

鸚鵡热衣原体 *Mip* 基因原核表达载体的构建及多克隆抗体的制备

胡春生¹, 符玺宗², 周鹏², 柏琴琴², 曾心璇², 周朴帆², 刘子卿², 张程¹, 陈丽丽²

1. 湖南省疾病预防控制中心, 湖南 长沙 410005; 2. 南华大学公共卫生学院

摘要: **目的** 克隆鸚鵡热衣原体巨噬细胞感染增强蛋白 (Microphage infectivity potentiator, *Mip*) 基因, 构建原核重组质粒, 诱导表达重组蛋白, 并免疫 BALB/c 小鼠, 制备多克隆抗体, 为进一步研究其功能奠定了基础。 **方法** 提取鸚鵡热衣原体 6BC 基因组 DNA, PCR 扩增 *Mip* 基因, 克隆至 pET-30a(+), 构建原核表达载体 pET-30a(+)-Cps *Mip*。PCR、酶切及测序鉴定后, IPTG 诱导 pET-30a(+)-Cps *Mip* 在 *E. coli* BL21 中表达目的蛋白。融合蛋白纯化后免疫 BALB/c 小鼠, ELISA 检测小鼠血清中抗 *Mip* 抗体的效价。 **结果** PCR 扩增得到大小约为 768 bp 左右的 *Mip* 目的片段; 经 PCR、酶切及测序鉴定, 证明构建的原核重组质粒中插入的片段为 Cps *Mip* 基因, 测序结果经 BLAST 分析, 与 Genbank 上登录序列完全一致。经 IPTG 诱导, 重组工程菌表达一相对分子量 (Mr) 约为 34 kD 的目的蛋白; ELISA 检测免疫小鼠血清效价为 1:128 000。 **结论** 成功构建了鸚鵡热衣原体 *Mip* 基因原核表达载体, 并表达了相应可溶性蛋白, 制备了高效价的鼠抗 *Mip* 多克隆抗体。

关键词: 鸚鵡热衣原体; *Mip* 基因; 免疫原性; 多克隆抗体

中图分类号: R374⁺.2 文献标识码: A 文章编号: 1006-3110(2017)03-0280-04 DOI: 10.3969/j.issn.1006-3110.2017.03.007

Construction of prokaryotic vector encoding *Chlamydia psittaci* *Mip* gene and the preparation of its polyclonal antibodies

HU Chun-sheng, FU Xi-zong, ZHOU Peng, BAI Qin-qin, ZENG Xin-dian,

ZHOU Pu-fan, LIU Zi-qing, ZHANG Cheng, CHEN Li-li

* Hunan Provincial Center for Disease Control and Prevention, Changsha, Hunan 410005, China

Corresponding authors: CHEN Li-li, E-mail: chlili720612@163.com

Abstract: **Objective** To construct a prokaryotic recombinant plasmid containing the gene encoding microphage infectivity potentiator (*Mip*) of *Chlamydia psittaci* (*C. psittaci*), and lay a basis for further study on the function of the recombinant protein.

Methods The *C. psittaci* 6BC *Mip* gene was amplified by PCR and cloned into plasmid pET-30(+), then transformed into *E. coli* BL21. After being identified by PCR, restriction enzymes cleavage and nucleotide sequencing, the positive strains were induced by IPTG. Then the recombinant protein *Mip* was analyzed by SDS-PAGE and purified with Ni-NTA-His affinity chromatography. The purified recombinant *Mip* was used to immunize BALB/c mice, and the antibodies to *Mip* in mice sera were titrated with ELISA. **Results** A 768bp fragment of *C. psittaci* *Mip* gene was obtained by PCR. The target gene was proved to be successfully inserted into pET30(+) by PCR, restriction enzymes cleavage and nucleotide sequencing. The similarity was 100% between the inserted gene and *Mip* gene reported in Genbank by BLAST analysis. After the induction and purification, a recombinant protein about 34KD was obtained. Specific humoral response was elicited in BALB/c mouse after immunization with the purified recombinant protein and the antibody titer in mice' sera was higher than 1:128,000. **Conclusions** Prokaryotic expression plasmid pET-30(+)-Cps *Mip* is successfully constructed, a molecular weight about 34 KDa protein is obtained and specific antibody is successfully prepared.

