

· 研究原著 ·

文章编号 1000-2790(2004)18-1641-04

结核分枝杆菌 *furB* 基因的克隆、表达和纯化

姜泓 薛莹 高雪 师长宏 柏银兰 张海 李元 徐志凯

(第四军医大学基础部微生物学教研室 陕西 西安 710033)

Cloning, expression and purification of *Mycobacterium tuberculosis furB*

JIANG Hong, XUE Ying, GAO Xue, SHI Chang-Hong, BAI Yin-Lan, ZHANG Hai, LI Yuan, XU Zhi-Kai

Department of Microbiology, School of Basic Medicine, Fourth Military Medical University, Xi'an 710033, China

【Abstract】 AIM: To obtain *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) *furB* from H37Rv-DNA, express efficiently in *E. coli* and purify the FurB proteins. **METHODS:** *furB* was amplified by PCR from the genome of H37Rv and cloned into pGEM-T-Easy vector. After sequenced, *furB* was recombined into the expression vector pQE-80L by restriction enzyme digestion, which was named pQE-80L-*furB*. The plasmid pQE-80L-*furB* was transformed into *E. coli* DH5 α and induced by IPTG. The *furB* expression was analyzed by SDS-PAGE and confirmed by Western blot with mice-specific mAb against (His)₆. **RESULTS:** *furB* was identical to what reported by Genbank. The pQE-80L-*furB* vector expressed protein with relative molecule mass 15.0 \times 10³, which could be caught by (His)₆ mAb. The expressed protein could be purified by Ni-NTA system kit with denatured condition. **CONCLUSION:** *furB* has been successfully cloned and efficiently expressed in *E. coli*, The results lay the basis for further study of FurB functions.

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

【摘要】目的:从 H37Rv 基因组中扩增 *furB* 并高效表达和纯化。方法:用 PCR 技术从结核分枝杆菌 H37Rv 基因组中扩增 *furB* 序列,将其与 pGEM-T-Easy 载体连接转化 *E. coli* DH5 α 构建重组克隆载体 pGEM-T-Easy/*furB*, 测序正确后将目的基因片段克隆入 pQE-80L 原核表达载体并转化 *E. coli* DH5 α IPTG 诱导目的蛋白表达。经 Western blot 鉴定目的基因与 (His)₆ 融合表达,将已表达的蛋白质通过 Ni²⁺-NTA 亲和色谱柱进行纯化。结果:PCR 得到结核分枝杆菌 *furB* 测序

收稿日期 2004-05-20; 修回日期 2004-06-19

基金项目 军队重点课题资助项目(01 α 083)

通讯作者 李元. Tel. (029) 83374527 Email. Liyuan@fmmu.edu.cn

作者简介 姜泓(1977-),男(汉族),内蒙古自治区武川县人,硕士生(导师李元). Tel. (029) 83374527 Email. jiang518@fmmu.edu.cn

结果与 Genbank 中报道的完全一致。SDS-PAGE 显示,在 *M.* 为 15.0 \times 10³ 处有相应的蛋白质表达条带,Western blot 鉴定为 (His)₆ 融合表达蛋白。经 Ni²⁺-NTA 亲和色谱柱进行纯化后可得到纯化的蛋白。结论:成功克隆了铁调节蛋白基因 *furB* 序列,并在 *E. coli* DH5 α 高效表达,亲和层析后获得了纯化目的蛋白。

