

单核细胞增生性李斯特菌 *prfA* 基因缺失株的构建及其生物学特性

白春光, 殷月兰, 贾艳艳, 付红, 高云飞, 焦新安*

扬州大学, 江苏省人兽共患病学重点实验室, 扬州 225009

摘要: 【目的】单核细胞增生性李斯特菌(*Lm*)是人兽共患李斯特菌病的病原菌,其致病性与调控因子 PrfA 蛋白作用下毒力基因的表达有着密切关系,本文初步探讨了 PrfA 蛋白对细菌毒力因子的调控作用。【方法】利用同源重组技术对血清型分别为 1/2a 和 4b 的 LM4、F4636 进行 *prfA* 基因的敲除,并构建其回复突变株,对获得的突变株 LM4 Δ *prfA*、F4636 Δ *prfA* 进行生物学特性研究。【结果】实验结果表明:两株缺失株的溶血活性丧失、回复突变株的溶血活性得到恢复,突变株还丧失磷脂酶活性,黏附和侵袭特性显著下降($P < 0.05$),对 BALB/c 小鼠的半数致死剂量提高了 10^5 个数量级。【结论】由此表明,PrfA 蛋白对 *hly*、*plcB*、*inl* 家族基因的表达及细菌毒力具有重要的调控作用。*prfA* 基因缺失株的构建为进一步研究 PrfA 蛋白的调控功能提供了材料,为研究其在 *Lm* 致病性中的作用奠定了基础。

关键词: 单核细胞增生性李斯特菌, 突变株, *prfA* 基因, 同源重组, 生物学特性

中图分类号: R37 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209 (2011) 11-1555-06

李斯特菌为兼性厌氧的革兰氏阳性杆菌,无芽孢,不产生荚膜。本属有 7 个种,以单核细胞增生性李斯特菌(*Listeria monocytogenes*, *Lm*)为代表种。单核细胞增生性李斯特菌是一种重要的人畜共患病原菌,在自然界中广泛存在。该菌抵抗环境能力强,可在 $1\text{ }^{\circ}\text{C} - 4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 增殖存活,对食品卫生安全构成巨大的威胁^[1-2]。该菌可通过食物链,进入家畜和人的肠道内,侵入肠道上皮细胞,并可随血液进行传播,进而引起哺乳动物和人的败血症、脑膜炎,以及孕畜流产等^[3-4],其感染致死率约为 25%。20 世纪 90 年代,WHO 曾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^[5]。

Lm 是典型的胞内寄生菌,可在巨噬细胞和许

多非吞噬细胞(如上皮细胞、内皮细胞和肝细胞)内增殖,可以通过损伤的黏膜并经神经末梢的鞘膜侵犯中枢神经系统。该菌的毒力相关基因主要集中在毒力岛 I (LIPI-I) 和毒力岛 II (LIPI-II) 上^[6-7]。在毒力基因的作用下,细菌得以黏附、侵袭细胞,逃离吞噬小泡,从而在细胞内移动、定植、存活。PrfA (positive regulatory factor A) 是李斯特菌最重要的毒力调节因子,由 *prfA* 基因编码。该因子调节李斯特菌 LIPI-I、LIPI-II 上的毒力基因及其它潜在基因的表达,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 *prfA* 基因,并对缺失株的生物学特性进行了研究。

基金项目:教育部“长江学者和创新团队发展计划”创新团队资助;国家支撑计划(2009BADB9B01);江苏高校优势学科建设工程资助项目

* 通信作者。Tel: +86-514-87971136; Fax: +86-514-87311374; E-mail: xajiao@yahoo.com

作者简介:白春光(1985-),男,山东枣庄人,硕士研究生,主要从事预防兽医学。E-mail: chgbai@163.com

收稿日期:2011-05-23;修回日期:2011-09-08

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 、DH10 β 单核细胞增生性李斯特菌血清型为 1/2a 的野生型菌株 LM4、血清型为 4b 的野生型菌株 F4636、穿梭载体 pKSV7 (Amp^r) 质粒均由本室保存; pERL3 载体由德国吉森大学 Chakraborty 教授馈赠, 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 (BactoTM 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、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*H I、*Eco*R 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 (Amp)、氯霉素、红霉素等购自华美公司。PCR 仪购自东胜国际贸易公司; 电转化仪购自 Eppendorf; 培养箱购自上海跃进医疗器械厂; 摇床购自美国精骐有限公司; 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, 由南京金斯特公司合成。

