

结核分枝杆菌 RD-1 区编码蛋白的结构和功能 *

李 浩 徐俊杰** 陈 薇**

(军事医学科学院微生物流行病学研究所, 病原微生物生物安全国家重点实验室, 北京 100071)

摘要 RD-1(region of difference-1)被认为在结核分枝杆菌(*Mycobacterium tuberculosis*, MTB)的致病机理中起着关键的作用. RD-1 基因全长 9.5 kb, 开放读码框从 *Rv3871* ~ *Rv3879c*, 分别编码 9 种不同的蛋白质. RD-1 区在卡介苗(bacillus Calmette-Guerin, BCG)中是缺失的. 研究结果显示, RD-1 区是结核分枝杆菌的主要毒力因素之一, 同时 RD-1 区参与了一种新的分泌系统 ESX-1, 这种分泌系统能够促进某些特定蛋白的分泌. ESX-1 分泌的两种主要蛋白质 CFP-10 (culture filtrate protein of 10 ku)和 ESAT-6 (early secreted antigenic target of 6 ku)能够形成牢固的 1:1 的复合物, 这两种蛋白质能够协同分泌而且能够引起 T 细胞反应, 并可能作为理想的靶抗原在结核的预防和诊断中发挥作用.

关键词 结核分枝杆菌(MTB), RD-1 区, CFP-10, ESAT-6

学科分类号 Q71

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2009.00187

结核(tuberculosis, TB)是由结核分枝杆菌(*Mycobacterium tuberculosis*, MTB)引起的人兽共患慢性传染病, 是威胁人类的三大感染性疾病之一. 目前全世界大约有 20 亿人感染 MTB, 每年大约有 200~300 万的结核患者死亡^[1]. 结核分枝杆菌多重耐药性(multi-drug resistance, MDR)的出现以及艾滋病(HIV)感染者对结核分枝杆菌易感性的增强使结核的传播更加迅速^[2].

结核分枝杆菌区别于卡介苗(bacillus Calmette-Guerin, BCG)的一个重要特征是结核分枝杆菌的基因组中存在 RD-1 区(region of difference-1)而卡介苗没有. 结核分枝杆菌菌株 *H37Rv* 的 RD-1 区删除后注射 C57BL/6 鼠, 发现其毒力类似于 BCG 弱毒疫苗, 从而说明 RD-1 区与细菌的毒力有关^[3,4]. 在本文中, 我们重点描述 RD-1 区编码的两种蛋白质 ESAT-6 和 CFP-10, 这两种蛋白质是重要的 T 细胞抗原, 能诱导机体产生记忆性免疫应答, 在结核病的诊断、预防中已成为研究的热点.

1 RD-1 区相关蛋白质的功能和特点

结核分枝杆菌(*Mycobacterium tuberculosis*, MTB) *H37Rv* 基因 RD-1 区全长 9.5 kb, 共有 9 个开放读码框(*Rv3871* ~ *Rv3879c*), 分别编码 9 种蛋白质^[5] (图 1). *Rv3871* 是转录形成单位, 它和 *Rv3870* 蛋

白共同作用形成膜结合 ATPase, 同时还发现 *Rv3871* 能够识别 CFP-10 的 C 端并同 *Rv3870* 相互作用进而促进 CFP-10 和 ESAT-6 蛋白的分泌^[6,7]. *Rv3872* 和 *Rv3873* 分别是 PE 和 PPE 家族成员, 目前还没有证据表明 *Rv3872* 表达的 PE 蛋白存在于结核分枝杆菌细胞膜上, 但有研究表明, *Rv3873* 编码的 PPE 蛋白存在而且和细菌细胞膜相交联^[8,9]. *Rv3874* 和 *Rv3875* 分别编码两个低分子质量的分泌蛋白 CFP-10(culture filtrate protein of 10 ku, *esxB*) 和 ESAT-6 (early secreted antigenic target of 6 ku, *esxA*), 它们的分子质量分别是 10 ku 和 6 ku^[10]. 这两个蛋白质受同一个启动子调控转录, 分泌至体外形成 1:1 的蛋白质二聚体, CFP-10 的 C 端并不参与二聚体的形成, 但是 C 端的 7 个氨基酸对蛋白质的分泌却有重要的意义^[11](图 2). *Rv3876* 编码 N 端富含脯氨酸的蛋白质. *Rv3877* 编码跨膜蛋白, 该蛋白质有许多跨膜位点, 是形成蛋白质分泌通道的主要蛋白质^[7]. *Rv3878* 编码的蛋白质被称作 TB27.4, 有研究表明, TB27.4 的 C 端

* 国家自然科学基金资助项目(30571745).

