

DOI:10.13350/j.cjpb.230508

• 论著 •

结核分枝杆菌 Rv1511 基因编码蛋白的生物信息学分析与制备*

罗鹏征, 马锐, 王佩, 马国荣**

(宁夏医科大学基础医学院, 宁夏银川 750004)

【摘要】 **目的** 探究结核分枝杆菌 Rv1511 基因编码蛋白的基本生化性质, 为该蛋白在大肠埃希菌中重组表达及评估其成为结核病检测标志物的可行性提供实验数据。 **方法** 通过生物信息学方法获取 Rv1511 基因和氨基酸序列, 预测其基本生化性质; 构建以大肠埃希菌为宿主的重组表达载体 pET28a(+)-Rv1511, 经镍金属螯合层析获得高纯度重组蛋白, 并进行 Western blot 验证。 **结果** Rv1511 基因编码蛋白由 340 个氨基酸组成, 该蛋白是 GDP-d-甘露糖脱水酶, 与糖代谢途径相关, 可能参与细胞壁控制物质渗透作用。该蛋白为亲水性、无跨膜结构域的细胞内蛋白, 其理论相对分子质量为 38.34241×10^3 , 等电点为 6.08, 有 36 个磷酸化位点和 1 个 N-糖基化位。BepiPred-2.0 预测该蛋白含有 4 个 B 细胞表位, SYFPEITHI 和 Rankpep 预测含有 8 个 CTL 细胞表位和 Th 细胞表位; NetMHCIIpa 4.0 预测 T 细胞表位, 显示该蛋白有多个 MHCI 和 MHCII 结合位点。构建重组质粒, 转染 *E. coli* BL21(DE3) 后存在本底表达情况, 表达产物为不可溶包涵体, 经 8 mol/L 尿素变性后镍金属螯合纯化获得纯度为 92.6% 的目的蛋白, SDS-PAGE 和小鼠抗组氨酸蛋白抗体 Western blot 验证该重组蛋白在大肠埃希菌中成功表达。 **结论** Rv1511 基因及其编码蛋白在卡介苗中缺失, 有望成为结核病临床检测潜在标志物。该蛋白存在多个修饰位点和抗原表位, 可能与结核杆菌缺氧和营养匮乏状态下抗逆性相关, 是潜在的抗结核药物靶点。制备的 Rv1511 基因重组蛋白具有反应原性, 可为进一步评估其作为结核病检测标志物的可行性提供实验支持。

【关键词】 结核分枝杆菌; Rv1511; 结核病; 生物信息学; 载体构建

【中图分类号】 R378.91

【文献标识码】 A

【文章编号】 1673-5234(2023)05-0536-06

[*Journal of Pathogen Biology*. 2023 May;18(5):536-541,546.]

Bioinformatics analysis and preparation of the protein encoded by Rv1511 gene of *Mycobacterium tuberculosis*

LUO Pengzheng, MA Rui, WANG Pei, MA Guorong (School of Basic Medical Sciences, Ningxia Medical University, Yinchuan, 750004, China)***

【Abstract】 **Objective** To explore the basic biochemical properties of the protein encoded by Rv1511 gene of *Mycobacterium tuberculosis*, and provide experimental data for the recombinant expression of the protein in *Escherichia coli*, evaluated the feasibility of it as a marker for tuberculosis detection. **Methods** The Rv1511 gene and amino acid sequence were obtained by bioinformatics method, its basic biochemical properties were predicted. The recombinant expression vector pET28a (+)-Rv1511 with *Escherichia coli* as host was constructed, the high purity recombinant protein was obtained by nickel metal chelate chromatography and verified by Western blot. **Results** The protein encoded by Rv1511 gene consists of 340 amino acids. The protein is GDP-d- mannose dehydrase, which is related to the pathway of glucose metabolism and may be involved in the permeability of cell wall control substances. The protein is a hydrophilic intracellular protein without transmembrane domain, with theoretical molecular weight of 38.34241×10^3 and isoelectric point of 6.08. It has 36 phosphorylation sites and 1 N-glycosylation site. BepiPred-2.0 predicted that the protein contained 4 B cell epitopes, SYFPEITHI and Rankpep predicted 8 CTL cell epitopes and Th cell epitopes, NetMHCIIpa4.0 predicted T cell epitopes showed that the protein had multiple MHCI and MHCII binding sites. The recombinant plasmid was constructed and expressed in background after transfection of *E. coli* BL21 (DE3). The expressed product was insoluble inclusion body. The target protein with a purity of 92.6% was obtained by nickel metal chelation purification after 8mol/L urea denaturation. SDS-PAGE and mouse anti-histidine protein antibody Western blot confirmed that the recombinant protein was successfully expressed in *Escherichia coli*. **Conclusion** Rv1511 gene and

* **【基金项目】** 国家自然科学基金项目(No. 82160027);宁夏回族自治区科技厅重点研发计划一般项目(No. 2019BEG03065)。

** **【通讯作者】** 马国荣, E-mail: guorongma8000@163.com

【作者简介】 罗鹏征(1994-),男,宁夏固原人,硕士研究生。主要研究方向:病原微生物蛋白质组学。E-mail :2191364854@qq.com

coding protein are deleted in BCG, which is expected to be a potential marker for clinical detection of tuberculosis. The protein has multiple modification sites and antigenic epitopes, which may be related to the stress resistance of *Mycobacterium tuberculosis* under hypoxia and nutritional deficiency, and is a potential target for anti-tuberculosis drugs. The recombinant protein of Rv1511 gene has reactivity, which can provide experimental support, further evaluation of its feasibility as a marker for tuberculosis detection.

