

刘思琪, 郭梦娇, 吴艳涛, 等. 禽致病性大肠杆菌菌蛻的制备及裂解条件优化 [J]. 畜牧与兽医, 2025, 57 (7): 97-102.

LIU S Q, GUO M J, WU Y T, et al. Preparation of bacterial ghost of avian pathogenic *Escherichia coli* and optimization of conditions for pyrolysis [J]. Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2025, 57 (7): 97-102.

禽致病性大肠杆菌菌蛻的制备及裂解条件优化

刘思琪^{1,2}, 郭梦娇², 吴艳涛², 袁橙^{1*}

(1. 江苏农牧科技职业学院动物医学院, 江苏 泰州 225300;

2. 扬州大学兽医学院, 江苏 扬州 225000)

摘要: 旨在制备禽致病性大肠杆菌菌蛻, 并优化制备条件。将温控型表达质粒 pBV221-E 通过电击的方式, 电转化入 12 株禽致病性大肠杆菌分离株中, 通过改变温度诱导 E 基因表达来裂解细菌制备菌蛻; 同时探究了不同起始诱导 A_{600} 值 (0.4、0.5、0.6) 对裂解效率的影响, 优化制备条件提高裂解效率, 并评估禽致病性大肠杆菌菌蛻的免疫保护力。结果: 不同菌株的裂解效率有较大差异, 在起始诱导 A_{600} 值为 0.5 时, 禽致病性大肠杆菌 D78 菌蛻的裂解效率最高, 可达约 98.00%; 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, 菌体电子密度下降; 免疫效力评估试验显示, SPF 鸡经肌肉注射 D78 菌蛻疫苗, 二免 14 d 后, 通过气囊注射攻毒, D78 菌蛻疫苗的免疫保护率为 66.67%, 优于 D78 甲醛灭活疫苗。研究结果为新型禽致病性大肠杆菌疫苗的研发奠定了基础。

关键词: 菌蛻; 禽致病性大肠杆菌; E 基因; 裂解效率

中图分类号: S852.61

文献标志码: A

文章编号: 0529-5130(2025)07-0097-06

Preparation of bacterial ghost of avian pathogenic *Escherichia coli* and optimization of conditions for pyrolysis

LIU Siqu^{1,2}, GUO Mengjiao², WU Yantao², YUAN Cheng^{1*}

(1. College of Veterinary Medicine of Jiangsu Agricultural and Animal Husbandry Vocational College, Taizhou 225300, China;

2. School of Veterinary Medicine, Yangzhou University, Yangzhou 225000, China)

Abstract: In order to prepare a bacterial ghost of avian pathogenic *Escherichia coli* and to optimize the preparation conditions, the temperature-controlled expression plasmid pBV221-E was electro-transformed into 12 avian pathogenic *Escherichia coli* strains by electric shock. The E gene expression was induced by changing the temperature to lyse the bacteria to prepare the bacterial ghost. At the same time, the effects of different initial induction A_{600} values (0.4, 0.5, 0.6) on the lysis efficiency were explored, the preparation conditions were optimized to improve the lysis efficiency, and the immune protection of avian pathogenic *Escherichia coli* ghosts was evaluated. The results showed that the lysis efficiency of different strains evidently varied. When the initial induction A_{600} value was 0.5, the lysis efficiency of avian pathogenic *Escherichia coli* D78 ghosts was the highest, reaching about 98.00%. The transmission electron microscopy showed that there were obvious pores in the surface of the prepared bacterial ghost, and the cytoplasm overflowed from the pores, and the electron density of the bacteria decreased. The immune efficacy evaluation test showed that 14 days after the SPF chickens were intramuscularly injected with D78 bacterial ghost vaccine, the immune protection rate of the D78 bacterial ghost vaccine was 66.67%, which was better than that of the D78 formaldehyde inactivated vaccine. The present study laid a foundation for development of new avian pathogenic *Escherichia coli* vaccines.