【关键词】 *furB* 表达 纯化 结核分枝杆菌

【中图分类号】 R378.91 **【文献标识码】** A

0 引言

结核分枝杆菌(*Mycobacterium tuberculosis*, MTB)在结核病(tuberculosis, TB)患者体内的生长与铁の利用有关。研究发现,MTB 基因组包含了两个相似的铁摄取基因 *furA* 和 *furB*。*furA* 主要与其下游的 *katG* 基因表达有关,而 *furB* 的功能现在还不清楚。为此,我们在原核表达载体中表达 MTB *furB* 并对其进行了纯化,为其功能研究奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料 MTB 毒株 H37Rv, DH5 α 由本室保存; pGEM-T-Easy 及 Wizard Plus Purification system 购自 Promega 公司; X-gal, 限制性内切酶 *Bam*H I, *Hind* III 及 T₄-DNA 连接酶, *Taq*DNA 聚合酶均为 TaKaRa 公司产品; IPTG, DTT, DTE, 小量质粒提取试剂盒均为 Sigma 公司产品, 胶回收试剂盒为 Vitagene 公司产品。

1.2 方法

1.2.1 引物的设计与合成 根据已发表的 MTB H37Rv 全基因组 *furB* 编码区(2641648-N, 2642040-C)序列设计引物。上游引物 P₁: 5'-GGATCCAGTC-CAGCCGGTGTCCGC-3' 中加入 *Bam*H I 酶切位点; 下游引物 P₂: 5'-AAGCTTCCTTTTGGTGCTGGAGACGG-3' 中加入 *Hind* III 酶切位点。引物由上海博亚生物技术有限公司合成。

1.2.2 *furB* 片段的扩增 取保存于改良罗氏培养基的 MTB H37Rv 接种于 7H9 液体培养基, 37 $^{\circ}$ C 间或振荡培养 2~3 wk。取 5 mL 液体培养物的菌体沉淀重悬于 50 μ L 裂解液(10 \times PCR 缓冲液 5 μ L, 45 g/L

吐温 5 μL , 45 g/L NP-40 5 μL , 20 g/L 蛋白酶 K 0.5 μL 及水 34.5 μL) 中。于 55 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 1 h, 沸水浴 10 min 灭活蛋白酶 K, 离心取上清, 用酚/氯仿抽提, 无水乙醇沉淀, 溶于 50 μL TE 中^[1], 作为 DNA 模板。PCR 反应体系为: 10 \times buffer 5 μL , dNTPs 5 μL (2.5 mmol/L), DNA 模板为 1 μL , P₁, P₂ 引物各 1 μL (25 $\mu\text{mol/L}$) 及 *Taq* 酶 1 μL , 加水至 50 μL 。PCR 条件: 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 40 s, 56 $^{\circ}\text{C}$ 复性 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 50 s, 25 个循环。

1.2.3 PCR 产物的克隆与鉴定 PCR 产物用琼脂糖凝胶电泳回收 DNA 条带。取纯化的 PCR 产物与质粒 pGEM-T-Easy 进行连接反应, 转化感受态 DH5 α , 均匀涂布于含有 x-gal (33 μL) 和异丙基 β -D 硫代半乳糖苷 IPTG (20 μL) 的 LB 培养皿中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 16 h, 挑取白色菌落进行酶切鉴定, 所获阳性克隆命名为 pGEM-T-Easy-*furB*, 送至上海生工生物工程有限公司进行序列测定。

1.2.4 目的蛋白的诱导表达 经 *Bam*H I 和 *Hind* III 双酶切后与经同样酶切的 pQE-80L 载体进行连接反应, 转化感受态 DH5 α , 挑取的阳性克隆命名为 pQE-80L-*furB*。在含有氨苄青霉素 (100 mg/L) 的 LB 培养基中过夜培养 pQE-80L-*furB*。按 10% 的接种量进行转接, 37 $^{\circ}\text{C}$ 摇菌 3 h, 加入异丙基 β -D 硫代半乳糖苷 (IPTG) 至终浓度为 0.5 mmol/L, 37 $^{\circ}\text{C}$ 继续培养 4 ~ 5 h。取 1.5 mL 细菌培养物, 8000 g 离心 30 s 收集菌体, 加入 2 \times 样品缓冲液剧烈振荡混匀, 100 $^{\circ}\text{C}$, 5 min, 8000 g 离心 5 min, 取上清进行 SDS-PAGE 电泳检测。

