

徐 龙,曹小安,刘永生,等. 布鲁氏菌 BP26 蛋白对鼠源树突状细胞分化及抗原提呈作用[J].江苏农业学报,2020,36(4):984-991.
doi:10.3969/j.issn.1000-4440.2020.04.025

布鲁氏菌 BP26 蛋白对鼠源树突状细胞分化及抗原提呈作用

徐 龙^{1,2}, 曹小安², 刘永生², 周建华², 张广林^{1,2}, 孙晶晶², 李玲霞², 赵永婕², 胡永浩¹

(1.甘肃农业大学动物医学院,甘肃 兰州 730070; 2.中国农业科学院兰州兽医研究所/家畜疫病病原生物学国家重点实验室,甘肃 兰州 730070)

摘要: 构建 pET-30a-BP26 并在大肠杆菌中表达获得重组布鲁氏菌 BP26 蛋白,研究重组表达蛋白对鼠髓源树突状细胞分化及抗原提呈作用。设计布鲁氏菌 BP26 蛋白引物,PCR 扩增该基因并酶切、连接在 pET-30a 载体上。将构建成功的 pET-30a-BP26 转化至感受态细胞 BL21 表达获得重组 BP26 蛋白。采用 SDS-PAGE 和 Western-Blot 检测蛋白表达量和反应原性后,用重组蛋白刺激 BALB/C 小鼠分离髓源树突状细胞(BM-DCs),观察 BM-DCs 的成熟分化并利用流式细胞术进行表型分析。成功获得 BP26 重组蛋白,SDS-PAGE 和 Western-Blot 分析结果表明,BP26 重组蛋白可溶性高且具有良好的反应原性,流式细胞术检测结果显示,BP26 能刺激 BM-DCs 分化成熟和抗原提呈作用。

关键词: 布鲁氏菌; BP26; 鼠源树突状细胞; 抗原提呈

中图分类号: Q816 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2020)04-0984-08

Antigen presentation effect and differentiation of murine dendritic cells stimulated by *Brucella* BP26 protein

XU Long^{1,2}, CAO Xiao-an², LIU Yong-sheng², ZHOU Jian-hua², ZHANG Guang-lin^{1,2}, SUN Jing-jing², LI Ling-xia², ZHAO Yong-jie², HU Yong-hao¹

(1.College of Veterinary Medicine, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070, China; 2.State Key Laboratory of Veterinary Etiological Biology/Lanzhou Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Lanzhou 730070, China)

Abstract: In this study, the pET-30a-BP26 was constructed and transferred into *Escherichia coli* to obtain recombinant protein BP26 of *Brucella*. In addition, the effects of recombinant protein on differentiation and antigen presentation of murine dendritic cells were studied. The *Brucella* BP26 protein specific primers were designed to amplify this target gene by PCR, then the gene was digested and linked to pET-30a vector. The pET-30a-BP26 was transformed into competent cell BL21, and the recombinant protein BP26 was obtained. The protein expression and reactogenicity were identified by SDS-PAGE and Western-blot. The bone marrow-derived dendritic cells(BM-DCs) were stimulated by recombinant protein. The differentiation of BM-DCs was observed, and the phenotype was analyzed by flow cytometry. The recombinant protein BP26

was successfully obtained. The results of SDS-PAGE and Western-blot showed that BP26 had high solubility and good reactogenicity. The results of flow cytometry showed that BP26 could simulate the differentiation, maturity and antigen presentation of BM-DCs.

Key words: *Brucella*; BP26; murine dendritic cells; antigen presentation

收稿日期:2020-01-02

基金项目:国家重点研发计划项目(2018YFD0500900)

作者简介:徐 龙(1995-),男,河北唐山人,硕士研究生,研究方向为动物传染病与病原分子生物学。(Tel)13897457409;(E-mail)xl645467288@163.com

通讯作者:胡永浩,(E-mail)yhh0817@126.com

布鲁氏菌病 (*Brucellosis*) 是由布鲁氏菌 (*Brucella*) 感染引起的人畜共患传染病, 具有流行广泛、危害极大的特点。近年来, 布鲁氏菌给中国的公共卫生与安全带来了新挑战。由于布鲁氏菌没有明显的外毒素, 其依靠外膜蛋白、脂多糖及 IV 型分泌系统发挥毒力并通过抑制溶酶体的相关功能抵抗细胞凋亡和逃离细胞死亡与降解。*Brucella* 在宿主发挥细胞免疫和体液免疫时, 具有逃避能力。*Brucella* 在侵入机体后, 主要侵染胚胎细胞及巨噬细胞, 胞内生存和繁殖是其主要致病机理, 其免疫机制在逃离宿主的免疫系统时发挥了重要作用^[1]。

