

RsbV 基因缺失对单核细胞增生李斯特菌毒力的影响

张再超¹, 孟庆玲^{1*}, 乔军^{1*}, 陈创夫¹, 才学鹏², 杨丽红¹, 王为升¹, 蔡扩军¹

¹石河子大学动物科技学院预防兽医学重点实验室, 石河子 832003

²中国农业科学院兰州兽医研究所, 家畜疫病病原生物学国家重点实验室, 兰州 730046

摘要: 【目的】探讨 RsbV 基因缺失对单核细胞增生李斯特菌(LM)毒力的影响。【方法】运用基因重叠延伸 PCR(SOE-PCR)技术扩增出 LM-XS5 野毒株的 RsbV 基因缺失片段,然后用同源重组方法构建 RsbV 基因缺失株;通过肝脾细菌计数、LD₅₀的测定和毒力基因转录水平的检测(qRT-PCR),研究 LM 野毒株和缺失株在毒力上的差异。【结果】RsbV 基因缺失株 LD₅₀是野毒株的 10⁴倍($P < 0.01$);缺失株在小白鼠肝和脾内的载菌量均明显减少($P < 0.05$);实时荧光定量 PCR 检测结果发现,缺失株 4 个毒力因子的表达水平均显著低于野毒株($P < 0.05$);缺失株免疫小白鼠后对野毒株的攻毒具有良好的免疫保护作用。【结论】RsbV 对 LM 的 4 个毒力基因 inlA、LLO、PlcA 和 PrfA 的表达具有调控作用;RsbV 基因缺失株毒力明显减弱,但仍保留了较强的免疫原性。

关键词: 单核细胞增生李斯特菌, RsbV 基因缺失株, 毒力, 同源重组

中图分类号: R378 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2013)01-0059-07

单核细胞增生李斯特菌(*Listeria monocytogenes*, LM)是一种革兰氏阳性兼性厌氧杆菌,广泛存在于土壤、污水等环境中,为环境常在菌^[1]。作为一种胞内寄生的人兽共患病原菌,LM 可引起人和动物的多种疾病,是四大食源性致病菌之一^[2-3]。该菌不仅严重危害食品安全,同时给畜牧业也带来较大的威胁。

LM 可穿越宿主的主要生理屏障(肠屏障、血脑屏障和胎盘屏障),侵入机体后能在专职和非专职吞噬细胞(如上皮细胞、肝细胞及成纤维细胞等)中生存和繁殖,LM 在胞内寄生和细胞间扩散

的每一步均由特定的毒力因子调控^[4]。LM 编码与胞内寄生生活有关的毒力基主要集中在 2 个区域,即致病岛 1(LIPI-1)和致病岛 2(LIPI-2)^[5]。LIPI-1 主要包含 6 个基因,依次为 prfA、plcA、hly、mpl、actA、plcB;LIPI-2 又称为内化素小岛,包含编码富含亮氨酸重复序列的 2 个内化素亚族,亚族 1 的代表是由 inlA 和 inlB 基因编码的 inlA 和 inlB 多肽,亚族 2 是由相对分子质量较小的蛋白质组成^[6-7]。LM 首先通过 inlA、InlB 和 p60 蛋白等的黏附进入宿主细胞,这一过程是建立感染的前提^[8]。然后在 LLO、PI-PLC 和 pCopLC 协同作用下

基金项目: 国家自然科学基金(30960274);家畜疫病病原生物学国家重点实验室开放基金(KEYLAB200908);石河子大学高层次人才专项(RCZX200801)

* 通信作者。Tel: +86-993-2055036; E-mail: qj710625@yahoo.com.cn

作者简介: 张再超(1987-),男,山东郓城人,硕士研究生,主要从事病原分子生物学研究。E-mail: zhangzaichao@sina.cn

收稿日期: 2012-08-04; **修回日期:** 2012-10-22

裂解吞噬体膜,进入宿主细胞胞浆并在其中繁殖。位于细菌表面的 ActA 能聚集宿主细胞肌动蛋白,使 LM 在胞浆内运动并向临近细胞扩散^[9],从而完成其侵染和扩散过程。

