

牛结核分支杆菌 MB1916c 基因的克隆和原核表达

郝俊峰 赵德明

(中国农业大学 动物医学院/ 国家动物海绵状脑病实验室, 北京 100094)

摘要 构建牛结核分支杆菌 *MB1916c* 的原核表达载体, 获得了高纯度的融和表达蛋白。以牛结核分支杆菌 DNA 为模板, 利用 PCR 方法扩增出牛结核分支杆菌 *MB1916c* 基因片段, 将回收纯化后的产物克隆到 pGEM-T 载体, 测序分析鉴定为阳性的质粒, 经 *Sac* / *Kpn* 双酶切后与同样条件下双酶切后的 pET-30a(+) 载体连接, 再转化到 *E. coli* BL21(DE3) 表达菌株中, 经菌落 PCR 快速筛选克隆, 以 *Sac* / *Kpn* 双酶切和测序分析鉴定。确定正确的阳性菌株 IPTG 诱导后, 收集菌体进行 SDS-PAGE 和 Western-blotting 分析。结果显示: 以牛结核分支杆菌 DNA 为模板, PCR 后得到了 *MB1916c* 目的基因片段, 经克隆、亚克隆、序列分析和 *Sac* / *Kpn* 双酶切鉴定, 获得了牛结核分支杆菌 *MB1916c* 原核表达菌株, IPTG 诱导表达后, SDS-PAGE 分析可见约 26 ku 蛋白表达条带, Western-blotting 分析证实所获得的蛋白具有牛结核分支杆菌的抗原性。本实验构建了 pET-30a(+)-*MB1916c* 原核表达载体, 得到融合 6 个组氨酸残基的 *MB1916c* 蛋白纯度大于 95%, 为进一步研究其结构和功能奠定了基础。

关键词 牛结核分支杆菌; 促复苏因子 C; *MB1916c* 基因; 原核表达

中图分类号 S 851. 618

文章编号 1007-4333(2006)06-0001-06

文献标识码 A

Cloning and prokaryotic expression of *Mycobacterium bovis* MB1916c gene

Hao Junfeng, Zhao Deming

(College of Veterinary Medicine, China Agricultural University / National Animal TSE Laboratory, Beijing 100094, China)

Abstract To obtain fusion protein with high purity of *Mycobacterium bovis* resuscitation promoting factor C, the recombinant prokaryotic expression vector for MB1916c gene encoding resuscitation promoting factor C was successfully constructed. The MB1916c gene encoding protein was amplified by PCR technique from *M. bovis* genomic DNA. PCR production was cloned into sequencing vector pGEM-T. After correcting the sequence, pGEM-T-MB1916c and pET-30a(+) were digested by *Sac* and *Kpn* double enzyme. The prokaryotic expression vector pET-30a-MB1916c was constructed by using the purified MB1916c gene that was subcloned into the expression vector pET-30a(+). Plasmid containing pET-30a-MB1916c was transformed into competence *E. coli* BL21 (DE3). The bacterium was induced by IPTG and its lysates were analysed by SDS-PAGE and Western-blotting assay. We proved that its molecular weight was 26 ku and it possessed the antigenic activity of *M. bovis*. The prokaryotic expression vector pET-30a(+)-MB1916c gene was successfully constructed, and the high purity fused MB1916c protein with hexa-histidine tail at its N-terminal were obtained. These results could serve as a basis for further studies on the usefulness of the gene and its expression.

Key words *Mycobacterium bovis*; resuscitation promoting factor C; MB1916c gene; prokaryotic expression

结核分支杆菌初次感染机体后, 可在体内存活数月, 甚至数年之久, 是典型的在宿主细胞内以休眠状态寄居的病原微生物。通过化疗和增强患者的免

疫力可以有效地消除结核杆菌的感染, 但是不可能清除已侵入机体而处于休眠状态的病菌^[1-3]。

牛结核分支杆菌 *MB1916c* 基因是牛结核分支

收稿日期: 2006-09-05

基金项目: 博士后基金资助项目; 国家重点基础研究发展计划项目(2005CB23000)

作者简介: 郝俊峰, 博士后, 主要从事动物疾病病理的研究, E-mail: haojf@cau.edu.cn; 赵德明, 教授, 博士生导师, 通讯作者, 主要从事动物传染性海绵状脑病的研究, E-mail: zhaodm@cau.edu.cn

