



结核分枝杆菌Rv3432c蛋白的原核表达与生物信息学分析*

易海波, 高兴红, 罗果, 徐鹏, 王欢[△]

遵义医科大学贵州省普通高等学校传染病与生物安全特色重点实验室(遵义 563099)

【摘要】目的 构建结核分枝杆菌(*Mycobacterium tuberculosis*, *M.tb*)Rv3432c基因的原核表达质粒并进行体外表达, 运用生物学信息学软件分析蛋白Rv3432c特征, 探讨抗*M.tb*新型药物靶点。**方法** 以灭活的结核分枝杆菌H37Rv基因组DNA为模板, PCR法扩增Rv3432c基因, 并与表达载体pET-28a构建原核表达重组质粒。SDS-PAGE分析表达产物并利用亲和层析的方法进行纯化。采用ProtParam、Pfam online tool、SOMPA、ProtScale、TMHMM、SignalP 6.0、NetPhos3.1、SUMOsp 2.0、SWISS-MODEL等生物信息学软件分析蛋白Rv3432c的生物学特性。**结果** pET-28a-Rv3432c重组质粒测序结果与目的基因完全一致; SDS-PAGE分析表明, 该融合蛋白以可溶性蛋白形式存在, 相对分子质量约为 55×10^3 , 与预期大小相符。蛋白Rv3432c为亲水性蛋白(GRAVY值为-0.079)。蛋白Rv3432c为无跨膜结构域和信号肽的蛋白。Rv3432c二级结构主要由无规则卷曲(39.78%)和 α -螺旋(39.57%)构成, 结构比较松散。**结论** 成功构建*M.tb*蛋白Rv3432c的原核表达质粒, 并利用生物信息学分析其结构, 为进一步研究Rv3432c在结核病发生发展中的作用以及抗*M.tb*新型药物靶点奠定了基础。

【关键词】 结核分枝杆菌 Rv3432c蛋白 原核表达 生物信息学

Prokaryotic Expression and Bioinformatic Analysis of Rv3432c From *Mycobacterium tuberculosis* YI Haibo, GAO Xinghong, LUO Guo, XU Peng, WANG Huan[△]. Key Laboratory of Infectious Disease & Bio-safety, Provincial Department of Education, Zunyi Medical University, Zunyi 563099, China

[△] Corresponding author, E-mail: wanghuan928@163.com

【Abstract】 Objective To express the protein encoded by the Rv3432c gene of *Mycobacterium tuberculosis* (*M.tb*) *in vitro* by prokaryotic expression, to analyze the structure of the Rv3432c protein by using bioinformatics software, and to explore for new drug targets against *M.tb*. **Methods** The Rv3432c gene was amplified by PCR using the genomic DNA of the inactivated *M.tb* strain H37Rv as the template and a recombinant plasmid was constructed with the expression vector pET-28a. The expression products were analyzed by SDS-PAGE and purified using affinity chromatography. The biological properties of Rv3432c were analyzed with ProtParam, the Pfam online tool, SOMPA, ProtScale, TMHMM SignalP 6.0, NetPhos3.1, SUMOsp 2.0, and SWISS-MODEL. **Results** pET-28a-Rv3432c recombinant plasmid sequencing results were fully consistent with those of the target gene. SDS-PAGE analysis showed that the fusion protein existed in the form of a soluble protein with a relative molecular mass of about 55×10^3 , which matched the expected size. ProtParam analysis showed that the Rv3432c protein was hydrophilic (showing a GRAVY value of -0.079). Rv3432c was a protein with no transmembrane structural domains or signal peptide. The secondary structure of Rv3432c mainly consisted of random coils (39.78%) and α -helix (39.57%) and was relatively loosely structured. **Conclusion** We successfully constructed a prokaryotic expression plasmid of the Rv3432c protein and analyzed its structure using bioinformatics, laying the foundation for further research on the role of Rv3432c in the pathogenesis and progression of tuberculosis as well as the identification of new drug targets against *M.tb*.

【Key words】 *Mycobacterium tuberculosis* Rv3432c protein Prokaryotic expression Bioinformatics

结核病是由结核分枝杆菌(*Mycobacterium tuberculosis*, *M.tb*)感染引起, 严重威胁人类健康的重大传染病。世界卫生组织(World Health Organization, WHO)

发表的全球结核病报告指出, 全球约有20亿~30亿感染*M.tb*, 2022年新发结核病病例约1060万, 约有130万人死于与结核病相关的疾病^[1]。虽然近年来我国结核病发病率有所下降, 但仍是结核病发病率较高的国家之一, 而耐药结核病的流行加剧了我国结核病控制的难度。*M.tb*耐药机制之一是能在吞噬细胞的酸胁迫下存活, 而这样的生存伴随着菌体进入休眠状态(其复制、基因表达及体内代谢活动大幅减弱), 减少了*M.tb*对大多数抗结核药物的敏感性, 从而产生耐药。因此, 研究*M.tb*的抗酸系

