

# 肺炎衣原体蛋白激酶 Cpn0148 的克隆表达和定位

陈 凡<sup>1\*</sup> 程 文<sup>2</sup>

(1. 中南大学湘雅医院心血管内科 湖南 长沙 410008)

(2. 中南大学基础医学院免疫学系 湖南 长沙 410078)

**摘 要:** 目前认为肺炎衣原体(*Chlamydia pneumoniae*, Cpn)除导致呼吸道疾病外,也是与冠心病相关的重要病原体。作为一种细胞内寄生的病原菌,Cpn 激活宿主细胞信号通路,维护其在细胞内生长代谢,并导致疾病。肺炎衣原体基因 Cpn0148 可编码真核细胞样的丝/苏氨酸蛋白激酶,利用 PCR 技术扩增全长 Cpn0148 ORF,将其定向插入 pGEX-6p 原核表达载体,在大肠杆菌 XL-1blue 中表达,测序显示 Cpn0148 ORF 全长 1860 bp,编码 619 个氨基酸,分子量大约 70 kD,将 Cpn0148-GST 融合蛋白免疫 BALB/c 小鼠获得抗 Cpn0148 多克隆抗体,间接免疫荧光法检测显示 Cpn0148 表达在菌体上。Cpn0148 蛋白质的获得为进一步研究 Cpn 与宿主细胞的相互作用奠定了基础。

**关键词:** 肺炎衣原体, Cpn0148, 丝/苏氨酸蛋白激酶

## Cloning and Localization of the Ser/Thr Protein Kinase Cpn0148 from *Chlamydia pneumoniae*

CHEN Fan<sup>1\*</sup> CHENG Wen<sup>2</sup>

(1. Xiang-ya Hospital of Central South University, Hunan, Changsha 410008, China)

(2. Basic Medical School of Central South University, Hunan, Changsha 410078, China)

**Abstract:** *Chlamydia pneumoniae*(Cpn) is thought to be one of the important pathogens which are associated with coronary heart disease. It can induce the activation of host signaling pathways to maintain the survival and metabolism of itself in the cell, and finally leads to disease. The ORFs of Cpn0148 encoding eukaryote-like serine/threonine protein kinase was amplified from *Chlamydia pneumoniae* serovar AR39 genomic DNA. The amplified product was cloned in pGEX-6p and expressed in XL-1blue. DNA sequencing showed that the whole ORF is about 1860 bp, encoding a protein with 619 amino acid. The molecular weight of Cpn0148 is about 70 kD. Polyclonal antibody was obtained from immune BALB/c mice with the Cpn0148-GST fusion protein, and the expressing of Cpn0148 was detected on the bacteria organism by immunofluorescence. The finding of Cpn0148 protein is very helpful foundation for further study of the host-bacteria interaction.

**Keywords:** *Chlamydia pneumoniae*, Cpn0148, Serine/threonine protein kinase

肺炎衣原体(*Chlamydia pneumoniae*, Cpn)是一种细胞内寄生的革兰氏阴性菌,可导致多种疾病,目前研究显示 Cpn 不仅可导致衣原体性肺炎、支气管

