

· 研究原著 ·

文章编号 1000-2790(2006)18-1633-04

结核分枝杆菌 RpfA 蛋白的表达纯化与鉴定

高 辉 柏银兰 王丽梅 徐志凯 薛 莹 (第四军医大学基础部微生物学教研室 陕西 西安 710033)

Expression , purification and identification of *Mycobacterium tuberculosis* RpfA

GAO Hui , BAI Yin-Lan , WANG Li-Mei , XU Zhi-Kai , XUE Ying
Department of Microbiology , School of Basic Medicine , Fourth
Military Medical University , Xi'an 710033 , China

【 Abstract 】AIM : To express efficiently *Mycobacterium tuberculosis* RpfA in *E. coli* and purify the fusion proteins. **METHODS :** RpfA gene segments were digested with *Nde*I and *Bam*HI and cloned into pcDNA3. 1⁺ vector. After sequencing , RpfA were subcloned into the prokaryotic expression vector pET19b to get pET19b-RpfA. The plasmid pET19b-RpfA were transformed into *E. coli* DE3 and induced by IPTG for its expression. The RpfA fusion protein expression was analyzed by SDS-PAGE and confirmed by Western blot. Recombinant(His)₆ fusion proteins were purified via Ni²⁺-NTA affinity chromatography. **RESULTS :** RpfA gene segments were identical to that GenBank reported (lacking 5' ends of 99 bp). The pET19b-RpfA vector expressed RpfA fusion proteins at *M_r* about 80 ku , which could be caught by anti- (His)₆ mAb , anti-Rv1884 and anti-Rv2389 immune serum. SDS-PAGE analysis showed that the fusion proteins mainly existed in inclusion bodies. The expressed proteins could be purified via Ni²⁺-NTA affinity chromatography in denatured condition. **CONCLUSION :** The recombinant expression plasmid pET19b-RpfA has been constructed and RpfA fusion proteins been successfully expressed in *E. coli* and purified , which lay a basis for further study of RpfA functions.

【 Keywords 】 RpfA ; expression ; purification ; *Mycobacterium tuberculosis*

【 摘 要 】目的 : 表达和纯化 RpfA 融合蛋白。方法 : 将含有 RpfA 基因片段的质粒用 *Nde*I 与 *Bam*HI 双酶切 , 然后将目的基因片段克隆入 pcDNA3. 1⁺ 载体构建重组载体 pcDNA3. 1⁺-RpfA , 测序正确后再将目的基因片段亚克隆入 pET19b 原核表达载体并转化 *E. coli* DE3 , IPTG 诱导表达融合蛋白 , Western

blot 鉴定融合蛋白。在变性条件下 Ni²⁺-NTA 亲和色谱柱纯化目的融合蛋白。结果 : 目的基因片段测序与 Genbank 报道一致 (切去了 5' 端 99 bp)。SDS-PAGE 显示 , 在 *M_r* 约为 80 ku 处有表达条带 , Western blot 鉴定为 (His)₆ 融合蛋白 , 并与小鼠抗 Rv1884 和抗 Rv2389 免疫血清有交叉反应。可溶性分析发现融合蛋白主要以包涵体形式存在。经 Ni²⁺-NTA 亲和色谱柱纯化得到了融合有 6 个组氨酸残基的 RpfA 融合蛋白。结论 : 成功构建了 pET19b-RpfA 表达载体 , 并在 *E. coli* DE3 中高效表达 , 亲和层析后获得了纯化目的蛋白。

【 关键词 】 RpfA 表达 纯化 分枝杆菌 结核

【 中图分类号 】 R392. 11 **【 文献标识码 】** A

0 引言

复活促进因子 (resuscitation promoting factor , Rpf) 最早在藤黄微球菌中发现 , 它可以促进休眠期结核分枝杆菌的生长^[1]。Rpf 样蛋白广泛存在于革兰氏阳性菌中 , 并参与革兰氏阳性菌生物活性^[2]。RpfA (Rv0867c) 是结核分枝杆菌 Rpf 家族五种蛋白 (A-E) 中的一员^[3]。在对 Rpf 家族其他成员的研究中发现 Rpf 样蛋白不仅与细菌的增殖有关 , 还有可能是宿主免疫系统识别的一个靶抗原^[4-5]。我们表达并纯化 RpfA 融合蛋白 , 以期进一步研究 RpfA 融合蛋白刺激细菌增殖功能的作用机理和自身的免疫学特性 , 评价其作为快速培养检验结核分枝杆菌 (*mycobacterium tuberculosis* , MTB) 的候选组分的可能性。

