



单增李斯特菌毒力因子溶血素关键氨基酸位点在感染过程中的作用研究

冯昱超^{1#}, 徐加利^{1#}, 朱斌杰¹, 吴泽斌¹, 王雯静¹, 丁桢¹, 蔡孜萌¹,
陈绵绵¹, 孙静¹, 江铃丽², 宋厚辉¹, 夏菁^{1*}, 程昌勇^{1*}

- 1 浙江农林大学动物科技学院·动物医学院 浙江省畜禽绿色生态健康养殖应用技术研究重点实验室 动物健康互联网检测技术浙江省工程研究中心 浙江省动物医学与健康管理国际科技合作基地 中澳动物健康大数据分析联合实验室, 浙江 杭州 311300
2 宁波卫生职业技术学院, 浙江 宁波 315100

冯昱超, 徐加利, 朱斌杰, 吴泽斌, 王雯静, 丁桢, 蔡孜萌, 陈绵绵, 孙静, 江铃丽, 宋厚辉, 夏菁, 程昌勇. 单增李斯特菌毒力因子溶血素关键氨基酸位点在感染过程中的作用研究[J]. 微生物学报, 2024, 64(4): 1219-1232.

FENG Yuchao, XU Jiali, ZHU Binjie, WU Zebin, WANG Wenjing, DING An, CAI Zimeng, CHEN Mianmian, SUN Jing, JIANG Lingli, SONG Houhui, XIA Jing, CHENG Changyong. Roles of key amino acid residues of the virulence factor listeriolysin O in *Listeria monocytogenes* infection[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2024, 64(4): 1219-1232.

摘要: 【目的】探究单增李斯特菌溶血素 O (listeriolysin O, LLO) 中 D3 区域 β 8 折叠片上第 253 位氨基酸(谷氨酰胺, Q)和第 254 位氨基酸(异亮氨酸, I)对单增李斯特菌(*Listeria monocytogenes*)感染生物学功能的影响。【方法】构建 LLO_{Q253A} 和 LLO_{I254A} 突变蛋白的原核表达菌株, 以及利用同源重组方法构建 *hly*_{Q253A} 和 *hly*_{I254A} 突变株; 通过表达纯化突变蛋白, 测定溶血活性; 比较 LLO 第 253 位 Q 和第 254 位 I 均突变成丙氨酸(A)后, 对细菌体外生长能力、黏附侵袭、胞内迁移和增殖能力的影响。【结果】相应位点突变后, LLO 蛋白均能够正常表达。在 pH 6.5 条件下, 所有突变蛋白和突变株的溶血活性丧失。然而, 在 pH 5.5 条件下, LLO_{I254A} 和 *hly*_{I254A} 恢复了溶血活性。与野生株相比, 突变株的体外生长、黏附能力和胞内增殖能力均无明显差异; 突变株的侵袭能力和胞内迁移能力显著低于野生株。【结论】本研究证实第 253 位 Q 和第 254 位 I

资助项目: 国家自然科学基金(32172849, 32302961); 浙江省自然科学基金(LQ22C180001, LY23C180002); 宁波市公益类科技项目(2022S006); 浙江农林大学人才启动项目(2023LFR013)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (32172849, 32302961), the National Science Foundation of Zhejiang Province (LQ22C180001, LY23C180002), the Ningbo Science and Technology Bureau (2022S006), and the Zhejiang A&F University Talents Starting Program (2023LFR013).

[#]These authors contributed equally to this work.

*Corresponding authors. E-mail: CHENG Changyong, lamge@zafu.edu.cn; XIA Jing, xiajing125@zafu.edu.cn

Received: 2023-11-04; Accepted: 2024-01-05; Published online: 2024-01-09

均突变成 A 后, 单增李斯特菌在 pH 6.5 条件下丧失溶血活性, 并降低了感染宿主细胞的能力, 但具体机制还有待进一步探索。本研究为深入探究 LLO 结构对单增李斯特菌生物学功能的影响奠定基础, 对单增李斯特菌点突变株的构建具有一定参考意义。

关键词: 单增李斯特菌; 溶血素 O; 感染; 点突变缺失株

Roles of key amino acid residues of the virulence factor listeriolysin O in *Listeria monocytogenes* infection

FENG Yuchao^{1#}, XU Jiali^{1#}, ZHU Binjie¹, WU Zebin¹, WANG Wenjing¹, DING An¹, CAI Zimeng¹, CHEN Mianmian¹, SUN Jing¹, JIANG Lingli², SONG Houhui¹, XIA Jing^{1*}, CHENG Changyong^{1*}

¹ Key Laboratory of Applied Technology on Green-Eco-Healthy Animal Husbandry of Zhejiang Province, Zhejiang Provincial Engineering Research Center for Animal Health Diagnostics & Advanced Technology, Zhejiang International Science and Technology Cooperation Base for Veterinary Medicine and Health Management, China-Australia Joint Laboratory for Animal Health Big Data Analytics, College of Animal Science and Technology & College of Veterinary Medicine, Zhejiang A&F University, Hangzhou 311300, Zhejiang, China

² Ningbo College of Health Sciences, Ningbo 315100, Zhejiang, China

Abstract: [Objective] To investigate the impacts of the amino acid residues at position 253 (glutamine, Q) and 254 (isoleucine, I) in the β 8 sheet of the D3 domain of listeriolysin O (LLO) on the biological functions of *Listeria monocytogenes*. **[Methods]** We constructed the mutant proteins LLO_{Q253A} and LLO_{I254A} and the mutant strains *hly*_{Q253A} and *hly*_{I254A} by homologous recombination. After the expression and purification, the mutant proteins examined for the hemolytic activity. Furthermore, the growth, adhesion, invasion, intracellular migration, and proliferation were compared between the mutant strains *hly*_{Q253A} and *hly*_{I254A}. **[Results]** After the mutation of the corresponding sites, LLO proteins could be expressed normally. However, the mutant proteins and strains lost hemolytic activity at pH 6.5, and the hemolytic activities of LLO_{I254A} and *hly*_{I254A} were restored at pH 5.5. The mutant strains showed no significant differences in extracellular growth, adhesion, and intracellular proliferation compared with the wild-type strain. However, the invasion and intercellular migration of the mutant strains were significantly lower than that of the wild-type strain. **[Conclusion]** The mutations of Q253A and I254A in LLO cause the loss of hemolytic activity at pH 6.5 and a reduction in the bacterial infection, the specific mechanisms of which remain to be explored. This study establishes a foundation for deeply understanding the impact of LLO structure on the biological function of *L. monocytogenes* and holds significance for the construction of point-mutated strains of *L. monocytogenes*.

Keywords: *Listeria monocytogenes*; listeriolysin O; infection; point-mutated strains

单核细胞增生李斯特菌 (*Listeria monocytogenes*, LM), 简称单增李斯特菌, 是一种广泛存在于自然环境中的革兰阳性食源性胞内寄生菌, 可以在土壤、水、植物、动物及人体中存在^[1]。单增李斯特菌感染主要在老人、孕妇、孩童以及免疫力低下人群中多发, 可引起败血症、脑膜炎、胎儿流产等多种疾病, 致死率可达 20%–30%^[2]。单增李斯特菌能够在 4–45 °C 的温度下生长, 尤其适应在低温环境中进行生长繁殖^[3]。因此, 冰箱和冷冻食品储存室是单增李斯特菌滋生和传播的重要场所。此外, 该细菌具有极强的耐盐性和耐酸性, 能够在酸性食品中存活和繁殖^[1]。

单增李斯特菌溶血素 O (listeriolysin O, LLO), 是一种由 *hly* 基因编码的成孔毒素, 属于胆固醇依赖性溶细胞素(cholesterol-dependent cytolysins, CDCs)家族。LLO 主要在裂解和吞噬体中起关键作用, 其通过溶解细胞吞噬体膜, 促进单增李斯特菌进入胞质并增殖, 影响细菌毒力, 是单增李斯特菌的主要毒力因子之一^[3–5]。LLO 的 N 末端具有富含脯氨酸(P)、谷氨酸(E)、丝氨酸(S)和苏氨酸(T)的 PEST 序列, 该 PEST 序列可以调节 LLO 蛋白活性, 其主要作用是使蛋白质磷酸化和通过泛素-蛋白酶体途径引起蛋白降解。去除 PEST 序列的 LLO 可聚集在胞内, 对细胞的毒性增强, 但导致单增李斯特菌致病能力下降^[6]。

