

窦焱萍, 赵琰, 平晓坤, 等. 牛分枝杆菌 PtpA 蛋白对 NF- κ B 信号通路的调控机制 [J]. 华南农业大学学报, 2019, 40(4): 1-7.
DOU Yiping, ZHAO Yan, PING Xiaokun, et al. Regulation mechanism of *Mycobacterium bovis* PtpA protein on NF- κ B signaling pathway[J]. Journal of South China Agricultural University, 2019, 40(4): 1-7.

牛分枝杆菌 PtpA 蛋白对 NF- κ B 信号通路的调控机制

窦焱萍, 赵 琰, 平晓坤, 罗静龙, 贾 坤

(华南农业大学 兽医学院/广东省兽医临床重大疾病综合防控重点实验室/

广东省宠物工程技术研究中心, 广东 广州 510642)

摘要:【目的】研究牛分枝杆菌 *Mycobacterium bovis* PtpA 蛋白对免疫应答相关的 NF- κ B 信号通路的影响, 以揭示 PtpA 蛋白在机体免疫应答中的作用。【方法】构建 *PtpA* 基因真核表达载体 FLAG-PtpA, 并将其转染到 HEK293T 中, 进行 SDS-PAGE 分析及 Western blot 检测。激活 NF- κ B 信号通路后, 通过双荧光素酶试验和 qPCR 方法探究 PtpA 蛋白对 NF- κ B 信号通路的影响。【结果】成功构建 *PtpA* 基因真核表达载体 FLAG-PtpA, 转染 HEK293T 后经 SDS-PAGE 分析, 相对分子质量约为 22 000 处可见特异性蛋白条带。Western blot 结果显示, 表达产物可与一抗特异性结合, 证明该蛋白是 PtpA 蛋白。双荧光素酶试验中, 转染 2~24 h, 试验组与对照组萤火虫荧光素酶和海肾荧光素酶的相对荧光强度的比值差异显著 ($P<0.05$); 转染 2 h 后, 对照组萤火虫荧光素酶和海肾荧光素酶的相对荧光值是试验组的 2.93 倍, 说明 PtpA 蛋白对 NF- κ B 信号通路激活早期具有显著的抑制作用。qPCR 结果显示, 转染 2 h 后, 对照组的 IL-6、GM-CSF、BIRC-2 和 BIRC-3 的表达量分别是试验组的 3.93、3.42、2.17 和 2.30 倍 ($P<0.01$); 转染 4 h 后, 对照组的 IL-6、GM-CSF、BIRC-2 和 BIRC-3 的表达量分别是试验组的 4.26、3.93、2.36 和 2.50 倍 ($P<0.01$), 说明 PtpA 蛋白对 NF- κ B 信号通路相关的细胞因子 (IL-6、GM-CSF、BIRC-2、BIRC-3) 在免疫早期具有显著抑制作用。【结论】qPCR 结果与双荧光素酶试验结果一致, 表明牛分枝杆菌 PtpA 蛋白对 NF- κ B 信号通路的影响主要发生在早期。本研究为后续研究有效的结核病防控药物提供了理论基础。

关键词: 牛结核病; 牛分枝杆菌; PtpA 蛋白; NF- κ B 信号通路; 细胞因子; 免疫应答

中图分类号: S852.618

文献标志码: A

文章编号: 1001-411X(2019)04-0001-07

Regulation mechanism of *Mycobacterium bovis* PtpA protein on NF- κ B signaling pathway

DOU Yiping, ZHAO Yan, PING Xiaokun, LUO Jinglong, JIA Kun

(College of Veterinary Medicine, South China Agricultural University/Guangdong Provincial Key Laboratory of Veterinary Clinical Integrated Disease Prevention and Control/Guangdong Pet Engineering Technology Research Center, Guangzhou 510642, China)

Abstract: 【Objective】To investigate the effect of *Mycobacterium bovis* PtpA protein on NF- κ B signaling pathway which is related to immune response, and reveal the role of PtpA protein in the body's response to immunity. 【Method】The *PtpA* gene eukaryotic expression vector FLAG-PtpA was transfected into HEK293T

收稿日期: 2018-09-15 网络首发时间: 2019-06-25 15:53:00

网络首发地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/44.1110.s.20190625.0931.006.html>

作者简介: 窦焱萍 (1994—), 女, 硕士研究生, E-mail: 441952235@qq.com; 通信作者: 贾 坤 (1981—), 男, 讲师, 博士, E-mail: jiakun@scau.edu.cn

