

# 结核分枝杆菌膜蛋白的异源表达与纯化研究进展

廖 丹<sup>1</sup>, 谢建平<sup>1, 2\*</sup>, 王洪海<sup>2</sup>

(<sup>1</sup> 西南大学生命科学学院 现代生物医药研究所 重庆 400715)

(<sup>2</sup> 复旦大学生命科学院 遗传学研究所 遗传工程国家重点实验室 上海 200433)

**摘 要** 膜蛋白是一类与生物膜相互作用、具有重要功能和独特结构的蛋白质。异源表达纯化一直是了解膜蛋白结构和功能的重要瓶颈。结核分枝杆菌作为典型的胞内致病菌,其膜蛋白的研究具有很好的代表性以及重要意义。目前用于表达膜蛋白的有大肠杆菌、酵母、哺乳动物细胞等表达系统,但结核菌膜蛋白的表达宿主还往往局限于大肠杆菌。异源表达需要综合考虑蛋白的来源、疏水性、跨膜区等特性。低温、加入共表达因子以及改变培养条件有助于结核菌膜蛋白的可溶性表达。另外,包涵体复性也是获得结核菌目的膜蛋白的重要途径。随着新的表达系统,新的促可溶表达策略,新的包涵体复性手段,新的纯化方法的应用,将有更多的膜蛋白异源表达纯化成功,为蛋白质功能研究奠定基础。

**关键词**: 结核分枝杆菌;膜蛋白;异源表达;纯化

中图分类号: Q51, Q936 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209(2007)05-0932-05

对于一个有功能的细胞而言,膜蛋白的重要性是毋庸置疑的。据统计,膜蛋白的编码基因占整个基因组的 20% ~ 30%<sup>[1]</sup>,它们执行了包括跨膜运输、结构支撑、维持细胞电势、信号传递和代谢等重要的细胞功能。目前约有 70% 的药物以膜蛋白为作用靶点<sup>[2]</sup>,同时,很多诊断靶标以及疫苗分子都是膜蛋白。因此,无论在理论研究还是在实践应用方面,膜蛋白的异源表达和纯化都有重要意义。本文主要阐述针对结核菌膜蛋白结构和功能研究的异源表达纯化。

膜蛋白结构特殊、研究困难,在蛋白数据库(Protein Data-Bank)里能够获得结构数据的膜蛋白,仅占蛋白总数的 0.5%<sup>[3]</sup>。要进行结构研究,按目前的技术水平,需 10 ~ 数百 mg 的高纯度蛋白。要得到满足数量和纯度要求的蛋白,一般来说可以从以下四个方面来考虑:从天然蛋白中纯化;化学合成;体外表达系统表达分离;通过异源表达纯化得到。通常情况下,天然条件下膜蛋白的含量过低,分离纯化困难。而化学合成受肽链长度的限制,迄今未有成功合成膜蛋白的报道。体外表达系统是很有潜力的<sup>[4]</sup>,但它的成本高,而且缺乏必要的翻译后修饰,目前仍然没有大规模应用。异源表达仍是大多数人的首选途径。研究者对此作了大量的探索工作。

结核病目前依然是严重威胁人类健康的传染病之一,结核分枝杆菌(*Mycobacterium tuberculosis*,简称 MTB)是结核病致病菌,它的细胞被膜有独特的分子组成和结构,介导该菌的胞内寄生,参与宿主的免疫应答,并通过屏蔽或外排药物导致该菌的耐药性。研究它们的结构和功能为了解 MTB 的感染机理以及治疗结核病提供重要线索。同时,MTB 的膜蛋白

具有一定的代表性,它不仅具有原核生物中功能保守的膜蛋白,还有类似真核生物的膜蛋白,如:真核样的腺苷酸环化酶<sup>[5]</sup>、真核样 G 蛋白<sup>[6]</sup>等。所有已知的脂质、聚酮代谢途径在分枝杆菌中都有发现,MTB 的脂质、聚酮合成酶中,很多超出已知范围,研究它们还有可能获得新的脂质聚酮合成途径。因此,本文通过综述针对结构和功能研究的 MTB 膜蛋白异源表达与纯化,阐述膜蛋白对病原微生物研究的重要意义,为成功表达膜蛋白,提供了可供选择的方案及实例。

