

研究报告

淋病奈瑟菌肽基脯氨酰异构酶的原核表达及其作为候选疫苗的初步评价

胡欣^{1,2}, 谢晓婷^{1,2}, 李晓楠³, 赵娟娟^{1,2}, 李紫玥^{1,2}, 陈佳琪^{1,2}, 张莉^{*1,2}, 张雷^{*1,2}

1 大理大学病原与媒介生物研究所 云南省自然疫源性疾病预防控制技术重点实验室, 云南 大理 671000

2 大理大学基础医学院病原生物学综合实验室, 云南 大理 671000

3 大理市第一人民医院, 云南 大理 671000

胡欣, 谢晓婷, 李晓楠, 赵娟娟, 李紫玥, 陈佳琪, 张莉, 张雷. 淋病奈瑟菌肽基脯氨酰异构酶的原核表达及其作为候选疫苗的初步评价[J]. 微生物学通报, 2023, 50(11): 5058-5067.

HU Xin, XIE Xiaoting, LI Xiaonan, ZHAO Juanjuan, LI Ziyue, CHEN Jiaqi, ZHANG Li, ZHANG Lei. Prokaryotic expression and potential as a candidate vaccine of peptidyl-prolyl isomerase from *Neisseria gonorrhoeae*[J]. Microbiology China, 2023, 50(11): 5058-5067.

摘要:【背景】淋病是我国主要的性传播疾病之一, 感染淋病奈瑟菌可促进人类免疫缺陷病毒(human immunodeficiency virus, HIV)的传播和感染。目前我国淋病发病人数呈上升趋势, 随着多重耐药菌株的出现, 亟须研发保护性疫苗来防治淋病的传播和感染。【目的】分析淋病奈瑟菌(*Neisseria gonorrhoeae*, NG)肽基脯氨酰异构酶(peptidyl-prolyl isomerase, PPIase)蛋白的高级结构和表位, 探讨其作为疫苗和分子诊断靶点的潜力。【方法】利用生物信息学软件分析 PPIase 蛋白的极性、亲水性、柔韧性、表面可及性、二级和三级结构, 以及 T、B 细胞表位等; 用 pET32a(+)质粒构建 PPIase 蛋白的原核表达系统并纯化蛋白, 用纯化的重组蛋白和超声波破碎的 NG 全菌抗原分别免疫 BALB/c 小鼠, 收获免疫血清; 制备 NG 全细胞抗原, 分别以全细胞抗原酶联免疫吸附试验(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)和间接免疫荧光试验检测重组 PPIase 蛋白血清抗体与 NG 全细胞表面抗原的结合情况。【结果】生物信息学分析结果显示, PPIase 蛋白主要以 α 螺旋(39.34%)、无规则卷曲(30.51%)和延伸链(20.59%)为主; 经表位分析筛选出 5 个 B 细胞优势表位、9 个细胞毒性 T 淋巴细胞优势表位和 18 个辅助性 T 淋巴细胞优势表位; 通过原核表达系统实现了 PPIase 重组蛋白的表达和纯化; 纯化的重组蛋白可刺激 BALB/c 小鼠产生高效价的抗体, 全细胞抗原的 ELISA 试验和间接免疫荧光试验的结果表明该蛋白诱导产生的血清抗体能与 NG 外膜表面抗原结合。【结论】PPIase 蛋白作为一种外膜蛋白, 具有良好的免疫原性和免疫反应性, 其所诱导产生的

资助项目: 国家自然科学基金(81760303)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (81760303).

*Corresponding authors. E-mail: ZHANG Li, nizi9358@163.com; ZHANG Lei, zhanglei@dali.edu.cn

Received: 2023-03-13; Accepted: 2023-06-23; Published online: 2023-07-12

特异抗体可以结合到 NG 表面, PPIase 蛋白有作为 NG 候选疫苗的潜力和价值。

关键词: 淋病奈瑟菌; 肽基脯氨酰异构酶; 抗原表位分析; 原核表达; 候选疫苗

Prokaryotic expression and potential as a candidate vaccine of peptidyl-prolyl isomerase from *Neisseria gonorrhoeae*

HU Xin^{1,2}, XIE Xiaoting^{1,2}, LI Xiaonan³, ZHAO Juanjuan^{1,2}, LI Ziyue^{1,2}, CHEN Jiaqi^{1,2}, ZHANG Li^{*1,2}, ZHANG Lei^{*1,2}

1 Yunnan Provincial Key Laboratory for Zoonosis Control and Prevention, Institute of Pathogens and Vectors, Dali University, Dali 671000, Yunnan, China