1.2.5 表达产物鉴定 将经诱导的 pQE-80L-*furB* 和 *E. coli* DH5 α 分别制样, 进行 Western blot 分析。

1.2.6 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, 超声破菌。离心后将上清和沉淀分别制样, 进行 SDS-PAGE 分析。

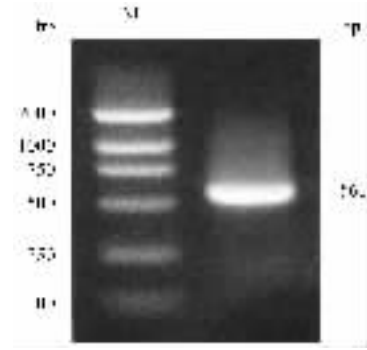
1.2.7 表达产物的纯化 根据 Ni²⁺-NTA 试剂盒的说明书, 将融合蛋白与 Ni²⁺-NTA 结合, 用不同 pH 值咪唑溶液进行洗脱, 得到纯化产物。

2 结果

2.1 *furB* 片段的扩增及序列测定 经 25 个循环 PCR 扩增, 可得与预计长度相等的片断 (Fig 1)。将 DNA 回收后插入 pGEM-T-Easy 载体, 经测序证实所扩增的 *furB* 序列与 Genbank 数据库所收录的 *furB* 序列完全一致。

2.2 表达载体的构建 pQE-80L 经 *Bam*H I 和 *Hind* III 双酶切后与 *furB* 目的片断进行连接反应后, 转化

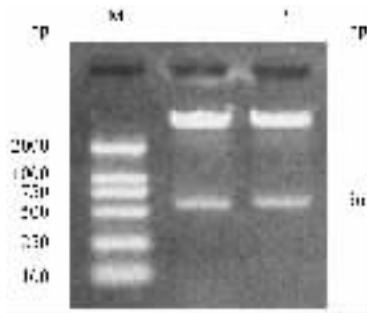
感受态 *E. coli* DH5 α 。挑取的克隆子进行酶切鉴定, 切出约 561 bp 大小片段的为阳性克隆子 (Fig 2), 命名为 pQE-80L-*furB*。



M: DNA marker DL2000; 1: PCR product.

Fig 1 Agarose gel electrophoresis of *furB* PCR product

图1 PCR 扩增 *furB* 产物琼脂糖凝胶 (10 g/L) 电泳结果

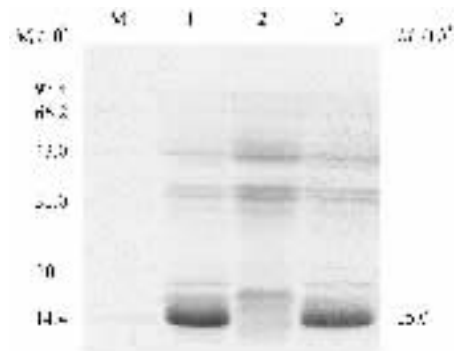


M: DNA marker DL2000; 1: pQE-80L-*furB*.

Fig 2 Identification of pQE-80L *furB* plasmid by restriction enzyme digestion

图2 pQE-80L-*furB* 质粒酶切鉴定结果

2.3 *furB* 在 pQE-80L 表达载体中的诱导表达 将 pQE-80L-*furB* 经 37 $^{\circ}\text{C}$ 活化过夜, 经 IPTG 诱导表达后做 SDS-PAGE 分析, 从电泳图中可以看出在 M_r 为 15.0×10^3 处出现了一条表达带, 表达量约占菌体总蛋白的 20% (Fig 3)。

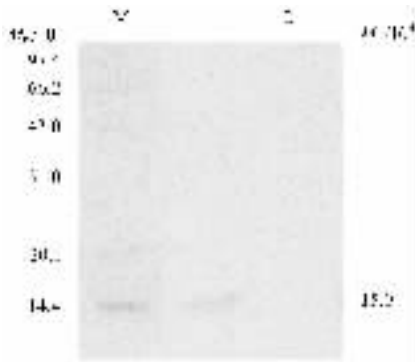


M: Protein markers; 1, 3: Induced *E. coli* DH5 α that transformed pQE-80L-*furB*; 2: Uninduced *E. coli* DH5 α that transformed pQE-80L-*furB*.

