

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*  
55 (2) :220 - 226; 4 February 2015  
ISSN 0001 - 6209; CN 11 - 1995/Q  
http://journals.im.ac.cn/actamicrocn  
doi: 10.13343/j.cnki.wsxb.20140285

## 结核分枝杆菌 MPT83 的免疫原性及其奶牛结核病血清学检测方法建立

孟闯<sup>1</sup>, 万婷<sup>1</sup>, 徐正中<sup>1</sup>, 单法<sup>1</sup>, 范峰<sup>2</sup>, 陈祥<sup>1\*</sup>, 焦新安<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>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

<sup>2</sup>无锡市动物疫病预防控制中心, 江苏 无锡 214026

**摘要:** 【目的】利用大肠杆菌系统表达并纯化结核分枝杆菌 MPT83 蛋白, 通过小鼠模型评价其免疫原性, 建立血清学间接 ELISA 方法用于牛结核病临床检测, 评价其应用潜能。【方法】构建 pET30a (+)-*mpt83* 重组质粒, 转化 BL21 (DE3) 诱导表达并纯化, 经细胞表面分子的流式细胞术 (Flow Cytometry, FCM) 分析、ELISPOT 试验等分析其在小鼠中的免疫原性, 建立间接 ELISA 方法, 检测临床奶牛血样, 评价其用于牛结核病血清学检测的潜能。【结果】SDS-PAGE 显示目的蛋白成功表达, Western blot 证实其对免疫抗 H37Rv 多抗血清具有良好免疫反应性; FCM 结果显示其下调树突状细胞表面 CD80 分子的表达, 上调小鼠脾脏 CD4<sup>+</sup> 和 CD8<sup>+</sup> T 细胞表面 CD69 的表达, ELISPOT 结果表明其诱导的特异性 IL-4 分泌细胞数显著高于 IFN- $\gamma$  分泌细胞数, 表现为 Th2 型免疫应答; 建立了 ELISA 方法, 检测临床奶牛血样 200 份, 与牛结核外周血  $\gamma$ -干扰素体外释放试验结果的阳性符合率和阴性符合率分别为 48.6% 和 90%。【结论】在大肠杆菌系统中高效可溶性表达 MPT83 蛋白, 其在小鼠模型中主要呈现 Th2 型免疫应答, 并以该蛋白为抗原建立了牛结核病血清学检测的间接 ELISA 方法。

**关键词:** 牛结核病, MPT83 蛋白, 原核表达, 免疫原性, 血清学检测

中图分类号: R392 文章编号: 0001-6209 (2015) 02-0220-07

牛结核病 (Bovine tuberculosis) 主要是由牛分枝杆菌 (*Mycobacterium bovis*) 等感染动物引起的一种人兽共患慢性传染性疾病<sup>[1]</sup>。*M. bovis* 宿主范围广泛, 可感染 50 多种哺乳动物及 20 余种禽类, 极大增加了全球防控牛结核病的难度, 以至无一国家获世界动物卫生组织 (World Organisation for Animal Health, OIE) 的“无结核”认可<sup>[2]</sup>。人通过接触病牛或食用污染奶制品可导致感染, 约 6% - 7% 成年结

核病人及 33% - 45% 儿童结核病患者为 *M. bovis* 感染所致<sup>[3]</sup>。牛结核病作为危害公共健康的人兽共患病风险, 其预防和检测具有重大的经济和社会意义。

目前, 各国普遍采取“检疫-扑杀”策略控制该病传播<sup>[4]</sup>。最常用的检测方法是基于特异性细胞介导的免疫应答的结核菌素皮内试验 (Tuberculin skin test, TST), 并发展为多种不同方式。近年来新建立

基金项目: 国家“973 项目” (2012CB518805); 国家星火计划项目 (2014GA690017); 扬州市自然科学基金项目 (YZ2014027); 江苏高校优势学科建设工程资助项目

\* 通信作者。焦新安, E-mail: jiao@yzu.edu.cn; 陈祥, E-mail: chenxiang@yzu.edu.cn

作者简介: 孟闯 (1985 -), 男, 江苏徐州人, 博士研究生, 研究方向为动物免疫学。E-mail: mengchuangyu@163.com

收稿日期: 2014-06-03; 修回日期: 2014-09-01

的抗原特异的牛结核外周血  $\gamma$ -干扰素体外释放试验经大量临床试验证明具有较高敏感性和特异性, 已被 OIE 认可, 并作为唯一辅助诊断试验, 成为 TST 之外的一种活畜诊断试验方法<sup>[1]</sup>。基于病原抗体应答的检测也有大量研究, 目前已证实 ESAT-6、CFP10、MPT63、MPT70、MPT51、MPT32 和 MPT83 等抗原含有重要的 B 细胞表位, 其血清学诊断研究正在进行<sup>[5-6]</sup>。

