

卢宝平, 扈立伟, 任君, 等. 牛布氏杆菌病和分枝杆菌病二联表位疫苗的构建及其免疫效果评价 [J]. 畜牧与兽医, 2024, 56 (2): 69-75.

LU B P, HU L W, REN J, et al. Construction and immunological evaluation of bovine brucellosis and mycobacteriosis bivalent epitope vaccine [J]. Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2024, 56 (2): 69-75.

牛布氏杆菌病和分枝杆菌病二联表位疫苗的构建及其免疫效果评价

卢宝平¹, 扈立伟¹, 任君¹, 杜荣起¹, 顾天越¹, 包利霞¹, 刘青¹,
朱凡杰¹, 张东超^{1,2*}, 金天明^{2,3*}

(1. 天津农学院/天津市农业动物繁育与健康养殖重点实验室, 天津 300392;

2. 天津农学院动物科学与动物医学学院/天津市畜禽病原检测与基因工程疫苗工程技术中心, 天津 300392;

3. 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, 天津 300192)

摘要: 为研发一种更安全、有效的防控牛布氏杆菌病和分枝杆菌病的疫苗, 运用在线软件 ABCPerd 和 IEBD 对牛布氏杆菌外膜蛋白 (Omp25) 和牛分枝杆菌抗原 85A (Ag85A) 的 B、T 细胞表位进行预测分析, 设计新的表位基因肽段 New I 和 New II, 并通过 SOPMA 和 VaxiJen 在线软件对 New I 和 New II 的二级结构与抗原性进行分析。将 New I、Omp25、New II 和 Ag85A 基因序列依次用自剪切肽 T2A、P2A、E2A 进行连接, 获得串联基因并命名为 COE, 将 COE 基因构建至真核表达载体 GV658, 获得重组质粒 GV658-COE; 将上述重组质粒转染至 HEK293 细胞, 利用细胞计数 (CCK-8) 试验评估 GV658-COE 对细胞的安全性, 通过免疫印迹分析目的蛋白的表达情况; 将重组质粒以 400 $\mu\text{g}/\text{只}$ 的剂量免疫大鼠, 检测在第 3 次免疫后的血清抗体及大鼠脾淋巴细胞中的 T 细胞亚群占比情况。结果显示: New I 和 New II 序列二级结构较稳定, 抗原性良好; 重组质粒经 PCR 扩增获得 3 231 bp 大小的目的条带, 与预计相符; 重组质粒对 HEK293 细胞无毒性作用; 重组质粒在 HEK293 细胞中可表达出目的蛋白, 分别在 22.3、17.3、23.9 和 35.6 kDa 处有目的蛋白 New I、Omp25、New II 和 Ag85A 的表达。三免后, 重组质粒免疫大鼠产生的 IgG 水平均高于空载质粒组和 PBS 组; 与 PBS 组相比, 重组质粒免疫大鼠脾脏中 CD4⁺ 和 CD8⁺ T 淋巴细胞百分比均升高。研究表明, 重组质粒 GV658-COE 能有效激发大鼠的体液免疫和细胞免疫反应, 可成为预防牛布氏杆菌病和分枝杆菌病的候选疫苗。

关键词: 牛布氏杆菌病; 牛分枝杆菌病; 表位疫苗; Omp25; Ag85A

中图分类号: S852.6 **文献标志码:** A **文章编号:** 0529-5130(2024)02-0069-07

Construction and immunological evaluation of bovine brucellosis and mycobacteriosis bivalent epitope vaccine

LU Baoping¹, HU Liwei¹, REN Jun¹, DU Rongqi¹, GU Tianyue¹, BAO Lixia¹, LIU Qing¹,
ZHU Fanjie¹, ZHANG Dongchao^{1,2*}, JIN Tianming^{2,3*}

(1. Tianjin Key Laboratory of Agricultural Animal Breeding and Health Breeding, Tianjin Agricultural University, Tianjin 300392, China;

2. College of Animal Science and Veterinary Medicine, Tianjin Agricultural University/Tianjin Engineering Technology Center of Livestock Pathogen Detection and Genetic Engineering Vaccine, Tianjin 300392, China;

3. Tianjin Academy of Agricultural Sciences/Tianjin Key Laboratory of Molecular Breeding and Biotechnology of Livestock and Poultry, Tianjin 300192, China)

Abstract: In order to develop a safer and more effective vaccine against bovine brucellosis and mycobacteriosis, the epitopes of B and T

收稿日期: 2022-12-31; 修回日期: 2023-12-19

基金项目: 天津市自然科学基金重点项目 (12JCZDJC22100); 国家自然科学基金青年基金项目 (32202760); 天津市农委农业科技示范推广项目 (批准文号: 201202110); 天津市兽医生物技术优秀科研创新团队项目 (TD12-5019); 天津市高等学校科技发展基金项目 (20060720); 天津市农业动物繁育与健康养殖重点实验室开放基金课题资助项目 (2020zdkf02)

