



结核分枝杆菌 Rv3194c 蛋白的亚细胞定位

赵东岳, 王德民, 林丹枫*

福建师范大学生命科学学院, 福建省发育与神经生物学重点实验室, 福建 福州 350108

摘要:【目的】Rv3194c 基因编码的是结核分枝杆菌的 PDZ 信号蛋白, 本研究探讨该蛋白的亚细胞定位, 为其细胞结合蛋白的筛选奠定基础。【方法】从 H37Rv 基因组中扩增出编码只含有 PDZ 结构域的 tRv3194c (Rv3194c 1–234 aa) 的基因片段, 在 3'端加 T2A 和 EGFP 序列, 一并插入真核表达载体构建出 pcDNA3.1-tRv3194c-T2A-EGFP。将构建好的质粒瞬时转染 L929 细胞, 并共感染重组痘苗病毒 vTF7-3, 用间接免疫荧光、流式细胞分选以及 Western blotting 检测融合蛋白的表达以及亚细胞定位。【结果】成功构建出真核表达载体 pcDNA3.1-tRv3194c-T2A-EGFP, 瞬时转染 L929 细胞后融合蛋白 tRv3194c 定位于线粒体膜上, 且重组痘苗病毒 vTF7-3 的感染有助于靶蛋白表达水平的提高。【结论】Rv3194 蛋白的 PDZ 结构域与线粒体外膜相关蛋白结合, 为了解该蛋白在细胞内的致病机制提供重要线索。

关键词: 结核分枝杆菌, Rv3194c 蛋白, 线粒体, 重组痘苗病毒, 重组质粒

结核病是由结核分枝杆菌 (*Mycobacterium tuberculosis*) 和牛分枝杆菌引起的人畜共患的慢性消耗性传染病, 该病极易传染, 除人外还可感染牛、羊、鹿等动物, 被世界动物卫生组织列为 B 类动物疫病^[1]。主要的致病性菌株有人型^[2]、牛型^[3]和非洲型^[4]结核分枝杆菌, 其中以人型结核分枝杆菌感染最常见并且致病力最强。宿主在感染结核分枝杆菌后, 被巨噬细胞吞噬进而定殖在肺泡巨噬细胞中, 也可在胞外生长^[5–6], 因此, 结核分枝杆菌的携带者没有典型的结核病症状, 在短

期内没有传染性, 但是这些携带者一旦受到相应的刺激或者免疫力低下时, 就有可能发展成为具有传染性的结核病。这种长期处于潜伏感染状态的结核分枝杆菌携带者已成为全世界致力于消灭结核病的又一大障碍。结核杆菌的致病机制复杂, 一方面随着结核杆菌长期与宿主巨噬细胞的感染-免疫斗争, 其自身也随之进化出免疫逃逸的策略来抵御宿主的免疫攻击, 使结核杆菌的免疫反应变得越来越复杂^[7]; 另一方面, 感染结核杆菌的患者主要使用抗结核药物治疗, 例如利福平、异烟

基金项目: 福建省教育厅项目(A类)(JAT170137, JT180080); 福建师范大学生命科学学院项目(FZSKK2018003, FZSKK2018004)

*通信作者。Tel: +86-591-22860765; E-mail: mountain@fjnu.edu.cn

收稿日期: 2018-04-23; 修回日期: 2018-07-10; 网络出版日期: 2018-12-03

胍、乙胺丁醇、吡嗪酰胺和链霉素等,但是由于长期用药引起的耐菌株的出现,使结核病的发病呈现回升现象,尤其是多重耐药分枝杆菌的出现以及病毒的混合感染,使得对结核病的治疗变得越来越困难^[8]。因此研究结核病的致病机制,寻找新型、高效的药物靶点成为当务之急。结核分枝杆菌 Rv3194c 蛋白的功能,至今还不清楚,经生物信息学预测,该蛋白含有 PDZ (PSD-95、DLG、ZO-1) 结构域、Lon C 结构域以及跨膜区,推测该蛋白可能为分泌蛋白。从蛋白质组学的角度讲,PDZ 结构域分布广泛,结合机制多样,对蛋白与蛋白相互作用起着特殊的调节作用^[9]。富含 PDZ 结构域的蛋白通常是蛋白相互作用的“节点”,使其成为下一代药物的理想靶标^[10],因此设计针对 PDZ 结构域的药物可特异性阻断与其特定配体之间的相互作用,切断其信号传导,为相关疾病的治疗提供新途径^[11]。本课题组前期发现 Rv3194c 的 PDZ 结构域可以结合细胞基质中的糖胺聚糖类分子具有黏附素特性^[12]。Rv3194c 的 PDZ 结构域在细胞内的配体还不清楚,因此,阐明 Rv3194c 蛋白在细胞内的定位,可为筛选该蛋白在细胞内的配体奠定基础,对于理解 Rv3194c 蛋白的致病机制以及新型药物靶点的开发,具有非常重要的指导意义。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株、质粒、细胞与病毒: 菌株 *E. coli* DH5 α 、结核分枝杆菌 *H37Rv* 基因组、表达 T7 RNA 多聚酶的重组痘苗病毒 vTF7-3 以及 L929 细胞系均由本实验室保存。真核表达质粒 pcDNA3.1 (plasmid #52535) 购自 Addgene。

