

结核分枝杆菌 Rv1168c 蛋白的基因表达、纯化及结构分析

余晓丽^{1,3}, 孙战强², 周晨俊³, 温子禄¹, 陈军⁴, 孙庆文³, 王洪海^{3*}, 张舒林^{2*}

(¹武汉工业学院生物与制药工程学院, 武汉 430023)

(²上海交通大学医学院病原生物学教研室, 上海 200025)

(³复旦大学遗传学研究所遗传工程国家重点实验室, 上海 200433)

(⁴武汉市结核病防治所, 武汉 430083)

摘要:【目的】应用原核表达体系对结核分枝杆菌 PPE 蛋白家族 Rv1168c 进行高效表达, 进一步进行蛋白纯化和结构分析。【方法】以结核分枝杆菌 H37Rv 基因组为模板, 扩增 Rv1168c 基因, 构建 pET32a-Rv1168c 重组质粒; 转化重组质粒到大肠杆菌 DH5 α 并在 BL21(DE3) 诱导表达, 通过十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺电泳 (SDS-PAGE) 鉴定 Rv1168c 在大肠杆菌中的表达情况; Ni-NTA His* Bind Resin 纯化重组蛋白 Rv1168c; SDS-PAGE 和质谱分析测定相对分子量后, 用圆二色光谱 (CD) 和同源建模方法分析和检测重组蛋白 Rv1168c 的二级和三级结构。【结果】成功克隆了 971 bp 的目的基因 Rv1168c, 并获得了高纯度的重组蛋白 Rv1168c。重组蛋白的分子量为 51.5 kDa (含载体蛋白)。25 °C 时重组蛋白 Rv1168c 的二级结构包括 34.4% α 螺旋, 33.7% β 转角, 31.9% 无规则卷曲, 它的三维模型显示为 (β/α)₅ 结构。【结论】成功得到高纯度的重组目的 Rv1168c 蛋白, 并初步进行了结构分析, 为进一步对 Rv1168c 结构和功能研究奠定了基础。

关键词: 结核分枝杆菌; Rv1168c; 基因表达; 蛋白纯化; 圆二色谱

中图分类号: R392 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2010) 07-0931-06

2009 年全球结核控制报告显示, 结核病迄今仍是全球范围内单一病原体引起死亡人数最多的传染性疾病。据 WHO 最新统计数据表明, 全球每年新发结核病 (TB) 900 多万人, 死于结核病近 200 万人^[1]。通过对结核分枝杆菌相关基因及其编码蛋白的结构、功能进行深入研究, 为开发结核病早期诊断试剂、新型疫苗和新型药物提供理论依据不仅必要而且迫切。

1998 年, 结核分枝杆菌全基因组测序完成, 并发现了 PE 和 PPE 两大富含甘氨酸的蛋白家族, 推测其功能可能与结核分枝杆菌抗原变异和干扰、抑制抗原提呈过程相关, 具有极为重要的免疫学意

义^[2]。由此, PE 和 PPE 蛋白家族日益得到研究人员的关注。Rv1168c 基因所编码的 PPE17 蛋白, 即 Rv1168c 是 PPE 蛋白家族成员。研究报道, Rv1168c 蛋白抗原可以用来诊断肺阴结核和肺外结核; 并且可以在结核杆菌感染病人体内激发强烈的特异性细胞免疫反应, 促进释放 γ -干扰素, 对结核感染具有免疫保护性^[3]。

本文通过在大肠杆菌中克隆、表达结核杆菌重组 Rv1168c 蛋白, 获得纯化的 Rv1168c 蛋白, 并对其结构进行初步分析。为进一步深入研究该蛋白的免疫学特性, 开发更有效的基于复合抗原的结核病免疫学诊断试剂, 以及新型疫苗和新型药物研究提供

基金项目: 国家“十一五”重大传染病专项 (2009ZX10004-313); 上海市科委国际合作计划项目 (08410703800); 湖北省教育厅科研项目 (B20101701)

* 通信作者。Tel: +86-21-6384659; Fax: +86-21-65648376; E-mail: shulinzhang@sjtu.edu.cn; hhwang@fudan.edu.cn

