

王书利,李志强,魏淑娟,等. 布鲁氏菌外膜蛋白 OMP25 诱导 BALB/c 小鼠免疫反应的分析 [J]. 中国实验动物学报, 2022, 30(5): 655-661.

Wang SL, Li ZQ, Wei SJ, et al. Immune responses of BALB/c induced by *Brucella melitensis* outer membrane protein OMP25 [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2022, 30(5): 655-661.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2022.05.008

布鲁氏菌外膜蛋白 OMP25 诱导 BALB/c 小鼠免疫反应的分析

王书利^{1,2}, 李志强², 魏淑娟², 司丽芳^{1*}

(1. 河南科技大学动物科技学院, 河南 洛阳 471003; 2. 商丘师范学院生物与食品学院, 河南 商丘 476000)

【摘要】 目的 本研究旨在分析布鲁氏菌外膜蛋白 OMP25 诱导机体产生的免疫反应。方法 采用 PCR 方法扩增羊种布鲁氏菌 16M 的 *omp25* 基因, 克隆至 pET-32a 质粒。重组质粒 pET32a-OMP25 转化至大肠杆菌 BL21 (DE3) 中, 并诱导表达。利用 Ni²⁺ 柱纯化试剂盒进行蛋白纯化。用纯化的重组蛋白 (rOMP25) 和 Rev. 1 疫苗株免疫小鼠, 检测小鼠脾细胞中 IFN- γ 和 IL-2 的水平, 以及小鼠血清中 IgG 抗体和抗炎因子 IL-10 水平, 并用 Western Blot 检测反应原性。结果 (1) *omp25* 基因大小为 642 bp, 编码 214 个氨基酸, rOMP25 大约在 40.8×10^3 处出现蛋白条带, 纯化后为单一条带。(2) 用 *t* 检验方法统计显示, rOMP25 免疫小鼠后, 诱导脾细胞产生 IFN- γ 和 IL-2 的水平, 小鼠血清中 IgG 和 IL-10 的水平与 Rev. 1 组相似, 显著高于对照组 ($P < 0.01$)。(3) Western Blot 检测结果显示, rOMP25 具有较好的反应原性。结论 rOMP25 具有较好的免疫原性和反应原性, 为进一步研究 OMP25 蛋白的功能, 以及研制相关疫苗提供了生物材料。

【关键词】 布鲁氏菌; OMP25; 免疫

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2022) 05-0655-07

Immune responses of BALB/c induced by *Brucella melitensis* outer membrane protein OMP25

WANG Shuli^{1,2}, LI Zhiqiang², WEI Shujuan², SI Lifang^{1*}

(1. College of Animal Science and Technology, Henan University of Science and Technology, Luoyang 471003, China.

2. College of Biology and Food, Shangqiu Normal University, Shangqiu 476000)

Corresponding author: SI Lifang. E-mail: 511488470@qq.com

【Abstract】 **Objective** The purpose of this study was to analyze the immune responses induced by *Brucella melitensis* (*B. melitensis*) outer membrane protein OMP25. **Methods** The *omp25* gene from *B. melitensis* 16M was amplified by PCR. The fragment was cloned into pET-32a vector plasmid. The constructed recombinant plasmid pET32a-OMP25 was transformed to *E. coli* BL21 (DE3) and was induced to express the fusion protein. Then the protein was purified using a Ni²⁺ column purification kit. Mice were immunized with rOMP25 and current vaccine Rev. 1, and IFN- γ , IL-2 in splenocytes and IgG antibody and anti-inflammatory factor IL-10 levels in the serum were detected by ELISA. The reactionogenicity was detected by Western Blot. **Results** (1) The full length of the *omp25* gene was 642 bp, encoding 214 amino acids. rOMP25 was approximately 40.8×10^3 as measured by SDS-PAGE. There was a single band after

【基金项目】 河南省高等学校重点科研项目 (21A230015), 河南省重点研发与推广专项 (科技攻关) 项目 (212102310746)。

Funded by the Key Scientific Research Project of Colleges and Universities in Henan Province (21A230015), Foundation of the Technology Department of Henan Province (212102310746).

【作者简介】 王书利 (1988—), 女, 在读硕士研究生, 研究方向: 动物传染病致病机理及免疫防治。Email: 453144249@qq.com

【通信作者】 司丽芳 (1976—), 女, 副教授, 博士, 研究方向: 微生物与分子生物学。Email: 511488470@qq.com

purification. (2) The *t*-test method showed that mice were immunized with rOMP25 and Rev. 1, the levels of IFN- γ and IL-2 in splenocytes, IgG antibody and IL-10 levels in serum in the rOMP25 group were similar to those in the Rev. 1 group, and significantly greater than those in the control ($P < 0.01$). (3) rOMP25 had good reactivity as observed in the Western Blot. These result confirmed that rOMP25 could induce the body to produce high levels of cellular and humoral immunity, with good reactivity. **Conclusions** This study provides technical support for further study of the function of OMP25 protein for *B. melitensis* related vaccine development.

