



单位代码 10635

学 号 2009317000179

西南大學

博士学位论文

结核分枝杆菌信号转导调控网络研究及
新型免疫抗原的筛选鉴定和运用初探

论文作者：周培富

指导教师：谢建平 研究员

Yossef Av-Gay 教授

学科专业：微生物学

研究方向：药用（工业）微生物功能基因组学
与新药筛选模型

提交论文日期：2012年04月08日

论文答辩日期：2012年06月02日

学位授予单位：西南大学

中国·重庆

2012年04月

独创性声明

学位论文题目：结核分枝杆菌信号转导调控网络研究及
新型免疫抗原的筛选鉴定和运用初探

本人提交的学位论文是在导师指导下进行的研究工作及取得的研究成果。论文中引用他人已经发表或出版过的研究成果，文中已加了特别标注。对本研究及学位论文撰写曾做出贡献的老师、朋友、同仁在文中作了明确说明并表示衷心感谢。

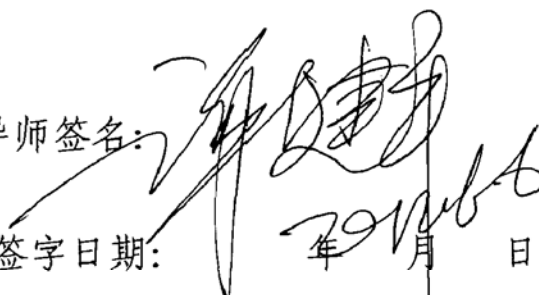
学位论文作者：周培富 签字日期：2012年06月06日

学位论文授权使用授权书

本学位论文作者完全了解西南大学有关保留、使用学位论文的规定，有权保留并向国家有关部门或机构送交论文的复印件和磁盘，允许论文被查阅和借阅。本人授权西南大学研究生院（筹）可以将学位论文的全部或部分内容编入有关数据库进行检索，可以采用影印、缩印或扫描等复制手段保存、汇编学位论文。

（保密的学位论文在解密后适用本授权书，本论文：不保密，保密期限至 年 月止）。

学位论文作者签名：周培富

导师签名：

签字日期：2012年06月06日

签字日期：2012年06月06日

目 录

| | |
|---|----|
| 摘要 | I |
| Abstract | V |
| 第 1 章 文献综述 | 1 |
| 1 结核病现状 | 1 |
| 1.1 全球结核病疫情 | 1 |
| 1.2 中国结核病疫情 | 1 |
| 2 结核分枝杆菌信号转导系统 | 2 |
| 2.1 概况 | 2 |
| 2.2 真核样丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 | 4 |
| 2.3 PTK-磷酸酶系统 | 9 |
| 2.4 结核菌信号转导系统运用潜力 | 13 |
| 参考文献 | 22 |
| 第 2 章 结核菌新型免疫抗原的筛选鉴定和运用初探 | 29 |
| 1 引言 | 29 |
| 1.1 结核病诊断的重要性及现状 | 29 |
| 1.2 电化学免疫传感器在诊断中的作用 | 29 |
| 2 材料和方法 | 30 |
| 2.1 菌株及培养条件 | 30 |
| 2.2 结核分枝杆菌溶菌产物制备 | 30 |
| 2.3 蛋白质双向凝胶电泳和 Western blot 及杂交点质谱鉴定 | 31 |
| 2.4 Rv2175c 的克隆表达及纯化 | 31 |
| 2.5 多克隆抗体的制备 | 31 |
| 2.6 血清样品 | 31 |
| 2.7 ELISA | 32 |
| 2.8 电化学免疫传感器的制备和血清检测 | 32 |
| 3 结果与分析 | 33 |
| 3.1 结核菌中 4 个蛋白点能够与结核菌患者血清杂交呈现较强信号 | 33 |
| 3.2 免疫杂交点 B 为 <i>rv2175c</i> 基因编码的保守假设性的调节蛋白 | 33 |
| 3.3 Rv2175c 的克隆, 表达及纯化 | 34 |
| 3.4 多克隆抗体的制备 | 34 |
| 3.5 Rv2175c 特异性 IgG 健康人与结核病患者血清中很低, ELISA 未能检测差异 .. | 35 |
| 3.6 电化学免疫传感器能有效检测出结核病人血清中与 Rv2175c 相互作用分子 | 36 |
| 4 结论与建议 | 38 |
| 4.1 结论与讨论 | 38 |
| 4.2 建议 | 38 |
| 参考文献 | 40 |

| | |
|--|----|
| 第 3 章 结核菌 H37Rv 及牛分枝杆菌 BCG 中 <i>ptkA</i> 基因缺失后的蛋白质组学研究..... | 43 |
| 1 引言..... | 43 |
| 2 材料和方法..... | 44 |
| 2.1 菌株及培养条件..... | 44 |
| 2.2 结核菌全菌体蛋白的制备..... | 44 |
| 2.3 蛋白凝胶双向电泳..... | 44 |
| 2.4 蛋白差异点质谱鉴定..... | 44 |
| 3 结果与分析..... | 45 |
| 3.1 <i>ptkA</i> 在结核菌 H37Rv 中的缺失导致蛋白质表达谱的上较大差异, 但在牛分枝杆菌 BCG 中导致的差异并不明显..... | 45 |
| 3.2 结核菌 H37Rv 菌株中差异表达蛋白的鉴定..... | 45 |
| 4 讨论..... | 48 |
| 4.1 <i>ptkA</i> 基因在结核菌中涉及压力反应, 休眠及免疫原性? | 48 |
| 4.2 为何 <i>ptkA</i> 基因的缺失对结核菌蛋白谱在不同菌株中差异较大? | 50 |
| 5 结论与建议..... | 50 |
| 参考文献..... | 51 |
| 第 4 章 结核菌 PtkA 受 STPKs 磷酸化调控..... | 53 |
| 1 引言..... | 53 |
| 2 材料与与方法..... | 54 |
| 2.1 菌株及培养条件..... | 54 |
| 2.2 基因克隆, 蛋白表达与纯化..... | 54 |
| 2.3 结核菌全菌体蛋白制备..... | 54 |
| 2.4 体外蛋白激酶实验..... | 54 |
| 2.5 PtkA 磷酸化位点鉴定..... | 55 |
| 3 结果与分析..... | 56 |
| 3.1 PtkA 被结核菌中内源性的蛋白激酶磷酸化..... | 56 |
| 3.2 STPKs 体外磷酸化 PtkA..... | 56 |
| 3.3 PknD 以时间和浓度依赖的方式磷酸化 PtkA..... | 57 |
| 3.4 PknD 磷酸化 PtkA 的 T ¹¹⁹ 和 C-端靠近自磷酸化位点的一个基序..... | 58 |
| 4 结论与建议..... | 65 |
| 参考文献..... | 66 |
| 致谢..... | 67 |
| 发表论文及参加课题一览表..... | 69 |

结核分枝杆菌信号转导调控网络研究及 新型免疫抗原的筛选鉴定和运用初探

微生物学专业博士研究生：周培富

指导教师：谢建平 教授

Yossef Av-Gay 教授

摘要

结核病是由结核分枝杆菌（简称结核菌）感染引起的慢性传染病，长期以来严重影响人类的健康。目前全世界的结核病疫情依然十分严峻，是全球仅次于艾滋病感染导致死亡的第二大传染性疾病。全球近1/3的人口被结核菌感染，大部分处于潜伏性感染状态。当人体免疫力由于各种原因有所下降的时候，结核菌便开始生长，逐渐发展成活动性结核。这在艾滋病患者中，比率会更高。据世界卫生组织 2011年全球结核病防控报告：在2010年，全球新增850-920万结核病例，120-150万病例死于结核病（其中不包括HIV阳性患者）。长期以来，由于结核病治疗周期长，导致治疗不彻底，抗生素在某种程度上的不合理使用及结核菌自身的进化，世界各地出现越来越多的耐多药结核菌（Multidrug-resistant TB, MDR-TB）和广泛耐药结核菌（Extensively drug-resistant TB, EDR-TB），使得抗结核药物面临巨大困境。而目前作为防止结核病的唯一疫苗牛分枝杆菌 BCG（*Mycobacterium bovis* Bacillus Calmette-Guerin, BCG）的效果也不尽人意。该疫苗能对婴儿和儿童提供很好的保护，但是对成年人的保护效果降低且存在较大的差异。这也使得社会中的绝大多数群体成为结核菌潜在的感染对象。结核病的防治仍然是全球面临的一个艰巨任务，特别是在在贫困地区及发展中国家。

我国仍然是全球22个结核病高负担国家之一。结核病年发病人数约为130万，占全球发病人数的14%，位居全球第二位。近年来，我国每年报告肺结核发病人数始终位居全国甲乙类传染病的前列；耐多药肺结核危害日益凸显，每年新发患者人数约12万，未来数年内可能出现以耐药菌为主的结核病流行态势；结核菌/艾滋病病毒双重感染患者人数持续增加，防治工作急待加强；中西部地区、农村地区结核病防治形势严峻。因此，新型药物，疫苗及诊断技术都必须不断发展和进步，以应对和控制目前和未来严峻的结核病疫情。

首先, 诊断是治疗的前提。目前结核病的诊断方法主要包括影像学、微生物学、免疫学和分子生物学诊断。基于特异性抗原-抗体反应的血清学免疫诊断方法因其耗时短, 方法简单, 样品容易获得及适应人群广泛等优点而备受青睐。目前存在的很多基于胶体金试纸条检测技术的快速结核病检测盒由于灵敏性和特异性差异较大而不能满足临床使用要求。开发高特异性和高灵敏性的诊断方法主要依赖于特异性抗原的鉴定及检测方法的选择。电化学免疫传感器是将免疫测定法与高灵敏的电化学传感技术相结合的一类新型生物传感器, 被广泛应用于痕量免疫原性物质的分析研究。因此, 本实验结合蛋白质凝胶双向电泳与 Western blot 技术, 将结核菌溶菌蛋白与结核病患者血清进行免疫杂交, 鉴定杂交点, 利用 ELISA 技术进行抗原性验证, 再与免疫电化学传感器结合并探索在血清学检测中的运用潜力。免疫杂交发现 4 个信号较强的杂交点, LC-MS/MS 鉴定产生最强信号的抗原蛋白为 *rv2175c* 基因编码的保守假设性的调节蛋白 Rv2175c。克隆, 表达并纯化 Rv2175c 后, 利用该蛋白免疫兔子成功制备多克隆抗体血清。利用酶联免疫检测法 (enzyme linked immunosorbent assay, ELISA) 技术对几组健康人血清及结核病患者血清中抗 Rv2175c 特异性 IgG 进行检测, 发现这些血清中对应抗体浓度非常低, 且在健康人血清与结核病患者血清之间无明显差异。进一步利用包被了 Rv2175c 蛋白的免疫电化学传感器检测到结核病患者血清中存在较强信号, 暗示结核病患者血清中存在一些能与 Rv2175c 蛋白发生特异性相互作用的抗体或其它蛋白。本文对结果进行了深入分析, 并提出 ELISA 与免疫电化学传感器之间结果的差异, 为后续相关实验提供经验。

此外, 结核菌在传播, 胞内滞留性感染等过程中都面临着各种苛刻的生存环境。因此, 强大的信号转导系统是保存其能够感应信号并进行下游调控的重要基础, 也是结核菌生存的关键。结核菌的信号转导系统主要由双组份调控系统 (Two-component systems, TCS), 真核样丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 (Ser/Thr protein kinases, STPKs) 和丝氨酸/苏氨酸磷酸酶系统, 酪氨酸蛋白激酶 (Protein tyrosine kinase, PTK) 和酪氨酸磷酸酶系统, σ 因子系统组成。PtkA 是目前结核菌中发现的唯一的酪氨酸蛋白激酶, 其自磷酸化和底物蛋白磷酸化均发生在酪氨酸残基上。编码酪氨酸的密码子为 GC 含量很低的 UAU 或 UAC, 而分枝杆菌属细菌均为高 CG 含量, 均在 65% 左右。酪氨酸在这样的情况下并没有优势, 但 PtkA 仍然在结核菌的漫长进化中保存了下来, 因此它必然在结核菌中承担着比较重要的功能。而目前对 PtkA 仅有的了解是它能够磷酸化酪氨酸磷酸酶 PtpA。

为了探索 PtkA 在结核菌中的更多生理功能, 本研究首先从野生型结核菌 H37Rv 及结核菌 H37Rv Δ ptkA 缺失突变菌株, 牛分枝杆菌 BCG 和牛分枝杆菌 BCG Δ ptkA 缺失突变株入手, 用蛋白质凝胶双向电泳方法对比野生型菌株与缺失突变

菌株之间胞质蛋白表达谱上的差异。结果显示*ptkA*基因的缺失对结核菌的胞质蛋白表达谱影响较大，而对牛分枝杆菌则没有明显的影响。进一步的质谱分析鉴定了结核菌 H37Rv Δ *ptkA*菌株与结核菌 H37Rv相比，表达量明显下降的三个蛋白点为低氧反应蛋白1，热休克蛋白HspX和普遍胁迫蛋白Rv2623。这些蛋白涉及多方面的环境压力应急及免疫原性等，且都同属于结核菌休眠调控蛋白DosR调控子，暗示了PtkA可能涉及结核菌的压力反应，休眠与结核菌免疫原性等方面。而在*ptkA*基因及其临近基因在序列和基因组上的排布与结核菌完全一样的牛分枝杆菌中，*ptkA*的缺失对胞质蛋白表达谱几乎没有影响，进一步暗示*ptkA*可能在结核菌中发挥了重要功能。本实验为后续的工作提供了一个大体的研究方向。

另外，PtkA作为一个蛋白酪氨酸激酶，其发挥生理功能的方式是通过磷酸化其底物蛋白，改变底物蛋白的功能活性，进而调控相关的代谢。而PtpA是其已知的唯一磷酸化底物。PtpA通过结合巨噬细胞空泡膜上的H⁺-ATPase中的H亚基并去磷酸化HOPS (homotypic vacuole fusion and vacuole protein sorting) 复合体上VPS33B(human class C Vacuolar Protein Sorting VPS33B)蛋白来阻止吞噬体与溶酶体的结合，在结核菌的滞留性感染中发挥至关重要的作用。对如此重要的一个生理过程，PtkA是如何感应细胞中的环境，在什么样的条件下磷酸化和调控PtpA的功能呢？它自身又有没有受到其它蛋白的调控呢？除了PtpA以外，PtkA还调控着哪些重要的生理功能呢？为此，我们首先将PtkA与结核菌的胞质蛋白在体外进行孵育，以期能够发现更多的磷酸化底物蛋白，却意外的发现了PtkA蛋白受到结核菌中内源性蛋白激酶的磷酸化。结合已有知识，推定磷酸化PtkA的内源性蛋白激酶应该为STPKs。我们首先克隆，表达和纯化了PknB, PknD, PknG和PknH。体外蛋白激酶反应发现这四个蛋白激酶均能对PtkA进行不同程度的磷酸化，其中以PknD对PtkA的磷酸化活性最强，PknG次之。进一步的实验证实PknD以时间及浓度依赖的方式对PtkA进行磷酸化，证明了PtkA是PknD的特异性磷酸化底物。利用LC-MS/MS分析发现PknD对PtkA的磷酸化位点为T¹¹⁹和另外一个靠近其自磷酸化位点Y²⁶²的基序，暗示其可能影响自磷酸化位点附近的结构，进而改变其自磷酸化活性，间接改变其底物磷酸化活性。因此，STPKs可能通过调控PtkA而间接调控PtpA的功能，影响结核菌与宿主之间的相互作用和滞留性感染。本实验结果又一次揭示了结核菌中信号转导系统之间的相互调控关系，展示了结核菌信号传导系统的复杂性和调控的多层次性。

关键词：结核分枝杆菌，血清学诊断，信号传导系统，蛋白酪氨酸激酶，真核样丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶

Study of *Mycobacterium tuberculosis* signal transduction system and screening, identification and preliminary application of novel antigen

Ph.D Candidate in Microbiology: Zhou Peifu

Supervisors: Pro. Xie Jianping

Pro. Yossef Av-Gay

Abstract

Tuberculosis (TB) remains a major threat of global public health, and it is a chronic infectious disease caused by single etiological agent, *Mycobacterium tuberculosis* (*M.tb*). The death caused by TB is second only to the acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) among infectious diseases. The burden of disease caused by TB is still very heavy and one third of global population was infected by *M.tb*, most of which are latent infection. However, the ‘dormant bacteria’ will resuscitate and develop into active TB when the host immune system is compromised due to various reasons, especially in human immunodeficiency virus (HIV) positive patients. According to report from World Health Organization (WHO) in 2011, globally there were 8.5–9.2 million active cases and 0.9–1.2 million of deaths among human immunodeficiency virus (HIV)-negative cases of TB. Incomplete therapy due to long therapy time, unreasonable use of drug and continuous evolution of bacteria corporately lead to the initiation and spread of multidrug-resistant TB(MDR-TB) and extensively drug-resistant TB(EDR-TB), which make the anti-tubercular agent in difficulty. *Mycobacterium bovis* BCG, the only vaccine currently used in TB prevention, can provide efficient protection for infants and children but unsatisfactory and variable protection for adult. TB prevention is a global arduous task, especially in depressed area and developing countries.

China is still one of the 22 High-burden countries of TB. There were about 1.3 million active cases in China in 2011, which is 14 % of global cases. More and more MDR-TB has been found and it might lead the epidemic condition in China in the

coming years. The increasing number of TB/HIV co-infection patient requires us to reinforce the prevention and cure, especially in central and west regions, and the vast rural areas in China. At the same time, development of novel drugs, vaccines and diagnostic techniques are urgently needed.

Diagnosis is the prerequisite to treatment. Currently, TB diagnostic methods largely base on imaging, microbiology, immunology, molecular biology with vary sensitivity and specificity. Serodiagnosis is gaining more and more attention due to time-saving, simplicity of operating, easy to sampling and extremely versatile. Many rapid TB test kits based on immunogold filtration assay strip are marketing. However, the performance evaluation sponsored by WHO/TDR in 2008 suggested that these kits were not recommended for clinical use mainly due to low sensitivity and specificity. The sensitivity and specificity of serodiagnosis largely hinge on the choice of diagnostic markers and test methods. Electrochemical immunosensor, combining the high specificity of immunoassay and high sensitivity of sensing technology, is widely used in detection of trace immunogenic substance. Here, cellular extracts of *M.tb* was separated by two-dimensional gel electrophoresis and electro-transferred completely to a PVDF membrane, followed by hybridization with TB patient sera. According to LC-MS/MS analysis, the strongest hybridization spot correspond to the transcriptional factor Rv2175c encoded by gene *rv2175c*. Recombinant Rv2175c protein was produced from *E.coli* and antibodies were generated in rabbit using the recombinant antigens. Rv2175c specific IgGs are too low in both health and TB patient serum and indistinguishable between them based on ELISA. But electrochemical immunosensor can detect a stronger signal from TB group than from health serum. This indicates that antibodies against protein Rv2175c or other proteins that can interact with Rv2175c exist in TB group. Thees results were thoroughly discussed, which will provide precious experience for our further work.

In addition, during dissemination and infection, *M.tb* has to handle harsh extracellular and cellular situations it encounters. A robust and precise signal transduction system is imperative for handling the complex, volatile, harsh niche and persistent in the host. Signal transduction system of *M.tb* consists mainly of 12 two-component systems (TCSs), 11 eukaryotic-like Ser/Thr protein kinases(STPKs) systems, 1 protein tyrosine kinase(PTK) system and 11 extracytoplasmic function sigma factor (ECF- σ) systems. PtkA is the only tyrosine protein kinase present in *M.tb* and both autophosphorylation and substrate phoshorylation are occur on tyrosine residue.

Tyrosine encoding codons are UAU or UAC, which are low GC content. Comparing to other amino acid, tyrosine is relatively low in *M.tb* with high GC content (65%). However, PtkA has been reserved during the long term evolution. So, it must undertake some important roles in *M.tb*. But until now, the substrate PtpA is the only thing we know about PtkA.

To explore more physiological function of PtkA, protein expression profile between wild type and *ptkA* deletion mutant were compared in both *M.tb* H37Rv strain and *M.bovis* BCG by two-dimensional gel electrophoresis. The results indicate that the deletion of *ptkA* in *M.tb* H37Rv cause a remarkable change in protein expression profile, but no obvious change in *M.bovis* BCG. LC-MS/MS analysis found that the 3 prominently down-expressed proteins in H37Rv Δ *ptkA* strain are hypoxic response protein 1, heat shock protein hspX (alpha-crystallin) and universal stress protein Rv2623. All these proteins involve in various stress response, immunogenicity and belong to DosR regulon, which is the main switch controlling the active or dormancy state in *M.tb*. This indicates PtkA might involve in stress response, immunogenicity and persistent directly or indirectly. And the sequence and location of *ptkA* and its neighboring genes are some between *M.tb* H37Rv strain and *M.bovis* BCG strain, but the effect of *ptkA* deletion are different. This hints that PtkA might regulate some global regulator in *M.tb*.

Protein kinases mainly play their role by phosphorylating their substrates. PtpA is the only substrate has been identified for PtkA. In macrophage, PtpA block the fusion between phagosome and lysosome and inhibit phagosome acidification by binding to the subunit H of H⁺-ATPase and dephosphorylating human class C Vacuolar Protein Sorting VPS33 in BHOPS (homotypic vacuole fusion and vacuole protein sorting) complex. This is a very important strategy for *M.tb* to persistent in the host. But what signal can activate PtkA and then to phosphorylate PtpA? Is PtkA itself been regulated by other protein? Does PtkA play some other roles in *M.tb*? To identify more cognate substrates, cellular extracts of *M.tb* was incubated with recombinant PtkA. Be interesting, PtkA phosphorylation level was increased when incubated with *M.tb* cellular extracts compared to PtkA alone. This suggests that PtkA by itself can serve as a substrate for endogenic *M.tb* protein kinases. Combining the existing information, we hypothesize that PtkA might be phosphorylated by one or more of the STPKs. Then, PknB, PknD, PknG and PknH were expressed and purified as GST or His-tag recombinant protein. The purified kinases were incubated with PtkA by using the γ -[³²P]

ATP as phosphate group donor. And we found that all these four kinases can phosphorylate PtkA with different intensity, in which PknD is the strongest one and followed by PknG. PknD phosphorylate PtkA in time and dose dependent manner further confirm that PtkA is a specific substrate of PknD. LC-MS/MS analysis reveal that PknD phosphorylate PtkA on T¹¹⁹ and another motif, which is close to the autophosphorylation site Y²⁶². This reminds us PknD might modify the autophosphorylation activity by phosphorylating this motif. At last, STPKs might regulate PtpA through PtkA and affect the pathogen-host interaction and persistence of *M.tb* indirectly. This is another new example of convergence of different signal transduction systems in *M.tb*, which further reveal that *M.tb* signal transduction systems are very complicated and themselves can be regulated in multi-levels.

Keywords: Mycobacterium tuberculosis, Serodiagnosis, Signal transduction system, Protein tyrosine kinase, Eukaryotic-like Ser/Thr protein kinases

第 1 章 文献综述

1 结核病现状

1.1 全球结核病疫情

结核病是由结核分枝杆菌（简称结核菌）感染引起的慢性传染病。结核菌可能侵入人体全身各种器官，但主要侵犯肺脏，成为肺结核病，俗称痨病，如果不经过治疗，具有很高的死亡率。该疾病通过空气传播，有“白色瘟疫”之称，是一种古老的传染病，一直以来对人类健康构成巨大威胁。自 1882 年科赫（Robert Koch）发现了结核病的病原菌为结核菌之后，人类对该疾病的理解和研究才真正拉开了序幕。

全球有近 1/3 的人口被结核菌感染，但是大部分人群能利用自身的免疫系统压制该菌在体内的生长，使得其处于一种“持留状态”，也称潜伏性感染。但是当人体免疫力由于各种原因有所下降的时候，结核菌便开始生长，逐渐发展成活动性结核，这样的情况通常占被感人人数的 1/10。但在人体免疫缺损病毒（Human Immunodeficiency Virus, HIV）感染的艾滋病阳性患者中，这个比率会更高。自科赫鉴定了结核菌的近 130 年中，人类研发了很多治疗结核病的药物及免疫接种疫苗，结核病在某种程度上得到了较好的控制。但由于种种原因，结核病疫情依然严峻甚至出现反弹，因此世界卫生组织（World Health Organization, WHO）于 1993 年发布全球结核病紧急宣言，将结核病重新列入重要防控对象。据 WHO 2011 年全球结核病防控报告：在 2010 年，全球新增 850-920 万结核病例，120-150 万病例死于结核病（其中包括 HIV 阳性患者）[1]。

由于抗生素的不合理使用及结核菌自身的进化，近年来世界各地发现越来越多的耐多药结核（Multidrug-resistant TB, MDR-TB）和广泛耐药结核（Extensively drug-resistant TB, EDR-TB），使得用于治疗结核病的抗生素面临巨大困境。而目前作为防止结核病的唯一疫苗牛分枝杆菌 BCG（*Mycobacterium bovis* Bacillus Calmette-Guerin, BCG）的效果也不尽人意。该疫苗能对婴儿和儿童提供很好的保护，但是对成年人的保护效果降低且存在较大的差异。这也使得社会中的绝大多数群体成为结核菌潜在的感染对象。虽然目前有大量的潜在疫苗处于临床前期研究或临床试验，但能否开发出比牛分枝杆菌 BCG 更有效的疫苗并广泛使用仍然是一个未知数。种种的因素导致了结核病成为全球仅次于 HIV 的第二大导致死亡的传染性疾病[2]。结核病的防治仍然是全球面临的一个艰巨任务，特别是在贫困地区及发展中国家。

1.2 中国结核病疫情

中国作为一个人口大国，同样也是一个结核病高负担国家。虽然在 1990 至 2010 年期间，结核病新发病例和死亡病例大幅降低：流行率降低一半，死亡率降低了近 80%，发病率每年降低 3.4%[1]。但是我国仍是全球 22 个结核病高负担国家之一。目前我国结核病年发

病人数约为130万，占全球发病人数的14%，位居全球第二位[1]。近年来，我国每年报告肺结核发病人数始终位居全国甲乙类传染病的前列；耐多药肺结核危害日益凸显，每年新发患者人数约12万，未来数年内可能出现以耐药菌为主的结核病流行态势；结核菌/艾滋病病毒双重感染患者人数持续增加，防治工作亟待加强；中西部地区、农村地区结核病防治形势严峻[3]。

2 结核分枝杆菌信号转导系统

2.1 概况

结核菌的成功之处在于它能适应各种复杂多变且苛刻的生存环境：活性巨噬细胞产生的氧化剂（活性氧中间物、活性氮中间物）；吞噬体中的低pH环境；由肺泡表面活性物质、毒性肽或蛋白、毒性自由脂肪酸等导致的表面结构损伤；吞噬体及肉芽瘤中的低氧环境；营养素及重要元素的贫乏；传播过程中暴露于紫外光、干燥及低温环境等[4]。在这些过程中，结核菌除了需要具备有效利用特殊碳源及氮源的代谢途径外，还需要精确而有力的信号转导机制能及时准确的感应外界的环境变化，并将其传递到胞内，调控胞内相应的代谢变化来适应环境的变化。结菌H37Rv基因组共编码约190个转录调控子，其中包括12对双组份调控系统（Two-component systems, TCS）和4个属于双组份调控系统的未配对的孤儿蛋白，11个真核样丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶（Ser/Thr protein kinases, STPKs）和丝氨酸/苏氨酸磷酸酶，1个酪氨酸蛋白激酶（Protein tyrosine kinase, PTK）和两个酪氨酸磷酸酶，13个 σ 因子（其中10个为胞外功能亚家族 σ 因子，涉及细胞周质空间及胞外信号的转导）及140多个其它推定的调控蛋白[2, 5]。对这几类信号转导系统的研究主要起始于1998年结核菌全基因组测序完成，对基因组全局性的了解及基因功能预测。随着研究的不断深入，人们也发现结核菌中各种生理代谢无处不涉及这些信号转导系统的调控，如DesR/S/T双组份调控系统涉及结核菌的休眠状态的调控[6-9]，而酪氨酸蛋白激酶PtkA及其对应的磷酸酶PtpA则被证实直接参与修饰宿主巨噬细胞中的信号转导，阻碍吞噬体与溶酶体的融合[10-12]等等，对结核菌在巨噬细胞中的生存起着决定性的作用，这可能是揭示其滞留性的关键。 σ 因子通常被理解为由原核生物基因转录过程中的一个关键蛋白，但是越来越多的研究发现 σ 因子在转录水平和翻译后水平受到广泛的调控。其中最要的是受到对应的Anti- σ 因子及Anti-anti- σ 因子的调控，而这两者多以膜蛋白形式定位于细胞膜上，直接或间接的感应胞外或周质空间的信号并据此对存在于胞内的 σ 因子进行活性调控。Staron等详细阐述了将 σ 因子列为原核生物信号转导系统的理由及相关功能概述[13]。这几组信号转导系统以不同的作用机制在不同层面发挥作用（图1），但相互之间又相互调控并形成了复杂而精确的调控网络（图2）。

下面将主要对涉及本研究内容的真核样丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶系统，酪氨酸蛋白激酶系统及其对应的磷酸酶进行综述。结核菌双组份调控系统的内容可参考文献[14-15]， σ 因子相关的内容可参考[16-17]。

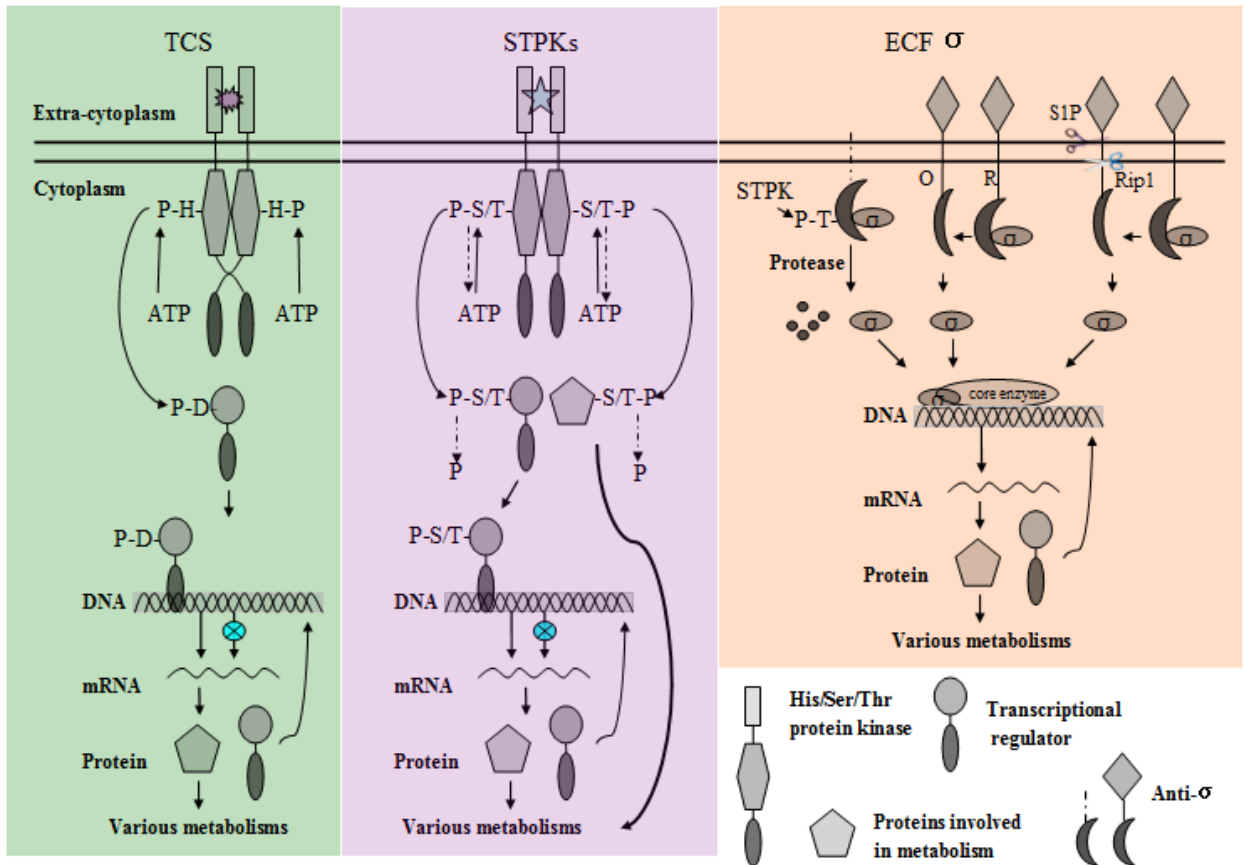


图 1 信号转导系统作用机理。A，双组份调控系统中膜整合性组氨酸激酶感应特定信号并形成二聚体，磷酸化自身的某个组氨酸，再将该磷酸基团转移给其对应反应调控蛋白的特定天冬氨酸残基，以此来调控后者的功能活性[18]。B，真核样丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶与双组份调控系统类似，但是激酶的自磷酸化是发生在丝氨酸或者苏氨酸残基上，该磷酸化基团也是转移到底物蛋白的丝氨酸或者苏氨酸残基。而这些底物蛋白通常直接参与各种生理代谢，也有少数为转录调控因子。C，胞外功能 σ 因子中的 anti- σ 的作用机制有如下三种类型：第一种类型以膜整合型 anti- σ 因子 RslA 为例[19]：anti- σ 因子在还原性条件下结合 σ 因子而在氧化性条件下释放 σ 因子；第二种类型为存在于细胞质中（或者是膜整合的但是缺少信号感应结构域），如 anti- σ 因子 RseA[20]：被某种真核样丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶磷酸化后，会进一步被蛋白酶 ClpC1P2 水解并释放 σ 因子；最后一类作用机制来源于 RskA, RslA 和 RsmA [21]：在特定情况下，这些 anti- σ 因子会被 site-one protease (S1P) 和 Regulated intramembrane proteolysis (Rip1, Rv2869c) 水解进而释放 σ 因子。