作者简介: 余晓丽 (1963-), 女, 河南南阳人, 副教授, 主要从事分子免疫学方面的研究。E-mail: yxll268@126.com

收稿日期: 2010-02-02; **修回日期:** 2010-03-26

理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株:结核分枝杆菌 H₃₇Rv 标准株由中国药品生物制品检定所提供,质粒 pET32a、大肠杆菌 (*Escherichia coli*) DH5 α 克隆菌株和 BL21 (DE3) 表达宿主菌株为上海交通大学医学院病原微生物检测实验室保存。

1.1.2 主要试剂:卡那霉素 (Kan)、异丙基硫代 2- β -D2 半乳糖苷 (IPTG) 及尿素购自 Sigma 公司,限制性内切酶 *Bam*H I、*Xho* I、高保真 DNA 合成酶 (*Pfu* 酶) 及 T4DNA 连接酶购自 TaKaRa 生物公司, Ni-NTA His* Bind Resin 购自美国 Novagen 公司; PCR 产物纯化试剂盒、DNA 胶回收试剂盒、质粒抽提试剂盒、蛋白分子量标准均购自上海华舜公司; 引物合成和 DNA 序列测定由上海生物工程有限公司完成。

1.2 PCR 引物的设计与合成

根据 GenBank 中 Cole 等^[2] 报道的结核杆菌 H37Rv 株 *Rv1168c* 基因序列 (基因检索代码为 PPE17, 去除信号肽 75bp) 设计引物。上游引物序列 (P1): 5' GAATGGATCCGCGAACGCCTGGAAGAAT, 下游引物序列 (P2): 5' TATGCTCGAGTGACCGCAGTATCACTCCG, 上下游引物的 5' 末端分别引入 *Bam*H I 和 *Xho* I 酶切位点 (用下划线表示)。

1.3 *Rv1168c* 基因的扩增

以结核杆菌 H₃₇Rv 株全基因组 DNA 为模板, 进行 PCR 扩增。反应体系 50 μ L: ddH₂O 37.5 μ L, 模板 1 μ L, dNTPs (2.5 mmol/L) 4 μ L, *Pfu* 酶 0.5 μ L, 10x *Pfu* Buffer 5 μ L, 特异性引物 (上、下游引物混合) 2 μ L (20 mmol/L)。PCR 反应条件为: 94 $^{\circ}$ C 5 min; 94 $^{\circ}$ C 45 s, 56 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10 min。

1.4 克隆 PCR 产物及重组转化子的鉴定

Rv1168c 基因片段回收、纯化后, 用 *Bam*H I、*Xho* I 两种限制性内切酶在 37 $^{\circ}$ C 酶切 4 h, 然后与经同样酶切的 pET32a 载体用 T4 DNA 连接酶连接, 转化大肠杆菌 DH5 α , 经电泳, 酶切筛选和 DNA 测序鉴定, 得到重组质粒 pET32a-*Rv1168c*。抽提重组质粒, 转化 BL21 (DE3)。

1.5 目的蛋白的诱导表达和 SDS-PAGE 分析

用测序正确的重组质粒转化 BL21 感受态细胞, 涂在含有 Kan 抗性的平板进行培养。挑取单菌

落, 接种于 5 mL 有 Kan 抗性的 LB 培养液中, 37 $^{\circ}$ C 摇床培养至对数生长期。取 20 μ L 菌液再转入 5 mL 有 Kan 抗性的 LB 培养液中共 10 管。37 $^{\circ}$ C、220 r/min 摇床培养 2 h 左右, 加入终浓度为 1 mmol/L IPTG, 诱导时间为 2 h、4 h, 诱导温度为 37 $^{\circ}$ C、25 $^{\circ}$ C 进行诱导表达^[4-5]。4 $^{\circ}$ C 离心收集菌体。菌体沉淀用 200 μ L, 10 mmol/L binding buffer 吹散, 用超声破碎 (超声 4 s, 间隔 6 s 冰浴超声 10 min)。4 $^{\circ}$ C 离心 20 min。取沉淀和上清分别溶解在样品缓冲液中进行 SDS-PAGE。

1.6 重组蛋白的纯化及复性

由上一步 SDS-PAGE 结果可知, 目的蛋白在菌体的上清液中含量很低, 而菌体沉淀中则存在大量目的蛋白, 所以 *Rv1168c* 基因表达蛋白经 IPTG 诱导后是以包涵体形式存在, 参照文献^[6] 中的方法来去除包涵体获得蛋白。

