

绵羊李斯特菌载体结核疫苗株 *inlB1* 基因 缺失减毒株的构建及评价*

黄嘉玲, 刘思静, 苏琳, 汪川[△]

四川大学华西公共卫生学院 卫生检验与检疫系(成都 610041)

【摘要】 目的 对以绵羊李斯特菌(*Listeria ivanovii*, LI)为载体的结核疫苗候选株 LI-Ag85C 进行基因减毒,初步评价其体内外生物学特性。**方法** 构建含有 *inlB1* 基因上、下游同源序列的打靶质粒,电转原始菌 LI-Ag85C 感受态细胞,同源重组敲除 *inlB1* 基因;测定减毒株 LI Δ *inlB1*-Ag85C 和原始株 LI-Ag85C 的体外生长曲线;测定两株菌对于肝癌细胞系 HepG2 细胞的黏附、侵袭能力的影响,比较两株菌溶血能力的差异,两株菌对于小鼠的半数致死量(median lethal dose, LD₅₀)差异。**结果** 敲除 *inlB1* 基因的重组结核疫苗候选株 LI Δ *inlB1*-Ag85C 的基因序列符合预期结果。减毒株与原始株的体外生长情况基本一致;对于 HepG2 细胞的黏附率分别为 6.66% 和 7.46%,侵袭率分别为 0.031% 和 0.042%,减毒株的黏附、侵袭能力均低于原始株,但差异无统计学意义;减毒株的溶血活性较原始株无明显变化;对小鼠的 LD₅₀ 值分别为 3.2×10^8 CFU/只和 6.7×10^7 CFU/只,减毒株 LD₅₀ 相较于原始株明显提高。**结论** 成功构建 *inlB1* 基因缺失的新型结核疫苗候选株 LI Δ *inlB1*-Ag85C,其毒力较原始株降低。

【关键词】 绵羊李斯特菌 结核疫苗 *inlB1* 基因敲除 减毒

Construction and Evaluation of a Novel TB Vaccine Candidate Based on *inlB1* Gene Attenuated *Listeria ivanovii*

HUANG Jia-ling, LIU Si-jing, SU Lin, WANG Chuan[△]. Department of Public Health Laboratory Sciences, West China School of Public Health, Sichuan University, Chengdu 610041, China

[△] Corresponding author, E-mail: wangchuan@scu.edu.cn

【Abstract】 Objective To construct a novel tuberculosis vaccine candidate LI Δ *inlB1*-Ag85C by knocking out the *inlB1* gene of *Listeria ivanovii* (LI) recombinant strain LI-Ag85C, and study the biological characteristics of the attenuated strain *in vitro* and *in vivo*. **Methods** Targeting plasmid carrying *inlB1* upstream and downstream sequences was constructed and electroporated into LI-Ag85C competent cells. Afterward *inlB1* gene was knocked out by homologous recombination. Recombinant attenuated strain LI Δ *inlB1*-Ag85C and parental strain LI-Ag85C were tested in growth characteristics, hemolyticability, the adhesion and invasion tendency to HepG2 *in vitro* and the median lethal dose (LD₅₀) for C57BL/6 mice *in vivo*. **Results** Genome sequence of the attenuated tuberculosis vaccine candidate LI Δ *inlB1*-Ag85C was as expected. The attenuated strain and the parental strain showed the similar growth curve *in vitro*. The adhesion rates of the two strains were 6.66% and 7.46%, respectively, and the invasion rate of them were 0.031% and 0.042% respectively. LI Δ *inlB1*-Ag85C seemed having a lower adhesion and invasion rates to HepG2 cells, however the difference had no significance. The hemolytic ability of recombinant strain was the same as to the parental strain. The LD₅₀ of LI Δ *inlB1*-Ag85C and LI-Ag85C for C57BL/6 mice were 3.2×10^8 CFU/per mouse and 6.7×10^7 CFU/per mouse, respectively. LI Δ *inlB1*-Ag85C showed a significantly decrease in animal virulence. **Conclusion** A novel tuberculosis vaccine candidate LI Δ *inlB1*-Ag85C based on attenuated *Listeria ivanovii* was successfully constructed with a significant decrease in toxicity.

