

重组创伤弧菌溶细胞素缬氨酸V201和V289突变 对其活性的影响

郭雅君 叶美萍 王 帅 楼永良*

(温州医学院浙江省医学遗传学重点实验室, 温州 325035)

摘要 将重组创伤弧菌溶细胞素A(recombinant *Vibrio vulnificus* hemolysin, rVvhA)第201位和第289位的缬氨酸定点突变为甘氨酸, 并表达rVvhA^{val201gly, val289gly}突变蛋白。检测突变蛋白与未突变蛋白的溶血活性、对胞内钙离子浓度、钾离子外流及对细胞损伤的影响。结果显示, 与rVvhA相比, rVvhA^{val201gly, val289gly}的溶血活性和细胞毒性均降低, 诱导人类脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cells, HUVEC)凋亡、胞内钙离子内流和钾离子外流等作用均受到抑制。实验结果表明, 在创伤弧菌溶细胞素的活性发挥中, rVvhA中的V201和V289两个氨基酸与该蛋白质损伤靶细胞时引起胞内外离子平衡失调有关, 并能影响该蛋白质的溶血活性和细胞毒作用。

关键词 创伤弧菌; 溶细胞素; 缬氨酸; 突变

创伤弧菌(*Vibrio vulnificus*, Vv)是一种革兰氏阴性嗜盐性弧菌^[1]。该菌广泛存在于沿海环境中, 并且已从海水、海底沉淀物、虾类、鱼类、蚌类及蛤类等海产品中分离得到, 主要经口感染和伤口接触感染, 能在短时间内引起伤口发炎, 严重时会导致败血症, 死亡率高达50%以上。特殊人群如肝病(包括肝硬化、肝炎等)患者在感染该菌后的发病率高达95.3%, 较其他人群要高^[2]。

VvhA属于膜胆固醇依赖毒素(membrane cholesterol-dependent cytolysins, CDCs), 是创伤弧菌唯一分泌至胞外的具有种特异性的外毒素^[3], 也是其主要致病因子之一。膜胆固醇对VvhA作用于靶细胞时的生物学活性有重要的作用^[4], 胆固醇可能是创伤弧菌溶细胞素作用于细胞时与细胞膜表面相互作用的重要受体^[5]。但是, rVvhA如何通过寡聚化结合细胞膜、插入细胞膜后与细胞膜如何相互作用以及如何激活胞内信号分子引发细胞的应激和凋亡等有关机制尚未明了。

Palmer^[6]发现, CDC家族中存在与膜胆固醇发生结合作用的共同基序, 即L/V-X(1-5)-Y-X(1-5)-R/K。目前研究发现, 产气荚膜梭菌溶素O(perfringolysin O, PFO)、肺炎链球菌溶血素(pneumolysin, PLO)、艾滋病病毒跨膜糖蛋白gp-41、神经轴突膜蛋白-22(neuronal axonal membrane protein-22, NAP-22)等都是CDC家族成员^[6-9]。基于CDC家族都具有上述

共同基序, Soltani等^[10]和Farrand等^[11]认为其第一个非极性氨基酸L/V的改变能够影响溶细胞毒素识别膜胆固醇的能力。因此, 本实验将rVvhA胆固醇结合模序的第201位和第289位非极性氨基酸——缬氨酸进行了定点突变, 表达rVvhA^{val201gly, val289gly}, 并比较突变前后的蛋白质溶血活性差异, 以及它们对HUVEC细胞毒性、胞内钙离子浓度、培养液上清钾离子释放量及致凋亡等的影响, 探讨了胆固醇结合模序中缬氨酸在rVvhA损伤靶细胞中的作用机理, 为进一步研究胆固醇结合模序的功能提供了实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种和细胞株 菌株*E.coli* BL21(DE3)(含pET-28a(+)-vvhA质粒)和HUVEC细胞由本实验室保存。

1.1.2 主要试剂及耗材 异丙基硫代β-D-半乳糖苷(IPTG)、蛋白质低分子量Marker、Trixton X-100、质粒提取试剂盒、PCR反应体系均购自宝生物工程(大连)有限公司; Ni²⁺-NTA His Band亲和层析柱购

收稿日期: 2011-10-24 接受日期: 2012-04-10

浙江省自然科学基金(No. Y2090468)资助项目

*通讯作者。Tel: 0577-86699200, E-mail: lyl10282004@yahoo.com.cn

自上海申能博彩生物科技有限公司; 还原型谷胱甘肽(GSH)、氧化型谷胱甘肽(GSSH)、精氨酸均为美国波士顿生物技术公司产品; 绵羊RBC购自温州市晟恒科贸有限公司; RPMI-1640培养基购自Hyclone公司; 胎牛血清购自杭州四季青生物工程材料有限公司; CCK-8试剂盒、青链霉素、胰酶细胞消化液、FLUO-3 AM钙离子检测荧光探针购自碧云天生物技术有限公司; 钾离子检测试剂盒购自南京建成生物工程研究所; Annexin V-FITC细胞凋亡检测试剂盒购自南京凯基生物技术有限公司; 激光共聚焦专用小皿(35 mm玻底皿)购自杭州生友生物技术有限公司。

