

牛分枝杆菌 Mb0950c 的免疫特性及其血清学检测方法的建立

夏爱鸿¹, 李昕¹, 冯莉¹, 全娟娟², 姚志鸿², 陆梦君¹, 徐正中^{1,2*}, 陈祥^{1,2*}, 焦新安^{1,2}

¹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

²农业农村部农产品质量安全生物性危害因子(动物源)控制重点实验室, 江苏扬州 225009

摘要:【目的】利用原核表达系统对牛分枝杆菌 Mb0950c 蛋白进行表达和纯化, 通过小鼠模型评价其免疫原性, 建立血清学间接 ELISA 方法用于牛结核病的临床检测。【方法】构建 pET32a-Mb0950c 原核表达质粒, 并转化至 BL21(DE3)中诱导蛋白的表达, 对蛋白进行纯化。使用流式细胞术(flow cytometry, FCM)、ELISA 等对该蛋白在小鼠中的免疫原性进行分析。建立基于 Mb0950c 的间接 ELISA 方法, 评价该方法的临床检测潜力。【结果】SDS-PAGE 和 Western blotting 结果显示, 成功获得了可溶性 Mb0950c 蛋白, 且具有良好的免疫反应性; FCM 结果显示, Mb0950c 蛋白上调了 T 细胞表面 CD69 分子的表达。细胞因子和抗体结果表明, 该蛋白能够诱导特异性的 IFN- γ 和 IL-4 的分泌, 同时能诱导机体分泌特异性的抗体, 且以 IgG1 型为主。建立了 ELISA 检测方法应用于牛结核临床检测, 结果显示, 该方法与牛结核外周血 IFN- γ 外释放试验和皮试试验结果的阳性符合率、阴性符合率和总符合率分别为 65.7%、97.9%和 72.4%。【结论】在原核表达系统中可溶性表达 Mb0950c 蛋白, 它在小鼠模型中诱导 Th1 和 Th2 型免疫应答, 基于此蛋白建立了牛结核病血清学检测的间接 ELISA 方法。

关键词: 牛分枝杆菌, Mb0950c 蛋白, 免疫学特性, 血清学检测

牛结核病是由牛分枝杆菌引起的一种在自然界广泛分布的慢性消耗性人兽共患病, 被世界动物卫生组织(OIE)列为需通报的动物疫病^[1]。该病不仅能在动物间高度传播, 而且能够传染给人

类^[2], 给养殖业和社会公共卫生造成巨大的威胁。据世界卫生组织报道显示, 在 2018 年大约 143000 人感染牛分枝杆菌, 其中 12300 人死亡^[3]。因此牛结核病的预防和检测具有重大的经济和社会意义。

基金项目: 国家重点研发计划(2018YFD0500500, 2017YFD0500300); 江苏省自然科学基金(BK20201432, BK20171285); 扬州大学科技创新培育基金(2019CXJ158); 江苏“六大人才高峰”和优势学科建设工程

*通信作者。E-mail: 徐正中, zzzx@yzu.edu.cn; 陈祥, chenxiang@yzu.edu.cn

收稿日期: 2020-02-20; 修回日期: 2020-08-05

目前,常采用结核菌素皮试试验作为检疫依据,通过扑杀结核阳性牛,来控制 and 消灭牛结核病。但该方法存在诸多缺陷如假阳性高、主观误差大、无法连续检测等^[4]。牛 γ -干扰素试验作为一种牛结核病诊断的辅助手段应运而生。该方法既能保证灵敏度,又能极大地提高检测的特异性^[5]。研究显示当使用牛 γ -干扰素试验检疫时,该方法的敏感性为 81.8%–100%,特异性为 94%–100%^[6]。结核菌素皮试试验与牛 γ -干扰素试验的结合,大大提高了检测效率。牛分枝杆菌感染后,机体首先产生细胞免疫,体液免疫反应相对滞后,抗体水平与病程发展成正相关。而上述的两种方法都是基于细胞免疫,仍存在漏检的情况^[7]。因此对牛结核病的血清学诊断仍需大量的研究。目前可用于检测的抗原包括 CFP-10、ESAT-6、MPB64、MPB70、MPB83、Ag85 等^[8]。牛分枝杆菌 Mb0950c 蛋白是一种短链脱氢酶/还原酶,与结核分枝杆菌 Rv0927c 的氨基酸序列 100%同源。它属于短链脱氢酶/还原酶家族(SDR),该家族是依赖 NAD 或 NADP 的氧化还原酶大家族之一,存在于所有结核分枝杆菌菌株中。已有研究显示该家族可作为分枝杆菌诊断的分子靶标^[9],然而关于该蛋白的免疫学特性和作为诊断靶标的潜力尚未被探究。

因此本研究成功构建了 Mb0950c 的原核表达质粒,获得了可溶性表达的 Mb0950c 蛋白,并对该蛋白的免疫学特性进行了探究,同时建立了基于 Mb0950c 蛋白的间接 ELISA 抗体检测方法,对其在牛结核血清学检测中进行了初步应用。