表 1 实验所用引物

Table 1 Primer pairs used to amplify related genes

Primer	Sequence(5'→3')	Size/bp	Restriction site
<i>prs1</i> (LM4)	CCGGATCCCATTAGGGCAGCATTT		<i>Bam</i> H I
<i>prs1</i> (F4636)	CCGGATCCCATTAGGTGATGATCT		<i>Bam</i> H I
<i>prs2</i>	GATTGGGGGATGAGATGTCCTGCTCTTGG	560	joint
<i>plcA1</i>	TCTCATCCCCAATCGTTTTTATCGCCCT		joint
<i>plcA2</i>	CCGAATTCCTTTTACTACTCCAGAACTGAC	720	<i>Eco</i> R I
<i>dele-prfA1</i>	GTTGAAACGGCTTCCGCAG		
<i>dele-prfA2</i>	TGTCCGCTCTACCTGACACAAC	684	
<i>prfA1</i> (LM4)	TCGCCGCTCGAGTTCTTGTTGAAGCAATCG		<i>Xho</i> I
<i>prfA1</i> (F4636)	TCGCCGCTCGAGTTCTTGCGGAAGCAATCG		<i>Xho</i> I
<i>prfA2</i>	GTACGGCTCGACTTGTGTTACTGCCTAAT	880	<i>Sal</i> I

1.2 *prfA* 突变株的构建

1.2.1 目的基因的制备:以 LM4、F4636 在 BHI 液体培养基中的新鲜培养物为材料, 用细菌基因组 DNA 提取试剂盒提取 LM4、F4636 的基因组。用引物 *prs1* 和 *prs2*、*plcA1* 和 *plcA2* 分别扩增上下游同源臂片段 *prs*、*plcA*。PCR 产物经 DNA 回收试剂盒切胶纯化回收, 再以 *prs1* 和 *plcA2* 为引物, 通过 SOEing PCR 将 *prs*、*plcA* 连接起来。

连接片段 *prs/plcA* 经 DNA 回收试剂盒纯化回收后与 pMD18-T 载体相连, 转化至 *E. coli* DH5 α 中, 涂布含氨苄青霉素 (100 μ g/mL) 的 LB 固体培养基培养。挑取菌落培养, 提取质粒进行 PCR 鉴定及 *Bam*H I、*Eco*R I 的双酶切分析。初步鉴定为阳性的克隆送金斯特公司测序, 测序正确的质粒经双酶切后电泳割胶纯化回收 *prs/plcA* 片段。

1.2.2 目的片段与 pKSV7 载体的连接:穿梭载体 pKSV7 (Amp^r) 经 *Bam*H I、*Eco*R I 双酶切回收后与

prs/plcA 片段连接, 电转化至野生型单核细胞增生性李斯特菌中, 用氯霉素 (10 μ g/mL) 筛选阳性克隆。

1.2.3 目的基因片段与野生菌基因组的同源重组:将 1.2.2 中获得的阳性克隆在温度 (42 $^{\circ}$ C) 和氯霉素抗性 (10 μ g/mL) 双重选择压力下传 8 代, 使之发生同源重组。然后在 37 $^{\circ}$ C 无抗性压力下传 10 代, 将载体丢失, 获得在氯霉素 (10 μ g/mL) 抗性中不能生长且经 PCR 鉴定正确的菌株。

