

单核增生李斯特氏菌LPXTG基序锚定蛋白Lmo0130的感染生物学作用

邓思敏, 葛泓睿, 单■, 毛敏杰, 徐加利, 夏菁, 宋厚辉*, 程昌勇*

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

邓思敏, 葛泓睿, 单■, 毛敏杰, 徐加利, 夏菁, 宋厚辉, 程昌勇. 单核增生李斯特氏菌 LPXTG 基序锚定蛋白 Lmo0130 的感染生物学作用[J]. 微生物学报, 2025, 65(9): 4188-4197.

DENG Simin, GE Hongrui, SHAN Yan, MAO Minjie, XU Jiali, XIA Jing, SONG Houhui, CHENG Changyong. Infection ability of LPXTG motif-anchored protein Lmo0130 in *Listeria monocytogenes*[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2025, 65(9): 4188-4197.

摘要:【目的】为了探究 LPXTG 基序锚定蛋白 Lmo0130 对单核增生李斯特氏菌 EGD-e 在感染致病中的影响, 比较该菌 EGD-e、*lmo0130* 基因缺失株和回补株在生长、细胞和宿主感染等方面的差异。【方法】构建单核增生李斯特氏菌 *lmo0130* 基因缺失株 $\Delta lmo0130$ 和回补株 $C\Delta lmo0130$, 探究 Lmo0130 对单核增生李斯特氏菌的生长能力、细胞表面的细菌黏附与侵袭能力、细胞内的细菌增殖能力、细胞间的迁移能力, 以及感染小鼠的存活能力和细菌定殖能力等方面的影响, 从而阐明 Lmo0130 对单核增生李斯特氏菌在细胞和宿主感染中的作用。【结果】LPXTG 基序锚定蛋白 Lmo0130 有助于单核增生李斯特氏菌在细胞表面的黏附与侵袭、在细胞内的增殖、在感染小鼠组织中的定殖, 并最终有助于在小鼠中的致病力, 但对该菌的生长和胞间迁移能力无显著影响。【结论】本研究阐明了 Lmo0130 在单核增生李斯特氏菌感染细胞和宿主中的作用。

关键词: LPXTG 基序锚定蛋白 Lmo0130; 感染致病; 胞内增殖; 单核增生李斯特氏菌

资助项目: 国家重点研发计划(2023YFD1801800); 国家自然科学基金(32473026, 32302961); 2025年浙江省大学生科技创新活动计划暨新苗人才计划资助项目(2025R412A011); 2025年浙江省大学生创新训练项目

This work was supported by the National Key Research and Development Program of China (2023YFD1801800), the National Natural Science Foundation of China (32473026, 32302961), the Zhejiang University Students' Scientific and Technological Innovation Project in 2025 (2025R412A011), and the College Students' Innovative Entrepreneurial Training Plan Program in Zhejiang Province in 2025.

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

Received: 2025-03-06; Accepted: 2025-03-31; Published online: 2025-05-30

Infection ability of LPXTG motif-anchored protein Lmo0130 in *Listeria monocytogenes*

DENG Simin, GE Hongrui, SHAN Yan, MAO Minjie, XU Jiali, XIA Jing, SONG Houhui*, CHENG Changyong*

Key Laboratory of Applied Technology on Green-Eco-Healthy on 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, Zhejiang A&F University, Hangzhou, Zhejiang, China

Abstract: [Objective] To investigate the role of *Listeria monocytogenes* LPXTG motif-anchored protein Lmo0130 in infection causing diseases, the bacterial growth, infection in cell and host among the *L. monocytogenes* wild-type, *lmo0130*-deleted and *lmo0130*-complementary strains were compared. **[Methods]** The *lmo0130*-deleted strain $\Delta lmo0130$ and *lmo0130*-complementary strain $C\Delta lmo0130$ were constructed to investigate the effects of Lmo0130 on the abilities of bacterial growth, cell surface adhesion and invasion, intracellular proliferation, intercellular migration, survival of infected mice, and bacterial load in mouse organs, ultimately demonstrated the role of *L. monocytogenes* Lmo0130 in cell and host infection. **[Results]** LPXTG motif-anchored protein Lmo0130 contributed to cell surface adhesion and invasion, intracellular proliferation, specific colonization in the liver and spleen, and pathogenicity in mice. However, it had no effect on bacterial growth or intercellular migration. **[Conclusion]** Lmo0130 contributes to cell and host infection of *L. monocytogenes* finally.

