

网络出版时间: 2021-7-28 11:40 网络出版地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20210728.1015.018.html>

肺炎支原体 P116 基因 FP2 片段的免疫优势和细胞黏附活性

林康¹, 文志¹, 周畅¹, 李文丽¹, 吴焕武¹, 刘丹艳², 朱玉林³, 王林定¹

摘要 目的 通过对肺炎支原体 P116 基因 FP2 段的 453 bp 片段进行了克隆表达, 探讨肺炎支原体 P116 蛋白对 A549 细胞的黏附性。方法 肺炎支原体感染者血清和肺炎支原体抗体用 Western blot 和 ELISA 检测纯化的 P116 蛋白片段的免疫原性及效价。P116-FP2 多克隆抗体和 A549 细胞黏附试验用免疫荧光评价肺炎支原体的黏附、黏附抑制。结果 P116-FP2 蛋白具有免疫原性, 用该蛋白构建的 ELISA 方法

具有较高的敏感性和特异性。制备的 P116-FP2 抗体可阻断肺炎支原体黏附 A549 细胞。随着多克隆抗体效价的增加, 肺炎支原体对 A549 细胞的黏附率明显降低。结论 初步证明 P116-FP2 蛋白具有免疫反应性。P116-FP2 多克隆抗体能够抑制肺炎支原体对 A549 细胞的黏附。

关键词 肺炎支原体; P116 蛋白; A549 细胞; 多克隆抗体
中图分类号 R 375.2

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2021)08-1268-05
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2021.08.019

2020-10-16 接收

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 81271837); 安徽高校自然科学基金项目(编号: KJ2012A161); 安徽省自然科学基金项目(编号: 1708085MH193); 安徽医科大学基础与临床合作研究提升计划(编号: 2019xkjT024); 2019 年度安徽医科大学校科研基金项目(编号: 2019xkj020)

作者单位: ¹ 安徽医科大学微生物学教研室, 合肥 230032

² 阜阳师范大学, 阜阳 236000

³ 安徽医科大学第一附属医院儿科, 合肥 230032

作者简介: 林康, 男, 硕士研究生;

王林定, 男, 教授, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: wanglinding@ahmu.edu.cn

肺炎支原体是一种原核细胞型微生物, 是已知能够自我复制的最小的人类病原体, 大约 7% ~ 20% 的获得性肺炎病例是由该病原体引起的^[1-2]。肺炎支原体对宿主呼吸道黏膜上皮细胞的黏附和定植是成功感染的关键因素之一^[3]。这一过程由肺炎支原体的附着细胞器(adherent organelle, AO)所介导。AO 是一种极化和锥形的细胞延伸, 被认为与肺炎支原体滑动和细胞分裂有关^[4]。肺炎支原

Effects of high-salt environment on store-operated calcium entry and contractile function in rat coronary artery smooth muscle

He Ke, Xiao Hui, Lu Haoyang, et al

(Dept of Cardiology, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022)

Abstract Objective To investigate the effects of high-salt environment on store-operated calcium entry (SOCE) and contractile function in rat coronary artery smooth muscle. **Methods** After culturing the isolated rat coronary arteries in different concentrations of high-salt culture media (with 137.65 ~ 167.65 mmol/L NaCl respectively) for 24 h, the distribution and expression of Orai1, STIM1, IP₃R and ET_A in coronary artery smooth muscle were detected by immunohistochemistry assays, U46619, ET-1 and SOCE-induced coronary vasoconstriction were examined by microvascular tension measurement system, and the SOCE mediated Ca²⁺ influx in RCASMCs was detected by calcium imaging technology. **Results** High-salt environment significantly enhanced ET-1 and SOCE-induced coronary vasoconstriction ($P < 0.01$) and SOCE mediated Ca²⁺ influx in the RCASMCs ($P < 0.01$), and increased the expression of Orai1, STIM1 and IP₃R in coronary artery smooth muscle ($P < 0.05$). **Conclusion** The extracellular high-salt environment can enhance the contractile function of rat coronary artery induced by agonist and SOCE, and the mechanism may be associated with the up regulation of key proteins related to the IP₃R-SOCE pathway and the enhancement of Ca²⁺ influx mediated by SOCE in the rat coronary artery smooth muscle.