1.3 *prfA* 回复突变株的构建

分别扩增 *prfA* 基因, 并经 *Xho* I 和 *Sal* I 双酶切回收后与 pERL3 质粒连接, 转化到 *E. coli* DH10 β 中, 在红霉素 300 μ g/mL 的 LB 中培养, 经 PCR 和双酶切鉴定并测序。结果正确的质粒电转化到 LM4 Δ *prfA*、F4636 Δ *prfA* 感受态中, 挑取菌落在红霉素为 5 μ g/mL 的 BHI 培养基中培养鉴定。

1.4 溶血实验

细菌37 °C 振荡培养15 h, 取1 ml菌液离心获取上清, 用 PBS 调整 OD_{600} 至相同大小, 取70 μ L 上清液用 PBS (PH6.0) 从原液倍比稀释至 2^{-7} 。然后加30 μ L 1% 羊红细胞, 置于37 °C 温箱内1 h, 观察溶血情况。

1.5 磷脂酶实验

根据文献 [8] 报道, 配制卵黄琼脂炭粉 (YAC) 培养基: 在100 mL BHI 固体培养基中加入100 °C 干烤3-4 h 的活性碳粉0.5 g, 调 pH 值至6.5 后高压灭菌, 待冷却至45 °C 左右时加入5 mL 无菌卵黄液, 混匀后倾注平皿。分别将 LM4、LM4 Δ *prfA*、F4636、F4636 Δ *prfA* 在 YAC 培养基表面划线接种, 37 °C 培养箱中培养2-3 d。

1.6 细胞侵袭实验

从生长良好的 RAW264.7 细胞瓶中, 消化转移一定数量的细胞至24孔细胞培养板中, 用有血有抗的 DMEM 培养至单层, 改用不含双抗、含10% FCS 的 DMEM 继续培养2 h。然后按 MOI = 50, 加入新鲜的待测菌培养2 h, 换用含硫酸庆大霉素 (100 μ g/mL) 的 DMEM 培养1.5 h。PBS 清洗, 再用冷的0.1% Triton X-100 裂解细胞, 释放细菌。稀释液10倍比稀释涂 BHI 板, 置于30 °C 温箱培养计数。

1.7 LM4 Δ *prfA*, F4636 Δ *prfA* 及野生型菌株对 BALB/c 小鼠的 LD₅₀ 实验

取37 °C 新鲜培养的菌液, 用 PBS 洗两遍, 调整 OD 值至所需大小。将6周龄 BALB/c 小鼠随机分成4组, 每组5只, 进行尾静脉注射。每只小鼠注射100 μ L, 每组注射剂量呈2倍或3倍递减。观察14 d, 记录死亡情况。

2 结果

2.1 *prfA* 回复突变株的构建

2.1.1 上游同源臂 *prs* 与下游同源臂 *plcA* 基因的扩增及拼接: *prs* 和 *plcA* 的 PCR 扩增产物经1.0% 琼脂糖凝胶电泳, 条带大小分别为560 bp 和720 bp。对两个 DNA 片段进行 SOEing PCR 连接电泳, 呈现一条约1260bp 的特异性条带, 与预期的片段大小一致。

2.1.2 目的片段与载体的连接: 将目的片段 *prs/plcA* 分别与 pMD18-T 载体连接并测序, 测序正确的

克隆将目的片段与穿梭载体 pKSV7 相连, 经 PCR 和双酶切鉴定结果均与预期相符, 表明得到了正确的重组质粒。

2.1.3 同源重组菌的筛选: 传代细菌在 BHI 固体培养基中划线培养, 挑取单菌落通过 PCR 鉴定与氯霉素抗性相结合进行筛选。选择目的条带大小为1260 bp 且在氯霉素抗性下不能生长的菌株, 即为发生同源重组且质粒被脱掉的重组菌株。

2.1.4 重组菌鉴定: 在 *prs* 基因的上游引物 *prs1* 与 *plcA* 基因的下游引物 *plcA2* 的外侧设计一对引物 *dele-prfA1*, *dele-prfA2*, 对筛选菌株进行进一步鉴定。结果显示筛选菌株扩增出条带大小约1863 bp, 而亲本株扩增出的条带大小约为2547 bp, 表明同源片段定点整合到基因组中, *prfA* 缺失株构建成功。

