

带有氯霉素抗性基因标记的重组布氏杆菌 S2 的构建及其生物学特性

毛开荣, 丁家波, 程君生, 蒋玉文, 姚文生

(中国兽医药品监察所 北京 100081)

摘 要 无法区分免疫接种和自然感染是限制布氏杆菌疫苗应用的主要原因。本研究通过基因同源重组技术, 用氯霉素抗性基因(*Cm^r*)替代布氏杆菌弱毒 S2 株的 *WbkC* 基因, 筛选获得重组布氏杆菌 rS2-*WbkC* 株。试验发现, 重组菌 rS2-*WbkC* 由原先的光滑型转变成粗糙型。rS2-*WbkC* 在 TSA 培养基上传 25 代后仍能稳定表达氯霉素抗性蛋白。小鼠动物试验模型表明, rS2-*WbkC* 与 S2 有相似的保护性, 但 rS2 比 S2 具有更高的安全性。rS2-*WbkC* 免疫小鼠后, 其抗血清可通过平板凝集试验与 S2 免疫的血清相区分。本研究为布氏杆菌标记疫苗的研制提供了技术平台。

关键词 布氏杆菌; 氯霉素抗性基因; *WbkC* 基因; 标记疫苗

中图分类号 Q786 **文献标识码** A **文章编号** 1001-6209(2007)06-0978-04

布氏杆菌病(布病)是由布氏杆菌(*Brucella*)引起的以流产和发热为特征的人兽共患病, 严重地威胁着人和多种动物的生命健康。布氏杆菌具有细胞内寄生的特点, 人感染布氏杆菌后, 需要长时间的抗生素治疗, 而且往往会留下严重的后遗症^[1]。因此在布氏杆菌流行的国家, 消除布病一直是公共健康计划中最重要的目标之一^[2]。

当前布氏杆菌病我国的流行已经比较严重, 通过疫苗预防接种显然是控制该病的良好手段^[3,4]。目前我国使用的布氏杆菌疫苗主要为用 S2 株(猪型 2 号苗)制备的疫苗, 与其它疫苗株制备的疫苗相比, 该疫苗适用的宿主广泛, 而且疫苗的毒力较弱, 免疫效果良好^[5]。但是和其它布氏杆菌疫苗一样, 经疫苗免疫后的动物, 无论从抗原还是从抗体水平都很难与野毒株布氏杆菌相区分, 给布氏杆菌病的诊断带来了很大的麻烦。这在一定程度上限制了疫苗的使用, 也是 S2 布氏杆菌疫苗没被广泛使用于奶牛免疫的主要原因^[2]。

为了克服布氏杆菌现有疫苗的缺点, 通过现代分子生物学技术对布氏杆菌进行分子标记是一种有效的途径。本研究通过基因同源重组技术, 获得了带有氯霉素抗性蛋白分子标记、且能稳定遗传的重组布氏杆菌疫苗株。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌种和试验动物 S2 株布氏杆菌由中国兽医药品监察所保存; pACYC184 由北京市农林科学院

徐福洲博士提供。昆明系小白鼠购自北京通利华实验动物技术有限公司。

1.1.2 主要试剂和仪器 pUC18、PCR Kit、T4 DNA 连接酶、各种限制性内切酶等均购于 TaKaRa 公司(大连); 细菌基因组提取试剂盒(Lot:187282)购自 Promega 公司; 胰大豆肉汤(TSB, Lot:5215216)和胰大豆琼脂(TSA, Lot:4251054)购自美国 BD 公司; 电转化仪(Genepulser Xcell)购自 Bio-Rad 公司。

1.1.3 引物 用于扩增氯霉素抗性(*Cm^r*)基因的引物和布氏杆菌 *WbkC* 基因上、下游同源臂的引物见表 1。

1.2 同源重组质粒的构建

1.2.1 布氏杆菌基因组 DNA 的提取 复苏一种冻干的 S2 株布氏杆菌, 划线接种到胰琼脂培养基上, 至 37℃ 培养 60h。用生理盐水将细菌洗下, 并参照细菌浊度比浊管, 初步计算出细菌含量。按照 Promega 细菌基因组提取试剂盒说明书, 提取基因组 DNA, 将提取的 DNA 溶解于 TE 中, 待用。

1.2.2 不同片断的 PCR 扩增 95℃ 变性 5min; 95℃ 50s; 54℃ 50s; 72℃ 1min, 进行 30 个循环; 72℃ 延伸 10min。

