

DOI:10.3969/cjz.j.issn.1002-2694.2013.05.008

# 不同源沙门氏菌对小鼠致病力的比较与毒力基因检测

程 琼, 庞瑞亮, 王若晨, 苏方超, 刘军军, 李 郁

**摘要:**目的 探究不同来源沙门氏菌的致病力及毒力基因分布的差异性。**方法** 采用改良寇氏法对7株不同来源的沙门氏菌进行小鼠致病性试验、病理剖检和组织切片观察,应用PCR检测质粒毒力基因和部分毒力岛基因。**结果** 7株菌株的LD<sub>50</sub>按表中编号⑥、④、⑤、②、①、③、⑦依次降低,菌株⑦、①、③引致的病理变化最为明显,4株猪源沙门氏菌的致病力均高于3株鸡源菌株。仅菌株⑦菌株检出 $spvR$ 、 $spvA$ 、 $spvB$ 、 $spvC$ 、 $spvD$ 质粒毒力基因;毒力岛毒力基因 $sscA$ 、 $sseD$ 、 $sseE$ 7株菌株全部检出,而 $sseC$ 基因仅有③、④、⑤和⑦检出。**结论** 不同来源的沙门氏菌对小鼠的致病力具有明显差异,不同沙门氏菌对小鼠的致病力表型与其毒力基因的分布存在相关性。

**关键词:**沙门氏菌;猪源;鸡源;致病力;毒力基因

中图分类号:R378.2

文献标识码:A

文章编号:1002-2694(2013)02-0460-06

## Comparative study on pathogenicity of *Salmonella* isolates from different sources of laboratory mice and the detection of their virulence genes

CHENG Qiong, PANG Rui-liang, WANG Ruo-chen, SU Fang-chao, LIU Jun-jun, LI Yu

(College of Animal Science and Technology, Anhui Agricultural University, Hefei 230036, China)

**ABSTRACT:** The aim of this study was to explore the pathogenicity of *Salmonella* isolates from different sources and the distribution of their virulence genes. We tested the pathogenicity of seven *Salmonella* isolates from different sources by the modified Karber method. The pathological changes were observed, and the plasmid virulence genes ( $spv$ ) and some pathogenicity island (SPI) genes were detected by PCR. Results showed that according to the number of strain in the table the LD<sub>50</sub> in the seven isolates were decreased in the order of ⑥, ④, ⑤, ②, ①, ③, ⑦. The most obvious pathological changes were caused by ①, ③ and ⑦. The pathogenicity of *Salmonella* isolates from swine was stronger than others from chicken. The  $spv$  genes detected from ⑦ isolate only. The SPI virulence genes  $sscA$ ,  $sseD$ , and  $sseE$  were detected in all *Salmonella* isolates with the present of  $sseC$  in ③, ④, ⑤ and ⑦. Results suggested that there is obvious difference of pathogenicity to mice among *Salmonella* isolates from different sources, which indicated a correlation between pathogenicity to mice and the carrier condition of virulence genes of *Salmonella* isolates from different sources.

**KEY WORDS:** *Salmonella*; isolates from swine; isolates from chicken; pathogenicity; virulence gene

Supported by the National Science and Technology Support Program (No. 2009BADB9B01), the Provincial Natural Science Research Project of Anhui Province Institutions of Higher Learning (No. KJ2008B056), and the Student Research Fund of Anhui Agricultural University (No. 2011212)

Corresponding author: Li Yu, Email:liyouer@163.com

沙门氏菌广泛分布于自然界,极易污染食物、水源、土壤等。根据血清型分类,目前沙门氏菌已有2 500种以上,其中许多血清型菌株在人和动物之间

国家科技支撑项目(2009BADB9B01);安徽省高等学校省级自然科学研究项目(KJ2008B056);安徽省生猪产业体系基金和安徽农业大学大学生科技创新基金项目(2011212)联合资助

通讯作者:李郁,Email:liyouer@163.com

作者单位:安徽农业大学动物科技学院,合肥 230036

交叉感染,且大部分具有很强致病性。人类由于食用患病动物的肉、乳、蛋或被患病动物的排泄物污染的食物,常引起肠热症、胃肠炎和败血症等。沙门氏菌致病机制较为复杂,其感染宿主通常是先粘附到宿主组织上,进而通过毒力因子侵袭宿主细胞,导致宿主患病及死亡,这些毒力因子由细菌的基因编码<sup>[1]</sup>,而这些基因主要存在于毒力质粒和染色体上的毒力岛(*Salmonella* pathogenicity island, SPI)

