

布鲁氏菌 S2 Δ bp26 缺失株的构建与生物学特性

刘世博^{1,2#}, 唐新月^{1,3#}, 张晓茜¹, 张莹辉¹, 靳继惠¹, 孙伟峰¹, 彭小微^{1*},
李俊平^{1*}

1 中国兽医药品监察所, 国家动物布鲁氏菌病参考实验室, 北京

2 吉林农业大学 动物医学院, 吉林 长春

3 北京三元集团畜牧兽医总站, 北京

刘世博, 唐新月, 张晓茜, 张莹辉, 靳继惠, 孙伟峰, 彭小微, 李俊平. 布鲁氏菌 S2 Δ bp26 缺失株的构建与生物学特性[J]. 微生物学报, 2025, 65(3): 1137-1147.

LIU Shibo, TANG Xinyue, ZHANG Xiaoqian, ZHANG Yinghui, JIN Jihui, SUN Weifeng, PENG Xiaowei, LI Junping. Construction and biological characterization of *Brucella* S2 Δ bp26[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2025, 65(3): 1137-1147.

摘要: 【目的】研发一种安全、有效且可鉴别的新型疫苗。【方法】以 S2 作为亲本株, 利用同源重组技术构建 S2 Δ bp26 基因缺失株, 并对缺失菌株的稳定性、安全性和有效性进行全面评价。【结果】构建了 S2 Δ bp26 缺失株, 该缺失株在体外连续传代 20 代后其表型和基因型均未发生改变。小鼠和豚鼠的安全性试验结果表明, 缺失株在生物安全性方面与 S2 疫苗株无显著差异。不同代次的 S2 Δ bp26 缺失株和 S2 亲本株接种豚鼠后, 每克脾脏分菌数量均小于 2×10^5 个, 表明该缺失株毒力较低。残余毒力试验数据表明, 接种缺失株的小鼠半数痊愈时间比 S2 亲本株更短。同时, 免疫 S2 Δ bp26 菌株的小鼠可以成功抵御 2×10^5 CFU/只剂量的 M28 野毒株攻毒。【结论】本研究构建的 S2 Δ bp26 基因缺失株展现出优异的安全性和免疫保护力, 为布鲁氏菌病可鉴别诊断疫苗的研发提供了技术储备。

关键词: 布鲁氏菌; 疫苗; S2 Δ bp26; 生物学特性

资助项目: 国家重点研发计划(2022YFD1800600, 2022YFD1800601)

This work was supported by the National Key Research and Development Program of China (2022YFD1800600, 2022YFD1800601).

[#]These authors contributed equally to this work.

*Corresponding authors. E-mail: LI Junping, lijunping03@163.com; PENG Xiaowei, girlflytosky@163.com

Received: 2024-10-16; Accepted: 2024-11-20; Published online: 2025-02-13

Construction and biological characterization of *Brucella* S2Δbp26

LIU Shibo^{1,2#}, TANG Xinyue^{1,3#}, ZHANG Xiaoqian¹, ZHANG Yinghui¹, JIN Jihui¹, SUN Weifeng¹, PENG Xiaowei^{1*}, LI Junping^{1*}

1 National Reference Laboratory for Animal Brucellosis, China Institute of Veterinary Drug Control, Beijing, China

2 College of Animal Medicine, Jilin Agricultural University, Changchun, Jilin, China

3 Animal Husbandry & Veterinary Station of Beijing SanYuan Group, Beijing, China

Abstract: [Objective] To develop a safe, effective, and identifiable new vaccine. [Methods] The gene deletion strain S2Δbp26 was constructed by homologous recombination with S2 as the parental strain. The stability, safety, and efficacy of S2Δbp26 were then evaluated. [Results] The phenotype and genotype of S2Δbp26 did not change after 20 successive passages *in vitro*. The experiments in mice and guinea pigs showed that there was no difference in biosafety between S2Δbp26 and S2. The bacterial load was less than 2×10^5 CFU per gram of spleen in guinea pigs inoculated with S2Δbp26 at different passages and S2, which suggested that the virulence of the mutant strain was attenuated. The mice inoculated with S2ΔBP26 had a shorter 50% recovery time than those inoculated with S2. Meanwhile, the mice immunized with S2Δbp26 could successfully resist the challenge with M28 wild-type strain at a dose of 2×10^5 CFU/mouse. [Conclusion] S2Δbp26 was successfully constructed, with excellent safety and immunoprotective capacity, which provided technical reserves for the development of identifiable vaccines for brucellosis.

Keywords: *Brucella*; vaccine; S2Δbp26; biological characterization

布鲁氏菌病(brucellosis)是由胞内寄生的布鲁氏菌(*Brucella* spp.)感染引起的一种具有严重危害的人畜共患传染病^[1]。该病主要引起动物流产、睾丸炎、关节炎等症状^[2]；人感染布鲁氏菌后主要会出现波浪热、多汗、肌肉疼痛、乏力、全身不适等临床表现。该病在全球范围内 170 多个国家均有流行^[3]。进入 21 世纪以来，由于我国畜牧养殖业的快速发展和活畜调运的便捷，布鲁氏菌病在我国迅速传播，严重影响了畜牧业的健康发展和人民群众的公共卫生安全^[4]。

疫苗免疫是防控家畜布鲁氏菌病的有效措施之一，全球已有多个国家通过疫苗免疫实现了该病的有效控制。目前我国已批准使用的布鲁氏菌病疫苗共有 7 种，包括 S2 株、M5/M5-90 株、M5-90Δ26 株、A19 株、A19ΔVirB12 株、

Rev.1 株和 BA0711 株。这些均为弱毒活疫苗，对人体具有一定的感染性。S2 株是中国兽医药品监察所专家于 1952 年从进口母猪流产胎儿中分离出的一株猪种布鲁氏菌，经过 7 年的人工致弱处理^[5-6]。S2 疫苗株在我国家畜布鲁氏菌病的防控中得到了广泛应用。与其他布鲁氏菌病疫苗相比，S2 疫苗具有较高的安全性，可通过口服免疫方式避免引起怀孕动物流产^[6-7]。然而，由于 S2 疫苗具有完整的脂多糖结构，导致家畜免疫后产生的自然感染抗体与免疫抗体无法有效区分。

BP26 蛋白是一个可分泌的周质蛋白，生物信息学建模分析表明，其三级结构呈现为通道状组件，由 16 个 BP26 分子构成，其中 8 个分子连接成环形成八聚体，而 2 个八聚体相互作用

