

论著

单核细胞增生李斯特菌的毒力基因检测及 PFGE 分型的研究

陈伟伟 洪锦春 张巧姬 杨毓环 马群飞

(福建省疾病预防控制中心,福建 福州 350001)

摘要:目的 了解福建省食品中单核细胞增生李斯特菌携带 *hly*、*plcA*、*plcB* 和 *pfA* 毒力基因的情况及脉冲场凝胶电泳 (PFGE) 的分型情况。方法 将 *hly*、*plcA*、*plcB* 和 *pfA* 基因作为靶序列选取 4 对引物,通过聚合酶链反应 (PCR) 检测 61 株单核细胞增生李斯特菌和 2 株可疑单核细胞增生李斯特菌的毒力基因,用 PulseNet 单核细胞增生李斯特菌标准方法进行 7 株单核细胞增生李斯特菌的 PFGE 分子分型。结果 61 株单核细胞增生李斯特菌毒力基因因为 *hly*⁺、*plcA*⁺、*plcB*⁺ 和 *pfA*⁺, 2 株可疑单核细胞增生李斯特菌的毒力基因分别为 *hly*⁻、*plcA*⁺、*plcB*⁻、*pfA*⁻ 和 *hly*⁻、*plcA*⁻、*plcB*⁻、*pfA*⁻。7 株单核细胞增生李斯特菌的 PFGE 分为 5 个型。结论 实验结果表明福建省食品中分离到的单核细胞增生李斯特菌均含有 *hly*、*plcA*、*plcB* 和 *pfA* 基因,属于致病株。对 2 株可疑单核细胞增生李斯特菌进行了进一步的鉴定,排除了单核细胞增生李斯特菌,该毒力基因检测方法可用于可疑单核细胞增生李斯特菌的进一步鉴别。7 株菌中有两对 2 株 PFGE 型别一致,一致的菌株来自不同年份不同销售地点的同一品牌,应用 PFGE 方法可以进一步调查该厂冻鸡肉中单核细胞增生李斯特菌的传播途径和污染源。

关键词: 李斯特菌;单核细胞增生;毒力;基因;电泳;凝胶;脉冲场

Virulence-Associated Genes and Molecular Sub-Typing of *Listeria monocytogenes* in Foods

CHEN Wei-wei, HONG Jin-chun, ZHANG Qiao-ji, YANG Yu-huan, MA Qun-fei

(Fujian Provincial Center for Disease Prevention and Control, Fujian Fuzhou 350001, China)

Abstract: **Objective** To understand the virulence-associated genes and the molecular sub-typing of the *Listeria monocytogenes* isolated from foods in Fujian Province. **Method** 61 strains of *L. monocytogenes* and 2 strains of presumptive *L. monocytogenes* isolated from raw meats were subjected to PCR assay for four virulence-associated genes, *hly*, *plcA*, *plcB* and *pfA*. 7 of the 61 strains of *L. monocytogenes* were genotyped by PulseNet pulsed-field gel electrophoresis (PFGE). **Results** The PCR assay revealed that the 61 strains of *L. monocytogenes* possessed all the four virulence-associated genes, *hly*, *plcA*, *plcB* and *plcA* the 2 strains of presumptive *L. monocytogenes* were *hly*⁻, *plcA*⁺, *plcB*⁻, *pfA*⁻ and *hly*⁻, *plcA*⁻, *plcB*⁻, *pfA*⁻ by PCR. PFGE divided 7 strains of *L. monocytogenes* into 5 different genotypes. **Conclusion** The 61 strains of *L. monocytogenes* possessed all the four virulence-associated genes, indicating their pathogenicity. The 2 strains of presumptive *L. monocytogenes* were confirmed as *L. innocua* by further study. The virulence genes-targeted PCR holds a good promise as a rapid and reliable method for further identification of *L. monocytogenes*. 2 pairs of the 7 strains of *L. monocytogenes* genotyped by PFGE have been identified having same pulsotype and have been found previously in chicken products from the same factory. Despite different in time and place, this finding indicates that the PFGE method can be used for further investigation of the source and route of transmission of *L. monocytogenes* in the frozen chicken produced by that factory.