Key words high-salt; coronary artery; vasoconstriction; vascular smooth muscle; store-operated calcium entry

体黏附过程需要多种蛋白质的参与,包括 P1、P2、P3、P116 和 P30 以及高分子量 (high molecular weight, HMW) 蛋白^[5-8]。与其他表面黏附蛋白不同, P116 不与 P1、P30 或 HMW 蛋白形成复合物,而是独立参与细胞黏附^[9]。P116 蛋白由 3 093 bp 的开放阅读框编码,编码 1 030 个氨基酸,分子量为 116 ku^[10]。该研究旨在对 P116 蛋白的敏感性、特异性和黏附介导区,作结构-功能研究,为提供临床诊断和治疗策略提供线索。

1 材料与方法

1.1 材料 A549 细胞购于美国 ATCC。肺炎支原体 SP4 快速培养基购于珠海迪尔生物技术有限公司、质粒提取试剂盒购于北京 TIANGEN 公司; QuickCut 限制性内切酶 EcoR I 与 BamH I 及其配套缓冲液购于北京 Takara 公司; Ni-NTA 购于生工生物工程(上海)股份有限公司

1.2 方法

1.2.1 肺炎支原体标准株的复苏培养 将肺炎支原体标准株 (FH, ATCC 15531) 接种于支原体培养液中,需氧培养,每日观察。当培养基颜色由红色变为橙色时,细菌处于指数生长期。收集细菌,用 PBS 洗涤,离心,静置,在 PPLO 琼脂平板上涂板,37 °C、5% CO₂ 培养,每 3 d 进行 10 倍显微镜观察,可疑菌落用双烯染色,镜下观察和 PCR 鉴定。

1.2.2 重组质粒 PQE-P116-FP2 的构建 参照文献设计 P116-FP2 基因引物,上游引物 5-CCAAGTG-GATCCCTGATCTCTTTGGCGAC-3; 下游引物 5-GCAAATTG-AATTCCCCGTTTCAGGATCAG-3。内切酶为 BamH I 酶与 EcoR I 酶,由上海生工生物工程有限公司合成。合成后粉剂按说明书稀释分装,贮存于 -20 °C。复苏培养 MP-FH 标准菌株,经检测阳性后,用细菌基因组 DNA 提取试剂盒提取 DNA,测定浓度加入 100 ng 模板基因 95 °C、5 min, 95 °C、30 s 62 °C、30 s, 72 °C、1 min, 72 °C、10 min 反应体系 50 μl: PCR mix 25 μl, 上下游引物各 2 μl 模板 15 μl ddH₂O 6 μl。通过 PCR 的方法扩增肺炎支原体 P116-FP2 基因片段,克隆到表达载体 PQE80-L 中,转化大肠杆菌 BL21(DE3)。

1.2.3 重组蛋白诱导表达 大肠杆菌 BL21(DE3) 用 1 mmol/L 的异丙基硫代半乳糖苷 (isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside, IPTG) 在 37 °C 诱导 6 h 后,收集细菌,离心,再悬浮在裂解缓冲液 (50 mmol/L NaH₂PO₄, 500 mmol/L NaCl, 10 mmol/L 咪唑, pH

8.0) 中。收集悬浮菌,加入 PMSF 蛋白酶抑制剂和溶菌酶,冰浴 20 min。超声破碎 5 s,间隔 5 s,功率 300 W,总工作时间 18 min。然后将裂解物以 4 °C, 8 000 r/min 的速度离心 20 min。用 50 ml 变性裂解缓冲液 (10 mmol/L Tris, 100 mmol/L NaH₂PO₄, 10 mmol/L 咪唑, 8 mol/L 尿素, pH 8.0) 溶解沉淀。收集上清液,经 Ni-NTA 琼脂树脂过滤。用 12% SDS-PAGE 电泳分析蛋白质。SDS-PAGE 和 Western blot 分别用 5% 和 12% 的分离和浓缩胶进行。样品在 SDS 蛋白上样缓冲液中煮沸 10 min,然后用 12% 的 SDS-PAGE 电泳分离,每份样品 10 μl。凝胶用考马斯亮蓝染色 1 h,脱色液脱色 12 h。Western blot 实验用上述同样的方法,待电泳完毕后,将蛋白分离后转移到聚偏二氟乙烯膜 (PVDF 膜) 上,用含 5% 脱脂牛奶的 PBST 室温封闭膜 2 h,用 PBST 洗涤,与抗 P116 血清抗体孵育 (1 : 200) 2 h。TBST 洗涤 3 次。用 Goat Anti-Rabbit IgG (Elabscience, 1 : 5 000) 孵育 1 h 后, TBST 洗涤 4 次,加化学发光剂,免疫检测采用 ECL 检测系统。

