

# 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

罗正, 刘若尘, 郑世军

中国农业大学动物医学院 农业生物技术国家重点实验室, 北京 100193

**摘要:** 为了深入研究单核增生性李氏杆菌(*LM*)致病机理, 从其基因组中克隆李氏杆菌溶血素基因 *hly*, 并将其与原核表达载体连接在大肠杆菌 BL21 中表达携带 His 标签的李氏杆菌溶血素(LLO)融合蛋白, 经镍柱纯化得到重组 LLO 蛋白作为免疫原并免疫小鼠。取免疫小鼠的脾细胞与骨髓瘤细胞(Sp2/0)进行融合, 经过 3 次亚克隆后获得 3 株稳定分泌针对 LLO 蛋白单抗的杂交瘤细胞株, 分别命名为 Anti-LLO1、Anti-LLO2、Anti-LLO3; 经 ELISA 测定其细胞培养上清效价分别为  $1:3.6 \times 10^4$ 、 $1:6.4 \times 10^4$ 、 $1:1.6 \times 10^4$ , 腹水效价分别为  $1:2 \times 10^7$ 、 $1:2 \times 10^7$ 、 $1:1 \times 10^7$ ; 亲和力解离常数( $K_d$ )分别为  $6.18 \times 10^{-11}$ 、 $7.50 \times 10^{-11}$ 、 $6.27 \times 10^{-11}$ ; 3 株单抗的 IgG 亚类均为 IgG1。经 Western blotting 鉴定证明, 该 3 株抗体均能特异地识别李氏杆菌 LLO 蛋白, 该单抗的制备为深入研究 *LM* 的致病机理奠定了基础。

**关键词:** 单核增生性李氏杆菌, 李氏杆菌溶血素, 原核表达, 单克隆抗体

## Prokaryotic expression of *Listeria monocytogene* (*LM*) *hly* and development of monoclonal antibodies against listeriolysin O (LLO)

Zheng Luo, Ruochen Liu, and Shijun Zheng

State Key Laboratory of Agrobiotechnology, College of Veterinary Medicine, China Agricultural University, Beijing 100193, China

**Abstract:** In order to study the pathogenesis of *Listeria monocytogenes* (*LM*), we cloned *listeriolysin* gene into prokaryotic expression vector PET21a. The expression vector was transformed into *Escherichia coli* BL21 for expression of listeriolysin O (LLO). LLO-His tag fusion protein was purified with a Ni-NTA affinity column and was used as an immunogen to vaccinate BALB/C mice. Hybridomas were developed by fusing mouse myeloma cells Sp2/0 and splenocytes from the immunized mice and screened with purified LLO. Three hybridomas secreting antibodies against listeriolysin O were obtained and named anti-LLO1, anti-LLO2 and anti-LLO3, respectively. Western blotting analysis showed that all of them could specifically bind to the LLO secreted by the *LM*. The titers of anti-LLO monoclonal antibodies in the supernatants of three hybridomas cultures were  $1:3.6 \times 10^4$ ,  $1:6.4 \times 10^4$  and  $1:1.6 \times 10^4$ , respectively, and the titers of ascites from the hybridoma-injected mice were  $1:2 \times 10^7$ ,  $1:2 \times 10^7$  and  $1:1 \times 10^7$ , respectively, based on ELISA test. The isotypes of the monoclonal antibodies were determined to be IgG1. The dissociation constants ( $K_d$ ) of these three monoclonal antibodies were determined to be  $6.18 \times 10^{-11}$ ,  $7.50 \times 10^{-11}$  and  $6.27 \times 10^{-11}$  respectively. These data and reagents will

**Received:** August 28, 2009; **Accepted:** September 18, 2009

**Supported by:** National Basic Research and Development Program of China (973 Program)(No. 2006CB504303), National Natural Science Foundation of China (No. 30725026).

**Corresponding author:** Shijun Zheng. Tel: +86-10-62734681; Fax: +86-10-62734681; E-mail: sjzheng@cau.edu.cn

国家重点基础研究发展计划(973 计划)(No. 2006CB504303), 国家自然科学基金项目(No. 30725026)资助。

be of great assistance to elucidate the pathogenesis of *Listeriosis*.

