

单核细胞增生李斯特菌溶血素 hly 基因 缺失株和回补株的构建

陈凤霞, 叶精精, 姜莉, 王航, 吕洁婷, 罗微微, 冯振灿, 程昌勇*, 宋厚辉*

(浙江农林大学动物科技学院, 浙江临安 311300)

摘要:单核细胞增生李斯特菌(简称单增李斯特菌)为革兰染色阳性菌,在人类与动物生活环境中均广泛分布,为人畜共患病原菌。李斯特菌溶血素 O(LLO,由 hly 编码)作为李斯特菌重要毒力因子主要在细菌裂解并逃逸吞噬体中起作用,但其潜在的分子机制尚待深入解析。以单增李斯特菌 EGD-e 为参考菌株,通过 PCR 分别扩增 hly 基因的上、下游同源臂序列(各约 500 bp),选用 SOE PCR 方法将同源臂整合连接成融合片段。经 BamH I / Sal I 酶切、连接后克隆至李斯特菌温敏型穿梭质粒 pKSV7 中得到重组质粒 pSL081,测序验证后电转至 EGD-e 感受态细胞中,在温度变化及抗生素双重选择压力下筛选获得 hly 基因缺失株 Δ hly。同时,设计引物扩增含 hly 基因启动子和编码区序列的片段,克隆至李斯特菌整合型质粒 pIMK2 中得到重组质粒 pSL251,测序验证后电转至缺失株 Δ hly 感受态细胞中,经抗性筛选获得回补株 C Δ hly。测序结果显示,缺失株 Δ hly 和回补株 C Δ hly 均构建正确。利用 Western blot 方法检测突变株中 LLO 的表达情况,结果显示 EGD-e 和 C Δ hly 中均能检测到 LLO 的正常表达,而 Δ hly 中无法检测到,进一步证实成功构建了 hly 基因缺失株和回补株,为下一步深入探索 LLO 在李斯特菌感染过程中的生物学功能奠定了基础。

关键词:单增李斯特菌;李斯特菌溶血素 O;hly 基因;同源重组;质粒回补

中图分类号:S852.616

文献标识码:A

文章编号:1007-5038(2018)03-0005-06

单核细胞增生李斯特菌 (*Listeria monocytogenes*, Lm) 简称单增李斯特菌,因其对盐浓度、pH 等理化因素不敏感而在自然界中广泛存在,对人和动物的健康构成很大的威胁^[1-5]。2015 年蓝铃公司生产的冰淇淋曾因其中存在李斯特菌而被紧急召回,2017 年 4 月加拿大某公司生产的酸奶也因疑似污染李斯特菌被要求全部下架。该菌在 4℃ 仍然可以增殖,因此冷藏食品成为该菌感染人类的重要传播媒介。

单增李斯特菌作为胞内寄生菌,其感染宿主细胞主要包括黏附与侵袭、逃逸吞噬体、胞内增殖及细胞间迁移等诸多过程,且每一步均有相关的毒力因子参与^[6]。

李斯特菌溶血素 O (listeriolysin O, LLO) 作为李斯特菌重要毒力因子主要介导细菌裂解并逃逸吞噬体,该蛋白由 hly 基因编码,属于依赖胆固醇的膜穿孔蛋白家族(CDCs)^[7],在酸性条件下可形成直径为 35 nm 的孔状结构进而插入到宿主细胞膜内^[8]。因此,当李斯特菌包裹在吞噬体内侵入细胞时,可借

助 LLO 和磷脂酶 A、B(PlcA 和 PlcB)的作用^[9],将吞噬体的膜破坏使其得以逃脱并进入细胞质,导致其在胞内能够进行增殖。由此可见,在细菌逃逸初级和次级吞噬体过程中 LLO 发挥着重要作用^[7]。除此之外,LLO 还能激活如钙离子、核转录因子 κ B (NF- κ B)^[10-11]等信号通路。

