

• 论 著 • DOI:10. 3969/j. issn. 1672-9455. 2018. 15. 009

结核分枝杆菌休眠存活调节子蛋白 Rv2029c 促进大肠埃希菌生长

王永祥¹, 张本忠¹, 吴 聪¹, 李豪杰¹, 何文华¹, 高小玲^{2△}

(1. 兰州大学公共卫生学院, 兰州 730000; 2. 甘肃省人民医院转化医学研究所, 兰州 730000)

摘 要:目的 探讨结核分枝杆菌休眠存活调节子(DosR)蛋白 Rv2029c 对大肠埃希菌生长的影响,以探索其生物学功能。方法 根据 GenBank 中结核分枝杆菌 H37Rv 基因组核酸序列,设计 Rv2029c 特异性引物,采用原核表达的技术构建 pET30a-Rv2029c 重组质粒,并导入大肠埃希菌中进行表达。通过基因测序结果,确定正确质粒,将质粒负载大肠埃希菌,测定大肠埃希菌模式并绘制生长曲线。结果 由于缺乏营养物质和氧气,空质粒组大肠埃希菌在 6 h 进入平台期,而携带有 pET30a-Rv2029c 的重组质粒能够促进大肠埃希菌突破生长界限,维持快速对数生长期长达 10 h。结论 结核 DosR 蛋白 Rv2029c 能够促进大肠埃希菌生长,突破其生长界限,提高细菌应对低氧、营养物质缺乏等应激环境的能力,这可能与其在低氧环境下促进细菌的糖酵解能力有关。

关键词:结核分枝杆菌; 休眠存活调节子蛋白; Rv2029c; 大肠埃希菌

中图分类号:R446.5

文献标志码:A

文章编号:1672-9455(2018)15-2221-04

Dormancy survival regulator protein Rv2029c of Mycobacterium tuberculosis promotes the growth of Escherichia coli

WANG Yongxiang¹, ZHANG Benzong¹, WU Cong¹, LI Haojie¹, HE Wenhua¹, GAO Xiaoling^{2△}

(1. School of Public Health, Lanzhou University, Lanzhou, Gansu 730000, China;

2. Institute of Translational Medicine, Gansu Provincial Hospital, Lanzhou, Gansu 730000, China)

Abstract:Objective To investigate the effect of dormancy survival regulator (DosR) protein Rv2029c on the growth of Escherichia coli, so as to explore its biological function. **Methods** Based on the Rv2029c specific primer, designed according to the genomic DNA sequence of Mycobacterium tuberculosis H37Rv in GenBank, the recombinant plasmid of pET30a-Rv2029c was constructed by prokaryotic expression technique and expressed in Escherichia coli. The growth characteristic of Escherichia coli treated with pET30a-Rv2029c was studied. **Results** After 6 hours in culture medium, Escherichia coli reached the platform phase due to the lack of nutrients and oxygen. However, the Escherichia coli carried pET30a-Rv2029c stayed at logarithmic phase as long as 10 hours. **Conclusion** Rv2029c could promote the growth of Escherichia coli and break the boundaries of growth, Rv2029c could help bacteria to deal with stress, which might related to its ability to promote glycolysis in the hypoxic environment.

Key words: mycobacterium tuberculosis; dormancy survival regulator; Rv2029c; escherichia coli

据 WHO 估计,全球约有 1/3 的人口是结核分枝杆菌潜伏感染患者,其中有 5%~10% 的人会发展成活动性肺结核^[1-2]。潜伏期结核分枝杆菌存在于肉芽肿组织中,这是一种低氧、高一氧化氮、营养物质匮乏的微环境^[3]。结核分枝杆菌在此环境中处于休眠期,生长速度非常缓慢,也正是因为如此,结核分枝杆菌逃避了机体免疫系统的作用,从而存活下来^[4-5]。进一步的研究发现,结核分枝杆菌基因组存在着一组包含 48 个基因的休眠存活调节子(DosR),这 48 个基因编码的蛋白控制着结核潜伏期的生理过程^[6]。肉芽肿组织中的结核分枝杆菌存在着依赖氧压的细胞和生化动力学机制,能够使其快速适应微环境改变的能力,在此过程中结核分枝杆菌 DsoR 基因起着至关重

