文章编号:1000-5404(2014)04-0331-05

论著

金黄色葡萄球菌 agr 基因敲除及其对膜泡毒力影响

袁吉振[1],杨 杰[1],袁文常[1],胡 珍[1],尚伟龙[1],张 霞[1],朱军民[1],胡启文[1],周人杰[2],饶贤才[1] (400038 重庆,第三军医大学基础医学部微生物学教研室,重庆市微生物工程实验室[1];400037 重庆,第三军医大学新桥医院急诊科[2])

[摘要] **目的** 利用同源重组技术构建金黄色葡萄球菌 RN4220 附属基因调节系统(agr)的敲除株,探讨 agr 基因缺失对金黄色葡萄球菌分泌膜泡毒力的影响。**方法** 分别扩增 agr 基因的上下游同源臂,利用重叠 PCR 获得 agr 基因上下游同源臂的融合片段,经酶切后连接敲除载体 PYT3,构建同源重组质粒 pYT3::Δagr,电转化至金黄色葡萄球菌 RN4220,利用 pYT3 质粒对温度敏感的特点筛选 agr 缺失的突变株。分别制备野生菌 RN4220 和突变株 RN4220::Δagr 的膜泡,小鼠毒力实验观察 agr 基因缺失后对金黄色葡萄球菌膜泡毒力的影响。**结果** 同源重组质粒 pYT3::Δagr 通过酶切鉴定证明构建成功;经 PCR 及 DNA 测序证实获得金黄色葡萄球菌 RN4220 agr 缺失突变株,重组效率为 5.6%;agr 突变株与野生株相比,其分泌膜泡的毒力大大降低,72 h 内小鼠存活率为 100%。**结论** agr 基因缺失后能够显著降低膜泡的毒力。

[关键词] 金黄色葡萄球菌;膜泡;同源重组;附属基因调节系统
[中图法分类号] R378.11;R394-33 [文献标志码] A

Gene knockout of *Staphylococcus aureus* agr and its effect on virulence of bacterial membrane vesicles

Yuan Jizhen[1], Yang Jie[1], Yuan Wenchang[1], Hu Zhen[1], Shang Weilong[1], Zhang Xia[1], Zhu Junmin[1], Hu Qiwen[1], Zhou Renjie[2], Rao Xiancai[1] ([1]Department of Microbiology, Laboratory of Microbiological Engineering, College of Basic Medical Sciences, Third Military Medical University, Chongqing, 400038; [2]Department of Emergency, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400037, China)

[**Abstract**] Objective To construct the agr gene knockout mutant of *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) and evaluate the effect of agr on the virulence of secreting membrane vesicles. Methods A plasmid pYT3::Δagr was constructed for homologous recombination of *S. aureus* and transferred into *S. aureus* strain RN4220. *S. aureus* RN4220 with the recombination vector was incubated at 42 ℃ and 25 ℃ alternatively to select the agr deletion mutant. Membrane vesicles were prepared from both RN4220::Δagr mutant and the wild type strain, and the virulence of the membrane vesicles was evaluated after challenging BALB/c mice. Results Restriction endonucleases analysis indicated that the homologous recombination vector was correctly constructed and the agr deletion mutant was characterized by PCR and direct sequencing of the chromosomal DNA. The virulence of membrane vesicles prepared from the RN4220::Δagr mutant (72 h mouse survival rate 100%) was significantly decreased as compared to that from the wild type RN4220. Conclusion The agr gene of *S. aureus* has great effect on the virulence of membrane vesicles. The construction of the RN4220::Δagr mutant will lay down a solid foundation for preparation of safe staphylococcal membrane vesicle vaccine.

