

一株羊种变异布鲁氏菌分离株遗传特征分析

杨晓雯, 韩秀瑞, 朴东日, 赵鸿雁, 田国忠, 姜海

摘要: 目的 为研究一株羊种布鲁氏菌粗糙型变异菌株的遗传特征。**方法** 本研究利用布鲁氏菌表型鉴定方法、全基因组测序及比较基因组分析方法。**结果** 分离株与单因子R血清、三胜黄素发生凝集且能够被结晶紫染色, 全基因组测序表明, 该分离株与羊种2型菌株相似性最高; 其基因组由2条染色体组成, 大小为3 311 700 bp, GC含量为57.2%, 含有3 379个CDS, 9个rRNA, 55个tRNA和4个ncRNA; 存在282个变异, 其中243个SNPs, 39个InDel; 已知的LPS合成基因中, 8个存在错义突变。**结论** 基因水平上的突变导致LPS合成受阻, 分离株表型由光滑型变为粗糙型。本研究为羊种布鲁氏菌粗糙型变异菌株的研究提供了基础数据, 同时也为布鲁氏菌疫苗候选株的筛选提供新思路。

关键词: 布鲁氏菌; LPS; 全基因组测序; 单核苷酸变异

中图分类号: R378.5 文献标识码: A 文章编号: 1002-2694(2020)11-0894-06

Genetic characteristics of the *Brucella melitensis* strain with a rough phenotype

YANG Xiao-wen, HAN Xiu-rui, PIAO Dong-ri, ZHAO Hong-yan, TIAN Guo-zhong, JIANG Hai

(State Key Laboratory for Infectious Disease Prevention and Control, National Institute for Communicable Disease Control and Prevention, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing 102206, China)

Abstract: The aim of this study was to analyze the genetic characteristics of the *B. melitensis* strain with a rough phenotype. In this study, rough phenotype detection methods, whole-genome sequencing and comparative genome analysis methods were used. The results showed that this isolated strain was agglutinated with R monospecific sera and trisavin, and could be stained with crystal violet. The genome sequence of the isolation was similar to *B. melitensis* bv.2 str. ATCC23457 at the genomic level. The genome of the isolation consisted of two chromosomes, with a size of 3 311 700 bp and a GC content of 57.2%, including 3 379 CDS, 9 rRNA, 55 tRNA and 4 ncRNA. There are 282 variations, including 243 SNPs and 39 InDel. Among them, eight of the known LPS-related genes had missense variations. In conclusion, because these variations at the gene level hindered LPS synthesis, the phenotype of the isolation changed from smooth to rough. This study provided the basic data for rough *B. melitensis*, and new insights for the screening of *Brucella* vaccine strains.

Keywords: *Brucella*; LPS; whole-genome sequencing; SNPs

Supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 81902105), Academician Yunde Hou Youth Foundation (No. 2019HYDQNJJ08), Prevention and treatment of major infectious diseases such as AIDS and viral hepatitis (No. 2018ZX10712-001).

Corresponding author: Jiang Hai, Email: jianghai@icdc.cn

国家自然科学基金(No.81902105),侯云德院士科研青年基金项目(No.2019HYDQNJJ08)和艾滋病和病毒性肝炎等重大传染病防治(No.2018ZX10712-001)联合资助。

通讯作者:姜海,Email:jjianghai@icdc.cn;

ORCID:0000-0003-2533-3736

作者单位:传染病预防控制国家重点实验室,中国疾病预防控制中心
传染病预防控制所,北京 102206

布鲁氏菌(*Brucella*)是一种兼性胞内寄生菌, 易造成宿主持续性感染, 引起全球性人兽共患流行性疾病—布鲁氏菌病。该病主要表现为发热、多汗、乏力、关节疼痛等症状, 严重者使患者丧失劳动能力, 影响公共卫生安全以及经济发展^[1]。人感染布鲁氏菌若诊疗不及时, 容易引起各种并发症, 如脊柱炎、心内膜炎、脑炎等^[2]。羊种、牛种、猪种和犬种布