尽管关于 LLO 功能的研究已较多,但该分子在发挥生物学功能过程中涉及的潜在分子机制尚待深入解析。本研究采用同源重组策略及质粒回补手段构建出 hly 基因缺失株和回补株,并利用这些重组菌株进一步探索和挖掘 LLO 参与李斯特菌感染、胞内生存等生物学途径的分子机理,为进一步探索 LLO 在李斯特菌感染过程中的生物学功能奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株及培养条件 试验需用到的菌株有单增李斯特菌野生型 EGD-e 和大肠埃希菌 DH5 α ,来自

收稿日期:2017-07-12

基金项目:国家自然科学基金项目(31402215)

作者简介:陈凤霞(1996-),女,浙江桐乡人,本科生,主要从事单增李斯特菌生物学功能研究。* 通讯作者

于 Song's Lab 冻存库。EGD-e 菌株需要接种于牛脑心浸出液肉汤 (brain heart infusion, BHI), DH5 α 菌株需要接种于肉汤 (luria-bertani, LB), 37 $^{\circ}$ C 振荡过夜培养。

1.1.2 试剂和仪器 T4 核酸连接酶、DNA 标准品、经典蛋白, 宝日生物技术有限公司产品; 限制性核酸内切酶 *Bam*H I 和 *Sal* I, 美国 NEB 公司产品; PCR 产物纯化/回收试剂盒, 上海莱枫生物科技有限公司产品; 质粒提取试剂盒, 天根生化科技有限公司产品; 蛋白免疫印迹显色液, 伯尚生物技术有限公司产品; 硝酸纤维素膜, 上海安谱实验科技股份有限公司产品; 山羊抗小鼠 IgG (H+L) HRP-tag, 上海生工生物工程技术有限公司产品; 聚丙烯酰胺凝胶电泳试剂, 美国 BBI 生命科学有限公司; 质粒 pKSV7 Plasmid pKSV7, 本实验室自存; 李斯特菌

裂解液, 本实验室自配。

1.1.3 引物设计与合成 对于缺失株的构建, 所用模板为 EGD-e 菌株全基因组 (GenBank No NC-003210.1), 设计 2 对分别用于扩增 *hly* 基因 (lmo0202) 上、下游同源臂序列的特异性引物 (*hly* EGD-e up-fwd/rev 和 *hly* EGD-e down-fwd/rev), 同时为了后续缺失株的筛选, 在距离上游同源臂 100 bp 左右设计 1 条引物 (*hly* EGD-e up front), 并搭配引物 *hly* EGD-e down-rev 用于同源重组后基因交换验证。对于回补株的引物设计与缺失株的不同在于用到的是在 EGD-e 菌株全基因组、表达载体 pIMK2 和重组载体 pSL251 上都具有其识别位点的 1 对序列 (*hly* EGD-e completion-fwd/rev), 本研究中用到的引物见表 1。

表 1 本研究中所用到的引物
Table 1 Primers used in this study

引物 Primer	序列 (5'-3') Sequence(5'-3')
<i>hly</i> EGD-e up fwd <i>Sal</i> I	ACGCGTTCGACTTCTCTGCTTCTAGTTGTTGGTACAATGA
<i>hly</i> EGD-e up rev	TATTACTTTTACAAGGGTTTCACTCTCCTTCTACATTTTTTAAAC
<i>hly</i> EGD-e down fwd	AGAGTGAAAACCTTGTAAGTAATAAAAAATTAAGAATAAAACCGC
<i>hly</i> EGD-e down rev <i>Bam</i> H I	CGCGGATCCGCTTATCTTTTGTTCATATCAAGAATTTTAAAATTT
<i>hly</i> EGD-e up front	TGAGTAATCGTTTCTAATACACCTGAAAGTG
<i>hly</i> EGD-e completion fwd <i>Bam</i> H I	CGCGGATCCAATGAAAAAATAATGCTAGTTTTTATTACACTTATA
<i>hly</i> EGD-e completion rev <i>Xho</i> I	CCGCTCGAGTTATTCGATTGGATTATCTACTTTATTACTATATTTTC

