

单核细胞增多性李氏杆菌野毒株 InlB 的分子特征及其表达和纯化研究

孟庆玲^{1,2} 乔 军¹ 才学鹏^{1*} 景志忠¹ 贾桂珍³

(¹ 中国农业科学院兰州兽医研究所 家畜疫病病原生物学国家重点实验室 甘肃省人兽共患病重点实验室 兰州 730046)

(² 甘肃农业大学动物医学院 兰州 730070) (³ 塔里木大学动物科技学院 阿拉尔 843300)

摘 要 采用 PCR 技术扩增单核细胞增多性李氏杆菌 TA 野毒株内化素 B (InlB) 基因, 进行编码分子的序列和结构分析, 并克隆入大肠杆菌表达载体 pET28a 中诱导表达。该基因全长 1893bp, 编码 630 个氨基酸, 其中前 35 个氨基酸残基构成信号肽序列。在推导的 InlB 蛋白氨基酸序列中, 从 N 端到 C 端分别包括 1 个 α -螺旋的 Cap 结构域、6 个富含亮氨酸的重复基序 (LRR)、1 个免疫球蛋白样结构域 (IR)、1 段 B 重复序列和 3 个串联的 GW 结构域, 同时还存在 5 个潜在的 N-糖基化位点, Leu 占有氨基酸残基的 10.2%。与 GenBank 已经报道的 18 个不同流行株 InlB 基因相比, 核苷酸和推导的氨基酸序列的同源性分别在 91.1% ~ 99.6% 和 92.3% ~ 99.8% 之间。重组菌菌体裂解物经 SDS-PAGE 和 Western blot 分析证实该基因已经正确表达。用 Ni²⁺ 亲和层析柱纯化了 InlB 重组蛋白。

关键词: 单核细胞增多性李氏杆菌; InlB; 表达; 纯化

中图分类号: Q932 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209(2007)06-1098-04

李氏杆菌病是由单核细胞增多性李氏杆菌 (*Listeria monocytogenes*, LM) 所引起的人畜共患传染病, 感染动物主要出现脑膜炎、败血症、流产等临床症状, 病死率较高^[1]。2005 年 6 月, 新疆塔里木地区某马鹿养殖场的马鹿发生了以神经症状并伴有流产为主要表现的一种传染病, 我们从马鹿流产的胎儿肝脏内分离出一株单核细胞增多性李氏杆菌 (命名为 TA 株)。本研究克隆和表达了该野毒株内化素 B (Internalin B, InlB) 基因, 揭示了其编码分子的结构特征和遗传变异情况, 为进一步探讨该菌入侵宿主细胞的分子机制和研制有效的疫苗奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株: 马鹿 LM TA 野毒株是 2005 年 6 月从新疆库尔勒地区某塔里木马鹿养殖场流产胎儿的肝脏内分离得到的, 经细菌形态学和生化试验鉴定为单核细胞增多性李氏杆菌。

1.1.2 主要试剂和仪器: Taq plus DNA 聚合酶和 DNA gel Extraction Kit 购自上海生物工程公司。T4 DNA 连接酶、限制性内切酶和 pMD18-T 载体购自大连 TaKaRa 公司。大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 表达载体 pET28a、克隆宿主菌 JM109 和表达宿主菌 BL21(DE3) 由本室保存。NTA 蛋白质纯化试剂购自上海申能博彩生物科技有限公司。兔抗 *L. monocytogenes* 多克隆抗体由本室制备。辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG 抗体购自 Sigma 公司。

1.1.3 引物: 根据 GenBank 中已报道的 *L. monocytogenes*

EGD 株 InlB 蛋白基因序列 (登录号: M67471), 设计一对特异性引物 P1 和 P2, 预期扩增长度为 1893bp。上游引物 P1: 5'-ACCGGATCCAAAGAAAAGCACAACCCAAG-3'; 下游引物 P2: 5'-ACCCTCGATTATTTCTGTGCCCTTAAAT-3'。为下一步表达需要, 分别在上、下游引物中引入 BamHI 和 XhoI 酶切位点, 并加有 3 个保护性碱基。

