

沙眼衣原体 CT-249 基因编码蛋白为一包涵体膜蛋白

贾天军¹, 刘殿武^{1*}, 罗建华², 钟光明²

(¹ 河北医科大学流行病学教研室 石家庄 050017)

(² Department of Microbiology and Immunology, University of Texas Health Science Center at San Antonio,

7703 Floyd Curl Drive, San Antonio, Texas 78229, USA)

摘 要 使用融合蛋白 GST-CT249 的抗体对假想蛋白 CT249 的特性进行研究。使用 PCR 方法从 L2 型沙眼衣原体的基因组中扩增编码 CT249 蛋白的开放读码区基因, 限制性内切酶 *Bam*HI 和 *Not*I 消化, T4 连接酶连接导入 pGEX-6p2 载体, 进一步把重组质粒 pGEX-6p2-CT249 转化到 XL1-blue 细菌, 并诱导表达融合蛋白 GST-CT249。在融合蛋白 GST-CT249 免疫小鼠制备抗体后, 应用直接免疫荧光技术对衣原体感染细胞内的 CT249 基因表达的内源性蛋白进行初步定位。成功克隆出沙眼衣原体基因 CT249, 全长为 351bp, 并表达了融合蛋白 GST-CT249, 分子量为 38.2kDa。制备了融合蛋白 GST-CT249 的抗体并初步定位假想蛋白 CT249 于沙眼衣原体包涵体膜蛋白上。总之, 使用融合蛋白 GST-CT249 的抗体, 鉴定假想蛋白 CT249 为一种新的沙眼衣原体包涵体膜蛋白。该发现将为进一步深入研究衣原体与宿主细胞间某些机制提供了有用的途径。

关键词: 沙眼衣原体, 融合蛋白, 克隆, 表达, 包涵体膜蛋白

中图分类号: Q936 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209(2007)04-0645-04

衣原体是一类严格的活细胞内寄生的微生物, 有其独特的生活特性, 包括原体和始体。其中, 肺炎衣原体和沙眼衣原体均为人类致病菌, 但他们的组织特异性和疾病的广谱性不同^[1,2]。生殖道衣原体 (*Chlamydial trachomatis*, CT) 感染是全球范围内危害妇女生殖健康的主要性传播疾病之一, 主要表现为宫颈炎, 继而发生慢性盆腔炎、异位妊娠和不孕等^[3,4]。其感染特征是较隐匿, 易迁延, 常常造成病原菌的广泛传播, 给妇女健康带来很大的危害。由于在体外培养比较困难, 因而对其生物学特性了解不多。衣原体在宿主细胞内生存和繁殖的关键特性之一是能阻止包涵体与宿主细胞的溶酶体融合^[5]。因而了解衣原体包涵体的生物学作用和功能尤为重要, 寻找包涵体膜蛋白并进一步研究其特性及其作用机制是该领域研究的热点之一。自从 1995 年 Rockey DD 等^[6]首次报道了来自衣原体性的豚鼠包涵体关节炎的包涵体膜蛋白(命名为 IncA)以来, 已经陆续发现在沙眼衣原体 CT115 到 CT119 和 CT222 到 CT233 的基因组区域内包括有许多编码包涵体膜蛋白基因, 除此之外在其他区域也发现了包涵体膜蛋白包括 CT089、CT442、CT529 以及 CT813^[7,10]。Bannantine JP 等^[8]Toh H 等^[9]基于已知衣原体基因

组的序列而利用计算机预测包涵体膜蛋白。虽然预测出大约 100 包涵体膜蛋白, 但这些计算机预测的结果并不是完全与实验并证据相符^[8], 因此有必要进一步用实验去证实。CT249 时在克隆了大量基因的基础上发现的又一个包涵体膜蛋白。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株: L2, 为 CT 的一个菌株, 由美国 UTHSCSA 的钟光明教授的实验室提供。

1.1.2 试剂和仪器: Pfx (1U/ μ L)、Taq DNA 聚合酶 (5U/ μ L)、T4 DNA 连接酶 (U/ μ L)、限制性内切酶 *Bam*HI (10U/ μ L) 和 *Not*I (15U/ μ L)、PCR 扩增试剂盒、以及 Cy2 标记的羊抗兔 IgG (绿)、Cy3 标记的羊抗兔 IgG (红)、Hoechst 均购于 Invitrogen 公司; dNTP (10mmol/L, sigma); 质粒提取试剂盒 (Bio-Rad 公司); PCR 仪 (PTC200 peltier thermal cycler MJ research Inc, USA); CO₂ 培养箱 (Formo USA); 荧光生物显微镜 (AX-70, Japan)。

