

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2017.01.005

嗜吞噬细胞无形体 aph0653 的克隆表达及重组蛋白的抗原性分析*

徐文婷 贺美玲 张磊 黄瑞 牛华[△]

(苏州大学医学部 江苏 苏州 215123)

摘要 目的:克隆表达嗜吞噬细胞无形体(*Anaplasma phagocytophilum*, AP) APH0653 基因,并对表达产物进行抗原性分析。**方法:**以嗜吞噬细胞无形体基因组 DNA 为模板,使用特异性引物,PCR 扩增 APH0653 基因并克隆入原核表达载体进行表达。使用镍柱亲和层析纯化重组蛋白,并应用免疫印迹方法检测 APH0653 与嗜吞噬细胞无形体感染血清的免疫反应性。**结果:**菌落 PCR、DNA 测序和 SDS-PAGE 蛋白凝胶电泳表明 APH0653 基因已成功克隆入原核表达载体,并可诱导表达重组蛋白。免疫印迹实验表明 AP 阳性血清可识别重组蛋白 APH0653,并产生明显的特异性条带。**结论:**嗜吞噬细胞无形体 APH0653 蛋白可在原核表达系统中高效表达,且重组蛋白具有较好的抗原性。

关键词:人粒细胞无形体病;嗜吞噬细胞无形体;APH0653;抗原性

中图分类号:Q78;R51;R384.4 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2017)01-20-04

Recombinant Expression of *Anaplasma Phagocytophilum* APH0653 and Determination of its Antigenicity*

XU Wen-ting, HE Mei-ling, ZHANG Lei, HUANG Rui, NIU Hua[△]

(Medical College, Soochow University, Suzhou, Jiangsu, 215123, China)

ABSTRACT Objective: Recombinant expression of *Anaplasma phagocytophilum* APH0653 and determination of its antigenicity.

Methods: Bioinformatical analysis of APH0653 amino acid sequence was performed. DNA fragment encoding APH0653 was amplified by PCR using *A. phagocytophilum* genomic DNA as template, followed by ligation with prokaryotic vector pET28a (+) after double digestion with endonucleases. After the inserted DNA sequence was confirmed by colony PCR and sequencing analysis, the recombinant plasmid was transformed into *Escherichia coli* BL21 (DE3) for protein expression. After purification by Nickel affinity chromatography, the recombinant APH0653 was subjected to western blot analysis to determine its antigenicity. **Results:** Bioinformatical analysis results showed that APH0653 is a hydrophilic protein with 5 antigenic determinants. The molecular mass of this protein was computed to be 18.5 kDa. The PCR product encoding APH0653 was cloned into pET28a(+) successfully as verified by colony PCR and sequencing analysis. Recombinant APH0653 was highly expressed in *E. coli* BL21 (DE3) after induction with IPTG, and purified with Nickel affinity chromatography. Western blot analysis showed that APH0653 strongly reacted with *A. phagocytophilum* positive sera. **Conclusions:** *A. phagocytophilum* APH0653 was highly expressed in a prokaryotic expression system. In addition, APH0653 is a protein with strong antigenicity.

Key words: Human granulocytic anaplasmosis; *Anaplasma phagocytophilum*; APH0653; Antigenicity

Chinese Library Classification(CLC): Q78; R51; R384.4 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2017)01-20-04

前言

人粒细胞无形体病(human granulocytic anaplasmosis, HGA)是一种经蜱虫传播,由嗜吞噬细胞无形体(*Anaplasma phagocytophilum*, AP)感染引起的新发可致命性传染病。此病最早于1994年在美国的威斯康辛州被发现,目前已在我国广泛流行^[1,2]。由中国疾病预防控制中心组织的,对我国10个城市或省份的农业从业者的流行病学调查发现,AP感染血清阳性率平均达到13.9%,并且在病患者中严重并发症的发生比率和死亡

率较高^[3]。HGA临床症状常类似于感冒,极易误诊,可导致治疗延误,并产生严重后果^[4,5]。因此,建立一种简单可靠、敏感性高、特异性强的诊断方法具有十分重要的意义。ELISA技术由于具有操作简单、结果可靠和可自动化等优点已广泛用于血清学诊断感染性疾病,但目前以嗜吞噬细胞无形体外膜蛋白P44为单一抗原的人粒细胞无形体病诊断ELISA方法存在漏检现象,灵敏度仅为80-90%^[6,7]。本研究旨在鉴定嗜吞噬细胞无形体新抗原,为后续提高ELISA检测灵敏度的研究工作提供新线索。在本研究中,我们鉴定出APH0653为嗜吞噬细胞无形体一新