1.1.2 主要试剂: Primer star 高保真酶、T4 DNA Ligases、各种限制性内切酶、Agarose Gel DNA Purification Kit 均购自 TaKaRa 生物工程有限公司。质粒提取试剂盒、胶回收试剂盒以及 PCR 纯化试剂盒均购于 Omega 公司; 转染试剂 Lipofectamine 3000, Alexa Fluor-488/688/800 标记的山羊抗鼠 IgG 的荧光二抗,均购自 Thermo Fisher 公司; 小鼠抗 Flag-tag 单克隆抗体购自 Novagen; Digitonin、Triton X-100、PIPES 系 Sigma 公司产品。

1.1.3 引物: 用在线服务器 pfam 分析结核分枝杆菌 Rv3194c (Accession: AFN51190) 的氨基酸序列,发现该蛋白包含 PDZ 结构域(115–197 aa)和 Lon C 结构域(236–305 aa),为了研究该 PDZ 结构域在细胞内的功能,我们需要在细胞内表达截短的 Rv3194c (Rv3194c 1–234 aa 片段),其编码碱基为 702 bp。我们设计如下引物从 *H37Rv* 基因组中扩增出编码 Rv3194c (1–234aa) 的基因片段,基因的 3'端引入 T2A 序列,其引物序列: Rv3194c-F: 5'-**GCTAGCGTGAATAGGCGGATATTGACC**-3'; Rv3194c-R: 5'-**TGGGCCAGGATTCTCCTCGACGTCACCGCATGTTAGACGACTTCCTCTGCCCTCTCCACTGCCCGACGTTGGCGAGGTGGA**-3',其中粗字体为限制性内切酶位点 *Nhe* I (**GCTAGC**)、下划线的序列为 T2A 序列。我们设计如下引物从质粒 pEGFP-N1 中扩增出 EGFP 基因,其基因的 5'端引入 T2A 序列,其引物序列: EGFP-F: 5'-**GGCAGTGGAGAGGGCAGAGGAAGTCGTCTAACATGCGGTGACGTCGAGGAGAATCCTGGCCCAATG**GTGAGCAAGGGCGA-3', EGFP-R: 5'-**GAATTCTCACAAATTTTGTAAATCCAGAGG**-3',其中粗字体为限制性内切酶位点 *Eco*R I (**GAATTC**),下划线的序列为 T2A 序列。我们还设计如下引物从

H37Rv 基因组中扩增出编码 Rv3194c (1–234 aa) 的基因片段, 5'端引入限制性内切酶位点 *Nhe* I (GCTAGC), 3'端引入限制性内切酶位点 *EcoR* I (GAATTC), 其引物序列: *Rv3194c*-F1: 5'-GCTAGCGTGAATA GGCGGATATTG ACC-3', *Rv3194c*-R1: 5'-GAATTCGACGTTGGCGAGGT GGA-3', 其中粗字体为限制性内切酶位点。