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、大肠埃希

氏菌(*Escherichia coli*, *E. coli*)DH5 α 、BL21(DE3)均由本室保存;pET32a(+)购自 Novagen 公司。限制性内切酶 *EcoR* I 和 *Hind* III 购自 TaKaRa 公司;RPMI 1640、胎牛血清、青链霉素双抗购自 GBICO 公司;CD4、CD8 和 CD69 抗体与小鼠 IFN- γ 、IL-4 检测试剂盒购自 BD Biosciences 公司;羊抗鼠 IgG-HRP、IgG1-HRP、IgG2a-HRP、ConA 均购自 Sigma 公司。6 周龄雌性 C57BL/6 小鼠(H-2^b),购自扬州大学比较医学中心。

1.2 Mb0950c 基因的扩增和重组菌的构建

查询目标基因序列,使用 Primer Premier 5.0 软件设计 PCR 扩增引物,上游引物为:5'-GCTGA TATCGGATCCGAATTCATGATCCTGGATATGTT CCGTCTT-3' (引入 *EcoR* I 酶切位点),下游引物为:5'-CTCGAGTGC GGCCGCAAGCTTTCACAG GTCCGGAATGGGA-3' (引入 *Hind* III 酶切位点)。PCR 扩增目的片段,回收后使用一步法连接至 pET32a(+)载体,并热激转化至 DH5 α 感受态细胞中。获得阳性克隆后 PCR、质粒双酶切和测序鉴定。

1.3 Mb0950c 融合蛋白的表达与鉴定

将测序正确的 pET32a-Mb0950c 重组质粒热转至大肠杆菌感受态 BL21(DE3)中,在含有卡那霉素的 LB 固体培养基上挑取阳性克隆。将重组菌培养至 OD_{600} 为 0.4–0.6 时,加入终浓度为 0.5 mmol/L 的 IPTG,30 °C 诱导 5 h。诱导结束后使用预冷的 PBS 洗涤 2 次,随后加入适宜体积的 PBS 进行重悬。超声破碎后离心,收集上清和沉淀,进行 SDS-PAGE 和 Western blotting 分析。使用 His 标签纯化试剂盒对蛋白进行纯化,随后对蛋白进行透析和内毒素的去除,测定蛋白浓度和内毒素含量。最后将获得的蛋白进行分装,并置于-70 °C 保存。

1.4 FCM 检测脾脏 T 细胞表面 CD69 的表达

取预先制备的 Mb0950c 蛋白与 DDA 佐剂按体积比 1:1 混合乳化充分后, 按 100 μg 蛋白/只, 皮下注射方式免疫 6–8 周龄雌性 C57BL/6 小鼠, 每组 6 只, 同时设定阳性对照组及阴性对照组。阳性对照在第二次免疫时间点时腹腔注射 BCG (10^7 CFU/只), PBS (100 μL /只)及 DDA (250 μg /只)免疫阴性对照组, 与实验组也一样进行 3 次免疫。间隔两周免疫 1 次, 共免疫 3 次。收集小鼠血清, 同时无菌取脾脏, 参照文献[10]方法制备小鼠脾脏单细胞悬液, 细胞计数后, 调制至 2×10^7 个/mL 备用。

参照文献[11]方法对小鼠脾脏细胞表面的 CD4、CD8 和 CD69 分子进行染色, FACS 检测各组细胞中 CD4⁺、CD8⁺ T 细胞表面分子 CD69 的表达水平。

1.5 ELISA 试验检测特异性 IFN- γ 和 IL-4 分泌水平

将各组细胞悬液调整至 2×10^6 个/mL, 50 μL /孔, 加至 96 孔细胞板中, 再加入 50 μL 用完全培养基稀释的 Mb0950c (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$)进行刺激培养, 同时设立未刺激细胞组和刀豆蛋白(ConA)刺激剂组, 设 2 个重复孔, 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱培养 48 h。4 $^{\circ}\text{C}$ 、1000 r/min 离心 5 min, 收集细胞培养上清, 使用 ELISA 检测试剂盒对上清中的 IFN- γ 、IL-4 进行检测。

1.6 ELISA 检测免疫小鼠血清中特异性抗体效价

将 Mb0950c 蛋白稀释至 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 100 μL /孔过夜包被, 同时设立非相关蛋白包被孔。取采集的小鼠血清从 1:8000 等比稀释至 1:1024000, 每孔加入 100 μL , 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 2 h。PBST 洗涤 6 遍, 分别加入工作浓度的羊抗鼠 IgG-HRP、IgG1-HRP、IgG2a-HRP 二抗, 100 μL /孔, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 2 h。使

