

DOI:10.13350/j.cjpb.240614

• 论著 •

基于生物信息学分析的弓形虫 TgSUB3 多抗制备*

李瑾¹, 张欣¹, 雷战², 谢金晶¹, 王龙江¹, 尹昆¹, 徐超¹, 魏庆宽¹, 孙慧^{1**}

(1. 山东第一医科大学(山东省医学科学院), 山东省寄生虫病防治研究所, 山东济宁 272033;

2. 山东第一医科大学(山东省医学科学院))

【摘要】 目的 在利用生物信息学全面分析 TgSUB3 序列的基础上, 制备针对该蛋白 B 细胞抗原表位的兔源多克隆抗体。 **方法** 采用生物信息学软件对 TgSUB3 蛋白的理化性质、空间结构、磷酸化/糖基化位点、B 细胞抗原表位等进行分析。用原核表达、纯化的 TgSUB3 重组蛋白免疫新西兰大白兔, 于 4 次加强免疫后第 7 d 制备兔血清, 采用 Protein A 亲和纯化抗体蛋白, 分别利用 SDS-PAGE 和 ELISA 分析抗体纯度和效价。 **结果** 生物信息学分析 TgSUB3 为不稳定亲水性蛋白, 无信号肽, 跨膜区为 19-39aa, 包含 1 个 Peptidases_S8 结构域(358-617aa)。二级结构中无规卷曲占 51.29%, α 螺旋占 26.11%。TgSUB3 包含 65 个磷酸化位点和 126 个糖基化位点。B 细胞抗原表位区集中在 45-290aa 和 715-937aa。SDS-PAGE 显示纯化的 TgSUB3 多抗为单一 55 ku 条带, ELISA 检测 TgSUB3 抗体滴度为 1:102 400。

结论 成功制备了兔源 TgSUB3 抗血清, 经纯化获得高纯度高滴度的多抗。

【关键词】 弓形虫; SUB3 蛋白; 多克隆抗体; 生物信息学

【文献标识码】 A

【文章编号】 1673-5234(2024)06-0690-05

[Journal of Pathogen Biology. 2024 Jun.; 19(6):690-694.]

Bioinformatics-based polyclonal antibody preparation of *Toxoplasma gondii* Subsilisins 3

LI Jin¹, ZHANG Xin¹, LEI Zhan², XIE Jinjing¹, WANG Longjiang¹, YIN Kun¹, XU Chao¹, WEI Qingkuan¹, SUN Hui¹ (1. Shandong Institute of Parasitic Diseases, Shandong First Medical University & Shandong Academy of Medical Sciences, Jinan 272033, Shandong, China; 2. Shandong First Medical University & Shandong Academy of Medical Sciences)

【Abstract】 Objective Rabbit polyclonal antibody targeting the B cell epitope of TgSUB3 was prepared based on comprehensive analysis of TgSUB3 sequence by bioinformatics method. **Methods** The physical and chemical properties, spatial structure, phosphorylation/glycosylation sites and B cell epitope of TgSUB3 were predicted by bioinformatics software. New Zealand white rabbits were immunized with purified TgSUB3 protein expressed in prokaryotic expression. The rabbit serum was collected on the 7th day after the fourth intensive immunization, and purified with Protein A affinity. The purity and titer of the antibody were analyzed by SDS-PAGE and ELISA, respectively. **Results** Bioinformatics analysis showed that TgSUB3 was an unstable hydrophilic protein with no signal peptide. The transmembrane region and Peptidases_S8 domain of TgSUB3 were 19-39aa and 358-617aa, respectively. The secondary structure mainly included random coil (51.29%) and α helix (26.11%). TgSUB3 including 65 phosphorylation sites and 126 glycosylation sites. The antigen region of B cell epitopes were concentrated at 45-290aa and 715-937aa. SDS-PAGE result of the purified TgSUB3 polyclonal antibody showed a specific band at around 55 ku. The ELISA result showed that the titer of TgSUB3 antibody was 1:102 400. **Conclusion** In this study, the rabbit antiserum of TgSUB3 was successfully prepared, and the good purity and high titer polyclonal antibody was obtained after purified.

