

内蒙古科尔沁地区奶牛布病流行病学调查及 OMP22 互作蛋白的筛选与鉴定

李向阳 著

中国农业科学技术出版社

内蒙古科尔沁地区奶牛布病流行病学调查及 OMP22 互作蛋白的筛选与鉴定

李向阳 著

中国农业科学技术出版社

图书在版编目 (CIP) 数据

内蒙古科尔沁地区奶牛布病流行病学调查及 OMP22 互作蛋白的筛选与鉴定 / 李向阳著. —北京: 中国农业科学技术出版社, 2012. 12
ISBN 978 - 7 - 5116 - 1166 - 6

I. ①内… II. ①李… III. ①乳牛 - 布鲁氏菌病 - 家畜流行病学 - 研究 - 内蒙古②乳牛 - 布鲁氏菌病 - 蛋白质 - 相互作用 - 研究 - 内蒙古 IV. ①S858.23

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2012) 第 304937 号

责任编辑 朱 绯

责任校对 贾晓红 郭苗苗

出 版 者 中国农业科学技术出版社

北京市中关村南大街 12 号 邮编: 100081

电 话 (010) 82106626 (编辑室) (010) 82109702 (发行部)

(010) 82109709 (读者服务部)

传 真 (010) 82109707

网 址 <http://www.castp.cn>

经 销 者 新华书店北京发行所

印 刷 者 北京京华虎彩印刷有限公司

开 本 787 mm × 1 092 mm 1/16

印 张 6.75

字 数 125 千字

版 次 2012 年 12 月第 1 版 2012 年 12 月第 1 次印刷

定 价 28.00 元

版权所有 · 翻印必究

著者简介及科研成果

李向阳，男，1972年5月出生，汉族，内蒙古扎兰屯市成吉思汗镇出生，中共党员，吉林大学博士研究生，内蒙古民族大学副教授。1996年7月至今内蒙古民族大学成人教育学院学籍科长。

科研成果：国家自然科学基金课题主持人 [项目名称：内蒙古东部区布鲁氏菌流行病学调查及分子标记疫苗研究（项目批准号：31260608）]；内蒙古自治区高等学校科学技术研究重点项目主持人 [项目名称：布鲁氏菌 16MSUCB 基因缺失株构建及免疫效果的研究（项目编号：NJZZ12117）]；2001—2005 年，在吉林大学就读硕士期间参加的“草原红牛微卫星 DNA 多态性的研究”由国家高技术研究发展计划（863 计划）项目资助（项目编号：2001AA243051）；肉用胚胎冷冻与肉用性状基因标记的研究（第二参与人）获吉林省科技厅科技成果（证书号：2004458-02）；2005—2008 年，在内蒙古民族大学参加国家自然科学基金课题一项 [巴氏杆菌耐药性基因突变介导的耐药机制及其检测（基金批准号：30460103）]；2005—2007 年，参加自治区教育厅科研项目 [巴氏杆菌耐药性检测基因芯片的研究（文号 NJ04060）]；2005 年，主持内蒙古民族大学硕士启动基金课题 [蒙古牛种质特性及分子研究（编号：S823.2）]；2008 年，主持内蒙古民族大学自然科学基金课题 [蒙古牛种质特性及分子遗传标记研究（项目号：MDX2007043）]。

在《中国兽医学报》发表《布鲁氏菌外膜蛋白 Omp22 克隆测序及生物信息学分析》一文，《安徽农业科学》发表《CD4⁺T 细胞表位预测及其应用》等论文近 20 篇，主编《计算机基础教育》一书，参编《动物繁殖学》一书。多次获内蒙古民族大学优秀教学质量奖；成人教育管理先进个人；三育人先进个人；成人高等教育先进工作者等荣誉称号。

邮箱：13904752248@139.com

审稿：张嘉保（吉林大学 教授 博导）

序

著者在大学多年讲授课程及在吉林大学读硕士、博士期间，拜读过多位大师的研究成果，深感受益匪浅，获得无限的灵感，现把著者多年来的学术研究成果编辑成册，以供同仁、研究者及学生参考，本书内容紧密跟踪专业步伐，尤其是适合内蒙古地区的相关专业学者、师生使用的一本学术论著。著者严谨求证，字斟句酌，对科尔沁地区奶牛布病进行了调查与研究，书稿由于时间紧迫，著者能力有限，难免挂一漏万，敬请同行不吝赐教。

