



一种基于 NanoLuc 荧光素酶报告布鲁菌基因启动子活性质粒的构建及应用

连拯民¹ 田明星² 尹伊² 石文骏³ 包世俊^{*1} 于圣青^{*2}

1 甘肃农业大学动物医学院 甘肃 兰州 730070

2 中国农业科学院上海兽医研究所 上海 200241

3 扬州大学兽医学院 江苏 扬州 225009

摘要:【背景】布鲁菌病是由布鲁菌感染引起的一种人兽共患传染病,对畜牧业发展和人类健康有着巨大的威胁。利用新型报告基因 NanoLuc 荧光素酶构建一种可以检测布鲁菌基因启动子活性的质粒,对于研究布鲁菌毒力基因的调控表达具有重要意义。【目的】制备 NanoLuc 荧光素酶多克隆抗体,构建一种基于 NanoLuc 荧光素酶报告布鲁菌基因启动子活性的质粒,并通过测定 *bcs31* 基因启动子和 *virB* 启动子活性验证该方法的可行性。【方法】构建 NanoLuc 荧光素酶原核表达载体 pET-Nluc,纯化蛋白免疫新西兰大白兔制备多克隆抗体;以广宿主质粒 pBBR1MCS 为骨架,构建质粒 pNluc、pBcsp31-Nluc 和 pVirB-Nluc,通过电转化构建 S2308(Nluc)、S2308(Bcsp31-Nluc)和 S2308(VirB-Nluc)重组菌株,在体外培养条件下测定 *bcs31* 基因启动子和 *virB* 启动子活性;比较分析 *virB* 启动子在胞内感染条件下和体外培养条件下的活性。【结果】通过原核表达获得 NanoLuc 荧光素酶重组蛋白,并制备得到效价高于 1:100 000 的多克隆抗体;成功构建 pNluc、pBcsp31-Nluc 和 pVirB-Nluc 质粒以及 S2308(Nluc)、S2308(Bcsp31-Nluc)和 S2308(VirB-Nluc)重组菌株;体外培养条件下测定 *bcs31* 基因启动子和 *virB* 启动子活性,结果显示 pNluc 质粒可以精确报告其活性;测定 *virB* 启动子在胞内诱导条件下和体外培养条件下的活性,结果显示 *virB* 启动子活性在胞内感染条件下明显增强。【结论】构建了基于 NanoLuc 荧光素酶报告布鲁菌基因启动子活性的质粒,并验证其可以精确反映布鲁菌基因启动子活性,为研究布鲁菌毒力基因以及揭示其致病机制奠定了基础。

关键词: NanoLuc 荧光素酶, 布鲁菌, 启动子活性, 质粒

Foundation items: National Natural Science Foundation of China (31602070); Scientific and Technical Innovation Project of the Chinese Academy of Agricultural Sciences (SHVRI-ASTIP-2014-8)

***Corresponding authors:** BAO Shi-Jun: Tel: 86-931-7631220; E-mail: bsjdy@126.com

YU Sheng-Qing: Tel: 86-21-34293461; E-mail: yus@shvri.ac.cn

Received: 27-02-2019; **Accepted:** 11-04-2019; **Published online:** 20-05-2019

基金项目: 国家自然科学基金(31602070); 中国农业科学院科技创新工程(SHVRI-ASTIP-2014-8)

***通信作者:** 包世俊: Tel: 0931-7631220; E-mail: bsjdy@126.com

于圣青: Tel: 021-34293461; E-mail: yus@shvri.ac.cn

收稿日期: 2019-02-27; **接受日期:** 2019-04-11; **网络首发日期:** 2019-05-20

Construction and application of a novel plasmid for promoter activity determination of *Brucella* genes base on NanoLuc luciferase

LIAN Zheng-Min¹ TIAN Ming-Xing² YIN Yi² SHI Wen-Tao³ BAO Shi-Jun^{*1}
YU Sheng-Qing^{*2}