[**Key words**] *Staphylococcus aureus*;membrane vesicles;homologous recombination;accessory gene regulator

Supported by the National Natural Science Foundation of China (31270979), the Special Project of Notional Major Technology of China(2012ZX09103301-038) and the Natural Science Foundation of Chongqing (CSTC2012jjA10066). Corresponding author:Zhou Renjie, Tel:86-23-68755653, E-mail:zhou_rj@aliyun.com;Rao Xiancai, Tel:86-23-68752240, E-mail:raoxiancai@126.com

[基金项目] 国家自然科学基金(31270979);国家重大科技专项(2012ZX09103301-038);重庆市自然科学基金(CSTC2012jjA10066)
[通信作者] 周人杰,电话:(023)68755653,E-mail:zhou_rj@aliyun.com
饶贤才,电话:(023)68752240,E-mail:raoxiancai@126.com
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20131121.1717.005.html(2013-11-21)

细菌膜泡(membrane vesicles,MVs)是以出芽方式从细菌表面分泌的球形双层膜结构,直径20~200 nm,是细菌分泌胞外因子的重要机制之一[1]。MVs可携带细菌的多种成分,如细菌脂多糖、毒素、毒性酶、表面蛋白以及细菌的DNA,因此,致病菌产生的MVs往往具有一定的毒力,参与细菌的致病过程。正因为MVs携带了细菌的抗原,可诱发机体产生免疫保护反应[2],且有研究证实MVs刺激机体产生的免疫能够抵抗病原菌的再感染,同时也可作为新型的疫苗传递载体,携带特定免疫原,并兼具佐剂活性[3-6],因而成为近年来新兴的疫苗研究热点。

从疫苗安全性来看,降低膜泡的毒力是成功制备细菌膜泡疫苗的前提。革兰阴性菌中脂多糖(LPS)是主要的致病物质,研究证实LPS也可被膜泡携带,故在制备革兰阴性菌膜泡疫苗时常常需要先对宿主菌编码LPS的基因进行改造[7-8]。2009年Lee等[9]发现革兰阳性金黄色葡萄球菌(简称金葡菌)也可分泌膜泡,研制革兰阳性菌膜泡疫苗既可避免革兰阴性菌热原质LPS的影响,又可将外源基因插入膜泡携带主要抗原基因中,形成融合蛋白并随膜泡分泌,达到制备多种疫苗乃至多价疫苗的目的。但由于金葡菌可产生多种毒力因子,如溶血素、肠毒素、血浆凝固酶、表皮剥脱毒素等,金葡菌膜泡携带这些毒力因子成为限制该类膜泡走向临床应用的瓶颈[10-11]。

控制毒力因子的表达是降低金葡菌膜泡毒力的有效途径。金葡菌中毒力因子的表达受着严格的调控,其中附属基因调节系统(accessory gene regulator, agr)是金葡菌最重要的毒力表达调节系统,对细菌的毒力及生物膜的形成均起着重要作用[12]。为研究金葡菌agr系统与细菌分泌膜泡毒力之间的关系,我们利用同源重组技术构建了金葡菌RN4220 agr系统敲除突变株,同时比较了agr缺失前后细菌膜泡的毒力差异,旨在为后续制备安全的金葡菌膜泡疫苗奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株及动物 金葡菌RN4220为限制性内切酶缺陷菌株,可接受并修饰来自大肠埃希菌的穿梭质粒,由中国科学技术大学孙宝林教授惠赠。大肠埃希菌DH5α购于天根生化公司。质粒pYT3为温度敏感型穿梭质粒,含有*Bam*HⅠ和*Sal*Ⅰ酶切位点,具有氨苄和四环素抗性,由第四军医大学连建奇教授惠赠。BALB/c小鼠购自本校实验动物中心,雌性,6~8周龄,体质量20 g左右,SPF级。

1.1.2 仪器与试剂 Bio-Rad PCR仪,Bio-Rad凝胶成像仪,超滤离心管(Milipore);*Taq* DNA聚合酶、四环素(tetracycline,Tet)和氨苄(ampicillin,Amp)购自上海生工生物工程技术服务有限公司;PrimeSTAR® HS DNA聚合酶、限制性内切酶和DNA连接酶购自TaKaRa公司;DNA标准购自Thermo Scientific公司;琼脂糖凝胶回收试剂盒、质粒抽提试剂盒购自Promega公司;胰蛋白胨大豆肉汤培养基(tryptone soya broth, TSB)、胰蛋白胨(Tryptone)、酵母提取物(Yeast Extract)等购自英国Oxiod公司;溶葡萄球菌素购自Sigma公司。

1.2 方法

1.2.1 引物设计 根据GenBank中金葡菌RN4220基因组序列利用Primer Premier 5.0软件设计agr基因上游片段引物(up-agr-S、up-agr-AS)、下游片段引物(down-agr-S、down-agr-AS)并在上游片段和下游片段的外侧再设计1对引物(out-L、out-R),所设计的引物由北京华大基因科技有限公司合成。见表1。

