

携带新城疫病毒融合蛋白基因的重组减毒单核 细胞增多性李斯特菌构建与鉴定

徐晶靓, 江玲丽, 陈 宁, 帅江冰, 方维焕*

(浙江大学动物预防医学研究所 浙江省动物预防医学重点实验室 杭州 310029)

摘 要:以鸡新城疫病毒 *F* 基因(NDV-*F*)为模式外源基因,通过基因切割-重叠延伸 PCR 法(SOE-PCR)将其插入到单核细胞增多性李斯特菌(*Listeria monocytogenes*)毒力基因 *hly* 的启动子和信号肽序列下游,并将该融合片段克隆入穿梭质粒 pKSV7,随后将重组质粒电转李斯特菌进行同源重组。NDV-*F* 基因的 PCR 扩增表明该重组菌构建成功,RT-PCR 结果表明 *F* 基因在重组菌中得到了转录。比较了重组菌和野生型菌株的溶血性、黏附和侵袭力、对小鼠和鸡胚的毒力和生长特性以及重组菌的体内外稳定性。结果表明:*hly* 基因中 *F* 片段的整合消除了单核细胞增多性李斯特菌溶血素基因的表达,其培养上清液没有溶血性,而野生型菌株的溶血价达 2^4 ,细胞试验表明重组菌对细胞的黏附力和相对侵袭力均有不同程度的降低,而相对侵袭力与野生型菌株具有显著性差异($P < 0.05$);重组菌对小鼠及鸡胚的毒力(LD₅₀)与野生型相比分别下降 3.7 和 6.5 个对数数量级;重组菌在 BHI 肉汤和小鼠体内连续 5 次后,仍然可以扩增出目的基因 NDV-*F*,初步表明该重组菌较为稳定。

关键词:单核细胞增多性李斯特菌;同源重组;插入突变;李斯特菌溶血素 O

中图分类号:Q78 文献标识码:A 文章编号:1001-6209(2006)03-0445-06

以细胞内感染性细菌如减毒鼠伤寒沙门氏菌(*Salmonella typhimurium*)和单核细胞增多性李斯特菌(*Listeria monocytogenes*, Lm)等作为疫苗载体将外源基因呈递给宿主 APC 细胞,并诱导相应的免疫反应,是新型基因工程疫苗研究的新途径^[1-3]。Lm 是具有潜在优势的重组疫苗活载体之一,已用于人的乳头瘤病毒(Human papillomavirus, HPV)、艾滋病病毒(human immunodeficiency virus, HIV)、丙肝病毒(Hepatitis C virus, HCV)等疫苗的研究。Lm 作为一种侵袭性胞内菌,可在专职和非专职吞噬细胞内存活并繁殖^[4-6]。其毒力因子包括 *plcA*、*hly*、*mpl*、*actA* 和 *plcB*,它们位于同一基因簇中,并受 *prfA* 的调控^[7]。其中 *hly* 编码的李斯特菌溶血素(α -IL0)是其主要毒力因子,能裂解吞噬体膜,使 Lm 逸入胞浆并大量繁殖^[8]。Lm 感染诱导的免疫应答主要以 CD8⁺ 介导的细胞免疫为主;同时还可诱导产生 IL-12、IL-18、 γ 干扰素和 TNF 等细胞因子^[9,10]。而且,相对于其它细菌,Lm 对抗生素更为敏感。因此,如何利用这些特性,将其改造为抗病毒感染或抗肿瘤疫苗载体是近年来国外一些学者的研究热点。

但 Lm 为人和动物李斯特杆菌病的病原体,因而

将其作为疫苗载体之前需进行减毒。目前 Lm 减毒的方法有两种:一为基于毒力基因的缺失或插入突变^[11],二为营养缺陷型突变。如 D-丙氨酸为 Lm 生长所必需,通过缺失 D-丙氨酸消旋酶(*dal*)和 D-丙氨酸转氨酶(*dat*)合成基因即可构建条件突变株^[12]。而毒力基因缺失或插入突变是主要的减毒方法。本文以 Lm 的主要毒力基因 *hly* 为靶基因,将编码鸡新城疫病毒(NDV)融合蛋白的 *F* 基因通过融合 PCR 技术插入该基因的启动子及信号肽下游,并利用同源重组技术构建整合有 NDV *F* 基因的重组单增李斯特菌,并初步观察其溶血活性、细胞侵袭力、生长动态等生物学特性的变化。

