

## Cpn0585 蛋白的免疫活性及血清学诊断初步评价

李 波<sup>1</sup>, 刘良专<sup>2</sup>, 刘 磊<sup>3</sup>, 罗金花<sup>4</sup>, 贺志国<sup>1</sup>

(1. 南华大学第三附属医院 内二科, 湖南 衡阳 421900; 2. 南华大学 病原生物学研究所;  
3. 南华大学第三附属医院 检验科; 4. 南华大学第三附属医院 内一科)

**摘要:** **目的** 克隆肺炎嗜衣原体包涵体膜蛋白 Cpn0585 基因, 初步探讨其在血清学诊断中的应用价值。  
**方法** 构建 pGEX-6p-2/Cpn0585 重组质粒, 诱导表达并纯化重组蛋白, 免疫 BALB/c 小鼠, 间接酶联免疫吸附试验 (ELISA) 检测小鼠血清抗体滴度, 以重组蛋白作为 ELISA 包被抗原检测血清中 Cpn IgG 抗体和检测 36 份 Cpn -/Ct + IgG 阳性参考血清。  
**结果** 高效表达和纯化出一相对分子质量约为 95 kDa 的重组蛋白, 蛋白质印迹法证明其能与抗 Cpn IgG 抗体发生反应; 在被免疫的 BALB/c 小鼠体内, 特异性 IgG 抗体的滴度为 1:12 800; 检测 104 例临床血清标本中的 IgG 抗体, 与以色列 Savyon Diagnostics 公司 SeroCP™ IgG ELISA 诊断试剂盒的检测结果进行比较, 符合率为 98.3%。  
**结论** 表达的 Cpn0585 重组蛋白具有良好的免疫活性, 在 Cpn 的血清学诊断中具有较高的应用价值。

**关键词:** 肺炎嗜衣原体; Cpn0585; 免疫活性; 血清学诊断

中图分类号: R374.3 文献标识码: A 文章编号: 2095-1116(2011)05-0524-05

## Preliminary Evaluation of Immunocompetence and Serological Diagnosis of Cpn0585 Protein

LI Bo, LIU Liang-zhuan, LIU Lei, et al

(The Third Affiliated Hospital, University of South China, Hengyang, Hunan 421001, China)

**Abstract:** **Objective** To clone and express the Cpn0585 gene from *Chlamydomydia pneumoniae* e. and then evaluate the clinical value of the recombinant protein in serodiagnosis. **Methods** The pGEX-6p-2/Cpn0585 recombinant plasmid was constructed, and then expression of recombinant protein was induced. The expressed recombinant protein was identified by SDS-PAGE. BALB/c rats were immunized with the purified protein; indirect ELISA was applied to measuring its immunogenicity; and its immunoreactivity was analyzed by reacting with Cpn-specific IgG antibody in sera. Cpn IgG and *Chlamydozoa trachomatis* positive sera were detected with indirect ELISA. **Results** The recombinant protein with relative molecular weight about 95 kDa was expressed and purified effectively. Western blot analysis proved that the recombinant protein could react with human anti Cpn IgG specifically. The titer of the specific IgG antibodies in the immunized BALB/c rats was above 1:12 800. The compliance rate between the indirect ELISA test and SeroCP™ IgG ELISA kits to 104 patients sera were 98.3%. **Conclusion** The expressed recombinant protein of Cpn0585 from Cpn shows excellent immunocompetence. It is suitable for preparation of serodiagnostic ELISA reagent for Cpn infection.