1 材料和方法

1.1 材料 含 RpfA 基因片段的质粒由 Mike Young 教授惠赠 (University of Wales , Cardiff , United Kingdom) ; pcDNA3. 1⁺ 载体与 Ni²⁺-NTA Purification System (美国 Invitrogen 公司) ; pET19b 载体 (美国 Novagen 公司) ; *E. coli* DE3 菌株为第四军医大学微生物学教研室保存 ; 限制性内切酶 *Nde*I , *Bam*HI 与 T4 DNA 连接酶 (大连 TaKaRa 公司) ; IPTG (美国 Sigma 公司) ; 质粒微量提取试剂盒与胶回收试剂盒 (美国 Omega 公司) ; PVDF 膜 (美国 Millipore 公司) ; 抗 His 标签 mAb (北京天为时代公司) ; 小鼠抗 Rv1884 和抗 Rv2389 免疫血清 (切去 His 标签) 为第四军医大学微生物学教研室制备。

收稿日期 2006-04-13 ; 接受日期 2006-06-20

基金项目 国家自然科学基金项目 (30470097 , 430500432)

通讯作者 薛 莹。Tel : (029) 84774527 Email : xueying@fmmu.edu.cn

作者简介 : 高 辉。硕士生 (导师徐志凯)。Tel : (029) 84774527

Email : vinurs@fmmu.edu.cn

1.2 方法

1.2.1 基因片段的测序鉴定 将含有目的片段的质粒用 *Nde*I 和 *Bam*HI 双酶切,琼脂糖凝胶电泳后回收目的片段条带。再将纯化的回收产物与经同样酶切的 pcDNA3.1⁺ 载体进行连接,转化感受态 *E. coli* DE3, 均匀涂布于含有 100 mg/L 氨苄青霉素的 LB 培养基中,37℃ 培养 16 h,随机挑取克隆进行酶切鉴定,将酶切正确的克隆送至上海博亚生物工程有限公司进行序列测定。

1.2.2 目的蛋白的诱导表达 测序结果正确的质粒经 *Nde*I 和 *Bam*HI 双酶切后,回收目的片段,与经同样酶切的 pET19b 载体进行连接,转化感受态 *E. coli* DE3, 随机挑取 4 个克隆进行酶切鉴定。把酶切鉴定正确的阳性克隆接种在含有 100 mg/L 氨苄青霉素的 LB 培养液中,37℃ 振荡过夜,然后按 1:25 的接种量进行转接,37℃ 振荡 3 h 后加入异丙基 β-D-硫代半乳糖苷 (IPTG) 至终浓度为 1.0 mmol/L,37℃ 继续培养 4 h。取 1.0 mL 细菌培养物,离心 1 min 收集菌体,加入 2 × 样品缓冲液剧烈振荡混匀,100℃ 煮 10 min 后 12 000 g 离心 10 min,取上清进行 SDS-PAGE 电泳检测,并通过凝胶薄层扫描测定其表达量。

1.2.3 表达产物鉴定 所构建的重组质粒表达的 RpfA 蛋白是带有 6 个组氨酸标签的融合蛋白,而且表达的 RpfA 蛋白是与 Rpf 家族其它蛋白高度同源的,都含有关键的 Rpf 样结构域^[6]。将经过诱导的细菌制成样品,进行 100 g/L SDS-PAGE 电泳,并转移至 PVDF 膜上,用 10 g/L BSA 封闭过夜,分别加入抗组氨酸标签的特异性 mAb,小鼠抗 Rv1884 免疫血清,小鼠抗 Rv2389 免疫血清作用 1 h,以 10 mmol/L PBS (pH 7.2) 洗涤后,加入 HRP 标记的羊抗鼠 IgG 作用 1 h,以 DAB 显色观察表达产物。分别以未诱导细菌裂解物,第四军医大学微生物学教研室制备的 ES-AT6-MPT64 融合蛋白为阴性对照。

