ,dem ,DE3) 由本实验室保存 ;产类志贺毒素大肠杆菌 (WH3) 由本实验室分离保存 猪霍乱沙门氏菌弱毒疫苗株 asd⁻ C500 本实验室构建 ;pYA3493(Asd⁺ ,pBRori , β -lactamase signal sequence) 及其宿主菌 x6097(ara Δ (lac-pro) rps1 Δ asdA4 Δ [zhf-2 : :Tn10] thi ϕ 80d/lacZ Δ M15) 由美国华盛顿大学 Dr. Roy Curtiss III 教授惠赠 ;PMD18-T 购自 TaKaRa 公司。大肠杆菌和沙门氏菌在 LB 37 $^{\circ}$ C 静止(固体) 或振荡(液体) 培养 , 根据需要加

入氨苄青霉素 (Amp) , 终浓度 100 mg/L , asd 缺失株培养时加入 2,6-二氨基庚二酸(DAP) , 终浓度 50 mg/L。

1.1.2 主要试剂和仪器 :DAP(2,6-二氨基庚二酸) 购自上海 Sigma 公司 ;各种内切酶、T4DNA 连接酶、Taq DNA 聚合酶等均购自大连 TaKaRa 公司 ;DNA 回收试剂盒购自上海生工生物工程有限公司 ;小量质粒提取试剂盒和基因组提取试剂盒购自北京 TianGen 公司。胰蛋白胍 (Tryptone) 和酵母浸出物购自英国 Oxoid 公司 ;氯化钠、葡萄糖、琼脂粉等常规试剂均购自中国医药 (集团) 上海化学试剂公司 ;生化鉴定管购自杭州天和微生物试剂有限公司。Eppendorf 离心机 , 购自德国 Eppendorf 公司 ;Bio-Rad 电转仪 , 购自美国 Bio-Rad 公司。

1.1.3 引物 :用于扩增及鉴定的引物见表 1 , 引物由上海生工生物工程公司合成。

表 1 本研究所用引物

Table 1 Primers used in this study

Primer name	Primer sequence(5'→3')	The length of fragment/bp	Restriction site
pS1	TTTAAGAATTCGCGGATTGTGCTAAAGG	204	EcoR I
pS2	TTTAAGTCGACGTTAAACTTCACCTGG		Sal I
pF1	TAATGTCTGACACTCTACAAGTAGAC	840	Sal I
pF2	TTTAAGTCGACGCTACTTATTACGCGATG		Hind III
pi1	CAGGATACCTATAGTGCTGC	580(<i>Salmonella</i>)	/
pi2	CGCACCGTCAAAGGAACCGT		
pa5	TTCCTTTCCAACCTGCTGAGC	180 \times (wt)	/
pa6	TCCTATCTGCGTCGTCCTAC	315(Δ asd)	
pa7	TGGACAATGTTACCGATAA	371 \times (wt)	/
pa6	TCCTATCTGCGTCGTCCTAC	222 \times (Δ asd)	
pYA	AATGAGCTGTGACAATTAATCA	120 \times (pYA-SF)	/

1.2 SLT-IIeB 和 FedF 基因片段的克隆、重组质粒 pYA-SLT-IIeB-FedF 的构建与鉴定

PMD18-T-SLT-IIeB-FedF(缩写为 PMD18-SF) 的获得方法参照文献 [7] 基因的来源为实验室最新分离大肠杆菌 WH3 , 引物为表 1 所列。用 EcoR I 和 Hind III 同时双酶切质粒 PMD18-SF 与穿梭质粒 pYA3493 将连接产物转化 Asd⁻ 大肠杆菌 χ 6097 , 筛选阳性克隆 , 提取 pYA-SLT-IIeB-FedF(缩写为 pYA-SF) 质粒进行酶切鉴定并进行序列测定。