**Key words:** *chlamydomydia pneumoniae*; Cpn0585; immunocompetence; serodiagnosis

肺炎嗜衣原体 (*Chlamydomydia pneumoniae*, Cpn) 是一类细胞内寄生, 具有独特发育周期的原核细胞型微生物。人群 Cpn 感染极为普遍, 感染率可

达到 50% ~ 70%<sup>[1-3]</sup>, Cpn 大部分感染者呈隐性感染, 病原体可在体内持续存在, 造成人体多系统、多器官的慢性病理损害<sup>[4-6]</sup>。但是, 目前对 Cpn 感染

尚无高效的检测手段,因此有必要建立简便快速、高度特异和敏感的诊断方法,为 Cpn 感染的早期诊断提供实验依据。

Cpn 检测方法迄今已建立多种<sup>[7-9]</sup>,包括病原分离培养、PCR、血清学诊断方法等。由于 Cpn 严格细胞内寄生,在培养过程中易受细胞碎片污染而导致阳性率下降,是公认较难培养的衣原体种<sup>[10,11]</sup>,故培养法不适合作为常规诊断。PCR 技术不仅对专业人员要求较高,而且无标准可言,不同检测方案的阳性结果相差甚远<sup>[12,13]</sup>,因而难以在临床上普遍推广;MIF 需要荧光显微镜等特殊设备;ELISA 法操作简便快捷、使用可靠的仪器客观地阅读结果,因而适合于在临床上普遍推广。

Cpn 包涵体膜蛋白是衣原体基因编码、表达定位于 Cpn 包涵体膜上的蛋白质,它一般具有较强的免疫原性,而且保护衣原体免遭宿主的免疫系统的识别和清除。Cpn0585 由 Cpn 合成并定位于包涵体膜上,在 Cpn 感染早期就可以检测这种蛋白的抗体<sup>[14]</sup>。另外,这种 Cpn 基因高度保守,与其他已知基因同源性低<sup>[15]</sup>,若应用于临床 Cpn 检测,既有较高敏感度、特异性,又可以避免衣原体之间的交叉反应;同时,国内外还尚无对这种蛋白在 Cpn 感染诊断中的应用研究。为此,本研究分析了 Cpn0585 免疫活性,探讨了其在 Cpn 感染临床诊断中的应用价值。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

1.1.1 菌株、载体 Cpn AR39 株、pGEX-6p-2 载体南华大学病原生物学研究所保存。

1.1.2 主要试剂与试验动物 限制性内切酶、DNA 聚合酶均为 NEB 公司;DNA 标准、蛋白质标准为东盛公司产品;GST 纯化树脂购于 Merk;雄性 BALB/c 小鼠购自南华大学动物部;Cpn AR39 多克隆抗体购于 abcam;SeroCP™ IgG ELISA 购于 Savyon Diagnostics 公司。

1.1.3 临床血清样本 104 例血清样本收于 2008 年 1 月至 2010 年 2 月就诊于衡阳市南华大学附属第三医院呼吸科的呼吸道感染患者;36 例沙眼衣原体(*C. trachomatis*, Ct)阳性血清采集于南华大学附属第三医院妇产科,没有任何 Cpn 感染的临床和实验室检查证据。

### 1.2 方 法

1.2.1 原核表达载体 pGEX-6p-2/Cpn0585 的构建与鉴定 从 GenBank 中查询 Cpn0585 的基因序列,

设计 PCR 引物,P1 序列为 5' CGC GGA TCC ATG GCA ACA CCC GCT CAA AAA T 3',P2 序列为 5' TTTTCCTTTT GCGGCCGC TTA TCC TTG TTG AAA TTG CTC TTG 3',分别引入 BamHI 和 NotI 酶切位点。PCR 条件为:94℃ 5min 预变性,94℃ 30 s,55℃ 45 s,72℃ 2 min,循环 30 次,72℃ 延伸 10 min 终止反应,产物经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳分析,纯化后克隆到 pGEX-6p-2 上,重组质粒 pGEX-6p-2/Cpn0585 转化入 *E. coli* BL21 中,经 PCR 筛选,双酶切和测序(武汉 Invitrogen 公司)鉴定,筛选阳性克隆。

1.2.2 重组蛋白 GST-Cpn0585 的表达、纯化与鉴定 按《分子克隆实验指南》所述方法,用 IPTG 诱导表达重组蛋白 GST-Cpn0585,并反复优化表达条件诱导表达可溶性蛋白。然后用 GST 纯化树脂按说明书进行纯化。10% SDS-PAGE 分析蛋白质的表达形式及纯度;在核酸蛋白分析仪上,测定蛋白质浓度。纯化的 GST-Cpn0585 用 Cpn AR39 多克隆抗体行免疫印迹鉴定。

