

DOI:10.13350/j.cjpb.230905

• 论著 •

# 减毒沙门菌介导牛结核杆菌多表位疫苗的构建 及免疫反应性研究\*

任君<sup>1</sup>, 扈立伟<sup>1</sup>, 卢宝平<sup>1</sup>, 杜荣起<sup>1</sup>, 刘青<sup>1</sup>, 朱凡杰<sup>1</sup>, 包利霞<sup>1</sup>, 顾天越<sup>1</sup>, 张东超<sup>1, \*\*</sup>, 金天明<sup>2, \*\*</sup>

(1. 天津农学院天津市畜禽病原检测与基因工程疫苗工程技术中心, 天津 300384;

2. 天津市农业科学院天津市畜禽分子育种与生物技术重点实验室)

**【摘要】** 目的 构建以减毒沙门菌为载体的牛结核杆菌多表位疫苗, 免疫小鼠后观察其刺激产生的免疫反应。方法 运用 BepiPred 和 IEBD 对牛结核杆菌 Ag85B、MPT63 和 HSP65 的 B、T 细胞表位进行预测分析, 设计新的表位基因肽段 AMH, 通过 ProtParam、VaxiJen、ProtScale、TMHMM、SOPMA 和 SWISS-MODEL 在线软件对 AMH 的理化性质、免疫原性、亲水性、跨膜区和空间结构进行分析, 利用 C-IMMSIM 进行免疫模拟。将 AMH、Ag85B、MPT63 和 HSP65 基因序列用 T2A 和 P2A 连接后构建入真核表达载体 pEGFP-N1。将重组质粒导入减毒沙门菌 LH430, 对重组减毒沙门菌进行 PCR 检测。取重组减毒沙门菌以每只  $2 \times 10^7$  cfu/200  $\mu$ L 的剂量灌胃免疫小鼠 2 次, 检测末次免疫后小鼠血清抗体和细胞因子水平及脾淋巴细胞中的 T 细胞亚群百分率。结果 共筛选出 17 条表位肽段, 构建的表位蛋白序列 AMH 分子质量为 30.213 39 ku。生物信息学预测 AMH 结构稳定, 亲水性高, 无跨膜区, 二级结构松散易与抗体结合。免疫模拟显示 AMH 可引起 B 细胞和 TH 细胞免疫反应, 刺激抗体 IgM、IgG 和细胞因子 IFN- $\gamma$ 、IL-2 水平升高。重组质粒经双酶切得到 4 713 bp 和 3 133 bp 两条目的片段, PCR 扩增的目的基因片段大小与预期相符, 且重组减毒沙门菌经 PCR 扩增获得 3 133 bp 的片段。与 PBS 组和空载减毒沙门菌组相比, 小鼠经重组减毒沙门菌加强免疫后血清 IgG 水平显著升高(均  $P < 0.01$ ), 细胞因子 IFN- $\gamma$ 、IL-4 和 IL-10 水平显著升高(均  $P < 0.05$ ), 脾脏 CD4<sup>+</sup> T 淋巴细胞占比和 CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> 值均显著升高(均  $P < 0.05$ )。结论 重组减毒沙门菌能激发小鼠的体液免疫和细胞免疫反应, 为牛结核病新型疫苗的研制奠定了基础。

**【关键词】** 牛结核病疫苗; 多表位疫苗; 免疫模拟; 减毒沙门菌; 免疫反应

**【中图分类号】** R378.91

**【文献标识码】** A

**【文章编号】** 1673-5234(2023)09-1017-06

[Journal of Pathogen Biology. 2023 Sep;18(9):1017-1022.]

## Construction and immune response of attenuated *Salmonella*-mediated bovine tuberculosis multi-epitope vaccine

REN Jun<sup>1</sup>, HU Liwei<sup>1</sup>, LU Baoping<sup>1</sup>, DU Rongqi<sup>1</sup>, LIU Qing<sup>1</sup>, ZHU Fanjie<sup>1</sup>, BAO Lixia<sup>1</sup>, GU Tianyue<sup>1</sup>, ZHANG Dongchao<sup>1, 2</sup>, JIN Tianming<sup>2</sup> (1. Tianjin Agricultural University, Tianjin Livestock and Poultry Pathogen Detection and Genetic Engineering Vaccine Engineering Technology Center, Tianjin 300384, China; 2. Tianjin Academy of Agricultural Sciences, Tianjin Key Laboratory of Animal Molecular Breeding and Biotechnology) \*\*\*