用 PBST 洗涤 5 遍后, TMB 显色, 2 mol/L H_2SO_4 终止显色, 测量 OD_{450} 值。

1.7 间接 ELISA 方法的建立及评价

将 Mb0950c 蛋白稀释至 0.25、0.50、1.00、2.00、4.00、8.00 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 100 μL /孔加入 ELISA 板中, 4 $^{\circ}\text{C}$ 包被过夜, 用 PBST 清洗 3 次后, 每孔加入 300 μL 5%脱脂奶的 PBS 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 封闭 2 h。同前洗涤后, 取牛结核阳性血清从 1:25 等比稀释至 1:100, 每孔加入 100 μL , 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 2 h。用 PBST 清洗 6 次后加入工作浓度的羊抗牛 IgG, 37 $^{\circ}\text{C}$ 反应 45 min。同前洗涤 6 次, 100 μL /孔加 TMB 进行显色, 用 2 mol/L H_2SO_4 终止, 测量 OD_{450} 值以确定 Mb0950c 的最佳包被浓度和适当的血清稀释度。

使用建立的牛结核抗体 ELISA 检测法与商品化 BOVIGAMTM 试剂盒, 共同检测一批临床样品。

1.8 统计学分析

统计分析采用 Prism V6.01 软件, Student's *t* 检验进行差异分析。

2 结果和分析

2.1 重组质粒的构建及其蛋白的表达与纯化

成功扩增 Mb0950c 目的基因, 并构建了 pET-32a-Mb0950c 载体(图 1-A), 经双酶切和测序鉴定正确。将重组载体热转至 BL21(DE3)中, 并进行诱导表达, 成功获得可溶性表达的 Mb0950c, 随后对蛋白进行纯化, 对纯化后的蛋白进行 SDS-PAGE 和 Western blotting (His 标签单抗检测)分析, 结果如图 1 所示, 成功对该蛋白进行了纯化(图 1-B)。随后又对该蛋白的免疫原性进行鉴定, 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)。

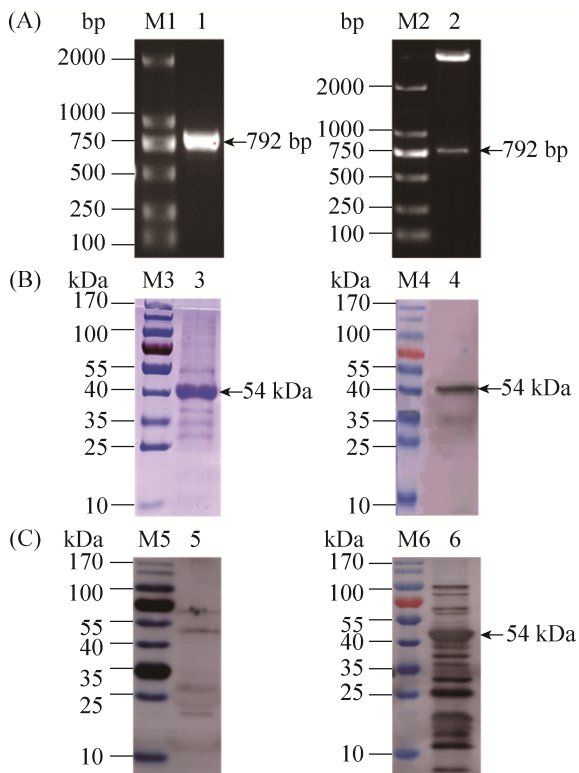


图 1. Mb0950c 蛋白的表达与鉴定

Figure 1. Analysis of recombinant plasmid and Mb0950c protein. A: Analysis of Mb0950c gene PCR product and recombinant plasmid pET32a-Mb0950c. M1, M2: DL2000 DNA marker; lane 1: PCR product of Mb0950c gene; lane 2: pET32a-Mb0950c digested by restriction enzyme. B: SDS-PAGE and Western blotting analysis of Mb0950c protein. M3, M4: Protein molecular weight marker; lane 3, 4: Affinity purification of Mb0950c protein. C: Western blotting analysis of the reactivity of Mb0950c with sera from healthy rabbits (lane 5) or rabbits immunized with *M. tuberculosis* (lane 6). M5, M6: Protein molecular weight marker; lane 5, 6: Purified product of Mb0950c protein.

2.2 T 细胞表面分子 CD69 的表达变化分析

通过流式细胞术对各组小鼠脾脏的 $CD4^+$ 、 $CD8^+$ T 细胞表面分子 CD69 的表达水平进行检测, 结果显示, Mb0950c 蛋白+DDA 佐剂免疫组相较于仅 DDA 佐剂免疫组小鼠脾脏 $CD4^+$ T 细胞和 $CD8^+$ T 细胞表面 CD69 分子的表达水平均显著升高, 显示 T 细胞被活化(图 2)。

