维普资讯 http://www.cqvip.com

论 著 文章编号:0253-3626(2008)05-0560-04

结核分枝杆菌 RpfA 蛋白的原核表达、鉴定和纯化

徐 蕾[1], 帖儒修[2],王 爽[2], 王瑜伟[2],李 娜[2],何永林[1],蒋仁举[1]

(1. 重庆医科大学基础医学院病原生物学教研室;2. 重庆医科大学免疫学教研室,重庆 400016)

【摘 要】目的:构建结核分枝杆菌(Mycobacterium tuberculosis,MTB)复活促进因子 A(Resuscitation-promoting factor,ARpfA)的原核表达质粒,并在大肠杆菌中表达和纯化。方法:采用聚合酶链反应(PCR)方法从结核分枝杆菌 H37Rv 基因组 DNA 中扩增出 RpfA 基因(1 224bp),然后用双内切酶消化后,与同样酶消化的 pET32aα(+) 载体连接,转入大肠杆菌 Top10;阳性克隆用酶切和 DNA 测序鉴定。测序正确后,将重组质粒转化到的大肠杆菌 BL21 中,经 IPTG 诱导,由 T7 启动子调控表达了 RpfA 蛋白;利用 His-tag in-gel Stain 对表达蛋白进行鉴定,最后对目的蛋白进行纯化。结果:双酶切鉴定所切下的片段大小与理论值相符,测序结果与文献报道一致。经 SDS-PAGE 分析和 His-tag in-gel Stain 鉴定均发现 66ku 处有特异性蛋白条带。结论:成功克隆并构建了 RpfA 基因的重组表达质粒 pET32α(+)-RpfA,并获得了高纯度的重组蛋白,为以后的深入研究奠定了基础。

【关键词】结核分枝杆菌;RpfA;克隆;表达;纯化

【中国图书分类法分类号】R378 【文献标识码】A 【收稿日期】2007-10-26

Expression, identification and purification of the resuscitation-promoting factor A of mycobacterium tuberculosis

XU Lei, et al

(*Department of Biopathogy, College of Basic Medicine, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To construct the Resuscitation-promoting factor A(RpfA) expression plasmid of Mycobacterium tuberculosis, and express and purify it in E.coli. *Methods*: RpfAgene of Mycobacterium tuberculosis was amplified with PCR method from the H37Rv, cloned into pET32a(+) vector, and then transformed into E. coli Top10. After identifying by restriction digestion and DNA sequencing, the constructed recombinant plasmid was transformed into E.coli BL21, and expressed the recombinant protein under the control initiated by T7 after induction with IPTG. The target protein was identified by His-tag in-gel Stain and purified by using affinity chromatograghy. *Results*: The size of the RpfA gene digested by restricted enzymes accorded with the theoretical size and the DNA sequence with the reported one in literatures. 66ku protein was found by SDS-PAGE and His-tag in-gel Stain. *Conclusion*: The recombinant expression plasmid pET32a(+)-RpfA was successfully cloned and constructed, and the recombinant protein with high purity was obteined; which laid the basis for further study.

【Key words】 Mycobacterium tuberculosis; RpfA; Clone; Expession; Purification

全球约有 1/3 的人口受 MTB 感染,仅有 10% 的感染者发生结核病,而绝大多数为潜伏感染。我国为结核病重灾区,每周至少有 3 000 人死于该病,结核病复发率相当高,这与 MTB 的潜伏感染也有着密切的关系。潜伏感染归因于 MTB 能在宿主体内以休眠状态存在的能力。这种结核休眠菌[1],它能抵抗巨噬细胞的吞噬杀灭作用,并能耐受通常对生长繁殖的 MTB 具有杀灭效果的抗结核药物的作用,使其与机体之间达到一种平衡,在体内持续存在达数月至数年。当机体免疫力降低时结核休眠菌又开始生长繁殖导致疾病。

RpfA 是结核分枝杆菌 Rpf 蛋白家族的一员。研究表明,该家族与 MTB 尤其是处于生长迟缓期的 MTB 的增殖相关[2],推测其与结核休眠菌也有一定的联系。我们从 GeneBank 中获得 RpfA 基因的核酸序列,通过PCR 方法从结核分枝杆 H37Rv 株中获得该基因,并定向克隆到表达载体中,对表达的目的蛋白进行鉴定和纯化;为了解 MTB 进入休眠期和在休眠状态下复苏的机制,进而寻找抑制其进入休眠期或杀灭休眠菌的方法奠定基础。