Keywords: LPXTG motif-anchored protein Lmo0130; infection causing diseases; intracellular proliferation; *Listeria monocytogenes*

食源性胞内致病菌单核增生李斯特氏菌 (*Listeria monocytogenes*) 是重要的革兰氏阳性菌, 也是引起人类食物中毒性死亡的第三大病原微生物^[1-2]。单核增生李斯特氏菌经受污染的食物进入感染机体后, 通过裂解吞噬泡进入细胞质中并大量增殖, 进而在细胞间传播^[3-4], 甚至突破血脑屏障或孕妇的胎盘屏障, 引发孕妇流产, 幼儿、老人和免疫力低下者脑膜炎和败血症等临床症状, 病死率高达 30%^[5-6]。单核增生李斯特氏菌表达多种表面蛋白和分泌蛋白参与单核增生李斯特氏菌感染宿主的细胞表面黏附、细胞侵袭、细胞内增殖和细胞间传播等过程^[7-8]。

其中 LPXTG 基序锚定蛋白是羧基端带有 LPXTG 保守基序的一类蛋白质, 通过 SrtA 分选酶将其共价结合到细胞壁肽聚糖上, 并呈现在细菌表面。这类表面蛋白在感染机体过程中发挥重要的毒力作用, 如重要毒力因子 InlA^[1,9]、Vip^[10]和 LapB^[11]。在单核增生李斯特氏菌 EGD-e 的全基因组中发现 41 个 LPXTG 基序锚定蛋白^[12-13], 且其中多个 LPXTG 基序锚定蛋白的感染生物学功能和机制未知。

本研究通过比较单核增生李斯特氏菌 EGD-e、缺失株 $\Delta lmo0130$ 和回补株 $C\Delta lmo0130$ 在生长、细胞和宿主感染等方面的差异, 明确 LPXTG 基

序锚定蛋白 Lmo0130 在单核增生李斯特氏菌感染致病中的作用,旨在为进一步解析 Lmo0130 介导的感染机制奠定理论基础。

1 材料与方法

1.1 菌株、质粒和引物

单核增生李斯特氏菌参考菌株 EGD-e、缺失株 $\Delta lmo0130$ 和回补株 $C\Delta lmo0130$ 培养于牛脑心浸出液肉汤培养基(brain heart infusion, BHI)中,在 37 °C 摇床或生化培养箱中振荡或静置培养。

本研究所涉及引物见表 1。

1.2 $\Delta lmo0130$ 缺失株和 $C\Delta lmo0130$ 回补株的构建和筛选

基于无痕基因敲除原理构建单核增生李斯特氏菌基因缺失株^[14]。以 *lmo0130*-up-F/R 和 *lmo0130*-down-F/R (表 1)为引物,以过夜培养的单核增生李斯特氏菌 EGD-e (GenBank 登录号: NC_003210.1)菌液作为基因组 DNA 模板进行 PCR 反应分别扩增 *lmo0130* 基因的上、下游同源臂。PCR 反应体系(50 μ L): 2 $\times$ KOD OneTM PCR Master Mix 25 μ L, 上、下游引物(10 μ mol/L)各 2 μ L, DNA 模板 2 μ L, ddH₂O 19 μ L。PCR 反应条件: 98 °C 预变性 5 min; 98 °C 变性 10 s,

58 °C 退火 5 s, 72 °C 延伸 1 s, 35 个循环; 72 °C 终延伸 7 min。以 *lmo0130*-up-F 和 *lmo0130*-down-R 为引物,以 *lmo0130* 基因的上、下游同源臂扩增产物各 1 μ L 为基因组 DNA 模板,参照上述 PCR 反应体系和条件通过重叠 PCR 获得上下游同源臂融合片段。该融合片段经 *Hind* III 和 *Eco*R I 双酶切后构建至 pKSV7 质粒中获得重组质粒 pKSV7_ *lmo0130*。随后将该重组质粒电转至单核增生李斯特氏菌 EGD-e 感受态中,通过温度和 *Cm*^r (10 μ g/mL)抗性双重选择压力下进行同源重组克隆的筛选,并用引物 *lmo0130*-front-F/*lmo0130*-down-R (表 1)对筛选出的重组单克隆进行 PCR 和测序双重验证,最终获得缺失菌株 $\Delta lmo0130$ 。

通过 biocyc 数据库查明单核增生李斯特氏菌 *lmo0130* 基因为单转录本,参考文献[14]构建回补株。设计引物 $C\Delta lmo0130$ -F/R (表 1)扩增 *lmo0130* 的启动子和开放阅读框。扩增产物经 *Sac* I 和 *Bam*H I 双酶切后构建至 pIMK2 质粒中获得重组质粒 pIMK2_ *lmo0130*。将该质粒电转至 $\Delta lmo0130$ 感受态中,通过卡那霉素(50 μ g/mL)抗性筛选,并对筛选出的单克隆经菌落 PCR 和测序验证后最终获得回补株 $C\Delta lmo0130$ 。

通过 *lmo0130*-in-F/R 和 *lmo0130*-out-F/R

表1 引物序列信息

Table 1 Primers used in this study

Primers name	Primer sequences (5'→3')
<i>lmo0130</i> -up-F	CCCAAGCTTGCTGCTTGCTACATAATGCGCC
<i>lmo0130</i> -up-R	CAATCCAGCTGTATCAAATTTGTTCACTTTCACACTCTCCCTTTT
<i>lmo0130</i> -down-F	AAAGTGAACAAATTTGATACAGCTGGATTGGCAACTGTATTTG
<i>lmo0130</i> -down-R	CCGGAATTCCACGGAATGAATGATCGTGGAATGAAGAAA
<i>lmo0130</i> -front-F	CCGCGATAGCAAGTTCGGTTATTTTC
$C\Delta lmo0130$ -F	GGGGATCGGAATTCGAGCTCTTCAAGAAAACACTACACATGTTTTACTCGTAGCAG
$C\Delta lmo0130$ -R	GCAGCCCGGGGGATCCACCAGTTGTTGGTAAGGAAGTATTGG
<i>lmo0130</i> -in-F	TTTTTTCCATCGAAATGAAAATATAGCCAAATTTTATCATTACA
<i>lmo0130</i> -in-R	AGGGTGTTCCAGGAAGCTGG
<i>lmo0130</i> -out-F	TGACAATGCTATCCGTGTTCAAGC
<i>lmo0130</i> -out-F	AGGGTGTTCCAGGAAGCTGG

