

## 产单核细胞李斯特菌 *actA/plcB* 缺失株的构建及其生物学特性

殷月兰, 朱国强, 耿士忠, 胡茂志, 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:** 产单核细胞李斯特菌的毒力因子与该菌在细胞间扩散、传播有着直接的关系, 其中肌动蛋白聚集因子 ActA 是细菌由细胞浆扩散至相邻细胞所必须的因子, 而广谱磷脂酶 C 则参与具有双层膜吞噬体的裂解过程。[方法] 本研究中利用同源重组技术成功构建了毒力因子 ActA 和 PC-PLC 双缺失的突变株, [目的] 并对突变株的毒力和免疫应答潜能进行评价。[结果] Western blot 和磷脂酶活性测定实验, 分别从蛋白质水平上证实 *actA* 和 *plcB* 基因的缺失。突变株的毒力显著降低, 对小鼠半数致死剂量比野生型菌株提高约  $10^3$  倍, 但仍然保持较好地诱导 T 细胞应答的能力, 并且能完全保护野生型细菌致死剂量的攻击。实验结果不仅表明 ActA 和 PC-PLC 是产单核细胞李斯特菌的重要毒力因子, 而且证实安全性提高的突变株依然保持有较强地诱导细胞免疫应答的能力。[结论] 因此, 该突变株的获得不仅对李斯特菌病的预防具有重要作用, 而且为构建预防人类和动物疫病的疫苗载体奠定了基础, 此外对于阐明 LM 毒力因子的致病机理与免疫保护作用提供了条件。

**关键词:** 产单核细胞李斯特菌; 突变株; *actA*; *plcB*; 同源重组

**中图分类号:** Q936 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2008) 03-0299-05

产单核细胞李斯特菌 (*Listeria monocytogenes*, LM) 是一种胞内寄生菌, 人兽共患李斯特菌病的病原, 感染后发病死亡率约为 25%<sup>[1-2]</sup>。欧美国家曾多次暴发流行, LM 对食品的污染与危害, 已引起世界各国的普遍关注和高度重视, 其中研制预防李斯特菌病的减毒活疫苗是重要的课题之一<sup>[3]</sup>。另外, LM 所具有的独特免疫应答机制使它成为一种非常具有吸引力的运送异源抗原的疫苗载体<sup>[4-6]</sup>。目前研究表明, 通过毒力基因缺失的方法可使 LM 毒力降低, 但毒力降低不显著, 安全性得不到有效的保障。

*actA* 和 *plcB* 基因的编码产物 ActA 和 PC-PLC 是与 LM 致病性相关的主要毒力因子, *actA* 编码的表面蛋白 ActA 在 LM 胞内运动中起着重要作用, 能产生一种使肌动蛋白聚合的因子, 诱导 LM 一极的肌动蛋白的聚合, 以促进 LM 在宿主细胞内的极向运动<sup>[7]</sup>。基因 *plcB* 编码

广谱磷脂酶 C (PlcB), 在吞噬泡双层膜溶解中起作用<sup>[8]</sup>。本研究通过同源重组的方法从基因组中缺失这两个基因, 并对突变株的生物学特性进行了初步研究。

### 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 $\alpha$  由本室保存; 产单核细胞李斯特菌血清型 1/2a 的野生型菌株 yzuLM4 由本室分离保存; 穿梭载体 pKSV7 (Amp<sup>r</sup>) 由扬州大学朱国强教授馈赠, 质粒载体 pGEM-T 购自 Promega 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:** BHI 培养基 (Bacto<sup>TM</sup> Brain Heart Infusion) 购买自 BD 公司。

基金项目: 国家“973 项目” (2006 CB504404); 国家自然科学基金 (30425031)

\*通讯作者: Tel: +86-514-87971136; Fax: +86-514-87311374; E-mail: xajiao@yahoo.com

作者简介: 殷月兰 (1971-), 女, 山东青岛人, 副教授, 博士, 研究方向为畜禽重要疫病发病机理和免疫机理。

E-mail: lanyy31@yahoo.com.cn

收稿日期: 2007-09-20; 修回日期: 2007-11-23

**1.1.4 主要试剂：**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、*Eco*R) 购自大连宝生物(TaKaRa)公司, T4 DNA 连接酶购自 Promega 公司, 氨基青霉素(Amp)等购自华美公司。

