

DOI:10.13350/j.cjpb.240613

• 论著 •

结核分枝杆菌潜伏抗原 Rv2628 的生物信息学分析*

王思萌¹, 王文涛¹, 王延霞¹, 张钧泽², 姜吉亮¹, 付玉荣², 李猛^{1**}, 伊正君^{1**}

(1. 山东第二医科大学医学检验学院, 山东潍坊 261053; 2. 山东第二医科大学基础医学院)

【摘要】 目的 运用生物信息学的方法分析结核分枝杆菌潜伏相关蛋白 Rv2628 的结构与功能。 **方法** 自 NCBI 网站获取 Rv2628 蛋白的基本信息; 利用 ProtParam、ProtScale 预测 Rv2628 蛋白的理化性质、亲疏水性; 应用 Signal 6.0 Server、TMHMM Server V. 2.0、NLStradamus、PSORTb 预测 Rv2628 蛋白的信号肽、跨膜区域、核定位信号及亚细胞定位; 使用 NetNGlyc1.0、NetPhos Server v. 3.1 预测 Rv2628 蛋白的糖基化位点及磷酸化位点; 利用 SOPMA 分析 Rv2628 蛋白的二级结构, 使用 SWISS-MODEL 对其进行三级结构同源建模; 使用 ABCpred、SYFPEITHI 预测 Rv2628 蛋白的相关抗原表位; 利用 MEGA 构建 Rv2628 蛋白的分子进化树; 使用 STRING 数据库预测与 Rv2628 蛋白可能发生互作的蛋白; 使用 autodock 实现 Rv2628 蛋白与化合物的分子对接。 **结果** Rv2628 基因全长 363 bp, 由 120 个氨基酸构成, 分子式为 $C_{575}H_{906}N_{178}O_{168}S_4$, 等电点(pI)为 9.09; Rv2628 蛋白亚细胞定位于细胞质, 无跨膜结构、信号肽及糖基化位点, 存在 12 个磷酸化位点, 包括 6 个苏氨酸、5 个丝氨酸和 1 个酪氨酸磷酸化位点; 该蛋白的二级结构以 α -螺旋(41.67%)、无规则卷曲(35.83%)为主; Rv2628 蛋白含有 10 个 B 细胞、6 个 Th 细胞和 6 个 CTL 候选表位, 三级结构同源建模的 GMQE 为 0.72; 苯基香豆素化合物 10 可以稳定的与 Rv2628 蛋白结合并发挥抑制作用; 此外, Rv2628 蛋白可能与 Rv1733c、rip3、hrp1、devR、hspX 等蛋白存在相互作用, 参与结核分枝杆菌潜伏休眠的过程, 诱导 Th1 免疫反应。 **结论** Rv2628 蛋白为亲水性蛋白, 存在多个磷酸化位点并能够与多种蛋白相互作用, 具有高度免疫原性, 包含多个优势 B 细胞、T 细胞抗原表位, 可作为结核病诊断的候选蛋白。

【关键词】 结核分枝杆菌; Rv2628; 潜伏性相关抗原; 生物信息学分析

【文献标识码】 A **【文章编号】** 1673-5234(2024)06-0685-05

[Journal of Pathogen Biology. 2024 Jun.; 19(6): 685-689, 694.]

Bioinformatics analysis of the *Mycobacterium tuberculosis* latency-associated protein Rv2628

WANG Simeng¹, WANG Wentao¹, WANG Yanxia¹, ZHANG Junze², JIANG Jiliang¹, FU Yurong², LIMeng¹, YI Zhengjun¹ (1. School of Medical Laboratory, Shandong second Medical University, Weifang 261053, Shandong, China; 2. School of Basic Medicine Science, Shandong second Medical University)***

【Abstract】 Objective This study aims to analyze the structure and function of Rv2628 protein of *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) using bioinformatics methods. **Methods** Basic information of the Rv2628 protein was retrieved from the NCBI website. ProtParam and ProtScale were employed to predict its physicochemical properties and hydrophobicity. Signal 6.0 Server, TMHMM Server V. 2.0, NLStradamus, and PSORTb were utilized to predict its signal peptide, transmembrane regions, nuclear localization signals, and subcellular localization. NetNGlyc1.0 and NetPhos Server v. 3.1 were employed to predict its glycosylation and phosphorylation sites. SOPMA was used to analyze its secondary structure, while SWISS-MODEL was employed for tertiary structure homology modeling. ABCpred and SYFPEITHI were utilized to predict its relevant antigenic epitopes. MEGA was employed to construct its molecular evolutionary tree. STRING database was used to predict proteins potentially interacting with Rv2628, and autodock was used to implement molecular docking of Rv2628 protein with compounds. **Results** The full length of the Rv2628 gene is 363 bp, encoding 120 amino acids, with a molecular formula of $C_{575}H_{906}N_{178}O_{168}S_4$, and an isoelectric point (pI) of 9.09. This protein is subcellularly localized in the cytoplasm, lacking transmembrane structures, signal peptides and glycosylation sites, and containing 12 phosphorylation sites, including 6 threonine, 5 serine, and 1 tyrosine. Its secondary structure is primarily composed of α -helices (41.67%) and random coils (35.83%). Rv2628 protein contains 10 B cell, 6 Th cell and 6 CTL candidate epitopes. The homology modeling of tertiary structure has a GMQE of 0.72. Compound 10 of benzopyran compounds could stably bind to Rv2628 protein and exert inhibitory effects. Additionally, Rv2628 protein may interact with proteins such as Rv1733c, rip3, hrp1, devR, and hspX, participating in the process of *Mycobacterium tuberculosis* dormancy and in-

