

单核增生性李斯特菌 hly 缺失菌株的构建及生物特性的初步鉴定

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

摘要: 为研究单核增生性李斯特菌 (*Listeria monocytogenes*, *Lm*) hly 基因对毒力的影响, 利用同源重组原理, 使用穿梭载体, 构建单核细胞增生性李斯特菌野生菌株 EGD-e 的 hly 基因缺失菌株 EGD-e Δhly 。细菌活性实验证明缺失菌株生长状态与亲本无差异, 但 EGD-e Δhly 丧失溶血活性, 细胞侵袭能力降低约 90%, 在 10^7 cells/mL 腹腔注射条件下不表现动物毒性。在转录水平上 EGD-e Δhly 的毒力基因 *inlC*、*prfA* 的表达量分别下降了 81% 和 76%, *actA*、*plcB* 的表达量分别提高了 2.7 倍和 1.8 倍。 hly 缺失菌株的成功构建及生物特性的初步研究结果为研究 *Lm* 致病机理提供依据。

关键词: 单核增生性李斯特菌; hly 基因; 同源重组; 生物特性

Construction and Biological Characterization of hly Gene Knockout *Listeria monocytogenes* Mutant Strains

XIE Manman, LIU Wukang, DING Chengchao, DONG Qingli, CHEN Guowei, ZENG Haijuan, GUO Liang, LIU Qing*
(School of Medical Instrument and Food Engineering, University of Shanghai for Science and Technology, Shanghai 200093, China)

Abstract: This study aimed to elucidate the effect of hly gene on the virulence of *Listeria monocytogenes*. We constructed a hly gene knockout mutant strain EGD-e Δhly from wild-type *L. monocytogenes* EGD-e by using a shuttle vector through homologous recombination. Biological characterization showed that there was no difference between the growth status of the mutant and parent strains. However, the mutant strain lost hemolytic activity, the cell invasion ability was decreased and there was no toxicity observed in animals receiving intraperitoneal injection at a concentration of 10^7 cells/mL. At the transcriptional level, the knockout of hly gene down-regulated the expression levels of virulence genes *inlC* and *prfA* by 81% and 76% respectively and up-regulated the expression levels of *actA* and *plcB* genes by 2.7 and 1.8 times, respectively. This paper may provide a basis for the study of the pathogenic mechanism of *Lm*.

Key words: *Listeria monocytogenes*; hly gene; homologous recombination; biological characteristics

DOI:10.7506/spkx1002-6630-201716003

中图分类号: TS201.3

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630 (2017) 16-0017-06

引文格式:

谢曼曼, 刘武康, 丁承超, 等. 单核增生性李斯特菌 hly 缺失菌株的构建及生物特性的初步鉴定[J]. 食品科学, 2017, 38(16): 17-22. DOI:10.7506/spkx1002-6630-201716003. <http://www.spkx.net.cn>

XIE Manman, LIU Wukang, DING Chengchao, et al. Construction and biological characterization of hly gene knockout *Listeria monocytogenes* mutant strains[J]. Food Science, 2017, 38(16): 17-22. (in Chinese with English abstract)

DOI:10.7506/spkx1002-6630-201716003. <http://www.spkx.net.cn>

单核细胞增生性李斯特菌 (*Listeria monocytogenes*, *Lm*) 是一种营细胞内寄生的人畜共患的食源性致病菌, 广泛存在于生鲜或即食食品中^[1-2]。*Lm*可穿透人体的三大屏障——肠道屏障、血脑屏障和胎盘屏障, 导致肠炎、

脑膜炎、流产^[3], 是研究胞内寄生菌与宿主之间的相互作用的重要模式菌^[4]。在寄生及繁殖的不同阶段中, *Lm*有多个毒力因子来协助其进行机体的感染继而发挥致病作用^[5], 目前已发现多个与*Lm*致病性与毒力相关因子, 其

收稿日期: 2016-12-08

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (31371776); 上海理工大学微创励志创新基金项目 (YS30809101);

上海理工大学研究生创新基金项目

作者简介: 谢曼曼 (1988—), 女, 博士研究生, 研究方向为食源性致病菌致病机理。E-mail: xiemanman880224@163.com

*通信作者: 刘箐 (1970—), 男, 教授, 博士, 研究方向为食源性致病菌致病机理、疫苗及快速检测技术。

E-mail: liuq@usst.edu.cn

中多是表面蛋白或者是分泌蛋白^[6-7]。编码这些蛋白的毒力基因(*hly*、*plcA*、*plcB*、*mpl*、*actA*、*inlA*和*inlB*)主要位于细菌染色体上的2个毒力岛上^[8]。其中*hly*基因编码溶菌素(*listeriolysin O*, LLO)是一个主要毒力因子^[9]。