基金项目: 广东省自然科学基金 (2017A030310032); 广东省现代农业科技创新联盟建设项目 (2018LM2150); 广州市珠江科技新星项目 (201610010073)

for SDS-PAGE analysis and Western blot detection. After activation of NF- κ B signaling pathway, the effects of PtpA protein on NF- κ B signaling pathway were investigated by dual luciferase assay and qPCR. 【Result】 The eukaryotic expression vector FLAG-PtpA of *PtpA* gene was successfully constructed, transfected into HEK293T and analyzed by SDS-PAGE. The specific molecular band was visible with relative molecular mass of 22 000. Western blot results showed that the expression product specifically bound to the primary antibody, demonstrating that the protein was a PtpA protein. In the double luciferase assay, the ratios of the relative fluorescence intensities of firefly luciferase and Renilla luciferase in the test group and the control group were significantly different from 2 to 24 h after transfection ($P<0.05$). The relative fluorescence values of firefly luciferase and Renilla luciferase in the control group were 2.93 times higher than those in the experimental group 2 h after transfection, indicating that PtpA protein had a significant inhibitory effect on the early activation of NF- κ B signaling pathway. qPCR results showed that the expression levels of IL-6, GM-CSF, BIRC-2 and BIRC-3 in the control group were 3.93, 3.42, 2.17 and 2.30 times respectively of those in the test group 2 h after transfection ($P<0.01$), and were 4.26, 3.93, 2.36 and 2.50 times respectively of those in the test group 4 h after transfection ($P<0.01$). These results indicated that PtpA protein had a significant inhibitory effect on NF- κ B signaling pathway-associated cytokines (IL-6, GM-CSF, BIRC-2 and BIRC-3) in the early stage of immunization. 【Conclusion】 qPCR results are consistent with the results of dual luciferase assay, indicating that the effect of *M. bovis* PtpA on NF- κ B signaling pathway mainly occurs in the early stage. This study provides a theoretical basis for the follow-up study of effective tuberculosis prevention and control drugs.

Key words: bovine tuberculosis; *Mycobacterium bovis*; PtpA protein; NF- κ B signaling pathway; cytokine; immune response

牛结核病主要是由牛分枝杆菌 *Mycobacterium bovis* 引起的一种人兽共患病^[1], 影响范围非常广泛, 涉及大多数的哺乳动物宿主, 包括人类、牛、鹿、骆驼、猪、猫等, 值得注意的是牛分枝杆菌对野生动物和杂食动物的威胁同样严重。有报道, 马^[2-3]和羊^[4-5]对结核病具有较高的耐受性。

发展中国家牛结核病的危害要远甚于发达国家。在缺乏有效措施和力度控制牛结核病的国家和地区, 形势非常严峻。研究报道中 10 个欧盟国家大约 60 例的年度病例总数和拉丁美洲估计 7 000 例的病理报告充分说明了这一问题^[6-7]。

结核分枝杆菌酪氨酸磷酸酶 A (Protein tyrosine phosphatase, PtpA) 是分枝杆菌中一个重要的磷酸化酶, 启动子的表达只发生在生长缓慢的卡介苗细菌中, 在快速增长的腐生类耻垢分枝杆菌中不表达^[8]。*PtpA* 基因是致病性分枝杆菌基因组中具有重要调控作用的一段基因, 可通过和利用宿主 NF- κ B 信号通路竞争结合宿主衔接蛋白 TAB3, 进一步发挥对宿主先天免疫应答的抑制作用, 进而帮助结核分枝杆菌逃避宿主免疫系统的清除作用^[9-10]。牛分枝杆菌在基因上虽然与结核分枝杆菌区别极小, 但对宿主的致病机制却大为不同, 对于牛分枝杆菌 *PtpA*

基因是如何通过 NF- κ B 信号通路逃避宿主免疫系统清除作用的机制, 是否和结核分枝杆菌 *PtpA* 基因相似, 目前还不清楚。本研究旨在说明牛分枝杆菌 PtpA 蛋白是如何通过调控 NF- κ B 信号通路来逃避宿主免疫系统清除作用的机制。

1 材料与方法

1.1 DNA、细胞、质粒

牛分枝杆菌基因组 DNA、人肾上皮细胞 (HEK293T)、真核表达载体 p3 $\times$ FLAG-CMV-10、PEGFP-N1 由华南农业大学兽医学院临床外科实验室保存; 克隆载体 pMD-18T Vector 购自宝生物工程 (大连) 有限公司; pGL4.32[luc2P/NF- κ B-RE/Hygro] 报告基因质粒购自美国 Promega 公司

1.2 主要试剂和仪器

试剂: EX(*Taq*) 酶试剂盒、核酸染料、DL2000 DNA Marker 购自宝生物工程 (大连) 有限公司; 限制性内切酶 *Not* I、*Xba* I、*T₄* 连接酶购自 NEB 公司; 2 $\times$ *Taq* PCR Star Mix 购自 Genstar 公司; 琼脂糖购自 Biowest 公司; 普通琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒、快速质粒小提试剂盒、无内毒素质粒大提试剂盒、IRDye 800CW Goat anti-Mouse IgG(H+L) 购

