

# 痢疾杆菌福氏 2a *sf301DsbA/virG* 双突变减毒活候选疫苗 构建和初步鉴定

杨筱凤 周 乐 郑 瑾 司履生 王一理\*

(西安交通大学 生物医学信息工程教育部重点实验室 生命科学与技术学院癌症研究所 西安 710061)

**摘 要:**为预防细菌性痢疾的爆发和流行,构建志贺氏福氏 2a 减毒活疫苗。选用中国痢疾杆菌主要流行株 *sf301* 为受体菌,通过基因重组交换技术,突变细菌 *DsbA* 和 *virG* 基因,并以 Serney 试验和 HeLa 细胞侵袭实验鉴定突变菌株 *sf301*  $\triangle virG$  :*DsbA33G* 毒力和侵袭力,采用豚鼠结肠囊接种免疫动物,检测突变菌株免疫原性,了解候选疫苗对免疫动物的保护能力。与野生亲本比较 *sf301*  $\triangle virG$  :*DsbA33G* 已完全丧失毒力,但保留了一定的侵袭力。与未接受免疫的对照组相比,通过粘膜途径免疫的豚鼠,无论是单次免疫,还是双免疫策略都可以诱发血清和胃肠道粘膜部位产生特异性抗 *sf301* LPS IgG 和 IgA,面部、胃肠道引流淋巴结和脾脏中 IgG 和 IgA 抗体分泌细胞(Antibody secreting cells ASCs)数目显著性增高,两种免疫方案都可给免疫动物提供 100% 抵抗野生亲本毒株攻击的能力。初步动物实验结果提示构建的福氏 2a 活疫苗 *sf301*  $\triangle virG$  :*DsbA33G* 是一种潜在的候选痢疾疫苗。

**关键词:**细菌性痢疾,福氏 2a 痢疾杆菌,减毒活疫苗

中图分类号:R378.2.5 文献标识码:A 文章编号:1001-6209(2005)05-0748-06

细菌性痢疾是由痢疾杆菌感染引起的一种急性肠道病,是世界上流行非常严重的传染病,据 WHO 新的统计报告,全球每年菌痢的发病人数高达两亿,死亡人数达 600000 之多,其中 80% 以上在发展中国家<sup>[1]</sup>。在我国,菌痢的发病率位于 24 种法定甲、乙类传染病的前列,每年发病人数达 200 万<sup>[2]</sup>,痢疾杆菌分为志贺氏、福氏、鲍氏和宋内氏 4 种血清型,人和灵长类动物的回结肠上皮细胞是它们的唯一宿主。在我国,由福氏菌感染引发的痢疾占总发病率的 70%,20% 左右由宋内氏引起,细菌性痢疾除造成患者腹痛和腹泻外,也是六岁以下儿童死亡的主要感染致病因素之一,此外,志贺氏菌感染在军事医学上也有重要的意义,美国在 1998 年海湾战争中,参战人员中 26% 的腹泻是由志贺氏菌感染引起,其中 60% 的患病者不能参战执行任务<sup>[3]</sup>。在致肠病性病原体中,痢疾杆菌的毒力非常强,10 至 100 个活菌就可使没有免疫力的人患病(伤寒杆菌致病力为 10000 个)<sup>[4]</sup>,近年来,多药耐药菌株的出现使得疫苗开发更为迫切。口服或经肠外给予灭活疫苗并不能刺激宿主产生有效的保护性免疫,自然感染仅能获得短暂的型特异性保护性免疫<sup>[5]</sup>。因而,根据目前已知的痢疾杆菌的致病机理,制备保留一定的