【Keywords】 *Toxoplasma gondii*; SUB3 protein; polyclonal antibody; bioinformatics

***弓形虫(*Toxoplasma gondii*, Tg)呈世界性分布, 可感染几乎所有温血动物的有核细胞, 引发人和多种动物的感染, 导致人兽共患弓形虫病。我国人群弓形虫平均感染率约为 10%, 猪的弓形虫感染率为 30%~50%, 南方地区鸡的感染率超过 20%, 北方和西北地区羊的感染率约为 20%^[1]。畜禽弓形虫感染不但给畜牧养殖业带来经济损失, 同时会增加人感染弓形虫的风险。

弓形虫入侵基于多种蛋白协调且机制精细复杂,

大多数蛋白需经蛋白酶修饰加工使其功能域展现或形

* **【基金项目】** 山东省自然科学基金项目 (No. ZR2022MH271); 山东省医药卫生科技项目 (No. 202301011242); 山东省医药卫生科技发展计划项目 (No. 202101050153)。

** **【通讯作者】** 孙慧, E-mail: sunhui123aq@126.com

【作者简介】 李瑾(1980-), 女, 山东济宁人, 硕士研究生, 副研究员, 主要从事寄生虫病防治研究。E-mail: lijn829@qq.com

成活性位点才能发挥功能^[2]。因此,蛋白酶在弓形虫入侵宿主细胞、逃避宿主免疫机制、参与细胞分化和调节致病机制中发挥重要作用^[3-5]。

类枯草杆菌蛋白酶(subtilisin-like protease, SUB)属于丝氨酸蛋白酶家族,是广泛分散在进化中的一组古老的蛋白酶。SUB最初以无活性的前蛋白形式存在,一般包括信号肽、前肽结构域(前结构域)和催化结构域。在信号肽被水解后,前结构域被自动催化断裂,但仍以非共价结合状态发挥分子伴侣的作用,用于后续的正确折叠而催化为活性酶。前结构域通常是其同源酶的有效和选择性抑制剂。SUB在功能上具有多样性,但具有保守的催化结构域,催化三联体残基以保守性的 Asp-His-Ser 排列,在这些残基周围具有容易识别的序列基序^[6]。目前已在顶复门原虫中的疟原虫、弓形虫、新孢子虫、隐孢子虫中发现了 SUB 同源蛋白,分别为 PfSUB1、PfSUB2、PfSUB3、TgSUB1、TgSUB2、NcSUB1 和 CpSUB1^[7-13]。在弓形虫中,TgSUB3 是继 TgSUB1 和 TgSUB2 发现后被鉴定的第三种 SUB,但其定位及功能尚不十分清楚。本研究从 TgSUB3 序列分析入手,筛选其 B 细胞抗原表位,针对其表位区制备兔源多抗并进行纯化,为该蛋白的相关研究奠定基础。

材料与方法

1 材料

1.1 载体和菌株 原核表达载体 pET30a 由本实验室保存。大肠埃希菌 TOP10 和表达菌 BL21(DE3) pLysS 感受态细胞购自北京天根生化科技有限公司。

1.2 实验动物 体重约 2.0 kg 新西兰大白兔。

1.3 主要试剂 胶回收试剂盒和质粒提取试剂盒购自北京全式金生物技术有限公司;HRP 标记的羊抗兔 IgG 和 TMB 显色试剂盒购自北京天根生化科技有限公司;EcoR I 和 Xho I 购自赛默飞世尔科技有限公司;Ni-NTA 亲和层析柱购自美国 Sigma 公司;Protein A 亲和纯化柱购自美国 GE 公司。

2 方法

2.1 TgSUB3 基因以及蛋白序列的获取 从 Toxodb 获取 TgSUB3 基因及其编码蛋白序列,登录号为 TGME49_200350,该基因位于弓形虫第 VIII 染色体上。

2.2 TgSUB3 的生物信息学分析 利用 ProtParam(<https://web.expasy.org/protparam/>)预测 TgSUB3 相对分子质量、等电点、氨基酸组成、不稳定指数、脂肪指数和亲水系数;利用 SignalP-6.0 (<https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?SignalP>)和 TOPCONS(<https://topcons.cbr.su.se/pred/>)预测

