

布鲁氏菌 *vjbR* 突变株的构建及其毒力表型分析

付思美^{1,2Δ} 白耀霞^{1Δ} 曲勍^{1,2} 徐杰¹ 王玉飞¹ 钟志军¹ 于爽¹ 王同坤¹ 杨毅¹
陈燕芬^{1,2} 汪舟佳¹ 杜昕颖¹ 黄留玉¹ 甄清^{2*} 陈泽良^{1*}

(1. 军事医学科学院疾病预防控制所 北京 100071)

(2. 吉林大学公共卫生学院 人畜共患病教育部重点实验室 吉林 长春 130021)

摘要: 为分析 *vjbR* 在布鲁氏菌毒力中的作用, 构建了 *vjbR* 的突变株和互补株, 并分析了它们在巨噬细胞和小鼠体内的存活能力。利用同源重组的方法, 用卡那抗性基因替换了 16M 的 *vjbR* (BMEIII116) 基因, 得到了 *vjbR* 的缺失突变株 16MΔ*vjbR*。将 *vjbR* 基因的 ORF 克隆到 pMD18-T 载体中, 然后将其转入到突变株 16MΔ*vjbR* 中得到互补株 16MΔ*vjbR*-C。用 16M、16MΔ*vjbR* 和 16MΔ*vjbR*-C 侵染巨噬细胞和感染小鼠, 比较分析它们在巨噬细胞内的生存能力及小鼠毒力。研究表明 *vjbR* 突变株在巨噬细胞和小鼠体内的毒力减弱, 存活能力下降, 说明 *vjbR* 基因是布鲁氏菌 16M 的毒力相关基因, 对于布鲁氏菌建立慢性感染是必要的。

关键词: 布鲁氏菌, *vjbR*, QS 系统, 毒力

Construction of the *vjbR* Mutant Strain and Analysis of Its Virulence Phenotypes

FU Si-Mei^{1,2Δ} BAI Yao-Xia^{1Δ} QU Qing^{1,2} XU Jie¹ WANG Yu-Fei¹
ZHONG Zhi-Jun¹ YU Shuang¹ WANG Tong-Kun¹ YANG Yi¹
CHEN Yan-Fen^{1,2} WANG Zhou-Jia¹ DU Xin-Ying¹ HUANG Liu-Yu¹
ZHEN Qing^{2*} CHEN Ze-Liang^{1*}

(1. Institute of Disease Control and Prevention, Academy of Military Medical Science, Beijing 100071, China)

(2. School of Public Health, Key Laboratory of Zoonosis, Ministry of Education, Jilin University, Changchun, Jilin 130021, China)

Abstract: To evaluate the virulence roles of *vjbR*, the mutant and complementary strains of *vjbR* were constructed, and their survival capabilities in macrophage and mice were assayed. By using homologous recombination, the *vjbR* (BMEIII116) was replaced by kanamycin gene, resulting the deletion mutant 16MΔ*vjbR*. The ORF was PCR amplified and cloned into pMD-18T, which was transformed into mutant strain to generate the complementary strain 16MΔ*vjbR*-C. The three strains, 16M, 16MΔ*vjbR* and 16MΔ*vjbR*-C, were used to infect macrophage and mice, and their survival capability were assayed and

基金项目: 国家 863 计划项目(No. 2007AA02Z412); 国家传染病重大专项项目(No. 2008ZX10004-015, 2009ZX10004-103)

Δ对本文有同等贡献

*通讯作者: 陈泽良: Tel/Fax: 86-10-66948434; ✉: zeliangchen@yahoo.com

甄清: Tel: 86-431-85619446; ✉: zq415@sina.com

收稿日期: 2010-01-29; 接受日期: 2010-03-31

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

compared. The *vjbR* mutant strain 16M Δ *vjbR* showed reduced survival in macrophage and mice, indicating that *vjbR* is a virulence gene of *Brucella*, and is essential for establishment of chronic infection.

