



## 流产布鲁氏菌转录调控因子 GntR 在小鼠模型上诱导的辅助性 T 细胞免疫应答

王书利, 赵书杰, 罗怡馨, 杨岚, 郭文静, 田婷婷, 李志强\*, 原宝东\*

商丘师范学院生物与食品学院, 河南 商丘 476000

**摘要:** 【目的】通过对布鲁氏菌 *gntR* 基因进行原核表达, 分析其诱导机体产生的 Th1 和 Th2 型免疫反应。【方法】以布鲁氏菌 S2308 基因组为模板, 根据 GenBank 上公布的 S2308 *gntR* 基因序列设计引物, 利用分子克隆技术, 将 *gntR* 基因片段克隆至原核表达载体 pET-30a, 转化至大肠杆菌 BL21 感受态细胞中, 诱导 GntR 蛋白表达; 利用 SDS-PAGE 对 GntR 重组蛋白(rGntR)进行分析; 利用 AKTExpress 智能多维纯化系统对 rGntR 进行纯化; 利用 Western blotting 分析其免疫反应性; 用 rGntR 刺激小鼠巨噬细胞 RAW 264.7 和小鼠脾细胞, 利用 ELISA 试剂盒检测细胞因子 IFN- $\gamma$ 、IL-2、IL-4 和 IL-5, 以及 IgG 抗体的水平。将 rGntR 免疫小鼠, 检测小鼠血清中 IFN- $\gamma$  和 IL-4 的水平。【结果】*gntR* 基因大小为 735 bp, 编码 245 个氨基酸, 大约在 35 kDa 处出现蛋白条带, 纯化后为单一条带。WB 显示, rGntR 具有较好的免疫反应性。rGntR 可诱导宿主细胞和小鼠产生较高水平的 IFN- $\gamma$ 、IL-4 和 IgG。【结论】rGntR 可在体内或体外诱导辅助性 T 细胞(Th1 和 Th2 型)免疫反应。本研究可为布鲁氏菌病疫苗的研发提供科学依据。

**关键词:** 布鲁氏菌, 转录调控因子 GntR, 免疫反应

布鲁氏菌病(Brucellosis)是一种在全世界范围内都广泛分布的人畜共患传染病, 全世界 200 多个国家和地区中, 有近 170 多个国家存在此病<sup>[1]</sup>。每年有超过 50 万人被感染, 造成巨大经济损失<sup>[2]</sup>。自 2000 年以来, 布鲁氏菌病的人畜疫情在世界范

围内均出现了回升势头, 并呈持续增长态势, 愈演愈烈。全世界每年因布鲁氏菌病造成的直接经济损失近 30 亿美元, 我国布鲁氏菌病的疫区主要集中在西北、东北、华北等地。布鲁氏菌病的病原为布鲁氏菌(*Brucella*), 是一种革兰氏阴性细胞

基金项目: 国家自然科学基金(31602080)

\*通信作者: Tel: +86-370-3115957; Fax: +86-370-3125957; E-mail: 李志强, lizhiqiangstr@126.com, 原宝东, yuanbao365@163.com

收稿日期: 2019-07-22; 修回日期: 2019-10-11; 网络出版日期: 2020-01-21

内寄生的寄生菌。布鲁氏菌主要感染反刍动物和人类，感染动物后可引起公畜的睾丸炎、附睾炎和母畜的流产、不孕；感染人后可引起全身症状，如发热、出汗、关节痛、关节炎、心内膜炎、肝脾肿大和败血症等<sup>[3]</sup>。

通过对布鲁氏菌基因组功能的研究发现，布鲁氏菌中有 184 个已知功能的毒力基因<sup>[4]</sup>。其中转录调控因子是一类重要的毒力调控系统，通过结合到其识别的 DNA 序列(位于启动子区)上，介导靶基因转录的上调或下调。除了 RNA 聚合酶外，转录调控因子还是参与基因转录起始过程中不可缺少的重要元件之一。转录调控因子 GntR 具有  $\alpha$  螺旋- $\beta$  转角- $\alpha$  螺旋的特征，具有保守的 N 端 DNA 结合区域和多样化的 C 端效应子结合区域和寡聚化结构域，以此来调节和影响基因的转录和其他生物学过程<sup>[5]</sup>。转录调控因子 GntR 调控的靶基因包括脂肪酸代谢、氨基酸代谢、有机酸代谢、碳源代谢等多种重要的代谢过程以及复杂有机物降解等相关功能的基因<sup>[5]</sup>。细菌生存相关的基因也受 GntR 调控，GntR 主要通过调控基因的转录，使细菌感应和应答胞内和胞外的信号<sup>[6-7]</sup>。由此可见 GntR 在细菌致病过程中发挥了重要作用，是重要的调控因子。然而，GntR 在布鲁氏菌致病过程中的免疫反应和免疫机制还尚不清楚。