**【Abstract】** **Objective** To construct a multi-epitope vaccine of bovine tuberculosis with attenuated *Salmonella* as the carrier, and to observe the immune response in mice after immunization. **Methods** BepiPred and IEBD were used to predict and analyze the B and T cell epitopes of bovine tuberculosis Ag85B, MPT63 and HSP65, and a new epitope gene peptide AMH was designed. The physical and chemical properties, immunogenicity, hydrophilicity, transmembrane region and spatial structure of AMH were analyzed by ProtParam, VaxiJen, ProtScale, TMHMM, SOPMA and SWISS-MODEL online software. C-IMMSIM was used for immune simulation. The AMH, Ag85B, MPT63 and HSP65 gene sequences were ligated with T2A and P2A to construct the eukaryotic expression vector pEGFP-N1. The recombinant plasmid was introduced into attenuated *Salmonella* LH430, and the recombinant attenuated *Salmonella* was detected by PCR. The mice were immunized twice with recombinant attenuated *Salmonella* at a dose of  $2 \times 10^7$  cfu/200  $\mu$ L per mouse. The levels of serum antibodies and cytokines and the percentage of T cell subsets in spleen lymphocytes were detected after the last immunization. **Results** A total of 17 epitope peptides were screened, and the molecular weight of the constructed

\* **【基金项目】** 天津市教委科技计划项目(No. 2019KJ032)。

\*\* **【通讯作者】** 金天明, E-mail: jtm680@163.com; 张东超, E-mail: zdc2991@163.com

**【作者简介】** 任君(1997-), 女, 山西大同人, 在读硕士研究生, 主要从事人兽共患病分子病原学与免疫学研究。E-mail: renjun0921@163.com

epitope protein sequence AMH was 30, 213 39 ku. Bioinformatics predicts that AMH has stable structure, high hydrophilicity, no transmembrane region, loose secondary structure and easy binding to antibodies. Immunological simulation showed that AMH could induce immune responses of B cells and TH cells, and increase the levels of IgM, IgG and cytokines IFN- $\gamma$  and IL-2. The recombinant plasmid was double-digested to obtain two target fragments of 4 713 bp and 3 133 bp. The size of the target gene fragment amplified by PCR was consistent with the expectation, and the recombinant attenuated *Salmonella* was amplified by PCR to obtain a 3 133 bp fragment. Compared with PBS group and empty attenuated *Salmonella* group, the serum IgG level of mice after booster immunization with recombinant attenuated *Salmonella* was significantly increased (all  $P < 0.01$ ), the levels of cytokines IFN- $\gamma$ , IL-4 and IL-10 were significantly increased (all  $P < 0.05$ ), and the proportion of spleen CD4<sup>+</sup> T lymphocytes and CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> values were significantly increased (all  $P < 0.05$ ). **Conclusion** The recombinant attenuated *Salmonella* can stimulate the humoral and cellular immune responses in mice, which lays a foundation for the development of a new vaccine for bovine tuberculosis.

**【Key words】** bovine tuberculosis vaccine; multi-epitope vaccine; immune simulation; attenuated *Salmonella*; immune response

牛结核病(Bovine tuberculosis)主要是由牛结核分枝杆菌(*Mycobacterium bovis*)引起的一种慢性传染病,每年全球约有5 000万头牛患病,给畜牧业造成严重的经济损失<sup>[1-2]</sup>。卡介苗(BCG)是利用牛结核杆菌制成的一种减毒活疫苗,主要用于预防人类结核病<sup>[3]</sup>。因动物接种BCG后PPD检测呈阳性的几率极高,给区疫苗接种和自然感染的区分带来难度,且自然环境中BCG在动物体内提供的保护作用不稳定,故目前尚不能通过接种BCG预防牛结核病<sup>[4]</sup>,亟需研发一种更安全有效的防控牛结核病的新型疫苗。

牛结核杆菌候选抗原的筛选是牛结核病新型疫苗研发的关键。目前,已发现多个牛结核杆菌功能蛋白可作为候选疫苗抗原。其中,Ag85复合物可诱导Th1型免疫应答,在调控牛结核分枝杆菌胞内感染过程中具有重要作用<sup>[5]</sup>。MPT63是牛结核分枝杆菌分泌的与毒力相关的小分子质量蛋白,可刺激T淋巴细胞产生免疫反应,促进IFN- $\gamma$ 的产生<sup>[6]</sup>。HSP65是牛分枝杆菌中免疫应答的主要靶点,也是结核分枝杆菌黏附巨噬细胞的关键成分<sup>[7]</sup>。

本研究选取牛结核分枝杆菌的3种特异性抗原基因Ag85b、MPT63和HSP65,利用生物信息学技术设计表位蛋白AMH,并对其理化性质、蛋白特性、免疫模拟进行分析,将4个蛋白借助柔性肽连接构建至真核表达载体pEGFP-N1,借助减毒沙门菌为中间体递送至动物体。重组减毒沙门菌免疫动物后先激活机体的免疫系统,将外源质粒递送至机体,使表位蛋白AMH诱导机体的细胞和体液免疫,同时3种特异性抗原基因发挥特异性免疫作用,进而实现多基因的联合免疫效应,籍此实现对牛结核病的协同免疫效果。

## 材料与amp;方法

### 1 材料

**1.1 载体、菌株和实验动物** 载体pEGFP-N1和减

毒沙门菌LH430由天津农学院兽医学实验室保存;6~8周龄雄性SPF级昆明小鼠30只[许可证编号:SCXK(京)2019-0010],购于北京斯贝福生物科技有限公司。