* **【基金项目】** 山东省自然科学基金面上项目(No. ZR2022MH024)。

** **【通讯作者】** 伊正君, E-mail: fuyizhengjun@163.com; 李猛, E-mail: 2006limeng@163.com

【作者简介】 王思萌(1999-), 女, 山东淄博人, 硕士, 临床检验诊断学。E-mail: wangsimeng54@163.com

ducing Th1 immune responses. **Conclusion** Rv2628 protein is hydrophilic, containing multiple phosphorylation sites, and capable of interacting with various proteins. It exhibits high immunogenicity, containing multiple dominant B cell and T cell antigenic epitopes. Therefore, Rv2628 protein could be served as a candidate protein for tuberculosis diagnosis.

【Keywords】 *Mycobacterium tuberculosis*; Rv2628; latency-associated antigen; bioinformatics

结核病 (tuberculosis, TB) 是由结核分枝杆菌 (*Mycobacterium tuberculosis*, Mtb) 感染引起, 目前, TB 仍然是全球最为流行的传染病之一^[1]。宿主感染 Mtb 后会进入潜伏性结核感染 (latent tuberculosis infection, LTBI) 状态, 在这种状态下, Mtb 仍然存在于人类宿主体内, 但被宿主免疫系统限制在肉芽肿内, 宿主并不表现出活动性 TB 的临床症状^[2]。据统计, 我国超过 2 亿人为 LTBI 状态, 这其中 5%~10% 的 LTBI 患者将会进展为 TB 患者^[3]。因此, LTBI 的准确诊断对于控制结核病的传播至关重要, 寻找新的 LTBI 相关抗原迫在眉睫。

在 LTBI 期间, Mtb 的 DosR 蛋白被诱导激活, 有助于维持细菌的休眠状态。DosR 调控子已被证明在 Mtb 休眠状态相关的代谢调控中扮演着关键角色^[4]。尽管 DosR 蛋白可以被 T 细胞特异性识别, 但 DosR 调控子产物在人类 Mtb 感染中的确切作用尚不完全明确。潜伏抗原 Rv2628 在 DosR 调控子的调控下, 在缺氧诱导的休眠模型中表达显著上调, Rv2628 通过信号传导促使单核巨噬细胞释放多种炎症因子, 促进 Mtb 休眠。多个研究表明, Rv2628 具有强免疫原性, 易被 LTBI 患者所识别, 这可能有助于区分 TB 与 LTBI^[5]。在本研究中, 我们应用生物信息学方法对 Rv2628 蛋白的结构和功能进行预测分析, 为进一步探究该蛋白作为诊断 TB 与 LTBI 的潜在候选蛋白的可行性提供理论依据。并研究了该蛋白在 LTBI 发病机制中的关键作用, 以期对潜伏期特异性候选疫苗的研发提供参考。

材料与方法

1 基本信息

使用 NCBI 在线网站获得 Rv2628 基因 ID 为 888566, 基因组序列为 NC_000962.3, Rv2628 的蛋白序列为 NP_217144.1。该基因 Mtb (H37Rv 株) 全基因组中的位置是 2955058—2955420, 全长 363 bp, 其中 GC 含量为 63.64%, ATG 为 Rv2628 基因的起始密码子, TAA 为终止密码子。运用 Open Reading Frame Finder 查询其开放阅读框架, 显示 Rv2628 基因包含 5 个开放阅读框。

2 方法

使用 ProtParam 分析 Rv2628 蛋白的理化性质; 通过 ProtScale 预测 Rv2628 蛋白的亲疏水性及可溶

性; 运用 Signal 6.0 Server、TMHMM Server V. 2.0 预测 Rv2628 蛋白是否存在信号肽及跨膜结构; 利用 NLStradamus 预测 Rv2628 蛋白的核定位信号, 通过 PSORTb 进一步分析 Rv2628 蛋白的亚细胞定位情况; 使用 NetNGlyc1.0、NetPhos Server v. 3.1 预测 Rv2628 蛋白是否存在糖基化位点及磷酸化位点; 利用 SOPMA 分析 Rv2628 蛋白的二级结构, 同时通过 SWISS-MODEL 对其进行三级结构同源建模; 应用 ABCpred、SYFPEITHI 预测分析 Rv2628 蛋白的 B 细胞抗原表位、Th 表位及 CTL 表位; 使用 MEGA 构建 Rv2628 蛋白的分子进化树; 查找 STRING 数据库预测与 Rv2628 蛋白可能发生互作的蛋白, 并分析其功能; 使用 autodock 程序进行 Rv2628 蛋白与化合物的分子对接, 预测其之间的稳定性。

