

· 基础研究 ·

结核分枝杆菌 H37Rv 株 PE_PGRS35 蛋白的表达、纯化及其生物信息学分析

袁美丽^{1,2}, 王楚彤^{1,2}, 李敏英^{1,2}, 李柏青^{1,2,3}, 许涛^{1,2,4}, 汪洪涛^{1,2,3}

1. 蚌埠医学院检验医学院检验医学实验中心, 安徽 蚌埠 233000; 2. 蚌埠医学院慢性疾病免疫学基础与临床安徽省重点实验室, 安徽 蚌埠 233000; 3. 蚌埠医学院检验医学院免疫学教研室, 安徽 蚌埠 233000; 4. 蚌埠医学院检验医学院临床检验诊断学教研室, 安徽 蚌埠 233000

摘要: **目的** 克隆结核分枝杆菌(*Mycobacterium tuberculosis*, MTB)PE_PGRS35 基因, 构建 pET28a-PE_PGRS35 重组表达载体, 异源表达并纯化 MTB H37Rv 的 PE_PGRS35 蛋白, 经生物信息学分析后, 探讨抗 MTB 新型靶点。**方法** PCR 扩增 PE_PGRS35 编码基因, 利用重组克隆技术, 构建表达载体 pET28a-PE_PGRS35, 测序鉴定成功后转化至大肠埃希菌(*E. coli*)BL21(DE3)中, 加入异丙基- β -D 半乳糖苷(IPTG)进行诱导表达。用 Ni 柱亲和层析纯化 PE_PGRS35 蛋白, 并对其进行生物信息学分析。**结果** 经测序证明 pET28a-PE_PGRS35 表达载体构建正确, 表达的 PE_PGRS35 蛋白相对分子质量约 53 000, 主要以包涵体形式存在, 纯度达 90%。生物信息学分析表明, PE_PGRS35 蛋白为酸性不稳定性蛋白, 主要二级结构为 β -折叠和无规则卷曲, 无跨膜区, 推测为膜外蛋白, 有 39 个磷酸化位点和 2 个保守结构域, 有 Rv1769、PPE8、PPE64、PPE54、PPE24、PPE16、PPE35、PPE6、PPE28、PE2 共 10 个蛋白与 PE_PGRS35 蛋白相互作用。**结论** 成功获得高纯度的 PE_PGRS35 蛋白, 为进一步开发抗 MTB 药物新型靶点提供了参考。

关键词: 结核分枝杆菌; PE_PGRS35 蛋白; 原核表达; 生物信息学分析

中国分类号: R392 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-5503(2023)01-0032-07

Expression, purification and bioinformatics analysis of PE_PGRS35 protein of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv strain

YUAN Mei-li, WANG Chu-tong, LI Min-ying, LI Bai-qing, XU Tao, WANG Hong-tao
Laboratory Medicine Experimental Center, Laboratory Medicine College, Bengbu Medical College,
Bengbu 233000, Anhui Province, China

Corresponding author: WANG Hong-tao, E-mail: hongtaowang@bbmc.edu.cn

Abstract: **Objective** To clone PE_PGRS35 gene of *Mycobacterium tuberculosis* (MTB), construct recombinant vector pET28a-PE_PGRS35, express and purify the PE_PGRS35 protein of MTB H37Rv heterologously, and explore a new target against MTB after bioinformatics analysis. **Methods** The PE_PGRS35 coding gene was amplified by PCR and used to construct the expression vector pET28a-PE_PGRS35 by recombinant cloning technology, which was transformed to *E. coli* BL21 (DE3) after successful sequencing and induced by using IPTG. The obtained PE_PGRS35 protein was purified by Ni column affinity chromatography and analyzed by bioinformatics. **Results** The pET28a-PE_PGRS35 prokaryotic expression vector was constructed correctly as identified by sequencing. The PE_PGRS35 protein was mainly expressed in the form of inclusion bodies, with a relative molecular mass of about 53 000 and a purity of 90%. Bioinformatics analysis showed that PE_PGRS35 protein was an acid-labile protein, with main secondary structure of β -sheet and random coil, and no transmembrane region, which was presumed to be an extramembrane protein with 39 phosphorylation sites and two conserved domains. Total 10 proteins, including Rv1769, PPE8, PPE64, PPE54, PPE24, PPE16, PPE35, PPE6, PPE28 and PE2, interacted with PE_PGRS35 protein. **Conclusion** PE_PGRS35 protein with high purity was successfully obtained, which provided a reference for the further development of new targets for drugs against MTB.

Keywords: *Mycobacterium tuberculosis* (MTB); PE_PGRS35 protein; Prokaryotic expression; Bioinformatics analysis

基金项目: 安徽省自然科学基金(1908085MH252, 2008085QH405).

