

噬菌体展示布鲁氏菌蛋白文库构建及差减筛选融合蛋白

王阔鹏,于凌娇,刘倩宏,刘 麒,张履冰

摘要:目的 建立噬菌体展示羊型布鲁氏菌16M株表面蛋白文库,差减筛选具有良好特异性、亲和力及反应原性的蛋白,为确定新型诊断用抗原奠定基础。**方法** 利用噬菌粒载体pYW01构建重组羊型布鲁氏菌16M株基因文库,辅助噬菌体VCSM13感染基因文库进而构建噬菌体展示羊型布鲁氏菌16M蛋白文库。利用PEG纯化后,扩增蛋白文库。随机挑取单克隆,提取质粒,测序鉴定蛋白文库。通过差减筛选,选择具有良好特异性、亲和力及反应原性的表面蛋白,为确定诊断用抗原奠定基础。**结果** 通过DNA重组技术,构建羊型布鲁氏菌16M基因文库,库容量达到 10^8 pfu/mL,并且随机性良好。利用辅助噬菌体VCSM13包装基因文库,随机挑取蛋白文库中单克隆,提取质粒,经测序鉴定,成功构建噬菌体展示羊型布鲁氏菌16M株表面蛋白文库。利用免疫血清及感染血清对噬菌体展示蛋白文库进行差减筛选,筛选出6个噬菌体融合蛋白。经Western-blot分析6个噬菌体融合蛋白均具有较好的反应原性及特异性。**结论** 成功构建噬菌体展示布鲁氏菌蛋白文库,差减筛选出6个具有较好反应原性及特异性的融合蛋白,为后续新型血清学诊断制剂筛选奠定基础。

关键词: 布鲁氏菌;噬菌体展示;融合蛋白;差减筛选

中图分类号:R378.5

文献标识码:A

文章编号:1002-2694(2019)05-0376-06

Phage display proteins library of *Brucella* and subtractive scanning fusion protein

WANG Kuo-peng, YU Ling-jiao, LIU Qian-hong, LIU Qi, ZHANG Lü-bing

(Institute of Animal Science and Technology, Agriculture Science and Technology College, Jilin 132100 China)

Abstract: We established a phage display surface protein library of *Brucella melitensis* 16M strain and to lay a foundation for the screening of a new diagnostic antigen. Recombinant *Brucella melitensis* 16M strain gene library was constructed by using phagemid vector pYW01. The protein library of *B. melitensis* 16M strain was constructed infected by helper phage VCSM13. Purified by PEG and enlarged library, the plasmid DNA was randomly extracted from the library to sequence and analyze. The novel proteins are identified by subtractive scanning of the protein library with vaccine serum and infected serum. Complete-enzyme-linked immunosorbent assay (c-ELISA) and Western blot were used to evaluate novel serodiagnostic antigens. *B. melitensis* 16M strain gene library was constructed by DNA recombination. The library's capacity was 10^8 pfu / mL with performance randomness. Gene library was infected by helper phage VCSM13 to generate protein library. The plasmid DNA of protein library were randomly extracted to sequence and analyze. The result reveals that phage display protein library of *B. melitensis* 16M strain was successfully constructed. Six fusion proteins were identified with subscribe scanning and verified by c-ELISA and Western blot.

Keywords: *Brucella*; phage display; fusion protein; subtractive scanning

吉林省科技厅项目(No.20150204022NY)和大学生科技创新项目
[No.吉农院合字(2009)第11439024号, No.201811439024]联合
资助

通讯作者:刘倩宏,Email:qianhongliu@126.com;

ORCID: 0000-0003-1961-1023

作者单位:吉林农业科技学院动物科技学院,吉林 132100

Supported by the Science and Technology Project of Jilin Province (No.20150204022ny), the Science and Technology Innovation Project for College Students [No.(2009)11439024 and No.201811439024]

