

# 结核分枝杆菌 ESAT6、CFP10 基因 DNA 疫苗 对小鼠免疫原性的初步研究

王慧勤<sup>1,2</sup>, 李跃峰<sup>2</sup>, 李志强<sup>2</sup>, 温书香<sup>2</sup>, 陈鹏博<sup>2</sup>, 赵庆亮<sup>2</sup>, 纪太旺<sup>2</sup>, 曹旭东<sup>3</sup>, 陈创夫<sup>2</sup>

**摘要:**目的 研究 ESAT6、CFP10 基因 DNA 疫苗分别与卡介苗联合免疫小鼠,以诱导免疫效果。方法 以构建的真核表达载体 pEGFP-N1-ESAT6、pEGFP-N1-CFP10 与卡介苗共同免疫随机分成 8 组的 80 只小鼠,分别标记为:生理盐水组(SLYS)、卡介苗组(KJM)、pEGFP-N1 组(P-N1)、pEGFP-N1-ESAT6 组(P-N1-E)、pEGFP-N1-CFP10 组(P-N1-C)、卡介苗加 pEGFP-N1 组(K+P-N1)、卡介苗加 pEGFP-N1-ESAT6 组(K+P-N1-E)和卡介苗加 pEGFP-N1-CFP10 组(K+P-N1-C)。每只小鼠皮内注射 100 $\mu$ L 卡介苗,每只小鼠肌肉注射 50 $\mu$ g 质粒,每组共注射 3 次。以纯化的 ESAT6、CFP10 蛋白作为抗原,用 DOT-ELISA 方法检测小鼠血清中的抗体;用 ELISA 方法检测小鼠血清中 IFN- $\gamma$  的变化。结果 免疫 3 次后的小鼠血清中检测到针对 CFP10 蛋白的抗体,未检测到针对 ESAT6 蛋白的抗体。但二者血清中 IFN- $\gamma$  水平都有显著上升,K+P-N1-C 和 K+P-N1-E 免疫 3 次后,测得的 IFN- $\gamma$  平均含量为(107.591 $\pm$ 7.3281)pg/mL 和(95.7503 $\pm$ 9.0184)pg/mL,显著高于免前、一免、二免( $P<0.01$ )。结论 结核分枝杆菌 ESAT6、CFP10 基因 DNA 疫苗和卡介苗联合应用后可诱导小鼠产生有效的细胞免疫应答,为 DNA 疫苗的研究奠定一定的基础。

**关键词:**结核分枝杆菌;ESAT6;CFP10;DNA 疫苗;卡介苗

中图分类号:R378

文献标识码:A

文章编号:1002-2694(2014)05-0458-06

## Preliminary study of *Mycobacterium tuberculosis* ESAT6 and CFP10 DNA vaccine immunogenicity in mice

WANG Hui-qin<sup>1,2</sup>, LI Yue-feng<sup>2</sup>, LI Zhi-qiang<sup>2</sup>, WEN Shu-xiang<sup>2</sup>, CHEN Peng-bo<sup>2</sup>,  
ZHAO Qing-liang<sup>2</sup>, JI Tai-wang<sup>2</sup>, CAO Xun-dong<sup>3</sup>, CHEN Chuang-fu<sup>2</sup>

(1. College of Life Sciences, Shihezi University, Shihezi 832003, China;

2. Key Laboratory of Ministry of Education, Xinjiang Endemic and Ethnic Diseases,  
Shihezi University, Shihezi 832003, China;

3. School of Medicine, Shihezi University, Shihezi 832003, China)

**ABSTRACT:** The objective of the present study was to investigate immune effect by using ESAT6, CFP10 DNA vaccine combined with BCG to immunize mice. DNA vaccine pEGFP-N1-ESAT6 and pEGFP-N1-CFP10 was primarily constructed, and 80 mice were randomly divided into eight groups including saline group (SLYS), BCG group (KJM), pEGFP-N1 group (P-N1), pEGFP-N1-ESAT6 group (P-N1-E), pEGFP-N1-CFP10 group (P-N1-C), BCG plus pEGFP-N1 group (K+P-N1), BCG plus pEGFP-N1-ESAT6 group (K+P-N1-E), and BCG plus pEGFP-N1-CFP10 group (K+P-N1-C). Each mouse was intradermally injected with 100  $\mu$ L BCG, while each mouse was intramuscularly injected with plasmid pEGFP-N1-ESAT6, pEGFP-N1-CFP10 (50  $\mu$ g). Each group was injected for three times. Purified ESAT6, CFP10 proteins were used as antigen. DOT-ELISA method was used to detect antibodies in the serum of mice. ELISA method was used to detect the change of the IFN- $\gamma$  in the serum of mice. Antibodies against CFP10 proteins were detected in mouse serum after three immunizations. Antibody against ESAT6 proteins was not detected. However, IFN- $\gamma$  levels in serum increased significantly. The average content of

