



硫氧还蛋白 Lmo1903 介导单增李斯特菌抵抗氧化应激的生物学功能研究

陈雨吉¹, 吕晓玲², 韩月¹, 罗平¹, 曹启予¹, 陈歆丹¹, 吴宇康¹,
徐加利¹, 管迟瑜¹, 宋厚辉^{1*}, 程昌勇^{1*}

- 1 浙江农林大学动物科技学院·动物医学院 动物健康互联网检测技术浙江省工程研究中心 浙江省动物医学与健康管理国际科技合作基地 中澳动物健康大数据分析联合实验室 浙江省畜禽绿色生态健康养殖应用技术研究重点实验室, 浙江 杭州 311300
- 2 宁波检验检疫科学技术研究院 宁波海关技术中心, 浙江 宁波 315100

陈雨吉, 吕晓玲, 韩月, 罗平, 曹启予, 陈歆丹, 吴宇康, 徐加利, 管迟瑜, 宋厚辉, 程昌勇. 硫氧还蛋白 Lmo1903 介导单增李斯特菌抵抗氧化应激的生物学功能研究[J]. 微生物学报, 2023, 63(3): 1269-1282.

CHEN Yuji, LÜ Xiaoling, HAN Yue, LUO Ping, CAO Qiyu, CHEN Xindan, WU Yukang, XU Jiali, GUAN Chiyu, SONG Houhui, CHENG Changyong. The thioredoxin Lmo1903 contributes to oxidative stress tolerance of *Listeria monocytogenes*[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2023, 63(3): 1269-1282.

摘要: 【目的】以单增李斯特菌(*Listeria monocytogenes*, LM)硫氧还蛋白 Lmo1903 为研究对象, 研究其在细菌环境适应过程中的抗氧化应激生物学作用。【方法】使用生物信息学方法分析 Lmo1903 的进化关系和关键活性位点, 使用酶切连接的方法构建 Lmo1903 蛋白表达载体, 获得纯化的重组蛋白, 以胰岛素为底物分析其氧化还原酶学活性; 同时制备鼠源多克隆抗体, 分析其在细胞内的定位; 采用核苷酸定点突变技术构建 CX₁X₂C 基序中的半胱氨酸点突变蛋白, 分析关键位点半胱氨酸对 Lmo1903 酶活的影响; 采用同源重组原理构建 *lmo1903* 基因缺失株 Δ *lmo1903* 和回补株 C Δ *lmo1903*, 研究 *lmo1903* 在单增李斯特菌生长、运动和抗氧化应激方面发挥的功能。【结果】生物信息学分析显示, Lmo1903 含有 CX₁X₂C 基序, 与枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)的 TrxA 的亲缘关系较近, 属于硫氧还蛋白家族成员, 主要定位在细菌细胞质中, 具有较强的还原酶学活性, 突变 CX₁X₂C 基序中的半胱氨酸残基会显著降低 Lmo1903 的还原酶活能力。缺失

资助项目: 国家自然科学基金(31902280, 31972648); 宁波市自然科学基金(202003N4179); 浙江农林大学学生科研训练项目(2021KX0120)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (31902280, 31972648), the Ningbo Natural Science Foundation (202003N4179), and the Scientific Research Training Program for Undergraduate of Zhejiang A&F University (2021KX0120).

*Corresponding authors. E-mail: CHENG Changyong, lamge@zafu.edu.cn; SONG Houhui, songhh@zafu.edu.cn

Received: 2022-08-02; Accepted: 2022-12-06; Published online: 2022-12-23

lmo1903 不影响单增李斯特菌的生长能力, 但显著减弱了细菌在铜离子胁迫环境中的氧化应激耐受能力, 且影响鞭毛合成相关因子的转录水平和细菌的运动能力。【结论】本研究首次证实了单增李斯特菌硫氧还蛋白 Lmo1903 具有还原酶学活性, 介导细菌运动和对氧化环境的适应。

关键词: 单增李斯特菌; 硫氧还蛋白; 细胞定位; 氧化应激; 运动性

The thioredoxin Lmo1903 contributes to oxidative stress tolerance of *Listeria monocytogenes*

CHEN Yuji¹, LÜ Xiaoling², HAN Yue¹, LUO Ping¹, CAO Qiyu¹, CHEN Xindan¹,
WU Yukang¹, XU Jiali¹, GUAN Chiyu¹, SONG Houhui^{1*}, CHENG Changyong^{1*}

1 Key Laboratory of Applied Technology on Green-Eco-Healthy Animal Husbandry of Zhejiang Province, China-Australia Joint Laboratory for Animal Health Big Data Analytics, Zhejiang Provincial Engineering Research Center for Animal Health Diagnostics & Advanced Technology, Zhejiang International Science and Technology Cooperation Base for Veterinary Medicine and Health Management, College of Animal Science and Technology/College of Veterinary Medicine, Zhejiang A&F University, Hangzhou 311300, Zhejiang, China

2 Technical Center of Ningbo Customs, Ningbo Academy of Quarantine & Inspection Science and Technology, Ningbo 315100, Zhejiang, China

Abstract: [Objective] The thioredoxin family plays a key role in the oxidative stress response of the foodborne bacterial pathogen *Listeria monocytogenes* (LM) during environmental adaptation. Here, we studied the biological role of the thioredoxin Lmo1903 in oxidative stress tolerance. **[Methods]** The phylogenetic relationship and key active sites of Lmo1903 were analyzed by bioinformatics tools. The recombinant Lmo1903 protein was expressed and purified. The oxidoreductase activity of the recombination protein was determined with insulin as the substrate and the cellular localization was predicted after preparation of mouse polyclonal antibody with the recombinant protein. The oligonucleotide-directed site-specific deletion of cysteine from Lmo1903 protein was carried out to analyze the key sites of enzyme activity. The *lmo1903*-deleted strain $\Delta lmo1903$ was constructed by homologous recombination, and the complementation strain $C\Delta lmo1903$ was constructed with the integrated complement plasmid pIMK2. The growth, motility, and oxidative stress tolerance of the strains were examined *in vitro*. **[Results]** Lmo1903 had a classical CX₁X₂C motif and was close related to the thioredoxin family member TrxA from *Bacillus subtilis*. It was mainly located in the cytoplasm of bacteria and possessed strong reductase activity. Cysteine was the key site for the enzymatic activity of Lmo1903. Deletion of *lmo1903* did not affect bacterial growth, while it significantly weakened the tolerance to oxidative stress in Cu²⁺ stress environment. Furthermore, the deletion of this gene affected the transcriptional levels of the genes involved in bacterial flagellar formation and reduced the swimming motility. **[Conclusion]** The thioredoxin family member Lmo1903 exhibiting the reductase activity contributes to the oxidative stress tolerance and motility of *L. monocytogenes*.

Keywords: *Listeria monocytogenes*; thioredoxin; cellular localization; oxidative stress; motility

单增李斯特菌(*Listeria monocytogenes*, LM)是一类广泛存在于地表水、土壤、屠宰场中,能够污染食品加工环节,残留于新鲜蔬菜、水果、乳制品和生鲜中的食源性微生物,常导致食品安全事件发生,病死率高达 20%^[1-2]。氧化环境是细菌最容易遇到的胁迫环境,因此,对该菌抗应激生物学功能的研究具有重要的公共卫生学意义^[1]。

硫氧还蛋白是细菌体内修复氧化还原损伤、抵抗环境应激的重要参与者,通过介导蛋白质二硫键形成与打开保持胞内环境稳态^[2]。胞内蛋白的氧化还原需要一定的场所,细胞外浆的氧化还原电位较高,为-150~-200 mV,蛋白容易被氧化,所以细胞膜和细胞周质是蛋白质二硫键形成的主要场所^[3]。而细胞质的氧化还原电位(Eh)为-280~-298 mV,是一个相对还原的环境,介导蛋白质二硫键还原的硫氧还蛋白大多位于此^[4]。如硫氧还蛋白 Trx 位于细胞质中,其还原酶学活性高于位于细胞周质的 Dsb 蛋白^[4]。因此,蛋白的细胞定位不同,其发挥的功能也不尽相同^[2]。