Keywords: *Brucella*, *vjbR*, Quorum sensing system, Virulence

密度感应(Quorum sensing, QS)系统是一种细胞密度依赖性的细胞间信号传递系统, 是一个总体调控系统, 在细菌的交流中发挥着重要作用, 细菌通过该系统协调基因的表达, 使细菌的活动具有组织性, 产生类似于多细胞生物群体性活动^[1-3]。QS 系统存在于很多细菌中, 布鲁氏菌也含有 QS 系统, 该系统可以感应和处理环境信号, 当布鲁氏菌侵入宿主细胞时, 它可以调控布鲁氏菌各种靶基因以适应胞内各种不良环境, 从而增强抵抗巨噬细胞杀伤的能力^[4]。因此 QS 系统的研究可为理解布鲁氏菌的致病机制提供大量有价值的信息。

QS 系统由两个蛋白组成: LuxI 家族的 AHL 合成酶和 LuxR 家族的转录激活因子。其中, LuxR 蛋白作为转录激活因子, 结合到特定的调控区域, 激活靶基因的表达从而表现出相应的表型^[5]。已经发现, QS 系统与细菌的很多毒力相关表型密切相关, 如生物膜的形成、对抗生素的抗性、迁移能力和趋化等。布鲁氏菌的 QS 系统有两个 LuxR 转录激活因子——VjbR 和 BlxR。VjbR (BMEII1116) 基因位于二号染色体上, 长度为 708 bp。目前对 BlxR 的毒力表型以及调控机制已经进行了详细的研究, 但是对 *vjbR* 的调控机制尚不完全清楚。为了深入探讨 *vjbR* 在布鲁氏菌毒力中的作用, 以及其缺失株作为疫苗株的可能性, 本研究中, 我们构建了强毒株 *vjbR* 的缺失株和互补株, *vjbR* 的缺失株是 ORF 序列的缺失, 并比较它们在巨噬细胞和小鼠体内的存活能力。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株、质粒载体及引物: 羊布鲁氏菌强毒株 (*Brucella melitensis*, 16M) 为本室保存; 大肠杆菌 (*Escherichia coli*, DH5 α) 为本室保存; pUC19K 质粒为本室构建^[6], 本研究所用的引物及其序列见表 1。

1.1.2 主要试剂: PCR 产物回收试剂盒、DNA 胶回收试剂盒及质粒提取试剂盒均购自 Promega 公司, 各种限制性内切酶购自 TaKaRa 公司, T4 DNA 连接酶购自 NEB 公司, 其它试剂均为国产分析纯。

表 1 引物名称及序列
Table 1 Primers used in this study

Primer 引物	Primer sequence (5'→3')引物序列
BMEII1116-N-F	ACGTGGTACCGAAGCACAGGCCGA AACGC
BMEII1116-N-R	ACGTCTCGAGTAGCGGCATCCTATTCA
BMEII1116-C-F	ACGTGTCGACAATCGCCGAAATCCTCAG
BMEII1116-C-R	ACGTAAGCTTACCGCCTTCCATCACCCCTC
Puc19K-F	ACGTGGATCCCTCGAGGGGCCCGCCA CCTGGGATGAATGTC
Puc19K-R	ACGTGTCGACTCTAGAGATATCACGCGT CGGTCAATTCGAACCCAGCA
BMEII1116-I-F	AACGCAGCCATGCCATCA
BMEII1116-I-R	TGATCTCCGGCTGGTTGA

1.2 突变盒的构建

根据 *vjbR* (BMEII1116) 及两侧的序列设计扩增 N 端和 C 端同源臂的引物, N 端: BMEII1116-N-F 和 BMEII1116-N-R, 5'端酶切位点为 *Kpn* I 和 *Xho* I; C 端: BMEII1116-C-F 和 BMEII1116-C-R, 5'端酶切位点为 *Sal* I 和 *Hind* III。以 16M 基因组为模板, 首先扩增 *vjbR* 基因的 N 端同源臂, 并将其插入到 pUC19K 的 *Kpn* I 和 *Xho* I 位点, 得到质粒 pUC19K-N; 然后扩增 C 端同源臂, 将其插入到 pUC19K-N 的 *Sal* I 和 *Hind* III 位点, 得到含有突变盒 N-K-C 的突变载体 pUC19K-NC。质粒 pUC19K-NC 转化 DH5 α , 经 PCR 和酶切鉴定正确之后, 送测序公司测序。

