

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*

54 (3) :330 - 337; 4 March 2014

ISSN 0001 - 6209; CN 11 - 1995/Q

http://journals.im.ac.cn/actamicrocn

doi: 10.13343/j.cnki.wsxb.2014.03.010

结核分枝杆菌 Rv1886c 的原核表达及其免疫生物学特性

陶成武[#], 赵丹[#], 董慧, 单发, 连凯, 潘志明, 陈祥, 殷月兰^{*}, 焦新安

扬州大学, 江苏省人兽共患病学重点实验室, 江苏省动物重要疫病与人兽共患病防控协同创新中心, 江苏 扬州 225009

摘要:【目的】Rv1886c 基因编码的 Ag85B 是结核分枝杆菌 (*Mycobacterium tuberculosis*, *M. tb*) 感染早期的分泌蛋白, 本研究对其所诱导的免疫应答特性进行了探索。【方法】对 Ag85B 进行原核表达和鉴定, 并通过夹心 ELISA、间接 ELISA 及 ELISPOT 方法测定其诱导的细胞免疫和体液免疫应答水平。【结果】SDS-PAGE 及 Western blot 鉴定结果表明, 以包涵体形式表达的 Ag85B 蛋白, 经变性、复性后能与结核病人的抗血清及免疫重组李斯特菌 LM-Ag85B 的小鼠抗血清发生特异性反应, 表明 His-Ag85B 融合蛋白具有较好的免疫活性。将纯化的 Ag85B 蛋白皮下免疫 C57BL/6 小鼠, 夹心 ELISA 的测定结果表明, Ag85B 蛋白免疫组诱导小鼠产生的特异性 IFN- γ 水平显著高于 IL-4 的水平 ($P < 0.001$), 呈现 Th1 型细胞免疫应答趋势; 以结核菌素 PPD 作为包被抗原, 通过间接 ELISA 测定的血清抗体效价达到 1:6400, 表明 Ag85B 也能诱导有效的体液免疫应答。此外, 以尾静脉途径初次免疫小鼠 42 天时, ELISPOT 测定结果显示, 结核分枝杆菌 H37Rv 诱导小鼠产生 Ag85B₂₄₀₋₂₅₉ 特异性的 IFN- γ 水平极显著高于卡介苗 (BCG) 免疫组 ($P < 0.001$)。【结论】Ag85B 蛋白能激发小鼠产生较强的 Th1 型细胞免疫应答和较好的体液免疫应答; BCG 单次免疫后诱导小鼠产生的 Ag85B 特异的细胞免疫应答水平较低。本研究为揭示结核分枝杆菌的致病机理、新型疫苗的研制和早期诊断试剂的开发奠定了基础。

关键词: 结核分枝杆菌, Ag85B, Th1 型应答, 体液免疫, 早期感染

中图分类号: Q936 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2014) 03-0330-08

结核分枝杆菌 (*Mycobacterium tuberculosis*, *M. tb*) 是人类结核病 (tuberculosis, TB) 的主要元凶, 每年导致 200 - 300 万人的死亡, 新增 TB 患者 800 万人, 对人类健康所造成的严重威胁已引起了全球的高度关注^[1]。有效的早期诊断方法和及时治疗是控制 TB 传播的重要手段^[2]。结核分枝杆菌的表面蛋白和分泌蛋白中存在大量的保护性抗原, 其中不

乏一些感染早期分泌蛋白, 弄清其结构和免疫原性特征, 对于诊断试剂的研制、疫苗的开发都显得尤为必要。由 Ag85A、Ag85B 和 Ag85C 3 个蛋白组成的抗原 85 复合物 (Ag85) 是结核分枝杆菌生长过程中分泌到细胞外的主要蛋白, 占细胞外分泌蛋白总量的 45%, 具有分枝菌酸转移酶活性, 在细胞壁合成

基金项目: 国家“973 项目”——国家重点基础研究发展计划 (2012CB518805); 江苏省自然科学基金 (BK2011446); 2012 年度国家级大学生创新创业训练计划项目 (201211117021); 国家自然科学基金 (31101841)

^{*} 通信作者。Tel: +86-514-87971136; Fax: +86-514-87311374; E-mail: yylan@yzu.edu.cn

作者简介: [#] 对本文有同等贡献。陶成武 (1991 -), 男, 江苏淮安人, 从事重要人兽共患病疫苗研制相关研究, E-mail: 1511702164@qq.com; 赵丹 (1989 -), 女, 江苏淮安人, 硕士研究生, 从事病原微生物的致病机理, E-mail: 1094386311@qq.com

