

# 结核分枝杆菌 *Rv0859* 基因的克隆、表达、纯化及蛋白的亚细胞定位

刘岩岩<sup>1,2</sup> 马国举<sup>2</sup> 廖海印<sup>2</sup> 张 鹭<sup>1,2\*</sup> 王洪海<sup>1\*</sup>

(1. 复旦大学生命科学学院遗传学研究所 遗传工程国家重点实验室 上海 200433)

(2. 齐齐哈尔大学生命科学与工程学院 黑龙江 齐齐哈尔 161006)

**摘 要:** 本研究体外克隆了结核分枝杆菌 *Rv0859* 基因, 融合表达并纯化了 *Rv0859* 蛋白。首先提取 *H<sub>37</sub>Rv* 标准菌株中的基因组DNA, 设计 *Rv0859* 基因两端的引物, 以 *H<sub>37</sub>Rv* 基因组DNA为模板通过PCR方法扩增 *Rv0859* 基因。用 *Hind* III 和 *Bam* H I 两种限制性内切酶双切 *Rv0859* 基因, T4 连接酶连接到 pET30 载体上, 再转入大肠杆菌 JF1125 中, 经过筛选鉴定后抽提质粒测序, 得到重组正确载体, 转化到表达宿主大肠杆菌 BL21 中。用 IPTG 进行诱导表达, 通过聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 及质谱鉴定重组表达蛋白。0.05 mol/L 浓度的 IPTG 37°C 诱导 4 h 重组蛋白的表达量最高。制备重组蛋白的多克隆抗体, 通过亚细胞分离及 Western-blotting 分析蛋白的亚细胞定位。结果成功地构建原核表达载体 pET30a-*Rv0859*, 并获得 47845 D 左右的大量表达的 *Rv0859* 蛋白, Western-blotting 结果表明 *Rv0859* 蛋白主要定位于细胞膜中, 微量存在于细胞壁中, 为进一步的 *Rv0859* 蛋白功能研究奠定了一定的基础。

**关键词:** 结核分枝杆菌 *Rv0859*, 克隆, 表达, 纯化

## Cloning and Expression of *Mycobacterium tuberculosis Rv0859* Gene and Its Purification

LIU Yan-Yan<sup>1,2</sup> MA Guo-Ju<sup>2</sup> LIAO Hai-Yin<sup>2</sup> ZHANG Lu<sup>1,2\*</sup> WANG Hong-Hai<sup>1\*</sup>

(1. State Key Laboratory of Genetic Engineering, Institute of Genetics, School of Life Sciences, Fudan University, Shanghai 200433, China)

(2. School of Life Science and Engineering of Qiqihaer University, Qiqihaer, Heilongjiang 161006, China)

**Abstract:** To clone *Rv0859* gene of *Mycobacterium tuberculosis* and purify its fusion protein. Genome DNAs of *H<sub>37</sub>Rv* was extracted. Primers for *Rv0859* gene was designed, and DNA fragments encoding *Rv0859* was obtained by PCR and inserted into proeukaryotic expression plasmid pET30a followed by digestion with *Hind* III and *Bam* H I. pET30a-*Rv0859* is connected by T4 ligase which was transformed into *Escherichia coli* JF1125. Sequence analysis was performed to verify the recombinant plasmid. The recombinant plasmid was transfected into *Escherichia coli* BL21. After induction with IPTG, the expression of *Rv0859* protein was identified by SDS-PAGE and mass spectrum. The expressed protein was the maximum

when induced with 0.05 mol/L IPTG for 4 h at 37°C. The polyclonal antibodies were prepared to detect the subcellular localization by Western-blotting. The result is the prokaryotic expression vector pET30a-*Rv0859* was constructed successfully and the recombinant *Rv0859* was expressed heavily. The result of Western-blotting indicated that the protein located on the cell envelope partly and little on the cell well. The study laid the foundation for application in the tuberculosis.