用使环中心形成一个大的内腔通道。此结构与参与感染的噬菌体蛋白具有相似性, 预示着BP26蛋白可能参与布鲁氏菌的感染过程^[2]。BP26蛋白在布鲁氏菌中高度保守, 能够刺激保护性T细胞产生迟发型变态反应, 是一种可诱导产生抗体的优势抗原^[8]。同时, BP26蛋白还具有区分感染动物与免疫动物血清学反应的潜力^[9]。目前, 针对BP26蛋白的布鲁氏菌病检测方法众多, 其作为优势抗原诱导产生高滴度抗体的能力已得到广泛认可。

1 材料与方法

1.1 材料

B. suis S2菌株、粗糙型布鲁氏菌RM6/66株、羊种布鲁氏菌*B. melitensis* M28株均由国家兽医微生物菌(毒)种保藏中心鉴定保存; 同源重组质粒pEX18AP(蔗糖诱导的自杀质粒)由本实验室保存; 大肠埃希氏菌DH5 α 和BL21(DE3)感受态细胞均购自北京索莱宝科技有限公司; 小鼠布鲁氏菌病抗体阴性血清、布鲁氏菌病抗体阳性血清、BP26蛋白多抗阳性血清均由本实验室保存; 限制性内切酶*Kpn* I和*Bam*H I均购自NEB公司; 胰蛋白胨大豆琼脂培养基(tryptone soy agar, TSA)和胰蛋白胨大豆肉汤培养基(tryptone soy broth, TSB)均购自BD公司; 质粒

小量提取试剂盒和琼脂糖凝胶DNA回收试剂盒均购自Omega公司; 细菌基因组提取试剂盒购自西安天隆科技有限公司。6-8周龄的雌性BALB/c小鼠及350-400g雌性豚鼠均购自北京维通利华实验动物技术有限公司。

1.2 引物设计与合成

布鲁氏菌S2染色体I基因组在NCBI网站的序列号为CP006962, 其上包含*bp26*基因(BSS2_I1433)。根据基因序列设计上、下游同源臂引物(D-S2-Bp26F-F/R和D-S2-Bp26R-F/R)、鉴定筛选引物(YZ1-Bp26-F/R)以及*bp26*基因载体鉴定引物(18Ap-F/R), 所有引物均由生工生物工程(上海)股份有限公司合成, 引物序列见表1。

1.3 同源重组质粒pEX18AP-bp26-DFR的构建

取保存的冻干*B. suis* S2菌株溶解后, 于TSA平板上划线, 37℃培养48h后挑取复苏的单菌落, 接种于15 mL TSB培养基培养至对数期。使用细菌基因组提取试剂盒提取S2基因组。以该基因组为模板, 分别使用引物D-S2-Bp26F-F/R和D-S2-Bp26R-F/R, 通过PCR扩增*bp26*基因的上、下游片段。PCR反应体系(50 μ L): 2 \times PrimeSTAR Max Premix 25 μ L, 上、下游引物(10 μ mol/L)各1 μ L, S2 DNA模板1 μ L, ddH₂O 22 μ L。PCR反应条件: 95℃预变

表1 构建*bp26*基因缺失株相关引物

Table 1 Primers related to the construction of *bp26* gene deletion strain

Primers name	Primer sequences (5'→3')	Restriction sites	Lenth of products
D-S2-Bp26F-F	GGGGTACCTCAACGAGGCAGATTATGG	<i>Kpn</i> I	523
D-S2-Bp26F-R	AAGCGGGTTATGTCAGG	-	
D-S2-Bp26R-F	AACCCGCTTGCCCTTTGCCACCTGAT	-	506
D-S2-Bp26R-R	CCGGATCCGCTCAAATCGTTCGTCGTT	<i>Bam</i> H I	
YZ1-Bp26-F	GCAGCCTCATTTTCCACAA	-	441
YZ1-Bp26-R	ACCGCCCTGATTAACACC	-	
18Ap-F	CTGCAAGGCGATTAAGTTGGGTAAC	-	1 193
18Ap-R	TATGTTGTGTGGAATTGTGAGCGGA	-	

性 5 min; 98 °C 变性 10 s, 60 °C 退火 5 s, 72 °C 延伸 5 s, 30 个循环; 72 °C 终延伸 10 min。切取目的产物大小位置的琼脂糖电泳凝胶后, 按照琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒说明书对扩增产物进行纯化回收。以胶回收纯化后的 DNA 产物为模板, 通过 PCR 扩增将上、下游同源臂进行融合。PCR 反应体系(50 μ L): 2 \times Premix TaqTM 25 μ L, 上、下游同源臂各 1 μ L, 上、下游引物(10 μ mol/L)各 1 μ L、ddH₂O 21 μ L。PCR 反应条件: 94 °C 预变性 2 min; 94 °C 变性 30 s, 60 °C 退火 5 s, 72 °C 延伸 1 min, 每个循环退火温度下降 0.5 °C, 共进行 20 个循环; 94 °C 变性 30 s, 50 °C 退火 5 s, 72 °C 延伸 1 min, 共进行 10 个循环; 72 °C 终延伸 10 min。切取目的产物大小位置的琼脂糖电泳凝胶后, 使用核酸胶回收试剂盒纯化回收 *bp26* 基因的上、下游融合片段。

将 pEX18AP 质粒和 *bp26* 基因的上、下游融合片段在 37 °C 用 *Kpn* I 和 *Bam*H I 内切酶双酶切 4 h。胶回收纯化质粒和片段的酶切产物, 在 16 °C 用连接酶连接 2 h 后, 转入 DH5 α 感受态细胞中。提取质粒, 得到同源重组质粒 pEX18AP-p26-DFR。

1.4 布鲁氏菌 S2 Δ bp26 缺失株的构建与筛选

取 10 μ L 同源重组质粒 pEX18AP-p26-DFR, 加入 90 μ L 制备的布鲁氏菌 S2 株感受态细胞中混匀, 以 2 200 V、200 Ω 的条件进行电转。电转后迅速向电击杯中加入 1 mL 无抗 TSB, 轻柔吹打混匀后将所有液体移入无菌 EP 管中, 于 37 °C、180 r/min 复壮培养 12 h。将复壮的菌液在常温下以 8 000 r/min 离心 8 min 后重悬菌体, 在含氨苄青霉素的 TSA 培养基上 37 °C 培养 48 h, 进行第 1 次单交换筛选。同时, 在含氨苄青霉素的 TSA 培养基和 5% 蔗糖的无抗性 TSA 培养基上随机选择长出的单菌落进行 37 °C 双划

