

DOI:10.13350/j.cjpb.241201

• 论著 •

结核分枝杆菌融合基因 Rv0071/74 编码蛋白的生物信息学分析与制备*

杨玲玲^{1,2}, 秦莲花^{1,3**}, 黄劲^{2**}

(1. 贵州医科大学公共卫生与健康学院, 环境污染与疾病监控教育部重点实验室, 贵州贵阳 561113;

2. 贵州医科大学基础医学院生物化学与分子生物学教研室;

3. 同济大学医学院附属上海市肺科医院上海市结核病(肺)重点实验室)

【摘要】 目的 探究融合基因编码的蛋白 Rv0071/74 在北京型结核分枝杆菌的流行和耐药中的作用。方法 运用 NCBI 获取并下载 Rv0071、Rv0074 的蛋白氨基酸序列, 采用在线软件 ProtParam、ProtScale、PSORT 分析蛋白的理化性质、亲水性和亚细胞定位; 使用在线软件 SignalP6.0、TMHMM、NetNGlyc1.0、NetPhos-3.1 分析蛋白的信号肽数量、跨膜区域、糖基化和磷酸化位点; 运用软件 SPOMA、SWISS-MODEL 进行蛋白的二级结构和三级结构的预测; 使用 ABCpred、SYFPEITHI 软件进行蛋白的 T、B 细胞抗原表位预测; 采用软件 STRING 进行预测分析 Rv0074 蛋白的相互作用蛋白。结果 Rv0071/74 基因全长 1 032 bp, 编码的蛋白氨基酸序数为 343, 分子式为 C₁₅₄₈H₂₄₅₈N₄₅₀O₄₈₁S₉, 为稳定的疏水蛋白, 亚细胞可能定位于细胞质。该蛋白有 21 个磷酸化位点, 无糖基化位点、信号肽及跨膜区域; 二级结构预测结果显示 α-螺旋(38.78%)、无规卷曲(37.90%)为该蛋白的主要元件, 三级结构建模与羧肽酶有较高相似性。融合蛋白 Rv0071/74 含有 32 个 B 细胞抗原表位, 17 个 T 细胞抗原表位。Rv0074 蛋白的相互作用蛋白为 Rv0073、Rv0075、Rv0072、Rv0071、Rv3346c、pks15、PPE38、Rv0552、Rv2052c、Rv2628。重组质粒 Pet28a-Rv0071/74 在表达宿主 *E. coli* BL21 中为不可溶性表达; SDS-PAGE 证实重组质粒 Pet28a-Rv0071/74 在 *E. coli* BL21 表达成功。结论 生物信息学预测 Rv0071/74 可能为羧肽酶家族, T、B 细胞抗原表位有两个区域重叠, 可能是结核病新型疫苗开发新靶点, 可为探索其在北京型结核分枝杆菌致病性中的功能作用提供理论基础。

【关键词】 结核分枝杆菌; Rv0071/74; 生物信息学

【文献标识码】 A **【文章编号】** 1673-5234(2024)12-1391-06

[Journal of Pathogen Biology. 2024 Dec.; 19(12):1391-1396, 1403.]

Bioinformatics analysis and preparation of protein encoded by *Mycobacterium tuberculosis* fusion gene Rv0071/74

YANG Lingling^{1,2}, QIN Lianhua^{1,3}, HUANG Jing² (1. School of Public Health, the Key Laboratory of Environmental Pollution Monitoring and Disease Control, Ministry of Education, Guizhou Medical University, Guiyang 561113, China; 2. Department of Biochemistry and Molecular Biology, School of Basic Medical Sciences, Guizhou Medical University; 3. Shanghai Key Laboratory of Tuberculosis, Shanghai Pulmonary Hospital, Tongji University School of Medicine)***

【Abstract】 **Objective** Exploring the role of the fusion gene-encoded protein Rv0071/74 in the prevalence and drug resistance of Beijing *Mycobacterium tuberculosis* strain. **Methods** NCBI was used to obtain and download the protein amino acid sequences of Rv0071 and Rv0074, Online software ProtParam, ProtScale and PSORT were used to analyze the physical and chemical properties, hydrophilicity and subcellular localization of proteins; the number of signal peptides, transmembrane regions, glycosylation and phosphorylation sites of the proteins were analyzed by using the online software SignalP6.0, TMHMM, NetNGlyc1.0, NetPhos-3.1 to analyze the number of signal peptides, transmembrane regions, glycosylation and phosphorylation sites of proteins; the software SPOMA and SWISS-MODEL were used for the prediction of the secondary and tertiary structures of proteins; ABCpred and SYFPEITHI software were used for the prediction of the T and B cell antigenic epitopes of proteins; the software STRING was used for the prediction and analysis of Rv0074 protein interacting proteins. **Results** The Rv0071/74 gene is 1032 bp in length and encodes a protein with an amino acid sequence of 343 and a molecular formula of C₁₅₄₈H₂₄₅₈N₄₅₀O₄₈₁S₉, which is a stabilized hydrophobic