1.2 引物设计

根据 STD 基因库 (www.stdgen.lanl.gov) 提供信息选择沙眼衣原体 CT249 基因的开放读码框的基

* 通讯作者。Tel: 86-311-86265531; E-mail: liudianw@hebmu.edu.cn

作者简介: 贾天军 (1968 -) 男, 河北张家口人, 副教授, 博士研究生, 研究方向为衣原体相关基因的功能研究。E-mail: jiatianjun@yahoo.com

收稿日期: 2006-11-01; 接受日期: 2006-12-06; 修回日期: 2007-02-05

因序列以及所用的克隆和表达载体 pGEX-6p2 设计引物序列如下: CT249: Primer 1 (*Bam*H I): 5'-CGCGGATCCATGGGTATCAAACCTCATGATC-3'; Primer 2 (*Not* I): 5'-TTTTCTTTTGGCGGCCGC CTACGCCTTTGAAGTAATCGAA-3'; pGEX6P2: OPA1: 5'-GGGCTGCAAGCCAGGTTTGGTG 3'; OPA2: 5'-CCGGGAGCTGCATGTCTCAGAGG-3'.

1.3 衣原体基因组 DNA 的提取和 PCR 扩增

取 50 μ L 预先制备的 L2 菌液, 加入 2.5 μ L 10% SDS, 煮沸 10min, 冰上冷却然后加 100 μ L 双蒸水, 高速离心 1min, 储存于 -20 $^{\circ}$ C 备用。

采用 Invitrogen 公司的 PCR 扩增试剂盒, 反应体系为 100 μ L。反应条件: 95 $^{\circ}$ C 2min; 94 $^{\circ}$ C 30s, 52 $^{\circ}$ C 90s, 68 $^{\circ}$ C 4min, 30 个循环; 68 $^{\circ}$ C 10min, 4 $^{\circ}$ C 保存。琼脂糖电泳。用酚-氯仿法纯化扩增产物。最后用 100 μ L 的双蒸水溶解沉淀, -20 $^{\circ}$ C 保存。按常规方法使用限制性内切酶 *Bam*HI/ *Not*I 消化扩增产物, T4 连接酶连接, 热休克法转化感受态菌 XL1-blue。

1.4 阳性克隆的初步筛选

挑取在选择性培养基上生长的菌落进行阳性克隆的筛选, 挑取选定菌落的一半加入到 40 μ L 双蒸水, 煮沸 10min, 冰上冷却, 离心取上清作模板。用 pGEX-6P2 的引物进行扩增。反应体积为 20 μ L。扩增条件: 95 $^{\circ}$ C 4min, 94 $^{\circ}$ C 30s, 46 $^{\circ}$ C 90s, 72 $^{\circ}$ C 4min, 25 个循环, 72 $^{\circ}$ C 10min。琼脂糖电泳观察结果并拍照。

1.5 重组质粒的鉴定

用质粒提取试剂盒 (Bio-Rad 公司) 对初步筛选阳性克隆的纯培养物提取质粒。各选用与 CT249 和 pGEX-6P2 相对应的一条引物进行交叉-PCR, 反应体系及程序同 1.4。用提取的质粒, 进行测序并进行序列分析, 使用 BLAST 软件比对分析。

1.6 融合蛋白的提取和纯化

将过夜的培养物按 1:50 接种到含有氨卞青霉素的 400mL TB 培养基中, 37 $^{\circ}$ C、200r/min 培养到 OD_{600} 为 0.8 时加入 IPTG, 终浓度为 0.1mmol/L。30 $^{\circ}$ C 诱导 3h, 4 $^{\circ}$ C、6000r/min 离心, 收获细菌。加入细胞裂解缓冲液, 冰浴超声, 4 $^{\circ}$ C 15000r/min 离心 15min, 将上清吸到另一干净的离心管中加入 200 μ L 预处理的 Glutathione Sepharose TM 4B (Beads), 室温转动吸附 60min, 离心弃上清, 分别用 PBST 和 PBS 各洗 3 次, 离心, 吸取少量沉淀物加入 SDS 上样缓冲液, 混匀后 100 $^{\circ}$ C 10min, 冷却, 离心, 取上清进行 PAGE 凝胶电泳。凝胶浓度为 15%, 200V 60min, 考马氏亮蓝染色, 观察结果并拍照。

