

李志强, 王书利, 朱庆妍, 等. 布氏杆菌分泌蛋白 BspD 真核表达载体的构建及在小鼠巨噬细胞中的表达 [J]. 畜牧与兽医, 2025, 57 (6): 83-91.

LI Z Q, WANG S L, ZHU Q Y, et al. Construction of eukaryotic expression vector of *Brucella* secretory proteins BspD and expression in murine macrophages [J]. Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2025, 57 (6): 83-91.

布氏杆菌分泌蛋白 BspD 真核表达载体的构建及在小鼠巨噬细胞中的表达

李志强^{1,2}, 王书利², 朱庆妍², 蔺秋慧³, 高丰衣², 马亚静²,
齐德重¹, 祝芳¹, 孙婷¹, 解然¹

(1. 商丘医学高等专科学校基础医学教学部, 河南 商丘 476005;

2. 商丘师范学院生物与食品学院, 河南 商丘 476000;

3. 河南师范大学生命科学学院, 河南 新乡 453000)

摘要: 旨在构建布氏杆菌分泌蛋白 BspD 基因的真核表达载体, 研究其在小鼠巨噬细胞 RAW 264.7 中的表达情况。根据 GenBank 公布的牛种布氏杆菌 2308 *bspD* 基因序列进行合成和设计特异性引物, 通过 PCR 获得 *bspD* 基因片段, 并将其克隆至 pcDNA3.1-EGFP 载体, 获得真核表达载体 pcDNA3.1-EGFP-*bspD*; pcDNA3.1-EGFP-*bspD* 经酶切和测序分析鉴定后, 用 Lipofectamine 3000 脂质体转染至小鼠巨噬细胞 RAW 264.7, 采用 Western blot 检测 BspD 蛋白在 RAW 264.7 细胞的表达, 用 ELISA 试剂盒检测细胞上清中细胞因子 γ -干扰素 (IFN- γ) 和白细胞介素-4 (IL-4) 的分泌水平, 利用水溶性四唑盐-1 (WST-1) 细胞毒性检测试剂盒检测细胞毒性水平, 利用细胞活力检测试剂盒-8 (CCK-8) 检测细胞增殖情况, 利用实时荧光定量 PCR (RT-qPCR) 技术检测细胞凋亡基因 Caspase-3 和 Caspase-8 的表达水平。结果: 阳性克隆载体经 PCR 扩增出 936 bp 的 *bspD* 基因片段, 经限制性内切酶 *Kpn* I 和 *Bam* H I 酶切验证正确, 测序分析显示与 GenBank 公布的序列信息同源率为 100%, 表明真核表达载体 pcDNA3.1-EGFP-*bspD* 构建成功; Western blot 检测结果为 pcDNA3.1-EGFP-*bspD* 转染组在 36 kDa 处出现条带, 与预期结果相符, 表明 BspD 蛋白能够在 RAW 264.7 细胞中表达; 细胞因子检测结果显示, BspD 蛋白可诱导 RAW 264.7 细胞分泌辅助型 T 细胞 1 (Th1) 型细胞因子 IFN- γ 和辅助型 T 细胞 2 (Th2) 型细胞因子 IL-4; 细胞毒性检测结果显示, BspD 蛋白对细胞无毒性, BspD 蛋白对细胞增殖和 Caspase-3 和 Caspase-8 的表达无显著影响。综上, 布氏杆菌分泌蛋白 BspD 能够在 RAW 264.7 细胞中表达, 为进一步研究其功能及分子机制提供参考。

关键词: 布氏杆菌; BspD 蛋白; 真核表达; 巨噬细胞

中图分类号: S856.61

文献标志码: A

文章编号: 0529-5130(2025)06-0083-09

Construction of eukaryotic expression vector of *Brucella* secretory proteins BspD and expression in murine macrophages

LI Zhiqiang^{1,2}, WANG Shuli², ZHU Qingyan², LIN Qihui³, GAO Fengyi², MA Yajing²,
QI Dechong¹, ZHU Fang¹, SUN Ting¹, XIE Ran¹

(1. Department of Basic Medicine, Shangqiu Medical College, Shangqiu 476005, China;

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

3. College of Life Sciences, Henan Normal University, Xinxiang 453000, China)

Abstract: This study was to construct a eukaryotic expressive vector of *Brucella bspD* and to express this gene in murine macrophage RAW 264.7 cells. Specific primers were designed based on the sequence information of *Brucella abortus bspD* published in GenBank, and the *bspD* gene was amplified by PCR. Then, the fragment was cloned into a pcDNA3.1-EGFP vector to obtain a eukaryotic vector pcDNA3.1-EGFP-*bspD*. The vector was transfected into murine macrophage RAW 264.7 cells by Lipofectamine 3000 immediately after it was confirmed by enzyme digestion and sequencing analysis. Next, BspD protein expression in RAW 264.7 cells was detected by Western blot. The secretion levels of cytokines gamma interferon (IFN- γ) and interleukin-4 (IL-4) were detected by an ELISA kit, and the level of cytotoxicity was

收稿日期: 2024-06-16; 修回日期: 2025-04-23

基金项目: 商丘医学高等专科学校开放课题 (KFKT23016); 河南省高等学校重点科研项目 (24A230014)

第一作者: 李志强, 男, 博士, 副教授, 主要从事动物传染病致病机理及免疫防治研究, E-mail: lizhiqiangstr@126.com。

detected by a water soluble tetrazolium salt-1 (WST-1) cytotoxicity detection kit. Finally, cell proliferation was detected using a cell counting kit-8 (CCK-8). The expression levels of apoptosis genes cysteinyl aspartate specific proteinase-3 (Caspase-3) and cysteinyl aspartate specific proteinase-8 (Caspase-8) were detected using real-time fluorescence quantitative PCR (RT-qPCR). The results showed that a 936 bp *bspD* gene fragment was amplified by PCR from the positive cloning vector. The positive cloning vector was verified by restriction enzyme *Kpn* I and *Bam*H I digestion. The sequencing analysis showed that the homology of the gene was 100% with the sequencing information published in GenBank. These results indicated that a eukaryotic expression vector pcDNA3.1-EGFP-*bspD* was successfully constructed in this study. The WB detection results showed that the transfection group of pcDNA3.1-EGFP-*bspD* displayed bands at 36 kDa, which was completely consistent with the expected results, indicating that BspD protein could be expressed in RAW 264.7 cells. The cytokines test results showed that BspD protein could induce RAW 264.7 cells to secrete Th1 cytokine IFN- γ and Th2 cytokine IL-4. BspD protein was non-toxic to RAW 264.7 cells, and it had no significant effect on cell proliferation. The Caspase-3 and Caspase-8. *Brucella* secreted protein BspD could be expressed in RAW 264.7 cells. This finding provided reference for further research on the function and molecular mechanism of BspD.