【Keywords】 *Brucella melitensis*; OMP25; immunity

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

布鲁氏菌病是由布鲁氏菌引起的细菌性人畜共患病,给许多发展中国家造成了巨大的公共卫生负担^[1]。人类通过接触受感染的动物或其产品而感染布鲁氏菌病^[2]。动物发病后主要表现为流产,而人类发病后会导致反复发热、脊柱炎、关节炎和骨髓炎等^[3]。Rev. 1 是通过世界卫生组织和世界动物卫生组织认证的用于羊的疫苗株^[4]。Rev. 1 为光滑型菌株,具有链霉素抗性^[5]。Rev. 1 可诱导机体较强的免疫应答,保护羊免受布鲁氏菌的感染^[6]。但这些疫苗也有一些缺点,如妊娠动物流产、干扰血清学诊断、通过气溶胶传播,及引起局部超敏反应等^[7]。因此,需要研制一种安全有效的疫苗。

重组亚单位疫苗是当前布鲁氏菌疫苗研发热点,该疫苗不存在毒性,不会引起感染。外膜蛋白是布鲁氏菌保护性抗原。OMP25 是布鲁氏菌的一种外膜蛋白,在多种布鲁氏菌属和菌株中具有高度保守性,与布鲁氏菌的肽聚糖层结合^[8]。OMP25 是布鲁氏菌毒力因子之一,可抑制 TNF- α 产生,是布鲁氏菌潜在抗原^[9-10]。基于 OMP25 在布鲁氏菌毒力中的意义,我们研究了羊种布鲁氏菌 OMP25 作为布鲁氏菌病亚单位疫苗候选株的可行性。由于重组蛋白亚单位疫苗的组成是已知的,且不能在宿主体内复制,免疫动物后不会致病,因此,亚单位疫苗被认为是新一代疫苗更好、更安全的选择。

本研究为了筛选布鲁氏菌亚单位疫苗株的候选抗原,对外膜蛋白 OMP25 进行原核表达,并对其诱导机体产生的免疫反应进行检测,为亚单位疫苗候选抗原的筛选提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

15 只 SPF 级雌性 BALB/c 小鼠,6 周龄,体重约为 25 ~ 30 g,购于河南省实验动物中心【SCXK(豫)2017-0001】,饲养于商丘美兰生物工程有限公司动

物实验室【SYXK(豫)2017-0006】。饲养期间各组小鼠自由饮水,饲喂普通维持饲料由河南省实验动物中心【SCXK(豫)2017-0001】提供。饲养环境:温度控制在 22 ~ 25℃,湿度 50% ~ 60%,自动光控(昼夜各半循环照明)。所有操作均符合商丘师范学院实验动物伦理学要求(2021-5)。

1.1.2 主要试剂与仪器

T-Vector pMD 19 (Simple) 载体 (TaKaRa, 日本);限制性内切酶 *Bam*H I (TaKaRa, 日本);限制性内切酶 *Sal* I (TaKaRa, 日本);DNA Ligation Kit Ver. 2.1 (TaKaRa, 日本);DNA Marker (TaKaRa, 日本);pET-32a 载体 (Promega, 美国);蛋白 Marker (博士德, 中国);2 × Taq PCR Mastermix (天根生化科技(北京)有限公司, 中国);琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒 (中科瑞泰(北京)生物科技有限公司, 中国);高纯度质粒小提试剂盒 (天根生化科技(北京)有限公司, 中国);大肠杆菌 (*E. coli*) DH5 α 和 BL21 (DE3)感受态细胞 (北京全式金生物技术有限公司, 中国);IPTG 诱导剂 (西格玛奥德里奇(上海)贸易有限公司, 中国);蛋白纯化试剂盒 (北京康为世纪生物科技有限公司, 中国);氨苄霉素 (西格玛奥德里奇(上海)贸易有限公司, 中国);刀豆蛋白 (ConA, 上海源叶生物有限公司);NC 膜 (北京索莱宝科技有限公司, 中国);辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的羊抗鼠 IgG (EarthOx, 美国);布鲁氏菌(外膜蛋白 OMP25)特异性 IgG ELISA 检测试剂盒 (RD, 美国);细胞因子 ELISA 检测试剂盒 (RD, 美国);RPMI 1640 细胞培养液 (Gibco 生命科技公司, 美国);胎牛血清 (Gibco 生命科技公司, 美国);一次性细胞培养板 (Gibco 生命科技公司, 美国)。

微量移液枪 (Eppendorf, 德国);PCR 仪 (nexus GSX1, Eppendorf, 德国);凝胶成像系统 (Gel Doc XR+, Bio-Rad, 美国);高速离心机 (MiniSpin, Eppendorf, 德国);冷冻离心机 (Centrifuge 5810R, Eppendorf, 德国);电子分析天平 (FA2204, 上海舍岩

