

单增李斯特菌 (EGDe) *sigB* 基因缺失株的构建及其生物特性的初步鉴定

陈国薇, 刘武康, 丁承超, 谢曼曼, 郭亮, 董庆利, 刘箐
(上海理工大学医疗器械与食品学院, 上海 200093)

摘要: 单核细胞增生李斯特氏菌 (*Listeria monocytogenes*, *Lm*) 是一种人畜共患的食源性致病菌, 在感染过程中可以穿越人体肠道屏障、胎盘屏障及血脑屏障, 进而引发肠胃炎、脑膜炎及孕妇流产等疾病。Sigma B (*sigB*) 基因编码产生的 sigmaB 因子是许多革兰氏阳性菌对环境胁迫产生应答反应的主要调控因子, 并且直接或间接的调控 *Lm* 中相关重要毒力基因如 *prfA*、*inlA* 等的表达。本文通过同源重组技术将 *Lm* 野生菌株 EGDe 的 *sigB* 基因敲除, 并且对缺失菌株的生长曲线, *inlA*、*inlB*、*prfA* 等 13 种 *Lm* 的毒力基因表达水平及对肠道上皮细胞 Caco-2 的侵袭进行了研究。实验表明, EGDe- Δ *sigB* 基因缺失菌株生长速度与 EGDe 基本一致; *sigB* 基因的缺失造成 *inlA* 和 *inlB* 基因表达水平的大幅度下调, 但 *actA* 和 *plcA* 等毒力基因却上调 4-5 倍, 说明 *sigB* 基因对于单核增生性李斯特菌的一些毒力基因表达影响比较大; Caco-2 细胞的侵袭实验显示 EGDe- Δ *sigB* 基因的缺失对 Caco-2 细胞侵袭能力的下降。

关键词: 单核细胞增生李斯特氏菌; *sigB*; 生物特性; 细胞侵袭

文章编号: 1673-9078(2017)9-102-108

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2017.9.015

Construction of Attenuated *Listeria monocytogenes* Strain EGDe- Δ *sigB* and Preliminary Identification of Biological Activity of *sigB*

CHEN Guo-wei, LIU Wu-kang, DING Cheng-chao, XIE Man-man, GUO Liang, DONG Qing-li, LIU Qing
(School of Medical Instrument and Food Engineering, University of Shanghai for Science and Technology, Shanghai 200093, China)

Abstract: *Listeria monocytogenes* is a foodborne pathogen infectious to both humans and animals. *L. monocytogenes* can cross the human intestinal barrier, placental barrier, and blood-brain barrier, thereby causing gastroenteritis, meningitis, miscarriage, and other diseases. Sigma B factor, encoded by the gene *sigB*, is an important regulatory factor for the environmental stress response in many Gram-positive bacteria, and directly and indirectly controls the expression of important virulence genes, such as *prfA* and *inlA*. The *sigB* gene of *L. monocytogenes* strain EGDe was knocked out by homologous recombination, and the resulting deletion strain (EGDe- Δ *sigB*) was used to study the effect of *sigB* deletion on growth, expression of 13 virulence genes (including *inlA*, *inlB*, and *prfA*), and invasion of Caco-2 intestinal epithelial cells. The results showed that the growth rate of the EGDe- Δ *sigB* strain was equivalent to that of the wild-type EGDe strain. Deletion of *sigB* caused a significant reduction in the expression levels of *inlA* and *inlB*, but a significant (four- to five-fold) increase in the expression levels of the virulence genes *actA* and *plcA*, demonstrating that *sigB* has a relatively large influence on the expression of some virulence genes in *L. monocytogenes*. Furthermore, invasion assays indicated that deletion of *sigB* caused a decline in the ability of *L. monocytogenes* strain EGDe to invade Caco-2 cells.

Key words: *Listeria monocytogenes* (*Lm*); *sigB*; biological properties; cell invasion

单核细胞增生李斯特氏菌 (*Listeria monocytogenes*, *Lm*) 是一种非芽孢的革兰氏阳性菌, 它是一

收稿日期: 2016-09-21

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31371776)

作者简介: 陈国薇 (1989-), 女, 博士研究生, 研究方向: 食源性致病菌致病机理

通讯作者: 刘箐 (1970-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 食源性致病菌致病机理、疫苗及快速检测技术研究

种可以引发李斯特病的食源性致病^[1,2], 广泛寄生于土壤、污水、人和动物的粪便、饲料及肉类、蛋类和禽产生肠胃炎、脊髓炎和脑膜炎等一系列疾病^[3,4]。在其侵袭宿主的过程中, 很多毒力基因及毒力蛋白发挥着重要的作用。LLO (Listeriolysin O) 是一种多功能的毒力因子, 在形成穿孔毒素及宿主细胞黏膜外渗方面起着重要的作用^[5,6]; 由 *actA* 基因编码的膜蛋白 ActA 与 *Lm* 的肌动性运动有关, *inlA* 和 *inlB* 是内化素蛋白

