

沙眼衣原体 CT058 蛋白在感染细胞中的定位分析

陈超群¹ 吴移谋^{1*} 任林² 李忠玉¹

(1. 南华大学 医学院微生物学与免疫学教研室/病原生物学研究所 湖南 衡阳 421001)

(2. 南华大学 附属第一医院检验科 湖南 衡阳 421001)

摘要: 分析沙眼衣原体 CT058 蛋白在感染细胞中的定位。克隆表达 CT058 蛋白; 纯化的 CT058 融合蛋白免疫小鼠制备多克隆抗体; 间接免疫荧光法对 CT058 蛋白在沙眼衣原体感染细胞中的定位进行分析; Western blot 检测 CT058 蛋白在原生体和网状体中的表达情况。间接免疫荧光染色实验显示 CT058 蛋白位于包涵体内; 鼠抗 GST-CT058 抗体与 GST-CT058 融合蛋白吸附后特异性染色消失, 而与 GST-CT232 融合蛋白吸附后仍然可见 GST-CT058 抗体的包涵体染色特征; Western blot 证实 CT058 蛋白在纯化的原生体和网状体上均有表达。CT058 蛋白定位于沙眼衣原体感染细胞的包涵体内。

关键词: 沙眼衣原体, CT058, 亚细胞定位

Intracellular localization of the hypothetical protein CT058 in the *Chlamydia trachomatis*-infected cells

CHEN Chao-Qun¹ WU Yi-Mou^{1*} REN Lin² LI Zhong-Yu¹

(1. Department of Microbiology and Immunology, Institute of Pathogenic Biology, School of Medicine, University of South China, Hengyang, Hunan 421001, China)

(2. Department of Clinical Laboratory, the First Affiliated Hospital, University of South China, Hengyang, Hunan 421001, China)

Abstract: To tract the intracellular localization of the hypothetical protein CT058 in the *Chlamydia trachomatis*-infected cells. The gene *ct058* was expressed as GST-CT058 fusion protein in *E. coli* and its antibody was prepared by immunizing mouse with the fusion protein. Then, the anti-GST-CT058 antibody was used to localize the endogenous protein in cells infected by *C. trachomatis* serovar L2 using indirect immunofluorescence assay (IFA). Western blot was carried out to detect whether CT058 presents in the purified elementary body (EB) or reticulate body (RB). The anti-GST-CT058 antibody detected an inclusion-inside signal in an IFA. The intra-inclusion signal could be removed by pre-absorption of the antibody with the GST-CT058 fusion protein but not control GST-CT232. Fur-

thermore, the mouse anti-CT058 antibody recognized the endogenous CT058 protein from purified EBs and RBs in a Western blot assay. The results of the current study support the general consensus that the hypothetical protein CT058 was localized within the inclusion body of the *C. trachomatis*-infected cells.

Keywords: *Chlamydia trachomatis*, CT058, Subcellular localization

沙眼衣原体(*Chlamydia trachomatis*, CT)是一种严格细胞内寄生、有独特发育周期的原核细胞型微生物,除引起人类沙眼外,同时也是性传播疾病的重要病原体;泌尿生殖道 CT 感染是 HIV-1 感染和传播的重要危险因素,是人乳头瘤病毒(HPV)致宫颈癌的协同因子^[1]。CT 基因组 DNA 序列和功能注释完成后,衣原体蛋白的亚细胞定位、结构和功能的研究已成为衣原体研究领域的热点之一^[2-8],包涵体膜蛋白(Inclusion membrane protein, Inc 蛋白)、分泌蛋白等效应蛋白丰富了衣原体蛋白质组学研究。