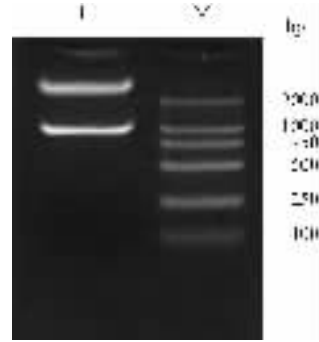
1.2.4 表达蛋白的可溶性分析 大规模培养细菌,诱导表达目的蛋白,收集细菌,超声波破碎细菌。12 000 g 离心 10 min 后将上清和沉淀分别制样,进行 SDS-PAGE 分析。

1.2.5 表达产物的纯化 采用 Invitrogen 的 Ni²⁺-NTA 纯化试剂盒纯化目的蛋白。将 50 mL 的诱导菌液离心,制备上柱样品,按照变性条件进行亲和色谱纯化,收集洗脱液进行 SDS-PAGE 分析。

2 结果

2.1 RpfA 基因片段的序列测定 含有目的基因片段的质粒用 *Nde*I 和 *Bam*HI 双酶切,得到大小约为

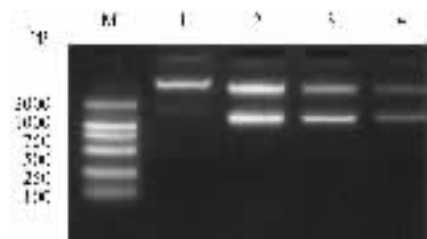
1125 bp 的片段(图 1) 将回收后的目的片段克隆入 pcDNA3.1⁺ 载体,挑选酶切鉴定正确的克隆,经正向全自动测序后证实目的片段序列与切去 N 末端 99 bp 信号肽编码序列后的 Genbank 序列完全一致。



M : DNA marker (DL2000) 1 : Plasmid-RpfA.

图 1 含 RpfA 基因片段质粒酶切鉴定

2.2 表达载体的酶切鉴定 将重组质粒 pcDNA3.1⁺-RpfA 经 *Nde*I 和 *Bam*HI 双酶切后,回收目的片段,与经同样酶切的 pET19b 载体进行连接,转化感受态 *E. coli* DE3, 随机挑取 4 个克隆进行酶切鉴定,其中 2, 3, 4 号克隆切出目的大小的片断,命名为 pET19b-RpfA-2, 3, 4(图 2)。



M : DNA marker (DL2000) 1 ~ 4 : pET19b- RpfA 质粒.

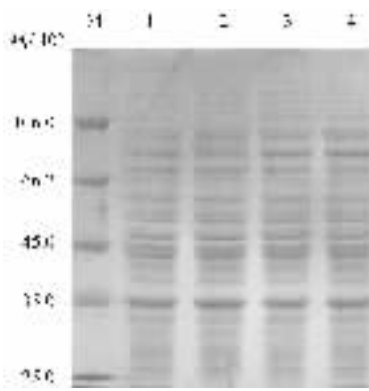
图 2 pET19b- RpfA 质粒酶切鉴定

2.3 RpfA 融合蛋白的表达 将重组质粒转化 *E. coli* DE3, 1 mmol/L IPTG 诱导 4 h,进行 100 g/L SDS-PAGE,从电泳图中可以看见在 M_r 约为 80 ku 处出现表达带,而未诱导的细菌没有表达带出现(图 3)。

2.4 融合蛋白的鉴定 将诱导细菌裂解物分别与抗组氨酸的特异性 mAb,小鼠抗 Rv1884 免疫血清和抗 Rv2389 免疫血清做免疫印记。结果显示在 M_r 约为 80 ku 处有一显色带,而未诱导对照,纯化的 ESAT6-MPT64 融合蛋白阴性对照没有显色(图 4)。

