DOI:10.13350/j.cjpb.230507

· 论著 ·

结核分枝杆菌休眠相关蛋白 HspX 的生物信息学分析、制备及对大肠埃希菌生长抑制探究*

马锐[1],马金花[1],杨壤[2],李雅婷[2],赵志浩[2],马国荣[1]**
(1.宁夏医科大学基础医学院,宁夏银川 750004;2.宁夏医科大学临床医学院)

【摘要】 **目的** 分析 HspX 蛋白的基本性质及其编码基因对大肠埃希菌(*E.coli*)生长的影响,为将其作为结核病疫苗候选分子和临床检测生物标志物的可行性提供实验依据。 **方法** 应用生物信息学方法分析 HspX 蛋白基本生化性质;构建原核重组表达载体并在 *E.coli* 中表达,用金属螯合层析法纯化 HspX 蛋白,观察该蛋白及其编码基因对宿主菌 *E.coli*-BL21(DE3)和 *E.coli* -DH5α 生长的影响。 **结果** 生物信息学分析 HspX 蛋白由 144 个氨基酸残基组成,相对分子质量为 $16.227\ 28\times10^3$,等电点为 5.00;该蛋白无信号肽,含有 14 个磷酸化位点,为亲水性细胞壁蛋白。其在大肠埃希菌中以可溶性表达,经镍金属螯合填料一步纯化得到纯度为 86.9%的重组蛋白。重组质粒(pET28a-Rv2031c)能显著抑制其表达宿主菌 *E.coli*-BL21(DE3)的生长,但不会抑制其克隆宿主菌 *E.coli* -DH5α 的生长。 **结论** HspX 蛋白能抑制 *E.coli*-BL21(DE3)宿主菌的生长,其可能是结核分枝杆菌在宿主体内滞留发挥作用的效应物之一。

【关键词】 HspX;Rv2031c;载体构建;重组表达;生物信息学分析
【中图分类号】 R378.91 【文献标识码】 A 【文章编号】 1673-5234(2023)05-0529-07

[*Journal of Pathogen Biology*. 2023 May;18(5):529-535.]

Bioinformatics analysis and preparation of *Mycobacterium tuberculosis* dormancy associated protein HspX and preliminary study on growth inhibition of *E.coli*

MA Rui[1], MA Jinhua[1], YANG Rang[2], LI Yating[2], ZHAO Zhihao[2], MA Guorong[1] (1. *School of Basic Medical Science, Ningxia Medical University, Yinchuan* 750004, *China*; 2. *School of Clinic Medical Science, Ningxia Medical University*)

【Abstract】 **Objective** HspX is a highly expressed protein of *Mycobacterium tuberculosis* during dormancy, which has huge effect in latent infection of the pathogenic bacteria. This study oriented in the analysis of the basic properties of HspX protein and the effects of its encoding gene on the growth of *E. coli*, which serves the purpose of making its feasibility as a candidate molecule for TB vaccine and biomarker for clinical detection of the tuberculosis. **Methods** Bioinformatics methods were applied in the analysis of the basic biochemical properties of HspX protein. The recombinant expression vector of HspX was constructed and expressed in *E. coli*. The HspX protein was purified by metal chelate chromatography and the effects of the protein and its coding gene on the growth of host bacteria *E. coli*-BL21(DE3) and *E. coli*-DH5α were observed. **Results** Bioinformatics analysis showed that HspX protein consisted of 144 amino acid residues, with relative molecular mass of $16.227\ 28\times10^3$ and isoelectric point of 5.00. The protein had no signal peptide and contained 14 phosphorylation sites, indicating that it was a hydrophilic cell wall protein. Which is soluble expressed in escherichia coli, and the recombinant protein with the purity of 86.9% is obtained through one-step purification by a nickel metal chelating filler. The recombinant plasmid (pET28a-Rv2031c) significantly inhibited the growth of its expression host strain *E. coli*-BL21(DE3), but not its clonal host strain *E. coli*-DH5α. **Conclusion** HspX protein can inhibit the growth of *E. coli*-BL21(DE3) host strain, and it may be one of the effectors of *Mycobacterium tuberculosis* retention in the host.

【Key words】 HspX; Rv2031c; vector construction; recombinant expression; bioinformatics analysis

*,**结核病(tuberculosis,TB)主要是由结核分枝杆菌(*Mycobacterium tuberculosis*,MTB)经呼吸道感染引发的一种慢性、人畜共患传染病[1-2]。我国是全球第三大结核病高发国,2021 年新增结核患者 80 余万[3]。MTB 是一种需氧且生长极其缓慢的胞内感染菌。巨噬细胞不仅是 MTB 栖居地,也是宿主抗原提呈与抗

* 【基金项目】 国家自然科学基金项目(No. 82160027);宁夏自然科学基金项目(No. 2022AAC03133);宁夏医科大学校级重点项目(No. XZ2021012)。
** 【通讯作者】 马国荣,E-mail:guorongma8000@163.com
【作者简介】 马锐(1981-),女,宁夏银川人,博士研究生,副教授。主要研究方向:病原生物学。E-mail:37750287@qq.com

菌效应细胞，通过参与影响宿主免疫应答系统维持机体内环境稳定。最终使病原菌与宿主免疫系统达到动态平衡，菌体以休眠状态在宿主细胞中存活下来[4]。有85%～90%的MTB感染者体内结核菌处于休眠状态，仅有5%～10%的结核病患者可能最终会发病[5]。休眠是MTB与宿主间长期进化、为适应生存环境演变而来的自我保护机制，也是结核病继发性感染的主要因素之一。休眠状态下，MTB许多代谢进程被迫下调甚至关闭。

