文章编号:1000-5404(2011)03-0237-04

论著

肺炎链球菌溶血素的体外表达及活性鉴定

贺 潇,袁 军,王 虹,李忱炜,姜 慧,董 杰,崔 瑾,董姗姗,周爱娥,张雪梅,胥文春,尹一兵,何於娟
(400016 重庆,重庆医科大学检验系临床检验诊断学教育部重点实验室)

【摘要】 **目的** 体外扩增肺炎链球菌(Streptococcus pneumoniae,S. pn)的溶血素(pneumolysin,ply)基因,在大肠杆菌中高效表达,并验证其生物活性。**方法** 分离培养D39型肺炎链球菌并提取其基因组DNA,采用PCR技术体外扩增ply基因,体外重组将ply序列克隆到原核表达载体pET28(a)内,测序鉴定后将重组子转化到*E. coli* Rosetta(DE3)中,经IPTG诱导大量表达融合6个组氨酸标签的Ply重组蛋白,经Ni-NTA树脂纯化后,获得的重组蛋白经SDS-PAGE鉴定后检测其溶血活性和细胞毒性。**结果** 克隆的ply序列与GenBank中的数据相符,并实现了Ply蛋白的可溶表达。所获重组蛋白纯度达到95%。溶血实验显示Ply对人红细胞具有极高的溶血活性,与对照组相比较差异有统计学意义($P<0.05$),并呈剂量依赖。细胞毒实验显示Ply对脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cell,HUVEC)细胞具有明显抑制作用,与对照组比较差异有统计学意义($P<0.05$),并呈剂量与时间依赖性,IC_{50}(24h)为1.525 μg/ml。**结论** 经测序鉴定ply基因正确扩增,并成功表达、纯化出具有高溶血活性和细胞毒性的Ply蛋白。

【关键词】 肺炎链球菌;溶血素;原核表达;生物活性
【中图法分类号】 R372;R378.12;R394.3 【文献标志码】 A

In vitro expression of pneumolysin and identification of its biological activity

He Xiao, Yuan Jun, Wang Hong, Li Chenwei, Jiang Hui, Dong Jie, Cui Jin, Dong Shanshan, Zhou Ai'e, Zhang Xuemei, Xu Wenchun, Yin Yibing, He Yujuan (Key Laboratory of Clinical Laboratory Diagnostics of Ministry of Education, Faculty of Laboratory Medicine, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016, China)

【**Abstract**】 **Objective** To detect the expression of *in vitro* amplified pneumolysin gene in *E. coli* and verify its biological activity. **Methods** DNA was isolated from cultured *S. pneumoniae* D39. Pneumolysin gene was amplified *in vitro* by PCR and cloned into pET-28(α) expression vector. Recombinant pneumolysin protein was transferred to *E. coli* Rosetta(DE3) by sequencing. Over-expression of recombinant pneumolysin gene labeled with 6 infused amino acids was induced by IPTG. Biological activity of the recombinant pneumolysin gene were detected after it was purified with Ni-NTA resin and identified with SDS-PAGE. **Results** The sequence of cloned pneumolysin gene was consistent with that in the GenBank. The pneumolysin gene was expressed a soluble manner. The purity of recombinant pneumolysin protein was 95%. Hemolysis testing showed that the hemolytic activity of pneumolysin increased in human red blood cells in a dose-dependent manner more significantly in experimental group than in control group ($P<0.05$). Cytotoxicity testing showed that pneumolysin inhibited the human umbilical vein endothelial cells in a dose-and-time-dependent more significantly in experimental group than in control group ($P<0.05$). The IC_{50}(24 h) was 1.525 μg/ml. **Conclusion** The amplified pneumolysin protein can be identified by sequencing, expressed and purified with a hemolytic activity and a cytotoxicity.

