

[19]中华人民共和国专利局

[51]Int.Cl⁶



[12] 发明专利说明书

A61K 39/02

C12N 1/21

C12N 15/63

[21] ZL 专利号 88104317.6

[45]授权公告日 1997 年 4 月 16 日

[11] 授权公告号 CN 1034553C

[22]申请日 88.6.4 [24]颁证日 97.1.18

[21]申请号 88104317.6

[30]优先权

[32]87.6.4 [33]US[31]058,360

[73]专利权人 分子工程合伙人有限公司

地址 美国阿拉巴马州

[72]发明人 罗伊·柯蒂斯

[74]专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 姜建成

[56]参考文献

EPA0127153

EPA0127153

EPA080806

EPA080806

WO8603123

WO8603123

AGRICL1,AMD BROL.CHEM.48(8):2129-30

1984. 4. 4

AGRICU1.AND BLOL.CHEM.48(8):2129-30

1984. 4. 4

C.A.76;NO.968477 1972. 2. 2

C.A.76;NO.968477(1992)

INF.AND IMMUNIFY55(12):3035-43 1987.

7. 7

INF.AND IMMUNIFY55(12):3035-43 1987.

7. 7

审查员 马昭若

权利要求书 3 页 说明书 61 页 附图页数 8 页

[54]发明名称 无毒微生物及其应用

[57]摘要

本发明提供了一种用于脊椎动物或非脊椎动物免疫的疫苗,该疫苗包括病原微生物的一种无毒衍生物,所说的衍生物基本上不能产生功能性腺苷酸环化酶和环化 AMP 受体蛋白质。本发明还提供了另一种用于脊椎动物或脊椎动物免疫的疫苗,该疫苗包括病原微生物的一种无毒衍生物,其中所说的衍生物基本上不能产生功能性腺苷酸环化酶和环化 AMP 受体蛋白质,但却能表达由所述脊椎动物的病原体分离得到的重组基因,从而产生一种抗原,它能够 在所述脊椎动物中诱发针对所述病原体的免疫应答。

权 利 要 求 书

1. 一种制备用于免疫脊椎动物或无脊椎动物的疫苗的方法，其中所述疫苗包含病原微生物的无毒衍生物，所述衍生物基本上不能产生功能性腺苷酸环化酶和环化AMP受体蛋白，所述方法包括制备含所述微生物的药用疫苗制剂。

2. 根据权利要求1的方法，其中的微生物能够表达由所述脊椎动物或无脊椎动物的病原体得到的重组基因，从而产生一种抗原，它能在所述脊椎动物或无脊椎动物中诱发针对该病原体的免疫应答。

3. 根据权利要求2的方法，其中所述重组基因编码一种具有药理活性的产物。

4. 根据权利要求1或2的方法，其中所述的病原微生物是一种细菌。

5. 根据权利要求4的方法，其中所述的细菌是志贺氏菌属、欧文氏菌属、耶尔森氏菌属、巴斯德氏菌属、拉基欧氏菌属或布鲁氏菌属。

6. 根据权利要求4的方法，其中的细菌属于寄宿于所述脊椎动物淋巴上皮结构的种或属于感染所述无脊椎动物的种。

7. 根据权利要求6的方法，其中所述的细菌是沙门氏菌属或沙门氏菌—埃希氏杆菌杂种。

8. 根据权利要求7的方法，其中所述细菌选自鼠伤寒沙门氏菌、伤寒沙门氏菌、副伤寒沙门氏菌、鸡沙门氏菌、肠炎沙门氏菌、*S. dublin*、霍乱沙门氏菌和亚利桑那沙门氏菌。

9. 根据权利要求2到8中任一项的方法，其中所述病原体是病毒、细菌、原生动物、寄生虫或真菌。

10. 根据权利要求9的方法，其中所述病原体是淋病奈瑟氏菌、

沙眼衣菌、突变链球菌、结核分枝杆菌、麻风分枝杆菌、肺炎链球菌、化脓性链球菌、钌密螺旋体、脑膜炎奈瑟氏菌、肺炎分枝支原体、流感嗜血杆菌、百日咳博德特氏菌、禽类博德特氏菌、大肠杆菌或等链球菌。

11. 一种制备用于脊椎动物或无脊椎动物宿主蛋白质合成的载体微生物的方法，其中所述载体微生物包括一种病原微生物的无毒衍生物，所述衍生物基本上不能产生功能性腺苷酸环化酶和环化AMP受体蛋白，但能够表达由脊椎动物宿主得到的重组基因，从而得到一种能够在所述脊椎动物或无脊椎动物中抑制、调节或增强免疫应答的产物，所述方法包括制备含有所述微生物的药用制剂。

12. 根据权利要求11的方法，其中所述的载体微生物是一种细菌。

13. 根据权利要求11或12的方法，其中所述的细菌是沙门氏菌属或沙门氏菌-埃希氏杆菌杂种，而且该细菌寄宿于所述脊椎动物的淋巴上皮结构或感染所述的无脊椎动物。

14. 根据权利要求13的方法，其中所述细菌是鼠伤寒沙门氏菌、伤寒沙门氏菌、副伤寒沙门氏菌、鸡沙门氏菌、肠炎沙门氏菌、*S. dublin*、霍乱沙门氏菌和亚利桑那沙门氏菌。

15. 一种制备病原微生物的无毒衍生物的方法，所述衍生物基本上不能产生功能性腺苷酸环化酶和环化AMP受体蛋白，该方法包括通过DNA重组技术或转座子诱变使病原微生物发生突变，使腺苷酸环化酶和环化AMP受体蛋白的基因各自形成缺失突变，并分离所述衍生物。

16. 根据权利要求15的方法，其中所述的载体微生物是一种细菌。

17. 根据权利要求15或16的方法，其中所述的细菌是沙门氏菌属或沙门氏菌-埃希氏杆菌杂种，而且该细菌寄宿于所述脊椎动物的淋巴上皮结构或感染所述的无脊椎动物。

18. 根据权利要求17的方法，其中所述细菌是鼠伤寒沙门氏菌、

伤寒沙门氏菌、副伤寒沙门氏菌、鸡沙门氏菌、肠炎沙门氏菌、
S. dublin、霍乱沙门氏菌和亚利桑那沙门氏菌。

说明书

无毒微生物及其应用

本申请是与此有关的美国申请的继续，该美国申请号为 0 5 8 3 6 0，申请日是 1 9 8 7 年 6 月 4 日。

本发明涉及无毒微生物，它们的制备方法及在疫苗中的应用。

以前所用的抗传染病的疫苗一般组成如下：（Ⅰ）由病原因子纯化得到的特定组分，包括完整的抗原、抗原片段或天然存在的抗原或抗原决定簇的合成类似物，（Ⅱ）抗个体基因型抗体，（Ⅲ）被灭活的完整病原因子，或（Ⅳ）作为活疫苗的病原因子的无毒衍生物。这些类型的疫苗有许多，下面即是其中的一些实例：

美国专利 4 2 5 0 2 6 2 公开了从突变链球菌 (*Streptococcus mutans*) 回收葡萄糖基转移酶的方法，并将该纯化酶用于抗龋齿的局部免疫，即Ⅰ型疫苗。就突变链球菌的血清型 *r*、*c* 或 *g* 来说，都对细菌的培养、酶的纯化以及用酶刺激唾液中的 Ig A 抗体等有详细描述。在美国专利 4 2 0 3 9 7 1 和 3 2 3 9 7 4 9 中，可见到从纯化细菌特定组分得到疫苗的其他一些例子，这些专利公开了用于抗淋病奈瑟氏菌 (*Neisseria gonorrhoeae*) 感染的疫苗，该细菌由淋球菌外膜物质中的糖蛋白组成。注射糖蛋白可刺激杀菌的抗体。

美国专利 3 9 3 1 3 9 8 公开了将死的突变链球菌细胞施用在口腔中防止牙齿衰败，这是Ⅲ型疫苗的一个例子。发明者发现，所产生的抗体是免疫球蛋白 A (Ig A) 抗体，它们使蚀斑的形成减少。

活细菌疫苗 (Ⅳ型) 含有选择的大肠杆菌 (*E. coli*) 菌株，这是美国专利 3 9 7 5 5 1 7 公开的。这种细菌在注射到奶牛乳腺之前要用稀福尔马林进行减毒处理，使其部分钝化。在以后的奶中发现

了这样产生的抗体，它能保护新生猪抵抗大肠杆菌的感染。使大肠杆菌钝化的福尔马林处理只是使细菌暂时减毒，因此在注射之前要小心防止细菌复原。这种复原会造成严重感染而不是起到保护作用。

将突变引入上述菌株以产生无毒菌株已是可行的，这样产生的菌株基本上在寄主内不能存活。这种菌株可以说是遗传学上的衰减。为了易于叙述，遗传衰减的原理将参照沙门氏菌系统予以说明，然而，正将如下面所讨论的，其原理能够广泛应用。

鼠伤寒沙门氏菌 (*Salmonella typhimurium*)、伤寒沙门氏菌 (*S. typhi*) 和具有侵染性质的其他沙门氏菌种，在口服之后通过附着、侵染和在与肠道相关的淋巴样组织 (GALT; 淋巴集结) 的细胞中增殖而进入深层组织 (Carter 和 Collins, J. Exp. Med. 139: 1189—1203, 1974)。由于沙门氏菌介导的抗原至 GALT 的传递能诱发分泌型免疫应答及体液与细胞免疫应答，无毒沙门氏菌突变体虽已失去致病能力，但并未损伤其附着并侵袭 GALT 的能力，因此它们很可能作为有效的载体以传递外源抗原，例如将集群或毒性抗原等转移到 GALT，并诱发针对衍生此抗原的病原体的保护性免疫。能够表达其他微生物抗原的无毒沙门氏菌疫苗菌株的构建，已通过经典的基因转移方法 (Formal 等人, Infect. Immun, 34: 746—750, 1981)) 利用 DNA 重组技术得到实现。利用后一技术，曾经构建了这样的无毒沙门氏菌菌株，它们能表达与沙门氏菌正常交换遗传信息的生物的基因 (Stevenson 和 Manning, FEMS Microbiol. Lett. 28: 317—321, 1985; Clements 等人, Infect. Imm. 53: 685—692, 1986)，以及用经典的基因转移法不能

将遗传信息转移给沙门氏菌的微生物的基因 (Curtiss, J. Dent. Res. 65: 1039—1045, 1986)。已经表明, 这种二价无毒沙门氏菌菌株能诱发针对表达的抗原的抗体, 并在一个例子中对表达的抗原产生细胞免疫应答 (Brown 等人, J. Infect. Dis. 155: 86—92, 1987), 但有关诱导抗提供集群或毒性抗原的病原体的保护性免疫的数据仍然不足。

Bacon 等人 (Brit. J. Exp. Pathol. 32: 85—96, 1951) 首先研究了伤寒沙门氏菌营养缺陷型突变体的无毒性。他们指出, 要求嘌呤、对氨基苯甲酸和门冬氨酸的突变体已降低对鼠的毒性。Germanier 和 Furer (Infect. Immun. 4: 663—673, 1971) 首先用鼠研究了使用鼠伤寒沙门氏菌 *galE* 突变体的无毒性和免疫原性, 然后提出使用伤寒沙门氏菌 *galE* 突变体 Ty 21a 作为人体抗伤寒热的疫苗 (J. Infect. Dis. 131: 553—558, 1975)。Stocker (美国专利 4550081) 利用 Tn 10 进行转座子诱变, 再选择蒽酮抗性, 这导致 Tn 10 和邻近 DNA 顺序的缺失性丢失, 从而产生不能回复的缺失突变, 这是一个 Bacon 等人使用的突变体中很明显的问题。Stocker 首先是分离 *aro A* 缺失 (Δ) 突变体, 其缺陷是不能合成芳族氨基酸组的化合物, 包括叶酸生物合成所需要的对氨基苯甲酸和二羟基苯甲酸, 后者是肠螯合素的前体, 并且最近将 Δ *aro A* 突变与排除腺嘌呤生物合成的缺失突变结合。由 Tn 10 诱导和蒽酮抗性产生的 Δ *asd* 突变, 产生了对二氨基庚二酸的要求, 这一点被用来使鼠伤寒沙门氏菌变为无毒, 并且不损害其诱导全身分泌免疫应答的能力。因为许多沙门氏菌具有一种提供毒性的质粒, 曾研究过去除此质粒的衍生物, 并提

出用它作为疫苗使用 (Nakamura 等人, *Infect. Immun.* 50: 586—587, 1985)。

尽管前面描述的提供无毒沙门氏菌而不损害其免疫原性的每一种方法都有其优点, 但每一种方法都存在问题。gal E 突变体难于生长以保持其免疫原性, 因为它们对半乳糖敏感, 必须在半乳糖存在的场合下生长以产生正常的 LPS, 然而正常的 LPS 选择性地导致非免疫原性的抗半乳糖突变体的产生。尽管 Δ aro A 突变体排除了肠螯合素和叶酸二者的合成, 肠螯合素对鼠伤寒沙门氏菌的毒性的必要性曾因 Benjamin 等人 (*Infect. Immun.* 50: 392—397, 1985) 的大量结果而受到怀疑, 这些结果表明, 干扰鼠伤寒沙门氏菌络合与铁运输能力的任何和所有突变都对毒性无很大的影响。因此 Δ aro A 突变体的无毒性很可能只是由于不能合成对氨基苯甲酸 (PABA) 与叶酸。由于 Bacon 等人 (见上) 观察到, 在用不能合成 PABA 的突变体感染的小鼠的饮食中施用对氨基苯甲酸导致野生型毒性水平, 因此人们必须注意疫苗菌株无毒性的表型逆转, 在饮食中消耗了其合成途径被无毒突变体所阻断的代谢物时则可能发生这种逆转。而 Δ asd 突变体, 尽管没有这些困难, 但它们在口服和侵入 GALT 后迅速死亡, 因此 Δ asd 突变体只能有效地诱导全身粘膜性免疫, 而不能有效地诱导体液与细胞免疫。

本发明利用转座子诱导的突变体而克服现有技术中疫苗的许多缺点, 在转座子诱导的突变体中, 导致无毒性的损伤不可能通过食物或动物宿主能提供的任何东西进行修复。这些缺失当然可由 DNA 重组技术引入。

本发明还提供一种使脊椎动物或非脊椎动物免疫的疫苗, 它由一

种病原微生物的无毒衍生物组成，所述衍生物基本上不能产生功能性腺苷酸环化酶和环化AMP受体蛋白质。

本发明还提供一种使脊椎动物或非脊椎动物免疫的疫苗，该疫苗由微生物的无毒衍生物组成，所述衍生物不能产生功能性腺苷酸环化酶和环化AMP受体蛋白质，而能表达由所述脊椎动物或非脊椎动物的病原体衍生的重组基因从而在该脊椎动物或非脊椎动物中产生一种抗原，该抗原能在该动物体内诱发针对所述病原体的免疫应答。

本发明还提供一种刺激脊椎动物或非脊椎动物内免疫系统的方法，其组成步骤如下：

给予所说的脊椎动物或非脊椎动物施用一种使脊椎动物或非脊椎动物免疫的无毒疫苗，该疫苗由病原微生物的无毒衍生物组成，所述衍生物不能产生功能性腺苷酸环化酶和环化AMP受体蛋白质。

本发明还提供刺激脊椎动物或非脊椎动物免疫系统的一种方法，其组成步骤如下：

给所述脊椎动物或非脊椎动物施用一种无毒的微生物衍生物，所述衍生物不能产生功能性腺苷酸环化酶和环化AMP受体蛋白质，但能表达由所述脊椎动物或非脊椎动物的病原体衍生的重组基因，从而在所述脊椎动物或非脊椎动物中产生一种抗原，它能在该动物体内诱发针对所述病原体的免疫应答。

本发明还为脊椎动物或非脊椎动物宿主蛋白质的合成提供一种载体微生物，它由病原微生物的无毒衍生物组成，所述衍生物不能产生功能性腺苷酸环化酶和环化AMP受体蛋白质，而能表达由所述脊椎动物或非脊椎动物宿主衍生的重组基因，从而产生一种能在所述脊椎动物或非脊椎动物体内抑制、调节或增强免疫应答的产物。

本发明还提供一种调控脊椎动物或非脊椎动物免疫应答的方法
该方法包括将病原微生物的无毒衍生物引入所说的脊椎动物中,所述
衍生物不能产生功能性腺苷酸环化酶和环化A M P受体蛋白质,但能
表达由所述脊椎动物或非脊椎动物衍生的重组基因,从而产生一种能
够抑制、调节或增强所述脊椎动物或非脊椎动物免疫应答的基因产物。