Inc 蛋白是指一类由衣原体基因编码合成并定位于衣原体包涵体膜上的蛋白质,多数 Inc 蛋白拥有由 40-60 个氨基酸残基组成的双叶片状疏水性基序(Bilobed hydrophobicity motif),借此锚定于包涵体膜上;Bannantine 等^[9-10]应用生物信息学预测 CT 基因组中有约 50 个候选 *inc* 基因, Bannantine^[9]的研究也表明部分候选 *inc* 基因编码的蛋白并非 Inc 蛋白,需要实验进一步证实。*ct058* 是候选 *inc* 基因,CT058 蛋白是否分布于包涵体膜上尚无实验证实。本研究以重组 CT058 融合蛋白为免疫原,免疫 BALB/c 小鼠制备多克隆抗体,采用间接免疫荧光法(IFA)对 CT058 蛋白进行了定位认识,同时采用 Western blot 检测了 CT058 内源性蛋白在原体(EB)和网状体(RB)中的分布情况,从而为深入探究 CT058 蛋白的生物学功能奠定基础。

1 材料与方 法

1.1 材料

1.1.1 菌株、质粒及引物: CT 血清型 L2 型、表达载体 pGEX6p-2、大肠杆菌 XL1Blue、HeLa 细胞等由美国得克萨斯大学圣安东尼奥医学科学中心

(UTHSCSA)钟光明教授实验室保存;引物由 UTHSCSA 的 DNA 实验室合成。

1.1.2 主要试剂: 限制型内切酶 *Bam*H I 和 *Not* I、*Pfx* DNA 多聚酶等购自 Invitrogen 公司; Glutathione Sepharose 4B 纯化试剂购自 Amersham Biosciences 公司;弗氏完全佐剂、不完全佐剂为 Sigma 公司产品;兔抗 CT 多克隆抗体 R1L2、鼠抗 CT 主要外膜蛋白(MOMP)单克隆抗体 MC22 由钟光明教授实验室制备并保存;Cy2 标记的羊抗兔 IgG 和 Cy3 标记的羊抗鼠 IgG 二抗购自 Jackson ImmunoResearch 公司。

1.1.3 实验动物: BALB/c 小鼠由 UTHSCSA 实验动物部提供和饲养。

1.2 方法

1.2.1 pGEX6p-2/*ct058* 重组表达质粒的构建与鉴定: 从 STD 数据库(<http://stdgen.northwestern.edu>)获取 CT 血清型 D 型 *ct058* 基因序列,在线限制性内切酶图谱分析(www.restrictionmapper.org),根据 pGEX6p-2 质粒的多克隆酶切位点信息设计适宜 PCR 引物(分别带 *Bam*H I 和 *Not* I 酶切位点,见表 1)。以 CT 血清型 L2 型基因组 DNA 为模板扩增 *ct058* 基因,纯化的 PCR 产物经 *Bam*H I 和 *Not* I 双酶切后以适当比例与同样双酶切的 pGEX6p-2 质粒在 T4 DNA 连接酶作用下 4 °C 连接过夜,连接产物转化大肠杆菌 XL1 Blue 感受态细胞,涂布于含氨苄青霉素的 LB 平板进行筛选,挑取菌落进行菌落 PCR 鉴定,对阳性菌落进行培养,提取质粒,选用 *ct058* 的引物 1 和载体 pGEX 的 OPA2 组合以及 *ct058* 的引物 2 和载体 pGEX 的 OPA1 组合进行交叉-PCR 对提取的重组质粒进一步确认,对确认阳性的质粒进行测序鉴定,测序结果使用 BLAST 软件比对分析。

表 1 *ct058* 基因扩增用 PCR 引物
Table 1 PCR primers for amplification of *ct058*

Primer	Sequence (5'→3')	Restriction site
<i>ct058</i> -P1	CGCGGATCCATGTTTACGTCGCTGTCCGC	<i>Bam</i> H I
<i>ct058</i> -P2	TTTTCTTTTTCGGCCGCTTATAAATTCACGGGTTGAGGG	<i>Not</i> I
pGEX- OPA1	GGGCTGGCAAGCCACGTTTGGTG	—
pGEX- OPA2	CCGGGAGCTGCATGTGTCAGAGG	—

