

结核分枝杆菌基因 *Rv2660c*、*Rv2460c*、*Rv3875*、*Rv3804c* 细胞表位融合蛋白的表达及其免疫原性评价^{*}

周玉真^{1,2}, 刘思静^{1,2}, 唐明圆^{1,2}, 蒋官羽^{1,2}, 汪川^{1,2△}

1. 四川大学华西公共卫生学院 卫生检验与检疫系(成都 610041);
2. 四川大学华西公共卫生学院 公共卫生与预防医学实验中心(成都 610041)

【摘要】 目的 评价结核分枝杆菌基因 *Rv2660c*、*Rv2460c*、*Rv3875* 和 *Rv3804c* 的细胞表位融合蛋白的免疫原性,为研制新型多阶段结核疫苗提供可靠的靶抗原。**方法** 将 *Rv2660c*、*Rv2460c*、*Rv3875* 和 *Rv3804c* 基因中的细胞表位串联构成融合抗原基因(命名为 *msv*),克隆到原核表达载体 *pEASY-Blunt* E1 中,诱导表达后采用亲和层析纯化表达产物,经 SDS-PAGE 和 Western blot 鉴定后,用纯化的融合抗原蛋白免疫小鼠,ELISA 法检测免疫小鼠的特异性抗体滴度;分离免疫小鼠的脾淋巴细胞,采用淋巴细胞增殖法检测其免疫原性。**结果** 成功构建了能表达融合抗原基因 *msv* 的原核表达质粒;SDS-PAGE 和 Western blot 结果表明,表达产物亲和层析纯化后,获得相对分子质量为 41.3×10^3 的目的蛋白;ELISA 检测免疫小鼠血清抗体滴度,结果表明特异性抗体效价约为 1:81 920;淋巴细胞增殖实验结果表明,抗原致敏的淋巴细胞经融合蛋白 *msv* 刺激后明显增殖。**结论** 成功表达并纯化出融合蛋白 *msv*,该融合蛋白可诱导小鼠特异性抗体表达和刺激细胞免疫应答,可作为结核疫苗的抗原组分。

【关键词】 结核分枝杆菌 多阶段 *Rv2660c* *Rv2460c* *Rv3875* *Rv3804c* 细胞表位

Prokaryotic Expression and Immunogenicity Analysis of a Fusion Protein Containing Cell Epitopes of *Mycobacterium tuberculosis* *Rv2660c*, *Rv2460c*, *Rv3875* and *Rv3804c* Genes ZHOU Yu-zhen^{1,2}, LIU Si-jing^{1,2}, TANG Ming-yuan^{1,2}, JIANG Gong-yu^{1,2}, WANG Chuan^{1,2△}. 1. Department of Public Health Laboratory Sciences, West China School of Public Health, Sichuan University, Chengdu 610041, China; 2. Research Center for Public Health and Preventive Medicine, West China School of Public Health, Sichuan University, Chengdu 610041, China

△ Corresponding author, E-mail: wangchuan@scu.edu.cn

【Abstract】 Objective To analyse the immunogenicity of a fusion protein containing cell epitopes of *Mycobacterium tuberculosis* genes *Rv2660c*, *Rv2460c*, *Rv3875* and *Rv3804c*, and to evaluate the feasibility of using it as a novel target antigen for developing multi-stage TB vaccines. **Methods** Cell epitopes of *Rv2660c*, *Rv2460c*, *Rv3875* and *Rv3804c* were fused in series to form a new antigen gene (named *msv*). Then *msv* was cloned into the prokaryotic expression vector *pEASY-Blunt* E1. The fusion protein *msv* was expressed by *pEASY-Blunt* E1 under the induction of isopropyl-β-d-thiogalactoside (IPTG). Purified the protein by affinity chromatography and identified the protein by SDS-PAGE and Western blot. To evaluate the immunogenicity of the protein, the mice were immunized with the purified fusion protein, and the titer of the antibody in mice serum was evaluated by ELISA. Besides, splenocytes of immunized mice were separated and splenocytes proliferation was determined under the stimulation of the protein. **Results** The prokaryotic expression plasmid carrying *msv* gene was constructed successfully and *msv* protein could be expressed by the plasmid under the induction of IPTG. SDS-PAGE and Western blot results confirmed that a purified protein (relative molecular mass was 41.3×10^3) was obtained. ELISA result indicated that the titer of the antibody in *msv* immunized mice serum was about 1:81 920. The spleen lymphocyte proliferation assay showed that after immunization with *msv* protein, significant proliferation of antigen-sensitized lymphocytes was observed. **Conclusion** The fusion protein *msv* was successfully expressed and purified, which can induce humoral and cellular immunity in mice. It may be used as an antigen component for the development of TB vaccine in the future.

