

## 研究报告

## 牛分枝杆菌分子标识物的筛选及在豚鼠体内的评价

辛凌翔<sup>1,2</sup>, 孙伟峰<sup>2</sup>, 王楠<sup>2</sup>, 李俊平<sup>2</sup>, 朱良全<sup>2</sup>, 王豪杰<sup>2</sup>, 徐磊<sup>\*2</sup>, 郭鑫<sup>\*1</sup>

1 中国农业大学, 北京 100193

2 中国兽医药品监察所, 北京 100081

辛凌翔, 孙伟峰, 王楠, 李俊平, 朱良全, 王豪杰, 徐磊, 郭鑫. 牛分枝杆菌分子标识物的筛选及在豚鼠体内的评价[J]. 微生物学通报, 2025, 52(2): 623-631.

XIN Lingxiang, SUN Weifeng, WANG Nan, LI Junping, ZHU Liangquan, WANG Haojie, XU Lei, GUO Xin. Screening of molecular markers of *Mycobacterium bovis* and preliminary evaluation in guinea pigs[J]. Microbiology China, 2025, 52(2): 623-631.

**摘要:** 【背景】牛结核病(bovine tuberculosis, BTB)是一种由结核分枝杆菌(*Mycobacterium tuberculosis*)复合体中的牛分枝杆菌(*Mycobacterium bovis*)引起的慢性传染性疾病,对牛群健康、畜牧业经济和公共卫生构成了重大威胁。【目的】筛选牛分枝杆菌新型诊断分子标识物,以期建立牛结核病新型诊断方法。【方法】利用同位素标记的相对与绝对定量技术并结合文献报道筛选出Mpb70、GroEL2、HspX、DnaK、Mpb83、EsxW、BfrB、Hrp1、EsxL、AtpD和EsxN这11种蛋白质进行制备,并通过豚鼠模型评价其致敏效果。【结果】当重组蛋白量为100 μg时,Mpb70、HspX、Mpb83和EsxN可引起明显的迟发型过敏反应,并且出现破溃。当使用量为50 μg时,Mpb70、HspX、Mpb83、EsxW、EsxL和EsxN可引起明显的迟发型过敏反应。当使用量低至12.5 μg时,则无法引起豚鼠的迟发型过敏反应。对不同蛋白进行组合使用,EsxW/EsxL/EsxN组合的活性最好,可刺激豚鼠产生明显的迟发型过敏反应;EsxW/EsxL、EsxW/EsxN、EsxL/EsxN组合也可引起迟发型过敏反应,但其反应程度不如EsxW/EsxL/EsxN组合。【结论】重组蛋白Mpb70、HspX、Mpb83、EsxW、EsxL和EsxN可引起较好的迟发型过敏反应,具有可替代结核菌素的应用前景。

**关键词:** 豚鼠模型; 迟发型过敏反应; 重组蛋白; 结核菌素

资助项目: 国家重点研发计划(2022YFD1800703)

This work was supported by the National Key Research and Development Program of China (2022YFD1800703).

\*Corresponding authors. E-mail: XU Lei, 609697832@qq.com; GUO Xin, guoxincau@cau.edu.cn

Received: 2024-08-31; Accepted: 2024-12-31; Published online: 2025-01-08

## Screening of molecular markers of *Mycobacterium bovis* and preliminary evaluation in guinea pigs

XIN Lingxiang<sup>1,2</sup>, SUN Weifeng<sup>2</sup>, WANG Nan<sup>2</sup>, LI Junping<sup>2</sup>, ZHU Liangquan<sup>2</sup>, WANG Haojie<sup>2</sup>, XU Lei<sup>\*2</sup>, GUO Xin<sup>\*1</sup>

1 China Agricultural University, Beijing 100193, China

2 China Institute of Veterinary Drug Control, Beijing 100081, China

**Abstract: [Background]** Bovine tuberculosis (BTB) is a chronic infectious disease caused by *Mycobacterium bovis*, a part of the *Mycobacterium tuberculosis* complex, posing threats to cattle health, livestock economies, and public health. **[Objective]** In order to screen new diagnostic molecular markers of *Mycobacterium bovis* and establish new diagnostic method for bovine tuberculosis. **[Methods]** Using isotopic labeling-based relative and absolute quantification techniques and article screening, we identified 11 proteins (Mpb70, GroEL2, HspX, DnaK, Mpb83, EsxW, BfrB, Hrp1, EsxL, AtpD, and EsxN) for further evaluation. These recombinant proteins were then assessed for sensitization effects in a guinea pig model. **[Results]** At a dose of 100  $\mu\text{g}$ , Mpb70, HspX, Mpb83, and EsxN induced marked delayed-type hypersensitivity (DTH) and rupture. At a dose of 50  $\mu\text{g}$ , Mpb70, HspX, Mpb83, EsxW, EsxL, and EsxN provoked significant DTH. At a dose of 12.5  $\mu\text{g}$ , the proteins did not induce DTH. Among the protein combinations, EsxW/EsxL/EsxN showed the highest activity, triggering robust DTH in guinea pigs. Other combinations such as EsxW/EsxL, EsxW/EsxN, and EsxL/EsxN also induced DTH, though to a lesser extent than EsxW/EsxL/EsxN. **[Conclusion]** Recombinant proteins Mpb70, HspX, Mpb83, EsxW, EsxL, and EsxN elicited notable DTH, demonstrating the potential as tuberculin substitutes.