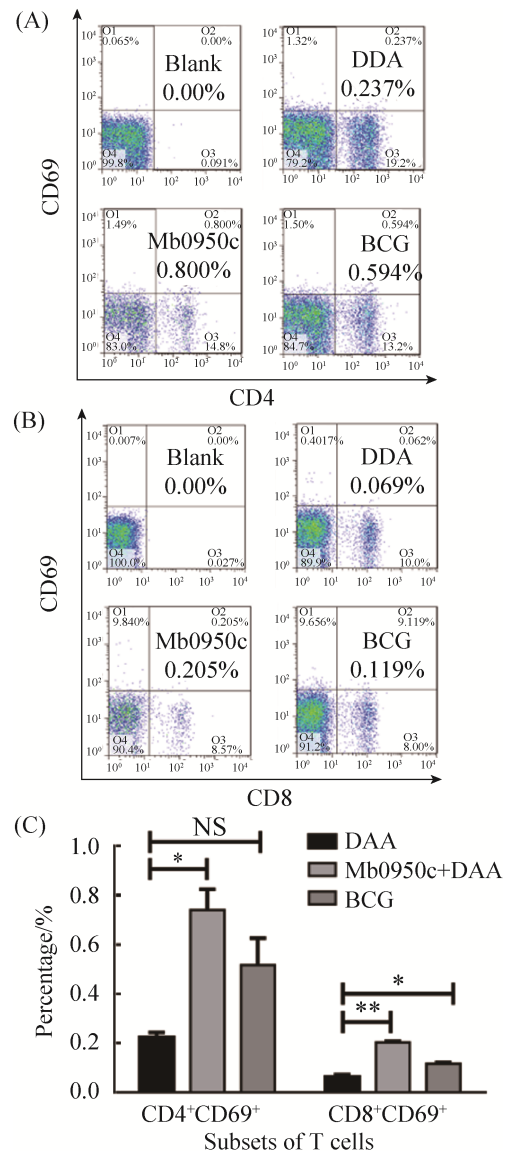


图 2. 蛋白免疫后小鼠脾脏 $CD4^+$ 和 $CD8^+$ T 细胞表面 CD69 的表达

Figure 2. Expression of CD69 on the surface of spleen $CD4^+$ and $CD8^+$ T cell in mice injected with Mb0950c. Single-cell suspension of spleen obtained from mice was surface stained with anti-mouse PE-CD4 and anti-mouse FITC-CD69 (A) or anti-mouse APC-CD8 α and anti-mouse FITC-CD69 (B), respectively. Then cells were analyzed by flow cytometry and as shown in the figure, the abscissa represents the fluorescence intensity of CD4 or CD8, while the ordinate represents the fluorescence intensity of CD69. According to the negative control, $CD4^+$ CD69⁺ and $CD8^+$ CD69⁺ T cells were gated. (C) Frequencies of $CD4^+$ CD69⁺ and $CD8^+$ CD69⁺ T cells were compared using the Student's *t*-test. *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$; Mean \pm SD is represented by error bar.

2.3 小鼠血清中特异性 IFN- γ 、IL-4 含量测定

采用夹心 ELISA 的方法测定各刺激组的细胞培养上清中的 IFN- γ 和 IL-4 含量。结果显示, Mb0950c 蛋白+DDA 佐剂免疫组与仅 DDA 佐剂免疫组相比, Mb0950c 蛋白刺激诱导的 IFN- γ 和 IL-4 显著增加(图 3), 此外这两免疫组中, 未刺激组均检测到微量 IFN- γ , ConA 刺激剂组检测到高水平的 IFN- γ 。表明 Mb0950c 蛋白可显著诱导 Th1 和

Th2 型细胞因子产生。

2.4 小鼠血清中特异性抗体效价

采用间接 ELISA 检测小鼠血清中 Mb0950c 的抗体及其亚型, 结果显示 Mb0950c 免疫组小鼠血清中抗体效价为 $1:1.024 \times 10^6$, BCG 免疫组小鼠血清中抗体效价为 $1:4 \times 10^4$ 。同时抗体的亚型测定结果表明, Mb0950c 主要诱导 IgG1 的抗体产生(图 4)。

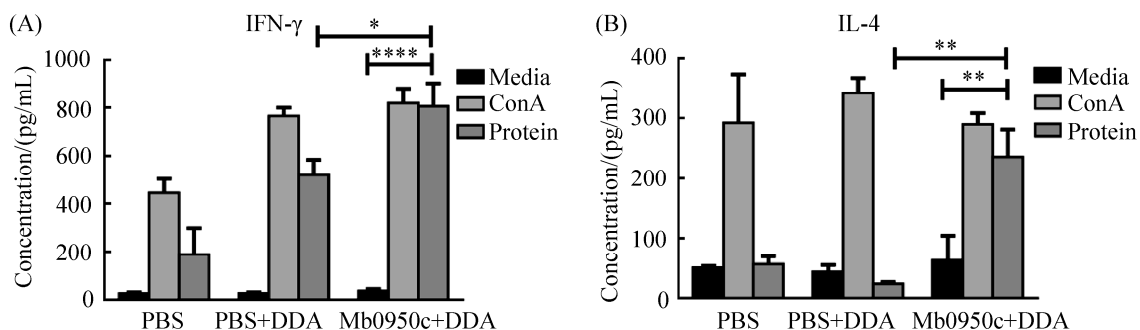


图 3. 夹心 ELISA 检测脾脏细胞培养上清中 IFN- γ 和 IL-4 含量

Figure 3. Detection the quantitation of IFN- γ (A) and IL-4 (B) in cultured supernate of spleen cells. Spleen cells were obtained from mice injected with Mb0950c and stimulated with ConA and Mb0950c protein. After 48 hours later, the supernatant was collected and the quantitation of IFN- γ and IL-4 were measured by sandwich ELISA. *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$; ****: $P < 0.0001$; Mean \pm SD is represented by error bar.