## 1 结核分枝杆菌膜蛋白的异源表达和纯化现状

1998 年 MTB 试验室菌株 H<sub>37</sub>Rv 的基因组测序完成以后,序列分析得到的 3924 个 ORF 中,预测有 1162 个是编码膜蛋白的<sup>[7]</sup>,其功能包括:能量代谢、大分子的合成和修饰、调控、降解、转运结合、毒力相关、细胞分裂、氨基酸合成、脂质合成、PE 和 PPE 家族、IS 元件、分子伴侣、细胞色素等 (<http://www.sanger.ac.uk>)

2002 年美国 National High Magnetic Field Laboratory 开展了 MTB 膜蛋白结构基因组计划(Membrane Protein Structural Genomics of *Mycobacterium tuberculosis*),拟以大肠杆菌(*Escherichia coli*)为异源宿主,表达所有的 MTB 膜蛋白,预计有 10% ~ 20% 的蛋白能够获得足够数量用以晶体结构分析。目前尝试表达了大约 300 多个膜蛋白,约有 50% 蛋白表达成功。(<http://magnet.fsu.edu/~mprotein/MBPweb>)。2005 年 Korepanova 等<sup>[7]</sup>同样利用大肠杆菌为宿主,以 pET 表达系统表达了 MTB 的 143 个膜蛋白,有 50% 的蛋白得到表达,25% 的蛋白表达量高。表 1 总结了异源表达成功的 MTB 膜蛋

基金项目: 国家重点基础研究发展规划项目(2002CB512804); 教育部科学技术研究重点项目(105146); 西南大学 211 微生物学科资助项目

\* 通讯作者。Tel: 86-23-68254062; Fax: 86-23-68252365; E-mail: georgex@swu.edu.cn

作者简介: 廖 丹(1981 - ),女,重庆人,硕士研究生,主要从事分子生物学与生物化学方面的研究。E-mail: liaodan@swu.edu.cn

收稿日期: 2007-02-13; 接受日期: 2007-04-30; 修回日期: 2007-07-09

白,不包括上述高通量表达的蛋白。

从表1可以看出,通过FtsX、真核样腺苷酸环化酶、Mce1A等分子的异源表达,对MTB的致病机理有了更进一步的了解。OmpATb、P55等分子表达成功,使结核菌的耐药

性研究进入分子水平。Hsp16.3分子是MTB的主要抗原。对这些膜蛋白功能的研究,为结核病提供了诊断试剂、疫苗候选分子以及潜在的药物靶标。

表1 异源表达的结核分枝杆菌膜蛋白

Table 1 The heterologous expression of membrane proteins from *Mycobacterium tuberculosis*

Protein name	Over expression host	Protein function	Expression situation	Transmembrane numbers
FtsX <sup>[8]</sup>	<i>Escherichia coli</i>	An ABC transporter type protein, involved in the assembly of potassium ion transport proteins; cell division and chromosome partitioning	MtFtsE and MtFtsX-6xHis proteins were found to exist as a complex on the membrane of <i>Escherichia coli</i> cells co-expressing the two proteins	4
cya <sup>[5]</sup>	<i>Escherichia coli</i> TP610 cya knockout mutant	Adenylyl cyclase	Recombinant cell membrane had the adenylyl cyclase activity	6
P55 <sup>[9]</sup>	<i>Mycobacterium smegmatis</i>	A multidrug efflux pump	P55 conferred recombinant aminoglycoside and tetracycline resistance	14
PPE37 <sup>[10]</sup>	<i>Mycobacterium smegmatis</i>	Belong to PPE family	Fusions of igr2 to lacZ were expressed in <i>Mycobacterium smegmatis</i>	6
OmpATb <sup>[11]</sup>	<i>Escherichia coli</i>	Behaved as a porin of low specific activity, with a pore diameter of 1.4 to 1.8 nm, and was also active in planar lipid bilayers, showing a single-channel conductance of 700 pS	Overexpression of the gene was toxic to the host, but limited amounts could be purified from cells before growth ceased	4
Mce1A <sup>[12]</sup>	<i>Escherichia coli</i>	Mediating <i>Mycobacterium</i> enter into host cells	Recombinant had the invasive activity	2
MscL <sup>[13]</sup>	<i>Escherichia coli</i> mscL knockout mutant	Mechanosensitive channel of large conductance	Structure of the MscL was determined by x-ray crystallography to 3.5 angstroms resolution.	2
Hsp16.3 <sup>[14]</sup>	<i>Escherichia coli</i> BL21	A small heat shock protein, a major membrane protein	Fusions of hsp16.3 to His tag were expressed successfully	1