本发明还提供一种针对变应原而使脊椎动物或非脊椎动物脱敏的
方法,该方法包括给所说的脊椎动物施用一种病原微生物的无毒衍生
物的步骤,该病原微生物表达一种由某种生物衍生的重组基因,该生
物能够产生针对所述脊椎动物或非脊椎动物的一种活性变应原,从而
在该动物中产生一种抗原,它能使所说的脊椎动物或非脊椎动物针对
所述脊椎动物的所述变应原脱敏,所说的无毒衍生物不能产生功能性
腺苷酸环化酶和环化A M P受体蛋白质。

本发明还提供一种产生病原微生物的无毒衍生物的方法,所说的
衍生物不能产生功能性腺苷酸环化酶和环化A M P受体蛋白质,该方
法包括使病原微生物产生突变,即使腺苷酸环化酶和环化A M P受体
蛋白质的基因通过转座子诱变产生缺失突变,并对衍生物进行分离。
利用D N A重组技术在腺苷酸环化酶和环化A M P受体蛋白质基因中
产生缺失也可达到相同目的。

图1说明在用 7.4×10^8 CFU $\times 4064$ 和 4.0×10^8
CFU $\times 3456$ 进行口服接种后一定时间,由淋巴集结(即GALT)
回收鼠伤寒沙门氏菌 $\Delta cya \Delta crp \times 4064$ (○)和野生型
 $\times 3456$ (○)的情况。垂直线条表示标准偏差。

图2说明在用 7.4×10^8 CFU $\times 4064$ 和 4.0×10^8
CFU $\times 3456$ 口服接种后一定时间,由隔膜淋巴结(■ □)和脾

($\Delta\Delta$) 回收鼠伤寒沙门氏菌 $\Delta cya \Delta crp$ $\times 4064$ ($\blacksquare\Delta$) 和野生型 $\times 3456$ ($\square\Delta$) 的情况。垂直线条表示标准偏差。

图3 说明某些鼠伤寒沙门氏菌菌株的质粒含量。用 Birnboim 方法 (Methods, Enzymol. 100: 243—255, 1983) 提取质粒 DNA, 溶于 0.5% (重量/体积) 琼脂糖凝胶中, 并用溴化乙锭染色。 $\times 3344$ 和 $\times 3337$ 溶解产物用苯酚/氯仿/乙醚提取, 不经过密度梯度离心。各道中的菌株 (100 Kb 质粒): a, $\times 3000$ (pStLT 100); b, $\times 3344$ (—); c, $\times 3347$ (pStLT 101); d, $\times 3306$ (pStSR 100); e, $\times 3337$ (—); f, $\times 3338$ (pStSR 101); g, $\times 3339$ (pStSL 100, 90 Kb, 8 Kb); h, $\times 3340$ (90 Kb, 8 Kb); i, $\times 3351$ (pStSR 101)。标记质粒是 Rldrd (100 kb) 和二聚 pA OYC 184 (8 kb) (未示出)。

图4 说明 100 kb 质粒的限制性酶消化的图谱。用 Hind III 消化质粒 DNA, 溶于 0.6% (重量/体积) 琼脂糖凝胶中, 并用溴化乙锭染色。道 a 含有用 Hind III 消化的噬菌体 λ DNA。其他道上还示出以下菌株 (和相应的质粒含量): b, $\times 3000$ (pStLT 100); c, $\times 3306$ (pStSR 100); d, $\times 3338$ (pStSR 101); e, $\times 3339$ (pStSL 100, 90 kb, 8 kb); 以及 f, $\times 3340$ (90 kb, 8 kb)。

图5 说明用鼠伤寒沙门氏菌 SR—11 作小鼠口服接种以后在 (A) 淋巴集结和 (B) 脾中的总 OFU。 $\times 3306$ ($\square$), $\times 3337$ ($\square$)。几何均值 $\pm$ 标准偏差, $n=2-7$ 只小鼠。

在测定 CFU 的单向跟踪的 Student 氏 t 试验中, χ^2_{3306} 比 χ^2_{3337} 的 P 值大: $a < 0.0125$, $b < 0.0005$ 。

图 6 说明用野生型和去除 100 kb 质粒的 SR-11 混合口服感染小鼠的结果。由淋巴集结 (○)、隔膜淋巴结 (△) 和脾 (□) 回收的野生型 χ^2_{3456} 与去除型 χ^2_{3337} 之比的几何平均值 $\pm$ 标准偏差。n = 3—7 只小鼠, 接种 7 天后为 n = 1, 在测定比值大于 1 的几何平均值的单向跟踪的 Student 氏 t 试验中的 P 值: $a < 0.05$, $b < 0.0125$, $c < 0.0025$, $d < 0.0005$ 。

在感染 3 天 ($P < 0.0125$)、4 天 ($P < 0.0005$) 和 5 天 ($P < 0.0025$) 后, 脾的比值比淋巴集结的比值大。在感染 3 天 ($P < 0.05$) 和 5 天 ($P < 0.005$) 后, 隔膜淋巴结的比值比淋巴集结的比值大。

图 7 说明在用 SL 1344 作小鼠的口服接种后, 小鼠组织中的 CFU。 χ^2_{3339} (空心符号)、 χ^2_{3340} (实心符号)。淋巴集结 (□, ■), 隔膜淋巴结 (△, ▲), 脾 (○, ●)。几何平均值 $\pm$ 标准偏差, n = 2—7 只小鼠。在测定 CFU 的单向跟踪的 Student 氏 t 试验中, χ^2_{3339} 的 P 值比 χ^2_{3340} 大; $a < 0.025$, $b < 0.0125$, $c < 0.0005$ 。

本发明是基于这一发现, 即某些突变可以使微生物变为无毒而基本上不影响它的免疫原性。更具体说, 本发明涉及微生物疫苗, 其中微生物携带有缺失 (Δ) 突变 Δcya 和 Δcrp , 它们分别除去了合成腺苷酸环化酶 (ATP 焦磷酸裂合酶 (成环) EC 4.6.1.1) 和环化 AMP 受体蛋白质 (CRP) 的能力。

环-3', 5'-AMP (cAMP) 和环化 AMP 受体蛋白质

对大量涉及传输和降解大量分解代谢产物的基因和操纵子的转录是必需的。曾有实验证据表明，用以传输燃料/碳源的系统都处在cAMP正控制之下，好几种氨基酸透性酶也是如此。除了在分解代谢中非常重要的作用外，细胞中cAMP的浓度还通过温和噬菌体、伞毛合成、鞭毛合成和至少一种外膜蛋白质的合成影响溶原化。尽管cAMP存在于哺乳动物细胞中，但在沙门氏菌可能侵入和增殖的巨噬细胞和其他细胞中存在的cAMP浓度低于0.1—1.0 mM cAMP，这种浓度对于使 Δcya 突变体在体外表现出野生型表型是必需的。而且，所含有的 Δcrp 突变会基本上消除由这种 Δcya 突变体在体外吸收cAMP可能积累的任何益处。

一旦因引入 $\Delta cya \Delta crp$ 突变而赋予无毒性后，该微生物即可作为诱发抗该微生物免疫的疫苗的免疫原性组分。因此，具有腺苷酸环化酶和cAMP受体蛋白质基因的任何微生物，都可考虑按本发明使用，包括而不限于沙门氏菌、大肠杆菌—鼠伤寒沙门氏菌杂种，志贺氏菌属 (*Shigella*)、欧文氏菌属 (*Erwinia*)、耶尔森氏菌属 (*Yersinia*)、巴斯德氏菌属 (*Pasteurella*)、拉基欧氏菌属 (*Legionella*)、或布鲁氏菌属 (*Brucella*)。较好的微生物是沙门氏菌属的成员，如鼠伤寒沙门氏菌、伤寒沙门氏菌、付伤寒沙门氏菌 (*S. Paratyphi*)、鸡沙门氏菌 (*S. gallinarum*)、肠炎沙门氏菌 (*S. enteritidis*)、霍乱沙门氏菌 (*S. Choleraesuis*)、亚利桑那沙门氏菌 (*S. arizona*) 或 *S. dublin*。

本发明的另一个具体方案是，用病原微生物的无毒衍生物 (本文还称为载体细菌) 将选定的抗原转移给GALT，例如转移给回肠的

淋巴集结。大家都知道某些属的细菌(如沙门氏菌)寄宿在淋巴集结 (Carter, P. B. 和 F. M. Collins, J. Exp. Med. 139: 1189, 1974)。鼠伤寒沙门氏菌—大肠杆菌杂种也表明聚集在小鼠中的淋巴集结 (Hohmann A.W. 等人, Infect. and Immun. 22: 763, 1978)。如果这些载体细菌含有并表达病原生物的重组基因, 将会诱发出针对由病原体产生的抗原基因产物的抗体。随着DNA重组技术的出现, 现在已有可能研制这样一种非常独特的疫苗, 它的特异抗原不是由病原因子而是由能表达那种抗原基因的另一宿主细菌菌株产生。当抗原与哺乳动物宿主的基因可能发生交叉反应, 并因此加强自身免疫的诱发时, 也有可能使用DNA重组技术改变基因, 使其不产生引起交叉反应的抗原决定簇。因此, DNA重组技术可用于研制这样的疫苗, 这种疫苗没有任何能与脊椎动物宿主抗原发生交叉反应的物质, 也不会诱发自身免疫状态。

很明显, 本发明对研制抗细菌、真菌、寄生虫或病毒致病因子 (在局部免疫是重要的并可能是第一道防线时) 的有效疫苗具有广泛的适用范围。这些疫苗的例子是, 控制由鼠疫耶尔森氏菌 (*Yersinia pestis*) 引起的肺病, 由淋病奈瑟氏菌引起的淋病, 由钯密螺旋体 (*Treponema pallidum*) 引起的梅毒, 以及由沙眼衣菌 (*Chlamydia trachomatis*) 引起的性病和眼的感染。A组与B组链球菌种, 如引起咽喉疼痛或心脏病的那些种, *Neisseria meningitidis*、肺炎分枝支原体 (*Mycoplasma pneumoniae*)、流感嗜血杆菌 (*Hemophilus influenzae*)、百日咳博德特氏菌 (*Bordetella Pertussis*)、结核分枝杆菌

(*Mycobacterium tuberculosis*)、麻疯分枝杆菌(*Mycobacterium leprae*)、禽类博德特氏菌(*Bordetella avium*)、大肠杆菌、等链球菌(*Streptococcus equi*)、肺炎链球菌(*S. Pneumoniae*)、流产布鲁氏菌(*Brucella abortus*)、溶血巴斯德氏菌(*Pasteurella hemolytica*)、霍乱弧菌(*Vibrio cholera*)、志贺氏杆菌以及嗜肺拉基欧氏菌(*Legionella pneumophila*)等都是本发明范围内附加的可由此获得基因的细菌实例。病毒疫苗,如抗流感病毒的疫苗,也可为本发明所包括。还可产生抗其他病毒的病毒疫苗,无论是DNA还是RNA病毒都行,例如来自Papovirus、腺病毒、疱疹病毒、痘病毒、细小病毒、呼吸道和肠道病毒、细小核糖核酸病毒、粘病毒、副粘病毒、或后病毒类的病毒。本发明还可考虑使用预防病原真菌、原生动物和寄生虫等感染的疫苗。

在进一步的具体方案中,当疫苗的免疫原性组分是一种宿主的变应原时,可在设计的接触摄取法中使用这种疫苗使敏感宿主特异性脱敏。

在一个具体方案中,本发明可描述为一种使脊椎动物或非脊椎动物免疫的疫苗,该疫苗含有病原微生物的活的无毒衍生物,所述衍生物不能产生功能性腺苷酸环化酶和cAMP受体蛋白质,但能表达由某种生物得到的重组基因,该生物是所说动物的一种病原体,或该生物产生所说动物的一种变应原。

在另一个具体方案中,可以使用本发明的无毒微生物作为合成各种宿主蛋白质的载体。由于本发明的无毒微生物在引入宿主后能穿越多种免疫活性结构,包括GALT、隔膜淋巴结和脾,所以可用这些

微生物瞄准多种免疫调节产物。因此，编码免疫调节蛋白质或肽的一种或多种基因可通过重组导入无毒微生物中，这样，当此微生物寄居在适当的免疫活性组织中时，能够表达在宿主中抑制、增强或修饰免疫应答的重组产物。免疫调节分子包括但不限于下述例子：集落刺激因子（巨噬细胞、粒细胞或混合细胞）、巨噬细胞化学毒素（Chemotoxin）、巨噬细胞抑制因子、白细胞抑制因子、淋巴细胞毒素、胚变因子、干扰素及白细胞间素。

本发明还有另一个具体方案，即利用此处所述的无毒微生物传递与产生药理活性产物，它们可能刺激或抑制各种生理功能（即增长率、血压等）。

对本发明的这些具体方案中的每个术语作如下的分析讨论。

疫苗是指用于刺激活体生物免疫系统（因此能对未来的伤害提供保护）的一种制剂。免疫作用是指连续高水平地诱导抗体和/或细胞免疫应答的过程，在该过程中，T—淋巴细胞可在生物内杀死病原体和/或活化其他细胞（例如吞噬细胞）以杀死病原体，该抗体针对于生物体以前已经接触过的病原体或抗原。尽管“免疫系统”这一短语可能包含单细胞生物对存在的外来物体的反应，例如干扰素的产生，但在本申请中，该短语限于与解剖学有关的特点和机制，即是指由多细胞生物产生针对侵入该生物的细胞或体液的抗原物质的抗体。如此产生的抗体可能属于免疫学分类中的任一类，如免疫球蛋白A、D、E、G或M。对于刺激产生免疫球蛋白A（IgA）的疫苗是特别感兴趣的，因为这是由恒温动物的分泌系统产生的主要免疫球蛋白，当然本发明的疫苗并不限于刺激产生IgA的那些疫苗。例如，具有本文描述的特性的疫苗，除了形成IgA外，很可能产生广泛的其他的

免疫应答，如细胞和体液的免疫。对抗原的免疫应答的研究深入而广泛。Barrett, James, T. (Textbook of Immunology: Fourth Edition, C.V. Mosby Co., St. Louis, MO, 1983) 对免疫学作了评述，此书全文被引作为本文的参考文献。

脊椎动物是指脊椎动物门的主要部——脊椎动物亚门的任何成员，包括鱼类、两栖类、爬行类、鸟类和哺乳动物，它们的特征是都具有分节骨骼或软骨脊柱。全部脊椎动物都具有功能性的免疫系统，通过产生抗体对抗原作出反应。因此，所有脊椎动物均能对疫苗发生反应。尽管疫苗一般主要用于哺乳动物，例如人或狗（狂犬病疫苗），但商业养殖的其他类脊椎动物的疫苗（如鱼类和鸟类），如具有这里所述的性质，也都在本发明的范围之内。

非脊椎动物是指动物界的任何成员，脊椎动物除外。这类动物构成非脊椎动物部，它们没有椎骨或脊柱。这一类包括除鱼类、两栖类、爬行类、鸟类和哺乳动物外的所有动物。很多非脊椎动物能对抗原刺激产生原始免疫应答，并对本发明公开的感染脊椎动物的相同的微生物敏感。这类非脊椎动物的例子有贝类、软体动物和其他有关动物。虽然至今还没有很好地记载疫苗在保护非脊椎动物方面的应用，但熟悉本领域的专业人员将知道，本发明通过使用非脊椎动物的原始免疫系统能够应用于它们。根据本发明举例来说，贝类受沙门氏菌感染的敏感性将允许导入沙门氏菌的无毒菌株，并因此提供原始免疫系统应答的可能性。因此，应用病原微生物的无毒衍生物（能使非脊椎动物感染的）刺激存在于所述非脊椎动物中的免疫系统对于病原体的应答也在本发明范围内。

本发明的一个具体方案是应用病原微生物的无毒衍生物作为基因

产物的载体寄宿于GALT或BALT, 所述基因产物用来刺激对病原体或变应原的抗体应答。无毒性并不意味着那一属或种的微生物在任何时候都不可能以病原体起作用, 而是指对于被治疗的特定动物来说, 所用的特定微生物是无毒的。这种微生物可能属于一个通常是病原体的属或甚至是种, 但它必须属于一种无毒菌株。病原体是指能引起疾病或破坏正常的生理功能。无毒菌株不能诱发通常与相应的毒性病原体相关的全部病症。这里使用的微生物包括细菌、原生动物和单细胞真菌。

