

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*  
55 (4) :433 - 439; 4 April 2015  
ISSN 0001 - 6209; CN 11 - 1995/Q  
http://journals.im.ac.cn/actamicrocn  
doi: 10.13343/j.cnki.wsxb.20140342

## 单核细胞增生李斯特菌 *hfq* 基因缺失株的构建及其生物学特性

康美琴, 蔡雪薛, 谈卫军, 段斐斐, 赵丹, 潘志明, 殷月兰\*, 焦新安

扬州大学, 江苏省人兽共患病重点实验室, 江苏省动物主要疫病防控协同创新中心, 江苏 扬州 225009

**摘要:** 【目的】单核细胞增生李斯特菌 (*Listeria monocytogenes*, *Lm*) 为革兰氏阳性的短杆菌, 营腐生和寄生生活, 是重要的食源性人兽共患病原菌, 对低温、酸碱和高渗透压等环境具有较强的抵抗力。 *Lm* 在各种环境中适应、生存并表现致病力, 是与调控因子的网络调控密切相关, 本文初步研究了细菌调控因子 *hfq* 的生物学特性。 【方法】利用同源重组技术对血清型为 1/2 a 的 EGDe 菌株进行 *hfq* 基因的敲除, 对获得的突变株 EGDe $\Delta$ *hfq* 进行生化鉴定及生物学特性研究。 【结果】实验结果表明: 在 4℃ 低温环境下, 缺失株生长显著减慢 ( $P < 0.05$ ); 在含 7% NaCl 高渗 BHI 培养基及含 4.5% 乙醇的 BHI 培养基中生长受到抑制; 缺失株形成生物被膜的能力显著下降 ( $P < 0.05$ ); 对 Caco-2 细胞系的侵袭能力下降; 与野生型菌株相比, EGDe $\Delta$ *hfq* 对 BALB/c 小鼠的感染能力减弱、半数致死剂量提高。 【结论】由此表明, Hfq 蛋白对细菌抗胁迫、生物被膜形成及细菌毒力具有重要的调控作用。此缺失株的构建为进一步研究 Hfq 的功能提供了材料, 为研究其在 *Lm* 胁迫环境生存及疾病预防控制奠定了基础。

**关键词:** 单核细胞增生性李斯特菌, *hfq* 基因, 调控因子, 致病性, 胁迫应答

**中图分类号:** Q933      **文章编号:** 0001-6209 (2015) 04-0433-07

单核细胞增生李斯特菌 (*Listeria monocytogenes*, *Lm*) 是一种重要的食源性病原菌, 作为一种兼性胞内寄生菌, 可在巨噬细胞和非吞噬细胞 (如上皮细胞、内皮细胞和肝细胞) 内增殖, 可引起哺乳动物和人的败血症、脑膜炎, 以及孕畜流产等<sup>[1-3]</sup>。 *Lm* 所引起的李斯特菌病, 对畜牧业造成经济损失, 对人类健康造成严重威胁。早在 20 世纪 90 年代, WHO 将该菌列为食品中的四大致病菌之一, 引起各国的普遍关注<sup>[4]</sup>。 *Lm* 的致病性与毒力与相关调控因子的表达有着直接关系, 深入研究其分子致病机理, 对于李斯特菌病的预防和控制显得尤为必要。

Hfq 也称 Host factor I (HF-I), 是一种热稳定蛋

白, 首次从金黄色葡萄球菌中发现, 其结构和细菌 Sm 蛋白相似, 通过形成同源六聚体与 sRNAs、DNA 或 RNA 的结合, 调控细菌基因的转录和翻译, 有利于细菌对生存环境的适应, 以及对致病性方面有所影响<sup>[5]</sup>。在不同细菌中 Hfq 的大小和功能有所不同, 如大肠杆菌中 Hfq 是核糖核酸调节的关键调节子, *hfq* 缺失株在高温、氧化、酸、渗透压等条件下生存、繁殖能力减弱<sup>[6-7]</sup>。另外, 布鲁氏菌 *hfq* 缺失株在营养匮乏、氧化、酸等不良环境中生存、繁殖能力丧失<sup>[8]</sup>。 Hfq 是李斯特菌重要毒力调节因子, 由 *hfq* 基因编码, 可与反式编码的 sRNAs 互作调控基因的转译<sup>[5]</sup>, 该因子与李斯特菌毒力基因及其它潜在基

基金项目: 国家自然科学基金 (31101841, 31472193); 江苏省科技支撑计划 (BE2012367)

\* 通信作者。 Tel: +86-514-87971136; Fax: +86-514-87311374; E-mail: yylan@yzu.edu.cn

作者简介: 康美琴 (-), 女, 河北人, 硕士研究生, 从事人兽共患病原菌的分子致病机理相关研究。

收稿日期: 2014-07-03; 修回日期: 2014-11-03

因的表达有关,从而对李斯特菌的侵袭起到调控作用。本研究通过同源重组的方法从基因组中缺失 *hfq* 基因,并对缺失株的生物学特性进行了研究。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 菌株和质粒:**大肠杆菌 (*Escherichia coli*) DH5 $\alpha$ 、单核细胞增生李斯特菌血清型为 1/2 a 的野生型菌株 EGDe、穿梭载体 pKSV7 (Amp<sup>r</sup>) 质粒均由本室保存;pMD18-T 购自 TaKaRa 公司。