## 2 膜蛋白的异源表达策略

膜蛋白的异源表达纯化过程是比较困难的,因为膜蛋白的正确折叠依赖信号识别蛋白(signal recognition particle)以及分子伴侣(Molecular Chaperon)。MTB的信号识别蛋白有FtsY、Ffh(Fifty-four homolog)等,分子伴侣有HSP(hot shock protein)家族、CSF(cold shock protein)家族等。异源表达膜蛋白时,缺乏这些信号分子以及分子伴侣难以形成正确高级结构;另外,膜蛋白的功能与结构都与细胞膜息息相关,在异源宿主中,不会有膜的膜空间可以提供给这些“额外”的膜蛋白,某些膜蛋白对异源宿主有毒性作用;有的膜蛋白由于宿主蛋白酶的影响,在宿主胞内不稳定。为克服这些不利因素,成功获得的异源表达,本文介绍了以下策略,适用于包括MTB在内的所有膜蛋白。

### 2.1 膜蛋白的表达系统

很多蛋白表达系统被尝试用于膜蛋白的表达。MTB的膜蛋白用到的异源表达系统多为大肠杆菌和耻垢分枝杆菌。

大肠杆菌表达系统是最常用的。其优点是方便、快捷、便宜。缺点是缺乏必要的分子伴侣、翻译后修饰系统以及形成正确膜蛋白构象必须的细胞膜成分<sup>[15]</sup>。筛选大肠杆菌的一些突变株可能更适合表达膜蛋白,如BL21(DE3)菌株的突

变菌株C41(DE3)、C43(DE3),它们能表达在BL21(DE3)中难于高水平表达的膜蛋白<sup>[16]</sup>。研究显示,用这些突变株表达异源膜蛋白时,增生出大量的细胞内膜,且这些细胞内膜的脂质成分与质膜的成分不同,这可能是它们能够较好的表达膜蛋白的原因之一。膜蛋白功能基因组计划中,选用的大肠杆菌菌株即为C43(DE3)表达了约300多个MTB膜蛋白,成功表达率达50%(<http://magnet.fsu.edu/~mprotein/MBPweb>)。

MTB膜蛋白表达中很多用到耻垢分枝杆菌(*Mycobacterium smegmatis*)是利用了它与结核分枝杆菌同属于分枝杆菌,但又无毒的特性。因为异源表达纯化膜蛋白的困难性,很多研究者都选择了避免膜蛋白的纯化,直接在异源表达的宿主中研究蛋白的功能。

目前用于表达膜蛋白的系统还有乳酸乳球菌(*Lactococcus lactis*)、酵母(yeast)、昆虫细胞(insect cell)以及哺乳动物细胞(mammalian cells)等,尽管目前没有找到用他们来表达MTB膜蛋白的例子,但可以对以后MTB膜蛋白的表达提供思路。以乳酸乳球菌作为宿主表达异源膜蛋白时,表达量能达到几十~几个mg/L<sup>[17]</sup>。它已经用于原核和真核膜蛋白的异源表达。有意思的是,在乳酸乳球菌中没有发现包涵体的存在<sup>[17]</sup>。另外,一种古菌嗜盐杆菌(*Halobacterium salinarum*)作为宿主表达细菌视紫红质可以达到每升培养物产生30mg蛋

白的产量<sup>[18]</sup>。推测其他好几种膜蛋白在这种嗜盐杆菌中也有相似的表达量<sup>[18]</sup>,因此它们作为表达膜蛋白的宿主是很有潜力的。