1.3 表达 SLT-IIeB 和 FedF 基因片段的重组菌株的构建

将重组质粒 pYA-SF 电转化 Δ asdC500 感受态细胞 , 在 DAP 阴性平板上筛选阳性克隆 , 挑取单菌落进行培养 , 并用引物 pa7/pa6、pS1/pS2 和 pF1/pF2 进行 PCR 鉴定。重组菌株命名为 C501(pYA-SF)。

1.4 重组菌株 C501(pYA-SF) 的表型鉴定

分别将 C501(pYA-SF) 重组菌株、亲本菌株 C500 及其徐引弟构建的 C500 平衡载体表达系统菌株 Δ asdC500(pYA3493) 划线接种 LB 平板 , 然后分别转接葡萄糖、乳糖、蔗糖、鼠李糖、甘露糖、阿拉伯糖、木糖、卫矛醇、尿素等碳源生化鉴定管进行生化反应。

1.5 重组菌株 C501(pYA-SF) 的生长特性研究

将 C501(pYA-SF) 重组菌株在 LB 中 37 $^{\circ}$ C 培养过夜 , 连续 10 倍稀释 , 选取 3 个合适的稀释度 , 每个稀释度取 100 μ L 在 LB 平板上轻轻均匀晃开 , 各做 3 个重复 , 37 $^{\circ}$ C 培养过夜 , 计数 , 取平均值 , 并计算原液的 CFU。转接终浓度为 10⁶ CFU/mL , 37 $^{\circ}$ C 200 r/min 培养 , 每 1 h 取样同上法计数并测 OD₆₀₀ 值 , 绘出生长曲线。同样的方法绘制亲本菌株 C500 及其徐引

弟构建的 C500 平衡载体表达系统菌株 Δ_{asd} C500 (pYA3493) 的生长曲线, 并比较其生长特性的差别。

1.6 重组菌株 C501(pYA-SF) 的遗传稳定性

将 C501(pYA-SF) 重组菌株在 LB 固体平板上划线培养, 挑取单菌落到 LB 液体培养基中, 37°C, 200 r/min 培养 16 h, 按 1:100 的比例转接到 LB 液体培养基中培养 12 h, 再次按 1:100 的比例转接到 LB 液体培养基中, 连续进行 50 次转接。用引物 pS1/pS2 和 pF1/pF2 进行 PCR 扩增, 扩增质粒在重组菌中的遗传情况。

1.7 重组菌株 C501(pYA-SF) 的分泌表达

挑取重组菌株 C501(pYA-SF) 的单菌落在 LB 液体培养基中, 37°C、200 r/min 培养 12 h, 4°C 放置 12 h, 按 1:100 的比例转接 LB 培养基再培养 6 h, 8000 × g 离心 10 min 收集菌体。上清液经 0.22 μm 滤膜过滤, 加等体积冰冷 20% 三氯乙酸冰浴 20 min, 12000 × g 离心 20 min, 沉淀用 1 mL 无水乙醇洗涤, 12000 × g 离心 5 min, 重复洗涤 1 次, 将两者进行 SDS-PAGE。并使用制备的兔抗 HIS-SLT-IIeB-FedF 血清进行 Western blot 分析。

1.8 重组菌株 C501(pYA-SF) 对小鼠的毒力试验

为测定构建的重组菌株 C501(pYA-SF) 对 BALB/c 小鼠的安全性, 将 40 只 BALB/c 小鼠分成两个大组, 每个大组又分为 4 小组, 每小组分别腹腔注射 2.1×10^5 CFU、 2.1×10^6 CFU、 2.1×10^7 CFU 和 2.1×10^8 CFU。记录死亡情况并按照 R-M 法进行计算小鼠半数致死剂量 (LD50)。评价 C501(pYA-SF) 重组菌株与亲本菌株 C500 相比毒力是否减弱以及对小鼠是否安全。

