

DOI: 10. 12138/j. issn. 1671-9638. 20233642

· 论 著 ·

结核分枝杆菌 Rv3529c 蛋白的生信分析及原核表达

陈瑞枫¹, 王 瑄², 马枫茜¹, 李祥芳¹, 丁寿鹏¹, 吴利先¹

(1. 大理大学基础医学院医学微生物学与免疫学教研室, 云南 大理 671000; 2. 南昌大学玛丽女王学院, 江西 南昌 330031)

[摘要] **目的** 通过生物信息学软件预测结核分枝杆菌 Rv3529c 基因编码蛋白的结构和功能, 并对其原核表达。**方法** 利用 UniproKB 数据库、PredictProtein 服务、AlphaFold 系统、SWISS-MODEL 服务、ProtParam 蛋白分析工具、ProtScale、DeepTMHMM 服务和 SignalP-5.0 服务、ProtCompB 方法、IEDB 数据库和 STRING 数据库等生物信息学预测软件对 Rv3529c 编码蛋白的二级和三级结构、理化性质、疏水性、信号肽、跨膜区、亚细胞定位及免疫表位进行分析预测。利用分子克隆技术构建表达质粒载体 pET-32a-Rv3529c 并进行原核表达, 运用 UniproKB 数据库的 Blast 工具对氨基酸序列进行比对, 采用 MEGA 11 软件构建进化树, 进行系统进化分析, 运用 STRING 数据库分析蛋白间相互作用。**结果** Rv3529c 基因全长 1 155 bp, 共编码 384 个氨基酸。Rv3529c 基因编码蛋白分子量为 43.35 kDa, 等电点为 6.04, 二级结构以 α -螺旋为主, 该蛋白为稳定的亲水性蛋白, 无跨膜区、无信号肽, 预测该蛋白亚细胞定位在细胞质中或细胞膜上, 存在多个抗原抗体表位, 与多个蛋白质有相互作用。经克隆、表达、鉴定、纯化后获得浓度和纯度较高的 Rv3529c 蛋白。**结论** 成功克隆、表达、纯化结核分枝杆菌 Rv3529c 蛋白, 并初步预测其结构及功能。

[关键词] 结核分枝杆菌; Rv3529c 蛋白; 原核表达; 生物信息学; 表位

[中图分类号] R521

Bioinformatics analysis and prokaryotic expression of the protein Rv3529c of *Mycobacterium tuberculosis*

CHEN Rui-feng¹, WANG Xuan², MA Feng-xi¹, LI Xiang-fang¹, DING Shou-peng¹, WU Li-xian¹ (1. Department of Medical Microbiology and Immunology, School of Basic Medical Sciences, Dali University, Dali 671000, China; 2. Nanchang University Queen Mary School, Nanchang 330031, China)

[Abstract] **Objective** To predict the structure and function of the protein encoded by *Mycobacterium tuberculosis* gene Rv3529c through bioinformatics software and perform prokaryotic expression of the protein. **Methods** The secondary and tertiary structure, physicochemical properties, hydrophobicity, signal peptide, transmembrane domain, subcellular localization and immune epitopes of Rv3529c-encoded protein were analyzed and predicted through bioinformatics prediction software such as The UniproKB database, PredictProtein service, AlphaFold system, SWISS-MODEL service, ProtParam protein analysis tool, ProtScale, DeepTMHMM service, SignalP-5.0 service, ProtCompB method, IEDB database and STRING database. Expression plasmid vector pET-32a-Rv3529c was constructed and performed prokaryotic expression by molecular cloning technique. Amino acid sequences were compared by the Blast tool of UniproKB database, and evolutionary tree was constructed by MEGA 11 software for phylogenetic analysis. Interactions among proteins were analyzed with STRING database. **Results** Gene Rv3529c was 1 155bp in length and encoded 384 amino acids. Gene Rv3529c encoded a protein with a molecular weight of

[收稿日期] 2022-11-30

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81260456); 云南省地方本科高校基础研究重点项目(202101BA07111-038)

[作者简介] 陈瑞枫(1996-), 男(汉族), 山西省大同市人, 硕士研究生, 主要从事分枝杆菌的致病机制与免疫研究。

[通信作者] 吴利先 E-mail: w_lixian@163.com

43.35 kDa and an isoelectric point of 6.04, and its secondary structure was mainly α -helix, which was a stable hydrophilic protein without transmembrane domain and signal peptide. It was predicted that its subcellular location was in cytoplasm or cell membrane, with multiple antigen-antibody epitopes, and interacted with various proteins. The protein Rv3529c with high concentration and purity was obtained after cloning, expression, identification and purification. **Conclusion** The protein Rv3529c of *Mycobacterium tuberculosis* is successfully cloned, expressed and purified, and its structure and function is tentatively predicted.