Key words: *Chlamydia psittaci*; Microphage infectivity potentiator (*Mip*) gene; immunogenicity; polyclonal antibody

基金项目: 国家自然科学基金项目(81572011); 湖南省自然科学基金(2016JJ3103); 湖南省研究生科研创新项目(CX2016B482)

作者简介: 胡春生(1975-), 男, 硕士, 研究方向: 微生物检验; 符玺宗(1990-), 男, 硕士研究生, 研究方向: 衣原体致病机制研究。胡春生、符玺宗为并列第一作者。

通信作者: 陈丽丽, E-mail: chlili720612@163.com。

鸚鵡热衣原体 (*Chlamydia psittaci*, Cps) 是一种人畜共患病原微生物, 主要感染鸟类, 也可感染牛、羊、兔、鼠等多种哺乳动物^[1-3]。动物受到 Cps 感染后, 可出现肺炎、结膜炎等一系列病变, 并可导致流产、死产、幼仔成活率降低等, 严重影响畜牧业的生产。人类通过接触被 Cps 感染动物的粪便或上呼吸道分泌物而被感染, 可引起肺炎、心肌炎、心包炎、脑炎等疾病, 还可导致肾损伤、肝炎及神经系统症状, 甚至诱发多脏器功能衰竭^[4-5]。全球多个国家和地区均有人类因感染 Cps 而发病甚至导致死亡相关病例的报道^[6-7]。Cps 感染后常表现为急性症状, 也可导致隐性或持续性的感染, 同时由于抗生素的滥用使耐药菌株增多, 使 Cps 感染迁延不愈, 对宿主造成进行性、不可逆的病理损伤。截至目前为止, 尚无有效疫苗上市。因此, 如何有效控制和预防 Cps 感染备受关注。

巨噬细胞感染增强蛋白 (microphage infectivity potentiator, Mip) 是衣原体含量最丰富的脂蛋白^[8], 在衣原体各种属间都存在且高度保守。Bas 等^[9]报道 Mip 可刺激 THP1 细胞产生一系列炎症因子, 参与衣原体对宿主细胞的侵袭及炎症反应。陆春雪等^[10]用鼠衣原体的 Mip 蛋白免疫小鼠, 发现 Mip 可诱导小鼠产生以 Th1 型为主的细胞免疫反应, 而且, 抗感染实验表明免疫后的小鼠能抵御生殖道衣原体感染及再感染。另有学者报道, 抗 Mip 蛋白抗体存在于 90% 以上鼠衣原体生殖道感染小鼠血清中, 且抗体效价明显高于 MOMP、CPAF 和 Pgp3 等衣原体优势抗原^[11]。由此可见, 衣原体 Mip 蛋白是一种较理想的疫苗候选抗原。本实验拟克隆 Cps Mip 基因, 构建原核表达载体, 表达可溶性蛋白, 并制备多克隆抗体, 为下一步研究 Mip 蛋白的功能奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物、菌株与质粒 4~6 周雌性 BALB/c 小鼠购自湖南斯莱克景达公司。Cps 6BC 标准株, pET-30a 质粒, *E. coli* BL21 菌株均为南华大学病原生物学研究所保存。

1.1.2 主要试剂 高保真 DNA 聚合酶购自日本 TOYOBO 公司; DNA 提取试剂盒、PCR 产物纯化回收试剂盒和质粒小量提取试剂盒均购自美国 OMEGA 公司; Ni-NTA HIS * BIND RESIN His 融合标签蛋白纯化树脂购自德国默克 Novagen 公司。