Key word: *Listeria monocytogenes*; Virulence; Genes; Electrophoresis, Gel, Pulsed-Field

单核细胞增生李斯特菌 (*Listeria monocytogenes*, 简称单增李斯特菌) 是一种重要的人畜共患病致病菌,老人、儿童、孕妇和免疫力低下者容易感染,可引起胃肠炎、败血症、脑膜炎、孕妇流产等症状,如有神经症状特别是累及脑干者预后较差,病死率可达 20%~30%。辽宁和福建等省多次报道李斯特菌在畜禽中引起疾病爆发事件^[1],1997 年云南省曾报道

李斯特菌引起两村庄 8.6% 的人群发病和大牲畜几乎全部死亡的爆发流行^[2]。国内孕产妇感染单增李斯特菌导致新生儿败血症合并化脓性脑膜炎而死亡的病例时有报道^[3,4]。单增李斯特菌是一种重要的食源性致病菌,在福建省食品特别是冻鸡肉中单增李斯特菌的污染率高达 38.46%^[5],而这些分离菌株的致病性以及菌株间的相关性如何尚不知晓。鉴于毒力基因和基因分子分型在食源性疾病爆发的临床诊断和流行病学监测中的重要作用,本实验采用 PCR 和 PFGE 方法对福建省 2000-2005 年分离的 61 株单增李斯特菌、2 株可疑单增李斯特菌进行 4 种

基金项目:国家科技部基金资助项目(2002 Y018);

福建省疾病预防控制中心课题资助项目(2002)。

作者简介:陈伟伟 女 副主任技师

毒力基因检测和 7 株单增李斯特菌的 PFGE 分子分型。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 菌株 单增李斯特菌标准菌株 (CMCC 54004) 来自中国药品生物制品检定所;PFGE 参考菌株沙门菌 H9812 由中国疾病预防控制中心传染病所提供。61 株单增李斯特菌由福建省龙岩、泉州、福州和三明的生肉类食品中分离,均经 GB/T 4789.30—2003 标准方法检测确认。2 株可疑单增李斯特菌菌株由于溶血现象不明显有待确认。

1.1.2 试剂 Tap DNA 聚合酶(华美生物工程公司), dNTP(Promega 公司), 琼脂糖 (TakaRa 公司), Tris base、EDTA、boric Acid (BBI 公司), N-Lauroyl-Sarcosine Sodium salt (Sarcosyl) (Sigma 公司), 蛋白酶 K(美国 Merck 公司), Xba (TakaRa 公司), AscI 酶 (NEB 公司), SeaKem Gold Agarose (北京基因公司)。API Listeria 生化鉴定试剂条 (法国生物梅里埃公司), 李斯特菌显色培养基 (法国科玛嘉公司), 血平板 (广州环凯公司)。

1.1.3 仪器和设备 PTC - 200 核酸扩增仪(美国 MJ 公司), 5415D 微量台式离心机(德国 Eppendorf 公司), BIO - RAD300 电泳仪、CHEF Mapper XA 及凝胶成像系统(美国伯乐公司)。微量移液器(法国吉尔森公司), EL5243 纯水仪(美国 PALL 公司), 比浊计(法国生物梅里埃公司), 英国 Grant 水浴摇床。

1.2 PCR 方法

1.2.1 引物合成 针对单增李斯特菌的 *hly*、*plcA*、*plcB* 基因^[6] 和 *pfA* 基因^[7] 选取 4 对特异性引物, 委托上海生物工程技术有限公司合成, 其序列见表 1。

