

# 肠炎沙门氏菌 *rpoH* 基因缺陷株的构建及其热激响应特性

曾庆梅, 张冬冬, 韩 抒, 司文攻, 李志强, 魏春燕, 吴 聪, 靳 靖  
(合肥工业大学 农产品生物化工教育部工程研究中心, 安徽 合肥 230009)

**摘 要:** 构建肠炎沙门氏菌 *Salmonella enteritidis* IFO3313 株的 *rpoH* 基因缺陷株 IFO3313- $\Delta rpoH$ , 比较不同温度下缺陷株与野生株的热激响应特性。利用  $\lambda$ -Red 重组系统对 *Salmonella enteritidis* IFO3313 的 *rpoH* 基因进行缺失突变, 并使用 PCR 方法对其进行验证, 在此基础上使用不同培养基对缺陷株与野生株进行不同温度下的热激应答结果和亚致死热损伤修复能力的考察: 野生株比缺陷株有更强的热激耐受能力, 在 DHL 平板上对亚致死热损伤的肠炎沙门氏菌的分离检测可能具有假阴性, 野生株比缺陷株在 TSYA 平板上有更强的修复能力。利用  $\lambda$ -Red 重组系统敲除了肠炎沙门氏菌 *rpoH* 基因, 有助于了解肠炎沙门氏菌的热激亚致死及其修复机制, 对亚致死状态食源性病原微生物的检测做出初步研究。

**关键词:** 基因敲除;  $\lambda$ -Red; *rpoH*;  $\sigma^{32}$ ; 热激应答

## Knockout of *rpoH* Gene in *Salmonella enteritidis* and Characterization of Heat Shock Response

ZENG Qing-mei, ZHANG Dong-dong, HAN Shu, SI Wen-gong, LI Zhi-qiang, WEI Chun-yan, WU Cong, JIN Jing  
(Engineering Research Center of Bio-process, Ministry of Education, Hefei University of Technology, Hefei 230009, China)

**Abstract:** The objective of this study was to construct a *rpoH* gene deficiency variant strain of *Salmonella enteritidis* IFO3313 called IFO3313- $\Delta rpoH$  and characterize the heat shock response of wild type and mutant strains under different temperatures. The kanamycin-resistant DNA cassette with 39 bp short homologous sequences on both ends generated by PCR was electroporated into *Salmonella enteritidis* IFO3313. Recombination between linear DNA cassettes and *Salmonella enteritidis* chromosomes took place with the help of  $\lambda$ -Red recombinase system and was confirmed by PCR method. Based on this, the heat shock response and the repair of sub-lethal heat injured wild type and mutant strains were compared using different media at different temperature. The wild type strain presented stronger heat-resistance and repair capacity in tryptic soy yeast agar (TSYA), compared to the mutant. False-negative results from the detection of the sub-lethal heat injured *Salmonella enteritidis* could occur in the desoxycholate - hydrogen sulfite - lactose agar (DHL). The *rpoH* gene knockout in *Salmonella enteritidis* using  $\lambda$ -Red recombination system provides us better understanding to the mechanism of heat shock and repair of *Salmonella enteritidis*.

**Key words:** gene knockout;  $\lambda$ -Red recombinase system; *rpoH* gene;  $\sigma^{32}$ ; heat shock response

中图分类号: Q949.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2009)11-0202-05

沙门氏菌, 特别是肠炎沙门氏菌(*Salmonella enteritidis*), 极易污染肉类、鱼类、禽肉类、奶类、蛋类食品<sup>[1]</sup>, 是引起食物中毒最常见的病原菌之一。在世界各国各类细菌性的食物中毒中, 沙门氏菌食物中毒位居前列<sup>[2]</sup>; 在我国食源性疾病中由沙门氏菌引起的中毒病例占 70%~80%<sup>[3]</sup>。为了减少高温对食品的风味、

营养成分的破坏和损失, 许多食品热加工过程选择中低温灭菌, 如巴氏杀菌; 即便采用高温杀菌处理, 也存在受热不均问题。受沙门氏菌污染的食品热杀菌后, 部分沙门氏菌由于只受到所谓“可修复性热损伤”而处于亚致死状态。我国现有的食品卫生测定方法(GB/T4789.4—2003)是采用选择性培养基(DHL)进行沙门氏菌