1.2 pcDNA3.1-*tRv3194c*-T2A-EGFP 以及 pcDNA3.1-*tRv3194c* 重组质粒的构建

利用设计的上游引物 *Rv3194c*-F 以及下游引物 *Rv3194c*-R, 以结核分枝杆菌 *H37Rv* 基因组为模板, PCR 扩增出 5'端引入酶切位点 *Nhe* I、3'端引入 T2A 序列的 *tRv3194c* (*Rv3194c* 1–702 bp) -T2A 片段。PCR 扩增体系(50 μ L): 结核分枝杆菌 *H37Rv* 基因组 DNA 1 μ L (100 ng DNA), Primer star Max DNA polymerase 25 μ L, 10 μ mol/L 上下游引物各 1 μ L, ddH₂O 22 μ L。PCR 扩增参数为: 94 $^{\circ}$ C 5 min; 94 $^{\circ}$ C 1 min 58 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10 min。PCR 扩增完成后, 割胶回收并用 PCR 产物纯化试剂盒进行纯化。利用设计上游引物 *EGFP*-F 以及下游引物 *EGFP*-R, 以质粒 pEGFP-N1 质粒为模板, PCR 扩增出 5'端引入 T2A 序列、3'端引入 *EcoR* I 限制性酶切位点的 T2A-EGFP 序列, 该 PCR 反应条件和反应体系同上。利用设计上游引物 *Rv3194c*-F 以及下游引物 *EGFP*-R, 以扩增产物 *tRv3194c*-T2A 和 T2A-EGFP 为模板, PCR 扩增出 *tRv3194c*-T2A-EGFP 片段, 该 PCR 反应体系和反应条件同上。利用 *Nhe* I-*EcoR* I 分别酶切 pcDNA3.1 质粒和 *tRv3194c*-T2A-EGFP 产物, 然后用 PCR 纯化试剂盒回收酶切产物, 最后通过 T4 DNA 连接酶定向克隆入质粒的 *Nhe* I/*EcoR* I 位点, 得到

pcDNA3.1-*tRv3194c*-T2A-EGFP 重组质粒(图 1)。利用设计上游引物 *Rv3194c*-F1 以及下游引物 *Rv3194c*-R1, 以结核分枝杆菌 *H37Rv* 基因组为模板, PCR 扩增出 5'端引入酶切位点 *Nhe* I、3'端引入 *EcoR* I 的 *tRv3194c* (*Rv3194c* 1–702 bp) 基因片段, 该 PCR 反应条件和反应体系同上, 然后利用 *Nhe* I-*EcoR* I 分别酶切 pcDNA3.1 质粒和 *tRv3194c*, 用 PCR 纯化试剂盒回收酶切产物, 最后通过 T4 DNA 连接酶定向克隆入质粒的 *Nhe* I/*EcoR* I 位点, 得到 pcDNA3.1-*tRv3194c* 重组质粒。

1.3 细胞转染

使用质粒提取试剂盒提取重组质粒 pcDNA3.1-*tRv3194c*-T2A-EGFP 以及 pcDNA3.1-*tRv3194c*。L929 细胞培养至汇合度达到 60%–80% 时, 用 PBS 漂洗 3 次, 分别加入 5 MOI 的 vTF7-3, 37 $^{\circ}$ C 吸附 1 h。根据 Superfect Transfection Reagent 转染试剂的说明书分别转染上述构建的重组质粒, 转染后小心移除 Superfect-DNA 混合物, 用 2 mL 无菌 PBS 洗涤细胞 3–4 次, 加入含 10% 胎牛血清培养基, 在 32 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 条件下继续培养 24 h。

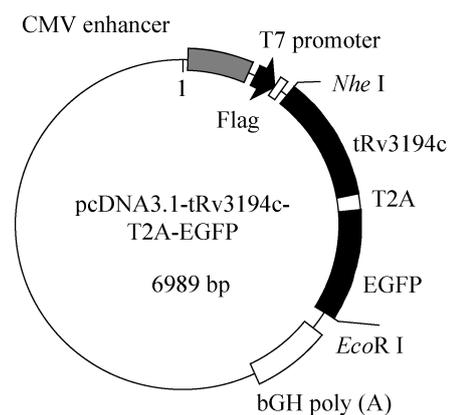


图 1. 重组质粒 pcDNA3.1-*tRv3194c*-T2A-EGFP 示意图

Figure 1. Schematic structure of recombinant plasmid pcDNA3.1-*tRv3194c*-T2A-EGFP.

1.4 间接免疫荧光(IFA)

共聚焦小皿用多聚赖氨酸(50 $\mu\text{g}/\text{mL}$)包被过夜后,用无菌水漂洗3次晾干备用。将转染重组质粒 pcDNA3.1-*tRv3194c* 的 L929 细胞接种到多聚赖氨酸包被过的共聚焦小皿,在含有 5%胎牛血清的细胞培养基中培养过夜,然后再用 250 nmol/L 的 MitoTracker (green)在培养液中处理细胞 30 min;用 PBS 溶液漂洗3次,冷丙酮(-20 $^{\circ}\text{C}$)固定 10 min,再用含有 100 mmol/L 甘氨酸的 PBS 冲洗3次,最后再用 PBS 洗3次;滴加封闭液(含 1%牛血清白蛋白的 PBS)室温放置 30 min;分别滴加抗小鼠的 anti-flag 的抗体(1:3000 稀释),4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜后,用 PBS 漂洗3次;滴加封闭液稀释的山羊抗鼠的 Alexa Fluor-688 荧光二抗(1:5000 稀释),37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 2 h,用 PBS 漂洗3次;滴加荧光淬灭剂封片,在共聚焦显微镜下观察融合蛋白的共定位情况。

