

瀋陽農業大學
全日制兽医硕士学位论文

基于 Dps 蛋白的布鲁氏菌自然感染抗体阻断
ELISA 检测方法的建立

研 究 生：_____张 招_____

指 导 教 师：_____刘宝山 讲师_____

合 作 指 导 教 师：_____罗桂燕_____

研 究 方 向：_____动物疫病防控_____

所 在 学 院：_____动物科学与医学学院_____

2023 年 6 月 6 日

DISSERTATION FOR MASTER OF VETERINARY MEDICINE

**Establishment of a blocking ELISA method based on the
Dps protein for detection antibodies against natural
infection of *Brucella***

Candidate: Zhang Zhao

Supervisor: Liu Baoshan

Co-supervisor: Luo Guiyan

Research Field: Animal disease prevention and control

College of Animal Science and Veterinary Medicine

Shenyang Agricultural University

June 6 , 2023

目 录

第一章 文献综述	4
1.1 概述	4
1.2 布鲁氏菌的分类	4
1.3 布鲁氏菌的抗原性	5
1.3.1 属内抗原	5
1.3.2 属外抗原	5
1.4 布鲁氏菌主要毒力因子	5
1.4.1 脂多糖(LPS)	5
1.4.2 IV型分泌系统(T4SS)	6
1.4.3 BvrR/BvrS 系统	6
1.5 布鲁氏菌病的实验室诊断	7
1.5.1 细菌学检测	7
1.5.2 分子生物学检测	7
1.5.3 血清学检查	8
1.6 研究目的和意义	11
第二章 DPS 蛋白生物信息学分析	12
2.1 方法	12
2.1.1 Dps 蛋白理化性质预测	12
2.1.2 大肠杆菌稀有密码子分析	12
2.1.3 信号肽预测	12
2.1.4 蛋白跨膜区预测	12
2.1.5 基于同源建模的蛋白质 3D 结构预测	12
2.1.6 同源性和保守性分析	13
2.1.7 抗原表位预测	13
2.1.8 免疫原性预测	13
2.2 结果	13
2.2.1 Dps 蛋白理化性质预测结果	14
2.2.2 大肠杆菌稀有密码子分析结果	14
2.2.3 信号肽预测结果	14
2.2.4 蛋白跨膜区预测结果	15
2.2.5 蛋白质 3D 结构预测结果	15
2.2.6 同源性和保守性分析结果	16
2.2.7 抗原表位预测结果	17
2.2.8 免疫原性预测结果	17

2.3 讨论.....	18
2.4 小结.....	18
第三章 DPS 蛋白的原核表达及多克隆抗体的制备.....	19
3.1 材料.....	19
3.1.1 载体、菌种、血清、动物.....	19
3.1.2 试剂.....	19
3.1.3 耗材.....	22
3.1.4 仪器设备.....	22
3.2 方法.....	23
3.2.1 重组表达载体的构建.....	23
3.2.2 重组蛋白诱导表达.....	28
3.2.3 重组表达蛋白的纯化.....	29
3.2.4 反应原性分析.....	32
3.2.5 Dps 蛋白多克隆抗体的制备与鉴定.....	33
3.3 结果.....	34
3.3.1 重组表达载体构建结果.....	34
3.3.2 蛋白诱导表达结果.....	36
3.3.3 蛋白纯化结果.....	37
3.3.4 反应原性结果.....	38
3.3.5 多克隆抗体制备和鉴定结果.....	38
3.4 讨论.....	39
3.5 小结.....	40
第四章 阻断 ELISA 检测方法的建立.....	41
4.1 材料.....	41
4.1.1 血清.....	41
4.1.2 试剂.....	41
4.1.3 耗材.....	42
4.1.4 仪器设备.....	42
4.2 方法.....	42
4.2.1 最佳重组蛋白最优工作浓度和多抗稀释比的确定.....	42
4.2.2 最佳封闭液的选择和二抗浓度的确定.....	42
4.2.3 最佳包被时间和封闭时间的确定.....	42
4.2.4 最佳小鼠多克隆抗体反应时间的确定.....	43
4.2.5 最佳显色时间的确定.....	43
4.2.6 最佳血清稀释倍数的确定.....	43
4.2.7 血清反应时间的选择.....	43
4.2.8 交叉反应试验.....	43
4.2.9 批间试验和批内试验.....	44

4.2.10 临界值的确定.....	44
4.2.11 血清的测定.....	45
4.3 结果.....	45
4.3.1 重组蛋白最优工作浓度和多抗稀释比的确定.....	45
4.3.2 封闭液的选择和二抗浓度的确定.....	46
4.3.3 包被时间和封闭时间的确定.....	47
4.3.4 小鼠多克隆抗体反应时间的确定.....	48
4.3.5 显色时间的确定.....	49
4.3.6 血清稀释倍数的确定.....	50
4.3.7 血清反应时间的确定.....	51
4.3.8 交叉反应试验结果.....	51
4.3.9 批间试验和批内试验结果.....	52
4.3.10 临界值的确定.....	53
4.3.11 血清的测定结果.....	54
4.4 讨论.....	54
4.5 小结.....	56
结论.....	57
参考文献.....	58

摘要

布鲁氏菌病是人畜共患传染病，我国将其列为二类传染病，其不仅影响畜牧业的发展，也危害公共卫生健康。当前对布鲁氏菌病的预防主要是对动物进行弱毒疫苗的免疫，然而现在还没有将自然感染抗体与疫苗免疫抗体进行区分的有效方法，不利于免疫和检测相结合的布病综合防控。为解决这一问题，本研究以布鲁氏菌 DNA 饥饿/稳定期保护蛋白（Dps）作为包被抗原，建立了一种布鲁氏菌自然感染抗体的阻断 ELISA 检测方法。

首先，为了有效地进行 Dps 蛋白的表达、纯化，对 Dps 蛋白进行生物信息学分析，预测分析了其基因密码子使用情况、信号肽、蛋白跨膜区、B 细胞抗原表位、蛋白免疫原性等性质。分析结果表明 Dps 蛋白为同源 12 聚体蛋白，没有信号肽和跨膜区，抗原性较好、同源性高、保守性好、免疫原性高，在大肠杆菌表达系统中表达较高。

随后，设计合成特异性引物对其基因进行了扩增，通过酶切连接等方法将目的片段插入 pET-28a 载体，成功构建了 pET-28a-Dps 重组载体。转化到大肠杆菌后对重组表达菌的诱导表达条件进行优化，确定该蛋白在自诱导培养基中 37℃ 震荡培养 7h 可以进行大量的诱导表达。通过亲和纯化获得了可溶性表达的重组蛋白。采用皮下多点注射的方式，将获得的 Dps 蛋白以 14 天为间隔免疫小鼠三次，制备了效价达 1:2¹⁸ 的多克隆抗体，为阻断 ELISA 方法的建立准备了材料。

最后用纯化的 Dps 蛋白作为抗原包被酶标板，用制备的小鼠多克隆抗体为一抗，用兔抗鼠 IgG 抗体作为二抗，建立了检测牛羊血清的阻断 ELISA 方法，并对各项试验条件进行了优化。优化结果显示最优条件为：Dps 抗原包被浓度为 1.0 μg/mL，包被时间 1.5 h；5% 脱脂奶封闭，封闭时间 1.0 h；待检测血清使用原液，反应 0.5 h；小鼠多克隆抗体 600 倍稀释，反应 1.0 h；二抗 1:2000 稀释，反应 30 min；避光显色 10 min。通过检测 300 份牛羊血清，结合 ROC 曲线分析，最终判定 Cut-off 值为 4.0%。在该阈值下该阻断 ELISA 的特异性为 98.5%，敏感性为 88.57%，具有较高的准确性。该方法具有良好的重复性，批间和批内变异系数均小于 10%。与其它疾病抗体不发生交叉反应，具有良好的特异性。对免疫血清的检测发现，该方法不能检出免疫血清，只能检出野毒感染血清，可用于免疫养殖场布病自然感染动物的检测。

综上所述，本研究成功建立了布鲁氏菌自然感染抗体的阻断 ELISA 检测方法，该方法有望为布鲁氏菌病的综合防控提供新的检测手段。

关键词：布鲁氏菌；诊断；自然感染；抗体；阻断 ELISA

Abstract

Brucellosis is a zoonotic infectious disease, which is classified as a second-class infectious disease in China. It not only affects the development of animal husbandry, but also endangers public health. At present, the prevention of brucellosis is mainly to immunize animals with attenuated vaccines. However, there is no effective method to distinguish between antibodies against natural infection and vaccination, which is not conducive to the comprehensive prevention and control of brucellosis by combining immunization and detection. In order to solve this problem, a blocking ELISA detection method for *Brucella* natural infection antibody was established by using *Brucella* DNA starvation / stabilization protective protein (Dps) as coating antigen.

Firstly, in order to effectively express and purify Dps protein, bioinformatics analysis of Dps protein was carried out, and its gene codon usage, signal peptide, protein transmembrane region, B cell epitope and protein immunogenicity were predicted and analyzed. The analysis results showed that the Dps protein was a homologous 12-mer protein without signal peptide and transmembrane region. It had good antigenicity, high homology, good conservation and high immunogenicity.

Subsequently, specific primers were designed and synthesized to amplify the gene, the target fragment was inserted into the pET-28a vector by enzyme digestion and ligation, and the pET-28a-Dps recombinant vector was successfully constructed. After transformation into *Escherichia coli*, the induced expression conditions of the recombinant expression bacteria were optimized, and it was determined that the protein could be induced to express in a large amount in the self-inducing medium at 37 °C for 7 h. Soluble recombinant protein was obtained by affinity purification. The obtained Dps protein was subcutaneously injected into mice three times at an interval of 14 days to prepare a polyclonal antibody with a titer of 1:2¹⁸ to prepare for the establishment of a blocking ELISA method.

Finally, the purified Dps protein was used as the antigen to coat the microplate, the prepared mouse polyclonal antibody was used as the primary antibody, and the rabbit anti-mouse IgG antibody was used as the secondary antibody. The blocking ELISA method for detecting bovine and sheep serum was established, and the experimental conditions were optimized. The optimization results showed that the optimal conditions were as follows : Dps antigen coating concentration was 1.0 μg / mL, coating time was 1.5 h ; 5 % skim milk for 1.0 h ; the serum to be tested did not need to be diluted and reacted for 0.5 h ; mouse polyclonal antibody was diluted 600 times and reacted for 1.0 h. The secondary antibody was diluted to 1 : 2000 and reacted for 30 min. Colored in dark for 10 min. By detecting 300 bovine and sheep

serum, combined with ROC curve analysis, the Cut-off value was finally determined to be 4.0 %. Under this threshold, the specificity of the blocking ELISA was 98.5 %, and the sensitivity was 88.57 %. The method had good repeatability, and the coefficient of variation between batches and within batches was less than 10 %. It does not cross-react with other disease antibodies and has good specificity. The detection of immune serum showed that this method could not detect immune serum, but only detected wild virus infected serum, which could be used for the detection of naturally infected animals in immune farms.

In summary, this study successfully established a blocking ELISA detection method for *Brucella* natural infection antibodies, which is expected to provide a new detection method for the comprehensive prevention and control of brucellosis.

Keywords : *Brucella* ; Diagnosis ; Natural infection; Antibody; Blocking ELISA

第一章 文献综述

1.1 概述

布鲁氏菌是革兰氏阴性菌 (Gram Negative Bacteria, GNB), 早期分离时常呈球状、球杆状和卵圆形, 无运动性、无芽孢、无鞭毛、一般不形成荚膜, 偶见类似荚膜样的结构, 布鲁氏菌属于 α -变形杆菌, 是兼性胞内病原菌(孙天浩等, 2021)。

布鲁氏菌是专性需氧菌, 在初代分离时需 5%-10% CO₂。最适生长温度和 pH 分别是 37°C 和 6.6-7.4。可形成几种菌落, S 型菌落无色透明、表面光滑湿润、大小不等, 直径 0.5-1.0 mm(庞宇等, 2021); R 型菌落不太透明, 多呈颗粒状, 浅黄色到褐色, 易碎或黏滞(郝海水等, 2021); 有时出现黏液型(M)菌落, 该菌落呈现黏胶状, 且浑浊不透明, 也有 S→R 中间型 (I) 菌落。5%-10% 马血清胰蛋白胨大豆琼脂适宜所有菌株生长(陆承平等, 2013)。实验室长期传代菌株培养 48-72 h 可生长良好, 但初次分离生长缓慢, 需 5-10 d, 甚至 30 d(陆承平等, 2013)。

布鲁氏菌对外界环境有较强的耐受力, 阳光直射可存活 4 h, 在水和土壤中可存活 1-4 个月, 皮毛中长达 2-4 个月, 对湿热敏感, 对消毒剂抵抗力较弱(蒙晓雷与崔捷, 2021; 任莹与郭金利, 2021)。

布鲁氏菌病可经多种方式传播, 如消化道、接触、呼吸道等, 人感染布病与职业和生活习惯密切相关, 易感人群主要有病畜相关饲养人员、兽医工作者及实验室人员。人类患病主要是因为直接接触感染了布鲁氏菌病的动物或食用了该类消毒不彻底的动物产品(孙天浩等, 2021)。人的传播途径主要是经性传播、母乳传播、垂直传播和血液传播(杜淑清与王芳蕊, 2021)。布鲁氏菌病主要是危害动物的繁殖性能, 反刍动物最易感。在动物中, 羊、牛、猪对布鲁氏菌的感染性最强, 母畜比公畜更易发病, 对于患病公畜, 会出现睾丸炎和附睾炎, 母畜出现不孕, 流产等症状(孙天浩等, 2021)。成年动物感染率比生殖器官未发育健全的幼龄动物高。患病母畜流产的胎儿、产后的胎衣和羊水、都会导致健康动物感染(杜淑清与王芳蕊, 2021)。

布鲁氏菌病严重危害当前经济社会发展, 控制和根除布鲁氏菌病是当前的重点任务。虽然现有的疫苗存在一些不足之处, 但它们在世界范围内预防布鲁氏菌病方面发挥了至关重要的作用。随着分子生物学技术的发展和布鲁氏菌致病机制的进一步研究, 新型基因工程疫苗有望取代传统疫苗用于布鲁氏菌病的控制。

1.2 布鲁氏菌的分类

根据不同的易感宿主, 将布鲁氏菌分为 6 个种和 19 亚型, 目前为止, 在我国已分

离到布鲁氏菌的 6 个种及其所有亚型。根据宿主特异性将本属菌分为马尔他布鲁氏菌 (*B.melitensi*)、流产布鲁氏菌 (*B.aborus*)、猪布鲁氏菌 (*B.suis*)、绵羊布鲁氏菌 (*B.ovis*)、沙林鼠布鲁氏菌 (*B.neotomae*) 和犬布鲁氏菌 (*B.canis*) 6 个种(蒙晓雷与崔捷,2021; 任莹与郭金利, 2021)。其中猪、牛、羊的影响最大,羊布鲁氏菌致病力最强(杜淑清与王芳蕊, 2021)。

1.3 布鲁氏菌的抗原性

抗原结构复杂,分属内抗原和属外抗原,前者包括 A、M 及 R 等表面抗原。

1.3.1 属内抗原

光滑型布鲁氏菌具有两种表面抗原,分别是 A 和 M,其抗原决定簇位于 LPS(脂多糖)多糖链部分。两者的含量在菌株之间有差异,如流产布鲁氏菌以 A 为主,马尔他布鲁氏菌以 M 为主,而猪布鲁氏菌两者含量相近,可用血凝试验鉴别(陆承平等,2013)。非光滑型布鲁氏菌共同具有 R 抗原,为低蛋白含量脂多糖复合物,其抗血清不与光滑型布鲁氏菌凝集,但可以与绵羊布鲁氏菌和犬布鲁氏菌凝集。

1.3.2 属外抗原

光滑型布鲁氏菌的表面抗原与小肠结肠炎耶尔森菌 O:9、土拉热弗朗西斯菌、霍乱弧菌和大肠杆菌 O:157 间存在共同抗原成分。非光滑菌株犬布鲁氏菌与驹放线杆菌、绿脓杆菌、多杀性巴氏杆菌的一些血清型之间存在交叉反应。用巯基化合物(半胱氨酸、巯基乙醇)处理血清,能明显甚至完全清除交叉反应(陆承平等, 2013)。

1.4 布鲁氏菌主要毒力因子

布鲁氏菌可寄生于宿主细胞内,定位于网状内皮系统、乳腺和生殖系统,这使其具有优秀的免疫监视逃避功能,保护布鲁氏菌在胞内不被补体等免疫杀伤反应裂解(陆承平等, 2013)。

布鲁氏菌的主要的毒力因子是:脂多糖(LPS)、IV型分泌系统和 BvrR/BvrS 系统,它们可以与宿主细胞表面相互作用进入细胞,形成早期和晚期的 BCV(含空泡的布鲁氏菌),也可以在细菌繁殖时与内质网(ER)相互作用(Głowacka, et al, 2018)。也正是这样的特性,布鲁氏菌感染可发展为隐性感染或慢性感染,并且一旦感染很难彻底清除根治。

1.4.1 脂多糖(LPS)

内毒素脂多糖是布鲁氏菌的重要毒力因子。在革兰氏阴性菌中,脂多糖由类脂 A、核心寡糖和 O-抗原组成。布鲁氏菌的脂多糖与经典的从大肠杆菌中分离的脂多糖相比,

毒性和活性都较低。在菌落光滑的菌株中，光滑型的脂多糖(S-脂多糖)含有：(1)类脂A：由两种类型的氨基糖和脂肪酸组成；(2)核心寡糖：由甘露糖、葡萄糖、喹诺酮胺组成；(3)O链：由4-甲酰胺-4,6-二脱氧甘露糖组成。在粗糙型的菌株中，脂多糖的O链减少或缺失(Głowacka, et al, 2018)。

布鲁氏菌脂多糖已被证明通过抑制补体和抗菌肽攻击以及通过阻止免疫介质的合成来削弱抗微生物反应(Lapaque, et al, 2005)。革兰氏阴性菌表面最显著的病原相关分子模式(PAMP)承载成分是LPS(又称内毒素)，PAMP可被TLR4-MD2受体-共受体复合体识别，触发强大的促炎反应，可能导致内毒素休克。但布鲁氏菌LPS不携带PAMP(Conde-Álvarez, et al, 2012)，并且脂质A在结构上也与TLR4-MD2识别的经典脂质A不同，使得布鲁氏菌的LPS是弱内毒素(Conde-Álvarez, et al, 2012)。但布鲁氏菌脂多糖可以刺激机体产生抗体，同时其外露多糖链可以阻止外膜蛋白的暴露，对机体保护性免疫十分重要，所以LPS是布鲁氏菌重要抗原成分，也是诊断的重要依据(阿斯马热·马合木提等, 2021)。

1.4.2 IV型分泌系统(T4SS)

IV型分泌系统(T4SS)将DNA和蛋白质底物跨细胞包膜转运，通常需要与受体细胞直接接触。大多数致病菌具有典型的IV型分泌系统，布鲁氏菌的IV型分泌系统可以选择性地使膜转运蛋白质(VceA、VceC)、单体蛋白质和其它大分子(毒素)通过，这对致病性至关重要(Gao, et al, 2013)。该系统以编码12个蛋白质的VirB操纵子为代表，与其它参与细胞内运输的病原体的IV型分泌系统具有同源性(Gao, et al, 2013; Głowacka, et al, 2018)。VirB操纵子的表达受群体感应调节因子VjbR的调节。布鲁氏菌VirB缺失突变体在体外巨噬细胞和体内小鼠感染模型中的毒力显著降低，无法在内质网内繁殖，可能是由于无法到达内质网所致(Głowacka, et al, 2018)。一些利于其在细胞内存活的蛋白，如外膜蛋白(Omp25, Omp31)在VirB缺失突变株中也表达下降。VirB8是布鲁氏菌IV型分泌系统(T4SS)的关键组成部分。VirB8的跨膜(TM)结构域在自身以及T4SS的其它蛋白的相互作用中起着至关重要的作用(Gao, et al, 2013)。

1.4.3 BvrR/BvrS系统

BvrR/BvrS双组分系统由位于细胞膜上的组氨酸激酶感受器(BvrS)和细胞质调节因子(BvrR)组成，是流产布鲁氏菌致病所必需的。BvrR/BvrS双组分基因传感系统(TCS)通过一系列蛋白磷酸化来调节细菌基因的表达，这被认为是调节细胞结合和侵入的关键因素之一(Gao, et al, 2013)。现已经确定BvrS/BvrR双组分系统参与了吞噬细胞对布鲁氏菌的内化。TCS BvrR/BvrS系统还参与外膜(OM)的动态平衡，可控制脂多糖的结

构及周质和各种表面蛋白(OMP)的表达,包括 Omp25(也称为 Omp3a)和 Omp22(Omp3b)(Gao, et al, 2013)。

1.5 布鲁氏菌病的实验室诊断

1.5.1 细菌学检测

采集流产胎儿的脏器、胃内容物、胎盘、羊水及流产母畜的阴道分泌物作为病料,涂片镜检,并将污染病料接种在含有放线菌酮 0.1 mg/mL、杆菌肽 25 IU/mL、多粘菌素 B6 IU/mL 的培养基,放置在含 5 %-10 %的 CO₂ 的 37 °C 培养箱进行培养。布鲁氏菌菌落特征为典型的圆形、闪亮、针尖和蜂蜜滴状外观(Tekle, et al, 2019)。如有细菌生长,挑选可疑菌落,进一步做玻片凝集试验或 PCR 鉴定。如培养至 30d 后仍无细菌生长,则判为阴性。布鲁氏菌通常表现为慢性或隐性感染,其诊断和检疫主要依靠血清学及变态反应,细菌学诊断仅用于流产动物或其它特殊情况。

尽管有很多技术可以用来诊断布鲁氏菌病,但目前明确的诊断仍然需要分离和鉴别病原微生物(K. Karthik, et al, 2014)。使用传统的细菌学检测技术需要一定的技术水平来分离单一病原微生物,而微生物生长仍需要 2-3 天,这些技术存在耗时长、敏感性低、载量低等问题。且由于布鲁氏菌病为人畜共患病,所有操作需要在生物安全柜里操作,使得操作变得繁琐(K. Karthik, et al, 2014)。

鉴于布鲁氏菌病可能由实验室感染所致,所以规定凡涉及本菌的样品检测,均应在生物安全 2 级实验室进行,凡涉及本菌的培养,则需在生物安全 3 级实验室内操作。

1.5.2 分子生物学检测

1.5.2.1 聚合酶链式反应 (PCR)