* **【基金项目】** 贵州省科技厅科技计划项目(黔科合支撑项目[2023]一般 233); 上海市结核病(肺)重点实验室开放基金(2022-KF-06)。

** **【通讯作者】** 黄劲, E-mail: huangjin@gmc.edu.cn; 秦莲花, E-mail: lianhuaq1013@163.com

【作者简介】 杨玲玲(1998-), 女, 贵州毕节人, 在读硕士, 主要研究方向: 结核分枝杆菌耐药研究。E-mail: linglingyang539@163.com

protein with a subcellular possible localization in the cytoplasm. The protein has 21 phosphorylation sites and no glycosylation sites, signal peptide or transmembrane regions; secondary structure prediction showed α -helix (38.78%) and random coiling (37.90%) as the main components of the protein, and tertiary structure modeling showed high similarity with carboxypeptidase. The fusion protein Rv0071/74 contains 32 B-cell antigenic epitopes and 17 T-cell antigenic epitopes. The interacting proteins of the Rv0074 protein are Rv0073, Rv0075, Rv0072, Rv0071, Rv3346c, pks15, PPE38, Rv0552, Rv2052c, Rv2628. The recombinant plasmid Pet28a-Rv0071/74 was insoluble expressed in the expression host *E. coli* BL21; SDS-PAGE confirmed that the recombinant plasmid Pet28a-Rv0071/74 was successfully expressed in *E. coli* BL21. **Conclusion** Bioinformatics predicts that Rv0071/74 may be a carboxypeptidase family with two regions of overlapping T-cell and B-cell antigenic epitopes, which may be a new target for the development of a novel vaccine for tuberculosis, and may provide a theoretical basis for exploring its functional role in the pathogenicity of *Mycobacterium tuberculosis* in Beijing.

【Keywords】 *Mycobacterium tuberculosis*; Rv0071/74; bioinformatics

结核分枝杆菌 (*Mycobacterium tuberculosis*, Mtb) 主要感染人的肺部引起慢性疾病结核病 (tuberculosis, TB)。2022 年全球有 1 060 万新发结核病患者, 我国的结核病新发患者为 74.8 万, 结核病的发病数排第三位^[1]。耐药结核分枝杆菌的出现增加了结核病的治疗难度同时也利于结核病的传播。尽管贝达喹啉, 德拉马尼、前托马尼获得批准, 但临床研究发现能从结核患者体内分离出贝达喹啉和德拉马尼的耐药菌株^[2-4]。结核病仍然是严重危害公众健康的全球公共卫生问题。

我国耐多药结核病 (Multidrug-resistant tuberculosis, MDR-TB) 的主要菌株是结核分枝杆菌北京家系 (Beijing *Mycobacterium tuberculosis* strain, Beijing)^[5]。Beijing 是全球流行株的第二大流行株, 占全球流行株的 11% 以上, 占我国流行株的 60%~80%, 我国北方流行株 90% 以上为 Beijing^[6], 相比其他亚型有更高的传播性和毒力^[7-8]。Beijing 的毒力差异可能与其遗传异质性有关, 其主要特征 RD105 区缺失是进化机制中的染色体结构域缺失, 而染色体的缺失可能通过改变或消除基因的功能来影响菌株的毒力和传播^[9]。RD105 区的缺失使得 Rv0071 的 1-84 bp 区域与 Rv0074 的 288~1 236 bp 区域融合, 从而形成融合基因 Rv0071/74^[10]。研究表明 Rv0072 和 Rv0073 与结核分枝杆菌的 ABC 转运蛋白系统有关^[11], 主要负责氨基酸的转运, 而 Rv0071、Rv0074 的基因功能未知。迄今, 对融合基因编码 Rv0071/74 编码的蛋白的功能尚需进一步研究。本研究通过对融合蛋白 Rv0071/74 进行生物信息学预测分析, 纯化表达出融合蛋白 Rv0071/74, 为后续探究该蛋白的免疫原性及其在致病中的作用提供实验基础, 为探讨 Rv0071/74 在 Beijing 的高传播、高致病力及耐药提供理论基础, 可为后续深入研究 Beijing 的致病机制和结核病新的药物靶点奠定基础。

材料与方法

1 材料

酵母提取物、大豆蛋白胨及胰蛋白胨均购自美国 OXOID 公司; IPTG 诱导剂购自、亲和 Ni 柱、PBS 粉剂、琼脂糖购自于上海生物工程股份有限公司; His 标签抗体、兔二抗及 ECL 显影液购自武汉爱博泰克生物科技有限公司; 感受态 *E. coli* BL21 (DE3) 为上海市肺科医院结核病 (肺) 重点实验室保存。

2 方法

2.1 Rv0071/74 基因编码蛋白的生物信息学分析
NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 获取 Rv0071、Rv0074 的基因及蛋白序列。运用表 1 中的生物信息学软件或在线网站对结核分枝杆菌 Rv0071/74 融合蛋白氨基酸序列及蛋白序列进行预测和分析。

表 1 生物信息学软件
Table 1 Bioinformatics analysis software

名称 Name	网址 Websites	功能 Fuctionon
ProtParam	https://web.expasy.org/protparam/	理化特性
ProtScale	https://web.expasy.org/protscale/	亲疏水性
PSORT	https://wolfsort.hgc.jp/	亚细胞定位
SignalP6.0	SignalP 6.0 - DTU Health Tech - Bioinformatic Services	信号肽
TMHMM	https://dtu.biolib.com/DeepTMHMM	跨膜区域
NetNGlyc1.0	https://services.healthtech.dtu.dk/services/NetNGlyc-1.0/	糖基化
NetPhos-3.1	https://services.healthtech.dtu.dk/services/NetPhos-3.1/	磷酸化位点
SPOMA	https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/secpred_sopma.pl	二级结构
SWISS-MODEL	https://swissmodel.expasy.org/interactive	三级结构
ABCpred	http://crdd.osdd.net/raghava/abcpred/ABC_submission.html	B 细胞表位
SYFPEITHI	http://www.syfpeithi.de/bin/MHCServer.dll/EpitopePrediction.htm	CTL 细胞表位
STRING	https://cn.string-db.org/cgi/input?sessionId=pppvCH451YUz	蛋白互作网络