杆菌促复苏因子 (*Mycobacterium bovis* resuscitation promoting factor) 家族成员之一,是牛结核分支杆菌休眠体或者生长静止期细菌存活和恢复生长所必须的因子。细菌复苏促进因子 (resuscitation promoting factor-Rpf) 是第一个被发现的原核生物自分泌生长因子,是藤黄微球菌 (*Micrococcus luteus*) 的一种分泌性蛋白,具有促进休眠菌复苏或者细菌快速生长的作用。体外研究显示:浓度 10^{-9} mol/L 的 Rpf 就可起到生物活性作用^[478],且该因子普遍存在于放线菌门细菌中,如链霉菌、棒状杆菌、分枝杆菌等均有 Rpf 基因,但其他种类的细菌中则没有发现该基因^[5]。序列对比分析发现,在富含 G+C 的革兰氏阳性杆菌中普遍存在有 Rpf 基因,其中肺结核分支杆菌和牛结核分支杆菌发现有 5 种同族体 (RpfA-E)^[2,10711]。这些细菌的“细胞因子”可能会通过结合受体将信号传导给休眠体杆菌而发挥其重要的生物学调节功能。

Biketov 等^[1]发现结核分支杆菌被巨噬细胞吞噬后,大多数菌体由于受到损害或者处于休眠状态而转变为不可培养的细菌,但是,如果在培养基中加入浓度 10^{-9} mol/L 的促复苏因子蛋白,则可以促进菌体恢复为可培养状态。其他研究资料^[1,1214]也表明:结核分支杆菌促复苏因子家族具有与藤黄微球菌类似的作用,可促进休眠体或无增殖能力的细菌的活化和生长。

Rpf 基因是藤黄微球菌的关键基因,如果剔除该基因,细菌就无法生存^[78,1516];但是对于含有 5 个促复苏因子基因的肺结核分支杆菌来说,情况较为复杂。Tufariello 等^[17]将结核分支杆菌 H₃₇Rv 株的 5 个基因分别剔除,构建单突变株后分析其表型特征,结果发现:剔除任何单一 Rpf 基因,不影响细菌在液体培养基中的生长,但在菌落形成能力和菌落形态方面有一定程度的变化,说明 5 个 Rpf 因子可能存在功能冗余。Downing 等^[1213]对结核分支杆菌的 5 个 Rpf 基因进行了多基因的剔除,构建 2 种多基因突变株 KDT8 (RpfA、RpfC 和 RpfB 基因被剔除) 和 KDT9 (RpfA、RpfC 和 RpfD 基因被剔除),结果显示:菌株表型发生了明显变化,对小鼠感染模型的毒力减弱,在体外也不能自发地复苏,这说明肺结核分支杆菌有 3/5 的 Rpf 基因被剔除就会影响在其机体内的生长和体外的复苏,可见 5 个 Rpf 基因并非完全功能冗余。如果在培养基中加入促复苏因子的抗体,则可以抑制休眠体的复苏和

生长。Yeremeev 等^[18]研究显示:利用促复苏因子蛋白制备的亚单位疫苗免疫小鼠,通过免疫学研究和强毒攻击实验发现,促复苏因子可以很好的保护小鼠 H₃₇Rv 毒株的攻击,降低脾脏和肺脏内的载菌量,说明促复苏因子蛋白具有良好的免疫学特性。Martin^[10]等研究也从结构方面证实肺结核分支杆菌促复苏因子具有溶菌酶的特性。

上述多方面的研究提示:促复苏因子不仅在休眠体或无增殖能力的细菌的复苏活化过程中具有非常重要的调节作用,而且其在结核分支杆菌的防治以及新型疫苗的研发中具有无可估量的应用价值,掌握结核分支杆菌 Rpf 参与体内外结核分支杆菌的潜伏——重新活化过程,将有助于更进一步的研究和阐述结核分支杆菌的致病和免疫逃避机制。本研究成功构建了 MB1916c 原核表达质粒,建立了重组融合蛋白表达的最佳条件,制备了高纯度的融和蛋白,为进一步研究其生物学特性、功能及探讨其潜在的应用价值奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1) 菌株。牛分支杆菌菌株 (C68-2) 由中国兽药监察所提供。

