

## · 基础论著 ·

## 布鲁菌强毒株与疫苗株基因间的比较基因组研究

赵琴<sup>1,3</sup> 李儒贵<sup>1</sup> 刘翔<sup>1</sup> 占国清<sup>1</sup> 杨靖<sup>1,2</sup> 李蓓<sup>2</sup> 谭华炳<sup>1</sup>

**【摘要】目的** 比较我国布鲁菌强毒株与不同疫苗株基因组间的差异, 寻找布鲁菌强毒株及不同种群布鲁菌所特有的基因。**方法** 利用布鲁菌全基因组DNA芯片, 进行牛、羊布鲁菌强毒株及我国常用布鲁菌疫苗株M5株(羊种)、S2株(猪种)、S19株(牛种)和104M株(牛种)间比较基因组学研究, 寻找布鲁菌强毒株及不同种群布鲁菌特有的基因。**结果** 在牛和羊布鲁菌强毒株中共发现263个在所有疫苗株中缺失的基因; 发现BMEII0827-BMEII0849基因片段在牛布鲁菌疫苗株与强毒株中均缺失, 而在羊及猪布鲁菌中能检测到; 在猪布鲁菌疫苗株中比牛、羊布鲁菌缺失了一个BMEII684-BMEII702的基因片段。**结论** 通过DNA芯片比较基因组学的研究, 寻找到布鲁菌强毒株及不同种群布鲁菌所特有的基因, 为布鲁菌致病机制的研究提供了靶标。

**【关键词】** 布鲁菌; 比较基因组; 疫苗; 毒力相关因子

**Comparative genomics between pathogenic strains and vaccines of brucella** Zhao Qin<sup>1,3</sup>, Li Rugui<sup>1</sup>, Liu Xiang<sup>1</sup>, Zhan Guoqing<sup>1</sup>, Yang Jing<sup>1,2</sup>, Li Bei<sup>2</sup>, Tan Huabing<sup>1</sup>. <sup>1</sup>Department of Infectious Diseases, and Lab of Liver Diseases, Renmin Hospital, Hubei University of Medicine, Shiyan 442000, China; <sup>2</sup>Department of Microbiology, Hubei University of Medicine, Shiyan 442000, China; <sup>3</sup>Clinical Laboratory, Fang County People's Hospital, Fangxian 442100, China

Corresponding author: Tan Huabing, Email: renmthb@163.com

**【Abstract】Objective** To compare the genomics between pathogenic strains and vaccines of *Brucella*, and to find the genes which might associated with pathogenesis or the characteristic genes between different species of *Brucella*. **Methods** The full genomics of pathogenic *Brucella*, and the live attenuated vaccines strains M5, S2, S19 and 104M were screened by DNA microarray. **Results** Total of 263 genes were discovered in the pathogenic strains but not in all vaccine strains. The fragment BMEII0827-BMEII0849 was detected in *B. melitensis* and *B. suis* but not in *B. bovis*. In *B. suis*, one fragment BMEII684-BMEII702 founded in *B. melitensis* and *B. bovis* was deleted. **Conclusions** Through the comparative genomic analysis by DNA microarray, the characteristic genes were discovered between different strains of *Brucella* to provided the new targets for the pathogenic study.

**【Key words】** *Brucella*; Comparative genomics; Vaccine; Virulence factor

布鲁菌病是一种在世界范围内广泛流行的, 危害严重的人畜共患疾病<sup>[1]</sup>。近年来, 我国布鲁菌病的发病率超过历史最高水平, 已引起我国政府的高度重视。对布鲁菌致病机制的了解是解决布鲁菌防控中迫切需要解决的理论问题。布鲁菌全基因组测序的完成与DNA芯片的构建为了解布鲁菌致病、寻找新的致病相关因子提供了新手段<sup>[2-3]</sup>。本研究利用布鲁菌全基因组芯片比较布鲁菌牛、羊强毒株与我