2.2 融合基因 Rv0071/74 引物设计及重组载体的构建

2.2.1 融合基因 Rv0071/74 基因引物设计、合成及重组质粒鉴定 融合基因 Rv0071/74 的基因序列主

要继续继承 *Rv0071* 的 1~84 bp 区域和 *Rv0074* 的 288~1 236 bp 区域的基因序列。通过 Primer-Blast 进行引物设计,由深圳华大基因股份有限公司合成。将重组质粒进行 PCR 反应扩增,用 1% 的琼脂糖凝胶验证扩增产物。

2.2.2 构建 *E. coli* Pet28a-*Rv0071/74*-BL21 菌株 取 1 μL 的质粒热击转化入实验室保存的感受态细胞 *E. coli* BL21,加入 500 μL LB 培养基,37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 30 min,取 200 μL 涂布于含卡那霉素的 LB 固体琼脂平板,37 $^{\circ}\text{C}$ 培养过夜挑选阳性克隆。

2.3 重组蛋白 *Rv0071/74* 表达分析 将阳性克隆菌株 *E. coli* Pet28a-*Rv0071/74*-BL21 转接至含卡那霉素的 500 μL LB 液体培养基中 2~3 h。将活化的菌液扩大培养,转接至的含卡那霉素抗性 LB 液体中,220 r/min,37 $^{\circ}\text{C}$ 摇床培养至 A_{600} 值为 0.6~0.8 时,收集诱导前的菌液后再加入终浓度为 1 mmol/L IPTG。于 220 r/min,16 $^{\circ}\text{C}$ 摇床培养 12~16 h。诱导后的菌液 5 000 r/min 离心 10 min。加入 10 mmol/L pH7.4 PBS 重悬菌沉淀,5 000 r/min(离心半径 9.8 cm)离心 10 min,重复 3 次。按 25 mL PBS 重悬 1 g 菌沉淀的比例重悬所有菌沉淀,超声破碎仪工作 3 s,停歇 10 s,破碎菌体 3 min,离心后分别收集破碎上清和沉淀进行 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)进行分析。超声波破碎后菌沉淀用 8 mol/L 尿素变性处理用镍离子金属层析螯合层析法分离纯化。

2.4 重组蛋白 *Rv0071/74* 纯化 取 3 mL 体积的镍金属螯合层析填料,加入重力柱后用 10 倍柱体积的 ddH₂O 清洗,10 倍柱体积 20 mmol/L Tris,300 mmol/L NaCl 洗柱。将超声上清挂柱 2 次,使用 Bindingbuffer、Washingbuffer、Elutionbuffer 各 10 mL(均 pH8.0),收集超声上清、超声沉淀、各洗脱液进行 10% SDS-PAGE 分析,使用考马斯亮蓝染色液进行评估。

2.5 重组蛋白 *Rv0071/74* 鉴定 取 2.4 中 Elutionbuffer 洗脱成分在 4 $^{\circ}\text{C}$ 的环境下进行蛋白透析复性,蛋白的透析复性液采用 pH 值 7.4 的 PBS 缓冲液。取透析复性的蛋白经 10% SDS-PAGE 分离后,转移至 PVDF 膜,用 5% 的 BSA 室温封闭 2 h;加入兔抗 His 标签抗体于 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜;用 TBS-T 洗涤 3 次,加入兔抗,室温孵育 2 h;用 TBS-T 洗涤 3 次,ECL 显色,蒸馏水终止反应。

结 果

1 融合蛋白 *Rv0071/74* 生物信息学预测

1.1 目的基因基本信息及序列分析 从 GenBank 网

站 *Mycobacterium tuberculosis* H₃₇Rv 的 *Rv0074* 的基因序列显示:该基因的 Gene ID 为 886976,*Rv0071* 的基因序列显示:该基因的基因 ID 为 886988。*Rv0071* 蛋白 GenBank 登录号为:CCP42794.1,*Rv0074* 蛋白登录号为:NP_214588.1。

1.2 融合蛋白基本理化性质的分析 融合蛋白的分子式为 C₁₅₄₈H₂₄₅₈N₄₅₀O₄₈₁S₉,由 4 946 个原子构成,包含 C、H、N、O、S 五种元素,相对分子质量为 35 357.81,理论等电点为 5.05。融合蛋白 *Rv0071/74* 由 22 种氨基酸组成丙氨酸(Ala)所占比例为 16.6%,Val 占 12.8%,Gly 占 10.2%,其余氨基酸所占比例不足 10%。该蛋白中带正电荷的氨基酸残基总数为(Arg + Lys)总数为 26,带负电荷的氨基酸残基(Asp + Glu)总数为 39,其不稳定指数为 39.19,可能为稳定蛋白。脂肪指数为 92.48。

1.3 亲疏水性及亚细胞定位 融合蛋白的亲疏水氨基酸的分布结果见图 1。该蛋白的多肽链中第 169 位缬氨酸具有最高值 2.389,疏水性较强,第 65 位的精氨酸具有最低值 -2.900,亲水性较强,总体上呈疏水性。融合蛋白的亚细胞定位于细胞质。

