

DOI:10.13350/j.cjpb.220117

• 论著 •

沙眼衣原体 T3SS 效应蛋白 CT622 的表达与多克隆抗体制备以及对 HeLa 细胞增殖的影响*

彭彬峰¹, 陈诗诗², 舒明艺³, 陈恩¹, 雷文波^{1,3***}, 刘双全^{1**}

(1. 南华大学衡阳医学院, 附属第一医院, 检验医学中心, 湖南衡阳 421001; 2. 衡阳市中医医院肿瘤内科;
3. 南华大学衡阳医学院病原生物学研究所, 湖南省特殊病原体防控重点实验室)

【摘要】 目的 原核表达沙眼衣原体 (*Chlamydia trachomatis*, Ct) CT622 蛋白, 制备 CT622 多克隆抗体, 初步探讨 CT622 蛋白对 HeLa 细胞增殖的影响, 为进一步阐明 CT622 蛋白在沙眼衣原体致病中的作用提供实验依据。方法 以 Ct D 型基因组为模板构建原核表达重组载体 pGEX-6p-1/CT622; 重组载体经 IPTG 诱导表达, Glutathione Sepharose 4B beads 纯化 GST-CT622 融合蛋白, PreScission Protease 酶切除 GST 标签后获取纯化的 CT622 蛋白; 将纯化的 CT622 蛋白去内毒素处理后, 经皮下免疫新西兰兔获取抗 CT622 抗体, 采用抗原亲和纯化层析柱进行抗体纯化, BCA 测定抗体浓度, SDS-PAGE 鉴定多克隆抗体纯度, ELISA 检测抗体效价; 用不同浓度的 CT622 蛋白处理 HeLa 细胞 24 h, CCK-8 细胞活性检测试剂盒检测细胞存活率(%)。结果 成功表达并纯化了 CT622 蛋白, 该蛋白最佳表达条件为 IPTG 终浓度 0.8 mol/L, 30 °C、180 r/min 条件下诱导 4 h。制备兔源性抗 CT622 多克隆抗体, 纯化后抗 CT622 抗体浓度为 0.75 mg/ml, 纯度 >70%, ELISA 检测免疫血清抗体效价为 1:512 000 左右; 经 1~15 μg/ml 浓度梯度的 CT622 蛋白处理 HeLa 细胞后, 其细胞存活率高于对照组。结论 成功表达、纯化了沙眼衣原体 CT622 蛋白, 制备了高效价兔源性抗 CT622 抗体。在一定浓度范围内, CT622 蛋白能促进 HeLa 细胞的增殖。

【关键词】 沙眼衣原体; CT622; 原核表达; 多克隆抗体; 细胞增殖

【中图分类号】 R374

【文献标识码】 A

【文章编号】 1673-5234(2022)01-0081-06

[Journal of Pathogen Biology. 2022 Jan; 17(1):81-86.]

Expression of and preparation of polyclonal antibodies against the *Chlamydia trachomatis* T3SS effector CT622 and its effect on the proliferation of HeLa cells

PENG Bin-feng¹, CHEN Shi-shi², SHU Ming-yi³, CHEN En¹, LEI Wen-bo^{1,3}, LIU Shuang-quan¹ (1. The First Affiliated Hospital, Department of Laboratory Medicine, Hengyang Medical School, University of South China, Hengyang, Hunan 421001, China; 2. Department of Medical Oncology, Traditional Chinese Medicine Hospital of Hengyang; 3. Department of Institute of Pathogenic Biology, Hunan Provincial Key Laboratory for Special Pathogens Prevention and Control, Hengyang Medical School, University of South China)***

【Abstract】 **Objective** A prokaryotic expression vector was used to express *Chlamydia trachomatis* CT622 protein, and the purified protein was used to immunize New Zealand rabbits to prepare CT622 polyclonal antibodies. The effect of the CT622 protein on the proliferation of HeLa cells was also analyzed. This study will provide experimental evidence to clarify the role of the CT622 protein in the pathogenesis of *C. trachomatis*. **Methods** The Ct D genome was used as a template to construct the prokaryotic expression recombinant vector pGEX-6p-1/CT622. Expression of the recombinant vector was induced with IPTG, the GST-CT622 fusion protein was purified using Glutathione Sepharose™ 4B Beads, and then the GST tag was removed with PreScission Protease to obtain purified CT622 protein. After the endotoxin was removed, New Zealand rabbits were subcutaneously immunized to obtain anti-CT622 antibodies, and the antibodies were purified on an antigen affinity purification column. The concentration of anti-CT622 antibodies was determined using BCA, the purity of the purified CT622 protein polyclonal antibody was identified using SDS-PAGE, and then the antibody titer was determined ELISA. After HeLa cells were stimulated with different concentrations of the CT622 protein for 24 h, cell viability was analyzed using a CCK8 detection kit. **Results** The CT622 protein was successfully expressed and