Corresponding author: Liu Qian-hong, Email, qianhongliu@126.com

布鲁氏菌病(简称布病)是由布鲁氏菌引起的一种人兽共患病,感染动物表现睾丸炎、不孕、不育、流产等症状,人类感染为波浪热、关节炎、脾脏肿大,也可引起生殖系统障碍^[1-2]。布病严重影响动物生产性能和产品品质,对畜牧业的生产和健康发展带来重大损失。近年来在我国北方部分地区、特别是牧区出现上升趋势,严重影响畜牧业发展和农牧民身体健康^[3-4]。该病治疗效果较差,以预防为主。故建立快速、准确诊断方法是控制、净化布病的必要手段。

目前布病的检测方法主要有病原学检测、血清学检测及分子生物学检测。现以血清学方法最为成熟,常用的方法有平板凝集(RBT)、试管凝集(SAT)、补体结合实验(CFT)、ELISA等。其中RBT由于操作简单,但敏感性、特异性均不高,而广泛地被用作现场的大规模初筛性试验;SAT虽然能用于定性检测,但主要检测血清中的IgM,由于IgM在血清中存在时间较短、含量也不如IgG高等原因,导致该方法敏感性、特异性也不高;CFT也能用于定性检测,但由于操作繁琐、耗时长也不常被采用。ELISA由于其快速、操作简单,在国际贸易中被世界动物卫生组织(OIE)规定为检测布病的指定方法,被公认为是一种比较有前途的方法。但是血清学方法检测的是菌体表面的脂多糖(lipopolysaccharide, LPS),布鲁氏菌的LPS与伤寒沙门氏菌、副伤寒沙门氏菌、霍乱弧菌、小肠耶尔森菌O:9等存在相似结构,故在诊断中存在假阳性^[5]。因此,新型诊断抗原的研制是建立ELISA方法的关键。

布鲁氏菌表面蛋白具有较强的免疫原性,而且在布鲁氏菌各个种间具有高度的保守性,以表面蛋白作为诊断抗原不容易和其他细菌,如大肠杆菌、小肠耶尔森菌等发生交叉反应,减少假阳性^[5-7]。很多表面蛋白,如omp25、omp28、omp31和bp26都曾被用做诊断抗原研究,但究竟哪个/些表面蛋白的特异性强、敏感性高,目前仍在探索。

由于噬菌体展示技术可以构建大容量文库并具有高通量筛选等特性,本研究利用噬菌体展示技术构建布鲁氏菌蛋白文库,通过差减筛选,选择具有良好特异性、亲和力及反应原性的表面蛋白,为确定诊断用抗原奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料 TG1大肠杆菌(广州碧云天生物有限公司);羊型布鲁氏菌16M株(标准热灭活,本室保存);辅助噬菌体VCSM13(海军总医院周丽君教授

惠赠);噬菌粒载体pYW01(梅西大学Jasna教授惠赠)。VCSM13及pYW01经测序鉴定,序列全部正确。

Taq Master Mix、细菌基因组提取试剂盒、胶回收试剂盒、DNA Marker(康为世纪公司);T4 DNA ligase、末端快速补平试剂盒、Sma I内切酶、虾碱性磷酸化酶(NEB公司);超声波细胞粉碎仪(新芝SCIENTZ-IIID型);电转仪(BIO RAD公司)。噬菌粒载体pYW01引物由长春库美生物科技有限公司合成,上游引物5'-AACATATGAAATACCT-GCTGCCGAC-3',下游引物5'-TCTTCCTCA-GAGATCAGCTTCTGCT-3'。

1.2 噬菌体展示布鲁氏菌16M株基因组文库构建

1.2.1 布鲁氏菌16M株基因组提取及基因组片段化 以布鲁氏菌16M株菌液(经热灭活)为模板,利用细菌基因组提取试剂盒提取16M株基因组,具体操作按试剂盒进行。

将超声条件设定为输出功率40%,每次超声3 s,间隔6 s,超声次数为10下,超声DNA总体积约500 μL,将基因组DNA随机打断。利用胶回收试剂盒对线性片段回收,以除去小于200 bp大于3 000 bp的片段。