**Keywords:** *Listeria monocytogenes*, listeriolysin O, prokaryotic expression, monoclonal antibody

单核增生性李氏杆菌(*Listeria monocytogenes*, LM)是一种细胞内寄生的革兰氏阳性短杆菌, 是重要的食源性人兽共患病病原。不仅如此, 它也是研究感染与免疫的重要细菌模型, 对生物学医学的发展极为重要。李氏杆菌溶血素 LLO 是由 *hly* 基因编码的一种分泌性蛋白, 也是 LM 的毒力因子, 其不仅在 LM 逃逸初级吞噬体时发挥着至关重要的作用, 同时也是 LM 逃逸两层膜吞噬体过程中必需的<sup>[1]</sup>, 因此该毒素在李氏杆菌感染过程中起着十分重要的作用。目前发现 LLO 除了能帮助 LM 逃逸吞噬泡外, 还能激活宿主细胞内多种信号传导通路, 譬如 MAPK 通路、钙离子信号途径、核转录调控因子 NF- $\kappa$ B 信号通路等<sup>[2]</sup>。LLO 具有调节巨噬细胞细胞因子表达、诱导树突状细胞凋亡的作用, 在 IFN- $\beta$  的作用下, 可以增加巨噬细胞细胞膜的通透性并加速细胞凋亡<sup>[3]</sup>。最新研究表明, LLO 还具有调节宿主细胞组蛋白去乙酰化的作用, 从而调控基因转录并影响宿主细胞的免疫应答<sup>[4]</sup>。由于 LLO 可以使 LM 从巨噬细胞的吞噬泡中逃逸到胞浆中增殖, 所以 LLO 是造成 LM 对巨噬细胞持续性感染的主要因素<sup>[5]</sup>。虽然对 LLO 功能研究取得了一定的进展, 但还有很多现象没有得到很好的解释, 譬如 LM 在早期感染诱导细胞凋亡<sup>[6]</sup>以及对先天性免疫的影响是否与 LLO 有关, 这些问题还需要深入研究。本研究成功表达 LLO 重组蛋白并制备出针对它的单克隆抗体, 为进一步研究 LM 致病的分子机理奠定了基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌株、细胞及实验动物

大肠杆菌菌株 DH5 $\alpha$ 、BL21 由本实验室保存, LM 强毒株由扬州大学焦新安教授惠赠, LM *hly* 基因缺失弱毒株以及骨髓瘤细胞系 SP2/0 细胞由本实验室保存, BALB/C 小鼠购自北京协和实验动物中心。

### 1.2 主要试剂

脑心浸液(BHI)培养基、肉汤培养基购自北京陆桥公司; 细菌基因组提取试剂盒购自天根科技有限公司; PMDT19-T Simple 载体、限制性内切酶 *Nde* I、

*Xho* I 购自宝生物公司; *Taqplus* DNA 酶、10 $\times$  PCR Buffer、dNTPs 购自威格拉斯公司; DNA 片段回收试剂盒购自博大泰克公司; PET21a(+)表达载体由本实验室保存; 低分子量蛋白标准购自 NEB 公司; Superflow 蛋白纯化预装柱购自 Qiagen 公司; His 单克隆抗体购自 Invitrogen 公司; HAT、HT 选择培养基购自 Sigma 公司; DMEM 购自 Gibico 公司; 胎牛血清购自 Hyclone 公司; IPTG、PEG4000 购自索莱宝公司; 酶标板购自 Costar 公司; HRP 标记山羊抗小鼠 IgG 购自鼎国生物公司。

### 1.3 *hly* 基因克隆与表达载体的构建

用 BHI 液体培养基 37 $^{\circ}$ C 振荡培养李氏杆菌, 提取细菌基因组。根据 GenBank 上登录的 *hly* 序列 (genID:987033)用 Primer 5.0 设计特异性引物, 上游加入 *Nde* I、下游加入 *Xho* I 酶切位点扩增去信号肽 *hly* 基因。上游引物 5'-CATATGGATGCATCTGCATTCAATAAAG-3', 下游引物 5'-CTCGAGTTCGATTGGATTATCTACTTTATTAC-3'。以提取的基因组为模板, 进行 PCR 扩增基因。反应条件为: 95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 95 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 57 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 共 30 个循环; 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min, 4 $^{\circ}$ C 保存。产物回收后与 PMDT-19 载体连接转化 DH5 $\alpha$ 感受态细胞。挑选菌落进行酶切和 PCR 鉴定再测序验证。