自 LI-COR 公司; 溴化乙锭 (EB) 替代物购自广州晖鼎生物科技有限公司; SDS-PAGE 试剂盒购自杭州弗德生物公司; 预染蛋白 Marker、转染试剂 Lipofectamine™ 3000 Transfection Reagent 购自 Thermo 公司; 聚偏二氟乙烯膜 (PVDF 膜, 0.45 μm) 购自 GE 公司; 脱脂奶粉购自广州华奇盛生物科技有限公司; 逆转录产品 HiScript II 1st Strand cDNA Synthesis Kit、ChamQ™ Universal SYBR® qPCR Master Mix 购自南京诺维赞生物技术公司; 双荧光素酶报告基因检测试剂盒购自美国 Promega 公司、通用型总 RNA 抽提试剂盒购自广州东盛生物技术有限公司。

仪器: 电泳成像系统 (香港基因有限公司)、核酸电泳仪 (美国 BIO-RAD)、SDS-PAGE 垂直电泳槽

(美国 BIO-RAD)、全能型蛋白转印系统 (美国 BIO-RAD)、恒温金属浴 (北京天根生化科技有限公司)、LightCycler 480 荧光定量 PCR 仪 (罗氏 (Roche) 公司)。

1.3 引物设计与合成

根据 NCBI 公布的牛分枝杆菌 *PtpA* 全长基因和人源 NF-κB 信号通路相关细胞因子的基因序列设计引物 (表 1)。相关细胞因子包括: 白细胞介素 6 (Interleukin-6, IL-6)、粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子 (Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, GM-CSF)、细胞凋亡抑制蛋白 1 (Cellular inhibitor of apoptosis 1, cIAP1 又称 BIRC-2)、细胞凋亡抑制蛋白 2 (Cellular inhibitor of apoptosis 2, cIAP2 又称 BIRC-3)。

表 1 引物名称及序列
Table 1 Primer name and sequence

引物名称 Primer name	引物序列(5'→3') ¹⁾ Primer sequence	产物大小/bp Product size
FLAG-PtpA-F	AAGGAAAAAAGCGGCCGCGGTGTCTGATCCGCTGCACG	492
FLAG-PtpA-R	CTAGTCTAGATCAACTCGGTCCGTT	
IL-6-F	GGTGTTCCTGCTGCCTTCC	100
IL-6-R	GTTCTGAAGAGGTGAGTGGCTGTC	
GM-CSF-F	TCCTGAACCTGAGTAGAGACACTGC	100
GM-CSF-R	CAGGTCGGCTCCTGGAGGTC	
BIRC-2-F	AGACACATGCAGCTCGAATGAGAAC	100
BIRC-2-R	AACACCTCAAGCCACCATCACAAC	
BIRC-3-F	CTGTGATGGTGGACTCAGGTGTTG	100
BIRC-3-R	TGGCTTGAACCTTGACGGATGAACTC	

1) 有下划线的序列为 *Not* I、*Xba* I 酶切位点
1) Sequences with underlines are *Not* I and *Xba* I restriction sites

1.4 PCR 扩增

以牛分枝杆菌基因组 DNA 为模板, 利用所设计的引物, 进行 PCR 扩增。PCR 反应采用 50 μL 反应体系, 含 5 U/μL 的 EX *Taq* 0.5 μL、引物 FLAG-PtpA-F 2 μL、引物 FLAG-PtpA-R 2 μL (序列见表 1)、2.5 mmol/L 的 dNTP Mixture 8 μL、Template DNA 2 μL、ddH₂O 35.5 μL。PCR 反应程序为: 95 °C 预变性 5 min; 95 °C 变性 30 s, 60 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 1 min, 共 35 个循环; 72 °C 终延伸 5 min, 4 °C 保存。预计扩增的目的片段大小为 492 bp。PCR 反应结束后, 经 15 g/L 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物。获得带有 *Not* I、*Xba* I 酶切位点的 *PtpA* 全长基因。

1.5 构建重组真核表达质粒

对 PCR 产物进行纯化回收, 将回收产物与 p3×FLAG-CMV-10 真核表达载体进行双酶切后, 在 T₄ DNA 连接酶的作用下于 16 °C 金属浴过夜连接, 将连接产物转化到大肠埃希菌 DH5α 感受态细胞, 扩菌提取重组质粒后进行测序, 重组质粒命名为 FLAG-PtpA。

1.6 检测重组质粒在细胞中的表达

培养 HEK293T 细胞至汇合度约 75%, 使用转染试剂 Lipofectamine™ 3000 Transfection Reagent 将测序结果完全正确的重组质粒转入细胞, 转染 48 h 后, 收集细胞提取总蛋白, 进行 Western blot 检测。

