

引用格式:

袁橙, 郭长明, 张步彩, 左伟勇, 唐晨晨, 蔺辉星. 鸭致病性大肠埃希菌的分离鉴定与毒力基因检测及菌蛻制备[J]. 湖南农业大学学报(自然科学版), 2020, 46(2): 223–229.

YUAN C, GUO C M, ZHANG B C, ZUO W Y, TANG C C, LIN H X. Isolation of pathogenic *Escherichia coli* from duck and detection of virulence gene and preparation of bacterial ghost[J]. Journal of Hunan Agricultural University(Natural Sciences), 2020, 46(2): 223–229.

投稿网址: <http://xb.hunau.edu.cn>



鸭致病性大肠埃希菌的分离鉴定与毒力基因检测及菌蛻制备

袁橙¹, 郭长明¹, 张步彩¹, 左伟勇¹, 唐晨晨¹, 蔺辉星^{2*}

(1.江苏农牧科技职业学院动物医学院, 江苏 泰州 225300; 2.南京农业大学动物医学院, 江苏 南京 210095)

摘要:从江苏省某水禽场的疑似感染致病性大肠埃希菌的病鸭中分离获得鸭致病性大肠埃希菌野毒株;通过玻板凝集和试管凝集试验确定其血清型,采用 PCR 进行分群分析和毒力基因检测;扩增 ϕX_{174} 噬菌体裂解蛋白 E 的基因序列,构建温控型表达质粒 pBV221-E,并将其电击转化入分离毒株,升温诱导 E 蛋白表达制备菌蛻;通过测量菌液 $A_{600\text{ nm}}$ 值和透射电镜下观察细菌形态,评估菌蛻构建效果;用该菌蛻进行灭活处理和无菌检测后,对雏鸭进行免疫,用间接 ELISA 法检测血清 IgG 水平。结果表明:该大肠埃希菌的血清型为 O24,属于 B1 群,具有毒力基因 *fimC*、*csgA* 和 *iroN*;获得的鸭致病性大肠埃希菌菌蛻裂解率为 99.96%;经透射电镜观察发现,制备获得的菌蛻表面有明显孔道,细胞质从孔道溢出,细胞膜皱缩变形;抗体水平检测结果显示,二免后菌蛻免疫组雏鸭血清 IgG 水平显著提高。可见,通过将 pBV221-E 重组质粒转化至鸭致病性大肠埃希菌分离株,调节细菌培养温度诱导 E 蛋白表达,能制备鸭致病性大肠埃希菌 B1 群 O24 型野毒株菌蛻。该菌蛻可诱发机体产生体液免疫。

关键词:鸭致病性大肠埃希菌;菌蛻;溶菌质粒;分群;毒力基因;抗体效价

中图分类号: S852.61⁺2 文献标志码: A 文章编号: 1007–1032(2020)02–0223–07

Isolation of pathogenic *Escherichia coli* from duck and detection of virulence gene and preparation of bacterial ghost

YUAN Cheng¹, GUO Changming¹, ZHANG Bucui¹, ZUO Weiyong¹, TANG Chenchen¹, LIN Huixing^{2*}

(1.College of Veterinary Medicine, Jiangsu Agri-Animal Husbandry Vocational College, Taizhou, Jiangsu 225300, China; 2.College of Veterinary Medicine, Nanjing Agricultural University, Nanjing, Jiangsu 210095, China)

Abstract: Wild Strain of duck pathogenic *Escherichia coli* was isolated from avian pathogenic colibacillosis suspected duck in a waterfowl farm in Jiangsu province. The isolated strain was subject to serotype identification, cluster analysis, virulence gene detection, E protein expression and bacterial ghosts preparing, and morphology observation. After inactivation and sterility test, ducklings were immunized with bacterial ghost and serum IgG levels were detected. The results showed that the serotype of the strain is O24 and the strain belongs to group B1. It has virulence genes *fimC*, *csgA* and *iroN*. The lysis rate of duck pathogenic *Escherichia coli* was 99.96%. The results of transmission electron microscopy showed that there were obvious channels on the surface of bacterial ghosts prepared. We found that the cytoplasm overflowed from the channels and the cell membrane was shrank and deformed. The results of antibody level test showed that the serum IgG level of ducklings in bacterial ghost group increased significantly after secondary immunization. It can be seen that by transforming the recombinant plasmid pBV221-E into duck pathogenic *Escherichia coli* isolate and

收稿日期: 2019–04–13

修回日期: 2019–05–15

基金项目: 江苏省高等学校自然科学研究项目(17KJB230003); 江苏省高校优秀科技创新团队项目(201753); 江苏农牧科技职业学院科研项目(NSF201605)

作者简介: 袁橙(1986—), 女, 江苏盐城人, 博士, 讲师, 主要从事禽用菌蛻疫苗研究, 840289909@qq.com; *通信作者, 蔺辉星, 博士, 讲师, 主要从事兽医微生物学与免疫学研究, linhuixing@163.com

regulating the temperature of bacterial culture to induce the expression of E protein. The bacterial ghost of wild strain O24 of B1 group of duck pathogenic *Escherichia coli* were constructed in this study and it owns capacity to induce humoral immunity.

