中国科学 C 辑:生命科学 2009 年 第 39 卷 第 9 期: 879 ~ 884
www.scichina.com life.scichina.com
《中国科学》杂志社
SCIENCE IN CHINA PRESS

论 文

伤寒沙门菌感染过程中体内诱导表达蛋白抗原的筛选

胡勇[①②], 丛延广[①*], 黎庶[①], 饶贤才[①], 王刚[③], 胡福泉[①*]

① 中国人民解放军第三军医大学基础部微生物学教研室, 重庆 400038;
② 重庆理工大学生物工程学院, 重庆 400050;
③ 中国人民解放军第三医院检验科, 宝鸡 721004
* 联系人, E-mail: ygcong@tmmu.edu.cn; hufuquan@yahoo.com

收稿日期: 2009-06-02; 接受日期: 2009-07-21
国家自然科学基金(批准号: 30500435)资助项目

摘要 在感染过程中, 病原体会表达一系列基因产物以适应体内环境. 因此, 病原体只在宿主体内表达或高表达的基因可能与致病机制密切相关. 本研究用体内诱导抗原技术(*in vivo* induced antigen technology, IVIAT)来筛选伤寒沙门菌感染过程中体内诱导表达的抗原, 共筛选到 7 个体内诱导(*in vivo* induced, IVI)抗原, 分别是 BcfD(菌毛结构亚单位)、GrxC(谷氧还蛋白 3)、SapB(ABC 转运系统)、T3663(ABC 未知转运系统)、T3816(可能的有关硫氰酸酶的硫转移酶)、T1497(可能的 TonB 依赖受体)和 T3689(功能未知), 其中 BcfD, GrxC, SapB, T3663 和 T3689 这 5 个抗原与吸附处理后的健康志愿者的血清无交叉免疫反应. 这些筛选到的体内诱导抗原是新药和疫苗开发的潜在靶标, 同时也有利于新诊断方法的研究.

关键词
伤寒沙门菌
体内诱导抗原技术(IVIAT)
毒力

伤寒是危害全球的一个严重的公共卫生问题[1], 它是由伤寒沙门菌(*Salmonella enterica* serovar Typhi)引起的一种细菌性疾病. 其症状包括突然持续发热、剧烈头痛、食欲不振、便秘或轻度腹泻[2,3]. 据 Crump 等人[4]估计, 全球每年发生伤寒病例 2100 万例, 其中约 22 万死亡病例. 近年来, 由多重耐药菌株引起的病例逐年增长, 使得治疗难度越来越大[2]. 因此, 迫切需要开发新的伤寒诊断治疗方法.

然而, 由于人是伤寒沙门菌唯一已知的天然感染宿主, 伤寒研究缺乏合适的动物模型, 使得对伤寒沙门菌致病性的直接研究存在很大困难. 目前为止, 关于伤寒致病机理方面仍然有很多不清楚的环节[5,6]. 现有关于伤寒沙门菌的致病性的了解大多是从鼠伤寒沙门菌感染小鼠的研究中得出的, 鼠伤寒沙门菌可以导致小鼠的全身性感染, 与人类伤寒过程类似[7]. 然而, 这两种病原菌存在许多差异. 例如, 鼠伤寒沙门菌宿主范围很广, 但人感染后只引起肠胃炎[2]; 另外, 鼠伤寒沙门菌感染小鼠巨噬细胞会引起细胞凋亡, 而伤寒沙门菌感染人巨噬细胞很少引起细胞凋亡[8]. 因此, 鼠伤寒沙门菌的研究结果不可能完全适用于伤寒沙门菌. 另一种研究模型是采用人和鼠的细胞株进行致病性研究, 但是细胞株仅能模拟感染过程的一个阶段, 无法模拟病原菌在完整个体感染过程中所遇到的所有复杂多变的环境.

