



用小鼠模型分析可溶性表达结核分枝杆菌Ag85A的免疫原性

徐正中, 胡婷, 刘泽, 沈轩云, 刘佳莹, 殷月兰, 孙林, 陈祥*, 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】可溶性表达结核分枝杆菌Ag85A蛋白, 并评价其免疫原性。【方法】利用冷休克表达质粒和含有伴侣质粒的大肠杆菌对Ag85A蛋白进行可溶性原核表达, 并进行纯化与鉴定, 通过C57BL/6小鼠模型对Ag85A蛋白的免疫原性, 包括诱导机体特异性体液免疫应答和细胞免疫应答水平进行分析。【结果】重组菌诱导后裂解上清中检测到可溶性Ag85A蛋白的表达, 经过亲和层析纯化收获了纯度在90%以上的Ag85A蛋白, Western blot鉴定显示其具有较好的免疫反应性。Ag85A蛋白免疫小鼠后, 血清中可以检测到高水平的IgG抗体效价, 其中IgG2b水平要高于IgG1。通过特异性多肽、蛋白刺激脾脏和腹股沟淋巴结细胞可分泌高水平的IFN- γ 、TNF- α 等Th1型细胞因子。【结论】实现了Ag85A蛋白的可溶性表达, 免疫特性评价显示Ag85A蛋白可诱导机体产生强烈的特异性体液免疫应答及Th1型的细胞免疫应答, 从而为其进一步免疫学功能的研究奠定了重要基础。

关键词: 结核分枝杆菌, Ag85A, 可溶性表达, 免疫原性

Ag85复合物是结核分枝杆菌、牛分枝杆菌卡介苗主要的分泌型蛋白, 在结核分枝杆菌H37Rv株中占分泌蛋白总量的30%左右, 可从早期培养物中分离, 是一种极不稳定的蛋白, 经SDS-PAGE和等电聚焦分析可以将其分为3个组分Ag85A、Ag85B和Ag85C, 大小分别为31 kDa、30 kDa和31.5 kDa, 结核分枝杆菌以3: 2: 1的比例将它们分泌于培养液中^[1]。Ag85复合体蛋白具有分

枝酰转移酶活性, 参与海藻糖素状因子的形成, 是维持细菌细胞壁完整性的重要结构^[2]。近年来研究显示, Ag85A是一种免疫优势抗原, 可诱导机体产生强烈的细胞免疫应答。Ag85A可刺激机体Th1型细胞因子, 如IL-2、IFN- γ 、TNF- α 等的产生水平升高^[3], 可使小鼠的CD8⁺细胞毒性T细胞(CTL)的细胞毒活性增强^[4], 促进NK细胞、单核巨噬细胞等对肿瘤细胞的杀伤作用^[5]。目前, 携

基金项目: 国家“973计划”(2012CB518805); 江苏省重点研发计划(BE2015343); 扬州市自然科学基金(YZ2014027); 国家自然科学基金(31201882); 江苏高校优势学科建设工程资助项目

*通信作者。Tel: +86-514-87971136; E-mail: 焦新安, jiao@yzu.edu.cn; 陈祥, chenxiang@yzu.edu.cn

收稿日期: 2015-07-15; 修回日期: 2015-10-07; 网络出版日期: 2016-05-04

带Ag85A的腺病毒(Ad)载体疫苗^[6]以及改良牛痘安卡拉病毒(MVA)载体疫苗^[7]都已经进入临床试验阶段。

从细菌菌体中直接提取Ag85A蛋白易发生凝集和降解,而且难以纯化。随着基因工程技术的发展,许多学者都对Ag85A蛋白进行原核表达及相关研究,但是多以包涵体形式表达^[8-10],因此限制了Ag85A蛋白在结核病诊断、基础免疫学研究和疫苗制备等领域中的应用。为了获取可溶性表达的结核分枝杆菌Ag85A蛋白并对其免疫特性进行进一步的研究,本文利用冷休克表达质粒和含有伴侣质粒的大肠杆菌对Ag85A蛋白进行了可溶性原核表达、纯化及鉴定,随后通过C57BL/6小鼠模型对Ag85A蛋白的免疫特性进行了分析,从而为其进一步的免疫学功能研究奠定了重要基础。

1 材料和方法

1.1 实验动物、质粒及菌种

6-8周龄雌性C57BL/6小鼠购自北京维通利华实验动物技术有限公司。克隆载体pMD20T、冷休克表达载体pCold DNA I、宿主菌Chaperone Competent Cells BL21 Set购自TaKaRa公司。结核分枝杆菌H37Rv基因组由中国疾病预防控制中心万康林研究员惠赠。

1.2 主要试剂

PrimeSTAR GXL DNA Polymerase聚合酶、dNTPs、限制性内切酶Sac I、Xba I、T4连接酶、IPTG、X-Gal均购自TaKaRa公司; His Bind purification kit购自Novagen公司; 羊抗鼠IgG-HRP购自Sigma公司; 羊抗鼠IgG1-HRP购自Invitrogen公司; 羊抗鼠IgG2b-HRP购自Southern Biotech公司; Mouse Th1/Th2/Th17 cytokine kit购自BD公司; PE Rat anti-mouse CD4和APC Rat anti-mouse CD8均购自BD公司; Ag85A多肽(p241-