* **【基金项目】** 国家自然科学基金项目(No. 31900160); 湖南省自然科学基金项目(No. 2019JJ50554); 湖南省委组织部“湖湘青年英才”人才支持计划项目(No. 201RHX002)。

** **【通讯作者】** 雷文波, E-mail: Leiwenbo2008@126.com; 刘双全, E-mail: dantelliu@163.com

【作者简介】 彭彬峰(1996-), 男, 湖南衡阳人, 硕士研究生, 主要从事病原体快速诊断及致病机制研究。E-mail: 1300073823@qq.com
彭彬峰和陈诗诗为共同第一作者

purified. The final concentration of IPTG was 0.8 mol/L, and optimal conditions for inducing expression were 30 °C and 180 r/min for 4 h. Rabbit-derived anti-CT622 polyclonal antibodies was prepared. After purification, the concentration of the anti-CT622 antibodies was 0.75 mg/mL, and the purity was over 70%. The serum titer of the antibodies in immunized rabbits was about 1:512 000. After HeLa cells were treated with the CT622 protein in a concentration gradient of 1-15 μg/mL, the cell survival rate was higher than that in the control group. **Conclusion** The CT622 protein of *C. trachomatis* was successfully expressed and purified, and high-titer rabbit-derived anti-CT622 antibodies were prepared. The CT622 protein promotes HeLa cell proliferation.

【Key words】 *Chlamydia trachomatis*; CT622; prokaryotic expression; polyclonal antibody; cell proliferation

沙眼衣原体(*Chlamydia trachomatis*, Ct)是一种专性细胞内寄生革兰阴性病原体,感染后会导致失明和泌尿生殖道疾病,严重危害人类生命健康。Ct是导致传播感染疾病常见病原体^[1],全球每年有超过1.3亿人被感染^[2]。尽管患者常表现为不典型症状,但生殖道衣原体感染是导致盆腔炎、输卵管因素不孕和异位妊娠的主要原因^[3]。同时,Ct的感染也会促进HIV的传播,并与宫颈癌的发病密切相关^[4]。然而,Ct的致病机制目前尚不完全清楚,因此研究Ct的致病机制,阐明其相关毒力因子的致病性,研发防治Ct新型疫苗与靶点药物,对预防和控制Ct感染性疾病具有十分重要的意义。

Ct作为严格的胞内寄生病原体,在其整个生长发育过程中,需完全依赖于宿主细胞的营养物质。目前,Ct已进化出逃避宿主免疫系统攻击的机制,并可在宿主上皮细胞内持续感染^[5]。研究表明,Ct通过分泌一些效应蛋白与宿主细胞相互作用,进而改变宿主细胞生物学行为,以完成在宿主细胞包涵体内的正常生长发育^[6]。在整个感染周期,Ct使用III型分泌系统(Type III Secretion System, T3SS)将其效应蛋白转运至宿主细胞胞浆及包涵体膜上或包涵体腔隙^[6-7],进而操控宿主细胞信号通路,逃避宿主免疫防御,获取胞内营养物质,建立适于生存的亚细胞环境,完成自身生长发育^[5,8,9]。研究表明,CT622蛋白是一种T3SS分泌性效应蛋白,且在Ct生长周期及致病过程中起重要作用^[10-11]。目前,对于T3SS效应蛋白CT622蛋白在Ct致病过程中扮演的角色尚有待进一步阐明。

本研究采用基因工程技术构建CT622原核表达载体,纯化CT622蛋白并获取其多克隆抗体;运用CCK-8分析CT622蛋白对宿主细胞增殖的影响,初步探讨Ct T3SS效应蛋白CT622的功能,为进一步阐明CT622在Ct致病机制中的作用提供实验依据。

