DOI:10.13350/j.cjpb.250107

· 论著 ·

布鲁氏菌分泌蛋白 BspC 的生物信息学分析、多克隆抗体制备及互作蛋白筛选*

印双红[1],刘虹燕[1],邓肖玉[2],杜昌青[1],刘阳[3],李寅翠[1],孙馨[1],王书利[4],张俊波[3,4]**
(1. 铜仁学院大健康学院,贵州铜仁 554300;2. 湖南医药学院基础医学院;3. 铜仁学院农林工程与规划学院;
4. 铜仁学院贵州省梵净山地区生物多样性保护与利用重点实验室;5. 商丘师范学院生物与食品学院)

【摘要】 **目的** 本研究旨在探究 BspC 蛋白在布鲁氏菌感染中的作用机理。 **方法** 通过在线预测软件分析 BspC 蛋白的生物学功能,通过化学合成法构建 pET-28a-BspC 原核融合表达载体并转化大肠埃希菌 BL2 感受态细胞,经 IPTG 诱导后大量表达和纯化 BspC 蛋白。利用纯化的蛋白进行动物免疫并收集抗血清,通过 ELISA 检测抗血清效价。纯化抗体并通过 Western blot 进行鉴定。构建 RAW264.7 细胞的 cDNA 文库和 BspC 蛋白的诱饵质粒,对诱饵质粒自激活和毒性进行检测,筛选与 BspC 互作的宿主蛋白,利用回交验证实验对互作蛋白进行验证。 **结果** BspC 蛋白具有信号肽,有 6 个抗原决定簇,二级结构以 α-螺旋为主;成功构建 pET-28a-BspC 载体,且诱导表达后重组蛋白大小约为 16.7 ku;ELISA 检测发现兔抗血清效价为 1∶512 000;Western blot 检测结果显示制备的多克隆抗体可以特异性结合体外表达的 BspC 蛋白;利用 NCBI 的 BLAST 对 7 个阳性克隆测序结果比对分析,获得潜在互作宿主蛋白 FDX1、DNAJA1、HSPA5、PTPN2。 **结论** 本研究成功制备 BspC 多克隆抗体和筛选获得 BspC 蛋白的互作蛋白,为进一步研究 BspC 蛋白在布鲁氏菌感染过程中的功能和机制奠定基础。

【关键词】 布鲁氏菌;分泌蛋白 BspC;生物信息学分析;多克隆抗体;酵母双杂交;互作蛋白
【文献标识码】 A 【文章编号】 1673-5234(2025)01-0034-07

[*Journal of Pathogen Biology*. 2025 Jan.;20(01):34-40,45.]

Bioinformatics analysis of *Brucella* secretory protein BspC, preparation of polyclonal antibody and screening of interacting protein

YIN Shuanghong[1], LIU Hongyan[1], DENG Xiaoyu[2], DU Changqin[1], LIU Yang[2], LI Yincui[1], SUN Xin[1], WANG Shuli[3], ZHANG Junbo[2,4] (1. *College of One Health, Tongren University, Tongren* 554300, *Guizhou, China*; 2. *School of Basic Medicine, Hunan University of Medicine*; 3. *College of Agroforestry Engineering and Planning, Tongren University*; 4. *Guizhou Provincial Key Laboratory for Biodiversity Conservation and Utilization in the Fanjing Mountain Region, Tongren University*; 5. *College of Biology and Food, Shangqiu Normal University*)**

【Abstract】 **Objective** To investigate the mechanism of BspC protein in *Brucella* infection. **Methods** The biological function of BspC protein was analyzed by online prediction software. pET-28a-BspC prokaryotic fusion expression vector was constructed by chemical synthesis method and transformed into Escherichia coli BL2 receptor cells. BspC protein was expressed and purified by IPTG induction. The purified protein was used for animal immunization and antiserum was collected. The antiserum titer was detected by ELISA. Antibodies were purified and identified by Western blot. The cDNA library of RAW264.7 cells and the decoy plasmid of BspC protein were constructed, and the self-activation and toxicity of the decoy plasmid were detected, and the host proteins interacting with BspC were screened, and the interacting proteins were verified by backcross verification experiment. **Results** The BspC protein had signal peptide and 6 antigenic determinant, and the secondary structure was mainly α-helix. The pET-28a-BspC vector was successfully constructed, and the size of the recombinant protein was about 16.7 ku after induced expression. The titer of rabbit antiserum was 1∶512 000 by ELISA. Western blot analysis showed that the prepared polyclonal antibody could bind specifically to BspC protein expressed in vitro. Seven positive clones were sequenced by NCBI BLAST, and potential interacting host proteins FDX1, DNAJA1, HSPA5 and PTPN2 were obtained. **Conclusion** This study successfully prepared BspC polyclonal antibody and screened the interaction protein of BspC protein, which laid a foundation for further

* 【基金项目】 国家自然科学基金项目(No. 82160391);铜仁市科技局项目(铜市科研[2022]67 号,铜市科研[2023]39 号);贵州省大学生创新创业训练计划项目(No. S202310665003,S202310665004)
** 【通讯作者】 张俊波,E-mail:zhangjunbo666@126.com
【作者简介】 印双红(1986-),女,贵州松桃人,硕士研究生,教授,主要从事免疫学。E-mail:ysh_hong2006@163.com

study on the function and mechanism of BspC protein during *Brucella* infection.

