

· 论著 ·

文章编号: 1007-8738(2013)06-0577-04

嗜肺军团菌巨噬细胞感染增强蛋白的表达和纯化及其在血清学诊断中的应用

刘黎¹, 曹秀琴², 杨志伟^{1*}¹宁夏医科大学基础医学院病原生物学与免疫学系; ²生育力保持省部级共建教育部重点实验室, 宁夏银川 750004)

[摘要] 目的 表达和纯化嗜肺军团菌巨噬细胞感染增强(MIP)蛋白, 研究其在军团菌肺炎血清学诊断中的应用价值。方法 将已构建成功的重组质粒 pET-mip 转化 *E. coli* BL21 感受态细胞, 诱导 MIP 蛋白表达, 运用 SDS-PAGE 分析和亲和层析法纯化。用 DRG 军团菌 IgG/IgM/IgA 的 ELISA 检测试剂盒筛选出 40 份阳性血清和 30 份阴性血清, 用纯化的 MIP 蛋白建立间接 ELISA, 同时与 R&D 的 ELISA IgG、IgM、IgA 试剂盒分别检测已筛选血清中的 IgG、IgM、IgA 抗体, 然后对这两种方法进行比较, 通过敏感性、特异性以及不同检测结果的一致性, 来评价该方法的应用价值。结果 诱导相对分子质量(M_r)大约 40 000 的 MIP 融合蛋白在 *E. coli* BL21 中表达并纯化。纯化蛋白建立的间接 ELISA 分别检测筛选血清中 IgG、IgM、IgA 抗体与国外 ELISA 试剂盒(R&D)进行比较, IgG 抗体的灵敏度 88.5%, 特异度 95.5%, 一致性 Kappa 值 0.846($P < 0.05$), ROC 曲线下面积 0.927。IgM 抗体的灵敏度 89.3%, 特异度 97.6%, 一致性 Kappa 值 0.88($P < 0.05$), ROC 曲线下面积 0.947。IgA 抗体的灵敏度 90%, 特异度 95.2%, 一致性 Kappa 值 0.856($P < 0.05$), ROC 曲线下面积 0.931。结论 成功诱导了嗜肺军团菌 MIP 蛋白稳定表达并纯化, 运用 MIP 作为包被抗原的军团菌肺炎的血清学诊断方法具有较高的诊断价值。

[关键词] 嗜肺军团菌; 巨噬细胞感染增强蛋白; 蛋白表达; 血清学诊断

[中图分类号] R392.33, R517.9 **[文献标志码]** A

Expression and purification of *Legionella pneumophila* MIP protein and its application in serological diagnosis

LIU Li¹, CAO Xiuqin², YANG Zhiwei^{1*}¹Department of Pathogenic Biology and Immunology, School of Basic Medicine, Ningxia Medical University; ²Key Laboratory of Fertility Preservation and Maintenance, Ministry of Education, Yinchuan 750004, China

[Abstract] **Objective** To express and purify macrophage infectivity potentiator (MIP) protein of *Legionella pneumophila* (*Lp*), and explore its value in the serological diagnosis of *Lp*. **Methods** The recombinant plasmid pET-mip was transformed into *E. coli* BL21 competent cells. The expression of MIP protein was induced, and then analyzed by SDS-PAGE electrophoresis, purified by affinity chromatography. We screened out 40 positive blood serum and 30 negative blood serum using the DRG (Germany, IgG/IgM/IgA) *Lp* kit. The blood serum samples were detected for IgG, IgM, IgA antibody levels by indirect ELISA that we had established with the purified MIP protein as the coating antigen, as well as by R&D (USA, IgG/IgM/IgA) *Lp* kit. The two methods were compared in the sensitivity, specificity and consistency of the test results. **Results** The recombinant MIP protein was successfully expressed and purified with M_r being 40 000 in *E. coli* BL21. In comparison of the indirect ELISA we developed with the R&D *Lp* kit for detecting *Lp* antibody IgG, IgM and IgA in blood serum, the specificity of IgG was 88.5% and the sensitivity was 95.5%, the Kappa value was 0.846 ($P < 0.05$), the area under the ROC curve was 0.927; the specificity of IgM was 89.3% and the sensitivity was 97.6%, the Kappa value was 0.88 ($P < 0.05$), the area under the ROC curve was 0.947; the specificity of IgA was 90% and the sensitivity was 95.2%, the Kappa value was 0.856 ($P < 0.05$), the area under the ROC curve was 0.931. **Conclusion** MIP proteins of *L. pneumophila* was expressed and purified successfully, and MIP protein can be used as a coating antigen in serological diagnosis of *L. pneumophila*.