材料与amp;方法

1 材料

1.1 细胞与质粒 pGEX-6p-1原核表达载体为南华大学衡阳医学院病原生物学研究所保存;HeLa-299细胞株购自中科院上海细胞库。

1.2 主要试剂 T4 DNA连接酶和限制性内切酶购自日本TaKaRa公司;PreScission Protease和Glutathione Sepharose 4B试剂盒购于美国GE Healthcare公司;Endotoxin Removal Kit内毒素去除试剂盒购于上海翊圣生物科技有限公司;Protein Marker购于美国Thermo公司;IPTG和弗氏佐剂购于美国Sigma公司;RIPA细胞裂解液和BCA蛋白浓度测定试剂盒购于康为世纪公司;PAGE凝胶快速制备试剂盒(12.5%)购于上海雅酶生物医药科技公司;羊抗兔HRP二抗购于美国CST公司;ECL蛋白印迹法检测试剂盒购于美国Pierce公司;其他试剂均为国产分析纯。

2 方法

2.1 CT622蛋白的基因克隆及载体构建 从GenBank数据库(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>)查询CT622基因序列,该基因的GenBank序列号为NC_000117.1。分别选择BamHI和NotI为上游和下游引物的酶切位点,并加上保护性碱基,CT622引物序列如下:

CT622-F: 5' - CGCGGATCCATGGAATCAG-GACCAGAATCA-3'(下划线部分为BamHI酶切位点);CT622-R: 5' - AAAGGAAAAGCGGCCGCTTA-AGAAAGATAACCAGAGAATA-3'(下划线部分为NotI酶切位点)。

以Ct D型基因组为模板,以CT622特异性引物PCR扩增CT622基因,构建原核表达重组载体pGEX-6p-1/CT622;pGEX-6p-1/CT622重组载体经PCR、双酶切后转化至BL21 *E. coli*进行PCR和测序鉴定。

2.2 CT622蛋白的原核表达 取pGEX-6p-1/CT622重组菌接种至含有Amp抗性的LB固体培养基,37 °C恒温培养箱培养过夜;挑取单个阳性菌落,接种至含有Amp抗性的LB液体培养基,37 °C、220 r/min水浴摇床振荡培养过夜;分别设置不同温度和不同IPTG诱导浓度,按1:100(vol/vol)的比例扩大培养,4 °C、4 000 r/min(离心半径9.54 cm)离心20 min,收集沉淀备检。

2.3 CT622 蛋白的纯化与鉴定 取上述重组菌沉淀超声破碎后离心收集上清,加入 500 μ l Glutathione SepharoseTM 4B Beads,充分摇匀,置于 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜; 4 $^{\circ}$ C、2 000 r/min(离心半径 8.31 cm)离心 10 min,弃上清,在沉淀中加入预冷 PBS 洗涤 6 次;SDS-PAGE 电泳鉴定 CT622 蛋白纯度。

2.4 GST-CT622 融合蛋白 GST 标签的切除 在上述沉淀中加入 2 ml 含 PreScission Protease(酶)的 PreScission cleavage buffer(pH 7.0),充分混匀,4 $^{\circ}$ C 孵育 17 h;4 $^{\circ}$ C、2000 r/min(离心半径 8.31 cm)离心 10 min,收集上清至灭菌的 EP 管,并留取沉淀,在沉淀中加入 200 μ l PBS,充分混匀再离心 10 min,收集上清。重复 3 次。将以上收集的上清液混合即为纯化蛋白。

2.5 目的蛋白的 Western blot 鉴定 取上述纯化的 CT622 蛋白,进行 12.5% SDS-PAGE 电泳,转膜后用 5%(m/v)脱脂牛奶室温下封闭 2 h,以免源性抗 CT622 蛋白抗体(1:400)为一抗,HRP 标记的抗兔 IgG(1:2 000)为二抗进行 Western blot 分析。

2.5 CT622 蛋白对 HeLa 细胞增殖的影响 将生长状态良好的 HeLa 细胞接种于细胞培养板中,置于含 5% CO₂ 的细胞培养箱中培养,当细胞融合度为 70%~80%时,分别用不同浓度的 CT622 蛋白处理 HeLa 细胞 24 h,用 CCK-8 试剂盒检测经 CT622 蛋白处理后的细胞存活率(%)。

2.7 CT622 蛋白多克隆抗体的制备 将纯化的 CT622 蛋白作去内毒素处理,BCA 法测定浓度与弗氏完全佐剂超声乳化,皮下免疫新西兰兔(体重 2~2.5 kg),400 μ g/次。2~3 周免疫 1 次,共免疫 3 次。末次免疫 7 d 后采血,采用间接 ELISA 检测抗血清针对 CT622 蛋白的效价,待效价 >1:50 000 后采血,制备抗血清。将 CT622 蛋白与琼脂糖介质偶联制备成抗原亲和和纯化层析柱,将制备的抗血清与 PBS 等量混合后缓慢上样,待抗体结合后用甘氨酸洗脱缓冲液洗脱,得到纯化抗体。纯化抗体在 PBS 中 4 $^{\circ}$ C 透析过夜,BCA 测定抗体蛋白浓度,SDS-PAGE 电泳鉴定抗体纯度。