研究报道,Lmo1903 具有 CX₁X₂C 的保守结构域,属于硫氧还蛋白家族成员^[5]。但是其在细胞中的位置和具体功能尚不清楚。本研究通过同源重组方法获得 *lmo1903* 基因缺失株与回补株,从生长、运动、抗氧化应激能力、蛋白定位等几个方面对 *lmo1903* 的应激生物学功能进行了初步的分析。

1 材料与方法

1.1 菌株、载体及培养条件

本研究使用的菌株包括:单增李斯特菌野生株 *L. monocytogenes* EGD-e、*Escherichia coli* DH5 α 和 Rosetta; 本研究所用的质粒有:温敏质粒 pKSV7、整合质粒 pIMK2 和表达载体

pET30a,均为本实验室保存。大肠杆菌使用肉汤培养基(LB)培养,单增李斯特菌使用脑心浸出液(brain heart infusion, BHI)培养。除突变株筛选需要用到 30 °C 和 42 °C,培养条件均为 37 °C; 氨苄青霉素、氯霉素和卡那霉素的使用浓度分别为 100、30、50 μ g/mL^[6]。

1.2 试剂

2 \times Phana Master Mix 购自南京诺唯赞生物科技有限公司;琼脂糖凝胶回收试剂盒购自上海惠凌生物技术有限公司,限制性内切酶购自 NEB (北京); LB 和 BHI 培养基均购自 Oxoid 公司。

1.3 引物

从 NCBI 上下载 *L. monocytogenes* EGD-e 基因组(NC-003210.1) *lmo1903*, 分别设计引物 *lmo1903*-UF/UR 和 *lmo1903*-DF/DR, 扩增 *lmo1903* 编码序列(coding sequence, CDS)区域前后 1 000 bp 的上、下游基因序列。设计用于鉴定 *lmo1903* 基因缺失株的引物: *lmo1903*-a front-UF/*lmo1903*-DR (表 1)。

1.4 生物信息学分析与 Lmo1903 点突变株的构建

利用 Uniport 蛋白数据库网站,获取不同种属的硫氧还蛋白 Trx 同源蛋白氨基酸序列。使用软件 CLC sequence viewer 软件,将李斯特菌 Lmo1903 与其他来源的同源蛋白进行氨基酸序列比对,以分析 Lmo1903 与其他 Trx 家族成员的进化关系。

根据生物信息学预测结果,发现 Lmo1903 具有硫氧还蛋白活性基序 CX₁X₂C。为此,采用氨基酸定点突变技术将 CX₁X₂C 基序的第 70 位和第 73 位半胱氨酸突变成丝氨酸(即 C70S、C73S),以研究半胱氨酸残基对 Lmo1903 蛋白酶活的影响。参照文献[7]的方法进行点突变蛋白的构建。首先,设计如表 1 所示点突变株引物。以 Lmo1903

表 1 本研究中用到的引物

Table 1 Primers used in this study

Primers	Sequences (5'→3')
<i>lmo1903</i> -UF	CAATGTCAATCAACAGGAATTCCCAG
<i>lmo1903</i> -UR	ATCAAAAACAACCTCTTCGTGCTTATTGTAC
<i>lmo1903</i> -DF	GATCTCTCTTCAATTTACATACTTTAAGTAA
<i>lmo1903</i> -DR	GCATGAGCGCCACTTTCTTGAAT
<i>lmo1903-a front</i> -UF	GCTCGAACCAGAAAATCAAATGGC
pSL2156-Fwd-Sac I	CGCGGATCCAATCACTTTTTCGAGTT
pSL2156-Rev-BamH I	CGAGCTCATAATAACATAAATGGATGC
pKSV7-M13-Fwd	GCGATTAAGTTGGGTAACGCC
pKSV7-M13-Rev	GCGGATAACAATTCACACAGGA
pSL1607-Fwd	CGCGGATCCAATCACTTTTTCGAGTT
pSL1607-Rev	CGAGCTCATAATAACATAAATGGATGC
Lmo1903-C70S-F	TCCGACCTCTGAAGATTGCCAAGCATTTTCAGC
Lmo1903-C70S-R	AATCTTAGAAGGTCGGACGCCCAA
Lmo1903-C73S-F	GACCTGTGAAGATTCTCAAGCATTTTCAGCCTATT
Lmo1903-C73S-R	GCTTGAGAATCTTCACAGGTCGGAC

的原核表达重组质粒为模板,进行 PCR 反向扩增,纯化回收后加入 *Dpn* I 消化质粒模板;随后将上述产物热激转化到 DH5 α 感受态细胞中,过夜培养后挑取单克隆,测序验证突变是否构建成功;最后将验证成功的菌株过夜培养,抽提质粒,再热激转化到 Rosetta 感受态细胞中,PCR 验证单点突变蛋白表达菌株是否构建成功。

1.5 Lmo1903 的蛋白表达及多克隆抗体制备

设计蛋白表达引物,如表 1 所示,扩增 Lmo1903 的 CDS 序列,通过酶切连接至 pET30a,热转化至大肠杆菌 DH5 α 感受态中,进行 PCR 验证及序列测定,获得阳性表达质粒。重组蛋白原核表达方法参照文献[6]进行。使用终浓度为 1 mmol/L 的异丙基- β -D-硫代半乳糖苷(isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside, IPTG)诱导 Lmo1903 蛋白表达,离心收集菌体,PBS 洗涤重悬后使用超声破碎仪破碎,离心取上清,经镍柱层析纯化后获得目的蛋白,使用 SDS-PAGE 验证重组蛋白的表达和纯化情况。

多克隆抗体制备参照文献[7-8]进行。选取

生长状况相似的 3 只雌性 ICR 小鼠(购自杭州医学院),适应环境 7 d 后进行免疫接种。使用等比例弗氏完全佐剂与蛋白混合,振荡乳化后于小鼠背部皮下进行多点注射,每只小鼠接种 100 μ g。采用 4 次免疫,2 次免疫之间间隔 14 d 的免疫策略进行免疫。加强免疫后 7 d 心脏采血,37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h 后离心收集血清,即为 Lmo1903 的多克隆抗体。以获得的 Lmo1903 多克隆抗体为一抗,使用辣根过氧化物酶标记的兔抗鼠 IgG (碧云天生物技术公司)为二抗,使用 Western blotting 方法对制备的多克隆抗体进行验证。

1.6 蛋白酶活测定

酶活测定,采用经典的胰岛素二硫键还原试验检测 Lmo1903 重组蛋白的还原酶学活性^[6-9]。

(1) 使用不同浓度(1、5、10 和 30 μ mol/L)的重组蛋白催化浓度为 120 μ mol/L 的胰岛素,同时设置阳性对照(TrxA)和阴性对照,按组别将蛋白、胰岛素(底物)、1 mmol/L 二硫苏糖醇(dithiothreitol, DTT)电子供体和 2 mmol/L

EDTA 混合在 10 mmol/L PBS 缓冲液中, 25 °C 反应 150 min, 每隔 10 min 测定反应液在 650 nm 处的吸光值(OD_{650}), 确定催化效果最佳的蛋白浓度。(2) 将(1)中筛选出的蛋白浓度与不同终浓度的胰岛素(15、30、60、90 和 120 $\mu\text{mol/L}$)、电子供体 1 mmol/L DTT 混合(缓冲液为 10 mmol/L PBS 和 2 mmol/L EDTA), 25 °C 反应 150 min, 每隔 10 min 使用测定液体在 650 nm 处的吸光值(OD_{650}), 并使用 Graphpad Prism 软件绘制酶活时间曲线图。

1.7 蛋白定位

参照文献方法制备野生株 EGD-e 全菌蛋白、胞质蛋白、细胞膜蛋白和分泌蛋白^[8]。随后测定各组分样品的蛋白浓度, 使用 PBS 稀释至相

同浓度后进行 SDS-PAGE 电泳, 同时使用 1.5 中制备的 Lmo1903 的多克隆抗体检测 Lmo1903 在细胞中的定位。

1.8 $\Delta lmo1903$ 缺失株构建

构建缺失载体: 以 EGD-e 全基因组为模板, 使用表 1 所示引物 *lmo1903*-UF/UR 和 *lmo1903*-DF/DR 分别扩增出上下游片段。使用重叠 PCR 方法获得上下游同源重组片段, 经限制性内切酶 *Kpn* I 和 *Bam* H I 酶切后连接入穿梭质粒 pKSV7 中, 转化至 DH5 α 感受态细胞中, 挑取疑似阳性菌落, 经 PCR 验证及 Sanger 测序后, 获得阳性重组质粒, 构建策略如图 1A 所示。