通信作者: 汪洪涛, E-mail: hongtaowang@bbmc.edu.cn

结核病是全球传染病致死的主要疾病之一,每年约有 1 000 万人患结核病,约 300 万人死于肺结核,结核病的传播严重危害人们的生命健康^[1]。结核分枝杆菌(*Mycobacterium tuberculosis*, MTB)是结核病的主要病原体,其与人类免疫缺陷病毒(human immunodeficiency virus, HIV)共同感染的威胁越来越大^[2]。近年来,耐药结核病尤其是耐多药结核病的出现严重影响了结核病的防控,给世界带来巨大挑战。目前,唯一可用于结核病治疗的疫苗为牛分枝杆菌减毒疫苗,即卡介苗(bacille de calmette guérin, BCG),但该疫苗在成人中的效力有限,且用于 MTB 的实验室诊断方法不敏感,耗时且费力^[3]。因此,探索新的 MTB 毒力决定因素及其新型药物靶点,对结核病的诊断以及疫苗研发具有积极作用。

PE_PGRS 家族蛋白主要包括 PE 和 PGRS 结构域,PE 结构域位于 N-末端且高度保守,PE_PGRS 家族所有成员在 PE 结构域均含有 1 个保守的四肽基序 DEVS 或 DXXS(X 为任意氨基酸)。PGRS 结构域富含 GC 序列,位于 PE 结构域之后,极富多态性且免疫原性较强,GC 序列是一个不完整的短的重复序列,可用于 MTB 菌株分型;PGRS 结构域具有 Gly-Gly-Ala 和 Gly-Gly-X 重复基序(X 为任意氨基酸),是分枝杆菌致病的重要因素^[4]。PE_PGRS 蛋白家族主要位于分枝杆菌的细胞壁和细胞膜上,是依赖于 ESX-5 机制的分泌性蛋白,可被 ESX-5 分泌系统运输和分泌^[5]。PE_PGRS35 蛋白(*Rv1983*)是含 558 个氨基酸的蛋白质,具有一个独特的 C-末端结构域,与 PE_PGRS16 的 C-末端结构域具有一定同一性,其在海洋分枝杆菌中的同系物可加工 MTB LipY 蛋白^[6]。PE_PGRS35 蛋白是一种毒力相关蛋白,其蛋白质结构、相互作用蛋白以及相关的生物学功能,及其在 MTB 中的作用和致病机制均尚不明确。因此,深入探讨 PE_PGRS35 蛋白有助于了解该蛋白在 MTB 的生长和感染中发挥的重要作用,这为结核病疫苗的开发提供了有效的靶向指标。

本研究利用同源重组克隆技术构建原核表达载体 pET28a-PE_PGRS35,经异丙基- β -D 半乳糖苷(IPTG)诱导,在大肠埃希菌(*E. coli*)中表达带 His 标签的 MTB H37Rv 菌株 PE_PGRS35 蛋白,经亲和层析纯化后进行生物信息学分析,为进一步鉴定蛋白功能和新型抗结核药物疫苗的研发提供依据。

1 材料与方法

1.1 菌株、载体及 DNA 克隆菌株 *E. coli* DH5 α , 表

达菌株 *E. coli* BL21(DE3)和原核表达载体 pET28a 由蚌埠医学院慢性疾病免疫学基础与临床安徽省重点实验室保存;MTB 标准菌株 H37Rv 基因组 DNA 购自上海晶诺生物科技有限公司。

1.2 主要试剂及仪器 Phanta Max Super-Fidelity DNA Polymerase、同源重组试剂盒购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司;质粒小提试剂盒和琼脂糖凝胶 DNA 试剂盒均购自天根生化科技(北京)有限公司;组氨酸(His)标签小鼠单克隆抗体、HRP 标记的山羊抗小鼠 IgG 和 ECL 底物化学发光显色试剂盒、5'-四甲基联苯胺(TMB)显色液均购自碧云天生物科技股份有限公司;IPTG、苯甲基磺酰氟(PMSF)均购自美国 Sigma 公司;Ni-IDA SepharoseCl-6B 亲和层析柱购自德国 Novagen 公司;其他常规试剂均为国产分析纯试剂。

1.3 引物设计及合成 根据 NCBI GenBank 数据库中 H37Rv PE_PGRS35 基因序列(885921)设计引物。pET28a-PE_PGRS35 正向引物:5'-AAGAAGGAGAT-ATACCATGGGCATGGTGTCTTTCTGGTCGTGCT-3', pET28a-PE_PGRS35 反向引物:5'-TGGTGGTGGTGTGCTVAGACGCCGGATGATCAAAGACTG-3', 扩增片段大小为 1 677 bp (全长 PCR 产物大小为 1 719 bp)。引物由上海派森诺生物科技有限公司合成。