家族中最重要的内化素蛋白,是最早被发现的介导 *Lm* 入侵宿主细胞的内化素^[7,8]。*plcA* 和 *plcB* 有助于 *Lm* 逃离吞噬小体, *prfA* 主要调控 *Lm* 的侵袭相关毒力因子,如 *inlA* 和 *inlB* 等^[9]。这些毒力基因互相影响,共同促成了 *Lm* 对宿主的侵袭和感染。

越来越多的证据表明 *Lm* 可以抵抗来自外界的多种压力,包括加热、冷冻、氯化钠、渗透压、pH、氧化物以及紫外线(UV)辐射等,使得 *Lm* 在各种乳制品、肉制品等各类食品加工过程及冷链运输过程中^[10]存活并引发李斯特病^[11]。因此,深入了解 *Lm* 的抗性系统将会对控制这种致病菌的传播起到重要的作用。有研究表明 *sigB* 基因在 *Lm* 抵抗外界压力方面起着关键作用^[12,13], *sigB* 基因的编码产物 *sigmaB* 因子是对环境胁迫产生应答反应的主要调控因子^[14], *RsbV* 和 *RsbW* 两个关键蛋白是 *sigmaB* 因子活性调控中最重要的两个关键蛋白,当细菌出路非压力环境下, *RsbW* 蛋白能使 *RsnV* 磷酸化,从而使得 *sigmaB* 活性受到抑制;当外界压力信号传递到细胞内时, *RsbV* 去磷酸化并结合 *RsbW* 蛋白上,促使其释放出 *sigmaB* 因子,激活的 *sigmaB* 因子进而装载到 RNA 核心酶上,从而诱导依赖 *sigmaB* 的基因转录,来抵抗来自外界的压力。*sigB* 基因通过直接或间接对 *Lm* 重要毒力基因的调控起到了其在 *Lm* 侵袭宿主时毒力因子的作用^[15],在受 *sigma* 因子调控的 54 个被鉴定的基因中,至少有 3 个基因属于毒力相关基因,如编码胆碱水解酶的 *bsh*^[16]、编码与 RNA 结合的调控蛋白的 *hfg*^[17]、以及编码渗透转运蛋白的 *opuC*^[18]。在以一定程度上,毒力基因 *inlA* 和毒力基因调控蛋白 *prfA* 的编码基因 *prfA* 也受其调控。另一方面,菌膜被认为是 *Lm* 抵御外界压力所形成的一种保护膜^[19], *sigB* 基因与 *Lm* 菌膜的形成有着非常重要的关联。通过联系抵御环境压力及调节其他毒力基因这两方面, *sigB* 基因在 *Lm* 在自然界的存活及侵袭宿主方面都有着非常重要的作用^[20]。因此本文利用同源重组技术将 EGDe 的 *sigB* 基因敲除,并且在生长速度、毒力基因表达水平及细胞侵袭生物学方面进行了初步的研究。

1 材料与方法

1.1 材料和主要实验仪器

1.1.1 菌株、细胞和质粒

血清型为 1/2 a 单核细胞增生李斯特氏菌的野生型菌株 EGDe (ATCC BAA-679);人结肠癌腺细胞 Caco-2 购于中国生命科学院细胞中心;温敏型穿梭质粒 pKSV7(大肠杆菌中为氨苄青霉素抗性, *Lm* 中为氯霉素抗性)为华中师范大学罗勤博士馈赠;大肠杆菌 (*Escherichia coli*)JM109 感受态细胞和 pMD19-T Vector 购于大连宝生物 (TaKaRa) 公司。

1.1.2 培养基和试剂

脑心浸液培养基(BHI)、胰蛋白胨、酵母浸粉等,北京陆桥北京陆桥技术股份有限公司;氨苄青霉素(Amp)、氯霉素(Cam),上海朝瑞生物科技有限公司;Dulbecco's Modified Eagle Medium(DMEM)细胞培养基、胎牛血清及胰蛋白酶等,美国 Gibco 公司;分子生物试剂 taq 酶、dNTPS 和反转录试剂盒等,大连宝生物(TaKaRa)公司;引物自行设计并由生工生物工程(上海)股份有限公司合成;细菌基因组抽提试剂盒、核酸凝胶回收试剂盒、质粒抽提试剂盒,天根生化科技(北京)有限公司;总 RNA 提取试剂 Trizol,英潍捷基(Invitrogen)公司;其他无机试剂均为化学纯。

