

单增李斯特菌 *lmo2300* 介导的氧化应激和感染生物学作用

张晓荟, 高宇杰, 葛同鑫, 王温馨, 许浩男, 宋若菲, 宋厚辉, 程昌勇*, 韩月*

浙江农林大学 动物医学院, 浙江省畜禽绿色生态健康养殖应用技术研究重点实验室, 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, 同一健康和食品安全“一带一路”国际联合实验室, 中澳动物健康大数据分析联合实验室, 浙江 杭州

张晓荟, 高宇杰, 葛同鑫, 王温馨, 许浩男, 宋若菲, 宋厚辉, 程昌勇, 韩月. 单增李斯特菌 *lmo2300* 介导的氧化应激和感染生物学作用[J]. 微生物学报, 2025, 65(9): 3946-3958.

ZHANG Xiaohui, GAO Yujie, GE Tongxin, WANG Wenxin, XU Haonan, SONG Ruofei, SONG Houhui, CHENG Changyong, HAN Yue. Oxidative stress resistance and infection mediated by *lmo2300* of *Listeria monocytogenes*[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2025, 65(9): 3946-3958.

摘要:【目的】研究单增李斯特菌 *lmo2300* 基因在 EGD-e 株抗氧化应激和感染生物学特性中的作用。【方法】以单增李斯特菌 1/2a 血清型 EGD-e 为亲本株, 利用同源重组法构建 *lmo2300* 的缺失株和回补株, 检测 $\Delta lmo2300$ 在体外的生长、运动能力, 对氧化环境的抵抗能力, 还原酶活性, 以及抗生素最小抑菌浓度; 检验突变株感染细胞后的黏附、侵袭、增殖和细胞间迁移能力; 使用荧光定量 PCR 技术检测 *lmo2300* 基因缺失后单增李斯特菌硫氧还蛋白相关基因和主要毒力基因的转录水平变化。【结果】经 PCR 鉴定及测序证明缺失株 $\Delta lmo2300$ 和回补株 C $\Delta lmo2300$ 构建成功。*lmo2300* 基因缺失后, 单增李斯特菌的生长、运动和对抗生素的敏感性均无显著变化, 黏附、侵袭和增殖能力也未受显著影响。*Lmo2300* 具有还原酶活性, $\Delta lmo2300$ 中硫氧还蛋白基因 *lmo1903* 和 *grx* 转录水平显著升高, 对 H_2O_2 、Diamide、 $CdCl_2$ 和 $MnSO_4$ 的氧化应激抵抗能力显著增强; 且该菌细胞间迁移能力显著提高, $\Delta lmo2300$ 中与细胞间迁移相关的 *actA* 基因转录水平上调约 8 倍。【结论】本研究表明 *lmo2300* 在细胞间迁移和抵抗氧化应激中发挥关键作用, 这一发现对于深入理解单增李斯特菌的抗氧化应激和感染生物学机制具有重要意义。

资助项目: 国家重点研发计划(2023YFD1801000); 国家自然科学基金(32473033, 32473026); 浙江省杰出青年科学基金(LR25C180001); 浙江省重点研发计划国际合作项目(2025C04009)

This work was supported by the National Key Research and Development Program of China (2023YFD1801000), the National Natural Science Foundation of China (32473033, 32473026), the Natural Science Foundation of Zhejiang Province for Distinguished Young Scholar (LR25C180001), and the Key Research and Development International Cooperation Program of Zhejiang Province (2025C04009).

*Corresponding authors. E-mail: HAN Yue, yuehan@zafu.edu.cn; CHENG Changyong, lamge@zafu.edu.cn

Received: 2025-02-19; Accepted: 2025-05-08; Published online: 2025-06-20

关键词: 单增李斯特菌; *lmo2300*; 氧化应激; 感染生物学

Oxidative stress resistance and infection mediated by *lmo2300* of *Listeria monocytogenes*

ZHANG Xiaohui, GAO Yujie, GE Tongxin, WANG Wenxin, XU Haonan, SONG Ruofei, SONG Houhui, CHENG Changyong*, HAN Yue*

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

Abstract: [Objective] To investigate the role of *lmo2300* in oxidative stress resistance and infection of *Listeria monocytogenes*. [Methods] With *L. monocytogenes* 1/2 a serotype EGD-e as the parent strain, the *lmo2300*-deleted strain and complementary strain were constructed by homologous recombination. The growth, motility, oxidative stress resistance, minimum inhibitory concentration and reductase activity of $\Delta lmo2300$ were evaluated. The adhesion, invasion, proliferation, and intercellular migration abilities of the $\Delta lmo2300$ strain was assessed using cell models. The transcriptional levels of thioredoxin-related genes and major virulence genes in $\Delta lmo2300$ were detected with RT-qPCR. [Results] PCR identification and DNA sequencing confirmed the successful construction of $\Delta lmo2300$ and $C\Delta lmo2300$. Deletion of *lmo2300* did not affect the bacterial growth, motility, antibiotic susceptibility, adhesion, invasion or intracellular proliferation. However, the *Lmo2300* protein possesses reductase activity, and the transcriptional levels of the thioredoxin gene *lmo1903* and *grx* are significantly upregulated in the $\Delta lmo2300$ mutant. And markedly improved resistance to oxidative substances, including H_2O_2 , diamide, $CdCl_2$, and $MnSO_4$ compared with the wild type. The $\Delta lmo2300$ mutation significantly enhanced intercellular migration ability, accompanied by an approximately 8-fold upregulation of the *actA* gene transcription, which is consistent with the enhanced intercellular migration ability. [Conclusion] This study demonstrates that *lmo2300* plays a critical role in modulating the oxidative stress resistance and intercellular migration of *L. monocytogenes*, providing novel insights into the infection biology and adaptive responses of *L. monocytogenes* to host-derived oxidative challenges.

Keywords: *Listeria monocytogenes*; *lmo2300*; oxidative stress; infection biology

单增李斯特菌(*Listeria monocytogenes*, LM)作为一种常见的食源性病原菌,广泛存在于自然界的土壤、水源中,容易对食品加工、运输

和储存等环节造成污染。该菌可通过破损的皮肤黏膜进入人体内,感染后能够引起李斯特病(listeriosis),高危人群主要包括孕妇、新生儿和

免疫能力低下者, 孕妇感染会引发妊娠中晚期的流产、死胎和早产, 新生儿感染则更易引发败血症和脑膜炎, 死亡率极高^[1]。

食品和卫生安全一直是社会广泛关注的问题。近年来, 不少研究表明细菌的致病力与其对氧化应激的抵抗能力息息相关^[2-3]。氧化胁迫对细菌来说是一种常见的应激环境。细菌在进行有氧呼吸的活动中会不可避免地产生一定量的活性氧(reactive oxygen species, ROS), 活性氧浓度过高时会形成氧化应激环境, 细菌持续暴露在高浓度的活性氧中会对细菌的生存和繁殖造成不利影响, 破坏细菌的新陈代谢^[4]。在医学和工业应用中, 利用氧化应激来抑制或杀死有害细菌是一种常见的策略。例如, 某些抗生素和消毒剂就是通过增加细菌内的活性氧水平来发挥作用的^[5-6]。为了适应氧化胁迫, 细菌也进化出了一些防御机制, 比如抗氧化酶系统、DNA 修复系统、非酶抗氧化剂等^[7-8]。硫氧还蛋白作为一种非酶抗氧化剂, 通过还原二硫键来保证蛋白质免受氧化损伤, 是细菌抵抗氧化应激环境的重要研究对象^[9]。

Lmo2300 在 NCBI 上注释为噬菌体 A118 的终止酶大亚基。蛋白结构模拟也显示 Lmo2300 与枯草芽孢杆菌等种属中的终止酶大亚基相似^[10-12], 但目前关于终止酶大亚基在细菌环境适应中的生物学功能尚未见报道。因此本研究以 EGD-e 为基础构建了 *lmo2300* 基因缺失株及回补株, 并对其部分生物学特性进行了分析, 以期为进一步探究 EGD-e 中的 *lmo2300* 的生物学功能奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