【**Key words**】 *Streptococcus pneumoniae*; pneumolysin; prokaryotic expression; biological activity

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (30872363). Corresponding author: He Yujuan, Tel: 86-23-68485216, E-mail: yjhemail@126.com

肺炎链球菌(*Streptococcus pneumoniae*,S. pn)是一种常见的兼性革兰阳性机会致病菌。它通常无症状地定植于人类鼻咽部,有时会从定植部位迁移到肺、脑和血液中。肺炎球菌的迁移会引起肺炎、中耳炎、脑膜炎和败血症等疾病[1]。肺炎链球菌溶血素(*Pneumolysin*,Ply)是S. pn分泌的一种重要的溶细胞毒素,由

【基金项目】 国家自然科学基金面上项目(30872363)
【通信作者】 何於娟,电话:(023)68485216,E-mail:yjhemail@126.com

471个氨基酸构成,相对分子质量为53×10³,含有4个结构域[2]。所有临床分离的S. pn都可产生溶血素。Ply作为一种胆碱结合蛋白,可以与宿主细胞膜上的胆固醇结合,从而插入脂质双分子层形成寡聚孔最终导致细胞溶解[3]。而ply缺陷菌株的毒力明显下降,肺部炎症反应减弱,中性粒细胞,淋巴细胞聚集也减少。有研究发现,Ply在诱导和维持宿主炎症反应过程中起重要作用,在增强病原菌侵袭力的同时,可激活机体免疫系统,活化补体经典途径[4],诱导巨噬细胞和单核细胞产生细胞因子,如IL-6、IL-1β、TNF-α等[4-5]。因此,Ply在肺炎链球菌的致病过程中发挥着重要的作用。

但是,对于Ply如何激活宿主细胞的免疫系统目前仍不甚清楚。深入研究Ply致病机制的前提是获得有活性的Ply蛋白。因此,本研究拟构建高效的pET28(a)-ply原核表达质粒,获得高纯度的包含6个组氨酸标签的Ply重组蛋白,并通过溶血试验证实蛋白活性和细胞毒实验验证其细胞毒性,为下一步研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种与质粒 NCTC7466(D39)型肺炎链球菌购自美国菌种保存中心,*E. coli* DH5α菌株,*E. coli* Rosseta(DE3)菌株,质粒pET28(a)为本实验室保存。

1.1.2 主要试剂和仪器 DNA提取试剂盒,DNA纯化试剂盒,PrimeStar高保真DNA聚合酶和限制性内切酶*Bam*HⅠ,*Xho*Ⅰ均为TaKaRa产品;质粒抽提试剂盒为Omega公司产品;T_4 DNA连接酶为Progema公司产品;IPTG、丙烯酰胺、双丙烯酰胺为Sigma产品;咪唑、NaCl和Tris碱为BBI产品;His-Bind Column(Ni-NTA)柱为Novagen公司产品;其余试剂均为国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 肺炎链球菌ply基因的扩增、克隆及序列测定 S. pn菌株D39于C+Y培养基中增菌至对数生长中后期,按试剂盒说明书提取细菌基因组DNA,扩增ply基因编码区。引物由金斯特公司合成,序列如下:上游引物:5′-GCTGGATCCCATATG-GCAAATAAAGCAGT-3′(划线部分为BamHⅠ酶切位点);下游引物:5′-CTGCTCGAGCTAGTCATTTTCTACCTTATC-3′(划线部分为*Xho*Ⅰ酶切位点)。取5 μl扩增产物于1%琼脂糖凝胶电泳鉴定后,采用DNA纯化试剂盒纯化PCR产物。

1.2.2 重组质粒的构建与鉴定 将纯化的PCR产物与pET28(a)质粒分别用*Bam*HⅠ、*Xho*Ⅰ限制性内切酶进行双酶切,酶切产物用纯化试剂盒纯化回收后采用T_4 DNA连接酶16 ℃连接过夜,连接产物转化DH5α感受态细胞,挑取单个菌落行菌落PCR,阳性克隆用试剂盒抽提质粒进行*Bam*HⅠ、*Xho*Ⅰ双酶切鉴定后送TaKaRa公司进行测序鉴定。

1.2.3 重组蛋白的表达及纯化 将鉴定正确的重组质粒转化感受态表达菌株*E. coli* Rosetta(DE3),涂布于含50 μg/ml卡那霉素抗性的LB平板,37 ℃培养12 h后挑取单个菌落接种LB培养液(含50 μg/ml卡那霉素)中,37 ℃培养过夜。次日将饱和培养物按1∶50接种至含相同卡那霉素浓度的LB培养液中,培养至$D(600)=0.4$时加IPTG(终浓度=0.2 mmol/L)20 ℃诱导培养6 h,4 ℃离心收集菌体。

