

学校编码: 10384  
学号: B20051403155

分类号 \_\_\_\_\_ 密级 \_\_\_\_\_  
UDC \_\_\_\_\_

廈門大學

博 士 学 位 论 文

结核分枝杆菌中 dodecin-like 家族蛋白的初步研究与  
结核抗体检测试剂盒的研制和应用

**The Preliminary Study on *M. tuberculosis* Dodecin-like  
Family Proteins and the Development and Application of  
Anti-TB IgG kit**

熊君辉

指导教师姓名: 夏宁邵 教授

专业名称: 生物化学与分子生物学

论文提交日期: 2010年 月

论文答辩时间: 2010年 月

答辩委员会主席: \_\_\_\_\_

评 阅 人: \_\_\_\_\_

2010年 月

## 厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为( )课题(组)的研究成果,获得( )课题(组)经费或实验室的资助,在( )实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):

年 月 日

# 厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

1. 经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，  
于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。

2. 不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年 月 日

## 目录

摘要.....	1
<b>Abstract</b> .....	3
缩略词(Abbreviations).....	5
前言.....	6
1. 结核病概述.....	6
1.1. 结核病流行情况.....	6
1.2. 结核病的诊断.....	7
2. 结核分枝杆菌概述.....	7
2.1. 结核分枝杆菌生物学特性.....	7
2.2. 结核分枝杆菌基因组.....	9
3. 结核病的血清学检测.....	12
3.1. 血清学检测意义.....	12
3.2. 常用诊断抗原.....	13
3.3. 结核抗体检测试剂.....	17
4. 蛋白质特殊理化性质研究.....	18
4.1. 蛋白耐盐性.....	18
4.2. 蛋白耐热性.....	19
5. 蛋白质结构与生物信息学研究.....	20
5.1. 蛋白质生物信息学分析.....	20
5.2. 蛋白质结构解析.....	25
5.3. 蛋白质功能预测.....	25
6. 黄素蛋白.....	28
6.1. 黄素.....	28
6.2. 黄素蛋白.....	30
6.3. Dodecin.....	31
7. 本论文的研究目的和意义.....	32
材料与方法.....	33
1. 材料.....	33

1.1. 主要仪器.....	33
1.2. 主要质粒菌株.....	34
1.3. 试剂.....	34
1.4. 常用溶液配制.....	35
2. 方法.....	37
2.1. 分子克隆.....	37
2.2. 基因工程重组蛋白的表达与纯化.....	40
2.3. 重组蛋白的性质分析方法.....	43
2.4. 重组蛋白结构分析方法.....	46
2.5. 蛋白质晶体培养.....	47
2.6. 蛋白质辅助设计与分析.....	49
第一部分 结核分枝杆菌中 dodecin-like 家族蛋白的研究结果与分析.....	50
第一节 Rv1498A 蛋白研究.....	50
1. 蛋白的表达纯化.....	50
1.1. 基因克隆与表达载体构建.....	50
1.2. 蛋白表达纯化与鉴定.....	50
2. 蛋白序列分析与蛋白功能.....	52
2.1. Rv1498A 蛋白序列分析.....	52
2.2. 多序列比对与分子进化分析.....	55
2.3. 蛋白与辅基的相互作用.....	60
3. 蛋白理化性质分析.....	65
3.1. 耐盐性.....	65
3.2. 耐热性.....	65
4. 蛋白晶体培养.....	68
5. 蛋白结构.....	68
5.1. 结构特征.....	68
5.2. 氢键分析.....	71
5.3. 十二聚体结构的组装机理分析.....	73
5.4. 十二聚体的结构与蛋白的稳定性.....	75

