论著

DOI:10.16016/j.1000-5404.201408063

沙眼衣原体隐匿质粒编码蛋白的表达及其相互作用

高磊琼[1,2],张 燕[2],华子瑜[1,2],沈 犁[2] (400014 重庆,重庆医科大学附属儿童医院:新生儿科[1],儿童发育疾病研究教育部重点实验室,儿科学重庆市重点实验室,重庆市儿童发育重大疾病诊治与预防国际科技合作基地[2])

[摘要] **目的** 分析沙眼衣原体隐匿质粒编码蛋白的相互作用。**方法** 采用基因克隆的方法将沙眼衣原体质粒基因 *pgp1*~*4* 及 *pgp8* 分别克隆到 pRAC 和 pRBR 上,通过转录激活细菌双杂交系统分析蛋白相互作用。**结果** Western blot 结果显示 Pgp1、Pgp3 与大肠杆菌 RpoA 氨基末端功能区(α-NTD)融合蛋白及 Pgp1、Pgp3、Pgp4 与 DNA 结合蛋白 λCI 融合蛋白,能在大肠杆菌中表达。在报告菌株中,共表达与 α-NTD 融合的 Pgp3 蛋白(α-Pgp3)及与 λCI 融合的 Pgp3 蛋白(CI-Pgp3),导致报告基因产物 β-半乳糖苷酶的活性升高。而余无明显变化。**结论** *pgp3* 编码的 Pgp3 能与自身相互作用。

[关键词] 沙眼衣原体; 隐匿质粒; Pgp3; 蛋白相互作用

[中图法分类号] R374.1; R394-33; R394.3 [文献标志码] A

Cryptic plasmid-encoded proteins in *Chlamydia trachomatis*: expression and interaction

Gao Leiqiong[1,2], Zhang Yan[2], Hua Ziyu[1,2], Shen Li[2] ([1]Department of Neonatology, [2]Key Laboratory of Child Development and Disorders of Ministry of Education, Chongqing Key Laboratory of Pediatrics, Chongqing International Science and Technology Cooperation Center for Child Development and disorders, the Chongqing Children's Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing, 400014, China)

[**Abstract**] **Objective** To analyze the interactions among the proteins encoded in the cryptic plasmid of *Chlamydia trachomatis* (*C. trachomatis*). **Methods** The DNA fragments of *C. trachomatis* plasmid genes, *pgp1*~*4* and *pgp8*, were cloned into the vectors (pRAC and pRBR), and the target genes were in-frame fused to α subunit N-terminal domain (α-NTD) and DNA binding protein, CI protein of bacteriophage λ (λCI), respectively. The expression of cloned genes in *Escherichia coli* (*E. coli*) were determined by Western blotting. The protein-protein interactions were analyzed by a transcription-based bacterial two-hybrid system. **Results** Western blotting indicated that isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) induced the expression of fusion proteins, α-Pgp1, α-Pgp3, CI-Pgp1, CI-Pgp3 and CI-Pgp4 in *E. coli*. In the presence of Pgp3 (encoded by plasmid pBRα-Pgp3), the expression of α-Pgp3 and CI-Pgp3 activated the transcription from a reporter gene β-galactosidase in the bacterial two-hybrid assay strain, but Pgp3 had no interaction with other test proteins. **Conclusion** Pgp3 encoded by *pgp3* interacts with Pgp3 in *C. trachomatis*.