单增李斯特菌 EGD-e 野生株、大肠杆菌 DH5 α 感受态、穿梭型质粒 pKSV7、回补质粒 pIMK2、人源肠上皮细胞(Caco-2)、小鼠单核巨噬细胞(RAW264.7)、小鼠成纤维细胞(L929)均由

本实验室保存。

牛脑心浸出液培养基(brain-heart infusion broth, BHI)购自 Oxoid 公司; 氯化钠、酵母浸出物、胰蛋白胨、琼脂糖、氨苄霉素(ampicillin, Amp)、氯霉素(chloramphenicol, Cm)、青霉素 G (penicillin G, PenG)、卡那霉素(kanamycin, Kana)、庆大霉素(gentamicin, Gent)、DMEM 高糖培养基(Dulbecco's modified eagle medium)、胎牛血清、乙二胺四乙酸(ethylenediaminetetraacetic acid, EDTA)均购自生工生物工程(上海)股份有限公司; HLingene PCR 产物纯化回收试剂盒和 HLingene 质粒提取试剂盒均购自上海惠凌生物技术有限公司; 限制性内切酶 *Bam*H I、*Kpn* I 和 T4 DNA 连接酶均购自 NEB 公司; 二硫苏糖醇(dithiothreitol, DTT)购自 Sigma-Aldrich 公司; 牛胰岛素购自上海源叶生物科技有限公司。

胰蛋白胨大豆琼脂(tryptose soya agar, TSA)半固体培养基: NaCl 0.4 g、胰蛋白胨 0.2 g 和琼脂粉 0.5 g, 用 ddH₂O 定容至 200 mL, 121 °C 灭菌 15 min 后充分摇匀。

1.2 缺失株和回补株的构建

PCR 扩增 *lmo2300* 基因上游片段 513 bp 和下游片段 508 bp, 通过 Overlap PCR 获得融合片段, 经 *Bam*H I 和 *Kpn* I 酶切, 连接至 pKSV7 质粒并转化至大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞中, 用含有氨苄霉素抗性的 LB 平板筛选阳性克隆, 经 PCR 鉴定和 DNA 测序鉴定正确后, 抽提质粒电击转化至 EGD-e 感受态细胞中, 通过氯霉素抗性环境和 42 °C 环境温度刺激目的片段同源重组后, 30 °C 培养细菌去除温敏质粒 pKSV7, 经 PCR 鉴定和 DNA 测序鉴定正确后, 将缺失株命名为 Δ *lmo2300*^[13]。

根据启动子预测网站预测 *lmo2300* 启动子区域, 以 EGD-e 基因组为模板 PCR 扩增含启动子区域的 *lmo2300* 片段 1 495 bp, 将片段与回补质粒 pIMK2 进行酶切连接后热转至大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞中, 经 PCR 鉴定和 DNA 测序

鉴定正确后, 提取该质粒电击转化至 $\Delta lmo2300$ 缺失株感受态细胞中, 利用含有卡那霉素的 BHI 平板筛选阳性克隆, 经 PCR 鉴定和 DNA 测序正确后, 将回补株命名为 $C\Delta lmo2300$ ^[13-14]。以上步骤所需引物均由北京擎科生物科技股份有限公司合成(表 1)。

1.3 生长曲线绘制

将 EGD-e、 $\Delta lmo2300$ 在 BHI 平板上划线复苏, 将 $C\Delta lmo2300$ 在含有卡那霉素的 BHI 平板上划线复苏, 挑取单菌落接种至 BHI 和含卡那霉素抗性的 BHI 液体培养基中, 37 °C、180 r/min 培养 8 h 后, 取 1 mL 菌液 5 000 r/min 离心 5 min, 使用 PBS 洗涤 3 次后重悬菌体, 调整细菌密度为 $OD_{600}=0.6$ (约 2.0×10^9 CFU/mL); 将细菌 1:100 转接至 100 mL 的 BHI 液体培养基中, 混匀后吸取 200 μ L 液体于 96 孔板中, 做 3 次平行, 测量 OD_{600} 数值并记录, 37 °C、180 r/min 培养 12 h, 间隔 1 h 测量菌液 OD_{600} 数值; 绘制细菌生长曲线^[15]。

1.4 细菌运动能力测定

按照 1.3 节的方法准备 $OD_{600}=0.6$ 的菌体。使用微量移液枪吸取 1 μ L 菌液, 穿刺进 TSA 半固体培养基, 置于 37 °C 和 30 °C 微生物恒温培养箱中, 分别培养 24 h 和 48 h。随后使用扫描

仪对细菌运动圈拍照保存, 量取细菌运动圈直径, 使用 GraphPad Prism 5 绘制运动圈直径柱状图并进行统计学分析^[15]。

1.5 单增李斯特菌氧化应激试验

按照 1.3 节的方法准备 $OD_{600}=0.6$ 的菌体, 将菌液 10 倍比稀释至 10^{-6} ; 将灭菌后的 BHI 固体培养基冷却至 40 °C 左右, 配制终浓度分别为 11、12、13 mmol/L 的 H_2O_2 培养基; 终浓度分别为 2、3、4 mmol/L 的 Diamide 培养基; 按照与 Diamide 相同终浓度配制 $ZnSO_4$ 、 $MnSO_4$ 和 $CdCl_2$ 培养基, 混匀后静置冷却; 待平板冷却后, 依次在平板第一列加入 10 μ L 的 10^{-1} 的菌液(约 2.0×10^8 CFU/mL), 第二列加入 10 μ L 的 10^{-2} 的菌液(约 2.0×10^7 CFU/mL), 以此类推。静置风干后置于 37 °C 温箱培养 12–14 h, 取出平板后扫描记录^[16-17]。

1.6 体外胰岛素还原试验

采用经典的胰岛素二硫键还原试验检测蛋白的还原酶活性^[18]。本研究以硫氧还蛋白 TrxA 为阳性对照, 以 10 mmol/L PBS 为阴性对照, 以纯化的 Lmo2300 蛋白为待测蛋白。配制终体积 200 μ L 的还原酶活性反应体系, 其中含有终浓度 2 mmol/L EDTA、1 mmol/L DTT、120 μ mol/L 胰岛素、10 μ mol/L 待测蛋白, 使用 10 mmol/L

表1 本研究所用引物

Table 1 Primers used in this study

Primers name	Primer sequences (5'→3')
<i>lmo2300-a front</i> -UF	TTGCCATTCAATTCATTTCGAG
<i>lmo2300-in</i> -F	GCATCACACGTATGATCGTCTTCTTT
<i>lmo2300-in</i> -R	CGTTCTTCTATGAAGTCGTCTGTTATCAG
<i>lmo2300</i> -UF	CGCGGATCCTTCGTCTACGTTCTCACTGTC
<i>lmo2300</i> -UR	TAGCTAAGGGCGGATAGGGGGGGAAACCTTGA
<i>lmo2300</i> -DF	GTTTCCCCCCCCCTATCCGCCCTTAGCTATGATG
<i>lmo2300</i> -DR	CGGGGTACCGATGGAAGGAAAGCTGATGAAGG
M13-F	GTAAACGACGGCCAGT
M13-R	CAGGAAACAGCTATGAC
<i>lmo2300-Xho</i> I-F	CCGCTCGAGCTAGTATTGAGCCCTAACTTCCT
<i>lmo2300-Sac</i> I-R	CGAGCTCATAGGCGTGTAGCTCTTCTT
pIMK2-Fwd	CTGCCAGGAATTGGGGATCG
pIMK2-Rev	GCTGGGAATTAACCCTCACTAAAGG

PBS 补足 200 μL 并混合均匀后分装至 96 孔板中, 每组实验设置 3 个平行, 室温反应 3 h, 间隔 10 min 检测反应液在 OD_{650} 下的吸光值。