收稿日期: 2008-12-15

基金项目: 国家自然科学基金项目(30871739); 安徽省教育厅重点科研项目(KJ2007A099);

农产品生物化工教育部重点实验室开放基金项目(KF2004005)

作者简介: 曾庆梅(1962-), 男, 教授, 博士, 研究方向为食品微生物学、生物化工。E-mail: zengqingmei-1@163.com

的分离检测。然而,采用选择性培养基难以检测出处于亚致死状态的沙门氏菌,常常出现假阴性,留下极大的食品卫生安全隐患。要解决热损伤亚致死状态肠炎沙门氏菌的检测问题,首先要清楚沙门氏菌的热激响应特性。

热激应答(heat shock response, HSR)是目前公认的精密且高度保守的分子应答模式,存在于绝大多数生物体内<sup>[4]</sup>。在原核生物中,*rpoH*基因编码分子量为32kD的次级 $\sigma$ 因子 $\sigma^{32}$ 。 $\sigma^{32}$ 参与构成的RNA聚合酶全酶能够识别热休克基因的启动子,热休克基因的转录启动,将在细胞内产生一系列的应激生理生化反应。对*E.coli*热激应答的研究认为:热激条件下 $\sigma^{32}$ 可快速积累,可诱导超过20种的热激蛋白(heat shock proteins, HSPs)的大量表达,包括DnaK、DnaJ、GrpE、GroEL和GroES等,它们在热激条件下扮演着帮助折叠蛋白和阻止蛋白聚集的重要角色,帮助微生物应对外界胁迫带来的胞外环境和胞内代谢的变化。这种应急机制在*E.coli*中的作用机制已有大量研究报道和结论<sup>[5-6]</sup>,但在沙门氏菌热激应答和亚致死修复体系中并没有开展深入研究。本课题进行“肠炎沙门氏菌*rpoH*基因缺陷株的构建及其热激响应特性”初探,为探讨亚致死状态的肠炎沙门氏菌可靠、快速的检测方法积累基础数据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 菌株与质粒

大肠杆菌BW25113/pKD46,质粒pKD46<sup>[7]</sup>含温度敏感型复制子repA10lts,高于37℃培养,质粒会自动丢失,含有氨苄青霉素抗性基因Ap<sup>r</sup>,以及L-阿拉伯糖启动子P<sub>araB</sub>,L-阿拉伯糖可诱导pKD46的3个基因*exo*、*bet*和*gam*表达重组酶Exo、Bet和Gam,其中Gam抑制细菌的RecBCD核酸外切酶V活性,使外源性DNA不至立即被降解,Exo和Bet引导线性片段与同源区发生重组置换;大肠杆菌BW25141/pKD4,质粒pKD4含氨苄青霉素抗性基因Ap<sup>r</sup>和卡那霉素抗性基因Km<sup>r</sup>,以上菌株均购自美国耶鲁大学大肠杆菌遗传保藏中心(The Coli Genetic Stock Center, CGSC)。肠炎沙门氏菌*Salmonella enteritidis* IFO3313,由日本九州大学食品卫生化学实验室宫本敬久教授(Takahisa Miyamoto)惠赠。

#### 1.1.2 试剂、酶和培养基

PCR扩增试剂盒、PCR产物纯化试剂盒和胶回收试剂盒、Taq Plus(Taq+Pfu)酶、Maker 上海生工生物工程有限公司;质粒提取试剂盒 Axygen公司;CaCl<sub>2</sub> Amresco公司;氨苄青霉素(Ampicillin)、卡那霉素(Kanamycin)、L-阿拉伯糖(L-arabinose) Sigma公司。