中。在沙门氏菌的毒力质粒中, *spv* (*Salmonella* plasmid virulence genes) 与细菌的毒力表型关系最为密切, 包括 *spvR*、*spvA*、*spvB*、*spvC*、*spvD* 基因等<sup>[2]</sup>, 其编码的产物能增强细菌在宿主细胞内生长, 与肠系膜淋巴结、脾、肝等肠道外组织感染有关。而沙门氏菌致病性的两个标志: 侵入非吞噬细胞及其在细胞内存活的能力和在宿主的吞噬细胞中复制的能力, 均与 SPI 密切相关<sup>[3]</sup>。

本研究通过寇氏法测定半数致死量 (LD<sub>50</sub>)、组织切片观察病理变化, 以及 PCR 检测毒力基因, 比较不同来源沙门氏菌的致病力及毒力基因分布的差异性, 从而为深入研究沙门氏菌的致病机制, 有效防控沙门氏菌病奠定基础。

## 1 材料与方法

**1.1 受试菌株** 7 株不同来源的沙门氏菌由安徽农业大学动物传染病实验室分离、鉴定并保存, 见表 1。

**1.2 参考菌株** *invA*、*spvR*、*spvA*、*spvB*、*spvC*、*spvD*、*sscA*、*sseC*、*sseD*、*sseE* 等基因阳性菌株均由安徽农业大学动物传染病实验室保存。

表 1 7 株不同来源沙门氏菌背景

Tab. 1 Background of seven *Salmonella* isolates from different sources

No. <i>Salmonella</i> isolate	来源 Source	血清型 Serotype
①	Meat sample of pig carcass	<i>S. saintpaul</i>
②	Surface sample pig carcass	<i>S. senftenberg</i>
③	Anal swab of pig	<i>S. arechavaleta</i>
④	Surface sample of chicken carcass	<i>S. muenster</i>
⑤	Anal swab of chicken	<i>S. saintpaul</i>
⑥	Chicken (clinical case)	<i>S. senftenberg</i>
⑦	Pig (clinical case)	<i>S. mkamba</i>

**1.3 主要试剂** 木糖赖氨酸脱氧胆酸琼脂 (XLD)、胰蛋白胨大豆肉汤培养基 (TSB)、琼脂粉、蛋白胨均购自绍兴天恒生物科技有限公司; Taq DNA 聚合酶、dNTP、Taq Reaction Buffer、DNA Maker-DL2000、DNA Maker I、普通质粒小提试剂盒(离心柱型)均购自天根生化科技(北京)有限公司。引物均由上海生物工程技术有限公司合成, 见表 2。

表 2 PCR 扩增引物序列及扩增条件

Tab. 2 PCR amplification primer and conditions

基因 Target	引物序列 (5'-3') Sequence of Primer (5'-3')	扩增条件 PCR amplification condition	片段大小 Base pairs/bp
<i>invA</i>	Upstream: GTGAAATTATCGCCACGTTGGCAA Downstream: TCATCGCACCGTCAAAGGAACC	94℃ 5 min; 94℃ 30 s, 60℃ 30 s, 72℃ 30 s, 35 cycles; 72℃ extension for 10 min	284
<i>spvR</i>	Upstream: AGGAAATCGGACCTACGG Downstream: TAACATCGCCAGGCCCTTG	94℃ 5 min; 94℃ 30 s, 57℃ 30 s, 72℃ 45 s, 35 cycles; 72℃ extension for 10 min	473
<i>spvA</i>	Upstream: GCTAACTGTCGGCAAG Downstream: GGACAATGGCACGAACCT	94℃ 5 min; 94℃ 30 s, 57℃ 30 s, 72℃ 45 s, 35 cycles; 72℃ extension for 10 min	432
<i>spvB</i>	Upstream: CCTGATGTTCCACCACTTT Downstream: ATGCCTTATCTGGCGATGT	94℃ 5 min; 94℃ 30 s, 57℃ 30 s, 72℃ 45 s, 35 cycles; 72℃ extension for 10 min	590
<i>spvC</i>	Upstream: AAGGTCGTTCAACAAGCC Downstream: CATTTCACCACCATCACG	94℃ 5 min; 94℃ 30 s, 55℃ 30 s, 72℃ 45 s, 35 cycles; 72℃ extension for 10 min	252
<i>spvD</i>	Upstream: CCCCTGATGATGAGAAGT Downstream: ACAGTGGGATTAGACAGC	94℃ 5 min; 94℃ 30 s, 55℃ 30 s, 72℃ 45 s, 35 cycles; 72℃ extension for 10 min	316
<i>sscA</i>	Upstream: ATGAAAAAGACCCGACCTA Downstream: TTAGCTCCTGTCAGAAAGTT	94℃ 5 min; 94℃ 30 s, 43℃ 30 s, 72℃ 45 s, 35 cycles; 72℃ extension for 10 min	474
<i>sseC</i>	Upstream: ATGAATCGAATTACAGTAA Downstream: TTAAGCGCGATAGCCAGCTA	94℃ 5 min; 94℃ 30 s, 43℃ 30 s, 72℃ 90 s, 35 cycles; 72℃ extension for 10 min	1 455
<i>sseD</i>	Upstream: ATGGAAGCGAGAACGTAGC Downstream: TTACCTCGTTAATGCCCGGA	94℃ 5 min; 94℃ 30 s, 41℃ 30 s, 72℃ 60 s, 35 cycles; 72℃ extension for 10 min	588
<i>sseE</i>	Upstream: ATGGTGCAAGAAATAGAGCA Downstream: TTAAAAACGTCGCTGGATAA	94℃ 5 min; 94℃ 30 s, 53℃ 30 s, 72℃ 45 s, 35 cycles; 72℃ extension for 10 min	417