侵袭力,但消除细胞间播散能力的口服减毒活疫苗可能是一种合理的选择,基于这一原理,目前已有相关候选疫苗的报道,如突变痢疾杆菌侵袭性大质粒(*virG*)或和其他细菌生化代谢所需的基因 *aroA*, *aroD*, *thyA*, *iuc* 等<sup>[6-8]</sup>。近年来,我国政府也投入了大量的资金和人力研制开发痢疾疫苗,一些候选疫苗已进入临床一期试验<sup>[9,10]</sup>。最近发现,细菌质周腔蛋白二硫键催化蛋白 *DsbA*,在痢疾杆菌细胞间播散中有重要的作用,缺失突变基因 *DsbA* 可使细菌失去细胞间播散能力并使毒力消失<sup>[11]</sup>,提示其可能是一个潜在的疫苗开发的候选靶点,本研究以我国流行菌株 *sf301* 为亲本菌株,构建侵袭基因 *virG* 和二硫键催化剂 *DsbA* 双突变菌株 *sf301*  $\triangle virG$  :*DsbA33G*,细菌在丧失毒力的同时,仍保留一定程度的侵袭力,动物试验初步证实了 *sf301*  $\triangle virG$  :*DsbA33G* 具有良好的安全性和免疫原性,受免疫动物可产生有效的保护性免疫。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 菌株和质粒** 野生性痢疾杆菌选用中国流行的主要菌株福氏 2a 型 *sf301*, p $\triangle virG$  和 p*DsbA33G*

基金项目:国家“863 计划”(2001AA215221),西安交通大学第一医院院基金(2001.YK.21)

\* 通讯作者。Tel/Fax 86-29-82655499, E-mail: wangyili@mail.xjtu.edu.cn

作者简介:杨筱凤(1973-),女,陕西人,西安交通大学主治医师,博士研究生,研究方向为肿瘤免疫。E-mail: yxf73@163.com

收稿日期:2005-02-06,修回日期:2005-06-13

由英国帝国理工大学于军研究员惠赠,自杀载体 pCVD442 中间宿主菌 *cc118λpir*、辅助质粒 pRK2013 由本室保存。

**1.1.2 试剂和动物:**细菌 LB 培养基购自英格兰 Oxoid 公司,所有抗生素和 DTT 购自 Sigma 公司,限制性内切酶购自大连 TaKaRa 公司,细胞培养基 RPMI1640 购自 GIBECO 公司,刚果红(Congo red CR)和其他试剂均为国产试剂分析纯。实验用动物雌性白化豚鼠由西安交通大学实验动物中心提供。

## 1.2 菌株抗性筛选

野生型 *sf301* 生长于 0.01% CR-LB 琼脂平板,挑取红色单菌落接种至 LB 培养基中 37℃ 180r/min 培养至对数生长期后离心,将其涂布在含 100μg/mL 利福霉素 CR-LB 平板上,37℃ 过夜,次日挑取 CR<sup>+</sup> 利福霉素抗性(*Rif<sup>r</sup>*)菌落进一步实验。

## 1.3 菌株突变

对数生长期的 *Rif<sup>r</sup>* CR<sup>+</sup> 野生型 *sf301*、pCVD442 :*virΔG* :*cc118λpir*、pRK2013 按一定比例混合后,接种于无抗性的 LB 平板上进行交配,37℃ 2h 后挑取部分细菌置于 Amp<sup>r</sup> *Rif<sup>r</sup>* CR<sup>+</sup> LB 平板上,37℃ 过夜,次日挑取 CR<sup>+</sup> 菌落并接种于 LB 培养基中扩增,至对数生长期后,按一定比例稀释后接种至 5% 蔗糖低盐培养基 30℃ 过夜,去除载体,诱导第二次重组,次日选取菌落经过氨苄抗性培养基、CR<sup>+</sup> 培养基双重选择,无氨苄抗性的 CR<sup>+</sup> 菌落即为完成第二次重组的候选菌株,将之扩增后经 PCR 鉴定,阳性菌株命名为 *sf301 :virΔG*,依照同样的方法将 pDsbA33G 导入 *sf301 :ΔvirG* 中,经过氨苄抗性培养基、10mmol/L DTT 培养基、CR<sup>+</sup> 培养基三重选择,无氨苄抗性、DTT 敏感的 CR<sup>+</sup> 菌落即为完成第二次同源重组的候选菌株,最后鉴定含有 *ΔvirG*、*DsbA33G* 双重突变基因的菌株命名为 *sf301 :ΔvirG :DsbA33G*。

## 1.4 突变菌株的毒性、侵袭力检测

**1.4.1 突变菌株的毒性:**利用豚鼠角结膜炎模型(Senery 试验)<sup>[12]</sup>检测菌株 *sf301 :ΔvirG :DsbA33G* 的毒力,选用 6~8 周雌性白化豚鼠,取对数生长期的野生型 *sf301* 和 *sf301 :ΔvirG :DsbA33G* 按照  $5 \times 10^8$  CFU/眼滴于豚鼠结膜囊中,每天观察角结膜炎发生,连续一周。评定标准 0 级,无炎症;1 级,轻度炎症或发病延迟和/或迅速复原;2 级,炎症明显但无脓液;3 级,炎症明显并有脓液。