很多真核膜蛋白用原核表达系统效果欠佳。真核表达系统成为一种重要选择。鉴于 MTB 膜蛋白中有类似真核的分子,以及 MTB 真核细胞内寄生的特性,用真核表达系统也不失为一种选择。单细胞真核生物酵母是一种重要的表达宿主,在表达 MTB 的抗原 CFP32 时,用甲醇酵母(*Pichia pastoris*)表达得到的重组蛋白比用大肠杆菌表达的蛋白在结核病人血清中引起更强的免疫反应<sup>[19]</sup>,说明通过酵母表达系统获得的重组蛋白具有更完整的抗原表位及三级结构。CFP32 是分泌蛋白,同膜蛋白一样,在蛋白翻译及分选过程中都需要跨越细胞膜,这为我们通过真核表达系统获得 MTB 膜蛋白的设想提供有利的证据。表 2 为其它表达膜蛋白的宿主。

表 2 用于膜蛋白表达的宿主

Table 2 Membrane protein overexpression host

Host	Vector and strain	Example
<i>Escherichia Coli</i>	C4( DE3 ) / C4X( DE3 )	uncoupling protein <sup>[20]</sup>
	BL2( DE3 ) - pET system	Na <sup>+</sup> -dependent citrate carrier of <i>K. pneumoniae</i> <sup>[21]</sup>
	Sø6645-pAG1 system	dihydroorotate dehydrogenase <sup>[20]</sup>
<i>Lactococcus lactis</i>	Strain: NZ9000	CorA Metal Ion Transporter form
	Plasmid: pNZ8048	<i>A. aeolicus</i> <sup>[22]</sup>
<i>Halobacterium salinarum</i>		Bacteriorhodopsin <sup>[18]</sup>
yeast	Strain: <i>Pichia pastoris</i> Plasmid: pPICZB; pPICZ αC	rat voltage-gated shaker K <sup>+</sup> channel Kv1.2 <sup>[23]</sup> ; GPCRs <sup>[24]</sup>
insect cell	Cell line: Sf9; fly eye EMBO Vector: <i>Baculovirus</i>	emerin <sup>[25]</sup> ; metabotropic glutamate receptor <sup>[26]</sup>
mammalian cells	Cell line: pCytIS; T-Rex; MEL; Imi270 and Coca270	The rat serotonin transporter <sup>[27]</sup>

## 2.2 增加膜蛋白在宿主胞内的可溶性表达策略

在异源表达体系中,往往形成无功能的蛋白堆积,表现为包涵体的形式,从包涵体中获得膜蛋白要通过复性这一步骤,不能成功复性的膜蛋白占有相当的数量<sup>[28]</sup>,因此通过增加异源表达蛋白的可溶性以提高蛋白产量是一条获得膜蛋白的重要途径。

**2.2.1 通过低温表达蛋白** 在我们的研究中,用大肠杆菌为宿主,表达了结核分枝杆菌的膜蛋白 Rv0621,表达过程中发现,以 37℃ 诱导没有可溶蛋白表达,而在 20℃ 诱导表达有约 50% 的蛋白以可溶形式表达出来。这是因为低温降低表达速度,有利于蛋白折叠<sup>[29]</sup>;常温时热休克蛋白酶的活性高,导致异源表达蛋白降解,而低温下,该蛋白酶活性较低,利于异源表达蛋白在宿主胞内的稳定性<sup>[30]</sup>。目前启动子 *cspA*<sup>[31]</sup> 能在低温下诱导蛋白表达。而耐寒细菌分子伴侣的应用,使大肠杆菌能在 4℃ 时生长速度不受影响<sup>[32]</sup>。有力的促进了