Keywords: duck pathogenic *Escherichia coli*; bacterial ghost; lysis plasmid; group; virulence gene; antibody titer

菌蛻是利用裂解基因制成的革兰阴性细菌的菌壳,可以刺激机体产生良好的体液、细胞和黏膜免疫,被认为是一类新型的候选疫苗^[1-2]。研究^[3-6]发现,菌蛻在不同种的血清型之间能诱导交叉免疫保护作用。同时,菌蛻具有免疫佐剂性质及递送系统功能,可以将其他抗原锚定于菌蛻表面,制备成重组疫苗,或将药物装载于菌蛻,用于疾病的靶向治疗;菌蛻疫苗和载体还具备制备工艺简单、保存与运输方便等优点;因此,菌蛻有较为广阔的应用前景。

禽致病性大肠埃希菌(avian pathogenic *Escherichia coli*, APEC)能够通过呼吸道感染宿主(鸡、火鸡等各种禽类),继而在宿主体内定殖,引发宿主一系列的临床症状,造成重大的经济损失^[7-9]。APEC菌蛻与活疫苗相比,具有相同功能的膜抗原表面结构,可诱导动物机体产生体液免疫和细胞免疫应答;与传统变性灭活菌苗相比,菌蛻完好地保留了细菌菌体的各种抗原结构,又没有任何免疫原性的改变。有研究^[10-11]显示,用 APEC 强毒株或基因缺失株制备的菌蛻在动物免疫试验中表现出比传统甲醛灭活疫苗更高的保护效率,是一种较有潜力的候选疫苗。

目前,对牛、猪、鸡和鱼用革兰阴性菌菌蛻疫苗研制的报道较多^[1-6,12],但对水禽致病性大肠埃希菌菌蛻疫苗制备的报道较少。本研究中,从具有禽大肠埃希菌病典型临床症状的鸭内脏器官中分离 1 株鸭致病性大肠埃希菌,分析其血清型、系统进化分群及相关毒力基因,并将表达噬菌体裂解蛋白的溶菌质粒转化入该菌株,制备鸭致病性大肠埃希菌菌蛻,检测菌蛻的免疫原性,旨在为研制禽致病性大肠埃希菌菌蛻疫苗和可用于禽类细菌病、病毒病和寄生虫病的新型疫苗载体或佐剂提供依据。

1 材料与方法

1.1 供试鸭和菌株及主要试剂

试验动物樱桃谷鸭购自江苏省某种鸭公司。温控表达质粒 pBV221、DH_{5α} 菌株由江苏农牧科技

职业学院动物流行病学研究中心保存。禽致病性大肠埃希菌菌株分离自江苏省某水禽场的病鸭。

药敏纸片和微量生化发酵管购自浙江省杭州滨和微生物试剂有限公司。大肠埃希菌单因子血清购自中国兽医药品监察所。麦康凯琼脂干粉、SOC 培养基、琼脂粉、氯化钠、TBE 电泳缓冲液、甘油等购自索莱宝生物科技有限公司。PCR 试剂盒、Ultra GelRed Nucleic Acid Stain、DL2000 Plus DNA Marker 等购自南京诺唯赞生物科技有限公司。Anti-Duck IgG(H+L)-Peroxidase 抗体购自 KPL 公司。可溶性单组分 TMB 底物溶液购自天根生化科技(北京)有限公司。限制性内切酶和连接酶为赛默飞世尔科技(中国)有限公司产品。质粒提取试剂盒为爱思进生物技术(杭州)有限公司产品。细菌培养用酵母提取物、胰蛋白胨和氨苄青霉素为 Sigma-Aldrich 产品。

按常规方法^[13]制备 LB 液体和固体培养基。抗性选择培养基中氨苄青霉素的质量浓度为 100 mg/L。

1.2 菌株的分离鉴定

无菌采集病死鸭的心血、肝脏等病料,在麦康凯琼脂培养基上划线接种,将琼脂平板倒置于 37℃ 恒温培养箱内培养过夜,次日取出进行菌落形态观察。挑取麦康凯平板上的典型菌落进行革兰染色和镜检,并将镜检结果为革兰阴性的细菌转接于葡萄糖、麦芽糖、乳糖、蔗糖、甘露醇、吡啶、MR、枸橼酸盐、VP、硫化氢等细菌生化微量鉴定管及三糖铁琼脂培养基,进行生化鉴定。参考已报道的针对大肠埃希菌 16s RNA 基因保守区的引物,对所分离的临床菌株进行 PCR 检测^[14-15],引物序列见表 1。PCR 反应体系:2×PCR Master Mix 12.5 μL,上下游引物各 20 pmol,模板 DNA 2 μL,加双蒸水至总体积 25 μL。PCR 反应条件:95℃ 预变性 4 min;95℃ 变性 30 s,不同基因的相应退火温度下(表 1)反应 30 s,72℃ 延伸 30 s,30 个循环;72℃ 延伸 10 min。

