



# 结核分枝杆菌 PE\_PGRS15 调控分枝杆菌细胞包膜结构与耐药性

李武<sup>1</sup>, 邓磊<sup>1</sup>, 阎紫菲<sup>1</sup>, 艾雪峰<sup>1,2</sup>, 吕茜<sup>1,2</sup>, 谢建平<sup>2\*</sup>

1 内江师范学院生命科学学院 特色农业资源研究与利用四川省高等学校重点实验室, 四川 内江 641100

2 西南大学生命科学学院 现代生物医药研究所 三峡库区生态环境与生物资源省部共建国家重点实验室培育基地, 重庆 400715

李武, 邓磊, 阎紫菲, 艾雪峰, 吕茜, 谢建平. 结核分枝杆菌 PE\_PGRS15 调控分枝杆菌细胞包膜结构与耐药性[J]. 微生物学报, 2023, 63(12): 4644-4658.

LI Wu, DENG Lei, YAN Zifei, AI Xuefeng, LÜ Xi, XIE Jianping. *Mycobacterium tuberculosis* PE\_PGRS15 modulates the envelope structure and stress resistance of mycobacteria[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2023, 63(12): 4644-4658.

**摘要:** 【目的】研究结核分枝杆菌 PE\_PGRS15 的功能。【方法】构建过表达 PE\_PGRS15 蛋白的重组耻垢分枝菌酸杆菌, 通过细胞分级分离实验检测其细胞定位。通过涂布实验、扫描电镜和透射电镜观察细菌菌落形态、细菌表面形态及细胞包膜(cell envelope)结构。通过杀菌曲线法及微量肉汤稀释法检测重组菌对环境压力及抗生素的耐受性。通过染料摄取实验检测重组菌细胞壁通透性, 并用气相色谱-质谱联用仪检测重组菌细胞壁脂肪酸谱。通过蛋白截短及融合实验分析 PE\_PGRS15 蛋白结构域的功能。【结果】PE\_PGRS15 蛋白定位于重组菌细胞壁, 其表达影响重组菌菌落形态和细胞包膜结构, 增强重组菌对环境压力和抗生素的耐受。PE\_PGRS15 的表达导致重组菌细胞包膜脂肪酸含量增加, 也降低了重组菌的细胞壁通透性。PE\_PGRS15 蛋白的 PE 结构域负责将该蛋白转运到细胞表面, 而 PGRS 结构域介导重组菌对压力条件和抗生素的耐受。【结论】PE\_PGRS15 蛋白可能通过调控耻垢分枝菌酸杆菌细胞包膜的结构进而影响细菌菌落形态、细胞壁通透性及耐药性, 为解析 PE/PPE 家族蛋白的功能奠定了一定的基础。

**关键词:** PE\_PGRS15; 耻垢分枝菌酸杆菌; 压力耐受; 细胞壁通透性; 过表达

资助项目: 国家自然科学基金(81601740); 四川省科技厅项目(2018JY0108); 内江师范学院科研项目(17CZ01); 大学生创新创业训练计划项目

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (81601740), the Science & Technology Department of Sichuan Province (2018JY0108), the Grant of Neijiang Normal University (17CZ01), and the College Students' Innovation and Entrepreneurship Training Program.

\*Corresponding author. Tel/Fax: +86-23-68253392, E-mail: georgex@swu.edu.cn

Received: 2023-04-20; Accepted: 2023-06-28; Published online: 2023-07-05

# *Mycobacterium tuberculosis* PE\_PGRS15 modulates the envelope structure and stress resistance of mycobacteria

LI Wu<sup>1</sup>, DENG Lei<sup>1</sup>, YAN Zifei<sup>1</sup>, AI Xuefeng<sup>1,2</sup>, LÜ Xi<sup>1,2</sup>, XIE Jianping<sup>2\*</sup>

1 Key Laboratory of Regional Characteristic Agricultural Resources, College of Life Sciences, Neijiang Normal University, Neijiang 641100, Sichuan, China

2 State Key Laboratory Breeding Base of Eco-environment and Bio-resource of the Three Gorges Area, Institute of Modern Biopharmaceuticals, School of Life Sciences, Southwest University, Chongqing 400715, China

**Abstract: [Objective]** To reveal the function of PE\_PGRS15 from *Mycobacterium tuberculosis*. **[Methods]** A recombinant *Mycobacterium smegmatis* strain heterologously expressing PE\_PGRS15 (MS-PE\_PGRS15) was generated. The colony morphology, cell surface morphology, and envelope structure were observed by a plating method, a scanning electron microscope, and a transmission electron microscope, respectively. The localization of PE\_PGRS15 was detected by the cell fractionation assay. The resistance of the recombinant strain to environmental stresses and antibiotics was measured by the killing curve method and micro-broth dilution method. The permeability and fatty acid profile of the cell wall of the recombinant strain were determined by dye uptake assay and gas chromatography-mass spectrometry, respectively. The functions of different domains of PE\_PGRS15 were analyzed by protein truncation and fusion experiments. **[Results]** PE\_PGRS15 was located on the cell envelope of MS-PE\_PGRS15. MS-PE\_PGRS15 showed altered colony morphology, envelope structure, and cell wall fatty acid profile, with noticeable increase in resistance to multiple environmental stresses and antibiotics. The dye uptake experiments with ethidium bromide and Nile red suggested that the cell wall of MS-PE\_PGRS15 was more impermeable than that of the control strain. The PGRS domain of PE\_PGRS15 affected mycobacterial cell wall permeability and stress resistance, while the PE domain was involved in the transport of the protein to the cell surface. **[Conclusion]** PE\_PGRS15 was present in the cell wall fraction of MS-PE\_PGRS15 and influenced cell wall permeability and colony morphology, ultimately enhancing the resistance of recombinant *M. smegmatis* to stresses.

**Keywords:** PE\_PGRS15; *Mycobacterium smegmatis*; stress resistance; cell wall permeability; overexpression

结核分枝杆菌(*Mycobacterium tuberculosis*, Mtb)感染导致的结核病(tuberculosis, TB)仍然是全球公共卫生的巨大威胁。特别是多重和广泛耐药 Mtb 及与人类免疫缺陷病毒(human immunodeficiency virus, HIV)共感染使得 TB 疫情愈发严峻。全球范围内, TB 在 2021 年造成约 1 060 万新发病例和超过 140 万死亡病例<sup>[1]</sup>。

因此, 迫切需要通过研究 Mtb 的致病机理, 开发新的 TB 防治策略。

脯氨酸-谷氨酸/脯氨酸-脯氨酸-谷氨酸(proline-glutamic acid/proline-proline-glutamic acid, PE/PPE)家族基因占 Mtb 基因组编码能力的 10%左右<sup>[2]</sup>。多态性富含 GC 的重复序列(polymorphic GC-rich repetitive sequence, PE\_PGRS)

是 PE/PPE 家族的亚家族蛋白, 在 Mtb 中有 65 个成员, 由一个高度保守的 PE 结构域和一个可变的 PGRS 结构域组成<sup>[3]</sup>。PE\_PGRS 蛋白只存在于慢生型致病分枝杆菌中, 如 Mtb、海分枝杆菌和牛结核分枝杆菌等<sup>[4]</sup>。越来越多的证据表明该亚家族蛋白参与 Mtb 致病性, 然而大多数成员在 Mtb 生理和毒力中的具体作用仍然未知<sup>[5]</sup>。因此研究 PE\_PGRS 蛋白的功能有助于深入理解 Mtb 的生理功能和致病能力。

PE\_PGRS 亚家族蛋白的一个显著特点是各成员之间高度的序列同源性和功能重叠性<sup>[6]</sup>。比如开发针对特定 PE\_PGRS 蛋白的抗体, 会与其他成员产生大量的交叉反应<sup>[7]</sup>。因此, 采用传统方法(如在致病分枝杆菌中敲除或过表达某个 PE\_PGRS 蛋白)研究单个 PE\_PGRS 蛋白可能会受到该亚家族其他成员的严重干扰。有研究报道 Mtb 的重要模式菌种——耻垢分枝菌酸杆菌(*Mycobacterium smegmatis*, 旧称耻垢分枝杆菌)中完全不存在 PE\_PGRS 的同源蛋白<sup>[8]</sup>。因此, 研究人员普遍采用在 *M. smegmatis* 中过表达 PE\_PGRS 蛋白来研究其功能<sup>[8-10]</sup>。

本研究以过表达 PE\_PGRS15 蛋白的重组 *M. smegmatis* 为研究对象, 检测 PE\_PGRS15 蛋白的细胞定位情况, 及对重组菌细胞壁通透性、脂肪酸含量、压力耐受性和抗生素耐药性的影响, 并明确各个亚基的不同功能。这些结果揭示了 PE\_PGRS15 蛋白的具体功能, 为进一步探索 PE\_PGRS 亚家族蛋白在 Mtb 生理和毒力中的作用奠定了坚实的基础。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材料

