

鸡白痢沙门氏菌 Mini-Tn5 转座子插入突变

耿士忠, 焦新安*, 陈晓娟, 潘志明, 张辉, 陈祥

(扬州大学 江苏省人兽共患病学重点实验室, 扬州 225009)

摘要: 将氯霉素(Cm)抗性基因克隆到 pUTmini-Tn5Km2 载体中, 利用含卡那霉素(Km)和氯霉素(Cm)抗性基因的 pUTmini-Tn5Km2(Cm)转座载体将 Km 和 Cm 抗性基因随机插入鸡白痢沙门氏菌基因组中, 以相应的抗生素进行筛选, 获得大量在不同位点插入突变的突变体, 从中筛选鸡白痢沙门氏菌某功能缺陷型突变株。通过对突变株的基本特征以及 PCR 鉴定后, 再进行插入基因定位。结果表明, Km 和 Cm 抗性基因已成功转座至鸡白痢沙门氏菌基因组上; 基因定位显示突变株均有且只有 1 个插入位点, 插入位点的位置不尽相同。这为研究鸡白痢沙门氏菌功能基因和筛选特定突变株提供了必要的基础。

关键词: 鸡白痢沙门氏菌; 基因转座; 突变; 基因定位

中图分类号: S852.61

文献标识码: A

文章编号: 0366-6964(2008)05-0621-06

Insertion Mutagenesis in *Salmonella pullorum* by Mini-Tn5 Transposon

GENG Shi-zhong, JIAO Xin-an*, CHEN Xiao-juan,

PAN Zhi-ming, ZHANG Hui, CHEN Xiang

(Jiangsu Key Laboratory of Zoonosis, Yangzhou University, Yangzhou 225009, China)

Abstract: Cm^R and Km^R genes were transposed into genomic DNA of *Salmonella pullorum* to produce a library of mutants of *Salmonella pullorum* by pUTmini-Tn5Km2(Cm) which was constructed by inserting Cm^R gene into pUTmini-Tn5Km2. Then some defective mutants were screened. Mutants were identified by basic characteristic of *Salmonella pullorum*, special PCR and gene location. The results showed that Cm^R and Km^R genes were integrated into genome of *Salmonella pullorum* mutants and each mutant has one and only one different locus of transposon in the genome. These results provided essential base for studying the function gene of *Salmonella pullorum* and screening special mutants.

Key words: *Salmonella pullorum*; gene transposition; mutation; gene location

鸡白痢是由鸡白痢沙门氏菌(*Salmonella pullorum*)引起的一种危害严重的常见传染病, 各年龄鸡都可发生^[1]。雏鸡发病表现急性败血症经过, 以发热、排灰白色粥样或黏液性粪便为特征。成年鸡发病以损害生殖系统为主的慢性或隐性感染为特征。鸡白痢给养鸡业造成巨大经济损失。对鸡白痢沙门氏菌的感染与致病的分子机制进一步研究有利于寻求新的防治措施。转座突变为提供了有效的手段^[2-3], 通过转座突变可使受体菌某些基因功能缺

失, 并对其某种功能进行有针对性的筛选(如肠内黏附、细胞内生存等), 最后通过基因定位鉴定突变株插入的功能失活基因, 从而获得诸多与此功能相关的突变株^[3]。因此突变株的获得对研究细菌的感染与致病的分子机制十分有用^[4-5]。为此, 本研究利用自杀性质粒 pUT 携带的 mini-Tn5 转座子对鸡白痢沙门氏菌进行转座突变^[6-8], 构建并鉴定突变株, 以为为进一步研究提供必要的材料。

收稿日期: 2007-06-29

基金项目: 国家自然科学基金(30425031); “863”项目(2006AA10A206)

作者简介: 耿士忠(1972-), 男, 江苏高邮人, 讲师, 博士生, E-mail: gszszg119@yahoo.com.cn

* 通讯作者: 焦新安, 主要从事畜禽传染病学和人兽共患病学研究, E-mail: jiao@yzu.edu.cn

1 材料与方 法

1.1 材 料

菌株和质粒见表 1。

高保真 *Taq* 酶、普通 *Taq* 酶、dNTPs、连接酶、

Genomic DNA extract Kit、plasmid extract Kit、限制性内切酶和 DNA 凝胶回收试剂盒购自宝生物工程(大连)有限公司。沙门氏菌 O9 单克隆抗体^[9]、常规生化试剂、培养基以及抗生素为实验室自备。