低温促溶方法的应用。

**2.2.2 通过共表达因子来表达蛋白** MTB 膜蛋白 FtsX,单独表达时,以包涵体形式存在,与 FtsE 共表达时,他们以复合物的形式表达在大肠杆菌的细胞膜上<sup>[8]</sup>。因为有些膜蛋白是与其他蛋白相互作用形成复合物发挥作用的,通过共表达他的伙伴蛋白有助于蛋白质的可溶表达。除此之外,还有分子伴侣能帮助重组蛋白的折叠,大肠杆菌的分子伴侣,如: DnaK 介导蛋白溶解、GroEL 防止蛋白聚集。小的热休克蛋白 IbpA 以及 IbpB 保护蛋白不热变性。与它们共表达能实现膜蛋白的可溶性异源表达。

**2.2.3 改变培养条件来获得可溶蛋白** 细胞生长所需的所有营养是在培养开始前统一加入的,随着细胞的生长,有一种因素就会成为蛋白产量的限制性因素,例如: pH 的改变、溶氧的变化、培养基的消耗等。诸多代谢途径产生抑制物的堆积也是限制性因素的一类。在一个连续的培养过程中,能源物质的浓度可以依据过程中消耗的量来进行补充,调节其它因素也能获得更多的产物。此法适用于大规模发酵生产。

## 2.3 通过包涵体复性的方法获得膜蛋白

当膜蛋白没有可溶性表达或表达量太少不能达后续纯化步骤的要求时,可以考虑采用包涵体复性的方法。分子量小的膜蛋白复性成功率要高些。分子量从 1 万到 8 万之间的膜蛋白有成功的例子<sup>[33,34]</sup>。MTB 膜蛋白 DAGK 即是通过包涵体复性的方法得到足够的样品进行核磁共振( nuclear magnetic resonance )分析的。( <http://magnet.fsu.edu/~mprotein/MBPweb> )

通过包涵体复性得到膜蛋白的步骤主要有分离包涵体;通过尿素、盐酸胍等变性剂溶解蛋白,如有需要加入强去垢剂促溶,加入磷脂,去垢剂混合物,去除变性剂使蛋白复性。有意思的是,有研究表明通过包涵体复性得到的蛋白比通过细胞膜上分离纯化得到的蛋白产生的晶体得到的分辨率更高<sup>[35]</sup>。但必须知道,摸索包涵体复性条件操作繁琐,并且复性成功的膜蛋白数量有限。目前对于包涵体形成以及蛋白质复性的分子机理尚未完全明了,所有成功的复性都是建立在大量选择优化实验的基础上。没有固定的方案可以适用所有的蛋白。目前基于蛋白拓扑学、动力学以及工程学的研究为膜蛋白的体外折叠提供理论数据,生物信息学为蛋白质体外复性构建模型以及提供最佳复性条件。当细胞膜环境能够很好模拟,折叠过程的分子动力学过程能得到控制,通过包涵体复性获得膜蛋白将是一条重要的途径。

## 3 膜蛋白的纯化

### 3.1 胞内功能性表达膜蛋白的纯化

膜蛋白的纯化包括分离细胞膜,选择合适的去垢剂解构膜的脂双层分子结构,释放膜蛋白,亲和,凝胶或离子交换层析纯化蛋白这几个主要步骤。但也有直接用去垢剂溶解细胞,再用亲和层析的方法得到目的蛋白的。例如已经完成了晶体结构测定的 MTB 机械感受通道蛋白 MscL,它的纯化步骤就是先将 1 ~ 2kg 诱导的重组细胞溶解在含有 1.0% 的 DDM( dodecyl-β-D-maltoside )中,使蛋白溶解,再在含有 0.1% 的 DDM 溶液中,通过亲和层析,离子交换以及凝胶层析

纯化得到足够纯度的蛋白质。得到的晶体结构分辨率能达到  $3.5\text{\AA}$ <sup>[13]</sup>。

### 3.2 包涵体复性得到膜蛋白的纯化

有些蛋白在较高的尿素浓度下,仍能结合在离子交换柱上,故能在变性的情况下纯化。但大多数蛋白是在完成变性的过程后,再进行纯化。通过凝胶过滤可以使折叠错误的蛋白与正常蛋白分开,因为它们之间构象的差异导致了分子流动力学半径的不同<sup>[36]</sup>。离子交换层析对某些膜蛋白也有一定的作用,同样也是由于构象的不同导致蛋白净电荷的差异<sup>[34]</sup>。