1.3 缺失突变株的构建

将含有突变盒的质粒 pUC19K-NC 电转入布鲁氏菌 16M 感受态细胞中, 复苏后涂布于卡那抗性 TSA 平板, 37°C 培养 3-5 d, 筛选抗性克隆。分别用位于目的基因外侧和抗性基因内部的鉴定引物 (BMEII1116-I-F 与 Puc19K-R 组合; BMEII1116-I-R 与 Puc19K-F 组合) 对抗性克隆进行菌落 PCR 鉴定, 同时以 16M 野生株作为对照。若抗性基因与外侧引物组合能扩增出预期大小的片段, 而野生株没有扩增片段, 则说明突变株构建正确, 得到的重组菌株命名为 16M Δ *vjbR*。

1.4 互补质粒的构建

以 16M 基因组为模板, 用引物 BMEII1116-N-F

和 BMEII1116-C-R 扩增 *vjbR* 基因(BMEII1116)的 ORF 及其包含启动子的 DNA 片段, PCR 产物回收纯化后与 pMD18-T 载体连接, 将连接产物转化 DH5 α 感受态细胞得到重组互补质粒 T-1116。氨苄抗性筛选后, 用扩增引物进行 PCR 鉴定, 鉴定正确后送测序公司测序。

1.5 互补株的构建

将 T-1116 质粒 DNA 电转化入布鲁氏菌突变株 16M Δ *vjbR* 感受态细胞中, 复苏后涂布含有 50 mg/L 卡那霉素和 100 mg/L 氨苄青霉素的 TSA 平板, 37°C 培养 3–5 d, 筛选抗性克隆。用引物 BMEII1116-N-F 和 BMEII1116-C-R 对抗性克隆进行菌落 PCR 鉴定, 同时以 16M 野生株和 16M Δ *vjbR* 突变株为对照。若能扩增出预期大小的片段, 将产物进行测序确认。得到的重组菌株命名为 16M Δ *vjbR*-C。

1.6 胞内存活实验

J774A.1 细胞(1×10^5)在 24 孔细胞培养板培养 16 h 形成单层细胞, 将 16M、16M Δ *vjbR* 和 16M Δ *vjbR*-C 以 50:1 的 MOI (侵染比例)侵染细胞。24 孔板, 室温 1000 r/min 离心 5 min, 然后在 37°C、饱和湿度和 5% CO₂ 环境中孵育 45 min。用 PBS 洗涤细胞去除未感染的胞外细菌, 并且在含有 50 mg/L 庆大霉素的 DMEM/F12 培养基中再孵育 60 min 来杀死胞外菌; PBS 漂洗 3 次, 将培养基的庆大霉素浓度降为 25 mg/L; 于孵育后的不同时间点(0、4、12、24、48 和 72 h)去除培养基, PBS 漂洗 3 次后用 0.25% 的胰酶消化收集细胞, 对细胞进行计数, 然后用 0.1% (V/V) 的 TritonX-100 裂解细胞, 释放出胞内菌; 将裂解液适当稀释以后涂 TSA 平板, 计算 CFU, 比较 16M、16M Δ *vjbR* 和 16M Δ *vjbR*-C 在巨噬细胞内的生存能力。重复实验 3 次, 计算平均值。

1.7 小鼠毒力实验

选用 6–8 周龄 Balb/c 小鼠, 随机分为 4 组, 每组 30 只, 分别为 16M Δ *vjbR* 突变株组、16M Δ *vjbR*-C 互补株组、16M 野生株组和生理盐水阴性对照组。感染剂量 5×10^5 CFU/只。生理盐水组感染剂量为 200 μ L/只。感染部位为腹腔注射, 感染次数为 1 次。在感染后不同时间点(1、3、7、14、28 d), 每个时间点每组取 5 只小鼠, 处死小鼠, 无菌条件下迅速取出肝脏、脾脏加入 1 mL 0.1% Triton X-100 的生理盐水, 用玻璃匀浆器制成匀浆, 取组织匀浆进行 10 倍系列稀释, 选取适当稀释度的匀浆液