**Keywords:** guinea pig model; delayed-type hypersensitivity; recombinant protein; tuberculin

牛分枝杆菌(*Mycobacterium bovis*)是引发牛结核病(bovine tuberculosis, BTB)的人兽共患重要病原菌<sup>[1]</sup>。该病原菌具有广泛的宿主范围,感染对象涵盖多种家畜、蹄类动物、食肉动物、有袋类动物、啮齿动物、泻形动物、灵长类动物及人类,对畜牧业的发展和公共卫生健康构成严重威胁<sup>[2-3]</sup>。当前,结核菌素皮试依然是全球范围内应用最广泛且由世界动物卫生组织(World Organization for Animal Health, WOAH)推荐的牛结核病检测标准方法之一<sup>[4]</sup>。然而,结核菌素的制备存在一些关键问题,如培养周期较长、批次效力不一致等<sup>[5]</sup>。因此,开发替代方法或分子标

志物显得尤为重要。研究表明,牛分枝杆菌的分泌蛋白可诱导宿主产生显著的细胞免疫反应,为诊断结核病及研制安全、有效的诊断制品提供了广阔的应用前景<sup>[5-6]</sup>。有研究表明, KLK12、MMP-1 和 MMP-9 在区分潜伏感染和活动性牛结核病的血清学标志物中具有重要价值<sup>[6]</sup>。

蛋白质组学技术是一种研究蛋白质组成及其变化规律的重要手段。其突出特点在于通过特定的蛋白质分离方法,结合高通量鉴定分析技术,有效研究蛋白质在特定条件下的表达情况,从而筛选出具有重要功能的蛋白质<sup>[7-9]</sup>。豚鼠在感染结核分枝杆菌(*Mycobacterium*

*tuberculosis*)后表现出的疾病症状与人类结核病具有许多相似之处, 结核病豚鼠模型广泛用于分枝杆菌的毒力测定及皮试试验, 有助于理解和描述疾病的发生机制<sup>[10-12]</sup>。因此, 本研究前期采用同位素标记的相对与绝对定量技术, 分析了国内外牛型结核菌素的蛋白质组成, 并结合文献报道筛选出多种候选蛋白质进行制备<sup>[13-20]</sup>。

## 1 材料与方 法

### 1.1 样 品

牛分枝杆菌 CVCC 68001 和牛分枝杆菌 CVCC 68002, 中国兽医药品监察所保藏并提供; 豚鼠, 北京维通利实验动物技术有限公司。动物实验方案经过中国兽医药品监察所实验动物福利伦理委员会审核[中监所(福) 2022 第 00014 号、中监所(福) 2022 第 00197 号]。

### 1.2 主要试剂和仪器

牛型结核菌素国家标准品、牛型结核菌素国际标准品和牛分枝杆菌致敏原参考品, 中国兽医药品监察所; 生理盐水, 北京中海生物科技有限公司; 生物安全柜, 青岛海尔股份有限公司; 恒温培养箱, 上海精宏实验设备有限公司; 涡旋振荡器, 上海旻泉仪器有限公司。

### 1.3 牛型结核菌素制备及其蛋白表达量分析

提纯牛型结核菌素并对牛型结核菌素的效价进行标定。采用同位素标记、相对和绝对定量技术, 对我国和进口制备的牛型结核菌素的蛋白质组分进行分析<sup>[7-9]</sup>。

### 1.4 蛋白的制备

根据蛋白表达量及文献[13-20]选择 11 种蛋白质委托北京六合华大基因生物科技有限公司利用原核表达的方式进行制备。分别编号: Mpb70、GroEL2、HspX、DnaK、Mpb83、EsxW、BfrB、Hrp1、EsxL、AtpD 和 EsxN。

### 1.5 不同剂量单一重组蛋白对豚鼠皮试试验

取 135 只 300 g 左右 SPF 级豚鼠, 分别在大腿内侧肌肉深部注射牛分枝杆菌致敏原 200  $\mu$ L。35 d 后, 在豚鼠臀部皮内注射牛型结核菌素检测致敏效果。在致敏效果良好的豚鼠(3 只/组, 共 39 组)背部采用多点轮回法各注射 0.1 mL 不同含量(100、50 和 25  $\mu$ g)的单一重组蛋白。同时, 设立提纯牛型结核菌素国家标准品作为阳性对照(100 IU/只), 以载体标签蛋白 pET (100、50 和 25  $\mu$ g)作为阴性对照, 各注射 0.1 mL。待 24 h 后测量注射部位肿胀直径并计算红肿面积<sup>[10-12]</sup>。

### 1.6 部分重组蛋白组合对豚鼠皮试试验

选取重组蛋白进行组合, 混合物中各组分等比例混合。取 100 只 300 g 左右 SPF 级豚鼠, 分别在大腿内侧肌肉深部注射牛分枝杆菌致敏原 200  $\mu$ L。35 d 后, 在豚鼠臀部皮内注射牛型结核菌素检测致敏效果。在致敏效果良好的豚鼠(5 只/组, 共 18 组)背部皮下注射 0.1 mL 混合后的蛋白(每种蛋白最终含量为 50、25 和 12.5  $\mu$ g), 同时设立提纯牛型结核菌素国家标准品作为阳性对照(100 IU/只), 以载体标签蛋白 pET (50  $\mu$ g)作为阴性对照, 各注射 0.1 mL。待 24 h 后测量注射部位肿胀直径并计算红肿面积。

## 2 结果与分析

### 2.1 牛型结核菌素蛋白表达量分析结果

通过同位素标记、相对与绝对定量技术对不同牛型结核菌素蛋白质组分进行分析, 牛型结核菌素中表达量前位的蛋白见表 1。结合已报道的文献[13-20]选择 11 种蛋白(Mpb70、GroEL2、HspX、DnaK、Mpb83、EsxW、BfrB、Hrp1、EsxL、AtpD 和 EsxN)进行制备并利用豚鼠模型评价引起迟发型过敏反应的效果。