** 通讯联系人. Tel: 010-66948491

徐俊杰. E-mail: xujunjie@sina.com

陈 薇. E-mail: cw789661@yahoo.com

收稿日期: 2009-03-29, 接受日期: 2009-05-11

分子是引起结核患者免疫反应的主要因素, 相反, 在 BCG 疫苗接种者身上没有引起相关的免疫反应, 这表明该蛋白质可能具有诊断意义^[12]. 有研究表明 *Rv3879* 编码的分泌蛋白能够和 *Rv3871* 编码蛋白相互作用进而促进蛋白 *Rv3881c*/Mh3881c(EspB) 的分泌^[13].

目前, 通过使用信号标记诱变、转座子杂交以及目标位点删除技术, 结核分枝杆菌 RD-1 区的几个相关基因被认为是在小鼠体内的主要毒力因素^[6, 14, 15]. 有研究表明, 结核分枝杆菌在进化的过程中可能形成一种叫做 ESX-1 新的分泌机制, 这种预测是建立在对 RD-1 区和相关基因区域的研究所得出的. 第一个表明这种新的分泌系统可能存在的实验是 BCG 菌株插入 RD-1 区序列后又恢复了毒力^[16]. RD-1 区因此被认为是结核分枝杆菌的主要毒力因子^[6, 14, 15]. 有研究表明, RD-1 区的主要功能是促进 ESAT-6 和 CFP-10 的分泌, 但这并不代表已经清楚地了解到 RD-1 区分泌的确切机制. 将 *Rv3870*, *Rv3871* 和 *Rv3877* 基因突变后, 发现 ESAT-6 和 CFP-10 的分泌会受到抑制和影响. 同时还发现 ESX-1 分泌系统中至少还有其他 14 种蛋白质参与. 然而, 参与 ESX-1 分泌系统蛋白质的

确切种类和数目仍在研究中, 而且这种不同可能表现在不同的菌种上. 目前, 一些参与的蛋白质已经被确认, *Rv3868* 是具有 AAA⁺ ATP 酶位点的假定细胞质伴侣蛋白. *Rv3883* 是一种枯草杆菌样丝氨酸蛋白酶, *Rv3870* 和 *Rv3871* 相互结合可能形成 FtsK/Spo III E 类 ATP 酶而起作用. 其他参与 ESX-1 分泌系统的蛋白质如 *Rv3869*, *Rv3877* 和 *Rv3881c* 以及 *Rv3882* 大部分被证明存在于细胞质膜. 例如, *Rv3877* 是一种跨膜蛋白, 能够在细胞质膜上形成蛋白质转位孔^[17, 18]. *Rv3881c*(Mh3881c)在分泌时 C 端会被切除, 而其 C 端对协同分泌具有重要的作用, 对 ESAT-6 的分泌水平有影响^[19]. 研究还发现, 基因序列 *Rv3614c*~*Rv3616c*, 同样参与到 ESX-1 的分泌系统之中(图 1). 其中 *Rv3616c* (EspA)和 ESAT-6、CFP-10 是协同分泌的, 共同参与 ESX-1 分泌系统^[20]. *Rv3815c* 的 C 端同 CFP-10 一样是分泌系统 ESX-1 所必需的^[21]. *Rv3849*(EspR)同样是 ESX-1 分泌系统的一个重要调节因素, EspR 蛋白能够直接和 *Rv3614c*~*Rv3616c* 序列启动子结合, 进而激活 *Rv3614c*~*Rv3616c* 相关基因的表达, 同时 EspR 也是依赖于 ESX-1 分泌系统来表达的^[22].