*M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155、大肠埃希菌及 pMV261 质粒由本实验室保藏。Middlebrook 7H9/7H10 培养基购自 BD Difco 公司。甘油、

Tween 80 及抗生素等购自生工生物工程(上海)股份有限公司。BCA Protein Assay Kit、鼠抗 Myc 抗体购自上海碧云天生物技术有限公司。外排泵特异性抑制剂氰氯苯腙(carbonyl cyanide 3-chlorophenylhydrazine, CCCP)购自北京索莱宝科技有限公司。限制性内切酶、连接酶及高保真 DNA 聚合酶购自纽英伦生物技术(北京)有限公司和宝日医生物技术(北京)有限公司。质粒提取试剂盒、胶回收试剂盒、鼠抗 His 抗体购自天根生化科技(北京)有限公司。引物合成和基因测序均由北京六合华大基因科技有限公司重庆分公司完成。其他实验常规试剂主要购自上海碧云天生物技术有限公司等公司。

### 1.2 重组质粒和菌株的构建及培养条件

本研究所用引物信息见表 1, 基因扩增的模板为 Mtb 实验室标准株 H37Rv 的基因组。扩增 PE\_PGRS15 全长基因的引物为 261-15FL-For 和 261-15FL-Rev, 扩增 PE\_PGRS15 的 PE 结构域(以下称 15PE)的引物为 261-15FL-For 和 261-15PE-Rev, 扩增 PE\_PGRS15 的 PGRS 结构域(以下称 15PGRS)的引物为 261-15PGRS-For 和 261-15FL-Rev, 扩增 PE\_PGRS33 的 PE 结构域(以下称 33PE)的引物为 261-33PE-For 和 261-33PE-Rev。先使用 261-33PE-For 和 33-15overlap-Rev 引物扩增 33PE 片段, 同时使用 33-15overlap-For 和 261-15FL-Rev 引物扩增 15PGRS 片段; 再使用重叠 PCR 技术构建 33PE 和 15PGRS 融合基因(以下称 33PE-15PGRS), 使用的引物为 261-33PE-For 和 261-15FL-Rev。PCR 产物与 pMV261 质粒分别用 *EcoR* I 和 *Hind* III 进行双酶切后, 用 T4 连接酶重新连接产生相应的重组质粒; 再将重组质粒电转化入 *M. smegmatis* 感受态, 产生相应的重组菌。*M. smegmatis* 及其重组菌培养于 7H9 液体培养基, 同时添加 0.2% (体积分数)甘油, 0.2% (质量体积分数)葡萄糖和 0.05% (体积百分比)

表 1 本研究使用的引物  
Table 1 Primers used in this study

Primers	Sequences (5'→3')	Restriction sites
261-15FL-For	GCGGAATTCATGTCGTATGTATTGGCGAC	<i>EcoR</i> I
261-15FL-Rev	CGCAAGCTTTCACAGATCCTCTTCAGAGATGAGTTTCTGCTCGCCGGGTTGGCCGGCG	<i>Hind</i> III
261-15PE-Rev	CTGAAGCTTTCACAGATCCTCTTCAGAGATGAGTTTCTGCTCGATCAGGGGGCGCCCG	<i>Hind</i> III
261-15PGRS-For	CGTGAATTCGGCAACGGCACCAATGGTG	<i>EcoR</i> I
261-33PE-For	CGCGAATTCATGTCATTTGTGGTACG	<i>EcoR</i> I
261-33PE-Rev	AGTAAGCTTTCACAGATCCTCTTCAGAGATGAGTTTCTGCTCGATCAGTGGGGCGCCCA	<i>Hind</i> III
33-15overlap-For	GCGCCCACTGATCGGCAACGGCACCAATG	
33-15overlap-Rev	CATTGGTGCCGTTGCCGATCAGTGGGGCGC	

The underlined lines represent the restriction sites. The italics represent Myc (human c-Myc proto-oncogene) epitope tag.

Tween 80。在培养重组菌时, 添加 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的卡那霉素防止质粒丢失。

### 1.3 Western blotting 检测重组蛋白的表达

离心收集对数生长期的重组 *M. smegmatis*, 洗涤并重悬于裂解缓冲液[50 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0)、300 mmol/L NaCl、1 mmol/L PMSF 及 1 mmol/L DTT]中。冰上超声 30 min (工作 5 s, 暂停 5 s, 30%功率), 离心收集上清液。使用 BCA Protein Assay Kit 测量样品蛋白浓度。取相同质量的细胞裂解液进行十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)分析, 将样品转移至聚偏二氟乙烯(polyvinylidene fluoride, PVDF)印迹膜上, 使用鼠抗 Myc 抗体检测重组蛋白的表达。

### 1.4 亚细胞分级分离实验检测蛋白定位

*M. smegmatis* 亚细胞分级分离实验参考文献[11]进行。离心收集对数生长期的重组 *M. smegmatis*, 洗涤并重悬于裂解缓冲液, 超声破碎。3 000 $\times g$  离心 30 min, 上清即为全细胞裂解液(whole cell lysates, WCL)。将 WCL 在 27 000 $\times g$  离心力下继续离心 60 min, 沉淀即为细胞壁组分(cell wall fraction, CW), 剩下的上清即为细胞膜和细胞质组分(cell membrane and cytosolic fractions, CM+Cy)。所有离心步骤均

在 4  $^{\circ}\text{C}$  下完成。取相同质量的各组分样品进行 Western blotting 分析。*M. smegmatis* 的内源性 GroEL 蛋白含有一串组氨酸残基, 可以被抗 His 标签抗体识别<sup>[12]</sup>, 因此将其作为细胞质的指示蛋白。

### 1.5 生长曲线的绘制

将重组 *M. smegmatis* 分别培养于丰富培养基(添加 0.5%甘油, 0.2%葡萄糖和 0.05% Tween 80 的 7H9 培养基)或基本培养基(添加 0.05% Tween 80 的苏通培养基)中, 调整起始  $OD_{600}$  值至约 0.02。在 70–80 h 时间段内, 每间隔 6 h 或 12 h 检测其吸光度, 最后绘制生长曲线。

### 1.6 菌落形态的观察

将相应重组菌涂布于 7H10 固体培养基上, 37  $^{\circ}\text{C}$  培养 5–6 d。使用数码相机对菌落进行拍照。

### 1.7 扫描电镜观察细菌形态

离心收集对数生长期的重组 *M. smegmatis*, 洗涤并重悬于 2.5%戊二醛固定液中固定过夜, 经浓度递增的乙醇脱水处理。超临界干燥机中干燥 1 h 后, 固定在样品台上喷金, 上镜观察拍照。

### 1.8 透射电镜观察细胞包膜(cell envelope)结构

离心收集对数生长期的重组 *M. smegmatis*, 洗涤并重悬于 2.5%戊二醛固定液中固定 10 min,

铜网蘸取后, 自然状态晾干 5 min, 1%磷钨酸染色 3 min, 自然状态晾干 15 min, 上镜观察拍照。

### 1.9 重组菌抗压力检测

离心收集对数生长期的重组 *M. smegmatis*, 洗涤并重悬于 7H9 培养基中, 调整起始  $OD_{600}$  值至约 0.02。为检测重组菌对不同压力条件的浓度依赖的敏感性, 将重组菌用不同浓度的 SDS、 $H_2O_2$  和溶菌酶分别处理 8、12 和 24 h, 以及用不同梯度酸性条件处理 6 h。为检测重组菌对不同压力条件的时间依赖的敏感性, 将重组菌分别在 0.075% SDS、10 mmol/L  $H_2O_2$ 、500  $\mu\text{g}/\text{mL}$  溶菌酶及 pH 5.0 的酸性条件下处理 8–24 h。重组菌对抗生素的杀菌曲线的绘制参照文献[13]进行。

### 1.10 重组菌对抗生素的敏感性评价

重组菌对抗生素的敏感性评价指标为最小抑菌浓度(minimal inhibitory concentration, MIC)。微量稀释法检测抗生素的 MIC 值参考文献[14]进行。将对数生长期( $OD_{600}$  约为 0.8)的重组菌调整浓度至  $5 \times 10^3$  CFU/mL, 分别向其中加入不同浓度的抗生素, 以 2 倍倍比稀释, 于 37 °C 静置培养 3 d 后, 经肉眼观察, 孔内无明显细菌生长的浓度即为该抗生素的 MIC 值。

### 1.11 细菌细胞壁通透性的检测

溴化乙锭(ethidium bromide)和尼罗红(Nile red)常被分别用作检测细胞壁对亲水性和疏水性化合物的通透性的指示分子<sup>[15-16]</sup>。离心收集对数生长期的重组菌, 洗涤并重悬于含 0.05% Tween 80 和 25 mmol/L 葡萄糖的磷酸缓冲盐溶液(phosphate-buffered saline, PBS)中。将 100  $\mu\text{L}$  细菌菌悬液转入黑色的 96 孔荧光板中, 分别向孔中添加终浓度为 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的溴化乙锭或 2  $\mu\text{mol}/\text{L}$  的尼罗红。立即用多功能酶标仪检测荧光值, 检测溴化乙锭时, 设置激发波长为 545 nm, 发射波长为 600 nm; 检测尼罗红时, 设置激发波

