

表达绿色荧光蛋白的重组绵羊李斯特菌的构建及荧光分析*

张 祥, 苏 琳, 刘思静, 李泳榆, 蒋明娟, 黄 欢, 汪 川[△]

四川大学华西公共卫生学院 卫生检验与检疫系(成都 610041)

【摘要】 目的 构建表达绿色荧光蛋白(GFP)的重组绵羊李斯特菌,为绵羊李斯特菌的研究提供重要工具。
方法 利用 SOEing PCR 的方法将单核细胞增生性李斯特菌溶血素的启动子(*phly*)与 GFP 基因融合,连接到 pCW 质粒上,构建重组原核表达质粒 pCW-*phly*-GFP。将重组质粒电转化绵羊李斯特菌,利用荧光显微镜分析荧光表达情况。分别在含红霉素和不含红霉素的 BHI 肉汤中连续传代培养携带重组质粒的绵羊李斯特菌,通过提取质粒和观察荧光的方法研究重组质粒 pCW-*phly*-GFP 及 GFP 在绵羊李斯特菌中的稳定性。**结果** 重组质粒 pCW-*phly*-GFP 酶切验证和测序均正确。在荧光显微镜下可以见到携带重组质粒的绵羊李斯特菌发绿色荧光。在红霉素抗性压力选择下重组质粒 pCW-*phly*-GFP 能稳定存在于绵羊李斯特菌中,并高效表达 GFP。**结论** 成功构建了 GFP 基因原核表达质粒 pCW-*phly*-GFP,能在绵羊李斯特菌中高效表达 GFP,为进一步研究绵羊李斯特菌作为疫苗载体提供了重要的工具。

【关键词】 绵羊李斯特菌 绿色荧光蛋白 原核表达

Construction and Fluorescence Analysis of the Recombinant *Listeria ivanovii* Strain Expressing Green Fluorescent Protein ZHANG Xiang, SU Lin, LIU Si-jing, LI Yong-yu, JIANG Ming-juan, HUANG Huan, WANG Chuan[△]. Department of Public Health Laboratory Sciences, West China School of Public Health, Sichuan University, Chengdu 610041, China

[△] Corresponding author, E-mail: wangchuan@scu.edu.cn

【Abstract】 Objective Constructing the recombinant *Listeria ivanovii* strain expressing green fluorescent protein to provide an important tool for study of *Listeria ivanovii*. **Methods** The promoter of *Listeria monocytogenes* Listeriolysin O (*phly*) and the green fluorescent protein (GFP) gene were fused by SOEing PCR, and then ligated the fusion gene into plasmid pCW to result in recombinant plasmid pCW-*phly*-GFP. Recombinant plasmid was electroporated into *Listeria ivanovii*, and fluorescence microscope was used to analyze the expression of GFP. To observe the stability of recombinant plasmid and the stable expression of GFP in *Listeria ivanovii*, bacteria were cultured in the BHI broth with or without erythromycin for several generations. The stability of recombinant plasmid pCW-*phly*-GFP and fluorescent protein in each generation of bacteriawas studied by extracting plasmids and observing fluorescence. **Results** The exactness of recombinant plasmid pCW-*phly*-GFP was confirmed with restrictive endonuclease assay and sequence analysis. Under the fluorescence microscope, the green fluorescence was obvious in *Listeria ivanovii* carried with pCW-*phly*-GFP. The recombinant plasmid pCW-*phly*-GFP was stable in *Listeria ivanovii* and the GFP kept expressing in a high level under the pressure of erythromycin. **Conclusion** The prokaryotic expression plasmid pCW-*phly*-GFP containing GFP gene was successfully constructed. *Listeria ivanovii* carried with the plasmid efficiently expressed GFP. This research provides an important tool for further study of *Listeria ivanovii* as a vaccine carrier.

