

鸚鵡热嗜衣原体 CPSIT_0018 融合蛋白原核表达载体的构建、表达及其在 HeLa 细胞中的定位

贺庆芝,曾怀才,陆春雪,胡艳群,陈芝喜,王 川,吴移谋

(南华大学 病原生物研究所,湖南 衡阳 421001)

摘 要: **目的** 构建鸚鵡热嗜衣原体(Cps)CPSIT_0018 原核表达载体,表达并纯化该融合蛋白,观察其在感染的 HeLa 细胞中的定位。**方法** 采用 PCR 技术从 Cps 6BC 基因组中扩增 CPSIT_0018 基因,并构建 pET30a-CPSIT_0018 原核表达载体,然后转化到宿主菌 E. coli BL21 中,IPTG 诱导 His-CPSIT_0018 融合蛋白表达,进一步用该融合蛋白免疫 BALB/c 小鼠制备多克隆抗体,间接免疫荧光法分析 His-CPSIT_0018 蛋白在 HeLa 细胞中的分布特征。**结果** 成功构建了 pET30a-CPSIT_0018 原核表达载体,并表达和纯化较稳定的重组蛋白;在 Cps 感染的 HeLa 细胞中 CPSIT_0018 的分布与主要外膜蛋白 MOMP 相似,而与包涵体膜蛋白 IncA 的分布模式不同。**结论** 成功克隆表达了 His-CPSIT_0018,该蛋白定位在 Cps 包涵体内。

关键词: 鸚鵡热嗜衣原体; CPSIT_0018; 克隆表达; 细胞定位

中图分类号:R374.2 **文献标识码:**A

Construction and Expression of the Prokaryotic Clone of Recombinant Protein CPSIT_0018 and Localization in HeLa Cells

HE Qingzhi,ZENG Huaicai,LU Chunxue, et al

(Pathogenic Biology Institute, University of South China, Hengyang, Hunan 421001, China)

Abstract: **Objective** The aim is to construct the prokaryotic expression plasmid of CPSIT_0018 gene from Cps 6BC strain; to express and purify the recombinant protein His-CPSIT_0018; and to localize the endogenous CPSIT_0018 protein in Cps- infected HeLa cells. **Methods** CPSIT_0018 gene was cloned by PCR and inserted into the expression vector pET30a to construct pET30a-CPSIT_0018. The recombinant plasmid was transformed into E. coli BL21, and the recombinant protein was expressed and purified. The purified protein was used to immunize BALB/c mice to produce polyclonal antibody, which were subsequently used to localize the endogenous CPSIT_0018 protein by indirect immunofluorescence assay (IFA). **Results** The recombinant expression plasmid pET30a-CPSIT_0018 was successfully constructed, and then the recombinant protein was expressed and purified. IFA showed that the distribution pattern of the CPSIT_0018 protein was similar to that of the major outer membrane protein (MOMP), but not to that of inclusion membrane protein A (IncA).

Conclusion CPSIT_0018 protein was successfully expressed and purified in prokaryotic expression system; CPSIT_0018 is located on the bacterial organism in Cps-infected HeLa cells.

Key words: Chlamydophila psittaci; CPSIT_0018; cloning and expression; cellular localization

收稿日期:2013-10-21

基金项目: 国家自然科学基金(81202323),湖南省科技厅项目(2012FJ6009),湖南省卫生厅项目(B2012-042),南华大学研究生科研创新项目(2012XCX13)。

作者简介: 贺庆芝,在读博士,副教授,研究方向:衣原体致病机制与防治,E-mail:hqz527@163.com. 通讯作者吴移谋,硕士,教授,博士生导师,研究方向:病原体致病机制与防治,E-mail:yimouwu@sina.com.

鸚鵡热嗜衣原体(Chlamydophila psittaci, Cps)是一种严格细胞内寄生、多宿主性的人兽共患病病原体,能引起人、哺乳动物、鸟类呼吸道感染等多种疾病^[1-2]。Cps 感染后可致肺炎、关节炎、淋巴瘤等多种疾病^[3]。由于 Cps 的细胞内寄生性常引起隐性、持续性的感染以及长期使用抗生素所造成的耐药性增加等因素,使得感染反复迁延,造成进行性、不可逆的病

