

牛布鲁氏菌 A19 突变株的构建及在 BALB/c 鼠中的免疫保护评估

易新萍¹, 叶锋¹, 姚刚², 谷文喜¹, 马晓菁¹, 吴冬玲³, 钟旗^{1*}

¹新疆畜牧科学院兽医研究所, 乌鲁木齐 830000

²新疆农业大学动物医学学院, 乌鲁木齐 830052

³新疆天康畜牧生物技术股份有限公司, 乌鲁木齐 830032

摘要:【目的】构建牛布鲁氏菌 A19-ΔVirB12 突变株并免疫 BALB/c 鼠, 初步评估了其免疫保护效果。【方法】应用 PCR 方法扩增 A19 疫苗株 VirB12 基因的上下游同源臂序列, 构建重组质粒 pBK-CMV-SacB-VirB12, 将该质粒电击转化至布鲁氏菌 A19 感受态细胞中, 筛选得到布鲁氏菌疫苗株 A19 的 VirB12 基因缺失株。以 A19 疫苗株为参照, 应用 A19-ΔVirB12 疫苗接种 BALB/c 小鼠, 免疫 45d 后布鲁氏菌 2308 强毒株攻毒, 攻毒 15d 后取 BALB/c 鼠的脾脏进行克脾指数测定和病理组织学检测。Western-blotting 鉴定 VirB12 蛋白的免疫反应性。【结果】构建了牛布鲁氏菌 A19-ΔVirB12 突变株, 小鼠免疫攻毒后 15d, A19-ΔVirB12 免疫组和 A19 免疫组的克脾指数与对照组之间有显著性差异 ($P < 0.05$)。A19 免疫组与 A19-ΔVirB12 免疫组之间克脾指数差异不显著 ($P > 0.05$)。Western blotting 实验表明 VirB12 蛋白具有免疫反应性。【结论】牛布鲁氏菌 A19-ΔVirB12 突变株与亲本株 A19 免疫保护性无明显差异, 通过血清学方法可区分疫苗免疫与野生型牛种布鲁氏菌 (*Brucella abortus*) 感染动物, 具备作为标记疫苗的潜力。

关键词:牛布鲁氏菌, A19-ΔVirB12 突变株, 同源重组, 免疫保护

中图分类号: S855.12 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209 (2013) 11-1213-08

布鲁氏菌病 (Brucellosis, 简称布病) 是由布鲁氏菌 (*Brucella*) 感染引起的人兽共患传染病。布病不仅对畜牧业生产造成巨大的经济损失, 同时因其可以感染人类, 也严重危害了社会公共卫生安全^[1]。近年来, 国内外布鲁氏菌病疫情呈上升趋势, 引起各国的广泛关注^[2]。人主要通过直接或间接接触患病动物而感染布病, 在正确诊断和捕杀患病动物切

断传染源的基础上, 动物接种疫苗是公认的能够降低畜间布病发生和传播的最实际、最有效的方法之一^[3]。因此, 布病疫苗的研制一直是布病防控的主要研究热点。

布鲁氏菌为胞内寄生菌, 抗生素对其效果甚微, 机体的细胞免疫对抑制布病有至关重要的作用^[4]。布病疫苗主要分为灭活疫苗、弱毒活疫苗和突变株

基金项目: 自治区高新技术研究发展计划 (200911109); 国家科技支撑项目 (2012BAD13B03); 2012 年新疆维吾尔自治区博士后资助; 农业部公益性行业专项 (201103008)

* 通信作者。Tel / Fax: + 86-991-4844713; E-mail: yyyzqok@aliyun.com

作者简介: 易新萍 (1970 -), 女, 湖北公安人, 博士, 主要从事布病诊断及疫苗研制。E-mail: yxp0925@sina.com

收稿日期: 2013-03-14; 修回日期: 2013-05-10

疫苗。其中弱毒活疫苗应用最广泛。我国动物布病防控的主要策略是检疫-扑杀和疫苗免疫接种相结合,现阶段所用疫苗主要有流产布鲁氏菌疫苗株 A19、猪布鲁氏菌疫苗株 S2 和羊布鲁氏菌疫苗株 M5。过去几十年来,这些疫苗为动物布病控制提供了重要保障,但也存在毒力较强,可造成部分怀孕母畜流产;无法区分疫苗免疫和自然感染等缺点。为了鉴别自然感染与疫苗免疫接种引起的免疫应答,通过分子生物学技术对布鲁氏菌进行遗传改造而获得具有分子标记的疫苗株是一种有效的途径^[5-6]。国内外研究者对牛型布鲁氏菌 19 号疫苗进行遗传改造,构建了具有分子标记的 A19 突变株^[7-10],但对这些 A19 突变株的实际应用未见进一步研究报道。

IV 型分泌系统 (T4SS) 是布鲁氏菌的重要毒力因子,它是由 12 个不同 VirB 蛋白构成的贯穿细菌壁和外膜的复合体,分别为 VirB1-12^[11]。研究表

