

牛分枝杆菌抗原 MPB70、MPB83 和 ESAT-6 的融合表达及重组蛋白的初步应用

郭设平^{1,2}, 刘思国^{1*}, 张秀华³, 王春来¹, 宫强^{1,2}, 郭洋³, 邵美丽⁴

(1. 中国农业科学院哈尔滨兽医研究所 兽医生物技术国家重点实验室, 哈尔滨 150001;

2. 中国农业科学院研究生院, 北京 100081; 3. 沈阳农业大学, 沈阳 110161;

4. 东北农业大学, 哈尔滨 150030)

摘要: 应用 PCR 方法从牛分枝杆菌 Vallee 株基因组中扩增获得 *mpb70*、*mpb83* 和 *esat-6* 三个目的基因片段。采用重叠延伸剪接技术(splicing by overlap extension, SOE)获得融合基因 *mpb70-mpb83* 后, 将 *mpb70-mpb83* 和 *esat-6* 串连于同一表达载体 pET32a(+) 中得到重组质粒 pET70-83-E6。转化 BL21(DE3) 大肠杆菌感受态后, 经 IPTG 诱导以可溶的形式表达融合蛋白。用 Ni²⁺ 亲和层析的方法纯化该融合蛋白。Western blot 分析显示: 该融合蛋白能与抗牛分枝杆菌阳性血清发生特异性反应, 而与牛副结核病阳性血清不反应。用该纯化蛋白初步建立了间接 ELISA 方法, 并检测了 117 份临床血清样本(其中 67 份为 PPD 阳性牛血清), 阳性率为 39.32%(46/117)份, 与 PPD 皮试诊断的符合率为 82.05%(96/117)。

关键词: 牛分枝杆菌; 融合表达; ELISA

中图分类号: S852.61⁺8

文献标识码: A

文章编号: 0366-6964(2006)07-0676-05

Fusion Expression of MPB70, MPB83 and ESAT-6 of *Mycobacterium Bovis* and Its Use as Diagnostic Reagent

GUO She-ping^{1,2}, LIU Si-guo^{1*}, ZHANG Xiu-hua³,

WANG Chun-lai¹, GONG Qiang^{1,2}, GUO Yang³, SHAO Mei-li⁴

(1. National Key Laboratory of Veterinary Biotechnology, Harbin Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Harbin 150001, China; 2. Graduate School, CAAS, Beijing 100081, China; 3. Shenyang Agricultural University, Shenyang 110161, China; 4. Northeast Agricultural University, Harbin 150001, China)

Abstract: The DNA fragments of *mpb70*, *mpb83* and *esat-6* were amplified by PCR from *M. bovis* Vallee genome DNA. *Mpb70* and *mpb83* were spliced by overlapping extension (SOE). Then the DNA fragments were inserted into the plasmid pET32a(+) and the recombinant plasmid pET70-83-E6 was acquired. The recombinant protein was expressed in the form of solution in pET70-83-E6 transformed BL21(DE3) induced by IPTG. Then the recombinant protein was purified by affinity chromatography. Western blot analysis shows that the protein could be recognized by sera from *M. bovis* infected bovines but not by sera from *M. paratuberculosis* infected bovines. The purified protein was used as diagnostic reagent and found to be useful for immunodiagnostic of bovine tuberculosis (BTB) by enzyme linked immunosorbent (ELISA). In field test, 46 out of 117 bovine sera (67 of them were positive in PPD skin test) were positive (39.32%). 82.05%

收稿日期: 2005-06-01

基金项目: 国家科技攻关计划(2002 BA518A04)

作者简介: 郭设平(1980-), 男, 浙江人, 硕士研究生, 主要从事动物传染病病原的分子生物学和免疫学等的研究。E-mail: guosp1981@126.com

* 通讯作者: 刘思国, Tel: 0451-85935076, E-mail: lsg960@sohu.com

(96/117) of them were consistent with PPD skin test.