100 μ L 涂 TSA 平板, 计算 CFU。

2 结果

2.1 含突变盒的 pUC19K-NC 质粒的构建

首先以 16M 全基因组为模板, PCR 扩增 *vjbR* 基因的 N 端同源臂, 电泳结果显示扩增出大小为 449 bp 的目的片段, 与预期的大小一致(图略)。对 N 端同源臂进行 *Kpn* I 和 *Xho* I 双酶切, 将其克隆到用同样酶切处理的 pUC19K 中, 转化 DH5 α , 涂布卡那抗性平板, 选用 N 端同源臂的扩增引物对长出的菌落进行 PCR 鉴定, 再从阳性克隆中提取质粒进行酶切鉴定。结果显示, N 端同源臂与 pUC19K 连接成功, 且插入位置正确(图略), 得到 *vjbR* 的 N 端同源臂重组质粒 pUC19K-N。用扩增 C 端同源臂的引物以 16M 的基因组为模板进行扩增, PCR 产物的电泳结果显示成功扩增出了 426 bp 预期大小的片段(图略), 回收纯化后的 PCR 产物用 *Sal* I 和 *Hind* III 进行双酶切处理, 然后克隆到用同样酶切处理的 pUC19K-N 质粒中, 将该质粒转化入 DH5 α , 得到突变盒的重组质粒 pUC19K-NC, 重组质粒分别用 PCR 方法和酶切方法进行鉴定。酶切结果显示(图略), C 端同源臂正确地插入到了 pUC19K-N 中。测序结果与序列信息一致(结果略)。

2.2 *vjbR* 突变株的构建与 PCR 验证

将重组突变盒质粒 pUC19K-NC 电转化到布鲁氏菌 16M 感受态细胞中, 涂布于卡那抗性平板, 将筛选到的卡那抗性阳性克隆进行 PCR 鉴定: 在 BMEII1116 同源臂 N 端的上游, 及同源臂 C 端的下游各设计一条鉴定引物: BMEII1116-I-F、BMEII1116-I-R, 分别与 Puc19K-R 或 Puc19K-F 组合 (N 端同源臂上游的鉴定引物与 Puc19K-R 组合, C 端同源臂下游的鉴定引物与 Puc19K-F 组合), 用来鉴定 *vjbR* 的正确替换。分别以突变株、野生株 16M 为模板, 进行 PCR 扩增。用 BMEII1116-I-F 和 Puc19K-R 进行 PCR 扩增时, 鉴定引物分别位于 N 端同源臂的外侧和卡那基因内, 突变株 16M Δ *vjbR* 能够扩增出 932 bp 的片段, 16M 无扩增; 用 Puc19K-F 和 BMEII1116-I-R 进行 PCR 扩增时, 突变株 16M Δ *vjbR* 能够扩增出 755 bp 的片段, 16M 无扩增(图 1), 与预期结果一致, 初步表明重组克隆发生了正确重组。将扩增产物进行测序, 测序结果与预期一致, 证实了突变株的构建成功。

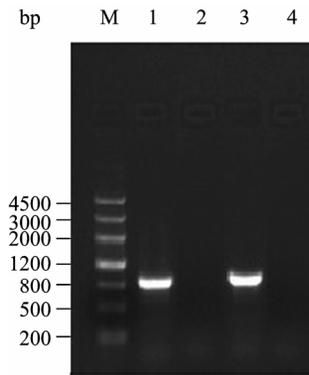


图1 PCR验证 *vjbR* 突变株结果

Fig. 1 PCR verification of 16MΔ*vjbR*

Note: M: Marker III; 1,3: 16MΔ*vjbR*; 2,4: 16M. 1,2: The primers BMEII1116-I-R and Puc19K-F; 3,4: The primers BMEII1116-I-F and Puc19K-R.