[**Key words**] *Mycobacterium tuberculosis*; Rv3529c protein; prokaryotic expression; bioinformatics; epitopes

尽管结核病是可以被预防 and 治疗的,但其仍然是世界上最致命的传染病之一,四分之一的世界人口,近 20 亿人患过结核病,每年约有 1 000 万人感染结核分枝杆菌 (*Mycobacterium tuberculosis*, MTB),每年报告超过 500 000 例耐多药结核病病例,每天超 4 100 例死亡^[1]。任何人都可能患上结核病,但一些人群患结核病的风险较其他人高。人类免疫缺陷病毒 (human immunodeficiency virus, HIV) 感染者相较其他人群更容易患上结核病, HIV 感染者中结核病发病率比一般人群高 18 倍。艾滋病和肺结核是世界上最致命的两种传染病,且这两种传染病还相互关联。结核病是 HIV 感染者死亡的主要原因;在潜伏性 MTB 感染者中, HIV 感染是已知发展为结核病的最强风险因素。感染 HIV-1 后,巨噬细胞中 toll 样受体 2 (toll-like receptor 2, TLR2) 可直接参与增强细胞对 HIV-1 感染的抵抗力^[2]。同时, MTB 在巨噬细胞中诱导肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 也需要 TLR。巨噬细胞识别 MTB 细胞壁成分后可分泌 TNF- α 和其他细胞因子,这些细胞因子对机体产生保护性炎症反应至关重要。TLR2 确定为这种诱导所需的特异性 TLR^[3]。针对这两种疾病共同的先天免疫系统,进一步检索文献。在小鼠巨噬细胞系中表达的一种髓样分化蛋白 88 (myeloid differentiation protein 88, MyD88), 为 TLR 信号传导所需的信号成分,可阻断 MTB 诱导的 TNF- α 生成。而 MTB 蛋白 Rv3529c 与 TLR 途径衔接蛋白 MyD88 的死亡结构域 (death domain) 有高度相似性^[4]。Rv3529c 蛋白可通过与 IL-1 受体相关激酶 (IL-1 receptor-related kinase, IRAK1) 竞争性结合,明显抑制 TLR2 诱导的 MyD88 与 IRAK1 结合,从而抑制 TLR2 的激活^[4]。IRAK1 和 IRAK4 是关键信号的传递介质,在 TLR 介导的先天性免疫和炎症反应中发挥关键作用。本研究利用多种蛋白质分析工具对 Rv3529c 蛋白进行生物信息学分析,预测其结构和功能,并在此基础上对其进行原核表达,为进一步了解该蛋白在 MTB

致病机制中的作用及后续试验提供基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 质粒、菌株 pET-32a 质粒载体及大肠埃希菌 BL21(DE3) 感受态细胞为本实验室保存; pET-32a-Rv3529c 重组质粒由生工生物工程(上海)股份有限公司构建。

1.1.2 主要试剂 Nco I 和 Xho I 限制性内切酶及 Taq 酶购自赛默飞世尔科技(中国)有限公司,质粒小提试剂盒、Pro-Light HRP 化学发光检测试剂购自天根生化科技(北京)有限公司,氨苄西林、IPTG、脱脂奶粉、小鼠抗 His 标签抗体、羊抗鼠二抗及 BCA 蛋白浓度检测试剂盒等试剂购自北京索莱宝科技有限公司, SDS-PAGE 凝胶电泳试剂购自上海雅酶生物科技有限公司, Ni Resin FF 购自南京金斯瑞生物科技有限公司。

1.2 方法

1.2.1 Rv3529c 基因核苷酸序列及编码蛋白氨基酸序列信息的获取 通过 UniProt 知识库 (UniProtKB)、NCBI Gene 数据库获取 MTB (菌株 H37Rv) Rv3529c 基因的核苷酸序列,以及该基因编码蛋白的氨基酸序列相关信息。

1.2.2 蛋白二、三级结构预测及绘图 采用 PredictProtein 服务^[5] 分析该蛋白的二级结构,采用 AlphaFold 系统^[6] 和 SWISS-MODEL 服务^[7] 共同预测该蛋白三级结构并建模。