国家自然科学基金(No. 31060333, 2013ZX10003003)联合资助

通讯作者: 陈创夫, Email: ccf-xb@163.com

曹旭东, Email: cxd100@sohu.com

作者单位: 1. 新疆石河子大学生命科学学院, 石河子 832003;

2. 新疆地方与民族高发病省部共建教育部重点实验室, 石河子 832003;

3. 新疆石河子大学医学院, 石河子 832003

the measured IFN- $\gamma$  was significantly higher than that before immunization; the first immunization and the second immunization ( $P<0.01$ ) was (107.591 $\pm$ 7.3281) pg/mL and (95.7503 $\pm$ 9.0184) pg/mL after three times immunization with K+P-N1-C and K+P-N1-E. It concluded that *Mycobacterium tuberculosis* ESAT6 and CFP10 DNA vaccine com-

combined with BCG combination could induce an effective cellular immune response, which lay a foundation for the study of DNA vaccines.

**KEY WORDS:** *Mycobacterium tuberculosis*; ESAT6; CFP10; DNA vaccine; BCG

Support by the National Natural Science Foundation of China (No. 31060333) and the Major Project for Control and Prevention of AIDS, Viral Hepatitis and Other Important Infectious Diseases (No. 2013ZX10003003)

Corresponding authors: Chen Chuang-fu, Email: ccf-xb@163.com; Cao Xu-dong, Email: cxd100@sohu.com

结核病(tuberculosis, TB)是由结核分枝杆菌感染引起的人兽共患慢性传染病之一。全世界约 20 亿人被感染结核分支杆菌,每年超过 200 万人死于本病<sup>[1]</sup>。目前广泛用于预防的疫苗是卡介苗(BCG),新生儿和儿童接种卡介苗可预防结核病的发生,但对于成人免疫保护效果十分低下。因此寻求效果优于 BCG 的新型疫苗势在必行。

ESAT6、CFP10 基因只存在于大多数致病性结核杆菌中,而不存在于卡介苗内。本实验旨在应用构建的真核表达载体 pEGFP-N1-ESAT6、pEGFP-N1-CFP10 分别与卡介苗一起联合应用免疫小鼠,在小鼠体内诱导细胞和体液免疫应答的能力,来检测小鼠血清中抗体和 IFN- $\gamma$  水平的变化,为 ESAT6、CFP10 基因 DNA 疫苗分别与卡介苗联合免疫后的免疫效果研究打下基础。

## 1 材料与方 法

1.1 材料 6~8 w 龄小白鼠购自石河子大学动物实验中心,卡介苗购自乌鲁木齐疾病控制中心,小鼠 IFN- $\gamma$  检测试剂盒购自 RD 公司(Cat #: CK-E11382M),原核表达载体 PET32a-CFP10、PET28a-GFP-ESAT6 和真核表达载体 PEGFP-N1-ESAT6、PEGFP-N1-CFP10 由本实验室构建<sup>[2-3]</sup>。增强型 HRP-DAB 试剂盒购自天根生化(北京)科技有限公司;兔抗 CFP10 多克隆抗体、鼠抗 ESAT6 单克隆抗体购自 abcam 公司;山羊抗兔 IgG-HRP、山羊抗鼠 IgG-HRP 购自 bioworld 公司;蛋白预染 Marker PageRuler Prestained protein ladder 购自 Thermo 公司。

### 1.2 方 法

1.2.1 PET32a-CFP10、PET28a-GFP-ESAT6 原核蛋白的表达、纯化 分别将含有 PET32a-CFP10、PET28a-GFP-ESAT6 质粒的 DE3 阳性菌接种于 20mL 含抗性的 LB 液体培养基,培养过夜。次日按 1% 的接种量转接于 600mL 含抗性的 LB 的三角烧瓶中,37℃ 培养至 OD<sub>600</sub>=0.6 左右时,加入 IPTG 终浓度为 1mmol/L 进行诱导表达 4 h,收集菌体按

照蛋白纯化步骤进行蛋白纯化,进而获得目的蛋白。收集各个步骤成分制备成蛋白样后进行 SDS-PAGE 和 Western Blotting 检测。Western Blotting 分析所用一抗为 abcam 公司,兔抗 CFP10 多克隆抗体、鼠抗 ESAT6 单克隆抗体。

### 1.2.2 小鼠分组及免疫

1.2.2.1 质粒的提取 用无内毒素质粒大提试剂盒分别对含有 pEGFP-N1、pEGFP-N1-ESAT6、pEGFP-N1-CFP10 质粒的大肠杆菌 DH5 $\alpha$  进行质粒提取,提取步骤按照天根无内毒素质粒大提试剂盒说明书中操作步骤进行质粒提取。