【Key words】 *Mycobacterium tuberculosis* Multi-stage *Rv2660c* *Rv2460c* *Rv3875* *Rv3804c* Epitope

^{*} 国家自然科学基金面上项目(No. 31570924)和四川省科技厅国际合作项目(No. 2017HH0080)资助
[△] 通信作者, E-mail: wangchuan@scu.edu.cn

结核病(tuberculosis, TB)由结核分枝杆菌(*Mycobacterium tuberculosis*, MTB)引起,是目前世界上由单一病原菌引起的死亡人数最多的疾病。潜伏性结核感染(latent tuberculosis infection, LTBI)是指宿主感染 MTB 后无任何 TB 的临床症状,此时体内的 MTB 处于潜伏状态,机体无法将其彻底清除。当宿主免疫力下降时,LTBI 者体内处于休眠状态的 MTB 将被激活,导致 TB 复发。研究表明,有 5%~10% LTBI 会发展为 TB 患者^[1]。因此,理想结核疫苗的作用靶点需同时关注 MTB 潜伏期与活动性感染期。研究发现,由 MTB *Rv3875* 基因编码的早期分泌抗原靶 6 kDa 蛋白(early secretory antigenic target of 6 kDa, ESAT-6)能诱导强烈的 T 细胞免疫应答,并提供一定的抗结核免疫保护^[2]; *Rv3804c* 基因编码的 Ag85A 蛋白是 MTB 的主要分泌蛋白 Ag85 复合物成分之一,可使细胞毒性 T 细胞的细胞毒活力升高^[3]; *Rv2660c* 基因编码的蛋白在 MTB 处于休眠状态时仍能持续表达,提示 *Rv2660c* 基因可作为清除潜伏性感染阶段 MTB 的作用靶点^[4]; ClpP2 蛋白酶为 MTB 生长必需,当 MTB 分别处于缺氧压力和复氧状态下, *Rv2460c* 基因对 ClpP2 蛋白酶的向上调控具有重要作用^[5],提示 *Rv2460c* 基因可能指示 TB 复发。故本研究以指示 MTB 感染不同阶段的上述 4 个基因 *Rv2460c*、*Rv2660c*、*Rv3875*、*Rv3804c* 为研究对象,从中分析选出可能的 T、B 细胞表位,将其串联融合形成一个融合蛋白,采用原核质粒表达,经体外表达和纯化后,对其免疫原性进行分析,为结核疫苗的研发提供新的靶抗原。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒 大肠杆菌 *Trans1*-T1、大肠杆菌 BL21 (DE3)、原核表达质粒 *pEASY*-Blunt E1 Expression Vector Kit 试剂盒均购于北京全式金生物技术有限公司。

1.1.2 主要试剂 限制性内切酶购自 NEB;抗 His 标签鼠单克隆抗体购自北京全式金生物技术有限公司;Ni-NTA 蛋白纯化试剂盒购自康为世纪生物技术有限公司;内毒素去除试剂盒购自金斯瑞生物技术有限公司;HRP 标记的羊抗鼠 IgG、Bradford 蛋白浓度测定试剂盒、Cell Counting Kit-8 购自碧云天生物技术有限公司;弗氏完全佐剂和弗氏不完全佐剂、刀豆球蛋白 A (concanavalin A, ConA) 购自