**Keywords:** *Mycobacterium tuberculosis*, *Rv0859*, Clone, Expression, Purified

20 世纪 90 年代初期, 全球结核病死灰复燃, 结核病疫情呈现上升趋势。WHO2006 年公布的全世界结核病状况调查结果显示, 每年新发病人达 800~1000 万<sup>[1]</sup>, 其中 98% 的结核病死亡发生在发展中国家。我国属于结核病高负担国家之一, 患病率高、死亡率高、耐药率高, 年递减率低, 问题非常严峻。中国结核病防治进展如何将直接影响全球结核病控制战略的实施和效果。

近年来, 结核分枝杆菌与 HIV 的共感染, 以及多耐药结核分枝杆菌的出现改变了结核的流行病学模式, 尤其是近期在非洲大陆发现极端耐药结核分枝杆菌, 该类病原菌耐受包括异烟肼、利福平、乙胺丁醇、吡嗪酰胺和链霉素等在内的所有一线药。并表现出对 6 种二线治疗药物中的至少 3 种耐药<sup>[2]</sup>。到目前为止, 极端耐药性分枝杆菌已经在全球包括 8 个欧洲国家在内的 28 个国家传播, 而极端耐药性结核患者数量约为 2.7 万例, 因此而死亡的患者数已逾 1.6 万例。这些数据使得全部极端耐药性结核感染患者的死亡率超过了 50%, 甚至在某种程度上高过了艾滋病感染的致死率<sup>[3]</sup>。目前所有可用的抗结核药物都无法治疗这种结核病, 一旦传播开来, 人类将面临重大灾难。所以目前对结核病的新发药物靶、快速诊断、以及耐多药结核病的治疗意义重大。

*Rv0859* 编码乙酰辅酶 A 蛋白。乙酰辅酶 A 由辅酶 A (CoA) 的 SH 基与乙酰基形成的硫酯键所构成, 在生物体内的乙酰化反应中可以作为乙酰基的供体。在丙酮酸经丙酮酸脱氢酶复合体的催化反应、脂肪酸的  $\beta$  氧化, 以及乙酸的活化反应均可生成乙酰辅酶 A, 其乙酰基与草酰乙酸反应生成柠檬酸, 而进入三羧酸循环。因此, 乙酰辅酶 A 在生物体的生长、代谢等基本生命过程中至关重要。本实验 PCR 扩增 *Rv0859* 基因, 以 pET30a 为载体, 构建重组质粒, 大量表达目的蛋白并纯化, 免疫新西兰兔获得抗血清。通过 Western-blotting 对蛋白进行亚细胞

定位。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

结核分枝杆菌 (*Mycobacterium tuberculosis*) H<sub>37</sub>Rv、质粒 pET30a、大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 菌株 JF1125、BL21 宿主菌为复旦大学遗传所结核病研究课题组保存、卡那霉素 (Kan)、异丙基硫代 2- $\beta$ -D-半乳糖苷 (IPTG) 及尿素购自 Sigma 公司。限制性内切酶 *Hind* III、*Bam*H、KOD 酶及 T4 DNA 连接酶购自 TaKaRa 生物公司。胶回收试剂盒、质粒提取试剂盒购自华舜生物公司。硝酸纤维素膜 (NC)、山羊抗兔 (AP 标记)、羊抗人 IgG (HRP 标记) 及 BCIP (显色试剂), 购自鼎国生物公司。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 方法

**1.2.1 目的基因原核表达载体的构建:** 根据 GenBank 中结核分枝杆菌全基因组 *Rv0859* 基因序列, 用 Oligo6 软件设计引物, 上下游分别含有 *Hind* III、*Bam*H 酶切位点 (黑体下划线部分)。

上游引物 (upper): 5' ATGGATCCATGTCCGAAGAAGCCTTCATCTAC 3'

下游引物 (lower): 5' TATAAAGCTTTTAAACCTCTCGATGATCGTCGC 3'

**1.2.2 *Rv0859* 编码区的扩增:** 反应体系: 以结核分枝杆菌 H<sub>37</sub>Rv 全基因组为模板, 进行 PCR 扩增反应。反应总体积 100  $\mu$ L: ddH<sub>2</sub>O 76.1  $\mu$ L, MgSO<sub>4</sub> (25 mmol/L) 2.5  $\mu$ L, dNTPs (2 mmol/L) 3.8  $\mu$ L, 模板 2.0  $\mu$ L, 特异性引物 (上、下游引物混合) 3.6  $\mu$ L (10  $\mu$ mol/L), KOD-plus 2.0  $\mu$ L, KOD-plus buffer 10  $\mu$ L。

PCR 扩增反应条件: 94°C 5 min; 94°C 30 s, 59°C 30 s, 68°C 1 min 15 s, 29 个循环; 68°C 10 min。