选取测序结果正确的克隆进行培养然后提取质粒 DNA。将提取的质粒用 *Nde* I、*Xho* I 双酶切过夜, 同时酶切表达载体 PET21a(+)质粒。回收酶切片段后取 *hly* 片段与 PET21a(+)片段连接过夜, 转化 DH5 $\alpha$ 感受态细胞, 再次挑选菌落进行鉴定。

### 1.4 蛋白表达与纯化

取测序正确的质粒转化 BL21 感受态细胞, 挑取单菌落后诱导表达。收获蛋白进行 SDS-PAGE 电泳, 考马斯亮蓝染色鉴定。证实有蛋白表达后再进行 Western blotting 鉴定, 以抗 His 标签单抗及抗 LM 小鼠阳性血清作为一抗, 以 HRP 标记的山羊抗小鼠 IgG 为二抗, 用化学发光法曝光 X 光胶片分析目的蛋白表达情况。用 Ni-NTA 亲和纯化预装柱纯化目的蛋白。

### 1.5 抗 LLO 单克隆抗体的制备

小鼠免疫: 首免用 PBS 稀释抗原, 使抗原量达到 30  $\mu\text{g}/\text{只}$ , 然后与等体积弗氏完全佐剂乳化后腹腔注射免疫 6 周龄的 BALB/c 小鼠; 二免、三免用抗原与弗氏不完全佐剂乳化物免疫小鼠。每次免疫间隔 3 周, 第 3 次免疫后断尾采血分离血清, 测定小鼠血清效价, 用 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的 LLO 抗原包被酶联反应板, 进行 ELISA 检测, 阴阳性临界值=阴性样本  $OD_{450}$  平均值+3 标准差(3SD)。当 ELISA 检测效价大于 1:10 000 时, 小鼠可用于细胞融合制备单抗。

细胞融合、阳性克隆筛选、亚克隆以及腹水的制备和纯化按常规方法进行<sup>[7]</sup>。

### 1.6 抗 LLO 单克隆抗体的鉴定

#### 1.6.1 单克隆抗体特异性鉴定

用培养的强毒李氏杆菌菌体裂解上清, 李氏杆菌 *hly* 基因缺失株培养菌体裂解上清, 大肠杆菌菌体裂解上清、沙门氏菌菌体裂解上清、金黄色葡萄球菌菌体裂解上清、布鲁氏菌菌体裂解上清进行 SDS-PAGE 电泳, 以制备的单抗为一抗, 进行 Western blotting 检测。

#### 1.6.2 单克隆抗体亲和力的测定以及 Ig 亚类鉴定

用 Sigma 公司的小鼠单抗型别鉴定试剂盒, 按照说明进行抗体亚类鉴定。以间接 ELISA 测定单抗的亲和力<sup>[8]</sup>: 用 0.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的重组 LLO 蛋白包被酶标板, 封闭好后向其中加入倍比稀释的单抗, 初始浓度为 250 ng/mL, 之后按常规 ELISA 程序操作, 酶标仪测定  $OD_{450}$  值。连续几个稀释度反应后读数不再增大时视为抗原抗体 100% 结合, 以  $OD_{450}$  吸光值为纵坐标, 抗体浓度为横坐标作散点图, 以读数最大值( $OD_{450}=4.0$ )的一半视为抗原与抗体结合率 50%。然后生成对数趋势线同时显示公式, 将  $OD_{450}=2.0$  代入公式, 求出此时的抗体浓度, 此时抗体的浓度即为亲和力解离常数( $K_d$ )。

## 2 结果

### 2.1 *hly* 基因克隆与表达载体的构建

以李氏杆菌基因组 DNA 为模板, 用特异性引物扩增 *hly*(图 1A), 获得与预期大小一致的 DNA 片段, 大小约 1500 bp。该片段与 T 载体连接后, 酶切鉴定

