

DOI:10.13350/j.cjpb.240403

• 论著 •

结核分枝杆菌 Rv3048c 基因及编码蛋白生物信息学分析与制备^{*}

徐锐强¹, 马瑛龙², 邱蕾², 王佩¹, 马国荣^{1*}

(1. 宁夏医科大学基础医学院, 宁夏银川 750004; 2. 宁夏回族自治区第四人民医院)

【摘要】 目的 探究结核分枝杆菌(*Mycobacterium tuberculosis*) Rv3048c 基因编码蛋白成为结核病临床检测标志物及蛋白疫苗的可能性, 为结核病防控提供新的实验数据。 **方法** 通过生物信息学方法分析、预测该基因及其编码蛋白的基本生物学性质; 在 NCBI 数据库检索 Rv3048c 基因及编码蛋白序列, 设计并合成 Rv3048c 基因的引物, 以热灭活 Mtb 基因组 DNA 为模板, 经聚合酶链式反应获得该基因并将其构建到 pET28a 表达载体, 构建 pET28a-Rv3048c 重组质粒; 应用热激法将其转化至 *E. coli* BL21(DE3) 感受态细胞, 构建 pET28a-Rv3048c-BL21(DE3) 表达菌株; 以 IPTG 为诱导剂获得 Rv3048c 基因编码的重组蛋白; 最后, 用镍金属螯合层析纯化获得高纯度重组蛋白, 并用 SDS-PAGE 和 Western blot 验证该重组蛋白。 **结果** Rv3048c 基因编码蛋白 NrdF2 由 324 个氨基酸组成, 含两个 α 亚基和两个 β 亚基。该蛋白是亲水性、无跨膜结构域、无信号肽的细胞内蛋白; 该蛋白理论分子质量为 36.991 53 ku, 等电点为 4.57, 有 36 个磷酸化位点。基于 ABCpred 预测出 5 个 B 细胞表位。SYFPEITHI 预测出 CTL 细胞表位和 Th 细胞表位共有 9 个。重组质粒 pET28a-Rv3048c 在表达宿主 *E. coli* BL21(DE3) 中为可溶性表达; SDS-PAGE 和小鼠抗 His-Tag 抗体免疫印迹 (Western blot, WB) 证实重组质粒 pET28a-Rv3048c 在 *E. coli* BL21(DE3) 中成功表达。 **结论** Rv3048c 基因编码蛋白 nrdF2 中存在多个位点和抗原表位, 是潜在的结核病检测血清标志物。本研究获得该重组蛋白, 为进一步评估其免疫原性与结核病血清学检测提供实验支持。

【关键词】 结核分枝杆菌; Rv3048c; 结核病; 血清标志; 生物信息学

【文献标识码】 A **【文章编号】** 1673-5234(2024)04-0382-07

[Journal of Pathogen Biology. 2024 Apr.; 19(4): 382-388, 394.]

Bioinformatics analysis and preparation of the Rv3048c gene and coding protein of *Mycobacterium tuberculosis*

XU Ruiqiang¹, MA Yinglong², QIU Lei², WANG Pei¹, MA Gurong¹ (1. School of Basic Medicine of Ningxia Medical University, Yinchuan 750004, China; 2. The Fourth People's Hospital of Ningxia Hui Autonomous Region)^{***}

【Abstract】 Objective Exploring the *Mycobacterium tuberculosis* Rv3048c gene coding protein, this possibility of becoming clinical detection marker and protein vaccine for tuberculosis, thus to provide new experimental data for the prevention and control of tuberculosis. **Methods** Analyze and predict the basic biological properties of the gene and its coding protein through bioinformatics methods; retrieve the Rv3048c gene and coding protein sequence in the NCBI database, design and synthesize the gene primers for the Rv3048c gene using heat inactivated *M. tuberculosis* genomic DNA as a template, obtain the gene through polymerase chain reaction, construct it into the pET28a expression vector to construct the pET28a-Rv3048c recombinant plasmid; apply heat shock method to convert it to *E. coli* BL21(DE3) competent cells, construct pET28a-Rv3048c-BL21(DE3) expression strain; obtain Rv3048c gene coding recombinant protein using IPTG as an inducer. Finally, high-purity recombinant protein was obtained through purification using nickel metal chelation chromatography, then verify the recombinant protein using SDS-PAGE and Western blot. **Results** Rv3048c gene coding protein NrdF2 is composed of 324 amino acids, containing two α subunits and two β subunits. This protein is a hydrophilic, transmembrane domain free, and signal peptide free intracellular protein; the theoretical molecular weight is 36.991 53 ku, with an isoelectric point of 4.57 and 36 phosphorylation sites. Five B cell epitopes were predicted based on ABCpred. SYFPEITHI predicted that there are nine CTL and Th cell epitopes. The recombinant plasmid pET28a-Rv3048c is soluble in the expression products of host *E. coli* BL21(DE3); SDS-PAGE and mouse anti-histidine protein

* **【基金项目】** 宁夏自然科学基金项目(No. 2023A1059); 宁夏回族自治区重点研发(一般项目)(No. 2019BEG03065)。

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

【作者简介】 徐锐强(1992-), 男, 山西永济人, 硕士研究生。主要研究方向: 结核病血清标志物研究。E-mail: ruiqxu@163.com

antibody Western blot (WB) confirmed that the recombinant protein Pet28a-Rv3048c was successfully expressed in *E. coli* BL21(DE3). **Conclusion** Rv3048c gene coding protein NedF2 has multiple sites and epitopes, which is a potential serum marker for tuberculosis detection. The recombinant protein obtained in this study, which can provide experimental support for further evaluation of its immunogenicity and serological detection of tuberculosis.