1.7 双荧光素酶报告基因检测

通过共转 pGL4.32[luc2P/NF-κB-RE/Hygro] Vector 和 FLAG-PtpA 质粒, 以 10 ng/mL 的 TNF-α 刺激细胞激活 NF-κB 信号通路后, 观察 PtpA 蛋白对 NF-κB 信号通路激活作用的影响, 试验设置对照组, 分别于 0、2、4、8、12、24 和 48 h 用双荧光素酶检测试剂盒进行检测, 通过对比萤火虫荧光素酶和海肾荧光素酶的相对荧光强度的比值确定 NF-κB 信号通路的激活情况, 确定 PtpA 蛋白对 NF-κB 信号通路激活的作用。

1.8 荧光定量 PCR(qPCR) 检测细胞因子的表达量

HEK293T 细胞培养后进行转染: 一组不做处理, 另一组转染 FLAG-PtpA 质粒。分别于 0、2、4、8、12、24、48 和 72 h 收集细胞, 根据通用型总 RNA 抽提试剂盒说明书提取总 RNA, 按照逆转录产品 HiScript II 1st Strand cDNA Synthesis Kit 说明书进行 cDNA 的制备。以不同时间点样本的 cDNA 为模板, 分别使用所设计的 5 组引物 (序列见表 1) 同步进行扩增反应 (每个样本引物均设置 3 个重复孔), 每个浓度梯度设置 3 个重复孔, 设置阴性对照。根据 ChamQTM Universal SYBR® qPCR Master Mix 通用型 qPCR 预混液说明书配制反应体系及设置反应程序 (需避光), 使用罗氏公司 Roche Lightcycler 480 系统进行 qPCR, 反应结束后根据 Roche Lightcycler 480 系统操作说明进行数据处理。使用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法^[11], 计算分析不同细胞因子的 mRNA 相对表达量。

1.9 数据分析

双荧光素酶试验和 qPCR 试验数据利用 GraphPad Prism 5.0 软件进行分析和图表绘制, 采用 *t* 检验法进行差异显著性分析。

2 结果与分析

2.1 PtpA 基因的扩增及重组表达载体的构建

将 PtpA 基因进行 PCR 扩增后得到 492 bp 的基因片段, 与预期片段大小一致 (图 1), 将带有酶切位点的 PtpA 基因和 p3×FLAG-CMV-10 真核表达载体双酶切成功构建 FLAG-PtpA 重组质粒后, 用 p3×FLAG-CMV-10 真核表达载体通用引物进行 PCR 扩增, 得到约 750 bp 的片段 (图 2), 进行测序, 测序结果与 NCBI 上公布的序列一致 (Gene ID: 887373)。