IFN- $\gamma$  是 Th1 型细胞因子，可刺激细胞免疫应答；而 IL-4 是 Th2 型细胞因子，可刺激体液免疫应答。因此，在本研究中，我们构建了 GntR 重组蛋白(rGntR)，并检测了其在免疫应答中的作用。另外，我们用间接 ELISA 检测了 Th1 和 Th2 型细胞因子。本研究的目的是确定 rGntR 是否可能作为有用的诊断布鲁氏菌病的蛋白抗原。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 菌株、试剂及实验动物：**流产布鲁氏菌 S2308 基因组、S2308 免疫小鼠的血清由石河子大学张辉教授馈赠。大肠杆菌 DH5 $\alpha$ 、DE3(BL21)感受态细胞、DNA Marker、蛋白 Marker、2 $\times$ Es Taq MasterMix、普通琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒、高纯度质粒小提试剂盒、辣根过氧化物酶标记山羊抗鼠 IgG (H+L)购自北京康为世纪生物科技有限公司。T-Vector pMD19 (Simple)、限制性内切酶、T4 DNA 连接酶购自宝生物工程(大连)有限公司。pET-30a 表达载体购自 Promega 公司。卡那霉素、氨苄青霉素、IPTG 诱导剂、NC 膜购自 Solarbio 公司。His-Ni 柱购自美国 GE 公司。膜封闭液、HRP-DAB 底物显色试剂盒购自天根生化科技有限公司。Western blotting 所用一抗(S2308 免疫小鼠的血清)由石河子大学张辉教授馈赠，辣根过氧化物酶(HRP)标记的羊抗鼠 IgG 购自北京中杉金桥生物有限公司。小鼠 IFN- $\gamma$ 、IL-2、IL-4 和 IL-5 细胞因子 ELISA 检测试剂盒购自美国 R&D Systems 公司。DMEM 细胞培养液、RPMI 1640 细胞培养液、胎牛血清、一次性细胞培养板购自美国 Gibco 生命科技公司。

**1.1.2 细胞：**RAW 264.7 小鼠巨噬细胞系，购自北京协和细胞资源中心。

**1.1.3 小鼠：**6 周龄 SPF 级雌性 BALB/c 小鼠，购自河南省实验动物中心[SCXK(豫)2017-0001]，动物实验在商丘美兰生物工程有限公司[SYXK(豫)2017-0006]完成。

### 1.2 重组质粒的构建与鉴定

根据 GenBank 上公布的布鲁氏菌 S2308 株的

*gntR* 基因序列(BAB2\_1138), 利用 Primer 5.0 软件设计引物, 引物序列见表 1, 引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。以布鲁氏菌 S2308 DNA 基因组为模板, 以 GntR-F、GntR-R 为引物扩增 *gntR* 基因。PCR 产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测回收后克隆至 T-Vector pMD19 (Simple), 转化至 *E. coli* DH5 $\alpha$  感受态细胞。提取质粒后, 进行 PCR 鉴定; 同时采用限制性内切酶 *Bam*H I 和 *Xho* I 双酶切后克隆至相同酶切后的 pET-30a 质粒中, 构建重组质粒 pET-GntR-30a。

重组质粒经限制性内切酶 *Bam*H I 和 *Xho* I 双酶切鉴定, 鉴定正确的质粒由生工生物工程(上海)股份有限公司测序鉴定。

### 1.3 重组蛋白的表达与纯化

将含 GntR-30a 重组质粒的克隆菌培养至  $OD_{600}$  约为 0.4–0.6 时, 取 2 mL 细菌悬液作为对照, 在剩余菌液中加入 IPTG 诱导剂至终浓度 1 mmol/L, 继续振荡培养, 分别在诱导 2、4、6、8 h 取样。用 12% 的聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 进行检测, 凝胶经染色、脱色后, 观察蛋白表达情况。rGntR 的纯化按照参考文献[8]进行。

### 1.4 Western blotting 分析

按照参考文献[8]用 Western blotting 分析 rGntR 蛋白的表达。

### 1.5 小鼠巨噬细胞 RAW 264.7 中的细胞因子检测

rGntR 刺激小鼠巨噬细胞 RAW 264.7, 按照

表 1. *gntR* 基因的引物序列

Table 1. Primers of *gntR*

Primer name	Primer sequence (5'→3')
GntR-F	GGATCCATGAATGTTGAATCGGATCAT ( <i>Bam</i> H I)
GntR-R	CTCGAGCTACCTTGTCCGACGTGATAA ( <i>Xho</i> I)

参考文献[9]检测细胞因子水平, 试验设 3 个重复。

### 1.6 小鼠脾细胞中的细胞因子检测

小鼠脾细胞中细胞因子水平的检测按照参考文献[9]进行。每次试验有 3 次平行, 试验设 3 个重复。

### 1.7 免疫小鼠

rGntR 免疫 BALB/c 小鼠按照参考文献[10]进行。将等体积的弗氏完全佐剂和纯化的 rGntR 制成油包水疫苗后免疫小鼠, 2 周后将等体积的弗氏不完全佐剂和纯化好的 rGntR 制成油包水疫苗再次加强免疫小鼠。每次注射蛋白量约为 50  $\mu$ g; 对照组小鼠注射 PBS。

### 1.8 rGntR 蛋白免疫小鼠后诱导 Th1 和 Th2 型细胞因子水平分析

rGntR 免疫 BALB/c 小鼠后小鼠脾细胞中 Th1 和 Th2 型细胞因子水平的检测按照参考文献[11]进行。用小鼠细胞因子 ELISA 检测试剂盒测定 IFN- $\gamma$ 、IL-2、IL-4 和 IL-5 的水平。

### 1.9 血清学分析

小鼠免疫后 7、14、21、28 和 35 d 后采集外周血, 分离血清, 按照参考文献[11]检测小鼠血清中 IgG 和 IgG 亚型(IgG1 和 IgG2a)水平, 试验设 3 个重复。

