

DOI:10.13350/j.cjpb.221102

• 论著 •

布鲁氏菌 VirB12 蛋白的生物信息学分析及功能预测*

叶锋, 马晓菁, 刘丽娅, 谷文喜, 钟旗, 易新萍**

(新疆畜牧科学院兽医研究所, 新疆畜牧科学院动物临床医学研究中心, 新疆乌鲁木齐 830000)

【摘要】 目的 应用生物信息学软件和方法对布鲁氏菌 VirB12 基因编码蛋白的结构及功能进行预测和分析。方法

从 NCBI 数据库中获取 VirB12 基因核酸序列及其编码蛋白的氨基酸序列信息;使用 ProtParam 及 ProtScale 对 VirB12 蛋白的理化性质和亲疏水性进行分析;运用 SignalP 6.0、TMHMM 和 NetPhos 分析预测 VirB12 的信号肽序列、跨膜区结构及磷酸化位点;分别运用 SOPMA 和 SWISS MODEL 预测 VirB12 蛋白的二级结构和三级结构;运用 ABCpred 和 SYFPEITHI 预测 VirB12 蛋白的 B 细胞和 T 细胞抗原表位;运用 STRING 预测与 VirB12 蛋白发生相互作用的蛋白,并对其参与的生物过程进行功能富集分析;运用 MEGA X 对 VirB12 蛋白的进化关系进行分析。结果 预测 VirB12 蛋白的相对分子质量为 19.028×10^3 。该蛋白由 519 个核苷酸编码,172 个氨基酸残基构成,平均疏水系数为 -0.229,为亲水蛋白。VirB12 蛋白在 N 端有一段脂蛋白信号肽序列,其水解位点位于第 15 和第 16 个氨基酸之间,无跨膜区域,有 11 个磷酸化优势位点。二级结构中无规则卷曲(Cc)含量占 43.02%, α 螺旋(Hh)含量占 38.95%, β 折叠(Ee)占 13.95%, β 转角(Tt)占 4.07%。该蛋白有 15 个 B 细胞优势抗原表位,6 个限制性 CTL 细胞的抗原表位,有 7 个限制性 Th 细胞抗原表位。VirB12 蛋白主要与 VirB9、VirB10、VirB11、TolB 和 nuol 蛋白存在相互作用,GO 富集分析显示其主要参与细菌致病的生物学过程。结论 生物信息学分析 VirB12 蛋白具有良好的抗原优势表位,参与布鲁氏菌感染宿主过程,是研究布鲁氏菌致病机制的重要靶标蛋白。

【关键词】 布鲁氏菌;VirB12 蛋白;生物信息学

【中图分类号】 R378.5

【文献标识码】 A

【文章编号】 1673-5234(2022)11-1247-05

[Journal of Pathogen Biology. 2022 Nov.;17(11):1247-1251.]

Bioinformatics analysis and functional prediction of *Brucella brucei* VirB12 protein

YE Feng, MA Xiao-jing, LIU Li-ya, GU Wen-xi, ZHONG Qi, YI Xin-ping (Institute of Veterinary Medicine, Xinjiang Academy of Animal Sciences, Urumqi, Xinjiang, China, 830000)***

【Abstract】 **Objective** Bioinformatics software were applied to predict and analyze the structure and function of VirB12 protein of *Brucella abortus*. **Methods** Nucleic acid and amino acid sequences of VirB12 were obtained from the NCBI database; ProtParam and ProtScale were used to analyze physicochemical properties and hydrophobicity of VirB12 protein; SignalP 6.0, TMHMM and NetPhos were used to predict the signal peptide sequence, transmembrane region structure and phosphorylation sites. SOPMA and SWISS MODEL were used to predict the secondary and tertiary structures, respectively. ABCpred and SYFPEITHI were used to predict the epitopes of VirB12 protein. Proteins interacting with VirB12 were predicted using STRING and their biological processes were functional enrichment analysis; evolutionary relationships of VirB12 proteins were analyzed by MEGA X. **Results** VirB12 protein was encoded by 519 nucleotides and consisted of 172 amino acid residues with an average hydrophobic coefficient of -0.229 and was hydrophilic. VirB12 protein has a lipoprotein signal peptide sequence at the N-terminal end with cleavage site located between amino acids 15 and 16, with no transmembrane region and 11 phosphorylation dominant sites. Analysis of secondary structure indicated that it consisted of 43.02% of random coiling (Cc), 38.95% of α -helix (Hh), 13.95% of β -folding (Ee) and 4.07% of β -turning angle (Tt). The protein was predicted to have 15 B-cell dominant antigenic epitopes, 6 CTL cell antigenic epitopes, and 7 Th-cell antigenic epitopes. VirB12 protein mainly interacts with VirB9, VirB10, VirB11, TolB and nuol proteins, and GO enrichment analysis shows that it is mainly involved in the biological process of bacterial pathogenesis. **Conclusions** Bioinformatics analysis shows that VirB12 protein has a good antigenic dominant epitope and involves in the process of *Brucella* infection, which is an important research target to explore the pathogenesis of *Brucella*.