LLO是一种由529个氨基酸组成具有溶血活性的成孔蛋白,属胆固醇依赖性溶细胞素家族的成员^[10]。它在*Lm*从初级和次级吞噬体逃逸中以及在宿主细胞质中的细菌增殖中都起到关键的作用^[11-12]。基于*hly*基因在*Lm*致病性中起到的重要作用,构建*Lm*的*hly*缺失减毒菌株不仅对于研究开发*Lm*减毒疫苗研究等有重要意义^[13-14]。而且,对于研究LLO在细胞内囊泡逃逸过程及其在*Lm*在细胞与细胞间的感染机理具有一定指导意义^[15]。本研究利用同源重组技术构建*hly*基因敲除菌株EGD-eΔ*hly*;并从生长状态、毒力基因转录水平、宿主致死率等方面研究*hly*基因缺失菌株的生物特性,为食源性致病菌*Lm*致病机理研究提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

1.1.1 菌株和质粒

单核细胞增生李斯特菌的标准株EGD-e、英诺克李斯特菌(*Listeria innocua*, Li)、Caco-2结肠腺癌细胞为本实验室保藏;穿梭质粒pKSV7质粒由华中师范大学罗勤博士馈赠;大肠杆菌DH5α感受态细胞、pMD19-T Vector购于日本TaKaRa公司;6~8周龄小鼠购于第二军医大学。

1.1.2 培养基和试剂

脑心浸液(brain heart infusion, BHI)培养基 北京陆桥技术股份有限公司;细菌基因组抽提试剂盒、核酸凝胶回收试剂盒 天根生化科技(北京)有限公司;Taq酶、反转录试剂 日本TaKaRa公司;DMEM(Dulbecco's modified Eagle medium)细胞培养基 美国Sigma公司;其他化学试剂均为分析纯。

1.1.3 引物

本实验中使用的引物参照GenBank中公布的序列(ID: 986837)设计,由生工生物工程(上海)股份有限公司合成,具体引物序列和对应酶切位点如表1所示。

表1 引物序列
Table 1 Primer sequences used in this study

引物名称	序列(5'→3')	酶切位点
<i>hly</i> 5'F	ATTCCCGGGCCGCGACATCTTTTAATGT	<i>Sma</i> I
<i>hly</i> 5'R	ATTCTAGATTGTTGCGCAATTGGTAGA	<i>Xba</i> I
<i>hly</i> 3'F	ATTCTAGACACCACGCTTTATCCGAAAT	<i>Xba</i> I
<i>hly</i> 3'R	ATTGTCGACAAGCTGTCTTGCTGCAAAAT	<i>Sal</i> I
<i>hly</i> KO F	TGACGAAATGGCTTACAGTG	
<i>hly</i> KO R	AATGGGAACCTCTGGTGTT	

注:*hly* 5'F、*hly* 5'R. *hly*基因上游片段引物;*hly* 3'F、*hly* 3'R. *hly*基因下游片段引物;下划线表示酶切位点序列。

1.2 仪器与设备

9500型普通聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)仪、7500型实时荧光定量(quantitative real-time, qRT)-PCR仪 美国应用生物公司;DYCP-31CN型电泳仪、MicroPulser电转仪 美国伯乐公司;SpectraMax M2型酶标仪 美国分子设备公司。

1.3 方法

1.3.1 *hly*敲除菌株的建立

EGD-eΔ*hly*菌株的构建,原理如图1。

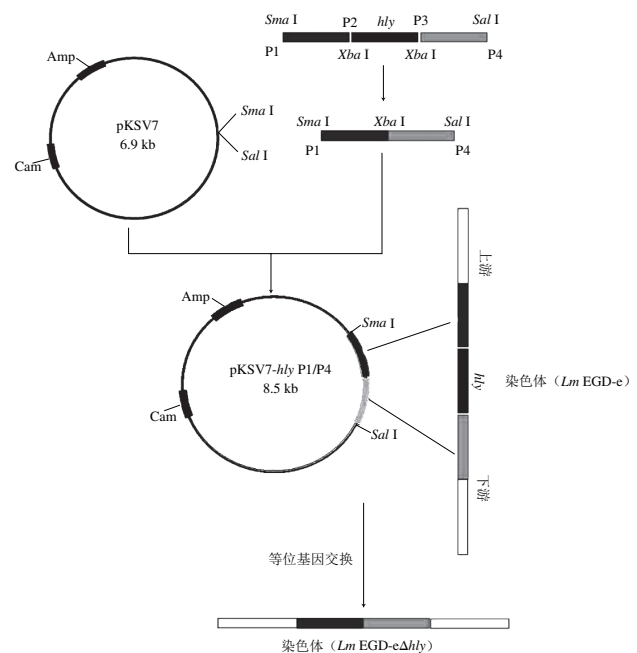


图1 EGD-eΔ*hly*菌株构建原理

Fig. 1 Schematic illustration of the principle for EGD-eΔ*hly* mutant construction