【Key words】 *Listeria ivanovii* (LI) Tuberculosis vaccine *inlB1* gene knock-out Attenuation

近 10 年来,肺结核感染率和死亡率在我国法定传染病中一直稳居第二^[1],但卡介苗(BCG)对青少年及成人肺结核保护效率有限^[2]。李斯特菌属是目前活菌疫苗的研究热点之一^[3],在本实验室的前期

研究中,已构建了一株以绵羊李斯特菌(LI)为载体、带有结核基因 *Rv0129c* 并表达结核分枝杆菌(*Mycobacterium tuberculosis*, MTB)保护性抗原 Ag85C 蛋白的疫苗候选株 LI-Ag85C^[4]。动物实验发现,LI 菌株在肝脏中大量增殖并引起严重的肝损伤,而在脾脏中增殖较少^[5],即机体有效的免疫剂量降低,导致其免疫原性受限。为提高其免疫原性,我们将研究重点转向内化素(internalins, inls),是李

* 国家自然科学基金面上项目(No. 31570924)和四川省科技厅国际合作项目(No. 2017HH0080)资助

[△] 通信作者, E-mail: wangchuan@scu.edu.cn

斯特菌毒力相关基因编码的一个蛋白质家族^[6],其中内化素蛋白 B1,是一种类肝细胞生长因子受体,与肝细胞靶向结合,介导细菌侵袭肝细胞^[7]。本研究拟敲除 *inlB1* 基因,对候选疫苗菌株进行减毒改造,通过分子、细胞层面和初步的动物水平评价重组菌的生物学特性,为进一步探究该新型结核疫苗的免疫保护效果奠定基础,同时也为进一步研究 *inlB1* 基因在介导 LI 内化肝细胞通路中的作用提供数据。

1 材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 菌株、质粒和细胞 菌株与质粒菌株 LI-Ag85C,由本实验室构建保存;TOP10 感受态细胞和 pUC-T 载体购自北京康为世纪生物科技有限公司;pCW182 骨架质粒为本实验室构建并经测序验证,大小为 12 118 bp,带有红霉素抗性基因 *Ery*、*Not* I 双酶切位点、*Xba* I 和 *Spe* I 酶切位点,以及李斯特菌属同源序列 *mpl*、*BAl*dh 基因。HepG2 人肝癌细胞系由本实验室保存。

1.1.2 引物序列 引物 LI-*inlB1*-up-f/r (f: 5'-CCCAAAAATCTAGACACTCGCACATTTATCCAAGCTAAAAA-3'; r: 5'-AAAGCGGCCGCTATTTTACACTCCTCTTATTATAAATTGGAAAC-3')用于扩增 *inlB1* 基因上游序列,目的条带长度 829 bp; LI-*inlB1*-down-f/r (f: 5'-AAAGCGGCCGCTCGGAAAGCAACTATTGGAGG-3'; r: 5'-CCCCAAAAAACTAGTTTGATTCCCGGACAAATACAGCA-3')用于扩增 *inlB1* 基因下游序列,目的条带长度 837 bp; LI-*inlB1*-f/r (f: 5'-CAGTGTGATGGATATCTGCAG-3'; r: 5'-CGACTTATCATTTTCCTAATCTATTTC-3')用于验证是否成功敲除 *inlB1* 基因,目的条带长度 178 bp; *Ery*-f/r (f: 5'-GTCGACGATTACAAAAAATAGGC-3'; r: 5'-ACTAGTCCCGGGGCGAATTG-3')用于扩增红霉素基因,目的条带长度 1 200 bp; *ldh*-f/r (f: 5'-GCATGCTTTTAAGATGAAGTCTCAC-3'; r: 5'-CAAAAAATCATTTTAGTTGGTCGACGG-3')用于扩增 LI 特异性基因 *BAl*dh,目的条带长度 1 024 bp。上述引物均由上海生工生物工程有限公司合成。