要的作用^[7-8]。与活动期结核分枝杆菌相比,DosR 区域编码的抗原能够引起潜伏期结核患者产生更强烈的免疫反应^[9],这表明 DosR 基因很可能在潜伏期特异性表达。有研究报道,DosR 基因编码的许多蛋白有助于结核分枝杆菌利用其他碳源途径获得能量,如乙醛酸代谢、硝基还原和脂肪酸代谢等^[10-11]。探索 DosR 基因生物学功能有助于进一步认识结核分枝杆菌潜伏期的生理调控过程,从而有针对性地进行检测,实现早发现、早诊断、早治疗的目的,对于预防活动性结核的发生至关重要。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂 本实验试剂结核分枝杆菌 H37Rv 株,载体 pET30a 由本实验室保存。大肠埃希菌 BL21

(DE3)感受态细胞购自南京诺唯赞公司;质粒提取试剂盒购自北京天恩泽公司;胶回收试剂盒购自 Zymo 公司;各种限制性内切酶购自 Thermo 公司;DNA 聚合酶和连接酶购自 TaKaRa 公司;异丙基硫代- β -D-半乳糖苷 (IPTG) 购自 Sigma 公司。美国 Biorad 酶标仪。

1.2 方法

1.2.1 结核分枝杆菌 DNA 的提取

结核分枝杆菌 DNA 的提取依据已报道的文献进行^[12]。具体方法如下:挑取结核分枝杆菌菌落,置于装有 200 μ L 生理盐水的 1.5 mL 离心管中,80 $^{\circ}$ C 煮沸灭活 30 min,12 000 r/min 离心 15 min 后,加入蛋白酶 K 和溶菌酶充分裂解结核分枝杆菌,然后用酚-氯仿抽提法获取结核分枝杆菌基因组,无水乙醇沉淀双链 DNA,干燥后 TE 缓冲液(50 μ L)溶解 DNA。

1.2.2 引物设计

在 DBGET 数据库中查找结核基因 Rv2029c 的全基因序列,然后采用 Primer5.0 和 Oligo6.0 设计 Rv2029c 特异性引物序列,上下游分别插入 EcoR I 和 Hind III 酶切位点。设计的引物序列为上游引物 Rv2029F:CGG AAT CCA TGA CGG AGC CAG CGG CGT,其中 CG 是保护性碱基,GAA TCC 是 EcoR I 酶切位点;下游引物 Rv2029R:CCC AAG CTT TCA TGG CGA GGC TTC CGG GTT,其中 CCC 是保护性碱基,AAGCTT 是 Hind III 酶切位点。

1.2.3 纯化目的基因

采用聚合酶链式反应(PCR)的方法对目的基因进行扩增,扩增条件:98 $^{\circ}$ C 变性 10 s,55 $^{\circ}$ C 退火 5 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 80 s,共扩增 35 个循环。扩增后的目的基因利用胶回收试剂盒(美国 Zymo 公司胶回收试剂盒,D4007)进行纯化和浓缩。具体方法如下:首先在琼脂糖凝胶上准确切取目的基因片段,然后加入凝胶溶解液,37~55 $^{\circ}$ C 孵育融化 5~10 min 后,过柱离心吸附,加 Washing buffer 洗涤 2 次后,用 10~20 μ L TE 缓冲液洗脱即可。

1.2.4 重组质粒的构建

重组质粒 pET30a-Rv2029c 的构建依据文献^[12],主要概述如下:用限制性内切酶 EcoR I 和 Hind III 对目的基因和载体 pET30a 进行双酶切,然后经 1.2% 的琼脂糖凝胶电泳后切胶回收。目的基因和载体按 3:1 的比例,在 DNA 连接酶的作用下,16 $^{\circ}$ C 过夜连接。连接后的目的基因,导入到大肠埃希菌感受态(BL21)细胞中,4 $^{\circ}$ C 水浴 30 min 后,42 $^{\circ}$ C 准确热激 45 s 后,加入无抗菌药物的 LB 培养液后,细菌复苏 45 min,然后将细菌均匀涂到含卡那霉素(50 μ g/mL)的 LB 固体培养皿中,37 $^{\circ}$ C 过夜后挑取阳性单克隆菌落并提取质粒(北京天恩泽公司质粒提取试剂盒,60205),双酶切(EcoR I 和 Hind III)鉴定后送南京金斯瑞公司进行测序分析。

1.2.5 重组质粒 pET30a-Rv2029c 促生长作用研究

大肠埃希菌 BL21 是一种常用的基因工程表达菌

株,其生长分为迟缓期、对数期、平台期和衰亡期。迟缓期大肠埃希菌适应新的环境,因此生长速度很慢,对数期营养物质充分,细菌呈对数增长,随着培养基中营养物质的不断消耗,大肠埃希菌代谢产物不断积累,培养基 pH 逐渐下降,大肠埃希菌生长速度变慢,细菌总数趋于稳定。大肠埃希菌的平台期与结核分枝杆菌的肉芽肿微环境相似,对细菌的生长都是一种不利的环境,以此模拟肉芽肿微环境,将结核 DosR 蛋白导入大肠埃希菌 BL21 中,观察对其生长有无影响。