【Key words】 *Mycobacterium tuberculosis*; Rv3048c; tuberculosis; serum markers; bioinformatics

结核病 (Tuberculosis, TB) 是结核分枝杆菌复合群 (*Mycobacterium tuberculosis* complex, MTBC) 入侵机体引起的慢性人兽共患传染病^[1]。2021 年全球新增结核患者 1 060 万例, 中国是全球第三大结核病高负担国; 2021 年新发结核病患者约 78 万^[2]。MTBC 属细胞内感染菌, 大部分宿主感染 MTBC 后处于潜伏状态 (Latent tuberculosis infection, LTBI), 仅 5%~10% 的患者可发展为活动性结核病^[3]。

结核病危害严重^[4], 如能及时确诊并规范治疗, 则 85% 以上的患者可治愈^[2]。故早发现、早诊断、早治疗是结核病防控的关键。目前已建立起基于病原学、影像学、免疫学和分子生物学、病理学等不同的结核病临床检测方法, 明显提升了该病的检出率。各检测方法在临床应用中仍存在不足。基于病原学的结核患者痰液抗酸染色-镜检法与细菌培养法是结核病检测的金标准。但患者痰液培养需耗时 2~8 周。痰液抗酸染色-镜检结果灵敏度低, 阳性率低于 30%^[5]。影像学检测结果特异性低, 尤其是初次感染者, 容易漏诊。基于聚合酶链式反应 (polymerase chain reaction, PCR) 的分子生物学检测方法易受实验室质量控制差异和外界同源核酸片段交叉污染的影响^[6-7], 导致 PCR 扩增失败。基于免疫学原理的酶联免疫斑点法 (enzyme linked immunospot assay, ELISPOT) 是目前结核病检测灵敏度最高的方法, 但该方法不能区分潜伏感染者与活动性结核病患者^[8], 且检测价格昂贵, 限制了其临床应用推广。病理学诊断也是结核病重要确诊途径之一, 特别在痰菌阴性肺结核及肺外结核诊断中发挥重要作用^[9]。结核病组织病理学通过观察肉芽肿形成以及多核巨细胞和朗格罕斯细胞形态, 如出现化脓性无肉芽肿的结核病, 则会造成组织病理学假阴性的结果^[10]。基于血清学的结核病特异抗原检测, 具有血清样本获取容易, 实验操作过程简单、快速, 检测费用低廉等优势, 成为结核病的快速诊断方法, 备受科研与临床工作者的青睐^[11-12]。

结核病血清抗体标志物研究现状因结核病复杂的病程, 患者机体免疫功能的差异性, 导致临床检测中, 单个或少数几个特异性结核菌抗原临床检测敏感性低, 限制了结核病血清学检测的应用^[13]。发现新的临床检测标志物有助于结核病的控制。Ma 等^[14]通过六柱级联的仿生亲和法在结核分枝杆菌培养滤液蛋白

(Cultre filtrates from *M. tuberculosis*, MTB-CFPs) 中检测到 541 个结核分枝杆菌蛋白。而 Rv3048c 基因编码蛋白 nrdF2 是结核分枝杆菌培养滤液和膜组分中所存在的高丰度蛋白之一^[15]; 因此, 该蛋白可能是最早与宿主免疫系统接触的结核分枝杆菌抗原之一。本研究通过对结核分枝杆菌 Rv3048c 基因编码蛋白生物信息学分析, 构建基因工程载体 pET28a-Rv3048c-BL21(DE3) 并纯化获得高纯度重组蛋白, 为探究该蛋白作为血清标志物的可行性提供实验数据。

材料与方法

1 材料

1.1 菌株和质粒重组载体构建 所需感受态细胞 *E. coli* DH5 α (克隆宿主)、*E. coli* BL21(DE3) 均购自天根生化(北京)有限公司; 热灭活 (65 $^{\circ}$ C, 10 min/次, 3 次) Mtb H37Rv 菌和表达载体 pET28a-*E. coli* DH5 α 为实验室冻存菌。

1.2 主要试剂及仪器 AxyPrepTM DNA Gel Extraction Kit 购自美国 Axygen 公司; T4 DNA Ligase, FastDigest EcoRI 和 FastDigest HindIII 购自 Thermo Scientific 公司; 6* His, His-Tag mouse Monoclonal antibody 购自武汉三鹰生物科技有限公司; HRP-conjugated Goat Anti-mouse IgG 购自武汉赛维尔生物科技有限公司; 2 $\times$ Taq Plus MixII、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 marker、Protein marker 购自 Takara bio 公司; 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 (上海汗诺仪器); Western blot 曝光仪 (杭州申花 SH-Advance523)。

2 方法

2.1 Rv3048c 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 Rv3048c 基因及其编码蛋白的氨基酸序列。在线软件 ProtPara (<https://web.expasy.org/protparam/>) 分析 Rv3048c 基因编码蛋白理化性质; ProtScale (<https://web.expasy.org/protscale/>) 分析亲水性和疏水性; DeepTMHMM (<https://dtu.biolib.com/DeepTMHMM>) 预测跨膜

区域;SignalP6.0(<https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?SignalP-6.0>)预测信号肽;NetPhos3.1(<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/>)预测磷酸化位点;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 抗原表位分析及蛋白相互作用分析

Rv3048c 基因编码蛋白抗原表位分析 Rv3048c 所表达的蛋白质用 BepiPred-2.0 预测 B 细胞表位;SYFPEITHI (<http://www.syfpeithi.de/index.html>)和 Rankpep (<http://imed.med.ucm.es/Tools/rankpep.html>)对特定的 DRB1 * 0401 即 Th 细胞表位预测与 HLA-A * 02 : 01 即限制性 CTL 细胞表位的预测;NetMHCpan4.1(<https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?NetMHCpan-4.1>)预测表位与 MHC I 类分子的不同等位基因的結合;NetMHCIIpan4.0(<https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?NetMHCIIpan-4.0>)预测蛋白质表位与 MHC II 分子的結合;蛋白相互作用网络分析(<https://string-db.org/>)。

2.2 Rv3048c 基因引物设计与重组载体构建

2.2.1 Rv3048c 基因引物设计及合成 依据 GenBank 网站 *Mycobacterium tuberculosis H37Rv* 的 Rv3048c 基因序列信息显示:该基因 (GeneID: 888886) 共 975 bp。根据序列信息设计上游引物:P1: 5'-GGAATTCATATGACTGGAAACGCAAAGC TAAT-3'(下划线为 NdeI 酶切位点);下游引物 5'-CCCAAGCTTGGCTAGAAAGTCCCAGTCATCGTC CT-3'(下划线为 HindIII 酶切位点)。引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

2.2.2 重组载体构建 以上述引物和实验室保存的热灭活结核分枝杆菌基因组为模板 PCR 扩增 Rv3048c 基因,使用 1% 琼脂糖凝胶验证 PCR 结果。然后将 PCR 产物和提取的 pET28a 质粒分别用 NdeI (FastDigest) 和 HindIII (FastDigest) 双酶切;双酶切质粒 pET28a 与 Rv3048c 基因经 T4 DNA Ligase 连接。取 10 μ L 连接产物热激转化入感受态细胞 *E. coli* DH5 α , 加入 600 μ L LB 培养基,37 $^{\circ}$ C 培养 30 min,取 200 μ L 涂布于固体 LB(Kan⁺)琼脂平板后筛选阳性克隆,并采用 PCR 验证目标基因 Rv3048c 成功克隆的菌株。将通过以上方法验证的重组菌送生工生物工程(上海)股份有限公司基因测序,测序正确的重

