

DOI:10.13350/j.cjpb.220608

· 论著 ·

梅毒螺旋体 TrkA 蛋白的表达、纯化及多克隆抗体制备*

曹二龙¹, 唐愈菲¹, 宁韶辉^{2**}

(1. 邵阳学院医学检验学院病原生物学教研室, 湖南邵阳 422600; 2. 邵阳学院附属第二医院检验科)

【摘要】 目的 分析梅毒螺旋体钾离子转运蛋白 TrkA 的生物学特性, 表达、纯化并制备 TrkA 蛋白的抗血清。方法 从 NCBI 中查到梅毒螺旋体钾离子转运蛋白 TrkA 的氨基酸序列, 采用生物信息学方法分析 TrkA 蛋白的基本理化性质、信号肽、定位、跨膜区、糖基化位点、磷酸化位点、二级结构、三级结构和 B 细胞表位。按照梅毒螺旋体 TrkA 的 DNA 序列设计引物, PCR 扩增 TrkA 基因, 双酶切后与质粒 pET28a 相连, 连接产物 pET28a-TrkA 转转化入大肠埃希菌 BL21, 培养后使用 IPTG 诱导重组 TrkA 蛋白表达, 利用 Ni²⁺ 亲和层析法纯化 TrkA 蛋白。取 TrkA 蛋白皮下接种小鼠, 免疫 3 次, 制备小鼠血清, ELISA 法检测血清 TrkA 特异性 IgG 滴度。结果 生物信息学预测 TrkA 蛋白共有 236 个氨基酸, 相对分子质量 26.7ku, 为胞内蛋白。该蛋白二级结构中 α 螺旋占 45.34%, β 折叠占 20.76%, 无规卷曲占 27.97%, β 转角占 5.93%。Phyre2 网站预测 TrkA 蛋白三级结构中 85.5% 氨基酸处于最合理区。TrkA 蛋白含有 6 个连续 B 细胞表位和 4 个非连续表位。成功构建重组质粒 pET28a-TrkA 并获得高纯度的重组 TrkA 蛋白。该蛋白免疫小鼠能够诱导产生特异性 IgG 抗体, 血清抗体滴度为 1:25 600。结论 生物信息学分析梅毒螺旋体 TrkA 为亲水性蛋白, 含有 B 细胞表位, 纯化的重组 TrkA 蛋白具有良好的抗原性, 能诱导小鼠产生高滴度抗体。

【关键词】 梅毒螺旋体; 钾离子转运蛋白; 生物信息学分析; 免疫原性

【中图分类号】 R377

【文献标识码】 A

【文章编号】 1673-5234(2022)06-0660-05

[Journal of Pathogen Biology. 2022 Jun.; 17(6):660-664.]

Expression and purification of *Treponema pallidum* TrkA and preparation of polyclonal antibody

CAO Er-long¹, TANG Yu-fei¹, NING Shao-hui² (Department of Pathogenic Biology of Laboratory Medicine, Shaoyang University, Shaoyang 422600, Hunan, China; 2. Laboratory Department of the Second Affiliated Hospital of Shaoyang University)

【Abstract】 **Objective** To analyses the biological information of *Treponema pallidum* TrkA, construct the recombinant prokaryotic expression plasmid, expresses and purify the recombinant TrkA protein, and tests its immunological activity. **Methods** The amino acid sequence of *T. pallidum* TrkA protein was obtained from NCBI website. Bioinformatics methods were used to analyze the basic physical and chemical properties, signal peptide, localization, transmembrane region, glycosylation site, phosphorylation site, secondary structure, tertiary structure and B cell epitope of TrkA protein. PCR primers were designed according the DNA sequence of TrkA which were used to amplify the TrkA gene. The TrkA were double digested then was ligated to the plasmid pET28a. The recombinant plasmid pET28a-TrkA was transformed into *E. coli* BL21, and the recombinant TrkA protein was induced by IPTG which was purified by Ni²⁺ affinity chromatography. Mice were immunized with recombinant TrkA protein and the content of total IgG were determined. **Results**

TrkA protein is an intracellular protein with 236 amino acids with a relative molecular weight of 26.7×10^3 . The content of α -helix is as high as 45.34%. The content of random coil was 27.97%, β -sheet was 20.76% and β -turn was 5.93%. The tertiary structure of TrkA protein predicted by phyre2 website and 85.5% amino acids in the most reasonable region. TrkA protein contains 6 continuous B cell epitopes and 4 discontinuous epitopes. The recombinant plasmid pET28a-TrkA was successfully constructed and the recombinant protein was purified. The specific IgG was induced by TrkA protein. The serum antibody titer in serum was 1:25 600. **Conclusion** The purified recombinant *T. pallidum* TrkA protein has good immunogenicity and can induce mice to secrete high titer antibodies.