**1.2.3 克隆 PCR 产物及重组转化子的鉴定:** *Rv0859* 基因片段回收、纯化后, 用 *Hind* III、*Bam*H I 两种

限制性内切酶在 37°C 酶切 4 h, 然后与经同样酶切的 pET30a 载体用 T4 DNA 连接酶连接, 转化大肠杆菌 JF1125 感受态细胞, 涂布 kan 抗性平板进行培养, 挑取单菌落进行测序。测序由上海生工完成。

**1.2.4 Rv0859 蛋白的表达及纯化:** 用测序正确的重组质粒转化 *Escherichia coli* 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°C 摇床培养至对数生长期。取 20  $\mu$ L 菌液再转接入 5 mL 有 kan 抗性 LB 培养液中共 10 管。37°C、220 r/min 摇床培养 2 h 左右, 加入终浓度为 1 mmol/mL、0.5 mmol/mL、0.25 mmol/mL、0.1 mmol/mL、0.05 mmol/mL、0.025 mmol/mL、0.01 mmol/mL、0.001 mmol/mL 的 IPTG。37°C、4 h、220 r/min 进行梯度诱导表达, 4°C 离心收集菌体。菌体沉淀用 200  $\mu$ L、10 mmol/L binding buffer 吹散, 超声破碎(超声 2 s, 间隔 3 s, 冰浴超声 10 min)。4°C 离心 30 min。取沉淀和上清分别溶解在样品缓冲液中进行 SDS-PAGE。根据 SDS-PAGE 结果选择梯度诱导目的蛋白表达量最好的 IPTG 浓度(0.05 mmol/L)进行大量诱导表达<sup>[4,5]</sup>。

**1.2.5 重组蛋白的大量获得:** 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 Rv0859 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。大量诱导菌液 500 mL, 超声破碎后, 先用 5 mL(6 mol/L)尿素溶解包涵体, 16°C 放置 2.5 h, 11000 g 离心 30 min, 去上清。在沉淀中加入 0.5 mL(8 mol/L)尿素 16°C 放置 1 h, 加入终浓度为 50 mmol/L  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ (pH 10.7)、1 mmol/L EDTA、50 mmol/L NaCl、加水补充至 4.5 mL, 用 KOH 调 pH 至 10.7, 室温放置 30 min, 用盐酸调 pH 至 8.0, 1000 g 离心 30 min。SDS-PAGE 分析包涵体溶解纯化结果。

### 1.3 兔抗重组蛋白血清的制备

初次免疫 4 kg 的雌性新西兰白兔前, 经耳缘静脉小量采血作为空白对照。将蛋白稀释到 100  $\mu$ g/mL, 与等量弗氏不完全佐剂混匀后背部皮下多点注射免疫, 总体积为 800  $\mu$ L, 200  $\mu$ g/只。每隔 2 周加强免疫 1 次, 共 3 次。于末次免疫后 1 周, 心脏采血, 分离血清备用。

### 1.4 兔抗 Rv0859 蛋白血清的效价测定

ELISA 测定兔抗 Rv0859 蛋白血清效价: 酶标

板(Nunc)用 5  $\mu$ g/mL 的纯化蛋白(100  $\mu$ L/孔)包被, 4°C 过夜; 用含有 1% BSA 的 PBST 封闭 2 h; 待测血清和对照血清用含有 1% BSA 的 PBST 稀释 1000 倍, 然后再等倍稀释。加入待测血清 100  $\mu$ L, 37°C 孵育 1 h; HRP 标记的羊抗兔 IgG 作为二抗, 每孔 100  $\mu$ L, 37°C 孵育 1 h; 每孔加 100  $\mu$ L OPD 显色液, 37°C 闭光反应 20 min, 每孔加 50  $\mu$ L, 7%  $\text{H}_2\text{SO}_4$  终止反应, 于 492 nm 波长处读取吸光度值。

### 1.5 结核分枝杆菌 H37Rv 亚细胞组分的分离

结核分枝杆菌 H37Rv 亚细胞组分的分离参考 Kwasi 等<sup>[7]</sup>的方法获得。收集临床培养结核分枝杆菌 H37Rv 菌株。所分离的非细胞成分上清 1, 经 0.22  $\mu$ m 滤膜过滤除菌, 冷冻干燥和超滤, 制得培养基滤过组分(Culture Filtration protein, CFP)。分离所得沉淀 1 置于冰上超声, 强度 120 W, 超声 2 s, 暂停 4 s, 共 360 次。所得裂解菌液, 4°C、8000 g 离心 45 min, 收集菌体裂解液。菌体裂解液经 4°C、27000 g 离心 1 h, 沉淀 2 为细胞壁组分(Cell Wall, CW), 收集上清 2; 上清 2 再经 4°C、100000 g 离心 4 h, 沉淀 3 为细胞膜组分(Cell membrane, CM), 所得上清 3 为细胞质组分(Cytoplasm, CP)。具体见图 1。

