

单核细胞增生性李斯特菌 iap 基因的原核表达

区燕宜*, 徐成刚*, 叶贺佳, 吴晓薇, 廖 明

(华南农业大学 兽医学院, 广东 广州 510642)

摘要: 该研究利用自行设计的引物通过 PCR 方法扩增出单核细胞增生性李斯特菌 *Listeria monocytogenes* C5305 株的 iap 基因, 在 iap 基因的 5' 端和 3' 端分别引入 *EcoR* I 和 *Xho* I 2 个酶切位点并将其克隆到 pET-28a 表达载体上, 经 PCR 鉴定、酶切鉴定和核苷酸序列测定后获得重组质粒 pET-28a-iap, 将该重组质粒转化入大肠杆菌 BL21 (DE3) pLysS, 经 1 mmol/L IPTG 诱导 4 ~ 6 h 后, 通过 SDS-PAGE 及 Western-blotting 鉴定, 证明该基因得到表达, 表达产物相对分子质量约为 60 000, 以可溶形式存在。

关键词: 单核细胞增生性李斯特菌; iap 基因; 原核表达

中图分类号: S852.6

文献标识码: A

文章编号: 1001-411X(2008)02-0108-04

Prokaryotic Expression of iap Gene from *Listeria monocytogenes*

OU Yan-yi*, XU Cheng-gang*, YE He-jia, WU Xiao-wei, LIAO Ming

(College of Veterinary Medicine, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

Abstract: In this study, the iap gene of *Listeria monocytogene* strain C5305 was amplified by PCR using specific primers. *EcoR* I and *Xho* I sites were induced to 5' and 3' end of iap gene, respectively. Specific PCR products were then cloned into expression vector plasmid pET-28a, and recombinant plasmid pET-28a-iap was verified by PCR, restriction enzyme digestion and sequencing. After transforming pET-28a-iap into *E. coli* BL21 (DE3) pLysS and inducing with 1 mmol/L IPTG for 4 ~ 6 h, the iap gene expressed successfully in soluble form and with a relative molecular mass of approximately 60 000.

Key words: *Listeria monocytogenes*; iap gene; prokaryotic expression

李斯特菌属 *Listeria* 分为 2 个群, 7 个种^[1]。第 1 群包括单核细胞增生性李斯特菌 *L. monocytogenes* (简称单增李斯特菌)、伊氏李斯特菌 *L. ivanovii*、无害李斯特菌 *L. innocua*、韦氏李斯特菌 *L. welshmei* 及塞氏李斯特菌 *L. seeligeri*; 第 2 群为较少见的格氏李斯特菌 *L. grayi* 和莫氏李斯特菌 *L. murrayi*。其中单增李斯特菌被认为是引起动物和人类李斯特菌病的主要致病菌。研究发现单增李斯特菌包括致病性、弱致病性和非致病性 3 种类型。单增李斯特菌能使人畜致病, 造成猪、鸡等多种畜禽死亡。人感染后则主要表现为脑膜炎、败血症和单核细胞增多。婴幼儿、

怀孕妇女和免疫耐受病人的感染死亡率可高达 20% ~ 30%^[2]。单增李斯特菌广泛存在于自然界中, 人们食用的肉奶蛋、水产品、蔬菜以及冷冻食品等均有不同程度的污染, 世界卫生组织 (WHO) 在关于单增李斯特菌食物中毒的报告中指出: 4% ~ 8% 的水产品、5% ~ 10% 的奶及奶制品、15% 以上的家禽、30% 以上的肉制品及冷冻制品, 均被该菌污染。食品中存在的单增李斯特菌对人类的食品安全存在较大威胁, 是冷冻食品中威胁人类健康的主要病原菌之一。

单增李斯特菌是典型的胞内寄生菌, 可在巨噬

收稿日期: 2007-07-05

作者简介: 区燕宜 (1981—), 女, 硕士研究生; 徐成刚 (1977—), 男, 硕士研究生; *: 对本文具有同样的贡献; 通讯作者: 廖 明 (1968—), 男, 教授, 博士; E-mail: mliao@scau.edu.cn