表 1 大肠埃希菌检测所用引物

Table 1 Primers for detection of *Escherichia coli*

基因	上游引物(5'—3')	下游引物(5'—3')	片段大小/bp	退火温度/℃
16sRNA	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	TACGGYTACCTTGTACGACTT	1 466	55
<i>chuA</i>	GACGAACCAACGGTCAGGAT	TGCCGCCAGTACCAAAGACA	279	61
<i>yiaA</i>	TGAAGTGTCAGGAGACGCTG	ATGGAGAATGCGTTCCTCAAC	211	61
<i>TspE4.C2</i>	GAGTAATGTCGGGGCATTCA	CGCGCCAACAAAGTATTACG	152	61
<i>fimC</i>	CGTCAATGTAAGGAAATCGCAGG	GGCATTCAACTCTGTTACCGTC	565	50
<i>kpsM</i>	GCGCATTTGCTGATACTGTTG	CATCCAGACGATAAGCATGAGCA	271	63
<i>csgA</i>	ACTCTGACTTGACTATTACC	AGATGCAGTCTGGTCAAC	200	50
<i>papC</i>	GACGGCTGTACTGCAGGGTGTGGCG	ATATCCTTTCTGCAGGGATGCAATA	353	63
<i>felA</i>	GGCAGTGGTGTCTTTTGGTG	GGCCCAGTAAAAGATAATTGAACC	279	69
<i>tsh</i>	TCTAACGGAAGTACCTGG	CATAGTCCAGCGTGATAG	427	55
<i>irp-2</i>	AAGGATTCGCTGTTACCGGAC	TCGTCGGGCAGCGTTTCTTCT	287	55
<i>iroN</i>	AAGTCAAAGCAGGGGTGCCCCG	GACGCCGACATTAAGACGCAG	667	55
<i>iutA</i>	GGCTGGACATCATGGGAAGTGG	CGTCGGGAACGGGTAGAATCG	302	63
<i>cvaC</i>	CACACACAAACGGGAGCTGT	CTTCCCGCAGCATAGTTCCAT	679	55
<i>iss</i>	CAGCAACCCGAACCACTTGATG	AGCATTGCCAGAGCGGCAGAA	323	55

1.3 O 血清型鉴定

将经过生化鉴定的大肠埃希菌接种于 2 mL LB 液体培养基中,37 ℃过夜振荡培养,次日,将细菌培养物于 121 ℃、103.4 kPa 下处理 2 h 后,离心弃上清,用 400 μL 0.5%的苯酚溶液重悬菌体,制成浓稠悬液,作为大肠埃希菌菌体抗原,备用。取 7 μL 菌体抗原和 2 μL 大肠埃希菌 O 抗原血清置于玻板上混匀,出现凝集即可初步定型,再通过试管凝集试验进一步确定血清型^[16]。

1.4 分群分析和毒力基因检测

参考文献[17–21]中序列,合成 *chuA*、*yiaA* 和 DNA 片段 *TspE4.C2* 的扩增引物(表 1)。依据 CLERMONT 等^[17]建立的将大肠埃希菌分为 A、B1、B2 和 D 群的分群方法进行分群分析。参照已发表的毒力基因引物序列^[17–21]合成检测引物(表 1),制备模板 DNA,分装后置于–20 ℃保存。按 1.2 中的方法进行 PCR 检测。取 PCR 反应产物 5 μL 用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测结果。

1.5 分离菌株的耐药性检测

参照美国国家临床实验室标准委员会(NCCLS)方法手册(2007 年版)规定的标准,检测菌株的耐药性,检测的抗生素包括氨苄青霉素、庆大霉素、卡

那霉素和四环素。依据检测结果选择合适抗性的原核表达载体,构建溶菌质粒。

1.6 溶菌质粒的构建

根据 NCBI 公布的 φX174 噬菌体裂解蛋白 E 的基因序列合成 *E* 基因,并连接至 pUC57 载体,命名为 pUC57–E。用限制性内切酶 *EcoR* I 和 *Sal* I 双酶切重组质粒 pUC57–E 和表达载体 pBV221,利用 T₄ DNA 连接酶将 *E* 基因片段连接至载体 pBV221,再将连接产物转化至 DH_{5α} 感受态细胞,在氨苄抗性平板上筛选阳性克隆并扩大培养,从菌液中提取质粒进行双酶切鉴定和测序鉴定,将构建成功的溶菌质粒命名为 pBV221–E。