【Key words】 *Listeria ivanovii* Green fluorescent protein Prokaryotic expression

绵羊李斯特菌(LI)是一种重要致病菌,主要感染以绵羊为主的畜类,对人不致病^[1]。LI是典型的胞内寄生菌,能诱导机体产生特异性CD8⁺和

CD4⁺T细胞反应^[2],故是一种理想的疫苗载体。已有研究者以LI为载体构建了携带结核分枝杆菌抗原的重组菌,免疫小鼠后特异性细胞因子如干扰素- γ (IFN- γ)、白介素(IL)-2和肿瘤坏死因子(TNF)的分泌上调,初步证实了LI作为疫苗载体的可行性^[3]。要将LI作为疫苗载体来开发,需要全面地掌握该菌在体内的迁移途径、增殖规律、致病机制等资

* 国家自然科学基金面上项目(No. 31570924)和四川省科技厅国际合作项目(No. 2017HH0080)资助

[△] 通信作者, E-mail: wangchuan@scu.edu.cn

料,使其更加安全可控,但目前有关 LI 的研究报道还比较匮乏。绿色荧光蛋白(GFP)作为标记蛋白被广泛应用于生命科学的各个领域^[4]。本研究构建 GFP 基因原核表达质粒,电转化 LI,可为 LI 示踪研究提供一种重要的手段和工具。

1 材料与方法

1.1 质粒和菌株

质粒 pCW 含有抗氨苄西林(Amp)基因、抗红霉素(Ery)基因、*Xba* I 和 *Spe* I 酶切位点;菌株 LI Δ actAplcB-lacZ 为敲除 actA 和 plcB,携带 lacZ 筛选标记的减毒 LI;菌株 LM-GFP 为携带 GFP 基因的重组单核细胞增生性李斯特菌(LM),以上质粒和菌株均由本实验室保存。DH5 α 感受态细胞购自 TaKaRa 公司。

1.2 PCR 引物

引物对 *phly*-f/r(f:5'-CAGTGTGATGGATA TCTGCAG-3', r:5'-AAGTTCTTCTCCTTTACT CATGGGTTTCACTCTCCTTCTACA-3')用于扩增 LM 李斯特菌溶血素(LLO)的启动子(*phly*),含有与 GFP 基因重叠的序列;引物对 GFP-f/r(f:5'-ATGAGTAAAGGAGAAGAACTTTTC-3', r:5'-TTATTTGTATAGTTCATCCATGCC-3')用于扩增绿色荧光蛋白 GFP 基因;引物对 link-f/r(f:5'-CAGATACACTTAAAAAAGTTCTAGACATGT TGATGGATATCTGCAG, r:5'-CAATTCGCCC CGGGACTAGTTTATTTGTATAGTTCATCCA TGCC-3')用于将融合片段连接至载体上,含有与质粒 pCW 载体骨架重叠的序列、*Xba* I 和 *Spe* I 酶切位点。引物由北京擎科新业生物技术有限公司合成。

1.3 主要仪器与试剂

PCR 仪(BIO-RAD);ChemiDoc XRS 凝胶成像系统(BIO-RAD);倒置荧光显微镜(NIKON Ti-U);胶回收试剂盒 E. Z. N. A.™ Gel Extraction Kit (200)和质粒提取试剂盒 Plasmid Mini Kit I (200)(OMEGA bio-tek);DNA 聚合酶、高保真 DNA 聚合酶、无缝克隆试剂盒 Trelief™ SoSoo Cloning Kit(北京擎科新业生物技术有限公司);限制性核酸内切酶 *Xba* I、*Spe* I (NEB);脑心浸液培养基、脑心浸液琼脂、LB 肉汤培养基、LB 琼脂(北京陆桥技术有限责任公司)。

1.4 *phly* 及 GFP 基因的扩增与拼接

以 LM-GFP 基因组为模板,分别以 *phly*-f/r、

GFP-f/r 为引物,扩增 *phly* 和 GFP 基因(片段长度分别为 263 bp 和 720 bp)。将 *phly* 和 GFP 基因分别纯化、回收后,用 SOEing PCR 将这两个片段拼接,扩增 *phly*-GFP。

1.5 重组质粒 pCW-*phly*-GFP 的构建

以 link-f/r 为引物,扩增 *phly*-GFP,用无缝克隆试剂盒将含有与质粒 pCW 载体骨架重叠序列的 *phly*-GFP 片段连接至经 *Xba* I、*Spe* I 双酶切的 pCW 载体骨架上,然后转化大肠杆菌 DH5 α ,用含 Amp(100 μ g/mL)的 LB 琼脂平板筛选阳性克隆菌,提取质粒酶切验证并送测序鉴定。