理损伤。到目前为止,Cps 的致病机制尚不清楚。有研究报道,衣原体产生的效应蛋白与宿主细胞的相互作用是衣原体致病过程中必不可少的环节^[3-4]。本研究采用 DNA 重组技术构建 pET30a-CPSIT_0018 原核表达载体,后将重组质粒转化到 E. coli BL21 中,诱导蛋白表达并对表达的蛋白进行纯化,免疫小鼠制备多克隆抗体,间接免疫荧光法分析 His-CPSIT_0018 蛋白在 HeLa 细胞中的分布特征,为进一步研究 Cps 的致病机制奠定理论和实验基础。

1 材料与方法

1.1 菌株、动物、细胞株和主要试剂

Cps 6BC 菌株由美国德克萨斯大学圣安东尼奥健康科学中心(UTHSCSA)钟光明教授实验室提供;清洁级 4~6 周龄雌性健康 BALB/c 小鼠购于湖南斯莱克景达实验动物有限公司;HeLa 细胞购自上海中科院细胞库。

DNA 聚合酶、dNTP Mix、限制性内切酶 BamH I 和 Not I、T4 连接酶均购自 Promega 公司, Ni-NTA Agarose 购自 Qiagen 公司,细菌 DNA 提取试剂盒、PCR 产物纯化试剂盒、DNA marker、蛋白质 marker、HRP 标记羊抗小鼠 IgG 购自碧云天生物公司,鼠抗 MOMP 多克隆抗体、鼠抗 InA 多克隆抗体、Cy3 标记的羊抗鼠 IgG 和 Cy2 标记的羊抗兔 IgG 均来自美国钟光明教授所在的实验室,DMEM 培养基购自 Invitrogen 公司,胎牛血清购自 Gibco 公司, CPSIT_0018 引物(上游 5'-CGC GGA TCC ATG GTT AAT CCT GTT GGT CCT-3',下游 5'-TTT TCC TTT TGC GGC CGC TTA CTG TAG GTA TCC GGA GAA-3')由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

1.2 pET30a-CPSIT_0018 原核表达载体的构建及鉴定

以 Cps 6BC 基因组 DNA 为模板,PCR 扩增 CPSIT_0018 基因;扩增产物经 1.5% (W/V) 琼脂糖电泳鉴定 PCR 产物;应用 PCR 产物纯化试剂盒纯化回收 PCR 产物,纯化产物和 pET30a 质粒经 BamH I 和 NotI 进行双酶切,纯化后用 T4 DNA 连接酶于 22 ℃ 连接 3 h,再将连接产物转化到 E. coli BL21 中,卡那霉素抗性平板筛选转化成功的菌株,挑取单个菌落进行 PCR 鉴定及序列测定(上海 Invitrogen 公司)。

1.3 CPSIT_0018 融合蛋白的表达与纯化

将鉴定后的阳性单克隆接种于 2 mL 抗性(含 60 μg/mL 卡那霉素) LB 培养液中,37 ℃ 水浴,

220 rpm 振荡培养过夜。次日以 1:100 的比例扩大培养;4 h 后加入 IPTG (终浓度为 0.25 mmol/L) 30 ℃ 水浴,180 rpm 振荡诱导表达,4 h 后离心收集细菌,超声破菌后高速离心,上清用 Ni-NTA 层析法过柱纯化蛋白,依次收集到首次流出液、第 1 次洗涤液(洗涤液 1)、第 2 次洗涤液(洗涤液 2)、第 3 次洗涤液(洗涤液 3)、第 1 次洗脱液(洗脱液 1)、第 2 次洗脱液(洗脱液 2),依次类推。各种液体经 12% SDS-PAGE 电泳和考马斯亮蓝染色分析,观察其表达情况和纯化效果。

1.4 免疫动物

取 4~6 周龄 BALB/c 小鼠 6 只,空白组合实验组各 3 只,每只小鼠以 100 μg 重组蛋白(约 50 μL)与等体积的完全弗氏佐剂经超声乳化后,行小鼠皮下注射,初次免疫后的第 20 天和第 28 天,再以每只小鼠 100 μg 重组蛋白与等体积的不完全弗氏佐剂超声乳化后进行第 2 次和第 3 次免疫,空白对照组用 PBS 替代蛋白。小鼠在每次免疫前尾静脉采血,最后 1 次免疫后 1 周摘眼球取血,以 2 000 rpm 离心 20 min 分离血清,分离的血清与空载体转化菌的诱导表达产物等体积混合完全后,37 ℃ 孵育过夜,14 000 rpm 离心 20 min,取上清作为吸附纯化的多克隆抗体。