**1.4.2 突变菌株侵袭力检测:**利用 HeLa 细胞检测 *sf301 :ΔvirG :DsbA33G* 侵袭上皮的能力<sup>[13]</sup>,人宫颈

癌细胞株 HeLa 细胞在无抗生素完全培养基(RPMI1640 + 10% FCS)中,培养于 6 孔培养板至半融合状态,按  $5 \times 10^6 \sim 1 \times 10^7$  CFU/孔将对数生长期的细菌加入 6 孔板中,2000r/min 离心 10min,37℃、5% CO<sub>2</sub> 共孵育 30min,吸取多余菌液, Hank's 液充分洗涤后,加入含庆大霉素(50μg/mL)的完全培养液,37℃、5% CO<sub>2</sub> 孵育细胞 90min, PBS 洗涤去除 FCS, 4% 多聚甲醛固定, Giemsa 染色,油镜下观察细胞内杆菌数目。

## 1.5 突变菌株免疫原性和保护试验

**1.5.1 突变菌株免疫原性的检测:**选 6~8 周雌性白化豚鼠,随机分为空白对照组、初次免疫组和加强免疫组,每组动物 6~8 只,分别将 PBS、*sf301 :ΔvirG :DsbA33G* 接种于豚鼠结膜囊,剂量为  $5 \times 10^8 \sim 1 \times 10^9$  CFU/眼/次,初次免疫时间在第 0、2、4 天,加强免疫时间在 14、15 天,免疫前、免疫后两周分别留取动物血清、肠道冲洗液。末次免疫后两周,拉颈处死动物并留取脾脏、淋巴结(颌下淋巴结、肠系膜淋巴结和回肠末端集合淋巴结)。

采用热酚水法自行制备和提纯 *sf301* LPS<sup>[14]</sup>,并以此为抗原,HRP-标记的抗豚鼠 IgG、IgA(DAKO)行 ELISA 法检测血清、体液中抗 *sf301* LPS IgG、IgA 水平,ELISPOT 检测脾脏和淋巴结中 IgG、IgA 抗体分泌细胞(Antibody secrete cells ASCs)<sup>[15]</sup>。

**1.5.2 保护试验:**利用 Senery 试验,在每组实验动物末次免疫后两周,用野生型 *sf301* 细菌攻击免疫动物的结膜囊( $5 \times 10^8$  CFU/眼),每日观察角膜结膜炎发生,连续 5 日,判定减毒菌株的保护效应,评定标准:完全保护,攻击后不发病或只有轻微刺激症状;部分保护,轻度炎症或发病延迟和/或炎症快速清除;无保护效应,角膜结膜明显炎症。

# 2 结果

## 2.1 减毒突变菌株 *sf301 :ΔvirG :DsbA33G* 鉴定

与野生型 *virG* 基因相比,*virΔG* 基因缺失了 212 个碱基对,完成二次同源重组后含有突变 *virΔG* 基因的突变菌株与野生型 *sf301* 相比,PCR 扩增产物比野生型产物小 212bp。

pDsbA33G 中将 *DsbA* 基因第 569~570 核苷酸由原来的 TGCT 变成 TGGA,并引入一个 *EcoRV* 酶切位点,编码第 33 位氨基酸由半胱氨酸变成甘氨酸,从而使 *DsbA33G* 不能形成分子内二硫键,失去原有的还原功能。完成二次同源重组后含有突变 *DsbA33G* 基因的突变菌株与野生 *DsbA* 基因相比,

PCR 产物可以被 *EcoRV* 切开。结果显示,双突变的 *sf301 : ΔvirG :DsbA33G* 的 PCR 扩增产物,可以被 *EcoRV* 切成 3 个不同的条带,而野生型的 *sf301* PCR 产物只能被切成两条带。

