

DOI:10.13350/j.cjpb.250309

· 论著 ·

结核分枝杆菌 PPE68 蛋白稳定片段的原核表达及纯化*

程龙云, 谢荣现, 李丽, 袁西露, 祝姚姚, 刘晓宇**, 李冰清**

(山东第一医科大学(山东省医学科学院)临床与基础医学院(基础医学研究所)病原生物学系, 山东济南 250000)

【摘要】 **目的** 了解结核分枝杆菌 PPE68 稳定片段,对稳定片段蛋白进行原核表达及纯化,为 PPE68 的结构解析奠定基础。**方法** 使用 Expasy-ProParam、MEME 等生信网站对 PPE68 的基本性状和序列进化保守性进行分析;使用双酶切方法,PCR 扩增 PPE68 基因,并克隆到 pGL01 载体上;使用大肠埃希菌 BL21(DE3)进行 PPE68 片段蛋白的原核表达,在 IPTG (isopropyl β -D-thiogalactoside)诱导表达后,利用 SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis)电泳分析表达产物并使用镍离子亲和层析及凝胶过滤层析的方法对表达产物进行体外纯化。后通过胰蛋白酶切实验、质谱分析确定 PPE68 最稳定片段。**结果** 生物信息学分析初步确定了 PPE68 可能的稳定片段为第 7-354 个氨基酸并成功构建 pGL01-PPE68(7-354aa)表达载体,蛋白表达纯化后获得 2.4 mg/mL 的 PPE68(7-354aa)片段蛋白但纯度较低;针对纯化的 PPE68(7-354aa)蛋白较杂问题进行胰蛋白酶切和质谱分析找到稳定片段,为 PPE68 的第 7-180 个氨基酸,构建质粒后在大肠埃希菌中能稳定表达并获得 2.9 mg/mL 的纯化蛋白,蛋白纯度可达 95% 以上。**结论** 成功找到结核分枝杆菌 PPE68 的稳定氨基酸序列,为未来 PPE68 蛋白晶体结构解析以及进一步结核病诊断和疫苗开发奠定基础。

【关键词】 结核分枝杆菌;PPE68;原核表达;蛋白纯化

【文献标识码】 A **【文章编号】** 1673-5234(2025)03-0316-05

[Journal of Pathogen Biology. 2025 Mar.;20(03):316-320.]

Prokaryotic expression and purification of a stabilized fragment of *Mycobacterium tuberculosis* PPE68 protein

CHENG Longyun, XIE Rongxian, LI Li, YUAN Xilu, ZHU Yaoyao, LIU Xiaoyu, LI Bingqing
(Department of Pathogen Biology, School of Clinical and Basic Medicine, Shandong First Medical University & Shandong Academy of Medical Sciences, Jinan 250000, China)***

【Abstract】 **Objective** To investigate the stable fragment of *Mycobacterium tuberculosis* PPE68, prokaryotic expression and purification of the stable fragment protein were performed, laying the foundation for structural analysis of PPE68. **Methods** The fundamental characteristics and evolutionary sequence conservation of PPE68 were examined utilizing Expasy-ProParam, MEME, and various other bioinformatics analysis websites. The PPE68 gene was subsequently amplified via PCR and cloned into the pGL01 vector through a double digestion technique. Prokaryotic expression of the PPE68 fragment protein was conducted in *Escherichia coli* BL21(DE3). Following induction with IPTG (isopropyl β -D-thiogalactoside), the expressed products were analyzed by SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis). Subsequently, the expressed products were purified *in vitro* using nickel ion affinity chromatography and gel filtration chromatography. Finally, trypsin digestion experiments and mass spectrometry analysis were performed to identify the most stable fragment of PPE68. **Results** Bioinformatics analysis preliminarily identified the potential stable fragment of PPE68 as the amino acids 7 to 354. The expression vector pGL01-PPE68 (7-354 aa) was successfully constructed. The purification of protein expression resulted in a concentration of 2.4 mg/mL for the PPE68 (7-354aa) fragment protein; however, the purity was suboptimal. To address the issue of heterogeneity in the purified PPE68 (7-354aa) protein, we employed trypsin digestion followed by mass spectrometry analysis. This approach allowed us to identify the stable fragment corresponding to PPE68 as 7-180 amino acids. After constructing the plasmid, stable expression was achieved in *Escherichia coli*, resulting in a purified protein concentration of 2.9 mg/mL with a purity exceeding 95%. **Conclusion** The stable amino acid sequence of *Mycobacterium tuberculosis* PPE68 was successfully found, which laid a foundation for the crystal structure analysis of PPE68 protein in the future, as well as further tuberculosis diagnosis and vaccine development.