1.1.3 实验动物 C57BL/6 小鼠,雌性,18~20 g,购自北京华阜康生物科技股份有限公司,在四川大学华西公共卫生学院 SPF 级动物实验中心饲养,动

物实验经四川大学医学伦理委员会审批通过。

1.1.4 主要试剂和仪器 脑心浸液(BHI)琼脂及培养基、LB 肉汤均购自北京陆桥技术股份有限公司;高糖培养基 DMEM 和胰酶购自 Hyclone 公司;FBS 购自 Gibco (澳洲)公司;质粒提取试剂盒 Plasmid Minikit I (200)和胶回收试剂盒 E. Z. N. A™ Gel Extration Kit(200)购自 OMEGA 公司;去磷酸化试剂盒和 T4 DNA Ligase 购自 TaKaRa Biotechnology; MyCycle PCR 仪 (BIO-RAD S1000Thermal Cycler);ChemiDoc XRS 凝胶成像仪(BIO-RAD);电泳仪(BIO-RAD PowerPac Basic)以及低温高速离心机 (Thermo Fisher Scientific Sorvall ST16K)。

1.2 方法

1.2.1 打靶质粒的构建 采用引物 LI-*inlB1*-up-f/r、LI-*inlB1*-down-f/r,以 LI 基因组为模板 PCR 扩增 *inlB1* 基因上游同源序列“up”片段(两端分别带 *Xba* I 和 *Not* I 酶切位点)和 *inlB1* 基因下游同源序列“down”片段(两端分别带 *Not* I 和 *Spe* I 酶切位点),构建 pUC-*inlB1*-up TA、pUC-*inlB1*-down TA 克隆质粒。提取 pCW182 骨架质粒和 pUC-*inlB1*-up TA 克隆质粒构建中间质粒 pCW182-*inlB1*-up;提取 pUC-*inlB1*-down TA 克隆质粒和中间质粒 pCW182-*inlB1*-up,构建打靶质粒 pCW182-*inlB1*-up-down。LI-*inlB1*-f/r 引物筛选(延伸 15 s)确证打靶质粒。

1.2.2 重组菌的构建与筛选 提取打靶质粒电转化 LI-Ag85C 感受态细胞(电转条件:电压 1 500 V,持续时间 5 ms)。以引物 LI-*inlB1*-f/r 筛选(退火温度:55 ℃,延伸 15 s)PCR 验证正确的阳性转化菌,并于 42 ℃、30 ℃连续传代,依次用 LI-*ldh*-f/r、*Ery*-f/r 以及 LI-*inlB1*-f/r 引物(延伸时间:3 min)进行 PCR 和测序验证。

1.2.3 体外生长曲线测定 细菌于 37 ℃、200 r/min 培养,BHI 肉汤空白调零,每间隔 1 h 测定 1 次 600 nm 处的吸光度(A)值,直至第 8 h,测定 A₆₀₀ 的同时取部分菌液进行活菌计数,得到重组菌培养时间与 A 值、细菌总数关系的公式,绘制生长曲线图,并与原始菌进行比较评价重组菌体外生长情况。

1.2.4 溶血实验 重组菌和原始菌分别在兔全血 BHI 琼脂平板上划线,37 ℃培养观察其溶血环大小和透明度。

1.2.5 细胞黏附和侵袭实验 黏附实验:HepG2 细

胞复苏(DMEM,10%FBS),37℃、5%CO₂培养;2次传代,接种于6孔板中继续培养12~16 h,当细胞铺板率达80%~90%时开始实验。Hank's液冲洗3次,每孔加入2 mL含10⁷菌量(重组菌或原始菌)的DMEM,即感染复数(multiplicity of infection,MOI)设置为10:1,37℃、5%CO₂孵育1 h,弃去上清,Hank's液清洗5次,每孔加入1% Triton X-100,作用10 min,收集裂解液,并用500 μL 1% Triton X-100清洗各孔,收集清洗液。用TritonX-100裂解液系列稀释收集的清洗液和加入的细菌原液,各稀释度取20 μL,平行双样滴于BHI平板,37℃培养48 h,计数。细菌黏附率计算公式:(胞内细菌数+胞外细菌数)÷加入菌数×100%。

