

一种 KBMA 炭疽疫苗候选株的研制

沈非^{1,2*}, 袁盛凌^{2*}, 展德文², 王艳春², 任敏^{1,2}, 陶好霞², 王芃², 王令春², 陈冬生¹, 刘纯杰²

1 安徽师范大学生命科学学院, 芜湖 241000

2 中国人民解放军军事医学科学院 生物工程研究所 病原微生物与生物安全国家重点实验室, 北京 100071

摘要: 炭疽病是由炭疽芽胞杆菌 *Bacillus anthracis* 引起的一种人畜共患传染病, 严重影响着人类的健康。近年来在细菌疫苗的研究中发现一种特殊的现象: 细菌被杀死后, 体内的代谢活性却仍然维持 (Killed but metabolically active, KBMA)。此发现为炭疽新型疫苗候选株的研制提供了新思路。先通过同源重组的方法, 利用 pMAD 质粒和 Cre-loxP 重组酶系统完成对缺失两个毒性大质粒的炭疽芽胞杆菌减毒株 AP422 的 *uvrAB* 基因的敲除, 得到 AP422 Δ *uvrAB* 菌株, 然后通过光化学处理 (包括长波紫外光的照射和 8-甲氧基补骨脂素处理), 使炭疽芽胞杆菌 AP422 Δ *uvrAB* 失去繁殖能力。利用四氮唑化合物 MTS 检测其代谢活性, 表明光化学处理杀死后的炭疽芽胞杆菌 AP422 Δ *uvrAB* 在至少 4 h 内维持一个很高的代谢活性水平, 即具备典型的 KBMA 特性。炭疽杆菌 AP422 Δ *uvrAB* 的 KBMA 菌株的成功研制为我们提供了一种新型炭疽疫苗候选株。

关键词: *uvrAB* 基因, 同源重组, Cre-LoxP 系统, 基因敲除, 长波紫外光, 8-MOP, MTS, 代谢活性

Development of a killed but metabolically active anthracis vaccine candidate strain

Fei Shen^{1,2*}, Shengling Yuan^{2*}, Dewen Zhan², Yanchun Wang², Min Ren^{1,2}, Haoxia Tao², Peng Wang², Lingchun Wang², Dongsheng Chen¹, and Chunjie Liu²

1 College of Life Sciences, Anhui Normal University, Wuhu 241000, China

2 State Key Laboratory of Pathogen and Biosafety, Institute of Biotechnology, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100071, China

Abstract: Anthrax is a zoonosis caused by *Bacillus anthracis*, which seriously affects human health. In recent years, a special phenomenon is found that the metabolic active of a bacterium remains after it is killed. To development of a KBMA (killed but metabolically active) *Bacillus anthracis* vaccine candidate strain, a plasmid pMAD and a recombinase system Cre-loxP were used to knockout the *uvrAB* gene of *B. anthracis* AP422 which lacks both of two plasmids pXO1 and pXO2. The results of PCR and

Received: December 13, 2010; **Accepted:** March 10, 2011

Supported by: National Infectious Diseases Major Project of China during the 11th Five-Year (No. 2008ZX10004-105).

Corresponding author: Chunjie Liu. Tel: +86-10-66948834; E-mail: liucj@nic.bmi.ac.cn

Dongsheng Chen. Tel: +86-553-3869217; E-mail: chends@ioz.ac.cn

*These authors contributed equally to this study.

十一五国家重大传染病专项 (No. 2008ZX10004-105) 资助。

RT-PCR shows that *uvrAB* genes were deleted from *B. anthracis* AP422 chromosome successfully. The constructed *B. anthracis* AP422 Δ *uvrAB* was inactivated by photochemical treatment (PCT) including an exposure in a long-wave-length ultraviolet (UVA) light and a treatment of 8-Methoxypsoralen (8-MOP), then the metabolic activity were detected by the method of MTS. The results showed that the killed *B. anthracis* AP422 Δ *uvrAB* maintained a highly metabolic activity for at least 4 hours, showing a state of KBMA. The KBMA strain of *B. anthracis* AP422 Δ *uvrAB* provides the prospective vaccine candidate strain for anthrax.

Keywords: *uvrAB* genes, homologous recombination, Cre-LoxP system, gene knockout, long-wave-length ultraviolet (UVA), 8-MOP, MTS, metabolically active

炭疽芽胞杆菌是一种能形成芽胞的革兰氏阳性菌，它引起的炭疽病是一种人畜共患的传染病，炭疽可通过皮肤、呼吸道、胃肠道三种方式侵害人类，因此严重地影响到人类的健康。在我国，据卫生部报道，仅 2007 年就有近 400 例发生 (1 例死亡)^[1]。同时炭疽芽胞杆菌芽胞可以气溶胶的形式传播，当前的主要威胁是生物战剂和生物恐怖袭击！

炭疽芽胞杆菌携带 2 个毒性质粒。一个是质粒 pXO1，编码炭疽毒素 3 个毒力因子：保护性抗原 (Protective antigen, PA)、致死因子 (Lethal factor, LF) 和水肿因子 (Edema factor, EF)；另一个毒性质粒 pXO2 中则含有 5 个与荚膜形成相关的基因，它们分别是 *capA*、*capB*、*capC*、*capD* 和 *capE*^[2]。炭疽芽胞杆菌 AP422 (pXO1⁻ pXO2⁻) 是一株不含有 2 个毒性大质粒的菌株，其毒性比我国的炭疽芽胞杆菌 A16R (pXO1⁺ pXO2⁻) 疫苗株明显减弱^[3]。

