

蛋白质组学在布鲁氏菌病研究中的应用

顾超慧¹, 崔步云², 关平原¹

摘要: 布鲁氏菌病是威胁人类健康和畜牧业发展的重要的传染病,同时也是一种生物武器,是世界性的公共卫生问题。以双向凝胶电泳、生物质谱及生物信息学为主要技术支撑的蛋白质组学研究技术的完善进步,蛋白质组学研究将不断深入发展。近年来,蛋白质组学研究技术已应用到布鲁氏菌病研究领域中,在医学研究领域不仅能为阐明布鲁氏菌活动规律提供理论基础,也能为探讨布鲁氏菌病的致病机理、疾病诊断、疾病防治和新型疫苗的研制等提供重要的理论依据和实际解决途径,从而为布鲁氏菌病的研究做出重大贡献。

关键词: 布鲁氏菌; 蛋白质组学; 应用

中图分类号: R516.7

文献标识码: A

文章编号: 1003-9961(2009)05-0373-06

Application of proteomes in the research of brucellosis GU Chao-hui^{*}, CUI Bu-yun, GUAN Ping-yuan.^{*} Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot 010018, China

Corresponding author: CUI Bu-yun, Email: cuibuyun@icdc.cn

Abstract: Brucellosis is an important infectious disease which threatens human health and the development of animal husbandry, as well as a kind of biological weapon, which should be regarded as a worldwide public health problem. With the development of the research techniques of proteomics, which is technically supported by two dimensional gel electrophoresis, biological mass spectrogram, and bioinformatics, the research of proteome will further develop into a higher level. Recently, the proteomics research technique has been applied in the field of brucellosis study. This technique will not only establish theoretical basis for the study of regular pattern of brucella activity, but also provide important practical directions for the study on brucella's pathogenesis, diagnosis, disease control and vaccine development, which greatly contribute to the research of brucellosis.

Key words: brucella; proteomics; application

布鲁氏菌病(布病)是《中华人民共和国传染病防治法》37种传染病中的乙类传染病^[1]。而且无论从其流行地域广泛性和受威胁人群数量之多,还是从其危害程度严重性和多方位性,布病都堪称为世界性的传染病^[2]。

1 布鲁氏菌

布鲁氏菌有6个种(Species),19个生物型^[3],包括羊种布鲁氏菌(*Brucella melitensis*)3个生物型,牛种布鲁氏菌(*Brucella abortus*)8个生物型,猪种布鲁氏菌(*Brucella suis*)5个生物型,沙林鼠种布鲁氏菌(*Brucella neotomae*),绵羊附睾种布鲁氏菌(*Brucella*

ovis)和犬种布鲁氏菌(*Brucella canis*)各有1个生物型。

2 蛋白质组学概念与内容

蛋白质组(Proteome)一词源于protein与Genome的杂合,是由澳大利亚Macquarie大学的Williams和Wilkins于1994年在意大利Siena举行的第一届国际双向电泳会议上首次提出的。蛋白质组指的是一个细胞或组织表达的所有蛋白质。研究细胞内全部蛋白质的组成及其活动规律的新兴学科则被称之为蛋白质组学(Proteomics)^[4]。蛋白质组学的研究可以追溯到30多年前,由O'Farrell^[5]于1975年建立的双向电泳技术(two-dimensional electrophoresis, 2-DE),使蛋白质分辨达到成千上万种,完全可以用于组织与细胞中大规模蛋白质的分离;20世纪80年代固相化PH梯度凝胶的引进,使得双向电泳的重复性和加样量得到巨大的改善,推进了今天的蛋白质组研究得以实施^[6]。近年来开发的多种分析系统与大规模的数据处理软件的问世,使科研工作者处理复杂的蛋白质图谱并建立相应的数据库得心应手。80年代末期出现

基金项目:863课题:布鲁氏菌快速诊断技术标志性抗原研究(No. 2007AA02Z410)

作者单位:1. 内蒙古农业大学, 内蒙古 呼和浩特 010018; 2. 中国疾病预防控制中心传染病预防控制所

作者简介:顾超慧,女,内蒙古呼和浩特市人,硕士研究生,主要从事布鲁氏菌蛋白质组学研究

通信作者:崔步云,Email: cuibuyun@icdc.cn

收稿日期:2009-01-08

的基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(matrix assisted laser desorption ionization time of flight massspectrometry, MALDI-TOF-MS)^[7]与电喷雾电离质谱(electro-spray ionization mass spectrometry, ESI-MS)^[8]可以高效、精确地测量生物大分子的质量并测定部分序列,进而用于数据库检索。Mann 等^[9]则在此基础上通过建立“肽质量指纹图谱与肽序列标签”等技术,使准确、快速、自动化,大规模鉴定蛋白质的质谱技术得到飞跃。

