



刘翠翠, 马思思, 王佳莹, 等. 布鲁菌缺失疫苗株 M5- $\Delta znuA$  和 M5- $\Delta bp26-\Delta znuA$  的构建及毒力和免疫原性的评估[J]. 华南农业大学学报, 2015,36(5):18-25.

# 布鲁菌缺失疫苗株 M5- $\Delta znuA$ 和 M5- $\Delta bp26-\Delta znuA$ 的构建及毒力和免疫原性的评估

刘翠翠<sup>†</sup>, 马思思<sup>†</sup>, 王佳莹, 吴云燕, 易琳, 赵明秋, 陈金顶

(华南农业大学 兽医学院, 广东 广州 510642)

**摘要:**【目的】利用分子生物学技术,通过同源重组的方法构建了新型的羊种布鲁菌 *Brucella melitensis* 减毒活疫苗株,为布鲁菌的防治提供新的选择.【方法】以羊种布鲁菌减毒活疫苗 M5 株及缺失 *bp26* 基因的 M5- $\Delta bp26$  缺失突变株为亲本株,利用电击转化法,将含有 *znuA* 基因上下游同源臂的自杀质粒转入到亲本株中,通过同源重组敲除 *znuA* 基因.对构建的新型基因缺失株进行生物学特性及毒力的鉴定与分析.【结果和结论】PCR 及核苷酸序列测序结果表明,羊种布鲁菌减毒活疫苗 *znuA* 单基因缺失株和 *bp26*、*znuA* 双基因缺失株均构建成功,分别将其命名为 M5- $\Delta znuA$  和 M5- $\Delta bp26-\Delta znuA$ . 与亲本株相比,2 种缺失突变株的生物学特性没有显著性差异;体外连续传至 20 代后,菌落 PCR 和核苷酸测序结果显示 M5- $\Delta znuA$  和 M5- $\Delta bp26-\Delta znuA$  株具有良好的遗传稳定性.小鼠脾脏质量和脾脏菌落数表明,M5- $\Delta bp26-\Delta znuA$  双基因缺失株毒力最弱,单基因缺失株 M5- $\Delta znuA$  和 M5- $\Delta bp26$  次之.血清中抗体水平的监测显示,*znuA* 基因的缺失对布鲁菌减毒活疫苗诱导机体体液免疫的能力没有影响.获得了免疫原性保持良好而毒力减弱的羊种布鲁菌减毒活疫苗基因突变株 M5- $\Delta znuA$  和 M5- $\Delta bp26-\Delta znuA$ .

**关键词:**布鲁菌; *znuA* 基因; 基因缺失株; 毒力; 免疫原性

中图分类号:S852.614

文献标志码:A

文章编号:1001-411X(2015)05-0018-08

## Construction of M5- $\Delta znuA$ and M5- $\Delta bp26-\Delta znuA$ mutant strains of *Brucella melitensis* and assessment of their virulence and immunogenicity

LIU Cuicui<sup>†</sup>, MA Sisi<sup>†</sup>, WANG Jiaying, WU Yunyan, YI Lin, ZHAO Mingqiu, CHEN Jinding

(College of Veterinary Medicine, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

**Abstract:**【Objective】To harvest a kind of live vaccine of *Brucella melitensis* with less virulence, the novel *B. melitensis* live vaccine was constructed through homologous recombination.【Method】M5 and M5- $\Delta bp26$  were used as the parental strains. *znuA* gene was knocked out through the recombined suicide plasmid. The biological characteristic of mutant strains was examined by inspecting and analyzing the growth curve, stability of generating the virulence in Balb/c mice.【Result and conclusion】The results of PCR amplification and sequencing showed that two types of genic deleted mutant strains were constructed successfully, which were designated as M5- $\Delta znuA$  and M5- $\Delta bp26-\Delta znuA$ . Compared with the parental strain M5, these two mutant stains had the growing characteristics similar to M5 and possessed a stable genic generation. Based on the mass and counts of spleen of Balb/c, the results demonstrated that M5- $\Delta bp26-\Delta znuA$  exhibited the lowest virulence among all strains, followed by M5- $\Delta znuA$  and M5- $\Delta bp26$ .

收稿日期:2014-08-09 优先出版时间:2015-07-27

优先出版网址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/44.1110.s.20150727.1455.023.html>

作者简介:刘翠翠(1988—),女,硕士研究生,E-mail:dongyishuidi@163.com;马思思(1989—),女,硕士研究生,E-mail:122160840@qq.com;†对本文贡献相同;通信作者:陈金顶(1963—),男,教授,博士,E-mail:jdchen@scau.edu.cn

基金项目:广东省教育部产学研结合项目(2011B090400259);公益性行业(农业)科研专项(201203056)

The quantity of specific antibody of serum revealed that the ability to induce humoral immune reaction was not affected by *znuA* deletion. In this study, two gene deletion mutants of *B. melitensis* live vaccine have been yielded, and they might be a new candidate vaccine.

**Key words:** *Brucella melitensis*; *znuA* gene; gene deletion strain; virulence; immunogenicity

布鲁菌病 (Brucellosis) 是世界范围内的重大人畜共患传染病之一,牛、羊、猪等多种动物和人均可感染该病,其导致的巨大经济损失和严重公共卫生问题一直备受人们关注.目前布鲁菌属 *Brucella* 中以马耳他型布鲁菌 *B. melitensis* 对人类的致病性最强、危害最重,在我国也最为流行<sup>[1]</sup>,因此对马耳他型布鲁菌病的防控是非常必要的.临床上主要通过接种减毒活疫苗 Rev. 1、M5 及 M5-90 等预防控制此病,其中 M5 株弱毒苗是通过将马耳他型强毒株 M28 由鸡体连续传代致弱而研制成功,自 20 世纪 70 年代起被广泛应用于我国,在有效控制羊布鲁菌病方面发挥了重大作用,但 M5 株仍具有布鲁菌弱毒苗普遍存在的残余毒力强、易引起孕畜流产、干扰血清学检测等缺点<sup>[2-3]</sup>.为克服以上缺点,构建安全、稳定、易检测的基因工程疫苗势在必行.ATP 结合盒式蛋白 (ATP-binding cassette transporter) 又称 ABC 转运蛋白,是细菌的一种物质转运蛋白,参与微生物体内的各种生理活动,如维持细胞内外渗透压平衡、抗原呈递、细胞分化、细菌免疫、胆固醇及脂质的运输<sup>[4]</sup>.其中,锌 ABC 转运蛋白 (ZnuABC) 为 ABC 转运蛋白中的一种金属离子转运蛋白,研究表明高亲和力 Znu-ABC 蛋白不仅与细菌吸收运输锌离子相关,也和多种细菌的致病力有着直接或间接的关系<sup>[5-7]</sup>.Bp26 蛋白是布鲁菌的外膜周质蛋白,该蛋白具有较强的免疫活性,能够有效地诱导机体产生特异性抗体.近年来,Bp26 蛋白成为了布鲁菌血清学诊断的重要靶蛋白,此外,*bp26* 基因缺失标记型疫苗株在区分布鲁菌人工免疫与野毒感染方面具有的优势使 *bp26* 基因成为现在布鲁菌基因缺失疫苗株的主要靶基因.