基金项目: 广东省自然科学基金创新团队项目 (5200638)

细胞和许多非吞噬细胞(如内皮细胞、上皮细胞和肝细胞)内增殖^[3]。单增李斯特菌的致病性涉及多个毒力因子^[4-6],如内化素、溶血素、p60 蛋白等。p60 蛋白是李斯特菌分泌的一种具有高免疫原性的胞壁质水解酶,由 iap 基因编码^[7],相对分子质量约为 60 000。p60 蛋白由 484 个氨基酸残基组成,N-末端有 27 个氨基酸残基组成的信号肽序列^[4]。对李斯特菌的 iap 基因进行测序后发现,其两端为保守区域,中间为可变区域^[8]。根据上述保守区和可变区序列建立的 PCR 方法能够用于李斯特菌的种、属鉴定。本研究旨在克隆和表达单增李斯特菌的 iap 基因,为研制基于 p60 蛋白的诊断用抗原和单克隆抗体,以及制备基因工程疫苗奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种及质粒 单增李斯特菌菌种(C5305 株)由华南农业大学禽病研究室提供。原核表达载体质粒 pET-28a 为 Novagen 公司产品。感受态细胞大肠杆菌 Top10 为华南农业大学兽医学院陈金顶教授惠赠,受体菌 BL21(DE3)pLysS 为 Promega 公司产品。

1.1.2 酶及相关试剂 Ex Taq 聚合酶,限制性内切酶 *EcoR* I、*Xho* I 及 IPTG 为大连宝生物工程有限公司产品。T4 DNA ligase 为 Promega 公司产品。兔抗单增李斯特菌血清由华南农业大学禽病研究室提供,羊抗兔 IgG-HRP 标记抗体为北京鼎国生物技术的发展中心产品。

1.2 方法

1.2.1 引物设计及 PCR 扩增 根据 GenBank 上发表的 iap 全基因序列,应用 DNASTar5.07 和 Primer Premier 5.0 设计 1 对引物,由上海生工生物公司合成,引物序列如下,其中划线部分分别为限制性内切酶 *EcoR* I (上游引物)和 *Xho* I (下游引物)的识别位点。

上游引物: 5'-GCGAATTCATGAATATGAAAAAG-CAACTATCGCG-3'; 下游引物: 5'-AAACTCGAGTTAT-ACGCGACCGAAGCCAACTAGA-3'。按照常规方法培养单增李斯特菌,抽提菌体基因组 DNA,然后进行 PCR,反应条件为 94 ℃ 预变性 3 min,然后再 94 ℃ 变性 1 min,56 ℃ 退火 1 min,72 ℃ 延伸 1.5 min,循环 30 次,最后 72 ℃ 延伸 10 min,预计扩增片段大小约为 1 434 bp。

1.2.2 重组原核表达质粒的构建及鉴定 参照文献[9]的方法将回收纯化的 PCR 产物定向克隆到原

核表达载体 pET-28a 中获得重组表达质粒 pET-28a-iap。碱裂解法提取质粒,用 *EcoR* I、*Xho* I 及 *Bam*-H I 对重组表达质粒进行酶切鉴定。并按照 1.2.1 的方法进行质粒 PCR 鉴定。最后将重组表达质粒送上海生工生物工程有限公司进行目的基因的核苷酸序列测定。

1.2.3 iap 基因在大肠杆菌中的诱导表达 将重组表达质粒 pET-28a-iap 及空载体质粒 pET-28a 分别转化入大肠杆菌 BL21(DE3)pLysS 中,37 ℃ 振荡培养至 $D_{600\text{ nm}}$ 值达 0.3~1.0 时,加入 IPTG 至终浓度为 1 mmol/L,继续培养,分别于 2、4 及 6 h 各取出 2 mL 菌液,测 $D_{600\text{ nm}}$ 值,离心收集菌体。

