



结核分枝杆菌Rv3194c蛋白的表达、纯化及活性鉴定

赵东岳^{1*}, 林莉莉¹, 温福利²

¹ 福建师范大学南方生物医学研究中心, 福建 福州 350117

² 南京军区福州总医院比较医学科, 福建 福州 350025

摘要: 【目的】Rv3194c基因编码的是结核分枝杆菌的PDZ信号蛋白, 本研究对其是否具有黏附素特性进行了探索。【方法】对Rv3194c进行原核表达, 然后Rv3194c蛋白分别与透明质酸、硫酸软骨素、I型胶原蛋白在不同温度(37、38、39、40 °C)的缓冲液中孵育过夜, 然后用Western blot和ELISA分析其上清液中组分含量的变化。【结果】Western blot鉴定结果表明, His-Rv3194c蛋白以可溶形式表达, 蛋白质的分子质量大小为35 kDa。Western blot表明, 39 °C实验组的上清中His-Rv3194c蛋白含量(** $P < 0.001$)显著小于其它实验组(37、38、40 °C); ELISA表明, 39 °C实验组的上清中透明质酸(HA)、硫酸软骨素(CS)、I型胶原蛋白(Collagen I)的含量(** $P < 0.001$)极显著小于其它实验组(37、38、40 °C)。【结论】首次证实了Rv3194c蛋白具有黏附素特性, 可成为研发新型抗结核药物的靶点蛋白。

关键词: 结核分枝杆菌, Rv3194c蛋白, 透明质酸、硫酸软骨素、I型胶原蛋白

结核病是由结核分枝杆菌(*Mycobacterium tuberculosis*)和牛分枝杆菌引起的人畜共患的慢性消耗性传染病, 该病极易传染, 除人外还可感染牛、羊、鹿等动物, 被世界动物卫生组织列为B类动物疫病^[1]。对人类有致病性主要有人型^[2]、牛型^[3]和非洲型^[4]结核分枝杆菌, 其中以人型结核分枝杆菌感染最常见并且致病力最强, 可感染几年而没有临床症状^[5]。结核分枝杆菌是胞内寄生菌, 不产生内外毒素, 其致病变存在以下特点^[6]: 当机体抵抗力强时以器官组织发生增生为主; 机体抵抗力弱时以器官组织发生渗出性炎症为主;

或者两种情况混合存在。结核分枝杆菌的致病机制可能与细菌在组织细胞内大量繁殖引起的炎症反应^[7], 以及菌体成分^[8]或者代谢产物对机体免疫系统产生免疫损伤有着直接关系^[9-10]。抗结核药物(利福平、异烟肼、乙胺丁醇、吡嗪酰胺和链霉素等)在结核病的控制中发挥了巨大作用, 但是由于长期用药引起的耐药菌株的出现^[11], 使结核病的发病呈现回升现象, 因此新型抗结核药物的开发迫在眉睫。本课题选取的结核分枝杆菌Rv3194c蛋白的结构和功能, 至今尚未有文献报道, 经生物信息学预测, 该蛋白含有PDZ [Post-synaptic

基金项目: 福建省科技计划引导性项目(2015Y0075); 南京军区福州总医院临床应用研究专项(2015L01)

*通信作者。Tel: +86-591-22860765; E-mail: mountain@fjnu.edu.cn

收稿日期: 2016-01-14; 修回日期: 2016-04-13; 网络出版日期: 2016-06-03

density-95 (PSD-95), *Drosophila* tumor suppressor protein diskslarge-1 (DLG), the tight junction protein zonula occludentes 1 (ZO-1)]结构域, 其结构域位于Rv3194c氨基酸序列的125-193AA (膜外段)。从蛋白质组学的角度讲, PDZ结构域分布广泛, 结合机制多样, 对蛋白与蛋白相互作用起着特殊的调节作用^[12], 富含PDZ结构域的蛋白通常是蛋白相互作用的“节点”, 该结构域功能的特殊性使其成为下一代药物的理想靶标^[13], 针对PDZ结构域设计的药物可特异性阻断与其特定配体之间的相互作用, 切断其信号传导, 为相关疾病的治疗提供新途径^[14-15]。PDZ结构域大约由90个氨基酸组成, 主体是一个比较典型的 β -桶结构, 两端被一大、一小2个 α 螺旋封住, 形成一个球形的三维空间构型能与配体蛋白的羧基C-末端的小肽通过反向的 β 折叠插入球状的疏水口袋中^[16]; 也可非常规的结合配体内部的一些有规律的序列(nNOS可结合Vac14的-GDHL-序列^[17]); 或者直接与蛋白结构域相互作用形成同源或者异源二聚体、多聚体甚至是寡聚体^[18]。基于该结构域的空间构象具有一定灵活性特点, 因此Rv3194c蛋白不仅可以结合多肽和脂质配体, 而且还有可能会结合多糖类分子、DNA以及RNA等^[16]。因此, Rv3194c蛋白胞外段的PDZ结构域是否具有黏附素特性, 能否成为抗结核药物的新靶标, 非常具有研究意义。结核分枝杆菌入侵宿主以及在宿主体内扩散的过程中黏附素发挥着重要作用, 而且随着体温的升高更有利于其功能发挥^[19-20], 所以基于体内扩散的特点本实验体外建立不同温度的孵育体系(37、38、39、40 °C), 初步探索Rv3194c蛋白所执行的生物学功能。