采用 Ni-NTA His* Bind Resin 来亲和纯化重组蛋白, 具体操作步骤如下: 破碎后菌液 10000 \times g 离心 20 min, 去除不溶性杂质, 取上清 4 $^{\circ}$ C 备用。纯化柱以 elution buffer 平衡后, 加入样品, 流速为 1 mL/min, 依次以 5 倍柱体积的 wash buffer (含 8 mol/L 尿素)、60 mmol/L 咪唑 elution buffer (含 8 mol/L 尿素)、80 mmol/L 咪唑 elution buffer (含 8 mol/L 尿素)、500 mmol/L 咪唑 elution buffer (含 8 mol/L 尿素) 过柱, 收集含 500 mmol/L 咪唑 elution buffer 洗脱液。

洗脱液收集后, 用尿素梯度透析的方法对重组蛋白进行复性, 尿素的梯度透析液依次为含 8、6、4、2、1 和 0 mol/L 尿素的 PBS (pH 8.0) 溶液。重组蛋白经透析复性后加入 20% 的甘油于 -20 $^{\circ}$ C 保存备用。

复性后的重组蛋白, 用 BandScan 法测定蛋白纯度, 用紫外吸收法结合 Bradford 法测定蛋白浓度。

1.7 重组蛋白质质谱分析和测定

取 25 μ g 重组蛋白, 应用 MALDI-TOF 质谱法测定其相对分子质量, 仪器为 Voyager-DE-PRO (Applied Biosystem, USA), 基质是 sinapinic acid。参数设置如下: grid, 95%; delayed time, 1100 ns; low mass gate, 1×10^3 , 25 kV。

1.8 重组蛋白的二维结构研究

应用 J-715 分光偏振光计 (JASCO Corporation, Japan) 对重组蛋白 *Rv1168c* 进行圆二色分析。蛋白样品浓度为 0.18 mol/L, 溶于 5 mmol/L 的 Tris-HCl 缓冲液, pH 7.5。操作温度 25 $^{\circ}$ C, 光径为 0.2 nm, 扫

描速度为 50 nm/min, 记录波长从 190 - 260 nm。所得结果为经过系统平滑计算和空白校正的 5 次扫描结果的平均值。二级结构参数由计算机程序 PROSEC 计算^[7]。

1.9 重组蛋白的三维结构建模

Rv1168c 蛋白在 SWISS-MODEL 数据库中进行蛋白质三维结构分析^[8-9]。

2 结果

2.1 目的基因的获得

以 P1、P2 为上下游引物, 通过 PCR 方法从 MTB H₃₇Rv 基因组 DNA 中获得 971 bp Rv1168c DNA 片段(去除信号肽), 与预计结果相符(图 1)。

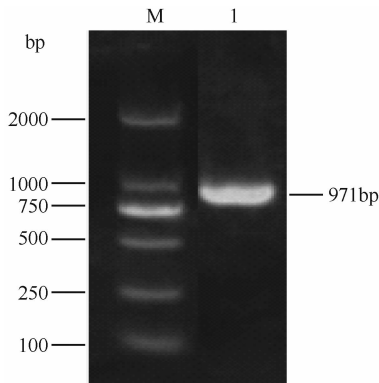


图 1 Rv1168c 基因的 PCR 片段扩增产物

Fig. 1 Rv1168c gene amplified by PCR. M. DL2000 marker; 1. products of Rv1168c.

2.2 pET32a-Rv1168c 重组子的获得

将目的基因片段与 pET32a 连接, 酶切鉴定证实有一大小为 971 bp 的片段插入载体, 初步确认为正确的重组载体。酶切处理重组子后得到目的基因片段。测序结果表明, 该重组表达载体 pET32a 上插入的目的基因序列全长与 GenBank 基因库中发表的序列 100% 一致, 命名为 pET32a-Rv1168c。

2.3 pET32a-Rv1168c 工程菌诱导表达及产物的鉴定

SDS-PAGE 分析结果表明, 与未经 IPTG 诱导的 pET32a-Rv1168c-BL21 (DE3) 相比, 经过 IPTG 诱导的 pET32a-Rv1168c-BL21 (DE3) 菌体在相对分子质量约 51 kDa 位置附近有浓重的重组蛋白表达条带出现; 目的蛋白在 37 °C 诱导 2 h 表达量较高(图 2)。经 Ni-NTA 亲和纯化获得了一条单一的约 51 kDa 大小的蛋白条带, 与预期的结果一致(图 3)。

