



研究报告

沙眼衣原体包涵体膜蛋白 CT225 与宿主波形蛋白存在相互作用

李雪燕 贾天军*

河北北方学院病原生物学与免疫研究所 临床检验诊断学重点实验室 河北 张家口 075000

摘要:【背景】衣原体独特的发育周期是在包涵体内完成的,大约 7%–10% 的基因编码包涵体膜蛋白,由此可见包涵体膜蛋白可能在其发育和致病过程中发挥重要作用。然而,其具体功能仍有待深入研究。【目的】筛选包涵体膜蛋白 CT225 的互作分子,以期进一步了解其可能的生物学功能。【方法】首先表达融合蛋白 GST-CT225,用亲和层析法从 HeLa 细胞裂解液中筛选 CT225 的互作分子,所得蛋白进行质谱分析。确定候选蛋白,然后通过免疫共沉淀方法(Co-Immunoprecipitation, CO-IP)、谷胱甘肽巯基转移酶(Glutathione S-Transferase, GST)下拉/沉降实验和亚细胞定位等方法进行验证。

【结果】参考质谱分析得分,通过实验初步验证得出波形蛋白(Vimentin, VIM)为与 CT225 相互作用的蛋白。【结论】CT225 与 HeLa 细胞的波形蛋白 Vimentin 互相作用,提示其功能可能与维持细胞骨架完整性、膜运输和脂质转运等有关。

关键词: 沙眼衣原体, CT225, GST 下拉/沉降实验, 质谱, 波形蛋白

Chlamydia trachomatis CT225 interacting with vimentin from HeLa cell

LI Xueyan JIA Tianjun*

Institute of Pathogen Biology and Immunology, Key Clinical Laboratory Diagnostics Laboratory, Hebei North University, Zhangjiakou, Hebei 075000, China

Abstract: [Background] The unique development cycle of *Chlamydia trachomatis* is completed in inclusion. About 7%–10% genes encode membrane proteins in the inclusion. Therefore, the membrane proteins in the inclusion may play an important role in the development and pathogenesis of *Chlamydia*. However, its specific functions still need to be further studied. [Objective] In order to further understand the function of the membrane protein CT225 in the inclusion, the association molecules were screened. [Methods] The fusion protein GST-CT225 was first expressed. Then, the interaction molecules of CT225 were screened from the lysate of HeLa cell by affinity chromatography, and analyzed by mass spectrometry. Finally, the candidate proteins were selected and verified by Co-immunoprecipitation, glutathione S-transferase (GST) pull-down test and subcellular localization. [Results] Vimentin was the

Foundation item: Hebei University Student Innovation and Entrepreneurship Training Program (2017023)

*Corresponding author: E-mail: tjia1968@163.com

Received: 28-02-2020; Accepted: 21-05-2020; Published online: 30-07-2020

基金项目: 河北省大学生创新创业训练计划(2017023)

*通信作者: E-mail: tjia1968@163.com

收稿日期: 2020-02-28; 接受日期: 2020-05-21; 网络首发日期: 2020-07-30

protein interacted with CT225 according to the score of mass spectrometry. **[Conclusion]** CT225 interacts with vimentin in HeLa cells, suggesting that CT225 has the relationship with the cytoskeleton integrity, membrane transport and lipid transport.

Keywords: *Chlamydia trachomatis*, CT225, GST pull-down test, mass spectrometry, vimentin

沙眼衣原体(*Chlamydia trachomatis*, CT)是一种专性胞内寄生的病原微生物, 主要引起眼部和生殖器感染, 具有特殊的双相发育周期^[1]。其包涵体作为衣原体复制和生物合成的场所, 不仅保护病原体免遭宿主免疫系统清除, 而且衣原体必须通过包涵体从宿主细胞内摄取营养和排泄代谢产物^[2]。包涵体膜蛋白(Inclusion Membrane Proteins, Incs)是一类定位于衣原体包涵体膜上的含独特双叶片状疏水性基序结构的衣原体蛋白, 大约 7%–10%的基因组编码包涵体膜蛋白^[3]。可见包涵体膜蛋白在衣原体的生命活动中发挥重要作用, 比如参与包涵体膜的运输、影响宿主细胞骨架构建、参与宿主泛素化及增强衣原体抗凋亡活性等^[4]。然而许多 Incs 的生物学功能仍需进一步研究。CT225 是已经证实的包涵体膜蛋白^[1], 未见其生物学功能的研究报道。本实验采用谷胱甘肽巯基转移酶(Glutathione S-Transferase, GST)融合蛋白沉降实验及质谱技术对与其相互作用的蛋白质进行筛选, 为进一步研究包涵体膜蛋白的生物学特性及沙眼衣原体的致病机制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 主要试剂和仪器

pGEX-6p2-CT225 重组质粒, 钟光明教授惠赠; 大肠埃希菌、XL1-Blue 感受态细菌和 HeLa 细胞, 本实验室保存; Pierce GST Protein Interaction Pull-Down Kit, Thermo 公司; 质粒提取试剂盒, Omega 公司; 小鼠抗 Flag 抗体, Sigma-Aldrich 公司; 兔抗 Myc 抗体、Cy3 标记的山羊抗鼠 IgG 抗体、FITC 标记的山羊抗兔 IgG 抗体、HRP 标记羊抗兔 IgG 和羊抗鼠 IgG (HRP 标记), Bioss 公司; 小鼠抗 CT225 抗体, 本实验室保存; 兔抗 Vimentin 抗体、DAPI 染色液(即用型), 上海碧云天生物技