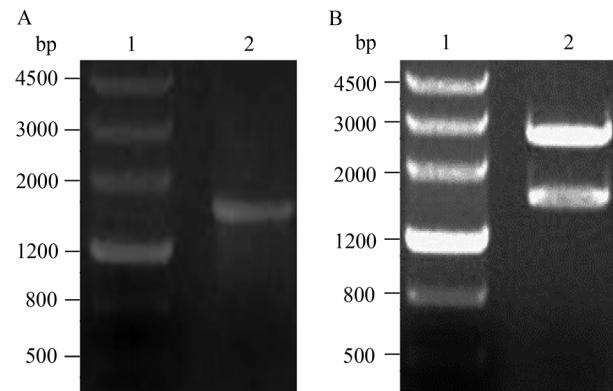


图 1 *hly* 基因克隆与表达载体的构建

Fig. 1 Cloning of *hly* gene and construction of its expression vector. (A) Lane 1: DNA marker; Lane 2: *hly* gene. (B) Lane 1: DNA marker; Lane 2: *hly* double restriction enzymatic digestive test with *Nde*I and *Xho*I.

获得与预期目的大小一致的 2 条片段, 其中约 1500 bp 的片段即为目的片段(图 1B), 多个克隆测序结果表明, 实验成功获得 *hly* 基因并构建了 LLO 表达载体。

### 2.2 LLO 蛋白表达纯化

将携带 *hly* 基因的表达载体在大肠杆菌原核表达系统中表达, 获得分子量大小约 57 kD 的蛋白(图 2A、2B), 通过镍柱纯化后的蛋白用 His 单抗进行 Western blotting 鉴定(图 2C), 表明该 His-LLO 融合蛋白按照预期得到了表达。

以李氏杆菌免疫小鼠得到的阳性血清作为一抗, Western blotting 检测表明大肠杆菌表达的 LLO-His 融合蛋白能被李氏杆菌阳性血清识别(图 2D)。该结果证明 LLO 具有良好的免疫学活性。该实验结果为进一步制备针对 LLO 的单克隆抗体奠定了基础。

### 2.3 抗 LLO 单克隆抗体的制备

小鼠经 3 次免疫后, 血清中抗 LLO 的 ELISA 效价测定结果均大于 1:10 000。取免疫小鼠的脾细胞和骨髓瘤细胞融合后, 经 ELISA 检测确定了 24 个阳性孔。选取 6 个阳性孔进行亚克隆, 经过 3 次亚克隆后, 得到 3 株能稳定分泌抗 LLO 的杂交瘤细胞株, 分别命名为 Anti-LLO1、Anti-LLO2、Anti-LLO3。用杂交瘤细胞进行小鼠腹腔注射获得腹水并将其纯化, 用分光光度计测定抗体浓度, 其浓度分别为: 1.58 mg/mL、1.52 mg/mL、2.26 mg/mL。