鲁氏菌能够感染人。全球人间布鲁氏菌病发病率年平均超过 50 万例^[3],中东地区每百万人中的布鲁氏菌病发病率均在 200 以上,叙利亚发病率最高(1 603.4/10 万),但据世界卫生组织(WHO)调查表明,实际发病率是报告的 10~25 倍^[4]。我国布鲁氏菌病首次报道于内蒙古^[5],人间布鲁氏菌病疫情于 1957—1963 年和 1969—1971 年出现两次流行高峰。随着动物布鲁氏菌病疫苗的使用,上世纪 80—90 年代人畜布鲁氏菌病发病率显著下降^[6],但自 20 世纪 90 年代中期开始,布鲁氏菌病疫情在国内再次肆虐,并从北方扩展到南方^[7],全国 32 省市自治区均有病例报道^[8]。

自然条件下,除犬种和绵羊附睾种布鲁氏菌外,其余种型布鲁氏菌为光滑型布鲁氏菌。布鲁氏菌的表型主要由外膜外侧的脂多糖(LPS)决定。LPS 由类脂 A、核心寡聚糖和 O 抗原组成,根据 LPS 是否含有 O 抗原,将布鲁氏菌分为光滑型和粗糙型,光滑型布鲁氏菌的 LPS 含有 O 抗原(S-LPS),而粗糙型布鲁氏菌的 LPS 缺少 O 抗原(R-LPS)^[9]。粗糙的布鲁氏菌的致病力降低,而粗糙型通常不会引起人类布鲁氏菌病^[10]。本研究针对课题组保存的菌株,经表型鉴定后,利用全基因组测序技术对变异羊种布鲁氏菌进行测序,分析其遗传特征,为我国布鲁氏菌病的防控提供基础性数据。

1 材料与方法

1.1 布鲁氏菌菌株 布鲁氏菌标准菌株和变异菌株于中国疾病预防控制中心传染病所 BSL-3 实验室内传代培养及增殖。布鲁氏菌标准菌株基因组序列及其氨基酸序列于 NCBI Refseq 数据库中下载(<https://ftp.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/brucella/>)。

1.2 粗糙表型鉴定 利用单因子 R 血清、三胜黄素检测表型。取培养后的布鲁氏菌,利用生理盐水调整其比浊度为 0.5 McF,取 30 μL 菌液与分别等体积的单因子 R 血清和三胜黄素混合,2 min 观察实验结果。粗糙型布鲁氏菌存在凝集现象,而光滑型布鲁氏菌不凝集^[11]。

结晶紫染色检测表型。待平板上长出单菌落后,稀释结晶紫染液至工作浓度,覆盖单菌落表面染色 15~20 s,弃掉染液后放大镜观察菌落着色情况。粗糙型布鲁氏菌着色,被染成红色或者紫色;光滑型菌落不着色,仍然为原来的黄色或黄绿色^[11]。

1.3 LPS 提取及鉴定 划线培养布鲁氏菌,取适量培养 48 h 的菌体,利用生理盐水调整比浊度为 1.5 McF,此时细菌浓度约为 1.0×10^9 CFU/mL。将菌

液于室温下 13 000 r/min 离心,弃掉上清液,重复 2~3 次,获取足够的细菌,然后按照脂多糖提取试剂盒(iTron,韩国)的操作说明提取 LPS,-20 ℃ 保存。将提取的 LPS 利用 SDS-PAGE(康为世纪,中国)检测,选用银染试剂盒(碧云天,中国)染色。

1.4 全基因组测序 划线培养菌株,取适量培养 48 h 的菌体,使用 Wizard Genomic DNA Purification 试剂盒(Promega,美国)提取细菌基因组 DNA。检测合格的基因组 DNA,使用 Nextera XT Library Prep 试剂盒(Illumina,美国)添加接头,进行了测序文库的制备。将序列送交华大基因有限公司(中国),使用 Illumina / Solexa 测序分析仪对文库进行测序,基因组覆盖度大于 100 倍(100 ×)。

测序完成后获得原始数据(raw data),应用 fastQC (<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>) 进行测序质量评价,去除冗余序列及质量低的序列。同时,将通过测序质量评价的序列去掉接头,即为 clean data,后续分析使用 clean data 进行。