表 1 试验用的细菌和质粒

Table 1 Bacteria and plasmids in the research

材料 Material	名称 Name	用途 Use	来源 Source
细菌 Bacteria	鸡白痢沙门氏菌 S06004(Nal ^R)	受体菌	本实验室分离保存
	S17- λ pir(pUTmini-Tn5 Km2)(Cm)	供体菌	本实验室构建
	S17- λ pir(Sm ^R)	克隆用细菌	德国 Geider 教授馈赠
	<i>E. coli</i> DH5 α	克隆用细菌	本实验室保存
质粒 Plasmid	pKD3	克隆 Cm ^R gene	加拿大 Marolda 教授馈赠
	pUTmini-Tn5Km2 载体	携带转座子	德国 Geider 教授馈赠
	pUC18	克隆用载体	本实验室保存

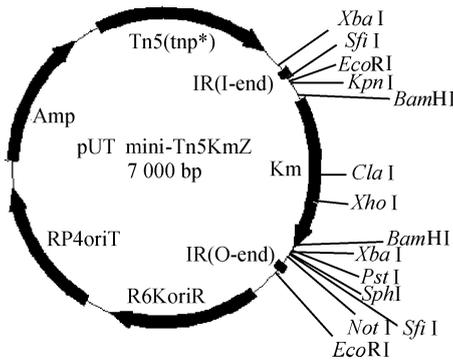


图 1 转座载体示意

Fig. 1 Figure of pUTmini-Tn5Km2 vector

1.2 Cm 抗性基因的克隆

根据质粒 pKD3 中氯霉素(Cm)抗性基因设计引物 pUT(Cm) *Not*I TagF 和 pUT (Cm) *Not*IR, 引入 *Not* I 限制性酶切位点, 并在引物 pUT (Cm) *Not*I TagF 上引入特异性鉴定引物 TagF, pUT (Cm) *Not*I TagF: 5'-ACCGCGGCCGC GTACCGCGCTTAATCAAGACG ATGGAATTAGCATGGTCC-3', pUT (Cm) *Not*IR: 5'-AGGGCGGCCCGTGTAGGCTGGAGCTGC-TTC-3', TagF: 5'-GTACCGCGCTTAATCAAGACG-3'。PCR 体系: 10 \times buffer 5.0 μ L, dNTPs (2.5 μ mol/L) 3 μ L、高保真 *Taq* 酶 0.25 μ L、pUT (Cm) *Not*I TagF (10 μ mol/L) 4 μ L、pUT (Cm) *Not*IR (10 μ mol/L) 4 μ L、质粒 pKD3 1.0 μ L、超纯水补足至 50 μ L。反

应条件: 94 $^{\circ}$ C 5 min; 94 $^{\circ}$ C 45 s, 60 $^{\circ}$ C 45 s, 72 $^{\circ}$ C 80 s, 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10 min。PCR 产物预期大小约为 1.0 kb。回收 PCR 产物连接至 pUC18 载体中, 转化至 *E. coli* DH5 α , 获得重组质粒, 命名为 pUC-Cm, 经鉴定后送宝生物工程(大连)有限公司测序。

1.3 转座载体的构建

用 *Not* I 酶切 pUCCm 质粒获得 Cm 抗性基因, 将 Cm 抗性基因连接至 pUTmini-Tn5Km2 载体, 再转化至 S17- λ pir 细菌中, 用链霉素、氨苄青霉素、卡那霉素和氯霉素进行筛选, 获得重组质粒, 命名为 pUTmini-Tn5Km2 (Cm)。用特定引物 PCR 扩增鉴定方向。PCR 体系: 10 \times buffer 2.0 μ L, DMSO 1.2 μ L, dNTPs 1.2 μ L, *Taq* 酶 0.1 μ L, TagF (10 μ mol/L) 1.6 μ L, pUTmini-Tn5KanaR1 (10 μ mol/L) 1.6 μ L (引物序列见突变株 Km^R 基因 PCR 鉴定)、pUTmini-Tn5Km2 (Cm) 质粒 DNA 1.0 μ L、超纯水补足到 20 μ L。反应条件: 94 $^{\circ}$ C 5 min; 94 $^{\circ}$ C 45 s, 62.5 $^{\circ}$ C 45 s, 72 $^{\circ}$ C 80 s, 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10 min, PCR 产物预期大小约为 1.5 kb。