本研究在表达、纯化和鉴定 MPT83 融合蛋白的基础上, 建立以其为包被抗原的间接 ELISA 方法, 对其在牛结核血清学检测中的应用进行初步探究。

## 1 材料和方法

### 1.1 菌种、试剂及实验动物

结核分枝杆菌 H37Rv 基因组 DNA 和兔抗 H37Rv 多抗血清, 由中国疾病预防控制中心万康林研究员惠赠; pMD18-T 购自宝生物工程 (大连) 有限公司; pET30a (+) 购自 Novagen 公司; 大肠埃希菌 DH5 $\alpha$ 、BL21 (DE3) 由本室保存。

分子生物学构建相关酶购自宝生物工程 (大连) 有限公司; His<sup>®</sup> bind purification kit 购自 Novagen 公司; HRP-Goat Anti-Rabbit IgG 购自 Invitrogen 公司, HRP-Goat Anti-Bovine IgG 购自 Southern Biotech 公司产品; GM-CSF 为 PeproTech 公司产品; 鼠 CD11c 磁珠购自美天妮公司; FCM 用抗体及 IFN- $\gamma$  和 IL-4 单抗均购自 BD 公司; 96 孔 ELISPOT 板购自 Millipore 公司; 牛结核外周血  $\gamma$ -干扰素体外释放试验检测试剂盒 BOVIGAM<sup>™</sup> *Mycobacterium bovis* Gamma Interferon Test Kit for cattl 购自 Prionics 公司; 其余常规试剂为国产分析纯。

6-8 周龄 C57BL/6 小鼠 (H-2<sup>b</sup>) 购自扬州大学比较医学中心。

### 1.2 *mpt83* 基因的扩增和重组菌的构建

根据 GenBank 中 *mpt83* 基因 (基因序列号: 887155) 序列设计 PCR 引物, 上游引物为: 5'-GGATCCTGTTTCGAGCACCAAACCC-3' (引入 *Bam*HI 酶切位点); 下游引物为: 5'-AAGCTTGCGCCGAACGTTACTGT-3' (引入 *Hind* III 酶切位点), 预期目的条带大小为 613 bp, 引物由南京金思瑞生物科技有限公司合成。

以 H37Rv 基因组 DNA 为模板扩增目的片段,

构建 pMD18-*mpt83* 重组质粒, 经 PCR 和酶切鉴定, 阳性克隆送南京金思瑞生物科技有限公司测序, 鉴定正确后构建 pET30a (+)-*mpt83* 重组质粒, 转化 BL21 (DE3), 命名为 BL21 (DE3)-pET30a (+)-*mpt83*。

### 1.3 MPT83 蛋白的表达和鉴定

重组菌培养至  $OD_{600}$  约 0.4-0.6, IPTG (0.5 mmol/L) 30 $^{\circ}$ C 诱导 5 h。收集菌体, 冰浴超声破碎后离心, 收集上清和沉淀, 进行 SDS-PAGE, 同时用兔抗 H37Rv 多抗血清进行 Western blot 分析。按照 His<sup>®</sup> bind purification kit 说明书纯化目的蛋白, 于无菌 PBS (pH 7.2) 中透析并浓缩, Bradford 法测定蛋白浓度, 灰度分析确定目的蛋白纯度, -70 $^{\circ}$ C 保存备用。

### 1.4 MPT83 蛋白调节 BMDC 表面分子的表达

骨髓源树突状细胞 (bone marrow dendritic cells, BMDC) 的制备参考文献 [7] 进行, 将 BM 以  $1 \times 10^6$  /mL 加入直径 10 cm 的培养皿, 同时添加 10 ng/mL 的 GM-CSF, 于 37 $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub> 培养 7 d, 并在培养的第 3 天和第 5 天半量更换新鲜培养基; 收获细胞, 标记 CD11c 磁珠, 使用 autoMACS 磁分选阳性细胞, 即为纯化的 BMDC。