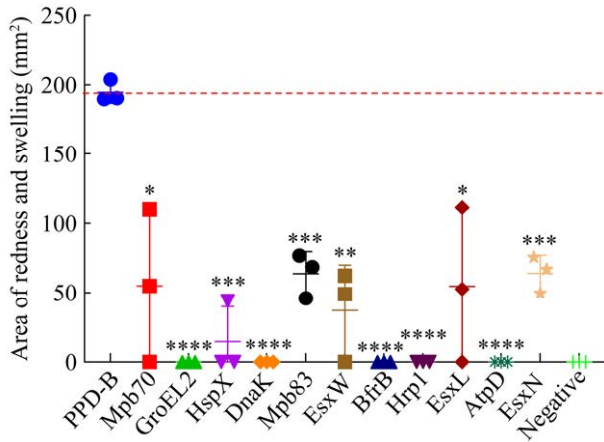
表 1 牛型结核菌素蛋白表达量分析结果

Table 1 Results of bovine-type tuberculin protein expression analysis

蛋白质 Protein	描述 Description	基因 Gene	牛型结核菌素 国家标准品 PPD-B-National	牛型结核菌素 国际标准品 PPD-B-International
P9WNK6	EsxA_MYCTO 6 kDa early secretory antigenic target	<i>esxA</i>	514 057.366 7	199 007.933 3
P9WNK4	EsxB_MYCTO ESAT-6-like protein EsxB	<i>esxB</i>	463 244.333 3	245 425.066 7
P0A669	MP70_MYCBO immunogenic protein MPB70	<i>mpb70</i>	185 242.4	83 105.8
P9WPE7	CH602_MYCTU 60 kDa chaperonin 2	<i>groEL2</i>	180 775.733 3	193 687.033 3
P9WPE4	CH10_MYCTO 10 kDa chaperonin	<i>groS</i>	174 369.0	157 614.9
Rv2031c	HspX heat shock protein HspX (alpha-crystallin homolog) (14 kDa antigen) (HSP16.3) 144 AA	<i>hspX</i>	159 732.6	65 283.7
A1KFH2	DNAK_MYCBP chaperone protein DnaK	<i>dnaK</i>	121 887.333 3	119 279.266 7
MT18B_2586	Mpt64 228 AA	<i>mpt64</i>	116 267.066 7	54 730.133 33
C1AL18	EFTU_MYCBT elongation factor Tu	<i>tuf</i>	90 511.366 67	163 797.2
MT18B_2507	Mpt63 159 AA	<i>mpt63</i>	88 832.366 67	51 538.066 67
C1AFY9	MP83_MYCBT cell surface glycolipoprotein MPB83	<i>mpb83</i>	80 193.566 67	51 298.666 67
MT18B_2421	Apa325 AA	–	70 745.533 33	43 624.233 33
MT18B_4797	EsxW98 AA	<i>esxW</i>	53 162.633 33	21 801.766 67
Rv1636	TB15.3 iron-regulated universal stress protein family protein TB15.3 146 AA	–	52 638.666 67	62 666.566 67
P9WQF3	AcpM_MYCTU meromycolate extension acyl carrier protein	<i>acpM</i>	50 730.2	60 883.966 67
P9WK06	METE_MYCTO 5-methyltetrahydropteroyltrimethylglutamate-homocysteine methyltransferase	<i>metE</i>	49 149.366 67	36 078.233 33
MT18B_3102	MT18B_310294 AA	–	48 238.4	17 045.2
O53166	AcnA_MYCTU aconitate hydratase A	<i>acn</i>	45 297.166 67	47 494.8
P9WHE2	RL7_MYCTO 50S ribosomal protein L7/L12	<i>rplL</i>	44 595.466 67	67 284.2
C1APB4	MASZ_MYCBT malate synthase G	<i>glcB</i>	44 020.266 67	52 378.433 33
P9WJA9	GarA_MYCTU glycogen accumulation regulator GarA	<i>garA</i>	38 722.766 67	31 356.433 33
H8F1Z2	BfrB_MYCTE ferritin BfrB	<i>bfrB</i>	38 495.8	45 768.033 33
P46817	KatG_MYCBO catalase-peroxidase	<i>katG</i>	35 432.833 33	56 655.333 33
P9WJA3	Hrp1_MYCTU hypoxic response protein 1	<i>hrp1</i>	35 058.266 67	17 687.0
MT18B_2828	wag31260 AA	–	34 508.566 67	31 535.233 33
P65004	Y2587_MYCBO uncharacterized protein Mb2587	<i>BQ2027_</i> <i>MB2587</i>	34 117.7	11 710.5
P9WGZ0	RpoA_MYCTO DNA-directed RNA polymerase subunit alpha	<i>rpoA</i>	33 017.2	60 324.533 33
Rv1198	EsxL putative ESAT-6 like protein EsxL (ESAT-6 like protein 4) 94 AA	<i>esxL</i>	32 678.166 67	13 035.1
C1AMV4	AtpB_MYCBT ATP synthase subunit beta	<i>atpD</i>	30 688.7	62 724.166 67
P0A571	EsxN_MYCBO ESAT-6-like protein EsxN	<i>esxN</i>	21 991.933 33	8 739.1