2.8 CT622 蛋白多克隆抗体效价测定 用 PBS 包被液将 CT622 蛋白抗原稀释成需要的浓度,混匀后加入 ELISA 板条中,每孔 100 μ l,4 $^{\circ}$ C 冰箱过夜,洗板 3 次;每孔加入 200 μ l 封闭液,37 $^{\circ}$ C 恒温箱 1 h,洗板 1 次;将免疫兔血清按 1:500 作为起始稀释浓度,并做 2 倍比稀释,每孔加入 100 μ l,37 $^{\circ}$ C 恒温箱 1 h,洗板 3 次;每孔中加入 100 μ l 山羊抗兔-HRP(1:50 000),37 $^{\circ}$ C 恒温箱 1 h,洗板 4 次;每孔加入 100 μ l TMB 显色液,37 $^{\circ}$ C 避光孵育 15 min;每孔加入 100 μ l 终止液终

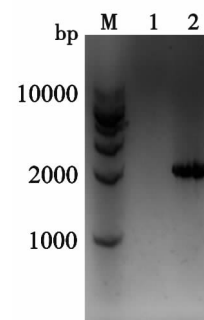
止反应。即刻在酶标仪上读取 A₄₅₀ 值,将 A₄₅₀ 值大于设定的阴性对照 A₄₅₀ 值的 2.1 倍的孔对应的稀释度定为免疫兔血清的抗体效价。

2.9 数据处理与统计学分析 采用 Quantity One 4.6.2 软件进行灰度值分析,采用 SPSS18.0 统计软件进行数据分析, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。采用软件 GraphPad Prism 8 制作统计图。

结果

1 沙眼衣原体 CT622 蛋白基因的克隆与载体构建

1.1 *ct622* 目的基因的 PCR 扩增 以 Ct D 型基因组为模板,以 *ct622* 特异性引物 PCR 扩增 *ct622* 基因,扩增产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳分析,大小约为 2 000 bp,与预期片段大小相符(图 1)。



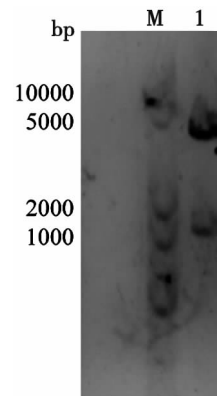
M DNA 标志物 1 Control 2 *ct622* 基因 PCR 产物

图 1 *ct622* 基因 PCR 扩增产物 1.5% 琼脂糖凝胶电泳分析

M DNA marker 1 Control 2 PCR amplification products of *ct622* gene

Fig. 1 PCR amplification products of *ct622* gene analysed by agarose gel

1.2 pGEX-6p-1/CT622 重组载体双酶切鉴定 取重组转化菌 BL21,接种于 3 ml LB(Amp⁺)固体培养基中扩大培养。提取 pGEX-6p-1/CT622 重组质粒,将重组质粒经 *Bam*HI 与 *Not*I 双酶切后进行 1.5% 琼脂糖凝胶电泳,得到 5 000 bp 和 2 000 bp 的酶切片段(图 2),与预期的片段大小相符,重组质粒转化成功。



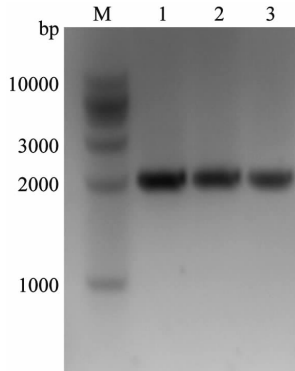
M DNA 标志物 1 pGEX-6p-1/CT622 双酶切

图 2 pGEX-6p-1/CT622 重组载体双酶切鉴定

M DNA marker 1 Restriction digestion of pGEX-6p-1/CT622 recombinant vector

Fig. 2 The recombinant vector of pGEX-6p-1/CT622 was identified by restriction digestion

1.3 pGEX-6p-1/CT622 原核表达载体的 PCR 鉴定
以重组菌液为模板,以 *ct622-F* 和 *ct622-R* 为特异性引物进行 PCR 扩增,扩增产物进行 1.5% 琼脂糖凝胶电泳分析,大小为 2 000 bp(图 3),与预期大小(1 944 bp)相符,表明质粒转化成功。