* **【基金项目】** 国家自然科学基金青年基金项目(No. 32300019)。

** **【通信作者】** 刘晓宇, E-mail: 13396421303@163.com; 李冰清, E-mail: bingqingsdu@163.com

【作者简介】 程龙云(2000-), 女, 山东济南人, 在读研究生, 研究方向为病原菌生存适应机制。E-mail: chenglongyun2000@163.com

【Keywords】 *Mycobacterium tuberculosis*; PPE68; prokaryotic expression; protein purification

结核分枝杆菌 (*Mycobacterium tuberculosis*, Mtb) 是引起结核病的病原菌, 主要通过气道传播并在巨噬细胞内存活进而破坏宿主细胞免疫^[1]。据世界卫生组织最新数据表明, 2020年结核病死亡人数可达140万, 仅次于 COVID-19, 成为全球第二大传染性死亡原因^[2], 与疟疾和艾滋病共同对人类社会经济及健康发展产生较为严重的影响^[3]。尽管目前对于结核病的诊断及疫苗开发从未间断, 但结核病仍难以根治。

结核分枝杆菌主要通过Ⅶ型分泌系统 (Type VII secretion system, T7SS) 分泌效应蛋白帮助其入侵并在宿主细胞内存活^[4]。T7SS 包含 5 个 Esx 基因座 (Esx-1 到 Esx-5)^[5], Esx 基因座可以编码很多效应蛋白, 传统意义上被分为 3 大蛋白家族: Esp (Esx-1 分泌相关蛋白)、Esx 和 PE (Pro-Glu)-PPE (Pro-Pro-Glu)^[6]。Esx-1 介导吞噬细胞内的吞噬体破裂^[7-8] 及结核分枝杆菌从吞噬溶酶体中的逃逸^[9-10], 在牛分枝杆菌卡介苗 (BCG Vaccine) 中 Esx-1 基因座上会有一些缺失片段, 这些缺失片段被称为差异区域 1 (Region of Differences 1, RD1)^[11], 是 BCG 减毒的主要原因^[12], 而在这段差异区域中 PE35 (Rv3872)-PPE68 (Rv3873) 表现出免疫优势, 在抗原变异及免疫逃逸中起到重要作用^[13-14]。此外, PPE68 蛋白还会干扰宿主 MKRN1 泛素系统^[15], 通过 TLR2 刺激 IL-10 和 MCP-1 的升高^[16], 从而在结核分枝杆菌的免疫调节中起作用。但关于 PPE68 在结核分枝杆菌与宿主细胞相互作用中发挥怎样的具体功能及该蛋白的结构鲜有报道。本研究对 PPE68 蛋白结构及性质进行分析并对稳定片段进行截取, 在体外通过原核表达及纯化获得稳定的 PPE68 片段蛋白, 为 PPE68 结构解析、功能探索及结核病的诊断、疫苗研发奠定基础。

材料与方法

1 材料

1.1 质粒与菌株 pGL01 载体 (pET-15b 载体改造而来, 氨苄抗性), 大肠埃希菌表达菌株 BL21 (DE3) 感受态细胞为本实验室保存。

1.2 试剂与仪器 质粒小提试剂盒和琼脂糖凝胶 DNA 试剂盒均购自天根生化科技 (北京) 有限公司; 氨苄青霉素及异丙基-β-D-硫代半乳糖苷 (IPTG) 购自北京索莱宝科技有限公司; DNA 聚合酶、限制性核酸内切酶 (BamHI、XhoI) 及 T4 连接酶均购自美国 Thermo 公司; 梯度 PCR 仪购自新加坡 ABI 公司; 分光光度计购自上海精密仪器仪表有限公司; QFF16/10, superdex 200 Increase10/300GL 凝胶过滤层析柱