组克隆菌株命名为 *E. coli* pET28a-Rv3048c-DH5 α 。

2.3 pET28a-Rv3048c 重组质粒验证

2.3.1 pET28a-Rv3048c 重组质粒 PCR 验证 将构建的重组 *E. coli* pET28a-Rv3048c-DH5 α 菌液接种 LB 培养基,于 37 $^{\circ}$ C,200 rpm 摇床培养 12-16 h,按照诺维赞质粒提取试剂盒说明书提取质粒。pET28a-Rv3048c-DH5 α 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 30 s;60 $^{\circ}$ C 20 s;72 $^{\circ}$ C 60 s)30 个循环;72 $^{\circ}$ C 8 min。经 1% 琼脂糖凝胶电泳验证 PCR 结果

2.3.2 pET28a-Rv3048c 重组质粒双酶切验证 质粒 pET28a-Rv3048c-DH5 α 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 5 min 灭活。经 1% 琼脂糖凝胶电泳验证双酶切结果。

2.4 重组蛋白可溶性表达分析 按照重组载体构建 *E. coli* pET28a-Rv3048c-BL21(DE3)菌株,将其转接在含 1% 硫酸卡那霉素的 LB 培养基中 12-16 h,200 rpm,37 $^{\circ}$ C 摇床培养 4-6 h 到 A₆₀₀ 值为 0.4-0.6 时,加入终浓度 1 mmol/L IPTG,诱导 4~6 h 后将菌液 9 800 r/min(离心半径 10 cm)离心 10 min。加入 10 mmol/L,pH7.4 PBS 重悬离心后沉淀,9 800 r/min 离心 5 min,此步骤共重复 3 次;按 25 mL 的 PBS 加入 1 g 菌泥的量重悬菌体,在功率 25% 的超声波破碎仪,以工作 3 s 停 5 s 冰浴,破碎菌体 40 min,离心后分别收集上清与沉淀进行 SDS-PAGE 聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE) 分析。

2.5 Rv3048c 基因编码的重组蛋白纯化 取 1 mL 体积的镍金属螯合层析填料,加入重力柱后分别用 10 倍体积 ddH₂O 和 10 mmol/L 磷酸盐缓冲液 (Phosphate buffer solution,PBS)(pH7.4+0.4 mol/L NaCl)平衡重力柱 10 次;取 1 mL 超声波破菌离心上清液加入重力柱,吸管吹吸混匀后室温孵育 30 min;收集全部流穿液,然后用 10 倍体积 PBS(10 mmol/L,0.4 mol/L NaCl,pH7.4)洗涤重力柱十次,收集末次,弃掉其他洗杂样;用 0.5 mol 咪唑洗脱填料 3 次(1 mL/次),收集 3 次洗脱液。将重组蛋白纯化后收集的所有样品经 10% SDS-PAGE 分析。

2.6 SDS-PAGE 与 Western blot 鉴定 将重组蛋白 *E. coli* pET28a-Rv3048c-BL21(DE3)超声波破菌后上清和蛋白纯化洗脱组分用 10% SDS-PAGE 检测。取其中一块凝胶用考马斯亮蓝染色评估,另一块凝胶在 200 mA、120 min 条件下转到 PVDF 膜上,用 5% 脱脂奶粉封闭 2 h;在摇床上 1 $\times$ TBST(1 L 加入 1 mL 吐温-20)快速清洗 3 次,每次 10 min。加入小鼠抗

His-Tag 一抗,冰箱 4℃ 过夜,在摇床上 TBST 快速清洗 3 次,加入羊抗小鼠二抗,室温摇床孵育 2 h,用 TBST 清洗 3 次,用 200 μL 超敏发光液曝光检测。

结 果

1 Rv3048c 基因编码蛋白 nrdF2 生物信息学分析

1.1 Rv3048c 基因编码蛋白理化性质 获取 Rv3048c 基因编码蛋白 nrdF2(登录号:YP_177921.1)。检索到其氨基酸序列:MTGNAKLIDRVSAINW NRLQDEKDAEVWDRLTGFWLPEKVPVSN DIP SWGTLTAGEKQLTMRVFTGLTMLDTIQGT VGA VSLIPDALTPHEEAVLTNIAFMESVHAKSYSQIF STLCSTAEIDDAFRWSEENRNLRKA EIVLQYY RGDEPLKRK VASTLLESFLFYSGFYLP MYWSSR AKLTNTADMIRLIIRDEAVHGYI GYKFQRGLA LVDDVTRAELKDYTYELLFELYDNEVEYTQDL YDEVGLTEDVKKFLRYNANKALMNLGYEALFP RDET D VNPAILSALSPNADENH DFFSGSGSSYVI GKAVVTEDDDDWDF。

Rv3048c 编码蛋白 Nrd2 由 324 个氨基酸组成;负电荷氨基酸(Asp+Glu)52 个,其中 Asp 27 个,Glu25 个;正电荷氨基酸(Arg+Lys)31 个,其中 Arg16 个,Lys15 个;含量最高的是 Leu(10.8%),其次是 Asp(8.3%)。分子式为 C₁₆₆₅H₂₅₄₂N₄₂₆O₅₁₃S₈,原子总数为 5 154,该蛋白理论分子质量为 36.991 53 ku,等电点为 4.57,酸性,消光系数为 63 830(mol/L)⁻¹cm⁻¹,在哺乳动物网织红细胞体外的半衰期为 30 h,酵母内的半衰期大于 20 h,大肠埃希菌内的半衰期大于 10 h。不稳定系数为 27.77,脂溶系数为 86.70。

1.2 Rv3048c 编码蛋白 Nrd2 抗原表位分析 ABCpred-2.0 预测 B 细胞表位筛选出来的表位共 5 个(表 1)。

表 1 ABCpred-2.0 筛选出来的 B 细胞表位
Table 1 B cell epitopes screened by ABCpred-2.0

编号 No.	起始 Start	结束 End	肽段 Peptide	长度(bp) Length
1	303	318	SGSGSSYVIGKAVVTE	16
2	170	185	GFYLP MYWSSRAKL TN	16
3	24	39	DAEVWDRLTGFWLPE	16
4	89	104	TPHEEAVLTNIAFMES	16
5	81	96	VSLIPDALTPHEEAVL	16