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 α 、质粒 pUC18 及新城疫病毒强毒株 F48E9 株由本实验室保存; *L. monocytogenes* 参考株 10403S(1/2a 血清型)系国际生命科学协会(International Life Sciences Institute)北美食品微生物专家委员会指定的康乃尔李斯特菌菌种保藏室提供(X1-001),穿梭

基金项目:国家自然科学基金(30270073)

* 通讯作者。Tel/Fax 86-571-86971242; E-mail:whfang@zju.edu.cn

作者简介:徐晶靓(1981-),女,浙江余姚人,硕士研究生,主要从事分子细菌学和 DNA 疫苗载体研究。E-mail:brendajingjing@163.com

收稿日期:2005-12-13;接受日期:2006-01-09;修回日期:2006-01-24

质粒 pKSV7 由美国康乃尔大学 Wiedmann 博士惠赠。

1.1.2 试剂: PCR 产物纯化试剂盒、dNTP、*Taq* 聚合酶、T4 DNA 连接酶、牛小肠碱性磷酸酶购自上海 Sangon 公司。

1.1.3 实验动物及细胞: 6~8 周龄雌性 ICR 小鼠购自浙江中医学院实验动物中心, 非免疫鸡胚购自杭州蛋鸡场。HeLa 细胞由本实验室保存。

表 1 本实验使用的引物列表

Table 1 Primer pairs used in the text with the restriction sites underlined

Primers	Sequence (5' ~ 3')	Enzyme sites
hly-a	GTAAGCTT <u>AGAGCGCTGCTAGGTTTGTGTGTC</u>	<i>Hind</i> III
hly-b	AGTACAT <u>CTAGATAGGGTGGTCCCATGGATGAAATTGA</u>	<i>Xba</i> I
hly-c	CTATCTAGATG <u>TACTGCCAATCGAAAAGAACACGC</u>	<i>Xba</i> I
hly-d	CGAGAAT <u>TCGCTTTTACGAGAGCACCTGGATAG</u>	<i>Eco</i> R I
hly-d'	GCAAATCAATGCTGAGTGTAAATGAATC	
NDV-Fa	G <u>TCTTAGAGATGGGCCCAAATCTTCTACCAATG</u>	<i>Xba</i> I
NDV-Fb	CAT <u>CTAGAACCTCTGCCTCTGTCTGTTCAG</u>	<i>Xba</i> I

1.3 重组穿梭质粒 pKSV7-hly-F 的构建及鉴定

TZ 法提取 *Lm* 的基因组 DNA^[13,14], 以基因切割-重叠延伸 PCR 法(SOE-PCR)^[15] 扩增同源重组区, 先以 hly-a/hly-b 及 hly-c/hly-d 引物对分别扩增 *hly* 的 aI (含启动子和信号肽的 *hly* 片段) 及 cd 片段, 再以上述两片段为上下游模板, hly-a/hly-d 引物对扩增 ad 片段。hly-ad 经 *Hind*III 和 *Eco*R I 双酶切后克隆入 pUC18 质粒, 酶切及 PCR 鉴定重组质粒 pUC18-hly。

RT-PCR 扩增鸡新城疫病毒 *F* 基因, 随后将 *F* 片段插入到 pUC18-hly 的 *Xba*I 位点中, 筛选正向克隆, 重组质粒 pUC18-hly-F 经 *Hind*III 和 *Eco*R I 双酶切后, 将 ad 及 *F* 融合片段克隆入穿梭质粒 pKSV7, 构建重组质粒 pKSV7-hly-F。

1.4 含 *F* 基因重组单增李斯特菌的构建与鉴定

参照 Park 等^[16] 方法将重组穿梭质粒 pKSV7-hly-F 电转入野生型 *Lm* 10403S 菌株, 并参照 Camilli 等^[17] 建立的方法通过温度和氯霉素抗性压力实现同源重组, 将 *F* 基因整合到 *Lm* 基因组中 (*Lm*- Δ hly-F)。重组菌以引物对 NDV-Fa/NDV-Fb、NDV-Fa/hly-d、NDV-Fa/hly-d'、hly-a/NDV-Fb 进行 PCR 鉴定, 同时以野生型 10403S 菌株为阴性对照。

