

天然缺失 *inlAB* 的非典型单核细胞增多性李斯特菌生物学特性鉴定

陈巧妙^{1,2}, 陈健舜², 吴迪², 蒋建军³, 杨倩¹, 方维焕^{2*}

(¹南京农业大学动物医学院, 南京 210095)

(²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)

(³石河子大学动物科技学院, 石河子 832000)

摘要【目的】 *InlA* 与 *InlB* 是单核细胞增多性李斯特菌重要的毒力因子, 其介导的黏附作用是细菌建立感染的前提。本研究拟探明天然缺失 *inlAB* 基因簇的非典型单增李斯特菌的表型与基因型特征。**【方法】** 针对 *inlAB* 天然缺失株 S10, 进行生化特征、细胞黏附力、小鼠体内毒力、感染相关基因检测、谱系分析等。**【结果】** S10 株为具有典型单增李斯特菌生化特征的 1/2b 型菌株, 对 HeLa 细胞的黏附力显著低于其他菌株 ($P < 0.05$), 对小鼠毒力较弱。S10 缺失 *inlAB* 及其毗邻的 *lmo0431*、*lmo0432*、*lmo0436*、*lmo0437* 基因, 但具有李斯特菌第一毒力岛中完整的毒力基因构成。S10 分布于谱系 I 的进化枝上, 与 4b 型菌株的遗传距离较近。**【结论】** S10 为单增李斯特菌 *inlAB* 天然缺失株, 代表该类非典型菌株的首次报道。S10 具有典型的单增李斯特菌谱系 I 基因背景, *inlAB* 可能通过独立的重组或水平转移事件缺失于基因组。

关键词: 单增李斯特菌; 内化素 AB; 毒力; 进化

中图分类号: Q933 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209(2009)08-1033-07

单核细胞增生性李斯特菌 (*Listeria monocytogenes*, 简称单增李斯特菌) 是重要的人兽共患食源性病原菌, 可引发胃肠炎、败血症、脑膜脑炎和流产等^[1]。但并非所有单增李斯特菌均具有相同致病力, 98% 以上的人单增李斯特菌病例由谱系 I 的 1/2b 与 4b 型以及谱系 II 的 1/2a 与 1/2c 型引起, 谱系 III 则很少引起发病^[2-3]。

单增李斯特菌的感染过程包括抵抗宿主体内环境、黏附与侵入宿主细胞、细胞内增殖与细胞间扩散, 每一步均由特定的毒力因子所负责^[4]。李斯特菌第一毒力岛 (*prfA-plcA-hly-mpl-actA-plcB*, LIPI-1) 与单增李斯特菌的胞内感染周期有关^[5], 而 Sigma B 是对环境胁迫产生应答反应的主要调控因子^[6], 其调

控的胆酸盐水解酶 (BSH) 可保护细菌免受胆酸盐的杀伤作用^[7], 而精氨酸脱亚胺酶系统 (ADI) 蛋白最近被证明与单增李斯特菌抵抗酸应激有关^[8-9]。单增李斯特菌内化素 (*Inl*) 家族共有 25 个成员, 其 N 端具有与受体结合、重复数不等的亮氨酸重复序列 (LRRs)^[10]。*InlA* 和 *InlB* 是该家族最重要的成员, 具有受体特异性: *InlA* 与钙黏蛋白 (E-cadherin) 结合, 介导细菌进入上皮细胞; *InlB* 则与补体分子 C1q 受体或肝细胞生长因子受体 (Met) 结合, 介导细菌穿越肝细胞、成纤维细胞、上皮细胞等^[11-12]。*InlC*^[13]、*InlJ*^[14] 与 *InlF*^[15] 亦先后被证明在特定情况下具有辅助的黏附与侵袭功能, 但 *inlAB* 被人工敲除后, 其它内化素并不能替代 *InlAB* 的作用, 进而导致细菌毒

基金项目: 国家自然科学基金 (30870068)

* 通信作者。Tel: +86-571-86971242; Fax: +86-571-86971242; E-mail: whfang@zju.edu.cn

作者简介: 陈巧妙 (1985-), 女, 安徽铜陵人, 硕士研究生, 主要从事黏膜免疫及动物病原微生物学研究。E-mail: bonny09222004@yahoo.com.cn

收稿日期: 2009-04-23; 修回日期: 2009-05-26

力显著降低^[4,10]。

本实验室在对 115 株不同来源的单增李斯特菌检测后,发现食品分离株 S10 天然缺失 *inlAB*。由于 *inlAB* 介导的黏附作用是该菌建立感染的前提,我们随之对这株非典型单增李斯特菌进行了表型与基因型分析。

1 材料和方法

1.1 菌株和主要试剂

8 株单增李斯特菌均由本实验室保存(表 1)。各菌株接种于 BHI (Difco) 培养基,37℃ 振荡培养过夜。*Taq* DNA polymerase、DNA Ladder Marker 购自 Taraka 生物工程有限公司; dNTP Mix 购自上海申能

博彩生物科技有限公司;DNA 胶回收试剂盒购自上海生工有限公司;核酸电泳染料 Goldview 购自赛百盛生物公司;引物由上海英骏生物技术有限公司合成(表 2);其余试剂均为国产分析纯。