聚合酶链式反应 (PCR) 是根据 DNA 的半保留复制的原则,用少量 DNA 模板,扩增出大量 DNA。该方法仅使用单一引物,无法判断布鲁氏菌的生物类型,因此多重 PCR 应运而生。同时,通过对引物探针添加荧光标记,捕捉实时的荧光信号,可以解决核酸定量问题,又较普通 PCR 省去了电泳的步骤(欧阳志良等, 2021)。该方法精确性高,试验结果直观,但成本较高,且对试验设备有一定的要求,适合实验室对布鲁氏菌的诊断。Wenlong Nan (2016) 等基于单核苷酸的多态性建立了布鲁氏菌 Cycleave PCR 检测方法,可以将其与 57 个其它 5 个种属的布鲁氏菌区分开,也可以将 A19 和 S19 与 22 个流产布鲁氏菌区分开。该方法可检测 A19 到 7.6 fg,非 A19/S19 则检测到 220 fg (Nan, et al, 2016)。关于布鲁氏菌病的 DNA 检测方法主要是各种 PCR,PCR 被普遍应用于布鲁氏菌病的诊断,该方法特异性高、灵敏性强、结果可靠,但其对仪器和后期结果呈现要求较高。这些问题都导致该方法不适用于现场检测(K. Karthik, et al, 2014)。

1.5.2.2 环介导等温扩增技术 (LAMP)

布鲁氏菌病的现场诊断是十分重要的, 需要一种特异性、灵敏度和可靠性都比较高的技术来取代血清学检测的方法, 环介导等温扩增就是这样的一种技术, 能够满足现场诊断(K. Karthik, et al, 2014)。环介导等温扩增技术与 PCR 原理相似, 但比传统 PCR 需要用到的仪器更少。环介导等温扩增技术相对于 PCR, 可在恒温条件下进行检测, 可替代一般 PCR 热循环反应过程, 检测时间短, 对实验仪器要求低, 且实验结果肉眼可以观察, 实验方便快捷, 耗时短、成本低、检测场地不受限制, 前景较好。Guo-Zhen Lin(2011)等基于 Omp 25 基因序列建立了一种能用来检测牛奶和血样中布鲁氏菌 DNA 的环介导等温扩增方法。能检测到 DNA 的含量低至 9 fg/ μ L, 有较高的敏感性(Lin, et al, 2011)。通过对 6 个种属的 19 株布鲁氏菌以及 28 株非布鲁氏菌进行验证, 未与非布鲁氏菌株发生交叉反应, 证明该方法具有良好的特异性。通过对 200 份左右的样品进行检测, 证明建立的检测方法符合率为 99.0 %(Lin, et al, 2011)。环介导等温扩增技术具有恒温工作、特异性高、检测速度快、灵敏度高的优点, 也可以添加染料, 在后期可通过肉眼观察实验结果, 没有复杂仪器的要求(K. Karthik, et al, 2014)。

1.5.2.3 重组酶聚合酶扩增技术 (RPA)

重组酶聚合酶扩增技术利用重组酶和引物形成的蛋白-DNA 复合物在双链 DNA 中寻找同源序列, 确定序列后发生链置换反应, 开始对模板上的靶标进行指数式 DNA 扩增, 在 25 $^{\circ}$ C-42 $^{\circ}$ C恒温条件下, 20 min 即可达到检测水平(于博, 2020)。Gumaa MM (2019) 等分别用 RT-RPA (实时重组酶聚合酶扩增)、qPCR (荧光定量聚合酶链式反应)、cPCR (常规聚合酶链式反应) 三种检测方法对 100 多份样品进行检测, RT-RPA 的阳性检出率最高(Gumaa, et al, 2019)。M. M. Gumaa (2020) 建立了一种特异性检测布鲁氏菌的双重重组酶聚合酶扩增(duplex RPA)方法, 双重 RPA 在青海、内蒙古和新疆不同类型的羊和牦牛样本中, 检出布鲁氏菌病阳性率可以达到 80.6%, 该方法对羊种布鲁氏菌和流产布鲁氏菌具有较高的特异性和敏感度, 可用于流行病学监测和临床应用。(Gumaa, et al, 2020)。

1.5.3 血清学检查

一般用已知抗体来鉴定分离菌是否为布鲁氏菌, 动物的群体检疫主要依赖血清抗体的检测, 抗体一般在动物感染后 7-15 d 出现。

血清学诊断方法操作简单、适用性广, 主要包括虎红平板凝集试验 (RBT)、试管凝集试验 (SAT)、补体结合试验 (CFT)、乳牛全乳环状试验 (MRT)、酶联免疫吸附试验 (ELISA)、荧光偏振测试 (FPA)、胶体金免疫层析法 (GICA) 等(莫茜等, 2021)。

Van Aert 等(1984)在 23 个感染过布鲁氏菌病的动物群中选择 785 只动物, 酶联免疫吸附试 (ELISA) 验检出 43 % 的阳性, 凝集试验 (SAT) 检验出 29 % 的阳性, 补体结合试验 (CFT) 检出 24 % 的阳性, 玫瑰-孟加拉 (RBT) 试验检出 21 % 的阳性(A.Vanaert, P.Brioen, P.Dekeyser, L.Uytterhaegen, R.J.Sijens, 1984)。

1.5.3.1 虎红平板凝集试验 (RBT)

虎红平板凝集试验是利用虎红中的抗原和血清中的抗体反应产生凝集现象, 来快速诊断布鲁氏菌病。将虎红抗原与待检血清样本按照一定比例混合均匀, 等待反应一段时间后, 通过肉眼观察凝集现象并对其作出判断(王刚等, 2021)。该方法操作简单、成本低、耗时短、灵敏度高、出结果快, 在样品量巨大时, 可用该方法进行初筛。但该方法的检测结果容易受到非特异性抗体的影响, 导致结果出现假阳性, 检出的阳性样品需要进一步用其它方法验证(王刚等, 2021)。因此在采集血清时应尽可能消除血液中纤维蛋白原的干扰, 从而提高该实验的准确性(王刚等, 2021)。

1.5.3.2 试管凝集试验 (SAT)

试管凝集试验是血清中的 IgM 抗体与布鲁氏菌抗原反应发生凝集, 通过肉眼观察对结果进行判定。当牛、马、鹿和骆驼 1:100 血清稀释度, 猪、山羊、绵羊和犬 1:50 血清稀释度, 出现“++”及以上凝集现象时, 判定为阳性; 当牛、马、鹿、骆驼 1:50 血清稀释度, 猪、山羊、绵羊和犬 1:25 血清稀释度, 出现“++”以上凝集现象时, 判定为可疑 (来自 GB/T 18646-2018, 动物布鲁氏菌病诊断技术)。该方法特异性较强, 不易受其它干扰因素的影响, 结果比较准确。但该过程需要对样本稀释 4 个梯度, 需要标准阴阳性作对照, 且试验反应时间长、操作繁琐、较费试验材料、前期准备工作及试验过程耗时较长, 出结果慢。其结果还需要借助其它方法进行进一步验证(王刚等, 2021)。

1.5.3.3 补体结合试验 (CFT)

补体结合试验以抗原抗体特异性结合为基础, 补体无法与不含有特异性抗体的样品结合, 在溶液中处于游离状态, 会产生溶血现象(欧阳志良等, 2021)。因此, 若不发生溶血现象, 则可能存在特异性抗体, 规定 1:10 被检血清阻止溶血超过 50 %, 即判定为阳性。该方法特异性高, 是慢性布鲁氏菌病一种可靠的诊断方法, 得到了国际认可, 但由于试剂制备困难、操作过程繁琐、且补体存在生物干扰, 不适用于猪布鲁氏菌病的检测, 具有一定的局限性(欧阳志良等, 2021)。

1.5.3.4 乳牛全乳环状试验 (MRT)

全乳环状试验主要是检测牛奶中的抗体, 牛奶样品和红色布鲁氏菌抗原反应, 若

形成紫红色的乳脂环，则判断为布鲁氏菌阳性。该方法无需采血，对奶牛没有应激，操作简便，价格低廉，试验结果较准确。但该方法仅适用于牛，检测动物品种单一，如果牛奶出现变质，对结果影响较大(王刚等，2021)。

1.5.3.5 酶联免疫吸附试验 (ELISA)

酶联免疫吸附试验是通过把特定的抗原或抗体固定在微孔板上，然后再利用其与酶标抗体反应，通过底物显色，酶标仪在一定的 OD 下读数来判断结果。该方法准确性高，敏感性和特异性高，误差小(王刚等，2021)。

尽管针对布鲁氏菌的减毒活疫苗 M5-90 有效，但其无法区分自然感染和疫苗免疫，疫苗还被证明会导致怀孕动物流产。因此需要一个更安全、更有效的疫苗来克服这些问题。TcfS 被评估为布鲁氏菌病的诊断标记物，因此 ZHIQIANG LI (2015) 等研究评估了使用 TcfS 蛋白作为诊断抗原标志的可能性，通过免疫小鼠以及建立间接 ELISA 检测方法，表明 TcfS 蛋白可用于区分疫苗接种和野毒感染(Li, et al, 2015)。

研究表明布鲁氏菌的致弱菌苗 BP26 和 Omp 31 基因缺失突变株都不会改变亲本株的生物学特征和免疫保护效果，BP26 基因被认为是目前布鲁氏菌最合适的基因缺失疫苗标志之一(左玉柱等，2014)。左玉柱等 (2014) 将布鲁氏菌外膜蛋白 BP26 作为包被抗原，建立了牛布鲁氏菌间接 ELISA 检测方法，该方法符合率高，且对其它相关的牛病病原无交叉反应，能够有效的区分布鲁氏菌自然感染和基因缺失苗免疫(左玉柱等，2014)。

Jing-Yu Wang (2014) 通过在 GenBank 对羊种布鲁氏菌、流产种布鲁氏菌、猪种布鲁氏菌、犬种布鲁氏菌、木鼠布鲁氏菌和绵羊种布鲁氏菌进行比对，发现 repA 相关基因只存在于猪布鲁氏菌、犬布鲁氏菌和微小布鲁氏菌中，通过 PCR 将 repA 基因扩增后插入到 pET-32a，诱导表达纯化后，将此蛋白作为抗原，其中接种猪布鲁氏菌 S2 疫苗株的动物血清作为阳性对照，相反接种羊种布鲁氏菌和流产布鲁氏菌的动物血清作为阴性，建立了一种区分猪种布鲁氏菌、羊种布鲁氏菌和流产布鲁氏菌的 ELISA 检测方法(Wang, et al, 2014)。

1.5.3.6 荧光偏振测试 (FPA)

荧光偏振测定法的原理是溶液中分子越大旋转速度越慢，用特定的荧光偏振仪器测定旋转速度来判断阴阳性。用已知的荧光标记抗原去结合血清中的抗体，若存在布鲁氏菌的抗体，则抗原抗体结合成较大的分子，使得旋转速度变慢，若偏振值升高则判定为阳性。该方法操作简单，特异性和敏感性较好，目前已有较成熟的配套试剂盒(王刚等，2021)。

1.5.3.7 胶体金免疫层析法 (GICA)

胶体金免疫层析法是将被胶体金标记的抗体固定在试纸条上,待检样品与抗体结合产生免疫反应,胶体金颗粒密度高,样品聚集在检测区,引发显色反应来对布鲁氏菌病进行诊断的一种方法。该方法特异性高、亲和性好、操作方便、检测迅速、适合现场检测及大面积推广使用(谢晓英, 2021)。

1.6 研究目的和意义

布鲁氏菌病是人畜共患传染病,我国将其列为二类传染病,其不仅影响畜牧业的发展,也危害公共卫生健康。当前对布鲁氏菌病的预防主要是对动物进行弱毒疫苗的免疫,然而现在还没有将野毒感染抗体与疫苗免疫抗体进行区分的有效方法,目前没有成品试剂盒可以直接将二者区分,对于布鲁氏菌病免疫和检测相结合的综合防控造成了严重困难。因此建立一种将免疫和野毒感染相区分的血清学检测方法非常重要。

DNA 饥饿/稳定期保护蛋白(Dps)是铁蛋白的一种,承担储存铁的作用,它可以在饥饿期间与 DNA 形成极其稳定的络合物,避免过氧化氢对 DNA 造成的氧化损伤,从而起到对 DNA 的保护作用。Dps 被认为是布鲁氏菌感染过程中潜在的免疫原性抗原(Hop, et al, 2018)。Hop HT (2018) 等评估了 Dps 重组亚单位疫苗预防小鼠布鲁氏菌病的能力,发现与对照组相比,免疫的小鼠的体液免疫反应升高,说明 Dps 基因编码的重组蛋白有可能保护小鼠免受布鲁氏菌病毒感染(Hop, et al, 2018)。孙天浩等(2022)根据此蛋白建立了间接 ELISA 检测方法(孙天浩等, 2022)。最近有研究报道, A19 疫苗株的 Dps 表达量显著降低甚至不表达,且在 NCBI 中对其进行比对, A19 疫苗株的 Dps 基因分析发现,该序列不在开放阅读框内,但在 2308 野毒株中处于编码区,因此 Dps 有望作为野毒感染抗体的靶标,建立检测布鲁氏菌野毒感染抗体的检测方法。

因此,本研究以布鲁氏菌 DNA 饥饿/稳定期保护蛋白(Dps)作为包被抗原,建立了一种布鲁氏菌自然感染抗体的阻断 ELISA 检测方法,解决当前难以在免疫养殖场筛选布鲁氏菌自然感染动物、不能将免疫和检测相结合进行综合防控这一问题。阻断 ELISA 的原理是先用待检血清与包被抗原反应,阻断后加入多克隆抗体与剩余的抗原结合,待检血清中抗体越高,阻断作用越明显,OD 值越低。该方法不同于间接法只能检测一种动物,可用于多种动物布鲁氏菌抗体的检测,适用性更广。

第二章 Dps 蛋白生物信息学分析

为了有效进行 Dps 蛋白的体外表达及抗体制备，使用生物信息学的方法对 Dps 蛋白的理化性质、信号肽、跨膜区、结构、同源性、免疫原性等进行分析预测，以便开展后续的研究，为建立布鲁氏菌病的诊断方法提供基础。

2.1 方法

2.1.1 Dps 蛋白理化性质预测

NCBI 网站获取 Dps 基因序列、氨基酸序列。使用在线分析软件 <https://www.expasy.org/> 对蛋白序列进行分析，对蛋白氨基酸数量、分子量、理论 PI、带负电荷的残基总数 (Asp + Glu)、带正电荷的残基总数 (Arg + Lys)、蛋白在 280 nm 波长处的消光系数、预估半衰期、不稳定指数 (II)、蛋白的脂类指数、总平均亲水性等进行预测。

2.1.2 大肠杆菌稀有密码子分析

该蛋白使用大肠杆菌表达系统进行诱导表达，因此使用在线分析软件 <https://www.genscript.com/tools/rare-codon-analysis> 对大肠杆菌稀有密码子进行分析，预测 Dps 蛋白在大肠杆菌表达系统中的表达容易程度。

2.1.3 信号肽预测

信号肽是引导新合成的蛋白质向分泌通路转移的短肽链（长度 5-30 个氨基酸）。常指新合成多肽链中用于指导蛋白质的跨膜转移（定位）的 N-末端的氨基酸序列（有时不一定在 N 端）。信号肽可以作为新生肽链分泌到细胞外的信号，它们也可以作为一些蛋白质定位在质膜和其它一些与细胞外相通的细胞器（包括内质网、高尔基体和溶酶体等）内的信号。本研究 Dps 蛋白为胞内表达，不需要信号肽，因此通过在线分析软件 <https://www.novopro.cn/tools/signalp> 对蛋白信号肽进行分析。

2.1.4 蛋白跨膜区预测

预测跨膜区是为了分析蛋白质的定位，如果含有跨膜区，可能是膜蛋白，该蛋白可能作为膜受体起作用，也可能是定位在膜上的离子通道蛋白。确定是否含有跨膜区，对分析其功能、制定纯化方案以及确定表达方式有很大帮助。通过在线分析软件 <https://www.novopro.cn/tools/tmhmm.html> 对蛋白跨膜区进行分析。

2.1.5 基于同源建模的蛋白质 3D 结构预测

使用在线建模软件 <https://swissmodel.expasy.org/>对蛋白进行分析。为后续构象表位预测提供基础。

2.1.6 同源性和保守性分析

同源性是指进化过程中源于同一祖先的各分支之间的关系，分子生物学水平上主要是指基因核苷酸序列之间的相似程度，同源性预测结果可以用来判断鉴定时的准确性。保守性是指蛋白序列在各物种之间的相似程度，保守性强的序列可能具有功能性价值。使用 NCBI 中 BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 进行同源性分析，使用 ESPript 3.0 (<https://esript.ibcp.fr/ESPript/cgi-bin/ESPript.cgi>) 对序列保守性进行分析。

2.1.7 抗原表位预测

抗原性是指抗原与抗体或致敏淋巴细胞特异性结合能力，抗原性好坏与抗原表位有关。构象表位是指序列氨基酸残基折叠形成的空间构象，线性表位是氨基酸残基通过共价键形成的结构。使用在线分析工具 <http://tools.iedb.org/ellipro/>对 B 细胞抗原线性表位和构象表位进行分析，根据表位的多少判断抗原性好坏。

2.1.8 免疫原性预测

免疫原性是指能够刺激机体免疫细胞活化、增殖、分化而产生特异抗体或致敏淋巴细胞的能力。预测该蛋白免疫原性，可以为后续免疫动物提供参考。通过在线分析软件 <https://wemol.wecomput.com/ui/#/>对蛋白免疫原性进行预测。

2.2 结果

Dps 蛋白基因序列来自 GenBank，登录号为 AM040264.1，基因序列如下：

```
ATGCCGAAGTCGATGCATGCAACCCGCAACGATCTTCCCTCCAATACCAAGAC
GACGATGATCGCGCTGCTCAACGAGAATCTTGCCGCAACAATCGATCTTGCCCTCA
TCACCAAGCAGGCGCACTGGAACCTCAAGGGACCGCAATTCATCGCCGTGCATGA
AATGCTCGATGGTTTCCGCGCAGAACTCGACGACCATGTGGACACGATTGCCGAA
CGTGCCGTGCAGATCGGCGGAACGGCCTATGGTACAACCCAGGTCGTGGTGAAGG
AATCCAGACTGAAGCCTTACCCGACCGACATTTATGCCGTCCACGACCATCTGGTG
GCACTGATCGAACGCTATGGTGATGTTGCCAATCTGGTGCGCAAATCGATCAAGGA
TGCAGACGACGCGGGTGACGACGACACGGCAGATATTTTCACCGCCGCATCGCGC
AGCCTCGACAAGGCACTCTGGTTCCTCGAAGCGCATGTGCAGGAAAGCAATTAA
```

蛋白序列如下：

```
MPKSMHATRNDLPSNTKTTMIALLNENLAATIDLALITKQAHWNLKGPQFIIVH
```

EMLDGFRAELDDHVDTIAERAVQIGGTAYGTTQVVVKESRLKPYPTDIYAVHDHLVAL
IERYGDVANLVRKSIKDADDAGDDDDTADIFTAASRSLDKALWFLEAHVQESN*

2.2.1 Dps 蛋白理化性质预测结果

使用在线分析软件 <https://www.expasy.org/>对蛋白序列进行分析, 该蛋白氨基酸数量为 164, 分子量 18.13 kD, 理论 PI 为 5.11, 带负电荷的残基总数 (Asp + Glu) 为 25, 带正电荷的残基总数 (Arg + Lys) 为 16。该蛋白在 280 nm 波长处的消光系数为 16960。预估半衰期: 30 h (哺乳动物网织红细胞, 体外), >20 h (酵母, 体内), >10 h (大肠杆菌, 体内)。不稳定指数 (II) 计算为 25.56, 将蛋白质归类为稳定。该蛋白的脂类指数为 94.09, 总平均亲水性为 -0.259。

2.2.2 大肠杆菌稀有密码子分析结果

通过分析, 预测值 1 是最理想的, 值越低越有可能表达不好, Dps 在大肠杆菌表达系统中密码子适应指数 (codon adaptation index, CAI) 是 0.71, 表达效率较高, 可以在大肠杆菌表达系统中进行表达, 预测结果见图 2-1。

Rare Codon Analysis Result			
	Actual Value	Ideal Value	Terms
CAI	0.71 ↓ Free Codon Optimization	0.8-1.0	<ul style="list-style-type: none"> A CAI of 1.0 is considered ideal. The lower the number, the higher the chance that your gene will be expressed poorly. GenScript's OptimumGene codon optimization tool can typically improve your sequence.
GC Content	56.47%	30%-70%	<ul style="list-style-type: none"> The ideal percentage range of GC content is between 30% and 70%.
CFD	7%	<30%	<ul style="list-style-type: none"> This un-optimized gene employs tandem rare codons that can reduce the efficiency of translation or even disengage the translational machinery. GenScript's OptimumGene can give you the option to solve this problem.