表1 PCR引物及其序列

引物	序列(5′→3′)	片段大小(bp)
up-agr-S	GGAGGATCCTAGTTCTAAAAATGAAACTCAAA	988
up-agr-AS	TAACTGACTTTATTATCTTAGTAATGAAGAAGGGA	
down-agr-S	ACTCATCCCTTCTTCATTACTAAGATAATAAAGTC	956
down-agr-AS	GAAGTCGACATGTGAATGAAAATGATGTAGTA	
out-L	AAAGGATCCTTATGTCTTGTGCTCGTTTTTTG	5 654
out-R	AAAGTCGACTGCGTTAGCTTTTGTGAGTTTGA	

——:分别为*Bam*HⅠ和*Sal*Ⅰ酶切位点

1.2.2 同源重组质粒pYT3::Δagr构建 按照图1所示,将agr基因上下游片段分别扩增,制备融合片段,再插入pYT3载体。(1)上游片段和下游片段获得:以RN4220染色体基因组为模板,用up-agr-S和up-agr-AS引物扩增上游片段,用down-agr-S和down-agr-AS引物扩增下游片段。反应条件为:98 ℃ 8 min;98 ℃ 10 s,55 ℃ 15 s,72 ℃ 1 min,共30个循环;最后72 ℃ 7 min。扩增结束后,取反应液2 μL进行琼脂糖凝胶电泳,以DNA marker为参照,确认反应产物大小,胶回收纯化。(2)同源重组上下游融合片段获得:各取上下游片段胶回收产物1μL加入PCR反应液中作为模板,用up-agr-S和down-agr-AS为引物进行扩增,反应条件为98 ℃ 8 min;98 ℃ 10 s,60 ℃ 15 s,72 ℃ 2 min,共35个循环,产物经胶回收纯化。(3)重组质粒pYT3::Δagr构建:质粒pYT3和上下游融合片段分别经*Bam*HⅠ和*Sal*Ⅰ双酶切,胶回收纯化,再用T_4连接酶连接后转化大肠埃希菌DH5α,涂布Amp(100 μg/mL)LB平板,37 ℃培养,次日挑取抗性菌落,抽提质粒,进行酶切鉴定。

1.2.3 质粒pYT3::Δagr电转化金葡菌RN4220 电转条件:电压2.5 kV,电容50 μF,电阻200 Ω。电转后的菌液涂布于含Tet(5 μg/mL)的胰蛋白胨大豆琼脂(TSA)平板上,挑取单个菌落种于含四环素的TSB液体培养基中,抽提质粒进行酶切鉴定。

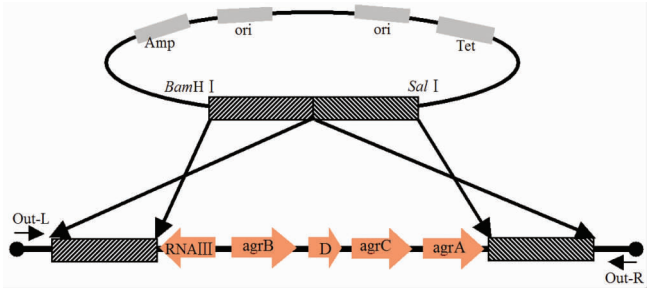


图 1　pYT3 质粒构建及重组机制示意图

1.2.4　RN4220::Δagr 菌株的筛选　　pYT3 是温度敏感型质粒,25 ℃时此质粒可以在革兰阳性菌中稳定存在,当温度≥42 ℃时质粒容易丢失。根据质粒特性进行 agr 基因敲除突变株的筛选,即将成功转入 pYT3::Δagr 的 RN4220 接种于 5 mL 含 5 μg/mL Tet 的 TSB 培养基中,42 ℃过夜培养;次日取 42 ℃过夜菌 50 μL 再接种于含 Tet 的培养基中,25 ℃过夜培养,这样交替重复 3 次后,取菌液划线接种 TSB 平板,37 ℃培养过夜,挑取单个菌落分别接种含 Tet(5 μg/mL)和普通(无抗生素)的 TSA 平板上,分别培养,在 Tet 平板上不生长,而在无抗生素平板上生长的菌落为可疑 agr 基因敲除突变株,命名为 RN4220::Δagr。