260)由北京中科亚光生物技术有限公司合成; 鼠抗Ag85A单抗6B5为本室研制并保存^[11]; 其余常规试剂为国产分析纯。

1.3 结核分枝杆菌BCG Ag85A蛋白的可溶性原核表达及鉴定

1.3.1 *fbpA* 基因的扩增及鉴定: 参照GenBank中已公布的*fbpA*序列(Accession No. NC000962), 使用Primer Premier 5.0软件设计特异性引物, *fbpA*基因ORF大小为1017 bp, 预期扩增的片段为921 bp, 引物由南京金思瑞公司合成。上游引物: 5'-TTAGAGCTCGCATTTCCTCCGGCCG-3' (Sac I); 下游引物: 5'-TATTCTAGAGTCTGTTCGGAGCTAGGC-3' (Xba I)。参照文献[12]方法以结核分枝杆菌H37Rv基因组为模板, 扩增*fbpA*基因片段并进行电泳检测。

1.3.2 重组克隆载体 pMD20T-*fbpA*的构建及鉴定: 参照文献[12]方法将回收的*fbpA*基因PCR产物和pMD20T载体, 用T4 DNA连接酶4 °C过夜连接、转化, 鉴定正确的阳性克隆进行测序, 测序正确的阳性克隆命名为pMD20T-*fbpA*。

1.3.3 重组表达质粒 pCold I-*fbpA*的构建及鉴定: 参照文献[12]方法使用Sac I和Xba I双酶切质粒pMD20T-*fbpA*及载体pCold I, 经过电泳、回收后, 用T4 DNA连接酶4 °C过夜连接、转化, 鉴定正确的阳性克隆进行测序, 测序正确的阳性克隆命名为pCold I-*fbpA*。

1.3.4 诱导重组菌Ag85A蛋白的可溶性表达及SDS-PAGE鉴定: 将重组质粒pCold I-*fbpA*分别转化5种含有不同伴侣质粒的感受态细胞, 并进行抗性筛选和鉴定, 鉴定正确的阳性克隆分别进行诱导表达。离心收集菌体, 超声波破碎仪裂解后进行SDS-PAGE电泳鉴定。

1.4 重组Ag85A蛋白的纯化及去内毒素处理

1.4.1 Ag85A蛋白的亲和层析纯化及 Western blot 鉴定: 将离心后收集的裂解上清使用His-Bind

Purification Kit亲和层析柱进行纯化,使用分光光度计测定纯化蛋白浓度。参照文献[13]方法以针对Ag85A单抗腹水6B5为一抗,进行Western Blot鉴定。

1.4.2 重组Ag85A蛋白的去内毒素处理及鉴定:将亲和层析纯化的Ag85A蛋白按照ProteoSpin™ Endotoxin Removal Kit Maxi for protein & peptides试剂盒的说明书进行内毒素去除,最终收集蛋白溶液并使用鲎试剂(LAL) QCL-1000®试剂盒检测内毒素含量。

1.5 重组Ag85A蛋白诱导免疫特性研究

1.5.1 动物免疫:将纯化Ag85A蛋白使用佐剂乳化后皮下免疫6-8周龄雌性C57BL/6小鼠,50 μg/只,每组5只,同时设定PBS(100 μL/只)皮下免疫阴性对照组。第1次免疫2周后以相同方法和剂量进行第2次免疫,二免2周后将小鼠安乐死,进行免疫评价试验。

1.5.2 血清特异性抗体水平的测定:收集小鼠血清,参照文献[13]方法以纯化Ag85A蛋白为包被抗原,以HRP-羊抗鼠IgG、IgG1和IgG2b为二抗,通过间接ELISA方法进行血清特异性抗体水平的测定。

1.5.3 细胞因子测定:参照文献[13]方法制备小

鼠脾脏单细胞悬液。细胞计数后,调整细胞浓度至 1×10^7 个细胞/mL,冰浴备用。将制备的单细胞悬液加入96孔板, 1×10^6 细胞/孔,然后分别加入1640完全培养基、Ag85A多肽、Ag85A蛋白和牛型PPD进行刺激培养,37 °C 5% CO₂培养48 h收集上清进行细胞因子测定。

1.5.4 脾脏 CD4⁺、CD8⁺ T细胞比例变化测定:将制备的脾脏单细胞悬液加入96孔板, 1×10^6 细胞/孔,分别加入Ag85A蛋白37 °C刺激培养24 h,同时设立未刺激对照组。将细胞洗涤2次,分别标记工作浓度PE Rat anti-mouse CD4和APC Rat anti-mouse CD8α,避光孵育30 min;将细胞洗涤3次,使用200 μL PBS重悬细胞,FACS检测各组脾脏细胞中CD4⁺、CD8⁺ T细胞比例变化。

1.6 数据分析

应用SPSS 16.0软件并对试验数据进行方差分析及卡方检验(* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$);应用GradPrism 5.0软件作图。

