

研究报告

Research Report

鼠伤寒沙门氏菌 *hilD* 基因缺失突变株的构建及其表型分析

唐正露* 罗聪玉* 曹堃 李郁**

安徽农业大学动物科技学院, 合肥, 230036

* 同等贡献作者

** 通信作者, liyouer@163.com

摘要 为研究鼠伤寒沙门氏菌(*Salmonella typhimurium*, S.T) *hilD* 基因的功能,通过同源重组方法构建 S.T *hilD* 基因缺失菌株 S.T ($\Delta hilD$) 电转化法构建 *hilD* 基因回补株 S.T ($\Delta hilD$ +pcDNA3.1-*hilD*)、*hilD* 基因缺失株空质粒菌 S.T ($\Delta hilD$ +pcDNA3.1)和亲本株空质粒菌 S.T (pcDNA3.1),进而对 S.T ($\Delta hilD$ +pcDNA3.1)与 S.T (pcDNA3.1)、S.T ($\Delta hilD$ +pcDNA3.1-*hilD*)的表型进行比较。结果显示 S.T ($\Delta hilD$ +pcDNA3.1)和 S.T ($\Delta hilD$ +pcDNA3.1-*hilD*)遗传性状稳定;三株菌的生长速率无显著差异($P>0.05$) S.T ($\Delta hilD$ +pcDNA3.1)的生物膜形成能力显著高于 S.T (pcDNA3.1)和 S.T ($\Delta hilD$ +pcDNA3.1-*hilD*)的($P<0.05$);而对于小鼠的致病力及对 HeLa 细胞的黏附力和侵袭力 S.T ($\Delta hilD$ +pcDNA3.1)均显著低于 S.T (pcDNA3.1)和 S.T ($\Delta hilD$ +pcDNA3.1-*hilD*) ($P<0.05$)。表明 S.T *hilD* 基因的缺失不影响其正常生长代谢过程,但毒力减弱。

关键词 鼠伤寒沙门氏菌; *hilD* 基因; 缺失株; 生物学特性

Constrution and Phenotypic Analysis of *hilD* Gene Mutant of *Salmonella typhimurium*

Tang Zhenglu* Luo Congyu* Cao Kun Li Yu**

College of Animal Science and Technology, Anhui Agriculture University, Hefei, 230036

* These authors contributed equally to this work

** Corresponding author, liyouer@163.com

DOI: 10.13417/j.gab.040.002748

Abstract In order to study the function of the *hilD* gene in *Salmonella typhimurium* (S.T), the S.T $\Delta hilD$ gene deletion mutant S.T ($\Delta hilD$) was constructed by homologous recombination technology, the *hilD* gene-complementation strain S.T ($\Delta hilD$ +pcDNA3.1-*hilD*), the *hilD* gene deletion strain S.T ($\Delta hilD$ +pcDNA3.1) and with parental strain S.T with the empty plasmid (pcDNA3.1) were constructed by electroporation, and then the phenotypes of S.T ($\Delta hilD$ +pcDNA3.1), S.T ($\Delta hilD$ +pcDNA3.1-*hilD*) and S.T (pcDNA3.1) were compared. The results showed that the genetic characters of S.T ($\Delta hilD$ +pcDNA3.1) and S.T ($\Delta hilD$ +pcDNA3.1-*hilD*) were stable, and the growth rate of the three strains had no significant difference ($P>0.05$). The biofilm formation ability of S.T ($\Delta hilD$ +pcDNA3.1) was significantly higher than that of S.T ($\Delta hilD$ +pcDNA3.1-*hilD*) and S.T (pcDNA3.1) ($P<0.05$). However, the pathogenicity of mice, adhesion and invasion to HeLa cells of S.T ($\Delta hilD$ +pcDNA3.1) were significantly lower than that of S.T ($\Delta hilD$ +pcDNA3.1-*hilD*) and S.T (pcDNA3.1) ($P<0.05$). In conclusion, the deletion of *hilD* gene in S.T did not affect the normal growth and metabolism process, but the virulence was reduced.

Keywords *Salmonella typhimurium*; *hilD* gene; Deleted strain; Biological characteristics

基金项目 本研究由国家星火计划重点项目(2014GA710002)、安徽省自然科学基金项目(1508085MC44)、安徽省重点研究与开发计划(面上攻关)项目(201904a06020013)、安徽省长三角联合科技攻关项目(1101c0603065)和安徽省生猪产业体系基金项目[皖农科(2016)84 号]共同资助

引用格式 :Tang Z.L., Luo C.Y., Cao K., and Li Y., 2021, Constrution and phenotypic analysis of *hilD* gene mutant of *Salmonella typhimurium*, Jiyinzuxue yu Yingyong Shengwuxue (Genomics and Applied Biology), 40(7-8 combined issue): 2748-2755. (唐正露, 罗聪玉, 曹堃, 李郁, 2021, 鼠伤寒沙门氏菌 *hilD* 基因缺失突变株的构建及其表型分析, 基因组学与应用生物学, 40 (第 7-8 期合刊): 2748-2755.)

鼠伤寒沙门氏菌(*Salmonella typhimurium*, S.T)是沙门氏菌最主要的菌型之一,在世界范围内均有分布且分离率高。该菌的天然宿主是老鼠,很容易传播给猪、人和其他物种,多存在于人及多种动物的消化道、肌肉、血液和其他组织中,在乳制品、肉蛋类等动物性产品中也较常见,是一种典型的食源性人畜共患病原菌。S.T的致病因子包括菌毛、脂多糖、毒力相关质粒和毒力基因等,其中毒力基因起到重要作用。

沙门氏菌的毒力基因除少数位于质粒上,其余均存在于染色体上,这些染色体被称为沙门氏菌的毒力岛(salmonella pathogenicity island, SPI) (曹恬雪等, 2014)。沙门氏菌通过 SPI1 和 SPI2 编码的Ⅱ型分泌系统侵入宿主肠道上皮细胞并在巨噬细胞内增殖感染宿主。*hilD* 基因位于 SPI1 上,其编码的 *hilD* 蛋白是沙门氏菌毒力调节系统的核心(Ellermeier et al., 2005)。为探究 *hilD* 基因的功能及体内环境中 *hilD* 对 SPI2 的调控作用,本研究采用自杀质粒介导的同源重组法,构建了 S.T *hilD* 基因缺失株及其回补株,并比较了基因缺失株、回补株与亲本株遗传稳定性、体外生长曲线、生物膜形成能力、对小鼠致病力、对 Hela 细胞的侵袭与黏附能力等生物学特性的差异。

