

毒力基因调控蛋白 PrfA 促进单核细胞增生 李斯特菌生物被膜的形成

冯飞飞 张强 王莉 冯晓琴 尹晓蛟 罗勤*

(华中师范大学 生命科学学院 遗传调控与整合生物学湖北省重点实验室 湖北 武汉 430079)

摘要: 单核细胞增生李斯特菌(*Listeria monocytogenes*, LM)是重要的革兰氏阳性食源性致病菌,易在食品以及各种食品加工、运输和保藏设备的接触面形成生物被膜,从而具有更强的抗逆性而难以彻底清除,因此成为食品卫生安全的重要隐患。PrfA 是 LM 毒力基因转录表达的重要调控因子,通过比较研究 LM 野生株(EGD 和 EGDe)、PrfA 缺失株(EGD Δ prfA 和 EGDe Δ prfA)、无害李斯特菌(*Listeria innocua*, LI)、携带组成性表达 PrfA 蛋白的重组无害李斯特菌(LI-pERL3-prfA*)以及重组单核细胞增生李斯特菌(EGDe Δ prfA-pERL3-prfA*)生物被膜形成能力的差异,探讨 LM 重要的毒力调控蛋白 PrfA 对生物被膜形成的影响。实验结果显示: LM 野生株具有较强的生物被膜形成能力,而 LI 形成生物被膜的能力最弱; PrfA 的缺失能降低 LM 生物被膜的形成能力;组成性高量表达 PrfA 蛋白可以回复 EGDe Δ prfA 的生物被膜形成能力,但对 LI 没有增强作用。以上实验结果表明: PrfA 在 LM 生物被膜形成中具有重要的促进作用。

关键词: 单核细胞增生李斯特菌, 无害李斯特菌, 生物被膜, PrfA

The virulence regulator PrfA plays a significant role in the *Listeria monocytogenes* biofilm formation

FENG Fei-Fei ZHANG Qiang WANG Li FENG Xiao-Qin YIN Xiao-Jiao
LUO Qin*

(Hubei Key Laboratory of Genetic Regulation and Integrative Biology, College of Life Science, Central China Normal University, Wuhan, Hubei 430079, China)

Abstract: The ability of the foodborne pathogen *Listeria monocytogenes* to develop biofilm in food-processing environment is a major concern for the food safety, because formation of biofilm facilitates bacteria to survive in the adverse environment and resist desiccation, UV light and treatment

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 30970111); 湖北省杰出青年基金项目(No. 2009CDA124); 华中师范大学科研基金项目(No. CCNU09Y01001); 华中师范大学研究生自主科研基金项目(No. 2009028)

* 通讯作者: Tel: 86-27-67863314; 邮箱: qinluo@mail.ccnu.edu.cn

收稿日期: 2011-03-20; 接受日期: 2011-05-17

with antimicrobial and sanitizing agents. However, the molecular mechanism of biofilm formation in *L. monocytogenes* has not been fully understood. PrfA is a key transcriptional activator that positively regulates most of the known listerial virulence genes expression. In order to explore the role of PrfA on *Listeria* biofilm development, we compared the abilities of biofilm formation in this study for *L. monocytogenes* wild type strains (EGD and EGDe) and their *prfA* deletion mutants (EGD Δ *prfA* and EGDe Δ *prfA*), nonpathogenic *Listeria innocua*, as well as the recombinant strains that can constitutively express PrfA in *L. innocua* (LI-pERL3-*prfA**) and in EGDe Δ *prfA* (EGDe Δ *prfA*-pERL3-*prfA**). Our results showed that the wild types of *L. monocytogenes* had strong abilities to develop “a network of knitted chains” biofilm structures on polyvinyl chloride microtiter plates, while unstructured biofilm was observed in *L. innocua*. Biofilm formation was reduced in *L. monocytogenes* mutants lacking PrfA and rescued in the strain with constitutive expression of PrfA. However, PrfA had no impact on *L. innocua* biofilm formation. Our results suggest that PrfA plays a significant role only in the *L. monocytogenes* biofilm formation but not in *L. innocua*. PrfA might indirectly regulate expression of certain genes involving in *L. monocytogenes* biofilm formation.

Keywords: *Listeria monocytogenes*, *Listeria innocua*, Biofilm, PrfA

生物被膜(Biofilm)是细菌在生长过程中,为适应生存环境而吸附于惰性或活性材料表面形成的一种与浮游细胞相对应的生长方式^[1]。它由细菌和自身分泌的多糖、蛋白质等胞外基质组成,是一个三维立体空间结构的生态系^[2]。由于生物被膜菌对各种化学杀菌剂的敏感程度只有浮游菌的 1/10–1/1 000,耐热性也相应增加,对环境变化不敏感,因此,在食品生产、加工、运输和保藏过程中,一旦发生细菌感染并形成生物被膜便难以将其彻底清除,不仅会对各种加工设备和输送管道的接触表面造成损伤,导致热传递效率降低、能耗增加,而且是一种极易产生食品生物危害的潜在污染源,严重威胁着食品卫生安全^[2]。