* 2018年度学术新苗培养及创新探索专项项目(黔科合平台人才[2018]5772-037)、贵州省教育厅滚动支持省属高校科研平台团队项目(黔教教[2022]027号)和贵州省普通高等学校青年科技人才成长项目(黔教合KY字[2022]279)资助

[△] 通信作者, E-mail: wanghuan928@163.com

出版日期: 2024-03-20

统对于耐药结核病的防治有重要意义。

谷氨酸依赖型的抗酸系统在细菌酸应激反应过程中发挥着非常关键的作用, 主要由谷氨酸脱羧酶(glutamic acid decarboxylase, GAD)中GadA、GadB以及逆向转运蛋白(GadC)组成。GAD广泛存在于植物、动物和微生物中, 能催化L-谷氨酸进行脱羧反应生成 γ -氨基丁酸(γ -aminobutyric acid, GABA), 参与抗酸等重要的生理过程^[2]。目前, 已有大量细菌(如植物乳杆菌、月形单胞菌、大肠杆菌等)GAD的氨基酸序列被报道^[3-6]。

研究发现谷氨酸脱羧酶在*M.tb*的正常生长、酸性培养基和巨噬细胞感染过程中的mRNA表达和酶活性等方面不可或缺。然而谷氨酸脱羧酶在*M.tb*中的作用尚不清楚。因此, 进一步分析谷氨酸脱羧酶在*M.tb*耐酸性和抗生素耐药性作用机制可为结核病的防治提供新的思路。Rv3432c蛋白在*M.tb*基因组中被注释为谷氨酸脱羧酶, 本研究拟通过对Rv3432c蛋白进行表达和生物学信息分析, 进一步研究Rv3432c在结核病发生发展中的作用以及抗*M.tb*新型药物靶点提供研究基础。

1 材料与方法

1.1 基因组DNA和质粒

本研究所用的*M.tb*标准株H37Rv(灭活)基因组DNA由遵义医科大学附属医院检验科陈玲老师惠赠; pET28a质粒由遵义医科大学许运斌副教授惠赠; pMD19T质粒载体和感受态细胞BL21(D3)购于宝日生物技术(北京)有限公司。

1.2 试剂

2×Taq RCR Master Mix、DNA连接酶(T_4)购于宝日生物技术(北京)有限公司; 质粒抽提试剂盒、DNA胶回收试剂盒、PCR产物纯化试剂盒购于生工生物工程(上海)股份有限公司; 蛋白纯化试剂盒购于上海碧云天生物技术有限公司。

1.3 方法

1.3.1 引物设计与合成

获取NCBI数据库*M.tb* H37Rv全基因组序列信息, 运用Primer Permier 5.0设计Rv3432c基因的扩增引物, 在引物的N端和C端添加EcoR I 和Kpn I 酶切位点。上游引物5'-ATAGAATTCATGTGTCTCGCAGTCACCCGTCC-3', 下游引物5'-CAAGCTTGCTAGTGC GCGAAATGCTGTGC-3'。该引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

1.3.2 扩增目的基因

用高保真酶进行PCR扩增Rv3432c的基因, 长度为1383 bp。20 μ L反应体系如下: 2×Taq RCR Master Mix

10 μ L, 上、下游引物各1 μ L, H37Rv灭活基因组模板1 μ L, 补水至20 μ L。扩增条件如下: 94 $^{\circ}$ C 3 min预变性; 98 $^{\circ}$ C 变性10 s, 60 $^{\circ}$ C 退火30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸1 min, 共进行35个循环; 循环结束后72 $^{\circ}$ C延伸10 min。RCR扩增产物用1%琼脂糖凝胶电泳进行鉴定。

1.3.3 pET28a-Rv3432c载体构建及鉴定

EZ-10柱式PCR产物纯化试剂盒回收PCR产物, 回收产物加A尾后连接到pMD19T质粒载体中, 经PCR和EcoR I、Kpn I 双酶切鉴定后, 采用EZ-10柱式DNA胶回收试剂盒回收的双酶切的Rv3432c基因片段, 将回收的目的片段与pET28a载体连接构建pET28a-Rv3432c载体。提取pET28a-Rv3432c质粒进行转化, 挑取阳性单菌落于含有KAN的LB液体培养基中37 $^{\circ}$ C振荡培养过夜, 收集菌株并提取质粒进行PCR鉴定, 上述方法参照文献所述方法^[7]进行。在进行PCR鉴定时均设计引物阴性对照(除不加模板外, 其余成分均与实验组相同)。

1.3.4 Rv3432c蛋白表达及纯化

1.3.4.1 Rv3432c蛋白表达

参照文献所述方法^[7]进行Rv3432c蛋白表达。将空载体pET28a转化到大肠杆菌*E.coli* BL21(DE3)菌株后, 将菌液涂布于卡那霉素抗性平板上; 经含卡那霉素的LB抗性平板传代后的BL21(DE3)(pET28a)及BL21(DE3)(pET28a-Rv3432c)挑取单克隆菌接种于5 mL LB+KAN液体中振荡培养过夜; 将种子液以1:100接种于100 mL新鲜的LB+KAN液体培养基中, 37 $^{\circ}$ C振荡培养至光密度(OD)₆₀₀=0.6, 加入终浓度为0.4 mmol/L异丙基硫代 β -D-半乳糖苷(IPTG)于37 $^{\circ}$ C进行诱导并处理样品; 样品经12%SDS-PAGE凝胶电泳分离, 考马斯亮蓝R-250染色, 脱色后观察结果。