长为 540 nm, 发射波长为 630 nm。为确定染料的富集是否受到外排泵的影响, 在检测溴化乙锭和尼罗红的富集实验中, 分别加入终浓度为 0.625  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的外排泵特异性抑制剂 CCCP, 其他实验条件不变。

### 1.12 脂肪酸定量分析

将重组菌培养至对数生长期, 离心收集样本, 送至青岛科创质量检测有限公司, 进行脂肪酸定量分析。

### 1.13 统计学分析

使用 GraphPad Prism 5 软件进行统计学分析, 多组间差异的比较采用单因素方差分析, 进一步的组内两两比较采用 Students' *t* 检验,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。误差棒代表标准偏差(standard deviation, SD)。

## 2 结果与分析

### 2.1 PE\_PGRS15 定位于细胞表面并改变重组菌的菌落形态及细胞包膜结构

使用 PCR 方法扩增 *pe\_pgrs15* 基因(长度为 1 821 bp), 获得大小正确的目的基因(图 1A)。MS-PE\_PGRS15 重组菌表达约 50 kDa 的目的蛋白, 而 MS-pMV 空载菌则没有条带(图 1B), 说明菌株构建成功。亚细胞分级分离实验检测到 PE\_PGRS15 定位于 MS-PE\_PGRS15 重组菌的细胞壁组分(图 1C)。有研究显示, 过表达某些蛋白质可能对宿主造成负担, 从而影响宿主菌的生长<sup>[17]</sup>。为了检测这一可能, 将 MS-pMV 空载菌和 MS-PE\_PGRS15 重组菌分别培养于丰富培养基和基本培养基中, 结果显示过表达 PE\_PGRS15 不影响重组菌在培养基中的生长(图 1D、1E)。

肉眼观察于 7H10 固体培养基上生长 5 d 的 MS-pMV 空载菌和 MS-PE\_PGRS15 重组菌, 发现二者菌落形态差异明显: 前者呈现典型的分

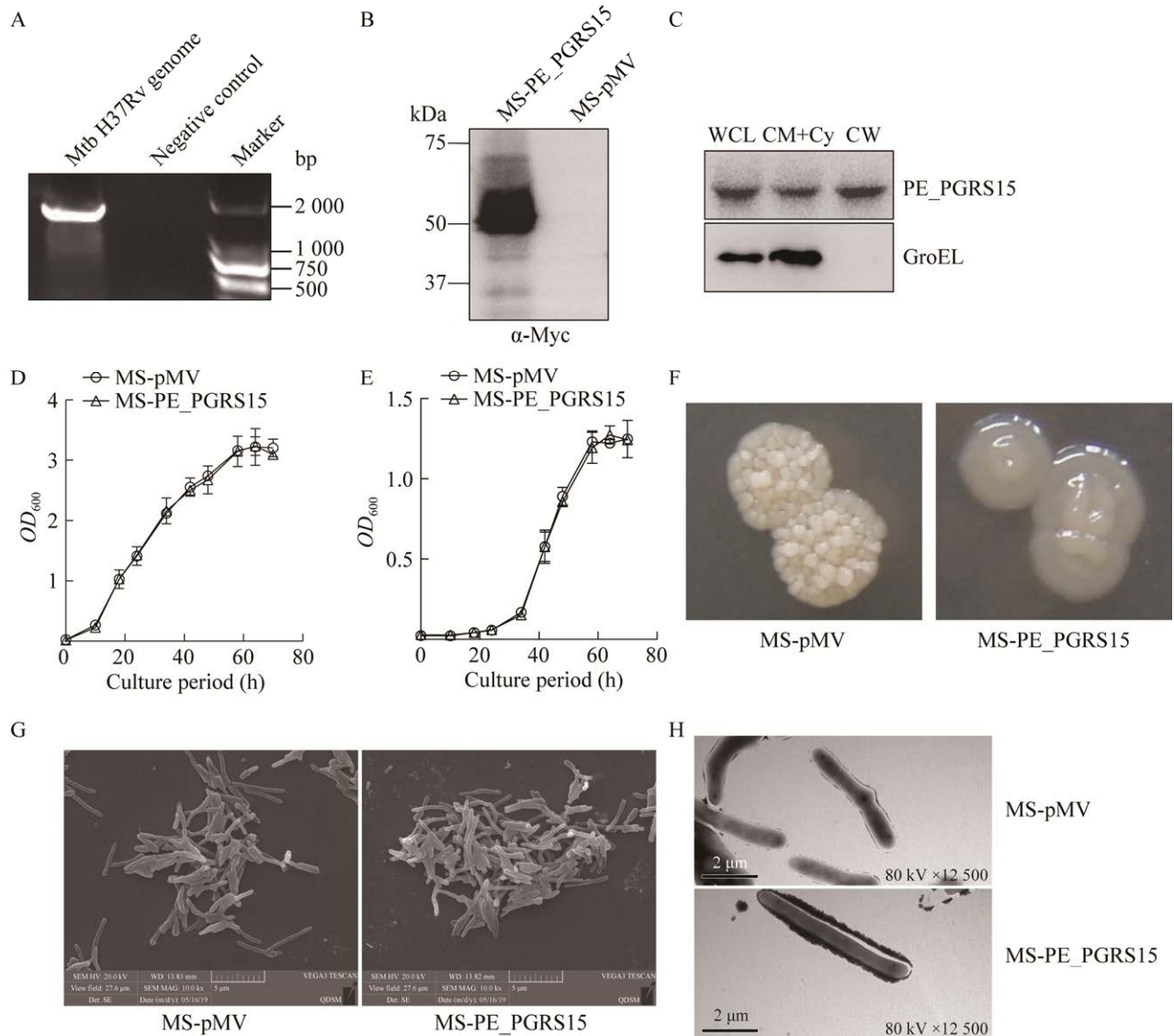


图 1 PE\_PGRS15 的细胞定位及其表达对重组菌菌落形态的影响

Figure 1 PE\_PGRS15, a cell wall-associated protein, alters the colony morphology of *Mycobacterium smegmatis*. A: PCR amplification of the *pe\_pgrs15* gene from Mtb H37Rv genome. B: Western blotting demonstrated the heterologous expression of Myc-tagged PE\_PGRS15 protein in recombinant *M. smegmatis*. C: Proteins from whole cell lysates (WCL), cytoplasmic membrane and cytoplasm (CM+Cy), and cell wall (CW) from *M. smegmatis* expressing PE\_PGRS15 were separated by SDS-PAGE and detected by Western blotting. Cytosolic GroEL was detected as a cytoplasmic control. D: The growth of MS-pMV and MS-PE\_PGRS15 at 37 °C in Middlebrook 7H9 liquid medium was monitored by determining  $OD_{600}$  at 6 h or 12 h intervals. E: The growth of MS-pMV and MS-PE\_PGRS15 at 37 °C in Sauton's medium was monitored by determining  $OD_{600}$  at 6 h or 12 h intervals. F: MS-pMV and MS-PE\_PGRS15 strains were grown at 37 °C on 7H10 agar without Tween 80. Pictures were taken on day 5. MS-pMV and MS-PE\_PGRS15 were cultured in 7H9 medium with 0.05% Tween 80, and at an  $OD_{600}$  of 0.6, the bacteria were harvested for scanning electron microscopy (G) and transmission electron microscopy (H). Two representative images for MS-pMV and MS-PE\_PGRS15 are shown. Experiments were performed three times, and similar results were obtained. Error bars indicate the standard deviation.