线培养 48 h。挑取仅在含氨苄青霉素的 TSA 培养基上生长的单菌落, 在 TSB 培养基中培养 24 h。以相同方式离心重悬菌体并进行 1 000 倍稀释, 将稀释液在含 5% 蔗糖的 TSA 培养基上 37 °C 培养 24 h, 挑取单菌落后同样进行双划线培养。再次挑取仅在含 5% 蔗糖的 TSA 培养基上生长的单菌落使用 YZ1-Bp26-F/R 引物进行 PCR 扩增鉴定。PCR 反应体系(25 μ L): 2 \times Premix TaqTM 12.5 μ L, 上、下游引物(10 μ mol/L)各 1 μ L, 灭活菌液模板 1 μ L, ddH₂O 9.5 μ L。PCR 反应条件: 94 °C 预变性 5 min; 94 °C 变性 30 s, 60 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 1 min, 30 个循环; 72 °C 终延伸 10 min。将鉴定阳性的菌株命名为 S2 Δ bp26, 并连续培养至第 20 代, 每隔 5 代以相同体系及步骤进行 PCR 验证, 并将各代次菌株均于 -80 °C 保存。

1.5 生长曲线测定及表型鉴定结果

取 S2 和 S2 Δ bp26 缺失株分别接种于无抗性 TSB 培养液中, 在 37 °C、200 r/min 培养 24 h 后进行平板计数。将菌液稀释至 2.7×10^5 CFU/mL 后转接入无抗性 TSB 培养液中, 以相同条件在摇床中培养。从转接时开始计时, 每隔 2 h 吸取 1 mL 菌液于酶标仪中测定 600 nm 处的吸光度, 直至第 30 h。取 S2、S2 Δ bp26-F1、S2 Δ bp26-F5、S2 Δ bp26-F10、S2 Δ bp26-F15、S2 Δ bp26-F20 株, 以及实验室保存的 M111 菌株, 通过结晶紫染色及吡啶黄试验观察细菌形态^[10-11]。

1.6 安全性试验

按照《中华人民共和国兽用生物制品规程》(2000 年版)^[12]要求, 将 20 只 18-20 g 的雌性 BALB/c 小鼠随机平均分为 4 组, 每组 5 只。分别在小鼠的腹股沟皮下注射 0.25 mL 的 S2 Δ bp26-F1、S2 Δ bp26-F5、S2 Δ bp26-F10 株和蛋白胨水, 菌株接种剂量为每只 2.5×10^8 CFU。接种后对小鼠的精神状态、食欲、饮水、体重、背毛、呼吸、

粪便和行动观察 6 d。

按照 *WOAH Terrestrial Manual 2022 Chapter 3.1.4*^[13]要求, 将 35 只 350–400 g 的雌性豚鼠随机分为 4 组, 实验组每组 10 只, 空白对照组 5 只。分别在豚鼠的腿部肌肉处注射 1 mL 的 S2 Δ bp26-F1、S2 Δ bp26-F5、S2 Δ bp26-F10 株和蛋白胨水, 菌株接种剂量为每只 5×10^9 CFU。接种后对豚鼠的精神状态、食欲、饮水、体重、背毛、呼吸、粪便和行动观察 14 d。

1.7 毒力试验

按照《中华人民共和国兽用生物制品规程》(2000 年版)^[12]相关要求, 将 20 只 350–400 g 的雌性豚鼠随机平均分为 4 组, 每组 5 只。分别在豚鼠的腹股沟皮下位置注射 1 mL 的 S2、S2 Δ bp26-F1、S2 Δ bp26-F5 和 S2 Δ bp26-F10 株。接种剂量为每只 1×10^9 CFU。在接种后第 15 天对豚鼠进行高浓度 CO₂ 处死。将处死的豚鼠用 75% 乙醇浸泡 30 s 后取出, 从腹腔左侧剪开外层皮肤和内层肌肉组织, 将脾脏剪下并剥离脂肪和系膜后称重记录, 全程保证无菌操作。将脾脏放入离心管中, 加入 2 倍脾质量的 0.1% 蛋白胨水, 将脾脏研磨成匀浆。对匀浆进行 10 倍梯度稀释, 前 3 个梯度中每个梯度取 100 μ L 匀浆溶液涂布在胰蛋白胨琼脂培养基中, 进行 3 个重复。将涂布后的培养基置于 37 $^{\circ}$ C 恒温培养 72 h 后数菌计数, 计算平均值。

1.8 残余毒力试验(50% 痊愈时间)

按照 *WOAH Terrestrial Manual 2022 Chapter 3.1.4*^[13]相关要求, 将 80 只 6 周龄的雌性 BALB/c 小鼠随机平均分为 2 组, 每组 40 只。分别在小鼠的腹股沟皮下注射 0.1 mL 的 1×10^9 CFU/mL 剂量的 S2 疫苗株和 S2 Δ bp26-F1 菌株。在接种后的第 3、5、7 和 9 周, 每组取 10 只小鼠摘眼球采血后脱颈处死, 用 75% 乙醇浸泡 30 s 后取出, 从腹腔左侧剪开外层皮肤和内层肌肉组织,

将脾脏剪下并剥离脂肪和系膜后称重记录, 全程保证无菌操作。向每个装有脾脏并做好标记的离心管中加入 1 mL 无菌 0.1% 蛋白胨水, 研磨成匀浆, 全部涂布在胰蛋白胨琼脂培养基中, 培养 3–5 d 后记录脾脏分菌情况, 并根据文献[14]报道的方法计算小鼠半数痊愈时间。

1.9 免疫保护力试验

将 36 只 6 周龄的雌性 BALB/c 小鼠随机平均分为 6 组, 每组 6 只。按照 *WOAH Terrestrial Manual 2022 Chapter 3.1.4*^[13]推荐的免疫剂量、方式及攻毒剂量, 分别在小鼠的腹股沟皮下注射 0.1 mL 的 S2 株和 S2 Δ bp26-F1 株, 菌株免疫剂量分别为每只 1×10^5 CFU, 空白组注射 0.1 mL 的 0.1% 蛋白胨水。小鼠免疫 30 d 后使用 0.1 mL 的 M28 株进行腹腔内攻毒, 剂量为每只 2×10^5 CFU, 攻毒前应使小鼠禁食禁水 16 h。在攻毒后第 15 天和第 45 天, 每种不同菌株和空白对照均随机取 1 组小鼠, 脱颈处死后在 75% 乙醇中浸泡 30 s, 取出后从腹腔左侧剪开外层皮肤和内层肌肉组织, 将脾脏剪下并剥离脂肪和系膜后称重记录。将脾脏分别装入离心管中并做好标记, 向每个离心管中加入脾重 9 倍的 0.1% 蛋白胨水, 研磨成匀浆。将组织匀浆进行 10 倍比稀释(10、100、1 000 倍), 并各取 100 μ L 涂布于 TSA 培养基上, 37 $^{\circ}$ C 培养 2–3 d 后, 选择菌落数少于 300 CFU 的平板进行菌落计数。