1.2.3 蛋白特性及信号肽预测分析 选择 ProtParam 工具^[8] 对该蛋白的分子质量、等电点、氨基酸和原子组成、消光系数、半衰期、不稳定系数、脂肪族氨基酸指数等进行预测分析;运用 ProtScale^[8] 分析蛋白的亲疏水性;通过 SignalP-5.0 服务^[9] 预测蛋白的信号肽。

1.2.4 蛋白跨膜结构及亚细胞定位 运用 Deep-TMHMM 服务和 ProtCompB 方法预测分析该蛋白

的跨膜结构和亚细胞定位。

1.2.5 重组质粒 pET-32a-Rv3529c 的鉴定与转化 将重组质粒 pET-32a-Rv3529c 进行 Nco I 和 Xho I 双酶切鉴定,并对质粒进行测序验证,将鉴定后的重组质粒转入感受态 BL21(DE3)细胞,42℃热激后涂布在含有氨苄西林(50 μg/mL)的平板上,37℃培养。

1.2.6 重组蛋白的诱导表达 挑取上述单个菌落至含有氨苄西林(50 μg/mL)的液体培养基中,置于摇床培养,37℃,200 r/min。当 OD 值达到 0.6 时,添加 0.5 mmol 诱导剂 IPTG,为探究重组蛋白的优化表达条件,将菌液分别于 20℃条件下培养过夜,37℃条件下培养 6 h,未添加诱导剂的为阴性对照。

培养结束后用离心机 3 000 r/min 离心 10 min,弃上清,收集菌体。

1.2.7 重组蛋白的 Western Blot 鉴定与纯化 将收集的菌体用 PBS 重悬后超声破碎,4℃,12 500 r/min,离心 5 min,分别取上清及沉淀蛋白进行制样,选择 12%浓度 SDS-PAGE 电泳分析,为确定目的蛋白是否表达,按 Western Blot 步骤进行检测,一抗为鼠抗 His 标签,二抗为羊抗鼠,用 HRP 化学发光试剂显色。使用亲和层析 Ni 柱对超声破碎后的菌体沉淀进行纯化,纯化后使用不同浓度的尿素(8、6、4、2 mol/L)和 PBS 进行复性,最后用超滤离心管浓缩,收集蛋白质并用 BCA 法测定浓度。

1.2.8 序列比对分析及构建系统进化树 使用 UniProtKB 中自带的 Blast 工具,比对 Rv3529c 基

因编码的氨基酸序列,筛选出同源性较高的氨基酸序列,运用 MEGA 11 软件为筛选后的多条氨基酸序列构建进化树。

1.2.9 蛋白免疫表位分析 采用 IEDB 数据库预测该蛋白的 CD4⁺ T 细胞免疫原性^[10]及 B 细胞抗原表位^[11]。

1.2.10 蛋白相互作用分析 通过 STRING 数据库^[12]分析 Rv3529c 基因编码蛋白的蛋白质相互作用。

2 结果

2.1 Rv3529c 基因编码蛋白质的基本信息 通过查找和比对,MTB Rv3529c 基因编码的蛋白质条目为 I6YCC4,氨基酸总数共 384 个,基因编码为 CCP46351.1,Rv3529c 基因全长 1 155 bp,在基因组 NC_000962.3 中的位置为 3 965 884 至 3 967 038。

2.2 蛋白的二三级结构 Rv3529c 基因编码蛋白的二级结构预测结果如图 1 第一、三行所示,蓝色表示螺旋结构(helix),主要包括 α-螺旋,占蛋白质总长度的 51.04%;红色条带显示该蛋白含延展结构(strand)5.21%,主要指 β-折叠;其他结构(other)用黄色指示,共占蛋白质总长度的 43.75%,该蛋白质可以归类为混合类型(“Mixed”: Helix > 45% 且 Strand > 5%)。



图 1 Rv3529c 蛋白的二级结构预测结果

Figure 1 Prediction results of secondary structure of protein Rv3529c

该蛋白的三级结构建模如图 2 示,SWISS-MODEL 服务显示(图 2A)该蛋白与模板 2zq5.1.A 的序列一致性为 99.74%,该模板来自 MTB H37Rv 磺基转移酶 STF1 的晶体结构,三级结构的 GMQE 评分为 0.95,QMEANDisCo Global 评估分数为 0.91 ± 0.05 (分数范围为 0~1,分数越大模型质量越高)。建模显示该蛋白为单体蛋白,不含具有生物活性的配体。AlphaFold 系统建模(图 2B)与其相似度较高,说明该蛋白三级结构较为稳定,预测模型