Sigma;ELISA Basic Kit 购自联科生物技术股份有限公司。

1.1.3 实验动物 6~8 周龄雌性 C57BL/6J 小鼠购自四川省人民医院实验动物研究所,于四川大学华西公共卫生学院动物实验中心饲养。

1.2 方法

1.2.1 结核分枝杆菌融合基因 *msv* 的合成 从 NCBI 网站上获取 *Rv2660c*、*Rv2460c*、*Rv3875* 和 *Rv3804c* 的氨基酸序列,利用 VaxiPred 在线软件 4 种计算方法分别预测上述蛋白的人源细胞毒性 T 细胞(cytotoxic T lymphocyte, CTL)抗原表位(<http://www.imtech.res.in/raghava/ctlpred>)和辅助性 T 细胞(helper T lymphocyte, Th)抗原表位(<http://www.imtech.res.in/raghava/propred>)。将 4 个基因的 T 细胞表位(其中有部分同时也是 B 细胞表位)通过柔性 linker (GGACCAGGAGGC) 连接,得到融合抗原基因 *msv*,委托南京金斯瑞生物科技有限公司合成,由公司提供克隆 *msv* 基因片段的质粒。

1.2.2 融合抗原基因 *msv* 的扩增 以公司提供的克隆 *msv* 的质粒为模板,以北京擎科新业公司合成的 *msv* 基因上游引物(5'-GTTCCAGATTATGC ATCATTG-3')和 *msv* 基因下游引物(5'-CCCA AACACGTGTATTATTCA-3')扩增 *msv*; 50 μ L 扩增体系: ddH₂O 19 μ L, 2 $\times$ High-Fidelity Master Mix 25 μ L, 上、下游引物各 2 μ L, pUC57-*msv* 质粒 2 μ L; 反应条件: 98 $^{\circ}$ C 2 min, 98 $^{\circ}$ C 10 s, 55 $^{\circ}$ C 15 s, 72 $^{\circ}$ C 1 min 30 s, 共 30 个循环, 72 $^{\circ}$ C 5 min。10 g/L 琼脂糖凝胶电泳检测并纯化产物。

1.2.3 融合抗原基因 *msv* 原核表达载体的构建 通过 *pEASY*-Blunt E1 Expression Vector Kit 试剂盒,将 PCR 产物与 *pEASY*-Blunt E1 Expression Vector 连接,连接产物转化感受态大肠杆菌 *Trans1*-T1,涂板于含氨苄青霉素(Amp)(100 μ g/mL)的 LB 琼脂平板,以北京擎科新业公司合成的筛选 *msv* 基因上游引物(5'-ATTCAACCACA AGCGAGATATA-3')和筛选 *msv* 基因下游引物(5'-CCAACTATGTGTGCCACTAT-3')扩增 *msv* 特异性片段以筛选阳性克隆菌; 25 μ L 扩增体系: ddH₂O 2.5 μ L, 2 $\times$ Taqmaster Mix 12.5 μ L, 上、下游引物各 1 μ L, 菌悬液 8 μ L; 反应条件: 94 $^{\circ}$ C 3 min, 94 $^{\circ}$ C 1 min, 55 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 共 30 个循环, 72 $^{\circ}$ C 5 min。提取 PCR 筛选阳性菌落的质粒以 *Nhe* I 和 *Sac* I 进行双酶切验证,酶切体系: 质

粒 9 μL , *Nhe* I 和 *Sac* I 各 1 μL , $10\times$ NEB Buffer 2 μL , ddH₂O 7 μL , 37 $^{\circ}\text{C}$ 酶切 1 h; 将酶切正确的质粒送北京擎科新业公司测序鉴定。

1.2.4 重组蛋白的诱导表达、鉴定及纯化 将重组质粒以热休克转化法转化感受态大肠杆菌 BL21 (DE3), 转化后的阳性细菌接种含 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Amp 的 LB 液体培养基, 以 0.5 mmol/L 异丙基- β -D-硫代半乳糖苷 (isopropyl- β -D-thiogalactoside, IPTG) 30 $^{\circ}\text{C}$ 诱导培养 6 h, 取低温超声裂解后的培养上清和沉淀进行 120 g/L SDS-PAGE 电泳, 以转化空质粒的大肠杆菌和未加 IPTG 诱导的重组菌作为阴性对照。利用 Ni-NTA 蛋白纯化试剂盒对蛋白样品进行分离纯化, 采用 Bradford 法测定蛋白浓度。将纯化产物进行 SDS-PAGE 电泳后电转印至 PVDF 膜, 以抗 His 标签的鼠单克隆抗体为一抗, HRP 标记的山羊抗小鼠 IgG 为二抗, 对封闭后的 PVDF 膜进行孵育后以 HRP 化学发光试剂显色。