1 材料和方法

1.1 质粒、基因组DNA和菌种

结核分枝杆菌H37Rv基因组、大肠杆菌DH5 α 和BL21菌株均为笔者所在实验室保存; 原核表达

质粒pET-28a购自Novagen公司。

1.2 主要试剂

DL2000 核酸Marker、限制性内切酶Nde I 和EcoR I、T4 DNA连接酶、Primer star高保真酶、蛋白质预染Marker、购自Fermentas公司; 质粒提取试剂盒、胶回收试剂盒和PCR纯化试剂盒均购于Omega公司; 小鼠抗His-tag单克隆抗体购自Novagen; Alexa Fluor 488标记的山羊抗鼠IgG的荧光二抗购自Invitrogen公司; 硝酸纤维素膜(NC膜)购自Millipore公司; I型胶原蛋白、透明质酸、硫酸软骨素、Tris、咪唑购于Sigma-aldrich公司; 透明质酸(HA)ELISA分析试剂盒、硫酸软骨素(CS)ELISA分析试剂盒、I型胶原蛋白ELISA分析试剂盒均购自上海谷研实业有限公司。

1.3 Rv3194c蛋白的预测分析

用TMHMM 2.0跨膜区预测服务器对Rv3194c蛋白(Accession: AFN51190)进行跨膜区预测, 发现Rv3194c蛋白含有一个跨膜区, 1-4个氨基酸位于膜内, 5-27个氨基酸位于跨膜区域, 28-340个氨基酸位于膜外。通过SignalP 4.1信号肽预测服务器并未预测到信号肽序列。通过蛋白质分析专家系统(Expert protein analysis system, 简称ExpPASy)下的ProtParam, 分析Rv3194c (28-340AA)的分子量约为35 kDa。根据NCBI中Rv3194c基因(Gene ID:13318007)序列, 用primer 5.0设计细胞膜外的碱基序列, 预计扩增924 bp (100-1023 bp)。根据其序列和pET-28a载体酶切位点的特点, 在引物上下游的5'端分别设计Nde I (CATATG, 下划线处)、EcoR I (GAATTC, 下划线处) 酶切位点, 引物序列如下(引物合成由博尚生物技术有限公司完成): F: 5'-CATATGCCCGGCCCAACGTTC-3'; R: 5'-GAATTCCCTAGCAGCTCGGCGTC-3'。

1.4 Rv3194c的克隆

Rv3194c基因片段的PCR扩增体系(50 μ L): 结核分枝杆菌H37Rv基因组DNA 1 μ L (100 ng DNA),

Primer star Max DNA polymerase 25 μL ; 10 $\mu\text{mol/L}$ 上下游引物各1 μL ; ddH₂O 22 μL 。PCR扩增参数为: 94 $^{\circ}\text{C}$ 5 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 57 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 35个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 10 min。PCR扩增完成后, 割胶回收并用PCR产物纯化试剂盒进行纯化。用限制性内切酶*Nde* I 和*Eco*R I 对pET-28a载体和*Rv3194c*基因扩增片段进行双酶切, *Rv3194c*基因片段的双酶切体系(50 μL): *Rv3194c*基因片段 25 μL , *Nde* I 2.5 μL , *Eco*R I 2.5 μL , 10 \times 缓冲液 5 μL , ddH₂O 15 μL 。pET-28a载体双酶切体系(20 μL): pET-28a 6 μL , *Nde* I 1.0 μL , *Eco*R I 1.0 μL , 10 \times 缓冲液 2 μL , ddH₂O 10 μL 。37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴酶切1.5 h, 1%的琼脂糖凝胶电泳回收带有粘性末端的*Rv3194c*基因片段和质粒pET-28a。pET28a-*Rv3194c*重组质粒的连接体系(10 μL): 酶切后*Rv3194c*基因片段 6 μL , pET-28a载体 1 μL , T4 DNA连接酶 1 μL , 连接缓冲液 1 μL , ddH₂O 1 μL , 16 $^{\circ}\text{C}$ 连接过夜。重组pET-28a-*Rv3194c*质粒的转化: 100 μL DH5 α 感受态细胞中加入10 μL 连接产物, 冰上静置30 min; 轻轻地放入42 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中热激60 s, 再放在冰上冰浴2 min; 向管中加入800 μL 37 $^{\circ}\text{C}$ 预热的无抗LB培养基, 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴1 h, 每30 min颠倒1次; 12000 r/min离心2 min, 吸掉大部分培养液, 剩余的100 μL 培养液将沉淀悬起, 用灭菌的玻璃棒均匀地涂布在K⁺抗性的LB平板上, 37 $^{\circ}\text{C}$ 倒置过夜培养, 16–24 h可见白色菌落。从平板上挑取单克隆菌落接种到K⁺抗性的LB培养液中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 过夜培养后, 用质粒提取试剂盒提取重组质粒。重组pET-28a-*Rv3194c*质粒的双酶切反应体系(20 μL): 重组质粒 10 μL , *Nde* I 1.0 μL , *Eco*R I 1.0 μL , 10 \times 缓冲液 2 μL , ddH₂O 6 μL , 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴2.0 h, 琼脂糖凝胶电泳鉴定酶切结果。