可信度较高。

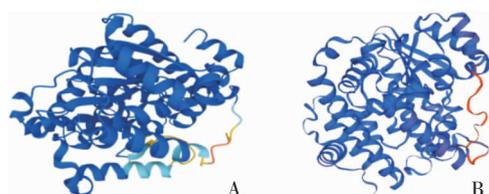
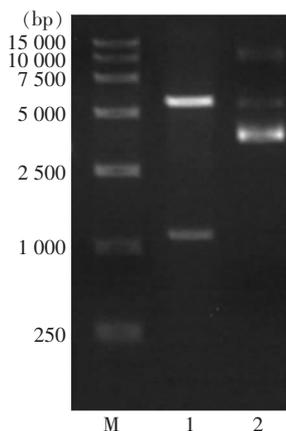


图 2 Rv3529c 蛋白的三级结构建模图

Figure 2 Modeling results of tertiary structure of protein Rv3529c

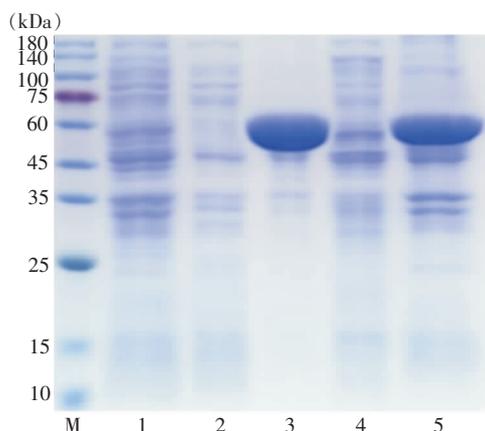


注:M为DNA Marker,1泳道为Nco I和Xho I消化后的质粒,2泳道为质粒。

图6 重组质粒酶切图谱

Figure 6 Recombinant plasmid digestion map

2.6 重组蛋白的诱导表达 在菌液中添加0.5 mmol诱导剂IPTG,并分别置于20、37℃条件下培养,取离心后菌体重悬,重悬菌液经超声破碎离心后得到上清与沉淀,将各条件下得到的上清与沉淀进行12%SDS-PAGE电泳。在20℃沉淀及37℃沉淀泳道中,约大于60 kDa的位置上出现明显的蛋白条带,条带的分子量大小与预测的Rv3529c蛋白质分子61 kDa大小一致(因连接含有His标签的pET-32a质粒),提示此蛋白可能为Rv3529c。见图7。



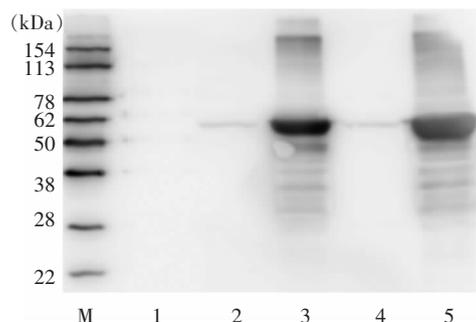
注:M为Protein Marker,1泳道为诱导前总蛋白,2泳道为20℃上清,3泳道为20℃沉淀,4泳道为37℃上清,5泳道为37℃沉淀。

图7 Rv3529c蛋白SDS-PAGE电泳结果

Figure 7 SDS-PAGE electrophoresis results of protein Rv3529c

2.7 重组蛋白的Western Blot鉴定结果及纯化 进行Western Blot鉴定,结果显示重组蛋白能被抗His标签单克隆抗体识别,识别得到条带均在62 kDa附

近,与预测分子量61 kDa相符合,表明成功诱导获得Rv3529c蛋白,蛋白以包涵体形式存在于沉淀中,见图8。纯化并浓缩后经BCA法测蛋白浓度,测得蛋白浓度为0.630 mg/mL,见图9。



