

## 布鲁氏菌 M5-90 疫苗株 *virB2* 基因缺失株的构建及鉴定

李臻<sup>1#</sup>, 张红星<sup>2#</sup>, 唐利燕<sup>1</sup>, 陈创夫<sup>1\*</sup>, 王远志<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup> 石河子大学生命科学学院, 石河子大学动物科技学院, 石河子大学医学院, 石河子 832003)

(<sup>2</sup> 安阳市中医院, 安阳 455000)

**摘要:**【目的】构建布鲁氏菌 M5-90 疫苗株 *virB2* 基因缺失株。【方法】利用常规分子生物学技术构建自杀载体 pGEM-7zf- $\Delta virB2$ -*sacB*, 通过同源重组的方法, 将电转化后的布鲁氏菌分别经 100 mg/L 氨苄抗性筛选和 5% 蔗糖敏感性筛选, 获得基因缺失株。对获得的基因缺失株进行 PCR 鉴定和稳定性检测。【结果】成功构建 M5-90 $\Delta virB2$  基因缺失株, 并且该缺失株在 10 代以内未发生回复突变。【结论】为研发新型布鲁氏菌弱毒基因缺失活苗奠定基础。

**关键词:** 布鲁氏菌; *virB2* 基因; 基因缺失株

**中图分类号:** R392      **文献标识码:** A      **文章编号:** 0001-6209 (2010) 12-1677-04

布鲁氏菌病 (*Brucellosis*) 是由布鲁氏菌引起的一种人畜共患传染病。近年来, 全国人、畜间布病疫情异常活跃, 人间布病爆发点增多, 疫情出现回升势头<sup>[1]</sup>。“检、杀、免”是当前防控、消灭动物布鲁氏菌病的主要手段。羊种布鲁氏菌疫苗株 M5-90 是我国最常使用的预防绵羊和山羊的疫苗株。羊型 M5-90 (M5) 弱毒活菌苗系我国哈尔滨兽医研究所将羊种布鲁氏菌生物 1 型 H2 强毒株经鸡传代减毒育成, 1969 年正式使用, 对牛、山羊、绵羊和鹿布鲁氏菌病的预防效果较好。M5-90 株的使用缺陷为: 免疫怀孕母畜, 可引起部分母畜流产; 用常规血清学方法检测, 不能区别疫苗免疫和自然感染。因而 M5-90 疫苗株有一定的改造空间。

IV 型分泌系统是布鲁氏菌重要的毒力因子, 由 12 个不同的蛋白构成的复合体, 这些蛋白跨越细菌的细胞壁。*virB2* 位于细菌表面, 与细菌侵袭有密切

关系<sup>[2]</sup>。Kahl-McDonagh<sup>[3]</sup>等用  $1 \times 10^5 - 5 \times 10^5$  个牛种布鲁氏菌 2308 野毒株和  $\Delta virB2::Km$  (卡那抗性基因替换 *virB2* 基因) 突变株感染 6-10 周龄 BALB/c 小鼠, 在感染后 1 周, 感染小鼠脾脏内布鲁氏菌  $\Delta virB2::Km$  突变株的菌落数只有 2308 野毒株感染组的 1/10-1/6, 在感染后 8 周, 感染小鼠脾脏内布鲁氏菌  $\Delta virB2::Km$  突变株的菌落数只有 2308 野毒株感染组的  $1/10^4 - 1/10^3$ , 说明 *virB2* 与布鲁氏菌毒力及胞内生存密切相关。

本研究以我国自主研发的羊种布鲁氏菌疫苗株 M5-90 为亲本株, 通过基因改造技术, 针对 IV 型分泌系统的 *virB2* 基因, 构建 M5-90 $\Delta virB2$  基因缺失突变株, 旨在进一步弱化 M5-90 活苗的毒力, 获得毒力下降、免疫原性和保护力基本不变的基因缺失突变株, 为研发新型预防布鲁氏菌病的弱毒基因缺失活苗奠定基础。