Keywords: bacterial ghost; avian pathogenic *Escherichia coli*; gene E; lysis efficiency

禽致病性大肠杆菌 (avian pathogenic *Escherichia*

coli, APEC) 能够通过呼吸道感染宿主, 继而在宿主体内定殖^[1-2]。该菌感染引发的疾病种类繁多, 包括但不限于大肠杆菌性肉芽肿、腹膜感染、输卵管炎症、脐部感染、滑膜炎等, 不仅影响禽类的生长和发育, 而且降低养殖效益。因此, 对禽大肠杆菌病有效防控措施的探索具有重要意义。目前, 防控大肠杆菌病的主要手段有生物安全防控, 使用抗生素和免疫疫苗。然而, 由于抗生素的不合理使用, 容易导致大

收稿日期: 2024-06-27; 修回日期: 2025-04-22

基金项目: 江苏省高等学校自然科学研究面上项目 (21KJB230007); 泰州市科技支撑计划 (农业) 项目 (TN202118); 江苏高校“青蓝工程”项目 (苏教师函〔2024〕14号)

第一作者: 刘思琪, 女, 硕士研究生。

*通信作者: 袁橙, 博士, 副教授, 研究方向为禽病防控,

E-mail: 840289909@qq.com。

肠杆菌耐药性菌株产生,且这种耐药性可在细菌之间进行传播^[3],因此,随着兽用抗菌药综合治理的加强,疫苗免疫逐步替代药物预防。这种转变不仅符合公共卫生和动物福利的要求,也展现了疫苗在疾病控制领域的重要地位^[4]。现有细菌疫苗存在一系列问题,如细菌灭活疫苗会破坏细菌表面的免疫原性,弱毒活菌苗存在将强毒株致弱的耗时耗力问题和弱毒活菌苗毒力返强的潜在风险,亚单位疫苗存在需要额外加入佐剂增加成本等。因此,能解决以上问题的新型禽致病性大肠杆菌疫苗一直是科研工作者的研究热点。

Lubitz 等^[5]研究发现,噬菌体 PhiX174 的裂解基因 E 在革兰阴性菌中表达,能够诱导菌体形成跨膜通道,从而允许细胞质和细胞器等关键组分从孔道中泄露,进而生成无繁殖活性的细菌空壳,即所谓的菌蛻。由于菌蛻并未破坏细菌表面的抗原结构,因此其细胞膜成分,如脂多糖、肽聚糖、鞭毛等得以完整保留,并能够刺激机体产生显著的体液免疫、细胞免疫

以及黏膜免疫应答,因此被视为一种具有潜力的新型疫苗候选。另有研究表明,菌蛻不仅可以直接作为疫苗进行免疫,还具有良好的载体和佐剂功能^[6-7]。此外,菌蛻易于储存和运输。综合以上特点分析,菌蛻具有较为广阔的应用前景。

本研究将温控型表达质粒 pBV221-E 电转入 12 株 APEC 分离株中,筛选出裂解率较高的菌株,对裂解条件进行优化以制备 APEC 菌蛻,并对所制备菌蛻的免疫保护力进行了测定。

1 材料与方法

1.1 菌株及质粒

对氨苄青霉素钠敏感的 APEC 菌株 D2、D3、D9、D25、D33、D52、D78、D123、D176、D204、D258、S4 分离自临床发病鸡(见表 1),温控型表达质粒 pBV221-E、pBV221 由江苏农牧科技职业学院保存及惠赠。

表 1 APEC 菌株信息

菌株名称	菌株来源	血清型	菌株名称	菌株来源	血清型
D2	鸭, 徐州, 2018	-	D78	鸡, 商丘, 2019	O78
D3	鸭, 徐州, 2018	-	D123	鸭, 宿州, 2019	O145
D9	鸭, 徐州, 2018	-	D176	鸭, 徐州, 2020	-
D25	鹅, 徐州, 2018	-	D204	鸭, 连云港, 2021	-
D33	鸭, 徐州, 2018	-	D256	鸭, 阜阳, 2021	-
D52	鸭, 周口, 2019	-	S4	鸭, 常州, 2021	-

注: -表示菌株血清型暂未确定。

1.2 主要试剂

PCR 试剂盒采购于北京全式金生物技术有限公司。DL2000 Plus DNA Marker 和 DNA 上样缓冲液等关键试剂,均从宝日医生物技术有限公司购入。氨苄青霉素则由 BBI 生命科学有限公司供应。氯化钠、氯化钾、磷酸二氢钾以及十二水合磷酸氢二钠等化学试剂全部购自国药集团化学试剂有限公司。

1.3 试验动物

7 日龄 SPF 来航鸡 45 只,购自勃林格殷格翰公司。

1.4 温控型表达质粒 pBV221-E、pBV221 的转化

按参考文献 [8] 的方法制备 APEC D2、D3、D9、D25、D33、D52、D78、D123、D176、D204、D258、S4 的电转化感受态细胞。取温控型表达质粒 pBV221-E、pBV221 各 1 μ L 分别加至 100 μ L APEC