枝杆菌形态,即干燥、易碎和不规则的褶皱结构;而后者菌落湿润、光滑且粘稠(图 1F)。研究表明分枝杆菌菌落形态的变化往往与菌体表面结构相关<sup>[8,18]</sup>。扫描电镜观察发现,二者在菌体长度、表面形态等方面并无明显差异(图 1G)。然而,透射电镜观察发现,与对照组相比,MS-PE\_PGRS15 重组菌具有更厚的包膜结构(图 1H)。以上结果表明,PE\_PGRS15 是一个细胞表面蛋白,其表达改变了 *M. smegmatis* 的菌落形态及细胞包膜结构。

## 2.2 MS-PE\_PGRS15 重组菌对环境压力更加耐受

分枝杆菌独特而高度复杂的细胞包膜结构在该属细菌抵抗巨噬细胞内各种杀菌因子如表面活性剂、活性氮/氧中间产物、抗菌肽及酸性条件等的过程中发挥了关键作用<sup>[19]</sup>。本研究已经证明 PE\_PGRS15 是一个细胞表面相关蛋白,有可能影响重组菌对抗各种环境压力。因此,首先检测 MS-pMV 空载菌和 MS-PE\_PGRS15 重组菌对 SDS、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>、溶菌酶及酸性条件的敏感性。浓度依赖性压力测试实验结果显示,和 MS-pMV 空载菌相比,MS-PE\_PGRS15 重组菌分别对 0.050%和 0.075%的 SDS(图 2A)、5 mmol/L 和 10 mmol/L 的 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>(图 2C)、250 μg/mL 和 500 μg/mL 的溶菌酶(图 2E)及 pH 5.0 和 pH 6.0 的酸性条件(图 2G)更加耐受。进一步的时间依赖性压力测试实验结果也佐证了 MS-PE\_PGRS15 重组菌比 MS-pMV 空载菌更加耐受环境压力(图 2B、2D、2F、2H)。以上结果表明,PE\_PGRS15 赋予了重组菌更加出色的环境压力耐受能力。

## 2.3 MS-PE\_PGRS15 重组菌对抗生素更加耐受

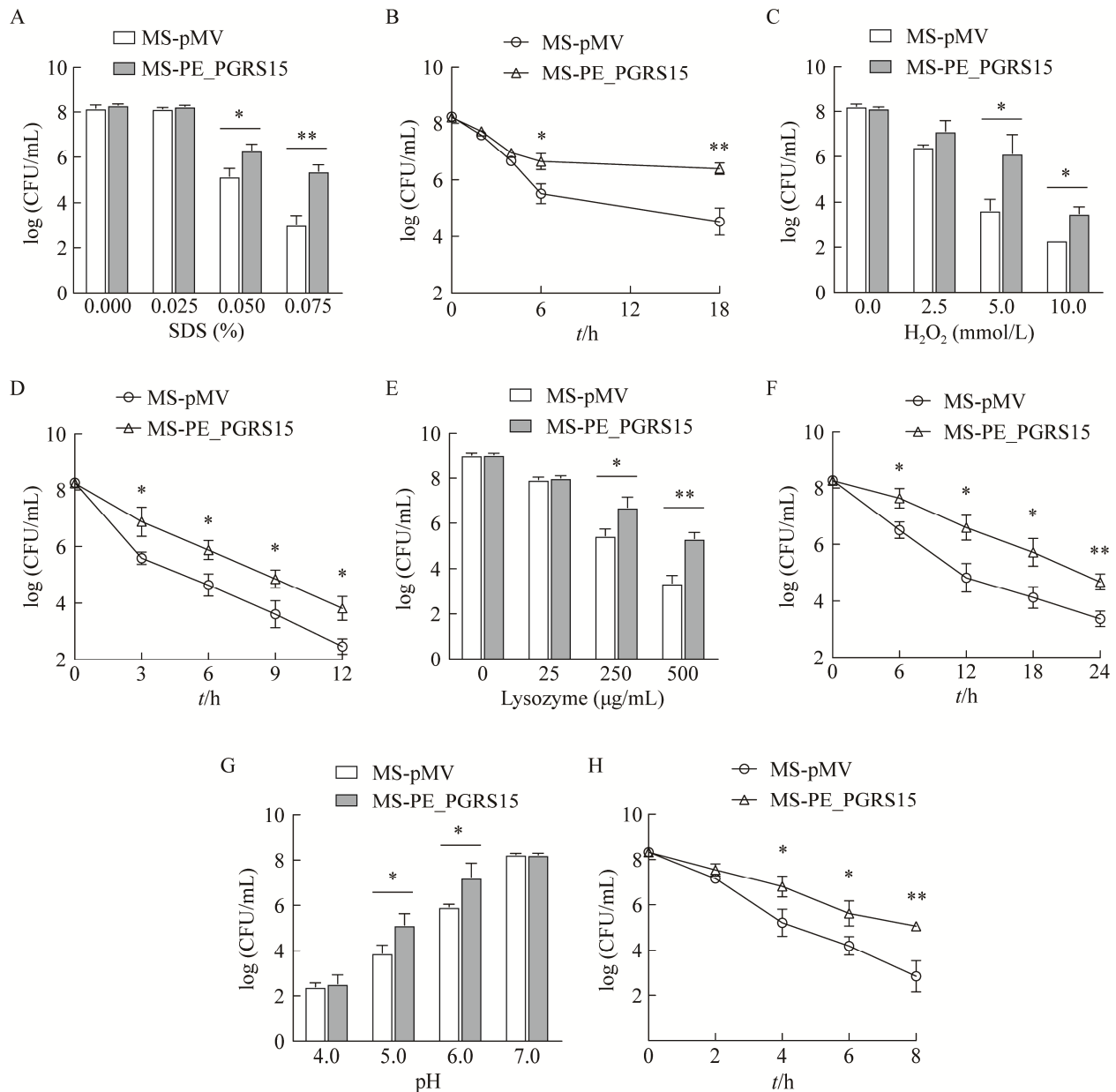
分枝杆菌致密的细胞包膜结构(包括细胞膜、细胞壁和荚膜)是一道天然屏障,能够极大地抑制抗生素等药物向细菌胞内的运输<sup>[20-21]</sup>。

为进一步研究 PE\_PGRS15 的表达是否影响重组菌对抗生素的抗性,使用 3 种亲水性抗生素(异烟肼、万古霉素和庆大霉素)和 3 种疏水性抗生素(红霉素、诺氟沙星和利福平)处理重组菌和空载菌,并测定每种抗生素对重组菌的 MIC 值。结果显示(表 2),在 6 种受试抗生素中,MS-PE\_PGRS15 重组菌的耐药性都优于 MS-pMV。为进一步验证以上结果,分别绘制以上 6 种抗生素对细菌的杀菌曲线。结果显示(图 3A-3F),MS-PE\_PGRS15 重组菌的抗生素耐药性均强于 MS-pMV 空载菌。

## 2.4 PE\_PGRS15 的表达影响重组菌细胞壁通透性及脂肪酸组成

鉴于 MS-PE\_PGRS15 重组菌对所有已测环境压力和抗生素都耐受,推测其潜在的耐受机制具有普遍性。本研究采用染料富集法检测以上结果是否与细菌细胞壁通透性有关。结果显示(图 4A、4B),MS-PE\_PGRS15 重组菌对亲水性化合物和疏水性化合物的富集作用都明显弱于 MS-pMV 空载菌;而外排泵特异性抑制剂 CCCP 并没有改变染料在 2 株菌中的富集趋势(图 4C、4D)。这说明 PE\_PGRS15 通过降低重组菌细胞壁通透性,而不是增加药物外排作用,来增加重组菌对环境压力的耐受和抗生素的抗性。

分枝杆菌包膜结构中的细胞壁是由结构复杂的脂质如分枝菌酸等组成<sup>[14]</sup>。分枝菌酸是一种高度饱和的长链脂肪酸,它的存在导致分枝杆菌细胞壁极低的流动性和不透性,最终使得分枝杆菌具有卓越的环境压力耐受性和抗生素耐药性<sup>[22]</sup>。为进一步探索 MS-PE\_PGRS15 重组菌的耐受机制,本研究利用气相色谱-质谱联用仪比较了 2 株菌的脂肪酸种类和含量。结果显示(图 4E),MS-PE\_PGRS15 重组菌和 MS-pMV 空载菌中脂肪酸种类并未发生变化,都拥有 32 种



**图 2 PE\_PGRS15 改变重组菌对环境压力的耐受能力**

Figure 2 MS-PE\_PGRS15 cells are more resistant to stress conditions. The mid-log-phase cultures of MS-pMV and MS-PE\_PGRS15 were either treated with medium alone or subjected to SDS for 8 h (A), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for 12 h (C), and lysosome for 24 h (E) at the indicated concentrations or treated with different pH gradients for 6 h (G). The mid-log-phase cultures of MS-pMV and MS-PE\_PGRS15 were incubated in 7H9 supplemented with 0.075% (W/V) SDS (B), 10 mmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (D), 500 μg/mL lysosome (F) and low pH (pH 5.0) (H) for the indicated time. Then, the recombinant strains were plated onto 7H10 plates by serially ten-fold dilution, and the bacterial CFUs were counted after 3–4 d of cultivation. Data are  $\bar{x} \pm s$  of technical triplicate from one representative of three or more independent experiments. \*:  $P < 0.05$ ; \*\*:  $P < 0.01$ .



表 2 不同抗生素对 MS-PE\_PGRS15 重组菌和 MS-pMV 空载菌的 MIC 值

Table 2 MICs of antibiotics for the MS-pMV and MS-PE\_PGRS15 strains

Strains	MIC ( $\mu\text{g/mL}$ )					
	INH	VAN	GEN	ERY	NOR	RIP
MS-pMV	8	2	2	8	0.5	4
MS-15PE	8	2	2	4–8	0.5	4
MS-15PGRS	4–8	2	2	8	0.5	2–4
MS-PE_PGRS15	32	4–8	8	16	2.0	8
MS-33PE	8	2	2	8	0.5	4
MS-33PE_15PGRS	32–64	4	8	16	2.0–4.0	8

INH: Isoniazid; VAN: Vancomycin; GEN: Gentamicin; ERY: Erythromycin; NOR: Norfloxacin; RIF: Rifampicin.