1.2.5　金葡菌 RN4220::Δagr 突变株的鉴定　　在 agr 基因同源左臂的上游和同源右臂的下游设计 1 对引物,如果 agr 基因敲除成功,则以敲除株的基因组为模板扩增得到的片段会比野生株 RN4220 少 3 000 bp,并将扩增得到的片段进行测序鉴定。

1.2.6　金葡菌 RN4220 膜泡的制备　　参照 McConnell 等[5]的方法,首先挑取单个菌落接种于 10 mL 无菌 TSB 中,37 ℃振荡培养过夜;次日以 1∶100 的比例接种于 500 mL 新鲜 TSB 中,37 ℃,200 r/min 振荡培养约 20 h 至对数中晚期[$D(600)\approx 1.0$],收集菌液离心(10 000 × g,4 ℃,10 min),吸取含有细菌膜泡的上清,用 0.45 μm 滤膜过滤去除细胞及碎片,0.25 μm 滤膜过滤去除任何可能的细胞残渣,再用超滤离心管离心(3 000 × g,4 ℃,15 min)浓缩上清。直至将上清浓缩至原体积的约 1/6 后,超速离心(200 000 × g,4 ℃)1 h,弃上清,PBS 洗涤两次后,将沉淀重悬于 PBS 中,即为制备的膜泡。

1.2.7　动物毒力实验　　参考 Rivera 等[13]的方法,采用腹腔注射的方法,取野生株 RN4220 膜泡和 RN4220::Δagr 敲除株膜泡(1 mg/mL)各 50 μL 分别攻击 BALB/c 小鼠,每组 8 只,实时观察每只小鼠的情况,记录死亡时间。

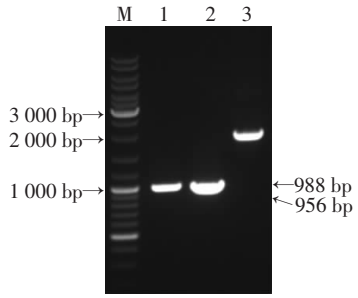
1.3　统计学分析

采用 SPSS 11.0 软件,经四格表 δ^2 检验分析。

2　结果

2.1　RN4220 菌株 agr 基因上下游片段的 PCR 扩增及 overlap PCR

以金葡菌 RN4220 基因组为模板,分别扩增 agr 基因的上下游片段,得到片段大小为 988 bp 的上游片段和 956 bp 的下游片段,并通过 overlap PCR 得到约 2 000 bp 的上下游融合片段,与预期的条带大小一致。见图 2。

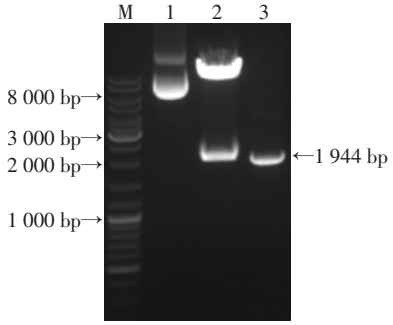


M:标准;1:上游扩增片段;2:下游扩增片段;3:上下游融合片段

图 2　agr 基因上下游片段扩增及 overlap PCR 结果

2.2　重组质粒构建

agr 基因上下游片段经 overlap PCR 得到融合片段后,经限制性酶切,回收目的片段,插入 pYT3 中,转化大肠埃希菌后得到的重组质粒经限制性酶切及 PCR 证实目的片段插入成功(图 3),命名为 pYT3::Δagr。



M:标准;1: pYT3 质粒;2: pYT3::Δagr 的 *Bam*H Ⅰ 和 *Sal* Ⅰ 双酶切;3:插入片段 PCR 扩增验证

图 3　pYT3::Δagr 重组载体酶切鉴定结果

2.3　同源重组质粒转化 RN4220 及鉴定

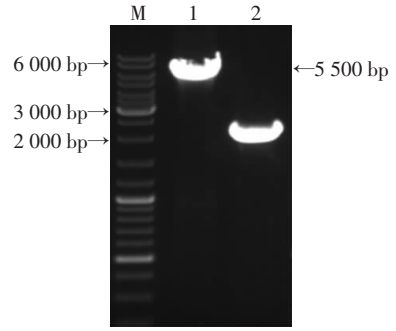
将 pYT3::Δagr 通过电转化导入金葡菌 RN4220 感受态,提取质粒电泳,经 PCR 和酶切证实转化成功。