菌体用Binding Buffer(300 mmol/L NaCl,20 mmol/L Tris-HCl,5 mmol/L咪唑,pH=8.0)洗涤后,按1 g湿菌10 ml Binding Buffer重悬细菌,冰上超声破菌。离心分离上清和沉淀,分别进行SDS-PAGE电泳分析表达情况。获得的超声破菌液上清转入经Binding Buffer(成分如前所述)平衡后的Ni-NTA树脂进行纯化,Washing Buffer(40 mmol/L咪唑,300 mmol/L NaCl,20 mmol/L Tris-HCl,pH=8.0)洗脱杂蛋白后用Elution Buffer(300 mmol/L咪唑,300 mmol/L NaCl,20 mmol/L Tris-HCl,pH=8.0)洗脱目的蛋白[6-7]。

目的蛋白经SDS-PAGE鉴定后用PBS溶液透析除盐,待咪唑浓度超滤至1 mmol/L以下时蛋白定量,过0.22 μm滤膜后低温无菌分装保存于-80 ℃备用。

1.2.4 溶血实验 取新鲜采集的人红细胞,用PBS洗涤3次,每次均1 000 r/min离心5 min。用PBS稀释成2%的人红细胞悬液并分装于离心管,并加入不同浓度的Ply蛋白(终浓度为1、2、5、10、20、50、100、200 ng/ml),另设加入等量PBS作为阴性对照组(即Ply终浓度为0 ng/ml)和用蒸馏水稀释的2%或1%人红细胞分别作为100%或50%溶血对照组,每组设5个平行管。置37 ℃孵育30 min后1 500 r/min离心10 min,取上清用酶标仪测定每孔光密度值[$D(450)$][8]。

1.2.5 细胞毒实验 取处于对数生长期的HUVEC制成密度为2.5×10^4/ml细胞悬液,接种于96孔板,每孔加200 μl,常规培养24 h待细胞贴壁后加入不同浓度Ply蛋白(终浓度为0.1、0.5、1、5、10 μg/ml),另设加入等量PBS的对照组(即Ply蛋白终浓度为0 μg/ml),每个实验组设5个平行孔。分别培养24、48、72、96 h后每孔加入MTT溶液(5 mg/ml)20 μl,37 ℃继续培养4 h,吸弃孔内培养上清液。每孔加入150 μl DMSO,振荡使结晶溶解后,用酶标仪测每孔光密度值[$D(492)$]并计算Ply对细胞生长的影响和抑制情况。

细胞增殖抑制率=$[1-D(492)_{处理}/D(492)_{对照}]\times100\%$

1.3 统计学分析

实验数据用$\bar{x}\pm s$表示。采用SPSS 13.0统计软件,选择单因素方差分析进行方差齐性检验,多组均数间两两比较采用Student-Newman-Keuls法。

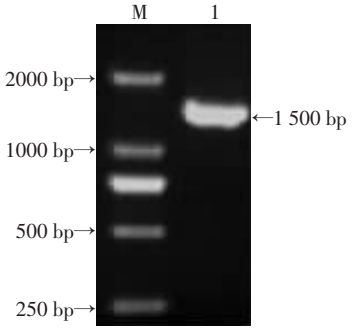
2 结果

2.1 目的基因的扩增

将PCR产物行1%琼脂糖凝胶电泳,可见清晰目的条带,结果表明该片段大小与预期值相符(图1)。

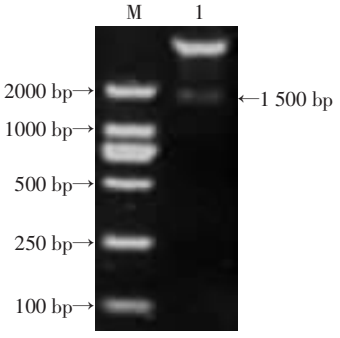
2.2 重组表达质粒的构建

纯化的扩增产物克隆于pET28a载体后得到多个阳性克隆,双酶切鉴定该克隆片段大小(图2)。测序结果与GenBank公布的序列一致,证明ply片段正确克隆入pET28a载体。