6. 应用.....	76
6.1. 展示载体.....	76
6.2. 蛋白的诊断应用价值.....	78
第二节 mtb8 蛋白研究.....	79
1. 蛋白的表达纯化.....	79
1.1. 基因克隆与表达载体构建.....	79
1.2. 蛋白表达纯化与鉴定.....	80
2. 蛋白序列分析与蛋白功能初步探索.....	81
2.1. mtb8 蛋白序列分析.....	81
2.2. 多序列比对与分子进化分析.....	85
2.3. 光谱学分析.....	87
2.4. 功能预测分析.....	87
3. 蛋白理化性质分析.....	88
3.1. 耐盐性.....	88
3.2. 耐热性.....	88
3.3. 有机溶剂（乙醇）耐受能力.....	91
3.4. 盐对 mtb8 蛋白的保护能力.....	91
4. 蛋白晶体培养.....	98
5. 蛋白结构初步分析.....	99
5.1. 十二聚体的证据.....	99
5.2. 二级结构预测.....	101
5.3. 同源模建.....	101
6. 应用.....	102
第一部分讨论.....	103
1. Dodecin-like 蛋白家族.....	103
1.1. 蛋白质家族概述.....	103
1.2. 分子进化树.....	103
1.3. Dodecin-like 蛋白在极端菌中的生理作用.....	106
1.4. Dodecin-like 蛋白的应用.....	106

2. 极端微生物中蛋白的特殊理化性质.....	107
2.1. 极端微生物与蛋白的特殊理化性质.....	107
2.2. 蛋白质的结构与稳定性.....	107
第二部分 结核分枝杆菌抗体检测试剂的研究与应用 结果与分析.....	109
1. TB-IgG 检测试剂盒的建立.....	109
1.1. 候选重组抗原的表达与纯化.....	109
1.2. 候选重组抗原免疫反应活性筛选.....	115
1.3. TB-IgG 抗体检测试剂盒的原料选择、优化与鉴定.....	123
1.4. TB-IgG 抗体检测试剂反应体系的优化.....	130
2. TB-IgG 抗体检测试剂盒的性能评价.....	136
2.1. 特异性评价.....	136
2.2. 灵敏度评价.....	137
3. TB-IgG 抗体检测试剂盒与其他同类试剂的比较.....	138
3.1. 与国产同类试剂的比较.....	138
3.2. 与进口同类试剂的比较.....	138
第二部分讨论.....	142
1. 血清学诊断现状与不足.....	142
2. 血清学诊断候选抗原.....	142
3. 血清学诊断试剂的改进.....	142
小结与展望.....	144
参考文献.....	146
发表论文.....	161
致谢.....	163

## Catalogue

<b>Abstract (Chinese)</b> .....	<b>1</b>
<b>Abstract (English)</b> .....	<b>3</b>
<b>Abbreviations</b> .....	<b>5</b>
<b>Introduction</b> .....	<b>6</b>
<b>1. Overview of Tuberculosis</b> .....	<b>6</b>
<b>2. Overview of MTB</b> .....	<b>7</b>
<b>3. Serological testing of TB</b> .....	<b>12</b>
<b>4. Protein study of special physicochemical property</b> .....	<b>18</b>
<b>5. Protein structure and information biology</b> .....	<b>20</b>
<b>6. flavoprotein</b> .....	<b>28</b>
<b>7. The objective and significance</b> .....	<b>32</b>
<b>Materials and Methods</b> .....	<b>33</b>
<b>1. Materials</b> .....	<b>33</b>
<b>2. Methods</b> .....	<b>37</b>
<b>Part I The results and analyses of MTB dodecin-like protein</b> .....	<b>50</b>
<b>First quarter The study of Rv1498A protein</b> .....	<b>50</b>
<b>1. The expression and purification</b> .....	<b>50</b>
<b>2. Sequence analysis and protein function</b> .....	<b>52</b>
<b>3. The analysis of physicochemical property</b> .....	<b>65</b>
<b>3.1. Salt tolerance</b> .....	<b>65</b>
<b>3.2. Thermotolerance</b> .....	<b>65</b>
<b>4. Protein crystals</b> .....	<b>68</b>
<b>5. Protein structure</b> .....	<b>68</b>
<b>6. Application</b> .....	<b>76</b>
<b>Second quarter The study of mtb8 protein</b> .....	<b>79</b>
<b>1. The expression and purification</b> .....	<b>79</b>
<b>2. Sequence analysis and preliminary test of protein function</b> .....	<b>81</b>