2) 质粒与宿主菌。PGEM-T easy 载体购自 Promega;pET30a(+)、DH5 和 BL21 (DE3) 由本实验室保存。

3) 主要试剂。Sac 酶、Kpn 酶、T₄DNA 连接酶 (NEB 公司);E. Z. N. A^(R) Gel Extraction Kit 和 E. Z. N. A^(R) Plasmid Mini Kit (OMEGA 公司);革兰氏阳性细菌基因组 DNA 小量快速提取试剂盒 (博大泰克生物基因技术有限公司);DL-2000、IPTG、DNTP、Ex-Taq 酶、氨苄青霉素和 X-gal (大连宝生物公司)。

1.2 方法

1) PCR 引物设计。根据 GeneBank 中牛结核分支杆菌 (*Mycobacterium bovis* AF2122/97) 基因组核酸序列 (登录号:NC-002945)。自行一对扩增 MB1916c 基因的引物序列,上游引物 P1 为:5'-TAGGTACC GTGCA TCCTTTGCCGGC-3',下游引物 P2 为:5'-TTGAGCTCTCA GCGCGGAA TACTTG-CCT-3'。在上下游引物 5 端分别引入 Sac / Kpn 酶切位点和 2 个保护碱基,以便于酶切和克隆,引物由上海生工生物工程技术有限公司合成。

2) 牛结核分支杆菌基因组的提取。将牛结核分支杆菌接种于改良罗氏培养基中培养,7周后按照革兰氏阳性细菌基因组 DNA 小量快速提取试剂盒提供的说明书进行 DNA 的提取。

3) *MB1916c* 基因的 PCR 扩增及产物的纯化。以牛结核分支杆菌染色体 DNA 为模板,以 P1、P2 为引物,对 *MB1916c* 基因进行 PCR 扩增。扩增条件为:95 5 min;94 1 min、56 1 min、72 1 min,共 30 个循环;72 延伸 10 min。PCR 产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳分析,并按照 DNA 胶回收纯化试剂盒的说明进行纯化、回收。

4) *MB1916c* 基因与 pGEM-T easy 载体的连接、转化及其鉴定。在 T₄ DNA 连接酶的作用下,纯化的 PCR 产物与 pGEM-T easy 载体于 4 连接 16 h,构建重组质粒 pGEM-T-MB1916c,再将其转化至 *E. coli* DH5 感受态细胞,涂布于含有 X-Gal 和 IPTG 的 LB (100 mg/mL 氨苄青霉素) 培养平板中,37 培养过夜、筛选。挑选阳性克隆接种至含有 100 μg/mL 氨苄青霉素的 5 mL LB 液体培养基中振荡培养 12~16 h,于 1.5 mL 离心管无菌取培养好的细菌 2 份,1 份用于提取质粒,进行双酶切鉴定,另 1 份同时送至上海英俊生物技术有限公司进行测序,正确的重组质粒命名为 pGEM-T-MB1916c。

5) *MB1916c* 基因原核表达载体的构建和鉴定。将测序正确的阳性质粒经 *Sac* / *Kpn* 双酶切后,与经过 *Sac* / *Kpn* 双酶切的 pET-30a(+) 连接于 20 连接 4 h 后,4 过夜,将连接产物转化到 *E. coli* BL21 (DE3) 菌株,涂布于 LB (含 100 μg/mL 卡那霉素) 琼脂平板。用合成的 PCR 引物做菌落 PCR,快速筛选克隆,所得克隆经 *Sac* / *Kpn* 双酶切及 DNA 测序鉴定,阳性克隆命名为 pET-30a(+)-MB1916c。

6) pET-30a(+)-MB1916c 融合蛋白的诱导表达。将原核表达阳性克隆接种于 5 mL 含卡那霉素的 LB 液体培养基中,37,200 r/min 培养过夜。取 2 mL 接种于含 100 mg/mL 卡那霉素的 LB 液体培养基中,37 250 r/min 培养至 A_{600} 为 0.6~0.8,加入不同终浓度的 IPTG (分别为 1、0.8、0.6、0.4 和 0.2 mmol/L) 来诱导表达,至 6 h 取菌液,以相同的方法诱导含有空 pET-30a(+) 的 *E. coli* BL21 (DE3) 6 h 作为对照。进行 12 g/100 mL SDS-PAGE,观察诱导表达情况。