Fig 3 Expression of (His)₆-*furB* fusion protein by SDS-PAGE

图3 (His)₆-*furB* 融合蛋白的表达

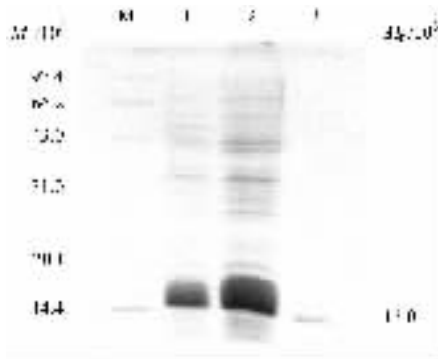
2.4 目的蛋白的鉴定 所构建的重组质粒表达的 FurB 蛋白以带有 6 个组氨酸的融合蛋白的形式出现,使用鼠抗 (His)₆ mAb 验证 FurB 蛋白的表达。结果显示在 M_r 为 15.0×10^3 处有一显色带,而对照无相应条带 (Fig 4)。



M: Protein marker; 1: (His)₆-furB protein expression; 2: DH5α.

Fig 4 Analysis (His)₆-furB protein expression by Western blot
图 4 (His)₆-furB 融合蛋白的 Western blot 分析

2.5 表达蛋白的可溶性分析 将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 (Fig 5)。



M: Protein marker; 1: (His)₆-furB protein expression; 2: Insoluble proteins of induced DH5α having plasmid pQE-80L furB; 3: Supernatant of induced DH5α having plasmid pQE-80L furB.

Fig 5 SDS-PAGE analysis (His)₆-furB solubility

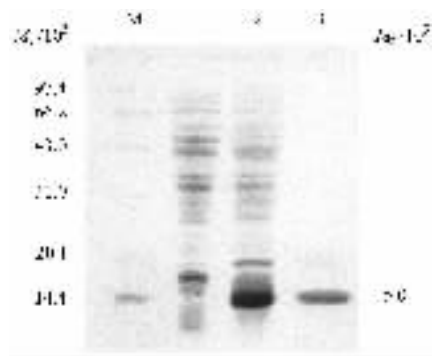
图 5 (His)₆-furB 融合蛋白的可溶性分析

2.6 目的蛋白的纯化 纯化的产物经 SDS-PAGE 分析可在 M_r 为 15.0×10^3 处得到一条清晰的条带 (Fig 6)。

3 讨论

由于 BCG 免疫效果极不稳定^[2],缺乏对 MTB 致病机制的深刻了解,现在全球已处于结核病的紧急状态^[3]。入侵机体的 MTB 和宿主的关系是动态的,必须快速适应不利并不断变化的环境。金属离子的获

取对病原菌的复制增殖是必需的。铁是多种酶的辅因子,参与电子转运和氧化还原反应^[4],在 MTB 的生长过程中发挥了重要作用。限制铁の利用可以延缓 MTB 的生长,同时铁の利用情况可作为反映几种毒性因子表达水平的指标^[5]。相反,铁的无限制地摄取会导致铁中毒和氧化应激从而使细菌停止生长^[6]。病原菌的金属调控蛋白主要有四个不同的簇组成,分别为 Fur (ferric uptake regulator), DtxR (diphtheria toxin repressor), MerR 和 ArsR。MTB 基因组包含了两个相似的铁摄取基因 furA 和 furB, furA 位于 katG 上游^[7],并与 katG 其表达调控有关,而 furB 的功能还不清楚。基因序列分析,MTB 基因组中的 furB 比 furA 更类似于大肠杆菌 fur,因此 furB 可能是细胞内多种基因表达的一个调控因子。



M: Protein markers; 1: Uninduced *E. coli* DH5α that transformed pQE-80L furB; 2: Induced *E. coli* DH5α that transformed pQE-80L furB; 3: Purified (His)₆-furB fusion protein.

