

肠炎沙门菌 *rfbG* 基因缺失株的构建及其生物学特性研究

王新为,宋丽,王铭,宋红芹

摘要:目的 探究 *rfbG* 基因对肠炎沙门菌毒力的影响,评价肠炎沙门菌缺失 *rfbG* 基因后作为减毒活疫苗的潜力。**方法** 利用自杀质粒介导的同源重组技术,无痕构建肠炎沙门菌 *Z11ΔrfbG* 缺失株,并对其生物学特性进行分析。**结果** 成功构建肠炎沙门菌 *Z11ΔrfbG* 缺失株,与野生株相比,缺失株 *Z11ΔrfbG* 生化特性没有发生变化,在 LB 液体培养基中生长速率较慢;缺失株生物被膜形成能力显著弱于野生株,其感染 J774A.1 细胞后,产生的细胞毒性亦显著低于野生株。此外,缺失株可与吖啶橙溶液发生凝集,但与 O₉ 血清不发生凝集。**结论** *rfbG* 基因缺失显著降低了肠炎沙门菌 *Z11* 的毒力,且缺失株符合粗糙型菌株的特点, *Z11ΔrfbG* 不仅具有作为沙门菌减毒活疫苗或载体的潜质,也具有作为 DIVA 疫苗的潜力,为肠炎沙门菌减毒活疫苗的开发研究奠定了基础。

关键词:肠炎沙门菌;*rfbG*;基因缺失;生物学特性

中图分类号:R378.2

文献标志码:A

文章编号:1002-2694(2021)11-0971-06

Construction and biological characteristics of *Salmonella enteritidis* with *rfbG* gene deletion

WANG Xin-wei, SONG Li, WANG Ming, SONG Hong-qin

(Key Laboratory of Zoonoses of Jiangsu Province, Key Laboratory of Prevention and Control of Biological Hazard Factors (Animal Origin) for Agrifood Safety and Quality, Ministry of Agriculture; Co-Innovation Center for Prevention and Control of Important Animal Infectious Disease and Zoonoses; College of Veterinary Medicine Yangzhou University, Yangzhou 225000, China)

Abstract: The aim was to explore the effect of *rfbG* on the virulence of *Salmonella Enteritidis* and evaluate its potential as a live attenuated vaccine. *Salmonella Enteritidis* *Z11ΔrfbG* was constructed using a homologous recombination technique mediated by the suicide plasmid, and its biological characteristics were analyzed. *Z11ΔrfbG* was successfully constructed, and there was no difference in biochemical characteristics between *Z11ΔrfbG* and the wild strain. The growth rate of *Z11ΔrfbG* was slower in LB liquid medium. The ability of the deletion strain to form biofilm was significantly weaker than that of the wild strain. The cytotoxicity of the deletion strain after infection of J774A.1 cells was significantly lower than that of the wild strain. In addition, the deletion strain could agglutinate with acridine orange solution but not with O₉ serum. The *rfbG* deletion significantly reduced the virulence of *Salmonella enteritidis* *Z11*, and the deletion strain had the characteristics of rough strains. *Z11ΔrfbG* not only has potential as a live attenuated vaccine or carrier of *Salmonella*, but also as a DIVA vaccine, which lays the foundation for research on live attenuated vaccines for *Salmonella enteritidis*.

Keywords: *Salmonella enteritidis*; *rfbG*; gene deletion; biological characteristics

江苏省政策引导类计划(国际科技合作/港澳台科技合作)(No. BZ2020013)

通讯作者:宋红芹, Email: hqsong@yzu.edu.cn;

ORCID:0000-0002-3784-4181

作者单位:江苏省人兽共患病学重点实验室;农业农村部农产品质量安全生物性危害因子(动物源)控制重点实验室;江苏省动物重要疫病与人兽共患病防控协同创新中心;扬州大学兽医学院,扬州 225000

Supported by Jiangsu Policy Guidance Program (International Science and Technology Cooperation/Hong Kong-Macao-Taiwan Science and Technology Cooperation) (No.BZ2020013)