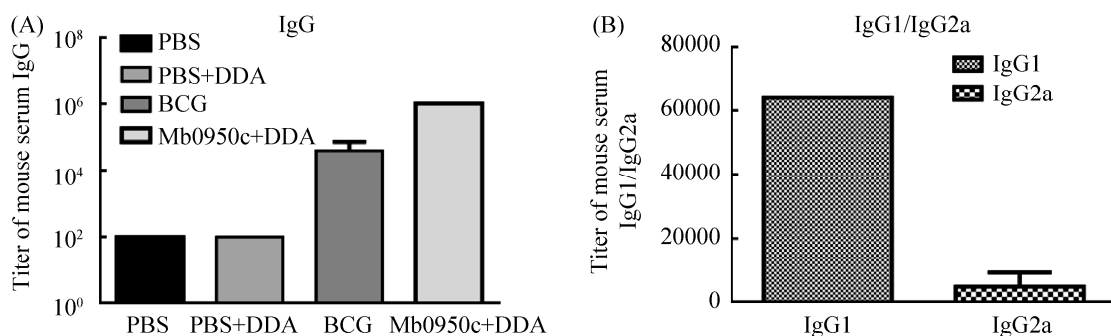


图 4. 小鼠血清抗体效价及亚型的检测

Figure 4. Detection of IgG and IgG subtype serum antibody against Mb0950c protein. The IgG, IgG1 and IgG2a were used as the detection antibody to measure the antibody titer of Mb0950c in mouse serum. The titer of mouse serum IgG (A) and IgG1/IgG2a (B) was calculated. Mean \pm SD is represented by error bar.

2.5 间接 ELISA 方法建立及评价

确定间接 ELISA 方法的抗原包被浓度为 2 $\mu\text{g/mL}$ ，样品稀释倍数为 25 倍。共检测 96 头阴性牛血浆来确定该方法的判定值，临界值为 0.237。随后对 192 头牛的临床血样进行检测，其中 96 头牛被皮试试验和 IFN- γ 试验均检测为阳性，另外 96 头牛被皮试试验和 IFN- γ 试验均检测为阴性。结果显示共检测出 47 份阳性样品的 OD_{450} 值大于 0.237，92 份阴性样品的 OD_{450} 值小于 0.237，计算得出该方法的特异性为 95.8%(92/96)、敏感性为 49.0%(47/96)。间接 ELISA 检测结果与皮试试验/BOVIGAMTM IFN- γ 检测试剂盒共同检测结果相比(表 1)，两者阳性符合率为 65.7%，阴性符合率为 97.9%，总符合率 72.4%。

3 讨论

由于检测方法的诸多缺陷，加上许多野生储存宿主的存在^[12]，牛结核病的控制和根除异常复杂。美国、英国、加拿大等发达国家依靠其强大经济实力，通过“检疫-扑杀”策略较好地控制了牛结核病的传播^[13]。然而随着现代科技的迅速发展，国际交往日益频繁，牛结核病的防控仍面临着巨大的挑战^[14]。

牛结核病检测的金标准仍是细菌的分离培养，但耗时长、难分离、检出率低等缺陷无法满足当前疫情的需要^[15]。结核菌素皮试试验是最早

被用来诊断牛结核病的方法，也是目前世界上应用最广泛的检测牛结核病的标准方法。该方法价格低廉，操作简便，但 PPD 批次差异、注射剂量、主观性误差等均会影响检测结果^[16]。体外 γ -干扰素释放试验可以作为 TST 的理想补充试验，有研究表明当结核菌素皮试试验与体外 γ -干扰素释放试验相结合时，95.2%的结核阳性牛能够被检出^[17]。结核菌素皮试试验与体外 γ -干扰素释放试验均是基于细胞介导的免疫反应，能够检测到感染早期的动物，但仍有高达 20%的假阴性存在^[18]。配合使用牛结核病的血清学检测可以检测出当前方法漏检的动物，提高检出率。目前已有较多抗原用于牛结核病的血清学检测，如对 MPB70、MPT63 和 MPB83 抗体的检测可以高特异性区别牛分枝杆菌和禽分枝杆菌的感染^[19]。牛分枝杆菌 Mb0950c 蛋白是一种分泌蛋白，并与分枝杆菌细胞壁分枝菌酸的合成相关。已有研究报道显示该基因在 H37Rv 中同源基因的转座失活，会上调宿主炎症因子的分泌^[20]。此外有研究报道显示，该基因无法在北京家族中正常表达，因而成为鉴别北京家族的靶标^[21]。而北京家族菌株正是感染牛的最主要的人结核分枝杆菌^[22]，因此将基于 Mb0950c 的间接 ELISA 法作为一种辅助检测手段，有利于牛结核病和人结核病的防控。