1.7 菌蛻的制备

参考文献[8],制备鸭致病性大肠埃希菌电转化感受态细胞,将 pBV221–E 和 pBV221 分别转化至分离菌株。用氨苄抗性平板筛选阳性克隆,通过鉴定的阳性克隆分别命名为 pBV221–E/D 和 pBV221/D,并进行溶菌动力学试验。将 pBV221–E/D 和 pBV221/D 菌液于 28 ℃振荡培养至 A_{600 nm} 约为 0.5 时,取 pBV221–E/D 菌液样品作为诱导前对照,然后将菌液等分为 2 瓶,一瓶置于 42 ℃诱导表达,另一瓶还置于 28 ℃,继续振荡培养,每隔 30 min 取样测定 A_{600 nm} 值,至 pBV221–E/D 菌

液的 $A_{600\text{ nm}}$ 值不继续下降,此时结束培养,收获菌液,并取出少量 pBV221-E/D 菌液作为诱导后样品。将诱导前的 pBV221-E/D 菌液用 0.9%NaCl 溶液进行 10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6} 稀释,升温诱导后的菌液用 0.9%NaCl 溶液进行 10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} 稀释,每个稀释度涂 3 块无抗 LB 平板,37 °C 恒温培养 12 h,选取合适稀释度的平板进行计数,取 cfu 平均值计算裂解率^[22]。

1.8 透射电镜检测

用负染色方法^[22]对 42 °C 诱导表达 2.5 h 的大肠埃希菌 pBV221-E/D 和 pBV221/D 菌液样品进行染色;用 Philips 透射电子显微镜(Tecnai 12)观察菌体结构。

1.9 菌蛻免疫原性检测

按上述制备方法,制备大量大肠埃希菌菌蛻,并测算裂解率。菌蛻溶液中加入 β -丙内酯至终浓度为 0.025%,再将菌液置于 42 °C 作用 1 h,离心收集菌体,菌体沉淀用灭菌 PBS(磷酸盐缓冲溶液)清洗 3 遍后重悬,加入 β -丙内酯至终浓度为 0.05%,再置于 42 °C 作用 2 h,制成菌蛻疫苗,并取少量悬浊液进行无菌检验和菌体计数。选取体质量接近的 7 日龄樱桃谷鸭 40 只,随机分成 2 组,每组 20 只。分别在颈部皮下接种菌蛻疫苗(1×10^9 cfu/只)和等体积(200 μ L)无菌 PBS;2 周后以相同剂量再免疫 1 次。分别于首免和二免后 2 周采集血液,分离血清。用鸭致病性大肠埃希菌分离株全菌抗原(1×10^9 cfu/mL)包被酶标板,将血清样品稀释 500 倍后,用间接 ELISA 法^[22]检测血清抗体(IgG)效价。

2 结果与分析

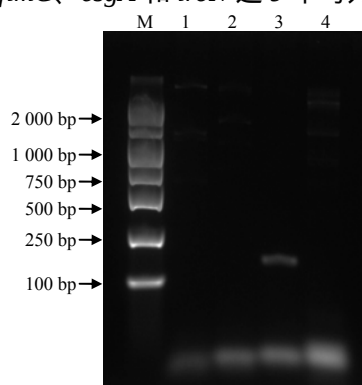
2.1 供试菌株的分离鉴定结果

根据病鸭临床症状、细菌形态学观察、生化鉴定和 16s RNA 扩增测序的结果,确定分离菌株为大肠埃希菌。通过玻板凝集试验和试管凝集试验鉴定,该菌株血清型为 O24。

2.2 供试菌株的分群分析和毒力基因检测结果

从图 1 可知, *chuA* 和 *yjaA* 的检测结果均为阴

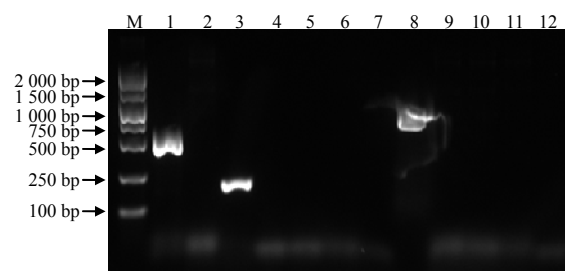
性, *TspE4.C2* 为阳性,据此确定该菌株为 B1 型。从图 2 可知, *fimC*、*csgA* 和 *iroN* 这 3 个基因的检测结果为阳性, *kpsM*、*papC*、*felA*、*tsh*、*irp-2*、*iutA*、*cvaC* 和 *iss* 这 8 个基因的检测结果为阴性,说明该菌株具有 *fimC*、*csgA* 和 *iroN* 这 3 个毒力基因。