结果

1 Rv2628 蛋白的理化性质

通过 ProtParam 预测分析 Rv2628 蛋白的氨基酸序列, 发现该蛋白分子式为 $C_{575}H_{906}N_{178}O_{168}S_4$, 包含 1831 个原子, 由 5 种元素构成 (C、H、N、O、S), 该蛋白的相对分子质量为 $13.12\ 885 \times 10^3$, 其理论等电点 (pI) 为 9.09。该蛋白由 120 个氨基酸构成, 包括 17 种类型, 其中丙氨酸 (Ala) 占 12.5%, 精氨酸 (Arg)、甘氨酸 (Gly) 各占 10.0%, 不含 Phe、Sec、Pyl (图 1)。预测该蛋白的消光系数 (280 nm) 为 31 970, 脂肪族氨基酸指数为 82.17, 不稳定指数为 41.95 (>40), 预测该蛋白为不稳定蛋白。

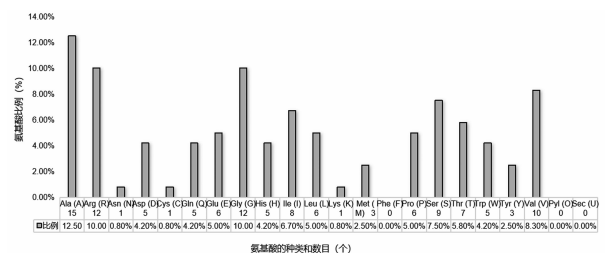


图 1 Rv2628 蛋白的氨基酸构成

Fig. 1 Amino acid composition of the Rv2628 protein

2 Rv2628 蛋白的可溶性及亲疏水性

ProtScale 预测 Rv2628 蛋白单个氨基酸亲水性系数的最大值 (MAX) 为 2.244, 最小值 (MIN) 为 -2.422, 亲水性总平均值 (GRAVY) 为 -0.269, 因此该蛋白为亲水性蛋白。

3 Rv2628 蛋白跨膜区、信号肽及亚细胞定位

Signal6.0 Server 预测 Rv2628 蛋白并不存在信号肽。采用 TMHMM Server v. 2.0 对该蛋白跨膜区域进行分析,共上传 364 个氨基酸残基,发现氨基酸残基的跨膜概率值并未突破阈值线,分析 Rv2628 蛋白无跨膜螺旋区段,不存在跨膜螺旋(TMhelix)。NL-Stradamus 预测结果显示 Rv2628 蛋白无核定位序列(Nuclear localization sequence, NLS),推测该蛋白位于细胞核外,同时利用 PSORTb 预测 Rv2628 蛋白定位在细胞质上的可能性概率较高(7.5),而定位在细胞膜或细胞壁的几率较低(1.15、0.62),故综合分析 Rv2628 蛋白亚细胞定位于细胞质。

4 Rv2628 蛋白糖基化及磷酸化位点

经 NetNGlyc1.0 预测发现 Rv2628 蛋白不存在糖基化位点。NetPhos3.1 预测 Rv2628 蛋白共有 12 个磷酸化位点,分别包括 6 个苏氨酸磷酸化位点,5 个丝氨酸磷酸化位点以及 1 个酪氨酸磷酸化位点(图 3)。

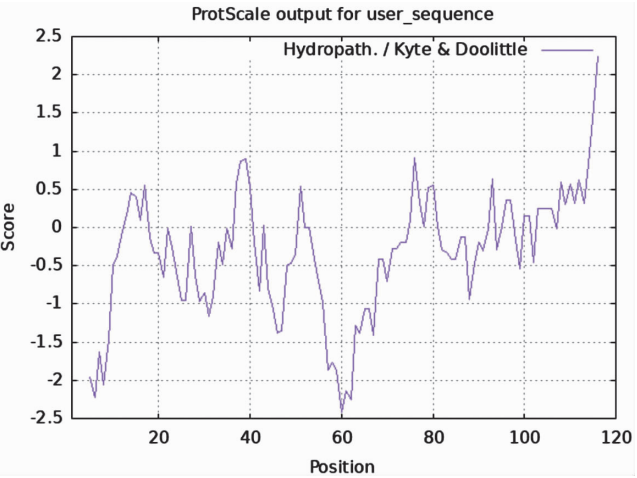


图 2 Rv2628 蛋白的亲疏水性分析
Fig. 2 Hydropilicity analysis of Rv2628 protein

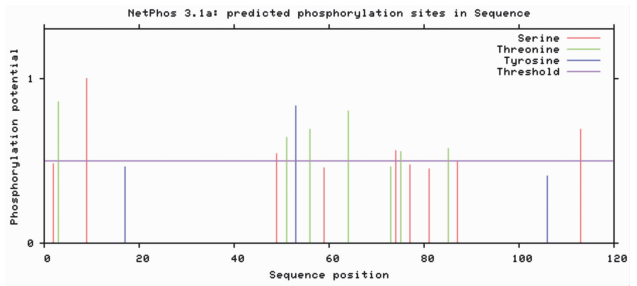
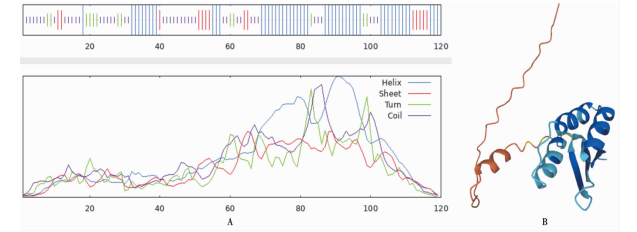