诸如 OMP10、OMP19 和 BP26 等外膜蛋白刺激 BM-DCs (小鼠分离髓源树突状细胞) 后, BM-DCs 表面共刺激分子和 MHC 分子的表达及培养上清液中 IL-12、IL-10、INF- γ 、TNF- α 的分泌均显著增加。而 OMP25 和 OMP31 刺激 BM-DCs 后会显著抑制部分表面分子的表达及炎性细胞因子 IL-12、IL-6、INF- γ 、TNF- α 的分泌^[2]。Dohmer 等^[3]也发现了其他种类的分泌蛋白质, 但对这些蛋白质的功能仍处于探索阶段, 具体机制也尚未研究透彻。刘景福等^[4]发现 BP26 蛋白在 BP26 免疫模型上能够形成明显的迟发型变态反应。王勇等^[5]发现重组蛋白 BP26 作为检测抗原建立的间接 ELISA 方法效果较为理想, 可适用于临床布鲁氏菌感染的检测。王芳等^[6]发现基于 BP26 建立的间接 ELISA 检测方法在检测 *Brucella* 时不能对细菌种属及其来源进行有效区分, 通过检测 BP26 抗体不能对羊布鲁氏菌病进行有效区分和诊断。对小鼠接种 OMP 或 L7/L12 抗原的 DNA 疫苗或重组蛋白质可有效对抗布鲁氏菌有毒株的攻击感染。Saadi 等^[7]从 OMP31、BP26、BLS、DnaK 和 L7/L12 蛋白中筛选了 5 个新的 T 细胞表位, 并基于上述蛋白质制成多表位肽疫苗使其稳定有效表达, 在未来有可能用于预防或治疗布鲁氏菌病。

虽然 BP26 能够产生强力的抗体, 但有效的抗原在细菌侵染宿主细胞时发挥的作用和分子机制尚不明确。本试验选取布鲁氏菌外膜蛋白基因 *BP26* 进行全基因扩增, 并成功将其构建到 pET-30a 质粒中进行稳定表达, 获得了重组质粒 pET-30a-*BP26*。说明该蛋白质可在大肠杆菌内稳定表达。利用分子生物学的方法对 BP26 蛋白进行分析, 获得了 BP26 蛋白的相关特性的基本信息, 为未来研究布鲁氏菌侵袭宿

主后 BP26 蛋白会通过何种信号通路对机体产生影响及相关调控机制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 菌株和质粒 布鲁氏菌阳性基因组、质粒 pET-30a(+) 为中国农业科学院兰州兽医研究所草食动物细菌病创新团队保存。大肠杆菌 DH5 α 和 BL21 (DE3) 感受态细胞购自北京全式金生物技术有限公司。

1.1.2 血清与抗体 羊布鲁氏菌阳性血清为中国农业科学院兰州兽医研究所草食动物细菌病创新团队保存, 辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的兔抗羊 IgG 购自赛默飞世尔科技(中国)有限公司。

1.1.3 主要生化试剂 2 \times EasyTaq[®] PCR SuperMix (+dye)、限制性内切酶 *EcoR* I、*Sal* I、T4 DNA Ligase、胶回收试剂盒、质粒小提试剂盒、IPTG 购自宝生物工程(大连)有限公司, 卡那霉素、30% Acr 制胶液、RPMI1640 细胞培养基、PBS (pH=7.2) 购自北京索莱宝科技有限公司, High Affinity Ni-Charged Resin FF 购自南京金斯瑞生物科技有限公司, Tryptone、Yeast Extract 购自 OXOID 公司。

1.1.4 试验动物、病毒及试剂 28~42 日龄 BALB/C 小鼠由中国农业科学院兰州兽医研究所动物中心提供, 所有动物试验按照单位相关伦理要求进行。

胎牛血清购自美国 Gibco 公司。重组小鼠粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子 (rmGM-CSF) 和重组小鼠白介素-4 (rmIL-4) 购自美国 PeproTch 公司。单克隆抗体为兔抗鼠的 PE-CD11c、FITC-MHC II、FITC-CD86、APC-CD80、APC-CD40, 均购自美国 BD Biosciences 公司。阳性对照为布鲁氏菌脂多糖 (LPS), 购自 Sigma 公司。

1.2 方法

1.2.1 引物合成 使用 Primer Premier5.0 筛选出最优引物, 上下游引物两端添加保护性碱基并分别引入 *EcoR* I 和 *Sal* I 2 个酶切位点, 并对密码子进行适当优化, 引物: *BP26*-F: 5'-CCGGAATTCGCCACCATGCAG-GAGAATCAGATGACG-3', *BP26*-R: 5'-CCGCTCGAC-TTAATGATGATGATGATGATGCTTGATTTCAAAAA-CGAC-3', 酶切位点以下划线标出。设计完成的引物由北京擎科新业生物技术有限公司合成, 扩增片段长度为 666 bp。

1.2.2 布鲁氏菌 BP26 基因的 PCR 扩增及克隆 以布鲁氏菌基因组作 DNA 模板,扩增体系参照说明书进行配置。采用 2×EasyTaq[®] PCR SuperMix (+dye) 和合成的引物在 56 °C 退火温度下扩增获得 BP26 目的片段,将扩增后的产物在 1.15% 琼脂糖凝胶上电泳,参照胶回收试剂盒说明书对切取的目的条带进行回收。用 *EcoRI* 和 *SalI* 对回收后的目的片段与 pET-30a 载体质粒在 37 °C 水浴锅中双酶切 4~5 h 后回收。用 T4 连接酶体系 16 °C 过夜连接线性化酶切的质粒和目的基因产物。将全部连接产物转入 DH5 α 中,冰浴 30 min 后 42 °C 热激 90 s,迅速转移至冰上放置 3 min。在含 200 mg/L 的 Kan⁺ 抗性固体培养基上培养,37 °C 倒置过夜培养后挑取阳性克隆的菌落小摇后进行 PCR 扩增及酶切鉴定。将鉴定成功的质粒送至北京擎科新业生物技术有限公司测序。