[Key words] *Legionella pneumophila*; macrophage infectivity potentiator protein; protein expression; serological diagnosis

收稿日期: 2012-12-24; 接受日期: 2013-03-07

基金项目: 国家自然科学基金(30860264); 宁夏自然科学基金(NZ0992)

作者简介: 刘黎(1984-), 女, 宁夏银川人, 硕士研究生

Tel: 18295005855; E-mail: 370666059@qq.com

*Corresponding author, 杨志伟, E-mail: yangzhw0817@163.com

军团病是一种急性呼吸道传染病,主要通过气溶胶传播,该病缺乏典型的症状和体征,治疗延迟或治疗方法不当病死率较高。因此特异、敏感、快速的检测方法对该病的防治非常重要。军团病确诊的“金标准”仍是培养出致病菌,但阳性率低,很难满足临床的需求^[1]。PCR 技术有较高的敏感性和特异性,但也存在一定的局限性,易受标本中 PCR 抑制剂的影响,引物的设计要求高,而且尚未标准化。血清学检测易掌握,检测结果可靠,简便、快捷、敏感性高,特异性高,是目前国内外临床诊断军团病的常用方法,但是以菌体蛋白作为包被抗原的血清学检测方法存在抗原成分复杂,纯度低,特异性差,易产生交叉反应,假阳性高等缺点。随着基因工程技术的成熟,特异性强,敏感性高的重组抗原已逐渐应用于血清学诊断。故本研究以有亲属特异性^[2-3]的 *mip* 基因编码的 MIP 蛋白作为包被抗原建立军团菌血清学检测方法,并与国外已商业化的 ELISA 试剂盒的检测结果进行比较,评价其在军团菌肺炎的血清学诊断中的应用价值。

1 材料和方法

1.1 材料 重组质粒 pET-*mip* 由本室构建,大肠杆菌 DH5 α 、BL21 均由本室保存。质粒小量提取试剂盒为 Omega 生物技术公司产品, MagaExtractor-His-tag 蛋白纯化试剂盒为 ToYoBo 公司产品, DRG Legionella ELISA (EIA-IgG) 检测试剂盒购自 DRG Instruments GmbH 公司;山羊抗人 IgG、IgM、IgA 抗体购自 Southern Biotech 公司, Tween20 购自 Sigma 公司,牛血清白蛋白由 Amresco 公司分装。R&D 军团菌检测试剂盒购自 R&D Systems 公司,40 例肺炎病人血清来自北京军区总医院,30 例阴性血清来自解放军第 5 医院。

1.2 方法

1.2.1 重组质粒 pET-*mip* 的蛋白表达 将已构建成功的重组质粒 pET-*mip* 转化入表达宿主菌 *E. coli* BL21, 选用含氨苄青霉素的 LB 琼脂培养基筛选阳性克隆;分别挑取含重组质粒 BL21 和空质粒 BL21 单个菌落,接种于含氨苄青霉素的 LB 液体培养基中,37 $^{\circ}$ C 培养 12 h;分别取菌液 200 μ L 接种于含氨苄青霉素的 LB 培养液中,37 $^{\circ}$ C, 300 r/min 培养 3 h;测定 A_{600} 值达到 0.8~1.0,加入 IPTG 5 μ L(终浓度为 0.2 mmol/L) 25 $^{\circ}$ C 诱导表达,震荡 200~300 r/min。分别于诱导后 0、1、2、4 h,取重组质粒和空质粒各 1 mL,收集菌体,悬浮。加入 2 \times SDS 上样缓冲液 80~120 μ L,混匀,沸水浴 3 min,离心。取 10 μ L 样品做 150 g/L SDS-PAGE 电泳分析。