M DNA 标志物 1~3 pGEX-6p-1/CT622 原核表达载体 PCR 扩增产物

图 3 pGEX-6p-1/CT622 原核表达载体菌液 PCR 鉴定

M DNA marker 1-3 PCR amplification product of pGEX-6p-1/CT622 prokaryotic expression vector

Fig. 3 The prokaryotic expression vector of pGEX-6p-1/CT622 was identified by PCR

1.4 pGEX-6p-1/CT622 重组质粒测序鉴定 提取重组菌质粒后测序,将测序结果与 GenBank 中的 *ct622* 基因序列进行 BLAST 比对,结果吻合(图 4),重组质粒构建正确。

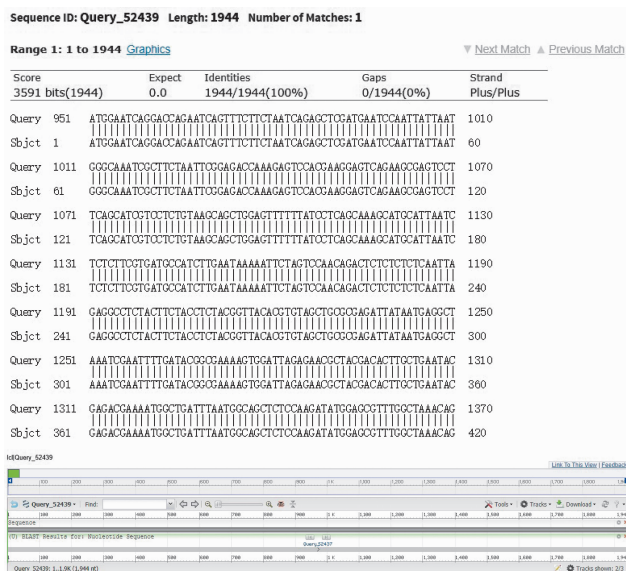
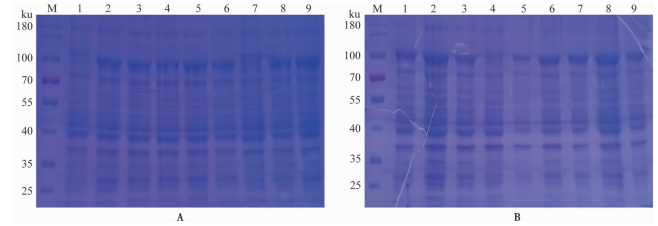


图 4 pGEX-6p-1/CT622 重组质粒测序鉴定及 Blast 比对分析
Fig. 4 Alignment of pGEX-6P-1 /CT622 recombinant plasmid to the sequence from theGenBank

2 CT622 蛋白的原核表达、纯化与鉴定

2.1 GST-CT622 融合蛋白的原核表达 将 pGEX-6p-1/CT622 转化 BL21 菌经不同温度和不同 IPTG 浓度(0.0、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mmol/L)诱导表达

后,SDS-PAGE 电泳检测目的蛋白的表达,结果见图 5。表达产物分子质量单位约为 100 ku,与目的蛋白理论大小一致。其中在终浓度为 0.8 mmol/L 的 IPTG,30 ℃、180 r/min 诱导 4 h 时 GST-CT622 融合蛋白表达较明显。



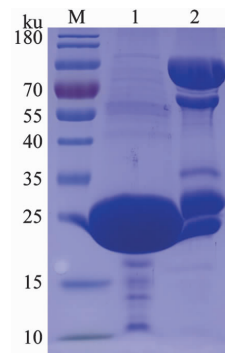
A M 蛋白分子质量标准 1~6 25 ℃条件下不同浓度 IPTG 诱导 4 h 7~9 30 ℃条件下不同浓度 IPTG 诱导 4 h B M Marker 1~3 30 ℃条件下不同浓度的 IPTG 诱导 4 h 4~9 37 ℃条件下不同浓度 IPTG 诱导 4 h

图 5 不同条件诱导 GST-CT622 融合蛋白的原核表达

A M Marker 1-6 Induced by different concentrations of IPTG for 4 hours at 25 ℃; 7-9 Induced by different concentrations of IPTG for 4 hours at 30 ℃ B M Marker 1-3 Induced by different concentrations of IPTG for 4 hours at 30 ℃ 4-9 Induced by different concentrations of IPTG for 4 hours at 37 ℃