## 2.2 不同剂量单一重组蛋白对豚鼠皮试试验效果

用灭活的牛分枝杆菌致敏豚鼠对重组蛋白引起迟发型过敏反应能力进行评价。分别皮下注射 100  $\mu\text{L}$  纯化后的不同重组蛋白(100、50 和 25  $\mu\text{g}$ )。结果显示, 当使用量为 25  $\mu\text{g}$  时, 不引起迟发型过敏反应(图 1); 当使用量为 50  $\mu\text{g}$  时, Mpb70、HspX、Mpb83、EsxW、EsxL 和 EsxN 可引起明显的迟发型过敏反应, 其中 Mpb70 和



**图 1 25  $\mu\text{g}$  重组蛋白对豚鼠的皮试效果** PPD-B 代表皮试注射提纯牛型结核菌素国家标准品的阳性对照组; Negative 代表皮试注射载体标签蛋白 pET 的阴性对照组; Mpb70、GroEL2、HspX、DnaK、Mpb83、EsxW、BfrB、Hrp1、EsxL、AtpD 和 EsxN 分别代表皮试注射以上单一重组蛋白的试验组。

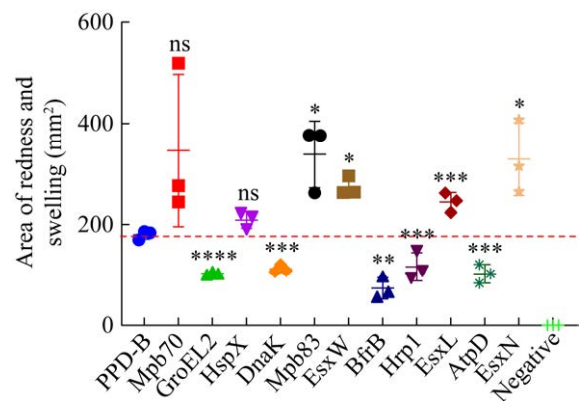
Figure 1 The skin test effect of 25  $\mu\text{g}$  recombinant protein on guinea pigs. PPD-B represents the positive control group injected with the national standard of purified bovine tuberculin. Negative represents the negative control group injected with the carrier label protein pET. Mpb70, GroEL2, HspX, DnaK, Mpb83, EsxW, BfrB, Hrp1, EsxL, AtpD and EsxN represents the experimental groups injected with the single recombinant protein, respectively. \*:  $P < 0.05$ ; \*\*:  $P < 0.01$ ; \*\*\*:  $P < 0.001$ ; \*\*\*\*:  $P < 0.0001$ . The same below.

HspX 引起的反应强度与 PPD-B 之间无显著性差异( $P > 0.05$ ), Mpb83、EsxW 和 EsxN 引起的反应强度与 PPD-B 之间存在显著性差异( $P < 0.05$ ), EsxL 引起的反应强度与 PPD-B 之间存在极显著性差异( $P < 0.01$ ); 其余蛋白引起的迟发型过敏反应强度均低于 PPD-B, 并且存在显著性差异( $P < 0.01$  或  $P < 0.001$ ) (图 2)。

当重组蛋白量为 100  $\mu\text{g}$  时, Mpb70、HspX、Mpb83 和 EsxN 可引起明显的迟发型过敏反应, 并且皮肤出现破溃(图 3)。其中 Mpb70 的反应强度与 PPD-B 之间存在显著差异( $P < 0.05$ ), 而 HspX、Mpb83 和 EsxN 所引起的反应强度与 PPD-B 之间无显著差异( $P > 0.05$ )。其余蛋白引起的迟发型过敏反应强度均低于 PPD-B, 并且存在显著性差异( $P < 0.01$  或  $P < 0.001$ ) (图 3)。

## 2.3 部分重组蛋白组合对豚鼠皮试试验效果

对单个皮试效果较好的重组蛋白进行组合 (EsxW/EsxL、EsxW/EsxN、EsxL/EsxN、EsxW/EsxL/EsxN) 后皮下注射豚鼠, 24 h 后观察豚鼠皮肤红肿情况。结果显示, 当剂量均为 50  $\mu\text{g}$



**图 2 50  $\mu\text{g}$  重组蛋白对豚鼠的皮试效果** ns: 组间差异不显著( $P > 0.05$ )。下同。

Figure 2 The skin test effect of 50  $\mu\text{g}$  recombinant protein on guinea pigs. ns: Not significant difference between groups ( $P > 0.05$ ). The same below.

时, 4 组混合蛋白均引起了强烈的迟发型过敏反应, 皮肤出现破溃, 但红肿面积与阳性对照差异不显著( $P<0.05$ ) (图 4)。当剂量均为  $25 \mu\text{g}$  时(图 5), 4 组混合蛋白均可刺激豚鼠产生明显的迟发型过敏反应, 皮肤未出现破溃, 并且红肿面积大于或等于阳性对照。EsxW/EsxL/EsxN 组合效果最佳, 与 PPD-B 之间存在极显著差异( $P<0.0001$ ); EsxW/EsxL、EsxW/EsxN、EsxL/EsxN

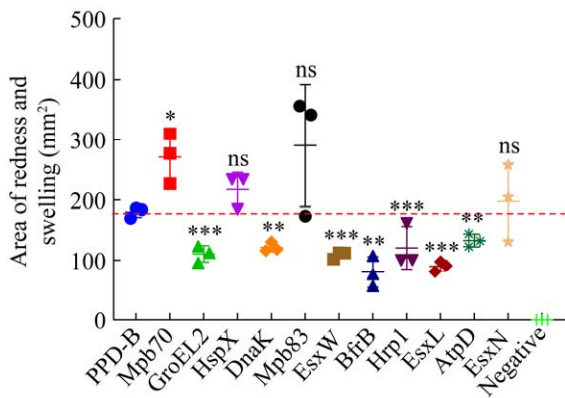


图 3 100  $\mu\text{g}$  重组蛋白对豚鼠的皮肤试效果

Figure 3 The skin test effect of 100  $\mu\text{g}$  recombinant protein on guinea pigs.