术有限公司。

超声波细胞破碎机, 宁波新芝生物科技股份有限公司; Omega Lum G 化学发光凝胶成像系统, Aplegen 公司; 毛细管高效液相色谱仪和电喷雾-组合型离子阱 Orbitrap 质谱仪, Thermo 公司。

1.2 CT225 基因编码蛋白的特性分析

运用 EXPSY Proteomics 分析系统(<https://web.expasy.org/protparam/>)分析蛋白质的分子式、氨基酸组成等基本理化特性。采用 PRABIGERLAND (<https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/secpredsopma.pl>)在线软件分析二级结构。使用软件 TMNMM Server V2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0>)分析跨膜区域。运用 SignalP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>)预测假设蛋白信号肽。运用 EXPASY Proteomics 软件模拟构建同源结构(三级结构模拟)。利用 ProtScale (<http://web.expasy.org/protscale>)分析该蛋白的亲疏水性。使用 PHP 蛋白功能预测数据库进行功能预测(<http://kiharalab.org/web/index.php>)。

1.3 CT225 互作分子的初筛

1.3.1 诱饵 GST-CT225 蛋白的制备

将 pGEX-6p2-CT225 重组质粒的甘油菌接入 LB 液体培养基中, 37 °C、200 r/min 振荡培养 16 h, 加入 IPTG (100 mg/mL) 10 μL 诱导表达。收集菌液于 4 000 r/min 离心 30 min 保留菌体沉淀, 加 1 mL 裂解液重悬。使用超声波细胞破碎机破裂菌体(功率 100 W, 超声 3 s, 间隔 4 s, 共 9 min), 4 000 r/min 离心 15 min 后留取上清液。部分上清在 4 °C 条件下与谷胱甘肽共轭琼脂糖微珠(GST 微珠)吸附 2.5 h, 使用 PBS 缓冲液冲洗 3 次, 12 000 r/min 离心 2 min, 弃上清, 加等体积上样缓冲液, 95 °C 金属浴 5 min, 进行 SDS-PAGE 电泳。

1.3.2 固定诱饵蛋白

制备洗涤溶液,按 1:1 比例将 TBS 缓冲液与 Pull-Down 裂解缓冲液混合。吸取 50 μL 的 GST 微珠浆液加入到 Pierce 旋柱中,盖上柱的底端向离心柱中加入 400 μL 洗涤液,盖上柱的顶盖倒转几次,以平衡混匀 GST 微珠,取下底端盖子,将离心柱置于收集管中,1 250 $\times g$ 离心 1 min,重复洗涤 5 次。将准备的 GST-CT225 融合蛋白 700 μL 加入到旋柱中,更换柱子的顶盖,4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 2 h 并且在旋转平台上轻轻摇动。移除旋柱底盖并置于收集管中,1 250 $\times g$ 离心 1 min,弃上清,加入 400 μL 的洗涤液,吹吸重悬后离心,1 250 $\times g$ 离心 1 min,共重复洗涤 5 次。取部分 GST 微珠加等体积上样缓冲液,95 $^{\circ}\text{C}$ 金属浴 5 min,进行 SDS-PAGE 电泳。

1.3.3 HeLa 细胞总蛋白的制备

将培养的细胞用 D-Hanks 液冲洗,胰酶消化后移至离心管,500 $\times g$ 离心 5 min 后弃去上清。加入 1 mL TBS 缓冲液,将细胞重悬后再次离心弃上清。向细胞中加入 1 mL Pull-Down 裂解液与蛋白酶抑制剂,立即倒转至完全混合,冰上放置 30 min,10 min 翻转一次管。12 000 $\times g$ 离心 5 min 取上清至 EP 管中。

1.3.4 GST-CT225 对 HeLa 细胞互作蛋白的捕获

取下装有 GST 融合蛋白的旋柱顶盖,加入 HeLa 细胞裂解液上清,4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 2 h,并在旋转平台上轻轻摇摆。取下旋柱底盖,置于收集管中,1 250 $\times g$ 离心 1 min,弃上清,加入 400 μL 洗涤液反复吹吸后 1 250 $\times g$ 离心 1 min,重复 5 次。取部分 GST 微珠至 EP 管中,加等体积上样缓冲液,95 $^{\circ}\text{C}$ 金属浴 5 min,进行 SDS-PAGE 电泳。

1.3.5 质谱分析

(1) 前处理

胰蛋白酶(Trypsin)酶解,于 GST 下拉/沉降实验(Pull-Down Test)得到的 GST 微珠中加入 50 mmol/L NH_4HCO_3 溶液至 200 μL ,于 4 $^{\circ}\text{C}$ 、10 000 r/min 离心 5 min,弃去上清,并重复操作 1 次。加入 50 mmol/L NH_4HCO_3 溶液 100 μL ,加入 DTT 溶液

使其终浓度为 10 mmol/L,于 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中还原 4 h。加入 IAA 溶液使其终浓度为 50 mmol/L,避光反应 40 min 后,于 4 $^{\circ}\text{C}$ 、10 000 r/min 离心 5 min,弃去上清。加入 50 mmol/L NH_4HCO_3 溶液 200 μL ,于 4 $^{\circ}\text{C}$ 、10 000 r/min 离心 5 min,弃去上清。加入 100 μL 50 mmol/L NH_4HCO_3 溶液,按照胰蛋白酶与底物质量比为 1:100 加入胰蛋白酶,37 $^{\circ}\text{C}$ 酶切 4 h,继续按质量比 1:100 加入胰酶,37 $^{\circ}\text{C}$ 酶切反应过夜(16 h)。酶切后肽段使用自填脱盐柱脱盐,于 45 $^{\circ}\text{C}$ 真空离心浓缩仪中挥干溶剂。