LB肉汤、胰酪胨大豆肉汤(TSB)、酵母浸粉、琼脂粉、胆硫乳琼脂(DHL)和其他试剂均为市售分析纯化学试剂。引物合成由上海生工生物工程有限公司完成。

#### 1.1.3 引物

引物P1(由Ha和Pa两部分组成)和P2(由Hb和Pb两部分组成),如图1,Ha、Hb(5'端划线部分)是长度39bp的*Salmonella enteritidis* IFO3313的*rpoH*基因上、下游同源区域序列,Pa、Pb(3'端未划线部分)是长度为20bp的质粒pKD4中卡那霉素抗性基因(Km<sup>r</sup>)的两侧互补序列。P1: 5'-ACGGTTGTTGCTCGCTGACGGTGCCAGGCAATACTGATTGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC-3'; P2: 5'-TTACGCTTCGATCGCAGCGCGAAGCTTTTCATGGCGTTATGGGAATTAGCCATGGTCC-3',PCR扩增出的打靶片段长度应为1574bp的片段。本研究中*rpoH*基因的敲除策略,就是将此打靶片段通过电穿孔的方法,转化进入含有 $\lambda$ -Red重组酶系统的*Salmonella enteritidis* IFO3313/pKD46中,通过体内同源重组,实现对*rpoH*基因的敲除。

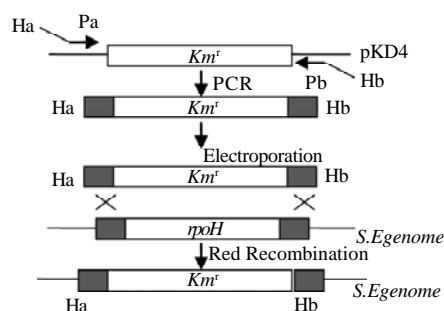


图1 *rpoH*基因敲除的策略

Fig.1 Gene disruption strategy by  $\lambda$ -Red recombination system

### 1.2 方法

#### 1.2.1 PCR打靶片段的制备

以质粒pKD46为模板,P1和P2为引物,进行PCR扩增,反应条件为:94℃预变性5min,94℃变性45s,50℃退火45s,72℃延伸1.5min,10个循环,94℃变性45s,68℃退火45s,72℃延伸1.5min,20个循环,最后72℃延伸10min<sup>[8]</sup>。为了避免模板自身对后续实验的污染、减小假阳性提高打靶效率,用PCR产物为模板进行二次PCR反应。产物经胶回收试剂盒纯化回收。

#### 1.2.2 质粒pKD46转化

CaCl<sub>2</sub>转化法,取100ml的OD<sub>600nm</sub>约0.5的新鲜培养*Salmonella enteritidis* IFO3313,冰上放置10min,4000r/min,4℃离心10min,弃上清液;0.05mol/L的CaCl<sub>2</sub>溶液10ml重悬,冰上放置20min,4℃离心10min,弃上清;用4ml预冷10%甘油、0.05mol/L的CaCl<sub>2</sub>溶液悬浮,分装

每管 200  $\mu$ l。取制作好的 *Salmonella enteritidis* IFO3313 感受态细胞 200  $\mu$ l, 加入约 50ng 质粒 pKD46, 冰上放置 30min, 42℃ 热激 90s, 冰上 5min, 加入 1ml 的 LB 培养基轻微振荡 1h, 取 100  $\mu$ l 涂布含 100mg/L 氨卞青霉素的 LB 平板, 30℃ 培养 24h, 筛选阳性转化子<sup>[9-11]</sup>。

### 1.2.3 电转化

挑取 *Salmonella enteritidis* IFO3313/pKD46 的单菌落, 接种于 2ml 含 100mg/L 氨卞青霉素的 LB, 30℃ 过夜培养, 取 1.0ml 转接于 50ml 含 100mg/L 氨卞青霉素的 LB, 培养至 OD<sub>600nm</sub> 约 0.3, 加入终浓度为 20mmol/L 的 L-阿拉伯糖, 继续培养 1h, 使 pKD46 上的 Exo、Bet 和 Gam 三种酶充分表达。冰上预冷 10min, 4000r/min、4℃ 离心 10 min, 弃培养基; 用预冷 10% 甘油离心洗涤 3 次, 浓缩 100 倍成 0.5ml 的感受态细胞, 分装每管 100  $\mu$ l。取约 100ng 的 PCR 打靶片段和 200  $\mu$ l 新鲜制备的 IFO3313/pKD46 感受态细胞混合后, 转入 0.2cm 的电击杯中, 用 Bio-Rad 电击仪进行电转化。电击参数设置为 2.5kV 电压, 200  $\Omega$  电阻, 25  $\mu$ F 脉冲, 电击时间为 4~5ms, 电击完成后迅速加入 1ml 的 LB 培养基 150r/min 振荡培养 1h, 涂布含 60mg/L 氨卞青霉素、50mg/L 卡那霉素的 LB 平板, 筛选阳性转化子<sup>[12-13]</sup>。