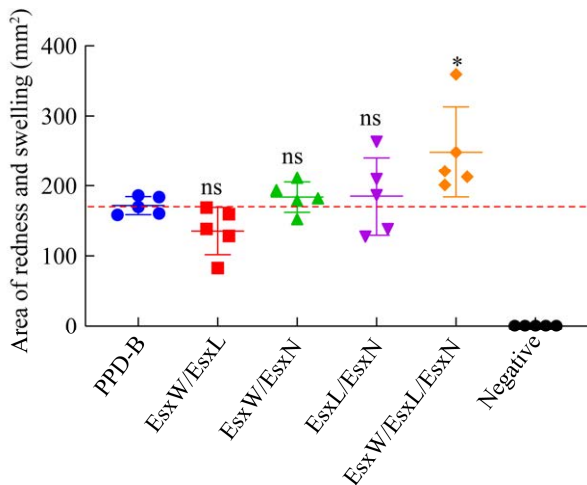


图 4 部分重组蛋白(50  $\mu\text{g}$ )组合对豚鼠皮肤试效果

Figure 4 The skin test effect of some combinations of recombinant proteins (50  $\mu\text{g}$ ) on guinea pigs.

组合也可引起明显的迟发型过敏反应, 与 PPD-B 之间也存在差异( $P<0.05$ )或相当( $P>0.05$ )。当剂量均为  $12.5 \mu\text{g}$  时(图 6), 则无法引起豚鼠明显的迟发型过敏反应。

图 7 为引起豚鼠不同反应的特征, 包括不反应、微弱红肿、红肿, 反应强烈导致破溃情况。

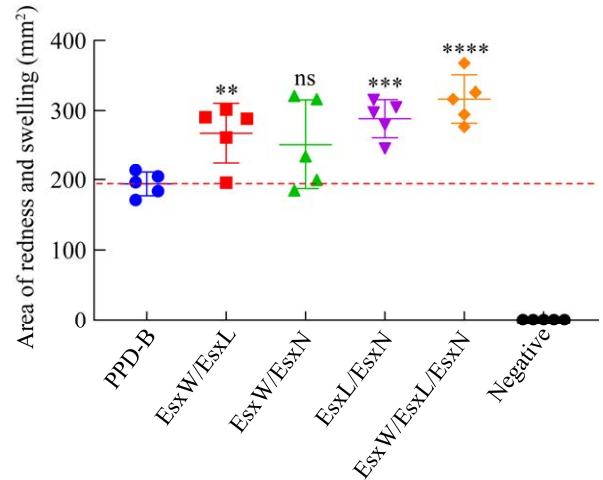


图 5 部分重组蛋白(25  $\mu\text{g}$ )组合对豚鼠皮肤试效果

Figure 5 The skin test effect of some combinations of recombinant proteins (25  $\mu\text{g}$ ) on guinea pigs.

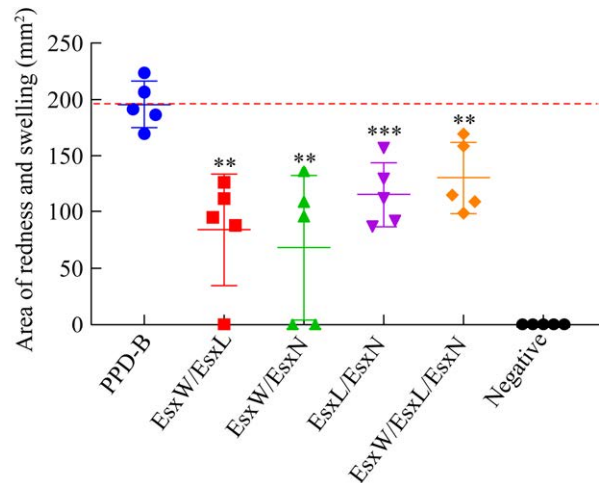


图 6 部分重组蛋白(12.5  $\mu\text{g}$ )组合对豚鼠皮肤试效果

Figure 6 The skin test effect of some combinations of recombinant proteins (12.5  $\mu\text{g}$ ) on guinea pigs.