蛋白质组学的特点是采用高分辨率的蛋白质分离手段结合高通量的蛋白质鉴定分析技术,全景式地研究在各种特定情况下的蛋白质表达谱。蛋白质组学研究主要涉及 3 个方面内容:①组成性蛋白质组学:对某个体系的蛋白质进行鉴定并详细阐述其翻译后修饰的特性;②差异显示蛋白质组学,即比较蛋白质组学:以重要生命过程或重大疾病为对象,进行生理和病理过程的蛋白质表达的比较;③相互作用蛋白质组学:通过多种先进技术研究蛋白质之间的相互作用,绘制某个体系的蛋白质作用的网络图谱^[10]。

3 蛋白质组学在布鲁氏菌研究中的应用

利用蛋白质组学研究病原细菌的优点^[11]:首先病原细菌基因组编码蛋白质的数量一般在一千至数千种,与蛋白质组分析中 2D 电泳近 2000 点的分辨率非常匹配,分辨效果好。其次百种以上的模式菌序列被测出,加之细菌编码基因中没有内含子,利于搜库和准确定位相关基因。而且易于大量获得一致性标本,实验结果可信。因此,通过对致病性不同的病原微生物菌株及致病菌株与非致病菌株的比较蛋白质组学研究,可发现和鉴定与毒力相关因子、抗生素与化学制剂的抗性,以及菌株分型相关的分子标志,从而解析其致病机制,同时发现的致病菌株中特异的基因和蛋白质,还有可能成为新型治疗方法或诊断方法上有潜力的靶标,对制药工业具有非常高的应用价值。

布鲁氏菌菌株 *B. melitensis* 16M、*B. suis* 1330、*B. abortus* 2308、*B. ovis* 全基因组测序相继完成,使很多新的高通量研究方法在布鲁氏菌的应用成为可能,也为布鲁氏菌蛋白组学研究提供了珍贵的背景资料。2-DE、MALDI-TOF-MS 技术的完善与生物信息学的结合为蛋白组学的研究提供了高通量快速蛋白鉴定技术平台。布鲁氏菌蛋白质组学的中心任务是要阐明基因组所表达的真正执行生命活

动的全部蛋白质的表达规律和生物学功能。蛋白质的功能、蛋白质间的相互作用、布鲁氏菌生命活动相关的蛋白质的鉴定等都是目前布鲁氏菌研究的热点。蛋白组学在布鲁氏菌的应用主要是致病机制、新型疫苗、代谢通路方面。布鲁氏菌蛋白质组的研究工作始于 20 世纪 70 年代末期。采用 1-DE-SDS-PFGE 及免疫痕迹试验等研究布鲁氏菌蛋白,证明了不同种型布鲁氏菌蛋白具有一定的特异性,强毒菌与弱毒菌蛋白既有相似又有区别。采用 2-DE-SDS-PFGE 镀银染色技术及 Western blot 等方法对不同种布鲁氏菌蛋白进行探索。共检测包括 *B. melitensis* 菌 34 种、*B. abortus* 菌 7 种和 *B. suis* 菌 13 种的共计 54 种蛋白质。美国 Vito G. Delvecchio 研究小组在完成羊种布鲁氏菌强毒株 16M 蛋白质图谱的基础上^[12],比较了牛种布鲁氏菌强毒株 S2308 和 16M 的差别^[13]以及对强毒羊种布鲁氏菌 16M 与疫苗株 Rev. 1^[14]进行鉴定,表明了二者蛋白的差别,这两个菌株在铁代谢、糖结合、脂代谢及蛋白合成等均有一定区别。Rev-1 菌株参与菌铁蛋白、铁调节 OMP 和 FRPB、铁结合周质蛋白前体、糖结合蛋白、D-核糖结合周质蛋白前体、烯-CoA 水合酶、酰基-CoA 脱氢酶、总 L-氨基酸结合周质蛋白 Aap J 前体、侧链氨基酸 ABC 转运蛋白、周质氨基酸结合蛋白、甘氨酸及三甲胺乙内酯/ α -脯氨酸结合蛋白 Prox、LeuI、Ile、Va-结合蛋白前体、Leu、Ile、Val、Thr 和 Ala 结合蛋白前体的各种代谢水平中各种表达蛋白质,与 16M 菌相比有所提高;Rev-1 参与含铁的 auguibactin 蛋白、D-半乳糖结合周质蛋白前体、D-核糖结合周质蛋白前体的代谢水平中表达蛋白,与 16M 相比有所降低。更进一步了解了弱毒菌株在代谢途径上的关键区别。