【Keywords】 *Brucella*; secretory protein BspC; bioinformatics analysis; polyclonal antibody; yeast two-hybrid; interacting protein

布鲁氏菌病是世界范围内广泛流行的一种人兽共患病[1],布鲁氏菌可导致雄性动物附睾炎和妊娠母畜流产、胎盘炎和不孕,人感染后可引起急性炎症并表现出许多类似流感感染的症状,包括波状发热、盗汗、关节痛和身体虚弱[2-4]。布鲁氏菌致病机制的关键是它与宿主细胞的相互作用,布鲁氏菌可利用自身的多种机制逃避宿主细胞的识别及杀伤,适应胞内环境并进行生存及复制[5-6]。因此,全面阐明布鲁氏菌的致病机理,寻找新的、有效的治疗靶点,成为布鲁氏菌防控亟待解决的关键。

布鲁氏菌的Ⅳ型分泌系统(Type IV Secretion System,T4SS)是公认的重要的布鲁氏菌毒力调控因子,它与布鲁氏菌的胞内存活密切相关[7-8]。布鲁氏菌通过T4SS将效应蛋白释放到宿主细胞中,在诱导宿主细胞凋亡、先天免疫和适应性免疫方面发挥重要作用[9-10]。研究发现,布鲁氏菌侵入细胞后,首先形成包含细菌的布氏小体(Brucella-Containing Vacuole,BCV),逃避溶酶体的降解。而在BCV整个胞内转运的过程中,T4SS能够分泌多种效应蛋白,在调控BCV的成熟和胞内转运、逃避宿主免疫监视和维持持续性感染等方面发挥重要作用[11]。目前研究人员已经筛选出一系列布鲁氏菌的效应蛋白,并获得了大多数效应蛋白的功能,它们在胞内布鲁氏菌存活中发挥重要作用,其中分泌蛋白A(Secreted effector protein A,SepA)、Rab2互作保守蛋白A(Rab2 interacting conserved protein A,RicA)、布鲁氏菌TIR蛋白(Brucella TIR protein (Btp) A,BtpA)等都与感染密切相关。然而布鲁氏菌分泌蛋白C(Brucella secreted proteins (Bsp)C,BspC)效应蛋白的作用机制及功能还尚不清楚[11]。因此,本研究选取了其中一个未知功能的BspC效应蛋白进行研究,为效应蛋白在布鲁氏菌致病中的作用机制提供科学依据。

材料与方法

1 材料

1.1 *实验细胞及动物* 大肠埃希菌DE3和DH5α感受态细胞为贵州省梵净山地区生物多样性保护与利用重点实验室保存;质粒pET-28a购自Novagen公司;2只日本大耳兔(约1.6 kg)由金开瑞生物有限公司提供。

1.2 *主要试剂* Y2H Gold酵母感受态细胞、胶回收试剂盒、DNA聚合酶、dNTP、限制性内切酶EcoRI、BamHI、T4DNA连接酶、DNA Marker、2×蛋白上样缓冲液,均购自大连TaKaRa公司;质粒pGBKT7、pGBKT7-53、pGADT7、pGADT7-T、酵母质粒小提试剂盒和酵母双杂交试剂盒及各种营养缺陷型培养基均购自美国Clontech公司;Lipofectamine3000转染试剂、ECL发光试剂盒购自美国Thermo公司;胎牛血清、DMEM培养基、胰蛋白酶购自美国GIBCO公司。诱导剂IPTG购自Merck公司;PVDF膜购自Millipore公司;ECL试剂盒购自Thermo公司。辣根过氧化物酶(HRP)标记羊抗兔IgG二抗购自博奥森公司(北京),弗氏完全佐剂和不完全佐剂购自西格玛奥德里奇(上海)贸易有限公司。

2 方法

2.1 *BspC蛋白的生物信息学分析* 使用ExPASy软件ProtParam(https://web.expasy.org/protparam/)预测BspC蛋白(GenBank登录号:WP_002963960.1)的基本组成、等电点、吸光系数、亲水系数等;采用SOPMA预测BspC蛋白的二级结构(https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=/NPSA/npsa_sopma.html);采用SWISS MODEL预测BspC蛋白的三级结构(https://swissmodel.expasy.org/interactive);使用Predicting Antigenic Peptides预测BspC蛋白的抗原决定簇(http://imed.med.ucm.es/Tools/antigenic.pl);采用SignalP 5.0(https://services.healthtech.dtu.dk/services/SignalP-5.0/)预测BspC蛋白是否存在信号肽序列。

2.2 *重组表达质粒pET-28a-BspC的构建* 根据布鲁氏菌M5-90的BspC基因序列(BM590_RS03990),引入酶切位点(BamH I/*Xho* I)送通用生物系统(安徽)有限公司合成BspC基因序列,然后将其克隆至原核表达载体pET28a,转化至DH5α感受态细胞中,将其涂布固体LB培养基过夜培养,用试剂盒提取pET-28a-BspC质粒,经BamH I/*Xho* I双酶切验证,利用1.5%琼脂糖凝胶电泳检测,然后将质粒送深圳华大基因科技有限公司测序。

2.3 *BspC蛋白的表达及纯化* 将pET-28a-BspC质粒转化至DE3感受态细胞中,挑选含重组质粒的单菌落至3 mL LB液体培养基中,37 ℃、220 r/min振摇至菌体A_{600}值约为0.6,向细菌培养物中加入诱导剂IPTG,在37 ℃、220 r/min条件下培养0、2、4、6、8 h以诱导BspC蛋白的表达,利用15%的SDS-PAGE凝

胶电泳检测检测 BspC 蛋白的表达情况[12]。

将菌液扩大培养 2 000 mL，摇菌至 A_{600} 值约为 0.6，加入诱导剂 IPTG，诱导至 4 h，超声破碎离心，取上清和沉淀进行 SDS-PAGE 分析。以 1 mL/min 的流速上样上清蛋白溶液；以 NTA-0 缓冲液(pH8.0)洗柱至流出液不含蛋白；用咪唑洗脱，分段收集洗脱液至 G250 检测液不变色；以去离子水洗涤柱料，以乙醇封柱；对收集的洗脱液浓缩进行 SDS-PAGE 电泳检测[13]。

2.4 BspC 多克隆抗体的制备及效价和抗体特异性的检测 将纯化后的 rBspC 蛋白与弗氏佐剂混合乳化后免疫日本大耳兔，免疫前经耳动脉采血 1～2 mL 作为阴性对照，首免按每 500 μg/只与弗氏完全佐剂混合乳化后，在日本大耳兔背部经皮下注射免疫。每隔 14 d(14 d、28 d 和 42 d)以弗氏不完全佐剂 300 μg 与等体积的重组蛋白混合乳化后免疫。第 4 次免疫结束后 1 周(首免后 49 d)采血，分离血清经 ELISA 检测其效价，采用 Western blot 检测血清的抗体特异性[14]。