1.5 比较基因组分析 利用 BWA^[12] 将 clean data 比对到参考基因组上,允许最大 gap 为 5,应用 samtools^[13] 输出测序深度,同时输出 4 × 和 20 × 测序覆盖度,利用 excel 统计测序深度和覆盖度。利用 velvet^[14] 将 clean data 进行组装成大片段序列 contig,利用 BLAST 将 contig 在全基因组中定位,利用 Vector NTI 设计引物将 gap 补全成为完整基因组,利用 NCBI Prokaryotic Genome Annotation Pipeline (PGAP)^[15] 进行全基因组注释。

利用 samtools 和 GATK^[16] 相结合的方法检测 SNP 和 InDel,更准确地对变异进行识别。通过多种算法各自识别的 SNP 和 InDel 进行一致性分析,保留具有高度一致性的变异作为最终结果,这些高度一致性的 SNP 和 InDel 具有非常高的可信度。将最终结果利用 GATK 进行过滤,留下测序质量大于 20 且两个 SNP 的距离不小于 5 的 SNP 和 InDel。

将参考基因组的序列建库,提取出参考基因组的蛋白编码序列,蛋白序列和信使 RNA 序列(mRNA)等,利用 snpEff^[17] 对找到的变异进行注释,包括同义突变,错义突变,移码突变等,同时利用 excel 统计每个样品的变异位点,数量和每 kb SNP 的大小用于比较变异率。

对完整的基因组来说,利用 MAUVE^[18] 将全基因组比对 SNP 结果输出;对测序样品来说,利用 samtools 和 GATK 结合寻找变异位点,从过滤后的

最终结果中提取出 SNP 位点。利用 phyloSNP 将两者的输出结果构建矩阵,采用邻接法(Neighbor-joining method, NJ)构建进化树,自检值为 1 000。

2 结 果

2.1 变异羊种布鲁氏菌 本研究发现,分离自宁夏的 1 株羊种布鲁氏菌能够与 R 血清和三胜黄素(图 1)发生凝集,且被结晶紫染色,初步判断该菌株为变异羊种布鲁氏菌。

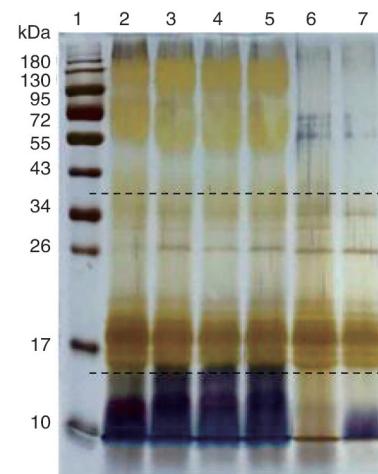


图 1 三胜黄素凝集试验检测布鲁氏菌表型

Fig.1 Rough phenotype detection by acriflavinium chloride

提取该菌株以及参考布鲁氏菌菌株的 LPS 后,利用 SDS-PAGE 凝胶检测,发现羊种布鲁氏菌参考菌株 16M、羊种疫苗株 M5 以及另外两株分离株 LPS 条带分布基本一致,除共有的条带簇之外,在 34-43 kDa, 55-95 kDa 及 180 kDa 附近也有明显的 LPS 组成条带分布(图 2)。而犬种布鲁氏菌 RM6/66 和宁夏分离株的 LPS 则不具有以上 3 个条带簇。从 LPS 的凝胶检测条带中可以发现,光滑型布鲁氏菌含有长链的 O 侧链,而宁夏分离株的脂多糖条带更接近于粗糙型犬种布鲁氏菌 RM6/66,主要包括中链和短链的 O 侧链,这和凝集试验结果相一致。

2.2 变异菌株全基因组注释 宁夏分离株共获得 1.48 Gb 大小的原始数据,过滤后共获得 1.25 Gb 大



1 为蛋白 marker, 2 为羊种布鲁氏菌 16M 菌株的 LPS, 3 为羊种布鲁氏菌疫苗株 M5 菌株的 LPS, 4-5 为其他分离株的 LPS, 6 为犬种布鲁氏菌 RM6/66 菌株的 LPS, 7 为本研究涉及的宁夏分离株的 LPS。