3.1 致病机制 基于全基因组的比较基因组杂交及蛋白质组技术大大促进了毒力基因的寻找和致病机制的阐述,相信这些高通量技术与传统分子生物学方法的有机结合,必将加速布鲁氏菌的致病机制,特别是胞内存活机制的研究^[15]。

布鲁氏菌主要感染巨噬细胞和胎盘滋养层细胞布鲁氏菌在这些细胞中表现出很强的生存和复制能力。布鲁氏菌基因组学的研究表明布鲁氏菌缺乏典型的毒力因子,胞内存活和复制是其主要的毒力特征,因此了解布鲁氏菌在巨噬细胞内的生存特征及其生存微环境是理解布鲁氏菌致病性的关键。布鲁氏菌强毒株在体内存活复制主要是通过以下策略:(1)抑制吞噬体(phagosome)的成熟,使

吞噬了布鲁氏菌的巨噬细胞不能与溶酶体正常融合,从而产生一个具有内吞体性质而非溶酶体性质的有益于细菌在细胞内生存的空间。(2)抑制巨噬细胞凋亡。(3)可充分利用宿主吞噬细胞内的解毒和修复机制。其中在布鲁氏菌感染早期抑制吞噬体成熟被认为是布鲁氏菌逃避宿主细胞吞噬的重要原因,可见在细菌感染过程中,宿主和病原体的早期相互作用具有非常重要的意义,这种相互作用直接决定感染的结果——要么病原体被宿主的防御体系清除,要么病原体在宿主内存活复制而导致宿主感染。

高永辉等^[16]用双向电泳和质谱技术对 THP-1 单核细胞受毒力不同的布氏杆菌株侵袭后的全细胞蛋白谱进行差异比较和分析,共发现了 38 个差异表达的蛋白质点,对应 38 个蛋白质编码基因。发现这些差异表达的蛋白主要集中在结构蛋白,信号传导途径和物质代谢等领域。布鲁氏菌强毒株侵入宿主巨噬细胞后,通过中度募集胞内的肌动蛋白丝而在吞噬体内扩散进而到达内质网,而一些突变株却不能在宿主细胞内弥散而是被早期溶酶体融合而被杀灭。可见,肌动蛋白丝被募集是布鲁氏菌强毒株抑制吞噬体成熟的关键过程之一。

布鲁氏菌的外膜由外膜蛋白(OMP)和脂多糖(LPS)组成。大量研究表明,布鲁氏菌拥有非典型的脂多糖,该脂多糖对布鲁氏菌的毒力有决定性作用,自然分离毒株缺失脂多糖会降低它在宿主的存活能力^[17]。此外,Cu/Zn 过氧化物歧化酶(SOD)、毒力基因 *virB*、热休克蛋白和 BvrR/BvrS 系统等都与细菌对宿主的致病性密切相关。

布鲁氏菌毒力相关调控(BvrS)和感觉(BvrR)蛋白组成布鲁氏菌二组分调节系统,大量研究表明 BvrR/BvrS 与细菌毒力有关,可以改变外膜的通透性,*bvrR* 或 *bvrS* 基因缺失后细菌进入非吞噬细胞的能力和在细胞内的毒力和运输能力都下降。国外学者 Lamontagne 和 Butler^[18] 研究认为缺失改变了细菌包膜蛋白的表达,出现毒力明显下降的表型,这个调节系统涉及细菌的细胞包膜和新陈代谢。Manterola 等^[19] 的研究更进一步证实 BvrR/BvrS 调节系统控制第 3 组外膜蛋白 OMP3a(OMP25)的表达,缺失 OMP3a 和 OMP3b 后细菌毒力减弱,但不是流产布鲁氏菌的主要毒力基因。