1.1.3 主要实验仪器

9500 型普通 PCR 仪、7500 型实时荧光定量 PCR 仪,美国应用生物公司 (ABI) 产品;SpectraMax M2 型多功能全波长酶标仪,分子设备公司 (Molecular Devices);核酸电泳设备、电转化仪、凝胶成像仪及相关软件,美国伯乐公司 (Bio-rad);Nano Drop 微量生化测定仪,美国赛默飞世尔科技公司 (Thermo Fisher Scientific);台式离心机,德国艾本德股份公司 (Eppendorf);电热恒温培养箱,上海一恒仪器;恒温摇床,上海世平实验设备有限公司。

1.2 实验方法

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequences

Primer	Sequence(5'→3')	Length/bp
<i>sigB</i> 5'F	ATT <u>CCCGGG</u> ATTAGGCGTATTTGTAGGA(<i>Sma</i> I)	618
<i>sigB</i> 5'R	ATT <u>TCTAGAT</u> TCTCTCCACCTGCTTTTC(<i>Xba</i> I)	
<i>sigB</i> 3'F	ATT <u>TCTAGAC</u> CATAACACCTTTTAAACT(<i>Xba</i> I)	558
<i>sigB</i> 3'R	ATT <u>GTCGACT</u> TTTAAAAATCCCAATTAG(<i>Sal</i> I)	
<i>sigB</i> F	GGTGTACGGAAGAAGAAGT	425
<i>sigB</i> R	CCGCAGTATTGTTGTAATGC	

1.2.1 引物

实验所用引物为表 1 所示。引物 *sigB* 5'F 与 *sigB* 5'R 用于扩增 *sigB* 基因的上游片段, 引物 *sigB* 3'F 与 *sigB* 3'R 用于扩增 *sigB* 基因的下游片段, 引物 *sigB* F 与 *sigB* R 的结合位点位于 *sigB* 基因编码区内, 用于鉴定 *sigB* 基因缺失。

1.2.2 EGDe 基因组 DNA 的提取

EGDe 基因组 DNA 的提取使用细菌基因组抽提试剂盒, 详细操作步骤见试剂盒说明书, DNA 浓度使用 Nano Drop 测定。

1.2.3 *sigB* 基因上下游同源臂的扩增

使用 EGDe 基因组 DNA 为模板进行 PCR 扩增, 产物进行 1.5%琼脂糖凝胶电泳, 在 120 V 电压下电泳 35 min, 电泳液为 1×TAE。电泳后使用凝胶成像仪成像, 并割胶回收, 割胶回收具体操作见核酸凝胶回收试剂盒说明书。

1.2.4 上下游同源臂连接和同源臂与 T 载体连接

将 1.2.3 中割胶回收的上下游同源臂使用相应的限制性内切酶单酶切处理后, 进行琼脂糖凝胶电泳并割胶回收, 割胶回收后的产物使用 T4 DNA 连接酶 16 °C 过夜连接, 连接完成后连接 T 载体并导入 JM109 感受态细胞中。平板上长出单菌落后进行 PCR 鉴定, 将阳性克隆的部分菌液转接扩大培养并抽提质粒 (抽提质粒方法详见质粒抽提试剂盒说明书), 剩余部分菌液加入 20~30%甘油混匀后于 -80 °C 冻存。

1.2.5 pKSV7 重组质粒的构建

将连有同源臂的 T 载体与 pKSV7 质粒使用相应的限制性内切酶进行双酶切, 随后进行琼脂糖凝胶电泳并割胶回收, 割胶回收后的产物使用 T4 DNA 连接酶 16 °C 过夜连接并导入 JM109 感受态细胞中。将阳性克隆的质粒抽提后进行双酶切鉴定并测序, 测序由华大基因完成, 测序后将序列比对正确的质粒保存待后续实验使用。

1.2.6 重组质粒电转化 EGDe 感受态细胞及鉴定

制备 EGDe 感受态细胞后进行电转化, 后将感受态细胞涂布于 BHI 平板 (含 10 μg/mL Cam) 上 30 °C 培养, 挑取菌落进行鉴定, 将阳性克隆的菌液冻存。

使用温度及氯霉素双重抗性的筛选。将含有重组质粒的 LM 转接到 BHI (含 10 μg/mL Cam) 液体培养基中 41 °C 连续培养并转接 8~10 次, 将末代细菌培养物划线于 BHI (含 10 μg/mL Cam) 平板上 41 °C 过夜培养; 挑取 BHI (含 10 μg/mL Cam) 平板上的单菌落于 BHI 液体培养基中 30 °C 连续培养并转接 6~8 次,

取末代培养物划线于 BHI 平板, 30 °C 过夜培养; 挑取单菌落进行 PCR 鉴定, 并将疑似突变株分别划线于抗性平板和非抗性平板; 对突变区域的基因序列测序以验证基因完全缺失。