1.2 方法

1.2.1 重组表达载体pET-28a(+)-*vvhA*^{val201gly, val289gly}的构建 以pET-28a(+)-*vvhA*为模板, PCR扩增获得VvhA。利用DNAMAN生物学软件设计突变引物如下: 正向突变引物R₄₁: 5'-TAC TCG AAA ACC TTG GGG TTT GAT AC-3', 反向突变引物R₄₂: 5'-TGT ATC AAA CCC CAA GGT TTC GAG T-3', 正向突变引物R₅₁: 5'-TTC GAG ATG GGC GGT AAA CTC AAC TA-3', 反向突变引物R₅₂: 5'-ATA GTT GAG TTT ACC GCC CAT CTC GA -3'; 上游引物P₁: 5'-CCC CAT GGT AAT GAA AAA AAT GAC TCT GT-3', 下游引物P₂: 5'-TTC TCG AGG AGT TTG ACT TGT TGT AAT GT-3', P₁、P₂ 5'端分别引入Nco I和Xho I限制性酶切位点及保护性碱基, 对VvhA进行定点突变得到VvhA^{val201gly, val289gly}。将目的基因插入质粒pET-28a中并进行表达。引物由上海生工生物工程有限公司合成。PCR反应条件为: 94 °C预变性5 min; 94 °C变性30 s, 58 °C退火45 s, 72 °C延伸1 min, 30个循环; 72 °C延伸10 min。

1.2.2 rVvhA的表达、纯化及复性 前期工作中已成功构建了pET-28a(+)-*vvhA*, 参照文献[13]进行rVvhA的表达、纯化及复性。

1.2.3 rVvhA^{val201gly, val289gly}的表达、纯化及复性 将pET-28a(+)-*vvhA*^{val201gly, val289gly}导入大肠杆菌*E. coli* BL21-(DE3)中, 并于30 °C以0.5 mmol/L IPTG诱导菌株表达rVvhA^{val201gly, val289gly}, Ni²⁺-NTA亲和层析法纯化、SDS-PAGE分析表达产物、复性并分步透析, 目的蛋白冷冻干燥后于-80 °C保存。

1.2.4 HUVEC细胞的培养及传代 HUVEC细胞培养于含10%胎牛血清的RPMI-1640培养液中, 置于37 °C、5% CO₂、饱和湿度的培养箱中培养。当细

胞生长密度约为80%时, 用0.25%胰酶消化传代, 每2~3天更换一次培养液。

1.2.5 溶血活性的测定 取绵羊全血1 mL, 用10倍体积生理盐水洗涤3次, 1 000 r/min离心10 min, 制备压积红细胞。取压积红细胞200 μL, 用生理盐水稀释为2%红细胞悬液。rVvhA和rVvhA^{val201gly, val289gly}均设置0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 μg作用组。每个实验组中都加入200 μL 2%红细胞悬液, 再分别加入0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 μg的两组蛋白, 置于37 °C水浴, 每隔10 min离心取红细胞上清液, 测542 nm处的吸光度D值。

1.2.6 细胞生长抑制实验 rVvhA和rVvhA^{val201gly, val289gly}均分为0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 μg作用组。HUVEC细胞以1×10⁴/mL接种于96孔板, 100 μL/孔, 待细胞完全贴壁后, 弃去孔内液体, 改加RPMI-1640, 分别加入0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 μg的两组蛋白作用6 h, CCK-8法检测细胞的存活率, 测定450 nm处各孔的吸光度D值, 以[(D_{作用组}-D_{空白组})/(D_{正常组}-D_{空白组})]×100%表示细胞的相对活力。

1.2.7 培养液上清中钾离子浓度的测定 rVvhA和rVvhA^{val201gly, val289gly}均分为0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 μg作用组。HUVEC细胞以1×10⁶/mL接种于12孔板中, 400 μL/孔, 过夜培养。待细胞完全贴壁后, 弃去孔内液体, 改加RPMI-1640, 加入0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 μg的两组蛋白作用6 h。收集培养液上清, 按照试剂盒操作说明测定钾离子浓度。

1.2.8 胞内钙离子浓度的测定 rVvhA和rVvhA^{val201gly, val289gly}均分为0.2, 0.4, 0.6 μg作用组。HUVEC细胞以1×10⁶/mL密度接种于LSCM小皿中, 过夜培养。各实验组细胞均加5 μmol/L Fluo-3 AM钙离子荧光探针, 37 °C避光孵育40 min, 装载探针。Hanks液洗涤3次, 继续孵育20 min。激光扫描共聚焦显微镜下进行连续扫描, 激发波长488 nm, 发射波长527 nm, 扫描时间4 s, 间隔时间4 s, 共扫描6 min。以未加蛋白质处理时的细胞为正常对照, 于扫描间隔期迅速加入0.2, 0.4, 0.6 μg的未突变蛋白和突变蛋白分别作用于细胞, 检测荧光信号, 分析胞内瞬间钙离子浓度的变化情况。

1.2.9 细胞凋亡检测 rVvhA和rVvhA^{val201gly, val289gly}均分为0.6, 0.8, 1.0 μg作用组。HUVEC细胞以1×10⁶/mL接种于6孔板, 1 mL/孔, 过夜培养。待细胞完全贴壁后, 弃去孔内液体, 改加RPMI-1640, 并分别加入0.6,

0.8, 1.0 μg 的未突变蛋白和突变蛋白, 作用6 h。分别收集不同处理组细胞, 按Annexin V-FITC细胞凋亡检测试剂盒操作说明进行染色, 流式细胞仪检测各组细胞凋亡率。