(表 1)基因内外引物对 $\Delta lmo0130$ 和 $C\Delta lmo0130$ 进行 PCR 鉴定。

1.3 生长曲线的绘制和菌落计数

参考文献[15]比较单核增生李斯特氏菌各菌株生长曲线的差异。过夜培养的菌液调整至相同 OD_{600} 吸光值后转接至新鲜培养基中培养 12 h, 并每隔 1 h 用多功能酶标仪 SynergyTM H1 测定 OD_{600} 吸光值。每个菌株设置 3 个重复。

1.4 细菌黏附与侵袭试验

参考文献[16]探究 Lmo0130 对单核增生李斯特氏菌在人肠上皮细胞 Caco-2 上黏附和侵袭的影响。培养到 OD_{600} 为 0.6 的单核增生李斯特氏菌菌液经 1×PBS (10 mmol/L)洗涤 2 次后用 RPMI 1640 细胞培养基稀释至 2×10^6 CFU/mL 备用。稀释后的菌液以感染复数(multiplicity of infection, MOI)=10 感染人肠上皮细胞 Caco-2。感染 30 min 后洗涤细胞 3 次, 裂解细胞并倍比稀释后涂布于 BHI 平板上计数, 黏附率计算如公式(1)所示。

黏附率=黏附后细菌数/感染前细菌数×100% (1)

感染 1.5 h 后, 加入 50 μ g/mL 庆大霉素的作用 30 min 杀灭胞外菌, 随后洗涤细胞 3 次, 并裂解细胞计数, 侵袭率计算如公式(2)所示。

侵袭率=侵袭后细菌数/感染前细菌数×100% (2)

1.5 胞内增殖试验

参考文献[17]探究 Lmo0130 对单核增生李斯特氏菌在小鼠巨噬细胞 RAW264.7 中增殖能力的影响。培养到 OD_{600} 为 0.6 的单核增生李斯特氏菌菌液, 经 1×PBS (10 mmol/L)洗涤 2 次后用 DMEM 细胞培养基稀释至 5×10^6 CFU/mL。稀释后的菌液以 MOI=10 感染 RAW264.7 细胞。感染 30 min 后用 50 μ g/mL 庆大霉素处理 30 min。处理后的细胞洗涤 3 次后用含 5 μ g/mL 庆大霉素的 DMEM 培养基(含 10% FBS)继续培养 1、4 和 7 h, 然后裂解细胞进行倍比稀释并涂布在 BHI 平板上进行细菌计数。

1.6 细菌空斑试验

参考文献[14]探究 Lmo0130 对单核增生李斯特氏菌在小鼠成纤维细胞 L929 间迁移的影响。培养到 OD_{600} 为 0.6 的单核增生李斯特氏菌菌液, 经 1×PBS 洗涤 2 次后用 DMEM 细胞培养基稀释至 2×10^5 CFU/mL。稀释后的菌液以 MOI=0.2 在 6 孔板中感染 L929 细胞。感染后的细胞继续培养 1 h 并在期间不时晃动细胞板使细菌分布均匀。随后洗涤细胞 3 次, 加入 50 μ g/mL 庆大霉素处理细胞 1 h 用于杀灭胞外细菌。洗涤细胞 3 次, 然后加入 3 mL 含 10 μ g/mL 庆大霉素和 10% FBS 的无酚红 DMEM 培养基与 0.7% 低熔点琼脂糖充分混匀后配制成的细胞覆盖琼脂, 待琼脂凝固后倒置细胞板继续培养 3 d 直至空斑出现。将细胞经 40% 甲醛溶液固定和 0.5% 结晶紫染色 10 min, 再用 ddH₂O 冲洗后测定空斑数量和大小。

1.7 细菌存活和组织定殖试验

参考文献[18]探究 Lmo0130 对单核增生李斯特氏菌感染小鼠存活能力和小鼠脏器中细菌定殖能力的影响。过夜培养的单核增生李斯特氏菌用 1×PBS 洗涤并稀释至 1×10^7 CFU/mL 备用。每只 6 周龄的雌性 ICR 小鼠腹腔注射 200 μ L 稀释后的菌液, 每组 7 只, 共 21 只。感染 24 h 和 48 h 后, 采集小鼠的脾脏(spleen)和肝脏(liver)进行组织匀浆, 随后将组织悬液倍比稀释后涂布在 BHI 平板上进行细菌计数, 每组去除最高值和最低值后进行数据处理。