表 1 单增李斯特菌相关毒力基因的引物

基因	引物	引物序列(5'-3')	退火温度(°C)	片段大小(bp)
<i>Hly</i>	<i>hly</i> F	GTTAATGAACCTACAAGHCC TICC	56	702
	<i>Hly</i> R	AACCGTTCCTCCACCATCCCA		
<i>plcA</i>	<i>plcA</i> F	AAGTTGAGTACGAA YTGCTCT ACTTTGTTG	58	600
	<i>plcA</i> R	AACACAAACGATGICATTGIAC CAACAAC TAG		
<i>plcB</i>	<i>plcB</i> F	GATAACCCGACAAA TACTGA CGTAAATAC	57	503
	<i>plcB</i> R	TCATCTGACAAAATCTTTTT TGCTACCATGTC		
<i>pfA</i>	<i>PfA</i> F	CCCAAGTAGCAGGACATGC	52	571
	<i>PfA</i> R	ATCACAAAGCTCACGAG		

1.2.2 模板 DNA 制备 将待检菌株划线接种 BHI

平板, 37 °C 培养 24 h, 挑取菌落溶解于 1 ml 无菌纯水的离心管中制成浓菌悬液, 100 °C 煮沸 10 min, 12 000 离心 5 min, 取上清保存于 - 20 °C 备用以待检测。

1.2.3 PCR 反应体系和参数 反应体系: 模板 DNA 1 μl, 5 μmol/L 上下游引物各 2 μl, 2 mmol/L dNTP 1 μl, 5 U/μl Taq 酶 0.4 μl, 25 mmol/L MgCl₂ 1.2 μl, 10 × buffer 2.0 μl, 纯水 10.4 μl, 总体积 20 μl。

PCR 反应参数 预变性 94 °C, 10 min; 变性 94 °C, 1 min; 退火时间 20 s (退火温度按表 1); 延长 72 °C, 20 s; 30 个循环; 再延长 72 °C, 8 min。

1.2.4 PCR 扩增产物的电泳 将 PCR 扩增产物及 2000 bp Marker, 分别上样 5 μl, 电泳。胶块在溴化乙锭中浸泡 20 min, 观察电泳结果, 并对其进行分析。

1.3 PFGE 方法

1.3.1 胶块的制备 制 CSB 菌悬液(A 值 4.0), 400 μl 于相应的 1.5 ml eppendorf 管中, 37 °C 水浴中孵育 5 min, 每管加入 20 μl 蛋白酶 K(20 mg/ml) 混匀, 加入 400 μl 的 1% Seakem Gold: 1% SDS, 加入模具凝固。

1.3.2 细胞的裂解及洗胶块 每管加入 5 ml 蛋白酶 K/CLB 混合液, 在 54 °C 水浴摇床中孵育 2 h, 转速 130 r/min。用 15 ml 预热的纯水和 TE Buffer 各重复洗 3 次, 其中每次放回 50 °C 水浴摇床中摇 10 min, 最后加入 10 ml TE, 4 °C 冰箱存放。

1.3.3 胶块内 DNA 的酶切 每管加入 200 μl 缓冲液 H 的稀释液, 放在 37 °C 水浴 10 ~ 15 min, 吸出缓冲液 H, 加入 200 μl 酶切混合液(参考菌沙门菌 H9812 和单增李斯特菌分别采用 Xba 和 Asc 酶切), 在 37 °C 水浴 2 h 后加样倒胶并电泳(4.0 ~ 40.0 s, 18 h, 初时电流为 120 ~ 145 mA)^[13]。胶块的染色和图谱获取后分析。

2 结 果

2.1 61 株单增李斯特菌毒力基因 PCR 检测结果为 *hly*⁺、*plcA*⁺、*plcB*⁺ 和 *pfA*⁺, 2 株可疑单增李斯特菌的毒力基因分别为 *hly*⁻、*plcA*⁺、*plcB*⁻、*pfA*⁻ 和 *hly*⁻、*plcA*⁻、*plcB*⁻、*pfA*⁻。所用 3 对引物检测单增李斯特菌标准菌株 (CMCC 54004) 和被检菌株相关基因 PCR 扩增产物的琼脂糖凝胶电泳结果如图 1 所示。

2.2 对 2 株可疑单增李斯特菌菌株和 30 株单增李斯特菌同时进行了进一步的鉴定, 采用 API Listeria 试剂条和溶血实验, 并接种李斯特菌显色平板。2 株可疑菌株在李斯特菌显色平板上呈蓝色菌落, 无晕轮, 划线接种的血平板上溶血现象不明显但刮开