仪器有限公司,中国);电热恒温培养箱(DNP-9052,上海舍岩仪器有限公司,中国);恒温摇床(OLB-200B,欧莱博,中国);电泳仪、电泳槽和半干式转膜系统(北京六一生物科技发展有限公司,中国);分子杂交箱(Big SHOT III,Boekel Scientific,美国);生物安全柜(BIO II A,Telstar,西班牙)。

1.2 方法

1.2.1 重组质粒的构建与鉴定

利用 Primer5.0 软件,根据 GenBank 登录的布鲁氏菌 16M 的 *omp25* 基因序列(BMEI1249)设计引物(表 1)。以布鲁氏菌 16M 基因组为模板,PCR 扩增 *omp25* 基因。利用琼脂糖凝胶电泳对扩增产物进行检测,将扩增产物进行回收纯化后,克隆至 pMD 19-T simple 载体,获得重组质粒。采用限制性内切酶 *Bam*H I/*Sal* I 对质粒进行酶切后与 pET-32a 载体相连,获得 pET OMP25-32a 质粒。质粒经 *Bam*H I/*Sal* I 双酶切鉴定后,由公司测序鉴定。转化鉴定正确的质粒至 *E. coli* BL21 感受态细胞,获得克隆菌。

表 1 *omp25* 基因的引物序列

Table 1 Primers for the *omp25*

引物名称 Primer names	引物序列(5'-3') Primer sequences (5'-3')
OMP25-N	GGATCCATGCGCACTCTTAAGTCTCTC(<i>Bam</i> H I)
OMP25-C	GTGCACTTAGAAGCTTGTAGCCGATGCC(<i>Sal</i> I)

1.2.2 重组蛋白的表达与纯化

将克隆菌培养至 OD₆₀₀ 约为 0.4 h,取 2 mL 菌液后,在剩余菌液中加入终浓度 1 mol/L 的 IPTG 进行诱导,诱导 2、4 和 6 h 时各取 2 mL 菌液,通过 12% 的聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)检测 OMP25 表达情况。蛋白通过蛋白纯化试剂盒进行纯化后,利用 SDS-PAGE 电泳对纯化效果检测。

1.2.3 免疫小鼠

参照相关文献^[11]对 BALB/c 小鼠进行免疫。将 6 周龄雌性 BALB/c 小鼠随机分为 3 组,每组 5 只。第 1 组皮下注射弗氏佐剂乳化 rOMP25(含 50 μg 的 rOMP25),免疫 3 次,每次间隔 2 周。第 2 组第只腹腔注射 1 × 10⁶ CFU 的 Rev. 1,第 3 组腹腔注射 200 μL 的 PBS。

1.2.4 rOMP25 蛋白免疫小鼠后诱导细胞因子水平分析

三免后第 6 周处死小鼠,参照相关文献^[12]无菌分离脾细胞,测定细胞因子的水平。用 rOMP25、

ConA(阳性对照)或 RPMI 1640 细胞培养液(阴性对照)刺激小鼠脾细胞,检测细胞因子 IFN-γ 和 IL-2 的水平。

1.2.5 血清学分析

小鼠免疫后,采用鼠尾采血法于第 2、4、6、8 周采集小鼠外周血,分离血清^[13]。参照相关文献^[14],利用小鼠血清 IgG 和 IL-10 ELISA 检测试剂盒测定小鼠血清中 IgG 和 IL-10 水平。

1.2.6 Western Blot 分析

参考相关文献^[15],取 1 μg 纯化的 rOMP25 蛋白,进行 SDS-PAGE 电泳,将目的凝胶块切下,200 mA 电流转膜 1 h,用 5 mL 5%脱脂奶粉封闭 1 h 后,以 rOMP25、Rev. 1 和 PBS 免疫小鼠的血清(1:300)为一抗,以 HRP 标记的羊抗鼠 IgG(1:2000)为二抗,经 Western Blot 检测 rOMP25 的反应原性。

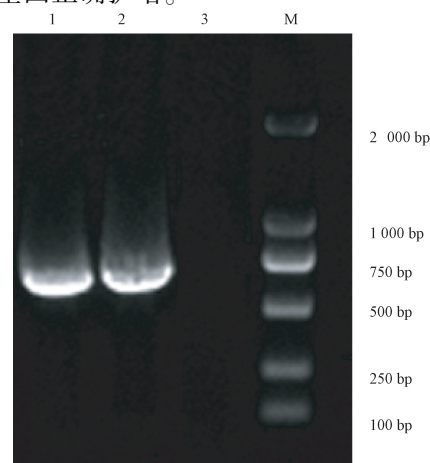
1.3 统计学分析

细胞因子用平均细胞因子浓度平均值 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。抗体用平均 OD₄₅₀ ± s 表示。用 *t* 检验方法统计显著性(*P* 值)。用 SPSS 21.0 软件对各组间的差异进行方差分析。*P* < 0.05 表示差异具有显著性。