参照文献进行感受态细胞的制备^[9]。将上述重组质粒电转入 EGD-e 感受态中, 通过改变

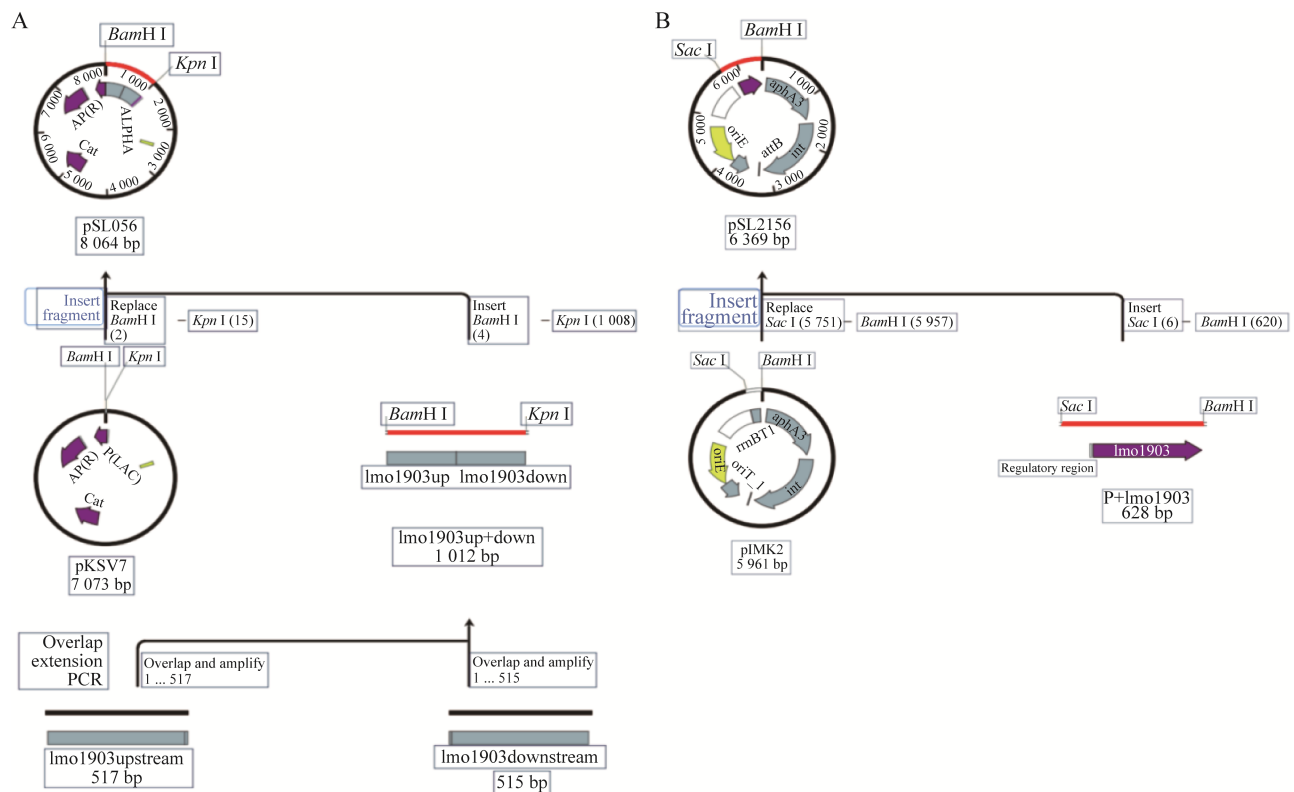


图 1 *lmo1903* 基因的重组缺失质粒 pSL056 与回补质粒 pSL2156 的构建策略

Figure 1 Construction strategy of the plasmids pSL056 and pSL2156 for *lmo1903* gene deletion and complementation. A: Construction of pSL056 for *lmo1903* gene deletion. B: Construction of pSL2156 for *lmo1903* gene complementation.

温度丢失 pKSV7 质粒, 经氯霉素抗性筛选获得疑似阳性克隆, 使用引物(*lmo1903-a front*-UF/*lmo1903-DR*)对其进行 PCR 验证, 测序正确后获得 *lmo1903* 无痕缺失株, 保存备用。

1.9 CΔ*lmo1903* 回补株构建

从 Biocyc 查询到 *lmo1903* 为单转录本, 使用 Promoter3.0 网站分析该基因的启动子序列, 通过 Snapgene 设计引物扩增 *lmo1903* 基因的上游启动子区和 CDS 区, 使用 *Sac* I 和 *Bam* H I 酶切链接至 pIMK2 载体, 将重组质粒转化至大肠杆菌 DH5α 中, 获得阳性克隆, 构建策略如图 1B 所示。将验证成功的回补质粒电转化至单增李斯特菌 Δ*lmo1903* 缺失株感受态, 涂布至 BHI (含 Kana 50 μg/mL) 固体培养基, 挑取阳性克隆进行 PCR 及测序验证。

1.10 细菌生长曲线绘制

参考文献[9]的方法进行细菌生长能力测定。每个菌设置 3 个平行, 37 °C 条件下静置培养, 每隔 1 h 测定 1 次 OD_{600} 。获得 1 个 OD_{600} 数值的生长曲线。

1.11 细菌运动性分析

细菌运动性测定参照文献[9]的方法进行。将处理好的 EGD-e、Δ*lmo1903* 和 CΔ*lmo1903* 菌液分别用牙签蘸取后竖直点在半固体培养基 (0.25%琼脂、2%氯化钠及 1.5%胰蛋白胨) 上, 于 30 °C 以及 37 °C 静置培养。观察并记录细菌在 24 h 和 48 h 形成的运动圈直径, 拍照分析。

1.12 *lmo1903* 突变株鞭毛相关基因转录水平分析

参考文献[10]的方法检测 *lmo1903* 基因缺失对鞭毛合成相关基因的影响。设计鞭毛相关基因 *flhB*、*motB*、*lmo0685*、*lmo0698*、*mogR*、*gmaR*、*fliF*、*lmo0695*、*fliL*、*flgD*、*lmo0675*、*fliQ*、*lmo0708*、*flgL*、*lmo0435*、*fliG* 和 16S 的荧光定量 PCR 引物, 其中 16S rRNA 为内参基

因, 引物序列如表 2 所示。将反转录后的 cDNA 按照所需比例稀释后用作模板进行 RT-PCR, 研究 *lmo1903* 基因缺失对鞭毛相关基因转录水平的影响。反应结束后荧光信号数据使用 GraphPad 8.0 软件进行统计学分析。使用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法计算 *lmo1903* 缺失后对鞭毛相关基因的转录水平变化, 其中 $\Delta C_t \text{ 样品} = C_t \text{ 目的基因} - C_t \text{ 内参基因}$; $-\Delta\Delta C_t = -(\Delta C_t \text{ 样品} - \Delta C_t \text{ 对照})$ 。