注:M为Protein Marker,1泳道为诱导前总蛋白,2泳道为20℃上清,3泳道为20℃沉淀,4泳道为37℃上清,5泳道为37℃。

图8 Rv3529c蛋白的Western Blot鉴定结果

Figure 8 Western Blot identification results of protein Rv3529c

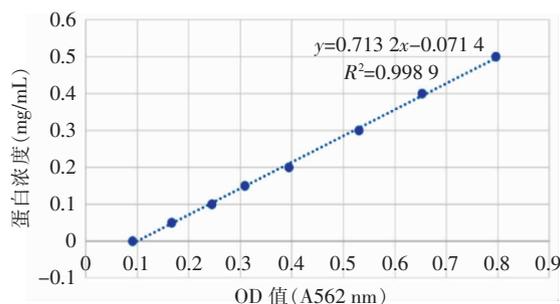


图9 BCA蛋白浓度测定标准曲线

Figure 9 Standard curve of protein concentration determined by BCA method

2.8 蛋白的系统进化树 经氨基酸序列比对后,MTB H37Rv菌种Rv3529c基因编码的蛋白与Mycobacterium riyadhense、Mycobacterium shinjukuense、嗜血分枝杆菌(Mycobacterium haemophilum)、未分类的分枝杆菌(unclassified Mycobacterium)、副结核分枝杆菌(Mycobacterium paratuberculosis)、鸟分枝杆菌亚种(Mycobacterium avium subsp. avium)均比对出高相似度氨基酸序列,UniProtKB中蛋白质条目分别为A0A1X2CIH0、A0A7I7MV45、A0A0I9TAB7、A0A1A0MHC8、Q743Q4、X8B0C4,序列相似覆盖区域分别为90.4%、89.6%、86.7%、88.7%、88.7%、88.7%,用MEGA11软件构建系统进化树,结果见图10,表明该蛋白与多个菌株中的蛋白质起源相近,具有较高的同源性。

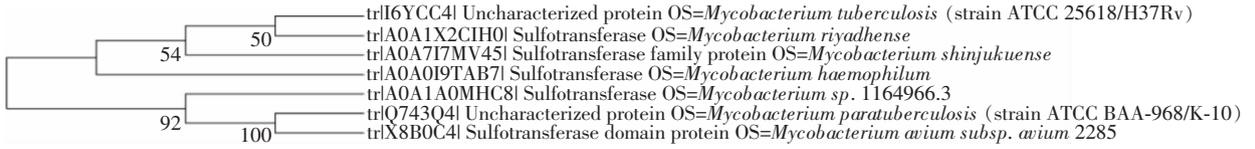


图 10 Rv3529c 蛋白的系统进化树

Figure 10 Phylogenetic tree of protein Rv3529c

2.9 蛋白 T 细胞及 B 细胞抗原抗体表位 运用 IEDB 数据库预测 CD4⁺ T 细胞的免疫原性,最大综合得分阈值默认为 50,返回 6 个可识别性较高的结果。见表 1。

通过 IEDB 分析预测 B 细胞抗体表位,结果见图 11。其中,4-14、24-38、49-55、80-88、127-145、151-177、183-210、221、273-282、345-346、348-377 共 11 组氨基酸为 B 细胞优势表位,可作为抗体识别靶点,最大得分 0.658。

2.10 蛋白相互作用网络 查询 STRING 数据库后,获得与 Rv3529c 蛋白相互作用的蛋白有 Rv3531c、Rv3530c、Rv3888c、Rv0310c、kshA、Rv0760c、hsaA、hsaC、Rv3527 和 kstR(见图 12)。通过分析 Rv3529c 的相互作用蛋白,推测 Rv3529c 可能在活化的巨噬

细胞内参与氧化还原反应,参与细胞内被吞噬的微生物代谢,调节宿主体内细胞的转录反应。

表 1 Rv3529c 蛋白 CD4⁺ T 细胞免疫原性预测结果

Table 1 Prediction results of CD4⁺ T cell immunogenicity of protein Rv3529c

多肽序列	起始位	终止位	综合评分	免疫原性评分
AGLTVLGSKMNRFFL	51	65	45.861	86.153
NRFFLRGALVARLLS	61	75	45.209	89.023
VTGLVRTGTTALHRL	96	110	47.951	95.876
KRWVLKNPSHLFALD	226	240	43.266	95.264
KNPSHLFALDALMAT	231	245	48.939	96.848
GLERFNAARAKYDSA	296	310	43.077	82.192