1.2.7 EGDe、EGDe-Δ*sigB* 的生长情况

使用酶标仪测定 EGDe、EGDe-Δ*sigB* 在 OD₆₀₀ 下的生长曲线, 比较 *sigB* 基因缺失后的菌株与 EGDe 的活力是否存在明显的不同。

1.2.8 RT-PCR 检测 EGDe-Δ*sigB* 主要毒力基因表达检测

表 2 RT-PCR 引物序列

Primer	Sequence(5'→3')	Length/bp
<i>16s</i>	F: ACATCCTTTGACCACTCTGGA	93
	R: CAACATCTCACGACACGAGC	
<i>actA</i>	F: AGGCGGTAGACCAACATCTG	143
	R: CCCGCATTTCTTGAGTGTTT	
<i>ami</i>	F: AGAAGACTCTGCGATTGACC	192
	R: ACGACTATATGCGGTGATGG	
<i>hly</i>	F: CAGCATTGATTTGCCAGGTAT	179
	R: TCACTGTAAGCCATTTTCGTCA	
<i>iap</i>	F: CGCCTAAAGTAGCAGAAACGA	89
	R: AAGCCCAAATAGTGTCAACCG	
<i>inlA</i>	F: TGTGGACGGCAAAGAAACA	96
	R: CCAACCAACAAATGTGTGACC	
<i>inlB</i>	F: GCAGGCATCTACAACTTCCA	104
	R: GCCATTTGCGGCTTCTCTA	
<i>inlC</i>	F: AATGCTAGTGTTAATTGTAGG	223
	R: TTGAATGTTGCTATTATCTCC	
<i>nox</i>	F: TCCAGAGACACCAAACAAAGC	80
	R: GCCACACAACCTGAAGACA	
<i>plcA</i>	F: ACTACAATGGTCCGAGTGTGAA	137
	R: CAGCATACTGACGAGGTGTGA	
<i>plcB</i>	F: GCAAATGCCTGTTGTGATG	112
	R: CGTCAGTATTTGTCGGGTTAIC	
<i>prfA</i>	F: GGCTCTATTTGCGGTCAACT	128
	R: GCTATGTGCGATGCCACTT	
<i>sigB</i>	F: TTTGGATTGCCGCTTACC	91
	R: TCGGGCGATGGACTCTACTA	
<i>srtA</i>	F: CGCAGTTCCATCTGTAGACG	85
	R: AACGCATAGTTGTTGCTCCA	
<i>vip</i>	F: GAACAGGCAGCCATACAAGC	130
	R: TCGGAAGCAGGAAGAACATC	

为考察 EGDe 在缺失 *sigB* 基因后其毒力基因的表达水平, 分别提取 EGDe、EGDe-Δ*sigB* 菌株的 RNA

后反转录成 cDNA, 以 EGDe 各毒力基因的表达水平作参考, 使用 RT-PCR 方法分别检测 EGDe- $\Delta sigB$ 中 *actA*、*inlA*、*inlB*、*plcB* 和 *hly* 等相关毒力基因的表达水平。RT-PCR 使用的引物序列详见表 2。

1.2.9 EGDe、EGDe- $\Delta sigB$ 侵袭 Caco-2 细胞

对细菌和细胞进行计数, 调整浓度使得细菌和细胞分别为 10^7 CFU/mL 和 100 个/mL, 调整比例为细菌数/细胞数=100/1 后进行细菌侵袭细胞实验。为排除胎牛血清对侵袭实验结果的影响, 在侵袭之前将 12 孔细胞培养板中换成不含血清的不完全培养基; 放入细胞培养箱侵袭 4 h 后每孔加入 0.5 mL、700 μ g/mL 的庆大霉素, 放置于细胞培养箱处理 30 min 充分灭活胞外细菌; 使用 PBS 清洗庆大霉素后每孔加入 0.5 mL 1% Triton-X-100, 室温处理 30 min, 充分破碎细胞后稀释涂布 BHI 平板, 37 $^{\circ}$ C 培养进行平板计数。