2.2 重组质粒在细胞中的表达

2.2.1 细胞转染结果 培养 HEK293T 细胞至汇合度约 75%, 使用转染试剂 Lipofectamine™ 3000

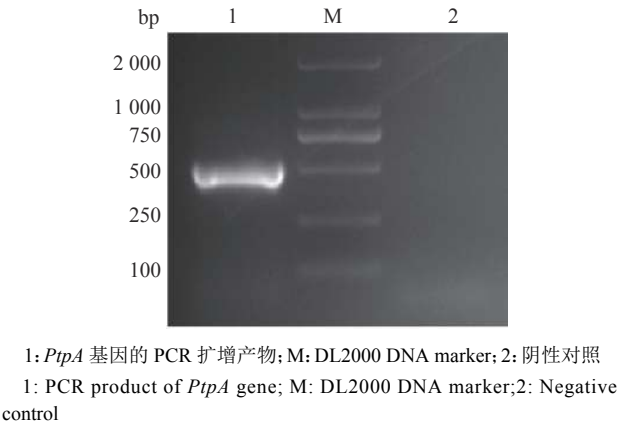


图 1 PtpA 基因的 PCR 扩增
Fig. 1 PCR amplification of the *PtpA* gene

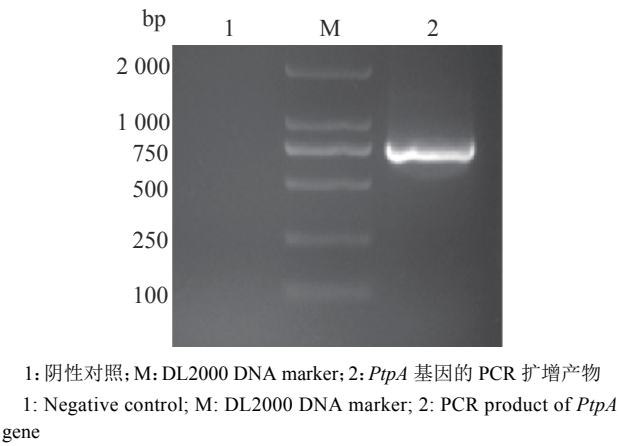
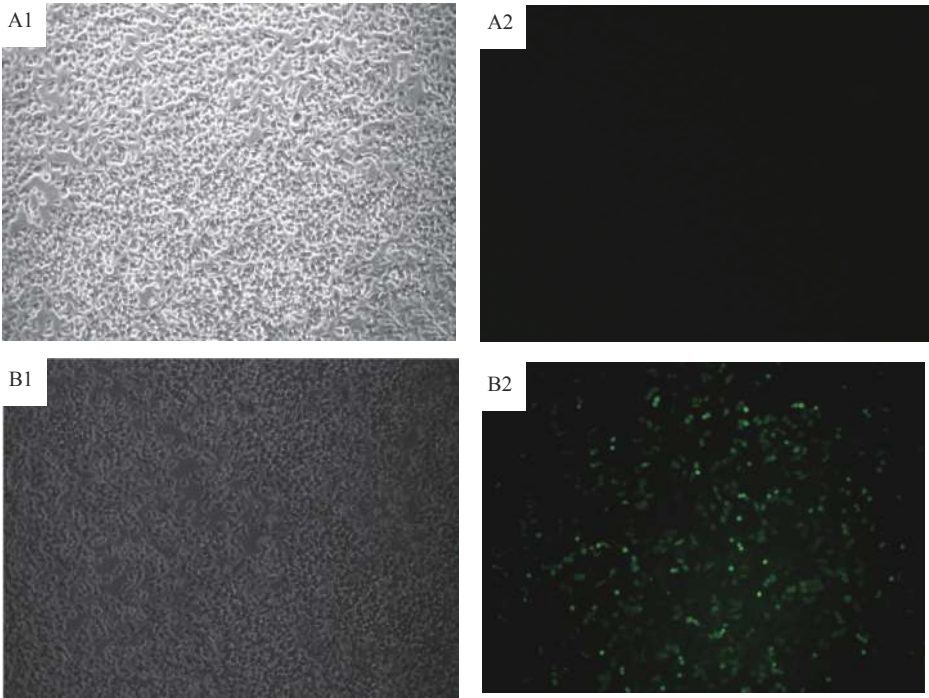


图 2 FLAG-PtpA 重组质粒中 PtpA 基因的 PCR 扩增
Fig. 2 PCR amplification of *PtpA* gene in FLAG-PtpA recombinant plasmid

Transfection Reagent 对细胞进行脂质体转染。细胞分为转染组和非转染组。由于 FLAG-PtpA 载体质粒在细胞中表达的蛋白无荧光, 无法简单而直接地判断质粒是否转入细胞, 而增强型荧光蛋白报告基因质粒 (pEGFP-N1) 在细胞中表达的蛋白带有绿色荧光, 可以直接在荧光显微镜下观察到, 因此转染组共转染 FLAG-PtpA 载体质粒和 pEGFP-N1 质粒可以确定转染效率, 非转染组不做任何处理。由图 3 的转染结果可以发现转染组转染效率约为 50%。

2.2.2 Western blot 检测结果 转染的细胞提取总蛋白用 SDS-PAGE 检测, 发现在相对分子质量为 22 000 处可见特异性蛋白条带 (图 4)。之后以抗 FLAG 标签的抗体为一抗, 对表达产物进行 Western blot 检测, 结果显示, 表达产物可与一抗特异性结合, 证明该蛋白是 PtpA 蛋白 (图 5), 表明 FLAG-PtpA 重组质粒在 HEK293T 细胞中成功表达。

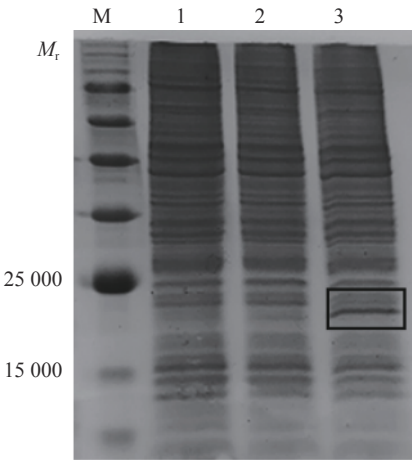


A1: 293T 未转染质粒 (白镜); A2: 293T 未转染质粒 (荧光); B1: 293T 转染 FLAG-PtpA 载体质粒+pEGFP-N1 质粒 (白镜); B2: 293T 转染 FLAG-PtpA 载体质粒+pEGFP-N1 质粒 (荧光)

A1: 293T untransfected plasmid (white mirror); A2: 293T untransfected plasmid (fluorescent); B1: 293T transfected FLAG-PtpA plasmid and pEGFP-N1 plasmid (white mirror); B2: 293T transfected FLAG-PtpA plasmid and pEGFP-N1 plasmid (fluorescence)

图 3 真核表达载体转染 293T 细胞

Fig. 3 Eukaryotic expression vector transfected 293T cells



M: 低相对分子质量蛋白质标准; 1: 空白对照; 2: HEK293T 细胞中转染 p3×FLAG-CMV-10 质粒; 3: HEK293T 细胞中转染 FLAG-PtpA 质粒