关于结核分枝杆菌中 Mb0950c 同源基因的表达已有报道^[23]，但仅获得了包涵体表达的蛋白。在本研究中我们尝试了多种原核表达质粒和蛋白

表 1. 牛血样的检测结果(192 份)

Table 1. Results of detection for serum samples

Results comparison	Tuberculin skin test/ BOVIGAM TM test kit		Positive coincidence rate	Negative coincidence rate	Total coincidence rate
	Positive	Negative			
Positive	47	4	65.7%	97.9%	72.4%
Negative	49	92			

诱导条件,最终成功获得可溶性的 Mb0950c 蛋白。同时在诱导后重组菌的缓冲液中加入溶菌酶和蛋白酶抑制剂再进行超声破碎以获得大量的可溶性蛋白。随后对该蛋白进行了纯化和透析,并加入保护剂防止蛋白的析出。使用 H37Rv 的兔多克隆抗体成功检测到了 Mb0950c,表明表达的蛋白具有良好的免疫原性。但由于免疫源是灭活的结核分枝杆菌,成分复杂,且多抗相比较于单抗能够识别多个抗原表位而具有高敏感性,这些因素导致当使用兔多抗血清来检测原核表达的 Mb0950c 蛋白时,Western blotting 结果中杂条带多。随后本研究在小鼠模型中评价了该蛋白的免疫学特性。考虑到完全弗氏佐剂中含有分枝杆菌成分,可能对牛分枝杆菌 Mb0950c 蛋白的免疫学特性分析有影响,因此我们选择了 DDA 作为佐剂。最终结果显示 Mb0950c 蛋白能够活化 T 细胞并诱导机体 IFN- γ 和 IL-4 的产生,此外该蛋白能够诱导机体产生大量的抗体,主要表现为 IgG1 型。Mb0950c 基因在 BCG 中也存在,相应的我们在 BCG 免疫组也检测到了 Mb0950c 的抗体产生,这为我们后续基于 Mb0950c 建立牛分枝杆菌间接 ELISA 方法提供依据。我们使用棋盘法确定了最佳包被浓度和最佳样品稀释度,建立了间接 ELISA 检测法。该方法与其他血清学检测方法相似,敏感性较低^[24],仅能达到 49.0%,但特异性较高,为 95.8%。与皮试试验/BOVIGAMTM IFN- γ 检测试剂盒共检测结果相比,两者的总符合率达到 72.4%。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^[25],且个体差异较大。但血清学检测仍然是众多检测手段中重要的一部分,将它与常规的检测手段联用,更利于诊断和控制牛分枝杆菌的感染^[26]。

本文成功表达了可溶性的 Mb0950c 蛋白,并

对其免疫学特性进行了分析。初步建立了基于该蛋白的牛结核病间接 ELISA 方法,为进一步的深入研究奠定了基础。

参 考 文 献

- [1] Li X, Xu ZZ, Shan F, Xia AH, Meng C, Shen YC, Chen YP, Nan WL, Chen X, Jiao XA. Development and evaluation of gamma-interferon sandwich ELISA kit in herds infected with *Mycobacterium bovis*. *Chinese Journal of Zoonoses*, 2017, 33(12): 1060–1065. (in Chinese)
李昕, 徐正中, 单法, 夏爱鸿, 孟闯, 沈也驰, 陈义平, 南文龙, 陈祥, 焦新安. 牛结核 γ -干扰素夹心 ELISA 检测试剂盒的研制与评价. *中国人兽共患病学报*, 2017, 33(12): 1060–1065.
- [2] Krajewska-Wędzina M, Weiner M, Anusz K, Augustynowicz-Kopeć E, Lipiec M, Szulowski K. Human as a potential vector of bovine tuberculosis in cattle. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, 2019, 26(3): 396–399.
- [3] World Health Organization. Global tuberculosis report 2019. Geneva: World Health Organization Report, 2019.
- [4] Xin T, Jia H, Ding JB, Li PJ, Yang HJ, Hou SH, Yuan WF, Guo XY, Wang HC, Liang QQ, Li M, Wang B, Zhu HF. Assessment of a protein cocktail-based skin test for bovine tuberculosis in a double-blind field test in cattle. *Clinical and Vaccine Immunology*, 2013, 20(4): 482–490.
- [5] Meng C, Wan T, Xu ZZ, Liu Y, Shan F, Sun L, Yin YL, Chen X, Jiao XA. Screening putative antigens as stimulators in the *Mycobacterium bovis* interferon-gamma release assay for cattle. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 2015, 168(1/2): 111–117.
- [6] Wood PR, Jones SL. BOVIGAMTM: an *in vitro* cellular diagnostic test for bovine tuberculosis. *Tuberculosis*, 2001, 81(1/2): 147–155.
- [7] de la Rua-Domenech R, Goodchild AT, Vordermeier HM, Hewinson RG, Christiansen KH, Clifton-Hadley RS. Ante mortem diagnosis of tuberculosis in cattle: a review of the tuberculin tests, γ -interferon assay and other ancillary diagnostic techniques. *Research in Veterinary Science*, 2006, 81(2): 190–210.
- [8] Gao XT, Jia H, Hou SH, Yang HJ, Guo XY, Yuan WF, Jiang YT, Zhu HF, Xin T, Ding JB. Preliminary evaluation of eleven *Mycobacterium bovis* antigens in the diagnostic methods of bovine tuberculosis. *China Animal Husbandry & Veterinary Medicine*, 2018, 45(8): 2282–2292. (in Chinese)
高新桃, 贾红, 侯绍华, 杨宏军, 郭晓宇, 袁维峰, 姜一瞳,