1.2 生化试验

鼠李糖、木糖、甘露醇与葡萄糖发酵反应及溶血性试验均按本实验室优化的方法进行^[3,16]。

1.3 基因组 DNA 的制备

采用煮沸法提取细菌基因组 DNA^[3]。离心收集细菌沉淀后用等体积的 2 × TZ 和蒸馏水重悬, -20℃ 静置 45 min,于沸水中 8 min 后立即置冰浴中冷却 7 min,离心后取上清保存于 -20℃ 备用。

表 1 单增李斯特菌谱系、血清型、感染相关基因分析及对小鼠的毒力

Table 1 Lineage classification, serotyping and detection of infection-associated genes of *L. monocytogenes* isolates and their *in vivo* virulence in ICR mouse model

Strain	Source	Lineage	Serovar	LD ₅₀ in mice ^a	Infection-associated genes detection								
					Stress response			Adhesion and invasion				Intracellular life	
					<i>sigB</i> , <i>bsh</i> , <i>dnaK</i> , <i>groEL</i> , <i>gadD2</i> , <i>arcA</i>	<i>lmo0038</i>	<i>inlAB</i>	<i>inlC</i>	<i>inlF</i>	<i>inlJ</i>	<i>ascB-dapE</i>	LlPI-1 ^b , <i>hpt</i>	<i>actA</i> (bp) ^c
S10	Seafood	I	1/2b	7.30	+	+	-	+	-	+	<i>inlC2DE</i>	+	432
M1	Milk	I	1/2b	6.46	+	+	+	+	-	+	<i>inlC2DE</i>	+	537
B3	Pork	I	1/2b	5.31	+	+	+	+	-	+	<i>inlC2DE</i>	+	432
M5	Milk	I	4b	3.86	+	+	+	+	-	+	<i>inlC2DE</i>	+	537
10403S	Reference	II	1/2a	5.49	+	+	+	+	+	+	<i>inlGC2DE</i>	+	537
V1	Vegetable	II	1/2c	6.11	+	+	+	+	+	+	<i>inlGHE</i>	+	537
54006	Reference	III	4a	8.35	+	-	+	-	-	-	-	+	432
W1-111	-	III	4c	5.20	+	-	+	+	-	-	-	+	432

^a. The LD₅₀ values for mice were calculated by using the trimmed Spearman-Kärber method. ^b. LlPI-1, *Listeria* pathogenicity island I containing *prfA*, *plcA*, *hly*, *mpl*, *actA* and *plcB*. ^c. Some *L. monocytogenes* strains exhibit a 105 bp deletion in *actA* gene, leading to removal of 35 amino acids in the ActA protein^[16].

1.4 PCR 及其产物测序

采用 30 μL 反应体系: 10 × *Taq* Buffer (含 Mg²⁺) 3 μL, 10 mmol/L dNTP Mix 0.6 μL, 25 μmol/L 引物各 0.6 μL, DNA 模板 2 μL, *Taq* DNA polymerase 0.8 μL, 加水补足体积。反应条件为: 94℃ 预变性 3 min; 94℃ 变性 30 s, 退火 30 s, 72℃ 延伸时间按 1000 bp/min 计算 30 个循环, 72℃ 5 min。PCR 产物回收纯化后送至上海英骏生物技术有限公司测序。

1.5 谱系与血清型分析

谱系分析参照 Wiedmann 等建立的方法进行^[17]而血清型分析参照 Doumith 等建立的多重 PCR 方法进行^[18]。

1.6 黏附力试验

按本实验室优化的方法进行^[19]。调整细菌浓度至 1 × 10⁸ CFU/mL 左右, 10 倍稀释到 DMEM 细胞培养液中, 并加入至融合度为 80% 左右的 HeLa 单层细胞。在 37℃ 和 5% CO₂ 条件下感染 1 h, PBS 洗

涤后, 以 0.1% Triton-100 裂解细胞, 平板法计数。黏附力的计算公式为 (胞内细菌数 + 胞外细菌数) / 加入孔内的细菌数 × 100。将 1/2b 型菌株 M1 的黏附力设为 100%, 相对黏附力(%) = 各菌株黏附力 / M5 黏附力。采用 *t* 检验进行统计学分析。

1.7 小鼠毒力试验

ICR 小鼠(雌性, 20 ~ 22 g)购自浙江省中医学院实验动物中心。小鼠毒力试验参照本实验室建立的方法进行^[3], LD₅₀ 根据 Spearman-Kärber 方法计算。

1.8 感染相关基因分析

对 24 个感染相关基因进行 PCR 扩增, 主要分为三大类: (1) 抗应激 (*sigB*, *bsh*, *dnaK*, *groEL*, *gadD2*, *lmo0038*, *arcA*) (2) 黏附侵袭 (*inlA*, *inlB*, *inlC*, *inlF*, *inlJ*, *ascB-dapE* 内化素岛 *inlGH* [C2D] E) (3) 胞内增殖与扩散 (*prfA*, *plcA*, *hly*, *mpl*, *actA*, *plcB*, *hpt*)。