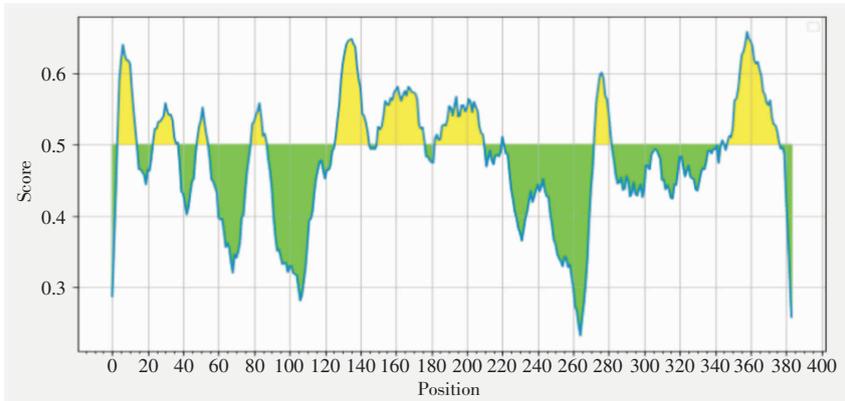


图 11 Rv3529c 蛋白线性抗体表位预测结果

Figure 11 Prediction results of linear antibody epitope of protein Rv3529c

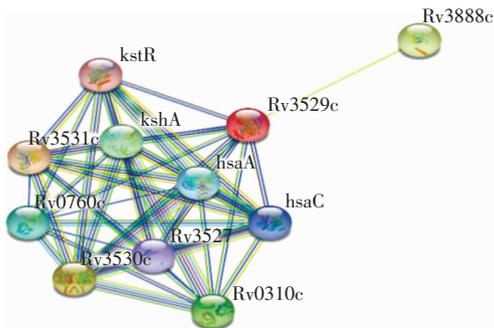


图 12 与 Rv3529c 蛋白相互作用的蛋白示意图

Figure 12 Schematic diagram of proteins interacting with protein Rv3529c

3 讨论

宿主为防御病原体的侵袭演化出多种防御机制,参与抵抗 MTB 的免疫反应主要为固有免疫反应。体内巨噬细胞接触 MTB 后,首先是位于这些细胞表面或细胞质溶胶中的模式识别受体(pattern recognition receptors, PRRs)识别微生物相关分子模式(microbe-associated molecular patterns, MAMPs)^[13]。不同组巨噬细胞 PRRs 识别 MTB 的不同组 MAMPs,这些 PRRs 触发固有免疫应答,对抗被宿主细胞识

别为异物的分子。一组称为 TLR 的 PRRs 识别 MTB,可触发细胞信号传导,推测诱导可控制感染的促炎症反应^[14]。

目前在人类和小鼠中共鉴定出 13 个 TLRs,TLR2 是其中重要的一员,也被称为 CD282。作为一种膜表面受体,TLR2 可识别许多细菌、真菌、病毒和某些内源性物质。TLR2 在 MTB 感染期间过度表达,MTB 中的脂甘露聚糖(lipomannan)等成分可作为 TLR2 的激动剂^[15]。致病相关分子可与 TLRs 和 MyD88 的 toll-白细胞介素 1 受体(toll-interleukin 1 receptor, TIR)结构域结合。MyD88 是一种通用衔接蛋白,几乎所有 TLRs(TLR3 除外)都用其激活核因子 κ B(nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells, NF- κ B)。这种相互作用激活 IRAK-1、肿瘤坏死因子 α 相关因子(tumor necrosis factor α -related factor, TRAF)和干扰素 β (interferon β , IFN- β)诱导的 TIR 携带分子(TIR-carrying molecule, TIRAK),并向细胞核传递 TLR 的激活信号^[16]。TNF- α 和 IL-1 水平升高后在细胞核中启动对 MTB 的免疫反应^[17]。

相对的,MTB 也演化出多种自我保护策略,以破坏这些宿主免疫应答,达到在宿主内长期存活的目的。MTB 逃避机体免疫的机制主要有融合吞噬溶酶体和产生有毒的活性氮中间体等^[18]。MTB 免疫逃逸的另一种策略是在其蛋白质中加入与宿主中不同蛋白质结构域相似的结构域。MyD88 介导先天免疫中许多重要的信号转导途径。MyD88 不仅在产生炎症反应方面发挥着关键作用,而且在诱导调节信号以防止肺部过度炎症和细胞损伤方面发挥着关键作用。许多参与吞噬后续过程的基因都依赖于 MyD88。除了在吞噬作用中发挥核心作用外,MyD88 对人类单核细胞和小鼠巨噬细胞吞噬体中细菌降解后发生的下游 TLR 激活和信号传导至关重要。细菌被吞噬后,在吞噬体的酸性环境中被激活的宿主酶和内体 TLR 受体可以识别其细菌配体。一旦这些细菌衍生配体在内化和降解后被释放,即可从吞噬体启动 TLR 依赖性反应^[16]。MTB 中的 Rv3529c 蛋白与 MyD88 的死亡结构域显著相似。用 Rv3529c 孵育巨噬细胞可特异性抑制 TLR2 介导的促炎症反应,用 Rv3529c 蛋白培养巨噬细胞可增加巨噬细胞内的细菌负荷^[4]。因此,针对 Rv3529c 蛋白进行研究可进一步了解 MTB 与 TLRs 及其相关通路的致病机制。