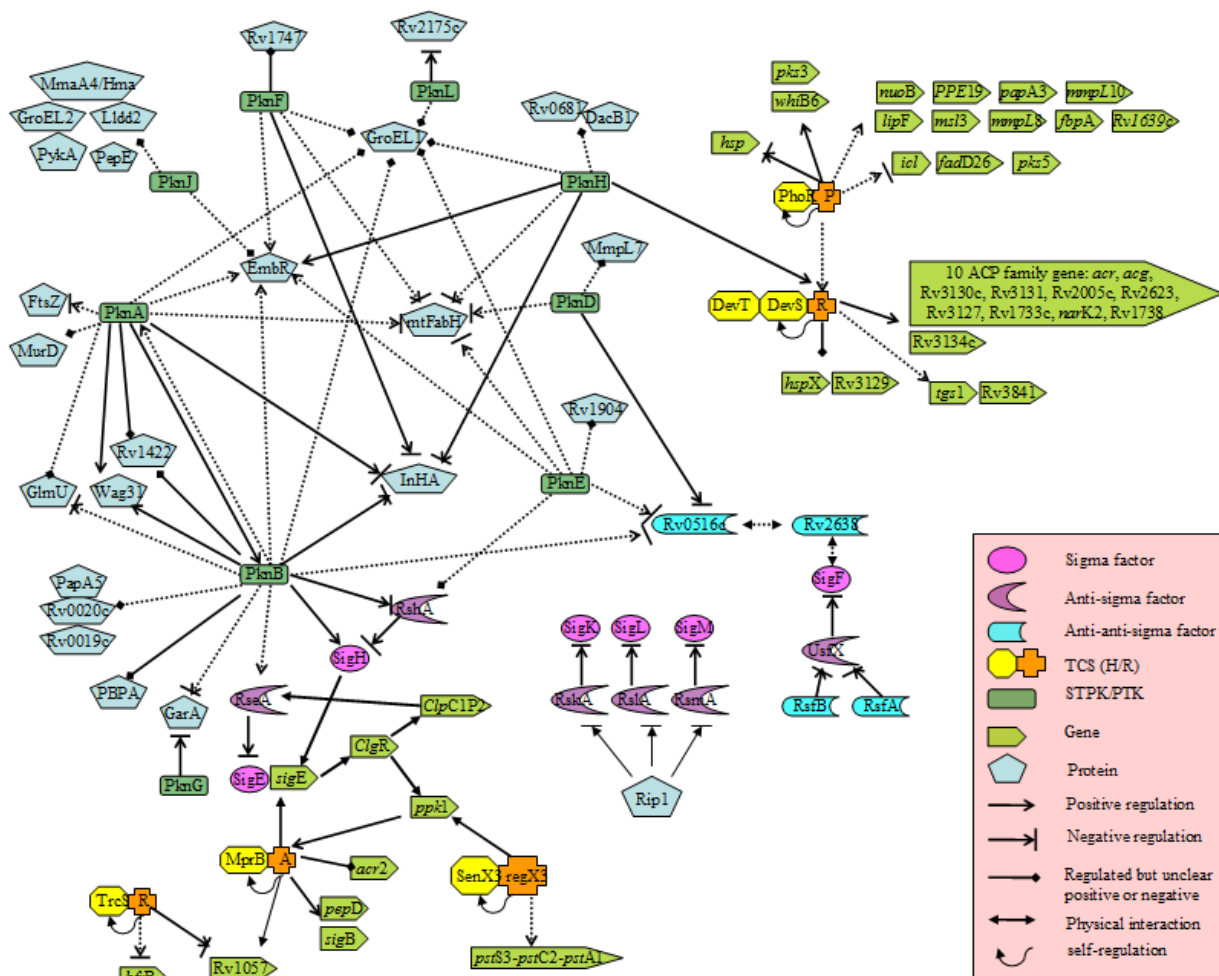


图2 结核分枝杆菌信号转导系统调控网络。虚线表示这种关系来源于体外实验或者间接证据。

2.2 真核样丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶

2.2.1 PknA 和 PknB

*pknA*和*pknB*这两个激酶编码基因在基因组上相邻排布，位于结核菌染色质复制起始点附近，与蛋白磷酸酶*pstP*，细胞形态调控基因*rodA*及肽聚糖合成基因*pbpA*共同组成一个操纵子。PknA和PknB都在细胞分裂及细胞形态调控方面共同发挥作用，且二者对结核菌的存活是必须的，缺失后会导致结核菌是致死[22]。PknA在大肠杆菌中的组成性表达导致细胞形态变长[23]。Choong-Min Kang[22]等研究发现：在耻垢分枝杆菌和牛分枝杆菌 BCG中，PknA和PknB过表达使细菌的生长和成活力受到抑制，且PknB导致的表型更严重。PknA过表达使细胞变得更长，更宽甚至有些出现分枝，PknB过表达使细胞变得更宽，更鼓而且直径不均匀；相反，在耻垢分枝杆菌中利用反义RNA干扰技术使PknA和PknB表达量降低时出现与过表达时相反的细胞形态，但生长同样受到抑制，这说明细胞的正常生长需要PknA和PknB的表达维持一个适量的水平。PknA和PknB的一些底物已经得到了体内或体外实验鉴定。PknA

的底物包括Wag31（细胞分裂蛋白DivIVA的同源蛋白），EmbR（调控编码细胞壁阿拉伯糖转移酶操纵子*embCAB*的表达），FtsZ（细胞分裂蛋白，涉及隔膜形成），MurD（UDP-N-acetylmuramoyl-L-alanine-D-glutamate synthetase），mtFabH（ β -酮酰基载体蛋白合酶III，连接FAS-I和FAS-II，涉及分枝菌酸的合成），GlmU（N-acetylglucosamine-1-phosphate uridyltransferase），被PknA磷酸化后的功能变化研究都充分证明了pknA在细胞生长，分裂，细胞壁及分枝菌酸生物合成方面的重要作用。PknB调控Wag31，EmbR，PBPA（青霉素-结合蛋白），PapA5（涉及结核菌醇二分支菌酸PDIM合成），GlmU等涉及细胞壁合成及细胞分裂相关蛋白也证明其在细胞生长，分裂，细胞壁及PDIM合成方面的重要作用。PknA与PknB之间的体外相互磷酸化活性更暗示了这两个激酶之间的协同调控关系[22]。此外，PknB还被证实体内磷酸化SigH，RshA(anti-sigH)，且RshA的磷酸化影响其与SigH的结合，因此pknB能通过对SigH和RshA(anti-sigH)的磷酸化来调控细胞中活性SigH的量，进而广泛的影响受SigH调控的下游通路[24]。还值得注意的是PknB是结核菌 11个STPKs中唯一一个胞外信号感应结构域中具有PASTA（penicillin and Ser/Thr kinase associated）结构域的激酶。Ishita M. Shah等[25]研究证明在枯草芽孢杆菌中，信号感应结构域中具有PASTA结构域的PrkC能特异性的识别并结合肽聚糖降解产生的胞壁肽（Muropeptides），将信号传递进入芽孢内，诱发芽孢萌发：PrkC诱导并调控分泌型肽聚糖水解酶YocH的表达，YocH水解所处环境中其它细菌释放的肽聚糖，所产生的碎片能够被PrkC感应到，然后调控关键转录因子EF-G和自身的表达。巧合的是结核分枝杆菌有5个基因编码含有细胞复苏因子（Rpf）保守结构域的蛋白，被命名为rpfA-E，能促进其从休眠期转换为活性状态。细胞复苏因子（Rpf）保守结构域在结构上与溶菌酶和可溶性转糖酶具有高度相似性[26]，其中RpfB的肽聚糖N-乙酰胞壁酸和N-乙酰氨基葡萄糖之间的beta-1,4-糖苷键水解酶活性已经得到了验证。Rv1477编码一个叫做Rpf相互作用蛋白A (RipA)的肽链内切酶，该酶能够降解肽聚糖，但更重要的体内试验证实是RipA能与RpfB和RpfE相互作用[27]。最新的研究还发现RipA还能与PBP1(penicillin binding protein 1, 细胞壁合成相关酶)，且它们之间进行相互作用的结构域与其与RpfB相互作用的结构域相同，因此推测PBP1和RpfB对RipA的竞争性结合能保持肽聚糖合成与降解之间的平衡[28]。那么结核分枝杆菌中会不会像枯草芽孢杆菌一样，RpfB和/或其它肽聚糖水解酶水解肽聚糖的碎片正好是PknB的特异性信号分子，因此PknB将此信号传递进入休眠细胞内，诱发其转化活性细胞？Kana等[29]对此进行了相关的分析，并提出Rpf可能与更多不同种类的内肽酶协同作用，而水解产生的不同的胞壁肽可能通过Nod1，Nod2途径参与宿主信号转导。

2.2.2 PknD

研究发现MmpL7是PknD的一个重要底物[30]。MmpL7属于分枝杆菌膜蛋白大家族（mycobacteria membrane protein large family, Mmpl），同时功能上属于RND (resistance, nodulation, and cell division) 家族转运体。MmpL7涉及毒力相关因子结核菌醇二分支菌酸

(phthiocerol dimycocerosate, PDIM) [31]和另外一种类似但是不同的酚糖脂 (phenolic glycolipid, PGL) [32]的转运。Jacqueline Pe'rez[30]等构建了结核菌*pknD*的缺失突变株,但没有发现*pknD*缺失是否会对其生理及毒力具体造成什么影响。此外, Andrew E. Greenstein等[33]发现PknD能磷酸化Rv0516c(Anti-Anti- σ), PknD对Rv0516c的磷酸化抑制了其同源Anti-Anti- σ Rv2638的结合能力, 且磷酸化位点Thr²不同于常规的Anti-Anti- σ 蛋白家族中的丝氨酸/苏氨酸磷酸化位点。同时Rv0516c不能被anti- σ UsfX, RshA及Rv0941c磷酸化, 但是能被PknB和PknE磷酸化, 这说明蛋白激酶能特异性的调控一些Anti-Anti- σ 的活性来调控对应 σ 的活性, 进而调控下游信号; 该实验组还发现PknD的过表达改变了很多SigF依赖的基因的表达谱, 暗示了PknD和SigF之间存在调控关系, 但是否就是有上面提及的Rv0516c及Rv2638来完成的还不清楚, 因为Rv0516, Rv2638和SigF之间是否存在相互作用关系还有待进一步验证。在牛分枝杆菌中, 该蛋白因移码突变而仅表达了N末端的激酶结构域 [34]。

2.2.3 PknE和PknH

研究发现结核菌 $\Delta pknE$ 缺失突变菌株在BALB/c鼠中无显著毒力差异[35], 但对一氧化氮供体如SNP, GSNO和酸化亚硝酸盐等产出不同程度耐受, 对还原剂及特定金属离子敏感, 提高对诱导人巨噬细胞编程性死亡, 抑制坏死和增殖的能力, 降低TNF-a和IL-6的表达, 其自身在巨噬细胞中生存能力减弱[36]。巨噬细胞的程序性死亡是宿主防御病原菌感染的一种有效手段, 它通过放大病原菌存在的信号而招募更多活性细胞并加强获得性免疫对病原菌进行杀伤。因此, PknE的作用可能是通过某种机制抑制巨噬细胞编程性死亡, 让宿主忽略结核菌的感染, 以争取建立持留性感染机会。

结核菌 $\Delta pknH$ 缺失突变菌株在BALB/c鼠模型中毒力增强[36]。*pknH*在低pH和热休克条件下其表达水平降低[37]。在*M.tb*中, EmbR被证实是PknH的一个底物, PknH通过磷酸化EmbR而正调控*embCAB*操纵子的表达。*embC*催化脂甘露糖 (lipomannan, LM)形成脂阿拉伯甘露聚糖 (lipoarabinomannan, LAM), 造成LAM/ LM的比例增高, 降低其毒性, 这也与 $\Delta pknH$ 在BALB/c Mice中毒力增强的结果吻合; *embAB*的过表达提高了对乙胺丁醇的耐受性。更重要的是PknK能够磷酸化调控DosR这个结核菌中主要涉及休眠的双组份系统调控蛋白, 且PknH对DosR的氨基酸残基的磷酸化与DosS 对DosR的天冬氨酸残基磷酸化能协同性的加强其对DNA序列的结合能力[38]。在*M.tb* CDC1551中, *MT3428*基因编码蛋白因与EmbR具有56%的相似性而被命名为EmbR2, Virginie MOLLE等[39]研究发现EmbR2能与PknH结合但不能被PknH磷酸化, EmbR2的结合抑制了PknH的自磷酸化活性因此也抑制了其底物 (比如EmbR)的磷酸化活性, 而PknE和PknF能同时磷酸化EmbR和EmbR2, PknA和PknB能磷酸化EmbR[40]。会不会PknE和PknF通过磷酸化EmbR2来实现对PknH的调控呢? 这个还需要进一步体内的实验的验证, 因为还有如下问题没有搞清楚: i, 在体内, PknE和PknF中谁能磷酸化EmbR2或是都能? ii, EmbR2的磷酸化状态是否影响其对PknH的结合及抑制能力? 但

是，这揭示了一种新的调控STPKs活性的机制，因为我们通常认为它们的活性是通过其自磷酸化与同族磷酸酶Mstp对其的去磷酸化来实现平衡的。PknH还能体外磷酸化底物蛋白Rv0681（TetR 家族转录调控因子）和DacB1（青霉素-结合蛋白，涉及肽聚糖合成），但这些功能还需要进一步的体内实验的验证[41]。

2.2.4 PknF

对于PknF，目前还没有对应缺失突变表型的研究报道，使用RNA干扰降低结核菌中*pknF*的表达量导致细菌生长加快，形态缩小且隔膜迷乱，对D-葡萄糖的摄取量增加但对甘油，亮氨酸及油酸的摄取无变化；而将*pknF*引入缺乏该基因的耻垢分枝杆菌中表达导致生长减慢，细胞形态缩短，膨胀且有缢痕[42]。Romain Veyron-Churlet等[43]还发现PknA，PknD，PknE，PknF和PknH在体外能磷酸化 β -酮酰基载体蛋白合酶III mtFabH，其中*pknA*和*pknF*对其活性最强。他们还证实了mtFabH在体内能被磷酸化，但是还没有确定该蛋白在体内具体哪一个或那几个激酶的底物。Juliet M. Curry等[44]利用酵母双杂交技术研究发现*pknF*与Rv1747之间存在相互作用。Rv1747编码一个跨膜结合ATP的蛋白ABC运输分子（transmembrane ATP-binding protein ABC transporter），但其具体转运的底物还不清楚。但 Δ Rv1747在巨噬细胞及BALB/c mice中的独立减弱，而体外的表型且无变化，暗示Rv1747在结核菌毒力因子转运方面的重要作用，同时也暗示*pknF*在结核菌毒力调控方面的重要性。

2.2.5 PknK

结核菌中PknK和PknG不具备跨膜结构域，最初被认为是可溶性的，关于PknG将在后面详细描述。PknK是结核菌11个STPKs中分子量最大的一个（1100个氨基酸。Pawan Kumar等[45]研究发现PknK尽管缺乏跨膜结构域，但却定位于细胞膜，推测可能是由于该蛋白中含有一个PDZ结构域的原因，因为在真核生物中，PDZ结构域除了涉及分子内或分子间的相互作用之外[46]，还能将激酶定位于部分膜性的区域（submembranous region）[47]。也有研究发现PknK可能被分泌进入吞噬体溶质中并参与其中细胞信号转导调控[48]。PknK可能从转录水平和翻译后水平调控结核菌中的分枝菌酸合成：转录调控子VirS及受其调控的*mymA*操纵子（Mym，LipR，Rv3085，Rv3086，Rv3087，Rv3088和FadD13）中的Mym，LipR，Rv3085，Rv3088在体外均能被*pknK*磷酸化，进一步的实验证明VirS是其体内的一个真正的底物，且PknK对VirS的磷酸化增强其与*mym*基因启动子结合的亲和性[45]。 Δ *pknK*的细胞形态和细胞壁组分也发生了变化[48]。Amit Singh等[49]证明VirS及受其调控的*mymA*操纵子基因对维持结核菌细胞壁超微结构及在豚鼠脾脏中的滞留性感染很重要： Δ *virS*和 Δ *mymA*改变了分支菌酸的含量及组分，积累饱和C24和C26脂肪酸，对抗生素、去垢剂和酸性pH更敏感；在活性巨噬细胞中生长受到抑制但是在静息巨噬细胞中不受影响； Δ *virS*感染豚鼠20个星期后，脾脏中菌含量降低了约800倍但在肺中却明显差异。Amit Singh等还基于实验定位了*mymA*操纵子基因在结核菌分支菌酸生物合成代谢中的作用。PknK在体内对转录调控蛋白

VirS的磷酸化调控，有力的证明了PknK在通过*mymA*操纵子基因功能介导的分支菌酸的生物合成调控中的重要作用，或许PknK在体外对*mymA*操纵子中Mym, LipR, Rv3085, Rv3088等的磷酸化作用暗示了PknK对*mymA*操纵子的调控可能是转录后和转录水平的双层调控。

2.2.6 PknG

PknG不具有跨膜结构域，实验也证明PknG主要存在于细胞质中[50]。Anne Walburger等[51]证实PknG可以分泌进入宿主巨噬细胞， Δ *pknG*牛分枝杆菌BCG在感染巨噬细胞后主要存在于LAMP-阳性囊泡中，而野生型主要存在于LAMP-阴性吞噬体中；细胞器电泳分析也发现 Δ *pknG*牛分枝杆菌BCG主要存在于溶酶体部分，而野生型存在于非溶酶体细胞器中；在感染巨噬细胞后1个小时内，野生型大量繁殖而突变株生长几乎完全受到抑制。耻垢分枝杆菌基因组中含有PknG编码基因但是通常情况不会被表达，感染巨噬细胞中很快被清除。但当*pknG*在耻垢分枝杆菌中表达时，也能抑制吞噬体向溶酶体转化，但表达无功能的牛分枝杆菌BCG-*pknG*^{K181M}与缺失突变特征相似，进一步的实验证明了上述的这些现象都依赖于PknG的激酶活性。Shivendra K Chaurasiya等[52]近期鉴定了PknG在THP-1细胞中的作用底物PKC α （蛋白激酶 α ），PKC α 能促进Fc- γ 受体介导的吞噬作用[53]并通过促进吞噬体或晚期内吞体和溶酶体的相互作用来调控吞噬溶酶体的生成，此外还能杀伤胞内病原体。PKC α 与PknG有一定的同源性，PKC- α 被证实能磷酸化p57 (human homologue of coronin family actin-binding protein)，p57的磷酸化对其从吞噬体上的脱离及对LAMP-1 的招募都是很重要的，而这个过程是吞噬体与溶酶体融合的一个关键步骤。因此，结核菌，牛分枝杆菌 BCG等通过利用PknG水解（而不同于常规的磷酸化作用）PKC α 而减少其胞内含量，干扰吞噬溶酶体的成熟及巨噬细胞对结核菌的杀伤。Nicole Scherr等[54]还进一步证实了PknG的自磷酸化在介导结核菌在巨噬细胞中的存活中至关重要。 Δ *pknG* 结核菌在体外及BALB/c 鼠中的生存能力减弱，在SCID鼠中毒力减弱，突变株中谷氨酸及谷氨酰胺积累，谷氨酰胺从头合成水平大大降低[55]。但 Δ *pknG* 牛分枝杆菌BCG 的谷氨酸及谷氨酰胺水平均不受影响[56]。Helen M. O'Hare等[57]体内鉴定了结核菌中GarA (*rv1827*) 是PknG的底物，磷酸化位点为T²¹并且磷酸化抑制其活性，GarA结合并调控NAD⁺特异性谷氨酸脱氢酶的活性。Villarino等[58]曾发现PknB在体外也能磷酸化GarA，磷酸化位点为T²²。两个激酶对GarA的磷酸化之间存在排斥作用，T²¹或T²²的磷酸化都能抑制其结合KGD（ α -酮戊二酸脱羧酶）和GDH（NAD-依赖的谷氨酸脱氢酶）的能力，而 GarA与KGD和GDH的结合抑制了这两个酶的活性。因此，PknB和PknG可能在不同的环境条件下竞争性调控GarA，进而调控重要的三羧酸循环代谢活动。然而，Liem Nguyen等发现 Δ *pknG*牛分枝杆菌BCG对胞外谷氨酰胺的摄取，胞内谷氨酰胺浓度及体外生长水平无变化[56]。此外，PknG还与分枝杆菌的内在的抗生素耐受性相关[59]。

2.2.7 PknI, PknJ和PknL

PknI具有一个跨膜结构域，Anubha Singh等[60]研究报道称PknI定位于细胞质中，但是从

作者文章中的图片中可以看出，除了细胞质中含量较多外，细胞膜中也含有不少，且细胞壁组分中含有较少但可见的组分，因此PknI的真正亚细胞定位还需要进一步的实验验证，上述实验中大量的PknI出现在细胞质中会不会是由于PknI大量表达，还未来得及正确定位于细胞膜上的原因？该实验组还发现结核菌在感染巨噬细胞后，*pknI*的转录水平降低。有意义的是，Radha Gopaldaswamy等研究发现 $\Delta pknI$ 结核菌在酸性，低氧条件及THP-1细胞中生长加快，在SCID鼠中毒力显著增强[61]，这暗示了PknI很可能涉及结核菌在体内的持留性感染。

PknJ含有单个跨膜结构域，体外以二聚体形式发挥蛋白激酶活性[62]。目前鉴定的底物蛋白包括：PknJ自身（自磷酸化Thr¹⁶⁸，Thr¹⁷¹和Thr¹⁷³氨基酸残基），转录调控因子EmbR，涉及分枝菌酸生物合成的甲基转移酶MmaA4/Hma，二肽酶PepE[62]，催化糖酵解途径第一步的丙酮酸激酶PykA，推定的乳酸脱氢酶LldD2和GroEL2[63]。转座子插入导致的*pknJ*突变菌株在骨髓来源的巨噬细胞和免疫缺陷小鼠中表型与野生型相似，但在SCID鼠中毒力增强[62]。

PknL为一个跨膜蛋白，胞内N-末端蛋白激酶结构域含368个氨基酸，而C末端胞外仅7个氨基酸，也暗示该激酶信号的感应可能需要其它蛋白的辅助。Marc J. Canova等[64]体外鉴定了转录调控蛋白Rv2175c是PknL的磷酸化底物，PknL对Rv2175c的磷酸化抑制了其DNA结合的亲和性。由于涉及细胞分裂及细胞壁生物合成的*dcw*基因簇与*pknL*及*rv2175c*在基因组上分布相邻，曾推测PknL可能涉及*dcw*基因簇相关功能的调控，但被Rv2175c调控的基因也还没有被鉴定，因此该说法仍有待实验证据的支持。

2.2.8 丝氨酸/苏氨酸蛋白磷酸酶Mstp (Ppp, rv0018c)

结核菌基因编码一个STPKs特异性的蛋白磷酸酶Mstp，在体外能去磷酸化目前发现的所有STPKs及其磷酸化底物。通过对蛋白进行去磷酸化，发挥与STPKs相反的作用来保持结核菌中蛋白质磷酸化的平衡，调节相关代谢的稳定。但是双组分调控系统为什么没有对应的蛋白磷酸化呢？一方面是由于一些双组分调控系统的组氨酸激酶具有双重功能，在不同条件下对同族调控蛋白发挥磷酸化或去磷酸的功能，比如双组分调控系统senX3/regX3[65]；另一方面可能是因为天冬氨酸-磷酸不稳定，半衰期在几个小时左右，所以某种程度上不需要蛋白磷酸酶发挥去磷酸化作用，而丝氨酸/苏氨酸/酪氨酸-磷酸很稳定，能坚持几个星期[66]，因此需要蛋白磷酸酶的介入，达到及时而精确的调控。既然Mstp调控的范围如此广泛，如果缺失该基因会导致什么样的后果呢？遗憾的是目前还没有这方面的报道。

2.3 PTK-磷酸酶系统

结核菌编码一个酪氨酸蛋白激酶PtkA (*rv2232*)及两个酪氨酸蛋白磷酸酶PtpA和PtpB。*ptkA*在感染巨噬细胞后表达上调[67]，暗示了该基因的重要功能。而PtkA的生化及生理功能却直到2009年才被鉴定[68]，同时还鉴定了其底物PtpA。PtpA作为结核菌中一个酪氨酸特异

性的磷酸酶，在感染巨噬细胞时表达量上调，能被分泌到宿主巨噬细胞中，抑制巨噬细胞的吞噬作用并增加肌动蛋白的聚合作用[69]。Horacio Bach等研究揭示了PtpA通过对宿主中VPS33B去磷酸化来抑制吞噬体-溶酶体融合，Dennis等进一步证明PtpA通过结合巨噬细胞空泡膜上的H⁺-ATPase中的H亚基并去磷酸化HOPS（homotypic vacuole fusion and vacuole protein sorting）复合体上人C型空泡分选蛋白VPS33B（human class C Vacuolar Protein Sorting, VPS33B）蛋白来阻止吞噬体与溶酶体的结合 [68, 70]。但是PtkA对PtpA的磷酸化与PtpA分泌是否有关目前还不得而知。而Christoph Grundner等[71]发现 $\Delta ptpA$ 结核菌在C57BL/6鼠中毒力无变化。因此，对于PtkA,除了磷酸化底物PtpA,还会不会磷酸化宿主中的一些底物呢？

PtpB也是一个分泌型的酪氨酸蛋白磷酸酶，实验证实PtpB具有双重特异性磷酸酶活性（DST, dual-specificity protein phosphatase）。且PtpB与哺乳动物脂质磷酸酶存在序列相似性并实际表现出磷酸酶活性，更重要的是它具有磷酸肌醇磷酸酶活性[72]。而宿主3-磷酸磷酸肌醇（PtdIns3P）负责将Rab5效应子hVPS34和EEA1招募到内吞体内，这是溶酶体成熟过程中的一个关键步骤[73]。研究发现 $\Delta ptpB$ 结核菌在IFN- γ 激活的巨噬细胞及豚鼠中毒力减弱。最新的研究发现PtpB可能通过下调ERK1/2和p38活性来阻断IFN- γ 刺激IL-6的产生，同时通过激活Akt和蛋白酶3（caspase 3）阻止巨噬细胞的程序性死亡[74]。

表 1. 结核分枝杆菌 STPKs-Mstp 系统和 PTK-磷酸酶系统概况

| 蛋白 | 功能 ^a | 调控底物 ^b |
|------------|---------------------------------|--|
| PknA | 调控细胞分裂及形态 | PknA [23]; pknB, Rv1422, Wag31 [22]; EmbR[40]; FtsZ[75]; MurD[76]; mtFabH[43]; GlmU[77]; GroEL1[78] |
| PknB | 调控细胞分裂及形态 | pknB [79]; PknA, Wag31, Rv1422 [22]; EmbR[40]; Rv0020c[80]; GarA[58]; PBPA(rv0016c) [81]; SigH, RshA [24]; Rv0019c, PapA5[82]; GlmU[77]; Rv0516c(Anti-Anti- σ)[33]; GroEL1[78] |
| PknD | | mtFabH[43], MmpL7[30]; Rv0516c [33]; GroEL1[78] |
| PknE | | PknE[83]; mtFabH[43]; Rv0516c, RshA, Rv1904, RsfA (Rv1365c)[33]; EmbR, EmbR2(.tb CDC1551, 该基因在37rv中缺失)[39]; GroEL1[78] |
| PknF | | PknF[50]; mtFabH[43]; EmbR, EmbR2[39]; Rv1747 [84]; GroEL1[78] |
| PknG | 调控谷氨酸代谢, 调控吞噬体与溶酶体的融合, 多种抗生素的耐受 | PknG[50]; GarA [57]; PKCα (THP-1细胞) [52] |
| PknH | 调控 LAM/LM 的比例及对 ethambutol 的耐受性 | PknH, EmbR [85]; mtFabH[43]; GroEL1[78]; Rv0681, DacB1[41] |
| PknI | | PknI[86] |
| PknJ | | |
| PknK | 调控分枝菌酸合成, 胞内滞留 | PknK, VirS , Mym, LipR, Rv3085和 Rv3088[45] |
| PknL | | PknL [87]; GroEL1[78]; Rv2175c [64] |
| Ppp (mstp) | 丝氨酸/苏氨酸特异性磷酸酶 | |
| PtkA | | PtkA, PtpA [68] |
| PtpA | 抑制吞噬体-溶酶体融合 | VPS33B (人的) [10] |
| PtpB | | |