【Key words】 *Mycobacterium tuberculosis*; Rv1511; tuberculosis; bioinformatics; vector construction

结核病 (tuberculosis, TB) 是结核分枝杆菌 (*Mycobacterium tuberculosis*, Mtb) 经空气传播所致传染病^[1]。WHO《Tuberculosis report 2021》显示中国是世界第二大结核病高负担国, 2020 年全国新增结核病患者约 84.2 万人^[2]。

及时、准确检出结核病患者是该病预防的关键。基于基因测序结果显示, 牛型分枝杆菌与人型结核杆菌在基因水平 99.95% 同源^[3]。卡介苗与结核分枝杆菌相比有 16 个 RD 区基因缺失, 该区域被证明与结核分枝杆菌毒性相关^[4]。目前基于 RD1、RD2、RD4 区基因与蛋白的研究较多^[5], 关于 RD-6 区的研究相对较少。RD6 区序列长 12.8 kb, 有 11 个阅读框, 编码核苷酸异构酶 EpiA (Rv1512) 和糖基转移酶 Rv1516c、膜蛋白 Rv1508c 和 Rv1510 等。该区与脂肪酸的合成相关, 且调控结核分枝杆菌致病性蛋白 Rv1515c^[6]。据此推测, RD6 区编码蛋白对结核病的防治具有较高价值。

结核分枝杆菌 RD6 区 Rv1511 基因编码的 GDP-d-甘露糖脱水酶与糖代谢途径相关。作者前期基于仿生亲和色谱-质谱策略检测到结核杆菌培养滤液中存在 Rv1511 基因编码蛋白, 表明该蛋白极有可能参与结核杆菌感染期对宿主细胞的免疫应答。本研究拟对结核分枝杆菌 Rv1511 基因编码蛋白进行生物信息学分析, 构建基因工程载体 pET28a(+)-Rv1511 并纯化重组蛋白, 为进一步探究该蛋白作为结核病检测标志物的可行性提供实验数据。

材料与方 法

1 材 料

1.1 菌株和质粒 感受态细胞 *E. coli* DH5 α 和 *E. coli* BL21(DE3) 购自天根生化公司; 热灭活 (65 $^{\circ}$ C, 10 min/次, 3 次) *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv 菌 (总基因组 DNA) 和原核表达载体 pET-28a(+) 为本实验室保存。

1.2 主要试剂及仪器 AxyPrepTM DNA Gel Extraction Kit 和 AxyPrepTM Plasmid Miniprep Kit 购自美国 Axygen 公司; T4 DNA Ligase, FastDigest EcoRI 和 FastDigest HindIII 购自美国 Thermo Scientific 公司; 6 \times His, His-Tag mouse Monoclonal

antibody 和 HRP-conjugated Goat Anti-mouse IgG 购自武汉三鹰生物科技有限公司; 2 \times Taq Plus MixII, DNA 和蛋白标志物、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 胶回收试剂盒和质粒小量抽提试剂盒购自南京诺唯赞生物科技有限公司; 镍金属螯合层析填料为实验室自制; 超声波细胞粉碎机 HN-650Y 为上海汗诺仪器有限公司生产; Western blot 曝光仪 (Amersham Imager 600) 购自美国通用电气公司。

2 方 法

2.1 Rv1511 基因编码蛋白的生物信息学预测

2.1.1 理化性质和修饰位点分析 从美国国家生物技术信息中心 NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 获取结核分枝杆菌 Rv1511 基因编码蛋白氨基酸序列, 通过在线软件 ProtPara (<https://web.expasy.org/protparam/>) 分析蛋白的理化性质, ProtScale (<https://web.expasy.org/protscale/>) 分析蛋白的亲水性和疏水性, DeepTMHMM (<https://dtu.biolib.com/DeepTMHMM/>) 预测其跨膜区域, SignalP6.0 (<https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?SignalP-6.0>) 预测其信号肽, NetPhos3.1 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/>) 预测其磷酸化位点, NetNGlyc 1.0 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>) 分析其 N-糖基化位点, YinOYang 1.2 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/YinOYang/>) 分析其 O-糖基化位点, NetAcet-1.0 (<https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?NetAcet-1.0>) 分析其 N-乙酰化位点。

2.1.2 抗原表位分析 采用 BepiPred-2.0 预测蛋白的 B 细胞表位; 采用 SYFPEITHI (<http://www.syfpeithi.de/index.html>) 和 Rankpep (<http://imed.med.ucm.es/Tools/rankpep.html>) 预测特定的 DRB1*0401, 即 Th 细胞表位及 HLA-A*02:01 即限制性 CTL 细胞表位, NetMHCpan4.1 (<https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?NetMHCpan-4.1>) 预测蛋白质表位与 MHC I 类分子的不同等位基因的结合; NetMHCIIpan4.0 (<https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?NetMHCIIpan-4.0>) 预测蛋白质表位与 MHC II 分子

的结合。

2.2 Rv1511 基因引物设计与重组载体构建 在 NCBI 网站中 Gene 词表选项下输入 Rv1511, 通过 GenBank 找到目标基因序列, Rv1511 共 1 023bp, GeneID:886529。Rv1511 基因引物由南京金斯瑞生物科技有限公司合成, 以热灭活结核杆菌基因组为模板 PCR 扩增 Rv1511 基因。将 PCR 产物和 pET28a (+) 质粒分别用 FastDigest EcoRI 和 FastDigest HindIII 双酶切, 双酶切质粒 pET28a (+) 与 Rv1511 基因经 T4 DNA 连接后转化感受态细胞 *E. coli* DH5 α , 在终浓度 20 μ g/mL 硫酸卡那霉素 (Kan) 的 LB 平板上筛选阳性克隆。