1.7 细菌最小抑菌浓度测定

将 EGD-e、 $\Delta lmo2300$ 、 $C\Delta lmo2300$ 按照 1.3 节的方法培养至对数生长期, 使用细菌比浊仪调整菌液浓度至 0.5 个麦氏单位(约 1.0×10^8 CFU/mL) 备用。根据美国临床和实验室标准化协会(Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI)推荐的药敏试验抗生素选择原则以及《食源性疾病监测工作手册: 2022 年版》^[19]确定抗生素种类, 设置抗生素的首孔浓度均为 32 $\mu\text{g/mL}$, 在 96 孔板第 2–12 列加入 100 μL 的 BHI 液体培养基, 将 200 μL 抗生素加入第 1 列中并向后孔依次进行 2 倍倍比稀释, 第二孔浓度为 16 $\mu\text{g/mL}$, 以此类推至第 11 列, 在 96 孔板第 1–10 列、第 12 列加入 100 μL 菌液, 第 11 列在抗生素中添加空白培养基设置为阴性对照, 第 12 列在菌液中添加空白培养基为阳性对照, 放置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱培养 14–16 h, 比较孔内液体浑浊状态, 菌液浑浊程度小于或等于阴性对照孔, 表明所加药物浓度可抑制孔内细菌生长, 抑制细菌生长所使用的最低药物浓度为最低抑菌浓度(minimum inhibitory concentration, MIC)^[20–21]。

1.8 细菌对 Caco-2 细胞黏附侵袭试验

本研究使用人结肠癌细胞模拟宿主肠道内环境, 将培养好的 Caco-2 细胞按照 2×10^5 CFU/孔的细胞密度铺于 24 孔细胞板内, 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 细胞培养箱培养过夜。

按照 1.3 节的方法准备 $OD_{600}=0.6$ 的菌体, 使用 PBS 稀释至 10^{-2} 后按感染复数(multiplicity of infection, MOI)为 10 感染细胞。于细胞培养箱中分别培养 0.5 h 和 2 h; 0.5 h 后取出细胞板, PBS 洗涤 2 遍, 将 0.25% EDTA 与 ddH₂O 按照 1:2 混合为细胞裂解液, 每孔加入 1 mL 细胞裂解液后置冰上裂解 8 min, 裂解后用移液枪吹下细胞并收集, 涡旋 3–5 min 破碎细胞, 10 倍

倍比稀释后点板计数, 统计黏附细菌量; 1 h 时更换培养基为含 50 $\mu\text{g/mL}$ 庆大霉素的 RPMI 1640 培养基, 继续培养 2 h 后收样, 统计侵袭细菌量^[22]。

1.9 细菌在 RAW264.7 中增殖存活试验

使用含 20% 血清的 DMEM 培养基将 RAW264.7 细胞复苏后按 2×10^5 个/孔的密度铺板于 24 孔细胞板内; 培养细菌和细胞并洗涤调整后, 按感染复数为 0.2 感染细胞, 分别培养 0.5、2、5 和 8 h 收集细菌并统计; 感染后 1 h 将培养液更换为含 50 $\mu\text{g/mL}$ 庆大霉素的 DMEM 培养基, 2 h 后将庆大霉素的浓度降低为 5 $\mu\text{g/mL}$ ^[23]。

1.10 细菌在 L929 细胞中迁移试验

通过 EGD-e、 $\Delta lmo2300$ 、 $C\Delta lmo2300$ 感染小鼠成纤维细胞 L929 后产生的空斑直径、空斑数量分析各菌株在细胞间的迁移能力, 以 $\Delta actA$ 、 Δhly 为阴性对照。

将细菌加至 DMEM 培养基中使细菌终浓度为 2×10^7 CFU/mL, 即以感染复数为 10 进行感染, 将细胞板放置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 细胞培养箱感染 1 h, 中途每隔 15 min 取出细胞板轻柔晃动; 1 h 后培养基更换为含 50 $\mu\text{g/mL}$ 庆大霉素的 DMEM 培养基, 杀除胞外细菌继续培养 1 h; 取出细胞, PBS 洗涤 2 遍, 加入 3 mL 含 0.7% 低熔点琼脂、5 $\mu\text{g/mL}$ 庆大霉素和 20% FBS 的 DMEM 培养基, 超净台中吹干后于细胞培养箱中倒置培养 48 h; 取出细胞板加入 10% 甲醛溶液 37 $^{\circ}\text{C}$ 固定 1 h, 洗去甲醛并去除低熔点琼脂, 放置于 60 $^{\circ}\text{C}$ 烘箱中烘干 30 min, 随后加入 1% 结晶紫染液 300 μL 室温染色 3 h, 使用 ddH₂O 轻柔洗涤细胞板后拍摄照片, 统计空斑直径和数量, 制作直径和数量柱状图, 同时进行数据差异性分析^[24–25]。

1.11 荧光定量检测分析

以 TRIzol 法提取细菌的 RNA, 待检测所提 RNA 的浓度与纯度后将其反转录为 cDNA 置于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 备用。参考王喆设计的毒力基因、硫氧还

蛋白基因荧光定量 PCR 引物和荧光定量 PCR 程序检测基因转录水平变化^[26]。

1.12 统计分析

使用 GraphPad Prism 8.0 进行数据分析, 所有结果均重复 3 次以上, 使用 *t*-test 检验分析各组差异, 结果采用 mean±SD 表示。其中*表示 $0.01 < P < 0.05$, **表示 $P < 0.01$, ***表示 $P < 0.001$, ns 表示 $P > 0.05$ 。

2 结果与分析

2.1 $\Delta lmo2300$ 缺失株和回补株的鉴定结果

以单增李斯特菌野生株 EGD-e 为模板, 使用 *lmo2300-a front*-UF 和 *lmo2300*-DR 引物进行 PCR 验证。结果表明, 野生株条带大小为 2 296 bp, 缺失株条带大小为 1 090 bp, *lmo2300* 缺失株条带大小相较于野生株减少了 1 206 bp (图 1A, 泳道 1 和泳道 2)。使用 *lmo2300-in*-F/R 引物进行 PCR 验证, 突变株无条带(图 1B, 泳道 1 和泳道 2), 表明 $\Delta lmo2300$ 缺失株构建成功。使用 *lmo2300-a front*-UF 和 *lmo2300*-DR 引物进行 PCR 验证, 回补株条带与缺失株相似(图 1A, 泳道 2 和泳道 3)。

使用 *lmo2300-in*-F/R 引物进行 PCR 验证, 野生株和回补株条带大小均为 1 157 bp (图 1B, 泳道 1 和泳道 3), 表明 $\Delta lmo2300$ 缺失株和 $C\Delta lmo2300$ 回补株构建成功。

2.2 *lmo2300* 基因缺失对细菌生长运动能力的影响

通过测定细菌在 12 h 内于 BHI 中的 OD_{600} 数值绘制细菌生长曲线。如图 2A 所示, 在 37 °C BHI 培养环境下 *lmo2300* 突变株的生长能力与 EGD-e 无差异($P > 0.05$)。细菌运动性结果如图 2B 所示, 在 37 °C 条件下野生株和突变株均无运动能力。在 30 °C 条件下培养 24 h 后, 野生株的运动圈直径平均为 18.5 mm, 缺失株的运动圈直径平均为 19.0 mm, 两者无统计学差异; 48 h 后野生株的运动圈直径平均为 58.5 mm, 缺失株的运动圈直径平均为 55.5 mm, 两者无统计学差异。结果表明, $\Delta lmo2300$ 的运动能力与 EGD-e 无明显变化($P > 0.05$, 图 2C)。综上所述, *lmo2300* 基因缺失后细菌的生长能力不受影响, 并且运动能力也无变化, 表明 *lmo2300* 不参与调控细菌的运动和生长能力。