图 3 Rv2628 蛋白的磷酸化位点
Fig. 3 Phosphorylation sites of the Rv2628 protein

5 Rv2628 蛋白的二级结构及三级结构模型

Rv2628 蛋白的二级结构由 50 个 α -螺旋(Hh)、43 个无规则卷曲(Cc)、13 个 β -转角(Tt)构成,分别占总比例的 41.67%、35.83%、10.83%(图 4A)。通过

SWISS-MODEL 预测 Rv2628 蛋白三级结构,选择序列相似度高的模板同源建模,该模型 GMQE 为 0.72,置信度高(图 4B)。



A Rv2628 蛋白的二级结构 B Rv2628 蛋白三级结构同源建模
图 4 Rv2628 蛋白的二级结构与三级结构模型

A Secondary structure of the Rv2628 protein B Modeling of the tertiary structure of the Rv2628 protein
Fig. 4 Secondary and tertiary structure modeling of the Rv2628 protein

6 Rv2628 蛋白 B 细胞、T 细胞抗原表位

ABCpred 预测 Rv2628 蛋白在临界阈值为 0.6 时有 10 个 B 细胞相关抗原表位(表 1)。使用 SYF-PEITHI 预测 Rv2628 蛋白的 T 细胞抗原表位(表 2),选择其中预测分值最高的氨基酸序列作为该蛋白的候选 Th 表位(表 3)。选择 HLA-A * 02:01 进行分析,当临界值为 20 时该蛋白有 6 个 CTL 细胞表位(表 4)。

表 1 Rv2628 蛋白的 B 细胞抗原表位预测
Table 1 Predicted B-cell epitopes of the Rv2628 protein

排名 Rank	表位序列 Epitopes sequence	氨基酸起始位置 The position of amino acid	得分 Score
1	HDGRTARVPGDEITST	60	0.88
2	SGIRAVGPYAWAGRCG	9	0.83
2	GRIGRWGVHQEAMMNL	24	0.83
3	TSTVSGWLSELGTQSP	73	0.82
4	AMMNLAIWHPRKVQSA	35	0.81
5	GPYAWAGRCGRIGRWG	15	0.80
6	IGDWPAAYAIGEHLVS	99	0.79
7	SELGTQSPLADELARA	81	0.78
8	MSTQRPRHSGIRAVGP	1	0.67
9	AYAIGEHLVSVEIAVAV	105	0.61
10	PRKVQSATITQVTDRS	44	0.60

表 2 Rv2628 蛋白的 Th 细胞抗原表位预测信息
Table 2 Predictive information on the Th cell antigenic epitope of the Rv2628 protein

MHC-II 类分子亚型 MHC-II molecular subtypes	SYFPEITHI 表位数(得分) Number of SYFPEITHI table positions
HLA-DRB1 * 0101	23(18-31)
HLA-DRB1 * 0301	5(18-21)
HLA-DRB1 * 0401	17(18-22)
HLA-DRB1 * 0701	7(18-32)
HLA-DRB1 * 1101	7(18-20)
HLA-DRB1 * 1501	13(18-28)

表 3 Rv2628 蛋白的优势候选 Th 表位预测
Table 3 Prediction of the Dominant Candidate Th Epitope of the Rv2628 Protein

表型 phenotype	氨基酸 起始位置 The position of amino acid	表位序列 Epitopes sequence	SYFPEITHI 得分 SYFPEITHI score
HLA-DRB1 * 0701	69	GDEITSTVSGWLSEL	32
	76	VSGWLSELGTQSPLA	27
HLA-DRB1 * 0101	77	SGWLSELGTQSPLAD	31
HLA-DRB1 * 1501	36	MMNLAIWHPRKVQSA	28
	73	TSTVSGWLSELGTQS	28
	96	AVRIGDWPAAAYAIGE	28

表 4 Rv2628 蛋白的 HLA-A * 02:01 限制性 CTL 细胞的
抗原表位预测

Table 4 The epitope prediction of Rv2628 protein in HLA-A * 02:01 restricted CTL cells

排名 Rank	氨基酸起始位置 The position of amino acid	表位序列 Epitopes sequence	得分 Score
1	106	YAIGEHLVS	23
2	75	TVSGWLSEL	22
3	39	LAIWHPRKV	20
4	88	PLADELARA	20
5	89	LADELARAV	20
6	111	HLSVEIAVA	20