1.4 原核表达载体的构建及鉴定 以 MTB H37Rv 标准菌株基因组 DNA 为模板,利用 pET28a-PE_PGRS35 正反向引物进行 PCR 扩增。50 μ L 反应体系:2 \times Max Buffer 25 μ L, dNTP Mix 1 μ L, 正、反向引物各 1 μ L, DNA Max Polymerase 1 μ L, 基因组 DNA 2 μ L, ddH₂O 19 μ L。反应条件:95 $^{\circ}$ C 预变性 3 min;95 $^{\circ}$ C 变性 15 s, 60 $^{\circ}$ C 退火 15 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 2 min, 共 40 个循环;72 $^{\circ}$ C 继续延伸 7 min。1.2% 琼脂糖凝胶电泳分离 PCR 产物,琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒回收目的基因片段。将表达载体 pET28a 经 Nco I 和 Xho I 双酶切,30 $^{\circ}$ C 酶切过夜;胶回收载体片段,按以下反应体系进行同源重组反应:酶切 pET28a 1 μ L, 胶回收目的基因 PE_PGRS35 1 μ L, 5 \times CEBuffer 5 μ L, ExnasoMultis 2 μ L, ddH₂O 12 μ L。将 10 μ L 重组产物转化至 100 μ L *E. coli* DH5 α 感受态细胞中,混匀,冰上静置 30 min;42 $^{\circ}$ C 热激 90 s, 迅速至冰上冷却 2 min;加至 900 μ L LB 液体培养基,37 $^{\circ}$ C 振荡 1 h;离心后涂布 LB 固体培养基(含 50 μ g / mL 卡那霉素),37 $^{\circ}$ C 摇床培养过夜;随机挑取单个阳性菌落进行菌落 PCR 鉴定,并送上海派森诺生物科技有限公司测序。选择测序正确的阳性菌株提取质粒,用于后续试验。

1.5 重组 PE_PGRS35 蛋白的表达 将原核表达载

体 pET28a-*PE_PGRS35* 转化至 *E. coli* BL21(DE3) 中, 挑取单克隆菌落接种至含 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 卡那霉素的 3 mL LB 液体培养基中, 37 $^{\circ}\text{C}$, 220 r/min 摇床振荡培养过夜; 进一步扩大培养, 按 1:100 比例接种至含 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 卡那霉素的 30 mL LB 液体培养基中, 37 $^{\circ}\text{C}$, 220 r/min 摇床振荡培养; 至 A_{600} 值达 0.6~0.8 时, 加入 IPTG 至终浓度为 0.5 mmol/L, 37 $^{\circ}\text{C}$ 诱导过夜; 室温, 8 910 $\times g$ 离心, 弃上清, PBS 重悬菌体沉淀, 重悬液经超声破碎后, 分别取超声破碎后上清和沉淀液进行 12% SDS-PAGE 分析, 考马斯亮蓝染色显示条带。

1.6 包涵体溶解及蛋白纯化 将菌体沉淀重悬于 20 mL 裂解缓冲液中 (20 mmol/L Tris-HCl, 含 1 mmol/L PMSF 和细菌蛋白酶抑制物混合液, pH 8.0), 进行超声破碎 (功率 400 W, 工作 4 s, 间歇 8 s, 共 20 min); 4 $^{\circ}\text{C}$, 8 910 $\times g$ 离心 20 min; 收集沉淀, 包涵体洗涤液 (20 mmol/L Tris, 1 mmol/L EDTA, 2 mol/L 尿素, 1 mol/L NaCl, 1% TritonX-100, pH 8.0) 洗涤 3 次, 溶解缓冲液 (20 mmol/L Tris, 5 mmol/L DTT, 8 mol/L 尿素, pH 8.0) 溶解包涵体, 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜; 室温, 8 910 $\times g$ 离心 15 min。将 *PE_PGRS35* 蛋白滴加至 20 mmol/L Tris-HCl, 0.15 mol/L NaCl, pH 8.0 缓冲液中, 倍比稀释后装入透析袋, 于 20 mmol/L Tris-HCl, 0.15 mol/L NaCl, pH 8.0 缓冲液中透析过夜; 将透析后的蛋白上清溶液转移至 Ni-IDA SepharoseCl-6B 亲和层析柱中, 用 Ni-IDABinding-buffer 冲洗, 直至流出液 A_{280} 值达到基线, 用 Ni-IDAWashing-buffer (20 mmol/L Tris-HCl, 20 mmol/L 咪唑, 0.15 mol/L NaCl, pH 8.0) 冲洗, 直至流出液 A_{280} 值达到基线, 用 Ni-IDAEluation-Buffer (20 mmol/L Tris-HCl, 20 mmol/L 咪唑, 0.15 mol/L NaCl, pH 8.0) 洗脱目的蛋白, 收集流出液, 置含 PBS 的透析袋中透析过夜后, 进行 12% SDS-PAGE 分析。

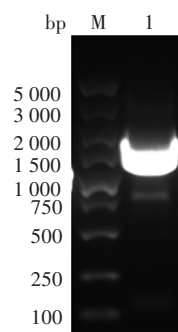
1.7 纯化的 *PE_PGRS35* 蛋白的鉴定 采用 Western blot 法。将纯化的变性蛋白经 12% SDS-PAGE 分离, 电转至 PVDF 膜上 (恒流 280 mA, 2 h), PBST 洗膜 3 次, 用含 5% 脱脂奶粉的 PBST 摇床封闭 5 h; 加入 His 标签的小鼠单克隆抗体 (1:1 000 稀释), 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜; PBST 洗膜 3 次, 加入 HRP 标记的山羊抗小鼠 IgG (1:1 500 稀释), 室温孵育 2 h; PBST 洗膜 3 次, ECL 显影, 曝光。

1.8 生物信息学分析 用 ExPasy 网站 ProParam 工具进行 *PE_PGRS35* 氨基酸理化参数解析, ExPasy 网站 Proscale 工具进行亲疏水性特征分析, TMHMM2.0 工具进行 *PE_PGRS35* 跨膜区预测, NetPhos3.1 软件进