(2) 毛细管液相色谱条件

预柱: 300 μm i.d. \times 5 mm, Packed with Acclaim PepMap RPLC C18, 5 μm , 10 nm。分析柱: 75 μm i.d. \times 150 mm, Packed with Acclaim PepMap RPLC C18, 3 μm , 10 nm。流动相 A: 0.1%甲酸, 2% ACN; 流动相 B: 0.1%甲酸, 80% ACN; 流速: 300 nL/min; 液相色谱梯度: 56 min。

(3) 质谱条件

一级质谱参数: Resolution: 70 000; AGCtarget: 3e6; MaximumIT: 40 ms; Scanrange: 350–1 800 m/z 。二级质谱参数: Resolution: 75 000; AGCtarget: 1e5; MaximumIT: 60 ms; TopN: 20; NCE/steppedNCE: 27。

1.3.6 数据库检索

质谱采集数据生成 Raw 格式文件,使用 Xcalibur 软件打开,可以看到总离子流色谱图。质谱原始文件使用 Maxquant (1.5.6.5)分别检索 Uniprot-Homo Sapiens (Human)数据库。在得分最高的几个分子中,结合分子功能的分析,选择对得分较高的 VIM 蛋白进行初步验证。

1.4 CT225 互作分子的鉴定

1.4.1 构建真核表达载体

以 HeLa 细胞 RNA 逆转录的 cDNA 为模板,与 pcDNA3.1(+)/His/Myc 和 pCMV-N-Flag 载体进行重组,依据 PCR 引物设计原则设计特异性引物(表 1),通过 PCR 扩增 VIM、CT225 目的片段。

表 1 实验所用引物
Table 1 Primers used in the experiment

Primers	Sequence (5'→3')
VIM 上游引物 VIM upstream primer	CCG-GAATTCGG-ATGTCCACCAGGTCCGTGT (<i>EcoR</i> I)
VIM 下游引物 VIM downstream primer	TTTTCTTTT-GCGGCCGC-TTATTCAAGGTCATCGTGATGC (<i>Not</i> I)
CT225 上游引物 CT225 upstream primer	CGC-GGATCC-ATGGCTAACAACTCCTTTATTCACC (<i>Bam</i> H I)
CT225 下游引物 CT225 downstream primer	TTTTCTTTT-GCGGCCGC-TTAATCCCACCCATGAAATTTAGC (<i>Not</i> I)

PCR 反应体系(100 μ L): 模板/CT 基因组 1–20 ng, 5 \times Prime STAR Buffer 20 μ L, dNTP Mixture (2.5 mmol/L) 8 μ L, 特异性上、下游引物(10 μ mol/L) 各 4 μ L, 高保真 DNA 聚合酶(5 U/ μ L) 1 μ L, ddH₂O 补齐 100 μ L。PCR 反应条件: 98 $^{\circ}$ C 5 min; 98 $^{\circ}$ C 10 s, 55 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 10 min, 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10 min。使用限制性内切酶酶切、T4 DNA 连接酶 16 $^{\circ}$ C 连接过夜。连接好的质粒采用热休克法转化入大肠埃希菌 XL1-Blue 感受态细胞, 37 $^{\circ}$ C 温箱内 LB 固体培养基长出菌落后筛选阳性菌落。用大肠埃希菌对质粒进行扩增和纯化, 大肠埃希菌在 LB 液体培养基中 37 $^{\circ}$ C、200 r/min 培养 16 h, 并配以适当的氨苄青霉素。用质粒提取试剂盒进行质粒提取, 送华大基因公司进行测序。

1.4.2 免疫共沉淀实验

HeLa 细胞培养在六孔细胞培养板中, 待细胞密度达到 80%时进行转染。转染 36 h 后收集六孔板中的 HeLa 细胞。裂解细胞后 13 000 r/min 离心 10 min 得到蛋白上清液, 将 c-Myc 探针抗体共轭琼脂糖微珠(c-Myc 微珠)加入到蛋白上清液中翻转吸附 2.5 h。1 \times PBST 缓冲液洗涤 3 次, 去除杂蛋白。加入等体积的上样缓冲液, 100 $^{\circ}$ C 下金属浴中孵育 10 min。通过 Western Blot 实验进行验证。

设置实验组: pcDNA3.1(+)His/Myc-CT225 与 pCMV-N-Flag-VIM。设置对照组: pcDNA3.1(+)His/Myc 与 pCMV-N-Flag-VIM; pcDNA3.1(+)His/Myc-CT225; pCMV-N-Flag-VIM。

1.4.3 GST 下拉/沉降实验

转染 pCMV-N-Flag-VIM 质粒至 HeLa 细胞。转染后 36 h 表达蛋白, 将 HeLa 细胞裂解作为猎物

蛋白。使用 GST Pull-Down Kit 进行实验, 将 1.3.1 部分表达的蛋白 GST-CT225 固定在 GST-微珠上作为诱饵蛋白, 孵育诱饵蛋白 2 h, 用 1 \times PBST 洗涤 3 次后孵育猎物蛋白 2 h, Western Blot 方法检测。