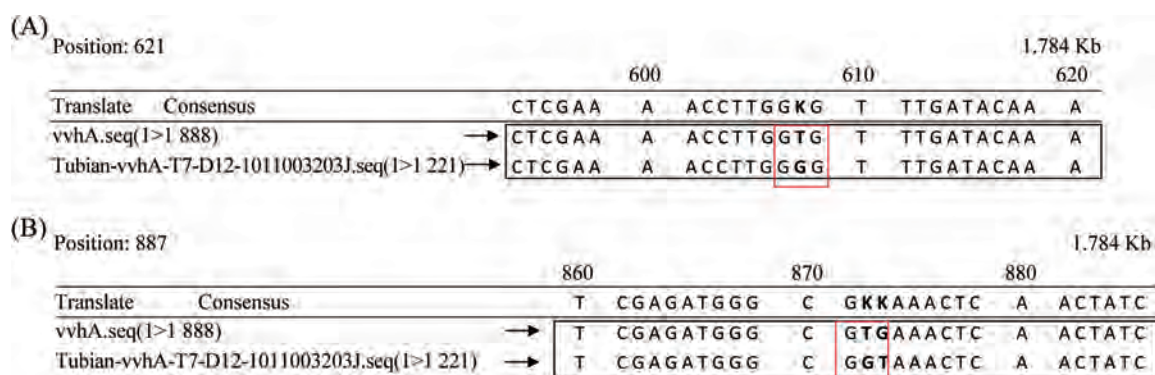
1.2.10 统计学处理 以上实验均重复3次以上, 采用SSPS16.0软件进行统计学分析。所有变量均用 $\bar{x}\pm s$ 表示, 各实验组与对照组间比较采用配对 t 检验, 组间比较采用单因素方差分析。 $P<0.05$ 为差异具有

统计学意义。

2 结果

2.1 pET-28a(+)-*vvhA*^{val201gly, val289gly}的构建

将突变PCR扩增产物连入原核表达载体pET-28a(+), 得到重组表达载体pET-28a(+)-*vvhA*^{val201gly, val289gly}。测序结果证明, rVvhA^{val201gly}和rVvhA^{val289gly}的突变位点与预期设计的突变相符(图1)。



A: rVvhA第201位缬氨酸突变测序比对图; B: rVvhA第289位缬氨酸突变测序比对图。

A: sequence alignment graph of rVvhA residue Val201 mutation; B: sequence alignment graph of rVvhA residue Val289 mutation.

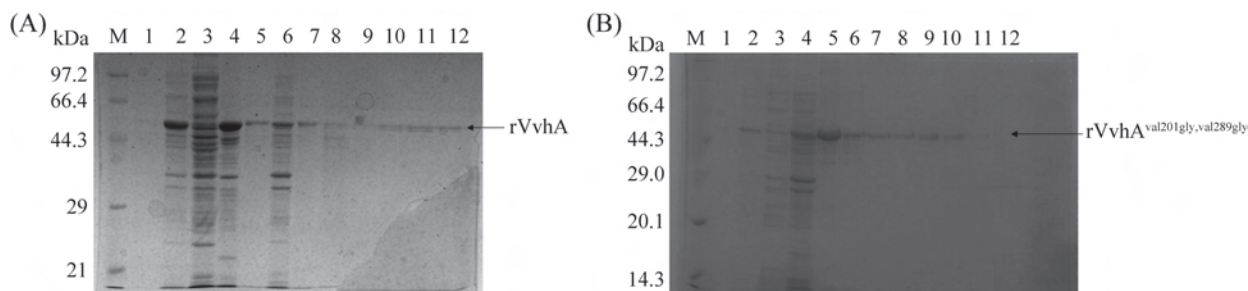
图1 rVvhA第201位和第289位缬氨酸突变测序比对图

Fig.1 Sequence alignment graph of rVvhA residue Val201 and Val289 mutations

2.2 rVvhA与rVvhA^{val201gly, val289gly}的表达、纯化和复性

参照文献[13]表达的rVvhA分子量为53.04 kDa, 经IPTG诱导表达的rVvhA^{val201gly, val289gly}分子量为52.96 kDa。

重组蛋白表达后均以包涵体形式存在, 经洗涤、 Ni^{2+} -NTA亲和层析得到纯化的rVvhA(图2A)和rVvhA^{val201gly, val289gly}(图2B), 参照文献[14]对纯化后的蛋白进行复性、透析后, 冷冻干燥后保存于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。



A: SDS-PAGE分析融合蛋白rVvhA的表达、纯化; B: SDS-PAGE分析融合蛋白rVvhA^{val201gly, val289gly}的表达、纯化。M: 蛋白质分子量标记; 1: 未诱导的全菌; 2: IPTG诱导后的全菌; 3,4: 超声破菌的上清液和沉淀; 5: 洗涤后的rVvhA、rVvhA^{val201gly, val289gly}包涵体; 6: 穿透液; 7-12: 0, 20, 40, 60, 100, 200 mmol/L咪唑洗脱液。

A: analysis of expression and purification of rVvhA by SDS-PAGE; B: analysis of expression and purification of rVvhA^{val201gly, val289gly} by SDS-PAGE. M: protein marker; 1: bacteria not induced by IPTG; 2: bacteria induced by IPTG; 3,4: supernatant and sediment of the total bacteria ultrasounded; 5: washed inclusion body of rVvhA and rVvhA^{val201gly, val289gly}, respectively; 6: total bacteria protein after penetrated through the column; 7-12: total bacteria protein eluted with 0, 20, 40, 60, 100, 200 mmol/L imidazole.