**1.1.5 引物：**表 1 为实验所用引物

表 1 用于扩增相关基因的引物  
Table 1 Primer pairs used to amplify related genes

Primer	Sequence(5' 3')
actA-	CCGAATTCTTTAGTTCGCAGTGGATGC ( <i>Eco</i> R )
actA+	GTCTAGCTCCAGTAGGGGATCCCTCGAGGCTGC AAATATTATG
plcB-	CATAATATTTGCAGCCTCGAGGGATCCCTACTG GAGCTAGA
plcB+	TAGTTCGACCTGTTGTCATCGAAGCGCAA ( <i>Sal</i> )
Dele-actA1	CGTATCACGAGGAGGGAGTAT
Dele-plcB2	TATATCCACCCGATAACGAG

## 1.2 减毒重组 *yzuLM $\Delta$ actA/plcB* 的构建

分别用引物 actA-、actA+及 plcB-、plcB+扩增 *actA* 及 *plcB* 基因片段, 再用引物 actA-和 plcB+进行 SOEing PCR, 扩增 *actA/plcB* 基因片段。以 *Sal* 和 *Eco*R 双酶切 *actA/plcB* 和 pKSV7, 并用 T4 DNA 连接酶进行连接、转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$ , 用含 Amp 的 LB 固体培养基筛选和鉴定。将测序正确的阳性克隆命名为 pKSV7-*actA/plcB*。用电转化方法将重组穿梭质粒 pKSV7-*actA/plcB* 导入野生型 *yzuLM4* 菌株。通过温度和氯霉素抗性压力进行同源重组, 最终将 *actA/plcB* 重组于 LM 基因组, 实现野生型 *yzuLM4* 菌株中 *actA*、*plcB* 基因的缺失。将阳性菌株命名为 *yzuLM $\Delta$ actA/plcB*(简称 *yzuLM1-2*)。

## 1.3 Western blot 分析

将 ActA 纯化蛋白经 SDS-PAGE 电泳后, 电转移至硝酸纤维素膜上, 分别以 *yzuLM1-2* 及 *yzuLM4* 的多抗血清为一抗, 辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠 IgG 的抗体为二抗, 二氨基联苯胺(DAB)为底物, 进行蛋白印迹分析。

## 1.4 磷脂酶活性试验

根据文献[14]报道, 稍作改进配制卵黄琼脂炭粉(YAC)培养基: 于 100mLBHI 固体培养基中加入 0.5 克活性炭粉, 调 pH 值至 6.5 后高压灭菌, 待冷却至 45 左右时加入 5mL 无菌卵黄液, 混匀后倾注平皿。把 *yzuLM4* 和 *yzuLM1-2* 在 YAC 培养基表面划线接种, 置于 37 培养。

## 1.5 重组菌株 *yzuLM1-2* LD<sub>50</sub> 的测定

将野生型菌株 *yzuLM4* 及重组菌株 *yzuLM1-2* 培

养 15h, 洗涤后将菌悬液进行梯度稀释, 取适宜稀释度的菌液进行动物实验, 不同实验组尾静脉注射所用剂量呈 4 倍递减。每一稀释度菌液尾静脉注射 5 只 6 周龄 BALB/c 小鼠, 100 $\mu$ L/只, 连续观察 14d, 记录接种后小鼠死亡情况。

## 1.6 脾脏 T 细胞亚群的测定

将 6 周龄 BALB/c 小鼠随机分成 5 组, 每组 6 只, 分别注射 *yzuLM1-2*、*yzuLM4*, 同时设空白对照组。在免疫后的 7d 和 14d 各组均取 3 只小鼠处死, 取脾脏, 经处理后将细胞用 DMEM 悬浮, 对细胞进行计数, 使其浓度为 10<sup>7</sup>/mL, 冰浴保存备用。用 FACS 染色缓冲液稀释抗体或标记试剂。分别用 PE-CD8b 的单抗、FITC-CD4 的单抗和 PECy5-CD3 的单抗各 20 $\mu$ L 与脾脏细胞混合, 4 避光反应 30min, FACS 测定 CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>T 细胞和 CD3<sup>+</sup>CD8b<sup>+</sup>T 细胞的数量。