1.5 His-Rv3194c融合蛋白的表达

将测序完全正确的重组pET-28a-*Rv3194c*原核表达质粒转化到BL21感受态细胞中, 涂于K⁺抗性的LB固体平板上, 37 $^{\circ}\text{C}$ 过夜培养; 挑取单克隆

大肠杆菌接种到5 mL LB (50 $\mu\text{g/mL}$ K⁺)液体培养基中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 振荡培养过夜; 过夜培养的菌液按照1:200比例接种到含有K⁺抗性LB液体培养基中, 然后37 $^{\circ}\text{C}$ 振荡培养至OD₆₀₀值0.6–0.8; 冷却后加入IPTG (终浓度为1 mmol/L), 摇床温度在23 $^{\circ}\text{C}$ 、振幅180 r/min、IPTG终浓度为1 mmol/L条件下诱导12 h; 离心机10000 r/min, 离心5 min后收集菌体细胞沉淀用4 $^{\circ}\text{C}$ 预冷重悬液(20 mmol/L Tris-HCl、150 mmol/L氯化钠、10%甘油、pH 8.0)悬浮菌体(1 L菌液用80 mL), 于冰水混合物中进行超声波破碎(400 W, 每5 s、间隔5 s, 共30 min), 待细胞破碎后溶液浑浊度降低且不再粘稠, 然后在4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下10000 r/min离心 15 min, 收集上清液, 待亲和层析用。将超声破碎后的上清, 在4 $^{\circ}\text{C}$ 下通过装有预处理的Ni-NTA琼脂糖的介质柱, 使其自然通过层析柱, 反复挂柱3遍, 每过完1次柱用平衡液(20 mmol/L Tris-HCl、500 mmol/L氯化钠、50 mmol/L咪唑、10%甘油pH 8.0)冲洗一个柱体积, 以冲掉部分非特异性结合的蛋白, 提供更多空间供目的蛋白结合; 用100 mL洗杂液(20 mmol/L Tris-HCl、500 mmol/L氯化钠、1% OB-2、80 mmol/L咪唑、10%甘油 pH 8.0)冲洗挂过蛋白的Ni-NTA琼脂糖介质柱; 用5 mL洗脱液(20 mmol/L Tris-HCl、150 mmol/L氯化钠、5%甘油、200 mmol/L咪唑、pH 7.4)洗脱并收集洗脱液然后用集30 kDa的浓缩管浓缩至1 mL。凝胶过滤层析: 将Superdex 200预装柱安装到AKTA蛋白纯化仪上, 用0.22 μm 超滤膜抽滤过的缓冲液(20 mmol/L Tris pH 7.5)平衡5个柱体积; 将超滤管浓缩后的蛋白样品进行上样, 启动程序, 进样速度为0.5 mL/min; 收集不同时间的穿过组份, 每管收集1 mL, 并进行SDS-PAGE, 检验分离纯化效果。

1.6 His-Rv3194c 融合蛋白的Western-blot分析

凝胶过滤层析后的His-Rv3194c融合蛋白进行SDS-PAGE分析, 分离胶和浓缩胶的浓度分别是10%和5%, 每块胶在恒流25 mA条件下电泳进行

浓缩, 进入分离胶后在调至恒压120 V, 待溴酚蓝指示剂接近底部时立即停止电泳, 然后分离胶和硝酸纤维膜(NC)全部放入转移缓冲液(39 mmol/L 甘氨酸、48 mmol/L Tris-HCl、20% 甲醇、0.037% SDS)浸泡15 min; 按照顺序把滤纸、胶、NC膜叠放整齐, 放在半干转印仪上, 注意赶气泡, 接通电源15 V, 转印30 min; 按照0.1 mL/cm²加入封闭液[50 mmol/L Tris-HCl (pH 7.5), 150 mmol/L NaCl, 5% 脱脂奶粉、0.02% NaN₃]置于适宜大小的塑料袋中, 室温旋转封闭2 h; 用PBST(0.01 mol/L PBS, pH 7.4, 0.05% Tween20)在摇床上洗膜, 共洗3次, 每次10 min; 鼠抗His标签蛋白单克隆抗体用封闭液按照1:2000的比例稀释, 然后37 °C 孵育1 h; 取出NC膜洗涤方法同上; Alexa Fluor 800标记的山羊抗鼠IgG的荧光二抗用PBST以1:10000的比例稀释, 37 °C孵育1 h; 取出NC膜洗涤方法同上。用红、绿双色荧光成像系统检测。