2 Laboratory of Pathogenic Biology, School of Basic Medical Sciences, Dali University, Dali 671000, Yunnan, China

3 Dali First People's Hospital, Dali 671000, Yunnan, China

Abstract: [Background] Gonorrhoea is one of the major sexually transmitted diseases in China, and the infection with *Neisseria gonorrhoeae* (NG) can promote the transmission and infection of HIV. The incidence of gonorrhoea in China is on the rise, and the emergence of multidrug resistant strains makes it an urgent need to develop protective vaccines for preventing the spread and infection of gonorrhoea. [Objective] To unveil the advanced structure and epitopes of peptidyl-prolyl isomerase (PPIase) of NG, and explore the potential of PPIase as a vaccine and a molecular diagnostic target. [Methods] Bioinformatics tools were employed to analyze the polarity, hydrophilicity, flexibility, surface accessibility, secondary and tertiary structures, and T and B cell epitopes of PPIase. The prokaryotic expression system of PPIase was constructed with pET32a(+), and the recombinant protein was purified. The BALB/c mice were immunized with the purified recombinant protein and the NG cells disrupted by ultrasound, respectively, and the sera were then harvested. The surface antigens of NG whole cells were prepared. The binding of serum antibody induced by PPIase to the surface antigens of NG whole cells was examined by the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and indirect immunofluorescence assay, respectively. [Results] The secondary structure of PPIase was mainly composed of α helix (39.34%), random coil (30.51%), and extended strand (20.59%). The epitope analysis revealed 5 B cell dominant epitopes, 9 cytotoxic T lymphocyte dominant epitopes, and 18 helper T cell dominant epitopes. The recombinant PPIase protein was expressed and purified by the prokaryotic expression system. The purified recombinant protein can stimulate BALB/c mice to produce high-titer antibodies, and the serum antibody induced by the recombinant PPIase protein can bind to the NG surface antigen. [Conclusion] PPIase as an outer membrane protein demonstrates good immunogenicity and immunoreactivity, and the specific antibody induced by this protein can bind to the surface antigen of NG. Therefore, PPIase has the potential as a candidate vaccine against NG.

Keywords: *Neisseria gonorrhoeae*; peptidyl-prolyl isomerase; antigenic epitope analysis; prokaryotic expression; candidate vaccine

淋病奈瑟菌(*Neisseria gonorrhoeae*, NG)又称为淋球菌,主要感染生殖器黏膜,也可以感染眼部、鼻咽部和肛门黏膜。在大约 10%–25% 未经治疗的女性中,NG 可通过生殖道上行感染而诱发盆腔炎(pelvic inflammatory disease, PID)临床综合征, PID 患者可能会出现长期和(或)永久性后遗症,如慢性盆腔疼痛、输卵管损伤、子宫内膜炎、异位妊娠和不孕^[1-2]。根据世界卫生组织的估计,全球 15–49 岁的人群将出现 8 700 万例新增的淋病感染者^[3]。目前我国淋病发病人数呈现上升趋势,在青少年及中年人群中增长速度较快^[4]。此外,NG 的感染还会促进 HIV 的传播和感染^[5],随着多重耐药 NG 菌株的出现^[6],研发 NG 保护性疫苗来防治淋病的传播成为迫切的需求。

在 NG 菌株 FA1090 中 NG1225 基因编码的氨基酸序列被注释为 PPIase 或巨噬细胞感染性增强因子(macrophage infectivity potentiator, MIP)^[7]。在 NG 和脑膜炎奈瑟菌(*Neisseria meningitidis*, NM)的所有菌株中都有 MIP 的表达,且氨基酸序列高度保守,是一种锚定在外膜表面的脂蛋白,并具有 PPIase 活性^[7]。对 NM-MIP 蛋白的研究发现, NM-MIP 血清抗体具有针对不同 NM 菌株的交叉抗体杀菌活性^[8],而 NG-PPIase 作为候选疫苗的研究尚未见报道,因此, NG-PPIase 作为候选疫苗抗原的潜力值得进一步研究。

本研究通过生物信息学分析淋病奈瑟菌的 PPIase 蛋白结构及其抗原表位,构建原核表达系统,并将纯化的重组蛋白免疫 BALB/c 小鼠,检测其诱导产生特异性抗体的能力,并将收获的抗体与 NG 全细胞抗原孵育,分别用酶联免疫吸附试验(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)和间接免疫荧光试验(indirect immunofluorescence assay, IFA)检测重组蛋白 PPIase 诱导产生的特异性抗体能否与 NG 外膜表面结合,以初步评价 PPIase 作为疫苗和分子诊断靶点的潜在价值。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

9 只 6–8 周无特定病原体(specific pathogen free, SPF)级雌性 BALB/c 小鼠购自湖南斯莱克景达试验动物有限公司,动物试验获得大理大学实验动物伦理委员会批准(2023-PZ-197)。

1.1.2 主要试剂和仪器

NG 菌株 FA1090, 美国菌种保藏中心; 化学发光检测试剂, 上海百赛生物技术股份有限公司; 限制性内切酶 *Bam*H I、*Xho* I, Fermentas 公司; *Pfu* DNA polymerase, Life Technology 公司; Ni-NTA 琼脂糖, Invitrogen 公司; 二抗(羊抗鼠 IgG), Jackson Immuno Research 公司; 羊抗鼠 IgG-FITC 抗体, 杭州华安生物技术有限公司; 小鼠源性 His 标签抗体, 索莱宝公司; 大肠杆菌 Rosetta(DE3)、pET32a(+)质粒和小鼠源性 NG 多克隆抗体由本实验室保存和制备。化学发光成像仪, GE 公司; 超声波细胞破碎仪, 新芝生物科技有限公司; 连续波长酶标仪, 基因有限公司。