### 1.10 统计分析

细胞因子水平的表达用平均细胞因子浓度  $\pm$  标准差(SD)表示。抗体水平用平均  $OD_{450} \pm SD$  表示。用 *t* 检验方法统计显著性(*P* 值), 用 SPSS 17.0 软件对各组间的差异进行方差分析。*P* < 0.05 表示差异显著。

## 2 结果和分析

### 2.1 重组质粒(pET-GntR-30a)的构建与鉴定

利用 PCR 的方法, 以流产布鲁氏菌 S2308 DNA 基因组为模板, 扩增 *gntR* 基因, 获得大小为 735 bp 的基因片段, 与预期大小相符, 表明扩增出 *gntR* 基因。

将重组质粒 pET-GntR-30a 经 *Bam*H I 和 *Xho* I 双酶切鉴定, 结果表明重组质粒 pET-GntR-30a 构建成功。

### 2.2 rGntR 的表达纯化与 Western blotting 分析

将重组质粒 pET-GntR-30a 转化至大肠杆菌 DE3(BL21), 加入 IPTG 诱导剂诱导表达后经 SDS-PAGE 分析, 在 35 kDa 处获得与预期蛋白分子质量大小一致的融合蛋白(图 1-A), 表明 rGntR 得到表达。

菌体超声破碎后, 经 AKTAexpress 智能多维纯

化, SDS-PAGE 结果显示, 在 35 kDa 处纯化出相应的蛋白(图 1-B)。

Western blotting 分析显示, 在大约 35 kDa 处出现特异性反应条带, 表明 rGntR 具有良好的免疫反应性(图 1-C)。

### 2.3 rGntR 在 RAW 264.7 中可诱导 Th1 和 Th2 型免疫反应

为了检测 RAW 264.7 中细胞因子水平, 用 rGntR 刺激小鼠巨噬细胞 RAW 264.7, 刺激后 4、8、12、24 h 收集样品, 检测细胞中的 Th1 型细胞因子 IFN- $\gamma$  和 IL-2 以及 Th2 型细胞因子 IL-4 和 IL-5 的水平。结果发现, 与对照组(PBS)相比, rGntR 刺激的细胞中有较高水平的细胞因子产生 ( $P < 0.05$ ), 并且这种差异随着刺激时间的延长而增加(图 2)。结果表明, rGntR 刺激小鼠巨噬细胞 RAW 264.7 后, 可诱导 Th1 和 Th2 型细胞因子的产生。

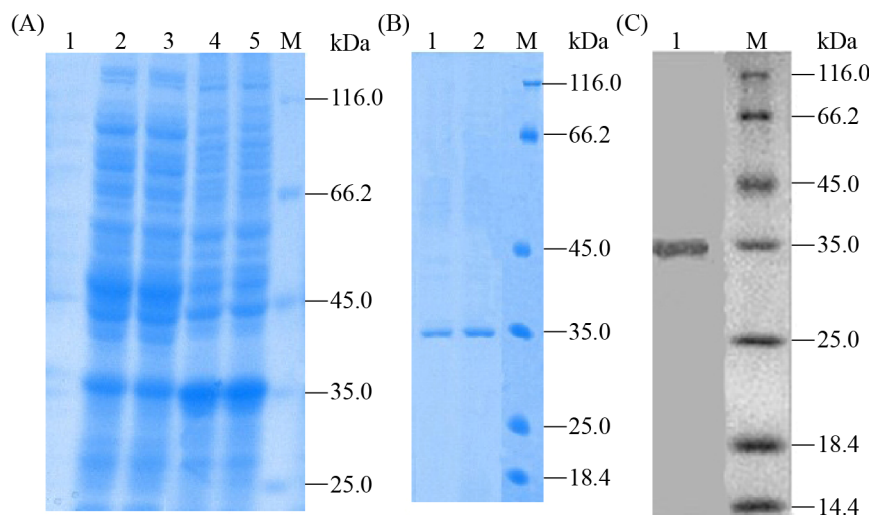


图 1. rGntR 的表达、纯化与 Western blotting 分析

Figure 1. Expression, purification and Western blotting analysis of rGntR. A: SDS-PAGE analysis of rGntR. Lane 1: Sample of rGntR without induction; lanes 2–5: Samples of rGntR induced for 2, 4, 6, 8 h; lane M: Protein marker. B: Purification analysis of rGntR. Lanes 1–2: rGntR samples; lane M: Protein marker. C: Western blotting analysis of rGntR. Lane 1: rGntR sample; lane M: Protein marker.

