

牛分枝杆菌三价组合及融合 DNA 疫苗免疫效果的研究

宫 强¹, 刘思国^{1*}, 王春来¹, 王 勇¹, 刘建东¹, 刘慧芳¹,
施远祥², 阿曼古丽², 李发斌³, 孔宪刚¹

(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
动物细菌病研究室, 哈尔滨 150001; 2. 新疆动物防疫监督总站,
乌鲁木齐 830063; 3. 黑龙江省结核病防治所, 哈尔滨 150500)

摘 要: 分泌性蛋白 Ag85B、MPB64 和 ESAT-6 为 *Mycobacterium bovis* 的主要保护性抗原, 在诱导机体免疫反应和抵抗感染中发挥重要作用。本研究以 pcDNA3.1(+) 为载体, 构建了由上述 3 种抗原基因构成的不同疫苗: 3 基因融合 (pcDNA-MPB64-Ag85B-ESAT-6, pCMAE) DNA 疫苗和三价 (pcDNA-Ag85B+pcDNA-MPB64+pcDNA-ESAT-6) DNA 疫苗, 评价各种 DNA 疫苗诱导的体液免疫、细胞免疫以及以 BCG 攻毒后的免疫保护水平。试验结果表明, 多基因融合 DNA 疫苗免疫后的小鼠血清抗体水平、淋巴细胞增殖 (SI 值)、gamma interferon (IFN- γ) 和 interleukin-2 (IL-2) 水平明显高于其他各组 ($P < 0.05$), 攻毒保护效果也优于多价 DNA 疫苗, 达到了 BCG 疫苗的免疫保护水平, 表明本研究制备的融合 DNA 疫苗具有良好的应用前景。

关键词: 牛分枝杆菌; 融合 DNA 疫苗; 多价 DNA 疫苗

中图分类号: S852.61⁺8

文献标识码: A

文章编号: 0366-6964(2008)04-0466-06

Study on Immune Efficacy of Trivalent Combinations and Fusion DNA Vaccine from *Mycobacterium bovis*

GONG Qiang¹, LIU Si-guo^{1*}, WANG Chun-lai¹, WANG Yong¹, LIU Jian-dong¹,
LIU Hui-fang¹, SHI Yuan-xiang², A Man-gu-li², LI Fa-bin³, KONG Xian-gang¹

(1. Division of Bacterial Diseases, National Key Laboratory of Veterinary Biotechnology, Harbin Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Harbin 150001, China; 2. Urumqi Work General

Station of Animal Veterinary Quarantine and Grassland, Urumqi 830063, China;

3. Heilongjiang Provincial Institute for Control of Tuberculosis, Harbin 150500, China)

Abstract: *Mycobacterium bovis* is the etiological agent of bovine tuberculosis (BT). The secretory proteins Ag85B, MPB64 and ESAT-6 are the major immunogenic antigens of *M. bovis*, and they play important roles in inducing immune responses that confer resistance against infection. In the present study, using pcDNA3.1(+) as vector, various DNA vaccines were constructed with the genes encoding the three antigens as follows: fusion of three genes (pcDNA-MPB64/Ag85B/ESAT-6, pcDNA-MAE) and trivalent combinations (pcDNA-Ag85B + pcDNA-MPB64 + pcDNA-ESAT-6). The immune efficacy of the DNA vaccines were evaluated based on serum antibody titers, lymphocyte proliferation assay and content of cytokine (interferon- γ and interleukin-2) titers. Protective efficacy following challenge with *M. bovis* Bacille Calmette-Guérin (BCG) was

收稿日期: 2007-05-23

作者简介: 宫 强 (1979-), 男, 博士生, 主要从事兽医分子生物学研究

* 通讯作者: 刘思国, E-mail: siguo_liu@hri.ac.cn, Tel: 0451-8593 5076

evaluated based on lung tissue bacterial loads and histopathologic changes. The data demonstrated that immunization with fusion DNA vaccines (three genes) resulted in significantly higher serum antibody levels, lymphocyte proliferation (SI) values, IFN- γ and IL-2 levels than immunization with polyvalent DNA vaccines ($P < 0.05$). Additionally, fusion DNA vaccines provided superior protection than polyvalent DNA vaccines following BCG challenge. The protective efficacy of the fusion DNA vaccines was equivalent to that of the BCG vaccine, suggesting that fusion DNA vaccines provide a promising approach for the prevention of BT.