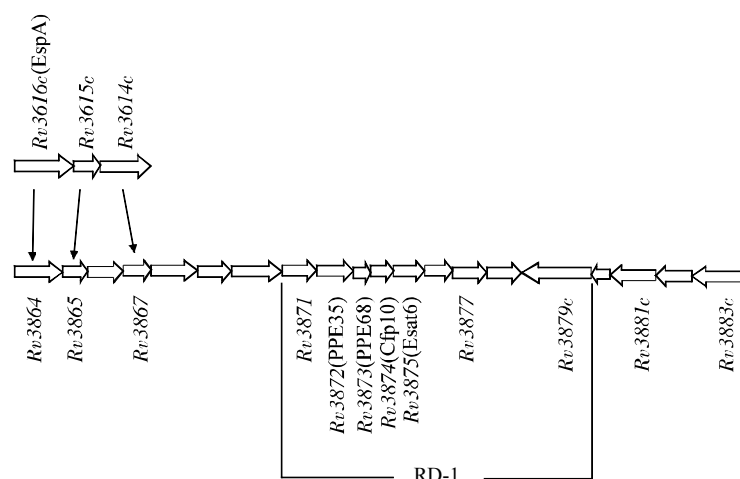


Fig. 1 Part of genes involved in the ESX-1 secretion system

图 1 结核分枝杆菌 ESX-1 分泌系统中参与的部分基因

箭头代表不同的编码序列以及基因转录的方向, 左上角是 EspA 操纵子. 左上方箭头所指向的基因序列为相应序列的同源序列.

2 CFP-10 和 ESAT-6 复合体的结构和功能

结核分枝杆菌能够分泌 ESAT-6 和 CFP-10 蛋白, 而这两种蛋白质是有效的 T 细胞抗原, 在结核分枝杆菌的毒力中起着重要的作用. 现在在大肠

杆菌中表达这两种蛋白质已经成为可能, 而且还发展了有效的纯化措施. 在类似于细胞内环境的条件下, 通过圆二色光谱以及核磁共振成像技术发现, ESAT-6 蛋白含有超过 75% 的二级结构, 以及很少但较为稳定的三级结构, 相反, CFP-10 只有很少

的二级结构, 而且以无规则卷曲的状态存在^[1].

ESAT-6 和 CFP-10 是受同一操纵子编码翻译的^[10], ESAT-6 和 CFP-10 能够形成牢固的 1:1 的复合体, 现在, ESAT-6 和 CFP-10 复合物的结构已经被确定, 两种蛋白质都能形成螺旋-转角-螺旋的发夹结构, 而且彼此相互平行, 同时在 ESAT-6 和 CFP-10 结构中都存在一种含有色氨酸和甘氨酸的称作 WXG 基序的结构, 这种基序主要位于发夹结构的转角部位(图 2), WXG 基序可能与结核分枝杆菌的毒力有关^[23]. ESAT-6 和 CFP-10 的接触面主要是疏水性氨基酸, 而且存在有强烈的范德华力^[11].

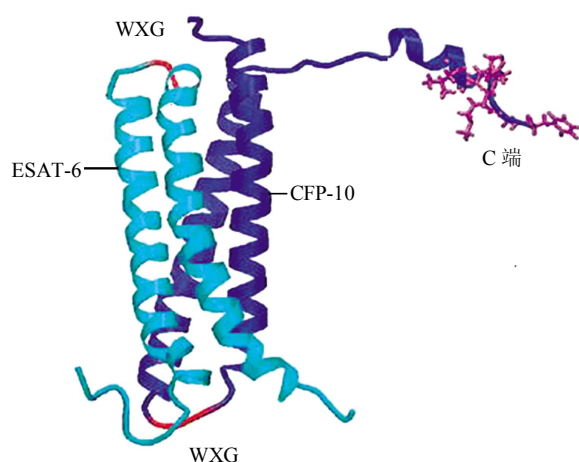


Fig. 2 Structure of the ESAT-6-CFP-10 dimer
(Modified from reference [11, 23])

图 2 ESAT-6 和 CFP-10 二聚体结构图
(修改自参考文献[11, 23])

浅蓝色: ESAT-6; 深蓝色: CFP-10; 粉红色: CFP-10 蛋白 C 端参与分泌的 7 个氨基酸; 深红色: WXG 基序.

Rv3874 和 *Rv3875* 只是结核分枝杆菌中 22 对成对编码基因中的一员^[24], 就 CFP-10 和 ESAT-6 而言, 尽管缺少了传统的信号序列, 但是通过这两种蛋白质的协同作用, 仍然能分泌到相应部位. 目前的研究表明, 这两种蛋白质的分泌是一种比较活跃的过程, 侧翼基因翻译的蛋白质形成的膜蛋白聚合体也参与了进去. 与 CFP-10/ESAT-6 类似归于同一家族成员的 *Rv0287/Rv0288* 以及 *Rv3019c/Rv3020c* 等也会形成牢固的聚合体并协同分泌^[1].