明, VirB 与布鲁氏菌在宿主细胞内生存、复制、免疫应答有关^[12-14],研究表明 VirB12 蛋白可作为一种布鲁氏菌血清学检测标记抗原^[15]。本研究应用同源重组方法敲除了布鲁氏菌 IV 型分泌系统中 VirB12 基因,获得 A19 缺失 VirB12 基因的突变株,即 A19-ΔVirB12 突变株。以布鲁氏菌 VirB12 蛋白作为标记抗原来区分布鲁氏菌病疫苗免疫和自然感染的目的,并在动物模型上验证该突变株的安全性和免疫效果,以期为布鲁氏菌病的防治提供技术支持。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒:

实验中使用的菌株和质粒见表 1。

表 1. 本研究使用的菌株和质粒

Table 1. Strains and plasmids in this study

No.	Strain or plasmid	Description	Source
1	pGEM-TEasy Vector	Cloning vector	Promega Company
2	pIB279	Containing SacB plasmid	Academy of Military Medical Sciences
3	pBK-CMV	Suicide plasmid	Strata gene Biotech Company
4	DH5a	<i>Escherichia coli</i> competent cells	Dingguo Biotech Company of Beijing
5	A19	<i>Brucella abortus</i> strain	Institute of Veterinary Drug Control
6	2308	<i>Brucella abortus</i> strain	Institute of Veterinary Drug Control

1.1.2 主要试剂: *Brucella* Broth 培养基和 *Brucella* Agar 培养基购自美国 BD 公司,培养基配方参照文献 [16]; *Taq* 酶、dNTP、PCR mix 购自北京庄盟生物技术有限公司;限制性内切酶购自 Fermentas 公司;质粒提取和胶回收试剂盒购自 Promega 公司。布鲁氏菌抗原购自中国疾病预防控制中心传染病研究所;氨苄青霉素、卡那霉素购自 Sigma 公司。

1.1.3 实验动物: BALB/c 雌鼠购自新疆实验动物研究中心,许可证号: SCXK (新) 2003 - 0002。BALB/c 雌鼠饲养于新疆天康畜牧生物技术股份有限公司三级生物安全实验室的负压隔离笼具中。

1.2 引物

根据 *Brucella abortus* 的 VirB12 基因 (ORF12) 序列 (GenBank, AF226278) 和 SacB 基因序列 (GenBank, NC-000964) 设计相应的引物,见表 2。

1.3 自杀质粒构建

以 A19 基因组为模板,以 VirB12-S-F 和

VirB12-S-R 为引物 PCR 扩增布鲁氏菌 VirB12 基因上游同源臂;以 VirB12-X-F 和 VirB12-X-R 为引物 PCR 扩增 VirB12 基因下游同源臂;以 pIB279 质粒 (含 SacB 基因) 基因组为模板,以 SacB-F 和 SacB-R 为引物 PCR 扩增 SacB 基因。将 PCR 扩增片段分别与 pGEM-TEasy 载体连接,转化、筛选、PCR 鉴定阳性克隆质粒,即 pT-VirB12-S、pT-VirB12-X 和 pT-SacB 质粒,送上海英俊生物公司测序。*Sal* I 和 *Bam* H I 同时双酶切 pBK-CMV 载体和 pT-SacB 克隆质粒,纯化回收 SacB 片段与 pBK-CMV 载体片段,连接,转化,筛选阳性重组质粒 pBK-CMV-SacB,双酶切及 PCR (SacB) 鉴定。参照上述步骤依次将 VirB12 基因上游同源臂和下游同源臂连接到 pBK-CMV-SacB 重组质粒上,分别应用 *Bam* H I / *Xho* I、*Xho* I / *Xba* I 双酶切和 PCR 方法鉴定筛选重组质粒,获得自杀质粒 pBK-CMV-ΔVirB12-SacB。

表 2. 引物序列
Table 2. Primer sequence

Primer	Sequence (5' → 3')	Size of amplification or amplification product/ bp	Restriction site introduced
VirB12-S-F	ggatcc TGTGCTCTTCTCTTTGTCCTG	2300	<i>Bam</i> H I
VirB12-S-R	ctcgag TAACCAATGTGCGCATT		<i>Xho</i> I
VirB12-X-F	ctcgagTGGATATCGAAATTTTA	2030	<i>Xho</i> I
VirB12-X-R	tetagaAGATGAGGAAACCAGA		<i>Xba</i> I
SacB-F	gtagc ATGAACATCAAAAAGTTTGC	1422	<i>Sal</i> I
SacB-R	ggatcc TTATTTGTTAACTGTTAATTG		<i>Bam</i> H I
VirB12-F	GTCAGCTTCTCGCCAACACAAG	713	/
VirB12-R	CGTCGGA ACCGCT CTATAGGTC		

1.4 A19-ΔVirB12 突变株构建及筛选鉴定

参照文献 [17] 方法制备 A19 感受态细胞。将自杀质粒 pBK-CMV-ΔVirB12-SacB 电击转化到 A19 感受态细胞中, 电击转化液于 37℃ 180 r/min 振荡培养 24 h。将转化液涂于含有卡那霉素 (kanamycin, kan^r) (50 μg/mL) 的布氏琼脂培养基平板上, 37℃ 5% CO₂ 条件下培养 3 d。挑取平板上转化子于 37℃ 250 r/min 振荡培养 48 h, 适当稀释培养物并涂布于添加 5% 蔗糖的布氏琼脂培养基平板上, 37℃ 培养 4 d。平板上长出的菌落以 VirB12-F 和 VirB12-R 为引物进行 PCR 鉴定, 将 PCR 鉴定正确的阳性菌落命名为 A19-ΔVirB12。

