

·论 著·

效应蛋白在布鲁氏菌毒力和免疫保护性中的作用机制

吴海燕 丁洁蔚 杨朝晖 沈扬

[摘要] 目的 分析效应蛋白在布鲁氏菌毒力和免疫保护性中的作用机制。方法 以布鲁氏菌为模板,采用PCR扩增BspC基因,后进行测序,观察布鲁氏菌的基因组学、布鲁氏菌属细菌中BspC蛋白,以及BspC蛋白是否存在免疫原性,BspC蛋白的三维结构建模,BspC蛋白的克隆、表达、纯化,BspC蛋白的免疫胶体金实验。结果 B29基因组大小为3.3 Mb,GC%含量57.2%,有两条环状染色体,大小分别2126260 bp、1185609 bp,含有3 368个编码基因,64个RNAs。布鲁氏菌属存在于各个种之间,且相对保守,均显示为100%相似度,未出现突变。BspC蛋白的N段存在明显的信号肽特征,在第20、23和25位的氨基酸有较为显著的预测值,BspC蛋白N端1-23位氨基酸预测为胞内和跨膜区域,BspC蛋白为布鲁氏菌特有的蛋白。BspC蛋白并粗纯化后蛋白分子量<13.9 kD。显微镜下检测结果显示,细菌的细胞膜外周可出现黑褐色颗粒,且在细胞质中也显示颗粒。结论 重组蛋白BspC具有免疫反应原性;BspC可能在布鲁氏菌感染宿主过程中发挥免疫逃逸的作用。

[关键词] 效应蛋白; 布鲁氏菌; 毒力; 免疫保护

Mechanism of effector proteins in virulence and immunoprotection in Brucella WU Haiyan, DING Jiewei, YANG Chaohui, et al. Department of Infectious Diseases, Taizhou First People's Hospital, Taizhou 318020, China.

[Abstract] **Objective** To analyze the mechanisms of effector proteins in Brucella virulence and immunoprotection. **Methods** BspC gene was amplified by PCR using Brucella as template and sequenced to observe the genomics of Brucella, immunogenicity of BspC protein, 3D structure modeling of BspC protein, the cloning, expression, and purification of BspC protein, immunocolloidal gold experiments of BspC protein. **Results** The B29 genome is 3.3 Mb with 57.2% of GC% and two circular chromosomes which are 2126260 bp and 1185609 bp, containing 3368 coding genes and 64 RNAs. Brucella genus exist in every species, and relatively conserved, all show 100% identity, no mutation. The N segment of BspC protein has obvious signal peptide characteristics, with significant predictive values at amino acids 20, 23 and 25, amino acids 1-23 at the N terminus of BspC protein are predicted to be intracellular and transmembrane regions, and BspC protein is unique to Brucella. BspC protein and crude purified protein molecular weights were <13.9 kD. Microscopic detection results showed that black-brown granules could appear in the periphery of the cell membrane of the bacteria, and the granules could be displayed in the cytoplasm. **Conclusion** BspC is immunoreactive. BspC may play a role in immune escape during Brucella host infection.

[Key words] effector protein; Brucella; virulence; immune protection

布鲁氏菌病是由布鲁氏菌侵入患者机体,引起

DOI: 10.13558/j.cnki.issn1672-3686.2023.007.003

基金项目:浙江省医药卫生科技计划(2023KY398)

作者单位:318020 浙江台州,台州市第一人民医院感染科(吴海燕、杨朝晖、沈扬);浙江省台州医院老年医学科(丁洁蔚)

感染导致的人兽共患疾病,传播途径包括破损的皮肤黏膜、消化道、呼吸道^[1]。有关研究表明,具有复制能力的吞噬小体的生物合成需四型分泌系统(type IV secretion system, T4SS)对其进行协助, T4SS可分泌多种效应蛋白,对吞噬小体在胞内的运转进行调控,克服、逃避吞噬细胞的防御机制^[2,3]。基