1.3.1.1 *hly*基因上下游同源臂的扩增及连接

将EGD-e接种于BHI培养基中于37℃、200 r/min摇床培养过夜,收集菌体使用细菌基因组抽提试剂盒获得基因组。使用*hly* 5'F、*hly* 5'R、*hly* 3'F和*hly* 3'R引物以抽提的基因组为模板扩增*hly*的上下游同源臂。得到的PCR片段电泳后割胶回收,使用酶*Xba* I对片段进行单酶切,并电泳割胶回收。产物使用T4 DNA连接酶连接,电泳割胶回收。

1.3.1.2 同源臂连接pMD19-T Vector并导入DH5α感受态细胞

得到的上下游连接产物链接pMD19-T Vector并转化至DH5α感受态细胞中,得到的菌悬液涂布于含100 μL/mL Amp平板上,37℃条件下培养。挑取单菌落扩大培养后进行PCR鉴定,对应的阳性克隆菌液使用质粒抽提试剂盒抽提质粒,同时菌液-80℃保存。

1.3.1.3 pKSV7重组质粒的构建与电转化

将连有同源臂的pMD19-T Vector与pKSV7质粒进行双酶切, 并进行琼脂糖凝胶电泳并割胶回收, 产物使用T4 DNA连接酶16℃条件下过夜连接并导入*Lm*感受态细胞。将阳性克隆的质粒抽提后进行双酶切鉴定并测序, 测序过程由华大基因公司完成, 将序列比对正确的脱盐质粒与*Lm*感受态混匀, 每200 μL *Lm* (1×10^{11} CFU/mL) 感受态的质粒用量约1 μg , 电转化条件2.25 kV/cm、4 ms。电转后将感受态细胞转入3~5 mL的BHI培养基中振荡培养约2 h, 离心收集菌体后涂布于含10 $\mu\text{g/mL}$ 克拉霉素 (clarithromycin, Cam) 的BHI平板, 30℃条件下培养, 挑取菌落进行鉴定, 将阳性克隆的菌液冻存。

1.3.1.4 *hly*基因缺失突变株的筛选与鉴定

将含有重组质粒的*Lm*转接到BHI (含10 $\mu\text{g/mL}$ Cam) 液体培养基中, 41℃条件下按1:100 (V/V, 下同) 连续转接10次, 将末代细菌培养物划线于BHI (含10 $\mu\text{g/mL}$ Cam) 平板上, 41℃条件下过夜培养; 挑取BHI (含10 $\mu\text{g/mL}$ Cam) 平板上的单菌落于BHI液体培养基中30℃条件下连续培养并按1:100转接8次, 取末代培养物划线于BHI平板, 30℃过夜培养; 挑取单菌落进行PCR鉴定将疑似突变株分别划线于抗性平板和非抗性平板, 含Cam的抗性BHI平板上不生长, 无抗性BHI平板上可生长的为疑似突变株, 对疑似突变株进行PCR鉴定以确定突变株。

1.3.2 生长曲线测定

挑取EGD-e、EGD-e Δhly 单菌落于BHI液体培养基中摇床过夜培养, 按1:100转接至装100 mL新鲜BHI培养基的锥形瓶中, 37℃、200 r/min培养, 每1 h取200 μL 于酶标板中测定OD_{600 nm}值, 共记录12 h, 得到的数据绘制细菌的生长曲线。

1.3.3 溶血活性的测定

溶血活性的测定参照Sivaranjani等^[16]进行, 挑取EGD-e、EGD-e Δhly 、*Li*的单菌落于BHI中培养至稳定生长早期 (OD_{600 nm}约为0.6)。将*Lm*培养物4℃、5 500 r/min离心10 min。取0.1 mL上清液样品加入到1 mL溶血素缓冲液 (0.145 mol/L NaCl、0.02 mol/L CaCl₂) 中, 并加入0.025 mL脱纤维羊血。设置0.1 mL培养基用作阴性对照, 0.1 mL 1% Triton-100X作为阳性对照。将混合物于37℃培养箱孵育30 min, 5 500 r/min离心10 min。使用分光光度计测定上清液的OD_{540 nm}值^[17]。

1.3.4 毒力基因转录表达测定

提取EGD-e和EGD-e Δhly RNA后, 使用反转录试剂盒反转录成cDNA, 用于qRT-PCR检测。其中以*Lm*的16S rRNA为内参基因, 按照试剂盒配置体系, 设定反应程序