1.2 方法

1.2.1 单增李斯特菌感受态细胞的制备 挑取单克隆摇菌, 培养过夜后吸取新鲜菌液 1 mL 放入 100 mL 终浓度为 0.5 g/mol 的蔗糖与 BHI 混合培养基中培养 4 h, 加入已过滤除菌的青霉素 G 进行筛选, 约 2 h 后李斯特菌生长至对数期, 适合做感受态细胞。用已过滤除菌的 1 mg/mol HEPES + 0.5 g/mol 蔗糖混合液进行洗涤, 一般洗 2 次, 第 1 次用 25 mL, 第 2 次用量减半, 最后再用 400 μ L 重悬。感受态细胞制备完毕, 若需要备用则可分两管冻存在 -80 $^{\circ}$ C。

1.2.2 EGD-e 基因组的抽提 试验采用裂解、冰冻、煮沸再冰浴冷却的方法, 促使它破裂, 释放出基因组。先从试管里吸取过夜培养的菌液 1 mL ~ 2 mL 到适合的离心管, 以 12 000 r/min 离心 1 min。轻轻取出并用 200 μ L 移液器吸取上清弃掉。然后用等体积的 TZ 和蒸馏水将沉淀菌体重悬, 将混合物于 -20 $^{\circ}$ C 静置 30 min 后, 立即放进泡沫浮漂置于沸水中 10 min, 随即冰浴进行 10 min 的冷却, 再次离心后取其上清置 -20 $^{\circ}$ C 冰箱保存备用。

1.2.3 *hly* 基因缺失株 Δ *hly* 的构建

1.2.3.1 *hly* 上、下游同源臂的扩增 以 EGD-e 基因组为模板, 采用 1 对上引物 *hly* EGD-e up-fwd/rev 从李斯特菌 EGD-e 基因组中扩增 *hly* 上游同源臂 *hly* EGD-e up homoarm (539 bp), 1 对下游引物 *hly* EGD-e down-fwd/rev 扩增 *hly* 下游同源臂 *hly* EGD-e down homoarm (541 bp)。利用引物 *hly* EGD-e up fwd *Sal* I 和引物 *hly* EGD-e down rev *Bam*H I 通过 SOE PCR 将上、下游同源臂连接起来, 得到 *hly* EGD-e homoarms。

1.2.3.2 *hly* 同源臂与 pKSV7 连接 将 *hly* 同源臂与 pKSV7 用 *Bam*H I、*Sal* I 进行双酶切, 经纯化回收之后, 用 T4 连接酶连接再转入大肠埃希菌 DH5 α 细胞中培养, 通过验证, 对得到的阳性克隆提质粒, 即可得到重组质粒 pSL081 (图 1)。

1.2.3.3 *hly* 基因缺失株的筛选 将质粒 pSL081 电转入 EGD-e 感受态细胞中, 42 $^{\circ}$ C、BHI/Chl 抗性下, 培养 2 代 ~ 3 代, 采用平板划线和 PCR 验证, 选出发生同源重组的阳性克隆。将阳性克隆在 30 $^{\circ}$ C、Chl 抗性下, 进行传代培养, 约 10 代后, 在无抗的

