

· 研究原著 ·

文章编号 1000-2790(2004)18-1637-04

结核分枝杆菌 *furA* 基因片段的克隆、表达和分离纯化

高雪 薛莹 姜泓 柏银兰 师长宏 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 of *Mycobacteria tuberculosis furA* and expression of its coding protein fused with (His)₆ tag

GAO Xue, XUE Ying, JIANG Hong, BAI Yin-Lan, SHI Chang-Hong, 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 *furA* (ferric uptake regulator A) gene segments of *Mycobacteria tuberculosis* (MTB), express efficiently in *E. coli* and purify the target proteins. **METHODS:** *furA* gene segments were amplified by PCR with specific primers from genome of MTB H37Rv strain. After sequenced, *furA* gene segments were inserted into pRSET-A and expressed in *E. coli* BL21. The recombinant (His)₆ fused proteins were purified by Ni-NTA purification system. **RESULTS:** The length of PCR product was 453 bp, identical with that reported by Genbank. The proteins were expressed in *E. coli* BL21 as soluble proteins, accounting for 10% of the total bacterial proteins. SDS-PAGE and Western blot showed that the M_r of this gene product was 23.0×10^3 . The (His)₆ fused proteins were purified by affinity chromatography. **CONCLUSION:** *furA* of MTB was successfully cloned and expressed in *E. coli* BL21. The purified proteins are obtained by Ni-NTA purification system. This work lays the foundation for further study on the ferric uptake of Fe^{2+} in MTB.

【Keywords】 *Mycobacterium tuberculosis*; FurA; cloning; expression; purification

【摘要】目的:获得结核分枝杆菌 *furA* 基因片段并高效表达、纯化。方法:用 PCR 技术从 MTB 毒株 H37Rv-DNA 中扩增出相应大小的 DNA 片段,将片段与 pGEM-T-easy 载体连接后测序。将测序正确的 *furA* 按照 *Bam*H I 和 *Hind* III 酶切位点克隆入原核表达载体 pRSET-A,将连接产物转化入 *E. coli*

BL21,挑出阳性克隆, IPTG 诱导表达重组的 (His)₆ 融合蛋白。对重组融合蛋白通过镍柱进行纯化。结果:PCR 获得的 *furA* 序列与 Genbank 报道的一致(为 453 bp)。重组载体在 *E. coli* BL21 中以可溶形式高效表达,融合蛋白经 SDS-PAGE 和 Western blot 分析,在 M_r 为 23.0×10^3 处有特异的蛋白条带,目的蛋白表达量占菌体总蛋白量的 10%。重组蛋白经镍柱进行纯化后,得到了高纯度的 FurA 融合蛋白。结论:成功克隆结核分枝杆菌 *furA* 基因片段,并在 *E. coli* BL21 中高效表达,亲和层析纯化后获得高纯度 FurA 融合蛋白。

【关键词】 分枝杆菌 结核 FurA 克隆 表达 纯化

【中图分类号】 R378.91 **【文献标识码】** A

0 引言

铁是维持结核分枝杆菌(*Mycobacterium tuberculosis*, MTB)新陈代谢所必需的营养物质之一,研究认为通过调节代谢途径来调控基因表达从而抑制 MTB 生长可以达到治疗结核病的目的^[1]。研究铁相关基因在 MTB 代谢过程中的作用,有助于我们深入了解 MTB 的致病机制,从而有效地控制结核病的流行。MTB 中包括四种铁依赖的调节基因,它们编码的蛋白分属两个家族,分别为 Fur 和 DtxR。其中 Fur 家族又包括 FurA 和 FurB^[2,3]。目前对于 DtxR 家族蛋白的结构和功能研究得比较清楚,而对 Fur 蛋白的研究比较少。我们从 MTB 中克隆 *furA* 基因片段,并在原核细胞中表达并纯化,为进一步探索其在 MTB 中的作用奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料 *E. coli* BL21, *E. coli* DH5 α , MTB H37Rv 菌株表达载体及 pRSET-A 由本室保存。寡聚核苷酸引物由上海博亚生物技术有限公司合成;克隆质粒 pGEM-T-easy 载体、质粒提取试剂盒、DNA 胶回收试剂盒、各种限制性内切酶、连接酶及 *Taq* DNA 聚合酶均为美国 Promega 公司产品, IPTG 为 Sigma 公司的产品 (His)₆ mAb 购自第四军医大学免疫学教研室, HRP-山羊抗小鼠 IgG 抗体购自华美生物公司; Ni^{2+} -NTA 纯化试剂盒购自 Invitrogen 公司;其余一般化学试剂均为国产分析纯。