图 2-1 大肠杆菌稀有密码子分析结果
Figure 2-1 Results of rare codon analysis in Escherichia coli

2.2.3 信号肽预测结果

通过在线分析软件 <https://www.novopro.cn/tools/signalp> 对蛋白信号肽进行分析, 结果表明, 该蛋白有信号肽的概率为 0.717%, 说明该蛋白不是分泌蛋白, 为胞内蛋白, 预测结果见图 2-2。

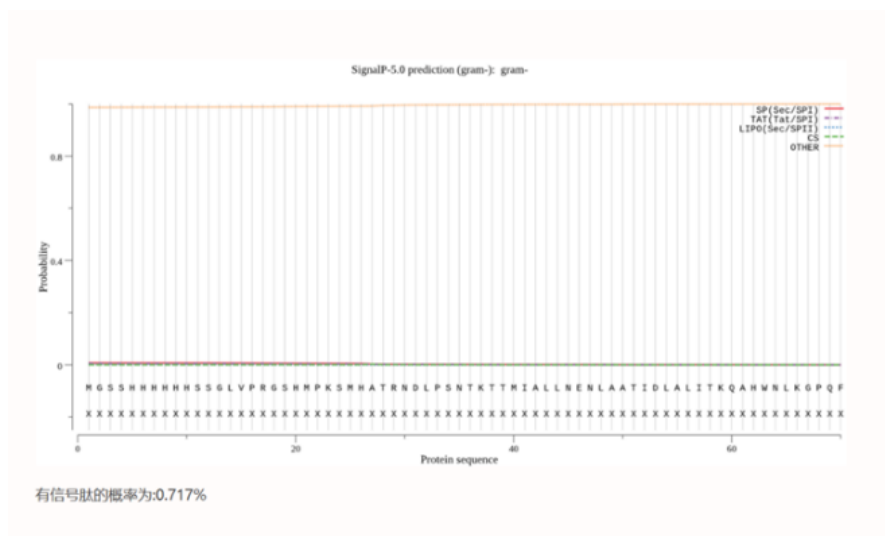


图 2-2 信号肽预测结果
Figure 2-2 Predicted results of signal peptide

2.2.4 蛋白跨膜区预测结果

通过在线分析软件 <https://www.novopro.cn/tools/tmhmm.html> 对蛋白跨膜区进行分析，结果说明该蛋白无跨膜区，不属于膜蛋白，预测结果见图 2-3。

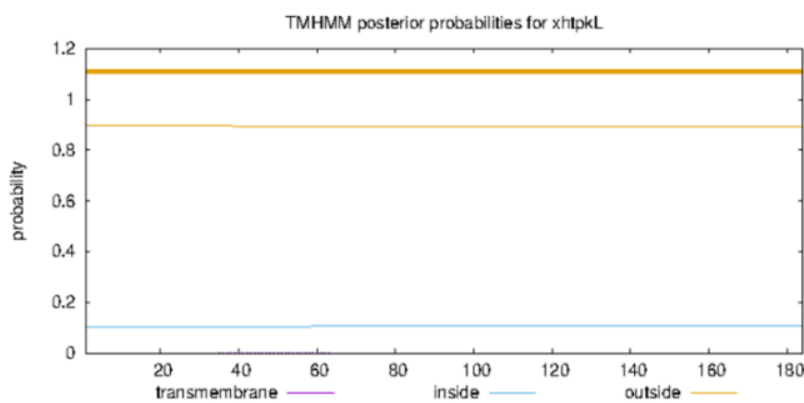


图 2-3 跨膜区预测结果
Figure 2-3 Predicted results of protein transmembrane regions

2.2.5 蛋白质 3D 结构预测结果

使用在线建模软件 <https://swissmodel.expasy.org/> 对蛋白进行分析，蛋白根据根癌农杆菌 Dps 进行同源建模，发现蛋白形成 12 聚体，形状为六面体，每一面由两个单体组成，预测结果见图 2-4。

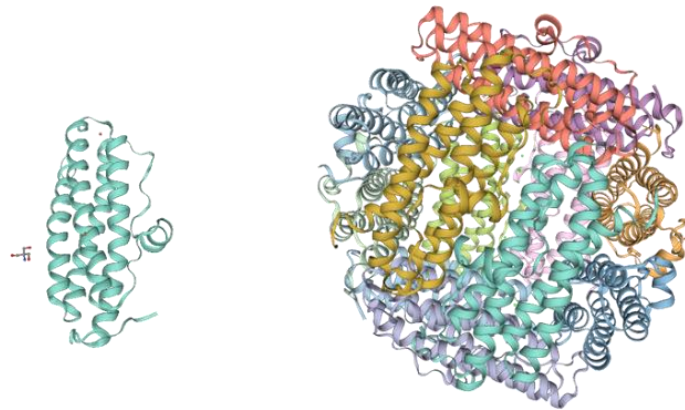


图 2-4 3D 结构预测结果
Figure 2-4 Predicted Results of Protein 3D Structure

2.2.6 同源性和保守性分析结果

使用 NCBI 进行比对，序列同源性高，均为布鲁氏菌。使用 ESPript3.0 预测保守性，该蛋白在各种属布鲁氏菌之间保守性强，预测结果见图 2-5 及图 2-6。

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
✓ DNA starvation/stationary phase protection protein Dps [Brucella]	Brucella	332	332	99%	1e-114	99.39%	165	WP_002965212.1
✓ DNA protection during starvation protein [Brucella melitensis bv. 1 str. 16M]	Brucella melitensis bv. ...	332	332	99%	1e-114	99.39%	180	AAL53161.1
✓ DNA protection during starvation protein [Brucella celli str. Cudo]	Brucella celli str. Cudo	332	332	99%	2e-114	99.39%	184	EFH15216.1
✓ Crystal structure of ferritin-DNA-binding protein DPS from Brucella Melitensis [Brucella melitensis]	Brucella melitensis	332	332	99%	2e-114	99.39%	173	3GE4_A
✓ DNA starvation/stationary phase protection protein Dps [Brucella abortus]	Brucella abortus	330	330	99%	4e-114	98.79%	165	WP_006104369.1
✓ DNA starvation/stationary phase protection protein Dps [Brucella]	Brucella	330	330	99%	5e-114	98.79%	165	WP_004686203.1
✓ DNA starvation/stationary phase protection protein Dps [Brucella ovis]	Brucella ovis	330	330	99%	5e-114	98.79%	165	WP_006014582.1
✓ DNA starvation/stationary phase protection protein Dps [Brucella vulpis]	Brucella vulpis	330	330	99%	6e-114	98.79%	165	CUW43532.1
✓ DNA starvation/stationary phase protection protein Dps [unclassified Brucella]	unclassified Brucella	330	330	99%	6e-114	98.79%	165	WP_008935080.1
✓ DNA starvation/stationary phase protection protein Dps [Brucella sp. 458]	Brucella sp. 458	330	330	99%	8e-114	98.18%	165	WP_209408096.1
✓ DNA starvation/stationary phase protection protein Dps [Brucella abortus]	Brucella abortus	330	330	99%	9e-114	98.79%	165	WP_071154765.1
✓ DNA starvation/stationary phase protection protein Dps [Brucella canis]	Brucella canis	330	330	99%	1e-113	98.79%	165	WP_115026933.1
✓ DNA starvation/stationary phase protection protein Dps [unclassified Brucella]	unclassified Brucella	329	329	99%	2e-113	98.18%	165	WP_025199718.1
✓ DNA starvation/stationary phase protection protein Dps [Brucella inopinata]	Brucella inopinata	329	329	99%	2e-113	98.18%	165	WP_070969974.1
✓ DNA starvation/stationary phase protection protein Dps [Brucella sp. 191011898]	Brucella sp. 191011898	328	328	99%	3e-113	97.58%	165	WP_180881639.1
✓ DNA starvation/stationary phase protection protein [Brucella sp. BO2]	Brucella sp. BO2	329	329	99%	4e-113	98.18%	163	EFM58591.1
✓ DNA protection during starvation protein [Brucella canis HSK AS2141]	Brucella canis HSK AS2...	327	327	96%	7e-113	100.00%	160	AEW14128.1
✓ DNA starvation/stationary phase protection protein Dps [Brucella inopinata]	Brucella inopinata	327	327	99%	2e-112	97.58%	165	WP_008503692.1
✓ ferritin Dps family protein [Brucella abortus bv. 3 str. Tuylu]	Brucella abortus bv. 3 s...	326	326	96%	2e-112	99.38%	160	ECX83564.1
✓ DNA starvation/stationary phase protection protein Dps [Brucella melitensis M28]	Brucella melitensis M28	326	326	96%	3e-112	99.38%	160	ADZ67211.1
✓ DNA starvation/stationary phase protection protein Dps [Ochrobactrum sp. 721/2009]	Ochrobactrum sp. 721/...	320	320	99%	9e-110	93.94%	165	PJR90778.1

图 2-5 序列同源性分析
Figure 2-5 Sequence homology analysis

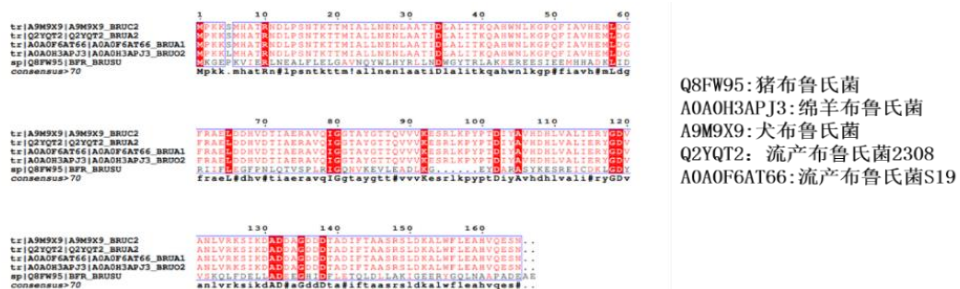


图 2-6 序列保守性分析
Figure 2-6 Sequence conservative analysis

2.2.7 抗原表位预测结果

根据 B 细胞抗原线性表位和构象表位预测结果，显示共有 6 个线性表位，4 个构象表位，抗原性较好，预测结果见图 2-7 及图 2-8。

Predicted Linear Epitope(s):

No.	Chain	Start	End	Peptide	Number of residues	Score	3D structure
1	A	1	17	MKTHKTKNDLPSNAKST	17	0.801	View
2	A	152	162	WFLEAHVQEKS	11	0.733	View
3	A	38	53	QAHWNLKGPFQIAVHE	16	0.699	View
4	A	94	105	KAYPTDIYKIHD	12	0.687	View
5	A	126	135	DDSDEAGDPT	10	0.688	View
6	A	74	80	VQLGGTA	7	0.523	View

图 2-7 线性表位
Figure 2-7 Linear epitopes

Predicted Discontinuous Epitope(s):

No.	Residues	Number of residues	Score	3D structure
1	A:E155, A:A156, A:H157, A:V158, A:Q159, A:E160, A:K161, A:S162	8	0.825	View
2	A:Q38, A:H40, A:W41, A:N42, A:L43, A:K44, A:G45, A:P46, A:Q47, A:F48, A:I49, A:A50, A:H52, A:E53, A:K94, A:A95, A:Y96, A:P97, A:T98, A:D99, A:I100, A:Y101, A:K102, A:H103, A:H104, A:D105, A:D106	27	0.709	View
3	A:M1, A:K2, A:T3, A:H4, A:T6, A:K7, A:N8, A:D9, A:L10, A:P11, A:S12, A:N13, A:A14, A:K15, A:S16, A:T17, A:V74, A:Q75, A:L76, A:G77, A:G78, A:T79, A:A80, A:L81, A:G82, A:S85, A:L84, A:Q85, A:A86, A:S88, A:S89, A:K123, A:D126, A:D127, A:D129, A:E130, A:A131, A:G132, A:D133, A:F134, A:T135, A:D136	42	0.7	View
4	A:K149, A:W152, A:F153	3	0.619	View

图 2-8 构象表位
Figure 2-8 Conformational epitopes

2.2.8 免疫原性预测结果

通过在线分析软件 <https://wemol.wecomput.com/ui/#/>对蛋白免疫原性进行预测，结果显示该蛋白具有较高的免疫原性，T 细胞表位包含了 27 个氨基酸残基，预测结果见图 2-9。

Protein_Id	Risk	Tce_Len	Tce_Sequences
0	high	27	IFTAASRSLDKALWFLEA,LALITKQ AH

图 2-9 免疫原性预测结果
Figure 2-9 Predicted results of immunogenicity

2.3 讨论

生物信息学是应用计算机技术管理生物信息的一门新型学科，它是生物学、数学、计算机科学、物理、化学等众多学科交叉的新型学科(林金安，2000)。随着人类基因组计划的实施，关于分子生物学相关的数据飞速增长，如此庞大复杂的数据使得生物信息学开始萌芽(朱杰，2005)。美国于 1988 年成立了国家生物技术信息中心 (NCBI)，以便进行分子生物学的研究。欧洲于 1993 年建立了欧洲生物信息学研究所 (EBI)，日本也于 1995 年组建了信息生物学中心 (CIB) (朱杰，2005)。生物信息学的研究内容已经渗透到生命科学的各个领域，生物信息学的发展将会大力促进生命科学领域的进步。生物信息学是目前基因组学、蛋白组学、生物芯片等生命科学前沿领域发展的直接推动力(朱杰，2005)。

在现有的生物信息学发展的基础上，本研究对 Dps 蛋白的信号肽、蛋白跨膜区、B 细胞抗原表位和免疫原性等进行分析。通过在线分析软件对蛋白信号肽进行分析，结果表明，该蛋白有信号肽的概率为 0.717 %。信号肽一般由 15-30 个氨基酸残基组成，含有 6-15 个带正电荷的非极性氨基酸，其作用为引导新合成的肽链转移到内质网上，信号肽位于新合成链的 N 端，它不仅决定蛋白是否为分泌蛋白，也与蛋白在细胞内的全方向的定位有关(韦雪芳等，2006)。通过在线分析软件对蛋白跨膜区进行分析，结果说明该蛋白不在跨膜区。使用在线建模软件对蛋白进行分析，发现蛋白形成的 12 聚体形状为六面体，每一面由两个单体组成。通过在线分析软件对蛋白抗原表位分析，根据 B 细胞抗原线性表位和构象表位预测结果，显示共有 6 个线性表位，4 个构象表位，各表位得分较高，抗原性较好。通过在线分析软件对蛋白免疫原性进行预测，结果显示该蛋白具有较高的免疫原性，T 细胞表位包含了 27 个氨基酸残基。

2.4 小结

使用生物信息学软件分析发现：

- 1.Dps 蛋白不存在信号肽，无跨膜区。
- 2.抗原性较好，同源性高，保守性强，免疫原性高。
- 3.蛋白为 12 聚体。

第三章 Dps 蛋白的原核表达及多克隆抗体的制备

在生物信息学预测与分析结果的基础上，将 PCR 获得的的目的片段插入到 pET-28a 载体，构建 pET-28a-Dps 重组载体，对重组载体进行诱导表达，选择最优条件进行纯化，将纯化获得的蛋白与佐剂充分混合后免疫小鼠，多次免疫后对血清抗体效价进行评定，获得该蛋白对应的多克隆抗体，为后续建立阻断 ELISA 检测方法做好材料准备。

3.1 材料

3.1.1 载体、菌种、血清、动物

本研究所用载体、菌种和血清均来自实验室保存，实验动物（昆明鼠）购买自辽宁长生生物技术股份有限公司。

3.1.2 试剂

3.1.2.1 商品化试剂

表 3-1 试剂
Table 3-1 Reagents

试剂名 Reagent name	生产厂家 Manufacturer
DH5 α	北京全式金生物技术股份有限公司
BL21 (DE3)	北京全式金生物技术股份有限公司
固体培养基预混粉	北京索莱宝科技有限公司
PCR 酶	南京诺唯赞生物科技股份有限公司
琼脂糖	莫纳生物科技有限公司
50 \times TAE	北京索莱宝科技有限公司
Good view	北京赛百盛基因技术有限公司
IPTG	北京索莱宝科技有限公司
OXOID 酵母膏	Thermo Fisher Scientific Inc.
OXOID 胰蛋白胨	Thermo Fisher Scientific Inc.
氯化钠	西陇科学股份有限公司
30%制胶液	北京索莱宝科技有限公司
1.5 M Tris-HCl (PH8.8)	北京索莱宝科技有限公司
1 M Tris-HCl (PH6.8)	北京索莱宝科技有限公司
TEMED	碧云天生物技术
SDS	北京索莱宝科技有限公司
TE 缓冲液	北京索莱宝科技有限公司
彩色凝胶染色液	武汉赛维尔生物科技有限公司
磷酸二氢钠	西陇科学股份有限公司
磷酸氢二钠	西陇科学股份有限公司

第三章 Dps 蛋白的原核表达及多克隆抗体的制备

试剂名 Reagent name	生产厂家 Manufacturer
尿素	西陇科学股份有限公司
氯化钠	西陇科学股份有限公司
磷酸氢二钾	西陇科学股份有限公司
氯化钾	西陇科学股份有限公司
咪唑	西陇科学股份有限公司
PMSF	北京索莱宝科技有限公司
乙醚	西陇科学股份有限公司
弗氏不完全佐剂	北京博奥龙免疫技术有限公司
弗氏完全佐剂	北京博奥龙免疫技术有限公司
PBS 预制粉	北京索莱宝科技有限公司
新霉素	生工生物工程（上海）股份有限公司
IPTG	生工生物工程（上海）股份有限公司
甲醇	西陇科学股份有限公司
乙醇	西陇科学股份有限公司
冰醋酸	西陇科学股份有限公司
SDS	北京索莱宝科技有限公司
甘油	西陇科学股份有限公司
溴酚蓝	北京索莱宝科技有限公司
β -巯基乙醇	北京索莱宝科技有限公司
Tris	北京索莱宝科技有限公司
硫酸卡那霉素	生工生物工程（上海）股份有限公司
吐温-20	生工生物工程（上海）股份有限公司
R250	北京索莱宝科技有限公司
G250	北京索莱宝科技有限公司
EDTA	北京索莱宝科技有限公司
磷酸二氢钾	西陇科学股份有限公司
硫酸镁	西陇科学股份有限公司
α -乳糖	西陇科学股份有限公司
硫酸镍	西陇科学股份有限公司
HRP 标记小鼠抗 His 单克隆抗体	生工生物工程（上海）股份有限公司
HRP 标记兔抗小鼠 IgG	生工生物工程（上海）股份有限公司
HRP 标记山羊抗牛 IgG	生工生物工程（上海）股份有限公司
质粒小提试剂盒	Thermo Fisher Scientific Inc.
胶回收试剂盒	Thermo Fisher Scientific Inc.
清洁试剂盒	爱思进生物技术（杭州）有限公司
可溶型单组分 TMB 底物溶液	天根生化科技（北京）有限公司
Pierce™ BCA 蛋白检测试剂盒	Thermo Fisher Scientific Inc.

3.1.2.2 溶液配制

(1) PBS: 0.27 g 磷酸二氢钾、1.42 g 磷酸氢二钠、8 g 氯化钠、0.2 g 氯化钾，加入 800 mL 去离子水搅拌溶解，调节 PH 值到 7.6，再定容到 1 L。

(2) 0.1 M/mL PMSF (苯甲基磺酰氟): 0.87095 g PMSF 溶于异丙醇溶液, 定容至 50 mL

(3) LB 液体培养基: 酵母膏 5 g、胰蛋白胨 10 g、氯化钠 10 g 加蒸馏水定容至 1 L, 摇匀, 高压灭菌。

(4) LB 固体培养基: 4 g 固体培养基预混粉, 加蒸馏水定容至 100 mL, 摇匀, 高压灭菌, 静置至温度不烫手时, 加入相应抗生素, 在超清工作台倒入一次性平皿, 待凝固后盖盖, 封口膜封口, 装入自封袋, 4 °C 保存备用。

(5) 1 M IPTG (异丙基硫代半乳糖苷): 10 g IPTG 溶于蒸馏水, 定容至 42 mL。

(6) 考马斯亮蓝染色液: 2.5 g R250、450 mL 甲醇、100 mL 冰醋酸, 加水定容至 1 L, 溶解后, 滤纸过滤使用。

(7) 脱色液: 100 mL 冰醋酸、200 mL 无水乙醇, 加水定容至 1 L。

(8) 5×蛋白上样缓冲液: 12.5 mL 1 M Tris-HCl (PH 6.8)、5 g SDS (十二烷基硫酸钠)、0.25 g BPB (溴酚蓝)、25 mL 甘油、250 μL β-巯基乙醇 (使用前加入), 加水定容至 50 mL。

(9) 5×电泳缓冲液 15.1 g Tris、94 g Gly、5 g SDS, 加水定容至 1 L

(10) 卡那霉素储存液 (50 mg/mL): 取 2.5 g 硫酸卡那霉素溶于 50 mL 去离子水, 完全溶解后, 在超清工作台用 0.22 μm 滤器过滤后分装, -20 °C 储存备用。

(11) PBST: 0.27 g 磷酸二氢钾、1.42 g 磷酸氢二钠、8 g 氯化钠、0.2 g 氯化钾、0.5 mL 吐温-20, 加入 800 mL 去离子水搅拌溶解, 调节 PH 值到 7.4, 再定容到 1 L。

(12) 5×G250 考马斯亮蓝: 100 mg G250 溶于 50 mL 95 % 乙醇, 加入 100 mL 85 % 磷酸, 混合均匀。

(13) Binding buffer (A Buffer) : 20 mM Tris、0.5 M NaCl、30 mM 咪唑, pH7.4

(14) Elution buffer (B Buffer) : 20 mM Tris、0.5 M NaCl、0.5 M 咪唑, pH7.4

(15) 浓缩后置换液: 50 mM Tris + 150 mM NaCl (PH 8.0)

(16) 20×NPS (100 mL): 90 mL 去离子水、6.6 g (NH₄)₂SO₄、13.6 g KH₂PO₄、14.2 g Na₂HPO₄

(17) 50×5052 (100 mL): 73 mL 去离子水、25 g 甘油、2.5 g 葡萄糖、10 g α-乳糖

(18) 1 M MgSO₄ (100 mL): 24.65 g MgSO₄·7H₂O, 加水定容至 100 mL

(19) 自诱导培养基 (1 L): 925 mL 去离子水、1 mL 1 M MgSO₄、10 g 胰蛋白胨、5 g 酵母、50 mL 20×NPS、20 mL 50×5052, 按顺序添加, 高压后使用。

(20) EDTA Buffer: 20 mM Tris、500 mM NaCl、50 mM EDTA, 溶于水。

(21) 咪唑 Buffer: 20 mM Tris、500 mM NaCl、500 mM 咪唑, 溶于水。

(22) 1.2% 琼脂糖凝胶: 称取 2.4 g 琼脂糖, 加入 1×TAE 定容到 200 mL, 充分加热溶解, 待溶液变得澄清透明, 停止加热, 放置到 50-60 °C 后, 加入 20 μL 核酸染料,

封口放到避光处保存。

(23) 新霉素 (50 mg/mL): 0.5 g 硫酸新霉素溶于 10 mL 高压去离子水, 过滤后使用。

3.1.3 耗材

表 3-2 耗材
Table 3-2 Consumables

耗材 Consumables	生产厂家 Manufacturer
1.5 mL、2 mL、5 mL、15 mL 离心管	兰杰柯科技有限公司
PCR 管	兰杰柯科技有限公司
1 mL、200 μ L、10 μ L 枪头	兰杰柯科技有限公司
枪头盒	南通冷欣生物科技有限公司
一次性培养皿	江苏晟康医疗用品有限公司
试管	天津天玻科技发展有限公司
一次性封口膜	parafilm
玻璃大平皿	昭昇玻璃科技有限公司
滤器	兰杰柯科技有限公司
50 mL、250 mL、500 mL 离心瓶	Thermo Fisher Scientific Inc
巴氏吸管	兰杰柯科技有限公司
50 mL、100 mL、250 mL 烧杯	四川蜀玻(集团)有限责任公司
涂布棒	泰州市智银丰实验器材有限公司
一次性注射器	江西丰临医用器械有限公司
脱脂棉	江西省华中纺织有限公司
防咬手套	临沂焊途安全科技有限公司
毛细管	南通医太科学仪器制造商
离心管架	海门市瑞博实验器材厂
医用三通	尚芯(衢州)医疗器械有限公司
HisTrap FF 预装柱	Cytiva
玻璃三角烧瓶	蜀牛玻璃仪器有限公司
涂布棒	蜀牛玻璃仪器有限公司
吊菌环	比克曼生物科技有限公司