图2 SDS-PAGE分析融合蛋白rVvhA和rVvhA^{val201gly, val289gly}的表达和纯化

Fig.2 Analysis of expression and purification of rVvhA and rVvhA^{val201gly, val289gly} by SDS-PAGE

2.3 溶血活性检测

不同剂量蛋白分别作用10 min(图3A), 20 min(图3B), 30 min(图3C)后, rVvhA对红细胞的溶血能力随毒素剂量、作用时间的增加而增加; 而rVvhA^{val201gly, val289gly}随毒素剂量及时间的增加, 溶血能力无显著变化。相同作用剂量下, rVvhA^{val201gly, val289gly}组较rVvhA组的溶血活性下降。

2.4 对细胞的毒性作用

rVvhA组的细胞毒性与毒素剂量呈正相关, 而rVvhA^{val201gly, val289gly}不同剂量组细胞毒性无差别。相

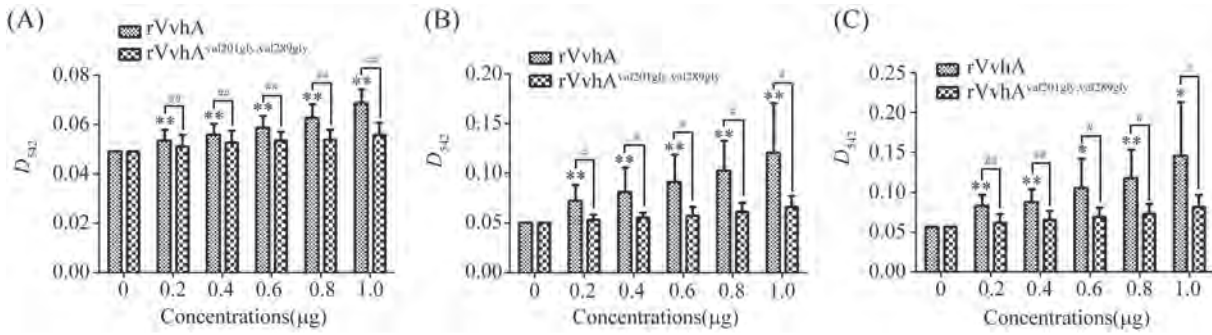
同作用剂量下, rVvhA^{val201gly, val289gly}组较rVvhA组细胞毒性明显降低(图4)。

2.5 胞内钾离子外流情况

与对照组相比, rVvhA组胞外钾离子浓度随毒素剂量的增加而增加, rVvhA^{val201gly, val289gly}各组也可引起胞外钾离子浓度的升高, 但与rVvhA组比较, 钾离子外流显著降低(图5)。

2.6 钙离子的内流

经不同剂量rVvhA作用后, 细胞荧光强度增强, 提示胞内钙离子浓度升高。A1-A3、B1-B3分别代表

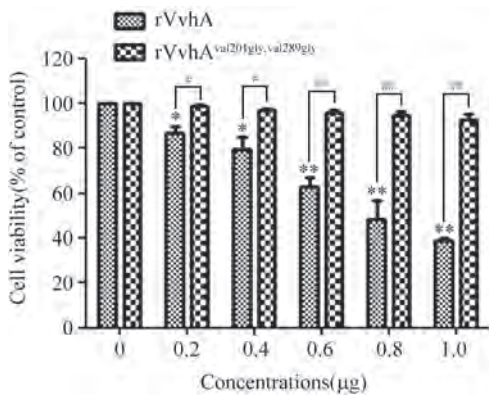


A: rVvhA和rVvhA^{val201gly, val289gly}分别作用10 min的溶血效应; B: rVvhA和rVvhA^{val201gly, val289gly}分别作用20 min的溶血效应; C: rVvhA和rVvhA^{val201gly, val289gly}分别作用30 min的溶血效应。**P*<0.05, ***P*<0.01, 与对照组比较; #*P*<0.05, ##*P*<0.01, 与相同浓度rVvhA作用组比较。

A: hemolytic effects of rVvhA and rVvhA^{val201gly, val289gly} on sRBC after 10 min; B: hemolytic effects of rVvhA and rVvhA^{val201gly, val289gly} on sRBC after 20 min; C: hemolytic effects of rVvhA and rVvhA^{val201gly, val289gly} on sRBC after 30 min. **P*<0.05, ***P*<0.01 compared with control; #*P*<0.05, ##*P*<0.01 compared with rVvhA of the same concentration.

图3 rVvhA和rVvhA^{val201gly, val289gly}分别作用10, 20, 30 min的溶血效应

Fig.3 Hemolytic effects of rVvhA and rVvhA^{val201gly, val289gly} on sRBC after 10, 20, 30 min, respectively

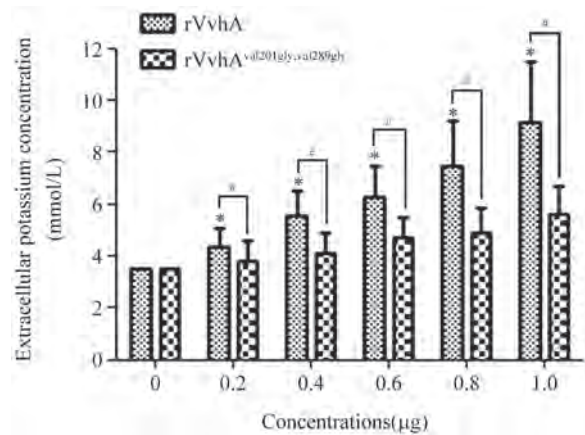


P*<0.05, *P*<0.01, 与对照组比较; #*P*<0.05, ##*P*<0.01, 与相同浓度rVvhA作用组比较。

P*<0.05, *P*<0.01 compared with control; #*P*<0.05, ##*P*<0.01 compared with rVvhA of the same concentration.