1 结果与分析

1.1 S.T ($\Delta hilD$)、S.T ($\Delta hilD$ +pcDNA3.1-*hilD*)、S.T ($\Delta hilD$ +pcDNA3.1)和 S.T (pcDNA3.1)菌株的构建及鉴定

对构建的 S.T ($\Delta hilD$)、S.T ($\Delta hilD$ +pcDNA3.1-*hilD*)、S.T ($\Delta hilD$ +pcDNA3.1)和 S.T (pcDNA3.1)分别进行 PCR 鉴定(图 1; 图 2),图 1 中 3~4 号样品出现比亲本菌株短 570 bp 的条带;图 2 中 *invA* 基因的引物扩增出现 250 bp 左右条带(1~4 孔) *hilD* 基因的引物扩增 S.T (pcDNA3.1(+))菌株和 S.T ($\Delta hilD$ +pcD-

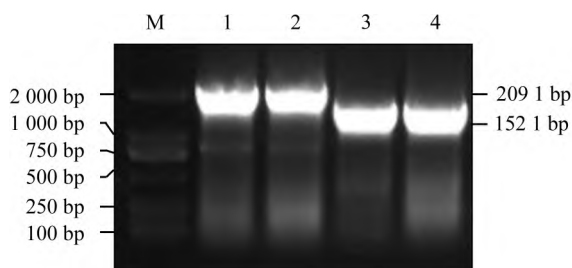


图 1 S.T ($\Delta hilD$)的 PCR 鉴定

注: M: DL2000 DNA Marker; 1~2: 亲本株 S.T; 3~4: S.T ($\Delta hilD$)
Figure 1 The PCR verify of S.T ($\Delta hilD$)

Note: M: DL2000 DNA Marker; 1~2: Parental strain S.T; 3~4: S.T ($\Delta hilD$)

NA3.1(+)-*hilD*) 菌株出现 948 bp 条带, S.T ($\Delta hilD$ +pcDNA3.1(+))菌株出现 378 bp 条带(5~8 孔) pcDNA3.1 (+)扩增均出现 250 bp 左右条带(9~12 孔)。表明缺失菌株构建成功。

1.2 S.T ($\Delta hilD$ +pcDNA3.1)与 S.T ($\Delta hilD$ +pcDNA3.1-*hilD*)及 S.T (pcDNA3.1)的表型比较

1.2.1 遗传稳定性测定

分别对 S.T ($\Delta hilD$ +pcDNA3.1)和 S.T ($\Delta hilD$ +pcDNA3.1-*hilD*) 的第 5、10、15、20、25、30 代培养物进行 PCR 扩增,缺失株 S.T ($\Delta hilD$ +pcDNA3.1)和回补株 S.T ($\Delta hilD$ +pcDNA3.1-*hilD*)均能够稳定遗传(图 3; 图 4)。

1.2.2 体外生长曲线测定

绘制体外培养条件下 3 株菌的生长曲线,可见 3

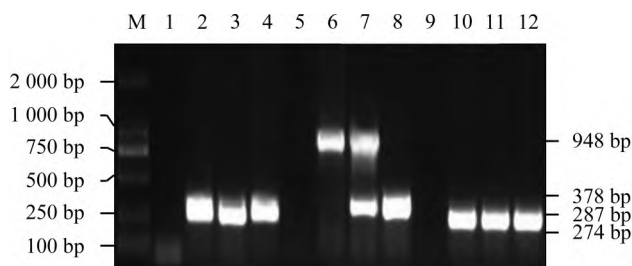


图 2 S.T (pcDNA3.1)、S.T ($\Delta hilD$ +pcDNA3.1)和 S.T ($\Delta hilD$ +pcDNA3.1-*hilD*)的 PCR 鉴定

注: M: DL2000 DNA Marker; 1,5,9: 空白对照; 2,6,10: S.T (pcDNA3.1); 3,7,11: S.T ($\Delta hilD$ +pcDNA3.1-*hilD*); 4,8,12: S.T ($\Delta hilD$ +pcDNA3.1)

Figure 2 The PCR verify of S.T (pcDNA3.1), S.T ($\Delta hilD$ +pcDNA3.1) and S.T ($\Delta hilD$ +pcDNA3.1-*hilD*)

Note: M: DL2000 DNA Marker; 1,5,9: Blank control; 2,6,10: S.T (pcDNA3.1); 3,7,11: S.T ($\Delta hilD$ +pcDNA3.1-*hilD*); 4,8,12: S.T ($\Delta hilD$ +pcDNA3.1)

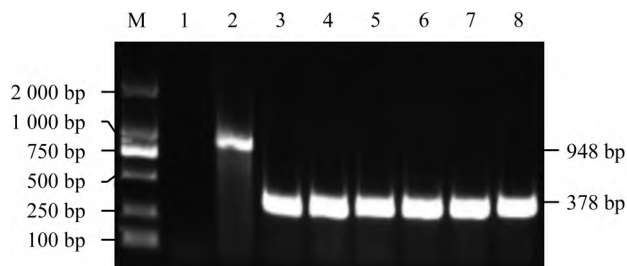


图 3 S.T ($\Delta hilD$ +pcDNA3.1)的遗传稳定性测定

注: M: DL2000 DNA Marker; 1: 空白对照; 2: S.T (pcDNA3.1); 3~8: S.T ($\Delta hilD$ +pcDNA3.1)第 5、10、15、20、25、30 代菌株

Figure 3 Stability identification of S.T ($\Delta hilD$ +pcDNA3.1)

Note: M: DL2000 DNA Marker; 1: Blank control; 2: S.T (pcDNA3.1); 3~8: 5, 10, 15, 20, 25 and 30 generations of S.T ($\Delta hilD$ +pcDNA3.1)

菌株在经历迟缓期和对数生长期后,均于第8小时进入稳定期,其中 S.T ($\Delta hilD$ +pcDNA3.1)的生长速度较 S.T (pcDNA3.1)和 S.T ($\Delta hilD$ +pcDNA3.1-*hilD*)稍快(图5)。