单核细胞增生李斯特菌(*Listeria monocytogenes*, 以下简称 LM)是革兰氏阳性无芽孢兼性厌氧杆菌,属于李斯特菌属,是人畜共患的李斯特菌病(Listeriosis)的主要病原菌,能引起人和动物脑膜炎、败血症、流产和单核细胞增多等症状,被 WHO 列为关系食品卫生安全的重要病原菌之一^[3–4]。LM 在自然界广泛分布,能在多数固体表面形成生物被膜,但其形成的具体分子机制尚不清楚^[5]。在被 LM 污染的食品中经常可以检出无害李斯特菌(*Listeria innocua*, 以下简称 LI),该菌在李斯特菌属中与 LM 亲源关系最近,因此常被作为表达 LM 特

有基因(如毒力基因)的寄主菌^[6–7]。其基因组中缺少绝大多数毒力因子的编码基因,对人畜没有致病性^[7]。由于 LM 中迄今为止发现的绝大多数毒力基因的转录表达都受到 PrfA (Positive Regulatory Factor A, 简称 PrfA, 因其在结构和功能上与大肠杆菌 cAMP 受体蛋白 Crp 极为相似,而被归于 Crp/Fnr 转录调控因子家族的一员的调控^[4],因此,本文试图通过比较研究 LM 野生菌(EGD 和 EGDe)、PrfA 缺失菌(EGD Δ *prfA* 和 EGDe Δ *prfA*)、LI 和携带组成性表达(Constitutive expression) PrfA 蛋白(PrfA*^[8])的重组无害李斯特菌(LI-pERL3-*prfA**)与重组单核细胞增生李斯特菌(EGDe Δ *prfA*-pERL3-*prfA**)生物被膜形成能力的差异,探讨 PrfA 在 LM 生物被膜形成中的作用,从而为深入研究 LM 致病机理和生物被膜形成的关系,以及建立经济有效的食品生产和保藏方法、提高食品卫生安全提供新的思路 and 理论依据。

1 材料与方法

1.1 菌株

单核细胞增生李斯特菌野生菌株 EGDe (BAA-679, 血清型 1/2a, 全基因组序列已知^[9])和 EGD (ATCC35152, 血清型 1/2a, EGDe 的衍生株)、*prfA* 缺失菌株 EGDe Δ *prfA* 和无害李斯特菌野生菌株

(CLIP 11262, 血清型 6a)以及携带组成型表达 PrfA 的质粒 pERL3-*prfA** (*prfA**指其编码产物 PrfA 蛋白的第 145 位的甘氨酸突变为丝氨酸^[8])均为德国维尔茨堡大学微生物系 Werner Goebel 教授馈赠;携带组成性表达 PrfA 蛋白的重组无害李斯特菌 LI-pERL3-*prfA**和重组单核细胞增生李斯特菌 EGDeΔ*prfA*-pERL3-*prfA**为本实验室构建保存。

1.2 构建携带组成型表达 PrfA 蛋白的重组无害李斯特菌 LI-pERL3-*prfA**和重组单核细胞增生李斯特菌 EGDeΔ*prfA*-pERL3-*prfA**

提取 pERL3-*prfA**质粒 DNA, 分别电转化入 LI 和 LM EGDeΔ*prfA* 的感受态细胞中, 利用质粒所带的红霉素抗性标记筛选阳性克隆, 并用来自 *prfA* 基因两端的特异性引物 (*prfA*-check-1F: 5'-AGCTC ACGAGTATTAGCGAG-3'; *prfA*-check-1R: 5'-TCC CCAAGTAGCAGGACATG-3')做菌落 PCR 进一步验证所得阳性克隆。与此同时, 分别电转化空质粒 pERL3 到 LI 和 EGDeΔ*prfA* 中作为实验的空白对照。

1.3 微孔板法检测菌体的生长和生物被膜的形成

该方法主要参照 Djordjevic 的报道进行^[10]: 挑取待测菌株的单个菌落接种于 BHI (Brain heart infusion)液体培养基中, 37 °C、180 r/min 振荡培养过夜, 然后以 1:50 的比例将菌液转入新鲜的 BHI 培养基中继续培养, 待其 OD_{600} 达到 0.2 时, 取 1 mL 菌液离心(8 000 r/min, 6 min)、重悬, 取重悬菌液 0.1 mL 做 100 倍稀释后, 从中吸取 200 μL 加入到 96 孔微孔板(NestBiotech Co., Ltd)中, 每样设 8 个平行重复。盖好盖子, 并用封口膜(CHICAGO, IL. 60631)封口, 防止培养基蒸发。将微孔板静置于 37 °C 分别培养 24、48、72 h 后, 首先用酶标仪(Powerwave XS, BIO-TEK®, 美国)测定菌液 OD_{600} 的光吸收值, 以检测菌株的生长情况, 然后小心弃去孔中的培养基, 用无菌蒸馏水洗涤 3 次, 以除去尚未形成生物被膜的浮游菌体。室温干燥 45 min 后, 向每个微孔加入 150 μL 1%结晶紫溶液, 染色 30 min。经无菌蒸馏水再洗涤 4 次并干燥后, 加入 160 μL 95%的乙醇溶液脱色 30 min, 最后用酶标仪检测生物被膜菌的光吸收值(OD_{570})。实验结果采用软件 Origin 6.1 进行统计学分析和绘制柱状图。