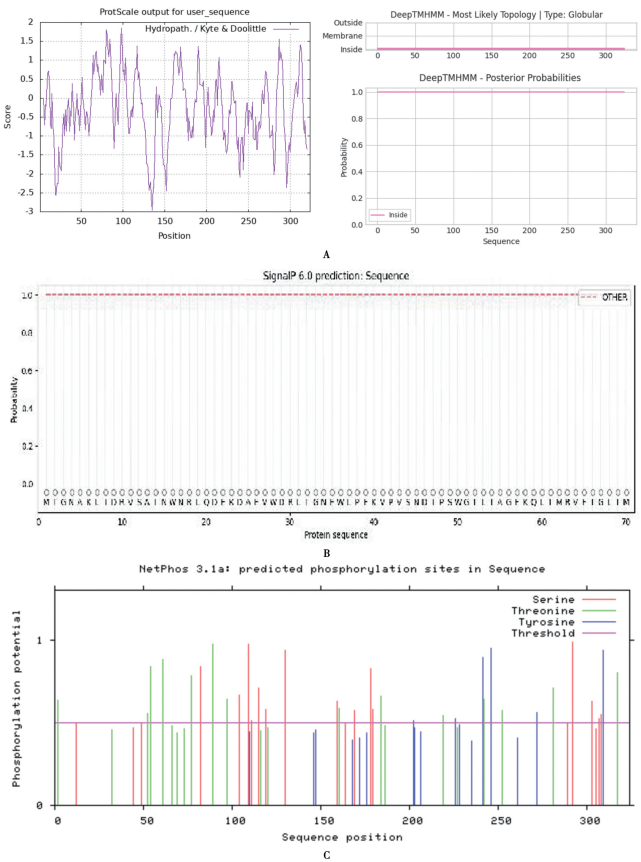
T 细胞的表位预测,综合 SYFPEITHI 服务器所给出的结果,Rv3048c 编码蛋白 Nrd2 的 CTL 细胞表位和 Th 细胞表位共有 9 个(表 2)。

1.3 Rv3048c 基因编码蛋白 NrdF2 亲疏水性、信号肽、跨膜结构域及磷酸化位点分析 ProtScale 预测 Rv3048c 基因编码蛋白 Nrd2 的亲水氨基酸数量比疏

水氨基酸数量多,整体表现为亲水性蛋白,蛋白残基 N98 疏水性最强,Score 值为 1.844,P135 亲水性最强,Score 值为-2.956(图 1A)。

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

名称 Name	肽段 Peptide	合计 Total
DRB1 * 0401	AFRWSEENRNLRKA	6
	EALFPRDET D VNP AI	
	ADMIRLIIRDEAVHG	
	LALVDDVTRAELKDY	
	TEDVKKFLRYNANKA	
	NPAISALSPNADEN	
HLA-A * 02 : 01	KLIDRVSAI	3
	YTYELLFEL	
	LLFELYDNEV	



A protscale 预测 Rv3048c 编码蛋白 NrdF2 亲疏水性 B DeepTMHMM 预测 Rv3048c 编码蛋白 NrdF2 跨膜区域 C Signalp-6.0 预测 Rv3048c 编码蛋白 NrdF2 的信号肽 D 预测 Rv3048c 编码蛋白 NrdF2 的磷酸化位点

图 1 Rv3048c 编码蛋白 NrdF2 亲疏水、跨膜区域、信号肽、磷酸化位点预测

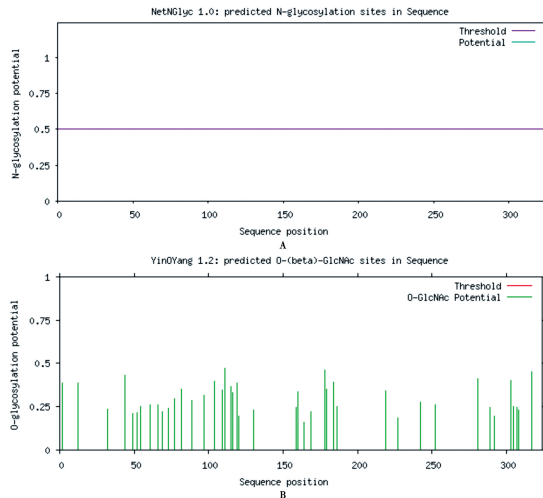
A Prediction of Rv3048c coding protein NrdF2 hydrophilicity and hydrophobicity based on protscale online prediction software B Prediction of Rv3048c coding protein NrdF2 transmembrane domain based on DeepTMHMM online signal peptide prediction software C Prediction of Rv3048c coding protein NrdF2 signal peptide based on Signalp-6.0 online prediction software D Prediction of Rv3048c coding protein NrdF2 phosphorylation sites

Fig. 1 Prediction of Rv3048c coding protein NrdF2 hydrophilic, transmembrane region, signal peptide, and phosphorylation site

DeepTMHMM 预测 Rv3048c 基因编码蛋白 Nrd2 无信号区序列, 其为胞内蛋白(图 1B); SignalP6.0 预测表明没有信号肽(Sec/SPI)、脂蛋白信号肽(Sec/SPII)、TAT 信号肽(Tat/SPI)、TAT 脂蛋白信号肽(Tat/SPII)、菌毛样蛋白信号肽(Sec/SPIII), 说明该蛋白无信号肽(图 1C)。

NetPhos3.1 预测磷酸化位点结果显示共有 36 个磷酸化位点, 其中 16 个丝氨酸(Ser)磷酸化位点, 14 个苏氨酸(Thr)磷酸化位点, 6 个酪氨酸(Tyr)磷酸化位点(图 1D)。

1.4 Rv3048c 基因编码蛋白 NrdF2 蛋白糖基化预测
NetNGlyc 1.0 Server 分析 Rv3048c 蛋白无 N-糖基化位点, 见(图 2A), YinOYang 1.2 Server 预测无 O-糖基化位点(图 2B), 利用 NetAcet-1.0 分析其存在 1 个乙酰化位点, 在 N2 位置。



A Rv3048c 编码蛋白 NrdF2 N-糖基化位点 B Rv3048c 编码蛋白 NrdF2 O-糖基化位点

图 2 Rv3048c 编码蛋白 NrdF2 N-糖基化位点和 O-糖基化位点预测

A Prediction of Rv3048c coding protein NrdF2 N-glycosylation site B Prediction of Rv3048c coding protein NrdF2 O-glycosylation site