### 1.4 生长曲线测定 按参考文献<sup>[4]</sup>。

### 1.5 动物致病性试验

1.5.1 实验动物 SPF 级昆明小鼠,40 只,体重约 20 g,雌雄各半,购自安徽医科大学实验动物中心。

1.5.2 测定 LD<sub>50</sub> 用递加法预试验确定 LD<sub>0</sub> 和 LD<sub>100</sub>。在此区间剂量范围内,将小鼠随机分为 5 组,即 5 个剂量组,每组 8 只,雌雄各半,相邻组间剂量参考文献[5]得出。采用腹腔注射,用培养 8 h 的菌液等容量不等浓度接种小鼠,0.5 mL/只,对照组注射等量生理盐水。攻毒后,连续观察 7 d,以改良寇氏法<sup>[5]</sup>计算 LD<sub>50</sub>。

1.5.3 剖检小鼠、回收细菌及 PCR 鉴定 对攻毒后死亡的小鼠,剖检观察各组织脏器病变。取小鼠的肝、脾脏接种 XLD,回收细菌,热裂解法提取细菌 DNA。选择沙门氏菌侵膜蛋白基因(*invA*),参考文献[6]合成属特异性引物(见表 2),PCR 检测脏器中是否存在沙门氏菌。

1.5.4 病理组织学观察 取小鼠的心、肝、脾及肺组织,制作石蜡切片,常规苏木素-伊红(HE)染色,光学显微镜观察攻毒后小鼠脏器的病理组织学变化。

### 1.6 毒力基因检测

1.6.1 引物选择 参考 Genbank 中沙门氏菌 *spvR*、*spvA*、*spvB*、*spvC*、*spvD* 基因序列各设计一对特异性引物。选择沙门氏菌毒力岛基因 *sscA*、*sseC*、*sseD*、*sseE*,参考文献[7]合成特异性引物。均见表 2。

1.6.2 总 DNA 和质粒的提取 热裂解法提取总 DNA,用于 SPI 基因的检测;按试剂盒说明提取质粒,用于 *spv* 基因的检测。

1.6.3 PCR 扩增 反应体系:10×Taq Reaction Buffer(Mg<sup>2+</sup> Plus) 2.5 μL, dNTPs(2.5 mmol/L) 2.0 μL, 上下游引物(10 μmol/L)各 1.0 μL, Taq

DNA 聚合酶(2.5 U/μL) 0.25 μL, 模板 DNA 2.0 μL, ddH<sub>2</sub>O 16.25 μL。反应条件见表 2。

1.6.4 PCR 产物分析 取 7 μL PCR 产物与 1 μL 10×Glycerol DNA Loading buffer 混匀,在 2% 琼脂糖凝胶(含 0.5 μg/mL 溴化乙锭)上,以 100 V 电压电泳 30 min 后,凝胶紫外成像系统观察并拍照。

## 2 结 果

2.1 生长曲线 7 株受试菌株的生长曲线均呈现明显的迟缓期、对数期、稳定期,且均在培养 2 h 后进入对数期,6~8 h 后进入稳定期(见图 1)。由此选择培养 8 h 的细菌进行攻毒试验。