1.5 ELISA 测定抗体的滴度

用 PBS 稀释纯化的重组蛋白 His-CPSIT_0018 至 10 μg/mL,每空 100 μL 蛋白包被酶标板,37 ℃ 孵育 1 h 后置 4 ℃ 过夜,5% 脱脂牛奶室温封闭 2 h,0.1% PBST 洗板 5 次,加入倍比稀释的不同浓度的待测免疫血清 100 μL,37 ℃ 孵育 1 h,PBST 洗板 5 次后分别加入 1:2 000 稀释的 HRP 标记的羊抗小鼠 IgG 100 μL 孵育 30 min,再同样方法 PBST 洗板 5 次,加入 TMB 显色剂 100 μL,37 ℃ 避光反应 10 min,最后用终止液 100 μL/孔终止反应,酶标仪读取 405 nm 波长的 OD 值。

1.6 细胞培养

HeLa 细胞培养于含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基中,37 ℃、5% CO₂ 的恒湿恒温培养箱中孵育,待细胞密度在 1.0~1.5×10⁶/mL 时,呈单层生长铺满培养瓶 80% 左右后,用胰酶消化进行细胞传代,接种于 24 孔板内。

1.7 间接免疫荧光法(IFA)对 CPSIT_0018 进行定位分析

取合适稀释度的 Cps6BC 型稀释液感染 24 孔板盖玻片上的 HeLa 细胞(细胞融合度约为 60% 左右),

37 ℃继续培养 48 h,然后用 4% 多聚甲醛固定 30 min, 0.3% Triton X-100 室温处理 10 min 使其膜通透性增加,PBS 洗涤和牛奶封闭后,以鼠抗 CPSIT_0018 多克隆抗体和兔抗 Cps 6BC 型全菌抗体为一抗,以 Cy3 标记的羊抗鼠 IgG(红色)和 Cy2 标记的羊抗兔 IgG(绿色)为二抗,同时用 Hoechst(蓝色)标记 DNA 进行免疫荧光检测。同时设立 MOMP、IncA 作为定位参考。

2 结 果

2.1 CPSIT_0018 基因的 PCR 扩增

PCR 扩增 Cps 6BC 基因组中的 CPSIT_0018 基因,将 PCR 扩增产物于 1.5% 琼脂糖凝胶电泳,结果如图 1 所示,在 1 200 bp 和 2 000 bp 位置可见一条清晰的特异性条带,与预期片段(1 920 bp)接近。

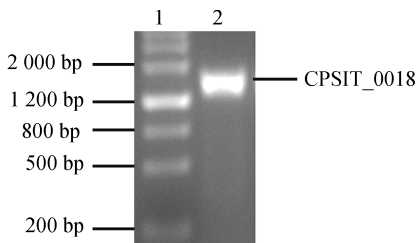


图 1 CPSIT_0018 基因 PCR 扩增产物图 1: DNA Marker;2: CPSIT_0018 基因 PCR 扩增产物

2.2 CPSIT_0018 重组蛋白的表达与纯化

将 pET30a-CPSIT_0018 重组质粒转化至 E. coli BL21,0.25 mmol/L IPTG 诱导其表达。SDS-PAGE 结果显示:诱导菌在 Mr 约为 87 kDa 处有明显条带,与预期的分子量相符(图 2);经 His 树脂纯化后,在相应位置处得到纯化的重组蛋白(图 3)。

2.3 His-CPSIT_0018 的抗原性分析

将重组蛋白 His-CPSIT_0018 作为检测抗原,包被酶标板,ELISA 法对 0、21、28、40 天收集的小鼠对照组和实验组血清中抗 His-CPSIT_0018 特异性抗体 IgG 进行检测,当 405 nm 相对吸光值(实验组/对照组)大于 2 为阳性反应,抗体反应呈阳性时的最高血清稀释度即抗体滴度。结果显示 CPSIT_0018 蛋白可刺激小鼠产生免疫反应,随着接种次数的增多抗体滴度逐渐升高,最高抗体滴度达 1:500 000。