1.5 毒力测定

生理盐水分别将布氏琼脂培养基上培养 72 h 的 A19-ΔVirB12 和 A19 的培养物洗下, 稀释成每毫升含 10 亿 CFU 菌的悬液, 腹股沟注射体重 20 - 22 g 的 BALB/c 小鼠各 5 只, 每只 0.2 mL, 14 d 剖杀, 无菌取脾脏, 称重, 灭菌 PBS 研磨脾脏制成乳剂, 分别按原液、1:100 稀释液和 1:10000 稀释液进行细菌分离、计数。计算每只 BALB/c 鼠每克脾脏的载菌量 (CFU/g) 并取其平均值, SPSS 11.5 软件, t 检验 ($P < 0.05$) 进行统计学分析。

1.6 免疫保护性

取 110 只 6 周龄的雌性 BALB/c 鼠, 随机分为 3 组。参照文献 [18] 方法, 分别将 A19 和 A19-ΔVirB12 以 5.0×10^4 CFU/只腹腔接种 BALB/c 鼠, 即 A19 组 (36 只)、A19-ΔVirB12 组 (38 只)。PBS 对照组 (36 只) 接种 0.01 mol/L PBS 1.0 mL。免疫后每周每组取 3 只 BALB/c 鼠眼球采血, 分离血清, 检测免疫抗体。第 45 天, 2308 毒株以 3.0×10^4 CFU/只的剂量攻毒所有 BALB/c 鼠。攻毒后第 15 天无菌取脾脏, PBS 研磨, 细菌分离并菌落计数,

计算 BALB/c 鼠克脾指数, 应用 SPSS 11.5 软件进行方差检验统计学分析。

1.7 VirB12 蛋白的 Western blotting 鉴定

以纯化的 VirB12 重组蛋白作为抗原, 以 1.6 中分离的鼠抗血清为一抗, 以山羊抗鼠 HRP-IgG 为二抗进行 Western blotting 分析, 试验方法和步骤参照文献 [19]。

1.8 组织病理变化

免疫攻毒后第 15 天剖杀 BALB/c 鼠, 多聚甲醛固定 A19 组、A19-ΔVirB12 组和 PBS 对照组 BALB/c 鼠肝脏、脾脏组织。组织脱水、透明、浸蜡和包埋, 常规方法制备石蜡切片, HE 染色, 镜检, 观察组织病理变化。

2 结果

2.1 自杀质粒 pBK-CMV-ΔVirB12-SacB 的酶切鉴定

用 *Xba*I 和 *Sal*I 双酶切自杀质粒, 得到大小约为 5750 bp 的 DNA 条带, 该条带与 SacB 基因和 VirB12 基因上下游同源臂片段大小的理论值相符; *Bam*H I 和 *Xho*I 双酶切自杀质粒, 得到约为 2300 bp 的 DNA 条带, 与 VirB12 基因上游同源臂片段大小的理论值相符; 用 *Xba*I 和 *Xho*I 双酶切自杀质粒, 得到与 VirB12 基因下游同源臂 DNA 条带, 片段大小与 2030 bp 的目的片段相符; *Bam*H I 和 *Sal*I 双酶切自杀质粒, 得到与 SacB 基因理论值相符的 1422 bp 的 DNA 条带; 上述的双酶切实验验证构建的自杀质粒 pBK-CMV-ΔVirB12-SacB 是完全正确的 (图 1)。

2.2 A19-ΔVirB12 突变株的 PCR 鉴定

A19-ΔVirB12 突变株的 PCR 扩增目的片段大小

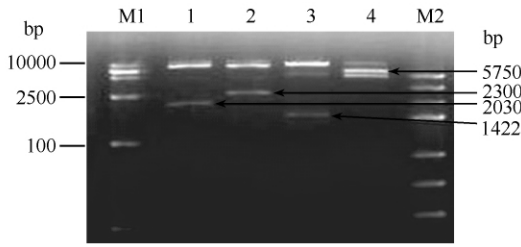


图 1. 自杀质粒 pBK-CMV-SacB-VirB12 酶切鉴定

Figure 1. Identification of pBK-CMV-SacB-VirB12 by restriction enzyme digestions. M1, DNA Marker VI; M2, DNA Marker III; lane 1, Products of pBK-CMV-SacB-VirB12 with *Xba* I and *Xho* I digestion; lane 2, Products of pBK-CMV-SacB-VirB12 with *Bam*H I and *Xho* I digestion; lane 3, Products of pBK-CMV-SacB-VirB12 with *Bam*H I and *Sal*I digestion; lane 4, Products of pBK-CMV-SacB-VirB12 with *Xba* I and *Sal*I digestion.

