李斯特菌溶血素基因的原核表达及其生物学特性

殷月兰 焦新安* 潘志明 张晓明 顾志强
(扬州大学生物科学与技术学院 扬州 225009)

摘 要 李斯特菌溶血素(LLO)是产单核细胞李斯特菌的主要毒力因子,利用 PCR 技术从血清型 4b 的产单核细胞李斯特菌菌株中扩增出编码 LLO 的 *hly* 基因,经克隆筛选和测序鉴定后,构建成该基因的原核表达质粒 pGEX6P-1-hly,SDS-PAGE 结果表明:LLO 与谷胱甘肽在大肠杆菌中已融合表达,融合蛋白的分子量为 82kD;溶血实验证明融合蛋白具有较强的裂解真核细胞膜的作用,表明表达产物 LLO 具有生物活性,其溶血效价达 2.26×10^4 HU/mg,这为进一步研究其致病与免疫机理、单抗研制和疫苗设计提供了条件。

关键词 李斯特菌溶血素,产单核细胞李斯特菌,*hly* 基因,原核表达
中图分类号:Q786 **文献标识码**:A **文章编号**:0001-6209(2004)06-0752-04

产单核细胞李斯特菌(*Listeria monocytogenes*,简称 LM)是人兽共患李斯特菌病的病原,亦是食源性四大病原菌之一。LM 有 13 个血清型,目前 1/2a、1/2b和 4b 这 3 个血清型引起全世界 95% 的李斯特菌病病例,而其中大多数病例是由血清型 4b 的菌株感染所致[1]。LM 的致病性与多种毒力因子有关,包括李斯特菌溶血素 O(Listeriolysin O,简称 LLO)、内化素(Internalian)、磷脂酶 C、ActA 蛋白,侵染性蛋白 p60 和 prfA 蛋白等[2]。LLO 是该菌侵染力的重要组成成分,是 LM 的主要毒力因子[2,3]。

LLO 是一种能结合胆固醇、可被巯基活化的细胞溶解素,由 *hly* 基因编码的 529 个氨基酸组成,其中有 25 个氨基酸构成的信号肽序列,分子量为 6×10^4 道尔顿。LLO 能溶解宿主细胞吞噬泡膜,逃离噬菌体,进入胞浆,逃避吞噬体中杀菌物质的杀灭;此外还能在感染细胞内诱导信号传导和定向免疫应答中发挥重要作用[7]。由于 LLO 所具有的独特生物学特性,已被用于构建各种减毒疫苗或核酸疫苗,且促进 MHC-I 类分子限制性免疫应答,增强了保护性抗原的免疫作用[8~11]。

本研究以血清型为 4b 的 LM 菌株为材料,克隆并鉴定了不含信号肽的 *hly* 基因,通过构建大肠杆菌诱导性表达质粒,实现了 LLO 的融合表达,为进一步开展其致病机理与免疫机理的研究、特异单抗的研制奠定了必要基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒:产单核细胞李斯特菌血清型 4b 菌株由本室保存;受体菌大肠杆菌(*Escherichia coli*)DH5α 和 BL21 由本室保存;质粒载体 pGEX-6p-1 和 pGEM-T easy 载体购自 Promega 公司。

1.1.2 试剂:高保真 DNA 聚合酶、限制性核酸内切酶(*Xho* Ⅰ,*Bam*H Ⅰ)、T4 DNA 连接酶、X-Gal、IPTG 购自 Promega 公司;DNA 回收试剂盒购自 TaKaRa;氨苄青霉素等购自华美公司;谷胱甘肽亲和层析柱购自 Amersham Pharmacia Biotech 公司。

1.2 DNA 模板的制备

采用酚-氯仿方法[6]分离与提取 LM DNA。

1.3 PCR 扩增 *hly* 基因

根据 GenBank 报道的 *hly* 基因序列,设计并合成了 2 条引物:Primer 1(含 *Bam*H Ⅰ 酶切位点)为 5′-TAGGATCCGCAAGGATGCATCTGCA-3′;Primer 2(含 *Xho* Ⅰ 酶切位点)为 5′-TCCTCGAGTCGTGTGTGT-GTTAAGCGGT-3′,两引物间跨度约 1500bp。PCR 反应体系(50μL):模板 DNA 2μL,10 × buffer 5μL,2.5mmol/L dNTPs 4μL,Primer 1 和 Primer 2(0.1μmol/L)各 1μL,高保真酶 0.75μL(3U/μL),ddH_2O 36.25μL。PCR 反应条件:94℃ 5min;94℃ 55s,45℃ 50s,5 个循环;94℃ 55s,55℃ 50s,72℃ 2min,25 个循