LLO 由两个亚基组成, 包括 LLO-A 和 LLO-B。LLO-A 是 LLO 的活性亚单位, 主要负责破坏细胞膜; LLO-B 则作为 LLO 的结构亚单位, 主要负责与胆固醇相互作用, 从而在细胞膜上形成孔洞。LLO-A 可以通过这些孔洞进入细胞, 破坏细胞质膜, 释放致病因子, LLO 的存在是单增李斯特菌对宿主细胞影响的主要机制之一^[7–8]。另外, LLO 蛋白由 4 个结构

域(D1–D4)组成, 其中 D1 中包含了 PEST 序列, D4 包含了胆固醇识别位点。LLO_{Q253}、LLO_{I254} 位于 D3 区 β 8 折叠片, 而 D3 区与 D1 区的电荷互补性对相邻分子间接触、LLO 聚集与孔形成可能是重要的, 且 D3 区中插入的螺旋束 HB1 与 HB2 的解折叠和聚集可导致 LLO 失活^[9–10]。因此, 本研究通过表达纯化 LLO_{Q253A} 和 LLO_{I254A} 突变蛋白, 利用同源重组的方法构建 *hly*_{Q253A} 和 *hly*_{I254A} 突变株, 检测各点突变蛋白和突变株的溶血活性, 以及点突变株的感染生物学能力, 为进一步探究 LLO 结构对单增李斯特菌生物学功能的影响奠定基础。

1 材料与方法

1.1 主要试验材料

本研究所涉及原核表达载体 pET-30a, 温敏型穿梭质粒载体 pKSV7, 单增李斯特菌 EGD-e (WT)和 Δhly (缺失 LLO 后单增李斯特菌丧失膜穿孔能力), 大肠杆菌 DH5 α 和 Rosetta, 人肠道上皮细胞 Caco-2, 小鼠成纤维细胞 L929, 小鼠单核巨噬细胞 RAW264.7 和 J774 均由本实验室保存; 2 $\times$ Phanta Max Master Mix、Green Taq Mix, 南京诺唯赞生物科技股份有限公司; 限制性内切酶 *Nde* I、*Xho* I、*Bam*H I 和 *Pst* I, NEB 公司; 无内毒素质粒提取试剂盒, 天根生化科技(北京)有限公司; 脑心肉汤(brain and heart infusion broth, BHI)和 LB 培养基, OXOID 公司; RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute 1640)、DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, DMEM)细胞培养基、血清(fetal bovine serum, FBS)和胰酶(0.25% Trypsin-EDTA), ThermoFisher Scientific; 无菌脱纤维绵羊血, 南京森贝伽生物科技有限公司; 卡那霉素和氯霉素, 上海阿拉丁生化科技股份有限公司。

1.2 引物设计与合成

根据 NCBI 查询单增李斯特菌(GenBank 登录号为 NC_003210.1)的 *hly* 基因序列, 利用 SnapGene 软件分别设计 *hly* 片段扩增引物 LLO-*Nde* I-Fwd/LLO-*Xho* I-Rev 和 *hly*-*Bam*H I-Fwd/*hly*-*Pst* I-Rev、点突变株重组质粒的鉴定引物 M13-Fwd/M13-Rev、蛋白表达载体构建的鉴定引物 T7-Fwd/T7-Rev、定点突变引物 *hly*_{Q253A}-Fwd/*hly*_{Q253A}-Rev、*hly*_{I254A}-Fwd/*hly*_{I254A}-Rev 以及点突变鉴定引物 A-Fwd/D-Rev, 引物序列见表 1。

1.3 重组质粒构建

参照本实验室已发表的实验方法^[11], 以单增李斯特菌野生株 EGD-e (WT)为模板, 分别用引物 LLO-*Nde* I-Fwd/LLO-*Xho* I-Rev 和 *hly*-*Bam*H I-Fwd/*hly*-*Pst* I-Rev, 通过 PCR 扩增 *hly* 基因的 ORF 区域。将上述获得的 2 个目的片段纯化后, 分别与 pET-30a 载体用 *Nde* I 和 *Xho* I 限制性内切酶、与 pKSV7 载体用 *Bam*H I 和 *Pst* I 限制性内切酶双酶切处理 2 h, 将纯化后的酶切产物用 T4 DNA 连接酶 4 °C 连接过夜。

使用鉴定引物 T7-Fwd/T7-Rev, 通过 PCR 验证 pET-30a-LLO 重组原核表达质粒; 使用鉴定引物 M13-Fwd/M13-Rev 通过 PCR 验证 pKSV7-*hly* 重组穿梭质粒; 将疑似正确的重组质粒送去杭州有康生物技术有限公司进行 DNA 测序。将测序正确的 pET-30a-LLO 原核表达质粒和 pKSV7-*hly* 重组穿梭质粒作为模板, 利用点突变引物 *hly*_{Q253A}-Fwd/*hly*_{Q253A}-Rev、*hly*_{I254A}-Fwd/*hly*_{I254A}-Rev 通过 PCR 技术构建 pET-30a-LLO_{Q253A}、pET-30a-LLO_{I254A} 重组原核表达质粒和 pKSV7-*hly*_{Q253A}、pKSV7-*hly*_{I254A} 重组穿梭质粒并进行测序, 将测序正确的 pET-30a-LLO_{Q253A} 和 pET-30a-LLO_{I254A} 原核表达质粒分别命名为 pSL3989、pSL3990 (图 1A); pKSV7-*hly*_{Q253A}、pKSV7-*hly*_{I254A} 重组穿梭质粒分别命名为 pSL3983、pSL3984 (图 1B)。

1.3.1 原核表达 LLO 突变蛋白重组质粒

分别将 pSL3989 和 pSL3990 热转化至原核表达感受态细胞 Rosetta, 将转化产物涂布于含卡那霉素(50 µg/mL)的 LB 固体培养基, 37 °C 静置