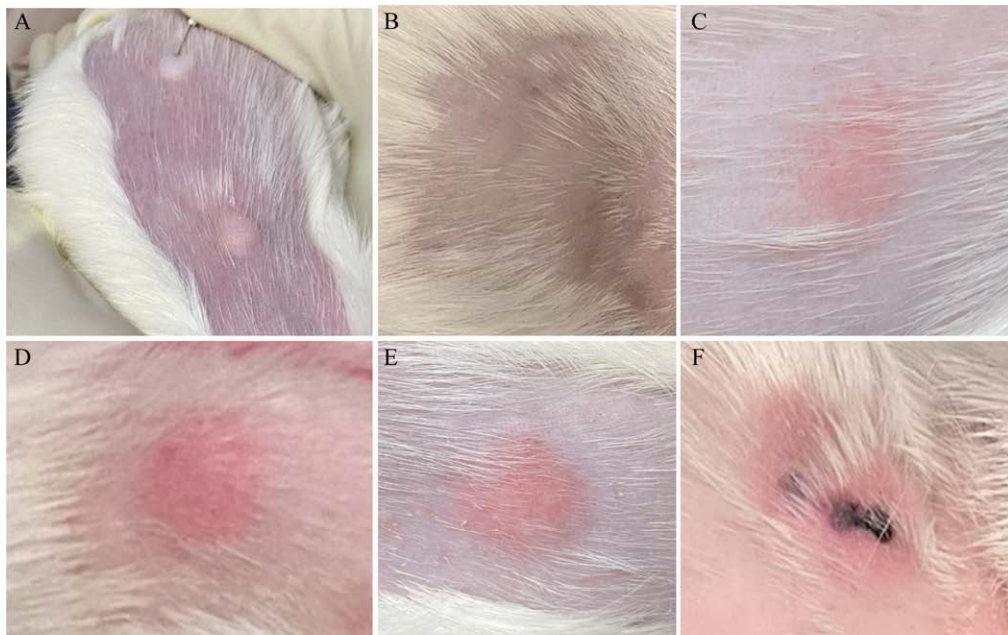


图 7 豚鼠皮试试验不同效果 A: 皮试注射; B: 不反应; C: 微弱红肿; D-E: 红肿; F: 破溃。

Figure 7 The skin test effect on guinea pigs. A: Skin test injection; B: No reaction; C: Mild redness and swelling; D-E: Obvious redness and swelling; F: Ulceration.

### 3 讨论

结核菌素皮内变态反应是国际通用的牛结核病检测方法之一，在防控牛结核病、保障人类健康方面具有重要意义<sup>[21]</sup>。然而，由于结核菌素的制备工艺复杂，成分难以保持稳定<sup>[5]</sup>，因此，亟须开发潜在的诊断分子标志物，以替代传统结核菌素。

本研究运用蛋白组学技术，从结核菌素中筛选出表达量较高的前 30 种蛋白质，并结合已有研究报道，选取了 Mpb70、GroEL2、HspX、DnaK、Mpb83、EsxW、BfrB、Hrp1、EsxL、AtpD 和 EsxN 蛋白进行评估。这些蛋白在牛结核分枝杆菌中发挥着重要作用。Mpb70 是一种由信号肽酶 I 切割的可溶性分泌蛋白，而 Mpb83 则是一种由信号肽酶 II 加工、位于细菌表面的糖基化脂蛋白，可能通过 N 端半胱氨酸与分枝杆菌外膜结合<sup>[22]</sup>。Mpb70 和 Mpb83 均为结核分

枝杆菌复合体中高度同源的主要抗原，也是牛分枝杆菌高度表达的关键抗原<sup>[22]</sup>。编码 GroEL2 的基因位于 GroE 操纵子外部的 *myc28* 基因上，属于典型的热休克蛋白家族伴侣蛋白<sup>[23]</sup>。GroEL2 蛋白与牛分枝杆菌的致病性密切相关，具有协助细菌黏附至宿主巨噬细胞、帮助细菌进入宿主细胞并在应激情况下保护细胞等功能<sup>[23]</sup>。HspX 蛋白能够刺激 CD4<sup>+</sup> 和 CD8<sup>+</sup> T 细胞，并诱导 TNF- $\alpha$  和 IFN- $\gamma$  表达，具有较强的免疫原性<sup>[24]</sup>。DnaK 在所有 NTM PPD 中均可检测到，并且该蛋白可作为结合疫苗的载体<sup>[25]</sup>。EsxW、EsxL 和 EsxN 均属于 VII 型分泌系统，在效应蛋白的分泌及调控宿主免疫功能方面起到重要作用<sup>[26-27]</sup>。BfrB 通过结合并降低核糖体蛋白 S3 的核丰度来抑制 NF- $\kappa$ B 依赖性转录，提示其在牛分枝杆菌与宿主相互作用中具有重要地位<sup>[28]</sup>。此外，Rv2626c 编码的 Hrp1 蛋白可通过 Ms 的分泌系统被分泌，并在结核分枝杆

菌的致病机制中发挥关键作用<sup>[29]</sup>。

## 4 结论

本研究通过原核表达制备 11 种蛋白, 并利用豚鼠模型初步评价其皮试效果。实验表明, 不同蛋白质及其剂量对豚鼠的皮试反应均具有不同程度的影响效果。当重组蛋白用量为 100  $\mu\text{g}$  时, Mpb70、HspX、Mpb83 和 EsxN 可引起强烈的迟发型过敏反应, 导致皮肤破溃, 其测量的红肿面积变小。其中 Mpb70 的反应强度与 PPD-B 组之间存在显著差异( $P < 0.05$ ), 而 HspX、Mpb83 和 EsxN 引起的反应强度与 PPD-B 组无显著差异( $P > 0.05$ )。其余蛋白的皮试效果均显著低于阳性对照。当重组蛋白用量降低至 50  $\mu\text{g}$  时, EsxL 可引起明显的迟发型过敏反应, 出现正常红肿现象, 其测量的红肿面积大于破溃情况下。蛋白用量降至 25  $\mu\text{g}$  时, 无法引起迟发型过敏反应。将部分蛋白组合使用显示, 用量过高会导致强烈的迟发型过敏反应且皮肤破溃, 过低不能反应。同时, 本研究尚存在一定局限性, 由于尚未在牛体内验证筛选蛋白的效果, 所筛选蛋白在牛体内的诊断潜力将在日后的试验中进一步确认。综上所述, 初步筛选出的重组 Mpb70、HspX、Mpb83、EsxW、EsxL 和 EsxN 蛋白显示出作为诊断抗原替代标识物的良好前景。