基金项目:全国博士学位论文作者专项资金资助项目(FANEDD 200358);江苏省国际合作项目(BZ2003031);江苏省六大人才高峰项目(G2002-026);江苏省教育厅重点实验室开放课题
* 通讯作者。Tel:86-514-7979233;Fax:86-514-7991747;E-mail:xajiao@yahoo.com
作者简介:殷月兰,女(1971-),山东青岛人,在职博士生,讲师,研究方向为核酸疫苗研究。E-mail:lanyy31@yahoo.com.cn
其他作者:陈 瑶
收稿日期:2004-02-19,修回日期:2004-05-24

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

环；72℃ 10min。

PCR 产物与 pGEM T easy 载体连接，转化 *E. coli* DH5α，提取质粒经 *Xho* Ⅰ 和 *Bam*H Ⅰ 双酶切后琼脂糖电泳鉴定。初步鉴定阳性的克隆由大连宝生物公司测序。

1.4　重组载体的构建

用试剂盒回收目的片段，与经过 *Xho* Ⅰ 和 *Bam*H Ⅰ 双酶切的 pGEX-6p-1 表达载体连接，转化 BL21 宿主菌，用含氨苄青霉素的 LB 固体培养基筛选，取单个菌落接种含氨苄青霉素的 LB 液体培养基进行扩大培养，提质粒进行 *Xho* Ⅰ 和 *Bam*H Ⅰ 双酶切后琼脂糖电泳鉴定。连接、转化、质粒提取、电泳鉴定的方法等均参照文献[4]。

1.5　*hly* 基因在大肠杆菌中的表达

构建 *hly* 的融合性表达质粒 pGEX 6P-1-hly，SDS-PAGE 鉴定 *hly* 基因在大肠杆菌中的表达情况，实验步骤依据《分子克隆实验手册》方法进行[4]。

1.6　亲和层析法分离纯化 GST-LLO 融合蛋白

重组质粒 pGEX6P-1-hly 转化大肠杆菌，挑取单菌落接种 LB 培养基，培养过夜后按 1% 比例接种于培养基，37℃ 培养至菌液的 OD_{600} 达到 0.4，加 IPTG 至终浓度为 0.4mmol/L，37℃ 诱导表达 3h 后，离心收获菌体，沉淀用磷酸盐缓冲液悬浮，超声波破碎菌体，再离心收集上清，经 Sepharose-4B 亲和层析柱分离纯化收集目的蛋白。

1.7　表达产物的生物学特性鉴定

1.7.1　表达产物溶血效价的测定：将诱导表达 LLO 的大肠杆菌超声波裂解，离心并收集上清，测定上清液 OD_{260} 和 OD_{280} 的吸光度值，同时以人源红细胞进行半数红细胞溶血效价的测定，溶血效价的测定依据 Geoffroy[5] 的方法进行。

1.7.2　不同 pH 条件对 LLO 溶血活性的影响：先分别用 pH5.0、5.5、6.0、6.5、7.0 的 PBS 梯度稀释裂解物上清，然后加入相应 pH 值的红细胞，其它操作步骤与 1.7.1 相同。

1.7.3　表达产物的动物毒性试验：将诱导表达 LLO 的大肠杆菌超声波裂解，离心并收集上清，将上清液和纯化产物分别进行梯度稀释，每一稀释度稀释液腹腔注射 3 只 BALB/C 小鼠，上清夜注射小鼠的剂量分别为 510μg/只、51μg/只和 5.1μg/只；纯化产物注射小鼠的剂量分别为 40μg/只、4.0μg/只和 0.4μg/只，以磷酸盐缓冲液、BL21(pGEX6P-1)作为阴性对照。

2 结果

2.1　重组 pGEX 6p-1-hly 质粒的构建

PCR 产物经 1.3% 琼脂糖凝胶电泳，呈现出约为 1.5kb 的特异性条带，与预期大小相符。T 载体连接所获得的重组质粒经 *Bam*H Ⅰ 和 *Xho* Ⅰ 双酶消化，电泳出现 1.5kb 的插入片段和 3.0kb 的载体，初步判定为阳性克隆，并命名为 pGEMT-hly。将来自该质粒的 *hly*(*Bam*H Ⅰ-*Xho* Ⅰ)片段连接到 pGEX-6p-1 上，利用 *hly* PCR 引物对阳性重组质粒进行 PCR 反应，结果均得到与 *hly* 基因大小相同的 PCR 产物。将该阳性克隆命名为 pGEX 6p-1-hly。