参数测定*Lm*主要毒力基因转录水平的变化, 基因名称及引物详细序列见表2。

表2 qRT-PCR引物序列
Table 2 Primer sequences for qRT-PCR

基因名称	引物序列	片段长度/bp
16S	F: ACATCCTTTGACCACTCTGGA R: CAACATCTCACGACACGAGC	93
<i>prfA</i>	F: GGCTCTATTTGCGGTCAACT R: GCTATGTGCGATGCCACTT	128
<i>hly</i>	F: CAGCATTGATTTGCCAGGTAT R: TCACTGTAAGCCATTTCGTCA	179
<i>inlA</i>	F: TGTGGACGGCAAAGAAACA R: CCAACCAACAATGTGTGACC	96
<i>inlB</i>	F: GCAGGCATCTACAACTTCCA R: GCCATTTGCGGCTTCTCTA	104
<i>plcA</i>	F: ACTACAATGGTCCGAGTGTGAA R: CAGCATACTGACGAGGTGTGA	137
<i>plcB</i>	F: GCAAATGCCTGTTGTGATG R: CGTCAGTATTTGTCGGGTATC	112
<i>actA</i>	F: AGGCGGTAGACCAACATCTG R: CCCGCATTCTTGAGTGTTC	146
<i>srtA</i>	F: CGCAGTTCATCTGTAGACG R: AACGCATAGTTGTGTCTCCA	85
<i>sigB</i>	F: TTTGGATTGCCGCTTACC R: TCGGGCGATGGACTCTACTA	91

1.3.5 Caco-2细胞侵袭实验

胰酶消化下的Caco-2细胞, 使用含20%胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS) 的DMEM重悬, 准确计数后均匀平铺12孔板底部, 2.0×10^5 cells/孔, 放置于细胞培养箱 (37℃, 2.5% CO₂) 过夜。取对数生长期的细菌, 按感染复数为100:1接种于孔板中共培养2 h。每孔更换0.5 mL 200 $\mu\text{g/mL}$ 含20% FBS的DMEM配置的庆大霉素溶液, 于37℃培养箱中培养30 min以清除胞外菌。吸出庆大霉素溶液, 使用磷酸盐缓冲液 (phosphate buffer saline, PBS) 洗2次, 每孔加入1 mL 1% Triton X-100充分吹打, 收集于1.5 mL无菌离心管中, 稀释后取100 μL 涂布于BHI固体培养板中, 37℃培养箱中培养24 h后计数统计。

1.3.6 致死率测定

取对数生长期的EGD-e Δhly 6 000 r/min离心4 min, 使用无菌PBS重悬配置成浓度为 10^7 cells/mL菌悬液。3组6~8周龄小鼠, 每组8只, 每只腹腔注射200 μL 菌悬液, 其中对照组注射200 μL PBS, 每天记录小鼠死亡状况。

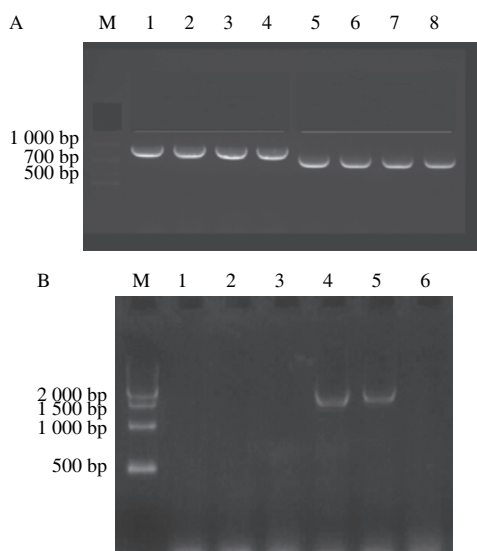
1.4 数据统计分析

本研究涉及的生物特性实验除生长曲线测定外, 均设置3个平行, 重复3次。所得数据使用GraphPad软件统计, 采用最小显著性差异法进行比较。

2 结果与分析

2.1 EGD-e Δhly 菌株的构建

2.1.1 上下游同源臂的扩增及连接PMD-19T



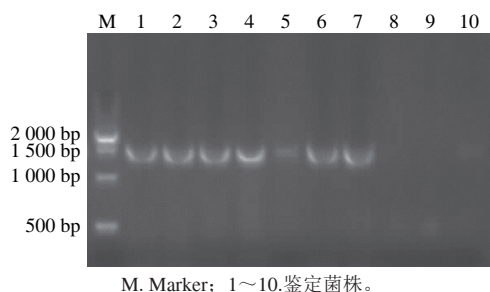
A. *hly* 5'片段和3'片段的PCR扩增结果: 1~4. *hly*上游片段克隆; 5~8. *hly*下游片段克隆; B. *hly* 5'片段与3'片段连接到pMD-19T后的菌落PCR鉴定结果: 1~6. 鉴定菌株。