及 AKTA 蛋白纯化仪均购自美国 Cytiva 公司。

2 方法

2.1 生物信息学分析 在 Uniprot 数据库及 NCBI 中获得 PPE68 (Rv3873) 氨基酸及核苷酸序列, 使用在线网站 PSIPRED Workbench (bioinf. cs. ucl. ac. uk/psipred/) 分析 PPE68 的氨基酸组成及二级结构, NCBI 数据库中分析保守性及同源结构, Expasy-ProParam 网站 (web. expasy. org/protparam) 分析信号肽、跨膜区及亲疏水性, Uniprot 数据库获得 AlphaFold 预测三级结构并使用 pymol 软件分析, MEME 网站 (meme-suite. org/meme/tools/meme) 分析 PPE68 蛋白序列进化保守性。

2.2 目的基因 PCR 扩增及质粒构建 NCBI 数据库中获得结核分枝杆菌 *H37Rv* 标准株 PPE68 (Rv3873) 基因序列, 根据载体酶切位点设计引物, 选择 BamHI 和 XhoI 为酶切位点, 上游引物为 7-BamHI-PPE68-F: 5'-ATAGGATCCATGCCGCCG GAACTGAATACCG-3', 下游引物为 354-XhoI-PPE68-R: 5'-ATACTCGAGTTAGCGTTCCTGAGC CAGAG-3', 以结核分枝杆菌 *H37Rv* 基因组为模版进行 PCR 扩增。PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳验证。回收产物及载体双酶切, 酶切产物经琼脂糖凝胶电泳回收后对酶切的目的片段及载体进行连接, 22 ℃ 反应 30 min 得到重组质粒。

2.3 转化 取 10 μL 重组质粒加入到 100 μL BL21 感受态中, 混匀后冰上静置 30 min, 42 ℃ 热激 90 s 后立即冰上冷却 2 min, 加入 500 μL 无抗 LB 培养基, 在 200 r/min, 37 ℃ 摇床培养 1 h, 将菌液涂布在带有氨苄抗性的固体培养板上, 37 ℃ 倒置过夜培养。

2.4 表达验证 取转化板上的单菌落至 1 mL 氨苄抗性的 LB 培养基中培养 2~3 h, 留取 200 μL 菌液, 向剩余菌液中添加 1 μL IPTG 诱导 1 h, 12 000 r/min 离心 1 min 收菌, 用 60 μL 2×loading buffer 重悬菌液, 95 ℃ 加热 10 min, 15% SDS-PAGE 电泳。

2.5 重组蛋白表达及纯化 将表达阳性及测序正确的重组菌株转接到带有氨苄抗性的 LB 培养基中, 37 ℃, 180 r/min 培养至 A₆₀₀ 约为 0.4 左右时 16 ℃ 降温, 待温度稳定后加入终浓度为 0.6 mmol/L IPTG 过夜诱导 (7~180 片段为 30 ℃ 诱导 6 h), 收集细菌沉淀。用 30 mL 重悬 buffer (500 mmol/L NaCl, 25 mmol/L Tris-Hcl pH 8.0) 重悬细菌沉淀, 加入 300 μL PMSF (10 mmol/L), 超声破碎 5 min; 4 ℃, 14 000 r/min 离心 50 min 收集上清, 将收集的上清过镍柱纯化; 用重悬 buffer 冲洗镍柱 20 个柱体积, 最后用 6 mL

洗脱 buffer(500 mmol/L NaCl, 25 mmol/L Tris-Hcl pH 8.0, 250 mmol/L 咪唑)洗脱目的蛋白。

2.6 层析纯化 使用凝胶过滤层析分子筛对蛋白进行纯化,先用 SD Buffer(100 mmol/L NaCl, 10 mmol/L Tris-Hcl pH 8.0)对分子筛平衡两个柱体积,待分子筛平衡完成后上样并按照设定程序洗脱,经 15% SDS-PAGE 蛋白电泳对纯度较高的蛋白收集冻存。