2 结果和分析

2.1 重组表达质粒的构建及鉴定

以结核分枝杆菌H37Rv基因组为模板,扩增

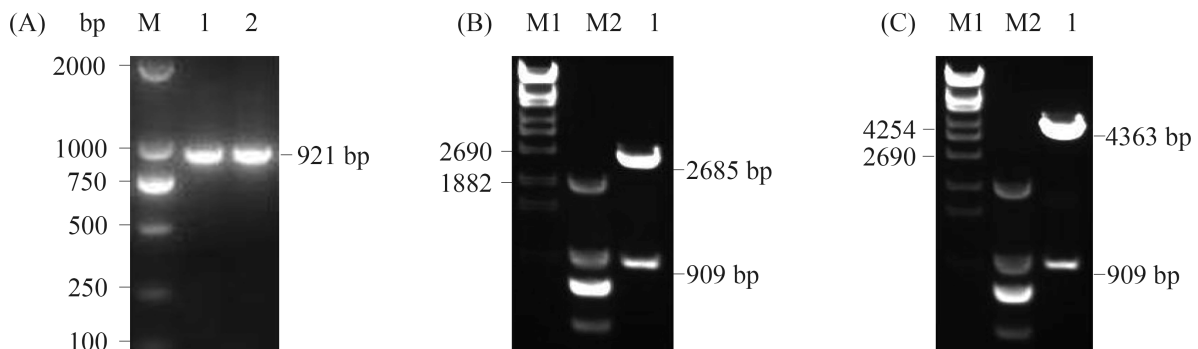


图 1. 重组表达质粒的构建鉴定

Figure 1. Analysis of recombinant plasmid. A: Analysis of *fbpA* gene PCR product. M: DL2000 DNA ladder; lane 1, 2: PCR product of *fbpA* gene. B: Analysis of recombinant plasmid pMD20T-*fbpA*. M1: λ -EcoT14 DNA ladder; M2: DL2000 DNA ladder; lane 1: pMD20T-*fbpA* digested by *Sac* I and *Xba* I. C: Analysis of recombinant plasmid pCold I-*fbpA*. M1: λ -EcoT14 DNA ladder; M2: DL2000 DNA ladder; lane 1: pCold I-*fbpA* digested by *Sac* I and *Xba* I.

*fbpA*基因片段并进行琼脂糖凝胶电泳鉴定。结果如图1-A所示, 目的基因片段大小约为921 bp, 与预期相符, 表明成功扩增*fbpA*基因。双酶切鉴定pMD20T-*fbpA*, 结果如图1-B所示, 酶切片段*fbpA*大小约为909 bp, 与预期相符, 表明成功构建重组质粒pMD20T-*fbpA*。双酶切鉴定pCold I-*fbpA*, 结果如图1-C所示, 酶切片段*fbpA*大小约为909 bp, 与预期相符, 表明成功构建重组质粒

pCold I-*fbpA*。

2.2 重组Ag85A蛋白的诱导表达及纯化

2.2.1 重组Ag85A蛋白的可溶性诱导表达及SDS-PAGE鉴定: 通过将构建成功的重组表达质粒pCold I-*fbpA*分别转化BL21和5种含有不同伴侣质粒的BL21感受态细胞后, 经过IPTG及L-Arabinose、Tetracyclin诱导后进行SDS-PAGE鉴定。结果如图2所示, Ag85A蛋白在所有宿主感受态细胞中均成