LM 不仅毒力基因众多,调节机制也非常复杂,存在着多级调控系统。研究表明,LM 的毒力主要受到正调节因子(PrfA)、应答调控因子(VirR)^[10-12]和环境应激因子 SigmaB 因子的调控。其中 SigmaB 因子对 PrfA、inlA、inlB 和 LLO 等主要毒力因子均具有调控作用^[13-16]。SigmaB 基因位于 SigmaB 操纵子上,SigmaB 因子的活性又受到该操纵子上众多的 Rsb 基因编码的 Rsb 蛋白的调节,其中最重要的调节蛋白为 RsbV 和 RsbW。RsbW 又称“抗 SigmaB 因子蛋白”,RsbV 为“抗-抗 SigmaB 因子蛋白”^[17-18]。本实验中,为了探讨 RsbV 基因的缺失对 LM 毒力的影响,应用细菌同源重组技术构建了 LM RsbV 基因缺失株(LM-XS5-ΔRsbV),并研究了 RsbV 基因缺失后 LM 菌株毒力的影响。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒:大肠杆菌 (*Escherichia coli*) DH5α 由本实验室保存;LM 强毒株 LM-XS5 分离自新疆某羊场患李氏杆菌病的绵羊,由本实验室鉴定后保存,血清型为 1/2a 型;穿梭载体 pKSV7 由扬州大学朱国强教授馈赠;质粒载体 pMD18-T 购自 TaKaRa 公司。

1.1.2 主要试剂:Taq plus DNA 聚合酶、dNTPs、琼脂糖凝胶电泳回收试剂盒购自上海生物工程公司;细菌基因组 DNA 提取试剂盒购自诺维森公司;限制性核酸内切酶 (*Xba*I 和 *Pst*I)、AMV 逆转录酶和 SYBR Premix Ex TaqTM (TaKaRa Code: DRR420A) 购自大连宝生物 (TaKaRa) 公司;T4 DNA 连接酶购自 Promega 公司;青霉素 G 和氯霉素购自北京鼎国生物技术有限责任公司;试剂 BHI 培养基 (BactoTM Brain Heart Infusion) 购自 BD 公司。

1.1.3 实验动物:8 周龄的健康昆明系小白鼠由石河子大学实验动物中心提供。

1.1.4 引物:表 1 为本实验中所用到的引物,由北京华大基因公司合成。

表 1 研究中用到的 PCR 引物

Table 1 PCR primers used in this study	
Primer	Sequence (5'→3')
RsbV-SOEA	GCTCTAGAATGGAAGACGGAGTATCA
RsbV-SOEB	TTGTCATGCATTGTAGCCATCACTTCACCCCA TCTAAT
RsbV-SOEC	ATTAGATGGGGTGAAGTGATGGCTACAATGCA TGACAA
RsbV-SOED	CCACTGCAGATCTTCTGTTCTCGTCATC
ropB-sense	AGAACCGTGATGCAAACCTAT
ropB-anti-sense	GAACGTACCCATTTCACTCA
inlA-sense	ATGGAAAATCAACGACTCAAGCA
inlA-anti-sense	TTTGCGGAAGGTGCTGTACTATT
LLO-sense	ACTCTGGAGGATACGTTGCT
LLO-anti-sense	ATGGACCATGTGAAATGAGC
PlcA-sense	ATACCAGGGACGCACGAT
PlcA-anti-sense	GTTAAGATCCTCTTTAGCTCTGA
PrfA-sense	TTCAAGCGGAATAGCACATA
PrfA-anti-sense	ACCATTCTGCAATCTTAGGG
RsbV-jiance1	TGAGTTGCATGATGACTTTACGC
RsbV-jiance2	TTTCTAAGTCAAGCTTGTCCA

1.2 RsbV 基因缺失株 LM-XS5-ΔRsbV 的构建

1.2.1 RsbV 基因缺失片段的获得和穿梭重组质粒的构建:用细菌基因组 DNA 提取试剂盒提取 LM-XS5 的基因组 DNA,然后以基因组 DNA 为模板,用引物 RsbV-SOEA 和 RsbV-SOEB 扩增得到上游同源臂,用引物 RsbV-SOEC 和 RsbV-SOED 扩增得到下游同源臂。再以上游同源臂和下游同源臂为模板,用引物 RsbV-SOEA 和 RsbV-SOED 通过基因重叠延伸 PCR (SOE-PCR) 的方法获得 RsbV 基因缺失片段。将 RsbV 基因缺失片段连接到 pMD18-T 载体上,然后转染到 DH5α 中,送到华大基因测序。用 *Xba*I 和 *Pst*I 两种限制性内切酶酶切测序结果正确的含有 RsbV 基因缺失片段的重组质粒,然后回收酶切后的 RsbV 基因缺失片段,同时用 *Xba*I 和 *Pst*I 双酶切载体 pKSV7,最后用 T4 连接酶将酶切后的 RsbV 基因缺失片段和酶切后的 pKSV7 载体片段连接,获得电转用的重组穿梭质粒 pKSV7-ΔRsbV。