采用间接 ELISA 检测 BspC 多克隆抗体效价，将纯化后的 BspC 融合蛋白稀释为 2 μg/mL 包被酶标板，4 ℃过夜，经洗涤、封闭后，将制备的 BspC 多克隆抗体用稀释液 2 倍倍比稀释(1∶2 000～1∶16 384 000)作为一抗，以免疫前的兔血清为阴性对照(与阳性血清作同比例稀释)，以羊抗兔 IgG-HRP(1∶5 000)为二抗，测定 A_{450} 吸光度值，以 $A_{阳性血清}/A_{阴性血清}$ 吸光度比值大于 2.1 的血清最高稀释度作为该 BspC 多克隆抗体的效价。

利用 Western blot 检测 BspC 多克隆抗体与 BspC 蛋白结合的特异性，取纯化后的 BspC 融合蛋白经 SDS-PAGE 检测分析，将蛋白转到 0.2 μm 的 PVDF 膜上，5%脱脂奶粉 4 ℃封闭过夜，以 BspC 多克隆抗体和免疫前兔血清(1∶1 000)为一抗，37 ℃孵育 2 h；以羊抗兔 IgG-HRP(1∶5 000)为二抗，经 Western blot 检测 BspC 多克隆抗体的特异性。

2.5 诱饵质粒构建、毒性及自激活检测 将 BspC 基因序列两端添加 EcoR I/BamH I 酶切位点后，送金斯瑞生物科技股份有限公司通过基因合成方法构建 pGBKT7-BspC 诱饵重组质粒，将诱饵质粒 pGBKT7-BspC 和 pGBKT7 分别转化酵母 Y2H Gold 感受态细胞，将 pGBKT7-53 和 pGADT7-T 质粒共转化酵母 Y2H Gold 感受态细胞作为阳性对照；将 pGBKT7-Lam 和 pGADT7-T 质粒共转化酵母 Y2H Gold 感受态细胞作为阴性对照；将各重组菌于 SD/-Leu/-Trp/X-α-gal (DDO/X)、SD/-Leu/-Trp/-His/X-α-gal (TDO/X)、SD/-Leu/-Trp/-His/-Ade/X-α-gal/AbA (QDO/X/A)固体培养基上涂布，30 ℃培养 3 d～5 d，观察是否有蓝色单菌落生长，验证诱饵蛋白的毒性及自激活活性。

2.6 与 BspC 蛋白互作的宿主蛋白的酵母双杂交筛选 RAW264.7 细胞 cDNA 文库由上海欧易生物医学科技有限公司构建。本研究采用 RAW264.7 细胞 Y2H cDNA 文库筛选与 BspC 相互作用的蛋白。将 pGBKT7-BspC(5 μg)和 RAW264.7 细胞 cDNA 文库质粒(10 μg)共转化酵母 Y2H Gold 感受态细胞；共转化 pGBKT7-53 和 pGADT7-T 于酵母 Y2H Gold 感受态细胞作为阳性对照，共转化 pGBKT7-Lam 和 pGADT7-T 于酵母 Y2H Gold 感受态细胞为阴性对照。将各转化子菌液涂布于 TDO/X 平板上，30 ℃恒温培养箱培养 3 d～5 d，统计单克隆数量，完成初筛；将初筛平板上蓝色阳性克隆转移到二次筛选培养基 QDO/X/A 上，进行高严谨度筛选；30 ℃恒温培养箱培养 3 d～5 d，预计有阳性克隆生长出，颜色蓝色。将得到的阳性克隆菌株分别提取质粒，转化 DH5α 感受态细胞扩增并提取质粒测序，将阳性克隆送擎科生物公司测序，对测序结果经 NCBI 数据库进行 BLAST 比对分析。

2.7 回交验证实验 将 **2.6** 步骤中提取的阳性克隆 pGBKT7-FDX1、pGBKT7-DNAJA1、pGBKT7-HSPA5、pGBKT7-PTPN2 质粒(200 ng)，分别与 pGBKT7-BspC(100 ng)共同转化酵母 Y2H Gold 感受态细胞，设置阳性对照(pGBKT7-53＋pGADT7-T)、阴性对照(pGBKT7-Lam＋pGADT7-T)、空白质粒对照(pGBKT7-BspC＋pGADT7)，分别涂布于 DDO(SD/-Leu/-Trp)和 QDO/X/A 平板上，30 ℃培养 3 d～5 d，观察酵母菌的生长情况，挑选变蓝单菌落用 0.9% NaCl 重悬进行 10 倍倍比稀释(10^{-1}～10^{-4})后分别取 10 μL 依次稀释点板在 DDO、QDO/X/A 平板上，于 30 ℃培养 3 d～5 d 后拍照记录酵母菌生长情况。

结 果

1 BspC 蛋白的理化性质

BspC 基因编码的蛋白分子式为 $C_{664}H_{1082}N_{182}O_{195}S_3$，包含 137 个氨基酸，相对分子质量为 14 831.18，总原子数为 2 126，理论等电点为 9.87。BspC 蛋白的氨基酸组成中丙氨酸(Ala)含量最高(16.1%)；带负电荷的氨基酸残基(Asp＋Glu)为 12，带正电荷的氨基酸残基(Arg＋Lys)为 25(表 1)；不稳定系数为 23.89，为稳定蛋白(标准≤40 的为稳定蛋白)；280 nm 处的吸光系数(A_{280})是 12 950 L/(mol·cm)；脂肪系数平均为 81.39，总平均亲水性为－0.209。

表1 BspC蛋白的氨基酸组成
Table 1 Amino acid composition of BspC protein

氨基酸	数目	占比(%)	氨基酸	数目	占比(%)
Ala (A)	22	16.1	Lys (K)	19	13.9
Arg (R)	6	4.4	Met (M)	1	0.7
Asn (N)	1	0.7	Phe (F)	6	4.4
Asp (D)	10	7.3	Pro (P)	3	2.2
Cys (C)	2	1.5	Ser (S)	12	8.8
Gln (Q)	6	4.4	Thr (T)	9	6.6
Glu (E)	2	1.5	Trp (W)	1	0.7
Gly (G)	7	5.1	Tyr (Y)	5	3.6
His (H)	0	0.0	Val (V)	8	5.8
Ile (I)	12	8.8	Pyl (O)	0	0.0
Leu (L)	5	3.6	Sec (U)	0	0.0