1.2.2.2 分组 将 80 只小鼠随机分成 8 组,每组 10 只,分别标记为生理盐水组(SLYS)、卡介苗组(KJM)、pEGFP-N1 组(P-N1)、pEGFP-N1-ESAT6 组(P-N1-E)、pEGFP-N1-CFP10 组(P-N1-C)、卡介苗加 pEGFP-N1 组(K+P-N1)、卡介苗加 pEGFP-N1-ESAT6 组(K+P-N1-E)、卡介苗加 pEGFP-N1-CFP10 组(K+P-N1-C)。

1.2.2.3 免疫小鼠及采血 每只小鼠质粒注射量为 50  $\mu$ g,采用后腿肌肉注射;含卡介苗注射组小鼠一支卡介苗稀释后注射 5 只小鼠,采用背部皮下注射。免疫 3 次,每次免疫间隔 1 周。第 1 次免疫前 1 d 采 1 次血,第 1 次免疫后第 5 d 天采血,第 2 次、第 3 次免疫 1 周后采血,然后 1 周之后采 1 次血。小鼠采血方法为断尾采血。收集血液后,3 000 r/min 离心 10 min 将血清和红细胞迅速小心的分离,分装于 1.5 mL 离心管中,于 -20℃ 保存备用。

1.2.3 小鼠血清中抗体检测 用针对 ESAT6、CFP10 蛋白的抗体以及免疫前小鼠血清分别作为一抗,作出所纯化的 ESAT6、CFP10 蛋白的标准 DOT-ELISA 结果;再以每次免疫后收集的不同组小鼠血清分别作为一抗,用 DOT-ELISA 方法检测针对 ESAT6、CFP10 蛋白的抗体。

1.2.4 小鼠血清中 IFN- $\gamma$  检测 用 RD 公司生产的小鼠 IFN- $\gamma$  Elisa 检测试剂盒,对免疫前、第 1 次免疫、第 2 次免疫和第 3 次免疫后小鼠血清中 IFN- $\gamma$  含量进行检测,并制作标准曲线,每组做 3 个重

复。检测操作步骤按如下说明书进行：①4℃冰箱中取出试剂盒，从室温平衡20 min后的铝箔袋中取出所需板条。②设置标准品孔和样本孔，标准品孔各加不同浓度的标准品50 μL。③样品孔先加待测样品10 μL，再加样本稀释液40 μL，空白孔不加。④除空白孔外，标准品孔和样品孔中每孔加入辣根过氧化物酶(HRP)标记的检测抗体100 μL，用封板膜封住反应孔，37℃恒温箱温育60 min。⑤弃去液体，吸水纸上拍干，每孔加满洗涤液，静置1 min，甩去洗涤液，吸水纸上拍干，如此重复洗板5次。⑥每孔加入底物A、B各50 μL，37℃避光孵育15 min。⑦每孔加入终止液50 μL，15 min内，在450 nm波长处测定各孔的OD值。

1.2.5 统计学分析方法 采用完全随机设计，数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示，使用spss17.0统计软件进行完全随机设计方差分析，求出统计量F值及P值。

## 2 结果

2.1 ESAT6、CFP10 原核蛋白的纯化及 Western Blot 验证 ESAT6、CFP10 基因原核表达蛋白的纯化用 SDS-PAGE 检测，结果表明这两个蛋白在第2次和第3次洗脱液中纯度较高，见图1；用购买的一抗体和二抗做 Western Blot 验证结果表明所纯化的 ESAT6、CFP10 蛋白具有抗原性，可以作为检测小鼠血清中针对 ESAT6、CFP10 蛋白的抗原，见图2。

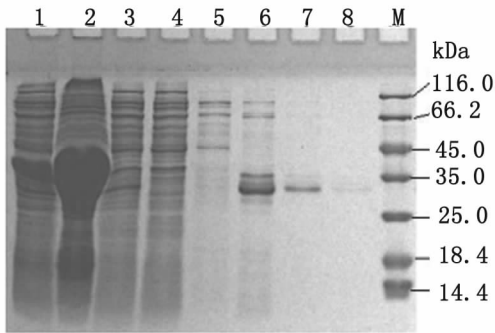


图 1A 重组融合蛋白 ESAT6 的诱导表达纯化

1: PET28a-GFP-ESAT6 DE3 全菌蛋白; 2: 裂解后沉淀; 3: 裂解后的上清; 4: 穿过液; 5: Wash Buffer; 6: 第一次洗脱; 7: 第二次洗脱; 8: 第三次洗脱; M: 蛋白 Marker;

Fig. 1A SDS-PAGE analysis of purified recombinant ESAT6 protein

1: PET28a-GFP-ESAT6 DE3 whole bacterial proteins; 2: Precipitation after lysis; 3: Supernatant after cleavage; 4: Soluble protein; 5: Wash Buffer; 6: The first washed protein 7: The second washed protein 8: The third washed protein; M: Protein Marker.