1.4 显微镜观察生物被膜的形态

培养在 96 孔板中不同菌株的生物被膜经 1% 结晶紫染色和 95%乙醇溶液脱色后, 直接置于倒置显微镜下(重光 COIC XDS-1B)观察, 拍照记录。

2 结果与分析

2.1 单核细胞增生李斯特菌野生菌株 EGD、*prfA* 缺失菌株 EGDeΔ*prfA* 和无害李斯特菌(LI)生物被膜形成能力的比较

如图 1A 所示, 3 种菌株在 24、48、72 h 的培养(37 °C、BHI 液体培养基、微孔板中静置培养, 如文中未特别注明, 均为此培养条件)过程中, LM 野生菌株 EGD 形成的生物被膜的量最大, 其次是 *prfA* 缺失株 EGDeΔ*prfA*, 而 LI 形成的生物被膜量最少; EGD 的生物被膜形成量在 24 h 时即可达到峰值, EGDeΔ*prfA* 在 48 h 时达到高峰后开始下降, 而 LI 生物被膜的形成却随培养时间延长呈缓慢上升趋势, 但是即使 72 h 时其形成的生物被膜量也远远低于 EGDeΔ*prfA* 的生物被膜最低量, 表明 3 种菌株生物被膜的成熟和形成能力具有较大差别。为探明这种差别是否因菌株在培养过程中的生长差异所造成, 我们检测了相应培养时间内各菌株的生长情况。从图 1B 中可以看到, 3 种菌株在 24、48、72 h 的培养过程中生长量的变化和差异较其生物被膜的差异相比并不十分显著; 并且 EGDeΔ*prfA* 和 LI 在 24 h 时的生长量甚至高于 EGD, 表明不同菌株生物被膜形成能力的差异与其生长的差异并不相关。显微镜观察 3 种菌株所形成的生物被膜形态(图 1C)显示: EGD 形成的网状生物被膜结构最为致密, 而 LI 在培养 72 h 后依然观测不到典型的针织网状生物被膜结构, 只能发现零星分散的一些小菌落; EGDeΔ*prfA* 形成的生物被膜的网状结构与野生型 EGD 类似, 但其孔隙比 EGD 的要大, 结构也稍疏松。显微镜观察结果与微孔板定量测定的 3 种菌株的生物被膜形成量的结论相一致, 表明 EGD 形成生物被膜的能力最强, LI 最弱, *prfA* 的缺失能降低 LM 生物被膜的形成能力, 但 EGDeΔ*prfA* 形成生物被膜的能力远高于 LI。