- 朱鸿飞, 鑫婷, 丁家波. 11种牛分枝杆菌抗原在牛结核病诊断中的初步评价. *中国畜牧兽医*, 2018, 45(8): 2282–2292.
- [9] Kakhki RK, Neshani A, Sankian M, Ghazvini K, Hooshyar A, Sayadi M. The short-chain dehydrogenases/reductases (SDR) gene: a new specific target for rapid detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex by modified comparative genomic analysis. *Infection, Genetics and Evolution*, 2019, 70: 158–164.
- [10] Xu ZZ, Hu T, Liu Z, Shen XY, Liu JY, Yin YL, Sun L, Chen X, Jiao XA. Expression and immunogenicity of Ag85A protein of *Mycobacterium tuberculosis*. *Acta Microbiologica Sinica*, 2016, 56(5): 804–813. (in Chinese)
徐正中, 胡婷, 刘泽, 沈轩云, 刘佳莹, 殷月兰, 孙林, 陈祥, 焦新安. 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.
- [11] 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.
- [12] Palmer MV. *Mycobacterium bovis*: characteristics of wildlife reservoir hosts. *Transboundary and Emerging Diseases*, 2013, 60(S1): 1–13.
- [13] Chen X, Xu ZZ, Shi ZH, Fang F, Jiang SJ, Meng C, Huang GC, Shan FL, Jiao XA. Comparison of gamma-interferon assay and tuberculin skin test for detection of bovine tuberculosis. *Chinese Journal of Zoonoses*, 2011, 27(2): 97–100. (in Chinese)
陈祥, 徐正中, 时振华, 范峰, 蒋锁俊, 孟闯, 黄根成, 单锋丽, 焦新安. γ -干扰素试验和皮试变态反应对检测奶牛结核病的比较. *中国人兽共患病学报*, 2011, 27(2): 97–100.
- [14] Sattah MV, Aye SS, Azen C, Kort JJ, Escalante P, Jones BE. Interferon-gamma release assay T-SPOT[®]. TB and HIV-related tuberculosis. *International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*, 2012, 16(2): 281–282.
- [15] 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.
- [16] Schiller I, Vordermeier HM, Waters WR, Whelan AO, Coad M, Gormley E, Buddle BM, Palmer M, Thacker T, McNair J, Welsh M, Hewinson RG, Oesch B. Bovine tuberculosis: effect of the tuberculin skin test on *in vitro* interferon gamma responses. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 2010, 136(1/2): 1–11.
- [17] Gormley E, Doyle MB, Fitzsimons T, McGill K, Collins JD. Diagnosis of *Mycobacterium bovis* infection in cattle by use of the gamma-interferon (Bovigam[®]) assay. *Veterinary Microbiology*, 2006, 112(2/4): 171–179.
- [18] Palmer MV, Waters WR. Advances in bovine tuberculosis diagnosis and pathogenesis: what policy makers need to know. *Veterinary Microbiology*, 2006, 112(2/4): 181–190.
- [19] Redchuk TA, Korotkevich NV, Kaberniuk AA, Oliinyk ES, Labyntsev AY, Romaniuk SI, Kolibo DV, Busol VA, Komisarenko SV. Statistical analysis of the distribution of the antibody levels to *Mycobacterium bovis* antigens for bovine tuberculosis diagnostics. *Cytology and Genetics*, 2010, 44(5): 280–285.
- [20] Beaulieu AM, Rath P, Imhof M, Siddall ME, Roberts J, Schnappinger D, Nathan CF. Genome-wide screen for *Mycobacterium tuberculosis* genes that regulate host immunity. *PLoS One*, 2010, 5(12): e15120.
- [21] Leung ETY, Zheng L, Wong RYK, Chan EWC, Au TK, Chan RCY, Lui G, Lee N, Ip M. Rapid and simultaneous detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex and Beijing/W genotype in sputum by an optimized DNA extraction protocol and a novel multiplex real-time PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 2011, 49(7): 2509–2515.
- [22] Chen YY, Chao YJ, Deng QT, Liu T, Xiang J, Chen J, Zhou JH, Zhan ZH, Kuang YJ, Cai H, Chen HC, Guo AZ. Potential challenges to the stop TB plan for humans in China; cattle maintain *M. bovis* and *M. tuberculosis*. *Tuberculosis*, 2009, 89(1): 95–100.
- [23] Jiang X, Gao F, Lu CY, Wang HH. Cloning and expression of Rv0927c gene and its role in *Mycobacterium tuberculosis* genotyping. *Chinese Journal of Tuberculosis and Respiratory Diseases*, 2008, 31(6): 465–467.
姜昕, 高峰, 路蝉伊, 王洪海. Rv0927c 基因的克隆表达及其在结核分枝杆菌基因分型中的作用. *中华结核和呼吸杂志*, 2008, 31(6): 465–467.
- [24] Steingart KR, Flores LL, Dendukuri N, Schiller I, Laal S, Ramsay A, Hopewell PC, Pai M. Commercial serological tests for the diagnosis of active pulmonary and extrapulmonary tuberculosis: an updated systematic review and meta-analysis. *PLoS Medicine*, 2011, 8(8): e1001062.
- [25] Peng YC, Zhu XJ, Wang ZJ, Chen YY, Guo AZ. Advance on immunological diagnosis techniques of bovine tuberculosis in cattle. *Chinese Journal of Veterinary Science*, 2018, 38(6): 1250–1254, 1259. (in Chinese)
彭永崇, 朱小洁, 王子健, 陈颖钰, 郭爱珍. 牛结核病免疫学诊断研究进展. *中国兽医学报*, 2018, 38(6): 1250–1254, 1259.