1.2.2 破碎基因组片段末端补平 将细菌基因组超声片段进行随机片段末端平齐化,体系如下:DNA随机片段38 μL、T4 DNA polymerase 1 μL、10×T4 DNA polymerase reaction buffer 5 μL、dNTP Mixture 2 μL、H₂O 4 μL,11 ℃反应20 min,70 ℃灭活10 min。补平后利用胶回收试剂盒对其进行纯化,准备连接。

1.2.3 酶切质粒pYW01及去磷酸化 Sma I单酶切噬菌粒载体pYW01,体系如下:10×buffer 5 μL、Sma I 1 μL、pYW01 30 μL、Water 14 μL,25 ℃,反应5 h。然后利用虾碱性磷酸酶(rSAP)直接进行去磷酸化,以防止载体自连,即直接在酶切反应结束后的体系中加入rSAP 1.5 μL,37 ℃温育60 min后65 ℃热灭活20 min。去磷酸化后胶回收试剂盒进行纯化,准备连接。

1.2.4 感受态细胞制备 取1 mL TG1母液接种到200 mL新鲜的LB培养液中,37 ℃,170 r/min振荡培养2.5 h,使OD₄₅₀达到0.7左右。冰浴30 min,4 000 r/min,4 ℃离心20 min,弃上清收集菌体。用含有10%甘油的无菌水洗涤菌体2次。最后用400 μL 10%甘油无菌水重悬细胞沉淀,分装,每管100 μL,-80 ℃保存备用。

1.2.5 连接 利用T4 DNA ligase将末端补平的布

鲁氏菌 16M 株基因组超声片段和酶切质粒 pYW01 (去磷酸化)以 4:1 比例(摩尔比)进行连接,体系如下:DNA 随机片段 12 μL,pYW01 1 μL、T4 DNA ligase 1 μL、10× ligation buffer 2 μL、H₂O 4 μL。22 ℃连接 1 h 后 70 ℃热灭活 5 min。

1.2.6 电转化 将连接产物 20 μL 电转化至 100 μL 感受态细胞中。(冰浴条件下,将连接产物和感受态细胞用枪头缓慢混合均匀)电转化条件为:1 mm 电击槽、电压 1 800 V、电阻 200 Ω、电容 25C,同时将 2 μL 噬菌粒载体 pYW01 转入 100 μL TG1 中作为对照,以检测感受态转化效率。电转完成后立即加入 900 μL LB 液体培养基,震荡活化 45 min (37 ℃, 170 r/min),此即为噬菌体展示布鲁氏菌 16M 株基因文库。

1.3 基因文库容量计算及随机性检测 取上述 10 μL 连接菌液用 LB 液体培养基稀释至 100 μL,均匀涂布于 LB 固体培养基(20 μg/mL 氯霉素)37 ℃过夜培养。观察各平板菌落形成数量,以公式计算库容量(cfu/mL)=菌落数×稀释倍数×10。

随机挑取菌落,LB 液体培养基(20 μg/mL 氯霉素)摇动约 6 h,取菌液行 PCR,鉴定文库插入效率。PCR 体系如下:上、下游引物各 0.5 μL,Taq Master Mix 5 μL,菌液 1 μL,用水补足体积至 10 μL。Touch-down PCR 运行程序:94 ℃ 1 min, 94 ℃ 30 s, 65 ℃ 30 s, 72 ℃ 30 s, 72 ℃ 10 min。其中退火温度从 65 ℃依次降落到 50 ℃,温度每降落一度运行两个循环,最后 50 ℃运行 10 个循环,共计 40 个循环,1% 琼脂糖电泳检测结果。