HspX是Rv2031c基因编码的小分子热休克蛋白家族中的成员，是休眠相关48个重要蛋白之一[6]。HspX蛋白是MTB在潜伏相时期重要的抗原，有很强的免疫原性，能够诱导Th1细胞的活化[7]。HspX蛋白具有特异性的B细胞和T细胞表位[8-9]。在约70%的痰液涂片阳性肺结核患者血清中发现了抗HspX蛋白抗体。该研究结果与文献[10-11]报道的HspX蛋白在患者血清抗体中的敏感性与特异性一致。Kingston等[12]报道HspX蛋白在小鼠和豚鼠中均能诱导迟发型超敏反应。亦有研究表明HspX蛋白在功能不同的T辅助亚群分化和增殖中发挥重要作用[13-14]。

HspX蛋白是一种可保护蛋白质在体外不聚集的分子伴侣[15-16]，该蛋白在体外被MTB感染过程中及低氧、CO暴露的环境中都能被诱导表达[17]。检测HspX蛋白亦可区分潜伏感染期的结核患者。MTB培养滤液蛋白组学研究显示，该蛋白在MTB培养滤液中属于高丰度蛋白[18]，且其在结核病患者血清中具有较高敏感性与特异性[11]。本研究拟应用生物信息学方法分析HspX蛋白基本理化性质，然后应用基因工程方法原核表达该蛋白，采用镍金属离子螯合法进行纯化，并评估该蛋白及其编码基因对其宿主菌生长状态的影响。

材料与方法

1 材料

1.1 菌株与质粒 重组表达载体构建的感受态细胞*E. coli* DH5α（克隆宿主）和*E. coli* BL21(DE3)购自天根生化公司；热灭活（65 ℃，10 min/次，3次）MTBH37Rv（总基因组DNA）和原核表达载体pET-28a(+)为本实验室保存。

1.2 主要试剂与仪器 AxyPrepTM DNA Gel Extraction Kit和AxyPrepTM Plasmid Miniprep Kit购自美国Axygen公司；T4 DNA Ligase，FastDigest XhoⅠ和FastDigest NdeⅠ购自美国Thermo Scientific公司；Anti-6×His rabbit polyclonal antibody和HRP-conjugated Goat Anti-mouse IgG购于武汉三鹰公司；硫酸卡那霉素，DNA marker，Protein marker，PVDF膜和DAB显色试剂盒购自生工生物工程（上海）股份有限公司；DNA polymerase，DNA胶回收试剂盒和质粒小量抽提试剂盒购自南京诺唯公司；镍金属螯合层析填料为本实验室制备。

2 方法

2.1 HspX蛋白基本性质生物信息学分析 HspX蛋白及其编码基因序列均来源于NCBI（https://www.ncbi.nlm.nih.gov/）数据库。上传HspX氨基酸序列至在线软件Protpapram（https://web.expasy.org/protparam/），获得该蛋白分子质量、等电点、总体疏水性等相关信息。通过以下在线数据库或网站获得HspX蛋白信号肽（http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/），跨膜区蛋白序列（https://services.healthtech.dtu.dk/service.php? TMHMM-2.0）及亚细胞定位（http://www.csbio.sjtu.edu.cn/bioinf/Cell-PLoc-2/），糖基化、磷酸化位点（NetPhos-3.1-Services-DTU Health Tech），蛋白相互作用网络（https://string-db.org）及序列同源性分析（Basic Local Alignment Search Tool，BLAST）相关信息。

2.2 原核重组表达载体的构建及重组HspX蛋白的表达

2.2.1 引物设计及合成 依据GenBank网站*Mycobacterium tuberculosis* H37Rv的基因Rv2031c（NP216547.1）序列信息，分别设计上、下游引物。上游引物P1：5′-GGAATTCCATATGGCCACCACCCTTCCCGTTC-3′（下划线部分为NdeI内切酶识别位点）；下游引物P2：5′-CCGCTCGAGGTTGGTGGACCGGATCTGAA-3′（下划线部分为XhoI内切酶识别位点）。引物由南京金斯瑞生物科技有限公司合成。

2.2.2 重组表达质粒的构建 以热灭活菌上清液提取的DNA为模板，按试剂说明PCR扩增Rv2031c基因，经1.5%琼脂糖凝胶电泳检测后切胶回收约500 bp的目的基因片段，将其与表达载体pET-28a(+)分别用FastDigest NdeⅠ和FastDigest XhoⅠ双酶切并回收酶切产物，在T4-DNA Ligase（按试剂盒说明书）作用下22 ℃连接1.5 h。取10 μL连接产物热激转化入感受态细胞*E. coli* DH5α（克隆宿主菌），经固体LB(Kan+)琼脂平板筛选阳性克隆，采用菌落PCR验证目标基因Rv2031c被成功亚克隆的菌株，并委托生工生物工程（上海）股份有限公司进行DNA测序，测序正确的重组克隆菌株命名为pET-Rv2031c-DH5α。

2.2.3 重组蛋白HspX的表达 取对数生长期pET-Rv2031c-DH5α细菌，提取质粒，经电泳验证后热激转化*E. coli* BL21(DE3)感受态细胞，转化菌涂布LB，筛选阳性单克隆菌落并接种至LB(Kan+)液体培养