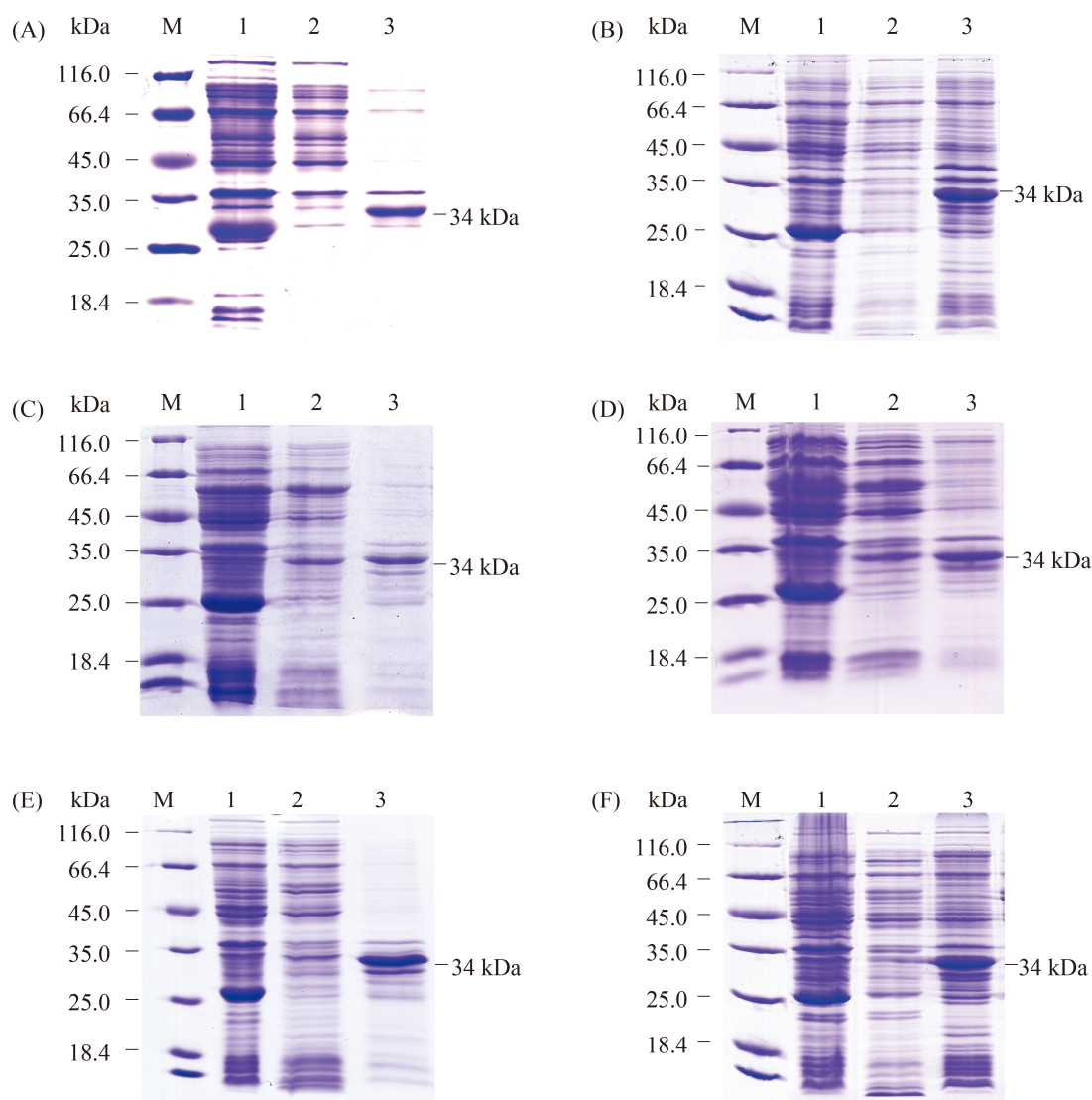


图 2. Ag85A蛋白的可溶性表达及SDS-PAGE鉴定

Figure 2. Soluble expression and SDS-PAGE analysis of Ag85A protein. A: BL21(pCold I-*fbpA*); B: BL21(pG-KJE8/pCold I-*fbpA*); C: BL21(pGro7/pCold I-*fbpA*); D: BL21(pG-KJE7/pCold I-*fbpA*); E: BL21(pG-Tf2/pCold I-*fbpA*); F: BL21(pTf16/pCold I-*fbpA*). M: protein marker; lane 1: BL21(pCold I); lane 2: supernatants of lysate; lane 3: sediments of lysate.

功表达(第3泳道), 在34 kDa左右出现明显的目的条带, 大小与目的蛋白预期相符。而且在重组菌 BL21 (pGro7/pCold I-*fbpA*)(图2-C), BL21 (pG-KJE7/pCold I-*fbpA*)(图2-D)的裂解上清中也出现了34 kDa目的条带(第2泳道), 表明Ag85A蛋白成功实现了部分可溶性表达。

2.2.2 重组Ag85A蛋白的亲和层析纯化及Western blot鉴定: 使用镍柱亲和和层析方法对重组Ag85A蛋白进行纯化, 结果如图3-A显示, 洗脱后收集的Ag85A蛋白经SDS-PAGE电泳鉴定, 经灰度分析蛋白纯度达到90%以上。随后使用Ag85A蛋白的特异性单抗6B5, 对纯化蛋白进行Western blot鉴定。结果如图3-B显示, 目的蛋白可以与单抗6B5特异性结合反应, 表明表达纯化Ag85A蛋白有着较好的免疫反应性。随后对表达纯化Ag85A蛋白进行去内毒素, 结果显示内毒素含量最终浓度低于0.1 EU/ μ g蛋白, 达到相关实验要求。

2.3 Ag 85A蛋白免疫特性研究

2.3.1 血清特异性抗体水平的测定: 为了解Ag85A蛋白诱导机体产生特异性体液免疫应答水平, 将纯化Ag85A蛋白皮下免疫C57BL/6小鼠,

二免2周后收集小鼠血清, 进行Ag85A蛋白特异性IgG及IgG亚型抗体效价检测。结果如图4所示, 与PBS免疫组相比, Ag85A蛋白免疫组小鼠血清中产生较高的特异性IgG抗体水平, IgG效价达到1:1024000。另外, 通过对血清IgG亚型的测定结果显示, 小鼠血清中Ag85A特异性IgG2b水平明显高于IgG1, 以上结果表明Ag85A可以诱导机体产生强烈的体液免疫应答, 并且免疫应答类型偏向于Th1型。

2.3.2 细胞因子测定: 为了解Ag85A蛋白诱导机体产生细胞免疫应答的类型和水平, 本研究使用Ag85A蛋白皮下免疫C57BL/6小鼠后, 分别使用Ag85A多肽、Ag85A蛋白和牛型PPD刺激免疫小鼠脾脏和腹股沟淋巴结细胞, 并对培养上清中分泌的Th1/Th2/Th17型细胞因子进行了测定。结果如图5所示, 经特异性多肽、蛋白刺激后, Ag85A蛋白免疫组小鼠脾脏和腹股沟淋巴结细胞均产生高水平的如IFN- γ 、TNF- α 等Th1型细胞因子, 表明Ag85A蛋白免疫小鼠后可以诱导机体产生以Th1型为主的细胞免疫应答。另外, Ag85A蛋白免疫组小鼠脾脏和腹股沟淋巴结细胞经特异性抗原刺激后, IL-17等免疫调节细胞因子也有一定