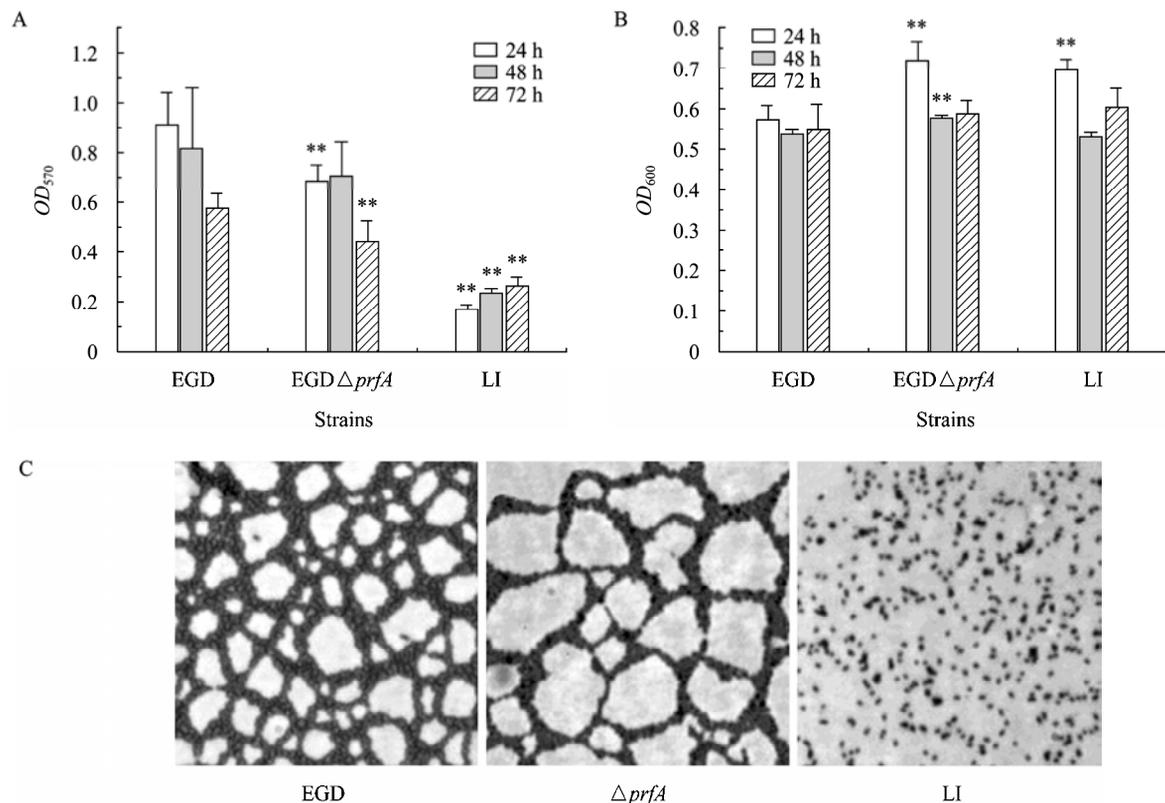


图1 单核细胞增生李斯特菌 EGD, EGD $\Delta prfA$, 无害李斯特菌(LI)三种菌株生物被膜形成能力的比较

Fig. 1 Biofilm formation by *L. monocytogenes* EGD, EGD $\Delta prfA$ and *L. innocua* (LI)

注: A: 3 种菌株在分别培养 24、48、72 h 后生物被膜的形成量; B: 3 种菌株培养 24、48、72 h 后的生长量; C: 3 种菌株形成的生物被膜的显微镜图片(40 \times). **: 在同一培养时间段内, 与野生型菌株 EGD 相比, EGD $\Delta prfA$ 和 LI 的生物被膜形成量或生长值具有极显著性差异($P < 0.01$).

Note: A: Biofilm quantities for three strains measured by microtiter plate assay after 24, 48 and 72 h of incubation; B: Growth quantities for three strains after 24, 48 and 72 h of incubation; C: Biofilm formed by three strains observed under a 40 \times objective. **: The difference that the biofilm formation or growth rate of strains EGD $\Delta prfA$ and LI compared with the wild type strain EGD in the same time is very significant ($P < 0.01$).

2.2 PrfA 对无害李斯特菌生物被膜形成的影响

LI 与 LM 同属, 测序结果显示这两种李斯特菌的基因组间具有高度的保守性和共线性^[7]。尽管 LI 基因组并不编码 LM 所特有的毒力基因调控蛋白 PrfA 以及相关毒力基因, 对人畜无致病能力, 但 *in silico* 分析 LI 全基因组编码基因的启动区域, 共发现了 307 个可能的 PrfA 蛋白结合位点(Putative PrfA-binding sites)^[9]; 而且分子进化分析显示 LI 和 LM 起源于同一个祖先细菌(Progenitor strain), 这个祖先细菌具有包括 PrfA 编码基因在内的完整的毒力基因簇(毒力岛 1, LIPI-1), LI 在漫长的进化中逐渐丢失了这个毒力基因簇, 因而成为无害的细

菌^[7]。为了探讨 LM 重要的毒力调控蛋白 PrfA 对 LM 和 LI 生物被膜形成的影响, 我们构建了携带组成型表达 PrfA 蛋白的 LI-pERL3-*prfA**以及空白对照菌株 LI-pERL3 并将它们一起与 LI 培养 24、48、72 h 后用酶标仪检测其生长状况和生物被膜形成量, 显微镜观察生物被膜形态(图 2), 在 24、48、72 h 的培养过程中, LI、LI-pERL3 和 LI-pERL3-*prfA** 3 种菌株之间的生物被膜形成量没有明显差异(图 2A); 同时, 尽管重组菌株和野生菌株一样随着培养时间的延长其生物被膜的量也有所增加, 但这种增加与 3 种菌株在各个培养时间段菌体生长的差异同样也没有相关性(图 2B); 这与图 1A 和图

1B 的结果相一致。3 种菌株在显微镜下的生物被膜形态几乎没有区别, 交联程度非常差, 难以观察到典型的针织网状生物被膜结构(图 2C)。以上结果显示 PrfA 不具备增强无害李斯特菌的生物被膜形成能力。

2.3 PrfA 对单核细胞增生李斯特菌 EGDe 生物被膜形成的影响

单核细胞增生李斯特菌 EGDe 是李斯特菌属中全基因组最早完成测序的菌株^[11], 国际上将其视为李斯特菌的标准菌株之一而被广泛研究。我们因此将携带组成型表达 PrfA 蛋白的 pERL3-*prfA**质粒电转化到 EGDe 的 *prfA* 缺失株 EGDe Δ *prfA* 中, 观察 PrfA*蛋白是否能够增强 EGDe Δ *prfA* 生物被膜的形成能力, 结果如图 3 所示。EGDe Δ *prfA*-pERL3-*prfA**

在培养 24 h 的生物被膜形成量略低于野生株 EGDe, 48 h 后超过 EGDe 达到峰值(图 3A); 显微镜观察 4 种菌株所形成的生物被膜形态(图 3C)也显示出 EGDe Δ *prfA*-pERL3-*prfA**所形成的生物被膜的针织网状结构比 EGDe Δ *prfA* 致密的多, 几乎与野生株 EGDe 和 EGD 一样, 其交联中的孔隙甚至比野生株的更小; 而 EGDe Δ *prfA* 和 EGDe Δ *prfA*-pERL3 所形成的生物被膜在形态上差别不大, 网状交联疏松, 孔隙较大。显微镜观察结果与微孔板定量测定结果基本一致, 表明过量表达的 PrfA 蛋白的确能显著增强 EGDe Δ *prfA* 生物被膜的形成能力, 暗示 PrfA 在 LM 生物被膜形成中具有重要作用。同时, 图 3B 的结果再一次显示, 菌株在培养过程中的生长量的高低与生物被膜量的高低并没有密切关系。