目前, ESAT-6 突变体的分析工作已经展开, 目的是为了寻找在同 CFP-10 组成二聚体协同分泌以及引起 T 细胞反应中起重要作用的氨基酸残基. 影响二聚体形成的几个重要的氨基酸已经被确

认, 例如 ESAT-6 蛋白的 Leu²⁸~Leu²⁹ 与 WXG 基序中的 Trp⁴³ 和 Gly⁴⁵, 它们的变异直接导致二聚体的破坏以及结核分枝杆菌毒力的减弱^[23].

Guinn 等^[14]报道 *Rv3870*, *Rv3871*, *Rv3874*, *Rv3875* 以及 *Rv3876* 的任何一个基因遭到破坏都会导致结核分枝杆菌 H37Rv 在巨噬细胞样细胞 THP-1 中生长缓慢而且丧失细胞毒性. Hsu 等^[15]证实无论是 RD-1 区的删除还是 *Rv3874-Rv3875* 的启动子被破坏都会导致结核分枝杆菌对肺泡细胞和巨噬细胞细胞毒性的消失. Hsu 等^[15]进一步发现, ESAT-6 蛋白无论是单独存在还是与 CFP-10 形成二聚体, 均会导致巨噬细胞溶解, 但是 CFP-10 单独存在时则不会有此种现象发生. 在此基础上, Hsu 等提出 ESAT-6 可能调节宿主胞膜的离子通道进而导致细胞溶解.

Renshaw 等^[11]报道 ESAT-6 和 CFP-10 二聚体的一个重要特征是 CFP-10 的 C 端是连接到细胞表面所必需的, 通过荧光电子显微镜技术他们发现, ESAT-6 和 CFP-10 二聚体特异地粘附到宿主细胞表面, 表明二聚体能够和细胞表面受体相结合, 并且可能在调节宿主细胞生理活动上起作用. Marei 等^[25]发现, 在体外实验中以溶酶体组织蛋白酶和蛋白质浓度 1:2 000 进行消化时, ESAT-6 和 CFP-10 的单体能够快速消化, 相反 ESAT-6 和 CFP-10 二聚体却能够抵制溶酶体酶的消化.

3 ESAT-6 和 CFP-10 在新疫苗开发中和作为分子标识的应用

Marei 等^[25]利用细胞内细胞激素染色技术证实, 当通过佛波酯加离子霉素的短期激活, T 细胞能够产生 TNF 以及 IFN- γ . 其中 CD4⁺ T 细胞优先产生 TNF, 而 CD8⁺ T 细胞优先产生 IFN- γ . 他们发现结核分枝杆菌 ESAT-6 蛋白与上述相似模式引发 T 细胞反应. 同时他们还发现, ESAT-6 和 CFP-10 复合物引发的 T 细胞反应强度没有 ESAT-6 单独存在时剧烈, 但是同 CFP-10 单独存在时引发的反应水平大致相同.

由于 ESAT-6 和 CFP-10 是结核分枝杆菌的重要免疫性抗原, 目前有关亚单位疫苗和基因重组疫苗的研究已经开展, 其中较为重要的是 Ag85B-ESAT6 的联合分子疫苗, 有时也被称作 H1. Ag85A 以及 ESAT-6 这两种分泌抗原已经被确认具有免疫原性^[26]. Agger 等^[26]测试了一种新合成的佐剂并命名为 IC31, 这种佐剂能够和重组亚单位疫

苗 ESAT-6 和 Ag85B 联合使用。研究结果表明，以 IC31 作为佐剂的 ESAT-6/Ag85B 疫苗对小鼠肺脏的保护力明显要强于只接种 BCG 疫苗的小鼠，这种疫苗已经进入临床试验阶段(表 1)。另一种佐剂 LTK63 和重组亚单位疫苗 ESAT-6 和 Ag85B 联合使用能够引发持续的 T 细胞反应，而且能使先前的 BCG 免疫得到增强^[27](表 1)。

Derrick 等^[28]通过下述方法评估一种能够表达融合蛋白 ESAT6-Ag85B 的 DNA 疫苗 PE6/85 的保护性效能。C57BL/6 小鼠无论是单独接种 PE6/85 3 次(每隔 3 周 1 次)或者在小鼠 BCG 免疫后的 12、13、14 个星期各注射 1 次 PE6/85 免疫小鼠。结果表明，在这两种情况下小鼠的肺脏和脾脏中杆菌的数量没有明显的不同，但是比单独使用 BCG 的杆菌数量明显减少。另外有研究发现，相对于只接种 BCG 的小鼠，同时接种 ESAT-6 的 DNA 疫苗和