最近,在布鲁氏菌中发现的由 *virB* 操纵子编码的 IV 型分泌系统与细菌的胞内运输密切相关。*virB* 是布鲁氏菌毒力基因,与其在宿主细胞内生产和复

制有关。IV 型分泌系统是一个含有 12 个可跨越细菌被膜的多蛋白复合物家族,分别为 *virB1-12*,由同一启动子调控。布鲁氏菌的 *virB1* 和 *virB10* 极性突变株丧失了在小鼠中复制的能力,而且这些突变体还可被吞噬溶酶体破坏^[20]。根据已有的实验数据推测,布鲁氏菌的 IV 型分泌系统在细菌刚开始进入细胞时并不发挥作用,而是主要调控布鲁氏菌从吞噬体样部位到内质网的胞内运输过程^[21]。已有的文献报道表明,IV 型分泌系统主要是通过分泌各种效应分子来克服和逃避巨噬细胞的各种防御机制,但是具体分泌了哪些效应分子,它们又是如何在体内发挥作用的目前尚不清楚^[20]。由 *virB* 区段编码的毒力基因是 IV 型分泌系统的重要成分,*virB5* 和 *virB8* 引发吞噬细胞产生酸性吞噬空泡,主要调节布鲁氏菌的吞噬作用和细胞内的运输。*virB3*、*virB6*、*virB7* 和 *virB10* 蛋白是细菌跨膜蛋白的传送信号,*virB4* 和 *virB11* 蛋白与 *virB4* 蛋白偶联 ATP 酶从表面跨膜进入细胞质,*virB2* 和 *virB5* 蛋白可能是细菌表面菌毛结构蛋白,*virB8* 在 IV 型分泌系统中起主要作用,主要是与 *virB9* 和 *virB10* 在细胞膜上形成群体。

3.2 代谢通路

3.2.1 糖代谢及相关蛋白 糖是细菌重要的碳源,也是细菌其他复杂成分(如脂多糖)的前体。细菌在巨噬细胞中面临的生存问题之一是缺少营养。麦芽糖、核糖、阿拉伯糖、半乳糖、葡萄糖、甘油、赤藓醇、肌醇降解通路对于布鲁氏菌的胞内生存是很重要的^[22]。

布鲁氏菌疫苗株 M5 中一些糖结合蛋白的表达较 16M 发生下调^[23],例如丙三醇-3-磷酸结合胞质蛋白前体(glycerol-3-phosphate-binding periplasmic protein precursor)和糖结合蛋白(sugar-binding protein)。尽管存在这些蛋白差异,布鲁氏菌疫苗株 M5 与强毒株 16M 还是具有相似的生物学特性(细菌生物分型试验可证明)。一些能量代谢的酶 glycerol trinitrate reductase 表达上升,而 3-methyl-2-oxobutanoate dehydrogenase, 4-hydroxybutyrate-dehydrogenase 和 3-hydroxybutyrate-dehydrogenase 表达下降^[24],这些与 Rev-1 不同。

转醛醇酶(Putative transaldolase)在布鲁氏菌强毒株 16M 中有高通量表达,它参与磷酸戊糖循环(Pentose phosphate cycle, PPC)。因为布鲁氏菌缺乏磷酸果糖激酶^[25],磷酸戊糖循环通路对于布鲁氏菌的糖降解就显得特别重要,该通路也为核酸合成提供

核糖,据报道,能重新合成嘌呤和嘧啶的能力对于布鲁菌细胞内复制是非常重要的。

3.2.2 氨基酸代谢及相关蛋白 胞质结合蛋白(ABC cobalt transporter, periplasmic binding protein)在布鲁氏菌强毒株 16M 中有高通量表达,它与钴的转运有关。钴是很多酶的必须成分,当细胞需要时必须转运到细胞内。金属离子在细菌毒力方面至少发挥两个主要功能:细菌的信号分子和各种酶的辅助因子。细菌必须严格调控金属离子的水平。镁、锌、铁离子转运基因参与了毒力作用,表明这些离子对于布鲁菌内环境稳定是必需的。

支链 α -酮酸脱氢酶(E2, branched-chain alpha-keto acid dehydrogenase subunit)、二氢硫辛酰胺脱氢酶(E3, dihydrolipoamide dehydrogenase)在布鲁氏菌强毒株 16M 中均有高通量表达。支链 α -酮酸脱氢酶 BCKAD 复合体是由 α -酮酸脱羧酶(E1)、二氢硫辛酰胺酰基转移酶(E2)和二氢硫辛酰胺还原酶(E3)组成,它能催化支链 α -酮酸氧化脱羧生成支链 α -脂酰辅酶 A 衍生物和 NADH,是支链氨基酸代谢的限速酶。