**1.2 主要试剂** 限制性内切酶EcoR I和Hand III购自赛默飞世尔科技(中国)有限公司;质粒提取试剂盒购自天根生化科技(北京)有限公司;ELISA试剂盒购自江苏酶免实业有限公司;FITC标记小鼠抗CD3<sup>+</sup>IgG,APC标记小鼠抗CD4<sup>+</sup>IgG和PE标记小鼠抗CD8<sup>+</sup>IgG抗体均购自美国Biosciences Pharmingen公司。

### 2 方法

**2.1 抗原表位的筛选** 从NCBI中获得牛结核杆菌Ag85b(GenBank:ADD50055.1)、MPT63(GenBank:ACD61708.1)和HSP65(GenBank:AHH32489.1)蛋白序列,利用生物信息学软件BepiPred、IEBD筛选抗原的B细胞表位,利用IEBD筛选抗原的CTL表位和THL表位。将筛选的肽段按照其在原有蛋白中的先后顺序连接,相同类型肽段用GPGPG连接,不同类型肽段用GPLS连接,构建表位蛋白序列,命名为AMH。

#### 2.2 AMH生物信息学分析

**2.2.1 理化性质、免疫原性、亲水性和跨膜区预测** 利用ExPasy中的ProtParam工具分析表位蛋白AMH的理化性质;利用VaxiJen分析表位蛋白AMH的免疫原性;利用ExPasy中的ProtScale工具分析表位蛋白AMH的亲水性;利用TMHMM分析表位蛋白AMH的跨膜区。

**2.2.2 AMH空间结构分析及免疫模拟** 利用Sopma分析AMH的 $\alpha$ 螺旋、 $\beta$ 折叠、 $\beta$ 转角和无规则卷曲等二级结构;利用SWISS-MODEL分析AMH的三级结构;利用C-IMMSIM模拟AMH的动态免疫反应,预测AMH诱导免疫细胞产生特异性抗体和细胞因子

的能力。

**2.3 重组质粒及重组减毒沙门菌的构建** 由生工生物工程(上海)股份有限公司合成 AMH、Ag85b、MPT63 和 HSP65 的基因序列,利用 T2A 和 P2A 将上述基因串联,使用限制性内切酶 EcoR I 和 Hand III 连接至真核表达载体 pEGFP-N1,通过 PCR 和双酶切鉴定阳性重组菌。根据构建的目的基因序列设计特异性引物。F: 5'-GAATTCATGGGCTATTTTGT-TACCGATGCG-3'; R: 5'-ATAAGCTTGGTGATG-GTGATGATGGACGAC-3'(加粗碱基为酶切位点)。PCR 反应程序:95 °C 预变性 5 min;95 °C 30 s,58 °C 30 s,72 °C 2 min,共 35 个循环;72 °C 延伸 10 min。取 PCR 产物进行 1%琼脂凝胶电泳检测并测序。

扩大培养阳性菌并提取质粒,通过热激方法转化至减毒沙门菌感受态中。将转化菌涂布于含 5%卡那霉素抗性的固体培养基上培养 24 h,挑取单个菌落进行 PCR 验证。阳性菌即为阳性重组减毒沙门菌。

**2.4 动物免疫** 将 30 只雄性昆明小鼠随机分为重组减毒沙门菌组(CZ 组)、空载减毒沙门菌组(KZ 组)和 PBS 组,每组 10 只。免疫前 30 min 先用 7.5%的 NaHCO<sub>3</sub> 给小鼠灌胃中和胃酸,100 μL/只。然后,CZ 组小鼠灌胃免疫沙门菌剂量为 2 × 10<sup>7</sup> cfu/200 μL/只,KZ 组灌胃相同剂量的空载减毒沙门菌,PBS 组灌胃等体积的 PBS。初次免疫后 28 d 加强免疫一次。

**2.5 血清抗体和细胞因子测定** 加强免疫后 14 d 采集小鼠血液,分离血清,采用 ELISA 方法按试剂盒说明检测牛结核杆菌特异性 IgG 和细胞因子 IFN-γ、IL-4 和 IL-10,使用分光光度计检测各孔的 A<sub>450</sub> 值,计算血清特异性 IgG 抗体水平和细胞因子浓度。

**2.6 T 淋巴细胞检测** 加强免疫后 14 d 处死小鼠,在无菌环境中取脾脏,制成单个脾淋巴细胞悬液。分别取 1 × 10<sup>6</sup> 个淋巴细胞于离心管中,按照试剂说明书分别加入 FITC anti-mouse CD3、APC anti-mouse CD4 和 PE anti-mouse CD8 特异性抗体,避光 4 °C 孵育 30 min。染色后离心,弃上清,用 1 mL PBS 重悬,过 200 目筛网。将细胞悬液移入 5 mL 流式管,上机检测并收集数据。

**2.7 统计学分析** 利用 SPSS 21.0 软件进行统计学分析。计量资料用均数 ± 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,多组间比较采用单因素方差分析,两组间比较采用 *t* 检验,并利用 GraphPad Prism 9.3 绘制图表。*P* < 0.05 表示差异有统计学意义。