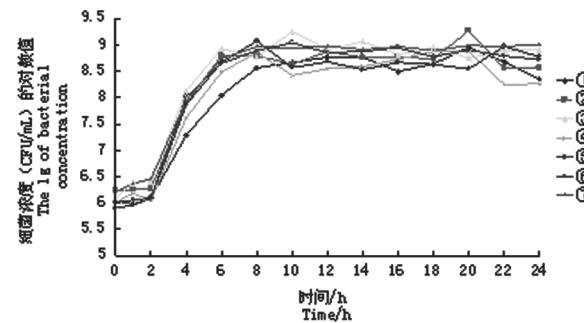


图 1 7 株沙门氏菌生长曲线测定结果

Fig. 1 Result of growth curve of seven *Salmonella* isolates

2.2 LD<sub>50</sub> 接种沙门氏菌后,试验组小鼠均于接种后 2 h 出现精神萎靡,饮、食欲下降,运动减少,打堆,毛松乱;之后部分小鼠腹泻,全身震颤;4~6 h 出现小鼠死亡的试验组依次为⑦、③、①;6~8 h 出现小鼠死亡的试验组为②、④、⑤、⑥;10~18 h 小鼠死亡达到高峰期;60 h 以后小鼠不再死亡。对照组未见异常。7 株受试菌株的 LD<sub>50</sub> 按⑥、④、⑤、②、①、③、⑦ 依次降低,见表 3。从各试验组死亡小鼠的肝、脾脏均回收到沙门氏菌,且 PCR 检测为阳性。

表 3 7 株不同来源沙门氏菌的 LD<sub>50</sub> 测定结果

Tab. 3 LD<sub>50</sub> result of 7 *Salmonella* isolates from different sources

菌株 Strain	LD <sub>0</sub> (cfu/mL)	LD <sub>100</sub> (cfu/mL)	LD <sub>50</sub> (cfu/mL)	95% 可信域 (cfu/mL) 95% confidential intervals	标准误 Standard error
①	9.6×10 <sup>7</sup>	9.6×10 <sup>9</sup>	4.05×10 <sup>8</sup>	2.17×10 <sup>8</sup> —7.53×10 <sup>8</sup>	0.137 7
②	4.7×10 <sup>7</sup>	4.7×10 <sup>9</sup>	4.06×10 <sup>8</sup>	2.99×10 <sup>8</sup> —4.24×10 <sup>8</sup>	0.127 2
③	3.0×10 <sup>6</sup>	3.0×10 <sup>9</sup>	7.32×10 <sup>7</sup>	3.01×10 <sup>7</sup> —1.78×10 <sup>8</sup>	0.196 9
④	3.7×10 <sup>8</sup>	3.7×10 <sup>9</sup>	9.42×10 <sup>8</sup>	7.00×10 <sup>8</sup> —1.27×10 <sup>9</sup>	0.065 8
⑤	3.0×10 <sup>7</sup>	3.0×10 <sup>9</sup>	4.62×10 <sup>8</sup>	2.55×10 <sup>8</sup> —8.36×10 <sup>8</sup>	0.131 5
⑥	4.7×10 <sup>7</sup>	4.7×10 <sup>10</sup>	9.65×10 <sup>8</sup>	5.13×10 <sup>8</sup> —1.81×10 <sup>9</sup>	0.139 8
⑦	1.1×10 <sup>6</sup>	1.1×10 <sup>9</sup>	2.26×10 <sup>7</sup>	8.44×10 <sup>6</sup> —6.06×10 <sup>7</sup>	0.218 4

## 2.3 病理学观察

**2.3.1 剖检** 发病死亡小鼠肝脏肿大,表面散布有数量不等的灰白色坏死灶;脾脏肿大,部分小鼠脾脏卷曲;多数小鼠的肠壁变薄透明,肠腔充满黄色液体;肺脏淤血或出血;心、肾脏无明显病变。接种①、③和⑦菌株致死的小鼠与接种②、④、⑤、⑥菌株致死的小鼠相比,肝、脾脏病变尤为明显,其中⑦菌株引致的病变最为明显,肝脏表面出现大量白色梗死灶并伴有出血,肠壁非常薄,有大量炎性物质渗出,脾脏明显肿大,约为正常脾的2~4倍。

**2.3.2 病理组织切片** 与正常肝细胞相比(见图2 A),感染致死的小鼠肝脏病变明显,胞浆或胞核内出现大小不等的空泡,整个细胞呈蜂窝状结构(见图2 B);肝细胞肿胀,胞浆内有大量微细的淡红色颗粒,肝窦受压闭锁,肝细胞索紊乱(见图2 C)。肺支气管腔内积有浆液性渗出物,并混有较多的炎性细胞和脱落的上皮组织(见图2 E);管腔周围毛细血管较正常组织扩张充盈,肺泡隔结缔组织增生,间质增宽,肺泡腔、细支气管腔变窄,甚至闭塞(见图2 F)。心肌成纤维细胞增生(见图2 G,H)。