表 2 本研究中荧光定量检测使用的引物

Table 2 Primers used for RT-PCR

Primers	Sequences (5'→3')
RT- <i>mogR</i> -F	TCTGAAATGCTCAGCCTAAA
RT- <i>mogR</i> -R	TCGGAATATCTTCTACTTGGA
RT- <i>motB</i> -F	GAGGCAAACAGAACGATAAATAGAG
RT- <i>motB</i> -R	GAGGCAAACAGAACGATAAATAGAG
RT- <i>gmaR</i> -F	AGCAAGTTCCATCAACCAAAAG
RT- <i>gmaR</i> -R	GTTGAGTTGTCATCGAAAGTAAGC
RT- <i>flhB</i> -F	GAGGTCGTGAAAGCGTTATTGT
RT- <i>flhB</i> -R	CGGTGTAATAATGAGCGTATCTAA
RT- <i>fliF</i> -F	GATGACGGCGAAGAGTAAACC
RT- <i>fliF</i> -R	TCACCATCATGCCTATCCAGTT
RT- <i>fliL</i> -F	CGTAACGCCAAAGCAGACAT
RT- <i>fliL</i> -R	TCCGAGGTAGCAGCAACAAT
RT- <i>fliG</i> -F	CGCCGTCCATTCTTTTCATT
RT- <i>fliG</i> -R	CGCTTATTATTGGAGCCTTGA
RT- <i>fliQ</i> -F	TGGTAGTGATTGTGGTTGCGATT
RT- <i>fliQ</i> -R	ATCCACGGTCCAAGAATAAAGA
RT- <i>flgL</i> -F	TTCGGTTGTCCCGTTATAGATG
RT- <i>flgL</i> -R	TAACTCAGAAGACGATGGCAGAT
RT- <i>lmo0435</i> -F	GATGAGGCTGGAACACCG
RT- <i>lmo0435</i> -R	TTGCTTCCGTACTATTCACTTCTG
RT- <i>lmo0675</i> -F	AAGCGAATCGCACGAGAAA
RT- <i>lmo0675</i> -R	CCAGAAGAACTGCACGTAACGTAT
RT- <i>lmo0685</i> -F	AACTTAGCGAAGCAATAGCCG
RT- <i>lmo0685</i> -R	CAAATGGTGTCCAAAGCACGT
RT- <i>lmo0695</i> -F	CTCATAAAGGGAGAAGCGGATAA
RT- <i>lmo0695</i> -R	TTGGCTGAAACGAGTGATGGT
RT- <i>lmo0698</i> -F	CACTCAAAGGCTATGTCACCG
RT- <i>lmo0698</i> -R	TGCTCTGTCCGCCCTGTAT
RT- <i>lmo0708</i> -F	TGAACAAATTCGCCAAATGC
RT- <i>lmo0708</i> -R	TGTTTCATCACTCCCTCGTAGC

1.13 细菌抗氧化应激能力测定

按照文献[10]中的方法进行细菌抗氧化应激能力的测定。选用加入双氧水、胍以及铜(copper, Cu)、镉(cadmium chloride, Cd)等二价金属离子的 BHI 培养基模拟氧化胁迫环境。双氧水、胍、镉离子和铜离子的使用浓度分别为 10.00、2.00、0.25、0.50 mmol/L。将 10 倍倍比稀释的菌液(10^{-1} – 10^{-6})接种至上述培养基, 37 °C 静置培养过夜。观察各梯度的细菌生长情况, 并与不加氧化剂的 BHI 空白组进行比对, 分析抗氧化应激能力的变化。

1.14 数据统计

本研究所得数据以平均值 \pm SD 形式表示, 使用 Graphpad Prism 中的 *t*-检验和双向方差分析(two way analysis of variance, two way ANOVA)方法分析差异性。数据用平均值 \pm SD 表示, ns 表示无差异, *表示 $P<0.05$, **表示 $P<0.01$,

***表示 $P<0.001$ 。使用 Adobe Illustrator 2021 进行数据处理和图片排版。

2 结果与分析

2.1 Lmo1903 氨基酸序列生物信息学分析和蛋白酶活测定

分析单增李斯特菌 Lmo1903 的氨基酸序列, 我们发现 Lmo1903 蛋白具有硫氧还蛋白特有的 CX₁X₂C 活性基序, 如图 2A 所示。为测定该活性位点中的 2 个半胱氨酸是否为其酶活关键位点, 我们将 Lmo1903 蛋白的第 70 位和 73 位的半胱氨酸突变为丝氨酸, 得到 Lmo1903 点突变蛋白 Lmo1903_{C70S} 与 Lmo1903_{C73S}。对 Lmo1903 重组蛋白和点突变蛋白进行酶活测定后得到如图 2B 所示结果, 发现 Lmo1903_{C70S} 与 Lmo1903_{C73S} 酶活能力下降, 表明第 70 位和 73 位的半胱氨酸(图 2C)是 Lmo1903 的关键酶活位点。

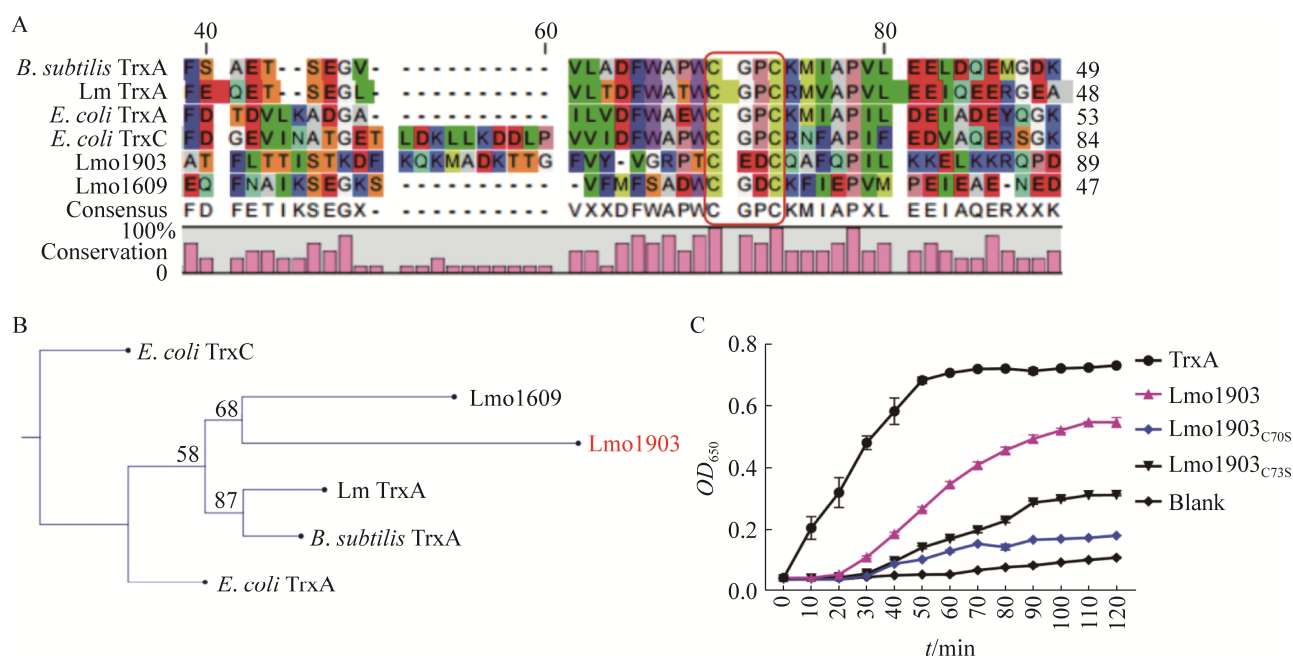


图 2 Lmo1903 氨基酸序列比对、进化分析和 Lmo1903 及蛋白酶活分析

Figure 2 Amino acid sequence alignment, phylogenetic tree construction and enzymatic activity analysis of Lmo1903. A: Amino acid sequence alignment of Lmo1903. B: Phylogenetic tree construction of Lmo1903. C: Enzymatic activity analysis of Lmo1903.