2 结果

2.1 重组质粒(pET OMP25-32a)的构建与鉴定

利用 PCR 扩增 *omp25* 基因后,获得 642 bp 的基因片段,与预期大小(642 bp)相符(图 1),表明 *omp25* 基因正确扩增。



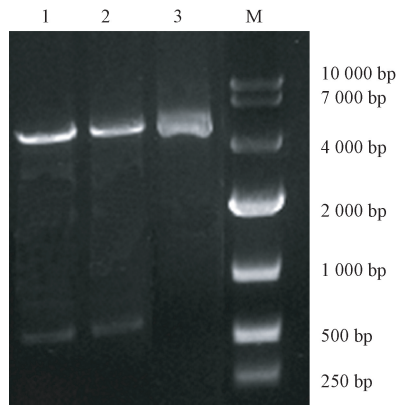
注:Lanes 1~2:*omp25* 的 PCR 产物;Lane 3:阴性对照;Lane M:DL2 000 DNA Marker。

图 1 *omp25* 基因的 PCR 扩增

Note. Lanes 1~2. PCR products of *omp25*. Lane 3. Negative control. Lane M. DL2 000 DNA Marker.

Figure 1 PCR amplification of *omp25* gene

将构建的重组质粒 pET OMP25-32a 进行 *Bam*H I/*Sal* I 双酶切后,发现两条条带,5900 bp 的条带系 pET-32a,642 bp 的条带系 *omp25*(图 2),与载体片段及目的片段的预期大小(642 bp)一致,且公司测序结果与 GenBank 中布鲁氏菌 16M 菌株的 *omp25* 基因序列同源性达 100%,未发生碱基错配,表明重组质粒 pET OMP25-32a 构建正确。



注: Lanes 1~2: pET OMP25-32a 酶切结果; Lane 3: pET OMP25-32a 质粒; Lane M: DL10000 DNA Marker。

图 2 重组质粒 pET OMP25-32a 的鉴定

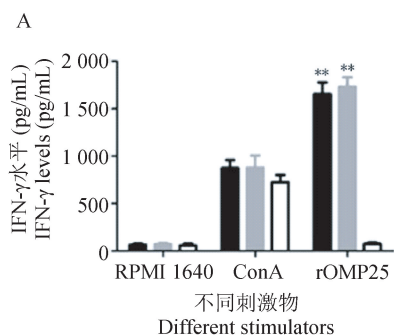
Note. Lanes 1~2. pET OMP25-32a digestion. Lane 3. pET OMP25-32a plasmid. Lane M. DL10000 DNA Marker

Figure 2 Identification of pET OMP25-32a recombinant plasmid

2.2 rOMP25 的表达与纯化

将重组质粒 pET OMP25-32a 转化至大肠杆菌 BL21 (DE3) 进行表达,在菌液中加入 IPTG 后进行 SDS-PAGE 检测,rOMP25 在 (40.8×10^3) 处出现与预期蛋白分子质量 (40.8×10^3) 大小一致的蛋白条带(图 3A),表明 rOMP25 表达正确,且在 IPTG 诱导 6 h 时表达量最高。

菌体超声破碎后,经蛋白纯化试剂盒纯化后,

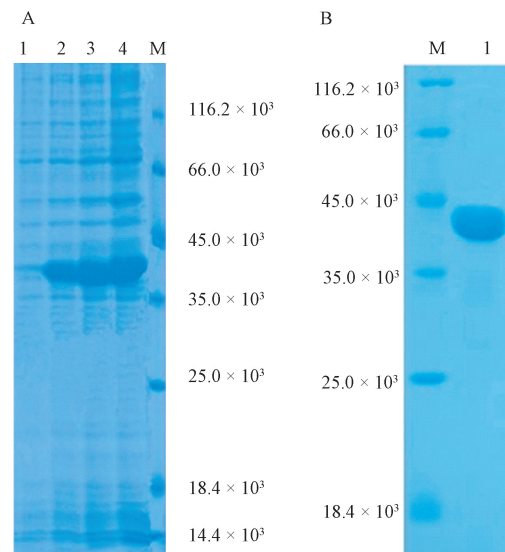


注: A: IFN- γ 的水平; B: IL-2 的水平; 与 PBS 组相比, ** $P < 0.01$ 。(下同)

图 4 rOMP25 和 Rev. 1 免疫小鼠后小鼠脾细胞中 IFN- γ 和 IL-2 的水平检测

Note. A. IFN- γ levels. B. IL-2 levels. Compared with PBS group, ** $P < 0.01$. (The same in the following figures)

Figure 4 Detection of IFN- γ and IL-2 levels in splenocytes of the immunized mice by rOMP25 and Rev. 1