1.2 LM TA 株 InlB 蛋白基因 RT-PCR 扩增、克隆和遗传变异分析

按常规方法培养马鹿 LM TA 野毒株, 用灭菌的生理盐水洗下菌苔, 用 SDS-蛋白酶 K 法提取细菌基因组 DNA。PCR 采用 50 μ L 反应体系: DNA 2 μ L, 10 \times PCR buffer 5 μ L, 25mmol/L MgCl₂ 4 μ L, 引物 P1 (25pmol/ μ L) P2 (25pmol/ μ L) 各 1 μ L, 2.5mmol/L dNTPs 4 μ L, 水 32.7 μ L, Taq plus DNA 聚合酶 0.3 μ L (5U/ μ L), 混匀。反应条件为: 96 $^{\circ}$ C 3min, 94 $^{\circ}$ C 50s, 56 $^{\circ}$ C 45s, 72 $^{\circ}$ C 2min, 35 个循环, 72 $^{\circ}$ C 10min。电泳分析 PCR 产物, 并回收目的片段, 与 pMD18-T 载体 16 $^{\circ}$ C 过夜连接。次日将连接产物转化大肠杆菌 JM109, 用酶切和 PCR 方法筛选重组质粒 pTInlB, 送上海生物工程公司测序, 用 DNASTAR 软件对李氏杆菌不同流行株 InlB 基因进行序列比较和遗传变异分析。

1.3 InlB 蛋白分子结构预测分析

用在线软件 (Http://www.expasy.org) 对推导的 InlB 蛋白序列进行生物信息学分析及二级和三级结构预测。

1.4 原核表达载体 pETInlB 的构建与重组蛋白的表达和检测

用 BamHI 和 XhoI 同时分别双酶切 pTInlB 和 pET28a, 分别回收目的片段和载体片段, 用 T4 连接酶连接, 构建原核

基金项目: 国家 973 项目 (G1999011906)

* 通讯作者。Tel: 86-931-6148039; E-mail: cai-xuepeng@yahoo.com.cn

作者简介: 孟庆玲 (1969 -) 女, 江苏徐州市人, 博士, 主要从事人兽共患病研究。E-mail: xjmqqj@sohu.com

收稿日期: 2007-03-14; 接受日期: 2007-05-17; 修回日期: 2007-07-20 © 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

表达载体 pETInlB,并用酶切和 PCR 进行鉴定。将 pETInlB 转化 BL21(DE₃)后,加 IPTG(终浓度为 1mmol/L)诱导 3~7h,将诱导菌用超声波裂解,取裂解液上清进行 SDS-PAGE 检测。一抗用兔抗 LM 多克隆抗体,二抗用辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG 抗体进行 Western blot 分析。

1.5 重组蛋白 InlB 的纯化

用超声波裂解表达菌至澄清透明,离心取上清液进行纯化。用 NTA 纯化树脂装柱,进行 Ni 离子亲和层析柱纯化重组蛋白 InlB。收集层析过程中的洗脱液,进行 SDS-PAGE 电泳,检测重组蛋白的纯化效果。

2 结果

2.1 LM TA 株 InlB 蛋白基因的扩增和克隆

经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳,马鹿李氏杆菌 InlB 蛋白基因 PCR 产物大小为 1893bp,与预期值相符。以重组质粒 pTInlB 为模板,用 PCR 可扩增得到 1893bp 的核酸片段。将重组质粒 pTInlB 用 BamH I 和 Xho I 双酶切,可得到 2692 bp 和 1893bp 两个片段,表明目的基因已克隆入 T 载体中。

