

徐悦,周明旭,朱纯,等.产低毒性脂多糖大肠杆菌 J5 基因重组株的构建[J].江苏农业科学,2020,48(17):54-58.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2020.17.009

# 产低毒性脂多糖大肠杆菌 J5 基因重组株的构建

徐悦<sup>1</sup>,周明旭<sup>1</sup>,朱纯<sup>1,2</sup>,尹文竹<sup>1</sup>,马芳<sup>1</sup>,鲍熹<sup>1</sup>,张金秋<sup>1</sup>,卢宇<sup>1,2,3,4,5</sup>

(1.江苏省农业科学院动物免疫工程研究所/江苏省农业科学院国家兽用生物制品工程技术研究中心,江苏南京 210014;  
2.南京农业大学动物医学院,江苏南京 210095; 3.江苏省食品质量安全重点实验室/省部共建国家重点实验室培育基地,江苏南京 210014;  
4.江苏省动物重要疫病与人兽共患病防控协同创新中心,江苏扬州 225009; 5.江苏大学药学院,江苏镇江 212013)

**摘要:**细菌脂多糖(LPS)对宿主细胞具有一定的毒性,但经修饰后的单磷酸类脂 A(MPLA)却是一种无毒性的高效免疫佐剂。选择天然 O 抗原不完全的大肠杆菌 J5 疫苗株为出发菌株,利用  $\lambda$ -Red 同源重组技术导入外源弗朗西斯菌(*Francisella novicida*)*lpxE* 基因,缺失大肠杆菌 *lpxM* 基因。结果显示,J5 $\Delta$ *laci*:*lpxE* $\Delta$ *lpxM* 基因重组株的 LPS 萤试剂活性较 DH5 $\alpha$  和 J5 原菌显著降低;对 4 周龄的 ICR 小鼠腹腔注射 LPS 提取物,重组菌和 PBS 组的小鼠体征及肝脏切片均正常。同时,腹腔注射大肠杆菌 J5 和 DH5 $\alpha$  的小鼠被毛凌乱、精神抑郁、肝脏细胞肿大,发生炎性浸润,有明显的毒性反应。以上结果说明,J5 重组菌的 LPS 已经区别于原菌,是低毒性的 MPLA 产物。上述重组株的成功构建,能为生产廉价的兽用 MPLA 免疫佐剂奠定工作基础。

**关键词:**大肠杆菌;MPLA;Red 同源重组;佐剂;疫苗;细菌脂多糖

**中图分类号:**S182 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2020)17-0054-05

细菌脂多糖(lipopolysaccharides,LPS)主要由类脂 A、核心多糖和 O-抗原 3 部分组成,其中类脂 A 是 LPS 的活性中心,其保守的结构可以被宿主细胞表面的 Toll 样受体 4(toll like receptor 4,TLR4)识别并引起机体炎症反应,严重时甚至导致机体休克或者死亡,因此 LPS 又被成为内毒素<sup>[1]</sup>。单磷酸类脂 A(monophosphoryl lipid A,MPLA)是类脂 A 在酶的催化作用下水解失去 1-磷酸(或 1-焦糖酸)后所形成的一种类脂 A 的衍生物,几乎失去了 LPS 的毒性,但是仍旧能够诱导机体产生各种免疫活性因子,激活吞噬细胞,MPLA 具备一定的免疫佐剂和免疫调理的作用<sup>[2-3]</sup>。