## 1.7 小鼠免疫保护试验

将 6 周龄 BALB/c 小鼠随机分成 4 组, 每组 5 只, *yzuLM1-2* 以 1 $\times$ 10<sup>6</sup>CFU 静脉注射, 在二免 14d 时, 将 *yzuLM4* 以 1 $\times$ 10<sup>5</sup>CFU/只攻毒, 连续观察 14d, 记录接种后小鼠死亡情况。

## 2 结果

### 2.1 *actA* 与 *plcB* 基因的扩增及拼接结果

*actA* 和 *plcB* 基因的 PCR 扩增产物经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳, 分别呈现一条长约为 1.0Kb 和 1.2Kb 的特异性条带, 与预期的大小相符。对两个 DNA 片段进行 SOEing PCR, 经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳呈现一条长约为 2.2Kb 的特异性条带, 与预期的片段大小一致。

### 2.2 穿梭载体 pKSV7-*actA/plcB* 的构建及鉴定结果

用 *Sal* 和 *Eco*R 双酶切 SOEing PCR 产物 *actA/plcB* 和穿梭载体 pKSV7, 酶切产物用胶回收试剂盒回收, 连接并转化。琼脂糖凝胶电泳结果显示嵌合基因 *actA/plcB* 已成功插入穿梭载体 pKSV7。测序结果表明序列正确, 扩增的 *actA/plcB* 基因片段长度约为 2.2kb, 中间引入 *Bam*H 和 *Xho* 酶切位点。

### 2.3 重组 LM 的 PCR 鉴定

对通过温度和氯霉素抗性压力下进行传代培养后, 在含氯霉素的培养基上不生长的细菌用被删除基因外围引物 dele-actA 1 和 dele-plcB 2 进行鉴定, 结果显示重组菌株扩增出条带大小约 2.2kb, 而野生型菌株扩增出的条带约为 4.8kb, 由此表明同源片段的定点整合以及 *actA* 和 *plcB* 基因已被删除, 将重组菌

命名为 *yzuLM4ΔactA/plcB*(简称 *yzuLM1-2*)。

### 2.4 Western blot 分析

由图 1 的免疫印迹结果可知,泳道 1 中,有一大小约为 97kDa 的特异印迹带,而泳道 2 中没有印迹带出现,表明以 *yzuLM1-2* 免疫小鼠制备的血清中没有针对 ActA 的抗体,在蛋白质水平上亦证实了 *actA* 基因的缺失。

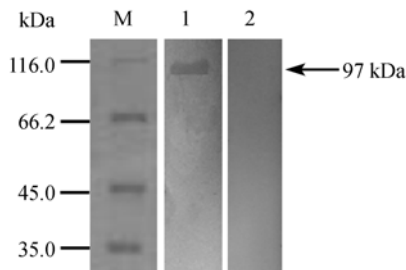


图 1 表达产物 ActA 与 LM 多抗的 Western blot 试验  
Fig. 1 Western blot analysis of expressed product with antibody against *yzuLM4* and *yzuLM1-2*. M. Protein marker; 1. Serum against *yzuLM4*; 2. Serum against *yzuLM1-2*.

### 2.5 磷脂酶活性试验

在 YAC 培养基上作用约 24h 后,接种在平板上的野生型 *yzuLM4* 菌株周围出现透明圈,而 *yzuLM1-2* 周围未出现此现象(图 2)。由此表明 *yzuLM1-2* 不具有磷脂酶生物活性,从而说明 *plcB* 基因已缺失。

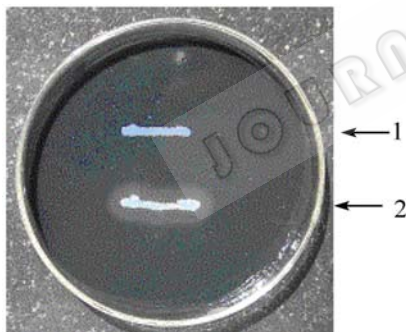


图 2 LM 在 YAC 培养基上的磷脂酶活性测定  
Fig. 2 Phospholipase activity assay using YAC plate. 1. *yzuLM1-2*; 2. *yzuLM4*.