1.10 统计学分析

使用 SPSS 17.0 软件中的独立样本 *t*-检验方法, 分析试验组和对照组之间的平均差异。 $P < 0.05$ 被认为具有显著差异。

1.11 动物实验的场所和伦理审查说明

所有涉及布鲁氏菌疫苗株的操作(安全性试验、毒力试验、残余毒力试验)均在中国兽医药品监察所 ABSL-2 实验室内进行; 涉及布鲁氏菌强毒株的操作(免疫保护力试验)在中国兽医药品

监察所 ABSL-3 实验室内进行。

本研究方案已通过中国兽医药品监察所实验动物福利伦理审查委员会的审查, 实验动物福利伦理审查编号分别为中监所(福)2023 第 00243 号、中监所(福)2023 第 00244 号、中监所(福)2023 第 00245 号、中监所(福)2023 第 00246 号。

2 结果与分析

2.1 同源重组质粒 pEX18AP-bp26-DFR 的构建与鉴定结果

以提取的 S2 基因组为模板, 通过 PCR 扩增得到 523 bp 的上游同源臂和 506 bp 的下游同源臂; 以上、下游同源臂为模板, 通过连接 PCR 扩增获得 1 020 bp 的融合片段, 并将该融合片段克隆至 pEX18AP 载体中。经过 Amp 抗性筛选、PCR 鉴定和双酶切验证, 获得阳性重组质粒, 命名为 pEX18AP-bp26-DFR。阳性重组质粒的双酶切验证结果如图 1 所示。

2.2 布鲁氏菌 S2Δbp26 缺失株的筛选与遗传稳定性鉴定结果

将同源重组质粒 pEX18AP-bp26-DFR 电转

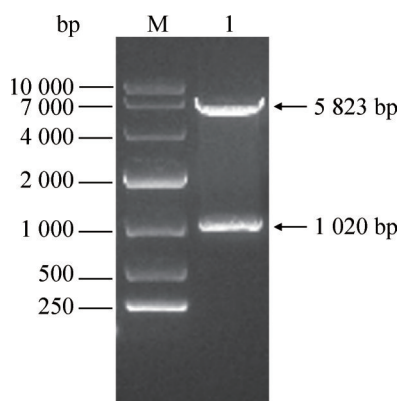


图1 pEX18AP-bp26-DFR重组质粒PCR鉴定结果
Figure 1 PCR identification results of recombinant plasmid pEX18AP-bp26-DFR. Lane M: 10000 bp DNA Marker; Lane 1: Double digested band of pEX18AP-bp26-DFR.

化至 S2 菌株中, 最终获得无 Amp 抗性, 且能在含蔗糖培养基上生长的 *bp26* 基因缺失株, 命名为 S2Δ*bp26*。采用引物 YZ1-Bp26-F 和 YZ1-Bp26-R 对 5 个 S2Δ*bp26* 阳性克隆进行 PCR 鉴定。结果如图 2 所示, 亲本 S2 疫苗株可以扩增出 441 bp 的片段, 而缺失菌株无条带。

为了验证 S2Δ*bp26* 的遗传稳定性, 选取 S2Δ*bp26* 缺失株的 1 号克隆进行连续传代, 并每隔 5 个代次采用引物 YZ1-Bp26-F 和 YZ1-Bp26-R 进行 PCR 验证。图 3 结果显示, 缺失株各代次均无条带, 而亲本 S2 株可以扩增出 441 bp 的片

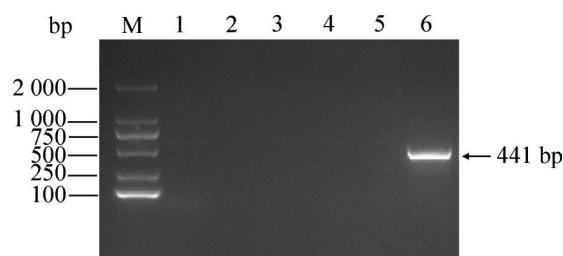


图2 布鲁氏菌S2Δbp26缺失株PCR鉴定结果
Figure 2 PCR identification result of *bp26* gene deletion strain of *Brucella* S2. Lane M: 2000 bp DNA Marker; Lanes 1–5: Identification of *bp26* gene deletion strain of *Brucella* S2 strain; Lane 6: S2 strain.

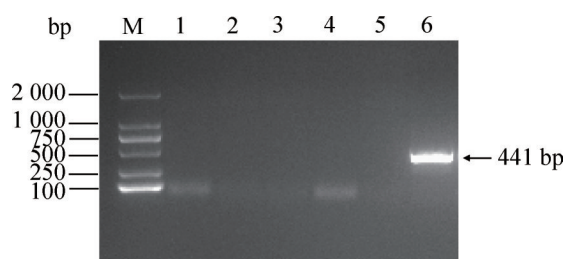


图3 布鲁氏菌S2Δbp26缺失株PCR筛选结果
Figure 3 PCR identification result of *bp26* gene deletion strain of *Brucella* S2 strain in different generations. Lane M: 2000 bp DNA Marker; Lane 1: Identification of *bp26* gene deletion strain of *Brucella* S2 strain; Lanes 2–5: S2Δ*bp26* deletion plants were obtained in the 5th, 10th, 15th, and 20th generations; Lane 6: S2 strain.

段, 表明 S2 Δ bp26 缺失株在体外连续传代 20 代时, 其基因型遗传稳定。将得到的菌株于 -80°C 冷冻保存。

2.3 生长曲线测定与表型鉴定结果

在 TSB 正常培养环境和初始菌株浓度相同的情况下, 每隔 2 h 对 S2 株和 S2 Δ bp26 缺失株在 600 nm 处的吸光度进行测量。结果表明, 在各个不同时间点, 2 个菌株的生长趋势基本一致, 见图 4。

根据脂多糖是否含有完整的 O 链可将布鲁氏菌分为光滑型和粗糙型。使用结晶紫对细菌进行染色时, 光滑型细菌不着色, 保持白色菌落形态; 而粗糙型细菌则被染成紫色。在吡啶黄试验中, 光滑型细菌不形成沉淀, 保持浑浊状态; 而粗糙型细菌则因自凝现象形成沉淀^[15-16]。本研究结果表明, S2 Δ bp26 缺失株各代

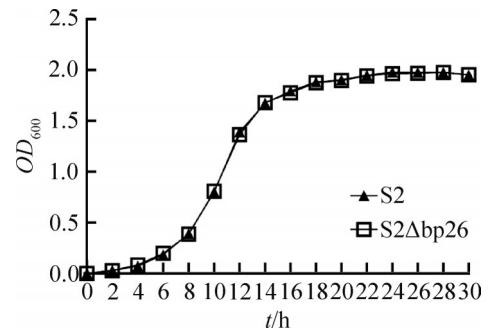


图4 细菌生长曲线测定

Figure 4 The growth curve of *Brucella* strains.

