

中国13个省份结核分枝杆菌5种特异性抗原人T细胞表位多态性分析

陈双双 徐永娟 肖诗琪 李马超 刘海灿 赵秀芹 蒋毅 吴移谋 万康林
421000 衡阳, 南华大学病原生物学研究所(陈双双、徐永娟、吴移谋、万康林);
100193 北京, 中国农业大学生物学院微生物学与免疫学系, 农业生物技术重点实验室(肖诗琪);
102206 北京, 中国疾病预防控制中心传染病预防控制所 传染病预防控制国家重点实验室 传染病诊治协同创新中心(李马超、刘海灿、赵秀芹、蒋毅、万康林)

通信作者: 万康林, Email: wankanglin@icdc.cn

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2016.04.023

【摘要】 目的 分析我国结核分枝杆菌复合群(MTBC)临床分离株中GlnA1、Mpt70、LppX、GroES和LpqH 5种抗原编码基因多态性及其人T细胞表位的多态性。方法 选取13个省份临床分离的173株MTBC, 采用PCR扩增5种抗原基因, 并运用BioEdit软件进行序列比对, 分析其人T细胞表位与非表位的变异情况。利用Mega 6.0软件分别计算同义突变率(dS)和非同义突变率(dN)及其比值。结果 173株菌的基因glnA1非表位区出现2个非同义突变位点; 基因mpt70表位区出现1个非同义突变位点; 基因lpqH表位区表现为1个非同义突变位点和1个同义突变位点; groES在整个基因中未发现任何突变; 基因lppX表位区表现为5个非同义突变和1个同义突变位点, 其中152位的氨基酸相同位点有9株菌发生了同义突变, 表现较高的多态性。同时基因lppX的15个T细胞抗原表位中有7个表位发生了改变, 其dN/dS值为0.19。结论 结核分枝杆菌抗原Mpt70、LppX和LpqH的人T细胞表位区具有多态性, 反映了此抗原可能参与逃避宿主免疫的分化选择。GlnA1的非表位区的多态性, 对该菌株的免疫反应影响较小。GroES序列相对保守, 不具有明显的多态性, 可能对结核分枝杆菌的鉴定、诊断及新型疫苗的研制具有重要作用。

【关键词】 结核分枝杆菌复合群; 特异性抗原; T细胞表位; 多态性

基金项目: 国家科技重大专项(2013ZX10003006-002-001); 国家自然科学基金(81401647)

Analysis on human T cell epitopes polymorphisms of five specific antigens of *Mycobacterium tuberculosis* in 13 areas of China Chen Shuangshuang, Xu Yongjuan, Xiao Shiqi, Li Machao, Liu Haican, Zhao Xiuqin, Jiang Yi, Wu Yimou, Wan Kanglin

Institute of Pathogenic Biology, University of South China, Hengyang 421000, China (Chen SS, Xu YJ, Wu YM, Wan KL); State Key Laboratory of Agrobiotechnology, Department of Microbiology and Immunology, College of Biological Sciences, China Agricultural University, Beijing 100193, China (Xiao SQ); State Key Laboratory of Infectious Disease Prevention and Control, Collaborative Innovation Center for Diagnosis and Treatment of Infectious Diseases, National Institute for Communicable Disease Control and Prevention, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing 102206, China (Li MC, Liu HC, Zhao XQ, Jiang Y, Wan KL)

Corresponding author: Wan Kanglin, Email: wankanglin@icdc.cn

【Abstract】 Objective To investigate the polymorphisms of the coding gene and the human T cell epitopes of antigen GlnA1, Mpt70, LppX, GroES and LpqH on *Mycobacterium tuberculosis* complex (MTBC) strains in thirteen provinces of China. **Methods** A total of 173 clinical MTBC isolates from thirteen provinces were selected to test the gene sequences of the five antigens, using PCR and DNA sequencing methods. Sequences were compared and sliced by BioEdit, and the variations of the human and nonhuman T cell epitopes were analyzed. The rates on synonymous mutation (dS), non-synonymous mutation (dN) and dN/dS values were calculated by Mega 6.0 software. **Results** Among the 173 strains, there were two non-synonymous mutations in the non-epitope region of glnA1, one non-synonymous mutations in epitope domain of mpt70, one