1.5 Western blotting 分析

将细胞裂解液用 10%的 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离,转移至硝酸纤维素膜上;用含 5%脱脂奶以及 0.02% NaN_3 的 TBS 封闭膜 30 min;用 PBST 在摇床上漂洗 PVDF 膜 3 次,每次 10 min;小鼠抗 Flag 标签蛋白的单克隆抗体用封闭液按照 1:2000 的比例稀释,在 4 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育过夜;用 PBST 在摇床上漂洗 PVDF 膜 3 次;滴加封闭液稀释的山羊抗鼠的 Alexa Fluor-800 荧光二抗(1:10000 稀释),室温孵育 2 h;用 PBST 在摇床上漂洗 PVDF 膜 3 次。用红、绿双色荧光成像系统检测。

1.6 活细胞的流式分析

L929 细胞培养至汇合度达到 60%–80%时,用 PBS 漂洗 3 次,加入 5 MOI 的重组痘苗病毒 vTF7-3,37 $^{\circ}\text{C}$ 吸附 1 h,对照组不加重重组痘苗病

毒。根据 Superfect Transfection Reagent 转染试剂的说明书分别转染重组质粒 pcDNA3.1-*tRv3194c-T2A-EGFP*, 转染后小心移除 Superfect-DNA 混合物,用 2 mL 无菌 PBS 洗涤细胞 3–4 次,加入含 10%胎牛血清培养基,在 32 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 条件下继续培养 24 h 后,分别收集 10^7 个细胞,放入流式细胞仪进行流式分选,观察融合蛋白的表达效率。

2 结果和分析

2.1 *tRv3194c* 融合蛋白表达载体的构建

以结核杆菌标准株 *H37Rv* 基因组 DNA 为模板,用 PCR 扩增出 *Rv3194c* (1–702 bp)片段,该截短型的基因片段表示为 *tRv3194c*,其所编码的氨基酸序列中仅包含 PDZ 结构域。将 PCR 产物进行 1%琼脂糖凝胶电泳,结果显示目的片段得到扩增,并与预期扩增值 702 bp 大小相一致(图 2)。*Rv3194c* (1–702 bp)测序证实正确后与空载的真核表达质粒 pcDNA3.1(-) 连接,构建出 pcDNA3.1-*tRv3194c* 重组质粒,用限制性内切酶 *Nhe* I 和 *Eco*R I 酶切后所得片段大小均与预测片段大小一致(图 3),测序结果也证明基因克隆正确。

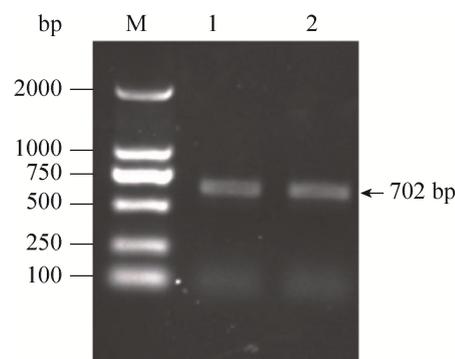


图 2. 截短 *Rv3194c* 基因的 PCR 扩增

Figure 2. Gene fragment of truncated *Rv3194c* amplified by PCR. M: DNA marker 2000; 1, 2: *Rv3194c* (1–702 bp).

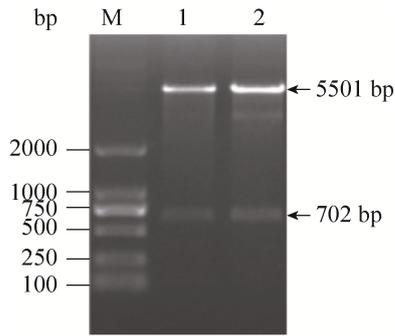


图 3. 质粒 pcDNA3.1-*tRv3194c* 的酶切鉴定图谱
Figure 3. Restrictive enzymatic digestion patterns of recombinant plasmid pcDNA3.1-*tRv3194c*. M: DNA marker 2000; 1, 2: *Nhe* I and *Eco*R I.