Key words: *Mycobacterium bovis*; fusion expression; ELISA

牛结核病是一种严重危害奶牛业的人兽共患传染病。其病原牛分枝杆菌可以通过牛奶感染人,尤其是婴幼儿。因此,根除牛结核病是控制和消灭人类结核病的前提和基础^[1]。根除牛结核病主要采取两种防制措施:一是屠宰结核菌素(PPD)皮试阳性牛;二是疫苗接种和化学药物治疗。但这两种方法在实施上都有一定难度。大批屠宰 PPD 阳性牛因经济消耗大而不适用于发展中国家,且有许多国家存在可作为牛分枝杆菌天然宿主的野生动物,而野生动物又不能进行屠宰。PPD 皮试也存在许多问题,尤其是它的特异性低,不能区分各种分枝杆菌;且只能进行活体试验,而不能对保存的样品进行回顾性分析,更不适用于野生动物和边远山区的牛结核病普查^[2]。疫苗免疫和化学药物治疗的效果不能令人满意,主要的原因是缺乏有效的疫苗和药物^[3]。因此,人们致力于牛结核病新型疫苗和新型诊断方法的研究,期望能发展出牛结核病的第三种防制措施:疫苗接种-诊断区分疫苗免疫和自然感染动物-扑杀感染动物。其中的关键就是发展一种高特异性高敏感性的新型诊断方法。间接 ELISA 方法因其敏感、特异、成本低和操作简便而受到青睐。而免疫学诊断方法研究的主要障碍在于没有合适的诊断抗原。本研究利用大肠杆菌表达系统获得了 MPB70、MPB83 和 ESAT-6 三种抗原融合的重组蛋白,并用它作为诊断抗原初步建立了牛结核病的间接 ELISA 诊断方法。

1 材料与方 法

1.1 菌种、载体及宿主

牛分枝杆菌(*M. bovis*)Vallee 株购自中国药品生物制品检定所。质粒 pET32a(+),宿主菌 *E. coli* TG1 和 *E. coli* BL21(DE3)感受态细胞均由本实验室保存。

1.2 血清

117 份待检牛血清均由本实验室在全国各地牛场收集,其中 67 份为 PPD 皮试阳性牛血清,50 份为 PPD 皮试阴性牛血清。150 份牛结核病阴性血清由本实验室保存(经 PPD 皮试、PPD-ELISA、病理学和细菌学检验)。牛结核病的阳性血清和牛副结核病阳性血清由本实验室保存(经 PPD 皮试、ELISA、病理学和细菌学检验)。

1.3 主要试剂

pfu DNA polymerase 和限制性内切酶购自 MBI 公司。DNA 胶回收试剂盒、DAB 和 OPD 购自上海华舜生物工程有限公司。Ex Taq DNA 聚合酶和 pMD 18T-Vector 购自 Takara(大连)公司。Ni-NTA His Bind Purification Kit 购自 Novagen 公司。HRP 标记的兔抗牛酶标二抗购自 Sigma 公司。

1.4 牛分枝杆菌基因组 DNA 的提取

用 TE(pH8.0)将灭活的牛分枝杆菌菌落从培养基上洗下来,离心集菌,沉淀用 TNE(pH8.0)洗涤 2 次之后重悬于 600 μ L 去离子水中,加入 50 μ L 10 mol/L 的 NaOH 和 300 μ L 10% 的 SDS(终浓度约为 3.4%),旋涡震荡混合后 37 $^{\circ}$ C 水浴 3 h,加蛋白酶 K 至终浓度 200 μ g/mL,旋涡震荡混合后 50 $^{\circ}$ C 水浴 2 h(期间旋涡震荡混合几次),离心取上清并用酚/氯仿抽提一次,无水乙醇沉淀 DNA 后用 70% 乙醇洗涤沉淀一次,吹干后用 40 μ L TE(pH8.0)溶解^[4]。取 1 μ L 稀释 100 倍后用分光光度计(Eppendorf Biophotometer)测其 DNA 浓度。该 DNA 溶液作适当稀释之后作为 PCR 模板。