3.1.4 仪器设备

表 3-3 仪器设备
Table 3-3 Instruments and equipments

设备名称 Equipment name	生产厂家 Manufacturer
水浴锅	国华电器有限公司
制冰机	上海比朗仪器制造有限公司
移液器	大龙兴创实验仪器(北京)股份公司
超清工作台	青岛海尔生物医疗股份有限公司

设备名称 Equipment name	生产厂家 Manufacturer
恒温摇床	苏州捷美电子有限公司
PCR 仪	Thermo Fisher Scientific Inc
纯水仪	RODI
低温超声破碎仪	聚能纳米生物科技有限公司
照胶仪	Omega
核酸电泳槽	北京市六一仪器厂
微波炉	格兰仕
电磁炉	美的
酶标仪	BioTek Instruments, Inc
台式低温高速大容量离心机	Thermo Fisher Scientific Inc
涡旋振荡仪	大龙兴创实验仪器(北京)股份公司
低温超高压破碎仪	广州聚能纳米生物科技股份有限公司
蠕动泵	大龙兴创实验仪器(北京)股份公司
小型离心机	Thermo Fisher Scientific Inc
低温超高压破碎仪	广州聚能纳米生物科技股份有限公司
超声破碎仪	上海之信仪器有限公司
AKTA	Cytiva
小型垂直电泳槽	Bio-Rad Laboratories
37 °C恒温培养箱	Thermo Fisher Scientific Inc
高速离心机	Thermo Fisher Scientific Inc
移液器	大龙兴创实验仪器(北京)股份公司
伯乐 Trans – Blot 半干转	Bio-Rad

3.2 方法

3.2.1 重组表达载体的构建

3.2.1.1 引物设计与合成

根据布鲁氏菌 Dps 核酸序列进行引物设计, 并使用 NCBI 网站的 Primer-Blast 进行了引物特异性比对, 确定引物特异性良好, 送上海生工生物进行合成。引物序列如下:

BDpsF: AAAA CATATG CCGAAGTCGATGC

BDpsR: AAAA CTCGAG CTTAATTGCTTTCCTGCACATGC

3.2.1.2 目的基因的扩增及回收

将合成的上下游引物 8000 rpm 离心 10 min 后, 加入 TE 缓冲液稀释到 10 μ m, 取稀释好的上下游引物、PCR Mix、水和模板配制体系, 进行 PCR 扩增, 体系和反应程序见下表。

表 3-4 PCR 反应体系

Table 3-4 PCR reaction systems

组成 Composition	用量 (μL) Dosage (μL)
BDpsF	1
BDpsR	1
2 × Taq Master Mix	10
dd H ₂ O	7
模板	1

表 3-5 PCR 反应程序

Table 3-5 PCR reaction procedures

程序 Program	温度 Temperature ($^{\circ}\text{C}$)	时间 Time	循环次数 Cycle index
预变形	95	3 min	1
变性	95	15 s	35
退火	58	15 s	35
延伸	72	31 s	35
再延伸	72	5 min	1

扩增后的 PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳。

将提取配好的 1.2 % 琼脂糖凝胶取出，加热融化后倒入已经放好托胶板并插好梳子的制胶架中，注意缓慢倒入，不要产生气泡，避光条件下等待 40 min 左右，待胶完全凝固，取下梳子，将凝胶连同托胶板转移到核酸凝胶电泳槽中，除去梳孔中的气泡后依次按照 DNA Marker (4 μL)、阴性对照 (5 μL) 和待检样本 (5 μL) 顺序将样品缓慢加入梳孔中。打开稳压器，调整到 120 V，25 min 进行电泳，电泳结束后取出凝胶放入凝胶成像仪中观察结果并留图。

将电泳后的 PCR 产物按照胶回收试剂盒说明书进行回收，回收过程如下：

(1) 用干净的刀片，切下含有目的基因片段的凝胶，切胶时，尽量切除多余的凝胶，将含有目的片段的凝胶置于已经预称重的 1.5 mL 离心管后称重，记下胶块的重量。

(2) 向凝胶块中按照体积：重量为 1:1 的比例加入结合液。

(3) 将上述离心管在 57 $^{\circ}\text{C}$ 条件下放置 10 min，直到胶块完全溶解，为了加速胶块的溶解，可以每隔几分钟检查一次，颠倒离心管，直至确保凝胶完全溶解。

(4) 将溶解的凝胶溶液转移到回收柱。12000 \times g 离心 1 min，倒掉废液，将柱子放回收集管。

(5) 向回收柱中加入 700 μL 漂洗液，12000 \times g 离心 1 min，倒掉废液并将柱子放回收集管。

(6) 将空的回收柱再离心 1 min，以完全除去残留的漂洗液。

(7) 将回收柱放入干净的 1.5 mL 离心管。向回收柱中膜中央加入 50 μL 洗脱液。12000 \times g 离心 1 min。

(8) 弃掉回收柱，回收的 DNA 储存在 -20 $^{\circ}\text{C}$ 。

3.2.1.3 质粒的提取

取实验室保存的含 pET-28a 的大肠杆菌，在超净台取 50 μL 加入到含 50 $\mu\text{g/mL}$ Kan 的 LB 培养基中，37 $^{\circ}\text{C}$ 200 rpm 过夜培养。将过夜培养的菌按照质粒小提试剂盒的说明书提取质粒 pET-28a。

质粒小提步骤如下：

(1) 取过夜培养的含有目的质粒的大肠杆菌，全部离心弃上清，将收集的菌液重悬于 250 μL 重悬液中。确保菌体充分悬浮，没有细胞团残留，将细胞悬液转移至离心管中。

(2) 向细胞重悬液中加入 250 μL 裂解液，小心翻转混匀离心管 5 次，使得溶液变为既有粘稠部分又有澄清部分的状态。

(3) 再加入 350 μL 中和液，立即颠倒离心管 5 次以充分混匀。

(4) 13000 \times g 离心 5 min，彻底除去细胞碎片和染色体 DNA。

(5) 将离心后上清转移到离心柱中，避免转入白色沉淀。

(6) 离心 1 min，倒掉收集管中的流穿液，将离心柱再次放入收集管中。

(7) 向离心柱中加入 500 μL 漂洗液，13000 \times g 离心 30 s，倒掉流穿液，将离心柱再次放回收集管中。

(8) 用 500 μL 漂洗液重复上述步骤。

(9) 弃掉流穿液后，空离 1 min，以便彻底弃除残留的漂洗液。

(10) 将离心柱转移到新的 1.5 mL 离心管中，向离心柱膜中央加入 50 μL 洗脱液。室温下放置 2 min 后 13000 \times g 离心 2 min。

(11) 弃掉离心柱，将提纯的质粒 DNA 储存于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 。

3.2.1.4 双酶切

将胶回收的目的片段和提取的质粒进行双酶切，加入限制性内切酶和 Buffer 后，将混合体系放 37 $^{\circ}\text{C}$ 金属浴酶切 3 h，酶切体系见下表。

表 3-6 目的片段酶切体系
Table 3-6 Target fragment digestion system

组成 Composition	用量 (μL) Dosage (μL)
Dps	10
<i>Nde</i> I	2
<i>Xho</i> I	2
10 \times Qcut Buffer	2
dd H ₂ O	4

表 3-7 载体酶切体系
Table 3-7 Carrier enzyme digestion system

组成 Composition	用量 (μL) Dosage (μL)
pET-28a	14
<i>Nde</i> I	2
<i>Xho</i> I	2
10×Qcut Buffer	2

将酶切后的载体用胶回收试剂盒进行回收，步骤同 3.2.1.2。

酶切后目的片段用清洁试剂盒进行清洁。

清洁试剂盒步骤如下：

(1) 向双酶切反应体系中加入 3 个体积的 Buffer PCR-A (如果 Buffer PCR-A 体积不足 100 μL, 则加至 100 μL); 均匀混合后, 转移到制备管中, 将制备管置于试剂盒提供的 2 mL 离心管中, 11000×g 离心 60s, 去除滤液。

(2) 将制备管放回 2 mL 离心管, 加 0.7 mL Buffer W2 concentrate, 11000×g 离心 60s, 去除滤液。

(3) 将制备管置于离心管中, 加 0.4 mL Buffer W2 concentrate, 11000×g 离心 60 s, 去掉滤液。

(4) 11000×g 离心 120 s, 目的是防止体系中有残留的乙醇。

(5) 将制备管置于新的 1.5 mL 离心管中, 向制备管膜中加 20 μL Eluent (若想提高洗脱效率, 可将 Eluent 预热至 60 °C), 室温静置 60 s 后, 11000×g 离心 60 s 洗脱 DNA。

(6) 清洁后产物放 -20 °C 保存。

3.2.1.5 连接

各取 4.5 μL 处理后的目的片段和载体, 分别加入 0.5 μL 10×DNA Loading Buffer, 吹打混匀后加入凝胶进行电泳, 120 V 25min。

将处理好的目的片段和载体 16 °C 过夜连接, 连接体系见下表。

表 3-8 连接体系
Table 3-8 Connection System

组成 Composition	用量 (μL) Dosage (μL)
酶切后 Dps	3
酶切后 pET-28a	15
T4	1
10×T4 Buffer	2.5
dd H ₂ O	3.5

3.2.1.6 转化

取过夜连接后的产物 7 μL ，转化到 BL21(DE3)中，转化步骤如下：

- (1) 冰盒解冻-80 $^{\circ}\text{C}$ 拿出的 BL21(DE3)感受态细胞。
- (2) 取 7 μL 连接产物，轻缓地转移到 50 μL BL21(DE3)感受态细胞中，置于冰盒，冰浴 30 min。
- (3) 冰浴完成后在 42 $^{\circ}\text{C}$ 水浴锅中热激 90 s，热激完成后再放回冰盒冰浴 5 min。
- (4) 在超清工作台小心加入 500 μL 高压后的无抗性 LB 液体培养基，用封口膜缠紧离心管口，斜 45 $^{\circ}$ 放入 37 $^{\circ}\text{C}$ ，200 rpm 的摇床培养 1.5 小时。
- (5) 将感受态细胞放入离心机，配平后，4000 rpm，离心 5 min。
- (6) 将装有感受态细胞的 1.5 mL 离心管和冰盒消毒后一起放入超清工作台，在超清工作台小心弃 550 μL 上清。
- (7) 用 200 μL 移液器将离心后的菌液吹打混匀，转移到固体培养基中，用消毒灭菌后的涂布棒涂抹均匀，若固体培养基表面还有液体流动，则将培养基正置放于 37 $^{\circ}\text{C}$ 温箱培养半小时，然后倒置过夜培养，否则直接倒置放于 37 $^{\circ}\text{C}$ 温箱过夜培养。

3.2.1.7 重组表达载体的验证

(1) PCR 验证

在超净台用吊菌环尖端挑取转化后的单菌落，转移到如下体系中，退火温度 55 $^{\circ}\text{C}$ ，延伸时间 35 s，其它程序同表 3-5，进行 PCR 验证，验证体系见表 3-9。

表 3-9 PCR 验证体系
Table 3-9 PCR validation system

组成 Composition	用量 (μL) Dosage (μL)
T7	1
T7t	1
2 \times Taq Master Mix	10
dd H ₂ O	7

(2) 双酶切验证

将 PCR 验证成功的单菌落在超净台转移到含有 Kan 抗性的 LB 培养基中过夜摇菌，次日取该菌液按照 3.2.1.3 中方法提质粒，使用 *Nde* I 和 *Xho* I 按照如下体系再次酶切，酶切操作同 3.2.1.4，酶切体系见表 3-10。

表 3-10 双酶切验证体系
Table 3-10 Double digestion validation system

组成 Composition	用量 (μL) Dosage (μL)
pET-28a-Dps 重组质粒	10
<i>Nde</i> I	1
<i>Xho</i> I	1
dd H ₂ O	1.5
10×Qcut Buffer	1.5

(3) 测序验证

将前面验证成功的菌送生工生物工程（上海）股份有限公司进行测序。

3.2.2 重组蛋白诱导表达

将验证成功的菌，接种于含有终浓度 50 μg/mL 的硫酸卡那霉素的 LB 液体培养基中。放于 37 °C 摇床，200 rpm 过夜摇菌。取 50 μL 过夜培养的菌液，接种于含有终浓度 50 μg/mL 的硫酸卡那霉素的 LB 液体培养基和自诱导培养基中。将接种于 LB 培养基的菌液放于 37 °C 摇床，200 rpm 摇菌，待菌液在 OD_{600nm} 处达到 0.6-0.8 时，取 200 μL 菌液标记为未诱导，其余加入终浓度 1 mmol/L 的 IPTG，做好标记，分别置于 16 °C，160 rpm、25 °C，180 rpm、37 °C，200 rpm，分别诱导 12 h、10 h、4 h。将接种于自诱导培养基的菌液分别放置于 16 °C，160 rpm、25 °C，180 rpm、37 °C，200 rpm 的摇床，分别诱导 15 h、13 h、7 h。分别取 4 mL 诱导后的菌液转移到 5 mL 离心管，12000 rpm 离心 2 min，弃上清，用 2 mL PBS 吹打混匀，置于冰盒，用超声破碎仪破碎，工作 5 s，休息 10 s，重复 30 次。全部破碎完成后，4 °C 离心机，12000×g，离心 5 min，将上清转移至干净的 2 mL 离心管，用 2 mL PBS 将沉淀吹打混匀，分别取 80 μL 破碎后的上清和沉淀，做好标记，加入 20 μL 5×蛋白上样缓冲液。未诱导离心弃上清，加入 100 μL 1×蛋白上样缓冲液，将以上离心管放水浴锅煮沸 10 min，离心机 8000 rpm 离心 10 min。

将薄玻璃板和厚玻璃板对齐后插入制胶框，放于桌面上，确保两块玻璃板下端齐平，扣好凸轮卡索。将装好的制胶框安装在制胶架上，用洗瓶在两块玻璃板之间加入少量水检验一下组装好的制胶架是否漏液，若不漏则将水控干，用滤纸吸干剩余水分，放旁边备用。配制 15 % 的下层分离胶和上层浓缩胶，组成成分见表 3-11 及表 3-12。加入下层胶溶液后，加入适当异丙醇液封使液面平齐，待下层胶凝固后用滤纸吸去多余的异丙醇，然后加入上层胶溶液，并尽快插入所需孔数的加样梳，避免产生气泡，放在平坦的桌面等待凝固。凝固后将制胶框卸下，转入电泳转印槽下槽，取一个主电极芯，将凝固的凝胶连同玻璃板固定在电极芯上，另一侧安装缓冲液挡板。先在内槽加入电泳液检验安装好的电极芯是否漏液，若不漏则补齐内外槽电泳液至指定高度。拔出加样梳，取 10 μL 上清依次加入蛋白胶上样孔，在最左侧加入 4 μL 蛋白 Marker，用

6 μL 1 \times 蛋白上样缓冲液补齐加样孔。连接好正负极，盖上电泳槽上盖，连接电源。首先 80 V 跑 30 min，将样品从浓缩胶跑入分离胶，然后切换至 120 V 跑 60 min。待蛋白 Marker 分离开，各条带位置距离适中，则停止电泳。小心取出凝胶，用胶铲切去边缘多余凝胶，转入考马斯亮蓝染色液，常温水平摇床染色 15 min，转入脱色液脱色至条带清晰。

表 3-11 上层胶溶液
Table 3-11 Upper glue solution

各组分名称 Name of each component	含量 (mL) Content (mL)
H ₂ O	1.1
30 % Acrylamide	2.5
1.5M Tris-HCl (PH 8.8)	1.3
10 % SDS	0.05
10 % APS	0.05
TEMED	0.002

表 3-12 下层胶溶液
Table 3-12 Lower glue solution

各组分名称 Name of each component	含量 (mL) Content (mL)
H ₂ O	1.4
30 % Acrylamide	0.33
1.0 M Tris-HCl (PH 6.8)	0.25
10 % SDS	0.02
10 % APS	0.02
TEMED	0.002
彩色凝胶预染液 (500 \times)	0.004

3.2.3 重组表达蛋白的纯化

3.2.3.1 样品预处理

(1) 进行大摇前，先摇 2 管 5 mL 小试管菌液，过夜培养使菌液浑浊。在 500 mL 自诱导培养基中分别加入 500 μL Kan 抗生素后，接入上述菌液，37 $^{\circ}\text{C}$ 200 rpm 7 h。

(2) 将诱导完成的菌液转到 500 mL 离心瓶，5000 rpm，离心 20 min，弃上清。

(3) 用约 50 mL PBS 溶解沉淀后 12000 rpm，离心 15 min，弃上清。

(4) 用约 30 mL A Buffer 溶解沉淀转移到 100 mL 烧杯中，置于冰盒上，加入 300 μL PMSF。

(5) 将细胞破碎机中 20 % 的乙醇用不高于 300 Pa 的压力放完，过 2 遍过滤后的超

纯水，再用 A Buffer 润洗一遍，倒入烧杯中的菌液，将压力调整至 1248 Pa 左右，重复破碎 3-5 次，直至流出液体澄清且不再粘稠。清洗细胞破碎仪，过 2 遍水，1 遍 20 % 乙醇，再用 20 % 乙醇填满管道（确保整个过程中，机器不能进气泡）。

(6) 将破碎后的菌液转入 50 mL 离心瓶，配平后，4 °C 高速离心机，13000 rpm，离心 50 min，取上清。

(7) 上清用 0.45 μm 的滤器过滤，若液体通过滤器困难，则将液体用超声破碎仪破碎后离心，取上清重新过滤器。

3.2.3.2 上样

(1) 蠕动泵处理预装柱：用水以 2 mL/min 的流速将预装柱里的酒精冲洗干净，再用 A Buffer 以相同的流速将预装柱内充满 A Buffer，使得预装柱内的 Buffer 和上样液的 Buffer 一致（避免气泡进入预装柱）。

(2) 上样：将蠕动泵速度调整至 1 mL/min，以缓慢的流速上样，以便使蛋白和填料更好的结合（避免气泡进入预装柱）。分别取上样前和流穿制作蛋白样。

3.2.3.3 程序设置

(1) 打开 AKTA 系统，在 Method Editor 窗口中，File 菜单栏下选择 New Method，在弹出的对话框中，选择 Predefined Method 下的 Affinity Chromatography (AC)，点击 OK。

(2) 由于我们使用蠕动泵上样，所以将上样 (Sample Application) 程序在程序设置里删除，除此之外，再将 (Column Wash) 删除。

(3) 在 Method Settings 中 Column type 的下拉框中选择使用的预装柱。

(4) 在 Equilibration 中将 Flow rate 改为 2 mL/min，将 the total volume is 改为 5 CV (柱体积)。

(5) 在 Elution 中 Flow rate 设置为 2 mL/min，Gradient elution 中设置见下表。Fractionate 中选择 using fraction collector，Fixed fractionation volume 设置 10.00 mL。

(6) 点击保存，命名后储存到指定文件夹。

表 3-4 程序设置
Table 3-4 Program Settings

	Type	Target % B (0-100)	Length (CV)
1	Step	50.0	6.00
2	Step	75.0	4.00
3	Step	100.0	10.00

在冲洗完系统 A/B 泵后，连接预装柱，按设定程序进行洗脱。蛋白洗脱完成后进行 SDS-PAGE 验证。

3.2.3.4 预装柱的处理

将使用后的预装柱接到蠕动泵上，调整流速 2 mL/min，所有经过柱子的溶液均需使用 0.22 μm 滤器过滤，切换溶液时均须暂停机器，以防预装柱进气泡，按如下顺序处理柱子：

- (1) 5 CV (柱体积) 的去离子水
- (2) 5 CV EDTA Buffer
- (3) 5 CV 的去离子水
- (4) 0.5 M NaOH (使用 G250 考马斯亮蓝检测流出液，待溶液不变蓝后进行下一步)
- (5) 5 CV 的去离子水
- (6) 5 CV 0.1M 硫酸镍
- (7) 5 CV 的去离子水
- (8) 5 CV 咪唑 Buffer
- (9) 5 CV 的去离子水
- (10) 5 CV 20 %乙醇，过完后接好柱子接口，4 $^{\circ}\text{C}$ 放置。

3.2.3.5 蛋白浓缩换液

(1) 浓缩：

由于本蛋白在天然状态下容易形成 12 聚体，形成 12 聚体后蛋白为 240 kD 左右，一般大小浓缩管不会将蛋白滤过，所以选择 50 kD 的浓缩管，可以把杂蛋白滤除但又不会将目的蛋白滤出。取出 4 $^{\circ}\text{C}$ 储存的浓缩管 2 个，将浓缩管内乙醇倒掉，用超纯水反复冲洗去除残留的乙醇。离心机提前预冷到 4 $^{\circ}\text{C}$ ，将纯化得到的蛋白转移至浓缩管，配平后，水平转子，4 $^{\circ}\text{C}$ 3200 rpm 离心 5 min。取 200 μL 1 \times 考马斯亮蓝 G 250 加入 1.5 mL 离心管中，然后取浓缩管滤出液 50 μL 加入到离心管中，扣盖混匀，检验浓缩管是否漏液。若 G250 不变蓝则说明浓缩管不漏，否则需要换更换浓缩管。如果 50 kD 以下杂蛋白过多，则验漏时可能导致 G250 变蓝，若无法确定是漏液还是杂蛋白，则可以保留浓缩管滤出液，待后续通过 SDS-PAGE 验证。如果浓缩管不漏，则继续浓缩，将两管蛋白总量浓缩至 2 mL 左右结束浓缩。此过程需要全程保持低温。

(2) 换液：

加上载体 His 标签后，该蛋白的等电点为 5.91，选择与等电点相差 2 个 PH 左右的置换液会使蛋白较为稳定，因此选择 PH 8.0 的 Tris 盐溶液 (0.22 μm 滤器过滤后使用)。本实验采取浓缩换液的方式置换，该方法置换比较剧烈，因此应缓慢换液。取上述两

管含有 1 mL 浓缩后蛋白的浓缩管，首次先取 100 μL 置换液，用枪头缓慢加入蛋白溶液中。4 $^{\circ}\text{C}$ 3200 rpm 离心，待离心至溶液剩余 1 mL 时，再次重复上述操作。如果蛋白承受能力比较强，后续可以将置换液缓慢从 200 μL 加至 1 mL，直到加入的置换液将蛋白原 Buffer 稀释到 500 倍以上时，可以结束换液，将置换后的蛋白用枪头吸出后加入适量甘油，转移至 -80 $^{\circ}\text{C}$ 储存。此过程需要全程保持低温。