TgSUB3 的信号肽及跨膜区;利用 CDD(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>)分析 TgSUB3 的结构域组成;利用 SOPMA(https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_sopma.html)和 SWISS-MODEL (<https://swissmodel.expasy.org>)预测 TgSUB3 蛋白的二、三级结构;利用 NetPhos-3.1 (<https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?NetPhos-3.1>)和 GPP(<http://comp.chem.nottingham.ac.uk/glyco/>)预测 TgSUB3 的磷酸化位点和糖基化位点;利用 STRING (<https://string-db.org>)预测其互作蛋白;利用 DNASTar 预测该蛋白的 B 细胞抗原表位区。

2.3 pET30a-SUB3-KB 表达载体的构建及表达 以已构建的 pMD18-T-SUB3 为载体,以引物 F(5'-AAAGAATTTCGAGACAGAACCCCAAAAAC-3')和 R(5'-AAACTCGAGGCCTTTGCTCAGCTGCGG-3')PCR 扩增 TgSUB3 的抗原表位区(45-290aa),下划线部分为酶切位点。酶切、连接构建表达载体 pET30a-SUB3-KB,转化 TOP10 感受态细胞,经双酶切、测序鉴定的阳性质粒转化表达菌 BL21(DE3) pLysS,命名为 pET30a-SUB3-KB/BL21(DE3) pLysS。重组表达菌用终浓度为 0.5 mmol/L IPTG 诱导 2 h,采用 SDS-PAGE 分析目的蛋白表达情况,之后进行蛋白的大量表达及纯化。

2.4 蛋白的大量表达及纯化 将过夜培养的菌液转接到 500 mL LB 液体培养基中,37 ℃,200 rpm,培养至 A₆₀₀ 为 0.6~0.8,0.5 mmol/L IPTG 37 ℃诱导 4 h。6 000 r/min 离心 5 min 收集菌体,菌体用 20~30 mL 10 mmol/L Tris-HCl(pH 8.0)溶液吹散,超声波破碎(500 W,60 次,每次 10 s,间隔 15 s)。20~30 mL 10 mmol/L Tris-HCl(pH 8.0)重悬超声离心得到的沉淀,静置 10 min,12 000 r/min 离心 10 min,弃上清,重复静置、离心一次。先加入少量的 10 mmol/L Tris-HCl(pH 8.0)溶液重悬沉淀,再加 5~10 mL 含 8 M 尿素的 10 mmol/L Tris-HCl(pH 8.0)溶液溶解蛋白。12 000 r/min 离心 10 min,收集上清,取 50 μL 电泳。

2.5 TgSUB3 的多抗制备及效价测定 取新西兰大白兔,用纯化的 TgSUB3 重组表达蛋白免疫 4 次,免疫之前耳静脉取血,分离血清作为阴性对照。首次免疫纯化蛋白用量为 400 μg,加强免疫为 200 μg,均用生理盐水稀释至 300 μL,加入等体积弗氏佐剂(首次免疫用弗氏完全佐剂,加强免疫用弗氏不完全佐剂),混匀后进行背部皮下多点注射,每次免疫的时间间隔为 14 d。

第四次加强免疫 7 d 后采血,分离血清,采用

ELISA 法测定抗体效价。纯化的 TgSUB3 重组表达蛋白包被浓度为 $2\ \mu\text{g/mL}$, 多抗血清从 1 : 200 开始作 2 倍梯度稀释至 1 : 204 800。二抗为 HRP-羊抗兔 IgG, 加入 TMB 显色 10 min 后终止反应, 用酶标仪双波长 (A_{450}/A_{630}) 测吸光度 A 值。试验设 PBS 空白对照和阴性兔血清 (1 : 200 稀释) 对照。结果判读: 效价为大于等于 1/2 最大 A 值所对应的最小稀释倍数。