## REFERENCES

- [1] OLEA-POPELKA F, MUWONGE A, PERERA A, DEAN AS, MUMFORD E, ERLACHER-VINDEL E, FORCELLA S, SILK BJ, DITIU L, EL IDRISI A, RAVIGLIONE M, COSIVI O, LoBUE P, FUJIWARA PI. Zoonotic tuberculosis in human beings caused by *Mycobacterium bovis*: a call for action[J]. The Lancet Infectious Diseases, 2017, 17(1): e21-e25.
- [2] NTIVUGURUZWA JB, MICHEL AL, KOLO FB, MWIKARAGO IE, NGABONZIZA JCS, van HEERDEN H. Prevalence of bovine tuberculosis and characterization of the members of the *Mycobacterium tuberculosis* complex from slaughtered cattle in Rwanda[J]. PLoS Neglected Tropical Diseases, 2022, 16(8): e0009964.
- [3] PALITTAPONGARNPIM P, TANTIVITAYAKUL P, AIEWSAKUN P, MAHASIRIMONGKOL S, JAEMSAI B. Genomic interactions between *Mycobacterium tuberculosis* and humans[J]. Annual Review of Genomics and Human Genetics, 2024, 25(1): 183-209.
- [4] NACHIAPPAN AC, RAHBAR K, SHI X, GUY ES, MORTANI BARBOSA EJ Jr, SHROFF GS, OCAZONEZ D, SCHLESINGER AE, KATZ SI, HAMMER MM. Pulmonary tuberculosis: role of radiology in diagnosis and management[J]. Radiographics, 2017, 37(1): 52-72.
- [5] JUHONG J, PONGSACHAREONNONT PF, SOMKIJRUNGROJ T, MAVICHAK A, VARADISAI A, CHARIVAVILASKUL P, CHATSUWAN T, SUTTICHET TB, KULVICHIT K. The sterility, stability and efficacy of repackaged ziv-aflibercept for intravitreal administration[J]. Scientific Reports, 2022, 12(1): 2971.
- [6] WANG YZ, QU MJ, LIU YD, WANG HR, DONG YH, ZHOU XM. KLK12 regulates MMP-1 and MMP-9 via bradykinin receptors: biomarkers for differentiating latent and active bovine tuberculosis[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2022, 23(20): 12257.
- [7] 刘媛, 顾芮嘉, 邱衍伦, 李星龙, 李迎丽, 高洁莹, 肖虹. 基于同位素标记相对和绝对定量技术研究耐铬(VI)菌株 CM01 的蛋白定量组学[J]. 微生物学通报, 2020, 47(10): 3183-3195.
- [8] LIU Y, GU RJ, QIU YL, LI XL, LI YL, GAO JY, XIAO H. Quantitative proteomic in hexavalent chromium resistance CM01 by isobaric tags for relative and absolute quantitation techniques (iTRAQ)[J]. Microbiology China, 2020, 47(10): 3183-3195 (in Chinese).
- [8] 冯宇, 胡莉萍, 朱良全, 丁家波. 蛋白质组学技术在布鲁氏菌病研究中的应用及发展[J]. 微生物学通报, 2018, 45(1): 191-196.
- [9] FENG Y, HU LP, ZHU LQ, DING JB. Advance in proteomic research and application for brucellosis[J]. Microbiology China, 2018, 45(1): 191-196 (in Chinese).
- [9] 冯爽, 张立, 张丽霞. 蛋白质组学在结核病诊断中的研究进展[J]. 现代预防医学, 2014, 41(17): 3206-3207, 3210.
- [10] FENG S, ZHANG L, ZHANG LX. Research progress on proteomics in diagnosis of tuberculosis[J]. Modern Preventive Medicine, 2014, 41(17): 3206-3207, 3210 (in Chinese).
- [10] CLARK S, LANNI FY, MARINOVA D, RAYNER E, MARTIN C, WILLIAMS A. Revaccination of guinea pigs with the live attenuated *Mycobacterium tuberculosis* vaccine MTBVAC improves BCG's protection against tuberculosis[J]. The Journal of Infectious Diseases, 2017, 216(5): 525-533.
- [11] ECKHARDT E, SCHINKÖTHE J, GISCHE M, SEHL-EWERT J, CORLEIS B, DORHOI A, TEIFKE J, ALBRECHT D, GELUK A, GILLERON M, BASTIAN M. Phosphatidylinositol mannoside vaccination induces lipid-specific Th1-responses and partially protects guinea pigs from *Mycobacterium tuberculosis* challenge[J]. Scientific Reports, 2023, 13(1): 18613.
- [12] STOSMAN KI, ALEKSANDROV AG, SIVAK KV,