图2 *hly*上下游片段的克隆

Fig. 2 Cloning of *hly* up-stream and down-stream sequence

使用*hly* 5'和*hly* 3'引物扩增同源臂PCR凝胶电泳结果如图2A所示, *hly* 5'片段条带位置在900 bp左右, *hly* 3'片段条带位置在700 bp左右。按照NCBI上提供的序列, 2个条带应分别为880、724 bp, 结果符合预期。图2B为*hly* 5'和*hly* 3'片段连接到pMD-19T后导入大肠杆菌的菌落PCR鉴定结果, 共挑取6个菌落, 其中4、5泳道出现阳性条带, 条带位置与预期目标条带1 604 bp相符。

2.1.2 PKSV7重组质粒的构建与电转化



M. Marker; 1~10. 鉴定菌株。

图3 pKSV7重组质粒鉴定

Fig. 3 Identification of pKSV7 recombinant plasmid by restriction enzyme digestion

构建好的pMD-19T与PKSV7质粒均使用限制性内切酶*Sal* I 和*Sam* I 进行双酶切, 使用T4连接酶连接切开的PKSV7与*hly*上下游重组片段得到重组的不含*hly*的重

组质粒PKSV7- Δhly , 经电转化将PKSV7- Δhly 载体导入到单核增生性李斯特菌感受态细胞内, 增菌后, 挑取单菌落进行PCR鉴定, 阳性克隆出现的条带大小理论值为1 604 bp。鉴定结果如图3, 鉴定实验使用引物*hly* 5'F和*hly* 3'R, 挑取的10个菌落有6个出现明显条带, 条带位置在1 600 bp左右, 符合预期。

2.1.3 同源重组菌的筛选



M. Marker; 1~9. 鉴定菌株; 10. 阳性对照。

图4 EGD-e Δhly 鉴定结果

Fig. 4 Identification of EGD-e Δhly by PCR

带有PKSV7- Δhly 质粒的EGD-e菌株, 经氯霉素抗性和温度筛选得到EGD-e Δhly 菌株, 菌株不含*hly*基因, 设计*hly*基因上引物*hly* KO F与*hly* KO R, 经PCR扩增、鉴定, 缺失菌株无条带, 而没有发生重组的菌株经扩增、凝胶电泳会出现对应的理论值为535 bp的条带。挑取9个单菌落, 进行PCR扩增鉴定, 结果如图4, 其中10泳道为阳性对照, 1、5、9泳道对应的菌株为目标菌株。

2.2 EGD-e Δhly 生长曲线

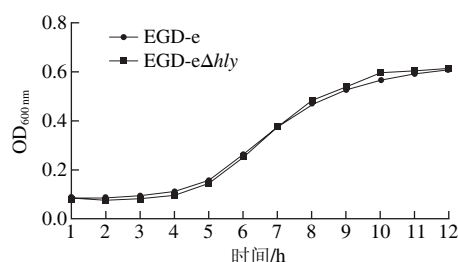


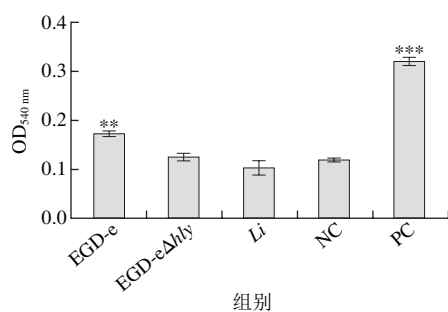
图5 EGD-e Δhly 生长曲线

Fig. 5 Growth curve of EGD-e Δhly

如图5所示, EGD-e Δhly 与EGD-e在过夜培养, 1:100接菌37℃、200 r/min摇床培养的条件下, 生长曲线基本重合, 前3 h为生长初期, 后经历对数期, 并在10 h到达稳定期, 此时OD_{600 nm}约为0.61, 各时期的生长速率基本一致。说明*hly*基因的缺失对EGD-e的生长不造成影响。

2.3 EGD-e Δhly 溶血活性

*hly*基因编码溶血素蛋白LLO, 是参与EGD-e溶血效应的基因, 使用溶血实验验证, 实验过程中设置的阴性对照OD_{540 nm}为0.118, 与Li、EGD-e Δhly 无显著性差异 ($P>0.05$), EGD-e与阴性对照有显著性差异。



NC.阴性对照; PC.阳性对照; *.在 $P<0.1$ 条件下差异显著; **.在 $P<0.05$ 条件下差异显著; ***.在 $P<0.01$ 条件下差异显著。下同。