2.2 LM TA 株 InlB 基因核苷酸和推导的氨基酸序列分析

经测序,TA 野毒株 InlB 蛋白基因全长 1893 bp,编码 630 个氨基酸(图 1)。此基因序列已向 GenBank 提交(EF466102)。用 Signal IP 软件分析表明,在推导的李氏杆菌 InlB 蛋白氨基酸序列中前 35 个氨基酸残基构成信号肽,后面 595 氨基酸构成成熟 InlB 蛋白,其中 Leu 占有所有氨基酸残基的 10.2%。PROSITE 软件分析发现,成熟蛋白上有 5 个潜在的 N-糖基化位点(84~87,99~102,398~401,461~464,484~487),9 个酪氨酸激酶 II 磷酸化位点、7 个蛋白激酶 C 磷酸化位点、2 个依赖于 cAMP-cGMP 蛋白激酶磷酸化位点(62~65 和 583~586),4 个 N-豆蔻酰化位点。SMART 软件分析发现,在推导的 InlB 蛋白氨基酸序列中,从 N 端到 C 端分别包括 1 个 α -螺旋的 Cap 结构域(36~84),6 个富含亮氨酸的重复基序(LRR,91~118,119~140,141~162,163~184,185~206,207~208),1 个免疫球蛋白样结构域(IR,239~320),1 段 B 重复序列(321~391)和 3 个串联的 GW 结构域(392~465,466~547,548~630)(图 1)。



图 1 LM TA 株 InlB 蛋白的分子特征

Fig.1 The molecular characteristics of deduced amino acid sequence of internalin B gene of *Listeria monocytogenes* TA strain.

2.3 LM TA 株 InlB 蛋白二级结构和三级结构预测

用 HNN 软件对 InlB 蛋白二级结构预测表明,InlB 蛋白分子包括 9 段 α -螺旋,中间由无规圈曲相连接。用 Swiss-model 软件进行三级结构预测表明,InlB 蛋白三级结构是由无规圈曲连接的多段 β -平行螺旋所形成中空状的靴状结构,其中上面的靴筒部分为入侵相关结构域集中区域(图 2)。

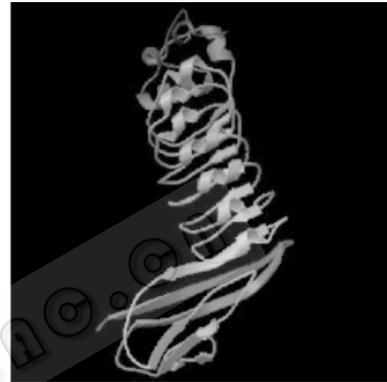


图 2 InlB 蛋白分子的 3D 结构分析

Fig.2 3D structure analysis of InlB protein by Swiss-model software.

2.4 LM 不同分离株 InlB 基因的系统发生分析

LM TA 野毒株与其他 18 个李氏杆菌毒株相比,InlB 基因核苷酸和推导氨基酸序列的同源性分别为 91.1%~99.6% 和 92.3%~99.8% 之间。不同的李氏杆菌分离株 InlB 基因存在一定的变异,主要为散在的点突变,其中 740~920、1560~1660 和 1760~1870 共 3 个区域为高变异区。聚类分析表明,李氏杆菌不同的分离株可分为两大谱系 Lineage I 和 Lineage II,其中 TA 株与 EGD 强毒株归为 Lineage II,两者 InlB 核苷酸和推导氨基酸序列的同源性分别为 99.3% 和 99.8%,表明两者亲缘关系很近(图 3)。