侵袭实验:用上述同样方法传代细胞、接种细菌(重组菌或原始菌),感染作用1 h后,Hank's洗涤5次,每孔加入1 mL含100 μg/mL庆大霉素的DMEM培养液,作用1 h,弃去上清,Hank's洗涤5次,取最后1次清洗液滴板计数验证胞外细菌杀死情况;同黏附实验操作,收集细胞裂解液,对胞内细菌进行滴板计数。侵袭率计算公式:胞内细菌数÷加入细菌数×100%。

1.2.6 半数致死量(LD₅₀)测定及免疫小鼠体质量变化情况 C57BL/6小鼠50只随机分为2组,每组25只,分别用LIΔ*inlB1*-Ag85C或LI-Ag85C经尾静脉免疫小鼠;每组又分为5个剂量亚组,每个亚组5只,按分组分别接种5×10¹⁰ CFU/只、5×10⁹ CFU/只、5×10⁸ CFU/只、5×10⁷ CFU/只、5×10⁶ CFU/只的菌液100 μL;连续观察7 d,统计小鼠死亡、存活情况,利用改良寇式法计算重组菌和原始菌的LD₅₀。另取C57BL/6小鼠16只随机分为两组,每组8只,分别于尾静脉接种0.1×LD₅₀剂量的重组菌或原始菌,自接种之日起,每天测量小鼠体质量。

1.2.7 统计学方法 组间比较采用秩和检验,α=0.05。

2 结果

2.1 重组菌 LIΔ*inlB1*-Ag85C 的构建

打靶质粒使用引物 *Ery*-f/r、*ldh*-f/r、LI-*inlB1*-f/r 进行 PCR 进行筛选和验证,结果如图 1 所示,可见 10~13 号孔出现目的条带,长度仅为 178 bp,表明经同源重组后,原始菌 LI-Ag85C 基因组上的 *inlB1* 片段(原本长度为 3 237 bp)已经被替换。同时测序结果符合预期。

2.2 重组菌体外生长情况

重组菌与原始菌在体外培养时,表现出相似的生长趋势和生长速度(图 2)。在培养约 4 h 时,进入对数生长期,在 8 h 达到稳定期。这一结果表明 *inlB1* 基因的敲除并不会干扰重组菌的生长。

2.3 溶血性

重组菌和原始菌在兔全血 BHI 平板上均呈现 β 溶血,说明 *inlB1* 基因缺失对李斯特菌属重要的生理学特性——细菌的溶血特性没有影响。见图 3。

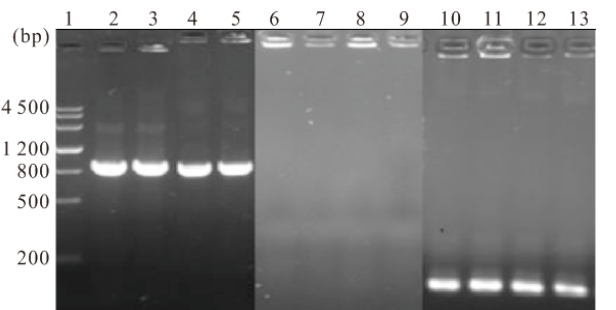


图 1 重组菌 LIΔ*inlB1*-Ag85C PCR 验证结果

Fig 1 Confirmation of recombinant strain LIΔ*inlB1*-Ag85C with PCR
1: Marker III; 2-5: PCR amplification of LI specific gene *BAldh* (1 024 bp); 6-9: PCR amplification of erythromycin gene; 10-13: PCR amplification of *inlB1* gene (178 bp)

