

李 军,李常挺,潘 艳,等. 羊种布鲁氏菌 NN1202 和 LA1105 株 OPM25 和 OPM31 蛋白 B 细胞抗原表位分析[J]. 江苏农业科学,2015,43(8):38-41.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2015.08.011

羊种布鲁氏菌 NN1202 和 LA1105 株 OPM25 和 OPM31 蛋白 B 细胞抗原表位分析

李 军^{1,2}, 李常挺³, 潘 艳^{1,2}, 杨 威^{1,2}, 许力干^{1,2}, 陈泽祥^{1,2}

(1. 广西兽医研究所,广西南宁 530001; 2. 广西畜禽疫苗新技术重点实验室,广西南宁 530001;

3. 广西隆安县动物疫病预防控制中心,广西隆安 532700)

摘要:应用 PCR 技术对羊种布鲁氏菌 NN1202 和 LA1105 株的 *OMP25* 和 *OMP31* 基因进行扩增、克隆和测序。测序结果显示,NN1202 和 LA1105 株的 *OMP25* 和 *OMP31* 基因在布鲁氏菌种间高度保守。应用 Garnier - Robson 方法和 Chou - Fasman 方法分析 *OMP25* 和 *OMP31* 蛋白的 α - 螺旋、 β - 折叠、转角区域和卷曲区域;应用 Kyte - Doolittle 方法、Karplus - Schulz 方法、Emini 方法和 Jameson - Wolf 方法分析蛋白的氨基酸亲水性、蛋白柔性区域、溶剂表面可及性和抗原指数。对各方法的结果综合分析,*OMP25* 蛋白的 27 ~ 34、59 ~ 65、69 ~ 75、101 ~ 107、148 ~ 154、182 ~ 189、197 ~ 202 区域以及 *OMP31* 蛋白的 25 ~ 32、50 ~ 58、63 ~ 70、102 ~ 111、125 ~ 130、166 ~ 173、176 ~ 183 区域可能是优势 B 细胞抗原表位。

关键词:布鲁氏菌;*OMP25*;*OMP31*;抗原表位

中图分类号: S858.26 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2015)08-0038-04

布鲁氏菌是一种感染人、家畜、野生动物等 60 多种动物的人兽共患病原菌,根据宿主和致病性的差异,分为羊种布鲁氏菌(*Brucella melitensis*)、牛种布鲁氏菌(*B. abortus*)、猪种布鲁氏菌(*B. suis*)、绵羊附睾种布鲁氏菌(*B. ovis*)、犬种布鲁氏菌(*B. canis*)和沙林鼠种布鲁氏菌(*B. neotomae*)6 个种;此外,还从海洋动物中分离到在致病性和分子特征上有别于前 6 种的海豚布鲁氏菌(*B. cetaceae*)和海豹布鲁氏菌(*B. pinnipediae*)^[1]。在这 8 种布鲁氏菌中,以羊种布鲁氏菌对人的致病性最强。布鲁氏菌的外膜由外膜蛋白、脂多糖和磷脂层构成。外膜蛋白为一类与毒力密切相关的免疫原性蛋白^[2-3],其中,分子量分别为 25 ku (*OMP25*)和 31 ku (*OMP31*)的 2 种外膜蛋白是布鲁氏菌的主要外膜蛋白^[4-5]。*OMP25* 蛋白和 *OMP31* 蛋白免疫小鼠后,能分别诱导产生 IgG_{2a} 和 IgG₁ 类型的抗体,是一种抗原免疫保护蛋白^[6-7]。Bowden 等证实 *OMP31* 的单克隆抗体与其诱导产生的抗体存在竞争抑制现象,表明 *OMP31* 存在抗原表位^[8]。本研究拟对广西分离的 2 株羊种布鲁氏菌 NN1202、LA1105 菌株的 *OMP25* 和 *OMP31* 基因进行克隆、测序,运用生物信息学技术对二者的 B 细胞抗原表位进行分析,为后续的合成肽疫苗研究提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株 羊种布鲁氏菌 NN1202 和 LA1105 菌株由广西兽医研究所细菌研究室分离、鉴定和保存^[9]。羊种布氏菌 5 号疫苗为 PCR 扩增阳性对照菌株。