1.2.4 表达产物的 SDS-PAGE 分析 取 IPTG 诱导前和诱导后各 1 mL 样品以 12 000 r/min 离心 1 min,弃上清液,参照文献[9]的方法进行 12 % SDS-PAGE 电泳分析。

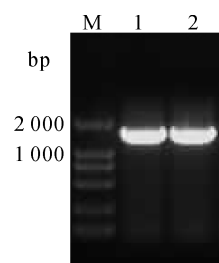
1.2.5 Western-blotting 免疫蛋白印迹分析 按常规方法纯化后的蛋白经 SDS-PAGE 分离后,电转移至硝酸纤维素膜上,以免抗单增李斯特菌血清为一抗,羊抗兔 IgG-HRP 标记抗体为二抗,进行免疫印迹分析。

1.2.6 表达产物的可溶性分析 重组菌经 IPTG 诱导后,取 100 mL,4 ℃ 8 000 r/min 离心 15 min,弃上清液;沉淀物用 10 mL 结合缓冲液(20 mmol/L Tris-HCl pH7.6,20 mmol/L 咪唑,0.5 mmol/L NaCl)重悬;超声裂解(60 W,2 min/次)10 min;将裂解物于 4 ℃ 8 000 r/min 离心 15 min,分别取适量上清和沉淀物用于 SDS-PAGE 检测。

2 结果与分析

2.1 PCR 扩增结果

扩增产物经 0.01 g/mL 琼脂糖凝胶电泳检测,可见有 1 450 bp 左右的预期片段产生(图 1)。



M:DNA marker DL2000

1,2:iap 基因的扩增产物

M:DNA marker DL2000

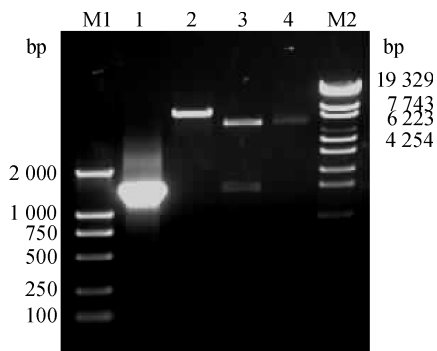
1,2:PCR product of iap gene

图 1 iap 基因 PCR 产物电泳图

Fig.1 Agarose gel electrophoresis of iap gene PCR product

2.2 重组原核表达载体质粒的 PCR、酶切鉴定及核苷酸序列测定

重组质粒 pET-28a-iap 用 *EcoR* I 和 *Xho* I 双酶切,产物电泳后产生 5 400 bp 左右条带及 1 450 bp 左右条带,其大小分别与表达载体质粒 pET-28a 及 iap 基因 PCR 产物的大小一致(图 2),核苷酸序列测定表明,插入片段大小为 1 434 bp,推导编码 478 个氨基酸,证明重组质粒 pET-28a-iap 构建成功.



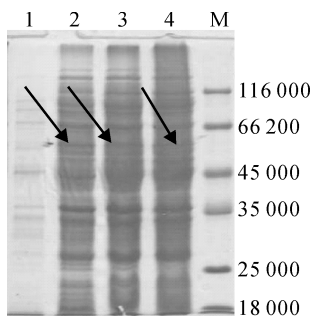
M1:DNA marker DL2000;1:iap 基因 PCR 产物;2:pET-28a-iap 重组质粒 *Bam* H I 单酶切;3:pET-28a-iap 重组质粒 *EcoR* I/*Xho* I 双酶切;4:重组质粒 pET-28a-iap;M2:λ-*EcoT*14 I digest marker
M1:DNA marker DL2000; 1: PCR product of *iap* gene; 2 :pET-28a-iap digested with *Bam*H I;3:pET-28a-iap digested with *EcoR* I/*Xho* I;4: re-combinant plasmid pET-28a-iap;M2:λ-*EcoT*14 I digest marker

图 2 pET-28a-iap 重组质粒的鉴定

Fig.2 Identification of recombinant plasmid

2.3 表达产物的 SDS-PAGE 分析

SDS-PAGE 分析结果表明,经 1 mmol/L IPTG 诱导后重组菌产生 1 条相对分子质量约 60 000 的特异蛋白条带,以诱导 4 h 的效果最好,蛋白表达量较大,杂蛋白较少(图 3) .