1.2.3 生物膜形成能力测定

在3株菌中,S.T ($\Delta hilD$ +pcDNA3.1)的生物膜形成能力显著高于 S.T (pcDNA3.1)和 S.T ($\Delta hilD$ +pcDNA3.1-*hilD*)的($P<0.05$),而 S.T (pcDNA3.1)与 S.T ($\Delta hilD$ +pcDNA3.1-*hilD*)的成膜能力无显著差异($P>0.05$),且3株菌在96 h时生物膜形成能力均为最强,在144 h成膜能力基本一致(图6)。

1.2.4 对小鼠致病力测定

腹腔攻毒时,S.T ($\Delta hilD$ +pcDNA3.1)的 LD_{50} 是 S.T (pcDNA3.1)的5.3倍,是 S.T ($\Delta hilD$ +pcDNA3.1-*hilD*)的4.6倍;灌胃攻毒时,S.T ($\Delta hilD$ +pcDNA3.1)的 LD_{50} 是 S.T (pcDNA3.1)的11.9倍,是 S.T ($\Delta hilD$ +pcDNA3.1-*hilD*)的20倍,表明*hilD*基因的缺失导致

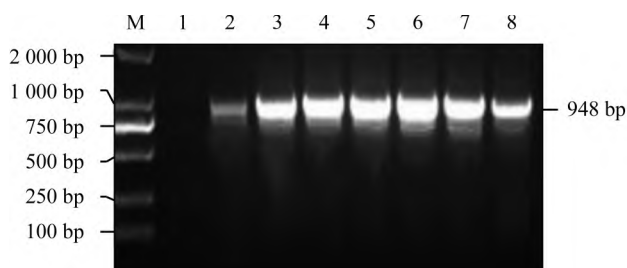


图4 S.T ($\Delta hilD$ +pcDNA3.1-*hilD*)的遗传稳定性测定

注: M: DL2000 DNA Marker; 1: 空白对照; 2: S.T (pcDNA3.1);

3~8: S.T ($\Delta hilD$ +pcDNA3.1-*hilD*)第5, 10, 15, 20, 25, 30代菌株

Figure 4 Stability identification of S.T ($\Delta hilD$ +pcDNA3.1-*hilD*)

Note: M: DL2000 DNA Marker; 1: Blank control; 2: S.T (pcDNA3.1); 3~8: 5, 10, 15, 20, 25 and 30 generations of S.T ($\Delta hilD$ +pcDNA3.1-*hilD*)

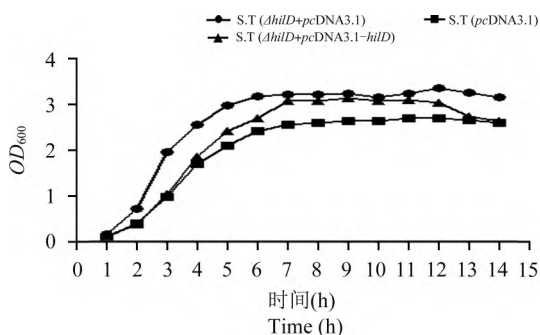


图5 S.T (pcDNA3.1), S.T ($\Delta hilD$ +pcDNA3.1)及 S.T ($\Delta hilD$ +pcDNA3.1-*hilD*)的体外生长曲线

Figure 5 The growth curve of S.T (pcDNA3.1), S.T ($\Delta hilD$ +pcDNA3.1) and S.T ($\Delta hilD$ +pcDNA3.1-*hilD*) in vitro

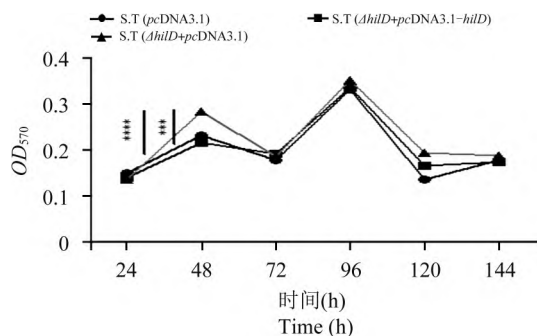


图6 S.T (pcDNA3.1), S.T ($\Delta hilD$ +pcDNA3.1)及 S.T ($\Delta hilD$ +pcDNA3.1-*hilD*)的生物膜形成能力

注: ***, $P<0.05$; ****, $P<0.01$

Figure 6 The biofilm formation of S.T (pcDNA3.1), S.T ($\Delta hilD$ +pcDNA3.1) and S.T ($\Delta hilD$ +pcDNA3.1-*hilD*)

Note: ***, $P<0.05$; ****, $P<0.01$

鼠伤寒沙门氏菌的毒力显著减弱,且灌胃攻毒较腹腔攻毒对毒力的减弱程度更高(表1;表2)。

1.2.5 对 HeLa 细胞的黏附与侵袭试验

黏附试验结果显示,S.T ($\Delta hilD$ +pcDNA3.1)的黏附能力显著低于 S.T (pcDNA3.1)和 S.T ($\Delta hilD$ +pcDNA3.1-*hilD*)的($P<0.05$),黏附至 HeLa 细胞的细菌数较 S.T (pcDNA3.1)降低 8.4 倍,较 S.T ($\Delta hilD$ +pcDNA3.1-*hilD*)降低 7.6 倍;镜下观察空白对照组无菌体黏附,S.T (pcDNA3.1)组细菌大量黏附于 HeLa 细胞上,S.T ($\Delta hilD$ +pcDNA3.1)组黏附细胞的菌体数量显著下降,而 S.T ($\Delta hilD$ +pcDNA3.1-*hilD*)组细菌黏附数量明显回升(图7)。

侵袭试验结果显示,S.T ($\Delta hilD$ +pcDNA3.1)对 HeLa 细胞的侵袭能力显著低于 S.T (pcDNA3.1)和 S.T ($\Delta hilD$ +pcDNA3.1-*hilD*)的($P<0.05$),侵袭细菌数较 S.T (pcDNA3.1)降低 16.2 倍,较 S.T ($\Delta hilD$ +pcDNA3.1-*hilD*)降低 8.4 倍(图8)。