1.2.3 pUC-*Cm^r* 质粒的构建 通过 PCR 扩增出的氯霉素抗性基因片断用 *Bam*H I 和 *Sal* I 双酶切后克隆进同酶处理的 pUC18 载体中, 筛选获得重组质粒 pUC-*Cm^r*。

1.2.4 同源穿梭质粒的构建 将 PCR 扩增出的 *WbkC* 基因左臂(*WbkCl*)通过 *Sac* I 和 *Bam*H I 克隆进 pUC-*Cm^r* 质粒中, 获得重组质粒 p*Cm^r*-*WbkC*-1, 将

表 1 用于扩增不同基因片断的 PCR 引物序列

Primer	Sequence(5'→3')	The sites opposite to the ORF of WbkC gene	Restri-enzyme sites	Fragment generated/bp
F _{WbkC1}	CAAAGAGCTCGAAACGGATGAGAGTG	- 722 ~ - 704	Sac I	834
R _{WbkC1}	CGGGGATCCGCAATCTTATCAATCTC	92 ~ 111	BamH I	
F _{WbkC2}	TTTGTGCGACTCGTCTCGTAGCTGTCCA	891 ~ 910	Sal I	1267
R _{WbkC2}	GCTTGCATGCCCGTTAAATAATCG	2138 ~ 2157	Sph I	
F _{Cm^r}	CGGGGATCCTGCTGTCCCTGTTGATA	363 ~ 380*	BamH I	900
R _{Cm^r}	TTTGTGCGACTGCCATTATCCCGCTTA	3726 ~ 3743*	Sal I	

* the site in the sequence of plasmid pACYC184 according to its enebank Accession Number : X06403.

PCR 扩增出的 *WbkC* 基因右臂(*WbkC2*),通过 SalI 和 SphI 克隆进 *pCmr-WbkC-1* 质粒中,获得重组质粒 *pCm^r-WbkC-1-2* 此质粒即为用于同源重组的穿梭质粒。

1.3 转化

1.3.1 布氏杆菌 S2 感受态细胞的制备 :接种单个 S2 菌于 100mL TSB 培养基中培养至对数中期后,放冰水中冷却 30min。12000r/min 离心 10min,弃去培养基,再分别用 100mL、50mL、10mL、5mL、2mL 灭菌水各离心洗涤一次。最后将获得的菌体重悬于 1mL 10%的甘油水溶液中,即为待用的感受态细菌,取 100μL 感受态进行菌落计数。

1.3.2 转化 :取 3μg *pCmr-WbkC-1-2* 质粒加入到 50μL S2 感受态细菌中,混匀后转移到电极杯中电击。电击电压和时间分别为 :1.8kV,3mS。电击完成后,立即加入 1mL TSB 培养基在 37℃ 摇瓶培养 4h 后,将菌液涂布到 2 块含 20μg/mL 氯霉素的 TSA 培养皿中,37℃ 培养 48h 以上,生长出的重组菌命名为 rS2-WbkC。

1.4 重组布氏杆菌的鉴定

1.4.1 氯霉素抗性基因的 PCR 检测 :从氯霉素平皿上挑取生长出的单个菌落,接种到 TSB 培养基中,37℃ 振荡培养 40h 后,提取细菌基因组 DNA。设计引物 F_(wbkC) :5'-TTACGCATAGTAAGTAC-3'(- 36 ~ - 19 to ORF of Wbk C);R_(wbkC) :5'-AACCTAAACAAGCAACAA-3'(787 ~ 804 to ORF of Wbk C),该对 PCR 引物横跨 *WbkC* 基因的 ORF。以该引物和提取出的细菌基因组 DNA 作模板进行 PCR,PCR 产物克隆进 pMD-18 T easy 载体中测序(上海生工生物工程技术有限公司)。取一株鉴定为阳性的重组菌命名为 rS2-WbkC,并进一步对其生物学特性进行检测。

1.4.2 粗糙型特性检查 :对重组菌 rS2-WbkC 分别进行热凝集试验、吡啶黄凝集试验、菌落结晶紫染色和沉降速度试验,同时用未重组的 S2 作为对照。

1.5 传代稳定性

1.5.1 重组菌在培养基上传代 :挑取单个重组菌在 TSA 培养基上划线培养,待长出单个菌落后,继续挑取单个菌落划线,以此法连续 25 代。

1.5.2 稳定性检测 :用 1.4.2 中提及的方法,分别

检测重组菌的粗糙型特性、和氯霉素抗性,确定其传代的稳定性。

1.6 重组菌对小白鼠安全性和保护性试验

1.6.1 安全性试验 :用生理盐水将在固体培养基上培养 48h 的 rS2-WbkC 和 S2(作为对照)培养物洗下并进行细菌计数。按 1 × 10¹¹ 个菌落形成单位(CFU),1 × 10¹⁰ CFU、1 × 10⁹ CFU rS2 或 S2 活菌的剂量分别皮下注射体重为 18 ~ 20g 的小白鼠 6 只,对照组注射生理盐水。注射后 7d 内观察动物存活情况,30d 后眼静脉采血,分离血清。