1.2.4 P116-FP2 多克隆抗体的制备 免疫前选取 3 只 3.5 kg 成年雄性新西兰大白兔 (安徽医科大学动物实验中心),编号 A、B、C,心脏取血 2 ml,此为阴性对照。然后,将制备好的纯化蛋白 200 μg 与完全弗氏佐剂 (美国 Thermo 公司) 充分混合,并沿背部多个部位皮下注射。第二周,将 100 μg 蛋白抗原与不完全弗氏佐剂 (美国 Sigma-Aldrich) 完全混合,免疫方案同上。每周加强免疫 1 次,共接种 4 次。末次免疫前抽取耳缘静脉血,Western blot 验证是否产生抗体。第四次免疫后 7 d,采集心脏血 60 ~ 80 ml,分离血清,无菌分装, -80 °C 保存。

1.2.5 P116-FP2 多克隆抗体效价的测定 用 ELISA 法检测抗 P116-FP2 多克隆抗体的效价。用 1 μg/L P116-FP2 蛋白包被 ELISA 板,每孔加 100 μl, 4 °C 孵育过夜。第二天用含 1% 山羊血清的封闭液, 250 μl 每孔, 37 °C 封闭 1 h 后洗涤,以免疫前采集的兔血清为对照,将抗血清 1 : 300、1 : 600、1 : 1 200、1 : 2 400、1 : 4 800、1 : 9 600 倍比稀释,每孔 100 μl 加到包被好的 ELISA 板中, 37 °C 孵育 1 h。PBST 洗涤 5 次,加入 1 : 3 000 稀释的 HRP 标记羊抗兔 IgG 100 μl, 37 °C 孵育 1 h,洗涤 5 次。每孔加入 50 μl 四甲基联苯胺 (TMB) 显色底物, 37 °C 避光 30 min,加终止液终止反应。用酶标仪检测 450 nm 波长下的吸光度。