为 236 bp, A19 株 PCR 扩增目的片段为 713 bp (图 2)。

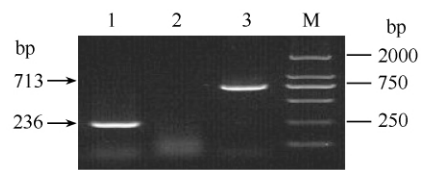


图 2. A19-ΔVirB12 突变株的 PCR 鉴定

Figure 2. Identification of A19-ΔVirB12 mutant strain by PCR. M, DNA Marker; lane 1, A19-ΔVirB12 mutant strain; lane 2, Blank control; lane 3, A19 strain.

2.3 A19-ΔVirB12 突变株毒力测定

分别将 A19-ΔVirB12 和 A19 以 1.0×10^9 CFU 腹腔注射 BALB/c 鼠, 15d 无菌取脾脏分离布鲁氏菌。表 3 结果表明 A19-ΔVirB12 突变株每克脾脏载菌量低于 1.0×10^6 CFU, 表明 A19-ΔVirB12 突变株为弱毒株。SPSS 11.5 软件的 t 检验表明, A19-ΔVirB12 的每克脾脏载菌量与 A19 差异显著 ($P < 0.05$), 表明 A19-ΔVirB12 标记株毒力弱于 A19 株。

表 3. A19 株和 A19-ΔVirB12 株毒力测定

Table 3. Determination of virulence of A19 and A19-ΔVirB12 strains

Strain	Inoculation method	CFU of inoculation	Days postchallenge/d	Mean weight of spleen/g	Number of bacteria per gram spleen/(CFU/g)
A19	Inguinal injection	1.0×10^9	15	0.26	$2.61 \pm 0.32 \times 10^5$ ^a
A19-ΔVirB12	Inguinal injection	1.0×10^9	15	0.22	$1.97 \pm 0.20 \times 10^5$ ^b

The difference between data with the different small letter within a row is significant ($P < 0.05$).

2.4 A19-ΔVirB12 免疫小鼠抗体检测

图 3 结果表明, A19 和 A19-ΔVirB12 免疫 BALB/c 鼠均能诱导动物机体产生免疫应答, A19 与 A19-ΔVirB12 免疫抗体在 BALB/c 鼠内消长曲线趋向基本一致, 没有明显的差异。在第 2 周可以检测到抗体, 第 3 至第 4 周抗体滴度维持在较高水平, 随后抗体滴度下降, 第 6 周至第 7 周抗体水平低于 1:50 或基本检测不到抗体 (图 3)。

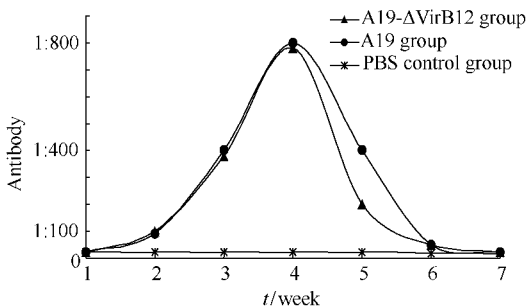


图 3. 布鲁氏菌特异性抗体消长曲线

Figure 3. Specific antibody response curve of *Brucella*.

2.5 免疫保护力

世界卫生组织 (WHO) 1997 年确定了评估突变株免疫保护能力的标准, 根据攻强毒株后特定时间内小鼠脾或肝脏的载菌量变化做出疫苗保护力的判断^[20]。攻毒后第 15 天剖杀 BALB/c 鼠, 无菌取脾脏分离细菌。SPSS 11.5 软件方差检验分析表明, A19 免疫攻毒组与 A19-ΔVirB12 免疫攻毒组之间克脾指数差异不显著 ($P > 0.05$)。A19 免疫攻毒组与 A19-ΔVirB12 免疫攻毒组和 PBS 对照组之间克脾指数差异显著 ($P < 0.05$)。A19 组 ($n = 15$) 有 3 只 BALB/c 鼠脾脏分离到布鲁氏菌。A19-ΔVirB12 组 ($n = 17$) 有 4 只 BALB/c 鼠脾脏分离到布鲁氏菌。PBS 对照组 ($n = 15$) 中 15 只 BALB/c 鼠均分离到布鲁氏菌。表 5 结果表明攻毒 15 d 后, A19-ΔVirB12 与 A19 株对布鲁氏菌 2308 毒株有较好的保护抵抗力, A19-ΔVirB12 株的免疫保护力与 A19 株相当。

表 5 BALB/c 鼠免疫保护实验结果

Table 5 The results of protective immunity in BALB/c

Group	Number ofBALB/c	<i>brucella</i> of 2308 load log (CFU/g spleen)	Ratio of isolation <i>brucella</i> in BALB/c
A19 group	15	3.445 ± 0.207 ^a	3/15
A19-ΔVirB12 group	17	3.022 ± 0.165 ^a	4/17
PBS control group	15	6.156 ± 0.325 ^b	15/15

The difference between data with the different small letter within a column is significant ($P < 0.05$), and the difference between data with the same small letter within a column is not significant ($P > 0.05$).