1.2.2 GST-CT058 融合蛋白的表达与纯化: 根据预试验诱导表达的条件, 参照文献[2]对融合蛋白进行诱导表达和纯化, 将单个阳性克隆菌落接种于 20 mL 含 100 mg/L 氨基青霉素的 TB 液体培养基, 37 °C 振荡培养过夜, 次日按 1% 比例转种于 400 mL 含氨基青霉素的 TB 液体培养基中, 37 °C 振荡培养至 OD_{600} 值达 0.6–0.8 时, 加入 IPTG 至终浓度 200 μ mol/L, 30 °C、220 r/min 培养, 诱导表达 3 h 后 4 °C、7 000 r/min 离心 10 min 收集菌体沉淀, 重悬于含蛋白酶抑制剂的 20 mL 裂解缓冲液中, 4 °C 超声裂解菌后, 低温高速离心 20 min, 取上清与 PBS 预平衡的 Glutathione Sepharose 4B Beads 在室温转动吸附 1 h, 低速离心弃上清, 经 0.25% PBST 和 PBS 洗涤后得到纯化的融合蛋白, 分装保存。取 10 μ L 纯化的产物进行 10% SDS-PAGE 电泳分析。

1.2.3 免疫血清的制备: 将纯化的 GST-CT058 融合蛋白与等量弗氏完全佐剂超声乳化后, 腹腔注射免疫 6 周龄 BALB/c 小鼠, 初次免疫 14 d 后, 每隔 10 d 用融合蛋白弗氏不完全佐剂加强免疫 3 次, 末次免疫 7 d 后采血, 分离血清获得多克隆抗体, 间接免疫荧光法检测 CT058 蛋白在 CT 感染 HeLa 细胞中的定位情况。

1.2.4 间接免疫荧光染色(IFA)分析衣原体蛋白的定位: 参照文献[2]方法进行, 取无菌 24 孔细胞培养板, 放置圆形盖玻片, 每孔加 1 mL 含 8×10^4 HeLa 细胞的细胞生长液(含 10% FBS 的 DMEM 培养基), 5% CO₂ 培养箱中 37 °C 培养 18–24 h, 细胞长成单层后弃去培养液, 接种 CT 血清型 L2 型, 加含 2 mg/L 放线菌酮的细胞生长液, 37 °C CO₂ 培养箱培养 40–46 h。吸出细胞培养孔中的衣原体感染液, 采用 4% 多聚甲醛固定和 0.1% Triton-100 打孔处理, PBS 洗涤后用含 10% FBS 的 DMEM 室温封闭, 一抗用兔抗 CT 多克隆抗体 R1L2, 和 1:200、1:1 000 和 1:5 000 稀释的鼠抗 CT058 蛋白抗体双染色, 37 °C

孵育 1 h; 洗涤后加入二抗, 二抗采用 Cy2 标记的羊抗兔 IgG 和 Cy3 标记的羊抗鼠 IgG, Hoechst 标记细胞核, 37 °C 孵育 1 h 后充分洗涤, 盖玻片放置于载玻片上并封片, Olympus AX-70 荧光显微镜观察结果, Hamamatsu 数码相机摄取图像, 利用 SimplePCI 软件将所有单一颜色融入三色图像。应用 Inc 蛋白 IncB (CT232) 作为对照, 所用一抗为鼠抗 GST-CT232 血清, 操作方法同前。为证实鼠抗 GST-CT058 多克隆抗体血清的特异性, 将血清分别与 GST-CT058 融合蛋白和 GST-CT232 融合蛋白在室温转动吸附 1 h, 离心收集上清后, 按上述方法进行进一步观察结果。

1.2.5 Western blot 分析衣原体蛋白在原体和网状体中的表达: 大量细胞培养 CT 血清型 L2 型, 采用不连续密度梯度离心法分离纯化原体(EB)和网状体(RB)。将 GST-CT058、GST-CT232、HeLa 细胞蛋白提取物、CT 血清型 L2 型感染 HeLa 细胞的蛋白提取物、纯化的 EB 和 RB 经 SDS-PAGE 电泳后转移至硝酸纤维素(NC)膜, 5% 脱脂奶粉室温封闭 1 h, 以 1:5 000 稀释的 GST-CT058 多克隆抗体血清作为一抗, HRP 标记的羊抗鼠 IgG 抗体为二抗, 通过 ECL 显色系统进行 Western blot 检测。随后 NC 膜与甘氨酸脱缓冲液(Glycine stripping buffer)室温作用 30 min, 0.05% PBST 充分洗涤后, 5% 脱脂奶粉封闭, 以 MOMP 单克隆抗体 MC22 作为一抗按上述方法进行 ECL 显色。