纯化重组蛋白经 SDS-PAGE 分析和 BandScan 纯化蛋白灰度扫描, 结果显示: 纯化蛋白目的带占总纯化蛋白总量的 90%, 即纯度为 90%。通过紫外吸

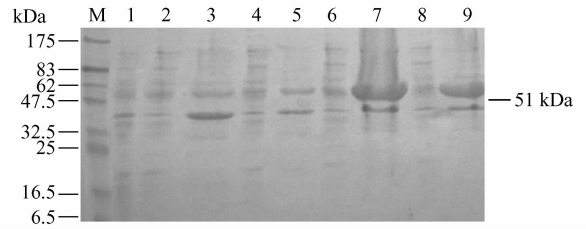


图 2 重组表达产物的 SDS-PAGE

Fig. 2 SDS-PAGE of gene products. M. protein molecular weight P7709 marker; 1. recombinant plasmid pET32a-Rv1168c not induced; 2. 25 °C 2 h supernatant; 3. 25 °C 2 h pellet; 4. 25 °C 4 h supernatant; 5. 25 °C 4 h pellet; 6. 37 °C 2 h supernatant; 7. 37 °C 2 h pellet; 8. 37 °C 4 h supernatant; 9. 37 °C 4 h p.

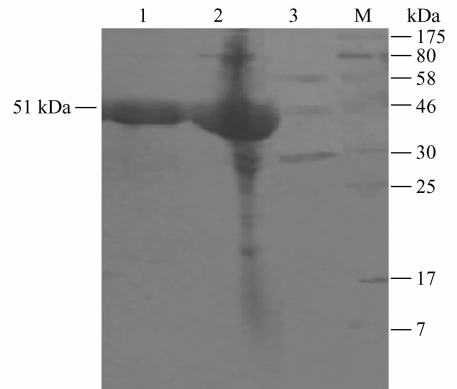


图 3 重组蛋白 Rv1168c 纯化结果

Fig. 3 The purification result of recombinant protein Rv1168c. 1. the purification result of inclusion body; 2. pellet of inclusion body; 3. supernatant; M. protein molecular weight P7708 Marker.

收法结合 Bradford 法测定: 重组 Rv1168c 蛋白的浓度为 568 μg/mL。

2.4 重组蛋白质谱鉴定

纯化后的重组 Rv1168c 蛋白经质谱分析(图 4), 测得的分子大小为 51.37 kDa(含载体蛋白分子量约为 18.8 kDa), 与理论计算的分子质量 51.5 kDa 接近, 证明了表达产物是准确的, 进一步验证了我们对重组质粒的测序结果。

2.5 重组蛋白的二级结构测定分析

纯化蛋白经圆二色光谱分析, 结果显示重组 Rv1168c 的二级结构中有 34.4% α 螺旋, 33.7% β 转角, 31.9% 无规则卷曲, 说明重组 Rv1168c 呈现 β/α 结构(图 5)。这和预期的二级结构相符(<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetSurfP/>)。

2.6 重组蛋白的三维建模

以结核分枝杆菌 PE/PPE 蛋白(2.20 Å, PBD 号 2g38B)为模板模拟结核分枝杆菌重组 Rv1168c 蛋白的三维模型, 模拟序列范围(modelled residue

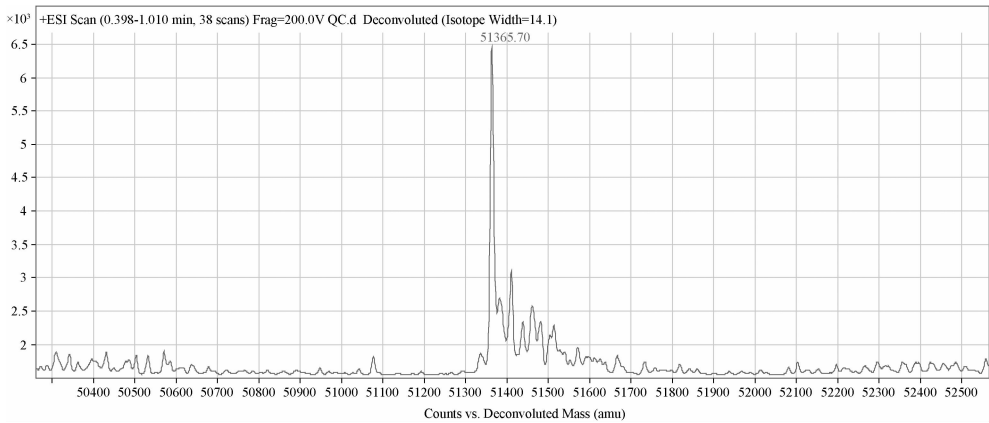


图4 重组蛋白 Rv1168c 质谱分析

Fig. 4 Mass spectrum analysis of recombinant protein Rv1168c.

