

## 利用酵母双杂交系统筛选 TRADD 的 互作牛分枝杆菌蛋白

何萍<sup>§</sup>, 赵孟成<sup>§</sup>, 王灵, 黄增帅, 陈堡, 黄俊峰, 宋厚辉\*, 杨杨\*

(浙江农林大学动物科技学院, 杭州 311300)

**摘要:** 为研究牛分枝杆菌抑制肿瘤坏死因子介导的细胞凋亡来逃避宿主免疫反应的机制, 本试验采用酵母双杂交系统在牛分枝杆菌中筛选可与肿瘤坏死因子受体 1 相关死亡域蛋白 (TRADD) 相互作用的蛋白。通过限制性内切酶 *Sau3A I* 部分消化牛分枝杆菌基因组, 回收片段随机插入 pGADT7 载体中, 转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$  感受态细胞, 构建牛分枝杆菌基因组文库。PCR 扩增人 *tradd* 基因, 将扩增产物克隆于 pGBKT7 载体上, 构建重组诱饵质粒 pGBKT7-tradd, 转化酵母菌 Y2HGold。用诱饵质粒 pGBKT7-tradd 对牛分枝杆菌基因组文库进行筛选, 以获得与 TRADD 互作的阳性候选克隆; 提取阳性候选克隆中的质粒, 经测序和同源性比对分析, 获得与 TRADD 互作的牛分枝杆菌蛋白的生物学信息。结果显示, 构建的文库滴度为  $2 \times 10^6$  CFU, 平均插入片段在 1.5 kb 左右, 文库重组率  $>95\%$ 。经 Western blotting 验证, 诱饵质粒 pGBKT7-tradd 可在酵母菌中表达诱饵蛋白 TRADD, 且 TRADD 的表达对酵母菌无毒性, 不会在酵母菌中自激活。应用酵母双杂交系统初步筛选出 20 个与 TRADD 互作的阳性克隆, 经复筛、测序和 BLAST 对比, 最终发现 7 个基因序列。本研究应用酵母双杂交技术成功筛选到 7 个与 TRADD 互作的牛分枝杆菌蛋白, 为进一步研究牛分枝杆菌对细胞凋亡的抑制机制提供线索。

**关键词:** 牛分枝杆菌; 肿瘤坏死因子 (TNF); 肿瘤坏死因子受体 1 相关死亡域蛋白 (TRADD); 细胞凋亡

中图分类号: Q812 文献标识码: A 文章编号: 1671-7236(2018)11-3018-07

### Screening of *Mycobacterium bovis* Proteins Interacting with TRADD by Yeast Two-hybrid System

HE Ping<sup>§</sup>, ZHAO Mengcheng<sup>§</sup>, WANG Ling, HUANG Zengshuai, CHEN Bao,  
HUANG Junfeng, SONG Houhui\*, YANG Yang\*

(College of Animal Science and Technology, Zhejiang A&F University,  
Hangzhou 311300, China)

**Abstract:** To investigate the mechanism of *Mycobacterium bovis* inhibiting apoptosis, proteins interacted with human TNFR1 associated death domain (TRADD) were screened by yeast two-hybrid system. In order to construct the genome library, the genome of *Mycobacterium bovis* was digested by *Sau3A I*, and then inserted into the vector pGADT7, and transformed into *E. coli* DH5 $\alpha$ . *tradd* gene was amplified by PCR and inserted into the vector pGBKT7. The recombinant vector named pGBKT7-tradd was transformed into yeast Y2HGold. The genome library of *Mycobacterium bovis* was screened to obtain positive clones interacting with human TRADD. The positive clones were confirmed by DNA sequencing and BLAST. The results showed that the titer of

收稿日期: 2018-05-13

基金项目: 国家自然科学基金 (31502034); 浙江省自然科学基金 (LQ15C180002); 浙江农林大学校科研发展基金人才启动项目 (2014FR069)

作者简介: 何萍 (1990-), 女, 山东日照人, 硕士, 研究方向: 分枝杆菌致病机制, E-mail: hepings201511401200@yeah.net

赵孟成 (1994-), 男, 浙江衢州人, 本科, 研究方向: 分枝杆菌致病机制, E-mail: 1228362648@qq.com

何萍与赵孟成对本文具有同等贡献, 并列第一作者

\* 通信作者: 宋厚辉 (1975-), 男, 山东枣庄人, 博士, 研究方向: 革兰氏阳性菌致病机制, E-mail: songhh@zafu.edu.cn

杨杨 (1988-), 女, 山东德州人, 博士, 研究方向: 分枝杆菌致病机制, E-mail: yyang@zafu.edu.cn

library was  $2 \times 10^6$  CFU with the average of inserted fragments about 1.5 kb, and the recombinant rate was  $>95\%$ . TRADD expression without toxicity and autoactivation in yeast was detected by Western blotting. Seven proteins interacting with TRADD were obtained by homology analysis from 20 positive colonies. The candidate proteins in the study were provided the clue to research the infection mechanism of *Mycobacterium bovis*.