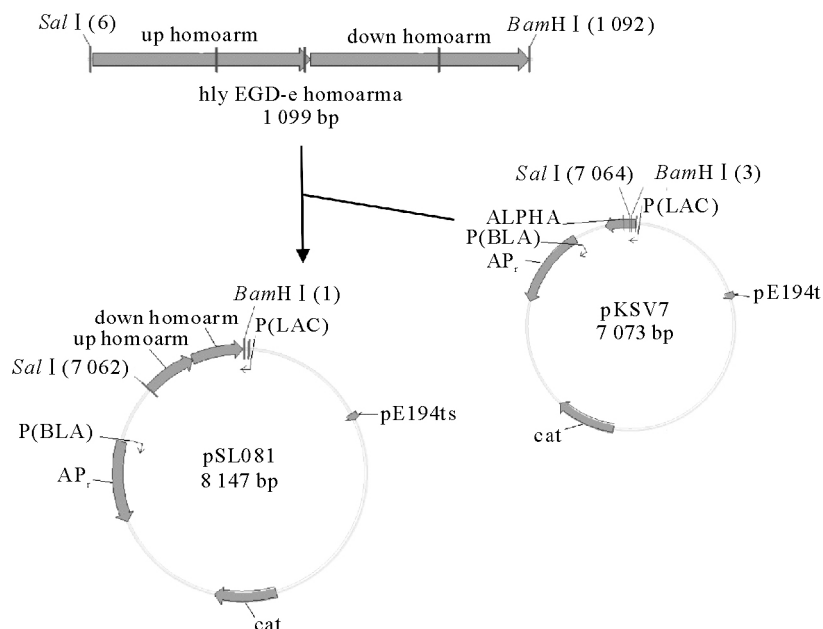


图1 基因敲除载体 pSL081 的构建

Fig.1 Construction strategy of the recombinant plasmid pSL081 for hly gene deletion

BHI 平板上划线。大约 24 h,待平板上长出菌落后,用无菌牙签挑取数个规则的单菌落同步接种于有氯霉素抗性和无抗性的 BHI 液体培养基或固体平板中培养。在没有抗性的培养基中长势良好,而对应的在有氯霉素抗性的培养基中无法繁殖的即是试验缺失成功的菌株。

1.2.4 hly 的回补株 CΔhly 的构建 为了证实缺失株 Δhly 的表型缺失是由于基因敲除造成的,利用表

达载体 pIMK2 构建了一个重组载体 pSL251(构建示意图见图 2),将其在 25 μF、200 Ω、2 500 V 条件下,用 0.2 cm 的电击转化杯电转至李斯特菌缺失株 Δhly 的感受态细胞中。将菌液涂布于有氯霉素抗性的 BHI 固体平板,放在 37℃ 恒温培养箱中培养约 12 h 后,挑取单克隆,用引物进行 PCR,经鉴定呈阳性的克隆送测序公司,测序成功后的菌株即为回补株,并将其命名为 CΔhly。

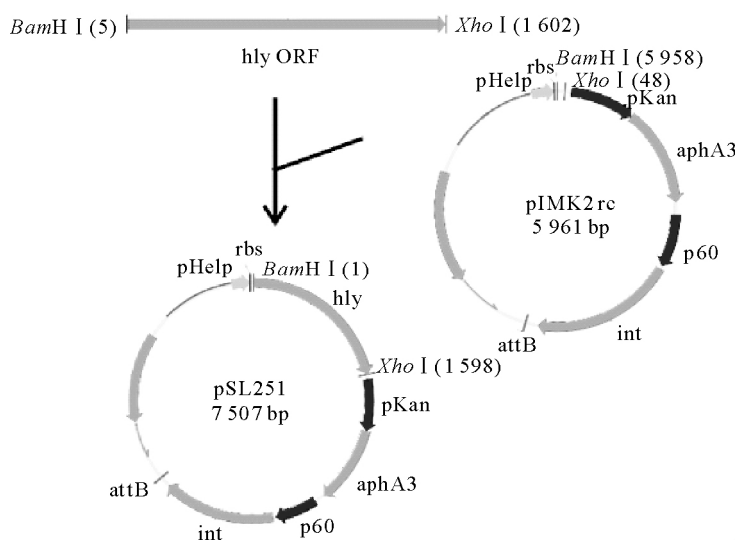


图2 李斯特菌 hly 基因回补株重组载体 pSL251 的构建

Fig.2 Construction strategy of the recombinant plasmid pSL251 for hly gene complementation

1.2.5 Δhly 和 CΔhly 的鉴定及遗传稳定性测定 用引物 hly EGD-e up front 和 hly EGD-e down rev BamH I 进行菌液 PCR 验证缺失株 Δhly 和回补株