* 基金项目:国家自然科学基金项目(31470276)

作者简介:徐文婷(1988-),女,硕士研究生,研究方向:感染与免疫, E-mail: 1002339413@qq.com

[△] 通讯作者:牛华,研究方向:感染与免疫,电话:051265880132, E-mail: hniu@suda.edu.cn

(收稿日期:2016-05-20 接受日期:2016-06-12)

抗原。

1 材料与方法

1.1 主要材料

血清样本来源于山东省单县中心医院检验科;AP 基因组 DNA 由美国俄亥俄州立大学 Yasuko Rikihisa 博士提供; *E. coli* 感受态细胞 Top10、BL21(DE3)购自全式金科技有限公司。

1.2 主要试剂和仪器

Platinum® Pfx DNA Polymerase 购自美国 Invitrogen 公司;限制性核酸内切酶 *EcoRI*、*XhoI* 购自 TaKaRa 公司;T4 DNA 连接酶购自 NEB 公司;EasyTaq® DNA Polymerase 购自全式金科技有限公司;SafeView™ Nucleic Acid Stains 购自 abm 公司;Ni-NTA Agarose 购自 QIAGEN 公司;DNA Marker、DNA 琼脂糖凝胶 /PCR 产物回收、质粒抽提试剂盒购自 Biomeiga 公司;HRP- 羊抗人 IgG 购自美国 KPL 公司;硝酸纤维素膜购自 Whatman 公司;IPTG 购自美国 Merck 公司;ECL 化学发光显色液购自联科生物技术有限公司;其他常规试剂为国产分析纯试剂。

PCR 仪为杭州朗基科学仪器有限公司产品;紫外凝胶成像仪为英国 Syngene 公司产品;Allegra X-15R 低温高速离心机为美国 Beckman-Coulter 公司产品;ECL 全自动化学发光图像分析系统为上海天能科技有限公司产品。

1.3 方法

1.3.1 APH0653 氨基酸序列的生物信息学分析

表 1 生物信息学分析 APH0653 氨基酸序列方法

Table 1 Analysis of APH0653 amino acid sequence by bioinformatics

Items for analysis	Analysis tools
Physical and chemical properties	http://web.expasy.org/cgi-bin/protparam/protparam
Antigenic epitope prediction	http://www.cbs.dtu.dk/services/BepiPred/
Protein secondary structures prediction	https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/secpred_phd.pl

1.3.2 APH0653 基因原核表达质粒的构建 根据 aph0653 核苷酸序列设计引物,上游引物为:5'-TCCGAATTCATGCAGT-GTTTACAGGCACTG-3',含 *EcoRI* 酶切位点;下游引物为:5'-GCACTCGAGCATAGGCACGTTCTGTACTAT-3',含 *XhoI* 酶切位点(下划线为酶切位点),以无形体基因组 DNA 为模板进行 Touchdown PCR 扩增,反应条件为:预变性后进入 Touchdown 循环,起始温度为 58℃,终止温度为 50℃,每个循环降低 2℃,结束后进入正常 PCR 反应循环,退火温度为 62℃,共 34 个循环。预计 PCR 产物大小为 507 bp。

PCR 产物应用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳进行鉴定,DNA 纯化回收试剂盒回收 PCR 产物,对 PCR 产物和 pET28a(+)质粒进行 *EcoRI* 和 *XhoI* 双酶切后连接并转化入 Top10 感受态细菌,菌落 PCR 鉴定,并将菌落 PCR 结果阳性的质粒委托金维智公司进行测序鉴定。