**Key words:** *Mycobacterium bovis*; tumor necrosis factor (TNF); TRADD; apoptosis

牛分枝杆菌(*Mycobacterium bovis*)是一种重要的人畜共患病原,其感染宿主谱广泛,不但严重影响动物健康和养牛业的发展<sup>[1]</sup>,也是较常见的人结核病的病原,威胁食品安全与人类健康<sup>[2]</sup>。在感染的肺脏中,巨噬细胞的凋亡可控制早期分枝杆菌的生长,并通过树突状细胞(DC)的抗原递呈引发获得性T细胞反应。大量研究证实,分枝杆菌具有抑制细胞凋亡的能力,且这种能力与细菌毒力呈正相关性<sup>[3]</sup>,强毒结核分枝杆菌(H37Rv)和牛分枝杆菌感染主要导致细胞坏死<sup>[3-4]</sup>,而弱毒的卡介苗分枝杆菌BCG和H37Ra则主要引发细胞凋亡<sup>[5]</sup>。研究表明,结核分枝杆菌可通过肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF)死亡信号通路来调控细胞凋亡。

通常, TNF 通过激活肿瘤坏死因子受体(tumor necrosis factor receptor, TNFR)传递死亡信号,但结核分枝杆菌是如何调控 TNF 通路的信号机制尚不清楚。目前研究发现,大肠杆菌毒力因子 NleB 可抑制 TNF 介导的细胞凋亡。NleB 蛋白的 N 端含有乙酰氨基葡萄糖转移酶,该酶可作用于 TNF 信号通路上的重要蛋白——TNFR1 相关死亡域蛋白(TNFR1-associated death domain, TRADD)的死亡结构域的精氨酸(Arg235),使死亡结构域(death domain, DD)糖基化而不能与 TNFR1 和 FADD(fas-associating protein with a novel death domain)寡聚化形成凋亡诱导复合物<sup>[6]</sup>。鉴于有毒力的分枝杆菌同样可抑制 TNF 死亡信号通路,那么牛分枝杆菌上是否存在与 NleB 功能相似的毒力蛋白,通过作用于 TRADD 上来抑制细胞凋亡,目前尚不明确。鉴于此,本研究运用酵母双杂交技术,以 TRADD 蛋白为诱饵,筛选牛分枝杆菌基因组文库,寻找可与上述蛋白互作的牛分枝杆菌蛋白,以期为进一步研究筛选所得蛋白对 TNF 死亡信号通路的调控作用提供参考依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌株和质粒

大肠杆菌 DH5 $\alpha$  感受态细胞、酵母菌 Y2H-

Gold 和 Y187、人 293T 细胞 cDNA 均由本实验室保存。牛分枝杆菌基因组由中国农业大学国家动物海绵状脑病实验室馈赠。质粒 pGADT7、pGBKT7、pGBKT7-53、pGBKT7-Lam 均购自 Clontech 公司。

### 1.2 主要试剂

SD 肉汤培养基、SD 固体培养基、Trp/Leu/His/Ade 等单缺、双缺和四缺等添加剂、金担子素等均购自 Clontech 公司。DNA 纯化试剂盒、质粒提取试剂盒均购自天根生化科技(北京)有限公司;KOD-Plus-Neo 高保真酶、Taq 酶均购自 TOYOBO 公司;DNA 连接酶、限制性内切酶 *Sau3A*I、*Bam*H I、*Eco*R I 均购自 NEB 公司。T4 DNA 连接酶、DNA Ladder、Prestained Protein Ladder 均购自 TaKaRa 公司;c-Myc 标签抗体、羊抗鼠 IgG 抗体均购自北京康为世纪生物科技有限公司。

### 1.3 牛分枝杆菌基因组文库的构建

用限制性内切酶 *Sau3A*I 部分消化牛分枝杆菌基因组 DNA,通过凝胶电泳回收 1.5~5 kb 之间的切割片段;用限制性内切酶 *Bam*H I 对 pGADT7 质粒进行酶切,酶切后用去磷酸化酶对载体进行去磷酸化,然后将 DNA 片段与载体进行连接反应,转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$  感受态细胞。利用载体上、下游引物,随机挑选 20 个菌落进行 PCR 验证,确定连接效率。待确定文库滴度符合筛选要求后,用 PEG/LiAc 转化法将文库质粒转化到酵母菌 Y187 中,SD/-Leu 平板上 30  $^{\circ}$ C 培养 3~5 d。

### 1.4 含有 *tradd* 基因的诱饵质粒的构建

1.4.1 目的片段扩增 根据 GenBank 发布的人 *tradd* 基因序列(登录号:NM\_003789.3),利用 Vector NTI 设计 1 对引物,送至苏州金唯智生物技术有限公司合成。引物序列为:上游引物:5'-CATGGAGGCCGAATTCATGGCAGCTGGGCCAAA-TGGGCAC-3';下游引物:5'-GCAGGTCGACG-GATCCCTAGGCCAGGCCCGCCATTG-GGAT-3'。使用高保真酶 KOD-Plus-Neo 扩增 *tradd* 基因片段,PCR 扩增体系 50  $\mu$ L:10 $\times$  KOD Plus Buffer 5  $\mu$ L,2 mmol/L dNTPs 5  $\mu$ L,25 mmol/L MgSO $_4$