1.2.2 MIP 蛋白的纯化 25 $^{\circ}$ C 诱导重组菌 4 h,收集菌体。按照说明书进行操作,150 g/L SDS-PAGE 电泳分析纯化蛋白结果。

1.2.3 间接 ELISA 建立 将纯化后的 MIP 蛋白作为包被抗原,运用十字交叉连续稀释分析法筛选出最佳的包被抗原的浓度(0.005 μ g/mL),血清的稀释度(1:40)以酶结合物山羊抗人 IgG、IgM、IgA 抗体(1:6 000)的稀释度。双抗体夹心

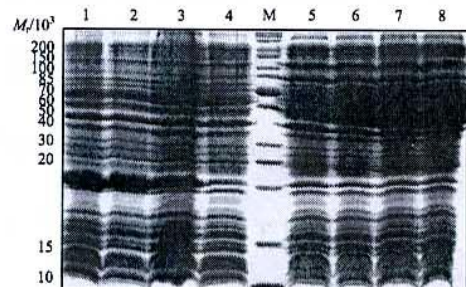
ELISA 分别检测已筛选出的 40 份阳性血清和 30 份阴性血清中的 IgG、IgM、IgA 抗体,测定波长为 450 nm。将以读取的吸光度(A_{450})值转化为血清 IgG、IgM、IgA 抗体浓度(血清 IgG、IgM、IgA 抗体浓度 = $A_{450} / CF \times 3$ 个标准血清的平均值)。

1.2.4 试剂盒检测血清 用 R&D 的 ELISA IgG、IgM、IgA 试剂盒检测同样的 70 份已筛选血清,分别检测血清中的 IgG、IgM、IgA 抗体浓度,具体操作步骤详见试剂盒说明书,设定波长为 450 nm,做出标准曲线,将吸光度(A_{450})值转化为 IgG、IgM、IgA 抗体浓度。

1.2.5 统计学分析 运用 SPSS17.0 统计学软件对以纯化蛋白为包被抗原的 ELISA 和 R&D 的 ELISA 试剂盒的结果进行统计学分析,然后运用配对资料的卡方检验和 ROC 分析,通过对两种方法的特异度、灵敏度、一致性及曲线下面积来评价 MIP 蛋白间接 ELISA 的诊断价值。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 MIP 融合蛋白诱导表达的结果 含 pET-*mip* 的大肠杆菌 BL21 经 IPTG 诱导 0、1、2、4 h 后,在 SDS-PAGE 电泳图上均可见 1 条 M_r 约 40 000 的浓厚条带,为重组 MIP 蛋白与标签蛋白融合表达的蛋白条带,与预期蛋白大小一致。含 pET-32a(+) 的大肠杆菌 BL21 经 IPTG 诱导 0、1、2、4 h 后在电泳图上均可见 1 条 M_r 约 20 000 的新增条带,为载体的 Trx-His 融合蛋白,而未经诱导的样品未见相应特异性条带(图 1)。



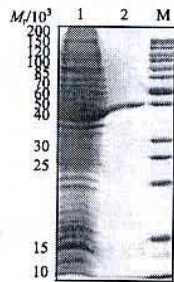
1: 空质粒经 IPTG 诱导 4 h 表达产物; 2: 空质粒经 IPTG 诱导 2 h 表达产物; 3: 空质粒经 IPTG 诱导 1 h 表达产物; 4: 空质粒经 IPTG 诱导 0 h 表达产物; M: 蛋白 M_r markers; 5: 重组质粒经 IPTG 诱导 0 h 表达产物; 6: 重组质粒经 IPTG 诱导 1 h 表达产物; 7: 重组质粒经 IPTG 诱导 2 h 表达产物; 8: 重组质粒经 IPTG 诱导 4 h 表达产物。

图 1 重组质粒 pET32a(+)-*mip* 表达产物的电泳结果

2.2 融合蛋白的纯化结果 M_r 约 40 000 左右处有一明显的 MIP 融合蛋白条带(图 2)。

2.3 血清学检测结果 以军团菌肺炎 R&D 的 ELISA IgG、IgM、IgA 试剂盒和 MIP 蛋白间接 ELISA 分别检测已筛选的 40 份阳性血清和 30 份阴性血清中的 IgG、IgM、IgA 抗体的检测结果。IgG 检测结果显示(图 3): MIP 蛋白间接 ELISA 的灵敏度 88.5%, 特异度 95.5%, 一致性 Kappa 值 0.846($P < 0.05$),

受试者工作特征曲线(receiver operator characteristic curve, ROC 曲线)面积 0.927, 95% 的置信区间为 0.85 ~ 1($P < 0.05$)。



1: 重组质粒经 IPTG 诱导 4 h 的表达产物; 2: 纯化后的表达产物; M: 蛋白 M_r marker.