3. Analysis of ptorein physicochemical property.....	88
4. Protein crystals.....	98
5. Preliminary analysis of protein structure.....	99
6. Application.....	102
<b>Discussion of Part I.....</b>	<b>103</b>
1. Dodecin-like family.....	103
2. The special physicochemical property of protein in extreme microorganism.....	107
<b>Part II The results and analyses of study and application about TB IgG kit.....</b>	<b>109</b>
1. The establishment of TB-IgG kit.....	109
2. The performance assessment of TB-IgG kit.....	136
3. TB-IgG kit compared with other same species kit.....	138
<b>Discussion of Part II.....</b>	<b>142</b>
1. The present situation and the insufficiency of serodiagnosis.....	142
2. The candidate antigens of serodiagnosis.....	142
3. The improvement of serodiagnosis kit.....	142
<b>The summary and perspective.....</b>	<b>144</b>
<b>References.....</b>	<b>146</b>
<b>Published papers.....</b>	<b>161</b>
<b>Acknowledgements.....</b>	<b>163</b>

## 摘要

结核病是一种古老的传染性疾病，但目前对于其病原微生物结核分枝杆菌的研究还不是很透彻。结核分枝杆菌的 4000 多个基因中，只有 40%左右的编码基因功能明确，其余基因的功能都不十分清楚。

我们发现结核分枝杆菌中存在一种特殊的黄素结合蛋白（dodecin），编码基因为 Rv1498A，共 70 个氨基酸，以十二聚体的形式存在，属于 dodecin-like 蛋白家族。目前发现 dodecin 蛋白基本上存在于极端微生物中，能够储存和运输黄素（包括 FMN 和 FAD），在微生物的氧化还原反应（如电子传递链）和某些新陈代谢过程中起着重要的作用。我们通过质谱、光谱学、分子进化分析和等温滴定微量热分析等方面的研究与分析，证实 Rv1498A 在体内体外都能够与黄素结合，且与 FMN 的结合能力高于 FAD。

对 Rv1498A 蛋白的理化性质分析表明，该蛋白能够耐受 5M NaCl（接近饱和的盐浓度）和 121℃ 高温处理等极端环境的破坏。经 DSC 分析表明，使该蛋白完全变性的温度需要超过 130℃。

通过对 Rv1498A 蛋白晶体结构的解析与分析，我们证实蛋白质在极端环境中的稳定性与表面电荷的多少没有关系，而是盐键网络、氢键网络、表面离子结合和疏水残基埋藏等因素综合作用的结果。Rv1498A 形成一个对称的四面体状中空结构，可以将蛋白或多肽展示在十二聚体的外表面，实现被展示蛋白的对称性多聚化，从而提高蛋白的活性；也可以将药物或生物活性化合物包埋在蛋白内部，为研制新型的药物投递系统和常温疫苗等奠定基础。

在对 dodecin-like 蛋白家族的分子进化分析研究中，发现该家族随着物种进化的过程，其蛋白功能由嗜盐古细菌的黄素结合开始，产生两种方向上的进化（直系同源和旁系同源），一个方向仍然结合黄素，另一个方向的功能尚不明确。在包括结核分枝杆菌在内的 7 种极端微生物中，同时存在 2 个 dodecin-like 蛋白家族的成员。我们针对结核分枝杆菌中另一个 dodecin-like 家族蛋白 mtb8 的理化性质、结构和功能等的研究和分析表明，该蛋白为盐依赖性蛋白，能耐受 5M NaCl 的高盐，并在盐离子（尤其是多价离子）的帮助下，可以耐受高压灭菌及高浓度乙醇溶液的破坏。Mtb8 在盐离子的作用下形成十二聚体，但不结合黄素，通过结构预测、分子进化分析、分析超离和光谱学分析等方式的研究证实，mtb8 拥

有与 Rv1498A 相似的结构但执行的功能不一致。

另外,我们在对结核分枝杆菌来源的其它基因工程重组抗原的理化性质研究中,发现很多表达在超声上清或包涵体复性后拥有接近天然构象的蛋白,也能够承受 100°C 的高温变性处理,证实极端微生物来源的蛋白质往往都具有耐受极端环境破坏的能力。这为今后基因工程重组抗原的表达纯化提供了一个良好的思路。