【Key words】 *Brucella*; VirB12 protein; bioinformatics

* **【基金项目】** 新疆维吾尔自治区自然科学基金面上项目(No. 2020D01A44)。

** **【通讯作者】** 易新萍, E-mail: 821489803@qq.com

【作者简介】 叶锋(1983-),男,新疆乌鲁木齐人,硕士,副研究员,主要从事布鲁氏菌病防控技术研究。E-mail: 89121145@qq.com

布鲁氏菌病(brucellosis)是布鲁氏菌(*Brucella*, spp)感染引起的人畜共患传染病,在全球70多个国家流行^[1-2],对公共卫生安全和畜牧业健康发展造成严重影响^[3]。人主要因接触患病动物而造成感染,近些年来我国人感染布鲁氏菌病病例数和发病率持续处于高位^[4-5]。布鲁氏菌可在宿主体内造成持续性感染,但其感染机制仍不明确^[6]。因此,研究布鲁氏菌的分子致病机制具有重要意义。

四型分泌系统(T4SS)是布鲁氏菌的重要毒力因子,对布鲁氏菌的感染和复制起重要作用^[7]。T4SS可使布鲁氏菌将效应蛋白转运至宿主细胞内,进而通过效应蛋白调控细胞的一系列通路,促进细菌定植于细胞^[8]。T4SS由VirB1-VirB12共12个蛋白组成, VirB12蛋白是T4SS的一个重要的毒力因子,在感染布鲁氏菌的动物血清中可持续的检测到其抗体^[9-10]。研究显示, VirB12基因缺失不影响布鲁氏菌存活的稳定性和感染力,但对菌株的毒力有一定影响^[11]。但是该蛋白在布鲁氏菌感染机制中的功能仍不清楚。本研究对牛种布鲁氏菌A19株的VirB12蛋白进行生物信息学分析,为布鲁氏菌VirB12蛋白在感染机制及临床诊断功能研究提供理论基础。

材料与方法

1 材料

牛种布鲁氏菌A19株的VirB12基因及其编码蛋白质氨基酸序列来自于NCBI GenBank(www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank)公布的基因组信息。VirB12的基因ID为NZ_CP030752.1,该基因编码蛋白ID为WP_002966521.1。

2 方法

2.1 VirB12基因序列分析 从NCBI数据库中获得基因序列,使用ORF Finder(https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/)分析其开放阅读框。

2.2 VirB12蛋白的生物信息学分析 运用ExPasy ProtParam(https://web.expasy.org/protparam/)和ProtScale(https://web.expasy.org/protscale/)等软件对VirB12蛋白的一级结构、亲疏水性等理化性质进行分析;运用SignalP 6.0(https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?SignalP-6.0)对VirB12蛋白的信号肽序列进行分析;运用TMHMM-2.0(https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?TMHMM-2.0)分析VirB12蛋白的跨膜区;运用NetPhos-3.1分析蛋白的氨基酸磷酸化位点;运用MotifScan(https://myhits.sib.swiss/cgi-bin/motif_scan)分析蛋白的翻译后修饰位点;运用SOPMA(https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page

=/NPSA/npsa_sopma.html)对VirB12蛋白的二级结构进行预测分析;运用SWISS-MODEL(https://swissmodel.expasy.org/interactive)预测分析VirB12蛋白的三级结构;运用在线分析软件ABCpred和SY-FPEITHI对VirB12蛋白的B细胞和T细胞抗原表位进行预测分析,并根据分析阈值筛选优势抗原表位;运用STRING(https://www.expasy.org/resources/string)对与VirB12蛋白产生相互作用的蛋白和参与的生物过程进行预测分析。对VirB12蛋白序列进行BLAST同源比对,使用MEGA软件构建M-L(Maximum-Likelihood)系统进化树,开展进化分析。