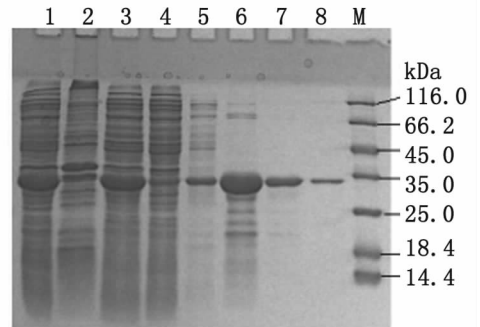


图 1B 重组融合蛋白 CFP10 的诱导表达纯化

1: PET32a-CFP10 DE3 全菌蛋白; 2: 裂解后沉淀; 3: 裂解后的上清; 4: 穿过液; 5: Wash Buffer; 6: 第一次洗脱; 7: 第二次洗脱; 8: 第三次洗脱; M: 蛋白 Marker

Fig. 1B SDS-PAGE analysis of recombinant CFP10 protein

1: PET32a-CFP10 DE3 whole bacterial proteins; 2: Precipitation after lysis; 3: Supernatant after cleavage; 4: Soluble protein; 5: Wash Buffer; 6: The first washed protein; 7: The second washed protein; 8: The third washed protein; M: Protein Marker.

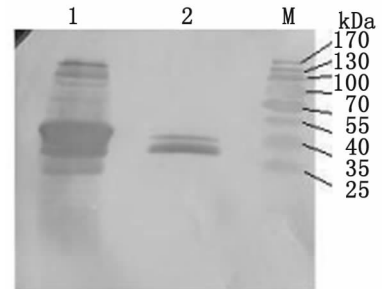


图 2A ESAT6 蛋白纯化后 Western Blot 分析

1: PET28a-GFP-ESAT6 DE3 全菌蛋白; 2: 纯化后第二次洗脱蛋白; M: 蛋白 Marker

Fig. 2A Western Blot analysis of purified ESAT6

1: PET28a-GFP-ESAT6 DE3 whole bacterial proteins; 2: The second washed purified protein; M: Protein Marker.

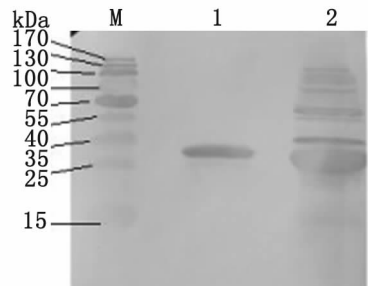


图 2B CFP10 蛋白纯化后 Western Blot 分析

1: PET32a-CFP10 DE3 全菌蛋白; 2: 纯化后第二次洗脱蛋白; M: 蛋白 Marker;

Fig. 2B Western blot analysis of purified CFP10

1: PET32a-CFP10 DE3 whole bacterial protein; 2: The second washed purified protein; M: Protein Marker.

2.2 小鼠血清中抗体检测 结合 2.1 中蛋白电泳结果,选择诱导后含有 PET28a-GFP-ESAT6、PET32a-CFP10 质粒的 DE3 全菌,纯化后 ESAT6、CFP10 的第 2、3 次洗脱蛋白进行每次免疫后的 DOT-ELISA 检测。第 1 次免疫、第 1 次免疫后的 DOT-ELISA 结果显示在第 2、3 次洗脱蛋白处没有出现褐色斑点,表明没有出现针对 ESAT6、CFP10 蛋白的抗体,而在第 3 次免疫后的 DOT-ELISA 结果显示在第 2 次、第 3 次洗脱蛋白 CFP10 出现了褐色的斑点,表明出现了针对 CFP10 蛋白的抗体。详细见图 3、图 4 和图 5。

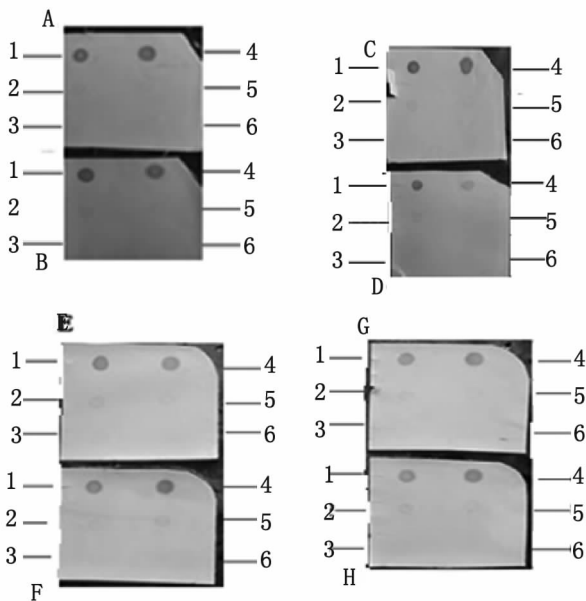


图 3 第 1 次免疫后 DOT-ELISA 分析

注: A、B、C、D、E、F、G、H 图中 1、2、3 依次为 PET28a-GFP-ESAT6 DE3 全菌蛋白、ESAT6 第 2 次洗脱蛋白、ESAT6 第 3 次洗脱蛋白; 4、5、6 依次为 PET32a-CFP10 DE3 全菌蛋白、CFP10 第 2 次洗脱蛋白、CFP10 第 3 次洗脱蛋白。