1.1.2 试剂 布氏琼脂粉购自英国 Oxoid 公司;马血清购自美国 Thermo 公司;细菌基因组 DNA 提取试剂盒、DNA 胶回收试剂盒及 PCR 反应所用试剂购自北京康为世纪生物科技有限公司。

1.2 方法

1.2.1 *OMP25* 和 *OMP31* 基因的 PCR 扩增和克隆 取保存的羊种布鲁氏菌 NN1202 株和 LA1105 株冻干菌种,每支菌种加入 0.2 mL 无菌水溶解,接种棒蘸取菌液接种于含 10% 马血清布氏琼脂斜面培养基,置于 37 ℃ 的 CO₂ 培养箱培养 72 h。用细菌基因组 DNA 提取试剂盒提取细菌 DNA,以细菌 DNA 为模板对 *OMP25* 和 *OMP31* 基因进行 PCR 扩增。以羊种布氏菌 5 号疫苗为阳性对照。PCR 反应条件为:95 ℃ 5 min;95 ℃ 1 min,60 ℃ (57 ℃) 1 min,72 ℃ 1 min,共 35 个循环;72 ℃ 10 min。扩增预期片段分别为 650 bp 和 750 bp。引物序列分别为 *OMP25* - F:5' - GAATTCATGCGACTCTTA-AGTCTCTC - 3'; *OMP25* - R:5' - GTCGACTTAGAACTTG-TAGCCGATGCC - 3'; *OMP31* - F:5' - GCGAATTCAT-GAAGTCCGTAATT - 3'; *OMP31* - R:5' - GCCTCGAGT-TAGAACTTGTAGTT - 3。引物由上海英骏生物技术有限公司合成。

DNA 胶回收试剂盒纯化、回收目的片段后,与 pMD - 18T 载体 4 ℃ 过夜连接,转化大肠杆菌 DH5 α ,PCR 鉴定正确的阳性克隆送上海英骏生物技术有限公司测序。

收稿日期:2014-08-05

基金项目:公益性行业(农业)科研专项(编号:201103008);广西畜禽疫苗新技术重点实验室系统性研究课题(编号:12-071-28-A-6);广西科技成果转化资金(编号:10100017-8)。

作者简介:李 军(1971—),男,广东梅县人,博士,副研究员,主要从事动物疫病防治与病原分子生物学研究。

通信作者:陈泽祥,研究员。E-mail:xjszexian@163.com。

1.2.2 *OMP25* 和 *OMP31* 基因的核苷酸同源性分析 应用 MegAlign 软件对测序获得的 *OMP25* 和 *OMP31* 基因的核苷酸序列与 GenBank 上登录的已知序列进行同源性比较,分析它们之间的亲缘关系。

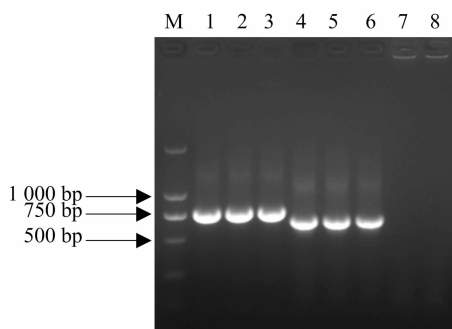
1.2.3 *OMP25* 蛋白和 *OMP31* 蛋白二级结构分析 运用 Garnier - Robson 方法和 Chou - Fasman 方法分析 *OMP25* 蛋白和 *OMP31* 蛋白的 α - 螺旋、 β - 折叠、转角区域和卷曲区域^[10-11]。

1.2.4 *OMP25* 蛋白和 *OMP31* 蛋白 B 细胞抗原表位分析 应用 Kyte - Doolittle 方法、Karplus - Schulz 方法、Emini 方法和 Jameson - Wolf 方法分析 *OMP25* 蛋白和 *OMP31* 蛋白的氨基酸亲水性、蛋白柔性区域、溶剂表面可及性和抗原指数,综合各方法的结果并结合 B 细胞表位网上预测 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/BepiPred/>) 来分析 *OMP25* 蛋白和 *OMP31* 蛋白的 B 细胞抗原表位^[12-15]。