在感染过程中, 病原菌在宿主体内必须适应一系列复杂多变的环境, 通常在其中任何一个环境中

引用格式: 胡勇, 丛延广, 黎庶, 等. 伤寒沙门菌感染过程中体内诱导表达蛋白抗原的筛选. 中国科学 C 辑: 生命科学, 2009, 39: 879—884

的生存都需要表达一些特殊的毒力因子. 因此, 病原菌只在体内环境表达或上调表达的基因对疾病的发生发展中可能起重要作用[9]. 如果这些基因编码的蛋白质具有抗原性, 它们就会刺激机体产生相应的抗体, 而利用免疫技术就可以鉴定出这些蛋白抗原[10]. 本研究利用体内诱导抗原技术(IVIAT)免疫学方法来筛选伤寒沙门菌在人体感染过程中所表达的抗原. 该方法可以规避伤寒沙门菌致病研究缺乏动物模型的缺陷. 本研究所筛选到的这些蛋白抗原可能对伤寒沙门菌的致病性具有重要作用.

1 材料与方法

1.1 菌株、质粒和培养基

伤寒沙门菌 Ty2 菌株购自中国医学细菌管理保藏中心(北京). 大肠埃希菌(*Escherichia coli*)DH5α和BL21(DE3)作为重组质粒的宿主菌, 由本室保存. 所有的菌株培养于 LB 培养基中, 需要加卡那霉素时其使用浓度为 50 μg/mL.

1.2 病人和血清

恢复期血清采自伤寒病人, 所有病人都经细菌培养确诊为伤寒患者, 用于研究的血清采自发病后第 22~40 日之间; 采集 4 位健康志愿者血清作为阴性对照血清. 所有血清由中国人民解放军第三医院(宝鸡)提供.

1.3 血清吸附

血清吸附的方法参见文献[11,12]. 为使后续的筛选工作更加有效, 挑选 3 个抗体效价较高的病人血清等体积混合(300 μL/个). 用体外培养的伤寒沙门菌 Ty2 菌株和大肠埃希菌 BL21(DE3)进行充分吸附. 先用全菌吸附, 再依次用全菌超声裂解物和热变性超声裂解物吸附. 为检测吸附效果, 每一步吸附结束后取 10 μL 样品, 以伤寒沙门菌 Ty2 菌株超声裂解物为抗原, 用间接酶联免疫吸附实验(ELISA)进行检测. 当吸附处理的血清与超声裂解物抗原没有明显可见的反应时, 分装吸附处理后的血清, 并保存于–70℃备用.

1.4 伤寒沙门菌基因组表达文库的构建

选择 pET-30a/b/c 表达载体来构建伤寒沙门菌基因组表达文库. 这 3 个载体依次相差一个碱基, 所以总能确保插入片段在其中一个载体中得到正确表达. 用 *Bam*H Ⅰ酶切表达载体 pET-30a/b/c, 胶回收试剂盒纯化, 并用 CIAP 去磷酸化. 用 *Sau*3A Ⅰ部分酶切伤寒沙门菌基因组 DNA, 琼脂糖凝胶电泳回收 0.5~1.5 kb 的片段. 插入片段与载体经 T_4 DNA 连接酶连接后电击转化大肠埃希菌 DH5α 感受态细胞, 将转化产物涂布于含 50 μg/mL 卡那霉素的 LB 平板, 37℃过夜培养后, 收集平板上的菌落, 提取重组质粒, 再电转大肠埃希菌 BL21(DE3)感受态细胞.

1.5 表达文库的免疫筛选

将上述电转获得的表达文库菌液涂布含卡那霉素的 LB 平板上, 使每个平板产生约 400 个菌落. 待菌落长到针尖大时, 复印到灭菌 NC 膜上, 将 NC 膜放到含卡那霉素和 IPTG(1 mmol/L)的 LB 平板上, 使有菌面朝上, 37℃诱导培养 5 h. 取下 NC 膜, 使之暴露于氯仿蒸汽中 15 min, 使菌落部分裂解. 将经过处理的 NC 膜放入 10%脱脂奶粉 4℃封闭过夜. 经 PBS-T (含 0.5%吐温-20 的磷酸盐缓冲液)洗涤后, 放入经 PBS 稀释(1∶200)的上述吸附血清中室温反应 1 h, PBS-T 洗涤. 再放入 1∶20000 稀释的辣根过氧化酶标记的羊抗人 Ig 抗体(Southerbiotech)中, 室温反应 1 h, PBS-T 洗涤. 最后采用 ECL 增强化学发光试剂盒(Pierce)检测. X 光片上明显区别于淡色背景的黑点所对应的菌落即为初步确定的阳性克隆, 将初步确定的阳性克隆–70℃保存.