图 2 SDS-PAGE 检测 LPS 的完整性

Fig.2 Composition of LPS by SDS-PAGE

小的 clean data。利用 velevet 进行组装时,收集大于 500 bp 的 contig。宁夏分离株基因组草图包含 27 个 contigs,最长 contig 片段为 609 252 bp, N50 大小为 358 887 bp,序列 GC 含量为 57.24%。

利用 Vector NTI 设计引物将 gap 补全成为完整基因组,结果发现,宁夏分离株的全基因组序列中包含两条染色体,染色体 1 大小为 2 126 100 bp,染色体 2 大小为 1 185 600 bp,基因组大小为 3 311 700 bp,GC 含量为 57.2%。该分离株基因组经注释后含有 3 379 个 CDS,9 个 rRNA,55 个 tRNA 和 4 个 ncRNA(图 3)。

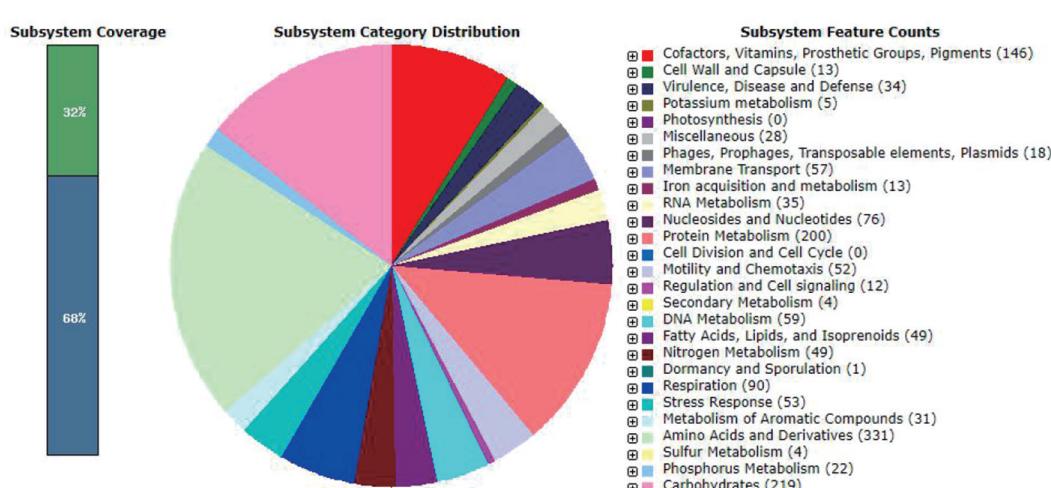


图 3 羊种布鲁氏菌粗糙型变异菌株全基因组基因功能注释图

Fig.3 Annotation of the whole genome sequences of the rough *B. melitensis* strain

2.3 变异菌株遗传特性分析 利用全基因组构建进化树可知,宁夏分离株属于羊种布鲁氏菌,且与羊种2型标准菌株ATCC23457亲缘关系最近。以羊种2型菌株ATCC23457为参考基因组,利用GATK和samtools寻找SNPs和InDel,结果发现,与参考菌株相比,该菌株存在282个变异,其中243

个SNPs,39个InDel(17个Ins和22个Del)。SNP主要存在于C和T的变异之间,其中SNPs转换(transitions, Ts)348个,颠换(transversions, Tv)137个,Ts/Tv率为2.54,变异率较低,表明基因组与参考基因组相比差异较小(图4)。