【Key words】 *Treponema pallidum*; TrkA protein; bioinformatics; immunogenicity

***梅毒是由梅毒螺旋体(*Treponema pallidum*, Tp)感染所导致的一种多阶段、多系统的性传播疾病^[1]。按照病情发展将梅毒分为一期、二期和三期。一期梅毒表现为硬下疳。二期梅毒表现为关节炎、脑膜炎、虹膜睫状体炎、粘膜病变、扁平湿疣、弥漫性淋巴结病等

* **【基金项目】** 湖南省自然科学基金项目(No. 2020JJ5522); 湖南教育厅科研项目(No. 18C0810)。

** **【通讯作者】** 宁韶辉, E-mail: 360110261@qq.com

【作者简介】 曹二龙(1985-), 女, 湖南邵阳人, 副教授, 硕士。专业方向: 病原生物学。E-mail: 278766113@qq.com

症状。三期发展为晚期神经梅毒、心血管梅毒和树胶样肿等^[1-3]。通常情况下梅毒的病史非常复杂,并且与梅毒螺旋体的侵袭性、免疫逃逸和致炎能力相关^[4-6]。虽然梅毒螺旋体对青霉素极为敏感,但是近年在全球范围内梅毒死灰复燃,世界卫生组织预计全球每年约有600万新病例,故研究梅毒螺旋体的致病机制具有重要意义^[7]。

钾离子是每种生物必需的金属元素之一,它是细胞质中主要的一价无机阳离子^[8]。细胞质中钾离子的浓度大于细胞膜外,动物细胞中钾离子的浓度约为膜外的10倍,细菌、真菌和植物中胞内浓度为膜外的 $10^3 \sim 10^5$ 倍。当细菌处于渗透胁迫时,膜内的钾离子浓度高达1摩尔每升^[8]。细菌中的钾离子起调节渗透压,调节细胞内pH值以及第二信使等多种功能。在细菌中有Trk和Ktr系统两个钾离子吸收系统^[9-10],其中Trk系统是由介导钾离子转运的跨膜亚基(TrkH蛋白、TrkG蛋白或者TrkI蛋白等)以及调节亚基(TrkA蛋白)组成^[9-11],但关于梅毒螺旋体获取钾离子的机制尚不清楚。本实验利用生物信息学软件预测梅毒螺旋体TrkA蛋白的生物学特性,并构建重组质粒pET28a-TrkA,表达重组TrkA蛋白,免疫小鼠后获得多克隆抗体,为研究梅毒螺旋体的致病机制提供实验基础。

材料与方 法

1 材 料

1.1 菌种和质粒 大肠埃希菌Top10、BL21和质粒pET28a由邵阳学院病原学实验中心保存;梅毒螺旋体由南华大学病原生物学研究所提供。

1.2 主要试剂 Ni-NTA蛋白纯化试剂盒购自美国GE公司;PCR引物由赛默飞世尔科技(中国)有限公司合成;琼脂糖凝胶DNA回收试剂盒,小量质粒提取试剂盒和细菌DNA提取试剂盒购自天跟生化科技(北京)有限公司;T₄DNA连接酶,限制性内切酶HindIII和NdeI,PCR扩增酶,蛋白质以及DNA Marker购自宝日生物技术有限公司;辣根过氧化物酶标记(Horseradish Peroxidase, HRP)的羊抗鼠IgG购自美国Abcam公司;BCA蛋白质定量试剂盒,弗氏完全佐剂和弗氏不完全佐剂购自美国Sigma-Aldrich公司。