表 1 本研究用的引物

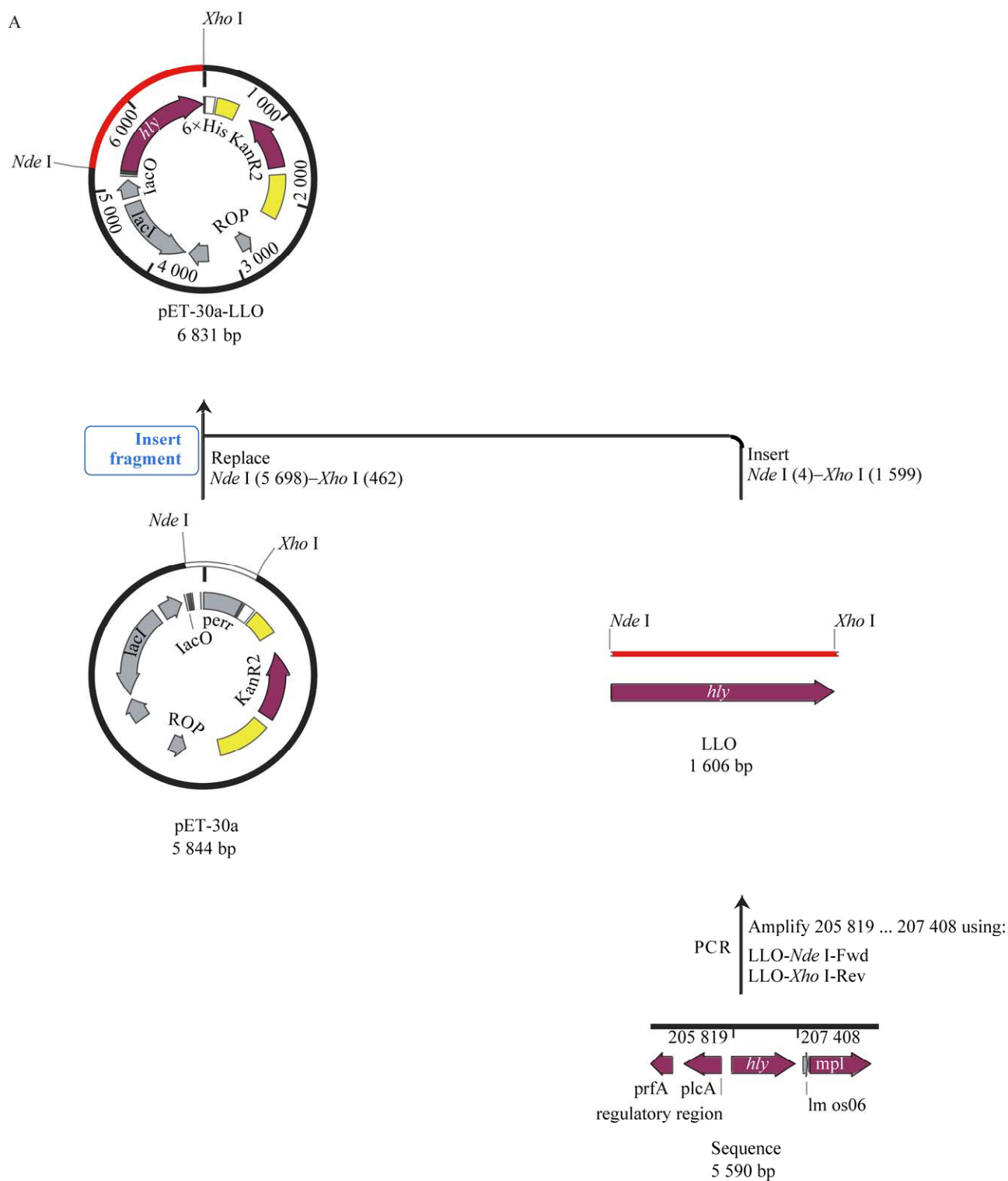
Table 1 Primers used in this study

Primers	Sequences (5'→3')
LLO- <i>Nde</i> I-Fwd	<u>CCC</u> <u>CATATG</u> ATGAAAAAATAATGCTAGTTTTATTACACTTATATTAGTTAGTCTACC
LLO- <i>Xho</i> I-Rev	<u>CCCTCGAG</u> TTATTCGATTGGATTATCTACTTTATTACTATATTTTCGGATAAAGC
<i>hly</i> - <i>Bam</i> H I-Fwd	<u>CGCGGATCC</u> ATGAAAAAATAATGCTAGTTTTATTACACTTATATTAGTTAGTCTACC
<i>hly</i> - <i>Pst</i> I-Rev	<u>GGCTGCAG</u> TTATTCGATTGGATTATCTACTTTATTACTATATTTTCGGATAAAGC
M13-Fwd	TGTAAAACGACGGCCAGT
M13-Rev	CAGGAAACAGCTATGACC
T7-Fwd	TAATACGACTCACTATAGGG
T7-Rev	ATTTAGGTGACACTATAGAA
<i>hly</i> _{Q253A} -Fwd	GTCATTAGTTTTAAAGCAATTACTATAACGTGAATGTTAATGAACCTAC
<i>hly</i> _{Q253A} -Rev	GTAGGTTTCATTAACATTCACGTTATAGTAAATTGCTTTAAACTAATGAC
<i>hly</i> _{I254A} -Fwd	GTCATTAGTTTTAAACAAGCTTACTATAACGTGAATGTTAATGAACCTAC
<i>hly</i> _{I254A} -Rev	GTAGGTTTCATTAACATTCACGTTATAGTAAAGCTTGTTTAAACTAATGAC
A-Fwd	CGCAGTAAATACATTAGTGGAAGATGG
D-Rev	GACAGATTTTCCGCTTACGGC

The protective bases are set to italic; The restriction enzyme sites are underlined.

培养 12–24 h, 挑取若干单菌落用点突变鉴定引物 A-Fwd/D-Rev 进行阳性转化子的 PCR 验

证, PCR 鉴定正确的 *hly* 基因点突变原核表达菌株为后续蛋白表达时使用。



B

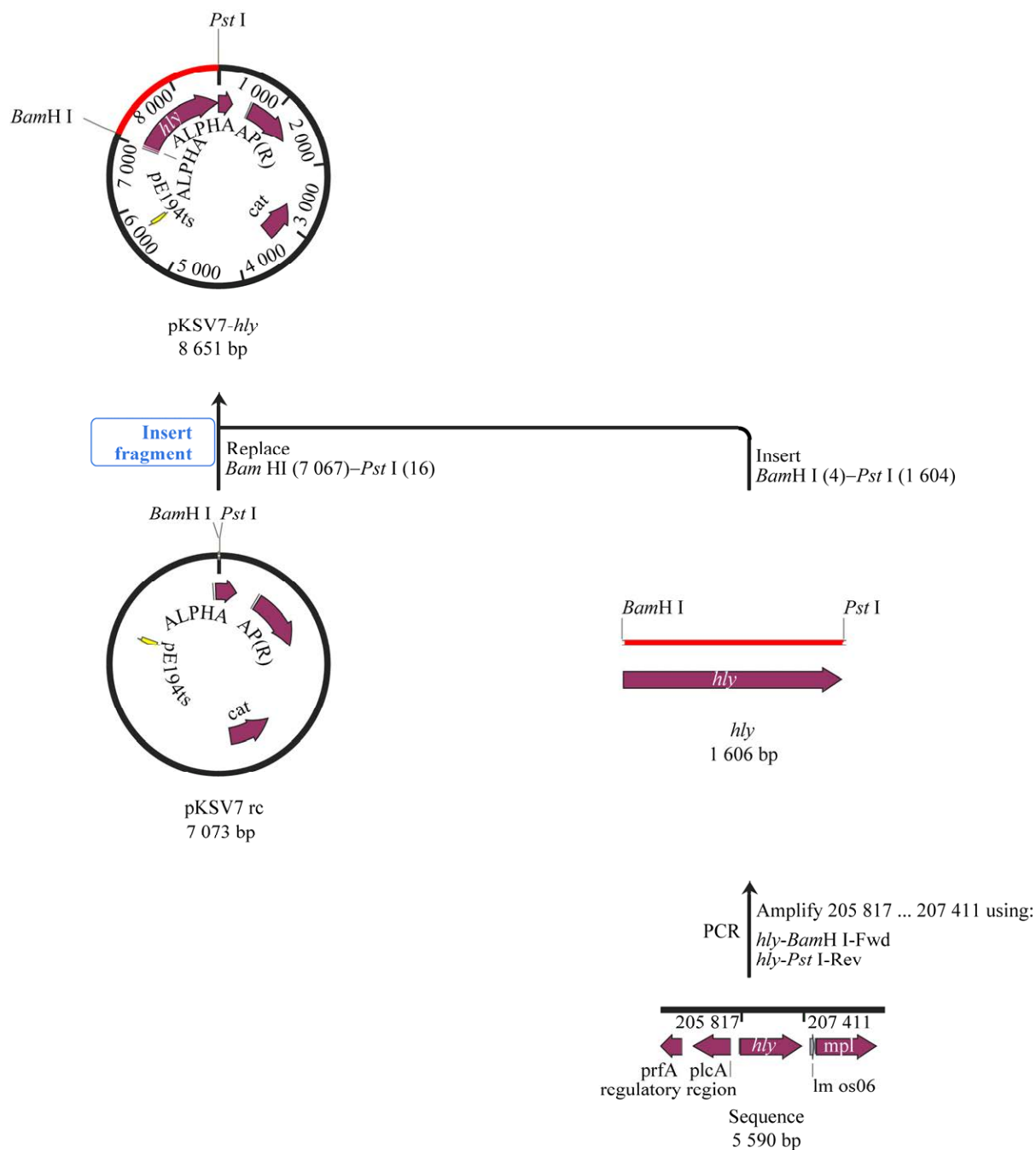


图1 原核表达 LLO 突变蛋白重组质粒(A)及单增李斯特菌 *hly* 位点突变重组质粒(B)的构建策略

Figure 1 Expression of LLO mutant protein in prokaryotes (A) and construction strategy of recombinant plasmids for mutagenesis of *hly* locus in *Listeria monocytogenes* (B).