Keywords: *Brucella*; BspD protein; eukaryotic expression; macrophage

布氏杆菌 (*Brucella*) 感染, 又称布氏杆菌病 (Brucellosis) 或布鲁氏菌病, 是一种全球范围内普遍存在的疾病, 对人类和动物都有严重影响^[1]。人体感染该病毒, 症状包括反复发热、关节疼痛、肝脏和脾脏肿大, 并且可能伴随其他更严重的副作用, 如脊椎炎症、心脏瓣膜病变、肺部积液, 以及肾脏损伤等, 甚至会导致患者失去工作能力^[2-6]。公畜感染后主要引起睾丸炎和附睾炎, 母畜主要表现为流产和不孕^[7]。因此, 布氏杆菌病给公共卫生和畜牧业造成重大威胁和经济损失。布氏杆菌是一种革兰阴性细菌, 同时也是一种能在细胞内寄生的病原微生物, 其主要寄生于巨噬细胞、树突状细胞和胚胎滋养层细胞^[8]。此外, 其他几种细胞, 如上皮细胞、人白血病单核细胞、破骨细胞、脑微血管内皮细胞和肝星状细胞等也易受布氏杆菌感染。

细胞凋亡是正常组织发育过程中调节组织质量和结构的重要生理过程^[9]。细胞凋亡是一种活跃的细胞死亡形式, 具有多种形态和生化特征^[10]。研究发现, 土拉杆菌能够诱导小鼠巨噬细胞凋亡^[11], 布氏杆菌也能调节巨噬细胞的凋亡^[12]。细胞凋亡在调节一系列重要的细胞生命活动中起着至关重要的作用。Caspase-3 和 Caspase-8 是凋亡反应的关键调控因子, 它们在疾病过程中与半胱氨酸蛋白酶 calpain 家族相互作用^[13]。Caspase-3 和 Caspase-8 在凋亡的死亡受体通路中被激活, Caspase-3 和 Caspase-8 的过表达可增强细胞的凋亡活性^[14]。

IV型分泌系统 (T4SS)、双组份系统 (TCS) 和密度感应系统 (QS) 等与布氏杆菌的毒力密切相关^[15-17]。T4SS 是一个由 12 个蛋白组成的复合物, 由 *VirB* 操纵子编码, 该系统能够将布氏杆菌的效应蛋白转运至受感染的宿主细胞中, 从而调控布氏杆菌适应胞内环境, 利于生存^[18]。目前, 应用 TEM-1 β -内酰胺酶 (TEM-1) 报告系统和钙调蛋白依赖的腺

苷酸环化酶 (CyaA) 报告系统筛选出 15 种通过 T4SS 分泌的效应蛋白^[18], 分别是 VceA、VceC、RicA、BtpA、BtpB、BspA、BspB、BspC、BspE、BspF、SepA、BPE005、BPE275、BPE043 以及 BPE123。布氏杆菌中还有一类不依赖 T4SS 分泌的效应蛋白, 如 BspD、BspG、BspH、BspI、BspJ、BspK 等^[19]。BspD 蛋白定位于细胞的内质网中^[20], 但其具体功能尚不清楚。鉴于此, 本研究以布氏杆菌分泌蛋白 BspD 为靶标, 通过构建真核表达载体, 转染巨噬细胞, 分析其表达和活性, 为进一步研究 BspD 的功能奠定基础。

1 材料与方法

1.1 载体和细胞

pcDNA3.1-EGFP 载体购自 Invitrogen 公司; DH5 α 超级感受态细胞购自碧云天生物技术有限公司; T-Vector pMDTM 19 (Simple) 购自 TaKaRa 公司; 小鼠巨噬细胞 RAW 264.7 由本实验室保存。

1.2 主要试剂

连接试剂盒 DNA Ligation Kit Ver. 2.1、Quick CutTM *Kpn* I 和 *Bam*H I 限制酶购自 TaKaRa 公司; Lipofectamine 3000 脂质体购自美国 Invitrogen 公司; BspD 重组蛋白免疫小鼠多克隆抗体由本实验室保存。辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的山羊抗鼠 IgG (H+L) 购自美国 Bioworld 公司; 小鼠 γ -干扰素 (IFN- γ) 和白细胞介素-4 (IL-4) 细胞因子酶联免疫吸附试验 (ELISA) 检测试剂盒均购自美国 R&D Systems 公司; 水溶性四唑盐-1 (WST-1) 细胞毒性检测试剂盒和细胞活力检测试剂盒-8 (CCK-8) 购自碧云天生物技术有限公司。

1.3 *bspD* 基因的引物设计与 PCR 扩增

根据布氏杆菌 S2308 的 *bspD* (BAB1_1611) 基因序列, 采用 Primer Premier 5.0 设计引物, 引物上

游和下游含有 *Kpn* I 和 *Bam*H I 酶切位点 (表 1)。该基因片段和引物由上海生工生物工程有限公司合成。

以合成后的 *bspD* 基因片段为模板, 使用 *bspD*-F 和 *bspD*-R 引物对 *bspD* 基因进行 PCR 扩增。经过 1.5% 琼脂糖凝胶电泳对 PCR 样品进行分析后, 从凝胶中分离出目标序列。将获得的序列与 T Vector pMD™ 19 (Simple) 连接, 并将其转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞。随后挑取单克隆菌, 在含有氨苄西林 (Amp⁺) 的 LB 培养基中进行培养, 再利用 PCR 技术对其进行筛选。最后, 提取阳性菌的质粒, 使用 *Kpn* I 和 *Bam*H I 进行酶切鉴定。将鉴定正确的质粒命名为 pMD-*bspD*, 送上海生工生物工程有限公司测序。

表 1 本研究所用的引物序列

引物名称	引物序列 (5'→3')	产物大小/bp
<i>bspD</i> -F	<u>GGTACCTGATTCAATCCGCTCTCTTT</u>	936
<i>bspD</i> -R	<u>GGATCCCTATTGCATGTCGCGGAT</u>	
Caspase-3-RT-F	TTCCACGCAAAGAAACAGAT	170
Caspase-3-RT-R	GGAGGACCGTCAGATTAGAT	
Caspase-8-RT-F	TATTGAGGGACATCTGGGTTT	184
Caspase-8-RT-R	AAATCACTCTGGCGGTTT	
β -actin-RT-F	CAATAGTGATGACCTGGCCGT	138
β -actin-RT-R	AGAGGAAATCCTGCGTGAC	