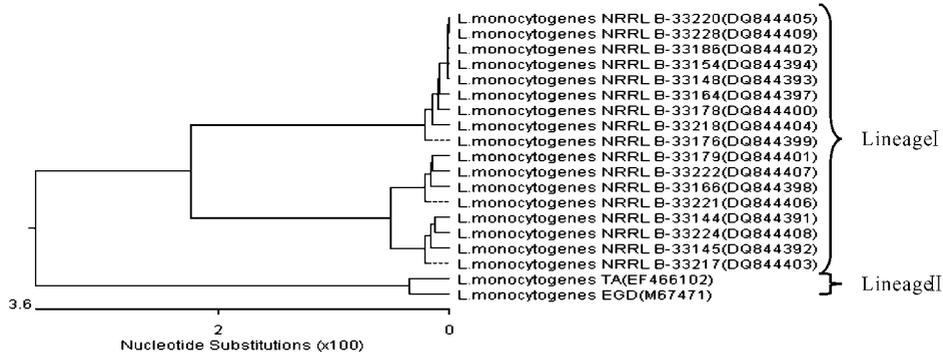


图 3 李氏杆菌不同野毒株 InlB 蛋白基因的系统发生分析

Fig.3 Phylogenetic tree based on homology of InlB genes of different strains of *L. monocytogenes*. GenBank accession numbers were as follows: *L. monocytogenes* strain NRRL B-33228, DQ844409; NRRL B-33224, DQ844408; NRRL B-33222, DQ844407; NRRL B-33221, DQ844406; NRRL B-33220, DQ844405; NRRL B-33218, DQ844404; NRRL B-33217, DQ844403; NRRL B-33186, DQ844402; NRRL B-33179, DQ844401; NRRL B-33178, DQ844400; NRRL B-33176, DQ844399; NRRL B-33166, DQ844398; NRRL B-33164, DQ844397; NRRL B-33160, DQ844396; NRRL B-33154, DQ844394; NRRL B-33148, DQ844393; NRRL B-33145, DQ844392; NRRL B-33144, DQ844391; NRRL B-33221, DQ844406; NRRL B-33224, DQ844408; NRRL B-33217, DQ844403; NRRL B-33179, DQ844401; NRRL B-33178, DQ844400; NRRL B-33176, DQ844399; NRRL B-33166, DQ844398; NRRL B-33164, DQ844397; NRRL B-33160, DQ844396; NRRL B-33154, DQ844394; NRRL B-33148, DQ844393; NRRL B-33145, DQ844392; NRRL B-33144, DQ844391; EGD M67471.

2.5 原核表达载体 pETInlB 的构建

以重组质粒 pETInlB 为模板,通过 PCR 可扩增出目的基因片段。用 *Bam*H I 和 *Xho* I 双酶切 pETInlB,可得到 5369bp 和 1893bp 两个片段,表明该重组质粒构建正确。

2.6 InlB 蛋白在 *E. coli* 中的表达、检测和纯化

pETInlB 转化菌的诱导产物在约 76.2 kDa 处有一条与预期值大小相符特异性的蛋白带,而 pET-28a(+) 转化菌的诱导产物和 pETInlB 转化菌的非诱导产物在该处没有蛋白带。

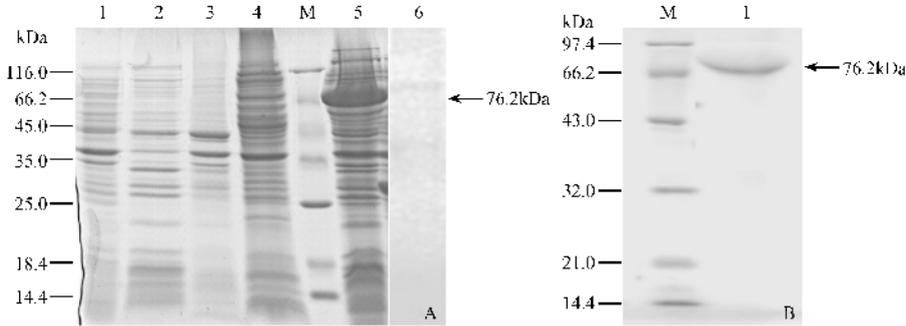


图 4 InlB 蛋白在 *E. coli* DE3 (BL21) 中的表达 (A) 和纯化 (B)