次在结晶紫染色中均未着色, 且在吡啶黄试验中均未出现沉淀(图 5、6), 这说明 S2 Δ bp26 缺失株的脂多糖结构完整, 呈现光滑型表型, 且各代次表型遗传稳定。

2.4 安全性试验结果

根据《中华人民共和国兽用生物制品规程》

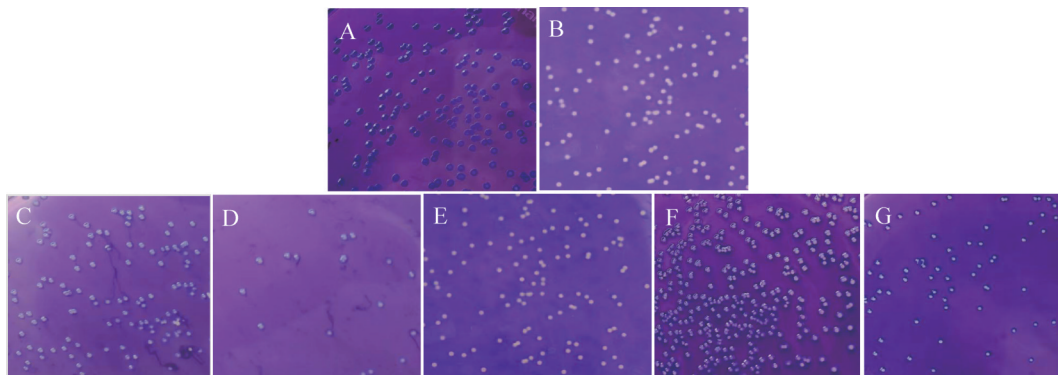


图5 不同布鲁氏菌菌株的结晶紫染色结果

Figure 5 The crystal violet staining results of *Brucella* strains. A: Rough RM6/66 strain; B: Smooth S2 strain; C: S2 Δ bp26-F1; D: S2 Δ bp26-F5; E: S2 Δ bp26-F10; F: S2 Δ bp26-F15; G: S2 Δ bp26-F20.

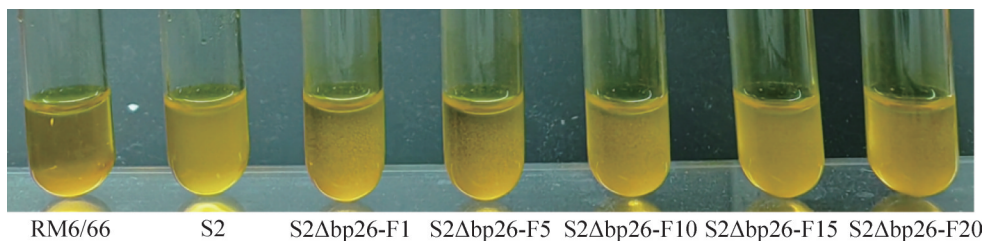


图6 不同布鲁氏菌菌株的吡啶黄凝集试验

Figure 6 The results of acridine yellow coagulation test of *Brucella* strains.

(2000 年版)^[12]及 *WOAH Terrestrial Manual 2022* Chapter 3.1.4^[13]的相关要求, 对接种 S2 株和 S2Δbp26 缺失株的小鼠和豚鼠进行观察, 这些动物的精神状态、食欲、饮水、体重、背毛、呼吸、粪便和行动均未出现异常。小鼠在 6 d 内全部健康存活, 豚鼠 14 d 内全部健康存活。这说明 S2 株和 S2Δbp26 缺失株均具有良好的安全性。

2.5 毒力试验结果

分别对接种 S2 株和 S2Δbp26 缺失株各代次 15 d 后的豚鼠脾脏质量和分菌情况进行评估, 结果见图 7 和表 2。接种 15 d 后, 各组豚鼠脾脏质量无明显差异。分菌结果显示, 豚鼠每克脾脏载菌量均小于 2×10^5 个, 表明缺失株的毒力较低, 符合《中华人民共和国兽用生物制品规程》(2000 年版)^[12]对疫苗株毒力的要求。

2.6 残余毒力试验结果

使用 S2 株和 S2Δbp26-F1 株接种 6 周龄

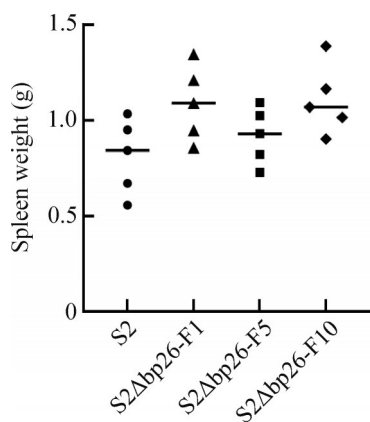


图7 豚鼠脾脏质量

Figure 7 Spleen weight of Guinea pigs.