2.6 VirB12 重组蛋白 Western blotting 鉴定

提纯 VirB12 重组蛋白, 经 SDS-PAGE 和 Western blotting 分析, 结果显示 VirB12 重组蛋白可与 A19 疫苗免疫的小鼠血清反应, 出现大小约

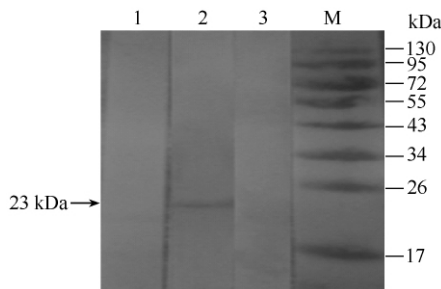


图 4. VirB12 蛋白的 Western blotting 分析

Figure 4. Western blotting of VirB12 protein. M, Protein Marker; lane 1, Negative control (PBS); lane 2, A19; lane 3, A19-ΔVirB12.

23 kDa 的特异性目的条带。VirB12 重组蛋白与 A19-ΔVirB12 和 PBS 免疫的小鼠血清均不反应(图 4), 结果表明 VirB12 重组蛋白具有良好的反应原性。

2.7 组织病理变化

布鲁氏菌 2308 强毒株攻毒 PBS 对照组和 A19-ΔVirB12 免疫组 BALB/c 鼠, 15 d 取肝脏和脾脏进行病理组织学切片检查, 结果表明, PBS 对照攻毒组的肝脏和脾脏比 A19-ΔVirB12 免疫攻毒组有明显的病理变化。A19-ΔVirB12 免疫攻毒组 BALB/c 鼠脾脏出现轻微的脾小梁延伸、增宽现象, 肝细胞有轻度水肿和增生; PBS 对照攻毒组 BALB/c 鼠脾脏内出现多个巨噬细胞; 肝细胞部分区域出现炎性细胞浸润(图 5)。病理组织切片结果进一步表明, A19-ΔVirB12 疫苗具有较好的免疫保护力。

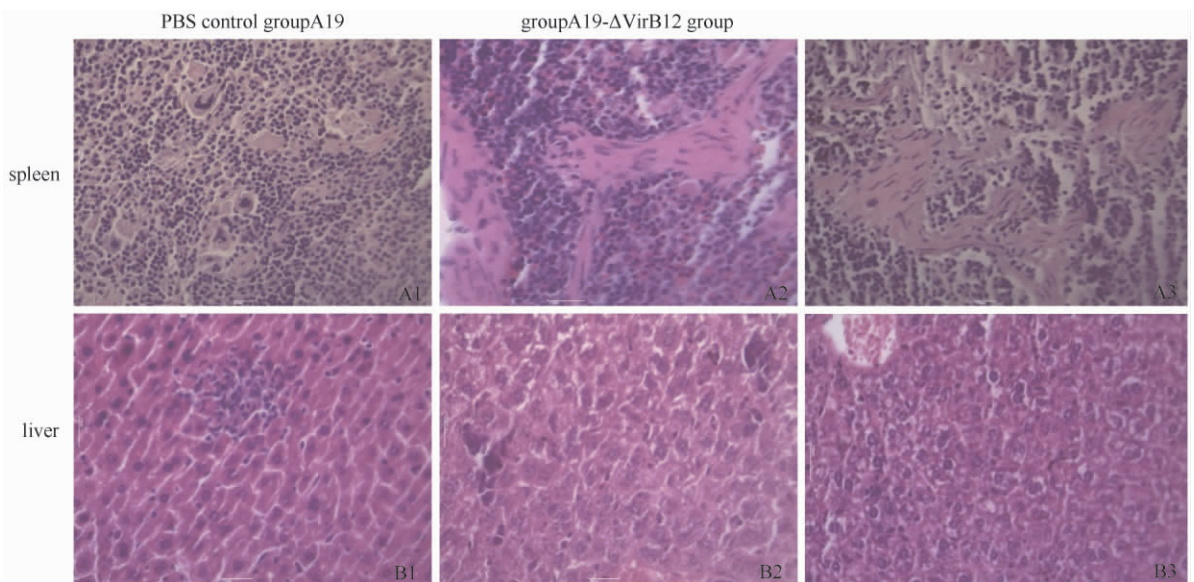


图 5. 2308 毒株攻毒 BALB/c 鼠的病理组织切片 (400 ×)

Figure 5. Histopathological changes of A19-ΔVirB12-immunized mice after challenge with 2308 strain (400 ×). A1: The spleen of PBS control group; A2: The spleen of A19 group; A3: The spleen of A19-ΔVirB12 group; B1: The liver of PBS control group; B2: The liver of A19 group; B3: The liver of A19-ΔVirB12 group.