1.4 双亲本滤膜接合转座

供体为携带 pUTmini-Tn5 Km2 (Cm) 质粒的大肠杆菌 S17- λ pir, 受体为鸡白痢沙门氏菌 S06004 (Nal^R)。两种细菌分别于含相应抗生素的 LB 培养基中过夜培养。离心后, 以 10 mmol/L MgSO₄ 溶液悬浮并调整菌浓度。分别取 200 μ L 供体菌 (约 4.5 $\times 10^8$ CFU) 和 200 μ L 受体菌 (约 1.0 $\times 10^9$

CFU)滤过于同一张 0.45 μm 的无菌滤膜上,取下滤膜置于 LB 平板中央,于 30 $^{\circ}\text{C}$ 培养 24 h。然后用无菌 PBS 缓冲液将滤膜上生长的菌苔洗下,以三抗 LB 平板(Km 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、Nal 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、Cm 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$)进行选择培养^[10-11]。

1.5 鸡白痢沙门氏菌转座突变株的筛选及鉴定

1.5.1 转座突变株抗生素筛选 将待测转座突变菌分别点种于含氨苄青霉素(Amp) 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、链霉素(Sm)50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、氯霉素(Cm)40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、卡那霉素(Km) 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和萘啶酮酸(Nal) 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 LB 平板上,37 $^{\circ}\text{C}$ 培养过夜后观察对抗生素的耐药性,选择 Amp 和 Sm 双敏感的菌株。

1.5.2 血清学鉴定 用沙门氏菌 O9 单克隆抗体对筛选出的突变株进行凝集试验。

1.5.3 PCR 鉴定

1.5.3.1 鸡白痢沙门氏菌特异性 PCR 鉴定: 参照文献[12]鉴定鸡白痢沙门氏菌转座突变细菌,引物为 *rfbSF* (5'-TGCCTATCAGAGTATTAGT-GT-3') 和 *rfbSR* (5'-TATTCACGAATT-GATATATCC-3')。PCR 反应条件:94 $^{\circ}\text{C}$ 5 min;94 $^{\circ}\text{C}$ 1 min,60 $^{\circ}\text{C}$ 1 min,72 $^{\circ}\text{C}$ 1 min,35 个循环;72 $^{\circ}\text{C}$ 10 min。PCR 预期产物大小为 400 bp^[13-14]。

1.5.3.2 Cm 抗性基因的鉴定: 根据质粒 pKD3 中氯霉素(Cm)抗性基因设计引物 RedP1(5'-GTG-TAGGCTGGAGCTGCTCC-3')和 RedP2(5'-ATGGGAATTAGCCATGGTCC-3')。PCR 反应条件:94 $^{\circ}\text{C}$ 5 min;94 $^{\circ}\text{C}$ 45 s,60 $^{\circ}\text{C}$ 45 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 80 s,35 个循环;72 $^{\circ}\text{C}$ 10 min。PCR 产物预期大小为 1.0 kb。

1.5.3.3 Km 抗性基因的鉴定: 根据质粒 pUT-mini-Tn5Km2 卡那霉素(Km)抗性基因设计引物 pUTminiTn5KanaF1(5'-GGCAGCGCAACGGA-ACATTCA-3')和 pUTminiTn5KanaR1(5'-GCGGC-CTCGAGCAAGACGTTT-3')。PCR 反应条件:94 $^{\circ}\text{C}$ 5 min;94 $^{\circ}\text{C}$ 45 s,60 $^{\circ}\text{C}$ 45 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 80 s,35 个循环;72 $^{\circ}\text{C}$ 10 min。PCR 产物预期大小为 492 bp。

1.5.3.4 pUT 载体的鉴定: 根据质粒 pUTmini-Tn5Km2 设计转座子 O-end 外侧的验证引物 pUT-miniTn5yzF(5'-GGATGTAACGCACTGAGAA-G-3')和位于转座子 O-end 内侧 pUTminiTn5-KanaR1(5'-GCGGCCTCGAGCAAGACGTTT-3')。PCR 反应条件:94 $^{\circ}\text{C}$ 5 min;94 $^{\circ}\text{C}$ 45 s,60 $^{\circ}\text{C}$ 45 s,