第一作者: 卢宝平, 男, 硕士研究生

* 通信作者: 金天明, 教授, 博士生导师, 研究方向为兽医生物技术与疫苗, E-mail: jtm680@163.com; 张东超, 讲师, 硕士生导师, 主要从事人兽共患病分子病原学与免疫学研究, E-mail: zdc2991@163.com。

cells of *Brucella* outer membrane protein Omp25 and *Mycobacterium bovis* antigen 85A (Ag85A) were predicted and analyzed using the online software ABCPerd and IEBD, and New epitope gene peptide segments New I and New II were designed. The secondary structure and antigenicity of New I and New II were analyzed by the SOPMA and VaxiJen online software. The gene sequences of New I, Omp25, New II and Ag85A were connected with self-shear peptides T2A, P2A and E2A successively to obtain tandem genes which were named COE. The COE genes were constructed into the eukaryotic expression vector GV658, and the recombinant plasmid GV658-COE was obtained. The recombinant plasmid was transfected into HEK293 cells, the safety of GV658-COE was evaluated by CCK-8 assay, and the expression of the target protein was analyzed by Western blot. Finally, rats were immunized with the recombinant plasmid at 400 $\mu\text{g}/\text{piece}$, and the serum antibodies and the proportion of T cell subsets in the spleen lymphocytes of the rats were detected after the third immunization. The results showed that the secondary structures of New I and New II sequences were stable and had good antigenicity. The target band size of 3 231 bp was obtained by PCR amplification, which was consistent with that of the prediction. The recombinant plasmid had no toxic effect on HEK293 cells. The recombinant plasmid was able to express target proteins in HEK393 cells; and target proteins New I, Omp25, New II and Ag85A are expressed at 22.3, 17.3, 23.9 and 35.6 kDa, respectively. After three rounds of immunization, the IgG levels of brucellosis and mycobacteriosis produced by the recombinant plasmid were higher than those in no-loaded plasmid group and the PBS group. Compared with the PBS group, the percentages of CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes in spleen of the recombinant plasmid immunized rats were increased. The above results indicated that recombinant plasmid GV658-COE effectively stimulated the humoral and cellular immune responses in rats, and was expected to be a candidate vaccine for the prevention of bovine brucellosis and mycobacteriosis.

Keywords: brucellosis; mycobacteriosis; epitope vaccine; Omp25; Ag85A

牛布氏杆菌病 (bovine brucellosis) 在世界范围内广泛流行, 是一种人畜共患传染病^[1]。布氏杆菌生存能力特别强, 能很快适应新的宿主, 可以直接或间接地传播给主要宿主和易感宿主^[2]。牛分枝杆菌病 (bovine mycobacteriosis) 是一种牛的慢性疾病, 常导致生产力下降, 同时可引起重大的公共卫生风险^[3]。目前预防两种疾病的疫苗存在免疫效果不理想和毒力返强风险等, 且市场上尚无牛布氏杆菌病和分枝杆菌病的二联疫苗。因此, 研发一种更安全、有效地防控牛布氏杆菌病和分枝杆菌病的二联疫苗具有实际意义。

布氏杆菌 Omp25 作为一种菌体外膜蛋白, 具有良好的免疫原性, 可诱导动物机体产生特异性抗体。最新研究发现, 布氏杆菌的毒力与 Omp25 有关, 缺失 Omp25 的疫苗菌株在动物模型中毒力减弱, 且提供的免疫保护水平与商品化减毒疫苗的保护效果相似^[4]。分枝杆菌基因组上的 3 个独立基因编码的抗原 85 (Ag85) 复合物是牛分枝杆菌、结核分枝杆菌 (Mtb) 和卡介苗 (BCG) 分泌蛋白, 这些蛋白质是分枝杆菌细胞壁合成所需的转移酶^[5]。Ag85A 作为主要的分枝杆菌分泌蛋白, 在诱导强烈的体液免疫和细胞免疫反应中发挥重要作用^[6]。

表位疫苗是基于已知核苷酸或氨基酸序列, 利用计算机辅助的免疫信息学分析等技术确定和筛选可能的优势表位, 然后人工合成或借助基因工程技术制备含有优势表位的多肽疫苗^[7]。表位疫苗最大的优点是免疫优势表位的聚集, 提高了疫苗的免疫原性, 减少其不良反应。

本研究通过在线生物软件对 Omp25 和 Ag85A 蛋

白进行表位筛选, 通过连接肽对所筛选的表位进行连接, 构建出 2 条具有高免疫原性、副作用较小的新表位基因肽段 New I 和 New II。将 New I、Omp25、New II、Ag85A 依次用自剪切肽 T2A、P2A、E2A 进行连接, 设计出串联基因 COE, 并构建重组质粒 GV658-COE。免疫动物后, 可通过 New I 和 New II 多表位基因肽段激发机体细胞免疫, 并通过布氏杆菌 Omp25 和牛分枝杆菌 Ag85A 特异性抗原激发机体免疫反应, 进而实现多基因的协同免疫效应, 为牛布氏杆菌病和分枝杆菌病的基因疫苗研究提供试验基础和理论支持。