2 结果与分析

2.1 *OMP25* 和 *OMP31* 基因的 PCR 扩增

提取羊种布鲁氏菌 NN1202 株和 LA1105 株的 DNA,分别对 *OMP25* 和 *OMP31* 基因进行 PCR 扩增,得到 650 bp 和 750 bp 的扩增片段,大小与阳性对照羊种布鲁氏菌 5 号疫苗的扩增结果一致(图 1)。



M—DM2000; 1—羊种布鲁氏菌5号疫苗*OMP31*; 2—NN1202株*OMP31*; 3—LA1105株*OMP31*; 4—羊种布鲁氏菌5号疫苗*OMP25*; 5—NN1202株*OMP25*; 6—LA1105株*OMP25*; 7—*OMP31*阴性对照; 8—*OMP25*阴性对照

图1 *OMP25* 和 *OMP31* PCR电泳结果

2.2 *OMP25* 和 *OMP31* 基因的核苷酸同源性分析

NN1202 株和 LA1105 株的阳性 *OMP25* 质粒测序后证实扩增片段大小为 650 bp,内含 1 个 642 bp 的开放阅读框,编码 213 个氨基酸,它们的核苷酸序列已登录 GenBank,登录号分别为 KJ720202 和 KJ720201。将它们的核苷酸序列与 GenBank 登录的相应序列进行同源性比较,NN1202 株和 LA1105 株 *OMP25* 之间的同源性为 100%,与羊种布鲁氏菌 M5 - 90 (CP001852)、猪种布鲁氏菌 S2 (CP006961)、牛种布鲁氏菌 S19 (CP000887)、犬种布鲁氏菌 ATCC23365 (CP000872)、绵羊附睾种 ATCC25840 (CP000708) 的同源性均为 100%。

NN1202 株和 LA1105 株的阳性 *OMP31* 质粒测序后证实扩增片段大小为 750 bp,内含 1 个 723 bp 的开放阅读框,编码 240 个氨基酸,它们的核苷酸序列已登录 GenBank,登录号

分别为 KJ720203 和 KJ720204。将它们的核苷酸序列与 GenBank 登录的相应序列进行同源性比较,NN1202 株、LA1105 株和羊种布鲁氏菌 M5 - 90 (CP001852) *OMP25* 之间的同源性均为 100%;与猪种布鲁氏菌 S2 (CP006961)、犬种布鲁氏菌 ATCC23365 (CP000872)、绵羊附睾种 ATCC25840 (CP000708) 的同源性为 99%。

2.3 *OMP25* 蛋白和 *OMP31* 蛋白二级结构分析

综合 Garnier - Robson 方法和 Chou - Fasman 方法的分析,*OMP25* 蛋白有 4 个 α - 螺旋区域 (13 ~ 29、75 ~ 79、100 ~ 104、109 ~ 114), 9 个 β - 折叠区域 (6 ~ 10、49 ~ 55、62 ~ 67、86 ~ 91、130 ~ 144、154 ~ 159、173 ~ 181、190 ~ 196、204 ~ 207)。在 α - 螺旋和 β - 折叠区域的间隙分布着长短不一的 13 个转角区域和 11 个卷曲区域(图 2)。*OMP31* 蛋白有 4 个 α - 螺旋区域 (4 ~ 21、121 ~ 134、144 ~ 145、172 ~ 176), 9 个 β - 折叠区域 (22 ~ 25、75 ~ 77、82 ~ 88、97 ~ 102、112 ~ 115、135 ~ 139、147 ~ 152、156 ~ 163、230 ~ 240)。在 α - 螺旋和 β - 折叠区域的间隙分布着长短不一的 17 个转角区域和 12 个卷曲区域(图 3)。

2.4 *OMP25* 蛋白和 *OMP31* 蛋白的氨基酸亲水性分析

Kyte - Doolittle 方法分析表明,*OMP25* 蛋白有较多的亲水性区域 (≥ 0.5),分布较为均匀,主要有 27 ~ 32、44 ~ 46、57 ~ 64、69 ~ 75、83 ~ 87、95 ~ 110、144 ~ 156、178 ~ 191、197 ~ 205 区域(图 4)。*OMP31* 蛋白的亲水区域 (≥ 0.5) 主要集中在 C 端,主要有 54 ~ 72、89 ~ 94、105 ~ 107、123 ~ 131、176 ~ 184、194 ~ 213、215 ~ 217、221 ~ 224 区域(图 5)。