Fig. 5 The expression of GST-CT622 fusion protein under different conditions

2.2 GST-CT622 融合蛋白的纯化 IPTG 诱导 4 h 的重组菌超声破碎上清经 Glutathione Sepharose™ 4B Beads 纯化后,取树脂沉淀作 SDS-PAGE 电泳鉴定,结果如图 6。pGEX-6p-1 空载体组在 25 ku 处有一明显条带,pGEX-6p-1/CT622 重组菌组在 100 ku 处有一明显条带,与预期大小一致。



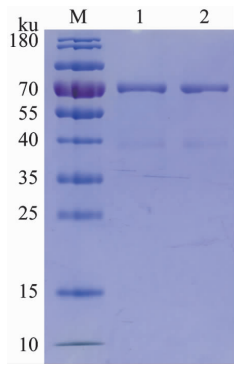
M 蛋白分子质量标准 1 pGEX-6p-1 空载体组 2 pGEX-6p-1/CT622 重组菌组

图 6 SDS-PAGE 分析 GST-CT622 融合蛋白

M Marker 1 pGEX-6p-1 empty vector group 2 pGEX-6p-1/CT622 recombinant bacteria group

Fig. 6 The expression of GST-CT622 recombinant protein was identified by SDS-PAGE

2.3 GST-CT622 融合蛋白 GST 标签的切除 在上述树脂沉淀中加入含 PreScission Protease 酶的 PreScission cleavage buffer,充分混匀,离心收集上清进行 SDS-PAGE 凝胶电泳,在 70 ku 处有一明显条带(图 7),与预期大小(69 ku)相符。

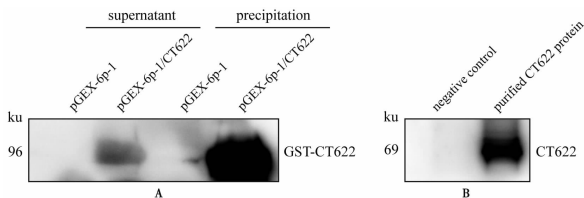


M 蛋白分子质量标准 1、2 纯化后 CT622 蛋白
图 7 SDS-PAGE 电泳分析切割 GST 标签后的 CT622 蛋白

M Marker 1、2 CT622 protein after purification

Fig. 7 The CT622 protein after cutting the GST tag was analyzed by SDS-PAGE

2.4 Western blot 鉴定 CT622 蛋白 取上述 GST-CT622 融合蛋白和纯化的 CT622 蛋白, 以兔源性抗 CT622 蛋白抗体为一抗, HRP 标记的抗鼠和抗兔 IgG 为二抗进行 Western blot, 结果见图 8。在相应的位置处出现抗原抗体反应条带, 即纯化的 CT622 能被兔源性抗 CT622 抗体识别。



A Western blot 检测 GST-CT622 融合蛋白 B Western blot 检测切割 GST 标签后的 CT622 蛋白

图 8 纯化后的 CT622 蛋白的 Western blot 分析

A GST-CT622 fusion protein was detected by Western blot B The CT622 protein after cutting the GST tag was detected by Western blot

Fig. 8 The purified CT622 protein was analyzed by Western blot

3 CT622 蛋白对 HeLa 细胞增殖的影响

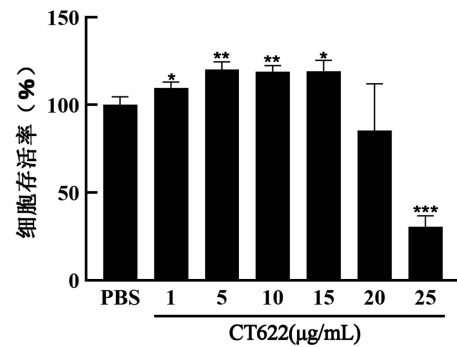
用不同浓度的 CT622 蛋白处理 HeLa 细胞 24 h 后, 采用 CCK-8 细胞活性检测试剂盒检测经 CT622 蛋白刺激后的细胞存活率(%). 结果如图 9, 经 1~15 $\mu\text{g/ml}$ 浓度梯度的 CT622 蛋白刺激 HeLa 细胞 24 h 后, HeLa 细胞存活率高于 PBS 对照组。

4 CT622 蛋白多克隆抗体的制备、鉴定与效价检测

4.1 CT622 蛋白多克隆抗体的制备 纯化的 CT622 蛋白经去内毒素处理后与弗氏完全佐剂超声乳化, 皮下免疫新西兰兔, 2~3 周免疫 1 次。将 CT622 蛋白与琼脂糖基质偶联制备成抗原亲和纯化层析柱进行免疫兔血清抗体纯化。BCA 测定 CT622 蛋白抗体浓度为 0.75 mg/ml。