CΔhly,以检测突变株是否发生缺失或回补不完全,并确定重组菌的遗传稳定性。预计野生型菌株和回补株 CΔhly 可以得到 2 779 bp 的片段,而缺失株

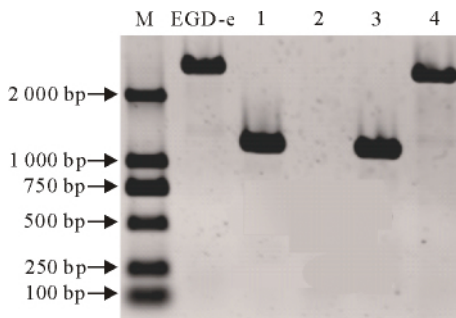
Δhly 预期得到 1 189 bp 的片段。

1.2.6 Western blot 检测 为了检测缺失株 Δhly 和回补株 CΔhly 是否构建成功,以及融合蛋白在重组菌株内是否成功表达,利用抗原抗体特异性反应原理,以 LLO 多克隆抗体为一抗,羊抗鼠 IgG-HRP 为二抗来检测。具体操作时先挑取制备的缺失株 Δhly 和回补株 CΔhly 单克隆摇菌,收集菌体后进行离心,分别获得上清和沉淀,为了得到上清中的蛋白,用 100 mL/L 的 TCA 对上清进行沉淀,为了得到菌体蛋白,超声破碎将沉淀中的菌体裂解。得到蛋白后测定浓度,计算蛋白量与着色液的合适配比并以两倍该体系分别加入蛋白与试剂,混合均匀,高温煮沸 5 min,将样品瞬间使得一些碎片沉到试管底部,降低对下一步 SDS-PAGE 的影响,电泳后采用半干法转膜,脱脂奶粉封闭,一抗二抗孵育,最后利用紫外线对蛋白进行检测。

2 结果

2.1 缺失株 Δhly 和回补株 CΔhly 的验证

采用菌液 PCR 技术,挑取在氯霉素抗性培养基中不生长而在无抗培养基中生长的单菌落进行验证,用引物 hly EGD-e up front 和 hly EGD-e down rev BamH I 验证缺失株 Δhly 和回补株 CΔhly。将所得产物进行琼脂糖凝胶电泳,由图 3 可知,与 DNA 标准 DL 2 000 相比,野生株 EGD-e 得到 2 779 bp 的片段,而缺失株 Δhly 是 1 189 bp 的片段。



M.DNA 标准 DL 2 000; EGD-e.野生株;1,3.缺失株 Δhly 阳性克隆; 2.阴性对照;4.回补株 CΔhly 阳性克隆

M.DNA Marker DL 2 000; EGD-e.Wild strain;1,3. Δhly KO candidates;2. Negative control; 4. CΔhly KO candidate

图 3 单增李斯特菌 EGD-e、缺失株 Δhly 和回补株 CΔhly 的 PCR 验证

Fig.3 Identification of EGD-e,Δhly and CΔhly mutants by PCR

2.2 缺失株 Δhly 序列测定与分析

本研究设计缺失的序列为 GenBank 中公布的 hly 基因整个 ORF 区(1 590 bp,NC-003210)。为

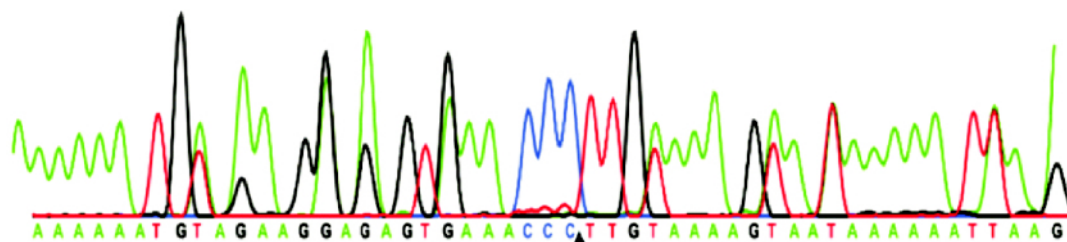
了进一步验证缺失株 Δhly 的构建情况,采用核苷酸测序分析发现,与野生型 EGD-e 的 hly 基因两侧序列比较,本研究构建的缺失株 Δhly 正好缺失了该基因的全部 ORF 区(1 590 bp),与预期完全一致(图 4),该结果进一步确证缺失株 Δhly 构建成功,可以用于下一步试验研究。