图6 溶血实验

Fig. 6 Hemolysis assay

2.4 SYBR Green荧光染料法毒力基因qRT-PCR

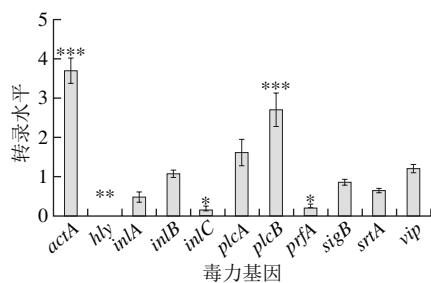


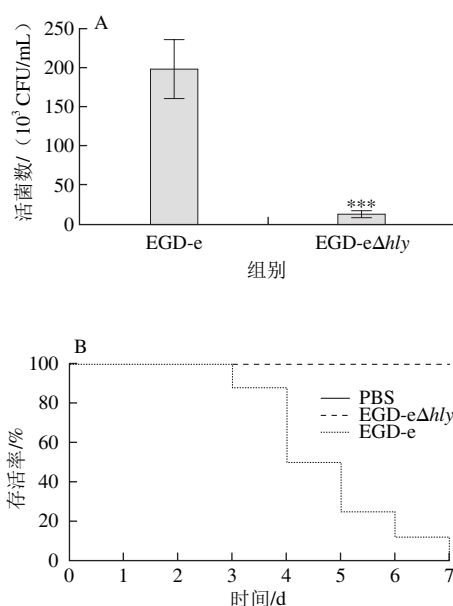
图7 毒力基因qRT-PCR

Fig. 7 mRNA expression levels of virulence genes assayed with qRT-PCR

如图7所示,以野生株EGD-e基因表达水平为对照,将对照组每个目的基因转录水平设为1,则与野生株EGD-e比,突变株EGD-eΔhly目的基因转录水平大于1为表达上调,反之则为下调。其中hly基因信号值比较低,与对照组有显著性差异($P<0.001$),验证hly基因成功敲除,同时hly敲除还导致inlC和prfA基因的下调,数值分别降为0.19和0.24,下降了81%和76%。相反的,基因actA、plcB表现上调,与对照组有显著性差异($P<0.001$),表达量分别提高了2.7倍和1.8倍。

2.5 Caco-2细胞侵袭实验与小鼠致死率

EGD-eΔhly菌株细胞侵袭实验结果如图8A所示,EGD-eΔhly小鼠致死结果如图8B, hly基因敲除后,细胞实验检测到的菌落显著降低,在腹腔注射200 μL 1.0×10^7 cells/mL条件下,其致死结果与对照组(PBS注射组)一致,均未出现小鼠死亡现象。而EGD-e注射组在第3天出现小鼠死亡,至第7天死亡率达100%,大部分死亡发生在注射后的第3、4、5天。说明hly基因敲除后,EGD-e的毒性下降。hly编码的蛋白LLO能够作用于包裹细菌的囊泡,使细菌从囊泡逃逸进入宿主细胞质以扩散增殖^[18]。失去hly基因的EGD-e LLO蛋白不能正常表达,细菌不能从囊泡中逃逸并转染其他细胞,毒性大大降低,小鼠的死亡率降低。



A.细胞侵袭效率; B.小鼠存活率(其中PBS组小鼠存活率始终为100%)。

图8 EGD-eΔhly与EGD-e的毒力鉴定

Fig. 8 Identification of virulence of EGD-eΔhly and EGD-e

3 讨论

利用同源重组技术构建缺失菌株,是实验室研究基因功能的常用手段。科研人员使用该方法已成功构建Lm inlA、inlB、actA、prfA等基因缺失菌株^[19-20]。本研究通过构建带有hly基因上下游片段的质粒利用同源重组删除Lm染色体上约1 600 bp hly基因序列,成功构建hly缺失菌株EGD-eΔhly。生物特性研究证明缺失菌株的生长不受影响而毒力大大降低,表现为细胞侵袭实验中检测到的细菌数量下降约90%,而且在较高浓度(1.0×10^7 cells/mL)腹腔注射条件下不表现出动物致死现象。有研究^[21]使用山羊体内分离的Lm构建hly基因缺失菌株,结果显示与野生型相比敲除菌株的半数致死量(LD₅₀)从 1.47×10^4 cells/mL上升至 2.15×10^9 cells/mL,毒力降低,与本实验相符。缺失菌株毒力的下降表明它对人和动物的致病性降低,为研制疫苗以预防李斯特疾病和或者作为疫苗载体提供研究基础^[22]。

Lm有多个毒力因子共同表现Lm毒性,其中由hly编码的LLO是一种成孔毒素,与菌体从逃逸囊泡进入胞质有关,是细菌得以在胞液内增殖的先决条件^[23]。本研究对hly基因敲除后其他主要毒力基因的转录水平的变化做了初步探索。其中inlC和prfA基因表现为下调,actA、plcB表现为上调。PrfA是Lm绝大多数毒力基因(包括prfA本身)的转录表达的调节蛋白^[24-25],该基因的低转录可能对其他毒力基因的转录表达造成影响。本实验中出现inlC基因的下调。inlC编码的蛋白InlC属内化素家族^[26],能够通