Key words: *Mycobacterium bovis*; fusion DNA vaccine; polyvalent DNA vaccine

牛结核病作为一种人畜共患病,给畜牧业尤其是养牛业带来了巨大的经济损失,并威胁着人类的健康。因此,控制牛结核病具有重大的公共卫生学意义。对于该病的控制措施,目前大多数国家采用检疫后扑杀的策略,即进行牛结核菌素皮试试验,淘汰阳性牛。欧美等一些发达国家已通过该策略有效地控制了牛结核病。但该策略并不适用于所有的国家和地区,尤其是经济比较落后的发展中国家,难以承受该策略带来的经济负担。自疫苗问世以来,其在传染病的预防控制中发挥了重要作用,然而目前仍没有一种疫苗可用于牛结核病的预防。许多学者正致力于这方面的研究,目前正在研究的牛结核病疫苗包括减毒活疫苗、重组卡介苗(rBCG)、亚单位疫苗和 DNA 疫苗等,但效果均不是特别理想^[1]。因此研制有效的牛结核病疫苗迫在眉睫。

本研究以牛分枝杆菌分泌性抗原 *ag85b*、*mpb64* 和 *esat-6* 基因为基础,分别构建了多价和多基因融合 DNA 疫苗,通过对 DNA 疫苗免疫指标的测定和免疫攻毒保护的比较研究,综合评价融合及多价 DNA 疫苗的免疫效果,旨在为牛结核病新型疫苗的研制奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌种 牛分枝杆菌(*M. bovis*) Vallee III 菌株购自中国药品检定所。

1.1.2 实验动物 6~8 周龄 BALB/c 小鼠购自哈尔滨医科大学第二医院。

1.1.3 主要试剂 限制性内切酶、连接酶为 MBI 公司产品;HRP 标记的山羊抗鼠 IgG、FITC 标记的山羊抗兔 IgG、RPIM1640 液体培养基为 Sigma 公司产品;脂质体 2000 为 Invitrogen 公司产品;OPD 购自华舜生物工程有限公司;小鼠 IFN- γ 和 IL-2

ELISA 检测试剂盒购自北京晶美生物工程有限公司;MTT 购自上海华舜生物工程有限公司;*Mycobacterium bovis* Bacille Calmette Guerin (BCG) Pasteur 疫苗株和 *M. bovis* Purified protein derivative (PPD) 购自中国兽医药品监察所;重组蛋白 MPB64-Ag85B-ESAT-6(rMAE)由作者实验室制备,作为检测血清抗体的 ELISA 包被抗原及诱导脾淋巴细胞增殖分化的刺激原,其浓度为 0.65 mg/mL。兔抗 PPD 血清由作者实验室制备,将牛分枝杆菌 PPD 与矿物油混合制成疫苗进行动物免疫,抗原含量为 2 mg/mL,每只兔注射 1 mL,采用背部多点注射,共免疫 3 次,每次间隔 2 周,琼脂扩散试验检测抗体效价后备用。

1.2 方法

1.2.1 目的基因的 PCR 扩增 根据 GenBank 中发表的序列设计特异性引物,引物序列见表 1。

根据 Del Portillo 等^[2]提供的方法提取牛分枝杆菌 Vallee III 菌株基因组(见文献[3]),以该基因组 DNA 为模板,分别以 a、b 及 a、c 为引物扩增 *mpb64* 基因;以 d、g 及 e、f 为引物扩增 *ag85b* 基因;以 h、j 及 i、j 为引物扩增 *esat-6* 基因。然后以 *mpb64* 和 *ag85b* PCR 产物(均含 linker 序列)为模板,以 a、g 为上下游引物,利用重叠延伸技术(SOE)扩增 *mpb64-ag85b* 融合基因片段。