3  $\mu\text{L}$ , 上、下游引物各 1.5  $\mu\text{L}$ , 人 293T 细胞 cDNA 1  $\mu\text{L}$ , DMSO 1  $\mu\text{L}$ , KOD-Plus-Neo 1  $\mu\text{L}$ , ddH<sub>2</sub>O 31  $\mu\text{L}$ 。PCR 扩增条件: 94  $^{\circ}\text{C}$  预变性 2 min; 98  $^{\circ}\text{C}$  变性 10 s, 60  $^{\circ}\text{C}$  退火 30 s, 68  $^{\circ}\text{C}$  延伸 45 s, 共 35 个循环; 68  $^{\circ}\text{C}$  延伸 7 min; 12  $^{\circ}\text{C}$  结束。PCR 产物经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳鉴定。

**1.4.2 重组质粒 pGBKT7-tradd 的构建** 使用限制性内切酶 *Bam*H I 和 *Eco*R I 分别酶切目的片段和质粒 pGBKT7, 反应体系 50  $\mu\text{L}$ : 基因片段或质粒 5  $\mu\text{L}$ , 10 $\times$ Cut smart Buffer 5  $\mu\text{L}$ , *Bam*H I 和 *Eco*R I 各 0.5  $\mu\text{L}$ , ddH<sub>2</sub>O 39  $\mu\text{L}$ 。37  $^{\circ}\text{C}$  水浴中酶切 4 h 后纯化回收。用 T4 DNA 连接酶于 16  $^{\circ}\text{C}$  金属浴中反应 1 h, 然后转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$  感受态细胞, 涂板过夜培养。挑取单个克隆, 菌落 PCR 筛选阳性克隆。挑选到的阳性克隆扩大培养后, 提取质粒送至测序公司测序。

### 1.5 Western blotting 检测诱饵蛋白 TRADD 在酵母细胞中的表达

挑取新鲜的直径为 1~2 mm 的酵母菌落接种于 5 mL SD/-Trp 液体培养基中, 在恒温摇床中 30  $^{\circ}\text{C}$ 、250 r/min 过夜培养 16~18 h。培养液全部转入 50 mL YPDA 培养液中, 30  $^{\circ}\text{C}$ 、250 r/min 振荡培养, 至菌液  $D_{600\text{nm}}$  值处于 0.4~0.6 之间。迅速将培养液收集于预冷的含有 25 mL 冰的 50 mL 离心管中, 4  $^{\circ}\text{C}$ 、1 000 r/min 离心 5 min, 弃掉上清液, 使用 Urea/SDS 法提取酵母菌蛋白。将蛋白样品上样进行 SDS-PAGE, 电转入 PVDF 膜后, 用小鼠抗 myc 单克隆抗体进行 Western blotting, 以检测 TRADD 蛋白的表达情况。

### 1.6 诱饵质粒 pGBKT7-tradd 对酵母的毒性及自激活检测

**1.6.1 毒性检测** 复苏酵母菌 Y2HGold, 并用 PEG/LiAc 法制备酵母感受态。分别将诱饵质粒 pGBKT7-tradd 和 pGBKT7 转化酵母感受态细胞 Y2HGold, 各取 100  $\mu\text{L}$  菌液分别涂于 SD/-Trp 固体培养板, 置于 30  $^{\circ}\text{C}$  恒温箱倒置培养 3~5 d 后, 对比转入不同质粒平板上酵母菌菌落生长的数量、形态、大小等差异。

**1.6.2 自激活检测** 将上述已转化诱饵质粒 pGBKT7-tradd 的剩余酵母菌液各取 100  $\mu\text{L}$ , 分别涂于 SD/-Trp(SDO)、SD/-Trp/X- $\alpha$ -gal(SDO/X) 和 SD/-Trp/X-/X- $\alpha$ -gal/AbA(SDO/X/A) 固体培养

板上。并以质粒 pGBKT7-53 作为阳性对照和 pGBKT7-Lam 作为阴性对照, 转化酵母感受态细胞, 并涂布于 SDO/X 固体培养板上。30  $^{\circ}\text{C}$  恒温培养箱倒置培养 3~5 d 后, 对比上述平板上酵母菌的生长形态、数量、大小、颜色等差异, 以确定是否存在自激活现象。