1.2.2 电转化和同源重组:用 BHI 培养基(含有青霉素 G)培养 LM-XS5,制备感受态细胞,然后用电转的方法(2.5 KV, 5 ms)将 pKSV7-ΔRsbV 转入 LM 感受态细胞中,通过 PCR 的方法进行鉴定,获得阳性转化子。将阳性转化子在 42℃ 和氯霉素的双重压力抗性下进行传代培养获得单交换的缺失株,然后再在 42℃ 无氯霉素抗性的条件下传代 15 代左右获得双交换的缺失株,双交换后的缺失株丧失了氯霉素抗性,

在传代的过程中用 PCR 的方法进行鉴定和监测。

1.3 缺失株 LM-XS5- Δ RsbV 的鉴定

用检测引物 RsbV-jiance1 和 RsbV-jiance2 进行

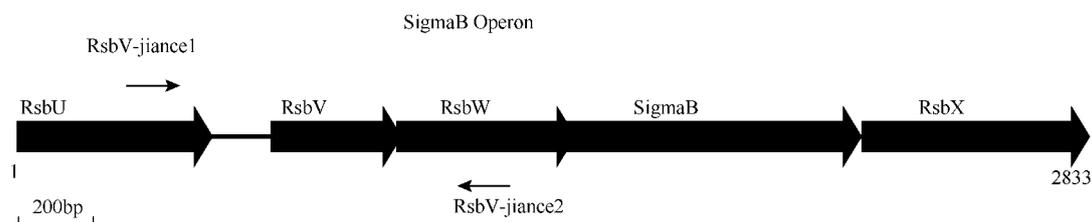


图1 RsbV 基因缺失片段示意图

Fig.1 Arrangement diagram of the deletion of RsbV gene. The missing part is marked with red color. RsbV-jiance1 and RsbV-jiance2 are the primers used to detect the deletion of RsbV gene.

1.4 野毒株 LM-XS5 和缺失株 LM-XS5- Δ RsbV 的 LD₅₀ 的测定

将野毒株 LM-XS5 和缺失株 LM-XS5- Δ RsbV 均在 37°C 250 r/min 条件下培养到 OD₆₀₀ 约为 0.7 时,分别离心收集细菌,用 PBS 清洗 2 遍,然后用 PBS 将细菌悬液进行梯度稀释。通过预实验确定野毒株 LM-XS5 和缺失株 LM-XS5- Δ RsbV 的绝对致死剂量 (Absolute lethal dose, LD₁₀₀) 和最小致死剂量 (Minimal lethal dose, MLD)。将稀释后的菌液腹腔注射 8 周龄昆明系小鼠,每个梯度 10 只,每只 100 μ L,连续观察 14 d,统计死亡数,利用寇氏法计算对小鼠的 LD₅₀。计算公式: LD₅₀ = lg - 1 [X_m - i (\sum P - 0.5)]。式中: X_m 为最大剂量的对数; p 为各组动物的死亡率 (以小数表示); \sum P 为各组动物死亡率的总和 (P₁ + P₂ + P₃...); i 为组间距 (相邻两组对数剂量的差值)。

1.5 小鼠肝脏和脾脏载菌量测定

将 8 周龄的昆明系健康小鼠分成两组,每组 5 只。将 LM-XS5 和 LM-XS5- Δ RsbV 分别接种到 BHI 培养基中过夜培养,然后按 1:100 分别接种到新的 BHI 培养基中培养,当其 OD₆₀₀ 值为 0.3 时,分别每组中的每只小鼠腹腔注射 0.1mL 的菌液 (亚致死量)。注射菌液的时刻 t = 0 (day),分别在 t = 2, 4, 6, 8, 10d 时每组取出 1 只小鼠,在无菌条件下取出它们的肝和脾,研磨均匀充分后进行系列稀释,然后涂布到 BHI 固体培养基上 37°C 条件下培养 48h,进行细菌计数;实验重复 3 次,取平均值作为其载菌量。

1.6 重组菌 LM-XS5- Δ RsbV 对小鼠的免疫保护实验

将 8 周龄的昆明系小鼠随机分成 A 和 B 两

PCR 扩增鉴定 (图 1),野毒株预期扩增的片段为 807 bp,缺失株预期扩增的片段为 479 bp。回收扩增得到的 PCR 产物进行测序鉴定。

组,每组 10 只。A 组为实验组,首次免疫为每只小鼠腹腔注射 0.1 mL 的 1 \times 10⁴ CFU/mL 的 LM-XS5- Δ RsbV 菌液,首次免疫后的第 7 天用相同量菌液进行二免;B 组为对照组,用等量的 PBS 进行腹腔注射。二免后第 7 天,对 A 组和 B 组的小鼠同时进行攻毒,每只小鼠腹腔注射 0.1 mL 的 1 \times 10⁷ CFU/mL 的 LM-XS5 菌液。攻毒后的 14 d 时间内,记录 A 组和 B 组的小鼠死亡情况。