作者介绍:徐 蕾(1980-),女,助教,硕士,
研究方向:感染与免疫。

维普资讯 http://www.cqvip.com

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 质粒与菌株 结核分枝杆菌菌株 H37Rv、大肠杆菌 Top10 株和 BL21 株、表达质粒 pET32a(+)均为本实验室保存。

1.1.2 主要试剂 TaqPlus DNA 聚合酶、T4 DNA 连接酶、限制性内切酶 *BamH* Ⅰ和 *Hind* Ⅲ 购自 TAKARA 公司;质粒纯化抽提试剂盒、胶回收和 PCR 产物纯化试剂盒均购自上海华舜生物公司。异丙基硫代 -β-D- 半乳糖苷(IPTG)为 Sigma 公司产品。PCR 引物序列由上海生物工程公司合成,重组质粒上目的基因的序列测定由上海生物工程公司完成。His-tag in-gel Stain 和 BenchMark His-tagged Protein Standard 购自 invitrogen 公司。

1.2 方法

1.2.1 引物的设计 根据 RpfA 基因的 CDS 序列设计一对引物,并引入酶切位点。引物序列如下(小写部分为酶切位点):

上游引物(P1):5'-ATAGGATCCATGAGTGGACGCCACC-3'引入 *BamH* Ⅰ酶切位点。

下游引物(P2):5'-GCCAAGCTTTCAGCCGATGACGTACG-3'引入 *Hind* Ⅲ 酶切位点。

P1,P2 均加入保护性碱基。

1.2.2 结核分枝杆菌基因组 DNA 的提取 取少量分枝杆菌 H37Rv 株接种罗氏培养基中,37℃培养 4 周。取适量培养物重悬于 50μl 裂解液中置于 55℃水浴 10min 使蛋白酶 K 灭活,再离心取上清,用酚 - 氯仿抽提,无水乙醇沉淀,溶于 20μl 水中备用。

1.2.3 RpfA 基因的克隆及表达质粒的构建 以结核分枝杆菌 H37Rv 基因组 DNA 为模板,按以下反应体系和程序进行 PCR。反应总体积 50μl,含 ddH_2O 38.0μl,10×buffer 5.0μl,dNTPs 4.0μl,DNA 模板 0.5μl,特异性引物对各 1.0μl,Taq-Plus 酶 0.5μl,反应条件:94℃ 5min 预变性;94℃ 60s,57℃ 60s,72℃ 150s,循环 36 次;72℃再延伸 10min。扩增产物取 5μl 电泳,紫外线下观察结果。PCR 产物回收后,经 *BamH* Ⅰ和 *Hind* Ⅲ双酶切,以 0.8%琼脂糖凝胶电泳检测鉴定并胶回收 DNA 大片段。同样,质粒 pET32a(+) 经 *BamH* Ⅰ和 *Hind* Ⅲ双酶切,0.8%琼脂糖凝胶电泳后胶回收大片段。回收双酶切片段按以下体系) 进行连接反应:RpfA DNA 大片段 8μl,pET32a (+) DNA 大片段 2μl,连接 buffer(Solution Ⅰ)10μl,16℃连接过夜。

1.2.4 重组质粒的鉴定 连接产物经转化 Top10 后,挑选单菌落提质粒为模板,按上述体系做 PCR 和电泳鉴定;阳性克隆再用 *BamH* Ⅰ和 *Hind* Ⅲ双酶切重组质粒,以琼脂糖凝胶电泳检测鉴定;最后进行 DNA 测序分析。

1.2.5 重组质粒的表达 将测序正确的重组质粒转化大肠杆菌 BL21 株中,挑取 4 个阳性克隆分别接种于 2ml 含氨苄青霉素的 LB 培养液中,37℃振荡过夜,分别取 100μl 菌液加到加入 2ml 含氨苄青霉素的 LB 培养液中,37℃振荡培养 2~3h,再加入 IPTG 使其终浓度为 2mmol/L,诱导 4h,进行 12% SDS-PAGE,考马斯亮兰染色,并通过凝胶薄层扫描测定其表达量。