1.5 引物的设计及目的基因的扩增

根据 GenBank 中牛分枝杆菌 AF2122/97(检索号 NC002945)^[5]株 *mpb70*、*mpb83* 和 *esat-6* 基因设计引物。引物由 Invitrogen(上海)公司合成。其序列如下:(1) *mpb70* (U-*KpnI*): 5' AGGGTACCAT-GGAATACGCGGCAGCCAAT3' (画线部分为 *KpnI* 识别位点); (2) *mpb70* (L-linker): 5' GGAACCTGGAGACGCCGAGGCATTAG3' (阴影部分为 linker 序列); (3) *mpb83* (U-linker): 5' TCTCCAGGTTCCATCAACGTTTCAGGCCAAAC3' (阴影部分为 linker 的互补序列); (4) *mpb83* (L-*BamHI*): 5' TGTGGATCCCGGAGACACCG-TATCGATCAT3' (画线部分为 *BamHI* 识别位点,阴影部分为 linker 序列); (5) *esat-6* (U-*BamHI*): 5' ACGGGATCCGAGCAGCAGTGGGAATTTC3' (画线部分为 *BamHI* 识别位点,阴影部分为 linker 序列); (6) *esat-6* (L-*EcoRI*): 5' GCCGAATTCCTATGCGAATCCCAGTG3' (画线部分为 *EcoRI* 识别位点)。

以牛分枝杆菌基因组 DNA 为模板,用 pfu DNA polymerase PCR 扩增 *mpb70* 和 *mpb83*。反

应体系(50 μL):上下游引物各 400 nmol/L, dNTP 各 0.2 mmol/L, 模板 12.5 ng, pfu DNA polymerase 1.25U。扩增的循环参数:95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min; 然后 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性、65 $^{\circ}\text{C}$ 退火和 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸各 1 min, 30 个循环;最后延伸 10min。扩增产物用 0.9% 的琼脂糖凝胶电泳检测, 胶回收试剂盒纯化 PCR 产物。

采用重叠延伸剪切技术(SOE)^[6] 获得 *mpb70* 和 *mpb83* 的融合基因 *mpb70-mpb83*。以上述纯化的 PCR 产物 *mpb70* 和 *mpb83* 为模板, 以 *mpb70* (U-*KpnI*) 和 *mpb83* (L-*BamHI*) 为引物, 用 Ex *Taq* DNA 聚合酶做 PCR。反应体系(50 μL):上下游引物各 200 nmol/L, *mpb70* 和 *mpb83* 胶回收产物各 1 μL , Ex *Taq* DNA 聚合酶 1.25 U。退火温度为 45 $^{\circ}\text{C}$, 其它条件同上。

以牛分枝杆菌基因组 DNA 为模板用 Ex *Taq* DNA 聚合酶 PCR 扩增 *esat-6*。反应体系(50 μL):上下游引物各 400 nmol/L, 模板 12.5ng, Ex *Taq* DNA 聚合酶 1.25 U。退火温度为 63 $^{\circ}\text{C}$, 其它条件同上。

1.6 重组质粒的构建与鉴定

将上述纯化的 PCR 产物 *mpb70-mpb83* 和 *esat-6* 基因分别连接 pMD 18 T-Vector, 转化 TG1 感受态细胞, 获得重组质粒 pMD18T-70-83 和 pMD18T-*esat-6*。经酶切和 PCR 鉴定的重组质粒, 用 *KpnI* 和 *BamHI* 酶切 pMD18T-70-83 并胶回收 *mpb70-mpb83* 片段, 将它连入经酶切处理的 pET32a(+) 的相应位点, 转化 TG1 感受态细胞, 酶切和 PCR 鉴定后获得重组质粒 pET70-83。用 *BamHI* 和 *EcoRI* 从 pMD18T-*esat-6* 切下 *esat-6* 片段, 将其连接到重组质粒 pET70-83 的 *BamHI* 和 *EcoRI* 酶切位点, 构建成重组质粒 pET70-83-E6, 酶切和 PCR 进行鉴定, 并测定重组质粒中外源片段的序列。