1.7 抗体的制备

按常规方法免疫 Balb/C 小鼠, 首次免疫剂量 100 μ L 融合蛋白 GST-CT249 与弗氏完全佐剂等体积混合, 4 周后第二次免疫剂量 50 μ L 融合蛋白 GST-CT249 与等体积的弗氏不完全佐剂混合, 然后每隔一周免疫一次, 在第三或第四次后采血, 用 IFA 鉴定血清效价。

1.8 蛋白的定位

1.8.1 抗原的制备: 参照文献 [7] 培养 HeLa 细胞, 用 DMEM 调至 8×10^4 加入预先放置有盖片的 24 孔板中过夜培养, 用 L2 感染。37 $^{\circ}$ C 7% CO₂ 条件下培养 36~42h。终止培养, 用 2% PF 室温固定 30min, 2% Sapomin 室温 1h。1% BSA 37 $^{\circ}$ C 封闭 1h。

1.8.2 染色: 用含 10% 胎牛血清的 DMEM 按 1:2000 稀释 CT395 抗体, 兔抗衣原体 L2 菌体蛋白 CT-395 的抗体, CT395 蛋白为 GpE 相关的伴侣 (chaperonin), 在所有的衣原体中的氨基酸序列同源性 >70%, 由 UTHSCSA 的钟光明实验室提供。后, 在用此稀释物按 1:200 稀释制备的抗体, 加入相对应的孔, 37 $^{\circ}$ C 1h。然后加入含有 Cy2 标记的羊抗兔 IgG、Cy3 标记的羊抗鼠 IgG 以及 Hoechst 的混合物, 37 $^{\circ}$ C 1h 荧光显微镜下观察结果。试验中以已知的沙眼衣原体包涵体膜蛋白 CT118 (IncG)^[10] 的作为试验对照, 所用的检测抗体为鼠抗 CT118 蛋白的抗体 (由 UTHSCSA 的钟光明实验室提供)。

2 结果

2.1 基因的克隆与鉴定

扩增产物经过电泳分析发现约在 375bp 处有扩增带, 与预期的设计相符。重组质粒 pGEX-6P2/CT249 经过 pGEX-6P2 的引物和特异性引物进行交叉 PCR 扩增, 获得的扩增产物与预期结果一致。直接以重组质粒 pGEX-6P2/CT249 为模板进行测序, 得到克隆片段的 DNA 序列, 与 STD 基因库 (实际长度为 351bps) 比对一致, 证实克隆基因序列正确。

2.2 CT249 基因在大肠杆菌中的表达与鉴定

选取表达较好的克隆进行大规模的植被 GST-CT249 融合蛋白的粗提物, 应用 Glutathione Sepharose TM 4B 纯化获得 GST-CT249 融合蛋白。经过 SDS-PAGE 分析显示可见显示两条带, 与蛋白参照分子相比, 较强的一条分子量约为 38.2kDa, 为 GST-CT249 的融合体, 是目的蛋白带。较弱的一条为 29kDa, 为单独的 GST。电泳显示的蛋白带谱与预期的结果一致 (图 1)。

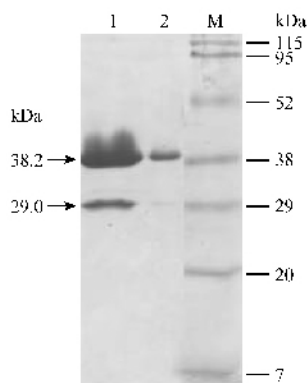


图1 融合蛋白 GST-CT249 的 SDS-PAGE 分析

Fig.1 SDS-PAGE analysis of fusion protein GST-CT249. 1. 12 μ L of purified GST-CT249; 2. 2 μ L of purified GST-CT249; M. Prestain protein marker.