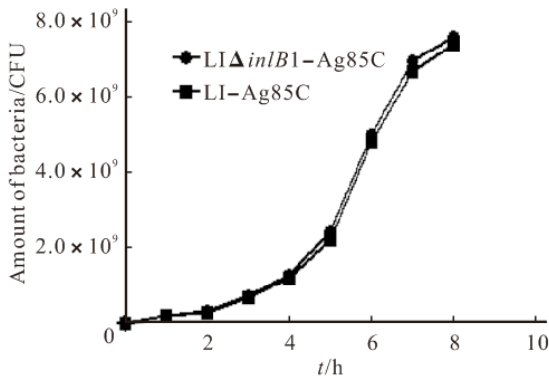


图 2 LIΔ*inlB1*-Ag85C 和 LI-Ag85C 体外生长曲线

Fig 2 Growth curve of LIΔ*inlB1*-Ag85C and LI-Ag85C *in vitro*

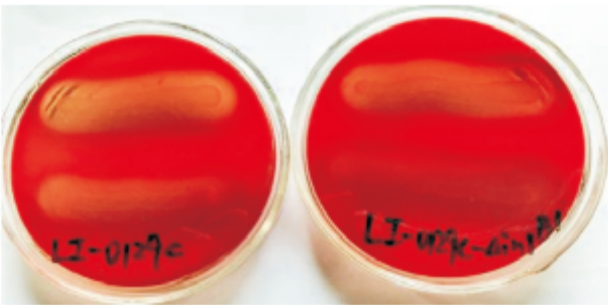


图 3 LI-Ag85C(左)和 LIΔ*inlB1*-Ag85C(右)溶血能力

Fig 3 The hemolytic ability of LI-Ag85C (left) and LIΔ*inlB1*-Ag85C (right)

2.4 细胞黏附率和侵袭率

重组菌和原始菌对于 HepG2 细胞的黏附率分别为 6.66% 和 7.46%，对于 HepG2 细胞的侵袭率分别为 0.031% 和 0.042%。相较于原始菌，重组菌的黏附、侵袭能力表现出一定水平的下降，但差异无统计学意义($P>0.05$)。

2.5 小鼠 LD₅₀ 和体质量的变化

经改良寇式法计算，该重组菌 LD₅₀ 为 3.2×10^8 CFU/只，原始菌 LD₅₀ 为 6.9×10^7 CFU/只；结果表明，重组菌的 LD₅₀ 相较原始菌降低了一个数量级，提示 *inlB1* 基因的缺失能够造成 LI 毒力的下降。由图 4 可见，接种 $0.1\times\text{LD}_{50}$ 的重组菌 LI Δ *inlB1*-Ag85C 的小鼠体质量下降程度较接种原始菌 LI-Ag85C 的小鼠更为明显。接种原始菌 LI-Ag85C 的小鼠体质量在接种后第 1 天开始下降，且体质量下降程度达最大，而后迅速恢复；接种重组菌 LI Δ *inlB1*-Ag85C 的小鼠体质量自接种之日起呈持续下降态势，在第 3、4 天，小鼠体质量最低，下降程度约为原始体质量的 8.3%，随后体质量开始恢复。

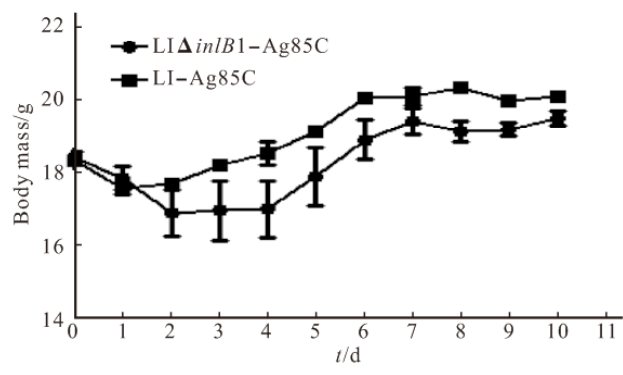


图 4 小鼠接种 LI Δ *inlB1*-Ag85C 和 LI-Ag85C 后体质量的变化情况
Fig 4 Body mass change post immunization with LI Δ *inlB1*-Ag85C and LI-Ag85C

3 讨论

LI 作为新型活菌疫苗载体的可行性已经初步得到验证^[8]，但作为活菌疫苗，载体的生物安全性一直受到广泛关注，如何在提高生物安全性的同时，不降低其免疫原性，即如何平衡载体菌的毒力及其安全性是研究重点所在。本研究通过敲除 *inlB1* 基因对细菌进行减毒，提高安全性，同时可望提高其在免疫器官的载量，更利于抗原递呈，诱导更强的免疫应答。实验结果表明，*inlB1* 基因的敲除降低了重组菌株对小鼠的毒力，使得其 LD₅₀ 降低了一个数量级。为保证安全性和免疫原性，我们进一步选择了 $0.1\times\text{LD}_{50}$ ，即 10^7 CFU/只，作为重组菌 LI Δ *inlB1*-