2.2 *tRv3194c*-T2A-EGFP 融合蛋白表达载体的构建

分别以结核杆菌标准株 *H37Rv* 基因组 DNA 以及质粒 pEGFP-N1 为模板,通过设计引物用 PCR 分别扩增出 *tRv3194c*-T2A 以及 T2A-EGFP 片段。通过上述扩增产物为模板,通过重叠 PCR 扩增出融合片段 *tRv3194c*-T2A-EGFP。将重叠 PCR 的产物进行 1%琼脂糖凝胶电泳,结果显示目的片段得到扩增,并与预期扩增值 1485 bp 大小相一致(图 3)。测序证实正确后与空载的真核表达质粒 pcDNA3.1(-)连接,构建出 pcDNA3.1-*tRv3194c*-T2A-EGFP 重组质粒,用限制性内切酶 *Nhe* I 和 *Eco*R I 酶切后所得片段大小均与预测片段大小一致(图 4),测序结果也证明基因克隆正确。

2.3 融合蛋白 *tRv3194c* 的亚细胞定位

Rv3194c 蛋白的氨基酸序列中包含 PDZ (115–197 aa)结构域和 Lon C (236–305 aa)结构域,为了筛选 *Rv3194c* 蛋白的 PDZ 结构域在细胞内的配体蛋白,必须明确 *Rv3194c* 蛋白在细胞器的定位。我们构建重组质粒 pcDNA3.1-*tRv3194c* 仅在细胞中表达含有 PDZ 结构域的融合蛋白 Flag-

tRv3194c (*Rv3194c* 1–234 aa)。我们在转染 pcDNA3.1-*tRv3194c* 质粒的 L929 细胞,首先用荧光染料 MitoTracker (green)标记细胞中的线粒体,再用 anti-Flag 抗体标记融合蛋白 Flag-*tRv3194c* (红光)。荧光共聚焦实验发现,融合蛋白 *tRv3194c* (红光)与线粒体发生共定位,并且感染重组痘苗病毒 vTF7-3 的细胞有助于融合蛋白 *tRv3194c* 的表达(图 5),说明 *Rv3194c* 蛋白的 PDZ 结构域的细胞内配体位于线粒体外膜上。

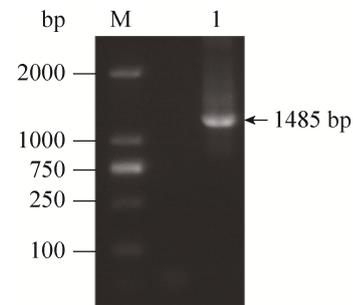


图 4. 重叠 PCR 扩增 *tRv3194c*-T2A-EGFP 基因片段
Figure 4. Gene fragment of *tRv3194c*-T2A-EGFP amplified by overlap PCR. M: DNA marker 2000; 1: *Rv3194c* (1–702 bp).

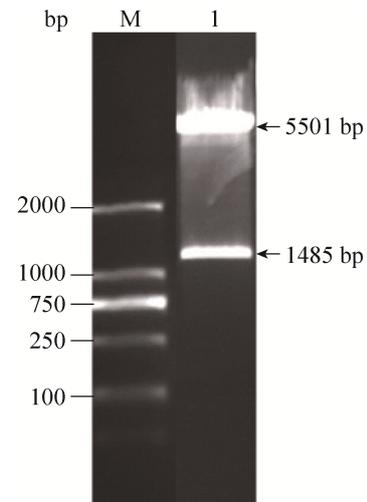


图 5. 质粒 pcDNA3.1-*tRv3194c*-T2A-EGFP 的酶切鉴定图谱
Figure 5. Restrictive enzymatic digestion patterns of recombinant plasmid pcDNA3.1-*tRv3194c*-T2A-EGFP. M: DNA marker 2000; Lane 1, 2: *Nhe* I and *Eco*R I.

2.4 重组痘苗病毒 vTF7-3 可有效增强融合蛋白的表达

免疫荧光实验发现(图 6), 重组病毒 vTF7-3 感染的细胞中有助于融合蛋白 tRv3194c 的表达。我们进一步通过流式细胞分选实验, 发现与重组表达质粒 pcDNA3.1-tRv3194c-T2A-EGFP 转染未感染 vTF7-3 病毒的细胞相比, 细胞发出绿色荧光的数目明显增多(从 19% 提高到 35%), 说明转染的细胞感染 vTF7-3 后, 融合蛋白 tRv3194c 的表达量显著提高(图 7)。同时 Western blotting 发现, 重组质粒 pcDNA3.1-tRv3194c-T2A-EGF 转染感染病毒的细胞中融合蛋白 tRv3194c 的表达量显著增加, 与流式细胞实验结果一致(图 8)。