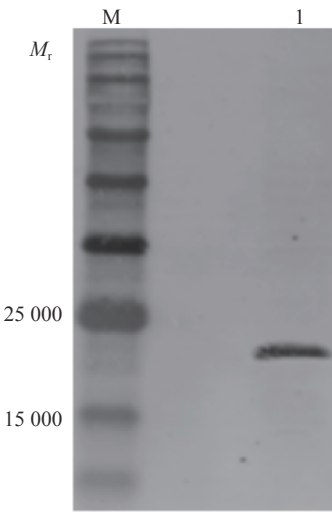
M: Low molecular weight protein standard; 1: Blank control; 2: p3×FLAG-CMV-10 plasmid transfected into HEK293T cells; 3: FLAG-PtpA plasmid transfected into HEK293T cells

图 4 HEK293T 细胞中 FLAG-PtpA 表达产物鉴定

Fig. 4 Identification of FLAG-PtpA expression product in HEK293T cells

2.3 双荧光素酶报告基因检测结果

转染后细胞分不同时间点收集后经检测发现, 转染 2 h 后, 对照组萤火虫荧光素酶和海肾荧光素酶的相对荧光强度比值是试验组的 2.93 倍, 差异显著 ($P<0.05$)。转染 4~24 h 后, 试验组与对照组相



M: 低相对分子质量蛋白质标准; 1: HEK293T 表达的 FLAG-PtpA 蛋白

M: Low molecular weight protein standard; 1: FLAG-PtpA protein expressed by HEK293T

图 5 HEK293T 表达 FLAG-PtpA 蛋白特异性分析

Fig. 5 HEK293T expression FLAG-PtpA protein specificity analysis

比差异极显著 ($P<0.01$), 说明转染 PtpA 表达质粒与否对 NF- κ B 信号通路的激活具有显著影响, PtpA 蛋白对 NF- κ B 信号通路的激活具有显著的抑制作用, 特别在信号通路激活早期的影响更为明显 (图 6)。