### 1.6 生物信息学预测重组蛋白的亚细胞定位

通过生物信息学预测重组蛋白的亚细胞定位, 结果如图 2 所示, 我们可以看出重组蛋白大部分是跨膜的。

### 1.7 重组蛋白的亚细胞定位——Western-blotting

通过 Western-blotting 技术对重组蛋白进行亚细胞定位分析。

## 2 结果

### 2.1 pET30a-Rv0859 重组子的获得

从转化后的重组子中抽提重组质粒经 Hind III 和 BamH 双酶切后, 取 5  $\mu$ L 进行 1% 琼脂糖凝胶电泳, 紫外灯下观察结果, 如图 3 所示重组质粒经上海生工生物工程有限公司测序, 结果正确。

### 2.2 Rv0859 重组蛋白在 BL21 菌株中的表达及蛋白纯化

将含有 pET30a-Rv0859 质粒的 *Escherichia coli* BL21 菌体(经不同浓度 IPTG 诱导)和与未经 IPTG 诱导的菌体, 超声破碎, 取沉淀溶解在 loading buffer 进行 SDS-PAGE, SDS-PAGE 的结果可以看出在分子量约为 47 kD 处, 有一条明显蛋白条带, 同预计的

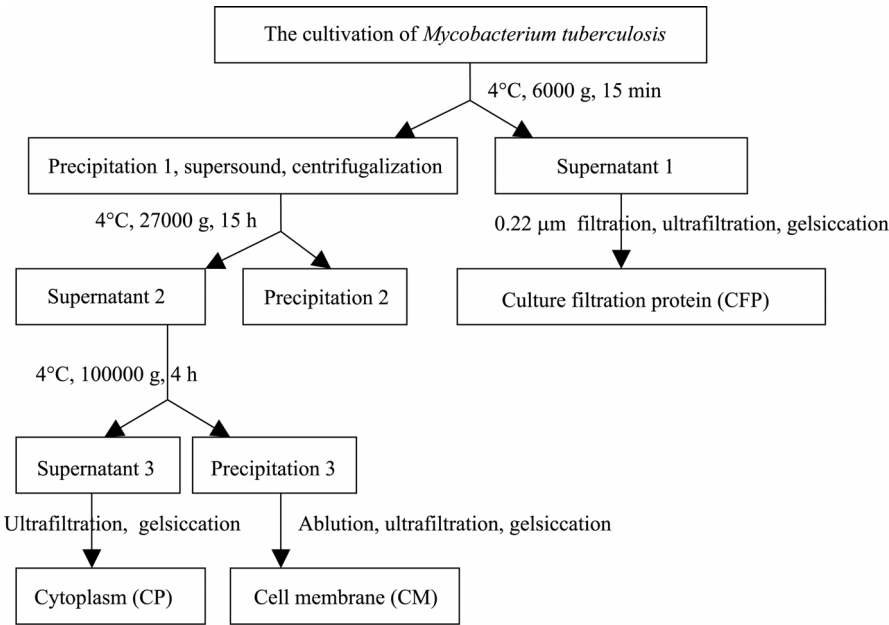


图 1 结核分枝杆菌亚细胞组分分离图

Fig. 1 The disassociation of composition cell of *Mycobacterium tuberculosis*

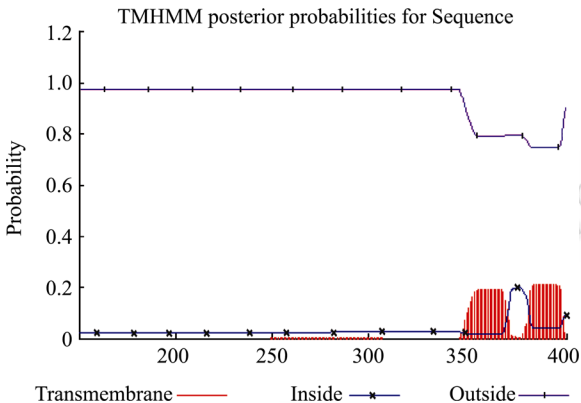


图 2 生物信息学预测重组蛋白的定位

Fig. 2 The prediction of recombinant protein by bioinformatics

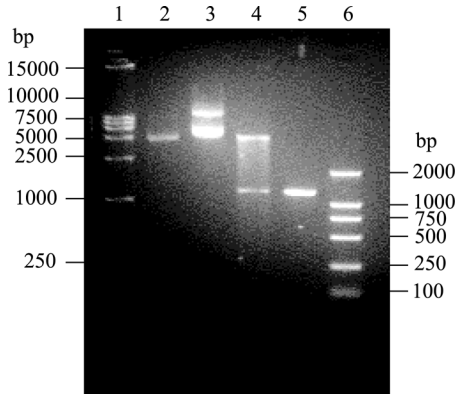


图 3 重组质粒 pET30a-*Rv0859* 双酶切鉴定电泳图