调整 BMDC 至  $2 \times 10^6$  /mL, 100  $\mu$ L/孔加入 96 孔板, 分别加入纯化的 MPT83 蛋白 (10  $\mu$ g/mL)、PPD (10  $\mu$ g/mL) 刺激, 同时设立阴性对照, 37 $^{\circ}$ C, 5% CO<sub>2</sub> 培养约 24 h 后收集细胞, 0.5% BSA-PBS 洗涤, 标记 CD11c、CD80 和 CD86 荧光抗体, 使用 BD 公司的 FACS Aria 检测各分子的表达情况。

### 1.5 FCM 检测脾脏 T 细胞表面 CD69 的表达

MPT83 纯化蛋白与福氏完全佐剂乳化后皮下免疫 6 周龄雌性 C57BL/6 小鼠 (100  $\mu$ g/只), 一免两周后弗氏不完全佐剂乳化蛋白二免, 二免两周后扑杀小鼠。无菌取脾脏, 制备单细胞悬液, 裂解红细胞并过滤、洗涤, 调整细胞至  $2 \times 10^7$  /mL, 冰浴备用。

取上述单细胞悬液 100  $\mu$ L, 0.5% BSA-PBS 洗涤, 标记抗鼠 CD69 及 CD4 和 CD8 $\alpha$  荧光单抗, 使用 FACS Aria 检测不同 T 细胞表面 CD69 分子的表达。

### 1.6 ELISPOT 试验检测特异性 IFN- $\gamma$ 和 IL-4 分泌细胞

用抗鼠 IFN- $\gamma$  和 IL-4 单抗, 4 $^{\circ}$ C 过夜包被 ELISPOT 板 (2  $\mu$ g/mL, 100  $\mu$ L/孔), 洗涤、封闭后各

孔加 1.5 制备的细胞悬液 50  $\mu\text{L}$ , 补加 50  $\mu\text{L}$  含牛 PPD (10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 或纯化蛋白 (10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 的培养基, 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  培养 48 h, PBST 洗涤, 加 biotin-IFN- $\gamma$  和 biotin-IL-4 单抗, 室温作用 3 h, 同前洗涤后加链亲和素-AKP (1: 1000 稀释), 室温作用 2 h, 洗涤后 BCIP/NBT 底物显色, 终止反应并自然干燥, Bioreader 5000-V $\beta$  读板仪对蓝斑计数。

### 1.7 间接 ELISA 的建立及应用

取 MPT83 蛋白分别以 0.25、0.50、2.0、4.0 和 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  4 $^{\circ}\text{C}$  包被过夜; PBST (含 0.05% Tween-20 的 PBS) 洗涤 3 次; 分别以 10% 小牛血清、10% 马血清和 1% BSA 于 37 $^{\circ}\text{C}$  封闭 2 h; 同前洗涤; 取牛结核阳性血清分别稀释 50、100 和 200 倍加入, 37 $^{\circ}\text{C}$  作用 2 h; 同前洗涤; 加入工作浓度的 HRP-Goat Anti-Bovine IgG 二抗 37 $^{\circ}\text{C}$  作用 1h; 同前洗涤, TMB 显色, 2 mol/L 硫酸终止, 测  $OD_{450}$  值, 分析结果, 优化体系, 建立血清学 ELISA 方法。

取本室采集制备的牛血浆上清样品 200 份 (已用 BOVIGAM<sup>TM</sup> 试剂盒检测 IFN- $\gamma$  水平), 利用上述 ELISA 体系检测其中特异性抗体的存在情况, 试验重复 3 次。结果判定时, 首先计算临界值 (cut-off value, 等于 IFN- $\gamma$  阴性样品 OD 均值 + 2  $\times$  SD), 所有大于临界值的样品均判定为阳性, 反之阴性。

### 1.8 统计学分析

数据采用平均数  $\pm$  标准差表示, t 检验进行差异分析, GraphPad Prism 6 软件绘图。

## 2 结果

### 2.1 重组蛋白的表达和鉴定

电泳结果显示特异性 PCR 产物约 600 bp, 与预期大小相符, 说明目的片段成功扩增。重组质粒 pET-30a (+) -*mpt83* 酶切和 PCR 鉴定正确, 测序结果与 H37Rv (NC\_000962.2) 中的 *mpt83* 基因序列一致, 说明重组质粒构建正确 (图 1-A)。