本书由国家自然科学基金项目 [项目名称：内蒙古东部区布鲁氏菌流行病学调查及分子标记疫苗研究（项目批准号：31260608）]，内蒙古自治区高等学校科学技术研究重点项目 [项目名称：布鲁氏菌 16MSUCB 基因缺失株构建及免疫效果的研究（项目编号：NJZZ12117）] 和内蒙古民族大学学术专著出版基金共同资助出版。

李向阳

（始稿于 2010. 10. 26 云台山，终稿于 2012. 11. 9 越南下龙湾）

前 言

布鲁氏菌病 (Brucellosis, 以下简称布病) 是由布鲁氏菌 (*Brucella*) 引起的人畜共患传染病。该病在世界各国广泛流行, 严重危害人类健康和畜牧业发展。在我国以羊及奶牛养殖区疫情较重, 且疫情呈现出从牧区、半牧区向农区甚至城市蔓延的趋势。内蒙古科尔沁地区奶牛养殖量较大, 布病是威胁奶牛养殖业的重要疾病之一, 有效地控制该病显得十分迫切。目前布鲁氏菌属分为 7 个种 20 个生物型 (传统分类为 6 个种 19 个型)。布鲁氏菌不同种型菌株具有不同的毒力, 甚至同种型的不同菌株其毒力大小也有很大差异。内蒙古地方株的分离鉴定将会为布病的防控提供理论和技术依据。

布鲁氏菌是一种胞内寄生菌, 具有比较独特的胞内生存和免疫机制。深入探讨布鲁氏菌的胞内生存和免疫保护机制, 对布鲁氏菌的胞内生存和免疫保护机制, 对布鲁氏菌致病机制的理解、新型疫苗的研发等具有重要意义。外膜蛋白在稳定细菌外膜的结构、适应胞内外环境和抵抗胞内杀菌机制等方面起着重要作用, 与细菌的毒力有密切关系。外膜蛋白位于细菌的表面, 容易被免疫系统识别, 在与宿主的相互作用中发挥作用。另一方面, 很多外膜蛋白都具有免疫原性, 其中很大一部分是免疫保护抗原。因此, 很多有关细菌致病和免疫反应机制的研究都集中在外膜蛋白上。

酵母双杂交 (Yeast Two-hybrid) 是利用遗传学方法在酵母真核细胞体内研究蛋白质之间相互作用的非常有效的一种分子生物学技术, 被广泛应用于蛋白质组学、细胞信号转导和功能基因组学等领域, 已成为分子生物学研究领域的重要实验手段之一。

本研究拟对内蒙古科尔沁地区奶牛运用免疫学检测方法进行流行病学调查, 常规方法分离培养该地区流行菌株, 分子生物学技术对布鲁氏菌的外膜蛋白 (OMPs) 进行表达及鉴定, 采用酵母双杂交和免疫学等相关技术以 Omp22 为诱饵从巨噬细胞 cDNA 文库中去调取与其相互作用的蛋白, 为探索主要外膜蛋白作为诊断抗原的可行性及深入了解致病机制以及亚单位疫苗的研发奠定基础。

一、我国布病流行情况

人间布病在我国曾经被有效控制,近年来由于多种因素,布病疫情又有回升趋势,部分地区布病疫情回升形势尤为严峻。2006 年,全国各省市布病新发报告病例统计,内蒙古发病率为 35.24/10 万,发病人数 8 408 人,占全国布病发病人数的 44.22%,2007 年,内蒙古传染病发病人数排位中,布病排第 3 位,仅次于乙肝和肺结核,布病已成为内蒙古最为严重的公共卫生问题之一。自 2000 年以来,全国兽医部门检出的布鲁氏菌病阳性牲畜数量也逐年增加。2001—2004 年,每年有 24~28 个省份报告检出布鲁氏菌病阳性牲畜,平均血检阳性率 0.4%,局部地区阳性率超过 5.0%。据不完全统计,2005 年,全国共报告畜间布鲁氏菌病疫点 351 个,报告发病牲畜总数 7 768 头;2006 年,全国共报告畜间布鲁氏菌病疫点 1 178 个,报告发病牲畜总数 7 123 头。目前,在我国以羊及奶牛养殖区疫情较重,且疫情呈现出从牧区、半牧区向农区甚至城市蔓延的趋势。近几年,我国奶业迅速发展,奶牛大范围流动,部分地区奶牛布病疫情上升较快。