行磷酸化位点预测, NCBI 数据库中 CD-Search 工具进行保守域分析。用 SOPMA 软件进行 *PE_PGRS35* 二级结构预测, SWISSMODEL 工具进行三级空间结构分析和模型构建。用 STRING 软件进行 *PE_PGRS35* 相互作用蛋白分析。

2 结果

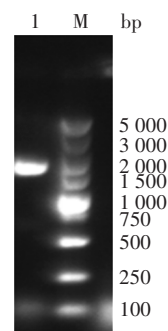
2.1 重组表达载体 pET28a-*PE_PGRS35* 的鉴定 *PE_PGRS35* 基因扩增产物经 1.2% 琼脂糖凝胶电泳分析, 可见 1 677 bp 的特异性片段, 大小与理论预测值相符, 见图 1。转化后阳性菌落经 PCR 鉴定, 可见 1 700 bp (含载体片段 170 bp) 的特异性条带, 见图 2, 表明 *PE_PGRS35* 基因已成功转化至 *E. coli* 感受态 DH5 α 细胞中。转化后阳性菌落测序结果与目的基因模板序列一致, 表明质粒 pET28a-*PE_PGRS35* 构建正确。



M: 蛋白质 marker; 1: 目的基因扩增产物。

图 1 *PE_PGRS35* 基因扩增产物电泳图

Fig. 1 Electrophoretic profile of amplification product of *PE_PGRS35* gene

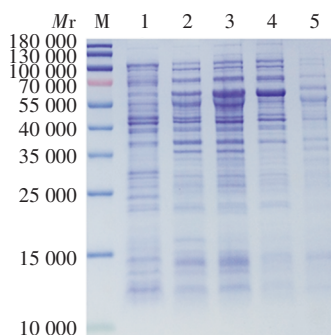


1: 目的基因菌落 PCR 产物; M: 蛋白质 marker。

图 2 *PE_PGRS35* 基因菌落 PCR 产物电泳图

Fig. 2 Electrophoretic profile of colony PCR product of *PE_PGRS35* gene

2.2 重组 PE_PGRS35 蛋白的鉴定 12% SDS-PAGE 分析显示,在相对分子质量约 53 000 处可见外源性蛋白表达条带,与预测的 PE_PGRS35 蛋白理论相对分子质量(53 730)一致,主要存在于破碎后沉淀中,上清中未见 PE_PGRS35 蛋白,见图 3。

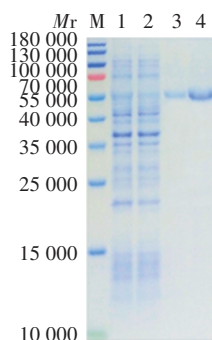


M: 蛋白质 marker; 1: pET28a 空载体; 2: 诱导前菌体; 3: 诱导后菌体; 4: 破碎后菌体上清; 5: 破碎后菌体沉淀。

图 3 表达的 PE_PGRS35 蛋白的 SDS-PAGE 分析

Fig. 3 SDS-PAGE analysis of expressed PE_PGRS35 protein

2.3 纯化的 PE_PGRS35 蛋白的鉴定 12% SDS-PAGE 分析显示,纯化的蛋白条带单一,纯度可达 90%,未见明显杂带,见图 4。Western blot 分析显示,在相对分子量约 53 000 处,诱导后以及诱导破碎后沉淀中可见特异性反应条带,而 pET28a 空载体、诱导前以及诱导破碎后上清中未见明显条带,表明 PE_PGRS35 蛋白在大肠埃希菌中主要以包涵体形式存在,见图 5。



M: 蛋白质 marker; 1: 上样蛋白液; 2: 流出蛋白液; 3, 4: 洗脱蛋白液。

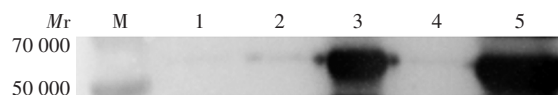
图 4 纯化的 PE_PGRS35 蛋白的 SDS-PAGE 分析

Fig. 4 SDS-PAGE analysis of purified PE_PGRS35 protein

2.4 生物信息学分析

2.4.1 亲疏水性特征分析 ProParam 软件分析结果显示, PE_PGRS35 的分子式为 $C_{4765}H_{7855}N_{1677}O_{1980}S_{520}$, 相对分子质量约为 136 989. 03, 理论等电点为 4. 89