72 $^{\circ}\text{C}$ 80 s,35 个循环;72 $^{\circ}\text{C}$ 10 min。PCR 产物预期大小 1.5 kb。

1.6 质粒营救法基因定位

1.6.1 细菌基因组 DNA 的制备 按 Genomic DNA extraction Kit 介绍的方法提取 DNA。

1.6.2 转座子侧翼序列的克隆 通过质粒营救法克隆 Km^R 或 Cm^R 基因及侧翼序列^[13-14],选用 4 种限制性内切酶 *Sph* I、*Xba* I、*Pst* I、*Sal* I 分别对基因组 DNA 充分酶切。100 μL 酶切体系中含有 2 μg 基因组和 20 U 限制性内切酶,反应体系在 37 $^{\circ}\text{C}$ 温育 8~12 h。酶切产物加入 1/5 体积的 5 mol/L NaCl 和 3 倍体积的无水乙醇沉淀后,与相应酶酶切过的 pUC18 载体进行连接,并按如下体系进行连接:约 0.5 μg 单酶酶切的基因组 DNA、1 μL 10 \times T4 DNA 连接缓冲液、1 μL (15 U) T4 DNA 连接酶、4 μL pUC18 用相应的限制性内切酶所获得的载体,无菌水补至 10 μL 。16 $^{\circ}\text{C}$ 保温 18~24 h 后,将连接产物转化 *E. coli* DH5 α 细菌。

1.6.3 克隆的鉴定与基因鉴定 挑 Amp^R Km^R 或 Amp^RCm^R 的细菌进行 PCR、抗性、pUT 载体的鉴定,将获得的阳性克隆进行测序。Amp^R Km^R 的菌株测序用引物为 P6(5'-CCTAGGCGGC-CAGATCTG-3'),Amp^RCm^R 的菌株测序用引物为 P4(5'-GGACCATGGCTAATCCCAT-3')。测序后,与 GenBank 中基因序列进行比对,通过基因序列相似性判定插入失活的功能基因。

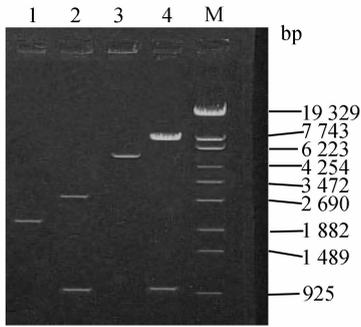
2 结果

2.1 转座载体 pUTmini-Tn5Km2(Cm)的构建与鉴定结果

从质粒 pKD3 中扩增的 Cm 抗性基因 PCR 产物大小约为 1.0 kb,将 PCR 产物克隆至 pUC18 载体中构建成重组质粒 pUCCm,*Not* I 酶切结果表明大小正确(图 2),测序结果显示 Cm 抗性基因序列完全正确。用 *Not* I 酶切 pUCCm 质粒,回收并克隆至 pUTmini-Tn5Km2(*Not*I)载体中,形成重组质粒 pUTmini-Tn5Km2(Cm),*Not*I 酶切结果显示正确(图 2);特异性引物 PCR 鉴定结果表明方向正确(图 3)。

2.2 鸡白痢沙门氏菌转座突变株的筛选结果

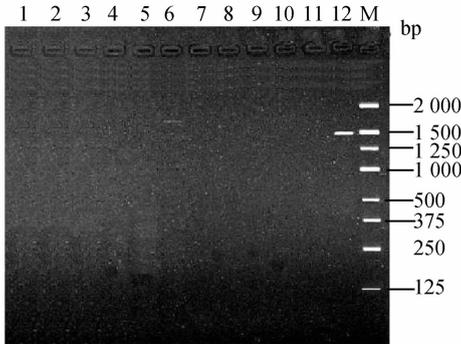
携带 pUTmini-Tn5 Km2(Cm) 质粒的大肠杆菌 S17- λ pir 供体菌和鸡白痢沙门氏菌 S06004 受体



M. λ EcoT14I; 1. pUCCm plasmid; 2. *Not* I of pUCCm; 3. pUTmini-Tn5Km2 (Cm) plasmid; 4. *Not* I of pUTmini-Tn5Km2 (Cm) plasmid

图2 pUCCm 和 pUTmini-Tn5Km2 (Cm) 构建与鉴定

Fig. 2 Construction and identification of pUCCm and pUTmini-Tn5Km2 (Cm)