1.5 RT-PCR 检测 *F* 基因在重组菌内的转录

UNIQU-10 柱式 TRIzol 总 RNA 抽提试剂盒提取重组菌的总 RNA, 经 DNase I 处理后, 用特异引物 NDV-Fa/Fb 进行 RT-PCR 扩增, 以检测 *F* 基因在重

1.2 引物设计和合成

参考 GenBank 上发表的 *hly* 全基因及其上游序列 (GenBank 登录号 NC 003210), 设计 4 条引物 (表 1), 其中 hly-a, hly-b, hly-c, hly-d 用于 *hly* 基因同源重组区的扩增, hly-d' (hly-d 下游 77bp 处) 用于同源重组菌的 PCR 鉴定; NDV-Fa 和 NDV-Fb 则用于扩增鸡新城疫病毒 *F* 基因。以上引物均由上海博亚公司合成。

组菌中的转录。

1.6 HeLa 细胞侵袭力试验

参考 Jaradat 等^[18] 的方法并加以改进。将 HeLa 细胞接种于 12 孔细胞培养板, 培养液为 DMEM (含 5% 胎牛血清), 37°C、5% CO₂ 培养至 60%~80% 的细胞融合度后, 用 0.01mol/L PBS (pH7.2) 洗涤一次。细菌于 37°C 静置培养过夜, 调节 OD₆₀₀ 至 0.1~0.12 (10⁸ cfu/mL), 以 1:10 的比例与 DMEM 培养液混合, 每孔接种 0.3mL 细菌混合液, 置 37°C、5% CO₂ 培养 1h 后, 弃去培养液, 用 PBS 洗涤 3 次, 用 100 μ g/mL 庆大霉素作用 1h (37°C、5% CO₂)。PBS 洗涤 4 次后, 再用 0.1% Triton-X 100 室温作用 5min。细菌粘附力的测定为在感染后 1h 经 PBS 洗涤 4 次后直接裂解。细胞裂解液经 10 倍连续稀释后, 分别在 TSB-Y 平板上进行细菌计数, 粘附率计算公式为: CFU_{rec}/CFU_{added} × 100 (其中 CFU_{rec} 表示细胞裂解后的细菌数)。而相对侵袭率的计算公式为: CFU_{intra}/CFU_{adh} × 1000 方法 (其中 CFU_{intra} 表示庆大霉素作用 1h 后的细菌裂解数, CFU_{adh} 表示黏附的细菌数)。

1.7 鸡胚及 ICR 小鼠毒力试验

按 Norrung 等^[19] 方法进行, 调整 *Lm*10403S 的浓度为 2.5 × 10⁸ cfu/mL, *Lm*- Δ hly-F 2.67 × 10¹¹ cfu/mL, 用 PBS 进行 10 倍梯度稀释, 选取 10⁻¹~10⁻⁵ 稀释度分别通过尿囊腔接种 14 日龄鸡胚 (0.1mL/只), 每组 6 只, 连续观察 7d, 每天记录鸡胚死亡情况。同时调

整 Lm 10403S 的浓度为 9.7×10^7 cfu/mL, Lm- Δ hly-F 细菌数为 4.9×10^{10} cfu/mL, 用 PBS 进行 10 倍梯度稀释后, 选取 $10^0 \sim 10^{-5}$ 稀释度接种 18 ~ 22g ICR 小鼠 (腹腔注射 0.1 mL/只), 每组 6 只, 连续观察 10d, 每天记录小鼠死亡情况。寇氏法计算 LD₅₀。

1.8 重组菌溶血活性变化

溶血价测定按照本实验室建立的方法进行^[11], 将突变株 Lm- Δ hly-F 及野生型菌株 10403S 37°C 培养 18h, 取上清用生理盐水进行对倍稀释, 加入等体积的 1% 绵羊红细胞悬液, 37°C 温育 1h, 以生理盐水为空白对照, 溶血价以能产生 50% 溶血的最高稀释倍数表示。同时将该重组菌及 10403S 菌株划线接种到含 7% 绵羊血的 TSA 平板上, 37°C 培养过夜, 观察其溶血现象。