2 结果

2.1 SLT-IIeB 和 FedF 基因片段的克隆、重组质粒 pYA-SF 的构建与鉴定

电泳结果显示所扩增的 SLT-IIeB 和 FedF 基因片段大小约为 204 bp, 840 bp, 与预期片段大小相符, 初步证实扩增产物为所需目的片段。连接 pYA3493, 得到的重组质粒酶切后在 1000 bp 左右有所需目的融合基因(图略)。

2.2 表达 SLT-IIeB 和 FedF 基因片段的重组菌株的构建

用引物 pa7/pa6 对重组菌株进行鉴定, 可以扩增出 Δ_{asd} 缺失型 2229 bp 片段, 而亲本菌 C500 则扩增出 3717 bp 的片段; 引物 pS1/pS2 扩增出 SLT-IIeB 特异性片段 204 bp, 引物 pF1/pF2 扩增出 FedF 特异

性片段 840 bp, 而亲本菌 C500 则不能扩增出该两种片段(图 1)。

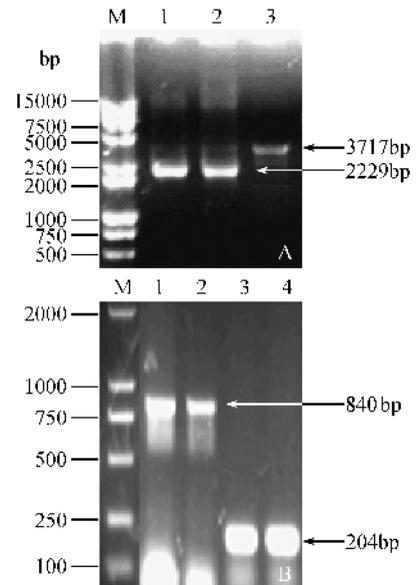


图 1 重组菌株 *asd* 缺失 PCR 鉴定(A) 和不同引物 PCR 鉴定重组菌(B)

Fig. 1 (A) PCR amplification to identify recombinant *asd* deleted mutants. M. DNA marker (DL 15,000); 1-2. Recombinant strains; 3. Parent strain C500. (B) PCR amplification to identify bacteria with the different pairs of primer. 1-2. Identification of FedF gene; 3-4. Identification of SLT-IIeB gene.

2.3 重组菌株 C501(pYA-SF) 的表型鉴定

将质粒 pYA3493 和 pYA-SF 电转化 Δ_{asd} C500 缺失株, 构建的重组空载体菌株 Δ_{asd} C500(pYA3493) 和表达 SLTEC 基因的重组菌株 C501(pYA-SF) 恢复了在不含 DAP 的培养基上生长的能力, 这说明 pYA3493 和 pYA-SF 质粒在 Δ_{asd} C500 菌株内能够表达 DAP 并与后者的 *asd* 基因的缺失形成互补。与亲本菌株 C500 相同, 重组菌株 C501(pYA-SF) 能够利用麦芽糖, 在加麦芽糖的麦康凯琼脂上呈红色菌落, 在 LB 平板上长成无色、光滑、湿润的乳白色菌落(图 2)。生化鉴定结果表明, Δ_{asd} C500(pYA3493) 和 C501(pYA-SF) 与亲本菌 C500 不能利用乳糖、蔗糖、阿拉伯糖、半乳糖醇和尿素, 但是能利用麦芽糖、葡萄糖、鼠李糖、甘露糖和木糖作为唯一碳源。

2.4 重组菌株 C501(pYA-SF) 的生长特性研究

从 C501(pYA-SF) Δ_{asd} C500(pYA3493) 与亲本菌株 C500 的生长曲线(图 3) 也可以看出, C501(pYA-SF) 生长速度与亲本菌株 C500 相似, 而 C500 缺失菌株 Δ_{asd} C500(pYA3493) 的生长速度比亲本菌株 C500 偏慢。