**1.1.2 实验动物:**BALB/c 小鼠由扬州大学比较医学中心提供。

**1.1.3 培养基:**试剂 BHI 培养基 (Bacto<sup>TM</sup> Brain

Heart Infusion) 购自 BD 公司。

**1.1.4 主要试剂和仪器:**细菌基因组 DNA 抽提纯化试剂盒购自上海华舜生物工程有限公司;DNA 聚合酶、高保真 DNA 聚合酶、DNA 回收试剂盒及限制性核酸内切酶 (*Bam*HI、*Xba*I)、DNA 分子标准量 Marker 均购自大连宝生物 (TaKaRa) 公司;T4 DNA 连接酶购自 Promega 公司;氨苄青霉素、氯霉素、红霉素等购自 Sigma 公司;电转化仪购自 Eppendorf;培养箱购自上海跃进医疗器械厂;摇床、离心机购自 Thermo, 凝胶成像系统购自伯乐生命医学产品有限公司。

**1.1.5 引物:**表 1 为本研究中使用的引物,参照 GenBank 上公布的基因序列设计,由南京金斯瑞公司合成。

表 1. 目的基因引物序列

Table 1. Primers sequences of target genes

Primer	Sequence (5'→3')	Restriction site
hfqaF	ACTGGGATCCGGAATAGGATGGAGATTGATTGGAT	<i>Bam</i> H I
hfqaR	TTGTCTTTTAAGTAACGTGCAATTTCCCTCTCCAATCTCTATCTT	
hfqbF	AAGATAGAGATTGGAGAGGGAAATTGCACGTTACTTAAAAGACAA	
hfqbR	AGCCTCTAGAAATAATCCGCGCCTCAACAGCAGCC	<i>Xba</i> I
hfqaF'	TGTGGCATTGGCTACAAAGA	
hfqbR'	ACGGTGCTGTTCAACATGCGTT	

### 1.2 EGDe $\Delta$ *hfq* 突变株的构建

以单核细胞增生李斯特菌标准株 EGDe 为材料,用细菌基因组 DNA 提取试剂盒提取 EGDe 的基因组。以引物 hfqaF 和 hfqaR、hfqbF 和 hfqbR 分别扩增上下游同源臂片段 *hfqa*、*hfqb*。PCR 产物经 DNA 回收试剂盒纯化回收,再以 hfqaF 和 hfqbR 为引物,通过 SOEing PCR 将 *hfqa*、*hfqb* 连接起来,命名为 *hfqab*。再与 pMD20T 载体相连,转化至 *E. coli* DH5 $\alpha$  中,经 PCR 鉴定及 *Bam*HI、*Xba*I 的双酶切分析,将阳性克隆送金斯瑞公司测序。以 *Bam*H I 和 *Xba*I 分别双酶切阳性克隆 pMD20T-*hfqab* 和 pKSV7,纯化后用 T4 DNA 连接酶进行连接、转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$ 。将测序正确的阳性克隆命名为 pKSV7-*hfqab*。用电转化方法将重组穿梭质粒导入野生型 EGDe 菌株,通过温度和氯霉素抗性压力进行同源重组,然后在 30 $^{\circ}$ C 无抗性压力下传 10 代,使载体丢失,获得在氯霉素 (10  $\mu$ g/mL) 抗性中不能生长且经 PCR 和 RT-PCR 鉴定正确的菌株 EGDe  $\Delta$ *hfq*。

### 1.3 EGDe 和 EGDe $\Delta$ *hfq* 对 NaCl 耐受性的测定

两株细菌接种到新鲜 BHI 培养基中过夜培养,次日取细菌,13800  $\times$  g 离心 2 min。PBS 重悬,测定此时的 OD<sub>600</sub> 值。将处理后细菌分别转接到 10 mL 质量分数为 7% NaCl 的 BHI 培养基或体积分数为 4.5% 乙醇的 BHI 培养基的三角瓶中,并使其初始 OD<sub>600</sub> 值为 0.05,每个细菌设 3 个平行组,置 37 $^{\circ}$ C 摇床振荡培养,定时测定各瓶的 OD<sub>600</sub> 值并记录实验数据。

### 1.4 EGDe 和 EGDe $\Delta$ *hfq* 在 4 $^{\circ}$ C 及 40 $^{\circ}$ C 温度条件下生长的测定

将细菌接种到新鲜 BHI 培养基中过夜培养,次日取 1 mL 菌液,PBS 清洗 2 遍并重悬,然后分别转接细菌到 10 mL BHI 培养基的三角瓶中,每个细菌设 3 个平行组,令初始 OD<sub>600</sub> 值为 0.05,分别置 4 $^{\circ}$ C 和 40 $^{\circ}$ C 摇床振荡培养并定时测定各瓶的 OD<sub>600</sub> 值。