A: SLYS 组; B: P-N<sub>1</sub> 组; C: P-N<sub>1</sub>-C 组; D: P-N<sub>1</sub>-E 组; E: KJM 组; F: K+P-N<sub>1</sub> 组; G: K+P-N<sub>1</sub>-C 组; H: K+P-N<sub>1</sub>-E 组

Fig. 3 DOT-ELISA analysis after 1st immunization

1: PET28a-GFP-ESAT6 DE3 whole bacterial proteins; 2: The second washed ESAT6 protein; 3: The third washed ESAT6 protein; 4: PET28a-GFP-CFP10 DE3 whole bacterial proteins; 5: The second washed CFP10 protein; 6: The third washed CFP10 protein;

A: SLYS group; B: P-N<sub>1</sub> group; C: P-N<sub>1</sub>-C group; D: P-N<sub>1</sub>-E group; E: KJM group; F: K+P-N<sub>1</sub> group; G: K+P-N<sub>1</sub>-C group; H: K+P-N<sub>1</sub>-E group.

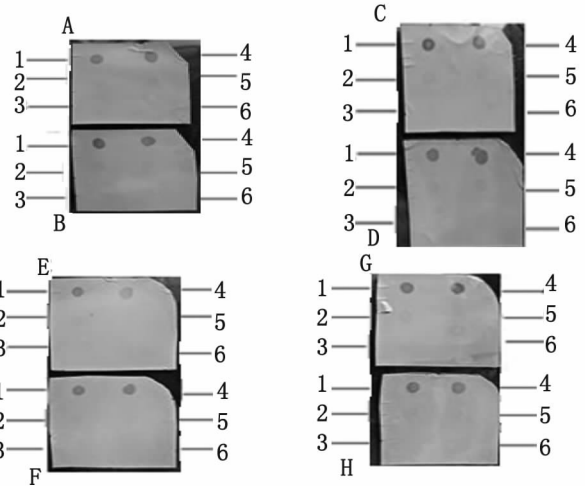


图 4 第 2 次免疫后 DOT-ELISA 分析

注: A、B、C、D、E、F、G、H 图中 1、2、3 依次为 PET28a-GFP-ESAT6 DE3 全菌蛋白、ESAT6 第 2 次洗脱蛋白、ESAT6 第 3 次洗脱蛋白; 4、5、6 依次为 PET32a-CFP10 DE3 全菌蛋白、CFP10 第 2 次洗脱蛋白、CFP10 第 3 次洗脱蛋白。

A: SLYS 组; B: P-N<sub>1</sub> 组; C: P-N<sub>1</sub>-C 组; D: P-N<sub>1</sub>-E 组; E: KJM 组; F: K+P-N<sub>1</sub> 组; G: K+P-N<sub>1</sub>-C 组; H: K+P-N<sub>1</sub>-E 组

Fig. 4 DOT-ELISA analysis after 2nd immunization

1: PET28a-GFP-ESAT6 DE3 whole bacterial proteins; 2: The second washed ESAT6 protein; 3: The third washed ESAT6 protein; 4: PET28a-GFP-CFP10 DE3 whole bacterial proteins; 5: The second washed CFP10 protein; 6: The third washed CFP10 protein; A: SLYS group; B: P-N<sub>1</sub> group; C: P-N<sub>1</sub>-C group; D: P-N<sub>1</sub>-E group; E: KJM group; F: K+P-N<sub>1</sub> group; G: K+P-N<sub>1</sub>-C group; H: K+P-N<sub>1</sub>-E group.

2.3 IFN- $\gamma$  检测 用 RD 公司生产的小鼠 IFN- $\gamma$  Elisa 检测试剂盒说明书进行实验,各组小鼠血清稀释五倍后,血清中 IFN- $\gamma$  测定结果使用完全随机设计方差分析,求出统计量 F 值(spss17.0)。结果见表 1,IFN- $\gamma$  变化结果见图 6。SLYS 组,免前、一免、二免、三免差异不显著,无统计学意义( $P > 0.05$ )。P-N<sub>1</sub> 组,免前、一免、二免差异不显著,但与三免差异极显著,有统计学意义( $P < 0.01$ )。P-N<sub>1</sub>-C 组;P-N<sub>1</sub>-E 组;KJM 组;K+P-N<sub>1</sub> 组;K+P-N<sub>1</sub>-C 组;K+P-N<sub>1</sub>-E 组免前、一免、二免、三免差异有统计学意义( $P < 0.01$ )。