### 2.6 重组菌株 *yzuLM1-2* LD<sub>50</sub> 的测定

由表 2 可知,在 BALB/c 小鼠进行的动物毒力试验中,重组菌株所测得的 LD<sub>50</sub> 为  $2.68 \times 10^7$  CFU,野生型细菌所测得的 LD<sub>50</sub> 为  $1.47 \times 10^4$  CFU,数据表明重组菌 *yzuLM1-2* 毒力降低了 3 个数量级。

### 2.7 静脉免疫后小鼠脾脏中 T 细胞亚群的测定结果

免疫 *yzuLM1-2* 后诱导小鼠脾脏中 CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T 细胞产生的数量及与 CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T 细胞比值与 *yzuLM4* 无显著性差异(图 3),此外还可看出,CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T 细胞的数量在首次免疫后的 7d 明显高于免疫后 14d 时测定的数值。

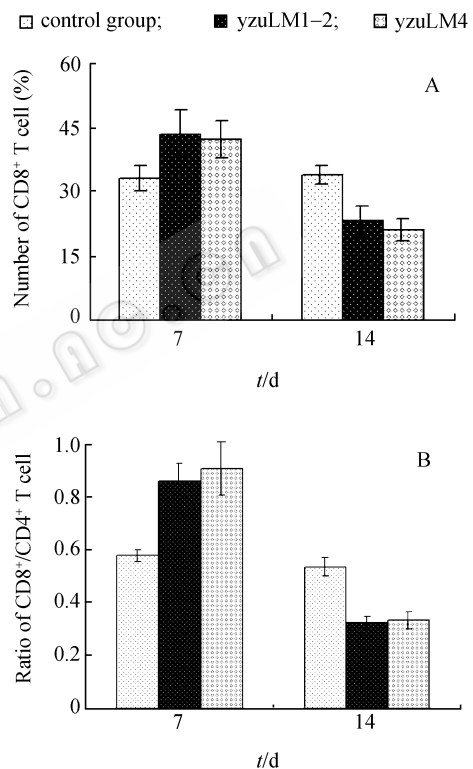


图 3 静脉免疫后小鼠脾脏中 T 细胞亚群的测定  
Fig. 3 The results of T cells subsets in murine spleen after vein inoculation. A: Number of CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T cell; B: Ratio of CD8<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup> T cell.

表 2 LM 菌株对 BALB/c 小鼠 LD<sub>50</sub> 的测定结果  
Table 2 LgLD<sub>50</sub> of LM for BALB/c mice

Dose	<i>yzuLM1-2</i> ( $1 \times 10^7$ CFU/mL)					<i>yzuLM4</i> ( $1 \times 10^4$ CFU/mL)				
	34.6	8.64	2.16	0.540	0.14	39.6	13.2	4.40	1.47	0.47
mortality	5/5	5/5	0/5	0/5	0/5	5/5	5/5	5/5	4/5	0/5
Lg LD <sub>50</sub>	7.64					4.167				
LD <sub>50</sub>	$2.68 \times 10^7$					$1.47 \times 10^4$				

## 2.8 对小鼠的免疫保护试验结果

由表3的实验结果可知, yzuLM1-2免疫组对血清型为1/2a的野生型 yzuLM4 具有良好的保护率, 达到100%, 这预示着对同种血清型 LM 的攻毒具有较好的免疫保护力。

表3 重组李斯特菌对小鼠的免疫保护结果  
Table 3 The protective efficacy of recombinant LM for mice

Group	Number of survivor	Number of dead	Protective rate /%
yzuLM1-2	5	0	100
Negative control	0	5	0

