

单增李斯特菌溶血素(LLO)的原核表达及其生物学活性鉴定

林婷婷 杨晶 李志清 王彩霞 向军俭*

(暨南大学抗体工程研究中心 广东 广州 510632)

摘要: 利用生物软件设计单增李斯特菌溶血素蛋白的基因 *hly* 的引物, 通过 PCR 扩增 *hly* 基因, 并将其克隆至 PET28a(+)原核表达载体, 转化大肠杆菌 BL21 进行优化表达。用镍柱纯化表达产物 LLO, 通过免疫印记鉴定其免疫原性, 并通过溶血实验鉴定其溶血活性。琼脂糖凝胶电泳结果表明 PCR 扩增出 1 590 bp 的片段, 经测序鉴定其序列同源性可达 99%。SDS-PAGE 结果表明诱导表达的产物大小约为 58 kD, 其最优化的表达条件是 28 °C 下用 0.1 mmol/L IPTG 诱导 6 h。Western blotting 结果表明重组表达的 LLO 具有免疫原性; 溶血实验表明重组表达的 LLO 具有较强的溶血活性, 其溶血效价可达 1:1 024。这为制备针对单增李斯特菌的单克隆抗体及其检测方法的建立奠定了基础。

关键词: *hly* 基因, LLO, 溶血素, 单增李斯特菌

Prokaryotic expression and bioactivity identification of hemolysin from *Listeria monocytogenes*

LIN Ting-Ting YANG Jing LI Zhi-Qing WANG Cai-Xia XIANG Jun-Jian*

(Antibody engineering center, Jinan University, Guangzhou, Guangdong 510632, China)

Abstract: Designing the primers of *hly* gene by biological software, amplifying the *hly* gene from *Listeria monocytogenes* by PCR and constructing the gene into prokaryotic expression vector PET28a(+), then transforming the gene into *E. coli* BL21 and expressing optimally; purifying the recombinant product LLO by nickel affinity chromatography, testing the immunogenicity by Western blotting and the hemolytic activity by hemolytic assay. It was demonstrated by agarose gel electrophoresis that the cloned *hly* gene was 1 590 bp in length and the protein sequence got about 99% homology with that published in GenBank. SDS-PAGE indicated that the molecular weight was about 58 kD and the optimal expression condition was induced for 6 h with 0.1 mmol/L IPTG at the temperature of 28 °C. The

result of Western blotting showed the recombinant protein LLO had immunogenicity. The hemolytic assay showed the product had the hemolytic activity, with the hemolytic titre of 1:1 024. These results would provide basis for the further studies on the development of monoclonal antibody against *Listeria monocytogenes* and the establishment of the detection methods.

Keywords: *hly*, LLO, Hemolysin, *Listeria monocytogenes*

李斯特菌属包括单增李斯特菌 *Listeria monocytogenes* LM、伊氏李斯特菌 *L. ivanovii*、英诺克李斯特菌 *L. innocua*、威尔斯李斯特菌 *L. welshimeri*、西尔李斯特菌 *L. seeligeri*、格氏李斯特菌 *L. grayi*、默氏李斯特菌 *L. murrayi* 7 个菌种。其中单增李斯特菌和伊氏李斯特菌是致病菌, 仅有单增李斯特菌可引起人类的脑膜炎、败血症、流产及新生儿感染等疾病。如果免疫缺陷者发生李斯特菌感染, 其病情严重, 病死率高达 33%。世界卫生组织(WHO)已将其列为新的食源性病菌^[1]。单增李斯特菌是冷藏食品和即食食品污染的重要致病菌之一^[2], 建立快速而特异的单增李斯特菌的检测方法是目前针对冷藏食品安全的研究热点之一。

LM 的毒力主要由 *plcA*、*hly*、*mpl*、*actA* 和 *plcB* 这 5 个基因组成的基因簇(又称 LM 毒力岛 I, 即 Lip I-1)所决定^[3]。其中 *hly* 基因是 LM 的毒力标志基因, 它编码分子量为 58 kD 的细胞溶血素蛋白(LLO), 是 LM 分泌的主要毒力因子^[4]。本研究对 LM 的 *hly* 基因进行克隆, 并将其在大肠杆菌

中表达, 获得具有溶血活性的产物 LLO, 为进一步研究 LM 单克隆抗体及其检测方法的建立奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 菌株、质粒及引物