Ag85C 的免疫剂量，通过比对两组小鼠体质量变化情况，发现接种重组菌 LI Δ *inlB1*-Ag85C 的小鼠体质量下降程度明显高于接种原始菌 LI-Ag85C 的小鼠。探究其可能原因，通过 LD₅₀ 来反映疫苗对于机体的实际损伤效应应当是不全面的，后续研究应当再结合菌株对肝脏、脾脏等的病理组织切片来进行损伤鉴定，从而确定疫苗候选株对于机体的实际损伤情况，以评价疫苗安全性和确定更为适宜的接种剂量。

在细胞层面的评价中，首次使用细胞评价绵羊李斯特菌的黏附、侵袭性，比较重组菌、原始菌对于 HepG2 细胞黏附、侵袭能力的差异。HepG2 是人肝癌细胞，编码表达 Met 蛋白受体（即酪氨酸激酶受体），是肝细胞生长因子的配体。李斯特菌属的 *inlB* 蛋白，是一种类肝细胞生长因子，可介导菌体结合至表达有 Met 蛋白细胞的胞外位点，并通过 Met 蛋白跨膜区向胞内传递活化信号，激活下游 PI3-激酶活化，从而介导菌体侵入细胞，同时宿主细胞开启相应免疫应答途径^[9]。在 LI 中，*inlB* 蛋白家族包括 *inlB1* 和 *inlB2* 蛋白，文献表明，二者均可起到 *inlB* 蛋白的相似功能^[10]；其中，*inlB1* 是 LI 的菌体蛋白，可直接介导菌体对于宿主细胞的黏附和侵袭，*inlB2* 为分泌蛋白，可通过分泌到菌体外发挥作用，刺激机体分泌细胞因子，同时刺激靶细胞引起胞膜皱褶，从而帮助侵袭以及胞间扩散，该作用方式相对较弱^[11]。在本次实验中，重组菌和原始菌对于 HepG2 细胞 1 h 黏附、侵袭能力并无差异，提示单一 *inlB1* 基因敲除的实际作用有限。探究可能原因是：HepG2 细胞同样表达有 E-钙黏蛋白，同属李斯特菌属内化素家族的 *inlA* 蛋白与宿主细胞上的 E-钙粘蛋白发挥作用，从而使得 *inlB1* 基因敲除的作用被弱化。E-钙黏蛋白是一种跨膜糖蛋白，由 5 个胞外结构域、1 个跨膜 α -螺旋和 1 个胞内尾巴构成^[12]，*inlA* 的亮氨酸重复区域（leucine-rich repeats, LRRs）区域与 E-钙黏蛋白相互识别形成复合物，随即发生结构特异性重排，利用跨膜区 α -螺旋结构和胞内区蛋白绑定 ActA，从而完成侵入^[13]。在单核细胞增生性李斯特菌（LM）*inlA*、*inlB* 蛋白的相关研究中，发现敲除 *inlB* 基因对于介导菌体黏附细胞的能力无影响，但侵袭细胞的能力显著性降低^[14]；进一步的研究还表明，LM Δ *inlA*、LM Δ *inlA/inlB* 侵袭 HT29 细胞的能力也弱于 LM Δ *inlB* ($P<0.01$)，且 LM Δ *inlA* 和 LM Δ *inlA/inlB* 侵袭细胞的能力没有明显差异 ($P>0.05$)^[15]；上述实验提示在

LM 内化过程中, *inlA* 在介导菌体侵袭宿主细胞中的作用功能可能强于 *inlB* 蛋白。LM 与 LI 具有高度相似的基因组成和生长特性^[16], 因此有理由推测在 LI 的内化过程中, *inlA* 蛋白同样起到主要作用, 且该作用强于 *inlB* 蛋白, 从而导致单一 *inlB1* 基因敲除的生理学作用被弱化。因此, 在后续的实验中, 为进一步探索李斯特菌属, 尤其是对人体无害的 LI 内化细胞的具体途径, 应对 *inlA* 和 *inlB2* 蛋白进行深入研究。