1.7 His-Rv3194c 蛋白与透明质酸(HA)、硫酸软骨素(CS)的相互作用

将100 μL的His-Rv3194c蛋白(2 mg/mL)分别加入到400 μL的HA反应缓冲体系(2.5 mmol/L HA, 20 mmol/L Tris-HCl, 150 mmol/L NaCl, 1 mmol/L DTT, pH 7.4)和400 μL的CS反应缓冲体系(4.0 mmol/L CS, 20 mmol/L Tris-HCl, 150 mmol/L NaCl, 1 mmol/L DTT, pH 7.4); 阴性对照组用已知不与HA、CS相互作用的融合蛋白GAPDH (2 mg/mL)(His-GAPDH) 100 μL分别加入到400 μL HA反应缓冲体系和400 μL的CS反应缓冲体系。试验组和对照组分别在37、38、39、40 °C孵育16 h, 然后10000 r/min离心3 min, 分别取上清20 μL进行Western blot分析上清中His-Rv3194c蛋白量, ELISA分析上清中硫酸软骨素和透明质酸的量。

1.8 His-Rv3194c 蛋白与I型胶原蛋白(Collagen I)相互作用

将100 μL的His-Rv3194c蛋白(2 mg/mL)加到400 μL的I型胶原蛋白(2 mg/mL)反应缓冲体系

(100 mmol/L NaAC, 2.5 mmol/L DTT, pH 5.5); 阴性对照组用已知不与Collagen I相互作用的融合蛋白GAPDH (2 mg/mL)(His-GAPDH)100 μL加入到400 μL的Collagen I反应缓冲体系中。试验组和对照组分别在37、38、39、40 °C孵育20 h, 然后10000 r/min离心3 min, 分别取上清20 μL进行Western blot分析上清中His-Rv3194c蛋白量, ELISA分析上清中I型胶原蛋白的量

1.9 统计学分析

应用SPSS软件对试验数据进行方差分析和卡方检验, * $P < 0.05$ 为差异显著, ** $P < 0.005$ 为差异极显著。用Imagine J软件定量分析Western blot图谱。

2 结果和分析

2.1 Rv3194c基因的PCR扩增及重组质粒的双酶切鉴定

以结核杆菌标准株H37Rv基因组DNA和pET28a-RVBD 3194c重组质粒为模板, 用PCR分别扩增Rv3194c基因后, 经1%的琼脂糖凝胶电泳检测后发现扩增的目的片段(924 bp)大小与预期一致(图1)。获得重组质粒pET28a-Rv3194c经Nde I和EcoR I双酶切鉴定, 发现酶切条带与目的条带的大小相吻合, 证明重组质粒构建成功(图2)。

2.2 His-Rv3194c蛋白表达、纯化与Western blot鉴定

将构建好的质粒pET28a-Rv3194c转入大肠杆菌BL21表达株中, 以终浓度1 mmol/L IPTG于23 °C条件下诱导12 h, 收集菌液并超声破碎后, 在4 °C下自然通过装有预处理的Ni-NTA琼脂糖介质柱, 洗杂液洗杂后, 分别用200 mmol/L和500 mmol/L的咪唑洗脱, 收集洗脱液并浓缩。SDS-PAGE电泳发现, 用含有200 mmol/L咪唑的洗脱液(20 mmol/L Tris-HCl、150 mmol/L氯化钠、5%甘油、200 mmol/L

咪唑、pH 7.4)可获得一条高纯度的、约35 kDa的蛋白条带(见图 3), 与预期蛋白的大小相符。为进一步确定其表达的蛋白是否为目的蛋白, 应用Western blot技术, 以鼠抗His标签单克隆抗体检测该蛋白的表达情况, 发现在35 kDa处有一条清晰条带, 而空载体对照无此条带, 因此进一步鉴定了Rv3194c蛋白的可溶性表达(图 4)。

2.3 His-Rv3194c蛋白与透明质酸(HA)、硫酸软骨素(CS)与I型胶原蛋白(Collagen I)的相互作用

His-Rv3194c蛋白分别与透明质酸(HA)、硫酸

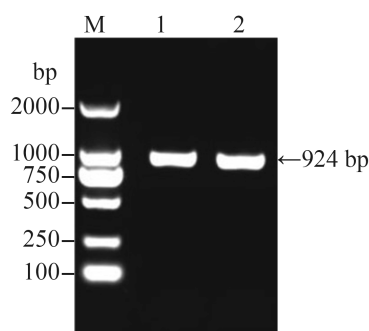


图 1. PCR扩增Rv3194c基因的产物

Figure 1. Production of *Rv3194c* gene amplified by PCR. M: DL2000 DNA marker; lane 1. *Rv3194c* gene was amplified from genomic DNA of *H37Rv* by PCR; lane 2: *Rv3194c* gene was amplified from recombinant plasmid pET28a-*Rv3194c* by PCR.