1 材料与方法

1.1 主要试剂及试验动物

限制性内切酶 *Pac I* 和 *EcoR V* 购自赛默飞世尔科技 (中国) 有限公司; Flag/HA/Myc/His 标记小鼠单克隆抗体、辣根过氧化物酶 (HRP) 标记山羊抗小鼠 IgG (H+L) 和 Lipo8000TM 转染试剂购自上海碧云天生物技术有限公司; 无内毒素质粒大提试剂盒购自天根生化科技 (北京) 有限公司; 细胞计数试剂 (CCK-8) 试剂盒购自金克隆北京生物技术有限公司; 异硫氰酸荧光素 (FITC) 标记的大鼠抗 CD3⁺ IgG, 藻胆蛋白 (APC) 标记的大鼠抗 CD4⁺ IgG, 藻红蛋白 (PE) 标记的大鼠抗 CD8⁺ IgG 抗体均购自 biosciences pharmingen 公司; ELISA 试剂盒购自江苏酶免实业有限公司; 6 周龄 SD 大鼠购自北京斯贝福生物科技有限公司 (许可证号: SCXK (京) 2019-0010)。

1.2 目的基因与序列合成

根据 NCBI 数据库中布氏杆菌 Omp25 基因 (Gen-

Bank: AM694369.2) 和牛分枝杆菌 Ag85A 基因 (GenBank: GQ150315.1) 的核苷酸序列, 通过在线软件 ABCPerd 和 IEBD 预测 Omp25 基因的 B 细胞和 T 细胞表位, 将所选取的肽段通过 VaxiJen 软件预测其免疫原性, 同时用 ToxinPred 软件预测是否具有细胞毒性, 最后选取肽段高分、免疫原性好且无细胞毒性肽段的表位作为目标表位^[8]。将上述筛选出来的细胞表位通过 GPGPG/GPLs 连接肽进行连接, 构建出新的肽段 New I。同法预测 Ag85A 基因, 构建出肽段 New II。将 New I、Omp25、New II 和 Ag85A 依次用自剪切肽 T2A、P2A 和 E2A 进行连接, 构建出新的肽段, 将其命名为 COE。根据大鼠表达蛋白质偏好密码子进行基因序列优化, 同时在 4 个氨基酸序列之后分别添加 Flag、HA、Myc 和 His 标签。将 COE 基因构建至真核表达载体 GV658 的 *Pac I* 和 *EcoR V* 酶切位点之间, 最后由上海吉凯生物技术有限公司合成并提供目的质粒、阴性质粒及其甘油菌。

1.3 COE 基因的 PCR 及双酶切鉴定

根据上述构建的 COE 基因序列设计特异性引物, COE-F: 5'-GTGGATCCGAGCTCGGTACCCGCCACGATATCCATCCAGGAGCAGCCCCCGTGCCCGCCCGGTGGAG-3'; COE-R: 5'-ATATTTTATTACCGGTTTAATTAAGTACTGCTGCTGCTGCTGCTGGGCGCCCTGGGGGC-3', 其中加粗碱基为交换配对碱基, 斜体碱基为酶切位点。

将获得的甘油菌接种氨苄抗性培养基, 培养 12 h 后, 利用上述引物进行菌液 PCR, 反应体系为: 12.5 μL 2 \times PCR *Taq* mix Buffer, 1 μL COE-F, 1 μL COE-R, 2 μL 菌液, 8.5 μL ddH₂O。反应程序为: 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 35 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 退火 35 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1 min, 共 30 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 15 min。随后将 PCR 产物利用琼脂凝胶电泳验证。将上述验证正确的阳性菌扩大培养后提取质粒, 并利用限制性内切酶 *Pac I* 和 *EcoR V* 进行双酶切鉴定。

1.4 重组质粒转染 HEK293 细胞

将 HEK293 细胞按照 1×10^5 个/孔加入 6 孔细胞培养板 (含 10% FBS 的 DMEM 培养基) 进行培养, 直到细胞汇合度达到 60%~70%。利用 Lipo8000TM 转染试剂对重组质粒进行转染, 在 48 h 时在显微镜下对转染组进行拍照, 观察重组质粒在 HEK293 细胞中的表达情况, 用 DAPI 试剂对细胞核进行染色, 观察绿色荧光蛋白 (GFP) 在 HEK293 细胞中的表达位置。

1.5 Western blot 验证重组质粒在 HEK293 细胞中的蛋白表达

将成功转染重组质粒的 HEK293 细胞培养 48 h

后, 用 PBS 洗 2 次, 加入裂解液使其充分裂解, 加入 4 \times 蛋白上样缓冲液, 在 100 $^{\circ}\text{C}$ 加热 15 min, 冷却后备用。将上述样品经电泳、转膜、封闭、抗体孵育后, 进行显色, 在 Bio-Rad 凝胶成像仪中拍照保存。

1.6 CCK-8 法评估重组质粒对细胞的安全性

取浓度为 1.0×10^4 个/mL 的 HEK293 细胞进行 96 孔板铺板, 当细胞覆盖率达到 60%~70%时, 将重组质粒和空载质粒分别按照 4 个质量浓度 50、100、200 和 400 ng/ μL 进行转染。分别于 24、48、72 h 加入 CCK-8 溶液 100 μL , 37 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育 0.5 h, 用酶标仪在 450 nm 波长检测每孔的 OD 值, 计算细胞活力。

