

文章编号:2095-7386(2015)04-0016-05

DOI:10.3969/j.issn.2095-7386.2015.04.005

非结核分枝杆菌 MmpL 家族同源性分析及拓扑结构预测

孙妍,陈高瞻,占卫红,雷航,王心情,余晓丽
(武汉轻工大学 生物与制药工程学院,湖北 武汉 430023)

摘要:以非结核分枝杆菌中的胞分枝杆菌、鸟分枝杆菌和耻垢分枝杆菌三个标准株为研究对象,对其 MmpL 家族蛋白的同源序列进行相似性分析和功能预测。根据 NCBI 数据库中分枝杆菌 MmpL 蛋白序列进行多重序列比对;用 TMHMM Server 2.0 在线软件对 MmpL 同源序列进行拓扑结构预测;用 Interproscan 对 MmpL3 同源序列进行保守序列和结构域分析。同源分析结果显示:与 H37Rv MmpL 家族比较,胞分枝杆菌中没有发现 MmpL2、MmpL6、MmpL7、MmpL8、MmpL9、MmpL12 和 MmpL13 的同源序列;鸟分枝杆菌没有发现 MmpL6、MmpL7、MmpL8、MmpL9、MmpL12 和 MmpL13 的同源序列;耻垢分枝杆菌没有发现 MmpL2、MmpL7、MmpL9、MmpL10、MmpL12 和 MmpL13 的同源序列,推测可能与菌种差异性有关;拓扑结构预测发现大部分同源序列跨膜次数与 H37Rv 的对应 MmpL 蛋白保持一致,少数序列与 H37Rv 的对应 MmpL 蛋白有较小偏差;保守序列分析发现:与 H37Rv 比较三个标准株的 MmpL3 同源序列有两个膜转运蛋白结构域(MMPL domain),没有固醇敏感多肽区(SSD domain)说明该同源序列有膜转运功能,无 SSD 介导的胆固醇自我平衡调节、物质运输以及细胞信号转导等功能。研究结果为进一步阐明非结核分枝杆菌的毒力、致病机制和疾病趋势提供基础资料。

关键词:非结核分枝杆菌;MmpL 家族蛋白;同源序列;拓扑结构

中图分类号: Q 93

文献标识码: A

Homology analysis and function prediction of MmpL protein family of *Nontuberculous Mycobacterium*

SUN Yan, CHEN Gao-zhan, ZHAN Wei-hong, LEI Hang, WANG Xin-qian, YU Xiao-li

(School of Biology and Pharmaceutical Engineering, Wuhan Polytechnic University, Wuhan 430023, China)

Abstract: To provide evidence for future research on the structures and function of MmpL protein family in *Mycobacterium*, this study analyzed homologous sequences, predicted topological structures and predicted conservative domain structures of three *Nontuberculous Mycobacterium* named *M. intracellulare*, *M. avium* subsp. *paratuberculosis* K-10 and *M. smegmatis*str. According to the homologous sequences three of NTM all have theregion of deletions. For example the *M. intracellulare* haven't MmpL2, 6, 7, 8, 9, 12, 13, *M. avium* subsp. *paratuberculosis* K-10haven, t MmpL6, 7, 8, 9, 12, 13, *M. smegmatis*strhaven, t MmpL2, 7, 9, 10, 12, 13. According to the topological structures many of the homologous sequences have the same transmembrane and few of them have different

收稿日期:2015-07-08. 修回日期:2015-10-12.

作者简介:孙妍(1992-),女,硕士研究生,E-mail:1928125710@qq.com.

通信作者:余晓丽(1963-),女,教授,E-mail:yxl268@126.com.

基金项目:武汉轻工大学研究生创新基金项目(2014cx019).

transmembrane, but all of them have little difference. Conservative sequence analysis found that: compared with H37Rv three standard strains of MmpL3 homologous sequences, there were two membrane transport protein structure domain (MMPL domain), no sterol-sensing domain(SSD domain) showed the membrane function, the homologous sequence of no self balance function of intracellular cholesterol levels. The research results further clarify the virulence of *M. tuberculosis*, pathogenic mechanism and trend of disease to provide basic data.