目前,结核分枝杆菌的感染情况很严重,全球约有三分之一的人群感染结核,且每年约有 800-1000 万新发结核病患者,约有 300 万人死于结核病,我国在全球结核病高负担国家中排名第二。然而结核病的现有诊断方式都存在各种缺陷和不足,其中血清学诊断试剂,尤其是国产试剂,质量需要尽快提高。

我们利用基因工程技术表达目前报道的效果较好的结核血清学诊断候选抗原,通过各抗原的检测效率和互补情况分析,将结核血清学诊断候选抗原大致分为 4 类,为今后诊断用抗原的进一步筛选比较提供指导,并以此建立初步的结核抗体检测试剂盒。经临床实验验证,该试剂盒的检测性能与国际主流试剂性能相当。

关键词: 结核; dodecin-like 家族; 蛋白质结构; 蛋白质功能; 诊断

## Abstract

TB is an ancient infectious disease, but the research on the pathogenic microorganism MTB is still not full. There are more than 4000 genes in MTB, but only 40% of them have been clearly studied, the function of the others is not clear.

We found that in MTB's proteome, there is a special flavoprotein (dodecin), which coded by Rv1498A gene. The protein has 70aa, and can form dodecamer, belong to dodecin-like family. The dodecin-like family proteins are found almost in the extreme microorganism, and the function is storing and transporting of flavins (including FMN and FAD), which are important in redox reaction (electron transport chain, for exaple) and some metabolic process. We confirm that Rv1498A can binding with flavin in vitro and in vivo and the binding capacity of FMN is stronger than FAD, through the study and analysis of mass spectrum, spectroscopy, phylogenetic analysis and ITC.

The analysis of the physical and chemical property of Rv1498A shows that Rv1498A can tolerate 5M NaCl (close to saturation) and 121 °C high temperature. And the DSC analysis shows that the temperature will be above 130 °C , when the protein is completely degenerated.

Through the Rv1498A crystal structure elucidation and analysis, we confirm that the protein stability in extreme conditions is related to the combined action of salt bond network, hydrogen bond network, surface ion binding, hydrophobic hiding and is not related to the number of surface charge. The hollow sphere dodecamer structure can display other protein or peptide on the surface, increasing the activity of protein or peptide through symmetrical multimerization, and can bind with drug or bioactive compound in the interior of the hollow sphere, laying the foundations for the study of new drug delivery system and the development of room temperature vaccine.

Through the phylogenetic analysis of dodecin-like family, we find that the function of dodecin-like family exist two evolution direction (ortholog and paralog), begining with the flavin-binding of halophilic archaea, along with the evolution of species. One direction is binding flavin, the other is still undefined. There are two dodecin-like family members together in 7 extreme microorganism, including MTB. The study on

physicochemical property, protein structure and function of mtb8, which is the other dodecin-like family protein, shows that mtb8 is salt-dependent protein, can tolerate high salt (5M NaCl) and high temperature (high pressure sterilization for example) and high concentration ethanol with the help of salt, especially polyvalent ion. On the side, we confirm that mtb8 can form dodecamer under the action of salt but can not bind flavin, through the analysis of structure prediction, phylogenetic tree, AUC and spectroscopy of mtb8. This means that mtb8 is different from Rv1498A on the protein function although they have the similar protein structure.

In addition, through the study on physical and chemical property of other MTB genetically engineered antigens, we find that many antigens expressed in supernatant or renaturing from inclusion body, can tolerate 100°C high temperature. The result confirms that the protein come from extreme microorganism can often tolerate extreme environment, this will offer some elicitation to the purification of genetically engineered antigen.

For now, the infection of MTB is very serious, one-third of the world's population is infected with tuberculosis, and causing around 8 to 10 million new cases and almost 3million deaths each year. China is the second high tuberculosis burden country. However, the existing diagnosis way of TB still have various defects and deficiencies, and the serodiagnostic reagents, especially domestic reagents, need improve quality as soon as possible.