2.3 蛋白的初步定位

经过 IFA 可观察到三色标记: Hoechst 对 DNA 进行染色, 显色为蓝色; Cy2 对衣原体 L2 菌体进行染色, 为绿色; 而 Cy3 则对目的蛋白进行染色显色为红色, 在衣原体的包涵体的膜上有目的蛋白的特异的染色(图 2), 可见融合蛋白 GST-CT249 的抗体所对应的内源性抗原即 CT249 定位在衣原体的包涵体的膜上。

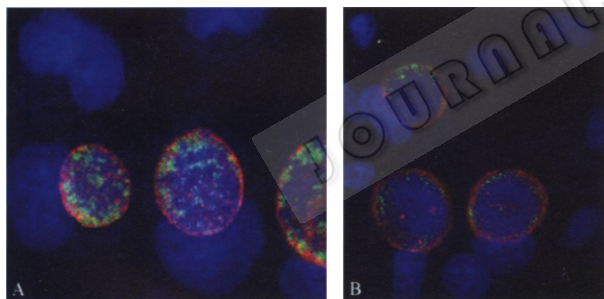


图2 CT249 基因编码蛋白的 IFA 染色

Fig.2 IFA staining with polyclone antibody to recombinant CT249 protein. A: Control D118(IncG); B: CT249. Red: Inclusion membrane protein stain; Green: Chlamydial organism stain; Blue: DNA stain.

3 讨论

沙眼衣原体引起的泌尿生殖道感染是性传播疾病的主要病原生物之一, 然而其确切的致病机制还不清楚, 其独特的生活方式即始体 \rightarrow 原体 \rightarrow 始体, 始体具有感染性而代谢能力弱, 原体没有感染性但代谢能力相当活跃^[11]。其整个循环是在其感染宿主细胞的胞浆内形成的包涵体内进行的。衣原体包涵体的作用至少体现在两个方面, 第一充当保护包涵体内的微生物的正常的生长发育的屏障, 第二充当衣原体与宿主细胞相互作用的门户。为了建立和维

持包涵体内衣原体的生长, 就必须通过包涵体膜与外界交换营养物质和信号。衣原体不仅能够从宿主细胞摄入营养和代谢中间产物, 而且能够分泌效应分子到宿主细胞和主动的操纵宿主的信号通路^[7]。尽管在衣原体和宿主细胞间经常进行物质和信号交换, 但如何通过包涵体膜交换的机制知道甚少。由于包涵体膜蛋白很可能在此发挥重要作用。因此鉴定新的包涵体膜蛋白和深入研究其特性的研究已经成一个深受关注的领域。

本试验中所使用的克隆和表达载体 pGEX-6P₂, 多克隆酶切位点含有 BamH I / Not I, 该组酶切位点通过检索发现在 CT249 的完整序列中没有酶切位点, 因而选用该组限制性内切酶作为该基因克隆的工具酶。另外由于使用该载体进行转化表达后的蛋白为融合蛋白, 为进一步分离纯化目的蛋白提供了方便。设计引物时在两条引物的 5' 端分别加上 BamH I 和 Not I 的酶切位点, 可以使目的基因定向插入到 pGEX-6P₂ 载体中。使用针对载体和目的基因的引物进行 PCR, 由于使用的引物一条来自目的基因 CT249, 而另一条引物来自载体 pGEX-6P₂, 从而进一步确保所扩增阳性的质粒为目的基因与载体的重组体。

本研究使用 HeLa 细胞作为沙眼衣原体 L2 感染的宿主细胞, 建立感染模型。感染 36 ~ 48h 后可见有包涵体的形成。通过免疫荧光染色, 三色标记: Hoechst 对 DNA 进行染色; Cy2 对衣原体进行染色; 而 Cy3 则对目的蛋白进行染色定位。用融合蛋白 GST-CT249 制备多克隆抗体, 很有可能含有针对 GST 的抗体, 但细胞感染模型中, 不可能表达 GST, 且由于编码 GST 的基因与衣原体 CT249 基因没有同源性, 故本实验中只有针对衣原体 CT249 的抗体可以显色。故图 2-B 中所见包涵体包膜上的红色当为 CT249 的抗体的显色。这一结果清楚地表明衣原体 CT249 蛋白为包涵体膜蛋白。这对于进一步了解衣原体与宿主细胞的相互作用即衣原体的抗宿主反应、宿主抗衣原体的免疫反应具有重要的意义。

综上所述, 我们成功地克隆出沙眼衣原体的 CT249 基因, 并置备了重组的 GST 融合蛋白, 使用重组的融合蛋白的抗体对培养的衣原体进行了 IFA, 显示该蛋白为包涵体膜蛋白, 提示我们有必要进一步深入研究其在整个发育过程中的表达时相、相互作用的配体以及与宿主的关系, 进一步探讨其生物学作用, 为未来的预防以及干预治疗提供策略。