[**Key words**] *Chlamydia trachomatis*; cryptic plasmid; Pgp3; protein-protein interaction

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (81370777) and the Project of National Key Clinical Specialty Funding for Neonatology (2011-873). Corresponding author: Hua Ziyu, E-mail: h_ziyu@163.com

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81370777);国家临床重点专科-新生儿学项目(卫办医政函[2011]873号)

[通信作者] 华子瑜,E-mail:h_ziyu@163.com

[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20141205.1530.083.html(2014-12-02)

沙眼衣原体(*Chlamydia trachomatis*)是一种胞内专性寄生革兰氏阴性菌,1957 年由我国汤非凡教授等首次分离出[1-2]。沙眼衣原体血清型 D-K 引起最常见的性传播性疾病,生殖道感染后可引起盆腔炎、不孕不育、附睾炎等疾病,还可能会增加 HIV 病毒的传播及宫颈癌的发病率,经围生期传播,可引起新生儿结合膜炎及婴儿肺炎,故严重危害妇女、性伴侣及子女的健康[3-5]。尽管许多国家已经加大对沙眼衣原体的控制力度,其发病率仍逐年增高:2012 年,WHO 报道每年新增病例为 1.057 亿,已经成为困扰许多国家的一大社会健康问题[6]。因此,为了降低沙眼衣原体带来的巨大社会及医疗负担,有必要对其致病因子及机制进一步研究。

沙眼衣原体菌株有一个约 100 万碱基对的基因组[7],编码约 900 个开放阅读框(ORFs)和约 7.5 kb 的隐蔽性质粒[8]。质粒编码 Pgp1 ~ Pgp8 八个功能不明的蛋白以及一个非编码小 RNA(nsRNA)。由于临床分离的自然无质粒株非常少见,且有质粒菌株在体外实验和动物模型中,显出与无质粒株明显不同的毒力和感染后果,提示此质粒与衣原体的致病性密切相关[9]。研究表明:Pgp3 可分泌至宿主胞浆、且为外膜复合体的组成成分,是衣原体感染的人和动物抗体识别的主要抗原,可能通过自身或与隐匿质粒上其他蛋白相互作用,影响沙眼衣原体的致病性[10-12]。此外,Pgp4 是潜在的转录调控蛋白,参与衣原体糖原代谢[13]。敲除沙眼衣原体 *pgp3*,可导致 *pgp4* 高表达;而敲除 *pgp4*,则引起 *pgp3* 低表达[10]。这些研究提示 Pgp3 的存在会影响 Pgp4 的表达,反之亦然。因而,质粒编码的蛋白的相互作用可能在维持衣原体的毒力基因的表达中起重要作用。本研究通过分析沙眼衣原体隐匿质粒编码蛋白的相互作用,为进一步研究沙眼衣原体的致病机制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 菌株和质粒

E. coli DH5α 由本室保存。细菌双杂交系统(Bacterial two-hybrid,B2H)由美国哈佛大学 Ann Hochschild 教授惠赠[14]。本实验使用的质粒,包括 pRACλCI-β-flap、pRAC663、pRBR、pRBRσ^{28} 等分别为对 pRAC-λCI 质粒和 pRBR-α 质粒的多克隆位点进行改造、克隆后而成[15]。

1.2 主要试剂

限制性内切酶、Phusion High-Fidelity DNA Polymerase 购自美国 New England Biolabs.; DNA marker、T_4 DNA 连接酶、dNTPs 购自 TaKaRa 公司;质粒提取试剂盒、胶回收试剂盒 均购自美国 Zymo 公司;氨苄青霉素(Amp)、卡拉霉素(Kan)、氯霉素(Cam)、IPTG、鼠抗 α-NTD 及 α-λCI 等购自美国 Sigma 公司;β-巯基乙醇购自北京鼎国生物工程公司。