**1.5 EGDe 和 EGDe $\Delta$ *hfq* 生物被膜形成能力比较** 构成生物被膜的胞外多糖易于结晶紫结合,可

利用胞外多糖的量来衡量生物被膜的生成量。收集过夜培养基于指形管,用 BHI 液体培养基调整各细菌  $OD_{600}$  值为 1.0, 稀释 10 倍后 ( $OD_{600}$  约为 0.1), 取 200  $\mu\text{L}$  菌悬液加入 96 孔 U 形细胞培养板中, 于 37 $^{\circ}\text{C}$  条件下培养 72 h。于 72 h 时吸走培养基, 无菌 SW 洗 3 遍, 用 0.1% 的结晶紫染色, 再用无菌 SW 洗 3 遍, 55 $^{\circ}\text{C}$  烘干后每孔滴加 225  $\mu\text{L}$  96% 乙醇洗脱 15 min, 使用酶标仪测量其在 595 nm 下的吸光度值。

## 1.6 细胞侵袭实验

挑取生长良好的 Caco-2 细胞, 消化转移一定数量细胞至 24 孔细胞培养板中, 至细胞培养至单层时, 对板孔内的细胞计数, 然后按细菌与细胞的数量比 (MOI) 20 加入新鲜培养的野生株 EGDe 和缺失株 EGDe  $\Delta hfq$ , 继续培养, 1 h 后换用含硫酸庆大霉素 (100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 的 DMEM 培养 2 h。用无菌 PBS 清洗 2 次, 加入冷的 0.1% Triton X-100 裂解细胞 8 min, 释放细菌。用无菌 PBS 稀释裂解液, 选择 10 倍和 100 倍稀释梯度涂布于 BHI 平板上, 置于 37 $^{\circ}\text{C}$  温箱培养 20 h 后对菌落计数。

## 1.7 野生株 EGDe 及缺失株 EGDe $\Delta hfq$ 对 BALB/c 小鼠的感染实验

取 37 $^{\circ}\text{C}$  过夜培养的两种菌液, 次日转接到新鲜培养基中培养 3 h, 将细菌用 PBS 洗 2 遍, 调整其  $OD_{600}$  至 0.8, 再调整细菌量为  $3 \times 10^5$  CFU, 将 6 周龄 BALB/c 小鼠随机分成 2 组, 每组 3 只, 分别感染 EGDe 与 EGDe  $\Delta hfq$ 。每只小鼠腹腔注射 100  $\mu\text{L}$   $3 \times 10^4$  CFU 细菌。3 天后, 分别摘取每组小鼠的脾脏和部分肝脏, 均质仪研磨后将组织液稀释并平板计数。

## 1.8 野生株 EGDe 及缺失株 EGDe $\Delta hfq$ 对 BALB/c 小鼠的 LD<sub>50</sub> 测定

37 $^{\circ}\text{C}$  培养细菌制备种子液, 次日将种子液按 1:20 的比例重新接种于新鲜的 BHI 液体培养基中, 于 37 $^{\circ}\text{C}$  振荡培养, 用无菌 PBS 洗 2 遍, 调整  $OD_{600}$  值至所需大小。将 6 周龄雌性 BALB/c 小鼠随机分成 2 组, 每组 5 只, 进行腹腔注射。每只小鼠注射剂量为 100  $\mu\text{L}$  并呈五倍递减, 同时将细菌适度稀释后涂布 BHI 培养板进行菌落计数。连续观察 14 天, 并记录小鼠死亡情况。采用 Reed-Muench 方法计算重组菌对雌性 BALB/c 小鼠的半数致死量。

## 2 结果

### 2.1 重组菌构建结果

**2.1.1 上下游片段 *hfqa*、*hfqb* 的扩增:** 以单核细胞增生李斯特菌标准株 EGDe 基因组 DNA 作为模板, 分别合成 *hfq* 基因上下游片段 *hfqa*、*hfqb*, 电泳结果显示产物大小与预期片段大小 253、467 bp 相符。

**2.1.2 pMD20-T-*hfqab* 的构建及鉴定:** 将通过 SOEing PCR 拼接片段连接至 pMD20-T 载体, 转化到 DH5  $\alpha$  中, 提取质粒通过 *Xba* I、*Bam* H I 双酶切鉴定分别得到 2700 bp 的载体片段和 675 bp 的目的片段, 与预期结果相符。

**2.1.3 pKSV7-*hfqab* 的构建及鉴定:** 用 *Xba* I、*Bam* H I 双酶切鉴定重组克隆, 得到 7000 bp 的载体片段和 675 bp 的同源片段, 与预期结果相符。

**2.1.4 缺失株的鉴定:** 用 PCR 鉴定转化产物, 结果显示在 997 bp 处有清晰的目的条带, 说明缺失株构建成功。分别提取 EGDe、EGDe  $\Delta hfq$  总 RNA 并反转录为 cDNA, 以得到的 cDNA 为模板进行反转录 PCR。电泳结果显示野生株能扩增出特异性条带, 大小为 234 bp (图 1), 缺失株无此条带。实验进一步证明 *hfq* 基因已成功缺失。