结果

1 VirB12蛋白的理化性质与一级结构

分析显示, VirB12蛋白由519个核苷酸编码,172个氨基酸组成,其中以脯氨酸(12.8%),缬氨酸(9.9%),丙氨酸(9.9%)3种氨基酸的组成比例较高;带正负电荷的残基数分别为19和9,由2706个原子构成,分子式为C₈₅₀H₁₃₆₆N₂₄₈O₂₃₆S₆,相对分子质量19.028×10³,理论等电点为10.28。VirB12蛋白在280nm处消光系数为22585时的吸光度为1.187。当该蛋白序列的N端是甲硫氨酸时,预测其半衰期为30h。脂肪族氨基酸指数为90.7,蛋白不稳定性指数为69.22,显示该蛋白质为不稳定蛋白。

2 VirB12蛋白的亲疏水性

利用ProtScale分析VirB12蛋白的20种氨基酸的亲水性,结果显示亲水性最大值2.633,最小值-1.856,由此计算出亲水性平均值-0.229,表明VirB12蛋白总体偏向亲水,属于亲水蛋白(图1)。

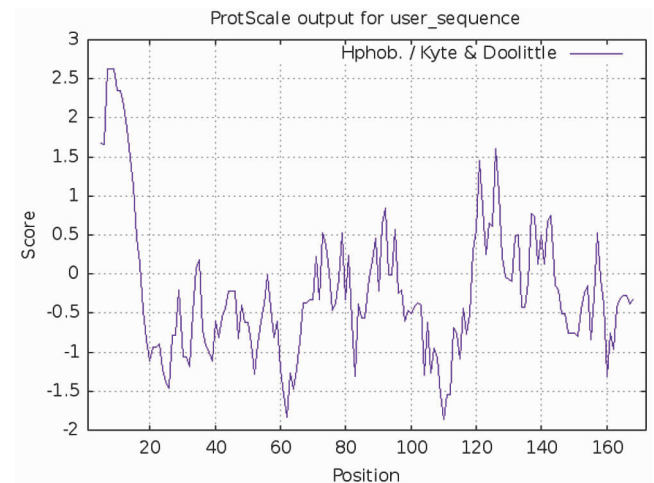


图1 VirB12蛋白的亲疏水性分析
Fig.1 Affinity analysis of VirB12 protein

3 VirB12蛋白的二级结构

利用SOPMA预测VirB12蛋白的二级结构,其

中无规则卷曲 (Cc) 占 43.02%, α 螺旋 (Hh) 占 38.95%, β 折叠 (Ee) 占 13.95%, β 转角 (Tt) 占 4.07% (图 2)。



图 2 VirB12 蛋白的二级结构预测

Fig. 2 Prediction of secondary structure of VirB12 protein

4 VirB12 蛋白的信号肽、跨膜区及氨基酸磷酸化位点预测

运用 SignalP6.0 对 VirB12 蛋白 N 端的 70 个氨基酸进行信号肽分析,显示该蛋白有一段由第 1-15 位氨基酸组成的脂蛋白信号肽序列,概率为 0.996,表明该蛋白为分泌蛋白(图 3)。跨膜区分析表明 VirB12 蛋白无跨膜区结构(图 4)。利用 NetPhos3.1 对 VirB12 蛋白的磷酸化位点进行预测,显示具有 6 个丝氨酸型、4 个苏氨酸型和 1 个酪氨酸型磷酸化优势位点(图 5)。利用 Motif-scan 对 VirB12 蛋白的修饰位点进行预测,该蛋白含有 N-豆蔻酰化位点(103-108)、蛋白激酶 C 磷酸化位点(26-28)、类 OmpA 结构域(58-172)及原核生物膜脂蛋白脂质附着位(1-16)。