基至菌液 A_{600} 值为 0.4～0.6，加入诱导剂异丙基-β-D-硫代半乳糖苷（IPTG）至终浓度为 1.0 mmol/L。诱导 8 h 后取菌液离心，用 10 mmol/L PBS 置换体系后沸水煮 10 min，SDS-PAGE 检测目的蛋白的表达。

2.2.4 重组 HspX 蛋白的镍金属螯合层析与 Western blot 验证 重组菌经活化、转接和增菌培养后按重量：体积＝1∶20（g/mL）的比例用 10 mmol/L PBS 液重悬菌体，冰浴、超声波破碎细菌细胞壁（破菌 2 s，间歇 3 s，共 40 min，功率 55%），8 000 r/min（离心半径 10 cm）离心 30 min，收集上清液（已验证 HspX 蛋白为可溶性表达），采用镍金属螯合层析法纯化目的蛋白。取不同组分溶液 SDS-PAGE 电泳检测，并用灰度分析法确定金属螯合层析后的目的蛋白纯度；采用 BCA 蛋白定量法测定其浓度。以小鼠抗 His 标签抗体为一抗，采用 Western blot 验证未纯化及镍金属螯合纯化的 Hspx 蛋白。

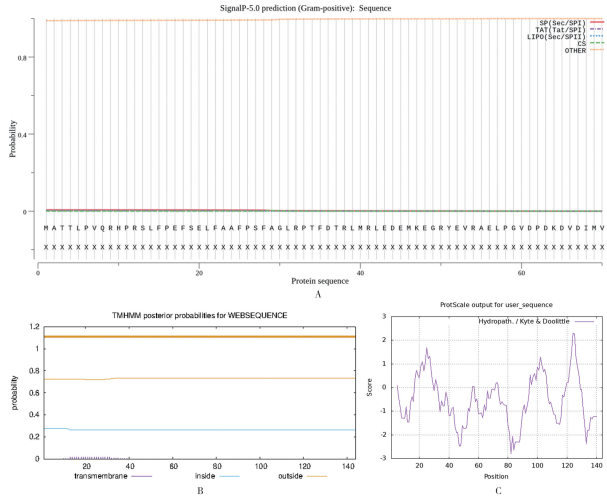
2.2.5 HspX 蛋白对菌体生长的影响观察 从固体 LB 培养基上挑取 pET-28a(＋)-DH5α，pET-28a(＋)-HspX-DH5α，pET-28a(＋)-BL21(DE3) 和 pET-28a(＋)-HspX-BL21(DE3) 菌株并将其接种在 5mL 的 LB 液体培养基中，37 ℃、200 r/min 摇菌培养 12～16 h。用新鲜培养基将所有样品的 A_{600} 值调整到 0.6，评估重组质粒对克隆宿主 DH5α 与表达宿主 BL21(DE3) 生长状态的影响。分组：(1) 不加诱导剂组；(2) 加入诱导剂 IPTG 组；(3) 加入诱导剂乳糖（Lactose，Lac）组；(4) 细菌生长至对数期后加入诱导剂 IPTG 与 Lac 组。测定相同培养条件下菌液 A_{600} 值，评估各组受试菌生长状态的差异性。

结 果

1 HspX 蛋白基本性质的生物信息学分析

1.1 Rv2031c 基因及其编码蛋白的理化性质 从 NCBI 等网站上获得 MTBRv2031c 的基因及其编码的 HspX 蛋白序列（https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NC_000962.3?report=genbank&from=2278498&to=2278932&strand=true）。简言之，根据 ProtParam 在线软件知 HspX 蛋白的相对分子质量为 $16.227\ 28\times10^3$，理论等电点为 5.00。该蛋白由 20 种共 144 个氨基酸组成。其中，天冬氨酸（Asp）和谷氨酸（Glu）含量最高，均占 9.0%；精氨酸（Arg）和苏氨酸（Thr）含量分别为 8.2% 和 7.6%。含负电荷氨基酸占总氨基酸数目的 18.06%（26/144），含正电荷氨基酸（Arg＋Lys）占其总数的（20/144）。其分子组成为 $C_{716}H_{1131}N_{197}O_{225}S_5$，原子总数为 2273。Hspx 蛋白的消光系数为 4470，在溶液中 280 nm 处吸光度为 0.275。该蛋白在大肠埃希菌，酵母菌及哺乳动物网状细胞内的半衰期分别＞10 h，＞20 h 和＞30 h。该蛋白不稳定性指数估算为 40.64，属不稳定蛋白。其脂肪族氨基酸指数为 72.43，总体平均亲水性为-0.52，属亲水性蛋白。

1.2 HspX 蛋白信号肽、跨膜区及总体亲疏水性分析 信号肽主要以经典的分泌（Sec/secretory）通路和双精氨酸转移（Tat/twin-arginine）通路的方式将蛋白输送到细胞膜外，然后由信号肽酶（SPaseI，SPaseII 或 SPaseIII）将其切除。Hspx 蛋白无经典 SPI/II 的切割位点，也无 TAT motif 的外分泌结构，因此该蛋白无信号肽（图 1A）。基于复杂隐马可夫规则与神经网络策略的 TMHMM v2.0 软件分析显示该蛋白为非跨膜蛋白（图 1B）。根据线性权重变化模型可以看出，该蛋白疏水区域＞0 的氨基酸所占比例小于 50%（图 1C），据此推测 HspX 为亲水性蛋白。