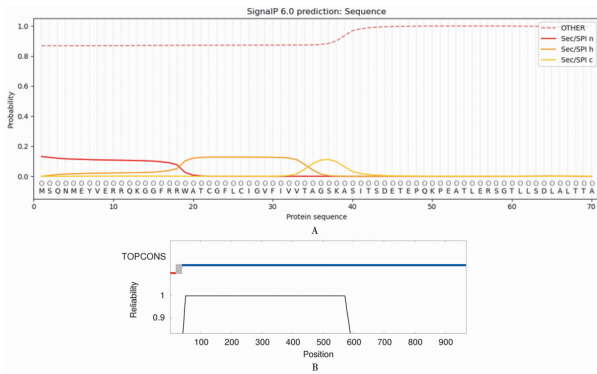
2.6 TgSUB3 多抗的纯化及其纯度与滴度测定 按照文献[14]的方法纯化 TgSUB3 多抗, 分别采用 SDS-PAGE 和 ELISA 进行抗体蛋白的纯度分析和滴度测定。

结 果

1 TgSUB3 的生物信息学分析

1.1 理化性质 TgSUB3 基因全长 2 910 bp, 编码 969 个氨基酸, 分子质量为 104. 114 97 ku, 理论等电点 5. 79, 为酸性蛋白。负电荷残基总数为 111, 其中天冬氨酸 55 个, 谷氨酸 56 个; 正电荷残基总数为 90, 其中精氨酸 54 个, 赖氨酸 36 个。TgSUB3 的半衰期为 30 h, 不稳定系数 53. 33, 为不稳定蛋白; 脂肪指数为 72. 30, 总平均亲水系数为 -0. 411, 属亲水蛋白。

1.2 信号肽、跨膜区以及结构域预测 经 SignalP-6. 0 和 TOPCONS 预测 (图 1A、1B), TgSUB3 不存在信号肽序列, 跨膜区位于 19-39aa (图 1)。CDD 预测该蛋白 358-617aa 为 Peptidases_S8 结构域, 催化三联体位于 Asp³⁶⁶、His⁴²² 和 Ser⁵⁸³, 推测的活性位点位于 Asp³⁶⁶、His⁴²²、Ser⁴⁸³、Try⁴⁸⁴、Gly⁴⁸⁵、Asn⁵¹³ 和 Ser⁵⁸³ (图 2)。



A TgSUB3 蛋白的信号肽预测 B TgSUB3 蛋白的跨膜区预测
图 1 TgSUB3 蛋白的信号肽和跨膜区预测分析

A Prediction of the signal peptide for TgSUB3 B Prediction of the transmembrane domain for TgSUB3

Fig. 1 Prediction of the signal peptide and transmembrane domain for TgSUB3

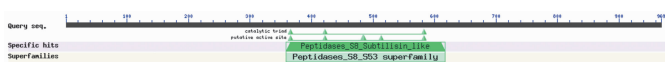


图 2 TgSUB3 蛋白的结构域预测
Fig. 2 Prediction of the protein domain for TgSUB3

TgSUB3 的二、三级结构 利用 SOPMA 分析 TgSUB3 蛋白的二级结构 (图 3A), 其中无规卷曲占 51. 29%, α 螺旋占 26. 11%, 延伸链占 14. 86%, β 转角占 7. 74%。SWISS-MODEL 分析 TgSUB3 蛋白的三级结构, 结果见图 3B。

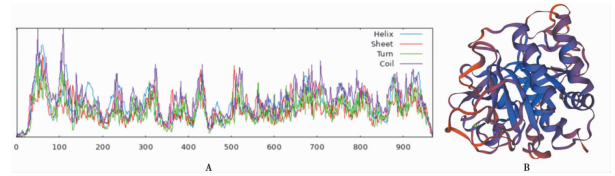


图 3 TgSUB3 蛋白的二级结构 (A) 和三级结构 (B) 预测
Fig. 3 Prediction of the secondary structure (A) and tertiary structure (B) for TgSUB3

1.4 TgSUB3 的互作蛋白 预测与 TgSUB3 互作的弓形虫蛋白有 TgMIC8、TGME49_030920 和 TGME49_090950 (图 4)。

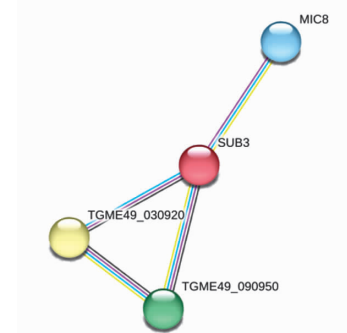


图 4 TgSUB3 的互作蛋白预测
Fig. 4 Analysis of the predicted protein interaction for TgSUB3

