维普资讯 http://www.cqvip.com

论 著 文章编号:0253-3626(2007)03-0253-04

结核分枝杆菌复活促进因子 B 的原核表达、鉴定和纯化

徐 蕾[1],何永林[1],张 黎[2],辛 渝[3],朱道银[1]

(1.重庆医科大学免疫学教研室;2.重庆医科大学附属第一医院眼科;3.重庆医科大学基础医学研究所,重庆 400016)

【摘 要】目的:构建结核分枝杆菌复活促进因子 B(RpfB)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 RpfB 基因(1089bp),然后用双内切酶消化后,与同样酶消化的 pET32a(+)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 RpfB 蛋白;利用 Western-blot 法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 Western-blot 鉴定均发现 61KDa 处有特异性蛋白条带。结论:成功克隆并构建了 RpfB 基因的重组表达质粒 pET32a(+)-RpfBv,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;RpfB;克隆;表达; 纯化

【中国图书分类法分类号】R378.91 【文献标识码】A 【收稿日期】2006-08-30

Expression, identification and purification of the resuscitation-promoting factor B of Mycobacterium tuberculosis

XU Lei, et al

(*Department of Immunology, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To construct the Resuscitation-promoting factor B (RpfB)expression plasmid of Mycobacterium tuberculosis, and express and purify it in E.coli. *Methods*: RpfB gene 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 Western-blot and purified by using affinity cbromatograghy. *Results*: The size of the RpfB gene digestedby restricted enzymes accorded with the theoretical size and the DNA sequence with the reported one in literatures. 61KDa protein was found by SDS-PAGE and Western-blot. *Conclusion*: The recombinant expression plasmid pET32a(+)-RpfBv of RpfB gene was successfully cloned and constructed, and the recombinant protein with bigh purity was obteined; wbicb laid the basis for further study.

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

全球约有 1/3 的人口受结核杆菌(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。MTB 的潜伏感染归因于 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。

RpfB(Resuscitation-promoting factor B)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],推测其与持留菌也有一定的联系。我们从 GeneBank 中获得 RpfB 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,硕士生,
主要研究方向: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。

1.2 方法

1.2.1 引物的设计 根据 RpfB 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'-CAAggatccATGTTGCGCCTGGTAGTCGGTGC-3'引入 *BamH* Ⅰ酶切位点。下游引物(P2):5'-TATaagcttTCAGCGCGCACCCGCTCGT-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 (10×PCR 缓冲液 5μl,45g/L 吐温 205μl,45g/L NP-40 5μl,20g/L 蛋白酶 K0.5μl 及水 345μl)中置于 55℃水浴 10min 使蛋白酶 K 灭活,再以 10000r/min 离心 1min,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 RpfB 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 ddH20 38.0μl,10×buffer 5.0μl,dNTPs 4.0μl,DNA 模板 0.5μl, 特异性引物对各 1.0μl,TaqPlus 酶 0.5μl,反应条件:94℃ 5min 预变性;94℃ 1min,63℃ 45s,72℃ 140s, 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:RpfB 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, 再将电泳凝胶上的蛋白转移至 PVDF 膜上,用 5%的脱脂奶封闭 2h,加抗组氨酸的特异性单抗 4℃孵育过夜,以 0.2mmol/L PBST 洗涤后,加羊抗鼠 IgG 室温作用 1h,以 DAB 显色观察结果。

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 RpfB 蛋白的纯化 将上述制备好的包涵体重悬于缓冲液 A (0.5mol/LNaCl,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℃,10000r/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/LNaCl,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 RpfB 基因片段与预期的片段大小相符(图 1)。

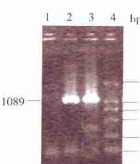
2.2 重组质粒双酶切电泳检测结果

RpfB 基因与 pET32a(+)vector 连接后的重组质粒命名 pET32a(+)-RpfBv。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-RpfBv,PCR 和双酶切后均产生 1089bp 的片段(图 2)。

2.3 重组质粒的测序鉴定

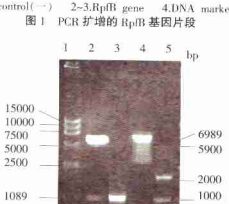
将表达质粒 pET32a(+)-RpfBv 样品送上海生物工程公司测序,双向测序结果显示:RpfB 的测序结果与 ncbi 上 RpfB 的编码序列比较完全一致。