二、布鲁氏菌外膜蛋白研究

由于布鲁菌属于胞内寄生菌,机体抗菌免疫以细胞免疫为主。与 Omp22 同属于布鲁氏菌 Omp25/Omp31 家族外膜蛋白的 Omp31,不仅可以引起保护性体液免疫反应,同时可以诱导特异性细胞免疫,是布鲁氏菌病亚单位疫苗 DNA 疫苗的良好候选靶点。同时 Omp31 也可用于布鲁氏菌病诊断。Omp25 亦是布鲁氏菌毒力基因,有研究表明,缺失 Omp25 基因的布鲁氏菌致病性降低,可用于布鲁氏菌病减毒活疫苗的研制,同时,Omp25 蛋白也是粗糙型布鲁氏菌的免疫保护性抗原,间接说明 Omp25 在布鲁氏菌毒力中发挥了重要的作用。Omp25 蛋白具有抑制 TNF- α 产生和分泌的作用,从而有利于布鲁氏菌的胞内存活。抗布鲁氏菌 Omp25 的抗体可以阻断 Omp25 对免疫反应的负调解。然而,目前在国内外对于 Omp22 的研究相对较少,Omp22 是否具有上述两种蛋白的特性和功能还不得而知,至此研究 Omp22 蛋白就显得尤为重要。所以我们通过构建 Omp22 为酵母双杂交的诱饵载体,从巨噬细胞 cDNA 文库中去调取与其相互作用的蛋白,利用相关的技术手段进行鉴定,探讨其相关的功能。

研究目标:系统阐述内蒙古科尔沁地区布病的流行状况、发病原因及传染的途径,分离鉴定菌株,初步揭示 Omp22 蛋白质与巨噬细胞表面蛋白的相互作用

机制。

研究内容：(1) 通过调查整理资料，确定高发地区，利用凝集试验对样品进行流行病学监测；(2) 进行 Omp22 基因 PCR 扩增、克隆与序列测定；(3) 重组质粒 psos-Omp22 的构建与序列测定；(4) 诱饵质粒的自激活检验和定位情况检验；(5) 巨噬细胞 cDNA 文库与捕获载体 pmyr-cDNA 的构建；(6) 构建 cDNA 文库作为捕获蛋白的捕获载体 pmyr-cDNA。构建以 Omp22 蛋白为诱饵载体 pSOs-Omp22。将上述载体共转化酵母温度敏感菌株 cdc25H，用酵母双杂交的方法筛选与 Omp22 蛋白相互作用的蛋白质分子；(7) 免疫共沉淀来验证筛选到的蛋白质与 Omp22 相互作用已排除酵母双杂交的假阳性。

本书通过对科尔沁地区奶牛布病流行性调查和布病外膜蛋白的研究，探索诊断和控制流行的可靠技术手段和方法，对膜蛋白的研究，在分子层面探寻 Omp22 蛋白质与巨噬细胞表面蛋白的相互作用机制。