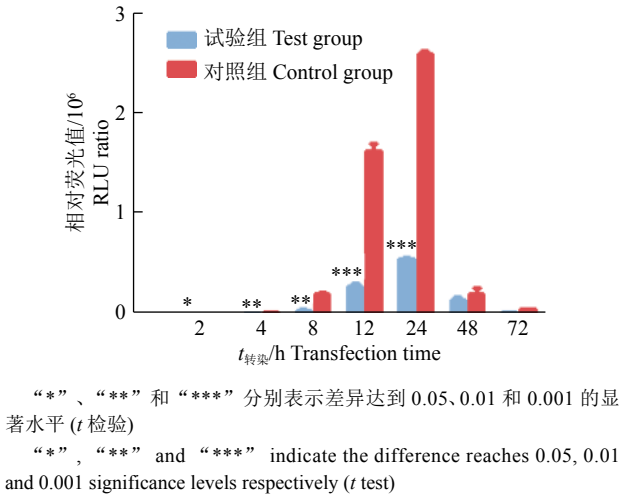


图 6 PtpA 蛋白对 NF-κB 信号通路激活的影响

Fig. 6 Effect of PtpA protein on activation of NF-κB signaling pathway

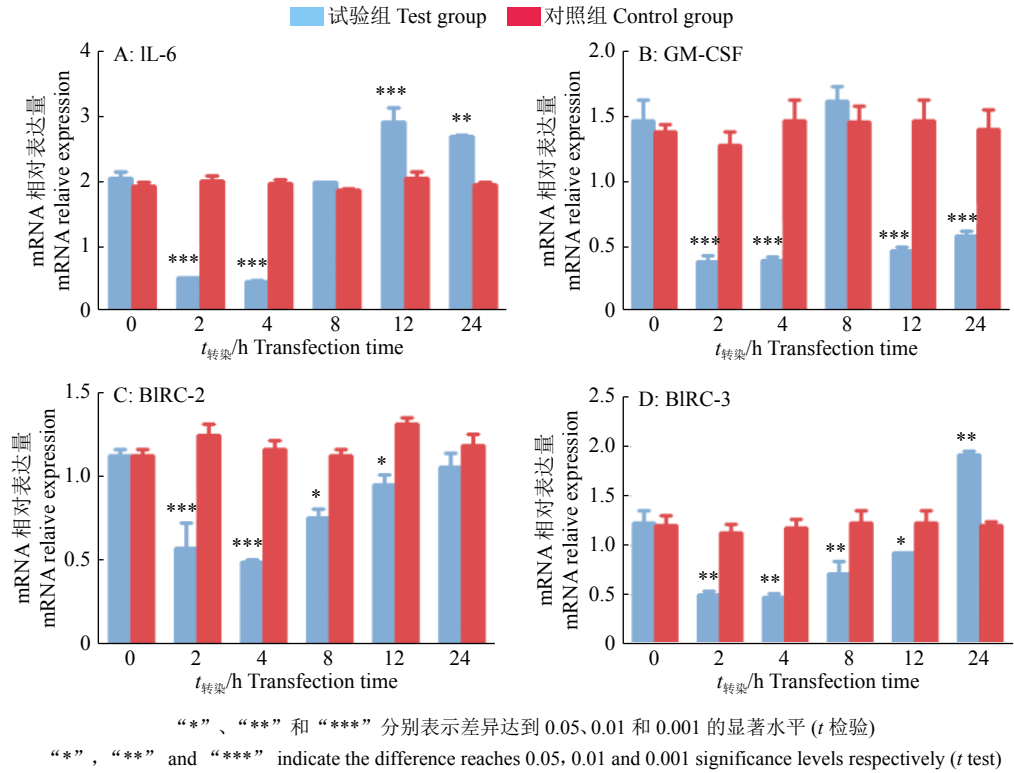


图 7 细胞因子的 mRNA 表达量

Fig. 7 mRNA expression of cell factors

3 讨论与结论

蛋白酪氨酸磷酸酶是从蛋白质上的磷酸化酪氨酸残基去除磷酸基团的一组酶。蛋白酪氨酸磷酸化是一种常见的翻译后修饰,可以为蛋白质相互作用和细胞定位产生新的识别基序,影响蛋白质稳定性并调节酶活性。维持蛋白酪氨酸磷酸化的适当水平对许多细胞功能是必不可少的^[12]。使用半胱氨酰-磷酸酶中间体,酪氨酸特异性蛋白磷酸酶催化去除与酪氨酸残基连接的磷酸基团。这些酶是信号转导

2.4 PtpA 蛋白对 NF-κB 信号通路相关细胞因子表达量的影响

荧光定量结果经使用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法分析,计算不同细胞因子的 mRNA 相对表达量。利用分析软件 Graphpad prism 5.0 分析每个时间点试验组与对照组数据 P 值,结果显示,对照组 IL-6、GM-CSF、BIRC-2 和 BIRC-3 的表达量在转染 2 h 后分别是试验组的 3.93、3.42、2.17 和 2.30 倍;在转染 4 h 后分别是试验组的 4.26、3.93、2.36 和 2.50 倍。在转染 2 h 和 4 h 后,IL-6、GM-CSF、BIRC-2、BIRC-3 的表达量与对照组相比都差异极显著 ($P<0.01$)(图 7),说明 PtpA 蛋白对上述 NF-κB 信号通路相关的细胞因子在免疫早期具有显著抑制作用。这也与之前 PtpA 蛋白对 NF-κB 信号通路激活影响的研究结果一致。

途径(例如 MAP 激酶途径)和细胞周期控制中的关键调节组分,并且在控制细胞生长、增殖、分化、转化和突触可塑性中发挥重要调控作用^[13-16]。在结核杆菌感染宿主后,牛分枝杆菌 *PtpA* 基因的去磷酸化为结核杆菌逃避宿主免疫清除发挥着重要作用^[17-18]。

本研究构建了 FLAG-PtpA 重组质粒,通过双荧光素酶报告系统对 PtpA 蛋白对 NF-κB 信号通路的具体作用做了初步探索。pGL4.32[luc2P/NF-κB-RE/Hygro] 载体是信号通路报告载体和哺乳动物载

体, 含有 5 个 NF-κB 应答原件, 可以驱动荧光素酶报告基因 *luc2P* 的表达, 分析 NF-κB 信号通路是否激活。试验结果表明, PtpA 蛋白对 NF-κB 信号通路的激活具有显著的抑制作用, 特别在信号通路激活早期的影响更为显著。这一结果与前人报道^[19-20] 的结果相符合: 结核分枝杆菌在感染机体后通过分泌一些蛋白来抑制宿主免疫应答, 从而逃避宿主清除作用后藏匿于细胞内, 在机体免疫能力降低后表现出致病力。本研究结果提示牛分枝杆菌 PtpA 蛋白可能在宿主感染病原菌后机体免疫应答早期抑制相关免疫应答信号通路的激活, 从而帮助结核分枝杆菌逃避宿主免疫系统清除, 使结核杆菌能够藏匿于机体细胞内。

本研究采用 qPCR 的方法继续探究了 PtpA 蛋白对 NF-κB 信号通路相关细胞因子表达量的影响, 以进一步确定 PtpA 蛋白对 NF-κB 信号通路具体调控机制。结果表明, PtpA 蛋白对 NF-κB 信号通路相关的细胞因子在免疫早期具有显著抑制作用, 这一结果提示 PtpA 蛋白在调控宿主先天免疫应答作用上主要集中在免疫应答早期, 这一结果与 PtpA 蛋白对 NF-κB 信号通路激活的影响结果一致。

目前对于结核病的防控研究已迫在眉睫, 而现在所常用的检测及免疫手段都有着不可控的缺陷, 对于结核病防控的研究来说, 找到一种有效的治疗药物或者免疫药物是未来的研究方向。本研究以分枝杆菌一个重要磷酸化酶 PtpA 蛋白为目标, 通过研究该蛋白对应答免疫相关的重要信号通路 NF-κB 信号通路的影响, 揭示了 PtpA 蛋白在机体免疫中所发挥的具体作用, 为后续研究有效的结核病防控药物提供了理论基础。

参考文献:

[1] SMITH N H, GORDON S V, DE LA RUA-DOME-NECH R, et al. Ecotypes of the *Mycobacterium tuberculosis* complex[J]. *J Theor Biol*, 2006, 239(2): 220-225.