BCG 疫苗能够大大提高特异性 IFN- γ 的形成，并且小鼠的脾脏和肺脏的结核分枝杆菌的数量大大减少，在肺部只能检测到轻微的病变，这表明 BCG 疫苗如果和其他相关疫苗联合使用能够引发更有效的免疫反应^[29]。Wu 等^[30]发现当以 CFP-10 的 DNA 疫苗注射 C3H 小鼠时能够选择性地引发 CFP-10₃₂₋₃₉ 特异性 CD8⁺T 细胞的反应。通过雾化的结核分枝杆菌气溶胶激发免疫小鼠，可导致 CFP-10₃₂₋₃₉ 特异性 CD8⁺ T 细胞的生长并将持续 8 个星期。他们还发现免疫过 CFP-10 DNA 疫苗的小鼠在 4 和 8 个星期之后肺部的菌落形成单位明显低于只接种 DNA 空载体的小鼠。他们因此认为 CFP-10 的 DNA 疫苗能够引发免疫保护反应，并可作为一种候选疫苗。Pym 等^[16]已将 CFP-10 的编码基因与 RD1 区的一些基因重组转入 BCG，形成重组的 BCG 菌株 BCG：RD1-2F。

Table 1 TB vaccine candidates in Phase I/II clinical trials^[31, 32]
表 1 临床试验第一，二阶段的结核候选疫苗简表^[31, 32]

疫苗名称	抗原	疫苗分类	研发阶段	相关机构和公司
rBCG30	Ag85B	活疫苗	临床 I 期(2004 年)	加利福尼亚大学
Advac	Ag85A, Ag85B 和 TB10.4	基因重组疫苗	临床 I 期(2007 年)	全球肺结核疫苗基金会
MVA85A	Ag85B	基因重组疫苗	临床 I 期(2003 年) 临床 II 期(2007 年)	牛津大学 /Emergent BioSolutions 公司
H1/IC31	Ag85B 和 ESAT-6	亚单位疫苗	临床 I 期(2005 年)	丹麦国立血清研究所 /Sanofi Pasteur 公司
H1/LTK63	Ag85B 和 ESAT-6	亚单位疫苗	临床 I 期(2007 年)	丹麦国立血清研究所 / Novartis 公司
HyVac4/IC31	Ag85B 和 TB10.4	亚单位疫苗	临床 I 期(2007 年)	丹麦国立血清研究所 /Sanofi Pasteur 公司 / 全球肺结核疫苗基金会

结核分枝杆菌抗原特异性 IFN- γ 释放试验 (IGRAs)的出现代表了结核病诊断领域的一个重大进展。这些试验主要是为 T 细胞对分泌抗原 ESAT-6 和 CFP-10 反应所产生的 IFN- γ 进行的检

测。现在商业化存在的 IGRAs 主要是 T-SPOT.TB 和 QuantiFERON-Gold(表 2)^[33~35]。由于大多数结核分枝杆菌感染者单个抗原是很难被检测出来的^[36]，因此检测结核分枝杆菌的多重抗体也许会更有效。

Table 2 The key features of T-SPOT.TB and QuantiFERON-Gold
表 2 T-SPOT.TB 和 QuantiFERON-Gold 的主要特征

要点	T-SPOT.TB	QuantiFERON-Gold
抗原	ESAT-6 和 CFP-10	ESAT-6 和 CFP-10
阳性对照	需要	需要
结果所需时长(h)	16~20	16~24
技术平台	ELISpot	ELISA
检测底物	人外周血单核细胞	全血
结果测量	产生 IFN- γ 的 T 细胞数量	T 细胞产生 IFN- γ 的血清浓度
读出系统	通过放大肉眼计数或者使用自动读取器计数	使用自动读取器进行光密度值的测量
规则核准	欧盟, 加拿大, 美国 FDA	欧盟, 加拿大, 美国 FDA

多重抗原免疫印迹法(MAPIA)是一种通过烟雾化作用使几种抗原印迹在硝酸纤维素膜上,然后通过与抗体的反应来诊断结核的^[37]. 在这种方法的基础上,目前一种新的诊断结核的血清学方法被发现,这种方法通过结核抗原 ESAT-6, CFP-10 和热休克蛋白覆盖于微球颗粒上面,然后通过荧光显色鉴定相关抗体. 这种方法已经被用于检测非人类灵长类的动物模型上^[38]. Fox 等^[39]通过 ELISPOT 实验方法确定 ESAT-6 和 CFP-10 的结合蛋白在对结核分枝杆菌隐性感染者能够提供最为有效和灵敏的结果,而 CFP-10 蛋白在诊断活动性结核方面作用明显.