7 Rv2628 蛋白系统发育树

将结核分枝杆菌 Rv2628 蛋白与 20 种细菌编码蛋白的氨基酸 FASTA 进行序列比对,构建该蛋白的分子进化树(图 5)。将该蛋白与人类蛋白进行 blast 对比,结果显示无相似序列,因此发生交叉反应概率几乎为零,可以作为结核病候选诊断蛋白或者疫苗潜在靶点。

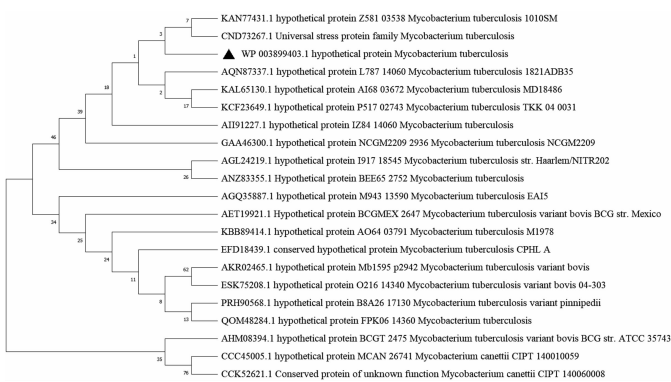


图 5 Rv2628 蛋白的分子进化树
Fig. 5 Molecular evolution tree of Rv2628 protein

8 Rv2628 蛋白的互作蛋白

利用 STRING 预测与 Rv2628 蛋白可能发生互作的蛋白。节点数共 11 个,边数 51 条, Rv2627c、Rv2624c、Rv1733c、rip3、hrp1、ctpF、devR、devS、narX、TB31.7 为 Rv2628 可能的相互作用蛋白(图 6)。Rv2628 蛋白分子功能富集分析提示 Rv2628 蛋白与缺氧反应有关。

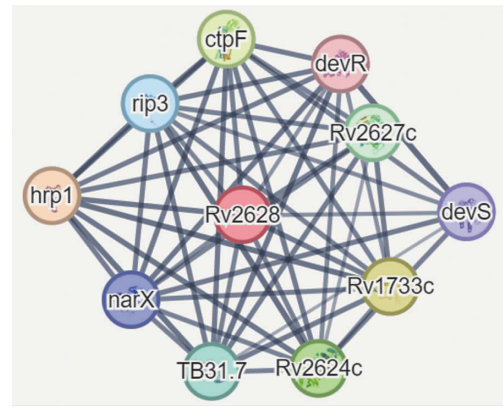


图 6 Rv2628 蛋白互作蛋白预测
Fig. 6 Rv2628 protein interaction protein prediction

9 Rv2628 药物抑制剂筛选及分子对接

通过基于受体的虚拟筛选研究发现,苯基香豆素化合物 10(Phenylcoumarin compound 10)可以在缺氧条件下选择性杀死 Mtb,抑制 DosR 调节基因的表达,阻断 DosR 与启动子 DNA 的结合^[6]。为进一步分析苯基香豆素化合物 10 能否抑制 Rv2628 的活性,通过分子对接技术预测苯基香豆素化合物 10 与模型化 Rv2628 结构之间是否存在相互作用(图 7)。结果显示苯基香豆素化合物 10 和 Rv2628 蛋白结构之间存在良好的稳定性,结合能力强,苯基香豆素化合物 10 与 Rv2628 活性位点发生重要的相互作用,可以抑制 Rv2628 蛋白表达。

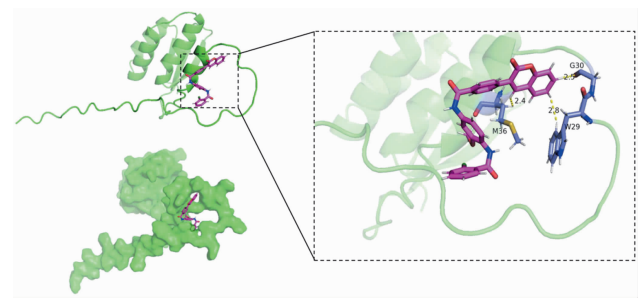


图 7 Rv2628 蛋白与苯基香豆素化合物 10 的分子对接
Fig. 7 Molecular docking of Rv2628 protein with Phenylcoumarin compound 10

讨论

Mtb 是一种引起人类长期感染的胞内寄生菌,主要攻击巨噬细胞。Mtb 的分泌蛋白和免疫原性蛋白在 TB 发病机制中发挥着关键作用^[7]。由于 LTBI 的特异性诊断策略有限,且当前应用的 IFN- γ 释放测定(IGRA)试验无法有效区分 TB 与 LTBI,因此迫切需要寻找新的 LTBI 相关抗原来检测潜伏感染个体^[8]。Rv2628 抗原在 LTBI 人群中具有强免疫原性,能够触发强烈的 IFN- γ^+ T 细胞反应,同时使记忆 T 细胞和其他保护性细胞因子的作用增强,从而诱导强烈的