图2 重组质粒 $pET32a(+)-mip$ 表达产物纯化后的电泳结果

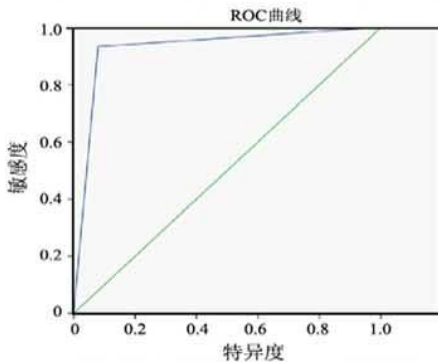


图3 MIP 蛋白间接 ELISA 与 R&D 的 ELISA IgG 试剂盒的 ROC 曲线

IgM 检测结果显示(图4): MIP 蛋白间接 ELISA 的灵敏度 89.3%, 特异度 97.6%, 一致性 Kappa 值 0.88($P < 0.05$), ROC 曲线下面积 0.947, 95% 的置信区间为 0.869 ~ 1($P < 0.05$)。

IgA 检测结果显示(图5): MIP 蛋白间接 ELISA 的灵敏度 90%, 特异度 95.2%, 一致性 Kappa 值 0.856($P < 0.05$), ROC 曲线下面积 0.931, 95% 的置信区间为 0.861 ~ 1($P < 0.05$)。

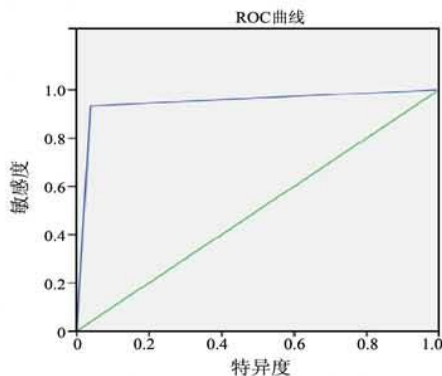


图4 MIP 蛋白间接 ELISA 与 R&D 的 ELISA IgM 试剂盒的 ROC 曲线

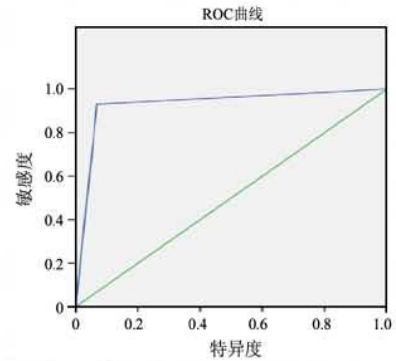


图5 MIP 蛋白间接 ELISA 与 R&D 的 ELISA IgA 试剂盒的 ROC 曲线

3 讨论

嗜肺军团菌、米克戴德军团菌、长滩军团菌等的 *mip* 基因核苷酸序列的同源性为 69% ~ 97%, 表明在军团菌属中 *mip* 基因具有高度保守性, 且 *mip* 基因具有管家基因的功能, 比其他的基因更具稳定性^[4]。Wilson 等认为 *mip* 基因有足够的序列差异来区别嗜肺军团菌与非嗜肺军团菌。已经建立的采用 5SrRNA 和 *mip* 基因双重 PCR 法检测嗜肺军团菌的方法, 有很好的灵敏度和特异度, 但由于扩增片段的增加, 需要更多的聚合酶、dNTP 和镁离子, 而引物的浓度也要根据基因拷贝数和扩增片段大小来决定, 故技术要求高难以普及^[5-6]。