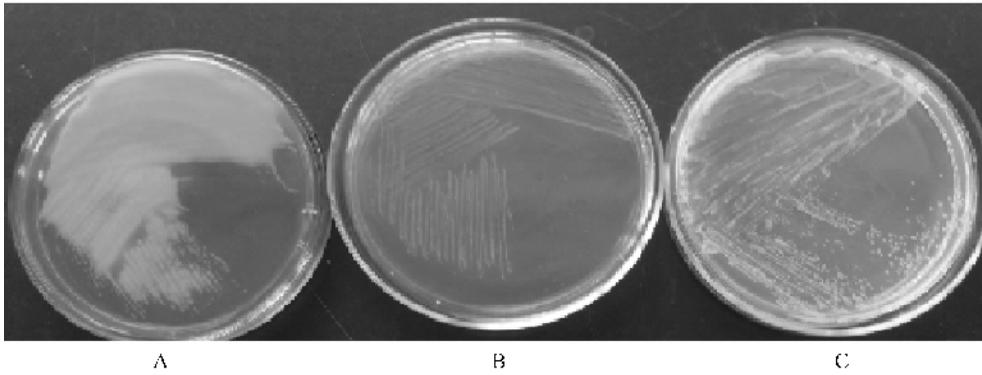


图 2 重组菌株 C50I(pYA-SF) 的生长情况

Fig.2 The growth of C50I(pYA-SF) on different base agar. A :MacConkey plate with 1% maltose ; B :MacConkey plate ; C :LB plate.

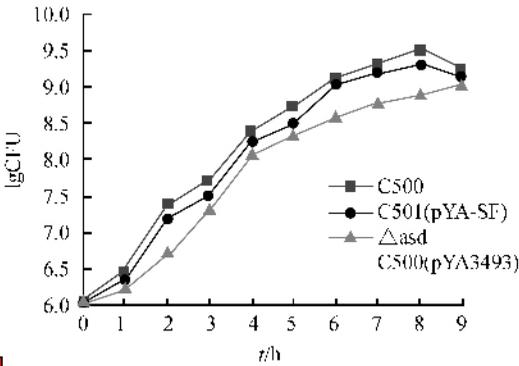


图 3 亲本菌株 C500、C50I(pYA-SF) 重组菌株和 ΔasdC500(pYA3493) 菌株的生长曲线

Fig.3 The growth curves of parent strain C500 , the C50I(pYA-SF) and ΔasdC500(pYA3493) .

2.5 重组菌株 C50I(pYA-SF) 的遗传稳定性

将 C50I(pYA-SF) 在 LB 液体培养基中连续传 50 代 , 分别取含有相同 CFU 的第 1、10、20、30 和 50 代的培养物为模板 , 用引物 pS1/pS2 进行 PCR 检测重组质粒 pYA-SF 在 ΔasdC500 中的遗传稳定性。结果表明 , 第 1、10、30 和 50 代均能扩增出 204 bp 的 DNA 条带 , 其亮度没有差别 (图 4)。

2.6 重组菌株 C50I(pYA-SF) 的分泌表达

SDS-PAGE 结果显示 , 重组菌株 C50I(pYA-SF) 在约 37 kDa 处有明显的表达带 , 而空载体对照菌株 ΔasdC500(pYA3493) 则没有对应的表达带。Western blot 分析表明 , 该重组蛋白能够与在大肠杆菌中表达的重组蛋白 HIS-SF 的兔抗血清发生特异性反应 (图 5)。

2.7 重组菌株 C50I(pYA-SF) 的毒力测定

将重组菌株 C50I(pYA-SF) 与亲本菌株 C500 分别计数后 , 每只小鼠腹腔注射适当浓度的 500 μL 菌液 , 观察 20 d , 记录死亡情况 (表 2) 。死亡小鼠心血接种麦康凯平板 , 分离到无色透明中等大小的纯菌