1.4 噬菌体展示布鲁氏菌 16M 株蛋白文库构建

1.4.1 辅助噬菌体滴度检测 10 μL 辅助噬菌体 VCSM13 用 LB 液体培养基 10 倍稀释,稀释成 10⁻¹ ~ 10⁻¹⁰ 10 个稀释度。分别取 100 μL(10⁻⁶、10⁻⁸、10⁻¹⁰)稀释辅助噬菌体和新鲜培养的宿主菌(TG1) 100 μL 混合均匀后,加入 5 mL 软琼脂混匀后快速倒入已预热的 LB 固体培养基中(20 μg/mL 氯霉素),37 ℃倒置培养 12~16 h。具体操作按照文献进行^[8],噬菌体滴度(pfu/ mL)=斑数×稀释倍数×10。

1.4.2 辅助噬菌体 VCSM13 感染基因文库 取全基因组文库菌液 1 mL,加入至 200 mL LB 培养液中(20 μg/mL 的氯霉素),37 ℃摇动培养 2~3 h 后。取菌液 10 μL,进行 10 倍梯度稀释,涂 LB 平板(20 μg/mL 的氯霉素)进行菌落计数。待菌落计数结果出来以后,加入辅助噬菌体 VCSM13(使 MOI 保持在 50:1~100:1 之间)。37 ℃静置感染 30

min,37 ℃振荡培养 1 h。

1.4.3 纯化噬菌体蛋白文库 上述培养物,室温 4 000 r/min 离心 10 min;弃上清,用 100 mL LB 培养基重悬沉淀,加入卡那霉素使其终浓度达到 50 μg/mL,37 ℃培养过夜;次日将菌液 4 000 r/min 离心 20 min,将上清转移至无菌离心管内,分别加入 1/4 体积的 PEG8000-NaCl 溶液,剧烈摇晃后,4 ℃过夜放置,沉淀噬菌体;4 ℃,10 000 r/min 离心 30 min;弃上清,用 3 mL PBS 重悬沉淀,即为辅助噬菌体包装后的展示蛋白文库,0.22 μm 滤膜过滤除菌即得到纯净的噬菌体悬液。

1.4.4 测序鉴定蛋白文库 利用质粒小提试剂盒提取此悬液质粒 DNA,电转化至 TG1 感受态细胞,条件同 1.6.2。将转化菌液涂布于含氯霉素的 LB 平板上,37 ℃过夜培养,随机挑取 20 个单克隆送公司测序。将测序序列与 GenBank 中 16M 株序列比对,鉴定蛋白文库。

1.5 差减淘选

1.5.1 差减筛选 将噬菌体展示文库作为流动相,将 M5 免疫羊血清作为固定相。将免疫血清包被在孔内,加入噬菌体展示蛋白文库,二者进行吸附。以未被吸附的噬菌体展示文库作为流动相,阳性血清作为固定相。提前将阳性血清包被在孔内,加入免疫血清未吸附的噬菌体展示蛋白文库,进行淘选。对差减淘选的噬菌体文库进行 2 轮富集。

1.5.2 扩增阳性克隆,测序 ① 对淘选到的阳性克隆进行扩增:挑取每个单克隆转接至新鲜 2×YT 液体培养基中,37 ℃振荡培养过夜。再转接 TG1 菌液中,培养至 OD=0.4 左右后,加入辅助噬菌体 VCSM13d3(MOI=1:100)超感染,以扩增单个阳性克隆噬菌体文库。② 用质粒小量抽提试剂盒提取重组质粒,操作方法按说明书进行。③ 对阳性重组质粒进行 Touch-down PCR 鉴定,分析插入片段大小;对鉴定阳性的质粒送公司测序。

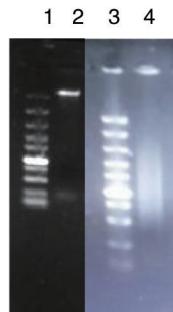
1.6 噬菌体阳性克隆筛选 竞争 ELISA、Western-blot 评价阳性克隆的亲和力、特异性及反应原性,筛选具有良好抗原性的噬菌体阳性克隆。① 提取 LPS,按试剂盒操作进行;② 竞争 ELISA 评价阳性克隆的亲和力:以筛选到的噬菌体融合蛋白包被,以提取 16M 株 LPS 作为竞争相,检测阳性克隆的亲和力;并利用 prism 软件分析阳性克隆亲和力;③ Western-blot 评价阳性克隆的特异性及反应原性,SDS-PAGE 检测;取纯化后的噬菌体融合蛋白进行 SDS-PAGE 电泳,同时以辅助噬菌体 VCSM13 作为阴性对照。转膜:剪下和凝胶大小吻合的 6 张 3M