嗜肺军团菌、米克戴德军团菌、长滩军团菌的 MIP 蛋白氨基酸序列同源性为 82% ~ 99%, 故 MIP 蛋白可以作为特异性的包被抗原。本实验制备了重组的 MIP 蛋白, 建立了间接 EILSA 检测血清中 IgG、IgM、IgA 抗体, 与目前市场上销售的嗜肺军团菌的 ELISA 试剂盒相比, 具有很好的灵敏度($>85%$)和特异度($>95%$)。国外的试剂盒, 虽然检测结果可靠, 但价格昂贵, 不适合于基层检测的需要, 而且大多以菌体蛋白为包被抗原, 易与铜绿假单胞菌、金黄色葡萄球菌、结核杆菌、鹦鹉热衣原体、斑疹伤寒立克次体等感染者的血清存在交叉反应, 易导致假阳性^[7]。以重组的 MIP 蛋白建立的间接 EILSA 检测血清中 IgG、IgM、IgA 抗体, 与 R&D 的嗜肺军团菌的 ELISA IgG、IgM、IgA 试剂盒相比, MIP 蛋白 ELISA 检测 IgG、IgM、IgA 抗体的灵敏度分别是 88.5%, 89.3%, 90%, 而 R&D 的嗜肺军团菌的 ELISA IgG、IgM、IgA 试剂盒 IgG、IgM、IgA 的灵敏度分别是 92%, 96.2%, 93.1%, 高于 MIP 蛋白 ELISA。MIP 蛋白为单一重组抗原, 而 R&D 的 ELISA 试剂盒的包被抗原为菌体混合抗原, 存在一定的假阳性率, 故灵敏度高于 MIP 蛋白 ELISA 可能是由于这个原因。而

R&D 的 ELISA 试剂盒的特异度在 90% ~ 95% 之间, MIP 蛋白 ELISA 的特异性均 > 95%, 也说明了与菌体混合抗原相比, 以 MIP 蛋白作为包被抗原具有较高特异性。MIP 蛋白 ELISA 与 R&D 的 ELISA 试剂盒比较具有较高特异度 (> 95%)、灵敏度 (> 85%) 和一致性 (Kappa 值 > 0.75)。ROC 曲线下面积均 > 0.9, 95% 的置信区间均在 0.85-1 ($P < 0.05$), 具有很好的一致性, 诊断价值较高, 为进一步研制特异性军团菌肺炎的血清学试剂盒及临床诊断奠定基础。

参考文献:

- [1] Kurutepe S, Ecemis T, Ozgen A, et al. Investigation of bacterial etiology with conventional and multiplex PCR methods in adult patients with community-acquired pneumonia[J]. Mikrobiyol Bul, 2012, 46(4): 523-531.
- [2] Juli C, Sippel M, Jager J, et al. Pipecolic acid derivatives as small-molecule inhibitors of the Legionella MIP protein[J]. J Med Chem,

2011, 54(1): 277-283.

- [3] Jarraud S, Descours G, Ginevra C, et al. Identification of legionella in clinical samples[J]. Methods Mol Biol, 2013, 954: 27-56.
- [4] Paveenkittiporn W, Dejsirilert S, Kalambaheti T. Genetic speciation of environmental Legionella isolates in Thailand[J]. Infect Genet Evol, 2012, 12(7): 1368-1376.
- [5] Yanez MA, Nocker A, Soria-Soria E, et al. Quantification of viable Legionella pneumophila cells using propidium monoazide combined with quantitative PCR[J]. J Microbiol Methods, 2011, 85(2): 124-130.
- [6] Mentasti M, Fry NK, Afshar B, et al. Application of Legionella pneumophila-specific quantitative real-time PCR combined with direct amplification and sequence-based typing in the diagnosis and epidemiological investigation of Legionnaires disease[J]. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2012, 31(8): 2017-2028.
- [7] Elverdal PL, Svarrer CW, Jørgensen CS, et al. Development and validation of ELISA for detection of antibodies to Legionella pneumophila serogroup 1, 3 and 6 in humansera[J]. Microbiol Methods, 2011, 86(3): 298-303.