本研究以马耳他型布鲁菌 M5 株和缺失株 M5-Δbp26 为亲本株,利用同源重组技术对其进行改造,敲除编码锌离子转运蛋白 *znuABC* 中的 *znuA* 基因,获得了单基因缺失株 M5-Δ*znuA* 和双基因缺失株 M5-Δ*bp26*-Δ*znuA*.对 2 种缺失株的形态、生长特性、遗传稳定性进行鉴定;并通过小鼠试验比较了缺失株 M5-Δ*znuA*、M5-Δ*bp26*-Δ*znuA* 及 M5-Δ*bp26* 和亲本株 M5 的毒力和免疫原性的强弱.

## 1 材料与方法

### 1.1 菌株、质粒、载体、蛋白

马耳他型布鲁菌减毒活疫苗株 M5 购于新疆天康畜牧生物技术股份有限公司,大肠埃希菌 *Escherichia coli* DH5α λ pir、PRE112 自杀质粒 (cat, sacB, oriTRP4, oriVR6K, MCS) 为华南农业大学微生物学与免疫学教研室保存;布鲁菌疫苗缺失株 M5-Δ*bp26* 及布鲁菌 BLS-L7/L12 融合蛋白 (BL 蛋白) 为华南农业大学微生物学与免疫学教研室构建并保存.

### 1.2 主要试剂

KOD FX DNA Polymerase 高保真酶为 TOYOBO 公司产品;限制性内切酶 *Kpn* I 和 *Sac* I、T4 DNA 连接酶、DNA Marker 等为 TaKaRa 公司产品;胶回收试剂盒、小量质粒提取试剂盒为 Omega 公司产品;QIAamp DNA 提取试剂盒为 QIAGEN 公司产品.

### 1.3 试验动物

120 只 5~6 周龄雌性 Balb/c 小鼠、鼠粮、垫料均购自广东省医学实验动物中心.

### 1.4 布鲁菌单基因缺失株 M5-Δ*znuA* 及双基因缺失株 M5-Δ*bp26*-Δ*znuA* 的构建

1.4.1 引物合成及 Δ*znuA* 基因片段的构建 按 QIAamp DNA 抽提试剂盒说明书提取马耳他型布鲁菌 M5 株基因组 DNA.根据该菌株 *znuA* 基因 (BMEA\_B1116) 左右两端序列运用 Primer5.0 设计 2 对通用引物对序列进行扩增,引物如下: F1: 5'-GATGG-TACCCGTCCTCGTTTGCTTGTGC-3' (*Kpn*I), R1: 5'-TCGCTGAAAGACTGCCTGT-3'; F2: 5'-GCAGTCTTT-CAGCGAAGCCAGAAAGGCAGAAGC-3', R2: 5'-AGA-GAGCTCCAATGTCCCCTTGGTCCC-3' (*Sac* I).其中 F1 和 R2 的 5'端分别添加 *Kpn* I 和 *Sac* I 酶切位点(斜体部分),F2 的 5'端添加 R1 中 15 个碱基的反向互补序列(划线部分),引物由上海立菲生物技术有限公司合成.用引物 F1 和 R1 扩增 *znuA* 基因的左端同源臂片段 ZN-L,F2 和 R2 扩增该基因右端同源臂片段 ZN-R,再以获得的 ZN-L 和 ZN-R 片段回收纯化产物为模版,用引物 F1、R2 进行 Overlap PCR 扩增,获

得缺失 *znuA* 基因的片段  $\Delta znuA$ 。

1.4.2 重组自杀质粒 pRE-M5- $\Delta znuA$  的构建 双酶切自杀载体 PRE112 和  $\Delta znuA$  片段,纯化回收后用 T4 DNA 连接酶连接(反应体系和反应条件按说明书操作),转化大肠埃希菌 DH5 $\alpha$   $\lambda$  pir,经菌落 PCR 鉴定、双酶切验证并基因测序正确,获得自杀性同源重组质粒 pRE-M5- $\Delta znuA$ 。

1.4.3 缺失株 M5- $\Delta znuA$  和 M5- $\Delta bp26$ - $\Delta znuA$  的构建 参考潘文等<sup>[8]</sup>,制备 M5 和 M5- $\Delta bp26$  感受态细胞,将自杀性质粒 pRE-M5- $\Delta znuA$  分别电转入 2 种感受态细胞,恢复质粒抗性后涂布 TSA-YE-Cm 平板,37 °C 培养约 72 h,随机挑选单交换子,菌落 PCR 验证,得到 2 菌株的同源重组单交换子。分别挑取上述 2 组同源重组单交换子接种至 TSB-YE 中培养约 20 h,菌液适当稀释后涂 TSA-YE-Sucrose 平板培养 72 ~ 96 h,利用自杀质粒 PRE112 中 *sacB* 基因对蔗糖的敏感性进行筛选,经 PCR 验证和基因测序正确,获得 M5 和 M5- $\Delta bp26$  缺失 *znuA* 基因的同源重组双交换子,即布鲁菌单基因缺失株 M5- $\Delta znuA$  和双基因缺失株 M5- $\Delta bp26$ - $\Delta znuA$ 。