1.9 重组菌的体外生长试验

96 孔板中依次加入 180 μ L BHI 肉汤 (pH7.2 和 pH5.5) 及 20 μ L 重组菌 Lm Δ hly-F 和野生型 10403S ($OD_{600} = 0.12$), 37°C 培养 12h, 每隔 1h 测 OD_{600} 值, Excel 软件绘制成图。

1.10 重组菌的稳定性试验

将重组菌在 BHI 中 37°C 培养 16 ~ 18h, 连续 5 次以检测重组菌在体外的稳定性。同时在 ICR 小鼠体内连续传 5 次, 即第一次腹腔内注射后, 隔日无菌取腹水、肝脏、脾脏涂布 BHI 平板, 37°C 培养过夜, 分离细菌, 用分离菌株再用同样的方法注射小鼠, 依此类推。提取每次分离株基因组 DNA, 用上述引物对 (NDV-Fa/hly-d') 进行 PCR 扩增。

2 结果

2.1 含 F 基因重组穿梭质粒的鉴定

采用 SOE-PCR 法可先扩增到 Lm hly 基因的 ab (573bp) 和 cd 片段 (261bp), 两个片段经融合 PCR 得到 820bp 的 ad 片段, 中间引入特异性酶切位点 Xba I。ad 片段经 Hind III 和 EcoR I 双酶切后克隆到 pUC18 构建成 pUC18-hly。重组质粒经 Hind III 和 EcoR I 双酶切后可切出 ad 片段, 表明重组质粒 pUC18-hly 的成功构建。

F 基因经 Xba I 酶切后插入到重组质粒 pUC18-hly 中, 构建成 pUC18-hly-F。Hind III (引物 a 引入) 和 Pst I (F 片段第 122bp 处) 双酶切能切出 695bp 的片段, 与理论值相符合, 表明了 F 基因为正向插入。pUC18-hly-F 用 Hind III 和 EcoR I 双酶切后, 将目的片段 ad + F (2482bp) 克隆入穿梭质粒 pKSV7。重组穿梭质粒的 PCR 和 Xba I 单酶切鉴定均能检测到 F

片段, 并且 Hind III 和 EcoR I 双酶切也能切出 ad + F 片段。以上结果都表明已成功构建了重组穿梭质粒 pKSV7-hly-F。

2.2 含 F 基因重组单增李斯特菌的鉴定

重组穿梭质粒 pKSV7-hly-F 电转入野生型 10403S 后, 通过温度和氯霉素抗性压力实现两次同源重组, 将 F 基因整合到 Lm 基因组中。用引物对 NDV-Fa/NDV-Fb, NDV-Fa/hly-d, NDV-Fa/hly-d', hly-a/NDV-Fb 以重组菌和野生型 10403S 菌株的基因组 DNA 为模板进行 PCR 扩增。图 1 表明, 重组菌中均能扩增出对应的预期目的片段 (分别为 1662bp, 1923bp, 2000bp 和 2235bp) 而阴性对照菌无任何片段, 表明 F 基因已整合到 Lm 染色体基因组中。

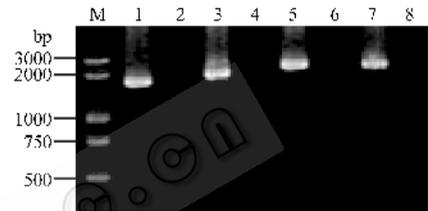


图 1 重组单增李斯特菌 PCR 鉴定

Fig. 1 PCR identification of the recombinant *Listeria monocytogenes* using different primer pairs. M represents DL 2000 Marker; 1, 3, 5, 7 represent PCR amplification of the genomic DNA of the recombinant bacteria using different primer pairs; 2, 4, 6, 8 represent the relative negative control.