(上接 576 页)

及羟脯氨酸含量明显低于模型组, 而 SP-A 的含量明显高于模型组。羟脯氨酸为肺纤维化的指标, 含量越高提示肺纤维化程度越高, SP-A 为肺泡 II 型上皮细胞分泌的表面活性物质, 含量越高提示健存肺泡越多, 以上结果说明, LAMR1 mAb 可能减轻肺纤维化程度。

有实验证明 TGF- β 与 LN 的过表达可能存在相关性^[15]。在本次试验中通过 LN 受体 mAb 干预肺纤维化过程中, 是否会有 TGF- β 1 的变化呢? 通过检测 TGF- β 1 含量发现, LAMR1 mAb 组中的 TGF- β 1 含量明显低于模型组, 说明 LAMR1 mAb 可能有抑制肺纤维化大鼠肺组织中 TGF- β 1 的表达, 其机理有待进一步研究证实。

在肺纤维化早期, MMP-9 表达升高, 降解细胞外基质, 破坏肺泡壁的基质而触发肺纤维化^[16]。而本实验中 LAMR1 mAb 组的 MMP-9 含量明显低于模型组, 提示 LAMR1 mAb 可能通过抑制 MMP-9 的合成来抑制肺纤维化。

本实验提示 LAMR1 mAb 对肺纤维化起保护性作用, 还需对 LAMR1 mAb 在肺纤维化模型中的作用机制及干预抗体用量等进一步深入的研究。

参考文献:

- [1] Givant-Horwitz V, Davidson B, Reich R. Laminin-induced signaling in tumor cells[J]. Cancer Lett, 2005, 223(1): 1-10.
- [2] 胡迎春, 贺性鹏. 层黏连蛋白与肺纤维化病变关系的研究进展[J]. 医学综述, 2010, 16(4): 484-486.
- [3] 芮炜玮, 易祥华. 转化生长因子 β 1 及相关细胞因子在肺纤维化

发生中的作用[J]. 同济大学学报, 2010, 31(3): 133-136.

- [4] 唐连涛, 江涛. 特发性肺纤维化治疗进展[J]. 医学综述, 2012, 18(9): 1309-1311.
- [5] 于露, 刘跃建. 肿瘤坏死因子- α 及转化生长因子- β 1 在肺纤维化形成中的作用研究进展[J]. 实用医院临床杂志, 2012, 9(3): 163-165.
- [6] 陈建中. 特发性肺纤维化西医治疗现状[J]. 工企医刊, 2012, 4(1): 38-40.
- [7] Atkinson JJ, Senior RM. Matrix Metalloproteinase-9 in lung remodeling[J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 2003, 28(1): 12-24.
- [8] 钟长军. 氧化应激在特发性肺纤维化中的作用及其机制研究进展[J]. 中国药理学通报, 2012, 28(2): 169-172.
- [9] Tzu J, Marinkovich MP. Bridging structure with function: structural, regulatory, and developmental role of laminins[J]. Int J Biochem Cell Biol, 2008, 40(2): 199-214.
- [10] Chilosi M, Zamò A, Doglioni C, et al. Migratory marker expression in fibroblast foci of idiopathic pulmonary fibrosis[J]. Respir Res, 2006, 7: 95.
- [11] 詹爱霞, 蔡文侠, 钱定良. 肺纤维化患者血清中 LN、HA、PCⅢ、CIV 检测的临床意义[J]. 全科医学临床与教育, 2006, 4(4): 289-290.
- [12] 杨瑞生, 谢海英, 曾碧娟. 纤维化患者血清 III 型前胶原和层粘连蛋白监测的临床意义[J]. 中国热带医学, 2005, 5(2): 215-217.
- [13] 乔军波, 张谢夫, 赵春临. 67LR 的研究进展[J]. 医药论坛杂志, 2008, 29(23): 120-123, 127.
- [14] 吴珊, 郑杰. 层黏连蛋白受体单克隆抗体对人肺癌细胞形态、粘着及铺展的影响[J]. 中国免疫学杂志, 1994, 10(5): 294-296.
- [15] Jiang Y, Cheng DW, Crook ED, et al. Transforming growth factor- β 1 regulation of laminin γ 1 and fibronectin expression and survival of mouse mesangial cells[J]. Mol Cell Biochem, 2005, 278(1-2): 165-175.
- [16] 李芳, 王文林. MMP-9 和 TIMP-1 及其在肺纤维化中的作用[J]. 中国病原生物学杂志, 2011, 6(12): 935-938.