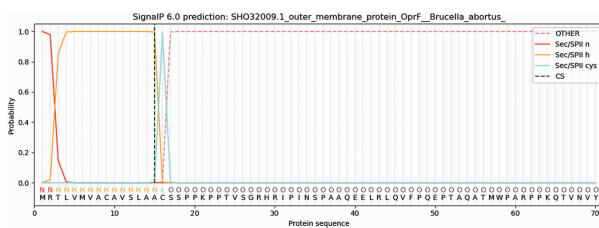


图 3 VirB12 蛋白的信号肽序列预测

Fig. 3 Prediction of signal peptide of VirB12 protein

5 VirB12 蛋白的三级结构预测分析

利用蛋白质分析系统 SWISS-MODEL 软件分析 VirB12 蛋白序列,预测 VirB12 蛋白的三级结构模型(图 6)。该结果来源于数据库模板 3td5.3.B,基于鲍曼不动杆菌的类 OmpA 结构域的三维建模^[12],该模型的最高 GMQE 指数为 0.36, QMEAN 指数为 0.6,表明数据库中已有的蛋白模板与 VirB12 蛋白结构的符合率较低。

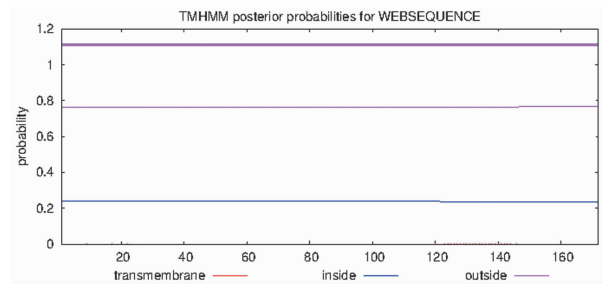


图 4 VirB12 蛋白的跨膜区预测

Fig. 4 Prediction of transmembrane domains of VirB12 protein

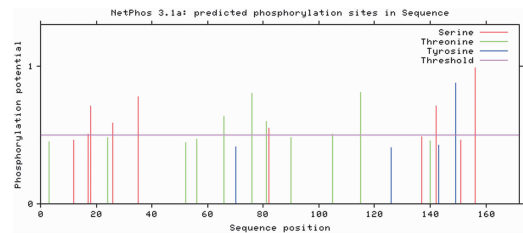


图 5 VirB12 蛋白的磷酸化位点预测

Fig. 5 Prediction of phosphorylation sites of VirB12 protein

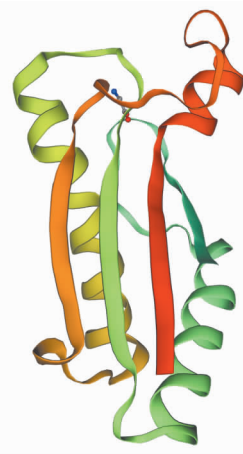


图 6 VirB12 蛋白的三级结构预测

Fig. 6 Prediction of tertiary structure of VirB12 protein

6 VirB12 蛋白的抗原表位预测

应用 ABCpred 对 VirB12 蛋白的 B 细胞抗原表位进行预测分析,当阈值为 0.56 时得到 15 个 VirB12 蛋白的 B 细胞优势抗原表位(表 1)。应用 SYFPEITHI 分析 VirB12 蛋白的 T 细胞抗原表位,当分析阈值为 21 时, VirB12 蛋白有 6 个 HLA-A * 02:01 限制性 CTL 细胞的抗原表位(表 2)和 7 个 HLA-DRB1 * 0401 限制性 Th 细胞抗原表位(表 3)。

7 VirB12 蛋白的相互作用网络及功能富集分析预测

STRING 分析表明, VirB12 蛋白与 VirB9、VirB10、VirB11、TolB 和 nuol 蛋白存在相互作用机制(图 7)。GO 富集分析显示 VirB12 蛋白主要参与细菌致病的生物学过程。

表 1 VirB12 蛋白的 B 细胞抗原表位预测
Table 1 Prediction of B cell epitopes of VirB12 protein

排序 Rank	抗原表位序列 Sequence	氨基酸起始位置 Start position	评分 Score
1	RITISYAPVKDYASNA	138	0.92
2	PKHINVRGLTDNNCPP	96	0.90
3	DYASNAPLSPGRVLR	148	0.90
4	LRLQVFPQEPTAQATM	42	0.85
5	PKPPTVSGRHRIPINS	20	0.85
6	PQEPTAQATMWPAPPP	48	0.83
7	QATMWPAPPPKQTVNV	54	0.79
8	CPPPGDTQVARVRALA	109	0.79
9	SGRHRIPINSPAAQEE	26	0.73
10	PAAQEELRLQVFPQEP	36	0.71
11	TVNVYFPQDVTVFRPT	66	0.70
12	DVTVFRPTSAQINQLH	74	0.64
13	VARVRALAIYNWLNQ	117	0.64
14	YNWLNQGVASRITI	126	0.60
15	PGRVLRNRVDIELRK	157	0.56