将第一种生物的基因物质转移到一般不与第一种生物交换基因物质的第二种生物中的技术, 近来由于DNA重组技术的迅速发展而得到非常广泛的采用。在这类应用中, 以这样的方式将遗传物质由一种生物转移到第二种生物, 即使第二种生物繁殖后能产生含有被称为重组基因的相同的遗传物质的后代。这里使用的术语基因是利用它最广泛的含义, 即代表任一种生物学遗传单位。重组基因不必如同亲本生物中存在的那样是完整基因, 它能够产生或调节一种大分子的生成, 例如一种功能性多肽。基因只要能够作为模板指导抗原产物的生产就行。这种产物可能是没有以那种严格形式存在于亲本生物中的物质。例如, 编码包括100个氨基酸残基的多肽抗原的功能基因可部分转移到载体微生物中, 使得由宿主细胞的细胞机制产生的肽只由75个, 或甚至10个氨基酸残基组成。然而, 如果这种基因产物是这样一种抗原, 它能够针对亲本生物中存在的类似抗原导致抗体形成, 则这种基因被认为是在本发明定义的基因范畴之内。另外, 如果已知一种特定抗原或其片段的氨基酸顺序, 则有可能用自动基因合成仪或类似装置化学合成DNA片段或其类似物, 并将所述DNA顺序导入合适的

表达载体中。在此谱系的另一端是编码几种基因产物的一长段 DNA，其中一个或全部都能是抗原。因此，本发明定义与要求保护的基因是能产生抗原的任何遗传单位。基因可以是染色体、质粒或病毒来源的。

为了使基因能有效地诱导免疫应答，该基因必须被表达。基因的表达意味着基因结构中的固有信息（DNA 碱基的顺序）通过基因源于其中的细胞的生化机制，以 RNA 分子、多肽或其他生物分子的形式转换成一种有形产物。这样产生的生物分子称为基因产物。这里使用的术语基因产物是指在基因控制下由生化反应产生的任一种或多种生物产品。基因产物可以是例如 RNA 分子、肽、或在酶或最初是基因产物的其他分子控制下产生的产物，即代谢产物。例如，基因可以首先控制 RNA 分子的合成，RNA 分子通过核糖体的作用翻译成酶，而酶又在与基因来源的原始细胞不同的环境条件下控制葡聚糖的生成。RNA 分子、酶、葡聚糖等按本发明使用的术语都是基因产物。这些基因产物中的任何一种，以及其他许多类型的基因产物，如糖蛋白和多糖，如果将它们引入动物的免疫系统都将起抗原作用。蛋白基因产物，其中包括糖蛋白和脂蛋白，是作为抗原用于疫苗中的优选的基因产物。

为了使疫苗能有效地产生抗体，应该以这样的方式释放抗原物质，即使接种动物的产生抗体的机制运转起来。因此，应该把基因产物的微生物载体引入动物中。如同前面所讨论，为了刺激 GALT 或 BALT 细胞更好地反应，最好以口服、胃插管或以气溶胶的形式将微生物或基因产品直接引入肠道或支气管中，当然其他施用疫苗的方法也是可能的，这些方法有例如静脉、肌肉、皮下注射或乳腺、阴茎、阴道用药。

当无毒微生物以载体微生物使用以及载体微生物存在于动物中后,抗原需要变成动物免疫系统能够接触的。这一点在载体微生物死后可以达到,因为此时抗原分子被释放。当然,使用不需溶解便释放周质内含物的“渗漏”无毒突变体也是可能的。另外,可以选择一种基因以控制抗原的产生,使得载体细胞在其死亡之前就使其外部环境能够接触抗原。用这种办法能使用一种活的微生物,它将滞留在接种动物中(如在淋巴集结处)继续产生抗原,因而连续地诱发抗体的生成。在这些情况下,一种较好的基因产物是通过细胞膜转移到外部环境中的产物,或者附着或嵌入外膜中的产物,使得该基因产物的全部或部分都暴露在环境里。典型的后一类基因产物是通常在生物体表面发现的抗原,而针对它们的预防正是所期望的。如果这些抗原以正常方式转移到细胞表面,则针对此抗原的抗体生成将会增加。

使用病原体向GALT或BAIT传递来自其他病原体的抗原是不合适的,除非这种病原体能被赋予无毒性,并同时保持侵染淋巴集结或BAIT的能力。

产生重组基因的生物可以是接种动物的任何病原体,或者可以是产生动物变应原或其他抗原的生物。变应原是引起动物变态反应的物质,该动物将进行抗变应原的接种。很多不同的物质都可以是变应原,如动物的毛发皮屑和花粉,而动物个体的变态反应将因任一种特定的变应原而不同。有可能在通常表现出变态反应的动物中诱导对变应原的耐性。诱导耐性的方法是公知的,通常包括给动物施用剂量不断提高的变应原。在前面引用的Barrett教科书中对诱导耐性作了进一步的讨论。最后,如果免疫调节基因或其他药理活性物质的基因是通过载体表达的,则宿主生物本身也可作为遗传物质来源。

给动物服用上面公开的这类活疫苗可用任何已知的或标准的技术。这些技术包括口服、胃插管或支气管—鼻喷雾。所有这些方法都能使活疫苗很容易到达GALT或BALT细胞诱发抗体生成，它们是优选的施用方法。可以使用其他的施用方法，如静脉注射使载体微生物达到动物血流中。

正如后面叙述的，静脉、肌肉或乳腺注射在本发明的其他具体方案中也都是可接受的。

由于施用的较好方法是口服、气溶胶喷雾和胃插管，因此较好的载体微生物是属于这些种，即它优先寄宿在接种动物的肠或支气管的淋巴上皮结构中。这些菌株最好是通过遗传操作肠病菌株所产生的肠病菌株的无毒衍生物。寄宿在淋巴集结并因此直接刺激IgA生成的菌株是最好的。在动物中，这些菌株包括寄宿在淋巴集结的沙门氏菌和沙门氏菌—大肠杆菌杂种的特殊菌株。

DNA重组技术目前已经是众所周知和广为传布了，以至于可看作是一种常规技术。根据普遍使用的广泛定义，此方法包括将一种生物的遗传物质，或更通常是遗传物质的一部分转移到第二种生物中，使得这种被转移的遗传物质成为该生物遗传物质的永久部分（与之重组）。这通常包括由亲本生物首先得到小片段DNA，该DNA来自质粒或亲本染色体。质粒（也称为染色体外元件）是一种与细胞染色体空间上分离的遗传单位。DNA可能具有任何大小，常常由限制性核酸内切酶的作用得到，该酶将DNA分子在特定的碱基对位置切开。与质粒、噬菌体或柯斯载体连接以形成重组分子后，该重组分子可通过各种方法转移到宿主细胞中，例如转化（从外部环境中吸收裸露的DNA，这可以通过各种化学试剂如钙离子人工诱发）。其他方法如

转导也是适用的，这里**重组DNA**包装在诸如转导噬菌体或柯斯载体之类的噬菌体内。重组DNA处于载体细胞内后，它可能继续以分离片段存在（一般来说完全转移的质粒是这样）或者可能插入宿主细胞染色体中，并在细胞分裂时与染色体一起复制。

尽管遗传物质的转移是相当简单的，但目前仍无法预测哪一个转移体将导致基因的表达。然而，这种选择过程对本发明来说不存在任何困难。由于宿主微生物必须表达被转移的基因并因此产生一种抗原，因此“鸟枪法”能很好地发挥作用。首先，用标准技术生产抗所希望抗原的抗体，例如抗病原微生物的细胞膜片段，来自抗原来源的生物的DNA用核酸内切酶切成多个片段，将这些片段随机插入载体微生物中，比较好的是通过克隆载体。表达病原体抗原的微生物可以很容易地由它们与针对病原体抗原的抗体的反应进行鉴定。可以选择并克隆表达抗原的微生物以得到所希望的重组生物。“鸟枪法”克隆是公知的，并在Maniatis, T.等人, *Molecular Cloning*, Cold Spring Harbor Laboratories (1982)中作了详细描述，该书列为本文参考文献。基因转移技术不被认为是本发明的一部分，能够产生包括来自某种生物基因（它在无毒微生物中被表达）的重组生物的任何方法将足以满足本发明的要求。

在生物种正常地交换遗传信息的情况下，可以采用更为经典的基因转移方法如结合、转化或转导等。

无毒微生物衍生物也被认为在本发明范围内。衍生物意指无毒菌株的有性或无性繁衍的后代和突变体，其中包括单碱基或多碱基置换、缺失、插入、倒位，它们保留了不能产生功能性腺苷酸环化酶和cAMP受体蛋白质的性质，不论它们是否有天然存在的有毒质粒。例如，带

有 *gyr A* 突变的 $\lambda 4062$ 和 $\lambda 4064$ 菌株具有萘啶酸抗性，这里方便地用它作为口服接种后跟踪菌株的标记。然而，对于用作疫苗的菌株来说，最好不具有抗药性。因此，通过对紧密连接的 *Tn10* 进行遗传选择，然后通过选择氨基糖苷抗性以去除 *Tn10*，从而将 *gyr A*⁺（赋予萘啶酸敏感性）基因转导入菌株，这样便很容易除去 *gyr A*⁺ 突变。

所需要的剂量将随基因产物的抗原性变化，需要量以诱发典型的现有疫苗的免疫应答就足够了。常规试验很容易确定所需要的量。典型的起始疫苗剂量可以是 $0.001-1\text{ mg 抗原/Kg 体重}$ ，按需要增加剂量或剂量次数可提供所希望的保护水平。

疫苗是悬浮或溶解在药物载体中，这种载体可以是任何溶剂、固体或用一种材料做成胶囊，这种材料对接种动物无毒性，并与载体生物或抗原基因产物是相容的。适当的药物载体包括液体载体，如一般的生理盐水和其他无毒盐溶液，其浓度是或接近生理浓度，还有固体载体如滑石或蔗糖，对于农场动物还可加在饲料里。如希望的话，可以加入佐剂以提高抗原性。当通过支气管施用时，疫苗以气溶胶形式是比较好的。

用产生基因产物的病原体进行免疫，还可与病原微生物的无毒衍生物的在先免疫结合使用，该病原微生物作为载体表达由来自病原体的重组基因编码的基因产物。在用表达病原体的基因产物（它刺激 *GALT* 或 *BALT* 的淋巴细胞）的载体微生物进行免疫，从而诱发了分泌免疫系统对于该基因产物的应答后，可用这种肠胃外免疫作为提高分泌性免疫应答表达的加强剂。提高的应答被称为二次的、增强的或记忆应答，并且能延长宿主的免疫保护。增强免疫可以重复很多

次而获得有益结果。

上述公开一般地说明了本发明。更为完全的理解可参看下面的特殊实例，这些实例只是作为说明，除非特别指出，它们不作为限制实例1

本实例说明通过导入影响cAMP合成和利用的缺失突变来构建一种无毒衍生物。

细菌菌株 所用鼠伤寒沙门氏菌菌株列于表1。它们保存在冰冻培养液里，其培养物悬浮在含5%甘油的1%细菌胨(Bacto-Peptide)中，并在干冰-乙醇中快速冷冻，双份贮存于-70℃，对于常规使用，也可在含50%甘油的1%细菌胨中于-20℃悬浮贮存。

培养基 对于常规培养，复合培养基是L-肉汤培养基(Lennox; Virology 1: 190-206, 1965)和Luria肉汤培养基(Luria和Burrous, J. Bacteriol. 74: 461-476, 1957)。对碱性琼脂来说，将1.2% Difco琼脂加入Luria肉汤中，对软琼脂来说，则加入0.65% Difco琼脂。常规的细菌计数使用Penassay琼脂。以最终浓度为1%的合适碳水化合物补充MacConkey碱性琼脂或Eosin亚甲基蓝琼脂(Curtiss, Genetics 58: 9-54, 1968)来评价发酵作用。

合成培养基是按前述(Curtiss, J. Bact. 89: 28-40, 1965)补充有最佳水平养分的最低液体(ML)和最低琼脂。按照常规使用带明胶的缓冲生理盐水作稀释剂。

转导 按照常规，使用噬菌体P22 HT int按标准方法进行

转导 (Davis 等人, "A man for Genet. Eng.—Adv. Bact. Genetics", Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, 1979)。供体菌株的过夜培养物于预热的 Luria-肉汤中按 1:20 稀释, 于 37℃ 振荡生长 60 分钟, 然后用 0.01 倍的 P22 H Tint 侵染。侵染混合物振荡过夜大约 15 小时。加氯仿后再于 37℃ 振荡 10 分钟, 悬浮液离心 (Sorvall RC50, SS-34 rotor, 7000 转/分, 10 分钟) 去除细菌碎片。含噬菌体 (约 10^{10} /ml) 的上清液在氯仿中于 4℃ 贮存。用浓度为 12.5 μ g/ml 四环素选择 Tn 10 诱发突变的转导。

缺失突变的蒽萘酸选择 使用由 Maloy 和 Nunn 所述的培养基和方法 (J. Bact. 145: 1110—1112, 1981)。带有 Tn 10 诱发突变的菌株, 在含 12.5 μ g 四环素/ml 的 L-肉汤中于 37℃ 生长过夜, 达到约 5×10^8 CFU/ml。培养液以 1:40 稀释于无四环素的预热 L-肉汤中, 并于 37℃ 通气至滴度约为 2×10^9 CFU/ml。合适数目 (10^7 — 10^8) 的细胞稀释在 BSG 中, 再涂布在含蒽萘酸的培养基上于 37℃ 培养 48 小时。用相同的选择培养基纯化抗蒽萘酸的分离物。挑出单一的提取物, 培养后用或者不用 12.5 μ g 四环素/ml 测定在 Penassay 琼脂上的四环素敏感性。

小鼠 全部的感染和免疫试验都使用雌性 BALB/c 小鼠 (Sasco, St. Louis, MO)。购买 3 或 7 周龄的小鼠, 在用于试验之前, 关在检疫室一个星期。实验小鼠放在具金属丝底板并有 Nalgene 滤器盖住的笼子¹。随意地喂饲料和水。动物房的温度保

持在22—23℃，照明期为12小时。

动物感染 在口服或腹腔接种后，测定鼠伤寒沙门氏菌菌株的毒性。为小鼠接种的细菌于L—肉汤中在37℃静置培养过夜。这种培养液以1:50稀释于预热的L—肉汤中，并于37℃通气约4小时，达到OD₆₀₀为大约0.8—1.0。在Sorvall RC5C离心机中离心使细胞浓缩50倍，使用GSA转子，转速为7000rpm，在4℃离心10分钟，接着将浓缩细胞悬浮在BSG中。将适当稀释的浓缩细胞涂布在Penassay琼脂上以测定滴度，以及涂布在含有1%麦芽糖的MacConkey琼脂上以检验Cya/Crp表型。

对于所有口服接种的小鼠。在侵染前4小时停止进食和进水。在用Pipetman P20口服20μl鼠伤寒沙门氏菌BSG悬浮液前五分钟，用Pipetman P200给小鼠喂30μl 10%（重量/体积）碳酸氢钠。口服接种以后30分钟恢复喂食与水。观察小鼠的病态和死亡率达30天以上。

放松的小鼠用26号针头腹腔接种300μl用BSG稀释的细菌悬浮液。此后观察小鼠的病态和死亡率达30天以上。

保护性免疫的评价 在初始试验中，对于用任一种鼠伤寒沙门氏菌突变株侵染30天后存活下来的任何小鼠，在第51天通过口服施用具小鼠毒性的野生型鼠伤寒沙门氏菌SR11Δ3306菌株，所用剂量为LD₅₀的10³—10⁴倍。接着，对多组小鼠通过口服用不同剂量的无毒突变体进行免疫，然后在初次免疫后的不同时间施用不同剂量的毒性Δ3306细胞。整个实验过程中要观察病态和死亡率，在施用Δ3306细胞后还要观察至少30天。