实验所用的菌株、质粒和引物见表 1, 引物由上海生工生物工程有限公司合成。

1.2 主要试剂

限制性内切酶 *Bam*H I、限制性内切酶 *Xho* I、T4 DNA 连接酶均购于大连宝生物工程有限公司, *Taq* DNA 聚合酶、dNTPs 购于 TOYOBO 公司, DNA marker 购于 Axygene 公司, 蛋白质 Marker 购于 Fermentas 公司, 镍离子亲和层析柱购于 GE Healthcare 公司。

1.3 单增李斯特菌基因组 DNA 的提取

取 LM 菌株接种于 30 mL TSB-YE 培养基, 37 °C 振荡培养 24 h。细菌 DNA 的提取按东盛生物公司的 DNA 抽提试剂盒说明书进行。

表 1 实验所用的菌株、质粒及引物
Table 1 Bacterial strains, plasmids and primers used in this study

菌株、质粒及引物 Strains, plasmids and primers	表型及相关特征 Phenotypes and related characters	来源 Sources
菌株 Strains		
<i>L. monocytogenes</i> (No. CMCC54002)	血清型 1/2b 型, 强致病菌	广东微生物研究所提供
<i>E. coli</i> DH5 α	<i>deoR</i> , <i>recA</i> , <i>endA</i> , <i>hsdR</i> , <i>supE</i> , <i>thi</i> , <i>gyrA</i> , <i>relA</i>	本室保存
<i>E. coli</i> BL21	F ⁻ , <i>ompT</i> , <i>hsdS</i> , <i>gal</i> , <i>dcm</i>	本室保存
质粒 Plasmids		
pMD18-T Simple Vector	T 载体, <i>lacZ</i> , <i>Amp</i> ^r	大连宝生物工程有限公司
PET28a(+)	<i>Kan</i> ^r , T7.tag, <i>his</i> .tag, <i>lacI</i>	本室保存
引物 Primers (5'→3')		
上游引物 Forward primer	CGGGAATTCATGAATATGAAAAAGCAACTATC	(下划线为 <i>Bam</i> H I 酶切位点)
下游引物 Reverse primer	CTTCTCGAGTTATACGCGACCGAAGCCAAC	(下划线为 <i>Xho</i> I 酶切位点)

1.4 *hly* 基因的 PCR 扩增及克隆

取上述提取的 DNA 为模板进行 PCR 扩增。体系为 50 μ L, 其中 H₂O 为 36.5 μ L, 10 \times 缓冲液为 5 μ L, 25 pmol/L dNTPs 5 μ L, 上游引物、下游引物各 1 μ L, *Taq* 酶 0.5 μ L, 模板 DNA 1 μ L。反应条件为: 95 $^{\circ}$ C 5 min; 94 $^{\circ}$ C 1 min, 55 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 90 s, 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10 min。将 PCR 产物回收后, 与 pMD18-T 16 $^{\circ}$ C 连接过夜, 连接产物转化 *E. coli* DH5 α , 利用 Axygen 公司的质粒抽提试剂盒抽提质粒, 进行 PCR 鉴定、*Bam*H I/*Xho* I 双酶切鉴定及测序鉴定。

1.5 表达载体的构建

将上述鉴定正确的重组质粒和 PET28a(+)质粒载体用 *Bam*H I、*Xho* I 双酶切, 纯化回收后用 T4 DNA 连接酶连接构建 PET28a(+)-*hly* 重组表达质粒, 连接产物转化 *E. coli* BL21, 经含卡那霉素的 LB 培养基筛选, 挑选单菌落提取质粒并测序鉴定。

1.6 重组菌的诱导表达条件优化

1.6.1 诱导温度的优化: 将鉴定正确的重组菌菌液涂布于含卡那霉素的 LB 平板上, 并置于 37 $^{\circ}$ C 恒温培养箱中过夜培养, 挑取单个菌落接种于 5 mL 2 \times YT 培养液(含 50 mg/L Kan^{R+})中, 37 $^{\circ}$ C、220 r/min 培养过夜, 从新鲜菌液中取 1 mL, 接种于 100 mL 2 \times YT 培养基中, 37 $^{\circ}$ C、220 r/min 培养 2 h 左右, 至 OD₆₀₀=0.5 时, 加入 IPTG 至终浓度为 0.5 mmol/L, 分别在 28 $^{\circ}$ C、30 $^{\circ}$ C、37 $^{\circ}$ C 下, 150 r/min 培养 8 h, 将诱导产物进行 SDS-PAGE 电泳分析。