收稿日期: 2013-04-12; 修回日期: 2013-12-02

晚期中发挥关键作用,具有与细胞表面的纤连蛋白结合特性,在结核分枝杆菌黏附细胞的过程中起重要作用^[3]。在抗原 85 复合物中,Ag85B 约占总量的 22%,是结核分枝杆菌重要的保护性抗原,作为结核分枝杆菌的早期分泌蛋白,能在结核感染初期,诱导机体产生有效的免疫保护作用,是近年来备受关注的结核病疫苗候选抗原分子,也是结核分枝杆菌早期感染的重要诊断抗原^[4-6]。本研究利用生物信息学软件对 Ag85B 进行了表位预测、原核表达和鉴定,并对其所诱导的免疫应答特性进行了探讨。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 质粒及菌种:BCG 丹麦株、宿主菌大肠杆菌 (*Escherichia coli*) DH5 α 、*E. coli* BL21 (DE3) 及 pET-30a 载体由本实验室保存,表达 Ag85B 的李斯特菌重组菌株 LM-Ag85B 由本室构建和保存;结核分枝杆菌 H37Rv 由武汉大学实验动物中心提供,相关实验在武汉大学实验动物中心生物安全三级实验室 (ABSL-III) 进行。

1.1.2 实验动物:6 周龄雌性 C57BL/6 (H-2^b) 小鼠购自北京维通利华实验动物技术有限公司。

1.1.3 主要试剂:His-Tag 纯化试剂盒购自 GE 公司;双十八烷基二甲基溴化铵 (DDA)、单磷脂酸 A (MPL-A) 购自 Avanti 公司;羊抗鼠 IgG-HRP 购自 Sigma 公司;重组鼠 IFN- γ 和 IL-4 购自 R&D 公司;抗小鼠 IFN- γ 单抗 (mAb) R4-6A2、抗小鼠 IL-4 mAb BVD4-1D11、IFN- γ -biotin mAb XMG 1.2、IL-4-biotin mAb BVD6-24G2、链亲和素-AKP、链亲和素-HRP 均购自 BD 公司;Bovine PPD 购自 Prionics AG 公司;TMB 购自 eBioscience 公司;酯纤维素底 96 孔 ELISPOT 板购自 MiLLipore 公司;其余常规化学试剂购于国药集团。

1.2 Ag85B 蛋白表位预测

利用网站的 VaxiPred 软件对 Ag85B 蛋白表位进行预测,B 细胞表位预测网站为 <http://www.imtech.res.in/raghava/abcpred>;辅助 T 细胞 (Th) 抗原表位的预测网站为 <http://www.imtech.res.in/raghava/propred>;细胞毒性 T 细胞 (CTL) 表位预测网站为 <http://www.imtech.res.in/raghava/ctlpred>。

1.3 Rv1886c 的扩增及原核表达载体 pET30a-Rv1886c 的构建

先以 BCG 的基因组为模板,扩增出不含信号肽序列的 Rv1886c 基因,再把纯化的 PCR 产物及 pET-30a 载体经 *Bam*H I、*Hind* III 双酶切消化,纯化回收并置 16 $^{\circ}$ C 连接过夜,转化至大肠杆菌 DH5 α ,酶切鉴定正确之后,将重组质粒送南京金斯瑞测序,将测序正确的质粒转化至大肠杆菌 BL21 (DE3),挑选阳性克隆用于表达研究。

1.4 Ag85B 蛋白的表达及纯化

将构建好的细菌 BL21 (DE3)-Rv1886c 在宿主菌 BL21 (DE3) 中诱导表达,IPTG 诱导浓度分别为 0、0.3、0.5 和 0.8 mmol/L,在 37 $^{\circ}$ C、30 $^{\circ}$ C、25 $^{\circ}$ C 诱导 6 h。诱导产物经 12% 的 SDS-PAGE 分析。按照上述确定的最佳条件扩大培养重组细菌至 1L,IPTG 诱导表达约 6h 后,离心收获细菌,参照 HIS purification kit 程序进行变性条件下的亲和层析纯化,收集洗脱样品进行 SDS-PAGE,同时用 Bradford 法测定蛋白浓度。

1.5 Western blot 鉴定

取纯化的 HIS-Ag85B 融合蛋白进行 SDS-PAGE,然后电转印至 NC 膜,1% BSA 的 PBST 溶液封闭过夜,次日分别与结核病人的抗血清及 LM-Ag85B 的抗血清作用 2 h,洗涤后加入 HRP 标记的羊抗鼠 IgG 二抗孵育 1 h,DAB 显色。

1.6 间接 ELISA 的初步应用

稀释 HIS-Ag85B 融合蛋白至 20 μ mol/L,包被 ELISA 板,封闭后,加入倍比稀释的免疫小鼠的抗血清,起始稀释浓度为 1:40,倍比稀释至 1:5120,同时设标准阳性对照、阴性对照,37 $^{\circ}$ C 孵育 2 h;洗涤后,加入工作浓度的 HRP 标记羊抗鼠 IgG 抗体,37 $^{\circ}$ C 孵育 1.5 h;OPD 显色,2mol/L H₂SO₄ 终止;酶标仪读取 OD₄₉₂ 值,以 P/N \geq 2.1 判为阳性。