从研究方法看，目前应用的疫苗有两类：一类是俄罗斯和中国用的是减毒活芽胞苗 (*B. anthracis* CT^M 和 A16R strain)，减毒活芽胞苗 A16R 通过皮下划痕接种，保护率为 80% 以上。但对肺炭疽的保护效果不佳，并具有一定的不良反应，如头晕、耳鸣、心悸、四肢乏力等，严重者可导致晕厥、四肢抽搐和呼吸困难。另一类是美国用的铝胶吸附苗 (AVA)，它是一种经氢氧化铝吸附和福尔马林处理的炭疽芽胞杆菌 V770-NPI-R 株的上清液铝胶苗。注射这种疫苗能够有效地刺激免疫系统产生特异性结合毒素的抗体，但它的制备产量有限，免疫效果不理想，要进行 6 次皮下注射，整个免疫程序长达 18 个月之久，因滤液中除 PA 外，还含有 EF 和 LF 及其他物质，所以会有少数免疫者呈现严重的不良反应，副

作用大，轻度局部反应达 30%，约 0.2% 接种者呈全身反应，症状表现为乏力、发热和寒颤^[2,4-5]。

目前，炭疽疫苗的主要研究思路仍然围绕着 PA 展开的，许多研究者认为 PA 加其他菌体或芽胞组分是一个比较理想的炭疽疫苗研究策略。如 PA 加灭活的芽胞、PA 加芽胞蛋白、PA 加减毒菌株、PA 加荚膜多糖和 PA 结构域加毒素结构域等。大量的实验结果也表明，这种多组分疫苗能起到更好的免疫保护作用^[6-11]。

KBMA 疫苗在炭疽杆菌疫苗的研究中刚刚崭露头角。研究者在细菌疫苗研究中，发现缺失基因 *uvrA*、*uvrB*、*uvrC* 的细菌在被补骨脂素 (Psoralen) 和长波紫外光 (UVA) 光化学处理 (Photochemical treatment, PCT) 后，菌体虽然失去繁殖能力，但体内代谢活性却仍然维持^[12-14]。它的主要机制是：细菌的 *uvrA*、*uvrB*、*uvrC* 基因在 PCT 后能诱发表达核酸修复酶 ABC，此酶能够切除修复被 Amotosalen (补骨脂素衍生物) 发生交联而受损伤的 DNA 和 RNA 片段，当细菌缺失 *uvrA*、*uvrB*、*uvrC* 任何一种基因时，在 PCT 作用下，核酸切除修复不能完成，因此细菌将很快失去繁殖能力，但体内代谢活性却能维持^[14-17]。据文献报道^[12,14]，KBMA 疫苗在动物的免疫和安全评价中，相比目前的减毒活疫苗安全性增强；相比 AVA 免疫效果要好和免疫周期要缩短；而且相比其他亚单位疫苗或灭活疫苗免疫效果要好。因此对 KBMA 候选株的研究具有潜在应用价值。本实验是通过同源重组的方法利用温敏型质粒 pMAD^[18] 和 Cre-LoxP 重组酶系统^[19] 敲除 *uvrAB* 基因从而成功制备了 KBMA 炭疽芽胞杆菌，它为我国研制新型炭疽疫苗提供了新的候选株。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株与质粒

文中使用的主要菌株和质粒见表 1。

1.1.2 主要试剂

基因组提取试剂盒为天根公司产品; *pfu*、*Taq* 酶, 大肠杆菌 DH5 α 、scs110, T 载体及其他 PCR 相关试剂为 Transgen 公司产品; 限制性内切酶和 T4

DNA 连接酶为 NEB 公司产品; 抗生素购自 Merck 公司; IPTG 和 X-gal 均为 Amresco 公司产品; TRIzol 为 Invitrogen 公司产品; 反转录酶为 Toyobo 公司产品; 8-甲氧基补骨脂素 (8-MOP) 为北京华威锐科化工产品; 脑心浸液 (BHI) 培养基为 BD 公司产品; 质粒提取试剂盒、DNA 凝胶回收试剂盒及代谢活性检测试剂盒购自 Promega 公司; PCR 引物合成和序列测定由华大公司完成, 所用引物序列见表 2。

表 1 主要菌株与质粒

Table 1 Strains and plasmids

Plasmids/strains	Relevant characteristics	Source
Plasmid		
pT-loxP::spc	A <i>spc</i> ^R inserted between two directly repeated loxP sites of pT-loxP	This Lab
pT-uvrABUD::spc	pT-loxP::spc with fragment of <i>uvrAB-U::loxP-spc-loxP::uvrAB-D</i>	This work
pMAD	Shuttle vector, <i>amp</i> ^R in <i>E.coli</i> and <i>em</i> ^R in <i>B.anthraxis</i> , Ts	[18]
pMAD-uvrABUD::spc	pMAD with fragment of <i>uvrAB-U::loxP-spc-loxP::uvrAB-D</i>	This work
pHY-cre	Cre recombinase expression vector	This Lab
<i>B. anthracis</i> strains		
AP422	pXO1 ⁻ pXO2 ⁻ , deriving from A16R	[3]
AP422 Δ uvrAB	AP422, <i>uvrAB</i> knocked out, containing one loxP site	This work

表 2 本次实验用的全部引物 (靶基因: *uvrAB* 基因, 位置: 4 885 594 bp-4 890 452 bp)