Th1 型免疫反应和体液反应^[9-10]。本研究通过生物信息学对 Rv2628 蛋白结构与功能进行预测分析,为研究 LTBI 的发病机制、诊断与治疗提供了理论依据。

本研究利用生物信息学方法预测 Rv2628 蛋白的氨基酸总数为 120,分子式为 $C_{575}H_{906}N_{178}O_{168}S_4$,相对分子质量为 $13.12\ 885 \times 10^3$,理论等电点为 9.09。本文分析发现 Rv2628 蛋白为亲水性蛋白,且该蛋白不存在信号肽以及跨膜区,亚细胞定位在细胞质,因此该蛋白为不分泌、非跨膜的细胞质蛋白。 α -螺旋(Hh)和无规则卷曲(Cc)是 Rv2628 蛋白主要的二级结构,分别占 41.67%和 35.83%,表明该蛋白具备良好的抗原特性,提示该蛋白易与抗体嵌合。分子进化树分析 Rv2628 蛋白与 Mtb 1010SM 的假设蛋白 Z58103538 和 Mtb 通用应激蛋白家族具有最大同源性。Rv2628 蛋白有多个磷酸化位点,推测 Rv2628 蛋白可能发挥关键的调控作用,提示其可能参与细胞间的信号转导。

STRING 分析表明 Rv2628 蛋白可能与其他蛋白相互作用,包括 Rv2627c、Rv2624c、Rv1733c、rip3、hrp1、ctpF、devR、devS、narX、TB31.7。其中,Rv1733c 是一种保守的跨膜蛋白,能够刺激巨噬细胞以及外周血单核细胞分泌关键细胞因子,这表明它可能是与 Rv2628 相互作用并传递信号的下游蛋白。此外,Rv2628 蛋白主要存在于细胞质中,STRING 分析结果还显示其与 Rv2031c 和 Rv3133c 之间存在密切的关系。Rv2031c(hspX)是细胞壁定位的蛋白,属于 Mtb 的休眠调节子,在潜伏期表达,并具有多种免疫学作用^[11-12]。Rv3133c 即 DevR/DosR 基因在 Mtb 休眠过程中具有重要作用。因此,Rv2628 极有可能是 Rv3133c 的表达调控蛋白或下游蛋白,参与 Rv3133c 对 Rv2031 的调控路径,抑制毒力因子,并控制细胞壁的形成,实现 Mtb 的休眠。当处于缺氧和高一氧化氮水平的环境下,Mtb 会进入低代谢的休眠状态,DosR 调节 Mtb 对缺氧的初始反应^[13],DosS 和 DosT 基因通过磷酸化激活 DosR,然后诱导 DosR 的脱乙酰化,增加 DosR 与 DNA 的结合能力,促进 DosR 下游靶基因的转录,使 Mtb 能够迅速适应缺氧环境^[14-15]。同时,DosR 还通过调控 tgs1 基因来增加 TAG 的积累,TAG 被认为是 Mtb 休眠及复苏期间的一种可靠、长期的能量来源,其分子质量比其他储存分子(如糖原)更小^[16]。此外,Rv2628 已被证实在对 HEK-TLR2 报告细胞系的刺激中与 TLR2 相互作用。Rv2628 蛋白能够激活外周血人单核细胞,被人类先天免疫识别分子 Toll 样受体(Toll-like receptors,TLR)2 和 4 所识别。这些相互作用导致多种炎症因子的释放,如核因子 κ B(Nuclear factor κ B,NF- κ B)和 TNF- α ,同时促进 NF- κ B p65 的活化。另外,Rv1733c 和 Rv2031 与

TLR2/TLR4 结合,引起细胞内的压力应激,进一步抑制 Mtb 的生长和繁殖,有可能促进 Mtb 的休眠,以抵御人类免疫系统的杀伤^[17-18](图 8)。Rv2628 在缺氧条件下表达显著上调,此时使用苯基香豆素化合物 10 充当 Rv2628 的小分子抑制剂,进一步检测宿主 T 细胞反应情况(IFN- γ 、TNF- α)。如若检测到 IFN- γ 、TNF- α 含量降低,则进一步验证了 Rv2628 在 LTBI 时诱导的促炎反应受到抑制,提示 Rv2628 抗原具有区分 LTBI 和 TB 良好的诊断潜能,且筛选的苯基香豆素化合物 10 作为小分子抑制剂有望成为治疗 LTBI 的新型药物活性化合物。

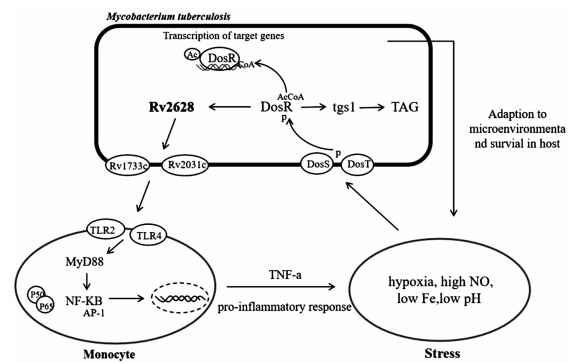


图 8 Rv2628 蛋白参与 Mtb 休眠的过程
Fig. 8 The Rv2628 protein participate in the process of Mtb dormancy