2 BspC蛋白的二级结构

BspC蛋白中有61个氨基酸参与形成α-螺旋，占总氨基酸的比例为44.53%；17个氨基酸参与延伸链的形成，占总氨基酸的比例为12.41%；13个氨基酸参与β-折叠的形成，占总氨基酸的比例为9.49%；46个氨基酸参与无规卷曲结构的形成，占总氨基酸的比例为33.58%(图1)。

图1 BspC蛋白的二级结构预测
Fig. 1 Secondary structure prediction of BspC protein

3 BspC蛋白的三级结构

BspC蛋白三级结构预测模型均以α-螺旋为主(图2)，与二级结构预测结果相吻合。

4 BspC蛋白抗原决定簇预测

BspC蛋白有6个抗原决定簇，分别位于4-26、35-42、44-62、73-79、92-104、107-113氨基酸处(表2)。

5 信号肽预测

Signal peptide(Sec/SPI)分泌蛋白转运途径的信号肽预测的可能性是0.9957，TAT signal peptide (Tat /SPI)双一精氨酸转运途径的信号肽的可能性是0.0005，Lipoprotein signal peptide(Sec/SPII)脂蛋白信号肽的可能性是0.0035。预测结果为BspC蛋白存在信号肽为Sec/SPI信号肽(图3)，其信号肽剪切位点位于第22和23个氨基酸之间，通过信号肽分析可以预测出BspC蛋白的转运途径是分泌型蛋白转运途径。

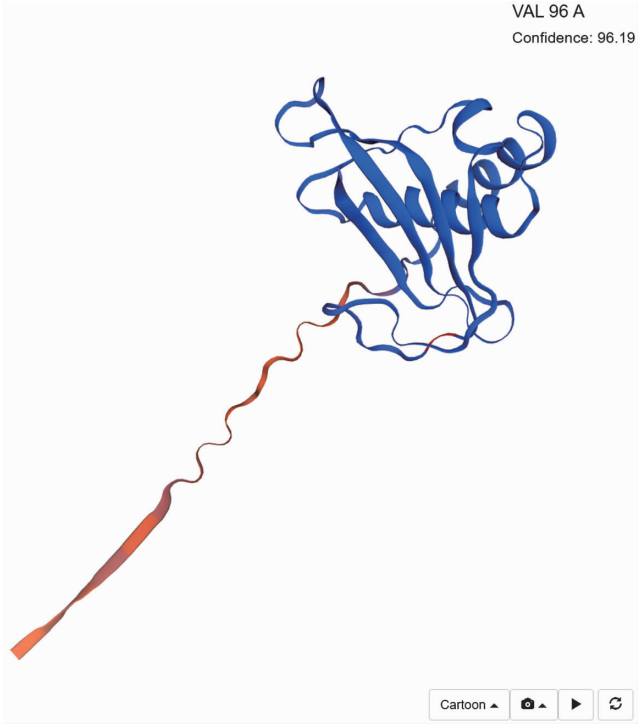


图2 BspC蛋白的三级结构预测
Fig. 2 Tertiary structure prediction of BspC protein

表2 BspC蛋白抗原决定簇预测
Table 2 Prediction of antigenic determinant of BspC protein

序号 No.	开始位置 Start position	结束位置 End position	序列 Sequence
1	4	26	TKIILSAIFAFGFTAAAQADAVP
2	35	42	NYQTLVKD
3	44	62	QASPQVADCIASGYDYVKK
4	73	79	KADIAAA
5	92	104	DAKKVSAIISVPG
6	107	113	RIKSVGY

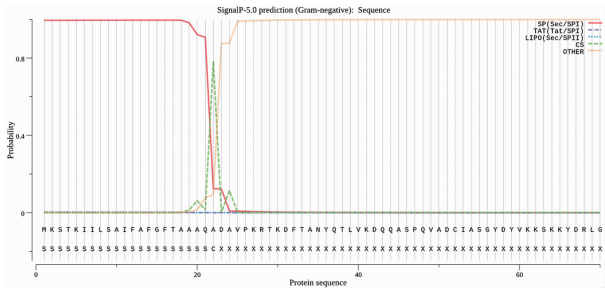
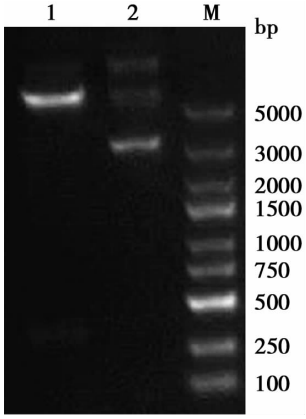


图3 BspC蛋白的信号肽预测
Fig. 3 Signal peptide prediction of BspC protein

6 重组质粒pET-28a-BspC的构建及鉴定

NCBI查找*BspC*基因基因序列，引入酶切位点(BamH I/*Xho* I)送通用生物合成cds区基因片段，并克隆至原核表达载体pET28a获得重组表达质粒pET-28a-BspC。质粒pET-28a-BspC经BamH I/*Xho*

I双酶切后，琼脂糖凝胶电泳结果显示，在360 bp左右有目的基因片段(图4)。



M DL5000 marker 1 pET-28a-BspC酶切 2 pET-28a-BspC质粒

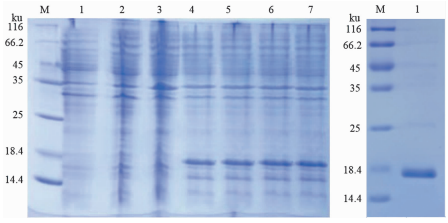
图4 pET-28a-BspC重组质粒酶切鉴定

M DL5000 marker 1 pET-28a-BspC enzyme digestion 2 pET-28a-BspC plasmid

Fig. 4 Identification of pET-28a-BspC recombinant plasmid by enzyme digestion

7 融合蛋白BspC的表达及纯化

将重组质粒PET-28a-BspC转化至大肠埃希菌DE3中，加入IPTG诱导培养，在0、2、4、6、8 h收样，进行15%的SDS-PAGE凝胶电泳分析，得到与预期蛋白分子量大小一致的16.7 ku融合蛋白(图5)。经过纯化，成功获得纯度较高的BspC融合蛋白，且浓度为1 mg/mL。



A M Protein marker 1 未诱导样品 2 空菌对照 3～7 表达菌诱导0、2、4、6、8 h B M Protein marker 1 纯化的蛋白