(3) 浓缩管处理：

使用完成的浓缩管，用超纯水冲洗，用枪头小心吹打，以防蛋白碎片残留堵塞滤膜，完成后将浓缩管转移至 0.1M NaOH 溶液中浸泡半个小时，然后取出浓缩管，配平后离心去除残留的 NaOH。离心后将浓缩管转移到超纯水中浸泡，每隔半小时换一次超纯水，三次后控干水分，将浓缩管浸泡到 20% 乙醇中，放 4 $^{\circ}\text{C}$ 储存。

3.2.3.6 蛋白浓度的测定

使用 Thermo Pierce™ BCA 蛋白检测试剂盒对蛋白浓度进行测定。

Reagent B 液使用量计算方式为 $B = (\text{标准品孔数} + \text{待测样品数}) \times 4 \mu\text{L}$

Reagent A 液使用量计算方式为 $A = B \text{ 液量} \times 50 \mu\text{L}$

将 A、B 液混合后，在 96 孔板每孔加入 200 μL A、B 液混合物，然后分别加入 10 μL 标准品和待测样品。将蛋白用 PBS 5 倍稀释后测浓度，做 2 个重复。盖上一次性封板膜，37 $^{\circ}\text{C}$ 温箱反应 30 min 后在酶标仪测 OD_{562nm} 处 OD 值，根据标准品 OD 值和对应的蛋白浓度制作标准曲线，然后根据标准曲线计算蛋白样品的浓度。测得蛋白样品 OD_{562nm} 处 OD 值为 0.678 和 0.685，经计算得到 5 倍稀释的蛋白浓度为 900.015 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和 911.3725 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，所以蛋白实际浓度约为 4.5 mg/mL。

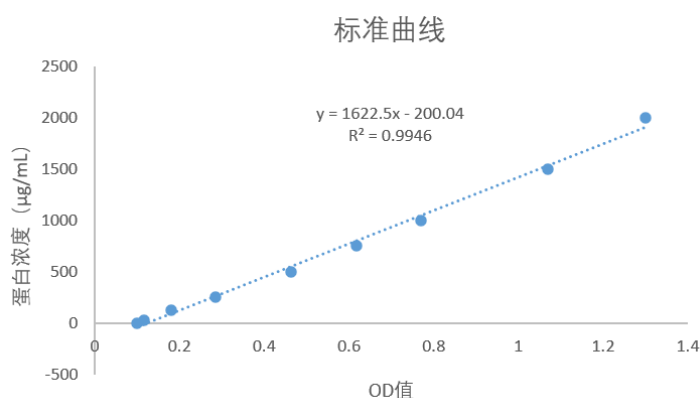


图 3-1 标准曲线
Figure 3-1 Standard curve

3.2.4 反应原性分析

蛋白胶配置过程同 3.2.2，取纯化后的蛋白制作蛋白样，电泳完成后，小心取出凝胶，用胶铲切去边缘多余凝胶，将凝胶转移至转印液中，用尺子测量凝胶的长和宽，

根据长和宽剪出合适大小的 PVDF 膜 1 张和厚滤纸 2 张，将 PVDF 膜转移到甲醇中激活一下，将滤纸在转印液中浸泡透，取 1 片厚滤纸，控干水分，放置在电转仪上，将 PVDF 膜放置在滤纸上，并赶走气泡，然后取凝胶放置在 PVDF 膜上，去除气泡后，盖上另一片厚滤纸。盖上电转仪的盖子，15V 40 min。

转膜结束后，取 PVDF 膜放入含 5 %脱脂奶粉的 PBST 溶液中，置于 37 °C恒温摇床，40 rpm 封闭 2 h，封闭结束后，将 PVDF 膜分别转移至封闭液稀释的抗 His 单抗、封闭液 50 倍稀释的背景清楚的牛布病阳性和阴性血清中，37 °C摇床孵育 1.5 h。孵育结束后，取 PVDF 膜放入 PBST 中洗膜，5 min 每次，洗三次。洗膜结束后将 PVDF 膜分别转移到用封闭液稀释的鼠二抗和牛二抗中，37 °C孵育 1.0 h，然后洗膜，过程同上。显色前，再将膜转移到避光处，先取反应液 2 mL 吸取到一个 10 mL 的干净棕色瓶子中，再依次取 40 μ L 左右的溶液 A 和 4 μ L 的溶液 C，形成显色工作液并充分混匀。在避光处将显色工作液加入膜上，将膜覆盖。37 °C 低速振荡反应 10 min 左右即可，这时浅棕色的条带出现。倒掉反应液，蒸馏水冲洗条带 3-4 次，自然干燥，拍照记录实验结果。

3.2.5 Dps 蛋白多克隆抗体的制备与鉴定

3.2.5.1 动物免疫

取 20 只成年昆明鼠，免疫前采血取血清记作未免血清。将纯化后的蛋白高速离心后转移至新的 1.5 mL 离心管，用 BCA 试剂盒测蛋白浓度，操作过程同 3.2.3.6，根据测得的蛋白浓度，用过滤后的 PBS 稀释到 1 mg/mL，加入等量的佐剂和千倍稀释的新霉素，使用三通将其乳化彻底。将乳化好的亚单位疫苗通过皮下多点注射的方式免疫小鼠，100 μ L/只，蛋白含量为 50 μ g。首次免疫用弗氏完全佐剂，二三次免疫用弗氏不完全佐剂，间隔 2 周免疫一次，每次免疫前采血取血清，三免后一周采血测抗体效价，若结果理想则将全部小鼠处死取血清。

3.2.5.2 血清抗体效价的测定

(1) 包被蛋白：取纯化得到的 Dps 蛋白，用包被液稀释到 1.0 μ g/mL，按照 100 μ L/孔加入到酶标板中。盖上一次性封板膜，将酶标板放 37 °C恒温箱反应 1.5 h。

(2) 洗板：取反应结束的酶标板，去除封板膜后放洗板机用 PBST 洗板，300 μ L 每次，洗 5 次。

(3) 封闭：将脱脂奶粉用 PBST 稀释到 5 %，取 300 μ L 加入到上述酶标板，盖上一次性封板膜，将酶标板放 37 °C恒温箱反应 1.0 h。

(4) 重复步骤 (2)

(5) 孵育血清：将一免、二免和三免后的血清用 PBST 分别按照 1:2⁷、1:2⁸、1:2⁹、1:2¹⁰、1:2¹¹、1:2¹²、1:2¹³、1:2¹⁴、1:2¹⁵、1:2¹⁶、1:2¹⁷、1:2¹⁸、1:2¹⁹ 稀释血清，稀释后取 100 μ L 加入酶标板，分别设置阴性对照和空白对照。盖上一次性封板膜，将酶标板放

37 °C恒温箱反应 1.0 h。

(6) 重复步骤 2

(7) 孵育二抗：将兔抗小鼠二抗用 PBST 2000 倍稀释后，每孔 100 μ L 加入到酶标板中。盖上一次性封板膜，将酶标板放 37 °C恒温箱反应 0.5 h。

(8) 重复步骤 2

(9) 显色：每孔加入 100 μ L 恢复至室温的 TMB 显色液，盖上一次性封板膜，在黑暗处避光反应 10 min，每孔加入 100 μ L 1.8M 硫酸终止显色。使用酶标仪在 OD_{450nm} 处读数，获得 OD 值。

3.2.5.3 多克隆抗体的验证

蛋白胶配置过程同 3.2.2，取纯化后的蛋白制作蛋白样，电泳完成后转膜，转膜操作见 3.2.4。

转膜结束后，取 PVDF 膜放入含 5 %脱脂奶粉的 PBST 溶液中，置于 37 °C恒温摇床，40 rpm 封闭 2 h，封闭结束后，将 PVDF 膜转移至封闭液稀释的小鼠免疫前和后的血清中，血清与封闭液稀释比为 1:200，37 °C摇床孵育 1.0 h。孵育结束后，取 PVDF 膜放入 PBST 中洗膜，5 min 每次，洗三次。洗膜结束后将 PVDF 膜转移到用封闭液稀释的鼠二抗中，37 °C孵育 1.0 h，然后洗膜，过程同上。显色前，再将膜转移到阴暗处，先取反应液 2 mL 吸取到一个 10 mL 的干净棕色瓶子中，再依次取 40 μ L 左右的溶液 A 和 4 μ L 的溶液 C，形成显色工作液并充分混匀。在阴暗处将显色工作液加入膜上，将膜覆盖。37°C 低速振荡反应 10 min 左右即可，这时浅棕色的条带出现。倒掉反应液，蒸馏水冲洗条带 3-4 次，自然干燥，拍照记录实验结果。

3.3 结果

3.3.1 重组表达载体构建结果

3.3.1.1 PCR 扩增结果

PCR 扩增出 507 bp 的片段，无其它杂带，与目的片段大小一致，结果见图 3-2。

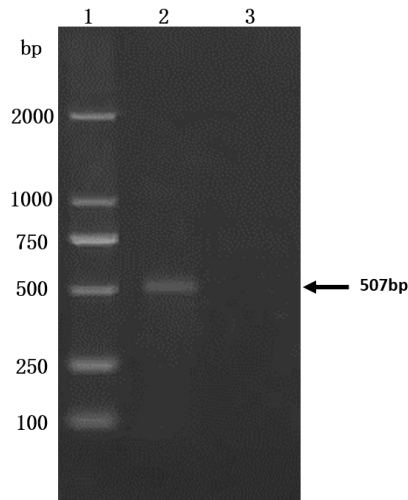


图 3-2 目的基因 PCR 扩增结果

Figure 3-2 PCR amplification results of the gene of interest

1: Marker; 2: 目的片段; 3: 阴性对照

1: Marker; 2: Target fragments; 3: Negative control

3.3.1.2 菌落 PCR 验证

经 PCR 验证，所挑的 10 个单菌落均是阳性菌落，PCR 验证成功，结果见图 3-3。

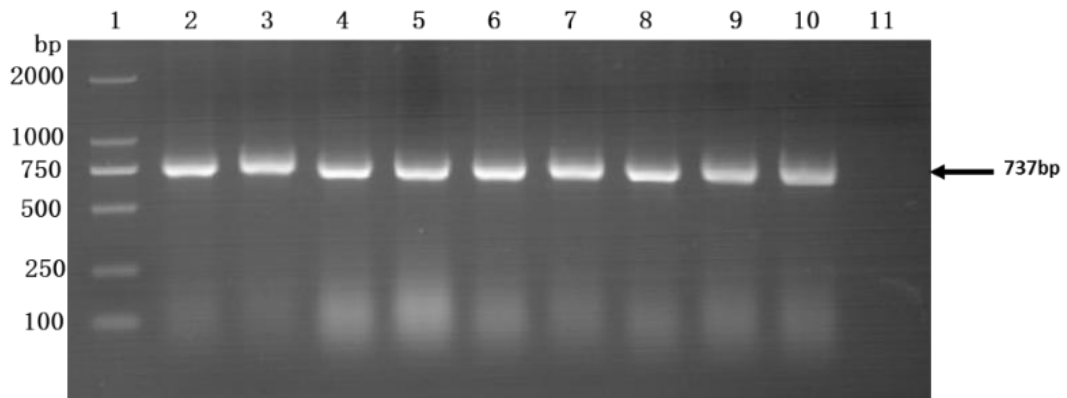


图 3-3 菌落 PCR 验证图

Figure 3-3 Colony PCR validation plot

1: DNA Marker; 2-10: 验证样品; 11: 阴性对照

1: DNA Marker; 2-10: Verify the sample; 11: Negative control

3.3.1.3 双酶切验证

经双酶切验证，分别切出 5282bp 的载体片段和 507bp 的目的基因片段，说明双酶切验证成功，结果见图 3-4。

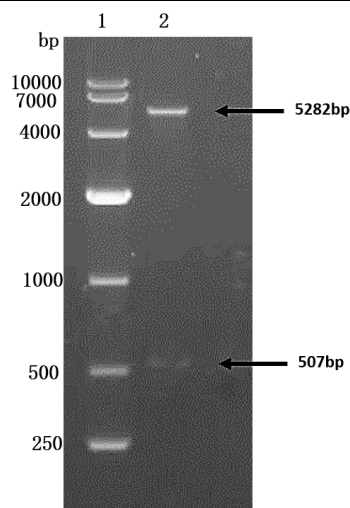


图 3-4 重组质粒双酶切验证

Figure 3-4 Recombinant plasmid double digestion validation

1: Protein Marker; 2: 双酶切电泳图

1: Protein Marker; 2: Double digestion electropherogram

3.3.1.4 测序验证

经 NCBI 中 BLAST 比较，测序序列与目的序列一致，测序验证成功，结果见图 3-5。

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
905 bits(490)	0.0	490/490(100%)	0/490(0%)	Plus/Plus
Query 444	GAAGTCGATGCATGCAACCCGCAACGATCTTCCCTCCAATACCAAGACGACGATGATCGC	503		
Sbjct 6	GAAGTCGATGCATGCAACCCGCAACGATCTTCCCTCCAATACCAAGACGACGATGATCGC	65		
Query 504	GCTGCTCAACGAGAATCTTGCCGCAACAATCGATCTTGCCCTCATCACCAGCAGGCGCA	563		
Sbjct 66	GCTGCTCAACGAGAATCTTGCCGCAACAATCGATCTTGCCCTCATCACCAGCAGGCGCA	125		
Query 564	CTGGAACCTCAAGGACCGCAATTCATCGCCGTCATGAAATGCTCGATGGTTCCGCGC	623		
Sbjct 126	CTGGAACCTCAAGGACCGCAATTCATCGCCGTCATGAAATGCTCGATGGTTCCGCGC	185		
Query 624	AGAACTCGACGACCATGTGGACACGATTGCCGAACGTGCCGTGCAGATCGGCGGAACGGC	683		
Sbjct 186	AGAACTCGACGACCATGTGGACACGATTGCCGAACGTGCCGTGCAGATCGGCGGAACGGC	245		
Query 684	CTATGGTACAACCCAGTGTGGTGAAGGAATCCAGACTGAAGCCTTACCCGACCGACAT	743		
Sbjct 246	CTATGGTACAACCCAGTGTGGTGAAGGAATCCAGACTGAAGCCTTACCCGACCGACAT	305		
Query 744	TTATGCCGTCCACGACCATCTGGTGGCACTGATCGAACGCTATGGTATGTTGCCAATCT	803		
Sbjct 306	TTATGCCGTCCACGACCATCTGGTGGCACTGATCGAACGCTATGGTATGTTGCCAATCT	365		
Query 804	GGTGGCGAAATCGATCAAGGATGCAGACGACCGGGTGACGACGACACGGCAGATATTTT	863		
Sbjct 366	GGTGGCGAAATCGATCAAGGATGCAGACGACCGGGTGACGACGACACGGCAGATATTTT	425		
Query 864	CACCGCCGATCGCGCAGCCTCGACAAGGCACTCTGGTTCTCGAAGCGCATGTGCAGGA	923		
Sbjct 426	CACCGCCGATCGCGCAGCCTCGACAAGGCACTCTGGTTCTCGAAGCGCATGTGCAGGA	485		
Query 924	AAGCAATTAA	933		
Sbjct 486	AAGCAATTAA	495		

图 3-5 测序验证

Figure 3-5 Sequencing validation

3.3.2 蛋白诱导表达结果

根据 SDS-PAGE 图，蛋白在 37 °C 的温度下，自诱导培养基中表达量高，蛋白为可溶性表达，结果见图 3-6。

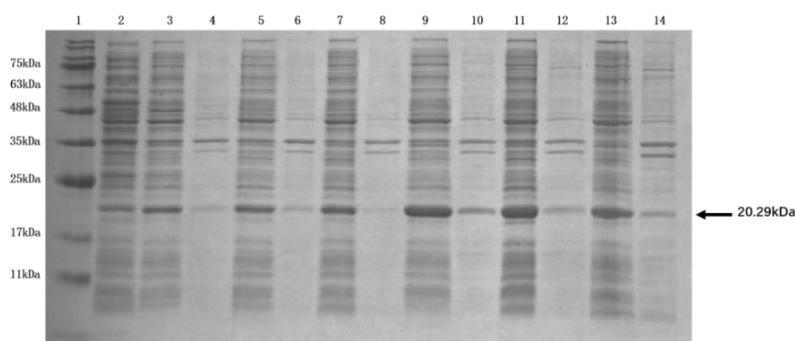


图 3-6 蛋白诱导表达

Figure 3-6 Protein-induced expression

1: Protein Marker; 2: 未诱导; 3: 37 °C LB 培养基诱导上清; 4: 37 °C LB 培养基诱导沉淀; 5: 25 °C LB 培养基诱导上清; 6: 25 °C LB 培养基诱导沉淀; 7: 16 °C LB 培养基诱导上清; 8: 16 °C LB 培养基诱导沉淀; 9: 37 °C 自诱导培养基诱导上清; 10: 37 °C 自诱导培养基诱导沉淀; 11: 25 °C 自诱导培养基诱导上清; 12: 25 °C 自诱导培养基诱导沉淀; 13: 16 °C 自诱导培养基诱导上清; 14: 16 °C 自诱导培养基诱导沉淀

1: Protein Marker; 2: Not induced; 3: 37 °C LB medium induces supernatant; 4: 37 °C LB medium induces precipitation; 5: 25 °C LB medium induces supernatant; 6: 25 °C LB medium induces precipitation; 7: 16 °C LB medium induces supernatant; 8: 16 °C LB medium induces precipitation; 9: 37 °C self-inducible medium induces supernatant; 10: 37 °C self-inducible medium induces precipitation; 11: 25 °C self-inducible medium induces supernatant; 12: 25 °C self-inducible medium induces precipitation; 13: 16 °C self-inducible medium induces supernatant; 14: 16 °C self-inducible medium induces precipitation

3.3.3 蛋白纯化结果

蛋白纯化后条带单一，无其它杂蛋白，使用 ImageJ 根据灰度值计算蛋白纯度可达到 91.3 %，结果见图 3-7。

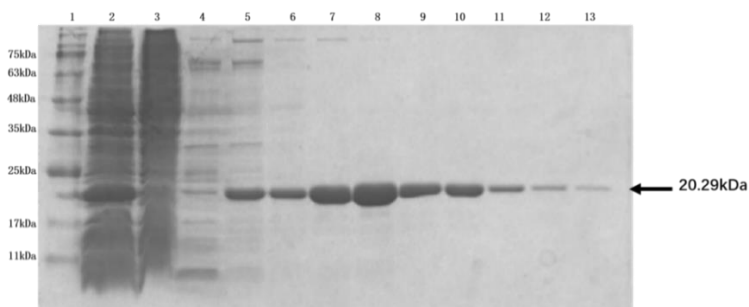


图 3-7 纯化 PAGE 图

Figure 3-7 Purified PAGE diagram

1: Protein Marker; 2: 上样前; 3: 流穿; 4-6: 洗杂; 7-13: 梯度洗脱

1: Protein Marker; 2: Before loading the sample; 3: Flow through the sample; 4-6: Wash away magazines; 7-13: Gradient elution samples

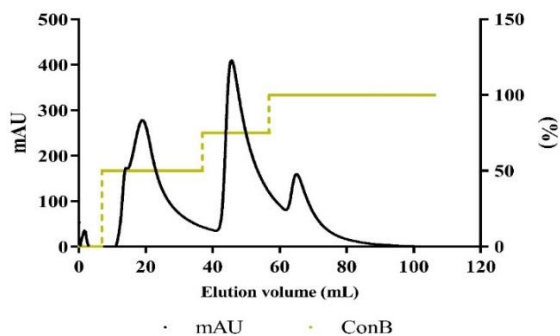


图 3-8 纯化结果图

Figure 3-8 Purification result diagram

3.3.4 反应原性结果

通过 Western blot, 对 Dps 进行反应原性分析, 如图所示, 蛋白可与牛布病阳性血清、抗 His 单抗反应, 与牛布病阴性血清不反应, 表明 Dps 具有良好的反应原性, 结果见图 3-9。

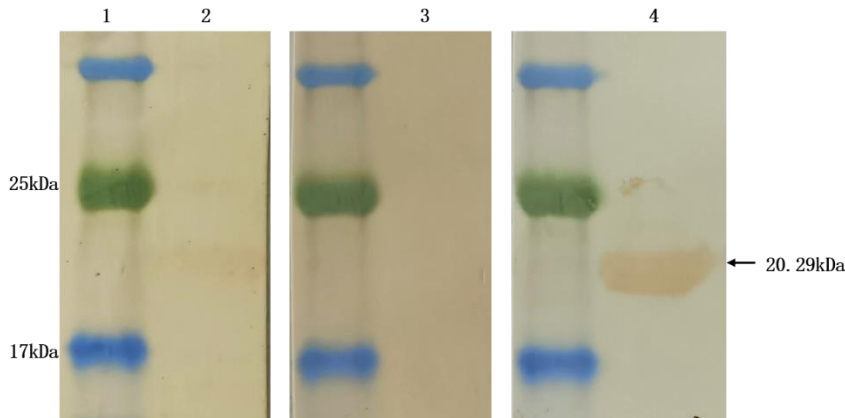


图 3-9 反应原性结果图

Figure 3-9 Reactionogenicity result diagram

1: Protein Marker; 2: 牛布病阳性血清; 3: 牛布病阴性血清; 4: 抗 His 单抗
1: Protein Marker; 2: Bovine brucellosis-positive serum; 3: Bovine brucellosis-negative serum; 4: Anti-His monoclonal antibody

3.3.5 多克隆抗体制备和鉴定结果

3.3.5.1 血清抗体效价结果

以 $P/N \geq 2.0$ 的最大的抗体稀释度作为抗体效价值, 三免后获得较高的抗体水平, 血清抗体效价可以达到 $1:2^{18}$ 。

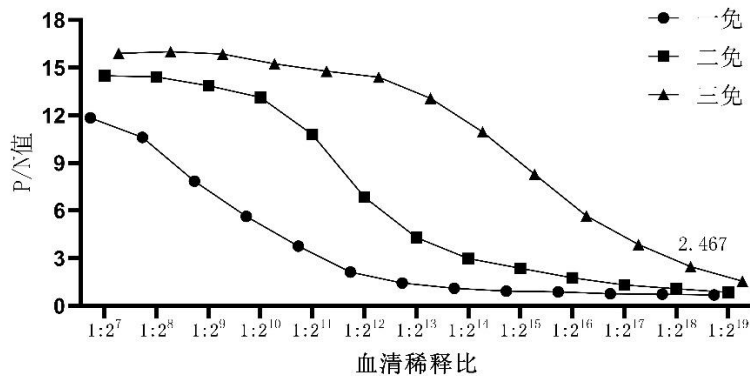


图 3-10 血清抗体效价

Figure 3-10 Serum antibody titer

3.3.5.2 多克隆抗体的验证结果

分别使用免疫前小鼠血清和免疫后小鼠血清进行 Western blot, 经验证只有免疫后小鼠血清与 Dps 蛋白反应, 证明获得的多克隆抗体为 Dps 蛋白免疫产生, 结果见图 3-11。