1.7 动物免疫

将 18 只 SD 大鼠适应性饲喂后, 随机分为 3 组, 第 1 组为重组质粒 GV658-COE 组, 第 2 组为空载质粒 GV658 组, 第 3 组为空白对照 PBS 组, 自由采食和饮水。将重组质粒和空载质粒按照 400 μg /只的剂量进行腿部肌肉注射, 间隔 14 d 加强免疫 1 次, 共免疫 3 次, 免疫前进行尾静脉采血。

1.8 T 淋巴细胞的分型检测

在无菌条件下取大鼠脾脏, 加入 PBS 对脾脏进行研磨, 过 200 目筛网收集脾细胞悬液, 在 4 $^{\circ}\text{C}$ 和 1 500 r/min 条件下离心 5 min, 弃掉上清液, 加 5 mL 红细胞裂解液重悬细胞, 冰上裂解 10 min, 离心, 反复裂解, 直到细胞悬液中无红细胞为止。按照抗体说明书对淋巴细胞进行计数染色, 样品上机, 收集和数据分析数据。

1.9 抗体水平检测

每次采血后, 室温静置 2 h, 2 500 r/min 离心 20 min, 小心吸取血清并做好标记。参照 ELISA 试剂盒说明书进行操作。在酶标包被板上按照 50 μL /孔量分别加入标准品、稀释血清样品, 置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 温育 30 min, 使用洗涤液洗涤 3 次; 每孔加入酶标试剂 50 μL , 再置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 温育 60 min, 洗涤 3 次; 每孔先后加入显色剂 A 和 B (各 50 μL), 轻轻震荡混匀, 37 $^{\circ}\text{C}$ 避光显色 10 min, 每孔加终止液 50 μL ; 混匀后使用分光光度计检测各样品在 450 nm 波长处的 OD 值。

1.10 统计分析

数据采用 SPSS 和 GraphPad Prism 7.0 进行单因素方差分析并绘图。数据用“平均数 \pm 标准差”表示。

2 结果与分析

2.1 抗原表位的筛选及连接

目的基因 Omp25 和 Ag85A 进行表位预测结果见

表 1, 将所选取的肽段通过 GPGPG/GPLS 连接肽进行连接, 同时在 N 端添加 Flag 和 Myc 标签, 构建出的新肽段分别命名为 New I 和 New II。

New I 序列为: AIQEPPVPAPVEVAPQYSWG-PGPGAIQEPPVPAPVEVAPQYSWGPGPGGYGWNKA-KTSTVGSIKPDDGPGPGGYGWNKAKTSTVGSIKPDDG-PGPGGYSWAKKSKDGLGVKQFCGPGPGIKLNNGLDD-ESKFRVGPLSQEQPPVPAPGPGPFQDQIVYGP GPGV-SAALLPFSATAFAADGPGPGVSAALLPFSATAFAADGPG-PGVSALLPFSATAFAAD。

New II 序列为: LVGAVGGTATAGAFSRPGLP-PGPGSSFYSDWYQPACGKAGCQTYKPGPGDAGGYK-ASDMWGPKEPAPWQRNGP GPGKPSDLGGNNLPAKG-PGPGLGATPNTGPAPGPGPLVAVGGTATAGAFSRP-GLPGPGSSFYSDWYQPACGKAGCQTYKPGPGPS-QAMGPTGPLSELPGWLQAGPGGVEYLQVPSPPG-PGSALT LAIYHGP GPGGVDFPDSGTHGPGPGPQQFV-YAGAMSGLLD。

表 1 B 细胞及 T 细胞表位预测结果

蛋白	抗原分类	表位位置	表位序列
Omp25	B 细胞	20~39	AIQEPPVPAPVEVAPQYSW
		49~67	GYGWNKAKTSTVGSIKPDD
	CTL 细胞	92~109	GYSWAKKSKDGLGVKQGF
		137~151	IKLNNGLDDSKFRV
	Th 细胞	22~30	QEPPVPAP
78~85		FQDQIVY	
Ag85A	B 细胞	4~19	VSAALLPFSATAFAAD
		31~50	LVGAVGGTATAGAFSRPGLP
	CTL 细胞	119~139	SSFYSDWYQPACGKAGCQTYK
		198~205	PSQAMGPT
		213~234	DAGGYKASDMWGPKEPAPWQRN
	Th 细胞	258~270	KPSDLGGNNLPAK
		325~335	LGATPNTGPAP
		51~59	VEYLQVPS
		146~154	SELPWLQA
	Th 细胞	174~182	SALT LAIYH
295~305		GVDFPDSGTH	
183~197		PQFVYAGAMSGLLD	

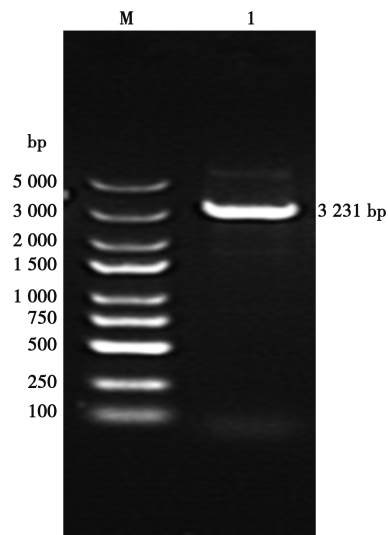
2.2 New I 和 New II 序列的二级结构及其抗原性

New I 和 New II 序列的预测结果分别是: α 螺旋分别为 8.89% 和 3.23%, β 转角分别为 4.44% 和 6.85%, 延伸链分别为 19.56% 和 16.53%, 无规则卷曲分别为 67.1% 和 73.39%。表明该序列中无规则卷曲占比较高, 具有良好的免疫原性; 通过在线软件 VaxiJen 预测 New I 和 New II 序列的抗原性, 评分分别为 0.945 2 和 0.904 7, 分值均大于 0.4, 说明该序