2.2　*hly* 基因序列测定和分析

测序结果显示，该基因为 1518bp，编码 505 个氨基酸，相对分子量为 56kD。同源性比较结果表明：与 GenBank 上公布的 *hly* 基因的第 772 个核苷酸不同，在氨基酸序列上表现为第 258 个氨基酸由 V 变为 M，核苷酸同源性为 99.8%。

2.3　*hly* 基因在大肠杆菌中的表达

以非重组菌 BL21(pGEX6p-1)菌体和未诱导的 BL21(pGEX6p-1-hly)菌体裂解物作对照，对重组菌 BL21(pGEX6p-1-hly)诱导表达后的菌体裂解物进行 SDS-PAGE 检测分析。结果显示：在分子量约为 82kD 的大小处有一特异的蛋白条带，与融合蛋白 GST-LLO 的分子量相当(图 1 的 3 和 4 泳道)。

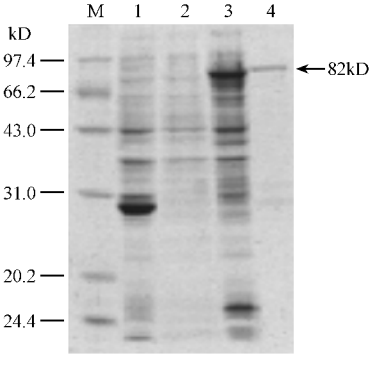

图 1　融合蛋白的 SDS-PAGE 分析

Fig. 1　SDS-PAGE analysis of expressed product

M. Protein marker; 1. BL21(6P-1) induced; 2. BL21(6p-1-hly) uninduced; 3. BL21(6p-1-hly) induced; 4. GST-LLO purified by Glutathione Sepharose 4B.

2.4　LLO 的生物学活性研究

溶血效价的测定结果表明，重组菌 BL21(6p-1-hly)培养物超声波裂解后离心收集的上清液测得可溶性蛋白的浓度为 1.16 mg/mL，LLO 的溶血效价为 2.26×10^4 HU/mg。

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部　http://journals.im.ac.cn

2.5 不同 pH 值对 LLO 溶血活性的影响

图 2 显示，LLO 在 pH5.5～6.0 时可发挥最佳生物活性，随着 pH 值的升高，LLO 的活性迅速下降，但在 pH7.0 时仍有一定的生物活性。

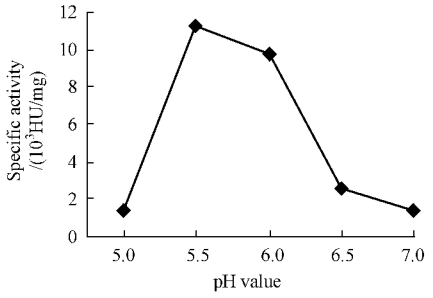

图 2 pH 值对 LLO 溶血活性的影响

Fig.2 The effect of hemolytic activity of LLO at different pH

2.6 融合蛋白对 BALB/c 小鼠的毒性试验

动物毒性试验结果表明，每只小鼠注射 510μg 总蛋白（<24h 死亡）或 40μg 纯蛋白（约 36h 死亡）可使小鼠在较短时间内死亡，其它组老鼠均健活；从死亡时间可推断前者毒性蛋白 LLO 的含量高于后者，且证明表达产物具有较高生物活性和较强毒性。

3 讨论

LM 作为一种兼性胞内菌，具有裂解宿主细胞吞噬泡膜、在胞浆中生长繁殖并可侵袭多种非吞噬细胞的特性，因而赋予它与那些在吞噬细胞的吞噬体中长期生存的细菌（如沙门氏菌、分支杆菌）不同的独特免疫应答机制：同时具有 MHC-Ⅰ类和 MHC-Ⅱ类抗原加工和提呈途径，其中以 MHC-Ⅰ类提呈途径为主，可激发 T 细胞较强的免疫应答；LLO 在 LM 该免疫生物学特性中起着重要的作用。LM 也因作为外源抗原表达的载体，成为分子生物学和免疫学研究的热点。本研究克隆、鉴定了 LM *hly* 基因，并将 *hly* 进行原核表达，获得纯化的具有活性的蛋白，这些结果为进一步研究 LLO 的致病机理、LLO 促进免疫应答的机制以及单抗的研制提供了重要条件。