取出保存的 pET30a 大肠埃希菌(空质粒组)和 pET30a-Rv2029c 大肠埃希菌(重组质粒组),在含 50 μ g/mL 卡那霉素的 5 mL LB 培养液中 37 $^{\circ}$ C 振荡培养过夜,记录吸光度(OD)600 值。然后将菌液调整至相同的 OD 值并吸取 600 μ L 菌液加至 300 mL LB 培养基中(含 50 μ g/mL 卡那霉素),37 $^{\circ}$ C 300 r/min 振荡培养,每隔 1 h 取 600 μ L 菌液,检测 OD 值(每次测 3 组 OD 值,每组测 200 μ L)。在第 5 个小时当 2 组大肠埃希菌 OD 值为 0.45 时,加入诱导剂异丙基硫代半乳糖苷(IPTG)(500 mmol/L),之后继续每隔 1 h 取 600 μ L 菌液测 OD 值,如此连续重复测量 15 h。在相同条件(相同菌种,相同生长和测量条件)下重复该实验 3 次。

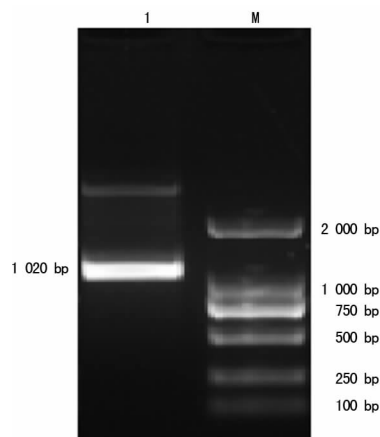
1.3 统计学处理

采用 SPSS22.0 对 1.6 实验结果进行定量数据重复测量的方差分析及 *t* 检验,比较空质粒组与重组质粒组对大肠埃希菌 OD 值是否产生影响,并作出生长曲线图。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Rv2029c 基因扩增结果

以提取的结核基因组为模板,在设计好的引物作用下,行 PCR 扩增。PCR 成功扩出 Rv2029c DNA,大小 1 020 bp。见图 1。



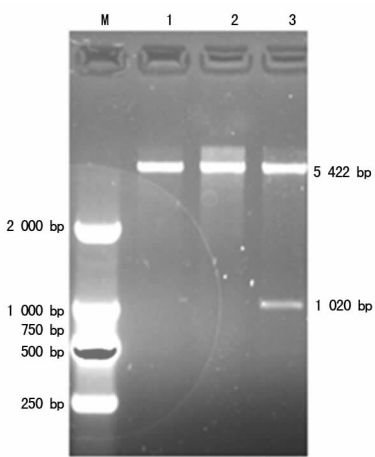
注:1 为基因 Rv2029c;M 为 DNA2000 标记物

图 1 结核 DosR 基因 Rv2029c PCR 结果

2.2 pET30a-Rv2029c 重组质粒的构建与鉴定

将挑取的单克隆菌用 EcoR I 和 Hind III 进行双酶切,酶切鉴定发现,阳性重组质粒能切出 2 条基因片段,分别为质粒 pET30a (5 422 bp) 和插入的目的基因

Rv2029c(1 020 bp)。与连接片段大小吻合,可初步认为 pET30a-Rv2029c 构建成功。见图 2。



注:M 为 DNA 标记物;1~2 为阴性质粒;3 为阳性质粒 pET30a-Rv2029c

图 2 pET30a-Rv2029c 重组质粒酶切鉴定结果

2.3 基因测序结果和 GenBank 序列比对 将酶切鉴定成功的重组质粒送往南京金斯瑞公司进行测序,测

序结果与 GenBank 所给序列进行 Blast。基因 Rv2029c 与 GenBank 中所给序列完全吻合,重复率 100%,基因无突变。

2.4 pET30a-Rv2029c 促大肠埃希菌生长的统计学分析 将 3 次测量获得的资料进行重复测量的方差分析,结果显示 sum 值观察时间效应:不同时间 OD 值差异有统计学意义($F=8\,351.248, P<0.05$),空质粒组(pET30a)和重组质粒组(pET30a-Rv2029c)不同时间 OD 值差异均有统计学意义($F=3\,593.681, 4\,125.791, P<0.05$)。sum 值观察处理因素效应,重组质粒组(pET30a-Rv2029c)OD 值高于空质粒组(pET30a)($t=4\,416.54, P<0.05$)。从各时间点来看,0~5 h 空质粒组和重组质粒组(pET30a-Rv2029c)OD 值差异无统计学意义($t=1.372, 1.220, 0.894, 0.935, 0.787, 0.395, P>0.05$),6~15 h 由于加入 IPTG 诱导了蛋白 Rv2029c 的表达,OD 值差异有统计学意义($P<0.05$);生长时间和处理因素存在交互效应($F=767.049, P<0.05$)。见表 1。