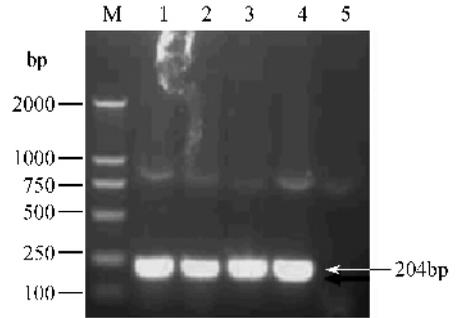


图 4 重组菌株 C50I(pYA-SF) 的遗传稳定性结果

Fig.4 Stable maintenance of pYA-SF plasmid in recombinant ΔasdC500 strain. M. DNA marker(DL2000) ; 1-4. Different single colony of PCR results ; 5. Parent strain C500.

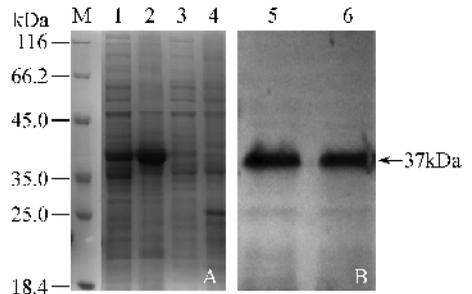


图 5 rSLT-IIeB - FedR (缩写为 rSF) 在 ΔasdC500 突变株中的表达

Fig.5 Expression of rSF in *S. choleraesuis* ΔasdC500 mutant. M. Protein Marker. A : SDS-PAGE analysis. 1. Supernatant of C50I(pYA-SF) ; 2. Total-cell extract of C50I(pYA-SF) ; 3. C50I(pYA3493) ; 4. C500. B : Western blot analysis of C50I(pYA-SF) . 5. Supernatant ; 6. Total-cell extract.

落。用引物 pi1/pi2 扩增沙门氏菌属特异性 invA 基因 , 用引物 pYA/pF2 扩增 pYA-SF 质粒的基因片段 , 用引物 pa5/pa6 扩增沙门氏菌的 asd 基因片段 , 均扩增出预期 580 bp、1206 bp 和 315 bp 的特异性 DNA 条带。根据 Reed-Muench 法计算细菌的 LD₅₀ , 结果表明 : 重组菌株 C50I(pYA-SF) 的 LD₅₀ 为 1.5 × 10⁷ CFU ,

C500 LD₅₀ 为 3.3×10^6 CFU, 重组菌株的毒力较亲本菌株 C500 降低了 4.5 倍。这说明 C501(pYA-SF) 重组菌株与已被证明安全的弱毒疫苗亲本菌株 C500 相比, 毒力更低。

表 2 重组菌株 C501(pYA-SF) 与亲本菌株 C500 毒力比较试验

Table 2 The virulence of C501(pYA-SF) compared with the parent C500 strain

Test strains	Infection dose	The total of test mice	deaths	LD ₅₀ (CFU)
Parent strain	2.0×10^5 CFU	5	0	3.3×10^6
C500	2.0×10^6 CFU	5	3	
	2.0×10^7 CFU	5	4	
	2.0×10^8 CFU	5	5	
	2.0×10^5 CFU	5	0	1.5×10^7
Recombinant strain C501 (pYA-SF)	2.0×10^6 CFU	5	1	
	2.0×10^7 CFU	5	3	
	2.0×10^8 CFU	5	5	