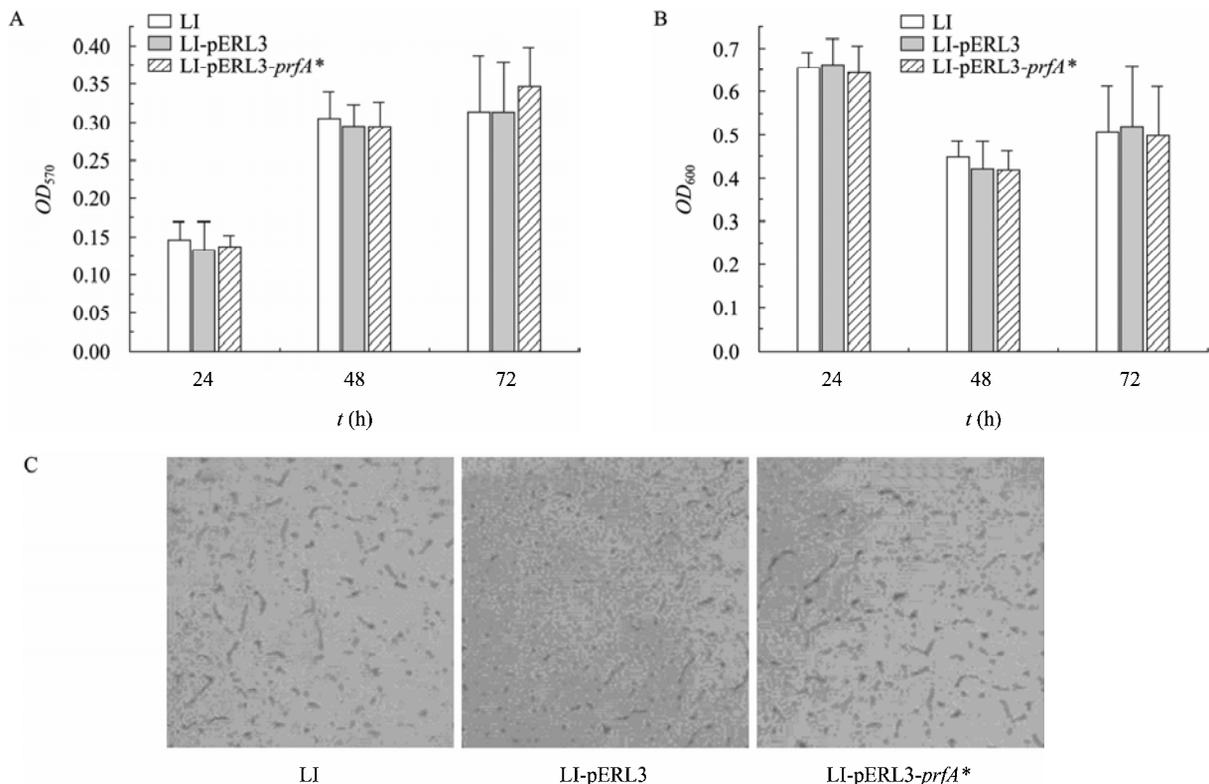


图 2 无害李斯特菌(LI), LI-pERL3, LI-pERL3-*prfA** 3 种菌株生物被膜形成能力的比较

Fig. 2 Biofilm formation by *L. innocua* (LI), LI-pERL3 and LI-pERL3-*prfA**

注: A: 3 种菌株在培养 24、48、72 h 后生物被膜的形成量; B: 3 种菌株培养 24、48、72 h 后的生长量; C: 3 种菌株形成的生物被膜的显微镜图片(40 \times)。其中在同一培养时间段内, 与 LI 菌株相比, LI-pERL3 和 LI-pERL3-*prfA** 的生物被膜形成量或生长值均不具有显著性差异($P>0.05$)。

Note: A: Biofilm quantities for three strains measured by microtiter plate assay after 24, 48 and 72 h of incubation; B: Growth quantities for three strains after 24, 48 and 72 h of incubation; C: Biofilm formed by three strains observed under a 40 \times objective. The difference that the biofilm formation or growth rate of strains LI-pERL3 and LI-pERL3-*prfA** compared with LI in the same time is not significant ($P>0.05$).