腹腔注射 200 μ L 稀释后的 1×10^7 CFU/mL 单核增生李斯特氏菌菌液感染雌性 ICR 小鼠, 10 只/组, 共 30 只, 感染后每隔 12 h 观察小鼠的存活情况并记录数据, 共观察 7 d。动物实验通过浙江农林大学实验动物伦理委员会审查, 编号: ZAFUAC202482。

1.8 数据统计与处理

使用 Graphpad Prism 8.0 进行数据处理和显著性分析。除小鼠存活曲线采用 LogRank 以外,

其余均采用 *T* 检验进行显著性分析, 其中 ns 表示 $P>0.05$, * 表示 $0.01<P<0.05$, ** 表示 $0.001<P<0.01$, *** 表示 $P<0.001$ 。使用 Adobe Illustrator 2025 进行图片排版。

2 结果与分析

2.1 单核增生李斯特氏菌缺失株 $\Delta lmo0130$ 和回补株 $C\Delta lmo0130$ 的构建

将筛选到的缺失株和回补株利用内部引物 *lmo0130*-in-F/R 和外部引物 *lmo0130*-out-F/R (表 1) 进行菌落 PCR 验证。如图 1 所示, 当用外部引物进行 PCR 扩增时, 以 EGD-e 为模板扩增出 732 bp 的 PCR 产物, 以缺失菌株 $\Delta lmo0130$ 和回补菌株 $C\Delta lmo0130$ 为模板扩增产物大小仅为 282 bp; 当用内部引物进行 PCR 扩增时, 以 EGD-e 和 $C\Delta lmo0130$ 为模板扩增出 492 bp 的 PCR 产物, 而以 $\Delta lmo0130$ 为模板未扩增出明显条带。进一步将扩增产物进行 DNA 测序验证, 测序结果与目的序列比对一致, 表明 $\Delta lmo0130$ 缺失株和 $C\Delta lmo0130$ 回补株构建成功。

2.2 Lmo0130 对单核增生李斯特氏菌生长的影响

测定单核增生李斯特氏菌在 37 °C BHI 肉汤

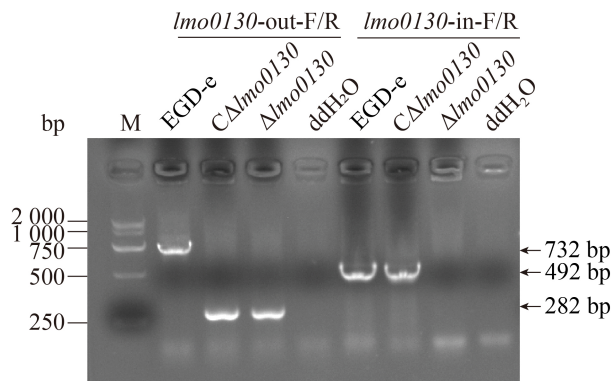


图1 单核增生李斯特氏菌EGD-e、 $\Delta lmo0130$ 和 $C\Delta lmo0130$ 的菌落PCR验证

Figure 1 The confirmation of *Listeria monocytogenes* EGD-e, $\Delta lmo0130$ and $C\Delta lmo0130$ strains by bacterial colony PCR. M: DNA marker.

中生长 0–12 h 的 OD_{600} 吸光值, 发现 Lmo0130 不影响单核增生李斯特氏菌的生长(图 2)。

2.3 Lmo0130 有助于单核增生李斯特氏菌对细胞的黏附和侵袭

利用人肠上皮细胞 Caco-2 探究 Lmo0130 对单核增生李斯特氏菌黏附和侵袭细胞的影响。与 EGD-e 和 $C\Delta lmo0130$ 相比, 感染 0.5 h 时的 $\Delta lmo0130$ 黏附率显著下降了 68.21% 和 54.02% (图 3A); 感染 1.5 h 时的 $\Delta lmo0130$ 侵袭率显著下降了 77.80% 和 71.31% (图 3B)。可见, 缺失 *lmo0130* 基因显著降低单核增生李斯特氏菌的黏附和侵袭能力。因此 Lmo0130 有助于单核增生李斯特氏菌对细胞的黏附和侵袭。

2.4 Lmo0130 有助于单核增生李斯特氏菌在小鼠巨噬细胞 RAW264.7 中的增殖

比较单核增生李斯特氏菌 EGD-e、 $\Delta lmo0130$ 和 $C\Delta lmo0130$ 在 RAW264.7 细胞中增殖能力的差异。单核增生李斯特氏菌在感染 0.5、2、5 和 8 h 时, 胞内细菌数呈明显上升趋势; 在 0.5–5 h 之间, EGD-e、 $\Delta lmo0130$ 和 $C\Delta lmo0130$ 在 RAW264.7 中细菌数无显著差异; 而在感染 8 h 时, RAW264.7 细胞中 $\Delta lmo0130$