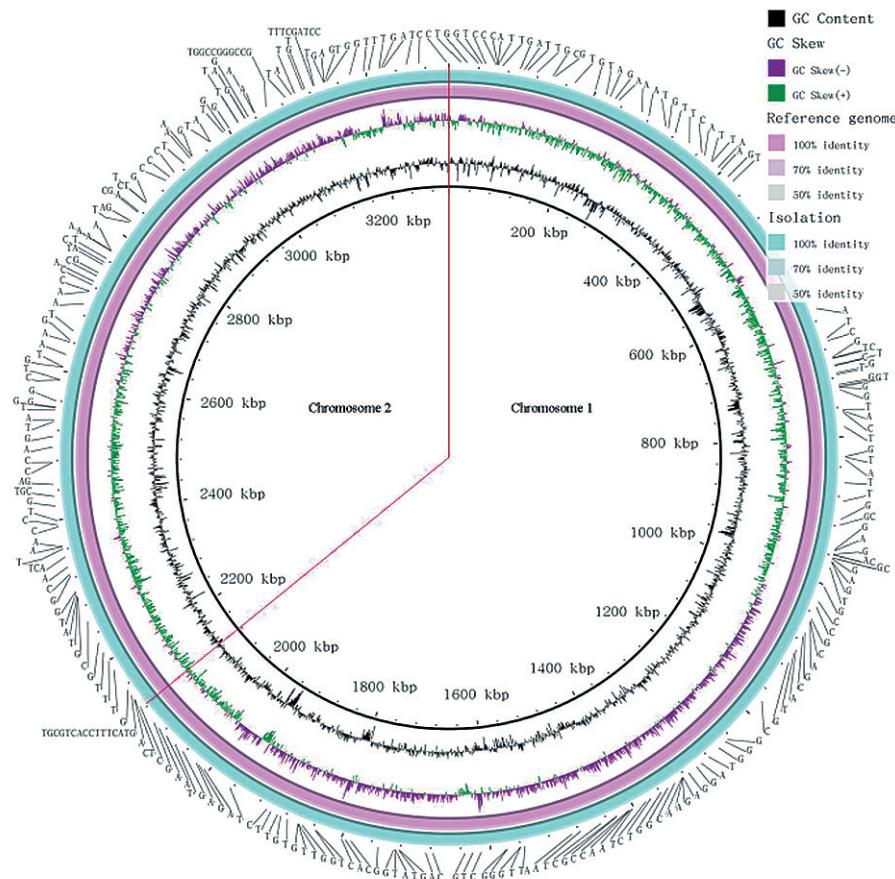


图4 羊种布鲁氏菌粗糙型变异菌株 SNP 及 InDel 在基因组中的分布图

Fig.4 Distribution of the SNP and InDel of the rough *B. melitensis* strain

已知的LPS合成相关基因中,假定甘露糖转移酶(*wboA*,*wboB*),甘露糖合成酶(*manBo-Ag*,*manCo-Ag*),ABC转运系统蛋白(*wzt*),十一异戊烯-糖基转移酶(*wbkF*),异构酶/脱水酶(*wbkD*)和葡萄糖磷酸变位酶(*pgm*)基因均在宁夏分离株中均出现错义突变,导致编码氨基酸出现变异。LPS合成受阻后,最终导致宁夏分离株表型由光滑型变为粗糙型,见表1。

3 讨论

LPS是布鲁氏菌的重要毒力因子,对S-LPS合成过程中所需的基因进行突变、表达量改变以及调控基因突变可以导致产生结构不完整的R-LPS,使

表1 已知LPS合成基因的变异统计表

Tab.1 Missense variations of the LPS-related genes

基因	突变位点	氨基酸位点
<i>wboB</i>	T to C (347)	L to S (116)
<i>wboA</i>	G to A (61)	V to I (21)
<i>manBoAg</i>	C to T (1141)	L to F (381)
<i>manCoAg</i>	T to C (397)	F to L (133)
<i>wzt</i>	A to C (125)	N to T (42)
	G to T (197)	G to V (66)
<i>wbkF</i>	T to G (1004)	L to R (335)
<i>wbkD</i>	A to G (1819)	K to E (607)
<i>pgm</i>	A to G (752)	H to R (251)