## 1.5 缺失株 M5- $\Delta znuA$ 和 M5- $\Delta bp26$ - $\Delta znuA$ 的生物学特性及遗传稳定性鉴定

1.5.1 形态学和生化特性鉴定 将 2 种缺失株 M5- $\Delta znuA$ 、M5- $\Delta bp26$ - $\Delta znuA$  和亲本株 M5 在 TSA-YE 上培养约 48 h,待长出单菌落后肉眼观察菌落形态。挑单菌落接种至 TSB-YE 中,37 °C 摇床振荡培养约 24 h,用革兰染色法和科兹洛夫斯基法染色,显微镜下观察细菌形态及染色情况。通过糖发酵试验、枸橼酸盐利用试验、吡啶试验等几种生化试验,比较缺失株与亲本株之间的生化特性差异。

1.5.2 生长特性 分别培养 M5、M5- $\Delta znuA$  和 M5- $\Delta bp26$ - $\Delta znuA$  纯培养菌液,分别将各菌液浓度调整一致( $D_{600\text{ nm}}$  为 0.6),按体积比 1:100 接种至 TSB-YE 液体培养基中,37 °C 200 r·min<sup>-1</sup> 振荡培养,隔 4 h 取 1 mL 菌液测定其  $D_{600\text{ nm}}$  并做 10 倍系列稀释后涂布 TSA-YE 平板,统计 3 株菌 72 h 内菌落数,绘制生长曲线。遗传稳定性测定: M5- $\Delta znuA$  和 M5- $\Delta bp26$ - $\Delta znuA$  在培养基上连续传 20 代,隔代次进行菌落 PCR 鉴定,确定缺失株的体外传代稳定性。

## 1.6 缺失株对 Balb/c 小鼠的毒力测定

将 3 种缺失株 M5- $\Delta bp26$ 、M5- $\Delta znuA$ 、M5- $\Delta bp26$ - $\Delta znuA$  和亲本株 M5 在 TSB-YE 中培养约 24 h,离心收集菌体,PBS 清洗重悬后进行细菌计数,按 10<sup>8</sup> CFU 的量调整菌液浓度,再分别以每只 0.2 mL 腹腔接种 5~6 周龄雌性 Balb/c 小鼠各 12 只,空白对照组为接种等量的 PBS,接种 3 d 内观察所有小鼠存活

情况。接种后的第 2、4、6、8 周分别按每组 3 只对各组小鼠称体质量,断颈处死后无菌取脾脏称质量并研磨成匀浆,脾脏匀浆作 10 倍系列稀释涂布 TSA-YE 平板,进行菌数量计数。

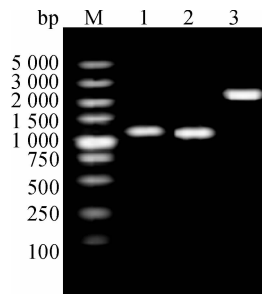
## 1.7 缺失株对 Balb/c 小鼠的免疫原性评估

培养 M5、M5- $\Delta bp26$ 、M5- $\Delta znuA$ 、M5- $\Delta bp26$ - $\Delta znuA$  4 株菌的纯培养菌液,以 PBS 溶液为空白对照,分别以每只 5 × 10<sup>5</sup> CFU 的剂量腹腔接种 Balb/c 小鼠,接种后 8 周内每隔 1 周每组各取 3 只小鼠眼眶静脉采血分离血清,作为待检样本保存备用。以布鲁菌 BL 融合蛋白为包被抗原进行间接 ELISA 检测,按照常艳等<sup>[9]</sup>建立的方法,确定最佳抗原浓度及血清稀释比例,iELISA 方法检测待检血清中 BL 特异性抗体水平。

## 2 结果与分析

### 2.1 M5 株 $\Delta znuA$ 片段的构建

对 M5 株 *znuA* 基因左右端同源臂分别扩增,得到左端同源臂 ZN-L 片段大小为 1 098 bp;右端同源臂 ZN-R 片段大小为 1 149 bp。以 ZN-L、ZN-R 为模板进行 overlap PCR 扩增,得到缺失中间 *znuA* 基因的大小为 2 247 bp 的片段,与理论值相符,表明  $\Delta znuA$  片段构建成功(图 1)。



M: DNA marker DL5000; 1: 左端同源臂 ZN-L; 2: 右端同源臂 ZN-R; 3:  $\Delta znuA$  片段。

图 1 布鲁菌 M5 株 *znuA* 基因左右端同源臂 ZN-L、ZN-R 片段及  $\Delta znuA$  片段的 PCR 扩增

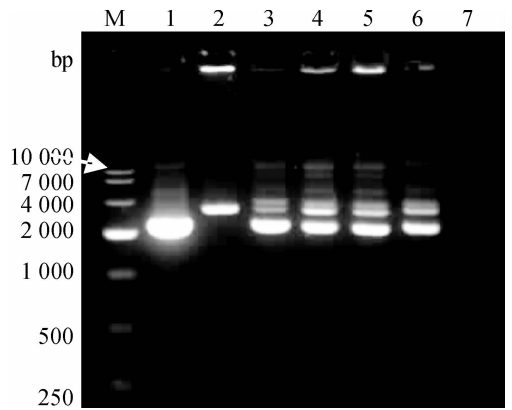
Fig. 1 PCR amplification of *znuA* gene about up homologous arms ZN-L and down homologous arms ZN-R and the  $\Delta znuA$  of *Brucella* M5 strain

### 2.2 重组自杀质粒 pRE-M5- $\Delta znuA$ 的构建

*Kpn* I、*Sac* I 双酶切 PRE112 和  $\Delta znuA$  并对两者进行连接,连接产物转化大肠埃希菌 DH5 $\alpha$   $\lambda$  pir,随机挑选转化子用引物 F1 和 R2 进行菌落 PCR 验证,阳性克隆获得后进行质粒抽提,对其双酶切 PCR 验证并送交测序,酶切验证结果与  $\Delta znuA$  片段大小相同为 2 247 bp,测序结果与  $\Delta znuA$  片段序列完全一致,表明重组自杀质粒 pRE-M5- $\Delta znuA$  构建成功。