Corresponding author: Song Hong-qin, Email: hqsong@yzu.edu.cn

沙门菌病(Salmonellosis)是由沙门菌引起动物和人类急性和慢性疾病的总称。沙门菌(*Salmonella*)是一种革兰氏阴性菌,同时也是重要的食源性人兽共患病原菌,宿主谱广泛,且危害严重^[1]。其中肠炎沙门菌可引起成年鸡隐性感染,并通过粪便向外界环境排菌,导致病原菌难以净化;受感染的雏鸡则表现为严重的全身性感染和高死亡率^[2]。近年,有报道指出,肠炎沙门菌正逐渐替代鼠伤寒沙门菌成为最常见的食源性沙门菌血清型^[3]。因此,加强肠炎沙门菌感染防控的研究势在必行。随着畜牧业的发展,抗生素的滥用,导致沙门菌耐药性增强,耐药谱加宽,给沙门菌的防控造成困难^[4]。与亚单位疫苗和灭活疫苗相比,减毒活疫苗免疫原性好,是预防沙门菌病的重要手段^[5]。

脂多糖(Lipopolysaccharide,LPS)作为革兰氏阴性菌菌体外膜结构的重要组成部分,主要影响沙门菌的表型、毒力及菌株间的免疫交叉反应^[6-7]。LPS主要由O抗原、核心多糖以及类脂A组成^[8]。

参与LPS生物合成的相关基因主要为:*rfa*基因簇、*rfb*基因簇和*rfc*基因簇^[9]。O抗原链的生物合成由*rfb*基因簇控制,其中*rfbG*基因负责编码CDP-glucose 4,6-dehydratase脱水酶^[10]。研究表明,*rfbG*基因的失活会导致肠炎沙门菌LPS的缺失,且*rfbG*基因的缺失会降低菌株的毒力,其基因位点可作为细菌鉴别疫苗(Differentiation of Infected and Vaccinated Animals,DIVA)的潜在靶点。

本研究以肠炎沙门菌Z11为研究对象,通过无标记突变法,构建肠炎沙门菌Z11Δ*rfbG*缺失株,并研究其基本的生物学特性,包括菌株的生长速率、生化特性、生物膜形成能力以及细胞毒性等,为肠炎沙门菌减毒活疫苗的研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 质粒、菌株及细胞 菌株、质粒及细胞信息见表1。

表1 实验所用菌株、质粒及细胞

Tab.1 Bacterial strains, plasmids and cells used in this study

名称	用途	来源	备注
Z11	肠炎沙门菌,野生株	本实验室分离	无
<i>E. coli</i> DH5α	大肠杆菌	本实验室保存	Cm ^R
<i>E. coli</i> X7213	大肠杆菌,供体菌	本实验室保存	依赖 DAP
pDM4	自杀质粒	本实验室保存	SacBR, Cm ^R
J774A.1	用于细胞毒性试验的宿主细胞	本实验室保存	小鼠巨噬细胞

1.2 主要试剂 DNA胶回收试剂盒、*Xba*I限制性内切酶、质粒纯化试剂盒、细菌基因组提取试剂盒、氯霉素(Cm)、DNA Marker、Primestar max DNA Polymerase 均购自宝生物工程(大连)有限公司;ClonExpress One Step Cloning一步法连接试剂盒和2×Taq Master mix购自南京Vazyme生物科技有限公司;API 20E肠道菌鉴定卡购自法国Bio Mérieux公司;DMEM培养基、胎牛血清、0.25%胰酶购自美国ThermoFisher公司;快速质粒小提试

剂盒、高效感受态细菌制备试剂盒及其他常规试剂购自生工生物工程(上海)股份有限公司;沙门菌属诊断血清试剂盒购自宁波天润生物药业有限公司;乳酸脱氢酶细胞毒性检测试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司。