1.7 Ag85B 蛋白诱导小鼠免疫应答特性分析

1.7.1 小鼠的免疫方法:6 周龄雌性 C57BL/6 小鼠随机分为 3 组,每组 5 只,分别为 Ag85B 蛋白免疫组、BCG 阳性对照组 (2 \times 10⁶ FU/只) 以及 PBS 阴性对照组,免疫途径为皮下注射。Ag85B 蛋白免疫组蛋白的处理方法为:25 μ g Ag85B 蛋白与 150 μ L 的 DDA 佐剂 (1.086 mmol/L) 及 50 μ L 的 MPL 佐剂 (14 μ mol/L) 充分乳化混合,25 μ g/只;阴性对照组以 PBS-DDA/MPL 按 200 μ L/只进行免疫。第 1 次

免疫 2 周后,以同样的方式加强免疫。

1.7.2 夹心 ELISA 试验检测特异性 IFN- γ 和 IL-4

分泌水平:2 免 7 天时处死小鼠,制备小鼠脾脏淋巴细胞,向孔中分别加入 50 μ L 终浓度为 4.5 μ mol/L 的 Ag85B₂₄₀₋₂₅₉ 作为刺激原,培养 48h。洗涤后加入生物素化抗小鼠 INF- γ 、IL-4 单抗及两种细胞因子的标准品,作用 3h。加入链亲和素-HRP 加入孔中,作用 3h 后加入 TMB 底物显色,以 2 mol/L H₂SO₄ 终止反应,酶联免疫阅读器读取 OD₄₅₀ 值。根据标准曲线计算 IFN- γ 和 IL-4 的产生水平。

1.7.3 间接 ELISA 检测血清中特异性抗体水平:

以用包被液稀释牛 PPD 为 10 μ g/mL,100 μ L/孔,4 $^{\circ}$ C 过夜;次日封闭后,取上述制备的小鼠特异性多抗血清以及阴性血清,以含 1% BSA 的 PBS 从 1:50 开始做系列倍比稀释,100 μ L 孔,37 $^{\circ}$ C 静置孵育 3h;加入羊抗鼠 IgG-HRP 抗体,100 μ L/孔,37 $^{\circ}$ C 静置孵育 1 h;以 80 μ L/孔加入 TMB 显色底物,2 mol/L H₂SO₄ 终止反应,以酶标仪读取 OD₄₅₀ 数值。

1.8 不同分枝杆菌免疫小鼠后所诱导的 Ag85B 特异的免疫应答分析

对 C57BL/6 小鼠随机分为 3 组,每组 5 只,分别为 H37Rv 免疫组 (5 \times 10⁵ CFU/只)、BCG 免疫组 (5 \times 10⁵ CFU/只) 以及 PBS 组 (100 μ L/只),免疫途径为尾静脉注射。在免疫后的 42 天,对小鼠实施安乐死,制备各组小鼠的脾脏淋巴细胞,加入到包被有抗小鼠 INF- γ 单抗及 IL-4 单抗的 ELISPOT 板中,并向孔中分别加入 50 μ L 终浓度为 10 μ g/mL 的 Ag85B 和 PPD 作为刺激原,培养 48 h。洗涤后加入生物素化抗小鼠 INF- γ 、IL-4 单抗,作用 3 h。加入链亲和素-AKP 加入孔中,作用 3 h 后,加入 BCIP/NBT 底物液显色,将孔置于立体显微镜下观察,计数每个孔中的蓝斑数。

1.9 统计学分析

应用 SPSS16.0 软件对试验数据进行方差分析及卡方检验。

2 结果

2.1 Ag85B B 细胞表位、T 细胞表位及 Th 表位的预测结果

采用 ABCpred 方案 (窗口长度 16, 阈值 0.6) 进行筛选^[7], 并进行验证和评分, 结果表明 Ag85B 蛋

白的第 119 - 135, 185 - 201 和 216 - 232 位等区段可能存在优势 B 细胞表位。将 Ag85B 蛋白氨基酸序列提交 CTL 表位预测网站, 选择基于人工神经网络法^[8], 预测出 3 个分值比较高的多肽, 分别为 102 - 110 位的 YQSGLSIVM、267 - 275 位的 EFLENFVRS 以及 211 - 219 位的 AGGYKAADM。使用在线程序对 Ag85B 蛋白 Th 表位进行的预测^[9], 预测出 DRB1_0101、DRB1_0102 和 DRB1_0103 3 种不同类型。综合分析 Ag85B 的 33 段三类结合肽, 有两段结合肽为三类结合肽等位基因所共有, 即第 15 - 23 位的 LMIGTAAAV 和 271 - 279 位的 FVRSSNLKF 为 Ag85B 的 Th 表位。

2.2 Rv1886c 的 PCR 扩增、克隆及鉴定

以丹麦株 BCG 为模板, PCR 扩增出一条清晰的 850 bp 左右条带, 电泳结果显示与预期的大小一致 (图略)。将高保真酶扩增并纯化的 PCR 产物经 BamH I 和 Hind III 双酶切消化并纯化后, 与用同样双酶切获得的 pET30a 载体进行连接, 转化大肠杆菌 DH5 α , 对重组菌提取的质粒进行双酶切后, 电泳显示出现 2690 bp 和 850 bp 的两条带 (图略), 说明重组质粒构建正确。