1.2.6 P116-FP2 多克隆抗体抑制肺炎支原体与

A549 细胞黏附的能力检测 为了检测特异性多克隆抗体抑制肺炎支原体与 A549 细胞黏附的能力, 以 4 个抗体浓度(1 : 50、1 : 100、1 : 200 和 1 : 500) 与肺炎支原体孵育, 然后感染 A549 细胞。人肺癌细胞株 A549(美国马纳萨斯, 弗吉尼亚州, ATCC) 在含有 25 mmol/L HEPES 缓冲液(0.01 mol/L N-2-羟乙基哌嗪-N9-2-乙磺酸, 0.15 mol/L NaCl, pH 7.2), 碳酸氢钠, 10% 胎牛血清, 200 μg/ml 庆大霉素, 2 mg/ml 庆大霉素的高糖 DMEM 中培养。经胰蛋白酶消化后, 将 A549 细胞(5 × 10⁴) 转移到 12 孔培养皿(康宁) 中的无菌玻璃盖片上, 并在 37 °C、5% CO₂ 加湿的环境中孵育过夜。用肺炎支原体 DMEM 悬液(100 μl /孔) 感染 A549 细胞, 37 °C、5% CO₂ 中孵育 6 h。感染的 A549 细胞在 4% 多聚甲醛中室温固定 1 min, 用 PBS 清洗。为检测黏附性支原体, 加入兔一抗(1 : 500) 37 °C 孵育 30 min, 再次加入 FITC 标记的驴抗兔 IgG(上海桑贡生物科技公司, 1 : 100) 与细胞孵育。细胞随后与 4-β-氨基-2-苯基吲哚(Sangon Biotech; 1 : 10) 在 37 °C 孵育 30 min, 最后用双蒸水洗涤细胞并进行分析。用 100 μl 的肺炎支原体悬液与不同稀释度(1 : 50、1 : 100、1 : 200、1 : 500) 的兔一抗 100 μl 在 37 °C 预孵育 30 min。然后将肺炎支原体/抗体悬液(200 μl) 加入含 1.5 ml 二甲基甲酰胺的 A549 细胞中, 在 37 °C、5% CO₂ 中孵育过夜, 然后如上所述测定黏附性。肺炎支原体表面暴露试验检测支原体表面蛋白, 固定前加入一抗, 所有其他程序与上述相同。将制备好的细胞标本用直立荧光显微镜进行观察, 成像前将一滴防褪色溶液(对苯二胺二盐酸盐, 1 μg/ml, 10% PBS 和 90% 甘油, pH 9.0) 放在盖片和载玻片之间。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 17.0 统计软件进行分析, 两两比较采用 *t* 检验, 以 α = 0.05 为检验标准。P < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 MP-FP2 重组载体的构建及鉴定 将目的基因经电泳分析正确后, 连接到表达载体 PQE-80-L 上, 转化构建好的重组载体至 BL21(DE3) 中, 平板四区划线后, 挑取单克隆菌落, 摇菌提取质粒。经 BamH I 与 EcoR I 双酶切鉴定后, 重组质粒载体 MP-FP2 切出目的基因片段, 大小与前期设计目的片段一致。表明目的基因成功连接到表达载体上。见图 1。

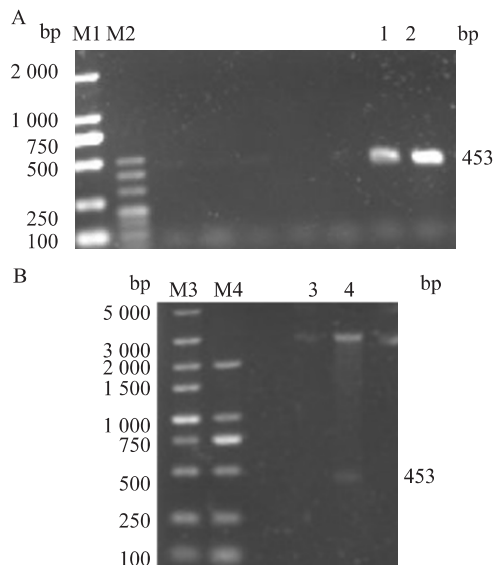


图 1 MP-FP2 目的基因 PCR 扩增及重组载体的双酶切鉴定

A: MP-FP2 目的基因 PCR 扩增产物电泳图; B: 重组载体 MP-FP2 双酶切电泳图; M1: DNA 2 000 Marker; M2: DNA 500 Marker; M3: DNA 5 000 Marker; M4: DNA 2 000 Marker; 1、2: MP 阳性菌株 FP2 基因 PCR 产物; 3: 重组质粒 PQE-80L-FP2; 4: 重组质粒 PQE-80L-FP2 双酶切

2.2 重组蛋白 SDS-PAGE 分析 肺炎支原体的克隆、表达和纯化通过 PCR 扩增出 P116-FP2 基因的 453 bp 片段, 将其克隆到 PQE80-L 表达载体中, 并在大肠杆菌 BL21 中表达。对重组蛋白进行 SDS-PAGE 分析。诱导了约 14 ku 的重组蛋白, 以上清液形式表达。对 P116-FP2 蛋白经 Ni-NTA 柱层析纯化, 结果如图 2 所示。

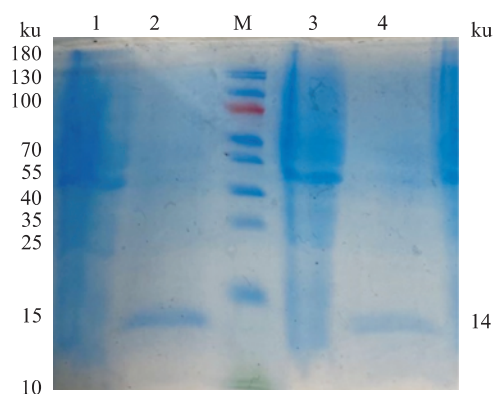


图 2 P116-FP2 目的蛋白的表达及纯化 SDS 分析图

M: 180 ku 蛋白 Marker; 1: 诱导 6 h 后的重组菌; 2: Ni²⁺ 柱亲和层析纯化过的上清蛋白; 3: 诱导前的重组菌; 4: 超声后的上清蛋白