1.3.3 APH0653 重组蛋白的表达和纯化 将 pET28a(+)

-aph0653 转化入 BL21(DE3)表达菌感受态中,挑取单菌落接种至 3 mL LB 液体培养液(含 50 μg/mL 卡那霉素),37℃,250 rpm 振荡培养 12-16 h。将培养的菌液 1:100 接种于新鲜的 3 mL LB 液体培养基中,37℃振荡培养至对数生长期,加入 IPTG (终浓度为 1 mM),37℃诱导培养 3 h,收集菌体进行 SDS-PAGE 电泳检测蛋白。在同样条件下将表达菌在 200 mL LB 培养液中诱导表达,取 8 mL 菌液低温离心,收集菌体超声裂解,SDS-PAGE 电泳检测包涵体和上清中蛋白以确定蛋白的表达形式。变性条件下纯化 APH0653。将剩余菌液离心收集菌体,超声裂解后低温离心,收集沉淀加入含 8 M 尿素,pH 为 8.0 的磷酸盐缓冲液溶解包涵体,Ni 琼脂糖亲和层析,使用 pH 为 4.8,含 250 mM 咪唑的磷酸盐缓冲液洗脱目的蛋白,分管收集。

1.3.4 免疫印迹检测 将纯化的 APH0653 蛋白进行 SDS-PAGE 电泳并湿转至硝酸纤维素膜上,50 g/L 脱脂奶粉室温封闭 30 min,AP 阳性血清 1:1000 稀释后作为一抗(AP 阳性血清来源于 IFA 检测结果),室温孵育 1 h,1× PBS 清洗 3 次,每次 5 min。HRP- 羊抗人 IgG 1:2000 稀释后作为二抗,室温孵育 1 h,1× PBS 清洗 4 次,每次 5 min,ECL 显色并拍照。

2 结果

2.1 应用生物信息学预测 APH0653 特征

嗜吞噬细胞无形体基因组共有 610 个编码未知功能蛋白基因。为鉴定嗜吞噬细胞无形体新抗原,我们利用 PCR 技术扩增出其中 35 个编码未知功能蛋白基因,并对其中部分基因进行了克隆表达(未发表内容),aph0653 为其中之一。APH0653 基因全长 507 bp,编码 169 个氨基酸。本研究利用表 1 中所列的生物信息学方法对 APH0653 氨基酸序列进行分析。ExPASy 网站 ProtParam 软件预测其分子式为 $C_{785}H_{1281}N_{229}O_{262}S_{11}$,理论分子量为 18.59 kDa,不稳定系数为 58.90,表示此蛋白质性质不稳定。平均亲水系数(Grand average of hydropathicity, GRAVY): -0.162,表明其为亲水性蛋白。二级结构预测结果显示 59.76% 蛋白片段为 α 螺旋 (Alpha helix),9.47% 蛋白片段为 β 折叠 (Extended strand),30.77% 蛋白片段为无规则卷曲 (Random coil),表示该蛋白以 α 螺旋为主。抗原位点分析共预测到 5 个抗原位点,分别出现氨基酸序列的 19-26,51-68,94-105,123-132,154-156 位置。

2.2 pET28a(+)-aph0653 原核表达质粒的构建与鉴定

以 AP 基因组 DNA 为模板,PCR 扩增出两侧含有 *EcoRI* 和 *XhoI* 酶切位点的 DNA 片段,PCR 产物应用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测发现在 500 bp 左右出现特异性条带,与理论预测值一致,见图 1。PCR 产物经 *EcoRI* 和 *XhoI* 双酶切后克隆入原核表达载体 pET28a (+),经 T4 DNA 连接酶连接后转化入 Top10 感受态细菌,挑取菌落进行菌落 PCR 鉴定。PCR 结果阳性的重组质粒(pET28a(+)-aph0653)再经测序确认,结果显示重组质粒中插入的 DNA 片段序列正确。

2.3 APH0653 重组蛋白的表达及纯化

将 pET28a(+)-aph0653 重组质粒转化入 BL21(DE3)表达菌感受态中,挑取单菌落接种至 LB 液体培养基(含 50 μg/mL 卡那霉素)中,经 IPTG 诱导,SDS-PAGE 检测发现在 25 kDa (APH0653 和载体来源的多肽分子量)处出现一条明显的蛋白诱导条带,

未经 IPTG 诱导的菌液未见明显条带。BL21-pET28a-aph0653 扩大培养后经 SDS-PAGE 分析重组蛋白 APH0653 在宿主菌中表达形式,发现 APH0653 蛋白主要以包涵体进行表达,见图 2。使用尿素裂解包涵体,通过 Ni 琼脂糖凝胶在变性条件下进行亲和层析纯化。SDS-PAGE 电泳显示成功纯化重组 APH0653 蛋白,见图 3。