1.6.2 IPTG 诱导浓度的优化: 从新鲜菌液中取 1 mL, 接种于 100 mL 2 \times YT 培养基中, 37 $^{\circ}$ C、220 r/min 培养 2 h 左右, 至 OD₆₀₀=0.5 时, 分别加入不同终浓度的 IPTG: 0.1、0.25、0.5、0.75、1.0 mmol/L, 28 $^{\circ}$ C、150 r/min 培养 8 h, 将诱导产物进行 SDS-PAGE 电泳分析。

1.6.3 诱导时间的优化: 从新鲜菌液中取 1 mL, 接种于 100 mL 2 \times YT 培养基中, 37 $^{\circ}$ C、220 r/min 培养 2 h 左右, 至 OD₆₀₀=0.5 时, 加入终浓度为 0.1 mmol/L 的 IPTG, 28 $^{\circ}$ C、150 r/min 培养, 每隔 1 h 收集 1 mL 菌体, 将诱导产物进行 SDS-PAGE 电泳分析。

1.7 重组蛋白 LLO 的分离纯化

菌体经超声破碎后, 8 500 r/min 离心 20 min, 收集沉淀。沉淀用 6 mol/L 盐酸胍溶解, 过滤后上样至用平衡缓冲液(500 mmol/L NaCl, 20 mmol/L Tris, 20 mmol/L 咪唑, 4 mol/L 尿素, pH 8.0)平衡的镍离子亲和层析柱。再依次用 80、500 mmol/L 咪唑进行分阶段洗脱, 收集各阶段洗脱液。将各阶段洗脱液进行 SDS-PAGE 电泳分析, 纯化后用梯度透析法复性。

1.8 免疫印记分析

纯化的 LLO 蛋白经 SDS-PAGE 后, 电转至 PVDF 膜上, 用 5%脱脂奶粉封闭, 分别用鼠抗 LM 的多抗和鼠抗组氨酸标签的抗体作一抗, 以辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠 IgG 为二抗, 二氨基联苯胺(DAB)为底物进行蛋白印迹分析。

1.9 表达产物的溶血活性分析

取 100 μ L 0.9%生理盐水至 EP 管中, 再取 100 μ L 用生理盐水稀释的纯化的溶血素 LLO (100 mg/L)做 2 倍连续梯度稀释, 每管加入等体积的 1%绵羊红细胞悬液, 37 $^{\circ}$ C 放置 60 min, 4 $^{\circ}$ C 30 min, 分别用生理盐水和水作阴、阳性对照。1000 r/min 离心 10 min, 取上清, 用紫外分光光度计测定在波长 540 nm 的吸光度值。

2 结果

2.1 *hly* 基因的 PCR 扩增结果

扩增产物经 1%琼脂糖凝胶电泳检测, 观察到 1 600 bp 左右的扩增片段, 与 *hly* 基因预期片段大小一致(图 1)。

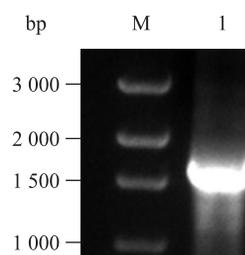


图 1 *hly* 基因的 PCR 扩增产物电泳图

Fig. 1 Agarose gel electrophoresis of PCR amplification product

Note: M: DNA marker DL3000; 1: PCR product of *hly*.

2.2 pMD18-T-hly 的酶切鉴定

重组质粒经 PCR 鉴定可以扩增出 1 600 bp 左右片段。分别用 *Bam*H I、*Xho* I 单酶切鉴定结果显示, 重组质粒大小约为 4 500 bp, 用 *Bam*H I 和 *Xho* I 双酶切获得 2 900 bp 和 1 600 bp 的片段, 证实 *hly* 已成功克隆到 T 载体 (图 2)。经测序鉴定, 其序列与 GenBank 的序列有 99% 的同源性。

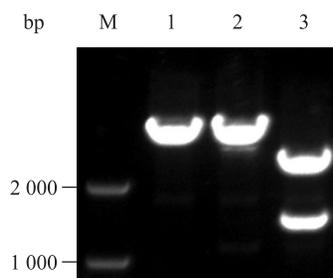


图 2 pMD18-T-hly 的酶切鉴定

Fig. 2 Identification of recombinant plasmid pMD18-T-hly

Note: M: DNA marker DL2000; 1: Recombinant plasmid pMD18-T-hly digested with *Bam*H I; 2: Recombinant plasmid pMD18-T-hly digested with *Xho* I; 3: Recombinant plasmid pMD18-T-hly digested with *Bam*H I and *Xho* I.