注: 上游引物下划线表示 *Kpn* I 酶切位点, 下游引物下划线表示 *Bam*H I 酶切位点; RT 表示荧光定量 PCR 检测引物。

1.4 真核表达载体 pcDNA3.1-EGFP-*bspD* 的构建

利用 *Kpn* I 和 *Bam*H I 酶切 pMD-*bspD* 质粒和 pcDNA3.1-EGFP 载体, 回收酶切后的产物, 连接 pcDNA3.1-EGFP 载体。按上述方法进行转化、筛选、提取质粒和酶切鉴定, 将鉴定正确的质粒命名为 pcDNA3.1-EGFP-*bspD*, 送上海生工生物工程有限公司测序。

1.5 细胞转染

利用 Lipofectamine 3000 脂质体转染试剂盒将 5 μ g 的 pcDNA3.1-EGFP-*bspD* 和 pcDNA3.1-EGFP 质粒转染 RAW 264.7 细胞^[21]。转染后 24 h 后弃掉培养液, PBS 漂洗 3 遍后利用荧光倒置显微镜检测转染效果, 并使用 RAPA 裂解液裂解细胞, 获得细胞总蛋白, 测定蛋白浓度, -20 $^{\circ}$ C 保存。

1.6 Western blot 检测 BspD 的表达

将细胞总蛋白加热变性后, 进行 SDS-PAGE 分析。电泳结束后, 将目的凝胶切下, 采用半干式电转法, 以 200 mA 的电流在 1 h 内将 BspD 蛋白转印至硝

酸纤维素膜 (NC 膜) 上; 在 37 $^{\circ}$ C 下用含 5% 脱脂奶粉的 5 mL 封闭液封闭 1 h; 用 TBST 清洗膜 3 次, 加入 5 mL 一抗 (BspD 重组蛋白免疫小鼠的血清或免疫前的小鼠血清, 稀释比例为 1:300), 37 $^{\circ}$ C 下孵育 1 h; 用 TBST 清洗膜 3 次, 加入 5 mL 二抗 (HRP 标记的山羊抗鼠 IgG, 稀释比例为 1:2 000), 37 $^{\circ}$ C 下孵育 1 h; 用 TBST 清洗膜 3 次后, 进行显色^[22]。

1.7 细胞毒性检测

利用 WST-1 细胞毒性检测试剂盒测定细胞毒性^[23]。将 RAW 264.7 细胞在 96 孔板中培养至单层, 按 1.5 中的方法转染细胞, 于转染后 12 和 24 h 加入 20 μ L 的 WST-1 溶液, 置于培养箱中继续培养 1 h 后将 96 孔板置轻轻摇动 1 min 充分混匀, 用酶标仪测定 450 nm 处的吸光度。以未转染的细胞作为空白对照组。

1.8 细胞增殖检测

利用 CCK-8 试剂盒测定细胞增殖^[24]。将 RAW 264.7 细胞按每 100 μ L 2 000 个接种于 96 孔板, 每孔加入 100 μ L 的细胞悬液培养至单层, 空白对照孔加入 100 μ L 的 PBS。按 1.5 中的方法转染细胞, 于转染后 12 和 24 h 加入 10 μ L 的 CCK-8 溶液, 置于培养箱中继续培养 4 h 后, 用酶标仪测定 450 nm 处的吸光度。

1.9 细胞因子检测

按 1.5 中的方法转染 RAW 264.7 细胞, 分别在转染后 12 和 24 h 收集细胞培养液, 培养液经 0.22 μ m 的滤膜过滤后, 检测细胞因子水平^[25]。

1.10 BspD 蛋白对细胞凋亡相关基因表达的影响

按 1.5 中的方法转染细胞, 于转染后 12 和 24 h 后弃去上清液, 用 PBS 漂洗细胞 3 次, 加入 1 mL TRIzol 裂解液裂解细胞, 利用 RNA 提取试剂盒提取 RNA, 经 Nanodrop 2000C 分光光度计测定 RNA 浓度后, 利用反转录试剂盒, 将 RNA 反转录成 cDNA。利用 RT-qPCR 技术, 分析 Caspase-3 和 Caspase-8 两个凋亡相关基因的 mRNA 相对表达水平, 在计算相对表达量时采用 β -actin 作为内参基因, 并使用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法^[26]。

1.11 数据统计与分析

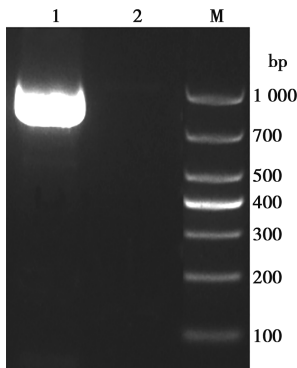
试验数据使用 SPSS 26.0 软件进行单因素方差分析 (One-way ANOVA), 试验结果以“平均值 \pm 标准差”表示, 以 $P < 0.05$ 表示差异显著, $P < 0.01$ 表示差异极显著。

2 结果与分析

2.1 *bspD* 基因的 PCR 扩增

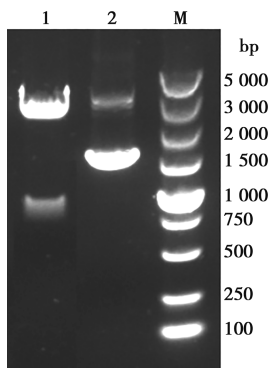
经 PCR 扩增后获得了 936 bp 的 *bspD* 基因片段

(图1), 通过 *Kpn* I 和 *Bam*H I 双酶切和测序鉴定 (图2), 成功构建了 pMD-*bspD* 载体。



1. *bspD* 基因 PCR 产物; 2. 阴性克隆 PCR 产物; M. DNA Marker DL1000。

图1 布氏杆菌 *bspD* 基因的 PCR 扩增

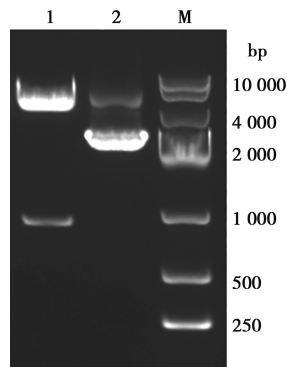


1. 酶切 pMD-*bspD*; 2. 未酶切 pMD-*bspD*; M. DNA Marker DL5000。

图2 重组质粒 pMD-*bspD* 的酶切鉴定

2.2 重组质粒 pcDNA3.1-EGFP-*bspD* 的酶切鉴定

重组质粒 pcDNA3.1-EGFP-*bspD* 经 *Kpn* I 和 *Bam*H I 双酶切和测序鉴定 (图3), 成功构建了 pcDNA3.1-EGFP-*bspD* 真核表达载体。