### 1.7 运用酵母双杂交技术筛选牛分枝杆菌上与 TRADD 互作的蛋白

挑取一个 2~3 mm 的含有诱饵质粒的酵母菌菌落, 转接到 50 mL SD/Trp 溶液, 30  $^{\circ}\text{C}$  培养 16~20 h 至  $D_{600\text{nm}}$  值到 0.8。1 000 r/min 离心 5 min 收集菌体, 用 4~5 mL SD/Trp 溶液重悬, 所制备的菌液悬液与 1 mL 牛分枝杆菌基因组菌液共同转接于含有 Kana 的 2 $\times$ YPDA 中, 30  $^{\circ}\text{C}$ 、30~50 r/min 低速培养 20~24 h。20 h 后显微镜观察, 若观察到类似米老鼠头像或三叶草图案, 则 1 000 r/min 离心 10 min, 弃上清, 用 0.5 $\times$ YPDA 重悬。每 200  $\mu\text{L}$  菌液涂于 DDO/X/A, 30  $^{\circ}\text{C}$  培养箱中培养 3~5 d 后标记 DDO/X/A 蓝色克隆。挑取阳性克隆划线接种在筛选更严紧培养 SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade/Xrp/-LeAbA(QDO/X) 平板上, 30  $^{\circ}\text{C}$  培养 3~5 d。

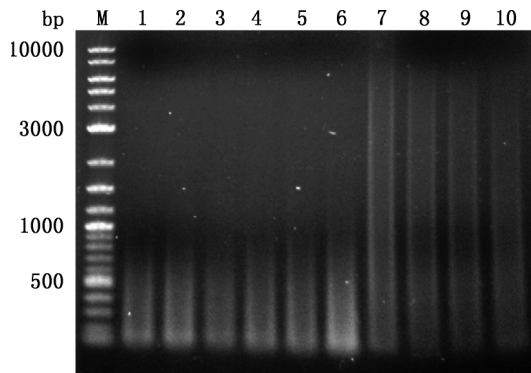
### 1.8 阳性候选克隆的初步分析

培养阳性候选克隆, 使用酵母菌质粒提取试剂盒提取酵母菌中质粒。将所获得的 pGADT7-X 质粒分别和 pGBKT7-tradd 及空载体 pGBKT7 两组队转染到酵母菌 Y2HGold 中, 菌液分别涂于 DDO/X 和 DDO/X/A 的平板中, 30  $^{\circ}\text{C}$  培养 3~5 d 后, 观察菌落颜色及生长情况, 以排除所筛选到的牛分枝杆菌基因本身可与报告基因的启动子直接作用而造成假阳性的可能。复筛后的质粒送至苏州金唯智生物技术有限公司测序, 分析插入片段的生物学信息。

## 2 结果

### 2.1 牛分枝杆菌基因组文库的构建

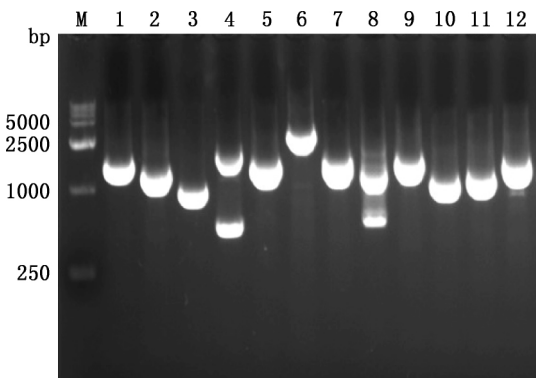
用限制性内切酶 *Sau*3A I 切割牛分枝杆菌基因组 DNA(图 1), 克隆到 pGBKT7 载体上, 转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$  感受态细胞, 经涂板检测, 文库容量为 2 $\times$ 10<sup>6</sup> CFU。随机挑取 24 个克隆, 摇菌, 抽提质粒, 用载体引物进行 PCR 扩增, 电泳检测, 文库平均插入片段在 1.5 kb 左右(图 2), 克隆阳性率 >95%, 覆盖基因组倍数约为 100 倍, 可满足后续试验的要求。



M, 1 kb DNA Ladder; 1~3, 1 U *Sau3A* I 分别酶切 1、2 和 3 h; 4~6, 0.1 U *Sau3A* I 分别酶切 1、2 和 3 h; 7~10, 0.01 U *Sau3A* I 分别酶切 1、2、3 和 4 h

M, 1 kb DNA Ladder; 1-3, Genome DNA digested by 1 U *Sau3A* I for 1, 2 and 3 h, respectively; 4-6, Genome DNA digested by 0.1 U *Sau3A* I for 1, 2 and 3 h, respectively; 7-10, Genome DNA digested by 0.01 U *Sau3A* I for 1, 2, 3 and 4 h, respectively

图 1 *Sau3A* I 酶切牛分枝杆菌基因组 DNA 条件优化  
Fig. 1 Optimal condition of *Sau3A* I digesting the genome DNA of *Mycobacterium bovis*

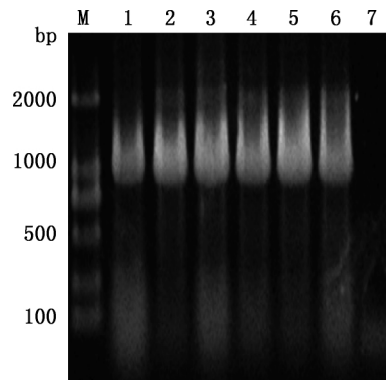


M, D15000 DNA Marker; 1~12, 随机挑选的文库质粒  
M, D15000 DNA Marker; 1-12, Randomly selected plasmids