SDS-PAGE 结果显示重组菌诱导后出现约 30 kDa 的新条带, 与目的蛋白理论大小相符, 说明 MPT83 蛋白成功表达 (图 1-B)。Western blot 结果显示, 融合蛋白与兔抗 H37Rv 多抗血清发生特异性反应, 表明其具备良好免疫反应性 (图 1-C)。灰度分析显示, 目的蛋白占全菌可溶性总蛋白的 27.4%, 而纯化后的纯度达到 96.6%。

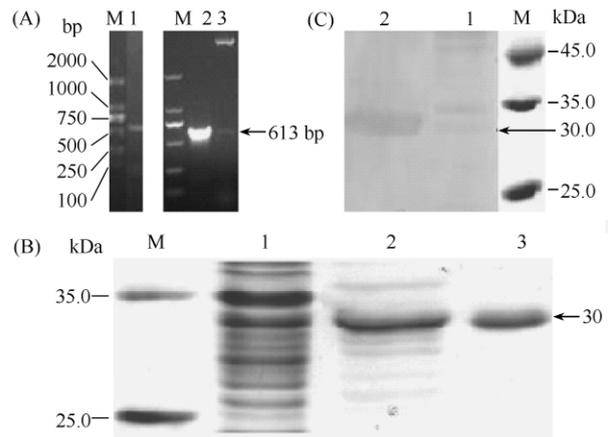


图 1. 重组质粒的构建和 MPT83 融合蛋白的鉴定

Figure 1. Construction of recombinant plasmids and identification of MPT83 fusion protein. A: M, DL2000 DNA marker; lane 1, PCR amplification of *mpt83* gene; lane 2, pET30a (+) -*mpt83* plasmid identified by PCR; lane 3, pET30a (+) -*mpt83* plasmid identified by enzyme digestion; B: M, Protein marker; lane 1, BL21 (DE3) - pET30a (+) control; lane 2, Supernatant of recombinant strain before purification; lane 3, Purified MPT83 fusion protein; C: M, Prestained protein ladder; lane 1, BL21 (DE3) - pET30a (+) control; lane 2, MPT83 fusion protein.

### 2.2 MPT83 调节 BMDC 表面 CD80 和 CD86 的表达

诱导 7 d 后可见明显的细胞集落形成, 很多细胞呈现树突状的特征性形态 (图 2-A), 经 MACS 分选后细胞群体中 CD11c 的阳性率达 96% 以上, 即为 BMDC (图 2-B)。

融合蛋白刺激 BMDC 24 h 后 FCM 检测细胞表面 CD80 和 CD86 分子的表达, 结果如图 2-C 所示, 与未刺激组相比, MPT83 蛋白刺激可下调 BMDC 表面 CD80 分子的表达, 而 CD86 分子的表达则无明显变化。

### 2.3 FCM 分析脾脏 T 细胞表面 CD69 的表达

FCM 检测小鼠脾脏 CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup> T 细胞表面 CD69 分子的表达, 结果如图 3 所示。与 PBS 组相比, 蛋白免疫小鼠脾脏 CD4<sup>+</sup> T 细胞和 CD8<sup>+</sup> T 细胞表面 CD69 分子的表达水平均显著升高 ( $P < 0.01$ ), 显示 T 细胞被活化, 且 CD4<sup>+</sup> T 细胞活化程度明显高于 CD8<sup>+</sup> T 细胞。