其毒力降低,可以作为弱毒活疫苗候选株。参与 O 抗原合成的基因主要有 GDP-甘露糖脱水酶(*gmd*)、过骨胺合成酶(*per*)、甲酰基转移酶(*wbkC*)、甘露糖糖转移酶(*wbkA*、*wbkE*)、*wbkD*、*wbkF* 和 ABC 转运系统蛋白(*wzm*)、*wzt* 等,另有两个假定甘露糖转移酶(*wboA* 和 *wboB*)^[19];与合成核心寡聚糖相关的基因主要有甘露糖酶(*manB-core* 和 *manCcore*)、甘露糖合成酶(*manAo-Ag*)、*manBo-Ag* 和 *manCo-Ag*、糖基转移酶(*wadA*、*wadB*、*wadC*)、*pgm*^[20]。参与类脂 A 合成的基因主要有酰基-(酰基载体蛋白)UDP-N-乙酰葡萄糖胺-O 酰基转移酶(*lpxA*)、UDP-3-O-酰基-N-乙酰葡萄糖胺二乙酰酶(*LpxC*)、UDP-3-O-(3 羟基肉豆蔻酰基)葡萄糖胺 N-乙酰转移酶(*LpxD*)、脂质-A-二糖合成酶(*LpxB*)、Tetraacylydisaccharide-1-P4' 激酶(*LpxK*)、2-脱氢-3-脱氧磷酸酯酸醛缩酶(*KdsA*)、3-脱氧-甘露糖基磺酸酯胞苷酰转移酶(*KdsB*)、3-脱氧-D-甘露八油酸转移酶(*KdtA*)、月桂酰酰基转移酶(*HtrB*)^[21]。自然条件下存在的布鲁氏菌的表型变异主要存在两个途径:插入段片(如 IS711)插入 LPS 合成相关基因中(如疫苗株 RB51)和 LPS 合成相关基因缺失(如绵羊附睾种布鲁氏菌缺失 GI-2)^[9],这两种表型变异机制均属于 LPS 合成相关基因的突变/缺失。最新的研究表明,参与 LPS 和成相关基因的表达量变化也能导致菌株表型的突变。羊种布鲁氏菌 RM57 为粗糙型菌株,与亲本菌株羊种布鲁氏菌 M1981 相比,参与 LPS 合成的基因未出现突变,但 *pgm* 基因表达水平改变,表明参与 LPS 合成的相关基因表达水平的变化也可能引起布鲁氏菌表型的变化^[22]。

由于缺少 O 抗原的保护,R-LPS 更容易暴露靶标,影响布鲁氏菌在细胞内的生存能力^[23],在感染细胞或机体内增殖能力和持续生存时间是布鲁氏菌毒力判定的依据。这些因素导致了粗糙的布鲁氏菌的致病力降低,而粗糙型通常不会引起人类布鲁氏菌病^[24]。研究表明,在没有抗体等因素参与的条件下,粗糙型布鲁氏菌侵入巨噬细胞的量要比光滑型布鲁氏菌大,但侵入细胞形成早期布氏小体(*Brucella*-containing vacuole, BCV)后,光滑型布鲁氏菌能够抑制 BCV 与溶酶体融合,最终进入内质网,在细胞内存活;而粗糙型布鲁氏菌无法逃避与溶酶体的融合,容易被细胞清除掉。粗糙型和光滑型布鲁氏菌刺激机体产生的抗体不同,粗糙型布鲁氏菌的抗体不影响血清学诊断,因此,粗糙型布鲁氏菌用于疫苗候选菌株具有较大的应用前景。目前,布鲁氏

菌病得到有效控制的国家采取以下程序:选择可靠的疫苗、制定恰当的免疫方案、形成广泛的保护率、选择合适的诊断方法,持续扑杀感染动物并严格控制感染动物群向无疫病动物群运输动物。基于这些措施,部分国家也成功消灭了人布鲁氏菌病^[25]。由于粗糙型布鲁氏菌毒力较光滑型低,且其刺激机体产生的抗体不影响布鲁氏菌的血清学诊断,因此,粗糙型菌株在疫苗研发中存在优势。我国布鲁氏菌病防控现状严峻,布病发病数逐年增高,且遍布全国。疫苗作为布病防控中的手段之一,需要着重筛选疫苗候选菌株,结合我国布病流行的优势菌株,才能更好更全面的用于我国布病的防控。