活体存活的鼠伤寒沙门氏菌细胞的计数 通过上述方法用大约

1×10^9 细胞对小鼠进行口服接种后, 测定野生型和突变型鼠伤寒沙门氏菌 SR 11 菌株的集群化和持续时间。在口服感染后 4、24、48、72、96 小时和 7 天时, 测定小肠和结肠内含物中和淋巴集结、位于已除去淋巴集结的回肠远端部分的一段 10 厘米的小肠壁以及结肠壁的匀浆 (8—10) 中的鼠伤寒沙门氏菌细胞的滴度。还测定了隔膜淋巴结和脾的匀浆中的细胞的滴度。通过 CO_2 窒息致死小鼠, 并立刻将隔膜淋巴结、脾、小肠和结肠置于在冰上冷冻的 $\text{ML} + 15\%$ 蔗糖最低盐 (MLS) 中。小肠置于装有 4.0 ml 冷冻 MLS 的培养皿中, 并用外科手术剪刀除去淋巴集结。淋巴集结用冷冻 BSG 冲洗两次, 每次 1 ml, 冲洗后放进一个带玻璃螺旋帽的管 ($15 \times 100 \text{ mm}$) 中, 其中装有 1 ml 冷冻的 MLS 和玻璃珠。然后将小肠纵向切割, 并将内容物和壁放进 50 ml 易处理的锥形管中, 把冷冻的 MLS 加至 5.0 ml 体积, 再摇动 1 分钟。取出 10 厘米长的小肠, 用 5 ml BSG 冲洗两次, 再放进带玻璃螺旋帽的管中 ($15 \times 100 \text{ mm}$), 其中装有 2.5 ml 冷冻 MLS 和玻璃珠。从纵向切割和洗涤小肠时使用过的冷冻 MLS 中回收小肠内容物, 并将其加进 50 ml 易处理的装有小肠内容物的锥形管中。用装有 4.0 ml 冷冻 MLS 的培养皿装结肠, 纵向切割盲肠。结肠内容物与结肠壁置于 50 ml 的最终体积后, 摇动 1 分钟。然后取出结肠壁, 用 5 ml BSG 冲洗 2 次, 其后放进带玻璃螺旋帽的管中 ($15 \times 100 \text{ mm}$), 其中装有 2.5 ml 冷冻 MLS 和玻璃珠。从纵向切割和洗涤结肠时使用的冷冻 MLS 中收集结肠内容物, 并加其加到 50 ml 易处理的装有关肠内容物的锥形管中。将隔膜淋巴结与其相连的脂肪组织放进一个带玻璃螺旋帽的管中 ($15 \times 100 \text{ mm}$) 摇动, 其中装有 1.0

ml 冷冻 M L S 和玻璃珠。把 96 小时和 7 天时收集的脾直接放进一个 Dounce 研棒型组织匀浆器中，与 2.5 ml 冷冻 M L S 一起研磨。每支带玻璃珠的管和组织用 Super-混合器高速摇动 4—5 分钟。悬浮液用 B S G 稀释，并涂布在 MacConkey 琼脂上，该琼脂含 1% 乳糖和 40 μ g 萘啶酸/ml。通过悬浮液、稀释液体积和平板计数确定总的存活滴度。使用含 1% 各种碳水化合物的 MacConkey 琼脂以鉴定所回收的生物具有期待的表型。

用 C y a 和 c r p 突变构建鼠伤寒沙门氏菌 S R 11 菌株 对于 B A L B/c 小鼠的口服感染使用鼠伤寒沙门氏菌 S R 11 菌株 χ 3 041。五天后严重生病的动物死亡，然后由淋巴集结回收到确定为具有完全小鼠毒性的分离物 χ 3 181。用 P 22 转导把赋予萘啶酸抗性的 g y r A 突变导入 χ 3 181 中而得到 χ 3 306，它即是本文所述所有菌株的亲本（表 1）。

由于已表明去除 100 kb 毒性质粒的鼠伤寒沙门氏菌分离物完全能附着、侵入和存在于淋巴集结中，但不能穿越隔膜淋巴结和脾，因此，将 C y a 和 C r p 突变引入去除质粒的鼠伤寒沙门氏菌 S R 11 菌株 χ 3 337 中，以及引入含质粒的 S R 11 衍生物 χ 3 306 中。应该强调的是，把 p S t S R 100 质粒再引入 χ 3 337 能完全恢复该质粒的毒性（见实例 3），因此保证了在去除毒性质粒时不会在 χ 3 337 中出现第二次突变。

表 2 列出所有突变菌株及其亲本关于糖的发酵和在各种碳源上生长的表型性质。以关于分解代谢活性对环化 A M P 和环化 A M P 受体蛋白的需要而发表的报告为基础，表型与所期望的一致（ χ 4 060 是一个例外，它的行为类似于 C y a C r p 双突变体，而与 c y a

单突变体不相似)。所有的 cya/crp 突变体菌株缺乏伞毛和鞭毛, 基于从前的结果, 这些都与所期望的一致 (Saier 等人, J. Bact. 134 (1): 356—358, 1978; Yokota 和 Gots, J. Bact. 103: 513—516, 1970; Kameda 等人, Mol. Gen. l Genet. 142: 289—298, 1975.)。另外很明显的是, $pStSR 100$ 质粒的存在对这些表型无什么影响。

在选择萘萘酸抗性四环素敏感性的衍生物以后的每一步构建中, 都要确定一下是否能以比 $\chi 3306$ 亲本菌株更高的频率观察到四环素抗性的回复突变体/突变体。在所有的情况下, 未观察到这种四环素抗性的回复突变体/突变体。

表3列出了好几种突变菌株及其亲本在含有0.5%葡萄糖的MA上的菌落直径(以不同的时间保温时), 以及在含有0.5%葡萄糖的ML中的代时。明显可见, 有或无 Δcrp 突变并与 $pStSR 100$ 质粒存在与否无关的 Δcya 菌株, 其生长要比其亲本 $\chi 3306$ 培养物慢得多。

表1 细菌菌株

菌株号	母体菌株/质粒	相关基因型	来源
χ3000	LT2-Z/pStLT100	原养型微生物	Charles Turnbough
χ3041	SR-11/pStSR100	有毒的原养型微生物 P22 ¹	William Benjamin
χ3147	LT2-Z/pStLT100	GYRA1816	χ3000 的自发性蒽吡啉抗体突变体
χ3181	SR-11/pStSR100	原养型微生物	小鼠排出的 χ3041
χ3306	SR-11/pStSR100	GYRA1816 P22 ¹	P22 HT int(χ3147)→χ3181
χ3337	SR-11	GYRA1816 P22 ¹	去掉 100kb 毒性质粒的 χ3306
χ3456	SR-11/pStSR101	pStSR100::Tnmini-tet43	P22 HT int(pStSR100::Tnmini-tet43 →χ3181
PP1002	LT2/pStLT100	cya::Tn10 trpB223	P.W.Postma; P22(PF991)→SB3507 (Postma et al., J. Bact 168:1107-1111
PP1037	LT2/pStLT100	crp773::Tn10 crpB223	P.W.Postma; P22(PF1011)→SB3507 (Postma et al.,
χ3395	SR-11/pStSR100	GYRA1816 cya::Tn10	P22 HT int(PF1002)→χ3306
χ3396	SR-11/pStSR100	GYRA1816 crp773::Tn10	P22 HT int(PF1037)→χ3306
χ4032	SR-11/pStSR100	GYRA1816 Δcya-1	χ3395 的 FAF ⁺ Tc ^s 衍生物
χ4055	SR-11/pStSR100	GYRA1816 Δcya-1 crp773::Tn10	P22 HT int(PF1037)→χ4032
χ4058	SR-11	GYRA1816 cya::Tn10	P22 HT int(PF1002)→χ3337
χ4060	SR-11	GYRA1816 Δcya-3	χ4058 的 FAF ⁺ Tc ^s 衍生物
χ4061	SR-11	GYRA1816 Δcya-3 crp773::Tn10	P22 HT int(PF1037)→χ4060
χ4062	SR-11	GYRA1816 Δcya-3 Acrp-2	χ4061 的 FAF ⁺ Tc ^s 衍生物
χ4064	SR-11/pStSR100	GYRA1816 Δcya-1 Acrp-1	χ4055 的 FAF ⁺ Tc ^s 衍生物

表2 细菌菌株的发酵和生长性质

菌株号	Cya Crp	在含下列物质的macConkey琼脂上发酵表现 ^a										在含下列物质的最低琼脂上生长							
		表型	Pro	Gal	Glu	Glyc	Mcl	Mtl	Nel	Srl	Cit	Gal	Glu	Glyc	Mal	Mtl	Mel	Srl	Suc
23306	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
23395	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	
23396	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	
24032	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	-	
24060	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	
24062	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	
24064	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	

^a + = 发酵或生长阳性; + / - = 中度粉红或雾型生长

- = 发酵或生长阴性

表3 细菌菌株的生长性质

菌株号	相关基因型	菌落直径(毫米) ^a			代时 ^b (分)
		40小时	65小时	87小时	
χ3306	野生型	2.0	2.1	2.1	78
χ3337	野生型	2.0	2.1	2.1	82
χ3395	<u>cya: Tn10</u>	1.5	2.1	2.3	120
χ3396	<u>crp773:: Tn10</u>	1.0	1.3	1.4	113
χ4032	<u>Δ cya-1</u>	1.0	1.1	1.4	150
χ4060	<u>Δ cya-3</u>	0.9	1.1	1.6	128
χ4062	<u>Δ cya-3 Δcrp-2</u>	0.8	1.5	1.8	180
χ4064	<u>Δ cya-1 Δcrp-1</u>	1.0	1.7	2.0	150

a. 菌落分布 在M A + 0.5%葡萄糖上每个平板为100

b. 在M L + 0.5%葡萄糖里生长

突变菌株对小鼠的毒性 用 10^6 突变体细胞腹腔感染单个小鼠, 或者用 10^8 突变体细胞口服感染单个小鼠, 记录其病症和死亡率, 这样得到突变体菌株毒性的初步信息。由于 $cya: Tn 10$ 突变的 $\chi 3395$ 和 $crp: Tn 10$ 突变的 $\chi 3396$ 显然是无毒的, 还由于用这两者感染后存活的小鼠对野生型 $\chi 3306$ 细胞的攻击有免疫能力, 所以对 $\chi 3395$ 和 $\chi 3396$ 的毒性进行进一步研究。表4的数据表明, 用 $cya: Tn 10$ 突变体或 $crp: Tn 10$ 突变体 LD_{50} 剂量的大约 10^3 倍感染, 小鼠还能继续存活。然后对缺失 $Tn 10$ 和相邻 DHA 顺序的菌株开始进行研究。表5列出通过口服鼠伤寒沙门氏菌野生型、 Δcya 和 Δcrp 菌株感染小鼠所出现的症状和死亡率。很明显, 不考虑感染时小鼠的年龄, 所有小鼠受到任一种突变菌株 $1000-4000$ 倍野生型 LD_{50} 剂量的感染后而存活。表5中关于 $pStSR 100$ 去除的衍生物 $\chi 3337$ 的无毒性的数据与实例3中详尽的研究结果是一致的。

表6还列出另外一些数据, 即关于用 Δcya 和 $\Delta cya \Delta crp$ 菌株 $\chi 4060$ 和 $\chi 4062$ (去除质粒的) 和 $\chi 4032$ 和 $\chi 4064$ (含有质粒的) 感染的数, 用 1×10^9 细菌口服感染小鼠, 与未受感染的小鼠实际上一样生长。

表7列出了有关鼠伤寒沙门氏菌突变体的腹腔施用的数据。小鼠对各种突变菌株以 10^2-10^3 倍野生型 LD_{50} 剂量感染仍然存活。在较高剂量下观察到疾病, 这可能部分是由于内毒素的影响。

表4 在口服接种后30天, 在BALB/c雌鼠中鼠伤寒沙门氏菌
SR-11 cya: Tn 10 和 crp 773: Tn 10 的毒性

菌株号	相关基因型	接种剂量 (CFU)	鼠数 ^a	存活 活的/总数	死亡平均日 ^b	健康状况 ^c
χ3306	野生型	2.5×10^5	8周	2/5	7	差
χ3395	cya: Tn 10	1.3×10^9	8周	2/5	17	差
χ3396	crp 773: Tn 10	2.4×10^8	8周	5/5	—	健康

a. 在免疫时

b. 已死动物的

c. 健康——无明显症状, 差——严重生病

表5 BALB/c小鼠口服鼠伤寒沙门杆菌SR-11 Δcya 和/或
 Δcrp 菌株30天后的病症和死亡率

菌株号	相关基因型	pStSR100	接种剂量 (cfu)	小鼠年龄 ^a	存活的/总	健康状况 ^b
$\chi 3306$	野生型	+	2.5×10^5	8 星期	3/6 ^c	差
$\chi 3337$	野生型	-	5.0×10^5	8 星期	6/6	差
$\chi 4032 \Delta cya-1$		+	1.3×10^9	4 星期	6/6	健康
$\chi 4032 \Delta cya-1$		+	1.3×10^9	8 星期	6/6	健康
$\chi 4060 \Delta cya-3$		-	7.8×10^8	4 星期	6/6	健康
$\chi 4060 \Delta cya-3$		-	7.8×10^8	8 星期	6/6	健康
$\chi 4062 \Delta cya-3 \Delta crp-2$		-	1.2×10^9	4 星期	6/6	健康
$\chi 4062 \Delta cya-3 \Delta crp-2$		-	1.2×10^9	8 星期	6/6	健康
$\chi 4064 \Delta cya-1 \Delta crp-1$		+	1.2×10^9	4 星期	6/6	健康
$\chi 4064 \Delta cya-1 \Delta crp-1$		+	1.2×10^9	8 星期	6/6	健康

a. 服用时间 b. 健康——无严重病状, 差——严重生病 c. 平均死亡日=7

表6 施用 Acya Acrp 鼠伤寒沙门杆菌 SR-11, 30 天后,
8 周龄 BALB/c 雌鼠的生长评价

菌株号	相关基因型	pS ⁺ SR100	接种剂量 (cfu)	重量(克)	
				侵染时间	侵染30天后
对 照			未侵染的	19.2±0.3	21.8±0.3
χ3395	<u>cya::Tn10</u>	+	1.3×10 ⁹	17.8±0.5	18.9±3.0
χ3396	<u>crp773::Tn10</u>	+	2.4×10 ⁸	18.9±1.1	20.5±1.3
χ4032	<u>Acya-1</u>	+	3.6×10 ⁸	19.8±0.5	21.4±0.5
χ4060	<u>Acya-3</u>	-	3.8×10 ⁸	19.4±0.6	21.4±1.4
χ4062	<u>Acya-3 Acrp-2</u>	-	6.8×10 ⁸	20.1±0.2	21.7±0.4
χ4064	<u>Acya-1 Acrp-1</u>	+	1.0×10 ⁹	19.9±0.4	21.9±0.8

表7 8周龄BALB/c雌鼠腹腔施用鼠伤寒沙门氏菌SR-11Δcya和/或

Δcrp菌株30天后出现的症状和死亡率

菌株号	相关基因型	pSR100	施用剂量 (CFU)	存活 活的/总数	平均死亡日 ^a	健康状况 ^b
3306	野生型	+	<50	3/6	7	差
3395	<u>cya::Tn10</u>	+	1.0×10 ⁴	0/5	12	无
			1.0×10 ⁵	1/5	7	差
			1.0×10 ⁶	0/5	3	无
3396	<u>crp773::Tn10</u>	+	1.0×10 ⁴	5/5	—	健康
			1.9×10 ⁵	4/5	10	中等
			1.9×10 ⁶	1/5	12	差
4062	<u>Δcya-3Δcrp-2</u>	—	1.0×10 ⁴	5/5	—	健康
			1.0×10 ⁵	5/5	—	健康
			1.0×10 ⁶	0/5	10	无
4064	<u>Δcya-1Δcrp-1</u>	+	1.6×10 ⁴	5/5	—	健康
			1.6×10 ⁵	2/5	14	差
			1.6×10 ⁶	0/5	16	无

a、死亡动物的

b、健康——无严重病状；中等——中等程度疾病；差——严重生病

无毒突变体免疫作用的效果 表8列出有关下述方面的数据: 鼠伤寒沙门氏菌 Δcya 和 $\Delta cya \Delta crp$ 不同突变体诱导对于口服 10^4 倍于 LD_{50} 剂量的完全毒性的鼠伤寒沙门氏菌SR11 $\chi 3306$ 细胞的免疫能力。在这种强烈侵染的情况下,许多小鼠出现中度疾病而且食量降低,但用 $\chi 4064$ 进行免疫的小鼠仍然健康,进食和生长正常。在服用30天后死亡的所有动物(甚至用 $\chi 4064$ 免疫的那些动物)显示脾肿大(Splenomeglia),以及能够回收 $\chi 3306$ 野生型服用菌株,但不能回收无毒的 Δcya 或 $\Delta cya \Delta crp$ 疫苗菌株。相反地,用完全毒性的 $\chi 3306$ 亲本菌株的仅仅100—1000倍于 LD_{50} 剂量施用于用大约 $1 \times 10^9 \chi 4064$ 免疫的小鼠时,未观察到脾肿大和服用菌株的回收。

无毒突变体在体内的组织营养作用和稳定性 图1和图2列出如下数据:在口服后的不同时间, $\Delta cya \Delta crp$ 菌株 $\chi 4064$ 的回收与萘啶酸敏感的野生型菌株 $\chi 3456$ (Tnminitet标记;见表1)的回收的比较。很明显, Δcya 和 Δcrp 突变没有严重损害鼠伤寒沙门氏菌在淋巴集结上附着、侵入和持续存在的能力,至少在足以诱发保护性免疫的时间内如此(图1),但确实损害达到脾脏或在其中存活的能力(图2)。

无毒突变体的遗传稳定性 以活疫苗口服的菌株必须在无毒性和致免疫能力两方面具有完全的稳定性。因此,在通气下用L—肉汤培养几种优选的疫苗菌株至晚对数期,浓缩50倍后以不同稀释度涂布在一系列含有碳源的最低琼脂培养基上,这些培养基不支持亲本突变体的生长(表2)。将一组复制平板在紫外光下照射,其光强可造成70%细胞死亡。在 Δcya 菌株 $\chi 4032$ 中以低而可测的频率