为消除其中的假阳性克隆, 以只含 pET-30a 空载体的大肠埃希菌 BL21(DE3)为阴性对照, 将初步确定的阳性克隆再次进行菌落免疫印迹反应. 重复以上免疫鉴定步骤, 筛选出与对照菌比较仍呈阳性反应的克隆. 提取确证阳性克隆重组质粒, 对插入片段进行测序. 由于这些插入片段往往包含不止 1 个基因片段, 为确定其中真正的体内诱导基因, 需要进行第 3 次筛选. 根据各插入片段所含的全部可读框(ORF), 设计各 ORFs 引物(表 1), 并在 5′端引入 *Nde* Ⅰ或 *Nco* Ⅰ(如果该 ORF 含有 *Nde* Ⅰ位点)酶切位点, 3′端引入 *Not* Ⅰ酶切位点, PCR 扩增各 ORFs, 酶切后与经过同样酶切的 pET-30a 载体连接, 电转入大肠埃希菌

BL21(DE3)中, 并再一次重复前面的免疫鉴定步骤.

1.6 IVIAT 筛选抗原与阴性对照血清的免疫反应

为评价 IVIAT 筛选抗原的交叉免疫反应性, 采用 4 位健康志愿者的混合血清对获得的阳性克隆进行同样的菌落免疫印迹反应, 重复前面的免疫鉴定步骤, 分析 IVIAT 筛选抗原同健康志愿者血清的免疫反应. 健康志愿者血清同样经过体外培养的含 pET-30a 的大肠埃希菌 BL21(DE3)的全菌、全菌裂解物及热变性裂解物充分吸附.

表 1 15 个全基因的 PCR 引物 [a)]

基因	引物
bcfD	Pf1: 5′-cgcgCATATGaaaatacctcttttatttgctc-3′
	Pr1: 5′-cggcGCGGCCGCttagtcaaagtccactcgc-3′
t3816	Pf2: 5′-cgcgCATATGcaagaaattatgcaatttgttg-3′
	Pr2: 5′-cggcGCGGCCGCtcacttaccgcgcacca-3′
grxC	Pf3: 5′-cgcgCATATGgccaatattgaaatctacacca-3′
	Pr3: 5′-cggcGCGGCCGCttaacgcaacagcggatcc-3′
t1497	Pf4: 5′-cgcgCATATGaaaattatttccgttagacagc-3′
	Pr4: 5′-cggcGCGGCCGCttattcaaattgccatgccag-3′
sapB	Pf5: 5′-cgcgCCATGGccatgattatcttcaccctg-3′
	Pr5: 5′-cggcGCGGCCGCttatcgtaaggcataccatt-3′
t3663	Pf6: 5′-cgcgCCATGG ttatggcaacccggcaca-3′
	Pr6: 5′-cggcGCGGCCGC ctacggccctggctcaa-3′
t3689	Pf7: 5′-cgcgCATATGaaaaaacgctccctttgct-3′
	Pr7: 5′-cggcGCGGCCGCtcaaaagcgatactcacc-3′
t0309	Pf8: 5′-cgcgCATATGaccttcaacataccgac-3′
	Pr8: 5′-cggcGCGGCCGC ctatttagcggatagcgc-3′
cysZ	Pf9: 5′-cgcgCATATG gtttcatcatccacaaccgt-3′
	Pr9: 5′-cggcGCGGCCGC ttatttccataacgcgtgttt-3′
t0429	Pf10: 5′-cgcgCATATG atgcaggatttgcgtctgat-3′
	Pr10: 5′-cggcGCGGCCGCtcaggcgttagcgtccat-3′
t3664	Pf11: 5′-cgcgCCATGGacaaagcgcattaataaagaca-3′
	Pr11: 5′-cggcGCGGCCGCttacagacgtgaccaggc-3′
t3467	Pf12: 5′-cgcgCCATGGctatgtctacaacaacgttaa-3′
	Pr12: 5′-cggcGCGGCCGCtcaggcttcctcccgttt-3′
t0769	Pf13: 5′-cgcgCATATGatgacaaatctaaaaaagcgcgaa-3′
	Pr13: 5′-cgcgGCGGCCGCttaatacgccgctttattaacaaac-3′
t0995	Pf14: 5′-cgcgCATATGatggcggttgaagttaaatacgta-3′
	Pr14: 5′-cgcgGCGGCCGCtcaggcggcttgctttttcgtt-3′
t0770	Pf15: 5′-cgcgCATATGatgagtttacgacaaaaaacgatc-3′
	Pr15: 5′-cgcgGCGGCCGCtcatccgacacgtaataacttttt-3′