2.2 回复突变株的构建

扩增出的长度为888 bp 的 *prfA* 基因经 *Xho* I 和 *Sal* I 双酶切后与 pERL3 载体相连, 酶切鉴定结果与预期相符, 将在两个 *prfA* 缺失菌株基础上获得的回复突变菌株分别命名为 L-*prfA* 和 F-*prfA*。

2.3 李斯特菌突变株及回复突变株的溶血实验

单核细胞增生性李斯特菌溶血素蛋白 O (LLO), 是一种穿孔蛋白, 该蛋白可溶解哺乳动物的红细胞, 由 LIPI-I 上的 *hly* 基因编码。由图1的测定结果可知, LM4、F4636 的溶血效价为 2^4 , LM4 Δ *prfA*、F4636 Δ *prfA* 的溶血效价为 2^0 , 表明 *prfA* 缺失株的溶血能力丧失, 而回复突变株 L-*prfA* 和 F-*prfA* 的溶血活性得到完全恢复。该实验证明 PrfA 对 *hly* 基因的表达具有调控作用。

2.4 磷脂酶实验

LIPI-I 中的 *plcB* 基因表达磷脂酰胆碱磷脂酶 (PC-PLC), 该酶可分解卵磷脂。从图2中可以看出细菌在37 °C 温箱中培养48 h 后, 亲本株细菌 LM4 和 F4636 的周围有透明圈, 而突变株细菌 LM4 Δ *prfA* 和 F4636 Δ *prfA* 没有出现透明圈。结果表明突变株失去了磷脂酶活性, 证明了 PrfA 对 *plcB* 基因具有调控作用。

2.5 细胞侵袭实验

细胞侵袭实验结果: LM4 侵袭率为1.68%、LM4 Δ *prfA* 为0.38%; F4636 侵袭率为2.02%、F4636 Δ *prfA* 为0.87%。图3通过相对侵袭率直观的显示出亲本株与突变株之间的差别, 显示出突变株的侵袭力有了极显著的下降 ($P < 0.01$)。LIPI-II

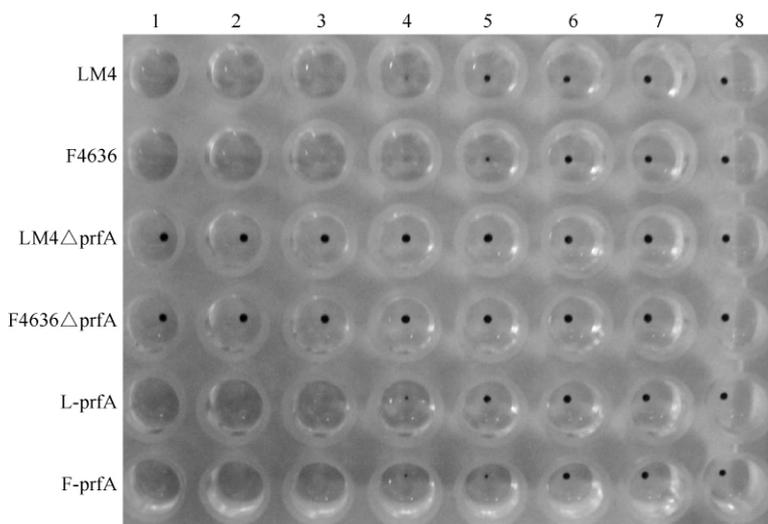


图 1 突变株和回复突变株的溶血实验结果

Fig.1 Hemolysis activity test result of mutant strains and reverse mutation strains. The culture supernatants were incubated with sheep erythrocytes at 37 °C in two-fold serial dilutions (wells 0 - 7) , the last well added PBS instead of culture supernatant.