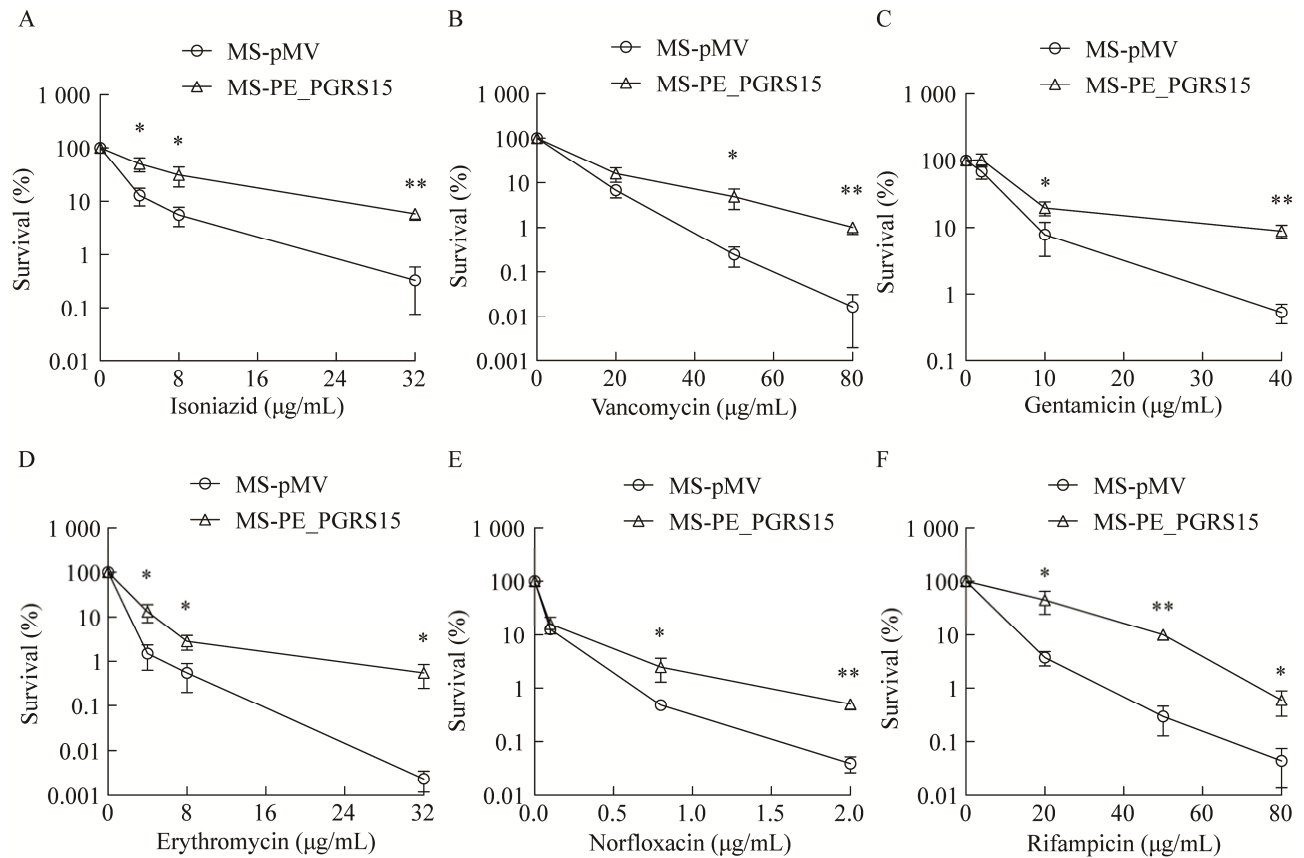


图 3 PE\_PGRS15 影响重组菌对抗生素的耐受能力

Figure 3 Expression of PE\_PGRS15 in *Mycobacterium smegmatis* enhanced bacterial survival following exposure to various antibiotics. The control strain (MS-pMV) and recombinant strain (MS-PE\_PGRS15) were diluted in 7H9 broth and then treated with isoniazid for 6 h (A), vancomycin for 10 h (B), gentamicin for 6 h (C), erythromycin for 22 h (D), norfloxacin for 6 h (E), and rifampicin for 6 h (F) at the indicated concentrations. Then, a ten-fold dilution of the bacteria was spotted on 7H10 supplemented with kanamycin, and the MS-pMV and MS-PE\_PGRS15 bacteria were counted after 3–4 d of cultivation. Data are  $\bar{x} \pm s$  of technical triplicate from one representative of three or more independent experiments. \*:  $P < 0.05$ ; \*\*:  $P < 0.01$ .