(表9)观察到自发回复突变体/突变体,在 Δcya 菌株 $\chi 4060$ 中以较高频率观察到自发的回复突变体/突变体。许多这种回复突变体能在大多数碳源上生长,因此很可能是 crp^* (Schalte和Postma, J. Bact. 141: 751—757, 1980; Gargos和Adhya, Cell 41: 745—751, 1985)或 csm (Melton等人, Mol. Gen. l Genet. 182: 480—89, 1981)突变,这些突变在无环化AMP时能使CRP活化转录。 $\Delta cya \Delta crp$ 菌株的回复突变体/突变体如 $\chi 4064$ 是极少的(表9),它们尽管能在选择它们的碳源(即甘露醇)上生长,但不能在其他任何原始菌株不能利用的碳源上生长(表2)。这些回复突变体/突变体无疑具有启动子突变,从而使特定基因/操纵子的转录与CRP无关。紫外光照射不能提高突变/回复的频率。

对六种回复突变体/突变体的毒性作了评价。用四只小鼠试验了每种回复突变体。一只口服剂量为 10^6 细胞,一只口服剂量为约 10^8 细胞,一只腹腔剂量为 10^2 细胞,一只腹腔剂量为 10^5 细胞。在所有情况下, Δcya 突变体的四种回复突变体和 $\Delta cya \Delta crp$ 菌株的二种回复突变体保留它们亲本的无毒性,因为所有32只小鼠仍然健康而无明显的疾病。因此,看来 Δcya 菌株的无毒性不可能只是由于碳水化合物分解代谢的缺陷所致。

上述结果证明了鼠毒鼠伤寒沙门氏菌SR11菌株 $\chi 3306$ 若干衍生物的构建,这些衍生物不能合成腺苷酸环化酶和环化AMP受体蛋白质,而且它们具有或不具有 $pStSR100$ 毒性质粒。尽管所有菌株经口服接种时均无毒性并且都能对毒性鼠伤寒沙门氏菌野生型细胞的攻击诱发较高的保护免疫力,但含有 Δcya 和 Δcrp 突变的

表8 无毒鼠伤寒沙门氏菌SR-11 Δ cya Δ crp突变体免疫在保护 2×10^9 CFU野生型毒性鼠伤寒沙门氏菌SR-11进攻时的效果^a

菌株号	相关基因型	pStSR100	免疫菌株剂量 (CFU)	鼠龄 ^b	存活 活的/总数	平均 死亡日 ^c	健康状况 ^d
$\chi 4032$	<u>Δcya-1</u>	+	1.3×10^9	4周	6/6	—	中等
$\chi 4032$	<u>Δcya-1</u>	+	1.3×10^9	8周	5/6	46	中等
$\chi 4060$	<u>Δcya-3</u>	—	7.8×10^8	4周	6/6	—	中等
$\chi 4060$	<u>Δcya-3</u>	—	7.8×10^8	8周	6/6	—	中等
$\chi 4062$	<u>Δcya-3Δcrp-2</u>	—	1.2×10^9	4周	5/6	46	中等
$\chi 4062$	<u>Δcya-3Δcrp-2</u>	—	1.2×10^9	8周	5/6	48	中等
$\chi 4064$	<u>Δcya-1Δcrp-1</u>	+	1.2×10^9	4周	6/6	—	健康
$\chi 4064$	<u>Δcya-1Δcrp-1</u>	+	1.2×10^9	8周	6/6	—	健康

a. 用指定菌株对4或8周龄小鼠在免疫后30天,小鼠口服施用 2.0×10^9 CFU

$\chi 3306$ 野生型有毒的鼠伤寒沙门氏菌SR-11

b. 在免疫时

c. 免疫后死亡动物的

d. 健康——无严重疾病或无病; 中等——中等疾病

表9 通过在含有最终浓度0.5%各种碳水化合物最低琼脂上涂布浓缩50倍的培养物所指示的ΔcyaΔcrp菌株自发的回复/突变

菌株号	pStSR100	相关基因型	回 复 频 率				
			Mtl	Srl	Mal	Cit	Suc Mel
24032	+	<u>Δcya-1</u>	3.0×10^{-5}	3.0×10^{-5}	0	0	0 0
24060	-	<u>Δcya-3</u>	THTC ^a	THTC	2.0×10^{-7}	2.0×10^{-7}	2.0×10^{-7} THTC
24062	-	<u>Δcya-3Δcrp-2</u>	2.7×10^{-8}	0	0	0	0 0
24064	+	<u>Δcya-1Δcrp-1</u>	6.0×10^{-8}	0	0	0	0 0

a. THTC = 多得无法计数

χ4062和χ4064仍是优先选择的。使用带有crp基因缺失的双突变体能排除crp突变的回复，此回复能在无需任何环化AMP的条件下允许需要CRP蛋白活化的基因和操纵子进行转录。类似地，crp基因的缺乏也能排除cms阻遏基因突变的回复（该突变和crp基因紧密相连）并也可避免环化AMP的需要。虽然所试验的Δcy_aΔcrp^{*}或cms回复突变菌株仍保留无毒性，但并没有对足够的独立的回复突变分离菌进行毒性试验，从而断定毒性不能恢复，因此不管这种变化是多么不可能，Δcrp突变体应能排除这种毒性恢复。此外，Δcrp::Tn10突变有效地降低了鼠伤寒沙门氏菌的毒性（表4），因此，即使在某些种类的基因转移过程中失去Δcy_a突变这种不大可能发生的情况下，Δcrp突变仍然赋予菌株无毒性。

仍具有pStSR100质粒的疫苗菌株χ4064能诱发比无质粒菌株χ4062更高的免疫力（表8）。这无疑得归因于χ4064（图1和图2）和含质粒的菌株增加了这样一种能力，即在隔膜淋巴结和脾中达到比无质粒菌株更高的效价和更长的持久性（见实例3）。另一方面，在年幼动物或营养不良或遭到损伤的个体中，对于用χ4064进行免疫的耐性不及用χ4062进行免疫的耐性。因此，如果两种免疫都需要，应首先用χ4062而后用χ4064进行免疫。

疫苗菌株如χ4062和χ4064的一种期望的用途是，作为载体向肠系淋巴组织定向集群化或转移毒性抗原（由来自其他病原体的基因表达），从而诱发全身分泌免疫应答和体液及细胞免疫（如有需要的话）。因此，大量克隆载体已被导入χ4062和χ4064

中, 这些质粒表现出在野生型亲本菌株中相等或更大的稳定性。事实上, X4062和X4064较慢的生长速率(表3)无疑提高了质粒复制跟上染色体复制的能力, 从而确保子代细胞中含有质粒。此外, 还构建了多种重组衍生物, 而且发现集落抗原Spa A在 $\Delta cya\ crp$ 突变体中的表达水平比在具有赋予无毒性的其他突变的鼠伤寒沙门氏菌中的表达水平更高, 所述Spa A抗原对于使突变沙门氏菌(*S. mutans*)和*S. sobrinus*群集于唾液糖蛋白覆盖的牙齿表面是必需的(Curtiss, J. Dent. Res. 65: 1034—1045, 1986)。

实例2

本实例说明如何将 Δcya 、 Δcrp 突变体导入其他沙门氏菌种中, 以使所说的种具有无毒性并因此能用作疫苗组分。

用来实行本发明此实例的沙门氏菌种包括亚利桑那沙门氏菌和鸡沙门氏菌, 以作为禽类沙门氏菌菌株。霍乱沙门氏菌作为专一于猪的沙门氏菌, *S. dublin*作为专一于牛的沙门氏菌以及许多由鸡、火鸡、小牛、猪和马分离获得的鼠伤寒沙门氏菌衍生物。这些菌株用来构建带有和不带有毒性质粒的 $\Delta cya\ \Delta crp$ 突变体, 从而首先在小鼠中, 而后在特定动物宿主中评价其保护性免疫力。这些无毒的沙门氏菌衍生物还可用来构建二价活疫苗菌株, 以刺激对集群和其他细菌病原的毒性蛋白质的保护性免疫。具体地说, 可以制备得到预防鸟沙门氏菌(*B. avium*)和大肠杆菌的疫苗, 这两种呼吸道病原体引起家禽的高发病率及死亡率, 以及制备在马群中引起马腺疫的等链球菌的疫苗。

无毒沙门氏菌菌株的构建 在培养基中具有带有 $\Delta [\text{gal} -$

uvr B) 1005 突变 (此突变根据是否有半乳糖存在而分别导致光滑或粗糙表型) 的 $cya::Tn10$ 或 $crp::Tn10$ 的鼠伤寒沙门氏菌 LT-2 菌株可用来产生 $\Delta cya \Delta crp$ 基因型。用 P22HTint 转导可以将 $cya::Tn10$ 和 $crp::Tn10$ 突变导入由各种宿主获得的鼠伤寒沙门氏菌菌株、伤寒沙门氏菌、付伤寒沙门氏菌及其他带有相似的 O 抗原的沙门氏菌中去。特异于粗糙型的普遍性转导噬菌体 pIL4 被用来将 $Tn10$ 诱导的突变导入亚利桑那沙门氏菌、鸡沙门氏菌、S.dublin 和霍乱沙门氏菌中。上述沙门氏菌的 pIL4 转导要求将粗糙突变体分离。选择 2-脱氧半乳糖抗性会导致 $galE$ 突变体。最后可通过 pIL4 转导除去 $galE$ 缺陷, 所说的 pIL4 是在带有野生型 gal^+ 基因的粗糙突变体上增殖的。

可以通过选择菌株的蒽萘酸抗性衍生物来分离稳定的缺失突变体, 所说的菌株含有 $cya::Tn10$ 和/或 $crp::Tn10$ 插入突变。蒽萘酸抗性衍生物由于转座子和相邻宿主染色体基因的不精确切除而对四环素过敏。要想成功地使用 $Tn10$, 就必须证实蒽萘酸抗性衍生物已完全失去了 $Tn10$ (例如, 可以采用 $\lambda::Tn10$ 载体作为杂交探针)。

去除毒性质粒的沙门氏菌菌株可以用为鼠伤寒沙门氏菌所发展的方法及遗传工具来构建 (见实例 1 和 3)。在此构建环节可采用 way 等人所描述的 Tnmini-tet (Gene 32: 369—79, 1984)。将缺乏转位酶并且不能自发缺失的转座子插入到 100 kb 毒性质粒的毒性相关区域中, 所说的质粒很可能和 S.dublin、鸡沙门氏菌和霍乱沙门氏菌的毒性质粒同源 (Popoff 等人, Ann. Microbiol.

(Inst. Pasteur) 135A: 389—398, 1984)。转座子插段被转导到其他种的 *galE* 突变体的同源顺序中。通过使细菌在升高的温度(约43℃)下在新生霉素(一种DNA解旋酶抑制剂)中生长来去除 *Tnmini-tet* 标记的毒性质粒。通过用 ^{32}P 标记的天然毒性质粒和去除质粒的衍生物杂交能够证实毒性质粒的去除。

对所有构建的菌株确定其遗传属性的稳定性,并确定在鼠伤寒沙门氏菌突变体中显示的表型也显示在其他沙门氏菌种中。用以促进动物研究的最后一步是导入一种药物抗性标志,从而在动物试验期间对跟踪沙门氏菌菌株提供帮助。使用通常采用的萘啶酸抗性或利福平抗性,因为这些抗性在鼠、鸡、火鸡的正常菌丛中并不流行。

通过转导将某些转座子诱发的突变导入某些沙门氏菌种中去也许是不可能的。但利用结合法可能较好,它是将转座子诱发的突变克隆在某质粒上,该质粒能从整合有 *IncF* 或 *IncP* 质粒的 *Hfr* 移入沙门氏菌中。转化提供了另一种方法,其中所进行的步骤是,选择顺序进入染色体中的重组体、质粒的去除及证实精确的基因损伤。

免疫原性、集群化和持久性的评价 前面构建的无毒沙门氏菌菌株可以通过对小鼠进行口服接种、胃插管或腹腔注射而进行评价。

在此方法中,首先使沙门氏菌菌株生长到对数期,然后在有明胶的缓冲盐水中将它们浓缩到接近 10^{10} 细胞/ml。要口服接种或胃插管的动物在接种前4小时停止进食和水。在接种前5分钟向小鼠施用碳酸氢钠以中和胃酸。接种后30分钟可以让小鼠进食和水。根据以前在小鼠上使用鼠伤寒沙门氏菌突变菌株的实验,一般对于小鼠的攻击剂量为 10^3 LD_{50} 。如果对各种野生型沙门氏菌的 LD_{50} 不及在鼠毒鼠伤寒沙门氏菌中观察到的剂量高,则此剂量就可能是不切

实际的。这一点对于口服接种更成问题，因为施用 10^9 以上的生物是很困难的。由腹腔接种也可用达到此水平的剂量进行，这将导致内毒素休克（约 10^7 细胞）。每月记录1次动物的重量和健康状况。

对接种了突变沙门氏菌菌株、存活30天的小鼠用 10^3 LD₅₀ 毒性沙门氏菌亲本菌株进行口服或腹腔攻击。受感染动物的健康状况可通过每天定期测定其增长速度确定。在进行攻击前，通过毛果碱刺激获取唾液试样，对每只动物抽血以收集其血清。然后确定针对沙门氏菌表面抗原的唾液中分泌的IgA和IgG以及血清中IgA和IgG的定量滴度。还测定二次免疫对抗体滴度和免疫持久性的影响。

无毒并能诱发较高免疫力且对体重增加无不利影响的疫苗菌株可用来确定菌株的定量滴度，所说菌株是附着在小肠和结肠的壁上，存在于淋巴集结、小肠和结肠内容物中、隔膜淋巴结和脾中，测定时间可在4、24、48、72、96小时及以后一周间隔（如有必要）进行。其结果与获得的免疫应答的数据有关。

然后用对小鼠无毒且致免疫的菌株在适当的动物种中进行试验，例如亚利桑那沙门氏菌、鸡沙门氏菌、鸟类的鼠伤寒沙门氏菌在鸡和火鸡幼禽中进行测试。确定了在禽类宿主中的无毒性及致免疫性以后，测定沙门氏菌在嗉囊、盲肠和法布里齐奥氏囊中的毒性滴度，还包括所检查的鼠组织。

针对禽类博德特氏菌免疫的二价疫苗菌株的构建及检测 针对禽类博德特氏菌的疫苗应表达这种表面结构，该结构涉及到集群化和抗原性，但又不是皮肤坏死毒素的毒性决定子。针对表面蛋白的疫苗应该通过阻断气管的集群化产生免疫力，而针对皮肤坏死毒素的抗体应当中和其不利影响。虽然还不了解涉及集群化的禽类博德特氏菌的

表面结构,但在 λ gt 11 表达载体中的禽类博德特氏菌的基因文库和转座子诱发的禽类博德特氏菌突变体的可得性,使得能够分离和鉴别编码表面蛋白质的基因。通过将含有表面蛋白质和/或皮肤坏死毒素决定子基因的重组质粒导入无毒沙门氏菌中,就能通过阻断集群化(并因此鉴别涉及集群化的基因)或中和毒素而选择出诱发保护性免疫的二价菌株。

根据 Curtiss 法(Manual of Methods in Bacteriology, ASM, Washington, D.C., 1981),通过转化将禽类博德特氏菌外膜蛋白质和/或皮肤坏死毒素的基因转移至适当的无毒亚利桑那沙门氏菌、鸡沙门氏菌和/或鼠伤寒沙门氏菌衍生物中,这些蛋白质的表达可用 Western 斑点印迹法(Towbin 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76: 4350—54, 1979)进行检查。在进行转化前,在 50℃ 下用 5 分钟热休克来克服沙门氏菌中的任何限制性障碍。以前的报告已经表明,博德特氏菌基因在大肠杆菌中不能有效地表达,除非它们是由大肠杆菌启动子转录的。这一关于禽类博德特氏菌基因表达和蛋白质向沙门氏菌外膜转移的问题可通过利用一种重组载体而消除,在该载体中,所说基因融合在大肠杆菌 λ amb 或 omp A 基因中。此外,一旦二价疫苗菌株群集于淋巴集结,则禽类博德特氏菌蛋白质将转移到沙门氏菌外膜并提高激起强免疫应答的可能性。当禽类博德特氏菌插入沙门氏菌中以后,就可以利用由 Ghoribit 等人(EMBO J. 5: 3029—37, 1986)公开的方法,通过利用特异抗体的集落免疫斑点和免疫标记的沙门氏菌的电镜法分析重组体克隆中基因的表达。

用二价疫苗口服免疫接种到 1—3 天龄的幼禽上,观察其血清和

呼吸道分泌物以确定抗体应答的类型〔 Ig Y (IgG、7SIg), Ig M, Ig A (Ig B) 〕及数量。比较免疫和未免疫的幼禽的体重减少以观察二价疫苗可能的付作用。另外,对火鸡幼禽由鼻内接种 10^9 有毒禽类博德特氏菌,或将它们暴露于感染鸟群中进行攻击。对受攻击的火鸡幼禽进行疾病观察、尸体剖检,察看其气管组织损伤以及生物滴度的变化。