## 3 讨论

为了研制安全有效的预防李斯特菌病的疫苗和作为运送异源抗原的载体, 科研者已开展了与减毒相关的研究并获得了大量缺失突变株, 如 LM prfA、LM actA、LM hly、LM plcB、LM plcA、LM plcA/plcB、LM inlA、LM inlB、LM inlAB 等, 其中有些突变株毒力降低不显著<sup>[9-12]</sup>, 有些虽然毒力显著降低, 但诱导免疫应答能力受到一定程度影响<sup>[13]</sup>, 总得看来减毒程度与缺失的毒力基因的功能关系密切。如何在毒力显著降低的前提下仍能较好的激发免疫应答的能力是评价突变株价值的重要因素。本研究所用野生型菌株的毒力略高于 LM10403S(IgLD<sub>50</sub>为4.47)<sup>[13]</sup>, 通过同源重组的方法缺失两个毒力基因 actA 和 plcB 的突变株的 IgLD<sub>50</sub>为7.64, 毒力低于除 LM hly 之外的其它单基因缺失的突变株, 但激发免疫应答的能力显著高于 LM $\Delta$ hly(另文报道)。另外, 小鼠免疫保护试验所显示的对同种血清型的野生型菌株致死剂量的攻击所具有良好的免疫保护率, 以及以 FACS 对诱导 CD8<sup>+</sup>T 细胞产生能力进行测定的结果都有力证实了突变株在毒力降低的前提下仍具有较好的激发免疫应答的能力。这说明我们通过双基因缺失的方法成功地获得了毒力显著降低的减毒菌, 也预示着减毒突变株对动物安全性的增加。

本研究根据 ActA 蛋白和 PC-PLC 的生物学特性分别以 Western blot 和磷脂酶活性试验对突变株进行了鉴定。针对 ActA 蛋白体外表达量极低的现象, 采用在大肠杆菌中表达的 ActA 作为抗原, 以 LM 免疫小鼠后获得的多抗血清为一抗进行 Western blot, 结果显示突变株的多抗血清没有特异印迹带, 而野生型菌株显示有 97KD 的特异印迹带, 说明突变株不能表达 ActA。PC-PLC 具有水解磷脂产生一系列水溶性

脂肪酸的生物活性, 而卵黄中富含磷脂, 因此卵黄琼脂法成为一种定性鉴定 PC-PLC 生物活性的简便方法<sup>[14]</sup>。本研究据 Ermolaeva 等<sup>[14]</sup>的报道, 利用卵黄琼脂炭粉培养基对突变株是否能表达 PC-PLC 进行了研究, 结果表明突变株丧失磷脂酶的生物学活性。由此从蛋白质水平上证实了 actA 基因和 plcB 基因的缺失。

本研究获得的突变株毒力显著降低、安全性明显增加, 具有较强激发免疫应答的能力和能免疫保护同种血清型野生型菌株的攻击。因此该突变株的获得不仅对李斯特菌病的预防具有重要作用, 而且为构建预防人类和动物疫病的疫苗载体奠定了基础。此外, 对于阐明 LM 毒力因子的致病机理与免疫保护作用提供了条件。

## 参 考 文 献

- [1] Chen Y, Zhang W, Knabel SJ. Multi-virulence-locus sequence typing identifies single nucleotide polymorphisms which differentiate epidemic clones and outbreak strains of *Listeria monocytogenes*. *Journal of Clinical Microbiology*, 2007, 45(3): 835-846.
- [2] Lyytikäinen O, Nakari UM, Lukinmaa S, et al. Surveillance of listeriosis in Finland during 1995-2004. *Euro Surveill*, 2006, 11(6): 82-85.
- [3] Angelakopoulos H, Looock K, Sisul DM, et al. Safety and shedding of an attenuated strain of *Listeria monocytogenes* with a deletion of actA/plcB in adult volunteers: a dose escalation study of oral inoculation. *Infect Immun*, 2002, 70(7): 3592-3601.
- [4] Singh R, Paterson Y. *Listeria monocytogenes* as a vector for tumor-associated antigens for cancer immunotherapy. *Expert Rev Vaccines*, 2006, 5(4): 541-552.
- [5] Orr MT, Orgun NN, Wilson CB, et al. Recombinant *Listeria monocytogenes* expressing a single immune-dominant peptide confers protective immunity to herpes simplex virus-1 infection. *Journal of Immunology*, 2007, 178(8): 4731-4735.
- [6] Zhao X, Zhang M, Li Z, et al. Vaginal protection and immunity after oral immunization of mice with a novel vaccine strain of *Listeria monocytogenes* expressing human immunodeficiency virus type 1 gag. *Journal of Virology*, 2006, 80(18): 8880-8890.
- [7] Cossart P, Sansonetti P J. Bacterial invasion: the paradigms of enteroinvasive pathogens. *Science*, 2004, 304: 242-248.
- [8] Yeung PS, Na Y, Kreuder AJ, et al. Compartmentalization of the broad-range phospholipase C activity to the spreading vacuole is critical for *Listeria monocytogenes* virulence. *In-*