1.6 重组质粒电转化 LI 及荧光分析

重组质粒 pCW-*phly*-GFP 电转化 LI Δ actAplcB-lacZ,将电转液涂布于含 Ery(3 μ g/mL)、X-gal 和 IPTG 的 BHI 琼脂平板,30 $^{\circ}$ C 培养 48~72 h,挑取蓝色菌落进行 PCR 鉴定,并送测序鉴定,筛选含重组质粒的细菌。倒置荧光显微镜下观察绿色荧光蛋白 GFP 基因在 LI 中的表达情况。

1.7 携带重组质粒的 LI 的体外稳定性

将构建好的携带重组质粒 pCW-*phly*-GFP 的 LI 分别在含 Ery(3 μ g/mL)和不含 Ery 的 BHI 培养基中连续培养 9 代,每代 16 h,于第 1、2、3、5、7、9 代观察荧光情况,同时取 5 mL 调整吸光度 A_{600} 至 0.7 的菌液提取质粒,用 nanodrop 核酸定量仪定量,并取 15 μ L 质粒溶液行琼脂糖凝胶电泳。

2 结果

2.1 重组质粒 pCW-*phly*-GFP 的筛选

phly 及 GFP 基因经 PCR 扩增后,电泳条带与预期(*phly* 为 263 bp,GFP 基因为 720 bp)相符(图 1A)。重组质粒阳性克隆的筛选结果见图 1B、图 1C,阳性克隆扩增出大小为 963 bp 的目的条带 *phly*-GFP(图 1B),提取的质粒经 *Xba* I、*Spe* I 双酶切后出现两个条带,与预期(963 bp 和 6 319 bp)相符(图 1C)。基因测序结果显示,测序序列与预期序列同源率达 99% 以上。

2.2 GFP 基因在 LI 中的表达

携带重组质粒 pCW-*phly*-GFP 的 LI Δ actAplcB-lacZ 的 PCR 验证结果见图 2,在 1 000 bp 处出现针对 LI 设计的特异条带和重组质粒 pCW-*phly*-GFP 上的特异条带 *phly*-GFP,基因测序结果显示,测序序列与预期序列同源率达 99% 以上,表明重组质粒 pCW-*phly*-GFP 已成功电转化 LI Δ actAplcB-lacZ。图 3 C 为携带重组质粒的

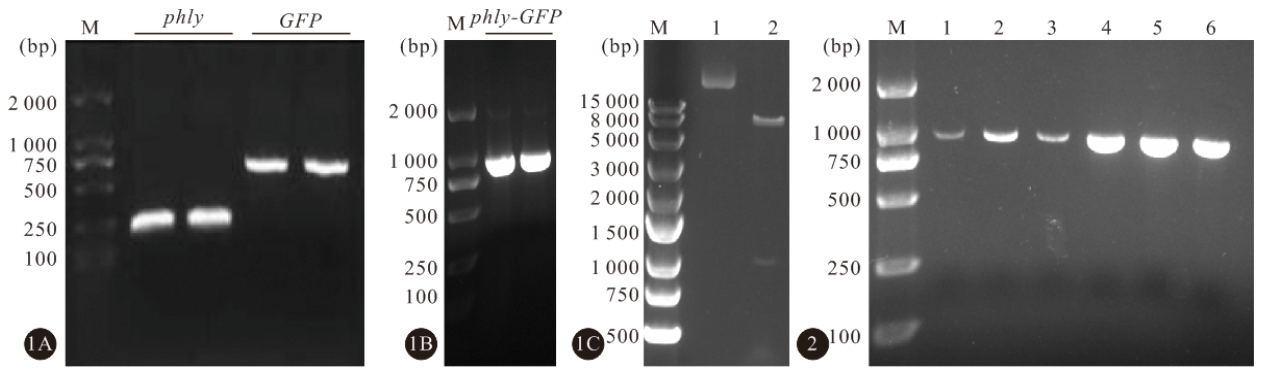


图 1 *phly*、*GFP* 基因的扩增(A)及重组质粒的扩增(B)和酶切鉴定(C) PCR 筛选结果

图 2 携带重组质粒 pCW-*phly-GFP* 的 *LIDactAplcB-lacZ* 的 PCR 筛选结果

Fig 1 PCR amplification of *phly* and *GFP* genes (A) and identification of recombinant plasmid (B: PCR amplification; C: Enzyme digestion) Fig 2 PCR selection of *LIDactAplcB-lacZ* carried with recombinant plasmid pCW-*phly-GFP*