Key words: Nontuberculous Mycobacterion; MmpL protein family; homologous sequence; topological structure

1 引言

非结核分枝杆菌 (*Nontuberculosis Mycobacteria*, NTM) 是指结核分枝杆菌复合群 (*M. tuberculosis complex*)、麻风分枝杆菌 (*M. leprae*) 以外的分枝杆菌。其中部分是致病菌或条件致病菌,临床上能引起人类疾病的主要有堪萨斯分枝杆菌、鸟分枝杆菌、胞分枝杆菌、龟分枝杆菌、脓肿分枝杆菌等 10 余种^[1]。广泛存在于环境中,能引起人类和动物肺部病变和肺部外其他部位患病^[2],做为条件致病菌可与结核分枝杆菌混合感染。临床症状多与结核分枝杆菌相似,在临床诊断上容易误诊,通过抗酸染色不能分辨^[3]。且对多种抗结核药物具有耐药性。

MmpL 家族是分枝杆菌耐受-结节-分裂家族 (resistance-nodulation-cell division family, RND 家族) 超家族蛋白中特有的一类膜蛋白,是影响分枝杆菌的生存和毒力的关键因子之一^[3],主要参与细胞内的物质运输和药物外排^[4,6]。RND 家族中固醇敏感多肽区 (SSD domain) 在胆固醇自我平衡调节、物质运输以及细胞信号转导中发挥重要的作用^[7]。此外,研究发现,在基因组中,有大约 20%—30% 的基因产物被预测为膜蛋白,在药物研发过程中,膜蛋白偶联受体是绝大多数药物的作用靶点,跨膜蛋白在生物体中担负着各种各样的重要功能:细胞的运输,细胞膜内外信号的传递及能量转换等^[8]。由于膜蛋白数量巨大而且功能多样,因此通过跨膜蛋白的拓扑结构能对其功能进行初步预测。

笔者以非结核分枝杆菌胞分枝杆菌、鸟分枝杆菌和耻垢分枝杆菌标准株为研究对象,对其 MmpL 家族蛋白进行同源性分析、跨膜结构预测以及保守序列和结构域预测,为进一步阐明抗酸染色阳性非结核分枝杆菌的毒力、致病机制和疾病研究提供理论依据。

2 方法和步骤

2.1 方法

运用生物信息学方法,通过序列对比,跨膜结构

预测,保守序列和结构分析等生物信息学手段,对胞分枝杆菌 (*M. intracellulare* ATCC13950)、鸟分枝杆菌 (*M. avium* subsp. *paratuberculosis* K-10)、耻垢分枝杆菌 (*M. smegmatis* MC2155) 的 MmpL 家族蛋白进行同源序列分析及功能预测。

2.2 步骤

2.2.1 MmpL 家族蛋白同源序列比对

在 NCBI 数据库中查找结核分枝杆菌 (MTB) H37Rv 的 MmpL 家族蛋白的氨基酸序列,在 BLAST 搜索三个标准株的同源序列。

2.2.2 MmpL 家族蛋白跨膜结构预测

用 TMHMM Server 2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>) 在线软件对 MmpL 家族蛋白进行拓扑结构预测。

