

• 临床检验研究论著 •

肺炎嗜衣原体 Cpn 0147 重组蛋白的免疫学活性研究^{*}

代国知¹, 马忠夏², 周安文², 陈虹亮^{2#}, 吴移谋^{1△}

(1. 南华大学病原生物学研究所, 湖南衡阳 421001; 2. 湖南省郴州市第一人民医院 423000)

摘要:目的 研究 Cpn 0147 重组蛋白的免疫学活性及其应用于肺炎嗜衣原体(Cpn) 感染临床诊断中的价值。方法 采用 GST 琼脂糖凝胶纯化目的蛋白, 将 Cpn 0147 重组蛋白免疫新西兰兔, 分别应用 Western blot、ELISA 法检测其免疫反应性及免疫原性, 同时通过检测临床标本以评估其诊断价值。结果 成功表达并纯化了相对分子质量约 41×10^3 的重组蛋白 GST-Cpn 0147; Western blot 和 ELISA 结果显示, 该重组蛋白具有良好的免疫反应性, 动物实验结果表明该重组蛋白具有较好的免疫原性, ELISA 结果显示该重组蛋白免疫新西兰兔血清抗体效价为 1 : 12 800。结论 Cpn 0147 重组蛋白具有较好免疫学活性和特异性, 可为 Cpn 感染的确诊、预防研究奠定基础。

关键词: 衣原体, 肺炎; Cpn 0147 重组蛋白; 临床诊断

DOI: 10. 3969/j. issn. 1673-4130. 2012. 14. 003

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2012)14-1671-02

Immunoactivity analysis of Cpn 0147 recombinant protein of Chlamydomophila pneumoniae

Dai Guozhi¹, Ma Zhongxia², Zhou Anwen², Chen Hongliang^{2#}, Wu Yimou^{1△}

(1. Institute of Pathogenic Biology, Nanhua University, Hengyang, Hu'nan 421001, China; 2. The First People's Hospital of Chenzhou City, Chenzhou, Hu'nan 423000, China)

Abstract: Objective To explore the immunoactivity of Cpn 0147 recombinant protein, and its clinical value for the diagnosis of Chlamydomophila pneumoniae(Cpn) infection. **Methods** GST-Cpn 0147 protein was purified by GST sepharose FF. Its immunoactivity was determined by Western blot, and clinical specimens were detected by enzyme linked immunosorbent assay(ELISA). **Results** The GST fusion protein with molecular weight of 41×10^3 was expressed. The purity of recombination protein after purification reached 95%. Both Western blot and ELISA showed good antigenicity of recombination protein. **Conclusion** The purified recombination protein might have high specificity and good immunological activity, which could lay a solid foundation for the further study on the serodiagnosis and prevention of Cpn.

Key words: Chlamydomophila pneumoniae; Cpn 0147 recombinant protein; clinic diagnosis

肺炎嗜衣原体(Cpn)是一种严格细胞内寄生, 具有独特发育周期的原核细胞型微生物, 于 1989 年正式确立为衣原体属的新种, 主要引起人类的呼吸道感染, 而且还有可能通过直接或间接的机制参与动脉粥样硬化的发生与发展, 因而受到人们越来越多的关注^[1]。近年来, 众多学者开始研究 Cpn 致病的分子机制、诊断及预防, 然而对其诊断方法的研究甚少, 现行的各种诊断方法也都存在不足之处^[2-3]。ELISA 法操作简便, 使用可靠的仪器客观地阅读结果, 可应用于各级实验室, 因此本研究建立以纯化的 Cpn 0147 重组蛋白作为包被抗原的间接 ELISA 法, 检测呼吸道感染患者血清, 初步评价其在临床诊断 Cpn 感染中的应用价值。

1 材料与方

1.1 仪器与试剂 限制性核酸内切酶 BamH I、Not I 以及 Pfx、Taq DNA 聚合酶、DNA Marker 均为大连宝生物公司产品; SeroCP™ ELISA 商品试剂盒为 Savyon Diagnostics 公司产品。梯度 PCR 仪为 Biometra 公司产品; Multiskan MK3 全自动酶标检测仪为芬兰雷勃公司产品。