**基金项目:** 国家“973 项目”(2010CB30203); 国际科技合作项目(2006DFA33740); 国家自然科学基金项目(30760187, 30800813)

\* 通信作者。Tel: +86-993-2058002; Fax: +86-993-2058031; E-mail: cc973@sina.com (陈创夫), wyzshz@sina.com (王远志)

**作者简介:** #共同为第一作者。李臻(1985-), 男, 河南人, 硕士研究生, 研究方向为分子免疫, E-mail: lizhen630@sina.com;

张红星(1973-), 男, 河南人, 硕士研究生, 研究方向为生化与分子, E-mail: zhxing1900@163.com

**收稿日期:** 2010-04-16; **修回日期:** 2010-08-23

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 菌株、酶和载体:**布鲁氏菌 M5-90 疫苗株、枯草芽孢杆菌均由本研究室保存;限制性内切酶 *BspH I*、*Sac I*、*Xho I* 均购自 TaKaRa 公司;pBS-T、pGM-T 载体购自北京天根生化科技有限公司,pGEM-7zf(-) 自杀载体购自 Promega 公司。

**1.1.2 培养基与主要试剂盒:***Brucella* Broth 培养基以及 *Brucella* Agar 培养基均购自美国 Becton, Dickinson 公司;琼脂糖凝胶回收试剂盒,质粒小提和中提试剂盒均购自北京天根生化科技有限公司。

### 1.2 引物

本实验研究所用引物均由上海生工生物技术服务有限公司合成。序列见表 1。

表 1 PCR 引物序列

Table 1 Nucleotide sequences of PCR primers

Primer	Primer sequences(5'→3')
<i>virB2</i> -F	ATTGATGATGCTGGAGGGTC
<i>virB2</i> -R	ATGGCACGGAACAAGGTGT
<i>sacB</i> -F	GAGCTCGGGCTGGAAGAAGCAGACCGCTA
<i>sacB</i> -R	GAGCTCGCTTATTGTAACTGTTAATTGTCC

### 1.3 同源重组质粒 pGEM-7zf- $\Delta$ *virB2*-*sacB* 的构建

以布鲁氏菌 M5-90 疫苗株基因组为模板,用引物 *virB2*-F 和 *virB2*-R 扩增出包含 *virB2* 基因及其侧翼序列的 DNA 片段,连接 T 载体后用 *Sac I*/*Xho I* 双酶切并回收目的片段,再用 *BspH I* 酶切回收产物,去除 *virB2* 基因。将酶切后得到的上下游同源臂连至自杀载体 pGEM-7zf(-),经过鉴定正确的重组质粒命名为 pGEM-7zf- $\Delta$ *virB2*。克隆枯草芽孢杆菌 *sacB* 基因连接 T 载体。分别用 *Sac I* 单酶切重组质粒 pGEM-7zf- $\Delta$ *virB2* 和 pGM-T-*sacB*,将得到 *sacB* 基因与线性化的重组质粒 pGEM-7zf- $\Delta$ *virB2* 连接,构建成同源重组质粒 pGEM-7zf- $\Delta$ *virB2*-*sacB*。

### 1.4 布鲁氏菌 *virB2* 基因缺失突变株的筛选及鉴定

制备布鲁氏菌 M5-90 电转化感受态细胞<sup>[4]</sup>,取 0.5  $\mu$ g 构建好的同源重组质粒 pGEM-7zf- $\Delta$ *virB2*-*sacB* 加入到 100  $\mu$ L 制备的感受态细胞中混匀,冰上放置 15 min,加入电击杯中,以  $E = 2.5$  KV/cm 电击,然后立即加入到 37 $^{\circ}$ C 预热的 1 mL *Brucella* Broth 培养基中,37 $^{\circ}$ C 摇床振荡培养 24 h 后收集菌液先后涂布于 100 mg/L Amp<sup>r</sup> 抗性和 5% 蔗糖的 *Brucella* Agar 培养基上,进行同源重组的单、双交换子筛选。对同源重组双交换子进行 PCR 鉴定和稳定性检测。