1.3.2 单增李斯特菌 *hly* 点突变重组菌株

分别将 pSL3983 和 pSL3984 电转化至单增李斯特菌感受态细胞中, 将转化产物涂布于含氯霉素(25 μ g/mL)的 BHI 固体培养基, 在 30 $^{\circ}$ C

静置培养 24–48 h, 挑取单菌落并用 pKSV7 鉴定引物 M13-Fwd/M13-Rev 筛选阳性转化子。将阳性转化子置于含氯霉素的 BHI 液体培养基中, 进行传代培养(42 $^{\circ}$ C、200 r/min), 传 5–10

代后实现同源重组;随后置于 30 °C 无抗性的 BHI 液体培养基中,进行传代培养,传至 15–20 代后,利用 pKSV7 鉴定引物 M13-Fwd/M13-Rev 和点突变鉴定引物 A-Fwd/D-Rev 通过 PCR 鉴定末代菌液,筛选出发生点突变的菌落。以筛选出的菌落基因组为模板,利用点突变鉴定引物 A-Fwd/D-Rev 经 PCR 后将扩增产物送去测序,将测序鉴定正确的 *hly* 基因点突变株分别命名为 *hly*_{Q253A} 和 *hly*_{I254A}。

1.4 LLO 点突变蛋白的原核诱导表达及蛋白纯化

挑取 LLO_{Q253A}、LLO_{I254A} 单菌落至 5 mL 含卡那霉素(50 µg/mL)的 LB 液体培养基中,37 °C、200 r/min 培养过夜。次日,按 1:100 转接至 200 mL 含卡那霉素(50 µg/mL)的 LB 液体培养基中扩大培养,使 OD₆₀₀ 达到 0.6。加入终浓度为 1 mmol/L IPTG,4 °C、150 r/min 诱导过夜。次日,4 °C、5 000 r/min 离心 15 min 收集菌体,经 50 mmol/L PBS 洗涤 3 次后重悬,超声(功率 200–300 W,超声 5 s 停 7 s)破碎 30 min 后收集破碎液,4 °C、12 000 r/min 离心 10 min 取上清。将收集的上清与镍在 4 °C、100 r/min 条件下结合过夜。次日,将结合液加至内毒素去除分离柱中,待结合液流尽后加入 30、50、100 mmol/L 咪唑洗脱杂蛋白,最后加入 300 mmol/L 咪唑收集 LLO 点突变蛋白。LLO 点突变蛋白经 BCA 试剂盒测定浓度后,取部分蛋白按比例加入 4×Loading buffer 制成 Western blotting 样品,进行 SDS-PAGE,检测纯化蛋白,剩余蛋白用超滤管进行超滤,超滤后的蛋白按照 1:1 加入纯甘油保存于–80 °C 冰箱中备用。经过纯化获得的 LLO 点突变蛋白命名为 LLO_{Q253A} 和 LLO_{I254A}。

1.5 LLO 点突变蛋白及突变株 *hly*_{Q253A} 和 *hly*_{I254A} 的溶血活性测定

取新鲜无菌绵羊血 1 mL 置于 2 mL EP 管

中,4 °C、1 000 r/min 离心 10 min,弃上清加入 1 mL 无菌生理盐水轻轻重悬红细胞,再次离心 10 min,弃上清。将红细胞和无菌生理盐水以 1:20 混匀,配制成的绵羊红细胞-生理盐水悬液(5% SRBC-0.9% NaCl)待用。LLO 点突变蛋白溶血活性测定:用 BCA 试剂盒测定蛋白浓度,并分别用 pH 6.5 的 10 mmol/L PBS 与 pH 5.5 的 10 mmol/L PBS 将蛋白浓度稀释至 35 nmol/L。在“U”型 96 孔板中,第一个孔加入 200 µL 稀释好的蛋白液,第 2–11 孔中分别加入 pH 6.5 和 pH 5.5 的 100 µL 10 mmol/L PBS,从第 1 个孔取 100 µL 蛋白液加入到第 3 个孔,混匀后再吸取 100 µL 至下一个孔,如此连续倍比稀释至第 11 个孔,置于 37 °C 培养箱中培养 10 min,向每孔等体积加入 5% SRBC-0.9% NaCl,放入 37 °C 培养箱中静置培养 30 min 后,4 °C、1 000 r/min 离心 3 min。吸取 150 µL 上清至平底 96 孔板中,测定 OD₅₅₀,以 10 mmol/L PBS (pH 6.5 或 pH 5.5)作为阴性对照,1% Triton X-100 作为阳性对照。突变株 *hly*_{Q253A}、*hly*_{I254A} 溶血活性测定:挑取单菌落接至 5 mL BHI 中,37 °C、200 r/min 培养至 OD₆₀₀ 约为 0.6。取 1 mL 菌液,4 000 r/min 离心 5 min,收集上清使用 0.22 µm 过滤器过滤后,取 200 µL 加入“U”型 96 孔板第 1 个孔中,并用 10 mmol/L PBS (pH 6.5 或 pH 5.5)进行连续倍比稀释至第 11 个孔,向每孔等体积加入 5% SRBC-0.9% NaCl,轻轻混匀,静置于 37 °C 培养箱中孵育 30 min,后续同 LLO 点突变蛋白溶血活性测定一致,以野生株 WT 作为阳性对照,缺失株 Δhly 作为阴性对照。记录结果并使用 GraphPad Prism 9.0 绘制溶血曲线。

1.6 生长曲线测定

挑取野生株 WT、缺失株 Δhly 、突变株 *hly*_{Q253A} 和 *hly*_{I254A} 的单菌落接种至 5 mL BHI 液体培养基中,37 °C、200 r/min 培养过夜。次

日, 取 1 mL 菌液, 4 000 r/min 离心 5 min, 弃上清, 加入 10 mmol/L PBS 重悬, 并调整菌液 OD_{600} 至 0.6, 将菌液按 1:100 转接至 12 mL BHI 液体培养基中, 37 °C、200 r/min 培养 12 h, 每 2 h 取 200 μ L 测定 OD_{600} 。记录结果并使用 GraphPad Prism 9.0 绘制细菌生长曲线。

1.7 人肠上皮细胞 Caco-2 黏附侵袭试验

用含有 10%胎牛血清(FBS)的 RPMI 1640 细胞培养基对 Caco-2 细胞进行铺板, 密度为 2×10^5 /孔, 并置于 37 °C、含有 5%的 CO_2 培养箱中培养过夜。分别将野生株 WT、缺失株 Δhly 、突变株 hly_{Q253A} 、 hly_{I254A} 菌液浓度调至 OD_{600} 为 0.6, 按照感染复数(multiplicity of infections, MOI)=10 感染 Caco-2 细胞。黏附: 细菌感染 Caco-2 细胞 30 min 后, 用 10 mmol/L PBS 洗涤细胞 3 次, 并用 1 mL 配制好的裂解液(0.25% Trypsin-EDTA 和预冷 ddH₂O 按照体积比 1:4 混匀后使用)吹打裂解细胞, 稀释到合适梯度后, 在 BHI 固体培养基上进行点板计数。入侵: Caco-2 细胞在细菌感染 1.5 h 后, 使用终浓度为 50 μ g/mL 庆大霉素(去除胞外菌)处理 1.5 h, 并用 10 mmol/L PBS 洗涤细胞 3 次, 随后用裂解液裂解细胞并进行稀释, 取 10 μ L 滴在 BHI 固体培养基上进行点板计数, 待菌液风干后, 倒扣至 37 °C培养箱, 培养 12 h, 记录结果并使用 GraphPad Prism 9.0 绘制成图。

1.8 小鼠成纤维细胞 L929 空斑试验

细胞培养与细菌 OD_{600} 设置同 1.7 方法进行, L929 细胞铺板密度为 5×10^5 个/孔, 按照 MOI=10 感染 L929 细胞。感染后不同角度水平摇晃培养板, 使其分布均匀, 每 15 min 晃动一次。感染 1 h 后使用 10 mmol/L PBS 洗涤细胞 3 次, 加入终浓度为 50 μ g/mL 庆大霉素(去除胞外菌)处理 1 h 后, 洗涤细胞 3 次, 最后加入含

10 μ g/mL 庆大霉素终浓度为 0.7%的低熔点琼脂糖的 DMEM (含 10% FBS)细胞培养基, 待琼脂凝固后, 将细胞培养板倒置于 37 °C、5% CO_2 细胞培养箱中培养 48 h。每孔加入 600 μ L 甲醛溶液浸润后置于 37 °C培养箱 2 h, 拍掉琼脂, 用 ddH₂O 冲洗孔板, 每孔加入 600 μ L 0.5%结晶紫溶液染色 5 min 后用 10 mmol/L PBS 冲洗孔板, 待风干后进行扫描成像。使用 Image J 统计空斑数量和直径, 使用 GraphPad Prism 9.0 绘制成图。