2.4　RN4220::Δagr 突变株的筛选与鉴定

用引物 out-L 和 out-R 对野生菌与初筛得到的重组菌的基因组进行 PCR,RN4220 得到约 5 500 bp 的片段,RN4220::Δagr 得到约 2 000 bp 的片段,表明 RN4220::Δagr 中的 agr 基因已缺失(图 4),进一步对扩增产物进行 DNA 测序,与 RN4220 野生株相比,证实 RN4220::Δagr 中 agr 基因已成功敲除。此次重组实验中总计筛选了 36 个菌落,其中有 2 个菌落经过验证已重组,重组效率为 5.6%。

2.5　动物实验结果

提取野生株和 RN4220::Δagr 菌株膜泡,接种小鼠进行毒力实验,结果如图 5 所示,野生株 RN4220 的膜泡攻击小鼠 24 h 后,只有 2 只小鼠存活,而相同剂量的 agr 敲除株膜泡攻击的小鼠全部存活,存活小鼠观察至 7 d 实验结束后,均未发现有任何发病症状。统计学分析结果显示,agr 敲除株与野生株感染组的存活率有明显差异($P<0.01$),表明金葡菌 agr 系统缺失会导致细菌膜泡的毒力显著下降。



M:标准;1:野生株 RN4220;2:重组株 RN4220::Δagr

图4 RN4220::Δagr 突变株 PCR 鉴定结果

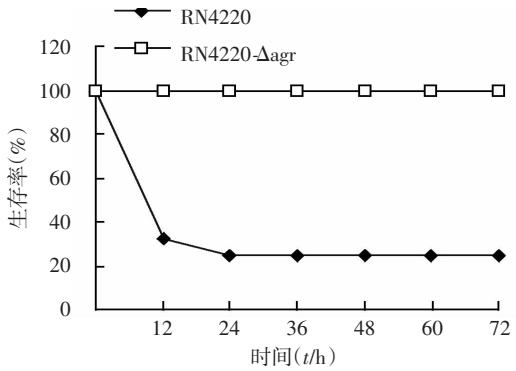


图5 野生株 RN4220 与 agr 敲除株的膜泡感染小鼠后的存活曲线

3 讨论

革兰阴性菌的膜泡早在20世纪50年代就已发现,直径20~200 nm,主要成分包括细菌的外膜抗原如LPS、脂质蛋白和一些胞质蛋白如黏附素、毒素、侵袭素、DNA等[14-15],可以通过膜泡的远距离运输到达其他部位,被膜泡携带的组分在运输过程中能够受膜泡结构的保护,免遭环境中一些蛋白酶、核酸酶的降解,与细菌的定植、信息传递、基因的水平转移、营养获取以及致病性密切相关[16-18]。细菌膜泡可携带细菌产生的毒力因子,一方面在细菌的致病中发挥重要作用;另一方面,膜泡携带的抗原分子也可以激发机体的免疫系统,发挥对病原菌感染的免疫保护功能,是新型疫苗研究的热点,同时也可携带异源免疫原,成为疫苗的递送系统[19]。革兰阴性菌膜泡携带的成分中始终有LPS存在,LPS可以引起促炎因子的大量释放,最终导致机体的发热反应、白细胞反应以及内毒素休克等毒性效应[20],因而成为影响膜泡疫苗安全性的重要因素。革兰阳性金葡菌的膜泡是2009年才发现的,用阳性菌膜泡制备疫苗可以完全避免革兰阴性菌中LPS的困扰,但金葡菌也可产生多种毒素,是医院和社区感染的重要病原菌,可引起皮肤软组织化脓性感染、化脓性肺炎、心内膜炎、骨髓炎及脓毒症休克等[21]。尽管细菌膜泡携带的是宿主菌产生的部分毒力因子,但浓缩的细菌膜泡也有一定毒力,对动物宿主有致病性。为了获得安全、稳定的膜泡疫苗载体,减少膜泡携带的细菌毒力因子(如毒素蛋白),降低膜泡毒力极为关键。金葡菌产生的毒力因子种类繁多,对每个毒力基因实施敲除显然技术难度很大,然而细菌毒力的表达受着严格的调控,除特定毒力基因的特殊调控外,细菌的全局性调控因子,如附属基因调节子agr等在金葡菌外毒素分泌和细菌表面蛋白表达中有着重要的调节作用,但agr缺失是否会降低金葡菌膜泡的毒力,尚少见相关报道。