设置实验组: GST-CT225 与 pCMV-N-Flag-VIM。同时设置对照组: GST-CT225 蛋白组; GST-微珠; VIM 猎物蛋白。

1.4.4 亚细胞共定位技术

无菌盖玻片放至 24 孔板, 培养 HeLa 细胞至 24 孔板, 细胞密度达到 80%。使用转染试剂将质粒共转染至 24 孔板中的 HeLa 细胞, 转染 36 h 后, 在室温下用 4%丙酮固定 15 min。在 PBS 中洗涤细胞并用 0.1% Triton X-100 渗透 10 min, 室温下用 10%山羊血清封闭 2 h。在 PBS 中洗涤细胞后加入一抗抗体避光孵育过夜。在 PBS 中再次洗涤, 并用适当浓度的荧光二抗孵育 2 h。在 PBS 中再次洗涤后, 使用 DAPI 染液对细胞核进行染色 20 min。玻片滴加抗荧光淬灭剂后被安装在玻璃载玻片上, 激光共聚焦显微镜下进行多层面观察拍照, 图像由共焦显微镜获取, 并使用 Zeiss LSM 图像浏览器进行处理。

设置实验组: pcDNA3.1(+)1His/Myc-CT225 与 pCMV-N-Flag-VIM, 一抗为兔抗 Myc 抗体、鼠抗 Flag 抗体, 二抗为 FITC 标记的羊抗兔 IgG 抗体、Cy3 标记的羊抗鼠 IgG 抗体。

设置对照组: pcDNA3.1(+)His/Myc 与 pCMV-N-Flag-VIM, 抗体同实验组; pcDNA3.1(+)His/Myc-CT225 与 pCMV-N-Flag, 抗体同实验组; pcDNA3.1(+)His/Myc-CT225, 一抗为鼠抗 CT225 抗体、兔抗 VIM 抗体, 二抗为 FITC 标记的羊抗兔

IgG 抗体、Cy3 标记的羊抗鼠 IgG 抗体。

2 结果与分析

2.1 生物信息学特征

通过多种软件对 CT225 基因编码蛋白进行生物信息学分析,结果显示该蛋白由 369 个氨基酸组成,分子量为 13.31 kD,理论 pI 为 5.33,成分为 $C_{1148}H_{1929}N_{369}O_{500}S_{52}$,不稳定指数为 34.24,说明该蛋白质较稳定;TMH 数量为 2,说明属于跨膜蛋白; D 值小于 0.450 (阈值),说明无信号肽序列;氨基酸残基数绝大多为亲水性残基,属可溶性蛋白可能性比较大;二级结构为 α -螺旋 58 个(47.54%)、无规则卷曲 36 个(29.51%)、延伸链 28 个(22.95%);三级结构建模模型与蛋白数据库比对,发现与 5xau.2.B 相似性最高,为 29.27%;预测蛋白参与的生物学过程为氢转运,分子功能为运输、转运,细胞定位于细胞膜上。

2.2 GST-CT225 蛋白的制备

通过蛋白表达与亲和层析纯化后,经 SDS-PAGE 电泳和考马斯亮蓝染色,得到大小为 39 kD 的诱饵蛋白,与预期一致,如图 1 所示。

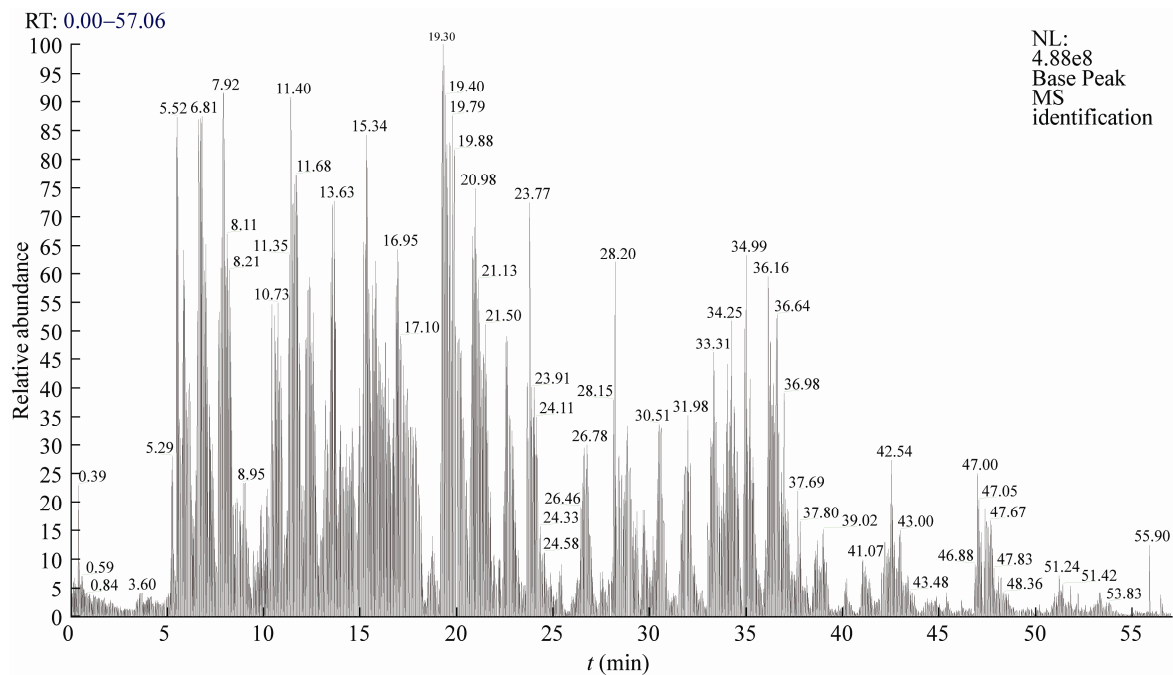


图 2 总离子流色谱图

Figure 2 Total ions chromatogram

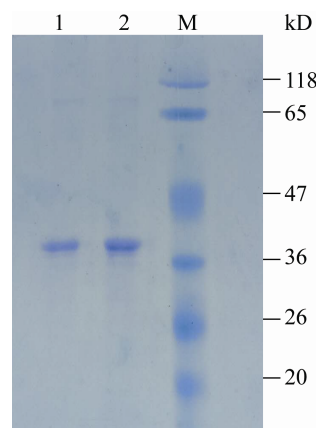


图 1 纯化蛋白的 SDS-PAGE 电泳分析

Figure 1 SDS-PAGE electrophoresis analysis of purified proteins

注: 1: CT225 纯化蛋白 5 μ L; 2: CT225 纯化蛋白 10 μ L; M: 蛋白分子量 Marker

Note: 1: CT225 purified protein 5 μ L; 2: CT225 purified protein 10 μ L; M: Protein Marker