2.3 PET28a(+)-hly 表达质粒的构建及鉴定

PET28a(+)-hly 分别用 *Bam*H I、*Xho* I 单酶切后都获得约 7 000 bp 的产物, 用 *Bam*H I 和 *Xho* I 双酶切可获得 5 400 bp 和 1 600 bp 的产物(图 3), 经测序发现其核苷酸序列与 GenBank 的序列有 99% 的同源性, 推导出的氨基酸序列有 100% 同源性, 证明 *hly* 基因已成功插入 PET28a(+) 表达载体。

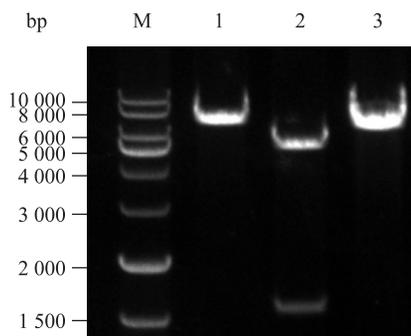


图 3 PET28a(+)-hly 的酶切鉴定

Fig. 3 Identification of recombinant plasmid PET28a(+)-hly

Note: M: DNA marker 1 kb; 1: Recombinant plasmid PET28a(+)-hly digested with *Bam*H I; 2: Recombinant plasmid PET28a(+)-hly digested with *Bam*H I and *Xho* I; 3: Recombinant plasmid PET28a(+)-hly digested with *Xho* I.

2.4 重组菌诱导表达条件的优化

SDS-PAGE 结果(图 4、5、6)表明, 重组 LLO 原核表达的最优化条件是 28 °C、0.1 mmol/L IPTG、诱导 6 h。

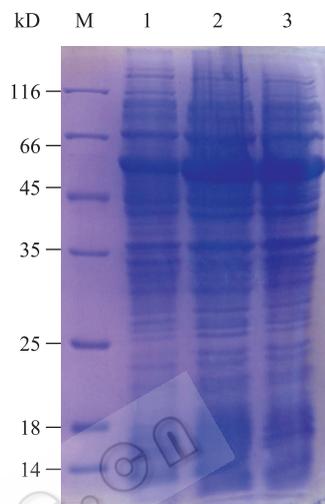


图 4 SDS-PAGE 分析不同诱导温度对 LLO 表达的影响

Fig. 4 SDS-PAGE analysis of the expression of LLO at different temperature

Note: M: Protein marker; 1: Expression of LLO at 37 °C; 2: Expression of LLO at 28 °C; 3: Expression of LLO at 30 °C.

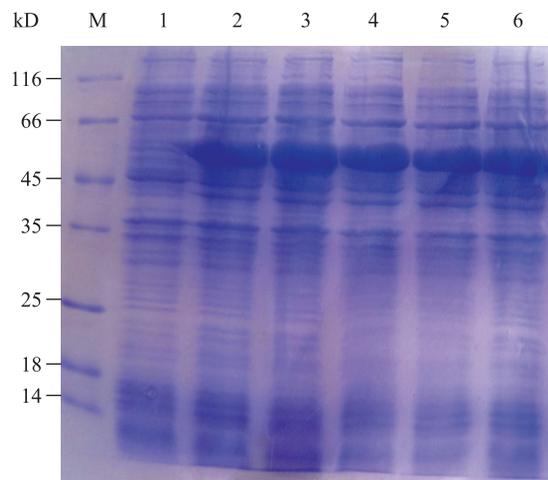


图 5 SDS-PAGE 分析不同 IPTG 浓度对 LLO 表达的影响

Fig. 5 SDS-PAGE analysis of the expression of LLO with different IPTG concentration

Note: M: Protein marker; 1: Expression of LLO in blank bacteria; 2: Expression of LLO with 0.1 mmol/L IPTG; 3: Expression of LLO with 0.25 mmol/L IPTG; 4: Expression of LLO with 0.5 mmol/L IPTG; 5: Expression of LLO with 0.75 mmol/L IPTG; 6: Expression of LLO with 1.0 mmol/L IPTG.