维普资讯 http://www.cqvip.com



1.control(－) 2~3.RpfB gene 4.DNA marker

图 1 PCR 扩增的 RpfB 基因片段



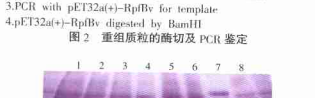
1.DNA marker (DL 1500)

2.pET32a(+)-RpfBv digested by BamHI and HindIII

3.PCR with pET32a(+)-RpfBv for template

4.pET32a(+)-RpfBv digested by BamHI

图 2 重组质粒的酶切及 PCR 鉴定



1~6.BL21 with pET32a(+)-RpfBv induced by IPTG for 4h

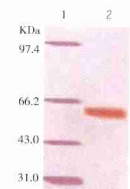
7.protein marker (from up to down):97.4KDa,66.2KDa,43.0KDa,31.0KDa,20.1KDa

8.BL21 with pET32a(+) induced by IPTG for 4h

图 3 SDS-PAGE 鉴定诱导表达的重组蛋白

2.4 重组质粒的表达及其产物的鉴定

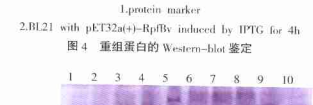
用 IPTG 诱导感染了 pET32a(+)-RpfBv 的 BL21 菌 4h 后，进行 12%SDS-PAGE，发现在 61KU 处可见表达的新蛋白带(pET 硫氧还蛋白约22KU)，同理论值大小相吻合(图 3)。经凝胶薄层扫描，测得重组蛋白表达带的蛋白约占菌体总蛋白量的 36%。将表达蛋白与抗组氨酸的特异性单克隆抗体做免疫印迹，发现 61KU 处有一条带(图 4)。对表达蛋白的可溶性分析证明，融合表达产物主要以不可溶的包涵体形式存在(图 5)。



1.protein marker

2.BL21 with pET32a(+)-RpfBv induced by IPTG for 4h

图 4 重组蛋白的 Western-blot 鉴定



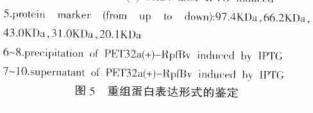
1~4.BL-21 with PET32a(+)-PrfBv after IPTG induced

5.protein marker (from up to down):97.4KDa,66.2KDa,43.0KDa,31.0KDa,20.1KDa

6~8.precipitation of PET32a(+)-RpfBv induced by IPTG

7~10.supernatant of PET32a(+)-RpfBv induced by IPTG

图 5 重组蛋白表达形式的鉴定



3.protein marker

5~8.the recombinant protein after purified

图 6 纯化后组蛋白的 SDS-PAGE 分析

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

维普资讯 http://www.cqvip.com

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 90%以上。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(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,以此类推把这些由结核杆菌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、RpfB、RpfC、RpfD 和 RpfE.其中 RpfB、RpfD 和 RpfE 有具有很高的特异免疫应答能力和很好的免疫原性。最近报道,RpfB 的表达可能调节 MTB 的增殖,而且 RpfB 基因敲除的 MTB 株在慢性结核病小鼠模型中存在活化缺陷;可见它与结核潜伏感染的活化有着密切的联系[8]。

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 RpfB 蛋白的特异性抗体,故利用抗组氨酸的特异性单抗与重组蛋白做免疫印记试验,对表达的目的蛋白进行初步鉴定。同时,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,再利用眯唑置换,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 RpfB 蛋白的重组表达质粒,并获得了较高纯度的 RpfB 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 RpfB 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。

(通讯作者:朱道银,重庆医科大学免疫学教研室,邮编 400016)

参 考 文 献

[1] Wayne LG.,Dormancy of mycobacterium tuberculosis and latency of disease[J].Eur J Clin Microbiol Infect Dis,1994;13:908-914.

[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] JoAnn MT,Kaixia M.Deletion of the Mycobacterium tuberculosis Resuscitation-Promoting Factor Rv1009 Gene Results in Delayed Reactivation from Chronic Tuberculosis[J].Infection and Immunity,2006;74(5):2985-2995.