2.3 His-Ag85B 蛋白表达条件的优化

重组质粒 pET30a-Rv1886c 转化大肠杆菌 BL21 (DE3) 中诱导表达, SDS-PAGE 电泳显示在 36kDa 处出现浓染带, 其大小与预期相符, 而空载体对照无此条带。同时对诱导物 IPTG 浓度和温度进行了优化, 结果表明 IPTG 最佳浓度为 0.5 mmol/L, 诱导最佳温度为 30 $^{\circ}$ C, 此时表达的蛋白主要存在沉淀中 (图 1)。对沉淀中的蛋白进行变性、复性后, 重组蛋白经 purification kit 纯化后, 洗脱液经 SDS-PAGE 鉴定只有在 36kDa 处有清晰的条带, 无其它杂带, 说明纯化效果较好 (图 2)。纯化蛋白经 Bradford 法测定的浓度为 4000 μ g/mL。

2.4 Western blot 鉴定

Western blot 结果显示, BL21 (DE3) -Ag85B 诱导表达的产物能与结核病人的抗血清发生特异性反应 (图 3-A), 也能与 LM-Ag85B 的免疫小鼠后的抗血清发生特异性反应 (图 3-B), 均在 35 - 40 kDa 之间有一清晰的条带, 而空载体对照无此条带, 说明表达的 Ag85B 蛋白具有免疫学活性。

2.5 间接 ELISA 检测

通过方阵实验得出蛋白最佳包被浓度为

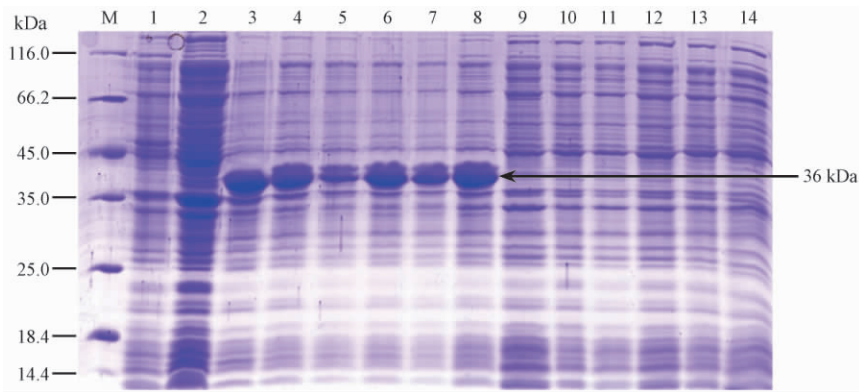


图 1. pET30a-Rv1886c 在大肠杆菌中表达产物的 SDS-PAGE 分析

Figure 1. SDS-PAGE analysis of pET-Ag85B products in *E. coli* BL21. M, Protein marker; lane 1, The supernatants of BL21 (DE3) - PET30a induced by 0.5mmol/L IPTG; lane 2, The precipitation of BL21 (DE3) -PET30a; lane 3 - 5, The precipitation of BL21 (DE3) -Rv1886c induced by IPTG (300mmol/L, 500mmol/L and 800mmol/L respectively); lane 6 - 8, The precipitation of BL21 (DE3) -Rv1886c induced by 20°C, 37°C and 30°C respectively; lane 9 - 11, The supernatants of BL21 (DE3) -Rv1886c induced by IPTG (300mmol/L, 500mmol/L and 800mmol/L respectively); lane 12 - 14, The supernatants of BL21 (DE3) -Rv1886c induced by 20°C, 37°C and 30°C respectively.

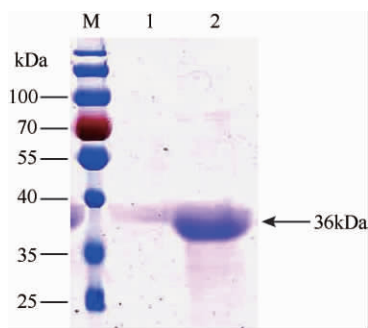


图 2. 融合蛋白 His - Ag85B 的纯化结果

Figure 2. The purification result of fusion protein His - Ag85B.

M, Protein marker; lane 1, Purification protein in first eluted tube; lane 2, Purification protein in second eluted tube.

8 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 间接 ELISA 检测 LM-Ag85B 免疫小鼠后抗血清特异性抗体水平, 2 次免疫之后免疫鼠抗血清在 1:40、1:80、1:160、1:320 稀释度下 OD_{490} 均值高于阴性对照值 ($P/N \geq 2.1$, * $P < 0.05$), 抗体效价为 1:320 (图 4); 同时说明表达的融合蛋白具有良好的免疫学活性。

2.6 Ag85B 诱导的细胞免疫应答分析 通过夹心 ELISA 的方法, 测定了各组细胞上清中细胞因子的含量。数据经统计学分析后, 结果如图 5 所示, 以 Ag85B₂₄₀₋₂₅₉ 多肽刺激各免疫组的脾脏淋巴细胞, Ag85B₂₄₀₋₂₅₉ 免疫组的 IFN- γ 与 IL-4 的含量与 BCG 对照组相比, 无显著性差异; 与阴性对照组相比, 有极显著性差异 ($P < 0.001$); 并且 IFN- γ 水平要显著