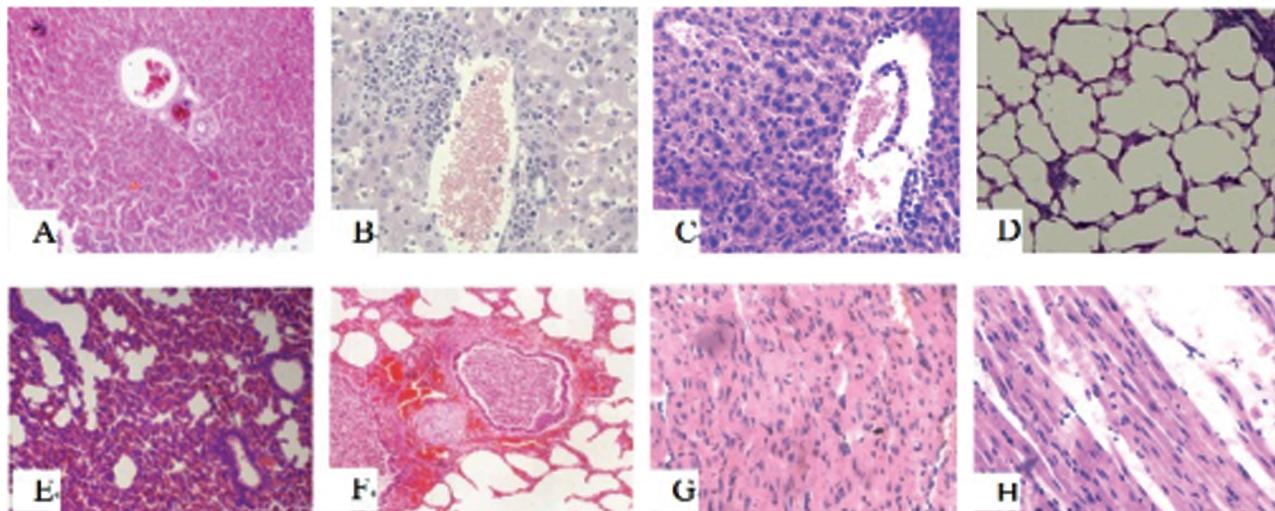


图2 病理组织学观察结果(HE染色,400×)

A: 肝脏对照组; B: 肝脏空泡样变性; C: 肝脏颗粒样变性; D: 肺脏对照组; E: 支气管肺炎; F: 间质性肺炎; G: 心肌成纤维细胞增生; H: 心肌梭状细胞。

Fig. 2 Photomicrographs of the influence on splanchnic tissue structure (H&E 400×)

A: Liver of mice in normal control group; B: Vacuolar degeneration in liver cells; C: Granular degeneration in liver cells; D: Lung of mice in normal control group; E: Bronchial pneumonia; F: Interstitial pneumonia; G: Myocardial fibroblast proliferation; H: Myocardial spindle cells.

## 2.4 毒力基因

**2.4.1 *spv* 基因** 在7株受试沙门氏菌中,⑦菌株检测出*spvR*、*spvA*、*spvB*、*spvC*、*spvD*,PCR扩增结果见图3;而其他6株菌均未检测到*spv*基因。

**2.4.2 毒力岛基因** 在7株受试沙门氏菌中,③、④、⑤、⑦菌株均检测到*sscA*、*sseD*、*sseE*、*sseC* 4种毒力基因,而①、②、⑥号均检测到*sscA*、*sseD*、*sseE* 3种毒力基因。*sscA*、*sseD*、*sseE*基因PCR扩增结果见图4,*sseC*基因PCR扩增结果见图5。

## 3 讨 论

**3.1 不同来源沙门氏菌对小鼠的致病力** 本研究中7株受试沙门氏菌的LD<sub>50</sub>按⑥、④、⑤、②、①、③、⑦依次降低,LD<sub>50</sub>值越小,细菌毒力越强,即⑥、④、⑤、②、①、③、⑦毒力依次增强。死亡小鼠组织

脏器呈现急性沙门氏菌败血症的病变,以肝、脾最严重,其次为肠道和肺,心、肾等脏器的病变不明显。⑦、①和③引致的肝、脾、肺脏病变尤为显著。显示4株猪源沙门氏菌对小鼠的致病力均强于3株鸡源沙门氏菌,表明沙门氏菌的毒力强弱与其来源的动物种类有关。在猪源沙门氏菌中,分离自临床病例的菌株致病力强于来自猪胴体和猪肛拭子的菌株;而在鸡源沙门氏菌中,分离自鸡肛拭子的菌株致病力强于来自临床病例的菌株,与猪源菌株不同,表明来自不同分离部位的沙门氏菌,其毒力也存在一定的差异。