M:DL2000 marker ,1,3,5:标准菌株 (*hly*、*plcA*、*plcB*) ,
2,4,6:实验菌株 (*hly*、*plcA*、*plcB*)

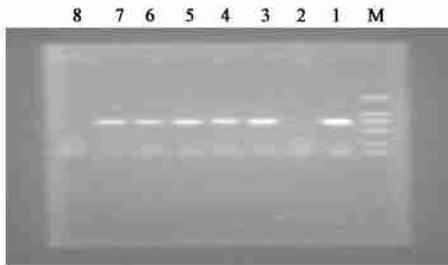
图1 标准菌株(CMCC 54004)和菌株 F32 单增李斯特菌 *hly*、*plcA* 和 *plcB* 基因的 PCR 扩增结果



M:DL2000 marker ,1:阴性对照 ,

2:单增李斯特菌(54004) ,3~8 为被检菌株。

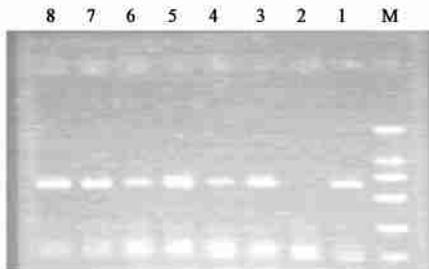
图5 部分单增李斯特菌 *pfA* 的 PCR 扩增结果



M:DL2000 Marker ,1:单增

李斯特菌(54004) ,2:阴性对照 ,3~8 为被检菌株。

图2 部分单增李斯特菌 *hly* 的 PCR 扩增结果



M:DL2000 Marker ,1:单增

李斯特菌(54004) ,2:阴性对照 ,3~8 为被检菌株。

图3 部分单增李斯特菌 *plcA* 的 PCR 扩增结果



M:DL2000 Marker ,1:单增

李斯特菌(54004) ,2:阴性对照 ,3~8 为被检菌株。

图4 部分单增李斯特菌 *plcB* 的 PCR 扩增结果

菌落仍可见溶血,刺种法的溶血现象与 30 株单增李斯特菌一样均为窄小的透明溶血环。API *Listeria* 生化鉴定中的 DIM 观察结果为橙色,生化结果的数码编号为 7510,而 30 株单增李斯特菌的 DIM 观察结果为无色或浅橙色。根据菌落特征、API *Listeria* 生化结果、溶血现象和携带毒力基因的情况综合判

定这 2 株可疑单增李斯特菌均为英诺克李斯特菌。
2.3 从 61 株单增李斯特菌中选择 4 个年份、3 个地点的 7 株单增李斯特菌进行 PFGE,电泳结果分为 5 个分子型别(图谱见图 6),单增李斯特菌的来源见表 2,其中 2 号和 4 号冻鸡肉的型别一致,虽然采样地点不同,但均为同一品牌同一生产厂的产品,3 号冻鸡肉和 5 号生羊肉的图谱一致,均为同一采样地点的样品。

表 2 7 株单核细胞增生李斯特菌的来源

菌株号	样品来源	分离时间(年)	分离地点
1	生猪肉	2000	龙岩
2	冻鸡肉	2002	龙岩
3	冻鸡肉	2002	龙岩
4	冻鸡肉	2003	尤溪
5	生羊肉	2005	龙岩
6	生猪肉	2005	泉州
7	生猪肉	2005	泉州

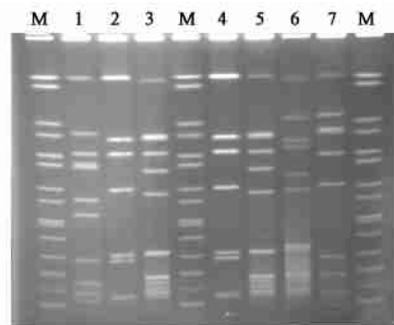


图6 7 株单增李斯特菌的 PFGE 图谱(M 为沙门菌 H9812)