1.2.3 布鲁氏菌 BP26 重组蛋白的表达及纯化 将构建成功的质粒转入 BL21 中保存,挑取单个阳性克隆的菌落接种至 5 ml 含 Kan 抗性液体 LB 中 37 °C 过夜培养。吸取 2 ml 培养的菌液至 200 ml 含 Kan 抗性液体 LB 中,37 °C,200 r/min 培养。当菌液 OD_{600} 值达到 0.6~0.8 时,设置诱导温度为 16 °C、25 °C、37 °C 3 个梯度,设置 IPTG 的终浓度分别为 1.00×10^{-3} mol/L、 5.00×10^{-4} mol/L、 2.50×10^{-4} mol/L、 1.25×10^{-4} mol/L、 1.00×10^{-4} mmol/L 5 个梯度,设置诱导时间为 3 h、4 h、5 h、6 h 4 个梯度。各设置条件诱导结束后收获菌液,8 000 r/min,4 °C,离心 30 min,弃上清液,用少许 0.01 mol/L 的 PBS 再次悬浮沉淀后用同等条件离心,收集沉淀。用 Lysis equilibration buffer (LE Buffer) 对沉淀进行悬浮后,超声破碎仪裂解,超声 5 s,间歇 2 s,工作时间为 1 h。破碎结束后以上述同等条件离心分离上清液和沉淀,分别取上清液与沉淀 40 μ l 和 10 μ l,5× SDS-PAGE Loading Buffer 充分混匀煮沸 10 min 后进行 SDS-PAGE,完成后使用考马斯亮蓝染色液对蛋白质胶室温染色 4 h 后,再以脱色液充分脱色,分析重组蛋白质 BP26 的表达水平。

将成功鉴定的布鲁氏菌 BP26 蛋白表达液装入经 LE Buffer 平衡后的 His-Tag Ni 柱中,收集流穿液后以 LE Buffer 洗脱 4 个柱体积后,以含 20 mmol/L 浓度咪唑 LE Buffer 为起点对柱内的沉淀进行洗脱,柱底端口液体流速控制在 1.0~1.5 ml/min。含 20 mmol/L 浓度咪唑 LE Buffer 洗涤 5 个柱体积,含 40 mmol/L 浓度咪唑

LE Buffer 洗涤 3 个柱体积,含 60 mmol/L 浓度咪唑 LE Buffer、含 160 mmol/L 浓度咪唑 LE Buffer 各洗涤 1 个柱体积,含 250 mmol/L 浓度咪唑 LE Buffer 洗脱 2 个柱体积,含 20 mmol/L、40 mmol/L、60 mmol/L、160 mmol/L 浓度咪唑 LE Buffer 流出液各收集 2 ml,含 250 mmol/L 浓度咪唑 LE Buffer 流出液全部收集,纯化获得试验所需的目的蛋白质。

1.2.4 布鲁氏菌 BP26 重组蛋白的 Western-Blot 分析 参考文献[8]中的方法,将稀释液调整为 10 倍稀释的 Casein 封闭液,优化一抗孵育时间为 1 h,二抗孵育时间为 45 min,对 BP26 蛋白进行 Western-Blot 分析。

1.2.5 小鼠髓源树突状细胞的体外诱导培养 选取 4 只 SPF 级的 42~56 日龄 BALB/c 雌性小鼠,参照文献[9]分离小鼠髓源树突状细胞(BM-DCs)。参考文献[10]中的方法用 rmGM-CSF 和 rmIL-4 刺激,使分离制备的骨髓原代细胞分化为未成熟 DCs。DCs 培养至第 6 d,调整 BP26 蛋白终浓度为 100 μ g/ml 刺激 DCs 细胞;调整 LPS 终浓度为 100 ng/ml 刺激 DCs 细胞,并将该组选作阳性对照,开展后续试验。

1.2.6 布鲁氏菌 BP26 蛋白刺激鼠源树突状细胞 设置 LPS 与重组 BP26 蛋白分别刺激 BM-DCs 24 h 后,收集 DCs,1 500 r/min 离心 7 min,收集上清液进行与介导细胞炎症相关细胞因子的检测。BM-DCs 沉淀用含有 5% 胎牛血清、pH 为 7.2 的 PBS 悬浮,对 DCs 活性以 PE-CD11c 抗体 4 °C 避光染色 30 min 后经流式细胞仪进行分析。DCs 共刺激分子表达分析:设置 PE-CD11c、APC-CD40、FITC-MHC II 三色共染为试验组一,设置 PE-CD11c、APC-CD80、FITC-CD86 为试验组二。同时设置同型对照和单染管,抗体 4 °C 染色 30 min,加入 1 ml 含有 5% 胎牛血清的 PBS,1 500 r/min,7 min 离心收集 DCs。上述 PBS 重悬细胞,用 FAC SC alibur 流式细胞仪进行检测,FlowJo 软件进行数据分析。