列可能具有较好的抗原性。

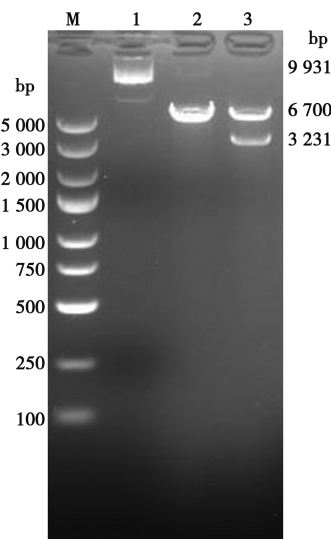
2.3 COE 基因的验证与表达

PCR 和双酶切结果显示, 在 3 231 bp 处出现明亮的目的条带, 与目的基因序列片段大小一致 (图 1、图 2)。经测序和同源性分析, 未发现碱基的缺失、增加及突变, 说明重组质粒构建成功。



M. DNA Marker; 1. COE 基因 PCR 产物。

图 1 PCR 扩增目的基因



M. DNA Marker; 1. GV658-COE 质粒; 2. 线性化 GV658 质粒; 3. GV658-COE 质粒双酶切。

图 2 重组质粒双酶切鉴定

2.4 重组质粒在 HEK293 细胞中的表达

通过荧光显微镜观察, 重组质粒 GV658-COE 在转染 HEK293 细胞 48 h 后, 可观察到清晰的绿色荧光, 且绿色荧光蛋白基本在细胞质中表达 (图 3)。

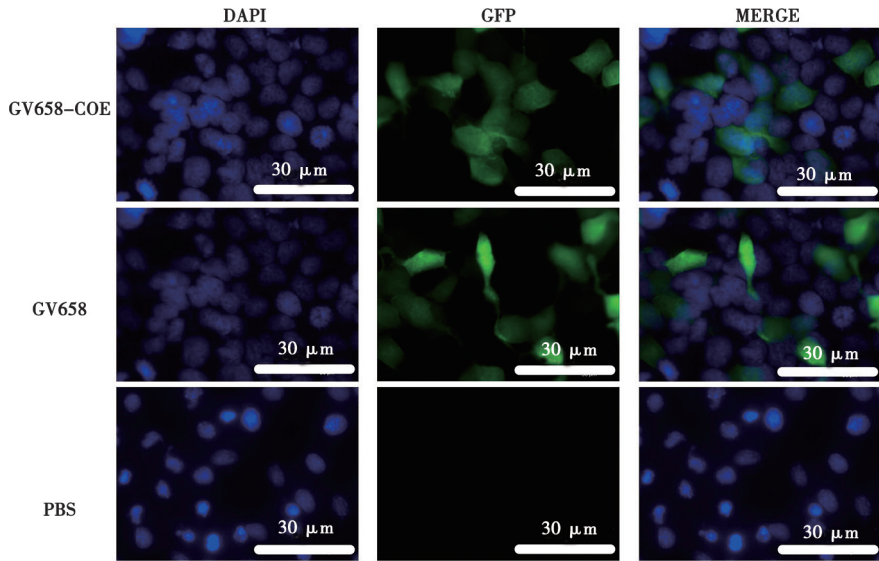


图3 重组质粒转染 HEK293 细胞结果

2.5 Western blot 验证重组质粒在 HEK293 细胞中的蛋白表达

将重组质粒和空载质粒转染 HEK293 细胞 48 h 后，提取细胞总蛋白进行 Western blot 分析，结果如图 4 所示。New I、Omp25、New II 和 Ag85A 蛋白分别在 22.3、17.3、23.9 和 35.6 kDa 处出现特异性条带，空载及未转染的 HEK293 细胞未出现条带，β-actin 内参各组均在 42 kDa 处出现特异性条带。结果表明，融合 Flag、HA、Myc 和 His 标签的 New I、Omp25、New II 和 Ag85A 蛋白在 HEK293 细胞中能够成功表达，且特异性蛋白条带与实际蛋白大小相符。