Table 2 Primers used in this study (Target gene: *uvrAB* gene and Site: 4 885 594 bp-4 890 452 bp)

Primer	Sequence (5'-3')	Restriction sites
uvrAB-U F	AGGATCCAGCGTCACTTCCACTCGG	<i>Bam</i> H I
uvrAB-U R	ACCGCGGACGTTCTAATCCAGCAACCTATA	<i>Sac</i> II
uvrAB-D F	TGAATTCCTCTTACTTGCGGCACTGAT	<i>Eco</i> R I
uvrAB-D R	ACTCGAGTTATTTGAACGGGATGATGT	<i>Xho</i> I
uvrAB-Uw F	CCACTTTTGAACTCTCTTACCTT	
uvrAB-Dw R	TTATTATCAGCCAGAAGCGTATG	
uvrAB F	GGTGTACGACCGATTGGCGATTGAT	
uvrAB R	CGATGTATAACGGGGACCAAGCGC	

1.2 方法

1.2.1 PCR 扩增上下游同源臂片段及鉴定

从 GenBank 中收录的 *B. anthracis* 基因组序列中找到 *uvrAB* 基因序列, 用 Primer 5.0 软件设计上游

同源臂的引物: *uvrAB-U F*, *uvrAB-U R* 和下游同源臂引物: *uvrAB-D F*, *uvrAB-D R* 并合成。提取炭疽芽胞杆菌 AP422 基因组, 以它为模板, 用 *pfu* 酶扩增上下游同源臂 *uvrAB-U* 和 *uvrAB-D*, 反应体系为 50 μ L, 反应条件为: 95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 94 $^{\circ}$ C 30 s, 49 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 5 个循环; 94 $^{\circ}$ C 30 s, 61 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 27 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。扩增完毕后, 凝胶电泳检测结果, 直接切胶回收纯化同源臂片段, 连接到 T 载体上, 进行双酶切鉴定和测序。

1.2.2 pT-uvrABUD::spc 载体的构建

用酶 *Bam*H I 和 *Sac* II, *Eco*R I 和 *Xho* I 分别依次从连接正确的 T 载体上双酶切下上下游同源臂 *uvrAB-U* 和 *uvrAB-D*, 并纯化, 同样用此酶依次双酶切质粒 pT-loxP::spc, 然后依次用 T4 DNA 连接酶将同源臂片段 16 $^{\circ}$ C 过夜连接到质粒 pT-loxP::spc 上, 构建成 pT-uvrABUD::spc 载体。

1.2.3 打靶载体 pMAD-uvrABUD::spc 的构建

用酶 *Bam*H I 和 *Xho* I 对质粒 pT-uvrABUD::spc 进行双酶切, 然后切胶回收并纯化 *uvrAB-U-spc-uvrAB-D* 片段, 同样用酶 *Bam*H I 和 *Sal* I 对质粒 pMAD 进行双酶切, 用 T4 DNA 连接酶将酶切片段 *uvrAB-U-spc-uvrAB-D* 16 °C 过夜连接到质粒 pMAD 上, 构建成 pMAD-uvrABUD::spc 载体。

1.2.4 炭疽芽胞杆菌 AP422 感受态细胞的制备

用试剂 1 (BHI containing 0.5% glycerol) 37 °C 培养炭疽芽胞杆菌 AP422, OD_{600} 达到 0.6 时, 将菌液冰浴 10 min, 4 °C、8 000×g 离心 2 min, 去上清。用冰冷的试剂 2 (1 mmol/L HEPES, 10% glycerol, pH 7.0) 重悬菌液, 重复 2 遍, 最终用试剂 2 定容菌液到 100 μL, 直接使用或 -80 °C 储存备用^[20]。

1.2.5 炭疽芽胞杆菌 AP422 菌株 *uvrAB* 基因的“无痕”敲除

按照文献[12]所述, 将去甲基化的打靶载体 pMAD-uvrABUD::spc 电击转入炭疽芽胞杆菌 AP422 感受态细胞中, 使打靶片段 *uvrAB-U-LoxP-spc-LoxP-uvrAB-D* 与 AP422 基因组上的部分 *uvrAB* 基因发生同源重组, 敲除 *uvrAB* 基因; 然后再将质粒 pHY-Cre 电击转入敲除 *uvrAB* 基因的 AP422 中, 去除壮观霉素 (Spc) 抗性基因, 最终实现“无痕”敲除 *uvrAB* 基因的 AP422, 即 AP422Δ*uvrAB*。

1.2.6 AP422Δ*uvrAB* 的 PCR 鉴定

对于 AP422 及带 *spc* 抗性重组菌 AP422Δ*uvrAB*::*spc* 和 AP422Δ*uvrAB* 菌株, 提取基因组作为模板, 用炭疽芽胞杆菌基因组上下游同源臂外侧设计的引物 *uvrAB-Uw* F 和 *uvrAB-Dw* R 进行 PCR 鉴定, 体系为 20 μL, 反应条件为: 95 °C 预变性 5 min; 94 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 3 min, 30 个循环; 72 °C 延伸 10 min。并对 PCR 产物连接到 T 载体后进行测序鉴定。

1.2.7 AP422Δ*uvrAB* 的 RT-PCR 鉴定

将 AP422Δ*uvrAB* 和 AP422 菌株在 BHI 液中 37 °C 培养 6 h, 取 1.5 mL 培养物 (约 10⁹ CFU), 离心取上清收集菌体, 加入 200 μL 溶菌酶 (20 mg/mL)