如果针对禽类博德特氏菌的粘膜免疫应答不足以保护年幼的鸡和火鸡,可以改对下蛋母鸡免疫接种表达禽类博德特氏菌集群化和/或毒性抗原的无毒沙门氏菌,以使母体抗体通过鸡蛋转移。随着幼鸡或火鸡幼禽逐渐长大,这种处理将增加其针对禽类博德特氏菌的免疫性能。在生长期也可以利用同样的重组载体对其进行保护性的口服免疫。

对禽类大肠杆菌免疫的二价疫苗菌株的构建及检测 通过上述方法,将使无毒大肠杆菌毒性增加或使其具有集群于小鸡气囊能力的重组体克隆导入鸡沙门氏菌和/或鼠伤寒沙门氏菌的无毒菌株中。用荧光抗体技术确定毒性决定子在沙门氏菌细胞表面的表达,但应该注意,大肠杆菌细胞表面决定子也可能表达在沙门氏菌的表面。

将二价疫苗菌株口服免疫接种到鸡中,并将有毒大肠杆菌注射到其尾气囊中进行攻击。如果没有发展败血症,可将鸡进行尸体剖检以确定集群于气囊的能力是否受到影响。接着,如前面对火鸡幼禽所述,对呼吸分泌物和血清中抗体应答的类型、数量及持续时间作综合研究。

疫苗的施用及测定技术和前面对禽类博德特氏菌疫苗一样。

针对等链球菌免疫的二价疫苗菌株的构建及检测 已经构建了表达链球菌M蛋白质的鼠伤寒沙门氏菌的无毒衍生物。

将等链球菌M蛋白质基因的DNA酶I产生的随机片段克隆到 λ gt11表达载体中。然后用能够诱导保护性免疫的针对M蛋白片段的抗血清,和存在于带有出血性紫癜的马免疫复合物中的针对M蛋白决定子的抗血清对文库进行顺序筛选。选择能表达保护作用但不产生紫癜的克隆基因,将它们融合到Lam B或Omp A基因中。首先在小鼠身上研究针对携带这些决定子的无毒沙门氏菌的免疫应答,然后再在小马和大马身上研究。

在其表面表达等链球菌M蛋白质的相关抗原决定基的所述沙门氏菌菌株的可用性,构成了激活针对马腺疫的粘膜性鼻咽保护性免疫应答的有效途径。M蛋白质中产生紫癜的决定子的切除能增加疫苗的安全性。

实例3

此实例说明毒性质粒缺失对几种沙门氏菌菌株的免疫原性及毒性的影响。

细菌菌株 此实例中所用的细菌菌株列于表10中,并附有质粒说明。使用了三种鼠伤寒沙门氏菌菌株:来自小鼠的有毒菌株SR-11和SL1344及毒性较小的菌株LT2。大肠杆菌HB101和C600用于遗传操作中。

培养基和生长条件 除非另有说明,否则细菌都是生长在L肉汤中或在L琼脂平板上(Lennox, Virology 1: 190—206, 1955),并补充有下列浓度的($\mu\text{g}/\text{ml}$)的合适抗菌素:氨苄青霉素(Amp)100—200,四环素(Tet)12.5—25,氯霉素(Chl)30,卡那霉素(Kan)50,链霉素(Str)50和萘啶酸(Nal)50。为了便于粘附、侵入及巨

表 10 细菌菌株

菌株	100kb 质粒	基因型	说 明
鼠伤寒沙门氏菌:			
LT2-Z	χ3000	pStLT100	野生型
χ3147		pStLT100	来自 C. Turnbough (69)
χ3344	—		χ3000 的自发性 NaI ⁺ 衍生物
χ3347		pStLT101	去除 100kb 质粒的 χ3000
			pStLT101 转化到 χ3344 中
			(由 pNK561 转移获得的
			Tnini-tet 标记的
			pStLT100), Tet ^r
χ3477	—	hsdL6, Δ(gal-uvrB)-1005,	用来获取 Rc 化学型 LPS; S.
		[flaA66, rpsL120 xyl-404,	A. Tinge 和 R. Curtiss
		lomb ⁺)(E. coli), Δ(zja::	(未公开),
		Tn10), hsdSA29	Δ(galE-uvrB)-1005 是
			由在 P22HT int 溶菌产物
			(来自 SL54000) 的 B.A.D.
			Stocker 制得

表 10 (续一)

菌株	100kb 质粒	基因型	说 明
SR11 χ 3181	pStSR100		SR-11(57) 是由感染小鼠淋巴瘤集分离得到; 来自 Suzanne Hichalek
χ 3306	pStSR100	<u>gyrA1816</u>	gyrA1816 由 χ 3147 转导至 χ 3181 中; 小鼠排出的
χ 3337	—	<u>gyrA1816</u>	去除 100kb 质粒的 χ 3306
χ 3338	pStSR101	<u>gyrA1816</u>	pStSR101(由 χ 3000[pStLT101] 转导得到的 Tnmini-tet 标记的 pStSR100) 转化到 χ 3337 中, Tet ^r
χ 3456	pStSR101		带有由 χ 3000(pStLT101) 转导得到的 Tnmini-tet 标记的 pStSR100 的 χ 3181, Tet ^r

表 10 (续二)

菌 株	100kb 质粒	基 因 型	说 明
1344 X3042	pStSL100	<u>rpsL</u> , <u>hisc</u>	来自 B.A.D. Stocker
X3339	pStSL100	<u>rpsL</u> , <u>hisc</u>	小鼠排除的 X3042
X3340	—	<u>rpsL</u> , <u>hisc</u>	去掉 100kb 质粒的 X3339
X3351	pStSR101	<u>rpsL</u> , <u>hisc</u>	转导到 X3340 中的 pStSR101 (Tnmini-tet 标记的 pStSR100), Tet ^r

大肠杆菌:

C600 的自发性 Nal^r 衍生物

K 12
F⁻, thr-1, leuB6, tonA1,
lacY1, λ⁻, gyrA, thi-1

H B 101
F⁻, ara-14, leuB6, ProA2,
lacY1, glnv44, galK2, λ⁻,
recA13, rpsL20, xy1-5,
mtl-1, thi-1, hds20
(rB⁻, mB⁻)

噬细胞感染, 可将某些培养物在脑心浸液培养基 (Difco, Detroit) 中生长, 因为这种培养基能增加细菌对所用哺乳动物细胞的粘附力。所有培养物都在 37 °C 下在适当培养基中静置生长过夜, 然后再使它们在震动培养基中生长至对数期 (OD_{600} 约 0.4~0.7)。

遗传交换 转化过程采用 Bagdasarian 和 Timmis 方法 (Curr. Top. Microbiol. Immunol. 96: 47—67, 1981) 进行。以噬菌体 P22HTint 作为媒介的转导过程按 Schmeiger 所述的方法 (Mol. Genl. Genet. 119: 75—88, 1972) 进行。结合过程既可以通过平皿接合, 也可以通过滤器接合 (Willettts, Meth. in Microbiol. 17: 33—58, 1984)。

DNA 操作 利用 Birnboim 法 (Meth. Enzymol. 100: 243—255, 1983) 进行大规模、快速提取微量溶菌产物质粒。用标准方法进行氯化铯密度梯度离心、Southern 斑点印迹杂交、集落斑点杂交和凝胶电泳等。根据制造者的指示, 用 [γ - 32 P] ATP (Amersham, Arlington Heights, Ill.; 比活: 1445 Ci/mmol) 进行的 DNA 缺口翻译由 Bethesda Research Laboratories, Gaithersburg, Md. (BRL) 的药盒进行。限制酶消化则由来自 BRL 的酶根据生产厂家的说明进行。

用 Tnmini-tet 标记鼠伤寒沙门氏菌的 100 Kb 质粒 用具有 Tnmini-tet 的 pNK861 (Way 等, Gene 32: 369—79, 1984) 转化含有 pStLT100 的菌株 χ 3000。

Tnmini-tet 基本上就是倒位重复中 Tn10 的 Tet^R 基因。通

过利用 F: Tn 5 在不相容的来自 $\chi 3000$ (pNK259, F::Tn 5) 的质粒 pNK259 中的转移, 从而将 pNK861 排除在 Amp^R、Tet^R $\chi 3000$ (pStLT100, pNK861) 文库之外。为了选择 Tnmini-tet 的在由 F 转移的 100 kb 质粒中的插段, 需将 $\chi 3000::$ Tnmini-tet(pNK259, F::Tn 5) 文库与大肠杆菌 HB101 进行接合并选择 Tet^R、Kan^R 和 Str^R。HB101 中潜在的 Tnmini-tet 标记的 100 kb 质粒通过选择 Tet^R 和 Nal^R 又转回到鼠伤寒沙门氏菌菌株 $\chi 3147$ 中。排出好几种不具有 F::Tn 5 的 Nal^R、Tet^R、Kan^S 分离物。

利用以噬菌体 P22 R Tint 为媒介的转导过程, 将 100 kb 质粒中的 Tnmini-tet 插段转导到每一个含有 100 kb 质粒的野生型鼠伤寒沙门氏菌菌株中。筛选 Tet^R 转导体中增大的 100 kb 质粒和与亲本质粒具有不同限制酶图谱的转导体。

另一种分离 pStLT100::Tnmini-tet 插段的方法是由 $\chi 3000$ (pStLT100, pNK861) 获取质粒 DNA, 并转化大肠杆菌 HB101 (pNK259), 选择 Tet^R 和 Chl^R。

去除鼠伤寒沙门氏菌中 Tnmini-tet 标记的 100 kb 质粒使 100 kb 质粒中带有 Tnmini-tet 插段的鼠伤寒沙门氏菌菌株经受两种去除过程——在 43 °C 生长或在含有新生霉素的肉汤中生长。对于每一种去除过程, 每天都要对 Tnmini-tet 标记的菌株给以少量接种物 (10^3 — 10^4 集落形成单位, CFU)。当培养物达到静止期时 (OD₆₀₀ 约 0.9), 将其一部分稀释并在含有萆萆酸的 L 琼脂上进行平板培养。然后, 从萆萆酸抗性集落中筛选 Tet^S, 然后利用微量溶菌产物分析法检查萆萆酸抗性和 Tet^S 的质粒含量。去

除型衍生物进一步利用 ^{32}P 标记的 pStSR 100 通过微量溶菌产物的 Southern 斑点印迹杂交法和细菌细胞的集落斑点杂交法进行检查, 从而证实已经去除并且没有染色体整合的质粒。

小鼠感染 用 7—10 周龄的雌性 BALB/c 小鼠 (Harlan Sprague/Dawley [Indianapolis] 和 Sasco [St. Louis]) 进行所有的动物感染实验。较大的小鼠用来获取腹膜巨噬细胞。由不同年龄的雄鼠获取正常鼠血清。

对于口服接种, 小鼠须 6 小时不进食和水, 然后喂入 $50\ \mu\text{l}$ 10% (重量/体积) 的碳酸氢钠, 而后再喂入 $20\ \mu\text{l}$ 悬浮于含有 0.1% (重量/体积) 明胶的缓冲盐水中的细菌 (BSG)。口服接种是将微量移液管头直接放在门牙之后以避免损坏口腔粘膜。小鼠在接种后 30 分钟喂入食物和水。

在皮下接种及侧向尾部静脉接种时, 用 0.1—0.2 ml 悬浮于 BSG 中的细菌注射放松的小鼠。

检查受感染小鼠的器官和组织以确定是否存在沙门氏菌, 具体过程如下: 利用 CO_2 窒息法将小鼠杀死。无菌摘取脾脏并匀浆于 2.5 ml BSG 中, 匀浆既可在备有小杯的 OMNI 混合器 (Dupont, Wilmington, Del.) 中进行, 也可在玻璃组织匀浆器中进行。从小肠上摘取淋巴集结, 通过在 2 ml BSG 中搅动冲洗 2 次, 将冲洗过的淋巴集结匀浆于 2.5 ml BSG 中, 该过程既可在 OMNI 混合器中进行, 也可在含有玻璃珠的玻璃管中搅动进行。隔膜淋巴结用玻璃组织匀浆器匀浆于 2.5 ml BSG 中。将组织和器官匀浆的稀释液涂在含有合适抗菌素的 L 琼脂平皿上。

统计方法 为了对用野生型或去除型鼠伤寒沙门氏菌感染的小

鼠组织中的CFU作出比较,先确定几何平均值,并利用单向跟踪的Student氏t试验与野生型CFU(大于去除型CFU)作比较。为了分析混合感染,利用单向跟踪的Student氏t试验,将来自单个小鼠的野生型与质粒去除型CFU的比值的几何平均值与其常用对数平均值大于0(即比值大于1)的比值作比较。采用Reed和Muench法(Amer.J.Hyg. 27: 493—497, 1938)确定小鼠LD₅₀值。组织培养物中的细菌CFU和巨噬细胞感染通过双向跟踪的Student氏t试验比较CFU平均值/孔。

100 kb质粒在鼠伤寒沙门氏菌菌株中的存在 所研究的三种鼠伤寒沙门氏菌菌株都具有100 kb质粒(图3)。此外,χ3339还具有90 kb和8 kb两种质粒。在此研究中,对鼠伤寒沙门氏菌菌株的100 kb质粒采用下述的三部分命名系统。为了识别象鼠伤寒沙门氏菌这样的血清型,使用“St”符号。后面是菌株符号(LT2中的“LT”,SR—11中的“SR”,SL1344中的“SL”)。最后用数字符号区别野生型质粒(100)或衍生物(101代表特异的Tnmini-tet插段等)。因此菌株SR—11的野生型质粒就是pStSR 100。利用限制性酶消化分析纯化的质粒制备物,用Hind III(图4)和EcoRI(数据未示出)在三种菌株的100 kb质粒中都得到完全相同的图谱。去除100 kb质粒的SL1344、χ3340的限制性酶消化(图4, f道)表明,相应于pStLT 100(图4, b道)和pStSR 100(图4, c道)的带已丧失。而这两个带存在于χ3339中(e道)。因此,本研究中所检查的三种鼠伤寒沙门氏菌菌株的每一种100 kb质粒即使不是完全相同,也是非常相似的。

菌株构建 用way等人(见上)所述的转座子Tnmini-tet标记带有Tet抗性标记的100 kb质粒。Tnmini-tet(一种Tn10衍生物)在倒位重复中不具有IS10R转化酶基因,因此转化酶基因在由供体质粒(pNK861)转位时丧失,因此不能作为Tnmini-tet转位或缺失的媒介。因此,Tnmini-tet插段要比亲本的插段(Tn10)稳定得多。

Tnmini-tet插入到菌株 $\chi 3000$ 的100 kb质粒中(导致pStLT101形成)后,使得能以 10^{-6} — 10^{-7} /细胞/代的频率在新生霉素中或在43℃生长以后选择去除100 kb质粒的衍生物,从而产生 $\chi 3334$ 。将相同的Tnmini-tet插段转导到 $\chi 3339$ 和 $\chi 3306$ 中,并用来去除这些菌株中的100 kb质粒,分别产生 $\chi 3340$ 和 $\chi 3344$ 。 $\chi 3340$ 保留有90 kb和8 kb质粒(图3, h道)。通过来自洗净的溶菌液的质粒DNA的凝胶电泳(图3),以及通过用 ^{32}P 标记的pStSR100使微量溶菌产物进行Southern印迹杂交与溶解细菌的集落斑点杂交(数据未给出),可以证明100 kb质粒已被去除。去除型衍生物不能进行集落斑点杂交表明,没有染色体整合的质粒存在。没有观察到具有整合质粒的去除质粒的衍生物。

通过转化将 $\chi 3000$, pStLT101和 $\chi 3306$, pStSR101的Tnmini-tet标记质粒导入去除型衍生物中,分别产生 $\chi 3347$ 和 $\chi 3338$ 。pStSR101被转化到 $\chi 3340$ 中,从而产生 $\chi 3351$ (表3, 图3, i道)。

小鼠毒性 确定野生型、去除型和再转化的衍生物对于BALB/c小鼠的口服LD₅₀剂量(表11)。小鼠排出的 $\chi 3306$ 和

χ3339 的口服 LD_{50} 分别是 3×10^5 CFU 和 6×10^4 CFU, 而 χ3000 的口服 LD_{50} 量大于 10^8 CFU。各种去除型衍生生物的口服 LD_{50} 都大于 10^8 CFU。用 χ3337 和 χ3340 感染的小鼠出现病症, 且偶有死亡。用 100 kb 质粒再转化的衍生生物的 LD_{50} 恢复到亲本野生型菌株的水平。这证实去除型衍生生物的遗传损害事实上就是 100 kb 质粒的丧失。