### 3 讨论

由于结核病疫情的严峻形势和 BCG 预防结核病效果的不确定性,世界各国人们一直对新型防御结核疫苗的研发持续进行。

表 1 IFN- $\gamma$  检测结果  
Tab. 1 Test results of IFN- $\gamma$

组别 Group	免前 (pg/mL) Before immunization	一免 (pg/mL) 1st immunization	二免 (pg/mL) 2nd immunization	三免 (pg/mL) 3rd immunization
SLYS	65.468 ± 0.5256 <sup>aA</sup>	65.4713 ± 0.3546 <sup>aC</sup>	65.4883 ± 0.474 <sup>aD</sup>	49.124 ± 9.9723 <sup>aB</sup>
P-N1	65.355 ± 0.7532 <sup>aA</sup>	66.133 ± 0.082 <sup>aC</sup>	68.2757 ± 0.2828 <sup>aD</sup>	83.8997 ± 6.0307 <sup>B</sup>
P-N1-C	65.5397 ± 0.3239 <sup>aA</sup>	66.6777 ± 0.1423 <sup>bC</sup>	71.086 ± 0.1399 <sup>cD</sup>	89.4847 ± 7.3282 <sup>B</sup>
P-N1-E	65.3557 ± 0.4924 <sup>aA</sup>	68.3283 ± 0.1023 <sup>bC</sup>	71.2083 ± 0.1627 <sup>cD</sup>	87.8493 ± 11.3742 <sup>B</sup>
KJM	65.0567 ± 0.1486 <sup>aA</sup>	70.137 ± 0.1251 <sup>bC</sup>	72.571 ± 0.1682 <sup>cD</sup>	88.743 ± 6.0379 <sup>B</sup>
K+P-N1	65.564 ± 0.4538 <sup>aA</sup>	70.7147 ± 0.6219 <sup>bC</sup>	73.114 ± 0.0243 <sup>cD</sup>	88.413 ± 5.0539 <sup>B</sup>
K+P-N1-C	65.523 ± 0.8086 <sup>aA</sup>	72.2943 ± 0.233 <sup>bC</sup>	74.2183 ± 0.0217 <sup>cD</sup>	107.591 ± 7.3281 <sup>B</sup>
K+P-N1-E	65.4057 ± 0.1534 <sup>aA</sup>	72.6603 ± 0.2867 <sup>bC</sup>	74.6017 ± 0.0562 <sup>cD</sup>	95.7503 ± 9.0184 <sup>B</sup>

注: ( $\bar{x} \pm s^A$ ) 表示: 平均值 ± 方差; 同行数据肩标相同小写字母表示差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ), 肩标不同小写字母表示差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 肩标不同大写字母表示差异极显著, 有统计学意义 ( $P < 0.01$ )。

Note: ( $\bar{x} \pm s^A$ ) means  $\pm$  variance; peer data shoulder the same lowercase letters means there is not statistically significant ( $P > 0.05$ ); shoulder different lowercase letters marked difference was statistically significant ( $P < 0.05$ ); shoulder different uppercase letters marked difference was statistically significant ( $P < 0.01$ ).

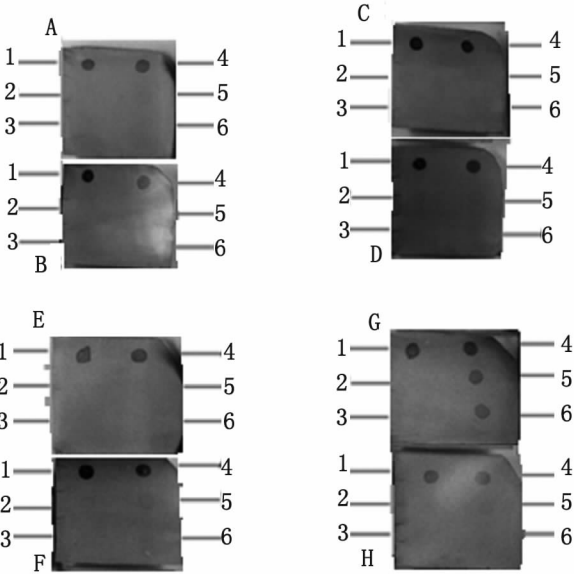


图 5 第 3 次免疫后 DOT-ELISA 分析

注: A、B、C、D、E、F、G、H 图中 1、2、3 依次为 PET28a-GFP-ESAT6 DE3 全菌蛋白、ESAT6 第 2 次洗脱蛋白、ESAT6 第 3 次洗脱蛋白; 4、5、6 依次为 PET32a-CFP10 DE3 全菌蛋白、CFP10 第 2 次洗脱蛋白、CFP10 第 3 次洗脱蛋白。

A: SLYS 组; B: P-N<sub>1</sub> 组; C: P-N<sub>1</sub>-C 组; D: P-N<sub>1</sub>-E 组; E: KJM 组; F: K + P-N<sub>1</sub> 组; G: K + P-N<sub>1</sub>-C 组; H: K + P-N<sub>1</sub>-E 组

Fig. 5 DOT-ELISA analysis after 3rd immunization

1: PET28a-GFP-ESAT6 DE3 whole bacterial proteins; 2: The second washed ESAT6 protein; 3: The third washed ESAT6 protein; 4: PET28a-GFP-CFP10 DE3 whole bacterial proteins; 5: The second washed CFP10 protein; 6: The third washed CFP10 protein; A: SLYS group; B: P-N<sub>1</sub> group; C: P-N<sub>1</sub>-C group; D: P-N<sub>1</sub>-E group; E: KJM group; F: K + P-N<sub>1</sub> group; G: K + P-N<sub>1</sub>-C group; H: K + P-N<sub>1</sub>-E group.