图4 rVvhA和rVvhA^{val201gly, val289gly}的细胞毒效应

Fig.4 Cell cytotoxicity effects of rVvhA and rVvhA^{val201gly, val289gly}



**P*<0.05, 与对照组比较; #*P*<0.05, 与相同浓度rVvhA作用组比较。

**P*<0.05 compared with control; #*P*<0.05 compared with rVvhA of the same concentration.

图5 rVvhA和rVvhA^{val201gly, val289gly}引起的钾离子外流变化

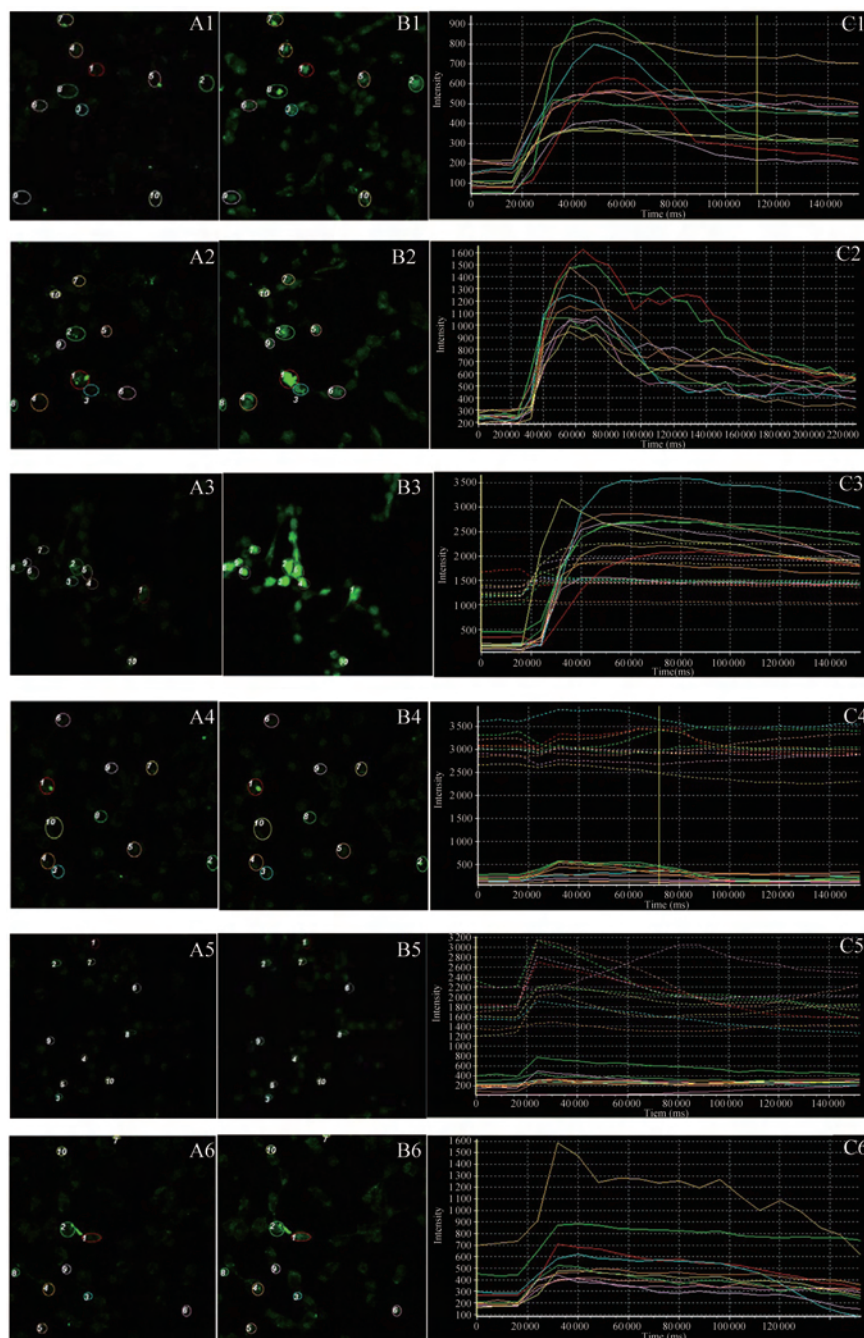
Fig.5 Effects of rVvhA and rVvhA^{val201gly, val289gly} induced release of potassium ion

rVvhA作用前后细胞内钙离子的荧光变化情况, C1-C3显示了任意选取的10个细胞内钙离子荧光强度变化曲线。经不同剂量的rVvhA^{val201gly, val289gly}作用后, 胞内钙离子内流的趋势较rVvhA作用组平缓, A4-A6、B4-B6分别代表rVvhA^{val201gly, val289gly}作用前后