2.7 蛋白稳定片段截取 通过对提取到的 PPE68 蛋白进行胰蛋白酶切实实验,经 SDS-PAGE 电泳分析不同胰蛋白酶浓度下 PPE68 的降解情况,并对降解出的最稳定片段送质谱分析;根据质谱结果、预测二级结构及 PPE68 蛋白物种进化保守性分析稳定蛋白片段的氨基酸序列,片段蛋白构建及提纯。

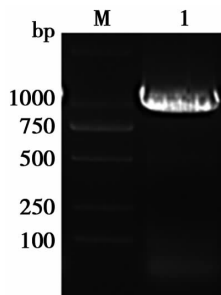
结果

1 PPE68 生物信息学分析

Expasy-ProParam 在线网站分析, PPE68 蛋白的分子式为 $C_{1622}H_{2568}N_{444}O_{529}S_{18}$, 全长共有 368 个氨基酸, 相对分子质量为 37 329.97, 理论等电点(PI)为 4.25, 不稳定指数为 44.62 (>40), 推测其蛋白稳定性及可溶性不好, 同时通过 MEME 在线网站对所有物种 PPE68 蛋白进化保守性分析结果显示全长蛋白两端保守性低, 因此本研究初步截掉了 PPE68 前 6 个氨基酸及后 14 个氨基酸。该蛋白无跨膜区但第 1-42 个氨基酸可能为该蛋白的信号肽结构, 发生概率为 38.25%。目前在 PDB 数据库中无该蛋白的结构。

2 重组表达载体 pGL01-PPE68(7-354aa)构建及鉴定

PPE68(7-354aa)基因大小为 1 044 bp, 从基因组中扩增出的目的片段大小与预期一致(图 1)。将重组质粒转化到 BL21 (DE3) 后进行表达验证, 经 15% SDS-PAGE 电泳分析, PPE68(7-354aa)大小为 35 ku, 与过表达带位置一致, 将表达阳性的菌株送测序发现结果正确, 表明 pGL01-PPE68(7-354aa)重组质粒构建成功。



M DNA 标志物(DL-2000) 1 PPE68(7-354aa)PCR 产物

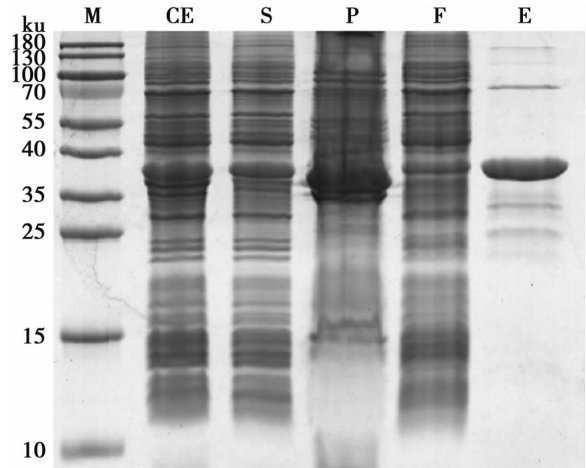
图 1 目的基因 PCR 产物琼脂糖凝胶电泳分析

M DNA marker(DL-2000) 1 PPE68(7-354aa) PCR product

Fig. 1 The agarose gel electrophoresis result of PCR product

3 PPE68(7-354aa)蛋白表达及纯化

对测序正确的菌株扩大培养, 经 IPTG 诱导的菌液经超声裂解高速离心后, 使用镍离子柱纯化目的蛋白, 蛋白留样经 15% SDS-PAGE 电泳分析结果如图 2。将收集到的目的蛋白进行凝胶过滤层析纯化蛋白, 根据出峰位置对目的蛋白进行 15% SDS-PAGE 分析(图 3), 获得 PPE68(7-354aa)片段蛋白, 蛋白浓度为 2.4 mg/mL。



M 蛋白分子质量标准 CE 超声破碎后全蛋白 S 超声破碎离心上清 P 超声破碎离心沉淀 F 上清镍离子柱流穿液 E Elution 洗脱液

图 2 镍离子柱纯化 PPE68(7-354aa)SDS-PAGE 电泳分析

M Protein marker CE Total protein after ultrasound fragmentation S After centrifugal supernatant P After centrifugal precipitate F Flow E Elution