M DL2000 Plus DNA Marker ; 1 *chuA* ; 2 *yjaA* ; 3 *TSPE4.C2* ; 4 (-)。

图 1 鸭致病性大肠埃希菌的 *chuA*、*yjaA* 和 *TSPE4.C2* 基因扩增产物

Fig.1 The amplification products of *chuA*, *yjaA* and *TSPE4.C2* of pathogenic *Escherichia coli* from duck



M DL2000 Plus DNA Marker ; 1 *fimC* ; 2 *kpsM* ; 3 *csgA* ; 4 *papC* ; 5 *felA* ; 6 *tsh* ; 7 *irp-2* ; 8 *iroN* ; 9 *iutA* ; 10 *cvaC* ; 11 *iss* ; 12 (-)。

图 2 鸭致病性大肠埃希菌的毒力基因扩增产物

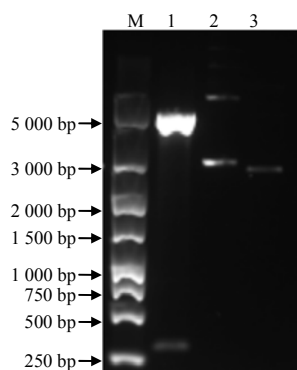
Fig.2 The amplification products of virulence gene of pathogenic *Escherichia coli* from duck

2.3 供试菌株的耐药性检测结果

分离株对四环素不敏感,对氨苄青霉素、庆大霉素及卡那霉素敏感;因此,选择对氨苄青霉素有抗性的 pBV221 载体进行溶菌质粒的构建。

2.4 供试菌株溶菌质粒的鉴定结果

用 *EcoR* I 和 *Sal* I 双酶切重组质粒 pBV221-E 可获得目的基因 *E* 和线性化 pBV221,条带大小与预测一致(图 3)。重组质粒测序结果显示 *E* 基因片段序列正确。



M DL5000 Plus DNA Marker; 1 pBV221-E 质粒双酶切;

2 pBV221-E 质粒对照; 3 pBV221 质粒对照。

图 3 pBV221-E 质粒的 *EcoR* I 和 *Sal* I 双酶切鉴定结果

Fig.3 The result of identification of recombinant plasmid

pBV221-E digested by *EcoR* I and *Sal* I

2.5 供试菌蛻制备效率检测结果

如图 4 所示,在诱导 30 min 后 pBV221-E/D 菌液的 $A_{600\text{ nm}}$ 开始下降,诱导 120 min 后 $A_{600\text{ nm}}$ 值趋于稳定,约为 0.3;而诱导培养后的 pBV221/D 和 28℃ 培养的 pBV221-E/D 对照菌液的 $A_{600\text{ nm}}$ 值一直保持上升趋势。pBV221-E/D 裂解率为 99.96%。

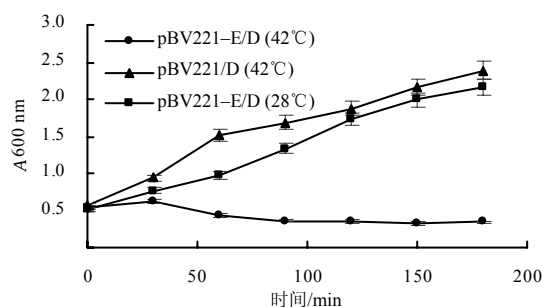
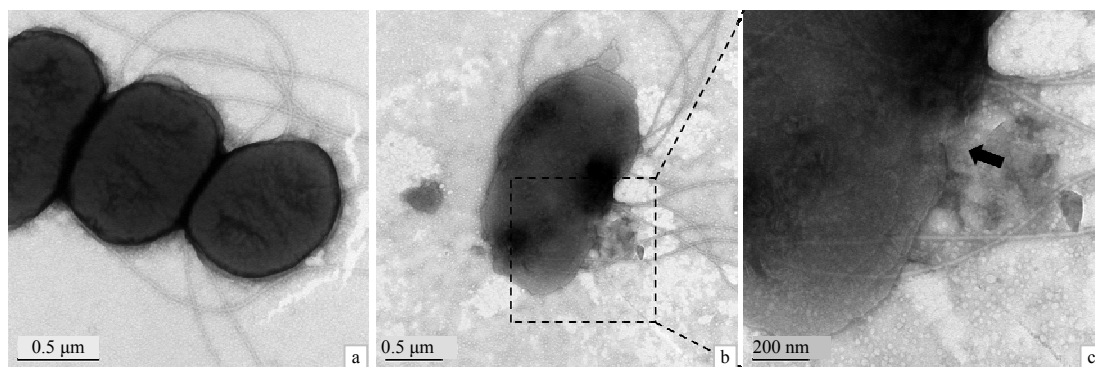