表 2 VirB12 蛋白的限制性 CTL 细胞的抗原表位预测
Table 2 Predicted CTL cell epitopes of VirB12 protein

排序 Rank	抗原表位序列 Sequence	氨基酸起始位置 Start position	评分 Score
1	QLHTLLWPV	87	25
2	VMVACAVSL	5	23
3	ALAIYNWLI	122	23
4	LLWPVPKHI	91	22
5	TLVMVACAV	3	21
6	AQINQLHTL	83	21

表 3 VirB12 蛋白的限制性 Th 细胞抗原表位预测
Table 3 Prediction of Th cell epitopes of VirB12 protein

排序 Rank	抗原表位序列 Sequence	氨基酸起始位置 Start position	评分 Score
1	LQVFPQEPTAQATMW	44	28
2	LAIYNWLNQGVAS	123	28
3	LVMVACAVSLAACSS	4	26
4	ELRLQVFPQEPTAQA	41	26
5	NVYFPQDVTVFRPTS	68	22
6	TLLWPVPKHINVRGL	90	22
7	TISYAPVKDYASNAP	140	22

8 VirB12 蛋白的进化分析

利用 MEGA X 构建 VirB12 蛋白的 M-L 进化树, 结果见图 8。布鲁氏菌 A19 株的 VirB12 蛋白与牛种布鲁氏菌、猪种布鲁氏菌和鲸种布鲁氏菌的外膜蛋白具有较近的遗传进化关系, 与该属的羊种布鲁氏菌也来自同一进化分支, 与克雷伯菌、沙门菌和假单胞菌的外膜蛋白遗传进化关系较远。

讨 论

动物布鲁氏菌病对我国的畜牧业发展和公共卫生安全造成严重困扰^[13]。布鲁氏菌在侵入机体的过程中, 主要通过逃避免疫系统的识别, 可在脾脏、淋巴结和巨噬细胞等免疫系统中定居增殖, 从而引起慢性感染^[14]。因此分析和明确布鲁氏菌自身蛋白组分是研

究其致病机制的重要途径。研究表明, 布鲁氏菌 VirB12 蛋白具有良好的免疫原性^[15-16]。蛋白质组学研究表明 VirB12 基因可抑制布鲁氏菌中某些毒力蛋白的表达, 这些蛋白均位于胞浆和细胞膜上^[17]。上述研究均证实 VirB12 蛋白参与布鲁氏菌的毒力水平调控。

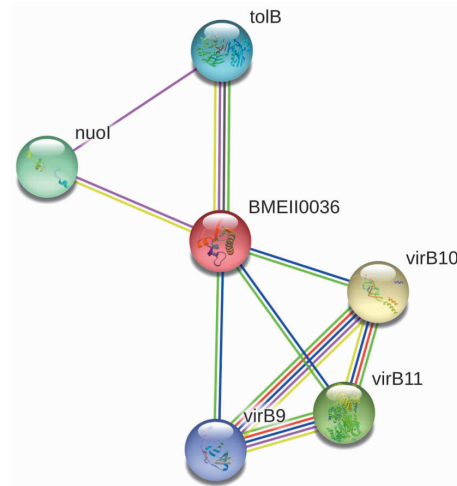


图 7 STRING 分析 VirB12 蛋白的相关作用蛋白
Fig. 7 Protein interaction with VirB12 protein analysed by STRING

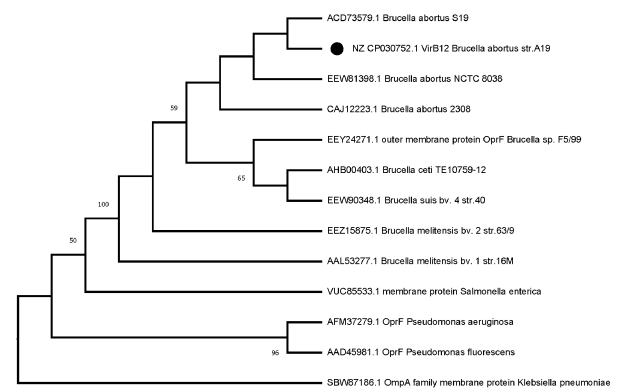


图 8 基于 M-L 算法构建的 VirB12 蛋白系统进化树
Fig. 8 Phylogenetic tree of VirB12 protein based on M-L algorithm