2.3 质谱分析

采集质谱结果原始数据可生成总离子流色谱图(图 2)。质谱结果显示得分最高的 CT225 的相互作用配体为: Alpha-actinin-4、Keratin、Vimentin、Tubulin 等(表 2)。

表 2 质谱检索的肽段对应蛋白(前十名)

Table 2 Top ten peptides scored

排名 Ranking	名称 Name	得分 Score	峰度 Kurtosis
1	Alpha-actinin-4	323.31	69 364 000
2	Keratin, type II cytoskeletal 1	323.31	486 870 000
3	Keratin, type I cytoskeletal 9	323.31	249 980 000
4	Keratin, type I cytoskeletal 10	323.31	117 700 000
5	Vimentin	302.04	141 130 000
6	Plectin	253.32	10 942 000
7	Keratin, type I cuticular Ha3-II	215.62	20 774 000
8	Actin, cytoplasmic 2; Actin, cytoplasmic 2, N-terminally processed	197.36	371 660 000
9	Carbonyl reductase [NADPH] 1	195.66	174 880 000
10	Tubulin beta chain; Tubulin beta-2B chain; Tubulin beta-2A chain	174.04	26 250 000

质谱检索结果中 Alpha-Actinin-4 分值虽高, 但峰度值不高(表 2)。Keratin 在质谱结果中一般认为是非特异性结合的分子, 选择对得分较高的 VIM 蛋白进行初步验证。

2.4 重构真核质粒

构建的真核质粒 pcDNA3.1(+)/His/Myc-CT225 与 pCMV-N-Flag-VIM 测序结果同数据库序列进行对比序列一致, 证明重组质粒成功。

2.5 免疫共沉淀技术证实 CT225 与 VIM 相互作用

为了验证 CT225 与 VIM 在细胞内的相互作用, 在免疫共沉淀(Co-Immunoprecipitation, CO-IP)试验中, 用 2 个质粒组合转染 HeLa 细胞, 将转染细胞裂解, 经免疫吸附、Western Blot 技术进行蛋白检测后分别在 13 kD 和 53 kD 处出现与预期相符的目的条带。

为证明 VIM 与 Myc-CT225 特异性结合而不是单独与 Myc 标签结合, 设置对照组 pcDNA3.1(+)/His/Myc 与 pCMV-N-Flag-VIM, 共转染结果无条带。pcDNA3.1(+)/His/Myc-CT225 质粒转染组在 13 kD 处有条带。只转染 pCMV-N-Flag-VIM 质粒且不经免疫沉淀处理的 VIM 靶蛋白对照条带大小为 53 kD, 与预期一致, 在这些条件下可以检测到 CT225 和 VIM 可以在细胞内相互作用(图 3)。

2.6 GST 下拉/沉降实验验证 CT225 与 VIM 相互作用

为检测 CT225 与 VIM 在细胞外的直接作用, 将 Flag-VIM 质粒单独转染至 HeLa 细胞过表达蛋白, 与 2.2.1 部分大肠杆菌表达的 GST-CT225 融合蛋白共同孵育, 经 Western Blot 检测, 在 39 kD 和 53 kD 位置有 2 条带, 与预期一致。仅孵育 GST-CT225 蛋白在 39 kD 位置获得目的条带, 仅孵育 VIM 蛋白在 53 kD 位置获得目的条带。阴性对照组上样 GST 微珠结果无条带, 与预期相符(图 4)。

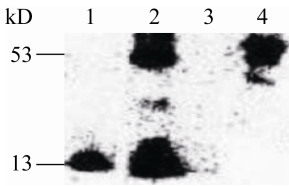


图 3 免疫共沉淀技术验证 CT225 与 VIM 相互作用
Figure 3 Co-immunoprecipitation assay to detect the interaction between CT225 and VIM

注: 1: pcDNA3.1(+)/His/Myc-CT225 质粒转染组(13 kD); 2: pcDNA3.1(+)/His/Myc-CT225 与 pCMV-N-Flag-VIM 质粒共转组 (13 kD 和 53 kD); 3: pcDNA3.1(+)/His/Myc 与 pCMV-N-Flag-VIM 质粒共转染组(无条带); 4: VIM 对照组(53 kD)

Note: 1: pcDNA3.1(+)/His/Myc-CT225 plasmid transfection group (13 kD); 2: pcDNA3.1(+)/His/Myc-CT225 and pCMV-N-Flag-VIM plasmids co-transfection group (13 kD and 53 kD); 3: pcDNA3.1(+)/His/Myc and pCMV-N-Flag-VIM plasmids co-transfection group (no stripe); 4: VIM control (53 kD)