图 4 鸭致病性大肠埃希菌诱导培养后的生长曲线

Fig.4 Growth curve of pathogenic *Escherichia coli* from duck after inducing

2.6 供试菌的透射电镜检测结果

诱导培养 2.5 h 后的 pBV221/D 对照菌呈现完整的细菌结构(图 5-a),电子密度较高且分布均匀;而诱导后的 pBV221-E/D 菌体电子密度降低且分布不均匀(图 5-b),菌膜上有孔道形成,孔道宽度约为 150 nm(图 5-c 箭头所指),细胞质通过孔道外泄,细胞膜有较为明显的皱缩变形;诱导前后菌体的鞭毛均清晰可见。



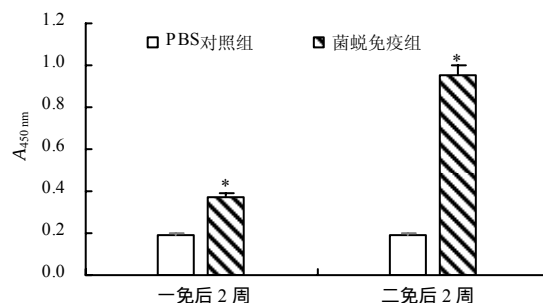
a pBV221/D 诱导前菌体; b pBV221/D 诱导后菌体; c pBV221/D 诱导后菌体(b)局部放大。

图 5 鸭致病性大肠埃希菌的透射电镜检测结果

Fig.5 The detection result of pathogenic *Escherichia coli* from duck by transmission electron micrographs

2.7 供试菌蛻的免疫原性

大量制备的大肠埃希菌菌蛻裂解率达 99.99%;经 β -丙内酯 2 次灭活处理后的菌蛻溶液涂布 LB 固体平板后未见菌落长出,说明菌蛻溶液中无活菌存在。如图 6 所示,菌蛻免疫组鸭的血清 IgG 水平在二免后上升,且显著高于 PBS 对照组的($P < 0.05$)。以 PBS 对照组为阴性值(N),菌蛻免疫组为阳性值(P),求得一免后 2 周和二免后 2 周的 P/N 值分别为 1.903(0.371/0.195)和 4.918(0.954/0.194),二免后 2 周的 P/N 值大于 2.1,判定为阳性血清。



“*”示菌蛻免疫组与 PBS 对照组间的差异显著($P < 0.05$)。

图 6 间接 ELISA 检测樱桃谷鸭的血清 IgG 水平

Fig.6 The serum IgG levels of Cherry Valley duck detected by indirect ELISA

3 结论与讨论

胡林等^[23]对华东部分地区 66 株禽致病性大肠埃希菌系统进化分群的分析显示, A、B1、B2、D 群菌株数分别占 33.4%、31.8%、13.6%、21.2%。张旭等^[16]对 2015—2016 年分离自江苏和山东部分地区的 173 株禽大肠埃希菌的血清型、致病性等流行病学特征进行调查, 结果显示优势血清型有 O78(21%)、O24(12%)和 O1(10%)。牛春玲^[24]在华东地区分离的 480 株鸭源 APEC 菌株中, A、B2 群分别占 56.25%、19.17%。董向磊^[25]分离得到 240 株 APEC 菌株, 检测发现 B2 和 D 型占 49.58%, 认为在 *iutA*、*iss*、*tsh*、*iroN*、*irp-2*、*cvaC* 这 6 个基因中, 如分离株的毒力基因数不小于 2 个, 即有 89.74% 的概率认定该分离株具有致病性。

本研究中, 用于制备菌蛻的 APEC 菌株分离于江苏省某水禽场的病鸭; 通过玻板凝集和试管凝集试验确定该菌株的血清型为 O24, 是江苏地区 APEC 的优势血清型; 对菌株进行分群分析和毒力基因检测后发现, 该菌株属于 B1 群, 并具有 *fimC*、*csgA* 和 *iroN* 这 3 个毒力基因, 初步推测其具有致病性; 在诱导 30 min 后 pBV221-E/D 菌液 $A_{600\text{ nm}}$ 开始下降, 诱导 120 min 后 $A_{600\text{ nm}}$ 数值趋于稳定, 说明重组菌株在诱导后 30 min 内 E 蛋白即开始表达, 诱导 120 min 后细菌裂解完全。ZHU 等^[12]的研究显示, 如菌液吸光度为 0.6 时开始诱导, 诱导 30 min 后菌液吸光度下降至最低; 如菌液吸光度为 1.2 时开始诱导, 则需诱导 120 min 后菌液吸光度下降至最低。这些诱导时间上的差别可能是由于菌液起始浓度不同、菌株自身差异或 E 蛋白表达效率不同等原因引起的。本研究中, 细菌裂解效率达 99.9% 以上, 与文献^[10-11]报道的结果一致; 电镜观察结果显示, 菌蛻上孔道的宽度约为 150 nm, 细菌内容物通过孔道溢出, 菌体皱缩变形, 电子密度降低, 这与 ZHU 等^[12]、TUNTUFYE 等^[26]和 LANGEMANN 等^[27]的报道一致; 细菌的鞭毛结构清晰完整, 说明在菌蛻制备过程中菌体结构得到完整保存; 在菌蛻疫苗制备中选择 β -丙内酯作为灭活剂, 与传统的甲醛灭活法^[10-11, 22]相比有可水解、无残留等优势; 免疫原性检测结果显示, 2 次免疫后菌蛻可使雏鸭血清 IgG 水平显著提高, 说明该菌蛻可以诱发机体产生体液免疫, 与何亮^[22]的研究结果一致。但对比发现, 本试验中, 一免后 2 周的血清 IgG 水平低于何亮的研究结果, 可能是菌株来源不同造成了免疫原性的差异。