经生物信息学预测分析后,由 MTB Rv3529c

基因合成的蛋白分子式为 $C_{1930}H_{2959}N_{547}O_{569}S_{13}$,分子量大小为 43 345.83;二级结构以 α -螺旋为主, β -折叠占比较低;理论等电点为 6.04,连接 pET-32a 质粒后表达的蛋白分子量有所增加,理论等电点略有增大,对蛋白质的上清表达会产生一定影响;氨基酸总数为 384 个,丙氨酸、亮氨酸占比较高,同时含有一定量的半胱氨酸,半胱氨酸可影响蛋白质在水溶液中的消光系数。经生信软件预测可知 Rv3529c 蛋白的脂肪族氨基酸指数较高,不稳定指数较低,可在大肠埃希菌体内长期存在,说明该蛋白稳定性和热稳定性均较高,适合原核表达后长期保存。预测该蛋白的总平均亲水性为 -0.388,推测该蛋白为可溶性表达,但实际表达后主要为不溶性形式的蛋白,其原因可能是虽然蛋白总平均亲水性较高,但连接 pET-32a 质粒后总蛋白亲水性发生改变,后续试验考虑对原核表达后的蛋白进行复性或改变条件,从而诱导蛋白在上清中表达。生信分析可知 Rv3529c 蛋白无信号肽且非跨膜蛋白。原核表达前需用双酶切验证重组质粒的构建,确保正确表达蛋白,经大量诱导活化后破碎细菌,提取蛋白,将蛋白上样处理后进行 SDS-PAGE 电泳并做 WB 验证,确定提取出目的蛋白。多序列比对显示,Rv3529c 蛋白与嗜血分枝杆菌等菌种中表达的蛋白有较高的同源性,与鸟分枝杆菌中表达的蛋白可能有共同起源。抗原抗体表位分析结果显示,Rv3529c 蛋白有 11 组 B 细胞抗体表位,其中 127-145、348-377 是该蛋白优势表位,预测分析后返回 6 组高识别度 T 细胞免疫原性位点。蛋白互作分析结果显示,Rv3529c 蛋白与 MTB 中分泌的多个蛋白有相互作用,预测其相互作用多为基因共现(gene co-occurrence),其中 kshA、hsaA、hsaC 等蛋白主要参与胆固醇的降解,胆固醇代谢可帮助处于感染早期阶段的细菌繁殖和播散,有助于 MTB 在宿主中的存活;kstR 蛋白则控制利用各种脂质作为能源的基因的表达;综上所述,推测 Rv3529c 蛋白可参与细胞内及细胞间的氧化还原代谢反应,抑制细胞凋亡,帮助 MTB 免疫逃逸。

本研究对 MTB 中 Rv3529c 基因编码的蛋白进行了多维的生物信息学分析,成功构建了 Rv3529c 蛋白的原核表达载体,并检测了 Rv3529c 蛋白的表达特性。生物信息学对蛋白进行分析得出的结论为理论结果,本研究对 Rv3529c 蛋白的理化性质仅进行初步的预测和分析,蛋白性状在细菌体内进行折叠、磷酸化等过程后会出现一些不可预知的变化。因此,仍有必要运用高端仪器对蛋白进行多方面

验。本研究结果显示, Rv3529c 蛋白在离心后的细菌裂解液中主要以沉淀形式存在, 说明该蛋白在原核表达过程中易形成包涵体, 所以优先考虑从沉淀中纯化该蛋白。从沉淀中纯化的操作步骤相对繁琐, 需保持蛋白的活性, 为进一步试验做好准备。Rv3529c 蛋白是 MTB 中的重要蛋白, 对其作用机体的机制尚不完全明确, 深入研究 Rv3529c 蛋白的免疫学特性及结构功能特征, 可为 MTB 的靶向治疗提供新思路。本研究可为进一步研究 Rv3529c 蛋白的结构、功能、理化性质明确方向, 也可为进一步揭示 MTB 的致病机制提供参考。

利益冲突: 所有作者均声明不存在利益冲突。

[参考文献]