2.3 *vjbR* 互补株的构建与 PCR 验证

以 16M 基因组 DNA 为模板, 用引物 BMEII1116-N-F 和 BMEII1116-C-R 扩增出了 1385 bp 含有 *vjbR* 基因 ORF 的片段(图略), 将片段克隆到 T 载体上, 得到重组质粒 T-1116, DNA 测序结果显示, 序列与预期一致(结果略)。将 T-1116 电转化到布鲁氏菌突变株 16MΔ*vjbR* 感受态细胞中, 涂布于卡那霉素和氨苄青霉素抗性平板, 成功筛选到阳性克隆 16MΔ*vjbR*-C, 它同时具有卡那霉素和氨苄青霉素抗性。然后分别以 16M、16MΔ*vjbR* 和 16MΔ*vjbR*-C 为模板, 用引物 BMEII1116-N-F 和 BMEII1116-C-R 进行 PCR 扩增。结果显示(图 2), 野生型扩增出一条 1385 bp 的片段, 突变株扩增出一条 2065 bp 的片段, 互补株分别扩增出 2065 bp 和 1385 bp 的片段, 表明 T-1116 正确整合到了突变株的染色体中。

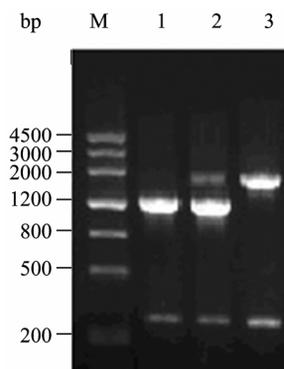


图2 *vjbR* 互补株 PCR 验证结果

Fig. 2 PCR verification of 16MΔ*vjbR*-C

Note: M: Marker III; 1: 16M; 2: 16MΔ*vjbR*-C; 3: 16MΔ*vjbR*.

2.4 布鲁氏菌胞内存活实验

将野生型、互补株和突变株分别以 50:1 的比例感染小鼠巨噬细胞 J774A.1, 通过比较感染后不同时间点的胞内细菌数来明确各菌株在巨噬细胞内的生存能力。我们首先对细胞计数, 目的是尽量减少细胞数对细菌计数的干扰。结果表明, 在各时间点, 野生型、互补株和突变株感染后的细胞数基本一致。如图 3 所示, 各菌株在感染巨噬细胞后的 4 h 内, 胞内细菌数都迅速下降。在 4 h 后, 野生型 16M 的胞内细菌数呈上升趋势, 说明野生型在侵入巨噬细胞后, 一部分细菌被巨噬细胞迅速杀灭, 存活下来的布鲁氏菌能够在巨噬细胞内繁殖复制, 胞内细菌数在 4 h 后又逐渐增加。与野生型相比, 突变株在感染 4 h 以后的胞内存活菌数明显下降, 且显著低于野生型。虽然在第 48 小时, 突变株还没有被清除掉, 但是细菌数已经减少到 10。而互补株由于 *vjbR* 基因的恢复, 其在巨噬细胞内的存活情况与野生型基本一致。这一结果表明 *vjbR* 的缺失使布鲁氏菌在巨噬细胞内的存活能力下降。

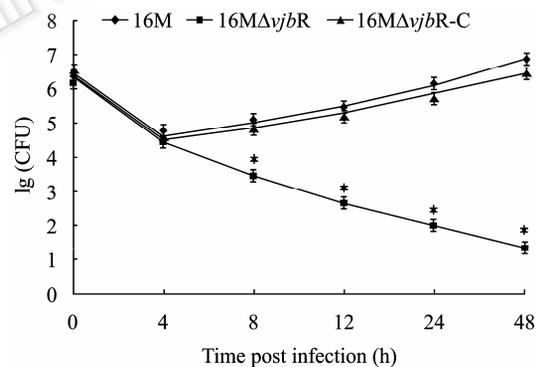


图3 16M 野生型、突变株、互补株胞内存活实验结果
Fig. 3 The Intracellular survival of 16M, 16MΔ*vjbR* and 16MΔ*vjbR*-C

Note: ANOVA analysis was used to compare the differences between the intracellular survival CFUs of infected mice at different time points post infection. Changes in 16M group were significantly different from 16MΔ*vjbR* group. * for $P < 0.05$.