1.2 方法

1.2.1 Cpn 0147 基因克隆 参照 Cpn 0147 全基因序列以及克隆表达载体 pGEX-6p-2 设计 PCR 引物, 序列如下: 上游引物 P1, 5'-CGC GGA TCC ATG GCT GTT CAA TCT ATA AAA GA-3'; 下游引物 P2, 5'-TTT TCC TTT TGC GGC CGC

CTA ACT TCC CGC CCC TGA A-3'。分别在 P1 和 P2 中引入 BamH I 酶切位点和 Not I 酶切位点, 同时加上保护性碱基。PCR 反应程序为 94 ℃ 5 min; 94 ℃ 30 s, 54 ℃ 90 s, 72 ℃ 45 s, 30 个循环; 72 ℃ 10 min; PCR 产物 4 ℃ 保存。取 5 μL PCR 产物样品中加入 1 μL 6×溴酚蓝加样缓冲液, 以 5 V/cm 在 1.5% 的琼脂糖凝胶中电泳, 初步鉴定 PCR 产物。

1.2.2 pGEX-6p-2/Cpn 0147 表达载体的构建及鉴定 1.2.1 中所得 PCR 产物经纯化、双酶切后连接至原核表达载体 pGEX-6p-2 上, 构建 pGEX-6p-2/Cpn 0147 原核表达载体, 再将 pGEX-6p-2/Cpn 0147 重组质粒转化入 E. coli XL1-Blue 中, 对转化子进行筛选, 双酶切鉴定, 对确认阳性的质粒测序^[4-5], 测定结果与 GenBank 上发表的 Cpn 0147 编码基因序列进行 BLAST 比对分析。

1.2.3 GST-Cpn 0147 重组蛋白的诱导表达 将已确证的重组质粒转化入表达菌 E. coli XL1-Blue 中, 以不同的诱导前菌液浓度、诱导温度、诱导时间及 IPTG 浓度诱导重组菌表达目的蛋白, 确定蛋白表达最佳条件。以最佳表达条件大规模表达 GST-Cpn 0147 重组蛋白, 12%SDS-PAGE 对表达产物进行鉴定分析。

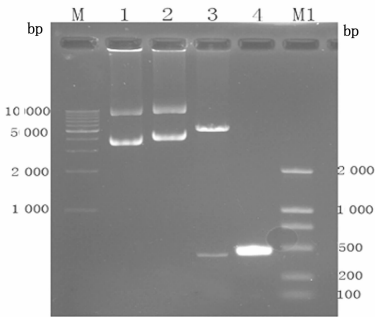
1.2.4 重组蛋白的纯化及鉴定 按 GST 融合蛋白纯化试剂盒说明书操作, 将含有目的蛋白的上清液装柱, 最后用 GENMED 洗脱液洗脱目的蛋白, 12%SDS-PAGE 分析纯化结果。

1.2.5 重组蛋白的免疫活性分析 将重组蛋白与弗氏佐剂混

合乳化,皮下多点注射免疫 20 只新西兰兔(1.5~3.0 千克/只),蛋白剂量为 200 微克/只,同时设立对照组(未注射组、缓冲液Ⅱ阴性对照组及 GST 标签蛋白组)。每次免疫前均于耳中央静脉采血,末次免疫 10 d 后心脏采血,离心分离血清,−20℃保存待用。采用 ELISA 法检测血清抗体效价,用纯化的目的蛋白包被酶标板,二抗为辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG,酶标仪测 450 nm 波长处的 A 值,结果判定以待测样本的 A 值与阴性对照的 A 值之比大于或等于 2.0($P/N \geq 2.0$)为阳性,显示阳性结果的最大抗体稀释度为血清效价。