目 录

第一篇 文献综述

第一章 布鲁氏菌病的研究进展	(3)
1.1 布鲁氏菌病原学	(3)
1.2 布鲁氏菌的分类与进化	(4)
1.3 布鲁氏菌的致病机制的研究进展	(8)
1.4 布鲁氏菌的诊断技术	(11)
1.5 布病流行病学研究进展	(11)
1.6 布病的预防与控制	(16)
第二章 应用酵母双杂交系统研究蛋白质之间相互作用的进展	(19)
2.1 酵母双杂交技术的基本原理和操作流程	(20)
2.2 高通量酵母双杂交系统的应用	(20)
2.3 酵母双杂交衍生技术的应用	(21)
2.4 酵母双杂交技术在蛋白质相互作用的应用	(23)
2.5 酵母双杂交系统优点与缺点	(24)
2.6 展 望	(25)
第三章 CD4⁺T 细胞表位预测及其应用	(27)
3.1 CD4 ⁺ T 细胞的作用	(27)
3.2 T 细胞表位的预测	(29)
3.3 T 细胞表位预测的应用	(30)
3.4 结语与展望	(30)
第四章 布鲁氏菌种具体分类及疫苗研究	(31)
4.1 羊种、绵羊及山羊布病羊种布鲁氏菌	(31)
4.2 牛种布鲁氏菌及牛布病	(32)
4.3 绵羊种布鲁氏菌及绵羊附睾炎	(32)
4.4 猪种布鲁氏菌及猪布病	(33)

4.5	海洋种布鲁氏菌	(34)
4.6	犬种布鲁氏菌及犬布病	(34)
4.7	布鲁氏菌疫苗的研制研究进展	(35)

第二篇 研究内容

第五章	科尔沁地区牛场布病流行病学调查及分离鉴定	(45)
5.1	材料与方法	(45)
5.2	结 果	(48)
5.3	讨 论	(52)
5.4	奶牛布鲁氏菌的分离与鉴定	(52)
5.5	结 果	(54)
5.6	讨 论	(56)
5.7	小 结	(56)
第六章	布鲁氏菌外膜蛋白 Omp22 基因克隆测序及生物信息学分析	(58)
6.1	材料与方法	(58)
6.2	结 果	(60)
6.3	讨 论	(64)
6.4	小 结	(66)
第七章	牛布鲁氏菌 Omp22 基因酵母双杂交诱饵载体的构建及鉴定	(68)
7.1	材料与方法	(68)
7.2	结 果	(71)
7.3	讨 论	(73)
7.4	小 结	(73)
第八章	Omp22 与牛布鲁氏菌感染后的巨噬细胞蛋白互作研究	(75)
8.1	材料与方法	(76)
8.2	结 果	(80)
8.3	讨 论	(84)
8.4	小 结	(86)
结 语		(87)
参考文献		(88)
附录: 英文缩略词表		(93)

第一篇

文献综述

第一章 布鲁氏菌病的研究进展

布鲁氏菌病（简称布病）是一种由布鲁氏菌所引起的人兽共患传染病，该病在世界范围内分布，是《中华人民共和国传染病防治法》规定的乙类传染病。布鲁氏菌是一种呈小球杆状的革兰氏阴性菌，根据农业部 2005 年发布的《病原微生物实验室生物安全管理条例》，将其列为二类动物病原微生物。据卫生部 2011 年报告，人布病发病数 38 151 例，相比 2010 年增加 12.45%，有逐年上升趋势，且动物发病数更达到惊人数目，这给人类健康和畜牧业生产和发展带来严重危害和造成巨大的经济损失。

1.1 布鲁氏菌病原学

布鲁氏菌是一种短小的球杆状细菌，革兰氏染色呈阴性，显微镜下多为单个排列，偶见成对或成串组合。该菌也是专性需氧菌，尤其牛种布鲁氏菌分离培养需在 5% ~ 10% CO₂ 下，且生长缓慢，需 72h 可观察到菌落。

布鲁氏菌属包括 6 个种，即牛种布鲁氏菌、羊种布鲁氏菌、猪种布鲁氏菌、绵羊附睾布鲁氏菌、犬种布鲁氏菌及沙林鼠布鲁氏菌，其中包含至少 19 个生物型。20 世纪 90 年代有研究报道，在海洋哺乳动物种也发现了两种布鲁氏菌，即鳍脚种和鲸种布鲁氏菌。1985 年 WHO 布鲁氏菌病专家委员会把布鲁氏菌属分为 6 个种 19 个生物型，即羊种（生物型 1 ~ 3）、牛种（生物型 1 ~ 7.9）、猪种（生物型 1 ~ 5）及绵羊型副睾种、沙林鼠种、犬种（各 1 个生物型）。我国已分离到 15 个生物型，即羊种（1 ~ 3 型）、牛种（1 ~ 7.9 型）、猪种（1.3 型）、绵羊副睾种和犬种各 1 个型。临床上以羊、牛、猪三种意义最大，羊种致病力最强。