2.5 感染后小鼠脾脏和肝脏中布鲁氏菌 CFU 的变化

2.5.1 脾脏: 布鲁氏菌感染宿主后, 侵袭的首要部位是局部淋巴结, 然后再从局部淋巴结转移到其它组织器官。布鲁氏菌主要寄生于吞噬细胞内, 因此免疫细胞丰富的组织器官(如脾脏和肝脏)是其寄居的主要场所, 脾脏和肝脏中的细菌数是细菌致病性的重要指标。为分析突变株在小鼠体内存活是否发

生改变, 3 个菌株分别腹腔接种小鼠, 然后在接种后不同时间点从小鼠肝脏和脾脏中分离细菌并计数。如图 4 所示, 细菌感染后第 1 天, 3 种菌株在小鼠脾脏的细菌数迅速达到接菌的量, 均为 5×10^5 CFU。从第 3 天开始, 野生型和互补株在小鼠脾脏内的存活趋势极其相似, 即二者的 CFU 呈现上升的趋势, 在感染后的第 7 天 CFU 达到最高, 接近 10^7 , 在 7 d 后 CFU 虽然开始下降, 但是到第 28 天为止, CFU 仍维持在较高水平(10^6)。相反, 从感染后第 3 天, *vjbR* 突变株接种组小鼠脾脏内的细菌数呈现下降趋势, 如第 7 天时 CFU 为 10^4 , 第 14 天时为 10^2 , 在感染后第 28 天脾脏内突变株已经完全被清除, 明显区别于野生型和互补株。结果显示, *vjbR* 突变株虽然可以入侵体内, 但是在短期即被杀灭, 说明 *vjbR* 对于布鲁氏菌在宿主细胞内的长期生存起着非常重要的作用。

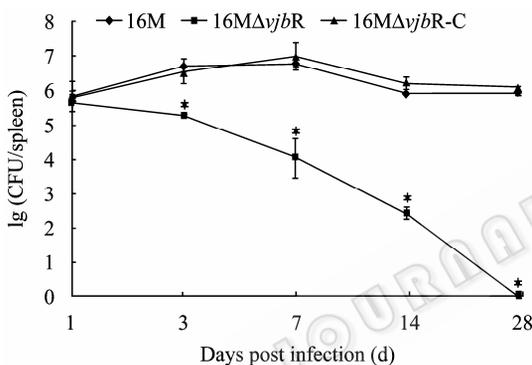


图 4 感染后不同时间小鼠脾脏中布鲁氏菌 CFU 的变化
Fig. 4 Survival of 16M, 16MΔ*vjbR* and 16MΔ*vjbR*-C in spleen of infected BALB/c mice

Note: ANOVA analysis was used to compare the differences between surviving CFU in spleens of infected mice at different time points post infection. Changes in 16M group were significantly different from 16MΔ*vjbR* group. * for $P < 0.05$.

2.5.2 肝脏: 从图 5 中可以看出, 野生型、突变株和互补株在肝脏内的细菌数略低于脾脏, 变化趋势与在脾脏内的变化趋势大体相似, 即野生型和互补株的细菌数变化趋势基本一致, 突变株在肝脏中的细菌数一直呈现显著下降趋势, 且在第 28 天时完全被清除。与脾脏中的 CFU 变化趋势不同之处在于, 肝脏内野生型和互补株的细菌数在第 3 天时即达到最高, 之后便呈现下降趋势。可以看出 *vjbR* 失活后, 布鲁氏菌在宿主肝脏内的生存率亦下降, 毒力减弱。