2.2 单增李斯特菌 Lmo1903 蛋白表达及酶活测定

使用菌落 PCR 验证及 Sanger 测序验证构建的蛋白重组质粒, 命名为 pSL1607, 使用 SDS-PAGE 验证纯化的 Lmo1903 蛋白大小为 15.95 kDa, 与预期大小相符, 表明蛋白表达成功(图 3A)。

酶活测定结果表明 TrxA 对照的催化能力最强, 其次为 10 $\mu\text{mol/L}$ 的 Lmo1903 蛋白, 都显著高于空白对照组(Blank 组), 如图 3B 所示。同时使用 10 $\mu\text{mol/L}$ 的 Lmo1903 蛋白催化不同浓度胰岛素分析该酶的催化活性发现, 当底物浓度较低时, Lmo1903 的催化效果与空白对照组相差无几, 但是随着胰岛素浓度增加, Lmo1903 的催化效果显著高于空白对照组, 如

图 3C 所示。结果表明, Lmo1903 重组蛋白可以将含有二硫键的氧化型胰岛素还原, 因此证明该蛋白具有还原酶学活性。

2.3 单增李斯特菌 Lmo1903 蛋白定位

SDS-PAGE 验证 Lmo1903 蛋白表达成功, 结果如图 4A 所示, 泳道 1、2、3 和 4 分别为 1、0.5、0.25 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 的 Lmo1903 蛋白和以及 PBS 阴性对照。泳道 1、2 和 3 上有单一蛋白反应条带, 泳道 4 上无条带, 表明该蛋白与多克隆抗体的反应强度随着蛋白浓度的增高而增强, 表明制备的多克隆抗体特异性较好, 可用于目标蛋白的特异性检测。

Lmo1903 蛋白定位结果如图 4B 所示, 全菌蛋白和胞质蛋白可以与 Lmo1903 多抗反

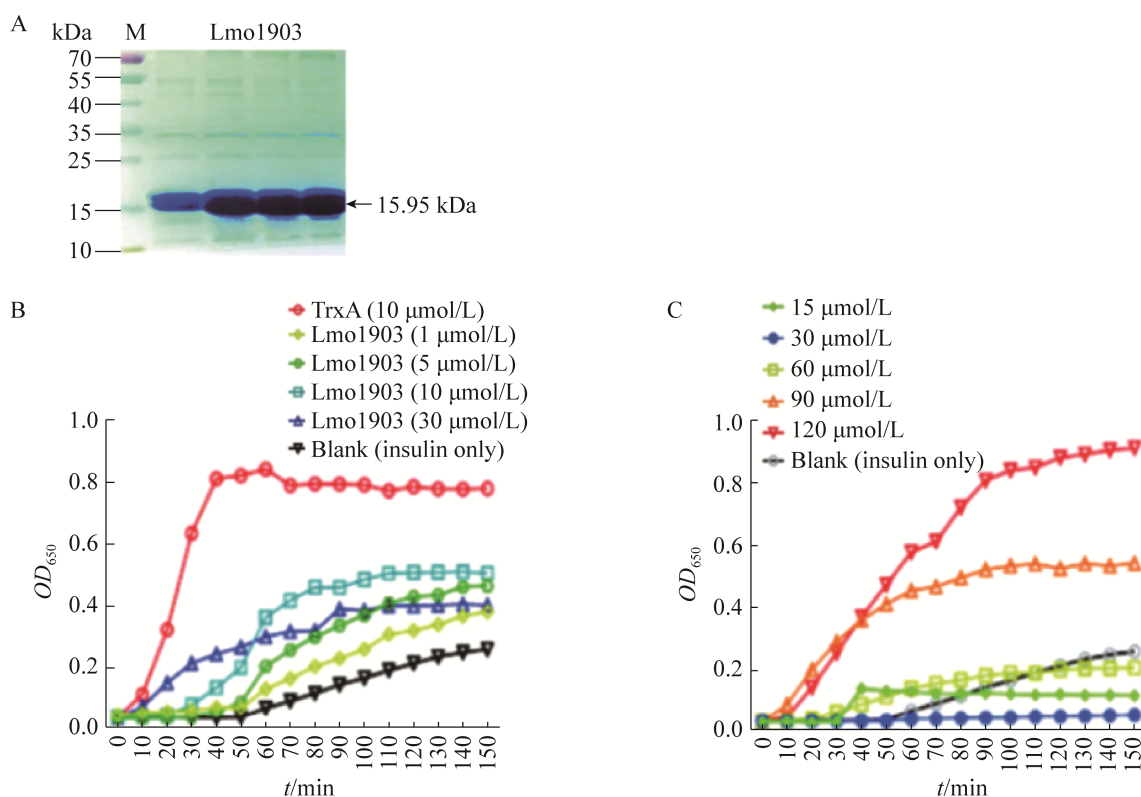


图 3 Lmo1903 蛋白表达及酶活测定

Figure 3 The protein expression and enzymatic activity analysis of Lmo1903. A: Identification of Lmo1903 expression by SDS-PAGE. B: The catalyzation of insulin with Lmo1903 at different concentration. C: The catalyzation of insulin.

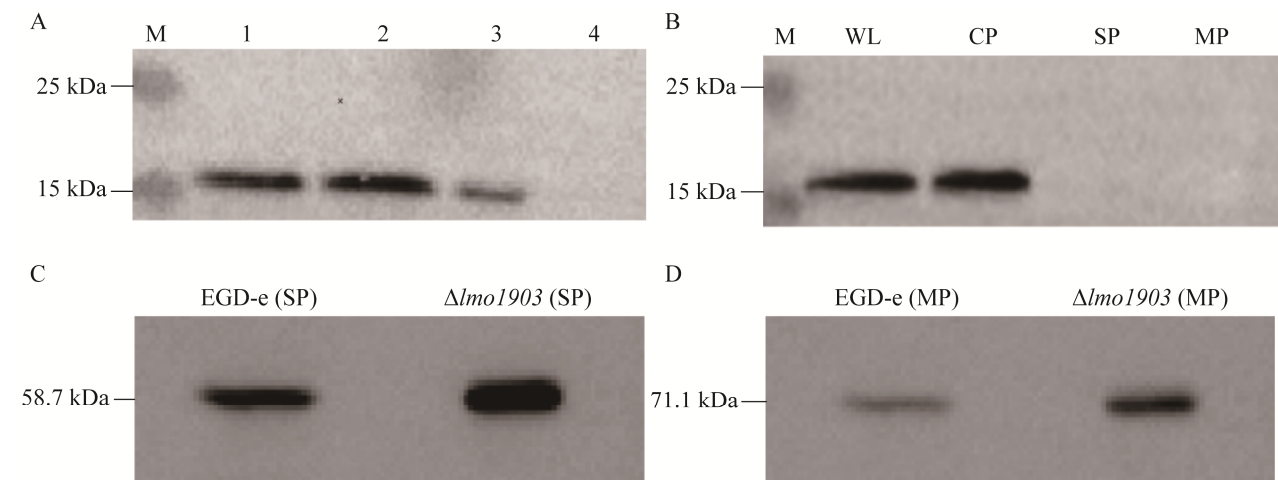


图 4 *Lmo1903* 多克隆抗体验证和蛋白定位

Figure 4 The specific polyclonal antibodies verification and cellular localization of *Lmo1903*. A: Identification of specific polyclonal antibodies against *Lmo1903*. B: The cellular localization of *Lmo1903*. C: Detection of LLO expression in SP, a positive control of secreted protein. D: Detection of InlB expression in MP, a positive control of membrane protein. WL: Whole cell lysate; CP: Cytoplasmic protein; SP: Secreted protein; MP: Membrane protein.

应, 而分泌蛋白和细胞膜蛋白则不与 *Lmo1903* 多抗反应, 表明单增李斯特菌 *Lmo1903* 主要定位在细菌细胞质中发挥功能。同时对所提取的 EGD-e 和 $\Delta lmo1903$ 分泌蛋白和膜蛋白进行验证, 使用在分泌蛋白中表达 LLO 一抗和在膜蛋白中表达的 InlB 一抗孵育对应蛋白, 得到了大小正确的单一条带(图 4C、4D), 确认提取的蛋白为正确的单增李斯特菌分泌蛋白和膜蛋白。

2.4 成功构建 *lmo1903* 缺失株及回补株

根据 1.8 中的缺失株构建方法获得大小为 1 114 bp 的阳性克隆(图 5A), 较野生株 EGD-e 的条带大小 1 585 bp 减少 471 bp, 为缺失的 *lmo1903* CDS 区, 表明突变株构建成功。测序正确后将该缺失株命名为 $\Delta lmo1903$ 。

根据 1.9 中回补株构建方法, 使用引物 (pSL2156-Fwd-Sac I/pSL2156-Rev-BamH I) 扩增菌落, 得到 $C\Delta lmo1903$ 重组质粒目的片段 621 bp (图 5B), 与预期的 *lmo1903* 启动子区和回补的

lmo1903 CDS 区大小相符, 表明回补株构建成功。经测序验证正确后将改回补株命名为 $C\Delta lmo1903$ 。

2.5 单增李斯特菌生长能力分析

生长曲线测定结果如图 6A 所示, 经 *t*-test 分析, $\Delta lmo1903$ 缺失株的生长速率与野生株相比, 没有显著差异($P>0.05$), 回补株也回复至野生株水平。表明 *lmo1903* 基因缺失不影响单增李斯特菌的生长速率。