表3 小鼠痊愈率及半数痊愈时间计算

Table 3 The recovery rate of mice and the calculation of 50% recovery time

Strains	Inoculation dose (CFU/mice)	Recovery rate (%)				RT ₅₀ (weeks)
		3 weeks	5 weeks	7 weeks	9 weeks	
S2	1×10^8	26	89	98	99	4.08
S2Δbp26-F1	1×10^8	56	95	98	99	2.62

表2 脾脏载菌量

Table 2 The spleen bacteria load

Strains	Bacterial load of spleen (CFU/g)
S2	3.56×10^4
S2Δbp26-F1	7.95×10^4
S2Δbp26-F5	2.19×10^4
S2Δbp26-F10	1.30×10^4

BALB/c 雌性小鼠, 分别在接种后的第 3 周、第 5 周、第 7 周和第 9 周扑杀小鼠并无菌取脾脏, 称重后进行研磨涂板。统计每周扑杀时脾脏无菌的小鼠数量, 并根据 *WOAH Terrestrial Manual 2022* Chapter 3.1.4^[13]中的方法, 统计随时间累计的小鼠痊愈数量, 计算半数小鼠痊愈时间(RT₅₀), 结果见表 3。结果显示, 随时间增加小鼠痊愈率升高, 在第 7 周和第 9 周时, 所有小鼠脾脏均未分离出布鲁氏菌。统计结果表明缺失株小鼠的半数痊愈时间早于亲本株。

2.7 免疫保护力试验结果

为探究 *bp26* 基因缺失对菌株免疫保护能力的影响, 使用 S2 株和 S2Δbp26-F1 株免疫 6 周龄 BALB/c 雌性小鼠, 免疫 30 d 后用 M28 强毒株进行攻毒。攻毒后第 15 天和第 45 天小鼠脾脏载菌量结果如图 8 所示。在攻毒后第 15 天及第 45 天, 免疫 S2 疫苗株和 S2Δbp26-F1 菌株的 2 组小鼠脾脏均未分离到细菌。与空白对照组相比, 各免疫组小鼠的脾脏含菌量差异均具有统计学意义($P < 0.01$)。以上结果表明, S2 疫苗株与 S2Δbp26-F1 菌株免疫后均能有效保护小鼠免受 2×10^5 剂量的布鲁氏菌野毒株攻击。

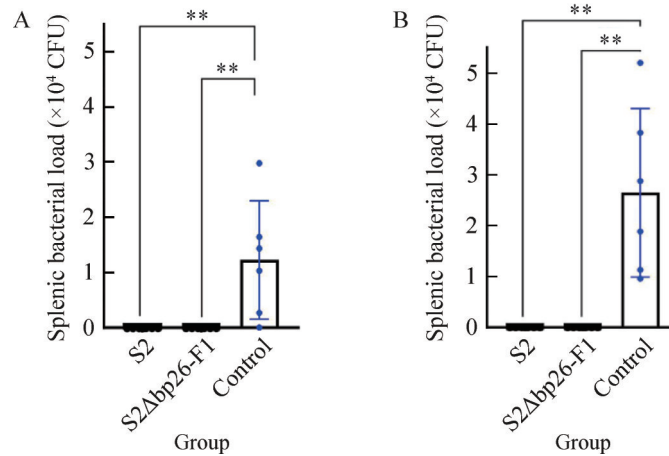


图8 攻毒后小鼠脾脏载菌量

Figure 8 The bacteria in the spleen of the vaccinated mice in different days. A: The splenic bacteria load of mice on days 15; B: The splenic bacteria load of mice on days 45. **: $P < 0.01$.

3 讨论与结论

从布鲁氏菌病疫苗生产的批签发数据来看, S2 疫苗株是我国使用最为广泛的一种疫苗, 其安全性和免疫保护能力均表现良好, 可用于接种猪、牛和羊, 其是全球唯一可用于免疫猪的布鲁氏菌病弱毒疫苗。S2 疫苗株能通过口服免疫途径为猪、牛和羊提供有效的免疫保护, 其优势在于口服免疫不会导致母畜流产。因其低残留毒力、高安全性、接种便利以及高效的保护力, S2 疫苗在中国及其他国家被广泛应用于家畜的布鲁氏菌病免疫接种。然而, 尽管 S2 疫苗在控制布鲁氏菌病方面取得了显著成效, 但它也存在一定的局限性, 即其完整的脂多糖结构会干扰感染动物与免疫动物的血清学诊断^[17]。

BP26 蛋白是布鲁氏菌的一种优势抗原, 在布鲁氏菌中高度保守, 并能刺激保护性 T 细胞产生迟发型变态反应。张瑞慧^[18]将 BP26 蛋白作为包被抗原建立了间接 ELISA 检测方法, 该方法具有良好的敏感性和特异性。孙田华等^[19]以 BP26 为包被抗原建立了胶体金试纸检测方法, 为饲养场大规模检测提供了更为便捷有效的检

测途径。许菲菲等^[20]利用纯化的 BP26 蛋白标记胶体金制成金标抗原, 成功研制出一种具有良好特异性和灵敏度的羊布鲁氏菌抗体金标检测试纸条。郭晓涵等^[21]通过对比不同布鲁氏菌病免疫层析胶体金抗体试纸条, 发现 F14 和 BP26 试纸条具有更强优势。除了血清学检测方法外, 马世辉等^[22]还基于 *bp26* 基因建立了环介导等温扩增检测法, 该方法通过肉眼即可直观地进行可视化判断, 为一线生产快速检测提供了新思路。

在原有布鲁氏菌病疫苗株基础上, 通过缺失免疫原性蛋白编码基因构建新型基因缺失疫苗, 是目前研发鉴别诊断疫苗的一种有效思路。例如, 由天康生物股份有限公司和新疆畜牧科学院兽医研究所联合研发的布氏病菌活疫苗 A19- Δ virb12 疫苗, 以及中国农业科学院哈尔滨兽医研究所开发的 M5-90 Δ 26 疫苗, 均是在原有的 A19 疫苗和 M5-90 疫苗基础上, 通过缺失免疫原性蛋白构建而成的。其中, M5-90 Δ 26 疫苗与本研究使用的缺失株缺失的是同一基因。上述 2 种疫苗均已获得新兽药证书, 并已开始在我国应用于家畜布鲁氏菌病的防控工作

中^[23-24]。据 M5-90Δ26 产品说明书介绍, 动物免疫 M5-90Δ26 后, 血清虎红平板凝集试验结果呈阳性。在免疫后 15–180 日内, 利用缺失株免疫的家畜不产生针对 Bp26 蛋白抗体的原理建立间接 Bp26-ELISA (Bp26-iELISA) 检测方法, 可区分本疫苗免疫与野毒感染, 该方法具有足够的敏感性和特异性。

在本研究中, 为了破解 S2 疫苗难以进行血清学鉴别诊断的难题, 对 S2 疫苗株的 *bp26* 基因进行了缺失, 成功构建了 S2Δ*bp26* 缺失株。与亲本菌株 S2 相比, 该缺失株在体外培养条件下的生长速度无显著差异。体外连续传代结果显示, 构建的缺失株基因型和表型均具有良好的稳定性。随后, 按照《中华人民共和国兽用生物制品规程》(2000 年版)^[12]、*WOAH Terrestrial Manual 2022*^[13]等规程的要求, 分别采用安全性试验、毒力试验、残余毒力试验和免疫原性试验等对该缺失株进行了全面的评价。结果显示, S2Δ*bp26* 缺失株的安全性与免疫保护力均与 S2 疫苗株无显著性差异。这说明该缺失株具备作为兽用布鲁氏菌病疫苗候选株的潜力。与其他前人关于布鲁氏菌病疫苗候选株的研究相比, 本研究对缺失株的生物学特性、安全性和有效性的评价更加全面和深入, 所得结果也更加严谨和科学。