表 2 引物及扩增条件

Table 2 PCR and sequencing primers used in this study

Locus	Putative function	Forward primer(5'→3')	Reverse primer(5'→3')	Length /bp	Annealing temperature /°C
<i>actA</i>	Actin-assembly inducing protein precursor	GGTACGTGATAAAAATCGACGA	TAGTTATGTCACTTATCAGAGC	537 or 432 ^a	55
<i>lmo0737</i>	Putative transcriptional regulator	AGGGCTTCAAGGACTTACCC	ACGATTTCTGCTTGCCATTTC	691	53
<i>lmo1118</i>	Hypothetic protein	AGGGGCTTAAAATCCTGGAA	CGGCTTGTTCCGCATACCTTA	906	53
<i>ORF2110</i>	Hypothetic protein	AGTGGACAATTGATTGGTGAA	CATCCATCCCCTTACTTTGGAC	597	53
<i>ORF2819</i>	Putative transcriptional regulator	AGCAAAAATGCCAAAATCTCGT	CATCACTAAAAGCCTCCCATTG	471	53
<i>sigB</i>	Stress responsive alternative σ factor B	CCAAAAAGTATCTCAACCTGAT	CATGCATTTGTGATATATCGA	643	62
<i>bsh</i>	Bile salt hydrolase	CCCACGACTATAAGCATCCA	GCAGGACTCAATTTCTCAGGA	399	58
<i>dnaK</i>	Class I heat-shock protein	ATTGGTCTGCATTGTTGCGA	TGGCGTAATCACTGGTGATGT	488	57
<i>groEL</i>	Chaperone protein	AATCGCCTGCTCCTTCTACGA	CTATCGCTCAAGTTGCTGCTA	585	57
<i>gadD2</i>	Glutamate decarboxylase	CGGAGAAAATGCCAACCATGCA	GTTCTTGAATAGAGGCTTGGGA	412	58
<i>lmo0038</i>	Putative stress response gene	TTGAAAAACAGCGTGGTTGCT	CCAACCACTTCACAGTTTGGGA	967	62
<i>arcA</i>	Arginine deiminase	GGTCATTTATGCATTTGGACA	GATCGTTTGATACTTGATTTCCGA	321	62
<i>inlA</i>	Internalin A	TAATAAAGTGATAAAGCCAG	TTTATCCGTAAGTAAATTC	606	60
<i>inlB</i>	Internalin B	CACFTTCTTTGGAGCATAATGGT	CATCATCACTTATTATTTCTGGA	394	60
<i>inlC</i>	Internalin C	CCATCTGGGTCTTTGACAGTA	CAAATAAGTGACCTTAGTCTT	398	55
<i>inlF</i>	Internalin F	TGACTTATTTGCAGTTGGGGT	TTGGTTTCAGGAATAAGCGCG	1,119	55
<i>inlJ</i>	Internalin J	AGATGTGACACCACAACTCAA	TGTATTATGCGTGACATCAAGCT	401	58
<i>ascB-dapE-1</i>	Internalin cluster between <i>ascB</i> and <i>dapE</i>	TGATGATTCAGTATGATTCCTA	ATCAGTAAGCACTGGATCAGTA	Variable ^b	55
<i>ascB-dapE-2</i>	Internalin cluster between <i>ascB</i> and <i>dapE</i>	TGATGATTCAGTATGATTCCTA	CGTTTGCTAAAATTCATCTGTGA	Variable ^b	55
<i>prfA</i>	Transcriptional regulator	CCATACACATAGTTCAGGATT	TTCGTTATAATGCTCTGGCTTT	266	60
<i>plcA</i>	Phosphatidylinositol- phospholipase C	ATTAACCAAAACCACTGGCTCA	TTGATAAGCAGTCTGGACAAT	502	55
<i>hly</i>	Listeriolysin O	GTTGCAAGCGCTTGGAGTGAA	ACGTATCCTCCAGAGTGATGG	420	58
<i>mpl</i>	Metalloenzyme	CAAGGACAGCTTAGGATTAC	TTCTTATTCGCCCATCTCGC	886	55
<i>plcB</i>	Phosphatidylcholine- phospholipase C	ATTAACCAAAACCACTGGCTCA	TTGATAAGCAGTCTGGACAAT	502	55
<i>hpt</i>	Hexose phosphate transport	GATTTGTGCAATCACCAGGT	GAACCTAGCAATGCTCCAAT	529	58
<i>dapE</i>	Succinyl diaminopimelate desuccinylase	GTAATAATTGATTCGACTAATG	CACTAGCACTTGTTCCTCTG	669	62
<i>gap</i>	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase	CTGGATCAGAAGCTGCTTCCA	TCGTATTCAAAAATGTGGAAGGA	621	60
<i>hisJ</i>	Histidinol phosphate phosphatase	TCCACATGGTACGCATGAT	GGACATGTCAAAAATGAAAGATC	714	58
<i>purM</i>	Phosphoribosyl aminoimidazole synthase	CAAGCTCCACTTTGACAGCTAA	TAAAGCAGCGCTGGACGTA	693	62

^a. Some *L. monocytogenes* strains/isolates harbor a 105-bp deletion in *actA* gene, leading to removal of 35 amino acids in the ActA protein^[16].

^b. Primer pairs targeting internalin cluster between *ascB* and *dapE* yield variable product sizes from different strains^[16].