non-synonymous mutation and one synonymous mutation in the epitope domain of *lpqH*; while *groES* showed no mutation. *lppX* had five non-synonymous mutations and one synonymous mutation in the epitope domain. Nine strains presented higher polymorphism at the same gene locus of position 152 in *lppX*. And seven of the fifteen epitopes contained in *lppX* were altered and the dN/dS value of this gene was 0.19. **Conclusions** Data from the human T cell epitope domains of MTBC antigens Mpt70, LppX and LpqH contained epitope diversity, indicated that these antigens may have involved in diversifying the selection to evade the host immunity. GlnA1 had the polymorphism in epitope domain, which might have little influence on the immuno-response. While GroES seemed relatively conservative, it could play an important role on identification, diagnosis and the development of potential *Mycobacterium tuberculosis* vaccine.

【Key words】 *Mycobacterium tuberculosis* complex; Specific antigen; T cell epitope; Polymorphism

Fund programs: National Science and Technology Major Project of China (2013ZX10003006-002-001); National Natural Science Foundation of China (81401647)

目前对结核分枝杆菌(MTB)抗原基因多态性、人T细胞表位的研究已取得快速发展,发现部分MTB的抗原可能在提高结核病诊断或研制新疫苗方面有重要作用^[1]。为此本研究选取我国13个省份173株结核分枝杆菌复合群(MTBC)分离株,扩增和比对五种抗原(GlnA1、Mpt70、LppX、GroES和LpqH)基因,分析其人T细胞抗原表位的多态性,探讨抗原及T细胞表位多态性对宿主T细胞免疫和MTB相互作用的影响。

材料与方法

1. 菌株来源:自中国CDC传染病预防控制所结核室保存的2346株国内MTBC临床分离株中,挑选173株作为本次实验用菌株(由于北京家族菌株在我国具有一定的流行优势,故本研究从保存的1738株北京家族菌株中随机挑选86株,并从608株非北京家族菌株中挑选87株,共173株)。选取的菌株尽可能包括不同省份及不同间隔区寡核苷酸分型的菌株^[2]。间隔区寡核苷酸分型是根据之前研究确定的方法进行^[3],并按照国际SpolIDB数据库标准分为不同的家族^[4]。其中随机挑选的非北京家族中包括2株牛分枝杆菌卡介苗(*Mycobacterium bovis*-BCG)家族分离株FJ07113和JL06005以及New、UMANU、T、EAI、LAM、CAS、S、Haarlem家族不同数量的菌株。本次挑选的菌株来源于13个省份,分别为安徽10株、山西17株、北京11株、福建29株、甘肃12株、广西29株、四川1株、河南11株、湖南7株、西藏10株、新疆12株、吉林14株及浙江10株,且涵盖了所有已经在中国发现的Spoligotyping类型。

2. 菌株培养和DNA提取:采用标准罗氏培养基培养试验选用的菌株,培养时间3~4周。待培养基表面有

不透明淡黄色,干燥颗粒状,凸起于培养基的菜花样菌落时,用生理盐水从培养基的斜面上洗脱菌体。然后将收集到的菌液80℃孵育30min灭活,离心弃去上清,用400μl TE重悬菌体,并于沸水中煮沸30min,离心4min,取上清液作为13800×g DNA扩增模板,并置于-20℃保存备用。

3. 目的基因引物及序列测定:引物(5'~3')的核酸序列是根据H37Rv基因序列由Clone Manager软件设计,具体引物序列见表1。目的基因扩增的PCR反应体系:DNA模板(500pg)1μl,10×PCR buffer 10μl,引物100nmol/L,dNTP混合液200μmol/L,DNA Taq酶(TaKaRa)0.5U,ddH₂O加至20μl。PCR反应条件:94℃预变性5min;94℃变性45s,62℃退火45s,72℃延伸1min,35个循环;72℃延伸10min,反应终止。

阳性对照加MTB标准株H37Rv 500pg DNA,阴性对照取等量高压灭菌蒸馏水代替模板DNA。PCR产物的有无及大小用2%的琼脂糖凝胶电泳鉴定。所有PCR均进行至少2次以确认试验的重复性。扩增产物由北京擎科生物技术有限公司进行双向测序和拼接。

4. 抗原T细胞表位区的确定:检索免疫表位数据库(Immune Epitope Database,IEDB),获得MTB中存在的人T细胞抗原表位序列,再与H37Rv株的*glnA1*、*mpt70*、*lppX*、*groES*及*lpqH*基因序列进行比对,