2.6 单增李斯特菌运动性分析

细菌运动性结果如图 6B 所示, 在 30 °C 静置培养条件下, $\Delta lmo1903$ 缺失株在 24 h 的运动圈直径是 13 mm, 野生株是 23 mm, 而回补株的细菌运动直径为 22 mm, 缺失株较野生株下降 44%, $\Delta lmo1903$ 缺失株在 48 h 的运动圈直径是 31 mm, 野生株是 49 mm, 回补株直径为 49 mm, 缺失株较野生株下降 36%。结果表明 *lmo1903* 基因缺失显著降低细菌运动能力($P<0.01$)。

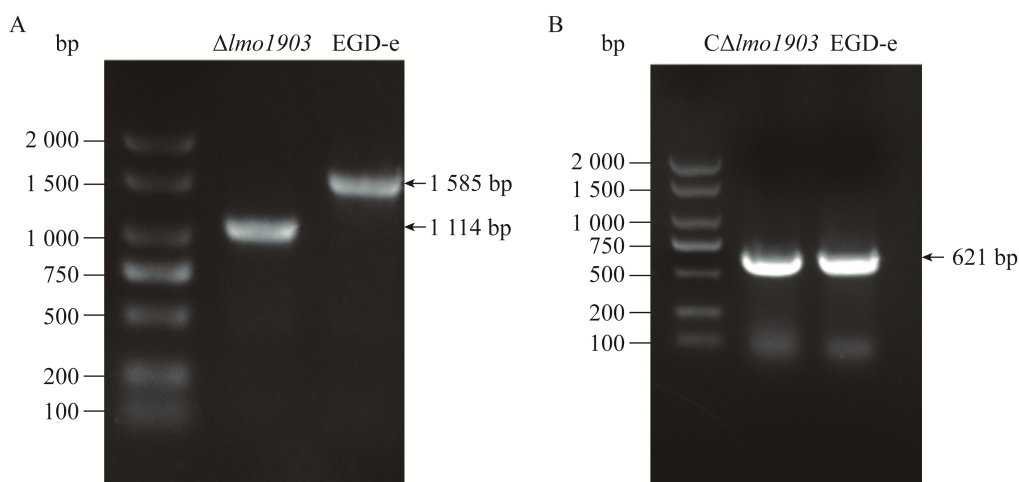


图5 缺失株 $\Delta lmo1903$ 和回补株 $C\Delta lmo1903$ 的 PCR 验证

Figure 5 Confirmation of *lmo1903* mutant strain and complementation strain by PCR. A: Confirmation of *lmo1903* mutant strain by PCR. B: Confirmation of *lmo1903* complementation strain by PCR.

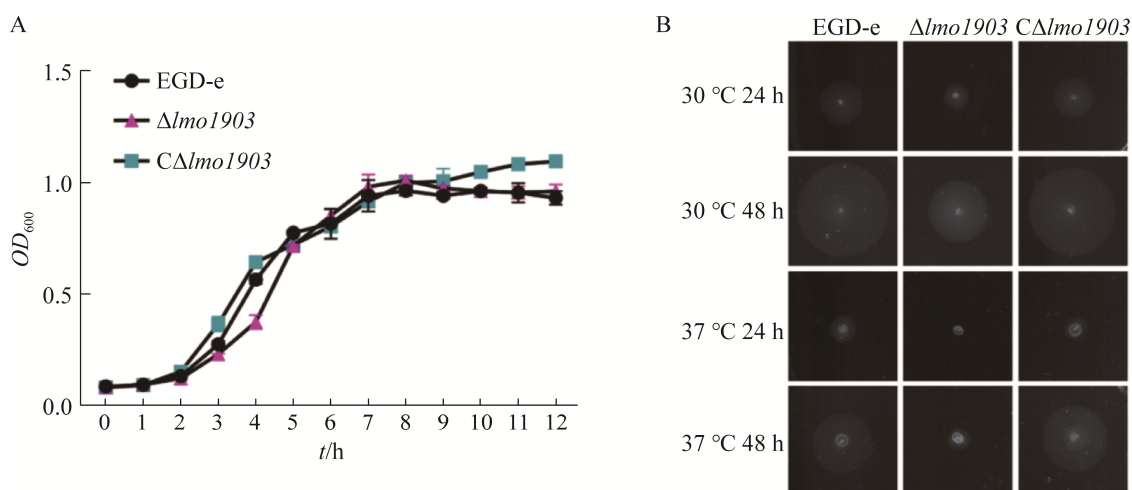


图6 EGD-e、 $\Delta lmo1903$ 和 $C\Delta lmo1903$ 的生长曲线绘制及运动能力分析

Figure 6 Growth and motility detection of EGD-e, $\Delta lmo1903$ and $C\Delta lmo1903$. A: Bacterial growth curve. B: Bacterial swimming motility.

2.7 *lmo1903* 突变株鞭毛相关基因转录水平分析

如 2.5 所述, $\Delta lmo1903$ 缺失株的运动能力显著减弱, 为进一步研究其运动能力减弱的原因, 我们使用荧光定量 PCR 方法对部分鞭毛相关基因的转录水平进行了检测(图 7)。结果显示, *lmo1903* 突变后鞭毛合成蛋白 FliQ、鞭毛

马达开关蛋白 FliG、鞭毛基座蛋白(特异性 ATP 合酶) FliI、鞭毛 MS 环蛋白 FliF、鞭毛钩相关蛋白 FlgL、肽聚糖结合蛋白 Lmo0435、鞭毛蛋白 Lmo0708、鞭毛基因转录抑制因子 *mogR* 均有不同程度的转录水平下调, 其中 *fliQ* 下调最显著, 用于拮抗 *mogR* 的糖基转移酶 *gmaR* 的转录水平则显著升高($P < 0.01$)。除 *fliQ*、*lmo0685*

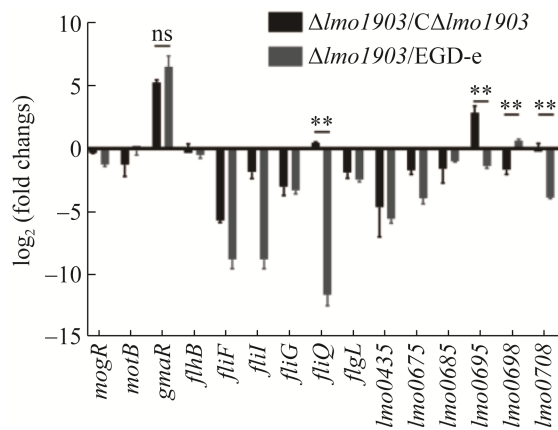


图 7 *lmo1903* 缺失对鞭毛相关基因转录水平的影响

Figure 7 Effects of *lmo1903* on transcriptional level of flagella-associated genes. ns: $P > 0.05$; *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$

和 *lmo0708* 外, 大部分鞭毛相关基因的转录水平在回补株中得到了恢复。表明 *lmo1903* 基因缺失通过影响鞭毛相关基因转录水平介导单增李斯特菌运动能力减弱。

2.8 *lmo1903* 基因氧化应激功能研究

前期的蛋白酶活和定位结果显示, *Lmo1903* 位于胞质中, 具有还原酶学活性, 那么 *Lmo1903* 是否能够抵抗氧化剂的氧化应激呢? 我们以常见的氧化剂 0.5 mmol/L 的氯化铜、0.25 mmol/L 的氯化镉、2 mmol/L 胍(diamine)和 10 mmol/L 双氧水为介质, 分析 *Lmo1903* 在抗氧化应激过程中的作用。结果显示(图 8), 缺失株 *Δlmo1903* 对铜离子的抵抗力低于野生株和回补株, 而对镉离子、胍和双氧水的应激与野生株和回补株相比, 没有显著差异。表明 *Lmo1903* 参与细菌抵抗铜离子介导的氧化应激。