作者贡献声明

刘世博: 文章撰写、数据分析、安全性试验; 唐新月: 缺失株构建、缺失株表型鉴定、安全性试验、残余毒力试验; 张晓茜: 安全性试验、免疫保护力试验; 张莹辉: 安全性试验、残余毒力试验; 靳继惠: 免疫保护力试验; 孙伟峰: 残余毒力试验; 彭小薇: 试验指导、文章修改; 李俊平: 试验设计、试验指导、文章修改。

作者利益冲突公开声明

作者声明不存在任何可能会影响本文所报告工作的已知经济利益或个人关系。

参考文献

- [1] TUON FF, GONDOLFO RB, CERCHIARI N. Human-to-human transmission of *Brucella*: a systematic review[J]. *Tropical Medicine & International Health*, 2017, 22(5): 539-546.
- [2] 赵庆亮, 卢梅, 谭艳, 冉光鑫, 王慧颖, 赵新霞, 盛金良. 羊种布鲁氏菌 BP26 蛋白的生物信息学分析[J]. *中国病原生物学杂志*, 2020, 15(11): 1277-1282.
ZHAO QL, LU M, TAN Y, RAN GX, WANG HY, ZHAO XX, SHENG JL. Bioinformatic analysis of the BP26 protein of *Brucella melitensis*[J]. *Journal of Pathogen Biology*, 2020, 15(11): 1277-1282 (in Chinese).
- [3] 刁彩霞, 师庆伟, 桑学波. 牛布鲁氏菌病疫苗接种免疫效果及安全性评价[J]. *现代化农业*, 2024(12): 77-79.
DIA CX, SHI QW, SANG XB. Evaluation of immunization effect and safety of bovine brucellosis vaccine[J]. *Modern Agriculture*, 2024(12): 77-79.
- [4] 唐玉伟, 王一佳, 高嘉妮, 张路遥, 莫菲, 牛生吏, 王盈予. 布鲁氏菌病的防治方法研究进展[J]. *中国兽医杂志*, 2024, 60(11): 98-106.
TANG YW, WANG YJ, GAO JN, Zhang Luyao, Mo Fei, Niu Sheng Li, WANG Yingyu. Research progress on prevention and treatment of brucellosis[J]. *Chinese Journal of Veterinary Medicine*, 2024, 60(11): 98-106.
- [5] CHEN S, CHEN YY, JIAO ZZ, WANG CQ, ZHAO DT, LIU YB, ZHANG WG, ZHAO SH, YANG B, ZHAO QN, FU SY, HE XL, CHEN QL, MAN CRG, LIU GY, WEI XF, DU L, WANG FY. Clearance of bacteria from lymph nodes in sheep immunized with *Brucella suis* S2 vaccine is associated with M1 macrophage activation[J]. *Veterinary Research*, 2023, 54(1): 20.
- [6] LI P, JIANG H, FENG Y, ZHANG GZ, BANAI M, DING JB. The advances of the Chinese *Brucella suis* strain 2 vaccine[J]. *Animal Research and One Health*, 2023, 1(1): 115-126.
- [7] 唐新月, 朱小洁, 武翠香, 彭小薇, 李俊平. 我国已上市动物布鲁氏菌病活疫苗的概况及新型疫苗研究方向[J]. *中国兽药杂志*, 2024, 58(5): 82-88.
TANG XY, ZHU XJ, WU CX, PENG XW, LI JP. A comprehensive overview of approved animal brucellosis live attenuated vaccines in China and novel vaccine research direction[J]. *Chinese Journal of Veterinary Drug*, 2024, 58(5): 82-88 (in Chinese).
- [8] 刘景福, 李恪梅, 王国治. 布鲁氏菌 BP26 蛋白迟发型变态反应的研究[J]. *药物分析杂志*, 2011, 31(7): 1224-1227.
LIU JF, LI KM, WANG GZ. Research on delayed-type hypersensitivity of *Brucella* BP26[J]. *Chinese Journal of Pharmaceutical Analysis*, 2011, 31(7): 1224-1227 (in Chinese).
- [9] EITAHIR Y, AI-ARAIMI A, NAIR RR, AUTIO KJ, TU HM, LEO JC, AI-MARZOOQI W, JOHNSON EH. Binding of *Brucella* protein, Bp26, to select extracellular matrix molecules[J]. *BMC Molecular and Cell Biology*,