(属于酸性蛋白), 不稳定性指数为 48. 30(属于不稳定性蛋白), 脂肪系数为 17. 11, 总平均亲水性为 0. 822, 见图 6。



M: 蛋白质 marker; 1: pET28a 空载体; 2: 诱导前菌体; 3: 诱导后菌体; 4: 破碎后菌体上清; 5: 破碎后菌体沉淀。

图 5 纯化的 PE_PGRS35 蛋白的 Western blot 分析

Fig. 5 Western blotting of purified PE_PGRS35 protein

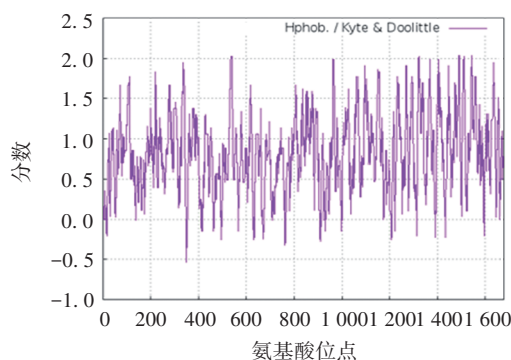


图 6 PE_PGRS35 蛋白亲水性分析

Fig. 6 Hydrophilicity analysis of PE_PGRS35 protein

2.4.2 磷酸化位点和保守域分析 NetPhos3. 1 软件预测 PE_PGRS35 蛋白有 39 个磷酸化位点, 其中丝氨酸位点 17 个, 苏氨酸位点 15 个, 酪氨酸位点 7 个, 见图 7。CD-Search 工具分析 PE_PGRS35 蛋白有 2 个保守结构域, 分别为 PE 超家族结构域和 PE_process_PecA 超家族结构域, 见图 8。

2.4.3 跨膜区预测 TMHMM2. 0 工具 PE_PGRS35 无跨膜区, 且预测所有氨基酸位于胞质内的概率为 0. 006 19, 推测为膜外蛋白, 见图 9。

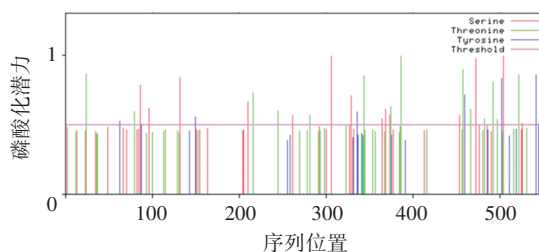


图 7 PE_PGRS35 蛋白磷酸化位点预测

Fig. 7 Prediction of phosphorylation sites of PE_PGRS35 protein

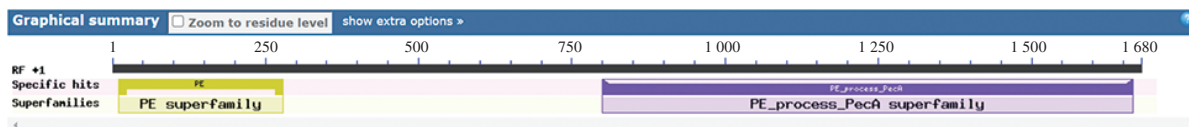


图 8 PE_PGRS35 蛋白保守域分析

Fig. 8 Analysis of conserved domains of PE_PGRS35 protein

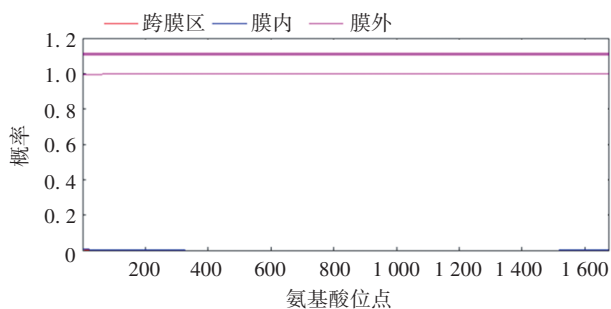


图 9 PE_PGRS35 蛋白跨膜区预测

Fig. 9 Prediction of transmembrane region of PE_PGRS35 protein

2.4.4 二级结构和三级结构预测 SOPMA 软件对 PE_PGRS35 蛋白的二级结构进行预测,其中 α -螺旋 (Hh)109 个,占 19.53%; β -折叠 (Ee)157 个,占 28.14%; β -转角 (Tt)40 个,占 7.17%;无规则卷曲 (Cc)含量最高,252 个,占 45.16%。因此,PE_PGRS35 的主要二级结构形式为 β -折叠和无规则卷曲。SWISSMODEL 工具对 PE_PGRS35 蛋白的三级结构进行预测并构建模型,其中有 GMQE 和 QMEAN 两个模型构建质量评估指标,GMQE 的取值 0~1,越靠近 1,构建的模型越好;QMEAN 得分越接近 0,构建的模型越成功,而分数 ≤ -4.0 ,构建模型不可靠。该模型 GMQE 评分为 0.36,QMEAN 评分为 0.75。见图 10。

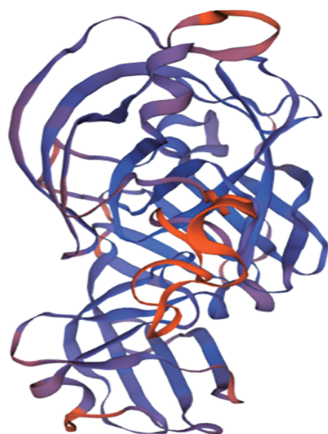


图 10 PE_PGRS35 蛋白三级结构

Fig. 10 Tertiary structure of PE_PGRS35 protein

2.4.5 相互作用蛋白预测 STRING 软件分析 PE-PGRS35 蛋白相互作用的网络图见图 11,节点数 11 个,Rv1769、PPE8、PPE64、PPE54、PPE24、PPE16、PPE35、PPE6、PPE28、PE2 共 10 个蛋白与 PE-PGRS35 蛋白相互作用。