1.5 TgSUB3 的磷酸化位点和糖基化位点 NetPhos-3.1 预测 TgSUB3 序列分值大于 0. 8 的磷酸化位点共有 65 个, 包含 47 个丝氨酸磷酸化位点, 12 个苏氨酸磷酸化位点, 6 个酪氨酸磷酸化位点 (图 5)。GPP 预测 TgSUB3 包含 126 个糖基化位点。

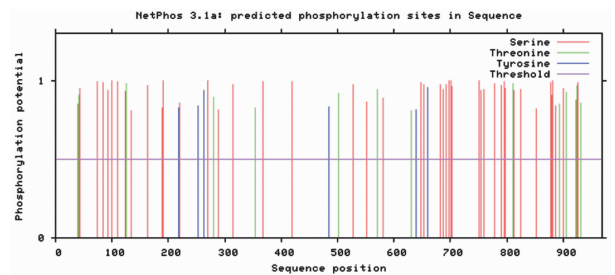


图 5 TgSUB3 蛋白磷酸化位点预测
Fig. 5 Prediction of phosphory sites for TgSUB3

1.6 TgSUB3 的抗原表位区 根据 DNASTar 对 TgSUB3 亲水性、抗原指数、表面可及性分析的预测结果, 当亲水性 > 0、抗原指数 > 0、表面可及性 > 1 时形成抗原表位的可能性大^[15]。因此, 该蛋白 B 细胞抗原

表位集中在 45-290aa 和 715-937aa(图 6)。

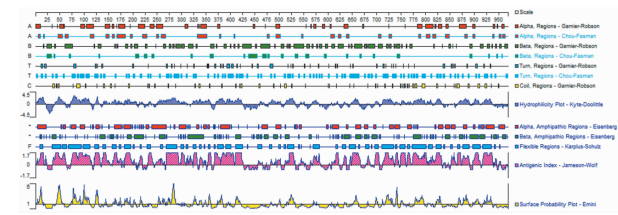
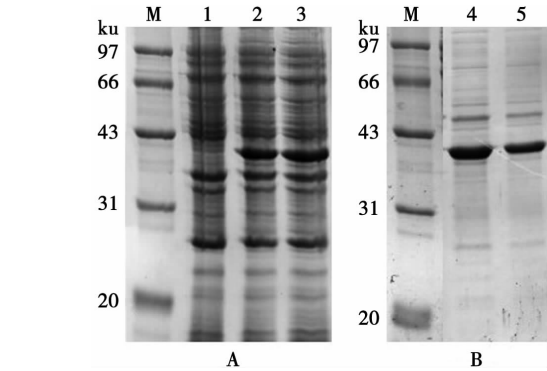


图 6 TgSUB3 蛋白的亲水性、表面可及性和 B 细胞抗原表位预测
Fig. 6 Hydrophilicity, surface accessibility and B cell epitopes of TgSUB3

2 TgSUB3 重组蛋白的表达及纯化

pET30a-SUB3-KB/BL21 (DE3) pLysS 经 IPTG 诱导后表达的目的蛋白分子质量为 38 ku(图 7A)。纯化的重组蛋白经 SDS-PAGE 检测为相对单一的 38 ku 电泳条带(图 7B)。



M 蛋白分子质量标准 1 pET30a-SUB3-KB/BL21 (DE3) pLysS 未诱导对照 2、3 pET30a-SUB3-KB/BL21 (DE3) pLysS IPTG 诱导 6 h 4 5 倍稀释的纯化蛋白 5 10 倍稀释的纯化蛋白

图 7 重组菌表达蛋白 TgSUB3(A)及其纯化产物的 SDS-PAGE 分析
M Protein marker 1 pET30a-SUB3-KB/BL21 (DE3) pLysS before induce expression 2,3 pET30a-SUB3-KB/BL21 (DE3) pLysS after induce expression 4 Diluted 5 times of protein 5 Diluted 10 times of protein