参 考 文 献

- [1] Rockey DD , Scidmore MA , Bannantine JP , *et al.* protein in the chlamydial inclusion membrane. *Microbes and Infection* 2002 **4**(3) : 333 – 340.
- [2] Abdelrahman YM , Belland RJ. The chlamydial developmental cycle. *FEMS Microbiol Rev* , 2005 **29**(5) 949 – 959.
- [3] Dautry-Varsat a , Balana ME , Wyploszmon B. Chlamydia-host cell interactions : Recent advances on bacterial entry and intracellular development. *Traffic* , 2004 , **5**(8) 561 – 570.
- [4] Spiliopoulou A , Lakiotis V , Vittoraki A , *et al.* *Chlamydia trachomatis* : time for creening ? *Clin Microbiol Infect* , 2005 , **11**(9) : 687 – 698.
- [5] Severin JA , Ossewaarde JM. Innate immunity in defense against *Chlamydia trachomatis* infections. *Drugs Today* , 2006 , **42**(Suppl A) 75 – 81.
- [6] Rockey DD , Heinzen RA , Hackstadt T. Cloning and characterization of a *Chlamydia psittaci* gene coding for a protein localized in the inclusion membrane of infected cells. *Mol Microbiol* , 1995 , **15**(4) 617 – 626.
- [7] Chen C , Chen D , Sharma J , *et al.* Hypothetical protein CT813 is localized in the *Chlamydia trachomatis* inclusion membrane and is immunogenic in women urogenitally infected with *C. trachomatis* . *Infect Immun* 22006 **74**(8) 4826 – 4840.
- [8] Bannantine JP , Griffiths RS , Viratytosin W , *et al.* A secondary structure motif predictive of protein localization to the chlamydial inclusion membrane. *Cell Microbiol* , 2000 **2**(1) 35 – 47.
- [9] Toh H , Miura K , Shirai M , *et al.* In silico inference of inclusion membrane protein family in obligate intracellular parasites chlamydiae. *DNA Res* , 2003 **10**(1) 9 – 17.
- [10] Scidmore MA , Hackstadt T. Mammalian I4-3-3beta associates with the *Chlamydia trachomatis* inclusion membrane via its interaction with IncG. *Mol Microbiol* 2001 **39**(6) : 1638 – 1650.
- [11] Subtil A , Dautry-Varsat A. Chlamydia : five years A. G. (after genome). *Current Opinion in Microbiology* , 2004 , **7**(1) 85 – 92.

Localization of the hypothetical protein CT249 in the *Chlamydia trachomatis* inclusion membrane

JIA Tian-jun¹ , LIU Dian-wu^{1*} , LUO Jian-hua² , ZHONG Guang-ming²

(¹ Department of Epidemiology , Hebei Medical University , Shijiazhuang 050017 , China)

(² Department of Microbiology and Immunology , University of Texas Health Science Center at San Antonio , 7703 Floyd Curl Drive , San Antonio , Texas 78229 , USA)

Abstract : To characterize the hypothetical protein CT249 using antibodies raised with CT249 fusion protein. The open reading frame (ORF) coding for CT249 in the *Chlamydia trachomatis* serovar L2 genome was cloned into the pGEX-6p2 vector using the restriction enzymes *Bam*H I and *Not* I . The recombinant plasmid pGEX-6p2-CT249 was transformed into XL1-blue bacteria and the gene CT249 was expressed as fusion proteins with the glutathione -s-transferase (GST) tagged to the N-terminus. The GST-CT249 fusion protein was used to immunize mice and the mouse anti-fusion protein antibody was used to localize the endogenous CT249 protein in Chlamydia-infected cells using an indirect immunofluorescence assay (IFA). The CT249 gene with 351bps in length was successfully cloned and expressed as GST fusion protein with molecular weight of 38.2kDa. The anti-fusion protein antibodies produced from mice detected the hypothetical protein CT249 in the inclusion membrane of *Chlamydia trachomatis*-infected cells. Using antibodies raised with GST-CT249 fusion protein , the hypothetical protein CT249 have been identified as a *Chlamydia trachomatis* inclusion membrane protein. Given the potentially important role of inclusion membrane proteins in chlamydial interactions with host cells , this finding has provided a useful tool for further understanding the mechanisms of chlamydial intracellular parasitism.

Keywords : *Chlamydia trachomatis* ; fusion protein ; expression ; inclusion membrane protein

* Corresponding author. Tel 86-311-86265531 , E-mail liudianw@hebmu.edu.cn

Received : 1 November 2006 / Accepted : 6 December 2006 / Revised : 5 February 2007