细胞内钙离子荧光变化情况, C4-C6显示了任意选取的10个细胞的钙离子荧光强度变化曲线(图6)。

2.7 细胞凋亡检测结果

与rVvhA组相比, rVvhA^{val201gly, val289gly}诱导细胞凋亡的能力显著下降, 如表1和图7所示。



A1-A6: 未加蛋白对照组; B1-B3: 0.2, 0.4, 0.6 μg rVvhA作用组; B4-B6: 0.2, 0.4, 0.6 μg rVvhA^{val201gly, val289gly}作用组; C1-C6: 细胞内钙离子荧光强度变化曲线。

A1-A6: control; B1-B3: 0.2, 0.4, 0.6 μg rVvhA treated group, respectively; B4-B6: 0.2, 0.4, 0.6 μg rVvhA^{val201gly, val289gly} treated group, respectively; C1-C6: the changes of fluorescence intensity in HUVEC.

图6 rVvhA和rVvhA^{val201gly, val289gly}引起HUVEC细胞内钙离子增加(400 \times)

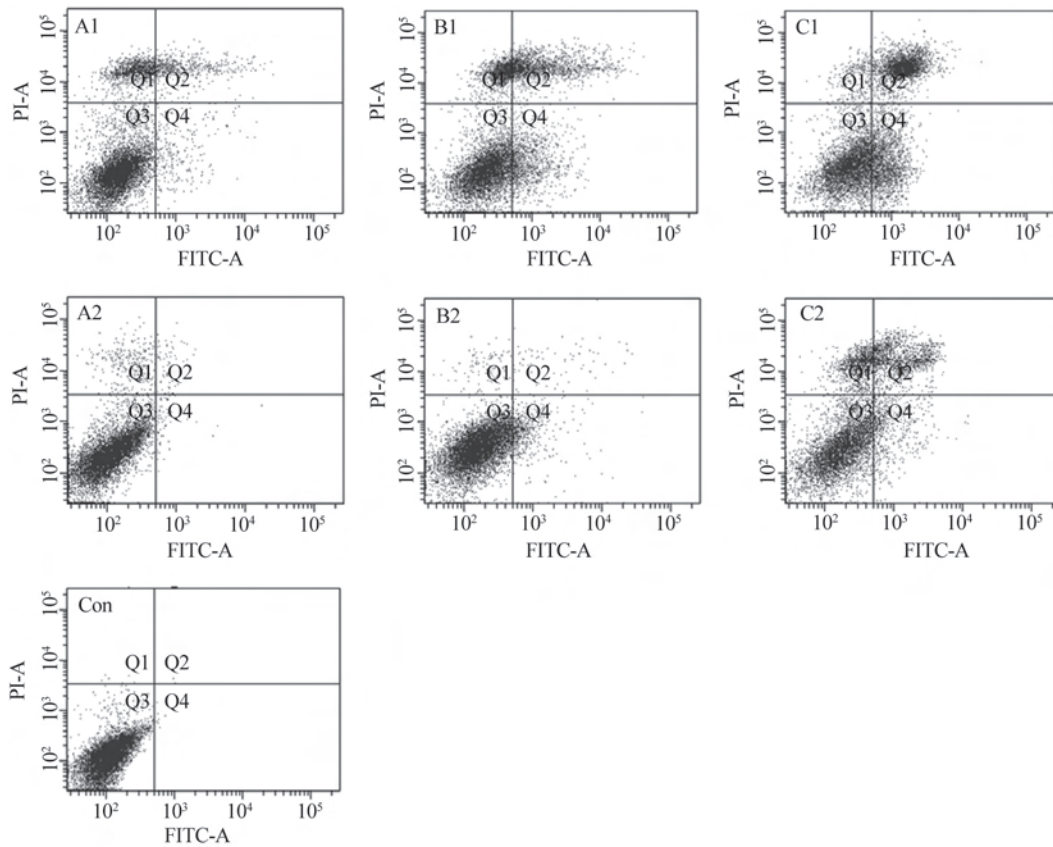
Fig.6 Effects of rVvhA and rVvhA^{val201gly, val289gly} on increase of $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in HUVEC(400 \times)

表1 rVvhA和rVvhA^{val201gly, val289gly}的致凋亡效应(n=3)Table 1 Cell apoptosis effects of rVvhA and rVvhA^{val201gly, val289gly}(n=3)

细胞比例(%)	对照组	rVvhA(μg)			rVvhA ^{val201gly, val289gly} (μg)		
Cell proportion(%)	Control	0.6	0.8	1.0	0.6	0.8	1.0
Apoptosis cells	0.24 \pm 0.12	3.00 \pm 0.35**	11.47 \pm 1.22**	21.27 \pm 2.48**	1.70 \pm 0.16 [#]	4.90 \pm 1.12 [#]	8.40 \pm 0.72 ^{##}
Dead cells	0.17 \pm 0.21	5.20 \pm 0.30	18.17 \pm 0.29	28.93 \pm 0.68	1.02 \pm 0.15	0.92 \pm 0.50	14.02 \pm 7.57
Live cells	99.57 \pm 0.25	81.00 \pm 0.44	58.20 \pm 1.04	53.17 \pm 7.01	95.26 \pm 0.90	92.10 \pm 3.55	65.32 \pm 8.99

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, 与对照组比较; [#] $P < 0.05$, ^{##} $P < 0.01$, 与rVvhA作用组比较。

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ compared with control; [#] $P < 0.05$, ^{##} $P < 0.01$ compared with rVvhA group.