3 讨论与结论

本研究通过同源重组的方法构建了 *lmo1903* 的基因缺失株、回补株, 以及 *Lmo1903* 的蛋白表达菌株和点突变蛋白, 通过胰岛素催

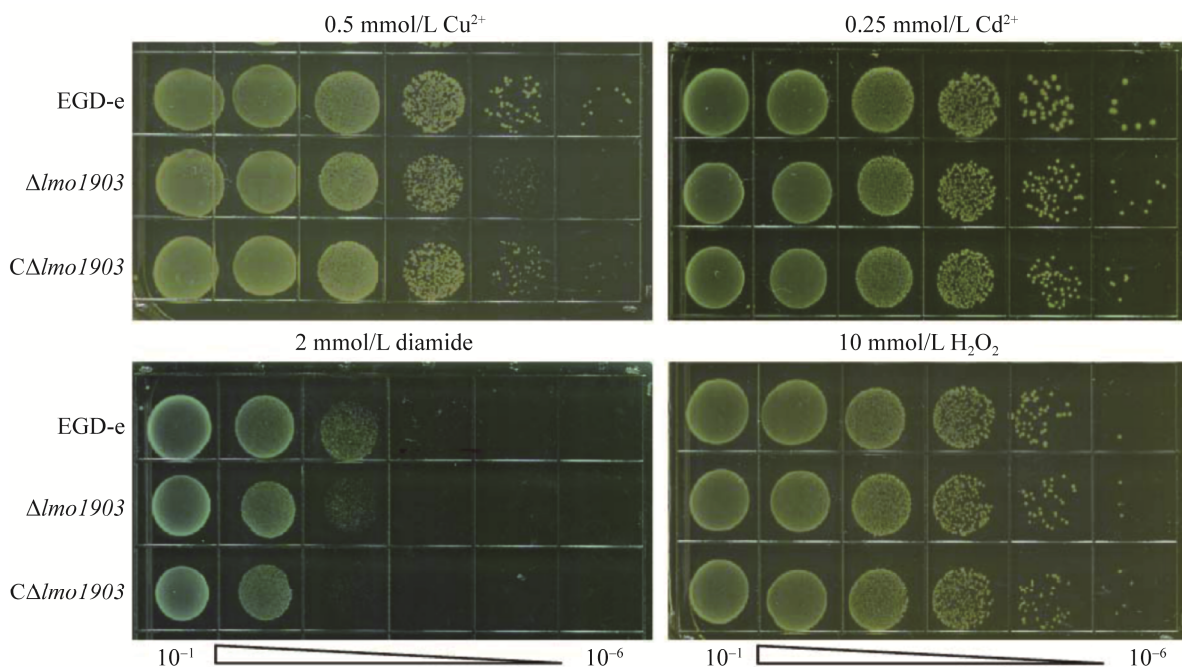


图 8 EGD-e、*Δlmo1903* 和 *CΔlmo1903* 对铜离子、镉离子、胍和双氧水的应激耐受检测

Figure 8 Oxidative resistance of wild-type EGD-e, *Δlmo1903* and *CΔlmo1903* mutant to different concentrations of Cu^{2+} , Cd^{2+} , diamide and H_2O_2 .

化试验对 Lmo1903 蛋白的还原酶学活性进行了分析,并探究了突变株在生长、运动、定位、抵抗外界氧化中的生物学功能。结果显示, Lmo1903 属于硫氧还蛋白家族成员,具有经典的 CX_1X_2C 基序,主要定位于细胞质中,由此推测其具有较低的氧化还原电位,可以催化胰岛素还原,具有还原酶学活性。但是在酶活测定过程中,浓度为 30 $\mu\text{mol/L}$ 的 Lmo1903 蛋白酶活催化效果低于浓度为 10 $\mu\text{mol/L}$ 的 Lmo1903 蛋白,推测可能是由于 Lmo1903 蛋白浓度增加到一定程度时反而抑制蛋白的催化活性造成。同时,也使用 CX_1X_2C 基序中的半胱氨酸残基点突变蛋白进行酶活测定,发现半胱氨酸突变为丝氨酸后,其催化胰岛素还原的能力较 Lmo1903 完整蛋白显著降低,表明 Lmo1903 的还原酶活性受关键位点 CX_1X_2C 影响。我们也使用巯基烷化剂碘乙酸对样品进行标记,使用 H_2O_2 和 DTT 对样品进行不同处理,使用 Lmo1903 抗体作为一抗进行 Western blotting 分析,同样证明 Lmo1903 的半胱氨酸处于还原状态(结果未呈现)。这些结果均表明 Lmo1903 具有还原酶活性。

本实验室前期研究表明,与 Lmo1903 同属硫氧还蛋白家族的 Grx、TrxA、yjbH 以及 Lmo1609 等基因的缺失都显示出了对细菌运动能力的影响。结合本研究中 *lmo1903* 缺失同样引起细菌运动能力减弱,表明硫氧还蛋白与细菌鞭毛基因之间有一定联系^[8-10]。单增李斯特菌鞭毛合成主要受调控因子 MogR 和 GmaR 的控制^[11]。由此,我们通过荧光定量 PCR 方法检测 Lmo1903 是否影响鞭毛运动相关蛋白转录。结果显示,*lmo1903* 基因缺失后 *gamR* 的转录水平较野生株显著上升。GamR 是一种转录抑制因子,通过拮抗鞭毛合成抑制因子 MogR,抑制启动子启动鞭毛相关基因转录,导致鞭毛无法

形成^[12]。据报道 TrxA 可以与 GamR 互作,进而影响鞭毛合成^[13]。已知 GamR 氨基酸序列中含有 2 个半胱氨酸残基,通过二硫键折叠成二聚体形式发挥作用^[14-16],那么 Lmo1903 是否通过还原 GamR 的二聚体发挥作用,进而抑制鞭毛形成,而造成对单增李斯特菌运动能力的影响呢?这还有待进一步研究。

同时研究结果也显示 Lmo1903 缺失后单增李斯特菌对 Cu^{2+} 的抗氧化应激能力降低,表明 Lmo1903 与细菌抵抗 Gu^{2+} 氧化应激相关, Cu^{2+} 是氧化还原活性离子,催化氧化反应,产生活性氧 ROS,保护细胞免受 Cu^{2+} 介导的毒性^[17]。研究报道,金属离子会催化蛋白发生氧化还原,打破胞内氧化还原稳态,引发应激反应,进而改变细胞状态和功能^[18-19]。因此, Lmo1903 对铜离子敏感性减弱,提示其参与介导细菌的感染生物学过程,后续我们将深入研究 Lmo1903 在单增李斯特菌感染过程中发挥的作用。

硫氧还蛋白的特异性活性基序 CX_1X_2C 是多种细菌氧化还原蛋白应对氧化应激的关键活性位点,包括了革兰阴性菌大肠杆菌、枯草芽孢杆菌和革兰阳性菌李斯特菌等。单增李斯特菌 Lmo1903 的活性位点为 CEDC^[7]。结合本实验室前期研究结果发现, Lmo1903 的酶学活性较活性位点为 CGPC 的 TrxA 降低;二者在单增李斯特菌的抗氧化应激过程中发挥的作用也不同, TrxA 对氧化剂胍的敏感性较高,而 Lmo1903 仅对铜离子的抵抗力减弱。胍是巯基特异性氧化剂,铜离子是氧化胁迫性。提示不同的硫氧还蛋白参与介导的氧化应激类型不同,所以硫氧还蛋白发挥功能的不同是否与其活性位点的 X_1X_2 有关,这也是我们下一步研究的要点所在。

细菌的抗氧化应激能力是其成功感染宿主的关键因素,抗氧化应激能力一般与感染能力

成正比。硫氧还蛋白通过参与维持细菌体内氧化还原平衡的机制进而参与细菌不同的生物学过程^[20-23]。那么影响 Lmo1903 还原酶活性的关键位点 C70 和 C73 是否同样影响细菌的抗氧化应激以及对细胞的感染能力, 还有待进一步研究。

综上所述, 我们证明了硫氧还蛋白 Lmo1903 在细菌运动性、抗氧化应激能力方面均发挥着不同的功能。本研究为下一步深入研究氧化还原蛋白介导单增李斯特菌运动和应激生物学机制奠定了基础。