1.2.2 重组质粒的构建 将 *mpb64*、*ag85b* 和 *esat-6* 基因(含起始密码子和终止密码子)PCR 产物胶回收后用 *Kpn* I / *Eco* R I 双酶切,与同样双酶切处理的真核表达质粒 pcDNA3.1(+)连接,转化大肠杆菌感受态细胞 TG₁,挑取单个菌落接种于含氨苄青霉素的 LB 液体培养基中培养,抽提质粒用 *Kpn* I / *Eco* R I 双酶切鉴定。阳性重组质粒分别命名为 pcDNA-MPB64 (pCM)、pcDNA-Ag85B (pCA) 和 pcDNA-ESAT-6(pCE6)。同样方法将 *esat-6* 基因(含 *Bam* H I 位点和终止密码子)PCR 产物连接

表 1 *mpb64*、*ag85b* 和 *esat-6* 引物序列
Table 1 Primer sequence of *mpb64*, *ag85b* and *esat-6* genes

名称 Names	引物序列 Sequence	PCR 产物大小/bp PCR product
<i>mpb64</i> 上游引物(<i>Kpn</i> I)	5'-GGCGGCGGTACCATGCGTTATCTGATAGCGAC-3' ^a	684
<i>mpb64</i> 下游引物(<i>EcoR</i> I)	5'-GCGAATTCTTAGATTGCCAGCGCGGAATG-3' ^b	
<i>mpb64</i> 下游引物(linker)	5'-GGAACCTGGAGA TGGGACCAATACCTG-3' ^c	
<i>ag85b</i> 上游引物(linker)	5'-TCTCCAGGTTCC ACAGACGTGAGCCGAAAG -3' ^d	986
<i>ag85b</i> 上游引物(<i>Kpn</i> I)	5'-GCGCGGTACCATGACAGACGTGAGCCGAAAG-3' ^e	
<i>ag85b</i> 下游引物(<i>EcoR</i> I)	5'-GTGGGGAATTCTAGCCGCGCCTAACGAAC-3' ^f	
<i>ag85b</i> 下游引物(<i>Bam</i> H I)	5'-GAGGGATCCTGGAGAGCCGCGCCTAACGAAC-3' ^g	
<i>esat-6</i> 上游引物(<i>Bam</i> H I)	5'-ACGGGATCCATGCAGCAGTGGAATTCC-3' ^h	288
<i>esat-6</i> 上游引物(<i>Bam</i> H I)	5'-ACGGGATCCGAGCAGCAGTGGAATTTC-3' ⁱ	
<i>esat-6</i> 下游引物(<i>EcoR</i> I)	5'-GCCGAATTCCTATGCGAACATCCCAGTG-3' ^j	

a、e. 含起始密码子,下划线为 *Kpn* I 位点; b、f、j. 含终止密码子,下划线为 *EcoR* I 位点;c. 阴影部分为 Linker 序列;d. 阴影部分为 Linker 互补序列; g、i. 下划线为 *Bam*H I 位点;h. 含起始密码子,下划线为 *Bam*H I 位点

a, e. The *Kpn* I recognition sequence is underlined and initiator is included; b, f, j. The *EcoR* I recognition sequence is underlined and termination codon is included; c. The linker is shaded; d. The complementary sequence of the linker is shaded; g, i. The *Bam*H I recognition sequence is underlined; h. The *Bam*H I recognition sequence is underlined and the initiator is included

pCDNA3.1(+),再将 *mpb64-ag85b* 融合基因连接于 *esat-6* 基因的下游,构建重组质粒 pCDNA-MPB64/Ag85B/ESAT-6(pCMAE)。