1.2 方法

1.2.1 PCR 扩增 Cps 6BC Mip 基因 分析鸚鵡热衣

原体 Mip 基因序列, 设计特异性引物。上游引物: CGCGGATCCATGAAAAACAATGGTATT (下划线为 BamH I 酶切位点), 下游引物: CCGCTCGAGTCATGAAGCTGTGTTTTTGTGTC (下划线为 Xho I 酶切位点), 引物由上海英潍捷基公司合成。用 DNA 提取试剂盒从 Cps 6BC 中提取基因组 DNA, 以基因组 DNA 为模板, PCR 扩增 Mip 基因。扩增条件为: 预变性 94 ℃ 5 min, 进入 94 ℃ 30 s, 54 ℃ 30 s, 72 ℃ 1 min 的 30 个循环, 72 ℃ 终延伸 5 min, 终止反应。经电泳鉴定后, 用 PCR 产物纯化试剂盒纯化 PCR 产物。

1.2.2 Cps Mip 基因的克隆及鉴定 纯化的 Mip PCR 扩增产物和 pET-30a(+) 空质粒经 BamH I 和 Xho I 双酶切后, 用 T4 连接酶连接, 转化至 *E. coli* BL21 感受态细胞中, 用含卡那霉素的 LB 固态培养基培养过夜, 筛选阳性克隆并用 PCR 初步鉴定。挑取 PCR 初筛阳性的单个菌落, 接种于含卡那霉素的 LB 液体培养基中, 提取质粒做双酶切鉴定, 并送往南京金斯瑞生物科技有限公司测序, 序列正确的重组质粒命名为 pET-30a(+)-Cps Mip。

1.2.3 重组 Cps Mip 蛋白的诱导表达及纯化 挑取经测序鉴定的阳性菌接种到含卡那霉素 (终浓度 100 μg/ml) 的 LB 液体培养基中, 37 ℃ 过夜培养。第 2 d 以体积比 1:100 接种于含卡那霉素的 LB 液体培养基, 37 ℃ 振荡至 OD 0.8 左右, 向菌液中加入终浓度为 0.5 mmol/L 的 IPTG, 30 ℃ 诱导 3 h, 同时设未诱导 (不加 IPTG) 的重组体组和空载体组为对照。离心收集菌体, 并用 PBS 洗涤沉淀, 再将沉淀重悬于裂解缓冲液中, 并加入溶菌酶 (4.0 mg/ml), 室温放置 30 min, 超声裂菌后, 离心取上清, 进行 SDS-PAGE 检测。同样条件对重组蛋白进行大规模诱导表达, 超声裂菌后, 取上清, 经 HIS 纯化树脂纯化, 利用咪唑洗脱吸附在 Ni-NTA-His 亲和层析柱上的目的蛋白, 从而得到纯化的 Mip 蛋白。

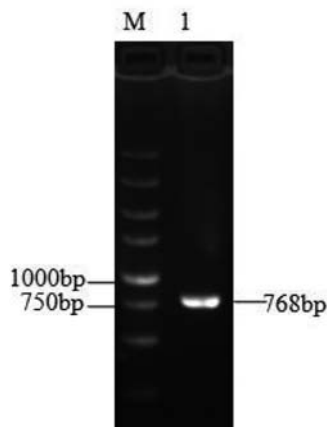
1.2.4 动物免疫 取等体积完全弗氏佐剂和纯化的 Mip 蛋白, 乳化完全 (注射器互推法), 腹腔注射免疫 BALB/c 小鼠, 蛋白免疫剂量为 30 μg/只; 第 14 d 和 21 d 各加强免疫一次, 佐剂改用不完全弗氏佐剂, 蛋白用量和接种方式不变。设 PBS 和空质粒组对照。末次免疫后 7 d, 麻醉小鼠, 眼球采血, 分离血清, 加入等体积甘油混匀后, -20 ℃ 保存备用。

1.2.5 间接 ELISA 法测定小鼠血清抗体效价 用 10 μg/ml Cps Mip 抗原包被酶标板, 每孔 100 μl, 同时设空白对照。4 ℃ 包被过夜, 0.05% PBST 洗涤 3 次后, 5% 脱脂奶粉封闭 1 h, 加入倍比稀释的待测鼠免疫血