表 1 1 野生型和去除 100 kb 质粒的鼠伤寒沙门氏菌的小鼠 LD_{50} 值^a (CFU)

菌株	100 kb 质粒	口 服	皮 下
SR-11:			
χ3306	+	3×10^5	< 50
χ3337	—	$> 10^8$	< 50 ^b
χ3338	+	10^5	< 50
SL1344:			
χ3339	+	6×10^4	< 50
χ3340	—	$> 6 \times 10^8$	400
χ3351	+	$< 5 \times 10^4$	< 50
LT2-2:			
χ3000	+	$> 10^8$	2×10^3
χ3344	—	NT ^c	2×10^3
χ3347	+	$> 10^9$	NT

a: 用 Reed 和 Meunisch 法确定 (见上)

b: χ3337 的平均死亡时间 (12.3 天) 大于 χ3306

的(7.0天) ($p < 0.001$, Student氏t试验)

c: NT: 未测

野生型和去除型衍生物的皮下LD₅₀值与口服LD₅₀值不一样(表11)。X3306和X3339的皮下LD₅₀小于50 CFU, 每一种接种物达到100%死亡率。X3306、X3337的去除型衍生物还杀死大多数注射量低于50 CFU的小鼠。但是X3337的平均死亡时间(12.3天)高于X3306的(7.0天) ($p < 0.001$, 单向跟踪的Student氏试验)。而去除100 kb质粒的SL1344, X3340的皮下LD₅₀都由低于50 CFU提高到400 CFU。Tnmini-tet标记的100 kb质粒再导入X3340中则恢复到野生型的皮下LD₅₀值。野生型和去除型LT2菌株的皮下LD₅₀大约分别为2000 CFU。

菌株SR-1和LT2之间质粒交换的效应 在口服时, 菌株LT2的毒性比菌株SR-11的要小得多(表11)。为了确定这两种菌株的100 kb质粒在此毒性差别中是否起作用, 将每一种100 kb质粒的Tnmini-tet衍生物转化到异源去除型菌株中。被10⁹ CFU具有pStLT101或pStSR101的菌株SR-11感染的小鼠在接种后7天死亡, 而具有任一种质粒的菌株LT2却无毒(口服接种10⁹ CFU)。因此, 菌株LT2的无毒并不是由于缺乏100 kb质粒。除了通过将SR-11质粒、pStSR101导入菌株SL1344以产生毒性X3351的结果(表11)以外, 这一结果也证明这三种菌株的100 kb质粒在功能上是等价的。

口服接种后的发病机理 野生型和去除型衍生物之间经口服比经皮下途径存在更为明显的毒性差别提高了这种可能性: 即100 kb

质粒涉及在肠道中的毒性，而不是涉及后来的疾病侵入阶段。为了检查这种可能性，用野生型SR—11， $\chi 3306$ 或 100 kb 质粒去除的SR—11， $\chi 3337$ 口服感染小鼠，并在感染后不同时间检查其淋巴集结和脾中的鼠伤寒沙门氏菌。三种实验的综合结果示于图5中。感染后3小时，在淋巴集结可以观察到很少量的鼠伤寒沙门氏菌($<100\text{ CFU}$)。这不是接种物由口腔向肠无效通过的结果，因为在接种后2小时内，差不多 100% 接种物由肠道(基本是大肠内容物)回收。进一步，小肠内容物中的 CFU 在接种后3天，野生型和去除型的SR—11彼此相等。在接种后1—2天内，淋巴集结里的 CFU 就逐渐地增加到 10^3 — 10^4 CFU ，而脾中的 CFU 仍然较低。在接种后3天，淋巴集结和脾所具有的野生型 $\chi 3306$ 比去除型 $\chi 3337$ 多得多。淋巴集结中 CFU 的差别不是一直可在不同实验中观察到的，这是因为各个时刻指示的数据都是短暂的。但是，脾中 $\chi 3306$ 、 $\chi 3337$ 的 CFU 显著不同， $\chi 3306$ 对于 $\chi 3337$ 的超出值逐渐增大，直到用 $\chi 3306$ 感染的小鼠在接种后第8天死亡。脾中 $\chi 3337$ 达到 10^4 CFU 的数量级，并且直到接种后25天仍可检测到。因此，口服接种后，野生型和有毒质粒被去除的鼠伤寒沙门氏菌SR—11之间在发病机理上的基本差别在于鼠伤寒沙门氏菌达到脾中和/或繁殖的数量。

为了更准确地比较野生型和质粒去除的SR—11的相对毒性，需用 Tet^R ，野生型SR—11， $\chi 3456$ 和 NaI^R ，去除质粒的SR—11， $\chi 3337$ 进行混合感染实验。对每只小鼠确定其野生型 CFU 与质粒被去除的 CFU 的比率。此外，还需确定隔膜淋巴结的 CFU 比率，因为隔膜淋巴结是由淋巴集结向脾侵入过程的中介。

观察每只鼠之间的CFU的大范围及比率,分析比率的几何平均值。三种实验的综合结果示于图6中。与用野生型或去除质粒的鼠伤寒沙门氏菌感染小鼠进行的实验所观察到的一样(图5),一直到接种后第3天,当野生型与去除型的比率在淋巴集结、隔膜淋巴结和脾中分别为11:1、200:1和79:1时,才在混合感染的小鼠中检测到淋巴集结或脾中存在明显的CFU差别。在接种后第4天,只有脾的比率明显大于1.0(比率=160:1),而淋巴集结和隔膜淋巴结的比率分别为1.5:1和13:1。另外,与在分别感染的小鼠中所看到的一样,在接种后3天出现短暂的差别后,淋巴集结中野生型和去除型SR-11的CFU几乎相等。接种后5天,隔膜淋巴结和脾所具有的比率分别为200:1和1600:1,淋巴集结的比率为1.1:1。接种后第7天,只有一只小鼠存活,其淋巴集结、隔膜淋巴结和脾的比率分别为2.1:1,290:1,210:1。相对于淋巴集结,各种器官中CFU的最大差别是在脾和隔膜淋巴结中。在接种后3、4、5天,脾中比率显著大于淋巴集结的比率,在接种后第3、5天,隔膜淋巴结的比率显著大于淋巴集结的比率(图6)。

通过口服感染小鼠研究野生型SL1344, χ 3339和100 kb质粒被去除的SL1344, χ 3340的发病机理。两种试验的结果示于图7中。接种后3天,在野生型和去除型SL1344之间,看不到淋巴集结、隔膜淋巴结或脾中CFU存在明显差别。在接种后7—8天,可以看到三种器官中野生型 χ 3339数目明显大于去除型 χ 3340的。而在隔膜淋巴结和脾中能看到比在淋巴集结中更大的差别。进一步,在此实验之一中,淋巴集结的CFU差别是不

明显的。因此，隔膜淋巴结和脾的感染代表野生型和100 kb质粒去除的SL1344之间在发病机理上主要而一致的差别。接种后14天，所有感染野生型 $\chi 3339$ 的小鼠都死亡，而感染去除型 $\chi 3340$ 的小鼠其淋巴集结和脾中分别感染了 2×10^3 CFU和 6.3×10^3 CFU。在接种后31天，感染 $\chi 3340$ 的小鼠的淋巴集结和脾中分别具有400 CFU和320 CFU。因此在口服接种后，去除100 kb质粒的SL1344能在淋巴集结和脾中存活更长的时间。

静脉接种后脾的感染 上述结果表明，100 kb质粒主要与口服接种后由淋巴集结向隔膜淋巴结和脾的侵入有关，而不是与淋巴集结感染或更早的过程有关。为检查鼠伤寒沙门氏菌在脾中的生长情况，用野生型SR-11， $\chi 3456$ 和去除质粒的SR-11， $\chi 3337$ 的混合物静脉接种到小鼠上，并监视脾的CFU（表12）。当小鼠由静脉接种 10^5 CFU $\chi 3456$ 和 $\chi 3337$ 时，在接种后1小时，这些菌株被同等地清除到脾中。因此，100 kb质粒的存在不会影响血液清除。用 1×10^3 到 4×10^3 CFU $\chi 3456$ 和 $\chi 3337$ 的混合物由静脉接种到其他小鼠身上。在接种后4天，检测不到脾中CFU存在明显的差别（表12）。但是，在接种后6—7天，野生型与由脾回收的去除型鼠伤寒沙门氏菌的比率为11.5:1。此刻，脾中 $\chi 3456$ 和 $\chi 3337$ 的平均量分别为 2.7×10^6 和 2.3×10^5 CFU。因此，去除质粒的SR-11能在静脉接种后在脾中存活并复制更长的时间。静脉接种后1周，脾中野生型与去除型SR-11的比率为11.5:1，而口服接种后5和7天，该比率为1600:1和210:1，两者之间形成鲜明对比。

由静脉混合接种获得的比率之所以较低,其原因不是 $\chi 3456$ 和 $\chi 3337$ 之间的协同作用,因为在接种后第6天,单用 2×10^3 CFU $\chi 3337$ 感染的小鼠或用混合了等量 $\chi 3456$ 的 $\chi 3337$ 感染的小鼠,其脾中 $\chi 3337$ 水平的平均值均为 2.3×10^5 CFU (表12)。

表12 小鼠静脉接种以后脾的感染^a

	接种后时间		
	1小时 ^b	4天 ^c	6—7天 ^c
CFU $\chi 3456$ ^d	1.9×10^5	4.6×10^4	2.7×10^6
CFU $\chi 3337$ ^d	1.4×10^5	2.5×10^4	2.3×10^{5e}
比率($\chi 3456$: $\chi 3337$) ^f	1.3:1	1.8:1	11.5:1 ($P < 0.0025$)
比率 $\pm$ SD ^g	0.11 ± 0.25	0.26 ± 0.38	1.06 ± 0.39

a. 小鼠用等量的野生型 $\chi 3456$ 和去除100 kb质粒的 $\chi 3337$ 混合物由静脉接种, $n = 3-5$ 只小鼠

b. 接种物= $\chi 3456$ 和 $\chi 3337$ 各 5×10^5 CFU

c. 接种物= $\chi 3456$ 和 $\chi 3337$ 各 $1 \times 10^4-4 \times 10^4$ CFU (每次实验给予相等的接种物)

d. 来自脾的CFU的几何平均值

e. 接种后6天,单用 2×10^3 CFU $\chi 3337$ 感染的小鼠脾中具有 2.3×10^5 CFU $\chi 3337$

f. $\chi 3456$: $\chi 3337$ 比率的几何平均值(对于比率 > 1.1 者作单向跟踪的Student氏t试验的P值)

8. 比率的常用对数平均值±统计分析中所用的标准偏差

去除质粒的鼠伤寒沙门氏菌在口服接种后能在淋巴集结中扩增并到达隔膜淋巴结(图5、6、7)。但是,一直发现野生型与去除质粒的鼠伤寒沙门氏菌之间向隔膜淋巴结和脾侵入的能力具有差别。还证实在口服接种小鼠以后,野生型鼠伤寒沙门氏菌在感染脾方面更为有效(野生型对去除型比率为1600:1,图6)。但是,即使是去除型衍生物所达到的脾水平也高达 10^4 CFU,并一直到接种后31天还可在脾中检测到(图5)。在用野生型和去除型SR-11的混合物口服接种以后,脾中和隔膜淋巴结中所发现的野生型与去除型SR-11的比率明显高于淋巴集结中的(图6)。

去除质粒的SR-11和SL1344的皮下LD₅₀分别小于50 CFU和400 CFU,这表明去除100 kb质粒的鼠伤寒沙门氏菌通过此途径接种时仍保持较大的毒性。必须注意的是,没有一种去除型菌株与³²P标记的毒性质粒杂交,因而不存在能产生毒性的染色体整合的该质粒的拷贝。研究了野生型和去除型菌株在静脉接种后感染脾的能力,发现用野生型和去除型鼠伤寒沙门氏菌混合物静脉接种后1周,脾中CFU出现明显差别(野生型与去除型的平均比率为7.5:1和20:1)。静脉接种后脾中CFU的差别没有口服接种后5—7天的大(1600:1和210:1倍)。这些实验再次证明去除质粒的鼠伤寒沙门氏菌在脾中能达到较高的数量并进行扩增,而且100 kb质粒对发病机理的最大影响是在口服接种之后。我们假定去除100 kb质粒的鼠伤寒沙门氏菌由皮下接种时仍保持毒性,这是因为该细菌能在细胞外快速扩增,在腹腔中没有被有效地吞噬掉;因此,在小鼠能够通过巨噬细胞清除细菌以控制感染之前就

会发生不可克服的感染。当口服施用，假设全部或大多数侵入细菌在到达隔膜淋巴结时是位于细胞之内。

说明书附图

图 1

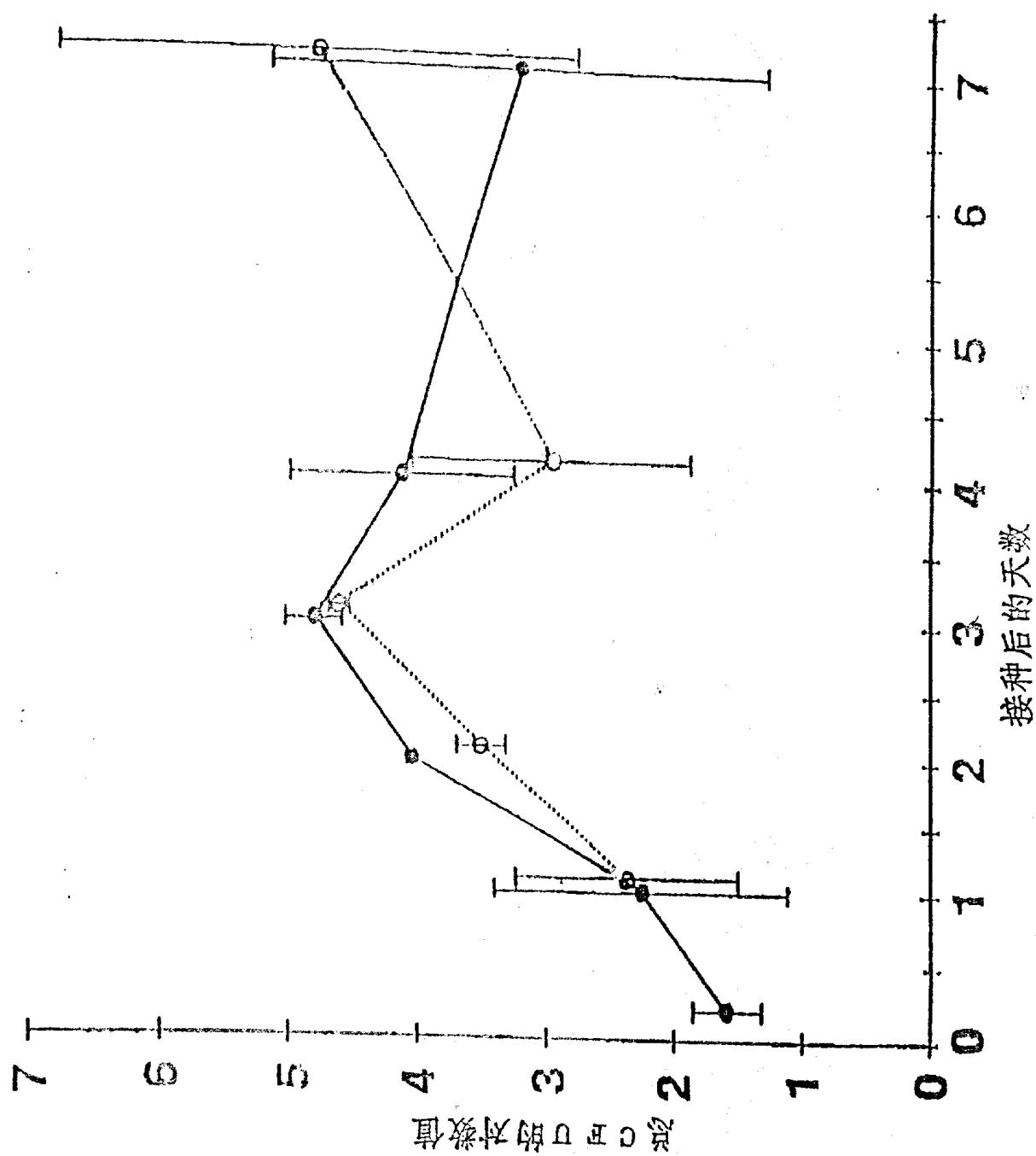
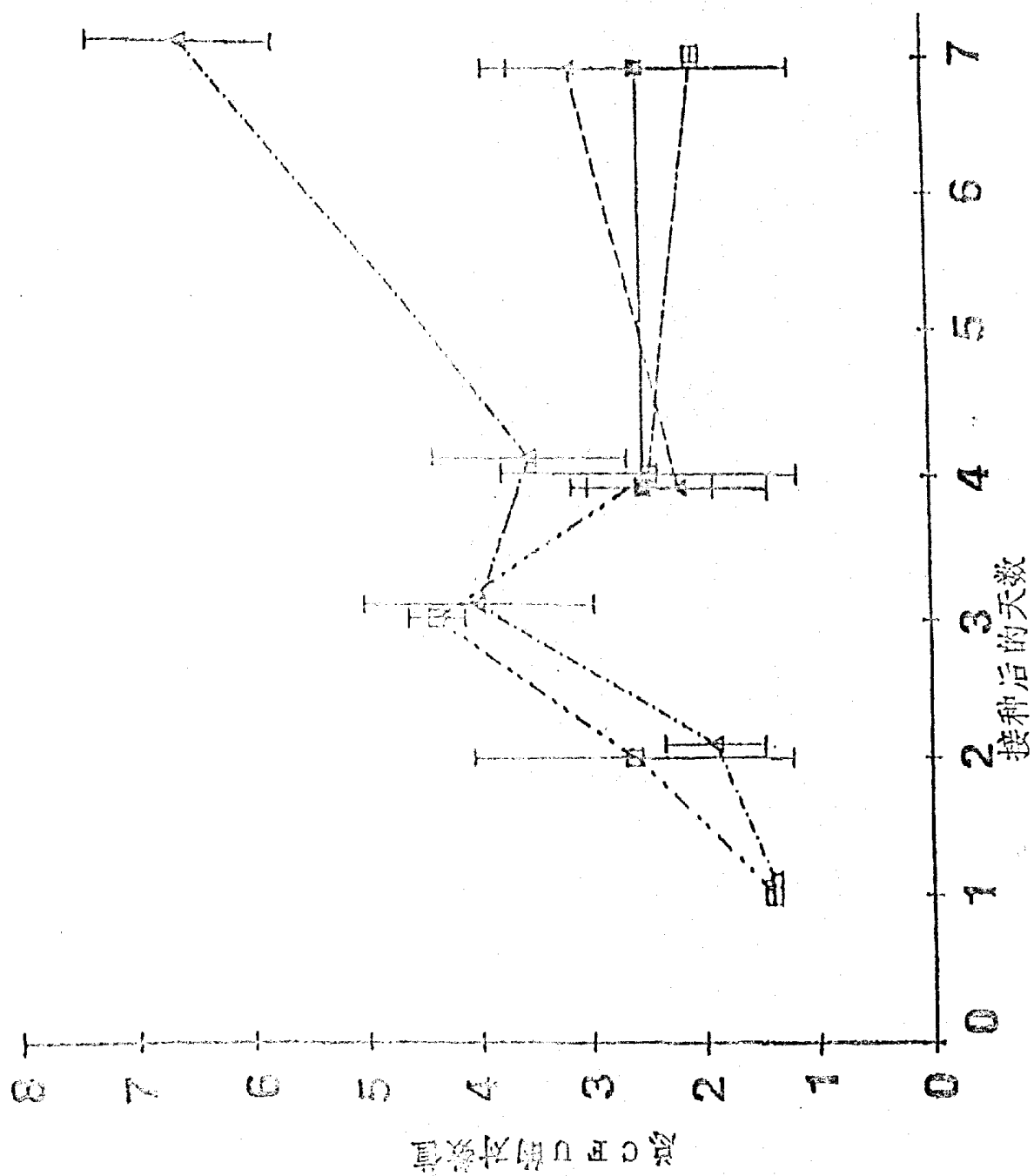