### 2.4 ELISPOT 试验

使用读板仪对蓝色斑点计数, 结果如图 4 所示。与 PBS 免疫组相比, MPT83 融合蛋白能显著活化脾脏淋巴细胞, 其中蛋白刺激的分泌 IL-4 的

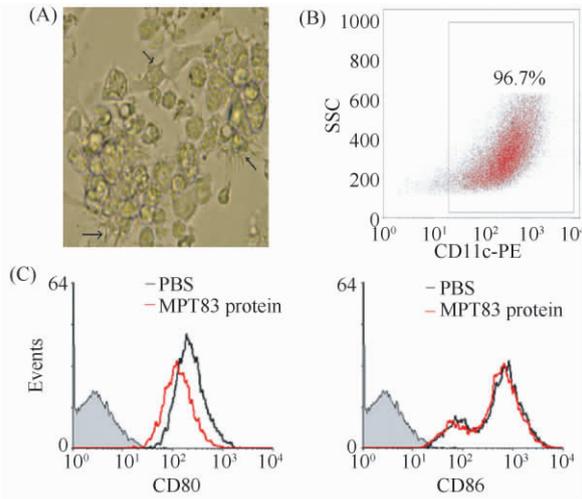


图 2. MPT83 融合蛋白诱导 BMDC 细胞表面 CD80 和 CD86 分子的表达

Figure 2. Expression of CD80 and CD86 molecules on BMDC surface stimulated by fusion protein of MPT83. A: Examination of BMDC by light microcopy (400 ×) after induced 7 days; B: Purity analysis of MACS sorted BMDC by FCM; C: Expression of CD80 and CD86 on BMDC detected by FCM.

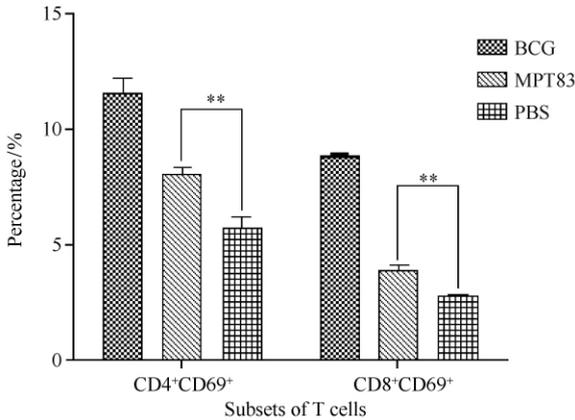


图 3. MPT83 融合蛋白免疫小鼠后脾脏 CD4<sup>+</sup> 和 CD8<sup>+</sup> T 细胞表面 CD69 的表达

Figure 3. Expression of CD69 molecule on splenic CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cell surface in mice injected with MPT83. \*\*,  $P < 0.01$ ; The results were representative of three independent experiments with five mice each group.

细胞数显著高于分泌 IFN- $\gamma$  的细胞数 ( $P < 0.05$ ), 显示其具备诱导机体产生 Th2 型免疫应答倾向的能力。

## 2.5 间接 ELISA 方法建立及牛结核病的检测

确定间接 ELISA 反应条件为: 蛋白包被浓度 0.25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 1% BSA 作封闭液, 待检血浆样品稀释 100 倍。共检测 200 份临床采集的牛血样品 (其中

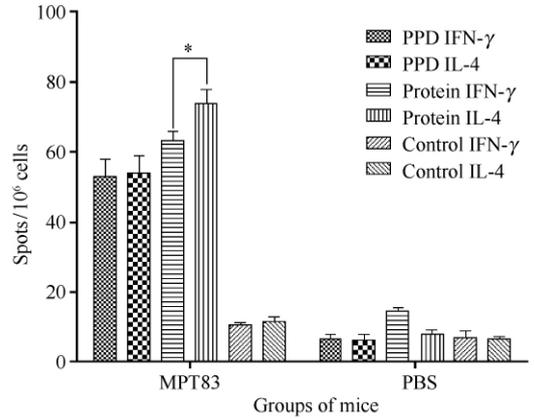


图 4. MPT83 融合蛋白的 ELISPOT 试验结果

Figure 4. Results of ELISPOT assay of MPT83 fusion protein. \*,  $P < 0.05$ ; The results were representative of three independent experiments with five mice each group.

BOVIGAM<sup>TM</sup> 试剂盒检测阳性 140 份、阴性 60 份), 结果判定的临界值为 0.305, 如表 1 所示。共检出阳性样品 74 份, 阳性率 37.0% (74/200), 其中两种方法均为阳性的样品 68 份, 占总阳性 91.9% (68/74)。间接 ELISA 检测结果与 BOVIGAM<sup>TM</sup> IFN- $\gamma$  检测试剂盒结果相比, 两者阳性符合率为 48.6% (68/140), 阴性符合率为 90% (54/60)。另外, 试剂盒检测结果显示其中存在相当一部分 (约 10%) 这样的样品: 即禽型 PPD 和牛型 PPD 刺激的 OD 值均较高的阴性样品 (即表 1 中 a), 其很可能与环境分枝杆菌的交叉感染有关, 会影响试剂盒检测结果的准确性。而本研究建立的间接 ELISA 方法能较好的识别这部分样品 (检出 5 份阳性), 显示 MPT83 作为检测抗原具备一定的区分非致病分枝杆菌和致病菌混合感染的能力, 从而有望成为牛结核外周血 IFN- $\gamma$  释放试验检测试剂盒的辅助诊断手段, 以进一步提高后者在牛结核检测中的敏感性。