注：HspX 蛋白信号肽预测（A），跨膜结构域预测（B），依据线性权重变化模型预测 HspX 蛋白的总体亲疏水性（C）

图 1 Signalp v6.0 对 HspX 蛋白信号肽的预测

Note: Prediction of HspX protein signal peptide (A), prediction of transmembrane domain (B), prediction of overall hydrophilicity of HspX protein based on linear weight change model (C)

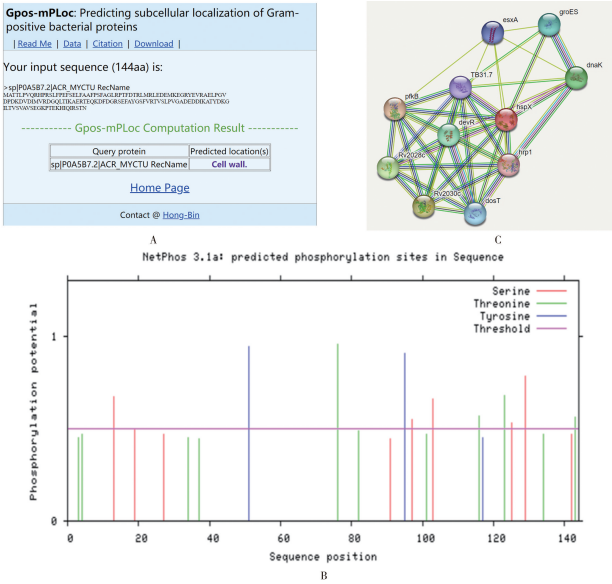
Fig. 1 Analysis of HspX protein based on Signalp V6.0 online signal peptide prediction software

1.3 HspX 蛋白亚细胞定位，糖基化、磷酸化位点预测与相互作用 蛋白网络预测 Psrotb 在线亚细胞定位软件分析显示 Hspx 位于细胞壁（图 2A）。此结果是否与 Hspx 表达使细胞壁的增厚有直接关系，需要进一步研究。

磷酸化可改变蛋白质结构，导致其活性变化，从而参与细胞的信号转导、生长发育等过程。采用 NetPhos 3.1 在线软件分析预测 HspX 蛋白无糖基化位点；磷酸化位点 11 个（图 2B），其中包括 4 个苏氨酸磷酸化位点。

热休克蛋白 HspX（α-晶体蛋白同源物）作为分子伴侣能够抑制醇脱氢酶的热变性。该基因过表达型细

胞比其野生型生长慢，并且在体外培养饱和后不易自溶，表明该蛋白可能会降低培养中和巨噬细胞感染时MTB的生长速度。相互作用蛋白网络预测Hspx蛋白的节点数共有11个，边数有41条(图2C)。10个蛋白中有6个与HspX性质相似度较高。其中，Rv2028c属于通用应激蛋白A家族；Rv2623，TB31.7也属于通用应激蛋白家族，可能在病原菌潜伏期发挥作用；Rv3418c，groES(10ku抗原)在Mg-ATP存在下与Cpn60结合，抑制后者的ATP；Dnak(热休克蛋白70)(HSP70)是可能的伴侣蛋白；Rv3875，EsxA，6ku早期分泌抗原靶蛋白，在调节宿主对感染的免疫反应以及负责细菌逃逸到宿主细胞质中；Rv2626c hrp1是缺氧反应蛋白。



注：Hspx蛋白的亚细胞定位分析(A)，磷酸化位点分析(B)，Hspx蛋白互作网络分析图(C)

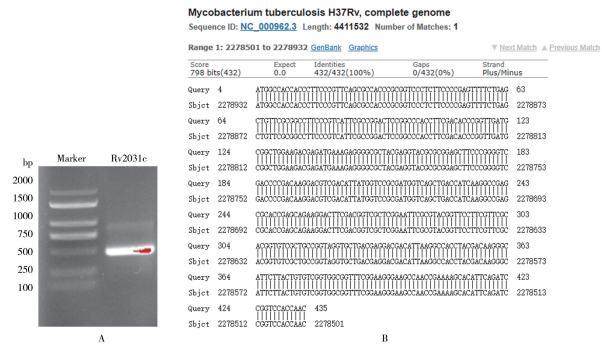
图2 NetPhos 3.1预测HspX蛋白的糖基化位点及相互作用蛋白

Note: Subcellular localization analysis of Hspx protein (A), phosphorylation site analysis (B), interaction network analysis of Hspx protein

Fig. 2 Analysis of HspX protein based on NetPhos 3.1 online signal peptide prediction software

2 MTBHspX基因重组载体的构建及重组蛋白HspX的表达

2.1 目的基因 Rv2031c片段扩增、克隆和酶切验证 PCR法从灭活MTB H37Rv菌液中扩增目的基因片段，经1.5%琼脂糖凝胶电泳检测，长度约470 bp，与Rv 2031c的DNA片段预期大小相符(图3A)。PCR产物及载体酶切后连接，连接部物转化DH5α菌并进行菌液PCR验证，对验证正确的pET28a-Rv2031c-DH5α进行测序，测序结果与NCBI数据库基因序列BLAST分析，显示亚克隆到pET-28a(+)载体的基因序列完全正确(图3B)。



注：Hspx蛋白编码基因的PCR扩增以及与结核分枝杆菌H37Rv基因序列间的比对结果(A)；数据库的BLAST比对结果(B)

图3 目的基因Rv2031c片段酶切验证及数据库的BLAST比对结果

Note: PCR amplification of Hspx protein coding gene and comparison of H37Rv gene sequence with Mycobacterium tuberculosis (A); BLAST comparison results of database (B)

Fig. 3 Target gene Rv2031c fragment digestion verification and database BLAST comparison results