2.3 RT-PCR 表明 F 基因能在重组菌中转录

重组菌 Lm Δ -hly-F 总 RNA 经 RT-PCR 检测能得到 1662bp 的 F 片段, 与以基因组 DNA 为模板扩增得到的 PCR 产物一致 (图 2), 表明 F 基因在重组菌内得到了转录。

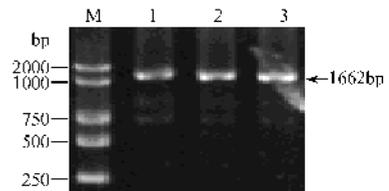


图 2 RT-PCR 扩增 F 基因

Fig. 2 Transcription of F by the recombinant mutant strain as amplified by RT-PCR on total RNA (lane 1 and 2), lane 3 is PCR amplification of F from the genomic DNA of the recombinant bacteria as the positive control; M: Marker.

2.4 Lm Δ -hly-F 与野生型 10403S 对 HeLa 细胞的粘附、侵袭力

Lm Δ -hly-F 对 HeLa 细胞的黏附力低于 Lm 10403S 野生型菌株, 分别为 21.27 ± 1.21 和 23.95 ± 5.38 , 但两者无显著性差异 ($P > 0.05$)。重组李斯特

菌对 HeLa 细胞的相对侵袭率为 4.17 ± 0.12 , 而野生型菌株 10403S 为 9.66 ± 1.25 , 具有显著性差异 ($P < 0.05$)。

2.5 LD_{50} 试验表明 Lm Δ -hly-F 毒力显著下降

F 基因的插入突变使该重组菌毒力显著降低, 与野生型相比, 在鸡胚模型中下降了 6.5 个对数数量级 ($10^{8.43}$ vs $10^{2.10}$), 而在小鼠模型中则下降了 3.7 个对数数量级 ($10^{9.19}$ vs $10^{5.29}$)。

2.6 重组菌 Lm Δ -hly-F 无溶血活性

重组菌 Lm Δ -hly-F 由于 *F* 片段的插入突变使溶血素基因失活, 溶血活性消失。野生型菌株的溶血价为 16 而突变株为 0。野生型菌株在血平板上的溶血现象非常明显 (图 3-B), 而重组菌则无可见的溶血圈 (图 3-A)。

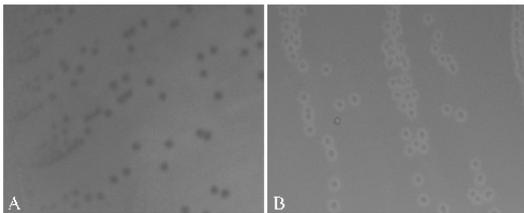


图 3 Lm Δ -hly-F 重组菌与野生型 10403S 菌株的溶血活性比较

Fig. 3 The hemolytic characteristic of mutant *Listeria monocytogenes* together with its parent strain on TSB-Y plates with 7% sheep blood after 24h incubation. (A) Integration of *F* gene demolished listeriolysin O expression while there was clear hemolytic zones with the parent strain (B).

2.7 Lm Δ -hly-F 与野生型 10403S 菌株的体外生长曲线具有一定的相似性

重组菌和野生型菌株 10403S 在正常 pH 值 (7.2) 的 BHI 肉汤中具有相似的生长曲线, 而在 pH5.5 下, 重组菌比野生型菌株生长缓慢 (图 4), 表明 *hly* 基因中 *F* 基因的插入突变在一定程度上影响了该重组菌的体外生长。

2.8 重组菌的稳定性

将在体内外连续传代 5 次的重组菌, 以 NDV-Fa 作为上游引物, NDV 基因下游外侧的溶血素基因 *hly-d'* 作为下游引物进行 PCR 扩增, 所有菌株均呈现与图 1 一致的 2000bp 条带。

3 讨论

单核细胞增多性李斯特菌作为一种兼性胞内细菌, 可侵袭多种非吞噬细胞, 并可在胞浆中生长繁殖, 因而具有与某些在吞噬体中长期生存的细菌 (如沙门氏菌、分支杆菌) 不同的免疫应答机制, 同时它