溶血效价的测定结果表明融合蛋白 GST-LLO 在 pH5.5 时可发挥最佳生物活性，随着 pH 值的升高，LLO 的活性迅速下降，但在 pH7 时仍有一定的活性，这与 Giammarini[12] 的报道一致。但 Geoffroy[5] 的实验结果表明在 pH5.5 时可发挥最佳生物活性，但在 pH7.0 的中性环境中 LLO 无生物活性。Giammarini 是以 PET 载体表达系统表达分子量为 56KD 的 LLO，本实验是以 pGEX- 6p-1 载体表达系统表达分子量为 56kD 的 LLO，而 Geoffroy 是用将 LM 培养物纯化进行的溶血实验。可能 LLO 的制备来源不同，溶解所用的缓冲液不同等差异影响到 LLO PEST 区或与溶血相关的结构域的稳定性，从而导致溶血实验结果的差异。溶血实验显示融合蛋白具有较强的裂解真核细胞膜的作用，且发挥生物活性最适 pH 值是 5.5。LLO 的这一特性与 LM 兼性胞内寄生生活相适应：当 LM 被吞噬细胞吞噬进吞噬泡后，吞噬体内的最适 pH 是 5，因此 LLO 在吞噬泡中可较好的发挥生物活性，导致吞噬泡的裂解，LM 进入细胞浆，此时在 PEST 区的作用下，LLO 降解，从而为细菌的繁殖创造条件[14,15]。

本研究成功获得 LLO 与 GST 的融合表达。非常有意义的是表达产物大部分以可溶性形式存在，且表现出较高的溶血效价，未纯化的细胞裂解物上清溶血效价为 1.13×10^4 (HU/mg)，说明融合蛋白具有较强生物活性。由于 LLO 具有毒性，且在常温下受 PEST 结构的影响不太稳定，因此虽尝试改变诱导物浓度、诱导温度和摇床转速，但其表达量并不是太高。由于以上原因，裂解产物经过柱纯化后，虽然纯度显著提高，但产量较低，所以以后还应根据 LLO 的特性，改进纯化方法，以增加回收得率。

我们曾尝试将带有信号肽的 *hly* 基因构建于 pET 载体或 pGEX-6p-1 载体，并诱导以期表达，虽然培养物能测到较低溶血活性，但是 SDS-PAGE 检测均未得到预期大小的蛋白质带，其中的原因尚需进一步研究。

参 考 文 献

[1] Vines A, Swaminathan B. Identification and characterization of nucleotide sequence differences in three virulence-associated genes of *Listeria monocytogenes* strains representing clinically important serotypes. *Current Microbiology*, 1998, **36**: 309 – 318.

[2] Cossart P. Molecular and cellular basis of the infection by *Listeria monocytogenes*: an overview. *Int J Med Microbiol*, 2002, **291**(6 – 7): 401 – 409.

[3] 闻玉梅. 现代医学微生物学. 上海：上海医科大学出版社，1999. 557 – 569.

[4] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis J. Molecular Coloning: A laboratory Manual. New York: Cold spring Harbor Laboratory Press, 1989.

[5] Geoffroy C, Gaillard J L, Alouf J E, *et al*. Purification, characterization, and toxicity of the sulfhydryl-activated hemolysin listeriolysin O from *Listeria monocytogenes*. *Infect Immun*, 1987, **55**(7): 1641 – 1646.

[6] Frederick M, Ausubel R B, Robert E K, *et al*. 精编分子生物学实验指南. 颜子颖，王海林，译. 北京：科学出版社，1998.

[7] Goebel W, Kreft J. Cytolysins and the intracellular life of bacteria. *Trends Microbiol*, 1997, **5**(3): 86 – 88.

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

[8] Ye L, Bu Z, Skeen M J, *et al*. Enhanced immunogenicity of SIV Gag DNA vaccines encoding chimeric proteins containing a C-terminal segment of Listeriolysin O. *Virus Res*, 2003, **97**(1): 7 – 16.

[9] Bu Z, Ye L, Skeen M J. Enhancement of immune responses to an HIV env DNA vaccine by a C-terminal segment of listeriolysin O. *AIDS Res Hum Retroviruses*, 2003, **19**(5): 409 – 420.