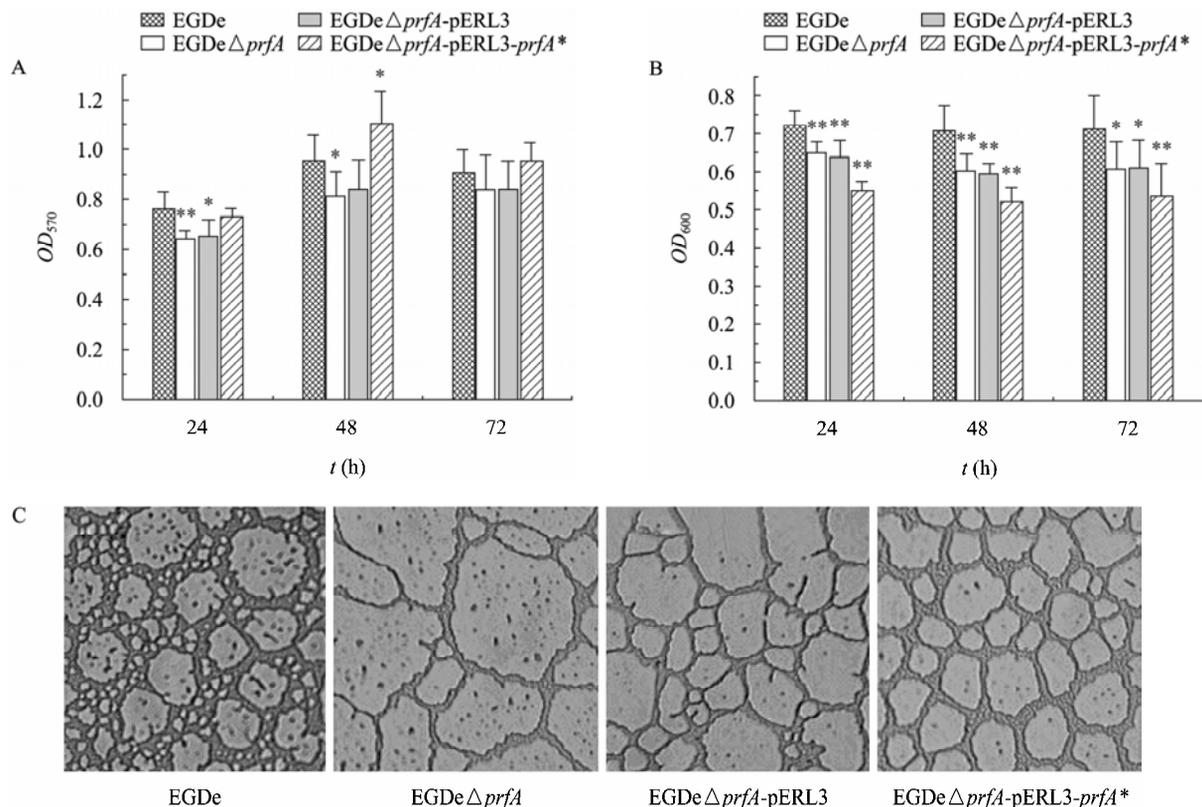


图3 单核细胞增生李斯特菌 EGDe, EGDe Δ *prfA*, EGDe Δ *prfA*-pERL3 和 EGDe Δ *prfA*-pERL3-*prfA** 四种菌株生物被膜形成能力的比较

Fig. 3 Biofilm formation by *L. monocytogenes* EGDe, EGDe Δ *prfA*, EGDe Δ *prfA*-pERL3 and EGDe Δ *prfA*-pERL3-*prfA**

注: A: 4 种菌株在培养 24、48、72 h 后生物被膜的形成量; B: 4 种菌株培养 24、48、72 h 后的生长量; C: 4 种菌株形成的生物被膜的显微镜图片(40 \times). *: 在同一培养时间段内与野生型菌株 EGDe 相比, EGDe Δ *prfA*、EGDe Δ *prfA*-pERL3 和 EGDe Δ *prfA*-pERL3-*prfA** 的生物被膜形成量或生长值具有显著性差异($P < 0.05$); **: 极显著性差异($P < 0.01$).

Note: A: Biofilm quantities for four strains measured by microtiter plate assay after 24, 48 and 72 h of incubation; B: Growth quantities for four strains after 24, 48 and 72 h of incubation; C: Biofilm formed by four strains observed under a 40 \times objective. *: The difference that strains EGDe Δ *prfA*, EGDe Δ *prfA*-pERL3 and EGDe Δ *prfA*-pERL3-*prfA** compared with the wild type strain EGDe in the same time is significant ($P < 0.05$); **: That difference is very significant ($P < 0.01$).

3 讨论

PrfA 是单核细胞增生李斯特菌中调控绝大多数毒力基因转录表达的重要的蛋白因子^[4,12]。编码 PrfA 蛋白的 *prfA* 基因与 LM 胞内感染相关的 6 个主要毒力因子的编码基因 *hly*、*plcA*、*plcB*、*mpl* 和 *actA* 共同组成 LM 染色体上一个 9 kb 长的基因簇, 即毒力岛 1 (LIPI-1), 缺失该基因簇将导致 LM 致病力完全丧失^[4]。PrfA 通过特异性识别并结合到靶基因启动子转录起始点上游约 40 bp 处的一段 14 bp 长的回纹保守序列(5'-TTAACANNTGTTAA-3', N 代表 TCGA 中任一碱基), 即所谓的 PrfA-box, 从而强