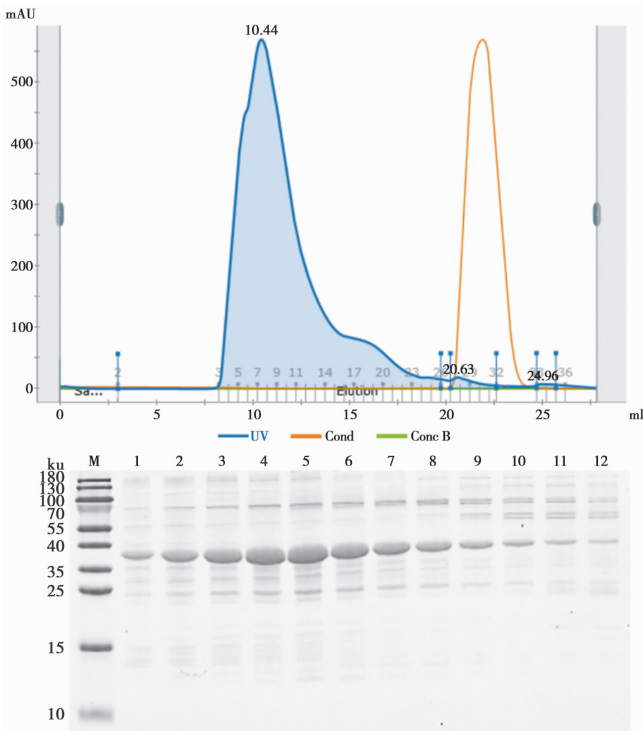
Fig. 2 SDS-PAGE result of PPE68(7-354aa) protein purification via Ni-NTA

4 PPE68(7-180aa)蛋白稳定片段截取及提纯

15% SDS-PAGE 电泳发现在 0.037 mg/mL 胰蛋白酶浓度下 PPE68(7-354aa)蛋白开始出现降解(图 4), 并在 0.333 mg/mL 浓度下出现大小为 14 ku 的降解条带且不随胰蛋白酶浓度的升高而继续降解, 质谱分析其氨基酸组成, 并根据 PPE68 蛋白预测二级结构以及进化保守性截取到可溶的 PPE68(7-180aa)稳定片段, 提取及纯化结果经 15% SDS-PAGE 电泳显示(图 5-6)获得高纯度的 PPE68(7-180aa)片段蛋白, 蛋白浓度为 2.9 mg/mL, 与 PPE68(7-354aa)片段蛋白相比纯度可达 95% 以上。

讨论

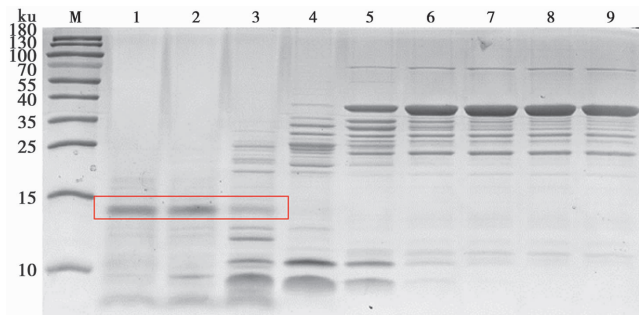
结核病是由结核分枝杆菌感染引起的致死性疾病, 虽然随着疫苗的开发结核病的预防和控制取得了一定的成效, 但由于广泛耐药结核病或结核病并存感染的存在导致其治疗效果变差从而对目前结核病的治疗造成了比较大的挑战^[17]。目前在早期进行诊断仍较困难, 亟需有效诊治手段用于临床。



M 蛋白分子质量标准 1~12 第4~15管凝胶过滤层析洗脱液
图3 PPE68(7-354aa)蛋白凝胶过滤层析洗脱峰图及
SDS-PAGE电泳分析

M Protein marker 1-12 Elution of gel filtration chromatography in tubes 4-15

Fig. 3 Purification of PPE68(7-354aa) Protein by gel filtration chromatography and results of SDS-PAGE analysis