感受态细胞中,在 2 500 V、200 Ω 、25 μ F 条件下电转化,于 28 $^{\circ}$ C、220 r/min 振荡培养 2 h,恢复抗性。取 100 μ L 菌液均匀地涂布于含有 50 mg/L 氨苄青霉素的 LB 琼脂平板上,28 $^{\circ}$ C 培养 16~18 h。挑取单菌落,接种至含 50 mg/L 氨苄青霉素的 LB 培养液中,28 $^{\circ}$ C 振荡培养 12~16 h。根据溶菌质粒 pBV221-E 上的裂解基因 E 基因设计引物(引物序列见表 2),对菌落中的 E 基因进行 PCR 鉴定。PCR 体系为 20 μ L,其中 dNTPs 1.6 μ L,10 \times Buffer 2 μ L, *Taq* 酶 0.2 μ L,上下游引物各 0.4 μ L,菌液 1 μ L, ddH₂O 14.4 μ L。PCR 反应条件为:94 $^{\circ}$ C 预变性 4 min;94 $^{\circ}$ C 变性 30 s,56 $^{\circ}$ C 退火 30 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s,进行 35 个循环;再 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。通过琼脂糖凝胶电泳确定 PCR 产物的片段大小,送至生工生物工程(上海)股份有限公司测序。

表2 E基因检测用引物

引物名称	序列 (5'→3')	片段大小/bp
221E-F	AAGAAGGGCATTCAAAG	476
221E-R	CTGCGTTCTGATTTAATCTG	

1.5 用于菌蛻制备的重组菌株的筛选

将鉴定为阳性的 APEC 重组菌株 D2、D3、D9、D25、D33、D52、D78、D123、D176、D204、D258、S4 分别接种于 5 mL 含氨苄青霉素的 LB 培养液中，28 °C 过夜培养。取 50 μL，转接至 5 mL 含氨苄青霉素的 LB 培养基中，将含有温控表达质粒 pBV221-E 和 pBV221 的菌液于 28 °C 振荡培养至 A_{600} 值约为 0.5 时^[8]，取 100 μL 含有 pBV221-E 的菌液样品作为诱导前对照，置于 4 °C 保存。然后将含有质粒 pBV221-E 和 pBV221 的菌液置于 42 °C 升温诱导 E 基因裂解，每隔 30 min 取样测定 A_{600} 值，至含有溶菌质粒 pBV221-E 菌液的 A_{600} 值不继续下降，此时结束培养，收获菌蛻溶液。将诱导前的含溶菌质粒 pBV221-E 的菌液用无菌 PBS 溶液进行 10^{-7} 、 10^{-8} 、 10^{-9} 稀释，升温诱导后的菌液用无菌 PBS 溶液进行 10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6} 稀释，每个稀释度各涂 3 个无抗生素的 LB 平板，平板在 37 °C 的恒温条件下培养 12 h 后进行菌落计数，并计算裂解率^[9]。

裂解率 = (1 - 诱导后菌落数/诱导前菌落数) × 100%。

1.6 裂解条件的优化

将筛选出的裂解效率最高的菌株接种于 5 mL 含氨苄青霉素的 LB 培养液中，28 °C 振荡培养过夜；取 50 μL，转接至 5 mL 含氨苄青霉素的 LB 培养基中，于 28 °C 培养至 A_{600} 值为 0.4、0.5、0.6 时，从培养物中取出 100 μL 含有 pBV221-E 的菌液样本，用作诱导前的对照，并将其置于 4 °C 条件下进行保存。接着，将含有质粒 pBV221-E 和 pBV221 的菌液置于 42 °C 摇床中，升温诱导 E 基因裂解，每隔 30 min 取样测定 A_{600} 值。诱导培养约 4 h 后，待含有溶菌质粒 pBV221-E 菌液的 A_{600} 值不继续下降，此时结束培养，收获菌蛻溶液。按照 1.5 所述计算裂解效率。

1.7 菌蛻的灭活

向菌蛻溶液中加入 β-丙内酯，终浓度达 0.025%，42 °C 作用 1 h 进行灭活。离心菌液收集菌

体沉淀，沉淀用无菌 PBS 溶液清洗 3 遍后重悬，再次加入终浓度为 0.05% 的 β-丙内酯，于 42 °C 作用 2 h，并取少量悬浊液接种无抗 LB 固体培养基和液体培养基进行无菌检验。

