

肺炎嗜衣原体 CPAF 原核表达载体的构建及其在大肠杆菌中的高效表达

周 洲, 吴移谋, 陈丽丽, 李忠玉, 陈超群

(南华大学 微生物学与免疫学教研室, 湖南 衡阳 421001)

摘 要: **目的** 对肺炎嗜衣原体蛋白酶样活性因子(CPAF)基因进行原核表达,为肺炎嗜衣原体的诊断及疫苗研究奠定基础。**方法** 利用 PCR 技术从肺炎嗜衣原体标准株 AR-39 中扩增 CPAF 基因,将其克隆于原核表达载体 pGEX-6p-2 中,构建重组表达载体。并用双酶切、PCR 及序列测定等方法进行鉴定后,在大肠杆菌中诱导表达 GST 融合蛋白。**结果** 重组质粒中 CPAF 基因序列与肺炎嗜衣原体 AR-39 的同源性达到 100%,CPAF 在大肠杆菌中表达高效的 GST 融合蛋白。**结论** 成功构建肺炎嗜衣原体 CPAF 基因的原核表达系统,并成功表达重组蛋白,为肺炎嗜衣原体疫苗的研究和临床检测试剂盒的研制打下基础。

关键词: 肺炎嗜衣原体; CPAF 基因; 原核表达

中图分类号: R374 **文献标识码:** A **文章编号:** 2095-1116(2011)06-0615-04

Construction of Prokaryotic Vector Encoding *Chlamydophila Pneumoniae* CPAF and Its Effective Expression in *E. coli*

ZHOU Zhou, Wu Yi-mou, CHEN Li-li, et al

(Department of Microbiology and Immunology, University of South China, Hengyang, Hunan 421001, China)

Abstract: **Objective** To express the recombinant protein of chlamydial protease-like activity factor CPAF from *Chlamydophila pneumoniae* for using in diagnosis and vaccine development. **Methods** The CPAF gene was amplified from the genome of *C. pneumoniae* strain AR-39, cloned into prokaryotic expression vector pGEX-6p-2 for fusion expression with GST. With identification by sequencing, the recombinant plasmid was transformed into *Escherichia coli* XL1-Blue and the recombinant proteins fused with GST was analyzed by SDS-PAGE. **Results** Sequence of the cloned CPAF gene was correct. The CPAF gene could be expressed in *E. coli* XL1-Blue which was transformed with pGEX-6p-2/CPAF but could not be expressed in *E. coli* XL1-Blue with pGEX-6p-2 or untransformed cells. **Conclusion** The Prokaryotic expression plasmid pGEX-6p-2/CPAF was successfully constructed and expressed in *E. coli* XL1-Blue, which is useful in *C. pneumoniae* diagnosis and vaccine development.

Key words: *Chlamydophila pneumoniae*; CPAF gene; prokaryotic expression

肺炎嗜衣原体 (*Chlamydophila pneumoniae*, Cpn) 是嗜衣原体属下的一个菌种, 主要引起人类呼吸道尤其是肺部感染, 还可能与动脉粥样硬化、心肌梗死等心脑血管疾病形成的病因有关^[1,2]。随着生物信息学的飞速发展, Cpn 引起各种疾病的分子生物学基础越来越受到关注, 阐明其致病机制, 寻找免

疫优势抗原基因以制备有效的诊断试剂盒及疫苗是预防、控制 Cpn 相关疾病的关键。

本研究采用分子生物学技术, 将 Cpn 标准株 AR-39 的 CPAF 全基因序列与原核表达载体 pGEX-6p-2 构建重组质粒, 并转化入大肠杆菌 XL1-Blue 中, 诱导表达出融合有 GST 标签的重组蛋白, 为 Cpn

收稿日期: 2010-11-26

基金项目: 国家自然科学基金(30901352)和 2008 湖南省教育厅研究生科研创新基金。

通讯作者: 吴移谋, 电话: 0734-8281555, E-mail: yimouwu@ sina.com.