Fig 6 Expression and purification of (His)₆-furB fusion protein by SDS-PAGE

图 6 (His)₆-furB 融合蛋白的表达及纯化

本实验中应用的 pQE-80L 表达载体为 4751 bp,起始码下游接有 6 个组氨酸,双链环状, Amp 抗性,多克隆位点有 9 个单一限制性酶切位点。PCR 产物共有 561 bp,其中 furB 本身有 393 个碱基,在其终止码的下游的 168 个碱基为非编码序列。因此 furB 克隆入 pQE-80L 载体中与 6 个组氨酸融合,可产生共 137 个氨基酸的融合蛋白, M_r 为 15.0×10^3 左右,实验结果与理论值相符合。融合蛋白有 (His)₆ 的表达,因此通过检测组氨酸的表达,可间接证明 furB 表达,同时 (His)₆ 的表达为进一步纯化蛋白提供了亲和位点,它可与 Ni²⁺ 特异性结合,通过 Ni²⁺-NTA 亲和色谱柱可得到纯化的目的蛋白。

我们成功地在原核表达系统中表达 MTB 的铁调控相关蛋白 FurB,并进行了初步鉴定和纯化,为进一步研究 FurB 的功能奠定了基础。

【参考文献】

[1] 范雄林,徐志凯,李元,等. 结核分枝杆菌 Ag85B 成熟蛋白基因免疫[J]. 第四军医大学学报, 2001 22(14): 1283-1287.
Fan XL, Xu ZK, Li Y, et al. Gene vaccination of *Mycobacterium tuberculosis* DNA vaccine encoding mature form of Ag85B [J]. *J Fourth Mil Med Univ*, 2001 22(14): 1283-1287.

[2] 江山,朱道银,蒋英,等. 结核分枝杆菌 Ag85B-Ag85A 双抗原融合真核表达质粒的构建及表达[J]. 第四军医大学学报, 2003 24(21): 1973-1975.
Jiang S, Zhu DY, Jiang Y, et al. Construction of the fused eukaryotic expression vector of *Mycobacterium tuberculosis* Ag85B and Ag85A antigens and its expression [J]. *J Fourth Mil Med Univ*, 2003 24(21): 1973-1975.

[3] Ulrichs T, Kaufmann SH. *Mycobacterial* persistence and immunity [J]. *Front Biosci*, 2002 7: 458-469.

[4] Earhart CF. Uptake and metabolism of iron and molybdenum [A]. In: *Escherichia coli* and salmonella: Cellular and molecular biology [M]. 2nd ed. Washington: ASM Press, 1996: 1075-1090.

[5] Litwin CM, Calderwood SB. Role of iron in regulation of virulence genes [J]. *Clin Microbiol Rev*, 1993 6: 137-149.

[6] Touati D. Iron and oxidative stress in bacteria [J]. *Arch Biochem Biophys*, 2000 373: 1-6.

[7] Cole ST, Brosch R, Parkhill J, et al. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence [J]. *Nature*, 1998; 393: 537-544.

编辑 甄志强

· 经验交流 · 文章编号 1000-2796(2004)18-1644-01

重型病毒性肝炎并发自发性腹膜炎 32 例分析

李小秋,徐哲,柴晓娜,胡奎,饶思友,刘新民,张春蕾 (武警江西省总队医院传染科,江西南昌 330001)