Fig. 2 Prediction of Rv3048c coding protein NrdF2 N-glycosylation and O-glycosylation sites

1.5 Rv3048c 基因编码蛋白 NrdF2 相互作用 相互作用蛋白网络预测结果显示, 与 Rv3048c 基因编码蛋白 nrdF2 相互作用蛋白有 10 个, 包括 nrdH、nrdB、adk、tmk、cmk、ndkA、gmK、nrdZ、nrdE、nrdI(图 3)。10 个蛋白中有 5 个与 nrdF2 性质相似。NrdE、NrdZ 提供 DNA 合成所需的前体, 催化相应核苷酸中合成脱氧核糖核苷酸。nrdI 参与核糖核苷酸还原的蛋白质, 也可能参与核糖核苷酸还原酶功能。Rv3053c 基因编码蛋白 nrdH 是谷胱甘肽类蛋白, 可能是谷氨酰胺电子转运成分。NrdB 可能参与脂质代谢的氧化酶。

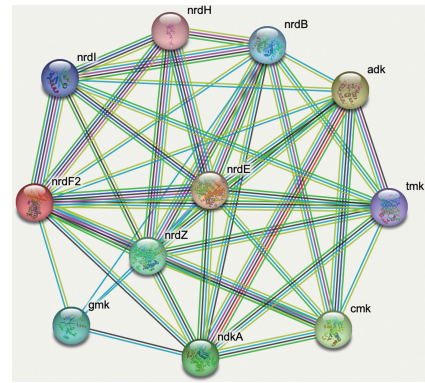
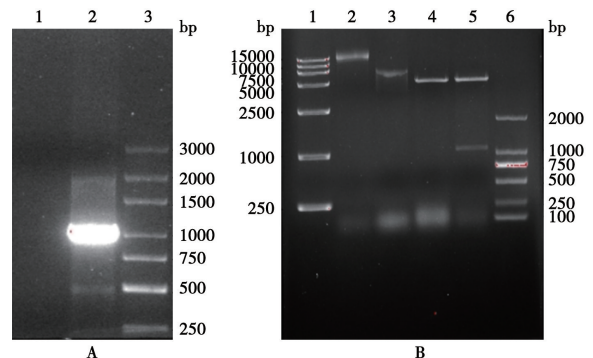


图 3 Rv3048c 蛋白相互作用分析
Fig. 3 Interaction network analysis of Rv3048c protein

2 Rv3048c 基因重组质粒的构建与验证

2.1 目标基因 Rv3048c 的获取与重组质粒构建 将 Rv3048c 基因 PCR 产物及 pET28a(+) 双酶切产物经 PCR 清洁试剂盒回收处理后用 T4DNA Ligase 连接, 连接产物转化感受态 *E. coli*-DH5 α , 挑取单克隆后菌液 PCR 验证; 经 1% 琼脂糖核酸凝胶电泳结果显示: 约 1 000 bp 处有一明显的电泳条带, 而对照组质粒 pET28a(+) -DH5 α 的 PCR 产物中未见(图 4A)。原始质粒和重组质粒分别用限制性核酸内切酶的单酶切和双酶切, 酶切产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测, 结果显示分别在约 1 000 bp 处和约 6 000 bp 处有明显电泳条带(图 4B)。以上验证结果均表明, 目标基因成功构建到 pET28a 质粒上。



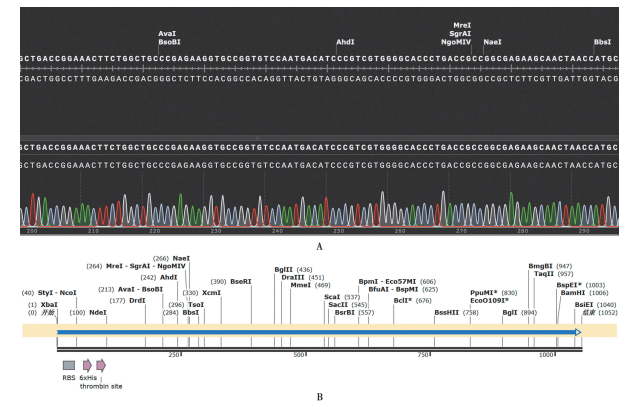
A 1 pET28a-DH5 α 质粒 PCR 2 重组 pET28a-RV3048C-DH5 α 质粒 PCR 3 Maker DL3000 B 1 Maker DL15000 2 pET28a-DH5 α 质粒结果 3 pET28a-DH5 α 质粒双酶切结果 4 重组 pET28a-RV3048C-DH5 α 质粒结果 5 重组 pET28a-RV3048C-DH5 α 质粒双酶切结果 6 Maker DL2000

图 4 pET28a 原始质粒与重组质粒双酶切及 PCR 验证

A 1 pET28a-DH5 α plasmid PCR 2 Recombinant pET28a-RV3048C-DH5 α plasmid PCR 3 Maker DL3000 B 1 Maker DL15000 2 pET28a-DH5 α plasmid results 3 Double restriction endonuclease digestion results of PET28A-DH5 α plasmid 4 Recombinant pET28a-RV3048C-DH5 α plasmid 5 Double restriction endonuclease digestion results of pET28a-RV3048C-DH5 α plasmid 6 Maker DL2000

Fig. 4 Double restriction endonuclease digestion and PCR of pET28a original plasmid and recombinant plasmid

2.2 pET28a(+)-Rv3048c 重组验证质粒测序 为进一步证实 Rv3048c 基因被 100% 正确构建,对 PCR 及限制性核酸内切酶双酶切验证后质粒进行测序验证。重组 pET28a-Rv3048c- DH5 α 测序结果与 NCBI 数据库检索到 Rv3048c 基因序列完全一致;其中图 5A 仅展示了部分序列比对结果;将 pET28a-Rv3048c- DH5 α 测定基因序列与 NCBI 网站公布的 Rv3048c 基因序列在 SnapGene 上比对,结果显示 100% 正确(图 5B),以上结果表明亚克隆到 pET-28a(+) 载体的 Rv3048c 基因序列完全正确。



A pET28a-Rv3048c 基因测序部分序列与其标准序列的比对结果
B Rv3048c 基因重组质粒测序结果与 NCBI 上检索 Rv3048c 基因序列在 SnapGene 上的比对结果

图 5 pET28a-Rv3048c 测序结果与标准序列的比对

A Comparison of partial sequence of pET28a-Rv3048c gene with its standard sequence B The results of Rv3048c gene recombinant plasmid sequencing were compared with the results of Rv3048c gene sequence retrieval on SnapGene in NCBI