## 结 果

### 1 抗原表位的筛选与连接

利用表位筛选工具对 Ag85b、MPT63 和 HSP65

的 B 细胞、CTL 和 THL 表位进行分析,将筛选的优势肽段(表 1)用短肽 GPGPG 和 GPLS 连接构成新的表位蛋白 AMH,其蛋白氨基酸序列为:GYFVT-DAERQEAVLGPGPGGISAGDASIGPLSEGLRNVAAGANPLGLGPGPGIDTKEQIAATAGISAGPLSESNTFGLQLGPLSLKSSTAVIPGYVPVAGQVWEAGPGPGPDTISGATIPQGEQSTGKGPLSKIYFDVTGPSPTIVAGPLSSSTAVIPGYGPGPGSQFNARTADGINYGPLSAGGYKAADMWGPSSDPAWERNDGPGPGFYSDWYSPACGKAGCGPLSKFQDAYNAAGGHNAVGPGPGPQQFIYAGSLALLDGPLSAVFNFPPNGTHGPGPGNTPAFEWYYGPGPGSAMILAA YH。

表 1 表位预测的肽段位置  
Table 1 Peptide position predicted by epitopes

特异性蛋白 Specific protein	B 细胞表位 B cell epitope	CTL 表位 CTL epitope	THL 表位 THL epitope
Ag85b	118-133,211-233	94-103,171-180,292-311	181-196,279-294
MPT63	59-79,115-133	61-70,94-107	132-147
HSP65	87-96,139-153	118-127	40-55,76-91

## 2 AMH 的生物信息学分析

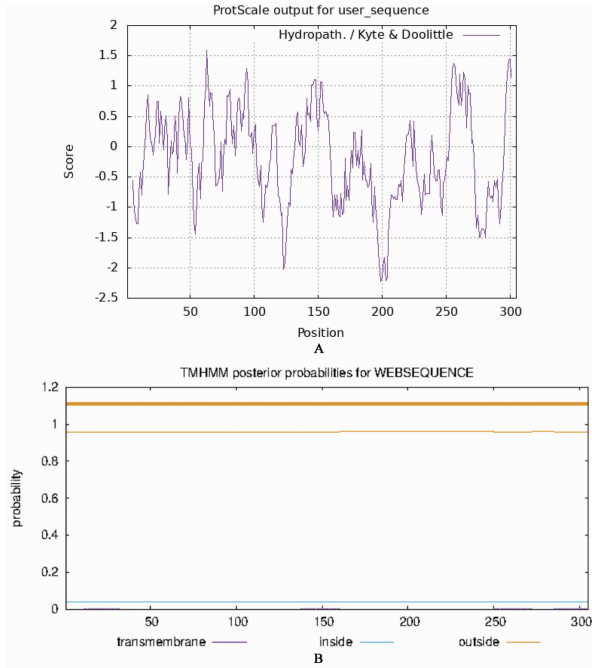
**2.1 理化特性** 生物信息学方法预测 AMH 的分子质量为 30.213 39 ku,理论等电点为 4.54,不稳定指数为 26.78,脂肪族指数为 26.46,亲水性指数为-0.187;预测 AMH 的保护性抗原总体分值为 0.8071。亲水性分析显示,AMH 的氨基酸中亲水性最高的是第 195 位的丝氨酸(Ser),分值为-2.222;疏水性最高的是第 59 位的异亮氨酸(Ile),分值为 1.589。AMH 的平均亲水性分值为-0.198(图 1A)。预测 AMH 的跨膜螺旋数为 0,即无跨膜区(图 1B)。表明 AMH 为非跨膜蛋白,具有免疫原性、亲水性和稳定性。

**2.2 空间结构** 二级结构分析显示,AMH 中 α 螺旋占 11.80%,β 折叠占 8.85%,无规则卷曲占 59.02%,延伸链占 20.33%(图 2A)。AMH 模型显示,Ag85b、MPT63、HSP 家族的晶体结构与 AMH 的重合度分别为 64.81%、92.98% 和 21.74%(图 2B)。表明 AMH 的整体结构松散,有利于抗原抗体的结合,与 MPT63 的三级结构重合度最高,可能发挥的免疫效果也最接近。

## 3 AMH 的免疫模拟

用 C-IMMSIM 模拟 AMH 刺激免疫细胞后所引起特异性抗体和细胞因子的变化。结果显示,AMH 刺激机体后处于抗原递呈状态下的 B 细胞数量快速上升,活化状态下的 B 细胞数量随后也开始上升(图 3A);活化和休眠状态下的 CD4<sup>+</sup> T 细胞在 AMH 的刺

激下数量同时上升(图 3B);CD8<sup>+</sup> T 细胞中活化状态的细胞数量上升,而休眠状态的细胞数量下降(图 3C);AMH 刺激 B 细胞后主要引起 IgM 和 IgG 的大量分泌,在第 14d 达到峰值水平(图 3D);AMH 诱导 T 细胞主要产生 IFN- $\gamma$  和 IL-2(图 3E)。表明 AMH 具有引发体液免疫和细胞免疫的能力。