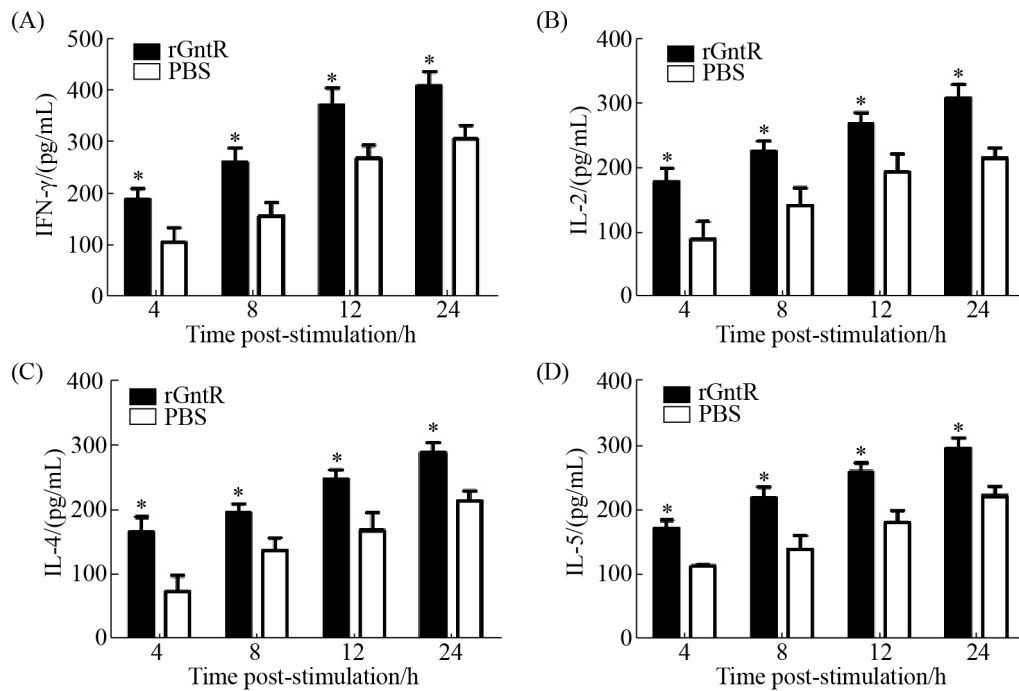


图 2. rGntR 刺激 RAW 264.7 细胞后 IFN- $\gamma$ 、IL-2、IL-4 和 IL-5 的水平检测

Figure 2. Productions of IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-4 and IL-5 in RAW 264.7 cells stimulated with rGntR. Productions of IFN- $\gamma$  (A), IL-2 (B), IL-4 (C) and IL-5 (D) were induced in RAW 264.7 cells after stimulation with rGntR for 4, 8, 12 and 24 h. \*: The difference was significant between rGntR and PBS groups ( $P < 0.05$ ).

## 2.4 rGntR 在小鼠脾细胞中可诱导 Th1 和 Th2 型免疫反应

为了检测小鼠脾细胞中细胞因子水平, 无菌分离小鼠脾细胞后, 用 rGntR 刺激小鼠脾细胞, 刺激后 12 h 和 24 h 收集样品, 检测细胞中的 Th1 型细胞因子 IFN- $\gamma$  和 IL-2 以及 Th2 型细胞因子 IL-4 和 IL-5 的水平。结果发现, 与对照组(1640)相比, rGntR 刺激的细胞中有较高水平 Th1 型细胞因子(IFN- $\gamma$  和 IL-2)的产生( $P < 0.05$ ) (图 3-A 和 3-B)。特别是 rGntR 刺激细胞后, IFN- $\gamma$  的水平显著高于对照组( $P < 0.05$ ) (图 3-A)。在 rGntR 刺激细胞 12 和 24 h 后, IFN- $\gamma$  出现较高的水平( $P < 0.05$ )。此外, 在 rGntR 刺激细胞中可发现较高水平的 Th2 型细胞因子(IL-4 和 IL-5) (图 3-C 和 3-D)。表明 rGntR 刺激小鼠脾细胞后, 可诱导 Th1 和 Th2 型

细胞因子的产生。

## 2.5 rGntR 可诱导细胞免疫反应

为了检测 rGntR 诱导的细胞免疫反应, 用 rGntR 免疫 BALB/c 小鼠后 35 d, 无菌分离脾细胞, 检测脾细胞中 Th1 型细胞因子 IFN- $\gamma$  和 Th2 型细胞因子 IL-4 的水平。免疫小鼠的脾细胞用 S2308 裂解物、ConA (阳性对照)或 RPMI 1640 (阴性对照)进行刺激。当用热灭活 S2308 刺激时, 免疫 rGntR 小鼠脾细胞产生 IFN- $\gamma$  和 IL-4 的水平显著高于免疫 PBS 的小鼠( $P < 0.01$ ) (图 4); 在所有组中, ConA 刺激小鼠脾细胞后, 均可产生较高水平的 IFN- $\gamma$  和 IL-4; 而 RPMI 1640 刺激的小鼠脾细胞没有细胞因子产生, 并且免疫 PBS 小鼠的脾细胞产生较低水平的细胞因子(图 4), 表明小鼠免疫 rGntR 后, 可诱导 Th1 和 Th2 型细胞免疫反应。