1.3 引物设计及合成

根据 GenBank 中登陆的 CDS2-6(NC-001372.1)序列设计引物(表 1)。引物由 Invitrogen(上海)贸易有限公司合成。

表 1 引物序列及酶切位点

引物	序列	备注
pgp8	上游:5′-ATTCCAACATTGCGGCCGCCATGGGTAAAGGGATTTTATCTTTGCAG C-3′	下划线部分为 *Not*Ⅰ 酶切位点
	下游:5′-TATACTAGTTTATTGTACAATATTAAACTAGTCTCTATA-3′	下划线部位为 *Spe*Ⅰ 酶切位点
pgp1	上游:5′-ATTCCTAACATTGCGGCCGCCATGGAAACTCGTTCCGAAATAGAAAATCG-3′	下划线部分为 *Not*Ⅰ 酶切位点
	下游5′-TATGGATCCACTAGTTTACCATACTTTTTTAATAGCGGAGAATTTACTAA-3′	下划线部位为 *Spe*Ⅰ 酶切位点
pgp2	上游:5′-ATTCCTAACATTGCGGCCGCCATGGTA AATTATAGTAACTGCCACTTCATCAAA-3′	下划线部分为 *Not*Ⅰ 酶切位点
	下游:5′-GATACTAGTTTAATTAATAGATTCTTGTTCCATTTGTTCTTAGATTTCT-3′	下划线部位为 *Spe*Ⅰ 酶切位点
pgp3	上游:5′-ATTCCTAACATTGCGGCCGCCATGGGAAATTCTGGTTTTTATTTGTATAACACT-3′	下划线部分为 *Not*Ⅰ 酶切位点
	下游:5′-TATGGATCCACTAGTTTAAGCGTTTGTTTGAGGTATTACTTC CA-3′	下划线部位为 *Spe*Ⅰ、*Bam*HⅠ 酶切位点
pgp4	上游:5′-ATTCCTAACATTGCGGCCGCCATGGAA AATAAAAGAAAAGTGAGGGACGA-3′	下划线部分为 *Not*Ⅰ 酶切位点
	下游:5′-TATGGATCCACTAGTTTATTCAGCCTTGGA AAA CAT GTCTTTTCT A-3′	下划线部位为 *Spe*Ⅰ、*Bam*HⅠ 酶切位点
pRBR Alpha	上游:5′-AGCGGATAA CAATTTCACA CAG-3′	–
pRBR	上游:5′-TGGCTGAACAACTGGAAGCT-3′	–
	下游:5′- ATTCG TCGCCCGCCATAA-3′	–
pRAC Lamda	上游:5′-CACTCATTAGGCACCCCAGG-3′	–
pRAC	上游:5′-TCCGTTGTGGGGAAAGTTATC-3′	–
	下游:5′-CCCATCGGTCGTCGTAGG-3′	–

1.4 重组质粒的构建

目的基因(*pgp1*～*4* 及 *pgp8*)的扩增:以质粒 pGFP:SW2(由 Southampton General Hospital Ian N. Clarke 教授惠赠)为模板,*pgp1*～*4* F、*pgp8* F 及 *pgp1*～*pgp 4* R、*pgp8* R 为引物,使用 High-Fidelity DNA Polymerase 扩增。PCR 反应条件为 94 ℃,1 min;(98 ℃,30 s;68 ℃,5 min,)共 30 个循环 ;72 ℃,10 min。产物经 1% 琼脂糖凝胶证实。*pgp1*～*4* 及 *pgp8* DNA 片段经 *Spe* Ⅰ、*Not* Ⅰ双酶切,琼脂糖凝胶电泳、鉴定,胶回收,克隆到相应酶切的载体 pRAC 和 pRBR;同样方法将 *Bam*H Ⅰ、*Not* Ⅰ双酶切的 *pgp3*、*pgp4* DNA 片段克隆到 pRAC 和 pRBR。重组质粒转化入 DH5α 大肠杆菌中,提取质粒酶切验证及插入片段测序,将鉴定正确的质粒命名为 pRAC*pgp1*、pRAC*pgp2*、pRAC*pgp3*、pRAC*pgp4*、pRAC*pgp8*,pRBR*pgp1*、pRBR*pgp2*、pRBR*pgp3*、pRBR*pgp4* 及 pRBR*pgp8*。

1.5 融合蛋白的表达

细菌裂解液经 10% SDS-PAGE 凝胶电泳分离,电转至 PVDF 膜上,以鼠抗 IgGα-NTD 及兔抗 IgGλCI 单克隆抗体作为一抗,羊抗鼠及羊抗兔作为二抗,进行 Western blot 验证。