- Infect Immun*, 2007, 75(1): 44–51.
- [9] Stritzker J, Janda J, Schoen C, *et al.* Growth, virulence, and immunogenicity of *Listeria monocytogenes* *aro* mutants. *Infect Immun*, 2004, 70(10): 5622–5629.
- [10] Pilgrim S, Kolb-Ma'urer A, Gentschev, *et al.* Deletion of the gene encoding p60 in *Listeria monocytogenes* leads to abnormal cell division and loss of Actin-based motility. *Infect Immun*, 2003, 71(6): 3473–3484.
- [11] Manohar M, Baumann DO, Bos NA, *et al.* Gut colonization of mice with *actA*-negative mutant of *Listeria monocytogenes* can stimulate a humoral mucosal immune response. *Infect Immun*, 2001, 69(6): 3542–3549.
- [12] Rudnicka W, Kaczmarek M, Szeliga J, *et al.* The host response to *Listeria monocytogenes* mutants defective in genes encoding phospholipases C (*plcA*, *plcB*) and actin assembly (*actA*). *Microbiol Immunol*, 1997, 41(11): 847–853.
- [13] Glomski I J, Decatur AL, Portnoy DA. *Listeria monocytogenes* mutants that fail to compartmentalize listerolysin O activity are cytotoxic, avirulent, and unable to evade host extracellular defenses. *Infect Immun*, 2003, 71(12): 6753–6765.
- [14] Ermolaeva S, Karpova T, Novella S, *et al.* 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.

## Construction and characterization of a mutant strain of *Listeria monocytogenes* with a deletion of *actA* and *plcB*

Yuelan Yin, Guoqiang Zhu, Shizhong Geng, Maozhi Hu, Xi nan Jiao \*

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

**Abstract:** The virulence of *Listeria monocytogenes* is directly related to its ability to spread from cell to cell without leaving the intracellular milieu. Among the bacterial factors involved in cell-to-cell spread, actin-polymerizing protein ActA is required for bacterial spread to adjacent cells, while the broad-range phospholipase C (PC-PLC) contributes to bacterial escape from secondary vacuoles. [Methods] Based on homologous recombination technology, we constructed a double gene-mutant strain by deleting two virulence factors, ActA and PC-PLC, [Objective] its toxicity and immunopotency was evaluated in murine model. [Results] And then, the mutant strain was further verified the absence of ActA and PC-PLC using Western blot analysis and phospholipase activity assay. It showed highly attenuated and its 50% lethal dose in BLAB/c mice was increased at least  $10^3$ -fold compared to the parent strain. Nevertheless, mice preimmunized with the mutant strain elicited strong T-cell responses and fully protected against a lethal challenge with the virulent strain. [Conclusion] These results not only verified that ActA and PC-PLC were essential virulence factors for *L. monocytogenes*, but also demonstrated that the mutant strain possessed good immunogenicity with higher safety. The mutant strain could be further studied as a vaccine candidate to prevent listeriosis and used as a vector to deliver heterologous antigens. Furthermore, it provided the possibilities to elucidate the molecular mechanisms of pathogenesis and immune response triggered by *L. monocytogenes*.

**Keywords:** *Listeria monocytogenes*; mutant ; *actA*; *plcB*; homologous recombination

Supported by the Major Project of China National Programs for Fundamental Research and Development (2006CB504404) and the National Natural Science Foundation of China (30425031)

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

Received: 20 September 2007/ Revised: 23 December 2007