2.4 IFA 分析 CPSIT_0018 在感染的 Hela 细胞内的定位

Cps6BC 感染 Hela 细胞 48 h 后,IFA 结果显示

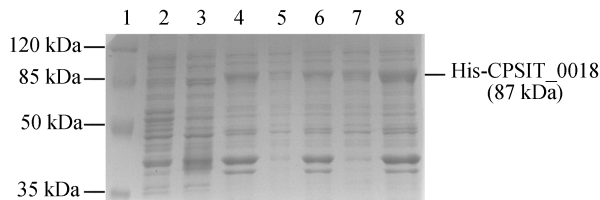


图 2 His-CPSIT_0018 重组蛋白表达的 SDS-PAGE 结果

1:蛋白 Marker;2:空菌(BL21)的表达产物;3:pET30a 空载体转化菌的表达产物;4:His-CPSIT_0018 重组质粒转化菌的表达产物;5:未被诱导的重组菌可溶性产物(上清);6:未被诱导的重组菌非可溶性产物(沉淀);7:IPTG 诱导的重组菌可溶性产物(上清);8: IPTG 诱导的重组菌非可溶性产物(沉淀)

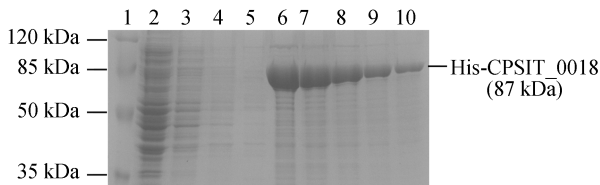


图 3 His-CPSIT_0018 重组蛋白通过 Ni-NTA 进行纯化的流程图

1:蛋白 Marker;2:首次流出液;3:洗涤液 1;4:洗涤液 2;5:洗涤液 3;6:洗脱液 1;7:洗脱液 2;8:洗脱液 3;9:洗脱液 4;10:洗脱液 5

包涵体分布(绿色)在 HeLa 细胞胞浆中,CPSIT_0018 蛋白(红色)定位在包涵体内,与主要外膜蛋白 MOMP 的分布模式相似,而与包涵体膜蛋白 IncA 的分布模式不同(图 4)。

3 讨 论

Cps 作为一种严格胞内寄生菌,经吞噬作用进入宿主细胞,并在宿主细胞内形成包涵体,逃避机体免疫系统和调控宿主细胞基因的转录与翻译。在此过程中 Cps 合成效应蛋白(主要是毒力因子)并通过不同的分泌系统将它们注入宿主细胞内,从而影响宿主细胞正常新陈代谢及功能,导致宿主免疫反应紊乱或细胞骨架重排,为衣原体的定植及其建立亚细胞的生态环境提供有利条件^[5]。这提示:衣原体效应蛋白可能在 Cps 的致病过程中发挥重要作用。

Ⅲ型分泌系统(Type III secretion system,T3SS)是革兰阴性致病菌重要的分泌系统,细菌通过 T3SS 将毒力蛋白注入宿主细胞内发挥致病作用。有研究报道,Cps 与革兰阴性细菌一样拥有 T3SS。所以,筛选和鉴定 Cps T3SS 效应蛋白并对其功能进行初步研究,能为开发具有新作用靶点的治疗药物奠定前

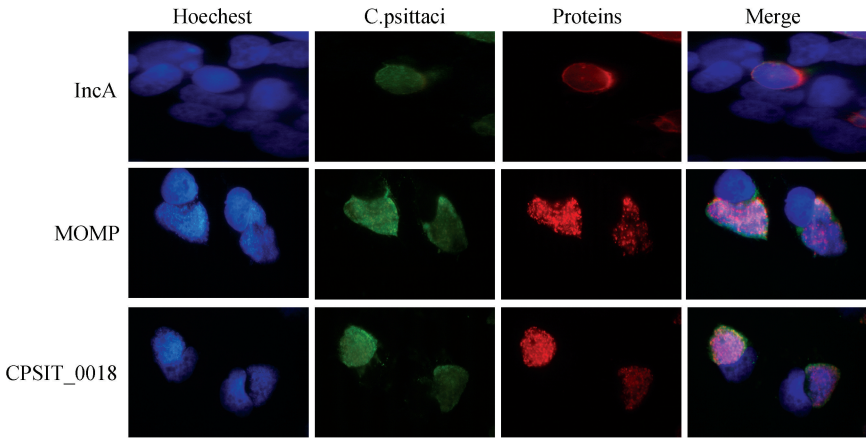


图4 CPSIT_0018 蛋白在 Cps 感染的 HeLa 细胞中的定位 (10 × 100)