国常用的疫苗株M5株(羊种)、S2株(猪种)、S19株(牛种)和104M株(牛种)的全基因组间的差异, 寻找布鲁菌强毒株及不同种布鲁菌所特有的基因, 为发现布鲁菌新的毒力相关因子及种群特有基因, 指导布鲁菌新疫苗的开发提供手段。

## 材料与方法

## 一、材料

1. 菌株: 羊种布鲁菌减毒疫苗株M5, 猪种布鲁菌减毒疫苗株S2, 牛种布鲁菌减毒疫苗株S19购自新疆天康畜牧生物技术股份有限公司。人用布鲁菌疫苗104株羊、牛布鲁菌分离强毒株DNA由军事医学科学院疾病预防控制所提供。

DOI: 10.3877/cma.j.issn.1674-1358.2015.04.028

基金项目: 国家自然科学基金(No. 81441119); 湖北省自然科学基金(No. 2014CFB643)

作者单位: 442000 十堰市, 湖北医药学院附属人民医院感染性疾病科(湖北医药学院肝病研究室、发热疾病研究室)<sup>1</sup>; 442000 十堰市, 湖北医药学院微生物学教研室<sup>2</sup>; 442100 湖北房县, 湖北省房县人民医院检验科

通讯作者: 谭华炳, Email: renmthb@163.com

2. 布鲁菌全基因组芯片: 布鲁菌全基因组芯片由军事医学科学院疾病预防控制中心研制, 整个芯片以马耳他布鲁菌16M(羊, 强毒株)全基因组基因加上流产布鲁菌9-941(牛, 强毒株)中特异性基因组成, 包含3016个布鲁菌基因<sup>[4]</sup>。

3. 主要试剂与设备: 大豆胰蛋白胨购自OXOID公司, DNA提取试剂盒为QIAGEN公司产品。GenePieX 4100A扫描仪及配套图象分析软件为美国AXON公司产品。

## 二、方法

1. 布鲁菌不同菌株及DNA提取: 羊种布鲁菌减毒疫苗株M5, 猪种布鲁菌减毒疫苗株S2, 牛种布鲁菌减毒疫苗株S19, 人用布鲁菌疫苗104株(牛种布鲁菌)及羊、牛布鲁菌分离强毒株在大豆胰蛋白胨肉汤培养至对数期, 离心集菌, 以QIAGEN公司基因组DNA提取试剂盒提取全基因组DNA, 紫外分光光度计确定DNA浓度, -20℃冰箱保存待用。

2. 芯片杂交: 以马耳他布鲁菌16M和流产布鲁菌9-941基因组DNA等量混合物为参照DNA, 分别以各疫苗株及牛、羊强毒株DNA为待检DNA。将待测菌株的基因组DNA与参照DNA配对, 分别以荧光素Cy3、Cy5标记后与芯片杂交, 每菌株重复杂交3次, 芯片扫描仪扫描不同基因点荧光信号值。进行数据分析, 取每个芯片上相应基因的信号比值(待检DNA信号强度/参照DNA荧光信号强度)的均值, 转换得到每个基因的log<sub>2</sub>值。

## 三、数据处理

以-1为Cut-off值鉴定基因的缺失, 即如果某

个基因的荧光比值的log<sub>2</sub>值小于-1, 那么表示该基因在相应菌株基因组中缺失。信号值大于-1则认为相关基因在菌株中存在。对不同菌株中缺失或者特有的基因进行分析与分类, 获得这些差异基因的功能信息。

## 结 果

### 一、布鲁菌强毒株特有的基因

在牛和羊布鲁菌强毒株中共发现263个在所有疫苗株中没有检测到的基因。其中155个为假定基因或功能未知基因, 7个转录调控基因(4个MarR家族, 1个LysR家族, 1个TetR家族, 1个ArsR家族), 其余基因主要参与细菌胞内活动与代谢。

### 二、牛布鲁菌缺失基因

通过芯片杂交及数据分析, 发现BMEI10827-BMEI10849基因片段在牛布鲁菌强度株及疫苗S19、104M株中均未检测到, 而在羊布鲁菌强度株、疫苗株M5及猪布鲁菌疫苗株S2基因组中能够检测到, 详见表1。PCR进行缺失基因验证也证明此片段在牛布鲁菌中缺失, 提示此基因片段可能在牛布鲁菌中特异缺失。此基因片段主要编码能量代谢相关蛋白, 可能与菌株的种属特异性致病相关。