1.7 重组质粒的诱导表达和重组蛋白的纯化、SDS-PAGE 分析

重组质粒 pET70-83-E6 转化 BL21(DE3) 感受态细胞, 涂布于 Amp⁺ (50 mg/mL) 的 LB 琼脂平板上, 挑单菌落接种于 5 mL Amp⁺ 的 LB 液体培养基, 37 $^{\circ}\text{C}$ 振荡至 OD₆₀₀ 约 0.6。菌液置 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱过夜, 次日取 1 mL 菌液于 1.5 mL 小离心管中, 离心集菌, 细菌用 1 mL Amp⁺ 的 LB 液体培养基重悬。以此菌液接种于 100 mL Amp⁺ 的 LB 液体培养基中 37 $^{\circ}\text{C}$ 振荡至 OD₆₀₀ 为 0.4 左右, 加 IPTG 至终浓度为 0.4 mmol/L, 继续振荡 3 h, 冰上放置 5 min 以冷却菌液, 离心集菌, 细菌用 50 mmol/L 的 Tris-

HCl (pH8.0) 洗涤 1 次后重悬于 10 mL Bind buffer (含 300 mmol/L NaCl 和 10 mmol/L 咪唑的 50 mmol/L 磷酸缓冲液, pH8.0) 中。超声波裂解细菌, 10 000 g 离心 15 min, 分别收集上清和沉淀。沉淀用 1 mL Tris-HCl 溶解, 按文献[7]的方法各取 20 μL 上清和沉淀加等体积的 2 倍 SDS 上样缓冲液后, 取 20 μL 进行 SDS-PAGE 分析。用 Ni-NTA His Bind Purification Kit 按说明书操作纯化可溶的重组蛋白。纯化后的蛋白溶液做 SDS-PAGE 分析。

1.8 纯化蛋白的 Western blot 分析

参考文献[7]的方法, 用半干转移电泳槽 (bio-ran JY-ZY4) 做 Western blot 分析。用含 3% 明胶的 PBS(pH7.4) 封闭后, 将 NC 膜分成两条。其中一条与 150 倍稀释的牛结核病阳性血清作用, 另一条与 150 倍稀释的牛副结核病阳性血清作用。二抗作 5 000 倍稀释。一抗稀释液采用含 3% 明胶和 1% 大肠杆菌裂解物的 PBS(pH7.4)。二抗稀释液为含有 3% 明胶、150 mmol/L NaCl 和 50 mmol/L Tris(pH7.5) 的溶液。显色后观察结果。

1.9 ELISA 方法的初步建立及其应用

参照文献[8]的方法, 用 bradford 方法测定用于包被的蛋白的浓度后, 将纯化蛋白连续稀释, 做 ELISA 检测(每个稀释度两孔), 从而确定重组蛋白的工作浓度。参照间接 ELISA 方法并做如下调整: 封闭用 3% 明胶, 37 $^{\circ}\text{C}$ 湿盒温育 1.5 h; 一抗稀释 200 倍, 二抗稀释 5 000 倍, 稀释液及洗液均用 PBST(含 0.05% Tween20)。显色和终止后, 用酶标仪 (Bio-Ran modal 680) 测 490 nm 的吸光度 (OD₄₉₀)。为了排除纯化蛋白中的干扰因素, 设置了牛结核病阴性血清、抗原空白、相应稀释度的蛋白纯化洗脱液和纯化的 pET32a(+) 空载体的组氨酸标签 (His Tag) 对照。按该 ELISA 操作程序检测 150 份阴性血清, 建立阳性判定标准。并对 117 份临床牛血清进行检测。