炎、哮喘等疾病,也与冠状动脉粥样硬化有关<sup>[1,2]</sup>,日益受到人们的关注。

外界环境刺激真核细胞产生反应是通过信号转

\* 通讯作者: Tel: 86-731-4327001; ✉: doctorchenf@yahoo.com.cn

收稿日期: 2008-08-11; 接受日期: 2008-12-08

导来完成的, 蛋白磷酸化是信号转导主要机制, 信号转导的调节主要通过蛋白激酶和磷酸酶对丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸残基磷酸化和去磷酸化而完成。以往认为仅真核细胞才有这些蛋白激酶和磷酸酶, 但现在通过对原核细胞的基因组序列分析, 发现并证实了原核细胞中也存在有真核细胞样的蛋白激酶<sup>[3-6]</sup>, 具有参与原核生物的生长发育, 对环境压力的反应以及致病等作用。细胞内寄生的 Cpn 具有独特的生活周期, 在包涵体中通过与宿主细胞的物质交换, 改变宿主的信号通路, 以完成其生物合成、组装和分化, 维护其在宿主细胞内存活, 并导致疾病。Cpn 不仅能从宿主细胞中摄取代谢所需的营养物质, 也可分泌自身成分干扰宿主信号通路<sup>[7]</sup>, 结合较前研究的原核生物中丝/苏氨酸蛋白激酶的重要生物学功能, 提示了 Cpn 中的丝/苏氨酸激酶在其与宿主细胞相互作用中可能存在的作用。本研究克隆并定位了 Cpn 丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 Cpn0148 (Pkn1), 对进一步研究其功能奠定了基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 菌株

肺炎衣原体菌株 AR39、HeLa229 细胞(ATCC)由美国德克萨斯州圣安东尼奥科学健康中心(UTHSCSA)钟光明教授实验室提供。

### 1.2 试剂

pfxDNA 聚合酶、Taq DNA 聚合酶、T4 DNA 连接酶、BamH<sup>1</sup>、Not<sup>1</sup> 限制性内切酶, 均购自于 Invitrogen 公司, 原核表达载体 pGEX-6p-1 购自 Amersham Biosciences 公司, 质粒抽提试剂盒购自 Qiagen 公司, Cy2 标记的羊抗兔 IgG、Cy3 标记的羊抗鼠 IgG 购自 Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc.

### 1.3 方法

**1.3.1 Cpn0148 基因序列分析和特异性引物设计:** 根据由 GenBank 检索的肺炎衣原体 Cpn0148 ORF 全长序列, 以及 pGEX-6p-1 载体上的多克隆酶切位点, 设计扩增 cpn0148 全长基因的 PCR 引物, 分别在引物的 5'端和 3'端引入强制性酶切位点和保护性碱基, 引物如下 P1:5'-CGG<sup>▼</sup>GATCCCATGGAAAGTGAGAAAGATATAGGA-3'(forward primer), P2:5'-TTTTCCTTTTGC<sup>▼</sup>GGCCGCTTAAAGATATTTTATGCGCACCTA-3' (reversed primer)。

**1.3.2 肺炎衣原体基因组 DNA 的提取及 Cpn0148 基因 PCR 扩增:** 参照《精编分子生物学实验指南》

抽提肺炎衣原体基因组 DNA, 以基因组 DNA 为模板扩增 Cpn0148 基因, 循环条件如下: 95°C 2 min; 95°C 30 s, 58°C 90 s, 72°C 2 min, 25 个循环; 72°C 10 min。琼脂糖凝胶电泳观察扩增产物。

**1.3.3 pGEX-6p-Cpn0148 原核表达载体的构建:** PCR 产物经苯酚-氯仿方法纯化后, 同时 BamH<sup>1</sup>、Not<sup>1</sup> 于 37°C 双酶切 2 h, 酶切产物纯化后经 T4 DNA 连接酶连接至同样经 BamH<sup>1</sup>、Not<sup>1</sup> 双酶切的 pGEX-6p 载体上, 通过热休克方法转染感受态细胞 XL-1blue。

**1.3.4 pGEX-6p-Cpn0148 阳性克隆的筛选和鉴定:** 转染 pGEX-6p-Cpn0148 质粒的感受态细胞加入 LB 液体培养基中, 37°C 温和振荡 40 min, 涂布于含有氨苄青霉素的 LB 固体培养基上 37°C 倒置培养过夜, 挑选菌落, 以菌落总 DNA 为模板, pGEX-6p 引物 PCR 扩增筛选阳性克隆。然后, 进一步扩增培养阳性克隆, 提取质粒 DNA, 用于重组质粒 PCR 鉴定 (Cpn0148 特异性引物与 pGEX-6p 引物交叉扩增)、双酶切鉴定和测序。