### 1.2.4 *rpoH* 基因缺陷株的鉴定及质粒 pKD46 的消除

分别以得到的阳性转化子和对照野生株 *Salmonella enteritidis* IFO3313 的基因组为模板, 以 A1、A2 和 B1、B2 为引物进行 PCR 扩增, 用琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物。将经过鉴定的重组菌株命名为 IFO3313- $\Delta$ *rpoH*, 接种于 LB 培养基中, 42℃ 培养 8h 后, 在 37℃ 条件下划线分离培养, 对每个单菌落进行氨卞青霉素和卡那霉素的抗性检测, 挑选对氨卞青霉素敏感而对卡那霉素具有抗性的克隆, 得到消除质粒 pKD46 的重组菌株<sup>[7,14]</sup>。

### 1.2.5 野生株和 *rpoH* 基因缺陷株在不同温度下的热激及修复比较

以非选择性培养基 TSYA(胰酪胨大豆肉汤 TSB + 0.3% 酵母浸粉 + 1.5% 琼脂粉)和选择性培养基胆硫乳琼脂(DHL)作为基础, 研究野生株和缺陷株在不同温度下的热激及修复比较<sup>[12,15]</sup>。

选定 45、50、55、60℃ 作为热激温度, 比较热激后野生株和 *rpoH* 基因缺陷株的未损伤存活菌落数。分别取 TSB 中 37℃ 过夜培养 OD<sub>600nm</sub> 约 0.6 的野生株和 *rpoH* 基因缺陷株的菌液 1ml 各 5 只试管, 1 只直接稀释涂布, 其余分别在 45、50、55、60℃ 下水浴 15min, 稀释涂布 TSYA 和 DHL 平板, 37℃ 培养 48h 计数。

选定 55℃ 作为热激条件, 采用固体培养基修复法比较热激后野生株和 *rpoH* 基因缺陷株的 6h 内的修复曲线: 分别取 TSB 中 37℃ 过夜培养 OD<sub>600nm</sub> 约 0.6 的野生株

和缺陷株的菌液 1ml 各 1 只试管, 分别在 55℃ 下水浴 15min, 稀释涂布 TSYA 平板, 37℃ 培养, 在 6h 内每小时在已涂布的 TSYA 各平板分别倾倒约 10ml 的 DHL 琼脂以终止修复<sup>[16]</sup>, 37℃ 培养继续培养, 48h 后计数。

## 2 结果与分析

### 2.1 外源 PCR 片段的制备

以质粒 pKD4 为模板, P1 和 P2 为引物, 进行 PCR 扩增, 产物两侧为 39bp 的 *rpoH* 基因上、下游同源区域序列, 中间为卡那霉素抗性基因(*Km<sup>r</sup>*), 长度应为 1574bp 的片段, 经琼脂糖凝胶电泳鉴定(图 2), 泳道 1 为 DL 2000 Marker, 泳道 2、3 为 PCR 扩增产物(泳道 3 在 120bp 左右的有少量引物二聚体), 结果与理论值一致。

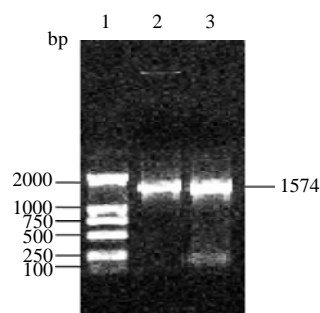


图 2 PCR 打靶片段电泳鉴定

Fig.2 Agarose gel electrophoresis pattern of PCR amplification product of kanamycin-resistant DNA fragment in plasmid pKD4

### 2.2 *rpoH* 基因缺陷株的鉴定

在 *rpoH* 基因同源区域的外侧, 设计 4 条引物 A1、A2 和 B1、B2, 用于检测重组菌株。A1: 5'-GCTCATCGGCTTTGGC-3'; A2: 5'-GCAGCCGATTGTCTGTTGTG-3'; B1: 5'-TTGTCACTGAAGCGGGAAGG-3'; B2: 5'-GCCGTCGTTACCACTTTGT-3'。分别从含有氨卞青霉素和卡那霉素的平板上筛选到的转化子和对照野生株的基因组为模板, 进行 PCR 扩增, 产物经 PCR 产物纯化试剂盒纯化后琼脂糖凝胶电泳鉴定。