- [1] World Health Organization. Global tuberculosis report 2020 [EB/OL]. (2020 - 10 - 15)[2022 - 11 - 10]. <https://www.who.int/publications/i/item/9789240013131>.
- [2] Victoria S, Temerozo JR, Gobbo L, et al. Activation of toll-like receptor 2 increases macrophage resistance to HIV-1 infection[J]. Immunobiology, 2013, 218(12): 1529 - 1536.
- [3] Underhill DM, Ozinsky A, Smith KD, et al. Toll-like receptor-2 mediates mycobacteria-induced proinflammatory signaling in macrophages[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999, 96(25): 14459 - 14463.
- [4] Bandyopadhyay U, Chadha A, Gupta P, et al. Suppression of toll-like receptor 2-mediated proinflammatory responses by *Mycobacterium tuberculosis* protein Rv3529c[J]. J Leukoc Biol, 2017, 102(5): 1249 - 1259.
- [5] Rost B, Sander C. Prediction of protein secondary structure at better than 70% accuracy[J]. J Mol Biol, 1993, 232(2): 584 - 599.
- [6] Jumper J, Evans R, Pritzel A, et al. Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold[J]. Nature, 2021, 596(7873): 583 - 589.
- [7] Waterhouse A, Bertoni M, Bienert S, et al. SWISS-MODEL: homology modelling of protein structures and complexes[J]. Nucleic Acids Res, 2018, 46(W1): W296 - W303.
- [8] Wilkins MR, Gasteiger E, Bairoch A, et al. Protein identification and analysis tools in the ExPASy server[J]. Methods Mol Biol, 1999, 112: 531 - 552.
- [9] Almagro Armenteros JJ, Tsirigos KD, Sønderby CK, et al.

SignalP 5.0 improves signal peptide predictions using deep neural networks[J]. Nat Biotechnol, 2019, 37(4): 420 - 423.

- [10] Dhanda SK, Karosiene E, Edwards L, et al. Predicting HLA CD4 immunogenicity in human populations[J]. Front Immunol, 2018, 9: 1369.
- [11] Jespersen MC, Peters B, Nielsen M, et al. BepiPred-2.0: improving sequence-based B-cell epitope prediction using conformational epitopes[J]. Nucleic Acids Res, 2017, 45(W1): W24 - W29.
- [12] Szklarczyk D, Gable AL, Lyon D, et al. STRING v11: protein-protein association networks with increased coverage, supporting functional discovery in genome-wide experimental datasets[J]. Nucleic Acids Res, 2019, 47(D1): D607 - D613.
- [13] Weiss G, Schaible UE. Macrophage defense mechanisms against intracellular bacteria[J]. Immunol Rev, 2015, 264(1): 182 - 203.
- [14] Kawai T, Akira S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on toll-like receptors[J]. Nat Immunol, 2010, 11(5): 373 - 384.
- [15] Shukla S, Richardson ET, Drage MG, et al. *Mycobacterium tuberculosis* lipoprotein and lipoglycan binding to toll-like receptor 2 correlates with agonist activity and functional outcomes[J]. Infect Immun, 2018, 86(10): e00450 - 18.
- [16] Cervantes JL. MYD88 in *Mycobacterium tuberculosis* infection[J]. Med Microbiol Immunol, 2017, 206(3): 187 - 193.
- [17] Biyikli OO, Baysak A, Ece G, et al. Role of toll-like receptors in tuberculosis infection[J]. Jundishapur J Microbiol, 2016, 9(10): e20224.
- [18] Madan-Lala R, Peixoto KV, Re F, et al. *Mycobacterium tuberculosis* Hip1 dampens macrophage proinflammatory responses by limiting toll-like receptor 2 activation[J]. Infect Immun, 2011, 79(12): 4828 - 4838.

(本文编辑: 文细毛)

本文引用格式: 陈瑞枫, 王瑄, 马枫茜, 等. 结核分枝杆菌 Rv3529c 蛋白的生信分析及原核表达[J]. 中国感染控制杂志, 2023, 22(6): 621 - 628. DOI: 10.12138/j.issn.1671-9638.20233642.

Cite this article as: CHEN Rui-feng, WANG Xuan, MA Feng-xi, et al. Bioinformatics analysis and prokaryotic expression of the protein Rv3529c of *Mycobacterium tuberculosis*[J]. Chin J Infect Control, 2023, 22(6): 621 - 628. DOI: 10.12138/j.issn.1671-9638.20233642.