2.3 细菌抗氧化应激能力测定

将 EGD-e、 $\Delta lmo2300$ 和 $C\Delta lmo2300$ 的菌液

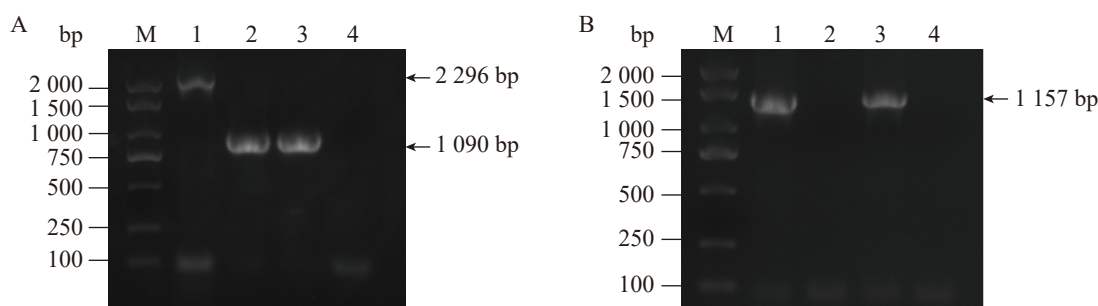


图1 缺失株和回补株PCR鉴定结果。A: 使用外侧引物*lmo2300-a front*-UF和*lmo2300*-DR鉴定缺失株; B: 使用内侧引物*lmo2300-in*-F/R鉴定缺失株和回补株。泳道M、1、2、3和4分别为DL2000 DNA marker、EGD-e、 $\Delta lmo2300$ 、 $C\Delta lmo2300$ 和阴性对照(ddH₂O)。

Figure 1 Identification of the mutant strain and complementation strain with PCR. A: Identification of $\Delta lmo2300$ mutant strain with *lmo2300-a front*-UF and *lmo2300*-DR primer pair; B: Identification of $\Delta lmo2300$ and $C\Delta lmo2300$ strain with *lmo2300-in*-F/R primer pair. Lane M: DL2000 DNA marker; Lane 1: EGD-e; Lane 2: $\Delta lmo2300$; Lane 3: $C\Delta lmo2300$; Lane 4: Negative control (ddH₂O).

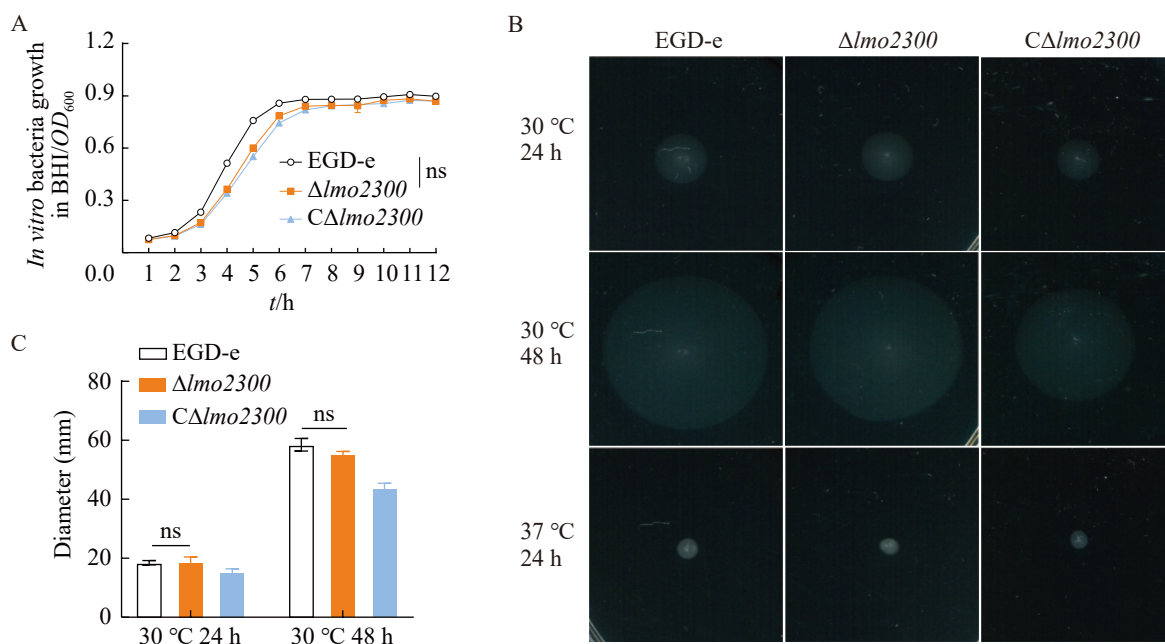


图2 EGD-e、 $\Delta lmo2300$ 、 $C\Delta lmo2300$ 菌株生长和运动能力检测。 A: EGD-e、 $\Delta lmo2300$ 、 $C\Delta lmo2300$ 菌株在BHI培养基中12 h内的生长曲线；B: EGD-e、 $\Delta lmo2300$ 、 $C\Delta lmo2300$ 菌株在半固体琼脂培养基中的运动能力测定；C: 细菌运动圈直径大小差异分析。

Figure 2 Detection of growth and motility ability of EGD-e, $\Delta lmo2300$, and $C\Delta lmo2300$. A: Growth curves of EGD-e, $\Delta lmo2300$, and $C\Delta lmo2300$ during 12 h growth in BHI medium; B: Swimming motility of EGD-e, $\Delta lmo2300$, and $C\Delta lmo2300$ in semi-solid agar; C: Statistical analysis of bacterial motility circle diameter. ns: $P > 0.05$.

倍比稀释后梯度滴加至添加含不同浓度 H_2O_2 、Diamide、 $MnSO_4$ 、 $ZnSO_4$ 、 $CuSO_4$ 和 $CdCl_2$ 的BHI 平板上, 通过观察生长细菌量检测各菌株抵抗氧化胁迫能力。依据能数出菌落的最小稀释梯度统计细菌存活数(图 3)。结果显示, $lmo2300$ 突变株对 $ZnSO_4$ 、 $CuSO_4$ 和 $MnSO_4$ 的抵抗能力较 EGD-e 无差异; 在 2、3、4 mmol/L 的 Diamide 胁迫中, 野生株在稀释梯度为 10^{-6} 时, 平板上的菌落数分别为 1、2 和 2 个, 缺失株的菌落数分别为 22、19 和 8 个, 缺失株对 2、3、4 mmol/L 的 Diamide 的抵抗能力较野生株分别增加了 22 倍、8.5 倍和 4 倍; 在 2 mmol/L、3 mmol/L 的 $CdCl_2$ 胁迫下, 10^{-5} 稀释的野生株的生长菌落数分别为 7 个和 18 个, 缺失株在 10^{-6} 稀释下, 其菌落数均为 9 个, 缺失株对 2 mmol/L、

3 mmol/L 的 $CdCl_2$ 的抵抗能力较野生株分别增加了 13 倍和 6.5 倍; 在 2、3、4 mmol/L 的 $MnSO_4$ 胁迫中, 野生株在 10^{-6} 稀释梯度下的菌落数分别为 2、1 和 2 个, 缺失株的菌落数分别为 7、9 和 6 个, 表明缺失株对 2、3、4 mmol/L 的 $MnSO_4$ 的抵抗能力较野生株分别增加了 3.5 倍、9 倍和 3 倍; 在 11、12、13 mmol/L 的 H_2O_2 胁迫中, 野生株在 10^{-5} 梯度下其菌落数分别为 17、10 和 10 个, 缺失株在 10^{-6} 稀释梯度下其生长菌落数分别为 51、49 和 42 个, 表明缺失株对 11、12、13 mmol/L 的 H_2O_2 的抵抗能力较野生株提高了 25 倍到 40 倍。综上所述, $lmo2300$ 参与细菌抵抗 H_2O_2 、Diamide、 $MnSO_4$ 和 $CdCl_2$ 的氧化胁迫。