1.3 实验动物 6~8周龄雌性BALB/c小鼠购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司。

2 方 法

2.1 TrkA蛋白生物信息学分析 利用ProtParam网站分析TrkA蛋白的理化特性;利用www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM网站分析TrkA蛋白是否

具有跨膜结构;利用Gneg-mPLoc软件分析TrkA蛋白的细胞定位;运用SignalP 5.0预测TrkA蛋白的信号肽;利用YinOYang1.2预测TrkA蛋白的糖基化位点;利用NetPhos3.1预测TrkA蛋白的磷酸化位点;利用软件分析TrkA蛋白的二级结构;利用Phyre2网站分析TrkA蛋白的三级结构,并使用VMD软件进行查看;利用www.iedb.org网站预测TrkA蛋白的B细胞表位。

2.2 重组质粒pET28a-TrkA的构建 从Pubmed中查找梅毒螺旋体TrkA的DNA序列,并据此设计PCR引物(F: 5'-CCCCATATGGTGAAAAGATTTGCTCTTATTGGACT-3',下划线为NdeI酶切位点; R: 5'-CCAAGCTTTCAGCTGGTAAGGAACCATTGTTT-3'下划线为HindIII酶切位点)。以梅毒螺旋体基因组DNA为模板,以上述引物PCR扩增TrkA基因,操作步骤和条件按大连宝生物公司PrimeSTAR PCR试剂盒说明书。利用NdeI和HindIII将空质粒pET28a和TrkA DNA片段双酶切,回收酶切后的pET28a和TrkA DNA,利用T₄DNA连接酶进行连接,然后利用42℃热激法将连接产物pET28a-TrkA转入大肠埃希菌Top10。利用卡那霉素筛选,挑取阳性菌落到LB液体培养基,然后放入摇床,37℃、200 r/min培养16 h,利用质粒提取试剂盒提取质粒,进行PCR鉴定和测序验证。

2.3 重组TrkA蛋白的表达与纯化 将pET28a-TrkA转化大肠埃希菌BL21,从抗性平板中挑取阳性菌,37℃震荡培养,第2 d按照1:100扩接,当菌液A₆₀₀值为0.5~0.6时,加入终浓度为0.5 mmol/L的IPTG诱导6 h。取菌液以12 000 r/min离心2 min,收集重组菌,PBS溶液洗涤2次;超声破碎,12 000 r/min离心10 min,收集上清,使用Ni²⁺亲和层析纯化TrkA蛋白并进行SDS-PAGE电泳分析。利用多粘菌素B试剂盒去内毒素,采用BSA试剂盒测定TrkA的浓度。

2.4 动物免疫 将BALB/c小鼠随机分为3组,每组6只,分别为TrkA蛋白+弗氏佐剂组,弗氏佐剂组和PBS组。第1次免疫将TrkA蛋白与弗氏完全佐剂按照1:1混合均匀,每只小鼠接种30 μg TrkA蛋白。第2次免疫将TrkA蛋白与弗氏不完全佐剂混匀,每只同样接种30 μg TrkA蛋白。第3次免疫时候与第2次免疫相同。3次免疫的时间分别为第0、2、4周。末次免疫后第2周处死小鼠,取血,分离血清。

2.5 血清抗体滴度测定 采用ELISA法。TrkA蛋白包被浓度为10 μg/ml,免疫兔血清作系列倍比稀释。HRP酶标记羊抗鼠IgG工作浓度按说明书,加显色剂显色15 min后终止反应,用酶标仪测定吸光度

A₄₅₀ 值。

2.6 统计学分析 采用 GraphPad 7.0 软件进行数据分析。组间均数比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结果

1 梅毒螺旋体 TrkA 蛋白的理化性质

生物信息学分析 TrkA 蛋白共有 236 个氨基酸, 分子式 C₁₂₀₉ H₁₉₂₉ N₃₁₇ O₃₄₅ S₁₀, 含有 3 810 个原子数, 相对分子质量为 26.7 ku, 理论等电点为 5.88。在 280 nm 处的消光系数为 1 3075, 吸光系数为 0.489。不稳定指数为 31.07, 表明该蛋白为较稳定蛋白质。亲水性平均系数(GRAVY)为 0.162, 属于亲水性蛋白。

2 梅毒螺旋体 TrkA 蛋白的信号肽、跨膜区和细胞定位

利用 SignalP 5.0 预测梅毒螺旋体 TrkA 蛋白无信号肽(图 1A), TMHMM 软件预测该蛋白无跨膜区(图 1B), Gneg-mPLOC 软件预测该蛋白定位在细菌内膜。