## 2.2 突变菌株 *sf301 : ΔvirG :DsbA33G* 毒力和侵袭力

**2.2.1 突变菌株 *sf301 : ΔvirG :DsbA33G* 毒力:** Senery 试验结果显示,与野生亲本 *sf301* 相比,*sf301 : ΔvirG :DsbA33G* 不引起任何程度的豚鼠角膜结膜炎(表 1)。与野生亲本相比,*sf301 : ΔvirG :DsbA33G* 丧失毒力。

表 1 *sf301 : ΔvirG :DsbA33G* 毒力鉴定

Table 1 Comparison *sf301 : ΔvirG :DsbA33G*'s virulence with wild type *sf301* by Senery test

Bacterial strains	Keratoconjunctivitis severity rating				
	0	1	2	3	Total (eyes)
<i>sf301</i>	0	0	0	8	8
<i>sf301 : ΔvirG :DsbA</i>	12	0	0	0	12

**2.2.2 突变菌株 *sf301 : ΔvirG :DsbA33G* 侵袭力:** 对 HeLa 细胞侵袭力检测结果发现,*sf301 : ΔvirG :DsbA33G* 的侵袭力已明显降低,每个 HeLa 细胞中约有 10 个以上野生型 *sf301* 细菌,而 *sf301 : ΔvirG :DsbA33G* 的数目仅有 1~2 个,说明 *sf301 : ΔvirG :DsbA33G* 在丧失毒力的同时仍具有一定的侵袭力(图版 I-A)。在高倍镜下,当侵袭细菌是野生型 *sf301* 时,每个 HeLa 细胞中有 20 个以上 Giemsa 染色呈紫蓝色棒状杆菌,而当侵袭细菌是 *sf301 : ΔvirG :DsbA33G* 时,细胞内杆菌数目只有 1~2 个,说明 *sf301 : ΔvirG :DsbA33G* 只具部分侵袭力。

## 2.3 *sf301 : ΔvirG :DsbA33G* 的免疫原性和保护效应

**2.3.1 *sf301 : ΔvirG :DsbA33G* 的免疫原性:**ELISA 结果表明,无论是一次免疫组还是两次免疫组,血清中抗 *sf301* LPS 的抗体 IgG 和 IgA 水平显著高于对照,但两组比较无统计学上的差异(图版 I-B)。对豚鼠血清、肠道冲洗液用 ELISA 检测后,结果发现,豚鼠经眼结膜囊一次免疫后,血清和体液中即具有抗 LPS 的 IgG 和 IgA 产生,经第二次加强免疫后,血中抗体稍微较前升高,但和第一次免疫后的水平相比,并无显著性差异。ELISPOT 法检测实验动物淋巴结、脾细胞中分泌特异性 IgG、IgA 的细胞频数表明,免疫动物组淋巴细胞 ASCs 的数目显著多于未免疫组,但与 ELISA 结果一致,初次免疫组和加强免疫组之间相比,两种免疫方案结果并无显著性差异(图

版 I-C)。  
**2.3.2 *sf301 : ΔvirG :DsbA33G* 的保护效应:**对经眼结合膜囊免疫的豚鼠,用野生型毒株滴眼行 Senery 试验,结果发现,免疫组动物明显得到保护,即使仅免疫一次的动物,也无一例发生明显的角膜结膜炎,证实无论是用 *sf301 : ΔvirG :DsbA33G* 对动物免疫一次还是免疫两次,都可以完全保护野生型 *sf301* 的攻击。表 2 表明,与阴性对照组相比,免疫组无论是初次免疫组,还是加强免疫组,两种免疫方案都能给免疫动物提供完全的保护效能,无一例发生明显的角结膜炎,证实无论是用 *sf301 : ΔvirG :DsbA33G* 对动物免疫一次还是免疫两次,都可以完全保护免疫动物抵抗野生型 *sf301* 的攻击。

表 2 *sf301 : ΔvirG :DsbA33G* 保护效力

Table 2 The protection efficacy of *sf301 : ΔvirG :DsbA33G* tested by Senery test

Immunization protocol	Protection efficacy (eyes)			
	Fully protection	Partial protection	No protection	Total
Primary group	12	0	0	12
Boosting group	14	0	0	14
PBS group	0	0	10	10

