

文章编号:1673-1689(2009)03-0403-05

携带 pEGFPC3 的减毒鼠伤寒沙门氏菌在 雏鸡体内的表达

方希修¹, 王冬梅¹, 杨晓志¹, 管军军³, 孙进², 乐国伟²

(1. 江苏畜牧兽医职业技术学院, 江苏 泰州 225300; 2. 江南大学 食品学院, 江苏 无锡 214122;
3. 河南工业大学 生物工程学院, 河南 郑州 450052)

摘要: 构建了重组减毒鼠伤寒沙门氏菌 SL8786/pEGFP-C3, 检测了 PEGFP-C3 在雏鸡体内荧光表达。将重组减毒鼠伤寒沙门氏菌 SL8786/pEGFP-C3 分别灌胃饲服 3 日龄雏鸡, 结果表明, 在体外稳定试验中, 重组菌经 LB 固体及液体培养基连续传 20 代后, 单个菌落和菌液均呈淡绿色。流式细胞仪结果证实, 减毒鼠伤寒沙门氏菌可以将 pEGFP-C3 转入脾脏细胞, 并在其中表达。在体内稳定试验中, 经雏鸡连续传代 12 次, 从肝脏、脾脏中分离的细菌经 LB 固体培养仍为绿色, 证明构建的重组减毒鼠伤寒沙门氏菌是稳定的。用免疫剂量的重组细菌接种雏鸡后, 观察 1 个月未见有异常现象, 同时剖检后也未见脏器有眼观病变。免疫一定时间后, 在雏鸡肝脏、脾脏、肾脏、胸腺、十二指肠、肌肉等组织有荧光表达。表达 PEGFP-C3 的重组鼠伤寒沙门氏菌在鸡体产生荧光表达, 为减毒沙门氏菌作为活载体的基因工程疫苗研制提供一个优良模型。

关键词: 增强型绿色荧光蛋白 C3 (EGFP-C3); 重组减毒鼠伤寒沙门氏菌; 荧光表达

中图分类号: S 82

文献标识码: A

Carrying pEGFP-C3 of Recombinant Attenuated *Salmonella typhimurium* Expressing in Chicken

FANG Xi-xiu¹, WANG Dong-mei¹, YANG Xiao-zhi¹, GUAN Jun-jun³,
SUN Jin², LE Guo-wei²

(1. Jiangsu Animal Husbandry and Veterinary College, Taizhou 225300, China; 2. School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 3. College of Bioengineering, Henan Industry University, Zhengzhou 450052, China)

Abstract: In this manuscript, a recombinant attenuated *Salmonella typhimurium* SL8786/pEGFP-C3 which express a green fluorescent protein gene (pEGFP-C3) was constructed and exhibited genetic stability after 20 generations. Then the recombinant strains inoculated in chicken and separated from its liver and spleen. The results demonstrated that the recombinant attenuated *Salmonella typhimurium* has considerable stability both in vitro and in vivo. Unusual phenomenon and internal organs observe pathological changes were not observed by inoculating with immune dosage recombinant bacteria in chicken after one month. The liver, spleen, kidney,

收稿日期: 2008-05-10

基金项目: 江苏畜牧兽医学院科技攻关项目(SM06005)。

作者简介: 方希修(1965-), 男, 山东日照人, 工学博士, 教授, 主要从事分子营养免疫与代谢方面的研究。

Email: fxxiu2008@yahoo.com.cn

chest gland, duodenum, muscle organization fluorescent expression was detected by fluorescent microscope screen in chicken. Cellular and organization fluorescent expression produced after oral recombinant attenuated *Salmonella typhimurium* in chicken and it offers a fine model to research the genetic engineering vaccine of living carrier.