大肠杆菌 J5(O111:B4)菌株是美国 Pfizer 公司推出的用于奶牛乳房炎灭活菌苗的疫苗株<sup>[4]</sup>。它

是 1 株 O-抗原不完全的粗糙型(R)突变菌,其 LPS 只含有结构较为单一的 Kdo2-类脂 A 和核心多糖结构。因 J5 株暴露的核心抗原具有良好的保守性和天然免疫原性,它作为抗革兰氏阴性菌感染的疫苗株在奶牛等家畜上被广泛应用<sup>[5-7]</sup>。考虑到 J5 株的 LPS 天然缺失 O 抗原且结构简单,30 多年的疫苗使用情况显示其安全性可靠,因此本研究选择 J5 株作为出发菌。通过同源重组技术将 J5 株基因组乳糖操纵子 *lac* 的抑制子基因 *lacI* 置换为弗朗西斯氏菌属(*Francisella*)的 *lpxE* 基因,达到常量表达的效果,该基因编码的磷酸酶可以选择性地降解存在于类脂 A 分子 C1 位上的磷酸基团,使其 LPS 成为 MPLA 结构<sup>[8]</sup>。与此同时,缺失 J5 株的 *lpxM* 基因,使细菌类脂 A 的分子 C3'位无法正常添加十四碳羟基脂肪酸链,从而只存在 5 条酰基链,进一步降低 LPS 对 TLR4 的激活效率,减少 MPLA 的毒性<sup>[9]</sup>。对 J5 株的 LPS 进行定向重组改造使其成为可以产低毒性 MPLA 的工程菌,应用于兽用佐剂的生产中。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌株、质粒与试验动物

大肠杆菌 J5 株(O111:B4)、Red 重组系统质粒 pKD3 和 pCP20 由扬州大学朱国强教授惠赠;弗朗西斯菌(*F. novicida*)基因组 DNA 由中国农业大学苏

收稿日期:2019-09-17

基金项目:江苏省农业科学院基本科研业务专项[编号:ZX(19)7006]。

作者简介:徐悦(1986—),女,江苏南京人,硕士,助理研究员,主要从事细菌佐剂与疫苗研究,E-mail:xellos05@163.com;共同第一作者:周明旭(1987—),男,江苏南京人,博士,助理研究员,主要从事牛源细菌病及其相关疫苗研究,E-mail:zhoumingxu@outlook.com。

通信作者:卢宇,研究员,主要从事疫苗制剂工艺研究。E-mail:luyu@jaas.ac.cn。

敬良教授惠赠; (20 ± 2) g 的清洁级 ICR 雌鼠购自扬州大学比较医学中心。

## 1.2 培养基和主要试剂

胰蛋白酶 (tryptone)、酵母提取物 (yeast extract), 购自 Oxoid 公司; 琼脂 (agar), 购自南京翼飞雪生物科技有限公司;  $\beta$ -半乳糖苷酶 (ONPG)、L-阿拉伯糖、氯霉素 (Cm) 和氨苄青霉素 (Amp), 均购自生工生物工程 (上海) 股份有限公司; DL 2 000 DNA Marker、Ex Taq (10 U/L)、dNTP, 均购自 TaKaRa 公司; DNA 胶回收试剂盒, 购自天根生化科技 (北京) 有限公司; Trans2K plus II DNA Marker、克隆载体 pEASY-T1 Simple 和感受态细胞, 均购自北京全式金生物技术有限公司; 显色基质萤试剂盒, 购于厦门萤试剂厂。

## 1.3 低毒性 LPS 重组株的构建

### 1.3.1 引物设计 根据 GenBank 上发布的大肠杆

菌 (*Escherichia coli*) *lacI* 基因和 *F. novicida lpxE* 基因序列, 设计 3 对引物, P1、P2 位于 *E. coli* J5 株中的 *lacI* 基因 ORF 的上下游外翼, 用于扩增检测 *lacI* 基因及其缺失突变株。其后在 P1、P2 内侧设计 1 对同源重组引物 P3、P6, 其 5' 端序列与 *lacI* 两翼序列同源, P2 的 3' 端序列与 *lpxE* 基因序列同源, P6 的 3' 端序列与 *cat* 基因序列同源。依照重叠延伸 PCR (SOE-PCR) 要求设计 P4、P5, 其中 P4 的 5' 端序列与 *cat* 基因序列同源, 3' 端序列与 *lpxE* 基因序列同源。再根据 GenBank 上发布的 *E. coli lpxM* 基因序列, 设计 2 对引物, P7、P8 位于 *E. coli* J5 株中的 *lpxM* 基因 ORF 的上下游外翼, 用于扩增检测 *lpxM* 基因及其缺失突变株。另外, 在 P7、P8 内侧设计 1 对同源重组引物 P9、P10, 其 5' 端序列与 *lpxM* 两翼序列同源, 3' 端序列与 *cat* 基因序列同源。引物由北京擎科生物技术有限公司合成, 引物序列见表 1。