镍结合周前体蛋白(Nickel-binding periplasmic protein precursor),在 Rev-1 中表达下降而在 M5 表达升高。*Nik* 基因是与尿素酶代谢及镍转运系统有关的基因,其敲除导致镍金属酶-尿素酶活性的丧失。试验发现 *Nik* 基因突变体和野生株 *B. suis* 在人单核细胞内生长相似,说明此基因与感染关系不明显。它的作用也许是:面对体内环境压力,运输镍保持酶的活性以利于细菌生长^[26]。法国 Jean-pierre liautard 研究小组采用绿色荧光蛋白作为报告基因对猪种布鲁氏菌(*B. suis*)的 *Nik* 基因簇进行了深入的研究,发现其在巨噬细胞中诱导表达^[27];在体外低氧、金属离子缺乏时激活,镍过量时抑制。

3.2.3 抗损伤与应激 布鲁氏菌强毒株躲避宿主细胞杀灭的重要策略是不影响宿主细胞的功能,不导致细胞明显的损伤。感染布鲁氏菌后宿主细胞发生氧化应激反应,导致细胞内许多生物大分子(蛋白质、核酸等)的结构和功能发生损伤。为了维持蛋白质、核酸等大分子的正常结构、功能和细胞的生理功能,ER60 protease, ERp28 等修复蛋白错误折叠的分子表达升高,热休克蛋白等分子伴侣表达上调,以恢复变性蛋白的功能。

Dps 蛋白(DNA protection during starvation)在布鲁氏菌强毒株 16M 中有高通量表达。它是原核生物中特有的一类具有铁离子结合和抗氧化损伤功

能的重要蛋白^[28]。当细菌处于氧化应激或者营养应激的状态,Dps 就会得到高通量表达。有报道说 Dps 是核样 DNA 结合蛋白,在体外适宜条件下(如葡萄糖缺乏或细菌生长停滞期)能够发生寡聚化,它的主要作用是在细菌生长停滞期应激条件下,保护细菌 DNA。它是一种非特异的 DNA 结合蛋白,结构与铁蛋白非常相似,SCOP 数据库基于这种结构的同源性,把两者划分为同一个超家族^[29]。虽然 Dps 蛋白是 DNA 结合蛋白,但是迄今为止还没有发现它的蛋白结合域,它与蛋白的结合机制也还不清楚。

乙醛还原酶Ⅲ(Class III alcohol dehydrogenase, ADH III)在布鲁氏菌强毒株 16M 中有高通量表达,它由两个 c 亚基组成,ADH5 基因编码,在目前所检测的所有组织中均有表达。它有很强的代谢长链醇类的能力,不过氧化乙醇的能力很有限。乙醛还原酶Ⅲ与甲醛脱氢酶(formaldehyde dehydrogenase)存在氨基酸序列同源性、结构相似性及动力学特点,说明了这两者是同工酶。乙醛还原酶Ⅲ在人体甲醛的代谢中发挥着很重要的作用。很多细菌都存在乙醛还原酶Ⅲ,例如球形红细菌(*Rhodobacter sphaeroides*)和脱氮副球菌(*Paracoccus denitrificans*),这两种菌都是兼性的甲基营养菌,能防御甲醛的毒性损伤。

3.3 新型疫苗 目前,蛋白质组学在致病微生物的诊断用蛋白的寻找方面,由蛋白质组学得来的诊断标记作为候选疫苗的靶位。在人群中采用菌苗预防和控制布病,中国是世界上仅有的少数国家之一。目前使用的 104M 菌苗,毒力低、稳定和免疫原性好。采用皮上划痕免疫人群,保护力约为 90%,保护期为 1 年。但是,弱毒、活菌苗有不容忽视的缺点:弱毒活菌苗有一定的不稳定性,时而出现因接种菌苗而感染。②菌苗进入机体后引起的免疫反应与自然感染相似,造成诊断的困难。③反复接种后引起强烈过敏病理损伤。基于这些原因有人不主张在人群中用菌苗免疫。仅在必要时对少数高危人群应用,且不能连年连续接种。现在中国免疫家畜使用的是弱毒活菌苗有 3 种,S2 是猪种菌疫苗,免疫方式是饮水免疫;M5 和 S19 是羊种菌疫苗,对牛、羊、鹿有较好的免疫力,对猪无效,可皮下、口服多途径接种。目前普遍认为,布鲁氏菌苗在预防和控制布病中是一项非常重要的措施,在畜间尤为重要。但是现用的菌苗有使孕畜流产和难以与感染鉴别的许多不足之处,对布病防治工作有一定