2.2.3 MmpL3 保守序列分析

用 Interproscan (<http://www.ebi.ac.uk/interpro/scan.html>) 对 MmpL3 进行保守序列和结构域分析。

3 结果

3.1 MmpL 家族蛋白同源序列比对

同源分析结果显示:与 H37Rv 的 MmpL 家族蛋白比较,胞分枝杆菌同源序列为 MmpL1 (Ident, 63%), MmpL3 (Ident, 68%), MmpL4 (Ident, 62%、57%、54%), MmpL5 (Ident, 73%), MmpL10 (Ident, 61%), MmpL11 (Ident, 72%); 鸟分枝杆菌同源序列为 MmpL1 (Ident, 53%), MmpL2 (Ident, 61%), MmpL3 (Ident, 70%), MmpL4 (Ident, 66%、62%、61%、60%、58%), MmpL5 (Ident, 73%), MmpL10 (Ident, 57%), MmpL11 (Ident, 76%); 耻垢分枝杆菌同源序列为 MmpL1 (Ident, 54%、46%), MmpL3 (Ident, 67%), MmpL4 (Ident, 66%、63%、56%、55%), MmpL5 (Ident, 69%、64%), MmpL6 (Ident, 51%), MmpL8 (Ident, 56%、51%), MmpL11 (Ident, 69%)。此外,同源比对还发现在胞分枝杆菌中没有发现 MmpL2、MmpL6、MmpL7、MmpL8、MmpL9、MmpL12 和 MmpL13 的同源序列; 鸟分枝杆菌没有发现 MmpL6、MmpL7、MmpL8、MmpL9、MmpL12 和

MmpL13 的同源序列; 耻垢分枝杆菌没有发现 MmpL2、MmpL7、MmpL9、MmpL10、MmpL12 和 MmpL13 的同源序列。

3.2 MmpL 家族蛋白跨膜结构预测

用 TMHMM 2.0 软件对 MmpL 家族蛋白及其同

源序列跨膜结构预测见表 1, 胞分枝杆菌, 鸟分枝杆菌, 耻垢分枝杆菌的 MmpL3 同源蛋白跨膜次数分别为 10、10、11(图 1)。

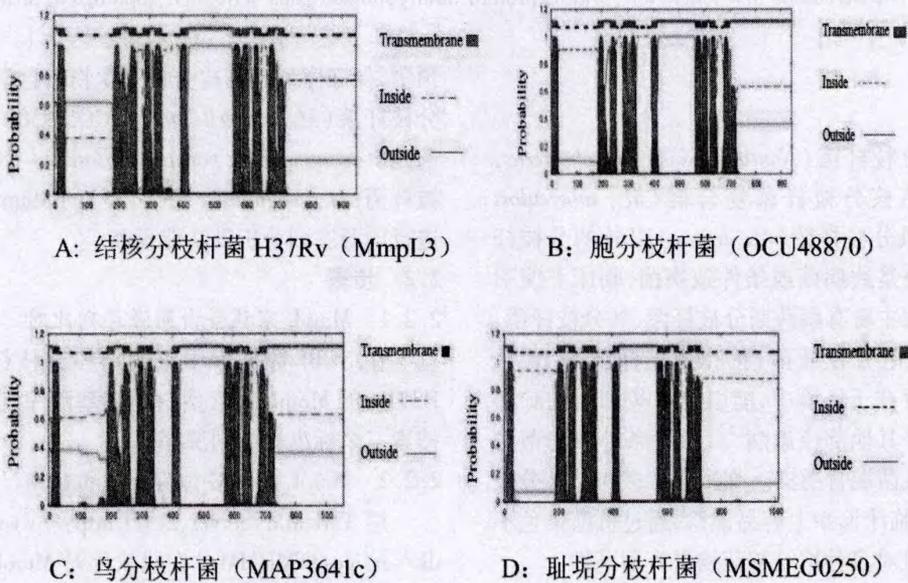


图 1 MmpL3 跨膜结构预测(A—D)