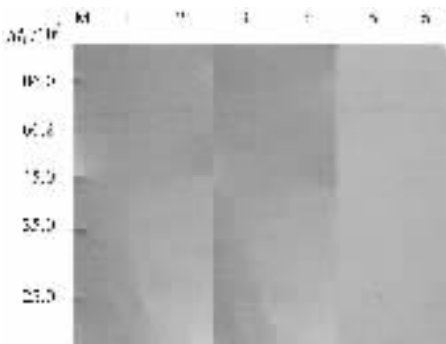
2.5 表达蛋白的可溶性分析与纯化 将细菌裂解产物的上清和沉淀分别所制样品,进行 SDS-PAGE 分析,表明表达产物主要在细菌裂解后的沉淀中,而上清中则很少。Ni²⁺-NTA 亲和色谱柱纯化蛋白后 SDS-PAGE 分析可发现在 M_r 约为 80 ku 处有一条清晰的

条带(图5)。



M: 标准分子量蛋白 1: 诱导的 *E. coli* DE3 2: 未诱导的 *E. coli* DE3 工程菌 3~4: 诱导的 *E. coli* DE3 工程菌。

图3 (His)₆-RpfA 融合蛋白的表达



M: 标准分子量蛋白 1: 诱导的 *E. coli* DE3 工程菌与抗 Rv1884 免疫血清 2: 纯化 ESAT6-MPT64 蛋白与抗 Rv1884 免疫血清 3: 诱导的 *E. coli* DE3 工程菌与抗 Rv2389 免疫血清 4: 纯化 ESAT6-MPT64 蛋白与抗 Rv2389 免疫血清 5: 诱导的 *E. coli* DE3 工程菌与抗 His 标签 mAb 6: 未诱导的 *E. coli* DE3 工程菌与抗 His 标签 mAb。

图4 RpfA 融合蛋白与小鼠抗 Rv1884 免疫血清、抗 Rv2389 免疫血清和抗 His 标签 mAb 免疫印记



M: 标准分子量蛋白 1: 菌体裂解物沉淀 2: 菌体裂解物上清 3: 未诱导的 *E. coli* DE3 工程菌 4: 诱导的 *E. coli* DE3 工程菌 5: 纯化的 RpfA 融合蛋白。

图5 (His)₆-RpfA 融合蛋白的纯化与可溶性分析

3 讨论

RpfA 基因全长 1224 bp, 表达的 RpfA 蛋白是一种分泌型蛋白, 包括有 N 末端信号肽, Rpf 样结构域,

富含脯氨酸-丙氨酸重复序列。我们表达的融合蛋白切去了 N 末端 33 个氨基酸的信号肽, 以利于表达融合蛋白, 因此用 pET19b 载体表达理论 M_r 应该约为 40 ku, 但是我们看见诱导表达的条带却是在 M_r 约为 80 ku 位置。为了鉴定所表达的蛋白是否是我们所需要的蛋白, 我们先用小鼠抗 His 标签 mAb 对表达产物进行免疫印记, 在 M_r 约为 80 ku 处出现单一条带, 而空载体诱导的菌体裂解物没有显色条带, 为了进一步鉴定所获的融合蛋白, 我们随后又分别用小鼠抗 Rv1884 和抗 Rv2389 免疫血清(均已切除了 His 标签)对诱导细菌裂解物进行免疫印记, 以纯化的重组结核杆菌 ESAT6-MPT64 蛋白作为阴性对照, 结果都在 M_r 约为 80 ku 处出现单一条带, 而阴性对照没有出现条带。因此我们认为所表达的蛋白就是我们所需要的蛋白。SAPS(www.isrec.isb-sib.ch/software/SAPS_form.html)分析发现 RpfA 蛋白 P₁₂₃-P₃₇₁ 集中了 75 个脯氨酸, 中间包含了大量的重复序列 LAPPAP, 而脯氨酸是唯一的一种环状氨基酸。因为它的环状结构, 刚性很强, 它的出现都是肽链方向的改变, 因此在高密度重复出现脯氨酸时, 肽链既不能形成 α -螺旋也不能形成 β -折叠, 只能形成长链的无规则卷曲。3D-JIGSAW(www.bmm.icnet.uk/servers/3djigsaw/)分析也预测了这一点。因此在形成 SDS-蛋白质复合物时, 按照“项链”模型理论^[7], SDS 在中央, 结合的肽链弯曲形成环状在外围, 而环的直径决定了复合物在聚丙烯酰胺凝胶中的泳动速率, 由于 RpfA 蛋白富含脯氨酸-丙氨酸重复序列, 造成环的弯曲受限, 从而导致环的直径变大, 导致了泳动速率的下降, 在 SDS-PAGE 电泳上就表现为分子量明显增加。Mukamolova 等^[8]用抗 Rpf 样结构域抗体对 MTB 和 BCG 培养上清浓缩液作免疫印记, 也发现在 M_r 约为 80 ku 处有表达条带, 因此我们的判断完全是有理由的。而且后续的实验已经显示纯化的 RpfA 融合蛋白对 BCG 和 H37Ra 的生长有刺激作用。