1.2.6 表达产物的鉴定 按上述方法诱导重组蛋白表达后进行 SDS-PAGE,电泳完成后小心取出凝胶,用 200ml 凝胶固定液室温固定凝胶约 1h;然后用超纯水洗涤凝胶 2 次,再用 His-tag in-gel Stain 孵育 1h,再用 20mmol/L pH7.8 的磷酸盐缓冲液清洗胶体 2 次,最后用配备有标准相机的紫外投射仪采集图像。

1.2.7 重组蛋白表达形式的分析 按前述方法诱导重组蛋白的表达并收集菌体,以 3ml/g 湿菌比例加入超声缓冲液重悬,用 36%强度的超声在冰浴中碎菌(功率 360W,总时间 30min,其中超声破碎 3s,间隔 3s),离心后分别收集上清和沉淀(即包涵体),以 SDS-PAGE 分析重组蛋白表达形式。

1.2.8 重组 RpfA 蛋白的纯化 将上述制备好的包涵体重悬于缓冲液 A (0.5mol/L NaCl,20mmol/L Tris-cl,5mmol/L 咪唑,8mol/L 尿素,pH7.9)中,冰浴搅拌 1h,使包涵体完全解;4℃,10 000r/min 离心 10min 后,将上清加入到用超声缓冲液平衡过的 Ni-NTA agarose 柱上,然后分别用 10 柱倍体积的缓冲液 A,6 倍柱体积的缓冲(0.5mol/L NaCl,20mmol/L Tris-cl,60mmol/L 咪唑,8mol/L 尿素,pH7.9),6 倍柱体积的缓冲液 C(0.5mol/LNaCl,20mmol/L Tris-cl,1mmol/L 咪唑,8mol/L 尿素,pH7.9)对目的蛋白进行洗脱,分步收集,每管约 1.5ml。取各管收集液 15μl,加以等量 2×蛋白上样 buffer 混匀,煮沸 5min 后进行 SDS-PAGE 鉴定,将含有目的蛋白的各管合并。

1.2.9 表达蛋白的复性 采取逐步降低尿素浓度的方法,除去蛋白溶液中的尿素,使变性的蛋白在此过程中自然复性,在 4℃下分别用含 6mol/L、4mol/L、2mol/L、1mol/L 尿素的缓冲液进行梯度透析 4h,透析完毕将蛋白质溶液置于 -20℃保存。

2 结 果

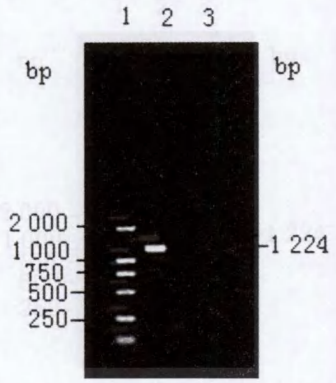
2.1 PCR 扩增产物琼脂糖电泳结果

通过设计的 PCR 引物,从结核分枝杆菌 H37Rv 基因组 DNA 中扩增出 RpfA 基因片段与预期的片段大小相符(图 1)。

2.2 重组质粒双酶切电泳检测结果

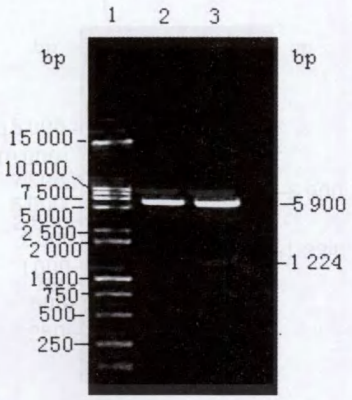
RpfA 基因与 pET32a(+)vector 连接后的重组质粒命名 pET32a(+)-RpfA。以重组质粒为模板进行 PCR,并挑选阳性克隆进行 *BamH* Ⅰ和 *Hind* Ⅲ双酶切,电泳图中可看到挑选的 pET32a-RpfA,双酶切后产生 1 224bp 的片段(图 2)。