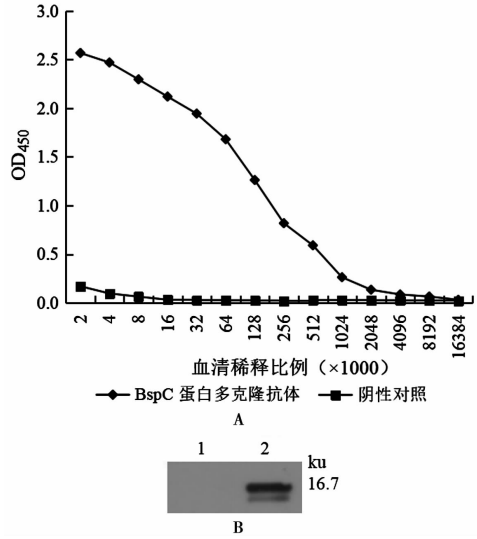
图5 融合蛋白BspC的表达及纯化

A M Protein marker 1 Uninduced sample 2 Empty bacteria control 3－7 The expression bacteria were induced for 0, 2, 4, 6, 8 h B M Protein Marker 1 Purified protein

Fig. 5 Identification and expression of fusion protein BspC

8 BspC多克隆抗体效价及特异性检测

以BspC融合蛋白为免疫原，皮下多点注射日本大耳兔，每隔14 d进行免疫，第4次免疫结束后1周(首免后49 d)采血，采用间接ELISA法测定BspC多克隆抗体效价，结果显示，BspC多克隆抗体的效价为1∶512 000，表明该抗体具有较高的效价(图6A)。利用Western blot检测BspC多克隆抗体与BspC蛋白结合的特异性，取纯化后的BspC融合蛋白经SDS-PAGE检测分析，以BspC多克隆抗体和免疫前兔血清为一抗，结果显示，BspC多克隆抗体能够与纯化的BspC融合蛋白反应(图6B)，表明BspC多克隆抗体能够特异性识别BspC融合蛋白，具有良好的反应原性。



1 免疫前兔血清 2 BspC多克隆抗体

图6 BspC多克隆抗体效价(A)及特异性(B)检测

1 Rabbit serum before immunization 2 BspC polyclonal antibody

Fig. 6 BspC polyclonal antibody titer (A) and specificity (B) detection

9 诱饵质粒的自激活与毒性检验

将诱饵质粒pGBKT7-BspC和pGBKT7分别转化酵母Y2H Gold感受态细胞，将pGBKT7-53和pGADT7-T质粒共转化酵母Y2H Gold感受态细胞作为阳性对照；将pGBKT7-Lam和pGADT7-T质粒共转化酵母Y2H Gold感受态细胞作为阴性对照；将各重组菌接种于DDO/X、TDO/X、QDO/X/A固体培养基上，结果显示，pGBKT7-BspC和pGADT7、pGADT7-T和pGADT7-53(阳性对照)、pGBKT7-Lam和pGADT7-T(阴性对照)菌落均能在DDO/X固体培养基上生长。pGBKT7-53和pGADT7-T质粒共转化的酵母菌在DDO/X和QDO/X/A培养基上有克隆生长且变蓝，表明阳性对照试验成功；pGBKT7-Lam和pGADT7-T质粒共转化的酵母菌在DDO/X培养基上生长但不变蓝，在QDO/X/A培养基上无克隆生长，表明阴性对照试验成功；pGBKT7-BspC和pGADT7在DDO/X培养基上生长，表明pGBKT7-BspC质粒成功转入酵母菌株中；在TDO/X和QDO/X/A培养基上不生长，表明pGBKT7-BspC在Y2H Gold酵母菌株中没有自激活活性(图7)。诱饵质粒pGBKT7-BspC和空pGADT7共转后克隆生长状态即可判断诱饵是否有毒性，本试验中诱饵质粒pGBKT7-BspC和空pGADT7共转后克隆生长正常，表明诱饵蛋白BspC无自激活活性和毒性。

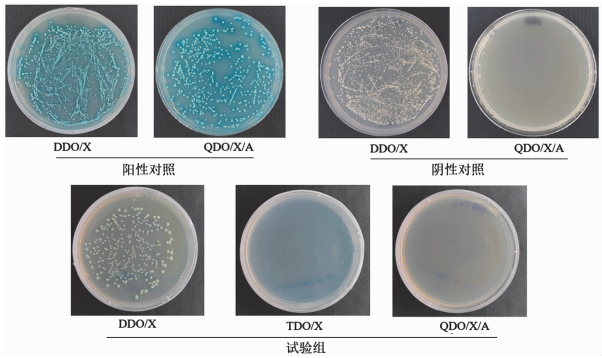


图 7 pGBKT7-BspC 自激活和毒性检测
Fig. 7 Self-activation and toxicity detection of pGBKT7-BspC

10 与 BspC 互作蛋白的筛选

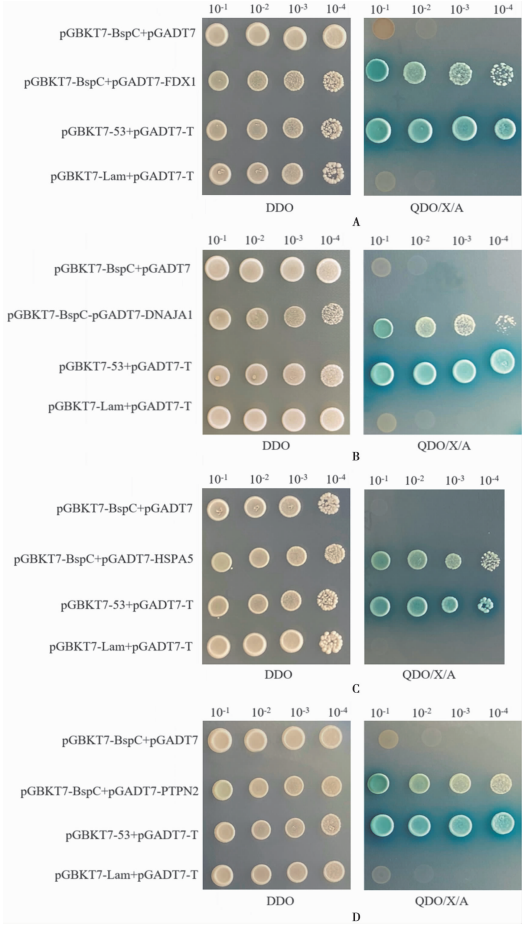
将 pGBKT7-BspC 和 RAW264.7 细胞 cDNA 文库质粒共转化酵母 Y2H Gold 感受态细胞；将 pGBKT7-53 和 pGADT7-T 共转化酵母 Y2H Gold 感受态细胞中作为阳性对照，将 pGBKT7-Lam 和 pGADT7-T 共转化酵母 Y2H Gold 感受态细胞为阴性对照。将各转化子菌液涂布于 TDO/X 平板上进行初筛，挑取 TDO/X 筛选平板上的蓝色克隆，转到 QDO/X/A 筛选平板上进行复筛，结果共有 7 个候选阳性克隆生长变蓝，将得到的 7 个阳性克隆菌株分别提取质粒，转化 DH5α 感受态细胞并提取质粒测序，测序结果利用 NCBI 的 BLAST 比对分析，获得潜在的 4 个与 BspC 存在互作宿主蛋白(表 3)。