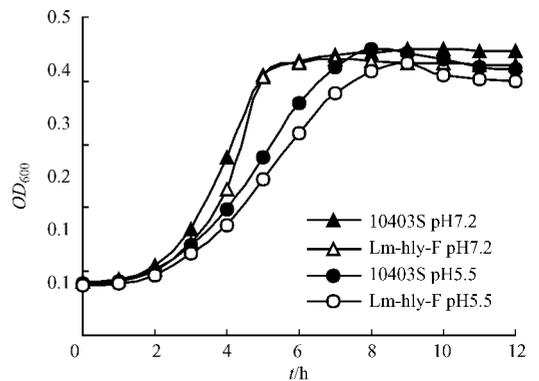


图 4 Lm Δ -hly-F 重组菌与野生型 10403S 的体外生长曲线

Fig. 4 Growth in BHI broth with different pH values of the recombinant *Listeria monocytogenes* and its parent strain. Closed triangle symbols represent bacteria growth in BHI at pH7.2. Open circle symbols represent bacteria growth in BHI at pH5.5.

还具有 MHC- I 类和 MHC- II 类抗原加工途径, 可激发较强的 T 细胞免疫应答^[20~21]。其中由 *hly* 基因编码的 LLO 能溶解宿主细胞的吞噬体膜, 使细菌进入宿主细胞胞浆, 逃避吞噬体的杀灭。由于 LLO 的独特生物学特性, 单增李斯特菌已被用于构建各种减毒疫苗或核酸疫苗^[22~24]。

本试验利用同源重组技术将 NDV 的 *F* 基因整合到单增李斯特菌染色体基因组中, 成功构建了重组单增李斯特菌。表明 RT-PCR 整合的外源基因 *F* 在重组菌中得到了转录 (图 2), 而 *hly* 基因中 *F* 片段的整合降低了重组菌对 HeLa 细胞的黏附力和相对侵袭力, 改变了单增李斯特菌溶血素基因的表达 (图 3), 但不影响其在 BHI 肉汤中 (pH7.2) 的生长, 而在 pH5.5 下, 重组菌比野生型生长缓慢 (图 4), 可能跟 *hly* 在酸性条件下能发挥较好的活性有关。鸡胚及小鼠 LD_{50} 试验表明该重组菌毒力比野生型分别下降了 6.5 个和 3.7 个对数数量级, 表明 *hly* 基因中 *F* 片段的整合致弱了单增李斯特菌。而 Garandeau 等^[25] 缺失 *srtA* 基因 ORF 中 57bp 短片段构建的 *srtA* 缺失株对瑞士小鼠的毒力比野生型约低 2 个对数倍数 ($10^{6.4}$ 对 $10^{4.5}$)。Borezee 等^[26] 用同源重组的方法构建了 *SspA* 基因缺失株, 该突变株缺失 79bp *SspA* (nt559~638) 基因序列, 对瑞士小鼠的 LD_{50} 为 $10^{7.2}$, 比野生型 LO28 (LD_{50} 为 10^5) 的毒力低 2 个对数级。因此, 本研究基于 *hly* 基因突变所构建的重组李斯特菌对小鼠的毒力更弱, 作为疫苗活载体在安全性上具有更大的潜力。

重组单增李斯特菌 PCR 筛选和鉴定发现, 用引物 a 和引物 d 扩增出的条带一直都存在着基因组的

干扰。而选用重组区旁侧引物 *hly* d' 并结合 F 片段的上游或下游引物进行 PCR 扩增时则只得到一个目的条带,野生型阴性对照没有任何条带。Misulovin 等^[27]学者也发现用旁侧引物和重组区任何一条引物筛选,20%~28%由引物 a 与 d 筛选为阴性的克隆其实是真阳性。

本试验表明 *hly* 基因可以作为单增李斯特菌减毒的靶基因,而且可以启动外源基因的转录,这些结果为研究减毒李斯特菌与抗原递呈细胞之间的关系以及含外源基因的减毒李斯特菌作为基因工程疫苗载体通过口服等方式进行免疫,诱导相应的免疫反应等方面奠定基础,从而为新型基因疫苗的研发开辟一条新途径。