Fig. 3 Electrophoresis result of recombinant plasmid pET30a-*Rv0859* digested by *Hind* III and *Bam* H

1: Marker 15000(bp); 2: Plasmid-pET30a; 3: Recombinant plasmid; 4: Digested-plasmid; 5: *Rv0859*; 6: Marker 2000(bp).

重组目的蛋白大小一致, 并且可以看出 0.05 mmol/L 浓度的 IPTG 诱导 4 h 重组蛋白的表达量最高, 杂蛋白条带少结果如图 4 所示。菌体蛋白纯化后获得了一条单一的约 47 kD 大小的蛋白条带, 与预期的结果相一致(图 5)。

纯化后的 *Rv0859* 重组蛋白测定蛋白浓度后进行质谱鉴定, 与理论预期的蛋白大小 47.85 kD 完全一致, 结果如图 6。

### 2.3 *Rv0859* 蛋白多抗血清效价的测定结果分析

ELISA 方法测定血清的效价, 结果如表 1。

因为血清是等比稀释的, 所以所得到的光吸收值大体为等比, 故当血清稀释到 1:64000 时, 基本为

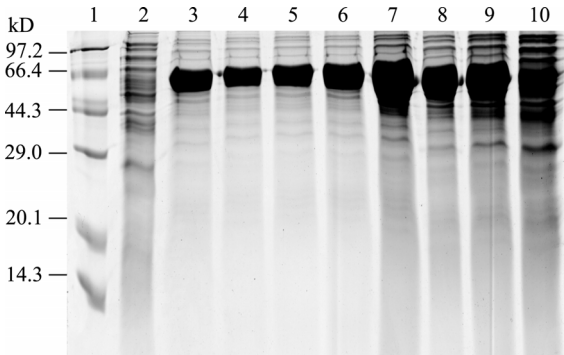


图 4 IPTG 梯度诱导蛋白表达结果

Fig. 4 The result of induction and expression by IPTG

1: Marker; 2-10: The concentration of IPTG is 0 mmol/L, 1 mmol/L, 0.5 mmol/L, 0.25 mmol/L, 0.1 mmol/L, 0.05 mmol/L, 0.025 mmol/L, 0.01 mmol/L, 0.001 mmol/L.

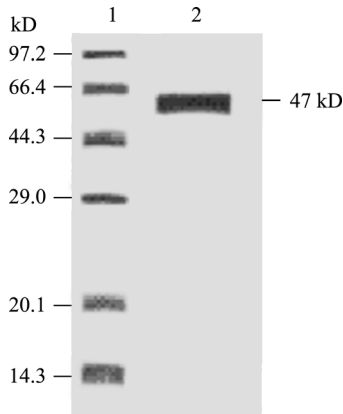


图 5 蛋白纯化结果  
Fig. 5 The purification result of protein  
1: Marker; 2: The purification result of cytorrhyses.