1.3.4.2 Rv3432c蛋白表达条件优化

为提高蛋白表达量, 分别对诱导剂IPTG的浓度、诱导温度进行优化。保持诱导温度为37 $^{\circ}$ C, 分别加入0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mmol/mL IPTG诱导培养8 h, 对照组不添加IPTG, 观察不同浓度诱导剂IPTG对Rv3432c蛋白表达量的影响。保持诱导剂IPTG浓度为1.0 mmol/mL, 于16 $^{\circ}$ C、28 $^{\circ}$ C、37 $^{\circ}$ C下诱导培养8 h。观察不同诱导温度对Rv3432c蛋白表达量的影响。

1.3.4.3 纯化重组蛋白

纯化重组蛋白按照说明书进行。将BL21(DE3)(pET28a-Rv3432c)的种子液以1:100接种于LB液体培养基(含KAN), 37 $^{\circ}$ C振荡培养至OD₆₀₀=0.6, 加1.0 mmol/mL IPTG于进行诱导培养在37 $^{\circ}$ C下诱导8 h。将1 L菌液移至离心管, 4 $^{\circ}$ C, 6000 \times g离心10 min, 弃上清, 记录沉淀质量, 按照每克细菌沉淀湿重加入3 mL裂解液、再加入溶菌酶

(终质量浓度为1 mg/mL)并混匀,超声破碎。加入RNase A至10 $\mu\text{g/mL}$ 及DNase I至5 $\mu\text{g/mL}$,冰上继续裂解,裂解完成后,离心搜集上清液,进行亲和层析,按照说明书分别加入10、20、30、40、50、100 mmol/L咪唑洗脱液进行洗脱得到纯化蛋白,经12%SDS-PAGE凝胶电泳分离鉴定。

1.3.5 蛋白生物信息学分析

NCBI数据库获取结核分枝杆菌H37Rv Rv3432c基因序列及蛋白序列,利用ORF Finder程序,预测Rv3432c基因序列开放阅读框。利用ProtParam分析Rv3432c蛋白的理化性质,ProtScale分析Rv3432c蛋白的疏水性,TMHMM法分析蛋白的跨膜区域,SignalP6.0 service分析Rv3432c蛋白的信号肽, Pfam 在线工具预测蛋白保守结构域, SOMPA预测Rv3432c蛋白的二级结构,采用NetPhos3.1 servera软件分析Rv3432c蛋白的磷酸化位点, SUMOsp 2.0预测sumo化位点,采用SWISS-MODEL预测蛋白的三级结构并建立三维模型。

2 结果

2.1 Rv3432c基因扩增结果

以灭活的 *M. tb* H37Rv 基因组DNA为模板,进行PCR扩增Rv3432c基因,用琼脂糖电泳进行检测,出现大小约为1 383 bp基因条带(图1)。

2.2 重组质粒双酶切鉴定

将Rv3432c基因克隆至pMD19T质粒载体中获得重组克隆质粒pMD19T-Rv3432c,经PCR鉴定得到1 383 bp大小的条带(图2A),而阴性对照无条带出现。并用限制性内切酶EcoR I、Kpn I对pMD19T-Rv3432c进行双酶切鉴定,同时只用限制性内切酶EcoR I对pMD19T-Rv3432c进行单酶切。双酶切后出现大小约1 383 bp的Rv3432c基因片段,单酶切后在1383 bp处未出现条带(图2B)表明重组

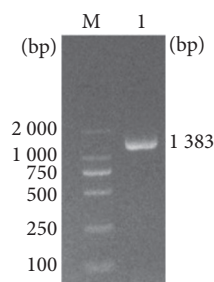


图1 PCR扩增Rv3432c

Fig 1 Result of PCR amplification of Rv3432c

M: DNA marker; 1: PCR product of Rv3432c.

克隆质粒pMD19T-Rv3432c构建成功。从pMD19T-Rv3432c质粒上酶切下Rv3432c基因片段并将其连接至pET28a表达载体,转化得到pET28a-Rv3432c重组质粒。用琼脂糖电泳进行检测,重组质粒出现大小约1 383 bp的特异性条带(图2C),而阴性对照无条带出现。