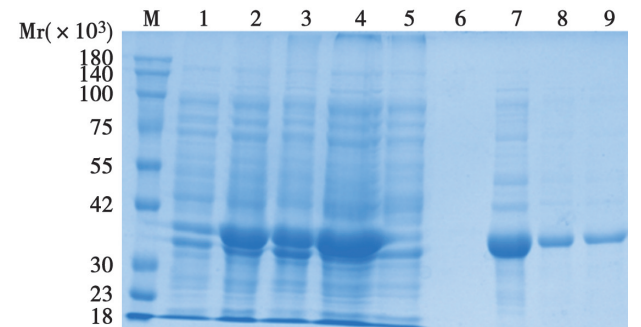
Fig. 5 Comparison of pET28a-Rv3048c sequencing results with standard sequences

2.3 Rv3048c 基因编码蛋白 NrdF2 的重组表达、纯化与鉴定

2.3.1 Rv3048c 基因编码蛋白 NrdF2 的诱导表达重组 蛋白表达受菌体培养温度、转速、诱导剂的种类及其加入量和诱导时长等因素的影响。在 37℃ 的对数生长期($A_{600}=0.8\sim1.0$) 菌液中加入终浓度为 1 mg/mL 的诱导剂 IPTG,5~6 h 后收集菌体,常规 SDS-PAGE 电泳检测,IPTG 诱导组分中在约 36~38 ku 处有明显的重组蛋白表达的条带,而未加 IPTG 的发酵液菌体中此处蛋白条带不明显(图 6)。且该蛋白在超声波破碎后离心的菌体上清液与沉淀物中均存在,表明 Rv3048c 编码蛋白 NdrF2 在大肠埃希菌中为部分可溶性表达(图 6)。

2.3.2 镍金属螯合层析法纯化重组 NrdF2 蛋白 pET28a 表达载体的 N 端与 C 端各有一个 6 $\times$ His 标签蛋白,而金属螯合层析与蛋白质的组氨酸能发生相互作用或吸附,进而实现对含 His 标签蛋白的分离纯化。超声波破碎后上清液用经典镍离子金属螯合层

析法分离纯化。纯化后重组蛋白 SDS-PAGE 检测,结果显示重组 NrdF2 蛋白被有效纯化(图 7A)。为了进一步验证纯化出的重组 NrdF2 蛋白,应用小鼠抗 His 标签抗体与重组表达及镍金属螯合层析后蛋白组分进行 Western blot 验证,结果显示该重组蛋白被有效表达并分离纯化(图 7B)。

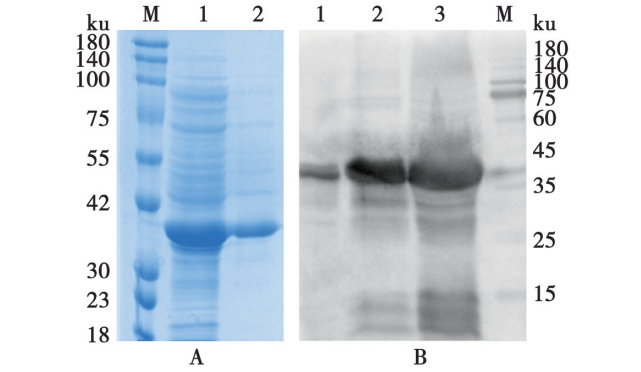


M Marker 1 未诱导 pET28a-Rv3048c-BL21(DE3)重组菌泥 2 诱导后 pET28a-Rv3048c-BL21(DE3)菌泥 3 pET28a-Rv3048c-BL21(DE3)诱导后破碎沉淀 4 pET28a-Rv3048c-BL21(DE3)诱导后破碎后上清 5 pET28a-Rv3048c-BL21(DE3)重组菌镍金属螯合层析的流穿液 6 纯化后末次洗液 7~9 分别为: 0.5 mol/L 咪唑洗脱组分 1~3

图 6 Rv3048c 蛋白可溶性表达及纯化 SDS-PAGE

M Marker 1 pET28a-Rv3048c-BL21(DE3) recombinant bacteria sludge was not induced 2 pET28a-Rv3048c-BL21(DE3) sludge after induction 3 pET28a-Rv3048c-BL21(DE3) induced crushing precipitation 4 pET28a-Rv3048c-BL21(DE3) after induction and crushing supernatant 5 The analysis of the purified nickel metal chelation flow solution 6 the last component of wash solution 7-9 The elution component 1-3 by 0.5 mol/L imidazole

Fig. 6 SDS-PAGE of soluble expression and purification of Rv3048c protein



A SDS-PAGE 结果 M Marker 1 pET28a-Rv3048c-BL21(DE3)诱导破碎后上清 2 pET28a-Rv3048c-BL21(DE3)镍金属螯合纯化洗脱组分 B Western blot 结果 1、2 pET28a-Rv3048c-BL21(DE3)镍金属螯合纯化洗脱组分 1 和 2 3pET28a-Rv3048c-BL21(DE3)诱导破碎后上清

图 7 融合蛋白异源表达可溶性及蛋白纯化 SDS-PAGE 及 Western blot 鉴定结果

A The SDS-PAGE result M Marker 1 pET28a-Rv3048c-BL21(DE3) induced crushing supernatant 2 pET28a-Rv3048c-BL21(DE3) Nickel metal chelate purified elution component B Western blot results 1, 2 pET28a-Rv3048c-BL21(DE3) nickel metal chelate purified elution component1, 2 3pET28a-Rv3048c-BL21(DE3) induced crushing supernatant

Fig. 7 Solubility of heterologous expression for fusion protein and protein purification SDS-PAGE and Western blot identification results

讨 论

结核病仍是严重威胁人类健康的传染病之一^[16],机体在感染结核分枝杆菌后,部分患者无明显症状而漏诊后发展为活动性结核患者。结核病的早期、快速检测对于该病的早期化疗和传播控制意义重大。虽然结核病细菌学检查是该病临床检测的“金标准”,然而患者痰液抗酸染色涂片阳性率偏低;痰液细菌学培养耗时长,很难满足临床快速检测的需求;尤其是痰液细菌培养阴性肺结核、肺外结核和儿童结核的临床诊断十分困难。免疫学检查标本来源方便、简便、快速、灵敏,目前已成为结核病重要的辅助检查手段。特别是血清学检测方法在人类及动物的多种疾病检测和筛查中得到广泛应用^[17],然而目前通过不同方法取得的多种结核分枝杆菌抗原蛋白用于结核病的血清学诊断评测效果欠佳,因此,开发新的快速检测结核患者的生物标志物迫在眉睫^[18]。