2 讨论

S.T 是当前研究最多的沙门氏菌血清型,也是引起人和动物食源性疾病的主要病原菌,它能够通过多种致病因子黏附并侵入宿主,造成感染或死亡,具有重要的公共卫生学意义。S.T 的5个SPI中,主要由SPI-1和SPI-2表达的两个型分泌系统执行侵入宿主细胞并在其内进行复制的功能。体外研究发现,SPI-1上的*hilD*基因是沙门氏菌的中心调节基因,其编码的*hilD*蛋白能参与*HilA*的调控实现对SPI-1的正调控,还能通过解除SPI-2上*ssrAB*启动子上游的阻遏蛋白H-NS进而抑制*ssrAB*的作用,实

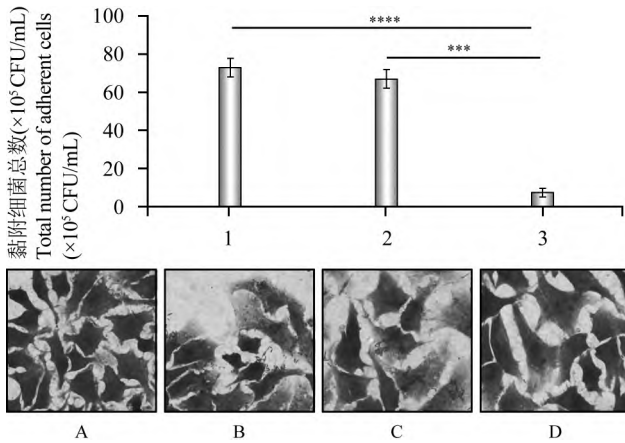


图 7 S.T. (pcDNA3.1), S.T. ($\Delta hilD$ +pcDNA3.1) 及 S.T. ($\Delta hilD$ +pcDNA3.1- $hilD$) 对 HeLa 细胞的黏附能力(1000 $\times$)
注: 1: S.T. (pcDNA3.1); 2: S.T. ($\Delta hilD$ +pcDNA3.1- $hilD$); 3: S.T. ($\Delta hilD$ +pcDNA3.1); A: 空白对照组; B: S.T. (pcDNA3.1); C: S.T. ($\Delta hilD$ +pcDNA3.1- $hilD$); D: S.T. ($\Delta hilD$ +pcDNA3.1); ***: $P<0.05$; ****: $P<0.01$

Figure 7 The ability of S.T. (pcDNA3.1), S.T. ($\Delta hilD$ +pcDNA3.1) and S.T. ($\Delta hilD$ +pcDNA3.1- $hilD$) to adhere to HeLa cells
Note: 1: S.T. (pcDNA3.1); 2: S.T. ($\Delta hilD$ +pcDNA3.1- $hilD$); 3: S.T. ($\Delta hilD$ +pcDNA3.1); A: Blank control; B: S.T. (pcDNA3.1); C: S.T. ($\Delta hilD$ +pcDNA3.1- $hilD$); D: S.T. ($\Delta hilD$ +pcDNA3.1); ***: $P<0.05$; ****: $P<0.01$

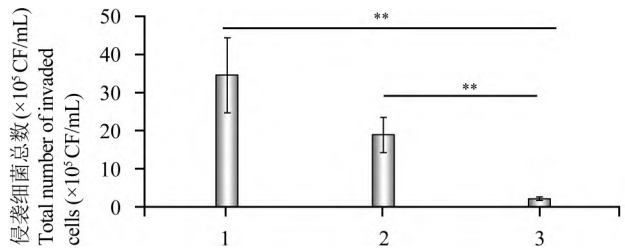


图 8 S.T. (pcDNA3.1), S.T. ($\Delta hilD$ +pcDNA3.1) 及 S.T. ($\Delta hilD$ +pcDNA3.1- $hilD$) 对 HeLa 细胞的侵袭能力
注: 1: S.T. (pcDNA3.1); 2: S.T. ($\Delta hilD$ +pcDNA3.1- $hilD$); 3: S.T. ($\Delta hilD$ +pcDNA3.1); **: $P<0.01$
Figure 8 The ability of S.T. (pcDNA3.1), S.T. ($\Delta hilD$ +pcDNA3.1) and S.T. ($\Delta hilD$ +pcDNA3.1- $hilD$) to invade HeLa cells
Note: 1: S.T. (pcDNA3.1); 2: S.T. ($\Delta hilD$ +pcDNA3.1- $hilD$); 3: S.T. ($\Delta hilD$ +pcDNA3.1); **: $P<0.01$

表 1 S.T. (pcDNA3.1), S.T. ($\Delta hilD$ +pcDNA3.1) 及 S.T. ($\Delta hilD$ +pcDNA3.1- $hilD$) 腹腔攻毒小鼠的 LD_{50} 测定

Table 1 The LD_{50} of S.T. (pcDNA3.1), S.T. ($\Delta hilD$ +pcDNA3.1) and S.T. ($\Delta hilD$ +pcDNA3.1- $hilD$) in jection

菌株	LD_{50}	95%上限	95%下限
Strain		95% upper limit	95% lower limit
S.T. (pcDNA3.1)	2.7×10^7 a	1.0×10^8	8.2×10^6
S.T. ($\Delta hilD$ +pcDNA3.1- $hilD$)	3.0×10^7 b	4.4×10^7	2.1×10^7
S.T. ($\Delta hilD$ +pcDNA3.1)	1.7×10^8 a,b	2.6×10^8	1.0×10^8

注: 上表中字母相同表明组间毒力差异不显著($P>0.05$); 字母不同表明组间毒力差异显著($P<0.05$)

Note: The same letter in the above table indicates that the difference in virulence between the groups is not significant ($P>0.05$); The different letter indicates significant ($P<0.05$)

现对 *ssrAB* 的正调控,促进 SPI-2 上毒力基因的表达 (Luany et al., 2011)。目前,关于 *hilD* 基因的功能及其缺失后生物学特征的变化尚未见报道。本研究通过构建 *hilD* 基因缺失株及回补株,对其表型进行比较,为研究 *hilD* 基因的功能和体内环境下 *hilD* 对 SPI2 的调控作用奠定基础。