a) 引物画线部分是限制性酶切位点

2 结果

2.1 表达文库的构建

*Sau*3AⅠ随机部分酶切伤寒沙门菌 *Ty2* 基因组 DNA, 获得大小主要集中在 0.5~1.5 kb 的酶切片段(图 1). 切下 0.5~1.5 kb 的酶切片段, 纯化后与线性去磷酸化的表达载体 pET-30a/b/c 连接, 电击转化大肠埃希菌感受态细胞, 将转化产物涂布于含卡那霉素的 LB 平板上, 过夜培养后, 随机挑选 10 个克隆, 提取质粒进行 *Kpn*Ⅰ和 *Hin*dⅢ双酶切, 琼脂糖凝胶电泳, 结果显示 10 个克隆都有外源插入片段, 且大小都分布在 0.5~1.5 kb 范围之内(图 2), 表明文库构建成功.

2.2 阳性克隆的筛选

以吸附处理后的伤寒病人恢复期血清为探针筛选表达文库, 初次筛选从大约 3 万个克隆中初筛到 23 个阳性反应克隆(图 3(A)显示其中一个阳性克隆). 以只含 pET-30 质粒的大肠埃希菌 BL21(DE3)为阴性对照, 菌落免疫印迹法对此 23 个阳性克隆进行复筛,

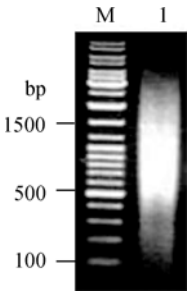


图 1 *Sau*3AⅠ部分酶切 *Ty2* 基因组 DNA

M: DNA 标准

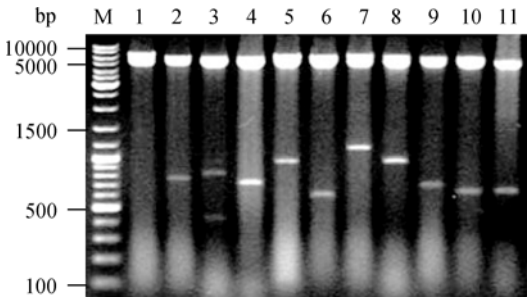


图 2 *Kpn*Ⅰ/*Hin*dⅢ双酶切随机表达文库质粒

泳道 1: 阴性对照质粒; 泳道 2~11: 10 个随机挑选的重组质粒; M: DNA 标准

其中 8 个克隆仍呈阳性反应.

2.3 体内诱导基因的测序分析

对 8 个阳性克隆测序, 并对各插入序列进行 BLAST(http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/) 分析, 发现 8 个阳性克隆共含有 15 个 ORFs. 对这 15 个 ORFs 进行 PCR 全基因扩增, 酶切后同 pET-30a 载体连接并转化大肠埃希菌 BL21(DE3), 分别获得 15 个转化克隆. 以吸附处理后的伤寒病人血清为探针, 菌落免疫印迹法进行第 3 次免疫筛选, 其中 7 个克隆结果呈阳性(图 3(B)). 它们所编码的蛋白见表 2, 包括 BcfD(菌毛结构亚单位)、GrxC(谷氧还蛋白 3)、SapB (ABC 转运系统)、T3663(ABC 未知转运系统)、T3816 (可能的有关硫氰酸酶的硫转移酶)、T1497(可能的 TonB 依赖受体)和 T3689(功能未知).

2.4 体内诱导抗原与阴性对照血清的反应

利用IVIAT所筛选到的7个体内诱导抗原与健康志愿者的混合血清进行菌落免疫印迹反应, 结果见图4. 其中5个克隆(BcfD, GrxC, Sap, T3689和T3663)与阴性对照克隆(只含 pET-30a 而不含插入片段的大肠埃希菌 BL21(DE3))无区别, 表明这 5 个体内诱导抗原与健康志愿者的血清无交叉免疫反应.