range) 从 5 到 173。两者一级序列同源率为 32%，模型较可靠。如图 6 所示，重组 Rv1168c 蛋白结构为 $(\beta/\alpha)_5$ 结构和已测得的理论二级结构数据相符。

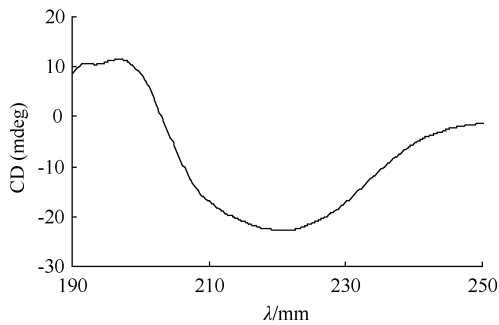


图5 重组蛋白 Rv1168c 圆二色分析

Fig. 5 Analysis of recombinant Protein Rv1168c by circular dichroism.

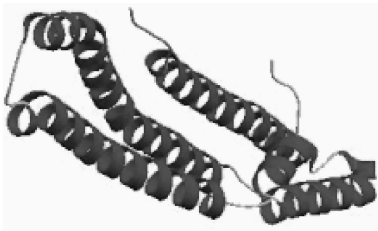


图6 重组蛋白 Rv1168c 的三维结构模型

Fig. 6 3D structure of recombinant protein Rv1168c.

3 讨论

结核分枝杆菌 PPE 蛋白家族是一类富含甘氨酸的蛋白，该家族所有成员的氨基末端均含有多个 Pro-Pro-Glu (脯氨酸-脯氨酸-谷氨酸) 重复基序^[10]。临床活动性结核病人的血清验证表明，同 PPD、Hsp60、ESAT-6 相比 Rv1168c 显示出强大免疫活性，可以将结核患者与 BCG 接种者区别开来^[5]。进一

步研究表明，Rv1168c 可诱发肺外结核产生强大的抗体反应，通过血清免疫学手段，Rv1168c 显示了可应用于临床肺外结核的诊断^[11]。与一些早期研究的 PPE 蛋白 Rv3425^[12]、Rv2608^[13] 和 Rv2430^[10] 相比，Rv1168c 抗原在诊断、检定肺外和肺内结核方面更有效，只有 Rv3872^[14] 的免疫原性与 Rv1168c 相当。研究表明，即 Rv1168c 蛋白与 ESX-5 区 ESAT-6 基因簇相关连^[15]，而 ESX-5 区被推测可能编码一个新分泌系统^[3,15]。致病分枝杆菌 ESX-5 区分泌系统负责各种 PPE 和 PE-PGRS 蛋白的分泌^[16]。Rv1168c 蛋白的强大免疫活性可应用于早期诊断，而作为与分泌有关的蛋白，它又可成为开发新型抗结核药物的潜在靶点。

根据 GenBank 的信息得知 Rv1168c 蛋白的功能未知，同源比对结果表明，此蛋白属于结核分枝杆菌特有的，这一切都说明 Rv1168c 在结核病的免疫诊断及潜在药靶等方面具有较高的应用前景。

本文研究的 Rv1168c 基因使用的表达载体是 pET32a，尽管该重组蛋白大部分以包涵体形式表达，亲和纯化时需要进行复性处理，但获得的重组蛋白纯度可达到 90% 以上。原核表达系统的优点是技术成熟，产率较高。通过紫外吸收法结合 Bradford 法测定，每 100 mL 培养菌可获得约 5.68 mg 左右的重组蛋白。显示本研究中使用的亲和层析纯化方法具有产物得率较高、纯化效果较好，且操作简便等特点。

通过 CD 和同源模建的方法，我们分析了重组 Rv1168c 的结构。CD 结果显示重组 Rv1168c 呈现 β/α 结构。同源模建获得的模型证明了这点，而且表明 Rv1168c 蛋白为 $(\beta/\alpha)_5$ 结构。

