

专论与综述

蛋白质组学技术在布鲁氏菌病研究中的应用及发展

冯宇¹ 胡莉萍² 朱良全^{1*} 丁家波^{1*}

(1. 中国兽医药品监察所 检测技术室 北京 100081)

(2. 山东省动物疫病预防与控制中心 山东 济南 250022)

摘要: 布鲁氏菌病是由布鲁氏菌引起的重大人畜共患病之一, 给我国养殖业发展和公共安全带来严重危害。有效控制和逐步消灭布鲁氏菌病对于公共卫生安全和养殖业的发展具有重要意义。然而, 由于布鲁氏菌为胞内寄生菌且结构复杂, 其致病机制和相关毒力因子仍不十分清楚; 加之我国现有的布鲁氏菌疫苗均为光滑型疫苗, 其诱导产生的抗体与自然感染在临床诊断上存在着干扰, 给种群净化带来严重困难。虽然已有许多研究通过多种技术尝试解决上述问题, 但进展多较为缓慢。蛋白质组学作为研究蛋白质组成和变化规律的新兴学科, 随着其研究手段的逐步发展和完善, 通过蛋白质组学的手段揭示布鲁氏菌的致病机理、免疫机制等的研究逐渐增多, 对于解决布鲁氏菌带来的上述问题提供了崭新的思路。本文结合实验室自身研究, 主要从蛋白质组学对布鲁氏菌特异性蛋白的挖掘和对鉴别诊断的意义等方面做一简要阐述。

关键词: 布鲁氏菌病, 蛋白质组学, 毒力因子, 鉴别诊断

Advance in proteomic research and application for brucellosis

FENG Yu¹ HU Li-Ping² ZHU Liang-Quan^{1*} DING Jia-Bo^{1*}

(1. Department of Inspection Technology Research, China Institute of Veterinary Drug Control, Beijing 100081, China)

(2. Shandong Animal Center for Disease Control and Prevention, Jinan, Shandong 250022, China)

Abstract: Brucellosis is a zoonotic and contagious infectious disease caused by infection with *Brucella* species, threat to livestock and human healthy seriously. Prevent and eliminate to brucellosis is significant to public health security and development of breeding industry. However, the pathogenic mechanism and relative virulence factors are not clear due to the facultative intracellular pathogen and complex construction for *Brucella*. In addition, brucellosis vaccine are all smooth strains currently in China, leading interfere with natural infection, which cause the seriously difficult for purification. Most of research had not preferable result due to these problems. Proteomic

Foundation items: National Key Research and Development Program of China (2016YFD0500902); Major Agricultural Applied Technology Innovation Program of Shandong Province

*Corresponding authors: Tel: 86-10-61255327

E-mail: ZHU Liang-Quan: 1367391894@qq.com; DING Jia-Bo: dingjiabo@126.com

Received: July 14, 2017; **Accepted:** November 14, 2017; **Published online** (www.cnki.net): November 15, 2017

基金项目: 国家重点研发计划(2016YFD0500902); 山东省农业重大应用技术创新项目

*通信作者: Tel: 86-10-61255327

E-mail: 朱良全: 1367391894@qq.com; 丁家波: dingjiabo@126.com

收稿日期: 2017-07-14; 接受日期: 2017-11-14; 网络首发日期(www.cnki.net): 2017-11-15

is a new method which is developing gradually to study constitutes and disciplinarians of proteins, the researches have increased to reveal the pathogenesis and immunologic mechanism of *Brucella*, and supplied a new way to solve above problems. Based on the author's own research in this field, this paper makes a summary on research progress of proteomic in the brucellosis research for seek the specific proteins and differential diagnosis methods.

Keywords: Brucellosis, Proteomic, Virulence factor, Differential diagnosis

布鲁氏菌病是由布鲁氏菌引起的一种严重危害动物健康和公共安全的人畜共患病,其主要临床症状为波状热、关节炎以及生殖障碍,而且该病往往难以治愈或预后不良,给公共卫生安全和养殖业带来严重的经济损失^[1]。布鲁氏菌是胞内寄生的革兰氏阴性菌,其侵入机体后在巨噬细胞内增殖并感染其他实质脏器,正是由于该特点,大多数抗生素类药物对布鲁氏菌病的治疗作用十分有限^[2]。布鲁氏菌没有菌毛、鞭毛、荚膜等细菌常有的毒力因子,其毒力机制尚不完全清楚,但通常认为与其细胞膜的复合组成结构有关^[3]。布鲁氏菌的细胞膜主要由膜蛋白、细胞周质间隙、脂多糖和其他小分子结构组成,其中膜蛋白在改变宿主细胞环境、介导机体产生细胞免疫应答和相关抗体等方面发挥重要作用^[4]。更为重要的是,这些膜蛋白被认为是布鲁氏菌与宿主细胞首先作用的组分^[5]。

正是由于膜蛋白在布鲁氏菌病发生发展中的重要作用,通过蛋白质组学(Proteomic)技术可以为有效的寻找相关毒力因子、筛选不同菌株之间的差异蛋白,以及为实现自然感染和疫苗免疫的鉴别诊断提供新的途径^[6]。本文对蛋白质组学在筛选布鲁氏菌毒力因子和鉴别诊断靶点上的相关研究进行简要阐述,并结合本实验室前期在蛋白质组学方面的研究成果,为后期相关研究提供借鉴。

1 蛋白质组学相关原理和常用技术

1.1 蛋白质组学相关原理

蛋白质组学是指研究细胞或机体内所有蛋白质的组成及其变化规律的学科,其最为突出的特点是通过特定的蛋白质分离手段并结合高通量鉴定分析技术,能够有效的研究在特定情况下的蛋白质表达情况^[7]。蛋白质组学的研究只要包含三方面的

内容:(1) 组成蛋白质组学,即对某个特定样品内的蛋白进行系统鉴定并阐述其特性;(2) 比较蛋白质组学,即通过比较不同状态下的不同蛋白质翻译状态,寻找特异性的蛋白差异;(3) 互作蛋白质组学,是指通过研究蛋白质之间的互作机制描绘一个或多个系统中蛋白质的作用图谱^[8]。

1.2 蛋白质组学常用技术

1.2.1 双向电泳技术

双向电泳(Two-dimensional electrophoresis, 2-DE)技术是整个蛋白质组学的核心技术之一,其原理是利用蛋白质分子量和等电点的不同对蛋白质混合物进行两次区分^[9]。该技术最早由 O'Farrell 在 1975 年建立,它使得蛋白的分离效率获得快速提升^[10]。20 世纪 80 年代,固相化 pH 梯度凝胶的出现使得双向电泳技术在蛋白质组学上的应用成为可能^[11]。2-DE 技术虽然可以使蛋白质的分离效率成倍增加,但仍有许多棘手问题:(1) 对于极性(大小、疏水性、酸碱性)蛋白质的分离效果较差;(2) 对于样品中表达丰度低的蛋白很难检测到;(3) 蛋白质点的筛选和纯化难以自动化;(4) 重复性较差^[12]。

1.2.2 质谱技术

质谱(Mass spectrometry, MS)技术最早于 1898 年出现,之后长期用于测定同位素的相对丰度^[13]。20 世纪 80 年代末期出现的基质辅助激光解析电离飞行时间质谱(MALDI-TOF-MS)使得质谱技术在蛋白质组学研究中成为重要方法之一^[14]。在蛋白质组学研究中,通常将质谱技术与其他相关技术联用,从而提高蛋白质分辨率和特异性。其中,液相色谱-质谱联用方法是针对丰度低、极性大的蛋白质而产生的技术^[15],"鸟枪法"的核心技术则是多维蛋白质鉴定技术(Multidimensional protein identification

technology, MudPTT), 其通过对多维液相色谱、串联质谱以及数据库的结合, 使得数据获得更加准确高效^[16]。有研究者采用该技术在短时间内进行一次操作, 即获得鉴定 1 484 个蛋白质点^[17]。

1.2.3 蛋白质芯片技术

蛋白质芯片技术是近年来兴起的一种研究蛋白质功能的高效方法, 其具有高通量、微型化和自动化等特点, 使得可以一次平行分析几千个甚至上万个蛋白样品, 并具有很高的敏感性和准确性^[18]。蛋白质芯片是一种高通量的研究方法, 能在一次试验中提供相当大的信息量, 能够全面、准确地研究蛋白表达谱, 这是传统的蛋白研究方法无法做到的; 蛋白质组芯片的灵敏度高, 可以检测出蛋白样品中微量蛋白的存在, 检测水平已达纳克级。蛋白质芯片主要应用于蛋白质之间的互作效应, 与传统研究方法相比, 蛋白质芯片技术降低了假阳性的发生概率^[19]。另外, 蛋白质芯片技术的灵敏性远高于其他方法, 能够用于研究蛋白质-药物、蛋白质-脂质以及蛋白质-小分子(DNA、RNA)等之间的相互作用^[20]。被普遍应用到癌症^[21]、肝炎^[22]等的诊断和检测中。

1.2.4 其他技术

蛋白质组学研究的其他技术还包括非标记方法 emPAI (Exponentially modified protein abundance index)、同位素标记的 ICAT (Isotope coded affinity tagging)、iTRAQ (Isobaric tag for relative and absolute quantification)、代谢标记(Metabolic Labeling)以及荧光标记的 DIGE 等^[23]。

另外, 生物信息学是一切蛋白质组学数据分析的基础和核心, 随着生物信息数据库的逐渐完善, 其对于蛋白质组学的借鉴和解释作用也会进一步增强。

2 蛋白质组学在布鲁氏菌病研究中的应用

蛋白质组学在布鲁氏菌病中的应用主要包括两个方面, 一是对布鲁氏菌致病机制的探究; 另一方面是对鉴别诊断蛋白点的挖掘。

2.1 蛋白质组学在研究致病机制中的应用

不同种属的布鲁氏菌基因序列高度保守, 其序

列之间的相似性高达 90%以上^[24]。但是, 不同种属之间的特性如毒力、对机体的易感性却不尽相同。所以, 在蛋白水平上揭示不同种属布鲁氏菌的差异成为重要途径之一。最早对于布鲁氏菌内蛋白质的研究可追溯到 20 世纪七八十年代, 研究者通过 SDS-PAGE 和免疫印迹的方法鉴定出不同种属布鲁氏菌的特异性蛋白^[25-26]。1997 年, Teixeira-Gomes 等首次通过双向电泳技术阐述了羊种布鲁氏菌 B115 株的蛋白质组学, 此后其又解释了羊种布鲁氏菌标准强毒株 16M 在热应激、酸处理和缺氧压力下蛋白质组学变化^[27]。但是, 上述研究所鉴定的蛋白质均建立在 Western blot 或 Edman 测序的基础上, 导致其灵敏度和分辨率均较差。

2002 年, Wagner 等将 2-DE 和质谱分析相结合, 共在羊种 16M 株上鉴定出 883 个明确的蛋白质点。与此同时, 有研究针对布鲁氏菌 Rev.1 弱毒疫苗株和 16M 强毒株进行对比, 发现其中 17 个蛋白点存在差异并进行进一步分析, 发现这 17 个蛋白参与铁离子转运、糖类结合以及蛋白质合成。这说明上述蛋白的变化与细菌毒力的减弱密切相关^[28]。

然而, 仅通过双向电泳和质谱分析的方法不能反映布鲁氏菌在感染动物后的变化, 免疫蛋白质组学的应用使得揭示布鲁氏菌与宿主之间的关系更为准确和方便。最早有研究将 2-DE 结合质谱分析得到 165 个蛋白点, 使用感染布鲁氏菌的患者血清进行免疫蛋白质组学分析, 共发现 42 个免疫蛋白点。主要包括外膜蛋白 OMP25、OMP31、OMP2b 以及 GroEL 伴侣蛋白等。除了上述蛋白, 该试验还发现了诸如延胡索酸还原酶亚基、F₀F₁ 型 ATP 合成单位和半胱氨酸合成酶 A 等新的蛋白质靶点^[29]。随后国内学者也对不同类型的布鲁氏菌进行蛋白质组学研究, 鉴定出的蛋白多涉及蛋白转运、能量代谢等途径^[30]。其中 Yang 等^[31]通过免疫蛋白质组学鉴定出两个具有良好免疫原性的布鲁氏菌特异性蛋白, RS- α 和 LS-2, 并使用 RS- α 进行保护性实验, 证实 RS- α 能够显著地调动小鼠产生免疫应答并抵抗羊种布鲁氏菌的攻击, 可以作

为潜在的布鲁氏菌亚单位疫苗之一。最近,有研究者通过液相色谱技术对羊种和牛种布鲁氏菌比较后发现了 568 个差异蛋白点,经过分析后发现其中 402 个存在明显差异^[32](图 1),这进一步表明通过蛋白质组学技术能够有效鉴定出特异性蛋白靶点。Lauer 等分别对粗糙型和光滑型羊种布鲁氏菌进行比较,发现影响细胞表面活性的多个蛋白存在明显差异,包括 G 蛋白调节因子 III、赖氨酸特异性脱甲基酶 5D 等^[33]。有研究者通过对感染布鲁氏菌的牛绒毛尿囊膜细胞进行分析发现,共有 103 个蛋白点与未感染布鲁氏菌的细胞存在着差异,而且更为重要的是,在感染的不同时间段内产生差异的蛋白也不一致,这揭示了布鲁氏菌在侵入机体后的影响^[34]。

本实验室同样通过免疫蛋白质组学的方法,使用布鲁氏菌山羊阳性血清对布鲁氏菌猪种 S2 株的膜蛋白进行筛选和鉴定,共鉴定出 131 个布鲁氏菌特异性蛋白质靶点,并对其中 30 个点进行进一步

质谱分析。这些蛋白点多与蛋白转运、抗压调节以及代谢途径等有关。这进一步证实,布鲁氏菌在感染机体后会改变自身的能量代谢和蛋白转运方式以适应机体内环境,从而保证其在机体内存活并持续增殖。

2.2 蛋白质组学在布鲁氏菌病鉴别诊断中的作用

蛋白质组学,特别是免疫蛋白质组学在布鲁氏菌病研究中最重要的作用是在鉴别诊断方面。对于布鲁氏菌病的鉴别诊断来说,主要包括两方面的研究方向。一是布鲁氏菌病与其他存在血清学干扰的疾病的鉴别诊断,如小肠结肠炎耶尔森氏菌 O9 (*Yersinia enterocolitica* O:9)、大肠杆菌 O157 等^[35-36];另一方面是布鲁氏菌不同种属之间或者疫苗株与野毒株之间的鉴别诊断。Al Dahouk 等^[37]在 2006 年通过 2-DE 和质谱分析对布鲁氏菌 1119-3 全菌蛋白进行鉴定,结合兔布鲁氏菌高免血清共筛选到 17 个免疫原性蛋白,应用 MALDI-MS 和 nLC-ESI-MS 方法鉴定出两个布鲁氏菌特异性蛋白,

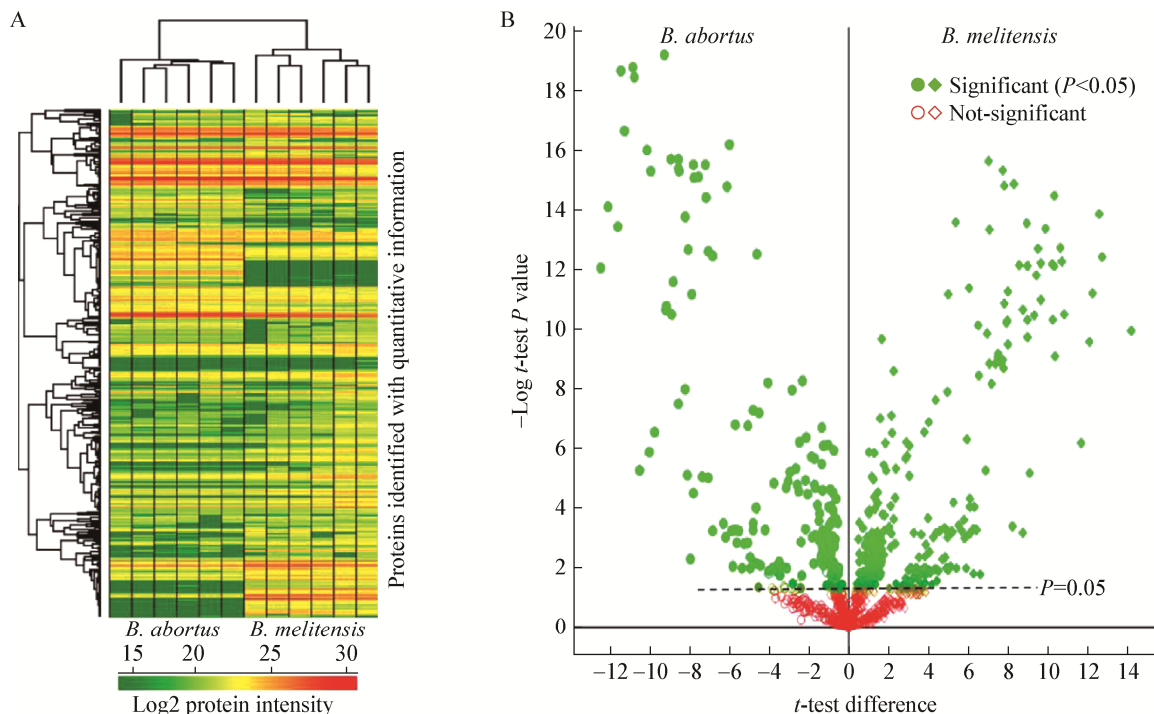


图 1 蛋白质组学技术揭示不同种属布鲁氏菌蛋白表达差异^[32]

Figure 1 The protein expressed difference of *Brucella* species revealed by proteomic^[32]

即 BCP31 和 SOD。这两个蛋白均可以与小肠结肠炎耶尔森氏菌 O9、城市沙门氏菌 N 群(*Salmonella urbana* group N)、霍乱弧菌(*Vibrio cholerae*)和土拉弗朗西斯 LVS 菌(*Francis tularensis* LVS)进行区分。Kim 等^[38]对布鲁氏菌 RB51 疫苗株与小肠结肠炎耶尔森氏菌 O9、大肠杆菌 O157 使用免疫蛋白质组学的方法进行区分,共鉴定筛选出 10 个只与 RB51 株具有反应性的蛋白点,分别是铜/锌超氧化物歧化酶、组氨醇脱氢酶、DnaK 伴侣蛋白、GroES 伴侣蛋白、辅酶 A 硫解酶、双组分应答调控因子、细胞分裂蛋白 FtsZ、醛脱氢酶、50S 核糖体蛋白 L10 和侵袭蛋白 B 等。

Munir 等^[39]通过分别提取布鲁氏菌疫苗株 S19、RB51 和一株野毒株的外膜蛋白后进行分析,使用制备的抗上述 3 个菌株的水牛血清对其进行 Western blot 验证,发现仅在野毒株中存在的大小为 151.3 kD 的外膜蛋白。随后, Pajuaba 等^[40]分别使用布鲁氏菌感染牛血清、免疫牛血清和阴性血清对提取的布鲁氏菌 S19 内组分进行鉴定,分别发现大小为 10、12 和 17 kD 的 3 个潜在用于鉴别诊断的蛋白质靶点,并对其中的 56 个蛋白质点进行进一步筛选,27 个蛋白质点对于免疫血清和自然感染血清存在差异;质谱分析发现,布鲁氏菌 S19 株上的 5 个蛋白与自然感染的血清存在特异性反应。2016 年, Wareth 等对分离自田间的两株牛种布鲁氏菌和羊种布鲁氏菌进行蛋白质组学鉴定,发现分别有 63 个和 103 个蛋白是牛种和羊种布鲁氏菌所特有的;使用不同感染动物(奶牛、水牛、山羊、绵羊)的布鲁氏菌阳性血清进行免疫蛋白质组学分析,其中牛种布鲁氏菌 25 个蛋白有特异性的免疫反应,羊种布鲁氏菌则有 20 个;牛种布鲁氏菌内的二氢吡啶二羧酸合成酶、3-磷酸甘油醛脱氢酶和乳酸/丙酮酸脱氢酶,羊种布鲁氏菌内的 ABC 氨基酸转运蛋白底物结合蛋白以及两株菌共有的延胡索酰乙酰乙酸水解酶则与所有的阳性血清均存在反应^[32]。上述研究对于揭示不同状态下机体对于免疫/感染后的免疫应答和鉴别自然感染与免疫状况

均具有重要意义。本实验室使用布鲁氏菌 S2 疫苗株的膜蛋白对免疫和感染的山羊血清进行免疫蛋白质组学和免疫共沉淀(Co-immunoprecipitation)鉴定,共筛选到 10 个候选蛋白,并对这 10 个蛋白通过原核表达系统进行表达纯化,初步建立了基于间接 ELISA 手段上的鉴别诊断方法。

3 结论与展望

蛋白质组学作为组学研究中的重要一环,对于揭示蛋白质对于机体的影响具有重要意义,也为阐明疾病的致病机理和有效治疗提供了理论依据和解决途径,为疾病的早期诊断提供了分子标识^[41]。布鲁氏菌作为胞内寄生菌,其调动免疫逃逸机制后对于宿主和自身内部蛋白质表达的变化相较于其他细菌来说更加明显,所以蛋白质组学方法对于布鲁氏菌病的研究具有重要意义^[6]。但是,布鲁氏菌无论是在致病特点还是在蛋白组成等方面都远比病毒等复杂,因此对其蛋白质组学的研究相对较少;而且现有的研究结果所筛选和鉴定得到的多是与调节物质代谢、能量转运和酶类激活等有关的蛋白,这些蛋白的改变是因为布鲁氏菌本身变化引起还是由于机体对于免疫/感染后产生的非特异性应答还需要进一步证实。另外,由于双向电泳等技术限制,其结果的重复性较差,需要在研究时同时做平行试验以保证结果的真实性。总之,蛋白质组学的引入对于更好地掌握布鲁氏菌的致病机制以及有效预防和治疗布鲁氏菌病提供了理论支撑。随着蛋白质组学相关技术的进一步发展,其在布鲁氏菌病研究上的应用将会更加完善和成熟。

REFERENCES

- [1] Cutler SJ, Whatmore AM, Commer NJ. Brucellosis—new aspects of an old disease[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2005, 98(6): 1270-1281
- [2] Kortepeter MG, Parker GW. Potential biological weapons threats[J]. *Emerging Infectious Diseases*, 1999, 5(4): 523-527
- [3] Celli J, Gorvel JP. Organelle robbery: *Brucella* interactions with the endoplasmic reticulum[J]. *Current Opinion in Microbiology*, 2004, 7(1): 93-97
- [4] Moriyón I, López-Goñi I. Structure and properties of the outer membranes of *Brucella abortus* and *Brucella melitensis*[J]. *International Microbiology*, 1998, 1(1): 19-26
- [5] Geiger O. Lipids and *Legionella* Virulence[M]. Berlin Heidelberg:

- Springer, 2010: 3195-3202
- [6] Delvecchio VG, Wagner MA, Eschenbrenner M, et al. *Brucella* proteomes—a review[J]. Veterinary Microbiology, 2002, 90(1/4): 593-603
- [7] Cox J, Hein MY, Luber CA, et al. Accurate proteome-wide label-free quantification by delayed normalization and maximal peptide ratio extraction, termed MaxLFQ[J]. Molecular & Cellular Proteomics, 2014, 13(9): 2513-2526
- [8] Pandey A, Mann M. Proteomics to study genes and genomes[J]. Nature, 2000, 405(6788): 837-846
- [9] Aebersold R, Mann M. Mass spectrometry-based proteomics[J]. Nature, 2003, 422(6928): 198-207
- [10] O'Farrell PH. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins[J]. The Journal of Biological Chemistry, 1975, 250(10): 4007-4021
- [11] Bjellqvist B, Ek K, Righetti PG, et al. Isoelectric focusing in immobilized pH gradients: principle, methodology and some applications[J]. Journal of Biochemical and Biophysical Methods, 1982, 6(4): 317-339
- [12] Tonge R, Shaw J, Middleton B, et al. Validation and development of fluorescence two-dimensional differential gel electrophoresis proteomics technology[J]. Proteomics, 2001, 1(3): 377-396
- [13] Patel RS, Roy M, Dutta GK. Mass spectrometry—a review[J]. Veterinary World, 2012, 5(3): 185-192
- [14] Karas M, Hillenkamp F. Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons[J]. Analytical Chemistry, 1988, 60(20): 2299-2301
- [15] Jemal M. High-throughput quantitative bioanalysis by LC/MS/MS[J]. Biomedical Chromatography, 2000, 14(6): 422-429
- [16] Chen EI, Hewel J, Felding-Habermann B, et al. Large scale protein profiling by combination of protein fractionation and multidimensional protein identification technology (MudPIT)[J]. Molecular & Cellular Proteomics, 2006, 5(1): 53-56
- [17] Washburn MP, Wolters D, Yates III JR. Large-scale analysis of the yeast proteome by multidimensional protein identification technology[J]. Nature Biotechnology, 2001, 19(3): 242-247
- [18] Zhu H, Snyder M. Protein chip technology[J]. Current Opinion in Chemical Biology, 2003, 7(1): 55-63
- [19] Borrebaeck CAK. Antibodies in diagnostics—from immunoassays to protein chips[J]. Immunology Today, 2000, 21(8): 379-382
- [20] Seibert V, Wiesner A, Buschmann T, et al. Surface-enhanced laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry (SELDI TOF-MS) and ProteinChip® technology in proteomics research[J]. Pathology-Research and Practice, 2004, 200(2): 83-94
- [21] Wiesner A. Detection of tumor markers with ProteinChip® technology[J]. Current Pharmaceutical Biotechnology, 2004, 5(1): 45-67
- [22] Morra R, Munteanu M, Bedossa P, et al. Diagnostic value of serum protein profiling by SELDI-TOF ProteinChip compared with a biochemical marker, FibroTest, for the diagnosis of advanced fibrosis in patients with chronic hepatitis C[J]. Alimentary Pharmacology and Therapeutics, 2007, 26(6): 847-858
- [23] Meng LL, Qi MW. Application of quantitative proteomics expression analysis using stable isotope labeling[J]. Journal of Isotopes, 2005, 18(4): 245-249 (in Chinese)
- 孟丽丽, 齐孟文. 稳定同位素标记方法在蛋白质组学定量分析中的应用[J]. 同位素, 2005, 18(4): 245-249
- [24] Wattam AR, Williams KP, Snyder EE, et al. Analysis of ten *Brucella* genomes reveals evidence for horizontal gene transfer despite a preferred intracellular lifestyle[J]. Journal of Bacteriology, 2009, 191(11): 3569-3579
- [25] Morris JA. The use of polyacrylamide gel electrophoresis in taxonomy of *Brucella*[J]. Journal of General Microbiology, 1973, 76(1): 231-237
- [26] Santos JM, Verstrete DR, Perera VY, et al. Outer membrane proteins from rough strains of four *Brucella* species[J]. Infection and Immunity, 1984, 46(1): 188-194
- [27] Teixeira-Gomes AP, Cloeckaert A, Bézard G, et al. Identification and characterization of *Brucella ovis* immunogenic proteins using two-dimensional electrophoresis and immunoblotting[J]. Electrophoresis, 1997, 18(8): 1491-1497
- [28] Wagner MA, Eschenbrenner M, Horn TA, et al. Global analysis of the *Brucella melitensis* proteome: identification of proteins expressed in laboratory-grown culture[J]. Proteomics, 2002, 2(8): 1047-1060
- [29] Connolly JP, Comerici D, Alefantis TG, et al. Proteomic analysis of *Brucella abortus* cell envelope and identification of immunogenic candidate proteins for vaccine development[J]. Proteomics, 2006, 6(13): 3767-3780
- [30] Wu S, Zhao ZP, Luo DY, et al. Application of immunoproteomics in research on outer membrane protein of *Brucella*[J]. Immunological Journal, 2008, 24(4): 385-388 (in Chinese)
- 吴朔, 赵忠鹏, 罗德炎, 等. 布鲁氏菌外膜蛋白免疫蛋白质组学方法的建立[J]. 免疫学杂志, 2008, 24(4): 385-388
- [31] Yang YL, Wang L, Yin JG, et al. Immunoproteomic analysis of *Brucella melitensis* and identification of a new immunogenic candidate protein for the development of brucellosis subunit vaccine[J]. Molecular Immunology, 2011, 49(1/2): 175-184
- [32] Wareth G, Eravci M, Weise C, et al. Comprehensive identification of immunodominant proteins of *Brucella abortus* and *Brucella melitensis* using antibodies in the sera from naturally infected hosts[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2016, 17(5): 659
- [33] Lauer SA, Iyer S, Sanchez T, et al. Proteomic analysis of detergent resistant membrane domains during early interaction of macrophages with rough and smooth *Brucella melitensis*[J]. PLoS One, 2014, 9(3): e91706
- [34] Mol JPS, Pires SF, Chapeaurouge AD, et al. Proteomic profile of *Brucella abortus*-infected bovine chorioallantoic membrane explants[J]. PLoS One, 2016, 11(4): e0154209
- [35] Ko KY, Kim JW, Her M, et al. Immunogenic proteins of *Brucella abortus* to minimize cross reactions in brucellosis diagnosis[J]. Veterinary Microbiology, 2012, 156(3/4): 374-380
- [36] Nielsen K, Smith P, Yu W, et al. Serological discrimination by indirect enzyme immunoassay between the antibody response to *Brucella* sp. and *Yersinia enterocolitica* O:9 in cattle and pigs[J]. Veterinary Immunology and Immunopathology, 2006, 109(1/2): 69-78
- [37] Al Dahouk S, Nöckler K, Scholz HC, et al. Immunoproteomic characterization of *Brucella abortus* 1119-3 preparations used for the serodiagnosis of *Brucella* infections[J]. Journal of Immunological Methods, 2006, 309(1/2): 34-47
- [38] Kim JY, Sung SR, Lee K, et al. Immunoproteomics of *Brucella abortus* RB51 as candidate antigens in serological diagnosis of brucellosis[J]. Veterinary Immunology and Immunopathology, 2014, 160(3/4): 218-224
- [39] Munir R, Afzal M, Hussain M, et al. Outer membrane proteins of *Brucella abortus* vaccinal and field strains and their immune response in buffaloes[J]. Pakistan Veterinary Journal, 2010, 30(2): 110-114
- [40] Pajuaba ACAM, Silva DAO, Almeida KC, et al. Immunoproteomics of *Brucella abortus* reveals differential antibody profiles between S19-vaccinated and naturally infected cattle[J]. Proteomics, 2012, 12(6): 820-831
- [41] Vogel C, Marcotte EM. Insights into the regulation of protein abundance from proteomic and transcriptomic analyses[J]. Nature Reviews Genetics, 2012, 13(4): 227-232