图 2 随机挑选文库质粒的 PCR 验证  
Fig. 2 Verification of the genome library by PCR

## 2.2 含有 *tradd* 基因的诱饵质粒的构建

利用特异性引物,以人 293T 细胞 cDNA 为模板,PCR 扩增目的条带,扩增出大小 939 bp 的目的条带。PCR 扩增产物和质粒 pGBKT7 经酶切、连接后,转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$  感受态细胞,涂于含有氨苄的 LB 固体平板上。挑选单个克隆,经菌落 PCR 验证,发现 6 个阳性克隆(图 3)。将阳性克隆扩增,提取质粒送测序,测序结果与已公布的基因序列一致,说明诱饵质粒 pGBKT7-*tradd* 构建成功。



M, D2000 DNA Marker; 1~6, 候选克隆; 7, 阴性对照  
M, D2000 DNA Marker; 1-6, Candidate colonies; 7, Negative control

图 3 菌落 PCR 鉴定阳性克隆

Fig. 3 Verification of positive colonies by colony PCR

## 2.3 诱饵蛋白 TRADD 在酵母菌种的表达情况

将诱饵质粒 pGBKT7-*tradd* 及阳性对照质粒 pGBKT7-53 和空载质粒 pGBKT7 分别转化酵母细胞,扩大培养后提取酵母蛋白,经 Western blotting 检测发现 TRADD 可在酵母菌中表达(图 4),在 55 ku 处有明显的条带。阳性对照 pGBKT7-53 在酵母菌中表达大小为 57 ku 的蛋白。

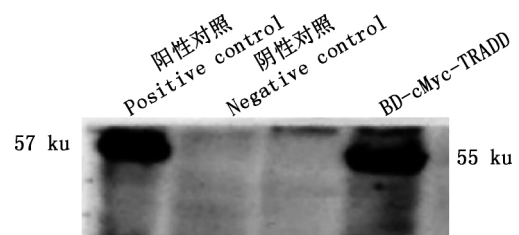


图 4 Western blotting 检测 TRADD 在酵母菌中的表达情况

Fig. 4 Western blotting analysis of TRADD expression in yeast

## 2.4 诱饵蛋白 TRADD 对酵母菌的毒性检测

分别将诱饵质粒 pGBKT7-*tradd* 和空载 pGBKT7 转化酵母感受态细胞 Y2HGGold 中,涂布于 SD/-Trp 固体培养板上,2 个平板上均有形态、大小相似的白色菌落(图 5A 和 5B),数量上的差异可能与质粒的转化率有关。表明诱饵质粒对酵母无毒性影响。

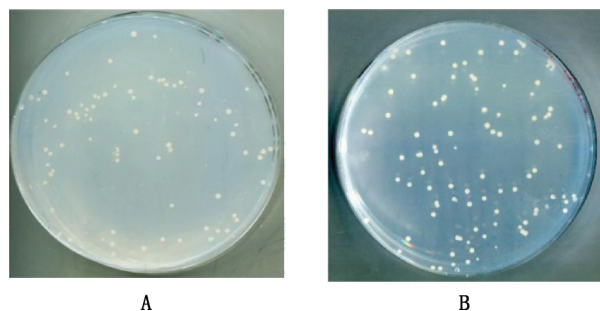
## 2.5 诱饵蛋白 TRADD 在酵母菌中的自激活检测

含有 pGBKT7-*tradd* 的酵母菌可在 SDO/X(图 6A)平板上长出大小、形态相似的白色菌落,而在 SDO/X/AbA(图 6B)的平板上没有菌落生长,阳性

对照(图 6C)长出蓝色菌落,阴性对照(图 6D)无菌落生长。表明诱饵质粒在酵母菌中没有自激活活性。

## 2.6 运用酵母双杂交筛选与 TRADD 互作的阳性克隆

将牛分枝杆菌基因组文库与诱饵质粒混合后进行酵母杂交转化,20 h 后取杂交菌液滴于载玻片上,显微镜下观察可见类似于米老鼠头像或三叶草形状的融合细胞(图 7),表明杂交成功。杂交成功的菌液经离心后涂于 DDO/X/A 平板上,培养 3~5 d。结果显示,DDO/X/A 平板上出现了 27 个大小不同的蓝色阳性候选克隆(图 8)。得到的候选克隆在更严格的缺陷筛选平板 SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade/X- $\alpha$ -gal/AbA(QDO/X/A)上培养得到 20 个蓝色克隆。