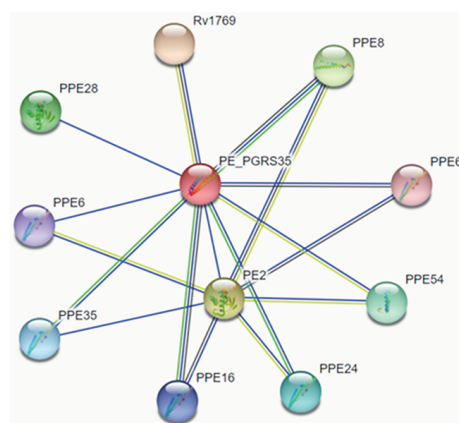


图 11 PE_PGRS35 蛋白相互作用蛋白分析

Fig. 11 Analysis of interacting proteins of PE_PGRS35 protein

3 讨论

MTB 是人类结核病的病原体,仍然是全球范围内的主要致死病原体之一,控制结核病需要更好地了解 MTB 逃避免疫系统并在宿主体内持续存在的机制^[7]。结核病是宿主与病原体及环境条件相关的复杂因素相互作用的结果,活动性结核病可通过长期的多药治疗方案治愈,但多重耐药结核病的出现仍然是未来结核病护理的主要障碍^[8]。潜伏期是结核病感染最显著的特征之一,在该种情况下,MTB 与宿主免疫系统建立了动态平衡,并伴随患者持续终生,且不会出现结核病的迹象及相关症状^[9]。PE_PGRS 家族成员仅在分枝杆菌基因组中被发现,因此对该家族蛋白的进一步研究将有助于了解结核病的发病机制和新的预防及治疗方法,以便寻找更有效的靶点药物和新型疫苗^[10]。

PE 和 PE_PGRS 蛋白家族被认为是海洋分枝杆菌中可能的毒力因子,参与分枝杆菌之间的细胞表

面相互作用以及分枝杆菌与巨噬细胞的相互作用^[11]。据文献报道,经 MTB 基因组测序发现了 PE 的多基因家族,占 MTB 整个基因组的 5%,由 36 个同源 PE 基因和 63 个分布在整个基因组中的同源 PE_PGRS 基因组成,位于 PE_PGRS 基因 N-末端的 PE 结构域与 38 个 PE 基因高度同源,表明这些基因间关系密切^[12-13]。PE_PGRS 蛋白家族的表达模式因家族成员和条件的不同而存在较大差异,该家族成员参与抗原变异和免疫逃逸等相关免疫反应,有助于了解 MTB 的生存和发病机制^[14]。已有研究发现,PE_PGRS33(*Rv1818c*) 在耻垢分枝杆菌的表达可增强其在巨噬细胞和宿主体内的持久性,诱导巨噬细胞凋亡和坏死^[15]。PE_PGRS42(*Rv2487c*) 被提议作为结核病诊断和疫苗的候选药物^[16]。PE_PGRS39(*Rv2340c*) 作为一种细胞外蛋白可能直接在宿主-病原体相互作用中发挥作用且具有引发免疫反应的潜力,有助于深入了解疫苗的开发^[17]。

PE_PGRS35 蛋白由 *Rv1983* 基因编码,其氨基酸序列保守性很强,是 MTB 所特有的性质。PE_PGRS35 是一种含 588 个氨基酸的蛋白质,含有 1 个独特的 C-末端结构域^[6]。BURGGRAAF 等^[18]研究表明,PE_PGRS35 在海洋分枝杆菌中表达为异源蛋白时,其在海洋分枝杆菌中的同系物可以加工 MTB 蛋白 LipY(LipYtub),PE_PGRS35 蛋白对来自海洋分枝杆菌和潜在 MTB 的 PE_PGRS 蛋白具有蛋白水解活性,被认为在免疫调节、巨噬细胞侵袭和 B 细胞反应中发挥着重要作用。已有研究表明,将 PE_PGRS35 重组载体转染至 HeLa 和 HEK293 上皮细胞中均可被强烈表达,与 PE_PGRS14、PE_PGRS24 等 7 个基因共属于组成型表达^[19]。PE_PGRS35 是在感染牛和接种 BCG 的牛中被识别的一种抗原,有 56% 的结核病患者对 PE_PGRS35 中至少一种肽有阳性反应,结核病患者会优先识别 PE_PGRS35-P4、P6-P13 和 P24 区域,已有研究数据表明,这些表位在结核病的免疫学诊断中可能具有潜在的诊断价值^[20]。PE_PGRS35 蛋白是 RD2 区的蛋白,在 MTB 毒株中保守存在。GROVER 等^[2]推测,PE_PGRS 家族成员在肺泡中形成空泡的过程是通过影响肉芽组织或维持刺激肿瘤坏死因子的方式实现的。尽管如此,PE_PGRS35 蛋白如何在结核病发病中起作用,以及其功能和生物学作用尚不明确,有待进一步探讨。

本研究扩增了 PE_PGRS35 编码基因,并利用同源重组技术将其克隆至 pET28a 载体,经 DNA 测序分析,测序结果与预期基因序列相一致,表明重组质粒 pET28a-PE_PGRS35 构建成功。SDS-PAGE 分析显

