

文章编号:2095-7386(2019)04-0017-05

DOI:10.3969/j.issn.2095-7386.2019.04.004

# 结核分枝杆菌 RodA 蛋白结构特征的生物信息学分析

郑辉<sup>1</sup>, 王华林<sup>1</sup>, 李娜<sup>1</sup>, 张露<sup>1</sup>, 周放<sup>1</sup>, 余晓丽<sup>1</sup>, 刘婷<sup>2</sup>

(1. 武汉轻工大学 生物与制药工程学院, 湖北 武汉 430023; 2. 武汉市医疗救助中心, 湖北 武汉 430023)

**摘要:**运用生物信息学软件分析及预测结核分枝杆菌 *Rv0017c* 基因编码蛋白 RodA 的结构与功能。采用 NCBI、ExPASy、PSORTb 等在线工具分析结核分枝杆菌 *Rv0017c* 的基因信息, 分析其保守域、理化性质和亚细胞定位; 利用 SOPMA、Vaxijen v2.0 等软件预测 RodA 蛋白的二、三级结构和抗原性。结果表明: *Rv0017c* 基因全长 1 410 bp, 编码 469 个氨基酸, 分子量为 50 610.83, 蛋白序列具有高度的保守性。RodA 的二级结构中,  $\alpha$  螺旋所占比例最多, 其次是 C 无规卷曲结构, 而  $\beta$  折叠相对占比很少。RodA 并非 MTB 发挥毒力效应的蛋白因子, 但具有较高的抗原性。结论为 RodA 蛋白序列保守稳定, 在结核菌的膜壁形成中发挥巨大作用, 且具有较高的抗原性, 可作为治疗耐药结核的新靶标。

**关键词:**结核分枝杆菌; RodA; 蛋白结构; 抗原性

**中图分类号:**R 378.911

**文献标识码:**A

## Bioinformatics analysis of physicochemical properties and structural characteristics of *Mycobacterium tuberculosis* RodA

ZHENG Hui<sup>1</sup>, WANG Hua-lin<sup>1</sup>, LI Na<sup>1</sup>, ZHANG Lu<sup>1</sup>, ZHOU Fang<sup>1</sup>, YU Xiao-li<sup>1</sup>, LIU Ting<sup>2</sup>

(1. School of Biology and Pharmaceutical Engineering, Wuhan Polytechnic University, Wuhan 430023, China; 2. Wuhan Medical Treatment Center, Wuhan 430023, China)

**Abstract:** Using bioinformatic software to analyze and predict the structure and function of *Mycobacterium tuberculosis* RodA. Analysis of the genetic information, homology, conservative domain, physical and chemical properties and subcellular localization of *Mycobacterium tuberculosis* RodA were accomplished using NCBI, ExPASy and PSORTb. SOPMA, Vaxijen v2.0 and other softwares were used to predict the secondary and tertiary structure and antigenicity of RodA. Data showed that the total length of gene *Rv0017c* was 1410bp, encoding 469 amino acids, and the molecular weight was 50 610.83. The similarity of the protein sequence to the *Mycobacterium tuberculosis* complex was more than 99%, which was highly homologous and conservative. Moreover, the secondary structure of RodA has the largest proportion of  $\alpha$ -helix, followed by the C random coil structure, while the relative proportion of  $\beta$ -sheet is very small. In addition, RodA is not a protein factor that exerts a virulence effect in MTB, but has a high antigenicity. The RodA protein sequence is conservative and stable, and plays an important role in the formation of the membrane wall of the tuberculous bacterium, and has a high antigenicity, which can be used as a new target for the treatment of drug-resistant tuberculosis.

收稿日期:2019-06-22.

作者简介:郑辉(1994-),男,硕士研究生,E-mail:freezh360@163.com.

通信作者:刘婷(1977-),女,主管技师,E-mail:534629003@qq.com.