Key words: enhance green fluorescent protein (EGFP-C3), recombinant attenuated *Salmonella typhimurium*, fluorescent expression

绿色荧光蛋白 (Green Fluorescent Protein, GFP) 基因是一种新型的报告基因, GFP 是一类存在于包括水母、水螅等腔肠动物体内的生物发光蛋白, 当受到紫外或蓝光激发时, 能发射绿色荧光, 且荧光性质稳定, 无种属限制, 已在大肠杆菌等多种动植物中成功表达并产生荧光。在一系列与 GFP 的 N 端或 C 端融和蛋白质的性质研究中, 已证明融合蛋白质具有 GFP 的荧光性质和配体蛋白质的生物功能。其次, GFP 的检测极其方便, 可用荧光显微镜、流式细胞仪或显微图像技术在活细胞中检测, 且对细胞无伤害。鉴于这些优点, GFP 已成为监测体内基因表达及细胞内蛋白质定位十分重要的报告基因。Shimomura 等(1962)^[1] 首先从多管水母属 (*Aequoriavictoria*) 中分离出了绿色荧光蛋白 (GFP); Prasher 等(1992)^[2] 克隆了 GFP 基因的 cDNA; Chalfie 等(1994)^[3] 首次在大肠杆菌细胞和线虫中表达了 GFP, 开创了 GFP 应用研究的先河, 之后很快发现 GFP 能在多种异源细胞中表达。Takarda 等(1997)^[4] 将 S65TGFP 连接到巨细胞病毒增强子和延长因子-1 启动子, 使 S65TGFP 在植入母体前的鼠和牛的胚胎中进行表达, 结果在桑椹胚和囊胚中检测到 S65TGFP, 12 个雏鸡中有 11 个转基因产物。研究表明, GFP 可用作逆转录病毒介导的基因转化标记物, 在哺乳动物中表达, 这将促进基因治疗的研究。作者将携带有增强型绿色荧光蛋白 (EGFP) 基因的 pEGFP-C3 质粒通过转化减毒鼠伤寒沙门氏菌 SL8786, 成功构建含有 pEGFP-C3 的转化减毒鼠伤寒沙门氏菌 SL8786/pEGFP-C3, 实验证明构建的转化菌能够稳定表达绿色荧光蛋白质^[5]。

1 材料与方法

1.1 材料

减毒鼠伤寒沙门氏菌 SL8786 (Δ phoP233): 美国华盛顿大学 Roy Curtiss III 教授提供, 江苏畜牧兽医职业技术学院保存; pEGFP-C3 质粒: 购自万方数据

Clon-tech 公司; DNA 限制性内切酶 (*Hind* III, *Xba* I 等)、RnaseA 酶、T4DNA 连接酶: 购自华美公司; 100~3 000 bp 核酸标准分子是参照物: 购自上海生物工程公司; 质粒小量提取试剂盒: 小量胶回收试剂盒购自上海华舜公司; RPMI1640 培养基: 购自 Gibco 公司; 胰蛋白酶、酵母提取物: 购自宝泰克公司; 抗生素卡那霉素: 齐鲁制药厂产品; 一般化学试剂均采用国产分析纯试剂; 电转化仪: 德国艾本德股份公司产品; 荧光显微镜: 上海蔡康光学仪器有限公司产品; 流式细胞仪: BD 公司产品; 三黄鸡雏鸡: 江苏畜牧兽医职业技术学院畜牧场提供。

1.2 方法

1.2.1 电转化法转化减毒沙门氏菌 挑取减毒沙门氏菌 SL8786 菌种涂布于固体 LB 培养基平皿。分别挑取平板培养好的减毒沙门氏菌 SL8786 菌种 2 mL 于 LB 液体培养基中, 37 °C、250 r/min 振荡过夜。取 50 μ L 菌液接种于 50 mL LB 液体培养基中, 37 °C、250 r/min 振荡培养至 OD_{590 nm} 在 0.6~0.7 (约 2~2.5 h), 4 °C、4 000 r/min 离心 5 min, 用 PBS 液洗 3 次, 分别离心; 最后悬浮于 2 mL 体积分数 10% 甘油中, 得到感受态菌株。分别取 200 μ L 感受态细菌液, 加入 1 μ g pEGFP-C3, 冰浴使其 DNA 吸附到细菌上, 然后移入电击杯中, 电转化条件: 2 000 V 电压、25 μ F 电容、200 Ω 、放电时间 4 ms。电击后加入 400 μ L LB, 37 °C 静止培养 2 h。试管中分别加入 LB 培养基 1 mL, 37 °C 轻柔震荡培养 45 min, 涂布在含卡那霉素 (25 mL/L) 的固体 LB 培养基的平皿中。37 °C 培养 16 h 后挑取转化菌落, 提取质粒, 进行酶切鉴定^[7]。