2.3 pET28a(+)-Rv1511 重组质粒验证 将构建的重组质粒 *E. coli* DH5 α -pET28a(+)-Rv1511 接种 LB 培养基, 于 37 $^{\circ}$ C、170 r/min 摇床培养过夜, 用质粒提取试剂盒提取质粒, 浓度为 100 ng/ μ L。质粒 pET28a (+)-Rv1511 的 PCR 按 2 \times Taq Plus MixII 试剂盒说明书配制体系。反应条件: 95 $^{\circ}$ C 3 min; 95 $^{\circ}$ C 15 s, 60 $^{\circ}$ C 20 s; 72 $^{\circ}$ C 60 s, 共 25 个循环; 72 $^{\circ}$ C 8 min。质粒 pET28a(+)-Rv1511 双酶切验证体系按照 Thermo Scientific 试剂盒说明书配制。酶切条件: 37 $^{\circ}$ C 反应 30 min, 80 $^{\circ}$ C 灭活 5 min。经验证的重组菌送生工生物工程(上海)股份有限公司测序, 测序正确的质粒转化 *E. coli* BL21(DE3) 感受态细胞。

2.4 重组蛋白的可溶性分析 将活化过夜的重组 *E. coli* BL21(DE3)-pET28a(+)-Rv1511 转接在含 1% 硫酸卡那霉素的 500 mL LB 培养基中, 37 $^{\circ}$ C、170 r/min 摇床培养 4 h 至 A₆₀₀ 值为 0.4~0.6, 加入终浓度 1 mmol/L IPTG 诱导 6 h, 取菌液 8 000 r/min (离心半径 9.7 cm) 离心 10 min, 1 \times PBS 重悬后洗两次, 再按 20 mL 1 \times PBS 与 1 g 菌沉淀比例重悬, 用超声波破碎仪冰浴条件下破碎 30 min (功率 25%, 工作 3 s, 停 5 s), 分别取上清与沉淀进行 SDS-PAGE 分析。

2.5 重组蛋白的纯化 已确定 Rv1511 基因重组表达蛋白在大肠埃希菌中为非可溶性表达。将诱导表达工程菌破碎、沉淀洗涤、过滤。取镍金属螯合层析填料 1 mL 加入重力柱, 用 30 mL Binding Buffer 平衡, 重复 3 次上样滤液 20 mL, 用 50 倍柱体积 Washing Buffer 冲洗, 确保洗去杂蛋白, 用 2 倍柱体积 Elution Buffer 洗脱融合蛋白。

2.6 重组蛋白的 SDS-PAGE 与 Western blot 鉴定 纯化后的洗脱组分、工程融合菌诱导与未诱导沉淀、*E. coli* BL21(DE3)-pET28a(+)-菌诱导与未诱导全蛋白经 15% SDS-PAGE 电泳后在 300 mA、90 min 条件下转到 PVDF 膜上, 用 5% 脱脂奶粉封闭 (含 1% 无质粒 DE3 全蛋白) 2 h, 用 TBST 清洗 3 次; 加入鼠抗

组氨酸 (6 \times His) 标签一抗, 室温摇床孵育 3h, 用 TBST 清洗 5 次; 加入酶标记羊抗鼠二抗, 室温摇床孵育 3 h, TBST 清洗 3 次后用 200 μ L 超敏发光液曝光。

结 果

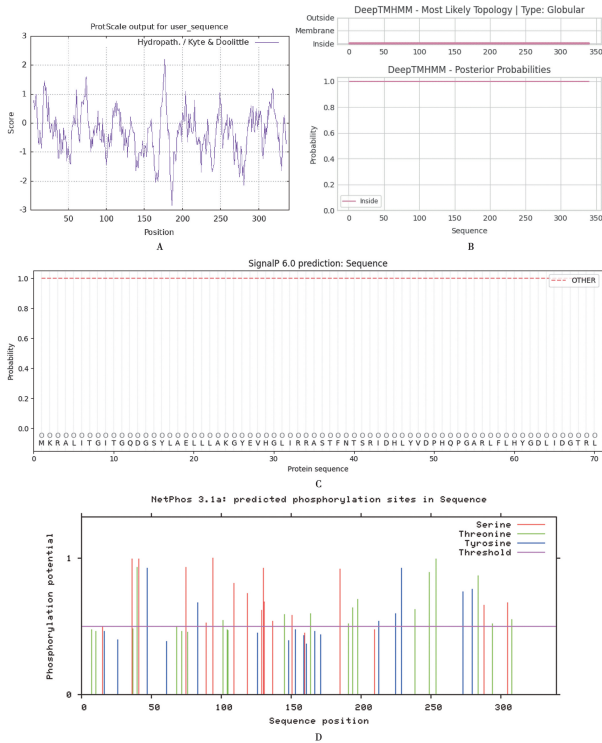
1 Rv1511 基因编码蛋白生物信息学分析

1.1 理化性质和修饰位点 获取 Rv1511 表达蛋白在蛋白质库中的登录号 >NP_216027.1。检索编码蛋白氨基酸序列为: MKRALITGITGQDGSYLAELL AKGYEVHGLIRRASTFNTSR IDHLYVDPHQPG ARLFLHYGDLIDGTRLVTLSTIEPDEVYNLAA QSHVRVSFDEPVHTGDTTGMGSMRLLEAVRL SRVHCRFYQASSEMFGASPPPQNELTPFYPRS PYGAAKVYSYWATRNYREAYGLFAVNGILFNH ESPRRGETFVTRKITRAVARIKAGIQSEVYMGN LDAVRDWGYAPEYVEGMWRMLQTDEPDDFVL ATGRGFTVREFARAAFEHAGLDWQQYVKFDQ RYLRPTEVDSLIGDATKAAELLGWRASVHTDEL ARIMVDADMAALECEGKPWIDKPMIAGRT。