## 2 结果

### 2.1 同源重组质粒 pGEM-7zf- $\Delta$ *virB2*-*sacB* 的鉴定

以引物 *virB2*-F, *virB2*-R 和 *sacB*-F, *sacB*-R 对同源重组质粒 pGEM-7zf- $\Delta$ *virB2*-*sacB* 进行 PCR 鉴定, *virB2* 侧翼序列大小约为 1000 bp, *sacB* 大小约为 1500 bp,结果与预期相符,如图 1。

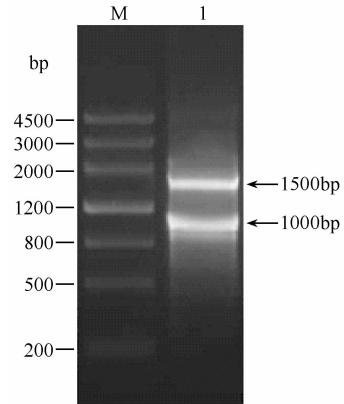


图 1 pGEM-7zf- $\Delta$ *virB2*-*sacB* PCR 鉴定

Fig. 1 Recombinant plasmid pGEM-7zf- $\Delta$ *virB2*-*sacB* PCR with *virB2* and *sacB* primers.

### 2.2 布鲁氏菌 *virB2* 基因缺失株同源重组单交换子和双交换子的筛选

经过电转化的布鲁氏菌培养后均匀涂布于含有氨苄抗性的 *Brucella* Agar 培养基上,长出大约 100 到 200 个菌落,如图 2-A。挑取单交换子于 *Brucella* Broth 培养基中培养 24 h,离心后再涂布于含有 5% 蔗糖的 *Brucella* Agar 培养基上,长出约 300 到 400 个菌落,如图 2-B。

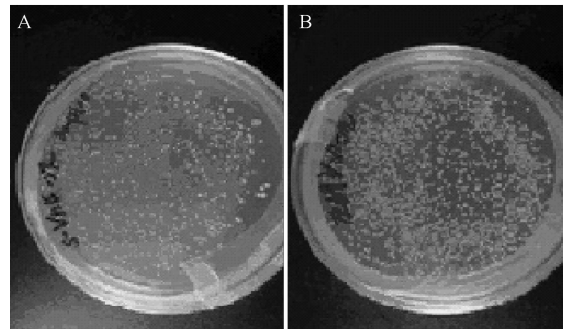


图 2 同源重组子第一次筛选和第二次筛选

Fig. 2 Homologous recombinants first filter (A) and second filter (B).

### 2.3 PCR 鉴定布鲁氏菌 *virB2* 基因缺失株

在双交换子平板上挑取单菌落,通过菌落 PCR 鉴定同源重组双交换子。以引物 *virB2*-R 和 *virB2*-F 扩增得到 1000 bp 的条带,即为 M5-90 $\Delta$ *virB2*。得到的大约 1300 bp 的条带是未能实现基因敲除的菌株,如图 3。

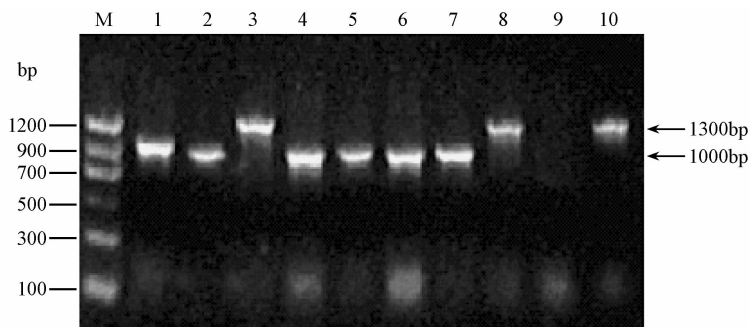


图3 M5-90  $\Delta virB2$  菌落 PCR 鉴定

Fig. 3 Identification of M5-90  $\Delta virB2$  by PCR. M: Marker. Line 1, 2, 4, 5, 6, 7 is  $\Delta virB2$ ; Line 3, 8 is M5 which come from  $\Delta virB2$ . Line 9 is negative; Line 10 is M5-90.