Fig. 4 Expression of InlB protein in *E. coli* DE3 (BL21) (A) and its purification (B). A: Expression of InlB protein in *E. coli* DE3 (BL21). M: Standard protein marker; 1: BL21(DE3) transformed by pET28a; 2, 3: Induced BL21(DE3) transformed by pET28a; 4: Uninduced BL21(DE3) transformed by pETInlB; 5: Induced BL21(DE3) transformed by pETInlB; 6: Western blot analysis. B: Purification of recombinant protein InlB SDS-PAGE analysis of purified protein InlB. M: Standard molecular weight protein marker; 1: Purified recombinant protein InlB.

3 讨论

内化素 (Internalin) 是由 LM 毒力相关基因编码的一组蛋白^[2,3] 其中最早被发现的是 InlA 和 InlB, 它们的功能与侵袭素相似, 能介导细菌侵入无吞噬能力的细胞内^[4,5]。在单核细胞增多性李氏杆菌中有大量的内化素类似物, 从结构上来看, 所有的内化素都有一个富含亮氨酸的重复序列 (LRR)^[6,7]。在该区域内, 亮氨酸在固定的位置以串联的排列方式重复出现。内化素典型的 LRR 含有 22~29 个氨基酸残基, 亮氨酸是在 3、6、9、11、16 和 22 位出现的 (x-x-I/V/L-x-x-F/P/L-x-x-L/P-x-L-x-x-L/I-x-L-x-x-N-x-I/L, x 代表任意氨基酸)。LRR 的这种基序形成右手螺旋状 (称为 β 平行螺旋), 每个 LRR 单元又有一个转角。具有 LRR 基序的蛋白在真核细胞中比较常见, 它介导蛋白质之间的相互作用, 与信号转导和细胞黏附等过程密切相关^[8,9], 但在原核细胞却很少见, 推测它能与细胞表面一些特异性的受体 (如 cMet 受体酪氨酸激酶、E 钙粘蛋白) 结合^[10,11], 与细菌对宿主细胞的黏附过程有关。

1991 年 Gaillard 等^[4]首次测定了 LM EGD 株 InlA 和 InlB 基因。序列分析表明, InlB 由 630 个氨基酸残基组成, 在其 N 端含有 7 个 LRR 单元, C 端含有一段 232 个氨基酸残基的区域, 该区域由 80 个氨基酸残基长的 3 个串联重复序列组成, 每个重复序列以 GW 开始, 这段区域与 InlB 蛋白黏附在菌体表面有关^[12]。本研究对推导的 TA 株 InlB 氨基酸序列分析表明, 在其 N 端存在 6 个 LRR 基序, 但在 LRR 基序前面还含有一段 α -螺旋的 Cap 结构域, 在其后面还有 1 个免疫球蛋白样结构域和 1 段 B 重复序列, 其中 B 重复序列这种结构通常

Western blot 分析可见, 该重组蛋白可与抗 *L. monocytogenes* 多克隆抗体发生血清学反应 (图 4-A 箭头处), 表明所表达的蛋白是特异性 InlB 蛋白。凝胶薄层扫描结果显示, pETInlB 转化的 BL21(DE3) 在 IPTG 诱导 6 h 后 InlB 蛋白的最高表达量可占菌体总蛋白量的 20.6%。将 Ni²⁺ 亲和层析柱纯化的重组蛋白进行 SDS-PAGE 电泳, 结果只出现了单一的蛋白带, 表明纯化效果良好 (图 4-B)。

