

肺炎衣原体 ompA 基因 VD2-VD3 区重组蛋白在血清学诊断中的初步应用

周 洲, 吴移谋*, 刘 劫, 陈超群, 杨 玲

(南华大学 病原生物学研究所 衡阳 421002)

摘 要: 应用聚合酶联反应(PCR)技术,从肺炎衣原体 *Chlamydia pneumoniae* 的主要外膜蛋白(Major Outer Membrane Protein, MOMP) 编码基因(ompA)上扩增出抗原优势表位 VD2-VD3 区基因,构建原核表达系统并诱导表达重组蛋白,经 Ni-NTA 亲和层析法纯化表达产物。间接酶联免疫吸附试验(Enzyme link immunosorbent assay, ELISA)检测人血清中特异性 IgG 抗体。试验表明,转化入 BL21 大肠杆菌的重组质粒,能表达并纯化出相对分子量(M_r)为 24KD 的重组蛋白。Western blot 证实重组蛋白只与 Cpn MOMP mAb 发生特异性反应,重组蛋白用作 ELISA 包被抗原检测 Cpn 阴阳性参比血清,特异性和灵敏度均为 100%,对 126 位冠心病患者血清进行的检测中,该间接 ELISA 法与晶美公司 Cpn IgG ELISA 诊断试剂盒的检测结果相比,符合率达到 96.3%。结果证实,制备的重组蛋白 MOMP_{VD2-VD3} 具有良好的免疫活性,在 Cpn 血清学诊断的应用中具有较大的利用价值。

关键词: 肺炎衣原体;主要外膜蛋白;血清学试验;酶联免疫吸附试验

中图分类号:R374.3 文献标识码:A 文章编号:0001-6209(2007)03-0512-05

肺炎衣原体(*Chlamydia pneumoniae*, Cpn)是 1989 年被正式命名的新衣原体种,是一种重要的呼吸道病原体,常引起人类呼吸系统感染,同时与冠心病、心肌梗死及脑血管等疾病的发生密切相关^[1]。Cpn 的人群感染极为普遍,血清流行病学调查显示,成人中 Cpn 的抗体阳性率可达 50%~70%^[2],临床上多以隐形、持续性感染的形式存在。感染反复迁延,造成病理变化,可导致复杂的并发症。因此,有必要建立一种简单、高效、快速的诊断方法,为早期诊断、早期治疗 Cpn 感染提供实验依据,以预防 Cpn 相关心脑血管疾病发生。

Cpn 是目前公认较难培养的衣原体种^[3],分离培养的困难严重阻碍了抗原的制备,更限制了血清学诊断的开展和疫苗的研制。目前认为通过基因工程方法获得 Cpn 重组抗原是制备检测试剂盒和研制疫苗的较好途径^[4],该方法不仅解决了抗原来源及抗原污染问题,也避免了全菌抗原与多种病原体的交叉反应,从而提高其在血清学诊断中的特异性。

目前已知具有免疫原性的 Cpn 蛋白有多种,而应用于研究工作的主要有:15kDa 的 CrpA、孔蛋白-b(PorB)、Hsp60、60kDa 的 Omp2 以及主要外膜蛋白

(Major Outer Membrane Protein, MOMP)。其中,相对分子量(M_r)为 40kDa 的 MOMP,免疫原性强,能刺激机体产生强烈的保护性免疫,是机体体液免疫反应的主要目标^[5],成为 Cpn 诊断试剂的主要候选抗原之一。尽管 MOMP 早已作为抗原被应用于 Cpn 诊断试剂盒的研制中,但是,衣原体间(沙眼衣原体、鹦鹉热衣原体及肺炎衣原体)交叉抗原的存在导致了检测结果的非特异性,因此,目前还没有一种仅针对 Cpn 的诊断试剂盒能在全球范围内被推广应用。本文根据 Cpn 全基因组测序结果^[6],将 Cpn AR-39 株的 ompA 通过软件分析,筛选 MOMP_{VD2-VD3} 区优势抗原表位基因进行克隆与表达,对重组蛋白的免疫活性进行检测,并以重组蛋白为包被抗原建立间接 ELISA 法,对 126 名冠心病患者血清进行检测,初步评价其作为诊断抗原的可行性及在临床检测中的应用价值。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 基因组 DNA 模板: Cpn 标准株 AR-39 基因组 DNA 模板由美国德州大学圣安东尼奥健康科学中