1.2 方法

1.2.1 理化性质和结构分析

利用 ProtParam tool 软件分析 PPIase 蛋白的理化性质, PONDRA 软件分析其内在的无序区域, NPC@SOPMA 软件分析其二级结构, SMART 在线软件分析结构域, ExPasy 工具中的 SWISS-MODEL 分析三级结构。

1.2.2 抗原表位分析

1) B 细胞抗原表位分析

应用 ExPasy-ProtScale 软件分析极性、亲水性、柔韧性和表面可及性,并结合 ABCpred 软件对 B 细胞表位进行评价。

2) T 细胞抗原表位分析

应用 SYFPEITHI 软件在线分析细胞毒性 T 淋巴细胞(cytotoxic T lymphocyte, CTL)表位和

$\bar{x} \pm SD$ 表示, 并用 SPSS 统计学软件中的两独立样本 t 检验分析各组数据之间的统计学意义, $P < 0.05$ 说明差异具有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 理化性质和结构分析的结果

该蛋白含有 272 个氨基酸残基, α 螺旋(alpha helix, Hh)占 39.34%、无规则卷曲(random coil, Cc)占 30.51%、延伸链(extended strand, Ee)占 20.59%、 β 折叠(beta turn, Tt)占 9.56% (图 1A); N 端 27-72 aa 区域存在连续的无序性区段(图 1B)。SMART 软件分析结果显示该蛋白包含 1 个信号肽(1-26 aa)、1 个 N 端的 FK506 结合蛋白(FK506 binding protein, FKBP)结构域(第 35-155 aa)和 1 个 C 端的 FKBP 结构域(第 160-250 aa) (图 1C)。PPIase 蛋白质的三级结构分析结果发现该蛋白结构比较松散, 可形成同

源二聚体结构, 通过 2 个单体 N 端的 $\alpha 1$ 和 $\alpha 2$ 螺旋的侧链之间的疏水作用结合在一起形成一种对称的非典型反向平行螺旋体结构(图 1D)。

2.2 抗原表位分析结果

2.2.1 B 细胞抗原表位分析结果

经 ExPasy-ProtScale 分析, 阈值 15 以上极性较强的肽段包括第 21-27、63-81、89-103、114-145、156-179、209-217 和 263-268 肽段(图 2A), 阈值 0 以上亲水性较强的肽段包括第 20-37、39-46、61-81、87-103、110-146、153-179、183-191、209-217、226-239 和 250-268 肽段(图 2B), 阈值 0.44 以上柔韧性较好的肽段是第 29-34、41-52、59-77、89-101、125-134、139-196、199-208、210-240 和 250-268 肽段(图 2C), 阈值 6.5 以上表面可及性较好的肽段是第 20-36、38-47、117-134、137-150、157-166 和 184-192 肽段(图 2D)。

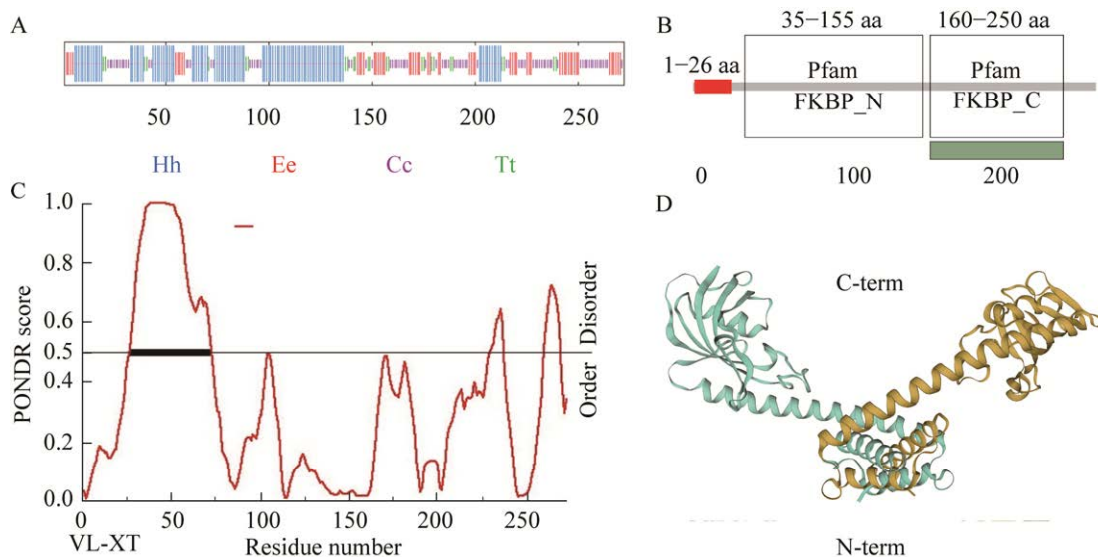


图 1 PPIase 蛋白的结构分析 A: NPS@SOPMA 预测二级结构. B: POND R 分析无序区域. C: SMART 分析结构域组成. D: SWISS-MODEL 分析蛋白三级结构

Figure 1 Structure analysis of PPIase protein. A: Prediction of secondary structure via NPS@SOPMA. B: Analysis of disorder residues via POND R. C: Analysis domain composition via SMART. D: Analysis of protein tertiary structure via SWISS-MODEL.