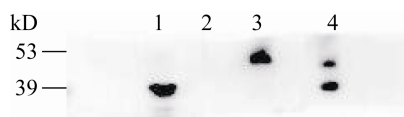


图4 GST pull-down 实验验证 CT225 与 VIM 相互作用
Figure 4 GST pull-down test to confirm the interaction between CT225 and VIM

注: 1: 诱饵蛋白 GST-CT225 (39 kD); 2: GST 微珠对照组 (无条带); 3: 猎物蛋白 pCMV-N-Flag-VIM 转染组(53 kD); 4: GST-CT225 与 pCMV-N-Flag-VIM 实验组(39 kD 和 53 kD)
 Note: 1: Purified bait protein GST-CT225 group (39 kD); 2: Glutathione sepharose agarose control group (no stripe); 3: Prey protein VIM group (53 kD); 4: Bait protein CT225 co-incubated with prey protein VIM group (39 kD and 53 kD)

2.7 亚细胞共定位技术验证 CT225 与 VIM 间作用

为进一步对转染入细胞的外源性蛋白 CT225 与 VIM 间作用进行鉴定, 检测转入蛋白 CT225 与 VIM 间的共定位, 将 HeLa 细胞转染 24 h 后, 用 1 mL 丙酮固定细胞, 用抗 Flag 和抗 Myc 抗体免疫标记, 采用三色荧光标记进行染色, 使用 FITC (黄绿色)对 CT225 蛋白进行染色, Cy3 (橙红色)对 VIM 蛋白进行染色, DAPI (蓝色)对 DNA 染色。

实验组即 pcDNA3.1(+)/His/Myc-CT225 与 pCMV-N-Flag-VIM 两种质粒共转染组, Myc-CT225 蛋白显示绿色荧光, Flag-VIM 蛋白显示红色荧光, 两者在 3 个层面均重叠呈现黄色荧光 (图 5A)。设置对照组 pcDNA3.1(+)/His/Myc 与 pCMV-N-Flag-VIM 质粒共转, 仅有 Flag-VIM 蛋白是红色荧光(图 5B); pcDNA3.1(+)/His/Myc-CT225 与 pCMV-N-Flag 质粒共转, 仅有 Myc-CT225 蛋白显示绿色荧光(图 5C)。

内源性蛋白相互作用实验组仅转染 pcDNA3.1(+)/His/Myc-CT225 质粒。结果显示 Myc-CT225 蛋白经鼠抗 CT225 标记后出现红色荧光, VIM 蛋白经兔抗 VIM 抗体标记后出现绿色荧光, 二者重叠呈现黄色荧光, 证明 CT225 可与内源性 VIM 蛋白相互作用(图 6)。总的来说, 这些实验支持沙眼衣原体包涵体膜蛋白 CT225 可以与波形蛋白 VIM 相互作用。

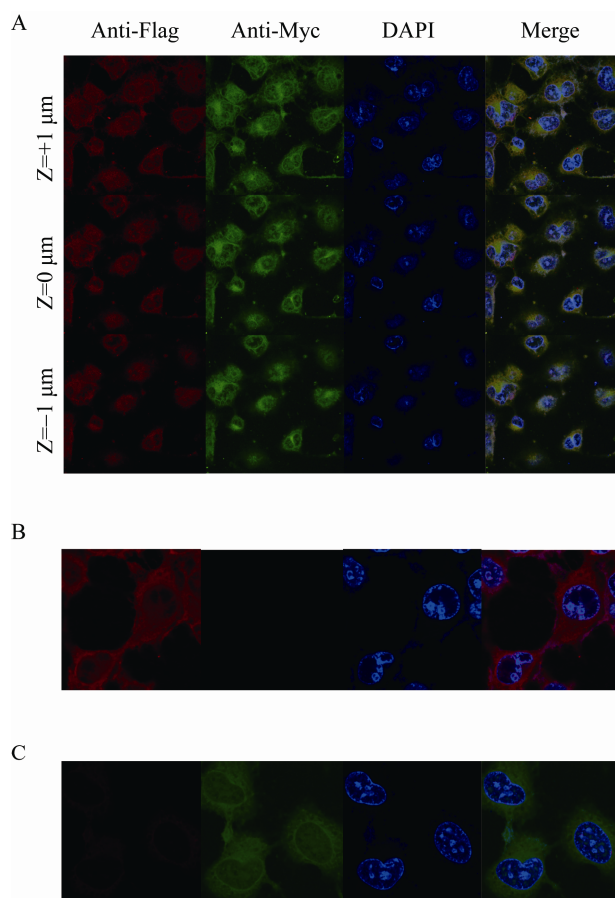


图5 间接免疫荧光实验验证 CT225 和 VIM 的胞内定位

Figure 5 The indirect immunofluorescence assay to confirm the cellular localization between CT225 and VIM in HeLa cells

注: A: HeLa 细胞与编码 Myc-CT225 和 Flag-VIM 的重组质粒共转染, 分别使用抗 Myc 和抗 Flag 抗体检测了蛋白质 CT225 (绿色)和 VIM (红色); B: 用编码 c-Myc 和 Flag-VIM 的质粒共转染 HeLa 细胞, 分别使用抗 Myc 和抗 Flag 抗体检测了 c-Myc 蛋白(绿色)和 VIM (红色); C: 用编码 Myc-CT225 和 Flag 的质粒共转染 HeLa 细胞, 分别使用抗 Myc 和抗 Flag 抗体检测了蛋白 CT225 (绿色)和 Flag (红色)