研究基因功能的方法一般分为两种,一是对目的基因进行表达,分析表达蛋白或 mRNA 的表达谱以研究目的基因功能;二是使目的基因缺失或沉默表达,研究缺失株功能的变化以反映目的基因的功能 (陈宝花等, 2019)。Daniel 等(2013)通过 pKD46 载体成功构建了沙门氏菌 *stdA* 基因缺失株以研究 *stdA* 基因的功能,陈秀琴等(2013)利用 pWM91 自杀性质粒介导的同源重组法对霍乱弧菌的 *hfg* 基因进行缺失,并选用 pUC18 克隆载体成功构建 Δhfg 缺失菌株的回补株。本研究采用自杀性质粒 pWM91 介导的同源重组法成功构建了 S.T. *hilD* 基因缺失株,该质粒含有正向筛选的氨苄青霉素(Amp)抗性基因和反向筛选的 *sacB* 蔗糖敏感基因,具有酶切酶连效率高、标记性良好等特点,方便缺失菌株的鉴定筛选;又通过电转化法成功获得 *hilD* 基因回补株、*hilD* 基因缺失株空质粒菌和亲本株空质粒菌,并对 3 株菌的遗传稳定性、生长曲线、生物膜形成能力、对小鼠致病力及对 HeLa 细胞的黏附力和侵袭力等生物学特性进行比较,以研究 S.T. *hilD* 基因的功能。

本研究中, S.T. ($\Delta hilD$ +pcDNA3.1)和 S.T. ($\Delta hilD$ +pcDNA3.1- $hilD$) 经 30 代传代培养后 *hilD* 基因缺失片段与 pcDNA3.1-*hilD* 均能稳定遗传;缺失 *hilD* 基因后, S.T. ($\Delta hilD$ +pcDNA3.1)较 S.T. ($\Delta hilD$ +pcDNA3.1- $hilD$)和 S.T. (pcDNA3.1)的生物膜形成能力与 LD_{50} 值均升高,且灌胃攻毒方式较腹腔攻毒方式小鼠的 LD_{50} 更高,对 HeLa 细胞的黏附力和侵袭力均显著降低。生物膜是细菌毒力因子的一种,形成生物膜的细菌对抗外界不利环境的抵抗力增强,能通过释放膜

表 2 S.T (pcDNA3.1), S.T ($\Delta hilD$ +pcDNA3.1) 及 S.T ($\Delta hilD$ +pcDNA3.1-*hilD*)灌胃攻毒小鼠的 LD_{50} 测定Table 2 The LD_{50} of S.T (pcDNA3.1), S.T ($\Delta hilD$ +pcDNA3.1) and S.T ($\Delta hilD$ +pcDNA3.1-*hilD*) in oral

菌株	LD_{50}	95%上限	95%下限
Strain		95% upper limit	95% lower limit
S.T (pcDNA3.1)	1.4×10^{11ab}	3.7×10^{11}	5.2×10^{10}
S.T ($\Delta hilD$ +pcDNA3.1- <i>hilD</i>)	9.0×10^{10ac}	1.4×10^{11}	5.6×10^{10}
S.T ($\Delta hilD$ +pcDNA3.1)	1.8×10^{12bc}	3.1×10^{12}	1.1×10^{12}

注: 上表中字母相同表明组间毒力差异不显著($P>0.05$); 字母不同表明组间毒力差异显著($P<0.05$)Note: The same letter in the above table indicates that the difference in virulence between the groups is not significant ($P>0.05$), The different letter indicates significant ($P<0.05$)

内的浮游菌感染宿主(Anna and Jordi, 2013)。研究表明 细菌生物膜形成能力越强 毒力一般越弱(Li et al., 2014)。不同感染途径细菌毒力存在差异 ,可能是因为腹腔攻毒时菌液通过门静脉进入脾脏毛细血管或经腹腔引流直接进入淋巴结 ,而灌胃攻毒时菌液主要通过肠黏膜进入上皮组织继而感染宿主 (Ibarra and Steele, 2009; 陈铨, 2016)。黏附力和侵袭力作为沙门氏菌毒力判定标准之一 ,由鞭毛和菌毛协同作用 鞭毛调控的主操纵子 *flhDC* 转录表达的 FlhD₄C₂ 复合体能控制沙门氏菌生物膜的形成、SPI1 毒力基因的表达及细胞表面抗原鞭毛蛋白的产生。P1 (*flhDC*)和 P5 (*flhDC*) 是起主要作用的 *flhDC* 潜在转录起始位点 其中 P1 (*flhDC*)激活 *flhDC* 的正负两个调节环 ,负调节环从 P1 (*flhDC*)开始形成 FlhD₄C₂ 进而反馈抑制 P1 (*flhDC*) ,而正调节环中 P1 (*flhDC*)能启动 SPI1 调控基因 *hilD* 转录 *hilD* 蛋白 ,激活 P5 (*flhDC*)启动子的转录 ,而 *hilD* 又能反作用于 P1 (*flhDC*)和 P5 (*flhDC*) (Mouslim and Hughes, 2014; Wiedemann et al., 2015)。可以推测 *hilD* 基因缺失后 ,P1 (*flhDC*)和 P5 (*flhDC*)转录被抑制 ,影响沙门氏菌生物膜形成和鞭毛蛋白的表达 细菌的黏附力和侵袭力均减弱 ,而关于 *hilD* 基因对菌毛的调控作用目前尚未见报道。

综上所述 *hilD* 基因缺失后 ,对 S.T 的生长速率无影响 ,但其生物膜形成能力增强 ,毒力减弱 ,为后续进一步研究体内环境下 *hilD* 对 SPI2 的调控作用奠定基础。

3 材料与方法

3.1 菌株、质粒和细胞

S.T 标准株 CMCC50115 购自广东省菌种保藏中心 ,亲本菌株 S.T (由 S.T 标准株 CMCC50115 诱导 ,具链霉素(Str)抗性但对氨苄青霉素(Amp)敏感) ,大肠杆菌 DH5 α 、原核表达载体 pcDNA3.1(+)、自杀性质粒 pWM91 和 HeLa 细胞均由安徽农业大学动物

传染病实验室保存。

3.2 主要试剂、培养基和实验动物

氨苄青霉素(Amp)、链霉素(Str)购自 Biosharp 公司 ,胰蛋白胨(Tryptone)、酵母提取物(Yeast Extract)购自 OXID 公司 ,T4 DNA Ligase、普通 *rTaq* 酶、*Not* 、*Xho* 、*Bam*H 、*Eco*R 内切酶、高保真酶 Primer Star 购自上海宝生物科技有限公司。DMEM 培养基、胎牛血清、胰酶消化液购自四季青生物有限公司。dNTPs (25 mmol/L)、10 $\times$ PCR Buffer、*Taq* DNA 聚合酶 (5 U/ μ L)、DNA Marker-2000、DNA Marker-600、2 $\times$ *Taq* PCR Master Mix、质粒小提试剂盒(离心柱型)均购自天根生化科技(北京)有限公司 ,普通琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒(离心柱型)购自天根生物科技有限公司。150 只 18~22 g 清洁级昆明小鼠购自安徽医科大学实验动物中心。

