

# 产单核细胞李斯特菌 *actA* 基因在大肠杆菌中的表达及其单克隆抗体的研制

殷月兰, 董 慧, 焦新安\*, 焦红梅, 顾志强

(扬州大学生物科学与技术学院 扬州 225009)

**摘 要** 利用 PCR 技术从血清型 1/2a 的产单核细胞李斯特菌 Lm-4 株中扩增出 *actA* 基因,经克隆筛选和测序鉴定后,构建成该基因的原核表达载体 pGEX-6P-1-actA 及 pET-actA,转入 *E. coli* 后, IPTG 诱导目的蛋白的表达。SDS-PAGE 结果表明, *actA* 基因在两种载体中均获得表达,融合蛋白的大小分别约为 120kDa 和 97kDa。以纯化蛋白为材料进行了 ActA 单抗的研制,获得 4 株抗 ActA 的单克隆抗体杂交瘤细胞株,腹水单抗 ELISA 效价为  $1:5 \times 10^4 \sim 1:1 \times 10^5$ 。选取单抗 1A5 进行 Western blot 分析,结果表明单抗 1A5 能和表达产物进行特异性反应,且与 Lm-4 多抗血清的 Western blot 结果一致。*actA* 基因的原核表达及单抗的研制为研究 ActA 蛋白的生物学活性及其致病作用奠定了基础。

**关键词**: 产单核细胞李斯特菌; *actA* 基因; 表达; 单克隆抗体

中图分类号: Q93 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209(2006)06-0999-04

产单核细胞李斯特菌(*Listeria monocytogenes*, Lm)是人兽共患李斯特菌病的病原,人感染后能引发脑膜炎、脑膜脑炎、发热性败血性胃肠炎等临床症状,感染后发病死亡率约为 25%。Lm 的致病性与它的侵袭力密切相关,有多种毒力因子与其侵袭力相关,包括 ActA 蛋白、李斯特菌溶血素  $\alpha$  (listeriolysin O, LLO) 等。这些毒力因子主要参与 Lm 的侵入、吞噬泡的溶解、极向运动及细胞间的扩散<sup>[1,5,8]</sup>。毒力因子 ActA 蛋白由 *actA* 基因编码的 639 个氨基酸组成,成熟的蛋白为 610 个氨基酸,分为 3 个结构域:羧基端结构域(391~639 位氨基酸),其包含的跨膜序列,使该蛋白固定于细菌表面;中央结构域(264~390 位氨基酸),包括 4 个富含脯氨酸的重复序列(PRRs),中央结构域能提高 Lm 的运动速率;氨基端结构域(30~263 位氨基酸),在聚合宿主细胞细胞质的肌动蛋白过程中必不可少的<sup>[2]</sup>。为了有效预防和控制李斯特菌病,有必要对 ActA 等主要毒力因子的生物学特性、致病机理和免疫应答机制进行深入研究。本研究成功地在*E. coli* 中表达了 *actA* 基因,并研制出 ActA 单克隆抗体,旨在为 ActA 蛋白的生物学特性、致病机理研究奠定基础,也为 Lm 病原鉴定提供新试剂。

## 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 1/2a 菌株 Lm-4、受体菌大肠杆菌(*Escherichia coli*) DH5 $\alpha$ 、BL21 和 BL21(DE3)由本室保存,李斯特菌减毒突变株 LM4 $\Delta$ actA 由本室构建;质粒载体 pET-30a(+ ) 购自 Novagen 公司, pGEM-T 载体购自 Promega 公司, pGEX-6p-1 载体购自 Amersham Biosciences 公司。

**1.1.2 试剂** 细菌基因组 DNA 抽提纯化试剂盒购自上海华舜生物工程有限公司。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、DNA 回收试剂盒、X-gal、IPTG 购自大连宝生物工程有限公司,氨苄青霉素等购自华美公司, His-Bind purification Kit 购自 Novagen 公司,谷胱甘肽亲和层析柱购自 Amersham Pharmacia Biotech 公司。鼠源单克隆抗体亚类试剂盒及辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠的抗体购自 Sigma 公司。

### 1.2 PCR 扩增 *actA* 基因

DNA 模板按细菌基因组 DNA 抽提纯化试剂盒方法制备,引物参照 GenBank 报道的 *actA* 基因设计,Primer1(含 *Bam* H I 酶切位点) 5'-GCAGGATCC

基金项目 国家自然科学基金(30425031),国家 973 项目(2006CB504400) 教育部 TRAPOYT(175),扬州大学科学基金项目(OK0313105)