**1.3.5 pGEX-6p-Cpn0148 重组质粒融合蛋白的表达与鉴定:** 将鉴定后的阳性单克隆菌落接种于含 100 μg/mL 氨苄青霉素的 LB 培养液中, 37°C 250 r/min 过夜, 然后以 1:50 比例将过夜菌液接种到 400 mL 含氨苄的 LB 培养液中, 培养至 OD<sub>600</sub> 为 0.8 时, 加入终浓度为 200 μmol/L 的 IPTG 30°C 诱导 3 h; 离心收集菌体, 重悬于 20 mL 含蛋白酶抑制剂细胞裂解液中, 超声裂解细胞, 4°C 1400 r/min 离心收集上清, 将上清加入 200 μL PBS 洗涤过的 Glutathione Sepharose 4B Beads 室温旋转 1 h, 离心收集谷胱甘肽琼脂糖珠, 经 0.25% PBST 和 1×PBS 洗涤后, 得到纯化的融合蛋白, 取适量融合蛋白加入 15 μL 2×SDS, 加热变性, 于 200 V 恒电压进行 12% SDS-PAGE 胶电泳, 考马斯亮蓝染色, 分析融合蛋白表达情况。

**1.3.6 Cpn0148 多克隆抗体制备:** 上述方法获得的融合蛋白免疫 BALB/c 小鼠。首次免疫, GST-Cpn0148 融合蛋白与等体积弗氏完全佐剂充分混合, 总体积 400 μL 小鼠腹腔注射; 首次免疫 21 d 后再免疫, GST-Cpn0148 融合蛋白与等体积弗氏不完全佐剂充分混合后小鼠腹腔注射; 此后, 每隔 1 周分别进行第 3、第 4 次免疫, 免疫同再次免疫。于第 4 次免疫 7 d 后收集小鼠血清, 进行抗体效价鉴定。

**1.3.7 Cpn0148 内源性蛋白表达定位:** 通过间接免疫荧光法观察 Cpn0148 基因的表达定位。肺炎衣原体 AR39 菌株感染 HeLa229 细胞(MOI=0.5)96 h 后,

<http://journals.im.ac.cn/wwxtbcn>

2%的多聚甲醛室温固定 30 min, PBS 洗涤后 2% Saponine 室温 1 h, PBS 洗涤细胞 3 次后含 10%小牛血清的 DMEM 封闭 1 h; 加入特异性抗体 37°C 孵育 1 h, 鼠抗 Cpn0148 多克隆抗体(1:2000 稀释), 兔抗 Cpn 菌体抗体 R12AR39(1:2000 稀释)(由 UTSCSA 钟光明实验室提供); 加入 1:1 000 稀释 Hoechst 和 Cy2 和 Cy3 标记的相应的二抗(1:2000 稀释)的混合液, 37°C 孵育 1 h; PBS 洗涤细胞后, 从 24 孔培养板中取出玻片, 用封闭液固定, 干燥后荧光显微镜下观察并拍照保存结果。

## 2 结果

### 2.1 激酶 Cpn0148DNA 序列分析

通过对肺炎衣原体 CWL029 株的基因组序列分析显示 Cpn 共有 3 个开放阅读框(ORF)具有丝/苏氨酸蛋白激酶同源性, 分别是 Cpn0148(编码 Pkn1)、Cpn0095(编码 PknD)、Cpn0703(编码 Pkn5), 这些同源性同样也存在于肺炎衣原体其它菌株中, 同属衣原体的沙眼衣原体也有 3 个编码丝/苏氨酸蛋白激酶 ORF: CT145(Pkn1)、CT301(PknD)和 CT673(Pkn5), 其中 CT145 与 CT301 均被证实具有激酶活性, 可以自身磷酸化和相互磷酸化<sup>[8]</sup>。同源性分析显示 CT145 和 Cpn0148 具有 58%的氨基酸同源性, 且丝/苏氨酸蛋白激酶的同源序列在 ORF 的氨基端。