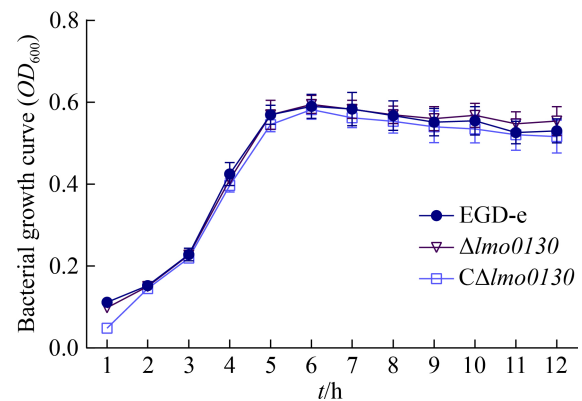


图2 比较单核增生李斯特氏菌EGD-e、 $\Delta lmo0130$ 和 $C\Delta lmo0130$ 的生长水平差异

Figure 2 The comparison of growth abilities among *Listeria monocytogenes* EGD-e, $\Delta lmo0130$, and $C\Delta lmo0130$ strains.

细菌数显著低于 EGD-e 和 $C\Delta lmo0130$ (图 4A), EGD-e 和 $C\Delta lmo0130$ 的增殖率分别是 $\Delta lmo0130$ 的 1.93 倍和 2.61 倍(图 4B)。因此 Lmo0130 有助于单核增生李斯特氏菌在小鼠巨噬细胞 RAW264.7 中的增殖。

2.5 Lmo0130 不影响单核增生李斯特氏菌在细胞间的迁移能力

探究 Lmo0130 对单核增生李斯特氏菌在小鼠成纤维细胞 L929 间迁移能力的影响。在单核增生李斯特氏菌 EGD-e、 $\Delta lmo0130$ 和 $C\Delta lmo0130$ 的

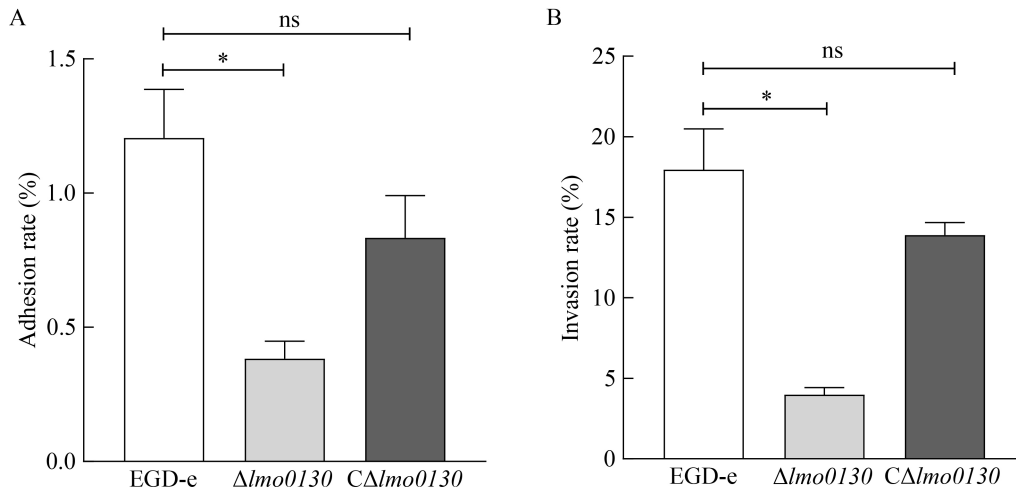


图3 比较单核增生李斯特氏菌EGD-e、 $\Delta lmo0130$ 和 $C\Delta lmo0130$ 的黏附(A)和侵袭(B)能力

Figure 3 The comparison of adherence (A) and invasion (B) abilities among *Listeria monocytogenes* EGD-e, $\Delta lmo0130$, and $C\Delta lmo0130$ in Caco-2 cells. *: $0.01 < P < 0.05$; ns: $P > 0.05$.

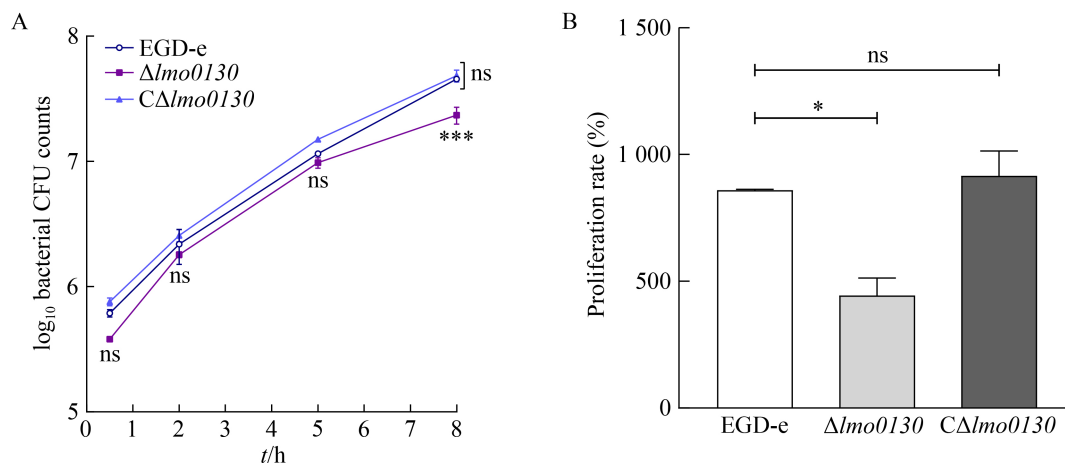


图4 比较单核增生李斯特氏菌EGD-e、 $\Delta lmo0130$ 和 $C\Delta lmo0130$ 在RAW264.7中增殖能力的差异。A: 胞内细菌数; B: 感染8 h后的增殖率。