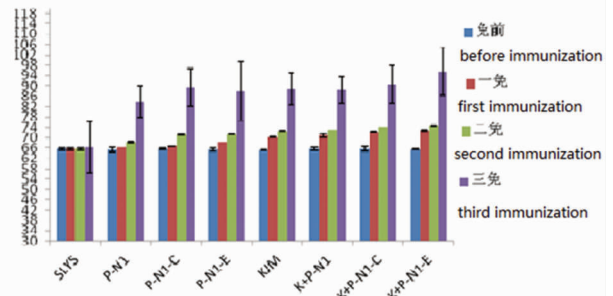


图 6 小鼠体内 IFN- $\gamma$  变化  
Fig. 6 Changes of IFN- $\gamma$  in mice

ESAT-6 是 MTB 培养早期分泌的抗原靶蛋白, 相对分子质量为  $6 \times 10^3$ 。CFP10, 培养滤液蛋白, 此蛋白位于 EAST-6 基因上游, 可以编码 100 个氨基酸, 相对分子量为  $10 \times 10^3$ 。培养滤液蛋白 10 (CFP10) 和早期分泌性抗靶 (ESAT6) 是从结核分枝杆菌短期培养滤液中分离到的两种低分子量蛋白质, 均由基因组 RD1 区编码, 该区只存在于结核分枝杆菌复合群和少数致病性分枝杆菌基因组中, 所有卡介苗 (BCG) 菌株及非致病性分枝杆菌基因组中均缺乏该区域<sup>[4-5]</sup>。本实验检测到了针对 CFP10 蛋白的抗体。CFP10 是免疫优势抗原, 能诱导机体产生强烈的免疫应答<sup>[6]</sup>。而本实验中未检测到针对 ESAT6 蛋白的抗体, 这可能是由于 DNA 疫苗激活 B 细胞反应有一定的滞后性, 抗体的产生需要 B 细胞对完整抗原的识别, 而识别的前提是抗原进入细胞表面或间隙以及抗原合成细胞的破裂释放<sup>[7]</sup>, 还有可能是 B 细胞活化的增殖, 产生特异性抗体, 需要分泌性或外源性的刺激和 CD4<sup>+</sup> T 细胞的辅助<sup>[8]</sup>。此外抗体的产生还与免疫佐剂的选择、免疫程序的使用、免疫次数、免疫途径、免疫剂量等有关,

所以在 DNA 疫苗免疫中抗体反应比较缓慢。

IFN- $\gamma$  是抗结核免疫反应中关键性的细胞因子,其作用主要有:促进 CD4<sup>+</sup> 和 CD8<sup>+</sup> T 细胞的聚集;增强细胞的抗原呈递;活化巨噬细胞,诱导产生活性氮介质(reactive nitrogen intermediates,RNI)的一氧化氮合成酶(nitric oxide synthase,NOS2)活性,从而增强巨噬细胞清除结核杆菌的能力<sup>[9-10]</sup>。

IFN- $\gamma$  基因的敲除小鼠较 NOS2 基因缺陷小鼠更易更感结核,对结核病易感性更高,且不能抑制结核杆菌的生长<sup>[11]</sup>;人体内出现 IFN- $\gamma$  受体基因或 IFN- $\gamma$  基因缺陷也更容易感染结核。所以血清中 IFN- $\gamma$  的变化可以作为检测结核疫苗免疫效果的一个重要指标,进而来反映细胞免疫水平的高低。CFP10 为一种有效的 T 细胞抗原,能刺激机体产生特异性细胞免疫应答,可以诱发 PPD 皮肤试验阳性者的外周血单个核细胞出现增殖反应和产生 IFN- $\gamma$ <sup>[12]</sup>。IFN- $\gamma$  能活化巨噬细胞,提高巨噬细胞对胞内结核菌的生长抑制作用和杀伤能力。ES-AT6、CFP10 是已被研究证实的结核分枝杆菌特有、BCG 中缺乏的一种分泌型蛋白抗原,由于富含 T 细胞抗原表位,而极少 B 细胞抗原表位,因此,是很强的结核细胞免疫刺激物,主要引起细胞免疫应答。实验中 pEGFP-N1-ESAT6、pEGFP-N1-CFP10 与 BCG 一起免疫小鼠 3 次后,IFN- $\gamma$  检测结果显示三组小鼠血清中 IFN- $\gamma$  水平均有显著上升,其中 pEGFP-N1-ESAT6 与 BCG 一起免疫组小鼠血清中 IFN- $\gamma$  水平高于 pEGFP-N1-CFP10 与 BCG 一起免疫组。说明 ESAT6、CFP10 基因 DNA 疫苗分别与 BCG 联合应用免疫小鼠后,小鼠在细胞免疫上产生了较高水平的 IFN- $\gamma$ 。随着免疫时间的推移,BCG 在三免时释放的  $\gamma$ -干扰素也逐渐升高,说明 BCG 也可以诱导小鼠产生细胞免疫和释放  $\gamma$ -干扰素,而低于 ESAT6 和 CFP10 基因 DNA 疫苗分别与卡介苗联合应用免疫小鼠,在小鼠体内诱导的免疫效果。