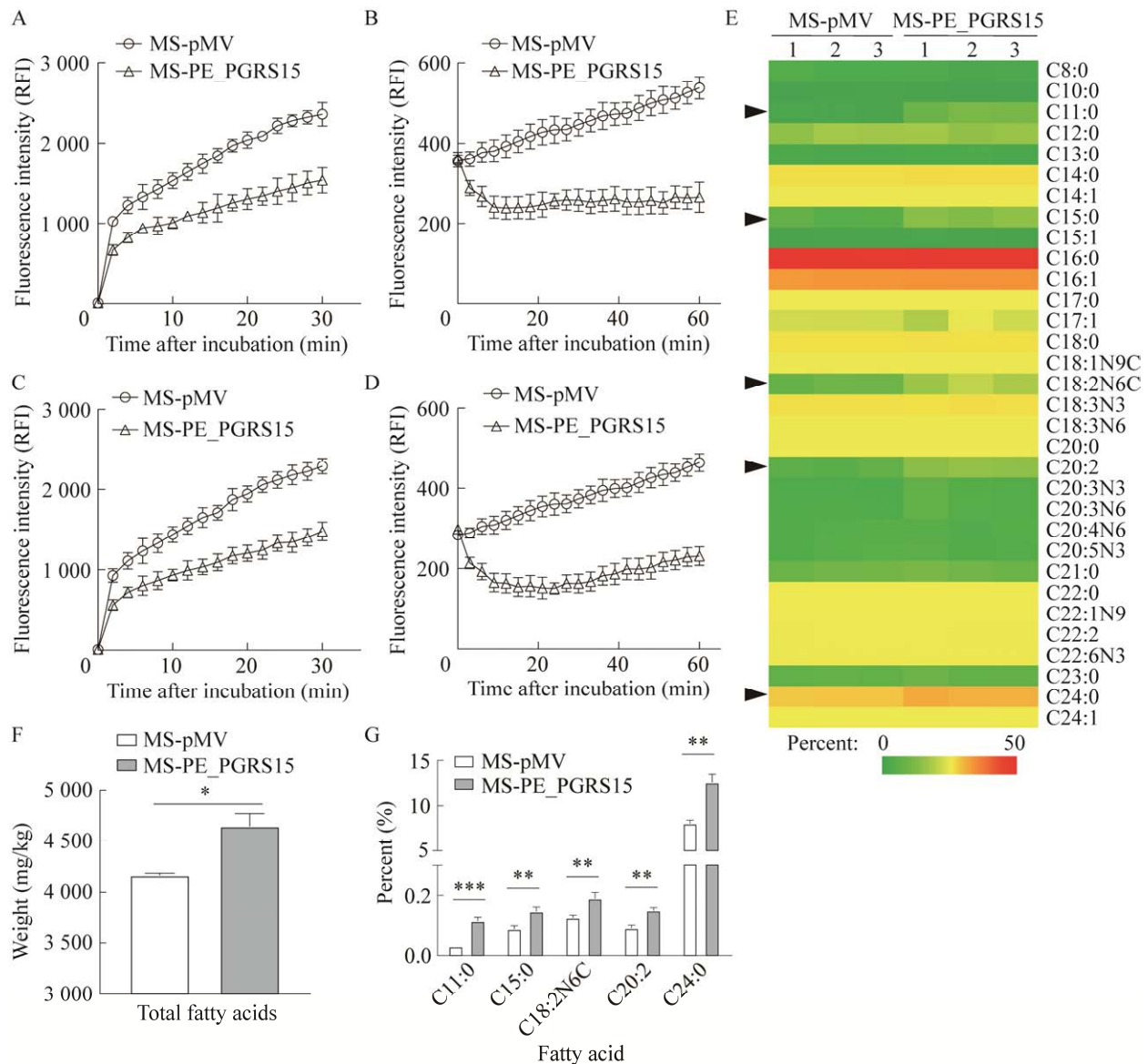


图 4 PE\_PGRS15 的表达影响重组菌细胞壁通透性及脂肪酸含量

Figure 4 Modulation of cell wall permeability and fatty acid composition of MS-PE\_PGRS15 cells. A: Mid-log-phase cultures of MS-pMV and MS-PE\_PGRS15 were incubated in PBS with 25 mmol/L glucose and 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ethidium bromide for the indicated time. B: Mid-log-phase cultures of MS-pMV and MS-PE\_PGRS15 were incubated in PBS containing 25 mmol/L glucose and 2  $\mu\text{mol}/\text{L}$  Nile red stain. C: Mid-log-phase cultures of MS-pMV and MS-PE\_PGRS15 were incubated in PBS with 25 mmol/L glucose and 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ethidium bromide and co-incubated with 0.625  $\mu\text{g}/\text{mL}$  CCCP. D: Mid-log-phase cultures of MS-pMV and MS-PE\_PGRS15 were incubated in PBS containing 25 mmol/L glucose and 2  $\mu\text{mol}/\text{L}$  Nile red stain and co-incubated with 0.625  $\mu\text{g}/\text{mL}$  CCCP. The assay of accumulation of ethidium bromide and Nile red over time in *Mycobacterium smegmatis* was conducted at 37  $^{\circ}\text{C}$ . E: Fatty acid composition (%) of MS-pMV and MS-PE\_PGRS15 estimated by GC/MS analysis. F: Quantification of total FAMES extracted from the MS-pMV and MS-PE\_PGRS15. G: The increased amount (%) of FAMES in the recombinant MS-PE\_PGRS15 strain compared with the MS-pMV control strain. Data are  $\bar{x} \pm s$  of technical triplicate from one representative of three or more independent experiments. \*:  $P < 0.05$ ; \*\*:  $P < 0.01$ ; \*\*\*:  $P < 0.001$ .

脂肪酸(从 C8–C24)。然而, MS-PE\_PGRS15 重组菌中总脂肪酸含量明显高于 MS-pMV 空载菌(图 4F)。具体表现为 MS-PE\_PGRS15 重组菌中 C11:0 (十一烷酸)、C15:0 (十五烷酸)、C18:2n6c (亚油酸)、C20:2 (附子脂酸)和 C24:0 (木蜡酸)等脂肪酸的含量明显高于 MS-pMV 空载菌(图 4G)。以上结果表明, PE\_PGRS15 可能通过增加细菌细胞壁脂肪酸含量, 导致细胞壁通透性进一步降低, 减少药物进入细胞内, 最终导致重组菌耐药性增加。

## 2.5 PE 结构域负责 PE\_PGRS15 的细胞定位, 而 PGRS 结构域负责其耐药机制

Mtb 的 PE\_PGRS 亚家族蛋白拥有类似的分子结构, 即由 PE 结构域和 PGRS 结构域组成<sup>[3]</sup>。为研究 PE\_PGRS15 的结构对于功能的影响, 本研究分别单独表达其 PE 结构域和 PGRS 结构域(图 5)。和全长蛋白一样, 15PE 和 15PGRS 的表达也未影响重组菌的生长(图 6B、6C)。令人意外的是, 15PE 和 15PGRS 都不能重现 PE\_PGRS15

在 *M. smegmatis* 中的耐药表型(表 2, 图 6D–6H)。通过蛋白定位实验发现, 全长 PE\_PGRS15 和 15PE 可以定位于细胞壁组分, 但 15PGRS 却不能(图 1C、图 6A)。根据以上结果推测, PE\_PGRS15 的 PE 结构域负责其亚细胞定位; 而 PGRS 结构域负责耐药等功能, 前提是该结构域能被转运到细菌细胞表面。

为了验证 15PGRS 需转运到细胞表面才能行使其功能这一猜想, 本研究构建了 MS-33PE-15PGRS 重组菌: 能表达 PE\_PGRS33 的 PE 结构域(33PE)和 15PGRS 的融合蛋白(图 5)。大量研究表明 PE\_PGRS33 定位于分枝杆菌细胞壁, 33PE 负责该蛋白的定位, 而且也能帮助其他融合蛋白定位于细菌细胞表面<sup>[8,23-24]</sup>。因此, 本研究构建 33PE 与 15PGRS 的融合蛋白, 以帮助 15PGRS 定位于细胞表面。与预期一致, 在重组菌的细胞壁组分中检测到了 33PE-15PGRS(图 6A)。结果显示(表 2, 图 6D–6H), 33PE-15PGRS 的表达能够重现重组菌对环境压力和抗生素的

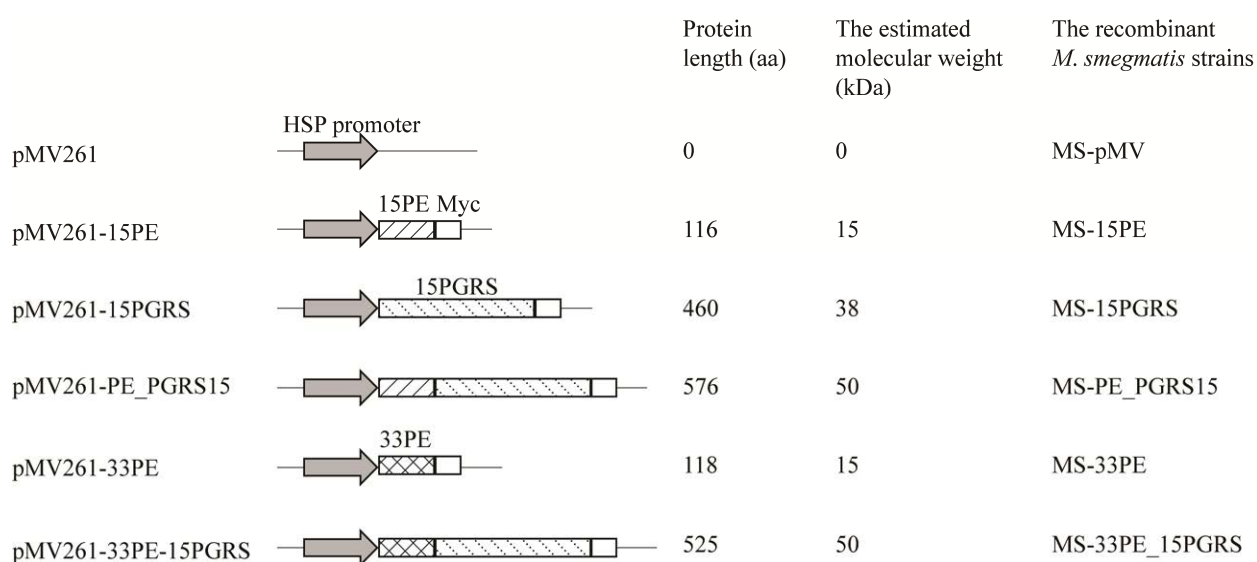
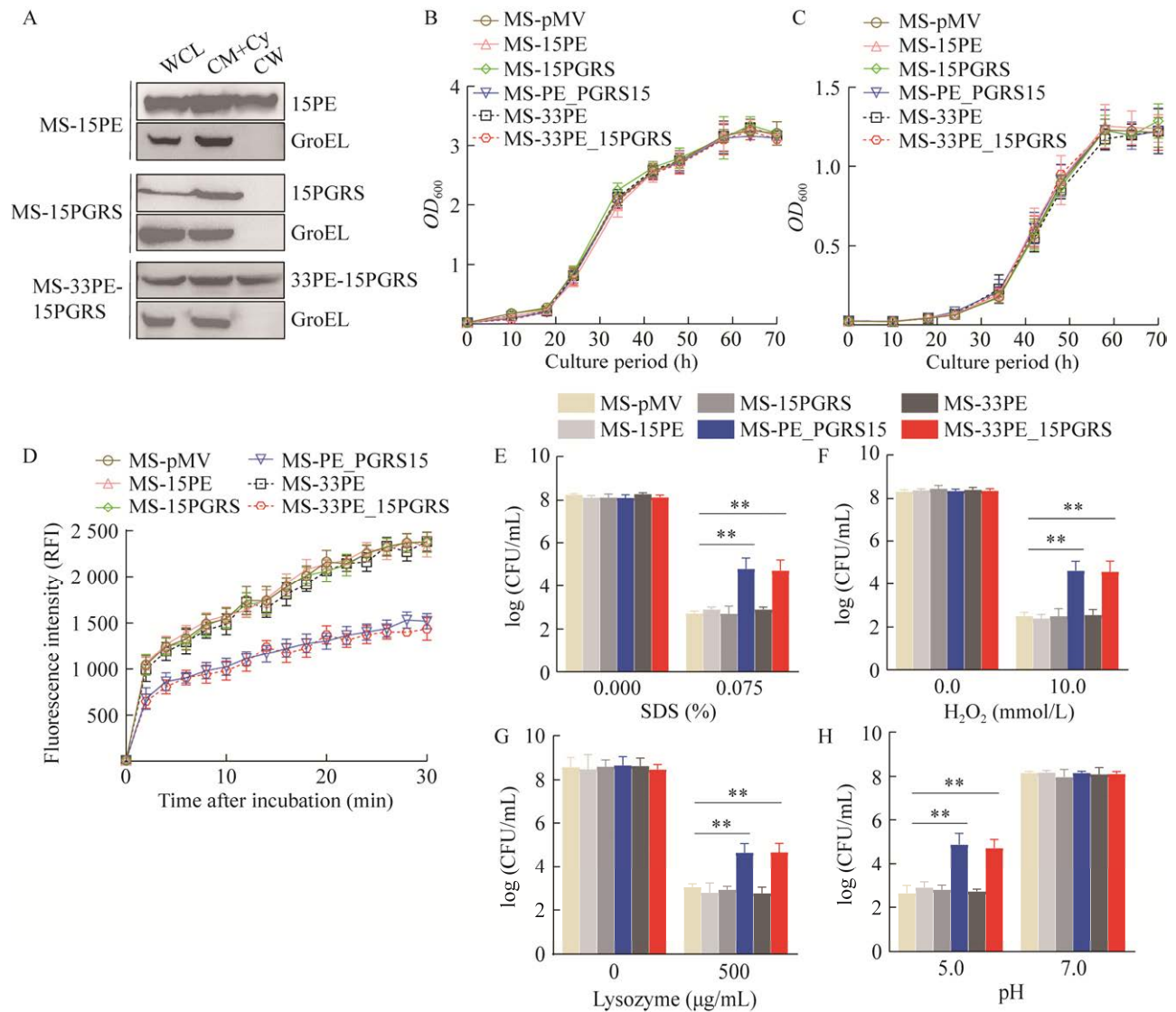