目前许多新型结核疫苗都已经进入临床试验阶段,但是应该注意到这些疫苗的研发仅仅是针对少数研究比较透彻的抗原进行的,这些抗原主要包括 ESAT-6、CFP-10、Ag85A 和 Ag85B. 因此,如果想获得更有效的疫苗,科研工作者应该拓展思路、积极地探索和发现更有效以及免疫原性更高的新型抗原. T-SPOT.TB 和 QuantiFERON-Gold 诊断技术,因其高度的灵敏度以及能够大大降低了传统的结核菌素皮肤试验(TST)所带来的假阳性概率而成为诊断潜伏性结核感染(LTBI)的新技术. 然而,对临床结果的纵向研究迫切需要定义结核分枝杆菌抗原特异性 IFN- γ 释放试验(IGRAs)对活动性结核的预测价值. 这些数据的确立将会为实施以 IGRAs 诊断结果为指导的治疗方法提供可靠依据.

4 结 语

为了应对结核这一世界性传染性疾病,科学家们对结核分枝杆菌培养液中的分泌蛋白进行了广泛的研究,由于结核分枝杆菌的 RD-1 区在 BCG 菌株中是缺失的,因此 RD-1 区蛋白受到了广泛的重视,其中 RD-1 区的 ESAT-6 和 CFP-10 蛋白由于具有较好的免疫原性而成为人们研究的热点. 结核分枝杆菌基因组测序工作的完成,为进行结核分枝杆菌蛋白质组学研究奠定了基础^[40]. 可以预见,通过蛋白质组学研究,许多用于结核分枝杆菌检测以及研制亚单位疫苗的新抗原分子将会被发现.

参 考 文 献

- WHO Global tuberculosis control-surveillance, planning, financing. [online] http://www.who.int/tb/publications/global_report/2008/en/index.html
- Wells C D, Ceqielski J P, Nelson L J, et al. HIV infection and multidrug-resistant tuberculosis: the perfect storm. J Infect Dis, 2007, **196** (Suppl 1): S86~S107
- Lewis K N, Liao R, Guinn K M, et al. Deletion of RD1 from *Mycobacterium tuberculosis* mimics bacilli Calmette-Guerin attenuation. J Infect Dis, 2003, **187**(1): 117~123
- Sherman D R, Guinn K M, Hickey M J, et al. *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv: Delta RD1 is more virulent than *M. bovis* bacille Calmette-Guérin in long-term murine infection. J Infect Dis, 2004, **190**(1): 123~126
- Renshaw P S, Panagiotidou P, Whelan A, et al. Conclusive evidence that the major T cell antigens of the *Mycobacterium tuberculosis* complex ESAT-6 and CFP-10 form a tight, 1:1 complex and characterization of the structural properties of ESAT-6, CFP-10 and the ESAT6-CFP10 complex: implication for pathogenesis and virulence. J Biol Chem, 2002, **277**(24): 21598~21603
- Stanley S A, Raghavan S, Hwang W W, et al. Acute infection and macrophage subversion by *Mycobacterium tuberculosis* require a specialized secretion system. Proc Natl Acad Sci USA 2003, **100** (22): 13001~13006
- Champion P A, Stanley S A, Champion M M, et al. C-terminal signal sequence promotes virulence factor secretion in *Mycobacterium tuberculosis*. Science, 2006, **313**(5793):1583~1584
- Okkels L M, Brock I, Follmann F, et al. PPE protein (Rv3873) from DNA segment RD-1 of *Mycobacterium tuberculosis*: strong recognition of both specific T-cell epitopes and epitopes conserved within the PPE family. Infect Immun, 2003, **71**(11): 6116~6123
- Pym A S, Brodin P, Brosch R, et al. Loss of RD-1 contributed to the attenuation of the live tuberculosis vaccines *Mycobacterium bovis* BCG and *Mycobacterium microti*. Mol Microbiol, 2002, **46** (3): 709~717
- Berthet F X, Rasmussen P B, Rosenkrands I, et al. A *Mycobacterium tuberculosis* operon encoding ESAT-6 and a novel low-molecular-mass culture filtrate protein (CFP-10). Microbiology, 1998, **144**(pt 11): 3195~3203
- Renshaw P S, Lightbody K L, Muskett F W, et al. Structure and function of the complex formed by the tuberculosis virulence factors CFP-10 and ESAT-6. EMBO J, 2005, **24**(14): 2491~2498
- Agger E M, Brock I, Okkels L M, et al. human T-cell responses to RD-1 encoded protein TB27.4 (Rv3878) from *Mycobacterium tuberculosis*. Immunology, 2003, **110**(4): 507~512
- McLaughlin B, Chon J S, MacGurn J A, et al. A mycobacterium ESX-1-secreted virulence factor with unique requirements for export. PLoS Pathog, 2007, **3**(8): 1051~1061
- Guinn K M, Hickey M J, Mathur S K, et al. Individual RD1-region genes are required for export of ESAT-6/CFP-10 and for virulence of *Mycobacterium tuberculosis*. Mol Microbiol, 2004, **51**(2): 359~370
- Hsu T, Hingley-Wilson S M, Chen B, et al. The primary mechanism of attenuation of bacillus Calmette-Guerin is a loss of secreted lytic function required for invasion of lung interstitial tissue. Proc Natl Acad Sci USA, 2003, **100**(21): 12420~12425
- Pym A S, Brodin P, Majlessi L, et al. Recombinant BCG exporting ESAT-6 confers enhanced protection against tuberculosis. Nature Med, 2003, **9**(5): 533~539