参 考 文 献

- [1] World Health Organisation. Global tuberculosis report 2016. WHO, 2016 [2017-03-21]. http://www.who.int/tb/publications/global_report/en/.
- [2] BISHAI W, SULLIVAN Z, BLOOM BR, *et al.* Bettering BCG: a tough task for a TB vaccine? *Nat Med*, 2013, 19 (4): 410-411.
- [3] QIAN Y, ZHANG N, JIANG P, *et al.* Inhibitory effect of live-attenuated *Listeria monocytogenes*-based vaccines expressing *MIA* gene on malignant melanoma. *J Huazhong Uni Sci Tech (Med Sci)*, 2012, 32(4): 591-597.
- [4] 任晨艳, 刘思静, 蒲启康, 等. 李斯特菌载体结核疫苗候选株基因重组构建及蛋白表达验证. *四川大学学报(医学版)*, 2016, 47(6): 819-824.
- [5] 周梦莹, 蒋明娟, 任晨艳, 等. 绵羊李斯特菌在小鼠体内的感染增殖规律及诱导的细胞因子分泌. *现代预防医学*, 2016, 43(9): 1644-1648.
- [6] KUHN M, GOEBEL W. Internalization of *Listeria monocytogenes* by nonprofessional and professional phagocytes. *Subcell Biochem*, 2000, 33: 411-436.
- [7] JONQUIÈRES R, BIERNE H, FIEDLER F, *et al.* Interaction between the protein *InlB* of *Listeria monocytogenes* and lipoteichoic acid: a novel mechanism of protein association at the surface of Gram-positive bacteria. *Mol Microbiol*, 1999, 34(5): 902-914.
- [8] LIN Q, ZHOU M, XU Z, *et al.* Construction of two *Listeria ivanovii* attenuated strains expressing *Mycobacterium tuberculosis* antigens for TB vaccine purposes. *J Biotechnol*, 2015, 196/197: 20-26 [2017-05-26]. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2015.01.008>.
- [9] COSSART P, TOLEDO-ARANA A. *Listeria monocytogenes*, a unique model in infection biology: an overview. *Microbes Infect*, 2008, 10(9): 1041-1050.
- [10] DOMÍNGUEZ-BERNAL G, MÜLLER-ALTROCK S, GONZÁLEZ-ZORN B, *et al.* A spontaneous genomic deletion in *Listeria ivanovii* identifies LIPI-2, a species-specific pathogenicity island encoding sphingomyelinase and numerous internalins. *Mol Microbiol*, 2006, 59(2): 415-432.
- [11] BIERNE H, COSSART P. *InlB*, a surface protein of *Listeria monocytogenes* that behaves as an invasin and a growth factor. *J Cell Sci*, 2002, 115(Pt 17): 3357-3367.
- [12] 王海艳, 刘中学, 石新华, 等. 单增李斯特菌及其表面蛋白的研究进展. *检验检疫科学*, 2006, 16(2): 76-80.
- [13] PIZARRO-CERDÁ J, KÜHBACHER A, COSSART P. Entry of *Listeria monocytogenes* in mammalian epithelial cells: an updated view. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2012, 2 (11): pii: a010009. doi: 10.1101/cshperspect.a010009.
- [14] 魏 丽, 邓兴梅, 蒋建军, 等. 单增李斯特菌 *inlB* 基因缺失株的构建及其生物学特性. *动物医学进展*, 2014, 35(10): 19-24.
- [15] 刘武康, 陈国薇, 吴 嫚, 等. *InlA* 和 *inlB* 基因缺失对单核细胞增生性李斯特菌侵袭 HT29 结肠癌细胞的影响. *食品科学*, 2016, 37(23): 166-172.
- [16] BUCHRIESER C, RUSNIOK C, GARRIDO P, *et al.* Complete genome sequence of the animal pathogen *Listeria ivanovii*, which provides insights into host specificities and evolution of the genus *Listeria*. *J Bacteriol*, 2011, 193(23): 6787-6788.

(2017-06-08 收稿, 2017-09-25 修回)

编辑 余 琳