### 3.3 去垢剂的选择

去垢剂的选择对于膜蛋白的纯化非常重要,要选择能够破坏细胞膜的脂双分子层,且又能保持膜蛋白不变性的去垢剂,通常需要一系列的试验确定它们的剂量以及种类。用一些短链的去垢剂可能增加蛋白与蛋白间的相互作用,有利于蛋白结晶,但大多数去垢剂导致蛋白聚合,并且会影响后来的纯化步骤<sup>[37]</sup>。一般来说,能否选择到合适的去垢剂,是膜蛋白能否纯化成功的关键。

结核分枝杆菌是威胁人类健康的主要病原微生物之一,众多的研究者对其的致病机理以及防治措施进行了长期的研究。它的膜蛋白在预防、诊断和治疗结核病中起到的重要作用,一直是研究的重点。为了获得膜蛋白的结构以及功能相关的信息,获得足够数量的膜蛋白是必须的。

目前适合膜蛋白的表达系统的发展很快,已有系统不断优化,新表达系统日益增多。共表达因子、有助于蛋白质胞内正确折叠的分子等都可能提高表达效率。蛋白拓扑学、动力学以及工程学的发展将促进包涵体更好复性。表达系统、促溶手段、包涵体复性等技术的不断更新,细胞生物学、蛋白质工程学以及生物信息学、结构生物学等学科的长足进步,都有望用来突破膜蛋白异源表达与纯化的难题,促进结核菌等胞内致病菌的膜蛋白的基础和应用研究。

### 参 考 文 献

- [1] Krogh A, Larsson B, von Heijne G, et al. Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes. *J Mol Biol*, 2001, **305**: 567–580.
- [2] Stahlberg H, Fotiadisa D, Scheuringa S, et al. Two-dimensional crystals: a powerful approach to access structure, function and dynamics of membrane proteins. *FEBS Lett*, 2001, **504**: 166–172.
- [3] White SH. The progress of membrane protein structure determination. *Protein Sci*, 2004, **13**: 1948–1949.
- [4] Schwarz D, Lhr F, Schneider B, et al. Cell-free expression as an emerging technique for the large scale production of integral membrane protein. *FEBS Journal*, 2006, **273**: 4141–4153.
- [5] Reddy SK, Kamireddi M, Dhanireddy K, et al. Eukaryotic-like adenylyl cyclases in *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv: cloning and characterization. *JBiolChem*, 2001, **276**: 35141–35149.
- [6] Shankar S, Kapatral V, Chakrabarty AM. Mammalian heterotrimeric G-protein-like proteins in mycobacteria: implications for cell signaling and survival in eukaryotic host cells. *Mol Microbiol*, 1997, **26**: 607–618.
- [7] Korepanova A, Gao FP, Hua Y, et al. Cross TA Cloning and expression of multiple integral membrane proteins from *Mycobacterium tuberculosis* in *Escherichia coli*. *Protein Sci*, 2005, **14**: 148–158.
- [8] Mir MA, Rajeswari HS, Veeraghavan U, et al. Molecular characterisation of ABC transporter type FtsE and FtsX proteins of *Mycobacterium tuberculosis*. *Arch Microbiol*, 2006, **185**: 147–158.
- [9] Silva PE, Bigi F, Santangelo MP, et al. Characterization of P55, a multidrug efflux pump in *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother*, 2001, **45**: 800–804.
- [10] Rodriguez GM, Gold B, Gomez M, et al. Identification and characterization of two divergently transcribed iron regulated genes in *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuber Lung Dis*, 1999, **79**: 382.
- [11] Senaratne RH, Mobasheri H, Papavinasundaram KG, et al. Expression of a gene for a porin-like protein of the OmpA family from *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. *J Bacteriol*, 1998, **180**: 3541–3547.
- [12] Lu S, Tager LA, Chitale S, et al. A cell-penetrating peptide derived from mammalian cell uptake protein of *Mycobacterium tuberculosis*. *Anal Biochem*, 2006, **353**: 7–14.
- [13] Chang G, Spencer RH, Lee AT, et al. Structure of the MscL homolog from *Mycobacterium tuberculosis*: a gated mechanosensitive ion channel. *Science*, 1998, **282**: 2220–2226.
- [14] Zhang H, Fu X, Jiao W, et al. The association of small heat shock protein Hsp16.3 with the plasma membrane of *Mycobacterium tuberculosis*: dissociation of oligomers is a prerequisite. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005, **330**: 1055–1061.
- [15] Daley DO, Rapp M, Granseth E, et al. Global Topology Analysis of the *Escherichia coli* Inner Membrane Proteome. *Science*, 2005, **308**: 1321–1323.
- [16] Arechaga I, Miroux B, Karrasch S, et al. Characterisation of new intracellular membranes in *Escherichia coli* accompanying large scale over-production of the b subunit of F<sub>1</sub>F<sub>0</sub> ATP synthase. *FEBS Lett*, 2000, **482**: 215–219.
- [17] Edmund RS, Kunji, Slotboom DJ, et al. *Lactococcus lactis* as host for overproduction of functional membrane proteins. *Biochim Biophys Acta*, 2003, **1610**: 97–108.
- [18] Turner GJ, Reusch R, Winter-Vann AM, et al. Heterologous gene expression in a membrane-protein-specific system. *Protein Expr Purif*, 1999, **17**: 312–323.
- [19] Benabdesselem C, Fathallah DM, Huard RC, et al. Enhanced patient serum immunoreactivity to recombinant *Mycobacterium tuberculosis* CFP32 produced in the yeast *Pichia pastoris* compared to *Escherichia coli* and its potential for serodiagnosis of tuberculosis. *J Clin Microbiol*, 2006, **44**: 3086–3093.
- [20] Selinsky BS. Membrane protein protocols: expression, purification, and characterization. 1<sup>st</sup> ed. Totowa, New Jersey: Humana Press, 2003.
- [21] Kastner CN, Dimroth P, Pos KM. The Na<sup>+</sup>-dependent citrate carrier of *Klebsiella pneumoniae*: high-level expression and site-directed mutagenesis of asparagine-185 and glutamate-194. *Arch Microbiol*, 2000, **174**: 67–73.
- [22] Surade S, Klein M, Bergner PC, et al. Comparative analysis and “expression space” coverage of the production of prokaryotic membrane proteins for structural genomics *Protein Sci*, 2006, **15**: 2178–2189.
- [23] Long SB, Campbell EB, Mackinnon R. Crystal structure of a mammalian voltage-dependent Shaker family K<sup>+</sup> channel. *Science*, 2005, **309**: 897–903.