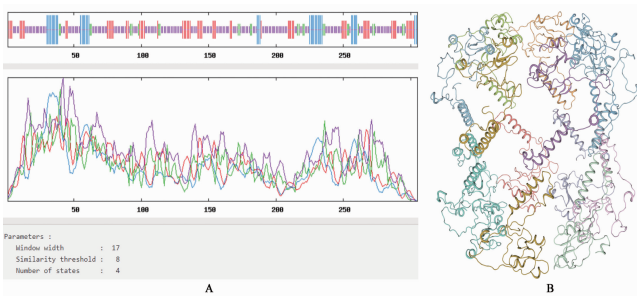


A 亲水性分析 B 跨膜结构分析

图 1 AMH 蛋白特性分析

A Hydrophilicity analysis B Transmembrane structure analysis

Fig. 1 Analysis of AMH protein characteristics



A 二维结构预测 B 三维结构预测

图 2 AMH 的空间结构预测

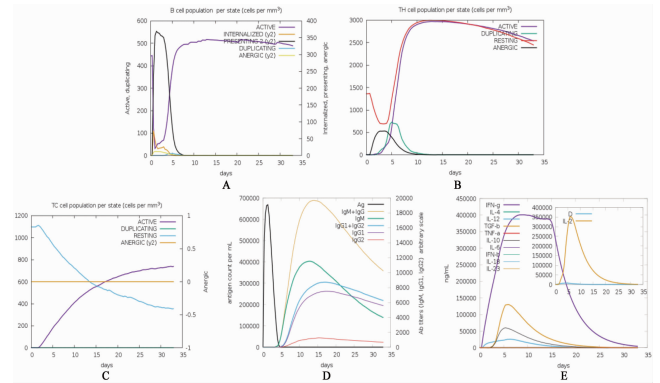
A Two-dimensional structure prediction B Three-dimensional structure prediction

Fig. 2 Spatial structure prediction of AMH

#### 4 重组质粒和重组减毒沙门菌的验证

将 AMH、Ag85b、MPT63、HSP65 基因片段连接后构建至真核表达载体 pEGFP-N1,用限制性内切酶 EcoR I 和 Hand III 对构建的重组质粒双酶切验证,获得大小为 4 733 bp 和 3 313 bp 的两条预期片段(图 4A);取重组质粒进行 PCR 验证,扩增片段为 3 313 bp (图 4B);取重组沙门菌菌液进行 PCR,扩增片段为

3 313 bp(图 4C)。重组质粒和重组减毒沙门菌构建正确。

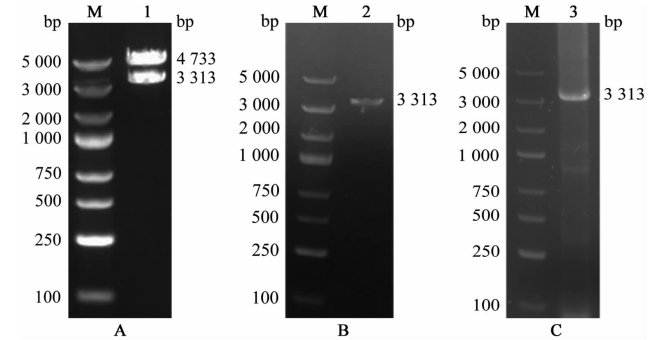


A 抗原暴露后不同状态下的 B 细胞数量 B 抗原暴露后不同状态下的 TH 细胞数量 C 抗原暴露后不同状态下的 TC 细胞数量 D 抗原暴露后产生的抗体 E 抗原暴露后产生的细胞因子。

图 3 AMH 的免疫模拟结果

A The number of B lymphocytes in different states after antigen exposure B The number of TH cells in different states after antigen exposure C The number of TC cells in different states after antigen exposure D Antibodies produced after antigen exposure E Cytokines produced after antigen exposure

Fig. 3 Immune simulation results of AMH



A 重组质粒双酶切鉴定 B 重组质粒 PCR 鉴定 C 重组减毒沙门菌菌液 PCR 鉴定 M DNA 标准 DL5000 1 重组质粒双酶切产物 2 重组质粒 PCR 产物 3 重组减毒沙门菌 PCR 产物

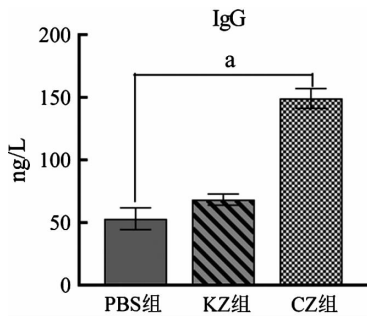
图 4 重组质粒和重组减毒沙门菌验证结果

A Results of double digestion of recombinant plasmid B Recombinant plasmid PCR results C PCR results of recombinant attenuated *Salmonella* M DNA standard DL5000 1 Recombinant plasmid double digestion products 2 Recombinant plasmid PCR product 3 Recombinant attenuated *Salmonella* PCR products

Fig. 4 Verification results of recombinant plasmid and recombinant attenuated *Salmonella*