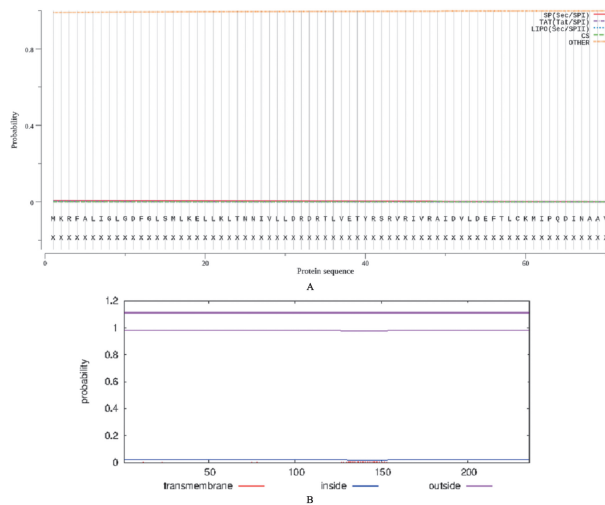


图 1 TrkA 蛋白的信号肽(A)和跨膜区(B)预测
Fig. 1 The signal peptide(A) and transmembrane region(B) of TrkA protein

3 梅毒螺旋体 TrkA 蛋白的磷酸化和糖基化修饰

使用 NetPhos3.1 预测 TrkA 蛋白的磷酸化, 可能有 10 个丝氨酸, 5 个苏氨酸, 3 个酪氨酸磷酸化位点。而 YinOYang1.2 软件预测 TrkA 蛋白无糖基化位点(图 2)。

4 TrkA 蛋白的二、三级结构

采用软件分析梅毒螺旋体 TrkA 蛋白的二级结构含量, 其中 107 个氨基酸为 α 螺旋(h), 占 45.34%; 49 个氨基酸为 β 折叠(e), 占 20.76%; 66 个氨基酸为无规卷曲(C), 占 27.97%; 14 个氨基酸为 β 转角(t), 占 5.93%(图 3)。

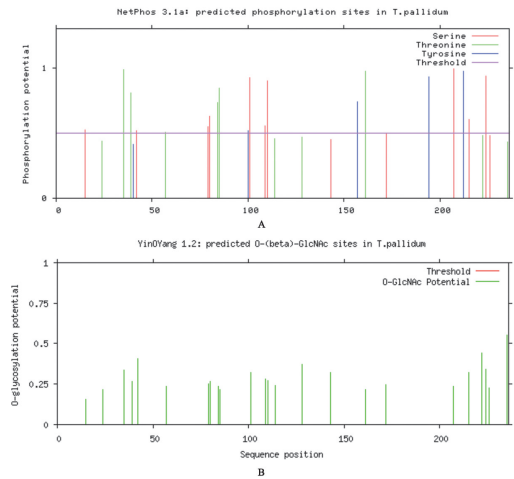


图 2 TrkA 蛋白的磷酸化(A)和糖基化(B)预测
Fig. 2 The phosphorylation(A) and glycosylation(B) sites of TrkA protein



图 3 TrkA 蛋白的二级结构
Fig. 3 The secondary structure of TrkA protein

使用 Phyre2 预测 TrkA 蛋白的三级结构(图 4A), 然后使用 VMD 软件进行看图, 获得空间结构。使用拉氏图(Ramachandran plot)检查结果, 其中 85.5% 的区域为最合理结构, 14.5% 为一般合理区(图 4B)。

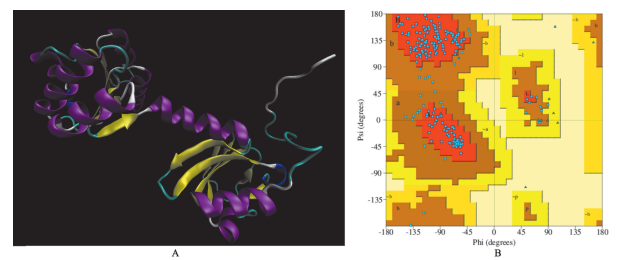


图 4 TrkA 蛋白的三级结构(A)和拉氏图(B)
Fig. 4 The tertiary structure(A) and ramachandran plot(B) of TrkA protein