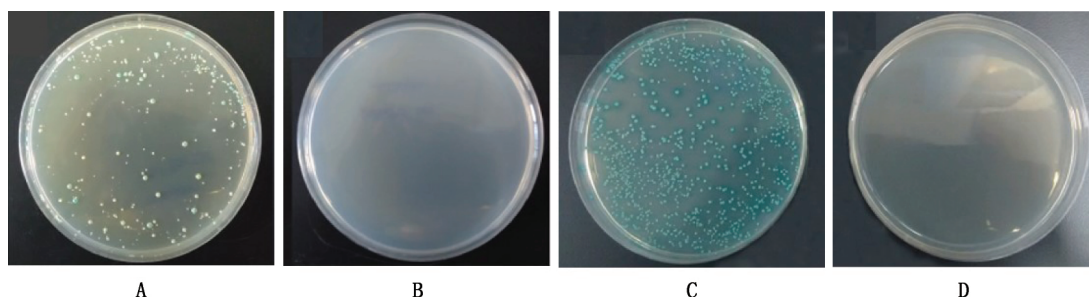


A, 含有 pGBKT7-tradd 的酵母菌 Y2HGOLD; B, 含有 pGBKT7 的酵母菌 Y2HGOLD

A, Y2HGOLD containing pGBKT7-tradd; B, Y2HGOLD containing pGBKT7

图 5 诱饵蛋白 TRADD 对酵母的毒性检测

Fig. 5 Toxicity detection of TRADD in yeast



A、B, 酵母菌 Y2HGOLD/pGBKT7-tradd 分别涂于 SDO/X (A)和 SDO/X/A (B)平板上; C, 阳性对照; D, 阴性对照  
A and B, Y2HGOLD/pGBKT7-tradd were plated on SDO/X (A) and SDO/X/A (B), respectively; C, Positive control; D, Negative control

图 6 诱饵蛋白 TRADD 自激活的检测

Fig. 6 Autoactivation detection of TRADD in yeast

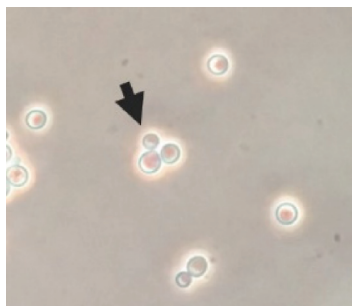


图 7 酵母双杂交中的接合子(400 $\times$ )

Fig. 7 Typical yeast zygote during yeast two-hybrid system (400 $\times$ )

## 2.7 阳性候选克隆的初步分析

将所获得阳性克隆质粒和 pGBKT7-tradd 及空载体 pGBKT7 两两组队转染到酵母菌 Y2HGOLD 中,菌液分别涂于 DDO/X 和 DDO/X/A 的平板中,进行回返验证。7 个候选基因与 pGBKT7-tradd 同时转染可在 DDO/X 和 DDO/X/A 平板上长出蓝色菌落,与空载 pGBKT7 的互转在 DDO/X 的菌落为白色,而在 DDO/X/A 平板上不生长,这说明 7 个蛋白均与 TRADD 蛋白互相作用。将阳性质粒送至测序公司测序,所得基因序列与牛分枝杆菌基因组经 BLAST 比对,共获得 7 个基因: Mb0557、Mb0902c、Mb1205c、Mb2685、Mb3295、Mb3583 和 Mb3787c。

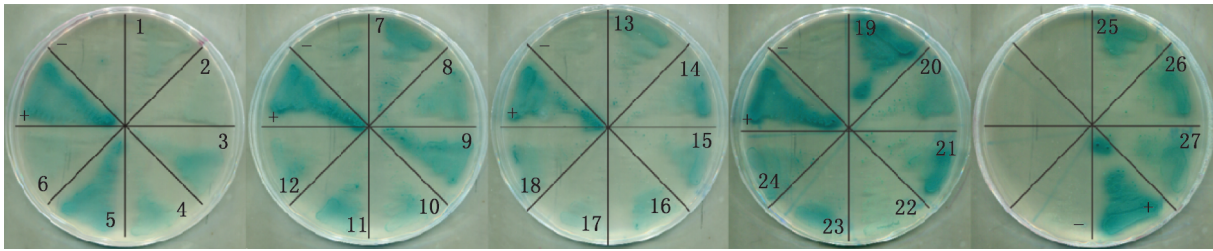


图 8 酵母双杂交系统筛选与 TRADD 互作的阳性候选克隆

Fig. 8 Screening of positive candidate colonies interacting with TRADD by yeast two-hybrid system

### 3 讨 论

在早期感染中,细胞凋亡不仅可控制分枝杆菌在巨噬细胞中的扩散,而且还可促进 DC 细胞递呈抗原来激活 T、B 淋巴细胞免疫。与 H37Rv 相比,BCG 和 H37Ra 可诱导高水平的细胞凋亡,激活更强烈的 T 细胞反应,从而增强机体对感染的控制。Riendeau 等<sup>[7]</sup>研究发现,H37Ra 和 BCG 诱导的细胞凋亡依赖于内源性的肿瘤坏死因子。尽管结核分枝杆菌 H37Rv 和 H37Ra 均可导致巨噬细胞产生大量的 TNF,但 H37Ra 可诱发高水平的细胞凋亡<sup>[8]</sup>。这说明分枝杆菌通过 TNF 死亡信号通路调控细胞凋亡。