- BUZITSKAYA ZV, STUKOVA MA. Evaluation of the immunotoxicity and allergenicity of a new intranasal influenza vector vaccine against tuberculosis carrying TB10.4 and HspX antigens[J]. Iranian Journal of Basic Medical Sciences, 2023, 26(5): 558-563.
- [13] 高新桃, 贾红, 侯绍华, 杨宏军, 郭晓宇, 袁维峰, 姜一瞳, 朱鸿飞, 鑫婷, 丁家波. 11 种牛分枝杆菌抗原在牛结核病诊断中的初步评价[J]. 中国畜牧兽医, 2018, 45(8): 2282-2292.
- GAO XT, JIA H, HOU SH, YANG HJ, GUO XY, YUAN WF, JIANG YT, ZHU HF, XIN T, DING JB. Preliminary evaluation of eleven *Mycobacterium bovis* antigens in the diagnostic methods of bovine tuberculosis[J]. China Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2018, 45(8): 2282-2292 (in Chinese).
- [14] ENCINAS M, MARFIL MJ, GARBACCIO S, BARANDIARAN S, HUERTAS P, MORSELLA C, MACÍAS A, MAGNANO G, ZAPATA L, BIGI F, CATALDI A, PAOLICCHI F, ZUMÁRRAGA M, EIRIN ME. *Mycobacterium bovis* ESAT-6, CFP-10 and EspC antigens show high conservation among field isolates[J]. Tuberculosis, 2018, 111: 143-146.
- [15] KANABALAN RD, LEE LJ, LEE TY, CHONG PP, HASSAN L, ISMAIL R, CHIN VK. Human tuberculosis and *Mycobacterium tuberculosis* complex: a review on genetic diversity, pathogenesis and omics approaches in host biomarkers discovery[J]. Microbiological Research, 2021, 246: 126674.
- [16] WELDINGH K, ROSENKRANDS I, OKKELS LM, DOHERTY TM, ANDERSEN P. Assessing the serodiagnostic potential of 35 *Mycobacterium tuberculosis* proteins and identification of four novel serological antigens[J]. Journal of Clinical Microbiology, 2005, 43(1): 57-65.
- [17] BORSUK S, NEWCOMBE J, MENDUM TA, DELLAGOSTIN OA, McFADDEN J. Identification of proteins from tuberculin purified protein derivative (PPD) by LC-MS/MS[J]. Tuberculosis, 2009, 89(6): 423-430.
- [18] MEHAFFY C, HESS A, PRENNI JE, MATHEMA B, KREISWIRTH B, DOBOS KM. Descriptive proteomic analysis shows protein variability between closely related clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis*[J]. Proteomics, 2010, 10(10): 1966-1984.
- [19] ROPERTO S, VARANO M, RUSSO V, LUCÀ R, CAGIOLA M, GASPARI M, CECCARELLI DM, CUDA G, ROPERTO F. Proteomic analysis of protein purified derivative of *Mycobacterium bovis*[J]. Journal of Translational Medicine, 2017, 15(1): 68.
- [20] INFANTES-LORENZO JA, MORENO I, RISALDE MLÁ, ROY Á, VILLAR M, ROMERO B, IBARROLA N, deLa FUENTE J, PUENTES E, de JUAN L, GORTÁZAR C, BEZOS J, DOMÍNGUEZ L, DOMÍNGUEZ M. Proteomic characterisation of bovine and avian purified protein derivatives and identification of specific antigens for serodiagnosis of bovine tuberculosis[J]. Clinical Proteomics, 2017, 14: 36.
- [21] TAZERART F, SAAD J, NIAR A, SAHRAOUI N, DRANCOURT M. *Mycobacterium bovis* pulmonary tuberculosis, Algeria[J]. Emerging Infectious Diseases, 2021, 27(3): 972-974.
- [22] WIKER HG, LYASHCHENKO KP, AKSOY AM, LIGHTBODY KA, POLLOCK JM, KOMISSARENKO SV, BOBROVNIK SO, KOLESNIKOVA IN, MYKHALSKY LO, GENNARO ML, HARBOE M. Immunochemical characterization of the MPB70/80 and MPB83 proteins of *Mycobacterium bovis*[J]. Infection and Immunity, 1998, 66(4): 1445-1452.
- [23] SARKAR S, SWAMI S, SONI SK, HOLIEN JK, KHAN A, KORWAR AM, LIKHIT AP, JOSHI RA, JOSHI RR, SARKAR D. Detection of a target protein (GroEl2) in *Mycobacterium tuberculosis* using a derivative of 1,2,4-triazolethiols[J]. Molecular Diversity, 2022, 26(5): 2535-2548.
- [24] VALIZADEH A, IMANI FOOLADI AA, SEDIGHIAN H, MAHBOOBI M, GHOLAMI PARIZAD E, BEHZADI E, KHOSRAVI A. Evaluating the performance of PPE44, HSPX, ESAT-6 and CFP-10 factors in tuberculosis subunit vaccines[J]. Current Microbiology, 2022, 79(9): 260.
- [25] CARROLL MV, SIM RB, BIGI F, JÄKEL A, ANTROBUS R, MITCHELL DA. Identification of four novel DC-SIGN ligands on *Mycobacterium bovis* BCG[J]. Protein & Cell, 2010, 1(9): 859-870.
- [26] SENGUPTA S, NAZ S, DAS I, AHAD A, PADHI A, NAIK SK, GANGULI G, PATTANAIK KP, RAGHAV SK, NANDICOORI VK, SONAWANE A. *Mycobacterium tuberculosis* EsxL inhibits MHC-II expression by promoting hypermethylation in class-II transactivator loci in macrophages[J]. Journal of Biological Chemistry, 2017, 292(17): 6855-6868.
- [27] WANG YC, TANG YT, LIN C, ZHANG JL, MAI JT, JIANG J, GAO XX, LI Y, ZHAO GP, ZHANG L, LIU J. Crosstalk between the ancestral type VII secretion system ESX-4 and other T7SS in *Mycobacterium marinum*[J]. iScience, 2022, 25(1): 103585.
- [28] SHAHZAD MI, SHAHID N, SIAL N, HASANAT A, KHALID M, YOUSAF M, HYDER Z, ASHFAQ M, RIVERA G, KHANUM A. Evaluation of DNA vaccines encoding M. Tb gene Bfrb and Mpt32 in mice model[J]. Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences, 2017, 30, 5(Suppl): 2025-2029.
- [29] OBOZOVA TA, ARTEM'EV MI, BARANOVSKIĬ PM, SMETANINA SE, KISELEV VI. Correlation between the expression of Rv3286c, Rv2626c, Rv2031c, AND Rv3133c and the tolerance of *Mycobacterium bovis* BCG to rifampicin and metronidazole in different physiological conditions[J]. Problemy Tuberkuleza i Boleznei Legkikh, 2005(2): 34-36.