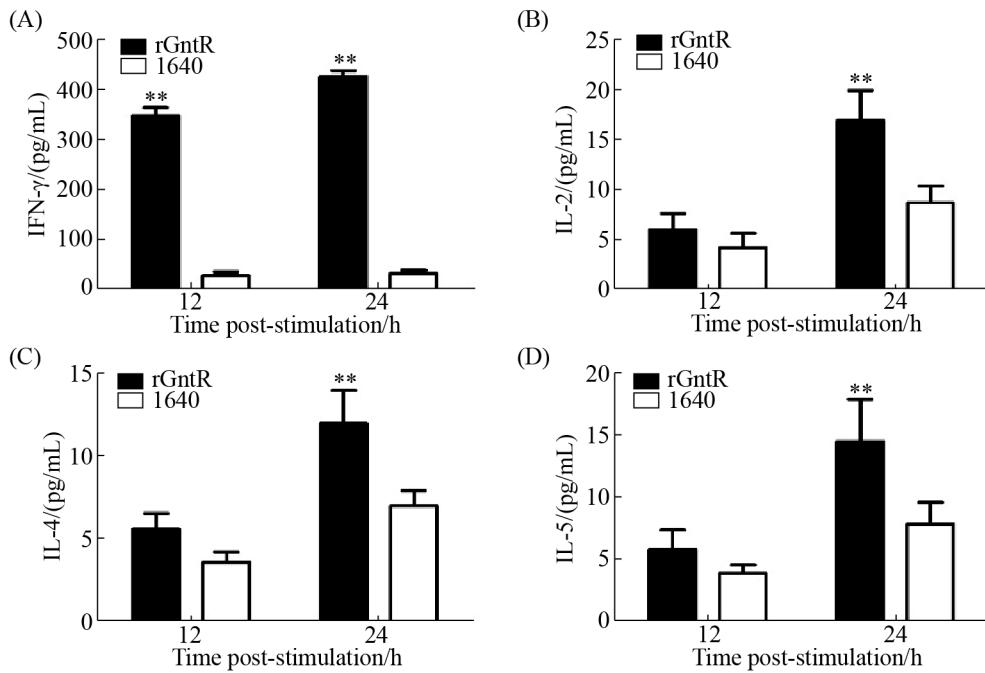


图 3. rGntR 刺激小鼠脾细胞后 IFN- $\gamma$ 、IL-2、IL-4 和 IL-5 的水平检测

Figure 3. Productions of IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-4 and IL-5 in mouse splenocytes stimulated with rGntR. Productions of IFN- $\gamma$  (A), IL-2 (B), IL-4 (C) and IL-5 (D) were induced in mouse splenocytes stimulation with rGntR for 12 and 24 h. \*\*: The difference was evident significant between rGntR and 1640 groups ( $P<0.01$ ).

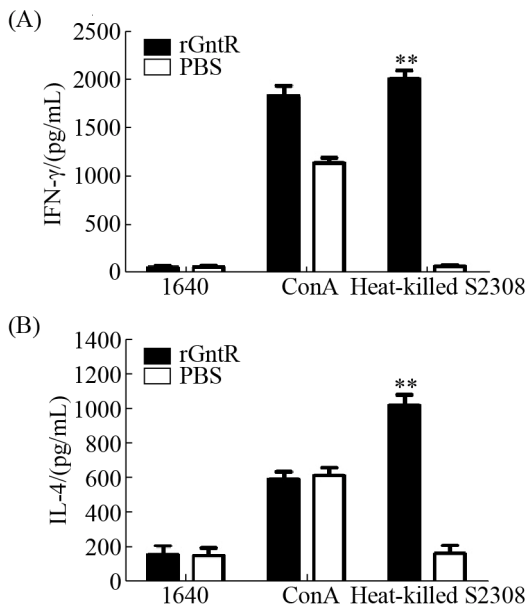


图 4. rGntR 免疫小鼠后小鼠脾细胞中 IFN- $\gamma$  和 IL-4 的水平检测

Figure 4. Detection of IFN- $\gamma$  and IL-4 levels in the splenocytes of the rGntR-immunized mice. A: IFN- $\gamma$  levels; B: IL-4 levels. \*\*: The difference was evident significant between rGntR and PBS groups ( $P<0.01$ ).

## 2.6 rGntR 可诱导体液免疫反应

收集 rGntR 和 PBS 免疫小鼠后第 7、14、21、28、35 天的血清,用 ELISA 方法检测血清中 IgG1、IgG2a 和 IgG 的抗体水平。结果显示,免疫 rGntR 的小鼠可产生较高水平的 IgG1 和 IgG2a (图 5-A 和 5-B)。免疫 rGntR 的小鼠也可产生较高水平的 IgG, 并且随着免疫时间的延长而升高(图 5-C), 但是免疫 PBS 的小鼠产生较低水平的 IgG1、IgG2a 和 IgG。表明小鼠免疫 rGntR 后,可诱导机体产生 Th1 和 Th2 型体液免疫反应。

## 3 讨论

GntR 是一种广泛存在的转录调控因子,具有 N 端的 DNA 结合结构域和 C 端的效应分子结合结构域。通过效应分子的结合,使蛋白构象发生变

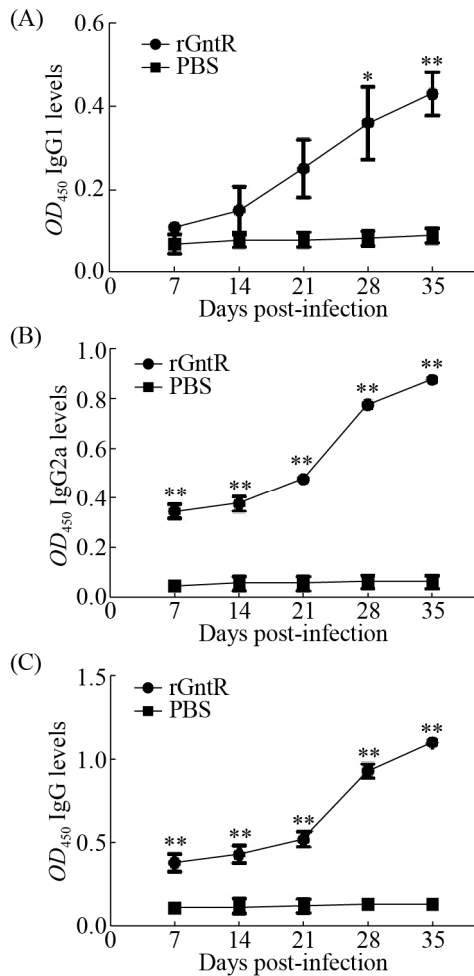


图 5. rGntR 免疫小鼠后小鼠血清中 IgG1、IgG2a 和 IgG 抗体的水平检测

Figure 5. Detection of IgG1, IgG2a and IgG antibodies level in the sera of the rGntR-immunized mice. A: IgG1 levels; B: IgG2a levels; C: IgG levels. \*: The difference was significant between rGntR and PBS groups ( $P < 0.05$ ).