注: A: rOMP25 的表达分析; Lane 1: 未诱导的 rOMP25 蛋白样品; Lanes 2~4: 诱导 2、4、6 h 的 rOMP25 蛋白样品; Lane M: 蛋白 Marker。 B: rOMP25 的纯化分析; Lane M: 蛋白 Marker; Lane 1: rOMP25 的纯化样品。

图 3 rOMP25 的表达纯化分析

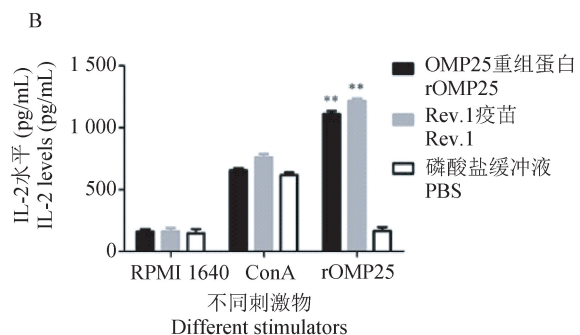
Note. A. Expression analysis of rOMP25. Lane 1. Sample of rOMP25 without induction. Lanes 2~4. Samples of rOMP25 induced after 2, 4, 6 h. Lane M. Protein Marker. B. Purification analysis of rOMP25. Lane M. Protein Marker. Lane 1. Samples of rOMP25 purification

Figure 3 Expression and purification analysis of rOMP25

SDS-PAGE 检测结果显示,在 40.8×10^3 处出现单一蛋白条带(图 3B)。

2.3 rOMP25 可诱导细胞免疫反应

为了检测 rOMP25 诱导的细胞免疫反应, rOMP25、Rev. 1 和 PBS 免疫小鼠 6 周后,处死小鼠,无菌摘除脾,分离脾细胞,检测脾细胞中 IFN- γ 和 IL-2 水平。免疫小鼠的脾细胞用 rOMP25、ConA 或



RPMI 1640 进行刺激。当用 ConA 刺激时,免疫 rOMP25 小鼠脾细胞 IFN- γ 表达量为 873.68 pg/mL, IL-2 的表达量为 655.21 pg/mL, 表达水平与免疫 PBS 小鼠脾细胞产生 IFN- γ 和 IL-2 的水平相似 ($P > 0.05$), 免疫 rOMP25 小鼠较免疫 PBS 小鼠无显著性差异 (图 4)。免疫 Rev. 1 小鼠脾细胞 IFN- γ 的表达量为 879.98 pg/mL, IL-2 的表达量为 761.16 pg/mL, 表达水平与免疫 PBS 小鼠脾细胞产生 IFN- γ 和 IL-2 的水平相似 ($P > 0.05$), 免疫 Rev. 1 小鼠较免疫 PBS 小鼠无显著性差异 (图 4)。当用 RPMI 1640 刺激脾细胞时, 各组产生的细胞因子较少 (图 4)。当用 rOMP25 刺激时, 免疫 rOMP25 小鼠脾细胞 IFN- γ 的表达量为 1655.98 pg/mL, IL-2 的表达量为 1108.79 pg/mL, 表达水平显著高于免疫 PBS 小鼠脾细胞产生 IFN- γ 和 IL-2 的水平 ($P < 0.01$) (图 4)。免疫 Rev. 1 小鼠脾细胞 IFN- γ 的表达量为 1732.23 pg/mL, IL-2 的表达量为 1215.15 pg/mL, 表达水平显著高于免疫 PBS 小鼠脾细胞产生 IFN- γ 和 IL-2 的水平 ($P < 0.01$) (图 4)。表明小鼠免疫 rOMP25 后, 可诱导细胞免疫反应。

2.4 rOMP25 可诱导体液免疫反应

采集 rOMP25、Rev. 1 和 PBS 免疫小鼠后的血清, 检测血清中 IgG 水平。发现 rOMP25 和 Rev. 1 免疫组产生 IgG 的水平较高, 两组无显著性差异 ($P > 0.05$), IgG 的水平在免疫后第 6 周到达高峰 (图 5)。但是注射 PBS 的小鼠产生的 IgG 较低 (图 5)。表明 rOMP25 可诱导体液免疫反应。

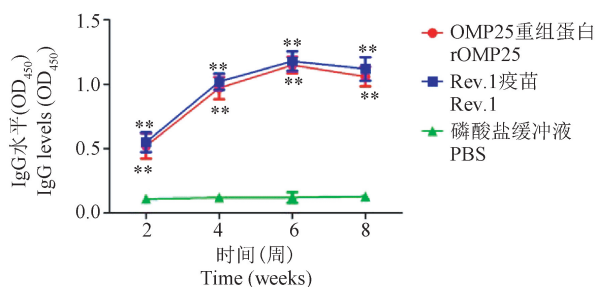


图 5 rOMP25 和 Rev. 1 免疫小鼠后小鼠血清中 IgG 抗体的水平检测

Figure 5 Detection of IgG antibody levels in serum of immunized mice by rOMP25 and Rev. 1