本研究为进一步的 Rv1168c 蛋白定位、功能研究奠定了一定的基础。此外，对开发新型结核病免

疫诊断试剂、新型疫苗和抗结核药物也有重要价值。

参考文献

- [1] World Health Organization. Global tuberculosis control - epidemiology, strategy, financing. WHO report 2009 (Geneva), WHO/HTM/TB/2009,411.
- [2] Cole ST, Brosch R, Parkhill J, Garnier T, Churcher C, Harris D, Gordon SV, Eiglmeier K, Gas S, Barry CE 3rd, Tekaiia F, Badcock K, Basham D, Brown D, Chillingworth T, Connor R, Davies R, Devlin K, Feltwell T, Gentles S, Hamlin N, Holroyd S, Hornsby T, Jagels K, Krogh A, McLean J, Moule S, Murphy L, Oliver K, Osborne J, Quail MA, Rajandream MA, Rogers J, Rutter S, Seeger K, Skelton J, Squares R, Squares S, Sulston JE, Taylor K, Whitehead S, Barrell BG. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature*, 1998,393(6685):537-544.
- [3] Abdallah AM, Verboom T, Hannes F, Safi M, Strong M, Eisenberg D, Musters RJ, Vandenbroucke-Grauls CM, Appelmek BJ, Luirink J, Bitter W. A speci? c secretion system mediates PPE41 transportin pathogenic mycobacteria. *Molecular Microbiology*, 2006, 62 (3) : 667-679.
- [4] 吕冲,姜昕,顾晓玲,王洪海. 结核分枝杆菌 Rv3369 基因的表达和纯化. 微生物学报(*Acta Microbiologica Sinica*), 2006,46(5):835-837.
- [5] Zhang SL, Zhao JW, Sun ZQ, Yang EZ, Yan JH, Zhao Q, Zhang GL, Zhang HM, Qi YM, Sun QW, Wang HH. Development and evaluation of a novel multiple-antigen ELISA for serodiagnosis of tuberculosis. *Tuberculosis*, 2009,89(4):278-284.
- [6] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. 分子克隆实验指南. 金冬雁,黎孟枫,等译(第二版). 北京:科学出版社, 1995,891-897.
- [7] Xu S, Yang Y, Jin R, Zhang M, Wang H. Purification and characterization of afunctionally active *Mycobacterium tuberculosis* prephenate dehydrogenase. *Protein Expression and Purification*, 2006,49(2):151-158.
- [8] Kiefer Florian, Arnold Konstantin, Kconzli Michael, Bordoli Lorenza, Schwede Torsten. The SWISS-MODEL Repository and associated resources. *Nucleic Acids Research*, 2009,37(1):D387-D392.
- [9] Jürgen Kopp, Torsten Schwede. The SWISS-MODEL Repository of annotated three-dimensional protein structure homology models. *Nucleic Acids Research*, 2004,32:D230-D234.
- [10] Choudhary RK, Mukhopadhyay S, Chakhaiyar P, Sharma N, Murthy KJ, Katoch VM, Hasnain SE. PPE antigen Rv2430c of *Mycobacterium tuberculosis* induces a strong β -cell response. *Infection and Immunity*, 2003, 71(11):6338-6343.
- [11] Khan N, Alam K, Nair S, Valluri VL, Murthy KJ, Mukhopadhyay S. Association of Strong Immune Responses to PPE Protein Rv1168c with Active Tuberculosis. *Clinical and Vaccine Immunology*, 2008, 15(6):974-980.
- [12] Zhang H, Wang J, Lei J, Zhang M, Yang Y, Chen Y, Wang H. PPE protein (Rv3425) from DNA segment RD11 of *Mycobacterium tuberculosis*: a potential β -cell antigen used for serological diagnosis to distinguish vaccinated controls from tuberculosis patients. *Clinical Microbiology and Infection*, 2007,13:139-145.
- [13] Chakhaiyar P, Nagalakshmi Y, Aruna B, Murthy KJ, Katoch VM, Hasnain SE. Regions of high antigenicity within the hypothetical PPE major polymorphic tandem repeat open-reading frame, Rv2608, show a differential humoral response and a low T cell response in various categories of patients with tuberculosis. *The Journal of Infectious Diseases*, 2004,190(7):1237-1244.
- [14] Mukherjee P, Dutta M, Datta P, Dasgupta A, Pradhan R, Pradhan M, Kundu M, Basu J, Chakrabarti P. The RD1-encoded antigen Rv3872 of *Mycobacterium tuberculosis* as a potential candidate for serodiagnosis of tuberculosis. *Clinical Microbiology and Infection*, 2007, 13:146-152.
- [15] Gey van Pittius NC, Sampson SL, Lee H, Kim Y, van Helden PD, Warren RM. Evolution and expansion of the *Mycobacterium tuberculosis* PE and PPE multigene families and their association with the duplication of the ESAT-6 (esx) gene cluster regions. *BMC Evolutionary Biology*, 2006,6:95.
- [16] Abdallah AM, Savage ND, van Zon M, Wilson L, Vandenbroucke-Grauls CM, van der Wel NN, Ottenhoff TH, Bitter W. The ESX-5 secretion system of *Mycobacterium marinum* modulates the macrophage response. *The Journal of Immunology*, 2008,181(10):7166-7175.