1.3 引物设计与合成 根据肠炎沙门菌Z11的*rfbG*基因序列,运用引物设计软件Primer 5.0设计特异性引物,如表2所示。引物由南京擎科生物科技有限公司合成。

表 2 PCR 扩增引物序列
Tab.2 Primers used for PCR in this study

Primes	Sequence(5'-3')	Size/bp
<i>rfbG</i> -UP-F	GAGCTCAGGTACCCGCATGCAAGATCTATTGGTTGATACGGGTGA- TTCTTC	490
<i>rfbG</i> -UP-R	ACTTATTTCTACTTACTCCCAGGTTTCCACGG	
<i>rfbG</i> -DOWN-F	GAGTAAGTAGGAAAATAAGTTAAGGAATCAAAGT	560
<i>rfbG</i> -DOWN-R	CCCTCGAGTACGCGTCACTAGTGGGGCCCTACGAACCT-CACTCAGGTTA- AATG	
<i>rfbG</i> -OUT-F	TGAAAATGTATTCTGTGCATGGTAT	1 343
<i>rfbG</i> -OUT-R	ATAAAAACTAACGGTTCCGATGTCA	
<i>rfbG</i> -IN-F	CCAAGTTATTTGAGATAGTGCGTC	437
<i>rfbG</i> -IN-R	CTCACAGACGCCAACCAACGCCAT	
pDM4-F	GAGCGGATAACAATTGTGGAATCCCGGGA	160
pDM4-R	AGCGGAGTGTATATCAAGCTTATCGATACC	

注:黑色粗体部分为与 pDM4 载体上的 *Xba* I 酶切位点侧翼序列互补配对片段,*rfbG*-UP-R 和 *rfbG*-DOWN-F 为互补序列。

1.4 肠炎沙门菌 Z11Δ*rfbG* 缺失株的构建

1.4.1 重组菌 *E. coli* Χ7213(pDM4-Δ*rfbG*)的构建 以肠炎沙门菌 Z11 基因组为模板,分别以 *rfbG*-UP-F/R 和 *rfbG*-DOWN-F/R 为引物,利用 PCR 扩增 *rfbG* 基因上下游同源片段,即 *rfbG*-U 和 *rfbG*-D 片段。利用 *Xba*I 限制性内切酶对 pDM4 载体进行酶切,用 C115 连接酶分别将 *rfbG*-U 和 *rfbG*-D 片段与 pDM4 载体连接,通过热激法将连接好的产物转入 *E. coli* Χ7213 λpir 感受态中,以 pDM4-F/R 为引物对阳性单菌落进行 PCR 鉴定,并送至南京擎科生物科技有限公司进行测序,获得重组质粒 pDM4-Δ*rfbG*,即获得供体重组菌 *E. coli* Χ7213(pDM4-Δ*rfbG*)。

1.4.2 接合转移与 Z11Δ*rfbG* 缺失株的筛选鉴定

以 *E. coli* Χ7213(pDM4-Δ*rfbG*)为供体菌,肠炎沙门菌 Z11 为受体菌进行接合转移。挑取阳性单菌落,以 pDM4-F/*rfbG*-OUT-F 和 pDM4-R/*rfbG*-OUT-F 两对引物分别进行 PCR 鉴定。将验证正确的阳性菌落接种于含 Cm 的 LB 液体培养基中,37 ℃培养。以 1:50 扩大培养于含有 15% 蔗糖的 LB 液体培养基中,37 ℃培养。挑取菌液,三区划线于含有 15% 蔗糖的 LB 固体平板上,37 ℃培养。挑取阳性克隆制备模板,以 *rfbG*-OUT-F/R 为引物进行 PCR 鉴定。将验证正确的菌株以 *rfbG*-IN-F/R 为引物进行 PCR 鉴定,并将验证正确的菌株送至南京擎科生物科技有限公司进行测序。