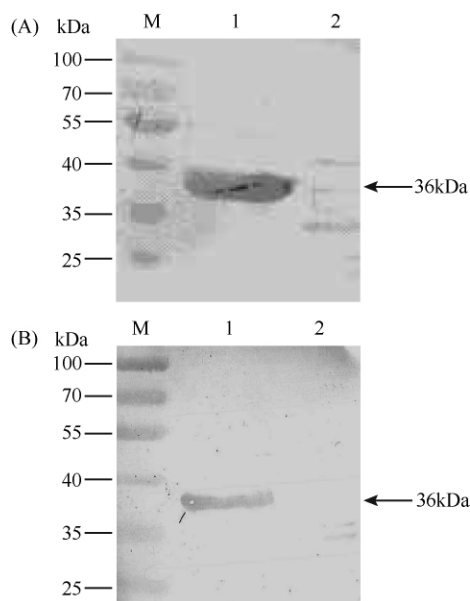


图 3. 融合蛋白 His-Ag85B 的免疫印迹分析

Figure 3. Western blot analysis of His-Ag85B fusion protein. M, Protein Marker; lane 1, BL21 (DE3)-Ag85B; 2. pET-30a A: Serum from tuberculosis patient; B: Serum from LM-Ag85B immunized mice).

高于 IL-4 的水平 ($P < 0.001$); 以上结果说明 Ag85B 能够诱导强烈的 Th1 型细胞免疫应答。

2.7 Ag85B 诱导的体液免疫应答分析

以 PPD 包板, 通过间接 ELISA 的方法, 测定了蛋白免疫组的抗血清中 Ag85B 抗体水平。结果如图 6 所示, 蛋白免疫组的抗血清稀释 6400 倍时, 与

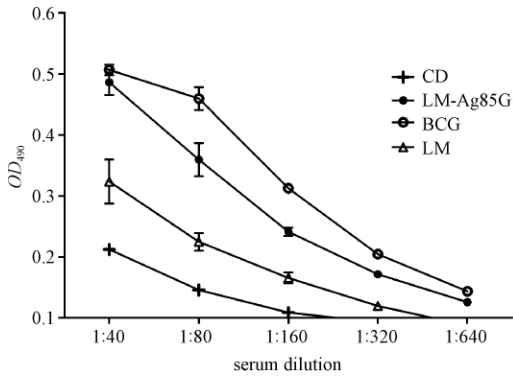


图4. LM-Ag85B 加强免疫之后小鼠抗血清 Ag85B 特异性抗体水平

Figure 4. Ag85B antibody response in mice after prime-boost immunization.

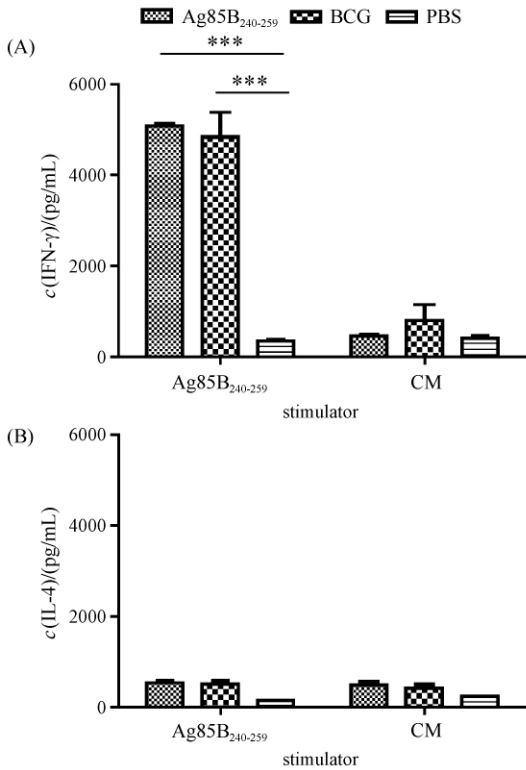


图5. 脾脏淋巴细胞分泌 IFN- γ (A) 与 IL-4 (B) 的水平

Figure 5. The levels of secreting IFN- γ (A) and IL-4 (B) in the spleen cells.

PBS 对照组相比,呈极显著差异 (** $P < 0.001$),说明 Ag85B 蛋白能诱导较强的体液免疫应答。

2.8 ELISPOT 实验结果

ELISPOT 结果显示,在分别以 Ag85B 和 PPD 作为刺激剂时,H37Rv 免疫组所诱导的小鼠产生的特异性分泌 IFN- γ 细胞数极显著高于 BCG 免疫组

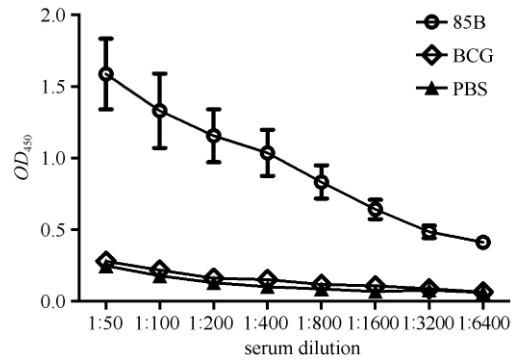


图6. 不同免疫组血清中 Ag85B 抗体水平

Figure 6. Serum antibody against Ag85B in different groups.