综上所述,与单因子 R 血清、三胜黄素发生凝集且能够被结晶紫染色的粗糙型变异羊种布鲁氏菌分离株,全基因组测序表明,该分离株与羊种 2 型菌株相似性最高。其基因组由 2 条染色体组成,大小为 3 311 700 bp,GC 含量为 57.2%,含有 3 379 个 CDS,9 个 rRNA,55 个 tRNA 和 4 个 ncRNA。与参考基因组相比,该分离株存在 282 个变异,其中 243 个 SNPs,39 个 InDel,变异率较低。已知的 LPS 合成基因中,8 个存在错义突变,LPS 合成受阻,导致分离株表型由光滑型变为粗糙型。本研究为羊种布鲁氏菌粗糙型变异菌株的研究提供了基础数据,同时也为布鲁氏菌疫苗候选株的筛选提供新思路。

利益冲突:无

引用本文格式:杨晓雯,韩秀瑞,朴东日,等.一株羊种变异布鲁氏菌分离株遗传特征分析[J].中国人兽共患病学报,2020,36(11):894-899. DOI:10.3969/j.issn.1002-2694.2020.00.146

参 考 文 献:

- [1] Kerial A, Botella E, Estrach S, et al. *Brucella* intracellular life relies on the transmembrane protein CD98 heavy chain[J]. *J Infect Dis*, 2015, 211(11): 1769-1778. DOI:10.1093/infdis/jiu673
- [2] Boschioli ML, Foulongne V, O'Callaghan D. Brucellosis: a worldwide zoonosis[J]. *Curr Opin Microbiol*, 2001, 4(1): 58-64. DOI:10.1016/s1369-5274(00)00165-x
- [3] Bukhari EE. Pediatric brucellosis. An update review for the new millennium[J]. *Saudi Med J*, 2018, 39(4): 336-341. DOI: 10.15537/smj.2018.4.21896
- [4] Hasanjani Roushan MR, Ebrahimpour S. Human brucellosis: An overview[J]. *Caspian J Intern Med*, 2015, 6(1): 46-53.
- [5] Zia SH, Wang FL. Brucellosis in north China: a clinical, etiological and epidemiological study[J]. *Am J Trop Med Hyg*, 1949, 29(6): 925-936. DOI:10.4269/ajtmh.1949.s1-29.925
- [6] Li ZJ, Cui BY, Chen H, et al. Molecular typing of *Brucella suis*