1.5 肠炎沙门菌 Z11Δ*rfbG* 缺失株的生物学特性

测定

1.5.1 生长速率测定 分别挑取野生株 Z11 和缺失株 Z11Δ*rfbG* 接种于 LB 液体培养基中,37 ℃培养。次日,将各菌液转入新的 LB 液体培养基中,并将转接后的菌液调至 OD₆₀₀=0.05(记作 0 h 读数)。分别将 OD₆₀₀ 为 0.05 的菌液转入 96 孔板中,用酶标仪检测 OD₆₀₀,每 0.5 h 测定 1 次,绘制生长曲线。

1.5.2 生化特性测定 分别挑取野生株 Z11 和缺失株 Z11Δ*rfbG* 接种于 LB 固体平板上,37 ℃培养。次日,挑取各菌株菌苔,分别搅拌混匀至含 0.45% 生理盐水的比浊管中,并将菌液比浊度调至 0.6~0.8。根据使用说明书向生化鉴定卡中加入菌液,将 API 20E 生化鉴定卡置于 37 ℃培养箱,24 h 后观察并记录结果。

1.5.3 生物被膜形成测定 分别挑取野生株 Z11 和缺失株 Z11Δ*rfbG* 接种于 LB 液体培养基中,37 ℃培养。次日,将各菌液 OD₆₀₀ 值调为 1 后,加入到 96 孔板中,37 ℃静置培养 48 h。将菌液弃掉,用超纯水洗涤;加入甲醇,固定一定时间,弃掉甲醇,晾干;加入结晶紫,染色一定时间,弃掉结晶紫;用超纯水洗涤,烘干;加入 95% 酒精溶解;用全自动酶标仪检测 OD₅₉₅,定量分析生物被膜形成情况。

1.5.4 粗糙表型鉴定 在载玻片上分别滴加 20 μL O₉ 单抗和吖啶橙,接种环挑取少许菌株分别与 O₉ 单抗和吖啶橙混合涂划均匀,观察凝集反应情况。

1.5.5 肠炎沙门菌 Z11Δ*rfbG* 缺失株的细胞毒性试验 将 J774A.1 细胞接种至 48 孔板,每孔加入

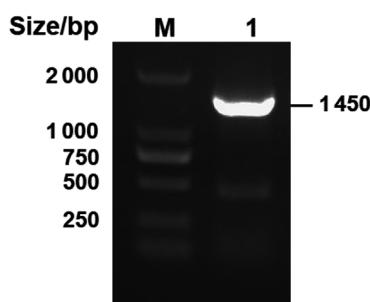
1.5×10^5 个细胞, 培养至次日使细胞覆盖率为 80%~90%。挑取野生株 Z11 和缺失株 Z11 $\Delta rfbG$ 接种于 LB 液体培养基中, 37 ℃ 培养。将菌液 4 500 r/min 离心 5 min, 弃去上清, 用无菌 PBS 洗涤, 再用无菌 PBS 重悬, 将其 OD₆₀₀ 调为 1。弃掉细胞培养液, 换新鲜的无抗 DMEM 培养基, 以 MOI=100 感染细胞。1 000 r/min 离心 10 min, 37 ℃ 感染 1 h。弃掉培养基, 用 PBS 洗涤。加入含有 20 μg/mL 庆大霉素的 Opti-MEM 培养基, 37 ℃ 培养 3 h。利用乳酸脱氢酶细胞毒性检测试剂盒测定野生株与缺失株对 J774A.1 细胞的毒性。

1.5.6 统计学分析 本实验所有数据均使用 GraphPad Prism 5 软件进行分析统计学差异。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结 果

2.1 肠炎沙门菌 Z11 $\Delta rfbG$ 缺失株鉴定

2.1.1 重组菌 E. coli X7213(pDM4- $\Delta rfbG$) 的构建及鉴定 以 $rfbG$ -UP-F/R 和 $rfbG$ -DOWN-F/R 为引物 PCR 扩增 $rfbG$ 基因上下游同源片段($rfbG$ -U 和 $rfbG$ -D 片段), 利用 C115 连接酶将 $rfbG$ -U 和 $rfbG$ -D 片段连接在 pDM4 载体上, 再转入 *E. coli* X7213 λpir 感受态细菌中, 构建供体重组菌 *E. coli* X7213(pDM4- $\Delta rfbG$)。以 pDM4-F/R 为引物进行 PCR 扩增, 验证构建的供体重组菌 *E. coli* X7213(pDM4- $\Delta rfbG$), 条带大小正确, 约 1 450 bp (图 1)。