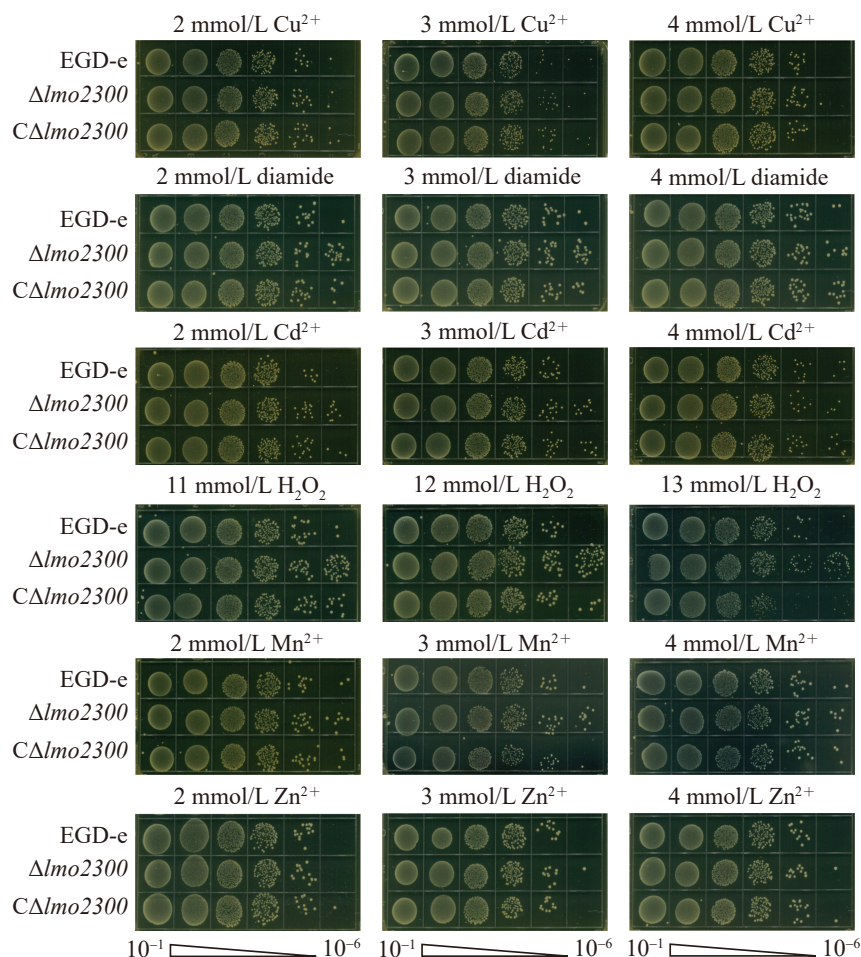


图3 野生株和*lmo2300*突变株对氧化基质的抗应激能力测定

Figure 3 Detection the anti-oxidative stress ability of wild type and *lmo2300* mutants to oxidative substances.

2.4 Lmo2300 还原酶活性测定

酶活测定结果如图 4A 所示, 在反应的 3 h 内 TrxA 蛋白具有较高的还原酶活性, 证明该实验成立。Lmo2300 蛋白在 OD_{650} 下的吸光值显著高于阴性对照组, 表明 Lmo2300 蛋白具有还原酶活性, 能够催化胰岛素还原, 提示 Lmo2300 在细菌氧化应激中发挥作用。

为进一步探究 Lmo2300 如何影响单增李斯特菌抵抗氧化的能力、还原酶活性, 以 16S rRNA 基因作为内参基因, 比较了硫氧还蛋白家族基因 *trxA*、*lmo1609*、*lmo1903* 以及 *grx* 在 $\Delta lmo2300$ 和野生株中的转录水平差异。如图 4B 所示, *lmo1903* 和 *grx* 在 $\Delta lmo2300$ 中的转录水

平较野生株上调了 38 倍和 14 倍, 说明 *lmo2300* 通过上调 *lmo1903* 和 *grx* 基因转录参与细菌抵抗氧化胁迫。

2.5 抗生素敏感性测定

抗生素敏感性结果的判读参考 CLSI M45^[27] 产单核细胞李斯特菌抗菌药物试验结果判断折点。MIC 结果显示, EGD-e、 $\Delta lmo2300$ 对氨苄西林、美罗培南和万古霉素的 MIC 值均分别为 (0.50 ± 0.00) 、 (0.125 ± 0.000) 、 (0.00 ± 0.00) $\mu\text{g/mL}$, 数值均在判定标准的敏感范围内, 即野生株和 $\Delta lmo2300$ 对氨苄西林、美罗培南和万古霉素均敏感。 $\Delta lmo2300$ 对四环素和环丙沙星的 MIC 值分别为 (2.00 ± 1.41) $\mu\text{g/mL}$ 、 (2.00 ± 0.00) $\mu\text{g/mL}$,

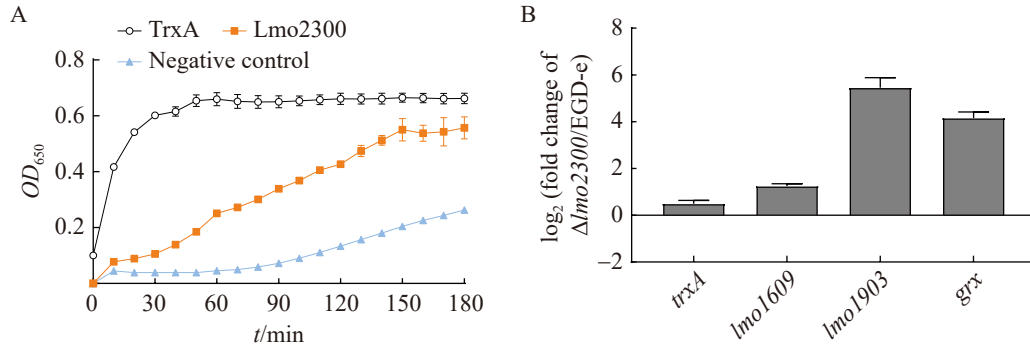


图4 *Lmo2300*蛋白的还原酶活性检测及*lmo2300*缺失对硫氧还蛋白相关基因转录水平的影响。A: *Lmo2300*蛋白的还原酶活性检测; B: *lmo2300*缺失对硫氧还蛋白相关基因转录水平的影响。

Figure 4 *Lmo2300* protein reductase activity detection and $\Delta lmo2300$ thioredoxin-related gene transcription level detection. A: *Lmo2300* protein reductase activity detection; B: $\Delta lmo2300$ thioredoxin-related gene transcription level detection.

EGD-e 对四环素和环丙沙星的 MIC 值分别为 $(4.00 \pm 0.00) \mu\text{g/mL}$ 、 $(2.00 \pm 0.00) \mu\text{g/mL}$ ，即野生株和 $\Delta lmo2300$ 对四环素和环丙沙星的敏感性均为中介(表 2)，表明 *lmo2300* 基因缺失不影响细菌的药物敏感性。

2.6 $\Delta lmo2300$ 的黏附率、侵袭率和增殖能力测定

使用 EGD-e、 $\Delta lmo2300$ 、 $C\Delta lmo2300$ 感染 Caco-2 细胞，以探究 *lmo2300* 基因缺失后在宿主肠道上皮细胞中的黏附和侵袭能力的变化。结果显示，野生株对细胞的黏附率为 5.7%、缺失株为 8.4%，野生株侵袭率为 18.1%、缺失株为 15.8%。黏附率与侵袭率相较于 EGD-e 无统计学差异($P > 0.05$ ，图 5A、5B)。

在对小鼠单核巨噬细胞 RAW264.7 中增殖

能力的研究结果显示， $\Delta lmo2300$ 在 RAW264.7 细胞中的增殖能力较 EGD-e 无显著差异($P > 0.05$ ，图 5C)，表明 *lmo2300* 基因缺失不改变单增李斯特菌在宿主吞噬细胞中的增殖能力。