Note: A: HeLa cells were co-transfected with recombinant plasmids encoding Myc-CT225 and Flag-VIM. The protein CT225 (green) and VIM (red) were detected with anti-Myc and anti-Flag antibodies, respectively; B: HeLa cells were co-transfected with plasmids encoding c-Myc and Flag-VIM. The protein c-Myc (green) and VIM (red) were detected with anti-Myc and anti-Flag antibodies, respectively; C: HeLa cells were co-transfected with plasmids encoding Myc-CT225 and Flag. The protein CT225 (green) and Flag (red) were detected with anti-Myc and anti-Flag antibodies, respectively

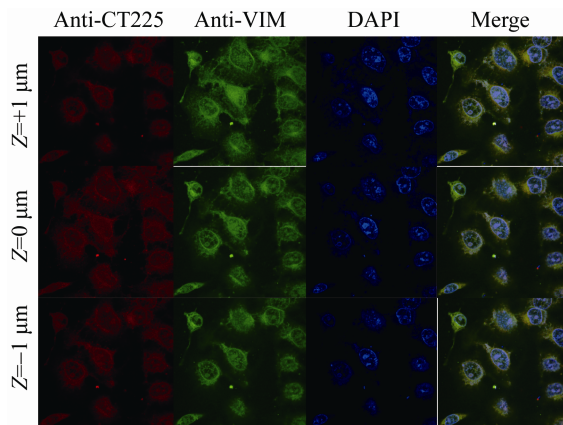


图6 间接免疫荧光法确定 HeLa 细胞中 CT225 和 VIM 之间的相互作用

Figure 6 The indirect immunofluorescence assay to confirm the interaction between CT225 and VIM in HeLa cells

注: 用编码 Myc-CT225 的重组质粒转染 HeLa, 分别使用鼠抗 CT225 和兔抗 VIM 抗体检测到 CT225 (红色)和 VIM (绿色)

Note: HeLa were transfected with recombinant plasmids encoding Myc-CT225; The CT225 (red) and VIM (green) were detected with anti-CT225 and anti-VIM antibodies respectively

3 讨论与结论

沙眼衣原体是一种专性细胞内致病菌, 主要引起眼盲和生殖系统感染。沙眼衣原体感染时宿主与病原体相互作用的组织位于包涵体膜上。在这个界面上, 沙眼衣原体建立和维持着它们的细胞内生态位^[5]。沙眼衣原体在细胞外和包涵体内都使用III型分泌系统将几种效应蛋白传递给宿主细胞的细胞质。这些效应蛋白的很大一部分即包涵体膜蛋白, 包涵体膜蛋白暴露在宿主细胞胞浆中, 其特殊的双重疏水结构域介导插入包涵体膜, 调节包涵体与宿主之间的交互作用^[6-7]。

CT223-CT229 基因连锁图谱表明其属于同一个基因簇^[8]。CT223/IPAM 结合宿主中心体蛋白破坏微管功能。CT223 与中心体蛋白绑定, 在包涵体表面积极地重组组织微管, 这导致形成微管上部结构, 该上部结构对于保持膜完整性是必需的^[9-10]。CT224 参与逆向囊泡转运, CT226 蛋白质涉及级联途径的信号转导互作于胞质 DNA/RNA 传

感器, 调控宿主免疫系统^[11]; CT228 通过与肌球蛋白磷酸酶靶亚基 1 (MYPT 1)的相互作用介导衣原体挤压, 调节原生小体挤出包涵体^[12-14]; CT229 与 GTP 酶的 Rab 分子互作, 调控内质体转运, 调节 CT 胞内运输, 抑制宿主细胞过早死亡^[15-16]。其他涉及多核的效应因子包括 CT223、CT224、CT225、CT166, 这些蛋白的异位表达阻碍了细胞分裂, 导致多核细胞产生, 多核提高了高尔基体的含量, 使衣原体容易获取高尔基体的脂质^[17]。

然而, 大多数 Incs 的功能还有待研究, 有些似乎起到结构性作用。某些 Incs (IncC、CT101、CT222、CT223、CT224、CT228 和 CT850)在衣原体包涵体膜的特殊微区中富集; 这些微区富含活性 Src 家族激酶和胆固醇, 被认为是与细胞骨架相互作用的平台^[18-19]。

CT225 蛋白的生物信息学分析显示其定位于膜上, 预测其功能主要为运输、转运。VIM 附在细胞核、内质网及线粒体的旁边或末端, 作为III型中间丝蛋白, 参与形成细胞骨架的结构框架, 对于维持细胞的正常形态和功能、支撑及稳固胞内的细胞器具有重要意义; VIM 除维持细胞完整性、稳定细胞骨架外, 还参与细胞的附着和迁移、细胞信号转导、传送低密度脂蛋白衍生的胆固醇至酯化位点等^[20-23]。

可以推测膜蛋白 CT225 结合宿主 VIM 蛋白主要完成运输功能, 可运输能量、脂质, 参与调节细胞凋亡通路等, 这可能因为沙眼衣原体在宿主细胞获取营养、逃避免疫、对细胞凋亡的调控等生物学功能与运输有密切联系。

本实验通过免疫共沉淀、间接免疫荧光和质谱分析等实验证实了 CT225 与 VIM 存在相互作用, 但相关机制还需要进一步研究。

REFERENCES

- [1] Li ZY, Chen CQ, Chen D, Wu YM, Zhong YM, Zhong GM. Characterization of fifty putative inclusion membrane proteins encoded in the *Chlamydia trachomatis* genome[J]. Infection and Immunity, 2008, 76(6): 2746-2757
- [2] Weber MM, Bauler LD, Lam J, Hackstadt T. Expression