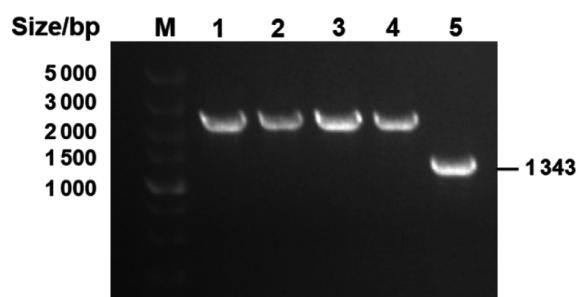
M:DL2000 Maker;1: $rfbG$ 基因上下游同源片段

图 1 重组质粒 PCR 验证

Fig. 1 PCR identification of *E. coli* X7213 (pDM4- $\Delta rfbG$)

2.1.2 接合转移与 $\Delta rfbG$ 缺失株的筛选鉴定 以野生株 Z11 作为受体菌, 重组菌 *E. coli* X7213 (pDM4- $\Delta rfbG$) 作为供体菌进行接合转移, 在含有 Cm 和 DAP 的 LB 固体平板上, 挑取阳性单菌落, 以 pDM4-F/ $rfbG$ -OUT-F 和 pDM4-R/ $rfbG$ -OUT-F

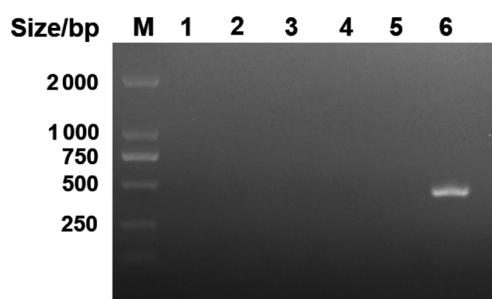
两对引物分别对其进行 PCR 鉴定。对验证正确的菌株以含有 15% 蔗糖平板进行负筛选, 以 $rfbG$ -OUT-F/R 为引物进行 PCR 验证, 获得候选缺失株约 1 343 bp(图 2)。以 $rfbG$ -IN-F/R, 不能扩增出条带(图 3)。结合测序结果, 确定 $rfbG$ 基因缺失株已构建成功, 即获得缺失株 Z11 $\Delta rfbG$ 。