M. 125 bp ladder marker; 1—11. Control primers; 12. Special primer TagF

图3 转座载体 pUTmini-Tn5Km2 (Cm) PCR 特异性引物鉴定

Fig. 3 Special PCR detection of pUTmini-Tn5Km2 (Cm)

菌固相杂交后,用含 3 种抗生素的平板(Km、Nal、Cm) 进行初步筛选(图 4),将获得的转座突变细菌再次进行 5 种抗生素(Nal、Km、Cm、Sm、Amp) 检验,结果表明,有部分细菌 Amp 抗性仍然存在,如表 2 中转座突变细菌 2,表明自杀载体 pUT 没有丢失,该细菌就要放弃。而转座突变细菌 1 则没有 Amp 抗性,表明自杀载体 pUT 已经丢失,此细菌说明转座突变成功(表 2)。凝集试验显示该突变细菌能够与沙门氏菌 O9 单克隆抗体发生凝集反应,结果进一步表明突变细菌是受体菌—鸡白痢沙门氏菌。

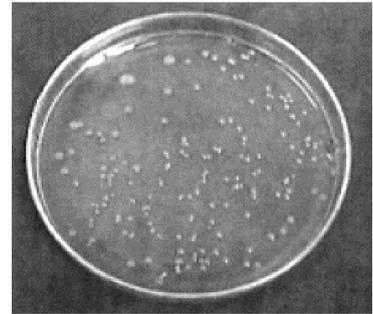


图4 抗生素选择平板上的鸡白痢沙门氏菌突变菌株落

Fig. 4 *S. pullorum* mutants on selective medium

2.3 转座突变细菌 PCR 鉴定

选择经过抗生素筛选所获得的阳性转座突变细菌进行 PCR 鉴定,结果表明都带有 Km、Cm 抗性基因,没有 Amp 抗性基因,能够扩增出鸡白痢沙门氏菌 *rfbS* 基因特异性条带,转座子外侧的部分没有转座到细菌染色体中。而对照表明,鸡白痢沙门氏菌 S06004 不能扩增出 Km、Cm 抗性基因,供体菌 S17-

表 2 转座突变细菌抗生素检验结果

Table 2 Antibiotics test of *S. pullorum* mutants

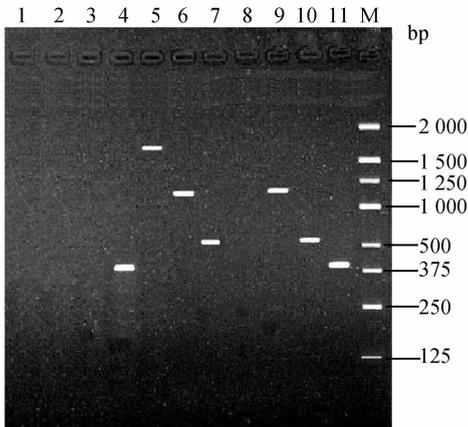
细菌 Bacteria	萘啶酮酸 Nal	卡那霉素 Km	氯霉素 Cm	链霉素 Sm	氨苄青霉素 Amp
受体菌-沙门氏菌 Recipient- <i>S. pullorum</i>	+	-	-	-	-
供体菌 Donor	-	+	+	+	+
转座突变细菌 1 Mutant strain 1	+	+	+	-	-
转座突变细菌 2 Mutant strain 2	+	+	+	-	+

“+”为正常生长,“-”为不生长

λ pir(pUTmini-Tn5 Km2(Cm))除了能扩增出 Km、Cm 抗性基因外,还能扩增转座子外侧的部分基因,因此所获得转座突变株都是鸡白痢沙门氏菌(图 5)。

2.4 质粒营救法基因定位

2.4.1 基因组 DNA 的提取 用 Genomic DNA extraction Kit 介绍的方法提取基因组 DNA; PCR 显示基因组 DNA 中含有 Km、Cm 抗性基因。



M. 125 bp ladder marker; 1. pUT vector of *S. pullorum*; 2. Cm^R gene of *S. pullorum*; 3. Km^R gene of *S. pullorum*; 4. *rfbS* gene of *S. pullorum*; 5. pUT vector of S17- λ pir (pUTmini -Tn5 Km^R (Cm)); 6. Cm^R gene of S17- λ pir (pUTmini -Tn5 Km^R (Cm)); 7. Km^R gene of S17- λ pir (pUTmini -Tn5 Km^R (Cm)); 8. pUT vector of the mutant; 9. Cm^R gene of the mutant; 10. Km^R gene of the mutant; 11. PCR of *rfbS* gene of the mutant