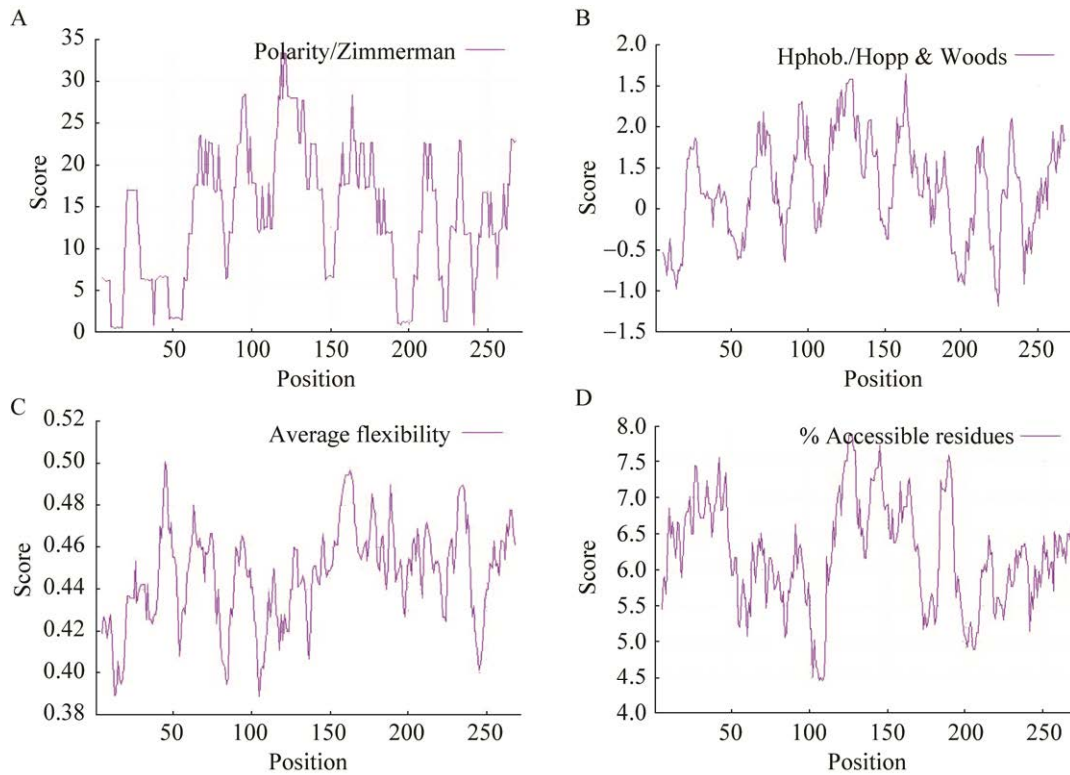


图2 ExPasy-ProtScale 在线工具分析 PPIase 蛋白的结果 A: 极性. B: 亲水性. C: 柔韧性. D: 表面可及性
 Figure 2 Results of PPIase protein analysis by ExPasy-ProtScale online tool. A: Polarity. B: Hydrophilic. C: Flexibility. D: Surface accessibility.

将 ABCpred 软件预测的结果(表 1)与 ExPasy-ProtScale 分析的结果综合分析,发现极性、亲水性、柔韧性和表面可及性均较好的优势 B 细胞表位有 5 个肽段,分别是 113-128、149-164、158-173、209-217 和 228-243 肽段。

2.2.2 T 细胞抗原表位分析结果

在去除 PPIase 蛋白信号肽的 26 个氨基酸残基后,对其余的 246 个氨基酸残基用 SYFPEITHI 软件分别分析其 CTL 和 Th 表位。通常 CTL 表位最佳长度为 9 个氨基酸残基,因此带有 246 个氨基酸残基的 PPIase 蛋白可拆分出的线性的 CTL 表位有 236 个,按 SYFPEITHI 的分析策略,具有可信度的表位至少占 80%,其中得分最高的前 2%是最佳的优势表位,同理可推断出最佳的 Th 表位。结果发现 9 个最佳的优势 CTL 表位(表 2)和 18 个优势 Th 表位(表 3)。

2.3 原核表达系统的构建及其表达、纯化和鉴定的结果

为了确保重组蛋白的可溶性表达,在克隆 PPIase 基因时,选择去除了编码 N 端信号肽、连续无序区段的碱基,并选择了具有 PPIase 酶活性区段的抗原性序列,对 121-272 位的氨基酸残基的编码基因进行了克隆。经琼脂糖凝胶电泳鉴定,在约 456 bp 处出现预期的电泳条带(图 3A),测序结果正确,表明 PPIase 原核表达系统