清, 37 ℃ 温育 1 h, 0.05% PBST 洗涤 5 次后, 加入 HRP-羊抗鼠 IgG, 37 ℃ 温育 1 h, 充分洗涤后, 37 ℃ 避光显色 15 min, 滴加终止液, 酶标仪 450 nm 读板, 实验组 A_{450} /空白对照组 $A_{450} \geq 2.1$ 为阳性, 以阳性血清最高稀释度定义为抗体效价, 即抗体滴度。

2 结果

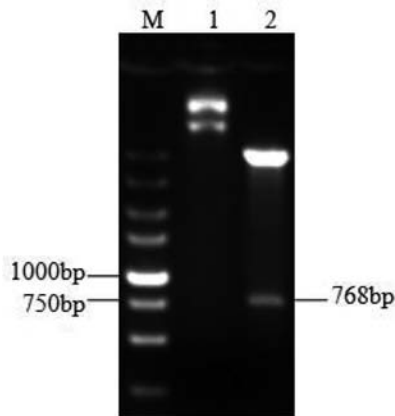
2.1 Cps Mip 的 PCR 扩增 提取 Cps 6BC 基因组 DNA, 经 PCR 扩增后, 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳结果显示, PCR 扩增到 768 bp 大小的 DNA 片段, 与预期目的基因大小相符, 见图 1。



M: DNA marker dl5000; 1: PCR product of Cps 6BC Mip

图 1 Mip 基因 PCR 产物琼脂糖凝胶电泳

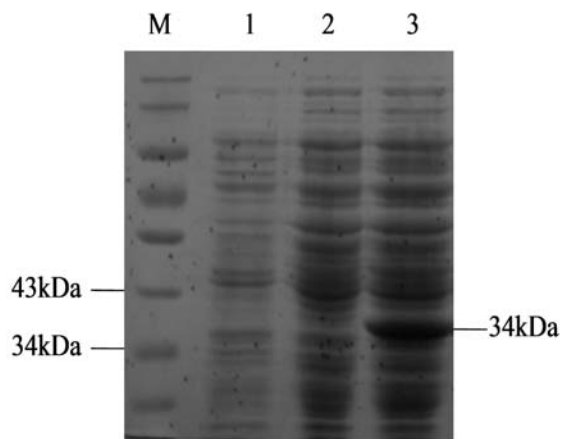
2.2 重组质粒的构建及鉴定 以重组质粒 pET-30a(+)-Cps Mip 为模板, 用 Mip 特异性引物 PCR 扩增得到 768 bp 的目的片段。重组质粒 pET-30a(+)-Cps Mip 经 BamH I 和 Xho I 双酶切后, 出现两个片段, 大片段接近 5.4 kb, 小片段约 768 bp 左右与预期值相符, 见图 2。测序后, Blast 分析发现, pET-30a(+)-Cps Mip 序列与 Genbank 登陆的 Cps 6BC Mip 基因同源性为 100%, 且密码子读码框架正确。



M: dl5000 DNA marker; 1: recombinant plasmid pET-30a(+)-Cps Mip; 2: pET-30a(+)-Cps Mip digested by BamH I and Xho I

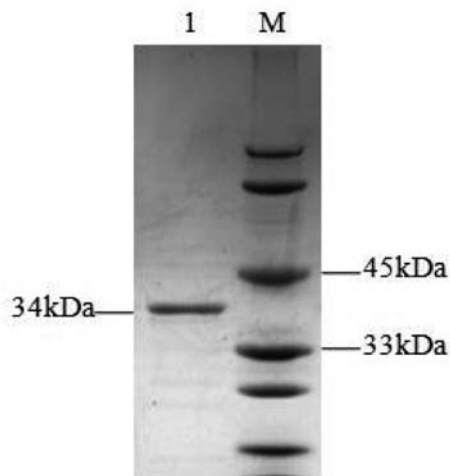
图 2 pET-30a(+)-Cps Mip 重组质粒双酶切鉴定

2.3 重组 Cps Mip 蛋白的表达及纯化 将 pET-30a(+)-Cps Mip 重组质粒转化至 *E. coli* BL21, IPTG 诱导表达后, 重组菌在 Mr 约为 34 kD 处有一明显条带, 见图 3。经 Ni-NTA-His 亲和层析柱纯化后在 Mr 约 34 kD 处有一条唯一的蛋白带, 见图 4。