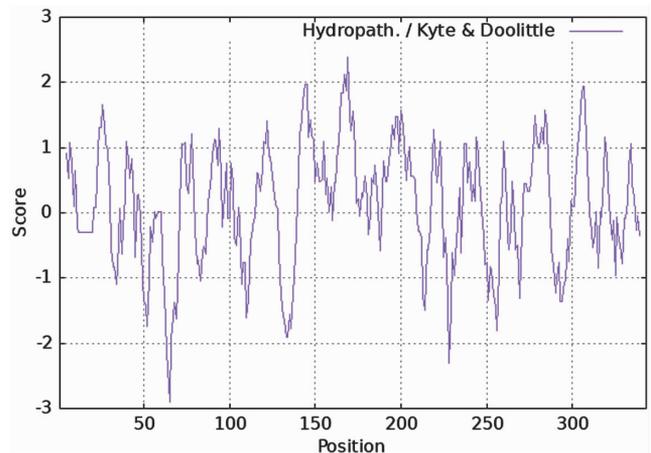


图 1 融合蛋白 *Rv0071/74* 的亲疏水性分析
Fig. 1 Hydrophobicity analysis of fusion *Rv0071/74* protein

1.4 蛋白的信号肽、跨膜区、糖基化及磷酸化位点预测分析 融合蛋白 *Rv0071/74* 的信号肽预测分析结果显示无信号肽;融合蛋白 *Rv0071/74* 序列的氨基酸残基共 343 个,预测分析结果显示该蛋白不存在跨膜序列(图 2),无 N-型糖基化位点,磷酸化位点有 21 个,其中丝氨酸有 8 个,苏氨酸有 10 个,酪氨酸有 3 个。

1.5 蛋白质的二级结构及三级结构 融合蛋白 *Rv0071/74* 的二级结构,结果见图 4,其中 α -螺旋(Hh)结构 133 个,占 38.78%;无规卷曲(Cc)130 个,占比 37.90%;延伸链(Ee)结构 50 个,占 14.58%; β -转角(Tt)30 个,占 8.75%。该蛋白的三级结构见图 5。该模型 GMOE 评分为 0.91,建模质量良好。

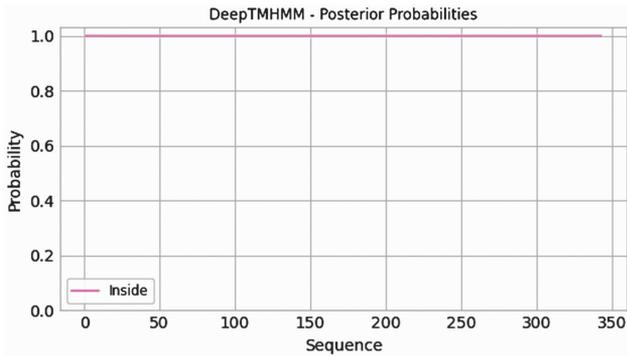


图 2 DeepTMHMM 预测融合蛋白 Rv0071/74 跨膜区域
Fig.2 Prediction of transmembrane domains of fusion Rv0071/74 protein in DeepTMHMM

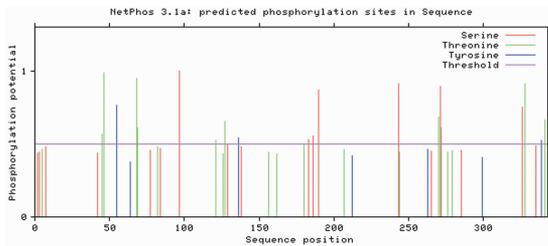


图 3 融合蛋白 Rv0071/74 磷酸化位点分析
Fig.3 Predicted phosphorylate sites of fusion Rv0071/74 protein



图 4 SOPMA 预测融合蛋白 Rv0071/74 的二级结构
Fig.4 Prediction of the secondary structure of fusion protein Rv0071/74

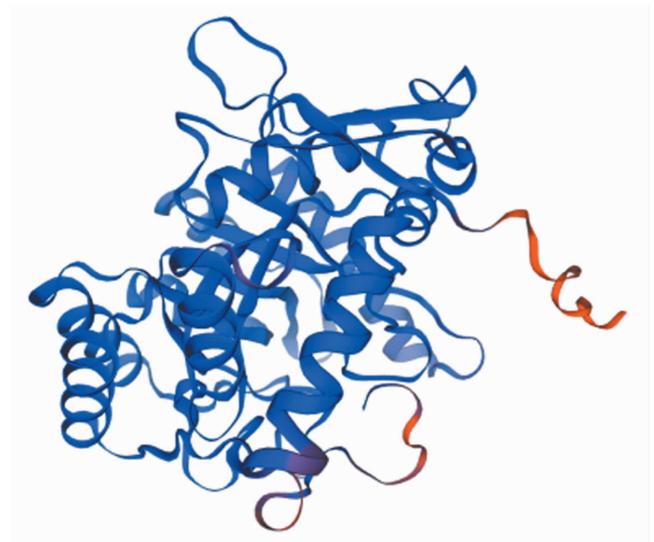


图 5 融合蛋白 Rv0071/74 三维结构
Fig.5 Predicted three-dimension structure of fusion Rv0071/74 protein