表1 五种特异抗原编码基因信息

基因	序列	位置	PCR产物 (bp)	表位数目
<i>glnA1</i>	CGACCATGGCCCCACAATAG CGGGTTGTGGCACCCGGCTGAAACG	2487472 ~ 2489214	1743	2
<i>mpt70</i>	ACTGACGTGAACTCCCACT GCAAGGGGCTACAGGTTTT	3186896 ~ 3187691	796	19
<i>lppX</i>	CGGCGAGCGCCGGAATGG GCCGCGTCCCACCAGCCGGAAC	3290472 ~ 3291494	1023	15
<i>groES</i>	ACGACGGCGCGAGGGCGCGGAC CCATGGCGCGACGCGGGTTTC	3836846 ~ 3837425	580	22
<i>lpqH</i>	ACCCGGATATACCGAGTTTG TCGGCACTACATTGCCACTA	4208869 ~ 4209653	785	29

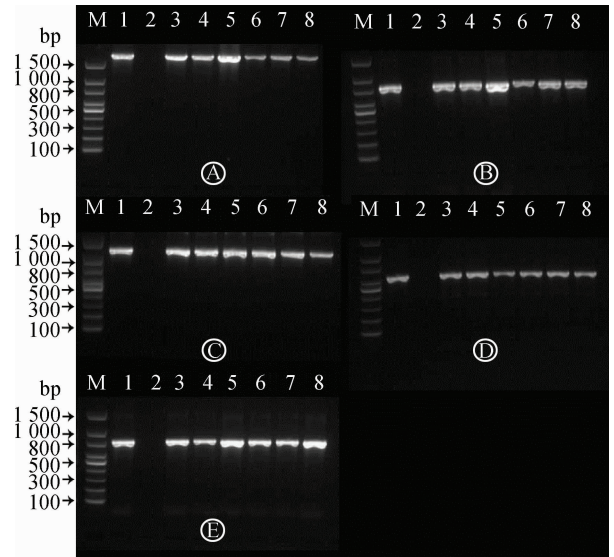
最终获得在该基因中存在的人T细胞抗原表位信息。

5. 统计学分析: 首先对PCR产物测序结果和NCBI下载获得的 *glnA1*、*mpt70*、*lppX*、*groES* 及 *lpqH* 基因序列, 进行核酸序列方向一致性调整, 使用ClustalW软件进行 alignment 操作^[5]; 再根据 H37Rv 株 *glnA1*、*mpt70*、*lppX*、*groES* 及 *lpqH* 基因序列, 截取所有测序菌株与之对应的基因全长序列; 然后对获得的基因用 BioEdit 软件进行比对, 取得各基因的突变情况; 分别截取其中的 T 细胞抗原表位区(重合表位只截取一次)和非表位区, 最后用 Mega 6.0 软件分别计算这些序列区中的同义突变率(dS)和非同义突变率(dN)及其比值(dN/dS)。

结 果

1. PCR 扩增目的基因: 173 株菌均扩增出 *glnA1*、*mpt70*、*lppX*、*groES* 和 *lpqH* 的 PCR 产物(图1)。

2. 5 种抗原基因中 T 细胞抗原表位信息: 经检索 IEDB 及与 H37Rv 基因序列进行比对后, 在 H37Rv 株分别发现 *glnA1* 基因中 2 个、*mpt70* 基因中 19 个、*lppX* 基因中 15 个、*groES* 基因中 22 个及 *lpqH* 基因中



注: A~E 分别为基因 *glnA1*、*mpt70*、*lppX*、*groES* 及 *lpqH* 扩增结果; M: 核酸 Markers, 1: 阳性扩增, 2: 阴性扩增, 3~8 为临床分离株 MTBC 扩增结果