7) 重组蛋白的纯化。将含有表达载体的宿主菌

接种到 LB 液体培养基,待菌生长到 A_{600} 约 0.8 时,加入终浓度为 1 mmol/L IPTG,28 诱导 6 h 后,取出菌液离心,菌体用裂解缓冲液 (50 mmol/L Tris-HCl, 0.5 mmol/L EDTA, 50 mmol/L NaCl, 5% (体积分数) 甘油, pH 8.0) 重悬,在冰浴条件下超声破碎,离心,将获得的包涵体蛋白依次用洗涤液 (含 10 mmol/L Tris-HCl, 0.2 mol/L 尿素, 0.5% (体积分数,下同) Triton X-100, 10 mmol/L EDTA, pH 8.0) 和洗涤液 (10 mmol/L Tris-HCl, 0.5% Triton X-100, 10 mmol/L EDTA, pH 8.0) 洗涤。然后用变性缓冲液 (8 mol/L 尿素, 0.5 mol/L NaCl, 20 mmol/L Tris-HCl, pH 7.8) 溶解,离心,取上清,将上清加入经 pH 7.8 的 8 mol/L 变性缓冲液平衡的 Ni-NTA 琼脂糖柱,4 条件下,结合 30 min,然后依次用 10~20 倍柱床体积的 pH 7.8、6.0 和 5.3 缓冲液洗涤 Ni-NTA 柱,洗去杂蛋白,最后用 pH 4.0 洗脱缓冲液洗脱含有 His-tag 的重组蛋白,分管收集,洗脱流速控制在 5~7 mL/h。

8) 蛋白质印迹分析。表达产物经 12% SDS-PAGE 分析后,按分子克隆所述方法,以 BIO-RAD 系统电转至 PVDF 膜上进行免疫染色,经牛血清白蛋白封闭后,依次加入兔抗牛分支杆菌阳性血清、辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔的抗体,最后在 3,3'-二氨基联苯胺 (DAB) 溶液中显色并观察结果。

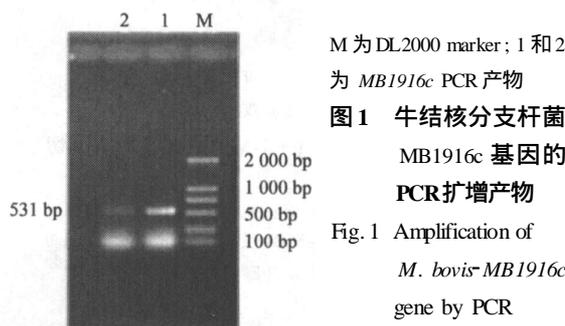
2 结果

2.1 *MB1916c* 基因扩增

以牛结核分支杆菌基因组 DNA 为模板,以 P1 和 P2 为引物进行 PCR 扩增,经 1 g/100 mL 琼脂糖凝胶电泳分析,可见 1 条 531 bp 的 DNA 片断 (图 1),与实验预期的目的 DNA 片断大小相一致。

2.2 pGEM-T-MB1916c 质粒构建和序列分析

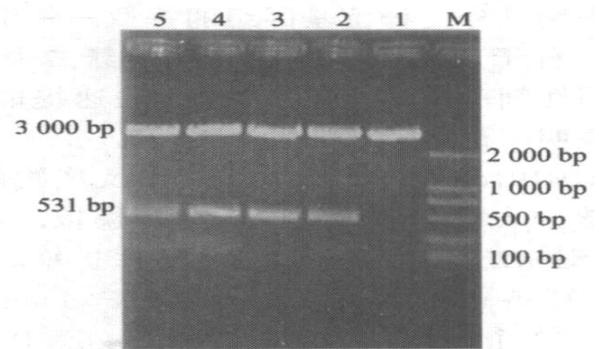
纯化后 *MB1916c* PCR 产物与 pGEM-T easy 载体连接后,经氨苄青霉素筛选及双酶切鉴定,1% 琼



脂糖凝胶电泳后可见约 3 000 bp 的 pGEM-T 线性片断和 531 bp 的插入片段(图 2)。序列分析证实(图 3),该 DNA 片断大小为 531 bp,与 GeneBank 中 *Mycobacterium bovis* AF2122/97 株 MB1916c 基因序列同源性为 100%,序列分析显示该基因与 *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv 株 Rv1884c 同源性也为 100%。