Figure 4 The comparison of proliferation abilities among *Listeria monocytogenes* EGD-e, $\Delta lmo0130$, and $C\Delta lmo0130$ in RAW264.7 cells. A: Bacterial counts in cell; B: Proliferation abilities after 8 hours infection. *: $0.01 < P < 0.05$; ***: $P < 0.001$; ns: $P > 0.05$.

感染孔中均可见均匀分布的蚀斑(图 5A), 且 Lmo0130 不影响蚀斑数目和大小(图 5B、5C), 因此 Lmo0130 不影响该菌在小鼠成纤维细胞 L929 中的胞间迁移能力。

2.6 Lmo0130 有助于单核增生李斯特氏菌对小鼠的致病力

通过小鼠感染模型来探究 Lmo0130 对单核增生李斯特氏菌致病力的影响。在小鼠存活试验中, 每隔 12 h 观察腹腔注射感染单核增生李斯特氏菌小鼠的存活情况。结果发现(图 6A), 在感染后 60 h 感染 EGD-e、 Δ lmo0130 和 C Δ lmo0130

的小鼠存活率分别为 70%、90% 和 80%; 在感染 80 h 后, 感染 EGD-e 和 C Δ lmo0130 的小鼠存活率分别降低了 30% 和 50%, 而感染 Δ lmo0130 小鼠的存活率仅降低了 10%。这表明 lmo0130 基因缺失显著提高了感染小鼠的存活能力。小鼠组织载菌量试验结果发现, 感染单核增生李斯特氏菌 24 h 时, 各菌株在小鼠肝脏和脾脏中的定殖能力无显著差异; 而在感染 48 h 时, 与 EGD-e 和 C Δ lmo0130 相比, 感染 Δ lmo0130 的小鼠肝脏载菌量分别下降了 84.98% 和 61.60%, 小鼠脾脏载菌量分别下降了 95.21% 和 84.37% (图 6B)。这表明 lmo0130 基因缺失后使感染小