- collected from 1960s to 2010s in China by MLVA and PFGE[J]. Biomed Environ Sci, 2013, 26(6): 504-512. DOI: 10.3967/0895-3988.2013.06.013
- [7] Piao DR, Liu X, Di DD, et al. Genetic polymorphisms identify in species/biovars of *Brucella* isolated in China between 1953 and 2013 by MLST[J]. BMC Microbiol, 2018, 18(1): 7. DOI: 10.1186/s12866-018-1149-0
- [8] Li YJ, Li XL, Liang S, et al. Epidemiological features and risk factors associated with the spatial and temporal distribution of human brucellosis in China[J]. BMC Infect Dis, 2013, 13: 547. DOI: 10.1186/1471-2334-13-547
- [9] Mancilla M. Smooth to Rough Dissociation in *Brucella*: The Missing Link to Virulence[J]. Front Cell Infect Microbiol, 2015, 5: 98. DOI: 10.3389/fcimb.2015.00098
- [10] Godfroid F, Taminiau B, Danese I, et al. Identification of the perosamine synthetase gene of *Brucella melitensis* 16M and involvement of lipopolysaccharide O side chain in *Brucella* survival in mice and in macrophages[J]. Infect Immun, 1998, 66(11): 5485-5493.
- [11] Ugalde JE, Czibener C, Feldman MF, et al. Identification and characterization of the *Brucella abortus* phosphoglucomutase gene: role of lipopolysaccharide in virulence and intracellular multiplication[J]. Infect Immun, 2000, 68(10): 5716-5723. DOI: 10.1128/iai.68.10.5716-5723.2000
- [12] Alton GG, Jones LM. Laboratory techniques in brucellosis[J]. Monogr Ser World Health Organ, 1967, 55: 1-92.
- [13] Li H, Durbin R. Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform[J]. Bioinformatics, 2009, 25(14): 1754-1760. DOI: 10.1093/bioinformatics/btp324
- [14] Li H, Handsaker B, Wysoker A, et al. The sequence alignment/map format and SAMtools[J]. Bioinformatics, 2009, 25(16): 2078-2087. DOI: 10.1093/bioinformatics/btp352
- [15] Zerbino DR, Birney E. Velvet: algorithms for de novo short read assembly using de Bruijn graphs[J]. Genome Res, 2008, 18(5): 821-830. DOI: 10.1101/gr.074492.107
- [16] Tatusova T, DiCuccio M, Badretdin A, et al. NCBI prokaryotic genome annotation pipeline[J]. Nucleic Acids Res, 2016, 44(14): 6614-6624. DOI: 10.1093/nar/gkw569
- [17] McKenna A, Hanna M, Banks E, et al. The Genome Analysis Toolkit: a MapReduce framework for analyzing next-generation DNA sequencing data[J]. Genome Res, 2010, 20(9): 1297-1303. DOI: 10.1101/gr.107524.110
- [18] Faison WJ, Rostovtsev A, Castro-Nallar E, et al. Whole genome single-nucleotide variation profile-based phylogenetic tree building methods for analysis of viral, bacterial and human genomes[J]. Genomics, 2014, 104(1): 1-7. DOI: 10.1016/j.ygeeno.2014.06.001
- [19] Darling AC, Mau B, Blattner FR, et al. Mauve: multiple alignment of conserved genomic sequence with rearrangements[J]. Genome Res, 2004, 14(7): 1394-403. DOI: <https://doi.org/10.1101/gr.2289704>
- [20] Godfroid F, Cloeckaert A, Taminiau B, et al. Genetic organisation of the lipopolysaccharide O-antigen biosynthesis region of *brucella melitensis* 16M (wbk)[J]. Res Microbiol, 2000, 151(8): 655-668. DOI: 10.1016/s0923-2508(00)90130-x
- [21] Gonzalez D, Grillo MJ, De Miguel MJ, et al. Brucellosis vaccines: assessment of *Brucella melitensis* lipopolysaccharide rough mutants defective in core and O-polysaccharide synthesis and export[J]. PLoS One, 2008, 3(7): e2760. DOI: 10.1371/journal.pone.0002760
- [22] Conde-Alvarez R, Arce-Gorvel V, Iriarte M, et al. The lipopolysaccharide core of *Brucella abortus* acts as a shield against innate immunity recognition[J]. PLoS Pathog, 2012, 8(5): e1002675. DOI: 10.1371/journal.ppat.1002675
- [23] Gil-Ramirez Y, Conde-Alvarez R, Palacios-Chaves L, et al. The identification of wadB, a new glycosyltransferase gene, confirms the branched structure and the role in virulence of the lipopolysaccharide core of *Brucella abortus*[J]. Microb Pathog, 2014, 73: 53-62. DOI: 10.1016/j.micpath.2014.06.002
- [24] Cardoso PG, Macedo GC, Azevedo V, et al. *Brucella* spp non-canonical LPS: structure, biosynthesis, and interaction with host immune system[J]. Microb Cell Fact, 2006, 5: 13. DOI: 10.1186/1475-2859-5-13
- [25] Feng Y, Peng X, Jiang H, et al. Rough *brucella* strain RM57 is attenuated and confers protection against *Brucella melitensis*[J]. Microb Pathog, 2017, 107: 270-275. DOI: 10.1016/j.micpath.2017.03.045
- [26] Rauteema R, Meri S. Complement-resistance mechanisms of bacteria[J]. Microbes Infect, 1999, 1(10): 785-794. DOI: 10.1016/s1286-4579(99)80081-1
- [27] Moreno E. Retrospective and prospective perspectives on zoonotic brucellosis[J]. Front Microbiol, 2014, 5: 213. DOI: 10.3389/fmicb.2014.00213

收稿日期:2020-04-03 编辑:张智芳