小鼠与猪同属于哺乳动物,而人类亦属于哺乳类动物,与禽类属于不同的纲。人感染沙门氏菌与动物及其制品污染沙门氏菌密切相关<sup>[8]</sup>。由本研究结果启示,人类因食用沙门氏菌污染的动物性食品



图 3 ⑦菌株 *spv* 基因扩增结果

M: DNA marker I; 1: *spvA* 基因阳性对照; 2: ⑦菌株 *spvA* 基因扩增结果; 3: *spvA* 基因阴性对照; 4: *spvB* 基因阳性对照; 5: ⑦菌株 *spvB* 基因扩增结果; 6: *spvB* 基因阴性对照; 7: *spvC* 基因阳性对照; 8: ⑦菌株 *spvC* 基因扩增结果; 9: *spvC* 基因阴性对照; 10: *spvD* 基因阳性对照; 11: ⑦菌株 *spvD* 基因扩增结果; 12: *spvD* 基因阴性对照; 13: *spvR* 基因阳性对照; 14: ⑦菌株 *spvR* 基因扩增结果; 15: *spvR* 基因阴性对照。

Fig. 3 PCR amplification on *spv* products of *Salmonella* strain ⑦

M: DNA marker I; 1: Positive control of *spvA* gene; 2: PCR products of *spvA* gene from *Salmonella* strain ⑦; 3: Negative control of *spvA* gene; 4: Positive control of *spvB* gene; 5: PCR products of *spvB* gene from *Salmonella* strain ⑦; 6: Negative control of *spvB* gene; 7: Positive control of *spvC* gene; 8: PCR products of *spvC* gene from *Salmonella* strain ⑦; 9: Negative control of *spvC* gene; 10: Positive control of *spvD* gene; 11: PCR products of *spvD* gene from *Salmonella* strain ⑦; 12: Negative control of *spvD* gene; 13: Positive control of *spvR* gene; 14: PCR products of *spvR* gene from *Salmonella* strain ⑦; 15: Negative control of *spvR* gene.

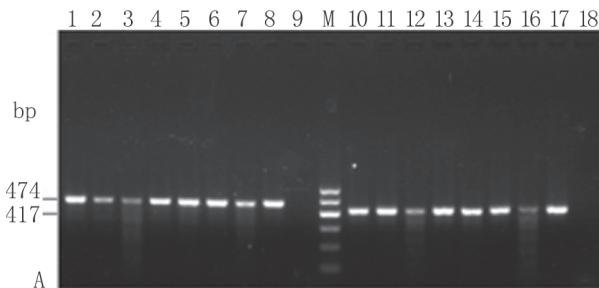


图 4 *sscA*、*sseE* 和 *sseD* 基因扩增结果

A. M: DNA marker I; 1: *sscA* 基因阳性对照; 2-8: ①-⑦菌株 *sscA* 基因扩增结果; 9: *sscA* 基因阴性对照; 10: *sseE* 基因阳性对照; 11-17: ①-⑦菌株 *sseE* 基因扩增结果; 18: *sseE* 基因阴性对照。

B. M: DNA Marker-DL2000; 1: *sseD* 基因阳性对照; 2-8: ①-⑦菌株 *sseD* 基因扩增结果; 9: *sseD* 基因阴性对照。

Fig. 4 PCR amplification of *sscA*, *sseE* and *sseD* products

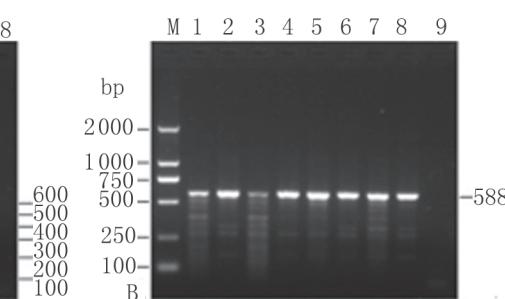
A. M: DNA marker I; 1: Positive control of *sscA* gene; 2-8: PCR products of *sscA* genes from *Salmonella* strain ①-⑦; 9: Negative control of *sscA* gene; 10: Positive control of *sseE* gene; 11-17: PCR products of *sseE* genes from *Salmonella* strain ①-⑦; 18: Negative control of *sseE* gene.

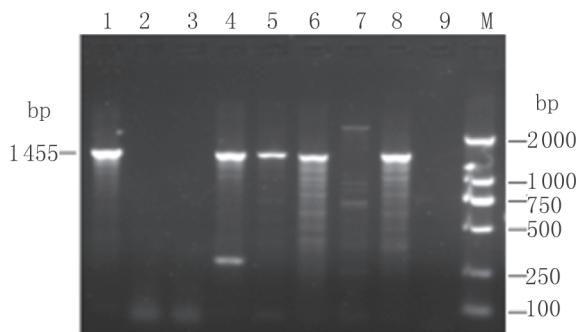
B. M: DNA marker-DL2000; 1: Positive control of *sseD* gene; 2-8: PCR products of *sseD* genes from *Salmonella* strain ①-⑦; 9: Negative control of *sseD* gene.