3 讨论

目前,对畜间布鲁氏菌病的防治主要依赖接种疫苗。减毒活疫苗 A19 株在防治牛布鲁氏菌病方面取得明显的效果。本研究以 A19 为亲本株,利用同源重组技术对 A19 疫苗株实施改造,敲除了布鲁氏菌四型分泌系统(T4SS)中 VirB12 基因,获得了具有布鲁氏菌病诊断标记的 A19-ΔVirB12 标记疫苗株,为建立区分动物布病免疫和自然感染的鉴别诊断方法奠定了理论基础。

布鲁氏菌的 IV 型分泌系统(T4SS)是继脂多糖之后又一个关键的致病力因子,T4SS 由 12 个可跨膜蛋白的多蛋白复合物家族组成, VirB 操纵子编码布鲁氏菌的 T4SS,与布鲁氏菌细胞内生存繁殖有关^[21],T4SS 突变会大大的衰减布鲁氏菌在体外培养模式中的胞内生存。VirB12 蛋白是由 VirB12 基因编码的一个布鲁氏菌宿主定植蛋白,分子量约为 17 kDa,在细菌与宿主的相互作用中起作用。研究证明, VirB12 在牛种布鲁氏菌感染中是一种免疫原性蛋白,而且该基因在小鼠感染牛种布鲁氏菌的过程中均有表达,但在 T4SS 中并不是必需蛋白^[22]。本研究以 A19 株为参照, A19-ΔVirB12 突变株免疫 BALB/c 鼠,抗体水平检测结果表明, A19-ΔVirB12 突变株和 A19 株在 BALB/c 鼠体内都诱导机体产生了免疫应答,而且产生的免疫应答强弱和体内持续时间无显著差异。Western blotting 分析进一步证明 A19-ΔVirB12 株免疫小鼠不产生 VirB12 特异性抗体,而且敲除 A19 的 VirB12 基因对其免疫原性无明显影响。研究结果更进一步证明 VirB12 可作为布病血清学检测标记抗原,为 A19-ΔVirB12 标记疫苗株的研发应用提供了科学的理论依据。

布鲁氏菌是一种胞内感染细菌,机体对胞内寄生菌的免疫清除以细胞免疫为主。本研究中体液免疫结果显示 A19-ΔVirB12 与亲本株 A19 的抗体增长趋势是一致的, IgG 的含量随着免疫时间的延长而增加,相同时期 A19-ΔVirB12 诱导产生的 IgG 含量与亲本株 A19 相当,在第 6 周抗体水平低于 1:25 或基本检测不到抗体。研究表明,在第 6 周 S19 接种的小鼠对布鲁氏菌可以建立起较强的细胞免疫反应^[23-24]。因此,本研究选择接种疫苗接种后的第 45 天(第 6-7 周)对免疫的 BALB/c 鼠攻毒来评价 A19-ΔVirB12 突变株的免疫保护效力。实验结果表明,

攻毒 15 d 后,与 PBS 对照组相比, A19-ΔVirB12 免疫攻毒组和 A19 免疫攻毒组的克脾指数差异显著($P < 0.05$),但 A19-ΔVirB12 免疫攻毒组和 A19 免疫攻毒组之间的克脾指数差异不显著($P < 0.05$)。实验结果说明 VirB12 蛋白的缺失几乎不影响 A19-ΔVirB12 疫苗株的免疫保护效力, A19-ΔVirB12 突变株能诱导小鼠对布鲁氏菌产生细胞免疫反应。肝脏和脾脏病理组织切片结果进一步证实 A19-ΔVirB12 与 A19 株对布鲁氏菌 2308 毒株均具有较好的保护抵抗力,而且 A19-ΔVirB12 株的免疫保护力与 A19 株相当。

综上所述,本研究对 A19-ΔVirB12 突变株在 BALB/c 鼠体内毒力、抗体水平、组织切片和免疫保护效力的测定,研究数据显示 A19-ΔVirB12 突变株在 BALB/c 鼠体内毒力有所降低,免疫保护效力在 BALB/c 鼠体内与亲本菌株 A19 无显著差异。初步证实构建的 A19-ΔVirB12 疫苗株可以采用常规的血清学方法进行区分自然感染和疫苗免疫,为布鲁氏菌标记疫苗的进一步研究提供了技术支撑,但 A19-ΔVirB12 突变株在靶动物体内免疫效力如何还需从靶动物内及其细胞免疫应答方面进一步评价证实。

参考文献

- [1] Dequ S, Donglou X, Jiming Y. Epidemiology and control of Brucellosis in China. *Veterinary Microbiology*, 2002, 90 (1/4) : 165-182.
- [2] Galindo RC, Munoz PM, Miguel MJ, Marin CM, Labairu J, Revilla M, Blasco JM, Gortazar C, de la Fuente J. Gene expression changes in spleens of wildlife reservoir species, Eurasian wild boar (*Sus scrofa*), naturally infected with *Brucella suis* biovar 2. *Journal of Genetics and Genomics*, 2010, 37 (11) : 725-736.
- [3] Mao K. Research progress of brucellosis. *Animal Care*, 2006, 109 (9) :28-30. (in Chinese)
毛开荣. 布鲁氏菌病研究进展. *动物保健*, 2006, 109 (9) :28-30.
- [4] Wyckoff JH, Potts RD. Killing of *Brucella* antigen-sensitized macrophages by T lymphocytes in bovine brucellosis. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 2007, 120 (3-4) : 148-159.
- [5] Cloeckeaet A, Jacques I, Grillom J, Grilló MJ, Marín CM, Grayon M, Blasco JM, Verger JM. Development and evaluation as vaccines in mice of *Brucella melitensis* Rev. 1 single and double deletion mutants of the BP26 and omp31 genes coding for antigens of diagnostic significance in ovine brucellosis. *Vaccine*, 2004, 22 : 2827-2835.