布鲁氏菌对外界环境的抵抗力较强，在动物皮毛、土壤和水中可存活数月。但对湿热的抵抗力较弱，60℃ 加热 30min 即可杀死，煮沸 1min 死亡。对消毒剂的抵抗力也不强，2% 的石炭酸、甲酚皂等可用于本菌的消毒，链霉素、土霉素、庆大霉素和金霉素等对本菌均有抑制作用，可用于急性期治疗。

布鲁氏菌是一种革兰氏阴性的胞内寄生菌，能感染人和家畜引起发热、无力、心内膜炎、关节炎及不孕不育等症状。这对公共卫生及畜牧业发展造成巨大

影响，严重危害人类健康及生产。

1.2 布鲁氏菌的分类与进化

布鲁氏菌一直是生物安全需要重中之重，摆在其研究者面前的挑战就是对于新分离株准确鉴定所属种属。先前鉴定种属的规则可能导致重要安全和调控需求的遗漏，因为物种分类增加了一些种属，并且需要包括额外种属。专家面对的问题就是发展更为准确命名关系，他们各自意见的差别必须减小到最小，希望有最为科学的命名规则。虽然一些额外因素影响选择决定，最重要的抉择就是对公共安全，调查者、科研机构和细菌分类学没有“危害”。接下来部分就是描述了布鲁菌属分类学历史，列举了一些科学家的工作，他们致力于一些毒力，细菌进化，消减生化武器威胁等方面研究。为了有助于理解在不同有机体的关系（通过比较离散集性质）而设计的人为分类系统，分类与进化是这点的集中体现。对于细菌命名，最初以字母命名由于非系统路径导致出现了一些问题，包括一些令人困惑和不准确的常用名字。一项新的决议重新开启细菌命名法，从而避免在更高级分类命名中出现的错误。通过建立一些新的设计规则来简化分类和避免一些不必要和模糊的改变。

1.2.1 布鲁氏菌的分类

布鲁氏菌属于杆动菌属和苍白杆菌属布鲁氏菌科家族，蛋白菌门的变形菌纲中根瘤菌目，变性菌纲的家族成员构成包括存在于哺乳动物、植物和两栖动物。在这些有机体中，影响哺乳动物的有巴尔通体属、立克次氏体和埃利希氏体属，所有这些都是通过媒介传播。这些有机体与其固有胞内自救一致，即使这种性质不能决定定义昆虫介导传播。与大多数根瘤菌目区分的布鲁氏菌特性包括对哺乳动物细胞感染，这一特性只与植物病原体的巴尔通体属相同。但是，专属胞内病原体巴尔通体属与兼性胞内病原体布鲁氏菌属还是存在主要区别。布鲁氏菌属的基因组比巴尔通体属基因组大 50% ~ 100%，同时也保留了更多代谢功能。在土壤中可以存在达 10 周之多，这一特性与植物物质代谢能力保持一致。土壤中的布鲁氏菌田鼠属的鉴定取决于这个家族中所有 3 种属共享的外界环境。布鲁氏菌属相对较大基因组表明它对于外界环境适应能力，可以适应不同宿主。不同宿主之间在细胞结构和最适生长环境表现出差异，与哺乳动物的物质吸收和胞内生长特殊机制一样。因此，可以侵染哺乳动物宿主的特性至少有可能通过后天获得部分巴尔通体属和布鲁氏菌属特性，同时有可能在保守的祖先基因的核苷酸组成上

显现出来。有一些人在致力于这项工作,包括编码多糖生物合成,分泌作用,细胞表面配基和透明质酸的基因等。但是,与哺乳动物细胞的摄取或侵入有关的基因有可能出现在祖先生物体内并且从植物病原体内丢失,如果这样的话,这些基因可能不会显现出有特征的组成,对于鉴定需要更多直接途径。一些布鲁菌属的基因进化表明在适应胞内环境过程中通过一些假基因结构使基因功能丢失。最近,与布鲁氏菌相关重要毒力因子的水平传播有可能与胞内生存相关。引人注意的是:非人畜共患的 *Brucella ovis* 中的与营养物质摄取和利用,细胞膜结构和脲酶相关的基因失活对与缩小组织嗜性和宿主范围起一定作用。但是,是随宿主共同进化还是后天适应这些问题没有研究清楚。具体分类请参阅本书第一篇第四章内容。