M; Marker. Fig 1C, 1; Recombinant plasmid pCW-*phly-GFP*; 2; Digestion of pCW-*phly-GFP*. Fig 2, 1-3; PCR amplification of specific fragment of *LIDactAplcB-lacZ*; 4-6; PCR amplification of *phly-GFP*

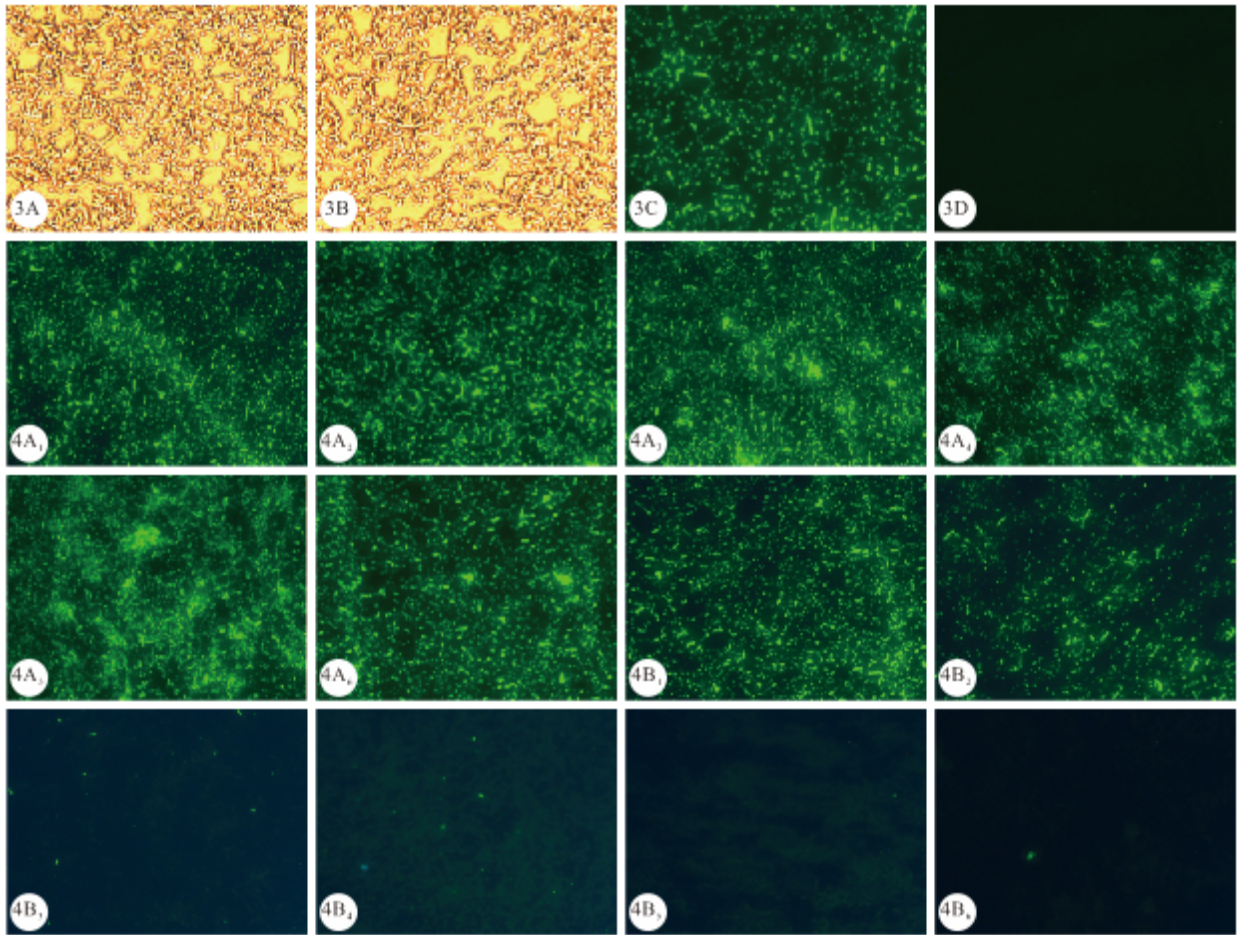


图 3 荧光显微镜下的 *LIDactAplcB-lacZ* 和携带 pCW-*phly-GFP* 的 *LIDactAplcB-lacZ*。× 200

图 4 携带 pCW-*phly-GFP* 的 *LIDactAplcB-lacZ* 连续传代后荧光显微镜下的图片。× 200

Fig 3 *LIDactAplcB-lacZ* and *LIDactAplcB-lacZ* carried with pCW-*phly-GFP* under fluorescence microscope. × 200

Fig 4 *LIDactAplcB-lacZ* carried with pCW-*phly-GFP* after serial passage under fluorescence microscope. × 200

3A: *LIDactAplcB-lacZ* carried with pCW-*phly-GFP* under microscope; 3B: *LIDactAplcB-lacZ* under microscope; 3C: *LIDactAplcB-lacZ* carried with pCW-*phly-GFP* under fluorescence microscope; 3D: *LIDactAplcB-lacZ* under fluorescence microscope; 4A₁-4A₆: The 1st, 2nd, 3rd, 5th, 7th, 9th generation of *LIDactAplcB-lacZ* carried with pCW-*phly-GFP* under Ery selection pressure, respectively; 4B₁-4B₆: The 1st, 2nd, 3rd, 5th, 7th, 9th generation of *LIDactAplcB-lacZ* carried with pCW-*phly-GFP* without Ery selection pressure, respectively