参 考 文 献

- [1] Darji A, zur Lage S, Garbe AI, et al. Oral delivery of DNA vaccines using attenuated *Salmonella typhimurium* as carrier. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 2000, **27**(4): 341–349.
- [2] Dietrich G, Gentschev I, Hess J, et al. Delivery of DNA vaccines by attenuated intracellular bacteria. *Immunol Today*, 1999, **20**(6): 251–253.
- [3] Gentschev I, Dietrich G, Spreng S, et al. Delivery of protein antigens and DNA by virulence-attenuated strains of *Salmonella typhimurium* and *Listeria monocytogenes*. *J Biotechnol*, 2000, **83**(1–2): 19–26.
- [4] Sewell DA, Douven D, Pan ZK, et al. Regression of HPV-positive tumors treated with a new *Listeria monocytogenes* vaccine. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*, 2004, **130**(1): 92–97.
- [5] Peters C, Peng X, Douven D, et al. The induction of HIV Gag-specific CD8⁺ T cells in the spleen and gut-associated lymphoid tissue by parenteral or mucosal immunization with recombinant *Listeria monocytogenes* HIV Gag. *J Immunol*, 2003, **170**(10): 5176–5187.
- [6] Simon BE, Cornell KA, Clark TR, et al. DNA vaccination protects mice against challenge with *Listeria monocytogenes* expressing the hepatitis C virus NS3 protein. *Infect Immun*, 2003, **71**(11): 6372–6380.
- [7] Vazquez-Boland JA, Kuhn M, Berche P, et al. *Listeria* pathogenesis and molecular virulence determinants. *Clin Microbiol Rev*, 2001, **14**(3): 584–640.
- [8] Cabanes D, Dehoux P, Dussurget O, et al. Surface proteins and the pathogenic potential of *Listeria monocytogenes*. *Trends Microbiol*, 2002, **10**(5): 238–245.
- [9] Kolb-Maurer A, Kammerer U, Maurer M, et al. Production of IL-12 and IL-18 in human dendritic cells upon infection by *Listeria monocytogenes*. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 2003, **35**(3): 255–262.
- [10] Soussi N, Milon G, Colle JH, et al. *Listeria monocytogenes* as a short-lived delivery system for the induction of type 1 cell-mediated immunity against the p36/LACK antigen of *Leishmania major*. *Infect Immun*, 2000, **68**(3): 1498–1506.
- [11] Jiang LL, Song HH, Chen XY, et al. Characterization of a mutant *Listeria monocytogenes* strain expressing green fluorescent protein. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, 2005, **37**(1): 19–24.
- [12] Thompson RJ, Bouwer HG, Portnoy DA, et al. Pathogenicity and immunogenicity of a *Listeria monocytogenes* strain that requires D-alanine for growth. *Infect Immun*, 1998, **66**(8): 3552–3561.
- [13] Winters DK, Maloney TP, Johnson MG. Rapid detection of *Listeria monocytogenes* by a PCR assay specific for an aminopeptidase. *Mol Cell Probes*, 1999, **13**(2): 127–131.
- [14] Abolmaaty A, Vu C, Oliver J, et al. Development of a new lysis solution for releasing genomic DNA from bacterial cells for DNA amplification by polymerase chain reaction. *Microbios*, 2000, **101**(400): 181–189.
- [15] Ho SN, Hunt HD, Horton RM, et al. Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction. *Gene*, 1989, **77**(1): 51–59.
- [16] Park SF, Stewart GS. High-efficiency transformation of *Listeria monocytogenes* by electroporation of penicillin-treated cells. *Gene*, 1990, **94**(1): 129–132.
- [17] Camilli A, Tilney LG, Portnoy DA. Dual roles of *plcA* in *Listeria monocytogenes* pathogenesis. *Mol Microbiol*, 1993, **8**(1): 143–157.
- [18] Jaradat ZW, Bhunia AK. Adhesion, invasion, and translocation characteristics of *Listeria monocytogenes* serotypes in Caco-2 cell and mouse models. *Appl Environ Microbiol*, 2003, **69**(6): 3640–3645.
- [19] Norrung B, Andersen JK. Variations in virulence between different electrophoretic types of *Listeria monocytogenes*. *Lett Appl Microbiol*, 2000, **30**(3): 228–232.
- [20] Kursar M, Bonhagen K, Kohler A, et al. Organ-specific CD4⁺ T cell response during *Listeria monocytogenes* infection. *J Immunol*, 2002, **168**(12): 6382–6387.
- [21] Darji A, Mohamed W, Domann E, et al. Induction of immune responses by attenuated isogenic mutant strains of *Listeria monocytogenes*. *Vaccine*, 2003, **21** Suppl 2: S102–109.
- [22] Ye L, Bu Z, Skeen MJ, et al. Enhanced immunogenicity of SIV Gag DNA vaccines encoding chimeric proteins containing a C-terminal segment of Listeriolysin O. *Virus Res*, 2003, **97**(1): 7–16.
- [23] Bu Z, Ye L, Skeen MJ, et al. Enhancement of immune responses to an HIV env DNA vaccine by a C-terminal segment of listeriolysin O. *AIDS Res Hum Retroviruses*, 2003, **19**(5): 409–420.
- [24] Saito G, Amidon GL, Lee KD. Enhanced cytosolic delivery of plasmid DNA by a sulfhydryl-activatable listeriolysin O/protamine conjugate utilizing cellular reducing potential. *Gene Ther*, 2003, **10**(1): 72–83.
- [25] Garandeau C, Reglier-Poupert H, Dubail I, et al. The sortase SrtA of *Listeria monocytogenes* is involved in processing of internalin and in virulence. *Infect Immun*, 2002, **70**(3): 1382–1390.
- [26] Borezee E, Pellegrini E, Beretti JL, et al. SvpA, a novel surface virulence-associated protein required for intracellular survival of *Listeria monocytogenes*. *Microbiology*, 2001, **147**(Pt 11): 2913–2923.
- [27] Misulovin Z, Yang XW, Yu W, et al. A rapid method for targeted modification and screening of recombinant bacterial artificial chromosome. *J Immunol Methods*, 2001, **257**(1–2): 99–105.