3 讨论

美国每年大约有 2 500 人因感染单增李斯特菌继发严重的疾病,大约有 500 人死亡。近年来通过彻底改善工厂卫生设施,确保肉制品加工的安全及外部包装的消毒处理,以及高危人群的健康教育,1996 年到 2001 年发病率下降了 35%,2001 年李斯特菌病被纳入国家法定上报的疾病。我国食品污染物监测网从 2000 年起开展对食品中单增李斯特菌的监测,随着对该菌的重视和检测技术的提高,食品中单增李斯特菌的检出率明显提高。

国外对单增李斯特菌研究较多的毒力基因有溶血素 (Listeriolysin O, LLO)、磷脂酶 (Phospholipases)、内化素 (Internalins)、肌动蛋白 (ActA)、毒力因子调节蛋白 (PifA) 和 P60 蛋白 (iap) 等。LLO 是单增李斯特菌的重要毒力因子, 由 *hly* 基因编码。1944 年, Harvey 等首次报道了单增李斯特菌可产生溶血素, 随后人们对其进行了纯化、鉴定、生化特征、克隆表达、细胞毒性等诸多方面研究。研究表明^[8], LLO 与单增李斯特菌的致病性密切相关, 有致病性的单增李斯特菌有 LLO, 无致病性的单增李斯特菌没有 LLO。单增李斯特菌正常菌株感染细胞后, 能裂解吞噬泡膜, 将细菌释放到宿主细胞胞浆中, 而缺乏 LLO 的突变体感染上皮细胞后保留在吞噬泡内。近年的研究表明 LLO 是一个多功能的毒力因子, 能引起宿主细胞很多反应, 如细胞增殖、黏膜细胞外渗作用、巨噬细胞中细胞因子的表达、树突状细胞的凋亡、磷脂代谢及引起机体产生免疫反应等。单增李斯特菌能产生两种磷脂酶 C: PI-PLC 和 PC-PLC。*plcA* 基因编码一个特异的作用于磷脂酰肌 (phosphatidylinositol) 的磷脂酶 C (PI-PLC)。*plcB* 基因编码一个宽范围的磷脂酶 C (PC-PLC)。目前的研究认为 PI-PLC 毒性相对较小, 对细菌在细胞间扩散作用不大, 主要是协同 PC-PLC 发挥作用。而 PC-PLC 的功能则较复杂, 它使细菌从吞噬泡中逃逸出来, 能破坏宿主细胞的信号通路, 能调节细胞因子和化学因子的合成, 还能通过二酰基甘油、神经酰胺、肌醇磷酸盐等调节细胞的生长、分化、凋亡等。*pfA* 编码 PifA 蛋白, 是单增李斯特菌毒力基因簇上各种毒力基因的调节蛋白, 直接检测 *pfA* 可以减少其他毒力基因突变或缺失所造成假阴性结果的概率^[7-12]。从实验结果可以看出, 福建省分离的 61 株单增李斯特菌均带有 *hly*、*plcA*、*plcB* 和 *pfA* 毒力相关基因, 属于致病株。2 株可疑单增李斯特菌的菌株 *hly*、*plcB* 和 *pfA* 的毒力基因均为阴性, 1 株菌有 *plcA* 毒力基因, 如上述该基因编码的蛋白毒性相对较小, 作用比较弱, 不是主要的致病因子。

在单增李斯特菌的分离检验工作中, 经常需要与英诺克李斯特菌进行鉴别。由于单增李斯特菌的生化特性与英诺克李斯特菌基本相同, 鉴别方法一般采用溶血实验、协同溶血实验和小鼠毒力实验。但由于协同溶血实验和小鼠毒力实验的实验步骤复杂和材料需求限制, 很多实验室没有开展。而在中国出入境检验检疫行业标准 SN 0184.1—2005《进出口食品中单核细胞增生李斯特菌检验方法》中, 常规检验可不进行协同溶血实验, 并且取消了小鼠毒力实验。2 株可疑单增李斯特菌虽然划线接种的溶血