1.2.5 动物免疫 将 6~8 周龄的 C57BL/6J 雌性小鼠随机分为 2 组, 每组 6 只。将去除内毒素的纯化融合蛋白 50 μg 与弗氏完全佐剂充分乳化后腹腔注射实验组小鼠, 间隔 1 周后将相同剂量蛋白与弗氏不完全佐剂充分乳化后进行第 2 次免疫, 于第 2 次免疫 1 周后进行第 3 次免疫(方法与第 2 次免疫一致); 阴性对照组(佐剂对照组)注射等量弗氏完全佐剂或弗氏不完全佐剂。初次免疫前 1 d 和每次免疫后第 7 天取小鼠尾静脉血测定血清抗体水平。末次免疫后第 7 天, 颈椎脱臼法处死小鼠无菌取脾, 测定小鼠淋巴细胞增殖指数。

1.2.6 免疫小鼠抗体水平检测 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 纯化融合蛋白以 100 $\mu\text{L}/\text{孔}$ 加至 96 孔板中, 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜包被 ELISA 板, 洗涤后用含 1% BSA 的 PBS 缓冲液 37 $^{\circ}\text{C}$ 封闭 2 h; 每孔加入 100 μL 不同稀释度的血清, 并设置 PBS 对照, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 2 h; 洗涤后每孔加入稀释的 HRP 标记的羊抗鼠 IgG 抗体(100 $\mu\text{L}/\text{孔}$), 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h 后洗涤; 每孔加入 100 μL TMB 显色液, 室温避光作用 30 min; 加入 2 mol/L 硫酸终止反应, 检测 450 nm 处吸光度值(A_{450} 值), 以 $A_{\text{实验孔}}/A_{\text{PBS对照孔}} > 2.1$ 为阳性阈值, 阳性阈值对应的最高稀释度作为抗体效价。

1.2.7 淋巴细胞增殖实验 无菌取小鼠脾脏置于 200 目尼龙网中, 加入 5 mL RPMI1640 培养液, 研磨棒轻柔研磨, 研磨液离心后弃上清, 加入 4 mL 红细胞裂解液, 室温裂解 5 min; 洗涤后加入含 10% FBS 的 RPMI1640 培养液将淋巴细胞悬液浓度调

为 $2\times 10^6 \text{ mL}^{-1}$, 加入 96 孔细胞培养板中(100 $\mu\text{L}/\text{孔}$), 实验组每孔加入 100 μL 纯化融合蛋白 msv (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$), 阴性对照孔加入 100 μL RPMI1640 培养液, 阳性对照孔加入 100 μL 非特异性刺激源 ConA (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$), 空白对照孔只加 200 μL RPMI1640 培养液(无淋巴细胞)。将 96 孔板静置于 37 $^{\circ}\text{C}$ CO₂ 培养箱内培养 68 h; 取出 96 孔板, 每孔加入 20 μL CCK-8 溶液, 避光培养 4 h 后检测 A_{450} 值, 刺激指数 = (实验组或阳性对照组 A_{450} 值 - 空白对照组 A_{450} 值) / (阴性对照孔 A_{450} 值 - 空白对照组 A_{450} 值)。

1.2.8 统计学方法 所有实验独立重复 3 次, 数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示。对各组数据进行正态分布和方差齐性检验, 采用 *t* 检验进行比较分析, $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 重组质粒的构建

以带有 *msv* 基因的质粒为模板, 经 PCR 扩增后, 获得大小为 1 028 bp 的基因片段(图 1), 与预期相符。将 PCR 产物与 pEASY-Blunt Expression Vector 载体连接, 进行 PCR 筛选和双酶切验证, PCR 筛选时获得大小为 553 bp 的 *msv* 基因特异性片段(图 2A), 与预期相符; 重组质粒经 *Nhe* I 和 *Sac* I 双酶切后分别获得 5 692 bp 的载体片段和 1 052 bp 的 *msv* 基因片段(图 2B); 基因测序结果表明重组质粒中的插入序列与预期一致, 说明重组原核表达质粒构建成功。