2.5 rOMP25 可抑制炎症反应

采集 rOMP25、Rev. 1 和 PBS 免疫小鼠后不同时间点的血清, 检测血清中抗炎因子 IL-10 的水平。发现 rOMP25 和 Rev. 1 免疫组产生 IL-10 的水平较高, 免疫 rOMP25 小鼠较免疫 Rev. 1 小鼠无显著性

差异 ($P > 0.05$) (图 6)。但是注射 PBS 的小鼠产生的 IL-10 较低 (图 6)。表明 rOMP25 后可抑制机体的炎症反应。

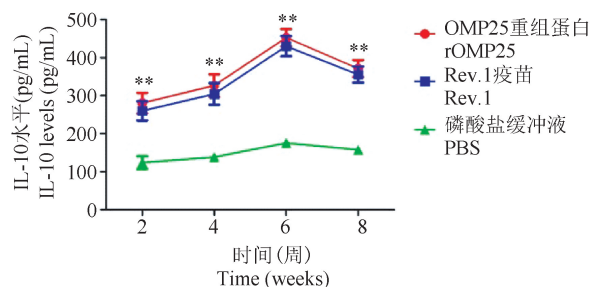
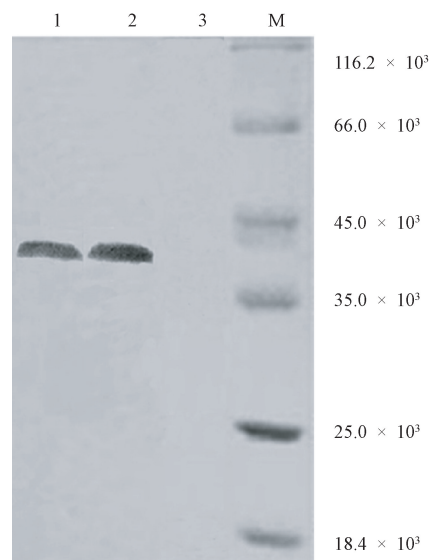


图 6 rOMP25 和 Rev. 1 免疫小鼠后小鼠血清中抗炎因子 IL-10 的水平检测

Figure 6 Detection of anti-inflammatory factor IL-10 levels in serum of immunized mice by rOMP25 and Rev. 1

2.6 rOMP25 的反应原性分析

为了检测 rOMP25 蛋白的反应原性, 以 rOMP25、Rev. 1 和 PBS 免疫小鼠的血清作为一抗, 以 HRP 标记的羊抗鼠 IgG 作为二抗, 进行 Western Blot 分析。结果显示, rOMP25 和 Rev. 1 免疫的小鼠出现血清反应, 但 PBS 免疫的小鼠血清无反应 (图 7), 表明 rOMP25 具有良好的反应原性。



注: Lane 1: 用于 rOMP25 免疫小鼠血清的 Western Blot 结果; Lane 2: 用于 Rev. 1 免疫小鼠血清的 Western Blot 结果; Lane 3: 用于 PBS 免疫小鼠血清的 Western Blot 结果; Lane M: 蛋白 Marker。

图 7 Western Blot 检测 rOMP25 的反应原性

Note. Lane 1. Western Blot using serum from rOMP25 immunized mice. Lane 2. Western Blot using serum from Rev. 1 immunized mice. Lane 3. Western Blot using serum from PBS immunized mice. Lane M. Protein Marker.

Figure 7 The immunoreactivity of rOMP25 was detected by Western Blot

3 讨论

近年来,越来越多的研究者致力于布鲁氏菌亚单位疫苗的研发,外膜蛋白的疫苗潜力已受到人们的重视。布鲁氏菌的外膜蛋白按其分子量可分为 3 组,其中第 3 组($25 \times 10^3 \sim 31 \times 10^3$)具有高度同源性,参与布鲁氏菌的毒力^[16]。OMP25 是布鲁氏菌的主要外膜蛋白之一,研究发现,OMP25 与毒力有关,牛种布鲁氏菌 omp25 突变株在机体内是减毒的^[17-19]。用抗 OMP25 的抗体对动物进行被动免疫,可提供较强的免疫保护力,进一步证实了 OMP25 在布鲁氏菌毒力中的作用,以及 OMP25 作为疫苗候选抗原的重要性^[20]。已有研究报道,将 OMP25 DNA 疫苗免疫 BALB/c 小鼠后,可保护小鼠免受羊种布鲁氏菌的侵袭^[21]。也有研究表明,牛种布鲁氏菌的重组 OMP25 蛋白也可为 BALB/c 小鼠提供保护力,抵抗牛种布鲁氏菌的感染^[22]。因此,OMP25 为较好的亚单位疫苗候选抗原。