当 Mtb 感染后会使得机体的免疫 T 淋巴细胞致敏,当已致敏的机体再次遭受 Mtb 抗原入侵时,致敏淋巴细胞就会与之结合引起免疫反应,而 LTBI 的诊断正是建立在这种基础之上,因此选择正确的抗原进行评估对于诊断 LTBI 至关重要^[13]。Rv2628 蛋白表现出强烈的免疫原性,特别是在 LTBI 人群中,它能够特异地激活 LTBI 的 T 细胞。相比较其他的 LTBI 相关抗原,Rv2628 蛋白引发的 IFN- γ 水平更高。因此,针对 Rv2628 的 T 细胞反应有望区分 TB 患者和 TB 潜在感染的健康接触者^[19],从而有效区分 LTBI 和 TB。此外,Rv2628 蛋白包含多个抗原表位,可能是 T 和 B 细胞的出色抗原靶点。在 LTBI 受试者中,全血中对 Rv2628 的 IFN- γ 反应相对于近期感染者来说,对远期感染者的特异性更为显著。因此,Rv2628 的免疫反应可能有助于控制 LTBI。基于这些特性,Rv2628 还可能成为增强先天免疫反应的选择性佐剂,同时也是增强获得性免疫反应的潜在疫苗候选物。

【参考文献】

- [1] Koch A, Mizrahi V. *Mycobacterium tuberculosis*[J]. Trends Microbiol, 2018, 26(6): 555-556.
- [2] Jung YEG, Schluger NW. Advances in the diagnosis and treatment of latent tuberculosis infection [J]. Curr Opin Infect Dis, 2020, 33(2): 166-172.

(下转 694 页)

Protein A 进行纯化, 获得了高纯度、高滴度的 TgSUB3 多抗, 为 TgSUB3 的定位及功能研究奠定了基础。

【参考文献】

- [1] Pan M, Lyu C, Zhao J, et al. Sixty years (1957-2017) of research on toxoplasmosis in china-an overview[J]. Front Microbiol, 2017, 8:1825.
- [2] Labesse G, Gelin M, Bessin Y, et al. ROP2 from *Toxoplasma gondii*: a virulence factor with a protein-kinase fold and no enzymatic activity[J]. Structure, 2009, 17(1):139-146.
- [3] Barren AJ, Kirschke H. Cathepsin B, Cathepsin H, and cathepsin L[J]. Methods Enzymol, 1981, 80:535-561.
- [4] Amuthan G, Biswas C, Zhang SY, et al. Mitochondria-to-nucleus stress signaling induces phenotypic changes, tumor progression and cell invasion[J]. EMBO J, 2001, 20(8):1910-1920.
- [5] Guicciardi ME, Deussing J, Miyoshi H, et al. Cathepsin B contributes to TNF- α -mediated hepatocyte apoptosis by promoting mitochondrial release of cytochrome c[J]. J Clin Invest, 2000, 106(9):1127-1137.
- [6] Rawlings ND, O'Brien E, Barrett AJ. MEROPS: the protease database[J]. Nucleic Acids Res, 2002, 30:343-346.
- [7] Blackman MJ, Fujioka H, Stafford WH, et al. A subtilisin-like protein in secretory organelles of *Plasmodium falciparum* merozoites[J]. J Biol Chem, 1998, 273(36):23398-23409.
- [8] Hackett F, Sajid M, Withers-Martinez C, et al. PfSUB-2: a second subtilisin-like protein in *Plasmodium falciparum* merozoites[J]. Mol Biochem Parasitol, 1999, 103(2):183-195.
- [9] Miller SA, Binder EM, Blackman MJ, et al. A conserved subtilisin-like protein TgSUB1 in microneme organelles of *Toxoplasma gondii*[J]. J Biol Chem, 2001, 276(48):45341-45348.

- [10] Miller SA, Thathy V, Ajioka JW, et al. TgSUB2 is a *Toxoplasma gondii* rhoptry organelle processing proteinase[J]. Mol Microbiol, 2003, 49(4):883-894.
- [11] Yba ez RH, Terkawi MA, Kameyama K, et al. Identification of a highly antigenic region of subtilisin-like serine protease 1 for serodiagnosis of *Neospora caninum* infection[J]. Clin Vaccine Immunol, 2013, 20(10):1617-1622.
- [12] Wanyiri JW, Techasintana P, O'Connor RM, et al. Role of CpSUB1, a subtilisin-like protease, in *Cryptosporidium parvum* infection *in vitro*[J]. Eukaryot Cell, 2009, 8(4):470-477.
- [13] Alam A, Bhatnagar RK, Chauhan VS. Expression and characterization of catalytic domain of *Plasmodium falciparum* subtilisin-like protease 3[J]. Mol Biochem Parasitol, 2012, 183(1):84-89.
- [14] 魏冬冬, 王龙江, 李瑾, 等. 弓形虫 TgMIC16 多克隆抗体制备、纯化及其在亚细胞定位中的应用[J]. 中国血吸虫病防治杂志, 2018, 30(4):440-442.
- [15] Jameson BA, Wolf H. The antigenic index: a novel algorithm for predicting antigenic determinants [J]. Computer Appl Biosci, 1988, 4(1):181-186.
- [16] 郑斌, 尹志奎. 刚地弓形虫类枯草杆菌蛋白酶的研究进展[J]. 中国人兽共患病学报, 2014, 30(1):93-97.
- [17] Zheng JF, Ge L. Diverse cellular strategies for the export of leaderless proteins[J]. Nat Sci Open, 2022, 1(3):20220018.
- [18] Lagal V, Binder EM, Huynh MH, et al. *Toxoplasma gondii* protease TgSUB1 is required for cell surface processing of micronemal adhesive complexes and efficient adhesion of tachyzoites[J]. Cell Microbiol, 2010, 12(12):1792-1808.