化,从而调控相关靶基因的转录和其他众多生物学过程。研究发现转录调控因子 GntR 在维持脂肪酸浓度<sup>[12]</sup>、氨基酸分解代谢<sup>[13]</sup>、有机酸代谢<sup>[14]</sup>、碳分子代谢<sup>[15]</sup>和复杂有机物降解<sup>[16]</sup>等方面发挥重要作用。

转录调控因子 GntR 在布鲁氏菌中发挥重要作用<sup>[17]</sup>。最近我们的研究表明,在布鲁氏菌感染

巨噬细胞期间,转录调节因子 GntR 影响布鲁氏菌 IV 型分泌系统(T4SS)和密度感应系统(QS)相关基因的转录<sup>[17]</sup>。此外,GntR 与布鲁氏菌的毒力有关,是一类重要的毒力因子,布鲁氏菌缺失该蛋白后,其在宿主体内外的毒力显著降低<sup>[18]</sup>。该蛋白在其他病原菌中也具有毒力因子的作用,例如结核分枝杆菌缺失该蛋白后,其在小鼠模型中的存活能力下降<sup>[19]</sup>。另外,鉴于该蛋白对细菌毒力的重要作用,我们的前期研究发现,小鼠免疫 GntR DNA 疫苗后,可产生较高的免疫保护力<sup>[20]</sup>。

目前,对布鲁氏菌亚单位疫苗的研究主要集中在可激活 T 细胞引起细胞免疫的分子,如 L7/L12 核糖体蛋白<sup>[21]</sup>、外膜蛋白 OMP25<sup>[22]</sup>、OMP10、OMP19 和 OMP28<sup>[23]</sup>、IV 型分泌系统相关蛋白<sup>[24]</sup>等。这些分子均可激活 T 细胞,引起巨噬细胞的活化或辅助性 T 细胞免疫反应。在本研究中,我们发现转录调控因子 GntR 同样可诱导机体或宿主细胞产生 Th1 和 Th2 型免疫反应。

检测细胞因子(如 IFN- $\gamma$ 、IL-4 等)的产生情况,可反映抗原刺激宿主后的免疫应答水平。本研究评价了 rGntR 诱导的体液免疫和细胞免疫应答。Th1 型免疫反应的主要特性是产生 IFN- $\gamma$ ,以抵抗布鲁氏菌的感染<sup>[25]</sup>。在布鲁氏菌感染过程中,巨噬细胞可分泌大量 IFN- $\gamma$  以杀死胞内的细菌<sup>[26]</sup>。IL-2 由 Th1 型细胞产生,既是自分泌生长因子,也是旁分泌生长因子,参与整个特异性免疫应答<sup>[27]</sup>。IL-4 由 Th2 型细胞产生,介导细胞免疫应答,诱导 Th2 细胞的生长和分化<sup>[27]</sup>。IL-5 由 Th2 型细胞产生,可刺激免疫细胞的生长和分化,增强其杀菌能力<sup>[27]</sup>。虽然 IFN- $\gamma$ 、IL-2、IL-4 和 IL-5 清除布鲁氏菌的具体机制不清楚,但它们在抵抗布鲁氏菌感染过程中发挥重要作用。在本研究中,

rGntR 刺激小鼠巨噬细胞后可诱导 IFN- $\gamma$ 、IL-2、IL-4 和 IL-5 的产生。

IgG1 抗体的产生依赖于 Th2 型细胞因子 IL-4 的分泌，而 IgG2a 抗体的产生依赖于 Th1 型细胞因子 IFN- $\gamma$  的分泌<sup>[28]</sup>。在本研究中，我们发现免疫 rGntR 后可诱导机体产生较高水平的 IgG。rGntR 免疫小鼠血清中特异性 IgG1 和 IgG2a 抗体的存在表明，rGntR 可诱导机体产生高水平的体液免疫反应。

布鲁氏菌亚单位除了产生免疫反应外，还应具有一定的保护力。目前用于布鲁氏菌病亚单位疫苗研究的蛋白有超氧化物歧化酶(rSodC)<sup>[29]</sup>、L7/L12 核糖体蛋白以及外膜蛋白<sup>[30]</sup>等。本研究中 rGntR 可能也是一株合适的亚单位疫苗候选株。然而，其保护效果还需要进一步研究。