**Key words:** *Mycobacterium tuberculosis*; RodA; protein characteristics; antigenicity

## 1 引言

世界卫生组织(WHO)2018 年结核病的报告显示<sup>[1]</sup>,2017 年全球的结核病潜伏感染人群约为 17 亿,潜伏感染率为 23%。尽管全球在结核病防治工作方面取得了巨大的进步,但结核病疫情仍然较为严重,包括中国在内,许多亚非拉国家是结核病的重灾区<sup>[2-3]</sup>。传统的抗结核药物包括链霉素、异烟肼等抗结核药物的使用已经超过半个世纪<sup>[4]</sup>,而新药极其稀缺;多药耐药和广泛耐药结核分枝杆菌的出现使全球抗结核的形势日益严峻<sup>[5-6]</sup>。在抗结核分枝杆菌新药的研究过程中,通过破解结核分枝杆菌在宿主中的生存机制,是预测抗结核分枝杆菌新的药物靶点最常用的手段<sup>[7]</sup>。因此,有必要研究结核分枝杆菌所分泌的蛋白质等组分的生物学性质应用于抗结核病新药的研究之中。

结核分枝杆菌 *Rv0017c* 所编码的细胞分裂蛋白 RodA(cell division protein RodA)是青霉素结合蛋白家族 PBP(penicillin-binding protein family)的重要成员,其能通过调控聚糖合成酶 PBP2 的活性,进而影响细菌细胞壁的主要成分——肽聚糖的合成<sup>[8-9]</sup>。同时,RodA 参与原核细胞骨架体系的形成<sup>[8]</sup>,在维持细胞形态、分裂过程中发挥重要作用<sup>[10-11]</sup>。因而,RodA 可作为潜在的抗结核药物靶点用于新药的研究。在本文中,利用生物信息学对 MTB RodA 基因进行分析,了解其编码蛋白特性,为蛋白 RodA 作为潜在的结核病药物靶点用于抗结核研究提供理论依据。

## 2 材料与方法

### 2.1 材料

登陆美国国家生物技术信息中心(National Center for Biotechnology Information, NCBI)网站,从 GenBank 数据库中获取 MTB H37Rv RodA (*Rv0017c*)基因序列以及氨基酸序列。

### 2.2 方法

#### 2.2.1 *Rv0017c* 基本基因信息的获取

从 NCBI 的 Gene 检索目录中获取 RodA 的基因信息,并在 GenBank 中获得核苷酸和其编码的氨基酸序列。

#### 2.2.2 理化性质预测

通过 ExPASy 的 ProtParam 在线软件,对

RodA 氨基酸序列的氨基酸数量、氨基酸组成、分子量、等电点、亲水性、不稳定系数等七个基本理化性质进行预测和分析,并使用 Bioedit 软件进行疏水性分析。

#### 2.2.3 保守域分析

通过 NCBI 在线生物信息学工具 CCD-BLAST 来分析目的蛋白的保守域。

#### 2.2.4 亚细胞定位与跨膜结构分析

通过亚细胞定位(sub-cellular localization),可以分析一种蛋白质是否能成为很好的药物和疫苗的靶标,而处在被膜表面的蛋白质是分析的重点。PSORTb 可以为未知蛋白做亚细胞定位,SACS HMMTOP 用于分析蛋白质的跨膜结构。

#### 2.2.5 蛋白质结构预测

蛋白质结构决定其功能,可用 SOPMA 和 Swiss-model 等工具预测和分析 RodA 的二、三级结构。

#### 2.2.6 抗原性蛋白的鉴定

Vaxijen v2.0 可对目的蛋白的抗原性进行鉴定,为进一步的表位预测提供一定依据。

## 3 实验结果

### 3.1 *Rv0017c* 基本基因信息

NCBI 中数据显示,*Rv0017c* 基因全长 1 410 bp,基因序列号为 NC\_000962.3。其编码的蛋白为 cell division protein RodA,全长为 469 aa,蛋白质登录号为 NP\_214531。