1.9 多位点序列分析(MLST)与生物信息学分析

选择毒力基因 *actA* 及看家基因 *dapE*、*gap*、*hisJ* 与 *purM* 进行序列测定与分析。应用 MAGE v4.0 软件^[20]对 *actA-dapE-gap-hisJ-purM* 串联序列进行比对,选用 Neighbor-joining 法构建无根进化树,经重复取样 1000 次,进行 Bootstrap 值分析。多态性位点通过 DnaSP v4.8 软件计算^[21]。遗传距离通过 MAGE v4.0 软件计算^[20]。

单增李斯特菌各血清型的 *inlAB* 的邻近基因序列来自单增李斯特菌全基因组(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>),其功能预测通过 BLAST 获得。

2 结果

2.1 S10 为具有典型生化特征的 1/2b 型单增李斯特菌

单增李斯特菌 S10 分离自华东地区的冻鱿鱼

头,具有单增李斯特菌典型的生化特征,即鼠李糖与葡萄糖阳性,木糖与甘露醇阴性,并有 β 溶血现象。S10 属于谱系 I,血清型为 1/2b 型。

2.2 S10 缺失 *inlAB* 及其邻近区域

通过已公布的单增李斯特菌全基因组序列分析,发现 *inlAB* 保守存在于各血清型,但其邻近区域则呈现出极大的多样性,其中 1/2b 型在该区域具有最简单的基因排布(图 1)。设计 13 对针对 *inlAB* 及其基因间序列的引物进行 PCR 反应,S10 均未扩增到任何条带。在 *inlAB* 两翼,编码转录调控因子(LysR 家族)的 *lmo0430*、编码乙酰转移酶(CysE/LacA/LpxA/NodL 家族)的 *lmo0431*、编码氧化还原酶(短链脱氢酶/还原酶家族)的 *lmo0432*、编码 YifG 的 *lmo0437* 与编码假定蛋白的 *lmo0436* 均保守存在于各血清型,而肽聚糖结合蛋白编码基因 *lmo0435* 仅存在于 1/2a 与 1/2c 型,细胞壁结合蛋白编码基因

F0450 仅存在于 4b 与 4a 型(图 1;表 3)。针对上述基因设计引物, *S10* 仅扩增得到 *lmo0430*, 与 1/2a 型

菌株 EGD、4b 型菌株 F2-365 与 4a 型菌株 HCC23 的同源性分别为 99.6%、94.0% 与 77.4%。

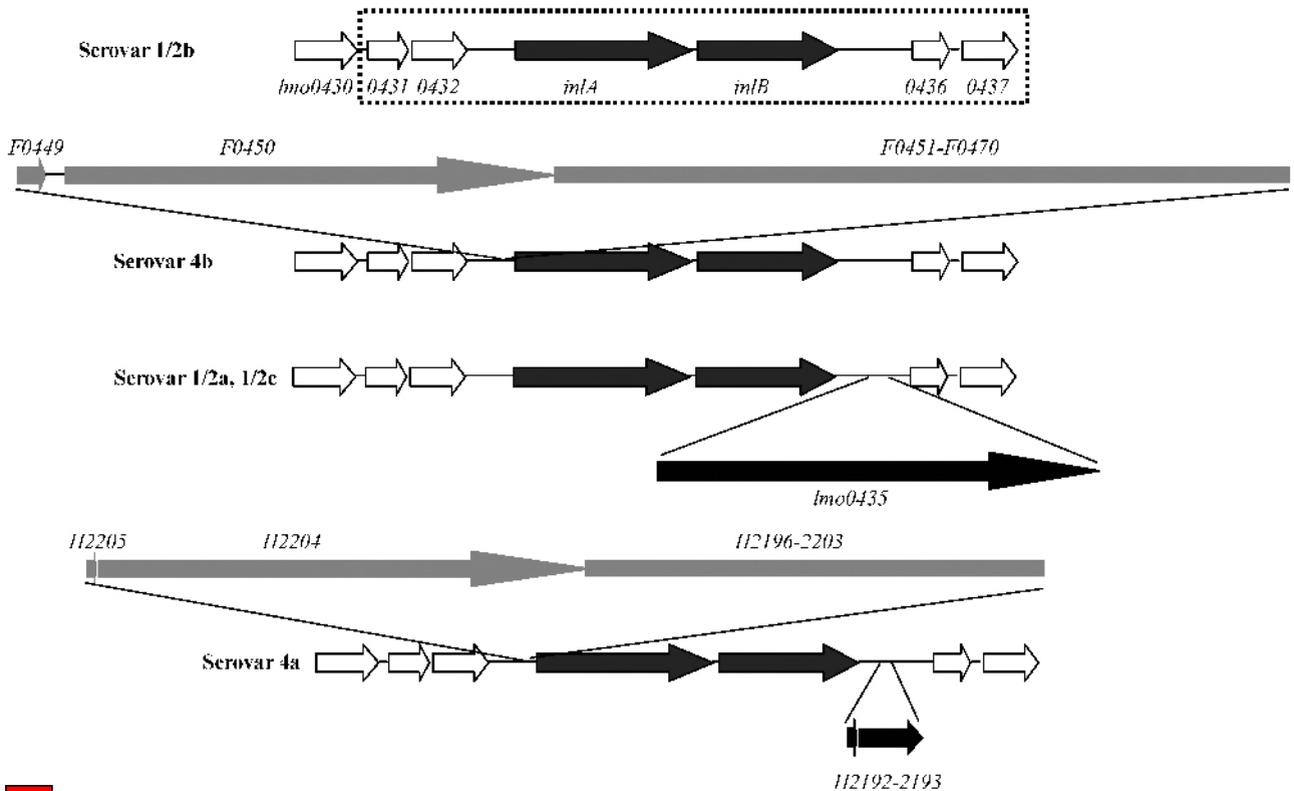


图 1 各血清型单增李斯特菌 *inlAB* 邻近区域基因结构。虚线框内区域为菌株 *S10* 所缺失。基因名称按标准菌株 EGD(1/2a 型)、F2365(4b 型)与 HCC23(4a 型)分别以 *lmo*、*F* 与 *H* 命名