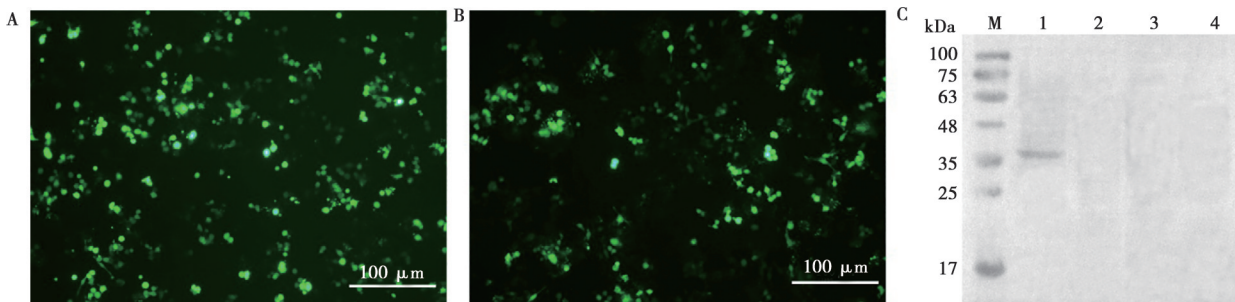


1. 酶切 pcDNA3.1-EGFP-*bspD*; 2. 未酶切 pcDNA3.1-EGFP-*bspD*; M. DNA Marker DL10000。

图3 重组质粒 pcDNA3.1-EGFP-*bspD* 的酶切鉴定结果

2.3 BspD 蛋白在巨噬细胞中的表达

真核表达载体转染 24 h 后利用荧光倒置显微镜检测发现 pcDNA3.1-EGFP-*bspD* 的试验组 (图4A) 和 pcDNA3.1-EGFP 空载体的对照组 (图4B) 均显示绿色荧光, 表明转染成功。Western blot 分析显示, 转染 pcDNA3.1-EGFP 空载体的对照组未出现特异性条带, 而转染 pcDNA3.1-EGFP-*bspD* 组在 36 kDa 处出现特异性目的条带 (图4C), 表明 BspD 蛋白可以在 RAW 264.7 细胞中表达。



A. pcDNA3.1-EGFP-*bspD* 转染效果; B. pcDNA3.1-EGFP 转染效果; C. Western blot 检测 BspD 蛋白的表达结果, 其中 M 为蛋白 Marker, 1 为 pcDNA3.1-EGFP-*bspD* 载体, 2 为 pcDNA3.1-EGFP 载体, 3 为 pcDNA3.1-EGFP-*bspD* 载体, 4 为 pcDNA3.1-EGFP 载体, 1 和 2 的一抗为 BspD 蛋白免疫小鼠的血清, 3 和 4 的一抗为 BspD 蛋白免疫前小鼠的血清。

图4 质粒转染效果及 BspD 蛋白的表达

2.4 BspD 蛋白对细胞毒性的影响

真核表达载体转染 12 和 24 h 后利用荧光倒置显微镜检测发现 pcDNA3.1-EGFP-*bspD* 和 pcDNA3.1-EGFP 空载体均显示绿色荧光,表明转染成功(图 5A)。细胞毒性检测结果显示,pcDNA3.1-EGFP-*bspD* 和 pcDNA3.1-EGFP 重组质粒转染 12 h 后 OD_{450} 值分别为 1.11 和 1.15,空白对照组为 1.22;

pcDNA3.1-EGFP-*bspD* 和 pcDNA3.1-EGFP 重组质粒转染 24 h 后 OD_{450} 值分别为 1.06 和 1.11,空白对照组为 1.25(图 5B)。随着转染时间的延长, OD_{450} 值略微降低,但各组差异不显著($P>0.05$)。结果表明,pcDNA3.1-EGFP-*bspD* 重组质粒转染细胞后,对细胞无毒性反应。

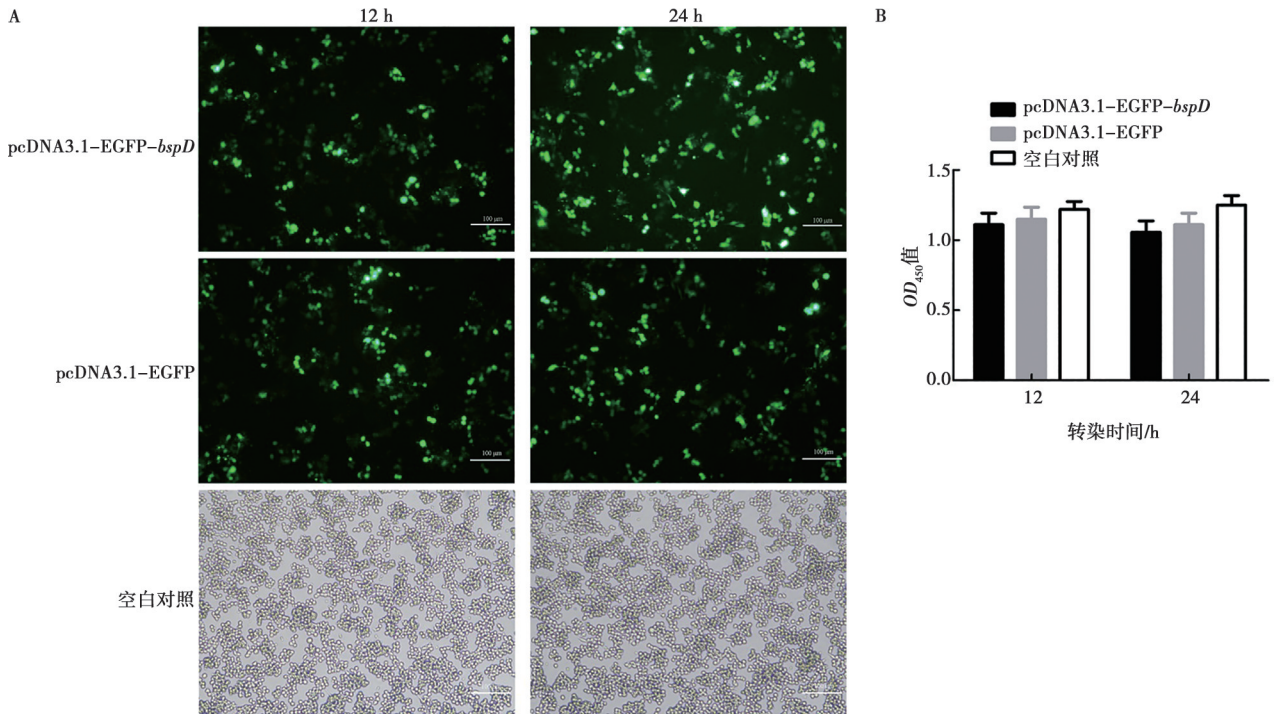


图 5 质粒转染效果 (A) 及 BspD 蛋白对 RAW 264.7 细胞的毒性 (B)