混匀 37 °C 处理 1 h, 然后按说明书要求用 TRIzol 提取 RNA, 再测定其浓度, 取 1 μg 作为模板, 利用随机引物反转录合成 cDNA 第一链, 然后再以此 cDNA 作为模板, 使用同源臂内侧设计的引物 *uvrAB* F 和 *uvrAB* R 进行 RT-PCR 分析, 反应条件同上。

1.2.8 AP422Δ*uvrAB* 菌株生长曲线的测定

炭疽芽胞杆菌 AP422Δ*uvrAB* 和 AP422 菌株 37 °C 过夜培养后, 以 1:100 转接至 200 mL BHI 三角烧瓶中, 37 °C、250 r/min 振荡培养, 每隔 1 h 测一次 OD_{600} 值。

1.2.9 AP422Δ*uvrAB* 菌株对 PCT 的敏感性测定

AP422Δ*uvrAB* 菌液在 BHI 液中 37 °C 培养, OD_{600} 达到 0.6 时, 加入 8-MOP (1 μg/mL), 37 °C 孵育 1 h, 然后按紫外照射时间将菌液分 6 个组, 每组做一复孔, 以每孔 2 mL 菌液加入 12 孔细胞板中, 1 700 μW/cm² 紫外灯下分别照射 10、20、30、40、50、60 min, 照射距离为 6 cm, 然后进行残留活菌计数。同时, 分别用加有 8-MOP (1 μg/mL 和 10 μg/mL) 的 AP422 菌液作为对照。

1.2.10 KBMA AP422Δ*uvrAB* 代谢活性的检测

按照此前方法, 1 700 μW/cm² 紫外灯下照射菌液 1 h 后 (6 J/cm²)。用 CellTiter 96 Aqueous Assay 试剂盒测定代谢活性。在 96 孔板中加入 20 μL MTS/PMS 混合溶液和 100 μL 稀释后的 PCT 菌液 (1×10⁶ CFU), 混匀, 37 °C 孵育, 每隔 30 min 在 492 nm 下用酶标仪测一次吸光度。同时用 PCT (8-MOP, 10 μg/mL) 的 AP422 菌液和不做 PCT 的活菌: AP422Δ*uvrAB*、AP422 菌液作为对照。

2 结果与分析

2.1 上下游同源臂片段的获得

同源臂是基因片段间发生同源重组的重要“桥梁”, PCR 扩增同源臂片段大小为: 上游同源臂 *uvrAB-U* 是 625 bp, 下游同源臂 *uvrAB-D* 是 658 bp。上游同源臂两端有两个酶切位点: *Bam*H I 和 *Sac* II, 下游同源臂两端也有两个酶切位点: *Eco*R I 和 *Xho* I。PCR 扩增出的上下游同源臂片段纯化后连到

T 载体上, 经过双酶切鉴定正确 (图 1) 和测序鉴定正确。

2.2 炭疽芽胞杆菌 AP422 菌株 *uvrAB* 基因的“无痕”敲除

pMAD 是温敏型质粒, 不仅可以在 X-gal 催化下生成蓝白斑, 提高筛选效率, 还可以在温度 $\geq 40^\circ\text{C}$

去除该质粒。我们先利用 pMAD 质粒构建打靶载体 pMAD-*uvrABUD::spc*, 然后在 Spc 抗性压力下促进同源重组; 再利用 pHY-Cre 质粒表达的 Cre 重组酶识别 loxP 位点, 去除重组后遗留在炭疽芽胞杆菌 AP422 基因组上的 Spc 抗性基因, 最终实现 *uvrAB* 基因的“无痕”敲除 (图 2)。

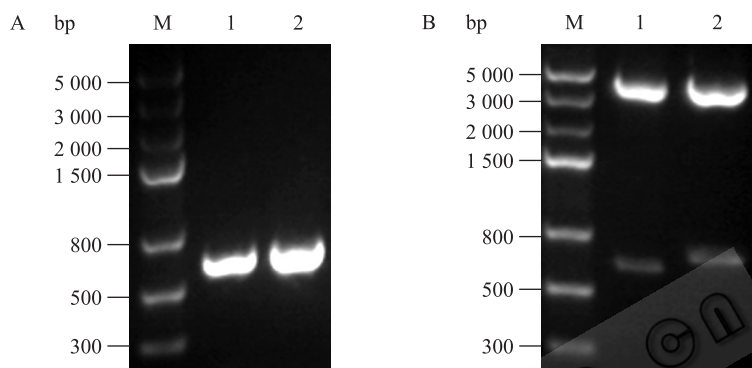


图 1 PCR 扩增出的上下游同源臂与双酶切鉴定

Fig. 1 PCR amplification of homologous arms and restriction enzyme analysis of homologous arms. (A) M: DNA marker; 1: upstream homologous arm, 625 bp; 2: downstream homologous arm, 658 bp. (B) M: DNA marker; 1: restriction enzyme analysis of upstream homologous arm; 2: restriction enzyme analysis of downstream homologous arm.