Fig.1 Organization of the regions flanking the *inlAB* chromosomal locus of strains belonging to different serovars. The region in dashed box was absent in serovar 1/2b strain *S10*. The genes (or counterparts) designated *lmo*, *F* and *H* were derived from *L. monocytogenes* reference strains EGD(serovar 1/2a), F2365 (serovar 4b) and HCC23 (serovar 4a) respectively.

表 3 内化素 AB 邻近区域基因生物信息学分析

Table 3 Bioinformatic analyses of genes flanking *inlAB* locus

Locus ^a	Size /bp	Predicted function
<i>lmo0430</i> /F0446/H2208	876	Transcriptional regulator (LysR family)
<i>lmo0431</i> /F0447/H2207	570	Acetyltransferase (CysE/LacA/LpxA/NodL family)
<i>lmo0432</i> /F0448/H2206	747	Oxidoreductase (short-chain dehydrogenase/ reductase family)
F0450/H2204	6588/6597	Wall-associated protein
<i>lmo0435</i>	6042	Peptidoglycan bound protein (LPXTG motif)
<i>lmo0436</i> /F0473/H2191	486	Hypothetical protein
<i>lmo0437</i> /F0474/H2190	846	YfG protein

^a. The counterparts designated *lmo*, *F* and *H* were derived from *L. monocytogenes* reference strains EGD(serovar 1/2a), F2365 (serovar 4b) and HCC23 (serovar 4a) respectively.

2.3 S10 的黏附力显著低于其他菌株

在 HeLa 细胞模型中,除 *S10* 外 7 株代表谱系 I、II、III 的单增李斯特菌分离株的相对黏附力为 29.9% ± 4.1% 至 184.8% ± 8.9%, 其中 1/2b 型菌株 M1、B3 的黏附力分别为 100% 与 88.0% ± 2.8%, 而 *S10* 的黏附力仅为 12.4% ± 2.0%, 显著低于其他菌株 ($P < 0.05$) (图 2)。

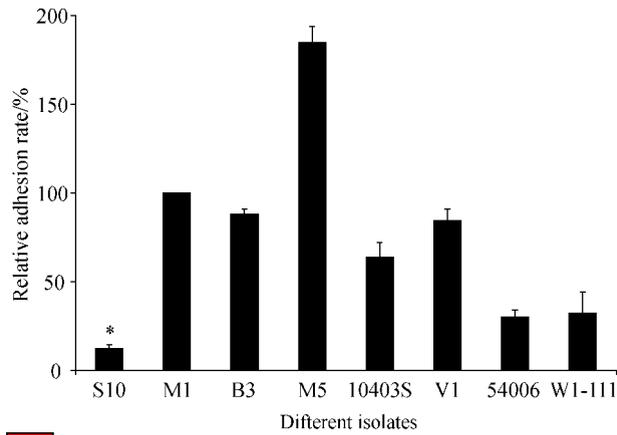
2.4 S10 对小鼠具有较弱的毒力

强毒单增李斯特菌对 ICR 小鼠的 LD₅₀ 约为 3.86

至 6.46, 其中 1/2b 型菌株 M1 与 B3 的 LD₅₀ 分别为 6.64 与 5.31, 而在单增李斯特菌-无害李斯特菌进化枝上处于进化过渡状态的 4a 型菌株 54006^[31] 的 LD₅₀ 则为 8.35 (表 1)。S10 的 LD₅₀ 为 7.30, 毒力弱于典型 1/2b 型菌株, 但强于 54006。

2.5 S10 具有除 *inlAB* 较完整的感染相关基因构成

在除 *inlAB* 外 22 个感染相关基因中, *inlF* 仅存在于谱系 II 菌株, *ascB-dapE* 内化素岛在不同血清型间呈现多态性, 全部或部分谱系 III 菌株缺失 ADI



2 单增李斯特菌对 HeLa 细胞的相对黏附力(%)

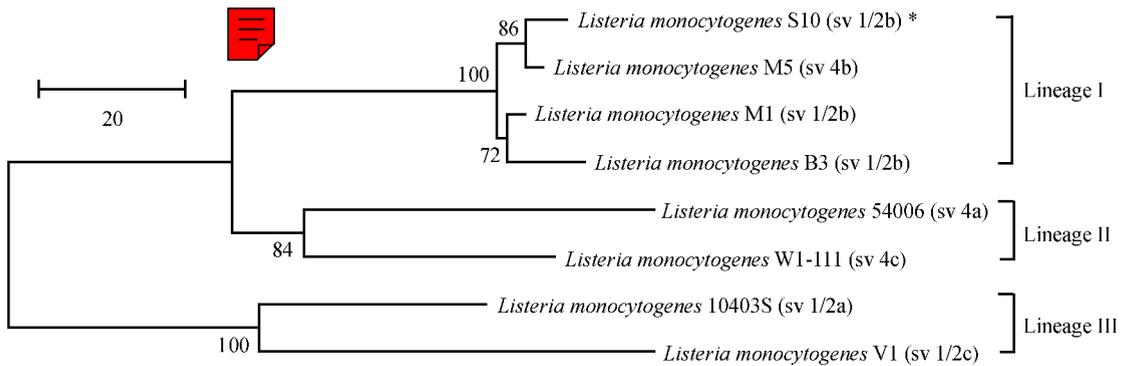
Fig.2 Relative adhesion rate of *L. monocytogenes* isolates on HeLa epithelial cell monolayers. The adhesion rate of serovar 1/2b isolate M1 was set at 100%. Vertical bars depict the standard deviation. *, $P < 0.05$.