综上所述, 通过将 pBV221-E 重组质粒转化至 APEC 分离株, 调节细菌培养温度诱导 E 蛋白表达, 成功获得鸭源 APEC 菌蛻, 且该菌蛻可以诱发机体产生体液免疫。

参考文献:

- [1] LANGEMANN T, KOLLER V J, MUHAMMAD A, et al. The bacterial ghost platform system[J]. *Bioengineered Bugs*, 2010, 1(5): 326-336.
- [2] KOLLER V J, DIRSCH V M, BERES H, et al. Modulation of bacterial ghosts-induced nitric oxide production in macrophages by bacterial ghost-delivered resveratrol[J]. *The FEBS Journal*, 2013, 280(5): 1214-1225.
- [3] MAYR U B, HALLER C, HAIDINGER W, et al. Bacterial ghosts as an oral vaccine: a single dose of *Escherichia coli* O157 H7 bacterial ghosts protects mice against lethal challenge[J]. *Infection and Immunity*, 2005, 73(8): 4810-4817.
- [4] XIA S L, LEI J L, DU M L, et al. Enhanced protective immunity of the chimeric vector-based vaccine rAdV-SFV-E2 against classical swine fever in pigs by a *Salmonella* bacterial ghost adjuvant[J]. *Veterinary Research*, 2016, 47: 64.
- [5] JAWALE C V, LEE J H. *Salmonella enterica* serovar enteritidis ghosts carrying the *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin B subunit are capable of inducing enhanced protective immune responses[J]. *Clinical and Vaccine Immunology*, 2014, 21(6): 799-807.
- [6] VILTE D A, LARZÁBAL M, MAYR U B, et al. A systemic vaccine based on *Escherichia coli* O157 H7 bacterial ghosts(BGs) reduces the excretion of *E. coli* O157 H7 in calves[J]. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 2012, 146(2): 169-176.
- [7] 恽时锋, 潘震寰, 郑明珠. 鸡大肠杆菌病研究进展[J]. *畜牧与兽医*, 1998, 30(6): 277-280.
- [8] YUN S F, PAN Z H, ZHENG M Q. Research progress of chicken colibacillosis[J]. *Animal Husbandry & Veterinary Medicine*, 1998, 30(6): 277-280.
- [8] 王少辉. 禽致病性大肠杆菌 DE205B 黏附及侵袭相关因子的致病作用[D]. 南京: 南京农业大学, 2011.
- [8] WANG S H. Pathogenic roles of adhesion and invasion associated factors of avian pathogenic *E. coli* DE205B[D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2011.
- [9] JANBEN T, SCHWARZ C, PREIKSCHAT P, et al. Virulence-associated genes in avian pathogenic *Escherichia coli*(APEC) isolated from internal organs of poultry having died from colibacillosis[J]. *International Journal of Medical Microbiology* 2001, 291(5): 371-378.
- [10] 王香萍. 鸡大肠杆菌 O₁ 和 O₇₈ 血清型菌蛻的制备和应