基金项目:湖南省卫生厅重点课题资助项目(A03-006)

* 通讯作者。Tel: 86-734-8281555; Fax: 86-734-8282907; E-mail: yimouwu@sina.com

作者简介:周 洲(1980-),女,湖南常德人,讲师,硕士,研究方向为肺炎衣原体的诊断与防治。E-mail: susiezhou99@hotmail.com

收稿日期:2006-10-30;接受日期:2006-11-29;修回日期:2007-01-30

心免疫和微生物学系钟光明教授惠赠。

1.1.2 菌株和载体:大肠埃希菌(*Escherichia coli*) JM109、BL21(DE3)及表达载体 pET30a 为本研究所保存。

1.1.3 主要试剂和仪器:Pfu-*Taq* 高保真 PCR 试剂盒为大连 TaKaRa 公司产品; *Bam*H I、*Hind* III 内切酶、DNA 分子量标准、蛋白分子量标准购自北京华美公司; Ni-NTA 亲和层析柱购自 Qiagen 公司; HRP 标记山羊抗人 IgG 抗体、HRP 标记山羊抗兔 IgG 抗体、显色底物 TMB 均购自北京鼎国公司; 多克隆抗体由美国德州大学健康科学中心免疫和微生物学系钟光明教授惠赠。聚丙烯微孔板为 Costar 公司产品。Cpn 标准血清参考品为德国欧蒙公司产品。Cpn IgG ELISA 诊断试剂盒购自北京晶美公司。梯度 PCR 仪购自 Biometra 公司; Multiskan MK-3 全自动酶标检测仪购自芬兰雷勃公司; DU640 核酸蛋白定量分析仪购自 Beckman 公司。

1.2 *ompA* 基因的分析及优势表位区的筛选

根据 GenBank 收录的 Cpn *ompA* 基因序列(Gi: 144534)利用 ExPASy 相关软件(www. Expasy. org)对其可变区的亲水性、抗原性、易曲性及可接近性分别进行预测分析, 用 TMPred 在线程序(www. ch. embnet. org/software/TMPRED. form. Html)作跨膜区分析, 并对照 VD2-VD3 区编码基因序列, 综合 3 项指标结果并优化组合, 筛选出最佳目的基因片段。

1.3 原核表达重组体 pET30a-MOMP_{VD2-VD3} 的构建及鉴定

选择编码优势表位 VD2-VD3 区的目的基因(442nt ~ 873nt), 设计一对引物, 并由上海 Sangon 公司合成。正向引物 P1 5'-CGGGATCCAACCTCTACAGC GTTCAATCT-3', 引入 *Bam*H I 酶切位点; 反向引物 P2 5'-CCAAGCTTTTATCGAGACCATTGTACTCC-3', 引入 *Hind* III 酶切位点, 50 μ L PCR 反应体系中, 含 5 μ L 10 \times buffer(含 MgCl₂) 4 μ L 的 dNTPs(25mmol/L), 各 0.5 μ L 的引物(50 μ mol/L), Cpn DNA 模板 1 μ L (2.5ng), *Taq* 酶 0.25 μ L(5U/ μ L)。PCR 反应条件: 94 $^{\circ}$ C 5min, 94 $^{\circ}$ C 1min, 48 $^{\circ}$ C 1min, 72 $^{\circ}$ C 1min, 35 个循环, 72 $^{\circ}$ C 10min。