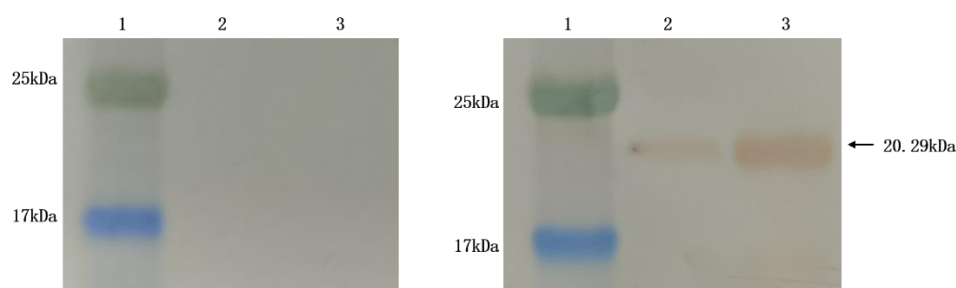


图 3-11 多克隆抗体的验证

Figure 3-11 Polyclonal antibody validation

1: Protein Marker; 2: 10 倍稀释蛋白样; 3: 2 倍稀释蛋白样

1: Protein Marker; 2: 10-fold diluted protein sample; 3: 2-fold diluted protein sample

3.4 讨论

布鲁氏菌病被世界卫生组织定位 B 类传染病，它不仅危害动物健康，妨碍畜牧业的发展，且由于其为人畜共患传染病，对人类健康也造成威胁(孙田华等，2022)。动物一旦感染布鲁氏菌，机体免疫能力下降，容易诱发继发感染，提高病死率(孙田华等，2022)。该病主要攻击动物繁殖系统，会导致妊娠动物出现流产死胎，雄性动物出现睾丸炎，降低精子质量(孙田华等，2022)。人类感染布鲁氏菌也会出现跟动物相同的症状。截止到 2020 年底，我国布鲁氏菌感染者已达到 1 万人(孙田华等，2022)。为了减少布鲁氏菌病的危害及促进畜牧业健康稳定的发展，建立一种规范便捷的诊断方法是十分必要的(江子昕，兰邹然，邢林林，徐聪，2022)。

本研究通过 PCR 大量扩增，获得大量目的片段 Dps，目的片段大小 507 bp，通过胶回收获取目的片段。在构建载体时使用的是 pET-28a 载体，通过 *Nde* I 和 *Xho* I 这两个酶切位点将目的片段 Dps 和 pET-28a 载体双酶切，使用 T4 连接酶在 16 °C 过夜连接，将连接产物转化到 BL21(DE3)感受态细胞中，37 °C 温箱过夜培养后进行菌落 PCR 验证，验证时可以用 pET-28a 的测序引物 T7/T7t 进行验证。如果连接效果不好，直接转化到表达感受态 BL21(DE3)中可能会出现不长单菌落的情况，这时可以先转化到克隆感受态 DH5 α 中，验证成功后提质粒再次转化到 BL21(DE3)中，这样转化成功的概率会有所提高。验证成功的单菌落用 LB 液体培养基摇菌，在 OD_{600nm} 0.6-0.8 时使用 IPTG (异丙基- β -D-硫代半乳糖苷) 诱导表达，同时在自诱导培养基中试诱导，自诱导培养基不用额外加诱导剂。将诱导后的菌离心，用 PBS 溶解破碎，分别取上清和沉淀进行 SDS-PAGE，成功表达蛋白大小为 20.29 kD。根据诱导结果来看，37 °C 诱导条件下，在自诱导培养基中表达量较高，蛋白为可溶性表达。因此选择这个最优条件，大量摇菌纯化。由于蛋白是可溶性表达，所以纯化过程都要低温进行，可溶性表达的蛋白纯化实验操作较为简单，首次纯化在设置洗脱条件时，未考虑到该蛋白在天然状态下容易形成多

聚体，与填料结合更牢固的情况，设置 3 % B Buffer 洗杂，从 3 % B Buffer 拉梯度洗脱到 100 % B Buffer，洗杂过程 UV 检测口检测到有杂蛋白洗脱下来，拉梯度时仅形成 UV 值不高的小峰，但随着 B Buffer 浓度的不断提高，UV 有明显的升高的迹象，因此在洗脱到 100 % B Buffer 时继续保持该浓度 Buffer 洗脱，后经 SDS-PAGE 验证，证实是在 100 % B Buffer 才将蛋白洗脱下来。由于蛋白形成 12 聚体，与填料中 Ni 结合比单体结合更为牢固，低浓度咪唑洗脱对其影响不大，需要高浓度咪唑才能将其洗脱下来。因此第二次纯化时，将洗杂浓度调整为 50 % B Buffer，使用较高浓度咪唑洗杂，不仅不会将 Dps 洗脱下来，还能除去大多数杂蛋白，使得洗脱的 Dps 蛋白更纯，事实证明，确实如此。洗脱得到的蛋白进行了 Western blot 验证，使用抗 His 单抗，经验证确实为目的蛋白。本研究蛋白纯化方式主要为亲和纯化，蛋白为多聚体，亲和纯化即可达到很好的纯化效果。纯化后得到的蛋白通过超滤浓缩，可进一步去除未能被 SDS-PAGE 检出的杂蛋白。

多点重复免疫(RIMMS)协议利用了动物的先天性免疫系统，该系统在遗传上预先编程，可以识别许多抗原。通过反复免疫动物，识别该抗原的 B 细胞保持不断扩张，直至采集到淋巴结用于杂交瘤的产生，这是一种制作更多样化的抗体或针对构象表位的抗体的好方法(Greenfield, 2020)。本研究采用多点注射的方式免疫小鼠，每只小鼠免疫蛋白 50 μg ，进行三次免疫后获得了较高水平的抗体，通过血清抗体效价测定，三免后的血清抗体效价可以达到 1:2¹⁸。使用获得的小鼠血清进行 Western blot 验证，结果表明使用的小鼠血清含有该蛋白免疫产生的抗体。

3.5 小结

- 1.成功构建出 pET-28a-Dps 重组蛋白。
- 2.该蛋白在 37 °C 自诱导培养基诱导 7 h 时表达量最高。
- 3.亲和纯化获得该蛋白，纯度为 91.3%。
- 4.使用蛋白免疫小鼠后，成功获得小鼠特异性 Dps 蛋白多克隆抗体血清。

第四章 阻断 ELISA 检测方法的建立

酶联免疫吸附试验具有速度快、灵敏度高和选择性强等优点。阻断 ELISA 是将特定的抗原包被于固相载体，待检血清中抗体与其结合后，使用该抗原对应多克隆抗体结合剩余结合位点，再与多克隆抗体对应的酶标二抗反应，根据显色后的 OD 值计算阻断率，可以特异性的检测多种动物血清，非常便于布鲁氏菌病这种多宿主疾病的检测。本章在前两章的基础上，采用方阵试验确定 ELISA 最佳反应条件，建立布鲁氏菌自然感染抗体的阻断 ELISA 检测方法，并对其临界值、特异性、敏感性、重复性进行评价。

4.1 材料

4.1.1 血清

表 4-1 血清来源
Table 4-1 Serum sources

血清 Serum	来源 Source
临床样品牛血清（142 份）	本溪爱民牛场（66 份）、辉山牛场（76 份）
临床样品羊血清（158 份）	辽宁李太斌羊场（79 份）、抚顺羊场（23 份）、辽中领头羊牧业有限公司（56 份）
布鲁氏菌免疫牛场血清（31 份）	辽宁辉山乳业集团
布鲁氏菌自然感染血清（35 份）	天康生物股份有限公司
各疾病阳性血清	天康生物股份有限公司
布鲁氏菌病标准阴阳性血清	实验室储存

4.1.2 试剂

表 4-2 试剂
Table 4-2 Reagents

试剂 Reagent	厂家 Producer
Na ₂ CO ₃	上海阿拉丁生化科技股份有限公司
NaHCO ₃	上海阿拉丁生化科技股份有限公司
MgCl ₂	沈阳化学试剂厂
PBS	北京索莱宝科技有限公司
吐温-20	生工生物工程（上海）股份有限公司
石炭酸	生工生物工程（上海）股份有限公司
脱脂奶粉	北京索莱宝科技有限公司
明胶	上海麦克林生化科技有限公司
封闭马血清	北京索莱宝科技有限公司
BSA	生工生物工程（上海）股份有限公司
HRP 标记兔抗鼠 IgG	生工生物工程（上海）股份有限公司
可溶型单组分 TMB 底物溶液	天根生化科技（北京）有限公司

第四章 阻断 ELISA 检测方法的建立

试剂 Reagent	厂家 Producer
硫酸	西陇科学股份有限公司
布氏杆菌病血清抗体检测试剂盒	北京爱德士生物科技有限公司
BIONOTE 布病抗体试剂盒	安世佳合

4.1.3 耗材

表 4-3 耗材
Table 4-3 Consumables

耗材 Consumables	厂家 Producer
酶标板	生工生物工程（上海）股份有限公司
一次性封板膜	海克斯生选
1.5 mL、5 mL、10 mL、15 mL、50mL 离心管	北京兰杰柯科技有限公司
1 mL、200 μ L、10 μ L 枪头	北京兰杰柯科技有限公司

4.1.4 仪器设备

表 4-4 仪器设备
Table 4-4 Instruments and equipments

仪器 Apparatus	厂家 Producer
排枪	大龙兴创实验仪器(北京)股份公司
洗板机	Thermo Fisher Scientific Inc
酶标仪	BioTek Instruments, Inc
PH 仪	上海仪电科学仪器股份有限公司

4.2 方法

4.2.1 最佳重组蛋白最优工作浓度和多抗稀释比的确定

将重组蛋白用包被液稀释成 100 ng/mL、500 ng/mL、1.0 μ g/mL、2.5 μ g/mL 和 5.0 μ g/mL 按照预先设定好的方阵每孔 100 μ L 加入到酶标板，然后用 300 μ L PBST 稀释的 5 %脱脂奶粉封闭。将小鼠多克隆抗体按照 1:200、1:400、1:600、1:800 和 1:1000 稀释，按照预先设定的方阵加入血清，然后加入 1:8000 稀释的二抗，显色，酶标仪 OD_{450nm} 读数。

4.2.2 最佳封闭液的选择和二抗浓度的确定

用筛选出的最优重组蛋白包被浓度包被酶标板，分别用 5 %脱脂奶粉、1 % BSA、5 %马血清和 1 % 明胶封闭，然后按照筛选出的最优多抗稀释比孵育多抗，再将兔抗小鼠 IgG 分别以 1:2000、1:4000、1:6000、1:8000 稀释按照方阵试验加入到酶标板，显色，酶标仪 OD_{450nm} 读数。

4.2.3 最佳包被时间和封闭时间的确定

将重组蛋白用包被液稀释成 1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 每孔 100 μL 加入到酶标板, 分别包被 1.0 h、1.5 h、2.0 h 和 2.5 h, 然后用 300 μL PBST 稀释的 5% 脱脂奶粉封闭, 封闭 1.0 h。将小鼠多克隆抗体按照 1:600 稀释, 加入酶标板, 然后加入 1:2000 稀释的二抗, 显色, 酶标仪 OD_{450nm} 读数。

将重组蛋白用包被液稀释成 1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 每孔 100 μL 加入到酶标板, 然后用 300 μL PBST 稀释的 5% 脱脂奶粉封闭, 分别封闭 1.0 h、1.5 h、2.0 h 和 2.5 h。将小鼠多克隆抗体按照 1:600 稀释, 加入多抗, 然后加入 1:2000 稀释的二抗, 显色, 酶标仪 OD_{450nm} 读数。

4.2.4 最佳小鼠多克隆抗体反应时间的确定

将重组蛋白用包被液稀释至 1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 每孔 100 μL 加入到酶标板, 然后用 300 μL PBST 稀释的 5% 脱脂奶粉封闭, 封闭 1.0 h, 将小鼠多克隆抗体按照 1:600 稀释, 加入多抗, 分别孵育 2.0 h、1.5 h、1.0 h、0.5 h, 洗板后, 加入 1:2000 稀释的二抗, 显色, 酶标仪 OD_{450nm} 读数。

4.2.5 最佳显色时间的确定

将重组蛋白用包被液稀释成 1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 每孔 100 μL 加入到酶标板, 然后用 300 μL PBST 稀释的 5% 脱脂奶粉封闭, 封闭 2.0 h。将小鼠多克隆抗体按照 1:600 稀释, 加入多抗, 然后加入 1:2000 稀释的二抗, 显色, 分别避光显色 10 min、15 min、20 min 和 25 min, 酶标仪 OD_{450nm} 读数。

4.2.6 最佳血清稀释倍数的确定

将重组蛋白用包被液稀释成 1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 每孔 100 μL 加入到酶标板, 然后用 300 μL PBST 稀释的 5% 脱脂奶粉封闭, 封闭 2.0 h。将标准布病血清按照原液、1:2.5、1:5、1:10 用 PBST 稀释, 100 μL 加入酶标板, 孵育 1.0 h, 然后加入按照 1:600 稀释的小鼠多克隆抗体, 然后加入 1:2000 稀释的二抗, 显色, 分别避光显色, 酶标仪 OD_{450nm} 读数。

4.2.7 血清反应时间的选择

将重组蛋白用包被液稀释成 1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 每孔 100 μL 加入到酶标板, 然后用 300 μL PBST 稀释的 5% 脱脂奶粉封闭, 封闭 2 h。将标准布病血清 100 μL 加入酶标板, 分别孵育 0.5 h、1.0 h、1.5 h、2.0 h, 然后加入小鼠多克隆抗体按照 1:600 稀释, 然后加入 1:2000 稀释的二抗, 显色, 分别避光显色, 酶标仪 OD_{450nm} 读数。

4.2.8 交叉反应试验

与布鲁氏菌同种属存在交叉反应的主要为根瘤杆菌、农杆菌和苍白杆菌, 其中根瘤杆菌和农杆菌主要感染植物, 目前未发现有关苍白杆菌感染牛、羊的研究。

交叉反应试验: 蛋白包被浓度为 1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、包被 1.5 h; 5% 脱脂奶粉封闭, 封闭

1.0 h; 其它疾病阳性血清使用原液, 反应 0.5 h、小鼠多克隆抗体稀释倍数为 1:600, 反应 1.0 h、二抗 2000 倍稀释, 避光显色 10 min。

4.2.9 批间试验和批内试验

批间: 取 3 个不同批次纯化的蛋白包被不同批次的酶标板, 配制的溶液也是不同时期配制的, 按照上述最优条件重复试验。

批内: 取同一批次纯化的蛋白在一天内不同时间包被同一批次酶标板, 按上述最优条件以相同的方式重复试验。

4.2.10 临界值的确定

大规模检疫时, 采取先用操作简便的方法进行初步筛选, 然后再用准确性较高的方法复核的原则。我国通常采用虎红平板凝集试验、乳汁环状试验进行现场或牧区大群检疫, 以试管凝集试验、补体结合试验或 ELISA 进行实验室最后确诊。

4.2.10.1 虎红平板凝集试验

临床样品先用虎红初筛, 使用前将虎红回温到室温, 取 30 μL 虎红滴在干净的玻璃平板表面, 另取 30 μL 血清与其和混合均匀, 充分搅匀, 在 4 min 内读取结果, 同时做标准阴阳性对照。

4.2.10.2 微量凝集试验

取一次性反应板 (96 孔 V 型 90°), 分别在 2、3、4 号孔加入 50 μL 稀释液 (0.5% 石炭酸生理盐水: 0.5 g 石炭酸溶于含 0.9 g 氯化钠的 100 mL 去离子水中), 第一个孔加入 96 μL 稀释液后加入 4 μL 待检血清, 用排枪吹打混匀后, 取 50 μL 转移到第 2 个孔, 再次混匀, 取 50 μL 加入第 3 个孔, 直至第 4 个孔, 第 4 个孔混匀后弃 50 μL , 这样 1-4 号孔稀释倍数为 1:25、1:50、1:100、1:200。

实验需要设置标准阴阳性对照, 用标准阴阳性血清重复上述操作。

将布病试管凝集抗原混匀后按照比例 (1:20) 用稀释液稀释, 稀释完成后取 50 μL 加入上述 4 个孔内, 此时血清稀释倍数变为 1:50、1:100、1:200、1:400。

盖上一次性封板膜, 防治水分蒸发, 放 37°C 温箱, 18-24 h 后观察结果。

结果判定:

分为 5 个等级, 标记为“++++”、“+++”、“++”、“+”和“-”。当牛、马、鹿和骆驼 1:100 血清稀释度, 猪、山羊、绵羊和犬 1:50 血清稀释度, 出现“++”及以上凝集现象时, 判定为阳性; 当牛、马、鹿、骆驼 1:50 血清稀释度, 猪、山羊、绵羊和犬 1:25 血清稀释度, 出现“++”以上凝集现象时, 判定为可疑 (结果判定来自 GB/T 18646-2018, 动物布鲁氏菌病诊断技术)。

“++++”: 菌落完全凝集, 1-4 号孔凝集物呈伞状均匀铺于孔底。

“+++”: 菌落几乎完全凝聚, 1-3 号孔凝集物呈伞状均匀铺于孔底, 第 4 号孔孔底

呈现白色点状。

“++”：菌落凝集显著，1-2号孔凝集物呈伞状均匀铺于孔底，3-4号孔孔底呈现白色点状。

“+”：凝集物有沉淀，第1号孔凝集物呈伞状均匀铺于孔底，2-4号孔孔底呈现白色点状。

“-”：无凝集，1-4号孔孔底呈现白色点状。

4.2.11 血清的测定

使用微量凝集试验和本研究建立的阻断 ELISA 检测方法分别对背景清晰的 31 份免疫血清和 35 份自然感染血清进行检测。

4.3 结果

4.3.1 重组蛋白最优工作浓度和多抗稀释比的确定

蛋白包被浓度和血清稀释比交叉方阵试验，酶标仪读数后，对三次实验结果进行统计学分析，计算变异系数。本研究最终确定蛋白包被浓度为 1.0 $\mu\text{g/mL}$ ，小鼠多克隆抗体稀释倍数为 1:600，结果见表 4-5。

表 4-5 重组蛋白最优工作浓度和血清稀释比的确定
Table 4-5 Determination of optimal working concentration and serum dilution ratio of recombinant protein

包被浓度 Coated concentration	血清稀释比 Serum dilution ratio	P/N			平均值 Mean value	标准差 Standard deviation	变异系数 (%) Coefficient of variation (%)
		1	2	3			
100 ng/mL	1:200	14.934	12.848	13.500	13.761	0.871	6.332
	1:400	15.327	14.769	15.942	15.346	0.479	3.122
	1:600	13.774	14.170	15.519	14.488	0.747	5.158
	1:800	14.235	13.140	13.686	13.687	0.447	3.267
	1:1000	14.558	11.966	13.745	13.423	1.083	8.065
500 ng/mL	1:200	15.782	15.982	17.607	16.457	0.817	4.966
	1:400	17.929	17.434	16.036	17.133	0.802	4.678
	1:600	15.672	16.769	16.907	16.450	0.553	3.359
	1:800	15.018	15.052	17.113	15.727	0.980	6.231
	1:1000	17.549	18.400	16.604	17.518	0.734	4.188
1.0 $\mu\text{g/mL}$	1:200	15.138	16.898	16.136	16.058	0.721	4.488
	1:400	17.305	18.364	16.750	17.473	0.669	3.831
	1:600	16.355	16.860	17.200	16.805	0.347	2.066
	1:800	16.712	16.373	18.357	17.147	0.867	5.054
	1:1000	17.655	15.794	16.397	16.615	0.775	4.666
2.5 $\mu\text{g/mL}$	1:200	13.473	15.892	15.849	15.071	1.130	7.500
	1:400	18.586	15.906	17.919	17.471	1.139	6.521
	1:600	18.772	17.678	16.375	17.608	0.980	5.564
	1:800	18.648	20.143	18.721	19.171	0.688	3.589
	1:1000	19.545	18.750	18.483	18.926	0.451	2.384

第四章 阻断 ELISA 检测方法的建立

包被浓度 Coated concentration	血清稀释比 Serum dilution ratio	P/N			平均值 Mean value	标准差 Standard deviation	变异系数 (%) Coefficient of variation (%)
		1	2	3			
5.0 $\mu\text{g/mL}$	1:200	15.671	14.143	14.959	14.925	0.625	4.185
	1:400	17.443	18.339	14.649	16.810	1.571	9.347
	1:600	17.516	18.518	18.299	18.111	0.430	2.375
	1:800	17.672	20.096	20.418	19.396	1.226	6.319
	1:1000	19.286	18.518	17.000	18.268	0.950	5.199

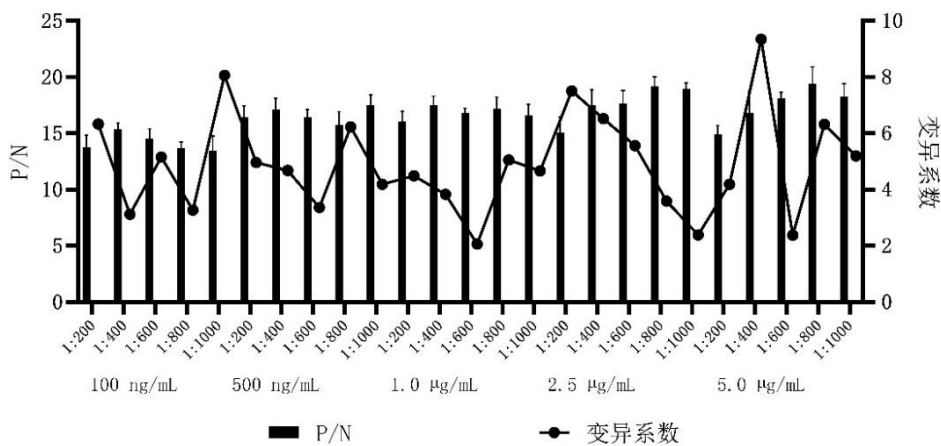


图 4-1 重组蛋白最优工作浓度和血清稀释比的确定

Figure 4-1 Determination of optimal working concentration and serum dilution ratio of recombinant protein

4.3.2 封闭液的选择和二抗浓度的确定

在蛋白包被浓度为 1.0 $\mu\text{g/mL}$ ，小鼠多克隆抗体稀释倍数为 1:600 的基础上，不同的封闭液和二抗稀释比交叉方阵试验，酶标仪读数后，对三次实验结果进行统计学分析，计算变异系数。本研究最终确定 5% 脱脂奶粉封闭，二抗 2000 倍稀释条件最优，结果见表 4-6。