M:标准;1:PCR扩增ply基因产物

图1 PCR扩增ply基因产物的电泳结果

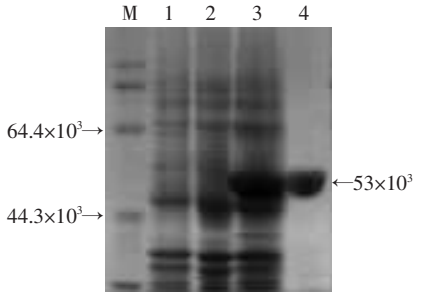


M:标准;1:重组质粒经*Eco*RⅠ和*Xho*Ⅰ双酶切鉴定

图2 重组表达质粒双酶切鉴定

2.3 重组蛋白诱导表达与纯化

由SDS-PAGE可见(图3),转化菌诱导后,较未诱导菌有一条明显增粗的蛋白条带,其相对分子质量为53×10^3左右,与期望值相符合。考马斯亮蓝R-250染色后,经过Bio-Rad扫描仪扫描,目的蛋白占全菌蛋白的40%左右,目的蛋白诱导6 h后趋于稳定表达。该目的蛋白为分泌到培养液上清的可溶性表达。超声破菌上清经Ni-NTA树脂亲和层析纯化及超滤除盐后,SDS-PAGE证明纯化产物为单一蛋白,凝胶扫描显示纯度达95%。

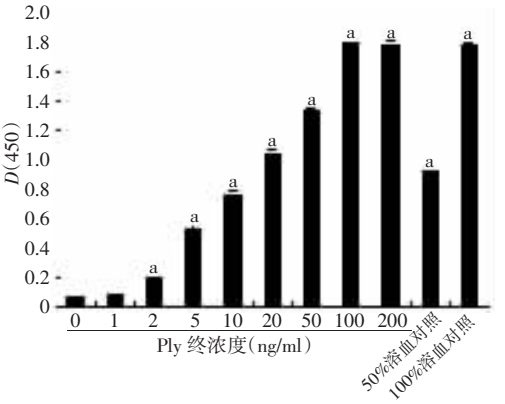


M:标准;1:空载*E. coli*菌体蛋白;2:未诱导表达菌;3:诱导后表达菌;4:纯化后目的蛋白

图3 重组蛋白Ply纯化前后的SDS-PAGE电泳结果

2.4 溶血实验

由图4所示,与对照组(Ply 0 ng/ml)相比,当Ply浓度为1 ng/ml时溶血活性与阴性对照无明显差异。而Ply浓度为2 ng/ml时则开始溶血,5 mg/ml时溶血活性显著增加,达到100 ng/ml时完全溶血,与对照组比较差异均有统计学意义($P<0.05$)。

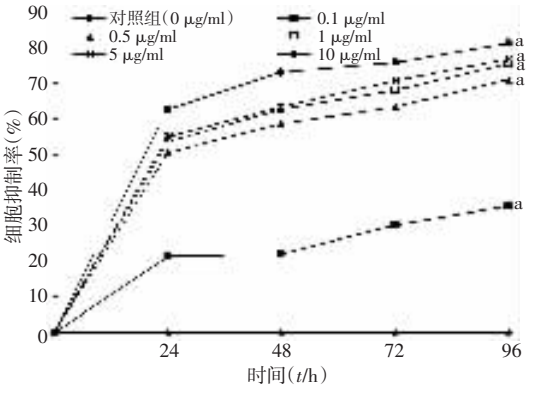


a:$P<0.05$,与对照组(Ply 0 ng/ml)比较

图4 不同浓度的Ply重组蛋白对人RBC的溶血作用的影响

2.5 细胞毒实验

由图5所示,应用不同浓度Ply重组蛋白处理HUVEC细胞不同时间后,显示Ply对HUVEC细胞具有明显抑制作用,与对照组(Ply重组蛋白0 ng/ml)比较差异有统计学意义($P<0.05$),并呈剂量与时间依赖性,IC_{50}(24 h)为1.525 μg/ml。