#### 5 免疫小鼠血清特异 IgG 抗体水平

采用 ELISA 检测小鼠血清特异 IgG 抗体水平,结果如图 5。加强免疫后第 14 d,CZ 组小鼠血清特异性抗体 IgG 为 (149.15 $\pm$ 7.59)ng/L,与 PBS 组(59.23 $\pm$ 2.51)ng/L 和 KZ 组(68.45 $\pm$ 4.51)ng/L 比较差异均有统计学意义( $t$  值分别为 18.861 和 15.312,均  $P < 0.01$ );KZ 组与 PBS 组比较特异 IgG 水平差异无统计学意义( $t = 3.019, P > 0.05$ )。



注: a 组间比较,  $P < 0.01$ 。

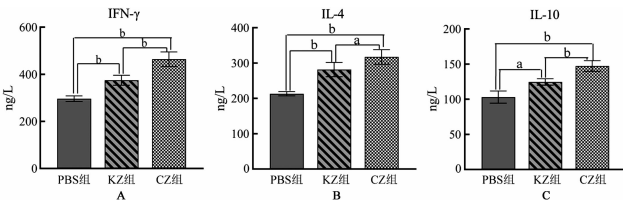
图5 免疫小鼠血清中牛结核杆菌特异性 IgG 浓度

Notes: a group comparison,  $P < 0.05$ 。

Fig. 5 The concentration of *M. bovis* specific IgG in mouse serum

## 6 免疫小鼠血清细胞因子水平变化

加强免疫后第 14 d, ELISA 检测 PBS 组小鼠血清中 IFN- $\gamma$ 、IL-4 和 IL-10 分别为  $(296.33 \pm 11.85)$  ng/L、 $(213.02 \pm 6.08)$  ng/L 和  $(97.33 \pm 10.41)$  ng/L, KZ 组分别为  $(374.67 \pm 21.01)$  ng/L、 $(281.67 \pm 20.21)$  ng/L 和  $(127.67 \pm 13.05)$  ng/L, CZ 组分别为  $(463.96 \pm 30.74)$  ng/L、 $(317.30 \pm 20.54)$  ng/L 和  $(159.63 \pm 14.38)$  ng/L。CZ 组 3 种细胞因子含量与 PBS 组比较差异均有统计学意义 ( $t$  值分别为 8.813、8.434、6.077, 均  $P < 0.01$ ), 与 KZ 组比较差异均有统计学意义 ( $t$  值分别为 4.154、2.142、2.979, 均  $P < 0.05$ ); KZ 组小鼠血清中的 3 种细胞因子含量与 PBS 组比较差异均有统计学意义 ( $t$  值分别为 5.626、5.636、3.147, 均  $P < 0.05$ ) (图 6)。



A 小鼠血清 IFN- $\gamma$  浓度 B 小鼠血清 IL-4 浓度 C 小鼠血清 IL-10 浓度。

注: 组间比较, a  $P < 0.05$ ; b  $P < 0.01$ 。

图6 小鼠血清细胞因子浓度

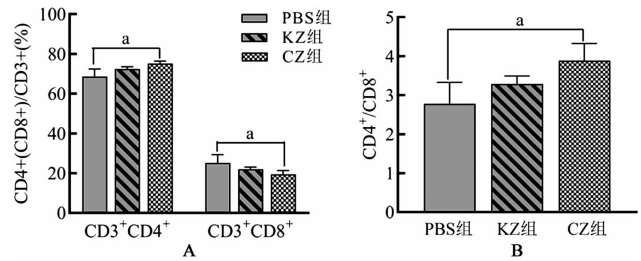
A Serum IFN- $\gamma$  concentration in mice B Serum IL-4 concentration in mice C Serum IL-10 concentration in mice. Notes: group comparison, a  $P < 0.05$ ; b  $P < 0.01$ 。

Fig. 6 Serum cytokine concentration in mice

## 7 脾淋巴细胞分型

流式细胞术检测 T 淋巴细胞分型, CZ 组小鼠脾脏 CD4<sup>+</sup> T 淋巴细胞占  $(75.17 \pm 1.19)\%$ , 与 PBS 组  $(68.63 \pm 3.78)\%$  比较差异有统计学意义 ( $t = 2.851$ ,  $P < 0.05$ ); CD8<sup>+</sup> T 淋巴细胞占  $(19.47 \pm 1.85)\%$ , 与 PBS 组  $(25.23 \pm 4.10)\%$  比较差异有统计学意义 ( $t = 2.218$ ,  $P < 0.05$ ) (图 7A); CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> 值  $(3.89 \pm 0.44)$ , 与 PBS 组  $(2.78 \pm 0.55)$  比较差异有统计学意

义 ( $t = 2.739$ ,  $P < 0.05$ ) (图 7B)。KZ 组小鼠脾脏 CD4<sup>+</sup> 和 CD8<sup>+</sup> T 淋巴细胞占比分别为  $(72.43 \pm 1.08)\%$  和  $(22.07 \pm 1.06)\%$ , CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> 值为  $3.29 \pm 0.20$ , 与 PBS 组比较差异均无统计学意义 ( $t$  值分别为 1.672、1.295、1.506, 均  $P > 0.05$ ) (图 7)。