### 2.2 p-GEX-6p-Cpn0148 质粒的构建

根据引物 P1 和 P2 扩增 Cpn0148 全长基因约 1860 bp, 纯化的 PCR 产物经 *Bam*H 和 *Not* 双酶切, 定向插入同样双酶切的 p-GEX-6p 载体中, 构建重组质粒。重组质粒转染感受态细胞 XL-1blue, PCR 扫描鉴定初步筛选阳性克隆进行扩增, 抽提质粒交叉 PCR 和测序进一步鉴定, 经 Blast 后证实克隆质粒序列正确。

### 2.3 GST-Cpn0148 重组蛋白表达和纯化

根据设定条件大规模诱导 Cpn0148 表达, 经 Glutathione sepharose TM B4 获得纯化的 Cpn0148 融合蛋白, 经 12% SDS PAGE 胶电泳可见在 96 kD 处有蛋白条带与预测 Cpn0148 融合蛋白分子量相一致 (GST 分子量 26 kD, Cpn0148 分子量约 70 kD)(图 1)。

### 2.4 Cpn0148 的亚细胞定位

将经 Cpn0148 融合蛋白免疫小鼠获得的多克隆抗体对倍稀释, 间接免疫荧光法检测多克隆抗体的效价, 当以 1:2000 稀释抗体时可检测到阳性的荧光染色(++)作为实验时抗体稀释度。Cpn 感染 96 h 后,

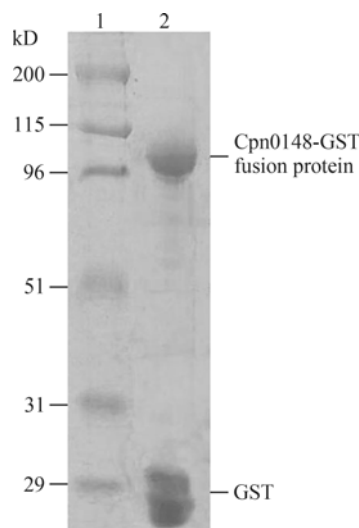


图 1 Cpn0148 融合蛋白 SDS-PAGE 胶分析

Fig. 1 Cpn0148 fusion protein analysis through SDS-PAGE gel

Note: 1: Pre-stained protein marker; 2: The expression of Cpn0148 fusion protein.

间接免疫荧光观察 Cpn0148 表达情况, 从图 2 看出 Cpn0148 主要表达在肺炎衣原体菌体上(红色), 与菌体(绿色)重叠呈黄色或橘黄色。蓝色是 Hoechst 染的含有 DNA 的细胞核。

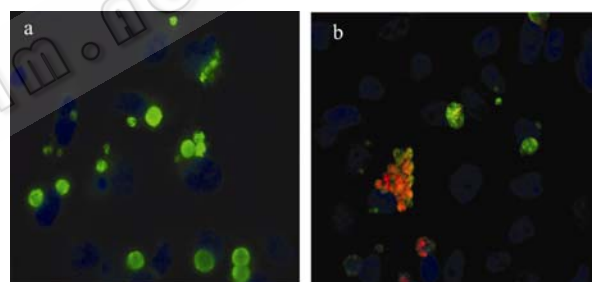


图 2 免疫荧光检测 Cpn0148 细胞内定位

Fig. 2 Localization of Cpn0148 by immunofluorescence

Note: a: Cpn0148 negative control serum; b: Cpn0148 immune serum.