图1 173 株 MTBC 5 种特异性抗原的 PCR 扩增结果

29 个 T 细胞表位(图2)。

3. 5 种抗原基因中单核苷酸多态性(SNP): 在 173 株菌中, 基因 *glnA1* 出现 2 个、*mpt70* 出现 1 个非

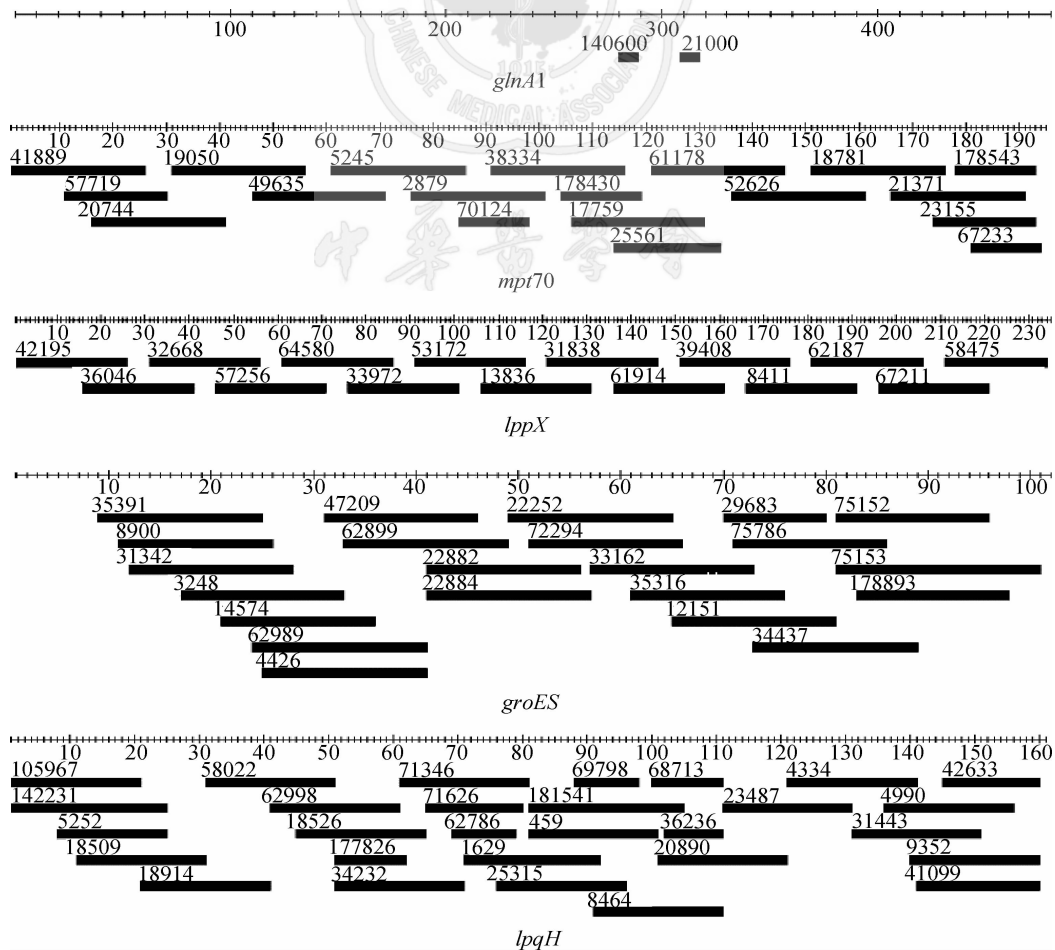


图2 173 株 MTBC 5 种特异性抗原 T 细胞表位分布

同义突变, *lppX* 出现 5 个非同义突变和 1 个同义突变, *lpqH* 出现 1 个非同义突变和 1 个同义突变, *groES* 未出现突变(表 2)。其中,有 9 株菌在 *lppX* 基因 152 位的氨基酸共同位点发生了同义突变,表现较高的多态性。这 9 株菌包括 3 株 T 家族菌株(AH03009、FJ05395 和 HuN06026), 5 株 U 家族菌株(ShanX05290、XJ06183、GX06043、GX06130 和 XJ06116)和 1 株新 Spoligotyping 型菌株(HuN06101)。*glnA1* 基因分别有 1 株临床分离菌株于 243 和 151 氨基酸位点发生非同义突变, 1 株为 T 家族(FJ05349), 另 1 株为北京家族(BJ05024)。1 株新 Spoligotyping 型的菌株(FJ06057)在 *mpt70* 基因的 21 位氨基酸发生同义突变。U 家族 FJ05413 临床分离株在 *lpqH* 基因 48 位氨基酸发生非同义突变, 北京家族 HeN06043 菌株也于此基因的 70 位氨基酸发生同义突变。两株 *M.bovis*-BCG 家族 FJ07113 和 JL06005 临床分离株未发现突变位点。