参考文献

- [1] TACK DM, RAY L, GRIFFIN PM, CIESLAK PR, DUNN J, RISSMAN T, JERVIS R, LATHROP S, MUSE A, DUWELL M, SMITH K, TOBIN-D'ANGELO M, VUGIA DJ, ZABLOTSKY KUFEL J, WOLPERT BJ, TAUXE R, PAYNE DC. Preliminary incidence and trends of infections with pathogens transmitted commonly through food-foodborne diseases active surveillance network, 10 U.S. sites, 2016–2019[J]. *MMWR Morbidity and Mortality Weekly Report*, 2020, 69(17): 509-514.
- [2] QUEREDA JJ, MORÓN-GARCÍA A, PALACIOS-GORBA C, DESSAUX C, GARCÍA-DEL PORTILLO F, PUCCIARELLI MG, ORTEGA AD. Pathogenicity and virulence of *Listeria monocytogenes*: a trip from environmental to medical microbiology[J]. *Virulence*, 2021, 12(1): 2509-2545.
- [3] BALSERA M, BUCHANAN BB. Evolution of the thioredoxin system as a step enabling adaptation to oxidative stress[J]. *Free Radical Biology and Medicine*, 2019, 140: 28-35.
- [4] DEPUYDT M, MESSENS J, COLLET JF. How proteins form disulfide bonds[J]. *Antioxidants & Redox Signaling*, 2011, 15(1): 49-66.
- [5] GOPAL S, SRINIVAS V, ZAMEER F, KREFT J. Prediction of proteins putatively involved in the thiol: disulfide redox metabolism of a bacterium (*Listeria*): the CXXC motif as query sequence[J]. *In Silico Biology*, 2009, 9(5/6): 407-414.
- [6] 韩月, 陈雨吉, 罗平, 陈歆丹, 曹启予, 吴宇康, 陈绵绵, 翟瑞东, 周彬, 孙静, 管迟瑜, 程昌勇, 吕晓玲, 宋厚辉. 单核细胞增多性李斯特菌硫氧还蛋白 Lmo1609 的应激生物学功能研究[J]. *微生物学报*, 2022, 62(9): 13343.
- [7] HAN Y, CHEN YJ, LUO P, CHEN XD, CAO QY, WU YK, CHEN MM, ZHAI RD, ZHOU B, SUN J, GUAN CY, CHENG CY, LV XL, SONG HH. Mechanisms of the thioredoxin Lmo1609 from *Listeria monocytogenes* involved in bacterial infection[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2022, 62(9): 13343 (in Chinese).
- [8] CHENG CY, HAN X, XU JL, SUN J, LI K, HAN Y, CHEN MM, SONG HH. YjbH mediates the oxidative stress response and infection by regulating SpxA1 and the phosphoenolpyruvate-carbohydrate phosphotransferase system (PTS) in *Listeria monocytogenes*[J]. *Gut Microbes*, 2021, 13(1): 1884517.
- [9] SUN J, HANG Y, HAN Y, ZHANG X, GAN L, CAI C, CHEN ZW, YANG Y, SONG QJ, SHAO CY, YANG YC, ZHOU YS, WANG XD, CHENG CY, SONG HH. Deletion of glutaredoxin promotes oxidative tolerance and intracellular infection in *Listeria monocytogenes*[J]. *Virulence*, 2019, 10(1): 910-924.
- [10] 韩笑. 单增李斯特菌氧化还原蛋白 YjbH 调控的抗氧化应激和细菌感染机制研究[D]. 杭州: 浙江农林大学硕士学位论文, 2019.
- [11] HAN X. Mechanisms of the putative thioredoxin YjbH from *Listeria monocytogenes* involved in oxidative tolerance and bacterial infection[D]. Hangzhou: Master's Thesis of Zhejiang A&F University, 2019 (in Chinese).
- [12] 董志梅. 单核细胞增多性李斯特菌硫氧还蛋白 TrxA 介导的感染机制研究[D]. 杭州: 浙江农林大学硕士学位论文, 2017.
- [13] DONG ZM. Mechanical study of thioredoxin A involved in *Listeria monocytogenes* infection[D]. Hangzhou: Master's Thesis of Zhejiang A&F University, 2017 (in Chinese).
- [14] CHENG CY, DONG ZM, HAN X, WANG H, JIANG L, SUN J, YANG YC, MA TT, SHAO CY, WANG XD, CHEN ZW, FANG WH, FREITAG NE, HUANG HR, SONG HH. Thioredoxin A is essential for motility and contributes to host infection of *Listeria monocytogenes* via redox interactions[J]. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2017, 7: 287.
- [15] KAMP HD, HIGGINS DE. Transcriptional and post-transcriptional regulation of the GmaR antirepressor governs temperature-dependent control of flagellar motility in *Listeria monocytogenes*[J]. *Molecular Microbiology*, 2009, 74(2): 421-435.
- [16] TAN YF, O'TOOLE N, TAYLOR NL, MILLAR AH. Divalent metal ions in plant mitochondria and their

- role in interactions with proteins and oxidative stress-induced damage to respiratory function[J]. *Plant Physiology*, 2010, 152(2): 747-761.
- [14] ELBEKAI RH, KADI AOS. The role of oxidative stress in the modulation of aryl hydrocarbon receptor-regulated genes by As^{3+} , Cd^{2+} , and Cr^{6+} [J]. *Free Radical Biology and Medicine*, 2005, 39(11): 1499-1511.
- [15] JIAO WX, BAI M, YIN HW, LIU JY, SUN J, SU XX, ZENG HH, WEN JH. Therapeutic effects of an inhibitor of thioredoxin reductase on liver fibrosis by inhibiting the transforming growth factor- β 1/smads pathway[J]. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 2021, 8: 690170.
- [16] 韩月, 叶佳雯, 程昌勇, 宋厚辉. 单增李斯特菌氧化还原蛋白系统研究进展[J]. *微生物学报*, 2021, 61(2): 346-356.
- HAN Y, YE JW, CHENG CY, SONG HH. Thioredoxin system in *Listeria monocytogenes*[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2021, 61(2): 346-356 (in Chinese).
- [17] MOHAMED FA, SHAKER GH, ASKOURA MM. Oxidative stress influences *Pseudomonas aeruginosa* susceptibility to antibiotics and reduces its pathogenesis in host[J]. *Current Microbiology*, 2020, 77(3): 479-490.
- [18] WIKTORCZYK-KAPISCHKE N, SKOWRON K, GRUDLEWSKA-BUDA K, WAŁECKA-ZACHARSKA E, KORKUS J, GOSPODAREK-KOMKOWSKA E. Adaptive response of *Listeria monocytogenes* to the stress factors in the food processing environment[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2021, 12: 710085.
- [19] GHAHREMANI F, SABBAGHZADEH R, EBRAHIMI S, JAVID H, GHAHREMANI J, HASHEMY SI. Pathogenic role of the SP/NK1R system in GBM cells through inhibiting the thioredoxin system[J]. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*, 2021, 24(4): 499-505.
- [20] dos SANTOS PT, THOMASEN RSS, GREEN MS, FÆRGEMAN NJ, KALLIPOLITIS BH. Free fatty acids interfere with the DNA binding activity of the virulence regulator PrfA of *Listeria monocytogenes*[J]. *Journal of Bacteriology*, 2020, 202(15): e00156-e00120.
- [21] VESZELYI K, VARGA V, BESZTERCEI B, NEMETH CE, MARGITTAI E. The role of thioredoxin/thioredoxin reductase system in the redox homeostasis of the endoplasmic reticulum[J]. *Free Radical Biology and Medicine*, 2021, 177: S91-S92.
- [22] OH HB, LEE SJ, YOON SI. Structural and biochemical analyses of the flagellar expression regulator DegU from *Listeria monocytogenes*[J]. *Scientific Reports*, 2022, 12: 10856.
- [23] SMITH V, JOSEFSEN M, LINDBÄCK T, HEGNA IK, FINKE S, TOURASSE NJ, NIELSEN-LEROUX C, ØKSTAD OA, FAGERLUND A. MogR is a ubiquitous transcriptional repressor affecting motility, biofilm formation and virulence in *Bacillus thuringiensis*[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2020, 11: 610650.