1.2.3 动物实验 取纯化的重组蛋白经腹膜下多点及腹腔注射免疫 6 只清洁级雄性 BALB/c 小鼠(购自南华大学动物部),同时设立 GST 免疫组、洗脱液阴性对照组及空白对照组。第一次免疫,剂量 150 μg/只,与等量弗氏完全佐剂充分乳化后,对小鼠进行注射,以后每隔 15 天左右用含重组蛋白 75 μg 的抗原加弗氏不完全佐剂加强免疫 3 次,末次免疫 7 天后眼眶静脉采血,分离并纯化血清,ELISA 法检测免疫血清的抗体效价。

1.2.4 Cpn IgG 抗体检测 以重组蛋白作为 ELISA 包被抗原检测血清中 Cpn IgG 抗体,纯化 GST-Cpn0585 重组蛋白用碳酸盐缓冲液稀释,按 100 μg/孔包被酶标板,建立间接 ELISA 法检测 104 份呼吸道患者的血清中的 Cpn IgG 抗体,并建立 GST、阴性及空白对照。待检血清作测定孔 A<sub>450</sub> 值 > 阳性界值为阳性,否则判为阴性,并与 Savyon Diagnostics 公司 SeroCP™ IgG ELISA 诊断试剂盒的检测结果进行比较,初步探讨 Cpn0585 在 Cpn 血清学诊断中的应用价值。

1.2.5 与 Ct 交叉反应试验 分别以 GST-Cpn0585 为抗原建立的 ELISA 法和目前国际上常用的 SeroCP™ ELISA 商品试剂盒平行检测 36 份 Ct 阳性血清,如结果有阳性则认为该方法与 Ct 有交叉反应;否则无交叉反应。

1.2.6 可靠性与稳定性试验 可靠性试验:不同批次的 ELISA 试剂检测同一份患者血清样品,每次每份 12 孔,分 3 组检测每组样品 A 值、批间变异系数

(CV)以计算平均批间 CV;分3天检测每天批内 CV 以计算平均批内 CV。稳定性试验:将 ELISA 试剂分成4组,分别置4℃,37℃反应,连续3天后同时检测每组批间 CV 并计算平均批间 CV。

## 2 结 果

### 2.1 原核表达载体 pGEX-6p-2/Cpn0585 的构建与鉴定

重组质粒的 PCR 产物经 1% 琼脂糖电泳,在约 1950 bp 位置见一明显条带,大小与预期值符合。经酶切和测序鉴定证明在重组质粒中有插入靶基因 Cpn0585 (图 1)。

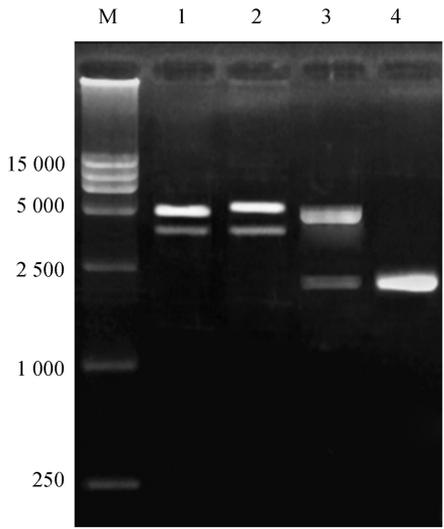


图 1 pGEX-6p-2/Cpn0585 重组质粒的 PCR 与酶切鉴定  
M: DNA Marker DL15000; 1: pGEX-6p-2 vector; 2: pGEX-6p-2/Cpn0585 recombinant plasmid; 3: pGEX-6p-2/0585 digested by BamH I and Not I; 4: PCR product of recombinant plasmid, pGEX-6p-2/Cpn0585