表 1 PCR 引物寡核苷酸序列和扩增片段大小

引物	序列 (5'→3')
P1	GCGGTATGGCATGATAGC
P2	GGTGCCTAATGAGTGAGC
P3	GCGGTATGGCATGATAGCGCCCGGAAGAGAGTCAATTCAGGGTGGTGAATATGCTCAAACAGACATTACA
P4	CGAAGCAGCTCCAGCCTACACACTAAATAATCTCTCTATTTCTCATC
P5	TGTGTAGGCTGGAGCTGCTTCG
P6	AAGCCTGGGGTGCTTAATGAGTGAGCTAACTCACAATTAATTGCGTTGCCCATATGAATATCCTCCTTAG
P7	CGCTACACTATCACCAGATTGA
P8	TGAACCTATCATCAGGCGAAGC
P9	CGCTACACTATCACCAGATTGATTTTTGCGTTATCCGAAACTGGAAGCTGTGTAGGCTGGAGCTGCTTCG
P10	CAAACCTGAACCTTATCATCAGGCGAAGGCCTCTCCTCGGAGAGGCTTTTCATATGAATATCCTCCTTAG

注: 下划线表示重组基因的同源臂序列, 波浪线表示 SOE-PCR 中 overlap 序列。

1.3.2 Red 重组构建 J5 $\Delta$ *lacI*::*lpxE* 为将 *lpxE* 基因插入细菌基因组并常量表达, 试验选择 *lac* 操纵子中抑制子 *lacI* 基因作为插入位点, 利用 Red 重组技术用 *lpxE* 基因置换 *lacI* 基因。

PCR 反应 1 以 *F. novicida* 基因组为模板, P3、P4 为引物, 扩增 *lpxE* 基因; 反应 2 以质粒 pKD3 为模板, P5、P6 为引物, 扩增 *cat* 基因。反应 1 和反应 2 按照常规 PCR 的方法进行操作, PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳后通过 DNA 胶回收并送北京擎科生物技术有限公司进行测序鉴定。SOE-PCR 以反应 1 和反应 2 的产物为模板, P3 和 P6 为引物, 按照文献 [10] 方法, 分 2 轮 PCR 扩增 *lpxE-cat* 重组片段。最后产物经 DNA 胶回收后 -20 ℃ 冻存备用。

按照文献 [11] 中的方法向已经导入 pKD46 的

J5 株感受态细胞中电转 *lpxE-cat* 重组片段, 通过氯霉素抗性平板筛选 1 次同源重组菌 J5 $\Delta$ *lacI*::*lpxE-cat*, 并进行 PCR 鉴定。然后向阳性菌种导入编码 Flp 重组酶的质粒 pCP20, 通过对 Flp 位点的识别消除抗性基因, 获得二次重组菌 J5 $\Delta$ *lacI*::*lpxE*, 利用 P1、P2 引物扩增目的片段, 送北京擎科生物技术有限公司进行测序鉴定。

1.3.3 Red 重组构建 J5 $\Delta$ *lacI*::*lpxE* $\Delta$ *lpxM* 以构建的 J5 $\Delta$ *lacI*::*lpxE* 重组株为出发菌株, 继续构建 *lpxM* 缺失株。以 pKD3 为模板, P9、P10 为引物, 按照文献 [11] 方法扩增 *cat* 基因, DNA 胶回收后 -20 ℃ 冻存备用。重组的具体方法同“1.3.2”节, 分别通过一次重组和二次重组构建 J5 $\Delta$ *lacI*::*lpxE* $\Delta$ *lpxM* 重组株, 利用 P7、P8 引物扩增目的片段, 送北京擎科生