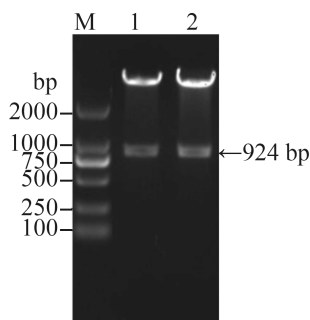


图 2. 重组质粒pET28a-Rv3194c的双酶切鉴定

Figure 2. Identification of recombinant plasmid pET28a-*Rv3194c* double digested with *Nde* I and *Eco*R I. M: DL2000 DNA marker; lane 1-2: products from recombinant plasmid pET28a-*Rv3194c* double digested with *Nde* I and *Eco*R I.

软骨素(CS)以及I型胶原蛋白(Collagen I)分别在39 °C的条件下孵育6 h后均出现絮状沉淀, 而其它孵育组(37、38、40 °C)上清中未出现絮状沉淀, 各孵育组反应20 h后终止反应, 然后10000 r/min, 离

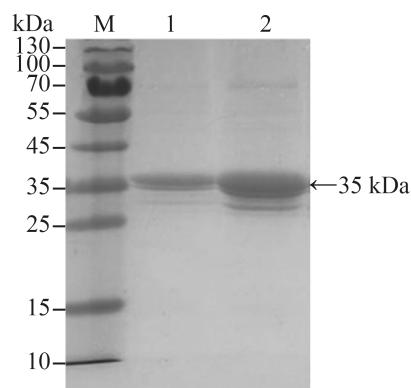


图 3. SDS-PAGE分析纯化后的原核表达产物His-Rv3194c蛋白

Figure 3. Purified analysis of His-Rv3194c protein expressed in prokaryotic system by SDS-PAGE. M: prestained protein marker; lane 1: His-Rv3194c protein expressed in prokaryotic system was purified by 500 mmol/L imidazole; lane 2: His-Rv3194c protein expressed in prokaryotic system was purified by 200 mmol/L imidazole.

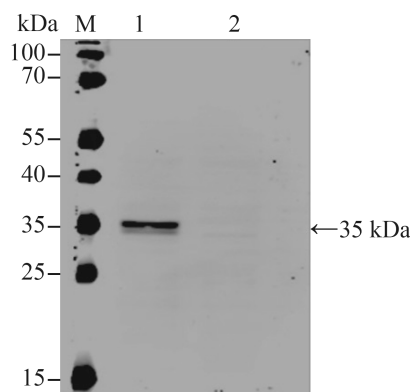


图 4. 融合蛋白His-Rv3194c的Western blot分析

Figure 4. Analysis of fusion protein His-Rv3194c by Western blot. M: prestained protein marker; lane 1: product induced by recombinant plasmid pET28a-*Rv3194c* was identified by Western blot; lane 2: product induced by empty vector pET28a was identified by Western blot.

心3 min, 收集上清液进行定量分析。从Western blot结果分析来看(见图 5-A、B、C), 39 °C 孵育组上清中His-Rv3194c蛋白量与其它孵育组(37、38、40 °C)比较差异极显著($***P<0.001$); 阴性对照组选择已知不与HA结合的GAPDH融合蛋白(His-GAPDH)在不同的孵育组(37、38、39、40 °C)反应, 发现各孵育组中His-GAPDH蛋白均未有显著变化, 从而排除His标签的非特异性结合。从ELISA结果分析来看, 39 °C 孵育组上清中的HA (图 6-A)、CS (图 6-B)以及Collagen I (图 6-C)与其

它孵育组(37、38、40 °C)比较差异极显著($***P<0.001$)。上述结果表明, His-Rv3194c蛋白可分别与透明质酸(HA)、硫酸软骨素(CS)以及I型胶原蛋白(Collagen I)相互结合并共同沉淀下来。

3 讨论

结核分枝杆菌(*Mycobacterium tuberculosis*)是胞内寄生菌, 致病性主要与糖脂和蛋白有关, 其中黏附素是结核分枝杆菌入侵宿主细胞的一种重要的物质。黏附素可介导结核分枝杆菌与宿主细