\* 通讯作者。Tel: 86-514-7979091; Fax: 86-514-7311374; E-mail: xajiao@yahoo.com

作者简介 殷月兰(1971-)女,青岛人,在职博士生,讲师,研究方向为动物重要疫病发病机理和免疫机理方面的研究。董 慧(1980-)女,扬州人,硕士研究生,研究方向为微生物遗传与免疫学。两位作者对本文有同等贡献。

其他作者 袁 舟,张晨菊,征超峰

收稿日期 2006-01-17;接受日期 2006-02-28;修回日期 2006-06-17

GCGATAGCGAAGATTC-3', Primer2(含 *Xho* I 酶切位点) 5'-GGTCTCGAGGCACATAGAACCACCT-3', 两引物之间跨度约为 1800bp。PCR 反应体系(50 $\mu$ L): 模板 DNA 2 $\mu$ L, 10  $\times$  buffer 5 $\mu$ L, 2.5mmol/L dNTPs 4 $\mu$ L, Primer1 和 Primer2 各 1 $\mu$ L, 高保真 *Taq* 酶 0.5 $\mu$ L (3U/ $\mu$ L), ddH<sub>2</sub>O 36.5 $\mu$ L。PCR 反应条件: 94 $^{\circ}$ C 5min; 94 $^{\circ}$ C 50s 45 $^{\circ}$ C 50s 72 $^{\circ}$ C 2min 5 个循环 94 $^{\circ}$ C 50s 58 $^{\circ}$ C 50s 72 $^{\circ}$ C 2min 20 个循环 72 $^{\circ}$ C 10min。PCR 产物加尾后与 pGEM-T 连接, 转化 DH5 $\alpha$  宿主菌, 提取质粒经 *Xho* I 和 *Bam*H I 双酶切鉴定。初步鉴定阳性的克隆由大连宝生物公司测序。

### 1.3 重组质粒的构建与鉴定

用试剂盒回收目的片段, 分别与事先经 *Xho* I 和 *Bam*H I 双酶切的 pGEX-6p-1 表达载体和 pET 表达载体连接, 再将重组质粒 pGEX-6p-1-actA、pET-actA 分别转化宿主菌 BL21 和 BL21(DE3)。经筛选后, 从转化子中提取质粒进行 *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 [3]。

### 1.4 *actA* 基因的原核表达

pGEX-6p-1-actA 与 pET-actA 分别在相应宿主菌中诱导表达, IPTG 诱导浓度为 0.4mmol/L, 30 $^{\circ}$ C 诱导 5h。诱导产物进行 SDS-PAGE 分析, 实验步骤依据文献 [3] 的方法进行。

### 1.5 ActA 单克隆抗体的制备

将大肠杆菌 BL21(DE3)(pET-actA) 及 BL21(pGEX-6p-1-actA) 经诱导表达后用超声波法裂解, 离心收集上清, 用两种亲和层析柱分别纯化重组表达产物 ActA。以与 His 融合的纯化 ActA 蛋白为免疫原, 以与 GST 融合的 ActA 蛋白作为检测抗原, 用间接 ELISA 方法进行杂交瘤细胞筛选。单抗制备参照文献 [12] 进行。

### 1.6 Western blot 分析

将经诱导后的 BL21(DE3)(pET) 及纯化蛋白 GST-ActA 和 His-ActA 进行 SDS-PAGE 后, 电转移至硝酸纤维素膜上, 分别以单克隆抗体 1A5 及 Lm-4 免疫小鼠获得的多抗血清为一抗, 辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠 IgG 的抗体为二抗, 二氨基联苯胺 (DAB) 为底物, 进行蛋白印迹分析。

## 2 结果

### 2.1 *actA* 的扩增及序列分析结果

PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳, 呈现出约为 1.8kb 的特异性条带, 与预期大小相符。测序结果

显示该基因长为 1833bp, 编码 610 个氨基酸, 相对分子量约为 93kDa。同源性比较结果表明, 其与 GenBank 上公布的 LM EGD 1/2a 菌株 *actA* 基因的核苷酸同源性为 100%, 这反映了该基因是一个保守性的基因。

### 2.2 克隆载体的构建

T 载体连接所获得的重组质粒经 *Bam*H I 和 *Xho* I 双酶切消化, 电泳出现 1.8kb 的插入片段和 3.0kb 的载体条带, 初步判定为阳性克隆, 并命名为 pGEMT-actA。

### 2.3 表达质粒的构建

重组表达载体 pGEX-6p-1-actA 经 *Bam*H I 和 *Xho* I 双酶切后, 电泳出现 5.0kb 和 1.8kb 左右的两条带, 与预期结果相符。重组表达载体 pET-actA 经双酶切后, 电泳出现 5.5kb 和 1.8kb 左右的两条带, 与预期结果一致。以上实验结果表明基因已成功插入 pGEX-6p-1 和 pET 载体。