2.5 BspD 蛋白对细胞增殖的影响

真核表达载体转染 12 和 24 h 后利用荧光倒置显微镜检测发现 pcDNA3.1-EGFP-*bspD* 和 pcDNA3.1-EGFP 空载体的均显示绿色荧光,表明转染成功(图 6A)。细胞增殖检测结果显示,pcDNA3.1-EGFP-*bspD* 和 pcDNA3.1-EGFP 重组质粒转染 12 h 后 OD_{450} 值分别为 0.88 和 0.75,空白对照组为 0.69;pcDNA3.1-EGFP-*bspD* 和 pcDNA3.1-EGFP 重组质粒转染 24 h 后 OD_{450} 值分别为 1.28 和 1.17,空白对照组为 1.07(图 6B)。随着转染时间的延长, OD_{450} 值略微升高,但各组差异不显著($P>0.05$)。结果表明,pcDNA3.1-EGFP-*bspD* 重组质粒转染细胞后,对细胞增殖无显著影响。

2.6 BspD 蛋白对细胞因子分泌的影响

图 7 显示,转染重组质粒 pcDNA3.1-EGFP-*bspD*

的细胞上清液中 IFN- γ 和 IL-4 的分泌水平显著高于 pcDNA3.1-EGFP 转染组和空白对照组 ($P<0.01$),重组质粒 pcDNA3.1-EGFP-*bspD* 转染组 Th1 型细胞因子 IFN- γ 的分泌水平与 Th2 型细胞因子 IL-4 的分泌水平相当。结果表明 BspD 蛋白可诱导 RAW 264.7 细胞分泌 Th1 型细胞因子和 Th2 型细胞因子。

2.7 BspD 蛋白对细胞凋亡相关基因表达的影响

由图 8 可知,pcDNA3.1-EGFP-*bspD* 和 pcDNA3.1-EGFP 重组质粒转染 RAW 264.7 细胞 12 h 和 24 h 后,RAW 264.7 细胞中 Caspase-3 和 Caspase-8 的相对表达水平略高于空白对照组,但各组差异不显著 ($P>0.05$)。结果表明,pcDNA3.1-EGFP-*bspD* 重组质粒转染细胞后,对细胞中凋亡相关基因的表达无显著影响。

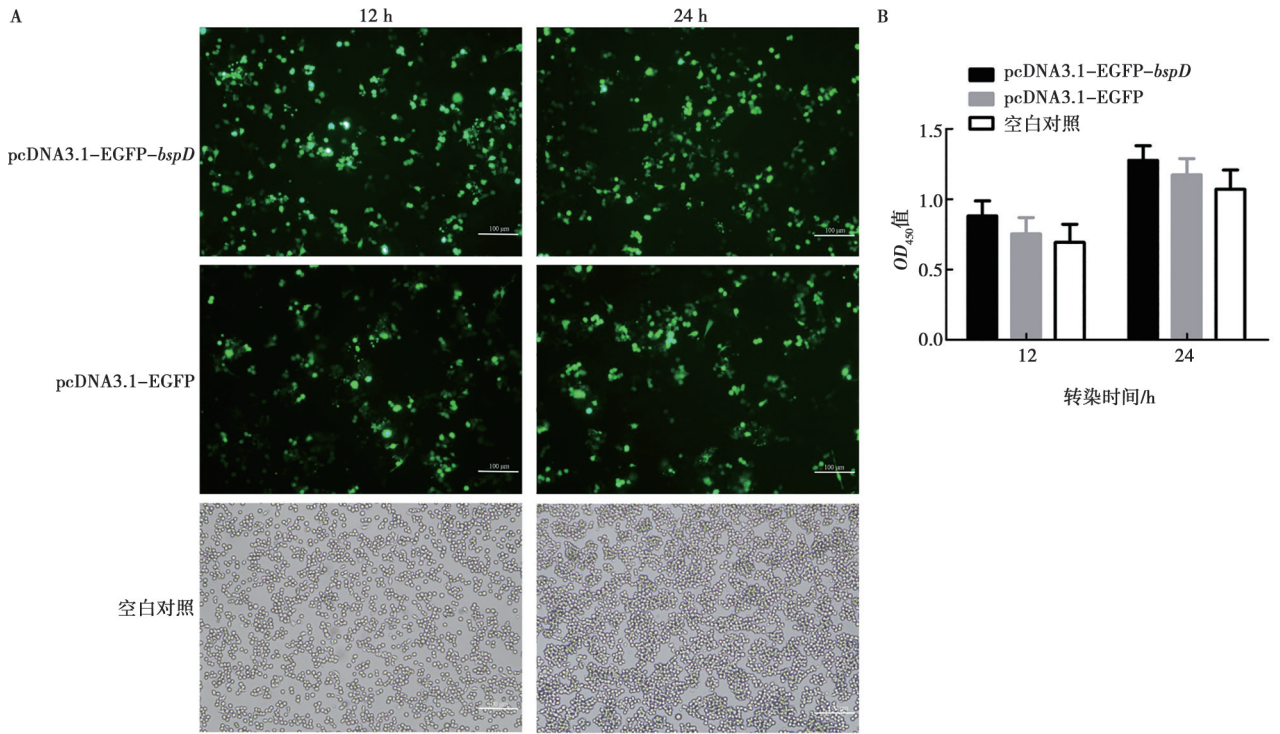
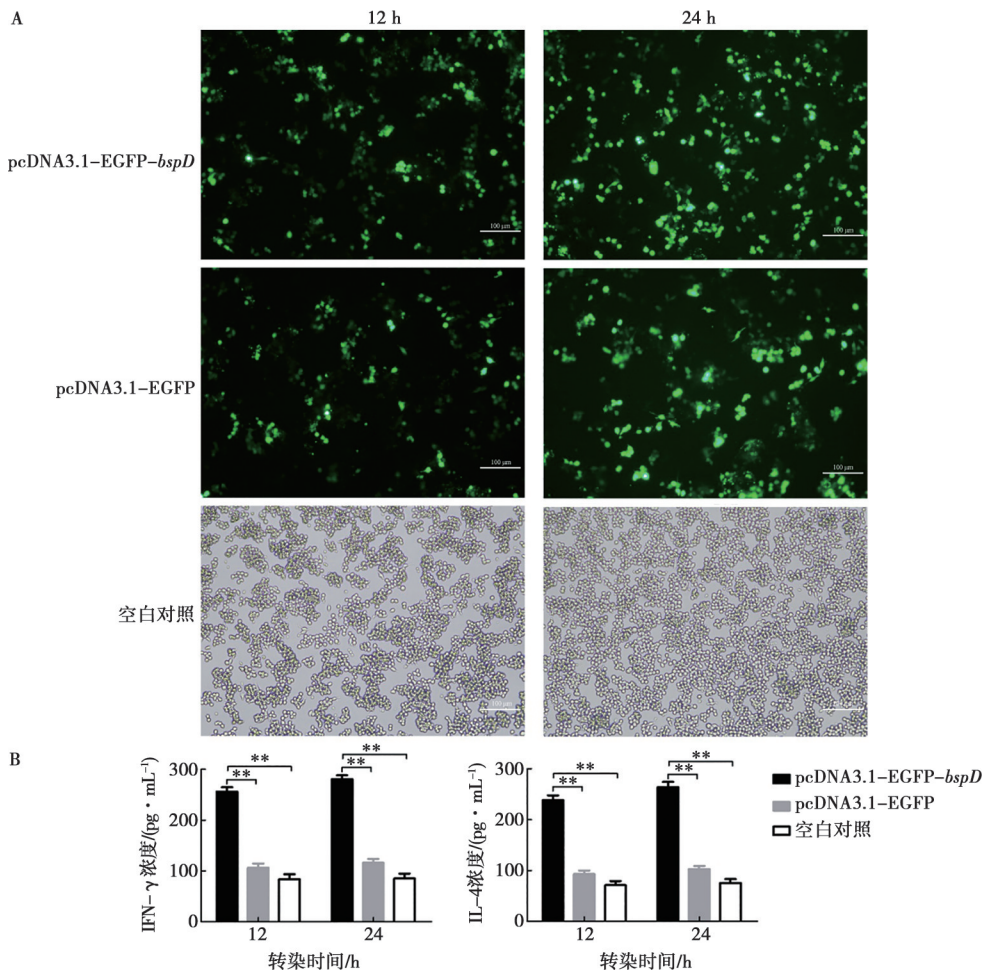