将 PCR 产物与 T 克隆载体在 T4 DNA 连接酶作用下 16 $^{\circ}$ C 连接过夜, 转化宿主菌 JM109 经鉴定为阳性克隆后, 以内切酶 *Bam*H I、*Hind* III 酶切并回收纯化目的基因片段, 与同样经双酶切处理的 pET30a 载体连接, 构建 pET30a-MOMP_{VD2-VD3} 重组质粒, 双酶切

及测序鉴定确认后, 重组质粒转化至表达宿主菌 BL21 中, 构建表达重组体。

1.4 MOMP_{VD2-VD3} 重组蛋白在大肠杆菌中的表达、纯化和鉴定

挑取含 pET30a-MOMP_{VD2-VD3} 重组质粒的菌落接种于 30 ~ 50 μ g/mL 硫酸卡那霉素的 LB 液体培养基中 37 $^{\circ}$ C 振荡培养过夜, 次日转接于新鲜培养基后, 37 $^{\circ}$ C 振荡培养至 OD₅₉₀ 值为 0.4 ~ 0.6 之间, 加 IPTG 至终浓度为 1mmol/L, 收集菌体, PBS 重悬后 4 $^{\circ}$ C 超声裂菌, 离心取上清液和沉淀行 SDS-PAGE 分析重组蛋白的表达形式。

按照优化的最适诱导条件(IPTG 终浓度 1mmol/L, 37 $^{\circ}$ C 5h)进行大规模诱导表达, 4000r/min 离心 20min 收获菌体, 经 PBS 重悬沉淀、超声裂菌后收集包涵体, 以缓冲液(10mmol/L Tris-Cl, 8mol/L Urea pH8.0)充分溶解包涵体, 用 Ni-NTA 层析柱纯化(具体操作见说明书)。

收集含目的蛋白的洗脱液, 经透析法复性后, SDS-PAGE 分析, BCA 法测定蛋白浓度。纯化产物用 MOMP 多克隆抗体行 Western blot 鉴定。

1.5 动物免疫实验

取制备的目的蛋白对 8 只清洁级雄性 BALB/c 小鼠行腹膜下多点注射, 同时设立空白对照、阴性对照组。基础免疫, 剂量 50 μ g/鼠, 与等量弗氏完全佐剂充分乳化后, 对小鼠进行注射, 以后每隔 15d 左右用含重组蛋白 50 μ g 的抗原加弗氏不完全佐剂加强免疫 3 次, 末次免疫 7d 后眼眶静脉采血分离血清, 间接 ELISA 法检测小鼠免疫血清的抗体效价。

1.6 重组蛋白作为 ELISA 包被抗原检测血清中 Cpn IgG 抗体

纯化复性的 MOMP_{VD2-VD3} 重组蛋白以 0.05mol/L pH7.4 碳酸盐缓冲液稀释, 按 100 μ L/孔包被酶标板, 建立检测 Cpn IgG 抗体的间接 ELISA 法, 检测 Cpn 标准血清参考品, 并设立阴、阳性对照, 显色底物为四甲基联苯胺(TMB), 用酶标仪测 A₄₅₀ 值。同时用建立的间接 ELISA 法检测 126 份冠心病患者的血清, 待检血清作 1:100 稀释, 以其平均 A₄₅₀ + 2S 为阳性临界值(cutoff), 测定孔 A₄₅₀ 值 > 阳性界值为阳性, 否则判为阴性, 并将结果与晶美公司的抗 Cpn IgG ELISA 诊断试剂盒的检测结果进行比较, 初步评价重组蛋白抗原在 Cpn 血清学诊断中的应用价值。

2 结果

2.1 ompA 的软件分析与目的基因的筛选

根据 *C. pneumoniae* 基因组序列,采用多种软件分析 Cpn MOMP 的结果显示,整个分子免疫原性较强,存在多个强抗原表位。综合评价其亲水性、抗原性等参数的分析结果(图 1),我们选取包括优势表位 VD2-VD3 区在内的一段保守序列为目的片段(148~291aa),预测 ompA_{VD2-VD3} 基因全长 451bp,编码约 144 个氨基酸序列。