2 结 果

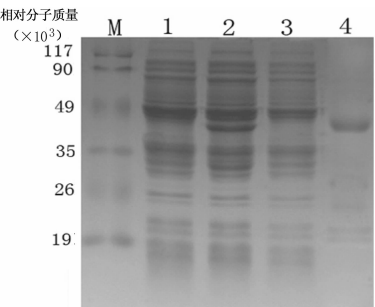
2.1 原核表达载体的构建及鉴定 将 PCR 产物纯化并经 BamHⅠ和 NotⅠ双酶切后,定向插入经同样方法处理的 pGEX-6p-2 载体中,通过 Amp 抗性筛选和双酶切鉴定,见图 1,证实其中重组载体中有 Cpn 0147 基因插入子,经正反双向自动基因测序分析,序列与 GenBank 登录的 Cpn 0147 基因片段完全相同。



M:DNA Marker;1:pGEX-6p-2 载体;2:pGEX-6p-2/Cpn 0147 重组质粒;3:BamHⅠ和 NotⅠ双酶切后的 recombinant plasmid pGEX-6p-2/Cpn 0147;4:PCR 产物;M1:DNA Marker。

图 1 pGEX-6p-2/Cpn 0147 重组质粒的 PCR 检测、酶切鉴定

2.2 重组蛋白的表达、纯化和鉴定 诱导、表达 GST-Cpn 0147 重组蛋白,经过 12% SDS-PAGE 分析显示 pGEX-6p-2/Cpn 0147 重组菌的裂解液在相对分子质量约 41×10^3 处出现新的蛋白表达条带,且以可溶性形式为主,与预期的结果一致,见图 2。

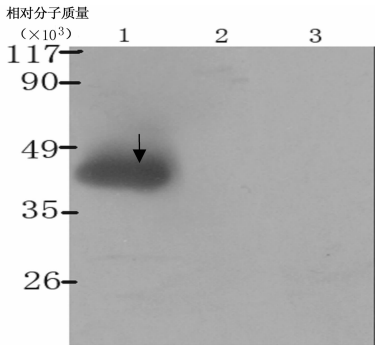


M:Marker;1:non-induced XL-1 Blue;2:induced XL-1 Blue with pGEX-6p-2/Cpn 0147;3:precipitation of broken induced XL-1 Blue with pGEX-6p-2/Cpn 0147;4:supernatant of broken induced XL-1 Blue with pGEX-6p-2/Cpn 0147。

图 2 重组蛋白表达形式分析

2.3 重组蛋白 GST-Cpn 0147 免疫学活性分析 (1)建立的间接 ELISA 法检测结果如下,用重组蛋白 GST-Cpn 0147 免疫兔第 1 次后血清中开始产生特异性抗体,免疫兔第 3 次后血清

中特异性 IgG 滴度高达 1:12 800 以上,免疫兔第 4 次后抗体效价开始下降,未注射组及缓冲液Ⅱ阴性对照组未检测出 Cpn 0147 特异性抗体,这表明重组蛋白 GST-Cpn 0147 能刺激兔产生抗体,具有较好的免疫原性;(2)以 GST-Cpn 0147 多克隆抗体为一抗,Western blot 分析目的蛋白的免疫反应性。可见,纯化蛋白在预期位置出现特异性条带,见图 3,表明重组蛋白 GST-Cpn 0147 具有较好的免疫反应性。



1:纯化 GST-Cpn 0147;2:GST-Cpn 0146;3:阴性对照。

图 3 重组蛋白 GST-Cpn 0147 的抗原性分析

3 讨 论

本研究应用 PCR 技术扩增出 Cpn 0147 编码基因片段,同时选用含有 T7 启动子和 Lac 操纵子的原核表达载体 pGEX-6p-2,成功地构建 pGEX-6p-2/Cpn 0147 重组质粒,并将其转染于相应宿主菌 E. coli XL-1 Blue,通过对重组质粒进行酶切鉴定和进一步核苷酸测序鉴定,证实了插入子序列与靶基因的一致性以及读码框架的正确,确保了下一步研究的可靠性^[6-7]。

如何制备高质量的重组蛋白 GST-Cpn 0147 是后续研究能否进行的关键问题之一,为此,作者对一系列诱导细菌表达条件进行了优化,设置培养温度梯度和诱导剂 IPTG 剂量梯度,并改变诱导时间,同时对比不同的细菌裂解液,从而获得可溶性重组蛋白的高效表达^[8]。此外,本实验采用默克 Novagen 的 GST 琼脂糖凝胶进行纯化,该 GST 纯化填料只对 GST 及 GST 重组蛋白有吸附活性,经纯化得到纯度高达 95% 以上的目的蛋白,同时,纯化的重组蛋白可以保持其天然生物学活性^[9]。