烈正调控毒力岛内基因的转录表达^[4,12]。除此之外, PrfA 还能直接调控位于毒力岛外的某些毒力因子的表达, 如 Hpt (6-磷酸葡萄糖转移酶)和内化素因子 InlC, 以及内化素操纵子 *inlAinlB* 的部分表达; 同时, 近年来的研究表明, PrfA 与压力胁迫调控因子 Sigma B 之间存在十分复杂的相互作用关系: *prfA* 启动子区域存在 Sigma B 的结合位点; 部分毒力基因的表达(如胆碱水解酶 BSH)与 PrfA 和 Sigma B 都有联系^[13], 暗示 PrfA 有可能与金黄色葡萄球菌中的全局性调控因子 SarA^[14] (Staphylococcal accessory regulator A)一样, 参与 LM 多种生理活动。

众所周知,细菌从浮游状态到生物被膜经历了从低密度到高密度、从无组织状态到有组织状态,其过程涉及到一系列基因的开启或关闭,那么 LM 中哪些基因在生物被膜中起着至关重要的“开”和“关”的作用? PrfA 是否也参与了这些基因的表达? LM 生物被膜的形成是否与其致病性直接关联? 然而迄今为止,尚未有文献完整阐明 LM 生物被膜的形成机制,更没有报道比较研究 LM 和 LI 生物被膜形成能力的差异。本实验研究结果显示: (1) LM 野生株 EGD 和 EGDe 形成生物被膜的能力比其相应的 PrfA 缺失株(EGDe Δ prfA 和 EGD Δ prfA)强; EGD 和 EGDe (图 1 和图 3)生物被膜的结构没有明显差异;组成型高量表达 PrfA 后能够明显回复 EGDe Δ prfA 形成生物被膜的能力,表明 PrfA 在 LM 生物被膜形成中具有重要的促进作用,但这种作用极可能在 LM 不同株、不同培养条件下的表现程度不相同。例如 Lemon 等人^[15]比较了 LM 中的 10403S (血清型 1/2a) PrfA 缺失株和野生菌株在加了 0.3%葡萄糖的基础培养基中生物被膜形成能力的差异,发现 PrfA 缺失株的生物被膜形成量远远低于野生株,其差异程度远高于我们的实验结果(利用 BHI 培养基观察 EGD 和 EGDe 与其 PrfA 缺失株的差异,见图 1 和 3); (2) 在相同培养基(BHI)、培养时间(24、48、72 h)、培养条件(37 °C 静置)和检测手段(微孔板酶标仪测量生物被膜的形成量和显微镜观察生物被膜的交联程度)下, LM 的生物被膜形成能力远远强于 LI(图 1)。尽管 LI 不具有依赖于 PrfA 调控的绝大多数毒力基因和感染宿主造成李斯特菌病的能力,但我们的实验结果并不因此暗示 LM 生物被膜形成能力的强弱与其致病能力正相关,因为,实验表明 PrfA 缺失的 LM 野生株(EGDe Δ prfA 和 EGD Δ prfA)的生物被膜形成能力也明显强于 LI; 同时,将组成型高表达 PrfA 蛋白的质粒电转化入 LI 后,不能增强 LI 生物被膜的形成能力。该结果一方面显示 PrfA 蛋白对于 LI 生物被膜的形成不具有作用,暗示 LM 和 LI 可能具有不同的(或者至少部分不同)生物被膜形成的调控机制,因为 LI 在营养相对贫乏的基础培养基中具有比在营养丰富的 BHI 中强的多的生物被膜形成能

力(未发表数据); 另一方面也暗示 LM 致病能力和生物被膜形成能力之间并不具有——对应的因果联系。形成结构致密的生物被膜能够使 LM 更强的抵御外界不利环境的压力而生存下来,并因此具备了侵染宿主造成疾病的先决条件,但 LM 能否成功高效地突破宿主免疫系统的屏障,并不与其生物被膜的形成能力直接相关。生物被膜的存在更可能是为了抵御外界的不良环境维持自己的基本生存而采用的不同于宿主胞内感染过程的基因表达模式。事实上,已发表的文献中也存在 LM 致病能力和生物被膜形成能力之间相互矛盾的报道: 例如,在流行病学研究中,能够引起大多数的人类李斯特菌病爆发流行和 70%人的散发病例的 LM 属于 Lineage I, Lineage II 中没有食源性的爆发流行的 LM 菌株, Lineage III 的菌株极少来源于人^[16]。Djordjevic 等人^[10]用微孔板法分析了 31 株来自 3 个不同致病谱系(Lineage)的 LM 菌的生物被膜量,结果显示 Lineage I 菌株形成生物被膜的能力显著高于 Lineage II 和 Lineage III; 然而 Harvey 等人^[17]在分析了 138 株 LM 后发现,属于 Lineage II 的血清型 1/2a 和 1/2c 菌株比属于 Lineage I 的 4b 和 1/2b 菌株的生物被膜形成能力还要强。

综上所述,我们认为毒力基因调控蛋白 PrfA 在 LM 生物被膜形成中具有重要的促进作用,而且这种作用仅仅只存在于 LM 中, PrfA 这一新功能的鉴定为深入研究 LM 致病机理提供了新的视点,其调控 LM 生物被膜形成的途径和分子机制将是我们今后研究的主要内容。

参 考 文 献

- [1] Costerton JW. Introduction to biofilm[J]. Int J Antimicrob Agents, 1999, 11(3/4): 217-221.
- [2] 李燕杰, 杜冰, 董吉林, 等. 食品中细菌生物被膜及其形成机制的研究进展[J]. 现代食品科技, 2009, 25(4): 435-450.
- [3] WHO/FAO (World Health Organization/Food and Agriculture Organization of the United Nations). Risk assessment of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods, MRA Series 4 & 5. 2004. Available at: http://www.who.int/foodsafety/publications/micro/mra_listeria/en/index.html.