- [ 24 ] Zeder-Lutz G , Cherouati N , Reinhart C , *et al.* Dot-blot immunodetection as a versatile and high-throughput assay to evaluate recombinant GPCRs produced in the yeast *Pichia pastoris*. *Protein Expr Purif* , 2006 , **50** : 118 – 127.
- [ 25 ] Roberts RC , Smith AJ , Wheeler MA , *et al.* The Emery Dreifuss muscular dystrophy associated-protein emerin is phosphorylated on serine 49 by protein kinase A. *FEBS Journal* , 2006 , **273** : 4562 – 4575.
- [ 26 ] Eroglu C , Cronet P , Panneels V , *et al.* Functional reconstitution of purified metabotropic glutamate receptor expressed in the fly eye. *EMBO Rep* , 2002 , **3** : 491 – 496.
- [ 27 ] Christopher GT , Haase J , Baker C , *et al.* Comparison of seven different heterologous protein expression systems for the production of the serotonin transporter. *Biochim Biophys Acta* 2003 , 1610 : 141 – 153.
- [ 28 ] Drew D , Froderberg L , Baars L , *et al.* Assembly and overexpression of membrane proteins in *Escherichia coli*. *Biochim Biophys Acta* , 2003 , **1610** , 3 – 10.
- [ 29 ] Weickert MJ , Doherty DH , Best EA , *et al.* Optimization of heterologous protein production in *Escherichia coli*. *Curr Opin Biotechnol* , 1996 , **7** : 494 – 499.
- [ 30 ] Chesshyre JA , Hipkiss AR. Low temperatures stabilize interferon  $\alpha$ -2 against proteolysis in *Methylophilus methylotrophus* and *Escherichia coli*. *Appl Microbiol Biotechnol* , 1989 , 31 : 158 – 162.
- [ 31 ] Mujacic M , Cooper KW , Baneyx F. Cold-inducible cloning vectors for low-temperature protein expression in *Escherichia coli* : application to the production of a toxic and proteolytically sensitive fusion protein. *Gene* , 1999 , 238 : 325 – 332.
- [ 32 ] Ferrer M , Chemikova TN , Timmis KN , *et al.* Expression of a temperature sensitive esterase in a novel chaperone based *Escherichia coli* strain. *Appl Environ Microbiol* , 2004 , 70 : 4499 – 4504.
- [ 33 ] Pautsch A , Vogt J , Model K , *et al.* Strategy for membrane protein crystallization exemplified with OmpA and OmpX , *Proteins : Struct Funct Genet* , 1999 , **34** : 167 – 172.
- [ 34 ] Buchanan SK. Overexpression and refolding of an 80-kDa iron transporter from the outer membrane of *Escherichia coli*. *Biochem Soc Trans* , 1999 , **27** : 903 – 908.
- [ 35 ] Blaauw M , Dekker N , Verheij HM. *et al.* Crystallization and preliminary X-ray analysis of outer membrane phospholipase A from *Escherichia coli* , *FEBS Lett* . 1995 , **373** : 10 – 12.
- [ 36 ] Prince SM , Feron C , Janssens D , *et al.* Expression , refolding and crystallization of the OpcA invasin from *Neisseria meningitidis* . *Acta Crystallogr* , 2001 , **57** : 1164 – 1166.
- [ 37 ] Fyfe PK , Hughes AV , Heathcote P. *et al.* Proteins , chlorophylls and lipids : X-ray analysis of a three-way relationship. *Trends Plant Sci* , 2005 , **10** : 275 – 282.