1.3 数据统计分析

本实验数据经 Microsoft Excel 与 SPSS 处理。

2 结果与讨论

2.1 *sigB* 基因上下游同源臂的扩增

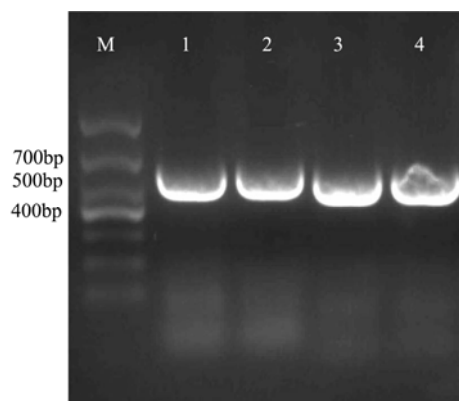


图1 上下游同源臂扩增

Fig.1 Amplification of upstream and downstream homologous flanking sequences

以 EGDe 基因组为模板扩增 *sigB* 基因的上下游同源臂, 扩增产物进行琼脂糖电泳的结果见图 1, 图 1 中 M 为 DL1000 bp Marker, 1、2 号泳道为上游同源臂 618 bp, 3、4 号泳道为下游同源臂 558 bp, 扩增的片段与预期的片段大小相符且特异性良好无杂带, 同时确定引物进行 PCR 反应时的退火温度为 56 $^{\circ}$ C。

2.2 上下游同源臂的连接和导入 JM109 感受态细胞

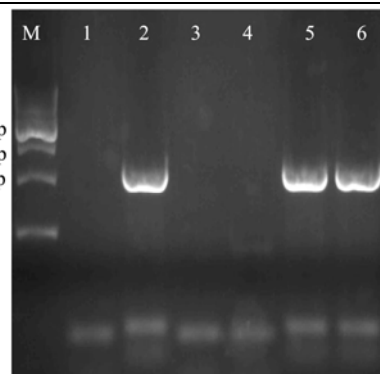


图2 连有同源臂的 T 载体鉴定结果

Fig.2 Identification of T-vector with homologous flanking sequences

将上下游同源臂使用相应限制性内切酶处理并用 T4 DNA 连接酶过夜连接, 连接产物与 T 载体连接并导入感受态细胞, 平板上长出的菌落 PCR 鉴定结果见图 2。图 2 中 M 为 500 bp DNA Ladder Marker, 1 号泳道为阴性对照, 2~6 号泳道为鉴定样本。*sigB* 基因的上下游同源臂连接后为 1164 bp, 由电泳图可知, 2、5 和 6 号样本为阳性克隆, 目的基因上下游同源臂均连接成功, 并与 T 载体连接成功, 将筛选到的阳性克隆扩大培养抽提质粒或冻存。

2.3 pKSV7 重组质粒的构建

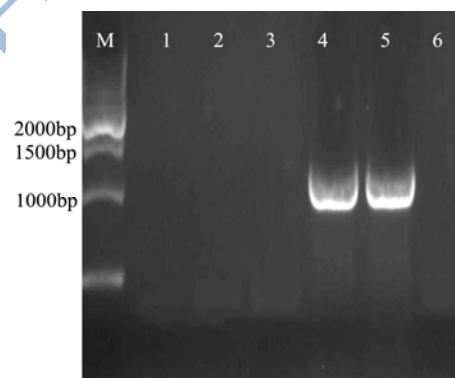


图3 重组质粒鉴定

Fig.3 Identification of recombinant plasmid

将连有同源臂的 T 载体与 pKSV7 质粒使用相应的限制性内切酶进行双酶切, 再使用 T4 DNA 连接酶 16 $^{\circ}$ C 过夜连接并将重组质粒导入感受态细胞中, 平板上长出的菌落鉴定结果见图 3, 图 3 中 M 为 500 bp DNA Ladder Marker, 1 号泳道为阴性对照, 2~6 号泳道为鉴定样本。电泳图显示 4 和 5 号样本为阳性克隆, 即重组质粒构建成功。双酶切鉴定与测序结果表明, 重组质粒上连接的目的基因同源臂序列与 NCBI 报导的相关基因序列匹配度达到 99% 以上, 无大量突变和错配情况存在, 可以用于后续实验。

2.4 重组质粒电转化 EGDe 感受态细胞

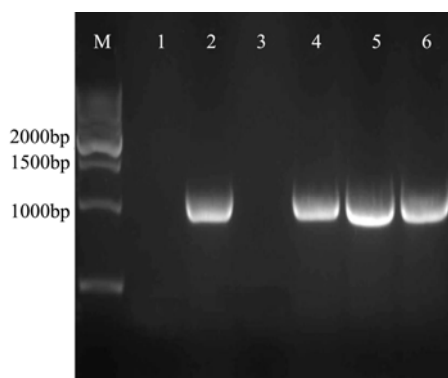


图4 含有重组质粒的转化子鉴定

Fig.4 Identification of transformants containing recombinant plasmid

挑取 BHI 平板 (含 10 μg/mL Cam) 上菌落进行鉴定, 鉴定结果见图4, 图4中 M 为 500 bp DNA Ladder Marker, 1 号泳道为阴性对照, 2~6 号泳道为鉴定样本, 电泳图显示 2、4、5 和 6 号样本为含有重组质粒的阳性转化子, 将阳性样本冻存用于后续实验。