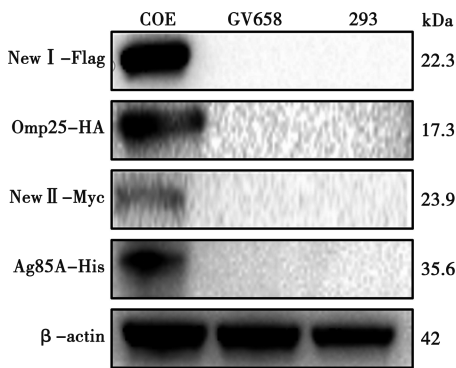
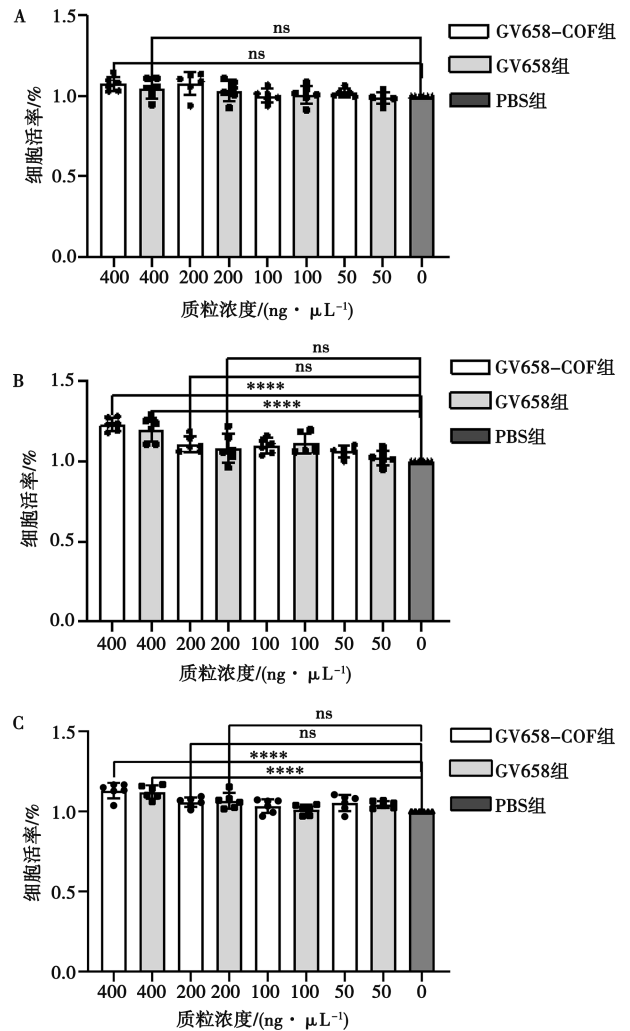


图4 重组质粒在 HEK293 细胞中的蛋白表达

2.6 CCK-8 法评估重组质粒对细胞活性的影响

将重组质粒 GV658-COE、空载质粒 GV658 和 PBS 分别和转染试剂进行混合，按照 50、100、200、400 ng 的剂量转染 HEK293 细胞。结果如图 5 所示，在 24 h 时，细胞存活率分别是 101%、100%、107% 和 107%，最高浓度剂量组与 PBS 组相比差异不显著 ($P>0.05$)，且相同浓度剂量组组间差异不显著 ($P>0.05$)。在 48 和 72 h 时，最高浓度剂量组与 PBS 组

差异极显著 ($P<0.01$)，但相同浓度剂量组组间差异不显著 ($P>0.05$)。



A. 24 h; B. 48 h; C. 72 h;

***表示 $P<0.001$, ns 表示 $P>0.05$ 。下同。

图5 CCK-8 试验结果

2.7 T 淋巴细胞分型

由表 2 可见, 与 PBS 组相比, 三免后重组质粒组大鼠脾脏中 CD4⁺ T 淋巴细胞在 CD3⁺ T 淋巴细胞中的百分比显著升高 ($P < 0.05$), 而 CD8⁺ T 淋巴细胞在 CD3⁺ T 淋巴细胞中的百分比显著降低 ($P < 0.05$); 在 CD3⁺ T 淋巴细胞中 CD4⁺ 与 CD8⁺ T 淋巴细胞的比值无显著性差异 ($P = 0.27$)。而且, 重组质粒组与空载质粒组、空载质粒与 PBS 组之间所有指标均无显著性差异。

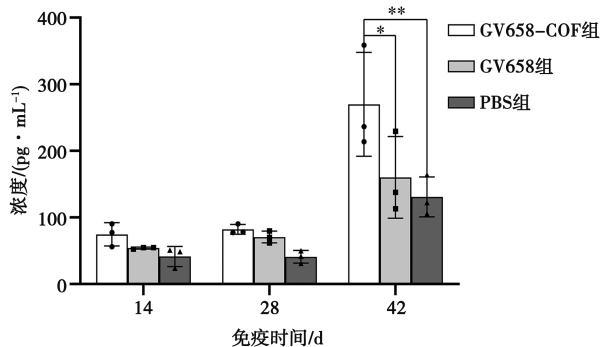
表 2 CD4⁺、CD8⁺ 与 CD3⁺ T 淋巴细胞比值 %

组别	CD4 ⁺ /CD3 ⁺	CD8 ⁺ /CD3 ⁺
GV658-COE	65.77±0.07 ^a	30.30±0.07 ^a
GV658	54.43±0.03 ^{ab}	41.50±0.04 ^{ab}
PBS	50.13±0.06 ^b	46.50±0.06 ^b