由本实验结果可见,以高纯度的重组蛋白 GST-Cpn 0147 免疫新西兰兔,获得兔抗重组蛋白的免疫血清。间接 ELISA 法检测免疫血清中多克隆抗体的效价,结果显示其特异性抗体效价均比较高,说明该重组蛋白具有良好的免疫原性,能刺激新西兰兔引发强烈的体液免疫应答。经 Western blot 分析证明重组蛋白能被 Cpn 阳性血清特异性地识别,具有良好的免疫反应性。

总之,本研究证实了 Cpn 0147 具有良好的免疫原性、免疫反应性及较高的临床诊断价值。然而,Cpn 感染的发生发展是一个多因素、多阶段、多步骤的过程,涉及到大量的分子参与和复杂的网络调控,因此,作者在下一步研究中还将筛选出更多的关键分子,并确定 Cpn 感染早期诊断和有效治疗的抗原标志物,同时在此基础上探索开发高质量 Cpn 感染诊断试剂,期望为 Cpn 的诊断、治疗和新药开发提供新的思路。

参考文献

[1] Burillo A, Bouza E. Chlamydomphila pneumoniae[J]. Infect Dis Clin North Am, 2010, 24(1): 61-71. (下转第 1674 页)

续表 1 不同保存期红细胞悬液中一氧化氮浓度及与输注有效率比较

红细胞制剂 保存期(d)	一氧化氮 检测病例(n)	一氧化氮 ($\mu\text{mol/L}$)	有效病例 (n)	RBC 输注 有效[n(%)]
28 ^④	105	2.01±6.54	98	76(77.55)
34 ^⑤	35	0.89±4.32	29	21(72.41)
合计	535	—	486	415(85.39)

—:无数据。从上至下两两分别进行 t 检验, $t_{①②}=3.245, P<0.01; t_{②③}=3.521, P<0.01; t_{③④}=3.263, P<0.01; t_{④⑤}=3.197, P<0.01$, 差异有统计学意义。

3 讨 论

输血作为目前仍不可替代的一种治疗手段, 保证其安全、有效是输血医学永恒的课题。传统的输血风险主要指免疫排斥、感染及传播疾病等方面, 但近年大量研究表明, 除免疫原因以外, 输血效果不佳还可能是随着储存期的延长、血液形态学和生化学的改变所产生的不良反应造成的。在储存期间, 受条件限制, 血液多种成分尤其是红细胞的生理功能受损, 细胞膜的流动性和通透性发生改变, 红细胞变形性降低, 聚集性增加, 细胞弹性下降使细胞变硬^[2-3], 影响微循环的有效灌注和器官供氧, 进而影响输血效果。

一氧化氮被认为是体内最重要的信号分子, 对机体健康至关重要, 存在于心血管系统、神经系统乃至全身。众所周知, 红细胞的主要功能是运输氧气和二氧化碳, 现在认为呼吸循环是一氧化氮/氧气二氧化碳的三气体系统。红细胞不仅运输氧气和二氧化碳, 还运输一氧化氮, 而且其生理性血管效应依赖于血红蛋白的作用。最新研究结果显示, 长期保存的血液制品中一氧化氮缺乏, 而只有当一氧化氮介导血管扩张, 红细胞才能将氧气顺利输送到机体组织^[4-5]。血库中的血液自从采集之后就会发生一系列的生理改变, 红细胞的形态发生改变, 细胞灵活性降低; 氧结合调节分子减少, 红细胞氧亲和性的降低和流变学及粘连性的改变可能加重局部缺血。本文研究已经发现红细胞的储存时间越长, 细胞内一氧化氮浓度越低, 输注有效率也越低, 且差异有统计学意义($P<0.01$)。