a:$P<0.05$,与对照组(Ply蛋白0 μg/ml)比较

图5 不同浓度的Ply重组蛋白对HUVEC细胞的生长抑制率的影响

3 讨论

肺炎链球菌是一种定植在40%健康人群鼻咽部的条件致病菌。对于老人和儿童而言,有很高的发病率和死亡率[1]。目前国内对肺炎链球菌的研究主要集中在其耐药性方面,而对于它致病的分子机制则涉及甚少。而肺炎链球菌溶血素作为肺炎链球菌最重要的毒力因子之一,在致病过程中发挥着重要作用。国外有研究表明,低浓度的Ply可以锚定在宿主初级神经元的线粒体膜,通过改变线粒体膜电势和孔的形成从而导致Ca^{2+}内流、ROS产生增加,最终引起AIF的释放,宿主初级神经元细胞凋亡;高浓度的Ply则直接溶解宿主细胞[9-10]。

在肺炎链球菌进入体内之后,溶解释放的Ply将通过何种信号通路从而激活宿主的免疫系统并激发天然免疫反应和适应性免疫反应?为此我们通过基因重组技术成功构建了Ply的原核表达体系并成功获得了

可溶性的培养液上清表达。Ply 作为天然的溶血素，可以破坏细胞的脂质双分子层从而发挥生物学作用。我们采用了溶血实验以验证其溶细胞活性。结果表明，我们表达的 Ply 重组蛋白具有极高的溶血活性，在 100 ng/ml 时就可以完全溶解红细胞。

血管内皮细胞是肺炎链球菌及其分泌的毒力蛋白入血的重要屏障之一，故本实验采用了人脐静脉内皮细胞作为切入点，应用 MTT 法初步观察了经不同浓度 Ply 重组蛋白作用后 HUVEC 增殖的变化。结果显示 Ply 重组蛋白的加入明显抑制了 HUVEC 的生长，并呈明显的时间和剂量依赖性，IC_{50}（24 h）为 1.525 μg/ml。

综上所述，Ply 在肺炎链球菌的致病过程中发挥着重要作用。因此，本研究中我们成功表达的有活性的 Ply 重组蛋白将为进一步阐明宿主对 Ply 的防御应答，及以 ply 为靶点的疫苗和抗菌药物开发提供一定的研究基础。

参考文献：

[1] Bogaert D, de-Groot R, Hermans P W. Streptococcus pneumoniae colonisation: the key to pneumococcal disease[J]. Lancet Infect Dis, 2004, 4(3): 144-154.

[2] Kanclerski K, Mollby R. Production and purification of Streptococcus pneumoniae hemolysin (pneumolysin)[J]. J Clin Microbiol, 1987, 25(2): 222-225.

[3] Rubins J B, Charboneau D, Fasching C, *et al*. Distinct roles for pneumolysin's cytotoxic and complement activities in the pathogenesis of pneumococcal pneumonia[J]. Am J Respir Crit Care Med, 1996, 153(4 Pt 1): 1339-1346.

[4] Kadioglu A, Weiser J N, Paton J C, *et al*. The role of Streptococcus pneumoniae virulence factors in host respiratory colonization and disease[J]. Nat Rev Microbiol, 2008, 6(4): 288-301.

[5] Shoma S, Tsuchiya K, Kawamura I, *et al*. Critical involvement of pneumolysin in production of interleukin-1alpha and caspase-1-dependent cytokines in infection with Streptococcus pneumoniae *in vitro*: a novel function of pneumolysin in caspase-1 activation[J]. Infect Immun, 2008, 76(4): 1547-1557.

[6] 袁军，陈曜，曹炬，等. 肺炎链球菌毒力因子 ClpP 蛋白酶的体外表达及纯化[J]. 第三军医大学学报，2008，30(18)：1753-1755.

[7] 龚艺，崔亚利，何於娟，等. 肺炎链球菌假想蛋白 SPD0414 的表达纯化及保守性分析[J]. 中国免疫学杂志，2010，26(9)：824-827.

[8] Mary E M, Kathryn S M, Clare C M, *et al*. Cholesterol as treatment for pneumococcal keratitis: cholesterol-specific inhibition of pneumolysin in the cornea[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2007, 48(6): 2661-2666.