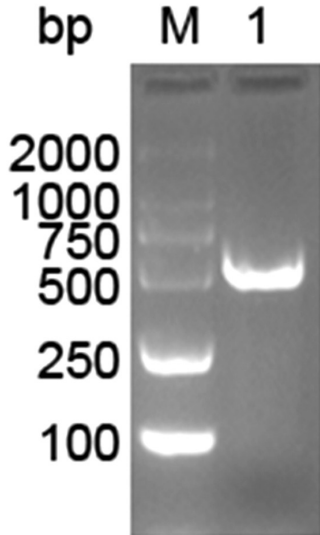


图 1 APH0653 基因的 PCR 扩增

Fig.1 PCR product of APH0653 gene

注:M;DNA marker;1:aph0653 的 PCR 产物。

Note: M: DNA marker; 1: PCR product of aph0653.

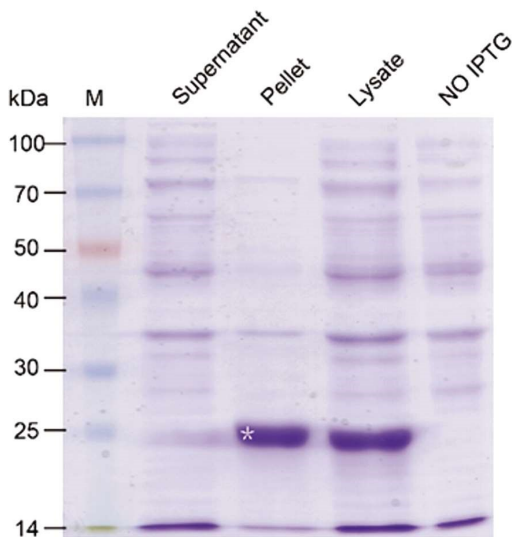


图 2 SDS-PAGE 电泳检测 APH0653 重组表达及蛋白可溶性分析

Fig.2 Analysis of APH0653 expression and its solubility by SDS-PAGE

注:M;标准分子量蛋白 marker;Supernatant:超声裂菌离心后的上清; Pellet:超声裂菌离心后的沉淀;

Lysate:超声裂解后的菌体裂解液;NO IPTG:未诱导的菌体沉淀;

*:重组蛋白 APH0653。

Note: M: Protein molecular weight marker; Supernatant: Supernatant after centrifugalization of ultrasonic lysis of bacteria; Pellet: Pellet after centrifugalization of ultrasonic lysis of bacteria; Lysate: Ultrasonic lysis of bacteria; NO IPTG: Non induced bacteria; *: Recombinant protein APH0653.

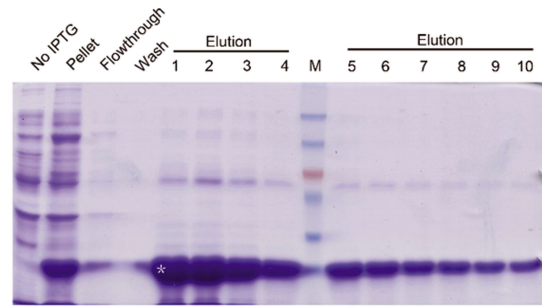


图 3 APH0653 重组蛋白的亲和纯化

Fig.3 Recombinant protein APH0653 purified by affinity chromatography

注:NO IPTG:未诱导的菌体沉淀;Pellet:超声裂菌离心后的沉淀; Flow-through:通过 Ni 柱的流出液; Wash:清洗 Ni-NTA Agarose 的 Buffer B 溶液;M:蛋白分子量标准;1-10:分管洗脱的蛋白洗脱液;

*:重组蛋白 APH0653。

Note: NO IPTG: Non induced bacteria; Pellet: Pellet after centrifugalization of ultrasonic lysis of bacteria; Flow-through: protein solution after passing the Ni-NTA Agarose column; Wash: Buffer B after being used for washing Ni-NTA Agarose; M: Protein molecular weight marker; 1-10: Sequentially collected recombinant protein purified with affinity chromatography; *: Recombinant protein APH0653.