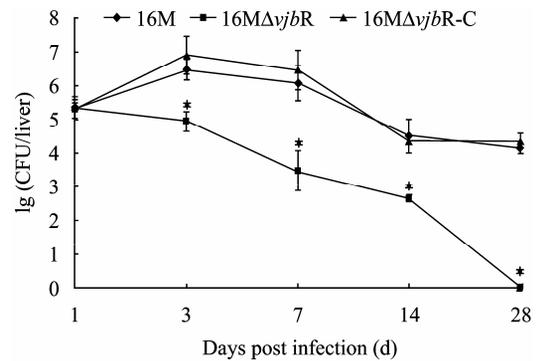


图 5 感染后不同时间小鼠肝脏中布鲁氏菌 CFU 的变化
Fig. 5 Survival of 16M, 16MΔ*vjbR* and 16MΔ*vjbR*-C in liver of infected BALB/c mice

Note: ANOVA analysis was used to compare the differences between surviving CFU in livers of infected mice at different time points post infection. Changes in 16M group were significantly different from 16MΔ*vjbR* group. * for $P < 0.05$.

3 讨论

目前, 使用中的疫苗主要是减毒活疫苗, 这些疫苗都是用传统的传代方法筛选得到的, 存在遗传背景不清楚, 毒力机制和免疫保护机制不明确, 容易发生回复突变导致毒力恢复等缺点。因此, 越来越多的人将注意力转移到了靶向缺失株的筛选, 期望通过缺失关键的毒力相关基因, 使毒力减弱, 且保持免疫保护性。我们在本研究中, 就是利用同源重组的方法缺失可能与毒力相关的基因, 证实其是否与毒力相关, 为下一步的免疫保护性奠定基础。QS 系统存在于很多细菌里, 我们在布鲁氏菌中进行了研究探索, 这样为其他菌种疾病的疫苗研制提供了相应的经验。

利用改造好的 pUC19K 载体, 我们采用抗性替换的方法构建了 *vjbR* 基因缺失突变株。利用位于染色体上同源臂序列之外的引物和位于抗性基因内部的引物进行组合扩增, 突变株能够扩增出预期大小的片段, 而野生型 16M 无扩增, 说明突变株构建成功。*vjbR* 基因缺失后会引发表型的改变。为了进一步证实表型变化是由 *vjbR* 缺失引起的, 互补株的构建是相当必要的。一般来说, 识别一个基因或基因簇的功能, 首先是失活或缺失目的基因或基因簇构建突变株, 然后将含有目的基因的片段克隆到合适的载体上, 再转入突变株来构建互补菌株, 最后对野生型、突变株和互补株的各种表型变化进行比较分析。只有在互补株中能得到恢复的表型才认为是与该基因或基因簇相关的表型。我们采用了自杀质

粒染色体整合的方式来构建互补株。将要恢复的基因扩增出来, 插入自杀质粒 pMD18-T Simple Vector, 然后将该质粒转入突变株中, 抗性筛选。由于该质粒不能复制, 在抗性筛选压力下, 该质粒将通过目的基因整合到染色体上, 从而使细菌具有抗性特征。如此得到的互补株, 恢复的能够表达的目的基因只有一个拷贝, 能够真实反映目标基因的表达及恢复的相关表型。

胞内生存和小鼠体内存活实验表明, *vjbR* 突变株在巨噬细胞内的生存能力下降, 毒力减弱, 与 Rambow^[3]等研究结果相符。这与 QS 系统影响布鲁氏菌毒力因子表达是相关的。布鲁氏菌的重要的毒力因子有 IV 型分泌系统、*omp25* 和 BvrR/BvrS 双组分系统等。近年来的研究结果显示^[7], *vjbR* 与 IV 型分泌系统互为正调控, 因此当 *vjbR* 缺失后, 突变株中的 IV 型操纵子 *virB* 的转录水平也下调, 低于野生型。而本实验室前期的研究表明, *virB* 对布鲁氏菌的复制和长期生存发挥作用, 是布鲁氏菌在巨噬细胞内生存所必需的, 缺失了 *virB* 的突变株在巨噬细胞内的生存能力明显减弱^[8-9]。因此 *vjbR* 可能可以通过调控 *virB* 来影响布鲁氏菌在巨噬细胞内的生存能力。Lestrade 等筛选布鲁氏菌的毒力基因时, 发现了与鞭毛合成有关的基因 *fliC*, 该基因与 *fliF* 类似, 可以编码鞭毛蛋白, 且 16M 的 *fliC* 缺失突变株在小鼠体内毒力下降, 说明该基因在毒力方面发挥了一定的作用, 与布鲁氏菌慢性感染的建立密切相关^[10-12]。文献报道 *vjbR* 也可以通过调控鞭毛调控子 FtcR 来调控鞭毛基因的转录^[13]。