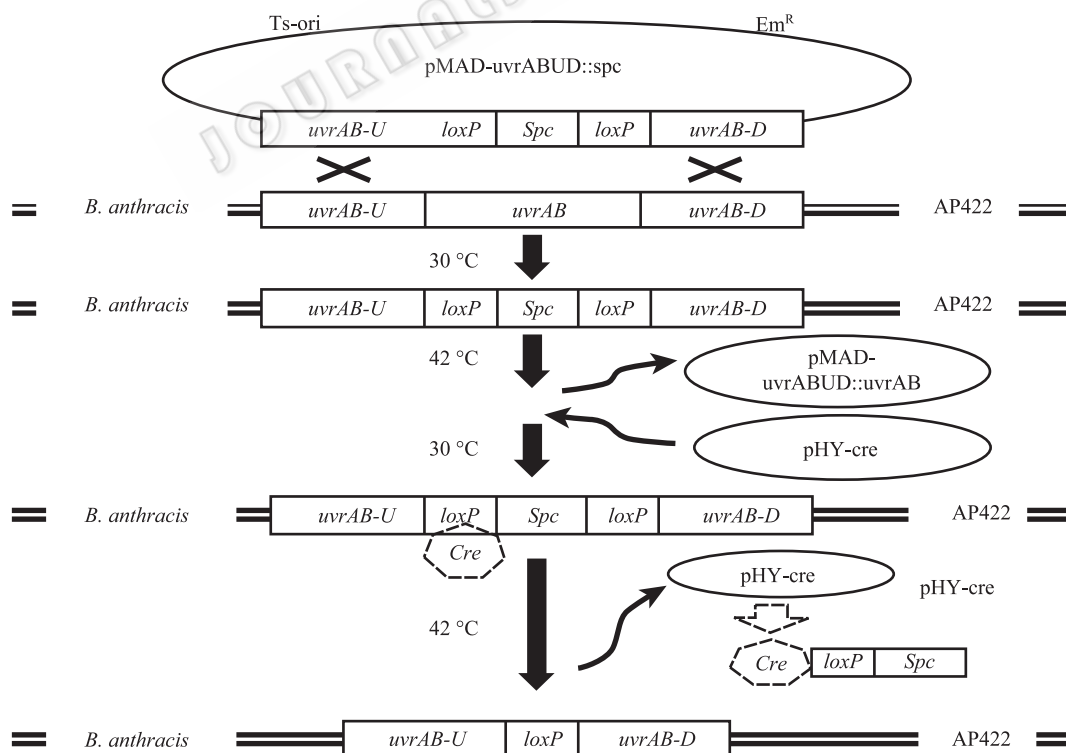


图 2 炭疽芽胞杆菌 AP422 菌株通过 Cre-loxP 重组酶系统敲除 *uvrAB* 基因示意图

Fig. 2 Schematic model showing the knockout of the *uvrAB* gene of *B. anthracis* AP422 by Cre-loxP system.

2.3 AP422 Δ uvrAB 菌株的 PCR 鉴定

理论上用引物 uvrAB-Uw F 和 uvrAB-Dw R 扩增 uvrAB 基因片段大小: 原始菌株 AP422 为 4 648 bp, 重组菌 AP422 Δ uvrAB::spc 为 2 751 bp, “无痕”敲除株 AP422 Δ uvrAB 为 1 621 bp。这和图 3A 中相一致, 从基因水平上说明在炭疽芽胞杆菌 AP422 的 uvrAB 基因已经被成功地“无痕”敲除。测序结果分析也再次验证了此结论。敲除位点上只留下一个 LoxP 位点。

2.4 AP422 Δ uvrAB 的 RT-PCR 鉴定

对于 DNA 水平鉴定正确的菌株, 利用 TRIzol 提取总 RNA, 结果如图 3B。以 uvrAB 基因特异性的引物 uvrAB F 和 uvrAB R 进行 RT-PCR 鉴定, 结果如图 3C 所示。理论上, 对于 uvrAB 基因完全敲除株 AP422 Δ uvrAB 来讲, 用引物 uvrAB F 和 uvrAB R 是扩增不出条带的, 而对照菌株 AP422 的总 RNA 应该能够扩增出相应的 uvrAB 基因, 长度为 3 027 bp。实验结果与理论值完全吻合, 这也就在 RNA 水平上说明, uvrAB 基因已经被成功敲除, 不再转录。

2.5 AP422 Δ uvrAB 生长曲线测定

将 AP422 和出发菌株 AP422 同时转接培养, 每

小时检测 OD_{600} , 共测定了 18 h。相比较原始菌株炭疽芽胞杆菌 AP422, 基因敲除后的炭疽芽胞杆菌 AP422 Δ uvrAB 菌株生长状况未发生改变 (图 4)。

2.6 AP422 Δ uvrAB 菌株对 PCT 的敏感性测定

在相同浓度的 8-MOP (1 μ g/mL) 下, AP422 Δ uvrAB 相比 AP422 对长波紫外光更为敏感。8-MOP 进入菌株体内和基因组结合, 破坏基因组双螺旋, 在缺失 uvrAB 基因后, 使菌株不能表达核苷酸修复酶 ABC 来修复 DNA 和 RNA 的损伤^[5], 因此炭疽芽胞杆菌 AP422 Δ uvrAB 在 60 min 内的光化学处理下先失去繁殖能力。而当 8-MOP 浓度增高时, 炭疽芽胞杆菌对紫外光敏感加强, 当 8-MOP 的浓度达到 10 μ g/mL 时, 在长波紫外灯下照射 60 min, AP422 全部失去繁殖能力 (图 5A)。

2.7 KBMA AP422 Δ uvrAB 代谢活性的测定

MTS (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium, inner salt) 是新合成的四唑氮衍生物, 它被活细胞中线粒体脱氢酶降解而产生棕黄色水溶性的甲臞, 能直接通过光谱吸收测定, 这和炭疽芽胞杆菌的代谢活性相一致。当与电子耦合剂 PMS (Phenazine methosulfate)