表 2 融合蛋白 Rv0071/74 的 B 细胞抗原表位预测
Table 2 Predicted B cell epitopes of fusion Rv0071/74 protein

等级 Rank	表位序列 Epitopes enquence	开始氨基酸位置 The position of amino acid	得分 Score
1	TRSGGHCWFL	82	0.78
2	PELVVSGPPL	72	0.78
3	TTIRDLGDRD	45	0.75
4	AIVAQGVWCG	196	0.75
5	GIEHCTFLSE	175	0.74
6	SGQLAAVVAA	138	0.74
7	AAALRSGIT	37	0.72
8	PVDPVDAVVA	19	0.72
9	WIKVMATGGF	115	0.72
10	AARGADWIKV	109	0.72
11	TTVGPPELVVS	68	0.7
12	PWQPQYGSQQ	131	0.7
13	SVDPVDPVDP	7	0.69
14	IPRVYPEMPE	208	0.69
15	FLSEGSAAAS	181	0.69
16	VVAAAQVGL	144	0.69
17	EYRQKTTVGP	63	0.68
18	DAVVAVGRAR	24	0.68
19	LVDVAVQERAA	101	0.67
20	MSSITVSVDP	1	0.67
21	TASDPWQPQY	127	0.66
22	DRDYAALALR	52	0.65
23	TAHAHATAGI	156	0.65
24	GFVTTASDPW	123	0.65
25	VGLPVTAAHAH	151	0.64
26	QGVWCGMTIP	200	0.63
27	PVDPVDPVDP	13	0.62
28	AVGRARRHAA	28	0.61
29	FLGGVADSVE	90	0.59
30	LALREEYRQK	58	0.58
31	VADSVEELVD	94	0.55
32	SAAASPDVVE	186	0.52

1.6 融合蛋白 Rv0071/74 的抗原表位 融合蛋白 Rv0071/74 的 B 细胞抗原表位预测结果见表 2,当临界阈值为 0.51 时该蛋白有 32 个 B 细胞相关抗原表位。应用 SYFPEITHI 软件预测融合蛋白 Rv0071/74 的 T 细胞表位,当临界阈值为 21 时该蛋白有 17 个 CTL 细胞的相关抗原表位(表 3),T、B 细胞抗原表位有两个区域重叠,起始氨基酸的位置位于第 90 位和第 181 位。

表 3 融合蛋白 Rv0071/74 HLA-A * 02:01 限制性 CTL 细胞抗原表位预测

Table 3 The epitope prediction of fusion protein in HLA-A * 02:01 restricted CTL cells

等级 Rank	表位序列 Epitopes equence	开始氨基酸位置 The position of amino acid	得分 Score
1	ALRSGITTI	39	28
2	VLPDDL VYL	256	28
3	FLGGVADSV	90	25
4	RLIDAGARV	232	25
5	GVADSVEEL	93	24
6	EMPENLVAV	214	24
7	DLLAVAAGV	302	24
8	SITVSVDPV	3	23
9	SVEELVDAV	97	23
1	QLAAVVAAA	140	23
11	ATAGIAAAV	161	23
12	AVAAGVDGI	168	23
13	FLSEGSAAA	181	22
14	YGSGQLAAV	136	21
15	IAAAVAAGV	165	21
16	VLTGATAAA	274	21
17	IAPGYDADL	295	21

1.7 Rv0074 蛋白相互作用蛋白 融合蛋白 Rv0071/74 的氨基酸序列主要是继承 Rv0074 蛋白的氨基酸序列,因此可通过预测 Rv0074 蛋白的互作关系来提示融合蛋白 Rv0071/74 潜在的相互作用蛋白。蛋白 Rv0074 与 10 个蛋白存在相互作用关系,结果见图 6。

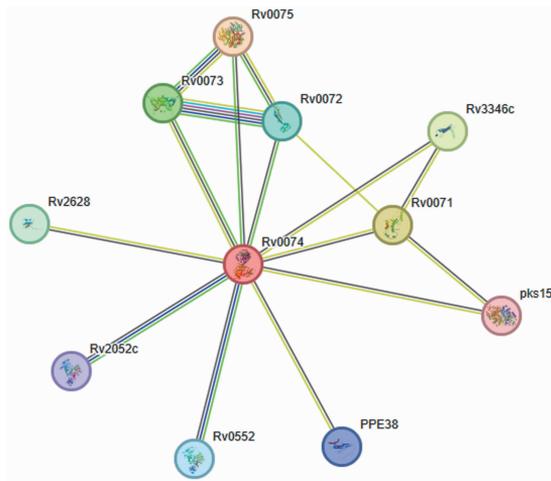


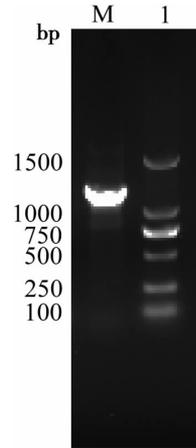
图 6 蛋白 Rv0074 相互作用蛋白预测
Fig. 6 Protein interaction prediction of Rv0074 protein