1.8 透射电镜观察菌蛻

用负染色方法对 D78 APEC 菌蛻进行染色，同时制备转化有空载体 pBV221 的宿主菌作为对照样品，使用 Philips 透射电子显微镜观察菌体结构。

1.9 菌蛻免疫保护力的测定

将 45 只 7 日龄 SPF 来航鸡随机分成 3 组，每组 15 只。其中：A 组肌肉注射甲醛灭活的 APEC D78 全菌，B 组肌肉注射 APEC D78 菌蛻，C 组肌肉注射 PBS 作为攻毒对照组，A 组和 B 组接种剂量为 2×10^9 CFU/只^[10]，C 组注射 PBS 100 μL/只。7 日龄进行首次免疫，2 周后进行第二次免疫，二免 14 d 后，每组鸡通过气囊注射 D78 株进行攻毒，攻毒剂量为 1×10^8 CFU/只。记录 7 d 内来航鸡的临床症状、发病数、存活数等，并计算保护率。

保护率 = (免疫组存活数/组内总数) × 100%。

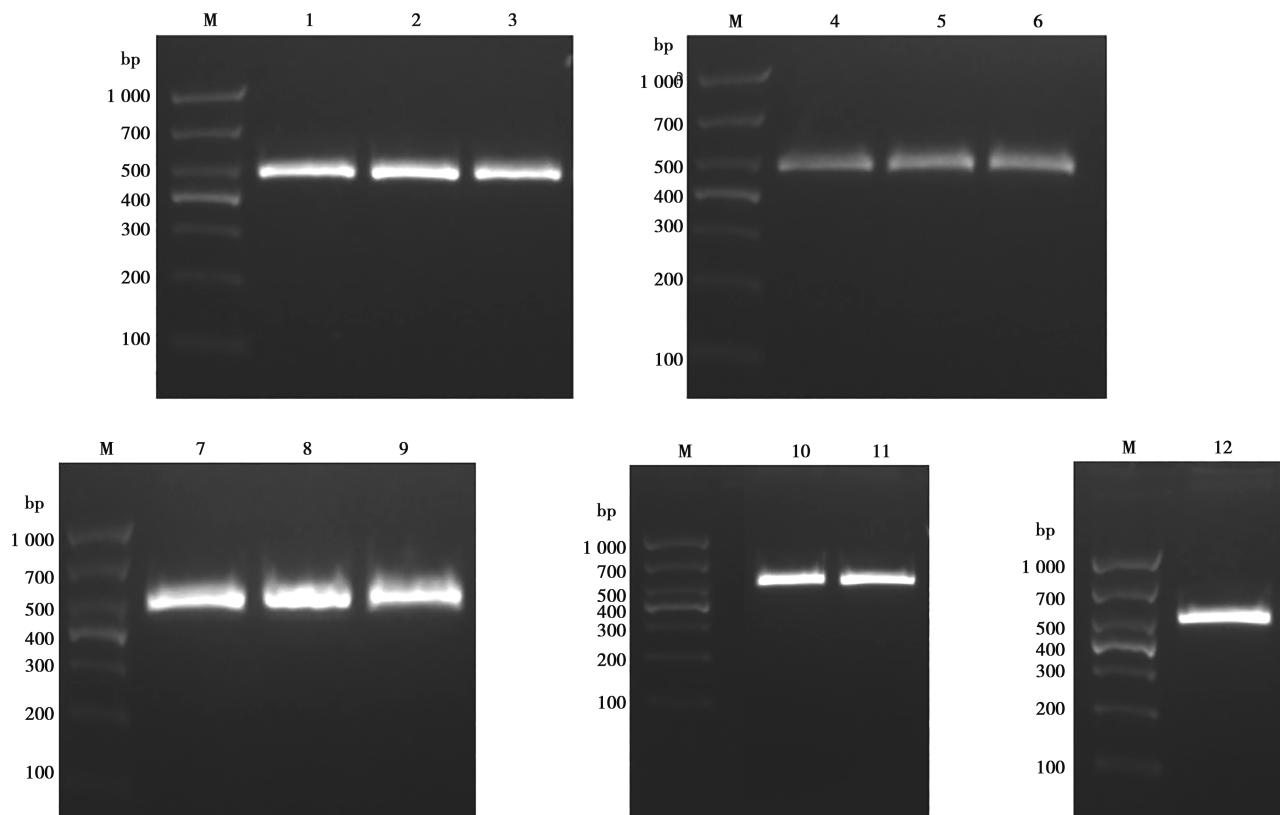
2 结果

2.1 裂解质粒转化 APEC 的鉴定

溶菌质粒 pBV221-E 电转 APEC 菌株后，通过菌液 PCR 鉴定发现扩增基因片段长度与 E 基因长度一致（见图 1），证明 pBV221-E 成功转入 12 株 APEC。