A CD4<sup>+</sup> 和 CD8<sup>+</sup> T 淋巴细胞在 CD3<sup>+</sup> T 淋巴细胞中的占比 B CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> 值 注: a 组间比较,  $P < 0.05$ 。

图7 小鼠脾 T 淋巴细胞中相关亚群占比及 CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> 比值

A The proportion of CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T lymphocytes in CD3<sup>+</sup> T lymphocytes B CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> ratio Notes: a group comparison,  $P < 0.05$ 。

Fig. 7 Proportion of related subsets in mouse spleen T lymphocytes

## 讨论

表位 (Epitope) 本质是一种特殊的化学基团, 这种化学基团是抗原分子中决定抗原特异性的重要部件, 可被免疫细胞识别引发免疫反应<sup>[8]</sup>。表位主要包括 B 细胞表位和 T 细胞表位, 在结构上可分为线性片段或空间构象性结构<sup>[9]</sup>。B 细胞表位是抗原表面的已知区域, 可与产生的抗体结合, 使其成为适应性免疫系统的中心。T 细胞表位可与 MHC 配体结合以触发 T 细胞免疫反应<sup>[10]</sup>。BepiPred 是一个针对 B 细胞表位筛选的服务器, 采用随机森林算法, 从抗体、抗原和蛋白质结构等方面进行 B 细胞表位筛选<sup>[11]</sup>。IEBD 数据库包含大量实验推导的表位数据以及各类表位预测工具, 应用各种算法可计算出表位的保守性、群体覆盖率和其他相关分析变量<sup>[12]</sup>。为确保所选的表位具有足够的抗原性以引发免疫反应, 本研究同时利用这两个服务器对 3 种抗原的优势表位进行筛选, 并且为了放大表位蛋白的免疫效果, 使用柔性短肽连接同类表位肽段, 刚性短肽连接非同类表位肽段, 以此方式降低表位之间的相互影响。

近年来, 随着神经网络的快速发展, 之前基于能量模型和采样程序的计算方法逐渐被替代<sup>[13]</sup>。当前的预测方法结合已知氨基酸序列、蛋白质数据库中同源物模板和蛋白质进化记录将粗略预测的蛋白结构进行细化, 提高了蛋白结构预测的准确度<sup>[14]</sup>。研究表明, 无规则卷曲和  $\alpha$ -螺旋是抗原蛋白中的重要结构, 在蛋白合成过程中这两种结构可以自然折叠, 被机体产生的抗体识别, 进而引发免疫反应<sup>[15]</sup>。本研究利用在线软件分析表位蛋白 AMH 的二级结构中无规则卷曲占比

高达 59.02%，整体结构松散，有利于抗原抗体结合。在牛结核杆菌感染的预防过程中，有效的 T 细胞反应是必不可少的，T 细胞一旦受到刺激就会分泌相关细胞因子，以杀伤或清除病原菌<sup>[16]</sup>。为评估构建的表位蛋白 AMH 激发的免疫反应效果，本研究模拟了 B 细胞和 T 细胞参与的免疫预测，结果表明 AMH 可刺激 B 细胞和辅助性 T 细胞反应，并促使 IFN- $\gamma$  和 IL-2 水平上升，提示 AMH 具备预防牛结核杆菌的能力，也为免疫小鼠的脾脏 CD4<sup>+</sup> T 淋巴细胞、血清抗体水平和细胞因子水平升高提供了佐证。

2A 肽是一种具有自剪切功能的肽段，一般由 18~25 个氨基酸组成，其自剪切功能的实现主要基于其可通过核糖体跳跃将自身的 C-端自动裂解，N-端则被 3C/3CD 蛋白酶裂解<sup>[17]</sup>。研究发现，2A 肽用于多基因表达时具有剪切效率高且上、下游蛋白均可高效表达的特点。目前常用的 2A 肽主要有 F2A、E2A、T2A 和 P2A<sup>[18]</sup>。本研究选用 T2A 和 P2A 连接 AMH 和牛结核杆菌的 3 种抗原，期望实现多基因共表达，从而发挥联合免疫作用。

借助减毒沙门菌口服免疫方式递送重组质粒，不仅对小鼠的应激作用弱，而且减毒沙门菌可通过小鼠肠道中 M 细胞引发机体的体液免疫和细胞免疫<sup>[19]</sup>。本研究构建的携带牛结核杆菌 Ag85b、MPT63、HSP65 及其表位基因的重组减毒沙门菌灌胃免疫小鼠后，诱导小鼠产生了高水平的 IgG 及细胞因子 IFN- $\gamma$ 、IL-4 和 IL-10，与 Hall 等<sup>[20]</sup>研制的可表达结核杆菌融合抗原 Ag85b-ESAT6 重组沙门菌免疫小鼠的结果相似。用重组减毒沙门菌免疫后的小鼠脾淋巴细胞中 CD4<sup>+</sup> T 细胞比例和 CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> 值上升，表明该疫苗可引发机体较强的细胞免疫，而牛结核杆菌为一种胞内寄生菌，普遍认可细胞免疫是机体抵抗牛结核病的主要免疫机制<sup>[21]</sup>，因此该疫苗有望成为预防牛结核病的候选疫苗。