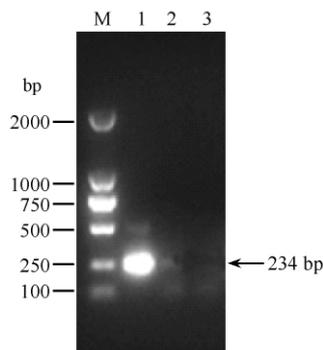


图 1. RT-PCR 鉴定缺失株 EGDe、EGDe  $\Delta hfq$

Figure 1. The result of RT-PCR identification of EGDe  $\Delta hfq$ . M: DL2000 Marker, lane 1: positive control, lane 2: PCR product of EGDe, lane 3: PCR product of EGDe  $\Delta hfq$ .

### 2.2 *Lm* 抗胁迫实验结果

**2.2.1 *Lm* 对 NaCl 耐受性测定:** 在等渗溶液中, 微生物可正常生长繁殖; 在高渗溶液中, 细菌的细胞失水收缩, 从而生长繁殖受到抑制。对 NaCl 耐受性测定结果表明, EGDe、EGDe  $\Delta hfq$  在含 7% NaCl 的 BHI 培养基中生长受到明显抑制, 进入稳定期时间延后 (图 2)。此外, 缺失株 EGDe  $\Delta hfq$  的生长趋势

较野生株减慢, 10 h 时 EGDe 的活菌数是缺失株 EGDe  $\Delta hfq$  的 2 倍。由此表明 7% NaCl 渗透强度明显抑制细菌生长和繁殖, 且 Hfq 对于 *Lm* 耐受 7% 渗透压力发挥重要作用。

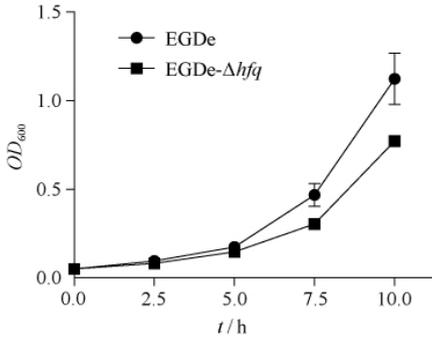


图 2. 细菌耐盐实验结果

Figure 2. Osmotic stress tolerance of EGDe and EGDe  $\Delta hfq$ .

**2.2.2 *Lm* 对 EtOH 耐受性的测定:** 醇类物质可侵入菌体细胞, 破坏蛋白质表面的水膜, 使之失去活性, 同时也破坏细菌蛋白质的肽键, 使之变性。由图 3 的测定结果可知, 在含有 4.5% 乙醇的 BHI 中, EGDe、EGDe  $\Delta hfq$  的生长都受到抑制, 但随着时间推移 EGDe  $\Delta hfq$  的生长能力较野生株下降, 在测定范围内, 12 h 时二者达到最大差异, 由此可见, *hfq* 对细菌耐受乙醇起着重要作用。

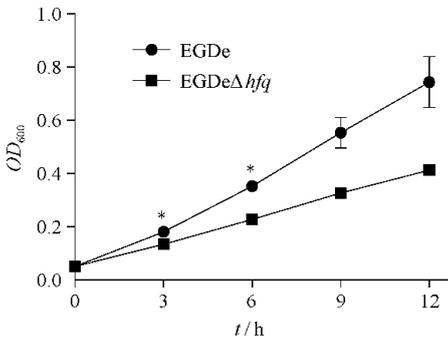


图 3. EGDe、EGDe  $\Delta hfq$  耐受乙醇实验结果

Figure 3. Ethanol stress tolerance of EGDe and EGDe  $\Delta hfq$ .

**2.2.3 低温胁迫对 *Lm* 生长的影响:** 考虑到 *Lm* 是一种可在低温下生长的食源性病原菌, 它的耐寒特性对食物保藏和公众健康造成严重威胁。本实验测定细菌在 4°C 培养条件下生长情况: 两株细菌的生长都极其缓慢, 但随着时间的推移, 缺失株的生长显著低于野生株 ( $P < 0.05$ ) (图 4), 由此提示, *hfq* 对于细菌抵抗低温环境发挥重要作用。

**2.2.4 高温胁迫对 *Lm* 生长的影响:** 单核细胞增生李斯特菌可以耐受 45°C 高温, 本实验探索了 *Lm* 于 40°C 温度条件下细菌的生长情况。图 5 中实验结果

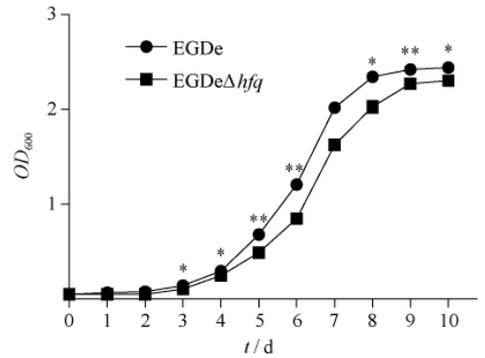


图 4. EGDe 和 EGDe  $\Delta hfq$  4°C 生长情况

Figure 4. The growth curve of EGDe and EGDe  $\Delta hfq$  at 4°C.