1.2.3 重组质粒在 SP2/0 细胞中的表达 将处于对数生长期的 SP2/0 细胞于转染前一天接种于 24 孔细胞培养板,5% CO₂、37℃ 孵育至细胞融合度达 70%~80% 时用脂质体 2000 转染重组质粒 pCM、pCA、pCE6 和 pCMAE 及空载体 pCDNA3.1(+),转染 72 h 后进行间接免疫荧光试验。用甲醇/丙酮室温固定 15 min,加入 1:40 稀释的兔抗 PPD 多抗,37℃ 湿盒内作用 1 h,加入 1:100 稀释的含 1% 伊文斯蓝的 FITC 标记的山羊抗兔 IgG,湿盒内 37℃ 作用 1 h,洗涤后滴加碱性甘油,倒置显微镜下观察结果。

1.2.4 DNA 免疫接种 6~8 周龄雌性 BALB/c 小鼠共 50 只,随机分为 5 组(每组 10 只),A 组:pCA、pCM 和 pCE6 三价疫苗免疫组,B 组:pCMAE 三基因融合免疫组,C 组:BCG 免疫组,D 组:pCDNA3.1(+)-空载体,E 组:PBS 免疫组。

DNA 免疫采取双侧胫前肌注射,各组每只小鼠免疫剂量均为 100 μg,A 组组内各成分含量均等,E 组每只小鼠肌注 100 μL PBS。各组均免疫 3 次,每次间隔 2 周,C 组仅在初免时皮下接种 1×10⁶ CFU

的 BCG^[3]。

1.2.5 血清特异性抗体的检测 间接 ELISA 方法测定抗体效价,即一免后每周断尾采血,分离血清,用 10 μg/mL rMAE 蛋白包被酶标板,封闭后加入 100 倍稀释的待检血清,37℃ 湿盒内作用 1.5 h 后加入 HRP 标记的抗鼠 IgG 作用 1.5 h,加入 OPD (邻苯二胺)显色 10 min 后用 2 mol/L 硫酸终止反应,在 OD₄₉₂ 处测定吸收值以确定免疫小鼠血清抗体水平,共检测 7 周。

1.2.6 脾淋巴细胞增殖试验 分别于一免 2 周、二免 2 周和三免 2 周后将小鼠脱颈处死,无菌采取脾脏制备脾细胞悬液,调整细胞浓度为 1×10⁷/mL。96 孔细胞培养板每孔加入脾细胞悬液 50 μL,同时设阴性对照。试验孔和阴性对照孔各设 3 个重复,试验孔每孔加入 50 μL 10 μg/mL 的 rMAE 蛋白,阴性对照孔每孔加入 50 μL 1640 培养液,置 37℃、5% 的 CO₂ 培养箱培养 36 h 后,每孔加入 5 mg/mL MTT 10 μL,继续培养 3 h,然后每孔加 100 μL 终止液(10% SDS-0.04 mol/L HCl),继续作用 2 h 终止反应,测定 OD₅₇₀ 吸光值,计算刺激指数(SI),SI=OD(试验孔)/OD(阴性对照孔)。

1.2.7 IFN-γ 和 IL-2 水平的测定 脾脏淋巴细胞悬液制备同 1.2.6,计数后调整细胞浓度为

1×10^7 /mL。同样制备 rMAE 蛋白活化的脾淋巴细胞, 37°C 5% CO_2 培养箱中培养 72 h 后, 吸取培养上清离心收集后 -20°C 保存。按照 IFN- γ 和 IL-2 检测试剂盒制作标准曲线, 对免疫小鼠脾细胞分泌的 IFN- γ 和 IL-2 进行检测。

1.2.8 攻毒和检测 三免 3 周后剩余小鼠(每组 10 只)通过鼻腔接种 1×10^6 CFU 的 BCG^[4]。攻毒 3 周后, 无菌取肺脏进行荷菌量和组织病理学检测。