Expression, purification, and characterization of *Mycobacterium tuberculosis* Rv1168c

Xiaoli Yu^{1,3}, Zhanqiang Sun², Chenjun Zhou³, Zilu Wen¹, Jun Chen⁴, Qingwen Sun³, Honghai Wang^{3*}, Shulin Zhang^{2*}

(¹ School of Biology and Pharmaceutical engineering, Wuhan polytechnic university, Wuhan 430023, China)

(² Department of Microbiology and Parasitology, School of Medicine, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200025, China)

(³ State Key Laboratory of Genetic Engineering, Institute of Genetics, Fudan University, Shanghai 200433, China)

(⁴ Wuhan tuberculosis control institution, Wuhan 430083, China)

Abstract: [**Objective**] To express and purify the Pro - Pro - Glu (PPE) family protein Rv1168c of *Mycobacterium tuberculosis* in *E. coli*. and to study the structure of Rv1168c. [**Methods**] The Rv1168c gene was amplified by PCR from *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv strain genomic DNA and cloned into a prokaryotic expression vector pET32a The resulting recombinant expression plasmid pET32a-Rv1168c was then transformed into the *E. coli* strain DH5 α and a high-level expression *E. coli* BL21 (DE3) was established after induction with Isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside (IPTG). SDS-PAGE and mass spectrum analysis determined the relative molecular weight of this recombinant Rv1168c protein. It's secondary and 3D structures were determined by circular dichroism and homologous modeling. [**Results**] The *Mycobacterium tuberculosis* Rv1168c gene (971bp) and high purified recombinant Rv1168c protein was obtained. The relative molecular weight of recombinant Rv1168c protein was determined to be 51.5kDa (vector included). Secondary structure of Rv1168c had about 34.4% α helix, 33.7% β tune, 31.9% random coil at 25 $^{\circ}$ C. Homologous modeling shows Rv1168c as (β/α)₅ protein. [**Conclusion**] This study obtained purified recombinant Rv1168c protein and laid the foundation for exploration of the relationship between the structure and function of Rv1168c in the *tuberculosis*.

Keywords: *Mycobacterium tuberculosis*; Rv1168c; gene expression; purification; circular dichroism

(本文责编:张晓丽)

Supported by the National Mega-Projects of Science Research for the 11th Five Year Plan, China (2009ZX10004-313), the Shanghai Commission of Science and Technology, China(08410703800) and the HuBei Education Department, China(B20101701)

* Corresponding author. Tel: +86-21-63846590; Fax: +86-21-65648376; E-mail: shulinzhang@sjtu.edu.cn; hhwang@fudan.edu.cn

Received: 2 February 2010/Revised: 26 March 2010

《微生物学报》关于署名

经过本刊审查通过后即将发表的稿件,作者在修改时,如果对“作者或单位的署名”进行变更,与最初的投稿不同,本刊要求:作者必须再提供有关证明,否则不能生效!此项规定早已公布在本刊的网页上、并且在本刊的纸质出版物中也多次公布。请作者登陆本刊网页(<http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>),在首页内、“常见问题”中有显示,点开左侧的“署名”,其中有详细的说明和办理方法。

- (1) 如变单位署名顺序,需要原研究内容所属单位(通常是第一署名单位)的证明信,证明内容:原署名顺序→现署名顺序→盖章。
- (2) 如变更作者署名顺序,需要通讯作者和第一作者同意的签字证明。证明内容:原作者姓名及顺序→修改之后的作者姓名及顺序。
- (3) 将此证明信返回编辑部(邮寄原件或扫描后 E-mail 发来),新的变更即可生效。