($P < 0.001$; $P < 0.01$) 和 PBS 组 ($P < 0.001$),且诱导小鼠产生的 IFN- γ 细胞数显著高于分泌 IL-4 的细胞数 ($P < 0.001$)。另外,在以 PPD 作为刺激物时,BCG 诱导产生的分泌 IFN- γ 细胞数显著高于 PBS 免疫组 ($P < 0.01$)。此外,3 个免疫组诱导小鼠产生的特异性分泌 IL-4 细胞数均很低(图 7)。上述结果表明,野生型结核分枝杆菌 H37Rv 的感染小鼠后所表达的 Ag85B 能诱导强烈的细胞免疫应答;

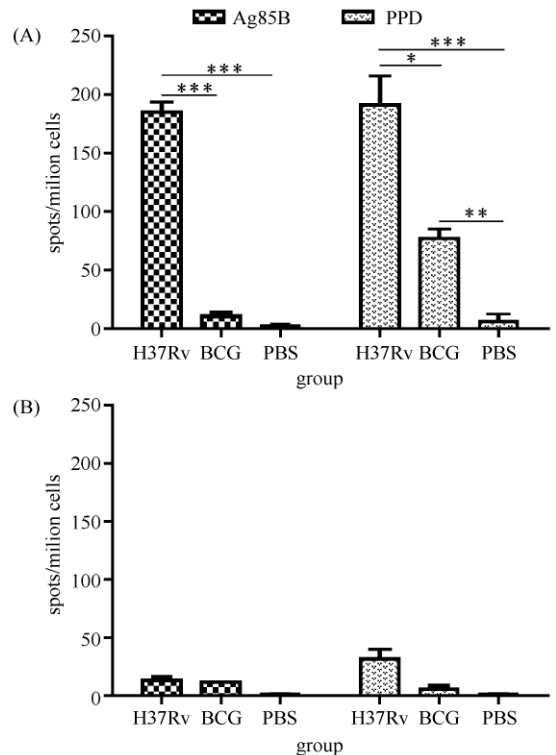


图7. 不同免疫组特异性分泌细胞因子的脾脏淋巴细胞数

Figure 7. The number of splenocytes secreting cytokines in different regimens. A: IFN- γ ; B: IL-4.

而 BCG 表达的 Ag85B 所诱导的细胞免疫应答水平比较低。

3 讨论

结核病是由结核分枝杆菌引起的慢性、消耗性传染病,是目前世界上由单病原菌引起的死亡人数最多、造成危害性最大的疾病。Ag85 复合物是目前在结核疫苗研究方面倍受关注的抗原之一,其中 Ag85B 是复合物中免疫原性最强的抗原,作为感染早期的分泌蛋白,在抵抗宿主免疫应答中发挥重要作用^[10-11]。本研究对 Ag85B 抗原表位进行了预测,在大肠杆菌中对 Ag85B 进行了表达和纯化,并以 C57BL/6 小鼠为实验动物模型,对 Ag85B 的免疫生物学特性进行了探讨。

在以大肠杆菌表达系统表达结核分枝杆菌抗原的研究中,我们发现有些蛋白在大肠杆菌中不表达,即使能表达的蛋白,绝大多数是以包涵体的形式存在。对于 Ag85B 的表达,虽然先后尝试了多种表达载体和诱导条件的优化,但未实现可溶性表达。因此,对包涵体形式表达的蛋白进行了变性和复性,Western blot 结果表明,复性后的蛋白可与 LM-Ag85B 免疫鼠抗血清及结核病人的抗血清发生反应;此外,利用 Ag85B 蛋白作为包被抗原建立间接 ELISA 检测方法,检测到免疫李斯特菌重组菌 LM-Ag85B 的小鼠抗 Ag85B 的效价达到 1:320,上述实验结果表明,原核表达的融合蛋白经变复性后,具有一定的免疫活性。Ag85B 蛋白的原核表达,为进一步研究其免疫学特性奠定了基础。

结核分枝杆菌是一种胞内寄生菌,在预防和控制分枝杆菌感染的过程中,机体抗结核病的免疫反应主要依赖于细胞免疫应答,而体液免疫检测也是评价结核病疫苗免疫效果的重要指标^[12-13]。因此筛选具有较强免疫保护力的蛋白,并应用于疫苗的开发显得非常重要。近年来,生物信息学方法辅助和结合科研实验方法逐渐成为研究蛋白结构、免疫原性的重要手段,这不仅减少了实验工作量,也节约了时间和研究经费。我们对 Ag85B 的可塑性预测和抗原性指数分析表明,Ag85B 蛋白存在多个潜在的抗原表位;此外,利用网上在线软件预测出 3 个 CTL 表位、2 个 Th 表位及多个 B 细胞表位。由此表明,Ag85B 蛋白不仅能被 CD4⁺ Th 细胞和 CD8⁺ 细