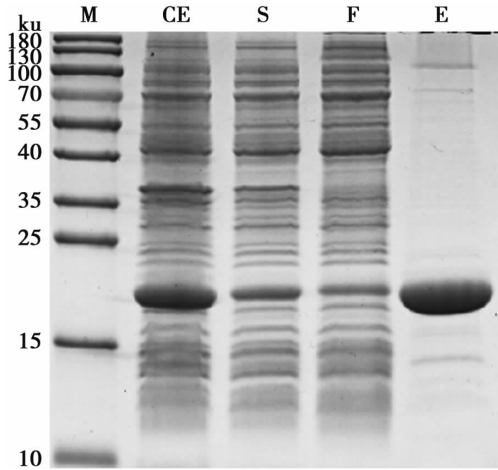
M 蛋白分子质量标准 1~9 胰蛋白酶浓度为2 mg/mL, 1 mg/mL, 0.333 mg/mL, 0.111 mg/mL, 0.037 mg/mL, 0.012 mg/mL, 0.004 mg/mL, 0.001 mg/mL, 0 mg/mL

图4 PPE68(7-354aa)蛋白胰蛋白酶酶切 SDS-PAGE电泳分析

M Marker 1-9 The trypsin concentrations were 2 mg/mL, 1 mg/mL, 0.333 mg/mL, 0.111 mg/mL, 0.037 mg/mL, 0.012 mg/mL, 0.004 mg/mL, 0.001 mg/mL, 0 mg/mL

Fig. 4 SDS-PAGE result of PPE68(7-354aa) protein trypsin digestion

结核分枝杆菌 T7SS 分泌的 PPE 家族蛋白具有独特的结构及表达特性,在结核分枝杆菌营养获取及致病性中起到重要作用^[18]。BCG 作为减毒活疫苗,与结核分枝杆菌菌株相比缺失了 RD1-RD16 区,其中研究最为透彻的是 RD1 区,RD1 区蛋白和结核分枝杆菌的毒力及免疫原性密切相关,由于 BCG 缺失 RD1 区,其免疫原性及毒力会随着 RD1 区基因的整合而逐渐

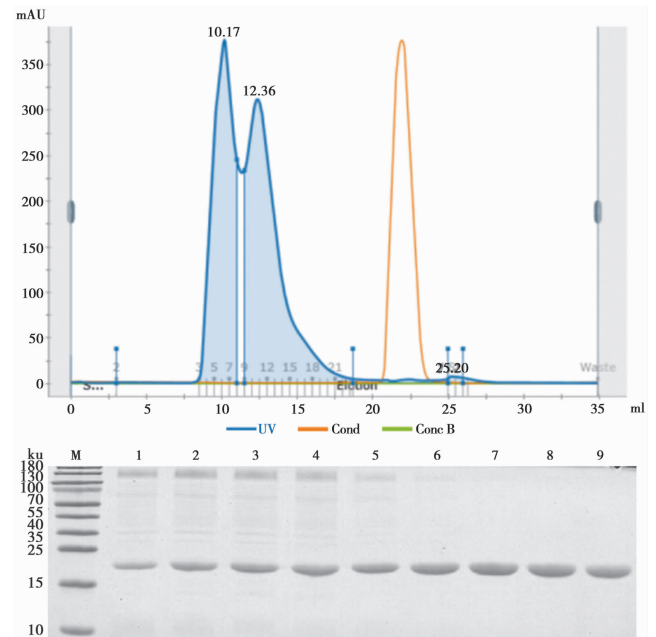


M 蛋白分子质量标准 CE 超声破碎后全蛋白 S 超声破碎离心上清 F 上清镍离子柱流穿液 E Elution 洗脱液

图5 镍离子柱纯化 PPE68(7-180aa) SDS-PAGE 电泳分析

M Protein marker CE Total protein after ultrasound fragmentation S After centrifugal supernatant F Flow E Elution