影响^[1]。

利用蛋白质组学技术鉴定蛋白质的高通量性与免疫学技术鉴定免疫原的可靠性有机结合起来,已广泛用于宿主对病原菌的体液和细胞免疫应答研究中,通过细菌的蛋白质与多克隆血清的杂交,寻找新的抗原决定因子,用于布鲁氏菌新型疫苗研究,可以去除上述疫苗的缺点。

有报道,外膜蛋白(OMP)除了维持细菌细胞膜的完整性外,还是布鲁氏菌表面主要的抗原。目前为止,布鲁氏菌表面的主要外膜蛋白(OMP)有 7 种已被发现,根据分子质量大小将它们分为 10, 16.5, 19, 25 ~ 27, 31, 34, 36 ~ 38 和 89 kU, 其中 25 ~ 27, 31 ~ 34, 36 ~ 38 kU 是菌体表面最主要的外膜蛋白, 25 ~ 27 kU 和 36 ~ 38 kU 主要存在 *B. abortus* 细胞表面, 31 ~ 34 kU 在 *B. abortus* 细胞表面存在较少, 但却是 *B. meliitensis* 和 *B. suis* 细胞表面主要的 OMPs。其中 36 ~ 38 kU 称为 2 组蛋白, 是一种外膜的孔蛋白; 25 ~ 27 kU 和 31 ~ 34 kU 称为 3 组蛋白, 2 组蛋白和 3 组蛋白以共价键的形式与细胞外膜的肽聚糖(peptidoglycan, PG)层紧密结合^[30]。两种天然粗糙型布鲁氏菌(*B. ovis* 和 *B. canis*)表面缺少 O 链, 所以主要 OMPs 在其表面能被暴露, 并发挥着重要的免疫作用。

研究发现,外膜蛋白 Omp25 在布鲁氏菌强毒株 16M 中有高通量表达。布鲁氏菌侵入巨噬细胞后,其表面 Omp25 的表达抑制巨噬细胞 TNF- α 的产生^[31]。IFN- γ 既是细胞因子,也是免疫调节因子之一,能直接杀伤布鲁氏菌,还能激活巨噬细胞的吞噬作用,而这种作用可以在巨噬细胞和 NK 细胞分泌的 TNF- α 的作用下达到最强。布鲁氏菌 Omp25 很有可能与位于巨噬细胞的受体作用,通过对 TNF- α 分泌途径的特异性修改,进行负调节,然而目前对这种受体和机制并不清楚。Omp25 还能调节对抗巨噬细胞的细菌蛋白的释放。有研究表明,删除 Omp25 基因可能影响布鲁氏菌的毒力^[32],可能作为有效的疫苗的候选抗原因子。

外膜蛋白 Omp31 前体(31 kDa outer-membrane immunogenic protein precursor),在布鲁氏菌疫苗株 M5 中有高通量表达。Omp31 具有良好的免疫原性,是目前免疫保护性分子的研究热点^[19],近年来已有很多研究用重组 Omp31 制备布鲁氏菌 DNA 疫苗。

Connolly 等^[33]对 *B. abortus* 的外膜蛋白(Omps)做了细致的研究。通过 2-DE、MALDI-TOF-MS、LC-

MS/MS 共鉴定了 163 个蛋白。同时联合 Western-blotting 技术,对这 163 个蛋白进行了深入的研究,发现了一些免疫原,在验证了传统的 6 个免疫蛋白,即 60 kD chaperonin GroEL, 10 KD chaperonin GroES, OMP25, Omp2b porin, OMP31b 和 periplasmic immunogenic protein; 又寻找了 4 个新的免疫蛋白,包括 fumarate reductase flavoprotein subunit, cysteine synthase A, 22 kD OMP 和 peptidase S24 family。新的免疫蛋白可能作为新型、安全有效的疫苗的免疫靶标。