- and localization of predicted inclusion membrane proteins in *Chlamydia trachomatis*[J]. Infection and Immunity, 2015, 83(12): 4710-4718
- [3] Dehoux P, Flores R, Dauga C, Zhong GM, Subtil A. Multi-genome identification and characterization of chlamydiae-specific type III secretion substrates: the Inc proteins[J]. BMC Genomics, 2011, 12(1): 109
- [4] Omsland A, Sixt BS, Horn M, Hackstadt T. Chlamydial metabolism revisited: interspecies metabolic variability and developmental stage-specific physiologic activities[J]. FEMS Microbiology Reviews, 2014, 38(4): 779-801
- [5] Bachmann NL, Polkinghorne A, Timms P. *Chlamydia* genomics: providing novel insights into chlamydial biology[J]. Trends in Microbiology, 2014, 22(8): 464-472
- [6] Fields KA, Mead DJ, Dooley CA, Hackstadt T. *Chlamydia trachomatis* type III secretion: evidence for a functional apparatus during early-cycle development[J]. Molecular Microbiology, 2003, 48(3): 671-683
- [7] Muschiol S, Boncompain G, Vromman F, Dehoux P, Normark S, Henriques-Normark B, Subtil A. Identification of a family of effectors secreted by the type III secretion system that are conserved in pathogenic Chlamydiae[J]. Infection and Immunity, 2011, 79(2): 571-580
- [8] Guo Y, Chen CQ. Progress on *Chlamydia trachomatis* inclusion membrane proteins[J]. Progress in Microbiology and Immunology, 2018, 46(5): 104-109 (in Chinese)
郭莹, 陈超群. 沙眼衣原体包涵体膜蛋白的研究进展[J]. 微生物学免疫学进展, 2018, 46(5): 104-109
- [9] Dumoux M, Menny A, Delacour D, Hayward RD. A *Chlamydia* effector recruits CEP170 to reprogram host microtubule organization[J]. Journal of Cell Science, 2015, 128(18): 3420-3434
- [10] Wesolowski J, Weber MM, Nawrotek A, Dooley CA, Calderon M, St Croix CM, Hackstadt T, Cherfils J, Paumet F. *Chlamydia* hijacks ARF GTPases to coordinate microtubule posttranslational modifications and golgi complex positioning[J]. mBio, 2017, 8(3): e02280-16
- [11] Mirrashidi KM, Elwell CA, Verschueren E, Johnson JR, Frando A, Von Dollen J, Rosenberg O, Gulbahce N, Jang G, Johnson T, et al. Global mapping of the Inc-human interactome reveals that retromer restricts *Chlamydia* infection[J]. Cell Host and Microbe, 2015, 18(1): 109-121
- [12] Lutter EI, Barger AC, Nair V, Hackstadt T. *Chlamydia trachomatis* inclusion membrane protein CT228 recruits elements of the myosin phosphatase pathway to regulate release mechanisms[J]. Cell Reports, 2013, 3(6): 1921-1931
- [13] Shaw JH, Key CE, Snider TA, Sah P, Shaw EI, Fisher DJ, Lutter EI. Genetic inactivation of *Chlamydia trachomatis* inclusion membrane protein CT228 alters MYPT1 recruitment, extrusion production, and longevity of infection[J]. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, 2018, 8: 415
- [14] Belland RJ, Zhong GM, Crane DD, Hogan D, Sturdevant D, Sharma J, Beatty WL, Caldwell HD. Genomic transcriptional profiling of the developmental cycle of *Chlamydia trachomatis*[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2003, 100(14): 8478-8483
- [15] Rzomp KA, Moorhead AR, Scidmore MA. The GTPase Rab4 interacts with *Chlamydia trachomatis* inclusion membrane protein CT229[J]. Infection and Immunity, 2006, 74(9): 5362-5373
- [16] Sixt BS, Bastidas RJ, Finethy R, Baxter RM, Carpenter VK, Kroemer G, Coers J, Valdivia RH. The *Chlamydia trachomatis* inclusion membrane protein CpoS counteracts STING-mediated cellular surveillance and suicide programs[J]. Cell Host and Microbe, 2017, 21(1): 113-121
- [17] Bothe M, Dutow P, Pich A, Genth H, Klos A. DXD motif-dependent and-independent effects of the *Chlamydia trachomatis* cytotoxin CT166[J]. Toxins, 2015, 7(2): 621-637
- [18] Mital J, Miller NJ, Fischer ER, Hackstadt T. Specific chlamydial inclusion membrane proteins associate with active Src family kinases in microdomains that interact with the host microtubule network[J]. Cellular Microbiology, 2010, 12(9): 1235-1249
- [19] Mital J, Miller NJ, Dorward DW, Dooley CA, Hackstadt T, Kelly KA. Role for chlamydial inclusion membrane proteins in inclusion membrane structure and biogenesis[J]. PLoS One, 2013, 8(5): e63426
- [20] Fletcher DA, Mullins RD. Cell mechanics and the cytoskeleton[J]. Nature, 2010, 463(7280): 485-492
- [21] Ivaska J, Pallari HM, Nevo J, Eriksson JE. Novel functions of vimentin in cell adhesion, migration, and signaling[J]. Experimental Cell Research, 2007, 313(10): 2050-2062
- [22] Chernyatina AA, Nicolet S, Aebi U, Herrmann H, Strelkov SV. Atomic structure of the vimentin central α -helical domain and its implications for intermediate filament assembly[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2012, 109(34): 13620-13625
- [23] Mendez MG, Kojima S, Goldman RD. Vimentin induces changes in cell shape, motility, and adhesion during the epithelial to mesenchymal transition[J]. The FASEB Journal, 2010, 24(6): 1838-1851