于此,本次研究分析BspC效应蛋白在布鲁氏菌毒力和免疫保护性中的作用,为布鲁氏菌如何利用宿主分泌运输功能强化致病力提供新的机制性见解,以期后续布鲁氏菌病防治提供新的干预靶点和理论基础。

1 材料与方法

1.1 菌株、试剂、实验动物 本次研究起止时间为2021年1月至2022年9月,研究单位为台州市第一人民医院。羊布鲁氏菌、大肠杆菌由中国人民解放军疾病预防控制中心培育。兔抗羊IgG(由上海生工生物工程技术服务有限公司生产)、DAB底物显色试剂盒(由中杉金桥生化科技有限公司生产)、Western Blot封闭液(由生工生物工程股份有限公司生产)、大鼠[由莱岸科技(广州)有限公司培育]。

1.2 方法

1.2.1 布鲁氏菌的培养 将布鲁氏菌接种于培养基,37℃下培养2 d,取生长状态良好的单个菌落接种于布鲁氏菌液体培养基,培养1~2 d,80℃下金属浴灭活1 h,作为PCR扩增模板。

1.2.2 BspC蛋白的同源建模及结构域分析 参考B.abortus 2308菌株BspC蛋白的氨基酸序列(WP_002963960.1),并根据在线数据库ExPASy在线工具分析BspC蛋白的氨基酸组成成分、分子式、分子质量的理化性质。采用Signal IP和TMHMM在线工具预测BspC蛋白的信号肽、跨膜区域;后使用Motif Scan分析结构域,采用CDD数据库分析保守结构域。采用Signal IP 3.0 Server对信号肽进行预测,使用TMHMM Server v.2.0预测跨膜区,并由SWISS-MODEL的在线程序进行BspC蛋白的三维结构建模。

1.2.3 BspC蛋白的克隆、表达、纯化 自NCBI获取BspC基因的序列,将其全长蛋白构建至pET 28b载体,根据多克隆位点中的Bam HI、Xho I限制性酶切位点,将其分别转入表达载体进行体外重组,采用Hisrap柱子对大量的初提蛋白进行提纯,并使用Superdex 75层析柱进行凝胶层析纯化。

1.2.4 Western blot分析重组蛋白 采用SDS-PAGE对重组蛋白产物进行电泳,使用半干式电转印仪将凝胶上蛋白转印至NC膜,封闭处理1 h,使用TBST洗涤3次,每次10 min;加入1:200稀释的布鲁氏菌阳性血清,37℃下孵育1 h,使用TBST洗涤3次,每次10 min;加入1:500稀释的辣根过氧化物酶标记的兔抗羊,37℃下孵育1 h,使用TBST洗涤

3次,加入DAB进行显色处理,后采用去离子水终止反应。

1.2.5 布鲁氏菌细胞中BspC蛋白的定位观察 采用胶体金实验,2.5%戊二醛的磷酸缓冲液中加入羊布鲁氏菌B29细菌,4℃下静置2 h,采用磷酸缓冲盐溶液清洗3 min,加入一抗,4℃下孵育20 h,后在室温中孵育2 h,磷酸缓冲盐溶液清洗3 min,在金标记的第2抗体室温下孵育1 h;使用0.02 mol/L磷酸缓冲盐溶液清洗3 min,在0.02 mol/L磷酸缓冲盐溶液中固定1 h,使用双蒸水清洗15 min;采用乙醇进行脱水、包埋处理,进行切片,并使用枸橼酸铅进行染色,获取的免疫金胶体进行超微切片,采用清洁、无残留的胶体金颗粒集中在抗原抗体反应部位。