3 讨论

近 20 年来, 以沙门氏菌作为载体表达外源抗原的多价重组活疫苗发展迅速。沙门氏菌可作为活疫苗载体携带多种细菌、病毒或寄生虫的免疫原性基因, 组成沙门氏菌病和其它疾病的多价重组基因工程活疫苗。减毒沙门氏菌可将克隆有异源抗原基因的真核表达质粒携带释放入宿主深部淋巴细胞, 使异源抗原基因在淋巴细胞的真核环境中进行表达。另外, 沙门氏菌重组活疫苗还具有副作用低等诸多优点。沙门氏菌的 Asd⁺ 平衡致死表达系统由缺失其生存所必需的 *asd* 基因的亲本菌和含有 *asd* 基因的互补质粒组成。该系统可以显著提高携带外源基因的质粒在沙门氏菌载体菌株中的存在和稳定表达, 且不降低其自身针对沙门氏菌感染的免疫效力。pYA3493 是一个含有 *asd* 基因的互补质粒, 由于该质粒同时含有沙门氏菌 β -lactamase 的信号肽序列和 12 个氨基酸的 N 端序列, 使其能够引导分泌外源蛋白到细胞质中并增强其免疫应答反应。因此, 该质粒已被应用到多种沙门氏菌 Asd⁺ 平衡致死表达系统中表达外源蛋白^[9]。

猪霍乱沙门氏菌 C500 弱毒株是我国广泛使用的预防仔猪副伤寒的标准疫苗株。C500 株是上世纪 60 年代将猪霍乱沙门氏菌强毒株在含醋酸铊的普通肉汤中传代 500 次后筛选出的一株具有良好免

疫原性的弱毒株, 已在国内推广使用超过 30 年, 在我国仔猪副伤寒的有效控制中起了重要作用。实践证明 C500 株具有免疫原性良好, 能激活全身、局部和远端粘膜的免疫系统, 副作用低, 安全性好的特点^[10]。本实验室徐引弟等构建了 C500 株的 *asd* 基因缺失株 Δ asdC500。实验证实 Δ asdC500 缺失株进一步降低了 C500 的毒力, 增加了疫苗安全性^[8]。

F18ab 菌毛与类志贺毒素 II 型变异体 (SLT-IIe) 是致仔猪水肿病的产类志贺毒素大肠杆菌的两个主要毒力因子。F18ab(F107) 是报道的首个水肿病大肠杆菌定居因子, 其基因也进行了克隆。编码 F18ab 的基因有 6 个: FedA、FedB、FedC、FedD、FedE 和 FedF。Smets A 等 (2001) 利用融合蛋白对 F18 菌毛粘附特性作了进一步的研究, 表明纯化的 FedF 的融合蛋白 (MBP-FedF) 可粘附于离体猪肠上皮细胞, 其抗血清则可阻断质粒 pIH120 转化菌 HB101 对离体猪小肠微绒毛的粘附作用。SLT-IIe 由一个分子量为 33 kDa 的 A 亚基和 5 个分子量为 7.6 kDa 的 B 亚基共同组成的聚合物。A 亚基是水肿病毒素的主要毒力亚单位, 为毒素的酶活性部位, 具有细胞毒性作用。SLT-IIeB 不具有酶活性作用, 但具有免疫原性, 是水肿病毒素的主要保护性抗原。因此将两者融合表达构建了重组质粒 pYA-SF, 将其转入 Δ asdC500 缺失株, 期望后续工作中据此开发的重组疫苗能起到良好的保护免疫动物抵抗猪源产类志贺毒素大肠杆菌攻击的效果。

在本研究中, 成功地将重组质粒两次转化最终获得 pYA3493-SF/ Δ asdC500 菌株, 体外传代稳定性表明: 在有和无选择压力的情况下, 重组菌株的繁殖生长和传代都较稳定, 特别是在没有选择压力的条件下, 质粒基本不丢失。结果说明构建的重组减毒沙门氏菌株有望作为预防猪水肿病 - 仔猪副伤寒的口服疫苗候选株。但可能因为质粒 pYA-SF 的拷贝数较低, 所以表达的蛋白量也较少, 还需摸索改进实验方法, 提高目的蛋白的表达量, 同时, 动物免疫的试验研究正在进行之中。

参考文献

- [1] Imberechts H, De Greve H, Lintermans P. The pathogenesis of edema disease in pigs-A review. *Veterinary Microbiology*, 1992, 31: 221 - 233.