岛、*inlC* 及 *inlJ*, 而 *prfA* 毒力岛、*bsh* 与 *hpt* 则存在于所有菌株中。S10 除缺失 *inlAB* 外, 具有典型的 1/2b

型感染相关基因构成。S10 的 *actA* 基因缺失 105 bp (35 个氨基酸), 即缺失 1 个脯氨酸富集区 (DFPPPPTDEEL) 这种缺失亦存在于其他谱系与血清型的菌株中。S10 在 *PrfA* 关键位点(如第 145、165、197 位等^[5, 24])未有突变。

2.6 S10 位于谱系 I 进化枝的 1/2b 型与 4b 型分枝间

选择毒力基因 *actA* 及看家基因 *dapE*、*gap*、*hisJ* 与 *purM*, 对 S10 及其余 7 株单增李斯特菌进行多位点序列分析(MLST)。将 5 个基因序列串联后, 共有 274 个多态性位点(274/3109, 8.8%), 可分辨出 8 个序列型(sequence type)。S10 具有独特的序列型, 位于谱系 I 的进化枝上, 与 4b 型菌株 M5 构成姐妹分枝(图 3)。S10 与 4b 型菌株(M5)与 1/2b 型菌株(M1、B3)的遗传距离分别为 14.5 与 17.5, 表明其与 4b 型菌株亲缘关系较近。



3 基于 *actA-dapE-gap-hisJ-purM* 串联序列的 Neighbor-joining 系统进化树

Fig.3 Neighbor-joining cladogram based on *actA-dapE-gap-hisJ-purM* concatenated gene cluster. The serovar 1/2b strain S10 naturally lacking *inlAB* was marked with asterisk. Sv, serovar.

3 讨论

单增李斯特菌是细胞内感染的模式病原, 对宿主细胞的黏附作用是其建立感染的前提, 主要由 *InlA* 与 *InlB* 介导^[4, 10]。但部分菌株的 *inlA* 碱基发生突变, 产生提前终止密码子(Premature stop codons, PMSC), 表达出截短的 *InlA*, 引起细菌的黏附、侵袭力以及对动物的致病力显著降低^[22]。但 *inlA* 的 PMSC 并不影响其下游基因 *inlB* 的表达^[22]。这类菌株大多为 1/2a 与 1/2c 型, 这可能为谱系 II 较之谱系 I 较少引起人单增李斯特菌病的原因之一。而 S10 属于谱系 I 的 1/2b 型, 天然缺失 *inlAB* 及其邻近区域, 包括 *CysE/LacA/LpxA/NodL* 家族的乙酰转移酶、短链脱氢酶/还原酶家族的氧化还原酶以及 *YifG* 编码基因等。S10 为这类非典型单增李斯特菌的首次

报道, 分离率极低($< 1\%$)。

S10 对 HeLa 细胞的黏附力显著低于其他菌株($P < 0.05$), 对小鼠的毒力(LD_{50} 为 7.30) 低于一般菌株, 但高于部分谱系 III 菌株, 如参考株 54006(LD_{50} 为 8.35) 及本实验室先前报道的牛奶分离株 M7(LD_{50} 为 8.21)^[3, 19]。我们进而检测了其他 22 个感染相关基因。S10 具有典型的 1/2b 型感染相关基因构成: 含有 *inlC* 与 *inlJ*、缺失 *inlF*、*ascB-dapE* 内化素岛结构为谱系 I 典型的 *inlC2DE*, 由此进一步表明 *inlAB* 在细菌感染过程中所起作用的不可替代性。*ActA* 蛋白有 4 个脯氨酸富集区(DFPPPPTDEEL), 介导宿主蛋白 VASP 与 Mena 的结合以激发基于肌动蛋白的细菌运动, 使细菌在细胞内及细胞间迁移^[23]。S10 与 54006、M7 均缺失其中 1 个脯氨酸富集区, 但类似的缺失亦存在于具有较强毒力的菌株中, 包括