2.5 *OMP25* 蛋白和 *OMP31* 蛋白的柔性区域分析

Karplus - Schulz 方法分析表明,*OMP25* 蛋白的柔性区域主要位于 28 ~ 34、59 ~ 76、103 ~ 108、110 ~ 120、140 ~ 154、182 ~ 189 和 193 ~ 205 (图 6)。*OMP31* 蛋白柔性区域主要位于 24 ~ 32、61 ~ 75、102 ~ 115、119 ~ 130、178 ~ 183、208 ~ 215 和 218 ~ 227 (图 7)。

2.6 *OMP25* 蛋白和 *OMP31* 蛋白的溶剂表面可及性分析

Emini 方法分析表明,59 ~ 63、70 ~ 75、101 ~ 107、177 ~ 189 和 196 ~ 202 区域出现在 *OMP25* 蛋白溶剂表面可及性较大 (≥ 1) (图 8)。*OMP31* 蛋白的溶剂表面可及性区域较少,只有 2 个区域 (63 ~ 69 和 177 ~ 182) (图 9)。

2.7 *OMP25* 蛋白和 *OMP31* 蛋白的抗原指数分析

Jameson - Wolf 方法分析表明,*OMP25* 蛋白抗原指数较高的区域 (≥ 0) 有:26 ~ 33、56 ~ 65、68 ~ 75、93 ~ 99、101 ~ 105、117 ~ 127、143 ~ 156、165 ~ 179、183 ~ 190、195 ~ 207,以 C 端区域的抗原指数较高,跨度较大,存在抗原表位的可能性也较大(图 10)。*OMP31* 蛋白抗原指数较高的区域 (≥ 0) 分布较均匀,以 23 ~ 33、51 ~ 75、102 ~ 111、118 ~ 130、136 ~ 147、167 ~ 173、177 ~ 184 和 206 ~ 227 区域存在抗原表位的可能性较大(图 11)。

2.8 *OMP25* 蛋白和 *OMP31* 蛋白 B 细胞表位综合分析

应用 Kyte - Doolittle 方法、Karplus - Schulz 方法、Emini 方法和 Jameson - Wolf 方法并结合 B 细胞表位网上预测分析 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/BepiPred/>), *OMP25* 蛋白的 27 ~ 34、59 ~ 65、69 ~ 75、101 ~ 107、148 ~ 154、182 ~ 189、197 ~ 202 区域以及 *OMP31* 蛋白的 25 ~ 32、50 ~ 58、63 ~ 70、