### 三、猪布鲁菌疫苗株缺失的基因

BMEI1688-BMEI1697共含10个基因的DNA片段在牛、羊种布鲁菌均能检测到, 但在猪布鲁菌S2株中未检测到(表2)。此基因片段上BMEI1692基因与细菌鞭毛形成相关, BMEI1691及BMEI1696可能编码膜锚定蛋白, 此基因片段可能编码与细菌特异性黏附相关蛋白。BMEI1697基因编码蛋白与毒力相关。相对于牛、羊布鲁菌, 猪布鲁菌导致母畜流产的比例大大降低, 这个片段的缺失可能与猪布鲁菌致病特性相关。

## 讨 论

布鲁菌病是由布鲁菌引起的能够在人、牛、羊

表1 牛布鲁菌特异性缺失的基因片段

基因编号	基因注释
BMEI0827	十一异戊二烯焦磷酸合成酶
BMEI0828	磷酸胞苷转移酶
BMEI0829	膜金属蛋白酶
BMEI0830	外膜蛋白
BMEI0831	UDP-3 葡萄糖胺 N 酰基转移酶
BMEI0832	脱水酶
BMEI0833	UDP-N- 乙酰转移酶
BMEI0834	假定蛋白
BMEI0835	脂质 A 双糖合成酶
BMEI0836	柠檬酸合成酶
BMEI0837	谷氨酰 -tRNA 合成酶
BMEI0838	come 操纵子蛋白 3
BMEI0839	come 操纵子蛋白 3
BMEI0840	LexA 抑制子
BMEI0841	MOEA 蛋白
BMEI0842	钼辅因子的生物合成的蛋白 C
BMEI0843	吡啶 -3- 甘油磷酸合酶
BMEI0844	邻氨基苯甲酸磷酸核糖基转移酶
BMEI0845	肽酰 - 脯氨酰 - 顺反式异构酶
BMEI0846	磷酸丙糖异构酶
BMEI0847	膜输送蛋白
BMEI0848	肉碱操纵子氧化还原酶
BMEI0849	CTP 合成酶

表2 猪布鲁菌中缺失的基因片段及其功能注释

基因编号	基因注释
BMEI1688	假定蛋白
BMEI1689	假定蛋白
BMEI1690	假定蛋白
BMEI1691	膜锚定蛋白
BMEI1692	鞭毛蛋白
BMEI1693	假定蛋白
BMEI1694	假定蛋白
BMEI1695	假定蛋白
BMEI1696	膜锚定蛋白
BMEI1697	毒力相关蛋白 E
BMEI1698	假定蛋白

和猪中传播的一类人兽共患病。布鲁菌为一类革兰阴性短杆菌,具有9个生物种和21个生物型。近10年来,从世界上不同海域的10余种不同海洋哺乳动物(海豚、海豹和各类鲸鱼等)中均分离到布鲁菌,不同种类布鲁菌大多具有不同宿主间交叉感染的能力,并具有极为明显的宿主危害倾向性<sup>[5-6]</sup>。对于人类,主要导致疾病的是牛、羊、猪布鲁菌。减毒活疫苗株是目前布鲁菌疫苗研究的重点,在世界范围内曾使用的布鲁菌疫苗主要包括RB51株(牛布鲁菌)、S19株(牛布鲁菌)、Rev.1(羊布鲁菌)株、S2株(猪布鲁菌)与M5株(羊布鲁菌)及曾用于人的104M株(牛布鲁菌),不同的布鲁杆菌减毒活疫苗株具有不同的免疫保护范围及不良反应<sup>[7-8]</sup>。其中,S19株是以流产布鲁菌自然减毒的19号菌株制成,曾被广泛的用于牛的接种,但此疫苗株能够感染人引起疾病并且可以造成母畜的流产,对其它动物布鲁菌感染无免疫保护作用。M5株是我国自主研发,将羊布鲁菌强毒株减毒制成,能够对牛、羊起到保护作用,目前我国仍广泛用于牛、羊的预防接种,但同样能够感染人并造成母畜的流产<sup>[7-9]</sup>。S2株免疫保护范围最广泛,对山羊、绵羊、猪、牛、羊布鲁菌均能起到免疫保护作用,而且不会造成母畜的流产,其毒力比S19弱,但是其保护力比S19与M5要低。104M株是从牛流产胎儿中分离出的一株突变毒力减弱株,曾经用于人类的预防接种,但是由于毒力强而停止使用<sup>[7-9]</sup>。因此,比较不同布鲁菌种及强毒株与疫苗株在基因组上的变化将有助于理解布鲁菌感染的宿主特异性及产生不同毒副作用的原因。