生物信息学分析被广泛应用于蛋白质的生物学特性及生物功能的分析和研究, 可为研究疾病发生机制和疫苗研发提供科学依据^[18-19]。本研究运用生物信息学软件对布鲁氏菌 VirB12 蛋白的结构和功能进行了分析和预测, 结果表明该蛋白为不稳定亲水性蛋白。信号肽序列分析显示 VirB12 蛋白含有一段脂蛋白信号肽序列, 无跨膜区域, 提示该蛋白可能从胞浆内合成后迁移到细胞膜表面, 从而可在血清中持续检测到该蛋白的抗体^[9]。VirB12 蛋白的二级结构中无规卷曲占比较高, 显示其可能存在较多抗原表位。而在线软件 ABCpred 和 SYFPEITHI 分析的预测结果也显示出 VirB12 含有较多的 B 细胞和 T 细胞优势抗原表位, 与文献^[20]的研究结果一致。互作蛋白网络及生

物学功能预测分析显示, VirB12 蛋白与 VirB9、VirB10、VirB11、TolB 和 nuol 蛋白存在相互作用。其中 VirB9、VirB10 和 VirB11 蛋白在布鲁氏菌持续感染宿主细胞和复制过程起关键作用^[21]。TolB 是细菌外膜上的转运蛋白,而 nuol 蛋白主要在微生物与外界进行离子交换的过程中起作用。如铜绿假单胞菌 OprF 蛋白功能研究表明,该蛋白与 VirB12 蛋白序列有较高相似度,是一种细胞外膜孔蛋白,为保持该细菌完整毒力的必要蛋白, OprF 蛋白缺失后会加速生物膜的形成和 Pel 胞外多糖的产生^[22]。易新萍等^[23]和叶锋等^[24]分别构建了缺失 VirB12 基因的 A19- Δ VirB12 和 Rev. 1- Δ Kan-VirB12 疫苗株,2 株疫苗的动物实验结果表明 VirB12 蛋白与布鲁氏菌的持续感染和复制等功能相关,该结论也与 GO 分析预测结果相一致。

综上所述, VirB12 蛋白是布鲁氏菌的重要毒力因子,并通过与其发生互相作用关系的蛋白影响布鲁氏菌的生存。本研究采用进行生物信息学方法对 VirB12 蛋白的信号肽序列、跨膜区、B 细胞和 T 细胞抗原表位以及与其互相作用蛋白及参与的生物学过程进行了预测分析,预测结果与该基因缺失株的研究均印证了 VirB12 蛋白在布鲁氏菌持续感染宿主细胞和复制过程中的作用,但该蛋白与 VirB9、VirB10、VirB11、TolB 和 nuol 等蛋白发生互作的相关机制有待进一步探讨。

【参考文献】

[1] Pappas G, Papadimitriou P, Akritidis N, et al. The new global map of human brucellosis[J]. Lancet Infect Dis, 2006, 6(2): 91-9.

[2] 王晓欢, 姜海. 全球人布鲁氏菌病流行特征[J]. 中华流行病学杂志, 2020, 41(10): 1717-1722.

[3] Dean AS, Crump L, Greter H, et al. Global burden of human brucellosis: a systematic review of disease frequency[J]. PLoS Negl Trop Dis, 2012, 6(10): e1865.

[4] 崔步云, 姜海. 2005-2016 年全国布鲁氏菌病监测数据分析[J]. 疾病监测, 2018, 33(3): 188-192.

[5] 廖伟斌, 孙建国, 于国伟, 等. 中国大陆 2006-2012 年人和牲畜布鲁氏菌病空间分布特征及相关性[J]. 中国公共卫生, 2015, 31(10): 1289-1293.

[6] Nymo IH, Tryland M, Godfroid J. A review of Brucella infection in marine mammals, with special emphasis on *Brucella pinnipedialis* in the hooded seal (*Cystophora cristata*) [J]. Vet Res, 2011, 42(1): 93.