1.2.6 BspC突变株的构建 以羊布鲁氏菌B29的基因组DNA为模板,进行PCR扩增,获得BspC基因的上游片段和下游片段,以质粒pEC1为模板,使用抗红霉素基因引物,获取Em片段。经过相应的限制性内切酶消化,连接BspC基因上游片段,Em片段,BspC基因下游片段,后以连接产物为模板,使用BspC基因上游片段引物、下游片段引物,进行扩增,将获得后的产物连接穿梭质粒pBT2,构建BspC基因敲除质粒;使用BspC基因敲除质粒电转化羊布鲁氏菌B29菌株,获得修饰化的BspC基因敲除质粒;使用修饰化的BspC基因敲除质粒转化羊布鲁氏菌B29菌株。使用氯霉素和红霉素双抗性筛选后的克隆,将其接种至红霉素抗性液体培养基,放入30℃下进行培养,使BspC基因敲除质粒与羊布鲁氏菌B29基因组进行同源重组,并经过多次的传代,获取BspC基因敲除菌株。

2 结果

2.1 布鲁氏菌的基因组学研究结果见封二图1

由封二图1可见,全基因组二代测序图显示,羊布鲁氏菌B29基因组大小为3.3 Mb,GC%含量57.20%,有两条环状染色体,大小分别2126260 bp、1185609 bp,含有3 368个编码基因,64个RNAs;三代PacBio测序的完整基因组序列显示,BspC在各菌种之间的高度保守性。

2.2 布鲁氏菌属细菌中BspC蛋白表达 布鲁氏菌2308菌株BspC蛋白的氨基酸序列显示,其存在于布鲁氏菌属各个种之间,且相对保守,均显示为100%相似度,未出现突变。

2.3 BspC蛋白存在免疫原性见封二图2

由封二图2A可见,BspC蛋白的N段存在明显的信号肽特征,在第20、23和25位的氨基酸有较为显著的预测值;由封二图2B可见,BspC蛋白N端1-23位氨基酸预测为胞内和跨膜区域。

2.4 BspC蛋白的三维结构建模和BspC蛋白PCR扩增产物电泳图见封二图3

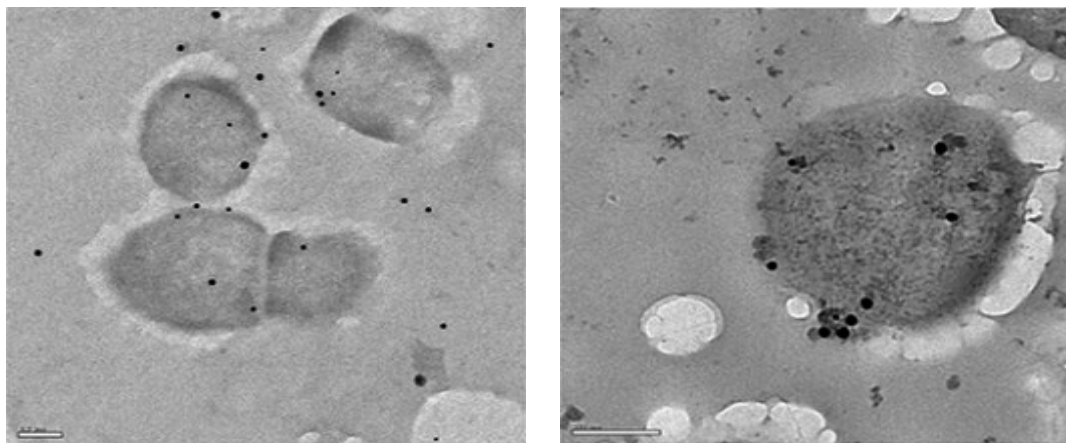
由封二图3A可见,BspC蛋白的三维结构模拟结果显示,BspC蛋白与已知蛋白具有较低的结构同