## 参 考 文 献

- [1] Pappas G, Papadimitriou P, Akritidis N, Christou L, Tsianos EV. The new global map of human brucellosis. *Lancet Infectious Diseases*, 2006, 6(2): 91–99.
- [2] Pappas G. The changing *Brucella* ecology: novel reservoirs, new threats. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 2010, 36(S5): S8–S11.
- [3] Purwar S, Metgud SC, Karadesai SG, Nagamoti MB, Darshan A, Tiwari S. Triad of infective endocarditis, splenic abscess, and septicemia caused by *Brucella melitensis*. *Journal of Laboratory Physicians*, 2017, 9(4): 340–342.
- [4] Delrue RM, Lestrade P, Tibor A, Letesson JJ, De Bolle X. *Brucella* pathogenesis, genes identified from random large-scale screens. *FEMS Microbiology Letters*, 2004, 231(1): 1–12.
- [5] Hoskisson PA, Rigali S. Variation in form and function: the helix-turn-helix regulators of the GntR superfamily. *Advances in Applied Microbiology*, 2009, 69: 1–22.
- [6] Haine V, Sinon A, van Steen F, Rousseau S, Dozot M, Lestrade P, Lambert C, Letesson JJ, de Bolle X. Systematic targeted mutagenesis of *Brucella melitensis* 16 M reveals a major role for GntR regulators in the control of virulence. *Infection and Immunity*, 2005, 73(9): 5578–5586.
- [7] Zhou D, Zhi FJ, Qi MZ, Bai FR, Zhang GD, Li JM, Liu H, Chen HT, Lin PF, Tang KQ, Liu W, Jin YP, Wang AH. *Brucella* induces unfolded protein response and inflammatory response via GntR in alveolar macrophages. *Oncotarget*, 2018, 9(4): 5184–5196.
- [8] Zhang JB, Yin SH, Yi JH, Zhang H, Fang WH, Wang JF, Li ZQ, Chen CF. Prokaryotic expression of *Brucella* M5-90 DnaK gene and study on protective immunity of the expressed protein. *Chinese Veterinary Science*, 2018, 48(8): 1004–1010. (in Chinese)  
张俊波, 印双红, 易继海, 张红, 方维焕, 王嘉福, 李志强, 陈创夫. 羊种布氏杆菌 M5-90 DnaK 的原核表达及免疫保护性研究. *中国兽医科学*, 2018, 48(8): 1004–1010.
- [9] Im YB, Shim S, Park WB, Kim S, Yoo HS. Th2-related immune responses by the *Brucella abortus* cellular antigens, malate dehydrogenase, elongation factor, and arginase. *Microbial Pathogenesis*, 2017, 110: 7–13.
- [10] Pathak P, Kumar A, Sarangi PP, Bhagyawant S, Thavaselvam D. Cloning, expression and purification of virB10 protein of *Brucella melitensis* and evaluation of its role as a serological marker for *Brucella* infection in experimental and natural host. *Protein Expression and Purification*, 2018, 145: 53–58.
- [11] Li ZQ, Wang SL, Zhang JL, Yang GL, Yuan BD, Huang J, Han JC, Xi L, Xiao YR, Chen CF, Zhang H. *Brucella abortus* 2308 $\Delta$ NodV $\Delta$ NodW double-mutant is highly attenuated and confers protection against wild-type challenge in BALB/c mice. *Microbial Pathogenesis*, 2017, 106: 30–39.
- [12] DiRusso CC, Nyström T. The fats of *Escherichia coli* during infancy and old age: regulation by global regulators, alarmones and lipid intermediates. *Molecular Microbiology*, 1998, 27(1): 1–8.
- [13] Hänbler E, Müller T, Jeßberger N, Völzke A, Plassmeier J, Kalinowski J, Krämer R, Burkovski A. FarR, a putative regulator of amino acid metabolism in *Corynebacterium glutamicum*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2007, 76(3): 625–632.
- [14] Morawski B, Segura A, Ornston LN. Repression of *Acinetobacter* vanillate demethylase synthesis by VanR, a member of the GntR family of transcriptional regulators. *FEMS Microbiology Letters*, 2000, 187(1): 65–68.
- [15] Rigali S, Nothhaft H, Noens EEE, Schlicht M, Colson S, Müller M, Joris B, Koerten HK, Hopwood DA, Titgemeyer F, van Wezel GP. The sugar phosphotransferase system of *Streptomyces coelicolor* is regulated by the GntR-family