3.3 引物合成

根据 GenBank 上登录的基因序列设计引物 ,其中 *philD*-del-1 和 *philD*-del-4 的 5' 端分别加入了 *Not* 和 *Xho* 酶切位点 ,*philD*-del-2 和 *philD*-del-3 的 5' 端加入了 10 个互补配对的碱基。S.T 基因缺失株及其回补株的相关引物序列(表 3)。

3.4 S.T ($\Delta hilD$)、S.T ($\Delta hilD$ +pcDNA3.1-*hilD*)、S.T ($\Delta hilD$ +pcDNA3.1)和 S.T (pcDNA3.1)菌株的构建及鉴定

3.4.1 pWM91 自杀质粒的抽提

将 SM10 λ *pir* (pWM91)接种于 LB/Amp 琼脂培养基上分离纯化 ,取单菌落转接至 5 mL 的 LB/Amp 液体培养基 ,37 $^{\circ}$ C 180 r/min 过夜培养。使用质粒小提试剂盒按说明书提取自杀质粒。

3.4.2 *hilD* 基因上、下游同源臂的扩增

以 SDS 法(颜瑛等, 2015)提取亲本菌株 S.T 的基

表 3 实验中所用引物及其序列

Table 3 Primers and their sequences used in this study

引物名称 Primers name	引物序列(5'-3') Primers sequence (5'-3')	限制性 酶切位点 Restriction site	用途 Use	目的片段(bp) Destination segment (bp)
invA-1	GTGAAATTATCGCCACGTTTCGGGCAA		回补株验证 Validation of complemen- tary strains	250
invA-2	TCATCGCACCGTCAAAGGAACC			
pcDNA 3.1-1	CCGCAGTGTTATCACTCATG		回补株验证	250
pcDNA 3.1-2	GTGGGTTACATCGAACTGGATC		Validation of complemen- tary strains	
p1	ATAGCGGCCGCTCCGGGCGAATCAGGATAAG	<i>Not</i>	<i>hilD</i> 基因的敲除	776
p2	AAGCTTCCACTTGCTGCCGGGTATTTGTCA		Knockout of <i>hilD</i> gene	
p3	CCGGCAGCAAGTGAAGCTTACGGATGTTG			765
p4	GCGCTCGAGAAAGGCAGGAGGGTTATGAG	<i>Xho</i>		
p5	ATAGAATTCATGGAAAATGTAACCTTTGTAAG	<i>EcoR</i>	构建 <i>hilD</i> 基因回补株	948
p6	GCGGGATCCTTAATGGTTCGCCATTTTATGA	<i>BamH</i>	Construction of <i>hilD</i> gene complementary strains	

基因组 DNA 作为模板, 引物 p1/p2 p3/p4 分别扩增 *hilD* 基因上下游同源臂。PCR 反应体系: 10×PCR Buffer 5 μL, 25 mmol/L MgCl₂ 3 μL, 上下游引物(10 μmol/L)各 1 μL, *rTaq* DNA 聚合酶(5 U/μL) 0.2 μL, 模板 1 μL, Primer Star 高保真酶 0.8 μL, 双蒸水(ddH₂O) 34 μL。PCR 反应条件: 95 °C 5 min, 95 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 1 min, 30 个循环, 72 °C 10 min, 4 °C 保存。经 0.8% 凝胶电泳后, 使用凝胶回收试剂盒按说明书回收 DNA 片段。以该片段为模板, p1、p4 为上下游引物进行 Overlap PCR 反应, 经 0.8% 凝胶电泳后使用凝胶回收试剂盒回收目的片段。

3.4.3 重组自杀质粒 pWM91-*ΔhilD* 的构建

根据设计位点对 Overlap PCR 的回收产物和自杀质粒 pWM91 进行 *Not* 和 *Xho* 双酶切, 乙醇沉淀法回收酶切产物, T4 DNA 连接酶连接两双酶切产物。CaCl₂ 法(李明才和何韶衡, 2005)制备大肠杆菌 SM10 (λpir)感受态细胞, 并通过化学转化法转入酶连产物。随机挑取转化子, 以 p1、p4 为引物进行 PCR 验证, 若表现阳性克隆, 则扩大培养并取新鲜菌液提取质粒, *Not* 和 *Xho* 双酶切后进一步鉴定可疑阳性克隆, 加 3 μL 10×Loading Buffer, 0.8% 琼脂糖凝胶电泳验证。将酶切和 PCR 鉴定均为阳性的重组菌液送至南京金斯瑞生物有限公司进行测序并保存。

3.4.4 重组自杀质粒(pWM91-*ΔhilD*)与亲本菌株 S.T 的接合

挑取 LB/Amp 琼脂培养基上纯化的 pWM91-

ΔhilD 和 LB/Str 琼脂培养基上纯化的 S.T 的单菌落, 分别接种于 5 mL LB/Amp 和 LB/Str 液体培养基中, 37 °C 180 r/min 过夜培养。按 5% 的比例将 pWM91-*ΔhilD* 转接至 LB/Amp 液体培养基, 1% 的比例将 S.T 接种到 LB/Str 液体培养基中, 37 °C 180 r/min 培养至 OD₆₀₀ 达到 0.8, 获得受体菌与供体菌。滤膜接合法(Werner et al., 2003)获得接合子。

3.4.5 *hilD* 基因缺失株的构建

将上述结合子在 LB/Amp/Str 琼脂培养基上纯化并转接至含 25% 蔗糖的 LB 固体培养基上, 22 °C 培养 40 h 挑取单菌落, 分别接种于 LB/Amp 琼脂培养基和 LB 琼脂培养基, 37 °C 过夜培养。选取在 LB/Amp 琼脂培养基上不生长而 LB 固体培养基上生长的菌落为模板, 以 p1、p4 为引物, 进行 PCR 验证, 基因条带变短者即为 *hilD* 基因缺失株 S.T (*ΔhilD*)。