本研究选取 Rv3048c 蛋白进行生物信息学分析,显示该蛋白的氨基酸主要由 Leu (10.8%)、Asp (8.3%) 构成。该蛋白与分枝杆菌脱氧核糖核酸合成途径相关,为无跨膜信号区的细胞质蛋白。磷酸化位点结果显示共有 36 个磷酸化位点,其中 16 个丝氨酸磷酸化位点,14 个苏氨酸磷酸化位点,6 个酪氨酸磷酸化位点,蛋白通过磷酸化修饰从而将影响蛋白酶活性调节、蛋白构象改变、蛋白相互作用以及蛋白稳定性等方面^[19]。研究表明,Rv3048c 基因主要参与 DNA 复制途径^[20]。该基因的靶向敲除仅在互补等位基因存在的情况下才能实现,说明该基因在正常体外生长条件下是必需的。这一观察结果还表明,由 nrdF 1 基因编码的替代 Ib 类小亚基不能取代 nrdF 2,并且 II 类 RNR NrdZ 不能取代 Ib 类酶 NrdF 2。结核分枝杆菌具有 Ib 类核苷酸还原酶(RNR),由 nrdE(Rv3051c 基因编码),nrdF2(Rv3048c 基因编码)和一个假定的备用小亚基由 nrdF1(Rv1981c 基因编码),其中包含关键的催化残基但不能与 nrdE 形成功能性核苷酸还原酶^[21]。我们采用 LC-MS/MS 对 MTB 培养滤液蛋白(MTB-CFPs)分析,共鉴定出 632 个 MTB 蛋白。然后评估检测到蛋白的包括 emPAI 值、分子质量(Mw)、等电点(pI)、总体亲疏水性(GRAVY)、跨膜结构域(TMD)和蛋白功能分组等基本生化性质特征值。应用基因工程方法在大肠埃希菌中重组表达并纯化出 10 个 emPAI 值>1.0 的 MTB 蛋白。随机选取并制备了 3 个 emPAI 在 0.1~0.5 之间的 MTB 蛋白作为对照组,采用 ELISA 法检测重组 MTB 蛋白的免疫原性。计算每种重组 MTB 蛋白的敏感性和受试者工作特征(ROC)曲线。结果表明,Rv2031c、Rv0577、

Rv0831c、Rv0934、Rv3248c 的曲线下面积(AUC)值均高于 Rv3875 (AUC 为 0.6643)。进一步分析重组 MTB 蛋白免疫小鼠的 emPAI 值与抗体敏感性、AUC 值和抗体亲和力的关系,emPAI 值与它们呈正相关^[22]。研究证实在复杂混合物中,蛋白浓度与其诱导宿主浆细胞产生的抗体滴度正相关。其中高丰度蛋白更有可能成为临床结核病血清抗体检测的标志物;而 Rv3048c 基因编码蛋白属于上述高丰度蛋白之一。

质粒(Plasmid)是细菌、酵母等细胞中能够自主复制的较小的 DNA 分子。大部分的质粒都是双链环状构型。极小的一部分为线形质粒。质粒的存在与否一般情况下对宿主细胞生存为非决定性因素;质粒是基因工程最常见的运载体。大肠埃希菌质粒属于是闭合的双链 DNA。在琼脂糖凝胶电泳过程中可能使质粒发生开环,或者由开环解开螺旋变成线形。本研究在实验过程中正常质粒仅出现了一条带,通过 PCR、测序以及双酶切验证都完全正确;未发现造成该情况具体原因,我们将继续探究导致此结果的原因。总之,本研究通过生物信息学方法得知 Rv3048c 蛋白为结核病患者血清结合的高丰度蛋白,该蛋白含有多个细胞表位和强免疫原性,可能成为结核病检测的血清标志物,同时也可作为潜在的重组疫苗候选蛋白。

【参考文献】

- [1] Ernst JD. Mechanisms of *Mycobacterium tuberculosis* immune evasion as challenges to TB vaccine design [J]. Cell Host Microbe, 2018, 24(1): 34-42.
- [2] Global tuberculosis report 2022. Geneva: World Health Organization; 2022. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.
- [3] Netea MG. Training innate immunity: the changing concept of immunological memory in innate host defence [J]. Europ J Clin Invest, 2013, 43(8): 881-884.
- [4] Tiberi S, du Plessis N, Walzl G, et al. Tuberculosis: progress and advances in development of new drugs, treatment regimens, and host-directed therapies [J]. Lancet Infect Dis, 2018, 18(7): e183-e198.
- [5] 郑强, 李朝金, 苟莉, 等. 多种肺结核临床实验室诊断方法的比较分析 [J]. 国际检验医学杂志, 2014, 35(21): 2941-2942.
- [6] Noordhoek GT, van Embden JD, Kolk AH. Reliability of nucleic acid amplification for detection of *Mycobacterium tuberculosis*: an international collaborative quality control study among 30 laboratories [J]. J Clin Microbiol, 1996, 34(10): 2522-2525.
- [7] Sarmiento OL, Weigle KA, Alexander J, et al. Assessment by meta-analysis of PCR for diagnosis of smear-negative pulmonary tuberculosis [J]. J Clin Microbiol, 2003, 41(7): 3233-3240.
- [8] Hill PC, Brookes RH, Fox A, et al. Longitudinal assessment of an ELISPOT test for *Mycobacterium tuberculosis* infection [J]. PLoS Med, 2007, 4(6): e192.
- [9] 李雪, 孟禹彤, 周翔, 等. 结核病病理诊断的新方法研究 [J]. 诊断病理学杂志, 2020, 27(5): 300-305.