图 5 本研究中构建的质粒及重组菌图示

Figure 5 Schematic representation of the recombinant constructs used in this study. aa: Amino acids.



**图 6 PE 结构域影响 PE\_PGRS15 的细胞定位，而 PGRS 结构域影响其耐药机制**

Figure 6 PGRS domain of the PE\_PGRS15 protein affects mycobacterial cell wall permeability and stress resistance. A: Cell fractionation experiments were performed to determine the sub-cellular localization of the indicated proteins. WCL represents whole cell lysates, CM+Cy represents cytoplasmic membrane and cytoplasm, and CW represents cell wall. Cytosolic GroEL was detected as a cytoplasmic control. B: The growth of the indicated strains at 37 °C in Middlebrook 7H9 liquid medium was monitored by determining  $OD_{600}$  at 6 h or 12 h intervals. C: The growth of the indicated strains at 37 °C in Sauton's medium was monitored by determining  $OD_{600}$  at 6 h or 12 h intervals. D: Mid-log-phase cultures of the indicated strains were incubated in PBS with 25 mmol/L glucose and 2  $\mu\text{g/mL}$  ethidium bromide for the indicated time. The assay of accumulation of ethidium bromide over time in *M. smegmatis* was conducted at 37 °C. The mid-log-phase cultures of the indicated strains were either treated with medium alone or subjected to SDS for 8 h (E),  $\text{H}_2\text{O}_2$  for 12 h (F), and lysosome for 24 h (G) at the indicated concentrations or treated with different pH gradients for 6 h (H). Then, the recombinant strains were plated onto 7H10 plates by serially ten-fold dilution, and the bacterial CFUs were counted after 3–4 d of cultivation. Data are  $\bar{x} \pm s$  of technical triplicate from one representative of three or more independent experiments with similar results. Significant differences (\*:  $P < 0.05$ ; \*\*:  $P < 0.01$ ) are compared with MS-pMV (two-tailed Student's *t*-test).

耐受性以及细胞壁通透性的改变。以上结果证明, PE 结构域负责 PE\_PGRS15 的细胞定位, 而 PGRS 结构域负责其耐药机制等生理功能。

### 3 讨论与结论

PE\_PGRS 亚家族蛋白在 Mtb 生理和毒力方面具有重要作用, 然而单个成员的具体功能仍然有待研究<sup>[2,4-5]</sup>。组学及感染实验发现 PE\_PGRS15 在 Mtb 感染巨噬细胞和动物模型时, 表达上调<sup>[25-27]</sup>。而 *pe\_pgrs15* 基因缺失的 Mtb 在感染非人灵长类动物的肺部时, 毒力明显变弱<sup>[28]</sup>。在体外模拟 Mtb 感染的环境压力条件下, 也会诱导 *pe\_pgrs15* 基因的上调表达。比如, 芯片分析缺氧条件<sup>[29]</sup>、酸性条件<sup>[30]</sup>及 SDS<sup>[31]</sup>处理的 Mtb 的转录组时, 都发现 *pe\_pgrs15* 基因的上调表达。以上数据均暗示 PE\_PGRS15 在协助 Mtb 适应胞内感染或休眠环境时的重要作用。

Mtb 基因组编码 65 个 *pe\_pgrs* 基因, 其中至少有 51 基因能够表达有功能的蛋白质<sup>[3]</sup>。然而在 Mtb 中研究单个 PE\_PGRS 蛋白充满挑战, 主要原因在于该家族蛋白序列高度同源且功能冗余<sup>[8,32]</sup>。因此, 本研究在 Mtb 的经典替代模式菌——*M. smegmatis* 中过表达 PE\_PGRS15 来探索其生物学功能。由于 *M. smegmatis* 中不含有 PE\_PGRS 的同源蛋白, 因此结果不会受到过多干扰; 且本研究同时构建了多种截短和融合蛋白, 最大限度排除蛋白质过表达可能造成的假象, 从而使本研究更加严谨。当然, PE\_PGRS15 在 Mtb 的生理和毒力中具体扮演何种角色, 还需在 Mtb 中进一步验证。然而, 如何避开该亚家族其他成员的干扰, 是这类研究首要考虑的问题。

本研究证明 PE\_PGRS15 蛋白定位于细胞壁, 并显著改变了重组菌的菌落形态。而菌落形态的变化通常与细菌毒力和抗生素敏感性密

切相关<sup>[18]</sup>。环境压力及抗生素敏感实验证明, 过表达 PE\_PGRS15 可以提高 *M. smegmatis* 的耐受性。重组菌能够耐受众多环境压力和抗生素, 暗示其耐受机制应该是广谱的, 而不是针对某个特定的环境压力或抗生素。染料富集实验显示, MS-PE\_PGRS15 重组菌对疏水性和亲水性染料的富集作用都比对照菌弱。外排泵抑制剂 CCCP 的加入, 不会改变 2 株菌对染料的富集趋势, 这说明 PE\_PGRS15 是通过降低细胞壁的通透性, 而不是提高药物外排作用来增加耐受性。

分枝杆菌具有独特而复杂的细胞包膜(cell envelope)结构, 由内向外依次为细胞质膜、细胞壁和荚膜<sup>[21]</sup>。其中, 细胞壁和荚膜富含致密且疏水的脂质层, 厚度达 50 nm, 可占细菌宽度的十分之一<sup>[19]</sup>。这造成整个包膜结构错综复杂, 流动性和通透性极差, 是分枝杆菌抵御环境压力的天然屏障<sup>[19]</sup>。大量研究表明分枝杆菌菌落形态改变和耐药性增加与细胞壁脂质成分的改变有密切联系<sup>[18,33]</sup>。因此, PE\_PGRS15 可能影响了重组菌细胞壁脂质的合成。脂肪酸定量分析结果显示, PE\_PGRS15 的表达的确增加了重组菌细胞壁的脂质总含量, 具体表现在十一烷酸、十五烷酸、亚油酸、附子脂酸和木脂酸含量的增加。因此, PE\_PGRS15 可能通过影响脂肪酸代谢, 加速分枝菌酸等脂质的合成, 造成重组菌包膜进一步增厚; 增厚的细菌包膜更加致密, 通透性更差, 从而增加重组菌对环境压力和抗生素的抵抗。

PE\_PGRS 亚家族蛋白拥有类似的分子结构: 由 1 个 PE 结构域和 1 个 PGRS 结构域组成<sup>[3]</sup>。大量研究表明, PE 结构域可能作为信号肽, 负责 PE\_PGRS 蛋白定位于细胞表面<sup>[8,24]</sup>。亚细胞分级分离实验证实 PE\_PGRS15 的 PE 结构域也负责该蛋白的转运, 这进一步证明了该亚家族蛋



白 PE 结构域的普遍功能。单独在 *M. smegmatis* 中过表达 PE\_PGRS15 的 PGRS 结构域无法重现全长蛋白的表型, 且该结构域也不能转运至细胞表面。而与 PE\_PGRS33 的 PE 结构域融合表达, 既能实现 15PGRS 的细胞定位, 又能重现 PE\_PGRS15 全长蛋白的表型。这些结果表明, PE\_PGRS15 的 PE 结构域作为信号肽负责蛋白质的定位, 而 PGRS 结构域负责其具体的生物学功能。

总而言之, 本研究利用 *M. smegmatis* 替代 Mtb 对 PE\_PGRS15 的功能进行了细致研究。通过亚细胞定位分析、菌落形态观察、抗性检测和脂肪酸定量分析等, 证实了定位于细胞壁上的 PE\_PGRS15 可能通过影响脂质代谢, 造成细菌菌落形态、细胞壁通透性的改变, 从而影响细菌对环境压力及抗生素的敏感性。本研究深化了 PE\_PGRS 亚家族参与分枝杆菌耐药性的理解, 为研发新型抗痨药物及相关疫苗提供了新思路。