【收稿日期】 2023-12-20 【修回日期】 2024-03-03

(上接 689 页)

- [3] Boom WH, Schaible UE, Achkar JM. The knowns and unknowns of latent *Mycobacterium tuberculosis* infection [J]. J Clin Invest, 2021, 131(3):e136222.
- [4] Kundu M, Basu J. Applications of transcriptomics and proteomics for understanding dormancy and resuscitation in *Mycobacterium tuberculosis*[J]. Front Microbiol, 2021, 12:642487.
- [5] Meier NR, Jacobsen M, Ottenhoff THM, et al. A systematic review on novel *Mycobacterium tuberculosis* antigens and their discriminatory potential for the diagnosis of latent and active tuberculosis [J]. Front Immunol, 2018, 9:2476.
- [6] Zheng H, Abramovitch RB. Inhibiting DosRST as a new approach to tuberculosis therapy [J]. Future Med Chem, 2020, 12(5):457-467.
- [7] Valizadeh A, Imani Fooladi AA, Sedighian H, et al. Evaluating the performance of PPE44, HSPX, ESAT-6 and CFP-10 factors in tuberculosis subunit vaccines [J]. Curr Microbiol, 2022, 79(9):260.
- [8] Adankwah E, Nausch N, Minadzi D, et al. Interleukin-6 and *Mycobacterium tuberculosis* dormancy antigens improve diagnosis of tuberculosis [J]. J Infect, 2021, 82(2):245-252.
- [9] Pandey K, Singh S, Bhatt P, et al. DosR proteins of *Mycobacterium tuberculosis* upregulate effector T cells and down regulate T regulatory cells in TB patients and their healthy contacts [J]. Microb Pathog, 2019, 126:399-406.
- [10] Coppola M, Villar-Hernandez R, Van Meijgaarden KE, et al. Cell-mediated immune responses to *in vivo*-expressed and stage-specific *Mycobacterium tuberculosis* antigens in latent and active tuberculosis across different age groups [J]. Front Immunol, 2020, 11:103.
- [11] Zhang C, Yang L, Zhao N, et al. Insights into macrophage auto-

phagy in latent tuberculosis infection: Role of heat shock protein 16.3[J]. DNA Cell Biol, 2018, 37(5):442-448.

- [12] 马锐, 马金花, 杨壤, 等. 结核分枝杆菌休眠相关蛋白 HspX 的生物信息学分析、制备及对大肠埃希菌生长抑制探究[J]. 中国病原生物学杂志, 2023, 18(5):529-535.
- [13] Carranza C, Pedraza-Sanchez S, De Oyarzabal-Mendez E, et al. Diagnosis for latent tuberculosis infection: new alternatives [J]. Front Immunol, 2020, 11:2006.
- [14] Yang H, Sha W, Liu Z, et al. Lysine acetylation of DosR regulates the hypoxia response of *Mycobacterium tuberculosis*[J]. Emerg Microbes Infect, 2018, 7(1):34.
- [15] Veatch AV, Kaushal D. Opening pandora's box: Mechanisms of *Mycobacterium tuberculosis* resuscitation [J]. Trends Microbiol, 2018, 26(2):145-157.
- [16] Maurya RK, Bharti S, Krishnan MY. Triacylglycerols: Fuelling the hibernating *Mycobacterium tuberculosis*[J]. Front Cell Infect Microbiol, 2019, 8:450.
- [17] Bhatt P, Sharma M, Prakash Sharma P, et al. *Mycobacterium tuberculosis* dormancy regulon proteins Rv2627c and Rv2628 as Toll like receptor agonist and as potential adjuvant [J]. Int Immunopharmacol, 2022, 112:109238.
- [18] Rajpoot S, Wary KK, Ibbott R, et al. TIRAP in the mechanism of inflammation [J]. Front Immunol, 2021, 12:697588.
- [19] Adankwah E, Lundtoft C, Guler A, et al. Two-hit *in vitro* T-cell stimulation detects *Mycobacterium tuberculosis* infection in quantiferon negative tuberculosis patients and healthy contacts from ghana [J]. Front Immunol, 2019, 10:1518.

【收稿日期】 2023-12-18 【修回日期】 2024-03-06