表 1. 待检样品的间接 ELISA 结果

Table 1. Results of indirect ELISA for serum samples

Results comparison		Indirect ELISA		Total
		Positive	Negative	
BOVIGAM <sup>TM</sup>	Positive	68	72	140
	Negative <sup>a</sup>	5	13	18
test kit	Negative <sup>b</sup> *	1	41	42
	Total	74	126	200

\* Negative samples with higher OD value (a) or lower OD value (b) stimulated by both avian PPD and bovine PPD.

### 3 讨论

一些发达国家通过“检疫-扑杀”策略较好的控制了牛结核病的传播,如英国,在1979年将牛结核患病率由早期15%–20%成功降至0.49%<sup>[8]</sup>。近年来随着国际贸易增多、*M. bovis* 野生动物宿主及人结核病增加等原因,全球牛结核情况重新严峻起来,相关防控花费也不断加大,已严重威胁人类健康。

细菌培养仍是牛结核病确诊的金标准,但操作繁琐、检出率低,已不能满足当前疫病诊断的需要。牛外周血  $\gamma$ -干扰素体外释放试验作为牛结核检测新方法,其良好的效果已由数十个国家的数十万例临床试验所证实<sup>[9]</sup>。ELISA 血清学方法利用抗原抗体反应检测针对 *M. bovis* 的循环抗体,操作简便、成本不高,能大幅降低牛结核病防控开支<sup>[10]</sup>。目前 ESAT-6、CFP10、MPT63、MPT64、MPT70、MPT51、MPB59、MPT32 和 MPT83 等抗原已被证实含有针对 *M. bovis* 的重要 B 细胞表位,其相关应用研究已经开展<sup>[11]</sup>。MPT83 蛋白是 *M. bovis* 分泌蛋白之一,是与菌体表面相关的脂蛋白,有糖基化位点,与 MPB70 蛋白高度同源,两者能发生交叉反应<sup>[12]</sup>。该蛋白在 MTB 和 *M. bovis* BCG 部分菌株 (Pasteur 株、Copenhagen 株和 Glaxo 株) 中低水平表达,而在 *M. bovis* 和 *M. bovis* BCG 的 Brazil、Moscow、Sweden 和 Tokyo 株中高表达<sup>[13]</sup>。MPT83 蛋白在体内不仅引发细胞免疫,而且引发体液免疫,是 *M. bovis* 重要的 B 细胞抗原靶,是血清学诊断良好候选抗原之一。

本研究利用大肠杆菌系统成功表达 MPT83 融合蛋白,并对纯化条件进行优化,获得了纯度很高的纯化产物。而对纯化产物进行透析等操作,有利于蛋白活性保存并提高后续实验的精确性。对其在小鼠模型中的免疫原性分析显示,该蛋白能上调小鼠脾脏 CD4<sup>+</sup> T 细胞和 CD8<sup>+</sup> T 细胞表面 CD69 分子的表达,从而活化 T 细胞参与免疫应答,但下调 BMDC 表面 CD80 分子的表达,显示其并不能促进抗原提呈细胞的抗原提呈过程,同时,ELISPOT 结果表明该蛋白在小鼠体内诱导产生 Th2 型免疫应答趋势。研究表明重组 MPT83 蛋白能促进巨噬细胞分泌 IFN- $\gamma$  等细胞因子并增强其抗原提呈能力从而活化 T 细

胞免疫应答,显示出较强的抗结核保护性免疫应答能力<sup>[14-15]</sup>,本研究结果也表明该蛋白在小鼠体内可以活化 T 细胞,但并不能增强树突状细胞的抗原提呈能力,这与巨噬细胞有所不同。另外,其诱导产生 IFN- $\gamma$  的同时也有高水平 IL-2 的分泌,提示该蛋白在体内可能引起更复杂的免疫反应。与其他分枝杆菌抗原蛋白的同步比较研究显示,该蛋白在小鼠体内诱导细胞免疫应答的能力并不突出,为此我们进一步分析了其体液免疫应答情况<sup>[16]</sup>。与多数单抗原血清学检测结果相似,本研究建立的间接 ELISA 用于牛结核检测的敏感性偏低,与外周血 IFN- $\gamma$  释放体外试验检测试剂盒结果的阳性符合率在 50% 左右,但其特异性较高,且在区分非致病分枝杆菌感染方面有一定优势。较低的敏感性可能与结核病的细胞免疫与体液免疫的分离现象有关,同时,*M. bovis* 是细胞免疫为优势应答的胞内寄生菌,其抗体反应性个体差异巨大、抗体反应谱广,单个抗原很难反应机体抗体水平和感染情况<sup>[17-18]</sup>。发掘有效的抗原种类及探讨不同种类抗原的最佳组合方式已成为近年来牛结核血清学检测关注重点。