诊断试剂盒及新型疫苗的研制打下实验基础。

1 材料与方法

1.1 材料

Cpn AR-39 标准株及 pGEX-6p-2 原核表达载体为德克萨斯大学圣安东尼奥医学科学中心钟光明博士馈赠; BamHI、NotI 购自 Fermentas; Taq DNA 聚合酶为东盛公司产品、DNA 及蛋白分子量标准等为 Takara 公司产品; AxyPrep™ PCR 清洁试剂盒、质粒提取试剂盒购自 Axygen 公司。

1.2 CPAF 基因的 PCR 扩增

设计一对针对 CPAF 基因的特异性引物, forward P1 序列为 CGC GGA TCC ATG AAA AAA GGG AAA TTA GGA GC, backward P2 序列为 TTT TCC TTT TGC GGC CGC TTA CGA AGC AGA AGT CGT TGT。100 μ L 反应体系包括: DNA 模板 0.2 μ L, 上游引物和下游引物各 2 μ L, Taq DNA 聚合酶 0.25 μ L, 10 $\times$ PCR Buffer 20 μ L, dNTPs 8 μ L, 剩余体积用 ddH₂O 补充; PCR 扩增在如下条件中进行: 94℃ 预变性 5 min, 95℃ 变性 30 s, 50℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 2 min, 循环数 35, 72℃ 补延 10 min, 产物经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳鉴定后, 以清洁试剂盒回收、纯化扩增产物。

1.3 CPAF 基因原核表达载体的构建

将 PCR 扩增产物与 pGEX-6p-2 进行纯化, BamHI、NotI 双酶切, 再次经清洁试剂盒纯化, 用 T4 连接酶 4℃ 作用下连接 16 h, 随后将产物转化 *E. coli* XL1-Blue, 经氨苄抗性的 LB 培养基筛选挑出阳性克隆, 提取质粒进行 PCR、双酶切鉴定并送往北京诺赛公司进行测序鉴定。

1.4 肺炎嗜衣原体 CPAF 基因序列分析

将上述获得序列重组质粒 pGEX-6p-2/CPAF 序列进行分析, 并提交 NCBI 进行 BLAST 比对 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>)。

1.5 重组质粒在 *E. coli* XL1-Blue 中的诱导表达

挑取含 pGEX-6p-2/CPAF 重组质粒的菌落接种于 50 ~ 100 μ g/mL 氨苄青霉素的 LB 液体培养基中, 37℃ 振荡培养过夜, 次日按 2% 的比例转接于新鲜 LB 液体培养基中, 37℃ 振荡培养至 $A_{600} \approx 0.6$ 时, 加 IPTG (0.2 mmol/L) 30℃ 诱导 4 h。

1.6 SDS-PAGE 电泳

取未诱导和诱导后的菌液 1 mL, 离心收集菌体后, 去上清, 加入 2 $\times$ SDS 上样 buffer, 100℃ 变性 10 min。变性后离心, 取上清各 20 μ L 进行 SDS-PAGE, 浓缩胶 3%, 分离胶 12%, 电泳条件为 60 V 约 40 min, 待溴酚蓝指示剂跑入分离胶后升高电压至 130 V 约 3 h, 待溴酚蓝指示剂跑到分离胶最底端时, 停止电泳, 考马斯亮蓝染色液染色, 脱色液脱色。

2 结 果

2.1 CPAF 基因的 PCR 扩增

将 PCR 扩增出的产物在 1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定, 结果出现一条大小约 1 860 bp 的目的条带, 与预期结果一致 (图 1)。

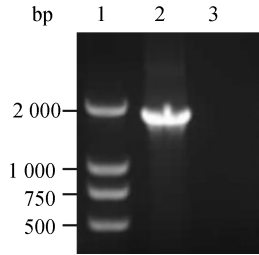


图 1 CPAF 基因 PCR 扩增产物

1: 2 kb DNA Marker; 2: CPAF 基因扩增产物; 3: 阴性对照

2.2 pGEX-6p-2/CPAF 重组质粒的鉴定

将构建的重组质粒 pGEX-6p-2/CPAF 进行 PCR 扩增, 可获得如上所述的约 1 860 bp 大小的目的片段。重组体经 BamHI、NotI 双酶切后, 可获得大小约为 4.9 kb 和 1 860 bp 左右的两个基因片段, 1% 电泳跑胶的结果中, 1 860 bp 的片断与 PCR 扩增产物在同一水平, 而 4.9 kb 的片段则与 pGEX-6p-2 空质粒双酶切后的结果在同一水平, 与预期结果相符 (图 2)。

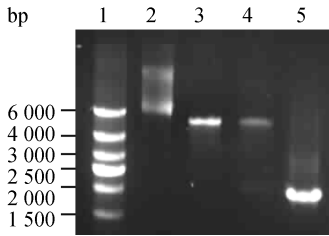


图 2 CPAF 重组质粒的 PCR、双酶切鉴定

1: 6 kb DNA Marker; 2: pGEX-6p-2/CPAF 重组质粒; 3: pGEX-6p-2 空质粒双酶切产物; 4: pGEX-6p-2/CPAF 重组质粒双酶切产物; 5: pGEX-6p-2/CPAF 重组质粒 PCR 产物