过减轻皮质张力,使质膜形成突起,从而促进 Lm 在细胞间的传播^[27],而 hly 基因的缺失,进入囊泡内的菌体不能复制逃逸,可能不需要更多的InlC以促进细菌向邻近细菌的转染而降低转录水平。 $plcA$ 、 $plcB$ 基因与 hly 基因的正常表达在细菌逃逸过程中是必须的,研究证明在缺乏LLO时, $plcB$ 基因表达的蛋白PC-PLC对于细胞二级双膜空泡的消散是必不可少的^[28]。 hly 基因缺失,可能会出现 $plcB$ 基因转录上调以增强细菌逃逸。 $actA$ 基因编码一种肌动蛋白,已证明与 Lm 进入细胞相关^[29],其上调的原因还不明确。迄今为止鉴定出的李斯特菌的毒力调节蛋白仅有PrfA,但明显的细菌各个毒力因子间的相互联系比较复杂,还需要进一步研究。

参考文献:

- [1] 兰欣怡,李发弟,王加启,等.生鲜乳中单核细胞增生李斯特菌的研究进展[J].食品科学,2014,35(19):318-323. DOI:10.7506/spkx1002-6630-201419063.
- [2] 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):557-562.
- [3] MCCOLLUM J T, CRONQUIST A B, SILK B J, et al. Multistate outbreak of listeriosis associated with cantaloupe[J]. New England Journal of Medicine, 2013, 369(10): 944-953. DOI:10.1056/NEJMoa1215837.
- [4] COSSART P, TOLEDOARANA A. *Listeria monocytogenes*, a unique model in infection biology: an overview[J]. Microbes & Infection, 2008, 10(9): 1041-1050. DOI:10.1016/j.micinf.2008.07.043.
- [5] VÁZQUEZ-BOLAND J A, KUHN M, BERCHE P, et al. *Listeria pathogenesis* and molecular virulence determinants[J]. Clinical Microbiology Reviews, 2001, 14(3): 584-640. DOI:10.1128/CMR.14.3.584-640.2001.
- [6] KANKI M, NARUSE H, TAGUCHI M, et al. Characterization of specific alleles in InlA and PrfA of *Listeria monocytogenes*, isolated from foods in Osaka, Japan and their ability to invade Caco-2 cells[J]. International Journal of Food Microbiology, 2015, 211: 18-22. DOI:10.1016/j.ijfoodmicro.2015.06.023.
- [7] LEBRETON A, STAVRU F, COSSART P. Organelle targeting during bacterial infection: insights from *Listeria*[J]. Trends in Cell Biology, 2015, 25(6): 330-338. DOI:10.1038/nature06479.
- [8] 王彬,倪宏波.单核细胞增生李斯特菌毒力因子研究进展[J].黑龙江八一农垦大学学报,2008,20(2):62-67.
- [9] BAHEY-EL-DIN M, CASEY P G, GRIFFIN B T, et al. *Lactococcus lactis*-expressing listeriolysin O (LLO) provides protection and specific CD8⁺ T cells against *Listeria monocytogenes* in the murine infection model[J]. Vaccine, 2008, 26(41): 5304-5314. DOI:10.1016/j.vaccine.2008.07.047.
- [10] HEUCK A P, HOTZE E M, TWETEN R K, et al. Mechanism of membrane insertion of a multimeric β -barrel protein[J]. Molecular Cell, 2000, 6(5): 1233-1242. DOI:10.1016/S1097-2765(00)00119-2.
- [11] RIBET D, HAMON M, GOUIN E, et al. *Listeria monocytogenes* impairs SUMOylation for efficient infection[J]. Nature, 2010, 464: 1192-1195. DOI:10.1038/nature08963.
- [12] DANCZ C E, HARAGA A, PORTNOY D A, et al. Inducible control of virulence gene expression in *Listeria monocytogenes*: temporal requirement of listeriolysin O during intracellular infection[J]. Journal of Bacteriology, 2002, 184(21): 5935-5945. DOI:10.1128/JB.184.21.5935-5945.2002.
- [13] MACIAG P C, RADULOVIC S, ROTHMAN J. The first clinical use of a live-attenuated *Listeria monocytogenes* vaccine: a phase I safety study of Lm-LLO-E7 in patients with advanced carcinoma of the cervix[J]. Vaccine, 2009, 27(30): 3975-3983. DOI:10.1016/j.vaccine.2009.04.041.
- [14] BAHEYELDIN M, CASEY P G, GRIFFIN B T, et al. Expression of two antigens (P60 and LLO) in and examination for use as live vaccine vectors[J]. 2010, 59: 904-912. DOI:10.1099/jmm.0.018770-0.