1.7 毒力基因表达水平的检测 (qRT-PCR)

根据 GenBank 上登录的序列设计检测 ropB (管家基因)、inlA、actA、PlcA、PrfA、LLO 六个基因的 qRT-PCR 引物 (表 1)。将 LM-XS5 和 LM-XS5- Δ RsbV 于 BHI 培养基中培养至 OD₆₀₀ 值为 0.6 时用 TrizoL 按照说明书的步骤分别提取细菌的总 RNA,然后用随机引物和 TaKaRa 公司的 AMV 逆转录酶进行逆转录反应。将 RT 产物稀释 10 倍,采用 SYBR Premix Ex TaqTM 试剂盒 (TaKaRa Code: DRR420A),在 Bio-Rad Chromo 4 仪器上进行 RT-PCR 检测。反应体系为 20 μ L,具体实验步骤按照说明书进行,每个样品重复 3 次。以 LM-XS5- Δ RsbV 为实验组,LM-XS5 为对照组,按照 2- $\Delta\Delta$ CT 的方法计算各个基因的相对表达量,然后进行数据分析。

2 结果

2.1 RsbV 基因缺失片段的融合

PCR 扩增后用 1.0% 琼脂糖凝胶电泳,分别获得长为 1052 bp 和 1089 bp 的特异性片段,与预期结

果一致。将这两个片段回收后,以它们为模板进行基因重叠延伸 PCR (SOE-PCR) 扩增,用 1.0 % 琼脂糖凝胶电泳得到长为 2141 bp 的片段,与预期结果一致,表明成功缺失了 RsbV 基因。

2.2 重组穿梭质粒 pKSV7- Δ RsbV 鉴定

双酶切鉴定结果表明,重组穿梭质粒 pKSV7- Δ RsbV 构建成功。

LM-XS5	TGAGTTGCAT GATGACTTTA CGCTTATTG TATTAAGCGA ACTAAATAAG AAGAAGTGAA GACGTACCTC ATTCTTTAGA GAGCATTAC TGGTTGGTGA
LM-XS5- Δ RsbV	TGAGTTGCAT GATGACTTTA CGCTTATTG TATTAAGCGA ACTAAATAAG AAGAAGTGAA GACGTACCTC ATTCTTTAGA GAGCATTAC TGGTTGGTGA
LM-XS5	GTAACGTAT TTAAGAGTG GAGCGTTTT ATTTTGAAT GTTTAATTT TATTAGTTAG GGTAAAATCG ACAGTATAC TAAAATTAGA TGGGTGAAG
LM-XS5- Δ RsbV	GTAACGTAT TTAAGAGTG GAGCGTTTT ATTTTGAAT GTTTAATTT TATTAGTTAG GGTAAAATCG ACAGTATAC TAAAATTAGA TGGGTGAAG
LM-XS5	GATGAATAT TAGTATAGAA ATAAAAGAAC GTGATACTGA CCACATAGAC ATATTTGTTG CTGGGGAGAT CGATGCTTAT ACAGCGCCAA AGGTAAAAGA
LM-XS5- Δ RsbV	GATG
LM-XS5	AGCACTTGAA GTATATCAAG TAAAAGAGGG TATAGTACTT CGAATCGATT TAACAGAAGT AAGTTATATG GATAGTACCG GATTAGCGT ATTTGTAGGA
LM-XS5- Δ RsbV	
LM-XS5	CGCTTTAAAA GCTTACGTCA ACGCCAAAGT GAACTGTGCT TGTTTGGTIT AAGCGACCGA CTTTTCCGAT TGTTTGAAT CACAGGATTG TCAGATATCA
LM-XS5- Δ RsbV	
LM-XS5	TTGTAATCAA AAATGTAGAG GGTGAAATGA ATGGCTACAA TGCATGACAA AATTACATTA CAACCTCCTG CCAAGCCTGA ATATGTTAGT TTAGGTAGAC
LM-XS5- Δ RsbV	GCTACAA TGCATGACAA AATTACATTA CAACCTCCTG CCAAGCCTGA ATATGTTAGT TTAGGTAGAC
LM-XS5	TTTCATTATC AGGAATTGCA AGTCGCGCAG GATTTTCTTA TGAAGCAATT GAAGATTGGA AAATAGCCGT AAGTGAAGCC ATCACTAATT CTGTAAGACA
LM-XS5- Δ RsbV	TTTCATTATC AGGAATTGCA AGTCGCGCAG GATTTTCTTA TGAAGCAATT GAAGATTGGA AAATAGCCGT AAGTGAAGCC ATCACTAATT CTGTAAGACA
LM-XS5	CGCATTAAA GGAGAAGATG ATGGTGAGAT TACAGTAGAA TATCTTATT ATGAAGACAA ATTAGAAGTT CGTGTTTCTG ATAATGGAAC AAGCTTCGAC
LM-XS5- Δ RsbV	CGCATTAAA GGAGAAGATG ATGGTGAGAT TACAGTAGAA TATCTTATT ATGAAGACAA ATTAGAAGTT CGTGTTTCTG ATAATGGAAC AAGCTTCGAC
LM-XS5	TTAGAAA
LM-XS5- Δ RsbV	TTAGAAA