注: 黑体表示得到体内的验证。

表2. 结核分枝杆菌STPKs-Mstp系统和PTK-磷酸酶系统成员缺失后效应

| | |
|-------------|--|
| 基因 | 基因敲出效应 |
| <i>pknA</i> | $\Delta pknA$ 无义突变无法获得, 致死, 部分缺失 (anti-RNA) 使细胞形态变得细长[22] |
| <i>pknB</i> | $\Delta pknB$ 无义突变无法获得, 致死, 部分缺失 (anti-RNA) 使细胞形态变得细长[22] |
| <i>pknD</i> | 毒力无变化[88] |
| <i>pknE</i> | $\Delta pknE$ 对一氧化氮供体 (SNP, GSNO和酸化亚硝酸盐)产出不同程度耐受, 对还原剂及确定金属离子敏感, 提高对诱导人巨噬细胞编程性死亡, 抑制坏死和增殖的能力, 降低TNF-a和IL-6的表达, 其自身在巨噬细胞中生存能力减弱[36]; $\Delta pknE$ 在BALB/c Mice中无显著毒力差异[35] |
| <i>pknF</i> | RNA干扰降低结核菌中 <i>pknF</i> 的表达量导致生长加快, 形态缩小且隔膜迷乱, 对D-葡萄糖的摄取量增加但对甘油, 亮氨酸及油酸的摄取无变化[42] |
| <i>pknG</i> | $\Delta pknG$ 在体外及BALB/c 鼠中的生存能力减弱, 在SCID鼠中毒力减弱, 突变株中谷氨酸及谷氨酰胺积累[55]; <i>PknG</i> 在 <i>M.tb</i> , <i>M.bovis</i> 和 <i>M.sm</i> 中的缺失导致对多药敏感[59] |
| <i>pknH</i> | $\Delta pknH$ 在BALB/c鼠中毒力增强[35] |
| <i>pknI</i> | $\Delta PknI$ 在酸性、低氧条件及THP-1细胞中生长加快, 在SCID鼠中毒力增强[61] |
| <i>pknJ</i> | 转座子插入导致的 <i>pknJ</i> 突变菌株在骨髓来源的巨噬细胞和免疫缺陷小鼠中表型与野生型相似, 但在SCID鼠中毒力增强[62] |
| <i>pknK</i> | $\Delta pknK$ 细胞的大小和细胞壁组分发生改变, 对特殊压力如酸性pH, 氧化压力, 低氧等更加耐受, 在体外稳定器生长加快, 在C57BL/6鼠中早起适应阶段生长减慢[48]。 |
| <i>pknL</i> | |
| <i>PPP</i> | |
| <i>ptkA</i> | |
| <i>ptpA</i> | $\Delta ptpA$ 在THP-1巨噬细胞中毒力减弱[10]; $\Delta ptpA$ 在C57BL/6鼠中毒力无变化[71] |
| <i>ptpB</i> | $\Delta ptpB$ 在IFN-g 激活的巨噬细胞及豚鼠模型中毒力减弱[73] |

2.4 结核菌信号转导系统运用潜力

2.4.1 药靶

随着对原核生物信号传导系统的研究，其中一些重要的系统被发现可作为药物开发的理想靶标。结核菌的信号传导系统涉及了细菌的多方面的生理功能，包括毒力，休眠，持留性感染及药物耐受等等。首先，一些对结核菌生存所必须的系统如真核样丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶系统中的PknA，双组份调控系统中的MtrA和PrrB/A，sigma因子系统中的SigA都可以作为药物开发的靶标。其次，一些被分泌进入宿主并干扰宿主信号，在结核菌持留感染中发挥重要作用的蛋白也是药物开发的重要靶点。比如结核菌信号转导系统中的PknG, PtpA及PtpB等。最后，其中控制结核菌毒力，休眠及药物耐受的系統也可作为理想的靶标。抑制这些系统并不会直接杀死结核菌，但是可能使其毒力降低，对药物敏感，阻止细菌进入休眠状态等。这样便可以使得目前正在使用中的主要针对蛋白质，DNA或细胞壁合成等这些复制性细胞才具有的代谢过程的抗生素能够持续的或重新发挥作用。比如，MprAB通过严紧反应来调控结核菌的持留性和药物耐受，DosR/S/T控制了结核菌活性状态与休眠状态之间的转换。这些都可以作为理想的药物开发靶标。最近，Rajesh Kumar 等基于DosR的结构找到的一种苯基香豆素（phenylcoumarin）结构衍生物能够有效的抑制 DevR 与 DNA的结合，进而下调休眠相关基因的表达，显著的降低了结核菌在低氧下的生存能力而不影响在营养缺陷休眠和活性结核菌的生长[89]。且大量真核生物中蛋白激酶抑制剂研究的取得成功，长期的经验及技术平台为原核生物中针对STPKs进行药物设计和开发奠定了坚实的基础。近年来针对结核菌的信号转导系统，特别是STPKs-Mstp系统及PTK-磷酸酶系统进行的抑制剂筛选取得了很大的进展。下面将它们的简要信息（抑制剂名称或代号，IC₅₀及选择性）列举于表3，对应的化学结构式见图3。除了表3中列举的针对TCS，STPKs等的组分开发的化学小分子抑制剂外，利用噬菌体表面展示技术还发现了模拟anti- σ RshA的短肽能竞争性的特异抑制 σ^H 的功能[90]，这也为我们提供了一种很好的思路。

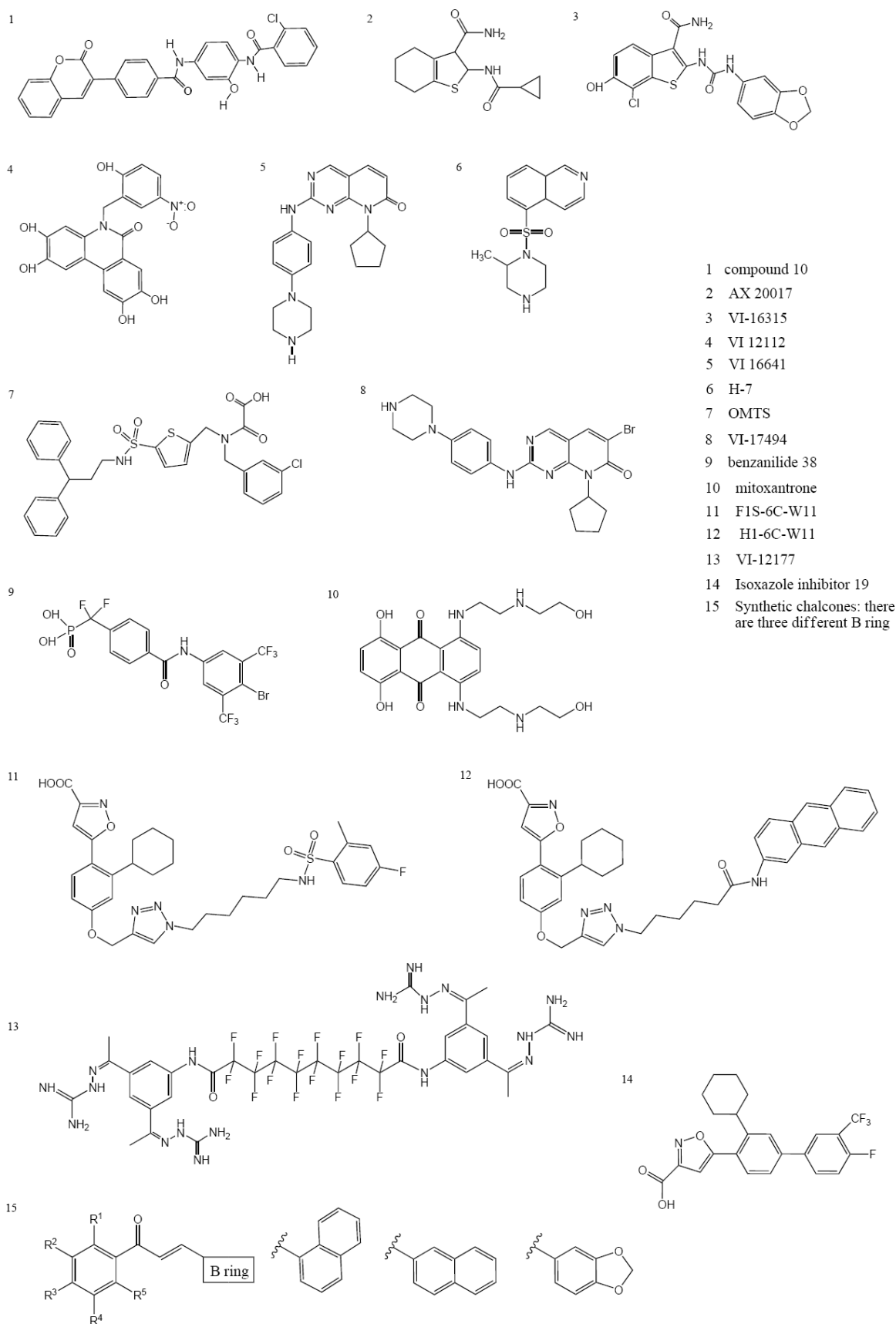
表 3. 针对结核分枝杆菌信号转导系统抑制剂概况

| 靶标 | 抑制剂 | IC ₅₀ ^a | 特异性 | |
|-------------------|--|-------------------------------|---|--------------|
| PknG ^b | AX20017 (tetrahydrobenzothiophenes) | 0.3μM | | [91] |
| | VI-16315 | 0.01μM | | [92] |
| | VI-16115 | 0.02μM | | [92] |
| | VI-16100 | 0.02μM | | [92] |
| | VI-16026 | 0.03μM | | [92] |
| pknB | VI-12177 | 0.088μM | | [92] |
| | VI-17494 | 0.129μM | | [92] |
| | VI 12112 | 0.274μM | | [91] |
| | VI 16641 | 0.258μM | | [91] |
| | 1-(5-isoquinolinesulfonyl)-2-methylpiperazine (H7) mitoxantrone | μM级 | | [93] |
| PtpA | Synthetic chalcones | 0.8 ± 0.05μM | | [94] |
| | Benzanilide类同系物 (以benzanilide 38为例) | 5-60μM Ki=1.4 ± 0.3μM | 是 HC PtpA 的 11 倍, 对 PtpB, PTP1B, Tc-Ptp, VHR CD45 LAR 等>70倍 | [95] [96] |
| PtpB | Isoxazole inhibitor 19 及其同系物 | Ki=0.22± 0.03μM | 是LAR的98倍, CD45的 38倍, 对PtpA VHR TC-Ptp等>225倍 | [97] |
| | (oxalylamino-methylene)-thiophene sulfonamide (OMTS) | 440± 50 nM | 对PTP1B, PTPβ, PTP-H1, PAC1, Glepp1 >60倍 | [98] |
| | Bidentate (F1S-6C-W11和H1-6C-W11) | Ki=150 nM和170 nM | F1S-6C-W11对PTP1B TCPTP YopH LMWPTP 的选择性在11-43倍之间, H1-6C-W11对它们的选择性在23-52倍之间 | [99] |

注: **a**, IC₅₀EMSA =抑制DevR 结合DNA活性的50%的药物浓度 (μg/mL)。 IC₅₀GFP=抑制DevR依赖性启动子活性 (以GFP荧光量来计算) 50%的药物浓度 (μg/mL)。

b, Rita Sz ékely等[91]针对pknG筛选的抑制剂有6个, 其IC₅₀在0.2-0.4μM之间, 这里仅列举了其中1个; 针对pknB的也有5个, 其IC₅₀在0.258-2.37μM之间, 这里仅列举了2个; B. Hegymegi-Barakonyi等[92]针对pknG筛选的抑制剂有9个, 其IC₅₀在0.01-0.3μM之间, 这里仅列举了其中4个; 针对pknB的也有9个, 其IC₅₀在0.088-0.870μM之间, 这里仅列举了2个。

图 3. 结核分枝杆菌信号转导系统抑制剂的化学结构



2.4.2 结核病疫情及疫苗

疫苗是控制疾病疫情的重要手段。目前唯一使用的结核病疫苗BCG能为新生儿和儿童提供较好的保护作用，但对成年人的保护作用差异较大且总体较低，导致占社会绝大多数的人群成为结核菌感染对象。因此急需能够对婴儿和成年人都提供免疫保护的新型疫苗，无论是直接代替BCG还是作为推进剂(booster)。尽管导致BCG保护效果不佳的原因很多，但是BCG与结核菌之间在免疫原性特征上的本质性区别或许是一个很重要原因。

2.4.2.1 累积性缺失开发减毒活疫苗

减毒活疫苗与其它类型疫苗相比的最大优点在于能在更大程度上模拟原始病原菌，引发与自然感染更类似的宿主免疫反应，因此能起到更好更全的免疫保护效果。特别是针对结核菌这种能够引发宿主复杂免疫反应的病原菌。但是BCG又能在多大程度上模拟感染人的主要致病菌结核分枝杆菌呢？BCG的出发菌株牛分枝杆菌（以牛分枝杆菌 AF2122_97为例）与人类结核病主要致病菌结核菌（以结核菌 H37Rv为例）相比，基因组相似性大于99.95%，但存在很多的微小的差异（表4），也正是这些微小的差异的一点点的积累导致两个具有相似基因组的细菌却表现出不一样的宿主偏好。更重要的是牛分枝杆菌与结核菌之间在细胞壁和分泌蛋白谱之间存在很大差异，而这些正好涉及其免疫原性及与宿主之间的相互作用[100]。而BCG与其出发菌株牛分枝杆菌相比，经过13年的传代筛选，也因累积了很多微小的差异（表4）而发生了巨大的变化。牛分枝杆菌与结核菌之间存在较大差异，而BCG又与牛分枝杆菌之间存在较大差异，也就注定了BCG与结核菌之间存在更大差异，这也可以从表1中的数据反应出来。

表4. 结核菌，牛分枝杆菌及牛分枝杆菌BCG间的比较基因组学差异[100-101]

| | Bovis-H37Rv | BCG-Bovis | BCG-H37Rv |
|---------------|-------------|-----------|-----------|
| RD | 38 | 5 | 39 |
| SNPs | 2437 | 736 | 2379 |
| Transversions | 788 | 217 | 777 |
| Transitions | 1649 | 519 | 1602 |
| Del | 205 | 76 | 205 |
| Ins | 177 | 89 | 175 |
| Subs | 118 | 50 | 111 |

注：H37Rv, *M. tuberculosis* H37Rv; BCG, *M. bovis* BCG Pasteur; Mb, *M. bovis* AF2122/97; RD, Regions of difference; Del, ≥ 1 bp deletion; Ins, ≥ 1 bp insertion; Subs, substitution > 1 bp.

BCG虽然不尽完美，但也堪称结核病史上的成功疫苗，同时也是一个累积性突变而产生的减毒活疫苗的经典案例。相对于出发菌株牛分枝杆菌而言，与BCG之间的差异可看成是突变。但在这些突变当中，没有哪一个突变能对其产生致命的，但是每一个突变或多或少的影响了其代谢中的某一方面，然后这些大量的微小影响的累积最终导致其毒力减弱。

目前针对结核病开发的处于临床试验的12款潜在疫苗包括基于重组抗原的亚单位疫苗，基于BCG改造型活疫苗和全菌体灭活疫苗[102]。虽然从结核菌本身出发进行减毒活疫苗的开发也一直在尝试中，但目前仍未取得重大进展。既然BCG的例子能够证明微小累积突变能够让致病菌毒力减弱最终成为减毒活疫苗，那我们能不能从真正感染人的结核菌出发，通过类似的方法得到在最大程度上模拟结核菌的减毒活疫苗呢？当然值得一试。那我们是重复像筛选BCG一样的历程呢还是怎样？也许时间并不允许我们这么做。而随着分枝杆菌遗传操作的成熟，也许我们可以尝试进行人为突变，当然缺失是我们最容易想到也最容易做到的。那结核菌的近4000个基因中，除了614个必须基因之外[103]，我们该选哪些进行缺失呢？

2.4.2.2 信号转导系统是进行累积性缺失的理想靶标

信号传导系统是结核菌感应各种环境并做出全局性代谢调控，以适应各种苛刻的生存环境，是其一切生理行为支配性系统。这些系统功能的微小改变就会引起其下游的广泛调控效应。如基因组层面上极为相似的牛分枝杆菌与结核菌之间，Mb2801c基因编码的AsnC/Lrp家族调控子[104]，编码真核样丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶的和[34]等全局性调控基因的突变对其差异发挥了很大程度的作用。全局性调控因子PhoP也是导致很多菌株减毒的例子：缺失该基因的结核菌表现出减毒[105]和改变的细胞壁形态特征[106]，因点突变而丧失PhoP功能的弱毒菌株H37Ra表现出与H37Rv Δ *phoP*缺失突变株类似的表型并且H37Rv Δ *phoP*能部分地恢复其毒力[107]。H37Rv *phoP*缺失突变株目前在疫苗临床前研究中表现出很好潜力。

结核菌的信号转导系统已经在前面部分进行了介绍。这些系统从调控的层面上各自大体上有分工：TCS主要从基因转录的层面进行调控；而STPKs-Mstp和PTK主要从蛋白质翻译后磷酸化修饰方面进行调控，当然由于其部分调控底物为转录调控因子，因此也间接的调控了基因的表达。而Sigma因子作为RNA聚合酶的组成部分，在转录水平发挥重要的调控功能，而其自身的功能又受到转录水平（其它sigma因子及转录调控因子）和转录后水平（anti-sigma因子，anti-anti-sigma因子，蛋白酶，STPK等）的调控。随着研究的不断深入，越来越多的证据发现结核菌的3类信号转导系统间存在着复杂的相互调控网络（图2）。更重要的是，我们分析发现结核菌，牛分枝杆菌和BCG之间在三组主要的信号转导系统之间也存在大量的差异如突变，缺失或插入等（表5）。这也暗示了这些全局性调控系统在这些不同菌株之间的功能差异。

表 5. 结核菌, 牛分枝杆菌和 BCG 三组信号转导系统时间的差异

| | | Bovis-H37Rv | | | BCG-Bovis | | | BCG-H37Rv | | | |
|-----------------|-------|-------------|-----------|-----|-----------|-----|-----|-----------|-----------|-----|--|
| | | M | Del | Ins | M | Del | Ins | M | Del | Ins | |
| | | | 1(C388aa) | | | | | | 1(C388aa) | | |
| STPKs | PknD | | | | 1 | | | | | | |
| | PknE | 1 | | | | | | | | | |
| | PknF | 1 | | | | | | 1 | | | |
| | PknH | 9 | 2 | | 2 | | | 9 | 2 | | |
| | PknK | 1 | | | | | | 1 | | | |
| Sigma Factor | PknL | 1 | | | | | | 1 | | | |
| | SigJ | 1 | | | | | | 1 | | | |
| | SigM | 8 | 3 | | 1 | | | 8 | 3 | | |
| | MtrB | 1 | | | | | | 1 | | | |
| | PhoR | 2 | | | | | | 2 | | | |
| TCSs | SenX3 | | | | 1 | | | 1 | | | |
| | RegX3 | | | | 1 | | | 1 | | | |
| | DosS | 1 | | | | | | 1 | | | |
| | DosT | 1 | | | | | | 1 | | | |
| | MprA | 1 | | 1 | | | | 1 | | 1 | |
| | MprB | 1 | | | | | | 1 | | | |
| | NarS | 1 | | | | | | 1 | | | |
| | NarL | 1 | | | 1 | | | | | | |
| | FdtaS | 1 | | | | | | 1 | | | |
| | KdpD | 2 | | | 2 | | | 4 | | | |
| | TcrY | 2 | | | | | | 2 | | | |
| TcrA | 1 | | | | | | 1 | | | | |

注: H37Rv, *M. tuberculosis* H37Rv; BCG, *M. bovis* BCG Pasteur; Mb, *M. bovis* AF2122/97; M: \geq aa mutation; Del, \geq 1aa deletion; Ins, \geq 1aa insertion。三个菌株中完全相同的蛋白, 这里没有列出。所有这些蛋白的氨基酸序列从NCBI下载, 利用DNAMAN1 software (Lynnon BioSoft, Vaudreuil, Quebec, Canada)进行序列比对分析。

实验证明, 结核菌的这3大信号转到系统中, 各自都存在对结核菌必须的基因和非必须的基因。双组份调控系统中的必须基因为MtrB/A[108]和PrrB/A[109], 真核样丝氨酸苏氨酸激酶系统中为pknA和pknB[22], 而sigma因子系统中为sigA[103]。也就是说这三个系统从不同层面牢牢控制了结核菌的命运。对每一个系统而言, 就像一个拥有10多个头的怪兽, 除主要的头外, 斩掉其他任何一个对其影响不大, 甚至它还可以通过增强其它头的功能来进行一定程度上的弥补, 让人不知所措。但任何事情都具有两面性。既然每个系统都由10几个成员组成, 也就意味着每个成员都承担了一部分但有不是太多的功能。因此, 对其中的任何一个的缺失不会对细菌产生致死性效果但又必然会或多或少地对其产生影响, 只是其中一些的影响也许并不会在体外或体内相关实验中明显表现出来。因此, 通过累积性的敲出那些不会在很大程度上影响细菌生理功能的成员, 逐步的减弱其生存适应能力, 减弱到让其能够生存但又不具备毒力并能诱导人体产生足够的免疫保护能力的时候, 便可以作为减毒活疫苗。虽然这些系统之间相互作用相互调控, 但是每个系统都大致上有自己的调控层面, 且为了让问题变得简单化, 应该针对其中的某一个系统进行累积性缺失。加之每一个系统大概都由10几个成员组成, 这对于进行遗传操作还是可以实现的。

2.4.2.3 选择系统中的那些成员进行缺失呢？

对某一系统中的成员，我们应该选择从哪一个开始进行缺失？后面又应该继续对哪些进行缺失呢？我认为有如下两个原则必须遵循：1，从对毒力最不重要的作为切入点。如果我们选择从对毒力最重要的进行缺失，势必会大大影响细菌在宿主里面的生存，过度的削弱了其引发宿主免疫保护的能力。2，尽量保留调控重要免疫原性蛋白或其他物质功能的成员。让这些重要的免疫原能正常产生，发挥诱导免疫保护作用。在此原则基础上，需要尽量完成如下工作：1，对结核菌的所有这些系统成员进行深入研究，弄清楚各自调控的把基因或把蛋白及它们的功能。2，对每个成员进行单基因缺失，并在同一条件下进行体外生长能力，压力承受能力及体内生存能力，毒力，诱导相关免疫保护能力等进行评价。然后综合所有的这些信息，拟定不同的缺失顺序组合，逐步进行缺失和相关指标的评价。

对这三个系统，目前都有较多的研究。对TCS的内容可以参考文献[14]，STPKs系统可参考[110]，Sigma因子系统可参考[4, 16-17]。表1，表2和表6分别系统的总结了结核菌中STPK系统和sigma因子系统中个成员的主要功能及缺失或过表达后的相关表型，TCS的可以参考文献[14]。可以看出，这些基因缺失后有以下几种表型：体内外的生长和毒力不受影响，体内外的生长基本不影响但其毒力减弱，体内生长和毒力都减弱，毒力增强。因此，对这些系统的详细功能的研究是我们进行累积性缺失的基础。

但是有一个问题就是随着累积性缺失数量的增加，在操作中如何选择抗性标记呢？即便能有这么多的抗生素使用，这不是会增加一个额外的风险吗？最终这些抗生素存在于疫苗菌株中，免疫接种后如果通过基因水平转移等方式被其他微生物获得，不是一个不可估量的灾难性后果嘛？这个问题也许我们可以引入一个Cre-lox P重组系统来解决。该系统由bacteriophage P1衍生而来，包含一个38 kDa的cre重组酶（Type I topoisomerase）和一对34 bp的Cre-特异性识别序列lox P位点。Cre酶特异性的识别两个lox P位点并将lox P位点序列的各自一半和两位点之间的序列切除，然后将剩下的两半lox P位点连接成一个完整的lox P位点[111-113]。且Joseph G. Sklara等已经利用该系统在分枝杆菌中成功地去除了潮霉素抗性基因[21]。

表 6. 结核分枝杆菌 sigma 因子系统概况

| 基因 | 主要功能 | 缺失或过表达效应 |
|------|--|---|
| sigA | 主要 sig 因子 [114], 也涉及结核菌毒力[115]。 | 缺失: 必须基因[103]; 通过反义RNA降低H37Rv中sigA表达使得其在人单核巨噬细胞和小鼠感染模型中生长减慢[115]; 若毒性 <i>M.bovis</i> ATCC-35721菌株 (sigA中启动子结合结构域中精氨酸突变成组氨酸) 的毒力能被正常sigA基因回补[116]; 过表达: sigA过表达加强结核分枝杆菌在巨噬细胞和小鼠肺部的生长[115]; sigA上调表达的临床分离菌株 <i>M.Tb</i> strain 210比其它菌株相比, 在人巨噬细胞中生长更快[117]。 |
| SigB | 与SigA功能部分重叠[114]。涉及对细胞壁压力, 氧化压力和低氧等的调控 [118] | 缺失: 对SDS和低氧更敏感, 但在THP-1巨噬细胞, 小鼠和豚鼠感染模型中与野生型无差别[118]。 过表达: <i>M. tuberculosis</i> CDC1551 中 sigB的过表达不会影响其它sig因子的表达变化, 但是会导致一些编码早期滤液抗原 (ESAT-6-样蛋白), 核糖体蛋白, PE-PGRS蛋白, 酮酰基合酶, KasA及调控蛋白WhiB2和IdeR的表达高度上调, 同时在巨噬细胞J774A.1中生长减慢[119]。 |
| SigC | 毒力及免疫原性调控 | sigC缺失突变 <i>M.tb</i> CDC1551在鼠骨髓来源巨噬细胞和激活的J774巨噬细胞中的存活不受影响, 在小鼠肺组织中的增殖和持留不受影响, 但是经气溶胶感染根本不会导致小鼠死亡 (野生型和互补菌株在约250天时全部死亡) 而通过静脉注射感染的mice在超过350天后仍然存活天 (野生型和互补菌株在约100天时全部死亡) [120]; sigC缺失突变 <i>M.tb</i> CDC1551在DBA/2的肺部增殖不受影响, 在DBA/2 鼠中引发的炎症反应和死亡率降低, 肺部TNF- α , IL-1 β , IL-6和IFN- γ 等表达降低; 在SCID 鼠中与在DBA/2鼠中表型类似, 引发死亡要比野生型和回补菌株慢但比在DBA/2鼠中快, 肺部促炎细胞因子表达降低; 但在豚鼠肺部的生长减慢[121]; 在体外Middlebrook 7H9培养基和THP-1巨噬细胞内的生长不受影响, 在豚鼠感染模型中生存力严重减弱[122] |
| SigD | 毒力及免疫原性调控 | 在 mouse感染模型中毒力减弱, 在肺组织中存活与引发炎症反应能力有所降低[123]; sigD缺失突变 <i>M.tb</i> CDC1551在体外生长和J774A.1巨噬细胞中的短期生长不受影响, 但巨噬细胞的TNF-a水平下降, 受突变株感染的C3H鼠与受野生型和回补菌株相比死亡延迟, 但肺组织和脾脏组织中细菌载量类似 [124] |
| SigE | 涉及毒力, 表面压力反应及感染过程中炎症反应的调控 | 对热, SDS和多种氧化压力更敏感, 在人 (THP-I) 和鼠 (J774) 未激活的巨噬细胞中生长减弱, 在激活的鼠巨噬细胞中更容易被杀死[125]; 感染人单核细胞树突状细胞后生长略为减弱, 但能诱导IL-10 的分泌而抑制CXCL10表达[126]; 通过静脉注射感染BALB/c鼠后, 与野生型和回补菌株相比, 鼠的组织损伤程度降低且存活率提高, 鼠体内菌载量低于野生型和回补菌株但IFN- γ , TNF- α , iNOS和 β -防卫素的表达量却更高, 经皮下注射在免疫缺陷的裸小鼠中的毒力比BCG更弱, 免疫BALB/c鼠后比BCG更能诱导对 |

| | | |
|------|---------------------|---|
| | | <i>M.tb</i> H37Rv和Beijing-9501000的保护作用[127] |
| SigF | 药物敏感性，毒力，细胞壁调控 | 缺失： sigF缺失突变 <i>M.tb</i> CDC1551在体外生长几乎无变化，对利福平和利福喷丁更敏感，对chenodeoxycholate摄取能力减弱，在人单核细胞中的短期生长不受影响，突变株感染的小鼠较野生型感染的小鼠死亡时间延迟约80天[128]；在体外Middlebrook 7H9培养基和THP-1巨噬细胞内的生长不受影响，在豚鼠感染模型中生存力略减[122]；过表达或缺失sigF不影响 <i>M.tb</i> 对利福平的敏感性[129]；在体外营养缺失条件，激活的小鼠巨噬细胞中的生长，体内肉芽瘤模型中的滞留性无影响[130]；感染小鼠后，sigF突变株能在肺组织中形成滞留感染但菌载量较野生型低，病理毒力减弱；免疫后使兔子获得比BCG略高的对 <i>M.tb</i> 的保护性（结块较小），膜相关硫酯含量降低[131]。 过表达： <i>M. tb</i> CDC1551 中过表达使其在巨噬细胞J774A.1 中生长减慢[119]；过表达导致大量细胞壁相关蛋白的表达[130]。 |
| SigG | 药物敏感性调控 | sigG缺失突变 <i>M.tb</i> CDC1551对mitomycin C的耐受性提高[132]； <i>M. tb</i> H37Rv中SigG并不控制DNA损伤应急[133] |
| SigH | 热压力，氧化压力，毒力等 | 对热和多种氧化压力敏感，但在巨噬细胞中的生长不受影响[134]；对氧化压力和热休克更敏感[135]；sigH缺失突变 <i>M.tb</i> CDC1551在resistant C57BL_6 mice中，肺组织和脾脏组织中菌载量与野生型相似但肺组织中炎症反应减弱并延迟，在感染的早期肺组织招募的CD4+和CD8+T细胞减少；在susceptible C3H mice中，免疫病理特征减弱，感染170天小鼠依然存活而野生型感染的小鼠在52时死亡[136]；对酰胺压力更敏感[137] |
| SigI | | |
| SigJ | 过氧化氢压力 | 在微需氧稳定期体外模型和血瘀免疫小鼠模型中生长不受影响，但H ₂ O ₂ 更敏感[138] |
| SigK | | BCG中sigK的起始密码子的点突变导致抗原蛋白mpb70(Rv2875)和mpb83(Rv2873)的表达降低[139] |
| SigL | 调控细胞壁和聚酮合成相关基因的表达 | sigL-rslA缺失菌株在小鼠模型中毒力大幅减弱[140]；对几种氧化压力和亚硝基应激的敏感性无差异，在小鼠感染模型中毒力大幅减弱[141] |
| SigM | 调控细胞表面和分泌分子的表达[142] | 在体外Middlebrook 7H9培养基和THP-1巨噬细胞和豚鼠感染模型中无变化[122]；sigM缺失突变 <i>M.tb</i> CDC1551 在静息的和激活的 J774A.1 巨噬细胞中的生存能力，在小鼠的肺组织和脾脏组织中的菌载量不受影响，受感染小鼠的死亡时间与野生型和回补菌株感染的小鼠相似[143]。 |

注：若无特殊说明，均指在结核菌H37Rv。

参考文献:

1. WHO, *GLOBAL TUBERCULOSIS CONTROL: WHO report 2011*. 2011.
2. Cole, S.T., et al., *Deciphering the biology of Mycobacterium tuberculosis from the complete genome sequence*. Nature, 1998. **393**(6685): p. 537-44.
3. Patricia A. Fontan, S.W.a.I.S., *Cellular signaling pathways and transcriptional regulation in Mycobacterium tuberculosis Stress control and virulence*. CURRENT SCIENCE, 2004. **86**(01).
4. Manganelli, R., et al., *Sigma factors and global gene regulation in Mycobacterium tuberculosis*. J Bacteriol, 2004. **186**(4): p. 895-902.
5. Tekaia, F., et al., *Analysis of the proteome of Mycobacterium tuberculosis in silico*. Tuber Lung Dis, 1999. **79**(6): p. 329-42.
6. Voskuil, M.I., et al., *Inhibition of respiration by nitric oxide induces a Mycobacterium tuberculosis dormancy program*. J Exp Med, 2003. **198**(5): p. 705-13.
7. Sousa, E.H., et al., *DosT and DevS are oxygen-switched kinases in Mycobacterium tuberculosis*. Protein Sci, 2007. **16**(8): p. 1708-19.
8. Kumar, A., et al., *Heme oxygenase-1-derived carbon monoxide induces the Mycobacterium tuberculosis dormancy regulon*. J Biol Chem, 2008. **283**(26): p. 18032-9.
9. Honaker, R.W., et al., *Unique roles of DosT and DosS in DosR regulon induction and Mycobacterium tuberculosis dormancy*. Infect Immun, 2009. **77**(8): p. 3258-63.
10. Bach, H., et al., *Mycobacterium tuberculosis virulence is mediated by PtpA dephosphorylation of human vacuolar protein sorting 33B*. Cell Host Microbe, 2008. **3**(5): p. 316-22.
11. Chao, J., et al., *Protein kinase and phosphatase signaling in Mycobacterium tuberculosis physiology and pathogenesis*. Biochim Biophys Acta, 2009.
12. Wong, D., et al., *Mycobacterium tuberculosis protein tyrosine phosphatase (PtpA) excludes host vacuolar-H⁺-ATPase to inhibit phagosome acidification*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011. **108**(48): p. 19371-6.
13. Staron, A., et al., *The third pillar of bacterial signal transduction: classification of the extracytoplasmic function (ECF) sigma factor protein family*. Mol Microbiol, 2009. **74**(3): p. 557-81.
14. Bretl, D.J., C. Demetriadou, and T.C. Zahrt, *Adaptation to Environmental Stimuli within the Host: Two-Component Signal Transduction Systems of Mycobacterium tuberculosis*. Microbiol Mol Biol Rev, 2011. **75**(4): p. 566-82.
15. Zhou, P.F., et al., *Mycobacterium tuberculosis Two-Component Systems and implications in novel vaccines and drugs*. Crit Rev Eukaryot Gene Expr, 2012. **22**(1): p. 37-52.
16. Rodrigue, S., et al., *The sigma factors of Mycobacterium tuberculosis*. FEMS Microbiol Rev, 2006. **30**(6): p. 926-41.
17. Sachdeva, P., et al., *The sigma factors of Mycobacterium tuberculosis: regulation of the regulators*. FEBS J, 2010. **277**(3): p. 605-26.
18. ZHOU PeiFu, L.Q., ZHOU YeXin, WANG HongHai, XIE JianPing, *Mycobacterium tuberculosis Two-Component Systems and implications in novel vaccines and drugs*. Critical Reviews in Eukaryotic Gene Expression, in press.
19. Thakur, K.G., T. Praveena, and B. Gopal, *Structural and biochemical bases for the redox sensitivity of Mycobacterium tuberculosis RslA*. J Mol Biol, 2010. **397**(5): p. 1199-208.
20. Barik, S., et al., *RseA, the SigE specific anti-sigma factor of Mycobacterium tuberculosis, is inactivated by phosphorylation-dependent ClpCIP2 proteolysis*. Mol Microbiol, 2010. **75**(3): p. 592-606.
21. Sklar, J.G., et al., *M. tuberculosis intramembrane protease Rip1 controls transcription through three anti-sigma factor substrates*. Mol Microbiol, 2010. **77**(3): p. 605-17.
22. Kang, C.M., et al., *The Mycobacterium tuberculosis serine/threonine kinases PknA and PknB: substrate identification and regulation of cell shape*. Genes Dev, 2005. **19**(14): p. 1692-704.
23. Chaba, R., M. Rajee, and P.K. Chakraborti, *Evidence that a eukaryotic-type serine/threonine protein kinase from Mycobacterium tuberculosis regulates morphological changes associated with cell division*. Eur J Biochem, 2002. **269**(4): p. 1078-85.