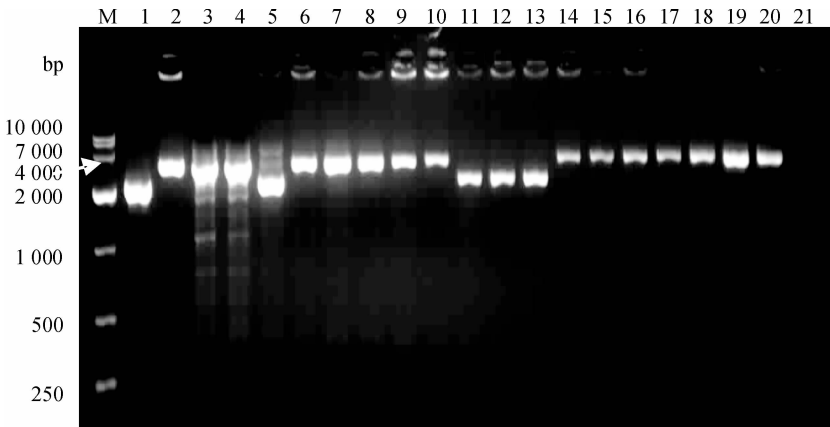
### 2.3 缺失株 M5-ΔznuA 和 M5-Δbp26-ΔznuA 的筛选与鉴定

自杀性质粒 pRE-M5-ΔznuA 在 1.8 kV、400 Ω、25 μF 的电场强度下分别电转入 M5 和 M5-Δbp26 感受态细胞中,通过氯霉素抗性平板筛选获得的阳性克隆用引物 F1/R2 进行扩增,从 PCR 产物的凝胶电泳图中可观察到在 3 180 与 2 247 bp 处的 2 条片段,验证结果与预期相符(如图 2,以 M5-ΔznuA 为例),得到同源重组单交换子.利用 pRE-M5-ΔznuA 质粒中含有的 *sacB* 基因对蔗糖的敏感性,将同源重组单交换子在 TSA-YE-Sucrose 中培养筛选得到同源重组双交换子,PCR 扩增,凝胶电泳图显示条带大小为 2 247 bp,与预期结果相符(如图 3,以 M5-ΔznuA 为例).送测序验证正确,得到目标菌株 M5-ΔznuA 和 M5-Δbp26-ΔznuA.



M:DNA marker DL10000;1:M5 株 ΔznuA 阳性对照; 2:M5 株 znuA 阳性对照;3~6:M5-ΔznuA 同源重组单交换子的 PCR 产物;7:阴性对照.

图 2 布鲁菌 M5-ΔznuA 株同源重组单交换子的 PCR 鉴定  
Fig. 2 PCR identification of homologous recombination single crossover of *Brucella* M5-ΔznuA strain



M:DNA marker DL10000;1:M5 株 ΔznuA 阳性对照 2:M5 株 znuA 阳性对照; 3~20:同源重组双交换子 PCR 产物,其中 5、11、12、13 泳道为 M5-ΔznuA; 21:阴性对照.

图 3 布鲁菌 M5-ΔznuA 株同源重组双交换子的 PCR 鉴定

Fig. 3 PCR identification of homologous recombination double crossover of *Brucella* M5-ΔznuA strain

### 2.4 缺失株的生长特性及遗传稳定性测定

将 2 株缺失株和亲本株 M5 分别在 TSA-YE 培养基上划线培养 72 h 后,均长出无色半透明、表面圆润光滑、边缘整齐、圆形稍隆起、均质样的露滴状单菌落;在液体培养基中均匀浑浊生长,不透明;2 种缺失株菌落涂片革兰染色镜检,菌体均被染成红色、单个散在的、无鞭毛无芽孢球杆状菌;科兹洛夫斯基染色镜检,2 种缺失株的菌体均被染成红色,而其他的组织细胞及杂物均被染成绿色,与布鲁菌 M5 的染色特性一致.多种生化反应试验显示缺失株与亲本株在生长特性上没有差异(表 1).

以相同的剂量在 TSB-YE 中分别培养 M5、M5-ΔznuA 和 M5-Δbp26-ΔznuA 菌液共 72 h,每 4 h 吸取 1 mL 菌液,10 倍系列稀释后涂布于 TSA-YE 平板,37 °C 培养 48~72 h,记录平板上的菌落数,并绘制生长曲线,如图 4 所示,构建的 2 种缺失株与亲本株

的生长特性无显著性差异,表明在营养充足的条件下单基因缺失(*znuA*)或双基因缺失(*znuA*、*bp26*)不会影响布鲁菌的生长. M5-ΔznuA 和 M5-Δbp26-ΔznuA 体外传代培养至 20 代,隔代次进行菌落 PCR 和基因测序,均未发生回复突变,表明 2 种缺失株遗传稳定性良好(图 5,仅以 M5-ΔznuA 为例).

表 1 3 种菌株的生化特性鉴定结果<sup>1)</sup>

Tab. 1 The biochemical characteristics of three *Brucella* mutant strains

生化试验名称	M5	M5-ΔznuA	M5-Δbp26-ΔznuA
糖发酵试验	+	+	+
V-P 试验	-	-	-
利用枸橼酸钠	-	-	-
H <sub>2</sub> S 产生试验	-	-	-
CO <sub>2</sub> 利用试验	-	-	-
明胶液化试验	-	-	-

1)“+”表示阳性反应,“-”表示阴性反应.