维普资讯 http://www.cqvip.com



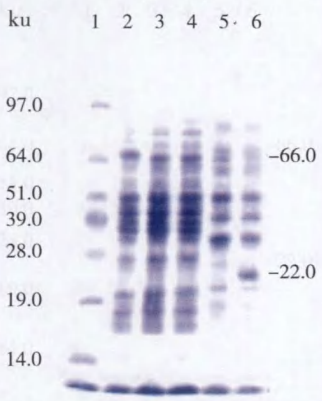
1. DNA marker; 2. RpfA 基因; 3. 阴性对照

图 1 PCR 扩增的 RpfA 基因片段



1. DNA marker; 2. pET32a (+)-RpfA digested by *BamH* Ⅰ; 3. pET32a(+)-RpfA digested by *BamH*Ⅰ and *Hind*Ⅲ

图 2 重组质粒的酶切鉴定



1. protein marker; 2~4. BL21 with pET32a (+)-RpfA induced by IPTG for 4h; 5. BL21 induced by IPTG for 4h; 6. BL21 with pET32a(+) induced by IPTG for 4h

图 3 SDS-PADE 鉴定诱导表达的重组蛋白

2.3 重组质粒的测序鉴定

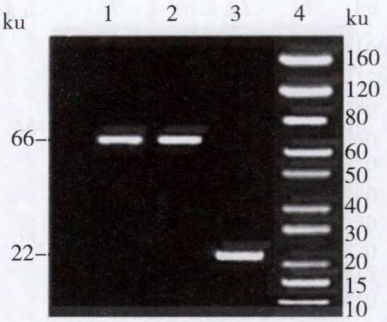
将表达质粒 pET32a(+)-RpfA 样品送上海生物工程公司测序,双向测序结果显示:RpfA 的测序结果与 ncbi 上 RpfA 的编码序列比较完全一致。

2.4 重组质粒的表达及其产物的鉴定

用 IPTG 诱导感染了 pET32a(+)-RpfA 的 BL21 菌 4h 后,进行 12%SDS-PAGE,发现在 66ku处可见表达的新蛋白带(pET 硫氧还蛋白约 22ku),同理论值大小相吻合(图 3)。经凝胶薄层扫描,测得重组蛋白表达带的蛋白约占菌体总蛋白量的 39%。用 His-tag in-gel Stain 鉴定目的蛋白的表达, 在在紫外投射仪中发现凝胶在 66ku处有一条带(图 4)。对表达蛋白的可溶性分析证明,融合表达产物主要以不可溶的包涵体形式存在(图 5)。

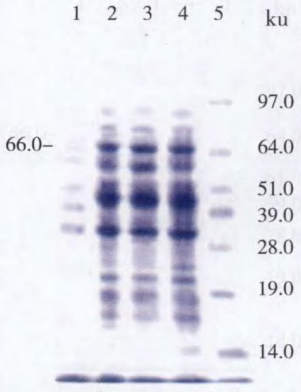
2.5 表达蛋白的亲和层析纯化和复性

从重组菌中制备的包涵体经洗涤溶解后,上到 Ni-NTA 金属螯合亲和层析柱中,洗脱下目的蛋白经 12%SDS-PAGE 证明了这种纯化方法的有效性(图 6),薄层扫描分析重组蛋白纯度可达 82%以上。



1~2. BL21 with pET32a(+)-RpfA induced by IPTG;
3. BL21 with pET32a(+) induced by IPTG;
4. BenchMark His-tagged Protein Standard

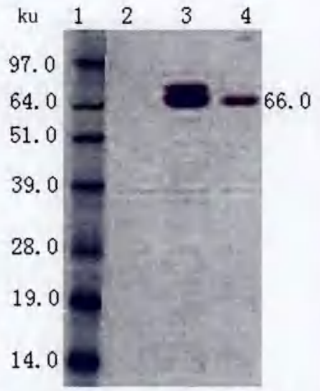
图 4 His-tag in-gel Stain 方法鉴定诱导表达的重组蛋



1. supernatant of PET32a(+)-RpfA induced by IPTG;
2~4. precipitation of PET32a(+)-RpfA induced by IPTG;
5. protein marker