24. Park, S.T., C.M. Kang, and R.N. Husson, *Regulation of the SigH stress response regulon by an essential protein kinase in Mycobacterium tuberculosis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(35): p. 13105-10.
25. Shah, I.M., et al., *A eukaryotic-like Ser/Thr kinase signals bacteria to exit dormancy in response to peptidoglycan fragments*. Cell, 2008. **135**(3): p. 486-96.
26. Keep, N.H., et al., *Wake up! Peptidoglycan lysis and bacterial non-growth states*. Trends Microbiol, 2006. **14**(6): p. 271-6.
27. Hett, E.C., et al., *A partner for the resuscitation-promoting factors of Mycobacterium tuberculosis*. Mol Microbiol, 2007. **66**(3): p. 658-68.
28. Hett, E.C., M.C. Chao, and E.J. Rubin, *Interaction and modulation of two antagonistic cell wall enzymes of mycobacteria*. PLoS Pathog, 2010. **6**(7): p. e1001020.
29. Kana, B.D. and V. Mizrahi, *Resuscitation-promoting factors as lytic enzymes for bacterial growth and signaling*. FEMS Immunol Med Microbiol, 2010. **58**(1): p. 39-50.
30. Perez, J., et al., *Mycobacterium tuberculosis transporter MmpL7 is a potential substrate for kinase PknD*. Biochem Biophys Res Commun, 2006. **348**(1): p. 6-12.
31. Cox, J.S., et al., *Complex lipid determines tissue-specific replication of Mycobacterium tuberculosis in mice*. Nature, 1999. **402**(6757): p. 79-83.
32. Reed, M.B., et al., *A glycolipid of hypervirulent tuberculosis strains that inhibits the innate immune response*. Nature, 2004. **431**(7004): p. 84-7.
33. Greenstein, A.E., et al., *M. tuberculosis Ser/Thr protein kinase D phosphorylates an anti-anti-sigma factor homolog*. PLoS Pathog, 2007. **3**(4): p. e49.
34. Peirs, P., et al., *The Mycobacterium bovis homologous protein of the Mycobacterium tuberculosis serine/threonine protein kinase MbK (PknD) is truncated*. FEMS Microbiol Lett, 2000. **188**(2): p. 135-9.
35. Papavinasasundaram, K.G., et al., *Deletion of the Mycobacterium tuberculosis pknH gene confers a higher bacillary load during the chronic phase of infection in BALB/c mice*. J Bacteriol, 2005. **187**(16): p. 5751-60.
36. Jayakumar, D., W.R. Jacobs, Jr., and S. Narayanan, *Protein kinase E of Mycobacterium tuberculosis has a role in the nitric oxide stress response and apoptosis in a human macrophage model of infection*. Cell Microbiol, 2008. **10**(2): p. 365-74.
37. Sharma, K., et al., *PknH, a transmembrane Hank's type serine/threonine kinase from Mycobacterium tuberculosis is differentially expressed under stress conditions*. FEMS Microbiol Lett, 2004. **233**(1): p. 107-13.
38. Chao, J.D., et al., *Convergence of Ser/Thr and two-component signaling to coordinate expression of the dormancy regulon in Mycobacterium tuberculosis*. J Biol Chem.
39. Molle, V., et al., *EmBR2, a structural homologue of EmBR, inhibits the Mycobacterium tuberculosis kinase/substrate pair PknH/EmBR*. Biochem J, 2008. **410**(2): p. 309-17.
40. Sharma, K., et al., *EmBR, a regulatory protein with ATPase activity, is a substrate of multiple serine/threonine kinases and phosphatase in Mycobacterium tuberculosis*. FEBS J, 2006. **273**(12): p. 2711-21.
41. Zheng, X., K.G. Papavinasasundaram, and Y. Av-Gay, *Novel substrates of Mycobacterium tuberculosis PknH Ser/Thr kinase*. Biochem Biophys Res Commun, 2007. **355**(1): p. 162-8.
42. Deol, P., et al., *Role of Mycobacterium tuberculosis Ser/Thr kinase PknF: implications in glucose transport and cell division*. J Bacteriol, 2005. **187**(10): p. 3415-20.
43. Veyron-Churlet, R., et al., *The Mycobacterium tuberculosis beta-ketoacyl-acyl carrier protein synthase III activity is inhibited by phosphorylation on a single threonine residue*. J Biol Chem, 2009. **284**(10): p. 6414-24.
44. Curry, J.M., et al., *An ABC transporter containing a forkhead-associated domain interacts with a serine-threonine protein kinase and is required for growth of Mycobacterium tuberculosis in mice*. Infect Immun, 2005. **73**(8): p. 4471-7.
45. Kumar, P., et al., *The Mycobacterium tuberculosis protein kinase K modulates activation of transcription from the promoter of mycobacterial monooxygenase operon through phosphorylation of the transcriptional regulator VirS*. J Biol Chem, 2009. **284**(17): p. 11090-9.
46. Nourry, C., S.G. Grant, and J.P. Borg, *PDZ domain proteins: plug and play!* Sci STKE, 2003. **2003**(179): p. RE7.

47. Ponting, C.P., et al., *PDZ domains: targeting signalling molecules to sub-membranous sites*. Bioessays, 1997. **19**(6): p. 469-79.
48. Malhotra, V., et al., *Mycobacterium tuberculosis Protein Kinase K confers survival advantage during early infection in mice and regulates growth in culture and during persistent infection: implications in immune modulation*. Microbiology, 2010.
49. Singh, A., et al., *Requirement of the mymA operon for appropriate cell wall ultrastructure and persistence of Mycobacterium tuberculosis in the spleens of guinea pigs*. J Bacteriol, 2005. **187**(12): p. 4173-86.
50. Koul, A., et al., *Serine/threonine protein kinases PknF and PknG of Mycobacterium tuberculosis: characterization and localization*. Microbiology, 2001. **147**(Pt 8): p. 2307-14.
51. Walburger, A., et al., *Protein kinase G from pathogenic mycobacteria promotes survival within macrophages*. Science, 2004. **304**(5678): p. 1800-4.
52. Chaurasiya, S.K. and K.K. Srivastava, *Downregulation of protein kinase C-alpha enhances intracellular survival of Mycobacteria: role of PknG*. BMC Microbiol, 2009. **9**(1): p. 271.
53. Breton, A. and A. Descoteaux, *Protein kinase C-alpha participates in FcgammaR-mediated phagocytosis in macrophages*. Biochem Biophys Res Commun, 2000. **276**(2): p. 472-6.
54. Scherr, N., et al., *Survival of pathogenic mycobacteria in macrophages is mediated through autophosphorylation of protein kinase G*. J Bacteriol, 2009. **191**(14): p. 4546-54.
55. Cowley, S., et al., *The Mycobacterium tuberculosis protein serine/threonine kinase PknG is linked to cellular glutamate/glutamine levels and is important for growth in vivo*. Mol Microbiol, 2004. **52**(6): p. 1691-702.
56. Nguyen, L., et al., *Role of protein kinase G in growth and glutamine metabolism of Mycobacterium bovis BCG*. J Bacteriol, 2005. **187**(16): p. 5852-6.
57. O'Hare, H.M., et al., *Regulation of glutamate metabolism by protein kinases in mycobacteria*. Mol Microbiol, 2008. **70**(6): p. 1408-23.
58. Villarino, A., et al., *Proteomic identification of M. tuberculosis protein kinase substrates: PknB recruits GarA, a FHA domain-containing protein, through activation loop-mediated interactions*. J Mol Biol, 2005. **350**(5): p. 953-63.
59. Wolff, K.A., et al., *Protein kinase G is required for intrinsic antibiotic resistance in mycobacteria*. Antimicrob Agents Chemother, 2009. **53**(8): p. 3515-9.
60. Singh, A., et al., *Protein kinase I of Mycobacterium tuberculosis: cellular localization and expression during infection of macrophage-like cells*. Tuberculosis (Edinb), 2006. **86**(1): p. 28-33.
61. Gopalaswamy, R., et al., *The serine/threonine protein kinase PknI controls the growth of Mycobacterium tuberculosis upon infection*. FEMS Microbiol Lett, 2009. **295**(1): p. 23-9.
62. Jang, J., et al., *Functional characterization of the Mycobacterium tuberculosis serine/threonine kinase PknJ*. Microbiology, 2010.
63. Arora, G., et al., *Understanding the role of PknJ in Mycobacterium tuberculosis: biochemical characterization and identification of novel substrate pyruvate kinase A*. PLoS One, 2010. **5**(5): p. e10772.
64. Canova, M.J., et al., *The Mycobacterium tuberculosis serine/threonine kinase PknL phosphorylates Rv2175c: mass spectrometric profiling of the activation loop phosphorylation sites and their role in the recruitment of Rv2175c*. Proteomics, 2008. **8**(3): p. 521-33.
65. Glover, R.T., et al., *The two-component regulatory system senX3-regX3 regulates phosphate-dependent gene expression in Mycobacterium smegmatis*. J Bacteriol, 2007. **189**(15): p. 5495-503.
66. Sickmann, A. and H.E. Meyer, *Phosphoamino acid analysis*. Proteomics, 2001. **1**(2): p. 200-6.
67. Srivastava, V., et al., *Macrophage-specific Mycobacterium tuberculosis genes: identification by green fluorescent protein and kanamycin resistance selection*. Microbiology, 2007. **153**(Pt 3): p. 659-66.
68. Bach, H., D. Wong, and Y. Av-Gay, *Mycobacterium tuberculosis PtkA is a novel protein tyrosine kinase whose substrate is PtpA*. Biochem J, 2009. **420**(2): p. 155-60.
69. Castandet, J., et al., *Tyrosine phosphatase MptpA of Mycobacterium tuberculosis inhibits phagocytosis and increases actin polymerization in macrophages*. Res Microbiol, 2005.

- 156(10): p. 1005-13.
70. Wong, D., et al., *Mycobacterium tuberculosis* protein tyrosine phosphatase (PtpA) excludes host vacuolar-H⁺-ATPase to inhibit phagosome acidification. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011.
 71. Grundner, C., J.S. Cox, and T. Alber, *Protein tyrosine phosphatase PtpA is not required for Mycobacterium tuberculosis* growth in mice. FEMS Microbiol Lett, 2008. **287**(2): p. 181-4.
 72. Beresford, N., et al., *MptpB*, a virulence factor from *Mycobacterium tuberculosis*, exhibits triple-specificity phosphatase activity. Biochem J, 2007. **406**(1): p. 13-8.
 73. Singh, R., A. Singh, and A.K. Tyagi, *Deciphering the genes involved in pathogenesis of Mycobacterium tuberculosis*. Tuberculosis (Edinb), 2005. **85**(5-6): p. 325-35.
 74. Zhou, B., et al., *Targeting mycobacterium protein tyrosine phosphatase B for antituberculosis agents*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(10): p. 4573-8.
 75. Thakur, M. and P.K. Chakraborti, *GTPase activity of mycobacterial FtsZ is impaired due to its transphosphorylation by the eukaryotic-type Ser/Thr kinase, PknA*. J Biol Chem, 2006. **281**(52): p. 40107-13.
 76. Thakur, M. and P.K. Chakraborti, *Ability of PknA, a mycobacterial eukaryotic-type serine/threonine kinase, to transphosphorylate MurD, a ligase involved in the process of peptidoglycan biosynthesis*. Biochem J, 2008. **415**(1): p. 27-33.
 77. Parikh, A., et al., *PknB-mediated phosphorylation of a novel substrate, N-acetylglucosamine-1-phosphate uridylyltransferase, modulates its acetyltransferase activity*. J Mol Biol, 2009. **386**(2): p. 451-64.
 78. Canova, M.J., L. Kremer, and V. Molle, *The Mycobacterium tuberculosis GroEL1 chaperone is a substrate of Ser/Thr protein kinases*. J Bacteriol, 2009. **191**(8): p. 2876-83.
 79. Av-Gay, Y., S. Jamil, and S.J. Drews, *Expression and characterization of the Mycobacterium tuberculosis serine/threonine protein kinase PknB*. Infect Immun, 1999. **67**(11): p. 5676-82.
 80. Grundner, C., L.M. Gay, and T. Alber, *Mycobacterium tuberculosis serine/threonine kinases PknB, PknD, PknE, and PknF phosphorylate multiple FHA domains*. Protein Sci, 2005. **14**(7): p. 1918-21.
 81. Dasgupta, A., et al., *The serine/threonine kinase PknB of Mycobacterium tuberculosis phosphorylates PBPA, a penicillin-binding protein required for cell division*. Microbiology, 2006. **152**(Pt 2): p. 493-504.
 82. Gupta, M., et al., *FHA domain containing protein Rv0019c and Polyketide-associated protein PapA5, from substrates of Serine/Threonine Protein Kinase PknB to interacting proteins of Mycobacterium tuberculosis*. J Biol Chem, 2009.
 83. Molle, V., et al., *Protein PknE, a novel transmembrane eukaryotic-like serine/threonine kinase from Mycobacterium tuberculosis*. Biochem Biophys Res Commun, 2003. **308**(4): p. 820-5.
 84. Molle, V., et al., *Two FHA domains on an ABC transporter, Rv1747, mediate its phosphorylation by PknF, a Ser/Thr protein kinase from Mycobacterium tuberculosis*. FEMS Microbiol Lett, 2004. **234**(2): p. 215-23.
 85. Sharma, K., et al., *Transcriptional control of the mycobacterial embCAB operon by PknH through a regulatory protein, EmbR, in vivo*. J Bacteriol, 2006. **188**(8): p. 2936-44.
 86. Gopalaswamy, R., P.R. Narayanan, and S. Narayanan, *Cloning, overexpression, and characterization of a serine/threonine protein kinase pknI from Mycobacterium tuberculosis H37Rv*. Protein Expr Purif, 2004. **36**(1): p. 82-9.
 87. Lakshminarayan, H., et al., *Molecular cloning and biochemical characterization of a serine threonine protein kinase, PknL, from Mycobacterium tuberculosis*. Protein Expr Purif, 2008. **58**(2): p. 309-17.
 88. Peirs, P., et al., *Mycobacterium tuberculosis with disruption in genes encoding the phosphate binding proteins PstS1 and PstS2 is deficient in phosphate uptake and demonstrates reduced in vivo virulence*. Infect Immun, 2005. **73**(3): p. 1898-902.
 89. Gupta, R.K., et al., *Structure-based design of DevR inhibitor active against nonreplicating Mycobacterium tuberculosis*. J Med Chem, 2009. **52**(20): p. 6324-34.
 90. Jeong, E.H., et al., *RshA mimetic peptides inhibiting the transcription driven by a Mycobacterium tuberculosis sigma factor SigH*. Biochem Biophys Res Commun, 2006.

- 339(1): p. 392-8.
91. Szekely, R., et al., *A novel drug discovery concept for tuberculosis: inhibition of bacterial and host cell signalling*. Immunol Lett, 2008. **116**(2): p. 225-31.
 92. Hegymegi-Barakonyi, B., et al., *Signalling inhibitors against Mycobacterium tuberculosis--early days of a new therapeutic concept in tuberculosis*. Curr Med Chem, 2008. **15**(26): p. 2760-70.
 93. Drews, S.J., F. Hung, and Y. Av-Gay, *A protein kinase inhibitor as an antimycobacterial agent*. FEMS Microbiol Lett, 2001. **205**(2): p. 369-74.
 94. Wehenkel, A., et al., *The structure of PknB in complex with mitoxantrone, an ATP-competitive inhibitor, suggests a mode of protein kinase regulation in mycobacteria*. FEBS Lett, 2006. **580**(13): p. 3018-22.
 95. Chiaradia, L.D., et al., *Synthetic chalcones as efficient inhibitors of Mycobacterium tuberculosis protein tyrosine phosphatase PtpA*. Bioorg Med Chem Lett, 2008. **18**(23): p. 6227-30.
 96. Rawls, K.A., et al., *Fragment-based discovery of selective inhibitors of the Mycobacterium tuberculosis protein tyrosine phosphatase PtpA*. Bioorg Med Chem Lett, 2009. **19**(24): p. 6851-4.
 97. Soellner, M.B., et al., *Fragment-based substrate activity screening method for the identification of potent inhibitors of the Mycobacterium tuberculosis phosphatase PtpB*. J Am Chem Soc, 2007. **129**(31): p. 9613-5.
 98. Grundner, C., et al., *Structural basis for selective inhibition of Mycobacterium tuberculosis protein tyrosine phosphatase PtpB*. Structure, 2007. **15**(4): p. 499-509.
 99. Tan, L.P., et al., *High-throughput discovery of Mycobacterium tuberculosis protein tyrosine phosphatase B (MptpB) inhibitors using click chemistry*. Org Lett, 2009. **11**(22): p. 5102-5.
 100. Garnier, T., et al., *The complete genome sequence of Mycobacterium bovis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(13): p. 7877-82.
 101. Brosch, R., et al., *Genome plasticity of BCG and impact on vaccine efficacy*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(13): p. 5596-601.
 102. Stefan H E Kaufmann, G.H., Paul-Henri Lambert, *Tuberculosis 6 New vaccines for tuberculosis*. The Lancet, 2010. **375**: p. 2110-19.
 103. Sassetti, C.M., D.H. Boyd, and E.J. Rubin, *Genes required for mycobacterial growth defined by high density mutagenesis*. Mol Microbiol, 2003. **48**(1): p. 77-84.
 104. Betts, J.C., et al., *Evaluation of a nutrient starvation model of Mycobacterium tuberculosis persistence by gene and protein expression profiling*. Mol Microbiol, 2002. **43**(3): p. 717-31.
 105. Perez, E., et al., *An essential role for phoP in Mycobacterium tuberculosis virulence*. Mol Microbiol, 2001. **41**(1): p. 179-87.
 106. Ludwiczak, P., et al., *Mycobacterium tuberculosis phoP mutant: lipoarabinomannan molecular structure*. Microbiology, 2002. **148**(Pt 10): p. 3029-37.
 107. Lee, J.S., et al., *Mutation in the transcriptional regulator PhoP contributes to avirulence of Mycobacterium tuberculosis H37Ra strain*. Cell Host Microbe, 2008. **3**(2): p. 97-103.
 108. Zahrt, T.C. and V. Deretic, *An essential two-component signal transduction system in Mycobacterium tuberculosis*. J Bacteriol, 2000. **182**(13): p. 3832-8.
 109. Haydel, S.E., et al., *The prrAB two-component system is essential for Mycobacterium tuberculosis viability and is induced during nitrogen-limiting conditions*. J Bacteriol, 2011.
 110. Chao, J., et al., *Protein kinase and phosphatase signaling in Mycobacterium tuberculosis physiology and pathogenesis*. Biochim Biophys Acta, 2010. **1804**(3): p. 620-7.
 111. Abremski, K. and R. Hoess, *Bacteriophage P1 site-specific recombination. Purification and properties of the Cre recombinase protein*. J Biol Chem, 1984. **259**(3): p. 1509-14.
 112. Hoess, R.H., M. Ziese, and N. Sternberg, *P1 site-specific recombination: nucleotide sequence of the recombining sites*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1982. **79**(11): p. 3398-402.
 113. Lewandoski, M. and G.R. Martin, *Cre-mediated chromosome loss in mice*. Nat Genet, 1997. **17**(2): p. 223-5.
 114. Hu, Y. and A.R. Coates, *Transcription of two sigma 70 homologue genes, sigA and sigB, in stationary-phase Mycobacterium tuberculosis*. J Bacteriol, 1999. **181**(2): p. 469-76.
 115. Wu, S., et al., *The principal sigma factor sigA mediates enhanced growth of Mycobacterium tuberculosis in vivo*. Mol Microbiol, 2004. **51**(6): p. 1551-62.

116. Collins, D.M., et al., *Mutation of the principal sigma factor causes loss of virulence in a strain of the Mycobacterium tuberculosis complex*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(17): p. 8036-40.
117. Wu, S., et al., *Activation of the eis gene in a W-Beijing strain of Mycobacterium tuberculosis correlates with increased SigA levels and enhanced intracellular growth*. Microbiology, 2009. **155**(Pt 4): p. 1272-81.
118. Fontan, P.A., et al., *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 Bacteriol, 2009. **191**(18): p. 5628-33.
119. Lee, J.H., P.C. Karakousis, and W.R. Bishai, *Roles of SigB and SigF in the Mycobacterium tuberculosis sigma factor network*. J Bacteriol, 2008. **190**(2): p. 699-707.
120. Sun, R., et al., *Mycobacterium tuberculosis ECF sigma factor sigC is required for lethality in mice and for the conditional expression of a defined gene set*. Mol Microbiol, 2004. **52**(1): p. 25-38.
121. Abdul-Majid, K.B., et al., *Altered cellular infiltration and cytokine levels during early Mycobacterium tuberculosis sigC mutant infection are associated with late-stage disease attenuation and milder immunopathology in mice*. BMC Microbiol, 2008. **8**: p. 151.
122. Karls, R.K., et al., *Examination of Mycobacterium tuberculosis sigma factor mutants using low-dose aerosol infection of guinea pigs suggests a role for SigC in pathogenesis*. Microbiology, 2006. **152**(Pt 6): p. 1591-600.
123. Raman, S., et al., *Transcription regulation by the Mycobacterium tuberculosis alternative sigma factor SigD and its role in virulence*. J Bacteriol, 2004. **186**(19): p. 6605-16.
124. Calamita, H., et al., *The Mycobacterium tuberculosis SigD sigma factor controls the expression of ribosome-associated gene products in stationary phase and is required for full virulence*. Cell Microbiol, 2005. **7**(2): p. 233-44.
125. Manganelli, R., et al., *The Mycobacterium tuberculosis ECF sigma factor sigmaE: role in global gene expression and survival in macrophages*. Mol Microbiol, 2001. **41**(2): p. 423-37.
126. Giacomini, E., et al., *Infection of human dendritic cells with a Mycobacterium tuberculosis sigE mutant stimulates production of high levels of interleukin-10 but low levels of CXCL10: impact on the T-cell response*. Infect Immun, 2006. **74**(6): p. 3296-304.
127. Hernandez Pando, R., et al., *Immunogenicity and protection induced by a Mycobacterium tuberculosis sigE mutant in a BALB/c mouse model of progressive pulmonary tuberculosis*. Infect Immun, 2010. **78**(7): p. 3168-76.
128. Chen, P., et al., *Construction and characterization of a Mycobacterium tuberculosis mutant lacking the alternate sigma factor gene, sigF*. Infect Immun, 2000. **68**(10): p. 5575-80.
129. Hartkoorn, R.C., et al., *Sigma factor F does not prevent rifampin inhibition of RNA polymerase or cause rifampin tolerance in Mycobacterium tuberculosis*. J Bacteriol, 2010. **192**(20): p. 5472-9.
130. Williams, E.P., et al., *Mycobacterium tuberculosis SigF regulates genes encoding cell wall-associated proteins and directly regulates the transcriptional regulatory gene phoY1*. J Bacteriol, 2007. **189**(11): p. 4234-42.
131. Geiman, D.E., et al., *Attenuation of late-stage disease in mice infected by the Mycobacterium tuberculosis mutant lacking the SigF alternate sigma factor and identification of SigF-dependent genes by microarray analysis*. Infect Immun, 2004. **72**(3): p. 1733-45.
132. Lee, J.H., D.E. Geiman, and W.R. Bishai, *Role of stress response sigma factor SigG in Mycobacterium tuberculosis*. J Bacteriol, 2008. **190**(3): p. 1128-33.
133. Smollett, K.L., L.F. Dawson, and E.O. Davis, *SigG does not control gene expression in response to DNA damage in Mycobacterium tuberculosis H37Rv*. J Bacteriol, 2011. **193**(4): p. 1007-11.
134. Manganelli, R., et al., *Role of the extracytoplasmic-function sigma factor sigma(H) in Mycobacterium tuberculosis global gene expression*. Mol Microbiol, 2002. **45**(2): p. 365-74.
135. Raman, S., et al., *The alternative sigma factor SigH regulates major components of oxidative and heat stress responses in Mycobacterium tuberculosis*. J Bacteriol, 2001. **183**(20): p. 6119-25.
136. Kaushal, D., et al., *Reduced immunopathology and mortality despite tissue persistence in a*

-
- Mycobacterium tuberculosis* mutant lacking alternative sigma factor, SigH. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(12): p. 8330-5.
137. Mehra, S. and D. Kaushal, *Functional genomics reveals extended roles of the Mycobacterium tuberculosis stress response factor sigmaH*. J Bacteriol, 2009. **191**(12): p. 3965-80.
138. Hu, Y., et al., *The Mycobacterium tuberculosis sigJ gene controls sensitivity of the bacterium to hydrogen peroxide*. FEMS Microbiol Lett, 2004. **237**(2): p. 415-23.
139. Charlet, D., et al., *Reduced expression of antigenic proteins MPB70 and MPB83 in Mycobacterium bovis BCG strains due to a start codon mutation in sigK*. Mol Microbiol, 2005. **56**(5): p. 1302-13.
140. Dainese, E., et al., *Posttranslational regulation of Mycobacterium tuberculosis extracytoplasmic-function sigma factor sigma L and roles in virulence and in global regulation of gene expression*. Infect Immun, 2006. **74**(4): p. 2457-61.
141. Hahn, M.Y., et al., *The Mycobacterium tuberculosis extracytoplasmic-function sigma factor SigL regulates polyketide synthases and secreted or membrane proteins and is required for virulence*. J Bacteriol, 2005. **187**(20): p. 7062-71.
142. Raman, S., et al., *Mycobacterium tuberculosis SigM positively regulates Esx secreted protein and nonribosomal peptide synthetase genes and down regulates virulence-associated surface lipid synthesis*. J Bacteriol, 2006. **188**(24): p. 8460-8.
143. Agarwal, N., et al., *Characterization of the Mycobacterium tuberculosis sigma factor SigM by assessment of virulence and identification of SigM-dependent genes*. Infect Immun, 2007. **75**(1): p. 452-61.