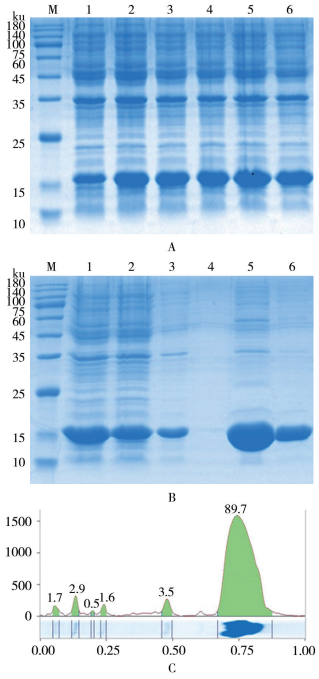
2.2 Hspx蛋白 重组表达及纯化产物的鉴定以及最佳诱导时长的确定重组蛋白在宿主菌中的表达受菌体培养温度、转速、诱导剂的种类及诱导剂加入量和诱导时间等多种因素的影响。本研究选择37 ℃、200 r/min、1 mmol/L IPTG为固定因素，诱导时长分别为2、4、6、8、12 h。从15% SDS-PAGE结果看出，在16×10^3处出现一深染的蛋白带，在加入IPTG后的8 h表达量达最大值，因此将其确定为最佳诱导时间(图4A)。

应用自制的镍金属层析填料，采用重力柱螯合层析法纯化重组HspX，纯化蛋白经SDS-PAGE凝胶电泳后用BioRad凝胶成像仪ImageLab3.0软件分析，0.5 mol/L咪唑一步洗脱液重组HspX蛋白纯度为86.9%(图4B，4C)。应用BCA法定量分析洗脱液中蛋白含量，洗脱组分1与洗脱组分2蛋白浓度分别为4.90 μg/μL和1.70 μg/μL。

2.3 重组HspX蛋白的Western blot鉴定 带有目标基因的重组表达载体pET28a(+)载体含6个组氨酸(His-flag)作为镍金属螯合层析时的识别标签。因此本研究将目的蛋白进行SDS-PAGE电泳分析(图5A)；另转膜后以抗组氨酸(His)标签的单克隆抗体为一抗，采用Western blot法间接验证目标蛋白中是否含有组氨酸标签蛋白。结果显示，在相对分子质量约16×10^3处有特异性反应条带，与预期的HspX蛋白分子质量一致。纯化的重组蛋白同样能被小鼠来源的抗组氨酸标签单克隆抗体识别(图5B)。

2.4 HspX蛋白及其编码基因对宿主菌生长的影响 DH5α是一种经诱变及生物工程改造后可摄入外源DNA的基因工程受体菌，缺失核酸内切酶(endA)，因而提高了质粒DNA的产量和质量；重组酶缺陷型(recA)减少插入片段的同源重组概率，保证了插入

DNA 的稳定性。因此 DH5α 是常用的质粒及目标基因储存菌,如用于基因文库的构建等。本研究中未构建目标基因的质粒 pET28a-DH5 与构建有目标基因的 pET28a-Rv2031c-DH5 随着菌体生长时间的延伸,宿主菌也同步增殖,二者之间生长状态无显著差异性(图 6A)。BL21(DE3)是经基因工程改造的染色体上携带 lacUV5 启动子控制的 T7 RNA 聚合酶基因,该菌种不带任何抗菌素抗性,其缺失 lon 和 ompT 蛋白酶基因适宜 IPTG 诱导下 T7 启动子驱动的外源基因高效表达的基因工程菌。与 pET28a- BL21(DE3)相比,相同培养条件下未加 IPTG 诱导剂组(图 6B),加入诱导剂乳糖组(图 6C),以及加入 1.0mmol/L 的 IPTG 诱导剂组(图 6D)含有目标基因 Rv2031c 的菌液生长状态均受到抑制,酶标仪测定含目标基因 Rv2031c 的菌液 A_{600} 值均低于不含目标基因的空白质粒组。



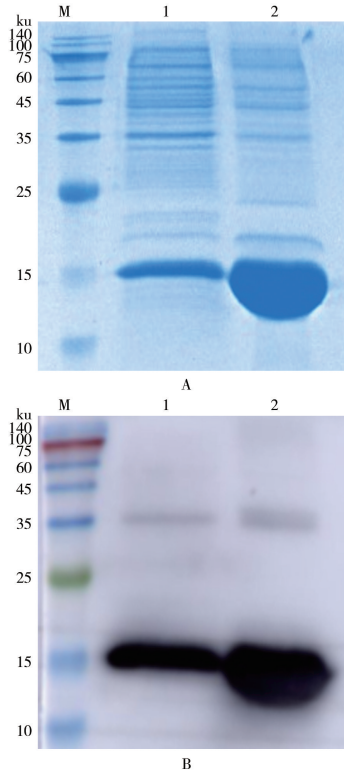
注:不同时间点 IPTG 有道 HspX 蛋白重组表达的测定:1 为未加诱导剂 IPTG 的 HspX 蛋白培养 12h 时的表达状况,2-6 分别表示 IPTG 诱导 2、4、6、8 和 12 h 时的目标蛋白表达量(A);HspX 蛋白的镍金属螯合层析结果 SDS-PAGE 电泳图,1-6 分别为未纯化 HspX 上清,镍金属螯合纯化后流穿液,洗杂液最初组分,洗杂液最末组分,洗脱组分 1,洗脱组分 2,以及 0.5mol/L 咪唑洗脱重组 HspX 蛋白的纯度分析(C)