2 Rv0071/74 编码蛋白诱导表达与纯化

2.1 重组质粒 Pet28a-Rv0071/74 鉴定 核酸电泳结果显示在 1 000 bp 左右可见目的条带(图 7),说明重组质粒构建成功。

2.2 Rv0071/74 编码蛋白 诱导表达与纯化 IPTG 诱导组分在 35~40 ku 处有明显的重组蛋白表达的条带,而未加 IPTG 的菌体在此处则无明显的蛋白条带(图 8)。该蛋白主要在超声波破碎后的沉淀表达,

说明该蛋白在大肠埃希菌里以包涵体表达(图 8)。镍离子金属螯合层析能与重组蛋白上的 6 个组氨酸发生相互作用或吸附,进而能分离纯化含 His 标签的蛋白。超声波破碎后的菌沉淀用 8 mol/L 尿素变性后用经典的镍离子金属螯合层析法分离纯化。纯化后重组蛋白 SDS-PAGE 检测,结果显示 Rv0071/74 编码蛋白被有效纯化(图 8)。

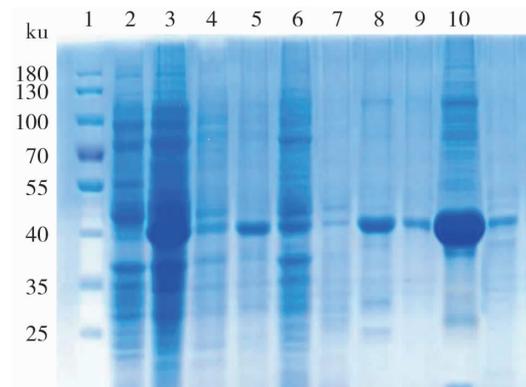


M Maker (DL 2000) 1 重组质粒 Pet28a-Rv0071/74

图 7 重组质粒 Rv0071/74-pET28a 鉴定

M Maker (DL 2000) 1 Recombinant plasmid Pet28a-Rv0071/74

Fig. 7 Map of recombinant plasmid Rv0071/74-pET28a



M Maker (10~180 ku) 1 未诱导 Pet28a-Rv0071/74-BL21 (DE3) 重组菌菌泥 2 诱导后 Pet28a-Rv0071/74-BL21 (DE3) 重组菌菌泥 3 诱导后 Pet28a-Rv0071/74-BL21 (DE3) 破碎上清 4 诱导后 Pet28a-Rv0071/74-BL21 (DE3) 破碎沉淀 5 诱导后 Pet28a-Rv0071/74-BL21 (DE3) 重组菌镍金属螯合层析的流穿液 6,7 纯化后洗杂液 8~10 分别为:300mmol/L 咪唑洗脱成分 1~3

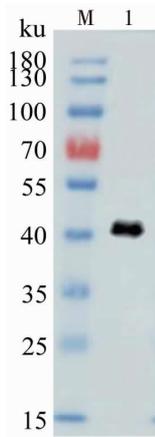
图 8 Rv0071/74 蛋白包涵体表达及纯化 SDS-PAGE

M Maker (10-180 ku) 1 Pet28a-Rv0071/74-BL21 (DE3) raecombinant bacteria sludge was not induced 2 Pet28a-Rv0071/74-BL21 (DE3) sludge after induction 3 Pet28a-Rv0071/74-BL21 (DE3) after induction and crushing supernatant 4 Pet28a-Rv0071/74-BL21 (DE3) induced crushing precipitation 5 The analysis of purified nickel metal chelation flow solution 6,7 The component of wash solution 8-10 The elution component 1-3 by 300 mmol/L by imidazole

Fig. 8 SDS-PAGE of inclusion body expression and purification of Rv0071/74 protein

2.3 Rv0071/74 编码蛋白 Western blot 验证纯化得到的蛋白纯化后的蛋白在 Western blot 结果图 35

~40 ku 处出现特异性条带(图 9),条带明亮,说明纯化得到的蛋白为融合蛋白 Rv0071/74。



M Maker(10-180 ku) 1 纯化的融合蛋白 Rv0071/74

图 9 融合蛋白 Rv0071/74 纯化后 Western blot 鉴定胶图

M Maker(10-180 ku) 1 Purified fusion protein Rv0071/74

Fig. 9 Western blot identification of fusion protein Rv0071/74 after purification

讨论

Beijing 是中国耐多药结核病的主要菌株^[13],临床和流行病学研究数据表明,Beijing 不仅与耐药性有关而且具有强致病性,进而导致其广泛传播^[12-14]。融合基因 Rv0071/74 在 Beijing 的强致病性及耐药性中的功能作用尚需进一步探讨。随着生物信息学技术的发展,利用生物信息学软件对融合蛋白 Rv0071/74 进行分析,通过基因工程的方法纯化得到重组蛋白,为将纯化蛋白免疫小鼠,获得血清并检测抗体的含量的后续实验提供实验基础,同时也为研究 Beijing 的 Rv0071/74 蛋白的功能及其在致病和耐药中的作用提供基础。

本研究表明融合 Rv0071/74 蛋白为稳定的疏水性蛋白,且具有较高的磷酸化位点,较高的磷酸化位点可能有利于 Beijing 对生存环境的感知,在宿主的体内存活进而利于其传播。蛋白质的功能由其结构决定,融合蛋白 Rv0071/74 的二级结构含有较高比例的 α -螺旋和无规卷曲,是该蛋白功能和构象的重要区域。Rv0071/74 蛋白的三级结构与 Cc2672 蛋白高度相似,Cc2672 是 *Caulobacter crescentus* 的羧肽酶,这提示 Rv0071/74 蛋白可能作为羧肽酶发挥功能作用。羧肽酶参与细胞壁肽聚糖层合成和重塑的动态过程^[15-16],这类水解酶可通过改变细胞壁的渗透性进而影响药物的作用。Qin 等^[10]的研究表明,融合基因 Rv0071/74 可以切割肽聚糖 UDP-胞壁酰五肽 C 端的 D-Ala 残基,改变了细胞壁的厚度而发生耐药。生物信息学预测结果显示融合蛋白 Rv0071/74 的亚细胞定位于细胞质,这与肽聚糖水解酶可能存在的位置相符^[17]。