Fig. 5 SDS-PAGE result of PPE68(7-180aa) protein purification via Ni-NTA



M 蛋白分子质量标准 1~9 第4~12管凝胶过滤层析洗脱液
图6 PPE68(7-180aa)蛋白凝胶过滤层析洗脱峰图及
SDS-PAGE电泳分析

M Protein marker 1-9 Elution of gel filtration chromatography in tubes 4-12

Fig. 6 Purification of PPE68(7-180aa) Protein by gel filtration chromatography and results of SDS-PAGE analysis

增强;RD1 区包含 2 个短基因(Rv3871 和 Rv3879c)以及 7 个完整基因(Rv3872-Rv3878),分别编码 8 个蛋白,其中 Rv3873 编码 PPE68 蛋白^[13]。PPE68 蛋白作为结核分枝杆菌 T7SS 亚型之一 Esx-1 分泌的 PPE 家族蛋白,是 Esx-1 基因座唯一编码的 PPE 家族蛋白,在细菌的胞内存活及毒力中发挥重要作用。巨噬细胞

E3 泛素化连接酶可以通过与 PPE68 的相互作用导致 PPE68 发生泛素化修饰进而显著抑制 NF- κ B 和 AP-1 信号通路以及促进 TNF- α 、IL-6 和 NO 的产生^[15]从而抑制宿主的先天性免疫反应。在海洋分枝杆菌的相关研究中,PPE68 家族蛋白除在细菌致病及毒力中发挥作用外,还可以与 PE35 及 EspG1 分子伴侣形成三聚体以帮助其他底物穿过内膜甚至外膜分泌,PPE68 蛋白同时也是 Esx-1 系统分泌高免疫原性底物 EsxA 和 EspE 所必需的^[19]。因此本研究推测 PPE68 家族蛋白可能既与其毒力效应蛋白分泌有关又在分枝杆菌的致病性及免疫逃逸中发挥着重要作用。但目前对于结核分枝杆菌效应因子 PPE 家族(包括 PPE68)致病机制的研究文章鲜有报道,且大多数结构未知,尽管目前部分 PPE 家族蛋白可在原核表达体系内表达但基本以包涵体的形式存在,推测其原因主要是因为 PPE 家族蛋白在大肠埃希菌表达体系内蛋白构象的错误折叠,这也进一步导致其分子作用机制并不清晰,限制了 PPE68 效应机制研究,因此 PPE68 蛋白的高纯度提取及结构解析对研究其分子机制及在宿主内存活机制具有重要意义。

本研究通过对 PPE68 蛋白理化性质的分析得出其含有 368 个氨基酸,不稳定系数超过 40,是一种稳定性差的蛋白。尽管全长蛋白可体外提取,但其表达量、可溶性及纯度不利于对 PPE68 蛋白的结构解析,因此本研究通过保守性分析对 PPE68 两端不稳定氨基酸进行截取,将扩增的 PPE68 片段基因克隆到 pGL01 载体上,成功构建 PGL01-PPE68 片段基因重组载体并在大肠埃希菌中成功表达,拿到 PPE68(7-354aa)蛋白,但在对纯化结果分析中发现 PPE68(7-354aa)片段蛋白可溶性及纯度也无法达到晶体解析的理想状态,因此本研究通过胰蛋白酶切等实验寻找到可溶性良好及高表达的 PPE68(7-180aa)片段蛋白。通过对晶体结构的解析可明确 PPE68 的生物学功能及在结核分枝杆菌感染中发挥的作用,同时为疫苗、药物研发及结核病诊断方法建立提供新的思路。

【参考文献】

- [1] Yousefi Avarvand A, Meshkat Z, Khademi F, et al. Immunogenicity of HspX/EsxS fusion protein of *Mycobacterium tuberculosis* along with ISCOMATRIX and PLUSCOM nano-adjuvants after subcutaneous administration in animal model[J]. *Microb Pathog*,2021,154:104842.
- [2] Rahlwes KC, Dias BRS, Campos PC, et al. Pathogenicity and virulence of *Mycobacterium tuberculosis*[J]. *Virulence*,2023,14(1):2150449.
- [3] Bourzac K. Infectious disease: Beating the big three[J]. *Nature*, 2014,507(7490):S4-7.
- [4] Rivera-Calzada A, Famelis N, Llorca O, et al. Type VII secretion