能与葡萄糖聚糖、糖蛋白 C1 等受体结合, 可能对宿主细胞的黏附起辅助作用。通过对 InlA 和 InlB 基因突变研究, 发现 InlA 和 InlB 基因均是 LM 侵入无吞噬性细胞所必需的^[13,14], 它们能使没有侵袭性细菌产生侵袭力, 两者协同作用引起细菌内化入宿主细胞中^[15]。InlB 蛋白能够诱导宿主细胞表面形成皱褶, 诱导宿主细胞蛋白质的酪氨酸磷酸化。研究还发现, InlB 和 InlA 具有不同的细胞特异性^[16], InlA 能介导细菌侵入 Caco-2 肠细胞, 而 InlB 则不能; 反之 InlB 能介导细菌侵入鼠 TIB73 肝脏细胞^[17], 但 InlA 却不能; 但对于侵入人肝细胞, 这两种内化素都是必需的^[15,16]。另外, 根据 InlB 基因的聚类分析, Nightingale 等 (2005) 研究发现可将 LM 不同地域的分离株分为两大遗传谱系^[18]。Yeu-Harn 等 (2006) 研究也发现, InlB 基因不但可以用于 LM 的基因型分型, 而且还存在着同源重组和在压力选择下而产生的遗传多样性^[19]。鉴于 InlB 蛋白与 LM 侵袭力、免疫原性和分子分类密切相关, 本试验开展了 InlB 蛋白基因的克隆、表达及纯化研究, 不但可以了解 InlB 蛋白的结构特征和野毒株 InlB 基因的遗传变异情况, 而且为进一步探讨 LM 侵入宿主细胞的分子机制和研制有效的基因工程亚单位疫苗奠定基础。

参 考 文 献

- [1] 陆承平 主编. 兽医微生物学. 第三版. 北京: 中国农业出版社 2001 303-305.
- [2] Lecuit M, Ohayon H, Braun L, et al. Internalin of *Listeria monocytogenes* with an intact leucine-rich repeat region is sufficient to promote internalization. *Infect Immun*, 1997, **65**(12):5309-

- [3] Wolf-Dieter S, Gero G, Meikel D, *et al.* Internalins from the human pathogen *Listeria monocytogenes* combine three distinct folds into a contiguous internalin domain. *Journal of Molecular Biology*, 2003, **312**(4): 783 – 794.
- [4] Gaillard JL, Berche P, Frehel C, *et al.* Entry of *L. monocytogenes* into cells is mediated by internalin, a repeat protein reminiscent of surface antigens from gram-positive cocci. *Cell*, 1991, **65**(7): 1127 – 1141.
- [5] Kim H, Marquis H, Boor KJ. Sigma B contributes to *Listeria monocytogenes* invasion by controlling expression of inlA and inlB. *Microbiology*, 2005, **151**(10): 3215 – 3222.
- [6] Alexander F, Matthias PM, Wolfgang PF, *et al.* Folding and Stability of the Leucine-rich Repeat Domain of Internalin B from *Listeria monocytogenes*. *Journal of Molecular Biology*, 2004, **337**(2): 453 – 461.
- [7] Marino M, Braun L, Cossart P, *et al.* Structure of the InlB leucine-rich repeats, a domain that triggers host cell invasion by the bacterial pathogen *L. monocytogenes*. *Mol Cell*, 1999, **4**: 1063 – 1072.
- [8] Bostjan K, Andrey VK. The leucine-rich repeat as a protein recognition motif. *Current Opinion in Structural Biology*, **11**(6): 725 – 732.
- [9] Cossart P, Lecuit M. Interactions of *Listeria monocytogenes* with mammalian cells during entry and actin-based movement: bacterial factors, cellular ligands and signaling. *EMBO J*, 1998, **17**: 3797 – 3806.
- [10] Schubert WD, Urbanke C, Ziehm T, *et al.* Structure of internalin, a major invasion protein of *Listeria monocytogenes*, in complex with its human receptor E-cadherin. *Cell*, 2002, **111**: 825 – 836.
- [11] Machner MP, Frese S, Schubert WD, *et al.* Aromatic amino acids at the surface of InlB are essential for host cell invasion by *Listeria monocytogenes*. *Mol Microbio*, 2003, **48**: 1525 – 1536.
- [12] Muller S, Hain T, Pashalidis P, *et al.* Purification of the inlB gene product of *Listeria monocytogenes* and demonstration of its biological activity. *Infect Immun*, 1998, **66**(7): 3128 – 33.
- [13] Parida SK, Domann E, Rohde M, *et al.* Internalin B is essential for adhesion and mediates the invasion of *Listeria monocytogenes* into human endothelial cells. *Mol Microbiol*, 1998, **28**(1): 81 – 93.
- [14] Poyart C, Trieu-Cuot P, Berche P. The inlA gene required for cell invasion is conserved and specific to *Listeria monocytogenes*. *Microbiology*, 1996, **142**(1): 173 – 180.
- [15] Lingnau A, Domann E, Hudel M, *et al.* Expression of the *Listeria monocytogenes* EGD inlA and inlB genes, whose products mediate bacterial entry into tissue culture cell lines, by PrfA-dependent and independent mechanisms. *Infect Immun*, 1995, **63**(10): 3896 – 3903.
- [16] Khelef N, Lecuit M, Bierne H, *et al.* Species specificity of the *Listeria monocytogenes* InlB protein. *Cell Microbiol*, 2006, **8**(3): 457 – 470.
- [17] Gregory SH, Sagnimeni AJ, Wing EJ. Internalin B promotes the replication of *Listeria monocytogenes* in mouse hepatocytes. *Infect Immun*, 1997, **65**(12): 5137 – 5141.
- [18] Nightingale KK, Windham K, Wiedmann M. Evolution and molecular phylogeny of *Listeria monocytogenes* isolated from human and animal listeriosis cases and foods. *J Bacteriol*, 2005, **187**(16): 5537 – 5551.
- [19] Yeu-Ham LT, Renato HO, Kendra KN, *et al.* *Listeria monocytogenes* internalins are highly diverse and evolved by recombination and positive selection. *Infection, Genetics and Evolution*, 2006, **6**(5): 378 – 389.