1.9 小鼠单核巨噬细胞 RAW264.7 和 J774 增殖试验

细胞培养与细菌 OD_{600} 设置同 1.7 方法进行, RAW264.7 细胞和 J774 细胞铺板密度为 2×10^5 个/孔, 按照 MOI=0.2 分别感染 RAW264.7、J774 细胞。感染细胞 30 min 后, 用 10 mmol/L PBS 洗涤细胞 3 次, 加入裂解液裂解细胞, 并稀释点板至 BHI 固体培养基。感染 1 h 后用 10 mmol/L PBS 洗涤细胞 3 次, 加入终浓度为 50 μ g/mL 庆大霉素(去除胞外菌)处理 1 h。10 mmol/L PBS 洗涤细胞 3 次, 加入 DMEM 培养基持续培养至 2、5 和 8 h 分别裂解细胞, 随后进行稀释点板。使用 GraphPad Prism 9.0 统计增殖细菌数并绘制成图。

1.10 数据统计

用 GraphPad Prism 9.0 对数据进行分析。其中 ns 表示 $P>0.05$, *表示 $P<0.05$, **表示 $P<0.01$, ***表示 $P<0.001$, ****表示 $P<0.0001$ 。

2 结果与分析

2.1 单增李斯特菌 *hly* 基因点突变株和原核表达 LLO 蛋白点突变株构建与鉴定结果

通过同源重组的方式将 *hly* 第 253 位谷酰胺 Q 和第 254 位异亮氨酸 I 突变成丙氨酸 A, 利用 PCR 扩增和 DNA 测序的方法对基因突

变株进行检测。如图 2 所示, 用点突变鉴定引物 A-Fwd/D-Rev 以点突变株为模板扩增的条带大小约为 500 bp, 以野生株 WT 作为阳性对照, 缺失株 Δhly 作为阴性对照; 用点突变鉴定引物 A-Fwd/D-Rev 以原核表达 LLO 蛋白点突变株为模板扩增的条带大小约为 500 bp, 以 LLO 蛋白原核表达菌株为阳性对照。并通过 DNA 测序方法验证, 测序结果正确, 表明单增李斯特菌 *hly* 基因点突变株和原核表达 LLO 蛋白点突变株构建成功。

2.2 LLO 突变蛋白的表达与纯化

点突变原核表达菌株经培养后, 在 IPTG 诱导下进行蛋白表达, 通过镍柱亲和纯化后获得相关 LLO 点突变蛋白。如图 3 所示, 第 2–4 泳道分别是使用 30、50 和 100 mmol/L 咪唑洗脱杂蛋白时收集到的样品, 第 5–10 泳道是最终使用 300 mmol/L 咪唑收集的 LLO 点突变蛋白。经 SDS-PAGE 显示纯化后位于第 7–10 泳道的 LLO_{Q253A} (图 3A) 和 LLO_{I254A} (图 3B) 突变

蛋白条带单一, 分子质量均约为 57.2 kDa, 蛋白大小与预期结果一致, 经 BCA 蛋白浓度测定试剂盒检测蛋白浓度均约为 2 mg/mL。以上结果说明, LLO 突变蛋白原核表达与纯化成功, 可用于后续的溶血试验。

2.3 各菌株与蛋白溶血活性比较

分别比较 LLO 点突变蛋白 LLO_{Q253A} 和 LLO_{I254A}、*hly* 基因点突变株 *hly*_{Q253A} 和 *hly*_{I254A} 在 pH 6.5 和 pH 5.5 的溶血活性。结果如图 4 所示, LLO 点突变蛋白 LLO_{Q253A} 和 LLO_{I254A} 以及单增李斯特菌点突变株 *hly*_{Q253A} 和 *hly*_{I254A} 在 pH 6.5 的条件下, 溶血活性均丧失(图 4A、4B); 当 pH 降至 5.5 时, LLO 点突变蛋白 LLO_{I254A} 和点突变株 *hly*_{I254A} 恢复溶血活性, LLO 点突变蛋白 LLO_{Q253A} 和点突变株 *hly*_{Q253A} 仍无溶血活性(图 4C、4D), 表明 *hly* 基因第 253 位氨基酸位点 Q 比第 254 位氨基酸位点 I 对 LLO 蛋白溶血活性的影响更大。

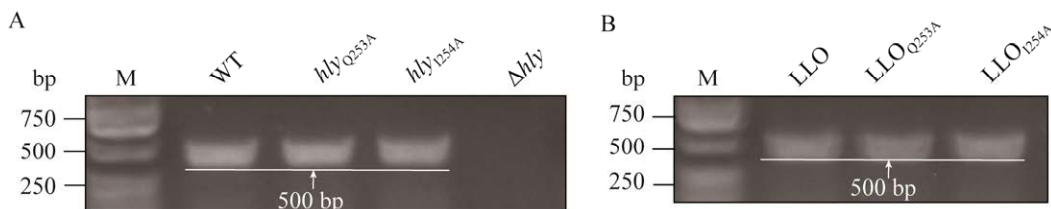


图 2 PCR 验证单增李斯特菌 *hly* 点突变株(A)和原核表达 LLO 蛋白点突变株(B)

Figure 2 Identification of *hly*_{Q253A} and *hly*_{I254A} mutant strains in *Listeria monocytogenes* with *hly* locus mutation (A) and prokaryotic strains expressing LLO_{Q253A} and LLO_{I254A} mutant proteins (B) by PCR.

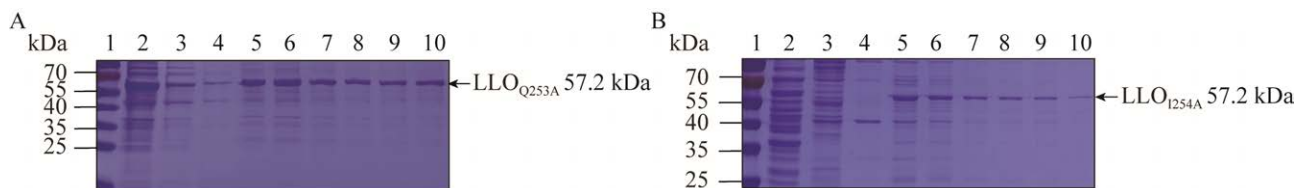


图 3 SDS-PAGE 鉴定 LLO_{Q253A} (A) 和 LLO_{I254A} (B) 突变蛋白

Figure 3 Identification of LLO_{Q253A} (A) and LLO_{I254A} (B) mutant proteins by SDS-PAGE. A: Lane 1 is the protein marker; Lane 2–4 are the samples of LLO_{Q253A} mutant protein eluted with 30, 50 and 100 mmol/L imidazole, respectively; Lane 5–10 are the samples of LLO_{Q253A} mutant proteins eluted with 300 mmol/L imidazole. B: Lane 1 is the protein marker; Lane 2–4 are the samples of LLO_{I254A} mutant proteins eluted with 30, 50 and 100 mmol/L imidazole, respectively; Lane 5–10 are the samples of LLO_{I254A} mutant proteins eluted with 300 mmol/L imidazole.