We expressed some MTB antigens reported for serodiagnosis, and these antigens were divided into 4 classes, to provide guidance for the screening of diagnosis antigens. And the comprehensive property of the Anti-TB IgG kit we build is similar to international mainstream reagent through clinical experience verified.

**Key words:** TB, dodecin-like family, protein structure, protein function, diagnosis

## 缩略词(Abbreviations)

缩略词	英文全称	中文全称
BCG	Bacillus Calmette-Guerin	卡介苗
TB	Tuberculosis	结核病
MTB	<i>Mycobacterium Tuberculosis</i>	结核分枝杆菌
RD	Regions of deletion	基因缺失区
Da	Dalton	道尔顿
kD	kilo Daltons	千道尔顿
ORF	Open Reading Frame	开放阅读框
Fab	Fragment-antigen binding	抗体的 Fab 段
Fc	Fragment crystallizable	抗体的 Fc 段
CFP	Culture filtrate proteins	培养滤液蛋白
HPLC	High Performance Liquid Chromatography	高效液相色谱
ELISA	Enzyme-Linked ImmunoSorbant Assay	酶联免疫吸附试验
MALDI-TOF-MS	Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization-Time Of Flight-Mass Spectrometry	基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱
DSC	Differential scanning calorimetry	差示扫描量热技术
ITC	Isothermal Titration Calorimetry	等温滴定微量热技术
AU	Analytical ultracentrifugation	分析型超速离心技术
PCR	polymerase chain reaetion	聚合酶链式反应
SDS	sodium dodecyl sulfat	十二烷基磺酸钠
PAGE	polyacrylamide gel electrophoresis	聚丙烯酰胺凝胶电泳
NCBI	National Center for Biotechnology Information	美国国家生物技术信息中心
COG	Clusters of Orthologous Groups of proteins	蛋白同源决定簇
PDB	Protein Data Bank	蛋白质数据库
SCOP	Structural Classification of Protein	蛋白质结构分类数据库
CDD	Conserved Domain Database	蛋白质保守结构域数据库
GRAVY	Grand average of hydrophobicity	疏水性平均值
FMN	Flavin Mononucleotide	黄素单核苷酸
FAD	Flavin Adenine Dinucleotide	黄素腺嘌呤二核苷酸
Sec/GSP	The general secretion pathway	经典分泌途径

## 前言

### 1. 结核病概述

#### 1.1. 结核病流行情况

结核病是由结核分枝杆菌引起的严重危害人体健康的传染性疾病，是人类历史上危害最严重的疾病之一。上世纪在世界范围内结核病有 3 次回升，最近发生的第三次回升与 HIV 感染、结核病高危人群的流动以及耐多种药物结核病例的增多等客观因素有密切关系。目前，全世界约有 1/3 的人口感染了结核杆菌，活动性结核病人达 2000 万，每年约有 800-1000 万人新发结核病患者，有约 300 万人死于结核病。许多发展中国家，因结核病死亡的人数较其他各种传染病死亡人数的总和还要多。