### 3.2 理化性质分析结果

通过 ExPASy 中的 ProtParam tool 分析,*Rv0017c* 编码的蛋白有 469 个氨基酸构成,分子量为 50 610.83,理论分子式为  $C_{2355}H_{3741}N_{605}O_{612}S_9$ 。由于蛋白质之中存在 Trp 和 Tyr 及 Cys 这三种 aa 残基,因此消光系数有一定数值( $\lambda_{max} = 280 \text{ nm}$ )。经分析发现,蛋白脂肪系数(Aliphatic index,即疏水值)、总平均亲水性(Grand average of hydropathicity (GRAVY))以及蛋白的不稳定系数(Instability index)之间并无直接对应关系,暗示该蛋白质结构的复杂性。

### 3.3 保守域分析结果

经 CCD-BLAST 分析蛋白 *Rv0017c* 的保守域区段分布表明,目的蛋白具有高度的保守性,属于 FtsW/RodA/SpoVE family cell cycle protein,表明





图3 RodA的三级结构预测模型

胞极性和膜相关细胞器的分布等方面发挥着重要的作用<sup>[14]</sup>。亚细胞定位表明,RodA位于细胞质膜上,且有11次跨膜结构。通过二、三级结构预测,验证该蛋白具有复杂性的结构,为RodA作为下一代抗生素的备选靶标提供了理论依据<sup>[15]</sup>。而从抗原性分析可知,该蛋白具有较高的抗原性,可以用于抗原表位的预测。

目前,人们主要是通过化学治疗来对结核病进行控制<sup>[16]</sup>。抗结核药物一般作用于特定的药物靶点,抑制结核菌的生长或者杀死结核菌,而达到治疗结核病的目的<sup>[17]</sup>。然而,随着耐药结核的出现,人们不得不寻找新的药物靶点,研制抗结核新药。RodA是结核杆菌的一种骨架蛋白,参与胞壁的生成与维持<sup>[18]</sup>,在其生长繁殖、免疫逃逸与耐药机制中展示出重要的功能,可作为治疗耐药结核的候选靶标。

在本文中,通过对RodA蛋白的分析,不仅可以加深对原核生物细胞骨架系统的了解,而且更为重要的是,RodA具有保守性、稳定性和较高的抗原性,可以作为耐药结核的潜在药物靶点,开辟新药研究的崭新途径。

#### 参考文献:

- [1] World Health Organization. Global tuberculosis report 2018[R]. Geneva: World Health Organization, 2018.
- [2] 张西燕,付玉荣,伊正君. 结核分枝杆菌 eis 基因及其编码蛋白的生物信息学分析[J]. 中国病原生物学杂志, 2018(02).
- [3] Millet J P, Moreno A, Fina L, et al. Factors that influence current tuberculosis epidemiology [J]. European Spine Journal, 2013, 22(4): 539-548.
- [4] Zumla A I, Gillespie S H, Hoelscher M, et al. New antituberculosis drugs, regimens, and adjunct therapies: needs, advances, and future prospects [J]. Lancet Infectious Diseases, 2014, 14(4): 327-340.
- [5] Joloba M, Bwanga F. Drug Resistance in Mycobacterium tuberculosis [J]. Current Issues in Molecular Biology, 2010, 8(1): 61-70.
- [6] Yu X, Wen Z, Chen G, et al. Molecular characterization of multidrug-resistant Mycobacterium tuberculosis isolated from south-central in China [J]. Journal of Antibiotics, 2014, 67(4): 291-297.
- [7] Murphy D J, Brown J R. Novel drug target strategies against Mycobacterium tuberculosis [J]. Current Opinion in Microbiology, 2008, 11(5): 422-427.
- [8] Sjødt M, Brock K, Dobihal G, et al. Structure of the peptidoglycan polymerase RodA resolved by evolutionary coupling analysis [J]. Nature, 2018, 556: 118-121.
- [9] Emami K, Guyet A, Kawai Y, et al. Corrigendum: RodA as the missing glycosyltransferase in Bacillus subtilis and antibiotic discovery for the peptidoglycan polymerase pathway [J]. Nature Microbiology, 2017, 2: 17019.
- [10] Noirclerc-Savoye M, Morlot C, Gerard P, et al. Expression and purification of FtsW and RodA from Streptococcus pneumoniae, two membrane proteins involved in cell division and cell growth, respectively [J]. Protein expression and purification, 2003, 30: 18-25.
- [11] Begg K J, Spratt B G, Donachie W D. Interaction between membrane proteins PBP3 and rodA is required for normal cell shape and division in Escherichia coli [J]. Journal of Bacteriology, 1986, 167(3): 1004-8.
- [12] Queval C J, Roland B, Roxane S. The Macrophage: A Disputed Fortress in the Battle against Mycobacterium tuberculosis [J]. Frontiers in Microbiology, 2017, 8.
- [13] Berrington W R, Hawn T R. Mycobacteri-