1.2.2 物种形成和宿主范围

关于布鲁氏菌属起源推测已经集中于对特定宿主的适应。基于已发现的宿主参数,得出布鲁氏菌属与其宿主共同进化,然而,在宿主特异性基因突变和布鲁氏菌属的突变方面,这一解释又不一致。显然表明,宿主和寄生菌不是同步进化的,但是,在寄生的布鲁氏菌属中发现有很大部分的相似性。在代表最初的6个物种的13种不同的布鲁氏菌中,应用分子钟方法,科研人员发现布鲁氏菌起源于86 000~296 000年前的同一个祖先(与 *B. ovis* 相似)。这一数字早于家畜类宿主,不可能去接近宿主的变异的时间。总之,布鲁氏菌属的变异不可能导致更大的与最初宿主协同进化,但是,反映出了对于这些宿主的适应和偏好。

但是,必须要指出的是,布鲁氏菌属对于宿主的偏好不是特别的严格,实验条件或自然条件下,布鲁氏菌可以感染其他动物,而非他们的最初宿主。但是,这样的感染具有自身的限制。此外,在有牛和山羊或者牛和猪分布的重叠区域,严重布鲁菌感染,例如暴发流产,仅仅引起首选物种的感染。最新实验研究表明,由于接触野猪而导致布鲁菌感染牛。尽管感染动物奶中排出了致病菌,但是不会传播开来,幼畜不会被感染。因此,对于宿主专一性说法对于未来仍然有待研究。

布鲁氏菌最初侵染的是生殖系统,存在于奶中并且传播。直接接触被污染的产品是唯一自然传播途径,这与实验报道一致,由此表明该菌传播不需要媒介引导。这些性质可能对于高密度饲养动物之间的传染提供条件。对于其他物种,例如肉食动物和食腐动物,也可能由于食用被污染兽体或腐质被传播。因此,我们可以得知布鲁氏菌的传播是通过直接接触或存在环境中携带者。

1.2.3 基因结构

通过对比亲缘关系,可以推测出布鲁氏菌或其祖先是一种通过突变在动物体内寄生生长的有机体,这个过程的准确步骤还不知道,但是,它包括性质的丢失、获得和改变。这些性质可以在基因组上反映出来,因此,更多基因序列分析显得非常重要。截至目前,有 38 个基因组可以用来分析。通过基因组的对比,显示相似大小,全部核苷酸组成和基因同线性。有趣的特征就是发现在不同物种中两条染色体出现分离。这一特性为邻近种属所共有,同时,表明大质粒的捕获和修改或者在染色体分割成一些独立单元。研究发现 *B. suis biovar 3* 含有一个单个染色体,从而也证实了两条染色体来源于 1 条染色体的论证。但是,质粒复制起始和染色体 II 的复制起始的特性与质粒衍生起源一致,在 rRNA 基因座之间通过重组正好可以解释 *B. suis biovar 3* 中一个单个染色体的存在。

不管多小染色体的质粒起始点,重要的基因位于两条染色体上,在序列特征上这两条染色体的分布还是具有相似性。在一些关系相近的种属中还是可以发现染色体 II 的质粒起始点,这些种属线性质粒显示相似的基因排布,这些基因组具有相似的 GC 含量,编码区域的比例和管家基因分布的数量。大量的整合子,插入序列和噬菌体遗迹等对于进化有很重要地推动作用。*B. suis* 表明在染色体 II 上有很多附属代谢功能,例如:一种可以利用植物衍生化合物的能力。这一特性在所有布鲁氏菌属是很保守的,在宿主内质网上能增加生存的能力。