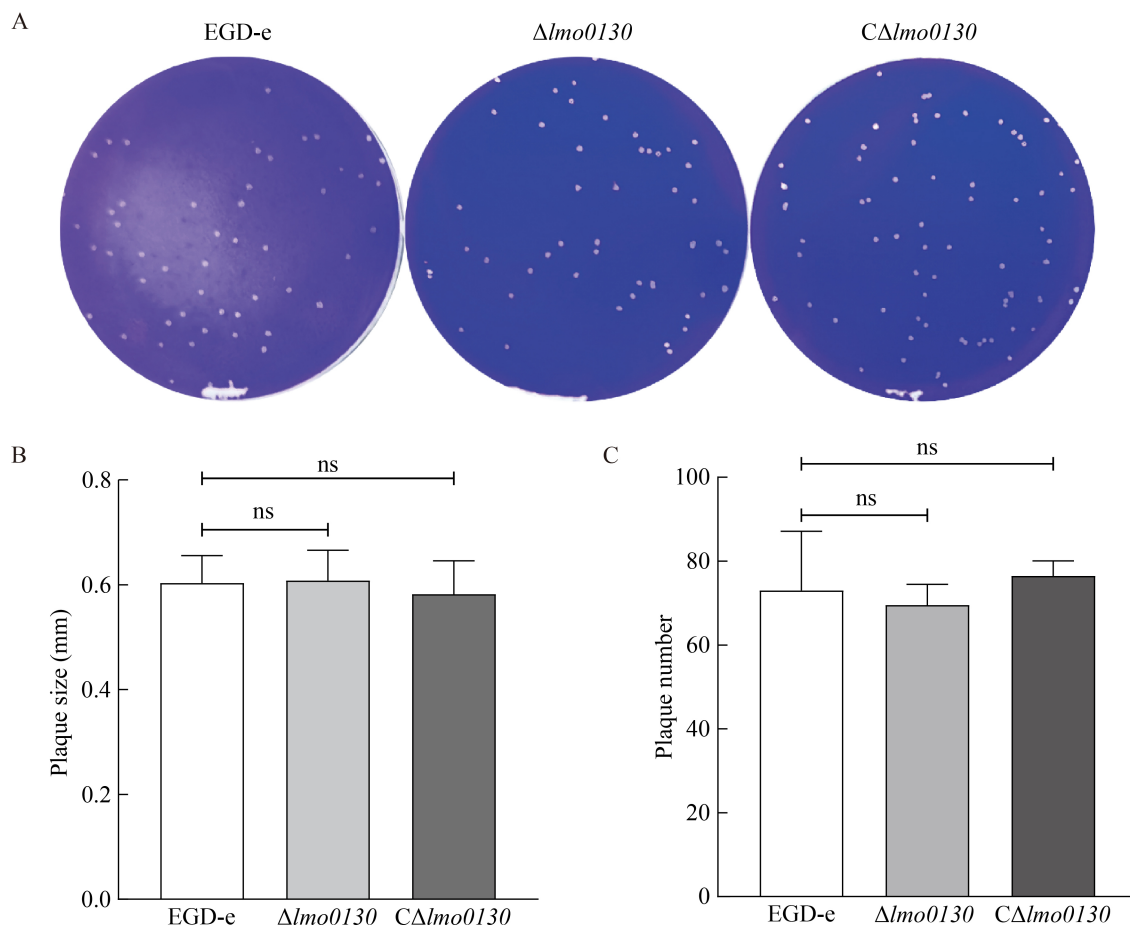


图5 比较单核增生李斯特氏菌EGD-e、 Δ lmo0130和C Δ lmo0130的胞间迁移能力差异。A: 细菌蚀斑; B: 蚀斑大小; C: 蚀斑数目。

Figure 5 The comparison of intercellular migration abilities among *Listeria monocytogenes* EGD-e, Δ lmo0130, and C Δ lmo0130 in L929 cells. A: Cell plaque; B: Plaque size; C: Plaque number. ns: $P>0.05$.

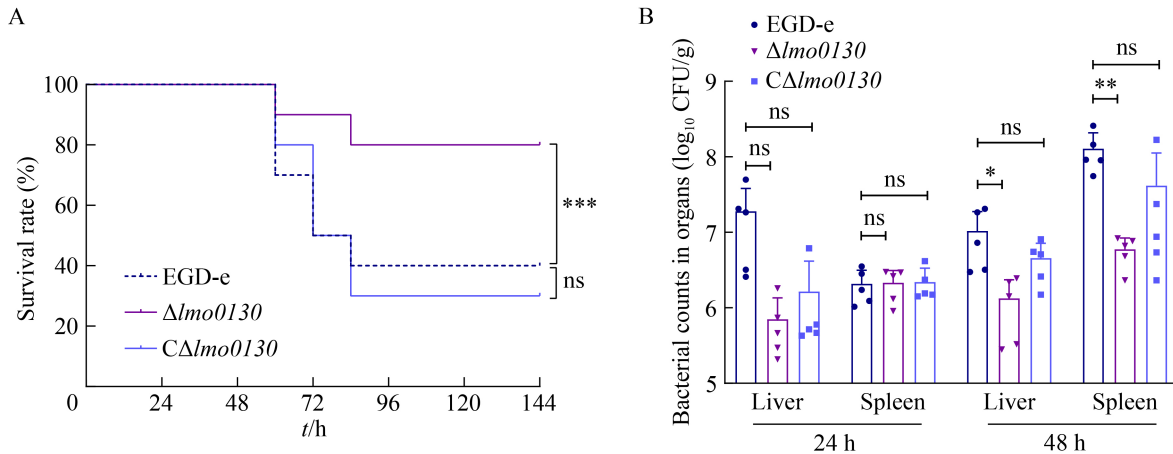


图6 比较单核增生李斯特氏菌EGD-e、 $\Delta lmo0130$ 和 $C\Delta lmo0130$ 对小鼠的致病力的差异。A：感染后小鼠的存活曲线；B：肝脏和脾脏的组织载菌量。

Figure 6 The comparison of pathogenicity among *Listeria monocytogenes* EGD-e, $\Delta lmo0130$ and $C\Delta lmo0130$ in infected mice. A: The survival curve of infected mice; B: The bacterial loads in liver and spleen of mice. *: $0.01 < P < 0.05$; **: $0.001 < P < 0.01$; ***: $P < 0.001$; ns: $P > 0.05$.

鼠脏器中单核增生李斯特氏菌的定殖能力显著降低。因此 *Lmo0130* 有助于单核增生李斯特氏菌对小鼠的致病力。

3 讨论与结论

单核增生李斯特氏菌是食源性疾病中病死率最高的致病菌之一，食用该菌污染的食物易引起败血症、脑膜炎、脑炎、流产或死胎等临床症状^[19-20]。表面蛋白对于革兰阳性菌在环境中的存活和宿主感染至关重要的，而 LPXTG 基序锚定蛋白是表面蛋白的重要组成部分，在黏附、侵袭、胞内增殖、逃逸吞噬体和胞间传播等宿主感染过程中发挥重要作用^[21]。本研究明确了功能未知的 LPXTG 基序锚定蛋白 *Lmo0130* 在单核增生李斯特氏菌生长和感染致病中的作用，对解析该菌感染宿主的机制具有重要意义。

本研究通过细胞和动物感染模型发现 LPXTG 基序锚定蛋白 *Lmo0130* 在单核增生李斯特氏菌的细胞和宿主感染中发挥重要作用，最终影响该菌的致病力。LPXTG 表面蛋白锚定到细胞壁上并介导多种革兰阳性菌的毒力，如李