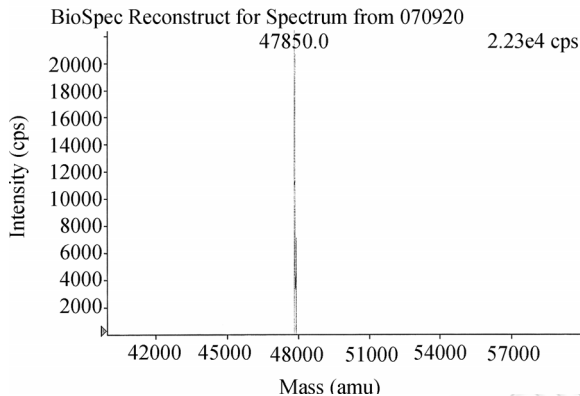


图 6 重组蛋白质谱图  
Fig. 6 MS analysis of the recombinant protein

等比例，以后的结果可信度很低，所以血清效价为 1：64000。当所获得的血清效价为 1：1000 的时候，证明我们已经获得了该蛋白的多克隆抗体，而本研究的血清效价为 1：64000。所以得到的血清更好，分离-20℃ 保存血清，为下一步 Rv0859 蛋白的亚细胞定位做准备。

2.4 重组蛋白亚细胞定位

分离结核分枝杆菌(*Mycobacterium tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv)亚细胞组分，兔多抗血清 Western-blotting 分析确定 Rv0859 蛋白在结核分枝杆菌中的亚细胞

分布。Western-blotting 结果如图 7 所示，可以看出蛋白主要定位于细胞膜中，微量存在于细胞壁中。与生物信息学预测 Rv0859 蛋白的亚细胞定位结果基本一致。

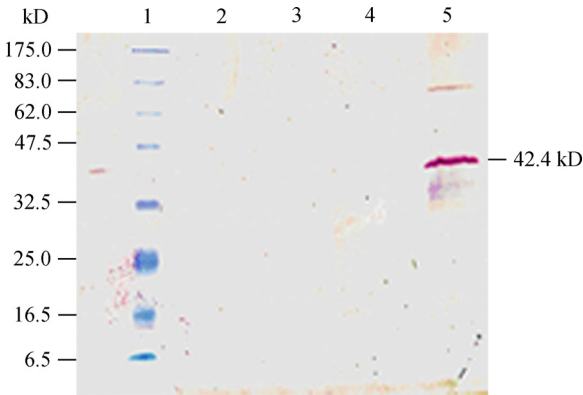


图7 Western蛋白印迹杂交结果  
Fig. 7 The result of western-blotting  
1: Cell wall(CW); 2: Marker; 3: Cytoplasm(CP); 4: Culture filtration protein(CFP); 5: Cell membrane(CM).

3 讨论

结核分枝杆菌于 1882 年由 Robert Koch 发现，至今仍然是最主要的导致人类死亡的传染病原体。每十秒钟就有一例死亡。TB 和艾滋产生灾难性并发症，使得这一情况雪上加霜。早期抗菌药物的出现曾为结核病的治疗带来了曙光，但如今结核病人由于治疗不当和治疗管理不当造成同时对 INH、RIF 两种或两种以上主要抗结核药物产生抗药性<sup>[8]</sup>。因此，结核病的治疗诊断及疫苗开发等任务变得更为迫切也更具有挑战性。

Rv0859 编码的蛋白是乙酰辅酶 A，分子量约为 47 kD，乙酰辅酶 A 是结核分枝杆菌三羧酸循环途径中的关键酶，对结核分枝杆菌在体内的生存及持续感染起着重要的作用。三羧酸循环途径是微生物、植物体内普遍存在的代谢途径。乙酰辅酶 A 作为三羧酸循环途径中的关键酶，一旦寻找到能有效抑制结核杆菌乙酰

表 1 ELISA 结果 Table 1 The result of ELISA												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.000	-0.007	-0.019	-0.023	-0.091	-0.070	-0.079	-0.073	0.012	-0.017	0.000	0.015
B	0.185	0.023	0.023	-0.012	-0.020	-0.007	-0.024	-0.021	-0.016	0.012	0.007	0.020
C	1.213	0.718	0.288	0.119	0.025	0.035	1.721	1.301	0.820	0.408	0.189	0.102
D	2.308	2.067	1.476	0.880	0.533	0.219	0.083	0.048	0.046	-0.005	0.005	-0.002

Note: 1-12: The different concentration of blood serum; A: Blank control; B: The result of the first immunity; C: The result of the second immunity; D: The result of the last blood serum's collection.