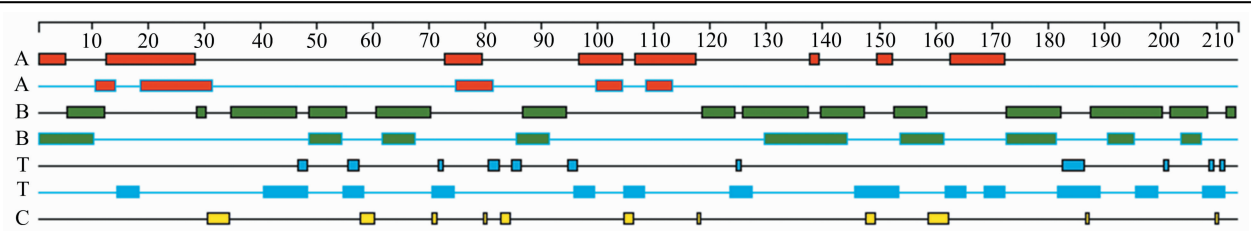


图2 OMP25 蛋白的二级结构分析

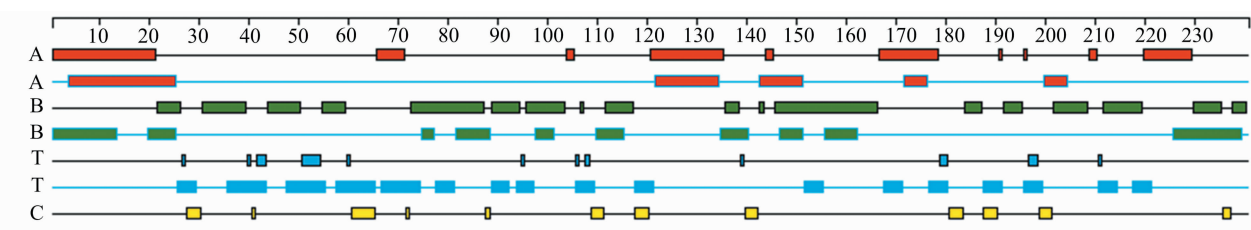


图3 OMP31蛋白的二级结构分析

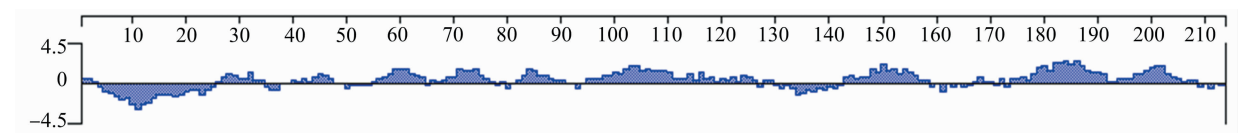


图4 OMP25蛋白的氨基酸亲水性分析

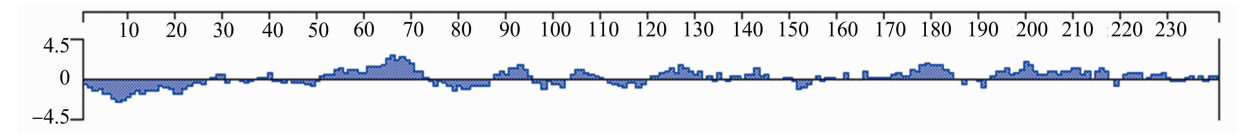


图5 OMP31蛋白的氨基酸亲水性分析

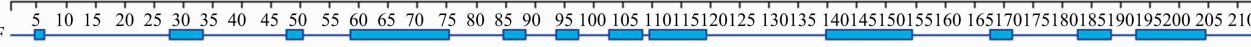


图6 OMP25蛋白柔性区域分析

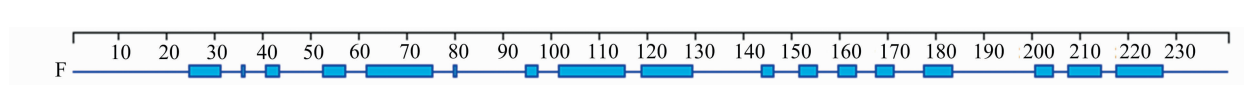


图7 OMP31蛋白柔性区域分析

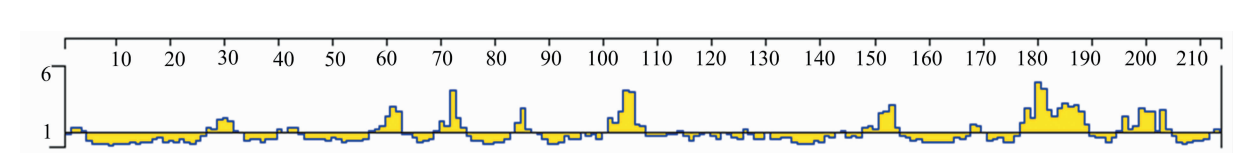


图8 OMP25 蛋白溶剂表面可及性分析

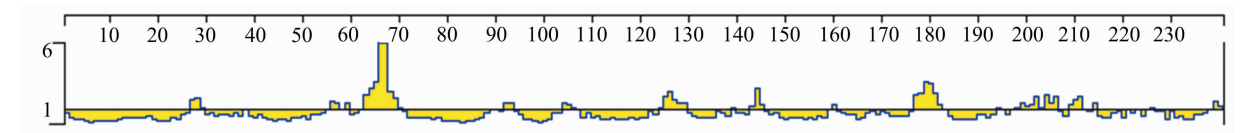


图9 OMP31 蛋白溶剂表面可及性分析

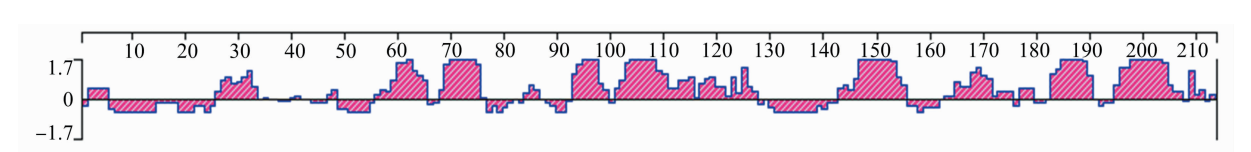


图10 OMP25 蛋白抗原指数分析

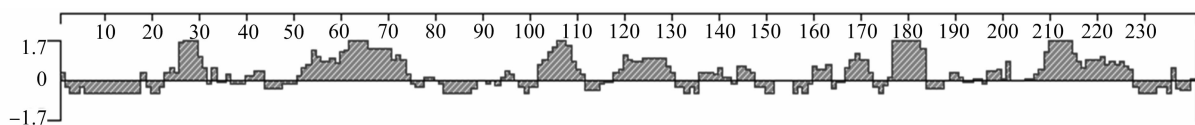


图11 OMP31 蛋白抗原指数分析

102 ~ 111、125 ~ 130、166 ~ 173、176 ~ 183 区域均具有较好的亲水性、柔性和溶剂表面可及性,抗原指数也较高,结合蛋白二级结构上含有容易形成抗原表位的转角和卷曲区域,因此,这些区域极有可能是 OMP25 蛋白和 OMP31 蛋白的优势 B 细胞抗原表位。

3 讨论

研究证实,布鲁氏菌 OMP25 和 OMP31 基因是免疫原性基因,它们编码的蛋白对小鼠具有免疫保护作用^[6-7]。本研究对羊种 NN1202 株和 LA1105 株 OMP25 和 OMP31 基因核苷酸同源性比较结果表明,OMP25 和 OMP31 基因在布鲁氏菌种间高度保守,OMP25 和 OMP31 蛋白可以作为布鲁氏菌合成肽疫苗的候选靶蛋白。