由于布鲁氏菌为兼性胞内寄生菌,因此,细胞免疫是清除布鲁氏菌的关键^[23]。早期研究也证明,能够诱导较强的细胞免疫反应的疫苗株可有效地预防布鲁氏菌病^[24]。IFN- γ 是一种重要的效应细胞因子,它能刺激巨噬细胞有效地杀死和清除细胞内的布鲁氏菌^[25]。IL-2 为 T 细胞生长因子,可促进 Th1 型和 Th2 型细胞分化,并激发 B 细胞生长及抗体产生^[26]。在本研究中,我们探讨了 rOMP25 免疫小鼠后,诱导机体产生的免疫应答情况。从免疫 rOMP25 小鼠中无菌分离脾细胞,并在体外用 rOMP25 刺激,可产生较高水平的 IFN- γ 和 IL-2,表明 rOMP25 可诱导机体产生强烈的细胞免疫应答。此外,在布鲁氏菌感染期间,体液免疫反应发挥重要作用^[27]。本研究发现,小鼠免疫 rOMP25 后,产生了较高水平的 IgG,且在三免后第 6 周达到高峰,表明 rOMP25 可诱导机体产生体液免疫反应。IL-10 是一种介导免疫抑制的细胞因子,可促进 B 细胞增殖分化及抗体产生。本研究发现,小鼠免疫 rOMP25 后,可产生较高水平的 IL-10,表明 rOMP25 可抑制机体的炎症反应。

目前,布鲁氏菌的许多外膜蛋白已被用于开发亚单位疫苗,如 OMP10^[28-29]、OMP19^[28-29]、OMP28^[29]、OMP25c^[30] 以及 OMP31^[31] 等。这些亚单位除了产生免疫反应外,还具有一定的保护力。本研究发现 rOMP25 可作为亚单位疫苗候选抗原,

但还需进一步评价其产生的保护能力。

本研究成功表达并纯化了布鲁氏菌外膜蛋白 OMP25,小鼠 rOMP25 免疫后产生的免疫水平较高,且 rOMP25 可抑制炎症反应。此外,rOMP25 具有良好的反应原性。因此,在布鲁氏菌亚单位疫苗抗原筛选中 OMP25 是其理想的候选抗原。然而,还需进一步检测 rOMP25 的保护效果。

参 考 文 献 (References)

- [1] Singh D, Goel D, Bhatnagar R. Recombinant L7/L12 protein entrapping plga (poly lactide-co-glycolide) micro particles protect BALB/c mice against the virulent b. abortus 544 infection [J]. Vaccine, 2015, 33(24): 2786-2792.
- [2] Babaoglu UT, Ogutucu H, Demir G, et al. Prevalence of *Brucella* in raw milk: an example from turkey [J]. Niger J Clin Pract, 2018, 21(7): 907-911.
- [3] Glynn MK, Lynn TV. Brucellosis [J]. J Am Vet Med Assoc, 2008, 233(6): 900-908.
- [4] Muñoz PM, De Miguel MJ, Grilló MJ, et al. Immunopathological responses and kinetics of *Brucella melitensis* Rev 1 infection after subcutaneous or conjunctival vaccination in rams [J]. Vaccine, 2008, 26(21): 2562-2569.
- [5] Elberg SS, Faunce K Jr. Immunization against *Brucella* infection. VI. immunity conferred on goats by a nondependent mutant from a streptomycin-dependent mutant strain of *Brucella melitensis* [J]. J Bacteriol, 1957, 73(2): 211-217.
- [6] Ebrahimi M, Nejad RB, Alamian S, et al. Safety and efficacy of reduced doses of *Brucella melitensis* strain Rev. 1 vaccine in pregnant iranian fat-tailed ewes [J]. Vet Ital, 2012, 48(4): 405-412.
- [7] Schurig GG, Sriranganathan N, Corbel MJ. Brucellosis vaccines: past, present and future [J]. Vet Microbiol, 2002, 90(1-4): 479-496.
- [8] 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(12): 3168-3174.
- [9] 乔凤. 外膜蛋白 Omp25 在布鲁氏菌毒力及免疫保护中的作用研究 [D]. 长春: 吉林大学; 2009.
- [10] 吕亚辉. 布鲁氏菌 Omp25 蛋白抑制巨噬细胞分泌 TNF- α 的分子机制研究 [D]. 杨凌: 西北农林科技大学; 2013.
- [11] Li Z, Zhang H, Zhang J, et al. *Brucella abortus* phosphoglyceromutase and dihydrodipicolinate reductase induce Th1 and Th2-related immune responses [J]. World J Microbiol