### 2.2 重组蛋白 GST-Cpn0585 的纯化与鉴定

通过 GST 纯化树脂纯化蛋白,可获得 95 kDa 左右的单一蛋白条带,蛋白印记分析此条带可以与 Cpn AR39 多克隆抗所识别,而空菌,含空载体的宿主菌在相应位置未出现相应条带(图 2)。

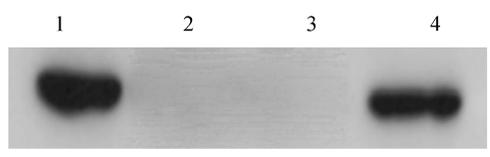


图 2 pGEX6p-2/ Cpn0585 的 Western blot 鉴定结果  
1: induced BL21 with pGEX-6p-2/Cpn0585; 2: induced BL21; 3: induced BL21 with pGEX-6p-2; 4: purified GST-Cpn0585

### 2.3 重组蛋白免疫原性分析

用间接 ELISA 法检测鼠血清中特异性 IgG 抗体效价,达 1:12 800,空白组及对照组都未检测出特异性抗体(表 1)。

表 1 ELISA 法检测 BALB/c 小鼠免疫血清中特异性抗体滴度

组别	鼠数量	血清 IgG 抗体效价
GST-Cpn 0585 免疫组	6	≥1:12 800
GST 免疫组	6	—
洗脱液阴性对照组	6	—
空白对照组	6	—

### 2.4 重组蛋白抗原的血清学诊断初步应用

2.4.1 Cpn IgG 抗体检测 GST-Cpn0585 为包被抗原与以色列 Savyon Diagnostics 公司 SeroCP™ IgG ELISA 诊断试剂盒的检测结果进行比较(表 2),经  $\chi^2$  检验,  $P < 0.05$ , 差异有显著性。且 GST-Cpn058 检测的特异性为 98.8%, 灵敏度为 93.5%, 符合率为 98.3%。

表 2 重组蛋白 ELISA 和 SeroCP™ IgG 诊断试剂盒检测结果比较

SeroCP™ 试剂盒	Cpn0585		
	阳性	阴性	合计
阳性	29	5	34
阴性	4	66	70
合计	33	71	104

2.4.2 与 Ct 的交叉反应试验 ELISA 诊断试剂盒平行检测 36 份 Cpn -/Ct + IgG 阳性参考血清, GST-Cpn0585 检测 1 例阳性,阳性率 2.8%, Sero CP 试剂盒检测 5 例阳性,阳性率 13.9%。两者比较,  $\chi^2 = 3.84, P < 0.05$ 。

2.4.3 可靠性与稳定性试验 分 3 组检测出平均批间变异系数(CV)为 5.46%,分 3 天检测出平均批内 CV 为 6.78%;对其进行稳定性试验,检测出平均批间 CV 为 5.63%,该方法具有较好的可靠性和重复性。

## 3 讨 论

Cpn 主要引起人类的各种呼吸系统疾病,还可引起心内膜炎、动脉粥样硬化等多种慢性病,甚至造

成难于治疗的并发症,对人类健康构成极大的威胁<sup>[16~18]</sup>。由此可见,早期准确地诊断 Cpn 感染,为有效地控制 Cpn 的传播和预防并发症的发生具有重要意义。目前国内外已有 Cpn 检测研究报道及商品化试剂盒,抗原主要是脂多糖(LPs)和 MOMP 蛋白及全菌。但因都与 Ct 和鹦鹉热衣原体(*Chlamydia Psittaci*, Cps)有一定程度的交叉反应,特异性不高,而且由于 Cpn 极难培养,开发出的商品试剂盒价格昂贵,从而限制了它们的广泛应用。由于 ELISA 法较易于标准化,在酶标仪相同波长下读数,结果也相对客观,且可以量化。本文构建了 pGEX-6p-2/Cpn0585 重组质粒,用以制备 GST-Cpn0585 重组抗原,建立 ELISA 法检测血清 Cpn IgG,比较了 Cpn0585 重组抗原和试剂盒抗原检测血清抗体。经四格表统计分析,两种方法的血清抗体阳性检测率基本相同,且符合率相对较高。说明 Cpn0585 重组抗原的抗原性强。