2.7 $\Delta lmo2300$ 在 L929 细胞中的迁移能力测定

以在 L929 细胞中不形成空斑的 Δhly 、 $\Delta actA$ 为对照，确保实验结果的可靠性。空斑试验结果经统计学分析显示， $\Delta lmo2300$ 产生的空斑大小与野生株相比上升 17.45%，差异极显著(***: $P < 0.001$ ，图 6A、6B)，空斑数量与野生株相比显著上升(*: $0.01 < P < 0.05$ ，图 6A、6C)，结果表明 *lmo2300* 基因参与细菌在胞内的迁移。

为进一步探究 *lmo2300* 介导单增李斯特菌胞内迁移能力增强的原因，以 16S rRNA 作为内

表2 *lmo2300*基因对抗生素耐药性的影响

Table 2 The effect of *lmo2300* gene on antibiotic resistance

Agent	MIC ($\mu\text{g/mL}$)			Standard ($\mu\text{g/mL}$)
	EGD-e	$\Delta lmo2300$	$C\Delta lmo2300$	
氨苄西林 Amp	0.50 ± 0.00	0.50 ± 0.00	0.50 ± 0.00	≤ 2.00 (susceptible)
四环素 TET	4.00 ± 0.00	2.00 ± 1.41	4.00 ± 0.00	0.50–4.00 (intermediate)
美罗培南 MEM	0.125 ± 0.000	0.125 ± 0.000	0.125 ± 0.000	≤ 0.25 (susceptible)
万古霉素 VAN	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	≤ 4.00 (susceptible)
环丙沙星 CIP	2.00 ± 0.00	2.00 ± 0.00	2.00 ± 0.00	2.00 (intermediate)

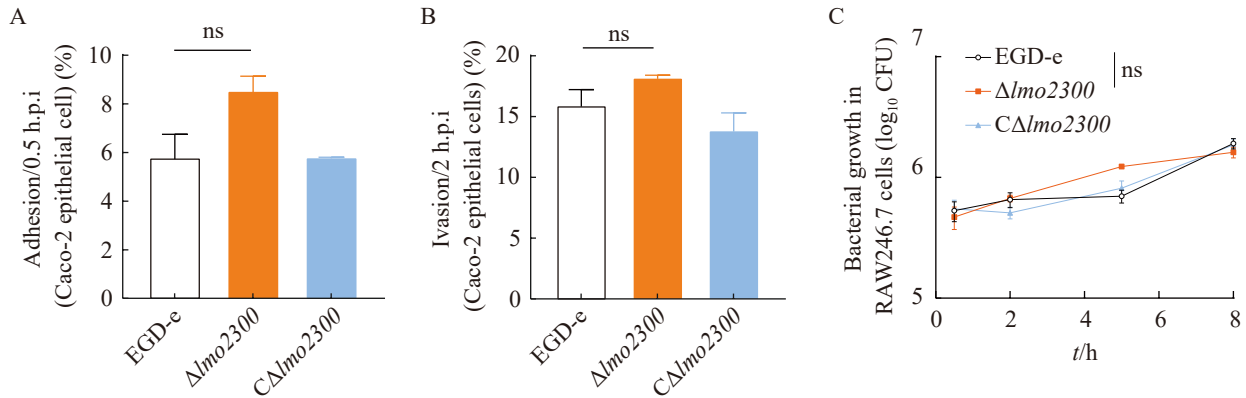


图5 野生株和*lmo2300*突变株感染细胞后黏附、侵袭和增殖能力检测。A: 感染Caco-2细胞后细菌黏附率; B: 感染Caco-2细胞后细菌侵袭率; C: 感染RAW264.7细胞后细菌增殖能力。

Figure 5 The ability of adhesion, invasion and proliferation of wild strain and *lmo2300* mutants were detected. A: Adhesion rate of Caco-2 cells; B: Invasion rate of Caco-2 cells; C: Bacterial proliferation ability after infection with RAW264.7 cells. ns: $P>0.05$.

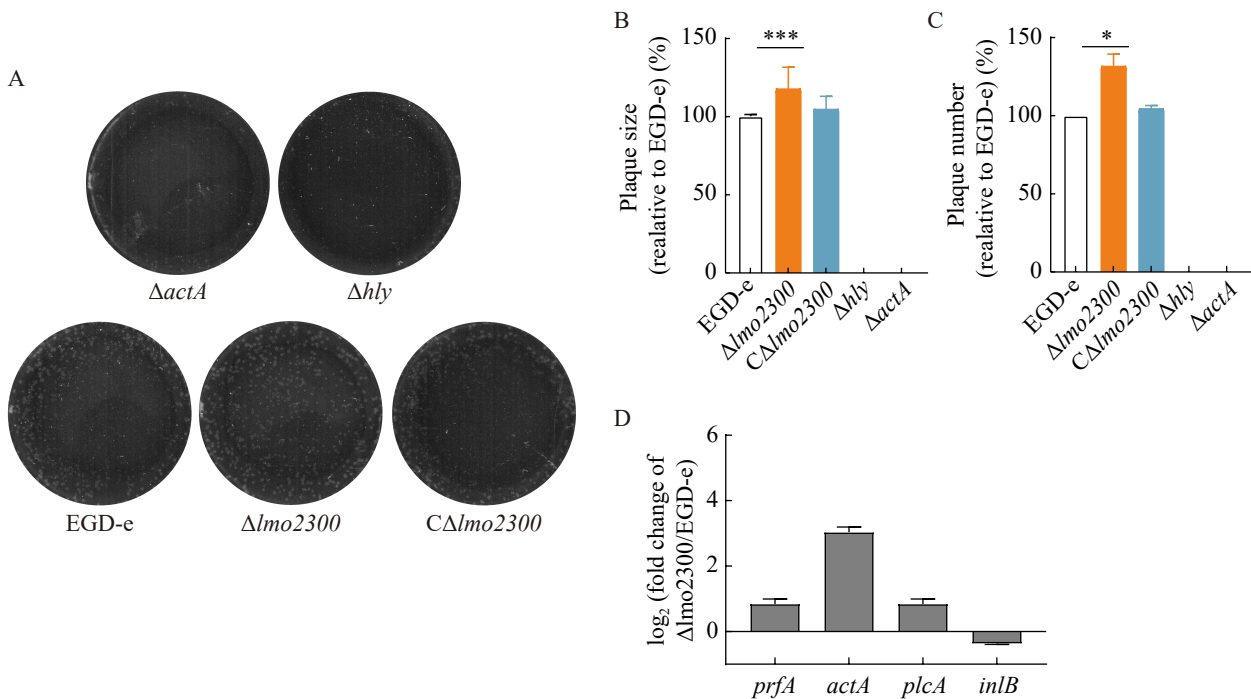


图6 细菌在细胞间迁移能力的检测。A: 野生株、*lmo2300*突变株、 Δhly 和 $\Delta actA$ 在L929细胞中的空斑试验; B: 空斑试验中形成的空斑直径; C: 空斑试验中形成的空斑数量; D: $\Delta lmo2300$ 中毒力相关基因转录水平检测。*表示 $0.01<P<0.05$; ***表示 $P<0.001$ 。

Figure 6 Detection of cell-to-cell migration ability of bacteria. A: Plaque assay in L929 cells with wild strain, *lmo2300* mutant, Δhly and $\Delta actA$; B: Plaque diameter formed in plaque assay; C: Number of plaques formed in plaque assay; D: Detection of transcription levels of virulence-related genes in $\Delta lmo2300$. *: $0.01<P<0.05$; ***: $P<0.001$.