源性,表明该蛋白为布鲁氏菌特有的蛋白。由封二图3B可见,根据BspC基因序列,PCR产物电泳结果显示,与目的长度相符一致,为413 bp。

2.5 BspC蛋白的凝胶层析和SDS-PAGE分析见封二图4

由封二图4可见,BspC蛋白并粗纯化后蛋白分子量<13.9 kD;在洗脱体积70 ml处表达较高。

2.6 BspC蛋白的免疫胶体金实验见图1



注:A为细菌细胞膜外周BspC蛋白表现;B为细胞质BspC蛋白表现。

图1 BspC蛋白在羊布鲁氏菌 B29菌株表面的定位研究

由图1可见,细菌的细胞膜外周可出现黑褐色颗粒,且在细胞质中也显示颗粒。

3 讨论

布鲁氏菌为兼性的革兰氏阴性菌,毒力主要为胞内寄生,可通过布鲁氏菌泡防止降解,在患者胞体内复制、生存,但不会造成细胞的程序性死亡。T4SS可对DNA进行转运,并可转运蛋白质、核糖核蛋白复合物等大分子物质,与机体内其他分泌系统不同^[4]。研究显示,基因水平的转移,可受到T4SS的影响,T4SS可通过细菌间的结合作用,传递相关毒力基因、对抗性基因,使细菌的进化程度加快^[5]。

布鲁氏菌外膜结构的稳定性受到T4SS的影响,T4SS可对细胞内生存相关蛋白进行调节,增加布鲁氏菌对恶劣环境的适应、抵抗能力,使其在巨噬细胞内复制、生存,导致机体发生感染^[6]。效应蛋白可通过宿主的胞内运输作用,使布鲁氏菌通过高尔基体到达机体内质网,促进其在布鲁氏菌胞内的长期生存^[7]。本次研究显示,布鲁氏菌属存在于布鲁氏菌各个种之间,且相对保守,均显示为100%相似度,未出现突变。布鲁氏菌可调节机体内宿主细胞的信号通路,破坏细胞的吞噬机制,避免其融合溶酶体,且布鲁氏菌可利用胞内的转运机制,将生态

位建立于内质网,调节宿主的免疫反应,导致机体发生慢性感染^[8]。

研究显示,机体受到布鲁氏菌感染后,单核细胞、巨噬细胞可识别病原菌的入侵,促使其释放大促炎因子,导致机体内炎症反应的发生^[9]。炎症反应为机体内复杂的免疫调控过程,在抵抗布鲁氏菌感染中,作用较为重要。在布鲁氏菌感染初期,NLRP3炎症小体可抑制炎症反应,并抑制白介素-1 β (interleukin 1 β , IL-1 β)、白介素-18 (interleukin 18, IL-18)的表达,减少其他致炎因子的表达^[10]。有关研究表明,T4SS分泌蛋白可抑制白介素-1 (interleukin 1, IL-1)的释放。转化生长因子- β 1 (transforming growth factor β 1, TGF- β 1)表达水平在布鲁氏菌引起的肝脏病变中作用较为重要^[11]。TGF- β 1表达水平的增加可使T细胞、中性粒细胞、单核细胞、成纤维细胞向机体内损伤部位迁移,机体内TGF- β 1表达水平的升高可促进活化的单核细胞分泌TGF- β 、IL-1等细胞因子,使免疫球蛋白的合成受到抑制,导致机体的免疫应答受到抑制。

T4SS可使BspC蛋白分泌到布鲁氏菌表面,与保守的高尔基体寡聚复合体相互作用,对COG依赖性运输进行调节,使高尔基体的膜转运功能得到重

塑,并将高尔基体衍生囊泡定向到BCV,增加布鲁氏菌的增殖^[12]。研究表明,BspC基因缺失后,可降低细胞内布鲁氏菌的复制功能^[13,14]。本次研究显示,BspC蛋白为布鲁氏菌特有的蛋白。BspC蛋白并粗纯化后蛋白分子量<13.9 kD。显微镜下检测结果显示,细菌的细胞膜外周可出现黑褐色颗粒,且在细胞质中可显示颗粒,表明布鲁氏菌的分泌途径可受到效应蛋白协同作用的调节,使布鲁氏菌病的发展加快,促进疾病的发展。BspC蛋白可被羊布鲁氏菌阳性血清识别,具有良好的抗原性,为临床关于布鲁氏菌的致病机制研究奠定基础。