收稿日期 2004-05-14; 修回日期 2004-06-09

基金项目 军队重点课题资助项目(01x083)

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

作者简介 高雪(1980-)女(藏族)内蒙古自治区乌兰浩特市人. 硕士生(导师李元). Tel. (029)83374527 Email. gaoxue@fmmu.edu.cn

1.2 方法

1.2.1 *furA* 片段的扩增 参考文献 [4] 方法获得 MTB H37Rv 的 DNA, 以此为模板, 设计一对引物 P1: 5'-GGATCCTCTAGTGTGTCTCTATACCG-3', 含 *Bam*H I 酶切位点; P2: 5'-AAGCTTGTAAATGGGTGGGTGTTGC-3', 含 *Hind* III 酶切位点. PCR 反应条件: 94℃ 40 s, 56℃ 30 s, 72℃ 1 min, 共 30 个循环, 72℃ 延伸 10 min.

1.2.2 目的基因的测序与克隆 回收 PCR 产物, 用 T4 连接酶将 PCR 产物与 pGEM-T-easy 载体连接, 转化 *E. coli* DH5 α 经氨苄青霉素抗性筛选出阳性克隆, 将提取的质粒用 *Bam*H I 和 *Hind* III 双酶切, 行琼脂糖凝胶电泳, 有目的片段的则为阳性克隆. 将筛选的阳性克隆由上海博亚公司完成测序, 命名为 pGEM-*furA*.

1.2.3 目的蛋白的诱导表达和纯化 将 pGEM-*furA* 被 *Bam*H I 和 *Hind* III 双酶切的片段与原核表达载体 pRSET-A 连接, 命名为 pRSET-A-*furA*. 将 pRSET-A-*furA* 转化入 *E. coli* BL21 中. 转化的细菌在含氨苄青霉素 (50 mg/L) 和氯霉素 (35 mg/L) 的 LB 培养基中过夜培养, 按 1:50 的接种量进行转接, 37℃ 摇菌 3 h 至 A=1, 加入异丙基 β -D 硫代半乳糖苷 (IPTG) 至终浓度为 1.2 mmol/L, 37℃ 继续通气培养 4~5 h. 取 5 mL 菌液, 收集菌体, 菌体加入 H₂O 80 μ L, 剧烈振荡混匀, 再加入 2 \times 样品缓冲液 80 μ L, 100℃ 水浴 5 min, 离心 10 min, 125 g/L 聚丙烯酰胺凝胶电泳检测, 预计 M_r 为 23.0 $\times 10^3$ 处有明显表达条带. 大规模培养细菌, 诱导表达目的蛋白, 收集菌体, 超声裂菌, 离心后将上清和沉淀分别制样, 进行可溶性分析. 如果目的蛋白为可溶性的直接用镍离子柱进行亲和层析纯化.

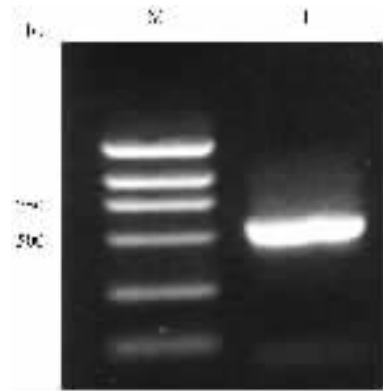
1.2.4 亲和色谱法纯化目的蛋白 采用 Invitrogen 的 Ni²⁺-NTA 纯化试剂盒纯化目的蛋白. 将 50 mL 的诱导菌液离心, 制备上柱样品, 按照可溶性条件 (native condition) 进行亲和色谱纯化, 收集洗脱液, 4℃ 保存.