Molecular characteristics of InlB protein of *Listeria monocytogenes* wild strain and its expression and purification

MENG Qing-ling^{1,2}, QIAO Jun¹, CAI Xue-peng^{1*}, JING Zhi-zhong¹, JIA Gui-zhen³

(¹ State Key Lab of Veterinary Etiological Biology, Gansu Key Lab of Amphixenosis, Lanzhou Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Lanzhou 730046, China)

(² Department of Animal Medical Sciences, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070, China)

(³ Department of Animal Sciences and Technology, Tarim Agricultural University, Alar 843300, China)

Abstract: Internalin B of *Listeria monocytogenes* TA wild strain was amplified by PCR method and sequenced, then subcloned into prokaryotic vector pET28a for expression. The complete length of InlB gene was 1893 bp, encoding 630 amino acids. The front 35 amino acids consisted of signal peptide. There were one cap domain with α -helix region, 6 leucine-rich repeat motifs, one immunoglobulin (Ig)-like domain, one B repeat sequence, 3 direct repeat GW domains and 5 N-glycosylation sites. The amino acid of leucine amounted to 10.2 percent in all amino acids of deduced sequence. Compared the InlB genes with that of other 18 isolates reported in GenBank, the identities of nucleotide sequence and deduced amino acid sequence were 91.1% ~ 99.6% and 92.3% ~ 99.8%, respectively. Expressed InlB protein was detected by SDS-PAGE and confirmed by western blot. Recombinant protein was successfully purified by Ni²⁺ affinity chromatograph column.

Keywords: *Listeria monocytogenes*; Internalin B; expression; purification

Foundation item: Key Project of Chinese National Programs for Fundamental Research and Development (G1999011906)

* Corresponding author. Tel: 86-931-6148039; E-mail: cai_xuepeng@yahoo.com.cn

Received: 14 March 2007/Accepted: 17 May 2007/Revised: 12 July 2007