Rv1511 编码蛋白由 340 个氨基酸组成, 负电荷氨基酸 (Asp+Glu) 43 个, 其中 Asp 21 个, Glu 22 个; 正电荷氨基酸 (Arg+Lys) 38 个, 其中 Arg 29 个, Lys 9 个。含量最高的是 Ala (10.0%), 其次是 Leu (8.8%)。蛋白的分子式为 C₁₇₁₃H₂₆₃₇N₄₇₉O₅₀₁S₁₂, 原子总数为 5 342, 相对分子质量为 38.342 41 \times 10³, 理论等电点为 6.08 (偏酸性), 消光系数为 58 455 (mol/L)⁻¹cm⁻¹。该蛋白在哺乳动物网织红细胞内的半衰期为 30 h, 在酵母内的半衰期 > 20 h, 在大肠埃希菌内的半衰期 > 10h, 不稳定系数为 31.87, 脂溶系数为 79.24, 平均亲水系数为 -0.316。蛋白残基 N177 疏水性最强, Score 值为 2.200; P186 亲水性最强, Score 值为 -2.833。蛋白的亲水氨基酸数量多于疏水氨基酸数量, 整体表现为亲水性蛋白 (图 1A)。DeepTMHMM 预测该蛋白无跨膜信号区 (图 1B); SignalP6.0 预测该蛋白无信号肽 (Sec/SPI)、脂蛋白信号肽 (Sec/SPII)、Tat 脂蛋白信号肽 (Tat/SPII)、菌毛蛋白信号肽 (Sec/SPIII) (图 1C)。NetPhos3.1 预测该蛋白共有 36 个磷酸化位点, 其中 15 个丝氨酸 (Ser) 磷酸化位点, 14 个苏氨酸 (Thr) 磷酸化位点, 7 个酪氨酸 (Tyr) 磷酸化位点 (图 1D)。NetNGlyc 1.0 Server 分析该蛋白含有 1 个 N-糖基化位点 N39 (图 2A), YinOYang 1.2 Server 预测无 O-糖基化位点 (图 2B), NetAcet-1.0 分析无乙酰化位点。

1.2 抗原表位 采用 BepiPred-2.0 对 Rv1511 编码蛋白进行预测, 共筛选出 4 个 B 细胞表位 (表 1)。SYFPEITHI 和 Rankpep 服务器综合预测该蛋白含有

8个CTL细胞表位和Th细胞表位(表2)。



A ProtScale 预测 Rv1511 亲疏水性 B DeepTMHMM 预测 Rv1511 编码蛋白跨膜区域 C SignalP-6.0 预测 Rv1511 编码蛋白的信号肽 D NetPhos3.1 预测 Rv1511 编码蛋白磷酸化位点

图1 Rv1511 编码蛋白亲疏水性、跨膜区域、信号肽及磷酸化位点预测

A ProtScale predict hydrophobicity of Rv1511 B DeepTMHMM predict transmembrane region of Rv1511 C SignalP 6.0 prediction: Sequence of Rv1511 D 4 Prediction of Rv1511 Sequence phosphorylation sites

Fig. 1 Prediction of hydrophobicity, transmembrane regions, signal peptides and phosphorylation sites of proteins encoded by 1Rv1511

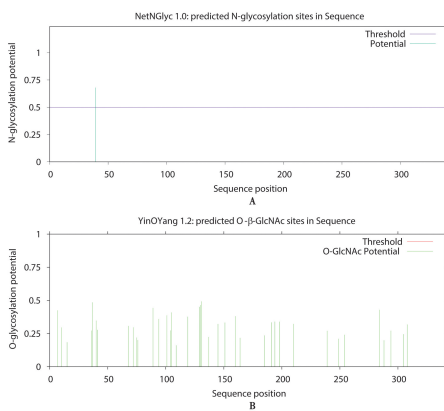


图2 Rv1511 编码蛋白 N-糖基化位点(A)和 O-糖基化位点(B)预测

Fig. 2 Prediction of N-glycosylation sites and O-glycosylation sites of Rv1511-encoded proteins

表1 BepiPred-2.0 筛选的 B 细胞表位
Table 1 B cell epitopes screened by BepiPred-2.0

| 编号 No. | 起始 Start | 结束 End | 肽段 Peptide | 长度 Length |
|-----------|-------------|-----------|----------------------|--------------|
| 1 | 36 | 55 | STFNTSRIDHLYVDPHQPGA | 20 |
| 2 | 94 | 100 | SFDEPVH | 7 |
| 3 | 268 | 287 | LDWQQYVKFDQRYLRPTEVD | 20 |
| 4 | 299 | 307 | LLGWASVH | 9 |

表2 SYFPEITHI 和 Rankpep 预测 CTL 细胞表位和 Th 细胞表位
Table 2 SYFPEITHI and Rankpep predict CTL and Th cell epitopes

| 名称 Name | 肽段 Peptide |
|---------------|---|
| DRB1 * 04:01 | WQQYVKFDQRYLRPT TRNYREAYGLFAVNG |
| HLA-A * 02:01 | LLLAGGYEV DLIDGTRLV ELLGWASVH GLFAVNGIL KITRAVARI YLAELLLAGK |