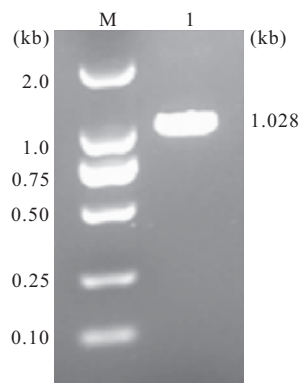


图 1 *msv* 基因 PCR 扩增结果

Fig 1 PCR amplification of *msv*

M: DL2000 marker; 1: PCR product of *msv* gene

2.2 融合蛋白的表达与纯化

对携带 *pEASY-msv* 表达质粒的大肠杆菌 BL21 进行诱导表达和纯化, 将获得的蛋白进行

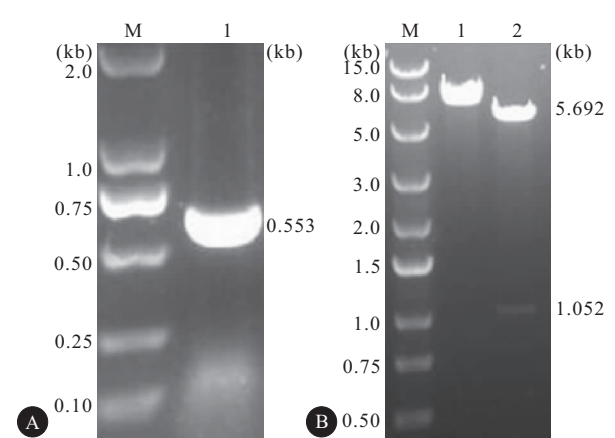


图 2 重组表达质粒 PCR 筛选(A)和双酶切结果(B)
Fig 2 The recombinant expression plasmid was identified by PCR (A) and restriction enzyme analysis (B)

Fig A, M: DL2000 marker; 1: PCR amplification of special fragment in *msv*; Fig B, M: 250 bp DNA ladder; 1: Recombinant plasmid; 2: The recombinant plasmid digested with *Nhe* I and *Sac* I

SDS-PAGE 电泳分析,如图 3A 所示,诱导后的重组菌在相对分子质量约 41.3×10^3 处可见 1 条明显的蛋白条带,其大小与预期一致;而空载体对照在相应位置无明显的蛋白表达条带,未用 IPTG 诱导的细菌在相应位置的蛋白条带很浅;融合蛋白纯化后产物纯度较高,杂蛋白较少。将纯化蛋白以鼠源抗 His-tag 单克隆抗体为一抗,进行 Western blot 检测,显色后在 41.3×10^3 处有一条特异性条带(图 3B)。上述结果表明对重组质粒表达产物进行亲和层析纯化后,可获得相对分子质量为 41.3×10^3 的融合蛋白。

2.3 免疫小鼠血清特异性抗体滴度

由图 4 可见,免疫前各组小鼠抗体水平皆为 0。重组蛋白 *msv* 免疫组的小鼠在初次免疫后第 7 天即可检测到相应特异性抗体,其抗体滴度为 1 : 40;在二次免疫和三次免疫后第 7 天,重组蛋白 *msv* 免