2 结果

2.1 pGEX6p-2/*ct058* 重组表达质粒的构建与鉴定
以 CT 血清型 L2 型基因组 DNA 为模板地扩增出大小为 1 104 bp 的目的片段, 对交叉-PCR 鉴定为阳性的重组质粒进行了测序, 测序结果 ORF 分析表明目的基因正确插入载体中, BLAST 分析显示 CT 血清型 L2 型的 *ct058* 基因 DNA 序列(GenBank accession

No. JN089721)与血清型 D 型的基因同源率为 98%。

2.2 GST-CT058 融合蛋白的表达与纯化

pGEX6p-2/*ct058* 阳性克隆菌经 IPTG 诱导后, 采用 Glutathione Sepharose 4B 纯化得到重组蛋白 GST-CT058, SDS-PAGE 显示在相对分子质量 96 kD 与 52 kD 处可见一清晰蛋白条带, 与预测融合蛋白分子量基本相符 (GST 相对分子质量为 26 kD, CT058 相对分子质量约 40 kD), 与其他 GST-融合蛋白纯化图谱存在差异(图 1)。

2.3 CT058 蛋白在感染细胞中的定位

CT 血清型 L2 型感染 HeLa 细胞 42 h, 固定细胞, 以融合蛋白多克隆抗体血清为一抗, IFA 结果显示 CT058 蛋白在感染细胞内的分布模式(图 2A)与已知的 Inc 蛋白-CT232 (图 2B)不一致, CT058 蛋白位于包涵体内, 而非包涵体膜上。GST-CT058 蛋白吸附鼠抗 GST-CT058 抗体血清后 Cy3 染色消失(图 2C), 而用 GST-CT232 融合蛋白吸附后仍然可见鼠抗 GST-CT058 抗体的包涵体染色特征(结果与图 2A 相似)。

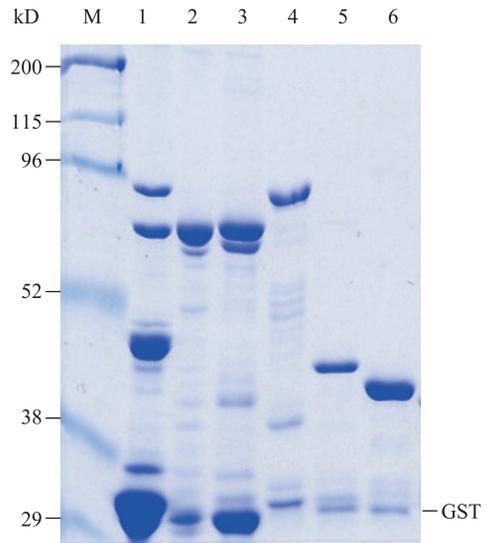


图 1 GST-CT058 融合蛋白纯化产物的 10% SDS-PAGE 分析

Fig. 1 SDS-PAGE analysis of purified GST-CT058 fusion protein

Note: M: Protein marker; 1: GST-CT005 (65 kD); 2: GST-CT036 (71 kD); 3: GST-CT058 (66 kD); 4: GST-CT089 (71 kD); 5: GST-CT101 (44 kD); 6: GST-CT115 (41 kD).