不管是进化趋异还是宿主特性适应,与毒力相关同源性的特性不会发生重要改变。尽管有噬菌体介导和其他插入或丢失存在,但是,他们对于毒力作用不是很明显,需要进化。因此,在一些同源性功能中,微小序列改变的作用仍然是最初重要差异的根源。

1.2.4 当前科学的争论

由于应用宽泛的分型方法来调解遗传多样性明显错误,布鲁氏菌的命名和分类引起许多关注。从 19 世纪末 20 世纪初布鲁氏菌的鉴定开始,种属的分类主要按照宿主的类型,1887 年 David Bruce 第一次从一个驻扎马耳他英国军人鉴定出了 *Brucella melitensis*,引起了人的发病。但是,后来证实引起感染的根源是山羊的奶,在接下来几十年内,布鲁氏菌属的发现都与其他宿主有关,例如:牛体内的 *Brucella abortus*、猪体内的 *B. suis*、狗体内的 *Brucella canis*、绵羊体内的 *B. ovis*、丛林荒漠中鼠体内的 *Brucella neotomae*。虽然他们都被定义为生物危害 III 级,但是,当以人为宿主时,这些病原体却有明确的差异。*B. abortus*、

B. melitensis 和 *B. suis* 被认为能够引起严重公共卫生安全, 而 *B. ovis*、*B. neotomae* 和 *B. canis* 却不是, 这是由于人类和动物很少发现由此引起的感染。20 世纪分类体系被建立, 用于不同种属分型的定型, 对于提高诊断和流行病学调查效率有很重要作用。它是建立在一些分类特征综合之上, 包括生长特性, 抗药性和物质代谢, 噬菌体分型, 抗原抗体凝集反应等。通过流行病学调查, 表型差异可以高效地鉴定出感染的根源, 有助于切断传播途径。这一分类体系被证明是有效的, 分子时代的到来又为鉴定分类带来了新的希望。

但是, 这些分子方法对于提高诊断没有起到多大作用, 相反, 最早的分子证据表明应用大于 95% DNA 同源性方法不能区分一些种属和变型。与所有相似性, 基因结构进化, 保守潜在可变基因功能 (16SRNA 和外膜蛋白) 和串联重复序列一致, 所有这些都意味着一个很小变异的种属。1980 年末, Verger 提出布鲁氏菌属是一种单一特异性种属, 运用先前物种鉴定分类方法表明是由 6 个属组成。

随着适用于布鲁氏菌属基因组测序的到来, 他们的遗传差异的本质正在被揭示。由于在重复序列之间或其内部发生的重组, 这些序列不存在于其他序列中, 可变数串联重复提供了型可变性。多态位点, 变异数量和串联重复序列分析已经成为最频繁方法用于鉴别不同种属之间显著差异, 与相近的亲缘关系一样。但是, 这种方法的更多的优势就是地理学上差异的特殊水平。

多态位点序列分析同样已经成为一种在系统发育学和全球流行病学研究的有力工具, 这个方法应用在进化过程中不易变化的保守管家基因的结合处的 DNA 序列, 优点就是避免了由于不对称而引起点突变的弊端。运用这种方法证明最早经鉴定的 4 个种属 (*B. melitensis*、*B. abortus*、*B. ovis* 和 *B. neotomae*) 代表独特分支和进化单位。*B. suis* 分离株与分离于其他的 *B. suis* biovar 5 有更多变异, 并且与哺乳动物分离株亲缘关系更近。*B. suis* biovars 3 和 4 可能起源于 *B. suis* biovars 1, 运用其他分型规则发现其有相近关系。总之, 以上结果表明: 随着知识的增加, 种属进化和工具的开发, 对于解释毒力的起源和宿主适应性有很重要作用。在整个基因组序列基础上的模型已经有了报道。

1.2.5 可能新种属的扩展

伴随着诊断能力的提高, 更新的检测方法已经鉴定出了新的布鲁氏菌属, 开始分别在海洋动物海豚和海豹中分离到, 他们是 3 个独立分支, 属于 *B. neotomae* 和 *B. suis* biovar 5。后来又鉴定出了 *B. microti*, 最初在田鼠体内发现, 接着狐狸和土壤中也发现了。DNA 分析和同源性比对发现是一个独立分支, 但与 *B. suis*