## 3 讨论

随着对肠道致病菌毒力相关基因了解的不断深入和分子生物学技术的发展,通过多位点基因定点突变的策略,使志贺氏杆菌各种毒力基因和/或毒力相关基因突变,构建口服减毒活疫苗成为目前的主要策略,这种减毒活疫苗在去除毒力的同时,保留一定的侵袭力,可使菌苗能够进入肠粘膜上皮,通过滤泡相关粘膜细胞到达肠相关淋巴组织,不引起明显的临床症状,但可有效递呈痢疾抗原<sup>[16,17]</sup>。以自然感染状态进入机体,激发针对细菌 O 抗原和其他毒力基因的粘膜免疫<sup>[18]</sup>。

痢疾杆菌主要的毒力特性表现为细菌在上皮细胞内和细胞间的扩散能力。支持细菌扩散过程顺利进行的功能蛋白大致分为两个功能群,一是影响负责调节细菌在组织中运动的外膜蛋白 IcsA,另一群是参与合成或分泌 Ipa 蛋白的成分,Ipa 蛋白参与上皮细胞膜的溶解。DsbA 基因 *dsbA* 位于细菌染色体上,是一种质周腔中巯基二硫化物还原酶,通过提供二硫键,催化毒力因子中氧化蛋白的折叠,包括 Spa32 的折叠。Spa32 是一种外膜蛋白,与 Mxi 构成志贺氏杆菌 III 型分泌器官。它虽是在细菌入侵上皮时的非必须因素,但 DsbA 有利于 Ipa 蛋白在细胞侵

袭扩散突起中的分泌,对于维持细菌的毒力、保证细菌在细胞间的扩散至关重要<sup>[19]</sup>。本实验采用我国流行的、并已完成测序的福氏 2a 型痢疾杆菌 *sf301* 为亲本<sup>[20]</sup>,首先构建缺失突变的  $\Delta virG$  基因(缺失 212bp),利用同源重组技术置于菌株的侵袭性大质粒中,含有  $\Delta virG$  基因的痢疾杆菌毒力丧失,不能引起豚鼠角结膜炎。*dsbA* 基因属于毒力相关基因,突变的 *DsbA33G* 不能催化 Spa 形成分子间二硫键,含有 *DsbA33G* 突变体的细菌分泌的 Ipa 蛋白减少,双重阻断细菌的细胞内/间播散能力,致细菌毒力减弱,侵袭力下降。但突变菌株 *sf301:  $\Delta virG$ : DsbA33G* 仍具有进入上皮细胞的能力,保留一定的侵袭力,满足作为疫苗候选株的基本条件。从制备减毒活疫苗的角度考虑,免疫原性应是候选疫苗的重要的参数,候选疫苗首先必须能够表达足够量的目的抗原,以诱发有效的保护性免疫反应,通常的解决方案是通过抗生素选择标记提供选择压力,迫使宿主菌携带多拷贝含有目的基因的质粒,并维持该质粒的稳定性。这一策略对于应用生物技术在体外制备疫苗可能是有用的,但这样形成的高拷贝状态通常在体内并不稳定,易于产生分离性丢失 (Segregational loss),而利用同源重组技术将目的基因定点整合到宿主菌染色体虽可解决目的基因的稳定性问题,但一般来说整合的基因位点多表现为单拷贝,导致目的抗原表达量过低而成为其最主要的缺陷。目前利用宿主染色体-载体平衡致死系统较满意的解决了这一问题,这一系统避免了抗生素选择压力,同时可使疫苗中多拷贝质粒高水平表达目的抗原,军事医学科学院曾利用宿主染色体-载体质粒平衡致死系统,构建了不带抗药基因的双价或多价稳定的痢疾疫苗候选株;兰州生物制品研究所研制的福氏 2a 和宋内氏双价口服活疫苗 FS 已进入临床一期试验<sup>[9,10]</sup>。

本实验从志贺氏菌的毒力/侵袭力,即细胞间播散能力考虑,以期选择合适的靶点,使其能够稳定减毒,并保持一定的侵袭力,动物实验结果初步证实 *sf301:  $\Delta virG$ : DsbA33G* 有免疫原性和保护效应,利用豚鼠角结膜炎试验这一粘膜途径免疫动物,可以获得全身和其他粘膜部位有效的免疫应答,无论初次免疫,还是两次免疫的增强方案,都可激发免疫动物产生保护性抗体 IgG 和 IgA,初步提示 *sf301:  $\Delta virG$ : DsbA33G* 是一种有应用潜力的候选痢疾疫苗,但目前的结果还不能确定其具有最佳的免疫原性,更由于人和灵长类动物是天然宿主,其他志贺氏