M:蛋白质相对分子质量标准;1:pET-28a-iap 重组质粒在 BL21 (DE3)pLysS 中未经IPTG 诱导;2~4:pET-28a-iap 重组质粒在 BL21 (DE3)pLysS 中经 IPTG 诱导 2、4、6 h;

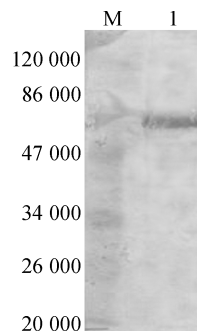
M: protein relative molecular mass marker; 1: pET-28a-iap in BL21 (DE3)pLysS without IPTG induction; 2 - 4: pET-28a-iap in BL21 (DE3)pLysS after IPTG induction for 2,4,6 h

图 3 蛋白表达产物的 SDS-PAGE 分析

Fig.3 SDS-PAGE analysis of p60 protein expressed in BL21 (DE3) pLysS

2.4 表达产物的 Western-blotting 检测

表达的相对分子质量约 60 000 的重组蛋白与兔抗单增李斯特菌血清可以发生特异性反应,表明单增李斯特菌的 iap 基因在大肠杆菌 BL21 (DE3) pLysS 中得到正确表达(图 4).



M:蛋白质相对分子质量标准;1:重组蛋白的 Western-blotting 免疫蛋白印迹分析

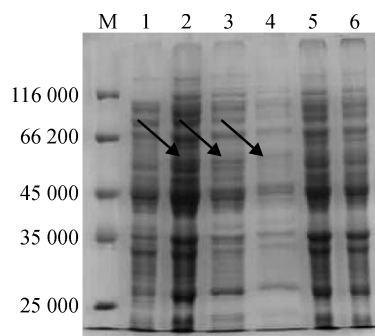
M:protein relative molecular mass marker;1: Western-blotting analysis of recombination protein

图 4 BL21(DE3) pLysS 中蛋白表达产物的 Western-blotting 免疫蛋白印迹分析

Fig.4 Western-blotting analysis of p60 protein expressed in BL21 (DE3) pLysS

2.5 表达产物的可溶性分析

超声裂解产物电泳后结果显示,p60 蛋白为可溶性蛋白,在上清液中存在(图 5).



M:蛋白质相对分子质量标准;1:pET-28a-iap 重组质粒在 BL21 (DE3)pLysS 中未经 IPTG 诱导;2:pET-28a-iap 重组质粒在 BL21 (DE3)pLysS 中经 IPTG 诱导 4 h;3、4:超声裂解后的上清液;5、6:超声裂解后的沉淀

M: protein relative molecular mass marker; 1 : pET-28a-iap in BL21 (DE3)pLysS without IPTG induction; 2 : pET-28a-iap in BL21 (DE3) pLysS after IPTG induction for 4 h ; 3,4: Supernate of IPTG-induced cells;5,6:Deposit of IPTG-induced cells

图 5 蛋白表达产物的可溶性分析

Fig.5 Solubility analysis of p60 protein expressed in BL21 (DE3) pLysS

3 讨论

常用于外源基因表达的系统有原核表达系统和真核表达系统,本研究选择了大肠杆菌表达系统,主要是由于其操作相对简便,且利用原核表达系统表达原核生物的基因具有一定的优越性. 大肠杆菌表达的蛋白具有免疫原性,可用于单增李斯特菌特异的单克隆抗体的研制及以后免疫学检测方法的摸索.

本研究选用了 pET-28a 原核表达载体,其具有强的 T7 启动子,且在载体序列的 N 端有 6 个 His-tag,利用 His-tag 与 Ni^{2+} 的亲和作用,表达出的蛋白产物可用 Ni^{2+} 柱进行纯化.