本研究通过基因芯片分析了布鲁菌牛、羊强毒株及相关疫苗株的基因组DNA发现,有263个基因只能在强毒布鲁菌中检测到,提示这部分基因可能与细菌的致病性相关。S2疫苗株相比其它疫苗株来说毒力更弱而且不会造成母畜流产,比较基因

组研究发现在猪布鲁菌S2中缺失了一个在牛、羊中布鲁菌的片段,这个片段可能与猪布鲁菌病毒力减弱或者与布鲁菌与动物胎盘滋养层相互作用相关,通过生物信息学分析发现这个片段编码细菌鞭毛类的物质可能与细菌黏附相关,具体需要进一步验证。在牛布鲁菌中相比羊与猪布鲁菌缺失了一个BMEII0827-BMEII0849基因片段,这个基因片段与细菌的糖代谢相关,此基因片段的缺失可能会影响布鲁菌在牛的代谢过程,失去合成与储藏能量的能力,分析可能是因为布鲁菌为胞内寄生菌,这段基因的缺失可能是布鲁菌为适应胞内低养环境而做出的适应性改变。通过DNA芯片比较谱全基因组范围的分析,为了解布鲁菌致病机制提供新的研究靶标。

### 参 考 文 献

- 1 Corbel MJ. *Brucellosis: an overview*[J]. Emerg Infect Dis,1997,3(2):213-221.
- 2 Del Vecchio VG, Kapatral V, Redkar RJ, et al. The genome sequence of the facultative intracellular pathogen *Brucella melitensis*[J]. Proc Natl Acad Sci USA,2002,99(1):443-448.
- 3 Ding J, Pan Y, Jiang H, et al. Whole genome sequences of four *Brucella* strains[J]. J Bacteriol,2011,193(14):3674-3675.
- 4 钟志军,徐杰,于爽,等.布鲁氏菌全基因组DNA芯片研制及比较基因组杂交方法的建立[J].中国兽医科学,2011,41(12):1215-1222.
- 5 Morgan WJ, Corbel MJ. Recommendations for the description of species and biotypes of the genus. *Brucella*[J]. Dev Biol Stand,1976,31:27-37.
- 6 Scholz HC, Hubalek Z, Sedlacek, et al. *Brucella microtisp*. Nov., isolated from the common vole *Microtus arvalis*[J]. Int J Syst Evol Microbiol,2008,58(pt2):375-382
- 7 Montaraz JA, Winter AJ. Comparison of living and nonliving vaccines for *Brucella abortus* in BALB/c mice[J]. Infect Immun,1986,53(2):245-251.
- 8 丁家波,毛开荣,程君生,等.布氏杆菌病疫苗的应用和研究现状[J].微生物学报,2006,46(5):856-859.
- 9 Blasco JM. A review of the use of *B. melitensis* Rev 1 vaccine in adult sheep and goats[J]. Prev Vet Med,1997,31(3-4):275-283.

(收稿日期:2014-11-22)

(本文编辑:孙荣华)

赵琴,李儒贵,刘翔,等.布鲁菌强毒株与疫苗株基因间的比较基因组研究[J/CD].中华实验和临床感染病杂志:电子版,2015,9(4):548-550.