## 2.4 布鲁氏菌 *virB2* 基因缺失株稳定性检测

经过鉴定的 M5-90  $\Delta virB2$ , 测序正确后进行传

代培养至 10 代, PCR 鉴定发现在 10 代以内未发生回复突变, 遗传稳定, 如图 4。

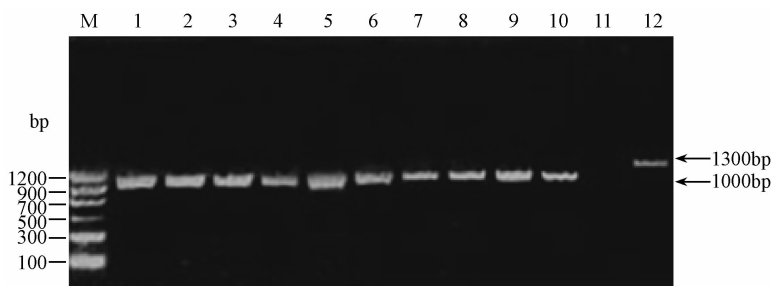


图4 M5-90  $\Delta virB2$  传代 10 代 PCR 鉴定遗传稳定性

Fig. 4 M5-90  $\Delta virB2$  Cultured 10 generation. M: Marker. Line 1 to 10 is  $\Delta virB2$ ; Line 11 is negative; Line 12 is M5-90.

## 3 讨论

基因缺失突变株的构建, 目前最常采用的方法是构建同源重组自杀载体。对同源重组子的筛选大都以抗生素作为筛选标记, 给临床兽医用药带来不必要的顾虑, 从而限制了疫苗在临床免疫中的使用。我们构建的同源重组质粒 pGEM-7zf- $\Delta virB2$ -sacB 所包含了氨苄抗性基因 ( $Amp^r$ ) 和枯草芽孢杆菌 *sacB* 基因, 分别作为正负筛选标记<sup>[4-6]</sup>。在二次同源重组子的筛选中, *sacB* 基因连同一次重组上的氨苄抗性基因一同被祛除, 避免了布鲁氏菌基因缺失株的 DNA 污染和抗生素基因的引入。同源重组序列的长度是影响基因同源重组效率的主要因素<sup>[7]</sup>。本研究在前期的预实验中构建了长度分别为 0.3 kb 左右的同源臂, 以及 0.5 kb 和 0.6 kb 的同源臂, 电转后发现后者的重组效率要高于前者, 这一点与 Leloup 等<sup>[8]</sup>的研究结果相吻合。他们发现同源片段长度在 0.3 - 1.2 kb 范围内, 同源重组的效率呈对数增长。

*virB2* 基因是布鲁氏菌的重要毒力因子之一, 在感染宿主和胞内生存方面具有特殊作用。布鲁氏菌侵入机体后在急性期出现菌血症<sup>[9]</sup>。本研究构建的 M5-90  $\Delta virB2$  基因缺失株, 以引物 *virB2*-F、*virB2*-R 进行 PCR 扩增, 可获得 1000 bp 的扩增产物, 该片段与野毒株对应片段 1300 bp 有明显差异, 从而能够在菌血症时期将 M5-90  $\Delta virB2$  基因缺失株与自然感染的野毒株相区分。另外, 缺失 *virB2* 基因可能会降低 M5-90 免疫机体产生的毒副作用, 有可能用于怀孕母畜的布病预防。

## 参考文献

- [1] 王茂武, 宫新生, 尚德秋, 张士义, 王大力. 市场经济下布鲁氏菌病防治工作的新思路. 疾病监测 (Disease Surveillance), 2004, 19(8): 306-308.
- [2] Christie PJ, Vogel JP. Bacterial type IV secretion: conjugation systems adapted to deliver effector molecules to host cells. Trends in Microbiology, 2000, 8(8): 354-360.
- [3] Kahl-McDonagh MM, Ficht TA. Evaluation of protection