Characterization of a recombinant *Listeria monocytogenes* strain containing the fusion protein gene of Newcastle disease virus

XU Jing-jing, JIANG Ling-li, CHEN Ning, SHUAI Jiang-bing, FANG Wei-huan*

(Zhejiang University Institute of Preventive Veterinary Medicine and Zhejiang Provincial Key Laboratory for Preventive Veterinary Medicine, Hangzhou 310029, China)

Abstract : Homologous recombination was utilized for construction of a recombinant strain of *L. monocytogenes* carrying a gene from the Newcastle disease virus by insertional mutation targeting its listeriolysin O gene (*hly*). The gene encoding fusion protein of the Newcastle disease virus (NDV-F) was used as the model heterologous gene. The F gene was inserted into *hly* downstream to its promoter and signal sequence by overlapping extension polymerase chain reaction, which was then subcloned into the shuttle plasmid pKSV7 for allelic exchange with *L. monocytogenes* chromosome. PCR amplification of the target genes indicated insertion of the F gene into the chromosome DNA of *L. monocytogenes*. RT-PCR showed transcription of F gene from the recombinant *L. monocytogenes* strain. Comparisons were then made between the recombinant strain and its wild parent strain in terms of the hemolytic activity, adhesion and invasiveness to cultured HeLa cells, virulence to mice and chicken embryos, and growth kinetics in broth medium as well as its stability upon repeated subculturing and serial passages in mice. The recombinant *L. monocytogenes* lost its hemolytic activity on the blood agar and had no hemolytic titer from its culture supernatants as compared with the titer of 24 in the supernatant from the wild parent strain. The recombinant strain also had lower adhesiveness ($P > 0.05$) and significantly lower relative invasiveness to the HeLa cells than its wild type strain ($P < 0.05$). Such insertional mutation resulted in reduced virulence, about 3.7 logs and 6.5 logs less than its parent strain *L. monocytogenes* 10403S as shown by the 50% lethal dose assays in the mouse and chicken embryonated egg models respectively. The recombinant strain was relatively stable as shown by amplification of the target gene NDV-F from its genomic DNA after subculturing in BHI broth or in mice for 5 times.

Keywords : *Listeria monocytogenes*; Homologous recombination; Insertional mutation; Listeriolysin O

Foundation item : Chinese National Natural Science Foundation (30270073)

* Corresponding author. Tel/Fax : 86-571-86971242 ; E-mail : whfang@zju.edu.cn

Received : 13 December 2005 / Accepted : 9 January 2006 / Revised : 24 January 2006