物技术有限公司进行测序鉴定。

#### 1.4 $\beta$ -半乳糖苷酶试验检测 *lac* 操纵子的表达

$\beta$ -半乳糖苷酶试验参照文献[12]进行。将 J5 株和 J5  $\Delta lacI::lpxE$  重组株分别接种 4 mL 于装有 LB 液体培养基的试管,放置在摇床中,37 °C、180 r/min 培养细菌 8 h。收集菌液,10 000 r/min 离心 10 min,取培养上清备用。按照文献[13]方法,配制 0.02 mol/L ONPG 底物溶液,过滤除菌,分装成 1 mL/管。分别在每管中加入 100  $\mu$ L 的培养上清,另设置 1 管加入 PBS 作为空白对照,放置在 37 °C 水浴锅中孵育 6 h,观察底物溶液颜色变化。

#### 1.5 细菌 LPS 的提取和纯化

细菌 LPS 的提取和纯化按照文献[14]进行。挑取 J5 株及重组株至 LB 液体培养基中,37 °C、180 r/min 培养过夜,并转接至 500 mL 细菌培养液中扩大培养 8 h。收菌时检测菌液的吸光度  $D_{600\text{ nm}}$ 。菌液 6 000 r/min 离心 20 min,并以 1:10 比例浓缩。浓缩菌液在 -20 °C 下反复冻融 3 次;加入溶菌酶(含 50  $\mu$ g/mL),37 °C 水浴 60 min。低温条件下超声破碎菌体,之后将菌液移至 200 mL 玻璃瓶中,在 68~70 °C 下预加热,加入新配制的等体积 90% 苯酚(体积分数),68~70 °C 下反应 30 min,期间每 5 min 摇晃振荡样品,使反应充分进行。结束后将混合液转移至离心杯中,并保存于 4 °C 过夜。次日 3 000 r/min 离心样品 30 min 后取上清,在剩余酚相中加入等体积的 ddH<sub>2</sub>O,重复提取 1 次,合并 2 次水相,并移至透析袋中。充分透析去除苯酚后,使用聚乙二醇(PEG 8000)浓缩,使体积至原液的 1/5~1/6。将透析袋内浓缩液吸出,离心(4 °C, 3 000 r/min, 30 min)取上清,即为 LPS 粗制品。

在 LPS 粗制品中加入 DNase I 和 Rnase A,37 °C 水浴 60 min,然后置于 65 °C 下 10 min 灭活酶。之后 5 000 r/min 离心 10 min,去除沉淀,将上清冻干处理,得到 LPS 冻干粉。冻干粉称质量,计算得率,并加入灭菌 ddH<sub>2</sub>O 复溶,配制成 1 mg/mL 的 LPS 纯品。

#### 1.6 鲎试剂检测 LPS 活性

按照鲎试剂盒说明书的方法配制内毒素标准溶液,按比例稀释 1.5 倍,获得 LPS 待测样品,根据说明试验步骤进行显色,使用全波长酶标仪测定 545 nm 波长处的吸光度,根据读值结果建立内毒素浓度标准曲线,并计算 LPS 样品的活性。