1 College of Veterinary Medicine, Gansu Agricultural University, Lanzhou, Gansu 730070, China

2 Shanghai Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Agriculture Sciences (CAAS), Shanghai 200241, China

3 College of Veterinary Medicine, Yangzhou University, Yangzhou, Jiangsu 225009, China

Abstract: [Background] Brucellosis is a zoonotic infectious disease caused by *Brucella* spp. and threatens the development of animal husbandry and human health. A novel plasmid was constructed for promoter activity determination in *Brucella* based on NanoLuc luciferase gene (*nluc*), which is important for research on regulatory mechanism of *Brucella* virulence genes. [Objective] Preparation of rabbit polyclonal antibody of Nluc, construction of a Nluc reporter plasmid for promoter activation determination in *Brucella*, and verification of the Nluc reporter plasmid for *Brucella* *bcs31* gene and *virB* promoter. [Methods] The *nluc* gene was ligated into prokaryotic expression vector pET-28a and constructed as recombinant vector pET-Nluc. The New Zealand rabbit was immunized to prepare polyclonal antibody of Nluc protein. The plasmids pNluc, pBcs31-Luc and pVirB-Luc were constructed based on a broad-host-range vector pBBR1MCS. *Brucella* recombinant strains S2308(Nluc), S2308(Bcs31-Nluc) and S2308(VirB-Nluc) were constructed by electrotransformation of plasmids. The promoter activity of *bcs31* and *virB* were detected in TSB. The activity of *virB* promoter in *Brucella* was compared in TSB and within RAW264.7 cells. [Results] The Nluc protein was expressed and purified. The ELISA titer of polyclonal antibody was approximately to 1:100 000. The plasmid pNluc, pBcs31-Luc, pVirB-Luc and the S2308(Nluc), S2308(Bcs31-Nluc), S2308(VirB-Nluc) strains were constructed successfully. The results of *bcs31* and *virB* promoter activity in TSB showed that promoter activity can be detected accurately in pNluc plasmid. The result of *virB* promoter activity in intracellular *Brucella* showed that the activity of *virB* promoter is enhanced significantly. [Conclusion] In this study, a plasmid for promoter activity determination of *Brucella* genes was constructed successfully. The results of this study showed that the promoter activity of *Brucella* genes can be detected accurately in pNluc plasmid. This study provides a novel strategy for determining promoter activity of *Brucella* virulence genes, which may benefit investigation of *Brucella* pathogenesis.

Keywords: NanoLuc luciferase, *Brucella*, Promoter activity, Plasmid

布鲁菌病是由布鲁菌感染引起的一种呈全球性分布的重要的人兽共患细菌性传染病^[1], 主要引起公畜生殖障碍和孕畜流产^[2], 人类主要通过接触患病动物或食用带有病原菌的食物感染, 该病对畜牧业发展和人类健康构成巨大的威胁^[1,3]。布鲁菌是一种革兰氏阴性短杆菌, 兼性胞内寄生, 主要侵袭巨噬细胞、树突状细胞、上皮细胞以及胎盘滋养层细胞等^[4]。布鲁菌毒力基因的鉴定, 对于阐明布鲁菌入侵宿主细胞, 并在胞内建立慢性感染的分子机制具有重要意义。启动子作为启动基因转录和表达

的重要结构, 在启动布鲁菌毒力基因转录过程中发挥重要作用, 毒力基因在特定条件下的转录和表达可通过测定其启动子的活性来进行监测和定量分析。*gfp* 和 *lacZ* 是常被用来测定基因启动子活性的报告基因^[5-6], 但它们对弱启动子的报告活性不灵敏, 精确度不高, 对设备仪器要求高, 测定方法复杂。因此, 构建一种可以更精确简便地报告布鲁菌基因启动子活性的质粒, 对于布鲁菌致病机制的研究具有重要意义。

NanoLuc 荧光素酶(Nluc)是一种来自深海虾

Oplophorus gracilirostris 并经基因工程改造的新型发光系统, 具有分子量小、灵敏度高、发光持续时间长、物理性质稳定、不依赖 ATP 等特点^[7]。相较于萤火虫荧光素酶(Fluc)、海肾荧光素酶(Rluc)等传统的荧光素酶, Nluc 具有更强的酶活性, 且 Nluc 以更加稳定的新型腔肠素衍生物为底物, 可维持更长时间、更加稳定的发光, 可精确测定其发光值^[7]。Nluc 在哺乳动物细胞中的表达不需要翻译后修饰^[7], 因此, 作为报告基因检测布鲁菌启动子活性具有较大的应用潜力。

1 材料与方法

1.1 主要材料

流产布鲁菌 S2308 株购自中国兽医药品监察所; pBBR1MCS 质粒由 Kovach ME 博士惠赠; 胰蛋白胨大豆肉汤培养基(TSA、TSB)购自 BD 公司; 细菌基因组 DNA 提取试剂盒、大肠杆菌 (*Escherichia coli*, *E. coli*) DH5 α 和 BL21(DE3)感受态细胞、质粒快速小提试剂盒和胶回收试剂盒均购自北京天根生化科技有限公司; PrimeSTAR[®] Max DNA 聚合酶及限制性内切酶购自 TaKaRa 公司; ClonExpress[™] 快速克隆试剂盒购自诺唯赞生物科技有限公司; pET-28a(+)质粒购自 Novagen 公司; BeaverBeads[™] His-Tag 蛋白纯化试剂盒购自海狸生物科技有限公司; B-PER[™] 细菌蛋白质提取试剂购自 Thermo Fisher Scientific 公司; 新西兰兔购自上海市松江区松联实验动物场; 小鼠单核巨噬细胞系

RAW264.7 购自中国科学院细胞库; pNL1.1 质粒和 Nano-Glo[™] 荧光素酶检测试剂盒购自 Promega 公司。PCR 引物序列见表 1, 由睿勉基因合成有限公司合成。