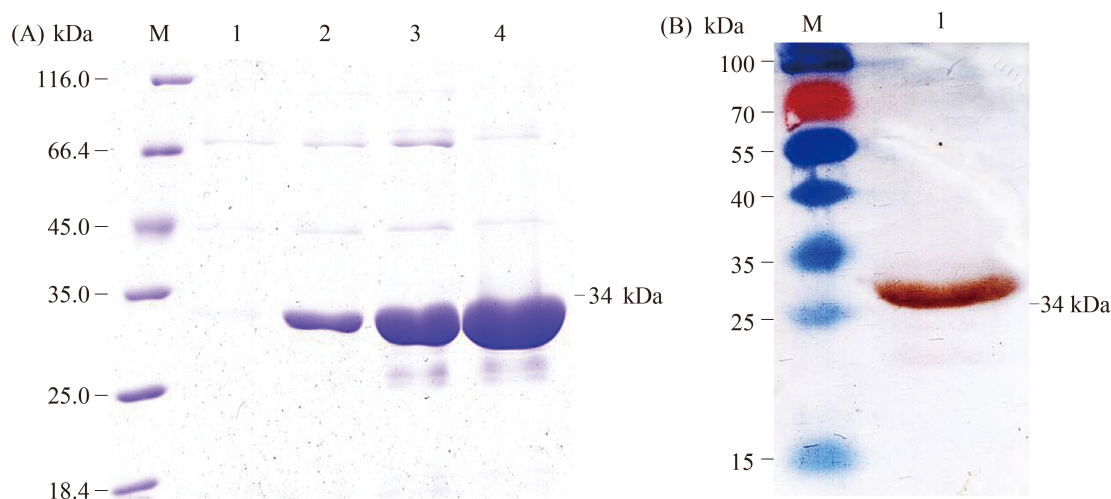


图 3. Ag85A蛋白的亲和层析纯化及Western blot鉴定

Figure 3. Affinity purification and Western blot analysis of Ag85A protein. A: Affinity purification of Ag85A protein. M: protein marker; lane 1–4: elution tube 1–4. B: Western blot analysis of Ag85A protein. M: protein marker; lane 1: purified Ag85A protein.

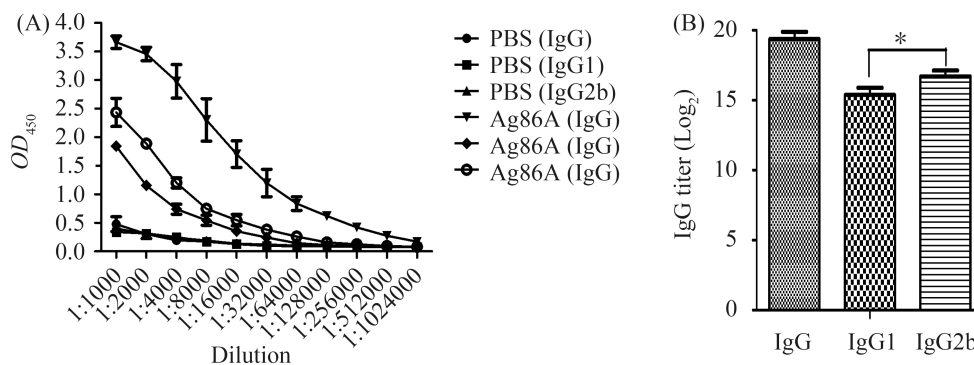


图 4. Ag85A 蛋白特异性IgG (A) 及IgG亚型 (B) 抗体效价测定

Figure 4. Detection of IgG (A) and IgG subtype (B) serum antibody against Ag85A protein. * $P < 0.05$.

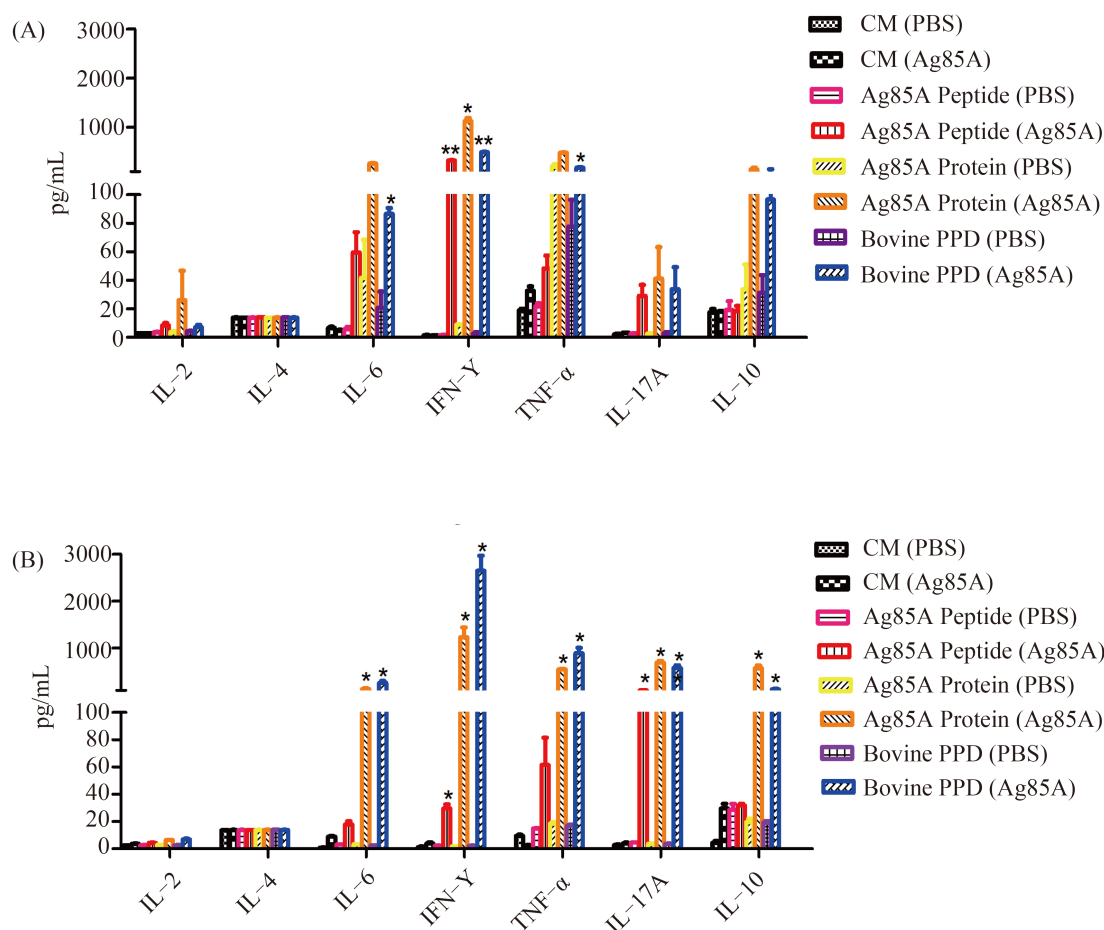


图 5. 小鼠脾脏(A)和腹股沟淋巴结(B)Th1/Th2/Th17型细胞因子测定

Figure 5. Detection of Th1/Th2/Th17 cytokines of murine spleen (A) and lymph node (B). * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$.