[7] Lacerda TL, Salcedo SP, Gorvel JP. Brucella T4SS: the VIP pass inside host cells[J]. Curr Opin Microbiol, 2013, 16(1): 45-51.

[8] Marchesini MI, Seijo S, Guaimas FF, et al. A T4SS effector targets host cell alpha-enolase contributing to *Brucella abortus* intracellular lifestyle[J]. Front Cell Infect Microbiol, 2016, 6: 153.

[9] Sun Y H, Rolan H G, den Hartigh AB, et al. Brucella abortus

virB12 is expressed during infection but is not an essential component of the type IV secretion system[J]. Infect Immun, 2005, 73(9): 48-54.

[10] Tian M, Song M, Yin Y, et al. Characterization of the main immunogenic proteins in Brucella infection for their application in diagnosis of brucellosis[J]. Comp Immunol Microbiol Infect Dis, 2020(70): 101462.

[11] 易新萍, 谷文喜, 吴冬玲, 等. 流产布鲁氏菌疫苗 A19- Δ VirB12 突变株生物学特性研究[J]. 中国人兽共患病学报, 2013, 29(09): 836-840.

[12] Park JS, Lee WC, Yeo K J, et al. Mechanism of anchoring of OmpA protein to the cell wall peptidoglycan of the gram-negative bacterial outer membrane[J]. FASEB J, 2012, 26(1): 219-228.

[13] 毛景东, 王景龙, 杨艳玲. 布鲁氏菌病的研究进展[J]. 中国畜牧兽医, 2011, 38(1): 222-226.

[14] Celli J, Chastellier CD, Franchini DM, et al. *Brucella evades* macrophage killing via virB-dependent sustained interactions with the endoplasmic reticulum[J]. J Exp Med, 2003, 198(4): 545-556.

[15] Mirkalantari S, Zarnani AH, Nazari M, et al. *Brucella melitensis* VirB12 recombinant protein is a potential marker for serodiagnosis of human brucellosis[J]. Ann Clin Microbiol Antimicrob, 2017, 16(1): 1-6.

[16] 张婷婷, 刘梦志, 冯生, 等. 布鲁氏菌 VirB12 蛋白纯化及其抗体 ELISA 方法的初步建立[J]. 沈阳农业大学学报, 2019, 50(2): 154-160.

[17] Yang J, He C, Zhang H, et al. Evaluation and differential diagnosis of a genetic marked *Brucella vaccine* A19 Δ VirB12 for cattle [J]. Front Immunol, 2021, 12: 679560.

[18] 朱亚洲, 吕咏雪, 杜先才, 等. 细粒棘球绦虫 Calmodulin 蛋白的生物信息学分析[J]. 中国病原生物学杂志, 2021, 16(8): 897-901.

[19] 宋通, 付玉荣, 伊正君. 结核分枝杆菌调节蛋白 RelA 结构和功能的生物信息学分析[J]. 中国病原生物学杂志, 2017, 12(5): 402-406.

[20] Rolan HG, den Hartigh AB, Kahl-McDonagh M, et al. VirB12 is a serological marker of *Brucella* infection in experimental and natural hosts[J]. Clin Vaccine Immunol, 2008, 15(2): 208-214.

[21] den Hartigh AB, Rolan HG, de Jong MF, et al. VirB3 to VirB6 and VirB8 to VirB11, but not VirB7, are essential for mediating persistence of *Brucella* in the reticuloendothelial system[J]. J Bacteriol, 2008, 190(13): 4427-4436.

[22] Bouffartigues E, Moscoso JA, Duchesne R, et al. The absence of the *Pseudomonas aeruginosa* OprF protein leads to increased biofilm formation through variation in c-di-GMP level[J]. Front Microbiol, 2015(6): 630.

[23] 易新萍, 叶锋, 姚刚, 等. 牛布鲁氏菌 A19 突变株的构建及在 BALB/c 鼠中的免疫保护评估[J]. 微生物学报, 2013, 53(11): 1213-1220.

[24] 叶锋, 马晓菁, 刘丽娅, 等. 羊种布鲁氏菌 Rev. 1 突变株在 BALB/c 鼠中的免疫保护评价[J]. 中国动物检疫, 2017, 34(7): 100-104.