2.4 免疫印迹检测 APH0653 的抗原性

将纯化的重组 APH0653 蛋白进行免疫印迹分析,结果显示 APH0653 与 AP 感染者血清发生强烈的免疫反应,与阴性血清不反应,说明 APH0653 具有较强抗原性,人体感染 AP 时能产生抗 APH0653 抗体,见图 4。

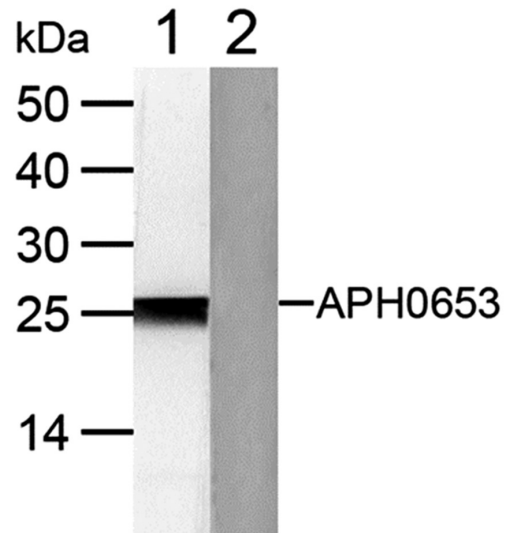


图 4 免疫印迹检测 APH0653 与 AP 阳性血清的反应

Fig.4 The reaction of APH0653 with AP positive serum by western blot analysis

注:1:免疫印迹检测 APH0653 与 AP 感染者血清的反应;2:阴性血清对照。

Note: 1: The reaction of APH0653 with AP positive serum by western blot analysis; 2: Negative serum control.

3 讨论

目前常用的 HGA 实验室检查方法包括检测血清中抗 AP

抗体的间接免疫荧光技术(IFA)和 ELISA 技术,以及扩增血标本中病原体 16S rRNA 特异性序列的 PCR 等技术^[8-10]。IFA 是目前应用最广泛的,敏感性最强的实验室检测手段,但这种方法需要购买价格昂贵的抗原片,对操作人员经验要求高,而且在疾病感染早期(<7 d),IFA 敏感性较低^[10]。PCR 技术可实现 HGA 早期诊断,但实验室条件、人员操作、标本采集时间等多种因素易对该技术敏感性造成影响^[10,11]。JACOB W. IJDO 等使用以重组 AP P44 蛋白作为包被抗原的 ELISA 方法检测病人血清中的抗 P44 抗体,证明重组 P44 蛋白可作为 HGA 诊断抗原^[6]。人体在感染 AP 后形成多种抗 P44 抗体,大部分 HGA 患者血清可特异性结合 P44 蛋白^[12,13]。以 P44 为诊断抗原的 ELISA 方法,具有成本低,特异性强的特点且可以实现大规模自动化筛查 AP 感染^[14,15]。但以 P44 作为单一诊断抗原的 ELISA 方法检测灵敏度仅为 80-90%,存在漏检现象,所以鉴定新的特异性诊断抗原,对提高 HGA 血清学检测灵敏度具有非常重要的现实意义。

生物信息学技术是由分子生物学和计算机信息处理技术相结合的一种新兴科学研究方法,具有效率高,成本低的特点,在生物科学研究中得到广泛应用^[16-18]。本研究应用生物信息学方法分析了 APH0653 氨基酸序列,预测其为亲水性蛋白,并有五个抗原位点,提示其可能具有较强的抗原性。本实验将 aph0653 克隆入原核表达载体并在 BL21(DE3)中高效表达,超声裂解菌体后经 SDS-PAGE 检测,结果显示该蛋白主要以包涵体形式表达。重组蛋白经 Ni 琼脂糖凝胶在变性条件下进行亲和层析纯化,获得高纯度的 APH0653 重组蛋白。免疫印迹分析发现 APH0653 能够与 AP 阳性血清发生较强免疫反应,提示其具有较强的抗原性,这与生物信息学预测结果一致。

HGA 最早在美国的威斯康辛州被发现,此后每年的病例报告数大幅度增加,HGA 快速和准确的实验室诊断对病人的及时有效治疗具有重要意义^[19,20]。目前的诊断方法不仅敏感性和特异性不是十分理想,而且成本较高,在一定程度上限制了 HGA 的诊断水平,延误治疗,因此发展高特异性和高敏感性的检测试剂具有重要的意义。本研究鉴定出 APH0653 为嗜吞噬细胞无形体的新抗原,这为后续提高血清学诊断 HGA 灵敏度的工作提供新的研究对象。

参考文献(References)