1.6 细菌双杂交分析

实验方法参照文献[16],基本原理为大肠杆菌中,转录激活因子由 α-NTD 与 λCI 组成,只有二者结合才能发挥转录激活功能。利用这一特性,将外源蛋白分别与这两结构域融合,形成蛋白表达载体。如果有蛋白相互作用,可形成一个完整的转录激活因子,并激活相应的下游报告基因表达。将重组质粒 pRBR 及 pRAC 共转化到 KS1 报告菌株中。以空质粒 pRAC 转化 pRBRσ^{28}/KS1 细菌为阴性对照,以 pRACλCI-β-flap 转化 pRBRL28/KS1 细菌[15]为阳性对照。挑取单克隆培养至 $D(600)=0.3$,均分成 3 管,分别加入 IPTG 0、5、20 μmol/L, 继续培养 1 h 后,离心,收集菌体,检测 β-半乳糖苷酶(LacZ)活性。在 96 孔板内用酶标仪测定 $D(600)$、$D(550)$ 与 $D(420)$ 的值。利用公式计算 LacZ 活性值:Miller Units $=1\,000\times[D(420)-1.75\times D(550)]/[T\times V\times D(600)]$。

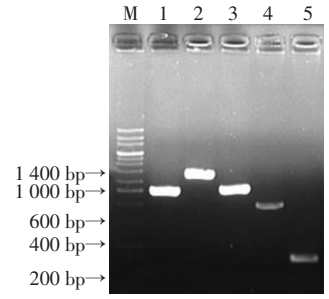
1.7 统计学分析

采用 SPSS 19.0 统计软件行单因素方差分析。

2 结果

2.1 目的基因扩增产物的鉴定

pgp8 及 *pgp1*～*4* 基因的 PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳分析,分别可见约 1 000、1 400、1 000、800、300 bp 的特异片段,大小与预期相符(图 1)。

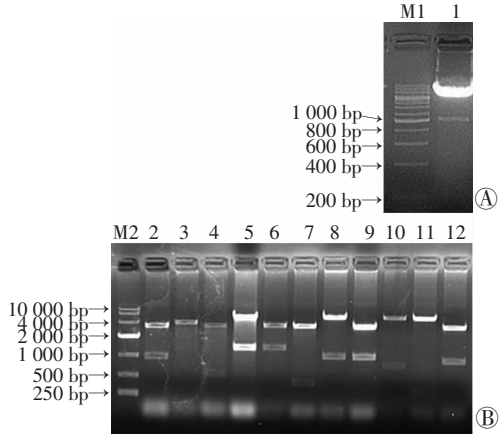


M:DNA marker DL200;1:*pgp8* 基因扩增产物;2:*pgp1* 基因扩增产物;3:*pgp2* 基因扩增产物;4:*pgp3* 基因扩增产物;5:*pgp4* 基因扩增产物

图 1 琼脂糖凝胶电泳分析 *pgp8*、*pgp1*～*4* 基因 PCR 产物

2.2 重组质粒的鉴定

琼脂糖凝胶电泳分析显示,重组质粒 pRBR*pgp1*、pRBR*pgp2*、pRBR*pgp8*, pRAC*pgp1*、pRAC*pgp2*、pRAC*pgp3*、pRAC*pgp4*、pRAC*pgp8* 经 *Spe* Ⅰ/*Not* Ⅰ双酶切产物,以及 pRBR *pgp3*、pRBR *pgp4* 经 *Bam*H Ⅰ/*Not* Ⅰ双酶切的产物,为约 1 400、1 000、800 bp 及 300、1 000 bp 的目的基因片段,大小与预期相符(图 2)。DNA 测序结果证实 pRAC*pgp1*～*3*、pRAC*pgp8*、pRBR*pgp1*～*4*、pRBR*pgp8* 为正确的重组质粒, pRAC*pgp4* 以不完全酶切的 *Not* Ⅰ(GGGCCGCC)插入 2 个 *pgp4*。