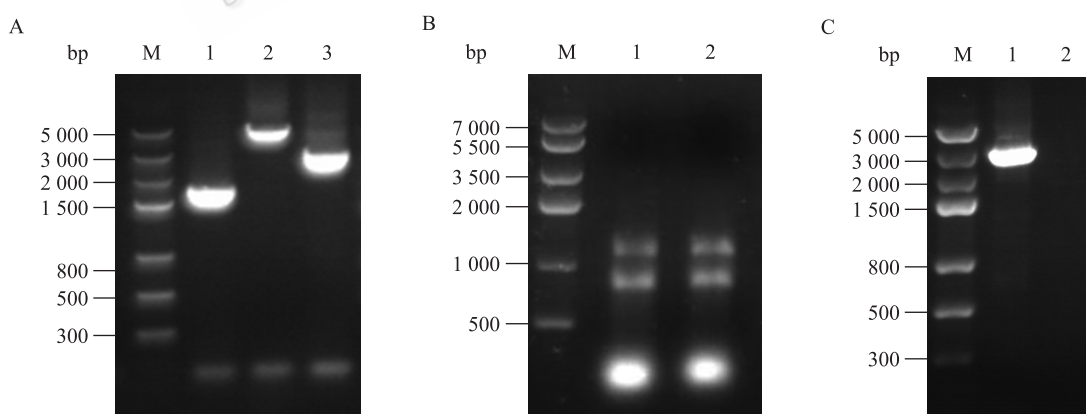


图3 完全敲除株 AP422 Δ uvrAB 的 PCR 鉴定和 RT-PCR 鉴定

Fig. 3 Identification of *B. anthracis* AP422 Δ uvrAB by PCR and RT-PCR. (A) PCR analysis of knock-out of the uvrAB gene in *B. anthracis* AP422. M: DNA marker; 1: AP422 Δ uvrAB (The uvrAB gene of *B. anthracis* AP422 was knocked out but retained loxP site); 2: AP422 (The uvrAB gene of *B. anthracis* AP422 was not knocked out); 3: AP422 Δ uvrAB::spc (The uvrAB gene of *B. anthracis* AP422 was knocked out but retained loxP-spc-loxP). (B) Total RNA of *B. anthracis* AP422 and AP422 Δ uvrAB. M: DNA marker; 1: AP422; 2: AP422 Δ uvrAB. (C) Identification of *B. anthracis* AP422 and AP422 Δ uvrAB by RT-PCR. M: DNA marker; 1: AP422; 2: AP422 Δ uvrAB.

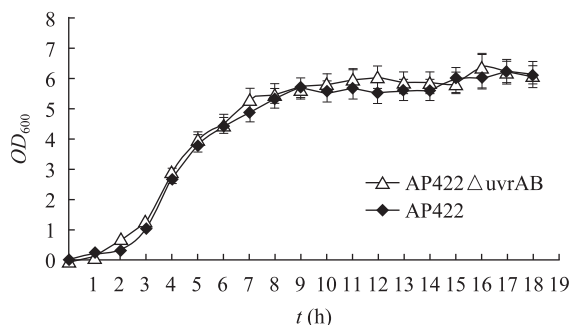


图4 炭疽芽胞杆菌 AP422 Δ uvrAB 与 AP422 菌株生长曲线的比较

Fig. 4 Growth curve of *B. anthracis* AP422 Δ uvrAB and AP422.

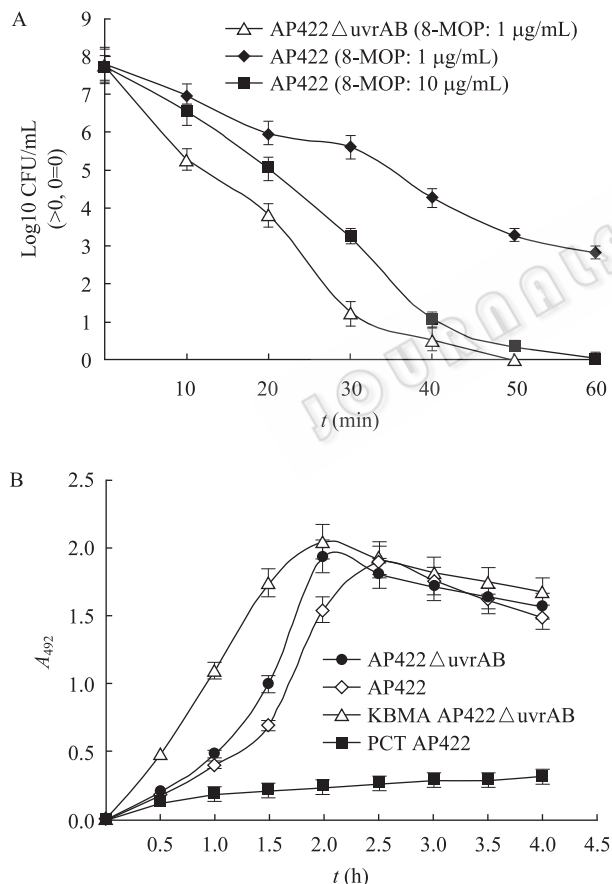


图5 炭疽芽胞杆菌 AP422 Δ uvrAB 对光化学敏感性以及代谢活性检测

Fig. 5 Photochemical sensitivity and analysis of metabolic activity of *B. anthracis* AP422 Δ uvrAB. (A) Photochemical sensitivity of *B. anthracis* AP422 Δ uvrAB (8-MOP: 1 μ g/mL). (B) Analysis of metabolic activity of KBMA AP422 Δ uvrAB.