2.3 P116-FP2 蛋白 Western blot 检测及其多克隆抗体效价测定 使用肺炎支原体阳性患者血清(1 : 200) 和阴性血清作为一抗, 对纯化后的抗原进

行免疫印迹反应。通过对比阴性与阳性的结果,显示表达的 P116-FP2 蛋白具有免疫反应性。见图 3。对 4 次免疫加强后的兔心脏取血清,间接 ELISA 法检测不同兔产生的抗 P116-FP2 血清的效价。结果判定:吸光度值大于 1.0 为阳性结果,通过比较 1:300 ~ 1:19 200 7 组稀释血清的吸光度值可以得出 3 份血清效价均大于 1:4 800,且 7 组间两两比较,经 *t* 检验均 $P < 0.05$,差异有统计学意义。见表 1。

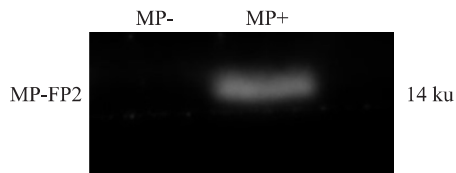


图 3 Western blot 检测 P116-FP2 蛋白的特异性
MP-: 阴性患者血清; MP+: 为阳性患者血清

2.4 荧光显微镜观察结果 在荧光显微镜下,可以观察到孵育肺炎支原体抗体与 A549 细胞有 FITC 的绿色荧光,随着抗体浓度的增加,激发的绿色荧光越少,表明对肺炎支原体黏附的抑制作用越强。细胞经过细胞核染色后,显示细胞核激发的蓝色荧光

位点与 FITC 激发的绿色荧光位点相同。见图 4。

3 讨论

肺炎支原体是支原体属的一个种。MP 感染的诊断主要有 3 种方法:培养、血清学和分子生物学法。培养法特异性强,传统上,肺炎支原体培养是肺炎支原体感染病原学诊断的标准,但由于肺炎支原体生长缓慢,阳性分离率低,限制了其临床应用^[11]。虽然 PCR 检测敏感,但实验技术和结果分析要求严格。因此,血清学是诊断肺炎支原体感染最常用的方法。近年来,除了制备完整的肺炎支原体和膜蛋白抗原外,还开发了合成肽抗原和重组抗原。由于现有的血清学试验是基于肺炎支原体的粗细胞成分,血清学试验往往受到非特异性反应的阻碍。用纯化的肺炎支原体表面蛋白进行 ELISA 具有独特的优点。发展肺炎支原体血清学检测方法的主要困难之一是难以在异源表达系统中表达其蛋白,因为肺炎支原体使用非通用密码子。例如,UGA 在肺炎支原体中被翻译为色氨酸,在大肠杆菌中被翻译为终止密码子。因此,UGA 密码子的存在可能导致克

表 1 抗 P116-FP2 多克隆抗体稀释度的检测($n=3$)

编号	阴性	空白	抗 P116-FP2 多克隆抗体稀释倍数						
			1:300	1:600	1:1 200	1:2 400	1:4 800	1:9 600	1:19 200
兔 A	0.204	0.217	3.123	2.543	1.903	1.634	1.212	0.739	0.417
兔 B	0.180	0.173	3.021	2.615	2.153	1.719	1.297	0.692	0.450
兔 C	0.172	0.168	3.097	2.483	2.029	1.648	1.193	0.594	0.395