图 5 重组蛋白表达形式的鉴定

维普资讯 http://www.cqvip.com



1. protein marker; 3~4. the recombinant protein after purified

图 6 纯化后重组蛋白的 SDS-PAGE 分析

将分步收集液中含目的蛋白的各管合并,缓慢逐步降低透析液中尿素的浓度,使变性的蛋白在此过程中自然复性,复性后的目的蛋白经冻干保存,以便于进一步的研究工作。

3 讨 论

Gvlina 等首先发现生长繁殖期的藤黄微球菌分泌的一种蛋白质能使处于休眠期的同类菌复苏并在培养基上形成菌落,故把该蛋白质称为“复苏促进因子”。Rpf 也可以刺激其它几种富含 G/C 的革兰阳性菌的生长,包括鸟分枝杆菌、母牛分枝杆菌、牛型结核分枝杆菌(BCG)、堪萨斯分枝杆菌、耻垢分枝杆菌和 MTB。同时又发现这些革兰阳性菌有 7 个基因的预计产物与上述 Rpf 的 N- 末端域十分相似,其中 5 个基因来自 MTB,它们都能分泌 Rpf 的同源蛋白,而这些蛋白具有 Rpf 相似的功能,以此类推把这些由 MTB 分泌的同源蛋白称为“结核分枝杆菌复活促进因子家族”[4-7]。

该家族 5 个成员分别是 RpfA 蛋白、RpfB 蛋白、RpfC 蛋白、RpfD 蛋白和 RpfE 蛋白;分子量为 10~30 ku。它们都由 3 个不同的区域组成:(1)跨膜转运螺旋区或分泌信号肽区(靠近 N 端),与 Rpf 连接在细胞外膜上或分泌有关,成熟的 Rpf 中分泌信号肽区将被切掉。(2)同源保守区,由 70 个氨基酸残基组成,其空间结构决定着促细菌复苏和生长的作用。(3)特异可变区,各个 Rpf 蛋白不同,由富含脯氨酸 - 丙氨酸的序列组成,它是细胞膜脂蛋白的脂质结合位点[3]。Martin 等发现 5 个 Rpf 蛋白的同源保守区有相同的空间结构———一个保守的谷氨酸盐活性位点和一个 C^- 型溶菌素样结构组成。前者是多糖连接位点;后者可以切割寡聚糖。所以,可以推测,结核分枝杆菌 Rpf 保守区能与细菌细胞壁结合并切割其寡聚糖,这很可能是 Rpf 促复苏功能的信号[5,8]。RpfA 蛋白由 407 个氨基酸组成,它的同源保守区(Rpf 样蛋白片段)位于 1 个较大特异可变区(以 A-PADLAPP 为一致性顺序的重复序列)之后。此外,RpfA 具有较好的特异免疫应答能力和很好的免疫原性。

在本试验中,我们选择的 pET32a(+)是一种融合表达质粒,其特点除了能够在外源蛋白 N 端编码 6 个组氨酸残基外,还能够编码硫氧还原蛋白(Trx)与外源蛋白融合表达,使重组蛋白分子量变大,不易被细菌内的蛋白酶降解,从而提高表达产物的稳定性;同时,外源蛋白与 Trx 之间还具有肠激酶和凝血酶的识别位点,可以方便的切下 Trx,使重组蛋白的构象及活性与天然目的蛋白更接近。由于未能获得针对 RpfA 蛋白的特异性抗体,故利用 His-tag in-gel Stain 对重组蛋白做初步鉴定。His-tag in-gel Stain 是一种共轭结合 Ni-NTA 复合物的荧光染料,镍离子与寡聚组氨酸序列之间具有高度亲和作用,可从众多内源蛋白中分辨出纳克级的 His-tag 蛋白;重组工程菌 BL21 中表达的外源蛋白融和了一个 6× His 的蛋白质标签,故目的蛋白在紫外投射仪中产生的荧光清晰可见,而且条带单一。该方法无需转膜,比免疫印记法更简便,同时敏感度高,可用于任何一种含组氨酸标签的蛋白的初步鉴定。此外,我们还利用重组蛋白上的组氨酸标签可以和 Ni-NTA 亲和层析柱上的金属镍结合的原理,使目的蛋白在流经柱床时被特异地吸附,再利用咪唑置换,洗脱下目的蛋白,从而对重组蛋白进行纯化。

本研究构建了编码 MTB H37Rv 株 RpfA 蛋白的重组表达质粒,并获得了较高纯度的 RpfA 蛋白。借助它很有可能建立 MTB 快速,敏感的培养方法,改进临床检验上常规 MTB 的分离培养和药敏实验方法,缩短所需时间,提高检验的敏感度。同时,该蛋白有可能是宿主免疫系统识别的一个靶抗原[2],需要进一步研究其免疫原性。此外,我们可以探讨 RpfA 蛋白与结核休眠菌之间的关系,前者是否可以促进后者的复苏和生长;为新型抗结核药的研制奠定基础。