1.2.2 荧光显微镜观察 将 1.2.1 中鉴定成功的转化菌 SL8786/pEGFP-C3 用 LB 液体和固体培养基过夜培养, 观察其颜色, 挑取培养基中的转化菌于荧光显微镜下观察。

1.2.3 转化细菌体外、体内稳定性试验 将转化菌 SL8786/pEGFP-C3 接种于 LB 固体培养基上, 37 °C 过夜培养, 挑取单个菌落, 于 LB 固定培养基上 37 °C 继续培养, 如此重复 20 次, 最后一次抽提质

粒,酶切分析。将 1×10^6 CFU 转化的细菌经静脉注入雏鸡中,第2天从其肝脏、脾脏中分离细菌。将肝脏、脾脏于LB上涂布,37℃培养过夜,再将此细菌 1×10^6 CFU 注入雏鸡中,传代10次。同时进行口服接种,每只雏鸡 1×10^8 CFU,共10只。分别于不同时间点捕杀雏鸡,取其脾脏、肝脏组织于研磨器中研磨,取100 μ L 稀释物于LB平板上过夜培养,观察细菌生长状况。

1.2.4 口服接种有表达质粒的转化减毒沙门氏菌

用含有相应抗生素的LB培养基分别培养SL8786/pEGFP-C3、SL8786/pcDNA3,振荡培养至 A_{600} 在0.6~0.7,以PBS悬浮,调整细菌浓度为 1×10^9 CFU/mL。3日龄雏鸡12只,随机分A、B两组,每组6只,每只雏鸡灌服5 g/dL 的NaHCO₃ 100 μ L,以中和胃酸,30 min后,A组分别灌服SL8786/pEGFP-C3 0.1 mL,B组分别灌服SL8786/pcDNA3 0.1 mL。

1.2.5 检测绿色荧光蛋白在雏鸡脾细胞内的表达

雏鸡口服转化菌3周后,每组分别脱颈处死2只雏鸡。无菌取脾脏,低渗裂解红细胞后得到单细胞,悬浮于无血清RPMI1640培养基中,接种于60 mm 细胞培养皿。37℃、5% CO₂ 培养箱培养2 h,使之贴壁。然后用无抗生素RPMI1640培养基洗涤细胞2次,洗去非贴壁细胞,所得贴壁细胞即为雏鸡脾脏细胞。用流式细胞仪检测贴壁细胞荧光蛋白表达。

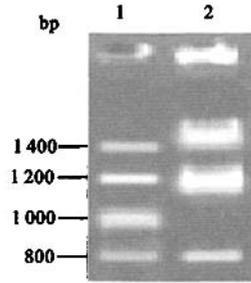
1.2.6 绿色荧光蛋白在不同组织中表达的检测

雏鸡口服转化菌2周后,A、B组分别宰杀2只。分离肝脏、脾脏、肾脏、胸腺、十二指肠、肌肉,分离后的组织立即用红细胞裂解液(0.01 mol/L Tris-HCl pH 7.6;0.01 mol/L NaCl;0.005 mol/L MgCl₂)溶解红细胞,以PBS洗涤,利用超声波打碎组织,离心去除上清液,置于紫外测定仪观察。

2 结果

2.1 转化减毒鼠伤寒沙门氏菌酶切鉴定

挑取pEGFP-C3质粒转化菌落,提取质粒,Marker DNA用EcoRI和Hind III双酶切,质粒用Hind III,Xba I双酶切。电泳结果表明:在电泳条带800 bp附近,有一条符合EGFP为730 bp的理论值,表明pEGFP-C3已转到减毒鼠伤寒沙门氏菌中,见图1。pEGFP-C3的MCS为:-Hind III-EcoRI-PstI-Sal I-Kpa I-Sac II-Apa I-BamH I-Xba I-BdI。



1:标准分子量;2:质粒酶切电泳

图1 重组减毒鼠伤寒沙门菌质粒 pEGFP-C3 酶切鉴定

Fig. 1 Recombinant attenuated *Salmonella typhimurium* plasmid pEGFP-C3 enzyme cut electrophoresis analysis