水平的产生。

2.3.3 小鼠脾脏和腹股沟淋巴结中CD4⁺T和CD8⁺T淋巴细胞比例变化分析: 为了分析Ag85A蛋白

免疫后诱导机体T细胞增殖的情况, 本研究使用重组Ag85A蛋白皮下免疫C57BL/6小鼠, 随后对体内脾脏和腹股沟淋巴结外周免疫器官中CD4⁺

T细胞和CD8⁺ T细胞比例变化进行了测定。结果由图6所示, 与PBS免疫组相比, Ag85A蛋白免疫组小鼠外周免疫器官中CD4⁺ T细胞与CD8⁺ T细胞的比值有所提高, 其中小鼠脾脏CD4⁺ T细胞/CD8⁺ T细胞的比值有显著上升, 表明Ag85A蛋白可以诱

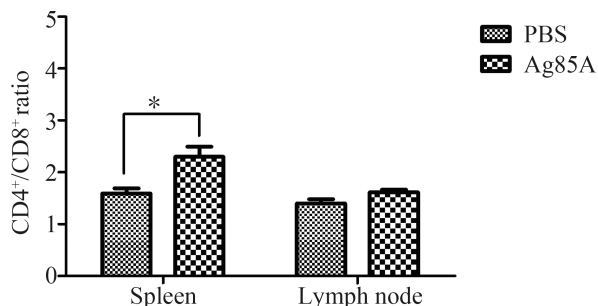


图 6. 小鼠脾脏和腹股沟淋巴结CD4⁺/CD8⁺ T细胞比例
Figure 6. Ratio of CD4⁺/CD8⁺ T cells in murine spleen and lymph node. * $P < 0.05$.

导机体产生Th1型细胞免疫应答。

3 讨论

Ag85复合物最初是在结核分枝杆菌和牛分枝杆菌的培养滤液中被发现, 包括Ag85A (*fbpA*, Rv3804), Ag85B (*fbpB*, Rv1886c)和Ag85C (*fbpC*, Rv0129c), 并且存在于多种分枝杆菌中, 如耻垢分枝杆菌(*M. smegmatis*)和脓肿分枝杆菌(*M. abscessus*)^[1]。结核分枝杆菌Ag85A分泌进入胞外环境中, 从而被宿主免疫系统识别诱导保护性免疫应答以及具有诊断价值的免疫应答反应, 已有运用Ag85A抗原建立的ELISA诊断方法进行结核分枝杆菌感染检测的相关研究和应用^[14]。另外, Ag85A蛋白与ESAT-6、CFP-10、Ag85B和TB10.4等蛋白都是结核分枝杆菌重要的免疫优势抗原^[15-16], 是最具潜力的候选疫苗抗原。

本研究尝试对结核分枝杆菌跨膜蛋白Ag85A进行可溶性表达, 然而, 在*E. coli*中表达的外源蛋白常常会发生各种问题, 例如, 形成不溶性的包涵体等, 原因大多是表达的蛋白质没有进行正

确的折叠。姜燕等^[8]对Ag85A基因进行了克隆和原核表达, 结果蛋白不能可溶性表达; 邓毛子等^[9]从H37Rv中扩增出Ag85A基因并进行了原核表达, 结果显示同样以包涵体形式表达, 并没有对蛋白免疫原性进一步研究; 张群等^[10]将Ag85A与ESAT-6基因融合原核表达, 通过将包涵体蛋白进行变性处理后仅对其生物学活性进行了测定。为了获取Ag85A蛋白并对其进行进一步的免疫功能研究, 本研究使用冷休克表达质粒与含有伴侣蛋白质粒的*E. coli* BL21制成的感受态细胞相结合的方法对Ag85A蛋白进行了可溶性原核表达, 结果显示本研究成功实现了Ag85A蛋白的可溶性表达, Western blot鉴定显示其具有较好的免疫反应性, 从而为其进一步研究提供了重要的生物材料。

近年来研究表明, Ag85A蛋白可以刺激机体产生强烈的细胞免疫应答和体液免疫应答, 机体Th1型细胞因子如IL-2、IFN- γ 、TNF- α 等的产生水平升高。Ag85A蛋白在结核分枝杆菌感染后可诱导机体产生细胞毒性T细胞免疫应答^[17], 并且在小鼠模型体内可以产生抗结核分枝杆菌的保护性免疫应答^[18]。有报道显示, Ag85A DNA疫苗联合BCG免疫比单独使用BCG进行免疫诱导产生更有效的抗结核感染免疫保护应答^[19]。本研究分别对Ag85A蛋白诱导小鼠机体产生特异性体液免疫应答和细胞免疫应答水平进行了测定。结果显示Ag85A蛋白免疫小鼠后, 血清中可以检测到高水平的IgG抗体效价, 另外IgG2b水平要高于IgG1, 表明Ag85A可以诱导机体产生偏向Th1型的免疫应答。另外, 本文通过对特异性多肽、蛋白刺激的脾脏和腹股沟淋巴结细胞分泌Th1、Th2和Th17型细胞因子进行测定, 显示Ag85A蛋白免疫组小鼠脾脏和腹股沟淋巴结细胞均可以产生高水平IFN- γ 、TNF- α 等Th1型细胞因子, 而产生较低水平的Th2型细胞因子, 如IL-6、IL-10, 表明Ag85A蛋白免疫小鼠后可以诱导机体同时产生Th1和Th2型