参 考 文 献

(下转第 637 页)

维普资讯 http://www.cqvip.com

uterine leiomyomata[J]. Am J Obstet Gynecol,2003;101(3):431-437.
[3] 田 杰,赵曼曼,温锦英,等. 不同术式子宫切除术对患者内分泌及骨代谢的影响[J]. 中国实用妇科与产科杂志,2003;19(8):497-498.
[4] Spies J,Patel A,Epstein N,et al. Recent advances in uterine fibroid embolization[J]. Curr Opin Obstet Gynaecol,2005;17(6):562-567.
[5] 霍 钢,李九州,郑履平,等.高强度聚焦超声损伤离体恶性胶质瘤的研究[J]. 第三军医大学学报,2006;28(11):1229-1230.

(责任编辑:冉明会)

(上接第 563 页)

[1] Wayne LG. Dormancy of mycobacterium tuberculosis and latency of disease[J]. Eur J Clin Microbiol Infect Dis,1994;13(11):908-914.
[2] Vladimir VY,Tatiana KK,Elvira IR,et al. Proteins of the Rpf Family:Immune Cell Reactivity and Vaccination Efficacy against Tuberculosis in Mice[J]. Infection and Immunity,2003;71(8):4789-4794.
[3] Galina V,Mukamolova GV. A family of autocrine growth factors in Mycobacterium tuberculosis[J]. Molecular Microbiology,2002;46(3):623-635.
[4] Galina V,Mukamolova GV,Arseny S,et al. A bacterial cytokine [J]. Microbilogy,1998;95(15):8916-8921.
[5] Martin CG,Nicholas HK,Angharad PD,et al. Resuscitation-promoting factors possess a lysozyme-like domain[J]. Trends in biochemical sciences,2004;29(1):7-10.
[6] Sergey B,Mukamolova GV,Vasiliy P,et al. Culturability of Mycobacterium tuberculosis cells isolated from murine macrophages: a bacterial growth factor promoters recovery[J]. FEMS Immunology and Medical Microbiology,2000;29(8):233-240.
[7] Adrie JC,Edsmond MC,Mary KH,et al. Mycobacterium tuberculosis WhiB3 interacts with RpoV to affect host survival but is dispensable for in vivo growth[J]. PNAS,2002;99(5):3147-3152.
[8] Martin CG,Philippe B,Brian H,et al. The structure of a resuscitation-promoting factor domain from Mycobacterium tuberculosis shows homology to lysozymes[J]. Nat Struct Mol Biol,2005;12(3):270-273.

(责任编辑:关蕴良)

(上接第 617 页)

展期大肠癌的辅助化疗手段。

参 考 文 献

[1] Salovaara R,Roth S. Frequent loss of Smad4/DPC4 protein in colorectal cancers[J]. Colorectal Cancer,2002;51(1):56-59.
[2] Inagaki M,Yagi T,Shima Y,et al. A successful case of preoperative intermittent hepatic arterial infusion of high-dose 5-FU and pharmacokinetic modulating chemotherapy against unresectable liver metastasis of colon cancer[J]. Gan To Kagaku Ryoho,2000;27(12):1830-1833.
[3] 唐 华,张才全.TGF-1 蛋白在大肠癌组织的表达及意义[J].重庆医科大学学报,2004;29(1):71-73.
[4] Rik Derynck,Rosemary J. Akhurst,Allan Balmain.TGF-signaling in tumor suppression and cancer progression[J]. Nature Genetics,2001;29(10):117-129.
[5] 李锟锟,王 黎,刘益清,等.TGFβ-1 及 Smad4 在大肠癌组织中的表达及临床意义[J]. 河南肿瘤学杂志,2004;17(2):86-88.
[6] Pizzi S,Azzoni C,Bassi D,et al. Genetic alterations in poorly differentiated endocrine carcinomas of the gastrointestinal tract [J]. Cancer, 2003;98(6):1273-1282.
[7] Alazzouzi H,Alhopuro P. SMAD4 As a PrognosticMarker in Colorectal Cancer[J]. Clin Cancer Res,2005;11(7):2606-2611.

(责任编辑:冉明会)