如图 3 所示, 引物 A1、A2 用于扩增片段 a; 引物 B1、B2 用于扩增片段 b; 引物 A1、B2 用于扩增片段 c。重组成功的菌株扩增出来的 a 长度应为 576bp, 扩增出来的 b 长度应为 1457bp, 扩增出来的 c 长度应为 2187bp, 而对照野生株应该只能用引物 A1、B2 扩增出长度 1519bp 的 c 片段。电泳结果见图 4, 泳道 1 和 8 分别为 DL 2000 和  $\lambda$ /Hind III Marker, 泳道 2、3、4 是转化子鉴定引物 PCR 扩增产物, 分别扩增 a、b、c; 泳道 5、6、7 为对照野生株鉴定引物 PCR 扩增产物,

分别扩增 a、b、c，结果显示，各片段长度与预计相符，说明 *rpoH* 基因已被 *Km<sup>r</sup>* 基因取代，缺陷株 IFO3313- $\Delta rpoH$  构建成功。

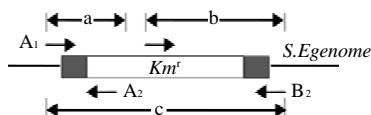


图3 PCR验证引物所在位置  
Fig.3 Scheme of priming sites

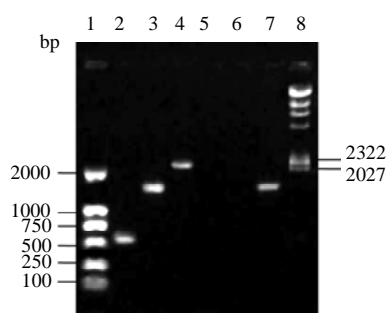


图4 *rpoH* 基因敲除的PCR验证  
Fig.4 Verification of *rpoH* knockout by PCR

### 2.3 *S.E* IFO3313 野生株和 *rpoH* 基因缺陷株的热激响应及修复初步研究

以非选择性培养基 TSYA 作为修复基础，计数热激未受损和亚致死复活的菌数；以选择性培养基 DHL 作为基础，计数未受损菌数。对不同温度热激下的野生株和 *rpoH* 基因缺陷株进行比较(图 5)。

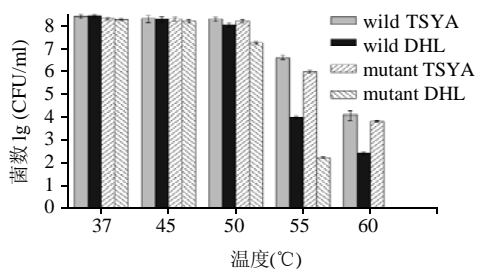


图5 野生株与缺陷株在不同温度下的热激后培养  
Fig.5 Viable numbers of wild type and mutant strains in TSYA and DHL media after heat shock of different temperatures

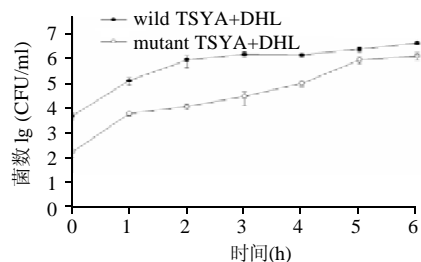


图6 野生株与缺陷株在 55℃ 温度下热激修复曲线  
Fig.6 DNA repair time courses of wild type and mutant strains in double-layer of TSYA and DHL after heat shock of 55℃ for 15 min

由上述结果可以看出，在 55℃ 条件下易产生大量的亚致死状态的热损伤菌，所以选择 55℃ 作为热激条件，热激 15min 后，采用双层平板法<sup>[16]</sup>比较野生株与 *rpoH* 基因缺陷株在 6h 以内的修复曲线，结果见图 6。