## 3 讨论

冠心病的发生与多种因素有关, 微生物感染是其中的一个因素, 肺炎衣原体感染与冠心病的关系越来越受到人们的关注。在动脉粥样硬化斑块中可检测到 Cpn<sup>[9]</sup>, 提示了 Cpn 感染与动脉粥样硬化形成间存在着联系。Cpn 导致冠状动脉粥样硬化具体机制目前还不是很清楚, 但认为与以下两个方面有关: 1) Cpn 可以促进巨噬细胞、内皮细胞形成泡沫细胞<sup>[10,11]</sup>, 泡沫细胞是冠状动脉粥样硬化特征性病理改变; 2) Cpn 也可通过导致局部炎症的产生, 促进冠状动脉粥样硬化。Cpn 感染可以激活 MAPK、NOD1-NF- $\kappa$ B 信号通路参与炎症反应<sup>[12,13]</sup>,

另外, TLR-2 受体途径参与了 Cpn 感染后巨噬细胞形成泡沫细胞<sup>[14]</sup>。这些研究显示 Cpn 与宿主细胞相互作用, 活化宿主细胞信号通路, 参与致病。

Mahony 研究证实了重组的 Cpn0148 具有激酶活性<sup>[15]</sup>。对假结核耶尔森菌的 Ser/Thr 蛋白激酶 YpkA 和酪氨酸蛋白激酶 YopH 研究发现它们可通过 型分泌机制分泌至宿主细胞浆参与致病<sup>[3]</sup>。目前已发现 3 种能分泌到宿主细胞浆中的 Cpn 自身蛋白<sup>[7,16,17]</sup>: Cpn1016、Cpn0797 和 Cpn076, 其中 Cpn1016 编码的 CPAFcp(Chlamydial Protease/Proteasome-like Activity Factor in *C. pneumoniae*)可通过降解宿主细胞转录因子 RFX5, 下调宿主细胞表面主要组织相容性复合体 MHC 分子, 从而使 Cpn 逃避了宿主的免疫监视<sup>[7,18]</sup>。因此, 我们设想肺炎衣原体的 Ser/Thr 蛋白激酶 Cpn0148 是可分泌的衣原体胞浆蛋白, 通过分泌至细胞浆行使激酶活性参与影响宿主细胞的信号通路。但间接免疫荧光染色显示 Cpn0148 仅表达在菌体, 胞浆中没有检测到 Cpn0148。说明 Cpn0148 并非通过分泌到胞浆的方式参与宿主细胞的相互作用。Anita Verma 研究显示与 Cpn0148 同源沙眼衣原体 CT145 编码的 Pkn1 可以磷酸化内源性的包涵体膜蛋白 IncG<sup>[8]</sup>, 沙眼衣原体感染细胞中可以检测到磷酸化的 IncG, 通过双酵母杂交法发现 IncG 可以与调节蛋白 14-3-3 $\beta$ 结合<sup>[19]</sup>, 14-3-3 $\beta$ 可与 Raf-1、PKC、Cdc25C、KSR、Bcr、Ca<sup>2+</sup>/CaM 激酶、Bad 和跨膜蛋白受体等多种信号蛋白结合发挥信号调节作用。提示我们 Cpn0148 可能存在的底物和其作用方式。

本研究仅克隆表达了 Cpn0148, 对其作了初步的细胞定位。下一步将进一步探讨其功能, 通过免疫共沉淀和双酵母杂交等方法寻找与其相互作用蛋白分子, 寻找底物, 以及探索 Cpn0148 对 Cpn 生长和对宿主细胞影响中的作用。

致谢: 感谢美国德克萨斯州圣安东尼奥科学健康中心(UTHSCSA)钟光明教授对本实验提供的帮助!