图6 质粒转染效果 (A) 及 BspD 蛋白对 RAW 264.7 细胞增殖能力 (B) 的影响



** P < 0.01。

图7 质粒转染效果 (A) 及 BspD 蛋白对 IFN-γ 和 IL-4 分泌 (B) 的影响

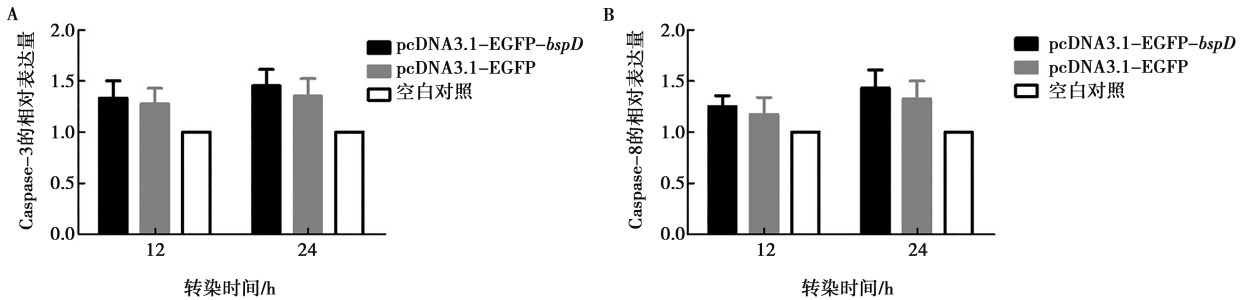


图8 BspD蛋白对细胞凋亡相关基因Caspase-3 (A) 和Caspase-8 (B) 表达的影响

3 讨论

布氏杆菌病是一种世界流行性的传染病，目前在许多国家和地区仍有疫情报道。T4SS是布氏杆菌的重要毒力调控系统，在布氏杆菌的胞内存活中发挥关键作用^[27]。Myeni等^[20]的研究发现，BspD蛋白为分泌蛋白，并通过TEM-1和CyaA报告子融合试验表明，BspD蛋白只有C端融合TEM-1报告子显示依赖于T4SS易位，表明BspD蛋白可能不只被T4SS易位，还可能被其他分泌系统通过转位信号混杂易位。Myeni等^[20]还发现，T4SS的功能受损并没有影响BspD蛋白的分泌，由此推测BspD蛋白依赖两个或两个以上的分泌系统。根据生物信息学的研究结果显示，BspD蛋白不具备信号肽，具有亲水性，且含有跨膜结构，同时具有17个磷酸化位点和11个抗原决定簇，其二级结构以 α -螺旋为主^[28]。在此基础上，本研究成功构建了真核表达载体pcDNA3.1-EGFP-bspD，转染RAW 264.7细胞后，BspD蛋白可在细胞内表达，并具有良好的反应原性，为进一步筛选宿主互作蛋白提供了材料。

本研究选取的pcDNA3.1-EGFP载体含有多克隆位点，可高效表达外源基因，广泛用于基因表达检测和DNA疫苗的研究^[29-30]。马科锋等^[31]构建了结缔组织生长因子(CTGF)的pcDNA3.1真核表达质粒(pcDNA3.1-CTGF)，转染人成骨样细胞SaOS-2后，能够在其中稳定表达。肖航等^[32]制备了血管紧张素转化酶2(ACE2)的pcDNA3.1真核表达质粒(pcDNA3.1-ACE2)，转染中国仓鼠卵巢(CHO)细胞后，发现可以在CHO细胞中表达ACE2蛋白。姚燕等^[33]构建鼠源核孔蛋白85(NUP85)的pcDNA3.1真核表达质粒(pcDNA3.1-3×Flag-c-NUP85)，转染小鼠巨噬细胞RAW 264.7后，NUP85能够抑制脂多糖(LPS)刺激的RAW264.7细胞的增殖并促进其凋亡，并且NUP85促进LPS刺激的RAW 264.7细胞中炎症因子白细胞介素-6(IL-6)和肿