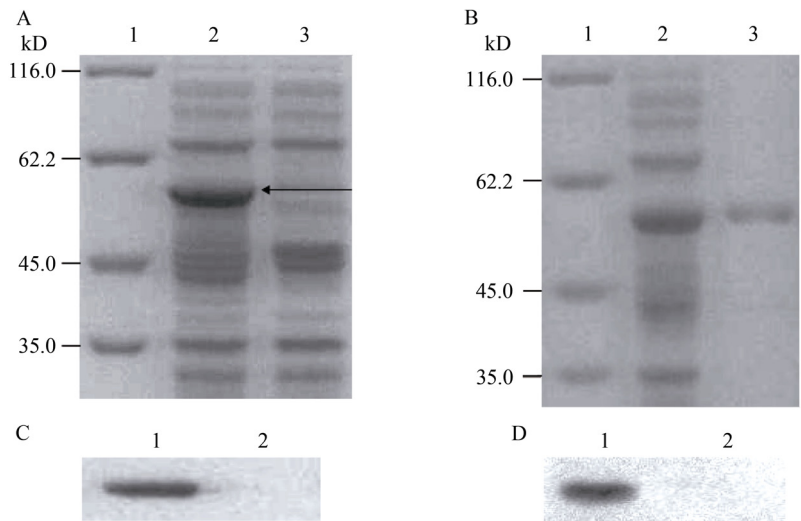


图 2 LLO 蛋白表达纯化  
Fig. 2 Expression and purification of recombinant protein LLO. (A) 1: protein marker; 2: expression of recombinant LLO; 3: negative control. (B) 1: protein marker; 2: expression of recombinant LLO without purification; 3: purified LLO recombinant protein. (C) anti-his McAb was used in Western blotting. 1: induction of LLO; 2: negative control. (D) LM polyclonal Ab was used in Western blotting. 1: induction of LLO; 2: negative control.

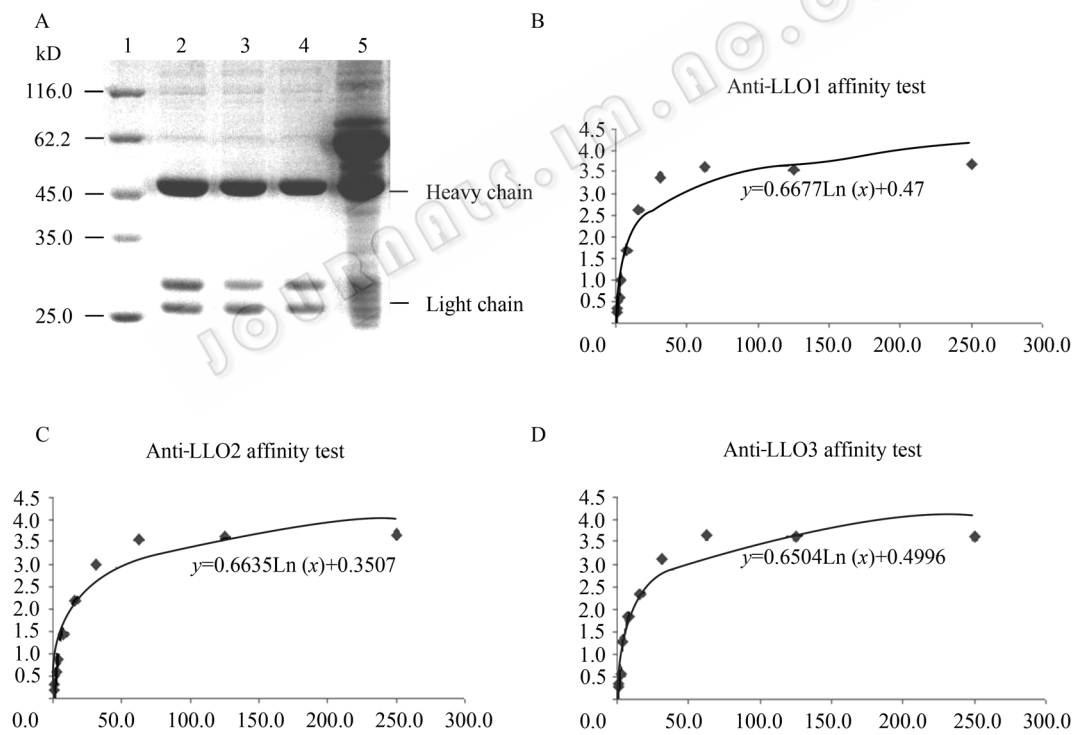


图 3 抗 LLO 单克隆抗体的纯化和亲和力测定  
Fig. 3. Anti-LLO antibody purification and their affinity test. (A) Antibody purification. 1: protein marker; 2-4: Anti-LLO1, Anti-LLO2, Anti-LLO3 monoclonal antibody purification. (B-C) Affinity test of Anti-LLO1, Anti-LLO2, Anti-LLO3.