## 参 考 文 献

- [1] Kuo CC, Campbell LA, Rosenfeld ME. *Chlamydia pneumoniae* infection and atherosclerosis: methodological considerations. *Circulation*, 2002, **105**(4): e34.
- [2] Campbell LA, Kuo CC. *Chlamydia pneumoniae*—an infectious risk factor for atherosclerosis? *Nat Rev Microbiol*, 2004, **2**(1): 23–32.
- [3] Galyov EE, Hakansson S, Forsberg A, et al. A secreted protein kinase of *Yersinia Pseudotuberculosis* is an indispensable virulence determinant. *Nature*, 1993, **361**(6414): 730–732.
- [4] Han G, Zhang CC. On the origin of Ser/Thr kinases in a prokaryote. *FEMS Microbiol Lett*, 2001, **200**(1): 79–84.
- [5] Nadvornik R, Vomastek T, Janecek J, et al. Pkg2, a novel transmembrane protein Ser/Thr kinase of *Streptomyces griseus*. *J Bacteriol*, 1999, **181**(1): 15–23.
- [6] Chaba R, Raje M, Chakraborti PK. Evidence that a eukaryotic-type serine/threonine protein kinase from *Mycobacterium tuberculosis* regulates morphological changes associated with cell division. *Eur J Biochem*, 2002, **269**(4): 1078–1085.
- [7] Fan P, Dong F, Huang Y, et al. *Chlamydia pneumoniae* secretion of a protease-like activity factor for degrading host cell transcription factors is required for major histocompatibility complex antigen expression. *Infect Immun*, 2002, **70**(2): 345–349.
- [8] Verma A, Maurelli AT. Identification of two eukaryote-like serine/threonine kinases encoded by *Chlamydia trachomatis* serovar L2 and characterization of interaction partners of Pkn1. *Infect Immun*, 2003, **71**(10): 5772–5784.
- [9] Yamashita K, Ouchi K, Shirai M, et al. Distribution of *Chlamydia pneumoniae* infection in the atherosclerotic carotid artery. *Stroke*, 1998, **29**(4): 773–778.
- [10] Kalayoglu MV, Byrne GI. A *Chlamydia pneumoniae* component that induces macrophage foam cell formation is chlamydial lipopolysaccharide. *Infect Immun*, 1998, **66**(11): 5067–5072.
- [11] Kalayoglu MV, Byrne GI. Induction of macrophage foam cell formation by *Chlamydia pneumoniae*. *J Infect Dis*, 1998, **177**(3): 725–729.
- [12] Krüll M, Kramp J, Petrov T, et al. Differences in cell activation by *Chlamydia pneumoniae* and *Chlamydia trachomatis* infection in human endothelial cells. *Infect Immun*, 2004, **72**(11): 6615–6621.
- [13] Opitz B, Förster S, Hocke AC, et al. Nod1-mediated endothelial cell activation by *Chlamydia pneumoniae*. *Circ Res*, 2005, **96**(3): 319–326.
- [14] Cao F, Castrillo A, Tontonoz P, et al. *Chlamydia pneumoniae*-induced macrophage foam cell formation is mediated by Toll-like receptor 2. *Infect Immun*, 2007, **75**(2): 753–759.
- [15] Marhony JB, Johnson D, Coombs B, et al. Expression of a novel protein kinase gene (Cpn0148) during the replication cycle of *Chlamydia pneumoniae*. International Symposium on Human Chlamydial Infections. In J Schachter, G Christianse and I Clarke (ed) International symposium on Human chlamydial infections, Vol 10, Antalya, Turkey. International Chlamydia Symposium, San Francisco, CA. 2002, pp.559–562.
- [16] Dong F, Flores R, Chen D, et al. Localization of the hypothetical protein Cpn0797 in the cytoplasm of *Chlamydia pneumoniae*-infected host cells. *Infect Immun*, 2006, **74**(11): 6479–6486.
- [17] Vandahl BB, Stensballe A, Roepstorff P, et al. Secretion of Cpn0796 from *Chlamydia pneumoniae* into the host cell cytoplasm by an autotransporter mechanism. *Cell Microbiol*, 2005, **7**(6): 825–836.
- [18] Heuer D, Brinkmann V, Meyer TF, et al. Expression and translocation of chlamydial protease during acute and persistent infection of the epithelial HEp-2 cells with *Chlamydia (Chlamydia) pneumoniae*. *Cell Microbiol*, 2003, **5**(5): 315–322.
- [19] Scidmore MA, Hackstadt T. Mammalian 14-3-3 $\beta$  associated with the *Chlamydia trachomatis* inclusion membrane via its interaction with IncG. *Mol Microbiol*, 2001, **39**(6): 1638–1650.

<http://journals.im.ac.cn/wswxtbcn>