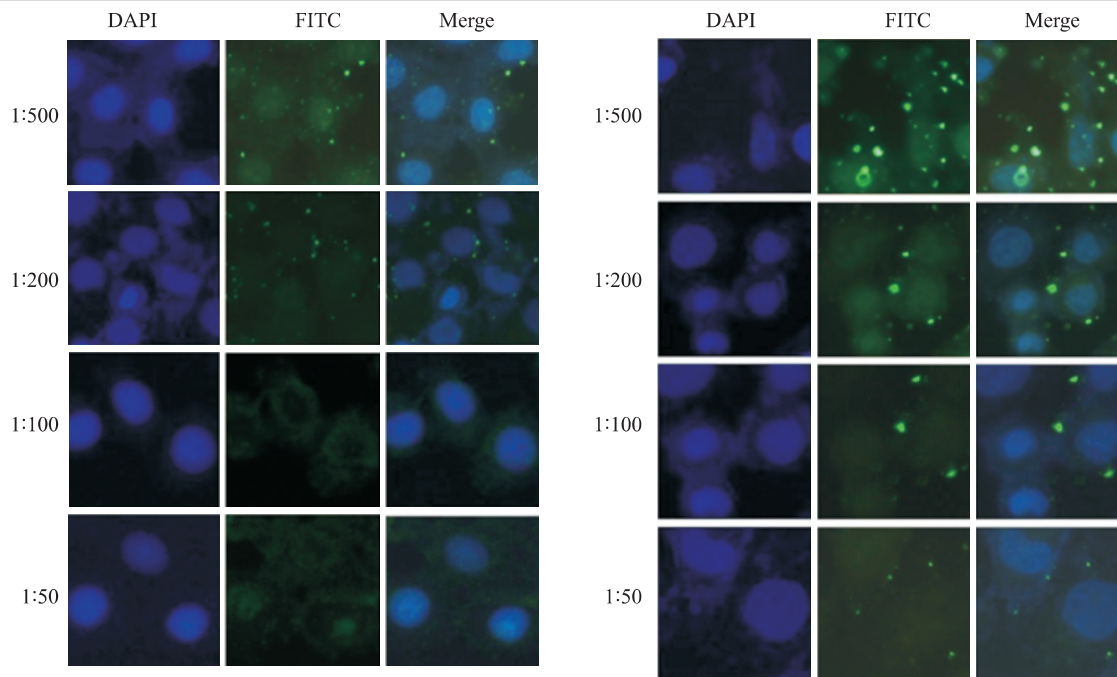


图 4 多克隆抗体抑制肺炎支原体感染 A549 细胞免疫荧光图 $\times 1 000$
FITC: 含 FITC 标记的荧光二抗; DAPI: 细胞核染色; Merge: 叠加效果

隆基因的不完全表达。P116 蛋白的基因和氨基酸序列在肺炎支原体 FH 和 M129 之间高度保守,与生殖支原体基因和氨基酸序列的同源性分别为 61% 和 52%。与其他支原体、细菌、病毒和脊椎动物相比,未发现同源基因。虽然一些报告已经在其他国家调查了类似的方法,尚未在用 P116 蛋白诊断肺炎支原体的报告。本研究使用了与 Tabassum et al^[12] 类似的方法,表达了 P116 蛋白,制备了抗肺炎支原体的抗体。肺炎支原体感染患者的 Western blot 结果表明蛋白具有免疫反应性。由于 P116 被认为是主要的黏附调节配体,随后又对其黏附抑制进行了实验。为了鉴定细胞黏附区,重组了 P116 蛋白。该重组蛋白与肺炎支原体多克隆抗体反应。IFA 结果表明,重组 P116 蛋白多克隆抗体能抑制肺炎支原体与 A549 细胞的黏附,证明 P116 蛋白在细胞黏附和免疫活性方面是一个不依赖于 P1 的重要因子。本研究对肺炎支原体 P116-FP2 段的免疫反应和细胞黏附区进行了系统的研究,结果表明,P116-FP2 多克隆抗体具备免疫肺炎支原体的能力,针对该区域的抗体阻断了肺炎支原体与细胞的黏附。

参考文献

- [1] Waites K B, Talkington D F. *Mycoplasma pneumoniae* and its role as a human pathogen [J]. *Clin Microbiol Rev*, 2004, 17(4): 697-728.
- [2] Rastawicki W, Rokosz N, Jagielski M. Evaluation of the usefulness of selected antigens of *Mycoplasma pneumoniae* for the serodiagnosis of mycoplasmosis [J]. *Med Dosw Mikrobiol*, 2009, 61(2): 175-82.