PCR 仪购自 ABI 公司; 生物安全柜购自 Labconco 公司; CO₂ 培养箱购自 Thermo Fisher 公司; 化学发光检测仪购自 Eppendorf 公司。

1.2 方法

1.2.1 *nluc* 基因克隆表达和蛋白纯化

以 pNL1.1 质粒为模板, 使用 eNluc-F/R 为引物 PCR 扩增获得 *nluc* 基因片段, 胶回收纯化 PCR 产物。用限制性内切酶 *Bam*H I 和 *Xho* I 酶切 pET-28a(+)质粒, 胶回收纯化酶切产物。通过同源重组方法, 将纯化的 *nluc* 基因片段与线性化的 pET-28a(+)连接, 连接产物转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞。

测序分析重组质粒, 鉴定正确的重组质粒命名为 pET-Nluc, 随后将该质粒转化至大肠杆菌 BL21(DE3)感受态细胞, 重组菌经 IPTG (终浓度为 50 mg/L)进行诱导表达, 收集菌体沉淀, 超声破碎 20 min (功率 300 W, 工作 5 s, 间歇 5 s), 8 000 r/min 离心 10 min, 分离沉淀和上清, 经 SDS-PAGE 凝胶电泳分析后, 通过 BeaverBeads[™] His-Tag 蛋白纯化试剂盒从上清中纯化 Nluc 蛋白, BCA 蛋白浓度测定试剂盒测定纯化蛋白浓度, 分装保存于 -80 °C 超低温冰箱备用。

表 1 PCR 引物序列

Table 1 PCR primer sequences

引物名称	引物序列
Primers name	Primers sequence (5'→3')
eNluc-F	AGCAAATGGGTCGCGGATCCATGGTCTTCACACTCGAAGA
eNluc-R	TGGTGGTGGTGGTGCTCGAGTTACGCCAGAATGCGTTCGC
pBBR1-F	TTAATGAATCGGCCAACGCG
pBBR1-R	CAATTCGCCCTATAGTGAGT
Nluc-F	TGGCCGATTCATTAAGTCTTCACACTCGAAGATTTTC
Nluc-R	CTATAGGGCGAATTGTTACGCCAGAATGCGTTCGC
pNluc-R	GTCTTCACACTCGAAGATTTTC
Bcsp31-F	TGGCCGATTCATTAAGAAACCCGACTATGCCATTC
Bcsp31-R	TTTCGAGTGTGAAGACCATAATACCAGTCTCTTCCCGC
VirB-F	TGGCCGATTCATTAATGACAGGCATATTTCAACGCGAC
VirB-R	TTTCGAGTGTGAAGACCACCATAGGATCGTCTCTCTCTCT

1.2.2 多克隆抗体制备及 ELISA 效价测定

将纯化蛋白与弗氏佐剂等体积混合乳化后, 按照 1 mg/只免疫新西兰大白兔, 首次免疫用弗氏完全佐剂, 免疫后间隔两周使用弗氏不完全佐剂加强免疫 2 次(1 mg/只)。第 3 次免疫 1 周后, 耳缘静脉采血, 分离血清检测其效价。

以纯化蛋白为抗原, 1 μ g/孔包被 96 孔板, 经 5% 脱脂乳封闭, 以梯度稀释的兔血清为一抗, HRP (辣根过氧化物酶) 标记的羊抗兔抗体为二抗, 反应后加入 TMB (3,3',5,5'-四甲基联苯胺) 显色液显色, 用 2 mol/L 硫酸终止反应, 酶标仪检测 A_{450} 值。试验设阴性对照(兔阴性血清)和空白对照(PBST), $P/N \geq 2.1$ 判为阳性, 否则为阴性。效价检测合格后, 大量分离兔血清, 分装保存于 -80°C 超低温冰箱备用。

1.2.3 质粒的构建

以 pBBR1MCS 质粒为模板, 使用 pBBR1-F/R 为引物 PCR 扩增制备线性化的 pBBR1MCS 质粒; 以 pNL1.1 质粒为模板, 使用 Nluc-F/R 为引物, PCR 扩增 *nluc* 基因片段(不含起始密码子 ATG), 同源重组试剂盒连接 *nluc* 基因片段和线性化的 pBBR1MCS 质粒, 连接产物转化至大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞, 构建用于报告布鲁菌基因启动子活性的质粒, 鉴定正确的质粒命名为 pNluc。

为验证 pNluc 质粒报告布鲁菌基因启动子活性的能力, 将 *bcs31* 和 *virB* 基因的启动子克隆至 pNluc 质粒中, 具体方法为: 以 pNluc 质粒为模板, 使用 pBBR1-F/pNluc-R 为引物, PCR 扩增后切胶回收制备线性化的 pNluc 质粒; 以流产布鲁菌 S2308 基因组为模板, 使用 Bcsp31-F/R 和 VirB-F/R 为引物, PCR 扩增 *bcs31* 和 *virB* 基因启动子片段, 通过同源重组试剂盒连接胶回收产物和线性化的 pNluc 质粒, 构建 pBcsp31-Nluc 和 pVirB-Nluc 质粒。

1.2.4 布鲁菌重组菌株的构建

流产布鲁菌 S2308 接入 TSB 培养基中, 37°C 、200 r/min 培养至对数生长前期(OD_{600} 为 0.6–0.8), 冰浴 15 min, 8 000 r/min 离心 2 min 收集菌体沉淀, 预冷的无菌去离子水洗涤菌体 2 次, 加入无菌的

10% 甘油重悬菌体沉淀。分别加入 2 μ g 的 pNluc、pBcsp31-Nluc 和 pVirB-Nluc 质粒, 冰浴 10 min, 2.4 kV、400 Ω 条件下将质粒电转化至 S2308 菌株中, 涂布含氯霉素(20 mg/L)的 TSA 平板筛选阳性克隆, 构建 S2308 (Nluc)、S2308 (Bcsp31-Nluc) 和 S2308 (VirB-Nluc) 重组菌株, 鉴定正确后, 保存菌种备用。

1.2.5 免疫印迹分析

纯化蛋白用 PBS 稀释至 1 mg/mL, 制备样品进行 SDS-PAGE 凝胶电泳后, 转印至硝酸纤维素膜, 并用 5% 脱脂乳封闭, 用制备的抗 Nluc 兔血清为一抗、HRP 标记的山羊抗兔 IgG 为二抗分别孵育后, 通过 ECL 底物显色液进行显色。

复苏 S2308、S2308(Bcsp31-Nluc) 和 S2308(VirB-Nluc) 菌株, 于 TSB 培养基中 37°C 、200 r/min 培养至对数期, 各取 1 mL 菌液, 离心收集菌体沉淀, 制备样品进行 SDS-PAGE 凝胶电泳后, 转印至硝酸纤维素膜, 并用 5% 脱脂乳封闭, 用制备的抗 Nluc 兔血清为一抗、HRP 标记的山羊抗兔 IgG 为二抗分别孵育后, 通过 ECL 底物显色液进行显色。

1.2.6 Nluc 酶活性检测

复苏 S2308(pNluc)、S2308(Bcsp31-Nluc) 和 S2308(VirB-Nluc) 3 个菌株, 于 TSB 培养基中 37°C 、200 r/min 培养至对数生长前期, 取适量菌液离心收集沉淀, 磷酸盐缓冲液(PBS)重悬菌体沉淀, 测定其 OD_{600} 值, 按 1:1 体积比加入 B-PERTM 细菌蛋白质提取试剂, 室温孵育 1 h, 12 000 r/min 离心 10 min, 收集上清, 取 50 μ L 裂解上清, 通过 Nano-GloTM 荧光素酶检测试剂盒测定 Nluc 发光值。

S2308(VirB-Nluc) 培养至对数生长期, 离心收集沉淀, PBS 重悬沉淀, 10 倍比稀释后涂布 TSA 平板, 37°C 培养 72 h 后计数 CFU, 并取适量菌液加入 B-PER 细菌蛋白质提取试剂, 测定 Nluc 发光值(方法同上)。RAW264.7 细胞接种于 24 孔板, 生长至单层细胞, DMEM 洗涤细胞 2 次, 按照感染复数(细菌:细胞) 1:1 000 的比例接种重组菌 S2308(VirB-Nluc), $400\times$ g 离心 5 min, 37°C 感染 1 h, PBS 洗涤细胞 2 次, 加入含有 100 μ g/mL 庆大霉素

的 DMEM, 37 °C 杀菌 1 h, PBS 洗涤细胞 2 次, 加入含有 2% FBS 和 20 μg/mL 庆大霉素的 DMEM 维持细胞, 于感染后 2、4 和 8 h, 加入 400 μL 0.2% Triton X-100 水溶裂解细胞, 取 100 μL 裂解液 10 倍比稀释后涂布 TSA 平板, 计算胞内细菌 CFU^[8], 另取 50 μL 裂解液按 1:1 体积比加入 B-PER 细菌蛋白质提取试剂, 室温孵育 1 h, 12 000 r/min 离心 10 min, 收集上清, 测定 Nluc 酶活性。

2 结果与分析

2.1 Nluc 表达质粒的构建及蛋白纯化结果

以 pNL1.1 质粒为模板, PCR 扩增获得 *nluc* 基因片段(约 500 bp, 图 1), 经酶切制备线性化的 pET-28a(+)质粒(约 5 000 bp, 图 1)。连接成功的重组质粒 pET-Nluc 转化至大肠杆菌 BL21(DE3)感受态细胞, 构建重组菌株 BL21(pET-Nluc)。BL21(pET-Nluc)经 IPTG 诱导表达, 收集菌体沉淀超声破碎后, 表达产物经 SDS-PAGE 凝胶电泳分析, 结果显示目的蛋白在上清、沉淀中均有表达, 大小约 22 kD (图 2), 使用 His-Tag 蛋白纯化试剂盒从上清中纯化得到 Nluc 蛋白(图 2)。

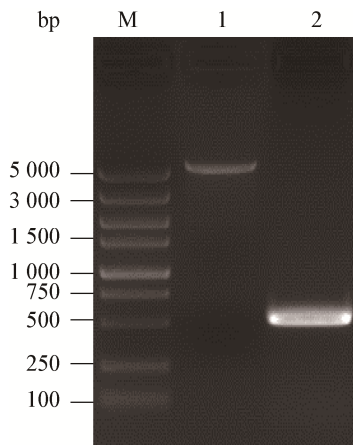


图 1 pET-28a(+)双酶切及 PCR 扩增 *nluc* 基因

Figure 1 pET-28a(+) digested by double restriction enzymes and PCR amplification of *nluc* gene

注: M: DL5000 DNA Marker; 1: pET-28a(+)双酶切产物; 2: *nluc* 扩增产物。

Note: M: DL5000 DNA Marker; 1: pET-28a(+) digested by double restriction enzymes; 2: PCR product of *nluc* gene.

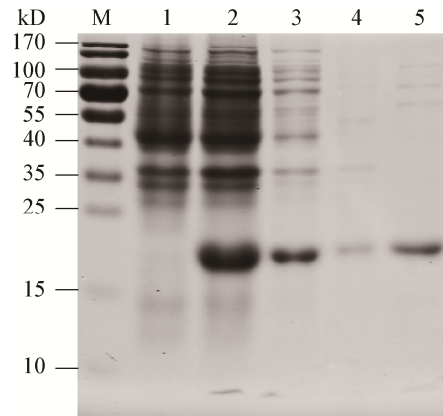


图 2 Nluc 蛋白表达和纯化

Figure 2 Expression and purification of Nluc protein

注: M: 蛋白分子质量标准; 1: IPTG 诱导的 BL21(pET-28a); 2: IPTG 诱导的 BL21(pET-Nluc); 3: 裂解后上清; 4: 裂解后沉淀; 5: 纯化的 Nluc 蛋白。

Note: M: Protein marker; 1: *E. coli* BL21(pET-28a) cells with IPTG; 2: *E. coli* BL21(pET-Nluc) cells with IPTG; 3: Supernatant from *E. coli* BL21(pET-Nluc) cells with IPTG; 4: Sediment from *E. coli* BL21(pET-Nluc) cells with IPTG; 5: Purified Nluc protein.

2.2 多克隆抗体效价测定及 Nluc 蛋白反应原性分析

纯化蛋白混合弗氏佐剂免疫新西兰大白兔后, 收集兔血清, 以纯化蛋白为抗原, 经 ELISA 测定其效价高于 1:100 000。在后续试验中, 通过免疫印迹试验证明制备的多克隆抗体对外源表达的融合蛋白 Nluc 具有较强的反应原性(图 3)。

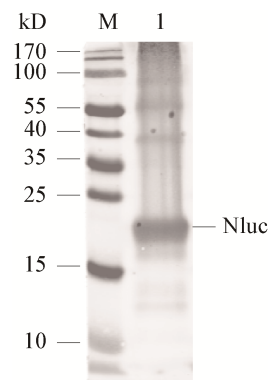


图 3 Nluc 蛋白反应原性分析

Figure 3 Reactogenicity analysis of Nluc protein

注: M: 蛋白分子质量标准; 1: 纯化的 Nluc 蛋白。

Note: M: Protein marker; 1: Purified Nluc protein.

2.3 质粒构建结果

以 pBBR1MCS 质粒为模板, 通过 PCR 扩增获得约 4 500 bp 大小的 pBBR1MCS 质粒片段(图 4A); 以 pNL1.1 质粒为模板, PCR 扩增获得约 500 bp 大小的 *nluc* 基因片段(图 4B), PCR 产物与线性化的 pBBR1MCS 质粒片段连接, 构建了重组质粒 pNluc。

通过 PCR 获得线性化的 pNluc 质粒, 目的片段约 5 000 bp (图 5), 以流产布鲁菌 S2308 基因组为模板, PCR 扩增得到 *bcs31* 基因和 *virB* 启动子片段, 大小分别为 200 bp 和 450 bp 左右(图 5), 并与线性化的 pNluc 质粒连接, 构建了 pBcsp31-Nluc 和 pVirB-Nluc 重组质粒。

2.4 布鲁菌 *bcs31* 基因启动子和 *virB* 启动子活性分析

将 pBcsp31-Nluc 和 pVirB-Nluc 质粒电转化至流产布鲁菌野生株中, 构建了重组菌株 S2308 (Bcsp31-Nluc)和 S2308(VirB-Nluc), 以制备的抗 Nluc 兔血清为一抗, 对 S2308(Bcsp31-Nluc)和 S2308(VirB-Nluc)进行免疫印迹分析, 其中野生株 S2308 作为阴性对照, 布鲁菌的 GAPDH 蛋白作为内参蛋白。结果显示, 在流产布鲁菌中 *bcs31* 基因

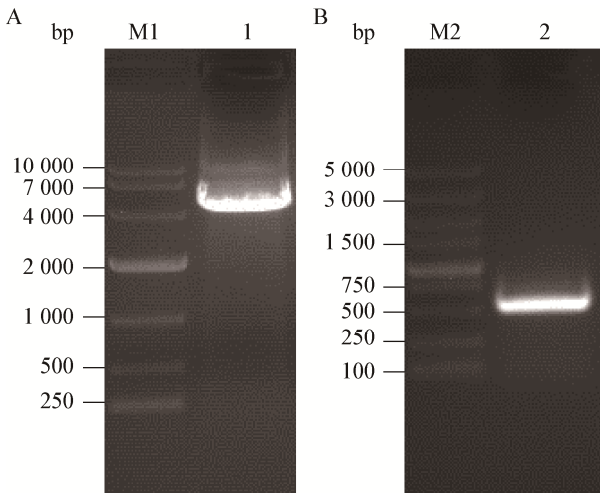


图 4 PCR 扩增 pBBR1MCS (A)和 *nluc* 基因(B)
Figure 4 PCR amplification of pBBR1MCS (A) and *nluc* gene (B)

注: M1: DL10000 DNA Marker; M2: DL5000 DNA Marker; 1: pBBR1MCS 扩增产物; 2: *nluc* 基因扩增产物。
Note: M1: DL10000 DNA Marker; M2: DL5000 DNA Marker; 1: PCR product of pBBR1MCS; 2: PCR product of *nluc* gene.

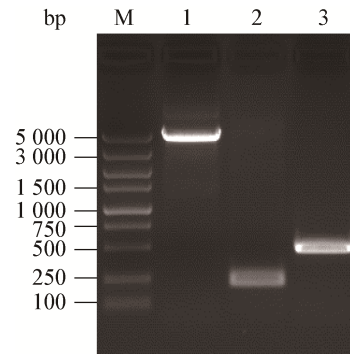


图 5 PCR 扩增 pNluc、*bcs31* 基因启动子及 *virB* 启动子
Figure 5 PCR amplification of pNluc, promoters of *bcs31* gene and *virB*

注: M: DL5000 DNA Marker; 1: pNluc 扩增产物; 2: *bcs31* 基因启动子扩增产物; 3: *virB* 启动子扩增产物。
Note: M: DL5000 DNA Marker; 1: PCR product of pNluc; 2: PCR product of *bcs31* gene promoter; 3: PCR product of *virB* promoter.

启动子和 *virB* 启动子能成功表达 Nluc 报告基因(图 6), 野生株 S2308 无 Nluc 蛋白的表达。之后定量测定了体外培养的 S2308(Nluc)、S2308(Bcsp31-Nluc)和 S2308(VirB-Nluc)菌株的发光值, 结果显示 S2308(Bcsp31-Nluc)和 S2308(VirB-Nluc)发光值显著高于 S2308(Nluc) (图 7), 证明 pNluc 质粒可以用于测定 *bcs31* 基因和 *virB* 基因的启动子活性。

2.5 布鲁菌 *virB* 启动子胞内诱导活性分析

为进一步探讨 Nluc 用于布鲁菌启动子诱导表达分析的可行性, 比较分析了 *virB* 基因启动子在布鲁菌体外培养和胞内感染状态下的活性。结果显示, 布鲁菌在胞内感染状态下 *virB* 启动子活性显著高于体外培养条件下的活性, 且在布鲁菌感染细胞 2、4 和 8 h 时, *virB* 启动子活性不断增强(图 8)。该结果表明 pNluc 质粒可以评价胞内感染条件下布鲁菌基因启动子的活性, 以及启动子活性的动态变化。

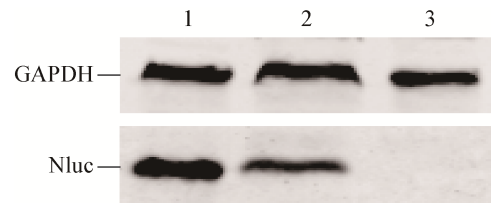


图 6 免疫印迹验证 S2308(Bcsp31-Nluc) 和 S2308(VirB-Nluc)中 Nluc 的表达
Figure 6 Identification of Nluc expression in S2308(Bcsp31-Nluc) and S2308(VirB-Nluc) by western blotting

注: 1: S2308(Bcsp31-Nluc); 2: S2308(VirB-Nluc); 3: S2308。
Note: 1: S2308(Bcsp31-Nluc); 2: S2308(VirB-Nluc); 3: S2308.

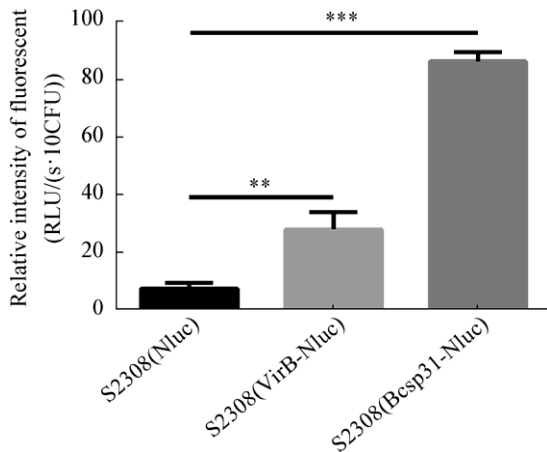


图7 体外培养条件下 *bcs31* 基因启动子及 *virB* 启动子活性分析

Figure 7 Analysis of *bcs31* gene promoter and *virB* promoter activity in TSB

Note: **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$.

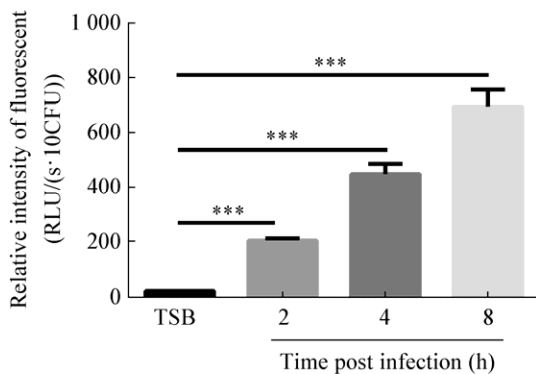


图8 *virB* 启动子胞内诱导活性分析

Figure 8 Analysis of *virB* promoter activity in *Brucella* within RAW264.7 cells

Note: ***: $P < 0.001$.

3 讨论与结论

Nluc 荧光素酶基因是一种新型报告基因。本研究通过构建原核表达载体,成功表达并纯化得到了 Nluc 荧光素酶重组蛋白,将重组蛋白免疫新西兰大白兔制备获得抗 Nluc 多克隆抗体,为 Nluc 荧光素酶的进一步应用奠定了基础。通过免疫印迹验证发现 *nLuc* 基因可在布鲁菌 *bcs31* 基因启动子和 *virB* 启动子的控制下表达,预示 Nluc 在布鲁菌的研究中具有进一步应用的价值。

bcs31 基因编码布鲁菌的一种膜蛋白,具有表达量高、保守性高等特点,且 BCSP31 蛋白具有较高的免疫原性,因此可将其作为一个布鲁菌病的诊断靶标^[9]。本研究通过 PCR 扩增 *bcs31* 基因启动子片段构建 S2308(Bcsp31-Nluc)菌株,通过测定 Nluc 酶活性验证 pNluc 质粒能否准确报告布鲁菌基因启动子活性,发现构建的 pNluc 质粒能高效地报告布鲁菌基因启动子的活性,为布鲁菌基因启动子活性研究提供了一种新的研究方法。*virB* 操纵子编码布鲁菌四型分泌系统(T4SS)组分,是影响布鲁菌胞内存活的一种重要的毒力因子^[10-12];布鲁菌感染巨噬细胞后,*virB* 操纵子被迅速激活,编码的 T4SS 帮助布鲁菌逃逸胞内溶酶体的降解,并促进 BCV 小体移行至内质网建立胞内复制环境^[13],*virB* 操纵子可在巨噬细胞内被特异性诱导表达,如低 pH、营养匮乏等条件^[10]。本研究探讨了基于 Nluc 能否实时监测胞内感染条件下布鲁菌 *virB* 操纵子的活性,通过测定 S2308(VirB-Nluc)菌株体外培养和感染小鼠巨噬细胞 2、4 和 8 h 的 Nluc 酶活性,发现在胞内感染状态下 *virB* 启动子活性明显高于体外培养条件下的活性,且感染细胞后 8 h 内 *virB* 启动子活性呈上升趋势,说明 pNluc 质粒能够准确报告体外培养和胞内感染状态下布鲁菌基因启动子活性,还可以通过动态测定的方法准确报告布鲁菌基因启动子活性的变化趋势。

布鲁菌无经典的毒力因子^[14],其致病性主要表现在感染宿主细胞后的存活和繁殖能力。目前已鉴定的布鲁菌毒力相关组分有脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)、四型分泌系统(type IV secretion system, T4SS)、双组分调控系统(two component signaling or regulatory system, TCS)等,该系列组分在布鲁菌感染宿主细胞并在宿主体内建立慢性感染过程中发挥着重要作用^[15-17],鉴定布鲁菌毒力相关基因对阐明其致病机制有着重要意义。启动子作为启动基因转录和表达的重要结构,Tian 等^[18]通过测定 β -半乳糖苷酶活性成功分析了布鲁菌新的毒力相关基因 *vhpA* 的启动子活性,间接证明 *vhpA* 基因可在布鲁

菌中成功转录和表达。本研究利用新型报告基因 Nluc 荧光素酶基因建立了一种新的布鲁菌基因启动子活性报告系统, 该报告系统可以准确报告体外培养状态和胞内感染状态下布鲁菌基因启动子的活性, 以及启动子活性的变化趋势; 相比于传统的 *lacZ* 报告系统, 该报告系统可以更精确地检测到 10 CFU 布鲁菌中待测启动子的活性。因此, 基于 Nluc 荧光素酶报告布鲁菌基因启动子活性系统的建立为鉴定布鲁菌新的毒力基因、揭示布鲁菌的致病机制奠定了基础。

REFERENCES

- [1] Boschiroli ML, Foulongne V, O'callaghan D. Brucellosis: a worldwide zoonosis[J]. *Current Opinion in Microbiology*, 2001, 4(1): 58-64
- [2] Von Bargen K, Gorvel JP, Salcedo SP. Internal affairs: investigating the *Brucella* intracellular lifestyle[J]. *FEMS Microbiology Reviews*, 2012, 36(3): 533-562
- [3] Atluri VL, Xavier MN, De Jong MF, et al. Interactions of the human pathogenic *Brucella* species with their hosts[J]. *Annual Review of Microbiology*, 2011, 65: 523-541
- [4] Roop II RM, Gaines JM, Anderson ES, et al. Survival of the fittest: how *Brucella* strains adapt to their intracellular niche in the host[J]. *Medical Microbiology and Immunology*, 2009, 198(4): 221-238
- [5] Ferent J, Ruat M, Traiffort E. Investigation of the proteolipid protein promoter activity during demyelination and repair[J]. *Differentiation*, 2013, 85(4/5): 182-189
- [6] Zhang X, Bremer H. Control of the *Escherichia coli* *rrnB* P1 promoter strength by ppGpp[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 1995, 270(19): 11181-11189
- [7] Hall MP, Unch J, Binkowski BF, et al. Engineered luciferase reporter from a deep sea shrimp utilizing a novel imidazopyrazinone substrate[J]. *ACS Chemical Biology*, 2012, 7(11): 1848-1857
- [8] Tian MX, Bao YQ, Li P, et al. The putative amino acid ABC transporter substrate-binding protein AapJ2 is necessary for *Brucella* virulence at the early stage of infection in a mouse model[J]. *Veterinary Research*, 2018, 49: 32
- [9] Zhang L, Wu XA, Zhang FL, et al. Soluble expression and purification of *Brucella* cell surface protein (BCSP31) of *Brucella melitensis* and preparation of anti-BCSP31 monoclonal antibodies[J]. *Molecular Biology Reports*, 2012, 39(1): 431-438
- [10] Boschiroli ML, Ouahrani-Bettache S, Foulongne V, et al. The *Brucella suis* *virB* operon is induced intracellularly in macrophages[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2002, 99(3): 1544-1549
- [11] O'callaghan D, Cazevieille C, Allardet-Servent A, et al. A homologue of the *Agrobacterium tumefaciens* VirB and *Bordetella pertussis* Ptl type IV secretion systems is essential for intracellular survival of *Brucella suis*[J]. *Molecular Microbiology*, 1999, 33(6): 1210-1220
- [12] Sieira R, Comerci DJ, Sanchez DO, et al. A homologue of an operon required for DNA transfer in *Agrobacterium* is required in *Brucella abortus* for virulence and intracellular multiplication[J]. *Journal of Bacteriology*, 2000, 182(17): 4849-4855
- [13] Celli J, De Chastellier C, Franchini DM, et al. *Brucella* evades macrophage killing via VirB-dependent sustained interactions with the endoplasmic reticulum[J]. *The Journal of Experimental Medicine*, 2003, 198(4): 545-556
- [14] Selem MN, Boyle SM, Sriranganathan N. *Brucella*: a pathogen without classic virulence genes[J]. *Veterinary Microbiology*, 2008, 129(1/2): 1-14
- [15] Porte F, Naroeni A, Ouahrani-Bettache S, et al. Role of the *Brucella suis* lipopolysaccharide O antigen in phagosomal genesis and in inhibition of phagosome-lysosome fusion in murine macrophages[J]. *Infection and Immunity*, 2003, 71(3): 1481-1490
- [16] Lacerda TLS, Salcedo SP, Gorvel JP. *Brucella* T4SS: the VIP pass inside host cells[J]. *Current Opinion in Microbiology*, 2013, 16(1): 45-51
- [17] Altamirano-Silva P, Meza-Torres J, Castillo-Zeledon A, et al. *Brucella abortus* senses the intracellular environment through the BvrR/BvrS two-component system, which allows *B. abortus* to adapt to its replicative niche[J]. *Infection and Immunity*, 2018, 86(4): e00713-17
- [18] Tian MX, Lian ZM, Bao YQ, et al. Identification of a novel, small, conserved hypothetical protein involved in *Brucella abortus* virulence by modifying the expression of multiple genes[J]. *Transboundary and Emerging Diseases*, 2019, 66(1): 349-362