A1-C1: 0.6, 0.8, 1.0 μg rVvhA分别作用6 h; A2-C2: 0.6, 0.8, 1.0 μg rVvhA^{val201gly, val289gly}分别作用6 h; Con: 对照组。

A1-C1: cells treated with 0.6, 0.8, 1.0 μg rVvhA for 6 h, respectively; A2-C2: cells treated with 0.6, 0.8, 1.0 μg rVvhA^{val201gly, val289gly} for 6 h, respectively;

Con: control.

图7 rVvhA和rVvhA^{val201gly, val289gly}致细胞凋亡的效应Fig.7 Cell apoptosis effects of rVvhA and rVvhA^{val201gly, val289gly}

3 讨论

创伤弧菌溶细胞素是创伤弧菌唯一分泌至体外的具有膜成孔作用的外毒素,其毒性强,是创伤弧菌的重要致病因子之一。原核表达的rVvhA具有溶血活性、致炎应激、诱导细胞凋亡等作用^[13,15-16]。现已证实rVvhA属于CDC家族,其活性的发挥需要细胞膜上胆固醇的参与^[4],但其机制至今仍未十分明确。

细胞膜上的胆固醇不仅直接影响膜的流动性、侧向扩散和通透性,还能调节膜蛋白的结构和功能^[17],同时又是构成脂质双分子层的重要组分,可影响其动力学和功能改变。和胆固醇相互作用的毒素主要有以下三种特征:(1)富含3个色氨酸和1个半胱氨酸残基的区域,如链球菌溶血素O(SLO)小肽段等;(2)与胆固醇作用相关的基序,其共同结构是L/V-X(1-5)-Y-X(1-5)-R/K,如PLO等;(3)胆固醇依赖性:

胆固醇对毒素活性的调节可能与其自身结构变化或者改变脂质膜的某些物理特性有关, 如细胞膜胆固醇的减少不影响中间型链球菌溶素(ILY)与宿主细胞的结合, 但是毒素的活性被抑制^[6]。

Yu等^[5]研究发现, 创伤弧菌溶细胞素通过结合膜胆固醇继而插入脂质双分子层, 导致跨膜孔形成。非极性氨基酸在毒素多聚体的形成过程中发挥着关键作用, 并且它们的改变将直接导致其毒性的降低^[10-11,18]。我们在前期研究中已发现, 细胞膜表面胆固醇是VvhA发挥细胞毒作用的重要条件之一^[4], 但尚未直接证明上述模序参与结合膜胆固醇。本实验通过突变其中两条模序中的缬氨酸, 来探讨模序中非极性氨基酸在rVvhA毒性发挥过程中的作用。

实验结果表明, rVvhA^{val201gly, val289gly}的溶血活性、细胞毒作用, 引起的钾离子外流、钙离子内流以及致细胞凋亡的能力较rVvhA显著降低。因此, 我们推测rVvhA胆固醇结合模序中非极性氨基酸的突变可能会影响该蛋白多聚体形成的能力, 导致溶细胞素与细胞膜表面的相互作用过程受损, 最终影响溶细胞素对靶细胞的毒性。此外, 通过实验结果我们还推测, 与胆固醇结合是rVvhA进一步发挥毒性的必要条件^[5,19-20], 最终导致胞内外信号的活化, 引起胞内外钙/钾离子平衡失调、细胞凋亡等一系列下游事件的发生, 其具体机制还有待进一步研究。

参考文献 (References)

- 1 Hollis DG, Weaver RE, Baker CN, Thornsberry C. Halophilic *Vibrio* species isolated from blood cultures. *J Clin Microbiol* 1976; 3(4): 425-31.
- 2 Jones MK, Oliver JD. *Vibrio vulnificus*: Disease and pathogenesis. *Infect Immun* 2009; 77(5): 1723-33.
- 3 Lee SE, Ryu PY, Kim SY, Kim YR, Koh JT, Kim OJ, *et al.* Production of *Vibrio Vulnificus hemolysin in vivo* and its pathogenic significance. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 324(1): 86-91.
- 4 丁 卉, 潘婵妮, 郭 秋, 楼永良, 严 杰, 伍 越, 等. 膜胆固醇对重组创伤弧菌溶细胞素活性的影响. *中国细胞生物学学报*(Ding Hui, Pan Lini, Guo Qiu, Lou Yongliang, Yan Jie, Wu Yue, *et al.* Membrane cholesterol influences the activity of recombinant *Vibrio vulnificus* hemolysin. *Chinese Journal of Cell Biology*) 2010; 32(5): 699-701.
- 5 Yu HN, Lee YR, Park KH, Rah SY, Noh EM, Song EK, *et al.* Membrane cholesterol is required for activity of *Vibrio vulnificus* cytolysin. *Arch Microbiol* 2007; 187(6): 467-73.
- 6 Palmer M. Cholesterol and the activity of bacterial toxins. *FEMS Microbiol Lett* 2004; 238(2): 281-9.
- 7 Rossjohn J, Polekhina G, Feil SC, Morton CJ, Tweten RK, Parker MW. Structure of perfringolysin O suggest a pathway for