- [4] Vázquez-Boland JA, Kuhn M, Berche P, et al. *Listeria* pathogenesis and molecular virulence determinants[J]. Clin Microbiol Rev, 2001, 14(3): 584–640.
- [5] Lemon KP, Higgins DE, Kolter R. Flagellar motility is critical for *Listeria monocytogenes* biofilm formation[J]. J Bacteriol, 2007, 189(12): 4418–4424.
- [6] Gaillard JL, Berche P, Frehe C, et al. Entry of *L. monocytogenes* into cells is mediated by internalin, a repeat protein reminiscent of surface antigens from gram-positive cocci[J]. Cell, 1991, 65(7): 1127–1141.
- [7] Hain T, Steinweg C, Chakraborty T. Comparative and functional genomics of *Listeria* spp.[J]. J Biotechnol, 2006, 126(1): 37–51.
- [8] 罗勤, 周青春, 冯莹颖, 等. 调控蛋白 PrfA 的单个氨基酸突变对单核细胞增生李斯特菌毒力基因转录水平的影响[J]. 自然科学进展, 2008, 18(8): 941–945.
- [9] Glaser P, Frangeul L, Buchrieser C, et al. Comparative genomics of *Listeria* species[J]. Science, 2001, 294(5543): 849–852.
- [10] Djordjevic D, Wiedmann M, McLandsborough LA. Microtiter plate assay for assessment of *Listeria monocytogenes* biofilm formation[J]. Appl Environ Microbiol, 2002, 68(6): 2950–2958.
- [11] Toledo-Arana A, Dussurget O, Nikitas G, et al. The *Listeria* transcriptional landscape from saprophytism to virulence[J]. Nature, 2009, 459(7249): 950–956.
- [12] 罗勤, 张晓莉, 李兵, 等. 单核细胞增生李斯特菌 PrfA 蛋白转录调控毒力基因表达的分子机制[J]. 微生物学通报, 2008, 35(2): 275–280.
- [13] 张强, 冯莹颖, 周青春, 等. SigmaB 在单核细胞增生李斯特菌耐受环境压力胁迫中的作用[J]. 微生物学报, 2009, 49(10): 1282–1288.
- [14] 唐俊妮, 史贤明, 曾志光, 等. 金黄色葡萄球菌毒力调控系统 TCRSs 和 SarA[J]. 上海交通大学学报: 农业科学版, 2009, 27(2): 171–176.
- [15] Lemon KP, Freitag NE, kolter R. The virulence regulator PrfA promotes biofilm formation by *Listeria monocytogenes*[J]. J Bacteriol, 2010, 192(15): 3969–3976.
- [16] 周晓辉, 焦新安. 单核细胞增生李斯特菌的分子亚型法及其应用[J]. 动物医学进展, 2003, 24(3): 44–47.
- [17] Harvey J, Keenan KP, Gilmour A. Assessing biofilm formation by *Listeria monocytogenes* strains[J]. Food Microbiol, 2007, 24(4): 380–392.

征订启事

2012 年中科院微生物所期刊联合编辑部联合征订

	《微生物学报》月刊(每月 4 日出版), 单价 55.00 元, 全年定价 660 元。刊号: ISSN 0001-6209; CODEN WSHPA8。国内邮发代号: 2-504; 国外邮发代号: BM67。
	《生物工程学报》月刊(每月 25 日出版), 单价 65.00 元, 全年定价 780 元。刊号: ISSN 1000-3061; CODEN SGXUED。国内邮发代号: 82-13; 国外邮发代号: BM5608。
	《微生物学通报》月刊(每月 20 日出版), 单价 58.00 元, 年价 696 元。刊号: ISSN 0253-2654; CODEN WSWPDI。国内邮发代号: 2-817; 国外邮发代号: BM413。
	《菌物学报》双月刊(单月 15 日出版), 单价 80 元, 全年定价 480 元。刊号: ISSN 1672-6472; CODEN JXUUAЕ。国内邮发代号: 2-499; 国外邮发代号: Q723。
订阅	欢迎广大读者直接与本刊发行部联系订购, 我们将按期免费为您邮寄。
	汇款地址: (100101)北京市朝阳区北辰西路 1 号院 3 号中科院微生物所 B401
	收信人: 《 》编辑部; 电话: 010-64806142; E-mail: bjb@im.ac.cn
	请在附言处注明“订刊费”及所订期刊名称、年代、卷、期和数量。