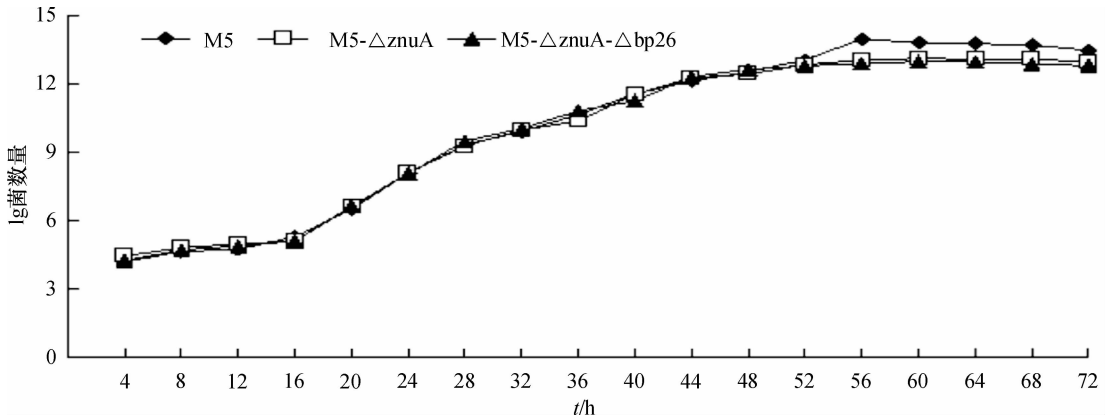
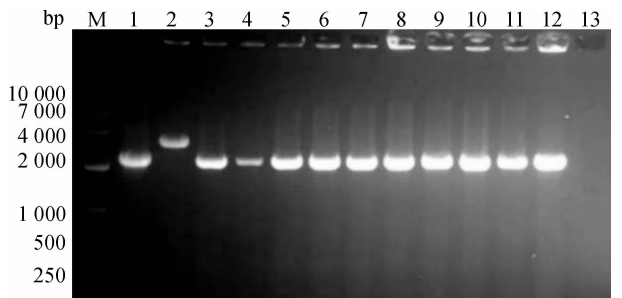


图4 布鲁菌 M5、M5-ΔznuA 及 M5-Δbp26-ΔznuA 株的生长曲线

Fig. 4 Growth curves of *Brucella* M5, M5-ΔznuA and M5-Δbp26-ΔznuA strains



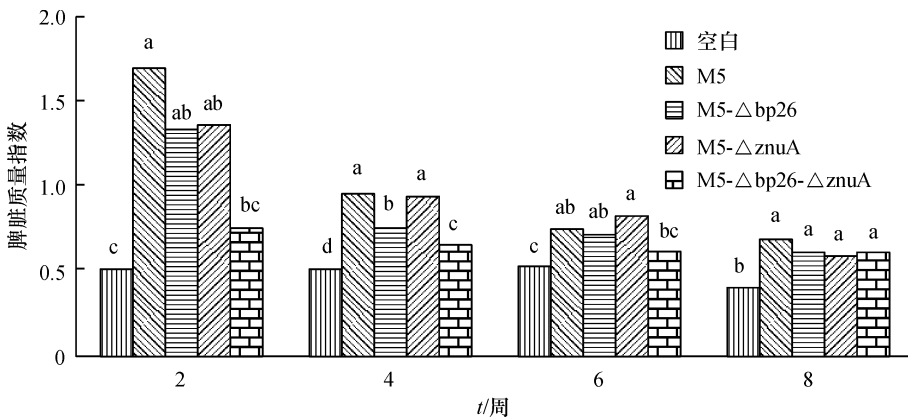
M; DNA marker DL10000; 1: M5 株 ΔznuA 阳性对照; 2: M5 株 znuA 阳性对照; 3~12: 缺失株 M5-ΔznuA 第 2、4、6、8、10、12、14、16、18、20 代菌落的 PCR 鉴定; 13: 阴性对照.

图5 布鲁菌 M5-ΔznuA 株遗传稳定性的 PCR 鉴定

Fig. 5 PCR identification of genetic stability of *Brucella* M5-ΔznuA strain

2.5 3种缺失株对 Balb/c 小鼠的毒力测定结果

5~6 周龄的雌性 Balb/c 小鼠, 每只小鼠腹腔注射  $10^8$  CFU 的待测菌液, 并在接种的 3 d 之内每天观察小鼠的精神状态直至恢复正常为止. 接种后 24~48 h 内亲本株 M5 及 3 种缺失株 M5-Δbp26、M5-ΔznuA 和 M5-Δbp26-ΔznuA 组内小鼠暂时出现轻度的精神萎靡、被毛凌乱现象, 在 72 h 内均恢复正常, 未见死亡, 对照组全部正常, 表明缺失株对小鼠具有良好的安全性. 接种后每个试验组每 2 周随机取 3 只小鼠, 称体质量, 无菌取脾称质量, 以每 10 g 体质量中脾脏所占质量 (mg) 表示脾脏质量指数, 如图 6 所示, 布鲁菌减毒活疫苗的接种均会引起小鼠脾脏的肿大, 脾脏的肿大程度随着时间的延长而逐渐减



脾脏质量指数为每 10 g 体质量中脾脏所占质量 (mg); 图中同一时间点不同柱子上凡是有有一个相同小写字母者, 表示差异不显著 ( $P < 0.05$ , 单因素方差分析).

图6 接种 M5、M5-Δbp26、M5-ΔznuA 和 M5-Δbp26-ΔznuA 后小鼠脾脏质量指数测定

Fig. 6 Spleen mass of mice infected with M5, M5-Δbp26, M5-ΔznuA and M5-Δbp26-ΔznuA

弱, 尤其在接种后 4 周, 脾脏的肿胀程度明显低于接种后 2 周. 接种后 4~8 周 3 株缺失株脾脏的质量变化与 PBS 的空白组比较变化不大. 从图 6 中, 可知 3 种基因缺失株引起脾脏的肿胀程度均低于亲本株 M5. 在 3 种缺失突变株中, 双基因缺失株 M5-Δbp26-ΔznuA 试验组的脾脏指数最小与亲本株 M5 具有显

著性差异, 此外, 与单基因缺失株 M5-ΔznuA 组及 M5-Δbp26 组也成显著性差异.

将上述脾脏研磨成匀浆, PBS 倍比稀释后涂布于 TSA-YE 平板, 菌落计数结果如图 7, 在接种 8 周内可见 3 种缺失株在小鼠体内的脾菌数残留量均随时间而逐渐减少 (被排出体外), 其中亲本株 M5 的

脾菌数残留量呈平稳降低态势,在8周时仍维持 $4.46 \lg_{10}$ 左右的量,高于其余3株缺失株 M5- $\Delta$ bp26、M5- $\Delta$ znuA 和 M5- $\Delta$ bp26- $\Delta$ znuA 约 $2.0 \lg_{10}$ ,有着较强的毒力;M5- $\Delta$ bp26- $\Delta$ znuA 在脾脏内残留菌数量最少,免疫2周时较 M5 低 $0.75 \lg_{10}$ ,并随时间呈逐渐减少趋势,8周时脾脏内所含的菌数量约 $2.5 \lg_{10}$ ,基本被清出小鼠体外.在接种后8周时,脾菌数残留量为 M5 > M5- $\Delta$ bp26 > M5- $\Delta$ znuA > M5- $\Delta$ bp26- $\Delta$ znuA,表明单基因缺失株 M5- $\Delta$ znuA 和 M5- $\Delta$ bp26 的毒力较之亲本株 M5 有所降低,而双基因缺失株 M5- $\Delta$ bp26- $\Delta$ znuA 的毒力最低.