表 3 潜在互作宿主蛋白信息
Table 3 Information of potential interacting host proteins

编号	捕获基因	GenBank 登录号
1	Mus musculus ferredoxin 1 (FDX1)	NM_007996.2
2	Mus musculus DnaJ heat shock protein family (Hsp40) member A1 (DNAJA1)	NM_001164671.2
3	Mus musculus heat shock protein 5 (HSPA5)	NM_001163434.1
4	Mus musculus protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 2 (PTPN2)	NM_008977.3

11 与 BspC 互作蛋白的验证

将提取的 4 个互作宿主蛋白基因质粒 pGBKT7-FDX1、pGBKT7-DNAJA1、pGBKT7-HSPA5、pGBKT7-PTPN2 分别与 pGADT7-BspC 共同转化酵母 Y2H Gold 感受态细胞进行回交验证试验，同时，设置阴、阳对照组和空质粒对照组，结果显示，阳性对照(pGBKT7-53＋pGADT7-T)能够激活报告基因的表达，在 QDO/X/A 培养基上长出蓝色克隆；阴性对照(pGBKT7-Lam ＋ pGADT7-T)、空白质粒对照(pGBKT7-BspC＋pGADT7)不能激活报告基因的表达，在 QDO/X/A 培养基上不生长，表明试验体系完好。pGBKT7-BspC ＋ pGADT7-FDX1、pGBKT7-BspC ＋ pGADT7-DNAJA1、pGBKT7-BspC ＋ pGADT7-HSPA5、pGBKT7-BspC＋pGADT7-PTPN2 菌株能够在 QDO/X/A 培养基上生长出蓝色克隆(图 8)，表明 BspC 与 FDX1、DNAJA1、HSPA5、PTPN2 蛋白能够相互作用。



A FDX1 蛋白 2 DNAJA1 蛋白 3 HSPA5 蛋白 4 PTPN2 蛋白

图 8 BspC 互作蛋白的回交验证

A FDX1 protein 2 DNAJA1 protein 3 HSPA5 protein 4 PTPN2 protein

Fig. 8 Backcross verification of BspC interacting proteins

讨 论

BtpB 具有 Toll 受体结构域，Toll 样受体结构域存在于真核生物的 Toll 样蛋白及其下游的 Toll 样衔接蛋白，当这二者相互作用时会产生级联信号引起核转录因子 κB(NF-κB)的核移位、促炎性细胞因子和 I 型干扰素的产生[15-17]。BPE123 是布鲁氏菌通过 VirB 转运的一种效应蛋白。有研究报道，通过液相串联质谱鉴别出了人的 α-烯醇酶，并用免疫共沉淀证明其可以与 BPE123 相互作用，α-烯醇酶的降解能阻碍牛种布鲁氏菌在人宫颈癌细胞中的增殖[16]。研究表明，通过酵母双杂交和共免疫沉淀筛选出了布鲁氏菌分泌蛋白 BspJ 相互作用宿主蛋白核苷二磷酸激酶 2 和肌酸激酶 B，且 BspJ 基因缺失菌株促进巨噬细胞凋亡，降

低布鲁氏菌在宿主细胞内的胞内存活[18]。

Myeni 等[11]利用生物信息学和 TEM-1 报告系统，鉴定到 BspA、BspB、BspF、BspC 和 BspE 5 个 T4SS 的底物；与野生型菌株和单缺失突变体相比，BspABF 突变体在小鼠肝脏中存活能力降低；BspB 与宿主保守的低聚高尔基体栓系复合体相互作用，通过劫持高尔基体囊泡的运输，使 BCV 能够稳定的向内质网方向移动，促进了 rBCV 的生物合成和布鲁氏菌的胞内增殖[19-20]。效应蛋白 BspA 和 BspF 能够抑制宿主细胞正常的蛋白分泌功能，促进布鲁氏菌的胞内增殖；BspF 缺失株在细胞中载菌量降低，感染小鼠的脾脏载菌量也降低[21]；BspC 和 BspE 存在于细胞核周围，其中 BspC 存在于高尔基体，BspE 则会形成囊泡[11]。本研究利用在线软件对 BspC 蛋白的生物信息进行预测分析，结果发现 BspC 蛋白具有信号肽，有 6 个抗原决定簇，二级结构以 α-螺旋为主。通过对 BspC 蛋白的生物信息进行预测分析，能够更好指导该蛋白的表达与纯化。

多克隆抗体生产过程简便、操作简单、产量大、成本低，且制备的多克隆抗体具有良好的抗体效价和特异性，因此研究者喜欢将其作为制备抗体的重要选择[22]。本研究还通过大肠埃希菌原核表达系统对 BspC 蛋白进行表达，免疫试验兔制备了多克隆抗体。在表达及纯化实验中发现 BspC 蛋白在上清中表达。使用纯化后的蛋白免疫兔 4 次结束后 1 周收集产生免疫抗体的兔血用间接 ELISA 法测定制备的多克隆抗体效价，结果显示，BspC 多克隆抗体效价可达 1∶512 000，这表明纯化的 BspC 具有良好的免疫原性，制备的抗 BspC 多克隆抗体具有较高的滴度，为亚单位疫苗的研发提供科学依据，为诊断试剂盒的研发以及相关抗体抑制剂的研究奠定了基础。