胞毒性 T 细胞识别,还能被 B 细胞识别,预示着该蛋白具有诱导细胞免疫、体液免疫应答的潜能。在此基础上,本研究通过动物实验对 Ag85B 的免疫原性进行了研究,在将 Ag85B 蛋白皮下免疫小鼠后,呈现显著的 Th1 型免疫应答趋势,同时也能诱导较高水平的体液免疫应答。另外,将野生型结核分枝杆菌感染小鼠 42 天时,也能诱导小鼠产生 Ag85B 特异的 Th1 型细胞免疫应答,实验结果与生物信息学预测结果较为一致,显示 Ag85B 蛋白具有诱导较强的细胞免疫和体液免疫应答的潜能,是一种较好的免疫保护性抗原,可以用于新型疫苗的候选抗原。

在以小鼠作为动物模型研究 Ag85B 的免疫生物学特性时,我们还发现,免疫途径、免疫次数及免疫时间对 BCG 诱导的免疫应答强度产生显著影响。在将 BCG 以皮下注射的方式进行初次免疫和加强免疫 21 天时,能诱导强烈的 Ag85B 特异的细胞免疫应答;但是以尾静脉注射的方式初次感染小鼠 42 天时,不能诱导明显的 Ag85B 特异的细胞免疫应答。与减毒的 BCG 相比,强毒的结核分枝杆菌 H37Rv 以同样剂量 (5×10^5 CFU) 和途径 (尾静脉) 感染小鼠时,能诱导极显著的 Ag85B 特异的细胞免疫应答,但该菌同时引起肺组织的结核性结节病变。由于结核病是一种慢性消耗性疾病,野生型菌株 H37Rv 感染小鼠 42 天时,属于早期感染阶段,这提示 Ag85B 特异的细胞免疫应答水平的显著升高与结核病的早期感染有一定的联系,可以通过检测宿主 Ag85B 特异的细胞免疫应答的方法来检测结核病的早期感染,弥补血清学检测方法中敏感性不高的问题^[14-15]。本研究为揭示结核分枝杆菌的致病机理和早期诊断试剂的研发奠定了基础。

参考文献

- [1] Wang C, Wu L. Advances in the study of the prevalence of co-infection with AIDS and TB and the mechanisms by which AIDS and TB interact. *Journal of Pathogen Biology*, 2013, 8 (8): 756-758. (in Chinese)
王超, 吴利先. 艾滋病与结核病双重感染的流行及相互作用机制的研究进展. *中国病原生物学杂志*, 2013, 8 (8): 756-758.
- [2] Wallis RS, Doherty TM, Onyebujoh P, Vahedi M, Laang H, Olesen O, Parida S, Zumla A. Biomarkers for tuberculosis disease activity, cure and relapse. *The*

- Lancet Infectious Diseases*, 2009, 9 (3) :162-172.
- [3] Zhang Y, Liu F, Cai H, Hu X, Song Z, Xu X. Humoral and cellular immune responses elicited by the trivalent DNA vaccine against *Mycobacterium tuberculosis*. *Chinese Veterinary Science*, 2011,41 (11) : 1154-1159. (in Chinese)
张云峰, 刘福元, 蔡宏, 呼西旦, 宋振忠, 徐雪萍. 结核分枝杆菌三价 DNA 疫苗的体液免疫与细胞免疫应答. *中国兽医科学*, 2011,41 (11) :1154-1159.
- [4] Kashyap RS, Saha SM, Nagdev KJ, Kelkar SS, Purohit HJ, Taori GM, Dagainawala HF. Diagnostic markers for tuberculosis ascites: a preliminary study. *Biomark Insights*, 2010,5:87-94.
- [5] Zhang C, Zhang H, Zhao Y, Mao F, Zhao S, Yang W, Bai B, Shi C. Application of Ag85B, Hsp 16.3 and ESAT6 of *Mycobacterium tuberculosis* in serological detection. *Progress in Modern Biomedicine*, 2011, 11 (3) :401-404. (in Chinese)
张彩勤, 张海, 赵勇, 毛峰峰, 赵善民, 杨巍, 白冰, 师长宏. 结核分枝杆菌分泌蛋白 Ag85B, Hsp16.3 和 ESAT6 在血清学检测中的初步应用. *现代生物医学进展*, 2011,11 (3) :401-404.
- [6] Rosseels V, Marché S, Roupie V, Govaerts M, Godfroid J, Walravens K, Huygen K. Members of the 30- to 32-kilodalton mycolyl transferase family (Ag85) from culture filtrate of *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* are immunodominant Th1-type antigens recognized early upon infection in mice and cattle. *Infection and Immunity*, 2006,74 (1) :202-212.
- [7] Saha S, Raghava GP. Prediction of continuous B-cell epitopes in an antigen using recurrent neural network. *Proteins*, 2006, 65 (1) :40-48.
- [8] Bhasin M, Raghava GP. Prediction of CTL epitopes using QM, SVM and ANN techniques. *Vaccine*, 2004, 22 (23-24) :3195-3201.
- [9] Singh H, Raghava GP. ProPred: prediction of HLA-DR binding sites. *Bioinformatics*, 2001, 17 (12) : 1236-1237.
- [10] Tang X, Deng W, Xie J. Novel insights into *Mycobacterium* antigen Ag85 biology and implications in countermeasures for *M. tuberculosis*. *Critical Reviews in Eukaryotic Gene Expression*, 2012,22 (3) :179-187.
- [11] Kashyap RS, Shekhawat SD, Nayak AR, Purohit HJ, Taori GM, Dagainawala HF. Diagnosis of tuberculosis infection based on synthetic peptides from *Mycobacterium tuberculosis* antigen 85 complex. *Clinical Neurology and Neurosurgery*, 2013, 115 (6) :678-683.
- [12] Kuo CJ, Ptak CP, Hsieh CL, Akey BL, Chang YF. Elastin, Novel extracellular matrix protein adhering to mycobacterial antigen 85 complex. *The Journal of Biological Chemistry*, 2013, 288 (6) :3886-3896.
- [13] Kashyap RS, Rajan AN, Ramteke SS, Agrawal VS, Kelkar SS, Purohit HJ, Taori GM, Dagainawala HF. Diagnosis of tuberculosis in an Indian population by an indirect ELISA protocol based on detection of Antigen 85 complex: a prospective cohort study. *BMC Infectious Disease*, 2007, 7: 74.
- [14] Imaz MS, Schmelling MF, Kaempfer S, Spallek R, Singh M. Serodiagnosis of tuberculosis: specific detection of free and complex-dissociated antibodies anti-mycobacterium tuberculosis recombinant antigens. *Brazilian Society of Infectious Diseases*, 2008, 12 (3) : 234-244.
- [15] Wu X, Yang Y, Zhang J, Li B, Liang Y, Zhang C, Dong M. Comparison of antibody responses to seventeen antigens from *Mycobacterium tuberculosis*. *Clinica Chimica Acta*, 2010, 411 (19-20) :1520-1528.