1.2.5 纯化蛋白的 Western-blot 鉴定 将上述表达产物进行 125 g/L SDS-PAGE 后转移至硝酸纤维素膜上, 50 g/L 脱脂奶在 37℃ 封闭 1 h, 加入 1:5000 稀释的 (His)₆ mAb, 37℃ 摇床孵育 1 h, PBS 洗涤 3 遍后, 加入 HRP-山羊抗小鼠 IgG 抗体, 37℃ 摇床孵育 1 h, PBS 洗涤 3 遍, 加入底物液 DAB 显色^[4].

2 结果

2.1 *furA* 片段的扩增及序列测定 用 PCR 方法以

MTB H37Rv 为模板进行扩增, 得到 453 bp 的目的片段 (Fig 1). 挑取含插入片段的阳性克隆 pGEM-*furA* 测序, 测序结果表明所扩增的 *furA* 与 Genbank 公布的序列完全相同.

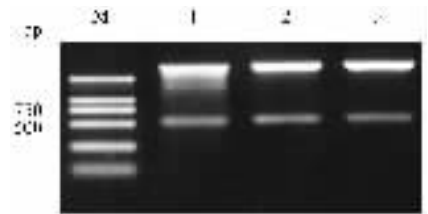


M: DNA marker; 1: *furA*.

Fig 1 PCR amplification products of *furA*

图1 *furA* PCR 扩增结果

2.2 表达载体的构建 pGEM-*furA* 经 *Bam*H I 和 *Hind* III 双酶切后的目的片段与 pRSET-A 进行连接反应后, 转化入感受态细胞 *E. coli* BL21, 经氨苄青霉素抗性筛选出阳性克隆进行酶切鉴定, 切出 453 bp 片段的为阳性克隆子 (Fig 2), 命名为 pRSET-A-*furA* 1 β .



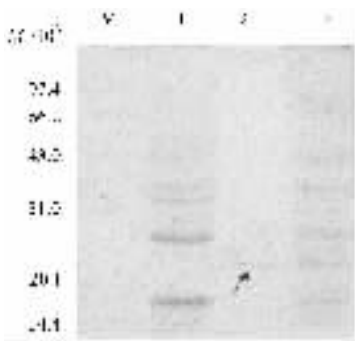
M: DNA marker; 1: pRSET-A-*furA* 1; 2: pRSET-A-*furA* 2; 3: pRSET-A-*furA* 3.

Fig 2 Restriction mapping of reconstruction plasmid pRSET-A-*furA*

图2 pRSET-A-*furA* 重组质粒酶切鉴定图谱

2.3 融合蛋白在大肠杆菌中的表达与纯化 将 pRSET-A-*furA*1 转化入 *E. coli* BL21, SDS-PAGE 电泳显示有目的蛋白表达. 进行可溶性分析发现融合蛋白有约 80% 位于菌体蛋白的可溶性上清中 (Fig 3). 上清直接经过镍离子柱进行亲和层析纯化, 得到 M_r 约为 23.0 $\times 10^3$ 的目的蛋白 (Fig 4).

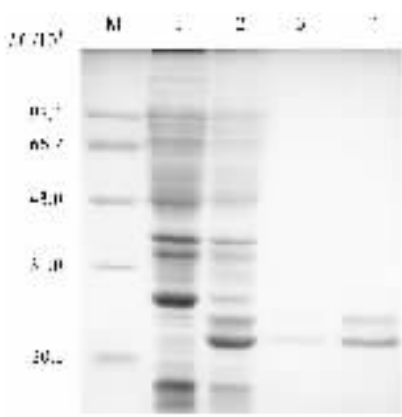
2.4 纯化蛋白的 Western-blot 鉴定 纯化后的 His-FurA 融合蛋白以鼠抗 (His)₆ mAb 为一抗, 山羊抗小鼠抗体为二抗进行蛋白印迹分析, 纯化蛋白在 M_r 为 23.0 $\times 10^3$ 处有明显的免疫杂交带 (Fig 5).