图 2 LM-XS5- Δ RsbV 与 LM-XS5 的测序

Fig. 2 Comparison diagram of Sequencing results between LM-XS5- Δ RsbV and LM-XS5.

2.4 野毒株 LM-XS5 和缺失株 LM-XS5- Δ RsbV 的 LD₅₀ 的测定

野毒株 LM-XS5 的 LD₅₀ 约为 10^{5.56} CFU, 缺失株 LM-XS5- Δ RsbV 的 LD₅₀ 为 10^{9.81} CFU (表 2)。结果

2.3 缺失株 LM-XS5- Δ RsbV 的鉴定

电转后得到的阳性转化子可同时扩增得到 807 bp 和 479 bp 的片段;对于传代后得到的单交换的菌株,依然具有氯霉素抗性;对于传代后的双交换的缺失株 LM-XS5- Δ RsbV, 失去氯霉素抗性,PCR 扩增结果只有一条 479 bp 的片段。测序结果表明,已经成功构建了 LM-XS5- Δ RsbV 缺失株(图 2)。

表明,RsbV 基因的缺失使得 LM 毒力明显下降 ($P < 0.01$),提示 RsbV 因子对 LM 毒力具有重要的调控作用。

表 2 LM-XS5 和 LM-XS5- Δ RsbV 对小白鼠 LD₅₀ 的测定结果

Table 2 LD₅₀ measurement of LM-XS5 and LM-XS5- Δ RsbV for mice

Dose	LM-XS5 (1×10^5)					LM-XS5- Δ RsbV (1×10^9)				
CFU / mouse	16.60	8.19	4.05	2.08	1.04	26.44	13.20	6.49	3.31	1.64
Mortality	10/10	9/10	6/10	2/10	0/10	10/10	8/10	5/10	2/10	0/10
LD ₅₀	10 ^{5.56} CFU					10 ^{9.81} CFU				

2.5 小鼠肝脏和脾脏的细菌计数结果

病理解剖发现,注射野毒株 LM-XS5 组的小鼠的脾脏明显肿大,而 LM-XS5- Δ RsbV 注射组小鼠脾脏基本正常。通过对两组小鼠肝和脾的细菌平板计数结果分析,发现在各个时间点注射 LM-XS5 组的

小鼠肝和脾载菌量要高于注射 LM-XS5- Δ RsbV 组肝和脾载菌量。在 0 至 6 天的过程中,肝和脾内的细菌数量呈上升趋势,并且肝和脾内的细菌含量都较多;在第 8 天和第 10 天的时候,两组小白鼠中的肝和脾内的细菌含量均明显的减少 ($P < 0.05$) (图

3)。

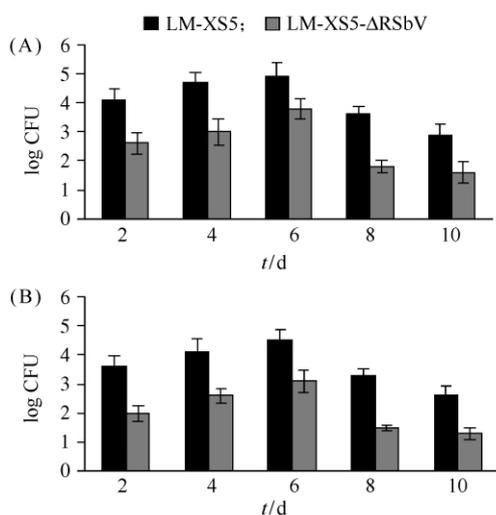


图3 肝脏和脾脏的细菌计数

Fig. 3 Bacterial count of LM-XS5 and LM-XS5-ΔRsbV in the spleens and livers of mice infected by mice Intraperitoneal infection. A: Liver; B: Spleen. The experiments were repeated for three times. The error bars indicate standard deviations.