2.3 重组质粒核苷酸测序结果分析

重组质粒 pGEX-6p-2/CPAF 测序结果显示与

GenBank 登陆的 Cpn AR-39 株 CPAF 基因序列(Cpn 1016)完全一致。

2.4 重组质粒 pGEX-6p-2/CPAF 在 XL1-Blue 中的表达

将测序确定读码框正确的重组质粒重组质粒 pGEX-6p-2/CPAF 转化进 XL1-Blue 感受态细菌中,在含有 100 μg/mL 氨苄青霉素的 LB 平板中 37℃ 过夜培养。挑单菌落进行培养至 $A_{600} \approx 0.6$ 时,加入 0.2 mmol/mL IPTG,30℃ 诱导,分别于诱导后 4 h 收集样本。然后跑 SDS-PAGE 鉴定目的蛋白。结果诱导后的样本在 Mr 约 98 kDa 处出现一条特异性的蛋白条带,而没有诱导的样本则没有特异条带的出现(图 3)。

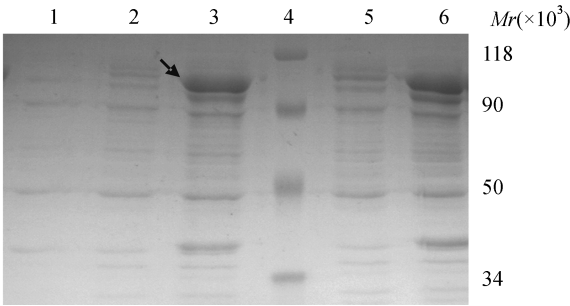


图 3 pGEX-6p-2/CPAF 重组质粒在大肠杆菌 XL1-Blue 中的诱导表达
1:含 pGEX-6p-2 空质粒的 XL1-Blue 诱导表达;2:未诱导 pGEX-6p-2/CPAF 重组质粒的表达;3:含 pGEX-6p-2/CPAF 重组质粒的诱导表达(箭头所指);4:蛋白 Marker;5:超声破碎上清中的蛋白分析;6:超声破碎沉淀中的蛋白分析

2.5 重组蛋白 CPAF 在 XL1-Blue 菌中表达的优化

将重组菌培养至 $A_{600} \approx 0.6$ 时,分别加入 0.2 mmol/mL 或 0.4 mmol/mL 的 IPTG,30℃ 或 37℃ 下分别诱导 1、2、3 h 后收集样本。然后跑 SDS-PAGE 鉴定目的蛋白在上清中的表达量。结果显示在诱导条件为 IPTG 浓度 0.2 mmol/mL,30℃ 下诱导 3 h 时上清中的 CPAF 蛋白表达量最高(图 4)。

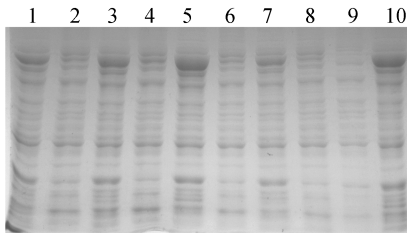


图 4 可溶性 CPAF 重组蛋白表达条件的优化
1,3,5,7,9 为原液分析,2,4,6,8,10 为上清分析。1 和 2:0.2 mmol/mL IPTG 30℃ 诱导 2 h;3 和 4:0.2 mmol/mL IPTG 30℃ 诱导 3 h;5 和 6:0.2 mmol/mL IPTG 37℃ 诱导 1 h;7 和 8:0.4 mmol/mL IPTG 30℃ 诱导 1 h;9 和 10:0.4 mmol/mL IPTG 37℃ 诱导 1 h

3 讨论

肺炎衣原体(*Chlamydia pneumoniae*, Cpn)是一类具有独特发育周期,严格活细胞内寄生的原核细胞型微生物,是一种重要的人类呼吸道病原体。Cpn 常引起人类呼吸系统的感染,导致了平均 10% 的社区获得性肺炎的发生^[3,4],还与动脉粥样硬化、冠心病、肺癌有一定的关系^[5,6]。Cpn 在世界各地流行很广,人群感染极为普遍。尤其近年来,Cpn 感染呈上升趋势,隐性、持续性感染形式的存在,导致感染反复迁延,造成进行性、不可逆性的病理变化。因此,有必要寻找一种免疫优势抗原为建立快速的检测方法以及有效疫苗提供实验依据。