Fig. 7 SDS-PAGE results of TgSUB3 expression and purification

3 TgSUB3 抗血清制备及效价测定

用纯化的 TgSUB3 重组表达蛋白免疫新西兰大白兔,制备兔源多抗。ELISA 检测显示兔抗血清效价为 1 : 102 400(图 8)。

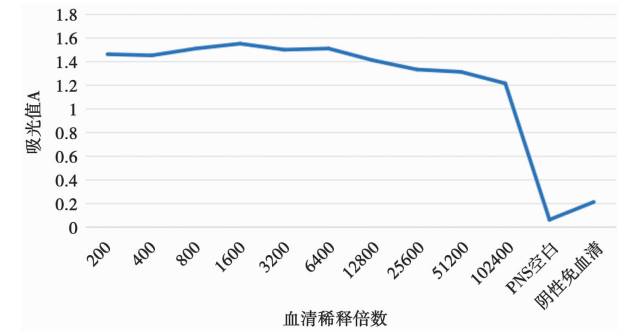


图 8 ELISA 检测兔源 TgSUB3 抗血清效价
Fig. 8 Determination of TgSUB3 antiserum titer

4 TgSUB3 多抗纯化及分析

纯化 TgSUB3 多抗,SDS-PAGE 显示纯化蛋白为 55 ku 的单一蛋白条带(图 9A)。ELISA 检测纯化蛋白的抗体滴度为 1 : 102 400(图 9B)。多抗纯度和滴度均符合要求。

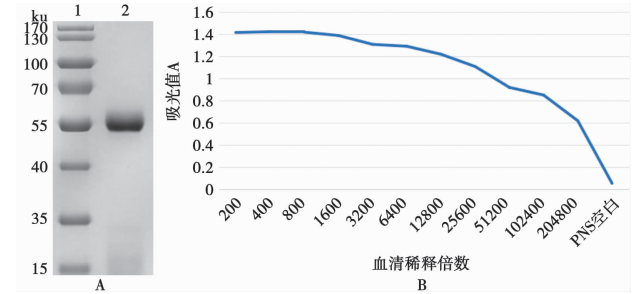


图 9 TgSUB3 多克隆抗体纯度(A)及滴度(B)测定
Fig. 9 TgSUB3 polyclonal antibody purity analysis (A) and titer determination (B)

讨 论

对 TgSUB3 的同源蛋白 TgSUB1 和 TgSUB2 的研究表明,TgSUB1 基因 ORF 全长 2 388 bp、编码 795 个氨基酸,有信号肽无跨膜区,催化三联体位于 Asp²⁵⁹、His³¹⁵、和 Ser⁴⁹⁰。TgSUB2 基因 ORF 全长 3 903 bp、编码 1 300 个氨基酸,包含信号肽和跨膜区,催化三联体位于 Glu⁷⁸³、His⁸³⁶、和 Ser⁹⁹⁹[16]。本研究对 TgSUB3 进行的生物信息学分析显示,该蛋白包含 969 个氨基酸,有跨膜区无信号肽。TgSUB3 同样具有 SUB 蛋白保守的催化三联体,位于 Asp³⁶⁶、His⁴²²和 Ser⁵⁸³。

蛋白经典分泌途径是指含前导序列(信号肽)的分泌蛋白经过内质网-高尔基体内膜运输系统完成的分泌过程。非经典蛋白质输出/分泌(unconventional protein export/secretion,UPE/UPS)利用不依赖内质网-高尔基体系统的多种方式释放无前导序列(在某些情况下也包括含有前导序列的膜蛋白)蛋白分泌到细胞外[17]。TgSUB1 和 TgSUB2 序列均包含信号肽,为经典的分泌蛋白。本研究预测 TgSUB3 无信号肽,该蛋白为非分泌蛋白还是非经典的分泌蛋白,以及该蛋白的功能,均需要进一步实验验证。

根据文献报道[16,18],TgSUB1 和 TgSUB2 可分别对弓形虫微线体蛋白(TgM2AP-MIC2 复合物和 Tg-MIC4)和棒状体蛋白 TgROP1 进行酶解加工,从而参与虫体入侵宿主细胞过程。亚细胞定位研究表明,TgSUB1 定位于弓形虫微线体,TgSUB2 与 TgROP1 共定位于棒状体。但关于 TgSUB3 的定位尚不清楚。