3 讨论

结核分枝杆菌 Rv3194c 蛋白的生物学功能至今还不完全清楚, 我们课题组在前期实验中初步发现, 该蛋白具有黏附素特性, 能够结合细胞外基质中的糖胺聚糖类分子, 其具体的黏附机制仍在探索中。由于 Rv3194c 蛋白的 PDZ 结构域具有

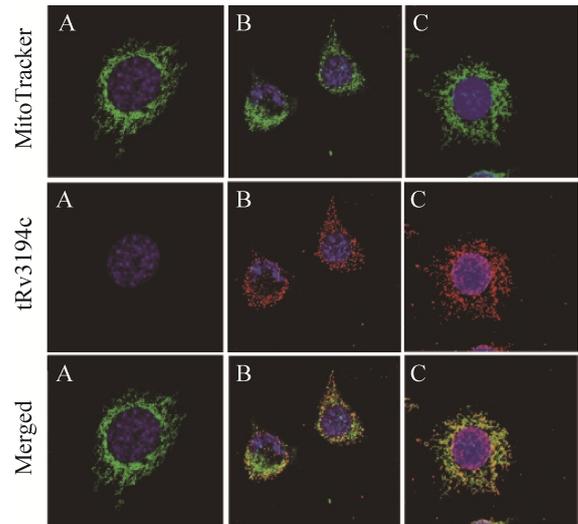


图 6. tRv3194c 与线粒体的共定位

Figure 6. Co-localization of tRv3194c and mitochondria. A: L929 cells transfected with empty vector pcDNA3.1 were cultured in medium overnight, and followed treatment with MitoTracker (250 nmol/L) for 30 min; B: L929 cells transfected with pcDNA3.1-tRv3194c were cultured in medium overnight, and followed treatment with MitoTracker (250 nmol/L) for 30 min; C: L929 cells added to 5 MOI vaccinia virus vTF7-3 were incubated at 37 °C for 1 h, and followed transfection with pcDNA3.1-tRv3194c before treatment with MitoTracker (250 nmol/L) for 30 min.

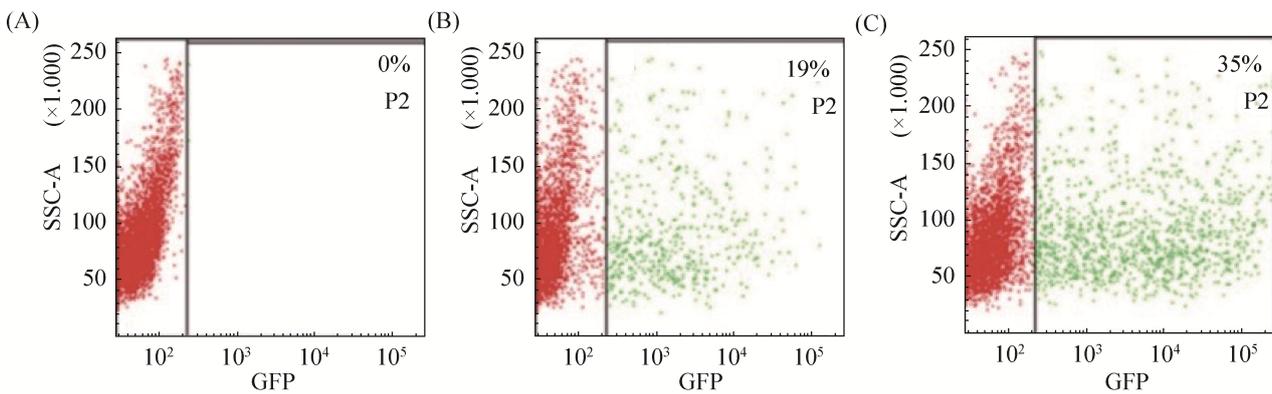


图 7. 流式细胞分选

Figure 7. Flow cytometry sorting. A: L929 cells were transfected with empty vector pcDNA3.1; B: L929 cells were transfected with recombinant plasmid pcDNA3.1-tRv3194c-T2A-EGFP; C: L929 cells added to vTF7-3 were incubated at 37 °C for 1 h before transfection with recombinant plasmid pcDNA3.1-tRv3194c-T2A-EGFP.