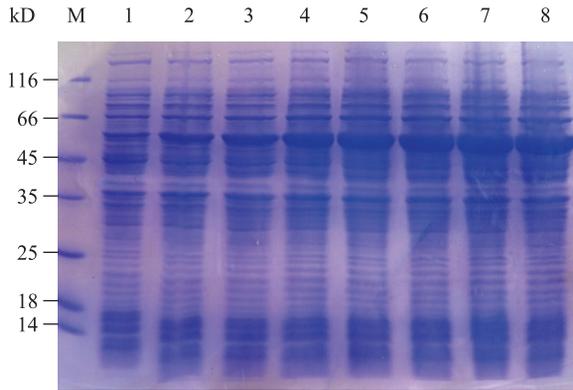


图6 SDS-PAGE 分析不同诱导时间对 LLO 表达的影响
Fig. 6 SDS-PAGE analysis of the expression of LLO with different induction time

Note: M: Protein marker; 1: Expression of LLO in non-induced bacteria; 2: Expression of LLO with 2 h; 3: Expression of LLO with 3 h; 4: Expression of LLO with 4 h; 5: Expression of LLO with 5 h; 6: Expression of LLO with 6 h; 7: Expression of LLO with 7 h.

2.5 表达产物的 Western blotting 鉴定

Western blotting 结果(图 7)显示 LLO 能与 Anti-his 单抗结合, 而空白菌的诱导产物并没有与 Anti-his 抗体结合, 证明 LLO 在 BL21 中能正确表达。LLO 与小鼠抗 LM 血清结合, 证明其具有免疫原性。

2.6 表达产物的溶血活性鉴定

通过溶血实验(图 8)证明重组表达的 LLO 具有强烈的溶血活性(当 LLO 与红细胞悬液 1:1 混匀时, 其溶血程度比水裂解红细胞强), 其溶血效价

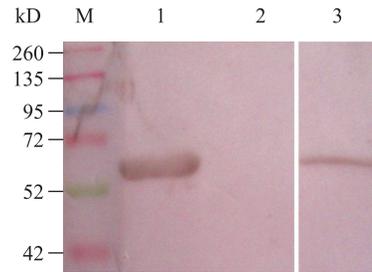


图7 Western blotting 鉴定 LLO

Fig. 7 Western blotting of LLO

Note: M: Prestained protein marker; 1: LLO with anti-his antibody; 2: Blank bacteria with anti-his antibody; 3: LLO with polyclonal antibody of LM.

为 1:1 024, 具有较强的生物学活性, 为进一步研究奠定了基础。

3 讨论

LLO 是由 LM 特有的毒力标志基因 *hly* 编码的分泌蛋白, 是 LM 的主要毒力因子^[4]。LM 感染宿主细胞后, 被包裹在宿主细胞的吞噬小泡中, LM 通过分泌溶血素(LLO)溶解吞噬体膜, 躲避吞噬体中的杀菌物质, 进入细胞浆中。Chaudhari 等^[5]发现, 水牛口服感染 LM 后, 7-10 d 即出现抗 LLO 抗体, 在感染后 70 d 仍然维持在可检测的水平。在抗体达到峰值时, 粪便、鼻液、血液培养物中没有发现病原体。Kalorey 等^[6]以高纯度 LLO 为抗原, 用间接 ELISA 检测牛奶中的 LLO 抗体, 敏感性和特异性均