#### 1.7 动物试验检测 LPS 毒性

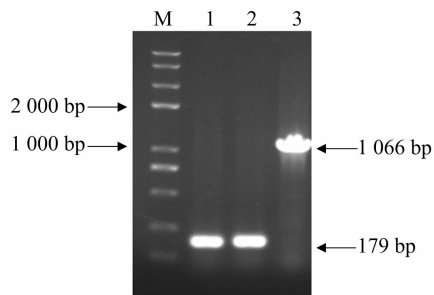
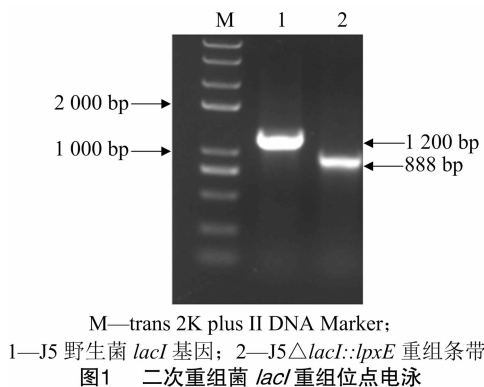
选取 20 g ICR 雌鼠 40 只,10 只/组进行分组,

设置 3 个试验组和 1 个对照组。稀释 1.5 倍,获得 J5、J5 $\Delta lacI::lpxE\Delta lpxM$  和 DH5 $\alpha$  的 LPS 提取物至 500  $\mu$ g/mL,试验组分别腹腔注射不同 LPS 提取物(剂量 5 mg/kg),注射量为 200  $\mu$ L/只,空白对照组注射 200  $\mu$ L PBS。观测攻毒后小鼠的生理精神状态(食欲、饮欲及活动状况等)和病症,并在攻毒 2 d 后剖杀小鼠,取肝脏制作石蜡切片,观察其组织病理变化从而判定不同 LPS 提取物的毒性强弱。

## 2 结果与分析

### 2.1 J5 $\Delta lacI::lpxE\Delta lpxM$ 重组株的鉴定

将二次重组菌制备基因组模板,以 P1 和 P2 为引物进行 PCR 扩增鉴定,对照野生型扩增片段为 1 200 bp,重组菌扩增片段为 888 bp(图 1),PCR 产物测序结果正确。以 P7 和 P8 为引物进行 PCR 扩增 *lpxM* 基因鉴定,对照野生型扩增片段为 1 066 bp,重组菌扩增片段为 179 bp(图 2),PCR 产物测序结果正确,命名重组菌为 J5 $\Delta lacI::lpxE\Delta lpxM$ 。



### 2.2 $\beta$ -半乳糖苷酶试验检测 *lac* 操纵子的表达

由图 3 可知,J5 野生菌和 J5 $\Delta lacI::lpxE$  培养上清分别加入底物 ONPG 孵育后,J5 野生菌培养液不变色;J5 $\Delta lacI::lpxE$  培养液显黄色,说明重组株 *lac* 操纵子可正常转录表达,*lpxE* 基因置换 *lacI* 成功。

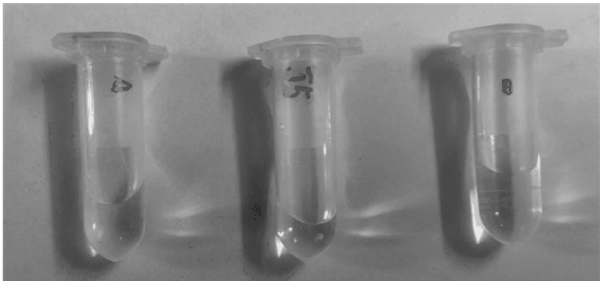


图3  $\beta$ -半乳糖苷酶试验检测重组株*lac*操纵子的表达情况

2.3 脂多糖产量比较

J5 株及重组株的 LPS 水溶物均为无色透明液，冻干后为白色粉末状。根据 LPS 冻干产物称质量的结果，计算出得率，见表 1。

表 1 大肠杆菌 J5 株和 J5Δ*lacI*::*lpxE* 重组株脂多糖得率

菌株	数量	得率
J5 株	0.5 L × 4 $D_{600\text{ nm}}$	58 mg/L
J5Δ <i>lacI</i> :: <i>lpxE</i> 重组株	0.5 L × 4 $D_{600\text{ nm}}$	80 mg/L