表 4-6 封闭液的选择和 HRP 标记兔抗小鼠 IgG 浓度的确定

Table 4-6 Selection of blocking solution and determination of HRP-labeled rabbit anti-mouse IgG concentration

封闭液 Blocking solution	二抗稀释比 Secondary antibody dilution ratio	P/N			平均值 Mean value	标准差 Standard deviation	变异系数 (%) Coefficient of variation (%)
		1	2	3			
1% 明胶	1:2000	20.506	18.907	19.694	19.702	0.565	2.870
	1:4000	17.708	14.606	16.091	16.135	1.097	6.798
	1:6000	15.034	12.031	14.352	13.806	1.113	8.062
	1:8000	11.459	10.121	8.083	9.888	1.202	12.156

封闭液 Blocking solution	二抗稀释比 Secondary antibody dilution ratio	P/N			平均值 Mean value	标准差 Standard deviation	变异系数 (%) Coefficient of variation (%)
		1	2	3			
1 % BSA	1:2000	17.479	18.892	17.582	17.984	0.557	3.096
	1:4000	17.828	12.430	13.197	14.485	2.065	14.256
	1:6000	13.143	10.309	13.383	12.278	1.209	9.847
	1:8000	11.759	8.364	11.704	10.609	1.375	12.960
5 % 脱脂奶	1:2000	21.579	20.654	20.092	20.775	0.531	2.555
	1:4000	19.390	11.831	13.969	15.064	2.755	18.289
	1:6000	15.927	10.452	13.410	13.263	1.938	14.611
	1:8000	12.691	9.984	10.679	11.118	0.994	8.941
5 % 马血清	1:2000	15.800	15.872	19.411	17.028	1.460	8.572
	1:4000	16.271	12.819	12.639	13.910	1.447	10.406
	1:6000	11.986	11.172	13.817	12.325	0.958	7.772
	1:8000	10.662	10.190	9.362	10.071	0.465	4.620

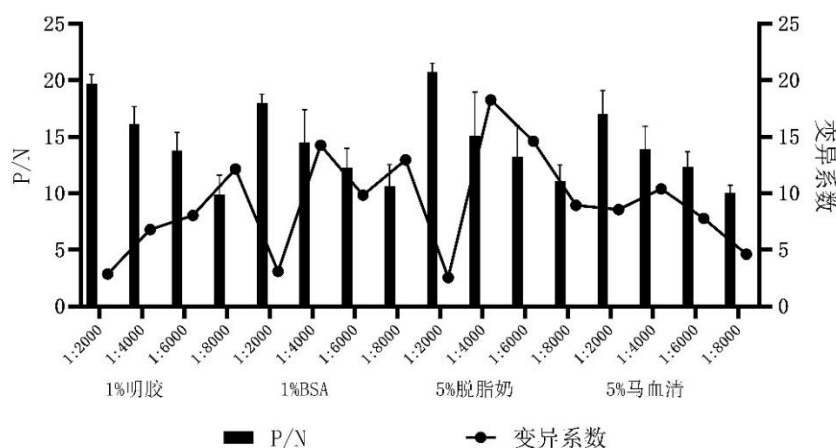


图 4-2 封闭液的选择和二抗浓度的确定

Figure 4-2 Selection of blocking solution and determination of second antibody concentration

4.3.3 包被时间和封闭时间的确定

在蛋白包被浓度为 1.0 μg/mL、5 %脱脂奶粉封闭、小鼠多克隆抗体稀释倍数为 1:600 和二抗 2000 倍稀释的基础上，对包被时间和封闭时间进行优化，酶标仪读数后，对三次实验结果进行统计学分析，计算变异系数。本研究最终确定包被 1.5 h、封闭 1.0 h 条件最优，结果见表 4-7 及表 4-8。

表 4-7 包被时间确定

Table 4-7 Determination of coating time

包被时间 Coating time	P/N			平均值 Mean value	标准差 Standard deviation	变异系数 (%) Coefficient of variation (%)
	1	2	3			
1.0 h	19.818	18.121	20.643	19.527	1.050	5.376
1.5 h	21.161	21.855	20.806	21.274	0.435	2.047
2.0 h	18.143	18.800	19.230	18.724	0.447	2.387
2.5 h	20.815	21.862	22.259	21.645	0.609	2.813

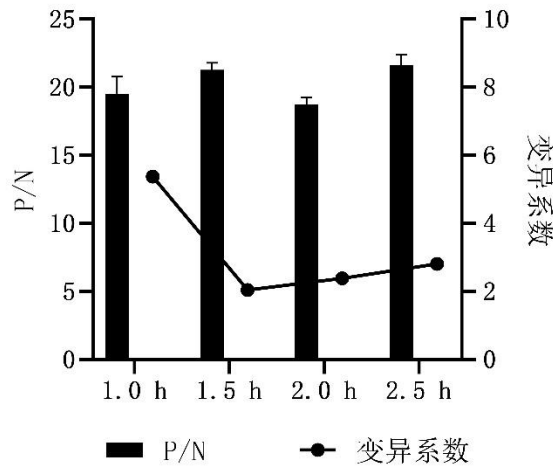


图 4-3 包被时间的确定
Figure 4-3 Determination of coating time

表 4-8 封闭时间的确定
Table 4-8 Determination of blocking time

封闭时间 Blocking time	P/N			平均值 Mean value	标准差 Standard deviation	变异系数 (%) Coefficient of variation (%)
	1	2	3			
1.0 h	16.435	16.205	15.461	16.034	0.416	2.592
1.5 h	12.669	12.662	13.946	13.092	0.604	4.611
2.0 h	15.432	15.017	14.272	14.907	0.480	3.219
2.5 h	15.000	15.980	14.603	15.194	0.579	3.809

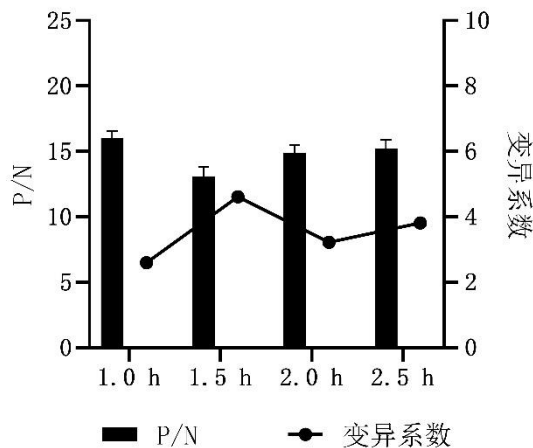


图 4-4 封闭时间的确定
Figure 4-4 Determination of blocking time

4.3.4 小鼠多克隆抗体反应时间的确定

在蛋白包被浓度为 1.0 $\mu\text{g/mL}$ ，包被 1.5 h、5 %脱脂奶粉封闭，封闭 1.0 h、小鼠多克隆抗体稀释倍数为 1:600 和二抗 2000 倍稀释的基础上，对小鼠多克隆抗体反应时间

进行优化, 酶标仪读数后, 对三次实验结果进行统计学分析, 计算变异系数。本研究最终确定小鼠多克隆抗体反应 1.0 h 条件最优, 结果见表 4-9。

表 4-9 小鼠多克隆抗体反应时间的确定
Table 4-9 Determination of reaction time of mouse polyclonal antibody

反应时间 Reaction time	P/N			平均值 Mean value	标准差 Standard deviation	变异系数 (%) Coefficient of variation (%)
	1	2	3			
1.0 h	21.364	22.241	22.340	21.981	0.439	1.996
1.5 h	21.054	18.250	18.619	19.308	1.244	6.442
2.0 h	24.160	22.885	23.269	23.438	0.534	2.279
2.5 h	22.925	20.250	22.132	21.769	1.122	5.153

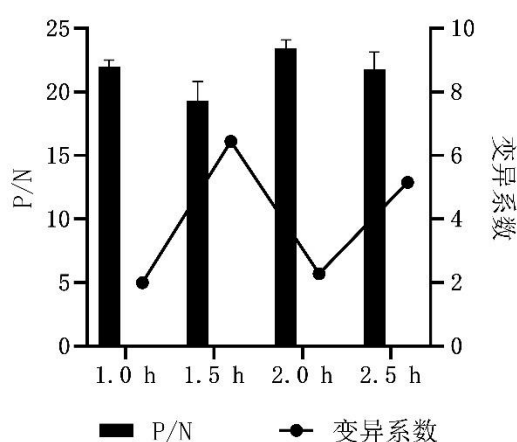


图 4-5 小鼠多克隆抗体反应时间的确定
Figure 4-5 Determination of reaction time of mouse polyclonal antibody

4.3.5 显色时间的确定

在蛋白包被浓度为 1.0 $\mu\text{g/mL}$, 包被 1.5 h、5% 脱脂奶粉封闭, 封闭 1.0 h、小鼠多克隆抗体稀释倍数为 1:600, 反应 1.0 h 和二抗 2000 倍稀释的基础上, 对显色时间进行优化, 酶标仪读数后, 对三次实验结果进行统计学分析, 计算变异系数。本研究最终确定显色 10 min 条件最优, 结果见表 4-10。

表 4-10 显色时间的确定
Table 4-10 Determination of color rendering time

显色时间 Color rendering time	P/N			平均值 Mean value	标准差 Standard deviation	变异系数 (%) Coefficient of variation (%)
	1	2	3			
10 min	21.902	20.782	21.943	21.542	0.538	2.498
15 min	20.154	19.113	20.667	19.978	0.647	3.236
20 min	14.981	16.973	17.479	16.478	1.078	6.543
25 min	16.797	13.848	15.722	15.456	1.219	7.886

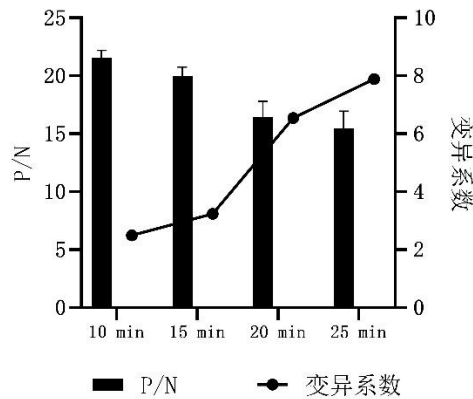


图 4-6 显色时间的确定

Figure 4-6 Determination of color rendering time

4.3.6 血清稀释倍数的确定

在蛋白包被浓度为 1.0 μg/mL，包被 1.5 h、5 %脱脂奶粉封闭，封闭 1.0 h、小鼠多克隆抗体稀释倍数为 1:600，反应 1.0 h、二抗 2000 倍稀释和显色 10min 的基础上，对血清稀释倍数进行优化，酶标仪读数后，对三次实验结果进行统计学分析，计算变异系数。本研究最终确定原液条件最优，结果见表 4-11。

$$\text{阻断率 (\%)} = (\text{标准阴性血清 OD} - \text{样品血清 OD}) / \text{标准阴性血清 OD} * 100$$

表 4-11 血清稀释倍数的确定

Table 4-11 Determination of serum dilution factor

血清稀释倍数 Serum dilution factor	阻断率			平均值 Mean value	标准差 Standard deviation	变异系数 (%) Coefficient of variation (%)
	1	2	3			
原液	55.829	56.418	57.304	56.517	0.606	1.073
1:2.5	51.852	51.896	50.086	51.278	0.843	1.644
1:5	43.760	40.560	50.415	44.912	4.105	9.140
1:10	23.867	28.063	20.640	24.190	3.039	12.563

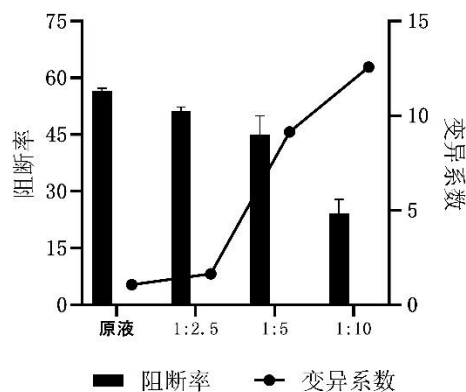


图 4-7 血清稀释倍数的确定

Figure 4-7 Determination of serum dilution factor

4.3.7 血清反应时间的确定

在蛋白包被浓度为 1.0 $\mu\text{g/mL}$ ，包被 1.5 h、5 %脱脂奶粉封闭，封闭 1.0 h、待检血清使用原液、小鼠多克隆抗体稀释倍数为 1:600，反应 1.0 h、二抗 2000 倍稀释和显色 10 min 的基础上，对血清反应时间进行优化，酶标仪读数后，对三次实验结果进行统计学分析，计算变异系数。1.5 h 与 0.5 h 变异系数值相近，阻断率却比 0.5 h 高，在不影响结果的情况下，考虑到时间成本，本研究最终确定血清反应时间为 0.5 h，结果见表 4-12。

表 4-12 血清反应时间的确定
Table 4-12 Determination of serum reaction time

血清反应时间 Serum reaction time	阻断率			平均值 Mean value	标准差 Standard deviation	变异系数 (%) Coefficient of variation (%)
	1	2	3			
0.5 h	56.147	55.504	51.960	54.537	1.841	3.376
1.0 h	56.684	63.492	57.794	59.323	2.982	5.027
1.5 h	66.826	67.751	62.510	65.696	2.284	3.476
2.0 h	68.471	68.515	60.827	65.937	3.614	5.481

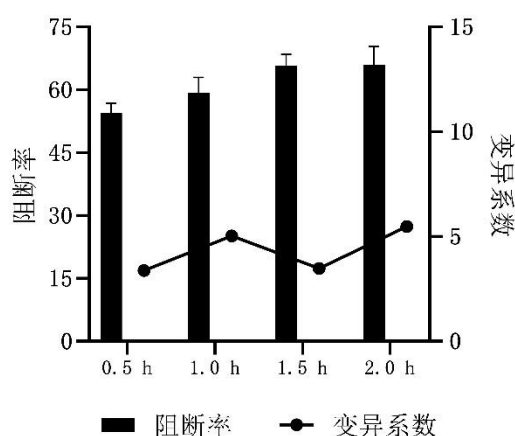


图 4-8 血清反应时间的确定
Figure 4-8 Determination of serum reaction time

4.3.8 交叉反应试验结果

用建立好的阻断法 ELISA 方法同时检测口蹄疫、病毒性腹泻黏膜病、曼氏杆菌、支原体、伪狂犬、梭菌、传染性鼻气管炎、布鲁氏菌阳性血清。由下表可知，除布鲁氏菌呈阳性反应外，其余几种病原的阳性血清均为阴性反应。证明该阻断 ELISA 方法能特异性的检测布鲁氏菌病抗体，并与其它几种病抗体无交叉反应，结果见表 4-13。

表 4-13 交叉反应试验
Table 4-13 Cross reaction test

血清 Serum	阻断率 (%) Interdiction rate (%)
口蹄疫	-5.101
病毒性腹泻黏膜病	-0.372
曼氏杆菌	-1.284
支原体	-2.399
伪狂犬	2.297
梭菌	1.486
传染性鼻气管炎	1.622
布鲁氏菌阳性	62.399

4.3.9 批间试验和批内试验结果

在蛋白包被浓度为 1.0 $\mu\text{g/mL}$ ，包被 1.5 h、5 %脱脂奶粉封闭，封闭 1.0 h、待检血清使用原液，反应 0.5 h、小鼠多克隆抗体稀释倍数为 1:600，反应 1.0 h、二抗 2000 倍稀释和显色 10 min 的基础上，进行批间和批内试验，酶标仪读数后，对三次实验结果进行统计学分析，计算变异系数。变异系数均在 10 %以内，说明本研究重复性良好，结果见表 4-14。

表 4-14 批间试验
Table 4-14 Inter-batch test

血清名 Serum name	OD			平均值 Mean value	标准差 Standard deviation	变异系数 (%) Coefficient of variation (%)
	1	2	3			
1	0.470	0.480	0.489	0.480	0.008	1.618
2	0.507	0.481	0.430	0.473	0.032	6.766
3	0.304	0.295	0.251	0.283	0.023	8.173
4	0.414	0.438	0.436	0.429	0.011	2.533
5	1.238	1.254	1.128	1.207	0.056	4.642
6	1.245	1.210	1.077	1.177	0.072	6.147
7	1.214	1.218	1.128	1.187	0.042	3.499
8	1.184	1.277	1.077	1.179	0.082	6.929
9	1.267	1.305	1.126	1.233	0.077	6.247
空白	1.275	1.226	1.116	1.206	0.066	5.514

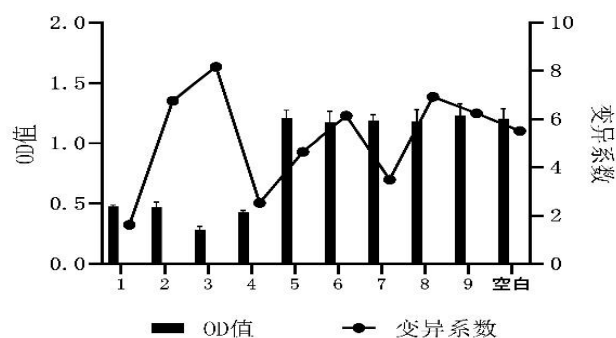


图 4-9 批间试验

Figure 4-9 Inter-batch test

表 4-15 批内试验
Table 4-15 Intra-batch test

血清名 Serum name	OD			平均值 Mean value	标准差 Standard deviation	变异系数 (%) Coefficient of variation (%)
	1	2	3			
1	0.494	0.515	0.530	0.513	0.015	2.878
2	0.486	0.476	0.456	0.473	0.012	2.639
3	0.279	0.318	0.269	0.289	0.021	7.323
4	0.454	0.454	0.466	0.458	0.006	1.235
5	1.257	1.208	1.217	1.227	0.021	1.735
6	1.179	1.193	1.186	1.186	0.006	0.482
7	1.233	1.375	1.382	1.330	0.069	5.162
8	1.167	1.321	1.344	1.277	0.079	6.152
9	1.148	1.230	1.064	1.147	0.068	5.907
空白	1.263	1.299	1.238	1.267	0.025	1.977

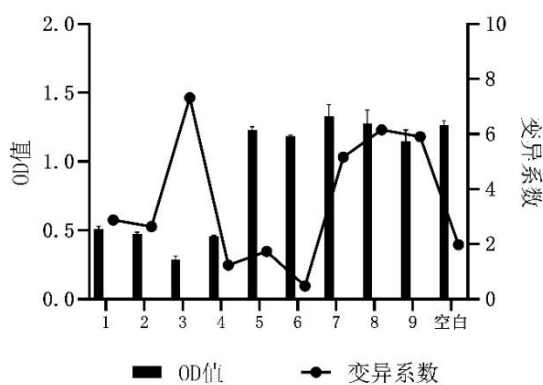


图 4-10 批内试验
Table 4-10 Intra-batch test

4.3.10 临界值的确定

分别根据牛和羊的血清阻断率做 ROC 曲线，确定 Cut-off 值，其中牛血清 Cut-off 值为 4.079，羊血清 Cut-off 值为 4.013，二者符合率较高。为了便于试剂盒的判定，当阻断率高于 4.0 时判定为阳性，低于 4.0 时判定为阴性。对 265 份阴性血清和 35 份阳性血清的阻断率进行分析，利用 GraphPad Prism 软件绘制 ROC 曲线，并计算灵敏度和特异性，灵敏度为 88.57%，特异性为 98.5%，AUC 为 0.9839，总 Cut-off 值为 4.156。

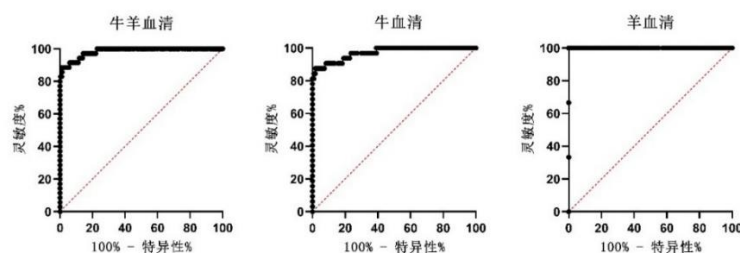


图 4-11 ROC 曲线
Figure 4-11 ROC curve

4.3.11 血清的测定结果

对背景清晰的 31 份免疫牛场血清和 35 份自然感染血清，分别用微量凝集试验和本研究建立的阻断法 ELISA 进行检测，其中微量凝集试验检出 24 份自然感染血清，5 份免疫血清，建立的阻断 ELISA 检出 20 份自然感染血清，3 份免疫血清。对阻断 ELISA 与微量凝集试验的符合率进行计算，符合率均较高，检测结果见表 4-15。因此，建立的阻断 ELISA 可代替微量凝集试验，有效检测野毒血清，而对免疫血清基本不能检测，可以用于免疫养殖场中布鲁氏菌野毒感染的检测。

表 4-16 血清测定结果
Table 4-16 Determination results of serum

	自然感染血清 Natural infection serum	免疫血清 Immune sera
样品总数	35	31
微量凝集试验	24	5
本研究建立的阻断 ELISA	20	3
符合率	88.57%	93.55%

4.4 讨论

虎红平板凝集试验和试管凝集试验的主要缺点是特异性不高，抗体有与其它革兰氏阴性菌发生交叉反应的可能(K. Karthik, et al, 2014)。王维(2022)等对 87 份羊血清的虎红平板凝集试验、试管凝集试验、竞争法酶联免疫吸附试验和布病抗体快速检测试剂卡的结果进行比较，发现竞争法 ELISA 的特异性可以达到 100%，是几种血清学检测方法中最优的(王维等, 2022)。Nannan Xu(2020)等通过对 235 例阳性患者分别进行细菌培养、凝集试验和 ELISA，其中 ELISA 可以检出率达 98.7%、凝集试验 63.8%、细菌培养仅 21.7%，ELISA 在疾病各个分期都有最高的阳性率(Xu, et al, 2020)。莫茜(2021)等通过对 180 多份血清的试管凝集试验、竞争法 ELISA 和高敏荧光检测方法结果进行比较，发现竞争法 ELISA 假阳性率和假阴性率都比其它两种方法低，一致率、Kappa 值和敏感性均比其它两种方法高(莫茜等, 2021)。竞争法 ELISA 是我国现行国标推荐的方法。