4.2 CT622 蛋白多克隆抗体的鉴定 将纯化抗体进行 SDS-PAGE 电泳分析, 显示分子质量单位为 55 ku

的单一条带(图 10)。经 Quantity One 软件进行灰度值分析, 纯化抗体纯度 >70%。

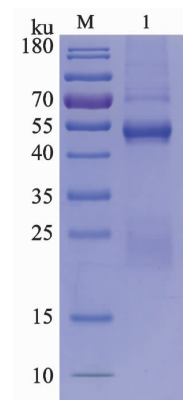


注: 与 PBS 对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。

图 9 CCK-8 检测 CT622 蛋白对 HeLa 细胞增殖的影响

Note: Compared with the PBS control group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。

Fig. 9 The effect of CT622 protein on HeLa cell proliferation was detected by CCK-8



M 蛋白分子质量标准 1 CT622 蛋白多克隆抗体

图 10 纯化 CT622 蛋白多克隆抗体的 SDS-PAGE 电泳分析

M Marker 1 CT622 protein polyclonal antibody

Fig. 10 The purified polyclonal antibody of CT622 was identified by SDS-PAGE

4.3 ELISA 检测 CT622 蛋白多克隆抗体效价

ELISA 检测 CT622 蛋白免疫新西兰兔抗血清效价为 1 : 512 000 时, 其中阴性对照 A_{450} 值为 0.108(表 1)。

表 1 ELISA 检测 CT622 蛋白多克隆抗体效价
Table 1 Detection of CT622 protein polyclonal antibody titer by ELISA

编号 No.	免疫兔血清稀释度 Serum dilution of immunized rabbits	A_{450} 值 A_{450} value
1	1 : 500	3.299
2	1 : 1 000	3.330
3	1 : 2 000	3.153
4	1 : 4 000	3.095
5	1 : 8 000	2.946
6	1 : 16 000	2.804
7	1 : 32 000	2.794
8	1 : 64 000	2.553
9	1 : 128 000	2.109
10	1 : 256 000	1.881
11	1 : 512 000	1.229

讨 论

Ct 为专性细胞内寄生原核细胞型微生物,具有独特的发育周期,为了完成其在细胞质内的生长发育,Ct 通过将效应分子分泌到宿主细胞中,参与调控宿主细胞信号通路^[12-13],以获取必要的营养物质和能量。Ct 通过 III 型分泌系统(T3SS)分泌效应蛋白与宿主细胞相互作用是其致病的关键。T3SS 主要的功能是通过与宿主细胞膜接触将病原体效应蛋白转运到宿主细胞胞浆^[14],与宿主细胞相互作用,从而参与宿主细胞一些关键信号通路的调控,如细胞骨架、细胞运输、细胞炎症、细胞死亡与存活以及 NF- κ B 和 MAPK 信号传导^[15]。研究表明,CT622 蛋白是一种 T3SS 分泌性效应蛋白^[16],且 CT622 的表达缺失严重影响 Ct 的生长,并显著降低其感染性^[11]。目前,对于 T3SS 效应蛋白 CT622 蛋白在 Ct 致病过程中扮演的角色尚有待进一步阐明。

有研究显示,Ct 能够抑制细胞的凋亡以完成自身生长发育^[17-18]。Zou 等^[19]报道,Ct 质粒蛋白 pGP3 通过激活 PI3K/AKT 信号通路介导 MDM2-p53 相互作用轴抑制 HeLa 细胞凋亡。这些研究均表明 Ct 可通过分泌效应蛋白影响宿主细胞的死亡途径。本研究通过 CCK-8 分析 CT622 蛋白对细胞增殖的影响,发现经 CT622 蛋白处理的细胞存活率高于对照组,表明 CT622 可能参与 Ct 抑制宿主细胞死亡途径的调控,对于该蛋白抑制细胞凋亡的作用还有待进一步证实。

本研究通过原核表达并纯化 CT622 效应蛋白,制备了抗兔多克隆抗体。经 ELISA 检测免疫兔血清抗体效价在 1 : 512 000 左右,纯化抗 CT622 抗体浓度为 0.75 mg/ml,纯度在 70% 以上,为研发防治 Ct 新型疫苗与靶点药物奠定了基础。同时本研究结果显示,CT622 蛋白能促进 HeLa 细胞的增殖,然而 CT622 蛋白操纵宿主细胞死亡及相关信号通路仍然不完全清楚,关于 Ct T3SS 效应蛋白 CT622 对细胞增殖、细胞凋亡的影响有待进一步阐明。

【参考文献】

[1] AL-fouzan A, AL-mutairi N. Overview of incidence of sexually transmitted diseases in Kuwait [J]. Clin Dermatol, 2004, 22(6): 509-512.