LI Δ actAplcB-lacZ 在倒置荧光显微镜下的结果,可见菌体发绿色荧光;图 3D 为 LI Δ actAplcB-lacZ 在倒置荧光显微镜下的结果,无可见荧光。以上结果表明重组质粒 pCW-phly-GFP 在绵羊李斯特菌 LI Δ actAplcB-lacZ 中成功表达绿色荧光蛋白。

2.3 重组质粒在 LI 胞内的传代稳定性

从图 4A 可见,在抗性选择压力下,携带重组质粒的 LI 体外连续培养 1、2、3、5、7、9 代均能高效表达绿色荧光蛋白;从图 4B 可见,在无抗性选择压力下,随着传代次数增加,绿色荧光蛋白的表达变弱,到第 3 代后,绿色荧光亮度明显减弱。从图 5 可见,携带 pCW-phly-GFP 的 LI Δ actAplcB-lacZ 分别在含 Ery 和不含 Ery 的 BHI 培养基中连续培养 9 代后,均能提取到质粒;从附表可见,在含红霉素和不含红霉素的 BHI 培养基中连续培养后,从 LI Δ actAplcB-lacZ 中提取的质粒用 nanodrop 核酸定量仪定量的质量浓度没有明显差异。以上结果表

附表 携带 pCW-phly-GFP 的 LI Δ actAplcB-lacZ 在含或不含红霉素的 BHI 肉汤中连续传代后提取质粒的质量浓度

Table The mass concentration of pCW-phly-GFP extracted from LI Δ actAplcB-lacZ cultured in BHI broth with or without Ery after serial passage

Group	Mass concentration of plasmid/(ng/ μ L)					
	1 st generation	2 nd generation	3 rd generation	5 th generation	7 th generation	9 th generation
Ery (+)	28.4	32.2	24.0	30.8	19.0	29.2
Ery (-)	27.6	23.0	21.5	30.6	21.4	26.4

3 讨论

LM 作为疫苗载体在国内外已得到越来越多的关注,目前,已有 5 株以 LM 为载体的疫苗候选株进入了临床试验的不同阶段^[5]。然而与 LM 同属于李斯特菌属,具有相似生物学性状的 LI 受到的关注却较少,目前,LI 的致病机理以及作为活菌疫苗载体的研究资料相对较少。为了促进 LI 作为疫苗载体的研究进一步深入发展,需要对其致病机理、在体内的生物学特征、如何传递抗原等机制进行深入研究,而利用荧光标记菌体再结合现有的体内荧光检测工具,可方便地观察细菌在体内外的分布迁移特征,帮助科学家获得有价值的研究资料。