- activation of cholesterol-dependent cytolysins. *J Mol Biol* 2007; 367(5): 1227-36.
- 8 Greenwood AI, Pan J, Mills TT, Nagle JF, Epand RM, Tristram-Nagle S. CRAC motif peptide of the HIV-1 gp41 protein thins SOPC membranes and interacts with cholesterol. *Biochim Biophys Acta* 2008; 1778(4): 1120-30.
- 9 Epand RM, Rychnovsky SD, Belani JD, Epand RF. Role of chirality in peptide-induced formation of cholesterol-rich domains. *Biochem J* 2005; 390(Pt 2): 541-8.
- 10 Soltani CE, Hotze EM, Johnson AE, Tweten RK. Structure elements of the cholesterol-dependent cytolysins that are responsible for their cholesterol-sensitive membrane interactions. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; 104(51): 20226-31.
- 11 Farrand AJ, LaChapelle S, Hotze EM, Johnson AE, Tweten RK. Only two amino acids are essential for cytolytic toxin recognition of cholesterol at the membrane surface. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010; 107(9): 4341-6.
- 12 李桂军, 楼永良, 严 杰. 创伤弧菌溶细胞素基因在大肠杆菌中的表达及溶血活性鉴定. *中国人兽共患病学报*(Li Guijun, Lou Yongliang, Yan Jie. Expression of the cytolysin gene from *Vibrio vulnificus* in *E.coli* and identification of its hemolytic activity. *Chinese Journal of Zoonoses*) 2007; 23(9): 852-9.
- 13 桂 静, 肖美英, 楼永良, 胡 蝶, 严 杰, 朱晔晶. 创伤弧菌溶细胞素融合蛋白重组、表达与细胞毒活性鉴定. *细胞生物学杂志*(Gui Jing, Xiao Meiyang, Lou Yongliang, Hu Die, Yan Jie, Zhu Yejing. Recombination expression and cytolytic bioactivity of vvhA fusion protein: Cytolysin of *V. vulnificus*. *Chinese Journal of Cell Biology*) 2008; 30(1): 89-94.
- 14 李桂军, 谢旦立, 楼永良. 创伤弧菌溶细胞素基因重组蛋白复性条件的优化及溶血活性鉴定. *温州医学院学报*(Li Guijun, Xie Danli, Lou Yongliang. Optimization of fusion protein VVC condition of renaturation and identification of hemolytic activity. *Chinese Journal of Microbiology and Immunology*) 2007; 37(4): 320-3.
- 15 王 波, 丁 卉, 谢旦立, 楼永良, 严 杰, 杨 军, 等. 重组创伤弧菌溶细胞素诱导人脐静脉内皮细胞凋亡的作用及其机制. *中国细胞生物学学报*(Wang Bo, Ding Hui, Xie Danli, Lou Yongliang, Yan Jie, Yang Jun, *et al.* Effect of apoptosis of rVvhA on HUVEC and related mechanism. *Chinese Journal of Cell Biology*) 2010; 32(1): 103-8.
- 16 李桂军, 桂 静, 肖美英, 楼永良. 创伤弧菌溶细胞素VvhA基因在大肠杆菌中的表达及其对应激因子的调控. *中华微生物学和免疫学*(Li Guijun, Gui Jing, Xiao Meiyang, Lou Yongliang. Expression of fusion protein VVC in *E.coli* and its regulatory effect on the stressors. *Chinese Journal of Microbiology and Immunology*) 2008; 28(1): 24-8.
- 17 Simons K, Ikonen E. How cells handle cholesterol? *Science* 2000; 290(5497): 1721-6.
- 18 Ramachandran R, Tweten RK, Johnson AE. Membrane-dependent conformational changes initiate cholesterol-dependent cytolysin oligomerization and intersubunit β -strand alignment. *Nat Struct Mol Biol* 2004; 11(8): 697-705.
- 19 Hotze EM, Heuck AP, Czajkowsky DM, Shao Z, Johnson AE, Tweten RK. Monomer-monomer interactions drive the prepore to pore conversion of a β -barrel-forming cholesterol-dependent cytolysin. *J Biol Chem* 2002; 277(13): 11597-605.
- 20 Heuck AP, Tweten RK, Johnson AE. Assembly and topography of the prepore complex in cholesterol-dependent cytolysins. *J Biol Chem* 2003; 278(33): 31218-25.

The Mutation of Valine201 and Valine289 Influences the Activity of Recombinant *Vibrio vulnificus* Hemolysin

Guo Yajun, Ye Meiping, Wang Shuai, Lou Yongliang*

(Zhejiang Provincial Key Laboratory of Medical Genetics, Wenzhou Medical College, Wenzhou 325035, China)

Abstract To compare the activity between rVvhA and rVvhA^{val201gly, val289gly}, Val201 and Val289 were mutated to glycines and recombinant proteins were expressed after mutations. The hemolytic activity, cytotoxic, intracellular calcium influx and potassium ion release between rVvhA and rVvhA^{val201gly, val289gly} were compared. The results showed that the hemolysis of rVvhA^{val201gly, val289gly} was reduced. Cell death was partly rescued by blocking calcium influx and potassium ion release. In conclusion, the mutations of Val201 and Val289 are relevant with the cells ions balance, hemolysis and cytotoxicity of rVvhA.

Key words *Vibrio vulnificus*; hemolysin; valine; mutation

Received: October 24, 2011 Accepted: April 10, 2012

This work was supported by the Natural Science Foundation of Zhejiang Province (No. Y2090468)

*Corresponding author. Tel: 86-577-86699200, E-mail: ly110282004@yahoo.com.cn