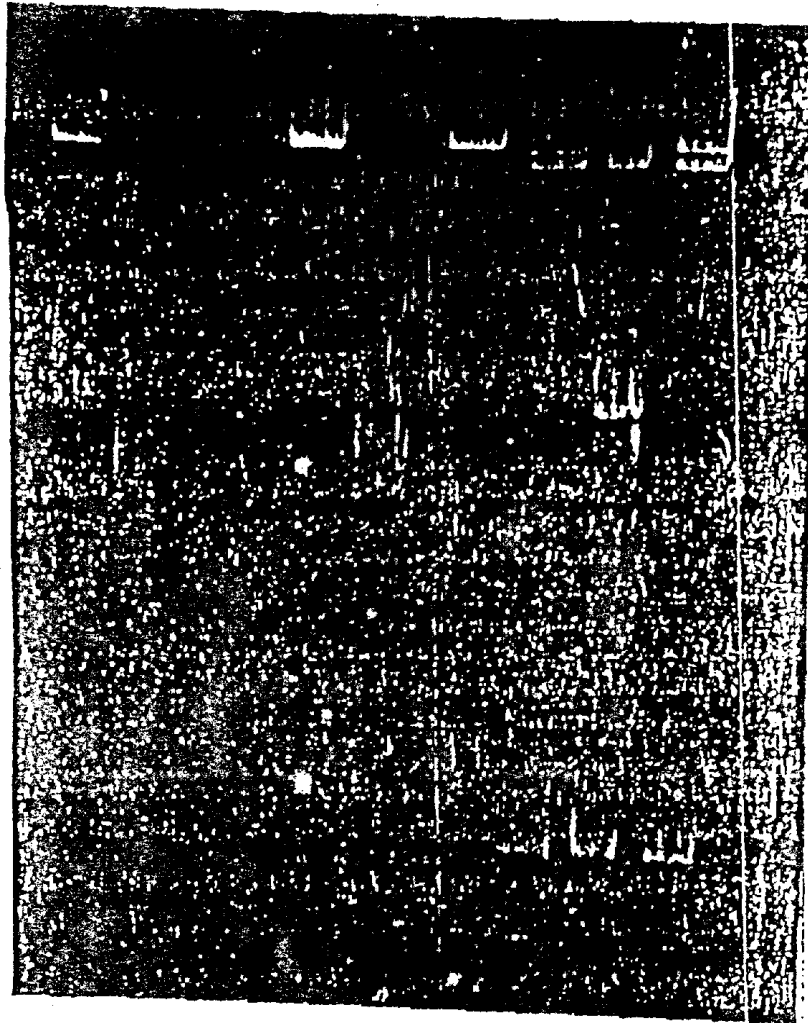
图 2



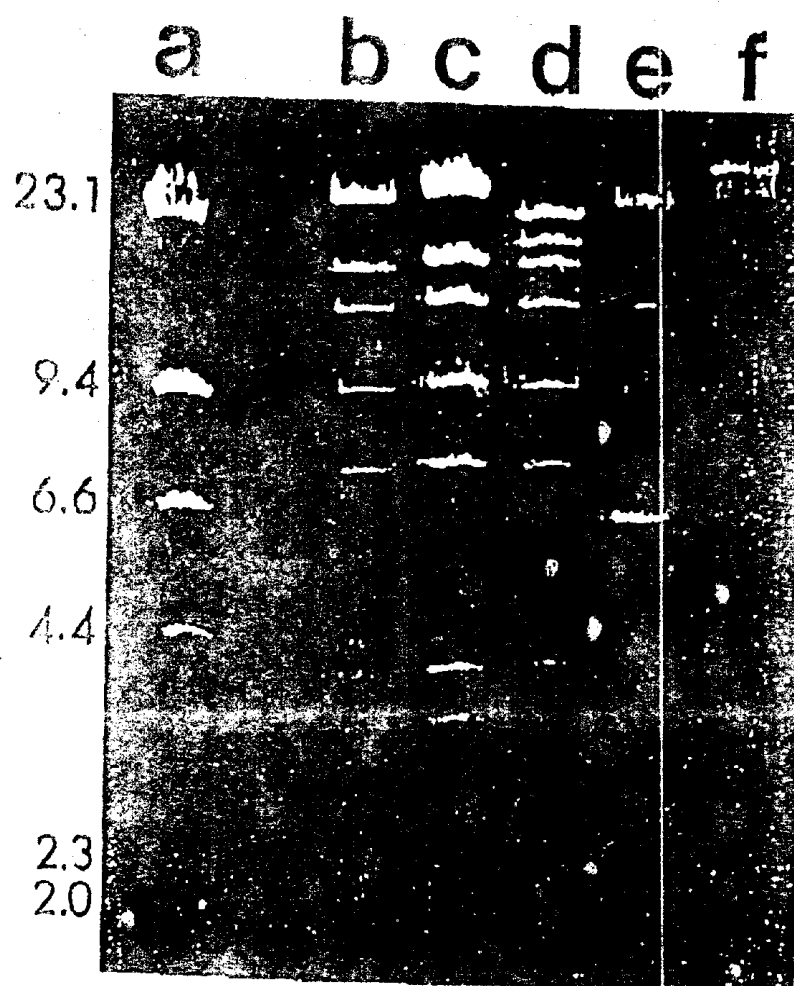
a b c d e f g h i

100 kb

8 kb



15 3



4

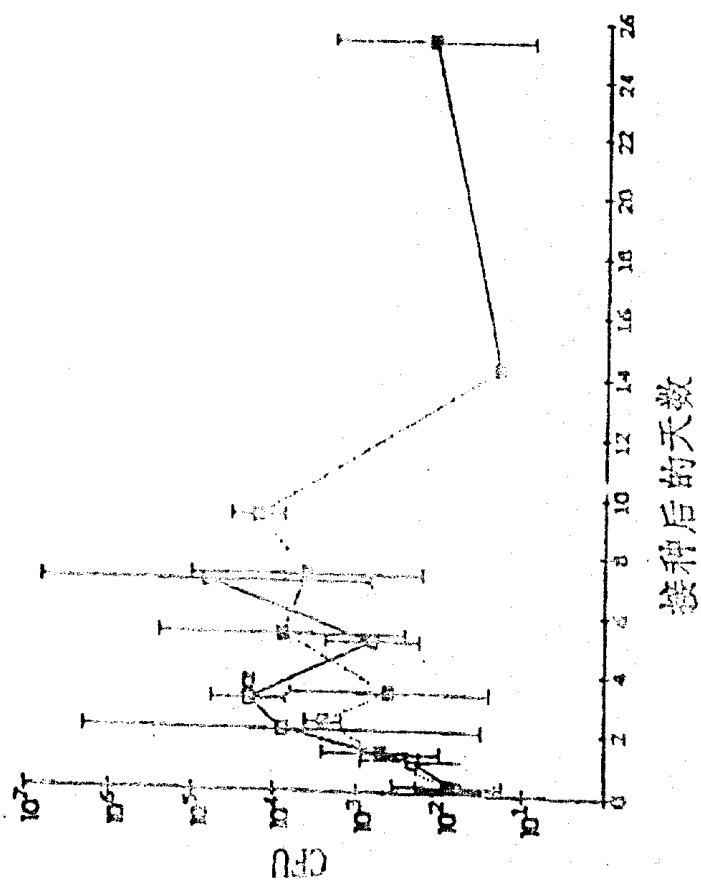


图 5A

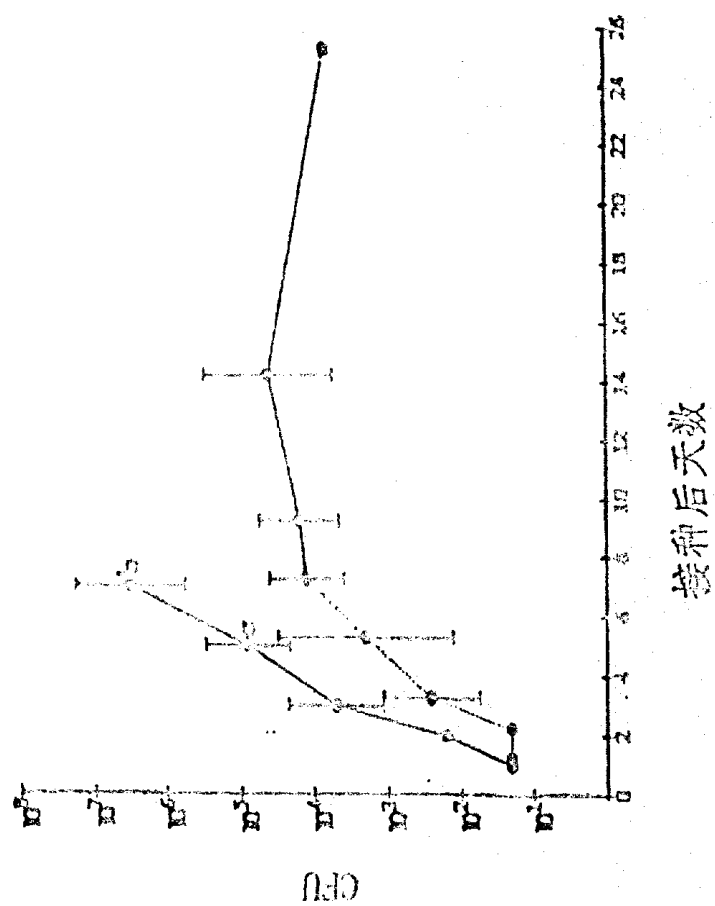


图 5 B

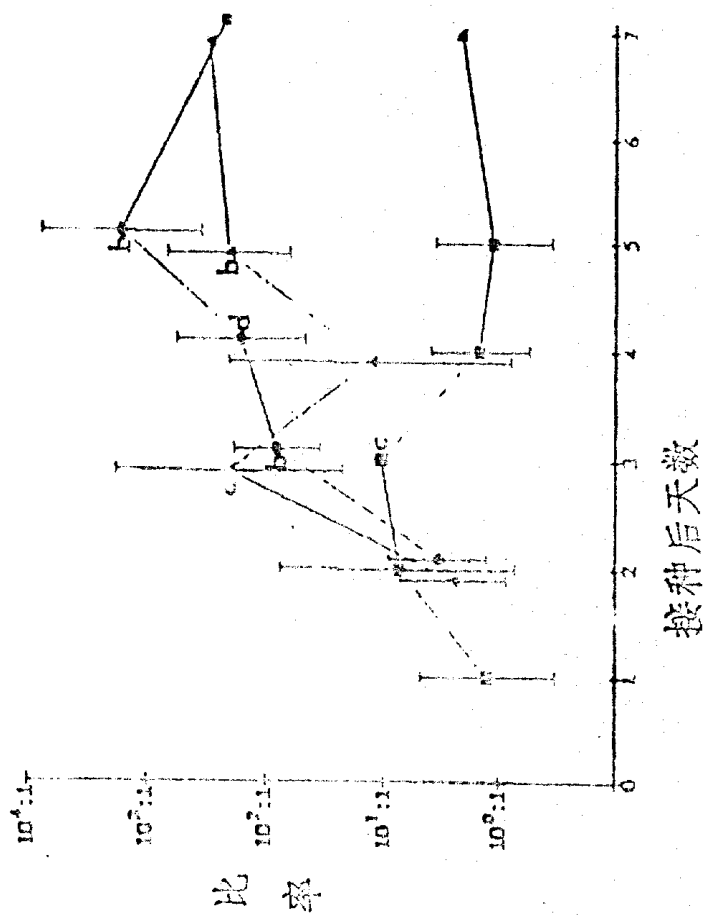


图 6

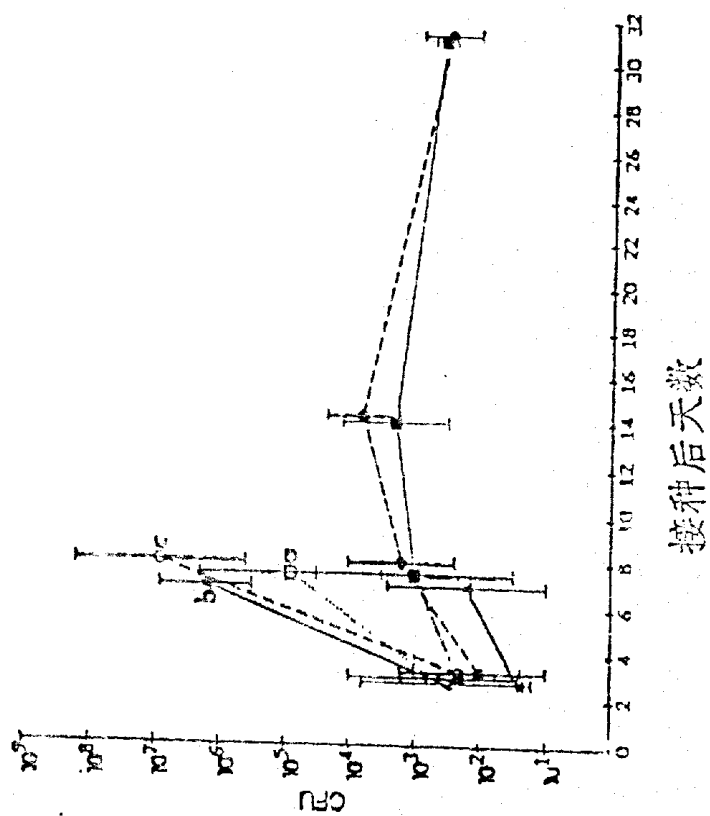


图 7