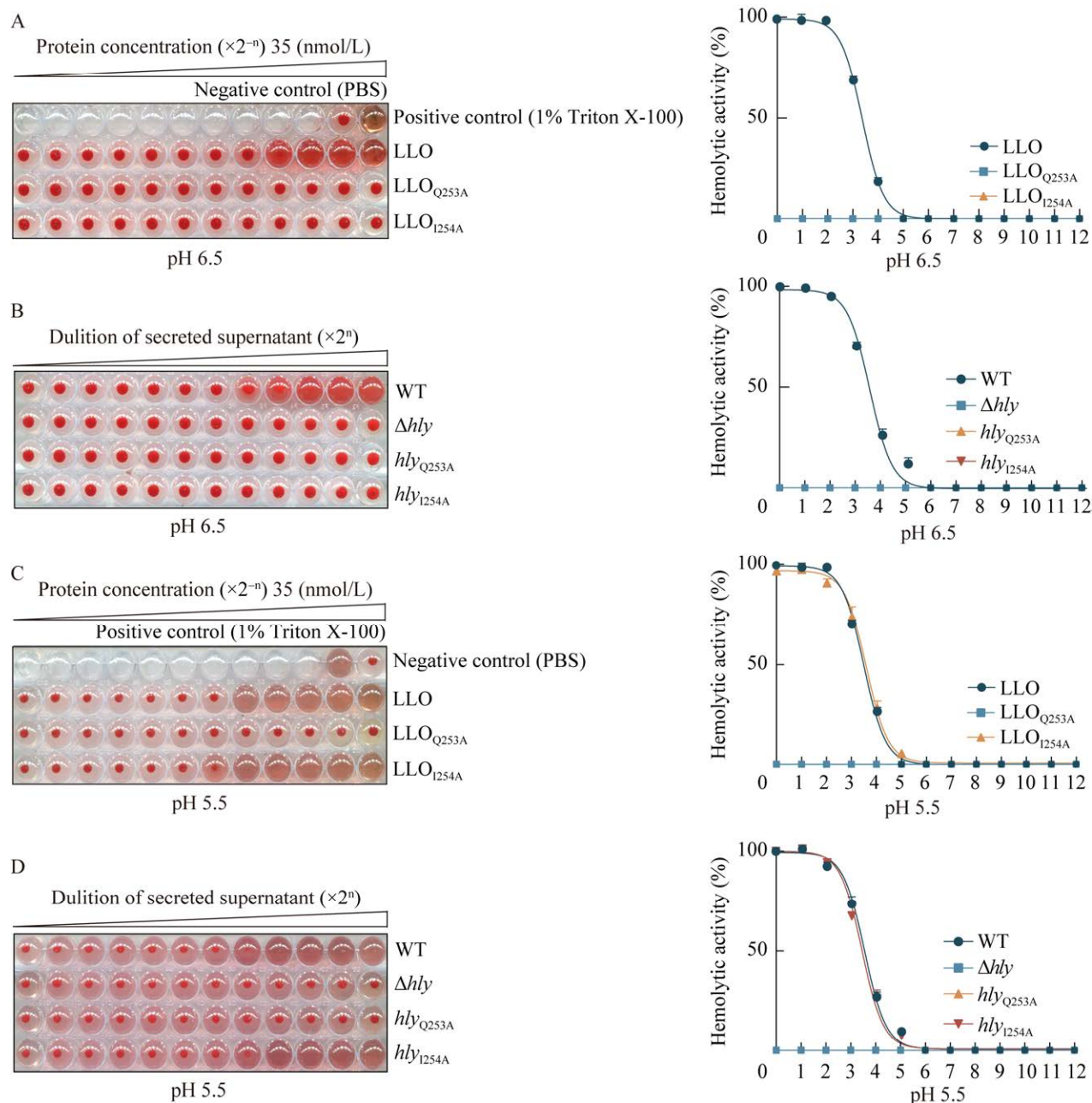


图4 LLO、LLO_{Q253A}和LLO_{I254A}蛋白及WT、 Δhly 、 hly_{Q253A} 和 hly_{I254A} 突变株在pH 6.5和pH 5.5条件下的溶血活性分析

Figure 4 Hemolytic activity of LLO, LLO_{Q253A} and LLO_{I254A} mutant proteins, WT, Δhly , hly_{Q253A} and hly_{I254A} mutant strains at pH 6.5 and 5.5. A: Hemolytic activity of LLO, LLO_{Q253A} and LLO_{I254A} mutant proteins at pH 6.5. B: Hemolytic activity of WT, Δhly , hly_{Q253A} and hly_{I254A} mutant strains at pH 6.5. C: Hemolytic activity of LLO, LLO_{Q253A} and LLO_{I254A} mutant proteins at pH 5.5. D: Hemolytic activity of WT, Δhly , hly_{Q253A} and hly_{I254A} mutant strains at pH 5.5. Data are expressed as means $\pm$ SD of three independent experiments.

2.4 各菌株体外生长能力趋于一致

比较野生株 WT、缺失株 Δhly 、突变株 hly_{Q253A} 和 hly_{I254A} 在 37 °C 条件下 BHI 液体培养基中的生长能力。结果如图 5A 所示，缺失株 Δhly 、突变株 hly_{Q253A} 和 hly_{I254A} 与野生株 WT 的生长趋势相比较趋于一致，均并无明显差异，说明 *hly* 基因第 253 和 254 位氨基酸位点突变后，不影响单增李斯特菌的体外生长能力。

2.5 突变株 hly_{Q253A} 和 hly_{I254A} 的侵袭能力显著下降

因单增李斯特菌的黏附侵袭能力对其入侵宿主细胞起重要作用。以野生株 WT、缺失株 Δhly 、突变株 hly_{Q253A} 和 hly_{I254A} 为研究对象，比较细菌在 Caco-2 细胞中的黏附、侵袭能力。如

图 5B 所示，*hly* 基因第 253、254 位氨基酸位点突变后，不影响单增李斯特菌在 Caco-2 中的黏附能力。然而，突变株 hly_{Q253A} 和 hly_{I254A} 在细胞中的侵袭能力较野生株 WT 显著下降(图 5C)。研究表明，单增李斯特菌 *hly* 基因第 253 和 254 位氨基酸位点突变后，主要影响了细菌的侵袭能力。

2.6 突变株 hly_{Q253A} 和 hly_{I254A} 在细胞间的迁移能力显著下降

单增李斯特菌作为胞内寄生菌，胞间迁移能力对于其感染能力也是至关重要的。将野生株 WT、缺失株 Δhly 、突变株 hly_{Q253A} 和 hly_{I254A} 作为研究对象，比较细菌在 L929 细胞中的胞间迁移能力，空斑直径越大代表其胞间迁移能力越强。如图 6A 所示，突变株 hly_{Q253A} 、 hly_{I254A} 感

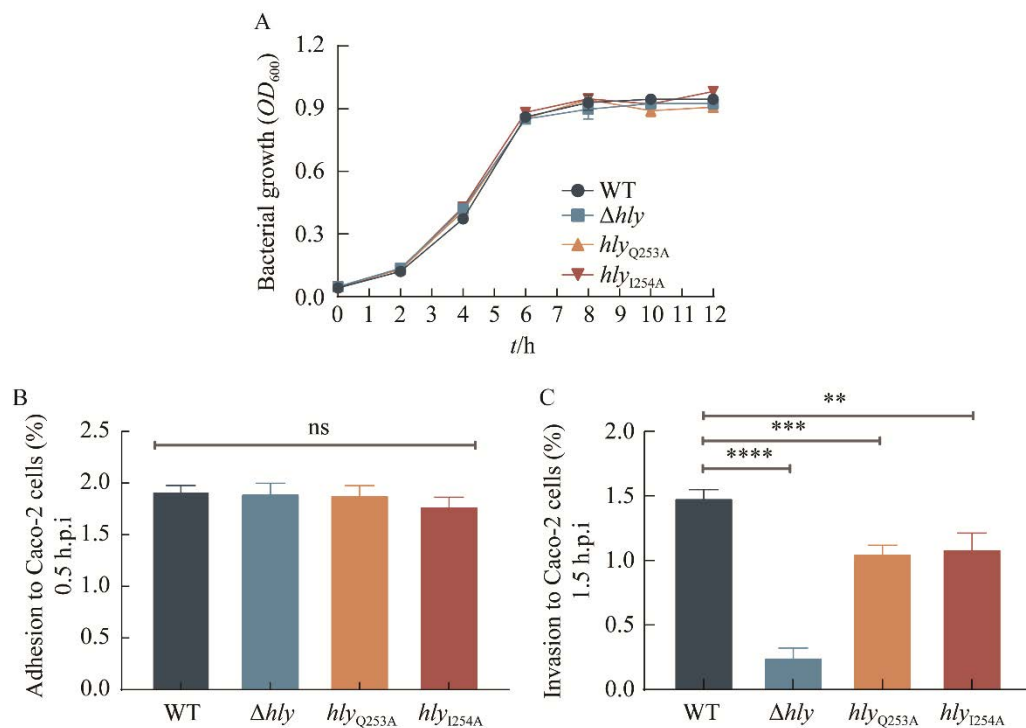


图 5 WT、 Δhly 、 hly_{Q253A} 和 hly_{I254A} 突变株在 37 °C 下的生长能力(A)及在 Caco-2 细胞中的黏附率(B)及侵袭率(C)

Figure 5 Growth ability of WT, Δhly , hly_{Q253A} and hly_{I254A} mutant strains at 37 °C (A), and analysis of adhesion (B) and invasion (C) of WT, Δhly , hly_{Q253A} and hly_{I254A} mutant strains in Caco-2 cells. Data are expressed as means $\pm$ SD of three independent experiments. ns: $P > 0.05$, **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$; ****: $P < 0.0001$.