- um tuberculosis, macrophages, and the innate immune response: does common variation matter? [J]. Immunological Reviews, 2010, 219(1):167-186.
- [14] Henriques A O, Glaser P, Piggot P J, et al. Control of cell shape and elongation by the rodA gene in *Bacillus subtilis* [J]. Molecular Microbiology, 1998, 28(2):235-247.
- [15] Sjødt M, Brock K, Dobihal G, et al. Structure of the peptidoglycan polymerase RodA resolved by evolutionary coupling analysis [J]. Nature, 2018, 556(7699):118. MLA.
- [16] 初乃惠, 刘禧玲. 抗结核药物研究进展 [J]. 中国实用内科杂志, 2015, 35(8):45-49.
- [17] 徐炎, 李学军. 多靶点药物治疗及药物发现 [J]. 药学学报, 2009(3):226-230.
- [18] Arora D, Chawla Y, Malakar B, et al. The transpeptidase PbpA and non-canonical transglycosylase RodA of *Mycobacterium tuberculosis* play important roles in regulating bacterial cell lengths [J]. Journal of Biological Chemistry, 2018, 293:6497-6516.

(上接第 12 页)

小,调整展开剂极性后使用展开剂为乙酸丁酯:甲酸:甲醇:水(14:5:4:5)的上层液展开,得到  $R_f$  值适合和特征点明显的斑点。

本实验采用 TLC 法对复方参柏温敏凝胶中的蛇床子、苦参、黄柏、蒲公英、金银花、地榆进行鉴定,其方法简便可行、斑点分离清晰。复方参柏温敏凝胶中盐酸小檗碱含量则选择用 HPLC 方法检测,经过一系列方法学考察,该制剂的稳定性良好,仪器精密度符合要求,且样品中检测出盐酸小檗碱含量也符合要求。因此本试验方法可作为复方参柏温敏凝胶质量标准控制的方法。

#### 参考文献:

- [1] 肖碧环,吴严,孙艳,等. 复方氟米松软膏治疗皮炎湿疹的系统评价 [J]. 华西医学, 2014, 29(04):692-701.
- [2] 刘懿,刘雁,李星国. 白芍总苷胶囊治疗皮炎湿疹的临床疗效及对外周血  $Th_1/Th_2$  的影响 [J]. 世界中医药, 2019, 14(02):462-465.
- [3] 罗玉鸿,高植明,梁逊莹,等. 蛇床子素的止痒作用 [J]. 中国药房, 2014, 25(19):1750-1753.
- [4] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部 [M]. 北京:中国医药科技出版社, 2015.
- [5] 罗美兰,廖银根,王文,等. 复方苦蛇黄洗剂质量标准 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(13):131-133.
- [6] 孙录,董莹,尹文杰,等. 薄层色谱法鉴别清热通淋片 [J]. 吉林中医药, 2016, 36(09):937-940.
- [7] 陈旭,张玉玺,赵春宝. 止咳平喘胶囊的薄层色谱鉴别研究 [J]. 中国现代药物应用, 2016, 10(10):288-289.
- [8] 刘佳,韦巧玲. 金葛感冒颗粒质量标准研究 [J]. 中国民族民间医药, 2018, 27(09):14-16.
- [9] 黄燕,戴余雯,焦海胜,等. 神经性皮炎凝胶剂的质量标准研究 [J]. 时珍国医国药, 2016, 27(11):2646-2649.