2.4 内毒素活性检测

鲎试剂中含有能被微量细菌内毒素和真菌葡聚糖激活的凝固酶原，是一种凝固蛋白原，能准确、快速地定性或定量检测样品中是否含有细菌内毒素<sup>[8-9]</sup>。根据定量试剂盒标准品形成的标准曲线的计算公式为  $Y = 0.819\ 0X + 0.305\ 2$ ,  $r^2 = 0.990\ 2$ 。推

算测得 DH5 $\alpha$  的 LPS 活性为  $2.3 \times 10^5$  EU/mg, J5 原菌的 LPS 活性为  $1.7 \times 10^5$  EU/mg, 改造菌株 J5Δ*lacI*::*lpxE*Δ*lpxM* 的 LPS 活性为  $4.3 \times 10^3$  EU/mg。改造菌株 J5Δ*lacI*::*lpxE*Δ*lpxM* 的 LPS 活性较 DH5 $\alpha$  和 J5 原菌显著降低,说明重组菌株改造成功。

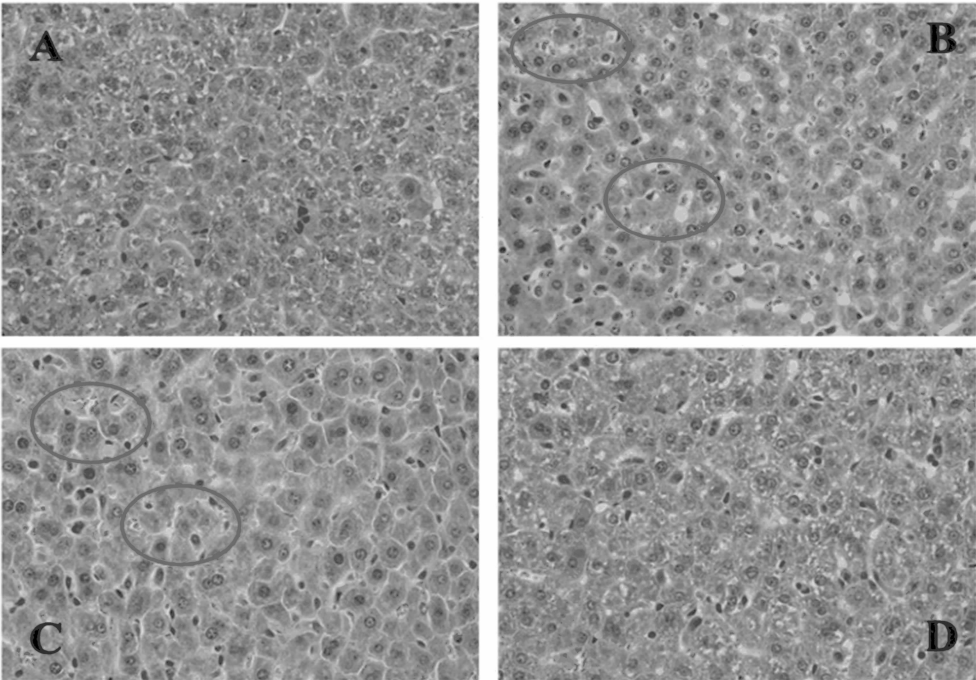
2.5 LPS 毒性试验结果

2.5.1 临床症状 通过对小鼠分别依次腹腔注射野生株 J5, 突变株 J5Δ*lacI*::*lpxE*Δ*lpxM* 以及 DH5 $\alpha$  的 LPS, 结果发现, 大肠杆菌 J5 和 DH5 $\alpha$  的 LPS 提取物攻毒组, 小鼠被毛凌乱、精神抑郁、有明显毒性反应; 而 PBS 组和 J5Δ*lacI*::*lpxE*Δ*lpxM* 的 LPS 提取物组的小鼠正常, 无任何临床症状。说明经改造的突变株 J5Δ*lacI*::*lpxE*Δ*lpxM* 的 LPS 毒性明显降低。