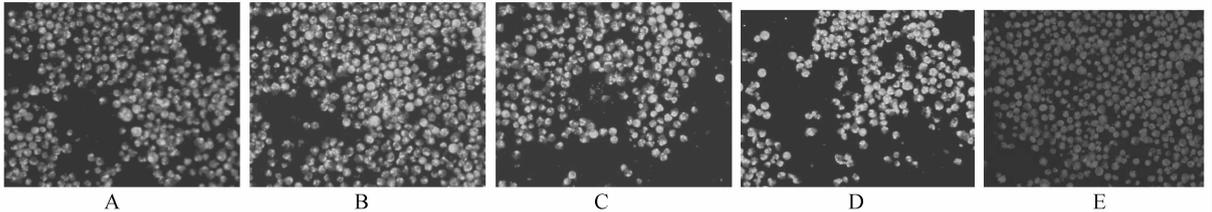
1.2.8.1 荷菌数检测: 无菌采取左全肺, 置灭菌的组织匀浆器中, 加 1 mL 无菌 0.05% PBS-吐温 80 进行研磨。按 10 倍进行梯度稀释, 选取 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} 3 个稀释度的组织悬液 100 μL , 分别接种于 3 个含改良罗氏培养基的试管斜面上, 37°C 保湿培养 3 周, 计数菌落, 计算每毫克肺组织的荷菌数^[4]。

1.2.8.2 组织病理学检查: 取攻毒小鼠右上肺叶组织, 福尔马林固定, 石蜡包埋, 切片, 常规 HE 染色。

2 结果

2.1 重组质粒的体外表达

转染了各重组质粒的 SP2/0 细胞在倒置显微镜下均可见到均质的蓝绿色荧光, 表明重组质粒 pCM、pCA、pCE6 和 pCMAE 在 SP2/0 细胞中均获得了表达, 所表达的蛋白可与兔抗牛分枝杆菌 PPD 多抗发生特异性结合, 而 pCDNA3.1(+) 转染的 SP2/0 细胞中无荧光出现, 表明牛分枝杆菌 *mpb64*、*ag85b*、*esat-6* 基因和 *mpb64-ag85b-esat-6* 融合基因能通过体外转染途径进入细胞并表达目的蛋白(图 1)。



A、B、C、D、E 分别为 pCM、pCA、pCE6、pCMAE 和 pCDNA3.1(+) 转染的 SP2/0 细胞

A、B、C、D、E. SP2/0 cells transfected by pCM、pCA、pCE6、pCMAE and pCDNA3.1(+)

图 1 *mpb64*、*ag85b*、*esat-6* 基因和 *mpb64-ag85b-esat-6* 融合基因转染 sp2/0 细胞的免疫荧光结果

Fig. 1 The results of *mpb64*, *ag85b*, *esat-6* and *mpb64-ag85b-esat-6* genes transfected into SP2/0 cells

2.2 血清特异性抗体的检测

以纯化的 rMAE 蛋白为包被抗原进行间接 ELISA 试验检测免疫小鼠血清特异性抗体水平, 结果如图 2 所示: 小鼠免疫后各疫苗组的抗体水平均呈现上升趋势, 其中以融合 DNA 疫苗组(B 组)抗体水平上升最快, 与组合 DNA 疫苗组(A 组)和 BCG 组(C 组)相比差异显著($P < 0.05$), A 和 C 组之间也表现出显著差异($P < 0.05$)。从一免后 3 周开始 A~C 组血清抗体水平与空载体对照组和 PBS 对照组相比均出现显著差异($P < 0.05$), 至第 5 周, A、B 组与 2 个对照组相比则差异极显著($P < 0.01$), 而 2 个对照组之间差异不显著($P > 0.05$)。

2.3 免疫小鼠脾淋巴细胞增殖情况

从脾淋巴细胞增殖试验的结果来看(图 3), 各疫苗组 T 淋巴细胞的增殖水平始终高于对照组。一免 2 周后 A、B、C 组之间无明显差异($P > 0.05$); 二免和三免后融合 DNA 疫苗组(B 组)的刺激值明显高于 BCG 组(C 组)($P < 0.05$), 组合 DNA 疫苗