2.2 转化减毒鼠伤寒沙门菌的观察

转化菌于LB液体培养基中过夜培养,菌液呈淡绿色。转化菌于LB固体培养基上过夜培养,见菌落亦呈淡绿色。挑取在LB培养基中培养的转化菌于荧光显微镜下观察,可见单个细菌呈淡绿色,细菌形态十分清晰,见图2。

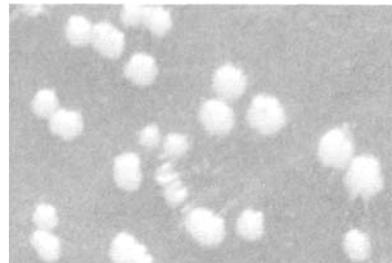


图2 重组减毒鼠伤寒沙门氏菌 SL8768/EGFP-C3 平板菌落形态(显微镜×200)

Fig. 2 Recombinant attenuated *Salmonella typhimurium* SL8768 (EGFP-C3) cultivating on plateform (microscope ×200)

2.3 转化菌的稳定性

2.3.1 转化菌的体外稳定性试验 观察于LB固体培养基上培养的转化菌SL8786/pEGFP-C3,所有细菌均成绿色,经连续20代培养,仍是绿色,证明转化菌SL8786/pEGFP-C3在体外稳定表达GF-PC3。最后一次培养物经碱裂解法抽提质粒,经酶切分析证明,质粒条带大小正确。

2.3.2 转化菌的体内稳定性试验 将转化菌于雏鸡中连续传12代,无菌取肝脏、脾脏,涂布于LB平板上,过夜培养,见有绿色细菌生长,而无其它杂菌,取最后一次细菌培养物提取质粒,同时酶切鉴定,结果酶切条带正确。口服组于29天时仍有转化菌,而静脉注射组于45天仍有转化菌生长。因

此,可以确定转化菌在体内能够稳定存活至少1个月以上。

2.4 绿色荧光蛋白在雏鸡脾细胞内的表达

雏鸡口服转化菌 SL8786/pEGFP-C3 3 周后,用流式细胞仪检测贴壁细胞荧光蛋白表达。发现两次贴壁培养得脾细胞中,EGFP 阳性率分别为 19.26% 和 20.17%,而 SL8786 (pcDNA3) 口服的雏鸡细胞中阳性率分别为 2.26% 和 1.69%。流式细胞仪结果证实,体外情况下,减毒鼠伤寒沙门菌可以将 pEGFP-C3 转入雏鸡腹腔灌洗巨噬细胞,并在其中表达。

2.5 口服转化菌后雏鸡体内不同组织表达情况

雏鸡口服转化菌 SL8786/pEGFP-C3 后,检测发现,雏鸡肝脏、脾、十二指肠 EGFP-C3 都表达较

强,肾、胸腺、肌肉次之,结果见表 1。

表 1 不同组织的 pEGFP-C3 质粒表达水平

Tab. 1 Plasmid pEGFP-C3 expression level in various tissues

肾	脾	胸腺	十二指肠	肌肉	肝脏
+	++	+	++	+	++

+代表正; -代表负

雏鸡口服转化菌 SL8786/pEGFP-C3 后,解剖获取肝脏、脾脏、肾脏、胸腺、十二指肠、肌肉等,分离后的组织立即用红细胞裂解液溶解红细胞,以 PBS 洗涤,利用超声波打碎组织,离心去除上清液,经过制片后,置于紫外测定仪观察,6 种组织均有不同强度的绿色荧光,结果见图 2。