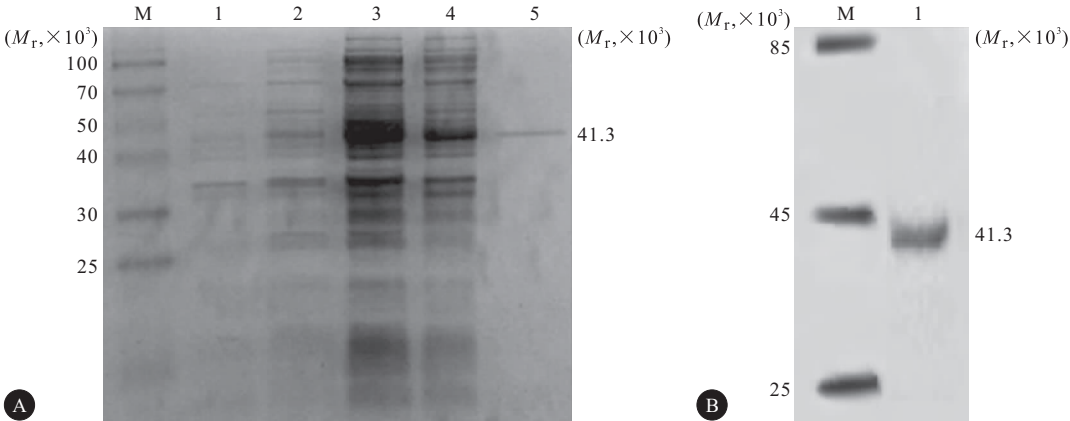


图 3 融合蛋白 *msv* 的 SDS-PAGE(A)和 Western blot(B)分析
Fig 3 SDS-PAGE (A) and Western blot analysis (B) of *msv* protein
Fig A, M: Protein marker; 1: Negative control; 2: Pre-induced; 3: Post-induced; 4: Supernant after ultrasonic; 5: Purified *msv* protein;
Fig B, M: Protein molecular weight marker; 1: Purified *msv* protein

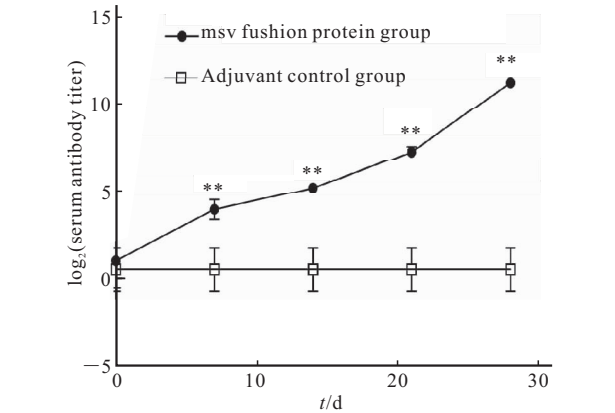


图 4 重组蛋白 *msv* 在小鼠体内所诱导的特异性抗体滴度
Fig 4 The titer of antibody in mice serum induced by *msv* fusion protein
* * $P<0.01$, vs. adjuvant control group

疫组的小鼠抗体滴度分别为 1 : 160 和 1 : 1 280;在三次免疫后第 14 天,重组蛋白 *msv* 免疫组的抗体水平迅速大幅度升高,抗体滴度达到 1 : 81 920。经蛋白免疫后,小鼠的抗体滴度均高于佐剂对照组(其抗体滴度均为 0),差异有统计学意义($P<0.01$)。

2.4 免疫小鼠抗原特异性淋巴细胞增殖

msv 蛋白能诱导免疫小鼠的脾淋巴细胞增殖,其刺激指数为 3.7 ± 0.8 , ConA 阳性对照组为 1.2 ± 0.1 ($P<0.01$)。

3 讨论

TB 一直以来都是全球性公共卫生难题,2017 年全球新增 TB 约 1 000 万例,约 130 万人死于结核^[6],而唯一批准使用的疫苗卡介苗 (*Bacillus*

Calmette-Guérin, BCG) 预防 TB 的效果却不甚理想, 一些接种过 BCG 的人仍可能潜伏性感染 MTB, 成为 LTBI 者。因此, 理想的结核疫苗需诱导机体产生同时针对活动性与休眠期 MTB 的免疫反应。有学者提出了多阶段结核疫苗的思路: 将 MTB 不同感染阶段的特征性蛋白融合构建疫苗, 建立针对不同感染状态下 MTB 的特异性免疫应答, 理想状态下, 多阶段疫苗不仅能弥补单一抗原的不足, 激发更强的免疫反应, 还能扩大疫苗的保护范围, 既能保护健康人群免受感染, 还能有效控制清除 LTBI 和 TB 人群体内的 MTB, 防止 TB 复发, 兼具预防和治疗的效果^[7-8]。