我们采用基因敲除法对金葡菌RN4220菌株agr基因进行了敲除,并探索agr缺失对细菌分泌的膜泡毒力的影响。基因敲除的基本原理是同源重组,同源重组要求有同源的DNA序列存在,同源区域的大小是影响重组效率的重要因素,同源区域太短,则发生重组效率会显著降低,一般将同源序列的大小设计在500~1 000 bp可以获得较高的重组效率[22]。本实验分别选择了agr基因上下游各988 bp和956 bp的序列作为同源臂,通过重叠延伸的方法进行拼接,再插入到敲除质粒中,既保证获得较高的重组效率以便于后续的突变株筛选,又避免了新加入额外的基因对实验结果带来的影响。用于金葡菌基因敲除的质粒主要是温敏型质粒,如pBT2、pYT3等。本研究我们使用pYT3质粒进行agr基因的敲除。pYT3是一种大肠埃希菌-金葡菌穿梭质粒,带有Amp及Tet抗性基因,Amp抗性在革兰阴性菌中表达较好,而Tet抗性在革兰阳性菌中表达较好[23]。转化入金葡菌的同源重组质粒在42 ℃培养时,要么不能复制被消除,要么插入到细菌的染色体上,发生单交换重组事件和染色体一起复制,目的基因依然存在;然后通过1∶100接入新鲜的培养基中在25 ℃中诱导培养,此时会发生很小概率双交换同源重组事件,导致目的基因被敲除,同时载体的序列也丢失。突变株由于丢失pYT3质粒,会恢复对Tet的敏感性,可把在含Tet(5 μg/mL)平板上不能生长的克隆,通过负性筛选确定为可疑突变株,再经过PCR和DNA测序方法证实并获得RN4220::Δagr突变株。

膜泡自身毒力与致病性是膜泡疫苗研究的最大障碍。动物实验表明,金葡菌野生株RN4220的膜泡免疫的小鼠在24 h内的致死率高达75%,即便小鼠存活,其腹部也会出现大面积溃疡,生命活动力显著下

降;而将 agr 基因敲除后,重组菌分泌的膜泡接种小鼠,受试动物观察 7 d 均能正常存活,表明敲除株产生的膜泡毒力显著下降。虽然 agr 敲除后导致金葡菌膜泡毒力下降的具体机制不清,但主要原因可能是 agr 缺失后,金葡菌的毒力因子如溶血素、蛋白酶、DNA 酶的表达下降,所分泌的膜泡中含上述毒力因子的量减少,使膜泡的致病性降低。从膜泡作为疫苗或疫苗递送载体的安全性角度考虑,敲除金葡菌 agr 系统对降低膜泡的毒力行之有效。

总之,本研究通过成功构建金葡菌 RN4220 agr 基因缺失突变株,观察到敲除株产生的细菌膜泡对小鼠的致病性显著降低。这为进一步研究金葡菌膜泡疫苗的保护作用提供了重要前提,为后续制备安全稳定的重组金葡菌膜泡疫苗奠定坚实基础。

参考文献:

[1] Beveridge T J. Structures of gram-negative cell walls and their derived membrane vesicles[J]. J Bacteriol, 1999, 181(16): 4725-4733.

[2] Thery C, Ostrowski M, Segura E. Membrane vesicles as conveyors of immune responses[J]. Nat Rev Immunol, 2009, 9(8): 581-593.

[3] Norheim G, Tunheim G, Naess L M, *et al*. An outer membrane vesicle vaccine for prevention of serogroup A and W-135 meningococcal disease in the African meningitis belt[J]. Scand J Immunol, 2012, 76(2): 99-107.

[4] Park S B, Jang H B, Nho S W, *et al*. Outer membrane vesicles as a candidate vaccine against edwardsiellosis[J]. PLoS One, 2011, 6(3): e17629.