引起新疆地区羊群发病的 4b 型菌株 90SB1、125SL1 与引起 1985 年美国加州单增李斯特菌暴发的 4b 型菌株 F2-365^[16]。由此可见, ActA 蛋白中 3 个脯氨酸富集区足以诱导细菌的运动, 1 个脯氨酸富集区的缺失并非导致弱毒的原因。 *inlA*、*inlB*、*actA* 等主要毒力因子均由转录活化因子 PrfA (*prfA*) 所调控^[5]。而 PrfA 的关键位点, 如位于螺旋-旋转-螺旋 (HTH) 基序外侧的第 145 位甘氨酸 (G) 若突变后, 则引起 PrfA 空间构象的改变, 使其处于高活性状态, 引起 PrfA 所调控的膜裂解蛋白如 LLO、PC-PLC 等过度表达, 细菌裂解宿主细胞能力亦随之增强, 从而使菌体暴露于机体免疫系统而被清除, 因而这类菌株的毒力较弱^[24]。54006、M7 的第 145 位氨基酸由甘氨酸 (G) 突变为丝氨酸 (S), 在第 165、197 位分别由 A、N 替代了 T、K, 而 S10 在这些位点 (如第 145、165、197 位等) 上未有突变, 表明 S10 具有正常的 PrfA 调控水平。进一步研究其他内化素基因在 *inlAB* 缺失背景下的转录、表达水平及在感染过程所起的作用, 将更全面地揭示单增李斯特菌的致病机制以及该细菌功能性内化素家族多元性的内涵。

基于 *actA-dapE-gap-hisJ-purM* 的多位点序列分析 (MLST) 具有理想的分辨力, 可将 8 个单增李斯特菌菌株分为 8 个序列型 (sequence type), 其中 S10 与 4b 型菌株 M5 位于姐妹分枝上。S10 与其他 1/2b 型菌株的遗传距离 (17.5) 大于 4b 型菌株 (14.5), 表明 S10 与 4b 型亲缘关系较近, 其进化过程可能异于其他 1/2b 型菌株。但 S10 具有典型的单增李斯特菌谱系 I 的基因背景, *inlAB* 可能通过独立的重组或水平转移事件缺失于基因组。随着对 *inlA* PMSC 的认识与 *inlAB* 天然缺失株的出现, 可以推测单增李斯特菌某些对致病力起决定作用的毒力基因正在消失^[25]。病原菌这种向着毒力减弱或消失方向进化的例子比较罕见。但从理论上说, 像单增李斯特菌这样亦可在自然界 (如水、土壤、植物等) 自由生活的细菌, 与致病力相关的基因对其并非必需, 将其缺失并不影响细菌的生存与增殖, 因此这样的基因片段可以看作一种不必要的负荷, 即“基因垃圾”, 在自然选择的压力下, 这种垃圾基因可能会清除, 以使细菌能更好地适应生存环境^[3, 26-27]。综上所述, 非典型单增李斯特菌 S10 对深入研究细菌的内化机制与致病基因组进化趋势具有重要意义。

参考文献

[1] Vazquez-Boland JA, Kuhn M, Berche P, et al. *Listeria* pathogenesis and molecular virulence determinants. *Clinical Microbiology Reviews*, 2001, 14(548): 584 - 640.

- [2] Swaminathan B, Gerner-Smidt P. The epidemiology of human listeriosis. *Microbes and Infection*, 2007, 9(10): 1236 - 1243.
- [3] Chen J, Jiang L, Chen X, et al. *Listeria monocytogenes* serovar 4a is a possible evolutionary intermediate between *L. monocytogenes* serovars 1/2a and 4b and *L. innocua*. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2009, 19(3): 238 - 249.
- [4] Cossart P, Toledo-Arana A. *Listeria monocytogenes*, a unique model in infection biology: an overview. *Microbes and Infection*, 2008, 10(9): 1041 - 1050.
- [5] Scotti M, Monzo HJ, Lacharme-Lora L, Lewis DA, et al. The PrfA virulence regulon. *Microbes and Infection*, 2007, 9(10): 1196 - 1207.
- [6] 冯莹颖, 张晓莉, 罗勤, 等. Sigma B 因子活性的调节及其在几种革兰氏阳性食源性致病菌中的作用. *微生物学报 (Acta Microbiologica Sinica)*, 2008, 48(6): 839 - 843.
- [7] Dussurget O, Cabanes D, Dehoux P, et al. *Listeria monocytogenes* bile salt hydrolase is a PrfA-regulated virulence factor involved in the intestinal and hepatic phases of listeriosis. *Molecular Microbiology*, 2002, 45(4): 1095 - 1106.
- [8] Chen J, Jiang L, Chen Q, et al. *lmo0038* is involved in acid and heat stress responses and specific for *Listeria monocytogenes* lineages I and II, and *Listeria ivanovii*. *Foodborne Pathogens and Disease*, 2009, 6(3): 365 - 376.
- [9] Ryan S, Begley M, Gahan CGM, et al. Molecular characterization of the arginine deiminase system in *Listeria monocytogenes*: regulation and role in acid tolerance. *Environmental Microbiology*, 2009, 11(2): 432 - 445.
- [10] Bierne H, Sabet C, Personnic N, et al. Internalins: a complex family of leucine-rich repeat-containing proteins in *Listeria monocytogenes*. *Microbes and Infection*, 2007, 9(10): 1156 - 1166.
- [11] Schubert WD, Urbanke C, Ziehm T, et al. Structure of internalin, a major invasion protein of *Listeria monocytogenes*, in complex with its human receptor E-cadherin. *Cell*, 2002, 111(6): 825 - 836.
- [12] Shen Y, Naujokas M, Park M, et al. InlB-dependent internalization of *Listeria* is mediated by the Met receptor tyrosine kinase. *Cell*, 2000, 103(3): 501 - 510.
- [13] Engelbrecht F, Chun SK, Ochs C, et al. A new PrfA-regulated gene of *Listeria monocytogenes* encoding a small, secreted protein which belongs to the family of internalins. *Molecular Microbiology*, 1996, 21(4): 823 - 837.
- [14] Sabet C, Toledo-Arana A, Personnic N, et al. The *Listeria monocytogenes* virulence factor InlJ is specifically expressed *in vivo* and behaves as an adhesion. *Infection and Immunity*, 2008, 76(4): 1368 - 1378.
- [15] Kirchner M, Higgins DE. Inhibition of ROCK activity allows InlF-mediated invasion and increased virulence of *Listeria*