CPAF 是由衣原体基因合成并分泌到宿主细胞胞浆内的蛋白质,是人类的一种免疫优势抗原^[7],其合成与分泌依赖于感染活动期衣原体的复制。一旦机体感染了 Cpn,即可产生强烈的体液免疫应答,不仅其抗体效价明显高于衣原体 MOMP 和 HSP60 抗体的效价,特异性的 CPAF 抗体还能中和内源性的 CPAF^[8,9]。种种证据显示,CPAF 很可能成为 Cpn 感染实验室诊断或早期诊断的新靶标。同时,不同衣原体种间的 CPAF 蛋白具有较高的特异性,其同源性约为 49% 左右,而同种衣原体菌株之间 CPAF 基因高度保守,与其它基因序列没有同源性。为研究 CPAF 基因功能,本研究采用 PCR 法从 Cpn 标准株 AR-39 基因组中扩增出 CPAF 基因,构建原核表达重组质粒,重组质粒经测序证实扩增的 CPAF 基因与 GenBank 登陆的基因序列完全一致。

目的蛋白的表达方式,根据溶解性的差异分为可溶性表达和不溶性(包涵体)表达。通常,重组异源蛋白在细菌中高效表达时易形成包涵体,此类蛋白不仅可能丧失其生物学功能,而且复性率极低,增加了基因工程技术的成本和复杂性。pGEX6p-2 载体是采用乳糖操纵子调控模式的一种原核表达载体,可以诱导外源基因在宿主菌中高效表达。它含有供目的基因插入的多克隆位点,并携带氨苄青霉素 β-内酰胺酶抗性基因,有利于转化宿主菌后筛选阳性克隆;同时 GST 编码序列的存在,可使表达的外源重组蛋白融合一个相对分子质量约为 26 kDa 的 GST 纯化标签,该标签对表达蛋白的有效纯化和保持蛋白质的天然生物学活性作用重大。在本研究中,CPAF 以 pGEX-6p-2 为表达载体在宿主菌 XL1-Blue 中诱导表达后,通过对重组蛋白存在状态的分析,发现重组蛋白主要以包涵体的形式存在。本研究对一系列诱导条件进行优化,如降低培养温度

(30℃),降低诱导剂 IPTG 剂量(0.2 mmol/L)及减少诱导时间(3 h),结果发现可溶性重组蛋白的表达较好。为进一步研究该蛋白的生物学功能,开发高效的诊断试剂盒及疫苗奠定了基础。

参考文献:

- [1] Blasi F, Tarsia P, Aliberti S. *Chlamydomonas pneumoniae* [J]. Clin Microbiol Infect, 2009, 15(1): 29-35.
- [2] Cosentini R, Tarsia P, Canetta C, et al. Severe asthma exacerbation: role of acute *Chlamydomonas pneumoniae* and *Mycoplasma pneumoniae* infection[J]. Respir Res, 2008, 30;9:48.
- [3] Kuo C-C, Jackson LA, Campbell LA, et al. *Chlamydia pneumoniae* (TWAR) [J]. Clin Microbiol Rev, 1995, 8(4): 451-461.
- [4] Hammerschlag MR. Activity of gemifloxacin and other new quinolones against *Chlamydia pneumoniae*: a review[J]. J Antimicrob Chemother, 2000, 45:35-39.
- [5] Paldanius M, Bloigu A, Alho M, et al. Prevalence and per-

sistence of *Chlamydia pneumoniae* antibodies in healthy laboratory personnel in Finland[J]. Clin Diagn Lab Immunol, 2005, 12(5): 654-659.

- [6] Littman AJ, White E, Jackson LA, et al. *Chlamydia pneumoniae* Infection and Risk of Lung Cancer [J]. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2003, 14:1624-1630.
- [7] Dong F, Zhong Y, Arulanandam B, et al. Production of a proteolytically active protein, chlamydial protease/proteasome-like activity factor, by five different *Chlamydia* species[J]. Infect Immun, 2005, 73:1868-1872.
- [8] Sharma J, Bosnic AM, Piper JM, et al. Human antibody responses to a *Chlamydia*-secreted protease factor [J]. Infect Immun, 2004, 72:7164-7171.
- [9] Sharma J, Dong F, Pirbhay M, et al. Inhibition of proteolytic activity of a chlamydial proteasome/protease-like activity factor by antibodies from humans infected with *Chlamydia trachomatis* [J]. Infect Immun, 2005, 73:4414-4419.

(此文编辑 朱雯霞)