- 用的初步研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2013 .
WANG X P . Preliminary studies on the preparation and application of chicken *Escherichia coli* O₁ and O₇₈ ghosts[D] . Wuhan : Huazhong Agricultural University , 2013 .
- [11] 杨立军 . 禽致病性大肠杆菌 *aroA* 和 *luxS* 双缺失株的构建及其菌蛻疫苗的制备[D] . 扬州: 扬州大学, 2016 .
YANG L J . Construction and bacterial ghosts development of avian pathogenic *Escherichia coli* *aroA-luxS* double gene deletion mutant[D] . Yangzhou : Yangzhou University , 2016 .
- [12] ZHU W X , ZHANG Y Y , LIU X L . Efficient production of safety-enhanced *Escherichia coli* ghosts by tandem expression of Φ X 174 mutant gene *E* and staphylococcal nuclease *A* gene[J] . Microbiological Research , 2015 , 176 : 7–13 .
- [13] SAMBROOK J , RUSSELL D W . Molecular Cloning: A Laboratory Manual[M] . New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001 .
- [14] EDWARDS U , ROGALL T , BLOECKER H , et al . Isolation and direct complete nucleotide determination of entire genes . Characterization of a gene coding for 16S ribosomal RNA[J] . Nucleic Acids Research , 1989 , 17(19) : 7843–7853 .
- [15] WEISBURG W G , BARNES S M , PELLETIER D A , et al . 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study[J] . Journal of Bacteriology , 1991 , 173(2) : 697–703 .
- [16] 张旭, 乔培壮, 张学斌, 等 . 江苏、山东部分地区禽致病性大肠杆菌流行病学调查[J] . 中国家禽, 2017 , 39(6) : 74–76 .
ZHANG X , QIAO P Z , ZHANG X B , et al . Epidemiological investigation of avian pathogenic *Escherichia coli* in Jiangsu and Shandong[J] . China Poultry , 2017 , 39(6) : 74–76 .
- [17] CLERMONT O , BONACORSI S , BINGEN E . Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group[J] . Applied and Environmental Microbiology , 2000 , 66(10) : 4555–4558 .
- [18] 宦海霞, 陈祥, 高崧, 等 . 禽病原性大肠杆菌部分毒力相关基因的克隆及序列分析[J] . 中国家禽, 2007 , 29(10) : 12–15 .
HUAN H X , CHEN X , GAO S , et al . Cloning and sequencing of virulence related genes of pathogenic *Escherichia coli* isolates from chicken[J] . China Poultry , 2007 , 29(10) : 12–15 .
- [19] 曹春光 . 苏鲁部分地区禽致病性大肠杆菌的分离及 2 个 O78 分离株致病性的研究[D] . 扬州: 扬州大学, 2015 .
CAO C G . The isolation and identification of avian pathogenic *Escherichia coli* in Jiangsu and Shandong Province and the virulence study of two O78 isolates[D] . Yangzhou : Yangzhou University , 2015 .
- [20] 白灏, 冀辉, 韩先干, 等 . 禽致病性大肠杆菌江苏、安徽分离株的生物学特性分析[J] . 微生物学通报, 2013 , 40(7) : 1315–1322 .
BAI H , JI H , HAN X G , et al . Characterization of avian pathogenic *Escherichia coli* isolated from Jiangsu and Anhui provinces[J] . Microbiology China , 2013 , 40(7) : 1315–1322 .
- [21] 陈文静, 韩先干, 何亮, 等 . 鸭致病性大肠杆菌的分离鉴定及其生物学特性分析[J] . 中国动物传染病学报, 2010 , 18(2) : 34–40 .
CHEN W J , HAN X G , HE L , et al . Characterization of duck pathogenic *Escherichia coli*[J] . Chinese Journal of Animal Infectious Diseases , 2010 , 18(2) : 34–40 .
- [22] 何亮 . 鸭致病性大肠杆菌菌蛻的制备及其免疫原性研究[D] . 扬州: 扬州大学, 2011 .
HE L . Production and immunogenicity of bacterial ghosts from pathogenic *Escherichia coli* isolated from ducklings[D] . Yangzhou : Yangzhou University , 2011 .
- [23] 胡林, 刘晓燕, 王颢锦, 等 . 华东部分地区禽致病性大肠杆菌系统进化分群及毒力相关基因的检测[J] . 畜牧与兽医, 2014 , 46(1) : 9–13 .
HU L , LIU X Y , WANG H J , et al . Phylogenetic clustering and virulence-associated genes of avian pathogenic *Escherichia coli* in some areas of Eastern China[J] . Animal Husbandry & Veterinary Medicine , 2014 , 46(1) : 9–13 .
- [24] 牛春玲 . 华东地区鸭源禽致病性大肠杆菌系统进化群及毒力相关基因特性分析[D] . 南京: 南京农业大学, 2009 .
NIU C L . Analysis on phylogenetic group of avian pathogenic *Escherichia coli* from ducks in Eastern China and characterizations of its virulence-associated genes[D] . Nanjing : Nanjing Agricultural University , 2009 .
- [25] 董向磊 . 禽致病性大肠杆菌的分离鉴定和分离株毒力基因与致病性相关性研究[D] . 扬州: 扬州大学, 2014 .
DONG X L . Isolation and identification of avian pathogenic *Escherichia coli* and the correlation of APEC virulence genes with its pathogenicity[D] . Yangzhou, China : Yangzhou University , 2014 .
- [26] TUNTUFYE H N , ONS E , PHAM A D N , et al . *Escherichia coli* ghosts or live *E. coli* expressing the ferri-siderophore receptors FepA , FhuE , IroN and IutA do not protect broiler chickens against avian pathogenic *E. coli*(APEC)[J] . Veterinary Microbiology , 2012 , 159(3/4) : 470–478 .
- [27] LANGEMANN T , KOLLER V J , MUHAMMAD A , et al . The bacterial ghost platform system : production and applications[J] . Bioengineered Bugs , 2010 , 1(5) : 326–336 .

责任编辑: 邹慧玲

英文编辑: 柳 正