建立以 GST-Cpn0585 重组蛋白为包被抗原的间接 ELISA 方法,并以 SeroCP™ IgG ELISA 诊断试剂盒为参照,对 104 份呼吸道感染的病人血清进行平行检测,比较结果后发现,ELISA 法与诊断试剂盒检测血清标本的特异度 97.5%、灵敏度为 90.7%、符合率为 96.7% 及其检出的阳性率 45.3%,比 Grayston 等<sup>[19]</sup>报道的全球 20 岁以上的成人几乎都受到过 Cpn 的感染,人群血清抗体阳性率可达 50%~70% 低,引起这种阳性率偏低的原因要作多方面考虑,如 Cpn 感染存在着季节性和区域性差异或者取样过程中的污染等因素。

应用以 GST-Cpn0585 为包被抗原的间接 ELISA 方法和 SeroCP™ 试剂盒同时检测 Ct 阳性血清,间接 ELISA 方法分别检出 1(1/36 Cpn0585)、5(5/36 SeroCP™ ELISA 商品试剂盒)例阳性,说明以 GST-Cpn0585 为抗原的间接血清学诊断方法的特异性相对较好,可以减少与 Ct 的交叉反应,因此 Cpn0585 具有较高的临床诊断应用价值。实验中发现 Cpn 检出率低,有些血清标本不能被 GST-Cpn0585 识别而可以被 SeroCP™ 试剂盒检测出来,其原因是:(1) SeroCP™ ELISA 试剂盒是以 Cpn 原体<sup>[20]</sup>为包被抗原,而间接 ELISA 法是分别以基因高度保守的重组蛋白为包被抗原,Cpn 原体与其它一些细菌都有一定的同源性,因此 SeroCP™ ELISA 试剂盒本身有一定的假阳性;(2) 抗原量过少或血清稀释度过低, A<sub>450</sub> 值达不到标准或是标本收集、保存等人为操作的失误;(3) 病人取样本前使用抗生素治疗,抗体效价不高,影响检出结果。

综合比较各项指标,本研究初步证实 GST-Cpn0585 具有较强的免疫活性,以该重组蛋白包被抗原建立的 ELISA 检测方法具有较高的敏感性和特异性,能应用于临床快速、早期诊断。为更好地评价以 GST-Cpn0585 重组蛋白为包被抗原建立的间接 ELISA 法在 Cpn 感染临床诊断中的应用价值,在下一步实验中将以商品化试剂盒为对照,平行检测更多的临床血清标本,比较各方法的优缺点;同时,根据检测目的的需要,可以利用分子生物学及化学手段对抗原表位进行筛选、化学修饰,使其抗原性发挥至最佳水平,应用于 Cpn 感染临床诊断。