较弱, 但刺种溶血实验均为阳性, 与单增李斯特菌溶血现象无明显差异。因此, 在鉴定单增李斯特菌时应特别注意, 对有异议的菌株可以采用如 API *Listeria* 生化试剂条、协同溶血实验和小鼠毒力实验等多种方法进行鉴定, 本次实验也说明单增李斯特菌的毒力基因检测可以是传统鉴定方法的一个补充。

PFGE 是目前比较理想的对食品携带的病原体进行分子“指纹鉴定”分型方法, 被认为是分子分型的金标准。该方法具有重复性好, 实验室内和室间可比性强, 分型能力强等特点, 已成功应用于大肠杆菌 O157 H7、志贺菌、沙门菌等多种致病菌的分型。标准化亚分型方法的应用, 能够确定大肠杆菌 O157、单核细胞增生李斯特菌、沙门菌和志贺菌以及食品可能携带的其他细菌的“指纹”菌株。这些实验室可以通过互联网数据库比较“指纹”菌株。若同一个“指纹”在若干地点出现有助于更迅速地确定和调查疫情。本实验尝试采用 PulseNet 网推荐^[13]的单增李斯特菌 PFGE 方法对福建省的分离株进行分型, 不同年份、不同地点分离的 7 株单增李斯特菌分为 5 个型别, 由于分型菌株数较少, 尚有待进一步实验总结分析。但 2002 年从龙岩冻鸡肉分离的菌株和 2003 年从尤溪冻鸡肉分离的菌株型别一致, 均为省内同一品牌同一厂家生产的冻鸡肉。该现象提示我们可以采用 PFGE 方法调查该厂冻鸡肉中单增李斯特菌的传播途径和污染来源。

参考文献

- [1] 郭亚霖, 曾凡伟. 上杭县人畜李斯特氏菌病发病与带菌调查研究[J]. 海峡预防医学杂志, 1999, 5(3): 9.
- [2] 肖义泽, 任丽娟, 王金玉, 等. 云南省首次动物源性李斯特氏菌病暴发的流行病学调查[J]. 中华流行病学杂志, 2000, 21(3): 236.
- [3] 李铁耕, 秦雨春. 新生儿单核细胞李斯特氏菌败血症 2 例[J]. 中国实用儿科杂志, 2006, 21(1): 75.
- [4] 邵泽运, 薛长江, 付文霞, 等. 新生儿李斯特氏菌败血症 3 例[J]. 现代中西医结合杂志, 1999, 8(12): 2038.
- [5] 陈伟伟, 洪锦春, 杨毓环, 等. 福建省 2000-2003 年食品中单核细胞增生李斯特氏菌的监测和分析[J]. 中国食品卫生杂志 2005, 17(2): 112.
- [6] DMITRIY VOLOKHOV. Identification of *Listeria* Species by Microarray-Based Assay[J]. Journal of Clinical Microbiology, 2002, 40(12): 4720-4728.
- [7] KARVEN J, COORAY, TAKEAKI NISHIBORI, et al. Detection of multiple virulence associated genes of *Listeria monocytogenes* by PCR in artificially contaminated milk samples[J]. Applied and environmental microbiology, 1994, 8: 3023-3026.
- [8] AMY L, DECATUR, DANIEL A, et al. A PESTLike Sequence in listeriolysin O essential for *Listeria monocytogenes* pathogenicity[J]. Science, 2000, 290: 992-995.

论著

六种血清型沙门菌 PFGE 指纹图谱研究

王颖 顾其芳 刘诚 周培君 张美英
(上海市疾病预防控制中心,上海 200336)

摘要:目的 用 PFGE 方法绘制不同血清型的沙门菌指纹图谱,并且进行同源性分析。方法 首先将从食品中检测出 6 中不同血清型的沙门菌菌株制成琼脂模块,再提取菌株的 DNA,用限制性内切酶 Xba 对细菌 DNA 进行酶切,用 Bio-rad CHEP MAPPER 绘制出菌株的 PFGE 指纹图谱,最后用 Quantity One™ 图像分析软件进行同源性分析。结果 所有的菌株的同源性均用相似性系数(矩阵)和百分数表示。结论 用 PFGE 绘制菌株的指纹图再用 Quantity One™ 图像分析软件进行分析,是确定食源性致病菌沙门菌同源性的一种有效的方法。