- systems; structure, functions and transport models[J]. *Nat Rev Microbiol*,2021,19(9):567-584.
- [5] Newton-Foot M, Warren RM, Sampson SL, et al. The plasmid-mediated evolution of the mycobacterial ESX (Type VII) secretion systems[J]. *BMC Evol Biol*,2016,16:62.
- [6] Damen MPM, Phan TH, Ummels R, et al. Modification of a PE/PPE substrate pair reroutes an Esx substrate pair from the mycobacterial ESX-1 type VII secretion system to the ESX-5 system[J]. *J Biol Chem*,2020,295(18):5960-5969.
- [7] Simeone R, Bobard A, Lippmann J, et al. Phagosomal rupture by *Mycobacterium tuberculosis* results in toxicity and host cell death[J]. *PLoS Pathog*,2012,8(2):e1002507.
- [8] Smith J, Manoranjan J, Pan M, et al. Evidence for pore formation in host cell membranes by ESX-1-secreted ESAT-6 and its role in *Mycobacterium marinum* escape from the vacuole[J]. *Infect Immun*,2008,76(12):5478-5487.
- [9] Van Der Wel N, Hava D, Houben D, et al. *M. tuberculosis* and *M. leprae* translocate from the phagolysosome to the cytosol in myeloid cells[J]. *Cell*,2007,129(7):1287-1298.
- [10] Simeone R, Sayes F, Song O, et al. Cytosolic access of *Mycobacterium tuberculosis*: Critical impact of phagosomal acidification control and demonstration of occurrence *in vivo* [J]. *PLoS Pathog*,2015,11(2):e1004650.
- [11] Mahairas GG, Sabo PJ, Hickey MJ, et al. Molecular analysis of genetic differences between *Mycobacterium bovis* BCG and virulent *M. bovis*[J]. *J Bacteriol*,1996,178(5):1274-1282.
- [12] Lewis KN, Liao R, Guinn KM, et al. Deletion of RD1 from *Mycobacterium tuberculosis* mimics bacille calmette-guerin attenuation[J]. *J. Infect*,2003,187(1):117-123.
- [13] Mustafa AS, Al-Attayah R, Hanif SNM, et al. Efficient testing of large pools of *Mycobacterium tuberculosis* RD1 peptides and identification of major antigens and immunodominant peptides recognized by human Th1 cells[J]. *Clin Vaccine Immunol: CVI*,2008,15(6):916-924.
- [14] Jiang Y, Wei J, Liu H, et al. Polymorphisms in the PE35 and PPE68 antigens in *Mycobacterium tuberculosis* strains may affect strain virulence and reflect ongoing immune evasion[J]. *Mol Med Rep*,2016,13(1):947-954.
- [15] Dou Y, Xie Y, Zhang L, et al. Host MKRN1-mediated mycobacterial ppe protein ubiquitination suppresses innate immune response[J]. *Front Immunol*,2022,13:880315.
- [16] Tiwari B, Soory A, Raghunand TR. An immunomodulatory role for the *Mycobacterium tuberculosis* region of difference 1 locus proteins PE35 (Rv3872) and PPE68 (Rv3873)[J]. *FEBS J*, 2014,281(6):1556-1570.
- [17] 毕珂凡,曹丹,丁丞,等. 结核病药物治疗的过去、现状及未来[J]. *浙江大学学报(医学版)*,2022,51(6):657-668.
- [18] Ehtram A, Shariq M, Ali S, et al. Teleological cooption of *Mycobacterium tuberculosis* PE/PPE proteins as porins: Role in molecular immigration and emigration [J]. *Int J Med Microbiol: IJMM*,2021,311(3):151495.
- [19] Damen MPM, Meijers AS, Keizer EM, et al. The ESX-1 substrate PPE68 has a Key function in ESX-1-Mediated secretion in *Mycobacterium marinum*[J]. *mBio*,2022,13(6):e02819-22.

【收稿日期】 2024-10-11 【修回日期】 2025-01-02