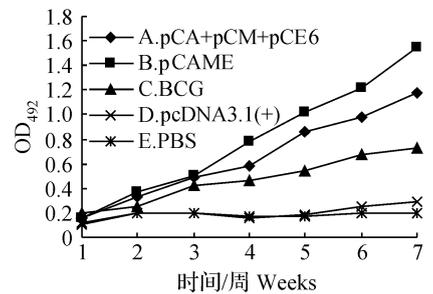


图 2 免疫小鼠血清抗体动态变化

Fig. 2 The dynamic changes of antibody level in serum from immune mice

(A 组)SI 值介于两者之间, A~C 组的 SI 值极显著高于 2 个对照组($P < 0.01$)。

2.4 免疫小鼠脾淋巴细胞 IFN- γ 分泌情况

IFN- γ 检测结果(图 4)表明, 经 rMAE 蛋白诱生后各疫苗免疫组小鼠脾淋巴细胞均可分泌较高水平的 IFN- γ 。一免 2 周后, 各组之间差异不明显($P > 0.05$); 二免后, 融合 DNA 疫苗组(B 组)小鼠分

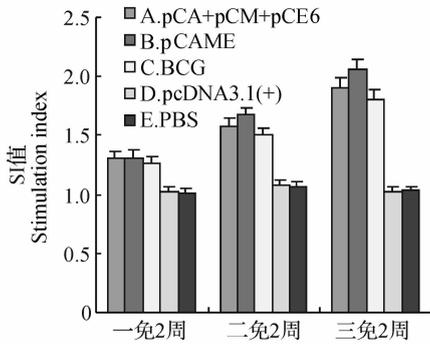


图3 小鼠脾脏淋巴细胞增殖情况(SI, $\bar{x} \pm s$)

Fig. 3 The splenic lymphocytes proliferation in mice (SI, $\bar{x} \pm s$)

泌的IFN- γ 量极显著高于其他各组($P < 0.01$),组合DNA疫苗组(A组)和BCG组(C组)之间无显著差别($P > 0.05$);三免后,B组仍显著高于其他疫苗组,且A组高于C组。

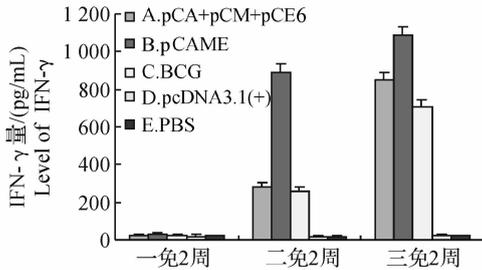


图4 rMAE蛋白刺激后脾淋巴细胞IFN- γ 分泌量

Fig. 4 The level of IFN- γ secreted by splenic lymphocytes induced with rMAE protein

2.5 免疫小鼠脾淋巴细胞IL-2分泌情况

IL-2检测结果(图5)表明,一免2周后经rMAE蛋白诱导,各组小鼠脾淋巴细胞分泌的IL-2水平无明显差异($P > 0.05$);二免后融合DNA疫苗组(B组)分泌的IL-2明显高于组合DNA疫苗组(A组)和BCG组(C组)($P < 0.05$);三免后,B组分泌的IL-2量极显著高于A和C组($P < 0.01$)。A组分泌的IL-2稍高于C组($P > 0.05$)。

2.6 肺组织荷菌数

BCG组和DNA疫苗组小鼠肺脏荷菌数明显低于2对照(组)($P < 0.05$),DNA疫苗组间相比差异显著($P < 0.05$),B组荷菌数虽稍高于BCG组,但两者无明显差别($P > 0.05$)。A组荷菌数高于B组,但明显低于对照组(D和E组)(表2)。