酵母双杂交系统是基于转录因子对细胞内蛋白质相互作用进行筛选与鉴定的系统，被广泛应用于病毒与宿主的互作研究[23-24]。本研究将 BspC 基因克隆到酵母双杂交表达载体 pGBKT7 中，并以 BspC 作为诱饵蛋白，从小鼠巨噬细胞 RAW264.7 cDNA 文库中初步鉴定与 BspC 存在相互作用的宿主蛋白，通过成功构建 BspC 的 bait 文库和细胞的 prey 文库，获得 7 个阳性克隆，然后进行测序，测序结果利用 NCBI 的 BLAST 比对分析，得到潜在互作宿主蛋白 FDX1、DNAJA1、HSPA5、PTPN2。FDX1 基因编码的蛋白作为蛋白脂酰化的调节因子参与介导铜死亡，并与肿瘤的免疫应答过程有关[25]。DNAJA1 可影响 p53 的定位和抗凋亡活性，增加致瘤性，介导细胞巨自噬[26]。HSPA5 与猪流行性腹泻病毒（PEDV）S 蛋白具有特异性相互作用，并通过干扰和过表达实验发现 HSPA5 对 PEDV 感染具有正向调节作用[27]。PTPN2 缺失严重损害巨噬细胞清除入侵细菌的能力[28]。后续将研究 FDX1、DNAJA1、HSPA5、PTPN2 如何调控布鲁氏菌胞内生存的分子机制。

【参考文献】

[1] Tuon FF, Gondolfo RB, Cerchiari N. Human-to-human transmission of *Brucella*-a systematic review [J]. Trop Med Int Health, 2017, 22(5): 539-546.

[2] Delpino MV, Barrionuevo P, Scian R, et al. *Brucella*-infected hepatocytes mediate potentially tissue-damaging immune responses [J]. J Hepatol, 2010, 53(1): 145-154.

[3] Jinior CAC, Moustacas VS, Xavier MN, et al. Andrological, pathologic, morphometric, and ultrasonographic findings in rams experimentally infected with *Brucella ovis* [J]. Small Ruminant Res, 2012, 102(2-3): 213-222.

[4] Liang L, Tan X, Juarez S, et al. Systems biology approach predicts antibody signature associated with *Brucella melitensis* infection in humans [J]. J Proteome Res, 2011, 10(10): 4813-4824.

[5] Celli J. The changing nature of the *Brucella*-containing vacurole [J]. Cell Microbiol, 2015, 17(7): 951-958.

[6] Jiao H, Zhou Z, Li B, et al. The mechanism of five intracellular parasitism of *Brucella*[J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(7): 3673.

[7] Del Giudice MG, Dohmer PH, Spera JM, et al. VirJ is a bracultatucella virulence factor involved in the secretion of type iv secreted substrates [J]. J Biol Chem, 2016, 291(23): 12383-12393.

[8] Macedo AA, Silva AP, Mol JP, et al. The abcEDCBA-Encoded ABC transporter and the virB operon-encoded type IV secretion system of *Brucella ovis* are critical for intracellular trafficking and survival in ovine monocyte-derived macrophages [J]. PLoS One, 2015, 10(9): e0138131.

[9] Sankarasubramanian J, Vishnu US, Dinakaran V, et al. Computational prediction of secretion systems and secretomes of *Brucella*: identification of novel type IV effectors and their interaction with the host [J]. Mol Biosyst, 2016, 12(1): 178-190.

[10] Ke Y, Wang Y, Li W, et al. Type IV secretion system of *Brucella spp*. and its effectors [J]. Front Cell Infect Microbiol, 2015, 5: 72.

[11] Myeni S, Child R, Ng TW, et al. *Brucella* modulates secretory trafficking via multiple type IV secretion effector proteins [J]. PLoS Pathog, 2013, 9(8): e1003556.

[12] 印双红，张俊波，李寅翠，等. 布鲁氏菌 DnaJ 蛋白的表达及功能分析[J]. 中国兽医杂志，2022，58(1)：10-15，26.

[13] 丁祎，张铭宇，庞维，等. 约氏疟原虫与伯氏疟原虫诱导感染小鼠产生保护性抗体的特点研究[J]. 微生物学杂志，2021，41(3)：68-74.

[14] 夏钱，龚威，金晶，等. 鸡 LncBMP4 编码小肽 EPC5 的生物信息学分析和多克隆抗体制备[J]. 农业生物技术学报，2023，31(3)：650-658.

[15] Felix C, Kaplan Turkoz B, Ranaldi S, et al. The *Brucella* TIR domain containing proteins BtpA and BtpB have a structural WxxxE motif important for protection against microtubule depolymerisation[J]. Cell Commun Signal, 2014, 12: 53.

[16] Marchesini MI, Morrone Seijo SM, 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.

[17] 肖启程，田一男，彭广能，等. 布鲁氏菌 IV 型分泌蛋白及其参与免疫应答的研究进展[J]. 中国人兽共患病学报，2017，33(11)：1029-1035，1040.