第2章 结核菌新型免疫抗原的筛选鉴定和运用初探

1 引言

1.1 结核病诊断的重要性及现状

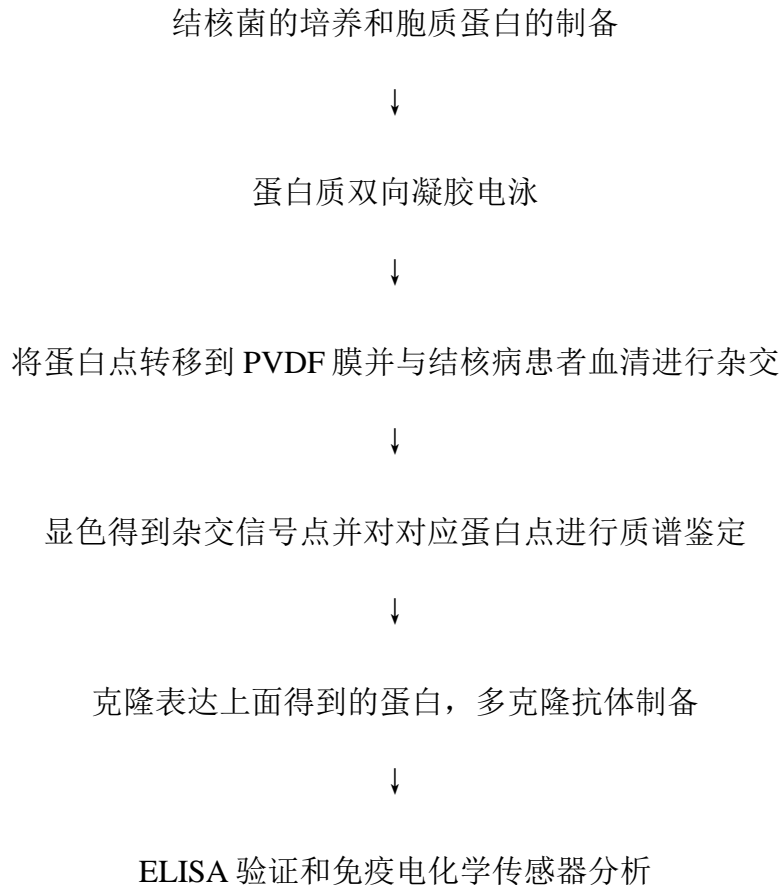
诊断是治疗的前提,但目前的诊断技术手段仍然不能满足临床运用的需求。目前结核病的诊断方法主要包括影像学、微生物学、免疫学和分子生物学诊断。这些方法具备不同的检测灵敏性和特异性,针对不同类型的患者各具长短。基于特异性抗原-抗体反应的血清学免疫诊断方法因其耗时短,方法简单,样品容易获得及适应人群广泛等优点而备受青睐。开发高特异性和高灵敏性的诊断方法主要依赖于特异性抗原的鉴定及检测方法的选择。目前血清学免疫诊断主要包括基于结核菌的特异性抗原的抗体免疫反应检测和基于 T 细胞介导的细胞免疫的检测如 γ 干扰素检测或直接检测结核菌特异性抗原如脂阿拉伯甘露糖等。目前也存在很多基于这些原理和方法的检测试剂盒。但在 2008 年,WHO/TDR 在同一实验室对目前可商业购买的 19 个快速结核病检测试剂盒进行了调研,参考分枝杆菌培养及临床跟踪结果得到它们的灵敏性和特异性分别介于 0.97%-59.7%和 53%-98.7%之间,并强调这些诊断试剂盒均不能被推荐使用于结核病诊断[1]。这 19 个试剂盒均是采用基于胶体金检测技术的试纸条。这类方法检测的浓度最低浓度有限,限制了其灵敏度。

1.2 电化学免疫传感器在诊断中的作用

电化学免疫传感器是将免疫测定法与高灵敏的电化学传感技术相结合而构建的一类新型生物传感器,应用于痕量免疫原性物质的分析研究。该方法能鉴别大分子之间的微小差异,具有很强的专一性。其工作原理和传统的免疫测试法相似,都属于固相免疫测试法,即把抗原或抗体固定在传感器表面,通过传感技术将抗原抗体发生吸附时产生的电流变化转变成可检测的信号来测定样品中待测分子的浓度。经过多年的研究,该技术已经成功运用于药物如恩氟沙星(enrofloxacin)[2];毒素如黄曲霉毒素 B(aflatoxin B)[3],黄曲霉毒素 M1(aflatoxin M1)[4],赫曲毒素 A(ochratoxin A)[5],磷酸化乙酰胆碱酯酶(phosphorylated acetylcholinesterase)[6];生物素[7];细菌如鼠伤寒沙门(氏)菌(*Salmonella typhimurium*)[8];病毒[9];激素如人绒毛膜促性腺激素(human chorionic gonadotrophin, hCG)[10],荷尔蒙 17 β -雌二醇(hormone 17 beta-estradiol)[11],睾酮(testosterone)[12];抗体如癌胚抗原(carcinoembryonic antigen (CEA))[13-15],前列腺特异抗原(prostate-specific antigen)[16-17], α -1-胎儿球蛋白(alpha-1-fetoprotein (AFP))[18];抗体如人体血清中 IgG[19-20],针对组织转谷氨酰胺酶抗体(tissue transglutaminase (tTG))[21];细胞因子如 IL-12[22]等的检测。这些电化学免疫传感器的检测最低浓度可达到纳克甚至皮克级,具有很高的灵敏度。

因此,本实验结合蛋白质凝胶双向电泳与 Western blot 技术,将结核菌溶菌蛋白与结核

病患者血清进行免疫杂交，鉴定杂交点，利用酶联免疫检测（Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA）技术进行抗原性验证，再与免疫电化学传感器结合并探索在血清学检测中的运用潜力，为后期的进一步工作奠定基础。总体的实验思路和技术路线如下：



2 材料和方法

2.1 菌株及培养条件

结核菌菌株 H37Rv 培养于含 10%OADA 和 0.05%Tween-80 的 7H9 (Difco)培养基。大肠杆菌 DH5a 和 BL21(DE3)培养条件为 LB 培养液或 LB 琼脂平板，培养条件为 37℃。使用的抗生素卡那霉素购自 Sigma 生物试剂有限公司，工作浓度为 50 mg/ml。

2.2 结核分枝杆菌溶菌产物制备

结核菌培养至OD600为0.8-1的时候，于4℃条件4000rpm离心15分钟收集菌体。菌体经PBS溶液 (pH 7.2)洗涤两次之后，重悬于含1mM PMSF和10mM EDTA的双蒸水，接着用超声破碎方法（振幅为70%，超声1分钟，停10秒，共15分钟）。之后，加入尿素和DTT是终浓度分别为9M 和 70mM，再分别加入Bio-lyte 和OD至终浓度为2%。样品置于室温30分钟，间隔

振荡。最后于在20℃条件下10000rpm离心30分钟收集上清，过滤并保存于-70℃备用。

2.3 蛋白质双向凝胶电泳和 Western blot 及杂交点质谱鉴定

该部分实验商业性的委托于北京华大蛋白质组学研究中心完成。大体实验方法如下：首先将60ug结核菌胞质蛋白加入水化溶液中（8M尿素，65mM DTT，4% CHAPS和40mM Tris，0.01%溴酚蓝），再通过水化膨胀法将蛋白吸收进入pH范围4-7的等电聚焦条（同时做两条）。在蛋白等电聚焦仪中完成第一维蛋白等电聚焦后，利用SDS-PAGE进行第二维的蛋白分散。其中一块交进行银染显色，另外一块胶上的蛋白被电转移到一张PVDF膜上。利用1:500倍稀释的利福平敏感性结核病患者混合血清作为一抗进行免疫杂交，再以1:2000倍稀释的HRP标记羊抗人IgG二抗（Zhongshan Goldenbridge Biotechnology, ZB-2304）进行检测。对应的阳性免疫杂交点进一步进行LC-MS/MS分析鉴定。

2.4 Rv2175c 的克隆表达及纯化

所有DNA操作和分析均参照分子克隆操作手册[23]。如无特殊说明，所有相关试剂如PCR试剂，限制性内切酶，连接酶等均购自TaKaRa生物科技有限公司并遵循其说明书操作。DNA测序由Invitrogen公司完成。利用引物对2715a（5' AGCCTAGGATCCATGCCTGGCC 3'，下划线部分为BamHI限制性酶切位点）和2715b（5' GAGAAGCTTCTGCAACCCCGGT 3'；下划线部分为HindIII限制性酶切位点）将开放阅读框Rv2175c从结核菌H37Rv基因组中扩增出来；扩增产物经BamHI和HindIII进行酶切，连接到经过相同内切酶酶切的pET28a质粒载体上；转化大肠杆菌DH5 α 经过PCR鉴定，测序验证后得到重组质粒pET28a-rv2175c转化进入大肠杆菌表达菌株BL21(DE3)。少量培养重组表达菌株，在对数生长期加入异丙基硫基半乳糖（isopropyl-b-dthiogalactopyranoside，IPTG）至终浓度1mM/L，于20℃，180rpm诱导培养8小时，利用SDS-PAGE检测蛋白的表达形式后。相同条件扩大培养，并利用Qiagen公司的镍亲和层析柱，参考其方法进行纯化。

2.5 多克隆抗体的制备

该部分实验商业委托于北京华大蛋白质组研究中心完成。大体步骤如下：利用200ug特异性抗原（Rv2175c编码蛋白）皮下初次免疫1只新西兰大白兔；之后定时进行3次加强免疫，每次200ug。耳静脉取血，利用ELISA检测效价，达标后采取颈动脉取血，离心收集多抗血清，分装后于-80℃冻存备用。

2.6 血清样品

本实验中用到了5组血清，其中健康人血清组1(H1)，利福平耐药性结核病患者血清组(TB1)，利福平敏感性结核病患者血清组(TB2)均于2008年11月24日采自重庆市肺科医院，均为10人份混合血清；健康人血清组2(H2)于2010年9月9日采自西南大学校医院，编号分

别为 1050、1605、352、1042、209、275、1610、1031、132 和 367；初治结核病人血清组 (TB3) 来源于 2010 年 11 月 22 日来源于南京，编号为 P1、P2、P3、P4、P5 和 P6；复治结核病人血清组 (TB4) 来源于 2010 年 11 月 22 日来源于南京，编号为 R1、R2、R3、R4、R5 和 R6。

2.7 ELISA

ELISA 方法主要参考文献[24]。大体如下：抗原包被：按照 8 μ g/空标准将 Rv2175c 蛋白包被在 96-空 ELISA 板上，于 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 小时然后置于 4 $^{\circ}$ C 16 小时；洗涤：倒尽板孔中液体，加满洗涤液，静放三分钟，反复三次，最后将反应板倒置在吸水纸上，使孔中洗涤液流尽；封闭：加封闭液 200 微升，37 $^{\circ}$ C 放置 1 小时；洗涤；血清孵育：根据需要稀释血清，每孔加 200 μ l，37 $^{\circ}$ C 放置 1 小时；洗涤；加 200 μ l 二抗 (1:2000)，37 $^{\circ}$ C 孵育 1 小时；洗涤；加底物邻苯二胺溶液加 200ml，室温暗处孵育 10-15 分钟；加 50 μ l 终止液；用酶联免疫检测仪记录 492nm 读数。

2.8 电化学免疫传感器的制和血清检测

2.8.1 化学试剂及材料

多壁碳纳米管 (纯度高于>95%) 购至成都有机化学试剂有限公司；牛血清白蛋白，离子交换膜 (Nafion)，亚甲蓝，氯化金购至 Sigma 化学试剂有限公司；其余所以试剂为实验室保存并且为试剂纯。奈酚分散的多壁碳纳米管的制备参照文献[25-26]。

2.8.2 电化学免疫传感器的制备

电化学免疫传感器的制备过程如下：将 3 μ l 奈酚分散的多壁碳纳米管修饰于洁净玻碳电极表面，室温干燥；将电极浸入 5mM 亚甲基蓝溶液 20 分钟；在电极表面电沉积一层纳米金；滴加 10 μ l 33 μ g/ml 特异抗原于电极表面，4 $^{\circ}$ C 孵育 6 小时；将电极浸入 0.25% 牛血清白蛋白溶液 20 分钟；用 PBS (pH7.0) 充分洗脱电极并于潮湿环境下保存。

2.8.3 血清样品检测

将制备好的电化学免疫传感器浸入 10 倍稀释血清，孵育 1 小时；用 PBS (pH7.0) 充分洗涤电极；将电极放入含有 3ml 0.1M 磷酸盐缓冲液 (pH 7.0) 的电化学小池 (electrochemical cell) 中；以 50 mV/s 的扫描速度记录从 -0.6~0 V 区间的循环伏安图；图形数据分析。

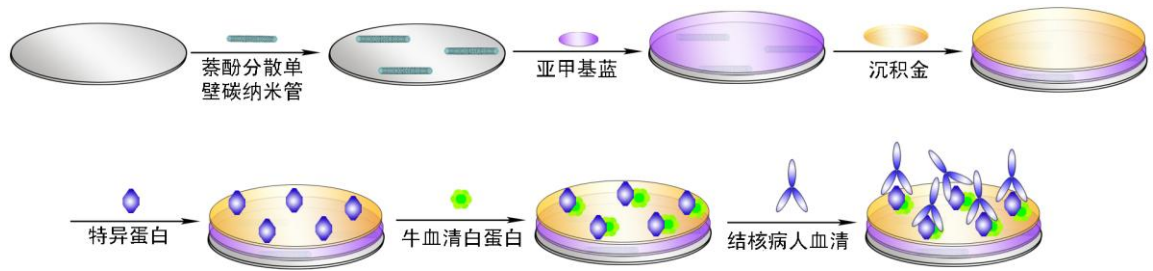


图 1. 电化学免疫传感器的制备及血清检测流程。将萘酚分散的多壁碳纳米管修饰于洁净玻碳电极表面，带正电荷的萘酚便能吸附带负电荷的亚甲基蓝，再电沉积一层纳米金，通过金与蛋白质上氨基之间的键合作用将特异性蛋白抗原固定在电极表面，再用牛血清白蛋白封闭没有被特异性抗原占据的地方，最后通过被检测样品中的抗原与电极上的抗体之间的特异性结合，引发电流变化而达到检测目的。

3 结果与分析

3.1 结核菌中 4 个蛋白点能够与结核菌患者血清杂交呈现较强信号

为了鉴定结核菌中心的免疫抗原蛋白，60 μ g 结核菌溶菌产物蛋白首先利用蛋白凝胶双向电泳进行分散，之后点转移到 PVDF 膜上，利用 1:500 倍稀释的利福平耐受性结核病患者混合血清作为一抗进行免疫杂交，再以 1:2000 倍稀释的 HRP 标记羊抗人 IgG 二抗进行检测，最后利用 ECL 方法显色。如图 2 所示，可以看到很多的杂交信号点，但出了其中 A, B, C 和 D 这 4 个点的信号较强（如红色箭头所示）外，其余的都较弱。

3.2 免疫杂交点 B 为 *rv2175c* 基因编码的保守假设性的调节蛋白

为鉴定上述试验中阳性信号杂交点对应的蛋白，其中信号最强的杂交点 B 在银染蛋白胶对应的点被挖取并进行 LC-MS/MS 分析鉴定。结果显示该蛋白点与 *rv2175c* 基因编码的保守假设性的调节蛋白 (Rv2175c) 匹配度最高，所检测的到肽段对整个蛋白质序列的覆盖率为 46%（如图 3 所示）。

Rv2175c 为一个 146 个氨基酸的推定的转录调控因子。这也引起我们的好奇，一个通常在细胞质内发挥功能的转录调控因子可以与结核病患者血清进行免疫杂交。那这个蛋白是如何被宿主识别并产生了对应的抗体呢？当然结核菌中也有转录调控因子被分泌出细胞外的例子，如 EspR 和 MtrA。EspR 正调控结核菌中 VII 型分泌系统（也称 ESX-1 分泌系统）相关基因的表达[27]。同时该分泌系统又可以通过将 EspR 分泌到胞外而降低其在胞内的浓度，进而减轻对 VII-型分泌系统的正调控作用。而 MtrA 属于双组份调控系统 MtrB/A 中的反应调控蛋白，有研究显示该蛋白能够在结核病患者血清中被检测到[28]。再加上一些被验证的抗原也并非都是分泌蛋白。因此，推定的转录调控因子 Rv2175c 能够与结核病患者血清杂交也是

正常的。

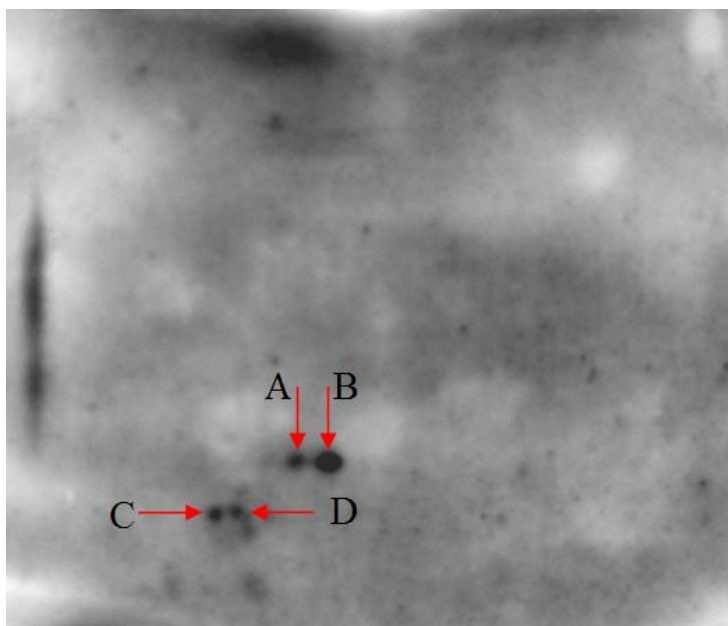


图 2. 结核菌溶菌蛋白与结核病患者血清 Western blot 免疫杂交。

```

1  MPGRAPGSTL ARVGSIPAGD DVLDPDEPTY DLPRVAELLG VPVSKVAQQL
51  REGHLVAVRR AGGVVIPQVF FTNSGQVVKS LPGLLTILHD GGYRDTEIMR
101 WLFTPDP SLT ITRDGSRDAV SNARPVDALH AHQAREVVRR AQAMAY

```

图 3. 免疫杂交点 B 的 LC-MS/MS 鉴定。匹配的肽段为红色加粗部分。

3.3 Rv2175c 的克隆，表达及纯化

基因 *rv2175c* 经 PCR 扩增得到 DNA 条带如图 4a 中箭头所指示：该基因长度为 441bp 加上两端的引物总长度为 477bp。克隆到载体 pET28a 后，测序发现其第 63 位胞嘧啶脱氧核苷酸突变成了腺嘌呤脱氧核苷酸，对应了蛋白质上第 21 位的天冬氨酸突变成了谷氨酸，调查已有的文献，没有报道该氨基酸对其功能发挥特殊功能，因此继续进行下一步的实验研究。该蛋白推定的蛋白分子量约为 15.7kDa，加上 pET28a 质粒上 N-末端约 3.5kDa 标签蛋白，应该大约为 19.2kDa。从图 4b 上看来，纯化后蛋白条带（箭头所示）在略高于 20.1kDa 条带的地方。这可能是由于某种蛋白修饰，导致蛋白质的实际分子质量与理论数值之间的微小差别。

3.4 多克隆抗体的制备

利用 200ug 特异性抗原（Rv2175c 编码蛋白）皮下初次免疫 1 只新西兰大白兔；在第 14 天第 24 天后分别进行皮下加强免疫，免疫量为 200ug；第 31 天进行耳静脉取血，测效价，

效价未达要求；第36天再进行一次皮下加强免疫，免疫量为200ug；第45天进行耳静脉取血测效价，效价达到要求（大于1:51200）。进行颈动脉取血，离心收集多抗血清，共30ml，按每1ml量分装后于-80℃冻存备用。

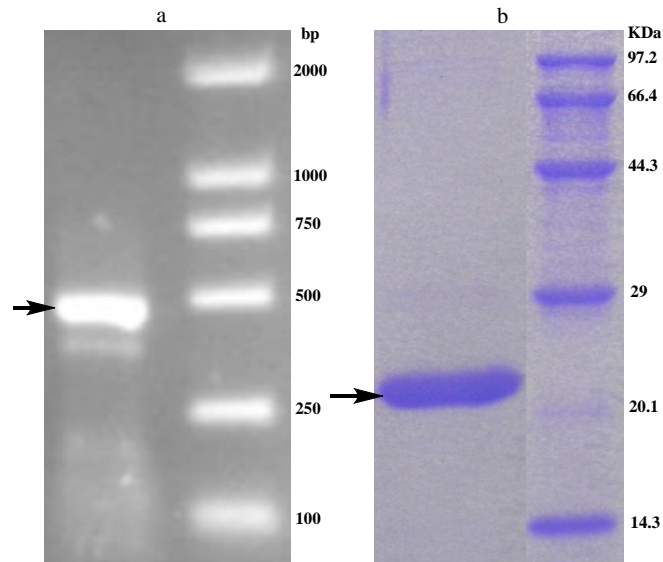


图4 Rv2175c基因的克隆及表达纯化。a, Rv2175c的PCR结果；b, 纯化后Rv2175c蛋白的SDS-PAGE检测结果。黑色箭头指示目的条带。

3.5 Rv2175c 特异性 IgG 健康人与结核病患者血清中很低，ELISA 未能检测差异

为了检测结核病患者血清中是否存在抗Rv2175c蛋白特异性抗体IgG以及与健康人血清之间是否存在差异，我们利用ELISA进行分析。正常兔子血清和Rv2175c蛋白兔子多克隆抗血清分别作为阴性和阳性对照。从图5A中可以看出，健康人血清组H1和结核病患者血清组TB1中抗Rv2175c蛋白特异性抗体IgG的量很低且几乎没有差异，也仅仅是比正常兔子血清中的量略高。为了排除血清样品可能存在的特殊性，我们对另外一组血清进行了检测。如图5B所示，复治结核病患者血清组4（TB4）中抗Rv2175c特异性IgG比健康人血清组2（H2）和初治结核病患者血清组3（TB3）中略高；但是这三组血清中的量都与正常兔子血清中的量类似甚至略低。这两组实验说明了抗Rv2175c蛋白特异性抗体IgG在健康人组合结核病患者血清组中含量非常低且不存在明显差异。该结果不能支持前面蛋白双向电泳免疫杂交及质谱鉴定结果的原因可能有如下一些。首先，蛋白双向电泳免疫杂交中的Rv2175c的信号可能是由于非特异性抗体结合的原因，也可能是人体中的其它类型的抗体而不是IgG类抗体。其次，前阶段的蛋白双向电泳及免疫杂交过程中，结核菌溶菌产物中的蛋白都经历了彻底的变性，血清中的一些抗体可能会识别并结合由于Rv2175c蛋白变性而暴露出的线性表位。但是在抗体制备及ELISA实验中所用到的蛋白均为天然状态下的蛋白。最后，Rv2175c蛋白在分枝杆菌属中高度

保守（见图7），人体对其它非致病性分枝杆菌特别是BCG疫苗的广泛接种都可能会使健康人与结核病患者血清中抗Rv2175c特异性抗体差异模糊化。

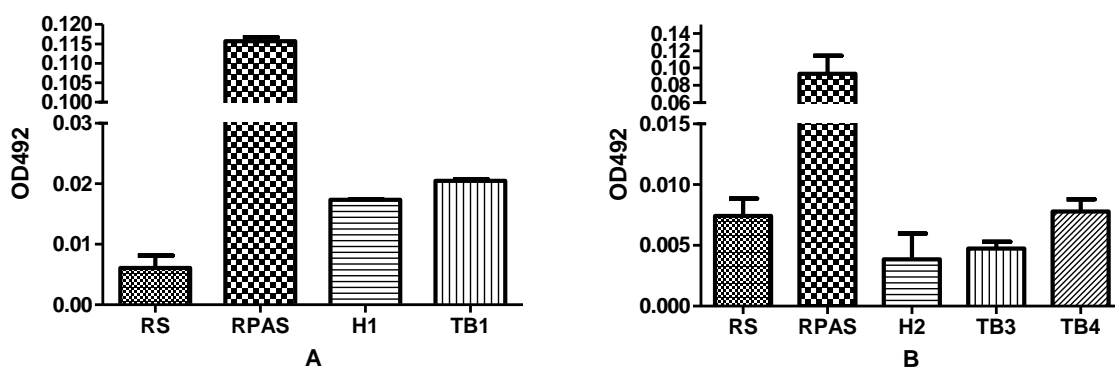


图 5. 不同血清样品中 Rv2175c 特异性抗体的 ELISA 检测。RS, 兔子阴性血清; RPAS, 兔子阳性多克隆抗血清; H1, 健康人血清组 1; H2, 健康人血清组 2; TB1, 利福平耐药性结核病患者血清组; TB3, 初治结核病人血清组; TB4, 复治结核病人血清组。所有试验进行了 3 次重复。

3.6 电化学免疫传感器能有效检测出结核病人血清中与 Rv2175c 相互作用分子

电化学免疫传感器是一种较ELISA更为敏感的检测技术，且并不局限于某一种抗体。因此，按照2.7节部分描述的方法，我们利用该技术对健康人血清组H1，利福平敏感性结核病患者血清TB2及兔多抗阳性血清进行检测。Rv2175c蛋白被固定在电极表面，如果血清中存在抗Rv2175c特异性抗体或者其它能够与之相互结合的蛋白，在孵育过程中便会发生特异性相互作用，进而造成的电阻性，阻碍电子传递，从而使得电极表面亚甲蓝所产生的氧化还原峰电流减小。图6为电化学免疫传感器在3组血清中孵育半小时前后的循环伏安图：黑线代表孵育前电流，红线代表孵育后电流，三者的电流变化差异 ΔI 分别为： $3\mu A$ ， $14\mu A$ 和 $9\mu A$ 。可以看出兔阳性血清和利福平敏感性结核病人血清在孵育前后引发的电流变化值是明显高于健康组1血清的，说明这两种血清中存在更多能与特异性抗原Rv2175c蛋白结合的蛋白。值得注意的是利福平敏感性结核病患者血清中的电流变化比兔子多克隆阳性抗血清中的还要高，这暗示了利福平敏感性结核病患者血清中与Rv2175c蛋白特异性结合的蛋白可能不仅仅局限于IgG或其它类型的抗体。

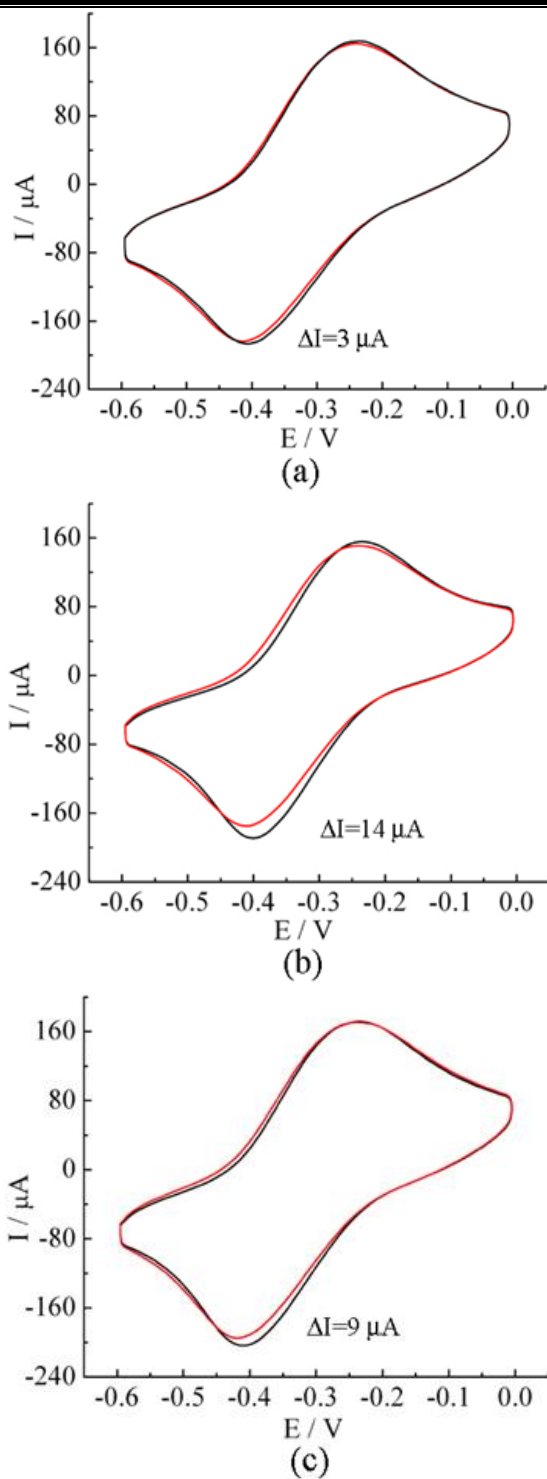


图 6. 电化学免疫传感器能检测出结核病人血清中与 Rv2175c 相互作用分子。(a), (b), (c) 分别代表对健康人血清组 1(H1), 利福平敏感性结核病人血清组 (TB2) 和兔多抗阳性血清的检测结果; 黑线代表孵育前电流循环, 红线代表孵育后电流循环。

4 结论与建议

4.1 结论与讨论

本实验结合蛋白质凝胶双向电泳与 Western blot 技术, 将结核菌胞质蛋白与结核病患者血清进行免疫杂交, 发现了 4 个杂交信号较强的点。利用 LC-MS/MS 鉴定其中免疫杂交信号最强的点为 *rv2175c* 基因编码的保守假设性的调节蛋白 Rv2175c。克隆, 表达并纯化 Rv2175c 后, 利用该蛋白免疫兔子成功制备多克隆抗体血清。以兔子阴性血清及阳性多克隆抗血清为对照, 利用 ELISA 技术对几组健康人血清及结核病患者血清中抗 Rv2175c 特异性 IgG 进行检测, 发现这些血清中对应抗体浓度非常低, 且在健康人血清与结核病患者血清之间无明显差异。进一步利用包被 Rv2175c 蛋白的免疫电化学传感器检测到结核病患者血清中存在较强信号, 暗示结核病患者血清中存在一些能与 Rv2175c 蛋白发生特异性相互作用的抗体或其它蛋白。

ELISA 结果与电化学免疫传感器检测结果之间存在一定的差异, 可能的原因有如下方面。首先是由于实验中血清样品的局限, 两个实验中使用的血清不完全相同。其次, 这两种检测方法本身在原理及检测的灵敏度上存在一定的差异。二者相比, ELISA 的灵敏度相对较低, 且检测到的仅仅是某一种类型的抗体, 而电化学免疫传感器除了灵敏度较高之外, 只要能够与固定在电极膜表面的 Rv2175c 蛋白发生相互作用并结合的蛋白都能导致信号的产生。

4.2 建议

根据本实验得到的结果及摸索的经验, 我提出如下建议:

1. 进一步鉴定蛋白双向凝胶电泳-Western blot 试验中发现的另外 3 个阳性杂交信号点并进行后续的相关验证。

2. 尝试将目前已经鉴定和成熟使用的结核菌诊断标记抗原与电化学免疫传感器技术相结合, 测试在结核病血清学诊断中的可行性。

3. Rv2175c 蛋白可能与结核病人血清中某种蛋白发生相互作用, 因此对该蛋白本身在结核菌中的生理功能有必要进行进一步的研究。比如鉴定其亚细胞定位, 调控的靶基因等。原因如下:

研究发现真核样丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 PknL 能通过磷酸化 Rv2175c 蛋白中 N-末端的第 9 位氨基酸 T⁹ (图 7 中箭头所示) 来抑制其 DNA 结合功能, 而缺失了 N-端前 13 个氨基酸的 Rv2175c 蛋白的 DNA 结合功能却不再受 PknL 的负调控[29]。Rv2175c 在分枝杆菌属中的广泛保守的分布暗示它可能为一个核心基因[30]。Rv2175c 蛋白在分枝杆菌属中除了包括结核菌, 牛分枝杆菌和 *M.africanum* 等部分细菌之外, 大多数 Rv2175c 的同源蛋白缺失了 N-端的 12 个氨基酸, 鸟分枝杆菌和 *M.gilvum* 则分别缺失 N-端的 21 和 45 个氨基酸, 而结核菌 CDC1551

菌株的 N-末端却比正常的蛋白还多出了 8 个氨基酸残基（图 7）。而从 Rv2175c 蛋白的三级结构来看（图 8），N-末端构成一个自由卷曲，而 PknL 对 T⁹ 的磷酸化可能导致该卷曲结构的变化，进一步去干扰蛋白的其他功能结构域，抑制其 DNA 结合能力。由于 *rv2175c* 基因 *dcw* 基因簇在基因组上较为靠近，推测其可能涉及结核菌细胞壁合成及细胞分裂[31]。结合 PknL 在结核分枝杆菌属种的保守的广泛分布，推测不同分枝杆菌可能通过 Rv2175c N-末端氨基酸残基的缺失来消除 PknL 对其的抑制调控，进而间接改变 Rv2175c 蛋白的下游调控。而 Rv2175c 本身的差异暗示该蛋白在不同的菌中发挥作用的程度不同，因此它可能是导致分枝杆菌中不同成员间差异的重要原因之一。