菌感染的动物模型,如豚鼠、家兔等<sup>[21]</sup>,由于制备过程中的人为因素,均不能理想的反映候选菌苗的免疫效果,因而应用上述宿主染色体-载体平衡致死系统克服抗生素选择压力的缺陷,优化抗原表达量(免疫原性),并采用理想的动物模型,使其更接近于临床应用,应是今后实验的方向。

## 参 考 文 献

- [1] Kotloff K L, Winickoff J P, Ivanoff B, et al. Global burden of *Shigella* infections: implications for vaccine development and implementation of control strategies. *Bull World Health Organ*, 1999, **77**: 651 - 666.
- [2] 李忠明主编. 当代新疫苗. 北京: 高等教育出版社, 2001.
- [3] Hyams K C, Bourgeois B R, Merrell R R, et al. Diarrheal disease during operation desert shield. *N Engl J Med*, 1991, **325**: 1423 - 1428.
- [4] 张继瑜, 周绪正, 李剑勇, 等. 志贺菌的致病性及其分子机理. 中国预防兽医学报, 2004, **26**(6): 479 - 481.
- [5] Dupont H L, Hornick R B, Snyder J P, et al. Immunity in shigellosis. II. Protection induced by oral live vaccine or primary infection. *J Infect Dis*, 1972, **125**: 12 - 16.
- [6] Kotloff K L, Taylor D N, Szein M B, et al. Phase I evaluation of  $\Delta virG$  *Shigella sonnei* live, attenuated, oral vaccine strain WRSS1 in healthy adults. *Infect Immun*, 2002, **70**: 2016 - 2021.
- [7] Venkatesan M M, Hartman A B, Newland J W, et al. Construction, characterization, and animal testing of WRSS1, a shigella dysenteriae 1 vaccine. *Infect Immun*, 2002, **70**: 2950 - 2958.
- [8] 刘英杰, 芮贤良, 徐永强, 等. 福氏 2a 志贺氏菌  $\Delta aroA$  突变减毒株的构建. 中国生物化学与分子生物学报, 1998, **14**(5): 542 - 546.
- [9] 涂光理, 崔长法, 王建阳, 等. 口服福氏 2a 和宋内氏痢疾双价活疫苗 FS 的双盲对照现场观察. 中国生物制品学杂志, 1999, **12**(3): 178 - 180.
- [10] 芮贤良, 徐永强, 吴旭东, 等. 利用宿主-载体平衡致死系统构建志贺氏菌 3 价疫苗候选株. 中国科学(C 辑), 1997, **27**(1): 83 - 88.
- [11] Yu J, Edwards-Jones B, Neyrolles O, et al. Key role for DsbA in cell-to-cell spread of *Shigella flexneri*, permitting secretion of Ipa proteins into interepithelial protrusions. *Infect Immun*, 2000, **68**: 6449 - 6456.
- [12] Hartman A B, Van de Verg L L, Collins H H Jr, et al. Local immune response and protection in the guinea pig keratoconjunctivitis model following immunizations with *Shigella* vaccines. *Infect Immun*, 1994, **62**: 412.
- [13] Elsinghorst E A. Measurement of invasion by gentamicin resistance. *Meth Enzyme*, 1994, **236**: 405 - 420.
- [14] Czerkinsky C C, Nilsson L A, Nygren H, et al. Solid-phase enzyme-linked immunospot (ELISPOT) assay for numeration of specific antibody-secreting cells. *J Immunol Methods*, 1983, **65**: 109 - 121.