现正在对 6 个种布鲁氏菌的可溶性蛋白和膜蛋白进行鉴定,以了解他们的宿主亲和性和毒力。牛种布鲁氏菌致弱 virB 变异株的相关蛋白已经得到测定,这对发展疫苗很有帮助。

参考文献

- [1] Cui BY. The epidemic situation surveillance and control of brucella in China [J]. *Disease Surveillance*, 2007, 22(10): 649 - 651. (in Chinese)
崔步云. 中国布鲁氏菌病疫情监测与控制 [J]. 疾病监测, 2007, 22(10): 649 - 651.
- [2] Shang DQ. Brucellosis infection and immune recent research [J]. *Chinese Journal of Control of Endemic Disenaces*, 2003, 18(2): 90 - 92. (in Chinese)
尚德秋. 布鲁氏菌病感染与免疫研究近况 [J]. 中国地方病防治杂志, 2003, 18(2): 90 - 92.
- [3] Shang DQ. The development of brucellosis [J]. *Chinese Journal of Control of Endemic Disenaces*, 2004, 19(4): 204 - 212. (in Chinese)
尚德秋. 布鲁氏菌病研究进展 [J]. 中国地方病防治杂志, 2004, 19(4): 204 - 212.
- [4] Li BL. Functional proteomics [J]. *Life Chemistry*, 1998, 18(6): 1 - 4. (in Chinese)
李伯良. 功能蛋白质组学 [J]. 生命化学, 1998, 18(6): 1 - 4.
- [5] O' Farrell PH. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins [J]. *J Biol Chem*, 1975, 250: 4007 - 4201.
- [6] Bjellqvist B, Ek K, Righetti PG, et al. Isoelectric focusing in immobilized pH gradient: principle, methodology and some applications [J]. *J Biochem Biophys Methods*, 1982, 6: 317 - 339.
- [7] Karas M, Hillenkamp F. Laser desorption ionization of proteins with molecular mass exceeding 10 000 daltons [J]. *Anal Chem*, 1988, 60: 2299 - 2301.
- [8] Fenn JB, Mann M, Meng CK, et al. Electro-spray ionization for mass spectrometry of large biomolecules [J]. *Science*, 1989, 246: 64 - 71.
- [9] Mann M, Hojrup P, Roepstorff P. Use of mass spectrometric molecular weight information to identify proteins in sequence databases [J]. *Biol Mass Spectrometry*, 1993, 22: 238 - 245.
- [10] Pandey A, Mann M. Proteomics to study genes and genomes [J]. *Nature*, 2000, 405 (6788): 837 - 846.