使用 NetMHCpan 4.1 和 NetMHCIIpan 4.0 进行 T 细胞表位的预测,其中 NetMHCpan 4.1 在预测时会大量生成随机肽段。将随机肽段与选定的 MHC 分子的结合力排序,筛选出排序前 0.5% 的肽段,将其定义为强结合肽段。将结合力排序前 0.5%~2% 的肽段定义为弱结合力肽段,并将已提交的氨基酸序列肽段与已定义随机肽段的亲和力进行比较,并将提交的氨基酸序列进行强、弱结合肽段的定义(表3)。

表3 NetMHCpan 4.1 预测 Rv1511 编码蛋白与 MHC I 结合情况
Table 3 NetMHCpan 4.1 Forecast of Rv1511-encoded proteins and binding MHC I

| 结合的 MHC I 分子名称 The molecular name of the bound MHC I | 强结合肽段数量 Number of strong binding peptide segments | 弱结合肽段数量 Number of weak binding peptide segments | 合计 Total |
|---|--|--|-------------|
| HLA-A * 11:01 | 4 | 18 | 22 |
| HLA-A * 24:02 | 9 | 38 | 47 |
| HLA-A * 02:01 | 5 | 27 | 32 |
| HLA-B * 40:01 | 4 | 18 | 22 |
| HLA-B * 58:01 | 7 | 30 | 37 |
| HLA-B * 51:01 | 6 | 25 | 31 |

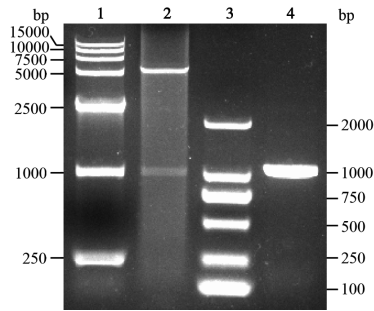
2 pET28a(+)- Rv1511 重组质粒的构建与验证

设计 Rv1511 基因扩增引物,PCR 扩增目的基因。扩增产物和 pET28a(+) 载体经限制性核酸内切酶酶切后用 T4 连接酶进行连接,构建重组质粒 pET28a(+)- Rv1511。重组质粒经双酶切和 PCR 鉴定构建正确(图3)。将酶切验证正确的重组质粒进行 DNA 测序,结果如图4。棕色的测序结果(上链)与黑色的数据库下载的 Rv1511 标准序列(下链)完全相同, pET28a(+)- Rv1511 重组质粒构建成功。

3 融合蛋白的表达、纯化及 SDS-PAGE 及 Western blot 鉴定

由图5可见,该融合蛋白在大肠埃希菌中的表达以包涵体形式存在。用 8 mol/L 尿素溶解包涵体蛋白后使用镍柱纯化,SDS-PAGE 电泳分析纯化产物为相对分子质量约 38.342×10^3 的单一蛋白条带(图6A)。重组质粒在 *E. coli* BL21(DE3) 中存在本底表达的情况。为了进一步从实验角度验证此现象,以无目标基

因的 pET28a-*E. coli* BL21(DE3)为对照组,以未加诱导剂及含诱导剂 IPTG 的破菌样品为实验组,用抗小鼠抗 His-tag 标签抗体进行 Western blot 验证,结果如图 6B。除对照组外,其余各组均有相应反应条带,即均有目标蛋白表达。



1 DNA 标志物(DL15000) 2 重组质粒双酶切 3 DNA 标志物(DL2000) 4 重组质粒 PCR 产物

图 3 重组质粒双酶切和 PCR 鉴定

1 DNA maker (DL15000) 2 The result of double enzyme digestion of recombinant plasmid 3 DNA maker (DL2000) 4 Result of recombinant plasmid PCR

Fig. 3 Recombinant plasmid double enzyme digestion and PCR

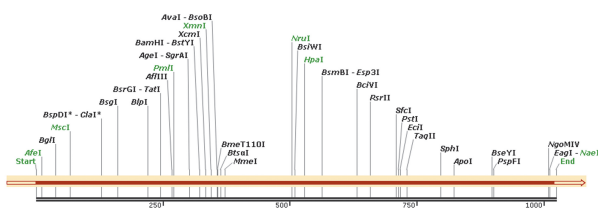
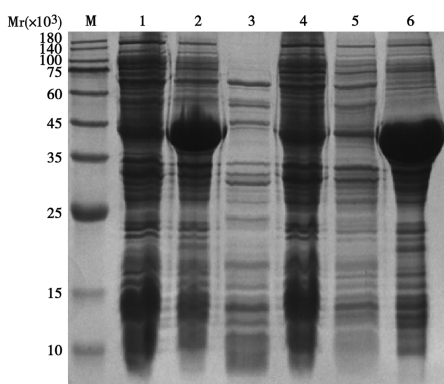


图 4 重组载体测序结果比对

Fig. 4 Compare sequencing results of recombinant vectors

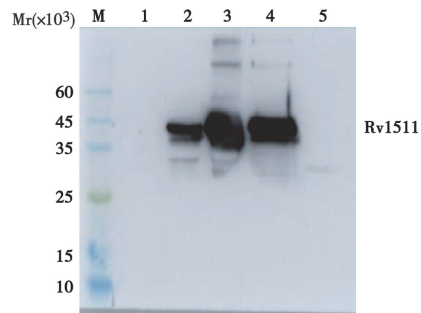
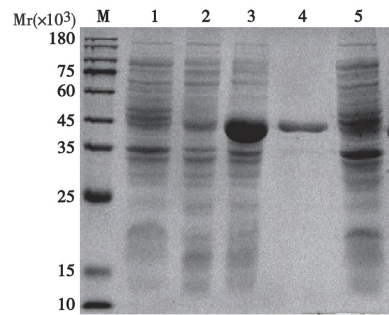