2.7 肺组织病理变化

HE染色检测以牛分枝杆菌BCG攻毒后的肺

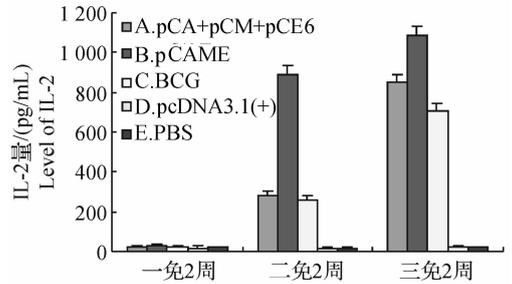


图5 rMAE蛋白刺激后脾淋巴细胞分泌IL-2的量
Fig. 5 The level of IL-2 secreted by splenic lymphocytes induced with rMAE protein

表2 小鼠肺组织荷菌数($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Bacterial load of mouse lung tissue ($\bar{x} \pm s$)

组别 Groups	荷菌量/(CFU/mg) Bacterial load
A. pCA+pCM+pCE6	$(0.74 \pm 0.07) \times 10^{4c}$
B. pCAME	$(0.67 \pm 0.05) \times 10^{4b}$
C. BCG	$(0.65 \pm 0.06) \times 10^{4b}$
D. pcDNA3.1(+)	$(2.14 \pm 0.17) \times 10^{4a}$
E. PBS	$(2.35 \pm 0.19) \times 10^{4a}$

不同字母表示 $P < 0.05$

Data with different superscripts differ significantly, $P < 0.05$

组织,D组和E组表现出严重的病理变化,纤维素性蛋白渗出和纤维素性肺炎;A组的病理变化比B和C组严重,但比D和E组轻,表现为肺泡隔充血扩张,毛细血管显著扩张和纤维素性蛋白渗出;与A、D和E组相比,B和C组的病理变化较轻,毛细血管扩张和轻微的纤维素性渗出。

3 讨论

牛分枝杆菌是结核分枝杆菌群的成员之一,其基因组存在多种保护性抗原成分。研究表明以ES-AT-6、MPB64、Ag85复合物等编码基因构建的DNA疫苗可表现出一定的保护效果^[4-6]。然而,不同DNA疫苗免疫效果差别很大,尤其是以单一的靶抗原研制的牛分枝杆菌DNA疫苗,对强毒攻击后的保护作用不明显或者不能肯定^[7-8]。而牛分枝杆菌多价及融合DNA疫苗的免疫保护效果明显优于单价DNA疫苗^[9-10]。

本试验以牛分枝杆菌分泌蛋白基因mpb64、ag85b和esat-6为基础构建了牛结核病三基因融合DNA疫苗pCMAE和三价组合DNA疫苗pCM+pCA+pCE6。通过对其免疫小鼠后的体液免疫和细

胞免疫指标的检测评价了其免疫效果。在设计基因融合时,为了增强各基因表达产物折叠的自由度,在 *mpb64* 基因的下游引物引入了 4 个氨基酸的连接肽,由于 Pro 残基的转角效应和 Gly 残基无侧链基团的柔软效应,避免了形成 α -螺旋,使各目的蛋白能够保持各自的空间结构和相对独立的生物学功能^[11]。

机体对牛分枝杆菌的免疫反应主要依赖于细胞免疫应答,T 细胞分泌的 IFN- γ 和 IL-2 等细胞因子在抗结核免疫中具有极其重要的作用。IFN- γ 可以诱导 Th0 细胞向 Th1 细胞分化,激活静止期的巨噬细胞,以及调节其呈递组织相容性复合物 II 类分子,活化的巨噬细胞产生活性氮中介物(RNI)、活性氧中介物(ROI)等毒性效应分子杀灭胞内分枝杆菌。T 细胞在牛分枝杆菌感染的潜伏期特别活跃,如果在此期间用抗 IFN- γ 抗体处理会使肺部细菌增长 10 倍。Vordermeier 等的研究表明 IFN- γ 分泌水平与疫苗的保护效果呈正相关^[12]。因此,IFN- γ 的分泌水平已成为评价疫苗免疫效果的一个关键指标^[13]。本研究对 DNA 疫苗免疫小鼠后脾淋巴细胞增殖水平及其分泌的 IFN- γ 和 IL-2 水平进行了检测,结果表明,融合 DNA 疫苗 pCMAE 诱导细胞免疫应答的能力明显优于三价组合 DNA 疫苗和 BCG 疫苗。