参基因对介导细菌胞间迁移的肌动蛋白 *actA* 和介导细胞膜裂解的磷脂酶蛋白 *plcA* 等毒力因子的转录水平进行检测, 结果如图 6D 所示, *lmo2300* 基因缺失后 *actA* 的转录水平上调 7.5–8.8 倍, 表明 $\Delta lmo2300$ 通过上调 *actA* 的转录水平增强其胞间迁移能力。

3 讨论与结论

单增李斯特菌是一种广泛存在于环境中的细菌, 可以在各种极端环境下生存和增殖, 能够引起李斯特菌病。这种细菌主要通过食物传播, 尤其是未经充分加热的乳制品、肉类、海鲜和即食食品。李斯特菌病对孕妇、新生儿、老年人和免疫系统较弱的人群尤其危险, 可能导致严重的健康问题^[28]。根据其表面抗原的不同, 单增李斯特菌可以分为多个血清型。目前已知的单增李斯特菌血清型有 13 种, 其中血清型 1/2a、1/2b 和 4b 是最常见的与人类疾病相关的血清型^[29-30]。作为其 1/2a 血清型的野生株 EGD-e 备受关注。

本研究通过胰岛素二硫键还原试验发现 *Lmo2300* 具有还原酶活性, 因此推测 *lmo2300* 参与抗氧化应激的生物学过程。本研究构建了 *lmo2300* 的缺失株和回补株, 探究了突变株在生长、运动和抵抗外界环境氧化等方面的生物学功能。结果显示, 在单增李斯特菌中 *lmo2300* 缺失后细菌的抗氧化应激能力增强, 在李斯特菌抵抗氧化应激过程中发挥关键作用。已知硫氧还蛋白家族成员具有催化胰岛素还原的活性^[15]。为进一步探究 *Lmo2300* 介导细菌抗氧化应激的原因, 首先对其是否属于硫氧还蛋白家族成员进行了预测, 发现其不包含硫氧还蛋白标志性序列“CXXC”, 并非硫氧还蛋白家族的一员。为研究该基因是否通过影响硫氧还蛋白家族成员发挥抗氧化应激功能, 随后对 $\Delta lmo2300$ 中的关键硫氧还蛋白家族成员 TrxA、*Lmo1609*、*Lmo1903* 和 Grx 的转录水平进行了测定。结果显示, 缺失 *lmo2300* 后 *Lmo1903* 和 Grx 的转录

水平较野生株显著升高, 由此推测 *Lmo2300* 缺失通过引起硫氧还蛋白家族基因水平上调, 增强其抗氧化应激能力。

本研究发现, *lmo2300* 基因的缺失不仅使细菌抵抗氧化应激的能力增强, 而且使细菌在细胞间的迁移能力显著上升。已知李斯特菌的细胞间迁移能力与肌动蛋白相关。为探究 *lmo2300* 缺失引起胞间迁移能力增强的原因, 研究检测了 $\Delta lmo2300$ 中的 *actA* 的转录水平, 结果显示 *lmo2300* 缺失导致细菌肌动蛋白基因 *actA* 上调, *ActA* 表达受中央毒力调控因子 PrfA 控制^[31]。结合 *Lmo2300* 缺失引起硫氧还蛋白家族基因水平上调, 推测 *Lmo2300* 可能通过硫氧还蛋白系统影响 PrfA 的活性^[32], 间接促进细菌肌动蛋白尾巴的合成, 从而增强其胞间迁移能力。

已知噬菌体终止酶是一种在噬菌体复制过程中起关键作用的蛋白质复合物, 它通常由大亚基和小亚基组成, 噬菌体终止酶大亚基在噬菌体的复制和组装过程中起着至关重要的作用, 确保 DNA 能够被正确地包装到病毒颗粒中, 从而完成病毒的生命周期^[33]。本研究发现 *Lmo2300* 通过上调硫氧还蛋白家族成员和 *actA* 转录水平参与细菌抵抗氧化应激和胞间迁移过程, 这与噬菌体基因与细菌基因之间存在调控互动相吻合^[34-35]。结合本研究结果, 推测 *Lmo2300* 可能通过以下 2 种途径参与细菌感染进程: 其一, 作为氧化还原传感器动态调节硫氧还蛋白系统的活性以维持胞内稳态; 其二, 通过蛋白互作网络影响 *actA* 等毒力效应因子的表达, 从而增强细菌对宿主细胞的侵袭效率。然而, 本研究主线聚焦于表型-基因功能的体外实验体系, 尚未验证 $\Delta lmo2300$ 菌株在宿主体内微环境中的氧化应激耐受性变化及其毒力表型。因此, 后续研究将围绕 2 个关键问题展开: (1) *Lmo2300* 是否通过硫氧还蛋白系统影响 PrfA 的活性? (2) 该基因的缺失是否会改变细菌在肝脾等靶器官中的定殖动力学? 未来研究将整合动物模型, 深度解析 *Lmo2300* 介导的氧化应激-

毒力耦合机制。

作者贡献声明

张晓芸：实验操作，数据收集与监管，论文撰写与修改；高宇杰：协助数据分析；葛同鑫：协助数据收集；王温馨：协助数据监管；许浩男：协助实验操作；宋若菲：协助数据处理；宋厚辉：获取基金，提供试验场地；程昌勇：获取基金，监督管理；韩月：获取基金，论文的修订与审阅。

作者利益冲突公开声明

作者声明不存在任何可能会影响本文所报告工作的已知经济利益或个人关系。

参考文献

- [1] 刘雨晴, 夏菁, 王喆, 费定润, 罗亚如, 陈绵绵, 江玲丽, 宋厚辉, 程昌勇. 单增李斯特菌二硫键形成蛋白 DsbG 介导酸耐受及鞭毛运动性调控[J]. 微生物学报, 2023, 63(2): 700-716.
LIU YQ, XIA J, WANG Z, FEI DR, LUO YR, CHEN MM, JIANG LL, SONG HH, CHENG CY. Role of DsbG in acid tolerance and flagella-mediated motility of *Listeria monocytogenes*[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2023, 63(2): 700-716 (in Chinese).
- [2] ZHANG Y, GUO Q, FANG XW, YUAN M, HU WJ, LIANG XY, LIU J, YANG YY, FANG C. Destroying glutathione peroxidase improves the oxidative stress resistance and pathogenicity of *Listeria monocytogenes*[J]. Frontiers in Microbiology, 2023, 14: 1122623.
- [3] ZHANG LX, LI CX, KAKAR MU, KHAN MS, WU PF, AMIR RM, DAI DF, NAVEED M, LI QY, SAEED M, SHEN JQ, ALI RAJPUT S, LI JH. Resveratrol (RV): a pharmacological review and call for further research[J]. Biomedicine & Pharmacotherapy, 2021, 143: 112164.
- [4] 李格, 孟小庆, 蔡敬, 董婷婷, 李宗芸, 朱明库. 活性氧在植物非生物胁迫响应中功能的研究进展[J]. 植物生理学报, 2018, 54(6): 951-959.
LI G, MENG XQ, CAI J, DONG TT, LI ZY, ZHU MK. Advances in the function of reactive oxygen species in plant responses to abiotic stresses[J]. Plant Physiology Journal, 2018, 54(6): 951-959 (in Chinese).
- [5] KANG Y, XU LL, DONG JR, YUAN X, YE JM, FAN YY, LIU B, XIE JL, JI XY. Programmed microalgae-gel promotes chronic wound healing in diabetes[J]. Nature Communications, 2024, 15: 1042.
- [6] PRAKASH A, DUTTA D. Bicyclomycin generates ROS and blocks cell division in *Escherichia coli*[J]. PLoS One, 2024, 19(3): e0293858.
- [7] CHEN MM, ZHANG JX, XIA J, SUN J, ZHANG X, XU JL, DENG SM, HAN Y, JIANG LL, SONG HH, CHENG CY. *Listeria monocytogenes* GshF contributes to oxidative stress tolerance via regulation of the phosphoenolpyruvate-carbohydrate phosphotransferase system[J]. Microbiology Spectrum, 2023, 11(5): e0236523.
- [8] ARQUÉS JL, RODRÍGUEZ E, NUÑEZ M, MEDINA M. Antimicrobial activity of nisin, reuterin, and the lactoperoxidase system on *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus* in cuajada, a semisolid dairy product manufactured in Spain[J]. Journal of Dairy Science, 2008, 91(1): 70-75.
- [9] PAUNKOV A, KUPC M, SÓKI J, LEITSCH D. Characterization of the components of the thioredoxin system in *Bacteroides fragilis* and evaluation of its activity during oxidative stress[J]. Anaerobe, 2022, 73: 102507.
- [10] LOKAREDDY RK, HOU CD, DOLL SG, LI FL, GILLILAN RE, FORTI F, HORNER DS, BRIANI F, CINGOLANI G. Terminase subunits from the *Pseudomonas*-phage E217[J]. Journal of Molecular Biology, 2022, 434(20): 167799.
- [11] SPROTTE S, RASMUSSEN TS, CHO GS, BRINKS E, LAMETSCH R, NEVE H, VOGENSEN FK, NIELSEN DS, FRANZ CMAP. Morphological and genetic characterization of *Eggerthella lenta* bacteriophage PMBT5[J]. Viruses, 2022, 14(8): 1598.
- [12] WOOD HE, DAWSON MT, DEVINE KM, McCONNELL DJ. Characterization of PBSX, a defective prophage of *Bacillus subtilis*[J]. Journal of Bacteriology, 1990, 172(5): 2667-2674.
- [13] 曹启予. 单增李斯特菌铁摄取调控因子 Fur 调控环境适应和宿主感染的机理研究[D]. 杭州: 浙江农林大学, 2024.
CAO QY. Mechanism of *Listeria monocytogenes* Fur in regulation of bacterial environmental adaptation and host infection[D]. Hangzhou: Zhejiang A&F University, 2024 (in Chinese).
- [14] XIA J, LUO YR, CHEN MM, LIU YQ, WANG Z, DENG SM, XU JL, HAN Y, SUN J, JIANG LL, SONG HH, CHENG CY. Characterization of a DsbA family protein reveals its crucial role in oxidative stress tolerance of *Listeria monocytogenes*[J]. Microbiology Spectrum, 2023, 11(6): e0306023.
- [15] 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 YJ, LÜ XL, HAN Y, LUO P, CAO QY, CHEN XD, WU YK, XU JL, GUAN CY, SONG HH, CHENG CY. The thioredoxin Lmo1903 contributes to oxidative stress tolerance of *Listeria monocytogenes*[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2023, 63(3): 1269-1282 (in Chinese).
- [16] 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, 2017.
DONG ZM. Mechanical study of thioredoxin a involved in *Listeria monocytogenes* infection[D]. Hangzhou: Zhejiang A&F University, 2017 (in Chinese).