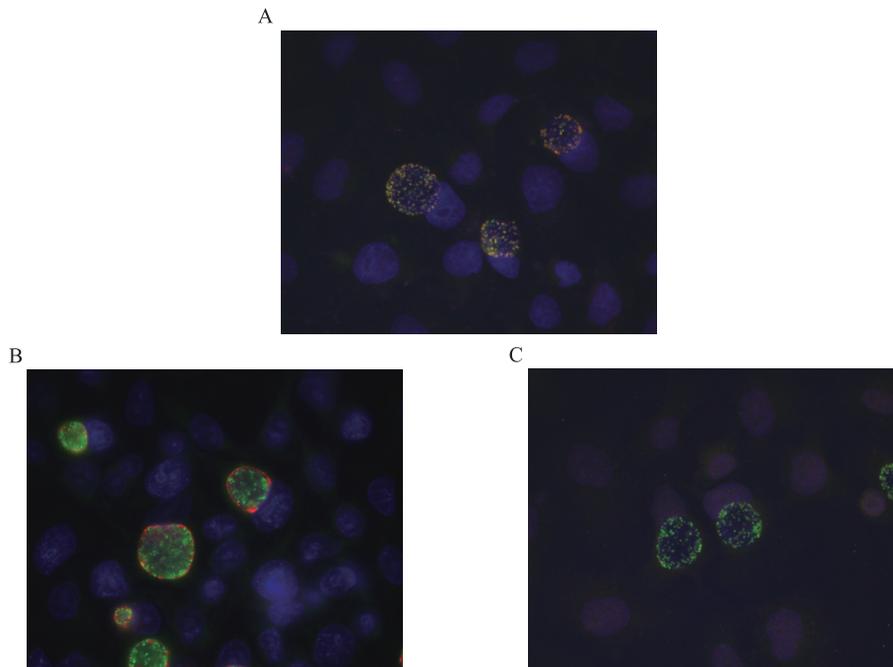


图 2 CT058 蛋白在感染细胞中的定位($\times 1\ 000$)

Fig. 2 Intracellular localization of the CT058 in the *C. trachomatis*-infected cells ($\times 1\ 000$)

Note: HeLa cells infected with *C. trachomatis* serovar L2 were immunostained with mouse anti-GST fusion proteins antibodies visualized with a goat anti-mouse IgG conjugated Cy3 (red), a rabbit anti-chlamydia antibody R1LZ visualized with a Cy2-conjugated goat anti-rabbit IgG (green), and a DNA dye (blue). A: The anti-GST-CT058 antibody (at 1:1 000) detected signals mainly inside the inclusions and the staining overlapped with the chlamydial organisms. B: The anti-CT232 antibody detected a dominant signal in the inclusion membrane. C: The anti-CT058 labeling was removed by preabsorption of the antibody with GST-CT058 fusion protein, but not an irrelevant GST-CT232 fusion protein (image not shown).

2.4 CT058 蛋白在 EB 和 RB 中的分布

Western blot 结果显示鼠抗 GST-CT058 抗体既能识别 GST-CT058 融合蛋白, 也能够识别内源性 CT058 蛋白(图 3); 内源性 CT058 蛋白不仅存在于 EB, 也存在于 RB 中; CT058 蛋白在 EB 和 RB 中的分布情形与 MOMP 相似。

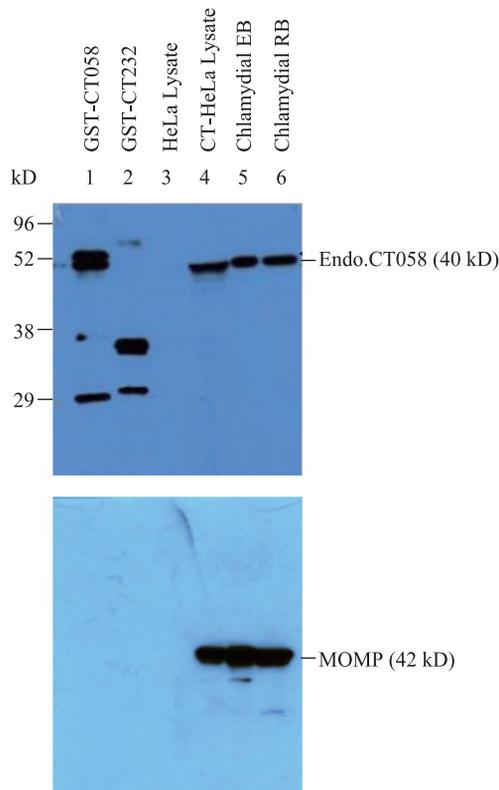


图 3 鼠抗 GST-CT058 抗体检测 CT058 内源性蛋白

Fig. 3 The anti-GST-CT058 antibody specifically detected the endogenous CT058 protein produced by chlamydial organisms.