注: 同列数据肩标小写字母不同表示差异显著 ($P < 0.05$), 字母相同或无字母表示差异不显著 ($P > 0.05$)。

2.8 ELISA 检测抗体水平

由图 6 可见, 在免疫第 42 天时, 重组质粒免疫大鼠产生的布氏杆菌 IgG 抗体水平极显著高于空白对照 PBS 组 ($P < 0.01$), 显著高于空载质粒 GV658 组 ($P < 0.05$), 且 GV658 组和 PBS 组之间大鼠产生的布氏杆菌 IgG 抗体水平无显著性差异 ($P > 0.05$)。



* 表示 $P < 0.05$, ** 表示 $P < 0.01$ 。下同。

图 6 布氏杆菌 IgG 变化

由图 7 可见, 在免疫第 14 天时, 重组质粒免疫大鼠产生的分枝杆菌 IgG 抗体水平显著高于空载质粒 GV658 组 ($P < 0.05$), 极显著高于空白对照 PBS 组 ($P < 0.01$); 在免疫第 28 和 42 天时, 重组质粒免疫大鼠产生的分枝杆菌 IgG 抗体水平显著高于空白对照 PBS 组 ($P < 0.05$)。而且, GV658 组和 PBS 组之间大鼠产生的分枝杆菌 IgG 抗体水平无显著性差异 ($P > 0.05$)。

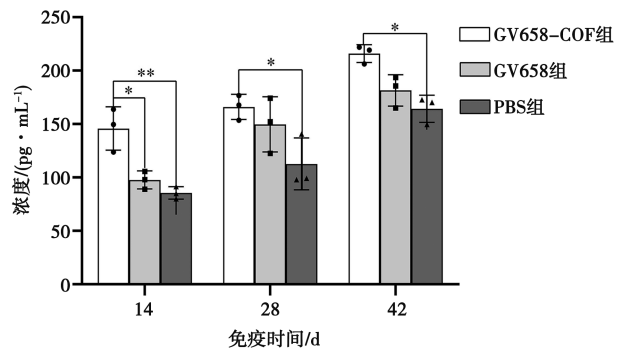


图 7 分枝杆菌 IgG 变化

3 讨论

布氏杆菌可导致妊娠母牛的流产和公牛的睾丸炎^[9], 牛分枝杆菌常常引起牛的肺结核、淋巴结核和肠结核^[10], 两种疾病一直影响着养牛业的发展, 时刻威胁着动物的生命与健康, 接种疫苗是预防这两种疾病最有效的途径。表位疫苗具有免疫力持久、抗原优化、成本低的巨大优势。由于两种细菌都是胞内寄生菌, 因此, 能够激发有效的细胞免疫就显得格外重要。表位疫苗可以达到这样的效果, 研制表位疫苗的关键是找到特异性抗原, 其抗原的结构与其功能具有密切的相关性^[11]。

随着信息技术和分子生物学技术的发展, 为表位疫苗的设计奠定了基础, 使用这些免疫信息学工具可以很好的预测特异性抗原表位^[12]。抗原的正确选择是设计表位疫苗的关键, 选择可以有效刺激机体产生免疫应答的 B 细胞抗原表位和 T 细胞抗原表位是决定表位疫苗是否有效的关键所在^[13-14]。单独表位构成的表位基因疫苗的效果远低于 T、B 细胞表位联合后所构建的疫苗^[15]。本试验采用在线软件 IEBD、BepiPred、ABCpred 对序列进行 T 细胞表位和 B 细胞表位预测, 克服了单一肽表位作为候选表位疫苗的限制性。在相同细胞表位间通过柔性肽 GPGPG 连接, T 细胞表位和 B 细胞表位间用刚性肽 GPLS 连接, 以此形成多抗原表位来启动抗原特异性 T 细胞反应, 引起高效免疫反应^[16]。

2A 肽是来源于病毒的短肽, 一般为 18~25 个氨基酸, 它们通常被称为“自我剪切”肽, 能使一条转录产物产生多种蛋白。2A 肽并不是完全的“自我剪切”, 而是通过使核糖体跳过 2A 元件 C 末端的甘氨酸和脯氨酸肽键的合成而发挥作用, 最终导致 2A 序列末端和下游产物分离。其中, 上游蛋白的 C 端将会添加一些额外的 2A 残基, 而下游蛋白的 N 端将会有额外的脯氨酸。目前有 4 种常用的 2A 肽, 分别

是 P2A、T2A、E2A 和 F2A，来源于 4 种不同的病毒。

本研究通过前期的预测，选取的抗原肽段稳定性良好，抗原性较高，不容易发生变形，适合用来进行表位疫苗设计。两种新肽段的 β 转角和无规则卷曲都占比较高，容易形成抗原表位^[17]。布氏杆菌和分枝杆菌的感染都能促进适应性 Th1 免疫应答，引起干扰素- γ (IFN- γ) 释放，增强抗原向 T 细胞的呈递^[18-19]。细胞免疫是清除细胞内寄生微生物的最为有效的防御反应，T 细胞功能性亚群主要分为 CD4⁺ T 细胞和 CD8⁺ T 细胞，CD8⁺ T 细胞能够识别细胞表面的主要组织相容性复合体 (MHC) I 类抗原复合物，CD4⁺ T 细胞的受体能识别与 MHC II 类结合的外来抗原。本研究构建的二联表位疫苗通过细胞计数试验首先证明了重组质粒具有较好的安全性；免疫大鼠后，CD4⁺ T 淋巴细胞比例显著升高，表明强烈激发了机体的细胞免疫反应；另外，该疫苗在免疫大鼠 14 d 后，体液免疫也表现出较好的效果，明显优于牛分枝杆菌 cfp10-esat6-cfp7 融合基因重组乳酸菌的免疫原性^[20]。值得注意的是，随着免疫次数的增加，血清中的抗体效价呈明显上升趋势，而未到达一个峰值，猜测与免疫的质粒浓度有关，有待进一步验证。本研究所构建的重组二联表位基因疫苗弥补了现有疫苗的部分不足之处，具有一定的免疫保护效果，有望成为牛布氏杆菌病和分枝杆菌病预防的候选疫苗。