5 TrkA 蛋白的 B 细胞表位

利用 Bepipred 网站预测 TrkA 蛋白共有 6 个连续的 B 表位, 表位的氨基酸序列、位置及得分见表 1。TrkA 有 4 个非线性表位, 其位置见图 5。

6 TrkA 蛋白的表达与纯化

以 PCR 法验证重组质粒 pET28a-TrkA, 获得 711 bp 左右的 DNA 片段, 与 TrkA 基因的理论大小相符

合(图6)。测序其与NCBI中梅毒螺旋体的TrkA基因序列相一致,重组质粒pET28a-TrkA构建正确。将pET28a-TrkA转化大肠埃希菌BL21,采用IPTG诱导TrkA蛋白表达,SDS-PAGE电泳分析重组蛋白相对分子质量约为29 ku。使用Ni²⁺亲和层析柱进行纯化,得到单一电泳条带的TrkA蛋白(图7)。

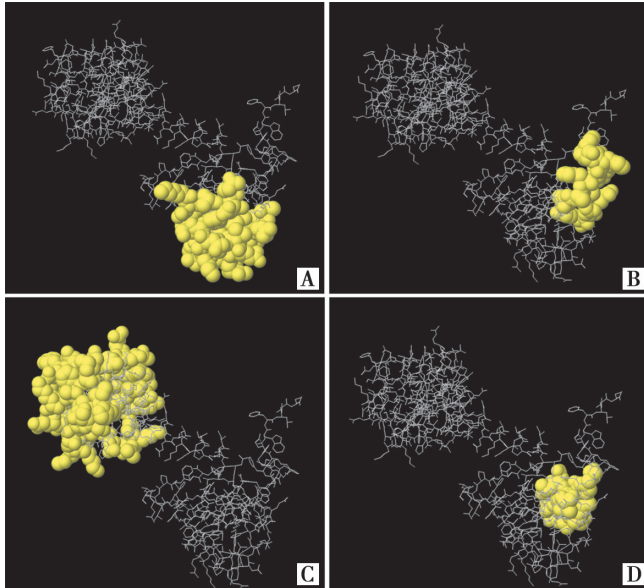
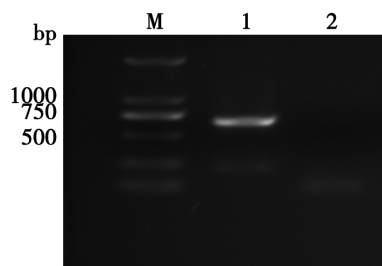


图5 TrkA蛋白非连续表位的空间位置
Fig. 5 Discontinuous epitopes of TrkA protein

表1 TrkA蛋白的连续表位的序列以及位置
Table 1 Locations and sequences of continuous B epitopes in TrkA protein

编号 No.	起点 Start	终点 End	肽段 Peptide	氨基酸数量 Amount of amino acids	得分 Score
1	219	236	LAHTHSFSDFKQWFLTS	18	0.814
2	180	199	KRDAEDFCFINDPEYCFEAN	20	0.74
3	21	26	LKLTNN	6	0.699
4	154	173	HEDYVGRTRLREVDVRKNFSL	20	0.687
5	32	66	RDRTLVEYRSRVIRVRAI DVLDEFTLCKMPQDI	35	0.666
6	85	93	TFLKKLEIA	9	0.619

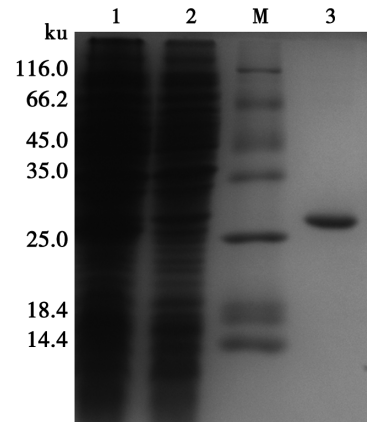


M DNA标志物 1 pET28a-TrkA PCR产物 2 空白对照
图6 重组质粒pET28a-TrkA的PCR检测
M DNA marker 1 PCR product of TrkA gene 2 Control
Fig. 6 PCR detection of recombinant plasmid pET28a TrkA