#### 【参考文献】

- [1] Srinivasan S, Conlan AJK, Easterling LA, et al. A meta-analysis of the effect of Bacillus Calmette-Guerin vaccination against bovine tuberculosis: is perfect the enemy of good? [J]. Front Vet Sci, 2021, 8: 637580.
- [2] 李瑞乾, 宋阿北, 魏硕彤, 等. 牛结核病的诊断与疫苗研发现状 [J]. 动物医学进展, 2021, 42(12): 116-121.
- [3] Lange C, Aaby P, Behr MA, et al. 100 years of *Mycobacterium bovis* bacille Calmette-Guerin [J]. Lancet Infect Dis, 2022, 22(1): e2-12.
- [4] Milian-suazo F, Gonzalez-ruiz S, Contreras-magallanes YG, et al. Vaccination strategies in a potential use of the vaccine against bovine tuberculosis in infected herds [J]. Animals (Basel), 2022, 12(23): 3377.
- [5] Huygen K. The Immunodominant T-cell epitopes of the mycolyl-

transferases of the antigen 85 complex of *Mycobacterium tuberculosis* [J]. Front Immunol, 2014, 5: 321.

- [6] Ghosh R, Mukherjee M, Chattopadhyay K, et al. Unusual optical resolution of all four tryptophan residues in MPT63 protein by phosphorescence spectroscopy: assignment and significance [J]. J Phys Chem B, 2012, 116(41): 12489-12500.
- [7] Shiryaev SA, Cieplak P, Aleshin AE, et al. Matrix metalloproteinase proteolysis of the mycobacterial HSP65 protein as a potential source of immunogenic peptides in human tuberculosis [J]. FEBS J, 2011, 278(18): 3277-3286.
- [8] Ong E, He Y, Yang Z. Epitope promiscuity and population coverage of *Mycobacterium tuberculosis* protein antigens in current subunit vaccines under development [J]. Infect Genet Evol, 2020, 80: 104186.
- [9] 宋娜娜, 付玉荣, 伊正君. 结核分枝杆菌 Mce3R 蛋白的生物信息学分析 [J]. 中国病原生物学杂志, 2022, 17(5): 550-553, 573.
- [10] Schaap-Johansen AL, Vujovic M, Borch A, et al. T cell epitope prediction and its application to immunotherapy [J]. Front Immunol, 2021, 12: 712488.
- [11] Jespersen MC, Peters B, Nielsen M, et al. BepiPred-2.0: improving sequence-based B-cell epitope prediction using conformational epitopes [J]. Nucleic Acids Res, 2017, 45 (W1): W24-W29.
- [12] Fleri W, Paul S, Dhanda SK, et al. The immune epitope database and analysis resource in epitope discovery and synthetic vaccine design [J]. Front Immunol, 2017, 8: 278.
- [13] Pearce R, Zhang Y. Toward the solution of the protein structure prediction problem [J]. J Biol Chem, 2021, 297(1): 100870.
- [14] Bryant P. Deep learning for protein complex structure prediction [J]. Curr Opin Struct Biol, 2023, 79: 102529.
- [15] Corradin G, Villard V, Kajava AV. Protein structure based strategies for antigen discovery and vaccine development against malaria and other pathogens [J]. Endocr Metab Immune Disord Drug Targets, 2007, 7(4): 259-265.
- [16] Vordermeier HM, Jones GJ, Buddle BM, et al. Bovine tuberculosis in cattle: Vaccines, DIVA tests, and host biomarker discovery [J]. Annu Rev Anim Biosci, 2016, 4: 87-109.
- [17] 许学林, 杨波, 荆焕松, 等. 双表达去势 DNA 疫苗的构建及其稳定性研究 [J]. 中国畜牧兽医, 2021, 48(5): 1745-1754.
- [18] 王海蓉, 李泽典, 任园园, 等. 基于 FMDV 2A 肽的新城疫病毒共表达系统的构建及验证 [J]. 中国兽医科学, 2023, 53(2): 198-206.
- [19] Juarez-Rodriguez MD, Yang J, Kader R, et al. Live attenuated *Salmonella* vaccines displaying regulated delayed lysis and delayed antigen synthesis to confer protection against *Mycobacterium tuberculosis* [J]. Infect Immun, 2012, 80(2): 815-831.
- [20] Hall L J, Clare S, Pickard D, et al. Characterisation of a live *Salmonella* vaccine stably expressing the *Mycobacterium tuberculosis* Ag85B-ESAT6 fusion protein [J]. Vaccine, 2009, 27(49): 6894-6904.
- [21] Cassidy JP. The pathogenesis and pathology of bovine tuberculosis with insights from studies of tuberculosis in humans and laboratory animal models [J]. Vet Microbiol, 2006, 112(2-4): 151-161.

【收稿日期】 2023-04-28 【修回日期】 2023-07-13