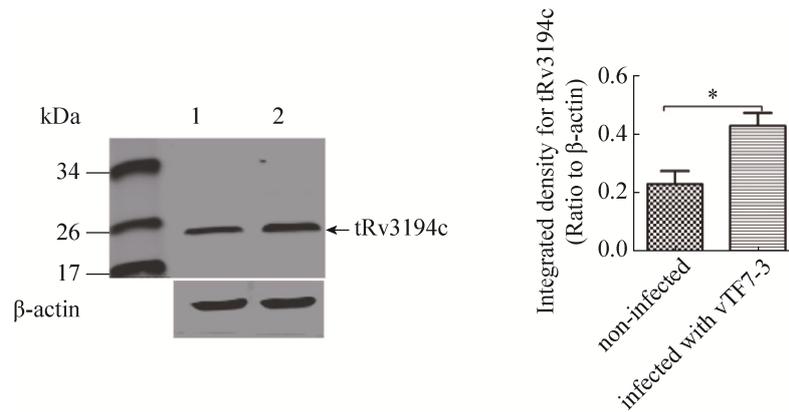


图 8. tRv3194c 的 Western-blot 分析

Figure 8. Analysis of western-blot for tRv3194c. L929 cells were lysed, and then extracted the total protein to detect tRv3194c by western blot using anti-flag antibody. 1: L929 cells were transfected with recombinant plasmid pcDNA3.1-tRv3194c-T2A-EGFP; 2: L929 cells added to vTF7-3 were incubated at 37 °C for 1 h before transfection with recombinant plasmid pcDNA3.1-tRv3194c-T2A-EGFP.

结合配体多样性的特点^[9], 因此我们试图寻找 Rv3194c 蛋白在细胞内的结合蛋白。本研究摸索了提高截短 Rv3194c (1–234 aa) 蛋白的表达量的多种方法, 可采取密码子优化, 也可共感染表达 T7 RNA 多聚酶的重组痘苗病毒^[13–14]。重组痘苗病毒 vTF7-3 感染细胞后可在胞浆中表达 T7 RNA 多聚酶, 从而可利用载体上的 T7 启动子, 高效率地转录, 并利用自身的酶合成 5'加帽和 3'加尾的 mRNA, 被宿主细胞的翻译系统翻译该编码基因^[15]。在本实验中, pcDNA3.1-tRv3194c-T2A-EGFP 重组质粒转染入细胞后, 进入细胞核的部分质粒在 CMV 启动子的作用下进行转录; 细胞浆中的质粒在病毒的 DNA 多聚酶的作用下大量复制使其拷贝数显著增加, 然后靶基因在 T7 启动子调控下由 vTF7-3 合成的 T7 RNA 多聚酶进行转录, 并且在胞浆中完成 mRNA 的加工, 显著提高靶蛋白的表达效率^[16]。综上所述, 我们通过感染表达 T7 RNA 多聚酶的重组痘苗病毒, 可有效增强融合蛋白 tRv3194c 的

表达, 并且该蛋白的 PDZ 结构域与线粒体外膜蛋白相结合, 这些结果的取得为进一步纯化 Rv3194c 蛋白的细胞结合蛋白、深入阐明结核杆菌的感染机制提供重要的线索。

参考文献

- [1] O'Reilly LM, Daborn CJ. The epidemiology of *Mycobacterium bovis* infections in animals and man: a review. *Tubercle and Lung Disease*, 1995, 76 Suppl: 1–46.
- [2] Someya S, Hayashi O, Tajima Y, Endo M. Studies on the virulence of tubercle bacilli. III. The fate of human type and bovine type tubercle bacille in various organs of intravenously infected mice. *Kekkaku*, 1951, 26(2): 74–78.
- [3] Ascoli A. Reaction of the cholemic calf to *Mycobacterium tuberculosis, bovine type*. *Giornale Italiano Della Tuberculosis*, 1950, 4(3): 129–130.
- [4] Castets M, Boisvert H, Grumbach F, Brunel M, Rist N. Tuberculosis bacilli of the African type: preliminary note. *Revue de Tuberculose et de Pneumologie*, 1968, 32(2): 179–184.