M: Protein Marker; 1: protein of *E. coli* BL21 induced with IPTG; 2: protein of pET-30a-Cps Mip without IPTG; 3: protein of pET-30a-Cps Mip with IPTG (0.5 mmol/L)

图 3 pET-30a-Cps Mip 在 *E. coli* BL21 中诱导表达



M: Protein marker; 1: Cps Mip protein after purification

图 4 Cps Mip 重组蛋白纯化的 SDS-PAGE 结果

2.4 抗 Cps Mip 蛋白多克隆抗体制备 用重组蛋白免疫 BALB/c 小鼠后, ELISA 法检测小鼠血清中抗 Cps Mip 特异抗体, 其效价达 1:128 000, 血清阳性反应率为 100%。经 PBS、空质粒免疫 4 次后, 小鼠血清中未检出 Cps Mip 特异性抗体。

3 讨论

鹦鹉热衣原体是一种专性细胞内寄生, 有独特二相生活周期的原核细胞型微生物, 也是一种重要的人畜共患病原体, 具有广泛的感染谱。人主要通过吸入有感染性的分泌物而发生感染, 感染后可引起非典

型性肺炎和败血症等疾病。目前为止,Cps 的确切致病机制不清楚,也无有效疫苗上市,开发有效的疫苗是预防 Cps 感染最根本的措施。

Mip 蛋白是广泛存在于衣原体各种属间且高度保守的脂蛋白,属于 FK506 结合蛋白(FK506 binding protein,FKBP)类型的肽基脯氨酰顺反异构酶(peptidyl-prolyl cis-trans-isomerase,PPIase)家族,具有 PPIase 活性,能与巨噬细胞的 FK506 结合形成复合物,抑制巨噬细胞的活化,从而逃避巨噬细胞的吞噬^[12]。FK506、雷帕霉素等免疫抑制剂可通过与 Mip 蛋白结合,抑制其 PPIase 活性,可有效减弱致病菌的毒力^[13-15]。同时系列文献报道显示,Mip 蛋白可刺激机体产生高效的免疫应答,在抗感染过程中发挥重要的作用,是一种较理想的疫苗候选抗原^[9-11]。

本实验用 PCR 从 Cps 6BC 基因组 DNA 中扩增 Mip 基因,构建原核表达载体 pET-30a(+)-Mip,通过 PCR 及酶切鉴定,证明重组质粒中插入的片段为 Mip 基因,测序结果经 BLAST 分析,与 Genbank 上登录序列完全一致。pET-30a(+)-Cps Mip 重组质粒转化至 *E. coli* BL21 中,经 IPTG 诱导后,表达了可溶性 Mip 融合蛋白。

本研究使用 pET-30a(+) 构建了原核表达载体 pET-30a(+)-Cps Mip,该表达载体含有噬菌体启动子,含有编码 6 个组氨酸的 His-Tag 标签,能与目的序列一起表达形成融合蛋白,且目的蛋白的生物学活性不受影响,因此,不必切除 His-Tag 标签。而且由于融合蛋白中含 6 个组氨酸,能够螯合金属 Ni,可用 Ni-NTA-His 亲和层析法纯化目的融合蛋白。本文利用这一原理和技术,成功获得了纯化的可溶性 Cps Mip 蛋白。用该重组蛋白免疫 BALB/c 小鼠制备免疫血清,ELISA 测定特异性抗体滴度达 1:128 000,说明该蛋白具有很强的免疫原性。