表 1 ABCpred 分析优势 B 细胞表位的结果

Table 1 Results of ABCpred analysis of dominant B cell epitopes

Rank	Sequence	Start position	Score
1	KIGPNATLVFDVKLVK	236	0.92
2	YREQGAGEKIGPNAT	228	0.89
3	SGLQYKITKQGEGKQP	149	0.89
4	QAKAVEKHKADAKANK	113	0.87
5	QGEGKQPTKDDIVTVE	158	0.85

表 2 SYFPEITHI 分析优势 CTL 表位的结果
Table 2 Results of SYFPEITHI analysis of dominant CTL epitopes

Phenotype classification	Position	Sequence	Score
HLA-A*02:01	173	VIPGWTEGV	24
	213	ATLVFDVKL	23
	214	TLVFDVKLV	22
HLA-A*03:01	59	AVYDGKEIK	30
	215	LVFDVKLVK	29
	31	GVDIGRSLK	27
HLA-B*07:02	230	APAKQPDQV	20
	135	QPTKDDIVT	18
	207	EKIGPNATL	17

构建成功。经 IPTG 诱导表达重组蛋白主要以可溶性形式大量表达于上清中，出现相对分子量约为 34kDa 的蛋白条带。pET32a(+)空质粒带有 18 kDa 左右的融合蛋白标签，而目标蛋白的分子量约为 16 kDa，因而出现明显蛋白条带的分子量与预期融合蛋白大小相符。对重组蛋白

表 3 SYFPEITHI 分析优势 Th 表位的结果
Table 3 Results of SYFPEITHI analysis of dominant Th epitopes

HLA phenotype	Position	Sequence	Score
HLA-DRB1*01:01	78	MKFLQEQQAKAVEKH	31
	197	NLAYREQGAGEKIGP	27
	75	EVMMKFLQEQQAKAV	26
HLA-DRB1*03:01	27	SYAMGVDIGRSLKQM	28
	181	VRLKKEGGEATFYIP	28
	212	NATLVFDVKLVKIGA	28
HLA-DRB1*04:01	77	MMKFLQEQQAKAVEK	28
	74	QEVMMKFLQEQQAKA	26
	50	LKVFTDAMQAVYDGK	22
HLA-DRB1*07:01	113	KDGVKTTASGLQYKI	24
	170	LSQVIPGWTEGVRL	24
	50	LKVFTDAMQAVYDGK	22
HLA-DRB1*11:01	174	IPGWTEGVRLKKEGG	23
	215	LVFDVKLVKIGAPEN	22
	83	EQQAKAVEKHKADAK	21
HLA-DRB1*15:01	29	AMGVDIGRSLKQMKE	24
	47	EIDLKVFTDAMQAVY	24
	74	QEVMMKFLQEQQAKA	24

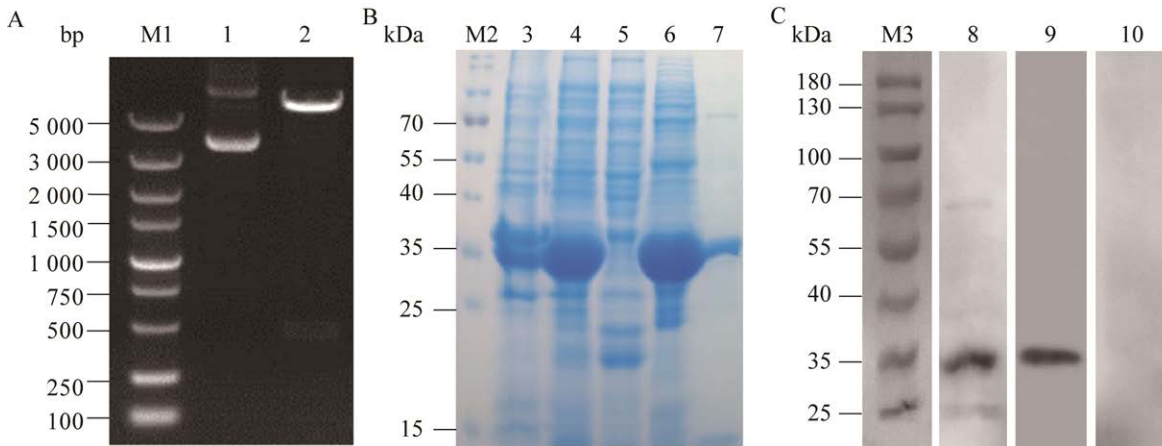


图 3 PPIase 原核表达系统的构建及其诱导表达、纯化和鉴定结果 A: 重组质粒酶切电泳结果. B: SDS-PAGE 鉴定. C: Western blotting 鉴定. M1: DNA 分子量标准; 1: 空质粒 pET32a(+); 2: 重组质粒 pET32a-PPIase 经 *Bam*H I 和 *Xho* I 双酶切; M2、M3: 蛋白分子量标准; 3: 菌体沉淀; 4: 菌体上清; 5: 上柱后的流出液; 6: 40 mmol/L 咪唑洗脱; 7: 500 mmol/L 咪唑洗脱; 8: 一抗为 NG 多克隆抗体; 9: 一抗为 His 标签单克隆抗体; 10: 一抗为免疫 PBS 的血清抗体