联用时,能增强 MTS 的还原反应,提高反应的灵敏性。PCT 实验中,在相同的紫外照射时间 (1 h) 下, AP422 Δ uvrAB (8-MOP: 1 μ g/mL) 和 AP422 (8-MOP: 10 μ g/mL) 都失去繁殖能力后,通过 MTS 试剂进行代谢活性检测,我们发现:相比 PCT AP422, AP422 Δ uvrAB 和活菌一样在 4 h 内维持一个很高的代谢活性水平,即形成 KBMA AP422 Δ uvrAB (图 5B)。

3 讨论

KBMA 最早由 Brockstedt 等发现,他们通过 Amotosalen HCl (s-59) 和长波紫外光的组合方法杀死细菌^[4,12-13]。本研究中,我们参照 Grass 等^[21]的研究选择了易于购买的 8-MOP,它和 s-59 都是补骨脂素的衍生物,都具有光敏作用。本次实验证明,在 1 μ g/mL 浓度的 8-MOP 和 6 J/cm² 强度的长波紫外光的 PCT 作用下,失去繁殖能力的炭疽芽胞杆菌 AP422 Δ uvrAB 仍然维持代谢活性,达到了 KBMA 实验要求。

在光化学敏感实验中,特别要注意以下几点:首先是要选择强度适中的长波长紫外灯;其次是紫外照射时间不能太长;再次是菌液的用量,本次实验统一都是用 2 mL 菌液,菌液用量太多,需要加长紫外照射时间才能杀死全部菌液,这会影响到实验的准确性;还要注意是菌液要达到对数生长期时才能加入 8-MOP,8-MOP 的浓度选择影响菌株的代谢活性检测。

对在 PCT 作用下被杀死的菌液代谢活性的检测是本次实验的重点,首先要确保实验用的炭疽芽胞杆菌全部在 PCT 中失去繁殖能力,为了能在 6 J/cm² 杀死所有的菌株,所以我们选择了对炭疽芽胞杆菌 AP422 加大 8-MOP 的浓度 (10 μ g/mL)。8-MOP 浓度太大会对菌株本身代谢活性产生影响,我们曾经参照 Lin 等^[22]的方法用 300 μ g/mL 的 8-MOP 处理菌株,结果 AP422 Δ uvrAB 在 3 J/cm² 的紫外光强度下失去了繁殖能力,但检测出的代谢活

性很低。随后我们做了大量的摸索,最终确定了本次实验方案。同时,我们在实验中设定了两个活菌作为对照,KBMA AP422 Δ uvrAB 和活菌一样,在 4 h 内维持了代谢活性,这也为后续的疫苗的研究提供了实验基础。

相对于传统的疫苗研究策略,如何采用新思路来探索更为安全和有效的新型炭疽疫苗,成为各国和政府应对于生物突发事件的首要问题。如 2009 年美国犹太大学(Yeshiva University)医学院在炭疽新型疫苗的研究中,研究人员从产生疫苗的毒素蛋白中寻找其中最小的蛋白质片段(或称多肽),并且这个小片段的蛋白质在注射到动物体内后,能引起动物产生保护性抗体^[23]。同时,KBMA 的发现也为疫苗的研究提供了新的思路,本次实验的研究成果,为新型炭疽疫苗的研究提供了实验基础。在当前异常复杂国际形势下,生物恐怖袭击的危险依然存在,KBMA 炭疽疫苗有可能会在生物反恐和保护人们的健康方面发挥积极的作用。