为发展新型多阶段结核疫苗, 本研究首先选取了两种经典的指示活动性 TB 的抗原编码基因 *Rv3875* 和 *Rv3804c*, 它们编码的蛋白 ESAT-6 和 Ag85A 能分别刺激机体产生强烈的 Th1、Th2 免疫应答^[2,9], 利用树突状细胞靶向慢病毒载体表达 Ag85A-ESAT6 融合蛋白, 可在小鼠体内引发针对上述抗原的细胞介导的免疫反应, 产生较高水平的干扰素- γ (interferon- γ , IFN- γ) 和白细胞介素 (interleukin, IL)-2^[10]。此外, 我们还选取了 MTB 的一种压力响应基因 *Rv2660c*, 其编码的蛋白能够与 Toll 样受体 2 (Toll-like receptors2, TLR2) 信号相互作用刺激巨噬细胞, 激发人体促炎细胞因子的分泌, 如 IL-1 β 、IL-8、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 等^[11], *Rv2660c* 引起的促炎反应可能是维持 MTB 潜伏期的重要途径。将 *Rv2660c* 基因与 Ag85B-ESAT-6 融合构建的多阶段结核疫苗 H56, 在动物实验中能诱发强烈的多功能 CD4⁺ T 细胞免疫应答, 不仅能诱导机体抗 MTB 感染, 还能协助机体清除休眠期的 MTB, 对 LTBI 有明显的抑制作用, 防止其发展成活动性 TB, 目前 H56 疫苗已进入 II 期试验^[12-13]。除此之外, 我们还选取了可能提示 TB 复发的 *Rv2460c* 基因, 体外模拟实验证实该基因在 MTB 处于低氧压力状态时表达上调, 而当 MTB 环境状态恢复到正常氧环境时, 其编码的 ClpP2 的表达量又会显著性提高^[5], 利用原核系统表达 *Rv2460c* 相关实验研究证实 ClpP2 具有较好的免疫原性^[14]。

大肠埃希菌表达系统遗传背景清晰, 具有高效、低价、易于操作等优点, 是目前表达融合蛋白时最常选用的表达系统^[15]。实验过程中, 为了获得较高量的表达, 我们分别对诱导时机 (菌液 A_{600} 值分别为 0.2、0.4、0.6、0.8、1.0、1.4)、诱导表达的温度 (25、

30、37 °C)、IPTG 浓度 (0.1、0.2、0.5、1、1.5 mmol/L)、诱导表达时间 (2、4、6、8 h) 等因素进行了探索, 经过综合筛选最终确定当菌液 $A_{600} = 0.4 \sim 0.6$, 加入 0.5 mmol/L IPTG, 在 30 °C 诱导表达 6 h 时诱导表达效率最高。

本研究将表达 MTB 不同感染阶段分泌蛋白 (分别指示 MTB 持留和复发、早期活动性感染) 的 4 种基因 *Rv2660cc*、*Rv2460*、*Rv3875*、*Rv3804c* 的细胞表位利用柔性 linker 串联融合为 *msv* 基因, 构建原核表达质粒。柔性 linker 的加入可增加单个抗原的稳定性, 在连接 2 个蛋白时不影响各自蛋白的天然构象与活性^[16], 本实验中采用了以甘氨酸为接头的 linker, 自身结构简单, 伸展性好。选取细胞表位时, 4 种基因的 T 细胞表位中部分同时也是 B 细胞表位, 理想状态下能同时介导机体体液和细胞免疫应答。随后我们利用大肠杆菌表达出了融合蛋白 *msv*, 将重组蛋白 *msv* 与弗氏完全佐剂均匀混合后免疫小鼠, 然后采集小鼠血清, 运用 ELISA 进行抗体滴度检测, 发现重组蛋白 *msv* 免疫组在 3 次免疫后抗体滴度可达 1 : 81 920, 小鼠脾淋巴细胞增殖实验结果显示, 重组蛋白 *msv* 免疫组刺激指数明显高于 ConA 非特异性刺激组, 这两项实验结果均表明在弗氏完全佐剂作用下, *msv* 蛋白对小鼠具有良好的免疫原性, 为新型结核疫苗的候选抗原提供了参考。