1.2.7 参与炎症反应的细胞因子检测 将 BM-DCs 沉淀以 Trizol 法提取细胞 RNA 并测定其浓度,使用 Qiagen Omniscript RT Kit 将 RNA 反转录为 cDNA。采用 2×SYBR Green Abstart PCR Mix,以 cDNA 为模板,参考文献[11]设计需要检测的细胞因子引物,各体系与扩增条件参照说明书。试验设置 3 个独立重复,扩增结束后记录 C_t 值。

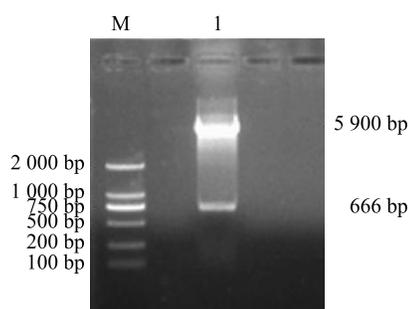
1.3 统计学数据分析

采用 FlowJo V10 软件对经流式细胞仪检测获得的结果进行分析,采用统计软件 Graphpad Prism 8 进行绘图,采用 SPSS V25.0 软件对试验组和对照组的流式数据与 *Ct* 值进行差异显著性分析,以 $P < 0.05$ 为差异显著, $P < 0.01$ 为差异极显著。

2 结果与分析

2.1 表达质粒的鉴定

基于挑取的阳性克隆菌落进行 PCR 扩增,并以挑取的菌落培养的菌液作为 DNA 模板再次进行 PCR 扩增,2 次均扩增出 666 bp 大小的条带。参照质粒小提试剂盒使用说明书提取菌液质粒,并用 *EcoR* I 和 *Sal* I 将重组表达质粒 pET-30a-BP26 双酶切后琼脂糖电泳,分别得到大小正确的目的片段和载体片段(图 1)。



M: 2 000 DNA marker ; 1: 质粒 pET-30a-BP26 酶切产物。

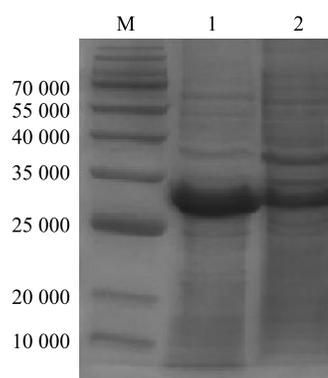
图 1 表达载体双酶切图谱

Fig.1 Restriction enzyme map of expression vector

2.2 BP26 蛋白的重组表达

对纯化后的 BP26 蛋白进行 SDS-PAGE 电泳后经卡马斯亮蓝染色后脱色,最佳诱导条件为:温度 37 °C, IPTG 浓度 5×10^{-4} mol/L, 时间 5 h 时。诱导后可在 30 000 左右出现条带(图 2),与预期条带大小最符合,条带最为清晰,证明该条件下 BP26 蛋白在 BL21(DE3)中的表达量最高。

将纯化诱导表达上清液中的 BP26 蛋白的各浓度咪唑洗脱液经 SDS-PAGE 鉴定分析,发现在泳道 1 有 BP26 蛋白和大量杂蛋白质出现,证明诱导表达上清中的蛋白质并未完全与 High Affinity Ni-Charged Resin FF 结合;泳道 2 出现了与泳道 1 相同的情况,证明 LE Buffer 据有将蛋白质从高亲和力树脂上洗脱下来的能力,泳道 3~6 并未出现明显的蛋白质条带,但是从泳道 7、泳道 8 可以观察出 BP26

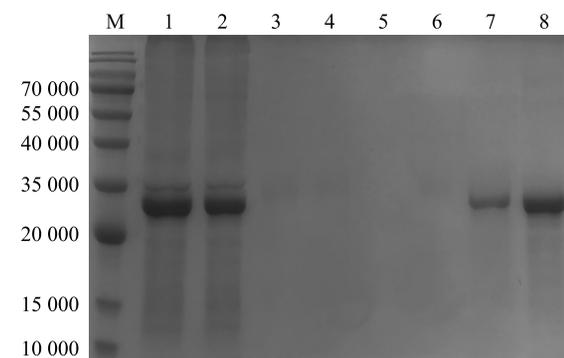


M: 蛋白质 marker; 1: pET-30a-BP26 上清液; 2: pET-30a-BP26 沉淀。

图 2 SDS-PAGE 鉴定 pET-30a-BP26 表达结果

Fig.2 Expression of pET-30a-BP26 by SDS-PAGE

蛋白的表达量较多,而杂蛋白质条带几乎没有。说明 20~160 mmol/L 浓度咪唑洗脱液可以充分将杂蛋白质从亲和树脂上洗脱下来,洗脱效果最佳的咪唑浓度为 40 mmol/L(图 3)。



M: 蛋白质 marker; 1: BP26 流穿液; 2: LE Buffer 洗涤后结果; 3: 含 20 mmol/L 咪唑 LE Buffer 洗涤结果; 4: 含 40 mmol/L 咪唑 LE Buffer 洗涤结果; 5: 含 60 mmol/L 咪唑 LE Buffer 洗涤结果; 6: 含 160 mmol/L 咪唑 LE Buffer 洗涤结果; 7、8: 含 250 mmol/L 咪唑 LE Buffer 洗脱结果。