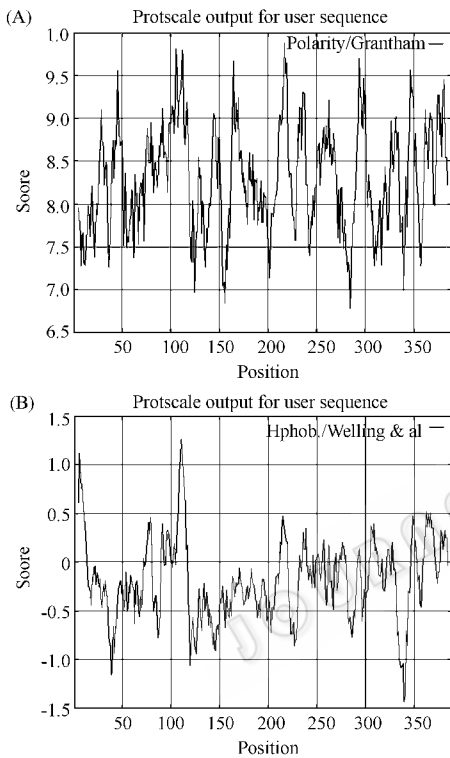


图 1 ompA 基因的亲水性分析(A)与抗原性分析(B)

Fig.1 Analysis of ompA gene for the hydrophilicity(A) and antigenicity(B).

2.2 重组蛋白的表达和可溶性分析

经 P1、P2 引物对重组质粒进行 PCR 扩增,获得产物的大小约为 450bp,与预期值相符。将重组表达载体用 *Bam*H I、*Hin*d III 双酶切分析,并进行 DNA 测序鉴定。结果显示,克隆的 ompA_{VD2-VD3} 基因与预期产物一致。重组菌经诱导后,表达产物经 12% 的 SDS-PAGE 分析,与空菌、含有空载体的宿主菌及未经诱导的重组菌进行对照比较,可清楚地观察到诱导菌在分子量约为 24kDa 处有一条明显的蛋白条带,而其他对照组均无此带。这与预期值相符(图 2)。检测破菌液上清及沉淀结果发现,重组蛋白主要存在于沉淀中,因此采用针对不溶性蛋白的提纯方法纯化目的蛋白。BCA 法测的纯化蛋白浓度为

0.55mg/mL。

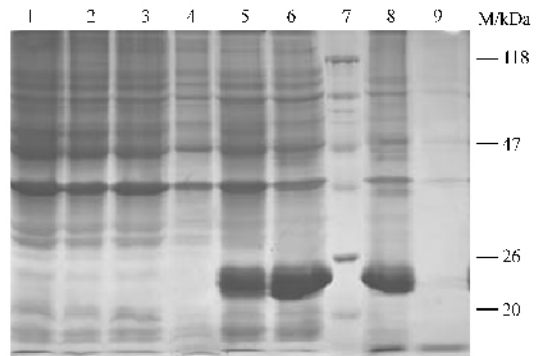


图 2 宿主菌 BL21 裂解物的 SDS-PAGE 分析

Fig.2 SDS-PAGE analysis for the lysate of host cell BL21. 1. IPTG induced BL21; 2. IPTG induced pET30a/BL21; 3. IPTG uninduced pET30a/BL21; 4. IPTG uninduced BL21/pET30a-MOMP_{VD2-VD3}; 5. IPTG induced BL21/pET30a-MOMP_{VD2-VD3}; 6. Protein molecular marker; 7. Pellet from the lysate after sonicate; 8. Supernatant from the lysate after sonicate.