以 *Mycobacterium bovis* BCG 攻击后,各疫苗组肺脏荷菌数显著低于 2 对照组,融合 DNA 疫苗组小鼠肺脏荷菌量与 BCG 组相似,明显低于多价 DNA 疫苗组($P < 0.05$),且多价 DNA 疫苗组肺脏病变程度也比融合 DNA 疫苗组严重。表明牛分枝杆菌融合 DNA 疫苗可有效抵抗牛分枝杆菌 BCG 菌株的攻击,其保护效果与卡介苗相当。

总体上,本试验构建的 2 种 DNA 疫苗诱导免疫应答的能力均优于 BCG 疫苗,且融合 DNA 疫苗免疫效果明显优于组合 DNA 疫苗。另外,融合 DNA 疫苗是将两种或多种抗原基因连接在同一载体中,置于同一启动子下,以一种融合蛋白的形式在体内表达,这比多价组合 DNA 疫苗更易于生产和产业化开发,不仅简化了生产过程,降低了生产成本,而且这不必考虑各单价 DNA 疫苗混合的比例问题,便于标准化,具有较好的应用前景。

参考文献:

[1] ORME I M. Current progress in tuberculosis vaccine development[J]. *Vaccine*, 2005,23:2 105-2 108.
[2] DEL P 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*, 1991,29:2 163-2 168.

- [3] 郭设平,刘思国,张秀华,等.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[J]. *畜牧兽医学报*,2006,37(7):676-680.
[4] HERNANDEZ Y L, CORONA D Y, RODRIGUEZ S S, et al. Immunization of mice with *Mycobacterium tuberculosis* genomic expression library results in lower bacterial load in lungs after challenge with BCG [J]. *Tuberculosis*, 2006,86:247-254.
[5] LOWRIE D B, SILVA C L, COLSTON M J, et al. Protection against tuberculosis by a plasmid DNA vaccine[J]. *Vaccine*,1997,15:834-838.
[6] TANGHE A, LEFEVRE P, DENIS O, et al. Immunogenicity and protective efficacy of tuberculosis DNA vaccine encoding putative phosphate transport receptors[J]. *J Immunol*,1999,162:1 113-1 119.
[7] LEFEVRE P, DENIS O, WIT L, et al. Cloning of the gene encoding a 22 kilodalton cell surface antigen of *Mycobacterium bovis* BCG and analysis of its potential for DNA vaccination against tuberculosis[J]. *Infect Immun*, 2000,68:1 040-1 047.
[8] NATIO M, MATSUOKA M, OHARA N. The antigen 85 complex vaccine against experimental *Mycobacterium leprae* infection in mice [J]. *Vaccine*, 1999,18:795-798.
[9] KAMATH A T, FENG C G, MACDONALD M, et al. Differential protective efficacy of DNA vaccine expressing secreted proteins of *Mycobacterium tuberculosis*[J]. *Infect immune*,1997,67: 1 702-1 707.
[10] AGGER E M, ROSENKRANDS I, OLSEN A W, et al. Protective immunity to tuberculosis with Ag85B-ESAT-6 in a synthetic cationic adjuvant system IC31 [J]. *Vaccine*, 2006,24:5 452-5 460.
[11] LIU S G, TU C C, WANG C L, et al. The protective immune response induced by B cell epitope of classical swine fever virus glycoprotein E2[J]. *J Viro Methods*, 2006, 134:125-129.
[12] VORDERMEIER H M, CHAMBERS M A, COCKLE P J, et al. correlation of ESAT-6 specific gamma interferon production with pathology in cattle following *Mycobacterium bovis* BCG vaccination against experimental bovis tuberculosis [J]. *Infect Immun*, 2002,70:3 026-3 032.
[13] AGGER E M, ANDERSEN P. Tuberculosis subunit vaccine development :on the role of interferon γ [J]. *Vaccine*, 2001,19:2 298-2 302.