荧光标记是活体细胞示踪研究的一种常用手段,目前,用于荧光标记的标记物有荧光素类染料、罗丹明类染料、菁染料、量子点、绿色荧光蛋白等。荧光染料操作复杂、荧光易淬灭、具有一定的细胞毒性,一定程度上限制了其应用。半导体量子点作为新型荧光标记物,具有发光效率高、发光稳定、发光颜色与粒径大小关联等优点,被广泛应用于活体细

胞示踪研究,细胞成像、蛋白质及 DNA 研究等生物学领域,但是半导体量子点也有一定的细胞毒性^[6]。GFP 作为标记蛋白具有以下优点^[7]:①易于检测,灵敏度高,不需要底物,在荧光显微镜下肉眼可见;②荧光性质稳定,对 pH 的适用范围广,荧光不易淬灭,能耐受长时间光照;③分子量小,对细胞无毒性,不影响融合蛋白的功能等。本研究将编码绿色荧光蛋白 GFP 的基因与 LLO 的启动子(phly)融合,克隆至质粒 pCW 载体上,构建 GFP 基因原核表达质粒 pCW-phly-GFP,将该重组质粒电转化 LI,成功表达了 GFP。利用该质粒作为分子探针标记 LI 可以进行细胞示踪研究,为研究 LI 与靶细胞的相互作用提供重要工具,另外,在该质粒的基础上,更换启动子或将目的蛋白质与 GFP 融合表达,可进一步研究 LI 的分子机制,为 LI 的深入研究和作为活菌疫苗载体的开发提供重要研究工具和数据。

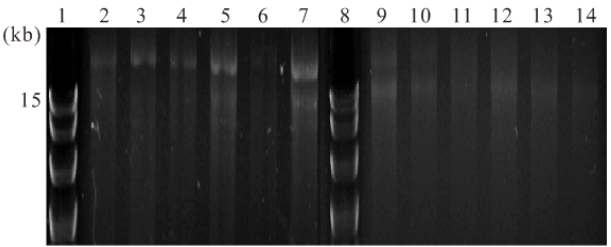


图 5 携带 pCW-phly-GFP 的 LI Δ actAplcB-lacZ 连续传代后提取质粒的电泳结果

Fig 5 Electrophoresis of plasmid extracted from LI Δ actAplcB-lacZ carried with pCW-phly-GFP after serial passage

1,8; 250 bp DNA ladder; 2-7; The 1st, 2nd, 3rd, 5th, 7th, 9th generation of LI Δ actAplcB-lacZ carried with pCW-phly-GFP under Ery selection pressure; 9-14; The 1st, 2nd, 3rd, 5th, 7th, 9th generation of LI Δ actAplcB-lacZ carried with pCW-phly-GFP without Ery selection pressure

胞示踪研究,细胞成像、蛋白质及 DNA 研究等生物学领域,但是半导体量子点也有一定的细胞毒性^[6]。GFP 作为标记蛋白具有以下优点^[7]:①易于检测,灵敏度高,不需要底物,在荧光显微镜下肉眼可见;②荧光性质稳定,对 pH 的适用范围广,荧光不易淬灭,能耐受长时间光照;③分子量小,对细胞无毒性,不影响融合蛋白的功能等。本研究将编码绿色荧光蛋白 GFP 的基因与 LLO 的启动子(phly)融合,克隆至质粒 pCW 载体上,构建 GFP 基因原核表达质粒 pCW-phly-GFP,将该重组质粒电转化 LI,成功表达了 GFP。利用该质粒作为分子探针标记 LI 可以进行细胞示踪研究,为研究 LI 与靶细胞的相互作用提供重要工具,另外,在该质粒的基础上,更换启动子或将目的蛋白质与 GFP 融合表达,可进一步研究 LI 的分子机制,为 LI 的深入研究和作为活菌疫苗载体的开发提供重要研究工具和数据。

本研究与同类型的其它重组质粒构建及表达的研究^[8-9]相比,着重考察了重组质粒在有无抗性压力存在下的遗传和表达稳定性。重组质粒不稳定性一直是基因工程中一个急需解决的问题,质粒不稳