TRADD 是 TNF 介导的细胞凋亡通路的一种重要的衔接蛋白。当 TNF 与细胞膜上的受体蛋白 TNFR1 结合后,可诱导 TNFR1 三聚体化<sup>[9]</sup>。TNFR1 位于胞浆内的死亡结构域 DD 与衔接蛋白分子 TRADD 和接头蛋白 FADD 上的 DD 结合形成凋亡诱导复合物。然后 FADD 上死亡效应结构域(death effector domain,DED)与 Caspase-8 前体的 DED 相互交联,募集 Caspase-8 前体进行自我活化,从而启动凋亡的发生<sup>[10]</sup>。除此之外,TRADD 还可招募细胞质中的 TNFR 相关因子和丝/苏氨酸蛋白激酶,并与之结合以激活 NF- $\kappa$ B 的活化,移位至核内介导基因表达<sup>[11]</sup>。病原微生物可通过直接作用于 TRADD 或 microRNA 等途径来调控 TNF 介导的细胞凋亡或 NF- $\kappa$ B 的活化<sup>[12]</sup>。而在肿瘤的研究中发现某些药物可通过作用于 TRADD 来调控肿瘤细胞的增殖<sup>[13]</sup>,且 TRADD 可作为某些肿瘤的标志物<sup>[14]</sup>。在结核分枝杆菌感染中,活动性结核患者的外周血单核细胞中参与外源性细胞凋亡的基因表达均降低,这些基因包括 TNF、TNFR1、TRADD、Fas、FasR 和 caspase-8<sup>[15]</sup>。

本研究经酵母双杂交系统从牛分枝杆菌基因组文库中筛选到 7 个可与 TRADD 互相作用的候选基

因,但其具体功能均不清楚。其中,Mb0902c 和 Mb1205c 基因分别编码牛分枝杆菌 PPE13 和 PE12 蛋白,这两个蛋白均属于 PE/PPE 家族。PE/PPE 家族蛋白因氨基末端附近分别存在保守的 Pro-Glu (PE)和 Pro-Pro-Glu(PPE)基序而得名<sup>[16]</sup>。目前认为,该家族成员是分枝杆菌潜在的毒力因子,与逃避宿主免疫系统相关<sup>[17-19]</sup>,可影响巨噬细胞免疫应答、细胞死亡和细胞因子的分泌。如 PE\_PGSR30<sup>[20]</sup>和 PE\_PGSR62<sup>[21]</sup>可抑制巨噬细胞中吞噬溶酶体的成熟,PE5 和 PE15<sup>[22]</sup>可抑制具有杀菌作用的 NO 的产生。据报道,与野生株相比,结核分枝杆菌 H37Rv 的 PPE13 突变株在巨噬细胞中的存活数量明显减少<sup>[23]</sup>,但具体机制尚不清楚。因此,推测 PPE13 或 PE12 极可能通过参与调控 TNF 介导的细胞凋亡来促进分枝杆菌在宿主细胞中的存活,尚需进一步试验验证。

### 4 结 论

本研究成功构建牛分枝杆菌基因组文库和诱饵质粒 pGBKT7-tradd,通过酵母双杂交系统筛选到了 TRADD 互作的牛分枝杆菌候选蛋白,为后续研究牛分枝杆菌通过 TRADD 对细胞凋亡的抑制机制提供了参考数据,为牛分枝杆菌感染机制及抗分枝杆菌药物靶点的研究奠定基础。

### 参考文献 (References):

- [1] RIVIERE J, CARABIN K, LE STRAT Y, et al. Bovine tuberculosis surveillance in cattle and free-ranging wildlife in EU Member States in 2013; A survey-based review [J]. *Veterinary Microbiology*, 2014, 173(3-4):323-331.
- [2] O'REILLY L M, DABORN C. The epidemiology of *Mycobacterium bovis* infections in animals and man; A review[J]. *Tubercle and Lung Disease*, 1995, 76(Suppl 1):1-46.
- [3] KEANE J, REMOLD H G, KORNFIELD H. Virulent