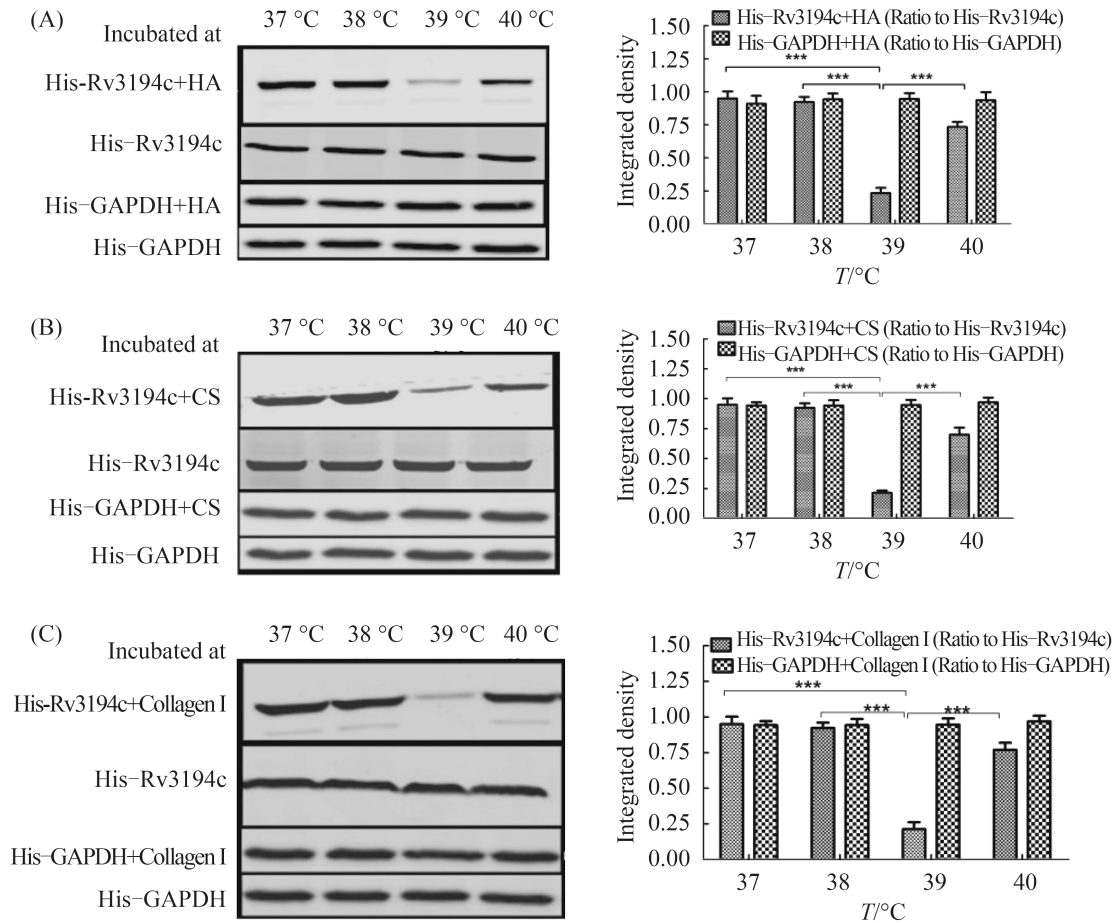


图 5. 上清中His-Rv3194c蛋白的Western blot定量分析

Figure 5. Quantitative analysis of His-Rv3194c protein in supernatant by Western blot 20 h after His-Rv3194c protein separately incubation with HA (A), CS (B) and Collagen I (C) at the different temperature (37, 38, 39, 40 °C), His-Rv3194c protein in supernatant was detected by Western blot; analysis of Western blot indicated that His-Rv3194c protein in supernatant of 39 °C experimental group was significantly less than that of other experimental groups ($***P<0.001$).

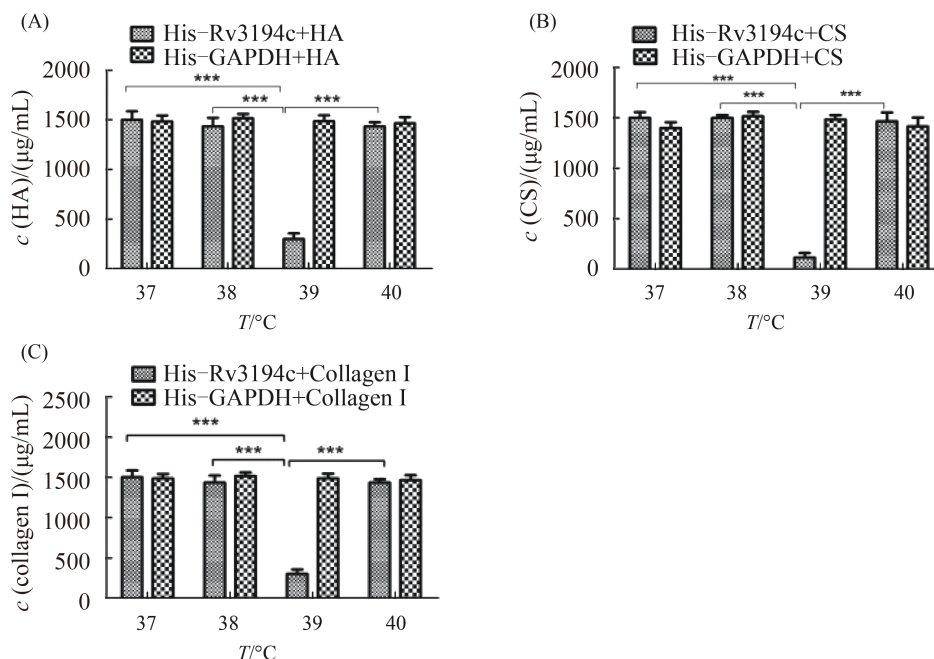


图 6. 上清组分的ELISA定量分析

Figure 6. Quantitative analysis of component in supernatant by ELISA 20 h after His-Rv3194c protein separately incubation with HA, CS and Collagen I at the different temperature (37, 38, 39, 40 °C), HA, CS and Collagen I in supernatant were quantified by ELISA; analysis of ELISA indicated that HA (A), CS (B) and Collagen I (C) in supernatant of 39 °C experimental group were significantly less than that of other experimental groups (** $P < 0.001$). Data in A, B and C are the mean \pm s.d. of triplicate samples.