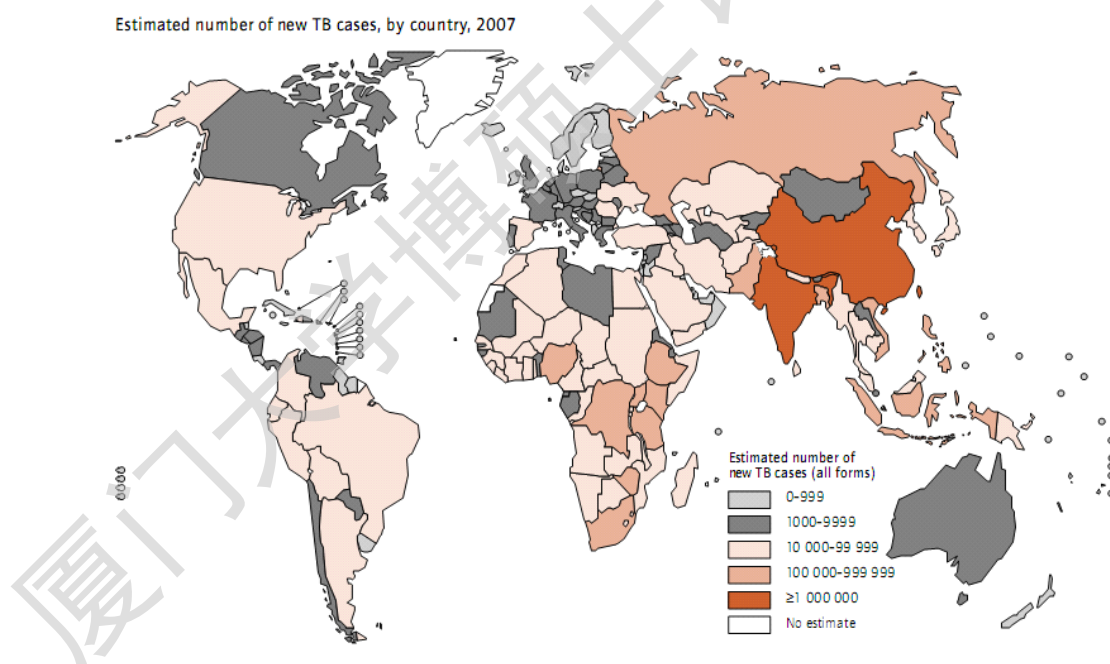


图 1 2007 年结核新发病例<sup>[1]</sup>

Figure 1 Estimated number of new TB case, 2007

据世界卫生组织 2009 年全球结核病控制报告<sup>[1]</sup>，2007 年全球有约 927 万例结核新发病例，高于过去数年的水平（1990 年，约 660 万例；2000 年，约 830 万例；2006 年，约 924 万例）。2007 年多数病例发生在亚洲（55%）和非洲（31%），

小部分病例发生在东地中海区域（6%）、欧洲（5%）和美洲（3%）。2007年病例数排名前五位的国家是：印度（200万）、中国（130万）、印度尼西亚（53万）、尼日利亚（46万）和南非（46万）。2007年的927万新发病例中，约有137万例（15%）为艾滋病毒阳性，其中，非洲占79%，东南亚占11%。

结核病已成为传染病中的第一号杀手和最大的死亡原因，全球处于结核病紧急状态中。

我国是全球结核病高负担国家之一，仅次于印度。2000年流调表明，全国有近半数（5.5亿）人口感染了结核杆菌，明显高出全球1/3人口感染的平均水平，特别是中西部结核病的疫情十分严重。全国有活动性肺结核约500万例，其中涂片阳性约150万例。

## 1.2. 结核病的诊断

当前，结核病的疫情十分严峻，结核病防控压力巨大。但是，结核病的诊断仍然存在很大的不足，现有的诊断方式（表1）都有一定的缺陷，给结核病的防控带来极大的影响。

## 2. 结核分枝杆菌概述

### 2.1. 结核分枝杆菌生物学特性

结核分枝杆菌是结核病的病原体，属分枝杆菌属，生长缓慢，传代时间大约为20小时。不产生内、外毒素，其致病性可能与细菌中组织细胞内大量繁殖引起的炎症、菌体成分和代谢物质的毒性及机体对菌体成分产生的免疫损伤有关。

#### 2.1.1. 结核分枝杆菌的多形态

结核分枝杆菌的形态变异是其重要特征，人工培养基中生长的结核分枝杆菌的形态往往与病理组织和体液中的结核分枝杆菌的形态有差异。感染组织和痰中呈更长更弯曲和更多的串珠状排列，巨噬细胞中存在十分明显的索状生长。化疗可能增加了结核分枝杆菌多形性的出现机会。结核分枝杆菌的各种形态可归纳为杆菌相、球菌相、颗粒相和滤过相四种类型。形状的改变伴随着细胞壁甚至其他组分的变异、缺陷甚至缺失，这可能是导致结核分枝杆菌在机体内的抗原性改变、甚至免疫逃避的重要原因。



Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to [etd@xmu.edu.cn](mailto:etd@xmu.edu.cn) for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库