图 4 HspX 重组蛋白的表达与分离纯化及蛋白纯度分析

Note: IPTG was used to measure the recombinant expression of HspX protein at different time points: 1 was the expression status of HspX protein cultured without inducer IPTG for 12h, and 2-6 was the expression level of target protein at 2h, 4h, 6h, 8h and 12h after IPTG induction (A). Results of nickel metal Chelation chromatography (SDS-PAGE) of HspX protein, 1-6 are the unpurified HspX supernatant, the purity analysis of the purified nickel metal chelation flow solution, the initial component of wash solution, the last component of wash solution, elution component 1, elution component 2, and 0.5mol/L imidazole elution recombinant HspX protein (C)

Fig. 4 Expression, isolation and purification of HspX recombinant protein and protein purity analysis

pET28(a)含 Lac 操纵子,根据 Lac 调控机理,乳糖也可对 lac 操纵子控制基因产生诱导作用。与 IPTG 相比,乳糖是一种价格低廉且没有毒性二糖。本研究在 A_{600} 值为 0.6 的对数生长期的亚克隆有目标基因的表达菌体中分别加入诱导剂 1 mmol/L 的 IPTG 和 1%(m/v=g/L)的乳糖,测定不同时间段菌液的 A_{600} 值。结果显示,含乳糖组的大肠埃希菌菌液 A_{600} 值比 IPTG 组略高(图 7A,7B)。可能原因为乳糖作为碳源可被大肠埃希菌代谢及利用,而 IPTG 是一种非代谢性诱导物不能为菌体生长利用,但二者均可诱导目标蛋白的表达(图 7C)。



注:SDS-PAGE 验证(A):M 为蛋白分子质量标准,1 为 pET28a-Rv2031c-BL21(DE3)超声破菌上清,2 为纯化的 HspX 蛋白;Western blot 验证(B):M 为蛋白分子质量标准,1 为 pET28a-Rv2031c-BL21(DE3)超声破菌上清与鼠抗组氨酸单克隆抗体反应条带,2 为纯化 HspX 蛋白与鼠抗组氨酸单克隆抗体反应条带

图 5 重组 HspX 蛋白的 SDS-PAGE 及 Western blot 分析

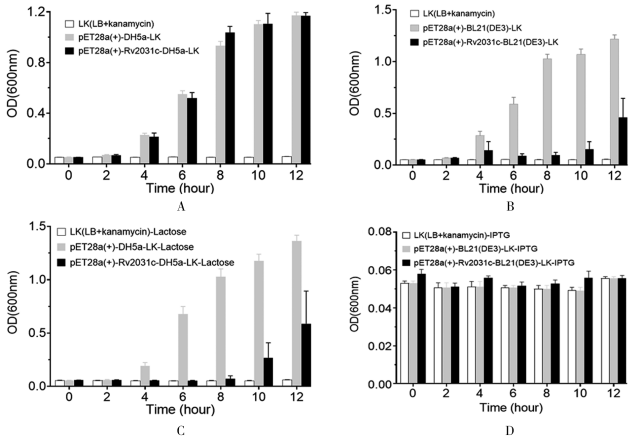
Note: SDS-PAGE verification (A): M is the protein molecular weight standard, 1 is pET28a-Rv2031c-BL21(DE3) ultrasonic bacteria-breaking supernatant, 2 is purified HspX protein; Western blot verification (B): M was the protein molecular quality standard, 1 was pET28a-Rv2031c-BL21(DE3) ultrasonic bacteria busting supernatant and mouse anti-histidine monoclonal antibody reaction strip, 2 was purified HspX protein and mouse anti-histidine monoclonal antibody reaction strip

Fig. 5 SDS-PAGE and Western blot of recombinant HspX protein

讨 论

由于对 MTB 潜伏感染者重视不够,导致 5%~10%的 MTB 潜伏感染者成为结核病患者,也成为结核病的重要传染源。休眠状态的 MTB 能表达多种休

眠相关特异性蛋白，改变代谢途径，表达异柠檬酸裂解酶和超氧化物歧化酶，最终使其在宿主体内滞留。研究发现，HspX蛋白是MTB在潜伏感染期的主要休眠相关蛋白。基于MTB培养滤液蛋白组学研究发现Hspx存在于液体苏通培养基中[18]。而苏通培养基比经典的Middlebrooks 7H9的成分简单，苏通培养基SDS-PAGE电泳检测不到任何蛋白，而Middlebrooks中含大量未知蛋白，从而为MTB的生长提供了重组的氮源。HspX蛋白是一种环境胁迫高表达蛋白，这可能是MTB培养滤液中检出高丰度HspX的原因。已有研究表明HspX蛋白与MTB细胞壁增厚相关，本研究基于该蛋白的亚细胞定位结果显示其为细胞壁蛋白。



注：不同时间段的pET28a空质粒以及pET28a-Rv2031c质粒在宿主菌DH5α中生长状态(A_{600})测定(A)；相同培养条件下未加IPTG诱导剂组(B)；加入诱导剂乳糖组(C)；加入1.0 mol/L的IPTG诱导组，包含目的基因Rv2031c的菌液生长状态(D)