胞外基质(EMC)和宿主细胞结合, 在结核分枝杆菌感染上皮细胞及其向其它组织扩散中发挥重要作用^[19]。本试验以pET28a为载体, *Rv3194c*基因经过PCR扩增后, 用*Nde* I 和*Eco*R I 双酶切, 然后将目的基因连接到pET28a载体上, 成功构建了含有6×His标签蛋白的重组质粒pET28a-*Rv3194c*。相对于其它载体而言, 该载体所带标签小, 自身没有信号肽, 对表达后的蛋白的空间结构和活性功能的影响较小, 有利于后续的研究工作。将构建好的重组质粒转入表达宿主BL21中进行表达, 得到了His-*Rv3194c*蛋白的高度表达, 但由于蛋白多数以包涵体的形式存在, 上清中溶解度比较小, 通过优化表达条件在IPTG终浓度为1 mmol/L、诱导温度23 °C条件下, 诱导12 h, 最终获得可溶性比较好的His-*Rv3194c*蛋白, 为后续目的蛋白的纯化和功能研究奠定了基础。结核分枝杆菌标准

株*Mycobacterium tuberculosis* H37Rv所编码的*Rv3194c*蛋白与*Mycobacterium tuberculosis* CDC1551株(牛源)、疫苗菌株BCG等多个菌株有100%的同源性。结核杆菌黏附素, 在结核杆菌入侵宿主以及结核杆菌在宿主体内的扩散过程中发挥重要作用, 而且体温升高更有利于其功能发挥^[20], 所以本实验体外建立不同温度的孵育体系(37、38、39、40 °C), 探索*Rv3194c*蛋白所执行的功能研究。实验数据表明, 在体外39 °C条件下His-*Rv3194c*蛋白分别与透明质酸、硫酸软骨素和I型胶原蛋白共同孵育上清中生成大量的絮状沉淀, 表明*Rv3194c*蛋白的胞外段可以与粘多糖和I型胶原蛋相互作用而结合在一起, 初步判断*Rv3194c*蛋白胞外段具有黏附素特性。本实验首次鉴定了*Rv3194c*蛋白与透明质酸、硫酸软骨素和I型胶原蛋白相互作用, 可能会成为研发抗结核

新型药物的靶点蛋白；初步判断Rv3194c蛋白具有结核杆菌黏附素特性。Rv3194c蛋白与粘多糖(HA, CS)相互作用产生的絮状沉淀, 是否与PDZ结构域结合粘多糖后而引起Rv3194c蛋白自身寡聚化而产生絮状沉淀, 有待于进一步研究。因此对Rv3194c蛋白功能更深入的了解还需要进行Rv3194c蛋白结晶等实验, 进一步寻找其功能域位置。