2.5 sigB 基因缺失突变株的筛选与鉴定

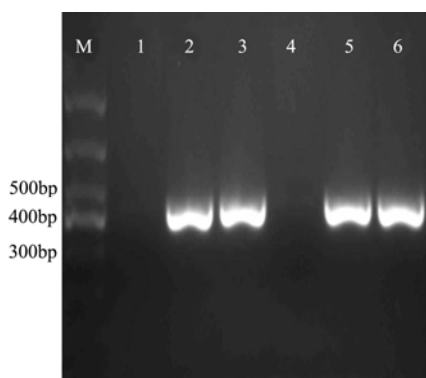


图5 sigB 基因缺失菌株的筛选

Fig.5 Screening of the sigB deletion strain

含有重组质粒的阳性转化子在特定条件下连续培养一定时间后, 对划线接种末代培养物的 BHI 平板上的菌落进行鉴定, 鉴定结果见图5。图5中 M 为 DL1000 bp Marker, 1 号泳道为阴性对照, 2 号泳道为以 EGDe 基因组 DNA 作为模板的阳性对照, 3~6 号泳道为鉴定样本。电泳结果显示, 4 号泳道的样本使用 sigB 基因鉴定引物则未扩增出任何产物, 说明样本的 sigB 基因很可能已经缺失。将疑似突变菌株分别涂布抗性和非抗性平板, 72 h 内在抗性平板上无法生长而在非抗性平板上可以生长的突变菌株即为完全失去抗性, 表明穿梭质粒在引导完成同源重组后已经丢失, 整个同源重组过程已经完成且得到的突变菌株为不含抗性的、可稳定存在的突变菌株。使用引物 sigB 5'F 与 sigB 3'R

扩增突变菌株 sigB 基因上游至下游的完整片段并对相应基因序列进行测序, 测序结果表明与野生菌株相比突变样本中的 sigB 基因已经缺失。sigB 基因缺失的 EGDe 菌株构建完成, 命名为 EGDe-ΔsigB, 将菌液冻存用于后续实验。

2.6 生长曲线的测定

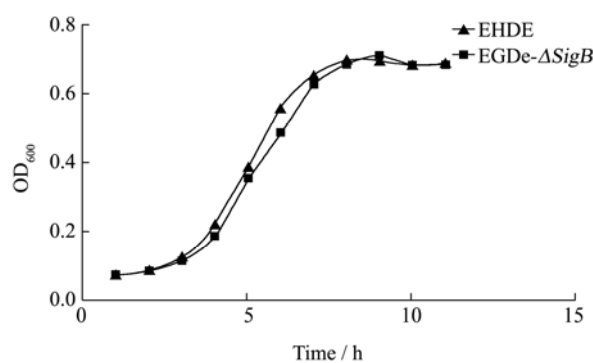


图6 EGDe 与 EGDe-ΔsigB 生长曲线

Fig.6 Growth curves of strains EGDe and EGDe-ΔsigB

将 EGDe 与 EGDe-ΔsigB 接种到 BHI 液体培养基中, 于 37 °C、200 r/min 下培养 12 h, 每小时使用酶标仪测定 EGDe 与 EGDe-ΔsigB 在 OD₆₀₀ 下的生长曲线, 比较 sigB 基因缺失后的菌株与 EGDe 的活力是否存在明显的不同。图 6 表明 EGDe-ΔsigB 在基因缺失后菌体生长趋势在 12 h 内与野生株 EGDe 基本完全一致, 于 8 h 左右到达饱和。

2.7 毒力基因的表达情况

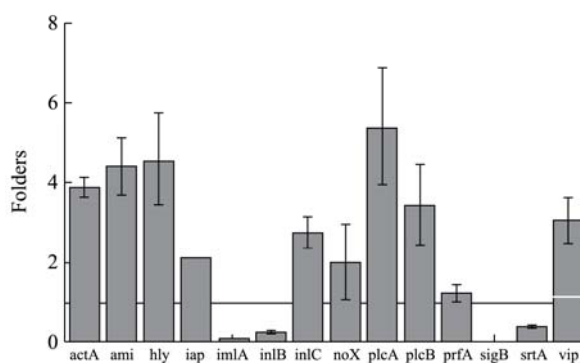


图7 EGDe-ΔsigB 毒力基因表达水平

Fig.7 Expression levels of virulence genes in strain EGDe-ΔsigB determined by RT-PCR

将 EGDe 与 EGDe-ΔsigB 的 RNA 提取反转录成 cDNA, 进行 RT-PCR 反应, 结果为图 7 所示。选择了 11 个 Lm 中较为重要的毒力基因作为研究对象, 并考察了负责 ROS 生成的 nox 基因的表达情况。结果显示 sigB 基因已无表达, inlA 和 inlB 与 srtA 基因表达水平也下降的非常明显, inlA 约下降十二倍左右, inlB 下