M:DL5000 Maker;1-4:野生株;5:候选缺失株

图 2 筛选缺失株 PCR 验证

Fig.2 PCR identification of screening deletion strains



M:DL2000 Maker;1-5:Z11 $\Delta rfbG$ 缺失株;6:野生株

图 3 缺失株 PCR 验证

Fig.3 PCR identification of deletion strains

2.2 肠炎沙门菌 Z11 $\Delta rfbG$ 缺失株的生物学特性测定结果

2.2.1 生长速率 利用全自动酶标仪, 在设定的时间点测定各菌液 OD₆₀₀ 值, 从而绘制生长曲线(图 4), 结果显示野生株生长速率高于缺失株。

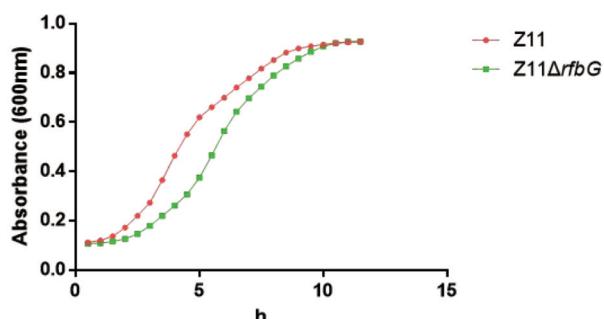


图 4 Z11 和 Z11 $\Delta rfbG$ 生长曲线

Fig.4 Growth curves of Z11 and Z11 $\Delta rfbG$

2.2.2 生化特性 野生株 Z11 和缺失株 Z11 $\Delta rfbG$ 通过 API 20E 生化鉴定卡进行生化特性鉴定,结果

显示 *rfbG* 基因的缺失对肠炎沙门菌 Z11 生化特性的主要指标并无影响(表 3)。

表 3 Z11 和 Z11 $\Delta rfbG$ 生化特性
Tab.3 Biochemical characteristics of Z11 and Z11 $\Delta rfbG$

菌株	ONPG	精氨酸	赖氨酸	鸟氨酸	柠檬酸钠	H ₂ S	脲素	色氨酸	丙酮酸盐	明胶	葡萄糖	甘露醇	肌醇	山梨醇	蔗糖	阿拉伯糖	蜜二糖	鼠李糖
Z11	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	+	+
Z11 $\Delta rfbG$	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+	-	+	+	+	+

2.2.3 生物被膜形成 将野生株 Z11 和缺失株 Z11 $\Delta rfbG$ 分别置于 96 孔板中 37 ℃ 培养 48 h,用结晶紫对其生物被膜进行定量分析。结果显示,缺失 *rfbG* 基因之后,肠炎沙门菌 Z11 形成生物被膜的能力显著降低(图 5)。

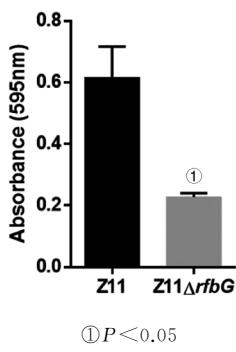


图 5 Z11 和 Z11 $\Delta rfbG$ 生物被膜检测

Fig.5 Biofilm of Z11 and Z11 $\Delta rfbG$

2.2.4 粗糙表型鉴定 野生株 Z11 缺失 *rfbG* 基因后,不与 O₉ 单抗发生凝集,与吖啶橙溶液发生凝集(图 6),符合粗糙型沙门菌的特点。

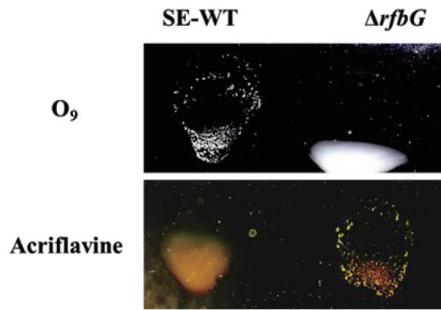


图 6 粗糙型菌株鉴定

Fig.6 Identification of rough strains

2.3 细胞毒性试验 J774A.1 细胞分别感染相同数量的野生株 Z11 和缺失株 Z11 $\Delta rfbG$ 后,利用乳酸脱氢酶细胞毒性检测试剂盒测定乳酸脱氢酶活