- [6] Jacques I, Verger JM, Laroucau K, Grayon M, Vizcaino N, Peix A, Cortade F, Carreras F, Guilloteau LA. Immunological responses and protective efficacy against *Brucella melitensis* induced by bp26 and omp31 *B. melitensis* Rev. 1 deletion mutants in sheep. *Vaccine*, 2007, 25 (5) :794-805.
- [7] Campos E, Cravero SL, Delgui L, Mora I, Kahn N, Arese AI, Rossetti OL. *Brucella abortus* INTA2, a novel strain 19 Δbp26: luc Δbmp18 double mutant lacking drug resistance markers. *Veterinary Microbiology*, 2002, 87 (1) :1-13.
- [8] Yan G, Wang X, Ren L, Liu K, Gao J, Wang X, Zhang H, Li X. Construction of molecular marker and virulence deleted vaccine strain Δ S19-2 of *B. abortus*. *China Journal of Veterinary Science*, 2007, 27 (5) : 690-694, 699. (in Chinese)
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 ΔS19-2 的构建. 中国兽医学报, 2007, 27 (5) :690-694, 699.
- [9] Zhong Q, He Q, Fan W, Gu W, Yi X, Wu D, Ye F, Li B, Liu L. Construction of VirB8 deletion mutants of *Brucella* and detection of its infection and virulence. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 2009, 40 (6) :892-897. (in Chinese)
钟旗, 何倩倪, 范伟兴, 谷文喜, 易新萍, 吴冬玲, 叶锋, 李博, 刘丽娅. 布鲁氏菌 VirB8 变异株的构建及其感染力和毒力的测定. 畜牧兽医学报, 2009, 40 (6) : 892-897.
- [10] Pan W, Wang J, Zhao M, Ju C, Yi L, Chang Y, Yu H, Chen J. Construction of unmarked bp26 gene-deleted strains of *Brucella* spp.. *Chinese Veterinary Science*, 2011, 41 (3) : 280-286. (in Chinese)
潘文, 王佳莹, 赵明秋, 琚春梅, 易琳, 常艳, 虞红娇, 陈金顶. 布鲁氏菌 bp26 基因缺失株的构建. 中国兽医科学, 2011, 41 (3) : 280-286.
- [11] Patey G, Qi Z, Bourg G, Baron C, O'Callaghan D. Swapping of periplasmic domains between *Brucella suis* VirB8 and a pSB102 VirB8 homologue allows heterologous complementation. *Infect Immun*, 2006, 74 (8) : 4945-4949.
- [12] Roux CM, Rolán HG, Santos RL, Beremand PD, Thomas TL, Adams LG, Tsolis RM. *Brucella* requires a functional Type IV secretion system to elicit innate immune responses in mice. *Cell Microbiology*, 2007, 9 (7) : 1851-1869.
- [13] Rolan HG, Tsolis RM. Mice lacking components of adaptive immunity show increased *Brucella abortus* virB mutant colonization. *Infection and Immunity*, 2007, 75 (6) : 2965-2973.
- [14] Rolan HG, Tsolis RM. Inactivation of the type IV secretion system reduces the Th1 polarization of the immune response to *Brucella abortus* infection. *Infection and Immunity*, 2008, 76 (7) : 3207-3213.
- [15] Rolán HG, den Hartigh AB, Kahl-McDonagh M, Ficht T, Adams LG, Tsolis RM. VirB12 is a serological marker of *Brucella* infection in experimental and natural hosts. *Clinic Vaccine Immunology*, 2008, 15 (2) : 208-214.
- [16] Yi X, Ma X, Yan J, Gu W, Liu L, Ye F, Tu N, Zhong Q. Isolation and identification of *Brucella* in raw milk. *Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine*, 2013, 35 (1) : 28-31. (in Chinese)
易新萍, 马晓菁, 闫晶华, 谷文喜, 刘丽娅, 叶锋, 吐尔洪·努尔, 钟旗. 牛乳样品中布鲁氏菌的分离与鉴定. 中国预防兽医学报, 2013, 35 (1) : 28-31.
- [17] Fang L, Gerhardt G. Electroporation of a suicide plasmid bearing a transposon into *Brucella abortus*. *Microbiology Pathology*, 1990, 9 (5) : 363-368.
- [18] Yi X, Gu W, Li J, Ye F, Ma X, Tang Y, Zhou C, Zhong Q. Establishment of BALB/c mouse model for evaluation of protective immunity in *Brucella abortus*. *China Animal Husbandry and Veterinary Medicine*, 2013, 40 (6) :73-77. (in Chinese)
易新萍, 谷文喜, 李金平, 叶锋, 马晓菁, 唐阳, 周超, 钟旗. 评价牛型布鲁氏菌疫苗免疫保护力 BALB/c 鼠模型的建立. 中国兽医杂志, 2013, 40 (6) :73-77.
- [19] Liu Q, Wu Q, Liu H, Li N, Lu X, Ren J, Zhang S. Expression and identification of outer membrane protein OMP25 of *Brucella*. *Chinese Journal of Veterinary Medicine*, 2008, 44 (8) :18-19. (in Chinese) 刘倩宏, 吴清民, 刘红卿, 李娜, 陆晓龙, 任婕, 张善娟. 布鲁氏菌外膜蛋白 OMP25 的原核表达与鉴定. 中国兽医杂志, 2008, 44 (8) :18-19.
- [20] Zheng X, Hu S, Wang J, Liu L, Gao H, Bu Z. Construction of mutant *Brucella abortus* S19 strain and evaluation of immunization in mice. *Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine*, 2009, 31 (11) : 887-891, 913. (in Chinese)
郑孝辉, 胡森, 王加兰, 刘林涛, 高红霞, 步志高. 流产布氏杆菌 S19 突变株构建及在小鼠感染模型中的免疫保护评估. 中国预防兽医学报, 2009, 31 (11) : 887-891, 913.
- [21] O'Callaghan D, Cazevieuille C, Allardet-Servent A, Boschioli ML, Bourg G, Foulongne V, Frutos P, Kulakov Y, Ramuz M. A homologue of the *Agrobacterium tumefaciens* VirB and *Bordetella pertussis* Ptl type IV secretion systems is essential for intracellular survival of *Brucella suis*. *Molecular Microbiology*, 1999, 33 (6) : 1210-1220.
- [22] Yao HS, Hortensia GR, Andreas B. *Brucella abortus* VirB1 2 is expressed during infection but is not an essential component of the type IV secretion system.