7 TrkA蛋白多克隆抗体的制备及其滴度

用重组TrkA免疫小鼠,获得多克隆抗体血清。

使用ELISA检测免疫小鼠血清特异抗体滴度为1:25 600,PBS和佐剂对照组小鼠血清中无特异性抗体(图8)。

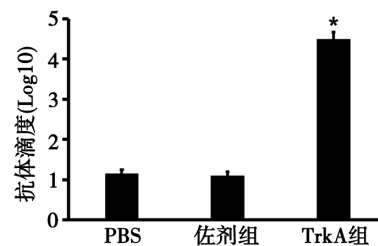


M 蛋白质分子质量标准 1,2 重组菌总蛋白 3 纯化的重组TrkA蛋白

图7 TrkA蛋白的表达与纯化

M Protein marker 1,2 Totalprotein 3 Purified recombinant TrkA protein

Fig. 7 Expression and purification of TrkA protein



注:与PBS组和佐剂组比较,*P<0.05。

图8 重组TrkA免疫小鼠血清抗体滴度(ELISA法)

Notes:Compared with PBS or adjuvant group group,*P<0.05。

Fig. 8 TrkA antibody

讨论

梅毒螺旋体是一种严格宿主内寄生菌,迄今为止尚未能在体外进行无生命培养基中培养^[4]。当梅毒螺旋体在宿主体内生存和增殖时,必须从宿主中获得各种营养物质以及进行生命代谢等基本生命活动^[12]。金属阳离子是生物体的基本组成部分,参与细菌的各种生物过程。细菌中最丰富的阳离子是钾离子,该金属离子也是生物体所必需的微量元素之一。在细菌中,钾离子起维持胞内恒定的pH、渗透压和正常的膜电位等功能^[8]。此外钾离子还能影响胞质内蛋白质的活性,是一种重要的信号分子,能够调节基因表达和调控代谢。与高等动物不同,原核生物中并不存在Na⁺/K⁺泵,而细菌胞内的钾离子浓度通常会高于外界环境,为了控制钾离子的输入与输出,细菌拥有一系列的钾离子转运系统和离子通道等来维持胞内钾离子浓度^[11-13]。

Trk系统是细菌中常见的一种钾离子转运系统,

已在大肠埃希菌、肺炎链球菌和结核分枝杆菌等多种病原菌中发现了 Trk 系统^[14-16]。Trk 系统是一个质子转运系统,通常由跨膜蛋白 TrkH 和结合核苷酸的外周膜蛋白 TrkA 组成^[10,14]。当 TrkA 与 TrkH 结合后,促进钾离子的摄取。Trk 系统受到胞质中的 c-di-AMP 调控,胞质中高浓度的 c-di-AMP 抑制 Trk 系统对钾离子的转运,当 c-di-AMP 结合 TrkA 后,TrkA 与 TrkH 的亲和力下降,两者的结合受到阻遏,从而影响细菌摄取钾离子^[16-17]。TrkA 系统在转运钾离子时候需要 ATP 的参与,当 TrkA 与 ATP 结合时,打开离子通道 TrkH,从外界获取钾离子;当与 ADP 结合时,离子通道关闭^[9-11]。

本研究采用生物学信息学方法分析了梅毒螺旋体 TrkA 蛋白的生物学特性,结果表明 TrkA 蛋白无信号肽,无跨膜结构,定位在梅毒螺旋体内膜,与大肠埃希菌等的 TrkA 蛋白定位相符合。TrkA 蛋白具有多个磷酸化位点,无糖基化位点。Phyre2 软件预测 TrkA 蛋白的三级结构,使用拉氏图检查证实 85.5% 的区域为最合理结构,14.5% 为一般合理区,表明模拟获得的三级结构可信度较高,与真实的空间结构匹配度较高。预测 TrkA 蛋白具有多个 B 细胞表位,其中 6 个连续表位和 4 个非连续表位。构建的重组质粒 pET28a-TrkA 转化 BL21 后经 IPTG 诱导表达重组蛋白 TrkA,纯化的 TrkA 蛋白能诱导小鼠产生特异性 IgG 抗体,这与创伤弧菌 TrkA 蛋白参与介导宿主免疫应答相符^[18]。