1.6.2 保护性试验 :分别以 1 × 10¹¹ CFU、1 × 10⁹ CFU、1 × 10⁷ CFU、1 × 10⁵ CFU rS2-WbkC 或 S2 活菌的剂量,各皮下注射体重 18 ~ 20g 的小白鼠 6 只,对照组注射生理盐水。30 天后用强毒布氏杆菌 M28 株以 200CFU/只的剂量接种小白鼠,30 d 后,测定试验小鼠脾脏含菌量,根据试验结果,比较 rS2-WbkC 和 S2 的保护性。

1.7 rS2-WbkC 抗原及抗血清的血清学反应特性

将 1.8.1 中分离的血清分别与布氏杆菌 S2、M28、2308、M111、RM6/66 等抗原进行平板凝集试验;同时用 rS2-WbkC 制备抗原,分别与 M111(粗糙型)和 S2(光滑型)抗原进行平板凝集试验,确定 rS2-WbkC 抗原及抗血清的反应特性。

2 结果

2.1 重组穿梭质粒的酶切鉴定

将筛选获得的包含 *Cm^r* 基因和 *WbkC* 基因上下游同源臂的穿梭质粒 *pCmr-WbkC-1-2* 用 *Sac* I、*Bam* H I、*Sal* I、*Sph* I 进行酶切鉴定,结果均于预期一致。

2.2 重组效率

感受态细菌菌落计数,浓度为 4 × 10¹⁰ 个菌/mL;3μg *pCm^r-WbkC-1-2* 质粒转化 50μL S2 感受态细菌 72h 后,最终从氯霉素 TSA 平板上获得 18 个菌落,不考虑因电击死亡的细菌,重组率约为 1 × 10⁻⁸。

2.3 重组菌的 PCR 鉴定

从生长出的 18 个菌落中,随机挑取 5 个菌落提取其基因组 DNA,以 F_(wbkC) 和 R_(wbkC) 为引物的 PCR 产

物经凝胶电泳(图1)和序列测定,结果均与预期一致,即以 WbkC 基因上、下游引物,扩增出了完整的 C_{m}^r 基因。而以 S2 基因组 DNA 为模板的 PCR 产物中,包含了完整的 WbkC 基因。

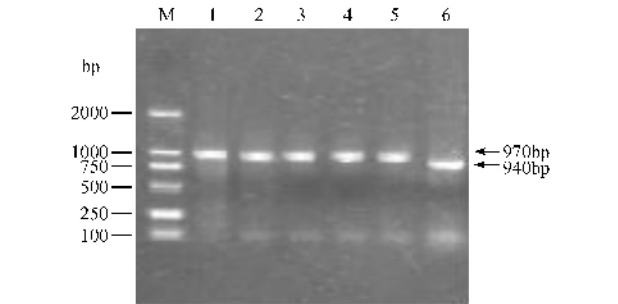


图1 同源重组菌的 PCR 鉴定
Fig.1 PCR identification for the homologous recombinant clones. M. DL2000 Marker ;2 ~ 5. PCR products of five homologous recombinant clones ,respectively ;6. PCR product of the original *brucella suis* S2 strain.

2.4 粗糙型特性鉴定

取1株 PCR 阳性的重组布氏杆菌,命名为 rS2-WbkC。该重组菌的热凝集试验、吡啶黄凝集试验、菌落结晶紫染色和沉降速度试验结果符合粗糙型布

氏杆菌的特点,即热凝集试验阳性,吡啶黄凝集试验阳性,能被结晶紫染色,细菌沉降速度明显快于光滑型布氏杆菌。

2.5 传代稳定性结果

rS2-WbkC 在 TSA 培养基上连续传 25 代,仍能在含 $20\mu\text{g/mL}$ 氯霉素的 TSA 培养基上生长,以 $F_{(wbkC)}$ 和 $R_{(wbkC)}$ 为引物的 PCR 产物为 970bp,序列测定结果与初代相同,以上试验说明重组菌具有良好的传代稳定性。