辅酶 A 活性的物质, 就可以阻断结核杆菌三羧酸循环途径, 达到杀菌的目的。本实验通过 Western-blotting 技术分析 Rv0859 蛋白在结核分枝杆菌中的亚细胞定位, 实验结果确定 Rv0859 蛋白主要位于细胞膜中。原核生物的细胞膜是其生成 ATP 的主要场所, Rv0859 蛋白一部分存在于细胞外膜, 可以很便利的获得 ATP 能, 从而发挥酶活性调节细胞功能。在细胞壁中的存在增加了其作为候选药靶的可能性, 据此设计的抑制剂更易于与靶蛋白相互作用, 达到杀菌效果。所以 Rv0859 编码蛋白乙酰辅酶 A 还可以作为新药筛选靶点。这一结果也提示我们, 该蛋白可能成为结核病血清学诊断的候选抗原。

由于结核杆菌生长缓慢并且菌体蛋白难以纯化, 至今还没有结核分枝杆菌天然乙酰辅酶 A 的相关报道。本文利用基因工程技术, 首次在大肠杆菌中高效表达 Rv0859 基因, 得到了重组乙酰辅酶 A 蛋白, 这一结果可以为后续试验结核分枝杆菌乙酰辅酶 A 蛋白的晶体结构分析、免疫学研究打下基础。

## 参 考 文 献

[1] Ginsberg AM, Spigelman M. Challenges in tuberculosis

drug research and development. *Nature*, 2007, **13**: 290-294.

[2] Chaisson SE. From magic bullets back to the magic mountain: the rise of extensively drug-resistant tuberculosis. *Nature Medicine*, 2007, **13**(3): 295-298.

[3] Cegielski JP, Chin DP, Espinal MA, *et al.* The global tuberculosis situation: Progress and problems in the 20th century, prospects for the 21st century. *Infect Dis Clin North Am*, 2002, **16**: 1-58.

[4] 陈 曦, 张宗德, 古淑香, 等. 结核分枝杆菌 rv3873 基因原核表达载体的构建、表达和纯化. 国际呼吸杂志, 2007, **27** (17):1292-1295.

[5] 蒋天舒, 姜加陶, 周 晔, 等. 结核分枝杆菌抗原 Rv0173 的克隆、表达与纯化. 中国实验诊断学, 2007, **11** (7): 914-916.

[6] J 萨姆布鲁克, 弗里奇, 曼尼阿蒂斯 T 著. 分子克隆实验指南. 第二版. 金冬雁, 黎孟枫等译. 北京: 科学出版社, 1995, pp.891-897.

[7] Kwasi G, Mawuenyega, Christian VF, *et al.* Mycobacterium tuberculosis functional network analysis by global subcellular protein profiling. *Molecular Biology of the cell*, 2005, **16**: 396-404.

[8] Abebe F, Holm-Hansen C, Wiker HG, *et al.* Progress in serodiagnosis of *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Journal of Immunology*, 2007, **66**: 176-191.

## 征订启事

### 《光明中医》杂志 2009 年征订征稿启事

《光明中医》杂志是国家中医药管理局主管、中华中医药学会主办的国家级中医药科技综合期刊, 刊号 CN11-1592/R, ISSN-8914。国内外公开发行人, 每月 20 日在北京出版。以广大基层中医药临床工作者、中医爱好者、科技、教学工作者及中医药院校师生为主要读者对象。系中国科技核心期刊(遴选)数据库、中国学术期刊(光盘版)、科技部万方数据库、中文科技期刊数据库全文收录期刊。

《光明中医》杂志是国家级综合性中医药学术期刊, 本刊以“寓医理于临床”为办刊宗旨, 以“面向临床”、“面向科研”、“面向社区”为办刊方针, 实用性强, 读者群广。主要栏目: 论著、实验研究、薪火传承、硕博论坛、针灸探骊、中西医结合、临床研究、医案医话、方药纵横、民族医药、教管研究、社区医药、护理研究、科研进展等。

《光明中医》杂志为月刊, 大 16 开, 内文 168 页, 每册定价 8.0 元, 全年定价 96.0 元, 邮发代号 82-525。各地邮局均可办理订购。若当地邮局订购有困难, 亦可直接与本刊广告发行部订购。欢迎广大读者、作者、赐稿订阅。

本刊全国唯一专用的投稿、汇款、通联信箱: 北京 105 信箱(相当于通函地址)邮编: 100036。电话 010-51813510/3503(传真)

本刊唯一指定官方网站: <http://bjgmzy.com>; 本刊唯一指定的在线投稿信箱: [gmzyzy@sina.com](mailto:gmzyzy@sina.com)

本刊社址: 北京市复兴门南大街甲 2 号知医堂配楼 102 室