2.4 抗 LLO 单克隆抗体特异性检测及亲和力测定  
抗体的亲和力是决定抗体质量的重要指标之一，以间接 ELISA 测定单抗的亲和力。检测结果表明，

3 株单抗的亲和力常数  $K_d$  分别为  $6.18 \times 10^{-11}$ 、 $7.50 \times 10^{-11}$ 、 $6.27 \times 10^{-11}$ (图 3B-D)，均属于高亲和力的单抗。

表 1 抗 LLO 单抗亚类鉴定

Table 1 Isotype determination of anti-LLO monoclonal antibody

	IgA	IgA	IgM	IgM	IgG1	IgG1	IgG2a	IgG2a	IgG2b	IgG2b	Ig3	Ig3
Anti-LLO1	0.1090	0.0930	0.1270	0.1180	0.5540	0.4870	0.1420	0.1340	0.1030	0.1020	0.1020	0.1090
Anti-LLO2	0.0940	0.0960	0.1060	0.0940	0.4260	0.4400	0.1290	0.1260	0.1000	0.0980	0.0990	0.1010
Anti-LLO3	0.1000	0.1040	0.1170	0.1030	0.4320	0.5040	0.1420	0.1430	0.1020	0.1100	0.1060	0.1110

抗体的特异性是决定抗体质量另一项重要指标,实验结果证实 3 株单抗不识别李氏杆菌 *hly* 基因缺失菌株以及常见的大肠杆菌、沙门氏菌、葡萄球菌、布鲁氏菌等分泌的病原蛋白(图 4)。该结果说明所获单抗具有良好的特异性。

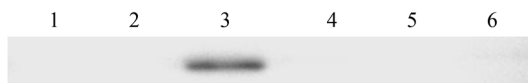


图 4 Western blotting 鉴定单抗的特异性

Fig. 4 Specificity test of monoclonal antibody by Western blotting. 1: lysate of *Salmonella*; 2: lysate of *hly* deficient LM; 3: lysate of virulent LM; 4: lysate of *Staphylococci*; 5: lysate of *E. coli*; 6: lysate of *Brucella*.

## 2.5 单抗亚类鉴定

用 ELISA 试剂盒鉴定 3 株单抗的重链亚类,结果表明 3 株单抗重链均属于 IgG1。

## 3 讨论

李氏杆菌溶血素 LLO 是李氏杆菌最重要的毒力分子,对其致病力有着重要影响。国外早在 2002 年就有人报道重组表达带 His 标签的 LLO 经过纯化复性能刺激细胞产生强烈的生物学反应<sup>[7]</sup>,国内也有人克隆表达过与 GST 标签融合的 LLO 蛋白,并且验证了其在免疫学和生物学上的活性,同时尝试将其用作李氏杆菌感染血清抗体检测诊断方法建立<sup>[10]</sup>,用大肠杆菌表达 LLO-His 融合蛋白,获得了特异的高亲和力的单抗。

在 LLO 单克隆抗体方面早在 1991 年就有国外学者用李氏杆菌培养上清中纯化的蛋白免疫小鼠制备单抗,并且得到了三株能抑制 LLO 溶血的单抗、一株能抑制 LLO 与红细胞膜结合的单抗以及两株能抑制与其他细胞膜结合的单抗<sup>[8]</sup>。在 1998 年有国外学者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氏杆菌是否为致病菌株<sup>[12]</sup>。国内也有学者于 2007 年制备出了针对 LLO

的单克隆抗体并对抗体进行了初步鉴定工作<sup>[13]</sup>。虽然世界上已经有了多株针对 LLO 的单抗,但是由于 LLO 本身是一个大分子,具有很多抗原表位,因此不同的针对 LLO 的单克隆抗体会对其功能造成什么影响仍然值得研究,尤其是在 LLO 刺激机体或细胞产生免疫应答过程中抗体的作用如何还不清楚,此外已有的单抗没有明确亲和力,而亲和力的大小决定了抗体的生物学功能,因此其使用范围受到一定的限制。与目前现有的克隆抗体相比,本实验所得到的单克隆抗体具有高亲和力的特点,用途将更为广泛,为深入研究 LLO 的致病机理奠定了基础。