REFERENCES

- [1] Li B, Li JM, Chen W. Progress in research on neutralizing antibody against *Bacillus anthracis*. Bull Acad Mil Med Sci, 2010, 34(2): 187-190.
李冰, 李建民, 陈薇. 炭疽芽胞杆菌中和性抗体的研究进展. 军事医学科学院院刊, 2010, 34(2): 187-190.
- [2] Zhan DW, Wang P, Wang LC, et al. Progress on the vaccine for anthrax. Acta Microbiol Sin, 2005, 45(1): 149-152.
展德文, 王芑, 王令春, 等. 炭疽芽胞杆菌疫苗研究进展. 微生物学报, 2005, 45(1): 149-152.
- [3] Zhan DW, Zhang ZS. A *Bacillus anthracis* without pXO1 and pXO2 plasmid and its use: CN, 200610007229.3. 2006-8-23.
展德文, 张兆山. 一株无 pXO1 和 pXO2 质粒的炭疽芽胞杆菌菌株及其用途: 中国, 200610007229.3. 2006-8-23.
- [4] Jendrek S, Little SF, Hem S, et al. Evaluation of the compatibility of a second generation recombinant anthrax vaccine with aluminum-containing adjuvants. Vaccine, 2003, 21(21/22): 3011-3018.
- [5] Scorpio A, Blank TE, Day WA, et al. Anthrax vaccines: pasteur to the present. Cell Mol Life Sci, 2006, 63(19/20): 2237-2248.
- [6] Chitlaru T, Altboum Z, Reuveny S, et al. Progress and novel strategies in vaccine development and treatment of anthrax. Immunol Rev, 2011, 239(1): 221-236.
- [7] Tournier JN, Ulrich RG, Quesnel-Hellmann A, et al. Anthrax, toxins and vaccines: a 125-year journey targeting *Bacillus anthracis*. Expert Rev Anti Infect Ther, 2009, 7(2): 219-236.
- [8] Mohamadzadeh M, Duong T, Sandwick SJ, et al. Dendritic cell targeting of *Bacillus anthracis* protective antigen expressed by *Lactobacillus acidophilus* protects mice from lethal challenge. Proc Natl Acad Sci USA, 2009, 106(11): 4331-4336.
- [9] Osorio M, Wu Y, Singh S, Merkel TJ, et al. Anthrax protective antigen delivered by *Salmonella enterica* serovar Typhi Ty21a protects mice from a lethal anthrax spore challenge. Infect Immun. 2009, 77(4): 1475-1482.
- [10] Baillie LW, Rodriguez AL, Moore S, et al. Towards a human oral vaccine for anthrax: the utility of a *Salmonella* Typhi Ty21a-based prime-boost immunization strategy. Vaccine, 2008, 26(48): 6083-6091.
- [11] Chawla A, Midha S, Bhatnagar R. Efficacy of recombinant anthrax vaccine against *Bacillus anthracis* aerosol spore challenge: preclinical evaluation in rabbits and Rhesus monkeys. Biotechnol J, 2009, 4(3): 391-399.
- [12] Brockstedt DG, Bahjat KS, Giedlin MA, et al. Killed but metabolically active microbes: a new vaccine paradigm for eliciting effector T-cell responses and protective immunity. Nat Med, 2005, 11(8): 853-860.
- [13] Lankowski AJ, Hohmann EL. Killed but metabolically active *Salmonella typhimurium*: application of a new technology to an old vector. J Infect Dis, 2007, 195 (8): 1203-1211.
- [14] Skoble J, Beaver JW, Gao Y, et al. Killed but metabolically active *Bacillus anthracis* vaccines induce broad and protective immunity against anthrax. Infect Immun, 2009, 77(4): 1649-1663.
- [15] Lin L, Cook DN, Wiesehahn GP, et al. Photochemical inactivation of viruses and bacteria in platelet concentrates by use of a novel psoralen and long-wavelength ultraviolet light. Transfusion, 1997, 37(4): 423-435.
- [16] Wollowitz S. Fundamentals of the psoralen-based Helinx™ technology for inactivation of infectious

- pathogens and leukocytes in platelets and plasma. *Semin Hematol*, 2001, 38(Suppl 11): 4-11.
- [17] Sancar A, Sancar GB. DNA repair enzymes. *Annu Rev Biochem*, 1988, 57: 29-67.
- [18] Arnaud M, Chastanet A, Débarbouillé M. New vector for efficient allelic replacement in naturally nontransformable, low-GC-content, gram-positive bacteria. *Appl Environ Microbiol*, 2004, 70(11): 6887-6891.
- [19] Wang YC, Jiang N, Zhan DW, et al. Application of Cre-LoxP system in the gene knockout of *Bacillus anthracis* and the knockout of *eag* gene. *Prog Biochem Biophys*, 2009, 36(7): 934-940.
王艳春, 姜娜, 展德文, 等. Cre-LoxP 系统在炭疽芽胞杆菌基因敲除中的应用及 *eag* 基因的敲除. *生物化学与生物物理进展*, 2009, 36(7): 934-940.
- [20] Pomerantsev AP, Camp A, Leppla SH. A new minimal replicon of *Bacillus anthracis* plasmid pXO1. *J Bacteriol*, 2009, 191(16): 5134-5146.
- [21] Grass JA, Hei DJ, Metchette K, et al. Inactivation of leukocytes in platelet concentrates by photochemical treatment with psoralen plus UVA. *Blood*, 1998, 91(6): 2180-2188.
- [22] Lin L, Wiesehahn GP, Morel PA, et al. Use of 8-methoxypsoralen and long-wavelength ultraviolet radiation for decontamination of platelet concentrates. *Blood*, 1989, 74(1): 517-525.
- [23] Abboud N, Jesus MD, Nakouzi A, et al. Identification of linear epitopes in *Bacillus anthracis* protective antigen bound by neutralizing antibodies. *J Biol Chem*, 2009, 284(37): 25077-25086.

科学出版社科学出版中心生命科学分社新书推介

中国至 2050 年农业科技发展路线图 (英文版)

赵其国 著译

开本: 大 16 开 营销分类: 农业 装帧: 平装

ISBN 978-7-03-029978-9 ¥ 108.00 2011 年 1 月出版

内容简介

本书明确了至 2050 年全球和我国农业发展面临的挑战与机遇, 预测我国未来对农业科技的重大需求, 提出至 2050 年我国农业科技领域发展战略目标、分阶段目标, 提出各阶段农业科技发展的主要方向及可突破的重大科学技术问题, 形成未来农业科技发展的总体路线图, 并提出为实现以上目标所需要的体制、资源、人才等方面的政策建议。

读者对象 本报告可作为政府部门、科研机构、大学、企业进行科技战略决策的重要参考, 也可供国内外专家、学者研究和参考。

编辑推荐 作者“中国科学院农业领域战略研究组”成员均为我国农业领域权威专家。语言简洁明了, 表述清晰。



欢迎各界人士邮购科学出版社各类图书 (免邮费)

邮购地址: 北京东黄城根北街 16 号 科学出版社 科学出版中心 生命科学分社 邮编: 100717

联系人: 周文字 (010-64031535)

网上订购: www.dangdang.com www.joy.com www.amazon.cn www.beifabook.com

更多精彩图书请登陆网站 <http://www.lifescience.com.cn>, 欢迎致电索要书目