3 讨论

病原菌的致病性取决于其突破宿主防御屏障进入宿主繁殖和定植于宿主体内的能力[13]. 许多细菌毒力因子都有在宿主体内被诱导表达的特征, 而在体外培养中这些体内诱导基因往往不表达或表达水平很低[14,15]. 当然, 并不是所有的体内诱导表达基因对毒力都是必需的. 不过, 它们在体内诱导表达的特征表明其有助于在宿主体内生长繁殖, 从而可能有助于提高病原菌的致病性.

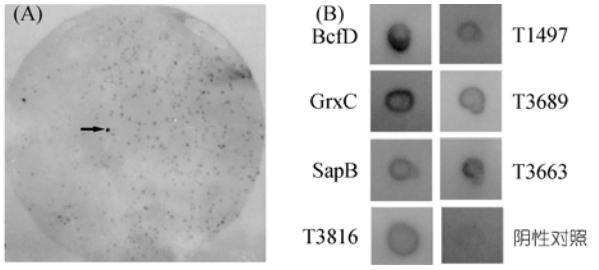


图 3 阳性反应克隆筛选

(A) 初筛阳性反应克隆(黑箭头所示); (B) 第 3 次筛选所获得的 7 个阳性反应克隆

表 2 IVIAT 筛选到的伤寒沙门菌 Ty2 菌株抗原

基因编号	蛋白名称	功能
t0025	BcfD	菌毛结构亚单位
t3816		有关硫氰酸酶的硫转移酶
t3817	GrxC	谷氧还蛋白及相关蛋白
t1497		外膜受体蛋白, 与Fe转运有关
t1598	SapB	ABC转运系统, 透性酶组成成分
t3663		ABC未知转运系统
t3689		功能未知

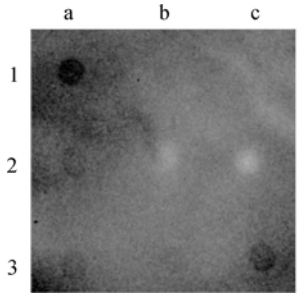


图 4 IVIAT 筛选抗原与阴性对照血清的菌落免疫印迹反应

1a: T3816; 3c: T1497; 1b: GrxC; 2a: BcfD; 2c: T3689; 3a: SapB; 3b: T3663; 1c 和 2b: pET-30a

近年来有多种方法被应用于鉴别致病菌的体内诱导基因, 包括体内表达技术(IVET)[14,16]、信号标签突变技术(STM)[17]以及差异荧光技术(DFI)[18]等. 但这些方法有一个共同的特点, 需要动物模型, 然而许多病原菌却缺少合适的动物模型, 况且即使有动物模型, 动物模型也不可能完全模拟人体内环境条件[10]. IVIAT 的主要特点是不依赖动物模型, 为伤寒沙门菌体内诱导基因的研究提供了一种可能, 因为人是伤寒沙门菌的唯一天然宿主, 伤寒研究缺乏合适的动物模型[3]. 那些利用动物模型或者细胞模型所筛选到的毒力因子最终都需要回到人体内环境来检验, 而 IVIAT 法由于采用实际感染的病人血清为探针, 因此可以直接筛选病原菌在宿主体内诱导表达的毒力因子抗原[19].

Harris 等人[20]曾利用 IVIAT 在伤寒沙门菌 CT18 菌株中筛选到 35 个体内诱导抗原. 但本实验只筛选到 7 个新的体内诱导抗原. 存在差异的原因可能主要

是由病人抗体反应的异质性所致. 其中有 5 个抗原与正常健康志愿者的血清无交叉免疫反应, 这 5 个抗原的编码基因分别是 *grxC*, *bcfD*, *sapB*, *t3663* 和 *t3689*.

grxC 基因编码谷氧还蛋白 3, 谷氧还蛋白是谷胱甘肽/谷氧还蛋白氧化还原系统的组成成分[21]. 研究[22,23]表明, 鼠抵抗鼠伤寒沙门菌的感染主要靠其吞噬细胞产生的氧化物和亚硝化物等天然免疫物质, 谷胱甘肽/谷氧还蛋白氧化还原系统为细菌提供抗氧化应急保护, 从而抵抗这些天然免疫物质的杀菌作用. 谷氧还蛋白是该系统的组成要素, 其编码基因在体内的诱导表达是可以预期的.