4. 5 种抗原基因中 T 细胞表位区的变异: 在免疫表位数据库中, *glnA1* 有 2 个、*mpt70* 中有 19 个、*lppX* 中有 15 个、*groES* 中有 22 个、*lpqH* 中有 29 个 T 细胞抗原表位。在 *lppX* 中, 15 个表位中有 7 个发生了改变(2 个包含有 2 个氨基酸的改变, 剩余 5 个具有 1 个氨基酸的改变); 而在 *mpt70* 和 *lpqH* 中, 各有 3 个表位发生了改变, 其中每个表位中有 1 个氨基酸改变(表 3)。

lppX 的 dN/dS 值为 0.19, *lpqH* 的 dN/dS 值为 0.36(表 4)。对于 *lppX* 及 *mpt70*, 不包括非表位区, 因为表位区覆盖了整个基因, 这一点也正体现了 *lppX*、*mpt70* 蛋白在感染后的 T 细胞免疫中的重要作用。*glnA1* 具有 2 个非同义突变, 其突变在非表位区。在 173 株菌中, *groES* 基因无任何突变, 证明了此蛋白基因序列的保守性。

讨 论

本研究根据我国地区和基

因型分布等条件, 从 13 个省份不同间隔区寡核苷酸分型方法基因型的 2 346 株 MTBC 临床分离株中, 随机选取 173 株, 采用 PCR 和 DNA 测序方法, 对 *glnA1*、*mpt70*、*lppX*、*groES* 和 *lpqH* 基因及其 T 细胞抗原表位进行分析。菌株代表性好, 得出的结果有较高的可信度。

研究中选取所得的各种 MTB 抗原均为具有独特功能的蛋白。*GlnA1*(Rv2220)是一种谷氨酰胺合成酶(代谢和呼吸过程中必不可少的一种酶), MTB 基因组中共发现 4 个 *glnA* 基因家族成员(*glnA1*、*glnA2*、*glnA3* 和 *glnA4*), 其中以 *glnA1* 作用最为重要, 主要将信使核糖核酸转化为腺苷酸, 因此在 MTB 毒力稳定性方面具有必不可少的作用。*Mpt70*(Rv2875)是一种重要的具有免疫原性的分泌性脂蛋白, 与 *Mpt83* 属于同一家族, 其具体功能目前还不

表 2 MTBC 菌株抗原 *glnA1*、*mpt70*、*lppX*、*groES* 及 *lpqH* 的基因碱基变化、突变类型及相关菌株

基因	碱基变化	氨基酸位置	突变类型	菌株	间隔区寡核苷酸分型
<i>glnA1</i>	CAG(Q)-CAA(Q)	243	非同义	FJ05349	T 家族
	ACG(T)-ACA(T)	251	非同义	BJ05024	北京家族
<i>mpt70</i>	GCG(A)-ACG(T)	21	非同义	FJ06057	新型
	GTG(V)-GGG(G)	14	非同义	HeN06024	北京家族
<i>lppX</i>	AGG(R)-AAG(K)	55	非同义	AH03026	北京家族
	GTC(V)-ATC(I)	77	非同义	GX06059	北京家族
	ATT(I)-AGT(S)	168	非同义	GS05111	北京家族
	ACC(T)-ATC(I)	171	非同义	HeN06042	北京家族
	TCC(S)-TCG(S)	152	同义	AH03009	T 家族
				ShanX05290	U 家族
				FJ05395	T 家族
				XJ06183	U 家族
				XJ06116	U 家族
				HuN06101	新型
				HuN06026	T 家族
				GX06043	U 家族
				GX06130	U 家族
<i>lpqH</i>	TCC(S)-TGC(C)	48	非同义	FJ05413	U 家族
	GCG(A)-GCT(A)	70	同义	HeN06043	北京家族