M: Protein marker; 1: BL21; 2: Supernatant of induced BL21 having plasmid pRSET-A-*furA*; 3: Insoluble proteins of induced BL21 having plasmid pRSET-A-*furA*.

Fig 3 SDS-PAGE analysis of FurA solubility

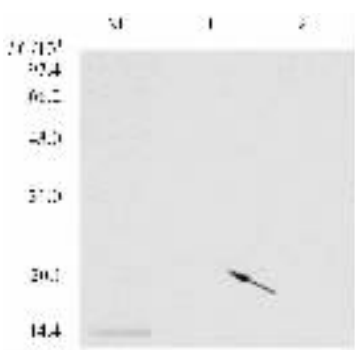
图3 FurA溶解性的SDS-PAGE分析



M: Protein marker; 1: BL21; 2: Total protein of induced BL21 having plasmid pRSET-A-*furA*; 3: Purified His-FurA fusion protein.

Fig 4 Expression and purification of His-FurA fusion protein

图4 (His)₆-FurA融合蛋白的表达及纯化



M: Protein marker; 1: Purified His-FurA fusion protein; 2: BL21.

Fig 5 Western-blot analysis of FurA fused protein

图5 FurA融合蛋白的Western-blot分析

3 讨论

铁作为营养物质对于大多数细菌都是必须的,但是摄入过多的铁会形成羟基引起细胞毒作用,所以细菌内有复杂的调控机制来控制铁的浓度。在大多数细菌中,这项功能主要由 Fur 执行。Fur 可以调控一

系列的生理反应包括调节铁的摄入量和调控毒力基因的表达^[4-6]。在调节铁摄入的过程中,Fur 作为阻遏蛋白可以与二价铁形成稳定的复合物,该复合物与铁调控基因上游长度 19 bp 的操纵子序列结合,从而达到抑制转录降低细胞内铁浓度的目的。在环境中缺铁的情况下,Fur 蛋白不能与这些序列结合,相应的基因序列则去阻遏铁的摄取增加^[7]。目前关于 Fur 蛋白的研究主要局限于大肠杆菌,而 MTB 中 Fur 蛋白研究得较少。MTB 有两个调节铁摄入的直向同源基因,分别为 *furA* 和 *furB*。它们在基因序列和蛋白结构上与大肠杆菌中的 Fur 蛋白有很高的同源性,所以推断它们与大肠杆菌 Fur 蛋白有相似的功能,在 MTB 的铁代谢中起了非常重要的作用,但是目前这个功能还没有被证实。FurA 蛋白有两个结构域:DNA 结合区和铁结合区。根据它的结构分析它的功能除了在细菌铁代谢中其重要作用外,还可能作为调节因子调控下游基因的表达。在分枝杆菌所有种属中,*furA* 都是直接位于 *katG* 基因的上游,而 *katG* 基因可以编码过氧化氢酶-过氧化物酶,它是 MTB 的主要毒力因子。转录物作用图表明 *katG* 是由一个强启动子调控的,但是它自身并没有这个强启动子,目前认为其上游的 *furA* 可能作为 *katG* 基因的启动子,并调控 *katG* 基因的表达^[8,9]。

我们通过设计 MTB *furA* 特异性引物,采用 PCR 方法从 MTB H37Rv DNA 库中扩增出目的片段 *furA*,序列测定与 Genbank 完全一致。为使融合基因得到高效及稳定的表达以及考虑到将来的纯化工作,我们构建了 (His)₆ 融合表达载体 pRSET-A-*furA*,在大肠杆菌 BL21 中获得了高效表达。pRSET-A 表达载体为 2900 bp,核糖体结合位点下游接有 6 个组氨酸,其后有一小肠激酶的酶切位点,双链环状,Amp 抗性,多克隆位点有 11 个单一限制性酶切位点及 T7 启动子,FurA 克隆入此载体,表达产物 M_r 为 23.0×10^3 ,在此位点也应有 (His)₆ 的表达,因此通过检测组氨酸的表达,可间接表明 FurA 的表达。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。Western blot 鉴定确为 FurA 蛋白,最后将融合蛋白通过 Ni²⁺-NTA 金属螯合亲和层析柱纯化得到了 FurA 蛋白,为进一步研究其在 MTB 铁摄取中的作用及对 *katG* 基因的调控功能奠定了基础。

【参考文献】

- [1] Ratledge C. Iron, mycobacteria and tuberculosis [J]. *Tuberculosis (Edinb)*, 2004; 84(1-2): 110-130.