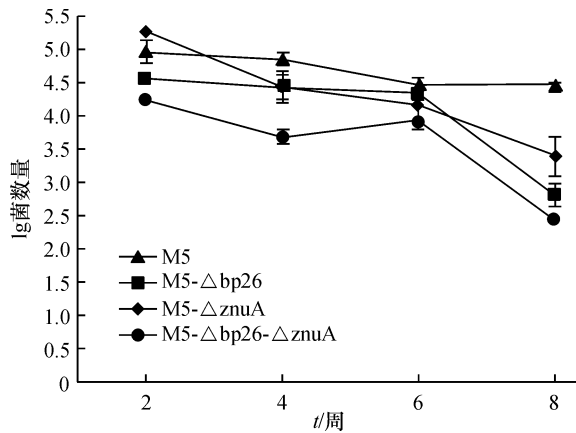


图7 M5、M5- $\Delta$ znuA、M5- $\Delta$ bp26、M5- $\Delta$ bp26- $\Delta$ znuA 接种小鼠脾脏细菌残留量测定结果

Fig. 7 Test results of bacterial residue of M5, M5- $\Delta$ znuA, M5- $\Delta$ bp26 and M5- $\Delta$ bp26- $\Delta$ znuA in the spleen of infected mice

### 2.6 3种缺失株免疫小鼠产生特异性抗体水平的检测结果

M5 株和 M5- $\Delta$ znuA、M5- $\Delta$ bp26、M5- $\Delta$ bp26- $\Delta$ znuA 株分别以 $5 \times 10^5$  CFU 剂量免疫小鼠,每2周眼窝静脉采集1次血清,iELISA 检测方法检测血清中抗 BLS-L7/L12 蛋白特异性抗体的产生量.抗原的包被浓度 $5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、血清稀释度1:80时为 P/N 最优值,测定结果如图8,M5 和 M5- $\Delta$ znuA 株接种小鼠诱导产生的 BLS-L7/L12 特异性抗体水平随时间变化趋势基本一致,且均在免疫小鼠后4周时达到峰值,此时 M5 抗体量略高于 M5- $\Delta$ znuA,随着时间的延长,各自特异性抗体量也逐渐下降直至维持在稳定的同等水平内,表明 M5- $\Delta$ znuA 与 M5 株均能引起小鼠产生相应程度的免疫应答;而 M5- $\Delta$ bp26 和 M5- $\Delta$ bp26- $\Delta$ znuA 株诱导小鼠产生特异性抗体的量在第6周时达到峰值,其中前者在前4周内产生的抗体量与 M5 在2周内产生的抗体量几乎相同,随时间延长逐渐增加至与 M5 峰量几乎等值,说明 bp26 基因的缺失对疫苗株的免疫原性影响不大,与 M5 相比仅在

短期免疫的过程中产生免疫应答的时间略有推迟.后者在4周内诱导小鼠产生的抗体量已与 M5 株相同,其峰值量则远远高于亲本株 M5.

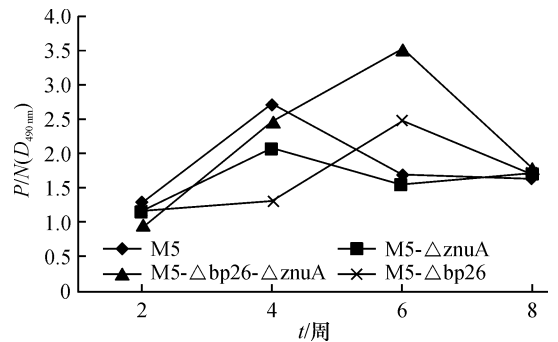


图8 免疫小鼠血清中 BL 特异性抗体间接 ELISA 测定结果  
Fig. 8 iELISA results of antibody responses to BL in the serum of mouse immunized

## 3 讨论

布鲁菌为细胞内寄生的兼性需氧型革兰阴性菌,可引起多种动物和人的感染,其感染动物后主要通过进入宿主细胞生存繁殖并产生毒力作用造成致病<sup>[10]</sup>.布鲁菌毒力基因的存在,一方面使该菌逃避吞噬细胞的抗菌作用,成功进入宿主细胞内寄生繁殖,造成细胞损伤;另一方面也可使该菌避免宿主细胞的杀害机制而引起长期的细胞毒性与慢性感染<sup>[10-12]</sup>.因此,改造诱发布鲁菌产生毒力的基因可极大地降低该菌的细胞损伤能力,从而降低致病力.

ABC 转运蛋白是一种在微生物中普遍存在的具有一系列功能的载体蛋白,对细菌获取和运输所需的各种营养物质,影响部分病原菌的致病过程等方面起到重要作用<sup>[13]</sup>.锌离子作为细菌多种结构蛋白的组成成分和代谢过程的催化因子,是细菌生长所必须的微量元素.高亲和力的 ZnuABC 是细菌主要的锌吸收转运系统,存在于大肠埃希菌、嗜血杆菌、淋球菌、巴斯德菌、布鲁菌等多种菌体中,ZnuABC 不仅参与锌的运输,还和多种病原菌的致病性相关<sup>[5,14-18]</sup>.Yang 等<sup>[16-17]</sup>将流产布鲁菌 *Brucella abortus* 2308 中的 znuA 基因敲除,证明了  $\Delta$ znuA2308 菌株抵抗巨噬细胞吞噬的能力下降、对 Balb/c 小鼠的毒力小且免疫保护力与 S19、RB51 相当.在此基础上他们又构建了1株 znuA 和 purE 双基因缺失株  $\Delta$ znuA $\Delta$ purE2308,该株显示出对小鼠单剂量毒力高于  $\Delta$ znuA2308 株,双剂量毒力与  $\Delta$ znuA2308 相当的特性,但无论单基因缺失株还是双基因缺失株、无论接种小鼠的剂量大小,均比 S19 疫苗株对小鼠的毒力要低,因此缺失株  $\Delta$ znuA2308 和  $\Delta$ znuA- $\Delta$ purE2308 均可作为布鲁菌新