[2] DELAHAY R J, DE LEEUW A N, BARLOW A M, et al. The status of *Mycobacterium bovis* infection in UK wild mammals: A review[J]. *Vet J*, 2002, 164(2): 90-105.

[3] MACIEL A, LOIKO M R, BUENO T S, et al. Tuberculosis in Southern Brazilian wild boars (*Sus scrofa*): First epidemiological findings[J]. *Transbound Emerg Dis*, 2018, 65(2): 518-526.

[4] PHILLIPS C J C, FOSTER C R W, MORRIS P A, et al. The transmission of *Mycobacterium bovis* infection to cattle[J]. *Res Vet Sci*, 2003, 74(2): 1-15.

[5] PUCKEN V B, KNUBBEN-SCHWEIZER G, DOPFER D, et al. Evaluating diagnostic tests for bovine tuberculosis in the southern part of Germany: A latent class analysis[J]. *PLoS One*, 2017, 12(6): e0179847.

[6] DE KANTOR I N and RITACCO V. An update on

bovine tuberculosis programmes in Latin American and Caribbean countries[J]. *Vet Microbiol*, 2006, 112(2/3/4): 111-118.

[7] STONE M J, BROWN T J and DROBNIIEWSKI F A. Human *Mycobacterium bovis* infections in London and Southeast England[J]. *J Clin Microbiol*, 2012, 50(1): 164-165.

[8] COWLEY S C, BABAKAIAFF R and AV-GAY Y. Expression and localization of the *Mycobacterium tuberculosis* protein tyrosine phosphatase PtpA[J]. *Res Microbiol*, 2002, 153(4): 233-241.

[9] CHAO Y, XING Y, CHEN Y, et al. Structure and mechanism of the phosphotyrosyl phosphatase activator[J]. *Mol Cell*, 2006, 23(4): 535-546.

[10] WANG J, LI B X, GE P P, et al. *Mycobacterium tuberculosis* suppresses innate immunity by coopting the host ubiquitin system[J]. *Nat Immunol*, 2015, 16(3): 237-245.

[11] PFAFFI M W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR[J]. *Nucleic Acids Res*, 2001, 29(9): e45.

[12] TONKS N K. Protein tyrosine phosphatases: From genes, to function, to disease[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2006, 11(7): 833-846.

[13] FU Y and GALAN J E. The *Salmonella typhimurium* tyrosine phosphatase SptP is translocated into host cells and disrupts the actin cytoskeleton[J]. *Mol Microbiol*, 1998, 27(2): 359-368.

[14] GOEBEL-GOODY S M, WILSON-WALLIS E D, ROYSTON S, et al. Genetic manipulation of STEP reverses behavioral abnormalities in a fragile X syndrome mouse model[J]. *Genes Brain Behav*, 2012, 11(5): 586-600.

[15] SHI L, POTTS M and KENNELLY P J. The serine, threonine, and/or tyrosine-specific protein kinases and protein phosphatases of prokaryotic organisms: A family portrait[J]. *FEMS Microbiol Rev*, 1998, 22(4): 229-253.

[16] YONGFANG Z, KURUP P, JIAN X, et al. Genetic reduction of striatal-enriched tyrosine phosphatase (STEP) reverses cognitive and cellular deficits in an Alzheimer's disease mouse model[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, 107(44): 19014-19019.

[17] WONG D, BACH H, SUN J, et al. *Mycobacterium tuberculosis* protein tyrosine phosphatase (PtpA) excludes host vacuolar-H⁺-ATPase to inhibit phagosome acidification[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011, 108(48): 19371-19376.

[18] WANG J, GE P, QIANG L, et al. The mycobacterial phosphatase PtpA regulates the expression of host genes and promotes cell proliferation[J]. *Nat Commun*, 2017, 8(1): 244.

[19] 孟露萍, 史梦婷, 包海洋, 等. 结核分枝杆菌 Rv2626c 蛋白对 RAW264.7 细胞凋亡的影响 [J]. *中国畜牧兽医*, 2016, 43(4): 892-898.

[20] VOLKMAN H E, POZOS T C, ZHENG J, et al. Tuberculous granuloma induction via interaction of a bacterial secreted protein with host epithelium[J]. *Science*, 2010, 327(5964): 466-469.