2.3 重组融合蛋白的诱导表达和纯化

将pET28a-Rv3432c重组质粒转化入BL21(DE3)中形成表达菌,使用IPTG进行诱导表达后用12%SDS-PAGE鉴定Rv3432c蛋白。结果表明,诱导表达产物在相对分子质量为 55×10^3 附近出现特异性蛋白条带,而且诱导温度为37 $^{\circ}\text{C}$ 时更有利于重组蛋白的表达(图3)。同时发现菌体裂解后上清液中含有大量目的蛋白,而沉淀中目的蛋白表达量较少,表明Rv3432c蛋白主要以可溶性蛋白的形式存在(图4)。在37 $^{\circ}\text{C}$ 下诱导培养8 h, 1 mmol/L IPTG浓度时Rv3432c表达量最高(图5)。采用His标签蛋白纯化试剂盒纯化Rv3432c蛋白,当用100 mmol/L咪唑洗脱液进行洗脱得到相对分子质量约为 55×10^3 的单一蛋白条带,纯化效果良好(图6)。

2.4 Rv3432c基因及其编码的蛋白的生物信息学分析

2.4.1 Rv3432c基因基本信息

NCBI的GenBank中显示Rv3432c基因全长1 383 bp,

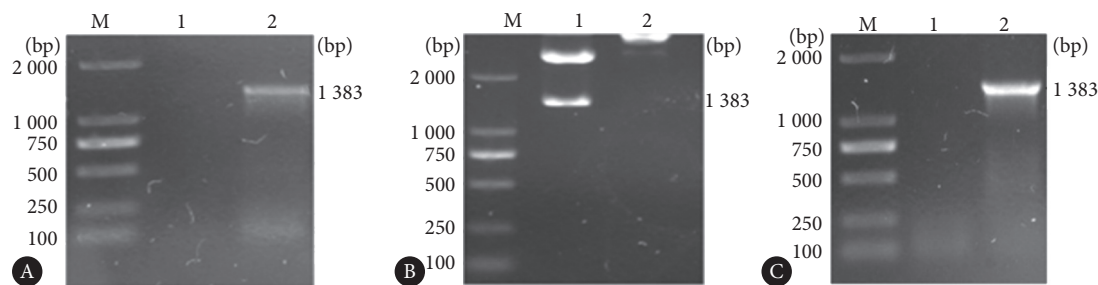


图2 重组质粒的鉴定

Fig 2 The identification of recombinant cloned plasmid

A, PCR identification of recombinant cloned plasmid pMD19T-Rv3432c (M: DNA marker; 1: the negative control; 2: PCR product of the positive clone). B, Enzyme digestion identification of recombinant cloned plasmid pMD19T-Rv3432c (M: DNA marker; 1: the duplex cleavage product; 2: the singlet cleavage product). C, PCR identification of recombinant expression plasmid pET28a-Rv3432c (M: DNA marker; 1: the negative control; 2: the PCR product of the positive clone).

位于*M.tb* H37Rv基因组的3850372 ~ 3851754位置。ORF Finder程序分析显示Rv3432c基因是一个1 383 bp的完整开放阅读框, 其编码谷氨酸脱羧酶, 蛋白登录号为NP_217949.1。

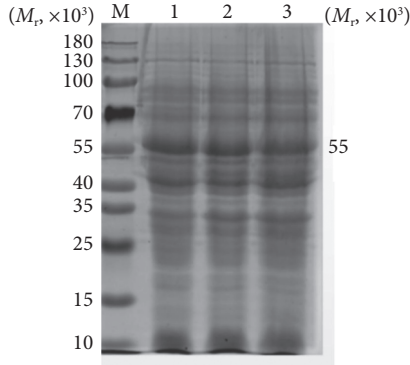


图 3 不同温度下Rv3432c融合蛋白的表达

Fig 3 The different temperature conditions to induce Rv3432c protein expression

M: protein marker; 1: 37 °C; 2: 28 °C; 3: 16 °C.

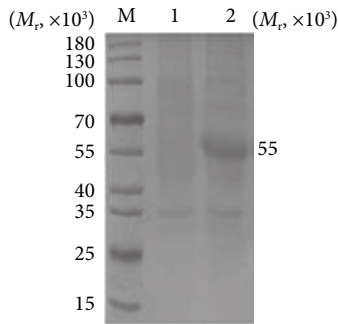


图 4 Rv3432c融合蛋白表达形式

Fig 4 The expression form of Rv3432c fusion protein

M: protein marker; 1: supernatant of cell lysate; 2: precipitation of cell lysate.

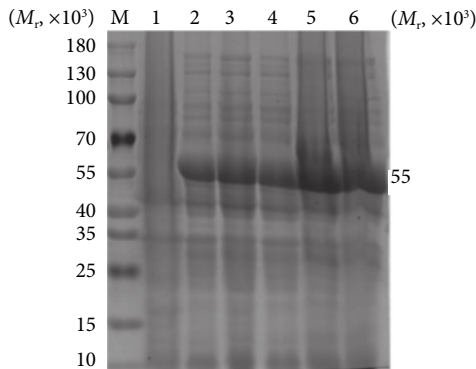


图 5 不同IPTG诱导浓度下的Rv3432c蛋白表达浓度

Fig 5 The different IPTG concentration conditions to induce Rv3432c protein expression

M: protein marker; 1: 0 mmol/L; 2: 0.2 mmol/L; 3: 0.4 mmol/L; 4: 0.6 mmol/L; 5: 0.8 mmol/L; 6: 1.0 mmol/L of IPTG.