Figure 3 Results of construction of construction of prokaryotic expression system of PPIase and its induced expression, purification and identification. A: Electrophoresis results of recombinant plasmid digestion. B: Results of SDS-PAGE identification. C: Results of Western blotting identification. M1: DNA Marker; 1: Plasmid pET32a(+); 2: pET32a-PPIase digested by *Bam*H I, *Xho* I; M2, M3: Protein marker; 3: Bacteriolytic precipitation; 4: Bacteriolytic supernatant; 5: Effluent after column installation; 6: 40 mmol/L imidazole elution; 7: 500 mmol/L imidazole elution; 8: Primary antibody-NG polyclonal antibody; 9: Primary antibody-His labeled monoclonal antibody; 10: Primary antibody-PBS serum antibody.

采用镍柱亲和层析法进行纯化, 用 500 mmol/L 咪唑洗脱可以得到纯度较高的重组蛋白(图 3B)。Western blotting 结果显示, 重组蛋白 PPIase 能与 NG 多克隆抗血清发生特异性结合, 在约 34 kDa 处出现了特异性条带, 说明表达产物具有良好的免疫反应原性(图 3C)。

2.4 小鼠免疫血清中 IgG 抗体效价的检测结果

重组 PPIase 蛋白免疫 BALB/c 小鼠后可刺激免疫系统产生效价较高的 IgG 抗体, 与免疫 NG 全菌抗原的阳性对照组相比较, 差异无统计学意义($P>0.05$) (表 4)。

2.5 PPIase 血清抗体与 NG 外膜表面结合的检测结果

2.5.1 全细胞抗原 ELISA 试验的检测结果

PPIase 免疫血清可以特异性地与 NG 全细胞表面抗原结合, 与免疫 NG 全菌抗原的阳性对照组血清相比较, 差异无统计学意义($P>0.05$)

(表 5)。

2.5.2 IFA 试验检测的结果

PPIase 重组蛋白和阳性对照组免疫血清均能特异性地结合在 NG 表面, 在 NG 表面出现 FITC 的荧光信号(图 4)。

表 4 PPIase 蛋白免疫小鼠的血清抗体效价 ($\bar{x} \pm SD, -\log_{10}$)

Table 4 Serum antibody titer of PPIase protein ($\bar{x} \pm SD, -\log_{10}$)

Groups	Antibody titer ($\bar{x} \pm SD, -\log_{10}$)
PPIase immune serum	3.70±0.62
Positive control group	4.41±0.00

表 5 全细胞抗原 ELISA 试验检测结果 ($\bar{x} \pm SD, -\log_{10}$)

Table 5 Results of whole cell antigen ELISA ($\bar{x} \pm SD, -\log_{10}$)

Groups	Antibody titer ($\bar{x} \pm SD, -\log_{10}$)
PPIase immune serum	3.10±0.14
Positive control group	3.60±0.14

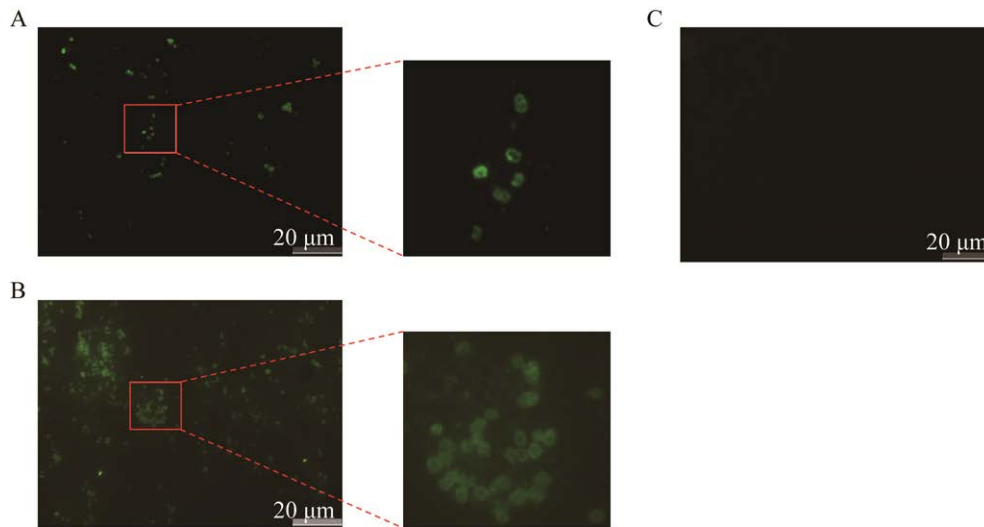


图 4 IFA 试验检测 PPIase 免疫血清与 NG 全细胞表面抗原结合的结果 A: 一抗为重组蛋白 PPIase 免疫血清. B: 一抗为 NG 全菌抗原的免疫血清. C: 一抗为 PBS 免疫血清

Figure 4 IFA results of PPIase immune serum binding to NG whole cell surface antigen. A: Primary antibody-serum of recombinant protein PPIase. B: Primary antibody-serum of NG whole bacterial protein. C: Primary antibody-serum of PBS.