[5] McConnell M J, Rumbo C, Bou G, *et al*. Outer membrane vesicles as an acellular vaccine against Acinetobacter baumannii[J]. Vaccine, 2011, 29(34): 5705-5710.

[6] Bai X, Findlow J, Borrow R. Recombinant protein meningococcal serogroup B vaccine combined with outer membrane vesicles[J]. Expert Opin Biol Ther, 2011, 11(7): 969-985.

[7] Kim S H, Kim K S, Lee S R, *et al*. Structural modifications of outer membrane vesicles to refine them as vaccine delivery vehicles[J]. Biochim Biophys Acta, 2009, 1788(10): 2150-2159.

[8] Leitner D R, Feichter S, Schild-Prufert K, *et al*. Lipopolysaccharide modifications of a cholera vaccine candidate based on outer membrane vesicles reduce endotoxicity and reveal the major protective antigen[J]. Infect Immun, 2013, 81(7): 2379-2393.

[9] Lee E Y, Choi D Y, Kim D K, *et al*. Gram-positive bacteria produce membrane vesicles: proteomics-based characterization of Staphylococcus aureus-derived membrane vesicles[J]. Proteomics, 2009, 9(24): 5425-5436.

[10] Gurung M, Moon D C, Choi C W, *et al*. Staphylococcus aureus produces membrane-derived vesicles that induce host cell death[J]. PLoS One, 2011, 6(11): e27958.

[11] Thay B, Wai S N, Oscarsson J. Staphylococcus aureus alpha-toxin-dependent induction of host cell death by membrane-derived vesicles[J]. PLoS One, 2013, 8(1): e54661.

[12] 唐俊妮, 周锐, 王红宁, 等. 附属基因调节子在葡萄球菌生物被膜形成与感染中的作用[J]. 中南大学学报: 医学版, 2008, 33(11): 1066-1170.

[13] Rivera J, Cordero R J, Nakouzi A S, *et al*. Bacillus anthracis produces membrane-derived vesicles containing biologically active toxins[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010, 107(44): 19002-19007.

[14] Bishop D G, Work E. An extracellular glycolipid produced by Escherichia coli grown under lysine-limiting conditions[J]. Biochem J, 1965, 96(2): 567-576.

[15] Lee E Y, Bang J Y, Park G W, *et al*. Global proteomic profiling of native outer membrane vesicles derived from Escherichia coli[J]. Proteomics, 2007, 7(17): 3143-3153.

[16] Ellis T N, Kuehn M J. Virulence and immunomodulatory roles of bacterial outer membrane vesicles[J]. Microbiol Mol Biol Rev, 2010, 74(1): 81-94.

[17] Kulp A, Kuehn M J. Biological functions and biogenesis of secreted bacterial outer membrane vesicles[J]. Annu Rev Microbiol, 2010, 64: 163-184.

[18] Schertzer J W, Whiteley M. Bacterial outer membrane vesicles in trafficking, communication and the host-pathogen interaction[J]. J Mol Microbiol Biotechnol, 2013, 23(1/2): 118-130.

[19] Lee D H, Kim S H, Kang W, *et al*. Adjuvant effect of bacterial outer membrane vesicles with penta-acylated lipopolysaccharide on antigen-specific T cell priming[J]. Vaccine, 2011, 29(46): 8293-8301.

[20] Raetz C R, Whitfield C. Lipopolysaccharide endotoxins[J]. Annu Rev Biochem, 2002, 71: 635-700.

[21] Lowy F D. Staphylococcus aureus infections[J]. N Engl J Med, 1998, 339(8): 520-532.

[22] Yu D, Ellis H M, Lee E C, *et al*. An efficient recombination system for chromosome engineering in Escherichia coli[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000, 97(11): 5978-5983.

[23] Hanaki H, Kuwahara-Arai K, Boyle-Vavra S, *et al*. Activated cell-wall synthesis is associated with vancomycin resistance in methicillin-resistant Staphylococcus aureus clinical strains Mu3 and Mu50[J]. J Antimicrob Chemother, 1998, 42(2): 199-209.

(**收稿**:2013-08-16;**修回**:2013-09-22)

(编辑 邓强庭)