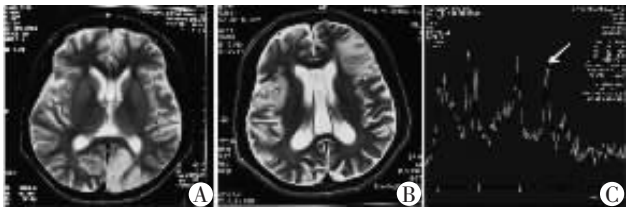
[9] Braun J S, Hoffmann O, Schickhaus M, *et al*. Pneumolysin causes neuronal cell death through mitochondrial damage[J]. Infect Immun, 2007, 75(9): 4245-4254.

[10] Beurg M, Hafidi A, Skinner L, *et al*. The mechanism of pneumolysin-induced cochlear hair cell death in the rat[J]. J Physiol, 2005, 568(Pt 1): 211-227.

（收稿 2010-09-09 修回 2010-10-30）
（编辑 张 维）

（上接 236 页）

长 T_2 异常改变（图 1B）；2009 年 10 月 MRS 发现病变部位（图 1B 中颞顶叶）N-乙酰天冬氨酸（NAA 峰）下降，出现增高的乳酸（Lac）双峰（图 1C 中箭头所示）。



A：2003 年 4 月 MRI 表现；B：2009 年 10 月 MRI 表现；C：2009 年 10 月 MRS 表现 ↑：增高的乳酸（Lac）双峰

图 1 MELAS 型线粒体脑肌病患者影像学表现

1.3 基因检测

经对患者肝素抗凝静脉血进行线粒体 DNA3243 位点和 11084 位点序列测定，发现患者线粒体 DNA3243 位点发生突变（该位点为杂合子）。故在基因水平上确诊患者为线粒体 DNA3243 位点发生突变所致的 MELAS 型线粒体脑肌病。

2 讨论

线粒体脑病中 80% 为 MELAS，多在 40 岁前起病，儿童期更多，临床表现复杂多样，可为突发卒中、偏瘫、偏盲、皮质盲、反复癫痫发作、神经性耳聋、智能低下和偏侧头痛等，极易误诊为脑炎、脑梗死、癫痫、重症肌无力、多发性硬化和周期性麻痹等。MELAS 的头颅 MRI 表现具有部位多变、不对称性和游走性等特点。病灶分布以颞顶叶、额叶及枕叶多见，表现为皮质及皮质下白质片状异常信号。典型特征为大脑半球皮质层状坏死[2]。病灶范围与脑血管供血区分布不一致，随着病情好转，病灶可自行消失，此与受损局部脑组织的 ATP 减少有关，而非血管缺血所致。脑功能磁共振检查可发现病变区域 N-乙酰天冬氨酸降低，出现增高的乳酸双峰，可以作为一种早期发现本病的有效手段[3]。但确诊需肌肉活检见到破碎红纤维或基因检测发现 mt DNA A3243G 突变。本病例反复出现癫痫、卒中样发作、耳聋等 MELAS 的典型症状，且多次影像学检查发现颅内具有游走性及不对称性病灶，有母系家族史。临床表现和 MRI、MRS 均符合典型 MELAS 表现，然而病程长达 10 年却一直被误诊为症状性癫痫、脑炎后遗症，主要是对本病缺乏认识。目前对该病尚无根治方法，但若早期诊断，予大剂量的 B 族维生素、辅酶 Q10、ATP、CoA 等治疗，病情可以得到一定程度的控制，对改善预后，延长生存期能起到重要作用。故临床上遇到患者出现反复癫痫、卒中发作、耳聋、视力障碍等不同寻常的症状时，应当考虑存在 MELAS 的可能性，可选择血乳酸、神经影像（MRI、MRS）及基因测定。

参考文献：

[1] 白亚辉，任传成. 线粒体 DNA 突变与线粒体脑肌病[J]. 临床神经病学杂志，2008，21(6)：471-472.

[2] 李国雄，阳昱恒，王凤鸣. MELAS 型线粒体脑肌病的 MRI 诊断[J]. 中国临床神经外科杂志，2009，14(3)：144-147.

[3] 冯逢，有慧，高晶，等. 质子磁共振波谱对 MELAS 诊断的初步评价[J]. 中国医学影像技术，2006，22(6)：822-825.

（收稿 2010-08-24 修回 2010-09-17）
（编辑 吴培红）