[2] Rodriguez GM, Voskuil MI, Gold B, et al. IdeR, An essential gene in *Mycobacterium tuberculosis*: Role of IdeR in iron-dependent gene expression, iron metabolism, and oxidative stress response [J]. *Infect Immun*, 2002; 70(7): 3371-3381.

[3] Escolar L, Perez-Martin J, de Lorenzo V, et al. Opening the iron box: Transcriptional metalloregulation by the Fur protein [J]. *J Bacteriol*, 1999; 181(20): 6223-6229.

[4] 柏银兰, 李元, 李别虎, 等. 结核分枝杆菌分泌蛋白 MPT64 的克隆、表达与鉴定 [J]. 第四军医大学学报, 2003; 24(1): 43-45.
Bai YL, Li Y, Li BH, et al. Cloning and expression of secreted protein MPT64 of *Mycobacterium tuberculosis* [J]. *J Fourth Mil Med Univ*, 2003 24(1) #3-45.

[5] Pohl E, Haller JC, Mijovilovich A, et al. Architecture of a protein central to iron homeostasis: Crystal structure and spectroscopic analysis of the ferric uptake regulator [J]. *Mol Microbiol*, 2003; 47(4): 903-915.

[6] 师长宏, 范雄林, 徐志凯, 等. 融合表达 Ag85B-ESAT6 的结核分枝杆菌真核表达载体的构建及其免疫源性 [J]. 第四军医大学学报, 2004 25(2): 121-124.
Shi CH, Fan XL, Xu ZK, et al. Construction of *Mycobacterium tuberculosis* eukaryotic expression vector fused expression Ag85B-ESAT6 and its immunological properties [J]. *J Fourth Mil Med Univ*, 2004 25(2) 121-124.

[7] Sala C, Forti F, Di Florio E, et al. *Mycobacterium tuberculosis* FurA autoregulates its own expression [J]. *J Bacteriol*, 2003; 185(18): 5357-5362.

[8] Milano A, Forti F, Sala C, et al. Transcriptional regulation of furA and katG upon oxidative stress in *Mycobacterium smegmatis* [J]. *J Bacteriol*, 2001; 183(23): 6801-6806.

[9] Zahrt TC, Song J, Siple J, et al. Mycobacterial. FurA is a negative regulator of catalase-peroxidase gene katG [J]. *Mol Microbiol*, 2001; 39(5): 1174-1185.

编辑 甄志强

· 经验交流 · 文章编号 1000-2790(2004)18-1640-01

外伤性双侧颈内动脉海绵窦瘘 1 例

彭 华 李 和 虞德明

(宜宾市第二人民医院神经外科 四川 宜宾 644000)