- monocytogenes*. *Molecular Microbiology*, 2008, 68(3):749 – 767.
- [16] Chen J, Luo X, Jiang L, et al. Molecular characteristics and virulence potential of *Listeria monocytogenes* isolates from Chinese food systems. *Food Microbiology*, 2009, 26(1):103 – 111.
- [17] Wiedmann M, Bruce JL, Keating C, et al. Ribotypes and virulence gene polymorphisms suggest three distinct *Listeria monocytogenes* lineages with differences in pathogenic potential. *Infection and Immunity*, 1997, 65(7):2707 – 2716.
- [18] Doumith M, Buchrieser C, Glaser P, et al. Differentiation of the major *Listeria monocytogenes* serovars by multiplex PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 2005, 42(3):3819 – 3822.
- [19] Jiang L, Xu J, Chen N, et al. Virulence phenotyping and molecular characterization of a low-pathogenicity isolate of *Listeria monocytogenes* from cow's milk. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 2006, 38(4):262 – 270.
- [20] Tamura K, Dudley J, Nei M, et al. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution*, 2007, 24(8):1596 – 1599.
- [21] Rozas J, Rozas R. DnaSP version 3: an integrated program for molecular population genetics and molecular evolution analysis. *Bioinformatics*, 1999, 15(2):174 – 175.
- [22] Nightingale KK, Ivy RA, Ho AJ, et al. *inlA* premature stop codons are common among *Listeria monocytogenes* isolates from foods and yield virulence-attenuated strains that confer protection against fully virulent strains. *Applied and Environmental Microbiology*, 2008, 74(21):6570 – 6583.
- [23] Geese M, Loureiro JJ, Bear JE, et al. Contribution of Ena/VASP proteins to intracellular motility of *Listeria monocytogenes* phosphorylation and proline-rich core but not F-actin binding or multimerization. *Molecular Biology and the Cell*, 2002, 13(7):2383 – 2396.
- [24] Vega Y, Rauch M, Vazquez-Boland JA, et al. New *Listeria monocytogenes* *prfA* * mutants, transcriptional properties of *prfA* * proteins and structure-function of the virulence regulator PrfA. *Molecular Microbiology*, 2004, 52(6):1553 – 1565.
- [25] Ragon M, Wirth T, Hollandt F, et al. A new perspective on *Listeria monocytogenes* evolution. *PLoS Pathogens*, 2008, 4(9):e1000146.
- [26] Johnson JK, Stelma JG, Smith BG, et al. Natural atypical *Listeria innocua* strains with *Listeria monocytogenes* pathogenicity island 1 genes. *Applied and Environmental Microbiology*, 2004, 70(7):4256 – 4266.
- [27] 陈健舜, 江玲丽, 方维焕. 李斯特菌毒力因子及其进化. *微生物学报(Acta Microbiologica Sinica)*, 2007, 47(4):738 – 742.

Characterization of a naturally atypical *Listeria monocytogenes* strain lacking *inlAB*

Qiaomiao Chen^{1,2}, Jianshun Chen², Di Wu², Jianjun Jiang³, Qian Yang¹, Weihuan Fang^{2*}

(¹ College of Veterinary Medicine, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

(² Zhejiang University Institute of Preventive Veterinary Medicine and Zhejiang Provincial Key Laboratory of Prevent Veterinary Medicine, Hangzhou 310029, China)

(³ College of Animal Science and Technology, Shihezi University, Shihezi 832000, China)

Abstract [Objective] We attempted to gain insights into the phenotypic and genetic characteristics of a naturally atypical *Listeria monocytogenes* strain S10 lacking *inlAB*. **[Methods]** The isolate S10, together with 7 *L. monocytogenes* strains representing different serovars, were studied by biochemical profiling, adhesion assay in HeLa cells, virulence to mice, detection of virulence-associated genes detection and genetic lineage analyses. **[Results]** The S10 isolate belonged to lineage I and serovar 1/2b, with carbohydrate fermentation and hemolytic characteristics typical of *L. monocytogenes*. However, this strain had reduced adhesion to HeLa cells and decreased pathogenicity to mice. It lacked the gene locus *inlAB* and their adjacent genes *lmo0431*, *lmo0432*, *lmo0436* and *lmo0437*, but contained an almost whole set of infection-associated genes. S10 fell into the lineage I cluster and form a sister branch with 4b strain. **[Conclusion]** The isolate S10 represents the first report of atypical *L. monocytogenes* lacking *inlAB*. As it lacked the *inlAB* locus from an otherwise typical lineage I genetic background, *inlAB* was probably lost from the genome via independent deletion event.

Keywords: *Listeria monocytogenes*; internalins A and B; virulence; evolution

(本文责编: 张晓丽, 谷志静)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (30870068)

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

Received: 23 April 2009/Revised 26 May 2009