3 讨论与结论

在 NG 候选疫苗的研究中,可诱导产生抗体杀菌效应的候选疫苗靶点通常是暴露在细菌表面高度保守的蛋白^[9],对 NG 疫苗的长期研究表明,NG 的脂寡糖、不透明蛋白和 IV 型菌毛等表面抗原容易发生变异而不宜作为候选疫苗靶点^[10]。孔蛋白作为 NG 表面的一种主要外膜蛋白,其能以宿主的线粒体为靶点调节细胞凋亡来促进 NG 的感染^[11],从而使机体无法产生有效的免疫保护作用。虽然 NG 疫苗的研究经历了数个世纪的时间,但至今尚无成功的疫苗用于淋病的预防。

在沙眼衣原体(*Chlamydia trachomatis*, CT)、嗜肺军团菌(*Legionella pneumophila*, LP)和锥虫(*Trypanosoma*)等病原体中都发现了具有 PPIase 活性的同源 MIP 蛋白,被鉴定为多种致病菌的毒力相关蛋白^[12-13]。这些病原体的 MIP 蛋白属于 FKBP 家族,具有 PPIase 酶活性,能够将肽基-脯氨酸键从顺式转化为反式,有助于蛋白质的折叠、稳定性和活性^[14]。有研究发现,作为一种胞内寄生菌,嗜肺军团菌的 MIP 可促进其在肺泡巨噬细胞和血液单核细胞的存活与繁殖^[15]。同时,在淋病奈瑟菌中发现的 PPIase 蛋白也可能在 NG 的持续性感染中发挥作用,其 PPIase 酶活性可以被雷帕霉素和他克莫司所抑制^[7]。由于雷帕霉素和他克莫司可抑制人 T 细胞增殖,所以不适宜作为上述细菌的抗菌药物。在针对 CT 和奈瑟菌 MIP 蛋白 PPIase 酶活抑制剂的筛选研究中发现哌啶酸衍生物 PipN3 和 PipN4 可影响 CT 在 HeLa 细胞中的发育周期,抑制 NG 在中性粒细胞中的生存以及抑制 NM 在上皮细胞的黏附、侵袭和存活^[16]。因此,PipN3 和 PipN4 作为 PPIase 酶活抑制剂有望成为耐药的 CT、LP、NG 和 NM 的有效抗菌剂而用于临床治疗。同样地,对淋病奈瑟菌的 PPIase 蛋白诱导所产生的

特异性抗体或致敏淋巴细胞,可能在通过识别或结合暴露在膜表面的淋病奈瑟菌 PPIase 蛋白而发挥阻止 NG 黏附上皮细胞的作用之外,还可能通过抑制其 PPIase 酶活性从而影响其中性粒细胞内的存活。

进一步分析本研究结果可发现,NG-PPIase 的 5 个优势 B 细胞优势表位中有 4 个位于 C 端的 FKBP 结构域,27 个 T 细胞优势表位中有 15 个同样位于 C 端的 FKBP 结构域,且 PPIase 蛋白是以 N 端的 α 螺旋锚定到细菌外膜上的二聚体结构,而 N 端的大部分序列是在胞内的部分,只有 C 端的 FKBP 结构域是充分暴露在细菌外膜的区域。因此,本研究中去除了 N 端包括 1 个信号肽序列、1 个连续的无序性区段和部分 FKBP_N 结构域序列的编码基因,选择了包含完整 PPIase 酶活区域的 FKBP_C 结构域序列的编码基因进行了成功地克隆,并实现了该蛋白在原核系统中大量可溶性表达。重组的 PPIase 蛋白诱导小鼠产生 IgG 抗体效价与 NG 全菌抗原免疫组相比无显著性差异,表明其具有良好的免疫原性,可诱导机体产生效价较高的抗体。此外,以 NG 全细胞为靶细胞,经全细胞 ELISA 和 IFA 试验均证实重组 PPIase 蛋白的免疫血清可以与 NG 靶细胞在表面发生特异性结合。在从大量外膜蛋白中筛选候选疫苗的研究中,这种通过检测外膜蛋白诱导产生的免疫血清与相应细菌表面分子的结合情况来初步、快捷地鉴定其是否可能作为候选疫苗的方法具有一定的借鉴价值。研究结果表明,PPIase 蛋白具有作为候选疫苗的潜在价值,该研究结果还可为进一步探索 PPIase 蛋白的致病机制以及 NG 的分子诊断靶点和药物靶点提供研究基础,同时 PPIase 蛋白在体内所产生的免疫应答对 NG 的 PPIase 酶活性的影响以及其对 NG 在中性粒细胞内存活的影响也值得进一步研究。