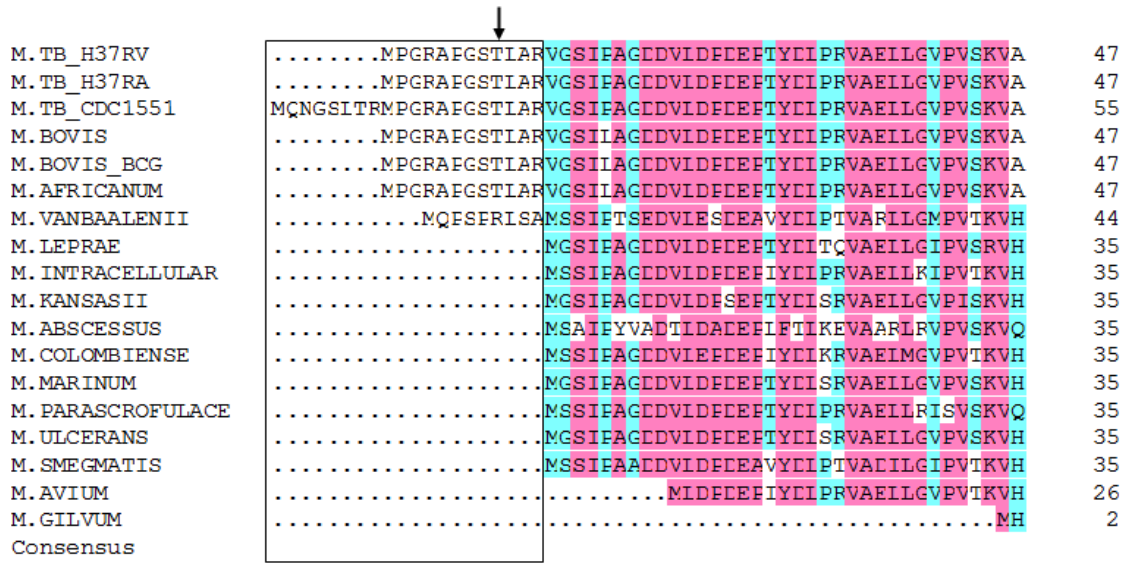


图 7. Rv2175c 蛋白 N-端序列在分枝杆菌属中的同源性比对。该图利用 DNAMAN 软件完成。

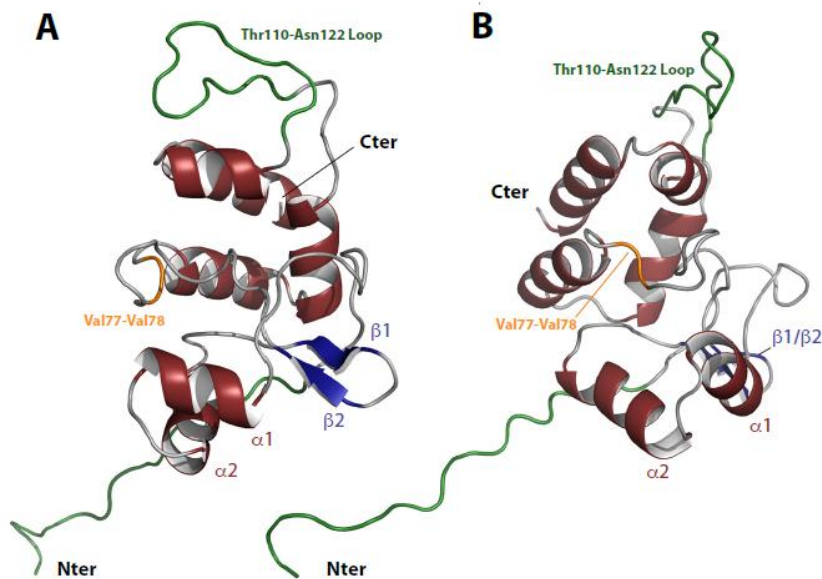


图 8. Rv2175c 蛋白的三级结构[29]。

参考文献:

1. WHO, *Laboratory-Based Evaluation of 19 Commercially Available Rapid Diagnostic Tests for Tuberculosis*. UNDP/World Bank/WHO Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases, 2008.
2. Wu, C.C., C.H. Lin, and W.S. Wang, *Development of an enrofloxacin immunosensor based on label-free electrochemical impedance spectroscopy*. *Talanta*, 2009. **79**(1): p. 62-7.
3. Tan, Y., et al., *A signal-amplified electrochemical immunosensor for aflatoxin B(1) determination in rice*. *Anal Biochem*, 2009. **387**(1): p. 82-6.
4. Parker, C.O. and I.E. Tothill, *Development of an electrochemical immunosensor for aflatoxin M1 in milk with focus on matrix interference*. *Biosens Bioelectron*, 2009. **24**(8): p. 2452-7.
5. Liu, X.P., et al., *Ultrasensitive electrochemical immunosensor for ochratoxin A using gold colloid-mediated hapten immobilization*. *Anal Biochem*, 2009. **389**(1): p. 63-8.
6. Liu, G., et al., *Nanoparticle-based electrochemical immunosensor for the detection of phosphorylated acetylcholinesterase: an exposure biomarker of organophosphate pesticides and nerve agents*. *Chemistry*, 2008. **14**(32): p. 9951-9.
7. Ho, J.A., et al., *Gold-nanostructured immunosensor for the electrochemical sensing of biotin based on liposomal competitive assay*. *J Nanosci Nanotechnol*, 2009. **9**(4): p. 2324-9.
8. Salam, F. and I.E. Tothill, *Detection of Salmonella typhimurium using an electrochemical immunosensor*. *Biosens Bioelectron*, 2009. **24**(8): p. 2630-6.
9. Dai, X. and Z. Liu, *[The fabrication of hepatitis B electrochemical immunosensor array]*. *Sheng Wu Yi Xue Gong Cheng Xue Za Zhi*, 2008. **25**(2): p. 450-3.
10. Yang, G., et al., *The preparation of reagentless electrochemical immunosensor based on a nano-gold and chitosan hybrid film for human chorionic gonadotrophin*. *Anal Chim Acta*, 2009. **644**(1-2): p. 72-7.
11. Liu, X. and D.K. Wong, *Picogram-detection of estradiol at an electrochemical immunosensor with a gold nanoparticle/Protein G-(LC-SPDP)-scaffold*. *Talanta*, 2009. **77**(4): p. 1437-43.
12. Lu, H., et al., *A recombinant Fab fragment-based electrochemical immunosensor for the determination of testosterone in bovine urine*. *Biosens Bioelectron*, 2007. **22**(8): p. 1756-63.
13. Wu, J., et al., *Disposable reagentless electrochemical immunosensor array based on a biopolymer/sol-gel membrane for simultaneous measurement of several tumor markers*. *Clin Chem*, 2008. **54**(9): p. 1481-8.
14. Zhang, X., et al., *A reusable electrochemical immunosensor for carcinoembryonic antigen via molecular recognition of glycoprotein antibody by phenylboronic acid self-assembly layer on gold*. *Analyst*, 2008. **133**(4): p. 485-92.
15. Viswanathan, S., et al., *Disposable electrochemical immunosensor for carcinoembryonic antigen using ferrocene liposomes and MWCNT screen-printed electrode*. *Biosens Bioelectron*, 2009. **24**(7): p. 1984-9.
16. Qu, B., et al., *A novel electrochemical immunosensor based on colabeled silica nanoparticles for determination of total prostate specific antigen in human serum*. *Talanta*, 2008. **76**(4): p. 785-90.
17. Namgung, M.O., et al., *Electrochemical immunosensor for prostate-specific antigen using self-assembled oligophenylethylenethiol monolayer containing dendrimer*. *Ultramicroscopy*, 2009. **109**(8): p. 907-10.
18. Sun, A.L., Q.A. Qi, and Z.L. Dong, *Label-free electrochemical immunosensor for the determination of fetoprotein based on core-shell-shell nanocomposite particles*. *Protein Pept Lett*, 2008. **15**(8): p. 782-8.
19. Zhong, Z., et al., *Signal amplification of electrochemical immunosensor for the detection of human serum IgG using double-codified nanosilica particles as labels*. *Biosens Bioelectron*, 2009. **24**(7): p. 2246-9.
20. Tang, D., R. Niessner, and D. Knopp, *Flow-injection electrochemical immunosensor for the detection of human IgG based on glucose oxidase-derived biomimetic interface*. *Biosens Bioelectron*, 2009. **24**(7): p. 2125-30.
21. Pividori, M.I., et al., *Electrochemical immunosensor for the diagnosis of celiac disease*.

-
- Anal Biochem, 2009. **388**(2): p. 229-34.
 22. Bhavsar, K., et al., *A cytokine immunosensor for Multiple Sclerosis detection based upon label-free electrochemical impedance spectroscopy using electroplated printed circuit board electrodes*. Biosens Bioelectron, 2009. **25**(2): p. 506-9.
 23. Joseph Sambrook, D.R., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd ed. 2001: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
 24. Frederick M. Ausubel, R.B., Robert E. Kingston, David D. Moore, J.G. Seidman, John A. Smith, Kevin Struhl, *Current Protocols in Molecular Biology*. 2003.
 25. Huilan Su, R.Y., Yaqin Chai, Ying Zhuo, Chenglin Hong, Zhongyuan Liu and Xia Yang, *Multilayer structured amperometric immunosensor built by self-assembly of a redox multi-wall carbon nanotube composite* Electrochimica Acta, 2009. **54**(17): p. 4149-4154
 26. Narayanan, D.R.S.J.a.S.S., *A novel nanobiocomposite based glucose biosensor using neutral red functionalized carbon nanotubes* Biosensors and Bioelectronics, 2008. **23**(9): p. 1404-1411
 27. Raghavan, S., et al., *Secreted transcription factor controls Mycobacterium tuberculosis virulence*. Nature, 2008. **454**(7205): p. 717-21.
 28. Singh, K.K., et al., *Antigens of Mycobacterium tuberculosis expressed during preclinical tuberculosis: serological immunodominance of proteins with repetitive amino acid sequences*. Infect Immun, 2001. **69**(6): p. 4185-91.
 29. Cohen-Gonsaud, M., et al., *The Mycobacterium tuberculosis Ser/Thr kinase substrate Rv2175c is a DNA-binding protein regulated by phosphorylation*. J Biol Chem, 2009. **284**(29): p. 19290-300.
 30. Marmiesse, M., et al., *Macro-array and bioinformatic analyses reveal mycobacterial 'core' genes, variation in the ESAT-6 gene family and new phylogenetic markers for the Mycobacterium tuberculosis complex*. Microbiology, 2004. **150**(Pt 2): p. 483-96.
 31. Canova, M.J., et al., *The Mycobacterium tuberculosis serine/threonine kinase PknL phosphorylates Rv2175c: mass spectrometric profiling of the activation loop phosphorylation sites and their role in the recruitment of Rv2175c*. Proteomics, 2008. **8**(3): p. 521-33.

第 3 章 结核菌 H37Rv 及牛分枝杆菌 BCG 中 *ptkA* 基因缺失后的蛋白质组学研究

1 引言

基因 *rv2232* 编码的 PtkA 是目前发现的结核分枝杆菌中唯一的蛋白酪氨酸激酶。PtkA 首先对自身的第 262 位酪氨酸进行磷酸化，然后将磷酸基团转移给底物蛋白上的特定酪氨酸 [1]。由于编码酪氨酸的密码子为 UAU 或 UAC，其中胞嘧啶和鸟嘌呤的比例（GC 含量）非常低；而编码丝氨酸的密码子为 UCU, UCC, UCA, UCG, AGU 和 AGC；编码苏氨酸的为 ACU, ACC, ACA 和 ACG。而分枝杆菌属细菌均为高 GC 含量，均在 65% 左右。丝氨酸和苏氨酸可以选择性的使用高 GC 含量的密码子，而酪氨酸则在这样的情况下没有优势。这也可以解释为什么结核分枝杆菌含有 11 种真核样丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶而迄今只发现一个酪氨酸蛋白激酶。但是 PtkA 还是结核菌的漫长进化中保存了下来，因此它必然在结核菌中承担者比较重要的功能。目前对 PtkA 仅有的了解是它能够磷酸化酪氨酸磷酸酶 PtpA [1]。

那 PtkA 在结核菌中到底发挥什么样的功能呢？为了初步探索其功能，本研究从构建的结核分枝杆菌 *ptkA* 缺失突变菌株 H37Rv 入手，用蛋白质凝胶双向电泳方法对比野生型菌株与缺失突变菌株之间在胞质蛋白表达谱上的差异。由于 *ptkA* 基因及其临近基因在结核分枝杆菌和牛分枝杆菌基因组上的排布完全一样（如图 1），因此我们也对牛分枝杆菌 BCG 及其 *ptkA* 缺失突变菌株进行分析。以比较 PtkA 在这两株毒力差异很大的菌株中是否发挥类似的功能，以期能为后面进一步的研究提供思路。

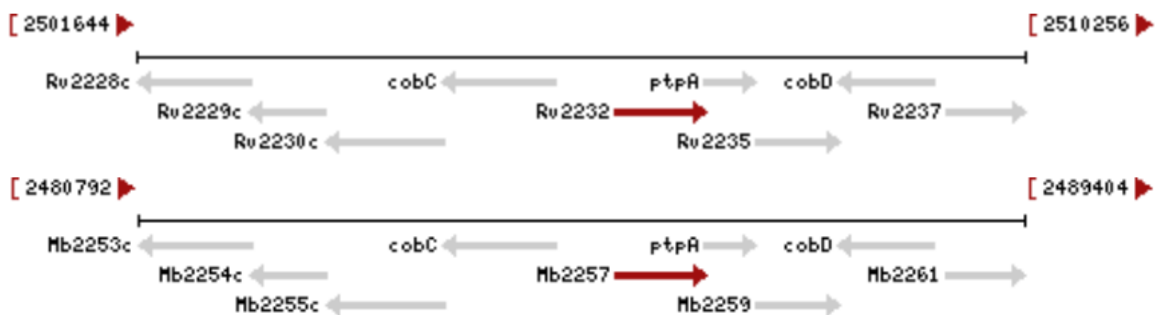


图 1. *ptkA* 基因在结核菌 H37Rv 和牛分枝杆菌基因组上的定位。上面为结核菌 H37Rv，下面为牛分枝杆菌。

2 材料和方法

2.1 菌株及培养条件

结核菌 H37Rv 菌株及牛分枝杆菌 BCG Pasteur 菌株为 Yossef Av-gay 实验室（加拿大英属哥伦比亚大学，医学系传染病部）保存。结核菌 H37Rv Δ ptkA 菌株及牛分枝杆菌 BCG Pasteur Δ ptkA 菌株由 Yossef Av-gay 实验室的 Dennis 构建（未发表的数据）。这些菌株均培养于含有 10% OADC（油酸，牛血清白蛋白，葡萄糖混合物）和 0.05% Tween-80（Fisher）的 7H9（BD）培养基中。对于突变菌株，加入潮霉素 B（Roche）至终浓度为 50ug/ml。

2.2 结核菌全菌体蛋白的制备

将对数生长期的菌液稀释到 OD₆₀₀≈0.05，接种 500ml 于 2L 滚动培养瓶（Greiner bio-one）中，37℃ 滚动培养至 OD₆₀₀≈1。离心收集菌体后，用蛋白提取缓冲液（20mM Tris-HCl, pH7.2, 1mM DTT 和 1mM PMSF）洗涤两次，最后重悬于 1/100 初始体积蛋白提取缓冲液。加入 1/3 体积 0.1mm 玻璃珠（BioSpec），用 Fastprep（Thermo）仪器以震动 30 秒，冰上放置 30 秒的程序重复 3 次破碎细胞。接着于 13000rpm 离心 15 分钟，上清经 0.2um 滤膜过滤收集，-80℃ 冻存备用。

2.3 蛋白凝胶双向电泳

第一维蛋白等电点聚焦于 GE Healthcare 系统中完成。加入 400ug 胞质蛋白到水化溶液中（8M 尿素，40mM DTT，4% CHAPS，5% IPG 缓冲液，0.002% 溴酚蓝），再通过水化膨胀法将蛋白吸收入 pH 范围 4-7 的等电聚焦条（GE Healthcare）。等电聚焦的程序为：20℃ 水化膨胀 14 小时；20℃ 条件下 50uA/条进行等电聚焦（S1：梯度，100V，1 分钟；S2：梯度，300V，30 分钟；S3：梯度，500V，30 分钟；S4：梯度，1000V，30 分钟；S5：稳定于 6000V 持续 7 小时）。蛋白等电点聚焦完成后，IPG 胶条置于 SDS 平衡缓冲液（6 M 尿素，75 mM Tris-HCl pH8.8，29.3% 甘油，2% SDS，1% DTT 和 0.002% 溴酚蓝）中，摇动平衡 10 分钟。IPG 胶条放入 12% SDS-PAGE 胶的上方，用琼脂糖凝胶封闭液（25mM Tris，192mM 甘氨酸，0.1% SDS，0.5% 琼脂糖，0.002% 溴酚蓝）封闭。于 40V 条件下进行电泳直到溴酚蓝移动到胶的下方边缘。参照文献[2-3]中的方法对蛋白胶进行银染。

2.4 蛋白差异点质谱鉴定

结核菌 H37Rv 菌株与结核菌 H37Rv Δ ptkA 菌株之间，或者牛分枝杆菌 BCG Pasteur 菌株与牛分枝杆菌 BCG Pasteur Δ ptkA 菌株之间的差异性表蛋白点被挖出，商业性委托于加拿大维多利亚大学蛋白质组学中心进行胰蛋白酶消化和 LC-MS/MS 分析鉴定。

3 结果与分析

3.1 *ptkA* 在结核菌 H37Rv 中的缺失导致蛋白质表达谱的上较大差异，但在牛分枝杆菌 BCG 中导致的差异并不明显

图 2 和图 3 分别展示野生菌株结核菌 H37Rv 与缺失突变菌株结核菌 H37Rv $\Delta ptkA$ ，野生菌株牛分枝杆菌 BCG Pasteur 与缺失突变菌株牛分枝杆菌 BCG Pasteur $\Delta ptkA$ 的全菌体蛋白表达谱。从图 2 可以看出，相比野生菌株结核菌 H37Rv，有 7 个蛋白在结核菌 H37Rv $\Delta ptkA$ 菌株中的表达量降低（如红色圈标记的点），其中有三个蛋白点 A1，A2 和 A3 的差异很明显。但从图 3 中，野生菌株牛分枝杆菌 BCG Pasteur 与缺失突变菌株牛分枝杆菌 BCG Pasteur $\Delta ptkA$ 之间出了红色标记的两个蛋白点略有差异之外，未发现其它明显差异的点。

3.2 结核菌 H37Rv 菌株中差异表达蛋白的鉴定

我们将图 2 中 *M.tb* H37Rv 与缺失突变菌株 *M.tb* H37Rv $\Delta ptkA$ 之间的显著表达差异点 A1，A2 和 A3 挖出，进行胰蛋白酶消化和 LC-MS/MS 分析鉴定。结果显示这三个蛋白点分别为低氧反应蛋白 1（Hypoxic response protein 1, Hrp1），热休克蛋白 HspX（Heat shock protein hspX，也称被注释为 Alpha-crystallin）和普遍胁迫蛋白 Rv2623（Universal stress protein Rv2623）。LC-MS/MS 分析中部分重要的参数列举于表 1 中，肽段与蛋白的匹配程度如图 4 所示。

表 1. 经 LC-MS/MS 分析鉴定的结核菌 H37Rv 与结核菌 H37Rv $\Delta ptkA$ 菌株之间差异表达蛋白

| | 蛋白名称 | 对应基因 Rv 编号 | 分子量(Da) | 等电点 | 蛋白序列覆盖率 |
|----|---------------|------------|---------|------|---------|
| A1 | 低氧反应蛋白 1 | Rv2626c | 15679 | 4.96 | 96% |
| A2 | 热休克蛋白 HspX | Rv2031c | 16217 | 5.00 | 75% |
| A3 | 普遍胁迫蛋白 Rv2623 | Rv2623 | 31747 | 5.46 | 74% |

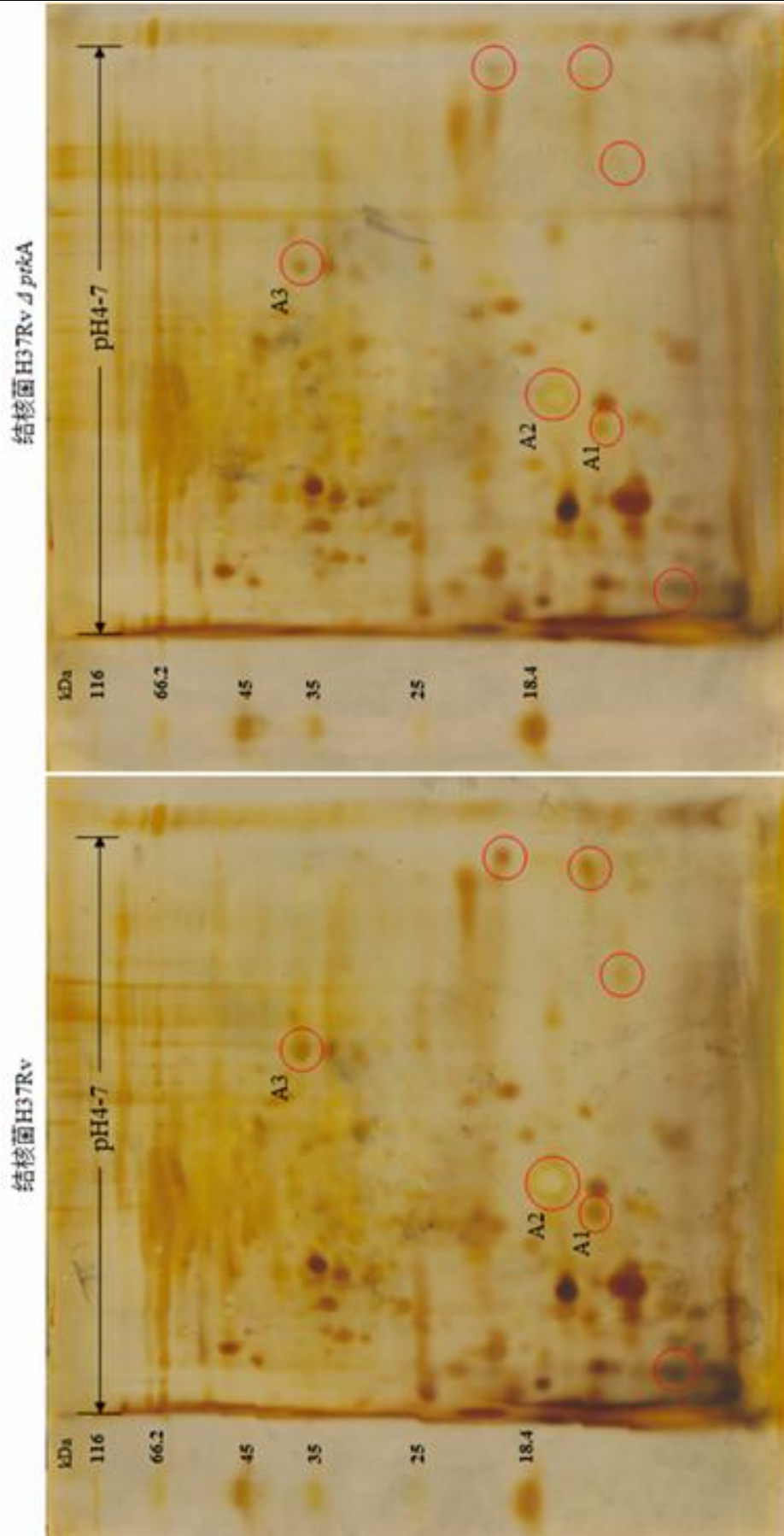
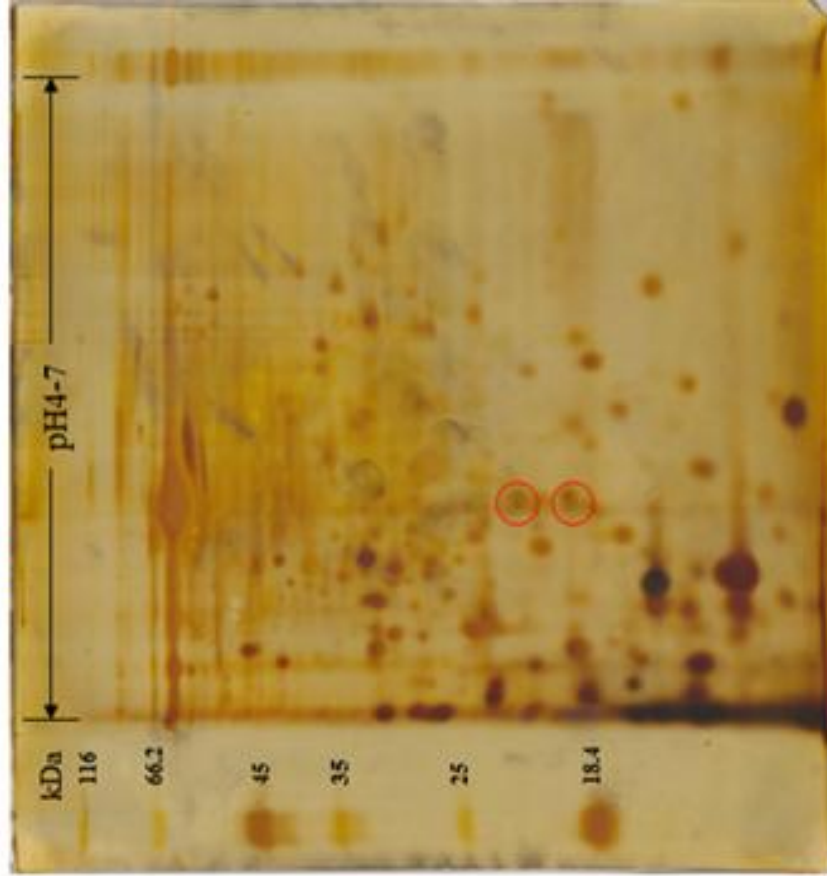


图 2. 结核菌H37Rv与结核菌H37Rv $\Delta ptkA$ 菌株蛋白表达谱。

牛分枝杆菌 BCG Pasteur $\Delta ptkA$



牛分枝杆菌 BCG Pasteur

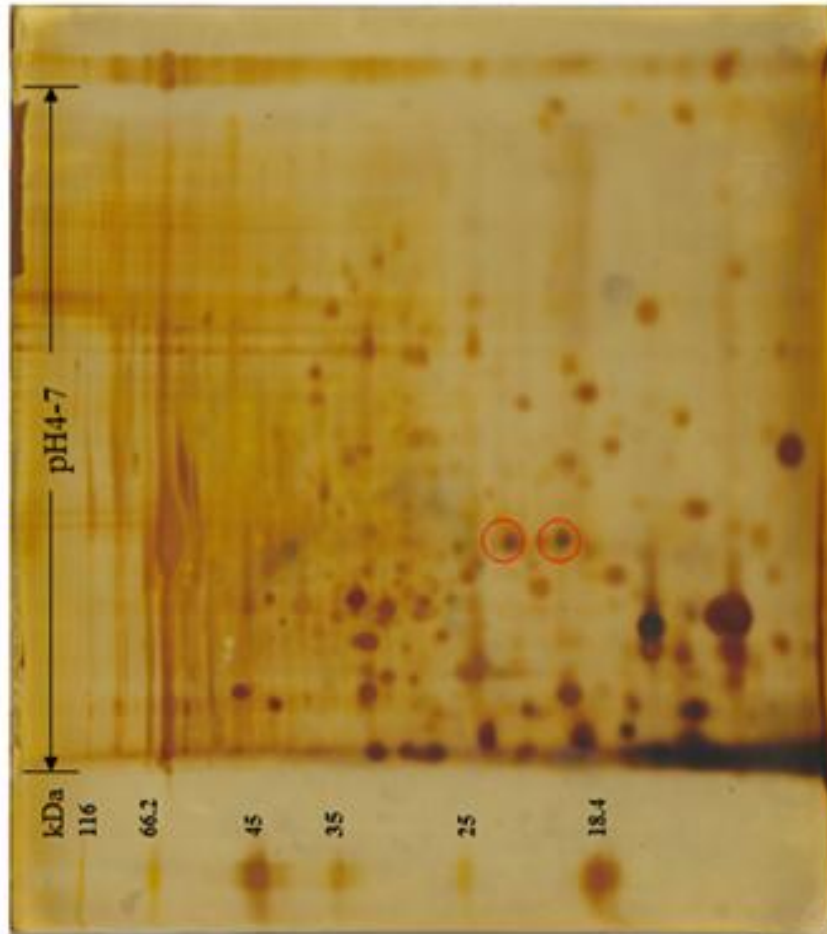


图 5. 牛分枝杆菌 BCG Pasteur 与牛分枝杆菌 BCG Pasteur $\Delta ptkA$ 菌株蛋白表达谱。

A1: Hypoxic response protein 1 (Hrp1)

MTTARDIMNA GVTCVGEHET LTAAAQYMRE HDIGALPICG DDDRLHGMLT
 DRDIVIKGLA AGLDPNTATA GELARDSIYY VDANASIQEM LNVMEEHQVR
 RVPVISEHRL VGIIVTEADIA RHLPEHAIVQ FVKAICSPMA LAS

A2: Heat shock protein HspX

MATTLPVQRH PRSLFPEFSE LFAAFPSFAG LRPTFDTRLM RLEDEMKEGR
 YEVRAELPGV DPDKVDIMV RDGQLTIKAE RTEQKDFDGR SEFAYGSFVR
 TVSLPVGAD EDDIKATYDKG ILTVSVAVSE GKPTEKHIQI RSTN

A3: Universal stress protein Rv2623

MSSGNSSLGI IVGIDDSPAA QVAVRWAARD AELRKIPLTL VHAVSPEVAT
 WLEVPLPPGV LRWQQDHGRH LIDDALKVVE QASLRAGPPT VHSEIVPAAA
 VPTLVDMSKD AVLMVVGCLG SGRWPGRLG SVSSGLLRHA HCPVVIHDE
 DSVMPHPQQA PVLVGVGSS ASELATAIAF DEASRRNVDL VALHAWSDVD
 VSEWPGIDWP ATQSMAEQVL AERLAGWQER YPNVAITRVV VRDQPARQLV
 QRSEEAQLVV VGSRGRGGYA GMLVGSVGET VAQLARTPVI VARESLT

图 4. 差异点 A1, A2 和 A3 的鉴定。红色加粗字体代表与蛋白匹配的肽段。

4 讨论

4.1 *ptkA* 基因在结核菌中涉及压力反应，休眠及免疫原性？

4.1.1 低氧反应蛋白1

基因 *hrp1* 编码一个 143 个氨基酸的蛋白低氧反应蛋白 1 (Hrp1)。该基因属于 DosR 调节子[4]，而 DosR 是结核菌中主要的活性与休眠状态转换条件的开关。Hrp1 具有胱氨酸合成酶结构域，但该蛋白与其他胱氨酸合成酶结构域不同，它不能结合 AMP。该蛋白除 C-末端对蛋白水解较为敏感外，还意外的发现它具有两个二硫键，其中一个在溶液中对还原剂耐受，推测可能是由于深藏于蛋白质的内部，因而溶剂无法与之接触[5]。

hsp1 的表达在很多不同压力条件下被诱导。在 Wayne 休眠模型中，牛分枝杆菌 BCG 中 *rv2623* 和 *hrp1* 的表达被诱导[6]，同时菌株表现出对利福平更加耐受而对甲硝唑更加敏感[7]。这暗示 Hrp1 和 Rv2623 可能涉及结核菌的休眠，因为利福平和甲硝唑分别作用于复制型和休眠状态的细菌，对前者的耐受和对后者的敏感从侧面反应了细菌处于一种休眠的状态。体外低氧培养条件下还发现 Hrp1 被分泌到培养液中而并不在细胞壁上积累[5]，同时另外一项研究也发现 Hrp1 同时存在于胞溶蛋白和培养上清中[8]。

此外, 研究发现 Hrp1 能对活动性结核病患者引出很强的血清抗体反应[9]。在结核菌小鼠感染模型中, *hspX*, *hrp1*, 和 *rv2623* 的 mRNA 表达水平均被诱导上调, 而超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase C, *sodC*), *sodA* 和纤连蛋白结合蛋白 B (fibronectin-binding protein B, *fbpB*) 等基因的表达则呈下调[10], 这也和结核菌体外适应低氧时的非复制滞留特征相符合 [11]。进一步的研究证实这些基因表达的变化主要是由 IFN- γ 介导的。在 IFN- γ 基因缺失的小鼠中, Th1 介导的免疫不能发挥作用, 导致细菌在小鼠内的生长不能受到控制, 因此 *sodC*, *sodA* 和 *fbpB* 的表达并不会降低, 而 *hspX*, *hrp1* 和 *rv2623* 仅在肺组织病理晚期才表现出上调[10]。利用分别携带表达结核菌 DosR 调控子中 Rv1733c, Rv2029c (PfkB), HspX, Rv2032 (Acg), Hrp1, Rv2627c 和 Rv2628 等抗原的质粒 DNA 免疫 BALB/c 和 C57BL/6 小鼠后, 它们都能够诱导强烈的体液和/或 Th1-型 (细胞介素 2 和 γ -干扰素) 细胞免疫反应, 其中以表达 HspX 和 Hrp1 质粒引发的 Th1 细胞免疫反应最强[12]。最新的研究还发现 Hrp1 蛋白能够结合到鼠巨噬细胞表面并引发 I-型免疫反应, 促进诱导性一氧化氮合成酶的表达和一氧化氮的释放。被 Hsp-1 蛋白刺的激鼠巨噬细胞和来自活动性结核病患者外周血单核细胞 (peripheral blood mononuclear cells, PBMCs) 中促炎性细胞因子 (IL-12 和肿瘤坏死因子 TNF- α) 显著上调, 另外一些共刺激分子 (co-stimulatory molecules) 如 B7-1, B7-2 和 CD40 在鼠巨噬细胞中的表达也被上调。且进一步证实这些都是由转录因子核因子 (transcription factor nuclear factor, NF- κ B) 所介导[13]。从这些结果来看, Hrp1 可能同时诱导先天性和适应性免疫反应来调节巨噬细胞的效应功能。

4.1.2 热休克蛋白HspX

基因 *rv2031c* 编码的热休克蛋白 HspX 为一个低分子量的分子伴侣, 能够在压力条件下阻止蛋白质的聚集, 也是结核菌体外生长稳定期占主导地位的蛋白质[14-15]。该基因同样属于 DosR 调控子, 在不同条件中被诱导表达, 如厌氧滞留[16], 高铁离子浓度[17], 感染巨噬细胞内[18]等。 *hspX* 基因的缺失导致结核菌的毒力减弱, 该蛋白被广泛的认为是人体滞留性感人过程中维持结核菌生存的重要蛋白 [19]。在气溶胶感染小鼠的模型中, HspX-特异性的 IFN- γ 在晚期阶段表达增加, HspX 抗原免疫小鼠后能够在感染 90 天后还具有较好的保护作用[20]。而另外一组实验测发现 *hspX* 基因缺失突变结核菌株在 BALB/c 小鼠感染模型, 静息或激活的巨噬细胞中菌表现出生长加快。在巨噬细胞中生长加快的程度与 *dosR* 基因缺失突变结核菌株的程度类似, 当在 *dosR* 基因缺失突变结核菌中组成性地表达 *hspX* 基因后则能将其毒力降低到野生菌株的水平。这暗示了 *dosR* 基因缺失突变结核菌株感染后生长加快的原因很大程度上是由于该突变株中 *hspX* 基因未能表达所致[21]。因此, HspX 会不会在发挥分子伴侣的同时也将大量涉及生理代谢功能的蛋白给“软禁”了, 不能正常发挥功能, 因此也导致了细菌生长的减慢?