[2] Rother M, Gonzalez E, da Costa AR, et al. Combined human genome-wide RNAi and metabolite analyses identify IMPDH as a host-directed target against *Chlamydia* infection [J]. Cell Host Microbe, 2018, 23(5): 661-671.

[3] Witkin SS, Minis E, Athanasiou A, et al. *Chlamydia trachomatis*: the Persistent Pathogen [J]. Clin Vaccine Immunol, 2017, 24(10): e00203-17.

[4] Malhotra M, Sood S, Mukherjee A, et al. Genital *Chlamydia tra-*

chomatis: an update [J]. Indian J Med Res, 2013, 138(3): 303-316.

- [5] Olive AJ, Haff MG, Emanuele MJ, et al. *Chlamydia trachomatis*-induced alterations in the host cell proteome are required for intracellular growth [J]. Cell Host Microbe, 2014, 15(1): 113-124.
- [6] Mueller KE, Plano GV, Fields KA. New frontiers in type III secretion biology: the *Chlamydia* perspective [J]. Infect Immun, 2014, 82(1): 2-9.
- [7] Elwell C, Mirrashidi K, Engel J. *Chlamydia* cell biology and pathogenesis [J]. Nat Rev Microbiol, 2016, 14(6): 385-400.
- [8] Pais SV, Key CE, Borges V, et al. CteG is a *Chlamydia trachomatis* effector protein that associates with the Golgi complex of infected host cells [J]. Sci Rep, 2019, 9(1): 6133.
- [9] Chumduri C, Gurumurthy RK, Zietlow R, et al. Subversion of host genome integrity by bacterial pathogens [J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2016, 17(10): 659-673.
- [10] Hamaoui D, Coss MM, Mohan J, et al. The *Chlamydia* effector CT622/TaiP targets a nonautophagy related function of ATG16L1 [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2020, 117(43): 26784-26794.
- [11] Coss MM, Barta ML, Fisher DJ, et al. The Loss of Expression of a Single Type 3 Effector (CT622) Strongly Reduces *Chlamydia trachomatis* Infectivity and Growth [J]. Front Cell Infect Microbiol, 2018, 8: 145.
- [12] Valdivia RH. *Chlamydia* effector proteins and new insights into chlamydial cellular microbiology [J]. Curr Opin Microbiol, 2008, 11(1): 53-59.
- [13] Weber MM, Faris R. Subversion of the Endocytic and Secretory Pathways by Bacterial Effector Proteins [J]. Front Cell Dev Biol, 2018, 6: 1.
- [14] Nans A, Kudryashev M, Saibil HR, et al. Structure of a bacterial type III secretion system in contact with a host membrane in situ [J]. Nat Commun, 2015, 6: 10114.
- [15] Pinaud L, Sansonetti PJ, Phalipon A. Host Cell Targeting by Enteropathogenic Bacteria T3SS Effectors [J]. Trends Microbiol, 2018, 26(4): 266-283.
- [16] Gong S, Lei L, Chang X, et al. *Chlamydia trachomatis* secretion of hypothetical protein CT622 into host cell cytoplasm via a secretion pathway that can be inhibited by the type III secretion system inhibitor compound 1 [J]. Microbiology (Reading), 2011, 157(Pt 4): 1134-1144.
- [17] Byrne GI, Ojcius DM. *Chlamydia* and apoptosis: life and death decisions of an intracellular pathogen [J]. Nat Rev Microbiol, 2004, 2(10): 802-808.
- [18] Al-zeer MA, Xavier A, Abu lubad M, et al. *Chlamydia trachomatis* prevents apoptosis via activation of PDPK1-MYC and enhanced mitochondrial binding of hexokinase II [J]. EBio Med, 2017(23): 100-110.
- [19] Zou Y, Lei W, Su S, et al. *Chlamydia trachomatis* plasmid-encoded protein Pgp3 inhibits apoptosis via the PI3K-AKT-mediated MDM2-p53 axis [J]. Mol Cell Biochem, 2019, 452(1-2): 167-176.

【收稿日期】 2021-08-23 【修回日期】 2021-11-03