- 17 DiGiuseppe Champion P A, Cox J S. Protein secretion systems in mycobacteria. *Cell Microbiol*, 2007, **9**(6):1376-1384
- 18 Abdallah A M, Champion P A, Cox J, *et al.* Type VII secretion-mycobacteria show the way. *Nat Rev Microbiol*, 2007, **5**(11): 883~891
- 19 Xu J, Laine O, Masciocchi M, *et al.* A unique *Mycobacterium* ESX-1 protein cosecretes with CFP-10/ESAT-6 and is necessary for inhibiting phagosome maturation. *Mol Microbiol*, 2007, **66** (3): 787~800
- 20 Fortune S M, Jaeger A, Sarracino D A, *et al.* Mutually dependent secretion of proteins required for mycobacterial virulence. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, **102**(30): 10676~10681
- 21 MacGurn J A, Raghavan S, Stanley S A, *et al.* A non-RD1 gene cluster is required for Snm secretion in *Mycobacterium tuberculosis*. *Mol Microbiol*, 2005, **57**(6): 1653~1663
- 22 Raghavan S, Manzanillo P, Chan K, *et al.* Secreted transcription factor controls *Mycobacterium tuberculosis* virulence. *Nature*, 2008, **454**(7205): 717~721
- 23 Brodin P, de Jonge M I, Majlessi L, *et al.* Functional analysis of ESAT-6, the dominant T-cell antigen of *Mycobacterium tuberculosis*, reveals key residues involved in secretion, complex-formation, virulence and immunogenicity. *J Biol Chem*, 2005, **280**(40): 33953~33959
- 24 Lightbody L K, Renshaw P S, Collins M L, *et al.* Characterisation of complex formation between members of the *Mycobacterium tuberculosis* complex CFP-10/ESAT-6 protein family: towards an understanding of the rules governing complex formation and thereby functional flexibility. *FEMS Microbiol Lett*, 2004, **238**(1): 255~262
- 25 Marei A, Ghaemmaghami A, Renshaw P, *et al.* Superior T cell activation by ESAT-6 as compared with the ESAT-6-CFP-10 complex. *Int Immunol*, 2005, **17**(11): 1439~1446
- 26 Agger E M, Rosenkrands I, Olsen A W, *et al.* Protective immunity to tuberculosis with Ag85B-ESAT-6 in a synthetic cationic adjuvant system IC31. *Vaccine*, 2006, **24**(26): 5452~5460
- 27 Dietrich J, Andersen C, Rappuoli, *et al.* Mucosal administration of Ag85B-ESAT-6 protects against infection with *Mycobacterium tuberculosis* and boosts prior bacillus Calmette-Guerin immunity. *J Immunol*, 2006, **177**(9): 6353~6360
- 28 Derrick S C, Yang A L, Morris S L. A polyvalent DNA vaccine expressing an ESAT6-Ag85B fusion protein protects mice against a primary infection with *Mycobacterium tuberculosis* and boosts BCG-induced protective immunity. *Vaccine*, 2004, **23**(6): 780~788
- 29 Fan X, Gao Q, Fu R. DNA vaccine encoding ESAT-6 enhances the protective efficacy of BCG against *Mycobacterium tuberculosis* infection in mice. *Scand J Immunol*, 2007, **66**(5): 523~528
- 30 Wu Y, Woodworth J S, Shin D S, *et al.* Vaccine-elicited 10-kilodalton culture filtrate protein-specific CD8⁺ T cells are sufficient to mediate protection against *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Infect Immun*, 2008, **76**(5): 2249~2255
- 31 Brosch R, Vincent V. Cutting-edge science and the future of tuberculosis control. *Bull World Health Organ*, 2007, **85**(5): 410~412
- 32 Mitsuyama M, McMurphy D N. Tuberculosis: vaccine and drug development. *Tuberculosis (Edinb)*, 2007, **87**(Suppl 1): S10~S13
- 33 Pai M, Riley L W, Colford J M Jr. Interferon-gamma assays in the immune-diagnosis of tuberculosis: a systematic review. *Lancet Infect Dis*, 2004, **4**(12): 761~776
- 34 Ariga H, Harada N. Evolution of IGRA researches. *Kekkaku*, 2008, **83**(9): 641~652
- 35 Bergamini BM, Losi M, Vaienti F, *et al.* Performance of commercial blood tests for the diagnosis of latent tuberculosis infection in children and adolescents. *Pediatrics*, 2009, **123**(3): e419~e424
- 36 Dayal R, Singh A, Katoh V M, *et al.* Serological diagnosis of tuberculosis. *Indian J Pediatr*, 2008, **75**(12): 1219~1221
- 37 Lyashchenko K P, Singh M, Colengeli R, *et al.* A multi-antigen print immunoassay for the development of serological diagnosis of infectious diseases. *J Immunol Methods*, 2000, **242**(1~2): 91~100
- 38 Khan I H, Ravindran R, Yee J, *et al.* Profiling antibodies to *Mycobacterium tuberculosis* by multiplex microbead suspension arrays for sero-diagnosis of TB. *Clin Vaccine Immunol*, 2008, **15**(3): 433~438
- 39 Fox A, Jeffries D J, Hill P C, *et al.* ESAT-6 and CFP-10 can be combined to reduce the cost of testing for *Mycobacterium tuberculosis* infection, but CFP-10 responses associate with active disease. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 2007, **101**(7): 691~698
- 40 Barenholz A, Hovav A H, Fishman Y, *et al.* A peptide mimetic of the mycobacterial mannosylated lipoarabinomannan: characterization and potential applications. *J Med Microbiol*, 2007, **56**(5): 579~586