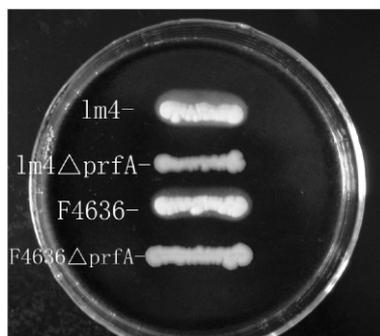


图 2 磷脂酶活性实验结果

Fig.2 Phospholipase activity assay by using YAC plate.

又称为内化素岛,该岛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。细胞侵袭实验表明 PrfA 对 LIPI-II 上的基因具有调控作用。

2.6 LM4ΔprfA ,F4636ΔprfA 对 BALB/c 小鼠 LD₅₀ 实验

表 2 为小鼠死亡的结果。经计算得 LM4ΔprfA

表 2 LM4ΔprfA ,F4636ΔprfA 菌株对 BALB/c 小鼠 LD₅₀ 的测定结果
Table 2 LD₅₀ measurement of LM4ΔprfA , F4636ΔprfA for BALB/c mice

Dose	LM4 (1 × 10 ⁴)				F4636 (1 × 10 ⁴)				LM4ΔprfA (1 × 10 ⁹)				F4636ΔprfA (1 × 10 ⁹)			
CFU per mouse	13.2	4.40	1.47	0.47	17.50	5.83	1.94	0.648	20	10	5	2.5	20	10	5	2.5
Mortality	5/5	5/5	4/5	0/5	5/5	5/5	1/5	0/5	5/5	5/5	0/5	0/5	5/5	5/5	1/5	0/5
LD ₅₀	10 ^{4.02} CFU				10 ^{4.43} CFU				10 ^{9.85} CFU				10 ^{9.79} CFU			

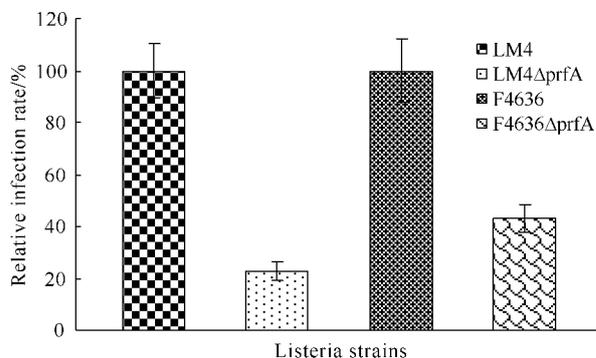


图 3 细胞侵袭实验结果

Fig.3 Result of cell invasion assay.

半数致死量为 10^{9.81} CFU、F4636ΔprfA 半数致死量为 10^{9.85} CFU。LM4 亲本株半数致死量为 10^{4.02} CFU ,F4636 亲本株的半数致死量为 10^{4.43} CFU ,表明 prfA 缺失株的半数致死量较其亲本株分别升高了 10⁵ 个数量级 ,表明突变株的毒力有了极显著的下降。

3 讨论

Lm 为兼性胞内寄生菌,它在黏附、侵袭、胞内增殖及细胞间直接扩散的生活周期中,毒力岛 I 和毒力岛 II 的基因受到转录活化因子 PrfA 的调控。目前已被证实受 PrfA 直接调控的毒力基因有 10 个,而更多基因被之调控的方式还不明了^[9-11]。PrfA 的表达受到多种因素的影响,体现出表达的时空特性。在体外环境中,PrfA 的表达受到抑制,而当细菌处于宿主中时则会最大限度的诱导它的表达^[12-13]。此外,PrfA 可根据外界环境如温度,对自身蛋白的构象起到调控作用。虽然人们对 PrfA 的调控作用及其它毒力基因的功能有了一定的了解,但目前有许多机制尚不清楚,需要进一步的研究。