性。结果表明,在缺失 *rfbG* 基因之后,肠炎沙门菌 Z11 对 J774A.1 细胞的毒力降低(图 7)。

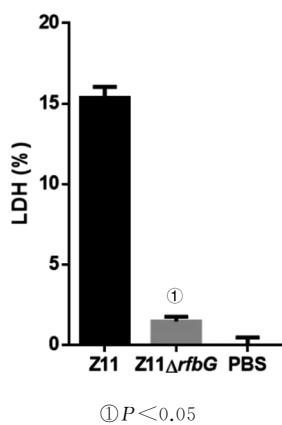


图 7 细胞毒性检测

Fig.7 Cytotoxicity test of Z11 and Z11 $\Delta rfbG$

3 讨 论

沙门菌减毒活疫苗具有免疫原性好和免疫方式类似自然感染等优越性,可以通过口服途径传递重组抗原到机体黏膜表面,从而诱导机体产生保护性免疫应答来对抗病原体的感染^[11]。尽管可以通过物理、化学等方法获得减毒沙门菌,但其所得疫苗存在背景不清、毒力易返强等缺点^[12]。随着分子生物学技术的发展,利用现代基因工程手段敲除单个或多个基因构建减毒沙门菌,可使其在降低毒力的同时,仍保留着高度的免疫原性^[13]。目前引起沙门菌毒力减弱的基因主要包括毒力相关基因、调控基因、管家基因以及编码生物活性酶的基因,如 *cya*、*crp*、*steA*、*spiC*、*yieA*、*aceE* 等基因^[11,13]。曹莉等^[14]通过 Red 重组系统成功构建肠炎沙门菌 *yjeA* 基因缺失株,研究结果表明,与亲本株比较, *yjeA* 基因缺失株生长稳定,毒力降低,且能够刺激机体产生特异性抗体。程墨等^[15]研究发现,鸡伤寒沙门菌同时缺失 *spiC* 与 *crp* 基因后,缺失株生长速率减慢,与亲本株相比其对雏鸡的 LD₅₀ 升高 107 倍。焦扬^[16]利用

信号标签诱变技术(STM 技术)分别筛选到 *rfbG* 与 *rfbH* 基因,且研究结果表明 *rfbG* 基因缺失株能对小鼠提供较为优良的免疫保护效力,是理想的疫苗候选株。

综上所述,本研究在前期工作的基础上,以肠炎沙门菌 Z11 为研究对象,以 *rfbG* 作为目的基因,利用自杀质粒 pDM4 介导的同源重组技术,构建肠炎沙门菌 Z11Δ*rfbG* 缺失株。研究表明,*rfbG* 基因缺失株与野生株相比,展示出相似的生化特性,但是在生长曲线前期则存在明显的差异,表明 *rfbG* 基因缺失对肠炎沙门菌 Z11 生长速率有一定影响。细菌生物被膜是细菌自身分泌的,如多糖、蛋白、脂质等细胞外多聚物,将细菌彼此黏附所形成的一种复杂的聚集体^[17]。当细菌存在于生物被膜中时,其对抗生素的耐药性会提高 10~1 000 倍,生物被膜对细菌会产生保护作用^[18]。本研究生物被膜试验结果显示,*rfbG* 基因缺失株能够降低肠炎沙门菌 Z11 形成生物被膜的能力。曹堃^[19]研究表明肠炎沙门菌 G9Δ*hilA* 生物被膜形成能力强,耐药性高,而 G9Δ*ssrAB* 生物被膜形成能力弱。由此推测 *rfbG* 基因缺失株可能会降低其对抗生素的耐药性,这部分工作值得进一步研究。

细菌感染细胞后,细胞发生坏死而造成的细胞膜结构的破坏会导致细胞浆内的 LDH 释放到培养液里,通过检测细胞培养液中的 LDH 的活性,可以对细胞毒性进行定量分析。LDH 活性越高,坏死的细胞越多,则细菌毒性越强;反之,则细菌毒性越弱^[20]。本研究细胞毒性试验显示,野生株感染 J774A.1 细胞后,LDH 的活性高。而与野生株相比,*rfbG* 基因的缺失降低了菌株的毒力。

可鉴别疫苗即 DIVA 疫苗可利用简便的血清检测手段,快速甄别免疫动物与天然感染动物。DIVA 疫苗所用的减毒株多为特定抗原(如脂多糖、神经氨酸酶)缺失菌株,因此 LPS 是构建 DIVA 疫苗合适的选择靶标^[21]。郭荣显^[22]研究表明,*rfaL* 基因编码 O-抗原连接酶,参与 LPS 的合成,缺失后形成截短的 LPS 结构,鸡白痢沙门菌 S06004Δ*spiC*Δ*rfaL* 与 O₉ 单抗不发生凝集,与吖啶橙溶液发生凝集现象,具有显著的 DIVA 特征。本研究结果与其研究结果相似,肠炎沙门菌 Z11 缺失 *rfbG* 基因后,O₉ 单抗玻板凝集试验呈阴性,吖啶橙凝集试验呈阳性,Z11Δ*rfbG* 符合粗糙型沙门菌的特点,即 *rfbG* 基因的缺失会影响 LPS 的合成。根据 *rfbG* 缺失株的这一特点,*rfbG* 基因具有作为 DIVA 疫苗靶点的潜力。总之,肠炎沙门菌 Z11 是