3.4.6 S.T (*ΔhilD*)基因回补株的构建

以 S.T 基因组 DNA 为模板, p5 和 p6 为引物扩增 *hilD* 基因, 经 0.8% 琼脂糖凝胶电泳后回收目的片段。对 *hilD* 的回收产物和表达质粒 pcDNA3.1(+)进行 *EcoRI* 和 *BamHI* 双酶切, 构建 pcDNA3.1-*hilD* 重组表达载体, 同时制备 S.T (*ΔhilD*)感受态细胞(方法同 3.4.3 节, 其中双蒸水替换 CaCl₂)。将 pcDNA3.1-*hilD* 转入 S.T (*ΔhilD*)感受态细胞, 构建 *hilD* 基因回补株 S.T (*ΔhilD*+pcDNA3.1-*hilD*), 经 PCR 验证(包括 *hilD* 基因, *invA* 基因及 pcDNA3.1(+))的扩增)后保存待用。

为避免差异,同样方法构建 *hilD* 基因缺失株空质粒菌 S.T ($\Delta hilD$ +pcDNA3.1)和亲本菌株空质粒菌 S.T (pcDNA3.1)并进行 PCR 鉴定。

3.5 S.T ($\Delta hilD$ +pcDNA3.1)与 S.T ($\Delta hilD$ +pcDNA3.1-*hilD*)及 S.T (pcDNA3.1)的生物学特性比较

3.5.1 遗传稳定性的测定

分别将 S.T ($\Delta hilD$ +pcDNA3.1)和 S.T ($\Delta hilD$ +pcDNA3.1-*hilD*)于 LB/Amp 琼脂培养基上连续传代,挑取第 5、10、15、20、25、30 代单菌落,以 p5、p6 为引物进行扩增鉴定,探究 S.T ($\Delta hilD$ +pcDNA3.1)和 S.T ($\Delta hilD$ +pcDNA3.1-*hilD*)中 *hilD* 的遗传稳定性。

3.5.2 体外生长曲线的测定

分别将 S.T (pcDNA3.1)、S.T ($\Delta hilD$ +pcDNA3.1)及 S.T ($\Delta hilD$ +pcDNA3.1-*hilD*)以 1:100 的比例转接至 100 mL LB/Amp 液体培养基中,37 °C、180 r/min 振荡培养,0~15 h 内每 1 h 取 600 μ L 菌液测定 OD_{600} ,重复 3 次,以时间为横坐标,吸光度为纵坐标,绘制 3 株细菌的生长曲线。

3.5.3 生物膜形成能力的测定

分别将 S.T (pcDNA3.1)、S.T ($\Delta hilD$ +pcDNA3.1)及 S.T ($\Delta hilD$ +pcDNA3.1-*hilD*)接种于 LB/Amp 琼脂培养基纯化培养,再转接至 5 mL LB/Amp 液体培养基,37 °C、180 r/min 过夜培养,按照 5%比例接种于 800 μ L LB/Amp 液体培养基中,37 °C 静置培养。结晶紫法(Mohd et al., 2007)测定 3 株细菌在培养 24、48、72、96、120、144 h 时的成膜能力,以时间为横坐标, OD_{570} 值为纵坐标,绘制生物膜形成曲线。

3.5.4 对小鼠致病力的测定

分别将 S.T (pcDNA3.1)、S.T ($\Delta hilD$ +pcDNA3.1)及 S.T ($\Delta hilD$ +pcDNA3.1-*hilD*)于 LB/Amp 液体培养基培养至稳定期。110 只小鼠随机分为 11 组,每组 10 只,其中 10 组试验组,1 组对照组。采用腹腔注射和灌胃两种方式对各试验组小鼠进行攻毒,剂量分别为 LD_0 、 LD_{0r} 、 LD_{0r^2} 、 LD_{0r^3} 和 LD_{100} ,预试验测定 LD_{100} 和 LD_0 $r = \sqrt[4]{LD_{100}/LD_0}$,对照组每只小鼠注射 0.3 mL 灭菌生理盐水。记录攻毒后 7 d 内小鼠的死亡数,以改良寇氏法计算细菌对小鼠的 LD_{50} (张成栋, 2009)。

3.5.5 对 Hela 细胞的黏附与侵袭试验

准备:分别将 S.T (pcDNA3.1)、S.T ($\Delta hilD$ +pcDNA3.1)及 S.T ($\Delta hilD$ +pcDNA3.1-*hilD*)于 LB/Amp 液体培养基培养至对数生长期,平板计数法计算活菌

数,同时培养 Hela 细胞至贴壁状态。按照 MOI=200:1 将细菌加入 Hela 细胞中,每株菌重复 3 次,于 37 °C、5% CO₂ 培养箱孵育 1.5 h,待后续处理。

黏附试验:弃上清液,灭菌 PBS 洗涤 5 次,每孔加入 0.1% Triton X-100 200 μ L 作用 15 min,收集裂解液进行 10 倍稀释,平板计数法计算黏附至 Hela 细胞的细菌数,判定黏附力(张成栋, 2009)。同时对黏附情况进行拍照,提前加入无菌盖玻片,于上述 PBS 洗涤后每孔加入 200 μ L 4%多聚甲醛溶液,室温固定 20 min,灭菌 PBS 洗涤 3 次,每孔再加入 500 μ L Giemsa 染液,室温孵育 30 min, PBS 轻轻冲洗 3 次,取出盖玻片,封片后在油镜下观察并拍照。空白对照组加无菌 DMEM 培养基。

侵袭试验:弃上清液,灭菌 PBS 洗涤 5 次,加入含 250 μ g/mL 庆大霉素的 DMEM 培养基 500 μ L 作用 2 h,以杀灭未侵袭的细菌,灭菌 PBS 洗涤 5 次,每孔加入 0.1% Triton X-100 200 μ L 裂解 15 min,收集裂解液进行 10 倍稀释,平板计数法计算侵袭细胞的细菌数,判定侵袭力(张成栋, 2009)。

3.5.6 数据统计与分析

试验数据采用 GraphPad Prism 5 软件进行统计分析。

作者贡献

唐正露是本研究的论文撰写人;罗聪玉是实验设计和实验研究的主要执行人;曹堃协助实验;李郁是项目负责人,指导实验设计并对论文进行修改。全体作者都阅读并同意最终的文本。