4.1.3 普遍胁迫蛋白Rv2623

由基因 $rv2623$ 编码的普遍胁迫蛋白Rv2623是结核菌在低氧和氮化应激中高度被诱导的蛋白。Rv2623涉及分枝杆菌在体外和体内生长的调控，同时也是结核菌在感染人体后进入慢性期所必须的一个蛋白，其功能的发挥依赖于其自身的ATP结合功能[22]。不同浓度的万古霉素也能诱导 $rv2623$ 基因的表达[23]。

因此，这三个蛋白都是涉及结核菌在体外和体内多种压力应急。在一些压力条件下甚至同时被诱导，且这三个基因都属于DosR调控子，推测它们在结核菌的持留性感染中发挥重要作用。

4.2 为何 $ptkA$ 基因的缺失对结核菌蛋白谱在不同菌株中差异较大？

从 $ptkA$ 基因及其附近基因的序列（比对结果较多，未显示）及染色质定位（图1）来看，结核菌和牛分枝杆菌BCG中是完全相同的。但是该基因在这两个菌株中的缺失对其蛋白质表达谱的影响却差别较大。且在结核菌 H37Rv $\Delta ptkA$ 菌株中表达量下降的三个蛋白低氧反应蛋白1，热休克蛋白HspX 和普遍胁迫蛋白Rv2623对应的编码基因 $rv2626c$ ， $rv2031c$ 和 $rv2623$ 在牛分枝杆菌菌株BCG中也是存在且序列完全相同（位显示数据）的。这是什么原因导致的呢？PtkA虽不是一个转录调控因子，而是发挥蛋白质翻译后磷酸化修饰功能。它同样可以通过翻译后修饰来调控其它一些关键性调控因子来实现对这些蛋白表达的间接调控。因为这些基因从转录到蛋白翻译及翻译后都受到很多的调控和修饰。比如在转录水平上，这三个基因都属于结核菌主要涉及休眠的双速分调控系统DosS/T/R中DosR调控子[4]；基因 $hrp1$ 的表达还受到另外一个双组份调控系统 MprAB的调控[24]，该系统同样在结核分枝杆菌持留性感染中发挥重要作用； $hspX$ 的表达受SigC的调控[25]等等。而翻译后水平上，体外实验证实HspX 受到多个真核样丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶如PknA, PknB, PknD, PknE和PknF的磷酸化调控，其中以PknB 和PknF对其的磷酸化程度最高[26]。

5 结论与建议

通过对结核菌 H37Rv $\Delta ptkA$ 菌株，牛分枝杆菌 BCG Pasteur $\Delta ptkA$ 菌株及其对应的野生型菌株胞质蛋白表达谱的比较分析。证实 $ptkA$ 基因的缺失对结核分枝杆菌的胞质蛋白表达谱影响较大，而对牛分枝杆菌则没有明显的影响。进一步的质谱分析鉴定了结核菌 H37Rv $\Delta ptkA$ 菌株与 $M.tb$ H37Rv相比，表达量明显下降的三个蛋白点为低氧反应蛋白1，热休克蛋白HspX 和普遍胁迫蛋白Rv2623。这几个蛋白涉及多方面的环境压力应急及免疫原性等，且都同属于结核菌休眠调控蛋白DosR调控子，暗示了PtkA可能涉及结核菌的压力反应，休眠与结核菌免疫原性等方面。

由于蛋白凝胶电泳检测的灵敏度有限，且不能很好的定量分析。我们正在利用同位素标记相对和绝对定量（Isobaric tag for relative absolute quantitation, iTRAQ）技术对样品做进一

步分析,同时对菌株进行各种环境压力的测试且已经取得很大进展和很好的结果(未发表数据,未展示)。

参考文献:

1. Bach, H., D. Wong, and Y. Av-Gay, *Mycobacterium tuberculosis PtkA is a novel protein tyrosine kinase whose substrate is PtpA*. *Biochem J*, 2009. 420(2): p. 155-60.
2. Morrissey, J.H., *Silver stain for proteins in polyacrylamide gels: a modified procedure with enhanced uniform sensitivity*. *Anal Biochem*, 1981. 117(2): p. 307-10.
3. Rabilloud, T., *A comparison between low background silver diammine and silver nitrate protein stains*. *Electrophoresis*, 1992. 13(7): p. 429-39.
4. Park, H.D., et al., *Rv3133c/dosR is a transcription factor that mediates the hypoxic response of Mycobacterium tuberculosis*. *Mol Microbiol*, 2003. 48(3): p. 833-43.
5. Sharpe, M.L., et al., *The structure and unusual protein chemistry of hypoxic response protein 1, a latency antigen and highly expressed member of the DosR regulon in Mycobacterium tuberculosis*. *J Mol Biol*, 2008. 383(4): p. 822-36.
6. Boon, C., et al., *Proteins of Mycobacterium bovis BCG induced in the Wayne dormancy model*. *J Bacteriol*, 2001. 183(8): p. 2672-6.
7. Obozova, T.A., et al., *[Correlation between the expression of Rv3286c, Rv2626c, Rv2031c, AND Rv3133c and the tolerance of Mycobacterium bovis BCG to rifampicin and metronidazole in different physiological conditions]*. *Probl Tuberk Bolezn Legk*, 2005(2): p. 34-6.
8. Rosenkrands, I., et al., *Hypoxic response of Mycobacterium tuberculosis studied by metabolic labeling and proteome analysis of cellular and extracellular proteins*. *J Bacteriol*, 2002. 184(13): p. 3485-91.
9. Davidow, A., et al., *Antibody profiles characteristic of Mycobacterium tuberculosis infection state*. *Infect Immun*, 2005. 73(10): p. 6846-51.
10. Shi, L., et al., *Expression of Th1-mediated immunity in mouse lungs induces a Mycobacterium tuberculosis transcription pattern characteristic of nonreplicating persistence*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003. 100(1): p. 241-6.
11. Wayne, L.G. and C.D. Sohaskey, *Nonreplicating persistence of mycobacterium tuberculosis*. *Annu Rev Microbiol*, 2001. 55: p. 139-63.
12. Roupie, V., et al., *Immunogenicity of eight dormancy regulon-encoded proteins of Mycobacterium tuberculosis in DNA-vaccinated and tuberculosis-infected mice*. *Infect Immun*, 2007. 75(2): p. 941-9.
13. Bashir, N., et al., *Mycobacterium tuberculosis conserved hypothetical protein rRv2626c modulates macrophage effector functions*. *Immunology*, 2010. 130(1): p. 34-45.
14. Yuan, Y., D.D. Crane, and C.E. Barry, 3rd, *Stationary phase-associated protein expression in Mycobacterium tuberculosis: function of the mycobacterial alpha-crystallin homolog*. *J Bacteriol*, 1996. 178(15): p. 4484-92.
15. Chang, Z., et al., *Mycobacterium tuberculosis 16-kDa antigen (Hsp16.3) functions as an oligomeric structure in vitro to suppress thermal aggregation*. *J Biol Chem*, 1996. 271(12): p. 7218-23.
16. Saxena, A., et al., *Identification of genes of Mycobacterium tuberculosis upregulated during anaerobic persistence by fluorescence and kanamycin resistance selection*. *Tuberculosis (Edinb)*, 2008. 88(6): p. 518-25.
17. Wong, D.K., et al., *Identification of fur, aconitase, and other proteins expressed by Mycobacterium tuberculosis under conditions of low and high concentrations of iron by combined two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry*. *Infect Immun*, 1999. 67(1): p. 327-36.
18. Monahan, I.M., et al., *Differential expression of mycobacterial proteins following phagocytosis by macrophages*. *Microbiology*, 2001. 147(Pt 2): p. 459-71.
19. Yuan, Y., et al., *The 16-kDa alpha-crystallin (Acr) protein of Mycobacterium tuberculosis*

-
- is required for growth in macrophages. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. 95(16): p. 9578-83.*
20. Jeon, B.Y., et al., *The immunity and protective effects of antigen 85A and heat-shock protein X against progressive tuberculosis. Microbes Infect, 2011. 13(3): p. 284-90.*
 21. Hu, Y., et al., *Deletion of the Mycobacterium tuberculosis alpha-crystallin-like hspX gene causes increased bacterial growth in vivo. Infect Immun, 2006. 74(2): p. 861-8.*
 22. Drumm, J.E., et al., *Mycobacterium tuberculosis universal stress protein Rv2623 regulates bacillary growth by ATP-Binding: requirement for establishing chronic persistent infection. PLoS Pathog, 2009. 5(5): p. e1000460.*
 23. Provvedi, R., et al., *Global transcriptional response to vancomycin in Mycobacterium tuberculosis. Microbiology, 2009. 155(Pt 4): p. 1093-102.*
 24. He, H., et al., *MprAB is a stress-responsive two-component system that directly regulates expression of sigma factors SigB and SigE in Mycobacterium tuberculosis. J Bacteriol, 2006. 188(6): p. 2134-43.*
 25. Sun, R., et al., *Mycobacterium tuberculosis ECF sigma factor sigC is required for lethality in mice and for the conditional expression of a defined gene set. Mol Microbiol, 2004. 52(1): p. 25-38.*
 26. Molle, V., et al., *An improved method to unravel phosphoacceptors in Ser/Thr protein kinase-phosphorylated substrates. Proteomics, 2010. 10(21): p. 3910-5.*

第4章 结核菌 PtkA 受 STPKs 磷酸化调控

1 引言

PtkA是目前鉴定的结核菌中唯一的蛋白酪氨酸激酶，而蛋白酪氨酸磷酸酶PtpA是其已知的唯一磷酸化底物[1]。愈来愈多的研究发现PtpA在结核菌与宿主相互作用，干扰宿主信号中发挥重要作用。PtpA在感染巨噬细胞时表达量上调，能被分泌到宿主巨噬细胞中，抑制巨噬细胞的吞噬作用并增加肌动蛋白的聚合作用[2]。Horacio Bach等研究揭示了PtpA通过对宿主中VPS33B去磷酸化来抑制吞噬体-溶酶体融合，Dennis等进一步证明PtpA通过结合巨噬细胞空泡膜上的H⁺-ATPase中的H亚基并去磷酸化HOPS（homotypic vacuole fusion and vacuole protein sorting）复合体上人C型空泡分选蛋白VPS33B（human class C Vacuolar Protein Sorting VPS33B）蛋白来阻止吞噬体与溶酶体的结合[1, 3]。但是PtkA对PtpA的磷酸化与PtpA分泌是否有关目前还不得而知。对如此重要的一个生理过程，PtkA又是如何感应细胞中的环境，在什么样的条件下磷酸化和调控PtpA的功能呢？它自身又有没有受到其它蛋白的调控呢？此外，如第3章引言部分所述，编码酪氨酸的密码子的GC含量是很低的，但是PtkA却能够在高GC含量的结核菌中保留下来，证明其必然发挥着重要功能，才不会在进化中被淘汰。那么除了PtpA以外，PtkA还调控着那些重要的生理功能呢？

带着这些疑问，我们首先是将PtkA与结核菌的胞质蛋白在体外进行孵育，以期能够发现更多的磷酸化底物蛋白。巧合的是由于我使用的PtkA蛋白自身的磷酸化活性不是太高，意外的发现了PtkA蛋白受到结核菌中内源性蛋白激酶的磷酸化。因此我们顺着这个线索，提出假设，一步步验证，发掘结核菌中对PtkA的上游翻译后修饰调控机制。大体思路如下：

PtkA蛋白与结核菌胞质蛋白体外蛋白激酶反应



PtkA蛋白被结核菌中内源性蛋白激酶磷酸化



提出假设：STPKs 磷酸化了PtkA



克隆和表达STPKs并进行体外激酶验证



LC-MS/MS进行磷酸化位点鉴定

2 材料与amp;方法

2.1 菌株及培养条件

相关基因的克隆等在大肠杆菌 DH5a 中进行，蛋白的诱导表达在大肠杆菌 BL21 中进行。这些菌株均培养于 LB 液体或 LB 固体平板。所涉及使用的抗生素浓度为：氨苄青霉素 100ug/ml。结核菌 H37Rv 菌株为 Yossef Av-gay 实验室（加拿大英属哥伦比亚大学，医学系传染病部）保存，培养于含有 10% OADC（油酸，牛血清白蛋白，葡萄糖混合物）和 0.05% Tween-80（Fisher）的 7H9（BD）培养基中。

2.2 基因克隆，蛋白表达与纯化

表达结核菌 PtkA 与 PtkAY262A 蛋白的重组质粒来源于 Horacio Bach（加拿大英属哥伦比亚大学，医学系传染病部），蛋白的表达及纯化条件参考文献[1]。表达结核菌 PknH 和 PknG 的质粒为 Yossef Av-Gay 实验室前期构建和保存，蛋白的表达及纯化分别参考文献[5]和[6]。结核菌 STPKs PknB 和 PknD 的蛋白激酶部分被克隆到 pGEX-4T3（GE Healthcare）载体中。所涉及的质粒的及引物信息见表 1。这些插入基因片段的序列经测序验证后，转化进入大肠杆菌 BL-21（DE3）中进行诱导表达。37℃培养至 OD600 至 0.6-0.8 之间，加入 IPTG (isopropyl β -D-thiogalactoside) 至终浓度 0.5mM，25℃诱导表达过夜。蛋白的纯化参考[7]。纯化后的蛋白在透析溶液（20mM Tris-HCl pH7.2，50mM NaCl，1mM DTT，10%甘油）中，4℃透析过夜。蛋白分装为 50ul 每管，-70 保存备用。

2.3 结核菌全菌体蛋白制备

结核菌H37Rv静置培养37℃，将对数生长期的菌液稀释到OD600 \approx 0.05，接种10ml于50ml离心管中（三支离心管）37℃，滚动培养至OD600 \approx 1。离心收集菌体后，用蛋白提取缓冲液（20mM Tris-HCl，pH7.2，1mM DTT 和1mM PMSF）洗涤两次，最后重悬于1/100 初始体积蛋白提取缓冲液。加入1/3 体积 0.1mm玻璃珠（BioSpec），用Fastprep（Thermo）仪器以震动30秒，冰上放置30秒的程序重复3次破碎细胞。接着于13000rpm离心15分钟，上清经0.2um滤膜过滤收集，加入甘油至终浓度为10%，于-80℃冻存备用。

2.4 体外蛋白激酶实验

体外蛋白激酶实验为20ul反应体系，反应缓冲液含20mM Tris-HCl，pH7.5，5mM MnCl₂，5mM MgCl₂，1mM DTT和2mM Na₃VO₄。加入适量蛋白激酶及底物蛋白之后，加入 7 uCi γ -³²P ATP启动反应，在室温（22℃）条件下孵育30分钟（对于时间依赖的蛋白激酶反应实验，时间从0分钟依次增加，详见文章的图注），加入5ul 5 \times SDS蛋白上样缓冲液后于95℃加热10分钟。样品经10% SDS-PAGE胶分离，银染和干燥后，利用PhosphorImager SI (Molecular Dynamics)扫描成像。需要时，蛋白条带被切下，用闪烁计数器(Beckman Coulter

LS 6500)进行计数。对后续需要进行质谱分析鉴定体外激酶实验,用相同浓度的非放射性 ATP代替 γ -[32 P] ATP。

表1. 研究中涉及的质粒及引物。

| 质粒 | 特征 | 来源及参考文献 |
|--------------------------------|--|---------------|
| pET151D/TOPO | 产生 N 末端组氨酸标签融合蛋白, <i>Amp</i> | Invitrogen |
| pET151D/TOPO- <i>ptkA</i> | pET151D/TOPO 携带 <i>ptkA</i> 基因, <i>Amp</i> | [1] |
| pET151D/TOPO- <i>ptkAY262A</i> | pET151D/TOPO 携带 <i>ptkAY262A</i> 基因, <i>Amp</i> | [1] |
| pGEX-4T3 | 产生 N-末端融合 GST 标签蛋白, <i>Amp</i> | GE Healthcare |
| pGEX-4T3- <i>pknB</i> | pGEX-4T3 携带 <i>pknB</i> ₁₋₃₃₂ 编码基因, 克隆在 <i>Bam</i> HI 和 <i>Sal</i> I 之间, <i>Amp</i> | 本研究 |
| pGEX-4T3- <i>pknD</i> | pGEX-4T3 携带 <i>pknD</i> ₁₋₃₇₈ 编码基因, 克隆于 <i>Bam</i> HI 和 <i>Not</i> I 之间, <i>Amp</i> | 本研究 |
| pWAB105 | pET22b 携带 <i>PknH</i> ₁₋₄₀₁ 编码基因, 克隆于 <i>Xho</i> I 和 <i>Nde</i> I 之间, <i>Amp</i> | [5] |
| pYA410E | pET22b 携带 <i>pknG</i> 编码基因, 克隆于 <i>Nde</i> I 和 <i>Hind</i> III 之间, <i>Amp</i> | [6] |
| 引物 | 序列 | 限制性内切酶微点 |
| pGEX- <i>pknB</i> F | CTATTGGATCCATGACCACCCCTTCCCAC | <i>Bam</i> HI |
| pGEX- <i>pknB</i> R | TATCTGTCGACTCACCAACGGCCACCGAACCGAT | <i>Sal</i> I |
| pGEX- <i>pknD</i> F | TATGGATCCGTGAGCGATGCCGTTCCGCAG | <i>Bam</i> HI |
| pGEX- <i>pknD</i> R | TATGCGGCCGCTTACTTCCGTTTGTGCGGCCGG | <i>Not</i> I |

注: *Amp*, 氨苄青霉素抗性, 限制性内切酶位点为下划线标注。

2.5 PtkA 磷酸化位点鉴定

经过体外蛋白激酶实验之后, PtkA 蛋白对应的条带被切下, 商业性委托于加拿大维多利亚大学蛋白质组学中心进行胰蛋白酶消化和 LC-MS/MS 分析鉴定。

3 结果与分析

3.1 PtkA 被结核菌中内源性的蛋白激酶磷酸化

PtkA是目前已知结核分枝杆菌中唯一的蛋白酪氨酸激酶，同时除了它能够磷酸化酪氨酸磷酸酶PtpA之外，其它的功能还知之甚少。为此，我们以放射性同位素 P^{32} 标记的ATP为磷酸基供体，尝试将结核菌全菌体蛋白与重组表达纯化的PtkA在体外共孵育，试图鉴定新的底物。同时PtkA蛋白自身及结核菌全菌体蛋白自身也进行同样的反应作为对照。但是结果却出乎预料。如图1所示，由于使用的PtkA自身的蛋白激酶活性并不是很好，能看到较低的自磷酸化。与未加PtkA蛋白的结核菌全菌体蛋白样品相比，加入PtkA蛋白后，PtkA对应的蛋白条带的磷酸化程度比PtkA自磷酸化程度要高，却没有发现另外的磷酸化蛋白条带。这暗示了存在于结核菌全菌体蛋白中的某些内源性蛋白激酶可能对PtkA进行了磷酸化。查阅Prisic前期的工作发现，PtkA的第36位苏氨酸残基被磷酸化[8]。因此，PtkA自身很可能是某一个或某几个其它蛋白激酶的磷酸化底物。

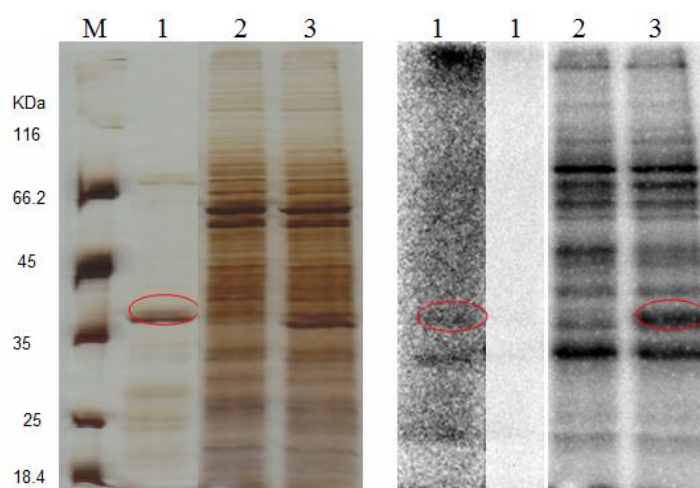


图 1. 结核菌中内源性的蛋白激酶磷酸化 PtkA。左边为银染的蛋白胶，右边为放射性自显影图片。M, 蛋白 marker; 1, PtkA 蛋白 (1.5ug); 2, 结核菌全菌体蛋白 (1.5ug); 3, 结核菌全菌体蛋白 (1.5ug) + PtkA 蛋白 (1.5ug)。

3.2 STPKs 体外磷酸化 PtkA

结核菌中，除了PtkA外，还有STPKs和属于双组份调控系统的组氨酸蛋白激酶。组氨酸蛋白激酶能够对自身的组氨酸残基进行磷酸化，进一步将磷酸基团转移给同族反应调控蛋白（通常为转录调控因子）上的天冬氨酸残基。通常情况下，组氨酸蛋白激酶的底物仅限于与之构成一个双组份系统的反应调控蛋白。而STPKs的自磷酸化及底物磷酸化均发生在丝氨酸

或者苏氨酸残基上。结合前期的研究发现PtkA的T³⁶被磷酸化，推测PtkA最可能是11个STPKs中某个或者某几个的底物。

为此，我们首先克隆了结核菌STPK中的 PknB, PknD, PknG和PknH的蛋白激酶结构域 (PknG为蛋白全长)，以GST标签融合蛋白 (PknG为组氨酸标签融合蛋白) 在大肠杆菌中表达。以放射性同位素P³²标记的ATP为磷酸基供体，将纯化后的蛋白激酶与PtkA蛋白进行体外蛋白激酶磷酸化反应。从图2中可以看出，PtkA自身存在自磷酸化，但是活性不是很高。而当不加入PtkA时，PknB, PknD, PknG和PknH均具有较好的磷酸化活性，且在PtkA蛋白条带对应的地方或其它地方没有明显的磷酸化的条带。而加入PtkA后，PtkA的磷酸化程度都比PtkA自磷酸化程度要高，其中以PknD对PtkA的磷酸化程度最高，PknG次之。该实验说明了PtkA可作为多个STPK的体外磷酸化底物，暗示了结核菌中PtkA可能收到多个STPKs的调控，因此间接地参与细胞中多种信号的转导。另外值得关注的是当将PknB与PtkA一起孵育以后，PknB自身的自磷酸化程度严重降低。这两者间具体发生了怎么样的相互作用也是值得进一步研究的。

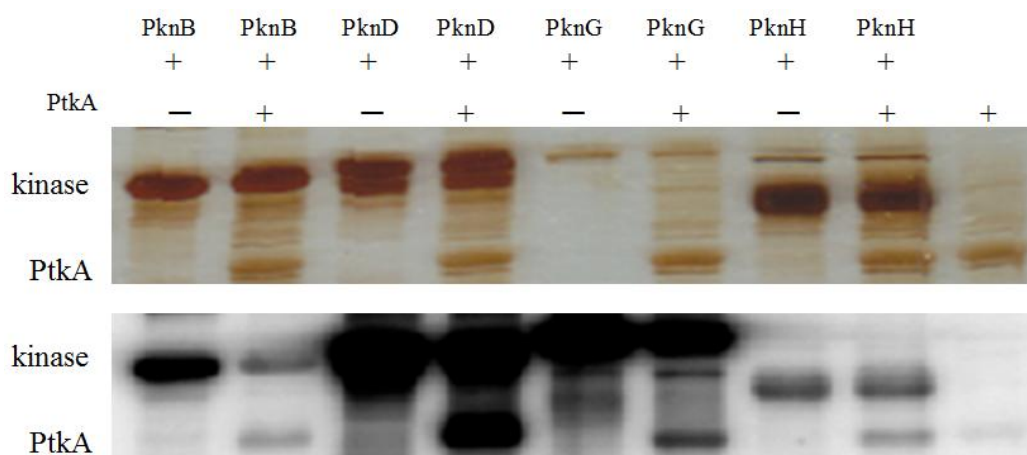


图 2. STPKs 体外磷酸化 PtkA。以放射性同位素 P³² 标记的 ATP 为磷酸基供体，结核菌编码的 4 个 STPKs 与 PtkA 蛋白进行体外蛋白激酶反应。为了得到合适的自磷酸化条带，STPK 的用量从 1.3ug 到 10ug 不等。样品通过 SDS-PAGE 分离，银染（上面部分），过夜放射自显影(下面部分)。

3.3 PknD 以时间和浓度依赖的方式磷酸化 PtkA

为了进一步证实 PtkA 是 PknD 的特异性磷酸化底物。我们用 PknD 对 PtkA 进行时间和浓度依赖的磷酸化检测。由于 PtkA 自身也是一个蛋白激酶，能够进行自磷酸化[1]。我们不清楚 PknD 对 PtkA 的磷酸化是否会影响其自磷酸化活性，为了排除这些因数的干扰，我们使用由于自磷酸化位点突变而不具有自磷酸化活性的 PtkAY262A[1]来代替 PtkA 进行这两组实

验。从图 3A 中可以看出, 在 PknD 和 PtkAY262A 浓度都不变的情况下, 随着时间的不断增加, PknD 对 PtkAY262A 的磷酸化程度以依次增强, 表现出时间依赖的磷酸化。而图 3B 中, 在 PknD 浓度不变的条件下 (图 3B 中 PknD 蛋白对应条带从银染结果上看有一定的增加, 那是由于 PtkA 蛋白样品中在此处有一条污染的蛋白, 但是该蛋白并不具有磷酸化活性, 从图 2 中可以看出), PtkAY262A 的磷酸化程度随着其浓度依次增加而增强, 表现出底物浓度依赖的磷酸化。这些结果共同证实 PtkA 是 PknD 的特异性磷酸化底物。

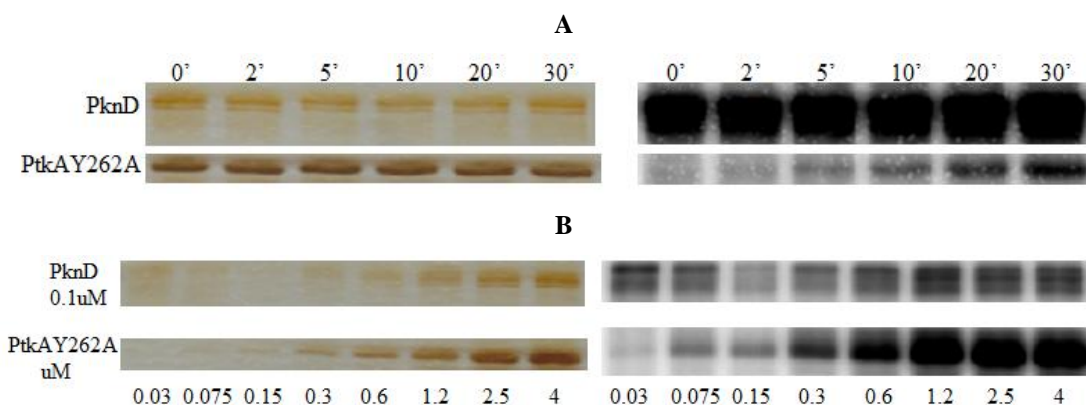


图 3. PknD 以时间和浓度依赖的方式磷酸化 PtkAY262A。A. 时间依赖。 3.6 μM PknD 于室温自磷酸化 30 分钟, 加入 1.4 μM PtkAY262A, 并在不同时间点加入 5× 上样缓冲液终止反应。**B. 浓度依赖。** 1.5 μM PknD 和不同浓度的 PtkAY262A 于室温下孵育 30 分钟。左边为蛋白胶银染图片, 右边为放射性自显影。

3.4 PknD 磷酸化 PtkA 的 T¹¹⁹ 和 C-端靠近自磷酸化位点的一个基序

从前面的结果, PtkA 在体外被 PknD 磷酸化的程度最高, 因此在体内最可能是 PknD 的特异性调控底物。为了鉴定 PknD 对 PtkA 的磷酸化位点, 我们以非放射性 ATP 为磷酸化供体, 将 PtkA 与 PknD 共孵育进行体外蛋白激酶反应。经 SDS-PAGE 分离后, 对 PtkA 对应的蛋白条带进行 LC-MS/MS 分析。作为对照, 单独的 PtkA 也进行相同反应和分析。我们发现 PtkA 对照中的 S²⁹ 是被磷酸化的 (图 4 中的蓝色标记氨基酸), 这个结果让我们觉得很好奇, 因为迄今为止我们并没有在大肠杆菌中发现相关的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶, 不可能是由于在表达的过程中被大肠杆菌中蛋白激酶磷酸化。而当 PtkA 与 PknD 进行孵育后, S²⁹ 的磷酸化消失了, 但是另外一个丝氨酸残基 S²⁷² 和 4 个苏氨酸残基 T¹¹⁹, T²⁷¹, T²⁷³ 和 T²⁷⁴ 被磷酸化 (图 4 中红色标示的氨基酸残基), 含有对应氨基酸残基磷酸化的肽段的质谱分析图分别见图 5, 图 6, 图 7, 图 8 和图 9。分析发现, 磷酸化残基 T²⁷¹, S²⁷², T²⁷³ 和 T²⁷⁴ 这 4 个氨基酸残基连接在一起形成一个氨基酸基序 (磷酸化基序)。该基序位于 PtkA 的 C-末端并且靠近自磷酸化位点 Y²⁶² 但是距离其催化结构域较远。由于 PtkA 的三维结构还没有被解析, 很难解释 T¹¹⁹ 和这个基序的磷酸化会