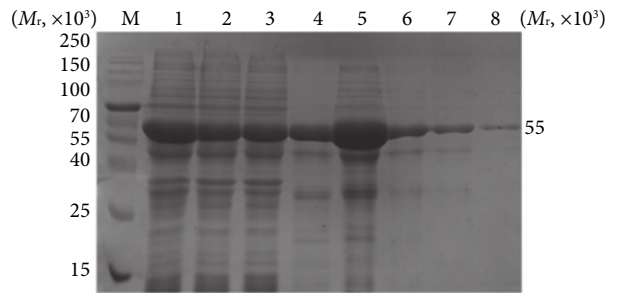


图 6 Rv3432c融合蛋白的纯化

Fig 6 Results of purification of the Rv3432c fusion protein

M: protein marker; 1: supernatant of Rv3432c fusion protein; 2: the fluid flowed through the affinity column; 3: 10 mmol/L iminazole elution; 4: 20 mmol/L iminazole elution; 5: 30 mmol/L iminazole elution; 6: 40 mmol/L iminazole elution; 7: 50 mmol/L iminazole elution; 8: 100 mmol/L iminazole elution.

2.4.2 Rv3432c蛋白的理化性质分析

利用ProtParam、ProtScale、Compute pI/Mw等程序对结核分枝杆菌的Rv3432c蛋白理化性质进行分析。结果显示, 该蛋白质的分子结构式为 $C_{2275}H_{3498}N_{622}O_{661}S_{20}$, 原子总数为7076个, 理论等电点5.37, 理论相对分子质量为51 779.77。在体外半衰期为30 h, 不稳定系数为31.34, 属于稳定型蛋白质。Rv3432c蛋白由329个非极性氨基酸(A, I, L, F, W, V)和461个极性氨基酸(N, C, Q, S, T, Y)组成, 分别占41.65%和58.35%。其中Val(V)48个(占10.4%), 其次Ala(A)有45个(占9.8%), 没有检测到Pyl(O)和Sec(U); 共有58个酸性氨基酸(Glu+Asp), 41个碱性氨基酸(Arg+Lys), 见表1。

表 1 蛋白Rv3432c的氨基酸组成

Table 1 Amino acid composition of the Rv3432c protein

Amino acid	Ala	Arg	Asn	Asp	Cys	Gln	Glu	Gly	His	Ile
Number	45	30	11	33	4	9	25	38	16	14
Mol/%	9.8	6.5	2.4	7.2	0.9	2.0	5.4	8.3	3.5	3.0
Amino acid	Lys	Met	Phe	Pro	Ser	Thr	Trp	Tyr	Val	Pyl
Number	11	16	20	28	24	25	9	15	48	0
Mol/%	2.4	3.5	4.3	6.1	5.2	5.4	2.0	3.3	10.4	0.0

2.4.3 亲疏水性、跨膜区和信号肽预测

利用ProtScale工具对Rv3432c蛋白亲疏水性分析发现, Rv3432c蛋白疏水性最大值是2.389, 最小值是-2.100(图7)。ProtParam软件分析结果显示, Rv3432c蛋白的GRAVY值为-0.079, 表明Rv3432c蛋白为亲水蛋白, 与ProtScale预测结果相符。TMHMM2.0软件显示Rv3432c蛋白不存在跨膜区, 属于非跨膜蛋白。通过Signalp6.0对Rv3432c蛋白进行信号肽切割位点预测,

显示该蛋白没有信号肽,表明Rv3432c蛋白不属于分泌蛋白。

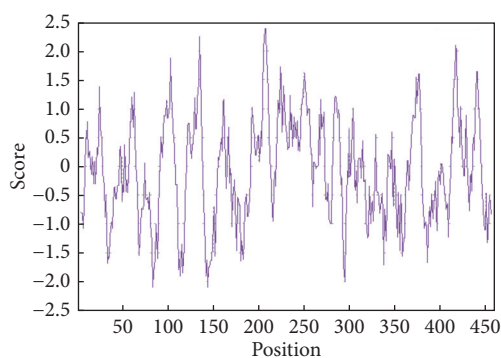


图 7 Rv3432c蛋白疏水性分析

Fig 7 Hydrophobic analysis of the Rv3432c protein

2.4.4 保守结构域分析

利用Pfam在线工具对Rv3432c蛋白的保守结构域分析发现,在Rv3432c蛋白的N端32~381位氨基酸有一个II型吡哆醛依赖性脱羧酶(Group II pyridoxal-dependent decarboxylases)保守结构域,该结构域与芳香族氨基酸脱羧有关,表明该蛋白为脱羧酶。

2.4.5 功能磷酸化位点及SUMO化位点预测

蛋白Rv3432c有29个磷酸化位点,其中有14个磷酸化丝氨酸位点,分别位于7、12、35、55、101、119、124、149、274、281、348、377、392、426位氨基酸;有9个磷酸