滤纸和1张PVDF膜(戴手套操作),PVDF膜先在甲醇溶液中浸泡15 s,转入去离子水中漂洗后,连同3M滤纸转入半干转印缓冲液中,浸泡30 min。将胶用去离子水冲洗后,也放在半干缓冲液中平衡。然后将胶、膜、滤纸制成三明治,注意每一层都不能有气泡,否则影响转印效果。叠好后,根据膜的大小,来确定转印时电流的大小(具体条件的设定参考仪器说明书)。本试验采用200 mA电流下转印60 min。

免疫检测:转印完成后将膜用丽春红染色,看胶上的目的条带是否转到膜上;然后用蒸馏水漂洗膜,用10%马血清封闭1 h后,用PBS洗涤3次,每次5 min;然后用新鲜配置的一抗(阳性血清)室温封闭膜70 min,再用PBST漂洗3次,每次5 min;用新鲜配置的二抗(兔抗羊血清)封闭膜35 min,洗膜3次,操作同上,然后再用PBS洗涤1次,3 min;用DAB染色3~5 min至膜上的条带清晰后,用蒸馏水终止反应。

2 结果

2.1 羊型布鲁氏菌16M株基因组提取及超声破碎结果 羊型布鲁氏菌16M株(标准热灭活)基因组提取结果见图1。从图中可见DNA提取浓度较高;经OD_{260/280}分析,基因组纯度也达到要求。取DNA约500 μL进行超声裂解,结果见图1。琼脂糖凝胶电泳显示,基因组裂解后随机片段大小集中在0.3~2 kb之间。



1:Marker 从上到下大小依次为100 bp,250 bp,500 bp,750 bp,1 000 bp,1 500 bp,2 000 bp,3 000 bp,5 000 bp,10 000 bp;
2:马尔他布鲁氏菌16M株DNA提取结果;3:Marker;4:基因组DNA超声裂解结果

图1 布鲁氏菌基因组及超声破碎电泳检测结果

Fig.1 Result of DNA extraction and cleavage

2.2 酶切噬菌粒载体pYW01结果 提取载体质粒pYW01,经1%琼脂糖凝胶电泳显示条带大小与预期质粒大小相符(图2)。质粒经测序(长春库美生

物有限公司)表明,提取结果正确。经Sma I单酶切后,在目的位置发现单一条带(图2)。对其进行去磷酸化后,准备连接。

2.3 构建羊型布鲁氏菌16M株全基因组文库 取100 μL转化后菌液涂板,经37 °C过夜培养后,有菌落在含氯霉素的LB平板上长出,证明重组噬菌粒载体pYW01成功电转至TG1感受态细胞。菌落大小、形态一致。经计算库容量约为10⁸ pfu/mL,达到建库要求。

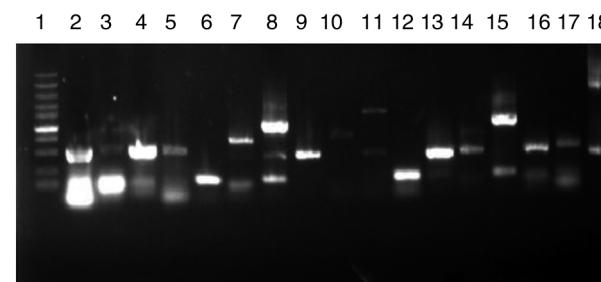
随机挑取17个单菌落,利用Touch-down PCR程序鉴定插入文库的片段,结果见图3。结果表明,插入片段具有较好随机性,且插入片段大小分布在0.2~3.0 kb间。