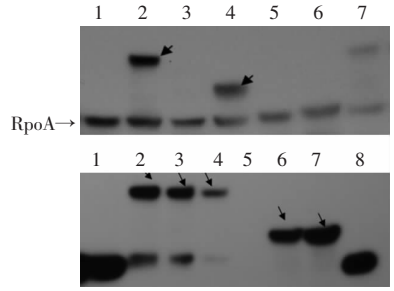


M1:DNA marker DL200;M2:DNA marker DL10 000;3:阴性对照(未酶切质粒);7:阳性对照[pRAC663(*Spe* Ⅰ/*Not* Ⅰ双酶切)];1、2、4～6、8～10:质粒的双酶切(*Spe* Ⅰ/*Not* Ⅰ)产物;11、12:质粒的双酶切(*Bam*H Ⅰ/*Not* Ⅰ)产物;1:pRAC*pgp8*;2:pRBR*pgp8*; 5:pRAC*pgp1*;6:pRBR*pgp1*;8:pRAC*pgp2*;9:pRBR*pgp2*;10:pRAC*pgp3*;12:pRBR*pgp3*;11:pRAC*pgp4*;4:pRBR*pgp4*

图 2 重组质粒的双酶切鉴定

2.3 融合蛋白在大肠杆菌中的表达

Western blot 检测结果显示:Pgp1、Pgp3 与大肠杆菌 RpoA 氨基末端功能区(α-NTD)融合蛋白及 Pgp1、Pgp3、Pgp4 与 DNA 结合蛋白 CI 融合蛋白,能在大肠杆菌中表达(图 3)。



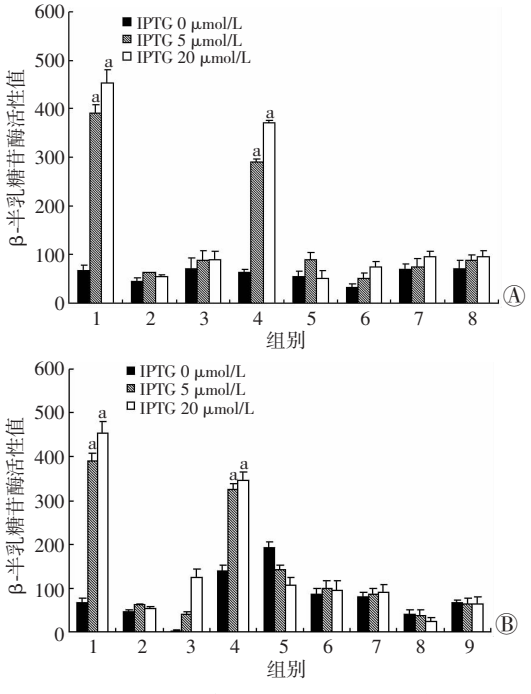
A:α-Pgps　1:α-Pgp8;2:α-Pgp1;3:α-Pgp2;4:α-Pgp3;5:α-Pgp4;6:阴性对照;7:阳性对照

B:CI-Pgps　1:阴性对照;2:阳性对照;3、4:CI-Pgp1;5:CI-Pgp2;6:CI-Pgp3;7:CI-Pgp4;8:CI-Pgp8

图 3　Western blot 检测相互作用蛋白表达

2.4　相互作用蛋白的检测

在报告菌株中,共表达 α-NTD 融合的 Pgp3 蛋白(α-Pgp3)及 λCI 融合的 Pgp3 蛋白(CI-Pgp3),导致报告基因产物 β-半乳糖苷酶的活性升高($P<0.01$,图 4),且随 IPTG 浓度增高而增高,与阳性对照菌株(共表达 pRACλCI-β-flap)和 pRBRL28/KS1 相仿,阴性对照 pRAC/pRBRσ^{28}/KS1 的 LacZ 活性基本不升高。而余无明显变化。



a:$P<0.01$,与 IPTG 0 μmol/L 比较

A:α-Pgps 相互作用蛋白的分析　1:CI-β-flap /α-σ^{28};2:CI/α-σ^{28};3:α-Pgp3/CI-Pgp1;4:α-Pgp3/CI-Pgp3;5:α-Pgp3/CI-Pgp4;6:α-Pgp1/CI-Pgp1;7:α-Pgp1/CI-Pgp3;8:α-Pgp1/CI-Pgp4