- [11] Zhang JZ. Comparative proteome analysis in the study of pathogenic bacteria [J]. *Chinese Journal of Zoonoses*, 2004, 20(9):96-97. (in Chinese)
张建中. 比较蛋白质组分析在病原细菌研究中的应用 [J]. 中国人畜共患病杂志, 2004, 20(9):96-97.
- [12] Wagner MA, Eschenbrenner M, Del Vecchio VG, et al. Global analysis of the proteome: identification of proteins expressed in laboratory-grown culture [J]. *Proteomics*, 2002, 2: 1047-1060.
- [13] Eschenbrenner M, Horn TA, Wagner MA, et al. Comparative proteome analysis of laboratory grown *Brucella abortus* 2308 and *Brucella melitensis* 16M [J]. *Proteome Res*, 2006, 5(7):1731-1740.
- [14] Eschenbrenner M, Wagner MA, Horn TA, et al. Comparative proteome analysis of *Brucella melitensis* vaccine strain Rev1 and a virulent strain 16M [J]. *J Bacteriol*, 2002, 184(18):4926-4970.
- [15] Zhao ZP, Wang XL. Brucellosis research progress in immune molecules [J]. *Progress in Veterinary Medicine*, 2006, 4: 31-33. (in Chinese)
赵忠鹏, 王希良. 布鲁氏菌免疫分子研究进展 [J]. 动物医学进展, 2006, 4: 31-33.
- [16] Gao YH, Ying TY, Wang XL. *Brucella* infection after THP-1 cells in proteomics research [J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2006, 46(4):629-634. (in Chinese)
高永辉, 应天翼, 王希良. 感染布氏杆菌后的 THP-1 细胞的蛋白质组学研究 [J]. 微生物学报, 2006, 46(4):629-634.
- [17] Lapaque N, Moriyon I, Moreno E, et al. *Brucella* lipopolysaccharide acts as a virulence factor [J]. *Current Opin Microbiol*, 2005, 8:60-66.
- [18] Lamontagne J, Butler H. Extensive cell envelope modulation is associated with virulence in *Brucella melitensis* [J]. *J Bacteriol*, 2006, 176(16):4526-4570.
- [19] Manterola L, Guzman-Verri C, Chaves-Olarte E, et al. BvrR/BvrS-Controlled outer membrane proteins OMP3a and OMP3b are not essential for *Brucella abortus* virulence [J]. *Infect Immun*, 2007, 75(10):4867-4874.
- [20] Duan XY. *Brucella* vaccine strain of molecular markers to build and set up for differential diagnosis [D]. Master paper, 2007:83-88. (in Chinese)
段小宇. 布鲁氏菌分子标记疫苗株的构建及鉴别诊断方法的建立 [D]. 硕士论文, 2007:83-88.
- [21] Wang YF, Cheng ZL, Huang LY. The development of *Brucella* intracellular survival mechanisms [J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2007, 34(6):1218-1221. (in Chinese)
王玉飞, 陈泽良, 黄留玉. 布鲁氏菌胞内存活机制研究进展 [J]. 微生物学通报, 2007, 34(6):1218-1221.
- [22] Zhao ZP, Wang XL. The development of *Brucella* virulence factors [J]. *Progress in Microbiology and Immunology*, 2007, 35(1):50-53. (in Chinese)
赵忠鹏, 王希良. 布鲁氏菌毒力因子研究进展 [J]. 微生物免疫学进展, 2007, 35(1):50-53.
- [23] Yang ZS, Chen JB. Drug proteomics research [J]. *Acta Academiae Medicinae Jiangxi*, 2006, 46(1):160-163. (in Chinese)
杨泽松, 陈建斌. 药物蛋白质组学的研究进展 [J]. 江西医学院学报, 2006, 46(1):160-163.
- [24] Essenberg RC. Sugar metabolism by *Brucellae* [J]. *Vet Microbiol*, 2002, 90:249-261.
- [25] Zhao DL, Chen XL, He HL, et al. Gene cloning and sequence analysis of the cold-adapted chaperones DnaK and DnaJ from deep-sea psychrotrophic bacterium *Pseudoalteromonas* sp. SM9913. *Acta Oceanologica Sinica*, 2007, 6.
- [26] Ve Ronique Jubirr-maurin, Agne's rodrigye, Safia Ouahranibettache, et al. Identification of the nik Gene Cluster of *Brucella suis*: Regulation and Contribution to Urease Activity [J]. *Bacteriol*, 2001, 183(2):426-434.
- [27] S ko Hler, Ouahran-bettache S, layssac M, et al. Constitutive and Inducible Expression of green fluorescent protein in *Brucella suis* [J]. *Infect Immun*, 1999, 67(12):6695-6697.
- [28] Echenique J, Dorsey CW, Luis C. et al. *Patrito Acinetobacter baumannii* has two genes encoding glutathione-dependent formaldehyde dehydrogenase: evidence for differential regulation in response to iron. *Microbiology* [J]. 2001, 147:2805-2815.
- [29] Cloeckert A, Kerkhofs P, Limet JN. Antibody response to *Brucella* outer membrane proteins in bovine brucellosis: Immunoblot analysis and competitive enzyme linked immunosorbent assay using monoclonal antibodies [J]. *J Clin Microbiol*, 1992, 30:3168-3174.
- [30] Loekkaert A, Vizcano N, paquet J Y, et al. Major outer Membrane proteins of *Brucellas* pp. past, present and future [J]. *Veter Microbiol*, 2002, 90:229-247.
- [31] DelVecchio VG, Kapatral V, Redkar RJ, et al. The genome sequence of the facultative intracellular pathogen *Brucella melitensis* [J]. *Proc Natl Acad Sci*, 2002, 99(1):443-448.
- [32] Essenberg RC. Sugar metabolism by *Brucellae* [J]. *Vet Microbiol*, 2002, 90:249-261.
- [33] Connolly JP, Comerci D, Alefantis TG, et al. Proteomic analysis of *Brucella abortus* cell envelope and identification of immunogenic candidate proteins for vaccine development [J]. *Proteomics*, 2006, 6:3767-3780.