瘤坏死因子- α (TNF- α)的表达。RAW 264.7细胞同样也是布氏杆菌的靶细胞。本研究构建了pcDNA3.1-EGFP-bspD真核表达质粒，转染RAW 264.7细胞，证实BspD蛋白能够在细胞中表达，为研究BspD蛋白对宿主细胞生理功能的影响奠定了基础。

IFN- γ 属于Th1型细胞因子，能刺激活化的浆细胞产生免疫球蛋白IgG2a^[34]。IFN- γ 是巨噬细胞杀菌活性所必需的因子，它可激活巨噬细胞以增强其杀伤作用并抑制病原微生物的繁殖^[35]。IFN- γ 可由激活的CD4⁺T细胞、CD8⁺T细胞和自然杀伤细胞(NK)细胞产生，当布氏杆菌感染细胞时，直接启动IFN- γ 基因的转录。因此，IFN- γ 在根除胞内布氏杆菌，特别是布氏杆菌感染早期发挥重要作用。IL-4主要由CD4⁺T细胞产生，调节细胞介导的免疫应答。IL-4属于Th2型细胞因子，Th2反应可促进布氏杆菌的调理作用。IL-4是一种抗炎因子，可抵抗病原微生物的入侵^[36]。去除IL-4可抑制抗布氏杆菌的抗体反应^[37]。本研究发现，pcDNA3.1-EGFP-bspD转染RAW 264.7细胞后可诱导细胞分泌较高水平的IFN- γ 和IL-4，表明BspD蛋白可诱导Th1和Th2型混合免疫反应。

细胞凋亡是细胞的程序性死亡，在病原体的致病过程中起着重要作用。布氏杆菌可抑制宿主细胞凋亡，达到在感染宿主中存活的目的^[38]。然而，具体机制尚不清楚。Caspase-3和Caspase-8是细胞凋亡的关键调节因子。Caspase-3分布广泛，可在淋巴细胞来源的细胞系中高表达，可能是免疫系统中细胞凋亡的重要介质^[39]。布氏杆菌感染宿主细胞后可抑制Caspase-3的表达^[12]。本研究发现，pcDNA3.1-EGFP-bspD转染RAW 264.7细胞后不影响Caspase-3和Caspase-8的转录。

4 结论

真核表达质粒pcDNA3.1-EGFP-bspD转染RAW

264.7 细胞后, BspD 蛋白能够在 RAW 264.7 细胞中表达。BspD 蛋白可诱导细胞分泌 Th1 型细胞因子 (IFN- γ) 和 Th2 型细胞因子 (IL-4), 对 RAW 264.7 细胞无毒性反应。此外, BspD 蛋白对细胞增殖和细胞凋亡相关基因的表达无显著影响。本研究为筛选 BspD 蛋白在宿主细胞的互作蛋白, 并探讨其在宿主细胞内的生物功能和影响机制奠定了基础。

参考文献:

- [1] ROOP R M II, BARTON I S, HOPERSBERGER D, et al. Uncovering the hidden credentials of *Brucella* virulence [J]. *Microbiol Mol Biol R*, 2021, 85 (1): e00021-19.
- [2] ATHANASIOU V, PAPAGIANNIS S, SIONS G, et al. Prosthetic knee joint infection by *Brucella melitensis* [J]. *Cureus*, 2022, 14 (10): e30088.
- [3] SPERNOVASILIS N, KARANTANAS A, MARKAKI I, et al. *Brucella* spondylitis: current knowledge and recent advances [J]. *J Clin Med*, 2024, 13 (2): 595.
- [4] NARIMISA N, RAZAVI S, KHOSH BAYAN A, et al. Prevalence of *Brucella* endocarditis: a systematic review and meta-analysis [J]. *Health Sci Rep*, 2023, 6 (5): e1301.
- [5] ALIKHANI A, ABBASPOUR KASGARI H, MAJIDI H, et al. *Brucella* pleurisy: an extremely rare complication of brucellosis [J]. *Clin Case Rep*, 2022, 10 (9): e6366.
- [6] ALKAN S, DEMIRAY E K D, TARHAN N, et al. A case of *Brucella* pyelonephritis: a rare case [J]. *Iberoamerican J Med*, 2022, 4 (2): 113-117.
- [7] NASEER A, MO S, OLSEN S C, et al. *Brucella melitensis* vaccines: a systematic review [J]. *Agriculture*, 2023, 13 (11): 2137.
- [8] VON BARGEN K, GORVEL J P, SALCEDO S P. Internal affairs: investigating the *Brucella* intracellular lifestyle [J]. *FEMS Microbiol Rev*, 2012, 36 (3): 533-562.
- [9] ELLIS R E, YUAN J Y, HORVITZ H R. Mechanisms and functions of cell death [J]. *Annual Rev Cell Dev Bi*, 1991, 7: 663-698.
- [10] ARENDS M J, WYLLIE A H. Apoptosis: mechanisms and roles in pathology [J]. *Int Rev Exp Pathol*, 1991, 32: 223-254.
- [11] HRSTKA R, STULIK J, VOJTESEK B. The role of MAPK signal pathways during *Francisella tularensis* LVS infection-induced apoptosis in murine macrophages [J]. *Microbes Infect*, 2005, 7 (4): 619-625.
- [12] LI T, XU Y, LIU L, et al. *Brucella melitensis* 16M regulates the effect of AIR domain on inflammatory factors, autophagy, and apoptosis in mouse macrophage through the ROS signaling pathway [J]. *PLoS One*, 2016, 11 (12): e0167486.
- [13] PU X, STORR S J, ZHANG Y, et al. Caspase-3 and caspase-8 expression in breast cancer: caspase-3 is associated with survival [J]. *Apoptosis*, 2017, 22: 357-368.
- [14] VAKKALA M, PAAKKO P, SOINI Y. Expression of caspases 3, 6 and 8 is increased in parallel with apoptosis and histological aggressiveness of the breast lesion [J]. *Brit J Cancer*, 1999, 81 (4): 592-599.
- [15] WAKJIRA B S. The role of type IV secretion system in *Brucella* virulence: a review [J]. *J Vet Heal Sci*, 2021, 2 (1): 30-35.
- [16] LI Z, ZHANG J, ZHANG K, et al. *Brucella melitensis* 16M Δ TcfSR as a potential live vaccine allows for the differentiation between natural and vaccinated infection [J]. *Exp Ther Med*, 2015, 10 (3): 1182-1188.
- [17] LI Z, WANG S, ZHANG H, et al. Development and evaluation of in murine model, of an improved live-vaccine candidate against brucellosis from to *Brucella melitensis* *vjbR* deletion mutant [J]. *Microb Pathogenesis*, 2018, 124: 250-257.
- [18] ZHENG M, LIN R, ZHU J, et al. Effector proteins of type IV secretion system: weapons of *Brucella* used to fight against host immunity [J]. *Curr Stem Cell Res T*, 2024, 19 (2): 145-153.
- [19] 吴同垒, 单晓枫, 康元环, 等. 布鲁菌IV型分泌系统效应蛋白的研究进展 [J]. *中国兽医学报*, 2018, 38 (3): 602-608.
- [20] MYENI S, CHILD R, NG T W, et al. *Brucella* modulates secretory trafficking via multiple type IV secretion effector proteins [J]. *PLoS Pathog*, 2013, 9 (8): e1003556.
- [21] 谢园园, 徐元宏, 闻慧琴, 等. 弓形虫棒状体 ROP16 基因转染 RAW264.7 的实验研究 [J]. *安徽医科大学学报*, 2015, 50 (10): 1367-1372.
- [22] 王书利, 魏淑娟, 李梦含, 等. 布鲁氏菌分泌蛋白 BspA 和 BspB 真核表达载体的构建及在胚胎滋养层细胞中的表达 [J]. *河南农业科学*, 2022, 51 (8): 143-149.
- [23] WENG M, GONG W, MA M, et al. Targeting gallbladder cancer: oncolytic virotherapy with myxoma virus is enhanced by rapamycin *in vitro* and further improved by hyaluronan *in vivo* [J]. *Mol Cancer*, 2014, 13: 1-15.
- [24] WANG R, YANG X, LIU J, et al. Gut microbiota regulates acute myeloid leukaemia via alteration of intestinal barrier function mediated by butyrate [J]. *Nat Commun*, 2022, 13 (1): 2522.
- [25] FATEHI Z, DOOSTI A, JAMI MS. Oral vaccination with novel *Lactococcus lactis* mucosal live vector-secreting *Brucella* lumazine synthase (BLS) protein induces humoral and cellular immune protection against *Brucella abortus* [J]. *Arch Microbiol*, 2023, 205 (4): 122.
- [26] LI Z, WANG S, ZHANG H, et al. Transcriptional regulator GntR of *Brucella abortus* regulates cytotoxicity, induces the secretion of inflammatory cytokines and affects expression of the type IV secretion system and quorum sensing system in macrophages [J]. *World J Microb Biot*, 2017, 33 (3): 60.
- [27] MARCHESINI M I, MORRONE SEIJO S M, GUAIMAS F F, et al. A T4SS effector targets host cell alpha-enolase contributing to *Brucella abortus* intracellular lifestyle [J]. *Front Cell Infect Mi*, 2016, 6: 153.
- [28] 李芮芮, 马忠臣, 张弘扬, 等. 布鲁氏菌分泌蛋白 BspD 多克隆抗体制备及其生物信息学分析 [J]. *中国畜牧兽医*, 2021, 48 (2): 676-684.
- [29] HARZANDI N, AGHABABA H, KHORAMABADI N, et al. Efficient immunization of BALB/c mice against pathogenic *Brucella melitensis* and *B. ovis*: comparing cell-mediated and protective immune responses elicited by pCDNA3.1 and pVAX1 DNA vaccines coding for Omp31 of *Brucella melitensis* [J]. *Ira J Biotechnol*, 2021, 19 (1): e2618.
- [30] SHOJAEI M, TAHMOORESPUR M, SOLTANI M, et al. Immuno-

- genicity evaluation of plasmids encoding *Brucella melitensis* Omp25 and Omp31 antigens in BALB/c mice [J]. Iran J Basic Med Sci, 2018, 21 (9): 957-964.
- [31] 马科锋, 杨树广, 刘少君. pcDNA3.1 (+) -CTGF 真核表达质粒构建及其在人成骨样细胞 SaOS-2 细胞中的表达 [J]. 中国应用生理学杂志, 2019, 35 (6): 573-576.
- [32] 肖航, 王凯, 王换换, 等. 真核表达质粒 pcDNA. 3.1 (+) -ACE2 的构建及其在 CHO 细胞中的表达 [J]. 畜牧与兽医, 2018, 50 (1): 54-58.
- [33] 姚燕, 王淑贤, 吴银翠, 等. 鼠源 pcDNA3.1-3×Flag-c-NUP85 真核表达质粒的构建及其部分功能研究 [J]. 安徽医科大学学报, 2023, 58 (5): 794-799.
- [34] MOTAHARINIA Y, REZAAE M A, RASHIDI A, et al. Induction of protective immunity against brucellosis in mice by vaccination with a combination of naloxone, alum, and heat-killed *Brucella melitensis* 16 M [J]. J Microbiol Immunol Infect, 2013, 46 (4): 253-258.
- [35] DORNELES E M, TEIXEIRA-CARVALHO A, ARAUJO M S, et al. Immune response triggered by *Brucella abortus* following infection or vaccination [J]. Vaccine, 2015, 33 (31): 3659-3666.
- [36] ALLEN J E, MAIZELS R M. Th1-Th2: reliable paradigm or dangerous dogma? [J]. Immunol Today, 1997, 18 (8): 387-392.
- [37] FERNANDES D M, BALDWIN C L. Interleukin-10 downregulates protective immunity to *Brucella abortus* [J]. Infect Immun, 1995, 63 (3): 1130-1133.
- [38] MA Q L, LIU A C, MA X J, et al. *Brucella* outer membrane protein Omp25 induces microglial cells in vitro to secrete inflammatory cytokines and inhibit apoptosis [J]. Int J Clin Exp Med, 2015, 8 (10): 17530-17535.
- [39] FERNANDES-ALNEMRI T, LITWACK G, ALNEMRI E S. CPP32, a novel human apoptotic protein with homology to *Caenorhabditis elegans* cell death protein Ced-3 and mammalian interleukin-1 beta-converting enzyme [J]. J Biol Chem, 1994, 269 (49): 30761-30764.