多克隆抗体在蛋白定位及功能研究中是一种重要的实验材料。本研究在筛选 TgSUB3 的 B 细胞抗原表位的基础上制备了针对该蛋白的兔抗血清,并通过

Protein A 进行纯化, 获得了高纯度、高滴度的 TgSUB3 多抗, 为 TgSUB3 的定位及功能研究奠定了基础。

【参考文献】

- [1] Pan M, Lyu C, Zhao J, et al. Sixty years (1957-2017) of research on toxoplasmosis in china-an overview[J]. Front Microbiol, 2017, 8:1825.
- [2] Labesse G, Gelin M, Bessin Y, et al. ROP2 from *Toxoplasma gondii*: a virulence factor with a protein-kinase fold and no enzymatic activity[J]. Structure, 2009, 17(1):139-146.
- [3] Barren AJ, Kirschke H. Cathepsin B, Cathepsin H, and cathepsin L[J]. Methods Enzymol, 1981, 80:535-561.
- [4] Amuthan G, Biswas C, Zhang SY, et al. Mitochondria-to-nucleus stress signaling induces phenotypic changes, tumor progression and cell invasion[J]. EMBO J, 2001, 20(8):1910-1920.
- [5] Guicciardi ME, Deussing J, Miyoshi H, et al. Cathepsin B contributes to TNF- α -mediated hepatocyte apoptosis by promoting mitochondrial release of cytochrome c[J]. J Clin Invest, 2000, 106(9):1127-1137.
- [6] Rawlings ND, O'Brien E, Barrett AJ. MEROPS: the protease database[J]. Nucleic Acids Res, 2002, 30:343-346.
- [7] Blackman MJ, Fujioka H, Stafford WH, et al. A subtilisin-like protein in secretory organelles of *Plasmodium falciparum* merozoites[J]. J Biol Chem, 1998, 273(36):23398-23409.
- [8] Hackett F, Sajid M, Withers-Martinez C, et al. PfSUB-2: a second subtilisin-like protein in *Plasmodium falciparum* merozoites[J]. Mol Biochem Parasitol, 1999, 103(2):183-195.
- [9] Miller SA, Binder EM, Blackman MJ, et al. A conserved subtili-

sin-like protein TgSUB1 in microneme organelles of *Toxoplasma gondii*[J]. J Biol Chem, 2001, 276(48):45341-45348.

- [10] Miller SA, Thathy V, Ajioka JW, et al. TgSUB2 is a *Toxoplasma gondii* rhoptry organelle processing proteinase[J]. Mol Microbiol, 2003, 49(4):883-894.
- [11] Yba ez RH, Terkawi MA, Kameyama K, et al. Identification of a highly antigenic region of subtilisin-like serine protease 1 for serodiagnosis of *Neospora caninum* infection[J]. Clin Vaccine Immunol, 2013, 20(10):1617-1622.
- [12] Wanyiri JW, Techasintana P, O'Connor RM, et al. Role of CpSUB1, a subtilisin-like protease, in *Cryptosporidium parvum* infection *in vitro*[J]. Eukaryot Cell, 2009, 8(4):470-477.
- [13] Alam A, Bhatnagar RK, Chauhan VS. Expression and characterization of catalytic domain of *Plasmodium falciparum* subtilisin-like protease 3[J]. Mol Biochem Parasitol, 2012, 183(1):84-89.
- [14] 魏冬冬, 王龙江, 李瑾, 等. 弓形虫 TgMIC16 多克隆抗体制备、纯化及其在亚细胞定位中的应用[J]. 中国血吸虫病防治杂志, 2018, 30(4):440-442.
- [15] Jameson BA, Wolf H. The antigenic index: a novel algorithm for predicting antigenic determinants [J]. Computer Appl Biosci, 1988, 4(1):181-186.
- [16] 郑斌, 尹志奎. 刚地弓形虫类枯草杆菌蛋白酶的研究进展[J]. 中国人兽共患病学报, 2014, 30(1):93-97.
- [17] Zheng JF, Ge L. Diverse cellular strategies for the export of leaderless proteins[J]. Nat Sci Open, 2022, 1(3):20220018.
- [18] Lagal V, Binder EM, Huynh MH, et al. *Toxoplasma gondii* protease TgSUB1 is required for cell surface processing of micronemal adhesive complexes and efficient adhesion of tachyzoites[J]. Cell Microbiol, 2010, 12(12):1792-1808.