表 1 0~15 h 导入 Rv2029c 对大肠埃希菌 OD 值的影响

组别		生长时间(h)									
		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
空质粒组	$\bar{x}$	0.003	0.003	0.005	0.018	0.102	0.444	0.571	0.584	0.595	0.599
	s	0.000	0.000	0.000	0.001	0.001	0.019	0.037	0.007	0.008	0.013
重组质粒组	$\bar{x}$	0.003	0.003	0.005	0.018	0.101	0.448	0.698	0.805	0.890	0.959
	s	0.000	0.000	0.000	0.001	0.005	0.023	0.019	0.022	0.016	0.017
sum	$\bar{x}$	0.003	0.003	0.005	0.018	0.101	0.446	0.634	0.694	0.742	0.778
	s	0.000	0.000	0.000	0.001	0.003	0.020	0.071	0.114	0.152	0.186
t		1.372	1.220	0.894	0.935	0.787	0.395	9.056	27.956	47.652	50.152
P		0.195	0.241	0.385	0.364	0.453	0.698	0.000	0.000	0.000	0.000

组别		生长时间(h)							F	P
		10	11	12	13	14	15	sum		
空质粒组	$\bar{x}$	0.605	0.608	0.616	0.610	0.608	0.618	0.411	3 593.681	0.000
	s	0.018	0.007	0.010	0.011	0.014	0.011	0.272		
重组质粒组	$\bar{x}$	1.015	1.057	1.097	1.103	1.164	1.159	0.658	4 125.791	0.000
	s	0.023	0.017	0.027	0.026	0.056	0.022	0.476		
sum	$\bar{x}$	0.809	0.832	0.856	0.856	0.885	0.889	0.534 *	8 351.248*	0.000*
	s	0.212	0.231	0.248	0.254	0.289	0.279	0.371 *		
t		42.664	70.736	49.077	51.358	28.815	66.182	4 416.540 *		
P		0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000 *		

注: $\bar{x}$ 为每个时间点 OD 值的平均值; s 为每个时间点 OD 值标准差;sum 为时间和处理因素主效应值(均数及标准差);* 为主效应的 F 和 P 值;交互相应 $F=767.049, P=0.000$

2.5 pET30a-Rv2029c 促大肠埃希菌生长曲线 以生长时间为横坐标,OD 值为纵坐标,绘制出大肠埃希菌生长曲线见图 3。在 5 h 时(此时 OD 值约为 0.45)加入 IPTG,空质粒组(pET30a)大肠埃希菌在 6 h 进

入平台期,而重组质粒组(pET30a-Rv2029c)却能继续维持对数期达 10 h 左右,并且突破大肠埃希菌的生长界限,使大肠埃希菌的 OD 值达到 1.16 左右才进入平台期,若以 OD 值反映大肠埃希菌数量,则重组质

粒(pET30a-Rv2029c)能促使大肠埃希菌生长量提高 1 倍。

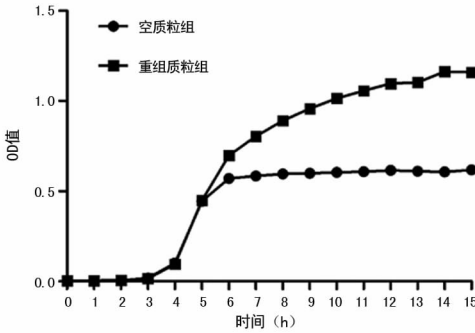


图 3 蛋白 Rv2029c 促大肠埃希菌生长曲线

3 讨 论

本实验发现导入了重组质粒 pET30a-Rv2029c 的大肠埃希菌与不导入该基因的大肠埃希菌相比,存在着某种机制使大肠埃希菌能够在低氧、营养物质匮乏的环境下继续维持在对数生长期,增强了大肠埃希菌抵抗应激环境的能力,增加了大肠埃希菌的数量。Rv2029c 蛋白在 Mg^{2+} 和 ATP 的参与下催化 6 磷酸果糖形成 2,6 二磷酸果糖,因此在糖代谢中起着重要作用。含有重组质粒 pET30a-Rv2029c 的大肠埃希菌可能通过 Rv2029c 蛋白,调节营养物质的供给,提高了对抗低氧环境,增加了利用糖酵解的能力,与不含 Rv2029c 的大肠埃希菌相比突破了糖代谢和糖利用的上限,促进了大肠埃希菌的生长。