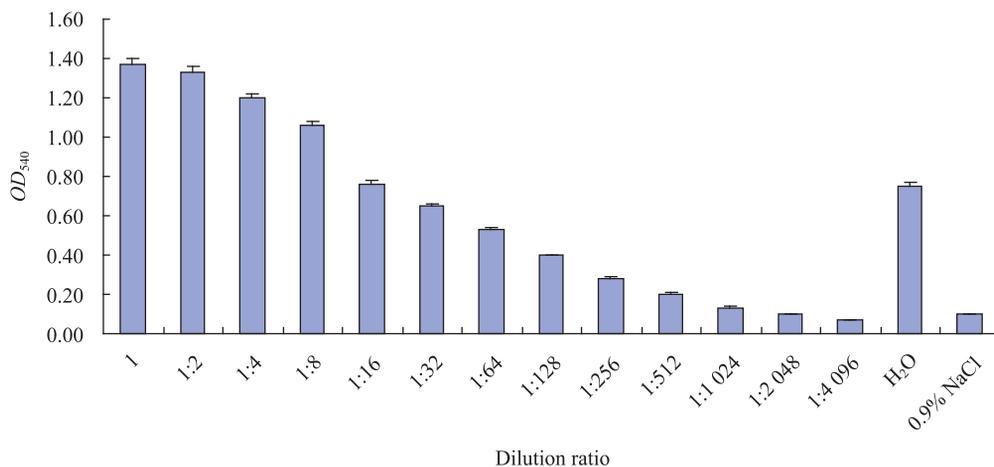


图8 LLO 溶血活性鉴定
Fig. 8 Hemolytic assay of LLO

达 100%。目前, 国内的赵松波等人^[7]已经原核表达出溶血素(LLO), 也建立了 LLO 的间接 ELISA 检测方法, 但是该方法在检测动物血清时容易出现假阴性。赵松波提出利用 LLO 单抗建立夹心 ELISA 可提高检测灵敏度, 但相关工作未见报道。董慧^[8]和罗正^[9]等人已经制备了 LLO 单抗, 但均未用于实际样品检测。早在 1991 年就有国外的学者用 LM 培养上清中纯化的蛋白免疫小鼠制备单抗, 获得 3 株能抑制 LLO 溶血的单抗、1 株能抑制 LLO 与红细胞膜结合的单抗以及 2 株能抑制与其他细胞膜结合的单抗^[10]。1999 年 Erdenlig 等人^[11]同样得到了具有抑制 LLO 溶血作用的单克隆抗体, 并用于鉴定所分离的李斯特菌是否为致病菌株。本实验对 LM 的毒力标志基因 *hly* 进行了原核表达获得具有免疫原性及溶血活性的溶血素(LLO), 为 LM 特异性单克隆体的制备及其检测方法的建立奠定了基础。

参 考 文 献

- [1] 张晓峰, 方维焕, 江玲丽, 等. 应用聚合酶链反应检测食品中单核细胞增多性李斯特菌[J]. 中华预防医学杂志, 2003, 37(3): 199-201.
- [2] Membré JM, Kubaczka M, Dubois J, et al. Temperature effect on *Listeria monocytogenes* growth in the event of contamination of cooked pork products[J]. J Food Prot, 2004, 67(3): 463-469.
- [3] Gedde MM, Higgins DE, Tilney LG, et al. Role of listeriolysin O in cell-to-cell spread of *Listeria monocytogenes*[J]. Infect Immun, 2000, 68(2): 999-1003.
- [4] Ryser ET. Incidence and behaviour of *Listeria monocytogenes* in cheese and other fermented dairy products[A]// Ryser ET, Marth EH, eds. *Listeria, Listeriosis, and Food Safety*. New York: Marcel Dekker, Inc, 1999: 411-503.
- [5] Chaudhari SP, Malik SVS, Rekha GB, et al. Detection of anti-listeriolysin O and *Listeria monocytogenes* in experimentally infected buffaloes (*Bubalus bubalis*)[J]. Trop Anim Health Prod, 2001, 33(4): 285-293.
- [6] Kalorey DR, Kurkure NV, Warke SR, et al. Evaluation of indirect and avidin-biotin enzyme linked immunosorbent assays for detection of anti-listeriolysin O antibodies in bovine milk samples[J]. Zoonoses and Public Health, 2007, 54(8): 301-306.
- [7] 赵松波, 孙晓林, 张少华, 等. 产单核细胞李斯特菌溶血素 O 基因在大肠杆菌中的优化表达及 ELISA 检测方法的建立[J]. 中国兽医学, 2009, 39(11): 968-972.
- [8] 董慧, 焦新安, 殷月兰, 等. 抗李斯特菌溶血素单克隆抗体的制备及初步鉴定[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2008, 24(3): 240-246.
- [9] 罗正, 刘若尘, 郑世军. 单核增生性李氏杆菌溶血素的原核表达及其单克隆抗体的制备[J]. 生物工程学报, 2009, 25(11): 1652-1657.
- [10] Klotz IM. *Ligand-Receptor Energetics: A Guide for the Perplexed*[M]. New York: John Wiley & Sons, Inc, 1997.
- [11] Erdenlig S, Ainsworth AJ, Austin FW. Production of monoclonal antibodies to *Listeria monocytogenes* and their application to determine the virulence of isolates from channel catfish[J]. Appl Environ Microbiol, 1999, 65(7): 2827-2832.