生物信息学分析梅毒螺旋体 TrkA 蛋白含有 B 细胞表位,表达的重组 TrkA 蛋白具有良好的抗原性,为研究梅毒螺旋体的致病机制奠定了基础。

【参考文献】

- [1] Plagens-Rotman K, Jarzbek-Bielecka G, Merks P, et al. Syphilis: then and now[J]. Postepy Dermatol Alergol, 2021, 38(4): 550-554.
- [2] Tiecco G, Degli Antoni M, Storti S, et al. A 2021 Update on syphilis: Taking stock from pathogenesis to vaccines[J]. Pathogens, 2021, 10(11): 1364.
- [3] 周湘潭, 刘双全. 梅毒感染患者多系统的临床表现[J]. 中南医学科学杂志, 2020, 48(2): 117-121.
- [4] 谢亚锋, 蒋传好, 吴移谋. 梅毒螺旋体遗传物质和致病机制的研究进展[J]. 微生物学免疫学进展, 2014, 42(3): 72-75.

- [5] Hawley KL, Montezuma-Rusca JM, Delgado KN, et al. Structural modeling of the *Treponema pallidum* outer membrane protein repertoire: a road map for deconvolution of syphilis pathogenesis and development of a syphilis vaccine[J]. J Bacteriol, 2021, 203(15): e0008221.
- [6] 曾铁兵, 陈德军, 何宇星, 等. 梅毒螺旋体黏附素的研究进展[J]. 中国病原生物学杂志, 2021, 16(7): 859-862.
- [7] 张海妮, 寇彩霞, 刘进权, 等. 梅毒疫苗研究进展[J]. 临床皮肤科杂志, 2021, 50(9): 572-576.
- [8] Do EA, Gries CM. Beyond Homeostasis: Potassium and pathogenesis during bacterial infections[J]. Infect Immun, 2021, 89(7): e0076620.
- [9] Cao Y, Pan Y, Huang H, et al. Gating of the TrkH ion channel by its associated RCK protein TrkA[J]. Nature, 2013, 496(7445): 317-322.
- [10] Diskowski M, Mehdipour AR, Wunnicke D, et al. Helical jackknives control the gates of the double-pore K⁺ uptake system KtrAB[J]. Elife, 2017(6): e24303.
- [11] Levin EJ, Zhou M. Recent progress on the structure and function of the TrkH/KtrB ion channel[J]. Curr Opin Struct Biol, 2014(27): 95-101.
- [12] Radolf JD, Deka RK, Anand A, et al. *Treponema pallidum*, the syphilis spirochete: making a living as a stealth pathogen[J]. Nat Rev Microbiol, 2016, 14(12): 744-759.
- [13] Quintero-Yanes A, Monson RE, Salmond G. Environmental potassium regulates bacterial flotation, antibiotic production and turgor pressure in *Serratia* through the TrkH transporter[J]. Environ Microbiol, 2019, 21(7): 2499-2510.
- [14] Cholo MC, Boshoff HI, Steel HC, et al. Effects of clofazimine on potassium uptake by a Trk-deletion mutant of *Mycobacterium tuberculosis*[J]. J Antimicrob Chemother, 2006, 57(1): 79-84.
- [15] Zhang H, Pan Y, Hu L, et al. TrkA undergoes a tetramer-to-dimer conversion to open TrkH which enables changes in membrane potential[J]. Nat Commun, 2020, 11(1): e54.
- [16] Zarrella TM, Metzger DW, Bai G. Stress Suppressor Screening Leads to Detection of Regulation of Cyclic di-AMP Homeostasis by a Trk Family Effector Protein in *Streptococcus pneumoniae* [J]. J Bacteriol, 2018, 200(12): e00045-18.
- [17] 蔡霞, 何进. 第二信使分子 c-di-AMP 调控细菌中钾离子转运的机制[J]. 微生物学报, 2017, 57(10): 1434-1442.
- [18] Chen YC, Chuang YC, Chang CC, et al. A K⁺ uptake protein, TrkA, is required for serum, protamine, and polymyxin B resistance in *Vibrio vulnificus* [J]. Infect Immun, 2004, 72(2): 629-636.

【收稿日期】 2022-02-19 【修回日期】 2022-05-09