型疫苗潜在候选者进行研究与开发。

本研究,以羊种布鲁菌减毒活疫苗 M5 株及缺失 *bp26* 基因的 M5- $\Delta$ *bp26* 缺失突变株为亲本株,通过 Overlap PCR 方法扩增获得了缺失 *znuA* 基因的片段  $\Delta$ *znuA*。利用含有 *sacB* 基因的自杀质粒 PRE112 为载体,通过等位基因交换的方法成功敲除布鲁菌的重要抗原基因 *znuA*,构建了具有非抗性基因标记的缺失株 M5- $\Delta$ *znuA* 和 M5- $\Delta$ *bp26*- $\Delta$ *znuA*。构建的 2 株缺失株在形态、生长、培养、染色、生化等生物学特性方面与亲本株基本保持一致,且体外遗传性状稳定,为开发新型布鲁菌疫苗奠定基础。

通过对比 M5- $\Delta$ *znuA*、M5- $\Delta$ *bp26* 株与 M5 株之间的脾脏菌数残留量(即小鼠康复时间)和脾脏质量指数来判断缺失株的毒力大小,发现 M5- $\Delta$ *znuA* 株比 M5 株毒力有明显的减小,比前人<sup>[18-19]</sup>构建的流产型布鲁菌 *znuA* 基因缺失株在 HeLa 细胞和巨噬细胞内的生存力低,较亲本株毒力小,杜克嗜血杆菌 *Haemophilus ducreyi* 缺失 *znuA* 基因突变株<sup>[6]</sup>构建的  $\Delta$ *znuA2308* 缺失株具有巨噬细胞内生存能力低、对 Balb/c 小鼠毒力小且免疫保护力与 S19、RB51 相当的研究结论相符。缺失株 M5- $\Delta$ *bp26*(兽医微生物学与免疫学教研室保存)的毒力检测中发现其比亲本株 M5 引起小鼠的炎症反应稍弱,差异并不显著,小鼠康复时间(脾菌数残留量)与亲本株 M5 的基本保持一致,说明 M5- $\Delta$ *bp26* 株在对小鼠的毒力方面与 M5 株相差不大,与胡森<sup>[23]</sup>构建的 1 株布鲁菌 *bp26* 基因缺失株 M5-90-26 在安全性及免疫原性方面与亲本株相比均未发生改变,并具备从血清学角度区分人工免疫和自然感染布鲁菌的优势的研究结果一致。在对 2 种缺失株毒力大小进行对比的试验中我们得出 M5- $\Delta$ *bp26* 株比 M5 株的毒力减弱程度不如 M5- $\Delta$ *znuA* 株的结论。

本研究在 M5- $\Delta$ *bp26* 株的基础上又敲除了 *znuA* 基因,构建 1 株双基因缺失株 M5- $\Delta$ *bp26*- $\Delta$ *znuA*,期望为开发安全性好、毒力小、能保持良好免疫原性又能从血清学角度区分人工免疫和野毒感染的布鲁菌新型疫苗提供新的途径。研究表明,*bp26* 和 *znuA* 双基因的缺失对亲本株 M5 的生物学特性无影响,且 M5- $\Delta$ *bp26*- $\Delta$ *znuA* 株对小鼠的毒力远远低于亲本株,也比 2 株单基因缺失株要低,呈显著性差异。陈瑞花等<sup>[24]</sup>构建 *bp26* 基因缺失株 M5-90 $\Delta$ *bp26* 并表达了 BP26 蛋白,胚胎滋养层细胞侵染结果表明 BP26 蛋白对细胞具有毒性作用,且缺失株 M5-90 $\Delta$ *bp26* 的细胞毒性小于亲本株,但由于缺失株在侵染细胞后仍

<http://xuebao.scau.edu.cn>

产生大量脱落和溶解的细胞,说明 *bp26* 基因可能是协同多种基因在布鲁菌侵染细胞的过程中发挥细胞毒性作用。本试验结果与此结论相符。

我们又通过对比 M5 株和 3 种缺失株在诱导小鼠产生特异性抗体水平方面进行了缺失株免疫原性的研究,发现 M5- $\Delta$ *bp26*- $\Delta$ *znuA* 株诱发小鼠产生的特异性抗体水平比 M5 和 M5- $\Delta$ *bp26*、M5- $\Delta$ *znuA* 株均强,具有更好的免疫原性,而 *bp26* 基因缺失株 M5- $\Delta$ *bp26* 的免疫原性与亲本株基本保持一致,仅在产生免疫应答的时间上较 M5 株推迟了 2 周。推测 *znuA* 和 *bp26* 基因在机体对布鲁菌的免疫过程中可能具有一定的相关性作用。缺失株 M5- $\Delta$ *znuA* 产生的抗体量消长趋势与 M5 株基本一致,维持时间与脾菌数残留时间成正相关,说明该菌株也能诱导小鼠产生相应的免疫应答,保持了相对良好的免疫原性,与李先富等<sup>[25]</sup>研究的猪链球菌 *Streptococcus suis* 中 ZnuA 蛋白对小鼠具有良好的免疫保护作用结论基本相符。