2.3 重组蛋白的纯化与 Western blot 分析

通过 Ni-NTA-His 亲和层析法纯化重组蛋白,随着洗脱缓冲液 pH 值的下降,可获得 24kDa 左右的单一蛋白条带。测定蛋白浓度为 0.5mg/mL。蛋白印迹分析显示,此蛋白条带只能为抗 MOMP 的 mAb 所识别,而空菌、含空载体的宿主菌在相应位置均未出现此带(图 3)。

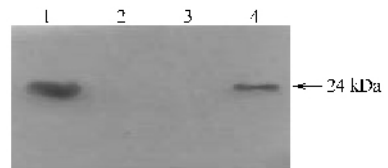


图 3 重组蛋白的 Western-blot 分析

Fig.3 Western blot analysis of recombinant protein. 1. IPTG induced BL21/pET30a-MOMP_{VD2-VD3}; 2. IPTG uninduced BL21; 3. IPTG induced BL21/pET30a; 4. Purified MOMP_{VD2-VD3}.

2.4 重组蛋白的免疫原性检测

采用间接 ELISA 法检测小鼠蛋白免疫组与空白对照组、阴性对照组抗体的滴度,结果发现在实验组小鼠血清中可明显检测到特异性抗体,且抗体的效价均在 1:20480 以上,而对照组未检测出针对 MOMP_{VD2-VD3} 的特异性抗体(表 1)。

表 1 ELISA 法检测鼠免疫血清的 MOMP_{VD2-VD3} 抗体滴度及阳性反应率

Table 1 Antibody titer and serum positive rate analysis by indirect ELISA			
Group	Mice amount	Serum titer	Serum positive rate
Immunization	8	≥1:20480	8/8
Control	8	-	0/8

The mice were immuned with purified recombinant protein, by calculating A_{450} of the serum sample/ A_{450} of the negative control, the ratio ≥ 2.1 was considered positive.

2.5 间接 ELISA 法检测血清中的 Cpn IgG 抗体

检测不同稀释度的标准血清参考品,结果显示,检测的特异性及灵敏度均达到 100%。对 126 份冠心病患者血清的检测中,检出 Cpn 阳性血清 38 例, Cpn 阴性血清 88 例,与 Cpn IgG ELISA 诊断试剂盒的检测结果(阳性血清 33 例,阴性血清 93 例)相比,两种方法的符合率为 96.3%(表 2)。

表 2 重组蛋白 ELISA 法和 Cpn IgG 诊断试剂盒对 126 名冠心病患者血清的检测结果

Table 2 The comparison between two different ELISA methods for 126 serum specimens' detection

Cpn IgG ELISA diagnosis kit	The recombinant antigen-ELISA test		Total
	+	-	
+	33	0	33
-	5	88	93
Total	38	88	126

Concordance = $(33 + 88) / (38 + 88) = 96.3\%$ 。

3 讨论

随着分子生物学技术的飞速发展, Cpn 引起各种疾病的分子基础越来越受到关注,对 Cpn 感染的快速诊断也成为当前研究的热点。目前,已建立起包括病原分离培养、PCR 在内的多种检测技术^[7],其中,血清学诊断因其方便快捷的优点而成为 Cpn 感染的常规检测方法^[8]。但是,不论被誉为“金标准”的 MIF 还是具有广泛应用前景的 ELISA,均很大程度依赖于抗原的制备,所以存在于各类病原体蛋白上相同的抗原表位会影响抗体的检出,造成假阳性结果。MOMP 作为衣原体外膜复合物的主要成分,因其在衣原体致病作用中起关键作用^[9],又能刺激机体产生强烈的保护性免疫,而成为研制衣原体候选疫苗及诊断方法的突破口。众多研究也表明^[10],几乎所有 Cpn 患者血清与其相应的 MOMP 均表现出中、高度的反应性,因此,用 MOMP 代替完整的菌体抗原作为检测试剂成为可能。但是,由于非同种衣原体间 MOMP 基因的同源性为 69% ~ 70%,它所编码的氨基酸同源性达到了 73% ~ 80%,因而各种属衣原体 MOMP 间会不可避免地产生交叉反应,从而限制其作为潜在的抗原候选分子在 Cpn 感染检测中的应用。