【参考文献】

- [1] Shleeva M, Mukamolova GV, Young M, et al. Formation of 'non-culturable' cells of *Mycobacterium smegmatis* in stationary phase in response to growth under suboptimal conditions and their Rpf-mediated resuscitation[J]. *Microbiology*, 2004, 150(6): 1687-1697.
- [2] Schroeckh V, Martin K. Resuscitation-promoting factors: Distribution among actinobacteria, synthesis during life-cycle and biological activity[J]. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 2006, 89(3-4): 359-365.
- [3] Mukamolova GV, Kaprelyants AS, Young DI, et al. A bacterial cytokine[J]. *Microbiology*, 1998, 95(15): 8916-8921.
- [4] Yermeev VV, Kondratieva TK, Rubakova EI, et al. Proteins of the Rpf Family: Immune cell reactivity and vaccination efficacy against

- tuberculosis in mice[J]. *Infect Immun*, 2003, 71(8): 4789-4794.
- [5] Tufariello JM, Mi K, Xu J. Deletion of the *Mycobacterium tuberculosis* resuscitation promoting factor Rv1009 gene results in delayed reactivation from chronic tuberculosis[J]. *Infect Immun*, 2006, 74(5): 2985-2995.
- [6] Telkov MV, Demina GR, Voloshin SA, et al. Proteins of the Rpf (resuscitation promoting factor) family are peptidoglycan hydrolases [J]. *Biochemistry*, 2006, 71(4): 414-422.

- [7] Gelamo EL, Silva CH, Imasato H. Interaction of bovine (BSA) and human (HAS) serum albumins with ionic surfactants: spectroscopy and modeling[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2002, 1594(1): 84-99.
- [8] Mukamolova GV, Turapov OA, Young DI, et al. A family of auto-crine growth factors in *Mycobacterium tuberculosis*[J]. *Mol Microbiol*, 2002, 46(3): 623-635.

编辑 杨湘华

· 经验交流 · 文章编号 1000-2790(2006)18-1636-01

微波治疗老年患者恶性气道阻塞 37 例

喻昌利, 刘 飒, 高 捷, 郭继芳, 付爱双, 王红阳
(华北煤炭医学院附属医院呼吸内科, 河北 唐山 063000)