[26] Coad M, Downs SH, Durr PA, Clifton-Hadley RS, Hewinson RG, Vordermeier HM, Whelan AO. Blood-based assays to detect

Mycobacterium bovis-infected cattle missed by tuberculin skin testing. *Veterinary Record*, 2008, 162(12): 382–384.

Immunogenicity evaluation of *Mycobacterium bovis* Mb0950c protein and establishment of serological diagnostic method for bovine tuberculosis detection

Aihong Xia¹, Xin Li¹, Li Feng¹, Juanjuan Quan², Zhihong Yao², Mengjun Lu¹, Zhengzhong Xu^{1, 2*}, Xiang Chen^{1, 2*}, Xin'an Jiao^{1, 2}

¹ 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

² Key Laboratory of Prevention and Control of Biological Hazard Factors (Animal Origin) for Agrifood Safety and Quality, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Yangzhou University, Yangzhou 225009, Jiangsu Province, China

Abstract: [Objective] The purpose of this study is to express Mb0950c protein by prokaryotic expression system, and to evaluate its immunogenicity by mouse model, further to establish a serological indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for clinical detection of bovine tuberculosis. [Methods] The prokaryotic expression plasmid of pET32a-Mb0950c was constructed and transformed into BL21(DE3) to induce protein expression. The immunogenicity of the protein in mice was analyzed by flow cytometry (FCM) and ELISA. And then an indirect ELISA method based on Mb0950c was established and used in clinical trial. [Results] SDS-PAGE and Western blotting showed that Mb0950c protein was successfully obtained and had good immunogenicity. The analysis of FCM showed that Mb0950c protein upregulated the expression of CD69 on the surface of T cells. The results of ELISA showed that the protein could induce the secretion of IFN- γ and IL-4, at the same time, it could induce the body to secrete specific antibodies, and it mainly belongs to IgG1. Total 192 serum samples were detected by indirect ELISA based on Mb0950c and the results showed that the positive coincidence rate, negative coincidence rate and total coincidence rate were 65.7%, 97.9% and 72.4% respectively. [Conclusion] Mb0950c protein is expressed in the prokaryotic expression system and it induces Th1-and Th2-type immune response in mouse models. Based on this protein, an indirect ELISA method for serological detection of bovine tuberculosis has been established.

Keywords: *Mycobacterium bovis*, Mb0950c protein, immunological characteristics, serological detection

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the National Key Research and Development Program of China (2018YFD0500500, 2017YFD0500300), by the Science and Technology Program of Jiangsu (BK20201432, BK20171285), by the Science and Technology Innovation Cultivation Program of Yangzhou University (2019CXJ158) and by the Six Talent Peaks Project, and Priority Academic Program Development of Jiangsu Higher Education Institutions

*Corresponding authors. E-mail: Zhengzhong Xu, zzxu@yzu.edu.cn; Xiang Chen, chenxiang@yzu.edu.cn

Received: 20 February 2020; Revised: 5 August 2020