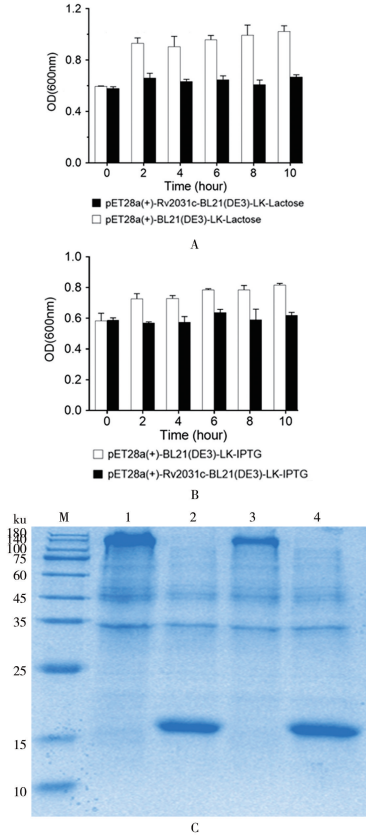
图6 重组HspX蛋白及其编码基因对宿主菌体生长状态的影响

Note: The growth status (A_{600}) of pET28a and PET28A-RV2031C plasmid in host bacterium DH5α at different time periods was determined (A); Group (B) without IPTG inducer under the same culture conditions; Add the inducer lactose group (C); Adding 1.0 mol/L IPTG induction group, the growth state of bacterial solution containing target gene Rv2031c (D)

Fig. 6 Effect of recombinant HspX protein and its encoding gene on the growth state of host bacteria

IPTG是高效乳糖启动子诱导剂，但其价格昂贵且对人体有潜在毒性，不适宜于大规模发酵生产。本研究观察了利用乳糖诱导Hspx蛋白表达的可行性。结果表明，乳糖不仅可诱导Hspx蛋白的表达，还对细菌的生长代谢有一定的促进作用。该重组蛋白可用镍金属螯合填料纯化，纯化的蛋白纯度及蛋白回收率与同等条件下IPTG诱导的重组蛋白结果一致。而在菌体培养初期，LB培养基中含终浓度1 mmol/L的IPTG或0.1%浓度的乳糖，均能抑制菌体生长。

HspX蛋白对*E. coli* DH5α和BL21(DE3)菌体生长影响的检测结果显示，pET-28a-Rv2031c质粒不影响克隆宿主菌DH5α的生长，而对表达宿主BL21



注：以乳糖为诱导剂的重组乳糖组pET28a-Rv2031c-BL21(DE3)质粒在大肠埃希菌菌液A_{600}值(A)；以IPTG为诱导剂pET28a-Rv2031c-BL21(DE3)质粒在大肠埃希菌菌液A_{600}值(B)；12 h表达产物的SDS-PAGE分析(C)

图7 乳糖和IPTG对重组菌的诱导效果比较

Note: Recombinant lactose group pET28a-Rv2031c-BL21(DE3) plasmid with lactose as inducer had A_{600} value in Escherichia coli fluid (A); The plasmid pET28a-Rv2031c-BL21(DE3) was used as IPTG inducer in the A_{600} value of *E. coli* liquid (B). SDS-PAGE analysis of the products expressed at 12 h (C)

Fig. 7 Comparison of induction effect of lactose and IPTG on recombinant bacteria

(DE3)生长有抑制作用。因此推测HspX蛋白可能影响宿主菌的生长，但具体的影响因素和主要机制尚不清楚，需要基于蛋白质组学及代谢组学等作进一步探究。

【参考文献】

[1] Annabel Baddeley, Marie-Christine Bartens, Anna Dean, et al. Global Tuberculosis report 2020[M]. World health orgnization (electronic version).

[2] Ernst JD. Mechanisms of *Mycobacterium tuberculosis* immune evasion as challenges to TB vaccine design[J]. Cell Host Microbe, 2018, 24(1): 34-42.

[3] World Health Organization. Global tuberculosis report 2021[EB/OL]. [2021-10-14]. https://www.who.int/publications/digital/global-tuberculosis-report-2021.

[4] Sly LM, Hingley-Wilson SM, Reiner NE, et al. Survival of *Mycobacterium tuberculosis* in host macrophages involves resistance to apoptosis dependent upon induction of antiapoptotic Bcl-2 family member Mcl-1[J]. J Immunol, 2003, 170(1): 430-

437.

[5] Netea,Mihai G . Training innate immunity:the changing concept of immunological memory in innate host defence[J]. Europ J Clin Invest,2013,43(8):881-884.

[6] Kennaway CK, Benesch JL, Gohlke U, et al. Dodecameric structure of the small heat shock protein Acr1 from *Mycobacterium tuberculosis* [J]. J Biol Chem,2005,280(39):33419-33425.

[7] Avarvand AY,Meshkat Z,Khademi F,et al. Immunogenicity of HspX/EsxS fusion protein of *Mycobacterium tuberculosis* along with ISCOMATRIX and PLUSCOM nano-adjuvants after subcutaneous administration in animal model[J]. Microbial Pathogenesis,2021(2):104842.

[8] Verbon A, Hartskeerl RA, Schuitema A, et al. The 14000-molecular-weight antigen of *Mycobacterium tuberculosis* is related to the alpha-crystallin family of low-molecular-weight heat shock proteins.[J]. JBacteriol,1992,174(4):1352-1359.

[9] Friscia G, Vordermeier HM, Pasvol G, et al. Human T cell responses to peptide epitopes of the 16-kD antigen in tuberculosis [J]. Clin Exp Immunol,1995.

[10] Bothamley GH,Rudd R,Festenstein F,et al. Clinical value of the measurement of *Mycobacterium tuberculosis* specific antibody in pulmonary tuberculosis[J]. Thorax,1992,47(4):270-275.