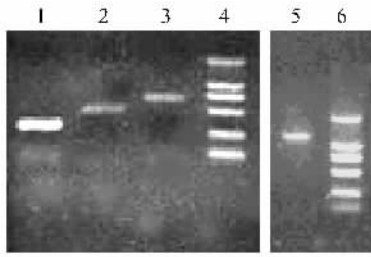
2 结果

2.1 PCR 扩增目的基因

如图 1 所示, *mpb70*、*mpb83* 和 *esat-6* 的 PCR 产物与预期大小一致, 分别约为 483、669 和 288 bp。*mpb70-mpb83* 融合基因的 SOE-PCR 产物约 1 200 bp, 也与预期(1 140 bp)大小一致。

2.2 重组质粒 pET70-83 和 pET70-83-E6 的鉴定

KpnI 和 *BamHI* 酶切和 PCR 扩增鉴定重组质粒 pET70-83, 结果均获得一条约 1 200 bp 的片段,



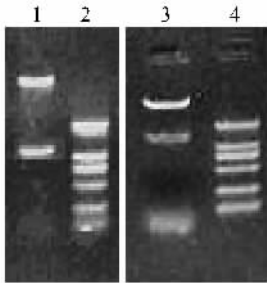
1~3, 5. 分别为 *esat-6*、*mpb70*、*mpb83* 和 *mpb70-mpb83* 的 PCR 产物;4, 6. DL2000 分子量对照(由下到上各条带分别表示 100、250、500、750、1000 和 2 000 bp,图 2 同)

1~3, 5. PCR product of *esat-6*; *mpb70*; *mpb83* and *mpb70-mpb83*; 4, 6. DNA Marker DL2000(From bottom to top, the bands indicate 100, 250, 500, 750, 1 000 and 2 000 bp respectively, the same in Fig. 2)

图 1 目的基因的 PCR 产物电泳

Fig. 1 Result of PCR amplification

与实际设计大小相符。以 *esat-6*(U-*Bam*HI) 和 *esat-6*(L-*Eco*RI)为引物 PCR 鉴定 pET70-83-E6, 扩增得一约 300 bp 的片段。以 *Kpn*I 和 *Eco*RI 酶切 pET70-83-E6 产生一约 1 400 bp 的片段, 与目的片段(483 bp + 669 bp + 288 bp = 1 440 bp)一致。酶切鉴定电泳结果见图 2, PCR 鉴定图略。



1. *Kpn*I 和 *Bam*HI 双酶切鉴定 pET70-83; 2, 4. DL2000 分子量对照; 3. *Kpn*I 和 *Eco*RI 双酶切鉴定 pET70-83-E6

1. pET70-83/ *Kpn*I and *Bam*HI; 2, 4. DNA Marker DL2000; 3. pET70-83-E6/ *Kpn*I and *Eco*RI

图 2 重组质粒 pET70-83 和 pET70-83-E6 的酶切鉴定
Fig. 2 Identification of recombinant plasmid of pET70-83 and pET70-83-E6 by restriction digestion

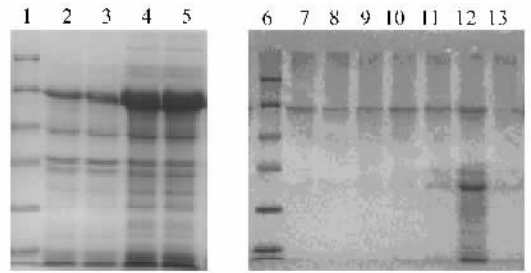
2.3 目的片段的序列分析

重组质粒 pET70-83-E6 中的外源片段经测序、序列拼接后, 与在 GenBank 中登陆的牛分枝杆菌 *Mycobacterium bovis* AF2122/97 相应基因片段进行比对。结果发现, 该目的片段与期望序列一致。

2.4 诱导表达重组蛋白及其纯化

如图 3, 分别取超声波裂菌离心后的上清和沉淀进行 SDS-PAGE 分析。结果显示诱导产生的融

合蛋白约为 66.2 ku, 与预计大小一致。大部分目的蛋白以可溶蛋白形式存在。用 Ni-NTA His Bind Purification Kit 纯化可溶的重组蛋白, 连续洗脱 7 次, 7 次洗脱液分别取样做 SDS-PAGE 分析。