- regulator DasR and links *N*-acetylglucosamine metabolism to the control of development. *Molecular Microbiology*, 2006, 61(5): 1237–1251.
- [16] Watanabe T, Inoue R, Kimura N, Furukawa K. Versatile transcription of biphenyl catabolic *bph* operon in *Pseudomonas pseudoalcaligenes* KF707. *The Journal of Biological Chemistry*, 2000, 275(40): 31016–31023.
- [17] Li ZQ, Wang SL, Zhang H, Zhang JL, Xi L, Zhang JB, Chen CF. 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. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2017, 33(3): 60.
- [18] Li ZQ, Zhang JL, Xi L, Yang GL, Wang SL, Zhang XG, Zhang JB, Zhang H. Deletion of the transcriptional regulator GntR down regulated the expression of genes related to virulence and conferred protection against wild-type *Brucella* challenge in BALB/c mice. *Molecular Immunology*, 2017, 92: 99–105.
- [19] Casali N, White AM, Riley LW. Regulation of the *Mycobacterium tuberculosis* *mce1* operon. *Journal of Bacteriology*, 2006, 188(2): 441–449.
- [20] Li ZQ, Wang SL, Zhang H, Xi L, Zhang JL, Zhang XG, Han JC, Zhang JB. Immunization with recombinant GntR plasmid confers protection against *Brucella* challenge in BALB/c mice. *Microbial Pathogenesis*, 2017, 111: 357–361.
- [21] Hu XK, Lu TC, Wang Y, Liu SY, Wang XR. Gene cloning and prokaryotic expression of L7/L12 protein of *Brucella*. *Genomics and Applied Biology*, 2019, 38(7): 3046–3050. (in Chinese)  
胡祥坤, 卢天成, 王岩, 刘思阳, 王秀然. 布鲁氏菌 L7/L12 蛋白的基因克隆与原核表达. *基因组学与应用生物学*, 2019, 38(7): 3046–3050.
- [22] Yousefi S, Tahmoospur M, Sekhavati MH. Cloning, expression and molecular analysis of Iranian *Brucella melitensis* *Omp25* gene for designing a subunit vaccine. *Research in Pharmaceutical Sciences*, 2016, 11(5): 412–418.
- [23] Im YB, Park WB, Jung M, Kim S, Yoo HS. Comparative analysis of immune responses to outer membrane antigens OMP10, OMP19, and OMP28 of *Brucella abortus*. *Japanese Journal of Infectious Diseases*, 2018, 71(3): 197–204.
- [24] Mirkalantari S, Zarnani AH, Nazari M, Irajian GR, Amirmozafari N. *Brucella melitensis* VirB12 recombinant protein is a potential marker for serodiagnosis of human brucellosis. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 2017, 16: 8.
- [25] Golding B, Scott D, Scharf O, Huang LY, Zaitseva M, Lapham C, Eller N, Golding H. Immunity and protection against *Brucella abortus*. *Microbes and Infection*, 2001, 3(1): 43–48.
- [26] Sathiyaseelan J, Goenka R, Parent M, Benson RM, Murphy EA, Fernandes DM, Foulkes AS, Baldwin CL. Treatment of *Brucella*-susceptible mice with IL-12 increases primary and secondary immunity. *Cellular Immunology*, 2006, 243(1): 1–9.
- [27] Zhou GY. Principles of immunology. 4th ed. Beijing: Science Press, 2018: 116–118. (in Chinese)  
周光炎. 免疫学原理. 第 4 版. 北京: 科学出版社, 2018: 116–118.
- [28] Raz E, Tighe H, Sato Y, Corr M, Dudler JA, Roman M, Swain SL, Spiegelberg HL, Carson DA. Preferential induction of a Th1 immune response and inhibition of specific IgE antibody formation by plasmid DNA immunization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1996, 93(10): 5141–5145.
- [29] Arayan LT, Huy TXN, Reyes AWB, Hop HT, Son VH, Min W, Lee HJ, Kim S. Substantial protective immunity conferred by a combination of *Brucella abortus* recombinant proteins against *Brucella abortus* 544 infection in BALB/c mice. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2019, 29(2): 330–338.
- [30] Golshani M, Amani M, Siadat SD, Nejati-Moheimani M, Arsang A, Bouzari S. Comparison of the protective immunity elicited by a *Brucella* cocktail protein vaccine (rL7/L12+rTOmp31+rSOmp2b) in two different adjuvant formulations in BALB/c mice. *Molecular Immunology*, 2018, 103: 306–311.

# Helper T cell immune responses induced by the *Brucella abortus* transcriptional regulator GntR in a mouse model

Shuli Wang, Shujie Zhao, Yixin Luo, Lan Yang, Wenjing Guo, Tingting Tian, Zhiqiang Li\*, Baodong Yuan\*

College of Biology and Food, Shangqiu Normal University, Shangqiu 476000, Henan Province, China

**Abstract:** [Objective] The Th1 and Th2-type immune responses induced by the *Brucella gntR* gene were analyzed by prokaryotic expression of *gntR*. [Methods] To clone and express *gntR* gene of *Brucella*, a pair of primers for the *gntR* gene of *Brucella* S2308 was designed based on published GenBank sequence. The *gntR* gene was amplified by molecular cloning technology from *Brucella* S2308 and then cloned into pET-30a vector and transformed to *E. coli* BL21. The expression of GntR protein was analyzed by SDS-PAGE. The GntR recombinant protein (rGntR) was purified by AKTExpress intelligent multidimensional purification system. The rGntR immunoreactivity was analyzed by Western blotting. Cytokines IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-4 and IL-5 in murine macrophages (RAW 264.7) and splenocytes stimulated with rGntR were detected by ELISA kit. Mice were immunized with rGntR and IFN- $\gamma$ , IL-4 and IgG in serum of mice were detected by ELISA kit. [Results] The full-length *gntR* gene was 735 bp, encoding 245 amino acids. SDS-PAGE showed that rGntR appeared in the approximately 35 kDa position. The band was single after purification. WB indicated that rGntR had good immunoreactivity. The rGntR could induce higher levels of IFN- $\gamma$ , IL-4 and IgG in host cells and mice. [Conclusion] The rGntR could induce helper T cells (Th1 and Th2-type) immune responses *in vivo* and *in vitro*. This study provides scientific basis for the development of brucellosis vaccines.

**Keywords:** *Brucella*, transcriptional regulator GntR, immune responses

(本文责编: 李磊)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (31602080)

\*Corresponding authors. Tel: +86-370-3115957; Fax: +86-370-3125957; E-mail: Zhiqiang Li, lizhiqiangstr@126.com, Baodong Yuan, yuanbao365@163.com

Received: 22 July 2019; Revised: 11 October 2019; Published online: 21 January 2020