参考文献：

- [1] KHURANA S K, SEHRAWAT A, TIWARI R, et al. Bovine brucellosis - a comprehensive review [J]. Vet Q, 2021, 41 (1): 61-88.
- [2] 邱润辉. 布鲁氏菌感染宿主细胞过程中 TBK1 对炎症信号通路的调控机制研究 [D]. 石河子: 石河子大学, 2022.
- [3] REFAYA A K, BHARGAVI G, Mathew N C, et al. A review on bovine tuberculosis in India [J]. Tuberculosis (Edinb), 2020, 122: 101923.
- [4] DORNELES E M, SRIRANGANATHAN N, LAGE A P. Recent advances in *Brucella abortus* vaccines [J]. Vet Res, 2015, 46 (1): 76.
- [5] YUK J M, JO E K. Host immune responses to mycobacterial antigens and their implications for the development of a vaccine to control tuberculosis [J]. Clin Exp Vaccine Res, 2014, 3 (2): 155-167.
- [6] XU Z Z, CHEN X, HU T, et al. Evaluation of immunogenicity and protective efficacy elicited by *Mycobacterium bovis* BCG overexpressing Ag85A protein against *Mycobacterium tuberculosis* aerosol infection [J]. Front Cell Infect Microbiol, 2016, 28 (6): 3.
- [7] JAVADI MAMAGHANI A, FATHOLLAHI A, SPOTIN A, et al. Candidate antigenic epitopes for vaccination and diagnosis strategies of *Toxoplasma gondii* infection: a review [J]. Microb Pathog, 2019, 137: 103788.
- [8] GUPTA S, KAPOOR P, CHAUDHARY K, et al. In silico approach for predicting toxicity of peptides and proteins [J]. PLoS One, 2013, 8 (9): e73957.
- [9] 袁方, 王晓芳, 邵丽玮, 等. 我养国牛业布鲁氏菌病现状及其疫苗研究进展 [J], 黑龙江畜牧兽医, 2023 (7): 37-42.
- [10] 江波. 牛结核病的防控 [J]. 中国乳业, 2021 (7): 63-67.
- [11] SALCEDO S P, MARCHESINI M I, DEGOS C, et al. BtpB, a novel *Brucella* TIR-containing effector protein with immune modulatory functions [J]. Front Cell Infect Microbiol, 2013, 3: 28.
- [12] PARVIZPOU S, RAZMARA J, OMIDI Y. Breast cancer vaccination comes to age: impacts of bioinformatics [J]. Bioimpacts, 2018, 8 (3): 223-235.
- [13] DALSASS M, BROZZI A, MEDINI D, et al. Comparison of open-source reverse vaccinology programs for bacterial vaccine antigen discovery [J]. Front Immunol, 2019, 10: 113.
- [14] POURSEIF M M, MOGHADDAM G, DAGHIGHKIA H, et al. A novel B- and helper T-cell epitopes-based prophylactic vaccine against [J]. Echinococcus Granulosus Bioimpacts, 2018, 8 (1): 39-52.
- [15] YU M, ZHU Y, LI Y, et al. Design of a novel multi-epitope vaccine against *Echinococcus granulosus* in immunoinformatics [J]. Front Immunol, 2021, 12: 668492.
- [16] WEISKOPF D, ANGELO M A, SIDNEY J, et al. Immunodominance changes as a function of the infecting dengue virus serotype and primary versus secondary infection [J]. J Virol, 2014, 88 (19): 11383-11394.
- [17] CHEN Z, ZHU Y, SHA T, et al. Design of a new multi-epitope vaccine against *Brucella* based on T and B cell epitopes using bioinformatics methods [J]. Epidemiol Infect, 2021, 149: e136.
- [18] BLANCO F C, SABIO Y, GARCIA J, et al. Recent advances in non-specific immune memory against bovine tuberculosis [J]. Comp Immunol Microbiol Infect Dis, 2021, 75: 101615.
- [19] MITTAL K R, TIZARD I R, MARTINEAU R. The use of the non-specific immunological factors, conglutinin, immunconglutinin and heterophile antibody, in the serodiagnosis of bovine brucellosis [J]. J Hyg (Lond), 1980, 84 (3): 405-409.
- [20] 包艳红. 牛分枝杆菌 cfp10-esat6-cfp7 融合基因重组乳酸菌的构建及免疫原性研究 [D]. 长春: 吉林农业大学, 2019.