图 5 转座突变鸡白痢沙门氏菌 PCR 检测结果

Fig. 5 PCR results of *S. pullorum* mutant

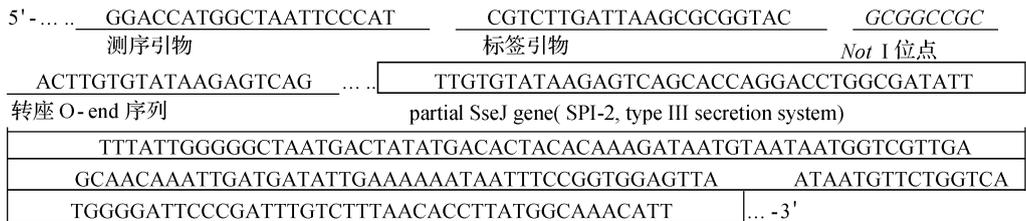


图 6 鸡白痢沙门氏菌突变株 STM1 测序结果

Fig. 6 Sequence of *S. pullorum* mutant STM1

上,序列中有来自 R6K 质粒的 π 蛋白依赖性复制起点,故质粒只能在表达 π 蛋白的菌株中复制,如 λ pir 溶源性感染的大肠杆菌 S17- λ pir (Sm^R)、SM10- λ pir (Km^R)和 CC118- λ pir。质粒中有 RP4 质粒的转移起点 oriT,因此可以接合性转移至受体菌。另外序列中还带有 Tnp5 基因^[2-3],它编码转座酶,是 mini-Tn5 转座所必需的。转座时该片段不进入受体菌的染色体,故转座后,染色体上的转座片段不会发生二次转移。当转座子结合到受体菌的染色体后,该菌就获得该标志所编码的 Km^R 性状,能很容易地与未诱变的菌体区分开来。与普通诱变法(如亚硝基胍诱变、紫外线照射诱变)比较,采用 mini-Tn5 系列转座子诱导突变株有明显的优势:第一,诱变率较高;

2.4.2 基因组 DNA 的酶切 将提取的基因组 DNA 用 *Sph* I、*Xba* I、*Pst* I、*Sal* I 4 种限制性内切酶分别酶切 8~12 h;电泳显示基因组 DNA 酶切完全。

2.4.3 转座子侧翼序列的克隆 将完全酶切的基因组 DNA 与相应内切酶酶切后的 pUC18 载体进行连接,转化入细菌 *E. coli* DH5 α ,用氨苄青霉素和卡那霉素以及氨苄青霉素和氯霉素分别进行筛选。质粒营救法所获得的阳性克隆含有转座子一侧的基因序列。

2.4.4 序列测定与基因鉴定 将质粒营救法所获得的阳性克隆进行测序,得到 3 株突变株细菌 STM1、STM2、STM3 的转座子侧翼序列,结果表明,突变株均有且只有 1 个插入位点,且插入位点不尽相同。将测序结果与 GenBank 中序列进行比对,从相似性上判定被插入失活的功能基因。STM1 测序结果见图 6。

3 讨论

3.1 mini-Tn5 系列转座子构建于自杀性质粒 pUT

第二,导致插入性单突变,不会出现多重突变,有利于准确地定位基因;第三,插入序列已知,便于对基因定位^[6]。本研究建立了 mini-Tn5 转座子突变鸡白痢沙门氏菌的方法,为进一步深入研究鸡白痢沙门氏菌功能基因,以及鸡白痢沙门氏菌致病机制奠定基础。

3.2 在转座子中克隆入 Cm 抗性基因,在做双亲本滤膜接合转座时,便于筛选重组转座子,减少假阳性的出现。在试验中尽管增加了抗性基因,但仍然还有 5%~10%假阳性重组转座子的出现^[10-11]。在双亲本固相杂交后,要去除有 Amp 抗性的菌株,因为存在 Amp 抗性说明转座载体仍然存在,转座突变还没有完成。