t0025 基因编码菌毛蛋白 BcfD 亚单位, 菌毛位于菌细胞表面, 通过特殊的受体黏附于宿主细胞表面, 而黏附通常认为是感染过程的一个必要步骤[3]. *bcfD* 属于 *Bcf* 菌毛操纵子, 该操纵子由 *bcf*ABCDEFG 组成[24], 所有的沙门菌属细菌都存在该操纵子. Huang 等人[25]发现鼠伤寒沙门菌感染猪的过程中, BcfA 蛋白表达, 并参与黏附、定植过程. Humphries 等人[26]也发现, 当注射体外培养的鼠伤寒沙门菌于牛回肠时, BcfA 蛋白被诱导表达. 本实验结果和上述研究结果一致, BcfD 蛋白在体内诱导表达, 其作用可能在于增强黏附人体上皮细胞的能力.

sapB 和 *t3663* 这两个基因都属于 ABC 转运体的基因, 根据细菌所处的环境条件的不同, ABC 转运体可以介导一些小分子物质在细菌细胞膜内外的运输[27]. 在一些病原菌中, 细菌多重耐药性[28,29]和致病性[30]的产生都与 ABC 转运体有着密切的联系. 目前普遍认为, ABC 多药转运蛋白的过表达能够帮助病原菌有效地逃避抗生素的杀菌作用, 同时还能够增强病原菌对宿主的侵袭能力[28,29,31].

综上所述, 对于缺乏动物模型的病原菌来说, IVIAT 是一种有效的筛选体内诱导抗原的方法. 由于体内诱导抗原是病原菌感染过程中特异性表达的, 很可能有利于病原菌适应体内环境进而在细菌致病过程中发挥重要作用. 因此, 体内诱导抗原也是抗菌药物和疫苗开发的潜在靶标, 那些同正常健康志愿者血清无免疫反应的体内诱导抗原还有望被开发成诊断试剂.

参考文献

1 Kumar S, Balakrishna K, Singh G P, et al. Rapid detection of *Salmonella typhi* in foods by combination of immol/Lunomagnetic separation and polymerase chain reaction. World J Mic, 2005, 21: 625—628

2 Boyle E C, Bishop J L, Grassl G A, et al. *Salmonella*: from pathogenesis to therapeutics. J Bacteriol, 2007, 189: 1489—1495

3 House D, Bishop A, Parry C, et al. Typhoid fever: pathogenesis and disease. Curr Opin Infect Dis, 2001, 14: 573—578

4 Crump J A, Luby S P, Mintz E D. The global burden of typhoid fever. Bull World Health Organ, 2004, 82: 346—353

5 Faucher S P, Curtiss R, Daigle F. Selective capture of *Salmonella enterica* serovar typhi genes expressed in macrophages that are absent from the *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* genome. Infect Immol, 2005, 73: 5217—5221

6 Chanana V, Majumdar S, Ray P, et al. Coordinated expression and i mmol/Lunogenicity of an outer membrane protein from *Salmonella enterica* serovar *Typhi* under iron limitation, oxidative stress and anaerobic conditions. J Biomed Sci, 2006, 13: 303—312

7 Chander H, Majumdar S, Sapru S, et al. Reactivity of typhoid patients sera with stress induced 55 kDa phenotype in *Salmonella enterica* serovar Typhi. Mol Cell Biochem, 2004, 267(1-2): 75—82

8 Schwan W R, Huang X Z, Hu L, et al. Differential bacterial survival, replication, and apoptosis-inducing ability of *Salmonella* Serovars within human and murine macrophages. Infect Immol, 2000, 68: 1005—1013

9 Rediers H, Rainey P B, Vanderleyden J, et al. Unraveling the secret lives of bacteria: use of *in vivo* expression technology and differential fluorescence induction promoter traps as tools for exploring niche-specific gene expression. Microbiol Mol Biol Rev, 2005, 69: 217—261