参考文献

- [1] O'Reilly LM, Daborn CJ. The epidemiology of *Mycobacterium bovis* infections in animals and man: a review. *Tubercle and Lung Disease*, 1995, 76(S1): 1–46.
- [2] Someya S, Hayashi O, Tajima Y, Endo M. Studies on the virulence of tubercle bacilli. III. The fate of human type and bovine type tubercle bacille in various organs of intravenously infected mice. *Kekkaku*, 1951, 26(2): 74–78.
- [3] Ascoli A. Reaction of the cholemic calf to *Mycobacterium tuberculosis*, bovine type. *Giornale Italiano Della Tubercolosi*, 1950, 4(3): 129–130.
- [4] Castets M, Boisvert H, Grumbach F, Brunel M, Rist N. Tuberculosis bacilli of the African type: preliminary note. *Revue de Tuberculose et de Pneumologie*, 1968, 32(2): 179–184.
- [5] Mikota SK, Peddie L, Peddie J, Isaza R, Dunker F, West G, Lindsay W, Larsen RS, Salman MD, Chatterjee D, Payeur J, Whipple D, Thoen C, Davis DS, Sedgwick C, Montali RJ, Ziccardi M, Maslow J. Epidemiology and diagnosis of *Mycobacterium tuberculosis* in captive Asian elephants (*Elephas maximus*). *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, 2001, 32(1): 1–16.
- [6] Wedlock DN, Skinner MA, de Lisle GW, Buddle BM. Control of *Mycobacterium bovis* infections and the risk to human populations. *Microbes and Infection*, 2002, 4(4): 471–480.
- [7] Roger PM, Bermudez LE. Infection of mice with *Mycobacterium avium* primes CD8⁺ lymphocytes for apoptosis upon exposure to macrophages. *Clinical Immunology*, 2001, 99(3): 378–386.
- [8] Delogu G, Pusceddu C, Bua A, Fadda G, Brennan MJ, Zanetti S. Rv1818c-encoded PE_PGRS protein of *Mycobacterium tuberculosis* is surface exposed and influences bacterial cell structure. *Molecular Microbiology*, 2004, 52(3): 725–733.
- [9] Smith I. *Mycobacterium tuberculosis* pathogenesis is and molecular determinants of virulence. *Clinical Microbiology Reviews*, 2003, 16(3): 463–496.
- [10] Rojas RE, Thomas JJ, Gehring AJ, Hill PJ, Belisle JT, Harding CV, Boom WH. Phosphatidylinositol mannoside from *Mycobacterium tuberculosis* binds $\alpha_5\beta_1$ integrin (VLA-5) on CD4⁺T cells and induces adhesion to fibronectin. *The Journal of Immunology*, 2006, 177(5): 2959–2968.
- [11] Shenai S, Rodrigues C, Mehta A. Rapid speciation of 15 clinically relevant mycobacteria with simultaneous detection of resistance to rifampin, isoniazid, and streptomycin in *Mycobacterium tuberculosis* complex. *International Journal of Infectious Diseases*, 2009, 13(1): 46–58.
- [12] Javier RT, Rice AP. Emerging theme: cellular PDZ proteins as common targets of pathogenic viruses. *Journal of Virology*, 2011, 85(22): 11544–11556.
- [13] Hormozdiari F, Salari R, Bafna V, Sahinalp SC. Protein-protein interaction network evaluation for identifying potential drug targets. *Journal of Computational Biology*, 2010, 17(5): 669–684.
- [14] Houslay MD. Disrupting specific PDZ domain-mediated interactions for therapeutic benefit. *British Journal of Pharmacology*, 2009, 158(2): 483–485.
- [15] Ottmann C. New compound classes: protein-protein interactions. *Handbook of Experimental Pharmacology*, 2016, 232: 125–138.
- [16] Zhang MJ, Wang WN. Organization of signaling complexes by PDZ-domain scaffold proteins. *Accounts of Chemical Research*, 2003, 36(7): 530–538.
- [17] Lemaire JF, McPherson PS. Binding of Vac14 to neuronal nitric oxide synthase: characterisation of a new internal PDZ-recognition motif. *FEBS Letters*, 2006, 580(30): 6948–6954.
- [18] Chen J, Pan LF, Wei ZY, Zhao YX, Zhang MJ. Domain-swapped dimerization of ZO-1 PDZ2 generates specific and regulatory connexin43-binding sites. *The EMBO Journal*, 2008, 27(15): 2113–2123.
- [19] Yuan XL, Chen LP, Deng XX, Cao J, Yu SY, Wang QK, Pang H, Liu SG. Characterization of *RV0394c* gene encoding hyaluronidase and chondrosulfatase from *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis*, 2013, 93(3): 296–300.
- [20] Hirayama Y, Yoshimura M, Ozeki Y, Sugawara I, Udagawa T, Mizuno S, Itano N, Kimata K, Tamaru A, Ogura H, Kobayashi K, Matsumoto S. Mycobacteria exploit host hyaluronan for efficient extracellular replication. *PLoS Pathogens*, 2009, 5(10): e1000643.

Expression, purification and characterization of Rv3194c protein from *Mycobacterium tuberculosis*

Dongyue Zhao^{1*}, Lili Lin¹, Fuli Wen²

¹ Southern Biomedical Research Center, Fujian Normal University, Fuzhou 350117, Fujian Province, China

² Department of Comparative Medicine, Fujian Medical University Affiliated Fuzhou General Hospital of Nanjing Command, People's Liberation Army, Fuzhou 350025, Fujian Province, China

Abstract: [Objective] PDZ [Post-synaptic density-95 (PSD-95), *Drosophila* tumor suppressor protein diskslarge-1 (DLG), the tight junction protein zonula occludentes 1 (ZO-1)] signal protein was encoded by *Rv3194c* gene from *Mycobacterium tuberculosis*, and its ability to adhere *M. tuberculosis* was studied. [Methods] Rv3194c protein was expressed in prokaryotic system. Rv3194c protein was separately incubated with hyaluronic acid, chondroitin sulfate and collagen I overnight at different temperature (37, 38, 39, 40 °C). Then component changes of culture supernatant were tested by Western blot and ELISA. [Result] Western blot showed that Rv3194c protein expressed in prokaryotic system, with a molecular weight of about 35 kDa, was mainly in soluble form. Western blot showed that His-Rv3194c protein in supernatant of 39 °C experimental group was significantly less than that of other experimental groups (37, 38, 40 °C)(*** $P < 0.001$). ELISA showed that hyaluronic acid, chondroitin sulfate and collagen I in supernatant of 39 °C experimental group was significantly less than that of other experimental groups (37, 38, 40 °C)(*** $P < 0.001$). [Conclusion] For the first time it was affirmed that Rv3194c protein with detected activity of adhesions in this study will be targeted to the development of the new anti-*M. tuberculosis* drug.

Keywords: *Mycobacterium tuberculosis*, Rv3194c protein, hyaluronic acid, chondroitin sulfate, collagen I

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the Leading Project of Science and Technology Plan of Fujian Province (2015Y0075) and by the Clinical Application Research of Fuzhou General Hospital of Nanjing Command (2015L01)

*Corresponding author. Tel: +86-591-22860765; E-mail: mountain@fjnu.edu.cn

Received: 14 January 2016; Revised: 13 April 2016; Published online: 3 June 2016