3.3 基因定位时运用 *Sph*I、*Xba*I、*Pst*I、*Sal*I 限制性内切酶,此 4 种限制性内切酶识别位点位于 Km^R 和 Cm^R 基因中间^[14-15], 否则就要破坏 Km^R 和 Cm^R 基因的序列,不能起到用相应的抗生素筛选的目的。由于这些酶识别位点都不在 Km^R 和 Cm^R 基因上, 这样通过质粒营救法克隆 Km^R 或 Cm^R 基因及侧翼序列时就可以有 4 种限制性内切酶的选择,用 4 种限制性内切酶分别进行单酶切,可以增加克隆的概率,大大提高了效率;而且还可以通过不同克隆之间的测序相互印证是否在同一个被插入失活的基因上。另外在用相应的抗生素筛选克隆时,并不是所有的筛选都有克隆出现,有时一种酶也只能克隆出一种抗性(Km^R 或 Cm^R)基因,甚至都没有克隆出现。

参考文献:

- [1] LIU G R, RAHN A, LIU S L. The evolving genome of *Salmonella enterica* Serovar *Pullorum*[J]. Journal of Bacteriology, 2002, 184 (10): 2 626-2 633.
- [2] 唐江涛, 何勇强, 唐纪良. 细菌转座子 Tn5 转座机理的研究进展[J]. 广西农业生物科学, 2003, 22(4): 316-321.
- [3] GORYSHIN I Y, WILLIAM S R. Tn5 *in vitro* transposition[J]. The Journal of Biological Chemistry, 1998, 273(13): 7 367-7 374.
- [4] LEHOUX D E, SANSCHAGRIN F, LEVESQUE R C, et al. Defined oligonucleotide tag pools and PCR screening in signature-tagged mutagenesis of essential genes from bacteria[J]. BioTechniques, 1999, 26: 473-480.
- [5] BELAS R, ERSKINE D, FLAHERTY D, et al. Transposon mutagenesis in *Proteus mirabilis* [J]. Journal of Bacteriology, 1991, 173(19): 6 289-6 293.
- [6] 李成涛, 薛景珍, 何朝族. 转座子标签法在构建 G^- 细菌突变体库中的应用[J]. 微生物学杂志, 2002, 22(4): 17-19.
- [7] KIM S, WATARAI M, KONDO Y, et al. Isolation and characterization of mini-Tn5Km2 insertion mutants of *Brucella abortus* deficient in internalization and intracellular growth in HeLa cells[J]. Infection and Immunity, 2003, 71(6): 3 020-3 027.
- [8] LEHOUX D E, SANSCHAGRIN F, LEVESQUE R C, et al. Identification of *in vivo* essential genes from *Pseudomonas aeruginosa* by PCR-based signature-tagged mutagenesis[J]. FEMS Microbiology Letters, 2002, 210: 73-80.
- [9] 张 扬, 焦新安, 刘文博, 等. 利用噬菌体展示肽库筛选和鉴定沙门氏菌 O9 抗原的模拟表位[J]. 中国人兽共患病杂志, 2003, 19(1): 60-63.
- [10] MORGAN E, CAMPBELL J D, WALLIS T S, et al. Identification of host-specific colonization factors of *Salmonella enterica* serovar *typhimurium*[J]. Molecular Microbiology, 2004, 54(4): 994-1 010.
- [11] OSORIO C G, CRAWFORD J A, CAMILLI A, et al. Second-generation recombination-based *in vivo* expression technology for large-scale screening for *Vibrio cholerae* genes induced during infection of the mouse small intestine[J]. Infection and Immunity, 2005, 73(2): 972-980.
- [12] 耿士忠, 潘志明, 焦新安, 等. 快速检测鸡白痢沙门氏菌等位基因特异性 PCR 建立及初步应用[J]. 中国兽医科学, 2007, 2: 113-116.
- [13] DESAI A R, DEVENDRA A, CHAE J S, et al. An allele-specific PCR assay for the rapid and serotype-specific detection of *Salmonella pullorum*[J]. Avian Diseases, 2005, 49(4): 558-561.
- [14] DENNIS J J, ZYLSTRA G J. Plasposons: modular self-cloning minitransposon derivatives for rapid genetic analysis of gram-negative bacterial genomes[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1998, 64 (7): 2 710-2 715.
- [15] 张 帆, 金维正, 陈双燕, 等. 质粒营救法和 Tail-PCR 法获得水稻 T-DNA 旁邻序列的效率比较[J]. 农业生物技术学报, 2004, 12(1): 13-18.