REFERENCES

- [1] QUILLIN SJ, SEIFERT HS. *Neisseria gonorrhoeae* host adaptation and pathogenesis[J]. Nature Reviews Microbiology, 2018, 16(4): 226-240.
- [2] STEVENS JS, CRISS AK. Pathogenesis of *Neisseria gonorrhoeae* in the female reproductive tract: neutrophilic host response, sustained infection, and clinical sequelae[J]. Current Opinion in Hematology, 2018, 25(1): 13-21.
- [3] KIRKCALDY RD, WESTON E, SEGURADO AC, HUGHES G. Epidemiology of gonorrhoea: a global perspective[J]. Sex Health, 2019, 16(5): 401-411.
- [4] 陈慧, 杨森. 2004–2017年中国淋病发病与死亡趋势分析[J]. 现代预防医学, 2022, 49(11): 1937-1944.
CHEN H, YANG S. Incidence and mortality of Gonorrhoea in China, 2004-2017[J]. Modern Preventive Medicine, 2022, 49(11): 1937-1944 (in Chinese).
- [5] GUVENC F, KAUL R, GRAY-OWEN SD. Intimate relations: molecular and immunologic interactions between *Neisseria gonorrhoeae* and HIV-1[J]. Front Microbiol, 2020, 11: 1299.
- [6] MŁYNARCZYK-BONIKOWSKA B, MAJEWSKA A, MALEJCZYK M, MŁYNARCZYK G, MAJEWSKI S. Multiresistant *Neisseria gonorrhoeae*: a new threat in second decade of the XXI century[J]. Medical Microbiology and Immunology, 2020, 209(2): 95-108.
- [7] LEUZZI R, SERINO L, SCARSELLI M, SAVINO S, FONTANA MR, MONACI E, TADDEI A, FISCHER G, RAPPUOLI R, PIZZA M. Ng-MIP, a surface-exposed lipoprotein of *Neisseria gonorrhoeae*, has a peptidyl-prolyl *cis/trans* isomerase (PPIase) activity and is involved in persistence in macrophages[J]. Molecular Microbiology, 2005, 58(3): 669-681.
- [8] HUNG MC, SALIM O, WILLIAMS JN, HECKELS JE, CHRISTODOULIDES M. The *Neisseria meningitidis* macrophage infectivity potentiator protein induces cross-strain serum bactericidal activity and is a potential serogroup B vaccine candidate[J]. Infection and Immunity, 2011, 79(9): 3784-3791.
- [9] ZIELKE RA, WIERZBICKI IH, BAARDA BI, GAFKEN PR, SOGE OO, HOLMES KK, JERSE AE, UNEMO M, SIKORA AE. Proteomics-driven antigen discovery for development of vaccines against Gonorrhoea[J]. Molecular & Cellular Proteomics, 2016, 15(7): 2338-2355.
- [10] BAARDA BI, ZIELKE RA, HOLM AK, SIKORA AE. Comprehensive bioinformatic assessments of the variability of *Neisseria gonorrhoeae* vaccine candidates[J]. mSphere, 2021, 6(1).
- [11] DEO P, CHOW SH, HAY ID, KLEIFELD O, COSTIN A, ELGASS KD, JIANG JH, RAMM G, GABRIEL K, DOUGAN G, LITHGOW T, HEINZ E, NADERER T. Outer membrane vesicles from *Neisseria gonorrhoeae* target PorB to mitochondria and induce apoptosis[J]. PLoS Pathogens, 2018, 14(3): e1006945.
- [12] LUNDEMOSE AG, KAY JE, PEARCE JH. *Chlamydia trachomatis* Mip-like protein has peptidylprolyl *cis/trans* isomerase activity that is inhibited by FK506 and rapamycin and is implicated in initiation of chlamydial infection[J]. Molecular Microbiology, 1993, 7(5): 777-783.
- [13] FISCHER G, BANG H, LUDWIG B, MANN K, HACKER J. Mip protein of *Legionella pneumophila* exhibits peptidyl-prolyl-*cis/trans* isomerase (PPIase) activity[J]. Molecular Microbiology, 1992, 6(10): 1375-1383.
- [14] ÜNAL CM, STEINERT M. Microbial peptidyl-prolyl *cis/trans* isomerases (PPIases): virulence factors and potential alternative drug targets[J]. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 2014, 78(3): 544-571.
- [15] HELBIG JH, KÖNIG B, KNOSPE H, BUBERT B, YU C, LÜCK CP, RIBOLDI-TUNNICLIFFE A, HILGENFELD R, JACOBS E, HACKER J, FISCHER G. The PPIase active site of *Legionella pneumophila* Mip protein is involved in the infection of eukaryotic host cells[J]. Biological Chemistry, 2003, 384(1):125-137.
- [16] REIMER A, SEUFERT F, WEIWAD M, EBERT J, BZDYL NM, KAHLER CM, SARKAR-TYSON M, HOLZGRABE U, RUDEL T, KOZJAK-PAVLOVIC V. Inhibitors of macrophage infectivity potentiator-like PPIases affect neisserial and chlamydial pathogenicity[J]. International Journal of Antimicrobial Agents, 2016, 48(4): 401-408.