B:CI-Pgps 相互作用蛋白的分析　1:CI-β-flap /α-σ^{28};2:CI/α-σ^{28};3:CI-Pgp3/α-Pgp1;4:CI-Pgp3/α-Pgp3;5:CI-Pgp3/α-Pgp4;6:CI-Pgp1/α-Pgp1;7:CI-Pgp1/α-Pgp3;8:CI-Pgp4/α-Pgp1;9:CI-Pgp4/α-Pgp3

图 4　B2H 分析相互作用蛋白

3　讨论

几乎所有沙眼衣原体菌株均有一个大小为 7.5 Kb 的隐秘性质粒,既往研究提示此隐匿质粒可能与沙眼衣原体的致病性密切相关[9-10]。本研究中,我们成功地运用转录激活为基础的细菌双杂交的方法,分析沙眼衣原体隐匿质粒上相互作用的蛋白。首先检测了融合蛋白的表达,然后通过细菌双杂交对可能有质粒编码的蛋白-蛋白相互作用进行检测。结果表明:沙眼衣原体隐匿质粒上 Pgp3 可以和自身相互作用。此结果与 Gong 等发现 Pgp3 是一个三聚体结构相符合。Pgp3 通过 6 位的苯丙氨酸与 234 位的络氨酸之间相互作用[17]。我们的结果不支持 Pgp3 与 Pgp1、Pgp3 与 Pgp4 及 Pgp1 与 Pgp4 蛋白的相互作用。尽管,DNA 测序证实 pRAC-*pgp8* 含有正确重组的 CI-*pgp8* 基因,但 Western blot 未能检测出大肠菌表达融合 CI-Pgp8 蛋白。有可能 CI-Pgp8p2 融合蛋白表达低或不稳定。衣原体染色体有较高 AT 含量(57%),其密码子使用与大肠杆菌(AT50%)有所不同。进一步优化密码子使用,有可能会改善衣原体基因产物在大肠菌的表达。

目前,研究蛋白质相互作用的方法众多,细菌双杂交技术由于细菌的生长速度快、转化效率高等优点而广泛应用于生物学的各个领域,有较大的优越性[18-19]:细菌生长快、进行基因操作技术成熟、方便等。但该系统在运用中也有一定的局限性:假阳性率较高,筛选到的蛋白必须通过其他生物学的方法验证;存在假阴性率,细菌缺少蛋白质翻译后加工修饰,筛选时可能会损失一部分相互作用蛋白质的信息。

综上所述,本研究通过对沙眼衣原体隐匿质粒编码蛋白的相互作用进行分析,证实 Pgp3 可以和自身相互作用,为进一步研究沙眼衣原体的致病机制奠定基础。对于本研究未检测出有相互作用的蛋白,需优化实验方案,如优化密码子使用,加大筛选降低细菌双杂交的假阳性率及假阴性率等,进一步从转录水平及翻译后修饰更好地了解病原体的致病机理。

志谢　感谢第三军医大学微生物教研室饶贤才教授在本课题的设计、实施中予以大力帮助

参考文献:

[1] Da-Ros C T, Schmitt-Cda S. Global epidemiology of sexually transmitted diseases[J]. Asian J Androl, 2008, 10(1): 110-114.

[2] Tang F F, Huang Y T, Chang H L, *et al*. Isolation of trachoma virus in chick embryo[J]. J Hyg Epidemiol Microbiol Immunol, 1957, 1(2): 109-120.