Note: Antigens, including GST-CT058 (lane 1), or GST-CT232 (lane 2) fusion proteins, HeLa cell lysates (lane 3), Chlamydia-infected HeLa (CT-HeLa) lysates (lane 4), purified Chlamydial EBs (lane 5) and RBs (lane 6), were resolved on SDS-polyacrylamide gel and blotted onto nitrocellulose membrane for detection with antibody against CT058 fusion protein. The mouse anti-GST-CT058 antibody reacted with both GST-CT058 fusion protein and the endogenous CT058 from the *C. trachomatis*-infected cells and detected the endogenous CT058 from the purified EBs and RBs. CT058 was enriched in the purified organisms. Anti-CT058 also picked up the GST-CT232 due to anti-CT058's ability to recognize GST. The same membrane was reprobated with anti-MOMP. The control antibody anti-MOMP was used to indicate that the CT-HeLa samples contain chlamydial organisms.

3 讨论

在感染宿主细胞过程中, CT 借助 EB 侵袭宿主易感细胞, 在宿主细胞内增殖形成包涵体, 在包涵体内完成 EB→RB→EB 的发育周期, 在某种信号的调控下 EB 体积增大分化为 RB, RB 则以二分裂方式进行繁殖, 随后部分 RB 又进一步分化为 EB, 包涵体成熟导致大量 EB 进入胞质, 宿主细胞裂解后 EB 被释放到宿主细胞外, 再感染其他易感细胞。包涵体为 CT 在宿主细胞内的生长繁殖提供屏障保护, 同时也是 CT 与宿主细胞进行物质交换和信息传递的门户, CT 不仅可从宿主细胞摄取营养物质^[1], 还可分泌效应蛋白进入宿主细胞胞质调节宿主细胞功能^[3,12]。在 CT 与宿主细胞相互作用过程中, Inc 蛋白、分泌蛋白等衣原体蛋白可能发挥着重要作用。鉴于蛋白质的亚细胞定位情况往往与其功能密切相关, 衣原体蛋白的定位认识成为其功能研究中的重要环节。

本研究选用含有 tac 启动子的原核表达载体 pGEX6p-2 成功构建了 pGEX6p-2/*ct058* 重组质粒, 转化大肠杆菌 XL1 Blue 后在 IPTG 诱导下表达了可溶性融合蛋白, 应用 Glutathione Sepharose 4B 吸附 GST 融合蛋白, 经充分洗涤后得到了纯度较高的融合蛋白, 为后续研究奠定了基础。为进一步认识 CT058 蛋白在感染细胞中的亚细胞定位, 本研究将纯化的 GST-CT058 融合蛋白免疫小鼠, 制备多克隆抗体, 采用间接免疫荧光法(IFA)分析 CT058 蛋白的分布特征, 在 IFA 染色过程中采用荧光染色三色标记, Hoechst 对 DNA 染色(呈蓝色), Cy2 标记的荧光抗体(绿色)对 CT 全菌体染色, 而 Cy3 标记的荧光抗体(红色)对目的蛋白进行染色定位; 若目的蛋白分布于菌体上, 则绿色荧光和红色荧光重叠, IFA 结果最终显示为黄色或橘黄色, 若目的蛋白位于包涵体膜上, IFA 结果显示在包涵体周围呈现红色的包涵体膜染色。本研究 IFA 结果显示 CT058 蛋白在感染细胞中的分布与已知的 Inc 蛋白——CT232 不一致, CT058 蛋白位于包涵体内。应用 IFA 实验进行亚细胞定位分析过程中, 确认一抗的特异性非常重要;