Infection and Immunity, 2005, 73 (9) : 6048-6054.

[23] Stevens MG, Olsen SC, Pugh GW, Brees D. Comparison of immune responses and resistance to *Brucellosis* in mice vaccinated with *Brucella abortus* 19 or RB51. *Infection and Immunity*, 1995, 63 (1) : 264-270.

[24] Stevens MG, Olsen SC, Pugh GW, Palmer MV. Immune and pathologic responses in mice infected with *Brucella abortus* 19, RB51, or 2308. *Inlet Immunity*, 1994, 62 (8) :3206-3212.

Construction of *Brucella abortus* A19-Δ VirB12 mutant and evaluation of its protective efficacy against 2308 strain challenge in BALB/c mice

Xinping Yi¹, Feng Ye¹, Gang Yao², Wenxi Gu¹, Xiaojing Ma¹, Dongling Wu³, Qi Zhong^{1*}

¹ Institute of Veterinary Research, Xinjiang Academy of Animal science, Urumuqi 830000, China

² College of Animal Medicine, Xin Jiang Agricultural University, Urumuqi 830052, China

³ Xinjiang Tiankang Animal Biotechnology Co. Ltd., Urumuqi 830032, China

Abstract: [Objective] A19-ΔVirB12 deletion mutant of *Brucella abortus* was constructed by using homologous recombination technology. BALB/c mice were vaccinated intraperitoneally with the mutant to evaluate protective efficacy against *Brucella abortus* 2308 challenge. [Method] A SacB gene was amplified by PCR from pIB279 plasmid. The sequences upstream and downstream of the VirB12 gene were amplified by PCR from *Brucella abortus* A19. These three PCR products were subsequently inserted into pBK-CMV vector, namely pBK-CMV-SacB-VirB12. This construct was transformed into *Brucella abortus* A19. The A19-Δ VirB12 mutants were obtained by Kan^r and 5% sucrose selection. Six-week-old female BALB/c mice were distributed into three treatment groups, including A19-Δ VirB12 group, A19 group and PBS control group. BALB/c mice were vaccinated intraperitoneally at a dose of 5.0×10^4 CFU. At the 45-days post-immunization, all of mice were challenged with 2308 strain. Fifteen days after the challenge, the levels of infection were expressed as means of the log₁₀ CFU/spleen values. The histological changes were assessed among the groups. [Results] Compared with PBS control group, the A19-Δ VirB12 deleted mutant had a statistically significant protection against 2308 challenge similar to A19 strain. Western blotting showed that A19-Δ VirB12 mutant did not express VirB12 protein. [Conclusion] The A19-Δ VirB12 deleted mutant elicits a strong protective immunity, and may become a promising vaccine candidate.

Keywords: *Brucella abortus*, A19-Δ VirB12 mutant strain, homologous recombination, protective immunity

(本文责编:王晋芳)

Supported by the High-tech Development Project of Xinjiang (200911109), by the National Science & Technology Pillar Program (2012BAD13B03), by the Postdoctoral Funding of Xinjiang in 2012 and by the Special Fund for Agro-scientific Research in the Public Interest (201103008)

* Corresponding author. Tel /Fax: +86-991-4844713; E-mail: yyyzqok@aliyun.com

Received: 14 March 2013/ Revised: 10 May 2013