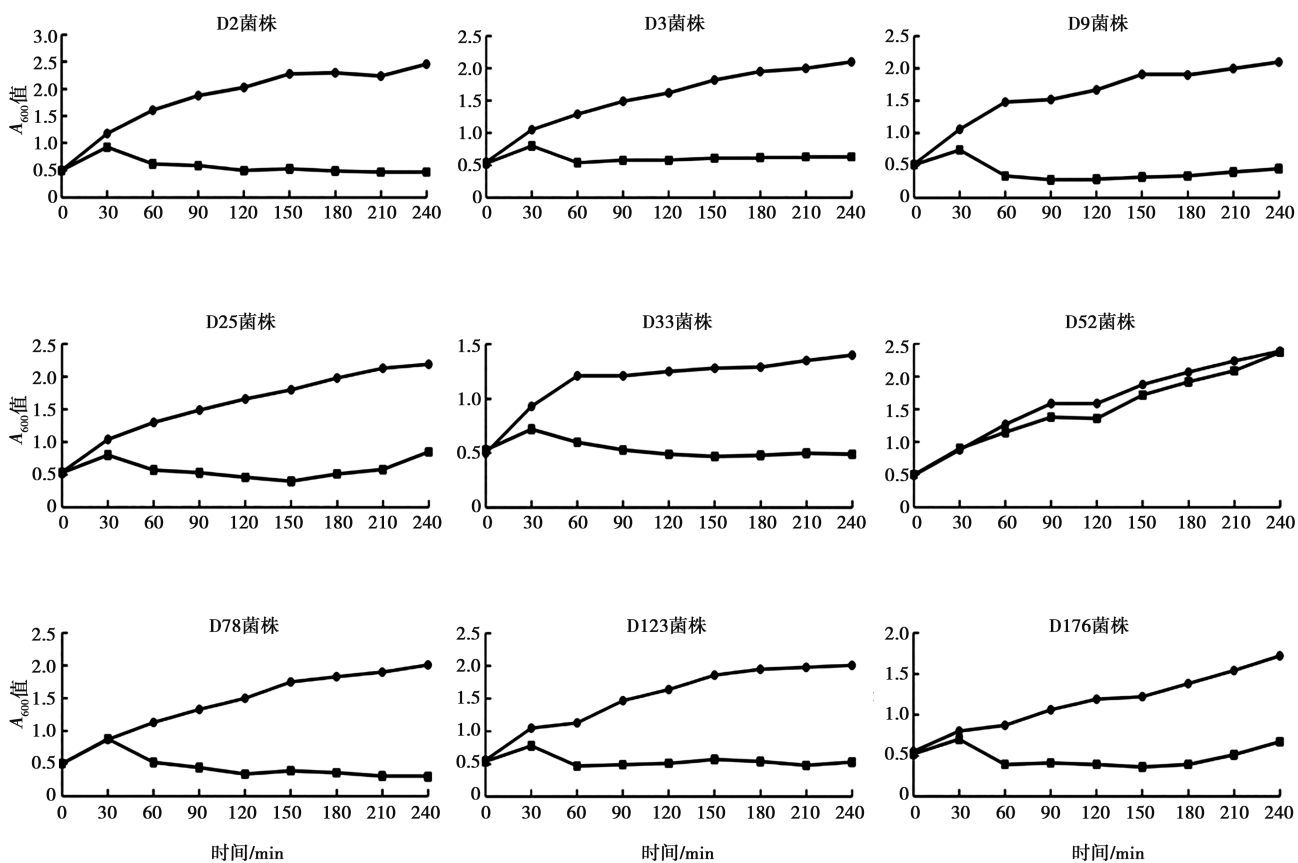
2.2 重组菌株的裂解效率

由图 2 可见，12 株转化溶菌质粒 pBV221-E 的重组菌 A_{600} 值均在升温诱导 30 min 后达到最高，然后下降；D2、D3、D9、D25、D33、D52、D123、D176、D204、D258、S4 菌株 A_{600} 值在诱导 210 min 后呈现上升趋势，但 D78 菌株在诱导中 A_{600} 值相对稳定，在 210 min 后达到最低，然后趋于平稳。经计算，转化溶菌质粒 pBV221-E 的 D2、D3、D9、D25、D33、D52、D78、D123、D176、D204、D258、DS4 菌液的裂解效率分别为 97.78%、60.00%、96.15%、14.00%、94.00%、0、98.00%、91.67%、45.00%、97.50%、89.40%、65.00%。以重组菌 D78 菌株的裂解效率最高，故选择该菌株制备菌蛻用于后续试验。