（下转 45 页）

和功能的调节[J]. 中国免疫学杂志,2016,32(10):1536-1540.
[8] 李圆圆,莫天录,姚永杰. 肠道菌群调控抑郁症炎症反应和氧化应激的机制及应用前景[J]. 科学通报,2023,68(33):4480-4490.
[9] 胡乃华. 石斛多糖通过改善肠道屏障功能、调节肠道微生物群、减少氧化应激和炎症反应改善右旋糖酐-硫酸钠诱导的小鼠结肠炎[J]. 天然产物研究与开发,2022,34(1):41.
[10] 彭慕立,苏赤,肖彧,等. 脑梗死患者认知功能障碍的炎症反应参与机制研究[J]. 海南医学院学报,2015,21(6):742-744.
[11] Sheng C, Lin L, Lin H, et al. Altered gut microbiota in adults with subjective cognitive decline: The SILCODE study[J]. J Alzheimers Dis, 82(2):513-526.
[12] 温娜娜,郑国华. 肠道菌群与老年认知障碍的研究进展[J]. 微生物学通报,2023,50(2):697-708.
[13] Wood JL, Weintraub S, Coventry C, et al. Montreal cognitive assessment (MoCA) performance and domain-specific index scores in amnestic versus aphasic dementia [J]. J Int Neuropsychol Soc, 2020, 26(9):927-931.
[14] Wang Q, Yang Q, Liu X. The microbiota-gut-brain axis and neurodevelopmental disorders. Protein Cell, 2023, 14(10):762-775.
[15] Lai Y, Dhingra R, Zhang Z, et al. Toward elucidating the human gut microbiota-brain axis: molecules, biochemistry, and implications for health and diseases[J]. Biochemistry, 2022, 61(24):2806-2821.
[16] Cerdo T, Dieguez E, Campoy C. Early nutrition and gut microbiome: interrelationship between bacterial metabolism, immune system, brain structure, and neurodevelopment[J]. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2019, 317(4):E617-E630.
[17] Bonnechere B, Amin N, van Duijn C. What are the key gut microbiota involved in neurological diseases? A systematic review[J]. Int J Mol Sci, 2022, 23(22):13665.
[18] 秦锐,冯昕. 无症状性脑梗死患者CRP及Hcy水平与认知功能障碍程度的关系[J]. 临床医学研究与实践,2019,4(36):122-124.
[19] 王莹,李慧英,甄伟兰,等. 腔隙性脑梗死早期患者同型半胱氨酸、高敏C反应蛋白及认知功能的临床分析[J]. 中国医药导报,2015,12(31):93-96.
[20] 刘辉武. 老年急性脑梗死患者血清HCY、CRP水平与认知功能障碍的关系[J]. 现代实用医学,2018,30(3):313-314,349.
[21] 曾秀丽,谭楚红,吴齐恒,等. 轻度认知功能障碍患者的肠道菌群特征[J]. 中国神经精神疾病杂志,2019,45(3):129-134.
[22] 田海涛,杨云红,李文俊,等. 肠道菌群及其代谢物在脑卒中后认知障碍发病机制中的研究进展[J]. 山东医药,2022,62(34):85-88.
[23] 汤倩倩,曹丽华. 肠道菌群与神经系统疾病[J]. 生物工程学报,2021,37(11):3757-3780.
[24] 李静,蒋春明. 肠道菌群及其代谢产物在炎症性肠病肠道屏障中的作用[J]. 中国现代医生,2022,60(22):89-92.
[25] 黄艳,高凌. 肠道微生物在脑肠轴及相关疾病中的作用[J]. 世界华人消化杂志,2017,25(34):3032-3037.
[26] 余锋,贾芳芳,徐帅,等. 运动介导肠道微生物-肠-脑轴调控神经功能的机制[J]. 上海体育学院学报,2021,45(1):66-77.
[27] 张银,闻俊,周婷婷. 肠道微生物多样性与神经系统疾病[J]. 中国药理学通报,2019,35(5):597-602.
[28] 郑少君,王志仁,王永前,等. 抑郁症和肠道微生态的关联性研究(综述)[J]. 中国心理卫生杂志,2018,32(7):537-541.
[29] 王云霞,李旺俊. 肠道菌群失调与阿尔茨海默病相关性及双歧杆菌四联活菌片对其改善作用[J]. 中国老年学杂志,2021,41(1):104-107.
[30] 周峰,周志强,嵇晴. 肠道菌群在神经精神疾病中的作用[J]. 医学综述,2019,25(23):4690-4695.
[31] Varesi A, Pierella E, Romeo M, et al. The potential role of Gut microbiota in alzheimer's disease: from diagnosis to treatment[J]. Nutrients, 2022, 14(3):668.
[32] Bello-Corral L, Alves-Gomes L, Fernandez-Fernandez JA, et al. Implications of gut and oral microbiota in neuroinflammatory responses in Alzheimer's disease[J]. Life Sci, 2023, 333:122132.

【收稿日期】 2024-07-02 【修回日期】 2024-09-30

(上接40页)

[18] Ma Z, Li R, Hu R, et al. *Brucella abortus* BspJ is a nucleomodulin that inhibits macrophage apoptosis and promotes intracellular survival of *Brucella* [J]. Front Microbiol, 2020, 11:599205.
[19] 焉鑫,李干武,胡森,等. 布鲁氏菌分泌系统及其底物蛋白的研究进展[J]. 中国预防兽医学报,2021,43(9):1019-1024.
[20] 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.
[21] 吴同垒,单晓枫,康元环,等. 布鲁菌Ⅳ型分泌系统效应蛋白的研究进展[J]. 中国兽医学报,2018,38(3):602-608.
[22] 陈秋利,杨丽超,李辉,等. 人Nek2蛋白原核表达纯化及其多克隆抗体制备[J]. 中国生物工程杂志,2020,40(3):31-37.
[23] Paiano A, Margiotta A, De Luca M, Bucci C. Yeast two-hybrid assay to identify interacting proteins[J]. Curr Protoc Protein Sci, 2019, 95(1):e70.
[24] Makuch L. Yeast two-hybrid screen[J]. Methods Enzymol, 2014, 539:31-51.
[25] Lu H, Zhou L, Zhang B, et al. Cuproptosis key gene FDX1 is a prognostic biomarker and associated with immune infiltration in glioma [J]. Front Med (Lausanne), 2022, 9:939776.
[26] Roth HE, Bhinderwala F, Franco R, et al. DNAJA1 Dysregulates metabolism promoting an antiapoptotic phenotype in pancreatic ductal adenocarcinoma [J]. J Proteome Res, 2021, 20(8):3925-3939.
[27] hou C, Liu Y, Wei Q, et al. HSPA5 promotes attachment and internalization of porcine epidemic diarrhea virus through interaction with the spike protein and the Endo-/Lysosomal pathway [J]. J Virol, 2023, 97(6):e0054923.
[28] Spalinger MR, Shawki A, Chatterjee P, et al. Autoimmune susceptibility gene PTPN2 is required for clearance of adherent-invasive *Escherichia coli* by integrating bacterial uptake and lysosomal defence [J]. Gut, 2022, 71(1):89-99.

【收稿日期】 2024-05-21 【修回日期】 2024-08-16