【关键词】重型病毒性肝炎;自发性腹膜炎
【中图分类号】R575.1 【文献标识码】B

1 临床资料 我院 1990/2002 年 12 a 间共收治重型病毒性肝炎 78(男 68,女 10)例,其中并发自发性腹膜炎(spontaneous bacterial peritonitis, SBP)32 例,占同期重型肝炎的 41.03%。78 例中,年龄 12~71 岁,临床诊断和分型参照 2000 年病毒性肝炎诊断标准^[1],其中急性重型病毒性肝炎 8 例,亚急性重型病毒性肝炎 15 例,慢性重型病毒性肝炎 55 例。各型重型病毒性肝炎并发 SBP 的发生率见表 1。SBP 在急性、亚急性和慢性重型肝炎患者中,以慢性重型肝炎发生率最高,急性重型肝炎次之,亚急性重型肝炎发生率最低,但三者间两两比较均无显著差异。

表 1 各型重型病毒性肝炎并发 SBP 的发生率

| 类别 | 例数 | SBP 发生例数 | SBP 发生率(%) |
|---------|----|----------|------------|
| 急性重型肝炎 | 8 | 3 | 37.50 |
| 亚急性重型肝炎 | 15 | 5 | 33.33 |
| 慢性重型肝炎 | 55 | 24 | 43.64 |

32 例 SBP 患者中,腹部表现为剧痛 4 例(12.50%),隐痛或胀痛 13 例(40.63%),腹胀感 15 例(46.87%),体检发现腹部压痛者 18 例(56.25%),伴反跳痛者 7 例(21.88%),腹水

征阳性 26 例(81.25%),全身表现为发热 25 例(78.13%),其中高热 6 例(18.75%),伴感染性休克 6 例(18.75%),伴上消化道出血 20 例(62.50%),伴肝肾综合征 19 例(59.38%),外周血白细胞总数或中性粒细胞计数升高,超过正常值上限者分别为 12 例(37.50%)和 20 例(62.50%),腹水 PMN 计数超过 $0.25 \times 10^9/L$ 者 30 例(93.75%)。

血培养瓶床边接种腹水作腹水细菌培养 20 例,获阳性结果 6 例,阳性率为 30%,其中大肠杆菌 3 例,克雷伯肺炎杆菌、肺炎球菌、绿脓杆菌各 1 例。

在综合治疗的基础上加用抗感染药物,其中头孢噻肟钠治疗 18 例,环丙沙星或联合甲硝唑治疗 6 例,乳酸左氧沙星治疗 6 例,亚胺培南治疗 2 例。所有患者的抗感染疗程 5~22(平均 13.6)d,17 例(53.13%)腹膜炎控制,但全组仅生存 5 例,7 例死于感染性休克,20 例分别死于脑水肿、脑疝、出血、肝肾综合征和呼吸衰竭等因素。

2 讨论 重型肝炎极易发生细菌感染,其中并发 SBP 最常见,其发生往往引起患者肝功能的急剧恶化,是患者死亡的主要原因之一。本组资料显示,重型肝炎 SBP 发生率平均为 41.03%,其中慢性重型肝炎最高达 43.64%,其原因可能是慢性重型肝炎腹水出现率较高。

SBP 多隐匿起病,少见有严重的腹部及全身症状和体征。本组 32 例中,剧烈腹痛者仅 4 例(12.50%),有典型腹膜刺激征者仅 7 例(21.88%)。重型肝炎并发 SBP 后预后差,本组 32 例 SBP 仅 5 例存活(15.63%)。重症肝炎患者应严密观察病情变化,患者出现不明原因的发热、乏力、纳差、腹胀、腹痛等非特异性症状加重及腹水增加、尿量减少时,应警惕可能并发 SBP,尽早行腹水检查,以求早期诊断和治疗。

【参考文献】

[1] 中华医学会传染病与寄生虫病学分会、肝病学分会. 病毒性肝炎防治方案[J]. 中华肝病杂志, 2000 8(6): 324-329.

编辑 袁天峰

收稿日期 2004-08-30; 修回日期 2004-09-03
 作者简介 李小秋(1966-),男(汉族),江西省新建县人,本科,副主任医师。Tel. (0791)5231988