- [17] 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.
- [18] 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): 3358-3372.
- HAN Y, CHEN YJ, LUO P, CHEN XD, CAO QY, WU YK, CHEN MM, ZHAI RD, ZHOU B, SUN J, GUAN CY, CHENG CY, LÜ XL, SONG HH. Stress response of the thioredoxin Lmo1609 from *Listeria monocytogenes*[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2022, 62(9): 3358-3372 (in Chinese).
- [19] 中国疾病预防控制中心. 食源性疾病监测工作手册: 2022年版[S]. 北京: 中国疾病预防控制中心, 2022.
- Chinese Center for Disease Control and Prevention. Foodborne disease surveillance manual: 2022 Edition[S]. Beijing: China CDC, 2022 (in Chinese).
- [20] RODRÍGUEZ-MELCÓN C, ALONSO-CALLEJA C, GARCÍA-FERNÁNDEZ C, CARBALLO J, CAPITA R. Minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) for twelve antimicrobials (biocides and antibiotics) in eight strains of *Listeria monocytogenes*[J]. *Biology*, 2021, 11(1): 46.
- [21] 周倩, 郑联, 向婧妹, 黄靖宇, 朱姝, 张德著, 罗信旭, 周黎. 2022年贵州省食品及病人来源单增李斯特菌的抗生素敏感性及其分子特征分析[J]. *中国人兽共患病学报*, 2024, 40(7): 613-619.
- ZHOU Q, ZHENG L, XIANG JS, HUANG JY, ZHU S, ZHANG DZ, LUO XX, ZHOU L. Analysis of drug resistance and molecular characteristics of *Listeria monocytogenes* from food and clinical sources in Guizhou Province in 2022[J]. *Chinese Journal of Zoonoses*, 2024, 40(7): 613-619 (in Chinese).
- [22] POIMENIDOU SV, SKARVELI A, SAXAMI G, MITSOU EK, KOTSOU M, KYRIACOU A. Inhibition of *Listeria monocytogenes* growth, adherence and invasion in Caco-2 cells by potential probiotic lactic acid bacteria isolated from fecal samples of healthy neonates[J]. *Microorganisms*, 2023, 11(2): 363.
- [23] NEIMAN-ZENEVICH J, STUART S, ABDEL-NOUR M, GIRARDIN SE, MOGRIDGE J. *Listeria monocytogenes* and *Shigella flexneri* activate the NLRP1B inflammasome[J]. *Infection and Immunity*, 2017, 85(11): e00338-17.
- [24] TRAVIER L, LECUIT M. *Listeria monocytogenes* ActA: a new function for a 'classic' virulence factor[J]. *Current Opinion in Microbiology*, 2014, 17: 53-60.
- [25] RINEHART E, CHAPMAN J, SUN Y. The production of listeriolysin O and subsequent intracellular infections by *Listeria monocytogenes* are regulated by exogenous short chain fatty acid mixtures[J]. *Toxins*, 2020, 12(4): 218.
- [26] 王喆. 二硫键形成蛋白 DsbA 介导单增李斯特菌氧化应激耐受及胞间迁移的机制研究[D]. 杭州: 浙江农林大学, 2024.
- WANG Z. Mechanism of disulfide bond-formation protein DsbA in oxidative stress tolerance and cell-to-cell spread of *Listeria monocytogenes*[D]. Hangzhou: Zhejiang A&F University, 2024 (in Chinese).
- [27] Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for antimicrobial dilution and disk susceptibility testing of infrequently isolated or fastidious bacteria: approved standard-third edition[S]. Wayne, PA: CLSI, 2016.
- [28] FARALLA C, RIZZUTO GA, LOWE DE, KIM B, COOKE C, SHIOW LR, BAKARDJIEV AI. InlP, a new virulence factor with strong placental tropism[J]. *Infection and Immunity*, 2016, 84(12): 3584-3596.
- [29] SHEN XY, SU Y, HUA Z, CHIU T, WANG YH, MENDOZA M, HANRAHAN I, ZHU MJ. Evaluating serotype-specific survival of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* on wax-coated Granny Smith apples during storage[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2025, 427: 110964.
- [30] KUENNE C, BILLION A, MRAHEIL MA, STRITTMATTER A, DANIEL R, GOESMANN A, BARBUDDHE S, HAIN T, CHAKRABORTY T. Reassessment of the *Listeria monocytogenes* pan-genome reveals dynamic integration hotspots and mobile genetic elements as major components of the accessory genome[J]. *BMC Genomics*, 2013, 14: 47.
- [31] TRAVIER L, GUADAGNINI S, GOUIN E, DUFOUR A, CHENAL-FRANCISQUE V, COSSART P, OLIVOMARIN JC, GHIGO JM, DISSON O, LECUIT M. ActA promotes *Listeria monocytogenes* aggregation, intestinal colonization and carriage[J]. *PLoS Pathogens*, 2013, 9(1): e1003131.
- [32] 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 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.
- [33] DUFFY C, FEISS M. The large subunit of bacteriophage lambda's terminase plays a role in DNA translocation and packaging termination[J]. *Journal of Molecular Biology*, 2002, 316(3): 547-561.
- [34] FITZPATRICK AD, TAYLOR VL, PATEL PH, FAITH DR, SECOR PR, MAXWELL KL. Phage reprogramming of *Pseudomonas aeruginosa* amino acid metabolism drives efficient phage replication[J]. *mBio*, 2025, 16(3): e0246624.
- [35] DERDOURI N, GINET N, DENIS Y, ANSALDI M, BATTESTI A. The prophage-encoded transcriptional regulator AppY has pleiotropic effects on *E. coli* physiology[J]. *PLoS Genetics*, 2023, 19(3): e1010672.