2.6 免疫保护实验

A组(缺失株 LM-XS5-ΔRsbV)两次免疫后小鼠存活了9只,保护率为90.0%。B组的小鼠只有1只存活,证实 LM-XS5-ΔRsbV 对小鼠具有良好的免疫保护效果(图4)。

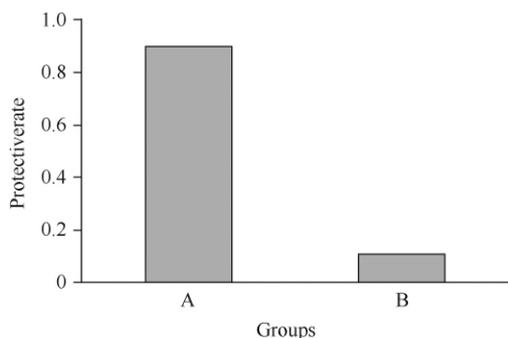


图4 重组菌 LM-XS5-ΔRsbV 对小白鼠的免疫保护

Fig. 4 The protective efficacy of LM-XS5-ΔRsbV for mice.

2.7 毒力基因转录水平的 qRT-PCR 检测结果

与 LM-XS5 相比, LM-XS5-ΔRsbV 的 LLO、PlcA 和 PrfA 3 个基因的表达量均明显下降(图5),存在极显著差异($P < 0.01$); inlA 的表达量有所下降,存在显著性差异($P < 0.05$); actA 的表达量不存在显著性差异($P > 0.05$)。

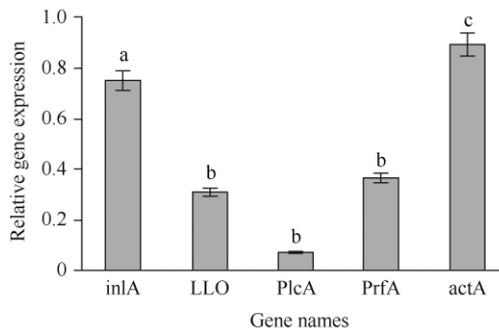


图5 五个毒力基因的相对表达量

Fig. 5 Relative expression of five virulence genes. Relative expression of each gene is calculated by the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. LM-XS5-ΔRsbV is the experimental group and LM-XS5 is the control group. Error bars represent standard deviations from three independent experiments. a: significant difference; b: highly significant difference; c: no significant difference.

3 讨论

LM 作为一种重要的人兽共患病原体不仅给畜牧业带来较大的经济损失,同时也严重威胁公共卫生安全。作为一种胞内寄生的模式菌,阐明 LM 的致病的分子机制对于研发具有应用前景的 LM 弱毒疫苗和活疫苗载体具有十分重要的意义。目前,尽管国内外已成功构建了针对 LM 毒力基因的缺失株,然而单一的毒力基因缺失株仍然对人和动物具有较强的致病性。基于这种现状,研究 LM 毒力因子调控网络中具有重要的意义。本实验成功构建了 RsbV 基因缺失株 LM-XS5-ΔRsbV, 它的 LD_{50} 比野毒株 LM-XS5 高出了 4 个数量级,说明 LM-XS5-ΔRsbV 的毒力明显下降。通过小鼠的肝脾细菌计数实验,发现在各个时间点缺失株 LM-XS5-ΔRsbV 在肝脾内的细菌数数量均明显少于 LM-XS5 的细菌数量($P < 0.05$),该实验进一步证实了 RsbV 基因的缺失使得该菌对小鼠的致病力明显减弱。小鼠的免疫保护实验表明,缺失株 LM-XS5-ΔRsbV 对同血清型的强毒株 LM-XS5 的侵袭具有良好的免疫保护效果。

目前关于 RsbV 因子功能大多是以革兰氏阳性菌—枯草芽胞杆菌为模型来研究的^[19], 现有的研究表明,在体外应激状态下, RsbV 因子在 LM 不同环境适应性生存中发挥了重要的调节作用^[20]。研究发现,在适宜条件下,枯草芽胞杆菌 RsbV 被