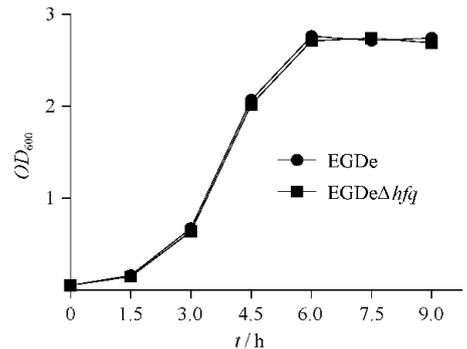


图 5. EGDe 和 EGDe  $\Delta hfq$  37°C 生长情况

Figure 5. The growing state of EGDe and EGDe  $\Delta hfq$  at 37°C.

显示缺失株的生长趋势与野生株相同, 表明 *hfq* 基因的缺失未对 *Lm* 耐受高温造成明显影响。

### 2.3 *Lm* 对 Caco-2 细胞系侵袭能力的测定

生物被膜是细菌抵抗外界不利环境时形成的, 它是一种多细胞聚合物, 由细菌团块与表多糖、蛋白和胞外 DNA 构成的细胞外基质形成的复合物。由图 6 可见缺失株 EGDe  $\Delta hfq$  与野生株 EGDe 相比, 形成生物被膜的能力有显著降低 ( $P < 0.05$ ), 实验表明 Hfq 对于细菌应对外界不利条件形成自我保护的生物被膜具有重要作用。

### 2.4 细胞侵袭实验

已知与黏附、侵袭及胞内繁殖相关的基因主要存在于 *Lm* 毒力岛 LIPI-I 和 LIPI-II 中, 其中 LIPI-II 上的基因编码一组与侵袭素功能相似的蛋白, 主导细菌对非吞噬细胞的黏附侵袭。图 7 的侵袭实验结果表明, EGDe  $\Delta hfq$  的侵袭能力 (0.786%) 明显低于野生株 EGDe (2.242%), 说明缺失 *hfq* 基因后, 细菌侵入 Caco-2 细胞的能力减弱。

### 2.5 野生株 EGDe 及缺失株 EGDe $\Delta hfq$ 对 BALB/c 小鼠的感染实验

由图 8 的实验结果可知, EGDe  $\Delta hfq$  感染小鼠

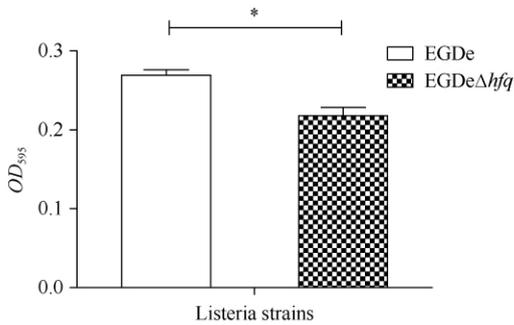


图 6. *Lm* 于 37°C BHI 生物被膜形成能力测定

Figure 6. Determination of ability of biofilm formation of *Lm* in BHI at 37°C.

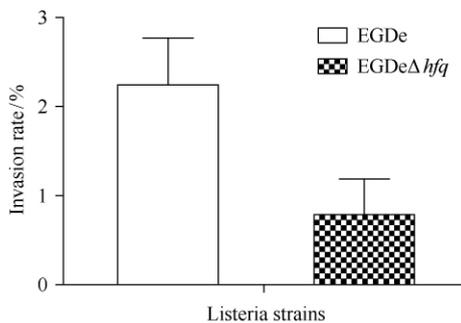


图 7. EGDe 和 EGDe $\Delta$ *hfq* 细胞侵袭实验结果

Figure 7. Result of cell invasion of EGDe and EGDe $\Delta$ *hfq*.

表 2. EGDe 和 EGDe $\Delta$ *hfq* 菌株对 BALB/c 小鼠 LD<sub>50</sub> 的测定结果

Table 2. LD<sub>50</sub> of EGDe and EGDe $\Delta$ *hfq* for BALB/c mice

Group	CFU per mouse / (1 × 10 <sup>5</sup> )			Mortality			LD <sub>50</sub> / (CFU)
EGDe	48	9.6	1.92	5 / 5	4 / 5	0 / 5	5.92 × 10 <sup>5</sup> CFU
EGDe $\Delta$ <i>hfq</i>	77	15.4	3.08	5 / 5	5 / 5	0 / 5	3.54 × 10 <sup>6</sup> CFU