- Mycobacterium tuberculosis* strains evade apoptosis of infected alveolar macrophages [J]. *The Journal of Immunology*, 2000, 64(4):2016-2020.
- [4] VELMURUGAN K, CHEN B, MILLER J L, et al. *Mycobacterium tuberculosis* nuoG is a virulence gene that inhibits apoptosis of infected host cells[J]. *PLoS Pathogens*, 2007, 3(7):e110.
- [5] BOHSALI A, ABDALLA H, VELMURUGAN K, et al. The non-pathogenic mycobacteria *M. smegmatis* and *M. fortuitum* induce rapid host cell apoptosis via a caspase-3 and TNF dependent pathway[J]. *BMC Microbiology*, 2010, 10:237.
- [6] LI S, ZHANG L, YAO Q, et al. Pathogen blocks host death receptor signalling by arginine GlcNAcylation of death domains[J]. *Nature*, 2013, 501(7466):242-246.
- [7] RIENDEAU C J, KORNFELD H. THP-1 cell apoptosis in response to mycobacterial infection[J]. *Infection and Immunity*, 2003, 71(1):254-259.
- [8] RODRIGUES M F, ALVES C C, FIGUEIREDO B B, et al. Tumour necrosis factor receptors and apoptosis of alveolar macrophages during early infection with attenuated and virulent *Mycobacterium bovis*[J]. *Immunology*, 2013, 139(4):503-512.
- [9] 高薇, 侯微, 李伟, 等. 细胞凋亡机制研究进展[J]. *中国畜牧兽医*, 2014, 41(10):150-156.  
GAO W, HOU W, LI W, et al. Research progress on cell apoptosis mechanism[J]. *China Animal Husbandry & Veterinary Medicine*, 2014, 41(10):150-156. (in Chinese)
- [10] 王力俭, 田可川, 吴伟伟, 等. 细胞凋亡信号传导通路的研究进展[J]. *中国畜牧兽医*, 2011, 38(10):132-135.  
WANG L J, TIAN K C, WU W W, et al. Recent advances on the signal transduction pathways of apoptosis[J]. *China Animal Husbandry & Veterinary Medicine*, 2011, 38(10):132-135. (in Chinese)
- [11] BLASER H, DOSTERT C, MAK T W, et al. TNF and ROS crosstalk in inflammation[J]. *Trends in Cell Biology*, 2016, 26(4):249-261.
- [12] GUNSTER R, MATTHEWS S A, HOLDEN D W, et al. SseK1 and SseK3 T3SS effectors inhibit NF- $\kappa$ B signalling and necroptotic cell death in *Salmonella*-infected macrophages [J]. *Infection and Immunity*, 2017, 85(3):e00010-17.
- [13] 肖娟, 张先锋, 刘重元, 等. LMP1 经 TRADD 促进鼻咽癌 SP18 细胞增殖[J]. *中国病理生理杂志*, 2017, 33(4):682-687.  
XIAO J, ZHANG X F, LIU Z Y, et al. Proliferation of nasopharyngeal carcinoma SP18 cells prompted by latent membrane protein 1 through TNF receptor-associated death domains[J]. *Chinese Journal of Pathophysiology*, 2017, 33(4):682-687. (in Chinese)
- [14] LIU Y, LU D, SHENG J, et al. Identification of TRADD as a potential biomarker in human uterine leiomyoma through iTRAQ based proteomic profiling[J]. *Molecular and Cellular Probes*, 2017, 36:15-20.
- [15] ABEBE M, DOHERTY T M, WASSIE L, et al. Expression of apoptosis-related genes in an ethiopian cohort study correlates with tuberculosis clinical status[J]. *European Journal of Immunology*, 2010, 40(1):291-301.
- [16] SAMPSON S L. Mycobacterial PE/PPE proteins at the host-pathogen interface[J]. *Clinical and Developmental Immunology*, 2011, 2011:497203.
- [17] NAIR S, RAMASWAMY P A, GHOSH S, et al. The PPE18 of *Mycobacterium tuberculosis* interacts with TLR2 and activates IL-10 induction in macrophage[J]. *The Journal of Immunology*, 2009, 183(10):6269-6281.
- [18] NAIR S, PANDEY A D, MUKHOPADHYAY S. The PPE18 protein of *Mycobacterium tuberculosis* inhibits NF- $\kappa$ B/rel-mediated proinflammatory cytokine production by upregulating and phosphorylating suppressor of cytokine signaling 3 protein[J]. *The Journal of Immunology*, 2011, 186(9):5413-5424.
- [19] MUKHOPADHYAY S, BALAJI K N. The PE and PPE proteins of *Mycobacterium tuberculosis* [J]. *Tuberculosis*, 2011, 91:441-447.
- [20] IANTOMASI R, SALI M, CASCIOFERRO A, et al. PE\_PGRS30 is required for the full virulence of *Mycobacterium tuberculosis* [J]. *Cellular Microbiology* 2012, 14(3):356-367.
- [21] THI E P, HONG C J H, SANGHERA G, et al. Identification of the *Mycobacterium tuberculosis* protein PE-PGRS62 as a novel effector that functions to block phagosome maturation and inhibit iNOS expression[J]. *Cellular Microbiology*, 2013, 15(5):795-808.
- [22] TIWARI B M, KANNAN N, VEMU L, et al. The *Mycobacterium tuberculosis* PE proteins Rv0285 and Rv1386 modulate innate immunity and mediate bacillary survival in macrophages[J]. *PLoS One*, 2012, 7(12):e51686.
- [23] STEWART G R, PATEL J, ROBERTSON B D, et al. Mycobacterial mutants with defective control of phagosomal acidification [J]. *PLoS Pathogen*, 2005, 1(3):e33.

(责任编辑 董晓云)