- [15] Westphal O, Jann K. Bacterial lipopolysaccharide extraction with phenol:water and further application of the procedure. *Methods Carbohydr Chem*, 1965 **5** 83-91.
- [16] Guan S, Verma N K. Serotype conversion of a *Shigella flexneri* candidate vaccine strain via a novel site-specific chromosome-integration system. *FEMS Microbiol Lett*, 1998 **166** 79-87.
- [17] Nataro J P. Vaccines against diarrheal diseases. *Semin Pediatr Infect Dis*, 2004 **15** 272-279.
- [18] Blumberg R S, Lancer W I, Zhu X P, et al. Antigen presentation by intestinal epithelial cells. *Immunol Letters*, 1999 **69** 7-11.
- [19] Yu J. Inactivation of DsbA, but not DsbC and DsbD, affects the intracellular survival and virulence of *Shigella flexneri*. *Infect Immun*, 1998 **66** (8) 3909-3917.
- [20] Jin Q, Yuan Z, Xu J, et al. Genome sequence of *Shigella flexneri* 2a: insights into pathogenicity through comparison with genomes of *Escherichia coli* K12 and O157. *Nucleic Acids Research*, 2002 **30** (20):4432-4441.
- [21] Hartman A B, Powell C P, Schultz C L, et al. Small-animal model to measure efficacy and immunogenicity of *Shigella* vaccine strains. *Infect Immun*, 1991 **59** 4075-4083.

## Construction and characterization of a live attenuated *Shigella flexneri* 2a vaccine strain, *sf301* $\triangle virG$ and *DsbA33G*

YANG Xiao-feng ZHOU Le ZHENG Jin SI Lv-sheng WANG Yi-li\*

(Key Laboratory of Ministry of Education for Biomedical Information Engineering, Institute for Cancer Research of Life Science and Technology, Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710061, China)

**Abstract**: Construction and characterization of a live attenuated *Shigella flexneria* 2a *sf301* vaccine strain to prevent the endemic of shigellosis. Using Chinese majority epidemic *Shigella flexneri* 2a serotype *sf301* as the target,  $p\triangle virG$ , a deletion derivation of the *virG* gene in the *SacB* suicide vector pCVD442 and pDsbA33G, an mutant of a disulfide bond catalyst DsbA, replaced its 33 amino acid Cystine by Glycerin in pCVD442, were used to generate a attenuated mutant strain *sf301*  $\triangle virG$  :*DsbA33G*. Its virulence was evaluated by Sereny test, the invasive ability was detected by HeLa cell invasive assay, immunogenicity was detected by immunized Guinea pigs through inoculated guinea pigs' conjunctive sac. Sereny test was negative and HeLa invasive assay showed *sf301*  $\triangle virG$  :*DsbA33G* retained partial invasive ability. In contrast to control group, *sf301*  $\triangle virG$  :*DsbA33G* could induced significantly high antibody levels of IgA and IgG against *sf301* LPS in animal's mucosal lavage fluids and sera in both primary immunization protocol and boosting protocol. The numbers of ASCs in local draining lymph nodes and spleens were significantly higher than control group. The immune response to *sf301*  $\triangle virG$  :*DsbA33G* could provide completely protection from the challenge of wild type *sf301*. *sf301*  $\triangle virG$  :*DsbA33G* is a safe and effective oral candidate vaccine to prevent the infection of *Shigella* strains.

**Key words**: Shigellosis, *Shigella flexneria* 2a, Live attenuated vaccine

Foundation item: Chinese National Programs for High Technology Research and Development(2001AA215221); Hospital Scientific Foundation of Xi'an Jiaotong University's First Hospital(2001.YK.21)

\* Corresponding author. Tel/Fax: 86-29-82655499, E-mail: wangyili@mail.xjtu.edu.cn

Received date 02-06-2005

## 《微生物学报》真诚欢迎刊登广告

《微生物学报》(双月刊)创刊于1953年,由中国科学院微生物研究所和中国微生物学会主办,是我国微生物学领域唯一的综合性学报级期刊和国家自然科学基金核心期刊,被国内外多家重要的文摘刊物和数据库收录。

本刊历史悠久,发行量大,内容涵盖面广,主要报道普通微生物学、工业、农业、医学和兽医微生物学、病毒学、免疫学以及生物工程等方面的研究成果和科研进展。一直受到国内外科研工作者、高等院校师生和相关企业界的欢迎。

本刊可以为您定期发布与微生物学相关的试剂、药品、仪器、设备及生物技术等方面的产品信息,可为您开拓在微生物学领域新的发展空间。另外,与生命科学有关的各类服务信息也在本刊发布之列。

本刊态度严谨,信守协议,由中国科学院科学出版社广告部代理广告业务(广告经营许可证:京东工商广字第0034号),编辑部备有最新的期刊简介和报价单,欢迎与我们联系。

电话 (010) 62630422 传真 (010) 62554303 电子信箱 actamicro@sun.im.ac.cn

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn