

犬种布鲁氏菌 ZG 株单克隆抗体 4H3 抗原模拟表位的筛选及分析

李巧玲, 蒋卉, 朱良全, 冯宇, 彭小薇, 范学政, 秦玉明, 丁家波*

中国兽医药品监察所 国家/OIE 布鲁氏菌病参考实验室, 北京 102600

李巧玲, 蒋卉, 朱良全, 冯宇, 彭小薇, 范学政, 秦玉明, 丁家波. 犬种布鲁氏菌 ZG 株单克隆抗体 4H3 抗原模拟表位的筛选及分析[J]. 微生物学通报, 2022, 49(8): 3244-3252

Li Qiaoling, Jiang Hui, Zhu Liangquan, Feng Yu, Peng Xiaowei, Fan Xuezheng, Qin Yuming, Ding Jiabo. Screening and analysis of mimic epitopes of monoclonal antibody 4H3 against *Brucella canis* ZG strain[J]. Microbiology China, 2022, 49(8): 3244-3252

摘要:【背景】目前犬布鲁氏菌病诊断存在一定的困难。【目的】筛选并研究犬种布鲁氏菌单克隆抗体 4H3 株的特异性抗原表位。【方法】利用噬菌体肽库展示技术, 以犬种布鲁氏菌单克隆抗体 4H3 株作为靶分子, 包被酶标板, 用 12 肽随机肽库经过 3 轮生物淘洗程序进行筛选。经过 3 轮筛选后, 噬菌体产出率从 5.00×10^{-7} 增加到 9.84×10^{-6} , 假阳性率逐轮降低。从第 3 轮筛选的阳性克隆中随机挑取 14 个进行增殖, 提取基因组 DNA, 进行测序分析; 并通过 iELISA 和 cELISA 检测阳性克隆的亲亲和性和特异性。【结果】14 株阳性单克隆噬菌体共出现 3 种不同的短肽序列, 分别是 KMSIRHPURLPI、ILRRRRKRIIQI 和 QRHMLRTTQS; iELISA 结果表明 3 种短肽序列与单克隆抗体的亲和性依次为 KMSIRHPURLPI>ILRRRRKRIIQI>QRHMLRTTQS; cELISA 结果显示短肽 KMSIRHPURLPI 和 ILRRRRKRIIQI 特异性较强。对亲和性较强、特异性较高的 2 条短肽 KMSIRHPURLPI 和 ILRRRRKRIIQI 展开具体分析, 比对分析表明 KMSIRHPURLPI 与犬种布鲁氏菌 RM6/66 菌株的肽酶 C26 家族蛋白(PuuD)有比较高的相似性, 氨基酸符合率为 75%, 而且存在 4 位连续相似氨基酸; ILRRRRKRIIQI 与布鲁氏菌 6/66 菌株中 3-氧酰基-[酰基载体蛋白]还原酶(OAR)相似性较高, 氨基酸符合率为 75%, 存在 2 位连续相似氨基酸。【结论】利用噬菌体肽库展示技术筛选出与犬种布鲁氏菌 ZG 分离株单克隆抗体特异性结合的短肽序列。

关键词: 犬种布鲁氏菌; 单克隆抗体; 12 肽库; 抗原表位

基金项目: 国家“万人计划”科技创新领军人才

Supported by: Leading Talents of Scientific and Technological Innovation in National “Ten Thousand Talents Plan” of China

*Corresponding author: E-mail: dingjiabo@126.com

Received: 2021-12-16; Accepted: 2022-01-08; Published online: 2022-04-01

Screening and analysis of mimic epitopes of monoclonal antibody 4H3 against *Brucella canis* ZG strain

LI Qiaoling, JIANG Hui, ZHU Liangquan, FENG Yu, PENG Xiaowei, FAN Xuezheng, QIN Yuming, DING Jiabo*

National/OIE Reference Laboratory for Brucellosis, China Institute of Veterinary Drug Control, Beijing 102600, China

Abstract: [Background] At present, there are some difficulties in the diagnosis of *Brucella canis*. [Objective] To screen and analyze the specific epitopes of monoclonal antibody 4H3 against *Brucella canis*. [Methods] The phage display peptide library was used for screening. The 4H3 against *B. canis* was used as the target molecule, which was employed to coat the ELISA plate. Then, we applied 12-mer phage display peptide library for screening through 3 rounds of biopanning. In the biopanning, yield of phage increased from 5.00×10^{-7} to 9.84×10^{-6} , and the false positive rate gradually decreased. We selected 14 of the screened positive clones for amplification, followed by extraction and sequencing of the genomic DNA. The affinity and specificity of the positive clones were detected by iELISA and cELISA. [Results] There were 3 different kinds of short peptide sequences in 14 monoclonal phages, which were KMSIRHPIRLPI, ILRRRRKRIIQI, and QRIHMRLTTQS, respectively. The affinity of the 3 short peptide sequences to monoclonal antibodies was in the order of KMSIRHPIRLPI > ILRRRRKRIIQI > QRIHMRLTTQS, and KMSIRHPIRLPI and ILRRRRKRIIQI had strong specificity. Thus, we further analyzed KMSIRHPIRLPI and ILRRRRKRIIQI and found that KMSIRHPIRLPI showed high similarity to peptidase C26 family protein (PuuD) of *B. canis* RM6/66 (75% similarity in amino acids) with 4 consecutive similar amino acids. ILRRRRKRIIQI had high similarity to 3-oxoyl-[acyl carrier protein] reductase (OAR) of *B. canis* RM6/66 (75% similarity in amino acids), with 2 consecutive similar amino acids. [Conclusion] Based on phage display peptide library, the short peptide sequences specifically binding to the monoclonal antibody against *B. canis* ZG were screened out.

Keywords: *Brucella canis*; monoclonal antibody; 12-mer phage display peptide library; epitope

犬种布鲁氏菌(*Brucella canis*)是一种革兰氏阴性胞内寄生菌^[1],可引起犬布鲁氏菌病(以下简称布病)。其在1966年首次分离于比格犬,1972年首次报道为人畜共患病原菌^[2],在全球范围内分布广泛^[3]。犬感染犬种布鲁氏菌后,最常见的症状是母犬不孕、流产或者产死胎;公犬患睾丸炎、附睾炎甚至不育^[4]。人感染犬种布鲁氏菌主要通过接触患病犬的分泌物或排泄物,随着宠物行业发展盛行,人类与犬接触越来越密切,因此感染风险也随之增加。

人感染多为慢性或隐性感染,数月甚至数年才能表现出症状^[5],可能会出现持续发热,严重者出现心内膜炎、骨髓炎和败血症,存在严重的公共卫生风险^[6]。因此针对犬布鲁氏菌病的前期诊断尤为重要。

噬菌体展示技术是噬菌体研究的一个转折点,最早由Smith提出^[7]。它是利用丝状噬菌体外壳蛋白表达外源肽或蛋白序列的一项强大的技术,可在未知受体情况下特异性筛选目的表位或者多肽^[8]。肽库中存在数十亿个噬菌体粒子,

每个噬菌体粒子都携带一段不同的外源 DNA 序列, 因此可以在表面展示不同的肽段。在细菌研究中, 利用噬菌体肽库可以筛选出特异性较高的抗原表位序列^[9]。近年来, 这项技术被应用于抗体工程^[10]、配体筛选^[11]、多肽药物的发现与生产^[12-13]、疾病分子层面诊断与分析^[14]和疫苗研发^[15-16]等各个领域, 同时也作为抗原表位筛选的重要手段^[17]。本研究主要以前期获得的犬种布鲁氏菌单克隆抗体 4H3 株为靶标抗原, 筛选噬菌体随机 12 肽库, 获得与抗原特异性结合的短肽及抗原表位信息, 以期为此株单克隆抗体用于犬种布鲁氏菌病的诊断提供依据。

1 材料与方法

1.1 细胞株

犬种布鲁氏菌单克隆抗体 4H3 株由国家/OIE 动物布鲁氏菌病参考实验室制备保存; 腹水由单克隆抗体 4H3 株制备。

1.2 主要试剂

Ph.D-12TM Phage Display Peptide Library Kit, NEB 公司; IPTG、X-gal、PEG-8000、盐酸四环素和 BSA, 索莱宝生物科技有限公司; PBS、抗原包被液和细菌琼脂粉, 北京陆桥生物技术有限公司; LB 液体培养基由 10 g/L NaCl、10 g/L 胰蛋白胨、5 g/L 酵母提取物配制, LB 固体培养基由 LB 液体培养基加入 12 g/L 琼脂粉制成。

1.3 噬菌体肽库展示筛选单克隆抗体表位

1.3.1 原噬菌体肽库滴度测定

将原始肽库稀释至适当浓度(倍比稀释 10^{11} 倍), 取每个稀释度的噬菌体进行噬菌斑计数, 测定 12 肽库噬菌体原库的滴度, 并计算其库容; 选择平板上约有 10^2 个噬菌斑的平板进行计数, 滴度计算公式为: 原始肽库滴度(PFU/mL)=噬菌斑个数×稀释倍数×噬菌体用量, 获得肽库滴度后, 进行生物淘选过程。

1.3.2 生物淘选

第 1 轮: 用包被液稀释单克隆抗体浓度至 100 $\mu\text{g/mL}$, 加入 100 μL 到包被板中, 4 $^{\circ}\text{C}$ 包被过夜, 弃掉包被液, 用 TBST (TBS-Tween-20) 清洗板 3 次, 在干净的纸巾上用力拍干, 加入 100 μL 封阻液, 4 $^{\circ}\text{C}$ 作用 1 h, 弃掉封阻液, 用 TBST 清洗板孔 6 次并将包被孔拍干。取 100 μL 用 TBST 稀释的原始噬菌体, 加入到包被孔中, 室温下 80 r/min 轻微振荡 60 min, 弃掉未结合上的噬菌体残留液, 用 TBST 清洗 10 次, 每次都用于干净的纸巾拍干, 以免污染。加入 100 μL 洗脱液(100 $\mu\text{g/mL}$ 的靶分子溶液)在摇床上 80 r/min, 室温轻微振荡 30 min, 将洗脱液转移至 1.5 μL 离心管中。将洗脱物倍比稀释, 分别取 10 μL 的 10^{-2} 、 10^{-3} 和 10^{-4} 稀释度洗脱液在 LB/IPTG/Xgal 平板上进行滴度测定。

1.3.3 噬菌斑扩增

将剩余的洗脱液加入到培养至对数期 (OD_{600} 为 0.4–0.6) 的 ER2738 宿主菌中, 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、180 r/min 条件下培养 4.5 h, 进行扩增后滴度测定。第 2 轮、第 3 轮等淘选程序均与第 1 轮相同, 同时分别将第 2 轮和第 3 轮单抗包被浓度调至 80 $\mu\text{g/mL}$ 和 60 $\mu\text{g/mL}$, 投入噬菌体浓度分别是 6.0×10^9 PFU/mL 和 6.3×10^{10} PFU/mL。

1.3.4 测序模板的纯化

挑取第 3 轮淘洗后的阳性噬菌斑单克隆, 37 $^{\circ}\text{C}$ 、180 r/min 培养 4.5 h, 4 $^{\circ}\text{C}$ 、10 000 r/min 离心 5 min。吸取 500 μL 含噬菌体的上清至 1.5 mL 离心管中, 加入 1/6 体积的聚乙二醇(polyethylene glycol, PEG)/NaCl, 冰浴 20 min。12 000 r/min 离心 10 min, 弃上清, 吸干残留液体。用 100 μL NaI 重悬沉淀物, 加入无水乙醇 250 μL , 室温沉淀 20 min, 12 000 r/min 离心 10 min, 弃掉上清。将残留液体用吸水纸吸干, 加入 30 μL 0.1 mmol/L TE (Tris-EDTA, pH 8.0) 缓冲液溶解。

1.3.5 阳性噬菌体单克隆的 DNA 序列测定

提取阳性噬菌体单克隆的单链 DNA, 送往生工生物工程(上海)股份有限公司测序, 使用-96gIII (5'-^{HO}CCCTCATAGTTAGCGTAACG-3') 测序引物, 并利用 DNASTar 分析短肽序列。

1.3.6 间接 ELISA 鉴定噬菌体阳性克隆

用 4H3 株单克隆抗体 5 μg/mL 包被 ELISA 板, 同时用 BSA 包被酶标板作对照, 每孔 100 μL, 4 °C 过夜。封闭液常温封闭 1 h, 用 PBST 清洗 3 次, 加入 100 μL 单个克隆的噬菌体扩增液(滴度稀释至 10¹¹ PFU/mL), 室温反应 1 h。弃掉反应液, 用 PBST 清洗 3 次, 然后加入适宜浓度的 HRP-抗 M13 mAb, 室温反应 1 h。用 PBST 清洗 3 次, 加入 100 μL TMB 底物显色液室温避光反应 20 min, 加入终止液终止反应, 读取 450 nm 处的吸光度值。

1.3.7 噬菌体阳性克隆的竞争抑制试验

ELISA 板包被单克隆抗体 10 μg/孔并封闭, 将阳性噬菌体扩增液分别按照 1:100、1:200、1:400、1:800、1:1 600、1:3 200 的比例稀释, 与犬种布鲁氏菌全蛋白等体积混合, 作为一抗加入酶标板, 每孔 100 μL, 室温孵育 1 h。PBST 清洗板孔 3 次, 加 HRP-抗 M13 mAb, 室温 100 r/min 振摇孵育 1 h, PBST 清洗 6 次酶标板, 加 TMB 显色液 100 μL, 室温避光孵育 15 min, 加 50 μL 终止液终止反应, 在酶标仪上测 A₄₅₀ 值。抑制率(%)=(未受抑制 A₄₅₀-抑制后 A₄₅₀)/未被抑制 A₄₅₀×100。

2 结果与分析

2.1 噬菌体肽库的富集率

将原始文库倍比稀释后, 记录稀释至 10⁻⁹ 的蓝斑数, 计算原始文库的浓度, 结果为 2.08×10¹³ PFU/mL。在淘洗过程中, 每轮用的噬菌体量为 input, 洗脱后得到的噬菌体数量为

output, 计算每轮噬菌体的产出率, 即 产出率=output/input, 从而分析噬菌体的富集情况。本研究经过 3 轮淘选, 发现产出率逐渐提高(表 1), 表明噬菌体富集效果较好。

2.2 随机单克隆噬菌体 DNA 提取结果

随机挑取 14 个单克隆噬菌体的噬菌斑, 在液体 LB 培养液中 37 °C 增殖培养, 并提取其 DNA, 核酸凝胶电泳检测, 结果 14 株噬菌体均提取到核酸, 在大于 5 000 bp 处出现条带, 如图 1 所示。

2.3 随机单克隆噬菌体 DNA 测序及序列分析

将提取的噬菌体 DNA 进行核酸测序, 并用 DNASTar 软件分析出其编码的对应氨基酸序列, 结果显示出现 3 种不同的氨基酸残基, 结果见表 2, 其中短肽链出现次数从高到低依次是 KMSIRHPIRLPI、QRIHMRLTTQS 和 ILRRRRKRIIQI。

2.4 噬菌体阳性克隆间接 ELISA 检测

利用间接 ELISA 方法检测 4H3 株单克隆抗体与筛选的噬菌体短肽的亲合力。在第 3 轮淘洗后随机挑取 14 个噬菌体阳性克隆, 用其扩增后的噬菌体液进行间接 ELISA, 设立

表 1 3 轮淘选噬菌体的富集情况

Table 1 Enrichment of phages in 3 rounds of panning

淘选次数 Elutriation times	抗原包被浓度 Antigen coating concentration (μg/μL)	投入量 Input (PFU)	产出量 Output (PFU)	产出率 Output rate
第 1 轮 (1st round)	100	2.0×10 ¹⁰	1.0×10 ⁴	5.00×10 ⁻⁷
第 2 轮 (2nd round)	80	6.0×10 ⁹	7.1×10 ³	1.18×10 ⁻⁶
第 3 轮 (3rd round)	60	6.3×10 ¹⁰	6.2×10 ⁵	9.84×10 ⁻⁶

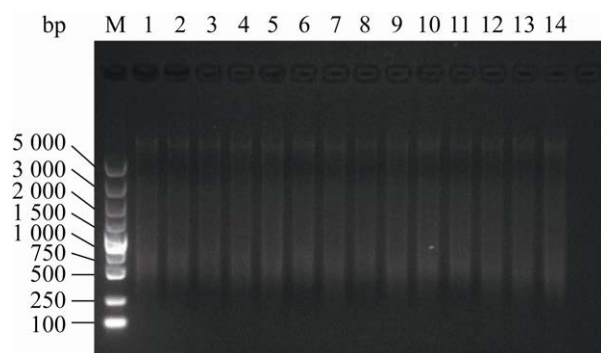


图 1 14 个噬菌体核酸电泳检测结果 M: DL5000 DNA Marker; 1-14: 分别为 14 个噬菌体核酸电泳结果

Figure 1 Results of DNA electrophoresis of the 14 phage. M: DL5000 DNA Marker; 1-14: The results of DNA electrophoresis of 14 phages.

BSA 对照。结果表明, 14 个噬菌体克隆对应的 3 条短肽链与 4H3 株单抗亲和力由高到低依次为 KMSIRHPIRLPI、ILRRRRKRIIQI、QRIHMRLTTQS, 结果见图 2。

2.5 噬菌体阳性克隆的竞争抑制试验

为了检测筛选的噬菌体短肽与 4H3 株单克

隆抗体的结合特异性, 用包被的犬种布鲁氏菌 ZG 株单克隆抗体与扩增并稀释不同浓度的噬菌体短肽(KMSIRHPIRLPI 和 ILRRRRKRIIQI)及 ZG 株全蛋白进行竞争抑制试验。结果显示, 随着对应氨基酸序列 KMSIRHPIRLPI (C1)和 ILRRRRKRIIQI (C3)噬菌体扩增液浓度降低, 其抑制单抗与犬种布鲁氏菌全蛋白的结合作用逐渐降低, 也就是抑制率逐渐降低, 表明 2 条噬菌体短肽能够与 4H3 株单抗发生特异性结合, 结果如图 3 所示。

2.6 阳性克隆氨基酸序列分析

利用 DNASTar 比对分析筛选出的阳性噬菌体短肽, 结果显示 KMSIRHPIRLPI (C1)与布鲁氏菌 RM6/66 中肽酶 C26 家族蛋白 157-168 位和氨肽酶 N 483-494 位氨基酸有一定相似性(图 4), 图 4 显示 12 肽中第 4、5、7 位的 I (异亮氨酸)、R (精氨酸)、P (脯氨酸)均和 RM6/66 中有对应; ILRRRRKRIIQI (C3)与 RM6/66 菌株中 3-氧酰基-[酰基载体蛋白]还原酶 126-137 位和 nnrS 家族蛋白的 404-414 位氨基酸有一定

表 2 噬菌体 DNA 测序及其对应的氨基酸序列

Table 2 Phage DNA sequencing and corresponding amino acid sequence

序号 No.	核酸序列 Nucleic acid sequence (5'→3')	氨基酸序列 Amino acid sequence
1	AAGATGAGCATTTCGACATCCAATTCGTCTGCCAATC	KMSIRHPIRLPI
2	AAGATGAGCATTTCGACATCCAATTCGTCTGCCAATC	KMSIRHPIRLPI
3	ATCCTTAGGAGAAGACGGAAACGCATAATACAGATT	ILRRRRKRIIQI
4	CAGCGAATACACATGAGACTCACCACGCAAAGC	QRIHMRLTTQS
5	ATCCTTAGGAGAAGACGGAAACGCATAATACAGATT	ILRRRRKRIIQI
6	CAGCGAATACACATGAGACTCACCACGCAAAGC	QRIHMRLTTQS
7	AAGATGAGCATTTCGACATCCAATTCGTCTGCCAATC	KMSIRHPIRLPI
8	ATCCTTAGGAGAAGACGGAAACGCATAATACAGATT	ILRRRRKRIIQI
9	AAGATGAGCATTTCGACATCCAATTCGTCTGCCAATC	KMSIRHPIRLPI
10	AAGATGAGCATTTCGACATCCAATTCGTCTGCCAATC	KMSIRHPIRLPI
11	AAGATGAGCATTTCGACATCCAATTCGTCTGCCAATC	KMSIRHPIRLPI
12	AAGATGAGCATTTCGACATCCAATTCGTCTGCCAATC	KMSIRHPIRLPI
13	CAGCGAATACACATGAGACTCACCACGCAAAGC	QRIHMRLTTQS
14	CAGCGAATACACATGAGACTCACCACGCAAAGC	QRIHMRLTTQS

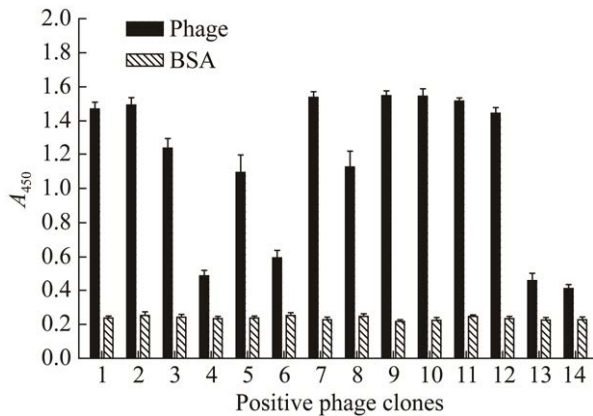


图 2 间接 ELISA 检测噬菌体短肽结合单抗 4H3 活性

Figure 2 Test of binding activity of the phage small peptides to 4H3 monoclonal antibody by iELISA.

的相似性(图 5), 并且 12 肽第 3、5、8 位的 R (精氨酸)均与 RM6/66 中有对应。结果表明, C1 和 C3 序列中均存在 R (精氨酸)与 RM6/66 中有对应, 提示 R 可能成为抗体结合的必要氨基酸位点。

3 讨论与结论

表位识别鉴定对于了解病原菌和抗体分子层面相互作用非常重要, 是研发特异诊断试剂

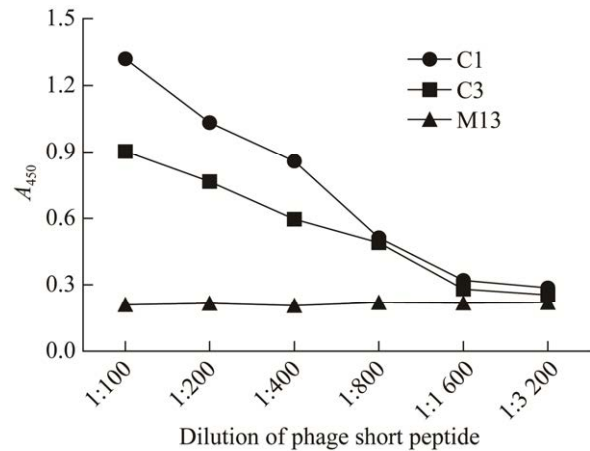


图 3 竞争 ELISA 检测阳性噬菌体结合单抗 4H3 特异性

Figure 3 Test of binding specificity of the phage small peptides to 4H3 monoclonal antibody by cELISA.

的重要前提^[18-19]。在细菌方面的研究中, 柴静^[20]利用噬菌体展示技术筛选出结核分枝杆菌表面毒力蛋白结合多肽, 可用于临床上结核分枝杆菌的检测; 何泊宁^[21]利用噬菌体展示技术筛选了牛多杀性巴氏杆菌 TapA 蛋白抗原表位, 为此病的血清学诊断奠定了基础。由此表明, 噬菌体模拟多肽可以用作细菌性疾病的诊断。

Query	1	KMSIRHPRLPI	12	Query	1	KMSIRHPRLPI	12
		++IRHP++L				SIR P+ +PI	
AIJ83625.1_611	157	RFAIRHPVKLNLP	168	AIJ81700.1_685	483	GQSIRKPMHPI	494

图 4 单抗阳性噬菌体 12 肽氨基酸序列 C1 与 RM6/66 菌株全蛋白组序列比对结果

Figure 4 Comparison of 12 peptide amino acid sequence C1 of monoclonal antibody positive phage with the whole proteome sequence of strain RM6/66.

Query	1	ILRRRKRIIQI	12	Query	1	ILRRRKRIIQI	12
		++RRR RII I				+LR+RR R+	
AIJ81885.1_534	126	MMRRRNGRIINI	137	AIJ84304.1_1084	404	LLFKRRSRMG	414

图 5 单抗阳性噬菌体 12 肽氨基酸序列 C3 与 RM6/66 菌株全蛋白组序列比对结果

Figure 5 Comparison of 12 peptide amino acid sequence C3 of monoclonal antibody positive phage with the whole proteome sequence of strain RM6/66.

本实验以犬种布鲁氏菌 ZG 分离株制备的单克隆抗体 4H3 为研究对象,用噬菌体 12 肽库筛选其抗原表位,对筛选的 14 个阳性克隆噬菌斑进行测序,得出 3 种不同的短肽序列,分别是 KMSIRHPIRLPI、ILRRRRKRIIQI 和 QRIHMRLTTQS。根据间接 ELISA 和竞争 ELISA 对其亲和性、特异性的鉴定结果,其中 KMSIRHPIRLPI 和 ILRRRRKRIIQI 这 2 条多肽既具有较强的亲和力,又具有较高的特异性。

经序列分析, KMSIRHPIRLPI 与布鲁氏菌 6/66 菌株中肽酶 C26 家族蛋白的 157-168 位氨基酸中有 5 位符合的氨基酸,其中 4 位连续氨基酸为 Ile-Arg-His-Pro,而且存在 4 位相似氨基酸,分别是 Met-Phe、Ser-Ala、Ile-Val 和 Arg-Lys,与肽酶 C26 家族蛋白符合率为 75%;与氨肽酶 N 483-494 位氨基酸有 5 位氨基酸符合,存在 3 位连续氨基酸,即 Ser-Ile-Arg,存在 2 位相似氨基酸分别是 Ile-Met 和 Leu-Ile,符合率为 58.3%。ILRRRRKRIIQI 与布鲁氏菌 6/66 菌株中 3-氧酰基-酰基载体蛋白还原酶 126-137 位氨基酸中有 7 位氨基酸符合,两处有 3 位连续的氨基酸,分别是 Arg-Arg-Arg 和 Arg-Ile-Ile,存在 2 位相似氨基酸为 Ile-Met 和 Leu-Met,符合率为 75%;与 nnrS 家族蛋白的 404-414 位氨基酸中有 5 位氨基酸符合,有两处存在连续 2 位氨基酸,分别是 Leu-Arg 和 Arg-Arg,存在 3 位相似氨基酸分别是 Ile-Leu、Arg-Lys 和 Ile-Met,符合率为 66.7%。由以上结果可知,其中一条阳性噬菌体短肽(KMSIRHPIRLPI)对应的氨基酸在肽酶 C26 家族蛋白中连续氨基酸序列最多,出现错配率最低,因此最可能成为筛选的靶标蛋白,其次是 ILRRRRKRIIQI 对应的 3-氧酰基-酰基载体蛋白还原酶,也有可能成为目标蛋白。

肽酶 C26 家族蛋白在 NCBI 的注释是 γ -谷

氨酰- γ -氨基丁酸水解酶(PuuD),参与微生物的 Puu 途径,将 γ -谷氨酰- γ -氨基丁酸(γ -Glu-GABA)水解为谷氨酰和 γ -氨基丁酸(γ -aminobutyric acid, GABA)^[22]。谷氨酰是谷氨酰肽的残基, γ -氨基丁酸(γ -aminobutyric acid)通常被称作 GABA,是一种四碳非蛋白氨基酸,广泛存在于自然界中,在微生物细胞中受到酸的调控。GABA 作为一种常见的响应外部应激的代谢物质发挥重要的调控作用^[23]。3-氧酰基-酰基载体蛋白还原酶(OAR)在细菌脂肪酸合成途径中发挥重要作用,参与催化 3-氧酰基-酰基载体蛋白还原过程^[24-25],其催化 NADPH 依赖的 β -酮酰基 ACP 底物还原为 β -羟酰基 ACP 产物,这是脂肪酸生物合成延伸周期中的第一个还原步骤^[26]。脂肪酸是细胞膜的主要组分,很大程度上决定细菌细胞膜的生物物理结构,通过调节脂肪酸的形成及结构维持膜的稳定性、调节正常生理功能,适应突变环境^[27]。革兰氏阴性菌外膜的种类 A 产生于脂肪酸生物合成过程中,而类脂 A 可引起致病,也是免疫细胞特异性识别的重要因子^[28]。因此,3-氧酰基-酰基载体蛋白还原酶(OAR)参与脂肪酸生物合成的过程对革兰氏阴性菌的生物学功能起着重要作用, γ -谷氨酰- γ -氨基丁酸水解酶与 3-氧酰基-酰基载体蛋白还原酶在布鲁氏菌中可进行深入研究。

犬种布鲁氏菌是典型的粗糙型细菌,不具有特异的细菌脂多糖(lipopolysaccharide, LPS),因此在诊断方面存在一定困难。本研究通过噬菌体随机肽库展示技术,对已获得犬种布鲁氏菌特异性单克隆抗体的抗原表位进行了筛选鉴定及分析,初步判断出 2 条阳性短肽序列位点分别与犬种布鲁氏菌的肽酶 C26 家族蛋白(PuuD)和 3-氧酰基-酰基载体蛋白还原酶(OAR)符合率较高,为该株单抗进一步应用于犬种布鲁氏菌病的诊断提供了研究基础。

REFERENCES

- [1] Hensel ME, Negron M, Arenas-Gamboa AM. Brucellosis in dogs and public health risk[J]. *Emerging infectious diseases*, 2018, 24(8): 1401-1406
- [2] Suárez-Esquivel M, Ruiz-Villalobos N, Hidalgo-Jara W, Chacón-Díaz C, Zúñiga-Pereira AM, Masis-Mora M, Fernández-Fernández E, Hernández-Mora G, Barquero-Calvo E, Chaves-Olarte E, et al. Canine brucellosis in Costa Rica reveals widespread *Brucella canis* infection and the recent introduction of foreign strains[J]. *Veterinary Microbiology*, 2021, 257: 109072
- [3] Keid LB, Chiebao DP, Batinga MCA, Fanta T, Diniz JA, De S Oliveira TMF, Ferreira HL, Soares RM. *Brucella canis* infection in dogs from commercial breeding kennels in Brazil[J]. *Transboundary and Emerging Diseases*, 2017, 64(3): 691-697
- [4] Eckstein C, Mol JPS, Costa FB, Nunes PP, Lima PA, Melo MM, Carvalho TP, Santos DO, Silva MF, Carvalho TF, et al. *Brucella ovis* mutant in ABC transporter protects against *Brucella canis* infection in mice and it is safe for dogs[J]. *PLoS One*, 2020, 15(4): e0231893
- [5] Krueger WS, Lucero NE, Brower A, Heil GL, Gray GC. Evidence for unapparent *Brucella canis* infections among adults with occupational exposure to dogs[J]. *Zoonoses and Public Health*, 2014, 61(7): 509-518
- [6] Whitten TV, Brayshaw G, Patnayak D, Alvarez J, Larson CM, Root Kustritz M, Holzbauer SM, Torrison J, Scheftel JM. Seroprevalence of *Brucella canis* antibodies in dogs entering a Minnesota humane society, Minnesota, 2016-2017[J]. *Preventive Veterinary Medicine*, 2019, 168: 90-94
- [7] Smith GP. Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface[J]. *Science*, 1985, 228(4705): 1315-1317
- [8] Zhang RH, Yang YP, Lan JJ, Lin SL, Xie ZJ, Zhang XS, Jiang SJ. A novel peptide isolated from a phage display peptide library modeling antigenic epitope of DHAV-1 and DHAV-3[J]. *Vaccines*, 2020, 8(1): 121
- [9] Wang MY, Zhai L, Yu W, Wei YH, Wang LZ, Liu S, Li WY, Li XT, Yu SM, Chen XT, et al. Identification of a protective B-cell epitope of the *Staphylococcus aureus* GapC protein by screening a phage-displayed random peptide library[J]. *PLoS One*, 2018, 13(1): e0190452
- [10] Frei JC, Lai JR. Protein and antibody engineering by phage display[J]. *Methods in Enzymology*, 2016, 580: 45-87
- [11] Malek TR, Robb RJ, Shevach EM. Identification and initial characterization of a rat monoclonal antibody reactive with the murine interleukin 2 receptor-ligand complex[J]. *PNAS*, 1983, 80(18): 5694-5698
- [12] Krumpe LRH, Mori T. Potential of phage-displayed peptide library technology to identify functional targeting peptides[J]. *Expert Opinion on Drug Discovery*, 2007, 2(4): 525-537
- [13] Wang LD, Hu Y, Li WJ, Wang F, Lu XS, Han XY, Lv JQ, Chen J. Identification of a peptide specifically targeting ovarian cancer by the screening of a phage display peptide library[J]. *Oncology Letters*, 2016, 11(6): 4022-4026
- [14] Anand T, Virmani N, Bera BC, Vaid RK, Vashisth M, Bardajaty P, Kumar A, Tripathi BN. Phage display technique as a tool for diagnosis and antibody selection for coronaviruses[J]. *Current Microbiology*, 2021, 78(4): 1124-1134
- [15] Rami A, Behdani M, Yardehnavi N, Habibi-Anbouhi M, Kazemi-Lomedasht F. An overview on application of phage display technique in immunological studies[J]. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 2017, 7(7): 599-602
- [16] Aghebati-Maleki L, Bakhshinejad B, Baradaran B, Motallebnezhad M, Aghebati-Maleki A, Nickho H, Yousefi M, Majidi J. Phage display as a promising approach for vaccine development[J]. *Journal of Biomedical Science*, 2016, 23(1): 66
- [17] Chen XN, Dreskin SC. Application of phage peptide display technology for the study of food allergen epitopes[J]. *Molecular Nutrition & Food Research*, 2017, 61(6): 201600568
- [18] 沈莉莉, 王姣姣, 陈吴越, 周婧, 马宏跃, 许惠琴, 程海波, 陆茵, 段金殿. 抗肿瘤多肽的高效筛选方法及研究现状[J]. *药学报*, 2020, 55(10): 2298-2305
- Shen LL, Wang JJ, Chen WY, Zhou J, Ma HY, Xu HQ, Cheng HB, Lu Y, Duan JN. Advances in effectively screening anti-tumor peptides[J]. *Acta Pharmaceutica Sinica*, 2020, 55(10): 2298-2305 (in Chinese)
- [19] Wang L, Deng XY, Liu HC, Zhao LH, You XL, Dai P, Wan KL, Zeng YH. The mimic epitopes of *Mycobacterium tuberculosis* screened by phage display peptide library have serodiagnostic potential for tuberculosis[J]. *Pathogens and Disease*, 2016, 74(8): ftw091
- [20] 柴静. 噬菌体展示技术筛选结核分枝杆菌表面毒力

- 蛋白结合多肽[D]. 武汉: 湖北大学硕士学位论文, 2016
- Chai J. The selection of random peptides that bind to surface virulence protein of *Mycobacterium tuberculosis* (H37Rv) by phage display technology[D]. Wuhan: Master's Thesis of Hubei University, 2016 (in Chinese)
- [21] 何泊宁. 牛多杀性巴氏杆菌分离鉴定及应用噬菌体展示技术筛选 TbpA 蛋白抗原表位[D]. 大庆: 黑龙江八一农垦大学硕士学位论文, 2019
- He BN. Isolation, identification of bovine *Pasteurella multocida* and screening of TbpA antigenic epitopes by phage display technology[D]. Daqing: Master's Thesis of Heilongjiang Bayi Agricultural University, 2019 (in Chinese)
- [22] Kurihara S, Oda S, Kumagai H, Suzuki H. γ -glutamyl- γ -aminobutyrate hydrolase in the putrescine utilization pathway of *Escherichia coli* K-12[J]. FEMS Microbiology Letters, 2006, 256(2): 318-323
- [23] 张宿. γ -氨基丁酸的生理作用及应用[J]. 安徽农业科学, 2019, 47(18): 1-9, 16
- Zhang X. The physiological mechanism and application of γ -aminobutyric acid[J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2019, 47(18): 1-9, 16 (in Chinese)
- [24] Zhang YM, Rock CO. Membrane lipid homeostasis in bacteria[J]. Nature Reviews Microbiology, 2008, 6(3): 222-233
- [25] Guo QQ, Zhang WB, Zhang C, Song YL, Liao YL, Ma JC, Yu YH, Wang HH. Characterization of 3-oxacyl-acyl carrier protein reductase homolog genes in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1[J]. Frontiers in Microbiology, 2019, 10: 1028
- [26] Lai CY, Cronan JE. Isolation and characterization of beta-ketoacyl-acyl carrier protein reductase (fabG) mutants of *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* serovar Typhimurium[J]. Journal of Bacteriology, 2004, 186(6): 1869-1878
- [27] Zhang YM, Rock CO. Membrane lipid homeostasis in bacteria[J]. Nature Reviews Microbiology, 2008, 6(3): 222-233
- [28] Wang XY, Quinn PJ. Lipopolysaccharide: biosynthetic pathway and structure modification[J]. Progress in Lipid Research, 2010, 49(2): 97-107