苏氨酸位点,分别位于18、65、78、121、191、203、341、387、397位氨基酸;有6个磷酸化酪氨酸位点,分别位于89、180、188、340、386、405位氨基酸(图8)。预测发现,Rv3432c蛋白有3个可以SUMO化的位点,分别位于204~208、414~418、448位氨基酸。

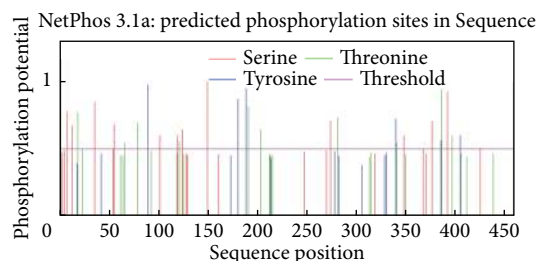


图 8 Rv3432c蛋白磷酸化位点分析

Fig 8 Predicted phosphorylated sites of the Rv3432c protein

2.4.6 Rv3432c蛋白结构及同源建模

SOMPA软件预测Rv3432c蛋白的二级结构(图9)显示,Rv3432c蛋白主要由无规卷曲结构(约39.78%)和 α -螺旋(约39.57%)组成,延伸链(约5.65%)和 β -转角(约14.57%),表明该蛋白结构比较松散。利用SWISS-MODEL软件,以3hbx.1.A为模板进行同源三级建模(图10),结构中主要是无规卷曲结构和 α -螺旋,并且结构较松散,其GMQE评分为0.83,Qmean评分为0.67,说明该模型结果可靠。

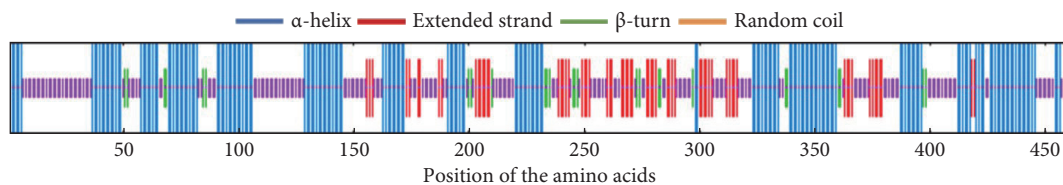


图 9 Rv3432c蛋白二级结构预测

Fig 9 Prediction of the two-level structure of the Rv3432c protein

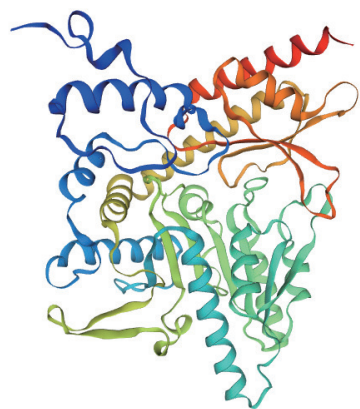


图 10 Rv3432c蛋白三级结构预测

Fig 10 Prediction of the three-level structure of the Rv3432c protein

3 讨论

*M.tb*能够长期潜伏在宿主细胞(尤其在巨噬细胞内的滞留)是结核病的重要来源,吞噬体酸化是巨噬细胞控制胞内致病菌的主要机制之一。因此,识别结核分枝杆菌应对酸性环境的基因有助于深化对*M.tb*致病机理的认识,发现抗*M.tb*新型药物靶点。GAD是一种常见的抗酸系统,存在于能在极端酸性条件下生存的细菌中^[8-12]。GAD系统由位于细胞质中的谷氨酸脱羧酶GadB(或GadA)和位于细胞膜上的Glu/GABA反向转运蛋白GadC组成,GadA或GadB通过利用细胞质中的游离质子将谷氨酸转化为GABA。当pH<5.6时,细胞质中的

GadB会迁移到内膜附近,以最大限度地与跨膜蛋白GadC协作^[13]。研究证实,*M.tb*基因组中存在基因能编码Gad蛋白,这些蛋白在*M.tb*的正常生长、酸性培养基中存活和巨噬细胞感染过程中的mRNA表达和酶活性等方面不可或缺^[14]。同时,谷氨酸脱羧酶的表达与抗生素耐药性有关,这表明GadB、耐酸性和抗生素耐药性之间存在联系^[15-17]。而GAD在分枝杆菌中的作用尚不清楚。因此,进一步分析GAD在*M.tb*耐酸性和抗生素耐药性作用机制可为结核病的防治提供新的思路。本研究通过扩增*M.tb* Rv3432c基因,并将其克隆至pET28a载体。SDS-PAGE结果显示BL21(DE3)(pET28a-Rv3432c)表达菌在相对分子质量约 55×10^3 附近出现与预期结果相符的条带,纯化后获得高纯度Rv3432c蛋白。