结核分枝杆菌的肉芽肿环境同大肠埃希菌平台期环境相似,都存在营养物质匮乏、低氧、代谢产物增加等对细菌生存不利的因素,依此推断,结核分枝杆菌蛋白 Rv2029c 可能在肉芽肿环境组织中起到重要的维持细菌存活的作用。结核分枝杆菌在潜伏期为适应肉芽肿的微环境,一方面需要减少自身代谢活动从而进入休眠期,KUMAR 等^[13]对 DosR 蛋白中的 Rv0079(休眠相关翻译抑制子 DATIN)的研究证实了这一点,发现此蛋白抑制了大肠埃希菌的生长,这是因为该蛋白与核糖体 30S 亚基结合从而阻断了蛋白合成中的翻译过程,降低了细菌的繁殖速度,使其进入休眠期。另一方面结核分枝杆菌可能需要最大限度利用环境中营养物质、氧气等满足自身生存基本需求,本文研究的结果支持了这一点,生物信息学分析表明蛋白 Rv2029c 为 6-磷酸果糖激酶 2,此蛋白属于 pfkB 糖激酶超家族,是糖代谢的一种重要信号酶,通过影响 2,6 二磷酸果糖的水平实现对糖酵解通路的调节,增强了结核分枝杆菌在肉芽肿环境中最大程度利用氧气和营养物质的能力,维持结核分枝杆菌生存基本需求。进一步研究该蛋白促进细菌糖酵解的具体机制是下一步研究的方向。

参考文献

[1] FINE P E. Variation in protection by BCG; implications of and for heterologous immunity [J]. Lancet, 1995, 346 (8986):1339-1345.

[2] OTTENHOFF T H M, KAUFMANN S H E. Vaccines against tuberculosis; where are we and where do we need to go? [J]. Plos Pathogens, 2012, 8(5):e1002607.

[3] FORRELLAD M A, KLEPP L I, GIOFFRÉ A, et al. Virulence factors of the Mycobacterium tuberculosis complex [J]. Virulence, 2013, 4(1):3.

[4] HARRIES A D, DYE C. Mycobacterium tuberculosis [J]. J Immunol Res, 2015, 2015(6):539-540.

[5] WAYNE L G, SOHASKEY C D. Nonreplicating persistence of mycobacterium tuberculosis 1 [J]. Annual Rev Microbiol, 2001, 55(1):139.

[6] PEDDIREDDY V, DODDAM S N, QURESHI I A, et al. A putative nitroreductase from the DosR regulon of Mycobacterium tuberculosis induces pro-inflammatory cytokine expression via TLR2 signaling pathway [J]. Sci Rep, 2016, 6(24535):24535.

[7] GUIRADO E, MBAWUIKE U, KEISER T L, et al. Characterization of host and microbial determinants in individuals with latent tuberculosis infection using a human granuloma model [J]. Mbio, 2015, 6(1):e02537.

[8] WATANABE S, ZIMMERMANN M, GOODWIN M B, et al. Fumarate reductase activity maintains an energized membrane in anaerobic mycobacterium tuberculosis [J]. Plos Pathogens, 2011, 7(10):e1002287.

[9] EM L, MY L, KL F, et al. Human T-cell responses to 25 novel antigens encoded by genes of the dormancy regulon of Mycobacterium tuberculosis [J]. Microbes Infect, 2006, 8(8):2052.

[10] VOSKUIL M I, SCHNAPPINGER D, VISCONTI K C, et al. Inhibition of respiration by nitric oxide induces a Mycobacterium tuberculosis dormancy program [J]. J Experim Med, 2003, 198(5):705-713.

[11] WAYNE L G, LIN K Y. Glyoxylate metabolism and adaptation of Mycobacterium tuberculosis to survival under anaerobic conditions [J]. Infect Immun, 1982, 37(3):1042-1049.

[12] 杨明. 原核表达的结核分枝杆菌 H-(37)RV 株重组 ES-AT-6 和 CFP-10 蛋白的功能分析 [D]. 长春: 吉林大学, 2009.

[13] KUMAR A, MAJID M, KUNISCH R, et al. Mycobacterium tuberculosis DosR regulon gene Rv0079 encodes a putative, 'dormancy associated translation inhibitor (DATIN)' [J]. Plos One, 2012, 7(6):e38709.