1:Marker 从上到下大小依次为100 bp,250 bp,500 bp,750 bp,1 000 bp,1 500 bp,2 000 bp,3 000 bp,5 000 bp,10 000 bp;2:提取噬菌粒pYW01;3:Sma I单酶切噬菌粒pYW01

图2 提取质粒pYW01及Sma I单酶切结果

Fig.2 Result of plasmid extraction and Sma I enzyme digestion



1:Marker 从上到下大小依次为100 bp,250 bp,500 bp,750 bp,1 000 bp,1 500 bp,2 000 bp,3 000 bp,5 000 bp,10 000 bp;2~18:PCR 鉴定结果

图3 1%琼脂糖电泳检测全基因文库中插入片段结果

Fig.3 Insert fragments of the library

2.4 构建羊型布鲁氏菌16M株蛋白文库 基因文库经辅助噬菌体VCSM13感染后,即可包装成蛋白文库。经PEG纯化后,对原始蛋白文库电转化增殖,37 °C过夜培养,即为增殖的蛋白文库。随机挑取LB平板上20个单克隆送公司测序。将测序结果与16M株序列比对,基因同源性达到98%以上。

结果表明,成功构建羊型布鲁氏菌 16M 株表面蛋白文库。

2.5 差减淘选,扩增阳性克隆,测序 利用免疫血清及感染血清对噬菌体展示蛋白文库进行差减淘选、两轮富集后,得到 37 个阳性克隆。每轮富集结果见表 1。

表 1 每轮淘选后阳性克隆数

Tab.1 Number of positive clones each round of panning

	第一轮 (pfu/mL)	第二轮 (pfu/mL)	富集率
噬菌体投入量	2.0×10^7	2.0×10^7	—
洗脱物滴度	1.0×10^4	3.0×10^5	300×

对阳性克隆进行扩增,提取质粒进行 Touch-down PCR 鉴定,分析插入片段大小;对鉴定阳性的质粒送公司测序。经 Blast,筛选出 6 个噬菌体融合蛋白,结果见表 2。

表 2 阳性噬菌体融合蛋白

Tab.2 Positive phage fusion protein

ACCESSION	locus_tag	product
AE008917	BMEI1242	hypothetical membrane spanning protein
CP007763	DK63_1291	hypothetical protein
CP007763	DK63_1023	outer membrane autotransporter barrel domain protein
CP007763	DK63_628	glutamate racemase
CP007763	DK63_1659	outer membrane autotransporter barrel domain protein
AE008918	BMEII0036	outer membrane protein oprf (an outer membrane porin)

2.6 竞争 ELISA 评价阳性克隆的亲和力 以筛选到的噬菌体融合蛋白包被,以提取 16M 株 LPS 作为竞争相,检测阳性克隆的亲和力,以辅助噬菌体 VCSM13d3 作为对照,结果表明,以融合蛋白 BMEI1242、DK63-1291、BMEII0036 亲和力最强见图 4。且经统计学分析,3 个融合蛋白之间差异没有统计学意义($F=0.038\ 22, P>0.05$)。

2.7 Western-blot 评价阳性克隆的特异性及反应原性 以布鲁氏菌病阳性血清为一抗,进行 Western-blot 分析各个阳性克隆的特异性及反应原性,以 VCSM13d3 为阴性对照,结果见图 5。结果表明,这 6 个噬菌体融合蛋白均具有较好的反应原性