2.6 重组菌对小白鼠安全性和保护性

以一定剂量 S2 和 rS2-WbkC 菌接种小鼠后,观察小鼠的健康状况(表2)。从表2分析,重组菌 rS2-WbkC 对小白鼠的最大免疫剂量是 S2 的 100 倍。具有更高的安全性。经一定剂量 S2 和 rS2-WbkC 免疫的小鼠对强毒布氏杆菌 M28 攻毒所提供的保护性结果见表3。表3结果显示,一定量(1×10^9 CFU 活菌)的重组菌 rS2-wboA 能提供和 S2 相似的保护水平,均都能抵抗强毒布氏杆菌的攻击,但当免疫剂量低至 1×10^5 CFU 时,从 rS2-wboA 试验组小鼠脾脏中分离到的攻毒菌是 S2 组的 5 倍(6.9/1.4)。

表2 布氏杆菌 S2 和 rS2-WbkC 对小白鼠的安全性比较

Table 2 Security comparison between *brucella suis* S2 and rS2-WbkC strains

Strain	Inoculation dose(CFU/mice)			Control group
	1×10^{11}	1×10^9	1×10^7	
S2	4 mice died in 18h post inoculation(PI), the rest of all died in 24h PI	Only 2 mice look listless 48h PI , but recovered in 72h PI	All mice live healthily	All mice live healthily
rS2-WbkC	No death in 24h PI ; 2 died between 24h to 48h PI ; 5 mice look listless in 48h PI , but recovered in 72h PI	All mice live healthily	All mice live healthily	

表3 布氏杆菌 S2 和 rS2-WbkC 对小白鼠免疫力比较

Table 3 Comparison of immunological efficiency between *brucella suis* S2 and rS2-WbkC strains

Strain	Inoculation dose(CFU/mice)				Control group
	1×10^{11}	1×10^9	1×10^7	1×10^5	
S2 (mean number of each spleen)	undone	0	33	1.4×10^3	1.3×10^5
rS2-WbkC (mean number of each spleen)	0	0	60	6.9×10^3	1.3×10^5

表4 rS2-WbkC 抗血清与不同布氏杆菌毒株抗原的平板凝集反应结果

Table 4 The reactions of rS2-WbkC anti-serum to different *brucella* antigen strains

	<i>brucella</i> antigen Strains				
	S2	M28	2308	M111	RM6/66
Rough(R) smooth(S) type	S	S	S	R	R
Reaction	-	-	-	+	+

" + " positive ; " - " negative .

2.7 rS2-WbkC 的血清学反应特性

rS2-WbkC 抗血清与不同布氏杆菌毒株抗原的平板凝集反应结果见表4。rS2-WbkC 抗原与 M111 (粗糙型)平板凝集试验为阳性,与 S2(光滑型)平板凝集试验为阴性。

3 讨论

布氏杆菌病是世界范围内存在的常见人兽共患传染病,严格控制好本病,不仅有利于我国畜牧业的发展,而且也关系到人们的生活健康。对布氏杆菌病流行不严重的国家,布氏杆菌病的防治主要是靠通过血清学诊断试验淘汰阳性动物,而对布氏杆菌病严重感染的国家和地区,则一般使用疫苗加以预防。

根据布氏杆菌菌落的形态特点,可以将布氏杆菌分为光滑型和粗糙型两种,一般粗糙型菌株的毒力比较弱。由于光滑型与粗糙型布氏杆菌之间在血清学上没有交叉反应,所以用粗糙型布氏杆菌疫苗免疫的动物,其血清只与粗糙型抗原发生凝集反应。

与光滑型血清不反应,以此可以区分疫苗株和野毒株。但目前自然分离的粗糙型布氏杆菌(如:M111、RM6/66等)由于其宿主限制性和免疫保护效果等方面的原因,未能得到广泛的应用。已有的研究证实布氏杆菌细胞壁脂多糖(LPS)结构中的O链决定其光滑型或粗糙型的表型,O链缺失会导致光滑型变成粗糙型。目前已经发现多个基因(如:*gmd*、*per*、*wbkA*、*wbkC*、*lpx*、*wa*、*wz*等)与O链的表达相关^[6~8]。基于以上考虑,本文选择了毒力弱、免疫原性优良、宿主广泛的布氏杆菌疫苗株S2为研究对象,通过同源重组技术,破坏了与O链光滑型表型形成相关的*WbkC*基因,最终筛选获得了重组粗糙型布氏杆菌rS2-WbkC株。