M. DL1000 DNA Marker; 1. pBV221-E/D2; 2. pBV221-E/D3; 3. pBV221-E/D9; 4. pBV221-E/D25; 5. pBV221-E/D33; 6. pBV221-E/D52; 7. pBV221-E/D78; 8. pBV221-E/D123; 9. pBV221-E/D176; 10. pBV221-E/D204; 11. pBV221-E/D258; 12. pBV221-E/S4。

图1 重组菌株的PCR鉴定



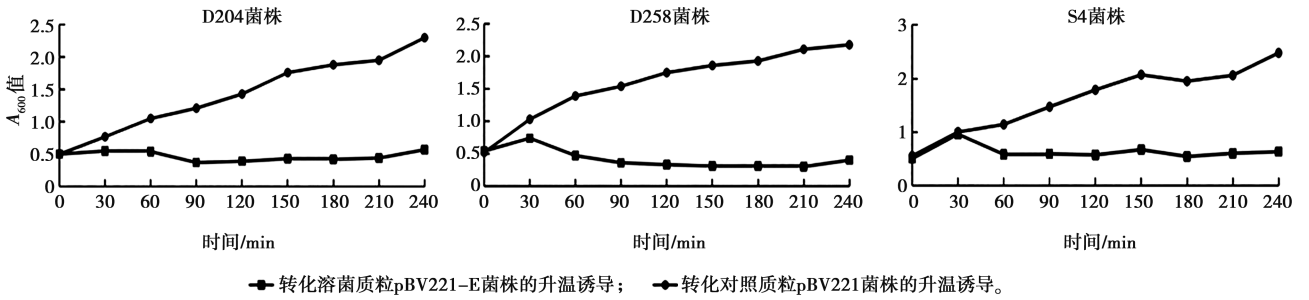


图2 重组菌株的生长曲线

2.3 裂解条件的优化

当起始 A_{600} 值分别为 0.4、0.5 和 0.6 时，D78 菌株的诱导培养生长曲线见图 3。在诱导培养 30 min 后，菌液的 A_{600} 值均达到最高。当起始 A_{600} 值为 0.5 时，培养 60 min 后的菌液 A_{600} 值最低。经计算，起始 A_{600} 值分别为 0.4、0.5 和 0.6 时，D78 菌株的裂解效率分别为 96.12%、98.00% 和 95.00%。因此，选择 A_{600} 值为 0.5 作为诱导培养起始点。