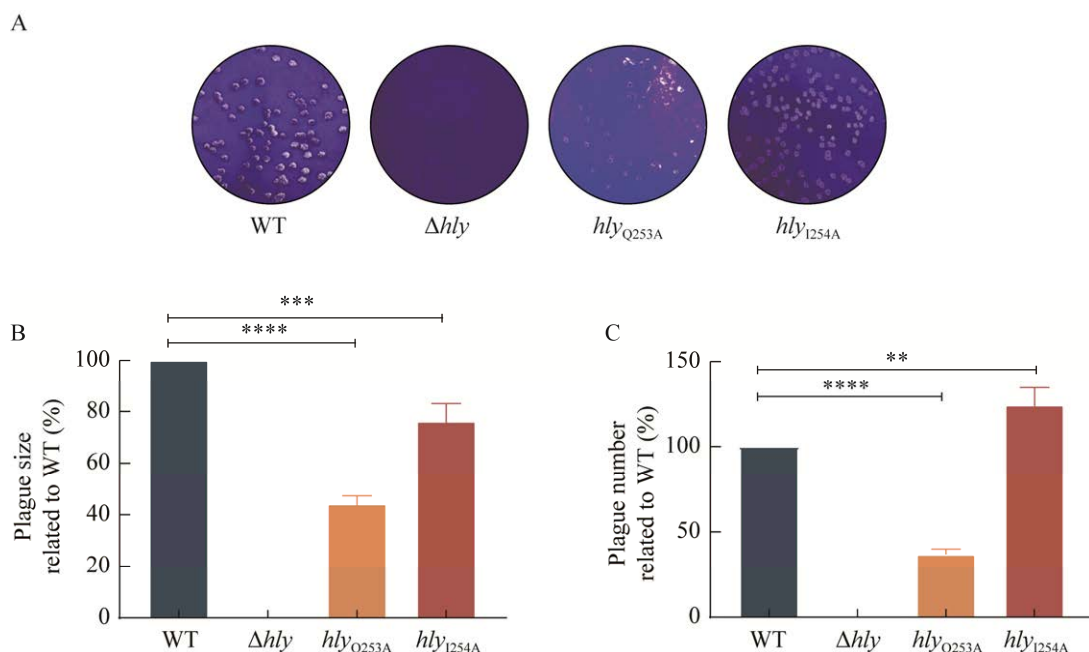


图 6 WT、 Δhly 、 hly_{Q253A} 和 hly_{I254A} 突变株在 L929 细胞中迁移能力分析

Figure 6 Plaque sizes and numbers formed by Δhly , hly_{Q253A} and hly_{I254A} mutant strains in L929 fibroblast cell as a percentage of the plaque size and number formed by WT strain. A: Plaque assay performed in the L929 fibroblast cell monolayers infected by WT, Δhly , hly_{Q253A} and hly_{I254A} mutant strains. B: The plaque sizes of WT, Δhly , hly_{Q253A} and hly_{I254A} mutant strains were indicated as a percentage of those formed by WT. C: The plaque number of WT, Δhly , hly_{Q253A} and hly_{I254A} mutant strains were indicated as a percentage of those formed by WT. The mutant strain Δhly , which is completely unable to spread during cell infection, was taken as a reference negative control. Data are expressed as means $\pm$ SD of three independent experiments. **: $P<0.01$, ***: $P<0.001$, ****: $P<0.0001$.

染 L929 细胞形成的空斑直径明显小于野生株 WT 形成的空斑直径，作为对照组的缺失株 Δhly 感染 L929 细胞则不能形成空斑；经统计学分析发现突变株 hly_{Q253A} 、 hly_{I254A} 形成的空斑直径大小相较于野生株 WT 显著减小($P<0.0001$)。另外值得注意的是，突变株 hly_{Q253A} 形成的空斑数量相较于野生株 WT 显著减少，而突变株 hly_{I254A} 形成的空斑数量相较于野生株显著增多(图 6B)，说明突变株 hly_{I254A} 感染细胞的能力较野生株 WT 和突变株 hly_{Q253A} 是明显增强的。以上结果表明，单增李斯特菌 hly 基因第 253 和 254 位氨基酸位点突变后在 L929 细胞中迁移能力明显减弱；且第 253 位氨基酸位点 Q 较第 254 位氨基酸位点对单增李斯特菌在 L929 细

胞中迁移能力的影响作用更显著。

2.7 各菌株的胞内增殖能力无显著差异

RAW264.7 及 J774 作为巨噬细胞可以主动吞噬单增李斯特菌，是研究单增李斯特菌胞内增殖能力的理想细胞模型。以野生株 WT、缺失株 Δhly 、突变株 hly_{Q253A} 和 hly_{I254A} 为对象，利用 RAW264.7、J774 作为细胞模型研究细菌在胞内的增殖能力。如图 7 所示，突变株 hly_{Q253A} 、 hly_{I254A} 与野生株 WT 相比在 RAW264.7 和 J774 的胞内增殖能力无明显差异($P>0.05$)，而突变株 hly_{Q253A} 对胞内增殖能力的影响略低于 hly_{I254A} 和 WT。试验结果表明，单增李斯特菌 hly 基因第 253 和 254 位氨基酸位点突变后，不影响单增李斯特菌的胞内增殖能力。

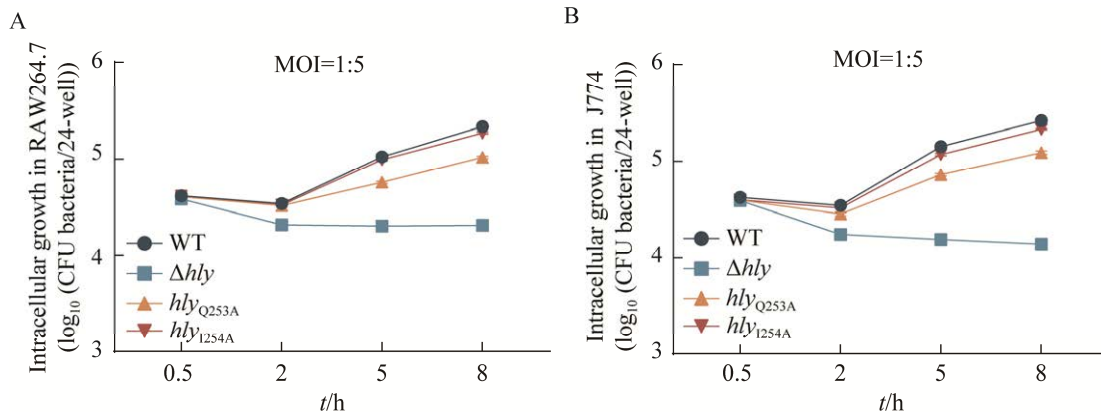


图 7 WT、 Δhly 、 hly_{Q253A} 和 hly_{I254A} 突变株在 RAW264.7 (A) 和 J774 (B) 巨噬细胞内增殖能力分析

Figure 7 Analysis of proliferation ability of WT, Δhly , hly_{Q253A} and hly_{I254A} mutant strains in RAW264.7 (A) and J774 (B) macrophages. Data are expressed as means $\pm$ SD of three independent experiments.