引发感染时,不同来源沙门氏菌造成危害程度可能不同,而猪源沙门氏菌的致病力是否强于鸡源沙门氏菌则尚需进一步试验研究。

**3.2 不同来源沙门氏菌的致病力与毒力基因分布的关系** 本研究中仅⑦菌株检出质粒毒力基因(*spv*),其他6株均未检出。⑦菌株 LD<sub>50</sub> 最低,引起的病变也最为严重,表明 *spv* 的存在能增强菌株的致病力,与 Terakado 等<sup>[9]</sup>的研究结果一致。而其他6株沙门氏菌之间致病力的不同,表明尚有其他编码沙门氏菌毒力表型的致病因子在发挥作用。

除 *spv* 外,沙门氏菌大多数毒力基因由染色体上的 SPI 编码<sup>[3]</sup>。目前已发现的 SPI 约有十几个,其中 SPI-2 编码与系统感染有关的Ⅲ型分泌系统,主要基因有 *ssa*、*ssr*、*ssc* 和 *sse*。*ssa* 编码Ⅲ型分泌系统成分,*ssr* 编码分泌系统调节子,*ssc* 编码分子伴侣,*sse* 编码分泌系统效应蛋白。研究证实,不同沙门氏菌的 SPI-2 碱基组成和基因分布不同,由其在水平基因的转移驱动沙门氏菌的毒力演变<sup>[10]</sup>; SPI-2 突变会大大降低沙门氏菌对小鼠感染的毒性<sup>[11]</sup>。本研究选择检测 SPI-2 上的效应蛋白基因 *sseD*、*sseC*、*sseE* 和伴侣蛋白基因 *sscA*、*sscA*、*sseD*、*sseE* 基因在 7 株受试菌株中均检出,而 *sseC* 基因仅在③、④、⑤、⑦菌株中检出。⑦菌株 LD<sub>50</sub> 最低,病变最明显,且检出 *sseD*、*sseC*、*sseE*、*sscA* 4 种基因,故毒力最强。在猪源沙门氏菌中,分离自肛拭子的③菌株致病力强于来自猪胴体肉样的①菌株,仅次于⑦菌株,且也检出 4 种毒力基因,而①菌株未检出 *sseC* 基因。在鸡源沙门氏菌中,*sseC* 基因缺失的⑥菌株致



图 5 *sseC* 基因扩增结果

M: DNA marker-DL2000; 1: *sseC* 基因阳性对照; 2-8: ①-⑦菌株 *sseC* 基因扩增结果; 9: *sseC* 基因阴性对照。

#### Fig. 5 PCR amplification of *sseC* products

M: DNA marker-DL2000; 1: Positive control; 2-8: PCR products of *sseC* genes from *Salmonella* strain ①-⑦; 9: Negative control.

病力最低,亦符合猪源沙门氏菌致病力强弱的规律。表明 *sseC* 基因的存在能增强沙门氏菌致病力,与 Bhowmick 等<sup>[7]</sup>的研究结果一致。*sseC* 基因编码的 *sseC* 蛋白作为Ⅲ型分泌系统中底物蛋白的效应蛋白,被分泌到细菌细胞膜而执行其毒力功能<sup>[12]</sup>。王淑娜等<sup>[13]</sup>研究结果显示,不同来源的副溶血性弧菌相同毒力基因的表达差异显著,毒力基因表达量的多少可以间接比较致病菌的毒力大小。在本研究中,均含有 *sseC* 基因的猪源③、⑦菌株致病力强于鸡源④、⑤菌株,表明在携带相同毒力基因的情况下,菌株所表现出的致病力差异可能与其表达差异有关。致病菌具有复杂的毒力基因表达调控系统,毒力基因的表达主要由蛋白质调控,同时,RNA 也起着重要作用<sup>[14]</sup>。而 *sseC* 基因缺失的猪源①、②菌株致病力却强于含有此基因的鸡源④、⑤菌株,这或许与 RNA 调控毒力基因表达的隔离和反义机制相关<sup>[14]</sup>。

本研究初步阐明了不同来源的沙门氏菌对小鼠的致病力具有明显差异,不同沙门氏菌对小鼠的致病力表型与其毒力基因的分布存在相关性。由此启示,不同来源沙门氏菌感染人类所造成危害程度可能不同,对有效防控人沙门氏菌病具有重要意义。