- [15] CZUCZMAN M A, FATTOUH R, RIJN J M V, et al. *Listeria monocytogenes* exploits efferocytosis to promote cell-to-cell spread[J]. Nature, 2014, 509: 230-234. DOI:10.1038/nature13168.
- [16] SIVARANIANI M, GOWRISHANKAR S, KAMALADEVI A, et al. Morin inhibits biofilm production and reduces the virulence of *Listeria monocytogenes*: an *in vitro* and *in vivo* approach[J]. International Journal of Food Microbiology, 2016, 237: 73-82. DOI:10.1016/j.ijfoodmicro.2016.08.021.
- [17] LIAO W Z, CHEN L Y, MA X, et al. Protective effects of kaempferol against reactive oxygen species-induced hemolysis and its antiproliferative activity on human cancer cells[J]. European Journal of Medicinal Chemistry, 2016, 114: 24-32. DOI:10.1016/j.ejmech.2016.02.045.
- [18] SCHNUPF P, PORTNOY D A. Listeriolysin O: a phagosome-specific lysin[J]. Microbes & Infection, 2007, 9(10): 1176-1187. DOI:10.1016/j.micinf.2007.05.005.
- [19] 刘武康,陈国薇,吴嫚,等. *inlA*和 $inlB$ 基因缺失对单核细胞增生性李斯特菌侵袭HT29结肠癌细胞的影响[J].食品科学,2016,37(23):166-172. DOI:10.7506/spkx1002-6630-201623028.
- [20] 丁承超,曾海娟,钟菲菲,等.双基因敲除减毒单增李斯特菌($\Delta actA/\Delta inlB$)的构建及其生物学初步鉴定[J].现代食品科技,2016,32(7):66-71. DOI:10.13982/j.mfst.1673-9078.2016.7.011.
- [21] 郭亮,陈国薇,谢曼曼,等.单增李斯特菌 $prfA$ 基因缺失菌株的构建及其生物学特性鉴定[J].食品科学,2017,38(10):12-17.
- [22] YIN Y, ZHANG C, DONG H, et al. Protective immunity induced by a LLO-deficient *Listeria monocytogenes*[J]. Microbiology and Immunology, 2010, 54(4): 175-183. DOI:10.1111/j.1348-0421.2010.00211.x.
- [23] 周云,潘蕾,郝春秋,等.单增李斯特菌作为疫苗载体的研究进展[J].中国免疫学杂志,2011,27(12):1132-1134. DOI:10.3969/j.issn.1000-484X.2011.12.19.
- [24] BIRMINGHAM C L, CANADIEN V, KANIUK N A, et al. Listeriolysin O allows *Listeria monocytogenes* replication in macrophage vacuoles[J]. Nature, 2008, 451: 350-354. DOI:10.1038/nature06479.
- [25] TOLEDO-ARANA A, DUSSURGET O, NIKITAS G, et al. The *Listeria* transcriptional landscape from saprophytism to virulence[J]. Nature, 2009, 459: 950-956. DOI:10.1038/nature08080.
- [26] 冯飞飞,张强,王莉,等.毒力基因调控蛋白PrfA促进单核细胞增生李斯特菌生物被膜的形成[J].微生物学通报,2011,38(9):1450-1457. DOI:10.13344/j.microbiol.china.2011.09.013.
- [27] 罗勤,周青春,邓克福,等.依赖PrfA转录调控的单核细胞增生李斯特菌毒力基因 $inlC$ 启动子结构特点的初步研究[J].微生物学报,2007,47(1):22-28. DOI:10.13343/j.cnki.wsxb.2007.01.006.
- [28] RAJABIAN T, GAVICHERLA B, HEISIG M, et al. The bacterial virulence factor InlC perturbs apical cell junctions and promotes cell-to-cell spread of *Listeria*[J]. Nature Cell Biology, 2009, 11(10): 1212-1218. DOI:10.1038/ncb1964.
- [29] GRÜNDLING A, GONZALEZ M D, HIGGINS D E. Requirement of the *Listeria monocytogenes* broad-range phospholipase PC-PLC during infection of human epithelial cells[J]. Journal of Bacteriology, 2003, 185(21): 6295-6307. DOI:10.1128/JB.185.21.6295-6307.2003.
- [30] YOSHIKAWA Y, OGAWA M, HAIN T, et al. *Listeria monocytogenes* ActA-mediated escape from 821 autophagic recognition[J]. Nature Cell Biology, 2009, 11(10): 1233-1240. DOI:10.1038/ncb1967.