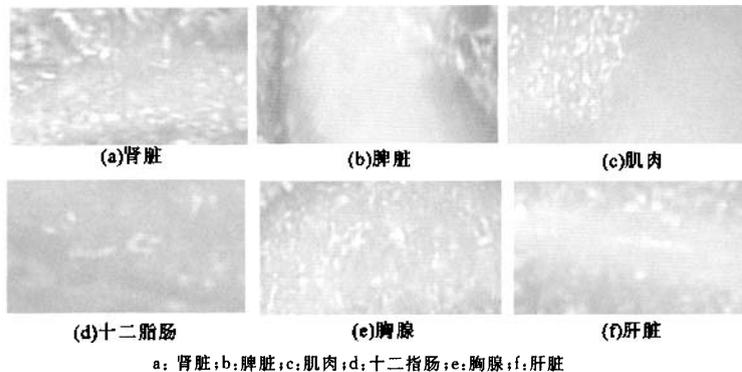


图 3 SL8768/pEGFP-C3 在雏鸡不同组织绿色荧光表达(荧光显微镜拍摄)

Fig. 3 SL8768/pEGFP-C3 green fluorescence expression in different organization in chicken (fluorescence microscope screen)

3 讨论

减毒鼠伤寒沙门菌作为疫苗载体已有多种细菌、寄生虫和病毒抗原被表达于沙门氏菌用作疫苗^[8-12]。鼠伤寒沙门氏菌能够通过粘附、侵袭,定居在肠道相关淋巴组织,并经肠系膜淋巴结到达肝脏、脾脏,进一步有效地刺激机体产生粘膜、细胞和体液免疫应答,产生分泌型抗体,目前已构建了一系列鼠伤寒沙门氏菌的减毒株,以它作为载体携带其它细菌、病毒或寄生虫等保护性抗原基因,构建双价、多价活苗。试验证明,这些活苗进入机体后,能够激发机体产生针对载体沙门氏菌和外源抗原的体液免疫、细胞免疫和粘膜免疫。减毒鼠伤寒沙门菌无致病性,但仍有一定的侵袭力。Peyer 淋巴结内的树突状细胞(dendritic cell, DC)在吞噬沙门菌中的作用可能更加重要。巨噬细胞和 DC 细胞都是良好的抗原提呈细胞,表达在沙门菌上的抗原蛋白可以被有效地递呈,从而诱导产生高效的粘膜和

系统免疫反应^[13]。Ayub 等^[14]将李斯特菌的两种致病基因克隆入真核表达载体,转染鼠伤寒沙门氏菌用于免疫动物,诱导产生了良好的体液和细胞免疫反应。Paola 等^[15]的研究进一步证实,在体内,减毒沙门菌可以将真核质粒递呈给雏鸡脾脏的树突状细胞。目前在动物体内,以减毒鼠伤寒沙门菌作为 DNA 递呈载体研制的口服 DNA 疫苗取得了良好的抗菌和抗肿瘤作用^[16-17]。

DNA 疫苗有许多优点:接种到体内的 DNA 可以持久地表达,成为抗原的体内贮备库;某些质粒序列具有免疫刺激作用可以作为佐剂^[6]。为了研究减毒沙门氏菌活疫苗载体与宿主免疫系统相互作用的规律及其调控机制,作者将绿色荧光蛋白(GFP-C3)基因通过转化转入减毒鼠伤寒沙门氏菌 SL8786 中,获得了稳定表达 GFP-C3 的转化鼠伤寒沙门氏菌。GFP-C3 的表达与否,肉眼即可看见,很直观。另外将菌液放于载玻片上,盖上盖玻片于荧光显微镜下观察,即可见一个个单个细菌发出很强

的绿色荧光,它产生的荧光不影响细菌进入到哺乳动物细胞中去,也不影响细菌在哺乳动物中的存活。在活的哺乳动物和被感染的组织中,可以观测到细菌产生的 GFP,它的荧光可以利用流式细胞术来检测。这样就可以衡量哺乳动物细胞被细菌感染的程度,有助于了解宿主-病原体相互作用的机理,从而达到消灭病原体的作用。

根据表达 GFPC3 的减毒鼠伤寒沙门氏菌的特

点,可以预期转化菌免疫雏鸡后,可在不同时间取其脾脏、肝脏,分离活细菌并进行计数,可以直观地反映转化菌体内的生长规律,即可以间接地预测外源蛋白质表达的量,从而监控机体的免疫状况,不需染色便可以直接通过 FACS 技术分析转化菌与宿主免疫系统相互作用的规律,这方面的研究对人类传染性疾病的免疫预防及免疫调节生物学基础研究上亦有重要应用价值,有关研究正在进行中。