- [2] Imberechts H , Wild P , Charlier G , et al. Characterization of F18 fimbrial genes fedE and fedF involved in adhesion and length of enterotoxemic *Escherichia coli* strain 107/86. *Microbial Pathogenesis* , 1996 , 21(3) : 183 - 192 .
- [3] Moxley RA. Edema disease. *Veterinary clinics of North America-Food Animal Practice* , 2000 , 16(1) : 175 - 185 .
- [4] Smeds A , Pertovaara M , Timonen T , et al. Mapping the binding domain of the F18 fimbrial adhesin. *Infection and Immunity* , 2003 , 71(4) : 2163 - 2172 .
- [5] Weinstein DL , MP Jackson , JE Samuel , et al. Cloning and sequencing of a Shiga-like toxin type II variant from *Escherichia coli* strain responsible for edema disease of swine. *Journal of Bacteriology* , 1988 , 170(9) : 4223 - 4230 .
- [6] Austin PR , Hovde CJ. Purification of recombinant shiga-like toxin type I B subunit. *Protein Expression and Purification* , 1995 , 6(6) : 771 - 779 .
- [7] 刘国平 , 吴斌 , 林艺远 , 等. 大肠杆菌 Ee 株 SLT-IIeB-FedF 基因的融合表达及表达产物的免疫原性研究. *微生物学报(Acta Microbiologica Sinica)* , 2007 , 47(6) : 1044 - 1049 .
- [8] 徐引弟 , 郭爱珍 , 刘维红 , 等. 猪霍乱沙门菌 C500 株 $\Delta crp\Delta asd$ 缺失株平衡致死载体系统的构建及鉴定. *生物工程学报(Chinese Journal of Biotechnology)* , 2006 , 22(3) : 366 - 372 .
- [9] Kang HY , Srinivasan J , Curtiss R III . Immune responses to recombinant pneumococcal PspA antigen delivered by live attenuated *Salmonella enterica* serovar typhimurium vaccine. *Infection and Immunity* , 2002 , 70(4) : 1739 - 1749 .
- [10] 房晓文. 仔猪副伤寒弱毒疫苗研究. 研究报告汇编 (*Study Repertoire*) , 1978 , 4 : 1 - 11 .

Construction of attenuated *Salmonella choleraesuis* vaccine strain expressing recombinant antigen of Shiga-like toxin *Escherichia coli*

Xiaoying Man , Bin Wu* , Yong Luo , Teng Yu , Zhanqin Zhao , Yindi Xu , Aizhen Guo , Huanchun Chen
(State Key Laboratory of Agriculture Microbiology , Huazhong Agricultural University , Wuhan 430070 , China)

Abstract : [**Objective**] To construct an attenuated *Salmonella choleraesuis* vaccine strain expressing the gene SLT-IIeB and FedF of Shiga-like toxin *Escherichia coli* (SLTEC) O138 with balanced lethal system. [**Methods**] The gene of SLT-IIeB and FedF of SLTEC O138 was amplified , and then recombined with a vector pYA3493 (*Asd*⁺). The recombinant was electroporated into attenuated *Salmonella choleraesuis* C500(*Asd*⁻). The expression of SLT-IIeB and FedF was analyzed by SDS-PAGE. The stability of the vaccine strains was studied by generation culture in vitro. [**Results**] The stable attenuated *Salmonella choleraesuis* vaccine strain expressing SLT-IIeB and FedF of SLTEC O138 was constructed with balanced lethal system. The expressed products with protein quality 37000 could react with the antibody of FedF and SLT-IIeB. [**Conclusion**] The attenuated *Salmonella choleraesuis* vaccine strain could probably serve as a vaccine against edema disease and piglets paratyphoid.

Keywords : attenuated *Salmonella choleraesuis* ; balanced lethal system ; Shiga-like toxin *Escherichia coli* (SLTEC)

(本文责编 : 王晋芳)