示,诱导的重组菌在相对分子量约 53 000 处可见明显条带,大小与预期结果相一致,并经 Western blot 分析,表达的 PE_PGRS35 蛋白以包涵体的形式存在,且具有良好的反应原性。这与很多 MTB 蛋白类似^[21-22]。此外,本研究对包涵体蛋白进行了溶解和纯化,获得纯度较高的变性蛋白,后续也将尝试用纯化后的 PE_PGRS35 蛋白制备多克隆抗体。本研究在 PE_PGRS35 的性质、结构和跨膜区等方面进行了生物信息学分析。PE_PGRS35 的等电点为 4.89,不稳定指数为 48.30,属于酸性不稳定性蛋白。在线软件 TMHMM 预测 PE_PGRS35 蛋白无跨膜区,且预测所有氨基酸位于胞质内的概率为 0.006 19,推测为膜外蛋白。MAWUENYEGA 等^[23]分析了 MTB 中上千种蛋白的亚细胞定位,证明 PE_PGRS35 蛋白定位于细胞壁上,这与 WOLFPSORT 软件分析结果一致,表明 PE_PGRS35 蛋白可能在 MTB 与宿主细胞之间发挥着相互作用。其二级结构主要为 β -折叠和无规则卷曲,占 73.3%;PE_PGRS35 含 39 个磷酸化位点,无规则卷曲占 45.16%,表明其易与抗体嵌合。CHEN 等^[24]发现,95% 的 PE-PPE 蛋白对与 ESX-5 分泌系统分泌的 EspG₅ 相互作用从而形成晶体结构,同时阐明了 PE-PPE 蛋白对结合特异性的分子基础,从而有利于结核分枝杆菌发挥免疫效应。WILLIAMSON 等^[25]提出来自 ESX-3 系统的 PE_{5_m}-PPE_{4_m}-EspG_{3_{mm}} 的异三聚体的晶体结构,揭示了 EspG_{3_{mm}} 以类似于 EspG₅ 的方式专门与 PPE_{4_m} 相互作用。根据对 PE_PGRS35 蛋白的相互作用蛋白的分析,由此可以推测 PE_PGRS35 蛋白也能与其相互作用蛋白构成 PE-PPE 结合对,从而与 EspG₅ 相互作用,发挥其对机体的免疫效应。

综上所述,本研究成功构建了 pET28a-PE_PGRS35 表达载体,经 IPTG 诱导表达了 PE_PGRS35 蛋白,该蛋白以包涵体形式存在,纯度较高,并利用在线软件对其进行了生物信息学分析。本研究在结核病的诊断、治疗和疫苗开发方面均具有潜在的价值,有利于控制结核病的传播及流行。

参考文献

- [1] FURIN J, COX H, PAI M. Tuberculosis [J]. Lancet, 2019, 393 (10181): 1642-1656.
- [2] GROVER S, SHARMA T, SINGH Y, et al. The PGRS domain of *Mycobacterium tuberculosis* PE_PGRS protein Rv0297 is involved in endoplasmic reticulum stress - mediated apoptosis through toll-like receptor 4 [J]. MBio, 2018, 9 (3): 01017-18. DOI: <https://doi.org/10.1128/mBio.01017-18>.