## REFERENCES

- [1] Gekara NO, Groebe L, Viegas N, *et al.* *Listeria monocytogenes* desensitizes immune cells to subsequent  $Ca^{2+}$  signaling via listeriolysin O-induced depletion of intracellular  $Ca^{2+}$  stores. *Infect Immun*, 2008, **76**(2): 857–862.
- [2] Rose F, Zeller SA, Chakraborty T, *et al.* Human endothelial cell activation and mediator release in response to *Listeria monocytogenes* virulence factors 1. *Infect Immun*, 2001, **69**: 897–905.
- [3] Zwaferink H, Stockinger S, Hazemi P, *et al.* IFN- $\beta$  increases listeriolysin O-induced membrane permeabilization and death of macrophages. *J Immunol*, 2008, **180**(6): 4116–4123.
- [4] Hamon MA, Batsche E, Re'gnault B. Histone modifications induced by a family of bacterial toxins. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, **104**(33): 13467–13472.
- [5] Birmingham CL, Canadien V, Kaniuk NA, *et al.* Listeriolysin O allows *Listeria monocytogenes* replication in macrophage vacuoles. *Nature*, 2008, **451**(7176): 350–354.
- [6] Zheng SJ, Jiang J, Shen H, *et al.* Reduced apoptosis and listeriosis in TRAIL-null mice. *J Immunol*, 2004, **173**: 5652–5658.
- [7] Liddell JE, Cryer A. A Practical Guide to Monoclonal Antibodies. John Wiley & Sons, Inc, 1991.
- [8] Klotz IM. Ligand-Receptor Energetics: A Guide for the Perplexed. New York: John Wiley & Sons, Inc, 1997.

- [9] Kohda C, Kawamura I, Baba H, *et al.* Dissociated linkage of cytokine-inducing activity and cytotoxicity to different domains of listeriolysin O from *Listeria monocytogenes*. *Infect Immun*, 2002, **70**: 1334–1341.
- [10] Zhang J, Luo XN, Zheng YD. Prokaryotic expression and bioactivity analysis of the *Listeria monocytogenes* listeriolysin O. *Chinese J Prev Vet Med*, 2007, **29**(11): 852–855.  
张杰, 骆学农, 郑亚东, 等. 李氏杆菌溶血素基因的表  
达及活性分析. 中国预防兽医学报, 2007, **29**(11):  
852–855.
- [11] Nato FK, Reich S, Lhopital S, *et al.* Production and characterization of neutralizing and nonneutralizing monoclonal antibodies against listeriolysin O. *Infect Immun*, 1991, **59**(12): 4641–4646.
- [12] 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. *Appl Environ Microbiol*, 1999, **65**(7): 2827–2832.
- [13] Dong H, Jiao XA, Yin YL, *et al.* Preparation and characterization of the monoclonal antibodies against listeriolysin O. *Chin J Cell Mol Immunol*, 2008, **24**(3): 240–246.
- [14] 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. 细胞与分子免疫学杂志, 2008, **24**(3): 240–246.

### 科学出版社科学出版中心生命科学分社新书推介

#### 中国至2050 年生物质资源科技发展路线图（中、英版）

中国科学院生物质资源领域战略研究组

中文版 978-7-03-025304-0 ¥65.00 2009年8月 出版  
英文版 978-7-03-025639-3 ¥124.00 2009年10月 出版

本书从我国国情出发,面向未来,综合考虑需求、资源、环境、科技和经济等多方面因素,在近期突出生物质能源的前提下,明晰我国生物质资源未来发展,前瞻性研编至2050年科技发展路线图。重点涵盖六个方面的内容:光合作用机理与提高作物及能源植物光能利用效率,生物质能源与能源植物,微生物资源发掘利用——一个巨大的未知资源世界,战略生物资源的发掘和可持续利用,基因组与生物质基因资源,生物质资源的特殊利用——仿生科学与技术。

本报告可作为政府部门、科研机构、大学、企业进行科技战略决策的重要参考,也可供国内外专家、学者研究和参考。



欢迎各界人士邮购科学出版社各类图书（免邮费）

邮购地址：北京东黄城根北街16号 科学出版社 科学出版中心 生命科学分社 邮编：100717

联系人：李韶文（010-64000849）周文宇（010-64031535）

更多精彩图书请登陆网站 <http://www.lifescience.com.cn>，欢迎致电索要书目