2.3 pET-30a(+)-MB1916c 重组质粒构建和双酶切鉴定结果

pGEM-T-MB1916c 阳性质粒和 pET-30a(+) 质粒经 *Sac* / *Kpn* 双酶切,纯化回收、连接和转化后,构建了 pET-30a(+)-MB1916c 重组质粒,菌落 PCR 快速筛选后的质粒,通过 *Sac* / *Kpn*



M 为 DL2000 marker;1 为阴性质粒;2~5 为阳性重组质粒双酶切结果

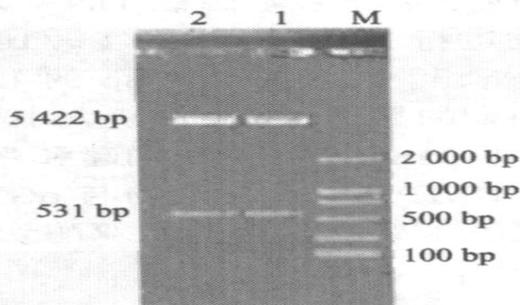
图 2 重组 pGEM-T-MB1916c 质粒双酶切电泳图
Fig. 2 Identification of recombinant clone pGEM-T-MB1916c by *Sac* and *Kpn* digestion

```
GTGCATCCTTTGCCGCCGACCACGGCCGGTGCCTGCAATAGACACCCGATCTCACCCTCTCTCT
AATCGGTAACGCTTCGGCCACTTCCGGCGATATGTCGAGCATGACAA GAA TCGCCAAGCCGCTCATCA
AGTCCGCCATGGCCGCA GGACTCGTCACGGCA TCCA TGTCGCTCTCCACCGCCGTTGCCACGCCGGT
CCCA GCCCGAACTGGGACGTCGTCGCGCA GTGCGAA TCCGGGGGCAACTGGGCGGCCAACACCGGA
AACGGCAAAATACGGCGGACTGCA GTTCAA GCCGGCCACCTGGGCCGCA TTCGGCGGTGTCGGCAACC
CAGCAGCTGCCTCTCGGGAACAACAAA TCGCAGTTGCCAATCGGGTTCGCGCAACA GGGATTGGA
CGCGTGGCCGACGTGCGGCCGCCCTCTGGCCTTCCGATCGCACTGTGGTCAAACCCGCGCA GGGC
ATCAA GCAAATCA TCAACGAGATCA TTTGGGCA GGCA TTCA GGCAA GTATTCCCGCGCTGA
```

图 3 MB1916c 测序结果

Fig. 3 Result of MB1916c by DNA sequencing

双酶切得到 5 422 bp 的线性 pET-30a(+) 片断和 531 bp 的插入片段(图 4)。菌落 PCR 鉴定也显示 531 bp 的 DNA 插入片段,序列分析进一步证实:成功构建了 pET-30a(+)-MB1916c 原核表达质粒和菌株。



M 为 DL2000 marker;1 和 2 为 pET-30a(+)-MB1916c 阳性重组质粒双酶切结果

图 4 重组 pET-30a(+)-MB1916c 质粒双酶切鉴定电泳图

Fig. 4 Identification of recombinant pET-30a(+)-MB1916c vectors by *Sac* and *Kpn* digestion

2.4 pET-30a(+)-MB1916c 融合蛋白的诱导表达及其纯化

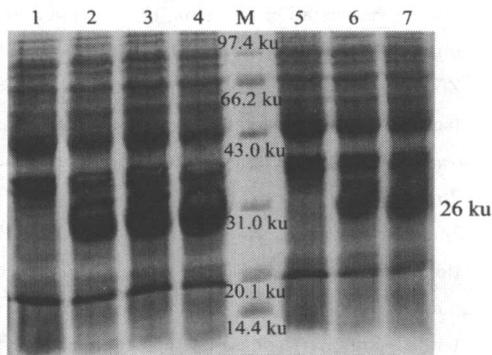
将鉴定正确的阳性克隆株在不同条件下进行诱导表达,12% SDS-PAGE 分析显示:28 250 r/min, IPTG 浓度为 1 mmol/L 条件下诱导 6 h 下,菌体表达量最大,约占菌体总蛋白 42.8%,结果在预期的分子质量 26 ku 处出现特异的、大量表达的蛋白条带(图 5);纯化的蛋白在 26 ku 处出现单一的条带,纯化率在 95% 以上结果(图 6)。