### 3 讨论

*Lm* 是一种能营腐生生活和寄生生活的病原菌, 该菌在体内黏附、侵袭及细胞内感染过程中, 其毒力因子各司其职由相互协作, 并受到调控因子的网络调控, 使其在各种环境中适应、生存并表现致病力。目前已经发现的致病因子主要包括 SigmB<sup>[9-10]</sup>、PrfA<sup>[11]</sup>、VirR<sup>[12]</sup>、HrcA 和 Hfq<sup>[1, 13]</sup>, 前四种调控因子的调控机制研究比较清楚, 而 Hfq 发现较晚, 对其研究报道较少。对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌等病原菌的 Hfq 研究发现, 将 *hfq* 基因缺失后, 突变株表型改变, 如难以应对各种环境压力、毒力减弱等。本文通过比较 *hfq* 缺失株和野生株性状, 对 *Lm* Hfq 蛋白在压力耐受及毒力方面的生物学特性进行了研究。

当 *Lm* 侵入小鼠体内后, 宿主会通过天然免疫和

后的肝脏和脾脏中的细菌载量均低于野生株 EGDe, 表明缺失株对小鼠的感染能力减弱, 毒力降低, Hfq 对李斯特菌致病性有重要作用。

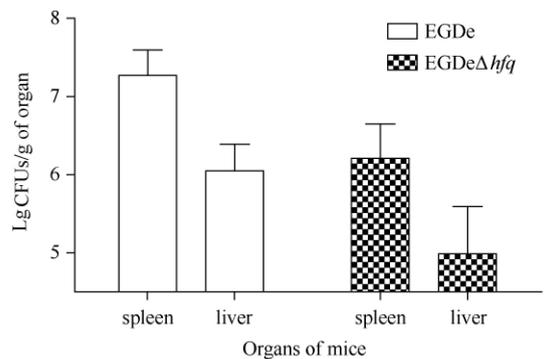


图 8. EGDe、EGDe $\Delta$ *hfq* 对 BALB/c 小鼠感染实验测定结果

Figure 8. The CFUs of EGDe and EGDe $\Delta$ *hfq* in mice organs.

### 2.6 野生株 EGDe 及缺失株 EGDe $\Delta$ *hfq* 对 BALB/c 小鼠的 LD<sub>50</sub> 测定

经 Reed-Muench 法计算得到 EGDe $\Delta$ *hfq* 对小鼠半数致死量为  $3.54 \times 10^6$  CFU, EGDe 对小鼠半数致死量为  $5.92 \times 10^5$  CFU, *hfq* 缺失株的半数致死量较其亲本株提高了 6 倍, 表明缺失株的毒力明显降低 (表 2)。

获得性免疫对其产生免疫应答, 以控制和清除病原菌; *Lm* 面临宿主体内的特殊环境时, 能及时调整新陈代谢并促使相应毒力因子的表达, 以逃离宿主对它的攻击, 在这个过程中, Hfq 可能在细菌适应宿主体内一系列特殊微环境中发挥作用<sup>[1]</sup>。本研究以人结肠腺癌细胞系 Caco-2 为体外感染模型、小鼠为体内感染模型, 对缺失株 EGDe $\Delta$ *hfq* 和野生株 EGDe 的侵袭能力、致病力及 LD<sub>50</sub> 进行了测定, 结果显示缺失株对 Caco-2 的侵袭率明显低于野生株, 由此表明 *hfq* 缺失株对非吞噬细胞侵袭能力减弱。以小鼠进行的体内感染实验结果显示, 缺失株在小鼠脾脏和肝脏中的数量明显少于野生株, 对小鼠的感染作用减弱; 而野生株 EGDe 对小鼠具有较强的感染能力和致病性, 由此提示 Hfq 对 *Lm* 在小鼠体内的生存起到一定作用。LD<sub>50</sub> 实验也进一步证明缺失株对小鼠的毒力明显下降, 这与一些革兰氏阴性菌 *hfq* 缺失株对动物模型的

毒力下降甚至消失相似<sup>[14][15]</sup>。已知 *Lm* 与黏附、侵袭及胞内繁殖相关的基因主要存在于毒力岛 LIPI-I 和 LIPI-II 中, 体内外实验结果提示, Hfq 蛋白与 *Lm* 的致病力相关, 可能对两个毒力岛中的基因具有调控作用和互作关系。

对大肠杆菌、嗜血杆菌、金黄色葡萄球菌、百日咳杆菌等 Hfq 蛋白的功能研究结果显示, 该蛋白除参与细菌的致病性之外<sup>[14-17]</sup>, 还参与细菌的基因转录、蛋白表达、应激反应等<sup>[18,20]</sup>。当亲本株 *hfq* 基因缺失后, 大量蛋白的表达发生变化, 从而细菌的生长、形态和对外界环境的耐受性改变<sup>[21-22]</sup>。本研究通过温度、高盐和乙醇等胁迫因素, 对野生株和 *hfq* 缺失株抗胁迫能力进行了测定。高盐胁迫实验结果显示, 虽然两株细菌在高盐培养基中生长都受到一定程度抑制, 但在测定范围内, 缺失株生长明显落后于野生株, 另外, 与野生株相比, 缺失株对乙醇敏感性显著性增加 ( $P < 0.05$ ) 且生物被膜形成能力显著下降, 这充分显示了 Hfq 影响 *Lm* 细胞膜的完整性以增强细菌适应性, 这与 Christiansen 等得出的结论一致。对温度这一环境条件研究结果显示, 突变株和野生株于 37、40℃ 的生长无显著性差异, 表明 *hfq* 对于细菌抵抗高温不是必需的。但于 4℃ 低温条件下两株细菌生长速度都减慢, 且缺失株生长明显落后于野生株 ( $P < 0.05$ )。以上实验结果说明 *hfq* 对于细菌抵抗外界不利环境发挥重要作用。

本研究成功地构建了单核细胞增生李斯特菌的 *hfq* 基因缺失株 EGDe $\Delta$ *hfq*, 并对缺失株的抗胁迫能力、对细胞的侵袭性以及小鼠的毒力进行了研究, 初步表明 *hfq* 对 *Lm* 压力耐受及致病性发挥一定作用, 本研究为开展 Hfq 蛋白的调控机理研究奠定了基础。

## 参考文献

- [1] Christiansen JK, Larsen MH, Ingmer H, Søgaard-Andersen L, Kallipolitis BH. The RNA-Binding Protein Hfq of *Listeria monocytogenes*: Role in Stress Tolerance and Virulence. *Journal of Bacteriology*, 2004, 186 (11): 3355-3362.
- [2] Hain T, Chatterjee SS, Ghai R, Kuenne CT, Billion A, Steinweg C, Domann E, Kärst U, Jänsch L, Wehland J, Eisenreich W, Bacher A, Joseph B, Schär J, Kreft J, Klumpp J, Loessner MJ, Dorscht J, Neuhaus K, Fuchs TM, Scherer S, Doumith M, Jacquet C, Martin P, Cossart P, Rusnock C, Glaser P, Buchrieser C, Goebel W, Chakraborty T. Pathogenomics of *Listeria spp.* *International Journal of Medical Microbiology*, 2007, 297 (7-8): 541-557.
- [3] Cossart P. Molecular and cellular basis of the infection by *Listeria monocytogenes*: an overview. *International Journal of Medical Microbiology*, 2002, 291 (6-7): 401-409.
- [4] Lian K, Tan W, Zhao D, Yin Y, Wang G, Duan F, Pan Z, Huang J, Jiao X. Epidemiology of listeriosis infection in humans and animals, China, 2002-2012. *Chinese Journal of Zoonoses*, 2014, 30 (10): 1033-1038. (in Chinese)
- 连凯, 谈卫军, 赵丹, 殷月兰, 王国梁, 段斐斐, 潘志明, 黄金林, 焦新安. 2002-2012 年人和动物李斯特菌感染报告数据流行病学分析. *中国人兽共患病学报*, 2014, 30 (10): 1033-1038.
- [5] Nielsen JS, Lei LK, Ebersbach T, Olsen AS, Klitgaard JK, Valentin-Hansen P, Kallipolitis BH. Defining a role for Hfq in gram-positive bacteria: evidence for Hfq-dependent antisense regulation in *Listeria monocytogenes*. *Nucleic Acids Research*, 2009, 38 (3): 907-919.
- [6] Muffler A, Traulsen DD, Fischer D, Lange R, Hengge-Aronis R. RNA-binding protein HF-I plays a global regulatory role which is largely, but not exclusively, due to its role in expression of the  $\sigma^S$  subunit of RNA polymerase in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 1997, 179 (1): 297-300.
- [7] Tsui HC, Leung HC, Winkler ME. Characterization of broadly pleiotropic phenotypes caused by an *hfq* insertion mutation in *Escherichia coli* K-12. *Molecular Microbiology*, 1994, 13: 35-49.
- [8] Robertson GT, Roop RM Jr. The *Brucella abortus* host factor I (HF-I) protein contributes to stress resistance during stationary phase and is a major determinant of virulence in mice. *Molecular Microbiology*, 1999, 34 (4): 690-700.
- [9] Wiedmann M, Arvik TJ, Hurley RJ, Boor KJ. General stress transcription factor  $\sigma^B$  and its role in acid tolerance and virulence of *Listeria monocytogenes*. *Journal of Bacteriology*, 1998, 180 (14): 3650-3656.
- [10] Ferreira A, O'Byrne CP, Boor KJ. Role of  $\sigma^B$  in heat, ethanol acid, and oxidative stress resistance and during carbon starvation in *Listeria*. *Applied and Environmental Microbiology*, 2001, 67 (10): 4454-4457.
- [11] de las Heras A, Cain RJ, Bielecka MK, Vázquez-Boland JA. Regulation of *Listeria* virulence: PrfA master and commander. *Current Opinion Microbiology*, 2011, 14 (2): 118-127.
- [12] Mandin P, Fsihi H, Dussurget O, Vergassola M, Milohanic E, Toledo-Arana A, Lasa I, Johansson J, Cossart P. VirR, a response regulator critical for *Listeria monocytogenes* virulence. *Molecular Microbiology*, 2005, 57 (5): 1367-1380.
- [13] Vera A, González G, Domínguez M, Bello H. Main