【收稿日期】 2023-12-20 【修回日期】 2024-03-03

(上接 689 页)

- [3] Boom WH, Schaible UE, Achkar JM. The knowns and unknowns of latent *Mycobacterium tuberculosis* infection [J]. J Clin Invest, 2021, 131(3):e136222.
- [4] Kundu M, Basu J. Applications of transcriptomics and proteomics for understanding dormancy and resuscitation in *Mycobacterium tuberculosis*[J]. Front Microbiol, 2021, 12:642487.
- [5] Meier NR, Jacobsen M, Ottenhoff THM, et al. A systematic review on novel *Mycobacterium tuberculosis* antigens and their discriminatory potential for the diagnosis of latent and active tuberculosis [J]. Front Immunol, 2018, 9:2476.
- [6] Zheng H, Abramovitch RB. Inhibiting DosRST as a new approach to tuberculosis therapy [J]. Future Med Chem, 2020, 12(5):457-467.
- [7] Valizadeh A, Imani Fooladi AA, Sedighian H, et al. Evaluating the performance of PPE44, HSPX, ESAT-6 and CFP-10 factors in tuberculosis subunit vaccines [J]. Curr Microbiol, 2022, 79(9):260.
- [8] Adankwah E, Nausch N, Minadzi D, et al. Interleukin-6 and *Mycobacterium tuberculosis* dormancy antigens improve diagnosis of tuberculosis [J]. J Infect, 2021, 82(2):245-252.
- [9] Pandey K, Singh S, Bhatt P, et al. DosR proteins of *Mycobacterium tuberculosis* upregulate effector T cells and down regulate T regulatory cells in TB patients and their healthy contacts [J]. Microb Pathog, 2019, 126:399-406.
- [10] Coppola M, Villar-Hernandez R, Van Meijgaarden KE, et al. Cell-mediated immune responses to *in vivo*-expressed and stage-specific *Mycobacterium tuberculosis* antigens in latent and active tuberculosis across different age groups [J]. Front Immunol, 2020, 11:103.
- [11] Zhang C, Yang L, Zhao N, et al. Insights into macrophage auto-

phagy in latent tuberculosis infection: Role of heat shock protein 16.3[J]. DNA Cell Biol, 2018, 37(5):442-448.

- [12] 马锐, 马金花, 杨壤, 等. 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[J]. 中国病原生物学杂志, 2023, 18(5):529-535.
- [13] Carranza C, Pedraza-Sanchez S, De Oyarzabal-Mendez E, et al. Diagnosis for latent tuberculosis infection: new alternatives [J]. Front Immunol, 2020, 11:2006.
- [14] Yang H, Sha W, Liu Z, et al. Lysine acetylation of DosR regulates the hypoxia response of *Mycobacterium tuberculosis*[J]. Emerg Microbes Infect, 2018, 7(1):34.
- [15] Veatch AV, Kaushal D. Opening pandora's box: Mechanisms of *Mycobacterium tuberculosis* resuscitation [J]. Trends Microbiol, 2018, 26(2):145-157.
- [16] Maurya RK, Bharti S, Krishnan MY. Triacylglycerols: fuelling the hibernating *Mycobacterium tuberculosis*[J]. Front Cell Infect Microbiol, 2019, 8:450.
- [17] Bhatt P, Sharma M, Prakash Sharma P, et al. *Mycobacterium tuberculosis* dormancy regulon proteins Rv2627c and Rv2628 as Toll like receptor agonist and as potential adjuvant [J]. Int Immunopharmacol, 2022, 112:109238.
- [18] Rajpoot S, Wary KK, Ibbott R, et al. TIRAP in the mechanism of inflammation [J]. Front Immunol, 2021, 12:697588.
- [19] Adankwah E, Lundtoft C, Guler A, et al. Two-hit *in vitro* T-cell stimulation detects *Mycobacterium tuberculosis* infection in quantiferon negative tuberculosis patients and healthy contacts from ghana [J]. Front Immunol, 2019, 10:1518.

【收稿日期】 2023-12-18 【修回日期】 2024-03-06