### 2.4 重组菌的诱导表达结果

对重组菌 BL21(pGEX-6p-1-actA)、BL21(DE3)(pET-actA) 诱导表达并纯化, SDS-PAGE 结果显示 *actA* 基因在构建的两种载体中均获得表达, 在 pGEX-6p-1 载体中获得表达的融合蛋白相对分子量为 120kDa (图 1), 在 pET 载体中获得表达的融合蛋

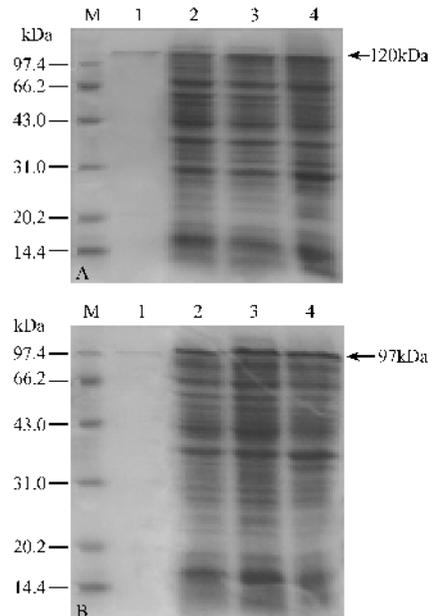


图 1 GST-ActA (A) 和 His-ActA (B) 融合蛋白大肠杆菌表达产物的 SDS-PAGE 分析

Fig.1 SDS-PAGE analysis of fusion protein GST-ActA from *E. coli* BL21 (A) and His-ActA from *E. coli* BL21(DE3) (B). A: M. Protein marker; 1. Purified GST-ActA protein; 2. pGEX-6p-1-actA; 3. Supernatants of lysate; 4. Sediments of lysate. B: M. Protein marker; 1. Purified His-ActA protein; 2. pET-actA; 3. Supernatants of lysate; 4. Sediments of lysate.

白相对分子量为 97kDa(图 2)均与预期大小相符。

## 2.5 单抗的生物学特性鉴定

经 2 次融合试验,共筛选得到 4 株单抗杂交瘤细胞系,分别命名为 1A5、2A2、3G11 和 6F5。4 株单抗的反应谱结果表明,它们是针对 ActA 蛋白的特异单抗(表 1)。经间接 ELISA 方法鉴定,杂交瘤 2A2 的亚类为 IgM,其他单抗的亚类均为 IgG1(表 2)。杂交瘤细胞 1A5 和 3G11 的单抗腹水 ELISA 效价为  $1:1 \times 10^5$ ,2A2 和 6F5 的单抗腹水 ELISA 效价为  $1:5 \times 10^4$ 。

表 1 ActA 单抗反应谱测定结果

Table 1 Reactivities of ActA McAbs

Strain	McAbs			
	1A5	2A2	3G11	6F5
BL2I( DE3 ) pET-actA )	+	+	+	+
BL2I( DE3 ) PET )	-	-	-	-
BL2I( pGEX - 6p -1-actA )	+	+	+	+
BL2I( pGEX-6p -1 )	-	-	-	-
Lm-4	+	+	+	+
Lm-4 $\Delta$ actA	-	-	-	-
<i>L. innocua</i>	-	-	-	-
<i>E. coli</i>	-	-	-	-

表 2 ActA 单抗的特性

Table 2 Characteristics of the McAbs against ActA

McAb	Isotype	Titers of ascites
1A5	IgG1	$1 \times 10^5$
2A2	IgM	$5 \times 10^4$
3G11	IgG1	$1 \times 10^5$
6F5	IgG1	$5 \times 10^4$

## 2.6 表达产物的 Western blot 分析结果

由图 3 和图 4 的免疫印迹结果可知,在图 3 和图 4 的泳道 1 中均有一大小约为 120kDa 的特异印迹带,图 3 和图 4 的泳道 3 中均有一大小约为 97kDa 的特异印迹带,而诱导的 BL2I( DE3 ) pET 对应的泳道中没有印迹带出现,由以上实验结果可以看出,用

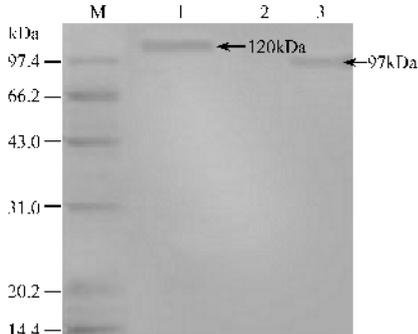


图 3 单抗 1A5 的免疫印迹图谱

Fig.3 Western blot analysis of McAb 1A5. M. Protein marker; 1. Purified protein GST-ActA; 2. BL2I( DE3 ) pET) induced; 3. Purified His-ActA.