在结核分枝杆菌感染过程中主要组织相容复合体(MHC)I类限制性细胞毒性 T 淋巴细胞发挥着重要作用,而 B 细胞可通过调节受感染宿主的各种免疫成分来促进宿主防御结核分枝杆菌^[18]。本研究在分析融合蛋白 Rv0071/74 的 T、B 细胞表位时,结果显示该蛋白有 32 个 B 细胞表位 17 个 T 细胞表位,T、B 细胞共同抗原表位有 2 个,这两个重叠区域作为新疫苗的开发可极大提高疫苗的效率。本研究表明 Rv0074 蛋白与 10 种蛋白相互作用,其中 Rv3346c、Rv0071、Rv0075、Rv0552、Rv2052c、Rv2628、PPE38 蛋白目前功能未知,此外 Rv0074 还与 Rv0072、Rv0073 和 Rv2628 有相互作用关系,Rv0072 和 Rv0073 与结核分枝杆菌的 ABC 转运系统有关^[11],Rv2628 是结核潜伏感染的相关抗原^[19],故推测蛋白 Rv0074 参与结核分枝杆菌的转运系统且可能在结核分枝杆菌的潜伏感染阶段发挥作用。

菌体的培养温度、转速、诱导剂的浓度、诱导时间等因素影响蛋白的诱导表达。在原核表达系统中,大肠埃希菌具有经济高效,耗时短的优点,但同时也容易形成包涵体。因尿素经济且容易清除,因此本研究用 8 mol/L 的尿素溶解包涵体,纯化得到的蛋白经 PBS 缓慢透析复性后获得融合蛋白 Rv0071/74。在透析复性过程中若快速清除尿素,则蛋白容易形成白色沉淀,得到无活性的蛋白。

综上,运用生物信息学软件对结核分枝杆菌的融合蛋白 Rv0071/74 进行预测,融合蛋白 Rv0071/74 可能为羧肽酶,有较高的磷酸化位点且有两段重叠的 T、B 细胞抗原表位,可能为结核病新型疫苗开发的新靶点,通过镍离子金属螯合层析法分离纯化得到蛋白 Rv0071/74,可为抗结核菌药物的研发提供理论基础。

【参考文献】

- [1] WHO. Global Tuberculosis Report 2023 [Z]. WHO,2023.
- [2] Andres S,Merker M,Heyckendorff J, et al. Bedaquiline-resistant tuberculosis: Dark clouds on the horizon [J]. Am J Respir Crit Care Med,2020,201(12):1564-1568.
- [3] Nimmo C,Millard J,Brien K, et al. Bedaquiline resistance in drug-resistant tuberculosis HIV co-infected patients [J]. Eur Respir J, 2020,55(6):1902383.
- [4] Polsfuss S,Hofmann-Thiel S,Merker M, et al. Emergence of low-level delamanid and bedaquiline resistance during extremely drug-resistant tuberculosis treatment [J]. Clin Infect Dis,2019,69(7): 1229-1231.
- [5] Chen Q,Pang Y,Liang Q, et al. Molecular characteristics of MDR *Mycobacterium tuberculosis* strains isolated in Fujian, China [J]. Tuberculosis (Edinb),2014,94(2):159-161.
- [6] 李国莉. 结核分枝杆菌北京家族与结核病近期复发的关系研究 [D]. 南京:东南大学,2019.