为了研究 PrfA 的功能,我们通过同源重组的方法从野生株 LM4、F4636 基因组中将 *prfA* 基因进行了敲除,并对突变株和野生株的生物学特性开展了相关研究。溶血实验结果表明野生株 LM4、F4636 溶血效价为 2^4 ,而相应突变株的溶血活性为 2^0 。磷脂酶实验结果显示,在卵黄琼脂炭粉培养基上 LM4 和 F4636 的周围有透明圈,而突变株细菌 LM4 $\Delta prfA$, F4636 $\Delta prfA$ 没有出现此现象,说明突变株细菌失去了磷脂酶活性。与溶血活性相关的是李斯特菌溶血素蛋白 LLO,该蛋白由 *hly* 编码;与磷脂酶活性相关的是 PlcB,由 *plcB* 基因编码。这两个基因表达的溶血素和磷脂酶在 LM 胞内感染时,参与吞噬体的裂解,从而使 *Lm* 能逃离吞噬体的束缚,并在胞内生存繁殖。通过溶血实验、磷脂酶活性实验间接证实了 PrfA 对 *hly*、*plcB* 基因的调控作用。已知 *Lm* 在胞内感染的过程中,粘附在细胞表面是实现入侵细胞的关键一步,而位于 LIPI-II 中的 *inl* 基因家族编码的内化素(internalin)蛋白与细胞表面受体的结合达到粘附的目的^[14-15]。细胞侵袭性结果表明突变株的侵袭性显著低于野生型菌株($P < 0.01$),证明了 PrfA 对 *inl* 基因家族的调控作用。基于 PrfA 对 *Lm* 主要毒力因子表达的调控作用,*prfA* 的缺失将会导致该菌毒力的减弱。小鼠 LD₅₀ 的测定结果表明 *prfA* 缺失株的毒力显著下降,亦表明了这一点。对回复突变株进行的溶血活性测定,结果表明回复突变株的溶血活性的到完全恢复,该实验进一步表明了 PrfA 对 *hly* 基因的调控作用。

本研究成功地构建了单核细胞增生性李斯特菌的 *prfA* 基因缺失株 LM4 $\Delta prfA$ 和 F4636 $\Delta prfA$ 及其回复突变株,并对缺失株的溶血活性、磷脂酶活性、对细胞的侵袭性以及小鼠的毒力进行了研究,有力证明了 PrfA 对 LIPI-I, LIPI-I 上相关毒力基因的表达起着调控作用,从而对 *Lm* 的致病性起着重要作用,本研究为开展 PrfA 蛋白的调控机理研究奠定了基础。

参考文献

- [1] Farber JM, Losos JZ. *Listeria monocytogenes*, a foodborne pathogen. *Canadian Medical Association Journal*, 1988, 138(5): 413-418.
- [2] Ramaswamy V, Cresence VM, Rejitha JS, Lekshmi MU, Dharsana KS, Prasad SP, Vijila HM. *Listeria*—review of epidemiology and pathogenesis. *Journal of Microbiology Immunology and Infection*, 2007, 40(1): 4-13.
- [3] Hain T, Chatterjee SS, Ghai R, Kuenne CT, Billion A, Steinweg C, Domann E, Karst U. Pathogenomics of *Listeria spp.* *International Journal of Medical Microbiology*, 2007, 297(7-8): 541-557.
- [4] 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.
- [5] 王彬,倪宏波.单核细胞增生性李斯特菌毒力因子研究进展.黑龙江八一农垦大学学报(*Journal of Heilongjiang August First Land Reclamation University*), 2008, 20(2): 62-67.
- [6] Rawool DB, Malik SV, Shakuntala I, Sahare AM, Barbudde SB. Detection of multiple virulence-associated genes in *Listeria monocytogenes* isolated from bovine mastitis cases. *International Journal of Food Microbiology*, 2007, 113(2): 201-207.
- [7] 罗勤,张晓莉,李兵,冯爱平,钱跃.单核细胞增生性李斯特菌 PrfA 蛋白转录调控毒力基因表达的分子机制.微生物学通报(*Microbiology, China*), 2008, 35(2): 275-280.
- [8] Ermolaeva S, Karpova T, Novella S, Wagner M, Scotti M, Tartakovskii I, Vazquez-Boland JA. A simple method for the differentiation of *Listeria monocytogenes* based on induction of lecithinase activity by charcoal. *International Journal of Food Microbiology*, 2003, 82(1): 87-94.