生物信息学作为一门新兴的学科,已被广泛应用于预测蛋白质的结构和功能^[18-19]。本研究运用生物信息学分析Rv3432c蛋白的结构域时发现,N端32-381氨基酸位置有一个II型吡哆醛依赖性脱羧酶保守序列,该序列芳香族氨基酸脱羧相关,笔者认为Rv3432c基因编码谷氨酸脱羧酶。生物信息学分析结果还显示*M.tb*Rv3432c蛋白为亲水性蛋白,不存在跨膜区。融合蛋白表达形式实验结果表明,Rv3432c蛋白以可溶性蛋白的形式存在细胞上清液中,与生物信息学分析结果一致。通过分析Rv3432c蛋白二级结构和三级结构发现,无规则卷曲结构所占比例最高(约39.78%)导致了Rv3432c蛋白比较松散,位于蛋白质的表面。通过蛋白磷酸化分析,Rv3432c蛋白含有的多个磷酸化位点、SUMO化修饰位点以及翻译后修饰位点。而蛋白的磷酸化修饰会调节蛋白酶活性、改变蛋白构象、影响蛋白相互作用,甚至影响蛋白的稳定,提示Rv3432c蛋白可能参与调控宿主细胞信号转导通路的磷酸化状态以及介导细胞间的信号转导过程。

综上所述,本研究通过构建pET28a-Rv3432c表达菌株、纯化Rv3432c蛋白并对其结构进行预测,有利于发现Rv3432c的新功能及其与致病的相关性,为进一步研究Rv3432c蛋白的生物学功能提供基础。从而为探究*M.tb*致病机制提供新线索及为抗结核杆菌药物的研发提供理论基础。

* * *

作者贡献声明 易海波负责论文构思、数据审编、正式分析、经费获取、研究方法、研究项目管理、验证和初稿写作,高兴红负责论文构思、数据审编、正式分析、研究方法和验证,罗果和徐鹏负责论文构思、数据审编、正式分析、研究方法、提供资源和验证,王欢负责论文构思、数据审编、正式分析、经费获取、研究方法、研究项目管理、提供资源、验证、初稿写作和审读与编辑写作。所有作者已经同意将文章提交给本

刊,且对将要发表的版本进行最终定稿,并同意对工作的所有方面负责。**Author Contribution** YI Haibo is responsible for conceptualization, data curation, formal analysis, funding acquisition, methodology, project administration, validation, and writing--original draft. GAO Xinghong is responsible for conceptualization, data curation, formal analysis, methodology, and validation. LUO Guo and XU Peng are responsible for conceptualization, data curation, formal analysis, methodology, resources, and validation. WANG Huan is responsible for conceptualization, data curation, formal analysis, funding acquisition, methodology, project administration, resources, validation, writing--original draft, and writing--review and editing. All authors consented to the submission of the article to the Journal. All authors approved the final version to be published and agreed to take responsibility for all aspects of the work.

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

Declaration of Conflicting Interests All authors declare no competing interests.

参 考 文 献

- [1] WHO. Global tuberculosis report 2023. (2023-11-07)[2024-02-09]. <https://www.who.int/teams/global-tuberculosis-programme/tb-reports/global-tuberculosis-report-2023>.
- [2] STRAUSBAUCH P H, FISCHER E H. Chemical and physical properties of *Escherichia coli* glutamate decarboxylase. *Biochemistry*, 1970, 9(2): 226-232. doi: 10.1021/bi00804a006.
- [3] SHIN S M, KIM H, JOO Y, et al. Characterization of glutamate decarboxylase from *Lactobacillus plantarum* and its C-terminal function for the pH dependence of activity. *J Agric Food Chem*, 2014, 62(50): 12186-12193. doi: 10.1021/jf504656h.
- [4] HUANG J, FANG H, GAI Z C, et al. *Lactobacillus brevis* CGMCC 1306 glutamate decarboxylase: crystal structure and functional analysis. *Biochem Biophys Res Commun*, 2018, 503(3): 1703-1709. doi: 10.1016/j.bbrc.2018.07.102.
- [5] SAGONG H Y, SON H F, KIM S, et al. Crystal structure and pyridoxal 5-phosphate binding property of lysine decarboxylase from *Selenomonas ruminantium*. *PLoS One*, 2016, 11(11): e0166667. doi: 10.1371/journal.pone.0166667.
- [6] MARAS B, SWEENEY G, BARRA D, et al. The amino acid sequence of glutamate decarboxylase from *Escherichia coli*. *Eur J Biochem*, 1992, 204: 93-98. doi: 10.1111/j.1432-1033.1992.tb16609.x.
- [7] 刘田, 万李, 周勇, 等. 结核分枝杆菌Rv1787基因编码蛋白PPE25的原核表达及生物信息学分析. *中国病原生物学杂志*, 2019, 14(7): 765-772. doi: CNKI:SUN:ZISC.0.2019-07-006.
- [8] LIU T L, WANG L, ZHOU Y, et al. Prokaryotic expression and protein bioinformatic analysis of the *Mycobacterium tuberculosis* Rv1787 gene encoding the protein PPE25. *J Pathog Biol*, 2019, 14(7): 765-772. doi: CNKI:SUN:ZISC.0.2019-07-006.
- [8] CHEN Z Z, KAN J Q, SHI H. Recent progress in molecular mechanism of acid resistance in *Escherichia coli*. *Food Science*, 2015, 36(21): 273-278. doi: 10.7506/spkx1002-6630-201521051.