- 2019, 20(1): 55.
- [10] 孙浩杰, 任小侠, 秦玉明, 朱良全, 蒋卉, 孙石静, 丁家波, 辛凌霄, 王楠, 李晓宁, 李巧玲, 毛开荣, 蔡亚南, 徐磊. 一株粗糙型牛种布鲁氏菌诱导株的构建及鉴定[J]. 中国畜牧兽医, 2020, 47(11): 3445-3453.
SUN HJ, REN XX, QIN YM, ZHU LQ, JIANG H, SUN SJ, DING JB, XIN LX, WANG N, LI XN, LI QL, MAO KR, CAI YN, XU L. Construction and identification of an induced strain of rough *Brucella abortus*[J]. China Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2020, 47(11): 3445-3453 (in Chinese).
- [11] 焉鑫, 陈霞, 孙世雄, 田雪, 邵卫星, 孙翔翔, 南文龙, 樊晓旭, 孙淑芳, 孙明军. 一株犬种布鲁氏菌的分离鉴定及其在巨噬细胞内存活能力的研究[J]. 中国预防兽医学报, 2023, 45(9): 889-894.
YAN X, CHEN X, SUN SX, TIAN X, SHAO WX, SUN XX, NAN WL, FAN XX, SUN SF, SUN MJ. Isolation and identification of a *Brucella canis* strain and its survival capability in macrophages[J]. Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine, 2023, 45(9): 889-894 (in Chinese).
- [12] 农业部兽用生物制品规程委员会. 中华人民共和国兽用生物制品规程(2000年版)[S]. 北京: 化学工业出版社, 2010.
Regulation Committee of China ministry of Agriculture for the Veterinary Biological Products. The People's Republic of China's Procedures for the Veterinary Biological Products, 2000 Edition[S]. Beijing: Chemical Industry Press, 2010.
- [13] World Organization for Animal Health. Brucellosis (Infection with *B. abortus*, *B. melitensis* and *B. suis*) Paris[M]// WOA Terrestrial Manual 2022. France: OIE, 2018, Chapter 3.8.7: 1-14.
- [14] POUILLOT R, GRILLÓ MJ, ALABART JL, GARIN-BASTUJI B, BLASCO JM. Statistical procedures for calculating the residual virulence of *Brucella abortus* strain 19 (S19) and *Brucella melitensis* strain rev 1 vaccines in mice: theoretical basis and practical applications[J]. Revue Scientifique et Technique, 2003, 22(3): 1051-1063.
- [15] GŁOWACKA P, ŻAKOWSKA D, NAYLOR K, NIEMCEWICZ M, BIELAWSKA-DRÓZD A. *Brucella*-virulence factors, pathogenesis and treatment[J]. Polish Journal of Microbiology, 2018, 67(2): 151-161.
- [16] FENG Y, PENG XW, JIANG H, PENG Y, ZHU LQ, DING JB. Rough *Brucella* strain RM57 is attenuated and confers protection against *Brucella melitensis*[J]. Microbial Pathogenesis, 2017, 107: 270-275.
- [17] 孙志鹏, 吕亮亮, 白智明, 葛双友, 岳帅, 李树森, 单美洁, 张春玲. 羊免疫布鲁氏菌病基因缺失活疫苗(M5-90Δ26株)与弱毒疫苗(S2株)效果对比分析[J]. 兽医导刊, 2023(3): 57-60.
SUN ZP, LÜ LL, BAI ZM, GE SY, YUE S, LI SS, SHAN MJ, ZHANG CL. Comparative analysis of the immune effect of brucellosis gene deletion live vaccine (M5-90Δ26 strains) and attenuated vaccine (S2 strain) on sheep[J]. Veterinary Orientation, 2023(3): 57-60 (in Chinese).
- [18] 张瑞慧. 布鲁氏菌间接ELISA抗体检测方法的建立及其性能评价[D]. 哈尔滨: 东北农业大学硕士学位论文, 2022.
ZHANG RH. Establishment and performance evaluation of indirect ELISA antibody detection method for *Brucella*[D]. Harbin: Master's Thesis of Northeast Agricultural University, 2022 (in Chinese).
- [19] 孙田华, 张祺, 李朋伟, 张正雷, 王彩霞, 张幸子, 彭林峰, 席仲兴, 焦磊, 王婷. 布鲁氏菌BP26抗原制备及基于BP26的金标检测试纸的初步研究[J]. 微生物学免疫学进展, 2022, 50(5): 16-20.
SUN TH, ZHANG Q, LI PW, ZHANG ZL, WANG CX, ZHANG XZ, PENG LF, XI ZX, JIAO L, WANG T. Expression and purification of *Brucella* BP26 antigen and preliminary study on colloidal gold test strip for *Brucella*[J]. Progress in Microbiology and Immunology, 2022, 50(5): 16-20 (in Chinese).
- [20] 许菲菲, 曾潮宁, 陈霞, 陈丽, 胡月娟, 陈松红, 李小花, 李克生, 杜惠芬. 基于重组BP26蛋白的羊布鲁氏菌抗体金标检测试纸研制[J]. 标记免疫分析与临床, 2020, 27(7): 1237-1240.
XU FF, ZENG CN, CHEN X, CHEN L, HU YJ, CHEN SH, LI XH, LI KS, DU HF. The construction of a gold colloidal immunochromatographic strip based on BP26 for the detection of *Brucella*[J]. Labeled Immunoassays and Clinical Medicine, 2020, 27(7): 1237-1240 (in Chinese).
- [21] 郭晓涵, 焉鑫, 邵卫星, 殷德辉, 闫昊, 南文龙, 樊晓旭, 孙世雄, 张培培, 孙翔翔, 刘蒙达, 张皓博, 孙淑芳, 孙明军. 基于不同抗原的犬布鲁氏菌病免疫层析胶体金抗体试纸条的制备和比较[J]. 中国动物检疫, 2024, 41(5): 90-95.
GUO XH, YAN X, SHAO WX, YIN DH, YAN H, NAN WL, FAN XX, SUN SX, ZHANG PP, SUN XX, LIU MD, ZHANG HB, SUN SF, SUN MJ. Preparation and comparison of colloidal gold immunochromatographic strips for canine brucellosis based on different antigens[J]. China Animal Health Inspection, 2024, 41(5): 90-95 (in Chinese).
- [22] 马世辉, 贾沅铮, 王福成, 连丽燕, 蒋蔚, 陈兆国, 韩先干, 陈伟. 基于布鲁菌 $bp26$ 基因LAMP检测方法的建立及优化[J]. 中国兽医科学, 2024, 54(8): 1043-1049.
MA SH, JIA YZ, WANG FC, LIAN LY, JIANG, CHEN ZG, HAN XG, CHEN W. Establishment and optimization of LAMP detection system in *Brucella* based on $bp26$ gene[J]. Chinese Veterinary Science, 2024, 54(8): 1043-1049 (in Chinese).
- [23] 赛力克·巴合达吾列提, 马晓菁, 加娜尔·木塔依别克, 阿依恒·沙布尔别克, 木尔扎提·阿勒腾别克, 何俊, 如扎·阿布德哈勒克, 舍卫俊. 牛种布鲁氏菌A19-ΔVirB12标记疫苗在阿勒泰地区推广应用[J]. 新疆畜牧业, 2023, 39(6): 21-24.
Selek Bahedavrieti, MA XJ, Gana Mutaibek, Ayiheng Shaburbek, Murzati Altenbek, Sodaa, Ruza Abdhalek, Shweijun. Popularization and application of *Brucella bovis* A19-ΔVirB12 labeled vaccine in Altay region[J]. Xinjiang Xumuye, 2023, 39(6): 21-24 (in Chinese).
- [24] 韦景平, 王宏宇, 张洪军, 孙泰然, 刘博, 刘亚涛, 袁芳, 马宏伟, 韩庆安. M5 (M5-90Δ26)株和S2株布氏杆菌疫苗对羊诱导的抗体消长动态规律及免疫效果研究[J]. 北方牧业, 2024(15): 13.
WEI JP, WANG HY, ZHANG HJ, SUN TR, LIU B, LIU YT, YUAN F, MA HW, HAN QA. Study on the dynamic law of antibody growth and decline induced by M5 (M5-90Δ26) strain and S2 strain *Brucella* vaccine in sheep and its immune effect[J]. North China Pastoral Industry Journal, 2024(15): 13 (in Chinese).