注: 以标准菌株 H37Rv 中 *glnA1*、*mpt70*、*lppX*、*groES* 及 *lpqH* 的序列为参考序列

表 3 MTBC 菌株 5 种抗原中 T 细胞抗原表位氨基酸变化情况

IEDB ID	表 位	碱基变化	Rv 标签	基因
20744	GLAAL A VAVSPPAAAGDLVGP	GCG(A)-ACG(T)	Rv2875	<i>mpt70</i>
41889	MKVKN T IAATSFAAAGLAAL A VAVS	GCG(A)-ACG(T)		
57719	SFAAA G LAAL A VAVSPPAA	GCG(A)-ACG(T)		
8411	DG I ST T KITGTIPASSVKMLDPGAK	ATT(I)-AGT(S) ACC(T)-ATC(I)	Rv2945c	<i>lppX</i>
39408	LSGV T NLQAQGTEVIDG I ST T KITG	ATT(I)-AGT(S) ACC(T)-ATC(I)		
33972	K V D S LLGITSADVDV R ANPLAAKGV	GTC(V)-ATC(I)		
64580	TKGLTSVHVAV R TTGK V D S LLGITS	GTC(V)-ATC(I)		
57256	SDPALLAE I RQSLDATKGLTSVHVA	AGG(R)-AAG(K)		
32668	KPD A EEQGV P SPTASDPALLAE I R	AGG(R)-AAG(K)		
42195	MNDGKRA V TS A VL V LGACLALWLS	GTG(V)-GGG(G)		
18526	GAAS G PK V VIDGKDQ N VTGS	TCC(S)-TGC(C)	Rv3763	<i>lpqH</i>
58022	SGET T TAAGTTAS P GAAS G P	TCC(S)-TGC(C)		
62998	TAS P GAAS G PK V VIDGKD Q N	TCC(S)-TGC(C)		

注: 以标准菌株 H37Rv 中各抗原序列为参考序列; 黑体部分表示氨基酸变化的位置

表 4 MTBC 菌株 4 个基因在表位区、非表位区及全基因的 dN/dS 值

基因	序列类型	序列长度 (bp)	异义突变数	同义突变数	dN	dS	dN/dS
<i>glnA1</i>	基因全长	1 437	2	0	0.000 13	0	- ^b
	T 表位区	150	0	0	0	0	- ^b
	非 T 表位区	1 287	2	0	0.000 13	0	- ^b
<i>mpt70</i> ^a	基因全长	582	1	0	0.000 03	0.000 00	- ^b
	T 表位区	582	1	0	0	0	- ^b
<i>lppX</i> ^a	基因全长	702	5	9	0.000 09	0.000 47	0.19
	T 表位区	702	5	9	0.000 09	0.000 47	0.19
<i>lpqH</i>	基因全长	480	1	1	0.000 04	0.000 11	0.36
	T 表位区	477	1	1	0.000 04	0.000 11	0.36
	非 T 表位区	3	0	0	0	0	- ^b

注:^a*mpt70* 及 *lppX* 基因无非表位区;^b该基因无同义突变

清楚。*LppX*(Rv2945c)是在牛结核分枝杆菌、MTB 和麻风分枝杆菌中的一种分泌性脂蛋白,在感染后的免疫反应中有着重要的作用。研究表明,成熟的 *LppX* 蛋白是一类输出性脂蛋白和保护性抗原^[6]。*GroES*(Rv3418c)是一种热休克蛋白,主要作用与 CPN60 结合,激活 mg-ATP 并抑制 ATP 酶的活性。*LpqH*(Rv3763)是一种 MTB 细胞内的脂蛋白前体,负责抑制 γ 干扰素调节蛋白 HLA-DR 及 mRNA 在人类巨噬细胞中的表达。

宿主-病原的协同进化关系主要表现在宿主的免疫压力与病原体的免疫逃逸。对某些病原体的研究表明为了逃避宿主的免疫,其抗原编码基因表现为高度可变,这是一种逃避人体免疫系统的多向性选择^[7-10]。研究发现 MTB 的 T 细胞抗原表位具有较高的保守性,并推断 MTB 缺少抗原变异及免疫逃逸^[11]。*lppX* 基因中 1 个 SNP 位点表现了较高的多态性,说明此基因受到了宿主的免疫压力而表现为抗原序列变化。*lppX* 基因中,15 个表位中有 7 个发生了改变;进一步研究需要证实,在 *lppX* 中抗原表位的高度改变是由于免疫压力、其他的选择压力还是仅仅是随机的基因漂移造成的。基因 *mpt70* 中 1 个表位发生改变、*lpqH* 中 2 个表位发生改变,可能反映了此抗原参与了逃避宿主免疫的分化选择。基因 *glnA1* 的非表位区的多态性,对该菌株的免疫反应影响较小。

在 173 株菌中,有 9 株菌在 *lppX*152 位的氨基酸发生了相同的突变,与 Jiang 等^[12]的研究一致。这 9 株菌包括 3 株 T 家族菌株,5 株 U 家族菌株和 1 株新 Spoligotyping 型菌株。所以,对于同一型的菌株来说,SNP 位点可作为进化的标识,而对于不同型别的菌株来说,它们是表现强选择压力的同型 SNP。结核分枝杆菌中基因 *lppX* 的高突变性,可能反映了该抗原参与了逃避宿主免疫的分化选择。然而,同义的突变并不造成蛋白的改变,在 *lppX* 中氨基酸序列