- [9] 彭春龙, 黄俊, 赵伟睿, 等. 酸胁迫下短乳杆菌谷氨酸脱羧酶系统关键基因的表达及酶活性响应. *高校化学工程学报*, 2015, 29(2): 359–365. doi: 10.3969/j.issn.1003-9015.2015.02.017.
- PENG C L, HUANG J, ZHAO W R, *et al.* Effects of acid stress on the expression of key genes of glutamate decarboxylase system and enzyme activity in *Lactobacillus brevis*. *J Chem Eng Chin Univ*, 2015, 29(2): 359–365. doi: 10.3969/j.issn.1003-9015.2015.02.017.
- [10] FREDDI L, DAMIANO M A, CHALOIN L, *et al.* The glutaminase-dependent system confers extreme acid resistance to new species and atypical strains of *Brucella*. *Front Microbiol*, 2017, 8: 2236. doi: 10.3389/fmicb.2017.02236.
- [11] BOONBURAPONG B, LALOKNAM S, INCHAROENSAKDI A. Accumulation of gamma-aminobutyric acid in the halotolerant cyanobacterium *Aphanothece halophytica*, under salt and acid stress. *J Appl Phycol*, 2016, 28(1): 1–8. doi: 10.1007/s10811-015-0523-7.
- [12] TRAMONTI A, VISCA P, De CANIO M, *et al.* Functional characterization and regulation of gadX, a gene encoding an AraC/XylS-like transcriptional activator of the *Escherichia coli* glutamic acid decarboxylase system. *J Bacteriol*, 2002, 184(10): 2601–2613. doi: 10.1128/JB.184.10.2603-2613.2002.
- [13] BRAUN H S, SPONDER G, ASCHENBACH J R, *et al.* The GadX, regulon affects virulence gene expression and adhesion of porcine enteropathogenic *Escherichia coli* *in vitro*. *Vet Anim Sci*, 2017, 3: 10–17. doi: 10.1016/j.vas.2017.04.001.
- [14] RUPAL R, VINAYAK S, BIJINA J M, *et al.* Mycobacterial response to an acidic environment: protective mechanisms. *Pathog Dis*, 2022, 80(1): ftac032. doi: 10.1093/femspd/ftac032.
- [15] NGUYEN L, PIETERS J. The trojan horse: survival tactics of pathogenic mycobacteria in macrophages. *Trends Cell Biol*, 2005, 15(5): 269–276. doi: 10.1016/j.tcb.2005.03.009.
- [16] NGUYEN L, WALBURGER A, HOUBEN E, *et al.* Role of protein kinase g in growth and glutamine metabolism of *Mycobacterium bovis* BCG. *J Bacteriol*, 2005, 187(16): 5852–5856. doi: 10.1128/JB.187.16.5852-5856.2005.
- [17] LEE J J, LIM J, GAO S, *et al.* Glutamate mediated metabolic neutralization mitigates propionate toxicity in intracellular *Mycobacterium tuberculosis*. *Sci Rep*, 2018, 8: 8506. doi: 10.1038/s41598-018-26950-z.
- [18] 姚松, 梁鹏, 涂清鲜, 等. 基于生物信息学方法分析急性心肌梗死机制中铁死亡关键基因. *遵义医科大学学报*, 2023, 46(4): 357–364. doi: 10.14169/j.cnki.zunyixuebao.2023.0053.
- YAO S, LIANG P, TU Q X, *et al.* Bioinformatics-based study of key genes for ferroptosis in the mechanism of acute myocardial infarction. *J Zunyi Med Univ*, 2023, 46(4): 357–364. doi: 10.14169/j.cnki.zunyixuebao.2023.0053.
- [19] 左青青, 钱露, 闻伟铿, 等. 千里光过氧化氢酶基因序列特征与功能的生物信息学分析. *遵义医科大学学报*, 2021, 44(1): 42–47. doi: 10.14169/j.cnki.zunyixuebao.2021.0008.
- ZUO Q Q, QIAN L, WEN W E, *et al.* Bioinformatics analysis of the structure and function with catalase protein from *Senecio scandens* Buch.-Ham. ex D. Don. *J Zunyi Med Univ*, 2021, 44(1): 42–47. doi: 10.14169/j.cnki.zunyixuebao.2021.0008.

(2023 – 11 – 13收稿, 2024 – 03 – 02修回)

编辑 何学令



开放获取 本文使用遵循知识共享署名—非商业性使用 4.0国际许可协议 (CC BY-NC 4.0), 详细信息请访问

<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>。

OPEN ACCESS This article is licensed for use under Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International license (CC BY-NC 4.0). For more information, visit <https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© 2024 《四川大学学报(医学版)》编辑部 版权所有

Editorial Office of *Journal of Sichuan University (Medical Science)*