外源基因在大肠杆菌中表达受很多因素影响,如外源基因的长度、表达载体的选择、稀有密码子的影响、感受态细胞的选择等. 本研究选择了受体菌 BL21 (DE3) pLysS,该菌株携带质粒 pLysS 编码 T7 溶菌酶的基因,T7 溶菌酶可降低 T7 启动子调控的目的基因的背景表达水平,但不干扰 IPTG 诱导目的基因的表达.

在利用 IPTG 诱导重组蛋白时,也进行了不同 IPTG 浓度及不同诱导时间的摸索,认为加入 1 mmol/L IPTG 在 37 °C 诱导 4 ~ 6 h,蛋白表达量较大.

单增李斯特菌为需氧或兼性厌氧菌,生长温度为 1 ~ 45 °C^[10],对不利环境具有比较强的耐受能力,在 4 °C 冰箱中也可生长繁殖,在 pH5.0 ~ 9.0 的环境中,1 年后仍可检出. 这使其危害性更进一步增大. 另外,单增李斯特菌病原体是定居在细胞内的^[8],因此应用抗生素治疗李斯特菌病的效果不太理想. 由李斯特菌引起的疾病及其食源性感染日益引起世界各国的重视. 对该病原进行快速、灵敏、准确的检测是有效防治本病和保证食品卫生安全的重要手段. 有研究表明在对单增李斯特菌的保护性免疫中 p60 蛋白也是一个重要的抗原成分,它是刺激机体 B 细胞和 T 细胞产生免疫反应的主要抗原分子^[11]. 本研究对单增李斯特菌 iap 基因进行了原核表达、对表达产物的抗原反应性以及可溶性进行了分析,为今后

进一步研究单增李斯特菌疫苗和开发单增李斯特菌的诊断试剂奠定了基础.

参考文献:

- [1] JONES D. Current classification of the genus *Listeria* [J]. Probl Listeriosis, 1992, 11: 7-8.
- [2] FARBER J M, PETERKIN P I. *Listeria monocytogenes*, a food-borne pathogen [J]. Microbiol Rev, 1991, 55: 476-511.
- [3] BUBERT A, KOHLER S, GOEBEL W. The homologous and heterologous regions within the iap gene allow genus- and species-specific identification of *Listeria* spp. by polymerase chain reaction [J]. Appl Environ Microbiol, 1992, 58: 2625-2632.
- [4] PORTNOY D A, CHAKRABORTY T, GOEBEL W, et al. Molecular determinants of *Listeria monocytogenes* pathogenesis [J]. Infect Immun, 1992, 60: 1263-1267.
- [5] 姜永强. 产单核细胞李斯特菌毒力因子的分子遗传学研究进展 [J]. 国外医学:微生物学分册, 1996, 19 (3): 23-25.
- [6] VINES A, SWAMINATHAN B. Identification and characterization of nucleotide sequence differences in three virulence-associated genes of *Listeria monocytogenes* strains representing clinically important serotypes [J]. Current Microbiology, 1998, 36: 309-318.
- [7] YU K Y, NOH Y, CHUNG M, et al. Use of monoclonal antibodies that recognize p60 for identification of *Listeria monocytogenes* [J]. Clinical And Diagnostic Laboratory Immunology, 2004, 11: 446-451.
- [8] 任艳红. 单核细胞增生性李斯特菌溶血素基因的原核表达 [J]. 中国人畜共患病杂志, 2005, 21 (12): 1078-1080.
- [9] 萨姆布鲁克 J, 弗里奇 E F, 曼尼阿蒂斯 T, 等. 分子克隆实验指南 [M]. 2 版. 金冬雁, 黎孟枫, 侯云德, 译. 北京: 科学出版社, 1992.
- [10] 陆承平. 兽医微生物学 [M]. 3 版. 北京: 中国农业出版社, 2001.
- [11] 王俊霞. 产单核细胞李斯特菌毒力因子及免疫预防研究进展 [J]. 动物医学进展, 2007, 28 (2): 78-81.

【责任编辑 柴 焰】