- [1] K M Asanovich, J S Bakken, J E Madigan, et al. Antigenic Diversity of Granulocytic Ehrlichia Isolates from Humans in Wisconsin and New York and a Horse in California [J]. J Infect Dis, 1997, 176 (4): 1029-1034
- [2] Li H, Zhou Y, Wang W, et al. The clinical characteristics and outcomes of patients with human granulocytic anaplasmosis in China [J]. Int J Infect Dis, 2011, 15(12): e859-866
- [3] Dumler JS. The biological basis of severe outcomes in Anaplasma phagocytophilum infection[J]. FEMS Immunol Med Microbiol, 2012, 64(1): 13-20
- [4] Bakken JS, Dumler JS. Human granulocytic anaplasmosis [J]. Infect Dis Clin North Am, 2015, 29(2): 341-355
- [5] Stuen S, Granquist EG, Silaghi C. Anaplasma phagocytophilum--a widespread multi-host pathogen with highly adaptive strategies [J]. Front Cell Infect Microbiol, 2013, 3: 31
- [6] IJdo JW, Wu C, Magnarelli LA, et al. Serodiagnosis of Human Granulocytic Ehrlichiosis by a Recombinant HGE-44-Based Enzyme-Linked Immunosorbent Assay [J]. J Clin Microbiol, 1999, 37 (11): 3540-3544
- [7] Tajima T, Zhi N, Lin Q, et al. Comparison of two recombinant major outer membrane proteins of the human granulocytic ehrlichiosis agent for use in an enzyme-linked immunosorbent assay[J]. Clin Diagn Lab Immunol, 2000, 7(4): 652-657
- [8] Zhang L, Wang G, Liu Q, et al. Molecular analysis of Anaplasma phagocytophilum isolated from patients with febrile diseases of unknown etiology in China[J]. PLoS One, 2013, 8(2): e57155-57165
- [9] Koebela C, Kerna A, Edouard S, et al. Human granulocytic anaplasmosis in eastern France: clinical presentation and laboratory diagnosis [J]. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease, 2012, 72 (3): 214-218
- [10] Yang J, Liu Z, Niu Q, et al. Evaluation of different nested PCRs for detection of Anaplasma phagocytophilum in ruminants and ticks[J]. BMC Vet Res, 2016, 12: 35-41
- [11] Dong T, Qu Z, Zhang L. Detection of A. phagocytophilum and E. chaffeensis in patient and mouse blood and ticks by a duplex real-time PCR assay[J]. PLoS One, 2013, 8(9): e74796-74803
- [12] Rikihisa Y. Mechanisms of obligatory intracellular infection with Anaplasma phagocytophilum [J]. Clin Microbiol Rev, 2011, 24(3): 469-489
- [13] Lappin MR, Chandrashekar R, Stillman B, et al. Evidence of Anaplasma phagocytophilum and Borrelia burgdorferi infection in cats after exposure to wild-caught adult Ixodes scapularis[J]. J Vet Diagn Invest, 2015, 27(4): 522-525
- [14] IJdo JW, Sun W, Zhang Y, et al. Cloning of the gene encoding the 44-kilodalton antigen of the agent of human granulocytic ehrlichiosis and characterization of the humoral response[J]. Infect Immun, 1998, 66(7): 3264-3269
- [15] Yoshikawa Y, Ohashi N, Wu D, et al. Anaplasma phagocytophilum antibodies in humans, Japan, 2010-2011 [J]. Emerg Infect Dis, 2014, 20(3): 508-509
- [16] Sinclair SH, Garcia-Garcia JC, Dumler JS. Bioinformatic and mass spectrometry identification of Anaplasma phagocytophilum proteins translocated into host cell nuclei [J]. Front Microbiol, 2015, 6 (4): 1719-1720
- [17] Myeni S, Child R. Brucella modulates secretory trafficking via multiple type IV secretion effector proteins [J]. PLoS Pathog, 2013, 9(8): e1003556-1003574
- [18] Zhang X, Acencio ML, Lemke N. Predicting Essential Genes and Proteins Based on Machine Learning and Network Topological Features: A Comprehensive Review[J]. Front Physiol, 2016, 7: 75
- [19] Chen SM, Dumler JS, Bakken JS, et al. Identification of a granulocytotropic Ehrlichia species as the etiologic agent of human disease[J]. J Clin Microbiol, 1994, 32(3): 589-595
- [20] Dugat T, Lagré e AC, Maillard R, et al. Opening the black box of Anaplasma phagocytophilum diversity: current situation and future perspectives[J]. Front Cell Infect Microbiol, 2015, 5: 61