- [3] Hu P C, Collier A M, Baseman J B. Surface parasitism by *Mycoplasma pneumoniae* of respiratory epithelium [J]. *J Exp Med*, 1977, 145(5): 1328-43.
- [4] Krause D C. *Mycoplasma pneumoniae* cytodherence: organization and assembly of the attachment organelle [J]. *Trends Microbiol*, 1998, 6(1): 15-8.
- [5] Williams C R, Chen L, Driver A D, et al. Sialylated receptor setting influences *mycoplasma pneumoniae* attachment and gliding motility [J]. *Mol Microbiol*, 2018, 109(6): 735-44.
- [6] Hatchel J M, Balish M F. Attachment organelle ultrastructure correlates with phylogeny, not gliding motility properties, in *Mycoplasma pneumoniae* relatives [J]. *Microbiology (Reading)*, 2008, 154(Pt 1): 286-95.
- [7] Schmid S R, Gronau K, Hames C, et al. The stability of cytodherence proteins in *Mycoplasma pneumoniae* requires activity of the protein kinase PrkC [J]. *Infect Immun*, 2010, 78(1): 184-192.
- [8] Nakane D, Kenri T, Matsuo L, et al. Systematic structural analyses of attachment organelle in *Mycoplasma pneumoniae* [J]. *PLoS Pathog*, 2015, 11(12): e1005299.
- [9] Layh-Schmitt G, Podtelejnikov A, Mann M. Proteins complexed to the P1 adhesin of *Mycoplasma pneumoniae* [J]. *Microbiology (Reading)*, 2000, 146(Pt 3): 741-7.
- [10] Duffy M F, Walker I D, Browning G F. The immunoreactive 116 kDa surface protein of *Mycoplasma pneumoniae* is encoded in an operon [J]. *Microbiology (Reading)*, 1997, 143(Pt 10): 3391-402.
- [11] She R C, Thurber A, Hymas W C, et al. Limited utility of culture for *Mycoplasma pneumoniae* and *Chlamydia pneumoniae* for diagnosis of respiratory tract infections [J]. *J Clin Microbiol*, 2010, 48(9): 3380-2.
- [12] Tabassum I, Chaudhry R, Chourasia B K, et al. Identification of an N-terminal 27 kDa fragment of *Mycoplasma pneumoniae* P116 protein as specific immunogen in *M. pneumoniae* infections [J]. *BMC Infect Dis*, 2010, 10: 350.

Immunodominance of FP2 fragment of P116 gene of *Mycoplasma pneumoniae* and cell adhesion activity

Lin Kang, Wen Zhi, Zhou Chang, et al

(Dept of Microbiology Anhui Medical University Hefei 230032)

Abstract Objective To clone and express the 453 bp fragment of P116 gene FP2 of *Mycoplasma pneumoniae*, and to investigate the adhesion of P116 protein to A549 cells. **Methods** The immunogenicity and titer of purified P-116 protein fragment were detected by Western blot and ELISA in serum and antibody of *Mycoplasma pneumoniae* infected. Immunofluorescence was used to evaluate the adhesion and adhesion inhibition of *Mycoplasma pneumoniae* to A549 cells by P116-FP2 polyclonal antibody. *Mycoplasma pneumoniae* adhesion, adhesion inhibition and surface exposure were evaluated using the anti-P116 polyclonal antibody and A549 cells adhesion assay. **Results** The results showed that P116-FP2 had immunoreactivity, and the ELISA method established with this protein had high sensitivity and specificity. The P116-FP2 antibody was prepared to block the adhesion of *Mycoplasma pneumoniae* to A549 cells. With the increase of titer of polyclonal antibody, the adhesion rate of *Mycoplasma pneumoniae* to A549 cells decreased significantly. **Conclusion** The P116-FP2 protein is proven to be immunoreactive preliminarily. The P116-FP2 polyclonal antibody can inhibit the adhesion of *Mycoplasma pneumoniae* to A549 cells. **Key words** *Mycoplasma pneumoniae*; P116 protein; A549 cell; polyclonal anti-body