本研究成功对 MPT83 蛋白进行表达、纯化和鉴定,并应用于牛结核病间接 ELISA 检测,为下一步深入研究奠定了基础。

### 参考文献

- [1] ÓReilly LM, Daborn CJ. The epidemiology of *Mycobacterium bovis* infections in animals and man—a review. *Tubercle and Lung Disease*, 1995, 76 (Suppl 1): 1-46.
- [2] Corner LAL. The role of wild animal populations in the epidemiology of tuberculosis in domestic animals: how to assess the risk. *Veterinary Microbiology*, 2006, 112 (2-4): 303-312.
- [3] Rodwell TC, Moore M, Moser KS, Brodine SK, Strathdee SA. Tuberculosis from *Mycobacterium bovis* in binational communities, United States. *Emerging Infectious Diseases*, 2008, 14 (6): 909-916.
- [4] Adams LG. In vivo and in vitro diagnosis of *Mycobacterium bovis* infection. *Revue Scientifique et Technique*, 2001, 20 (1): 304-324.
- [5] McNair J, Corbett DM, Girvin RM, Mackie DP, Pollock M. Characterisation of the early antibody response in bovine tuberculosis: MPB83 is an early target with diagnostic potential. *Scandinavian Journal of*

- Immunology*, 2001, 53 (4) :365-371.
- [6] Amadori M, Lyashchenko KP, Gennaro ML, John MP, Ilaria Z. Use of recombinant proteins in antibody tests for bovine tuberculosis. *Veterinary Microbiology*, 2002, 85 (4) :379-389.
- [7] Matheu MP, Sen D, Cahalan MD, Parker I. Generation of bone marrow derived murine dendritic cells for use in 2-photon imaging. *Journal of Visualized Experiments*, 2008, (17), e773.
- [8] Hope JC, Ramos BV. Bovine TB and the development of new vaccines. *Comparative Immunology Microbiology and Infectious Diseases*, 2008, 31 (2-3) :77-100.
- [9] Wood PR, Jones SL. Bovigam™: an in vitro cellular diagnostic test for bovine tuberculosis. *Tuberculosis*, 2001, 81 (1-2) :147-155.
- [10] Arias-Bouda LMP, Kuijper S, van Deutekom H, van Gijlswijk R, Pekel I, Jansen HM, Kolk AHJ. Enzyme-linked immunosorbent assays using immune complexes for the diagnosis of tuberculosis. *Journal of Immunological Methods*, 2003, 283 (1-2) :115-124.
- [11] Liu S, Guo S, Wang C, Shao M, Zhang X, Guo Y, Gong Q. A novel fusion protein-based indirect enzyme-linked immuno-sorbent assay for the detection of bovine tuberculosis. *Tuberculosis*, 2007, 87 (3) :212-217.
- [12] Hewinson RG, Michell SL, Russell WP, McAdam RA, Jacobs WR. Molecular characterization of MPT83: a seroreactive antigen of *Mycobacterium tuberculosis* with homology to MPT70. *Scandinavian Journal of Immunology*, 1996, 43 (5) :490-499.
- [13] Juarze MD, Torres A, Espitia C. Characterization of the *Mycobacterium tuberculosis* region containing the *mpt83* and *mpt70* genes. *FEMS Microbiology Letters*, 2001, 203 (1) :95-102.
- [14] Chen S, Li J, Zhang Y, Gao X, Cai H. Recombinant MPT83 derived from *Mycobacterium tuberculosis* induces cytokine production and upregulates the function of mouse macrophages through TLR2. *Journal Immunology*, 2012, 188 (2) : 668-677.
- [15] Kao FF, Mahmuda S, Pinto R, Triccas JA, West NP, Britton WJ. The secreted lipoprotein, MPT83, of *Mycobacterium tuberculosis* is recognized during human tuberculosis and stimulates protective immunity in mice. *PLoS One*, 2012, 7 (5) : e34991.
- [16] Meng C, Wan T, Xu Z, Shan F, Xie X, Shen J, Fan F, Chen X, Jiao X. Fusion expression of *Mycobacterium tuberculosis* ESAT6 and CFP10 protein and its cellular immunoproperties. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 2014, 45 (5) :789-794. (in Chinese)  
孟闯, 万婷, 徐正中, 单法, 解晓莉, 申峻松, 范峰, 陈祥, 焦新安. 结核分枝杆菌 ESAT6-CFP10 蛋白的融合表达及其细胞免疫学特性. 畜牧兽医学报, 2014, 45 (5) : 789-794.
- [17] Okuda Y, Maekura R, Hirotani A, Kitada S, Yoshimura K, Hiraga T, Yamamoto Y, Itou M, Ogura T, Ogihara T. Rapid serodiagnosis of active pulmonary *Mycobacterium tuberculosis* by analysis of results from multiple antigen specific tests. *Journal of Clinical Microbiology*, 2004, 42 (3) :1136-1141.
- [18] Greenwald R, Esfandiari J, Lesellier S, Houghton R, Pollock J, Aagaard C, Andersen P, Hewinson RG, Chambers M, Lyashchenko K. Improved serodetection of *Mycobacterium bovis* infection in badgers (meles) using multiantigen test formats. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 2003, 46 (3) :197-203.