参考文献(References):

- [1] Shimomura O S. Structure of the chromophore of *Aequorea* green fluorescent protein [J]. *FEBS Lettera*, 1979,104:220-222.
- [2] Prasher D, Echenrode V, Wand W, et al. Primary structure of the *Aequoreavitoria* green fluorescent protein[J]. *Gene*, 1992,111:229-233.
- [3] Chalfie M, Ta Y, Euskirchen G, et al. Green fluorescent protein in as a marker for gene expression[J]. *Science*,1994, 263:802-805.
- [4] Takarda T, Lida K, Awaji T, et al. Select yve production of transgenic mice using fluorescent protein as a marker[J]. *Nat Biotechnology*, 1997,15:458-461.
- [5] 李文波,姚志强,周永兴,等. 佐剂 CpGODN 对 HBV 基因疫苗诱导抗体产生的影响[J]. 第四军医大学学报,2000,21(7):799-801.
LI Wen-bo, YAO Zhi-qiang, ZHOU Yong-xin, et al. Adjuvant CpG ODN increases production of antHBs induced by HBV gene vaccines[J]. *Fourth Mil Med Univ*,2000,21(7):799-801. (in Chinese)
- [6] H Valdivia, Hromockyj A E, D Denise, et al. Applications for green fluorescent protein in the study of host-pathogen interactions[J]. *Gene*,1996,173:47-52.
- [7] 方希修、乐国伟、王冬梅,等,以减毒鼠伤寒沙门氏菌为载体的重组 HBsAg 口服疫苗的构建与鉴定[J],食品与生物技术学报,2006,25(5):98-102.
FANG Xi-xiu, LE Guo-wei, WANG Dong-mei, et al. Construction and identify of recombinant attenuated *Salmonella typhimurium* orally HBsAg vaccine[J]. *Journal of Food Science and Biotechnology*, 2006,25(5):98-102. (in Chinese)
- [8] Sambrook J, Fntsch D F, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*[M]. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989:16-19.
- [9] Eyal Raz. Intradermal gene immunization: The possible role of DNA uptake in the induction of cellular immunity to viruses[J]. *Pro Natl Acad Sci*, 1994,(91):9519-9523.
- [10] 刘晓峰、胡家露、彭道荣,等. 幽门螺杆菌尿素酶 B 亚单位基因在减毒鼠伤寒杆菌中的表达[J],第四军医大学学报,2000,21(8):1012-1014.
LIU Xiao-feng ,HU Jia-lu,PENG Dao-rong, et al. Establishment of attenuated salmonella typhimurium producing helicobacter pylori urease subunits B[J]. *Fourth Mil Med Univ*, 2000,21(8):1012-1014. (in Chinese)
- [11] Killen K, Spriggs D, Mekalanos J. Bacterial mucosal vaccines: *Vibrio cholerae* live attenuated vaccine/vector paradigm [J]. *CurrTop Microbiol Immunol*,1998,236:237-254.
- [12] Collins L V, Schde l F. *Veterinary Vaccinology*[M]. Amsterdam: Elsevier,1997:726-743.
- [13] Dunsan S J, Simmons C P, Strugnell R A. Comparison of the abilities of different attenuated *Salmonella typhimurium* strains to elicit humoral immune responses against heterologous antigen[J]. *Infect Immun*,1998,66:732-740.
- [14] Darji A, Carlos A, Guzm N, et al. Oral somatic transgene vaccination using attenuated *Salmonella typhimurium* [J]. *Cell*,1997,91:766-775.
- [15] Paola Paglia, Eva Medina, Ivano Aroili, et al. Gene transfer indendritic cells, induced by oral DNA vaccination with *Salmonella typhimurium*, results in protective immunity against *Amurine fibrosarcoma* [J]. *Blood*,1998,92(9):3172-3176.
- [16] Brunham R C, Zhang D J. Transgene as vaccine for chlamydia[J]. *Am Heart*,1999,138:519-522.
- [17] Jean C S, Florence N, Jean P K. Live attenuated *Salmonella*: Aparadigm of mucosal vaccines[J]. *Immunol Rev*, 1999, 171:5-26.

(责任编辑:李春丽)