M 蛋白分子质量标准 1 未诱导重组工程菌 2 重组工程菌 IPTG 诱导 6h 3 未诱导重组工程菌超声破碎上清 4 未诱导重组工程菌超声破碎沉淀 5 IPTG 诱导重组工程菌超声破碎上清 6 IPTG 诱导重组工程菌超声破碎沉淀

图 5 融合蛋白异源表达的可溶性分析

M Protein maker 1 Recombinant engineering bacteria were not induced 2 Recombinant engineering bacteria were induced 3 Recombinant engineering bacteria were not induced to be broken 4 Recombinant engineering bacteria were not induced to precipitate after fragmentation 5 Recombinant engineering bacteria induced crushing supernatant 6 Recombinant engineering bacteria induced crushing and precipitation

Fig. 5 Solubility of heterologous expression for fusion protein



A 重组蛋白的 SDS-PAGE 分析 B 重组蛋白的 Western blot 分析 M 蛋白分子质量标准 1 IPTG 诱导重组菌全蛋白 2 未诱导重组菌超声破碎沉淀 3 IPTG 诱导重组菌超声破碎沉淀 4 纯化的目标蛋白质 5 未诱导重组菌全蛋白。

图 6 重组蛋白的 SDS-PAGE 及 Western blot 鉴定

A Shows the result of SDS-PAGE B Shows the result of Western blot M Protein maker 1 Induced *E. coli* BL21 (DE3)-pET28a whole protein 2 Recombinant bacteria did not induce precipitation 3 Recombinant bacteria induced precipitation 4 Purified target protein 5 Uninduced *E. coli* BL21 (DE3)-pET28a whole protein

Fig. 6 results of SDS-PAGE and Western blot identification

讨论

卡介苗 (bacillus Calmette - Guerin, BCG) 是牛结核分枝杆菌传代约 230 次的减毒牛结核分枝杆菌,是目前 WHO 批准的唯一的人结核病预防疫苗^[7]。卡介苗对儿童粟粒型结核和结核性脑膜炎的感染保护力达 86%,但对成人保护力差异很大^[8]。Rehren 等^[9]用微点阵杂交法在牛分枝杆菌中对已知结核分枝杆菌的片段杂交,发现有 4 295 个基因可获得表达,但仅 258(6%)的基因表达有差异。在 RD4-RD11 区域中有 31 个基因在结核分枝杆菌中表达,在牛型结核分枝杆菌中不表达。这些基因可能与毒力强弱有关。因此,探究卡介苗中缺失的 RD 区基因及其所编码蛋白不仅对开发新的与卡介苗效果互补性疫苗至关重要,也可作为结核病检测候选标志物靶点,对结核病防控具有一定意义。

Rv1511 基因编码蛋白 GDP-D-甘露糖脱水酶是一种亲水性无跨膜结构的胞内蛋白, String 分析结果显示其与 Rv3471、Rv2957、udgA (Rv0322)、manB (Rv3264c)、gca (Rv0112)、epiA (Rv1512)、Rv1503c、Rv1489、Rv1513 有互作关系。基于 Mycobrowser

(<https://mycobrowser.epfl.ch/genes/>)分析结果显示 Rv2957 是糖基转移酶,而 UdgA(Rv0322)基因编码蛋白参与多糖生物合成;manB(Rv3264c)编码 D- α -D-甘露糖-1-磷酸鸟苷酸转移酶,参与 GDP-甘露糖生物合成和核苷酸激活的甘油-甘露糖-庚糖的生物合成。功能类别为细胞壁和细胞过程。所有甘露糖脂和多糖都需要 manB(Rv3264c)编码蛋白,它们与鼠李糖残基一样是分枝杆菌包膜的重要组成部分。epiA(Rv1512)可能与核苷酸糖代谢有关,目标蛋白参与糖代谢间接调控结核分枝杆菌细胞壁的合成。Saxena 等^[10]的 RT-PCR 结果显示,在厌氧条件下 Rv1511 基因表达增加,可能对细胞壁控制营养物质和抗生素渗透性有重要作用。据此推测该编码蛋白可能与结核分枝杆菌潜伏期抗逆性以及细胞壁的合成相关,有成为结核病潜伏感染检测标志物的潜力。RD6 区基因 Rv1515c 蛋白定位于细胞壁,可提高耻垢分枝杆菌在巨噬细胞中的存活率,介导内质网应激的细胞凋亡^[11]。RD6 区 Rv1511 基因 1023 个碱基对,由于 RD 区基因是结核分枝杆菌所特有,因此可作为使用荧光探针定量 PCR 快速检测结核病的目标基因。Rv1511 基因如何调控结核分枝杆菌的机制尚不明确,且是否参与其他生化反应也尚不清楚,但由于其和 Rv1512、Rv1516c 都与结核分枝杆菌糖代谢相关,且又同属 RD6 区,故可能有协同调节情况。