利用生物信息技术对病原微生物的抗原蛋白二级结构和 B 细胞抗原表位进行分析是研制合成肽疫苗的基础^[16]。研究表明,B 细胞抗原表位的形成取决于蛋白二级结构的形成。蛋白在形成立体构象时,多肽链中的 α -螺旋和 β -折叠的氢键键能高,形成稳定的刚性结构,在蛋白内部中起着“骨架”作用,不易与抗体结合,成为 B 细胞抗原表位的几率低。相反,转角和卷曲区域的氢键键能低,形成盘旋、扭曲等松散的柔性结构暴露在蛋白表面,与抗体结合的几率大,成为 B 细胞抗原表位的可能性高^[17]。此外,氨基酸的亲水性、极性也决定了其是否暴露在蛋白表面,因此,蛋白的亲水部位和溶剂表面可及性也与 B 细胞抗原表位有密切关系。

B 细胞抗原表位的分析方法主要有蛋白二级结构分析、氨基酸亲水性分析、蛋白柔性区域分析、溶剂表面可及性分析^[10-14]。Jamson 等将上述 4 种方法综合,以蛋白二级结构分析占 40%、氨基酸亲水性分析占 30%、蛋白柔性区域分析占 15%、溶剂表面可及性分析占 15% 的计算模式,提出一种抗原指数分析法^[15]。根据该方法分析,发现 OMP25 蛋白的 26 ~ 33、56 ~ 65、68 ~ 75、93 ~ 99、101 ~ 105、117 ~ 127、143 ~ 156、165 ~ 179、183 ~ 190、195 ~ 207 区域以及 OMP31 蛋白的 23 ~ 33、51 ~ 75、102 ~ 111、118 ~ 130、136 ~ 147、167 ~ 173、177 ~ 184 和 206 ~ 227 区域存在抗原表位的可能性较大,但由于蛋白在形成立体构象时,蛋白表面的氨基酸会遮盖一些抗原指数较高的区域,使其不能成为优势抗原表位,因此,根据综合分析,笔者选择 OMP25 蛋白的 27 ~ 34、59 ~ 65、69 ~ 75、101 ~ 107、148 ~ 154、182 ~ 189、197 ~ 202 区域以及 OMP31 蛋白的 25 ~ 32、50 ~ 58、63 ~ 70、102 ~ 111、125 ~ 130、166 ~ 173、176 ~ 183 区域作为后续合成肽疫苗研究的靶位点。