2.4 菌体的透射电镜观察

透射电镜观察发现，对照菌 pBV221/D78 菌体结构正常、完整，菌体的电子密度较高且分布均匀（图 4A）；pBV221-E/D78 菌体电子密度分布不均，

外围细胞质电子密度降低明显，菌膜上有孔道形成，可见细胞质通过孔道外泄（图 4B）。

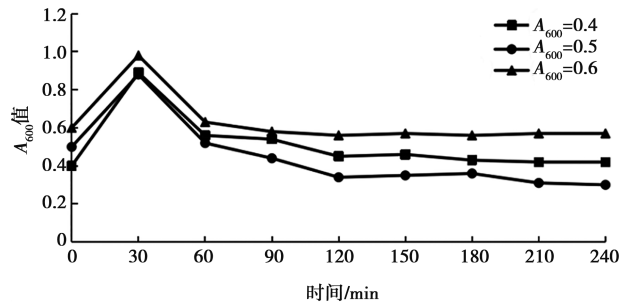
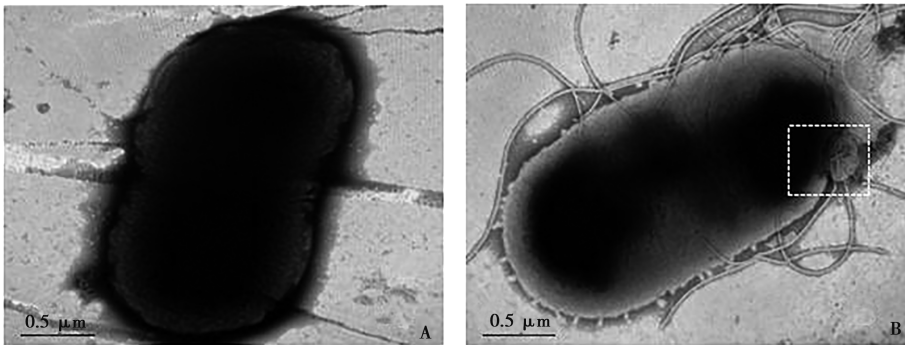


图3 pBV221-E/D78 诱导培养生长曲线



A. pBV221/D78 诱导后菌体（对照）；B. pBV221-E/D78 诱导后菌体，方框处为菌体上形成的孔道。

图4 透射电镜检测结果

2.5 菌蛻免疫保护力的测定

APEC 分离株 D78 攻毒后，A 组 SPF 鸡在 48 h 后陆续死亡 6 只，剩余 9 只耐过后逐渐康复，甲醛灭活疫苗对 D78 分离株攻毒 SPF 鸡的免疫保护率为 60.00% (9/15)；B 组 SPF 鸡在 48 h 后陆续死亡 5 只，剩余 10 只耐过后逐渐康复，菌蛻疫苗的免疫保护率为 66.67% (10/15)；攻毒对照组 SPF 鸡死亡 13 只。

3 讨论

菌蛻的形成是革兰阴性菌通过对噬菌体 PhiX174 的裂解基因 E 的利用实现的^[11-12]。裂解基因 E 能够使细菌的细胞外膜与内膜发生融合，成功诱导形成跨膜孔隙，其直径范围介于 40~200 nm，细菌的胞质内容物在渗透压的影响下，通过该孔隙排除，从而形成一个空壳^[13]。在此作用下形成的孔隙多分布在细菌

菌体的两极位置或中间位置，而不是在细菌菌体表面散在分布^[14]。本研究在制备了 D78 APEC 菌蛻后，于透射电镜下可观察到制备的菌蛻表面有明显孔隙，且孔隙宽度约为 200 nm，胞质内容物从孔隙排出，与相关报道中的描述相符。

本研究中，将溶菌质粒 pBV221-E 电转化入 APEC 分离株中，通过升温诱导 E 基因表达来制备菌蛻。检测发现，12 株 APEC 分离株的裂解效率差距较大，D52 株甚至未能被诱导裂解，提示菌株本身的遗传物质对外源质粒的表达或 E 蛋白裂解作用的发挥可能有较大影响，并不是所有菌株都可使用该方法高效制备菌蛻。在探究不同起始诱导 A_{600} 值（0.4、0.5、0.6）对裂解效率的影响时发现，起始 A_{600} 值分别为 0.4、0.5 和 0.6 时的生长曲线和裂解效率均有差异，在起始诱导 A_{600} 值为 0.5 时，裂解效率最高。以上结果与之前的研究结果基本一致^[14]。有研究者通过诱导 E 基因表达来制备 APEC DE17 菌株的菌蛻时，选择的起始诱导 A_{600} 值为 0.4，也取得了较高的裂解效率^[15]。这与本研究结果有所不同，分析原因可能是所用的 APEC 菌株存在差异。

单纯使用升温诱导 E 基因表达来裂解细菌，其裂解效率很难达到 100%^[16]，且菌蛻中仍有活菌残留，作为疫苗使用仍有风险。为了安全起见，本研究采取了 β -丙内酯进行了灭活，并通过灭活检验后，证实无活菌残留。攻毒保护试验结果显示，菌蛻疫苗组保护率为 66.67%，甲醛灭活疫苗组的保护率为 60.00%，表明菌蛻疫苗在不加佐剂的情况下免疫保护效果优于甲醛灭活疫苗，这与王景霖等^[17]的研究结果相符。然而，也有研究中甲醛灭活疫苗显示出更高的保护效果^[18-19]，原因可能是不同试验菌株的感染特性有差异。总之，在菌蛻疫苗的研发过程中，应充分考虑疫苗菌株在遗传物质和感染特性等方面差异，筛选裂解效率和保护效果均较优的菌株，以确保菌蛻疫苗的研究和应用价值。本研究结果为新型禽致病性大肠杆菌疫苗的研发奠定了基础。