(下转 394 页)

登革热流行具有周期性,优势流行株型别与基因型转换易于引起大规模流行,持续监测跟踪登革病毒流行情况,加强登革病毒分子流行特征研究,及时发现本地病例关联,确定传播来源,分析流行特点,可为登革热科学防控提供理论依据。

【参考文献】

- [1] Chambers JT, Hahn SC, Galler R, et al. Flavivirus genome organization, expression, and replication [J]. Annual Rev Microb, 1990, 44(1): 649-688.
- [2] Holmes CE, Twiddy S. The origin, emergence and evolutionary genetics of dengue virus[J]. Infect Gene Evol, 2003, 3(1): 19-28.
- [3] 陈仲威, 张莉萍, 方昌勇, 等. 东莞市 2014-2017 年 I 型登革病毒流行情况及 E 基因序列分析[J]. 中国热带医学, 2018, 18(10): 1016-1020.
- [4] Prommalikit O, Thisyakorn U. Dengue virus virulence and diseases severity [J]. Southeast Asian J Trop Med Public Health, 2015, 46(1): 35-42.
- [5] World Health Organization. Dengue and severe dengue [EB/OL]. <https://www.who.int/dengue/control/en>, 2021-01-12.
- [6] 王传滋, 陈文洲. 海南省登革热历年流行概况[J]. 海南医学, 1992, 3(3): 1-4.
- [7] 吴琳, 钱凡凡, 王熙, 等. 海南省 2019 年 9 例登革病毒的鉴定及 E 基因序列分析[J]. 中国热带医学, 2021, 21(12): 1140-1143.
- [8] 郭前方, 崔国辉, 方丹云, 等. 2014 年广东省登革热流行的病原体来源及分子进化特点[J]. 中山大学学报(医学科学版), 2017, 38(1): 21-28.
- [9] Sun J, Wu D, Zhou H, et al. The epidemiological characteristics and genetic diversity of dengue virus during the third largest

historical outbreak of dengue in Guangdong, China, in 2014[J]. J Infect, 2016, 72(1): 80-90.

- [10] 樊景春, 刘起勇. 气候变化对登革热传播媒介影响研究进展[J]. 中华流行病学杂志, 2013, 34(7): 745-749.
- [11] Xu L, Stige C L, Chan K, et al. Climate variation drives dengue dynamics[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2017, 114(1): 113-118.
- [12] Earl L, Marczak LB, Shirude S, et al. The current and future global distribution and population at risk of dengue[J]. Nat Microbiol, 2019, 4(9): 1508-1515.
- [13] Shepard DS, Undurraga EA, Betancourt-Cravioto M, et al. Approaches to refining estimates of global burden and economics of dengue[J]. PLoS Negl Trop Dis, 2014, 8(11): e3306.
- [14] Halstead B S, Dans F L. Dengue infection and advances in dengue vaccines for children[J]. Lancet Child Adolesc Health, 2019, 3(10): 734-741.
- [15] 陈奕, 易波, 劳旭影, 等. 浙江省宁波市登革热疾病经济负担研究[J]. 中国媒介生物学及控制杂志, 2020, 31(4): 385-388, 480.
- [16] 高文, 黄钢, 韩晓莉, 等. 河北省登革热媒介伊蚊监测点小型积水容器白纹伊蚊羽化情况调查[J]. 中国媒介生物学及控制杂志, 2019, 30(6): 648-652.
- [17] 鲍君铎, 冯生, 高岩, 等. 登革病毒铁蛋白纳米颗粒抗原的表达与纯化[J]. 中国病原生物学杂志, 2023, 18(12): 1365-1369, 1374.
- [18] 张朵, 冯冠榕, 彭程程, 等. 登革病毒分子流行病学研究进展[J]. 中国病原生物学杂志, 2022, 17(11): 1361-1363.
- [19] 曾毅, 周春丽, 闭志友, 等. 2010-2020 年南宁市登革热疫情流行病学特征分析[J]. 医学动物防制, 2022, 38(12): 1123-1127, 1131.
- [20] 吴维学, 金玉明, 孙莲英, 等. 海南省 2006 年登革热传播媒介监测分析[J]. 中国热带医学, 2007(10): 1863-1864, 1920.

【收稿日期】 2023-10-15 【修回日期】 2024-01-09

(上接 388 页)

- [10] Romdhane E, Rammeh S, Riahi H, et al. The value of histology in the diagnosis of tuberculous spondylodiscitis [J]. J Clin Rheumatol, 2020, 26(2): 63-66.
- [11] Chan E, Heifets L, Iseman M. Immunologic diagnosis of tuberculosis: a review[J]. Tubercle Lung Dis, 2000, 80: 131-140.
- [12] Hilary SW. Biomarkers of tuberculosis: a research roadmap[J]. Biomarkers Med, 2013, 7: 349-362.
- [13] Karen RS, Megan H, Suman L, et al. Commercial serological antibody detection tests for the diagnosis of pulmonary tuberculosis: a systematic review[J]. PLoS Med, 2007, 4(6): e202, 1041-1060.
- [14] Ma G, Zhang K, Zhou F, et al. Improving basic and membrane protein MS detection of the culture filtrate proteins from *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv by biomimetic affinity prefractionation[J]. Proteomics, 2017, 17(10): e1600177.
- [15] 时晓慧, 马国荣, 张舒林, 等. 不同佐剂组合对结核分枝杆菌四种蛋白的免疫原性影响[J]. 基因组学与应用生物学, 2021, 40(Z4): 3500-3507.
- [16] World Health Organization. Global tuberculosis report 2014 [R]. Geneva: WHO, 2014: 7-31.
- [17] 杨航, 努尔塞力克·努素甫, 杨亚军, 等. 结核分枝杆菌 rv1985c、

rv3807c、rv1981c 基因编码蛋白生物信息学分析以及间接 ELISA 方法的建立[J]. 中国病原生物学杂志, 2021, 16(2): 143-149.

- [18] Wilson ML. Rapid diagnosis of *Mycobacterium tuberculosis* infection and drug susceptibility testing[J]. Arch Pathol Lab Med, 2013, 137(6): 812-819.
- [19] Buckoreellall K, Wilson L, Parker WB. Identification and characterization of two adenosine phosphorylase activities in *Mycobacterium smegmatis*[J]. J Bacteriol, 2011, 193(20): 5668-5674.
- [20] Dawes SS, Warner DF, Tsenova L, et al. Ribonucleotide reduction in *Mycobacterium tuberculosis*: function and expression of genes encoding class Ib and class II ribonucleotide reductases[J]. Infect Immun, 2003, 71(11): 6124-6131.
- [21] Yang F, Curran SC, Li LS, et al. Characterization of two genes encoding the *Mycobacterium tuberculosis* ribonucleotide reductase small subunit[J]. J Bacteriol, 1997, 179: 6408-6415.
- [22] Ma GR, Wang P, Yang YH, et al. emPAI-assisted strategy enhances screening and assessment of *Mycobacterium tuberculosis* infection serological markers [J]. Microbial Biotechnol, 2021, 14(4): 1827-1838.

【收稿日期】 2023-10-14 【修回日期】 2024-01-05