免疫应答, 并以Th1型细胞免疫应答为主。Th0细胞在IL-6和IL-23的刺激下可以分化成Th17辅助性T细胞, 主要分泌IL-17、IL-22等促炎症因子, 在自身免疫中起重要的作用^[20]。在本研究中, Ag85A蛋白免疫组小鼠脾脏和腹股沟淋巴结细胞经特异性抗原刺激后, IL-17等免疫调节细胞因子也有一定水平的产生, 显示Ag85A蛋白具有诱导机体产生炎症反应, 调节自身免疫方面具有一定功能。另外, 通过对特异性抗原刺激的脾脏和腹股沟淋巴结T细胞亚群比例进行分析, 结果显示Ag85A蛋白免疫组小鼠外周免疫器官中CD4⁺T细胞与CD8⁺T细胞的比值有所增大, 并且在小鼠脾脏中细胞比例有显著性变化, 表明Ag85A蛋白可以诱导机体CD4⁺T细胞迅速增殖, 产生明显的Th1型为主的细胞免疫应答。

综上所述, 本研究成功实现了结核分枝杆菌Ag85A蛋白的原核可溶性表达, 经鉴定该蛋白具有较好的免疫反应性, 为该蛋白进一步研究提供了生物材料。随后对Ag85A蛋白的免疫特性鉴定结果表明Ag85A蛋白可诱导机体产生强烈的特异性体液免疫应答及Th1型细胞免疫应答, 从而为其进一步免疫功能的研究及结核病诊断、疫苗制备方面的应用奠定重要基础。

参考文献

- [1] Wiker HG, Harboe M. The antigen 85 complex: a major secretion product of *Mycobacterium tuberculosis*. *Microbiological Reviews*, 1992, 56(4): 648–661.
- [2] Belisle JT, Vissa VD, Sievert T, Takayama K, Brennan PJ, Besra GS. Role of the major antigen of *Mycobacterium tuberculosis* in cell wall biogenesis. *Science*, 1997, 276(5317): 1420–1422.
- [3] D'Souza S, Rosseels V, Romano M, Tanghe A, Denis O, Jurion F, Castiglione N, Vanonckelen A, Palfliet K, Huygen K. Mapping of murine Th1 helper T-Cell epitopes of mycolyl transferases Ag85A, Ag85B, and Ag85C from *Mycobacterium tuberculosis*. *Infection and Immunity*, 2003, 71(1): 483–493.
- [4] Miki K, Nagata T, Tanaka T, Kim YH, Uchijima M, Ohara N, Nakamura S, Okada M, Koide Y. Induction of protective cellular immunity against *Mycobacterium tuberculosis* by recombinant attenuated self-destructing *Listeria monocytogenes* strains harboring eukaryotic expression plasmids for antigen 85 complex and MPB/MPT51. *Infection and Immunity*, 2004, 72(4): 2014–2021.
- [5] Tarrant JP, Walsh MJ, Blanchard MC, Lee TDG, Hoskin DW, Giacomantonio CA. Reduced tumorigenicity of B16-F10 mouse melanoma cells transfected with mycobacterial antigen 85A. *International Journal of Oncology*, 2004, 25(6): 1693–1699.
- [6] Smaill F, Jeyanathan M, Smieja M, Medina MF, Thanthrige-Don N, Zganiacz A, Yin C, Heriazon A, Damjanovic D, Puri L, Hamid J, Xie F, Foley R, Bramson J, Gaudie J, Xing Z. A human type 5 adenovirus-based tuberculosis vaccine induces robust T cell responses in humans despite preexisting anti-adenovirus immunity. *Science Translational Medicine*, 2013, 5(205): 205ra134.
- [7] Tameris MD, Hatherill M, Landry BS, Scriba TJ, Snowden MA, Lockhart S, Shea JE, McClain JB, Hussey GD, Hanekom WA, Mahomed H, McShane H. Safety and efficacy of MVA85A, a new tuberculosis vaccine, in infants previously vaccinated with BCG: a randomised, placebo-controlled phase 2b trial. *The Lancet*, 2013, 381(9871): 1021–1028.
- [8] Jiang Y, Azuma Kalu, Lv CL, Shan FP. Clone and prokaryotic expression of *Mycobacterium tuberculosis* Ag85A DNA. *Journal of Microbiology*, 2007, 27(3): 16–20. (in Chinese)
姜燕, Kalu A, 吕昌龙, 单凤平. 结核分枝杆菌Ag85A DNA的克隆与原核表达. *微生物学杂志*, 2007, 27(3): 16–20.
- [9] Deng MZ, Shi CW, Wang F, Fu RL, Wang C, Fang ZM, Fan XL. Prokaryotic expression, purification and immunoreactivity of *Mycobacterium tuberculosis* Ag85A protein. *Basic & Clinical Medicine*, 2010, 30(2): 117–121. (in Chinese)
邓毛子, 石春薇, 王芳, 付瑞玲, 王春, 方正明, 范雄林. 结核分枝杆菌Ag85A蛋白的原核表达、纯化和免疫反应性. *基础医学与临床*, 2010, 30(2): 117–121.
- [10] Zhang Q, Zhu L, Lou JR. Prokaryotic expression and biological activity of recombinant *Mycobacterium tuberculosis* Ag85a-