本研究成功构建了原核表达载体 pET-30a(+)-Cps Mip,并得到相应的可溶性蛋白和小鼠免疫血清,为进一步探讨 Cps Mip 蛋白的功能奠定了基础。

参考文献

- [1] Donati M, Laroucau K, Delogu M, et al. *Chlamydia psittaci* in Eurasian collared doves (*Streptopelia decaocto*) in Italy [J]. J Wildl Dis, 2015, 51(1):214-217.
- [2] Stenzel T, Pestka D, Choszcz D. The prevalence and genetic characterization of *Chlamydia psittaci* from domestic and feral pigeons in Poland and the correlation between infection rate and incidence of pigeon circo-

- virus [J]. Poult Sci, 2014,93(12):3009-3016.
- [3] Ling Y, Chen H, Chen X, et al. Epidemiology of *Chlamydia psittaci* Infection in racing pigeons and pigeon fanciers in Beijing, China[J]. Zoonoses Public Health, 2015, 62(5):401-406.
- [4] Fraeyman A, Boel A, van Vaerenbergh K, et al. Atypical pneumonia due to *Chlamydophila psittaci*: 3 case reports and review of literature [J]. Acta clinica Belgica, 2010, 65(3):192-196.
- [5] Pannekoek Y, Visser C, Duim B, et al. *Chlamydophila psittaci* infections in the Netherlands [J]. Drugs of today (Barcelona, Spain: 1998), 2009, 45(Suppl B):151-157.
- [6] Verminnen K, Vanrompay D. *Chlamydophila psittaci* infections in turkeys: overview of economic and zoonotic importance and vaccine development[J]. Drugs Today (Barcelona, Spain:1998), 2009, 45(Suppl B):147-150.
- [7] Knittler MR, Berndt A, Bocker S, et al. *Chlamydia psittaci*: new insights into genomic diversity, clinical pathology, host-pathogen interaction and anti-bacterial immunity[J]. Int J Med Microbiol, 2014, 304(7):877-893.
- [8] 陆春雪,彭波,陈超群,等. 抗沙眼衣原体 MIP 蛋白单克隆抗体的制备及特性鉴定[J]. 中国免疫学杂志, 2014, 30(1):80-84.
- [9] Bas S, Neff L, Vuillet M, et al. The proinflammatory cytokine response to *Chlamydia trachomatis* elementary bodies in human macrophages is partly mediated by a lipoprotein, the macrophage infectivity potentiator, through TLR2 / TLR1 / TLR6 and CD14[J]. J Immunol, 2008, 180(2):1158-1168.
- [10] Lu CX, Peng B, Wu YM, et al. Induction of protective immunity against *Chlamydia muridarum* intravaginal infection with the chlamydial immunodominant antigen macrophage infectivity potentiator [J]. Microbes Infect, 2013,(15):329-338.
- [11] Zeng H, Hou S, Gong S, et al. Mapping immunodominant antigens and H-2-linked antibody responses in mice urogenitally infected with *Chlamydia muridarum*[J]. Microbes Infect, 2012, 14(7-8):659-665.
- [12] Rockey DD, Chesebro BB, Heinzen RA, et al. A 28 kDa major immunogen of *Chlamydia psittaci* shares identity with Mip proteins of *Legionella* spp. and *Chlamydia trachomatis*-cloning and characterization of the *C. psittaci* Mip-like gene[J]. Microbiology, 1996, 142(4):945-953.
- [13] Bas S, James RW, Gabay C. Serum lipoproteins attenuate macrophage activation and Toll-like receptor stimulation by bacterial lipoproteins [J]. BMC Immunol, 2010, 138(1):11-25.
- [14] Lundemose AG, Rouch DA, Penn CW, et al. The *Chlamydia trachomatis* Mip-like protein is a lipoprotein [J]. J Bacteriol, 1993, 175(11):3669-3671.
- [15] Lundemose AG, Kay JE, Pearce JH. *Chlamydia trachomatis* Mip-like protein has peptidyl-prolyl cis/trans isomerase activity that is inhibited by FK506 and rapamycin and is implicated in initiation of chlamydial infection[J]. Mol Microbiol, 1993, 7(5):777-783.

收稿日期:2016-08-25