图 3 BP26 蛋白纯化电泳检测

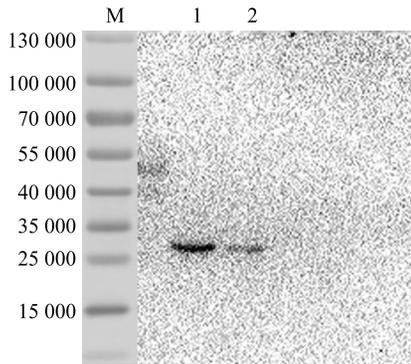
Fig.3 Electrophoresis detection of BP26 protein

2.3 BP26 蛋白 Western blotting 检测结果

表达产物经 SDS-PAGE 电泳后转印到 0.45 μ m PVDF 膜上,封闭液作用后、经一抗、二抗孵育后 ECL 显色,在 30 000 左右出现目的条带(图 4),说明表达产物的反应原性良好,符合后续试验要求。

2.4 BP26 蛋白基本性质分析

ExpAsy 在线软件分析结果显示,BP26 蛋白总



M:蛋白 marker;1,2: pET-30a- BP26 (+)。

图4 布鲁氏菌 BP26 蛋白 Western-Blot 结果

Fig.4 Western-blot results of *Brucella* BP26 protein

长约为 250 个氨基酸,相对分子质量大小为 26 550,等电点为 6.39;带正、负电荷氨基酸残基数均为 24。BP26 蛋白在 280 nm 处的摩尔消光系数为 5 960 mol/L;BP26 蛋白 N 端为 Met,在哺乳动物体内半衰期约为 30 h,在酵母体内半衰期大于 20 h,在大肠杆菌体内半衰期大于 10 h。

BP26 蛋白在溶液中的不稳定指数为 27.93,推测 BP26 蛋白性质稳定。BP26 蛋白的脂肪族指数为 92.16,亲水性平均系数为 -0.030,BP26 属跨膜蛋白且其外膜蛋白质具有较高的亲水性,属亲水蛋白质。对 BP26 蛋白的二级结构进行预测,发现 α 螺旋比例为 41.20%, β 转角比例为 4.80%,无规则卷曲比例为 36.80%,延长链比例为 17.20%,可见 BP26 蛋白的二级结构以 α 螺旋为主(图 5)。BP26 蛋白的信号肽区域为第 1~28 位氨基酸,信号肽剪切位点在 28~29 位氨基酸之间。对 BP26 蛋白的氨基酸序列中的抗原表位进一步进行分析,数据显示序列中存在 8 个潜在的抗原表位,平均抗原倾向性系数为 1.016 4。

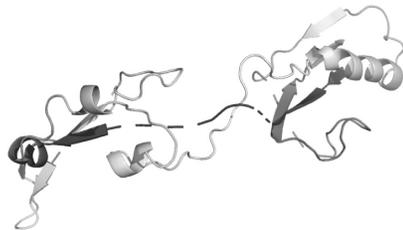


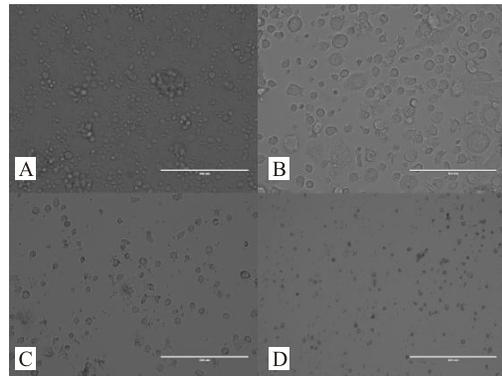
图5 布鲁氏菌 BP26 蛋白二级结构预测

Fig.5 Secondary structure prediction of *Brucella* BP26 protein

2.5 BM-DCs 体外诱导培养及纯度检测

在细胞因子 rmGM-CSF 和 rmIL-4 的共同作用

下,4 只 BALB/C 鼠分离的 BM-DCs 平均含量可达到 1 ml 1.3×10^6 细胞,符合试验要求。倒置显微镜观察 DCs 的形态特征及生长状况。在培养 24 h 后,可观察到 DCs 体积较小,为均一的圆形,部分贴壁生长。至第 3 d 可观察到 DCs 集落群并且 DCs 体积较第 1 d 的体积大。培养至第 6 d,部分 DCs 脱离集落群,呈现不规则形态并形成类似于树杈状的突起(图 6)。将培养第 6 d 的 DCs 用 PE-CD11c 染色标记后用流式细胞仪分析 DCs 活性,结果显示:分离制备的 DCs 活性可达到 85% 以上(图 7),符合试验要求,可用于后续试验。



A:骨髓原代细胞培养 24 h;B:诱导第 3 d;C,D:诱导第 6 d;A,C,D:放大 $\times 20$;B:放大 $\times 40$ 。

图6 用含 rmGM-SF 和 rmIL-4 完全培养基不同时间诱导的细胞形态

Fig.6 Induction of cell morphology at different time with complete medium containing rmGM-SF and rmIL-4