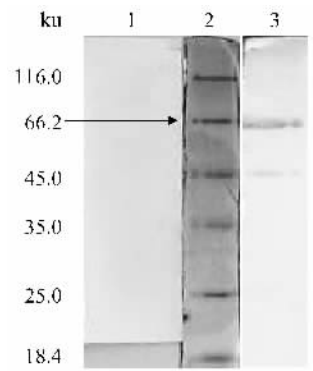
1, 6. 蛋白质分子量标准(由下到上各条带分别表示 18.4、25.0、35.0、45.0、66.2、116.0 ku); 2, 3. 沉淀部分; 4, 5. 上清部分; 7~13. 纯化蛋白的 7 次洗脱液

1, 6. Protein molecular weight marker(From bottom to top, the bands indicate 18.4, 25.0, 35.0, 45.0, 66.2, 116.0 ku respectively); 2, 3. Insoluble part of the bacterial lysates; 4, 5. The soluble part of the bacterial lysates; 7-13. The purified fusion protein

图 3 重组蛋白表达产物和纯化蛋白的 SDS-PAGE 分析
Fig. 3 SDS-PAGE analyze of the recombinant protein and the purified protein

2.5 纯化蛋白的 Western blot 分析

经 DAB 显色, 与牛结核病阳性血清作用的 NC 膜在约 66.2 ku 处出现一明显可见条带, 而与副结核阳性血清作用的 NC 膜则未见任何条带, 见图 4。



1. 与副结核牛阳性血清作用的 NC 膜; 2. 蛋白质分子量标准; 3. 与结核病牛阳性血清作用的 NC 膜

1. NC membrane incubated with sera from *M. paratuberculosis* infected bovine; 2. Protein molecular weight marker; 3. NC membrane incubated with sera from *M. bovis* infected bovine

图 4 Western blot 分析

Fig. 4 Western blot analysis

2.6 ELISA 的初步建立及其应用

用 bradford 法测得纯化蛋白的浓度为 0.366 4 mg/mL。将之倍比稀释做 ELISA, 每个稀释度有两

个孔。测得的 OD₄₉₀用空白调零后,取平均值。重组蛋白与牛结核病阳性血清产生较强的反应,而空白对照、阴性血清对照、洗脱液和组氨酸标签(His Tag)对照的 OD₄₉₀均极低。最终,将纯化蛋白的工作浓度确定为 0.25mg/mL。

150份阴性血清检测结果的 OD₄₉₀平均值(OD平均)为 0.1905,标准差(SD)为 0.1056。取 OD_{平均}+3×SD为阳性临界值,OD_{平均}+2×SD为阴性临界值;两者之间为可疑,需复检。即样本 OD₄₉₀大于 0.5为阳性,小于 0.4为阴性,两者之间为可疑。对 117份临床血清检测结果见表 1,PPD皮试的阳性率为 57.27%,ELISA检测的阳性率为 39.32%。67份 PPD皮试阳性牛血清中 46份 ELISA检测为阳性,21份为阴性;50份 PPD皮试阴性牛血清 ELISA检测则全为阴性。所以,ELISA方法与 PPD皮试的符合率为 82.05%(96/117)。