致谢

本研究由国家星火计划重点项目(2014GA71-0002)、安徽省自然科学基金项目(1508085MC44)、安徽省重点研究与开发计划(面上攻关)项目(201904a-06020013)、安徽省长三角联合科技攻关项目(1101c-0603065)和安徽省生猪产业体系基金项目[皖农科(2016)84 号]共同资助。

参考文献

- Anna F., and Jordi V., 2013, *Salmonella enterica* serovar Typhimurium skills to succeed in the host: virulence and regulation, Clin. Microbiol. Rev., 26(2): 308-341.
Cao T.X., Jiang W.C., He W.C., Ji F.X., and Wei Z.G., 2014, Research progress of virulence factors of *Salmonella*, Zhongguo Yufang Shouyi Xuebao (Chinese Journal of Preventive Vet-

- erinary Medicine), 36(4): 331-334. (曹恬雪, 蒋文灿, 何文成, 季凤仙, 魏志刚, 2014, 沙门氏菌毒力因子的研究进展, 中国预防兽医学报, 36(4): 331-334.)
- Chen B.H., Zhou T.T., Long Z.E., and Huang Y.H., 2019, Research strategies and methods for microbial gene function, Weishengwuxue Zazhi (Journal of Microbiology), 39(6): 117-123. (陈宝花, 邹婷婷, 龙中儿, 黄运红, 2019, 微生物基因功能的研究策略与方法, 微生物学杂志, 39(6):117-123)
- Chen C., 2016, Pathogenicity and drug sensitivity test of *Salmonella enteritidis* infection by different way in chickens, Thesis for M.S., Fujian Agriculture and Forestry University, Supervisor: Ma Y.F., pp.24. (陈铨, 2016, 肠炎沙门氏菌不同感染途径对雏鸡的致病性及其对药物敏感性实验, 硕士学位论文, 福建农林大学, 导师:马玉芳, pp.24.)
- Chen X.Q., Li J., Wang R.B., Yan M.Y., Kan B., Gao H., and Yan Z.Y., 2013, Involvement of Hfq in stress response and transcriptional regulation of virulence genes and stress-responsive genes in *Vibrio cholera*, Zhonghua Weishengwuxue he Mianyixue Zazhi (Chinese Journal of Microbiology and Immunology), 33(4): 241-246. (陈秀琴, 李杰, 王瑞白, 闫梅英, 阚飙, 高鹤, 闫志勇, 2013, Hfq 对霍乱弧菌环境适应能力的影 响及相关基因的转录调控, 中华微生物学和免疫学杂志, 33(4): 241-246.)
- Daniel C.S., Nicholas M.E., Dureen M.M., and Amin A.F., 2013, Role of StdA in adhesion of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis phage type 8 to host intestinal epithelial cells, Gut Pathogens, 5(1): 43.
- Ellermeier C.D., Ellermeier J.R., and Slauch J.M., 2005, *hilD*, HilC and RtsA constitute a feed forward loop that controls expression of the SPII type three secretion system regulator *hilA* in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium, Mol. Microbiol., 57(3): 691-705.
- Ibarra J.A., and Steele M.O., 2009, *Salmonella*-the ultimate insider. *Salmonella* virulence factors that modulate intracellular survival, Cell Microbiol., 11(11): 1579-1586.
- Li M.C., and He S.H., 2005, An efficient and rapid method for the preparation and transformation of competent cells from *Escherichia coli*, Shantou Daxue Yixueyuan Xuebao (Journal of Shantou University Medical College), 18 (4): 228-230, 241. (李明才, 何韶衡, 2005, 一种高效、快速的大肠杆菌感受态细胞制备及质粒转化方法, 汕头大学医学院学报, 18(4): 228-230, 241.)
- Li Y., Petrova O.E., Su S.C., Lau G.W., Panmanee W., Na R., Hassett D., Davies D.G., and Sauer K., 2014, BdlA, DipA and induced dispersion contribute to acute virulence and chronic persistence of *Pseudomonas aeruginosa*, PLoS Pathogens, 10(6): e1004168.
- Luayr C.M., Helen Y., Martha I.C., Dimitris G., Paul B., José L.P., and Víctor H.B., 2011, Integration of a complex regulatory cascade involving the SirA/BarA and Csr global regulatory system that control expression of the *Salmonella* SPI-1 and SPI-2 virulence regulons through *hilD*, Mol. Microbiol., 80 (6): 1637-1656.
- Mohd F.Z.R.Y., Zazali A., and Saiful A.K., 2017, Subtractive protein profiling of *Salmonella typhimurium* biofilm treated with DMSO, Protein J., 36(4): 286-298.
- Mouslim C., and Hughes K.T., 2014, The effect of cell growth phase on the regulatory cross-talk between flagellar and Spi1 virulence gene expression, PLoS Pathogens, 10(3): e1003987.
- Werner G., Willems R.J.L., Hidebrandt B., Klare I., and Witte W., 2003, Influence of transferable genetic determinants on the outcome of typing methods commonly used for *Enterococcus faecium*, J. Clin. Microbiol., 41(4): 1499-1506.
- Wiedemann A., Virlogeux-Payant I., Chausse A.M., Schikro A., and Velge P., 2015, Interactions of *Salmonella* with animals and plants, Front. Microbiol., 21(5): 791.
- Yan Y., Luo Y.B., Wang W.J., Pan Y., and Wan C.B., 2015, Comparative study on three kinds of DNA extraction methods of *Salmonella* and *Staphylococcus aureus*, Anhui Nongye Kexue (Journal of Anhui Agricultural Sciences), 43 (27): 41-43. (颜瑛, 罗玉彬, 王文娟, 潘影, 万承波, 2015, 沙门氏菌和金黄色葡萄球菌 3 种 DNA 提取方法的比较, 安徽农业科学, 43(27): 41-43.)
- Zhang C.D., 2009, Study on the cytotoxicity of type fimbriae mediated by *Salmonella typhimurium* in mice and invasion of antigen-presenting cells, Thesis for M.S., Huazhong Agricultural University, Supervisor: Guo A.Z., pp.23, 36. (张成栋, 2009, 型菌毛介导鼠伤寒沙门氏菌对小鼠的毒力及对抗原递呈细胞侵袭力的研究, 硕士学位论文, 华中农业大学, 导师 郭爱珍, pp.23, 36.)

(责任编辑 蹇慧)