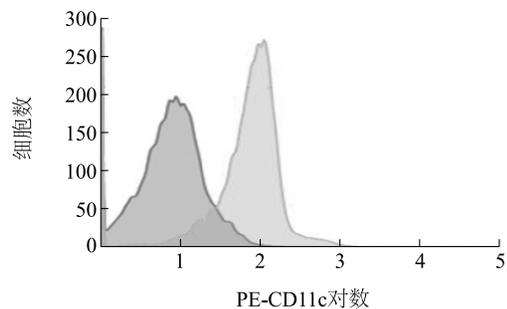


图7 DCs 活性

Fig.7 Activity detection of dendritic cells

2.6 布鲁氏菌 BP26 蛋白对 DCs 成熟及细胞因子表达

如图 8 所示,LPS 组与 DC 对照组相比,经 LPS

刺激作用后,DCs 的成熟呈促进趋势。同时发现在 BP26 刺激 BM-DCs 后,试验组设置的 CD40、MHC-II、CD86 和 CD80 的双染区域比值与空白 DC 组对比后,有明显的上升趋势,故能判定布鲁氏菌 BP26 蛋白对 BM-DCs 的成熟具有促进作用。SPSS 软件

分析结果显示,LPS 与 BP26 虽然对 BM-DCs 的成熟均有促进作用,但 APC-CD40、APC-CD80、FITC-CD86 组中差异不明显,而在 FITC-MHC II 组中呈现出较明显的差异。

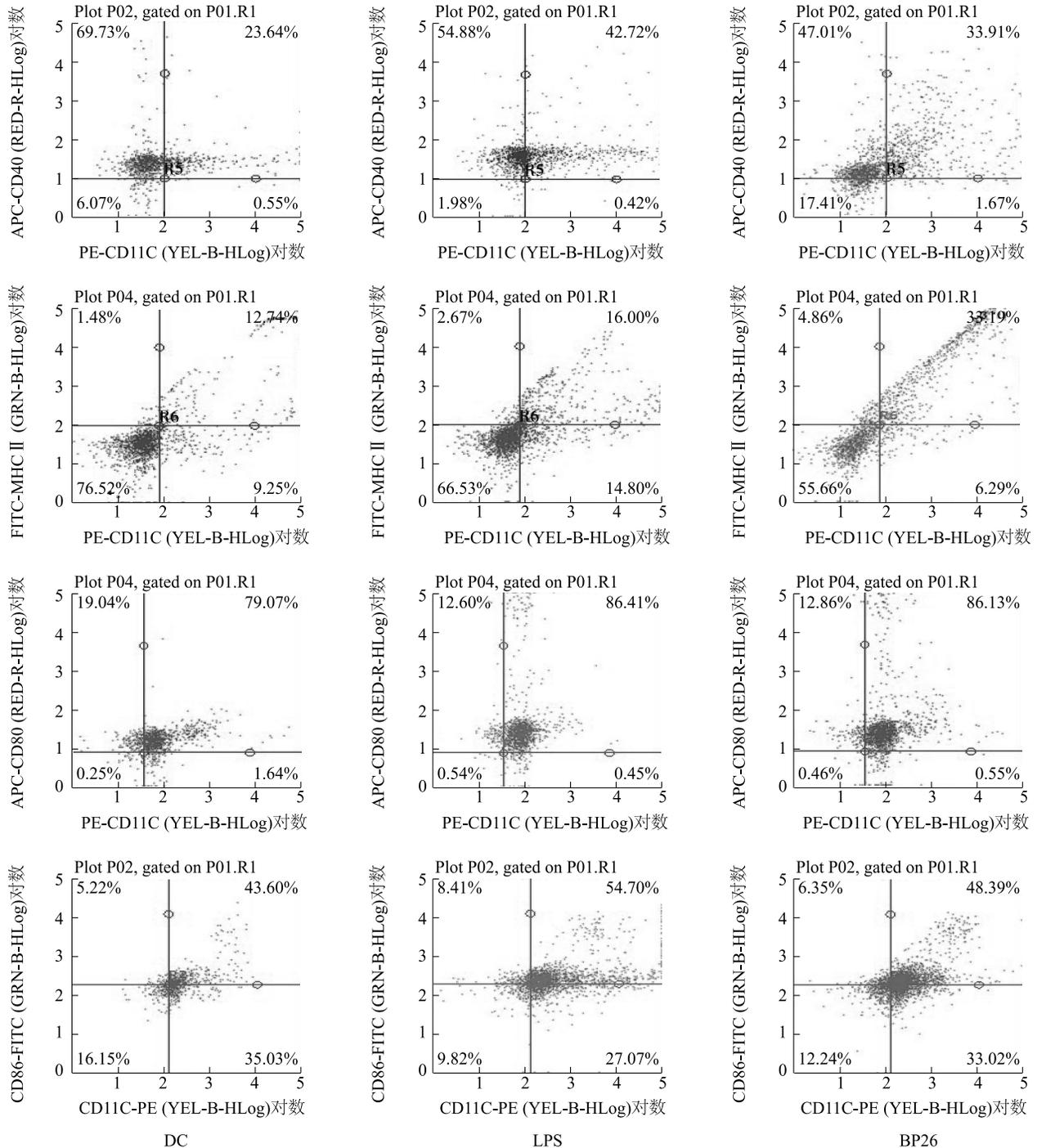


图 8 流式细胞术检测 BP26 和 LPS 处理后 DC 表面共刺激分子的表达

Fig.8 The expression of costimulatory molecules on dendritic cells treated with BP26 and LPS by flow cytometry