2.3 重组菌株 Western blot 检测

将李斯特菌 EGD-e、Δhly、CΔhly 过夜培养收集上清和沉淀。Western blot 检测结果见图 5,上清中的蛋白通过 TCA 沉淀的方法得到,沉淀中的蛋白通过超声裂解得到。经过 Western blot 检测,可以确认分泌型的 LLO 蛋白在 EGD-e wt 与 CΔhly 中正常表达,且在分子质量 58.7 ku 处可见明显条带,而在缺失株 Δhly 的上清与沉淀中均未有条带出现,而内参表达正常,说明试验结果准确。结合基因序列测定和 PCR 验证,表明无 LLO 的转录、翻译与表达,证明缺失株与回补株构建成功。

3 讨论

单增李斯特菌 LLO 是该菌感染宿主过程中至关重要的毒力因子,且对宿主细胞具有毒性^[12]。已有研究证实 LLO 能够在各种人类组织细胞(如鼠 BMDM 与 J774 和人 Caco-2 细胞)中协助细菌逃逸吞噬体^[13]。目前有研究表明,虽然 LLO 与细菌磷脂酶 PC-PLC 为裂解宿主细胞吞噬体膜所必需的蛋白,但单增李斯特菌可以通过肠道派伊尔结上的 M 细胞进入感染宿主细胞内^[14]而不依赖于 LLO 的作用。基于这一研究结果,笔者认为更有构建 Δhly 和 CΔhly 的必要性。在此基础上,下一步将开展 LLO 生物学特性分析、Δhly 毒力分析及致病机理的深入研究,以期解析 LLO 在单增李斯特菌增殖过程中所发挥功能的潜在分子机制及在没有 LLO 表达的情况下,单增李斯特菌如何进入被感染的宿主细胞内增殖,比较两者的区别及增殖途径的异同。本研究查阅大量文献做试验,详细记录了构建单增李斯特菌 hly 基因缺失株和回补株的方法,成功构建出缺失株 Δhly 和回补株 CΔhly,可为初步接触分子生物学领域的学子提供参考,也为进一步探究 LLO 蛋白的生物学功能奠定重要基础,为探索和挖掘 LLO 参与李斯特菌感染、胞内生存等生物学途径的分子机理提供试验材料。此外,有学者将李斯特菌用于疫苗开发和研究^[15],作为载体通过表达各种免疫蛋白来启动细胞免疫,故本研究成功构建的缺失株 Δhly 也可单增李斯特菌用于疫苗载体研究提供可行性方案。



此处已缺失1590个碱基对 1590 bp was deleted

图4 缺失株 Δ hly 测序鉴定结果

Fig.4 Verification of Δ hly mutant by sequencing

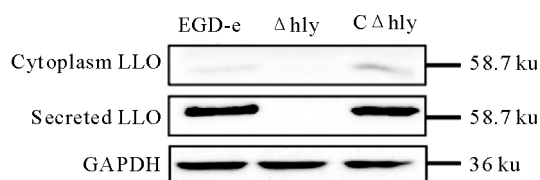


图5 单增李斯特菌 EGD-e、缺失株 Δ hly 和回补株 $C\Delta$ hly 中 LLO 的表达分析

Fig.5 Western blot analysis of LLO expression in the wild-type strain EGD-e and the mutant strains Δ hly and $C\Delta$ hly

参考文献:

- [1] Cheng C, Wang X, Dong Z, et al. Aminopeptidase T of M29 family acts as a novel intracellular virulence factor for *Listeria monocytogenes* infection [J]. *Sci Rep*, 2015, 5:17370.
- [2] Valckx W, Lutgens S P M, Haerens-arends H E, et al. *Listeria* endocarditis: a diagnostic challenge [J]. *J Invest Med High Impact Case Rep*, 2017, 5(2):1-3
- [3] 程昌勇, 陈健舜, 赵寒昕, 等. 单核细胞增生李斯特菌精氨酸脱亚胺酶基因的克隆及原核表达 [J]. *动物医学进展*, 2010, 31(s1):70-73.
- [4] Morlay A, Roux A, Templier V, et al. Label-free immunosensors for the fast detection of listeria in food [J]. *Methods Mol Biol*, 2017, 1600:49-59.
- [5] Althaus D, Jermina M, Giannini P, et al. Local outbreak of *Listeria monocytogenes* serotype 4b sequence type 6 due to contaminated meat pate [J]. *Foodb Pathog Dis*, 2017, 14(4):219-222.
- [6] Yin Y, Zhang C, Dong H, et al. Protective immunity induced by a LLO-deficient *Listeria monocytogenes* [J]. *Microbiol Immunol*, 2010, 54(4):175-183.
- [7] 程昌勇. 单核细胞增多性李斯特菌精氨酸和脯氨酸脱亚胺酶的抗酸应激机制及其调控 [D]. 浙江杭州: 浙江大学, 2014.
- [8] Bavdek A, Kostanjsek R, Antonini V, et al. pH dependence of listeriolysin O aggregation and pore-forming ability [J]. *FEBS J*, 2012, 279(1):126-141.
- [9] 武晓林. 单核细胞增多性李斯特菌溶血素 LLO 的功能关键位点鉴定及表面展示系统的构建 [D]. 浙江临安: 浙江农林大学, 2015.
- [10] Tsuchiya K, Kawamura I, Takahashi A, et al. Listeriolysin O-induced membrane permeation mediates persistent interleukin-6 production in Caco-2 cells during *Listeria monocytogenes* infection *in vitro* [J]. *Infect Immun*, 2005, 73(7):3869-3877.
- [11] Dramsi S, Cossart P. Listeriolysin O-mediated calcium influx potentiates entry of *Listeria monocytogenes* into the human Hep-2 epithelial cell line [J]. *Infect Immun*, 2003, 71(6):3614-3618.
- [12] Koster S, Van Pee K, Hudel M, et al. Crystal structure of listeriolysin O reveals molecular details of oligomerization and pore formation [J]. *Nat Commun*, 2014, 5:3690.
- [13] Carrero J A, Vivanco-Cid H, Unanue E R. Listeriolysin o is strongly immunogenic independently of its cytotoxic activity [J]. *PLoS One*, 2012, 7(3):e32310.
- [14] Hastings K T, Cresswell P. Disulfide reduction in the endocytic pathway: immunological functions of gamma-interferon-inducible lysosomal thiol reductase [J]. *Antioxid Redox Signal*, 2011, 15(3):657-668.
- [15] Yang Y, Hou J, Lin Z, et al. Attenuated *Listeria monocytogenes* as a cancer vaccine vector for the delivery of CD24, a biomarker for hepatic cancer stem cells [J]. *Cell Mol Immunol*, 2014, 11(2):184-196.

Construction of *Listeria monocytogenes* Listeriolysin O Encoding Gene (hly) Deletion and Complemented Strains

CHEN Feng-xia, YE Jing-jing, JIANG Li, WANG Hang, LÜ Jie-ting, LUO Wei-wei,
FENG Zhen-can, CHENG Chang-yong, SONG Hou-hui

(College of Animal Science and Technology, Zhejiang A & F University, Lin'an, Zhejiang, 311300, China)

Abstract: *Listeria monocytogenes* is a food-borne Gram-positive bacterium, which widely distributes outside the environment, and the pathogen can cause high mortality in some specific groups. Listeriolysin O (LLO, encoded by hly) of *L. monocytogenes* takes an important role in bacterial infection, but the underlying