由本实验室从鸡体分离所得,适于构建预防家禽肠炎沙门菌感染的减毒疫苗候选株,而且 Z11Δ*rfbG* 具有 DIVA 疫苗的功能,开发前景广阔。

利益冲突:无

引用本文格式: 王新为,宋丽,王铭,等.肠炎沙门菌 *rfbG* 基因缺失株的构建及其生物学特性研究[J].中国人兽共患病学报,2021,37(11):971-976,984. DOI:10.3969/j.issn.1002-2694.2021.00.137

参考文献:

- [1] 陆承平. 兽医微生物学[M]. 北京:兽医微生物学, 2012;116.
- [2] Balasubramanian R, Im J, Lee JS, et al. The global burden and epidemiology of invasive non-typhoidal *Salmonella* infections [J]. Hum Vaccin Immunother, 2019, 6(15): 1421-1426. DOI: 10.1080/21645515.2018.1504717
- [3] Voetsch AC, Van G, Angulo FJ, et al. FoodNet estimate of the burden of illness caused by nontyphoidal *Salmonella* infections in the United States[J]. Clin Infect Dis, 2004, 38: 127-134. DOI: 10.1086/381578
- [4] 徐家芳, 谢永登. 沙门氏菌研究进展[J]. 广西畜牧兽医, 2020, 2: 92-94. DOI: 10.3969/j.issn.1002-5235.2020.02.019
- [5] 马湘海, 尹佳彤, 汪珏楚, 等. 禽沙门菌疫苗研究进展[J]. 畜禽业, 2021, 4(32): 8-9. DOI: 10.19567/j.cnki.1008-0414.2021.04.005
- [6] Lalsiamthara J, Gogia N, Goswami TK, et al. Intermediate rough *Brucella abortus* S19Deltaper mutant is DIVA enable, safe to pregnant guinea pigs and confers protection to mice[J]. Vaccine, 2015, 22(33): 2577-2583. DOI: 10.1016/j.vaccine.2015.04.004
- [7] Maldonado RF, Sa-Correia I, Valvano MA. Lipopolysaccharide modification in Gram-negative bacteria during chronic infection [J]. FEMS Microbiol Rev, 2016, 4(40): 480-493. DOI: 10.1093/femsre
- [8] Schnaitman CA, Klenk JD. Genetics of lipopolysaccharide biosynthesis in enteric bacteria[J]. Microbiol Rev, 1993, 57(3): 655. DOI: 10.1128/mr.57.3.655-682.1993
- [9] Collins LV, Hackett J. Molecular cloning, characterization, and nucleotide sequence of the *rfaC* gene, which encodes an O-antigen polymerase of *Salmonella typhimurium* [J]. J Bacteriol, 1991, 173(8): 2521-2529. DOI: 10.1128/jb.173.8.2521-2529.1991
- [10] Yuasa R, Levinthal M, Nikaido H. Biosynthesis of cell wall lipopolysaccharide in mutants of *Salmonella*. V. A mutant of *Salmonella typhimurium* defective in the synthesis of cytidine diphosphoabequose[J]. J Bacteriol, 1969, 100(1): 433-444. DOI: 10.1128/jb.100.1.433-444.1969
- [11] 陈松彪, 张春杰, 程相朝. 沙门菌减毒基因的研究进展[J]. 中国免疫学杂志, 2016, 32(8): 1241-1244. DOI: 10.3969/j.issn.1000-484X.2016.08.036

(下转第 984 页)