#### 参考文献:

- [1] Kumar S, Hammerschlag MR. Acute respiratory infection due to *Chlamydia pneumoniae*: current status of diagnostic methods[J]. *Clin Infect Dis*, 2007, 44(4): 568-576.
- [2] Boman J, Hammerschlag MR. *Chlamydia pneumoniae* and atherosclerosis: critical assessment of diagnostic methods and relevance to treatment studies[J]. *Clin. Micro*, 2002, 15(1): 1-20.
- [3] Mukhopadhyay S, Good D, Miller RD, et al. Identification of *Chlamydia pneumoniae* proteins in the transition from reticulate to elementary body formation[J]. *Mol Cell Proteomics*, 2006, 5(12): 2311-2318.
- [4] Paldanius M, Bloigu A, Alho M, et al. Prevalence and persistence of *Chlamydia pneumoniae* antibodies in healthy laboratory personnel in Finland[J]. *Clin Diagn Lab Immunol*, 2005, 12(5): 654-659.
- [5] Littman AJ, White E, Jackson LA, et al. *Chlamydia pneumoniae* infection and risk of lung cancer. *Cancer Epidemiol*[J]. *Biomarkers Prev*, 2003, 14: 1624-1630.
- [6] Mukhopadhyay S, Good D, Miller RD, et al. Identification of *Chlamydia pneumoniae* proteins in the transition from reticulate to elementary body formation[J]. *Mol Cell Proteomics*, 2006, 5(12): 2311-2318.
- [7] Ciervo A, Petrucca A, Visca P, et al. Evaluation and optimization of ELISA for detection of anti-*Chlamydomytila pneumoniae* IgG and IgA in patients with coronary heart diseases [J]. *J Microbiol Methods*, 2004, 59(1): 135-140.
- [8] Verkooyen RP, Willemse D, Casteren S. C. A. M. H, et al. Evaluation of PCR, culture, and serology for diagnosis of *chlamydia pneumoniae* respiratory infections[J]. *J. Clin. Microbiol.*, 1998, 36(8): 2301-2307.
- [9] Kumar S, Hammerschlag MR. Acute respiratory infection due to *Chlamydia pneumoniae*: current status of diagnostic methods[J]. *Clin Infect Dis*, 2007, 44(4): 568-576.
- [10] Airaksinen U, Penttila T, Wahlstrom E, et al. Production

- of Chlamydia pneumoniae proteins in bacillus subtilis and their use in characterizing immune responses in the experimental infection model[J]. Clin Diagn Lab Immunol,2003,10(3):367-375.
- [11] Campbell LA, Melgosa MP, Hamilton DJ, et al. Detection of Chlamydia pneumoniae by polymerase chain reaction [J]. J. Clin. Microbiol., 1992, 30:434-439.
- [12] Apfalter P, Blasi G, Boman J, et al. Multicenter comparison trial of DNA extraction methods and PCR assays for detection of Chlamydia pneumoniae in endarterectomy specimens[J]. J. Clin. Microbiol, 2001, 39:519-524.
- [13] Fainardi E, Castellazzi M, Seraceni S, et al. Under the Microscope: Focus on Chlamydia pneumoniae Infection and Multiple Sclerosis[J]. Curr Neurovasc Res, 2008, 5(1):60-70.
- [14] Luo J, Jia T, Zhong Y, et al. Localization of the hypothetical protein Cpn0585 in the inclusion membrane of Chlamydia pneumoniae-infected cells[J]. Microb Pathog. 2007, 42(2-3):111-116.
- [15] Mukhopadhyay S, Good D, Miller RD, et al. Identification of Chlamydia pneumoniae proteins in the transition from reticulate to elementary body formation [J]. Mol Cell Proteomics, 2006, 5(12):2311-2318.
- [16] Palikhe A, Tirola T, Puolakkainen M, et al. Chlamydia pneumoniae DNA is present in peripheral blood mononuclear cells during acute coronary syndrome and correlates with chlamydial lipopolysaccharide levels in serum [J]. Scand J Infect Dis, 2009, 41(3):201-205.
- [17] Naoyuki M, Okimoto N, Yoshida K, et al. Clinical Presentation of Community- Acquired Chlamydia pneumoniae Pneumonia in Adults[J]. CHEST, 2002, 121:1776-1781.
- [18] 周 洲, 吴移谋, 刘 劫, 等. 肺炎衣原体 ompA 基因 VD2-VD3 区重组蛋白在血清学诊断中的初步应用 [J]. 微生物学报, 2007, 47(3):512-516.
- [19] Grayston JT. Chlamydia pneumoniae and atherosclerosis [J]. Clin Infect Dis, 2005, (40)8:1131-1132.
- [20] 郑江花, 吴移谋, 刘佳强, 等. 肺炎嗜衣原体蛋白酶样活性因子免疫优势区基因重组蛋白在早期诊断中的应用 [J]. 中华医院感染学杂志, 2008, 48(4):520-525.

(此文编辑 蒋湘莲)