- afforded by *Brucella abortus* and *Brucella melitensis* unmarked deletion mutants exhibiting different rates of clearance in BALB/c mice. *Infection and Immunity*, 2006, 74(7):4048-4057.
- [ 4 ] 闫广谋,王兴龙,任林柱,刘锴,高建勇,王学理,张辉,李晓燕. 布鲁氏菌分子标记、毒力缺失疫苗株  $\Delta$ S19-2 的构建. *中国兽医学报* (*Chinese Journal of Veterinary Science*), 2007, 27(5):690-694.
- [ 5 ] 王玉飞,陈泽良,赵红庆,苑锡铜,黄留玉. 以克隆载体为自杀载体快速构建布鲁氏菌的无痕缺失突变株. *微生物学通报* (*Microbiology*), 2007, 34(4):642-645.
- [ 6 ] Escamilla MA, DeMille MC, Benavides E, Roche E, Almasy L, Pittman S, Hauser J, Lew DF, Freimer N B, Whittle MR. A minimalist approach to gene mapping: locating the gene for acheiropodia, by homozygosity analysis. *American Journal of Human Genetics*, 2000, 66(6):1995-2000.
- [ 7 ] 马先勇,姚开泰. 同源重组技术研究进展. *生物工程进展* (*Progress in Biotechnology*), 1996, 16:16-23.
- [ 8 ] Leloup L, Ehrlich SD, Zagorec M, Morel-Deville F. Single-crossover integration in the *Lactobacillus sake* chromosome and insertional inactivation of the *ptsI* and *lacL* genes. *Applied and Environmental Microbiology*, 1997, 63(6):2117-2123.
- [ 9 ] El Kholy AA, Gomaa HE, El Anany MG, Abd El Rasheed E. Diagnosis of human brucellosis in Egypt by polymerase chain reaction. *Eastern Mediterranean Health Journal*, 2009, 15(5):1068-1074.

## Construction and identification of *virB2* deletion mutants of *Brucella* vaccine strain M5-90

Zhen Li<sup>1#</sup>, Hongxing Zhang<sup>2#</sup>, Liyan Tang<sup>1</sup>, Chuangfu Chen<sup>1\*</sup>, Yuanzhi Wang<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup>College of Life Science, College of Animal Science and Technology, College of Medicine, Shihezi University, Shihezi 832003, China)

(<sup>2</sup>Hospital of Traditional Chinese Medicine, Anyang 455000, China)

**Abstract:** [ **Objective** ] To construct *Brucella* vaccine strain M5-90  $\Delta$ *virB2* mutants. [ **Methods** ] Suicide plasmid pGEM-7zf- $\Delta$ *virB2*-*sacB* was constructed by traditional molecular biology technology. Through the method of homologous recombination, we screened *Brucella* gene deletion mutant by 100 mg/L ampicillin resistance screening and 5% sugar sensitivity screening after electroporation. The M5-90  $\Delta$ *virB2* mutant was identified by PCR. Its stability was detected by continuous bacteria culture. [ **Results** ] The *virB2* deletion mutant strain was successfully constructed. The reverse mutation did not occur within 10 passages. [ **Conclusion** ] The results of this study will be based on developing the new attenuated vaccine of *Brucella* gene deletion mutants.

**Keywords:** *Brucella*; gene *virB2*; gene deletion mutant

( 本文责编: 张晓丽 )

Supported by the National Basic Research Program of China (973 Project) (2010CB30203), by the Item of International Cooperative Science and Technology (2006DFA33740) and by the National Natural Science Foundation of China (30800813, 30760187)

\* Corresponding authors. Chuangfu Chen, Tel: +86-993-2058002, Fax: 86-993-2058031, E-mail: ccf973@sina.com; Yuanzhi Wang, Tel: +86-993-2057155, E-mail: wuzshz@sina.com

#These authors contribute equally to this work.

Received: 16 April 2010 / Revised: 23 August 2010