### 3 讨论

重组工程(recombineering)是一种近年来兴起的基于  $\lambda$  噬菌体 Red 重组酶系统和体内同源重组反应的新型遗传工程技术<sup>[7,10,17-18]</sup>。使用该技术不需要限制性内切酶和连接酶，仅需要含 35~60bp 的同源臂的打靶片段，即可在细菌体内对染色体 DNA、细菌人工染色体(BAC)进行高效精确的敲除、敲入和突变等修饰，而且效率较传统的同源重组方法高几十倍。利用 Red 重组酶系统和体内同源重组的方法实现了对 *Salmonella enteritidis* IFO3313 *rpoH* 基因的快速、准确的敲除，对食品微生物检测研究的思路给予了一种新的启发。实验中发现，质粒 pKD46 转化后，经过 3~4 次传代在宿主体内容易丢失，转化后要尽量避免多次传代。L-阿拉伯糖的终浓度和诱导时间对重组酶的表达对重组率的影响也较大，加入终浓度为 20~30mmol/L 的 L-阿拉伯糖诱导 1h 左右，可获得较高的重组效率<sup>[19]</sup>。

亚致死状态的细胞在选择性培养基(DHL)的表型是生长抑制，在非选择性培养基(TSYA)中可以得到较好修复<sup>[2]</sup>，比较野生株和 *rpoH* 基因缺陷株的热激研究结果，就可以知道未损伤的菌和可修复的热损伤菌的数量，也可以知道容易造成亚致死热损伤菌存在的热激温度范围。对于采用此温度范围加工的食品，在微生物安全检测中，应当重点检测。如图 5 所示，统计结果表明，相同或相近菌液浓度( $p > 0.05$ )的野生株和缺陷株在 50℃ 以上热激以后，在 DHL 平板上的菌落数量级总是比在 TSYA 上的数量级要低( $p < 0.01$ )，尤其缺陷株在 60℃ 热激后使用 DHL 检测不出亚致死状态的热损伤菌，但使用 TSYA 平板可检出，说明使用 DHL 平板对沙门氏菌的检测可能出现假阴性。野生株和缺陷株在 55℃ 和 60℃ 热激后，易产生大量的亚致死的热损伤菌，并且野生株和缺陷株在 TSYA 上的修复水平差异显著( $p < 0.01$ )，说明热损伤的野生株在 TSYA 上能更好的修复。

比较热激修复时间曲线，可以防止修复时间过长细菌繁殖引起的检测数值过大和修复时间不够而引起的漏检。参考不同温度下的热激修复实验，在 55℃ 热激以后，将会造成细菌大量损伤，导致较多的亚致死状态的细菌存在，选择以此条件作为参考，对热损伤修复时间曲线进行比较。如图 6 所示，相同或相近菌液浓度( $p > 0.05$ )的野生株和缺陷株 55℃ 热激后，野生株在 TSYA 上修复约 2h 内的数量级可以达到  $10^6$  CFU/ml(对比图 5，此数量级可作为修复终点参考)，而 *rpoH* 基因缺

陷株需要经过 5h 修复才能达到这个水平。说明野生株的修复时间应为 2h, 缺陷株的修复时间应为 5h, 才能保证检测的准确性, 也说明野生株具有更强的修复能力, 修复时间的要求更短。

通过比较野生株和 *rpoH* 基因缺陷株的热激和修复实验, 可以发现敲除 *rpoH* 基因减小了沙门氏菌的热激响应和修复的能力, 这可能由于 *rpoH* 基因的缺失, 热休克基因的转录水平降低, 在一定程度上抑制了热休克蛋白的大量表达和累积, 从而造成 *rpoH* 基因缺陷株的热激应答和修复能力受到一定的限制。许多食品热加工由于采用巴氏灭菌或加热不均, 容易造成亚致死的肠炎沙门氏菌的存在, 而现有的检测方法主要是用 DHL 琼脂对沙门氏菌进行分离后检测(GB/T4789.4—2003), 由实验结果可知, 在 DHL 琼脂上并不能保证亚致死状态肠炎沙门氏菌的分离检出。分析认为, DHL 琼脂的去氧胆酸钠和柠檬酸钠成分虽然对未受损的肠炎沙门氏菌没有或较弱的抑制作用, 但亚致死状态的热损伤肠炎沙门氏菌对其耐受能力却大大降低, 在 DHL 平板上对沙门氏菌的分离检测就得不到保障, 而在适宜条件下这些亚致死菌又可复活, 存在重大的食品安全隐患。通过比较野生株和 *rpoH* 基因缺陷株的热激和修复实验, 可以发现存在的问题, 对食品加工、食品贮藏、病原微生物检测等, 具有重要的指导意义。