- ESAT6 fusion protein. *Chinese Journal of Biologicals*, 2010, 23(11): 1153–1157. (in Chinese)
- 张群, 朱琳, 楼觉人. 重组结核杆菌Ag85a-ESAT6融合蛋白的原核表达、纯化及其生物活性. *中国生物制品学杂志*, 2010, 23(11): 1153–1157.
- [11] 胡婷. 牛白细胞介素-2和牛分枝杆菌Ag85A单克隆抗体的制备与鉴定. 扬州: 扬州大学硕士学位论文, 2015.
- [12] Sambrook J, Russell DW. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 3rd ed. Beijing: Science Press, 2002.
- [13] Meng C, Wan T, Xu ZZ, Shan F, Fan F, Chen X, Jiao XA. Immunogenicity evaluation of *Mycobacterium tuberculosis* MPT83 protein and establishment of serological diagnostic method for bovine tuberculosis detection. *Acta Microbiologica Sinica*, 2015, 55(2): 220–226. (in Chinese)
- 孟闯, 万婷, 徐正中, 单法, 范峰, 陈祥, 焦新安. 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的建立. *微生物学报*, 2015, 55(2): 220–226.
- [14] Dong EJ, Zhang LX, Zhang CY. Value of detection of recombinant Ag85A and Ag85B antigen of *Mycobacterium tuberculosis* in diagnosis of tuberculosis. *China Tropical Medicine*, 2011, 11(3): 279–280. (in Chinese)
- 董恩军, 张灵霞, 张翠英. 结核分枝杆菌Ag85A和Ag85B蛋白在结核病诊断的价值. *中国热带医学*, 2011, 11(3): 279–280.
- [15] Chen X, Ou Z, Xie XL, Xu ZZ, Jiao XA. Preparation of monoclonal antibodies against *Mycobacterium tuberculosis* TB10. 4 antigen. *Monoclonal Antibodies in Immunodiagnosis and Immunotherapy*, 2014, 33(6): 444–447.
- [16] Zhou HX, Chen X, Ji Y, Zhou WD, Hu MZ, Huang JL, Pan ZM, Jiao XA. Construction of recombinant adenovirus expressing Ag85B of *Mycobacterium bovis* and its cellular immunoproperties in mice. *Acta Microbiologica Sinica*, 2010, 50(6): 811–816. (in Chinese)
- 周海霞, 陈祥, 季琰, 周卫东, 胡茂志, 黄金林, 潘志明, 焦新安. 用小鼠模型分析表达牛结核分枝杆菌Ag85B重组腺病毒的细胞免疫特性. *微生物学报*, 2010, 50(6): 811–816.
- [17] Sable SB, Kaur S, Verma I, Khuller GK. Immunodominance of low molecular weight secretory polypeptides of *Mycobacterium tuberculosis* to induce cytotoxic T-lymphocyte response. *Vaccine*, 2005, 23(41): 4947–4954.
- [18] Fan XL, Gao Q, Fu RL. Differential immunogenicity and protective efficacy of DNA vaccines expressing proteins of *Mycobacterium tuberculosis* in a mouse model. *Microbiological Research*, 2009, 164(4): 374–382.
- [19] Romano M, Souza SD, Adnet PY, Laali R, Jurion F, Palfliet K, Huygen K. Priming but not boosting with plasmid DNA encoding mycolyl-transferase Ag85A from *Mycobacterium tuberculosis* increases the survival time of *Mycobacterium bovis* BCG vaccinated mice against low dose intravenous challenge with *M. tuberculosis* H37Rv. *Vaccine*, 2006, 24(16): 3353–3364.
- [20] Sherlock JP, Taylor PC, Buckley CD. The biology of IL-23 and IL-17 and their therapeutic targeting in rheumatic diseases. *Current Opinion in Rheumatology*, 2015, 27(1): 71–75.

Expression and immunogenicity of Ag85A protein of *Mycobacterium tuberculosis*

Zhengzhong Xu, Ting Hu, Ze Liu, Xuanyun Shen, Jiaying Liu, Yuelan Yin, Lin Sun, Xiang Chen^{*}, Xin'an Jiao^{*}

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

Abstract: [Objective] The aim of this study was to express *Mycobacterium tuberculosis* Ag85A protein and to evaluate its immunogenicity in mice. [Methods] The cold expressed system and chaperone competent cells BL21 were combined to express *Mycobacterium tuberculosis* Ag85A protein, then the protein was purified with affinity chromatography and identified by Western Blot analysis. [Results] The immunogenicity of the purified Ag85A protein was evaluated in C57BL/6 mice. Results show that high level of specific IgG was elicited in the serum, and the splenocytes and lymph node cells of immunized mice could produce more Th1 cytokines, such as IFN- γ and TNF- α , after stimulated with specific antigen. [Conclusions] Ag85A protein can induce strong specific humoral and Th1 type cellular immune responses, providing an important biological material for further research and application.

Keywords: *Mycobacterium tuberculosis*, Ag85A, soluble expression, immunogenicity

(本文责编: 李磊)

Supported by the National Basic Research and Development Program of China (973 Program) (2012CB518805), by the Research and Development Program of Jiangsu (BE2015343), by the NSF of Yangzhou (YZ2014027), by the National Natural Science Foundation of China (31201882), and by the Priority Academic Program Development of Jiangsu Higher Education Institutions

^{*}Corresponding author. Tel: +86-514-87971136; E-mail: Xin'an Jiao, jiao@yzu.edu.cn; Xiang Chen, chenxiang@yzu.edu.cn

Received: 15 July 2015; Revised: 7 October 2015; Published online: 4 May 2016