参考文献:

[1] 陆承平. 兽医微生物学[M]. 4 版. 北京:中国农业出版社,2007: 1-152.
[2] Cloeckaert A, Vizcaino N, Paquet J Y, et al. Major outer membrane

proteins of *Brucella* spp.: past, present and future[J]. Veterinary Microbiology, 2002, 90(1/4): 229-247.
[3] Verstrete D R, Creasy M T, Caveney N T, et al. Outer membrane proteins of *Brucella abortus*: isolation and characterization[J]. Infection and Immunity, 1982, 35(3): 979-989.
[4] 曲 勃, 王玉飞, 徐 杰, 等. 羊布鲁氏菌外膜蛋白质的组成鉴定[J]. 吉林大学学报:医学版, 2009, 35(5): 805-811.
[5] Eschenbrenner M, Wagner M A, Horn T A, et al. Comparative proteome analysis of *Brucella melitensis* vaccine strain Rev 1 and a virulent strain 16M[J]. Journal of Bacteriology, 2002, 184(18): 4962-4970.
[6] Bowden R A, Cloeckaert A, Zygmunt M S, et al. Evaluation of immunogenicity and protective activity in BALB/c mice of the 25-kDa major outer-membrane protein of *Brucella melitensis* (Omp25) expressed in *Escherichia coli*[J]. Journal of Medical Microbiology, 1998, 47(1): 39-48.
[7] Cassataro J, Estein S M, Pasquevich K A, et al. Vaccination with the recombinant *Brucella* outer membrane protein 31 or a derived 27-amino-acid synthetic peptide elicits a CD4⁺ Thelper 1 response that protects against *Brucella melitensis* infection[J]. Infection and Immunity, 2005, 73(12): 8079-8088.
[8] Bowden R A, Estein S M, Zygmunt M S, et al. Identification of protective outer membrane antigens of *Brucella ovis* by passive immunization of mice with monoclonal antibodies[J]. Microbes and Infection, 2000, 2(5): 481-488.
[9] 李 军, 陈泽祥, 杨 威, 等. 广西家畜布鲁氏菌病的监测分析[J]. 中国人兽共患病学报, 2012, 28(7): 754-758.
[10] Garnier J, Osguthorpe D J, Robson B. Analysis of the accuracy and implications of simple methods for predicting the secondary structure of globular proteins[J]. Journal of Molecular Biology, 1978, 120(1): 97-120.
[11] Chou P Y, Fasman G D. Prediction of the secondary structure of proteins from their amino acid sequence[J]. Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology, 1978, 47: 45-148.
[12] Kyte J, Doolittle R F. A simple method for displaying the hydropathic character of a protein[J]. Journal of Molecular Biology, 1982, 157(1): 105-132.
[13] Karplus P A, Schulz G E. Prediction of chain flexibility in proteins[J]. Naturwissenschaften, 1985, 72(4): 212-213.
[14] Emini E A, Hughes J V, Perlow D S, et al. Induction of hepatitis A virus-neutralizing antibody by a virus-specific synthetic peptide[J]. Journal of Virology, 1985, 55(3): 836-839.
[15] Jameson B A, Wolf H. The antigenic index: a novel algorithm for predicting antigenic determinants[J]. Computer Applications in the Biosciences, 1988, 4(1): 181-186.
[16] 张洪勇, 金宁一. 合成肽疫苗的分子设计[J]. 生物技术通讯, 2003, 14(2): 145-147.
[17] 来鲁华. 蛋白质的结构预测与分子设计[M]. 北京:北京大学出版社, 1993: 49-61.