单抗 1A5 和 Lm-4 的多抗血清进行的免疫印迹结果一致,表明表达的 ActA 蛋白具有免疫生物学活性,同时进一步证实了单抗的特异性。

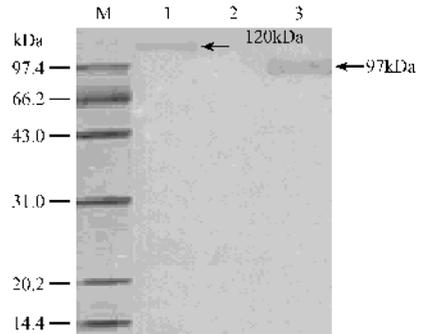


图 4 表达产物与 LM-4 多抗的免疫印迹图谱

Fig.4 Western blot analysis of product with polyclonal antibody against mouse. M. Protein marker; 1. Purified protein GST-ActA; 2. BL2I( DE3 ) pET) induced; 3. Purified His-ActA.

## 3 讨论

Lm 在感染过程中由宿主细胞的吞噬体逃逸到细胞质后,在菌体表面蛋白 ActA 的作用下激活 Arp2/3 复合物,使肌动蛋白进行装配,产生动力驱动 Lm 穿过细胞质进入相邻细胞,造成在细胞间的直接传播,使得该菌能逃避宿主先天性免疫和获得性免疫应答作用<sup>[4,9,10]</sup>。Cameron 等的研究表明,在没有其它 Lm 毒力因子存在下,ActA 足以引起运动<sup>[11]</sup>。因此 ActA 蛋白是 Lm 胞内运动所必需的成分,对 Lm 在细胞间的传播起关键作用。在将野生型 Lm *actA* 基因敲除后,细菌毒力降低 2000 倍(另文发表),进一步证实了 ActA 蛋白是 Lm 的主要毒力因子之一。

Shetron-Rama 等的研究表明,Lm 在未感染细胞之前,ActA 蛋白的表达水平极低,很难用常规手段检测到,只有在逃离宿主细胞吞噬体后表达量才显著提高<sup>[6]</sup>。ActA 蛋白表达受环境条件的影响无疑给该蛋白的纯化带来困难。在本研究中将 *actA* 基因进行原核表达并获得纯化蛋白,为深入研究 ActA 蛋白的免疫生物学特性及功能提供了材料。

为了对 Lm 的 ActA 蛋白进行定位,以及对参与细菌扩散的机制等进行研究,需要抗 ActA 的抗体,目前研究中普遍使用的是抗 ActA 多抗,虽然多抗的制备程序简单,但制备的纯度和产量有限,纯化过程复杂。本研究中,以分别与 His、GST 融合的 ActA 蛋白为免疫原和检测抗原,成功地获得抗 ActA 的单克隆抗体杂交瘤细胞株,为 Lm 病原鉴定和快速检测提供了新试剂,为深入开展 ActA 致病机理研究创造了条件。

最近的研究发现,除李斯特菌属的 Lm,志贺氏

菌属、立克次氏体属的一些细菌外,海分支杆菌、类鼻疽伯克氏菌以及肠致病型大肠杆菌(EPEC)和牛痘病毒等病原微生物也具有基于促使肌动蛋白装配、驱使细菌运动及细胞间直接传播的特性<sup>[4]</sup>。Cameron 等<sup>[12]</sup>的研究发现,以 Lm ActA 蛋白的 CFEFPPPTDE 多肽制备的 FS-1 抗体能阻断显微注射进 PtK2 细胞的志贺氏菌在细胞质内的运动。虽然 Lm ActA 蛋白和志贺氏菌的 IcsA 蛋白同源性并不高,但是 FS-1 抗体的作用以及两种菌体表面蛋白相似的功能预示着二者在促使肌动蛋白装配方面具有一些相似的抗原表位。本研究中 ActA 蛋白的获得和单抗的制备,必将对揭示这些具有与 ActA 功能相同或相似蛋白的病原微生物的致病机理和疾病预防提供借鉴。