[3] Silva L C, Miranda A E, Batalha R S, *et al*. *Chlamydia trachomatis* infection among HIV-infected women attending an AIDS clinic in the city of Manaus, Brazil[J]. Braz J Infect Dis, 2012, 16(4): 335-338.

[4] Verteramo R, Pierangeli A, Mancini E, *et al*. Human Papillomaviruses and genital co-infections in gynaecological outpatients[J]. BMC Infect Dis, 2009, 9: 16.

[5] Oh J K, Franceschi S, Kim B K, *et al*. Prevalence of human papillomavirus and *Chlamydia trachomatis* infection among women attending cervical cancer screening in the Republic of Korea[J]. Eur J Cancer Prev, 2009, 18(1): 56-61.

[6] World Health Organization. Stratagies and laboratory methods for strengthening surveilllance of sexually transmitted infection 2012[M]. Geneva: World Health Organization, 2012.

[7] Stephens R S, Kalman S, Lammel C, *et al*. Genome sequence of an obligate intracellular pathogen of humans: *Chlamydia trachomatis*[J]. Science, 1998, 282(5389): 754-759.

[8] Thomas N S, Lusher M, Storey C C, *et al*. Plasmid diversity in Chlamydia[J]. Microbiology, 1997, 143(Pt 6): 1847-1854.

[9] O'Connell C M, Ingalls R R, Andrews C W Jr, *et al*. Plasmid-deficient Chlamydia muridarum fail to induce immune pathology and protect against oviduct disease[J]. J Immunol, 2007, 179(6): 4027-4034.

[10] Gong S, Yang Z, Lei L, *et al*. Characterization of *Chlamydia trachomatis* plasmid-encoded open reading frames[J]. J Bacteriol, 2013, 195(17): 3819-3826.

[11] Li Z, Chen D, Zhong Y, *et al*. The chlamydial plasmid-encoded protein pgp3 is secreted into the cytosol of Chlamydia-infected cells[J]. Infect Immun, 2008, 76(8): 3415-3428.

[12] Comanducci M, Cevenini R, Moroni A, *et al*. Expression of a plasmid gene of *Chlamydia trachomatis* encoding a novel 28 kDa antigen[J]. J Gen Microbiol, 1993, 139(5): 1083-1092.

[13] Song L, Carlson J H, Whitmire W M, *et al*. *Chlamydia trachomatis* plasmid-encoded Pgp4 is a transcriptional regulator of virulence-associated genes[J]. Infect Immun, 2013, 81(3): 636-644.

[14] Shaywitz A J, Dove S L, Greenberg M E, *et al*. Analysis of phosphorylation-dependent protein-protein interactions using a bacterial two-hybrid system[J]. Sci STKE, 2002, 2002(142): pl11.

[15] Rao X, Deighan P, Hua Z, *et al*. A regulator from *Chlamydia trachomatis* modulates the activity of RNA polymerase through direct interaction with the beta subunit and the primary sigma subunit[J]. Genes Dev, 2009, 23(15): 1818-1829.

[16] Hua Z, Rao X, Feng X, *et al*. Mutagenesis of region 4 of sigma 28 from *Chlamydia trachomatis* defines determinants for protein-protein and protein-DNA interactions[J]. J Bacteriol, 2009, 191(2): 651-660.

[17] Galaleldeen A, Taylor A B, Chen D, *et al*. Structure of the *Chlamydia trachomatis* immunodominant antigen Pgp3[J]. J Biol Chem, 2013, 288(30): 22068-22079.

[18] Joung J K, Ramm E I, Pabo C O. A bacterial two-hybrid selection system for studying protein-DNA and protein-protein interactions[J]. J Proc Natl Acad Sci U S A, 2000, 97(13): 7382-7387.

[19] Hu J C, Komacker M G, Hochschild A. *Escherichia coli* one- and two-hybrid systems for the analysis and identification of protein-protein interactions[J]. Methods, 2000, 20(1): 80-94.

(收稿:2014-08-11;修回:2014-10-19)

(编辑 邓强庭)