本研究用纯化得到的 Dps 蛋白免疫小鼠，获得小鼠多克隆抗体，以该多克隆抗体为基础建立阻断 ELISA 检测方法。由于小鼠多克隆抗体为目的蛋白免疫后获得，与蛋白结合力强，因此在建立阻断法 ELISA 时，先使用其它种属布鲁氏菌血清与 Dps 蛋白反应，阻断完成后再用免疫后获得的小鼠多克隆抗体去结合剩余的结合位点，选择兔抗小鼠二抗。验证实验结果时，若其它种属布鲁氏菌血清为阳性，经过阻断后，测得的 OD 值较低，反之则高。

建立阻断 ELISA 检测方法时，首先采用方阵试验确定蛋白包被浓度和小鼠多克隆

抗体稀释倍数, 分别对 5.0 $\mu\text{g/mL}$ 、2.5 $\mu\text{g/mL}$ 、1.0 $\mu\text{g/mL}$ 、500 ng/mL 和 100 ng/mL 浓度的蛋白和 1:200、1:400、1:600、1:800 和 1:1000 稀释的小鼠多克隆抗体做交叉方阵, 对 3 次重复试验得到的 P/N 结果进行统计学分析, 分析其变异系数, 选取变异系数最低, 相对稳定的条件进行下一步试验。经过分析, 蛋白包被浓度为 1.0 $\mu\text{g/mL}$ 、血清 600 倍稀释时, 条件较为稳定, 以此条件为基础, 进行封闭液和二抗稀释倍数的方阵试验。选择实验室常用的几种封闭液: 5% 脱脂奶粉、1% BSA、5% 马血清和 1% 明胶与二抗 1:2000、1:4000、1:6000、1:8000 稀释做交叉方阵试验, 经统计学分析后, 选择 5% 脱脂奶粉封闭, 二抗 1:2000 稀释的条件。在以上选出的最优条件的基础上再对包被时间和封闭时间、小鼠多克隆抗体反应时间以及显色时间进行优化选择。选出包被 1.5 h, 小鼠多克隆抗体反应 1.0 h, 显色 10 min 为最优条件。至此, 最优条件为蛋白包被 1.0 $\mu\text{g/mL}$, 包被时间 1.5 h, 5% 脱脂奶封闭, 封闭时间 1.0 h, 小鼠多克隆抗体 600 倍稀释, 血清反应 1.0 h, 二抗 1:2000 稀释, 反应 30 min, 避光显色 10 min。然后用标准布鲁氏菌阳性血清去阻断抗原结合位点, 对血清稀释倍数和血清反应时间进行优化, 并对阻断结果进行统计学分析, 最终确定血清直接加原液, 反应 30 min 为最优条件。

本研究建立的阻断 ELISA 检测方法, 相比于传统虎红平板凝集试验有更高的准确性和特异性, 相比于凝集试验, 其操作时间更短, 一次性检测样本数更多。本研究使用牛/羊多抗阻断小鼠多抗, 阻断时不一定能将多抗所有抗体结合位点均与蛋白结合。假设该特异性小鼠多克隆抗体在 Dps 蛋白上原本有 10 个结合位点, 先用牛/羊的血清结合 Dps 蛋白, 若其中有 7 个结合位点与牛/羊血清中的抗体结合, 则小鼠多克隆抗体只剩 3 个结合位点, 兔抗小鼠 IgG 中针对特定抗体的量也是有限的, 随着小鼠多克隆抗体结合位点的降低, 二抗与剩余结合位点的结合率也随之降低, 体现在结果中则显示被阻断, 用多抗阻断多抗, 阻断率更高, 但本研究建立的检测方法可能会出现不能阻断的情况, 容易造成假阴性。如果采用单抗针对特定的结合位点结合的方式, 则需要花费大量时间筛选单抗, 筛选出的单抗也会出现部分血清没有该单抗结合位点的情况, 实际为阳性的样品可能会被判断为阴性, 则会出现漏检的情况。如果建立表达蛋白的单克隆抗体, 则检测的特异性和灵敏度更高。但本研究建立的检测方法操作简单, 因此本研究建立的检测方法优缺点并存。理论上, 本研究建立的阻断 ELISA 检测方法可用于检测多种不同动物的布鲁氏菌抗体, 但由于样品采集的限制, 仅对牛、羊血清中的布鲁氏菌抗体进行了检测, 表现出良好的效果。对猪、鹿等其它动物布鲁氏菌抗体的检测, 以后尚需进行检测分析。

4.5 小结

建立的阻断 ELISA 方法，灵敏度为 88.57%，特异性为 98.5%，可以检测免疫场内的野毒感染动物。通过对 ELISA 各阶段反应条件进行优化，选取最优条件，成功建立了布鲁氏菌自然感染抗体的阻断 ELISA 检测方法。

结 论

1.生信分析，Dps 蛋白不存在信号肽，不在跨膜区，抗原性较好，同源性高、保守性强、免疫原性高，且为 12 聚体。

2.成功构建 pET-28a-Dps 重组表达载体，表达纯化后免疫小鼠，获得高滴度的多克隆抗体。

3.成功建立了布鲁氏菌自然感染抗体的阻断 ELISA 检测方法，该方法具有良好的特异性、敏感性和稳定性。

参考文献

1. 林金安. 2000. 生物信息学简介. 生物学教学. (7): 43.
2. 朱杰. 2005. 生物信息学的研究现状及其发展问题的探讨. 生物信息学. 3(4): 185-188.
3. 韦雪芳, 王冬梅, 刘思, 周鹏. 2006. 信号肽及其在蛋白质表达中的应用. 生物技术通报. (6): 38-42.
4. 陆承平等. 2013. 兽医微生物学 第5版. 中国农业出版社. : 149-152.
5. 左玉柱, 王增利, 路广计, 王振来, 郑丽丽. 2014. 牛布鲁氏菌 BP26 间接 ELISA 检测方法的建立. 中国预防兽医学报. 36(3): 223-226.
6. 于博. 布鲁氏菌重组酶聚合酶扩增(RPA)检测方法的建立与评价. 预防兽医学. ,2020.
7. 阿斯马热·马合木提, 郭刚, 包建玲, 张文宝. 2021. 布鲁氏菌 S-2 与 S-19 株提取的脂多糖在人布鲁氏菌病诊断抗原中的应用. 食品安全质量检测学报. 12(1): 298-302.
8. 杜淑清, 王芳蕊. 2021. 布鲁氏菌病的流行特点及综合防控策略. 天津农林科技. (4): 40-41,44.
9. 郝海水, 王斌, 张秀芬, 刘增加. 2021. 布鲁氏菌病的防治研究进展. 中华卫生杀虫药械. 27(4): 366-370.
10. 蒙晓雷, 崔捷. 2021. 人畜共患布鲁氏菌病的危害与防治. 畜牧兽医科技信息. (6): 51.
11. 莫茜, 阳爱国, 郝力力等. 2021. 牛羊不同布鲁氏菌病血清学检测方法的比较. 中国动物保健. 23(8): 109-110.
12. 欧阳志良, 黄添祥, 温蕾. 2021. 布鲁氏菌病实验室检测方法的研究进展. 畜牧兽医科技信息. (9): 11-12.
13. 庞宇, 刘健鹏, 韩海玉等. 2021. 不同风险因素对陕北白绒山羊布鲁氏菌病个体阳性率的影响. 动物医学进展. 42(5): 57-61.
14. 任莹, 郭金利. 2021. 羊布鲁氏菌病及综合防治. 畜牧兽医科技信息. (12): 69.
15. 孙天浩, 马忠臣, 张欢等. 2021. 家畜布鲁氏菌病相关疫苗的研究进展. 现代畜牧兽医. (7): 80-86.
16. 王刚, 范伟兴, 刘坤, 田丽华, 温建新. 2021. 布鲁氏菌病血清学检测方法优缺点对比. 中国动物检疫. 38(5): 72-75.
17. 谢晓英. 2021. 关于牛羊布鲁氏菌病的流行与防控措施. 畜禽业. 32(7): 139,141.
18. 姜子昕, 兰邹然, 邢林林等. 2022. 家畜布鲁氏菌病诊断方法与综合防控研究进展. 山东畜牧兽医. 43(12): 86-89.
19. 孙天浩, 关飞虎, 张倩等. 2022. 基于布鲁氏菌 Dps 蛋白间接 ELISA 检测方法的建立与初

- 步应用. 中国兽医科学. 52(2): 143-151.
20. 王维, 沈艳, 范亚楠等. 2022. 布鲁氏菌病不同血清学检测方法的比较. 中国畜禽种业. (7): 52-54.
 21. 叶俊贤, 冯宇, 陈瑞爱, 丁家波. 2017. 布鲁氏菌 S19 疫苗应用及研究进展. 中国兽药杂志. 51(5): 62-67.
 22. Van Aert A, Brioen P, Dekeyser P, Uytterhaegen L, Sijens RJ, Boeyé A. 1984. A comparative study of ELISA and other methods for the detection of Brucella antibodies in bovine sera. Vet Microbiol. 10(1): 13-21.
 23. Conde-Álvarez R, Arce-Gorvel V, Iriarte M, et al. 2012. The lipopolysaccharide core of Brucella abortus acts as a shield against innate immunity recognition. PLoS Pathog. 8(5): e1002675.
 24. Gao G, Wang Y, Chen Z, Xu X, Xu J. 2013. Brucella virulence mechanisms and implications in novel vaccines and drugs. Crit Rev Eukaryot Gene Expr. 23(1): 49-64.
 25. Karthik K, Rathore R, Thomas P, et al. 2014. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) test for specific and rapid detection of Brucella abortus in cattle. Vet Q. 34(4): 174-179.
 26. Wang JY, Wu N, Liu WH, et al. 2014. A repA-based ELISA for discriminating cattle vaccinated with Brucella suis 2 from those naturally infected with Brucella abortus and Brucella melitensis. Mol Cell Probes. 28(5-6): 251-254.
 27. Li Z, Zhang J, Zhang KE, et al. 2015. Brucella melitensis 16MΔTcfSR as a potential live vaccine allows for the differentiation between natural and vaccinated infection. Exp Ther Med. 10(3): 1182-1188.
 28. Byndloss MX, Tsolis RM. 2016. Brucella spp. Virulence Factors and Immunity. Annu Rev Anim Biosci. 4: 111-127.
 29. Nan W, Zhang Y, Tan P, et al. 2016. A rapid cycleave PCR method for distinguishing the vaccine strain Brucella abortus A19 in China. J Vet Diagn Invest. 28(3): 214-218.
 30. Głowacka P, Żakowska D, Naylor K, Niemcewicz M, Bielawska-Drózd A. 2018. Brucella - Virulence Factors, Pathogenesis and Treatment. Pol J Microbiol. 67(2): 151-161.
 31. Gumaa MM, Cao X, Li Z, et al. 2019. Establishment of a recombinase polymerase amplification (RPA) assay for the detection of Brucella spp. Infection. Mol Cell Probes. 47: 101434.
 32. Greenfield EA. 2020. Repetitive Immunization at Multiple Sites (RIMMS) of Mice, Rats, and Hamsters. Cold Spring Harb Protoc. 2020(5): 100313.
 33. Gumaa MM, Li Z, Cao X, et al. 2020. Specific Detection and Differentiation Between Brucella

- melitensis and *Brucella abortus* by a Duplex Recombinase Polymerase Amplification Assay. *Front Vet Sci.* 7: 539679.
34. Xu N, Wang W, Chen F, Li W, Wang G. 2020. ELISA is superior to bacterial culture and agglutination test in the diagnosis of brucellosis in an endemic area in China. *BMC Infect Dis.* 20(1): 11.
35. Li R, Liu W, Yin X, et al. 2021. *Brucella* spp. Omp25 Promotes Proteasome-Mediated cGAS Degradation to Attenuate IFN- β Production. *Front Microbiol.* 12: 702881.
36. Shirdast H, Ebrahimzadeh F, Taramchi AH, et al. 2021. Recombinant *Lactococcus Lactis* Displaying Omp31 Antigen of *Brucella melitensis* Can Induce an Immunogenic Response in BALB/c Mice. *Probiotics Antimicrob Proteins.* 13(1): 80-89.
37. von Bargen K, Gorvel JP, Salcedo SP. 2012. Internal affairs: investigating the *Brucella* intracellular lifestyle. *FEMS Microbiol Rev.* 36(3): 533-562.
38. de Figueiredo P, Ficht TA, Rice-Ficht A, Rossetti CA, Adams LG. 2015. Pathogenesis and immunobiology of brucellosis: review of *Brucella*-host interactions. *Am J Pathol.* 185(6): 1505-1517.
39. de la Garza-García JA, Ouahrani-Bettache S, Lyonnais S, et al. 2021. Comparative Genome-Wide Transcriptome Analysis of *Brucella suis* and *Brucella microti* Under Acid Stress at pH 4.5: Cold Shock Protein CspA and Dps Are Associated With Acid Resistance of *B. microti*. *Front Microbiol.* 12: 794535.
40. Cloeckaert A, Verger JM, Grayon M, Grépinet O. 1995. Restriction site polymorphism of the genes encoding the major 25 kDa and 36 kDa outer-membrane proteins of *Brucella*. *Microbiology (Reading).* 141 (Pt 9): 2111-2121.
41. Cloeckaert A, Verger JM, Grayon M, Vizcaíno N. 1996. Molecular and immunological characterization of the major outer membrane proteins of *Brucella*. *FEMS Microbiol Lett.* 145(1): 1-8.
42. Paquet JY, Diaz MA, Genevrois S, et al. 2001. Molecular, antigenic, and functional analyses of Omp2b porin size variants of *Brucella* spp. *J Bacteriol.* 183(16): 4839-4847.
43. Cloeckaert A, Vizcaíno N, Paquet JY, Bowden RA, Elzer PH. 2002. Major outer membrane proteins of *Brucella* spp.: past, present and future. *Vet Microbiol.* 90(1-4): 229-247.
44. Gorvel JP, Moreno E. 2002. *Brucella* intracellular life: from invasion to intracellular replication. *Vet Microbiol.* 90(1-4): 281-297.
45. Moreno E, Cloeckaert A, Moriyón I. 2002. *Brucella* evolution and taxonomy. *Vet Microbiol.* 90(1-4): 209-227.

46. Celli J, Gorvel JP. 2004. Organelle robbery: Brucella interactions with the endoplasmic reticulum. *Curr Opin Microbiol.* 7(1): 93-97.
47. Delrue RM, Lestrade P, Tibor A, Letesson JJ, De Bolle X. 2004. Brucella pathogenesis, genes identified from random large-scale screens. *FEMS Microbiol Lett.* 231(1): 1-12.
48. Al Dahouk S, Tomaso H, Prenger-Berninghoff E, Splettstoesser WD, Scholz HC, Neubauer H. 2005. Identification of brucella species and biotypes using polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP). *Crit Rev Microbiol.* 31(4): 191-196.
49. García-Yoldi D, Marín CM, López-Goñi I. 2005. Restriction site polymorphisms in the genes encoding new members of group 3 outer membrane protein family of Brucella spp. *FEMS Microbiol Lett.* 245(1): 79-84.
50. Delpino MV, Cassataro J, Fossati CA, Goldbaum FA, Baldi PC. 2006. Brucella outer membrane protein Omp31 is a haemin-binding protein. *Microbes Infect.* 8(5): 1203-1208.
51. Al Dahouk S, Scholz HC, Tomaso H, et al. 2010. Differential phenotyping of Brucella species using a newly developed semi-automated metabolic system. *BMC Microbiol.* 10: 269.
52. Ficht T. 2010. Brucella taxonomy and evolution. *Future Microbiol.* 5(6): 859-866.
53. Barbier T, Nicolas C, Letesson JJ. 2011. Brucella adaptation and survival at the crossroad of metabolism and virulence. *FEBS Lett.* 585(19): 2929-2934.
54. O'Callaghan D, Whatmore AM. 2011. Brucella genomics as we enter the multi-genome era. *Brief Funct Genomics.* 10(6): 334-341.
55. Wattam AR, Inzana TJ, Williams KP, et al. 2012. Comparative genomics of early-diverging Brucella strains reveals a novel lipopolysaccharide biosynthesis pathway. *mBio.* 3(5): e00246-00211.
56. Ali S, Ali Q, Melzer F, et al. 2014. Isolation and identification of bovine Brucella isolates from Pakistan by biochemical tests and PCR. *Trop Anim Health Prod.* 46(1): 73-78.
57. Olsen SC, Palmer MV. 2014. Advancement of knowledge of Brucella over the past 50 years. *Vet Pathol.* 51(6): 1076-1089.
58. Wang Y, Wang Z, Zhang Y, et al. 2014. Polymerase chain reaction-based assays for the diagnosis of human brucellosis. *Ann Clin Microbiol Antimicrob.* 13: 31.
59. Elfaki MG, Alaidan AA, Al-Hokail AA. 2015. Host response to Brucella infection: review and future perspective. *J Infect Dev Ctries.* 9(7): 697-701.
60. Sheehan LM, Budnick JA, Roop RM 2nd, Caswell CC. 2015. Coordinated zinc homeostasis is essential for the wild-type virulence of Brucella abortus. *J Bacteriol.* 197(9): 1582-1591.
61. Nymo IH, Arias MA, Pardo J, et al. 2016. Marine Mammal Brucella Reference Strains Are

- Attenuated in a BALB/c Mouse Model. *PLoS One*. 11(3): e0150432.
62. Ronneau S, Moussa S, Barbier T, et al. 2016. *Brucella*, nitrogen and virulence. *Crit Rev Microbiol*. 42(4): 507-525.
 63. Sidhu-Muñoz RS, Sancho P, Vizcaíno N. 2016. *Brucella ovis* PA mutants for outer membrane proteins Omp10, Omp19, SP41, and BepC are not altered in their virulence and outer membrane properties. *Vet Microbiol*. 186: 59-66.
 64. Soler-Lloréns PF, Quance CR, Lawhon SD, et al. 2016. A *Brucella* spp. Isolate from a Pac-Man Frog (*Ceratophrys ornata*) Reveals Characteristics Departing from Classical Brucellae. *Front Cell Infect Microbiol*. 6: 116.
 65. Wareth G, Melzer F, Neubauer H. 2017. In *Brucella*: Selective pressure may turn some genes on instead of default off position. *Med Hypotheses*. 103: 29-31.
 66. Mesureur J, Arend S, Cellière B, et al. 2018. A MALDI-TOF MS database with broad genus coverage for species-level identification of *Brucella*. *PLoS Negl Trop Dis*. 12(10): e0006874.
 67. Amraei F, Narimisa N, Sadeghi Kalani B, Mohammadzadeh R, Lohrasbi V, Masjedani Jazi F. 2020. The expression of type II TA system genes following exposure to the sub-inhibitory concentration of gentamicin and acid stress in *Brucella* spp. *Microb Pathog*. 144: 104194.
 68. Christoforidou S, Kyritsi M, Boukouvala E, et al. 2020. Identification of *Brucella* spp. isolates and discrimination from the vaccine strain Rev.1 by MALDI-TOF mass spectrometry. *Mol Cell Probes*. 51: 101533.
 69. Eisenberg T, Schlez K, Fawzy A, et al. 2020. Expanding the host range: infection of a reptilian host (*Furcifer pardalis*) by an atypical *Brucella* strain. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 113(10): 1531-1537.
 70. Jacob J, Finke A, Mielke M. 2020. Survival of *Brucella abortus* S19 and other *Brucella* spp. in the presence of oxidative stress and within macrophages. *Folia Microbiol (Praha)*. 65(5): 879-894.
 71. Machelart A, Willemart K, Zúñiga-Ripa A, et al. 2020. Convergent evolution of zoonotic *Brucella* species toward the selective use of the pentose phosphate pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 117(42): 26374-26381.
 72. Paul S, Peddayelachagiri BV, Gogoi M, et al. 2020. Genome-wide unique insertion sequences among five *Brucella* species and demonstration of differential identification of *Brucella* by multiplex PCR assay. *Sci Rep*. 10(1): 6368.
 73. Fiebig A, Vrentas CE, Le T, et al. 2021. Quantification of *Brucella abortus* population structure in a natural host. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 118(11).

74. Girard V, Monnin V, Giraud D, et al. 2021. Multicenter evaluation of the VITEK MS matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry system for identification of bacteria, including *Brucella*, and yeasts. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 40(9): 1909-1917.
75. Roop RM 2nd, Barton IS, Hoppersberger D, Martin DW. 2021. Uncovering the Hidden Credentials of *Brucella* Virulence. *Microbiol Mol Biol Rev*. 85(1).
76. Socorro Ruiz-Palma MD, Avila-Calderón ED, Aguilera-Arreola MG, et al. 2021. Comparative proteomic analysis of outer membrane vesicles from *Brucella suis*, *Brucella ovis*, *Brucella canis* and *Brucella neotomae*. *Arch Microbiol*. 203(4): 1611-1626.
77. Xiong X, Li B, Zhou Z, et al. 2021. The VirB System Plays a Crucial Role in *Brucella* Intracellular Infection. *Int J Mol Sci*. 22(24).
78. El-Husseini DM, Sayour AE, Melzer F, Mohamed MF, Neubauer H, Tammam RH. 2022. Generation and Selection of Specific Aptamers Targeting *Brucella* Species through an Enhanced Cell-SELEX Methodology. *Int J Mol Sci*. 23(11).
79. Elbehiry A, Aldubaib M, Al Rugaie O, et al. 2022. Proteomics-based screening and antibiotic resistance assessment of clinical and sub-clinical *Brucella* species: An evolution of brucellosis infection control. *PLoS One*. 17(1): e0262551.
80. Ntivuguruzwa JB, Kolo FB, Mwikarago EI, van Heerden H. 2022. Characterization of *Brucella* spp. and other abortigenic pathogens from aborted tissues of cattle and goats in Rwanda. *Vet Med Sci*. 8(4): 1655-1663.
81. Greenfield EA. 2020. Standard Immunization of Mice, Rats, and Hamsters. *Cold Spring Harb Protoc*. 2020(3): 100297.
82. Vanaert, P.Brioen, P.Dekeyser, L.Uytterhaegen, R.J.Sijens aAB. 1984. A comparative study of ELISA and other methods for the detection of *Brucella* antibodies in bovine sera .
83. Zhang M, Han X, Liu H, et al. 2013. Inactivation of the ABC transporter ATPase gene in *Brucella abortus* strain 2308 attenuated the virulence of the bacteria. *Vet Microbiol*. 164(3-4): 322-329.
84. Sun MJ, Di DD, Li Y, et al. 2016. Genotyping of *Brucella melitensis* and *Brucella abortus* strains currently circulating in Xinjiang, China. *Infect Genet Evol*. 44: 522-529.
85. Yang J, He C, Zhang H, et al. 2021. Evaluation and Differential Diagnosis of a Genetic Marked *Brucella* Vaccine A19 Δ virB12 for Cattle. *Front Immunol*. 12: 679560.