- [9] 殷月兰, 朱国强, 耿士忠, 胡茂志, 焦新安. 单核细胞增生性李斯特菌 *actA/plcB* 缺失株的构建及其生物学特性. 微生物学报 (*Acta Microbiologica Sinica*), 2008, 48(3): 299-303.
- [10] Sleator RD, Wemekamp-Kamphuis HH, Gahan CGM, Abec T, Hill C. A PrfA-regulated bile exclusion system (BilE) is a novel virulence factor in *Listeria monocytogenes*. *Molecular Microbiology*, 2005, 55(4): 1183-1195.
- [11] Scortti M, Monzo HJ, Lacharme-Lora L, Lewis DA, Vazquez-Boland JA. The PrfA virulence regulon. *Microbes and Infection*, 2007, 9(10): 1196-1207.
- [12] Kreft J, Vazquez-Boland JA. Regulation of virulence genes in *Listeria*. *International Journal of Medical Microbiology*, 2001, 291(2): 145-157.
- [13] Lampidis R, Gross R, Sokolovic Z, Goebel W, Kreft J. The virulence regulator protein of *Listeria ivano* VII is highly homologous to PrfA from *Listeria monocytogenes* and both belong to the Crp-Fnr family of transcription regulators. *Molecular Microbiology*, 1994, 13(1): 141-151.
- [14] Jaradat ZW, Wampler JW, Bhunia AW. A *Listeria* adhesion protein deficient *Listeria monocytogenes* strains showed reduced adhesion primarily to intestinal cell lines. *Medical Microbiology and Immunology*, 2003, 192(2): 85-91.
- [15] Bergmann B, Raftelsbauer D, Kuhn M, Goetz M, Hom S, Goebel W. InlA- but not InlB- mediated internalization of *Listeria monocytogenes* by nonphagocytic mammalian cells needs the support of other internalins. *Molecular Microbiology*, 2002, 43(3): 557-570.

Construction and characterization of *Listeria monocytogenes* $\Delta prfA$ mutant strains

Chunguang Bai, Yuelan Yin, Yanyan Jia, Hong Fu, Yunfei Gao, Xin'an Jiao*

Jiangsu Key Laboratory of Zoonosis, Yangzhou University, Yangzhou 225009, China

Abstract: [Objective] *Listeria monocytogenes* (*Lm*) is an important pathogen that can cause serious listeriosis in humans and animals. The pathogenicity of *Lm* has a close relationship with the PrfA protein regulating the expression of virulence genes. Therefore, we studied the regulation functions of PrfA and its role on *Lm*'s virulence. [Methods] The *prfA* genes of LM4, serotype 1/2a, and F4636, serotype 4b, were deleted by homologous recombination technology, and the biological characteristics of the mutants were further studied. [Results] The *prfA* gene deleted strains LM4 $\Delta prfA$ and F4636 $\Delta prfA$ and their back mutation strains were successfully constructed. The results show that the hemolysis activity was lost in *prfA* deleted strains and was recovered in the reverse mutant strains. The *prfA* deleted strains lost phospholipase activity; their adhesion and invasion ability significantly decreased. Furthermore, their 50% lethal doses (LD_{50}) were 5 logs higher comparing with wild type strains. [Conclusion] PrfA regulates *hly*, *plcB* and *inl* gene family and affects significantly *Lm*'s virulence.

Keywords: *Listeria monocytogenes*, mutant, *prfA*, homologous recombination, biological characteristics

(本文责编:王晋芳)

Supported by the "Yangtze River Scholar and Innovation Team Program" from the Ministry of Education and by the National Key Program for Technology Research and Development of China(2009BADB9B01)

* Corresponding author. Tel: +86-514-87971136; Fax: +86-514-87311374; E-mail: xajiao@yahoo.com

Received: 23 May 2011/Revised: 8 September 2011