# Immunogenicity evaluation of *Mycobacterium tuberculosis* MPT83 protein and establishment of serological diagnostic method for bovine tuberculosis detection

Chuang Meng<sup>1</sup>, Ting Wan<sup>1</sup>, Zhengzhong Xu<sup>1</sup>, Fa Shan<sup>1</sup>, Feng Fan<sup>2</sup>, Xiang Chen<sup>1\*</sup>, Xin'an Jiao<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Jiangsu Key Lab of Zoonosis/Jiangsu Co-Innovation Center for Prevention and Control of Important Animal Infectious Diseases and Zoonosis, Yangzhou University, Yangzhou 225009, Jiangsu Province, China

<sup>2</sup> Wuxi Center of Animal Disease Control and Prevention, Wuxi 214026, Jiangsu Province, China

**Abstract:** [Objective] The aim of this study was to express *Mycobacterium tuberculosis* MPT83 protein and to evaluate its immunogenicity in murine model as well as the serological diagnosis potential value for bovine tuberculosis. [Methods] The fragment of *mpt83* gene was amplified and constructed into pET30a(+) -*mpt83* recombinant plasmid. MPT83 fusion protein was purified with His affinity chromatography column from strain of BL21(DE3) -pET30a(+) -*mpt83* after induced by IPTG, and then used to evaluate its immunogenicity in mice and the potential application in ELISA assay for the detection of bovine tuberculosis. [Results] SDS-PAGE and Western blot results show that MPT83 fusion protein was expressed successfully and possessed a good immunological reactivity. Flow cytometry (FCM) analysis displayed decreased expression of CD80 on dendritic cells and up-regulation of CD69 expression on both splenic CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells. Meanwhile, more IL-4 specific secreting cell spots rather than those of IFN- $\gamma$  were detected by ELISPOT assay in C57BL/6 mice injected with the fusion protein. Total 200 serum samples were detected by indirect ELISA based on MPT83 as antigen and the results showed 48.6% positive coincidence rate and 90% negative's compared to results of peripheral blood specific IFN- $\gamma$  release assay in bovine tuberculosis detection. [Conclusions] MPT83 fusion protein was expressed successfully with capability of eliciting Th2 immune response in mice and could be used for ELISA assay to detect bovine tuberculosis as a serological diagnosis antigen.

**Keywords:** bovine tuberculosis, MPT83 protein, prokaryotic expression, immunogenicity, serological diagnosis

(本文责编:王晋芳)

Supported by the Key Project of China National Programs for Fundamental Research and Development (2012CB518805) and by the Project Funded by the Priority Academic Program Development of Jiangsu Higher Education Institutions

\* Corresponding author. Tel: +86-514-87971136; E-mail: jiao@yzu.edu.cn, chenxiang@yzu.edu.cn

Received: 3 June 2014/ Revised: 1 September 2014