[11] Ma G,Wang P,Yang Y,et al. emPAI-assisted strategy enhances screening and assessment of *Mycobacteriumtuberculosis* infection serological markers[J]. Microbial Biotechnol,2021,14(4):1827-1838.

[12] Kingston AE,Salgame PR,Mitchison NA,et al. Immunological activity of a 14-kilodalton recombinant protein of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. [J]. Infect Immunity,1987,55(12):3149-3154.

[13] Agrewala JN,Wilkinson RJ. Differential regulation of Th1 and Th2 cells by p91-110 and p21-40 peptides of the 16-kD α-crystallin antigen of *Mycobacterium tuberculosis*[J]. Clin Exp Immunol,2010,114(3):392-397.

[14] And J,Wilkinson RJ. Influence of HLA-DR on the phenotype of $CD4^+$ T lymphocytes specific for an epitope of the 16-kDa-crystallin antigen of *Mycobacterium tuberculosis*[J]. Europ J Immunol,1999,29(6):1753-1761.

[15] Yuan Y, Crane DD, Barry CE. Stationary phase-associated protein expression in *Mycobacterium tuberculosis*: function of the mycobacterial alpha-crystallin homolog. [J]. J Bacteriol,1996,178(15):4484-4492.

[16] Serysheva I,Lee IH,Jakana J,et al. *Mycobacterium tuberculosis* 16-kDa antigen (Hsp16.3) functions as an oligomeric structure in vitro to suppress thermal aggregation[J]. J Biological Chem,1996,271(12):7218-7223.

[17] Cunningham,Adam F. Mycobacterial stationary phase induced by low oxygen tension: Cell wall thickening and. [J]. J Bacteriol,1998,180(4):801-808.

[18] Ma G,Zhou F,Gao L,et al. Improving basic and membrane protein MS detection of the culture filtrate proteins from *Mycobacterium tuberculosis* H3a7Rv by biomimetic affinity prefractionation[J]. Proteomics,2017:1600177.

【收稿日期】 2022-12-08 **【修回日期】** 2023-02-26

(上接528页)

[2] Sfaihi L,Kamoun F,Kamoun T,*et al*. Bacterial meningitis in children:epidemiological data and outcome[J]. Tunis Med,2014,92(2):141-146.

[3] Klein DL. Pneumococcal disease and the role of conjugate vaccines [J]. Microb Drug Resist,1999,5(2):147-157.

[4] 刘小宇,陈敏. 肺炎链球菌糖疫苗的研究进展[J]. 微生物学报,2022,62(2):446-457.

[5] Tenth WA. In epidemiology and prevention of vaccine-preventable diseases[M]. Washington,DC:Public Health Foundation,2007:257-270.

[6] 柏晓辉,刘雪,朱雯培,等. 肺炎链球菌耐药相关蛋白 Sp_0010 生物信息学分析及结晶尝试[J]. 中国病原生物学杂志,2020,15(11):1268-1276.

[7] 方盼盼,王颖源,杨俊文,等. 某儿童医院肺炎链球菌侵袭性感染的临床特征及耐药性分析[J]. 儿科药学杂志,2021,27(7):34-38.

[8] 何义. 肺炎链球菌临床分离株的临床特点、血清分型及耐药性分析[J]. 系统医学,2021,6(7):41-43.

[9] 黄亮,潘华,朱齐燕. 某院 2017 年-2019 年间儿童各标本中肺炎链球菌感染的病原菌分布特点及其耐药性分析[J]. 抗感染药学,2020,17(4):539-541.

[10] SF P. Eukaryote-like serine/threonine kinases and phosphatases in bacteria[J]. Microbiol Mol Biol Rev,2011(75):E905-E913.

[11] Jose E,Aras K,Susana R,*et al*. Protein serine/threonine kinase StkP positively controls virulence and competence in *Streptococcus pneumoniae*[J]. Infect Immun,2004(72):2434-2437.

[12] Lenka Saskov,Linda Nov kov,Marek Basler,*et al*. Eukaryotic-type serine/threonine protein kinase Stk P is a global regulator of gene expression in Streptococcus pneumoniae[J]. J Bacteriol,2007(189):4168-4179.

[13] L N.,Identification of multiple substrates of the Stk P Ser/Thr protein kinase in *Streptococcus pneumoniae*[J]. J Bacteriol,2010(192):3629-3638.

[14] Grangeasse C. Rewiring the Pneumococcal cell cycle with serine/threonine and tyroeine-kinases[J]. Trends Microbiol,2016,24(9):713-724.

[15] ML H. Model for cell wall growth of *Streptococcus faecalis*[J]. J Bacteriol,2007(101):634-648.

[16] 李莎莎. 细粒棘球绦虫重组抗原 P29B 细胞表位序列的优化及其免疫效果的研究[D]. 宁夏医科大学,2022.

[17] 李莎莎,陶佳,吕咏雪,等. 细粒棘球绦虫原头节抗原 Eg-00512 的生物信息学分析[J]. 中国病原生物学杂志,2022,17(1):71-74,113.

[18] Conan C,Charles GG,Alan FC,*et al*. *Echinococcus granulosus*: oncosphere-specific transcription of genes encoding a host-protective antigen[J]. Experimental Parasitol,2004(106):183-186.

[19] Lightowlers MW,Lawrence SB,Gauci CG,*et al*. Vaccination against hydatidosis using a defined recom binant antigen[J]. Parasite Immunol,1996,18(9):457-462.

【收稿日期】 2022-11-22 **【修回日期】** 2023-02-12