3 讨论与结论

LLO 是由单增李斯特菌主要毒力基因 *hly* 编码的一种成孔毒素，在细菌感染宿主的过程中发挥重要作用。本研究构建了 hly_{Q234A} 和 hly_{I254A} 单增李斯特菌 *hly* 点突变株，表达了 LLO 点突变蛋白 LLO_{Q253A} 和 LLO_{I254A}，并通过分子生物学和细胞生物学等手段，比较了单增李斯特菌 WT 与点突变株间的溶血活性以及体外生长、黏附与侵袭、胞间迁移和胞内增殖能力。结果显示，在 pH 6.5 的条件下，单增李斯特菌 *hly* 基因第 253 位 Q 和第 254 位 I 突变成 A 后，点突变蛋白与点突变株均丧失了溶血活性；在 pH 5.5 的条件下，LLO 点突变蛋白 LLO_{I254A} 和点突变株 hly_{I254A} 恢复溶血活性，LLO_{Q253A} 和点突变株 hly_{Q253A} 仍无溶血活性，说明 *hly* 基因第 253 位氨基酸位点 Q 较第 254 位氨基酸位点 I 对 LLO 蛋白溶血活性的影响占主要地位。 hly_{Q234A} 和 hly_{I254A} 的体外生长、胞内增殖和黏附能力与野生株相比无明显差异，其侵袭能力、胞间迁移能力与野生株相比有明显减弱。单增李斯特菌 *hly* 基因第 253 位 Q 和第 254 位 I 氨基酸位点发生改变后，有可能影响了 LLO 的结构改变进而影响了 LLO 的膜穿孔活性和逃逸吞噬体的能

力，进而影响细菌的感染宿主的能力，但不同氨基酸位点的改变其影响的结果也可能略有不同，其具体机制还有待进行深入研究。

单增李斯特菌作为典型的胞内寄生菌，是一种研究胞内感染菌和细胞免疫的良好模型。近年来，李斯特菌已经被应用于疫苗载体研究，其可作为基因递呈载体，进而表达各种免疫蛋白来启动细胞免疫。Abi Abdallah 等^[12]用李斯特菌的弱毒株作为沙蝇唾液蛋白 LIM 11 的疫苗表达系统来预防利什曼病。Jahangir 等^[13]用李斯特菌的弱毒株表达肿瘤相关抗原蛋白 Mage 有效地治疗了转移性乳腺癌。Yang 等^[14]将李斯特菌弱毒株作为肝肿瘤干细胞生物标记的 CD₂₄ 的疫苗载体，明显减小了肿瘤的大小，延长了小鼠的寿命。LLO 突变蛋白可为新型抗癌药物研发提供线索，Resnik 等^[15]发现 LLO_{Y406A} 是一种胆固醇依赖型毒素 LLO 突变体，其主要特征是在 pH 5.7 时具有优先活性，既可直接选择性靶向肿瘤细胞，也可从酸性核内体中释放累积的治疗药物。

本研究发现 hly_{Q234A} 和 hly_{I254A} 突变株虽然丧失了溶血活性，但在巨噬细胞内的增殖能力与野生株相比无明显差异，并且在 L929 细胞中仍具有一定程度的胞间迁移能力，说明了 LLO 的膜穿孔活性与单增李斯特菌实现胞间迁

移和感染并不严格相关^[11]。在 pH 6.5 时, *hly*_{Q234A} 和 *hly*_{I254A} 丧失溶细胞活性, 可能有以下三点原因: 突变后 LLO 不能与细胞膜结合; 抑制细胞膜上 LLO 寡聚化形成, 导致 LLO 不能形成弧形或环形结构^[13,16]; LLO 插入细胞膜的过程被抑制^[9]; 过高的 pH 环境^[17]。目前, 对单增李斯特菌 LLO 结构域上氨基酸位点的研究较少, 且突变后单增李斯特菌生物学功能改变的原因尚不清楚。本研究构建了 *hly*_{Q253A} 和 *hly*_{I254A} 突变株, 并对其生物学功能做了部分分析, 为后续深入探究 LLO 结构域中关键氨基酸位点的作用以及构建靶向治疗肿瘤或癌症的模式菌提供了一定的理论基础。

参考文献

- [1] RADOSHEVICH L, COSSART P. *Listeria monocytogenes*: towards a complete picture of its physiology and pathogenesis[J]. Nature Reviews Microbiology, 2018, 16: 32-46.
- [2] VÁZQUEZ-BOLAND JA, KRYPTOU E, SCORTTI M. *Listeria* placental infection[J]. mBio, 2017, 8(3): e00949-17.
- [3] VÁZQUEZ-BOLAND JA, KUHN M, BERCHE P, CHAKRABORTY T, DOMÍNGUEZ-BERNAL G, GOEBEL W, GONZÁLEZ-ZORN B, WEHLAND J, KREFT J. *Listeria* pathogenesis and molecular virulence determinants[J]. Clinical Microbiology Reviews, 2001, 14(3): 584-640.
- [4] LI RD, LIANG Q, TIAN SC, ZHANG YW, LIU SJ, OU Q, CHEN ZB, WANG C. Hemolysin function of *Listeria* is related to biofilm formation: transcriptomics analysis[J]. Veterinary Research, 2022, 53(1): 113.
- [5] NGUYEN BN, PETERSON BN, PORTNOY DA. Listeriolysin O: a phagosome-specific cytolysin revisited[J]. Cellular Microbiology, 2019, 21(3): e12988.
- [6] 崔焕忠, 乔立桥, 王义冲. 单核细胞增生性李斯特菌的主要毒力因子及其致病机理[J]. 中国畜牧兽医, 2010, 37(1): 128-133.
CUI HZ, QIAO LQ, WANG YC. Main virulence factors and pathogenesis mechanism of *Listeria monocytogenes*[J]. China Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2010, 37(1): 128-133 (in Chinese).
- [7] KAYAL S, CHARBIT A. Listeriolysin O: a key protein of *Listeria monocytogenes* with multiple functions[J]. FEMS Microbiology Reviews, 2006, 30(4): 514-529.
- [8] SEVEAU S. Multifaceted activity of listeriolysin O, the cholesterol-dependent cytolysin of *Listeria monocytogenes*[J]. Sub-Cellular Biochemistry, 2014, 80: 161-195.
- [9] KÖSTER S, van PEE K, HUDEL M, LEUSTIK M, RHINOW D, KÜHLBRANDT W, CHAKRABORTY T, YILDIZ Ö. Crystal structure of listeriolysin O reveals molecular details of oligomerization and pore formation[J]. Nature Communications, 2014, 5: 3690.
- [10] SCHNUPF P, PORTNOY DA. Listeriolysin O: a phagosome-specific lysin[J]. Microbes and Infection, 2007, 9(10): 1176-1187.
- [11] CHENG CY, JIANG L, MA TT, WANG H, HAN X, SUN J, YANG YC, CHEN ZW, YU HF, HANG Y, LIU FD, WANG BS, FANG WH, HUANG HR, FANG C, CAI C, FREITAG N, SONG HH. Carboxyl-terminal residues N478 and V479 required for the cytolytic activity of listeriolysin O play a critical role in *Listeria monocytogenes* pathogenicity[J]. Frontiers in Immunology, 2017, 8: 1439.
- [12] ABI ABDALLAH DS, PAVINSKI BITAR A, OLIVEIRA F, MENESES C, PARK JJ, MENDEZ S, KAMHAWI S, VALENZUELA JG, MARQUIS H. A *Listeria monocytogenes*-based vaccine that secretes sand fly salivary protein LJM11 confers long-term protection against vector-transmitted *Leishmania* major[J]. Infection and Immunity, 2014, 82(7): 2736-2745.
- [13] JAHANGIR A, CHANDRA D, QUISPE-TINTAYA W, SINGH M, SELVANESAN BC, GRAVEKAMP C. Immunotherapy with *Listeria* reduces metastatic breast cancer in young and old mice through different mechanisms[J]. Oncoimmunology, 2017, 6(9): e1342025.
- [14] YANG Y, HOU JJ, LIN Z, ZHUO H, CHEN DY, ZHANG XD, CHEN Y, SUN BC. Attenuated *Listeria monocytogenes* as a cancer vaccine vector for the delivery of CD24, a biomarker for hepatic cancer stem cells[J]. Cellular & Molecular Immunology, 2014, 11(2): 184-196.
- [15] RESNIK N, TRATNJEK L, KREFT ME, KISOVEC M, ADEN S, BEDINA ZAVEC A, ANDERLUH G, PODOBNIK M, VERANIĆ P. Cytotoxic activity of LLO Y406A is targeted to the plasma membrane of cancer urothelial cells[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2021, 22(7): 3305.
- [16] PODOBNIK M, MARCHIORETTO M, ZANETTI M, BAVDEK A, KISOVEC M, CAJNKO MM, LUNELLI L, DALLA SERRA M, ANDERLUH G. Plasticity of listeriolysin O pores and its regulation by pH and unique histidine[J]. Scientific Reports, 2015, 5: 9623.
- [17] 谭炳乾, 何启盖, 肖军, 陈焕春. 单核细胞增生性李斯特菌 *hlyA* 基因序列及溶血素活性测定[J]. 中国兽医学报, 2009, 29(2): 161-165.
TAN BQ, HE QG, XIAO J, CHEN HC. Analysis of *hlyA* gene and hemolytic activity of *Listeria monocytogenes* from different source[J]. Chinese Journal of Veterinary Science, 2009, 29(2): 161-165 (in Chinese).