通过对 Cpn MOMP 序列的分析可知, MOMP 含有 4 个可变区(VD),分别镶嵌于 5 个高度保守的恒定区中^[8]。Klein 等^[5]试验发现,用 Cpn 的几种表面蛋白重组体,在对一组种特异性病人血清的检测中, Cpn MOMP 的 VD2、VD3 区能且仅能被 Cpn 阳性血清

所识别,这不仅证实了 Cpn VD 域上种特异性表位的存在,更提示出其在提高诊断方法特异性方面所具备的巨大潜力。因此我们推测,根据 VD 结构将 MOMP 分成不同的 VD 片段来表达,就可能避免与病人血清发生交叉反应。

本研究利用基因工程的方法,成功构建了 pET30a/MOMP_{VD2-VD3} 原核表达系统,并在大肠杆菌 BL21 中获得高效表达。以纯化的蛋白免疫 BALB/c 小鼠,间接 ELISA 法检测小鼠免疫血清的抗体效价,结果显示抗体滴度在 1:20480 以上。说明表达的重组蛋白具有良好的免疫原性,能刺激小鼠产生高效价的抗体。经 Western blot 分析,重组蛋白能被 Cpn MOMP mAb 特异性的识别,说明具有良好的免疫反应性。同时,我们以重组蛋白作为包被抗原建立间接 ELISA 法检测 Cpn 参考血清,其灵敏度和特异性均达到了 100%,对 126 份冠心病患者血清的检测结果显示,有 5 份病人血清标本能被重组抗原识别而未被 IgG 诊断试剂盒检测出来。究竟是重组抗原与非 Cpn 感染血清存在交叉反应的结果,还是 MOMP_{VD2-VD3} 重组蛋白具有更好的灵敏度,亦或是其他原因所致。我们将在进一步研究中加以验证。

本研究初步证实,重组蛋白具有良好的免疫活性,以重组蛋白 MOMP_{VD2-VD3} 为基础建立的 ELISA 方法具有良好的灵敏度和特异性,可以用于临床及流行病学调查研究。但是,目前此项研究仍有许多问题尚待解决:①标准参比血清的空缺,在检测病人血清时尤其在以新制备的重组抗原进行检测时,缺乏相应的 Cpn 阴阳性标准血清,从而无法对检测结果进行对照评价;②尚未完善的临床检测系统,不能有效的对 Cpn 感染者及健康人群加以区分,因此无法为科研工作提供大量而准确的临床依据;③本实验在检测临床血清标本时发现,126 份冠心病病人血清标本中, Cpn 感染的人群检出率仅占 38/126 = 30%,远远低于报道所述的冠心病病人 80% 的 Cpn 感染率。我们推测可能由于标本收集、保存的失误而使抗体效价降低,也可能是抗原包被量过少或血清稀释度过低导致 A₄₅₀ 值达不到标准,还可能与尚不健全的 Cpn 诊断标准及抗体效价的地域差异性等等因素有关。目前,抗 Cpn MOMP_{VD2-VD3} mAb 的制备以及其它 Cpn 相关的研究工作正在进行之中,这将有助于我们对上述问题的理解和解决。

本研究的最终目的是为 Cpn 的诊断方法寻找到一个合适的抗原,这对其它种类衣原体的诊断研究

也是一个参考,并为 C_{pn} 疫苗的研制及其防治工作提供了另一种有效的思考线索。同时本研究也证明了重组蛋白作为 C_{pn} 诊断抗原的可行性,为今后进一步研究诊断 C_{pn} 感染的临床诊断试剂盒打下基础。

参 考 文 献

[1] Hermann C ,Craf K ,Groh A ,*et al.* Comparison of eleven commercial tests for *Chlamydia pneumoniae*-specific immunoglobulin G in asymptomatic healthy individuals. *J Clin Microbiol* ,2002 ,**40**(5): 1603 - 1609.

[2] Essig A ,Simmacher U ,Susa M ,*et al.* Analysis of the humoral immune response to *Chlamydia pneumoniae* by immunoblotting and immunoprecipitation. *Clin Diagn Lab Immunol* ,1999 ,**6**(6): 819 - 825.