对三个标准株 MmpL 家族蛋白序列进行同源比对和拓扑结构预测, 结合同源性、蛋白注释和跨膜次数筛选出 MmpL 家族成员见表 1。

表 1 MmpL 家族成员

成员	<i>H37Rv</i>		<i>M. intracellulare</i> ATCC 13950		<i>M. avium subsp. paratuberculosis</i> K - 10		<i>M. smegmatistr.</i> MC2155	
	成员	TMMs	成员	TMMs	成员	TMMs	成员	TMMs
MmpL1	Rv0402c	12	OCU00750	11	MAP0076	12	MSMEG0381 MSMEG0180	12 12
MmpL2	Rv0507	11	NOMAP3049c	12	NO			
MmpL3	Rv0206c	11	OCU48870	10	MAP3641c	12	MSMEG0250	11
MmpL4	Rv0450c	11	OCU45650 OCU31550	11 11	MAP3751 MAP3890	11 11	MSMEG3496 MSMEG0225 MSMEG0463	11 11 11
MmpL5	Rv0676c	12	OCU24920	11	MAP1738	12	MSMEG4383	12
MmpL6	Rv1557	5	NO		NO		MSMEG01382	12
MmpL7	Rv2942	12	OCU51160	12	NO		NO	
MmpL8	Rv3823c	12	NO		NO		MSMEG4741 MSMEG4625	12 12
MmpL9	Rv2339	11	NO		NO		NO	
MmpL10	Rv1183	11	OCU18350	11	MAP2232	6	NO	
MmpL11	Rv0202c	12	OCU48920	12	MAP3637c	12	MSMEG0241	11
MmpL12	Rv1522c	11	NO		NO		NO	
MmpL13	a) Rv1145 b) Rv1146	4 6	NO NO		NO NO		NO NO	
MmpLN	NO		7		4		8	
Total	14		15		12		19	

注: TMMs: 跨膜次数; MmpL N: 表中所列之外的 MmpL 家族蛋白成员。

3.3 MmpL3 同源序列结构域预测

H37Rv 的 MmpL3 结构域预测显示具有两个膜转运蛋白(MMPL domain)结构域和一个固醇敏感多肽区(Sterol-sensing domain, SSD),三个标准株的

MmpL3 同源蛋白均有两个膜转运蛋白结构域,没有 SSD 结构域,说明该同源序列有膜转运功能,无 SSD 结构域介导的胆固醇自我平衡调节、物质运输以及细胞信号转导功能(图 2)。



图 2 MmpL3 跨膜结构(A-D)

4 讨论

MmpL 家族蛋白是一组与结核分枝杆菌药物外排有关的一个跨膜蛋白家族,可作为抗结核药物或菌种鉴定药物提供靶位点。通过对三个标准株的生物信息学分析得到 MmpL 家族同源序列,其中胞分枝杆菌为 15 个,鸟分枝杆菌为 12 个,耻垢分枝杆菌为 19 个。经过同源分析和跨膜预测综合分析最终胞分枝杆菌确定 7 个同源序列,鸟分枝杆菌确定 10 个同源序列,耻垢分枝杆菌确定 11 个同源序列。与 2005 年研究结果^[8]相比得到更为精确的结果,该文献只对鸟分枝杆菌中的 8 个同源蛋白进行了同源分析,这 8 个序列中有 5 个序列与本实验分析结果相同,3 个序列分析结果不同,有 10 个成员分析不够精确。在分析 MmpL 家族成员的同源蛋白的过程中增加跨膜结构作为分析条件未见报道。

除此之外在对实验所得同源序列进行比较分析的过程中发现三个标准株中大多数 MmpL 蛋白存在同源序列,但是胞分枝杆菌没有 MmpL2、MmpL6、MmpL8、MmpL9 蛋白的同源序列;鸟分枝杆菌没有 MmpL6、MmpL7、MmpL8、MmpL9、MmpL12 和 MmpL13 同源序列;耻垢分枝杆菌没有 MmpL2、MmpL6、MmpL7、MmpL10、MmpL12 和 MmpL13 同源序列;这种现象可能与菌种差异性有关,可能为以后

菌种鉴定提供理论支持。

对 MmpL3 进行保守序列和结构域分析发现 MmpL3 的同源序列有膜转运功能蛋白但可能不具有 SSD 结构域在胆固醇自我平衡调节、物质运输以及细胞信号转导中的作用,这可能与菌种遗传差异有关,可能为后续菌种鉴定提供依据。

参考文献:

- [1] 马翔,孙丽君.传统方法在临床细菌学鉴定中的作用[J].中华检验医学杂志.2014,8(7):453-454.
- [2] 王琰.耐药结核分枝杆菌基因突变热点筛查与检测技术平台的建立[D].西安:第四军医大学.2004.
- [3] 张贺秋,赵雁林.现代结核病诊断技术[M].北京:人民卫生出版社,2013:37-40
- [4] Varela. Improved BM212 MmpL3 Inhibitor Analogue Shows Efficacy in Acute Murine Model of Tuberculosis Infection[J]. PLoS One, 2013, 8(2):5-25
- [5] Pacheco S, Brand J F, Zaveron M, et al. Sensitivity analysis and optimization method for the fabrication of one-dimensional beam-splitting phase gratings. Opt Express. 2015, 23(9):71-82.

- [6] Owens. MmpL11 Protein Transports Mycolic Acid-containing Lipids to the Mycobacterial Cell Wall and Contributes to Biofilm Formation in *Mycobacterium smegmatis*[J]. *Journal of Biological Chemistry*. 2013, 288(33): 213-222.
- [7] 胡广安. 固醇敏感多肽区(Sterol-sensing domain)的分子进化[J]. *河南师范大学学报(自然科学版)*. 2003, 01: 88-92, 109.
- [8] 喬东亮. 蛋白质跨膜结构与二硫键连接模式研究[D]. 上海: 上海交通大学, 2009.
- [9] 李岱容, 穆柳青, 张春燕, 等. 结核分枝杆菌 ClpC2 基因序列分析及功能预测[J]. *重庆医科大学学报*. 2014(1): 57-61.
- [10] Pilar Domenech, Michael B Reed, Clifton E Barry. Contribution of the *Mycobacterium tuberculosis* MmpL Protein Family to Virulence and Drug Resistance[J]. *Infection and Immunity*. 2005, 73(6): 92-101.
-
- (上接第3页)
- [4] 王卫锋, 胡东灵, 王成, 等. KMnO₄ 在柑橘保鲜包装中的应用研究[J]. *食品工业*, 2012, 12(33): 54-55.
- [5] 解淑慧, 邵兴锋, 王鸿飞, 等. 纳米保鲜包装对柑橘果实贮藏品质的影响[J]. *食品工业科技*, 2014, 01(35): 326-329.
- [6] 田春莲, 陈阳波. 壳聚糖对柑橘青、绿霉病原菌的抑菌效果研究[J]. *食品科学*, 2008, 29(12): 110-112.
- [7] 彭茹, 张璐, 曾凯芳, 等. 膜醭毕赤酵母与壳聚糖复合处理对柑橘果实防御酶及防御物质的影响[J]. *食品科学*, 2014, 10(35): 212-217.
- [8] 李亚娜. 壳聚糖/纳米 ZnO 涂膜对圣女果的保鲜性研究[J]. *食品与发酵工业*, 2013, 39(2): 233-236.
- [9] 陈玉锋, 庄志萍. 紫外分光光度法测定橙汁中维生素 C 的含量[J]. *安徽农业科学* 2011, 39(1): 236-237, 240.
- [10] 贺庆辉, 李亚娜, 刘琛, 等. 含钙离子壳聚糖涂膜对鲜切莴苣的保鲜性研究[J]. *中国酿造*, 2015, 34(6): 114-117
- [11] Bie P, Liu P, Yu L, et al. The properties of antimicrobial films derived from poly (lactic acid)/starch/chitosan blended matrix [J]. *Carbohydrate Polymer*, 2013, 98(1): 959-966.
- [12] Dutta P K, Tripathi S, Mehrotra G K, et al. Perspectives for chitosan based antimicrobial films in food applications [J]. *Food Chemistry*, 2009, 114(4): 1173-1182.
- [13] Elsabee M Z, Abdou E S. Chitosan based edible films and coatings: a review [J]. *Materials Science & Engineering*, 2013, 33(4): 1819-1841.