因 GST 基因与衣原体基因没有同源性,能较好地排除 GST 抗体染色的干扰;GST-CT058 蛋白吸附鼠抗 GST-CT058 抗体血清后的 IFA 结果显示 Cy3 荧光染色消失,而用 GST-CT232 蛋白吸附后仍然可见鼠抗 GST-CT058 抗体血清的包涵体染色特征,提示所制备的多克隆抗体是针对 GST-CT058 融合蛋白的,为通过 IFA 认识 CT058 蛋白在感染细胞中的亚细胞定位提供了保证。为了进一步认识 CT058 蛋白在 EB 和 RB 中的分布情况,本研究以鼠抗 GST-CT058 抗体为一抗进行了 Western blot 检测,结果表明 CT058 蛋白不仅存在于 EB,也存在于 RB 中;CT058 蛋白在 EB 和 RB 中的分布与 MOMP 相似。

综上所述,本研究借助 IFA 和 Western blot 成功地认识了 CT058 蛋白在沙眼衣原体感染细胞中的亚细胞定位情况,CT058 蛋白定位于包涵体内,为后续 CT058 蛋白的结构和生物学功能的深入研究奠定了基础。

致谢: 本研究部分实验在美国 UTHSCSA 钟光明教授实验室完成,感谢钟光明教授给予的实验指导和帮助。

参 考 文 献

- [1] 陈超群, 吴移谋, 李忠玉, 等. 沙眼衣原体外膜蛋白 2 重组蛋白的表达纯化和免疫性鉴定[J]. 中华检验医学杂志, 2005, 28(7): 697-699.
- [2] Chen C, Chen D, Sharma J, et al. The hypothetical protein CT813 is localized in the *Chlamydia trachomatis* inclusion membrane and is immunogenic in women urogenitally infected with *C. trachomatis*[J]. Infection and Immunity, 2006, 74(8): 4826-4840.
- [3] Pirbhai M, Dong F, Zhong Y, et al. The secreted protease factor CPAF is responsible for degrading pro-apoptotic BH3-only proteins in *Chlamydia trachomatis*-infected cells[J]. The Journal of Biological Chemistry, 2006, 281(42): 31495-31501.
- [4] Huang Z, Feng Y, Chen D, et al. Structural basis for activation and inhibition of the secreted chlamydia protease CPAF[J]. Cell Host and Microbe, 2008, 4(6): 529-542.
- [5] Li ZY, Wang SP, Wu YM, et al. Immunization with chlamydial plasmid protein pORF5 DNA vaccine induces protective immunity against genital chlamydial infection in mice[J]. Science in China Series C: Life Sciences, 2008, 51(11): 973-980.
- [6] Mehlitz A, Banhart S, Mäurer AP, et al. Tarp regulates early *Chlamydia*-induced host cell survival through interactions with the human adaptor protein SHC1[J]. The Journal of Cell Biology, 2010, 190(1): 143-157.
- [7] Qi ML, Lei L, Gong SQ, et al. *Chlamydia trachomatis* secretion of an immunodominant hypothetical protein (CT795) into host cell cytoplasm[J]. Journal of Bacteriology, 2011, 193(10): 2498-2509.
- [8] 李忠玉, 吴移谋, 黄秋林, 等. 质粒蛋白 pORF5 在沙眼衣原体感染细胞中的定位及免疫原性研究[J]. 免疫学杂志, 2011, 27(2): 93-97.
- [9] Bannantine JP, Griffiths RS, Viratyosin W, et al. A secondary structure motif predictive of protein localization to the chlamydial inclusion membrane[J]. Cellular Microbiology, 2000, 2(1): 35-47.
- [10] Toh H, Miura K, Shirai M, et al. In silico inference of inclusion membrane protein family in obligate intracellular parasites chlamydiae[J]. DNA Research, 2003, 10(1): 9-17.
- [11] Heuer D, Rejman Lipinski A, Machuy N, et al. Chlamydia causes fragmentation of the Golgi compartment to ensure reproduction[J]. Nature, 2009, 457(7230):731-735.
- [12] Zhong GM. *Chlamydia trachomatis* secretion of proteases for manipulating host signaling pathways[J]. Frontiers in Microbiology, 2011, 2: 14.