表 1 检测 117 份临床血清并与 PPD 皮试比较

Table 1 Field test of 117 sera and its comparison with PPD skin test

	PPD 皮试	ELISA 检测	符合率/%
阳性	67	46	82.05(96/117)
阴性	50	71	
阳性率/%	57.27	39.32	

3 讨论

Vordermeier 等研究了 ESAT-6、MPB64、MPB70 和 MPB83 及它们混合而成的“鸡尾酒”用于血清学诊断的可能性。结果发现这 4 个抗原在单独应用时能区分感染牛和免疫牛;包含 ESAT-6、MPB64 和 MPB83 的“鸡尾酒”也能区分感染牛和免疫牛^[9]。这种以多个抗原混合进行“鸡尾酒”诊断方法的研究,虽然能够提高诊断方法的特异性和敏感性,但也存在着每个抗原蛋白分别表达和纯化耗时费力,蛋白抗原配比不均,难于进行诊断抗原的标准化生产和产业化开发等问题。本试验将 ESAT-6、MPB70 和 MPB83 三个抗原性和特异性较高的抗原以串连融合的形式在大肠杆菌中实现了高效表达,便于融合蛋白的纯化。三个抗原以一个蛋白的形式表达,这比“鸡尾酒”式诊断抗原更易于生产和产业化开发,不仅简化了诊断抗原的生产过程,降低了生产成本,而且不必考虑抗原混合的比例问题,便于诊断抗原的标准化。另外,多个抗原蛋白联合应用可以保证诊断的敏感性;而选用牛分枝杆菌特异的 ESAT-6、

MPB70 和 MPB83 则保证了诊断的特异性。

在引物设计时,mpb70 的下游引物 mpb70(L-linker)带有一编码 4 个氨基酸的 linker 序列,而 mpb83 的上游引物 mpb83(U-linker)则带有 linker 的互补序列。采用 SOE 技术剪接 mpb70 和 mpb83。这样节省了剪接的步骤,减少了试验的工作量。另外,在引物 esat-6(U-BamHI)中也引入了 linker 序列。这样,融合蛋白中的三个抗原蛋白之间都有一个四氨基酸(SPGS)的连接肽。这个连接肽为三个抗原蛋白各自空间构象的形成提供了缓冲,使之不至于互相干扰,从而保证了蛋白的免疫学活性。

Western blot 分析结果显示,该重组蛋白具有很好的特异性,能够与牛结核病阳性血清呈现强的免疫反应,而与牛副结核病阳性血清不反应。初步建立间接 ELISA 方法之后,对 117 份临床血清的检测并与 PPD 皮试进行比较。结果说明本方法有较高的检出率,与 PPD 皮试有较高的符合率。因此,本试验所表达并纯化的三抗原融合蛋白可以直接作为一种新型的诊断抗原,初步建立的间接 ELISA 方法具有良好的应用前景。

参考文献:

- [1] 刘思国,于辉,宫强,等. 牛结核病研究进展[J]. 畜牧兽医科技信息,2003,10:10~14.
- [2] Menzies D. Interpretation of repeated tuberculin tests: boosting, conversion, and reversion[J]. Am J Respir Crit Care Med, 1999, 159: 15~21.
- [3] Wedlock D N, Skinner M A, Lisle G W, et al. Control of *Mycobacterium bovis* infections and the risk to human populations[J]. Microbes and Infection, 2002, 4: 471~480.
- [4] Del Portillo P, Murillo L A, Patarroyo M E. Amplification of a species-specific DNA fragment of *Mycobacterium tuberculosis* and its possible use in diagnosis[J]. J Clin Microbiol, 1991, 29: 2163~2168.
- [5] Garnier T, Eiglmeier K, Camus J C, et al. The complete genome sequence of *Mycobacterium bovis* [J]. PNAS, 2003, 100: 7877~7882.
- [6] Nikolai A S, Anton V B, Yevgeniya A N, et al. Construction of long DNA molecules using long PCR based fusion of several fragments simultaneously[J]. Nucleic Acids Research, 2004, 32(2): e19.
- [7] 萨姆布鲁克 J,拉塞尔 D W. 分子克隆实验指南[M]. 第 3 版,黄培堂,王嘉玺,朱厚础,等译. 北京:科学出版社,2002.
- [8] 奥斯伯 F M,金斯顿 R E,赛德曼 J G,等. 精编分子生物学实验指南[M]. 第 4 版,马学军,舒跃龙,译. 北京:科学出版社,2005. 475~484.
- [9] Vordermeier H M, Cockle P C, Whelan A, et al. Development of diagnostic reagents to differentiate between *Mycobacterium bovis* BCG vaccination and *M. bovis* infection in cattle[J]. Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology, 1999, 6(5):675~682.