蛋白质翻译后修饰对细胞生命活动至关重要,其最早发现于真核生物中,近代研究发现原核生物也存在类似修饰^[12]。蛋白质翻译后修饰包括磷酸化、糖基化、乙酰化等,其中磷酸化修饰常发生在蛋白质的丝氨酸、酪氨酸和苏氨酸的残基,常与信号传导级联相关;乙酰化修饰发生在组蛋白上,蛋白赖氨酸乙酰化参与调节细胞的新陈代谢;糖基化修饰发生在赖氨酸和精氨酸残基上,有 O 位糖基化和 N 位糖基化,在原核生物的细胞识别,黏着吸附以及维持蛋白质结构方面发挥作用^[13]。研究表明结核分枝杆菌中的 301 种蛋白质有 500 多个 Ser/Thr 磷酸化位点,对生长和环境适应至关重要,其 Ser/Thr 蛋白激酶 PknF 在结核分枝杆菌的葡萄糖转运、细胞生长和隔膜形成的调节中起直接或间接作用^[14-15]。Rv1511 基因编码蛋白含有 36 个磷酸化位点,1 个 N-糖基化位点,在结核分枝杆菌生命活动中发挥多种调节作用。

抗原表位又称抗原决定簇,能够引起机体免疫应答,因能与不同免疫细胞表面受体特异性结合分为 B 细胞抗原表位和 T 细胞抗原表位,而抗原表位的研究有助于制备抗结核病新疫苗的开发^[16]。预测 Rv1511 的 B 细胞抗原表位长度在 7~20 个氨基酸的有 4 个;T 细胞抗原表位 DRB1 * 0401 有 2 个,HLA-A * 02:

01 有 6 个。分析 Rv1511 编码蛋白与 MHC I 分子的结合情况,以 HLA-A * 24:02 结合肽段数最多,其中强结合肽段数 9 个,弱结合肽段数 38 个。预测其与 MHC II 受体自然呈递的可能性,以 HLA-DPA10201-DPB10101 结合肽段数最多,其中强结合肽段数 9 个,弱结合肽段数 20 个。

本研究对 Rv1511 蛋白进行了生物信息学分析,并进行了重组表达和纯化,为进一步评估其作为结核病血清标志物检测候选物提供了实验数据。

【参考文献】

- [1] Rudraraju KV, Aggarwal D, Zhang Z. Therapeutic targeting of protein tyrosine phosphatases from *Mycobacterium tuberculosis* [J]. *Microorganisms*, 2020, 9(1):14.
- [2] World Health Organization (WHO). Global tuberculosis report 2021. Geneva, Switzerland, 2021.
- [3] Garnier T, Eiglmeier K, Camus JC et al. The complete genome sequence of *Mycobacterium bovis* [J]. *Proc Natl Acad Sci US A*, 2003(100):7877-7882.
- [4] Teo JWP, Cheng JWS, Jureen R, et al. Clinical utility of RD1, RD9 and hsp65 based PCR assay for the identification of BCG in vaccinated children [J]. *BMC Res Notes*, 2013(6):434.
- [5] Stanley SA, Raghavan S, Hwang WW, et al. Acute infection and macrophage subversion by *Mycobacterium tuberculosis* require a specialized secretion system [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003, 100(22):13001-13006.
- [6] 李文彬, 万康林. 结核分枝杆菌 RD 区蛋白研究进展 [J]. *中国人兽共患病学报*, 2018, 34(4):362-371.
- [7] Cho T, Khatchadourian C, Nguyen H, et al. A review of the BCG vaccine and other approaches toward tuberculosis eradication [J]. *Hum Vaccin Immunother*, 2021, 17(8):2454-2470.
- [8] Nguipod-Djomo P, Haldal E, Rodrigues LC, et al. Duration of BCG protection against tuberculosis and change in effectiveness with time since vaccination in Norway: a retrospective population-based cohort study [J]. *Lancet Infect Dis*, 2016, 16(2):219-226.
- [9] German R, Shaun W. Differential gene expression between *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium tuberculosis* [J]. *Tuberculosis*, 2007(87):347-359.
- [10] Saxena A, Srivastava V, Srivastava R, et al. Identification of genes of *Mycobacterium tuberculosis* upregulated during anaerobic persistence by fluorescence and kanamycin resistance selection [J]. *Tuberculosis (Edinb)*, 2008, 88(6):518-525.
- [11] Yang W, Liu M, Yu X, et al. *Mycobacterium tuberculosis* Rv1515c antigen enhances survival of *M. smegmatis* within macrophages by disrupting the host defence [J]. *Microb Pathog*, 2021(153):104778.
- [12] Cain JA, Solis N, Cordwell SJ. Beyond gene expression: the impact of protein post-translational modifications in bacteria [J]. *J Proteomics*, 2014(97):265-286.
- [13] Sun M, Ge S, Li Z. The Role of phosphorylation and acylation in the regulation of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis* [J]. *Biomedicines*, 2022, 10(10):2592.

(下转 546 页)

过在线数据库 TMHMM 分析 EmHSP90 的跨膜结构域, Signal P-5.0 Server 分析 EmHSP90 的信号肽序列, 结果表明该蛋白是一个非跨膜蛋白并且无信号肽序列。通过 Predicting Antigenic Peptides 对 EmHSP90 抗原决定簇进行预测, 其平均抗原倾向指数为 1.0244, 共含有 27 个抗原决定簇区域, 表明 EmHSP90 含有较多的优势抗原表位结构, 抗原倾向指数较高。表位是指抗原分子中决定抗原特异性的特殊化学基团, 包括 B 细胞表位和 T 细胞表位^[15]。棘球绦虫为多细胞寄生虫, 在不同生活阶段的抗原成分, 其诱导不同的特异性免疫应答, 涉及体液免疫与细胞免疫^[16]。在筛选的蛋白分子中, 既是 B 细胞表位又是 T 细胞表位的肽段(称为交叉反应性表位肽)不仅可以诱导体液免疫, 还可诱导细胞免疫^[17-18], 对棘球绦虫疫苗的设计有十分重要的意义。本研究通过 IEDB、SYFPEITHI 分别预测了 EmHSP90 的 B 细胞表位与 T 细胞表位, 经过筛选, 分别得到优势 B 细胞表位 10 条, CTL 细胞优势表位 13 条, Th 细胞优势表位 14 条。因此证明 EmHSP90 可以作为泡型包虫病疫苗的一个候选分子。