#### 参考文献:

- [1]Chen JD, Suo QL, Liao M, et al. DNA sequence analysis and molecular detection of *invA* gene from *Salmonella* spp[J]. Chin J Zoonoses, 2004, 20(10): 868-871. (in Chinese)  
陈金顶,索青利,廖明,等.沙门氏菌的*invA*基因序列分析与分子检测[J].中国人兽共患病杂志,2004,20(10):868-871.
- [2]Foley SL, Lynne AM. Food animal-associated *Salmonella* challenges: pathogenicity and antimicrobial resistance[J]. J Anim Sci, 2008, 86(14 Suppl): E173-E187. DOI: 10.2527/jas.2007-0447
- [3]Wang XY. *Salmonella enterica* pathogenicity islands encoding type Ⅲ secretion systems[J]. Lett Biotechnol, 2004, 15(2): 160-162. (in Chinese)  
王效义.沙门氏菌毒力岛及其Ⅲ型分泌系统[J].生物技术通讯,2004,15(2):160-162.
- [4]Wang SZ, Gao B, Zhou ZH, et al. Determination of the growth curve for recombinant bacteria *E. coli* DH5 $\alpha$ [J]. Heilongjiang Anim Sci Vet Med, 2010, 21: 96-98. (in Chinese)  
王升智,高波,周智慧,等.重组大肠杆菌DH5 $\alpha$ 生长曲线的测定[J].黑龙江畜牧兽医,2010,21:96-98.
- [5]Huang XD, Cai JX, Lin HH. Toxicology study of *Cinnamomum japonica* volatile oil[J]. LI Shi-zhen Med Materia Medica Res, 2012, 23(1): 138-139. (in Chinese)  
黄晓冬,蔡建秀,林海鸿.天竺桂挥发油的毒理学研究[J].时珍国医国药,2012,23(1):138-139.
- [6]Ranh K, De Grandis SA, Clarke RC, et al. Amplification of an *invA* gene sequence of *Salmonella typhimurium* by polymerase chain reaction as a specific method of detection of *Salmonella*[J]. Mol Cell Probes, 1992, 6(4): 271-279. DOI: 10.1016/0890-8508(92)90002-F
- [7]Bhowmick PP, Devegowda D, Ruwandeepika HA, et al. Presence of *Salmonella* pathogenicity island 2 genes in seafood-associated *Salmonella* serovars and the role of the *sseC* gene in survival of *Salmonella enterica* serovar Weltevreden in epithelial cells[J]. Microbiology, 2011, 157(Pt 1): 160-168. DOI: 10.1099/mic.0.043596-0
- [8]Jiao XA, Tu CC, Haung JL, et al. Prevalence and control strategies of food-borne zoonotic bacterial disease[J]. China Poultry, 2009, 31(19): 4-11. (in Chinese)  
焦新安,涂长春,黄金林,等.我国食源性人兽共患细菌病流行现状及其防控对策[J].中国家禽,2009,31(19):4-11.
- [9]Terakado N, Serkizaki T, Hashimoto K, et al. Correlation between the presence of a fifty-megadalton plasmid in *Salmonella dublin* and virulence for mice[J]. Infect Immun, 1983, 41(1): 443-444.
- [10]Hensel M, Hinsley AP, Nikolaus T, et al. The genetic basis of tetrathionate respiration in *Salmonella typhimurium*[J]. Mol Microbiol, 1999, 32(2): 275-287. DOI: 10.1046/j.1365-2958.1999.01345.x
- [11]Shea JE, Hensel M, Gleeson C, et al. Identification of a virulence locus encoding a second type Ⅲ secretion system in *Salmonella typhimurium*[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996, 93(6): 2593-2597.
- [12]Klein JR, Jones BD. *Salmonella* pathogenicity island 2-encoded proteins SseC and SseD are essential for virulence and are substrates of the type III secretion system[J]. Infect Immun, 2001, 69(2): 737-743. DOI: 10.1128/IAI.69.2.737-743.2001
- [13]Wang SN, Fang WH. Differential expression of *tdh* gene from the different *Vibrio parahaemolyticus* isolates as determined by real-time PCR[J]. Anim Husb Vet Med, 2008, 40(9): 9-13. (in Chinese)  
王淑娜,方维焕.荧光定量PCR法检测副溶血弧菌基因的表达差异[J].畜牧与兽医,2008,40(9):9-13.
- [14]Johansson J, Cossart P. RNA-mediated control of virulence gene expression in bacterial pathogens[J]. Trends Microbiol, 2003, 11(6): 280-285. DOI: 10.1016/S0966-842X(03)00118-5

收稿日期:2012-11-12;修回日期:2013-01-16