关键词:沙门氏菌属;电泳,凝胶,脉冲场;基因,同源盒;细菌学技术

Study on fingerprint of Six strains of Salmonella Using PFGE

WANG Ying, GU Qi-fang, LIU Cheng, ZHOU Pei-jun, ZHANG Mei-ying

(Shanghai Municipal Center for Disease Prevention and Control, Shanghai 200336, china)

Abstract: Objective To draw the fingerprint of Salmonella of different serotypes by PFGE, for researching their source. **Method** Six different serotypes of Salmonella were made into plugs first. Then pure DNA was obtained with proteinase K and cut DNA using restriction enzyme Xba. Fingerprint was produced using Chef Mapper (Bio-Rad). Finally, the source of these strains were analyzed using the software-Quantity One™. **Results** The source of all strains were expressed in similarity coefficient and percentage. **Conclusion** PFGE is a very useful method to analyze the source of bacteria causing foodborne diseases.

Key word: Salmonella; Electrophoresis, Gel, Pulsed-Field; Genes, Homeobox; Bacteriological Techniques

由沙门菌所致的食物中毒,在国内外都是严重的问题。引起食物中毒的沙门菌型很多,如鼠伤寒沙门菌、肠炎沙门菌等^[1],我们实验室从食品中检测到多种血清型的沙门菌,现对其中 6 种进行 PFGE 指纹图谱的绘制和分析。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株的血清型 鼠伤寒沙门菌 O_{1,4,5}:H_{1,2} (A)、科特布斯沙门菌 O₈:H_{c,h;5} (B)、肠炎沙门菌

O_{1,9}:H_{g,m} (C)、汤卜逊沙门菌 O₇:H_{k,5} (E)、阿贡纳沙门菌 O_{1,4}:H_{f,g,5} (F)、伦敦沙门菌 O₁₀:H_{1,v;6} (H)。括号中为菌株代号。

菌株的分离来源与年代见表 1。

1.1.2 试剂 营养琼脂(上海市疾病预防控制中心培养基室),CSB (EDTA, Tris - HCL)、CLB (EDTA, Tris - HCL, 十二烷基肌氨酸钠) Sigma 公司, TE Buffer (10 ml 1 mol Tris - HCl pH 7.6, 2 ml 0.5 mol EDTA pH 7.6 加蒸馏水至 1 000 ml)、十二烷基肌氨酸钠 (Sigma 公司),蛋白酶 K(默克公司),限制性内切酶

[9] RUDNICKA W. The host response to *Listeria monocytogenes* mutants defensive in genes encoding phospholipasesC (plcA, plcB) and actin assembly(act) [J]. Microbiol, Immunol, 1997; 41 (11): 847-853.

[10] ZENEWICZ L A, SKINNER J A, COLDFINE H, et al. *Listeria monocytogenes* virulence proteins induce surface expression of Fas ligand on T lymphocytes[J]. Mbl Microbiol, 2004, 51(5): 1483-1492.

[11] JAVIER A, CARRERO, BORIS C, et al. Listeriolysin O from *Listeria monocytogenes* is a lymphocyte apoptogenic molecule[J]. The Journal

of immunology, 2004, 172: 4866-4874.

[12] SHAYNOOR D, PASCALE C. Listeriolysin O: a genuine cytolysin optimized for an intracellular parasite[J]. The Journal of Cell Biology, 2002, 156(6): 943-946.

[13] PULSENET USA CDC. Section 5. 3 Standardized protocol for molecular subtyping of *Listeria monocytogenes* by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) [Z]. 2004. 4.

[收稿日期: 2006-10-20]

中图分类号: R15; Q939.122; R378.994 文献标识码: A 文章编号: 1004-8456(2007)01-0021-05

作者简介: 王颖 女 副主任技师