2.5.2 组织病理变化 对攻毒小鼠的肝脏组织进行病理切片, 由图 4 可知, DH5 $\alpha$  组和 J5 组的肝脏细胞肿胀, 细胞间隙增大, 同时出现不同程度的炎性细胞浸润。相对于 DH5 $\alpha$  组和 J5 组, J5Δ*lacI*::*lpxE*Δ*lpxM* 组肝脏细胞与 PBS 组的肝脏细胞形态一致, 没有明显的病理变化, 仅发生局部炎性细胞浸润。说明改造后的 J5Δ*lacI*::*lpxE*Δ*lpxM* 突变株的毒性减弱。

3 结论与讨论

细菌 LPS 会最大程度地激活机体 TLR4、Notch<sup>[15]</sup> 通路, 引起细胞毒性反应。已有研究表明,



A—PBS对照; B—DH5a; C—J5; D—J5Δ*lacI*::*lpxE*Δ*lpxM*

图4 小鼠肝脏组织的病理变化

改变脂肪酸链的数量、长度以及磷酸基团个数均可降低 LPS 的毒性,使其发挥佐剂作用<sup>[16]</sup>,其中, MPLA 作为类脂 A 的结构变体,是一种免疫效力显著的佐剂物质。其传统的生产方法是收获 R 型沙门菌突变株 R595 的 LPS,并对其 LPS 采用酸解、碱解等一系列繁琐的化学手段脱去磷酸基团及酰基链获得。但该类产物的产率较低, MPLA 纯度无法保障,存在多种不同的阳离子使其溶解度降低,可能发生沙门菌污染,生产成本极高。

本研究选用 O 抗原不完全的大肠杆菌 J5 疫苗株作为出发菌,利用  $\lambda$ -Red 同源重组技术,从生物合成学的角度对细菌完成基因改造,使细菌直接合成 MPLA。其中非常重要的改造位点是导入可以去除磷酸基团的弗朗西斯菌的 *lpxE* 基因并保证常量表达,因此笔者所在课题组选择 *lac* 操纵子中常量表达的 *lacI* 基因作为重组位点。*lacI* 具备独立的启动子,可在非乳糖培养环境下常量表达, J5 野生菌中  $\beta$ -半乳糖苷酶 LacZ 在抑制子 LacI 的作用下转录被阻遏;当 *lacI* 基因的 ORF 被完成置换为 *lpxE* 的 ORF 后,细菌常量表达 LpxE 而非 LacI,原阻遏效应结束, LacZ 则开始转录表达并催化底物 ONPG,显示黄色;同时,常量表达的 LpxE 也保证了细菌 LPS 可以被催化转变为 MPLA 结构。

导致腹泻的野生猪源大肠杆菌 LPS 的活性可以达到  $1.21 \times 10^7$  EU/mg, Sigma 公司市售的 LPS 活性约为  $1 \times 10^5$  EU/mg<sup>[17]</sup>。而本研究中使用的大肠杆菌 J5 株由于其自身作为疫苗株的安全性优势,经笔者所在课题组测定 LPS 活性仅  $1.7 \times 10^5$  EU/mg,显著低于猪源野生大肠杆菌。但从小鼠的毒性试验结果可以发现, J5 株的 LPS 仍然可以引起小鼠包括被毛凌乱、精神抑郁等临床反应,肝脏组织也存在明显的病变。相对于 J5 野生株以及 DH5 $\alpha$ ,经改造 J5 菌株的 LPS 提取物对小鼠没有造成明显的临床症状,且肝脏组织切片也确定没有明显病变,说明该改造菌株的 MPLA 毒性显著低于原野生株,该改造菌株更安全。