定性主要包括结构不稳定性和分配不稳定性,我们通常关注的主要是分配不稳定性,即质粒在宿主菌的复制过程中丢失。影响质粒稳定性的因素有很多,如质粒的拷贝数、宿主的选择、培养环境等^[10]。但是关于提高质粒稳定性的研究仍比较少见。目前针对质粒不稳定的一个常用策略是增加选择性压力,如抗生素的添加。本研究分别考察了有无红霉素抗性压力存在时重组质粒 pCW-*phly-GFP* 在 LI Δ actA*plcB-lacZ* 中的稳定性,结果表明,在红霉素抗性压力选择下,连续培养 9 代, pCW-*phly-GFP* 能稳定存在于菌体中,并高效表达 GFP;当没有红霉素抗性选择压力时,虽然仍能从第 9 代细菌中提取出 质粒,且质粒量也并未显著降低,但是随着代次增加,绿色荧光蛋白的表达变弱。在无抗性压力环境下,质粒和绿色荧光蛋白均不是细菌所必须的,反而增加了细菌的负担,因此质粒的拷贝数在连续传代的过程中可能受到了影响,但是随着代次增加提取到质粒的浓度并没有降低,推测由于 LI 是革兰阳性菌,提取质粒难度较大,对结果有可能造成一定影响。另一方面,在无抗性选择压力下,红霉素基因表达下调可能同时影响了 *GFP* 基因的表达。

本研究成功构建了 *GFP* 基因原核表达质粒 pCW-*phly-GFP*,已在 LI Δ actA*plcB-lacZ* 中成功表达,后续将利用该质粒对 LI 进行进一步研究,为 LI 作为活菌疫苗载体的研究和应用提供实验依据。

参 考 文 献

- [1] 周梦莹,蒲启康,任晨艳,等. 致病性李斯特菌毒力因子蛋白组学及基因组学研究进展. 现代预防医学,2015,42(4):694-697.
- [2] ZHOU MY, JIANG MJ, REN CY, *et al.* *Listeria ivanovii* infection in mice: restricted to the liver and lung with limited replication in the spleen. *Front Microbiol*,2016,7:790[2017-09-28]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4894877/pdf/fmicb-07-00790.pdf>. doi:10.3389/fmicb.2016.00790.
- [3] LIN QQ, ZHOU MY, XU ZK, *et al.* Construction of two *Listeria ivanovii* attenuated strains expressing *Mycobacterium tuberculosis* antigens for TB vaccine purposes. *J Biotechnol*,2015,196-197:20-26[2017-09-28]. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168165615000176?via%3Dihub>. doi:10.1016/j.jbiotec.2015.01.008.
- [4] ERRAMPALLI D, LEUNG K, CASSIDY MB, *et al.* Applications of the green fluorescent protein as a molecular marker in environmental microorganisms. *J Microbiol Methods*,1999,35(3):187-199.
- [5] LE DT, DUBENSKY TW, Jr, BROCKSTEDT DG. Clinical development of *Listeria monocytogenes*-based immunotherapies. *Semi Oncol*,2012,39(3):311-322.
- [6] 李常艳,李倩,刘海涛,等. 量子点荧光标记技术的研究热点及面临的挑战. 生物化学与生物物理进展,2010,37(1):103-110.
- [7] ZHANG C, XING XH. Fluorescent proteins as a visible molecular signal for rapid quantification of bioprocesses: potential and challenges. *Chinese J Chem Eng*,2010,18(5):863-869.
- [8] 钟俐强,杨斯皓,贾钰铭,等. pGEX-4T-2-TK 原核表达质粒的构建及其表达. 重庆医学,2010,39(9):1036-1038.
- [9] 殷幼平,李强,袁训娥,等. 绿色荧光蛋白基因原核表达载体的构建及其在昆虫肠道短芽孢杆菌和苏云金芽孢杆菌中的表达. 微生物学报,2010,50(5):614-620.
- [10] 江伟华,刘益丽,江明锋. 大肠杆菌外源蛋白表达载体稳定性的研究进展. 生物技术通报,2014(5):25-31[2017-09-28]. <http://mall.cnki.net/magazine/Article/SWJT201405006.htm>. doi:10.13560/j.cnki.biotech.bull.1985.2014.05.012.

(2017-08-03 收稿,2017-10-21 修回)

编辑 吕熙