## 参考文献

- [1] WHO. Global tuberculosis report 2022[J/OL]. Available at: <https://www.who.int/publications/i/item/9789240061729>, 2022.10.27.
- [2] LI W, DENG WY, XIE JP. Expression and regulatory networks of *Mycobacterium tuberculosis* PE/PPE family antigens[J]. Journal of Cellular Physiology, 2019, 234(6): 7742-7751.
- [3] de MAIO F, BERISIO R, MANGANELLI R, DELOGU G. 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.
- [4] BRENNAN MJ. The enigmatic PE/PPE multigene family of mycobacteria and tuberculosis vaccination[J]. Infection and Immunity, 2017, 85(6): e00969-e00916.
- [5] ATES LS. New insights into the mycobacterial PE and PPE proteins provide a framework for future research[J]. Molecular Microbiology, 2020, 113(1): 4-21.
- [6] CHATRATH S, GUPTA VK, DIXIT A, GARG LC. PE\_PGRS30 of *Mycobacterium tuberculosis* mediates suppression of proinflammatory immune response in macrophages through its PGRS and PE domains[J]. Microbes and Infection, 2016, 18(9): 536-542.
- [7] BANU S, HONORÉ N, SAINT-JOANIS B, PHILPOTT D, PRÉVOST MC, COLE ST. Are the PE-PGRS proteins of *Mycobacterium tuberculosis* variable surface antigens?[J]. Molecular Microbiology, 2002, 44(1): 9-19.
- [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[J]. Molecular Microbiology, 2004, 52(3): 725-733.
- [9] KIM JS, KIM HK, CHO E, MUN SJ, JANG S, JANG J, YANG CS. PE\_PGRS38 interaction with HAUSP downregulates antimycobacterial host defense via TRAF6[J]. Frontiers in Immunology, 2022, 13: 862628.
- [10] QIAN JN, HU YW, ZHANG X, CHI MZ, XU SY, WANG HH, ZHANG XL. *Mycobacterium tuberculosis* PE\_PGRS19 induces pyroptosis through a non-classical caspase-11/GSDMD pathway in macrophages[J]. Microorganisms, 2022, 10(12): 2473.
- [11] LI W, DENG WY, ZHANG N, PENG HJ, XU Y. *Mycobacterium tuberculosis* Rv2387 facilitates mycobacterial survival by silencing TLR2/p38/JNK signaling[J]. Pathogens, 2022, 11(9): 981.
- [12] RENGARAJAN J, MURPHY E, PARK A, KRONE CL, HETT EC, BLOOM BR, GLIMCHER LH, RUBIN EJ. *Mycobacterium tuberculosis* Rv2224c modulates innate immune responses[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2008, 105(1): 264-269.
- [13] LI QM, ZHOU ML, FAN XY, YAN JL, LI WM, XIE JP. Mycobacteriophage SWU1 gp39 can potentiate multiple antibiotics against *Mycobacterium* via altering the cell wall permeability[J]. Scientific Reports, 2016, 6: 28701.
- [14] REN HP, LIU J. AsnB is involved in natural resistance of *Mycobacterium smegmatis* to multiple drugs[J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2006, 50(1): 250-255.
- [15] CHUANG YM, BANDYOPADHYAY N, RIFAT D, RUBIN H, BADER JS, KARAKOUSIS PC. Deficiency of the novel exopolyphosphatase Rv1026/PPX2 leads to metabolic downshift and altered cell wall

- permeability in *Mycobacterium tuberculosis*[J]. *mBio*, 2015, 6(2): e02428-14.
- [16] RODRIGUES L, MACHADO D, COUTO I, AMARAL L, VIVEIROS M. Contribution of efflux activity to isoniazid resistance in the *Mycobacterium tuberculosis* complex[J]. *Infection, Genetics and Evolution*, 2012, 12(4): 695-700.
- [17] BENTLEY WE, MIRJALILI N, ANDERSEN DC, DAVIS RH, KOMPALA DS. Plasmid-encoded protein: the principal factor in the “metabolic burden” associated with recombinant bacteria[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 1990, 35(7): 668-681.
- [18] SINGH P, RAO RN, REDDY JRC, PRASAD R, KOTTURU SK, GHOSH S, MUKHOPADHYAY S. PE11, a PE/PPE family protein of *Mycobacterium tuberculosis* is involved in cell wall remodeling and virulence[J]. *Scientific Reports*, 2016, 6: 21624.
- [19] DULBERGER CL, RUBIN EJ, BOUTTE CC. The mycobacterial cell envelope—a moving target[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2020, 18(1): 47-59.
- [20] VINCENT AT, NYONGESA S, MORNEAU I, REED MB, TOCHEVA EI, VEYRIER FJ. The mycobacterial cell envelope: a relict from the past or the result of recent evolution?[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2018, 9: 2341.
- [21] CAI XY, LIU L, QIU CH, WEN CZ, HE Y, CUI YX, LI SY, ZHANG X, ZHANG LH, TIAN CL, BI LJ, ZHOU ZH, GONG WM. Identification and architecture of a putative secretion tube across mycobacterial outer envelope[J]. *Science Advances*, 2021, 7(34): eabg5656.
- [22] NATARAJ V, VARELA C, JAVID A, SINGH A, BESRA GS, BHATT A. Mycolic acids: deciphering and targeting the Achilles’ heel of the tubercle bacillus[J]. *Molecular Microbiology*, 2015, 98(1): 7-16.
- [23] ZUMBO A, PALUCCI I, CASCIOFERRO A, SALI M, VENTURA M, D’ALFONSO P, IANTOMASI R, DI SANTE G, RIA F, SANGUINETTI M, FADDA G, MANGANELLI R, DELOGU G. Functional dissection of protein domains involved in the immunomodulatory properties of PE\_PGERS33 of *Mycobacterium tuberculosis*[J]. *Pathogens and Disease*, 2013, 69(3): 232-239.
- [24] CASCIOFERRO A, DELOGU G, COLONE M, SALI M, STRINGARO A, ARANCIA G, FADDA G, PALÙ G, MANGANELLI R. PE is a functional domain responsible for protein translocation and localization on mycobacterial cell wall[J]. *Molecular Microbiology*, 2007, 66(6): 1536-1547.
- [25] ROHDE KH, VEIGA DFT, CALDWELL S, BALÁZSI G, RUSSELL DG. Linking the transcriptional profiles and the physiological states of *Mycobacterium tuberculosis* during an extended intracellular infection[J]. *PLoS Pathogens*, 2012, 8(6): e1002769.
- [26] TALAAT AM, LYONS R, HOWARD ST, JOHNSTON SA. The temporal expression profile of *Mycobacterium tuberculosis* infection in mice[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2004, 101(13): 4602-4607.
- [27] KRUIH NA, TROUDT J, IZZO A, PRENNI J, DOBOS KM. Portrait of a pathogen: the *Mycobacterium tuberculosis* proteome *in vivo*[J]. *PLoS One*, 2010, 5(11): e13938.
- [28] DUTTA NK, MEHRA S, DIDIER PJ, ROY CJ, DOYLE LA, ALVAREZ X, RATTERREE M, BE NA, LAMICHHANE G, JAIN SK, LACEY MR, LACKNER AA, KAUSHAL D. Genetic requirements for the survival of tubercle bacilli in primates[J]. *The Journal of Infectious Diseases*, 2010, 201(11): 1743-1752.
- [29] RUSTAD TR, HARRELL MI, LIAO R, SHERMAN DR. The enduring hypoxic response of *Mycobacterium tuberculosis*[J]. *PLoS One*, 2008, 3(1): e1502.
- [30] ROHDE KH, ABRAMOVITCH RB, RUSSELL DG. *Mycobacterium tuberculosis* invasion of macrophages: linking bacterial gene expression to environmental cues[J]. *Cell Host & Microbe*, 2007, 2(5): 352-364.
- [31] FONTÁN PA, VOSKUIL MI, GOMEZ M, TAN D, PARDINI M, MANGANELLI R, FATTORINI L, SCHOOLNIK GK, SMITH I. The *Mycobacterium tuberculosis* sigma factor sigmaB is required for full response to cell envelope stress and hypoxia *in vitro*, but it is dispensable for *in vivo* growth[J]. *Journal of Bacteriology*, 2009, 191(18): 5628-5633.
- [32] DELOGU G, BRENNAN MJ, MANGANELLI R. *PE* and *PPE* genes: a tale of conservation and diversity[J]. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 2017, 1019: 191-207.
- [33] MAAN P, KUMAR A, KAUR J, KAUR J. Rv1288, a two domain, cell wall anchored, nutrient stress inducible carboxyl-esterase of *Mycobacterium tuberculosis*, modulates cell wall lipid[J]. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2018, 8: 421.