- [3] XIE Y, ZHOU Y, LIU S, *et al.* PE_PGRS: vital proteins in promoting mycobacterial survival and modulating host immunity and metabolism [J]. Cell Microbiol, 2021, 23 (3) : 13290.
- [4] MEENA L S. An overview to understand the role of PE_PGRS family proteins in *Mycobacterium tuberculosis* H₃₇ Rv and their potential as new drug targets: the current epidemiological TB [J]. Biotechnol Applied Biochem, 2015, 62 (2) : 145-153.
- [5] DE MAIO F, MAULUCCI G, MINERVA M, *et al.* Impact of protein domains on PE_PGRS30 polar localization in mycobacteria [J]. PLoS ONE, 2014, 9 (11) : e112482. DOI: 10.1371/journal.pone.0112482.
- [6] DE MAIO F, BERISIO R, MANGANELLI R, *et al.* PE_PGRS proteins of *Mycobacterium tuberculosis*: A specialized molecular task force at the forefront of host-pathogen interaction [J]. Virulence, 2020, 11 (1) : 898-915.
- [7] CAMASSA S, PALUCCI I, IANTOMASI R, *et al.* Impact of Pe_pgrs33 gene polymorphisms on *Mycobacterium tuberculosis* infection and pathogenesis [J]. Frontiers Cell Infect Microbiol, 2017, 7: 137.
- [8] MINERVA M, DE MAIO F, CAMASSA S, *et al.* Evaluation of PE_PGRS33 as a potential surface target for humoral responses against *Mycobacterium tuberculosis* [J]. Pathogens Dis, 2017, 75 (8) : 10.
- [9] KRAMARSKA E, SQUEGLIA F, DE MAIO F, *et al.* PE_PGRS33, an important virulence factor of *Mycobacterium tuberculosis* and potential target of host humoral immune response [J]. Cells, 2021, 10 (1) : 161.
- [10] TIAN C, JIAN-PING X. Roles of PE_PGRS family in *Mycobacterium tuberculosis* pathogenesis and novel measures against tuberculosis [J]. Microbial Pathogenesis, 2010, 49 (6) : 311-314.
- [11] ATESS L S. New insights into the mycobacterial PE and PPE proteins provide a framework for future research [J]. Mol Microbiol, 2020, 113 (1) : 4-21.
- [12] DENG W, LONG Q, ZENG J, *et al.* *Mycobacterium tuberculosis* PE_PGRS41 enhances the intracellular survival of *M. smegmatis* within macrophages via blocking innate immunity and inhibition of host defense [J]. Scientific Reports, 2017, 7 (1) : 46716.
- [13] BACHHAWAT N. PE-Only / PE_PGRS proteins of *Mycobacterium tuberculosis* contain a conserved tetra-peptide sequence DEVS / DXXS that is a potential caspase-3 cleavage motif [J]. J Biosci, 2018, 43 (4) : 597-604.
- [14] SINGH V K, BERRY L, BERNUT A, *et al.* A unique PE_PGRS protein inhibiting host cell cytosolic defenses and sustaining full virulence of *Mycobacterium marinum* in multiple hosts: A new PE_PGRS protein in *M. marinum* virulence [J]. Cell Microbiol, 2016, 18 (11) : 1489-1507.
- [15] JU X H, WANG Y H, FANG F. Research progress on the PE_PGRS33 protein of *Mycobacterium tuberculosis* [J]. Chin J Zoonoses, 2020, 36 (11) : 949-955. (in Chinese)
鞠晓红, 王月华, 方芳. 结核分枝杆菌 PE_PGRS33 蛋白的研究进展 [J]. 中国人兽共患病学, 2020, 36 (11) : 949-955.
- [16] XIE Y, ZHOU Y, LIU S, *et al.* PE_PGRS: Vital proteins in promoting mycobacterial survival and modulating host immunity and metabolism [J]. Cell Microbiol, 2021, 23 (3) : e13290. DOI: 10.1111/cmi.13290.
- [17] PATNI K, AGARWAL P, KUMAR A, *et al.* Computational evaluation of anticipated PE_PGRS39 protein involvement in host-pathogen interplay and its integration into vaccine development [J]. 3 Biotech, 2021, 11 (4) : 204.
- [18] BURGGRAAF M J, SPEER A, MEIJERS A S, *et al.* Type VII secretion substrates of pathogenic mycobacteria are processed by a surface protease [J]. MBio, 2019, 10 (5) : e01951-19. DOI: 10.1128/mBio.01951-19.
- [19] SHANG Q Y, SUN H L, LIANG L J, *et al.* Research progress of PE_PGRS family proteins in *Mycobacterium tuberculosis* [J]. Chin J Zoological Infect Dis, 2020, 30 (4) : 222-228. (in Chinese)
尚庆煜, 孙慧琳, 梁露静, 等. 结核分枝杆菌 PE_PGRS 家族蛋白研究进展 [J]. 中国动物传染病学报, 2020, 30 (4) : 222-228.
- [20] CHEN J, RUAN Q, SHEN Y, *et al.* Assessing and screening for T-cell epitopes from *Mycobacterium tuberculosis* RD2 proteins for the diagnosis of active tuberculosis [J]. Brazilian J Infect Dis, 2018, 22 (6) : 462-471.
- [21] QU R, WU K, WU J, *et al.* Prokaryotic expression of early secretory protein MPT64 from *Mycobacterium tuberculosis* and its application in serological diagnosis of tuberculosis [J]. Chin J Biologicals, 2021, 34 (5) : 566-570. (in Chinese)
屈蓉, 吴康, 吴娟, 等. 结核分枝杆菌早期分泌蛋白 MPT64 的原核表达及其在结核病血清学诊断上的初步应用 [J]. 中国生物制品学杂志, 2021, 34 (5) : 566-570.
- [22] TANG W G, SI Y, ZHANG N, *et al.* Expression, purification and bioinformatics of *Mycobacterium tuberculosis* protein Rv1872c [J]. Chin J Biologicals, 2020, 33 (10) : 1117-1121, 1127. (in Chinese)
唐王刚, 司雨, 张娜, 等. 结核分枝杆菌蛋白 Rv1872c 的表达、纯化及其生物信息学分析 [J]. 中国生物制品学杂志, 2020, 33 (10) : 1117-1121, 1127.
- [23] MAWUENYEGA K G, FORST C V, DOBOS K M, *et al.* *Mycobacterium tuberculosis* functional network analysis by global subcellular protein profiling [J]. Mol Biol Cell, 2005, 16 (9) : 396-404.
- [24] CHEN X, CHENG H, ZHOU J, *et al.* Structural basis of the PE-PPE protein interaction in *Mycobacterium tuberculosis* [J]. J Biological Chem, 2017, 292 (41) : 16880-16890.
- [25] WILLIAMSON Z A, CHATON C T, CIOCCA W A, *et al.* PE5-PPE4-EspG₃ heterotrimer structure from mycobacterial ESX-3 secretion system gives insight into cognate substrate recognition by ESX systems [J]. J Biological Chem, 2020, 295 (36) : 12706-12715.