RsbW 磷酸化后失活, RsbW 与 SigmaB 因子结合在一起形成复合物, 使 SigmaB 因子失活; 压力环境中, RsbV 去磷酸化后与 RsbW 结合, 使 RsbW 失活, 从而使 SigmaB 因子被释放出来发挥适应外界环境的调控作用。然而, 枯草芽胞杆菌没有致病性, 而 LM 具有致病性, LM 的 RsbV 因子的功能以及 sigmaB 的开关调节机制是否与枯草芽胞杆菌完全相同目前尚不清楚。作为李斯特属中唯一具有致病性的 LM, 开展 LM RsbV 因子和 SigmaB 因子毒力调控研究可为其他具有致病性的革兰氏阳性菌提供了良好的模型。在本实验中, LD₅₀ 的测定结果和肝脾载菌量结果均证实 RsbV 基因缺失株 (LM-XS5-ΔRsbV) 毒力明显低于野毒株 LM-XS5, 提示 RsbV 因子对 LM 体内致病力也同样具有重要的调节作用。qRT-PCR 检测结果表明, RsbV 因子缺失后导致 LM 的主要毒力基因 *inlA*、*LLO*、*PlcA* 和 *PrfA* 的表达量均有所下降, 提示 RsbV 因子对以上 4 种毒力因子的表达均具有调控作用, 该结果与小鼠体内研究结果一致。由于 RsbV 因子对 SigmaB 因子具有直接调节作用, 因此推测 RsbV 因子对 LM 主要毒力基因的调控可能是通过 SigmaB 因子来间接实现的。

总之, 本实验通过构建 LM 的 RsbV 基因缺失株证明了 RsbV 基因对 LM 毒力具有重要的调控作用, LM-XS5-ΔRsbV 株毒力明显减弱, 但仍保持了较好的免疫原性, 这为 LM 基因缺失疫苗和活疫苗载体的研发奠定了良好的基础。

参考文献

- [1] Swaminathan B, Gerner-Smidt P. The epidemiology of human listeriosis. *Microbes and Infection*, 2007, 9 (10): 1236-1243.
- [2] Allerberger F, Wagner M. Listeriosis: a resurgent foodborne infection. *Clinical Microbiology and Infection*, 2010, 16 (1): 16-23.
- [3] Cabanes D, Dehoux P, Dussurget O, Frangeul L, and Cossart P. Surface proteins and the pathogenic potential of *Listeria monocytogenes*. *Trends in Microbiology*, 2002, 10 (5): 238 - 245.
- [4] Dussurget O, Pizarro-Cerda J, Cossart P. Molecular determinants of *Listeria monocytogenes* virulence. *Annual Reviews Microbiology*, 2004, 58: 587-610.
- [5] Kreft J, Vázquez-Boland JA, Altrock S, Dominguez-Bernal G, Goebel W. Pathogenicity islands and other virulence elements in *Listeria*. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 2002, 264 (2): 109-125.
- [6] Pizarro-Cerdá J, Jonquières R, Gouin E, Vandekerckhove J, Garin J, Cossart P. Distinct protein patterns associated with *Listeria monocytogenes* *InlA*- or *InlB*-phagosomes. *Cellular Microbiology*, 2002, 4 (2): 101-115
- [7] Meng Q, Qiao J, Cai X, Jing Z, Jia G. Molecular characteristics of *InlB* protein of *Listeria monocytogenes* wild strain and its expression and purification. *Acta Microbiologica Sinica*, 2007, 47 (6): 1098-1101. (in Chinese)
孟庆玲, 乔军, 才学鹏, 景志忠, 贾桂珍. 单核细胞增生性李氏杆菌野毒株 *InlB* 的分子特征及其表达和纯化研究. *微生物学报*, 2007, 47 (6): 1098-1101.
- [8] Cossart P, Pizarro-Cerda J, Lecuit M. Invasion of mammalian cells by *Listeria monocytogenes*: functional mimicry to subvert cellular functions. *Trends in Cell Biology*, 2003, 13 (1): 23-31.
- [9] Drevets DA, Leenen PJM, Greenfield RA. Invasion of the central nervous system by intracellular bacteria. *Clinical Microbiology Reviews*, 2004, 17 (2): 323-347.
- [10] Kazmierczak MJ, Mithoe SC, Boor KJ, Wiedmann M. *Listeria monocytogenes* σ^B regulates stress response and virulence functions. *Journal of Bacteriology*, 2003, 185 (19): 5722-5734.
- [11] Kazmierczak MJ, Wiedmann M, Boor KJ. Contributions of *Listeria monocytogenes* *sigmaB* and *PrfA* to expression of virulence and stress response genes during extra- and intracellular growth. *Microbiology*, 2006, 152 (6): 1827-1838.
- [12] Zhou QC, Feng FF, Wang L, Feng XQ, Xiaojiao Yin XJ, Luo Q. Virulence Regulator *PrfA* is Essential for Biofilm Formation in *Listeria monocytogenes* but not in *Listeria innocua*. *Current Microbiology*, 2011, 63 (2): 186-192.
- [13] Nadon CA, Bowen BM, Wiedmann M, Boor KJ. *SigmaB* contributes to *PrfA*-mediated virulence in *Listeria monocytogenes*. *Infection and Immunity*, 2002, 70 (7): 3948-3952.
- [14] Ollinger J, Bowen B, Wiedmann M, Boor KJ, Bergholz TM. *Listeria monocytogenes* σ^B modulates *PrfA*-mediated virulence factor expression. *Infection and Immunity*, 2009, 77 (5): 2113-2124.
- [15] Kim H, Marquis H, Boor KJ. σ^B contributes to *Listeria monocytogenes* invasion by controlling expression of *inlA*