及特异性,而与辅助噬菌体不发生反应。

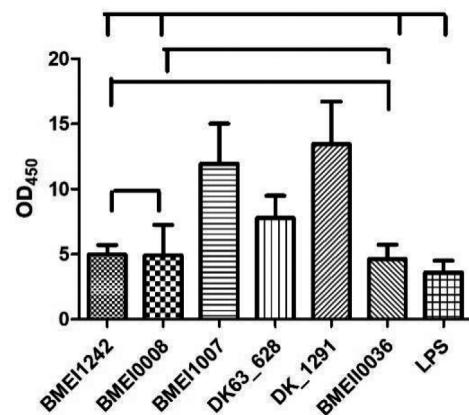
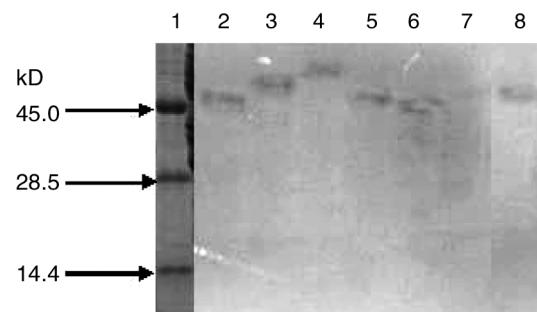


图 4 噬菌体融合蛋白 c-ELISA 结果

Fig.4 Result of c-ELISA of phage-fusion proteins



1: 低分子量蛋白 Marker; 2: BMEII0036; 3: DK63_1659; 4: DK63_628; 5: DK_631023; 6: DK63_1291; 7: VCSM13d3; 8: BMEI1242

图 5 感染/阳性血清的 Western-Blot 结果

Fig.5 Result of Western-Blot

3 讨 论

布鲁氏菌病新型诊断抗原的研究主要集中在两个方面。LPS 作为传统的诊断抗原,一直不断被试图改造^[9-12]。LPS 含有 M 和 A 两个表位,其中 A 表位是引起交叉反应的主要原因,而这两个表位还不能被分离^[13]。因此新合成的 LPS 只含有 M 表位或者含有被改造的 A 表位。但化学方法合成的 LPS 在生物学活性上,可能会大大降低。本研究通过利用噬菌粒载体 pYW01 及辅助噬菌体 VCSM13 构建了噬菌体展示布鲁氏菌表面蛋白文库,使目的蛋白能与噬菌体的 pⅢ 蛋白融合,共同展示在噬菌体表面。后续利用靶分子即可对文库进行高通量筛选,并且该技术还可以将基因型与表型联系起来。因此,噬菌体展示技术在肿瘤标记物的识别、新型抗毒血清治疗、疫苗候选株筛选、药物开发、蛋白质组学研究等方面得到广泛应用^[14-17]。本研究所用噬菌体展示系统,是 Jasna 教授等人于 2013 年构建,该

系统能降低外源蛋白对于宿主菌(大肠杆菌)的毒性,提高展示效率等特性^[18]。此系统用于构建布鲁氏菌表面蛋白文库还是首次,为布鲁氏菌新型诊断抗原的筛选奠定基础。

致谢 本研究得到梅西大学 Jasna Rakonjac 教授,海军总医院周丽君教授的无私帮助。

利益冲突: 无

引用本文格式: 王阔鹏,于凌娇,刘倩宏,等.噬菌体展示布鲁氏菌蛋白文库构建及差减筛选融合蛋白[J].中国人兽共患病学报,2019,35(5):376-381. DOI:10.3969/j.issn.1002-2694.2019.00.056

参考文献:

- [1] Khan MZ, Zahoor M. An overview of brucellosis in cattle and humans, and its serological and molecular diagnosis in control strategies [J]. Trop Med Infect Dis, 2018, 3(2): E65. DOI: 10.3390/tropicalmed3020065
- [2] Corbel MJ. Brucellosis: an overview [J]. Emerg Infect Dis, 1997, 3(2): 213-221. DOI: 10.3201/eid0302.970219.
- [3] 陈秋兰,杨维中. 内蒙古及相邻省份 2010—2014 年布鲁氏菌病流行特征和时空聚集性分析[J]. 中华疾病控制杂志, 2017, (1):30-34. DOI:10.16462/j.cnki.zhbzkz.2017.01.007
- [4] 娄鹏威,吴秀峰,张学良,等.基于 ARIMA 乘积季节模型的新疆布鲁氏菌病流行趋势分析[J].新疆医科大学学报, 2017, 40(1): 86-90. DOI:0.2017-01-023
- [5] Gerbier G, Garin-Bastuji B, Pouillot R, et al. False positive serological reactions in bovine brucellosis: evidence of the role of *Yersinia enterocolitica* serotype O : 9 in a field trial [J]. Vet Res, 1997, 28 (4): 375-383. DOI: 10.1111/j.1740-8261.1997.tb00862.x
- [6] Ahmed IM, Khairani-Bejo S, Hassan L, et al. Serological diagnostic potential of recombinant outer membrane proteins (rOMPs) from *Brucella melitensis* in mouse model using indirect enzyme-linked immunosorbent assay [J]. BMC Vet Res, 2015, 11:275. DOI: 10.1186/s12917-015-0587-2
- [7] Corrente M, Desario C, Parisi A, et al. Serological diagnosis of bovine brucellosis using *B. melitensis* strainB115[J]. J Microbiol Methods, 2015, 119: 106-109. DOI: 10.1016/j.mimet.2015.10.012
- [8] 丁立,熊丽娟,王欲晓,等. 抗 FKBP52 人源单链抗体的筛选及其完整抗体真核表达载体的构建[J]. 生物技术通讯, 2015, (6): 786-789. DOI:10.3969/j.issn.1009-0002.2015.06.011
- [9] Ganesh NV, Sadowska JM, Sarkar S, et al. Molecular recognition of *Brucella* A and M antigens dissected by synthetic oligosaccharide glycoconjugates leads to a disaccharide diagnostic for brucellosis[J]. J Am Chem Soc, 2014, 136 (46): 16260-16269. DOI: 10.1021/ja5081184
- [10] Mandal SS, Duncombe L, Ganesh NV, et al. Novel solutions for vaccines and diagnostics to combat brucellosis [J]. ACS Cent Sci, 2017, 3 (3): 224-231. DOI: 10.1021/acscentsci.7b00019
- [11] McGiven J, Howells L, Duncombe L, et al. Improved serodiagnosis of bovine brucellosis by novel synthetic oligosaccharide antigens representing the capping m epitope elements of *Brucella* O-polysaccharide[J]. J Clin Microbiol, 2015, 53(4):1204-1210. DOI: 10.1128/JCM.03185-14
- [12] McGiven JA. New developments in the immunodiagnosis of brucellosis in livestock and wildlife[J]. Rev Sci Tech, 2013, 32 (1):163-176. DOI:10.1111/j.1865-1682.2012.01333.x
- [13] Meikle PJ, Perry MB, Cherwonogrodzky JW, et al. Fine structure of A and M antigens from *Brucella biovars*[J]. Infect Immun, 1989, 57(9):2820-2828. DOI:10.1100/tsw.2002.428
- [14] Ebrahimizadeh W, Rajabibazl M. Bacteriophage vehicles for phage display: biology, mechanism, and application[J]. Curr Microbiol, 2014, 69 (2): 109-120. DOI: 10.1007/s00284-014-0557-0
- [15] Larimer BM, Thomas WD, Smith GP, et al. Affinity maturation of an ERBB2-targeted SPECT imaging peptide by in vivo phage display[J]. Mol Imaging Biol, 2014, 16 (4): 449-458. DOI: 10.1007/s11307-014-0724-5
- [16] Newton-Northup JR, Dickerson MT, Kumar SR, et al. In vivo bacteriophage peptide display to tailor pharmacokinetics of biological nanoparticles[J]. Mol Imaging Biol, 2014, 16 (6): 854-864. DOI: 10.1007/s11307-014-0762-z
- [17] Shim H. Therapeutic antibodies by phage display [J]. Curr Pharm Des, 2016, 22 (43): 6538-6559. DOI: 10.2174/1381612822666160923113714
- [18] Gagic D, Wen W, Collett MA, et al. Unique secreted-surface protein complex of *Lactobacillus rhamnosus*, identified by phage display[J]. Microbiol Open, Feb 2013, 2(1):1-17. DOI: 10.1002/mbo3.53

收稿日期:2019-03-01 编辑:张智芳