变化并不大。*glnA1*、*mpt70* 及 *lpqH* 基因具有一定的多态性,但只是个别菌株的变化。而 *groES* 基因无任何位点的改变。这些研究结果均与 MTB 基因的高保守性基本符合。

groES 相对保守,不具有多态性,可能对 MTB 的鉴定、诊断及新型疫苗的研制具有重要作用。在 *mpt70*、*lpqH* 及 *glnA1* 基因中,单株菌发生的突变点是否在其逃避宿主的免疫或增加菌株的耐药性方面中起作用,也需进一步证实。而 *lppX* 基因具有相对较高的变异度,将来在研制含有此抗原的新疫苗时需要考虑菌株间变异对其免疫效果的影响。

综上所述,MTB 相关抗原中的人 T 细胞抗原表位与既往研究结果基本一致,存在保守性的基因,也存在个别高变性的区域,为后续开发新的抗结核疫苗提供了部分理论基础。

利益冲突 无

参 考 文 献

- [1] Young DB, Kaufmann SHE, Hermans PWM, et al. Mycobacterial protein antigens: a compilation[J]. Mol Microbiol, 1992, 6(2): 133-145. DOI: 10.1111/j.1365-2958.1992.tb01994.x.
- [2] Ernst JD, Lewinsohn DM, Behar S, et al. Meeting Report: NIH workshop on the tuberculosis immune epitope database [J]. Tuberculosis, 2008, 88(4): 366-370. DOI: 10.1016/j.tube.2007.11.002.
- [3] Kamerbeek J, Schouls L, Kolk A, et al. Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology [J]. J Clin Microbiol, 1997, 35(4): 907-914.
- [4] Brudey K, Driscoll JR, Rigouts L, et al. *Mycobacterium tuberculosis* complex genetic diversity: mining the fourth international spoligotyping database (SpolDB4) for classification, population genetics and epidemiology [J]. BMC Microbiol, 2006, 6: 23. DOI: 10.1186/1471-2180-6-23.
- [5] Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ. Clustal W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice [J]. Nucleic Acids Res, 1994, 22(22): 4673-4680. DOI: 10.1093/nar/22.22.4673.
- [6] Dong HY, Liu ZG, Lv B, et al. Spoligotypes of *Mycobacterium tuberculosis* from different provinces of China [J]. J Clin Microbiol, 2010, 48(11): 4102-4106. DOI: 10.1128/JCM.00549-10.
- [7] Kawashima Y, Pfafferott K, Frater J, et al. Adaptation of HIV-1 to human leukocyte antigen class I [J]. Nature, 2009, 458(7238): 641-645. DOI: 10.1038/nature07746.
- [8] Farci P, Shimoda A, Coiana A, et al. The outcome of acute hepatitis C predicted by the evolution of the viral quasispecies [J]. Science, 2000, 288(5464): 339-344. DOI: 10.1126/science.288.5464.339.
- [9] Jeffares DC, Pain A, Berry A, et al. Genome variation and evolution of the malaria parasite *Plasmodium falciparum* [J]. Nat Genet, 2007, 39(1): 120-125. DOI: 10.1038/ng1931.
- [10] Urwin R, Russell JE, Thompson EAL, et al. Distribution of surface protein variants among hyperinvasive meningococci: implications for vaccine design [J]. Infect Immun, 2004, 72(10): 5955-5962. DOI: 10.1128/IAI.72.10.5955-5962.2004.
- [11] Comas I, Chakravarti J, Small PM, et al. Human T cell epitopes of *Mycobacterium tuberculosis* are evolutionarily hyperconserved [J]. Nat Genet, 2010, 42(6): 498-503. DOI: 10.1038/ng.590.
- [12] Jiang Y, Dou XF, Zhang W, et al. Genetic diversity of antigens Rv2945c and Rv0309 in *Mycobacterium tuberculosis* strains may reflect ongoing immune evasion [J]. FEMS Microbiol Lett, 2013, 347(1): 77-82. DOI: 10.1111/1574-6968.12222.

(收稿日期: 2015-11-15)
(本文编辑: 张林东)