降约三倍, *srtA* 约下降 2.5 倍。但是其余的重要的毒力基因却有上升的趋势, *plcA* 尤为明显, 约上调五倍左右。可见 *sigB* 基因对于 *Lm* 的毒力方面有着较大的影响, 根据初步结果分析, *inlA* 和 *inlB* 是负责单增李斯特菌侵袭的主要毒力因子, 其表达程度的明显下降会对细胞的侵袭造成较大影响, 但是其 *actA*、*hly* 和 *plcA* 等基因却显著上调, 则说明这对 *Lm* 在细胞之间的传播和寄生等能力有可能会上调。

2.8 细胞侵袭实验结果

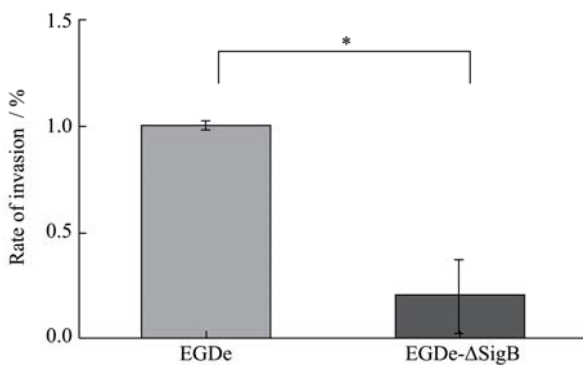


图8 EGDe 与 EGDe-Δ*sigB* 细胞侵袭结果

Fig.8 Invasion of Caco-2 cells by strains EGDe and EGDe-Δ*sigB*

通过 EGDe 与 EGDe-Δ*sigB* 两株菌株侵袭后, 统计成功侵入 Caco-2 细胞的细菌总数, 计算出各自侵袭比率。根据实验结果图 8 显示, EGDe 侵袭 4 h 后, 成功进入 Caco-2 细胞的比例约为 1% 左右, 但是 EGDe-Δ*sigB* 成功侵袭的比例平均约为 0.2% 左右, 下降了五倍左右。这表明 EGDe-Δ*sigB* 菌株与野生型菌株 EGDe 相比侵袭能力显著下降, 综合分析其毒力基因的表达情况, 主要为 *inlA* 和 *inlB* 在 *sigB* 基因敲除后表达显著下降, 这可能是造成 EGDe-Δ*sigB* 菌株在细胞水平上侵袭能力显著下降的原因。

3 结论

3.1 本实验利用了同源重组技术, 成功构建了 EGDe-Δ*sigB* 突变株。本实验使用的基因改造方法为使用温敏型自杀载体 pKSV7, 利用载体在 41 °C 和氯霉素双重压力下整合进入基因组 DNA 进行复制的特点, 将目的基因上下游同源臂连接于载体上, 引导载体在菌体内部特定位置进行同源重组, 从而实现目的基因的敲除。此种方法有操作简单和只需基础的分子生物学实验设备即可进行的优点, 但与目前新兴的多种基因编辑技术相比, 存在实验周期长、依赖专门的穿梭载体、筛选过程获得突变株的概率不高等明显的缺点。

3.2 本实验对 EGDe-Δ*sigB* 突变株进行了生长曲线的

测定, 发现该突变株的生长能力并未发生明显变化, 说明 *sigB* 基因的缺失并未影响其正常的生长代谢。同时, 相关文献也表明, *sigmaB* 因子在非压力情况下活性是被抑制, 因此若要研究 *sigB* 基因在生理代谢中的调控作用, 应设置有外界压力的生长环境。利用 Real-Time PCR 技术, 研究了此突变株中其他毒力基因的表达情况, 发现 *inlA*、*inlB*、*actA* 和 *plcA* 等重要的毒力基因都发生了明显的变化, 说明 *sigB* 基因对于其他毒力基因具有显著的调控作用。为了研究其对宿主细胞侵袭能力的影响, 进行了对人结肠腺癌细胞 Caco-2 的侵袭实验, 实验结果显示该突变株与 *Lm* 野生型菌株相比细胞侵袭能力显著下降, 约下调五倍左右, 具有显著性差异。但该实验结果只反映 *sigB* 基因对 *Lm* 在细胞水平上的侵袭能力的影响, 对 *sigB* 基因在整个毒力调控网络中的作用的研究还需借助基因芯片等高通量检测技术, 而对宿主的侵袭能力还应进行适当的动物实验以获得半数致死剂量、致死率等更加客观反映细菌毒力的结果。