- and *inlB*. *Microbiology (UK)*, 2005, 151 (10) : 3215-3222.
- [16] Zhang Q, Feng YY, Deng LF, Feng FF, Wang L, Zhou QC, Luo Q. SigB plays a major role in *Listeria monocytogenes* tolerance to bile stress. *International Journal of Food Microbiology*, 2011, 145 (1) : 238-243.
- [17] Hain T, Hossain H, Chatterjee SS, Machata S, Volk U, Wagner S, Brors B, Haas S, Kuenne CT, Billion A, Otten S, Pane-Farre J, Engelmann S, Chakraborty T. Temporal transcriptomic analysis of the *Listeria monocytogenes* EGD-e σ^B regulon. *BMC Microbiology*, 2008, 8 (20) .
- [18] Ferreira A, Gray M, Wiedmann M, Boor KJ. Comparative genomic analysis of the sigB operon in *Listeria monocytogenes* and in other Gram-positive bacteria. *Current Microbiology*, 2004, 48 (1) : 39-46.
- [19] Voelker U, Voelker A, Haldenwang WG. Reactivation of the *Bacillus subtilis* anti-sigmaB antagonist, RsbV, by stress- or starvation-induced phosphatase activities. *Jouranal of Bacteriology*, 1996, 178 (18) :5456-5463.
- [20] Chaturongakul S, Boor KJ. RsbT and RsbV contribute to σ^B dependent survival under environmental, energy, and intracellular stress conditions in *Listeria monocytogenes*. *Applied and Environmental Microbiology*, 2004, 70 (9) : 5349-5356.

Effects of the deletion of RsbV gene on virulence of *Listeria monocytogenes*

Zaichao Zhang¹, Qingling Meng^{1*}, Jun Qiao^{1*}, Chuangfu Chen¹, Xuepeng Cai², Lihong Yang¹, Weisheng Wang¹, Kuojun Cai¹

¹Key Laboratory of the High Incidence of Local and National Disease of Ministry of Education, Shihezi University, Shihezi 832003, China

²Key Laboratory of National Veterinary Etiological Biology, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Lanzhou Veterinary Research Institute, Lanzhou 102206, China

Abstract: [Objective] To study the effect of RsbV gene deletion on the virulence of *Listeria monocytogenes*. [Methods] The fragment with RsbV deletion was generated by gene overlap extension PCR (SOE-PCR) and the mutant with RsbV deletion was obtained by homologous recombination based on the wild strain LM-XS5. The differences in virulence between the two strains were determined by LD₅₀, bacterial counts in liver and spleen, and qRT-PCR experiments. [Results] LD₅₀ of the RsbV gene-deleted strain was 10⁴ higher than that of the wild strain. The numbers of gene-deleted strain in the mouse's liver and spleen were significantly fewer than that of the wild strain ($P < 0.05$). Results of qRT-PCR show that four virulence factors' expression levels of the RsbV gene-deleted strain were significantly lower than that of the wild strain ($P < 0.05$). The RsbV gene-deleted strain induced a strong immune response in mice against the wild strain. [Conclusion] RsbV regulates the expression of four virulence gene (*inlA*, *LLO*, *PlcA* and *PrfA*) of *Listeria monocytogenes*; The virulence of the RsbV gene-deleted strain is significantly reduced, but it still has good immunogenicity.

Keywords: *Listeria monocytogenes*, RsbV gene-deleted strain, virulence, homologous recombination

(本文责编:王晋芳)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (30960274), by the Open Fund of State Key Laboratory of Livestock Pathogenic Biology (KEYLAB200908) and by the Talent Foundation of Shihezi University (RCZX200801)

* Corresponding authors. Tel: +86-993-2055036; E-mail: xjmqlqj@sina.com; qj710625@yahoo.com.cn

Received: 4 August 2012 / Revised: 22 October 2012