机体在抵抗结核杆菌感染中主要依赖于 TH1 型细胞免疫应答,即 MHC II 类分子介导的 CD4<sup>+</sup> Th1 型细胞分泌 IFN- $\gamma$ ,活化巨噬细胞杀灭吞噬的细菌。基因疫苗正好具有这一特点。BCG 对成人肺结核的保护作用不高,近年来成人结核病发病人数有持续上升的趋势,正成为结核病预防的一个难题。本实验初步观察结果显示 ESAT6、CFP10 基因 DNA 疫苗分别与 BCG 联合应用免疫小鼠后,小鼠血清中 IFN- $\gamma$  水平高于单独使用 BCG 组,提示我们在将来的免疫中可以采取 DNA 疫苗与 BCG 联合免疫的方式来提高成人对结核病的免疫,为疫

苗的研究奠定一定的基础。

## 参考文献:

- [1]Kumar H, Malhotra D, Goswami S, et al. How far have we reached in tuberculosis vaccine development[J]. Crit Rev Microbio, 2003, 29(4): 297-312.
- [2]Cao XD, Chen CF, Wang YZ, et al. Expression and purification of GFP-ESAT6 in *E. coli*[J]. Chin J Vet Sci, 2009, 29(9): 1158-1162. (in Chinese)  
曹旭东, 陈创夫, 王远志, 等. GFP-ESAT6 融合蛋白表达载体的构建及表达纯化[J]. 中国兽医学报, 2009(9): 1158-1162.
- [3]Li YF, Fu Q, Zhang JB, et al. Construction of the eukaryotic expression vector for ESAT6 gene of *Mycobacterium tuberculosis* and its expression[J]. J Shihezi Univ, 2013, 31(3): 318-322. (in Chinese)  
李跃峰, 付强, 张俊波, 等. 结核分枝杆菌 ESAT6 基因真核表达载体的构建及表达[J]. 石河子大学学报自然科学版, 2013, 31(3): 318-322.
- [4]Gordon SV, Brosch R, Billault A, et al. Identification of variable regions in the genomes of tubercle bacilli using bacterial artificial chromosome arrays[J]. Mol Microbiol, 1999, 32(3): 643-655.
- [5]Behr MA, Wilson MA, Gill WP, et al. Comparative genomics of BCG vaccines by whole-genome DNA microarray[J]. Science, 1999, 284(5419): 1520-1523.
- [6]Berthet F, Rasmussen P, Rosenkrands I, et al. A *Mycobacterium tuberculosis* operon encoding ESAT6 and a novel low-molecular-mass culture filtrate protein (CFP10) [J]. Microbiology, 1998, 144(11): 3195-3203.
- [7]Xu JQ. DNA vaccines[J]. Foreign Med Sci (Sect Immunol Foreign Med Sci), 1998, 21(2): 82-86. (in Chinese)  
徐建青. DNA 疫苗[J]. 国外医学(免疫学分册), 1998, 21(2): 82-86.
- [8]Deng SX, Cheng AC, Wang MS. Research progress of DNA vaccine[J]. J Anhui Agr Sci, 2007, 35(8): 2249-2250. (in Chinese)  
邓树轩, 程安春, 汪铭书. DNA 疫苗研究进展[J]. 安徽农业科学, 2007, 35(8): 2249-2250.
- [9]Dalton DK, Pitts-Meek S, Keshav S, et al. Multiple defects of immune cell function in mice with disrupted interferon-gamma genes[J]. Science, 1993, 259(5102): 1739-1742.
- [10]Flynn JL, Chan J, Triebold KJ, et al. An essential role for interferon- $\gamma$  in resistance to *Mycobacterium tuberculosis* infection [J]. J Exp Med, 1993, 178: 2249-2254.
- [11]Cooper AM, Dalton DK, Stewart TA, et al. Disseminated tuberculosis in interferon gamma gene-disrupted mice[J]. J Exp Med, 1993, 178(6): 2243-2247.
- [12]Van Pinxteren LA, Ravn P, Agger EM, et al. Diagnosis of tuberculosis based on the two specific antigens ESAT-6 and CFP10[J]. Clin Diagn Lab Immunol, 2000, 7(2): 155-160.