尽管本研究已经成功构建了 J5 $\Delta$ *lacI*::*lpxE* $\Delta$ *lpxM* 重组菌,但是其产生的 MPLA 的佐剂效力仍有待进一步通过动物免疫试验验证和评估。而利用基因重组改造菌株生产并提取 MPLA 的技术思路,可以直接减少原生产的化学工艺流程中酸解和碱解的步骤,提高产品纯度和产率,显著降低生产成本,从而将廉价、高效的 MPLA 佐剂应用于兽用

疫苗。

#### 参考文献:

- [1] Wang X Y, Quinn P J. Endotoxins: structure, function and recognition [M]. Berlin: Springer, 2010.
- [2] Gregg K A, Harberts E, Gardner F M, et al. Rationally designed TLR4 ligands for vaccine adjuvant discovery[J]. Mbio, 2017, 8(3): e00417 - e00492.
- [3] Schülke S, Flaczyk A, Vogel L, et al. MPLA shows attenuated pro-inflammatory properties and diminished capacity to activate mast cells in comparison with LPS[J]. Allergy, 2015, 70(10): 1259 - 1268.
- [4] Tomita G M, Todhunter D A, Hogan J S, et al. Immunization of dairy cows with an *Escherichia coli* J5 lipopolysaccharide vaccine [J]. Journal of Dairy Science, 1995, 78(10): 2178 - 2185.
- [5] Abdulaziz T A, Elsukhon S N. Chickens hyperimmunized with *Escherichia coli* J5 strain are protected against experimental challenge with *Escherichia coli* O78 serotype [J]. Veterinary Research Communications, 1998, 22(1): 7.
- [6] Aslam M, Whitmore H L, Kakoma I. Effect of *E. coli* J5 vaccine and intramammary challenge with live *Escherichia coli* in lactating dairy goats[J]. Small Ruminant Research, 1995, 17(3): 275 - 281.
- [7] 王 刚. *E. coli* J5 菌苗对兔实验性感染巴氏杆菌的保护作用[J]. 预防兽医学进展, 2000(3): 48 - 49.
- [8] 李颜颜. 弗朗西斯菌类脂 A 的结构多样性及其分子机制研究[D]. 无锡: 江南大学, 2012.
- [9] 李颜颜, 史 锋, 李 烨, 等. 细菌类脂 A 结构与功能研究进展[J]. 微生物学报, 2008, 48(6): 844 - 849.
- [10] Horton R M, Cai Z L, Ho S N, et al. Gene splicing by overlap extension; tailor-made genes using the polymerase chain reaction, BioTechniques, 1990, 8(5): 528 - 535.
- [11] 郭志燕. FimA 介导 F18ab<sup>+</sup> 大肠杆菌病原性的研究[D]. 扬州: 扬州大学, 2014.
- [12] 胡会杰, 周明旭. 猪源产肠毒素大肠杆菌 *eltA* *flhD* *fimA* *faeG* 基因启动子的预测、克隆和鉴定[J]. 中国兽医学报, 2015, 35(10): 1640 - 1645.
- [13] Buelow P. The ONPG test in diagnostic bacteriology. Comparison of the ONPG test and the conventional lactose-fermentation test[J]. Acta Pathologica et Microbiologica Scandinavica, 1964, 60(3): 387 - 402.
- [14] Li Y, Powell D A, Shaffer S A, et al. LPS remodeling is an evolved survival strategy for bacteria [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2012, 109(22): 8716 - 8721.
- [15] 朱丽华, 熊御云, 夏 琳, 等. 积雪草酸预处理对脓毒症小鼠急性肾损伤的影响及机制[J]. 山东医药, 2017, 57(30): 10 - 13.
- [16] Kanistanon D, Hajjar A M, Pelletier M R, et al. A francisella mutant in lipid a carbohydrate modification elicits protective immunity[J]. PLoS Pathogens, 2008, 4(2): e24.
- [17] 冯 将, 王玉坤, 魏玉好, 等. 猪源大肠杆菌脂多糖的提取、纯化及活性分析[J]. 中国畜牧兽医, 2017, 44(3): 912 - 919.