### 参 考 文 献

- [ 1 ] 殷月兰, 焦新安, 潘志明, 等. 李斯特菌溶血素基因的原核表达及其生物学特性. *微生物学报*, 2004, **44** (4): 752 - 755.
- [ 2 ] Cabanes D, Dehous P, Dussurget O, *et al.* Surface proteins and the pathogenic potential of *Listeria monocytogenes*. *Trends Microbiol*, 2002, **10** (5): 238 - 245.
- [ 3 ] Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, *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.
- [ 4 ] Gouin E, Welch MD, Cossart P. Actin-based motility of intracellular pathogens. *Current Opinion in Microbiology*, 2005, **8** (1): 35 - 45.
- [ 5 ] Cossart P. Molecular and cellular basis of the infection by *Listeria monocytogenes*: an overview. *International Journal of Medicine Microbiol*, 2002, **291** (6-7): 401 - 409.
- [ 6 ] Shetron-Rama LM, Mueller K, Bravo JM, *et al.* Isolation of *Listeria monocytogenes* mutants with high-level *in vitro* expression of host cytosol-induced gene products. *Molecular Microbiology* 2003 **48** (6): 1537 - 1551.
- [ 7 ] Cossart P, Sansonetti PJ. Bacterial invasion: the paradigms of enteroinvasive pathogens. *Science*, 2004, **304**: 242 - 248.
- [ 8 ] Lacayo CI, Theriot JA. *Listeria monocytogenes* actin-based motility varies depending on subcellular location: a kinematic probe for cytoarchitecture. *Molecular Biology of Cell*, 2004, **15** (5): 2164 - 2175.
- [ 9 ] Goldberg MB. Actin-based motility of intracellular microbial pathogens. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2001, **65**: 595 - 626.
- [ 10 ] Upadhyaya A, VnOudenaarden A. Actin Polymerization: forcing flat faces forward. *Current Biology*, 2004, **14**: 467 - 469.
- [ 11 ] Cameron LA, Robbins JR, Footer MJ, *et al.* Biophysical parameters influence actin-based movement, trajectory, and initiation in a cell-free system. *Molecular Biology of the Cell*, 2004, **15**: 2312 - 2323.
- [ 12 ] 刘秀梵. 单克隆抗体在农业上的应用. 安徽: 安徽科学技术出版社, 1994.

## Expression of *actA* gene of *Listeria monocytogenes* in *Escherichia coli* and preparation of ActA monoclonal antibodies

YIN Yue-lan, DONG Hui, JIAO Xin-an\*, JIAO Hong-mei, GU Zhi-qiang  
(Bioscience and Biotechnology College, Yangzhou University, Yangzhou 225009, China)

**Abstract:** The *actA* gene was amplified from Lm-4 strain of *Listeria monocytogenes* serotype 1/2a by PCR and inserted into T vector. Sequencing showed *actA* gene was 1833bp long and nucleotide homology was 100% compared with *actA* gene of *Listeria monocytogenes* EGD strain in GenBank. The cloned *actA* gene was then inserted into prokaryotic expression vector pGEX-6P-1 and pET respectively. The predicted fusion protein was detected by SDS-PAGE after IPTG induction of recombinant bacteria. The fusion protein expressed in both vectors showed approximate molecular weight of 120kDa and 97kDa. The expressed fusion protein His-ActA was purified and used as antigen to immunize BALB/c mice, hybridomas were generated with traditional hybridoma techniques. McAbs were screened by ELISA, four hybridoma cell lines secreting antibodies against ActA protein were established and the ELISA titer of these ascitic McAbs were around  $1:5 \times 10^4 \sim 1:1 \times 10^5$ . The subtype and specificity of McAbs were identified by kit and Western blot. The McAb 1A5 reacted with the expressed fusion protein GST-ActA and His-ActA in Western blot, consistent with that of mouse anti-Lm-4 polyclonal antibodies. The successful expression of ActA protein in *E. coli* and preparation of its monoclonal antibodies has provided useful tools for studies on the biological activity of ActA protein and its role in listerial pathogenesis.

**Keywords:** *Listeria monocytogenes*; *actA* gene; Expression; Monoclonal antibody

Foundation item: National Natural Science Foundation of China (30425031); Key Project of Chinese National Programs for Fundamental Research and Development (2006CB504400); Teaching and Research Award Program for Outstanding Young Teachers in Higher Education Institutions of MOE, PRC (175); Natural Science Foundation of Yangzhou University (OK0313105)

\* Corresponding author. Tel: 86-514-7979091; Fax: 86-514-7311374; E-mail: xajiao@yahoo.com

Other authors: YUAN Zhou, ZHANG Chen-ju, ZHENG Chao-feng

Received: 17 January 2006/Accepted: 28 February 2006/Revised: 17 June 2006