## The heterologous expression and purification of membrane protein from *Mycobacterium tuberculosis*

LIAO Dan<sup>1</sup> , XIE Jian-ping<sup>1,2\*</sup> , WANG Hong-hai<sup>2</sup>

<sup>(1)</sup> Institute of Modern Biopharmaceuticals , School of Life Sciences , Southwest University , Chongqing , 400715 , China )

<sup>(2)</sup> State Key Laboratory of Genetic Engineering , Institute of Genetics , School of Life Sciences , Fudan University , Shanghai 200433 , China )

**Abstract** : Membrane proteins fulfill a wide range of central functions in the cell , but their structure determination remains one of the great challenges in structural biology. The heterologous overexpression is a demanding task. Here , we provide an overview of recent advance to heterologous expression and purification of membrane protein from *Mycobacterium tuberculosis* , whose membrane proteins represent the majority of the new potential drug targets in this bacillus , which is ranked as the number1 cause of infectious disease mortality in the world. A detailed structural and functional understanding of the membranes protein of *Mycobacterium tuberculosis* will be critical both for an understanding of the biology of infection and for the rational development of novel therapeutics. The procedures for functional expression followed by purification of membranes protein are reviewed here together with nonfunctional expression in inclusion bodies and subsequent refolding to produce functional proteins. The new expression systems , new approaches to soluble expression of recombinant proteins , new methods for membrane protein folding *in vitro* and new purification technology will provide a basis for choosing the best expression and purification protocol for a given membrane protein. The goal of this review is to aid researchers in the choice of a suitable expression system for their favourite proteins and make overproduction of functional membrane proteins becomes easier.

**Keywords** : *Mycobacterium tuberculosis* ; membrane protein ; heterologous expression ; purification

Foundation item : Key Project of China National Programs for Fundamental Research and Development ( 973 program 2002CB512804 ) ; Key project of MOE ( 105146 ) ; 211 microbiology project of SWU.

\* Corresponding author. Tel : 86-23-68254062 ; Fax : 86-23-68252365 ; E-mail : georgex@swu.edu.cn

Received : 13 February 2007 / Accepted 30 April 2007 / Revised : 7 July 2007