[3] Bennedsen M ,Berthelsen L ,Lind I ,*et al.* Performance of three Microimmunofluorescence assay for detection of *Chlamydia pneumoniae* immunoglobulin M ,G ,and A antibodies. *Clin Diagn Lab Immunol* ,2002 ,**4**(4): 833 - 839.

[4] 周林福 朱海红 陈离伟 ,等.肺炎衣原体膜表面蛋白重组质粒的构建. *科技通报* 2004 ,**20**(2):172 - 174.

[5] Klein M ,Kotz A ,Bernardo K ,*et al.* Detection of *Chlamydia pneumoniae*-specific antibodies binding to the VD2 and VD3 regions of the Major outer membrane protein. *J Clin Microbiol* ,2003 ,**41**(5):1957 - 1962.

[6] Read TD ,Brunham RC ,Shen C ,*et al.* Genome sequence of *Chlamydia trachomatis* MoPn and *Chlamydia pneumoniae* AR39. *Nucleic Acids Reseach* 2000 ,**28**(6):1397 - 1406.

[7] 刘 钢 胡翼云 赵德环 ,等.巢式聚合酶链反应诊断肺炎衣原体感染的临床应用探讨. *中华微生物学和免疫学杂志* ,2001 ,**21**(4):389 - 392.

[8] 陈丽丽 吴移谋 雷 达 ,等.泌尿生殖道沙眼衣原体 omp1 基因多态性研究. *微生物学报* 2006 ,**46**(2):214 - 218.

[9] 周 洲.衣原体主要外膜蛋白的研究现状. *国外医学·微生物学分册* 2005 ,**28**(2):29 - 31.

[10] Jantos CA ,Heck S ,Roggendorf R ,*et al.* Antigenic and molecular analyses of different *Chlamydia pneumoniae* strains. *J Clin Microbiol* ,1997 ,**35**(3):620 - 623.

Application of the recombinant protein MOMP_{VD2-VD3} from *Chlamydia pneumoniae* in sero diagnosis

ZHOU Zhou¹ ,WU Yi-mou^{1*} ,LIU Jie² ,CHEN Chao-qun³ ,YANG Ling⁴

(*Institute of Pathogenic Biology ,NanhuaUniversity ,Hengyang 421001 ,China*)

Abstract: To express the recombinant protein MOMP_{VD2-VD3} of *Chlamydia pneumoniae* , and research on the immunocompetence of the MOMP_{VD2-VD3} to support serodiagnosis ,PCR and gene recombinant technique was used to clone the targeted DNA fragment from a strain AR-39. The recombinant plasmid was induced in *E. coli* BL21 after having constructed the prokaryotic expression system ,then the immunocompetence of the expression product was analyzed by Western blot and indirected ELISA which is based on the animal experimentation. A group of control sera and 126 sera from patients with coronary heart disease were examined by using ELISAs based on the recombinant protein (MOMP_{VD2-VD3}) ,and then the results were evaluated comparing with a commercial ELISAs kit. The results of the Western blot and indirected ELISA showed ompA_{VD2-VD3} gene inserted in pET30a could express a recombinant protein with the molecular weight of 24kDa in BL21 and specifically reacted with the antibodies against the MOMP. Specific humoral response was elicited after immune the BALB/c mouse with protein and the specific antibody titer was more than 1 : 20480. Using a panel of control sera ,the participation of the recombinant antigen ,the sensitivity and the specificity of the indirected ELISAs were 100% respectively. Comparisons between two methods in detecting 126 sero samples ,the concordance of two tests was 96.3% . The results reported here show that the recombinant protein with excellent immunocompetence could benefit the research on the serodiagnosis to *Chlamydia pneumoniae* .

Keywords: *Chlamydia pneumoniae* ; major outer membrane protein ; immunocompetence ; serodiagnosis ; indirected ELISA