参考文献：

- [1] 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.
- [2] 闫冬, 戴鹏, 丁雪燕, 等. 禽致病性大肠杆菌疫苗研究进展 [J]. 中国家禽, 2023, 45 (8): 103-109.
- [3] GIOVANARDI D, CAMPAGNARI E, RUFFONI L S, et al. Avian pathogenic *Escherichia coli* transmission from broiler breeders to their progeny in an integrated poultry production chain [J]. Avian Pathol, 2005, 34 (4): 313-318.
- [4] 刘聚祥, 李宏娟, 李占雷, 等. 我国部分地区鸡致病性大肠杆菌的耐药性检测与分析 [J]. 河北农业大学学报, 2007 (5): 94-98.
- [5] KRAŠKO J A, ŽILIONYTĖ K, DARINSKAS A, et al. Bacterial ghosts as adjuvants in syngeneic tumour cell lysate-based anticancer vaccination in a murine lung carcinoma model [J]. Oncol Rep, 2017, 37 (1): 171-178.
- [6] WON G, JOHN HWA L. Potent immune responses induced by a *Salmonella* ghost delivery system that expresses the recombinant Stx2eB, FedF, and FedA proteins of the *Escherichia coli*-producing F18 and Shiga toxin in a murine model and evaluation of its protective effect as a porcine vaccine candidate [J]. Vet Q, 2017, 37 (1): 81-90.
- [7] SI W, YU S, LIU H, et al. A bacterial ghost improves the immunological efficacy of a Newcastle disease virus inactivated vaccine [J]. Vet Microbiol, 2017, 203: 189-195.
- [8] HAIDINGER W, MAYR U B, SZOSTAK M P, et al. *Escherichia coli* ghost production by expression of lysis gene E and staphylococcal nuclease [J]. Appl Environ Microbiol, 2003, 69 (10): 6106-6113.
- [9] 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.
- [10] 王月圆. 鸡大肠杆菌菌影的制备及免疫效果研究 [D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2016.
- [11] WITTE A, WANNER G, SULZNER M, et al. Dynamics of PhiX174 protein E-mediated lysis of *Escherichia coli* [J]. Arch Microbiol, 1992, 157 (4): 381-388.
- [12] WITTE A, WANNER G, BLÄSI U, et al. Endogenous transmembrane tunnel formation mediated by phi X174 lysis protein E [J]. J Bacteriol, 1990, 172 (7): 4109-4114.
- [13] ALI R H, ALI M E, SAMIR R. Production and characterization of bacterial ghost vaccine against *Neisseria meningitidis* [J]. Vaccines (Basel), 2022, 11 (1): 37.
- [14] 胡剑波, 董洪亮, 付立霞, 等. 制备禽致病性大肠杆菌菌蛻的三种方法比较 [J]. 生物工程学报, 2017, 33 (12): 2009-2016.
- [15] 袁橙, 郭长明, 左伟勇, 等. 制备大肠杆菌菌蛻的方法比较 [J]. 江苏农业学报, 2020, 36 (2): 410-416.
- [16] ZHU W, YANG G, ZHANG Y, et al. Generation of biotechnology-derived *Flavobacterium columnare* ghosts by PhiX174 gene E-mediated inactivation and the potential as vaccine candidates against infection in grass carp [J]. J Biomed Biotechnol, 2012, 2012: 760730.
- [17] HU M, ZHANG Y, XIE F, et al. Protection of piglets by a *Haemophilus parasuis* ghost vaccine against homologous challenge [J]. Clin Vaccine Immunol, 2013, 20 (6): 795-802.
- [18] 王景霖, 单晓枫, 冯超, 等. 犊牛腹泻大肠杆菌 O₁₅ 菌蛻的制备及免疫原性研究 [J]. 中国兽医科学, 2020, 50 (6): 711-716.
- [19] 左庚亮, 路佳兴, 马喆, 等. 鸡白痢沙门菌 pagC 基因缺失株菌蛻疫苗的制备和免疫保护效果评价 [J]. 中国兽医杂志, 2023, 59 (3): 21-27.