2.7 参与 DCs 炎症反应细胞因子的检测

如图9所示,LPS组与DC对照组相比,经LPS刺激作用后,TNF- α 的表达量差异显著($P < 0.05$)。同时发现在BP26刺激BM-DCs后,IL-10的表达量与DC对照组相比呈下降趋势且差异极显著($P <$

0.01),IL-12的表达量与DC对照组相比呈现下降趋势且差异显著($P < 0.05$)。分析结果说明,布鲁氏菌BP26蛋白能够引起细胞的炎症反应,促进炎症细胞因子的释放。

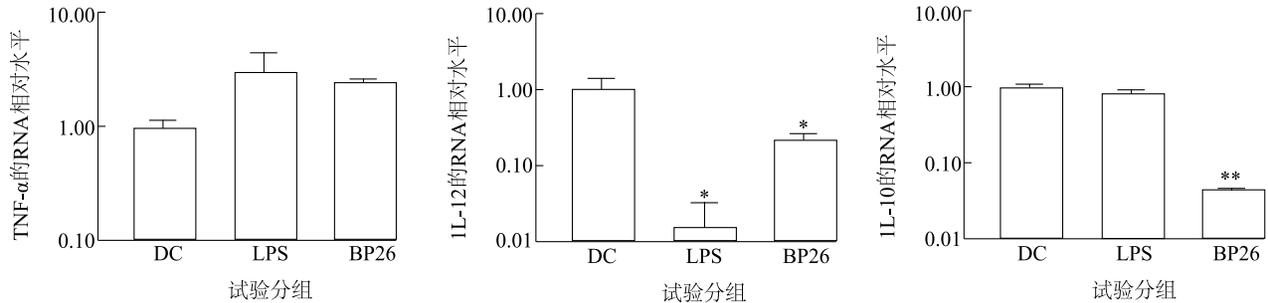


图9 参与 BM-DCs 炎症反应细胞因子显著差异性分析

Fig.9 Analysis of significant differences in cytokines involved in BM-DCs inflammatory response

3 讨论

本研究获得了高效可溶的BP26重组蛋白,与预测结果相一致。纯化后刺激BM-DCs的研究结果表明,BP26蛋白能促进BM-DCs分化成熟及诱导细胞炎症的发生,发现其呈现MHC II抗原提呈作用,并能对IL-10与IL-12的分泌产生抑制作用。

BP26蛋白作为布鲁氏菌外膜蛋白质家族重要的毒力因子^[12],对该蛋白质的研究集中于利用BP26蛋白或其家族成员与其他毒力因子相连进而制成多表位肽疫苗对动物进行相关免疫,从而预防布鲁氏菌病的发生^[13]。但是对于BP26在刺激细胞后激活的信号通路和由此产生的活化信号的研究较少。此外,本试验通过生物信息学工具进行分析发现该蛋白质有大量亲水性抗原区域暴露,亲水性高,这与试验获得高效可溶性表达蛋白质的结果一致。通过表达获得的可溶性活性高的重组蛋白质,为蛋白质与宿主互作功能研究奠定了可靠的基础。

树突状细胞(DCs)是在抗原提呈中扮演着重要角色,目前研究认为,DCs为体内提呈功能最强大的专职抗原提呈细胞(APC)^[14],是机体免疫应答的始动者。将此次试验构建的重组蛋白BP26作为抗原刺激BM-DCs,通过流式细胞术分析BM-DCs表面标志物的变化,发现布鲁氏菌BP26蛋白能促进BM-DCs成熟分化,表明该蛋白质参与细胞炎症反应,在细菌对宿主细胞的侵入过程中发挥

重要作用。

CD86是抗原呈递细胞上的表达分子,可提供T细胞活化和存活所必需的共刺激信号^[15]。它是T细胞表面上2种蛋白质CD28抗原和CTLA-4的配体,其主要与CD28结合^[16],该蛋白质与CD28抗原的结合是激活T细胞的共刺激信号。这些分子与CD80抗原一起提供必要的刺激,以引发T细胞抵抗抗原呈递细胞呈递的抗原^[17]。本研究发现重组BP26蛋白刺激BM-DCs后这些表面分子表达不同程度升高,表明该蛋白能够活化T细胞反应,而MHC II表面分子表达显著升高表明该蛋白质通过MHC II途径提呈抗原。

CD80是CD86活化T淋巴细胞时的协同刺激因子,在自身免疫监控、体液免疫应答及移植反应中发挥重要作用^[18]。CD80属于免疫球蛋白超家族,其受体是CD28和CD152(CTLA4)^[19-20]。CD80在活化B淋巴细胞、活化T淋巴细胞、巨噬细胞、外周血单核细胞及树突状细胞中均可表达;在非活化B淋巴细胞、红细胞、粒细胞及核细胞上不表达^[21-22],而多个研究结果表明,布鲁氏菌感染宿主后能够产生强烈的BP26蛋白相关表位的抗体^[23-24],细胞因子检测结果证明BP26能够激发细胞炎症反应,刺激免疫细胞活化。本研究通过重组BP26蛋白抗原刺激BM-DCs后CD80表面分子升高,说明BP26在细菌侵入宿主引起机体产生免疫效应的过程中发挥着重要的作用。