10 Handfield M, Brady L J, Progulske-Fox A. IVIAT: a novel method to identify microbial genes expressed specifically during human infections. Trends Microbiol, 2000, 8: 336—339

11 Hang L, John M, Asaduzzaman M, et al. Use of *in vivo*-induced antigen technology(IVIAT) to identify genes uniquely expressed during human infection with *Vibrio cholerae*. Proc Natl Acad Sci USA, 2003, 100: 8508—8513

12 Rollins S M, Peppercorn A, Hang L, et al. *In vivo* induced antigen technology (IVIAT). Cell Microbiol, 2005, 7: 1—9

13 Heithoff D M, Conner C P, Hanna P C, et al. Bacterial infection as assessed by *in vivo* gene expression. Proc Natl Acad Sci USA, 1997,

94: 934—939
14 Mahan M J, Slauch J M, Mekalanos J J. Selection of bacterial virulence genes that are specifically induced in host tissues. Science, 1993, 259: 686—688
15 Mahan M J, Tobias J W, Slauch J M, et al. Antibiotic-based selection for bacterial genes that are specifically induced during infection of a host. Proc Natl Acad Sci USA, 1995, 92: 669—673
16 Angelichio M J, Camilli A. *In vivo* expression technology. Infect Immol, 2002, 70: 6518—6523
17 Hensel M, Shea J E, Gleeson C, et al. Simultaneous identification of bacterial virulence genes by negative selection. Science, 1995, 269: 400—403
18 Valdivia R H, Falkow S. Fluorescence-based isolation of bacterial genes expressed within host cells. Science, 1997, 277: 2007—2011
19 Kim Y R, Lee S E, Kim C M, et al. Characterization and pathogenic significance of *Vibrio vulnificus* antigens preferentially expressed in septicemic patients. Infect Immol, 2003, 71: 5461—5471
20 Harris J B, Baresch-Bernal A, Rollins S M, et al. Identification of *in vivo*-induced bacterial protein antigens during human infection with *Salmonella enterica* Serovar Typhi. Infect Immol, 2006, 74: 5161—5168
21 Aslund F, Beckwith J. The thioredoxin superfamily: redundancy, specificity, and gray-area genomics. J Bacteriol, 1999, 181: 1375—1379
22 Bjur E, Eriksson Y S, Aslund F, et al. Thioredoxin 1 promotes intracellular replication and virulence of *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium. Infect Immol, 2006, 74: 5140—5151
23 Shiloh M U, Nathan C F. Reactive nitrogen intermediates and the pathogenesis of *Salmonella* and mycobacteria. Curr Opin Microbiol, 2000, 3: 35—42
24 Townsend S M, Kramer N E, Edwards R, et al. *Salmonella enterica* Serovar Typhi possesses a unique repertoire of fimbrial gene sequences. Infect Immol, 2001, 69: 2894—2901
25 Huang Y, Leming C L, Suyemoto M, et al. Genome-wide screen of *Salmonella* genes expressed during infection in pigs, using *in vivo* expression technology. Appl Environ Microbiol, 2007, 73: 7522—7530
26 Humphries A D, Raffatellu M, Winter S, et al. The use of flow cytometry to detect expression of subunits encoded by 11 *Salmonella enterica* serotype *Typhimurium fimbrial* operons. Mol Microbiol, 2003, 48: 1357—1376
27 Yazaki K. ABC transporters involved in the transport of plant secondary metabolites. FEBS Lett, 2006, 580: 1183—1191
28 Jones P M, George A M. Multidrug resistance in parasites: ABC transporters, P-glycoproteins and molecular modelling. Int J Parasitol, 2005, 35: 555—566
29 Sipos G, Kuchler K. Fungal ATP-binding cassette (ABC) transporters in drug resistance & detoxification. Curr Drug Targets, 2006, 7: 471—481
30 Brown J S, Gilliland S M, Holden D W. A *Streptococcus pneumoniae* pathogenicity island encoding an ABC transporter involved in iron uptake and virulence. Mol Microbiol, 2001, 40: 572—585
31 Wolfger H, Mamnun Y M, Kuchler K. Fungal ABC proteins: pleiotropic drug resistance, stress response and cellular detoxification. Res Microbiol, 2001, 152: 375—389