【关键词】外伤性 双侧 颈内动脉海绵窦瘘
【中图分类号】R651.15 【文献标识码】B

1 临床资料 患者女性 47 岁, 农民, 因被摩托车撞伤致昏迷, 右外耳道及鼻腔流血 20 min 入院。查体: T 38℃, P 147 次/min, R 32 次/min, BP 19.7/12.2 kPa。神志呈浅昏迷状, 烦躁不安, GCS 评分 6 分。双眼球固定, 左瞳 0.4 cm, 对光反射迟钝, 右瞳 0.8 cm, 对光反射消失。双侧巴彬氏阳性, 颈阻阳性。右颞面部挫伤肿胀, 双眼睑青紫肿胀, 双侧外耳道及鼻腔内均有活动性出血。右小腿中段畸形伴假关节形成, 右锁骨中段畸形, 右腰部软组织肿胀, 保留导尿管引出肉眼血尿。急诊头部 CT: 左颞顶区脑挫裂伤, 左颞脑内血肿, 大小约 2.0 cm × 2.1 cm × 2.0 cm; 广泛蛛网膜下腔出血, 脑肿胀, 颅内积气, 右侧中颅窝骨折, 右颞骨骨折, 累及乳突部。腹部 B 超: 肝肾隐窝有少量液性暗区。胸部 CT: 锁骨及右侧第 2, 3, 4 肋骨骨折。入院后予止血, 脱水降压, 预防感染, 右下石膏夹板外固定治疗。治疗过程中, 双眼睑肿胀及球结膜水肿进行性加重, 右耳道有破碎碎组织溢出, 意识仍为浅昏迷。第 8 日发现双眼球均突出, 右侧较左侧为重, 可扪及搏动, 可听到眼眶及颞部有血管杂音。眼眶 CT 示眼球后无血肿。第 10 日, 双侧搏动性突眼愈加明显, 左瞳也散大为 0.5 cm, 无光反射。眼底检查: 视网膜水肿, 仅局灶可见行走较直变细的动脉血管。第 11 日行脑血管造影证实为双侧性颈内动脉海绵窦瘘 (BC-

CF) 当晚患者发生高热, 意识障碍加深, 数小时后就发生呼吸停止, 血压不升。经呼吸机维持呼吸, 升压药维持血压 13 d 后, 患者全身浮肿, 无尿, 多器官功能衰竭而死。

2 讨论 颈内动脉海绵窦瘘 (CCF) 分为外伤性颈内动脉海绵窦瘘 (TCCF) 和自发性颈内动脉海绵窦瘘 (SCCF)。其中 TCCF 占 3/4, 为窦内段颈内动脉因外伤而破裂。如: ① 颅底骨折, ② 异物穿通伤, ③ 颈内动脉壁受剧烈动荡血流冲击而破裂或因此造成动脉壁的点状出血或局限性挫伤, 导致破裂, 此种原因所致, 从受伤到出现症状, 中间可有一无症状的间期^[1]。

CCF 临床上少见, 而 BCCF 临床上更为少见, 本例 BCCF 在行全脑血管造影后证实。根据 CCF 的特征性表现: 搏动性突眼和颅内血管杂音, 以及脑血管造影, 诊断并不困难。此病例因入院时即呈昏迷状, 眼睑青紫肿胀, 搏动性突眼不明显, 故把右瞳散大误认为脑干损伤所致, 而未考虑为 CCF 造成的动眼神经麻痹。在第 10 日双眼搏动性突眼明显且左瞳也逐渐散大, 而意识障碍未加重, 才考虑到 CCF。右侧 CCF 考虑右侧中颅窝底骨折致颈内动脉破裂所致, 左侧 CCF 考虑为左侧颈内动脉受挫伤出血后在动脉血流冲击后迟发破裂所致。

患者行急诊全脑血管造影术证实了诊断, 但因条件限制未立即行球囊导管栓塞瘘口。术后当晚意识障碍加深, 呼吸停止。我们考虑原因有: ① 造影术中因高速的造影剂及血流冲击使瘘口增大, 造成“盗血”现象加重; ② 造影剂加重脑血管痉挛, 使脑供血进一步减少; ③ 动脉血漏入静脉窦, 使得颅内静脉压增高; ④ 高热致脑缺氧耐受力差。以上原因使脑水肿迅速加重, 颅内压增高过快过重, 造成脑疝发生, 呼吸停止。因此, 临床上要提高对本病的认识, 一旦考虑到本症的发生, 需立即造影, 明确诊断后立即行可脱性球囊导管栓塞术 (尤其对于 BCCF)。

【参考文献】

[1] 王忠诚. 神经外科学 [M]. 武汉: 湖北科学出版社, 1998 367, 662-664.

收稿日期 2004-08-10; 修回日期 2004-09-09
作者简介: 彭 华 (1972-), 男 (汉族), 四川省宜宾市人。主治医师。Tel. (0831) 8252824

编辑 袁天峰