近年来一系列研究表明, 同种异体红细胞输注可能危害受

血者。特别值得注意的是, 在临床随机实验中大剂量输血同限制输血比较, 前者能够增加输血相关疾病发病率 20% 左右。血库中一氧化氮的大量流失, 血管不能扩张, 红细胞在血管中堆积, 机体组织就会缺氧, 接受输血的患者心脏病复发、心力衰竭、中风甚至死亡的概率较高。对于临床医师来说, 认识到红细胞输注的有限好处或者潜在危险, 有利于他们制定具有针对性和限制性的红细胞输注方案^[6-7]。

一氧化氮含量与贮存红细胞的生理活性密切相关。如何控制血库中一氧化氮的流失以及怎样补充一氧化氮, 提高红细胞运输氧气的能力, 这尚待进一步研究。在输血的同时补充一氧化氮, 已经在动物实验中取得成功^[4]。但能否应用到人体, 一氧化氮补充量的控制及方法等, 还需进一步临床实验。

参考文献

[1] 吕运来, 负中桥, 兰炯采, 等. 红细胞无效输注回顾性初探[J]. 中国输血杂志, 2007, 20(3): 220-221.

[2] Bonaventura J. Clinical implications of the loss of vasoactive nitric oxide during red blood cell storage[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2007, 104(49): 19165-19166.

[3] Koch CG, Li L, Duncan AI, et al. Transfusion in coronary artery bypass grafting is associated with reduced longterm survival[J]. Ann Thorac Surg, 2006, 81(5): 1650-1657.

[4] Reynolds JD, Ahearn GS, Angelo M, et al. S-nitrosohemoglobin deficiency: a mechanism for loss of physiological activity in banked blood[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2007, 104(43): 17058-17062.

[5] Bennett-Guerrero E, Veldman TH, Doctor A, et al. Evolution of adverse changes in stored RBCs[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2007, 104(43): 17063-17068.

[6] Kor DJ, Van Buskirk CM, Gajic O. Red blood cell storage lesion [J]. Bosn J Basic Med Sci, 2009, 9(Suppl 1): 21-27.

[7] Hu W, Jin R, Zhang J, et al. The critical roles of platelet activation and reduced NO bioavailability in fatal pulmonary arterial hypertension in a murine hemolysis model[J]. Blood, 2010, 116(9): 1613-1622.

(收稿日期: 2012-01-10)

(上接第 1672 页)

[2] Fainardi E, Castellazzi M, Seraceni S, et al. Under the microscope: focus on chlamydia pneumoniae infection and multiple sclerosis [J]. Curr Neurovasc Res, 2008, 5(1): 60-70.

[3] Bennedsen M, Berthelsen L, Lind I, et al. Performance of three microimmuno fluorescence assays for detection of chlamydia pneumoniae immunoglobulin M, G, and A antibodies[J]. Clin Diagn Lab Immunol, 2002, 9(4): 833-839.

[4] 颜子颖, 王海林. 精编分子生物学实验指南[M]. 北京: 科学出版社, 1998: 1.

[5] Sambrook J, Russell D. 分子克隆实验指南[M]. 黄培堂, 译. 3 版. 北京: 科学出版社, 2002: 1.

[6] Luo J, Liu G, Zhong Y, et al. Characterization of hypothetical proteins Cpn0146, 0147, 0284 & 0285 that are predicted to be in the

Chlamydia pneumoniae inclusion membrane[J]. BMC Microbiol, 2007, 7: 38.

[7] Hong LC, Zhou Z, Zhan H, et al. Serodiagnosis of Chlamydia pneumoniae infection using three inclusion membrane proteins [J]. J Clin Lab Anal, 2010, 24(1): 55-61.

[8] Dutta S, Lalitha PV, Ware LA, et al. Purification, characterization, and Immunogenicity of the refolded ectodomain of the Plasmodium falciparum apical membrane antigen 1 expressed in Escherichia coli[J]. Infect Immun, 2002, 70(6): 3101-3110.

[9] Gribskov M, Burgess RR. Overexpression and purification of the sigma subunit of E. coli RNA polymerase[J]. Gene, 1983, 26: 109.

(收稿日期: 2011-12-30)