综上所述,BspC蛋白是一个布鲁氏菌菌体表面蛋白,具有较强的免疫学活性,能诱导机体产生高效价的特异性抗体,逃避巨噬细胞的杀伤,保护自身的生存,为临床布鲁氏菌胞内的寄生免疫逃逸提供理论依据。但BspC确切的免疫学机制尚需要进一步明确,其自身的表达调控亦需要进一步明确,对其深入研究可为多种认知障碍疾病的防治提供新的靶点与思路。

参考文献

- 1 Dadar M, Tiwari R, Sharun K, et al. Importance of brucellosis control programs of livestock on the improvement of one health[J]. Vet Q, 2021, 41(1): 137-151.
- 2 Miller CN, Smith EP, Cundiff JA, et al. A brucella type IV effector targets the COG tethering complex to remodel host secretory traffic and promote intracellular replication[J]. Cell Host Microbe, 2017, 22(3): 317-329.e7.
- 3 Byndloss MX, Tsai AY, Walker GT, et al. Brucella abortus infection of placental trophoblasts triggers endoplasmic reticulum stress-mediated cell death and fetal loss via type IV secretion system-dependent activation of CHOP[J]. mBio, 2019, 10(4): 18-19.
- 4 Piao D, Wang H, Di D, et al. MLVA and LPS characteristics of brucella canis isolated from humans and dogs in Zhejiang, China[J]. Front Vet Sci, 2017, 4(1): 223.
- 5 罗波艳, 聂守民, 范锁平, 等. 陕西省咸阳市淳化县宣传干预前后农民养殖户布鲁氏菌病防控知识知晓情况调查[J]. 中华地方病学杂志, 2022, 41(3): 233-238.
- 6 王城, 马臻. ⁹⁹Tcm-MDP SPECT/CT诊断布鲁氏菌病脊柱炎[J]. 中国医学影像技术, 2022, 38(3): 431-434.
- 7 董棒, 李涛, 张海宁, 等. 山东省枣庄市71例急性期布鲁氏菌病患者临床特征分析[J]. 中华地方病学杂志, 2022, 41(1): 71-74.
- 8 张鹏葛, 王一瑞, 宋玉霞, 等. 分析中药治疗布鲁氏菌病的作用机制[J]. 中国药事, 2022, 36(3): 330-340.
- 9 张凡, 徐杰, 李刚, 等. 哈萨克羊iNOS基因多态性与布鲁氏菌病的相关性分析[J]. 中国畜牧兽医, 2021, 48(3): 1102-1111.
- 10 秦玉明, 冯宇, 蒋卉, 等. 动物布鲁氏菌病活疫苗生产环节生物安全风险分析与对策[J]. 中国兽药杂志, 2021, 55(6): 67-72.
- 11 杨文涛, 张建中, 吴翠萍, 等. 布鲁氏菌病患者尿液差异蛋白质组学分析[J]. 中国人兽共患病学报, 2021, 37(7): 593-602.
- 12 景添, 王天星, 陈曦, 等. 羊布鲁氏菌病及其国内外防控净化措施[J]. 动物医学进展, 2022, 43(2): 116-120.
- 13 蒋卉, 冯宇, 秦玉明, 等. 布鲁氏菌病微量补体结合试验的方法改进和应用[J]. 中国农业科学, 2022, 55(8): 1676-1684.
- 14 罗波艳, 聂守民, 范锁平, 等. 2016-2020年陕西省榆林市人间布鲁氏菌病流行特征与时空聚集性[J]. 中国人兽共患病学报, 2022, 38(2): 122-127.

(收稿日期 2023-01-05)

(本文编辑 高金莲)