综上所述,本研究对布鲁菌 M5 株进行基因改造,构建了 2 株基因缺失株 M5- $\Delta$ *znuA* 和 M5- $\Delta$ *bp26*- $\Delta$ *znuA*,进一步证实了潘文等<sup>[8]</sup>非抗性基因标记方法的可行性。在几种缺失株与亲本株的毒力、免疫原性比较方面,发现 M5- $\Delta$ *znuA* 株在毒力降低的同时保持了自身良好的免疫原性,而双基因缺失株 M5- $\Delta$ *bp26*- $\Delta$ *znuA* 毒力最低、免疫原性最好,又基于 *bp26* 基因的缺失标记使该菌株具有能在血清学诊断方面区别人工免疫或野毒感染的优势。布鲁菌单基因缺失株 M5- $\Delta$ *znuA* 和双基因缺失株 M5- $\Delta$ *bp26*- $\Delta$ *znuA* 的构建为布鲁菌新型疫苗的研究提供新的途径,也为研究布鲁菌 Bp26 蛋白与 ZnuA 蛋白在布鲁菌致病过程中<sup>[26]</sup>的相互关系奠定了基础。

#### 参考文献:

- [1] SHANG D Q, XIAO D L, YIN J M. Epidemiology and control of brucellosis in China[J]. *Vet Microbiol*, 2002, 90(1/2/3/4):165-182.
- [2] SCHURIG G G, SRIRANGANATHAN N, CORBEL M J. Brucellosis vaccines: Past, present and future[J]. *Vet Microbiol*, 2002, 90(1/2/3/4):479-496.
- [3] BLASCO J M. A review of the use of *B. melitensis* Rev. 1 vaccine in adult sheep and goats[J]. *Prev Vet Med*, 1997, 31(3/4):275-283.
- [4] 王华丙,张振义,包锐,等. ABC 转运蛋白的结构与转运机制[J]. *生命的化学*, 2007, 27(3):208-209.
- [5] CHEN C Y, MORSE S A. Identification and characterization of a high-affinity zinc uptake system in *Neisseria gon-*

- orrhoeae[J]. FEMS Microbiol Lett, 2001, 202(1): 67-71.
- [6] LEWIS D A, KLESNEY-TAIT J, LUMBLEY S R, et al. Identification of the znuA-encoded periplasmic zinc transport of *Haemophilus ducreyi*[J]. Infect Immun, 1999, 67(10): 5060-5068.
- [7] AMMENDOLA S, PASQUALI P, PISTOIA C, et al. High-affinity Zn<sup>2+</sup> uptake system ZnuABC is required for bacterial zinc homeostasis in intracellular environments and contributes to the virulence of *Salmonella enteric*[J]. Infect Immun, 2007, 75(12): 5867-5876.
- [8] 潘文, 王佳莹, 赵明秋, 等. 布鲁氏菌 bp26 基因缺失株的构建[J]. 中国兽医科学, 2011, 41(3): 280-286.
- [9] 常艳, 王佳莹, 吴云燕, 等. 布鲁菌 bp26 基因的表达与 bp26-间接 ELISA 抗体检测试剂盒的研制[J]. 中国畜牧兽医, 2013, 40(11): 21-25.
- [10] FINLAY B, FALKOW S. Common themes in microbial pathogenicity revisited [J]. Microbiol Mol Biol Rev, 1997, 61(2): 136-169.
- [11] COMERCI D J, MARTINEZ-LORENZO M J, SIEIRA R. et al. Essential role of the VirB machinery in the maturation of the *Brucella abortus*-containing vacuole[J]. Cell Microbiol, 2001, 3(3): 159-168.
- [12] WATARAI M, MAKINO S I, SHIRAHATA T. An essential virulence protein of *Brucella abortus*, VirB4, requires an intact nucleoside-triphosphate-binding domain[J]. Microbiology, 2002, 184(5): 1439-1446.
- [13] GARMORY H S, TITBALL R W. ATP-binding cassette transporters are targets for the development of antibacterial vaccines and therapies[J]. Infect Immun, 2004, 72(12): 6757-6763.
- [14] PATZER S I, HANTKE K. The zinc-responsive regulator Zur and its control of the znu gene cluster-encoding the ZnuABC zinc uptake system in *Escherichia coli*[J]. J Biol Chem, 2000, 275(24): 321-332.
- [15] KIM S, WATANABE K, SHIRAHATA T, et al. Zinc uptake system (znuA locus) of *Brucella abortus* is essential for intracellular survival and virulence in mice[J]. J Vet Med Sci, 2004, 66(9): 1059-1063.
- [16] YANG X, BECKER T, WALTERS N, et al. Deletion of znuA virulence factor attenuates *Brucella abortus* and confers protection against wile-type challenge[J]. Infect Immun, 2006, 74(7): 3874-3879.
- [17] YANG X H, THOMBURG T, WALTERS N, et al. ΔznuAΔpurE *Brucella abortus* 2308 mutant as a live vaccine candidate[J]. Vaccine, 2010, 28(4): 1069-1074.
- [18] 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]. Infect Immun, 2003, 71(6): 3020-3027.
- [19] SUK K, KENTA W, TOSHIKAZU S, et al. Zinc uptake system(znuA locus) of *Brucella abortus* is essential for intracellular survival and virulence in mice [J]. J Vet Med Sci, 2004, 66(9): 1059-1064.
- [20] GARRIDO M E, BOSCH M, MEDINA R, et al. The high affinity zinc-uptake system znuACB is under control of the iron-uptake regulator (fur) gene in the animal pathogen *Pasteurella multocida*[J]. FEMS Microbiol Lett, 2003, 221(1): 1092-1097.
- [21] CAMPOY S, JARA M, BUSQUETS N, et al. Role of the high-affinity zinc uptake znuACB system in *Salmonella enteric* serovar typhimurium virulence [J]. Infect Immun, 2002, 70(8): 4721-4725.
- [22] YANG X, BECKER T, WALTERS N, et al. Deletion of znuA virulence factor attenuates *Brucella abortus* and confers protection against wile-type challenge[J]. Infect Immun, 2006, 74(7): 3874-3879.
- [23] 胡森. 马耳他布鲁氏菌 M5-90 bp26 基因缺失疫苗株的构建及安全性和免疫原性评估[D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2009.
- [24] 陈瑞花, 张辉, 唐利燕, 等. 布鲁氏菌外膜蛋白 BP26 细胞毒性作用的研究[J]. 中国农业科学, 2012, 45(16): 2406-3413.
- [25] 李先富, 潘秀珍, 韩明月, 等. 2 型猪链球菌锌转运蛋白 A 对小鼠免疫保护作用[J]. 中国公共卫生, 2012, 28(1): 42-44.

【责任编辑 柴 焯】