参考文献

- [1] Wood S, Marushek N, Czuprynski C J. Multiplication of *Listeria monocytogenes* in a murine hepatocyte cell line [J]. *Infection and Immunity*, 1993, 61(7): 3068-3072
- [2] Lecuit M. Human listeriosis and animal models [J]. *Microbes and Infection*, 2007, 9(10): 1216-1225
- [3] Lecuit M. Understanding how *Listeria monocytogenes* targets and crosses host barriers [J]. *Clin. Microbiol. Infect.*, 2005, 11: 430-436
- [4] Holch A, Gottlieb C T, Larsen M H, et al. Gram L: Poor invasion of trophoblastic cells but normal plaque formation in fibroblastic cells despite *actA* deletion in a group of *Listeria monocytogenes* strains persisting in some food processing environments [J]. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2010, 76(10): 3391-3397
- [5] Ireton K. Entry of the bacterial pathogen *Listeria monocytogenes* into mammalian cells [J]. *Cellular Microbiology*, 2007, 9(6): 1365-1375
- [6] Decatur A L, Portnoy D A. A PEST-like sequence in listeriolysin O essential for *Listeria monocytogenes* pathogenicity [J]. *Science*, 2000, 290(5493): 992-995
- [7] Moors M A, Levitt B, Youngman P, et al. Expression of listeriolysin O and *actA* by intracellular and extracellular *Listeria monocytogenes* [J]. *Infection & Immunity*, 1999, 67: 131-139
- [8] Shaynoor M, Pascale C. Listeriolysin O: A genuine cytolysin

- optimized for an intracellular parasite [J]. *Journal of Cell Biology*, 2006, 156(6): 943-946
- [9] Dramsi S, Biswas I, Maguin E, et al. Entry of *Listeria monocytogenes* into hepatocytes requires expression of InlB, a surface protein of the internalin multigene family [J]. *Molecular Microbiology*, 1995, 16: 251-261
- [10] 马婷,李芳,单大亚.基于物联网技术的食品冷链物流跟踪及追溯问题研究[J].上海理工大学学报,2013,35(6):567-572
MA Ting, LI Fang, SHAN Da-ya. Tracking and retrospecting of food cold chain logistics based on internet of things technology [J]. *Journal of University of Shanghai for Science and Technology*, 2013, 35(6): 567-572
- [11] Chaturongakul S, Boor K J. SigmaB activation under environmental and energy stress conditions in *Listeria monocytogenes* [J]. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2006, 72(8): 5197-5203
- [12] Becker L A, Cetin M S, Hutkins R W, et al. Identification of the gene encoding the alternative sigma factor sigmaB from *Listeria monocytogenes* and its role in osmotolerance [J]. *Journal of Bacteriology*, 1998, 180(17): 4547-4554
- [13] Moorhead S M, Dykes G A. Influence of the sigB gene on the cold stress survival and subsequent recovery of two *Listeria monocytogenes* serotypes [J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2004, 91(1): 63-72
- [14] Van Schaik W, Tempelaars M H, Wouters J A, et al. The alternative sigma factor σ B of *Bacillus cereus*: response to stress and role in heat adaptation [J]. *J. Bacteriol.*, 2004, 186(2): 316-325
- [15] Kazmierczak M J, Mithoe S C, Boor K J, et al. *Listeria monocytogenes* sigmaB regulates stress response and virulence functions [J]. *Journal of Bacteriology*, 2003, 185(19): 5722-5734
- [16] Chan Y C, Boor K J, Wiedmann M. SigmaB-dependent and sigmaB-independent mechanisms contribute to transcription of *Listeria monocytogenes* cold stress genes during cold shock and cold growth [J]. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2007, 73(19): 6019-6029
- [17] Christiansen J K, Larsen M H, Ingmer H, et al. The RNA-binding protein Hfq of *Listeria monocytogenes*: role in stress tolerance and virulence [J]. *J Bacteriol.*, 2004, 186(11): 3355-3362
- [18] Fraser K R, Sue D, Wiedmann M, et al. Role of σ B in regulating the compatible solute uptake systems of *Listeria monocytogenes*: osmotic induction of opuC is σ B dependent [J]. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2003, 69(4): 2015-2022
- [19] Berrang M E, J F Frank, R J Meinersmann. Effect of chemical sanitizers with and without ultrasonication on *Listeria monocytogenes* as a biofilms within polyvinyl chloride drain pipes [J]. *Food Prot.*, 2008, 71: 66-69
- [20] Kazmierczak M J, Wiedmann M, Boor K J. Contributions of *Listeria monocytogenes* sigmaB and PrfA to expression of virulence and stress response genes during extra-and intracellular growth [J]. *Microbiology*, 2006, 152(6): 1827-1838