The Structure and Function of *M. tuberculosis* RD-1 Region Encoded Proteins*

LI Hao, XU Jun-Jie**, CHEN Wei**

(State Key Laboratory of Pathogen and Bio-security, Institute of Microbiology and Epidemiology, Beijing 100071, China)

Abstract The RD-1 locus has been considered crucial in the pathogenesis of *M. tuberculosis*, the RD-1 locus is 9.5 kb and spanning open reading frames *Rv3871* to *Rv3879c* encoding 9 different proteins separately. The RD-1 locus is missing in all bacillus Calmette-Guerin (BCG) strains, and is one of the key virulence factor in *M. tuberculosis*. The RD-1 locus participates in a new secreting system named ESX-1, which can facilitate the secretion of some special proteins. The two important proteins encoded by the RD-1 locus named CFP-10 and ESAT-6 can form a tight 1 : 1 complex, and has been shown to be coordinately secreted and lead to a strong T cell response, which suggests that these two proteins may act as ideal target antigens in diagnosis and prevention of tuberculosis (TB).

Key words *Mycobacterium tuberculosis*, RD-1, CFP-10, ESAT-6

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2009.00187

*This work was supported by a grant from The National Natural Science Foundation of China (30571745).

**Corresponding author. Tel: 86-10-66948491

XU Jun-Jie. E-mail: xujunjie@sina.com

CHEN Wei. E-mail: cw789661@yahoo.com

Received: March 29, 2009 Accepted: May 11, 2009