目前, 对于 HSP90 的研究备受关注, 但是对于 HSP90 在棘球绦虫方面的研究鲜有报道。基于 HSP90 在抗原呈递、免疫效应细胞应答和炎症过程调节中的细胞内和细胞外作用, 本研究利用生物信息学的方法预测 EmHSP90 含有丰富的优势 T、B 细胞表位, 为泡型包虫病疫苗的研发奠定了理论基础。

【参考文献】

- [1] Deplazes P, Rinaldi L, Alvarez Rojas CA, et al. Global distribution of alveolar and cystic echinococcosis[J]. Adv Parasitol, 2017(95): 315-493.
- [2] Wen H, Vuitton L, Tuxun T, et al. Echinococcosis: Advances in the 21st century[J]. Clin Microbiol Rev, 2019, 32(2): e00075-18.
- [3] Li K, Lowey C, Sandstrom P, et al. CAVES: A novel tool for comparative analysis of variant epitope sequences[J]. Viruses, 2022, 14(6): 1152.
- [4] Albekairi TH, Alshammari A, Alharbi M, et al. *E. hormaechei* designing of a novel multi-antigenic epitope-based vaccine against: An intergraded reverse vaccinology and immunoinformatics approach[J]. Vaccines (Basel), 2022(10): undefined.
- [5] Arora N, Keshri AK, Kaur R, et al. Immunoinformatic approaches for vaccine designing for pathogens with unclear pathogenesis[J]. Methods Mol Biol, 2022(2412): 425-437.
- [6] Strohaecker J, Sulyok M, Koenigsrainer A, et al. Alveolar echinococcosis-A challenging task for the hepatobiliary surgeon [J]. Pathogens, 2021(11): undefined.
- [7] Weingartner M, Stucheli S, Jebbawi F, et al. Albendazole reduces hepatic inflammation and endoplasmic reticulum-stress in a mouse model of chronic *Echinococcus multilocularis* infection[J]. PLoS Negl Trop Dis, 2022(16): e0009192.
- [8] Lang BJ, Prince TL, Okusha Y, et al. Heat shock proteins in cell signaling and cancer [J]. Biochim Biophys Acta Mol Cell Res, 2022(1869): 119187.
- [9] Prodromou C. The 'active life' of Hsp90 complexes[J]. Biochim Biophys Acta, 2012(1823): 614-23.
- [10] Lorenz OR, Freiburger L, Rutz DA, et al. Modulation of the Hsp90 chaperone cycle by a stringent client protein [J]. Mol Cell, 2014(53): 941-53.
- [11] Dixit A, Verkhivker GM. Probing molecular mechanisms of the Hsp90 chaperone: biophysical modeling identifies key regulators of functional dynamics [J]. PLoS One, 2012(7): e37605.
- [12] Pearl LH, Prodromou C. Structure and mechanism of the Hsp90 molecular chaperone machinery [J]. Annu Rev Biochem, 2006 (75): 271-294.
- [13] Miyata Y, Nakamoto H, Neckers L. The therapeutic target Hsp90 and cancer hallmarks [J]. Curr Pharm Des, 2013(19): 347-365.
- [14] Czuba LC, Hillgren KM, Swaan PW. Post-translational modifications of transporters [J]. Pharmacol Ther, 2018(192): 88-99.
- [15] Ramana J, Mehla K. Immunoinformatics and epitope prediction [J]. Methods Mol Biol. 2020(2131): 155-171.
- [16] Wang L, Gao J, Lan Xi, et al. *Echinococcus granulosus* identification of combined T-cell and B-cell reactive 95 antigens for the potential development of a multi-epitope vaccine [J]. Ann Transl Med, 2019(7): 652.
- [17] Lindesmith LC, Brewer-Jensen PD, Mallory ML, et al. Antigenic site immunodominance redirection following repeat variant exposure [J]. Viruses, 2022(14): undefined.
- [18] Bayindala X, Huang H, Gao S, et al. *Echinococcus multilocularis* induces surface high expression of inhibitory killer immunoglobulin-like receptor on natural killer cells [J]. Allergol Immunopathol (Madr), 2021(49): 78-86.

【收稿日期】 2022-12-30 【修回日期】 2023-03-15

(上接 541 页)

- [14] Prsic S, Dankwa S, Schwartz D, et al. Extensive phosphorylation with overlapping specificity by *Mycobacterium tuberculosis* serine/threonine protein kinases [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010, 107(16): 7521-7526.
- [15] Deol P, Vohra R, Saini A K, et al. Role of *Mycobacterium tuberculosis* Ser/Thr kinase PknF: implications in glucose transport and cell division [J]. J Bacteriol, 2005, 187(10): 3415-3420.
- [16] Madan R, Pandit K, Bhati L, et al. Mining the *Mycobacterium tuberculosis* proteome for identification of potential T-cell epitope based vaccine candidates [J]. Microb Pathog, 2021(157): 104996.

【收稿日期】 2022-12-16 【修回日期】 2023-02-25