通过本研究, 我们构建了 *vjbR* 突变株并证实了 *vjbR* 是毒力相关基因, 该基因缺失后, 16M 的毒力明显下降, 提示其作为减毒活疫苗株的可能性, 为减毒活疫苗的研究奠定了基础。在后续的研究中, 我们将对该缺失株毒力致弱机制, 以及其作为疫苗株的可行性进行研究。

参 考 文 献

- [1] Taminiau B, Daykin M, Swift S, *et al.* Identification of a quorum-sensing signal molecule in the facultative intracellular pathogen *Brucella melitensis*. *Infect Immun*, 2002, **70**(6): 3004–3011.
- [2] Davies DG, Parsek MR, Pearson JP, *et al.* The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm. *Science*, 1998, **280**(5361): 295–298.
- [3] Rambow-Larsen AA, Rajashekara G, Petersen E, *et al.* Putative quorum-sensing regulator BlxR of *Brucella melitensis* regulates virulence factors including the type IV secretion system and flagella. *J Bacteriol*, 2008, **190**(9): 3274–3282.
- [4] Rambow-Larsen AA, Petersen EM, Gourley CR, *et al.* *Brucella* regulators: self-control in a hostile environment. *Trends Microbiol*, 2009, **17**(8): 371–377.
- [5] Fuqua WC, Winans SC, Greenberg EP. Quorum sensing in bacteria: the LuxR-LuxI family of cell density-responsive transcriptional regulators. *J Bacteriol*, 1994, **176**(2): 269–275.
- [6] Yu DH, Hu XD, Cai H. A combined DNA vaccine encoding BCSP31, SOD, and L7/L12 confers high protection against *Brucella abortus* 2308 by inducing specific CTL responses. *DNA Cell Biol*, 2007, **26**(6): 435–443.
- [7] Delrue RM, Deschamps C, Leonard S, *et al.* A quorum-sensing regulator controls expression of both the type IV secretion system and the flagellar apparatus of *Brucella melitensis*. *Cell Microbiol*, 2005, **7**(8): 1151–1161.
- [8] Yufei Wang, Zeliang Chen, Feng Qiao, *et al.* The typeIV secretion system affects the expression of Omp25/Omp31 and the outer membrane properties of *Brucella melitensis*. *FEMS Microbiol Lett*, 2010(303): 92–100.
- [9] Yufei Wang, Zeliang Chen, Feng Qiao, *et al.* Comparative proteomics analyses reveal the *virB* of *B. melitensis* affects expression of intracellular survival related proteins. *PLoS ONE*, 2009, **4**(4): e5368.
- [10] Lestrade P, Delrue RM, Danese I, *et al.* Identification and characterization of *in vivo* attenuated mutants of *Brucella melitensis*. *Mol Microbiol*, 2000, **38**(3): 543–551.
- [11] Lestrade P, Dricot A, Delrue RM, *et al.* Attenuated signature-tagged mutagenesis mutants of *Brucella melitensis* identified during the acute phase of infection in mice. *Infect Immun*, 2003, **71**(12): 7053–7060.
- [12] Fretin D, Fauconnier A, Kohler S, *et al.* The sheathed flagellum of *Brucella melitensis* is involved in persistence in a murine model of infection. *Cell Microbiol*, 2005, **7**(5): 687–698.
- [13] Leonard S, Ferooz J, Haine V, *et al.* FtcR is a new master regulator of the flagellar system of *Brucella melitensis* 16M with homologs in Rhizobiaceae. *J Bacteriol*, 2007, **189**(1): 131–141.