参 考 文 献

- [1] KOUL A, ARNOULT E, LOUNIS N, *et al.* The challenge of new drug discovery for tuberculosis. *Nat*, 2011, 469 (7331):483-490.
- [2] 范 琴, 鲍 朗. 结核疫苗优势抗原 ESAT6、CFP10 的分子生物学基础及应用研究进展. *生物医学工程学杂志*, 2012, 29 (2):392-396.
- [3] KARBALAEI MZB, SOLEIMANPOUR S, REZAEI SA. Antigen 85 complex as a powerful *Mycobacterium tuberculosis* immunogene: biology, immune-pathogenicity, applications in diagnosis, and vaccine design. *Microb Pathog*, 2017, 112:20-29 [2018-10-10]. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2017.08.040>.
- [4] HOUGHTON J, CORTES T, SCHUBERT O, *et al.* A small RNA encoded in the *Rv2660c* locus of *Mycobacterium tuberculosis* is induced during starvation and infection. *PLoS One*, 2013, 8 (12):e80047 [2018-10-20]. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0080047>.
- [5] SHERRID AM, RUSTAD TR, CANGELOSI GA, *et al.* Characterization of a Clp protease gene regulator and the reaeration response in *Mycobacterium tuberculosis*. *PLoS*

- One,2010,5(7):e11622[2018-10-20]. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0011622>.
- [6] World Health Organisation. Global tuberculosis report 2017. (2018-09-18) [2018-10-20]. https://www.who.int/tb/publications/global_report/en/.
- [7] PENN-NICHOLSON A, TAMERIS M, SMIT E, *et al.* Safety and immunogenicity of the novel tuberculosis vaccine ID93 + GLA-SE in BCG-vaccinated healthy adults. *Lancet Respir Med*,2018,6(4):287-298.
- [8] BALDWIN SL, REESE VA, HUANG PW, *et al.* Protection and long-lived immunity induced by the ID93/GLA-SE vaccine candidate against a clinical *Mycobacterium tuberculosis* isolate. *Clin Vaccine Immunol*,2015,23(2):137-147.
- [9] 徐正中, 胡 婷, 刘 泽, 等. 用小鼠模型分析可溶性表达结核分枝杆菌 Ag85A 的免疫原性. *微生物学报*,2016,56(5):804-813.
- [10] SHAKOURI M, MOAZZENI SM, GHANEI M, *et al.* A novel dendritic cell-targeted lentiviral vector, encoding Ag85A-ESAT6 fusion gene of *Mycobacterium tuberculosis*, could elicit potent cell-mediated immune responses in mice. *Mol Immunol*,2016,75:101-111[2018-10-20]. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2016.04.014>.
- [11] YIHAO D, HONGYUN H, MAODAN T. Latency-associated protein Rv2660c of *Mycobacterium tuberculosis* augments expression of proinflammatory cytokines in human macrophages by interacting with TLR2. *Infect Dis (Lond)*, 2015,47(3):168-177.
- [12] AAGAARD C, HOANG T, DIETRICH J, *et al.* A multistage tuberculosis vaccine that confers efficient protection before and after exposure. *Nat Med*,2011,17(2):189-194.
- [13] LUABEYA AK, KAGINA BM, TAMERIS MD, *et al.* First-in-human trial of the post-exposure tuberculosis vaccine H56:IC31 in *Mycobacterium tuberculosis* infected and non-infected healthy adults. *Vaccine*,2015,33(33):4130-4140.
- [14] 康月茜, 张春燕, 穆柳青, 等. 结核分枝杆菌 Rv2460c 基因的克隆、表达及编码产物的免疫特性分析. *中国免疫学杂志*, 2015,31(6):790-794.
- [15] 许崇利, 杨 梅, 许崇波. 大肠杆菌表达系统的影响因素. *中国动物检疫*,2010,27(8):66-68.
- [16] 马建伟, 李春明, 冯思源, 等. 牛源多杀性巴氏杆菌融合基因 pm0979-PlpE 的表达及其融合蛋白的免疫效果. *中国兽医科学*,2015,45(10):1053-1057.
- (2018-11-30 收稿, 2019-03-05 修回)
- 编辑 余 琳