Prokaryotic expression and immunological characteristics of *Mycobacterium tuberculosis* Rv1886c

Chengwu Tao[#], Dan Zhao[#], Hui Dong, Fa Shan, Kai Lian, Zhiming Pan, Xiang Chen, Yuelan Yin^{*}, Xin'an Jiao

Yangzhou University, Jiangsu Key Laboratory of Zoonosis, Jiangsu Co-Innovation Center for Prevention and Control of Important Animal Infectious Disease and Zoonoses, Yangzhou 225009, Jiangsu Province, China

Abstract: [Objective] Ag85B (Rv1886c) is secreted during the early stages of infection by *Mycobacterium tuberculosis*. The purpose of this study was probed into the immune response against Ag85B *in vivo*. [Methods] Ag85B was prokaryotic expressed and identified, its immunological characteristics were evaluated with indirect-ELISA, Sandwich-ELISA and enzyme-linked immunospot assay (ELISPOT). [Results] Ag85B was mainly expressed in form of inclusion body confirmed by SDS-PAGE. Western blot analysis shows that the fusion protein had good specific reaction with serum of tuberculosis patient and serum of mice immunized with LM-Ag85B. C57BL/6 mice were subcutaneously immunized with Ag85B, the production of IFN- γ and IL-4 in the spleen cells was determined by Sandwich ELISA, the level of IFN- γ was significantly higher than that of IL-4 ($P < 0.001$) in the Ag85B immunization group, it indicated the protein induced Th1-tendency immune responses. Furthermore, purified protein derivative (PPD) used as coating antigen, antibody titer against Ag85B in murine serum reached 1:6400, it was demonstrated that Ag85B could also induce humoral immune responses. Additionally, C57BL/6 mice were intravenously immunized with *M. tb* H37Rv and bacillus Calmette-Guérin (BCG) respectively for 42 days, *M. tb* H37Rv group intended to induce Ag85B specific Th1 type immune response, and its ability of eliciting cellular immunity was significantly stronger than BCG group ($P < 0.001$). [Conclusion] Ag85B can affectively induce strongly Th1-tendency immune response and humoral response. Whereas, BCG prime vaccination only can elicit low levels of Ag85B₂₄₀₋₂₅₉ specific immune response. The study laid foundation for probing the pathogenic mechanism, the development of novel vaccine and the establishment of clinical diagnostic method.

Keywords: *Mycobacterium tuberculosis*, Ag85B, Th1 type immune response, humoral immunity, early stages of infection

(本文责编:王晋芳)

Supported by the Key Project of China National Programs for Fundamental Research and Development (2012CB518805), by the Natural Science Foundation of Jiangsu Province (BK2011446) by the National Training Programs of Innovation and Entrepreneurship for Undergraduates (201211117021) and by the National Natural Science Foundation of China (31101841)

^{*} Corresponding author. Tel: +86-514-87971136; Fax: +86-514-87311374; E-mail: yylan@yzu.edu.cn

[#]These authors contributed equally to this work.

Received: 12 April 2013 / Revised: 2 November 2013