期基础。近年来有研究者对衣原体 T3SS 效应蛋白的筛选和鉴定进行了相关的研究,并克隆表达了 T3SS 3 个结构蛋白 SctW、SctC 和 SctN 和一个效应蛋白 IncA,免疫荧光检测 SctW 和 IncA 定位于包涵体膜,SctC 和 SctN 定位于菌体^[6]。Cps T3SS 效应蛋白 IncA 与人 GTP 酶活化蛋白 SH3 域结合蛋白 1 (GTPase activating protein SH3 domain binding protein 1) 结合,能抑制 HEK293 细胞内 c-Myc 蛋白的表达^[7]。Prantner 等使用 T3SS 抑制剂 (INP0007) 可抑制沙眼衣原体的生长和细胞的炎症反应,加入 FeSO₄ 虽然可恢复其生长,但是细胞炎症反应依然被抑制^[8]。本课题组通过计算机软件分析预测了多个 Cps 效应蛋白,CPSIT_0018 就是其中之一。

本研究采用 PCR 方法从 Cps 6BC 基因组 DNA 模板扩增 CPSIT_0018 全长编码基因,通过 DNA 重组技术构建了 pET30a -CPSIT_0018 重组质粒,核苷酸序列测定证实扩增的目的基因与 GenBank 登录的基因序列完全一致,表明重组载体构建成功。将其转化到 E. coli BL21 中,经不断摸索和优化条件,表达可溶性蛋白,并采用 Ni-NTA 层析法对重组蛋白进行纯化。用高纯度的重组蛋白免疫 3~4 周龄 BALB/c 小鼠,得到了鼠抗 CPSIT_0018 的特异性免疫血清,经间接 ELISA 法检测抗体效价。抗体可用于 IFA,以便观察 CPSIT_0018 蛋白亚细胞定位,结果发现:在感染的 HeLa 细胞中 CPSIT_0018 蛋白与主要外膜蛋白 MOMP 的分布模式相似,而与包涵体膜蛋白 IncA 的分布模式不相同,这表明 CPSIT_0018 是定位在 Cps 6BC 菌体上的蛋白。推测 CPSIT_0018 的这种定位方式可能与衣原体裂解胞膜释放出胞外或保护胞外 EB 免受各种不利因素作用等有关^[9]。进一步寻找与 CPSIT_0018 相互作用的宿主细

胞靶蛋白,探讨其作用机制等将有望为衣原体致病机制研究提供新的研究方向。

参考文献:

[1] Jencek JE,Beaufrère H,Tully TN,et al. An outbreak of Chlamydomphila psittaci in an outdoor colony of Magellanic penguins (Spheniscus magella-nicus) [J]. J Avian Med Surg,2012,26(4):225-231.

[2] Dickx V,Vanrompay D. Zoonotic transmission of Chlamydia psittaci in a chicken and turkey hatchery [J]. J Med Microbiol,2011,60(6):775-779.

[3] Dolcetti R,Ponzoni M,Ferreri AJ,et al,Genetic and epigenetic changes linked to Chlamydomphila psittaci associated ocular adnexal lymphomas[J]. Hematol Oncol,2010,28 (1):1-2.

[4] Bode J,Dutow P,Sommer K,et al. A new role of the complement system:C3 provides protection in a mouse model of lung infection with intracellular Chlamydia psittaci [J]. PLoS One,2012,7(11):e50327.

[5] Dean P. Functional domains and motifs of bacterial type III effector proteins and their roles in infection[J]. FEMS Microbiol Rev,2011,35(6):1100-1125.

[6] Beeckman DS,Geens T,Timmermans JP,et al. Identification and characterization of a type III secretion system in Chlamydomphila psittaci[J]. Vet Res,2008,39(3):27.

[7] Borth N,Litsche K,Franke C,et al. Functional interaction between type III-secreted protein IncA of Chlamydomphila psittaci and human G3BP1 [J]. PLoS One, 2011, 6 (1):e16692.

[8] Prantner D,Nagarajan UM. Role for the chlamydial type III secretion apparatus in host cytokine expression [J]. Infect Immun,2009,77(1):76-84.

[9] 陆春雪,曾浩,吴移谋,等. 沙眼衣原体蛋白水解酶 CT841 在感染细胞中的定位及抗原性研究[J]. 免疫学杂志,2012,28(3):203-207.

(此文编辑:朱雯霞)