- Biotechnol, 2018, 34(2): 22.
- [12] Li Z, Wang S, Zhang H, et al. Immunization with recombinant GntR plasmid confers protection against *Brucella* challenge in BALB/c mice [J]. Microb Pathog, 2017, 111: 357–361.
- [13] 杨健莉, 刘佳, 郑志红. 常用实验大小鼠采血方法及其对实验动物福利的影响 [J]. 中国比较医学杂志, 2019, 29(1): 90–94.
- Yang JL, Liu J, Zheng ZH. Comparison and analysis of blood sampling methods from rats and mice [J]. Chin J Comp Med, 2019, 29(1): 90–94.
- [14] Li Z, Wang S, Zhang H, et al. Development and evaluation of in murine model, of an improved live-vaccine candidate against brucellosis from to *Brucella melitensis* vjbR deletion mutant [J]. Microb Pathog, 2018, 124: 250–257.
- [15] Li Z, Wang S, Zhang J, et al. brucella abortus 2308ΔNodVΔNodW double-mutant is highly attenuated and confers protection against wild-type challenge in BALB/c mice [J]. Microb Pathog, 2017, 106: 30–39.
- [16] Salhi I, Boigegrain RA, Machold J, et al. Characterization of new members of the group 3 outer membrane protein family of *Brucella* spp [J]. Infect Immun, 2003, 71(8): 4326–4332.
- [17] Edmonds MD, Cloeckeaert A, Booth NJ, et al. Attenuation of a *Brucella abortus* mutant lacking a major 25×10^3 outer membrane protein in cattle [J]. Am J Vet Res, 2001, 62(9): 1461–1466.
- [18] Edmonds MD, Cloeckeaert A, Hagius SD, et al. Pathogenicity and protective activity in pregnant goats of a *Brucella melitensis* deltaomp25 deletion mutant [J]. Res Vet Sci, 2002, 72(3): 235–239.
- [19] Edmonds MD, Cloeckeaert A, Elzer PH. Brucella species lacking the major outer membrane protein Omp25 are attenuated in mice and protect against brucella melitensis and *Brucella ovis* [J]. Vet Microbiol, 2002, 88(3): 205–221.
- [20] Bowden RA, Cloeckeaert A, Zygmunt MS, et al. Outer-membrane protein- and rough lipopolysaccharide-specific monoclonal antibodies protect mice against *Brucella ovis* [J]. J Med Microbiol, 1995, 43(5): 344–347.
- [21] Commander NJ, Spencer SA, Wren BW, et al. The identification of two protective DNA vaccines from a panel of five plasmid constructs encoding *Brucella melitensis* 16M genes [J]. Vaccine, 2007, 25(1): 43–54.
- [22] Goel D, Bhatnagar R. Intradermal immunization with outer membrane protein 25 protects BALB/c mice from virulent B. abortus 544 [J]. Mol Immunol, 2012, 51(2): 159–168.
- [23] Baldwin CL, Goenka R. Host immune responses to the intracellular bacteria *Brucella*; does the bacteria instruct the host to facilitate chronic infection? [J]. Crit Rev Immunol, 2006, 26(5): 407–442.
- [24] Yang X, Skyberg JA, Cao L, et al. Progress in *Brucella* vaccine development [J]. Front Biol, 2013, 8(1): 60–77.
- [25] Murphy EA, Sathiyaseelan J, Parent MA, et al. Interferon-gamma is crucial for surviving a *Brucella abortus* infection in both resistant C57BL/6 and susceptible BALB/c mice [J]. Immunology, 2001, 103(4): 511–518.
- [26] Spolski R, Li P, Leonard WJ. Biology and regulation of IL-2: from molecular mechanisms to human therapy [J]. Nat Rev Immunol, 2018, 18(10): 648–659.
- [27] Castaño-Zubieta MR, Rossetti CA, García-González DG, et al. Evaluation of the safety profile of the vaccine candidate *Brucella melitensis* 16MDelta vjbR strain in goats [J]. Vaccine, 2021, 39(3): 617–625.
- [28] Shim S, Soh SH, Im YB, et al. Elicitation of Th1/Th2 related responses in mice by chitosan nanoparticles loaded with *Brucella abortus* malate dehydrogenase, outer membrane proteins 10 and 19 [J]. Int J Med Microbiol, 2020, 310(1): 151362.
- [29] Im YB, Park WB, Jung M, et al. Comparative analysis of immune responses to outer membrane antigens OMP10, OMP19, and OMP28 of brucella abortus [J]. Jpn J Infect Dis, 2018, 71(3): 197–204.
- [30] Paul S, Peddayelachagiri BV, Nagaraj S, et al. Recombinant outer membrane protein 25c from *Brucella abortus* induces Th1 and Th2 mediated protection against *Brucella abortus* infection in mouse model [J]. Mol Immunol, 2018, 99: 9–18.
- [31] Shojaei M, Tahmoorespur M, Soltani M, et al. Immunogenicity evaluation of plasmids encoding *Brucella melitensis* Omp25 and Omp31 antigens in BALB/c mice [J]. Iran J Basic Med Sci, 2018, 21(9): 957–964.

[收稿日期] 2021–10–21