沙门菌 LAMP 可视化检测方法的建立与应用

刘志科¹,张洁²,杨宁宁¹,徐锦凤²,徐明国¹,荆明龙¹,吴文星¹,曹旭东³,
任艳³,石峰²,陈创夫^{1*}

(1.石河子大学动物科技学院,新疆石河子 832003;2.石河子大学生命科学学院,新疆石河子 832003;
3.石河子大学医学院,新疆石河子 832002)

摘要:建立沙门菌病原体的一种可可视化环介导等温扩增技术(LAMP),实现对沙门菌的高效快捷检测。针对沙门菌的 *invA* 基因的高度保守区域,设计一套特异性引物,优化 LAMP 扩增反应体系和条件,并对该方法的特异性、灵敏性和人工污染样品以及临床样品分别进行检测。与传统的细菌分离与鉴定、PCR 和 real-time PCR 方法进行敏感性比较。该方法优化后的最佳反应体系为内外引物浓度比例为 3:1, dNTPs 为 2.5 μ L, MgSO₄ 为 1.5 μ L, 2.5 μ L 甜菜碱(10 mol/L), 1 μ L Bst 2.0 DNA 聚合酶,在 62 $^{\circ}$ C 恒温条件下反应 50 min,可以特异性检出沙门菌,而对其他非沙门菌病原的检测结果为阴性。该方法的最低检测线为 1.0×10^2 CFU/mL,灵敏度是常规 PCR 检测方法的 1 000 倍,与 real-time PCR 方法的灵敏度基本接近;针对人工污染沙门菌的鱼粉其检测灵敏度为 5.0×10^2 CFU/mL;对临床样品的检出率为 65.4%,与传统检测方法的检出率一致。本研究建立的 LAMP 检测沙门菌的方法特异性强、灵敏度高、操作简便、效能高和可视化,为基层监管部门和畜牧兽医工作者对于沙门菌病原的监控和初步筛选提供了技术保障。

关键词:沙门菌; *invA* 基因;环介导等温扩增技术;可视化检测

中图分类号:S852.612

文献标识码:A

文章编号:1007-5038(2018)03-0010-09

在最新的研究报告中,由沙门菌引起人食物中毒的病例居于首位,其中肠炎沙门菌占 85% 以上,据不完全统计,全球每年报道的沙门菌食物中毒的病人大约为 170 万人,死亡人数大约在 1 000 人以上,且呈上升趋势^[1],对公共卫生安全构成威胁。由此造成的医疗费用每年约 114 亿美元,给各国政府

带来了巨大的经济负担^[2]。因此,迫切需要建立一种快速、准确诊断沙门菌食物中毒的方法。

目前,对沙门菌的检测方法主要有传统的分离鉴定方法、免疫学方法及分子生物学方法。传统的沙门菌检测方法是根据国家标准(GB4789.4-2016)进行的,其步骤比较繁琐,耗时较长,至少需要 4 d~

收稿日期:2017-06-27

基金项目:省级协同创新中心项目(2013-179)

作者简介:刘志科(1989-),男,河南新乡人,硕士研究生,主要从事人畜共患病研究。*通讯作者

molecular mechanism remains to be deep studied. In this study, we constructed a recombinant shuttle plasmid to delete the complete ORF of *hly* by using the molecular cloning techniques and the homologous recombination strategy with the temperature-sensitive shuttle vector pKSV7. The recombinant plasmid harboring the up and down-stream homoarms of *hly* were electroporated into wild strain EGD-e competent cells and utilized the variation of temperature and antibiotic to choose the correct transformants. To make the result more forceful, we here in this study tested the transformants by DNA sequencing. Based on this, we successfully constructed a LLO complemented strain. The mutant and complemented strains were designated as Δ *hly* and C Δ *hly*, respectively. Moreover, we found that expression level of LLO was almost abolished in the absence of *hly*, compared to the wild-type strain EGD-e and the complemented strain C Δ *hly*, suggesting that these recombinant strains were successfully constructed in our study. As a result, this research provided a basis for further study of the biological functions and the molecular mechanism of LLO involved in intracellular infection of *L. monocytogenes*.

Key words: *Listeria monocytogenes*; listeriolysin O; *hly*; homologous recombination; gene complementation