[10] Saito G, Amidon G L, Lee K-D. Enhanced cytosolic delivery of plasmid DNA by a sulfhydryl-activatable listeriolysin O ? protamine conjugate utilizing cellular reducing potential. *Gene Therapy*, 2003, **10**: 72 – 83.

[11] Hess J, Grode L, Gentschev I, *et al*. Secretion of different literiolysin cognates by recombinant attenuated *Salmonella typhimurium*: superior efficacy of haemolytic over non-haemolytic constructs after oral vaccination. *Microbes and Infection*, 2000, **2**(15): 1799 – 1806.

[12] Giammarini C, Andreoni F, Amagliani G, *et al*. High-level expression of the *Listeria monocytogenes* listeriolysin O in Escherichia coli and preliminary characterization of the purified protein. *Protein Expr Purif*, 2003, **28**(1): 78 – 85.

[13] Gedde M M, Higgins D E, Tilney L G, *et al*. Role of listeriolysin in cell-to-cell spread of *Listeria monocytogenes*. *Infect Immun*, 2000, **68**(2): 999 – 1003.

[14] Decatur A L, Portnoy D A. A PEST-like sequence in listeriolysin O essential for *Listeria monocytogenes* pathogenicity. *Science*, 2000, **290**(5493): 992 – 995.

[15] Lety M A, Frehel C, Dubail I, *et al*. Identification of a PEST-like motif in listeriolysin O required for phagosomal escape and for virulence in *Listeria monocytogenes*. *Mol Microbiol*, 2001, **39**(5): 1124 – 1139.

Prokaryotic Expression and Bioactivity of The *Listeria monocytogenes* Listeriolysin O

YIN Yue-Lan　JIAO Xin-an*　PAN Zhi-Ming　ZHANG Xiao-Ming　GU Zhi-Qiang

(*Bioscience and Biotechnology College, Yangzhou University, Yangzhou* 225009, *China*)

Abstract: To express the *Listeria monocytogenes hly* gene in *Escherichia coli* and study its primary biological characteristics, *hly* gene without signal peptide sequence was amplified from *Listeria monocytogenes* serotype 4b by PCR and inserted into T-easy vector. Sequencing showed this *hly* gene was 1518 bp and nucleotide homology was more than 99.8% compared with three *Listeria monocytogenes hly* genes in GenBank. The cloned *hly* gene was then inserted into prokaryotic expression vector pGEX-6P-1 and transformed into *E. coli* BL21. The predicted fusion protein was detected by SDS-PAGE after IPTG inducion, which had molecular weight approximately 82 kD. Hemolytic experiment demonstrated the expressed fusion protein can lyse human red cell and its hemolytic titer attained 2.26×10^4 HU/mg. Conclusively, the *Listeria monocytogenes hly* gene was successfully cloned and expressed in *E. coli*. The successful expression of LLO in *E. coli* BL21 constituted a solid foundation for further researches such as pathogenesis and immune mechanism, MAb and vaccine development.

Key words: Listeriolysin O, *Listeria monocytogenes*, *hly* gene, Prokaryotic expression

Foundation item: Foundation for The Author of National Excellent Dorctoral Dissertation of PR China (FANEDD200358); Jiangsu Province International Coorperation Project (BZ2003031)

* Corresponding author. Tel: 86-514-7979233; Fax: 86-514-7991747; E-mail: xajiao@yahoo.com

Other author: CHEN Yao

Received date: 02-19-2004

《微生物学报》2005 年征稿计划

为了适应我国生物科技飞速发展的需要,促进国内外学术交流,本刊 2005 年征稿的主要内容如下:

1. 国家高技术研究发展计划项目(即国家“863 计划”)和国家基础研究发展规划项目(即国家“973 项目”)。

2. 国家自然科学基金资助的重点基金项目、青年基金资助项目、杰出青年基金项目、地区基金项目和面上资助项目以及省部级基金资助项目。

3. 国家科技攻关项目及省部级科技攻关项目。

4. 国际合作项目。

5. 具创新性或有重大突破的基础和应用基础研究成果 对我国西部大开发具有重要学术价值和应用价值的研究成果。

对于高水平的论文本刊将优先发表。欢迎投稿!欢迎订阅!欢迎提出宝贵意见!

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部　http://journals.im.ac.cn