对及结构及活性造成什么影响。但我们推测这个基序的磷酸化可能影响了其自磷酸化位点附近的结构，进而改变其自磷酸化活性，间接改变其底物磷酸化活性。

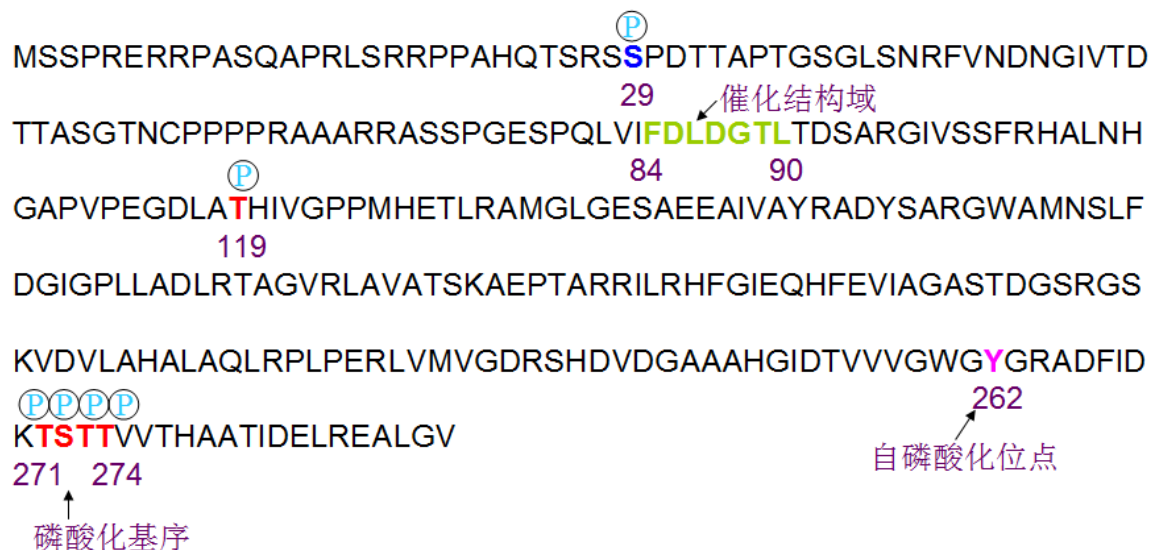


图 4. PknD 磷酸化 PtkA 的 T¹¹⁹ 和 C-端靠近自磷酸化位点的一个基序。该实验进行了两次重复，这里列出了两次试验中相同的磷酸化位点。

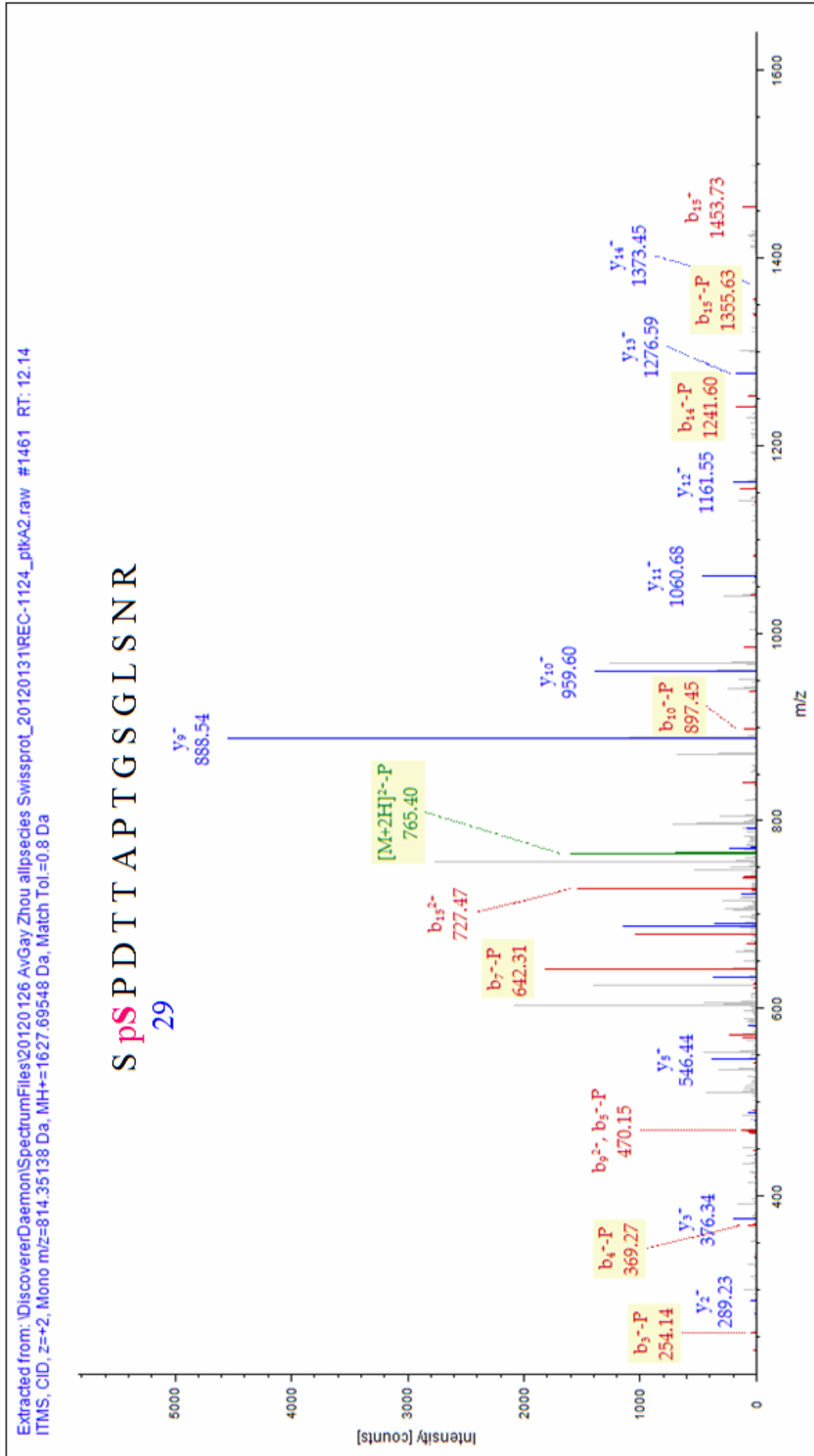


图 5. Pika中含S²⁹磷酸化肽段。

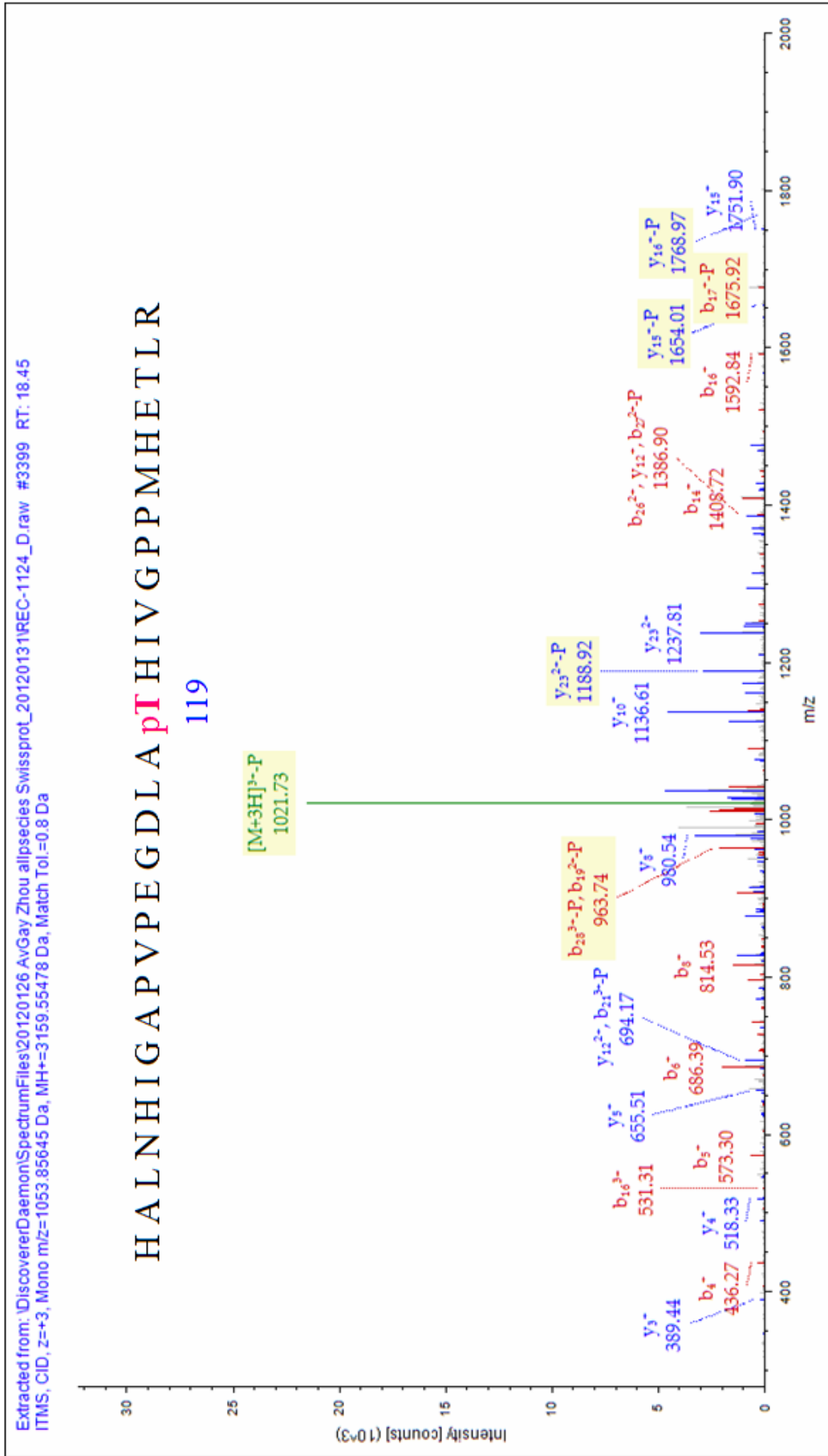


图 6. PtkA中含T119 磷酸化肽段。

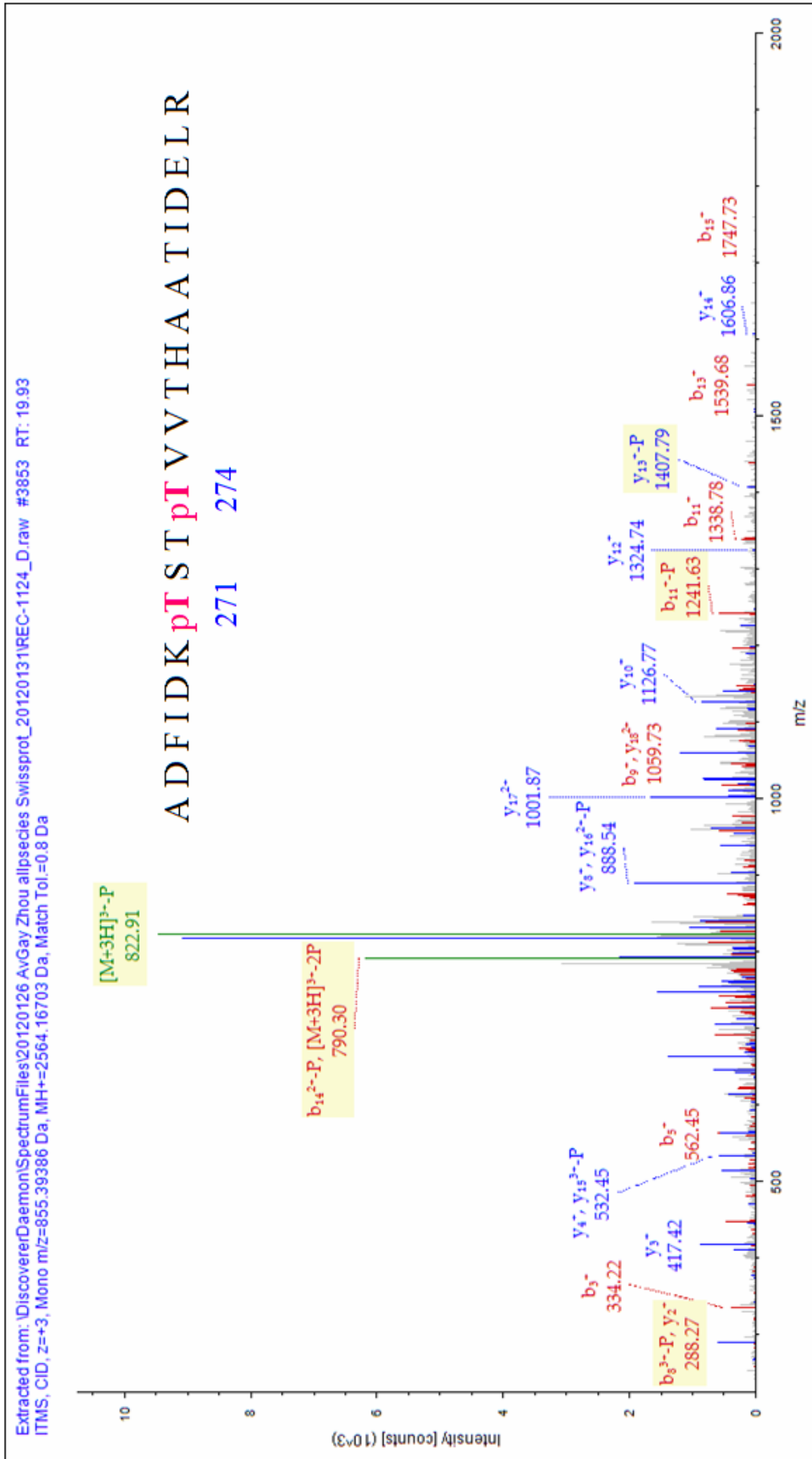


图 7. Peptide 中含 T²⁷¹, T²⁷⁴ 磷酸化肽段。

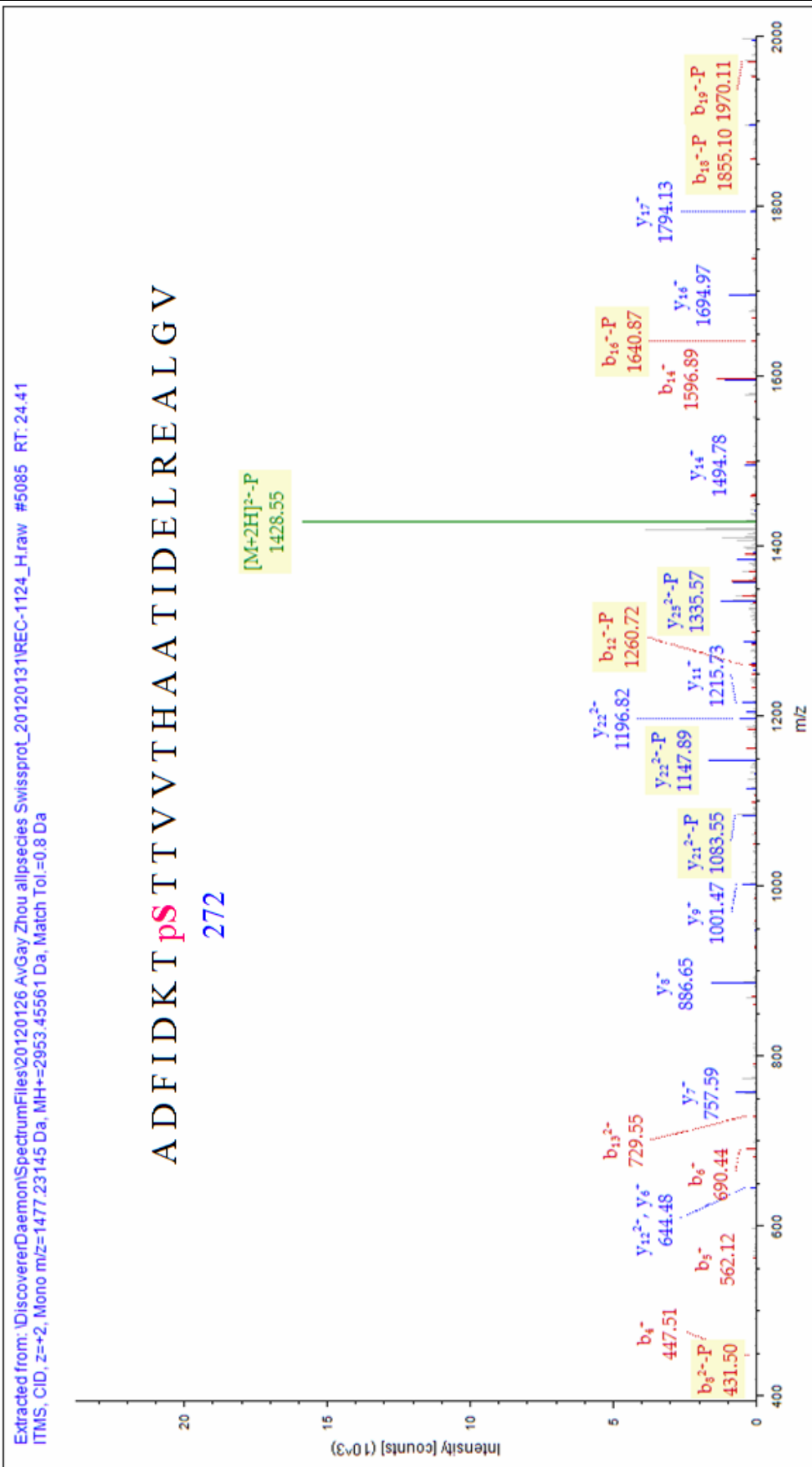


图 8. PtkA 中含 S²⁷² 磷酸化肽段。

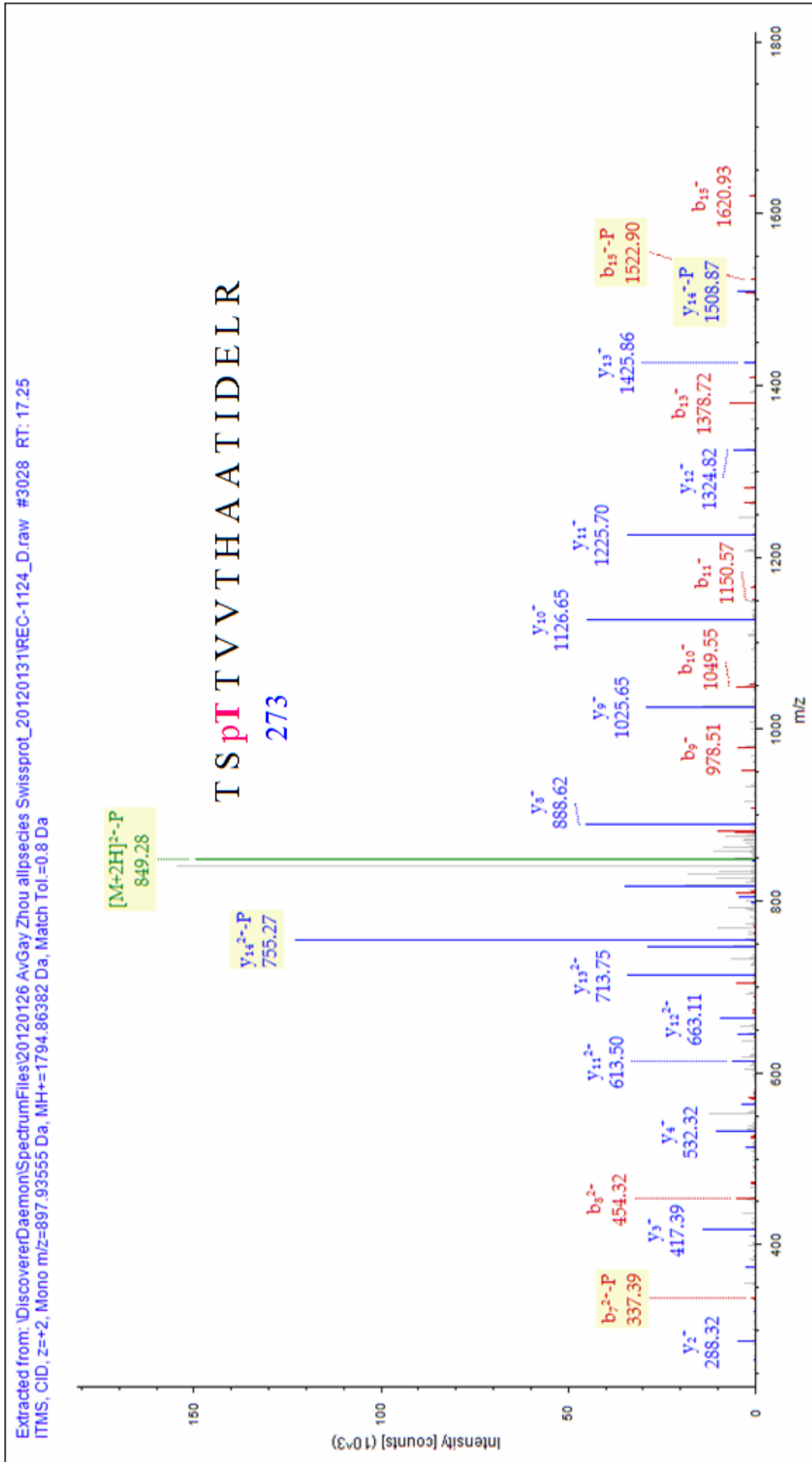


图 9. Peptide 中含 T²⁷³ 磷酸化肽段。

4 结论与建议

本实验中，首先通过将在大肠杆菌中重组表达的结核菌PtkA与结核菌胞质蛋白进行体外蛋白激酶反应，发现了PtkA蛋白被结核菌中的内源性蛋白激酶所磷酸化。结合已有的知识，推定对PtkA磷酸化的内源性蛋白激酶应该为STPKs。我们首先克隆，表达和纯化了PknB，PknD，PknG和PknH。体外蛋白激酶反应发现这四个蛋白激酶均能对PtkA进行不同程度的磷酸化，其中以PknD对PtkA的磷酸化活性最强，PknG次之。进一步的实验证实PknD以时间及浓度依赖的方式对PtkA进行磷酸化，体外证明了PtkA是PknD的特异性磷酸化底物。利用LC-MS/MS分析发现PknD对PtkA的磷酸化位点为T¹¹⁹和另外一个靠近其自磷酸化位点的基序，暗示其可能影响自磷酸化位点附近的结构，进而改变其自磷酸化活性，间接改变其底物磷酸化活性。而STPKs可能通过调控PtkA而间接调控PtpA的功能，影响结核菌与宿主之间的相互作用和滞留性感染。

从上面的结果，我们发现了结核菌重要的信号转导系统之间的调控。但是结核菌中有11个STPKs，我们这里仅尝试了其中4个对PtkA的磷酸化，那另外的7个能不能对PtkA进行磷酸化呢？不同激酶在体外对PtkA的磷酸化程度不同，这会不会是由于这些蛋白激酶的激酶结构域本身就存在一定的相似性[9]，因此在体外高浓度的条件下发生的非特异性磷酸化呢？在体内又怎么样呢？这些蛋白激酶对PtkA的磷酸化会对其活性造成影响吗？如果有影响，有具体是如何调控的呢？追随者这些问题，我们正在进行如下工作：

- 1, 已经克隆和表达了结核菌中另外7个STPKs的激酶结构域，体外测试对PtkA的磷酸化活性；

- 2, 利用ALPHAScreen蛋白-蛋白相互作用检测技术进行体外蛋白相互作用验证，同时基于耻垢分枝杆菌中蛋白-蛋白双杂交系统[10-11]，对11个STPKs与PtkA进行体内蛋白-蛋白相互作用验证；

- 3, 基于PknD对PtkA的磷酸化位点鉴定结果，对PtkA进行定点突变验证及其活性研究；

- 4, 测定PknD对PtkA及定点突变PtkA的酶反应动力学参数；

- 5, PtkA蛋白晶体结构的解析，从结构上了解该蛋白激酶作用机理，以及磷酸化位点在其结构中的影响。

参考文献:

1. Bach, H., D. Wong, and Y. Av-Gay, *Mycobacterium tuberculosis PtkA is a novel protein tyrosine kinase whose substrate is PtpA*. *Biochem J*, 2009. **420**(2): p. 155-60.
2. Castandet, J., et al., *Tyrosine phosphatase MtpA of Mycobacterium tuberculosis inhibits phagocytosis and increases actin polymerization in macrophages*. *Res Microbiol*, 2005. **156**(10): p. 1005-13.
3. Wong, D., et al., *Mycobacterium tuberculosis protein tyrosine phosphatase (PtpA) excludes host vacuolar-H⁺-ATPase to inhibit phagosome acidification*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2011.
4. Grundner, C., J.S. Cox, and T. Alber, *Protein tyrosine phosphatase PtpA is not required for Mycobacterium tuberculosis growth in mice*. *FEMS Microbiol Lett*, 2008. **287**(2): p. 181-4.
5. Zheng, X., K.G. Papavinasasundaram, and Y. Av-Gay, *Novel substrates of Mycobacterium tuberculosis PknH Ser/Thr kinase*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2007. **355**(1): p. 162-8.
6. Cowley, S., et al., *The Mycobacterium tuberculosis protein serine/threonine kinase PknG is linked to cellular glutamate/glutamine levels and is important for growth in vivo*. *Mol Microbiol*, 2004. **52**(6): p. 1691-702.
7. *Glutathione Affinity Handbook*. 2011.
8. Pristic, S., et al., *Extensive phosphorylation with overlapping specificity by Mycobacterium tuberculosis serine/threonine protein kinases*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2010. **107**(16): p. 7521-6.
9. Av-Gay, Y. and M. Everett, *The eukaryotic-like Ser/Thr protein kinases of Mycobacterium tuberculosis*. *Trends Microbiol*, 2000. **8**(5): p. 238-44.
10. O'Hare, H., et al., *A split-protein sensor for studying protein-protein interaction in mycobacteria*. *J Microbiol Methods*, 2008. **73**(2): p. 79-84.
11. Chao, J.D., et al., *Convergence of Ser/Thr and two-component signaling to coordinate expression of the dormancy regulon in Mycobacterium tuberculosis*. *J Biol Chem*, 2010. **285**(38): p. 29239-46.

致谢

时光飞逝，转眼便在西南大学度过了9年的时光。这些年中，我成长了很多，需要感谢的人太多太多，特别是自2007年进入硕士学习以后。

首先要诚挚的感谢我硕士和博士期间的导师谢建平教授。谢老师对我们的培养是多方面的。在做人方面，始终以“志存高远，老实做人，踏实做事”的理念引领我们的成长。而科学方面，谢老师一方面培养我们的全球性视野和理念，科学嗅觉的敏感性。在引领我们实验大方向的前提下，给我们较大的自由空间，锻炼我们对整体实验的设计和把握能力，同时不乏细致的指导。此外，谢老师还为我们提供和创造了很多的锻炼机会，从基本的待人接物到参加国内外学术会议，各种培训等等。特别感谢谢老师让我去参加博士生联合培养项目，把我本应该在本实验工作的时间贡献出来，让我去接受新的学习和培养。在5年的学习中，也经常遇到挫折坎坷，感谢谢老师一直的鼓励和支持，让我坚持走完这段艰苦而又倍感荣幸的历程。

其次要衷心的感谢加拿大英属哥伦比亚大学的Yossef Av-Gay教授。感谢他给以我在其实验室学习的机会。在2011年2月到2012年5月15个月的博士生联合培养期间，Yossef Av-Gay教授对我的实验选题、设计和试验都提供了虚心的指导和帮助，这段学习经历让我受益终身。

感谢西南大学生命科学学院的所有老师在我硕士和博士在读期间对我多方面的帮助。特别感谢罗凌飞老师在我申请硕士转博士期间的帮助。感谢陈亚飞老师，杨蕊老师对我帮助，特别是在国外的学习期间，帮助我办理了很多的手续。

感谢西南大学化学化工学院袁若教授及其课题组的卓颖师姐，袁亚利师妹在电化学免疫传感器实验的设计，讨论和实施中付出的辛苦。

感谢实验室前期的师兄师姐对我的指导和帮助，他们包括廖国建博士、柳云帆博士，师姐何颖、刘雪梅、庞蕾、黄宇琪、杨文秀、刘玉岭、陈长恒、陈宏玲、廖丹，费良润、邓平、郭茹珍、谢春娅，师兄刘申、赵宇中等。

感谢实验室所有成员在我的学习期间对我生活，学习上的帮助。包括同年级的王琳、胡锦涛、吴俊、吴雷婷、龙泉鑫、毋凡。以及实验室的师弟师妹石廷玉、杜庆林、毕继才、滕铁山、樊祥宇、付体伟，贺君丽、张繁、侯曼美、郑斐、周叶欣、陈静、邓万燕、贺黎铭、唐榭梅、曾立容、赵全菊、谢龙祥、张震、洪伟玲、喻晓雯、李春梅、严建龙、毛金校等。很荣幸能与大家一起分享这段学习生活中的快乐。

感谢Yossef Av-Gay实验的Horacio Bach教授、Mary Ko、Dennis Wong博士、Xingji Zhang博士、Anaximandro Gomez Velasco博士、Joseph Chao博士、Valerie Poirier博士、Melissa Richard博士、Anouf Nematallah博士和Bevin McMullin博士等对我在实验中的指导和生活中的帮助。

最后要特别感谢我的家人，亲戚和朋友对我的支持与鼓励。你们是我的后盾，我是你们的延生。

周培富

2012年5月28日

发表论文及参加课题一览表

发表的论文

- 1 Zhou Peifu, Wang Yiwei, Guo Ming, Wang Honghai, Xie Jianping, Daptomycin: putative new mechanisms of action and resistance evolved from transcriptome data mining. *Reviews in Medical Microbiology*. 2009, 20(1):12-18
- 2 PeiFu Zhou, QuanXin Long, YeXin Zhou, HongHai Wang, JianPing Xie, *Mycobacterium tuberculosis Two-Component Systems and Their Implications in Novel Vaccines and Drugs*. *Critical ReviewsTM in Eukaryotic Gene Expression*. 2012, 22(1):37-52
- 3 龙泉鑫, 周培富, 吴宗辉, 王洪海, 谢建平. 微生物药物外排泵及其抑制剂研究. *药学学报*. 2008, 43: 1082-8
- 4 Yexin zhou, Hairong Huang, Peifu Zhou, Jianping Xie, Molecular mechanisms underlying the function diversity of transcriptional factor IclR family. *Cellular Signalling*. 2012, 24(6):1270 - 1275
- 5 Wei He, Cheng Zhi Huang, Yuan Fang Li, Jian Ping Xie, Rong Ge Yang, Pei Fu Zhou, Jian Wang. One-Step Label-Free Optical Genosensing System for Sequence-Specific DNA Related to the Human Immunodeficiency Virus Based on the Measurements of Light Scattering Signals of Gold Nanorods. *Analytical Chemistry*. 2008,80(22): 8424 - 8430

参加的课题

- 国家科技重大专项(批准号: 2012ZX10003-003)
- 国家自然科学基金(批准号: 81071316)
- 重庆市自然科学基金(批准号:CSTC2010BB5002)
- 中央高校基本科研业务费专项(批准号: XDJK2009A003)
- 新世纪优秀人才资助计划
- Canadian Institute of Health Research Operating Grant MOP-106622