参考文献:

- [1] 李 娜. 布鲁氏菌中 CRISPR-Cas9 基因编辑技术研究[D]. 武汉:华中农业大学, 2017.
- [2] 童志霞. 布鲁氏菌主要外膜蛋白对树突状细胞成熟度及抗原递呈的影响[D]. 石河子:石河子大学, 2018.
- [3] DOHMER P H, VALGUARNERA E, CZIBENER C, et al. Identification of a type IV secretion substrate of *Brucella abortus* that participates in the early stages of intracellular survival [J]. *Cell Microbiol*, 2014, 16(3): 396-410.
- [4] 刘景福,李格梅,王国治. 布鲁氏菌 BP26 蛋白迟发型变态反应的研究[J]. *药物分析杂志*, 2011, 31(7): 1224-1227.
- [5] 王 勇,南文龙,巩明霞,等. 布鲁氏菌 5 种蛋白的原核表达及其作为间接 ELISA 检测用抗原的适用性比较[J]. *中国动物检疫*, 2015, 32(10): 72-75.
- [6] 王 芳,蒋 卉,朱良全,等. 检测 OMP28 抗体不能有效诊断羊布鲁氏菌病[J]. *微生物学通报*, 2015, 42(8): 1512-1519.
- [7] SAADI M, KARKHAH A, NOURI H R. Development of a multi-epitope peptide vaccine inducing robust T cell responses against brucellosis using immunoinformatics based approaches [J]. *Infect Genet Evol*, 2017, 51: 227-234.
- [8] 李仲乐. 布鲁氏菌 *L7/LI2*, *Omp31* 及其融合基因真核表达载体的构建及免疫原性研究[D]. 长春:吉林农业大学, 2016.
- [9] 杜国玉,吴锦艳,曹小安,等. 羊口疮病毒 ORFV129 蛋白对树突状细胞成熟和功能的影响[J]. *中国兽医科学*, 2019, 49(6): 700-706.
- [10] BLOY N, POL J, ARANDA F, et al. Trial watch: Dendritic cell-based anticancer therapy [J]. *Oncoimmunology*, 2014, 3(11): e963424.
- [11] JING H, GAO X, XU L, et al. H2S promotes a glycometabolism disorder by disturbing the Th1/Th2 balance during LPS-induced inflammation in the skeletal muscles of chickens [J]. *Chemosphere*, 2019, 222: 124-131.
- [12] 陈瑞花,张 辉,唐利燕,等. 布鲁氏菌外膜蛋白 BP26 细胞毒性作用的研究[J]. *中国农业科学*, 2012, 45(16): 3406-3413.
- [13] 吴静波. 马耳他布氏菌弱毒疫苗 M5-90 外膜蛋白 BP26 和 OMP31 抗原表位及其疫苗免疫评价[D]. 广州:南方医科大学, 2013.
- [14] 于秀石,田菊霞. Semaphorins 分子与树突状细胞的免疫功能 [J]. *健康研究*, 2011, 31(6): 469-472.
- [15] 纪志鹏. 共刺激分子 B7-1, B7-2 在大鼠热缺血再灌注肝脏表达的实验研究[D]. 济南:山东大学, 2006.
- [16] 杜军波. 共刺激分子 CD28/CTLA-4 在白癜风患者外周血 T 淋巴细胞的表达[D]. 郑州:郑州大学, 2012.
- [17] 顾晓冬. CD80/CD86 基因 RNA 干扰慢病毒载体的构建及其在抗异基因小鼠心脏移植排斥的作用[D]. 上海:复旦大学, 2010.
- [18] 王丽祥,方 琦. 共刺激分子 CD80, CD86 及抗原递呈细胞 DC 在鼻咽疾病的应用研究[J]. *微创医学*, 2017, 12(2): 230-232.
- [19] HATTORI H, OKANO M, YOSHINO T, et al. Expression of costimulatory CD80/CD86-CD28/CD152 molecules in nasal mucosa of patients with perennial allergic rhinitis [J]. *Clin Exp Allergy*, 2001, 31(8): 1242-1249.
- [20] 蔡 雷,任大明. 一对重要的免疫调节分子:CTLA-4 及其抗体 [J]. *中国免疫学杂志*, 2004(5): 363-366.
- [21] 文 津. STIM1/STIM2 对外周血单核细胞来源的树突状细胞表型及免疫功能的影响[D]. 泸州:泸州医学院, 2012.
- [22] 陈昌友. 抗人 CD80 单链抗体(ScFv)及双价抗体(diabody)的研制及生物学功能初步研究[D]. 苏州:苏州大学, 2011.
- [23] 杨 帆. 布氏杆菌 BP26 抗原特异单克隆抗体的制备与初步应用[D]. 哈尔滨:东北农业大学, 2010.
- [24] 姜东堡. 流产布鲁氏菌 BP26 蛋白 B 细胞线性表位的鉴定 [D]. 哈尔滨:东北农业大学, 2012.

(责任编辑:陈海霞)