- virulence factors of *Listeria monocytogenes* and its regulation. *Revista Chilena de Infectologia*, 2013, 30 (4): 407-416.
- [14] Simonsen KT, Nielsen G, Bjerrum JV, Kruse T, Kallipolitis BH, Møller-Jensen J. A role for the RNA chaperone Hfq in controlling adherent-invasive *Escherichia coli* colonization and virulence. *PLoS One*, 2011, 6 (1): 1-13.
- [15] Hempel RJ, Morton DJ, Seale TW, Whitby PW, Stull TL. The role of the RNA chaperone Hfq in *Haemophilus influenzae* pathogenesis. *BMC Microbiology*, 2013, 13: 134.
- [16] Liu Y, Wu N, Dong J, Gao Y, Zhang X, Mu C, Shao N, Yang G. Hfq is a global regulator that controls the pathogenicity of *Staphylococcus aureus*. *PLoS One*, 2010, 5 (9): e13069.
- [17] Bibova I, Skopova K, Masin J, Cerny O, Hot D, Sebo P, Vecerek B. The RNA chaperone Hfq is required for virulence of *Bordetella pertussis*. *Infection Immunity*, 2013, 81 (11): 4081-4090.
- [18] Faner MA, Feig AL. Identifying and characterizing Hfq-RNA interactions. *Methods*, 2013, 63 (2): 144-159.
- [19] Storz G. An expanding universe of noncoding RNAs. *Science*, 2002, 296: 1260-1263.
- [20] Sonnleitner E, Hagens S, Rosenau F, Wilhelm S, Habel A, Jäger KE, Bläsi U. Reduced virulence of a *hfq* mutant of *Pseudomonas aeruginosa* O1. *Microbial Pathogenesis*, 2003, 35 (5): 217-228.
- [21] Chiang MK, Lu MC, Liu LC, Lin CT, Lai YC. Impact of Hfq on Global Gene Expression and Virulence in *Klebsiella pneumoniae*. *PLoS One*, 2011, 6 (7): 1-17.
- [22] Zhang A, Wassarman KM, Ortega J, Steven AC, Storz G. The Sm-like Hfq protein increases OxyS RNA interaction with target mRNAs. *Molecular Cell*, 2002, 9 (1): 11-22.

## Construction and characterization of *Listeria monocytogenes* $\Delta hfq$ mutant strain

Meiqin Kang, Xuexue Cai, Weijun Tan, Feifei Duan, Dan Zhao, Zhiming Pan, Yuelan Yin<sup>\*</sup>, Xin'an Jiao

Yangzhou University, Jiangsu Key Laboratory of Zoonosis, Jiangsu Co-Innovation Center for Prevention and Control of Important Animal Infectious Disease and Zoonosis, Jiangsu Province, Yangzhou 225009, Jiangsu Province, China

**Abstract:** [Objective] Gram-positive bacterium *Listeria monocytogenes* (*Lm*) is an important zoonotic foodborne pathogen, engaged in both saprophytism and parasitism. It could adapt, survive and display pathogenicity under different environmental stress challenges, which is associated with the regulatory network consisting of regulating factors. The biological characterizations of regulator *hfq* was evaluated in this study. [Methods] *hfq* deleted serovar 1/2 a strain EGDe was constructed with homologous recombination, the biological characteristics of the mutant strain was compared with its parental strain. [Results] The growth of EGDe  $\Delta hfq$  was significantly inhibited under cold temperature ( $P < 0.05$ ), salt medium containing 7% NaCl and the medium containing 4.5% ethanol. The ability of biofilm formation of the mutant strain in Bacto™ Brain Heart Infusion (BHI) was reduced significantly ( $P < 0.05$ ); notably, the invasion rate to Caco-2 cell lines was obviously reduced. Infection capacity of EGDe  $\Delta hfq$  to BALB/c mice decreased and the LD<sub>50</sub> was 6 times higher than EGDe. [Conclusion] Hfq protein of *Listeria monocytogenes* plays an important role in regulating bacterial virulence, biofilm formation and stress response. This deletion strain provided material to further study the function of Hfq and provides the possibilities to elucidate the mechanisms of *Lm* in resisting the stress and paves ways to the development of novel strategies for the prevention and control of *Lm* infections.

**Keywords:** *Listeria monocytogenes*, *hfq* gene, regulator, pathogenicity, stress response

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the National Natural Science Fund of China (31101841, 31472193) and by the Science and support program of Jiangsu Province (BE2012367)

<sup>\*</sup> Corresponding author. Tel: +86-514-87971136; Fax: +86-514-87311374; E-mail: yylan@yzu.edu.cn

Received: 3 July 2014 / Revised: 3 November 2014