【关键词】纤支镜; 微波; 肺癌

【中图分类号】R562 【文献标识码】B

1 临床资料 2002-06/2005-06 老年恶性气道阻塞患者 37 (男 29, 女 8) 例, 年龄 60~80(72±8.4) 岁, 病史 1~48(平均 16) mo。纤支镜检查确诊, 气道完全阻塞 26 例, 病变在右主支气管 16 例, 在左主支气管 14 例, 中间支气管病变 12 例, 右上叶开口病变 3 例, 左上叶开口病变 4 例, 右上叶合并右中间支气管病变 6 例, 狭窄原因均为肺部恶性肿瘤。鳞癌 23 例, 肺小细胞癌 6 例, 腺癌 4 例, 大细胞癌 2 例, 未分化癌 2 例, 均有阻塞性肺炎及顽固性咳嗽, 发热 20 例, 低氧血症 36 例, 慢性阻塞性肺疾病 21 例, 并发呼吸衰竭 16 例, 并发肺不张 16 例, 并发胸腔积液 15 例, 并发高血压(和/或)冠心病 14 例, 肾功能不全 8 例。采用日本 Olympus BF-P30 型纤维支气管镜, 多功能微波治疗仪(南京新技术研究所研制生产) METI-XXX 型, 频率 2450 MHz, 输出功率 1~100 W, 辐射器, 单极同轴微波天线, 直径 1.5 mm, 长 100 cm, 尖端接 5 mm 柱状针。20 g/L 利多卡因鼻腔及咽喉部雾化吸入黏膜表面麻醉, 插入纤支镜后经活检孔注入利多卡因 8~10 mL, 麻醉咽喉气管及左右主支气管黏膜。微波凝固治疗功率 45~60 W, 每点持续时间 8~15 s。然后经活检孔插入微波辐射天线, 尖端插入或紧贴治疗部位, 自近及远行多点凝固治疗, 治疗中可见冒泡, 烟雾, 病变部位呈灰白色凝固坏死, 并及时用鳄鱼钳反复钳去焦化坏死组织或已游离的组织片。每 5~7 d 治疗 1 次, 3 次为 1 疗程。显效: 腔内肿块缩小或管径恢复到原径 $\geq 60\%$ 26 例

(70.3%), 有效: 腔内肿块缩小或管径恢复到原径 $> 30\%$, 但 $< 60\%$ 10 例(27.0%); 无效: 腔内肿块缩小或恢复到原径 $\leq 30\%$ 1 例(2.7%)。总有效率(97.3%)。术前 16 例并发肺不张, 治疗后 8 例(50%) 完全复张, 3 例(18.6%) 部分复张, 20 例(54.1%) 胸片肺门阴影缩小, 17 例(45.9%) 无明显变化, 8 例(21.6%) 术后 3~7 d 咳出血性污秽物或豆腐渣样物, 随后血常规及体温降至正常。在治疗过程中出现低氧血症 35 例, 出现小量咯血 6 例, 经止血治疗 3~7 d 后好转, 术后 2~3 d 发热 6 例, 接近 39℃ 2 例, 均经环丙沙星等治疗 3~5 d 后好转。均未发生穿孔、明显出血及心脏骤停等并发症。

2 讨论 微波作为一种交变电声, 在其交变外电场作用下, 生物体内水分子正负极的位置随外电场极性的超高速变化, 分子间相互摩擦产生内热, 高功率时可使组织局部温度迅速升达 60~120℃, 造成组织凝固坏死, 称为微波组织凝固治疗 (MTC)^[1-2], 在同样的温度下, 肿瘤细胞对高热损伤比正常细胞敏感, 42.5℃ 作用 2 h, 可杀死 95% 的肿瘤细胞, 对正常细胞只为 43%, 故微波透热治疗既可避免癌细胞在 40℃ 左右造成扩散, 又可有效地破坏癌细胞, 而对正常细胞则杀伤作用较小, 且可促使正常细胞复活^[3]。本组 37 例肺癌患者已证实, 经过 3 次微波治疗后, 癌细胞大片坏死。目前研究认为 MTC 治疗后造成大量的肿瘤细胞变性坏死, 其分解产物或坏死的残留组织释放某种物质形成抗原, 刺激机体产生特异的抗肿瘤免疫^[4]。

【参考文献】

- [1] 郭纪全, 陈正贤, 李 静, 等. 激光治疗老年癌性气道内阻塞 41 例临床分析[J]. *中国实用内科杂志*, 2005, 25(4): 324-325.
- [2] 张庆宪, 邢丽华, 孟 泳, 等. 纤维支气管镜微波治疗气管支气管肿瘤[J]. *河南肿瘤学杂志*, 1999, 12(2): 1033-1034.
- [3] 白 冲, 李 强, 刘忠令, 等. 经纤支镜微波治疗在气道内疾病中的应用[J]. *中国内镜杂志*, 2002, 8(1): 74-75.
- [4] 肖 梵, 赵自洁, 张言斌, 等. 支气管结核的微波介入治疗[J]. *中华结核和呼吸杂志*, 2003, 26(2): 116.

编辑 潘伯荣

收稿日期 2005-11-30; 接受日期 2005-12-20

作者简介 喻昌利, 副教授, 硕士生导师. Tel: (0315) 3725947 Email: liusa1688@126.com