2.5 重组蛋白 Western-blotting 鉴定结果

Western-blotting 检测结果显示:重组菌株在 26 ku 处出现深色的目的条带(图 7),由此证明,重组菌株在 26 ku 处表达的特异性蛋白条带就是牛结核分支杆菌 MB1916c 重组蛋白。

3 讨论

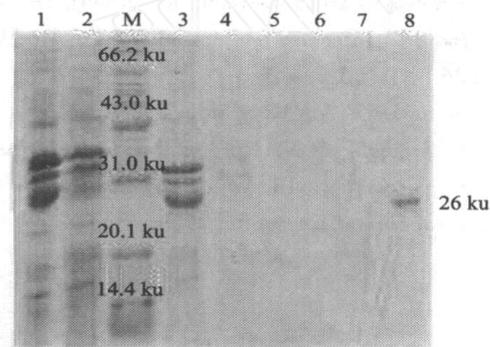
研究显示^[7,14]肺结核分支杆菌编码 5 个促复苏因子蛋白与革兰氏阳性藤黄微球菌复苏因子是异体同形,它们均能够促进休眠体或无培养特性的细菌生长和活化。虽然肺结核分支杆菌的持续存在和活



M 为低分子质量蛋白 Marker;1 和 5 为 pET-30a (+) 空白对照;2~4 和 6~7 为不同 IPTG(依次为 1、0.8、0.6、0.4 和 0.2 mmol/L) 诱导浓度的蛋白表达情况

图 5 重组 pET-30a(+)-MB1916c 融合蛋白 SDS-PAGE 分析

Fig. 5 SDS-PAGE analysis of expressed recombinant pET-30a(+)-MB1916c fusion protein

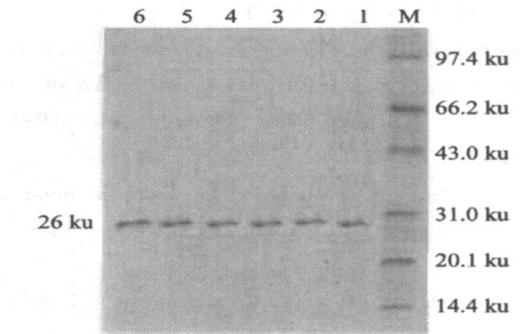


M 为低分子质量蛋白 Marker;1 为 pET-30a(+)-MB1916c 阳性菌液(阳性对照);2 为 pET-30a(+) 阴性菌液(空白对照);3 为溶解后的包涵体;4 为与 Ni-NTA 结合后流出液;5~8(依次为 pH7.8、6.0、5.3 和 4.0) 为用不同 pH 洗涤 Ni-NTA 后的流出液

图 6 重组 pET-30a(+)-MB1916c 融合表达蛋白纯化的 SDS-PAGE 分析

Fig. 6 SDS-PAGE analysis of purified recombinant pET-30a(+)-MB1916c fusion protein

化在该病的病理机制中具有重要的作用,但是促复苏因子在其中的生理学调节机理至今人们却知之甚少。本研究克隆、表达了牛分枝杆菌促复苏因子家族成员之一基因——*MB1916c* 基因,经过基因序列分析显示 *MB1916c* 基因由 531 bp,176 个氨基酸组成;SDS-PAGE 和 Western blotting 分析表明:MB1916c 重组蛋白可在大肠杆菌 BL21 中获得高效表达,并以包涵体的形式存在,表达量占菌体总量的 62.8%,大小约为 26 ku。IPTG 最佳诱导表达温度为 28℃,IPTG 终浓度为 1 mmol/L。此外,所表达的蛋白能够与兔抗牛结核分支杆菌阳性血清产生特



M 为预染蛋白 marker;1~6 为纯化的 pET-30a(+)-MB1916c 重组蛋白

图 7 重组 pET-30a(+)-MB1916c 融合表达蛋白 Western blotting 分析

Fig. 7 Analysis of recombinant pET-30a(+)-MB1916c fused expression protein by Western blotting