- [5] Flynn JL, Chan J. Immunology of tuberculosis. *Annual Review of Immunology*, 2001, 19(1): 93–129.
- [6] van Crevel R, Ottenhoff THM, van der Meer JWM. Innate Immunity to *Mycobacterium tuberculosis*. *Clinical Microbiology Reviews*, 2002, 15(2): 294–309.
- [7] Puvacić S, Dizdarević J, Santić Z, Mulaomerović M. Protective effect of neonatal BCG vaccines against tuberculous meningitis. *Bosnian Journal of Basic Medical Sciences*, 2004, 4(1): 46–49.
- [8] Shenai S, Rodrigues C, Mehta A. Rapid speciation of 15 clinically relevant mycobacteria with simultaneous detection of resistance to rifampin, isoniazid, and streptomycin in *Mycobacterium tuberculosis* complex. *International Journal of Infectious Diseases*, 2009, 13(1): 46–58.
- [9] Javier RT, Rice AP. Emerging theme: cellular PDZ proteins as common targets of pathogenic viruses. *Journal of Virology*, 2011, 85(22): 11544–11556.
- [10] Hormozdiari F, Salari R, Bafna V, Sahinalp SC. Protein-protein interaction network evaluation for identifying potential drug targets. *Journal of Computational Biology*, 2010, 17(5): 669–684.
- [11] Houslay MD. Disrupting specific PDZ domain-mediated interactions for therapeutic benefit. *British Journal of Pharmacology*, 2009, 158(2): 483–485.
- [12] Zhao DY, Lin LL, Wen FL. Expression, purification and characterization of Rv3194c protein from *Mycobacterium tuberculosis*. *Acta Microbiologica Sinica*, 2016, 56(12): 1847–1855. (in Chinese)
赵东岳, 林莉莉, 温福利. 结核分枝杆菌 Rv3194c 蛋白的表达、纯化及活性鉴定. *微生物学报*, 2016, 56(12): 1847–1855.
- [13] Xiao XD, Chakraborti S, Dimitrov AS, Gramatikoff K, Dimitrov DS. The SARS-CoV S glycoprotein: expression and functional characterization. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2003, 312(4): 1159–1164.
- [14] Simmons G, Reeves JD, Rennekamp AJ, Amberg SM, Piefer AJ, Bates P. Characterization of severe acute respiratory syndrome-associated coronavirus (SARS-CoV) spike glycoprotein-mediated viral entry. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2004, 101(12): 4240–4245.
- [15] Wu YS, Feng Y, Dong WQ, Zhang YM, Li M. A vaccinia replication system for producing recombinant hepatitis C virus. *World Journal of Gastroenterology*, 2004, 10(18): 2670–2674.

Subcellular localization of Rv3194c protein from *Mycobacterium tuberculosis*

Dongyue Zhao, Demin Wang, Danfeng Lin*

Fujian Key Laboratory of Developmental and Neuro Biology, College of Life Sciences, Fujian Normal University, Fuzhou 350108, Fujian Province, China

Abstract: [Objective] To investigate the expression and subcellular localization of post-synaptic density-95, *Drosophila* tumor suppressor protein diskslarge-1, the tight junction protein zonula occludentes 1 signal protein encoded by *Rv3194c* gene from *Mycobacterium tuberculosis*, and to serve the identification of the cellular binding proteins of Rv3194c protein. [Methods] The gene encoding tRv3194c (Rv3194c 1–234 aa) with T2A and EGFP sequence was cloned by PCR from the genomic *H37Rv*, then inserted into the eukaryotic expression vector to construct pcDNA3.1-tRv3194c-T2A-EGFP. Indirect immune fluorescence assay, flow cytometry sorting and Western blotting assay were used to observe subcellular localization, when L929 cells were transfected with constructs before infection with the recombinant vaccinia virus vTF7-3 expressing T7 RNA polymerase. [Results] The eukaryotic expression vector pcDNA3.1-tRv3194c-T2A-EGFP was constructed correctly. After the transient transfection with the plasmid, localization of fusion protein tRv3194 in mitochondria was observed by immune fluorescence assay. The dramatically enhanced expression level by co-infection with vTF7-3 before transfection was detected by flow cytometry sorting and Western-blotting assay. [Conclusion] Post-synaptic density domain in Rv3194c protein can bind to its ligand protein which located in mitochondrial outer membrane, which provides a key clue to understand its pathogenic mechanism in intracellular.

Keywords: *Mycobacterium tuberculosis*, Rv3194c protein, mitochondria, recombinant vaccinia virus, recombinant plasmid

(本文责编: 李磊)

Supported by the Educational Department Project (Category A) of Fujian Province (JAT170137, JT180080) and by the College of Life Sciences of Fujian Normal University (FZSKK2018003, FZSKK2018004)

*Corresponding author. Tel: +86-591-22860765; E-mail: mountain@fjnu.edu.cn

Received: 23 April 2018; Revised: 10 July 2018; Published online: 3 December 2018