#### 参考文献:

- [1] 汪琦, 张昕, 张惠媛, 等. 利用 PCR 方法快速检测食品中的沙门氏菌[J]. 检验检疫科学, 2005, 15(6): 26-28.
- [2] KOBAYASHI H, MIYAMOTO T, HASSHIMOTO Y, et al. Identification of factors involved in recovery of heat-injured *Salmonella enteritidis* [J]. Journal of Food Protection, 2005, 68(5): 932-941.
- [3] 马立农, 刘华伟, 张春柳, 等. 食品沙门氏菌 PCR 快速检测试剂盒简介[J]. 深圳职业技术学院学报, 2005, 4(2): 95-96.
- [4] 李娟, 杨惠, 周元国. 热激蛋白 90 与热激应答[J]. 生命的化学, 2008, 28(3): 299-301.
- [5] ARSENE F, TOMOYASU T, BUKAU B. The heat shock response of *Escherichia coli* [J]. Int J Food Microbiol, 2000, 55: 3-9.
- [6] HEITZER A, MASON C A, HAMER G. Heat shock gene expression in continuous cultures of *Escherichia coli* [J]. J Biotechnol, 1992, 22(1/2): 153-169.
- [7] DATSENKO K A, WANNER B L. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2000, 97(12): 6640-6645.
- [8] 侯松旺. 两种快速构建重组杆状病毒的方法的建立及棉铃虫病毒基因组中 orf107 和 orf135 的鉴定和初步功能分析[D]. 武汉: 华中农业大学, 2002: 4-45.
- [9] 萨姆布鲁克 J, 拉塞尔 D W. 分子克隆实验指南[M]. 3 版. 黄培堂, 译. 北京: 科学出版社, 2007.
- [10] SOLANO C, GARCIA B, GHIGO J M, et al. Genetic analysis of *Salmonella enteritidis* biofilm formation: critical role of cellulose [J]. Molecular Microbiology, 2002, 43(3): 793-808.
- [11] HELM R A, LEE A G, CHRISTMAN H D, et al. Genomic rearrangements at *rrn* operons in *Salmonella* [J]. Genetics Society of America, 2003, 165: 951-959.
- [12] 王恒樑, 冯尔玲, 史兆兴, 等. 用 Red 系统快速敲除痢疾杆菌 *asd* 基因[J]. 军事医学科学院院刊, 2002, 26(3): 172-175.
- [13] CHAVEROCHE M K, GHIGO J M, DENFERT C. A rapid method for efficient gene replacement in the filamentous fungus *Aspergillus nidulans* [J]. Nucleic Acids Res, 2000, 28(22): 97-103.
- [14] ELLERMEIER C D, JANAKIRAMAN A, SLAUCH J M. Construction of targeted single copy lac fusions using  $\lambda$  Red and FLP-mediated site-specific recombination in bacteria [J]. Gene, 2002, 290: 153-161.
- [15] MIYAMOTO T, KOBAYASHI H, IIO M. Recovery of stressed *Salmonella enteritidis* [C]//Proceedings of the United States-Japan Cooperative Program in Natural Resources, Protein Resources Panel, 30th Annual meeting, Tukuba, Ibaraki, 2001: 48-51.
- [16] KANG D H, SIRAGUSA G R. Agar underlay method for recovery of sublethally heat-injured bacteria [J]. Applied and Environmental Microbiology, 1999, 65: 5334-5337.
- [17] MUYRERS J P, ZHANG Y, TESTA G, et al. Rapid modification of bacterial artificial chromosome by ET-recombination [J]. Nucleic Acids Res, 1999, 27(6): 1555-1557.
- [18] YU D G, ELLIS H M, COURT L D, et al. An efficient recombination system for chromosome engineering in *Escherichia coli* [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2000, 97(11): 5978-5983.
- [19] 白光兴, 孙志伟, 俞炜源, 等. 利用 Red 重组系统对大肠杆菌 *ClpP* 基因的敲除[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2005, 21(1): 35-38.