异性反应,说明重组蛋白具有牛分枝杆菌的抗原性,为进一步研究其结构、功能和复苏机制奠定了理论基础。

参 考 文 献

- [1] Biketov S, Mukamolova G V, Potapov V, et al. Culturability of mycobacterium tuberculosis cells isolated from murine macrophages: a bacterial growth factor promotes recovery[J]. Immunol Med Microbiol, 2000, 29 (4): 233-240
- [2] Mukamolova G V, Turapov O A, Young D I, et al. A family of autocrine growth factors in *Mycobacterium tuberculosis*[J]. Arch Microbiol, 1999, 172: 9-14
- [3] Mukamolova G V, Kaprelyants A S, Kell D B, et al. Adoption of the transiently non-culturable state—a bacterial survival strategy[J]. Microb Physiol, 2003, 47: 65-129
- [4] Kaprelyants A S, Kell D B. Dormancy in stationary-phase cultures of micrococcus luteus: flow cytometric analysis of starvation and resuscitation[J]. Appl Environ Microbiol, 1993, 59: 3187-3196
- [5] Kaprelyants A S, Mukamolova G V, Kell D B, et al. Stimulation of dormant micrococcus luteus cells by penicillin lysis and by resuscitation in cell-free spent medium at high dilution[J]. Microbiol, 1994, 115: 347-352
- [6] Matsuda M, Togo M, Kagawa S, et al. PCR cloning of the resuscitation-promoting factor (Rpf) gene from *Micrococcus luteus*, sequencing and expression in *Escherichia coli*[J]. Microbios, 2001, 104 (407): 55-61
- [7] Mukamolova G V, Kaprelyants A S, Young D I, et al. Bacterial cytokine [M]. U S A: Proc Natl Acad Sci,

- 1998, 95(15) : 8916~8921
- [8] Mukamolova G V, Yanopolskaya N D, Kell D B, et al. On resuscitation from the dormant state of *Micrococcus luteus*[J]. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 1998, 73(3) : 237~243
- [9] Kaprelyants A S, Kell D B. Do bacteria need to communicate with each other for growth? [J]. *Trends Microbiol*, 1996, 4(6) : 237~242
- [10] Martin Coherr Gonsaud, Philippe Barthe, Claire Bagnéris, et al. The structure of a resuscitation-promoting factor domain from *Mycobacterium tuberculosis* shows homology to lysozymes[J]. *Nature Structural & Molecular Biology*, 2005, 12(3) : 270~273
- [11] Mukamolova G V, Turapov O A, Young D I, et al. A family of autocrine growth factors in *Mycobacterium tuberculosis*[J]. *Mol Microbiol*, 2002, 46(3) : 623~635
- [12] Downing K J, Betts J C, Young D I, et al. Global expression profiling of strains harbouring null mutations reveals that the five rpf-like genes of *Mycobacterium tuberculosis* show functional redundancy[J]. *Tuberculosis (Edinb)*. 2004, 84(3-4) : 167~79
- [13] Downing K J, Mischenko V V, Shleeva M O, et al. Mutants of *Mycobacterium tuberculosis* lacking three of the five rpf-like genes are defective for growth *in vivo* and for resuscitation *in vitro*[J]. *Infection and Immunity*, 2005, 73(5) : 3038~3043
- [14] Zhu W, Plikaytis B B, Shinnick T M. Resuscitation factors from mycobacteria: homologs of *Micrococcus luteus* proteins[J]. *Tuberculosis (Edinb)*, 2003, 83(4) : 261~269
- [15] Mukamolova G V, Kaprelyants A S, Kell D B. Secretion of an antibacterial factor during resuscitation of dormant cells in *Micrococcus luteus* cultures held in an extended stationary phase [J]. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 1995, 67(3) : 289~295
- [16] Mukamolova G V, Kormer S S, Kell D B, et al. Stimulation of the multiplication of *Micrococcus luteus* by an autocrine growth factor[J]. *Microbiol*, 1999, 172(1) : 9~14
- [17] Tufariello J M, Jacobs W R, Chan J. Individual *Mycobacterium tuberculosis* resuscitation-promoting factor homologues are dispensable for growth *in vitro* and *in vivo*[J]. *Infection and Immunity*, 2004, 72(1) : 515~526
- [18] Yeremeev V V, Kondratieva T K, Rubakova E I, 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