为了确定rS2-WbkC作为疫苗株应用的可能,本文从菌株的传代稳定性、安全性和免疫保护性进行了比较全面的研究,结果证实重组菌株不仅能在适宜培养基上稳定遗传,而且能提供比S2更高的安全性,同样的免疫菌数,rS2-WbkC能提供不低于S2的免疫效率(表3)。更具有诱人前景的是,rS2-WbkC免疫小鼠的抗血清,在平板凝集试验中不与常规虎红发生凝集反应,用rS2-WbkC制备的抗原只与粗糙型布氏杆菌抗血清发生凝集反应,与光滑型布氏杆菌抗血清不发生凝集反应。因而以该重组菌株制备的疫苗免疫动物后,不会对野毒感染的检测产生干扰,这为用rS2-WbkC生产疫苗对布氏杆菌病的综合防治提供了可能。

由于氯霉素已经作为兽医上禁用的抗菌素之一,所以本研究使用了氯霉素抗性基因作为报告基因,以减少因抗性基因而带来的生物安全的隐患。

即便如此,我们仍在探索新的、非抗性基因的筛选方法,以获得具有完全生物安全意义的重组布氏杆菌疫苗株,以满足我国目前对布病防治的需要。

参 考 文 献

- [1] Ariza J. Brucellosis: an update. The perspective from the Mediterranean basin. *Reviews in medical microbiology*, 1999, **10**: 125–135.
- [2] 丁家波,毛开荣,程君生,等.布氏杆菌病疫苗的应用和研究现状. *微生物学报*, 2006, **46**(5): 856–859.
- [3] Diptee MD, Adesiyun AA, Asgarali Z, et al. Serologic responses, biosafety and clearance of four dosages of *Brucella abortus* strain RB51 in 6–10 months old water buffalo (*Bubalus bubalis*). *Veterinary immunology and immunopathology*, 2006, **109**(1–2): 43–55.
- [4] Lopetegui P. Bovine brucellosis control and eradication programme in Chile: vaccine use as a tool within the programme. *Developmental biology (Basel)*, 2004, **119**: 473–479.
- [5] Mustafa AA, Abusowa MF. Field-oriented trial of the Chinese *Brucella suis* strain 2 vaccine on sheep and goats in Libya. *Veterinary research*, 1993, **24**(5): 422–429.
- [6] Ignacio M, Marfa JC, Daniel M, et al. Rough vaccines in animal brucellosis: Structural and genetic basis and present status. *Veterinary research*, 2004, **35**: 1–38.
- [7] Godfroid F, Cloeckaert A, Taminiau B, et al. Genetic organisation of the lipopolysaccharide O-antigen biosynthesis region of *brucella melitensis* 16M (wbk). *Research in microbiology*, 2000, **151**(8): 655–68.
- [8] Vemulapalli R, McQuiston JR, Schurig GG, et al. Identification of and IS711 element interrupting the *wboA* gene of *Brucella abortus* vaccine strain RB51 and a PCR assay to distinguish strain RB51 from other *Brucella* species and strains. *Clinical diagnostic laboratory immunology*, 1999, **6**: 760–764.

Construction and characterization of a *brucella suis* S2 strain with a chloramphenicol resistance marker

MAO Kai-rong*, DING Jia-bo, CHENG Jun-sheng, JIANG Yu-wen, YAO Wen-sheng
(China Institute of Veterinary Drug Control, Beijing 100081, China)

Abstract: Vaccination has not been used widely because of the interference in the discrimination between infected and vaccinated animals in immune-screening procedures. In the present study, chloramphenicol resistance gene (*Cm^r*) was cloned into the genomic DNA of *brucella suis* S2 strain by homologous recombination with knocking out the *WbkC* gene, and obtained the recombinant rS2-WbkC. Further study confirmed that rS2-WbkC was converted into rough-phenotype form smooth-phenotype. The recombinant keeps the ability to chloramphenicol resistance after 25 passages in tryptic soy agar (TSA). Mice tests showed rS2-WbkC offered similar protection to S2 strain, but more safe than S2. Serum collected from rS2-WbkC immunized mice could be easily distinguished from antiserum produced by smooth-phenotype *brucella abortus*. In view of these result, rS2-WbkC is a promising candidate for vaccine strain.

Keywords: *brucella suis*; chloramphenicol resistance gene; *WbkC* gene; vaccine strain

* Corresponding author. Tel: 86-10-62103629; E-mail: maokairong@ivdc.gov.cn

Received: 20 March 2007/ Accepted: 14 May 2007/ Revised: 9 July 2007