- that amplifies regulatory T cells in a pulmonary fungal infection [J]. *Infect Immun*, 2018; IAI. 00109-18.
- [5] Sun B, Ma LJ, Qi Y, et al. Correlation of IL-33 gene polymorphism with chronic obstructive pulmonary disease [J]. *Europ Rev Med Pharmacol Sci*, 2019, 23(14): 6277-6282.
- [6] 周怡希, 何文, 张巍, 等. 三维斑点追踪技术评估非瓣膜性心房颤动患者左房低电压区对左房结构及功能的影响 [J]. *临床超声医学杂志*, 2024, 26(4): 317-321.
- [7] 王荣荣, 刘媛媛, 郑美华. 三维斑点追踪成像技术对 AMI 患者 PCI 术后左心室重塑的预测价值 [J]. *江苏医药*, 2024, 50(4): 392-396, 400, 433.
- [8] 杨攀玉, 宋晓霞, 孙品, 等. 实时三维斑点追踪成像技术在维持性血液透析病人左心功能评价中的应用 [J]. *青岛大学学报(医学版)*, 2024, 60(2): 233-238.
- [9] 张海婷, 徐丽敏. 慢阻肺合并骨质疏松患者血清 IL-31、IL-33 水平与 OPG/RANK/RANKL 系统相关性研究 [J]. *临床肺科杂志*, 2024, 29(5): 695-698.
- [10] Kamel H, Elsayegh AT, Nazmi H, et al. Assessment of left ventricular systolic function using two- and three-dimensional speckle tracking echocardiography among healthy preschool-age pediatric children [J]. *Egy Heart J*, 2022, 74(1): 21.
- [11] 聂淑婷, 周畅, 孙恒, 等. 三维斑点追踪成像技术评估心房功能性二尖瓣反流患者左心室功能 [J]. *中国临床医学影像杂志*, 2024, 35(3): 174-177, 196.
- [12] 高源, 孙佳, 郑苗, 等. 三维斑点追踪技术评价心肌梗死患者心肌微循环特征及对左心室重塑的预测价值 [J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2024, 44(4): 483-490.
- [13] 李超, 徐紫薇, 张璇, 等. 血清 CCL21、CYTL-1 水平与慢性牙周炎患者牙龈卟啉单胞菌感染及牙周临床指标的相关性 [J]. *标记免疫分析与临床*, 2024, 31(2): 264-269.
- [14] 崔亚利, 杨延敏, 张慧婷, 等. 血清趋化因子 CCL21 水平对妊娠期高血压患者心血管不良事件的预测价值 [J]. *海南医学*, 2023, 34(23): 3442-3445.
- [15] 程茗慧, 刘丹, 宋海旭, 等. 冠心病合并 2 型糖尿病发病与 CCL21 基因 rs2812377 多态相关性研究 [J]. *临床军医杂志*, 2023, 51(11): 1144-1147.
- [16] Wang YB, Huang H, Lin S, et al. Evaluation of left ventricular function by three-dimensional speckle-tracking echocardiography in patients with chronic kidney failure [J]. *Contemporary Med Sci*, 2022, 42(4): 7.
- [17] 张明, 侯建伟, 王西辉, 等. 替罗非班联合氯吡格雷治疗急性心肌梗死的临床疗效及对患者血清 IL-6、TNF- α 、hs-CRP 水平的影响 [J]. *河北医学*, 2018, 24(5): 4.
- [18] 刘金艳, 段云鹏, 刘建伟, 等. 急性心肌梗死 PCI 术后肺部感染患者外周血 Ang-2 及肌红蛋白和降钙素原与心肌酶谱的相关性 [J]. *中华医院感染学杂志*, 2020, 30(19): 5.

【收稿日期】 2024-07-01 【修回日期】 2024-09-25

(上接 1396 页)

- [7] Hanekom M, Van der Spuy GD, Streicher E, et al. A recently evolved sublineage of the *Mycobacterium tuberculosis* Beijing strain family is associated with an increased ability to spread and cause disease [J]. *J Clin Microbiol*, 2007, 45(5): 1483-1490.
- [8] Aguilar D, Hanekom M, Mata D, et al. *Mycobacterium tuberculosis* strains with the Beijing genotype demonstrate variability in virulence associated with transmission [J]. *Tuberculosis (Edinb)*, 2010, 90(5): 319-325.
- [9] Tsolaki AG, Gagneau S, Pym AS, et al. Genomic deletions classify the Beijing/W strains as a distinct genetic lineage of *Mycobacterium tuberculosis* [J]. *J Clin Microbiol*, 2005, 43(7): 3185-3191.
- [10] Qin LH, Wang J, Lu J, et al. A deletion in the RD105 region confers resistance to multiple drugs in *Mycobacterium tuberculosis* [J]. *BMC Biol*, 2019, 17(1): 7.
- [11] Braibant M, Gilot P, Content J. The ATP binding cassette (ABC) transport systems of *Mycobacterium tuberculosis* [J]. *FEMS Microbiol Rev*, 2000, 24(4): 449-467.
- [12] Beijing/W genotype *Mycobacterium tuberculosis* and drug resistance [J]. *Emerg Infect Dis*, 2006, 12(5): 736-743.
- [13] Casali N, Nikolayevskyy V, Balabanova Y, et al. Evolution and transmission of drug-resistant tuberculosis in a Russian population [J]. *Nat Genet*, 2014, 46(3): 279-286.
- [14] Buu TN, Huyen MN, Lan NT, et al. The Beijing genotype is associated with young age and multidrug-resistant tuberculosis in rural Vietnam [J]. *Int J Tuberc Lung Dis*, 2009, 13(7): 900-906.
- [15] Loessner MJ, Kramer K, Ebel F, et al. C-terminal domains of *Listeria monocytogenes* bacteriophage murein hydrolases determine specific recognition and high-affinity binding to bacterial cell wall carbohydrates [J]. *Mol Microbiol*, 2002, 44(2): 335-349.
- [16] Vollmer W, Joris B, Charlier P, et al. Bacterial peptidoglycan (murein) hydrolases [J]. *FEMS Microbiol Rev*, 2008, 32(2): 259-286.
- [17] H ltjeJV. Growth of the stress-bearing and shape-maintaining murein sacculus of *Escherichia coli* [J]. *Microbiol Mol Biol Rev*, 1998, 62(1): 181-203.
- [18] Rijnink WF, Ottenhoff THM, Joosten SA. B-cells and antibodies as contributors to effector immune responses in tuberculosis [J]. *Front Immunol*, 2021, 12: 640168.
- [19] Leyten EM, Lin MY, Franken KL, et al. Human T-cell responses to 25 novel antigens encoded by genes of the dormancy regulon of *Mycobacterium tuberculosis* [J]. *Microbes Infect*, 2006, 8(8): 2052-2060.

【收稿日期】 2024-05-13 【修回日期】 2024-08-01