斯特氏菌^[13]、葡萄球菌^[22-23]、链球菌^[24]和肠球菌^[25]。*SrtA* 对于单核增生李斯特氏菌内化素 *InlA* 等 LPXTG 表面蛋白的表达和在细菌表面的锚定都是必需的^[26]，*srtA* 基因缺失导致该菌在小鼠肝、脾中的定殖能力和对小鼠的致病力都严重受损^[27-28]。单核增生李斯特氏菌内化素家族蛋白在该菌的宿主感染及致病中起重要作用，如 *InlA*^[29-31]、*InlF*^[32]、*InlJ*^[33]、*InlH*^[34]、*InlK*^[35] 和 *Lmo0171*^[36]。其中 *InlA* 通过 LRR 结构域发挥黏附侵袭和细菌内化，并在跨越肠道屏障和胎盘屏障中起着关键作用^[29-31]；*InlF* 与表面波形蛋白 *Vimentin* 的结合对于单核增生李斯特氏菌在大脑中的最佳定殖是必需的^[32]。黏附素 *InlJ* 在单核增生李斯特氏菌感染宿主时特异性表达，有助于该菌发挥完整毒力^[33]。LPXTG 表面蛋白 *LapB* 也是一种黏附素，对于单核增生李斯特氏菌侵袭哺乳动物细胞和致病力具有重要意义^[11]。此外，*Vip* 通过与宿主 *gp96* 相互作用在单核增生李斯特氏菌侵袭哺乳动物细胞和发挥毒力时起关键作用^[10]。李斯特氏菌侵袭素 *LmiA* 有助于细菌与宿主黏蛋白之间的互作并介导细菌的

侵袭^[37]。缺失 *iap* 基因后显著降低该菌在细胞间传播能力和对小鼠致病力^[38]。因此 LPXTG 蛋白在单核增生李斯特氏菌在感染致病中的作用和机制有待进一步探索。

本研究通过构建 *lmo0130* 的缺失株并探究其感染生物学功能,发现 LPXTG 基序锚定蛋白 Lmo0130 在单核增生李斯特氏菌细胞和宿主感染中发挥重要作用。这一发现对进一步解析 Lmo0130 介导宿主感染的机制及明确 LPXTG 基序锚定蛋白的功能奠定了重要基础。

作者贡献声明

邓思敏:研究构思和设计,数据收集和处理,论文撰写与修改;葛泓睿:实验操作和数据收集;单癸:协助实验操作;毛敏杰:指导实验操作和图片绘制;徐加利:提供技术指导;夏菁:提供技术支持;宋厚辉:研究构思和设计;程昌勇:研究构思和设计,论文修改。

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研究所报告工作的已知经济利益或个人关系。

参考文献

- [1] LINGNAU A, DOMANN E, HUDEL M, BOCK M, NICTERLEIN T, WEHLAND J, CHAKRABORTY T. Expression of the *Listeria monocytogenes* EGD inlA and inlB genes, whose products mediate bacterial entry into tissue culture cell lines, by PrfA-dependent and-independent mechanisms[J]. Infection and Immunity, 1995, 63(10): 3896-3903.
- [2] ORSI RH, WIEDMANN M. Characteristics and distribution of *Listeria* spp., including *Listeria* species newly described since 2009[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2016, 100(12): 5273-5287.
- [3] PIZARRO-CERDÁ J, COSSART P. *Listeria monocytogenes*: cell biology of invasion and intracellular growth[J/OL]. Microbiology Spectrum, 2018. DOI: 10.1128/microbiolspec. gpp3-10.1128/microbiolspec.0013-2018.
- [4] JOHANSSON J, FREITAG NE. Regulation of *Listeria monocytogenes* Virulence[J]. Microbiology Spectrum, 2019, 7(4): 7.4.27.
- [5] BALLOM KF, TSAI HC, TAYLOR M, TANG JM, ZHU MJ. Stability of *Listeria monocytogenes* in non-fat dry milk powder during isothermal treatment and storage[J]. Food Microbiology, 2020, 87: 103376.
- [6] DROLIA R, TENGURIA S, DURKES AC, TURNER JR, BHUNIA AK. *Listeria* adhesion protein induces intestinal epithelial barrier dysfunction for bacterial translocation[J]. Cell Host & Microbe, 2018, 23(4): 470-484.e7.
- [7] CHEN C, NGUYEN BN, MITCHELL G, MARGOLIS SR, MA D, PORTNOY DA. The listeriolysin O PEST-like sequence co-opts AP-2-mediated endocytosis to prevent plasma membrane damage during *Listeria* infection[J]. Cell Host & Microbe, 2018, 23(6): 786-795.e5.
- [8] SMITH GA, MARQUIS H, JONES S, JOHNSTON NC, PORTNOY DA, GOLDFINE H. The two distinct phospholipases C of *Listeria monocytogenes* have overlapping roles in escape from a vacuole and cell-to-cell spread[J]. Infection and Immunity, 1995, 63(11): 4231-4237.
- [9] GAILLARD JL, BERCHE P, FREHEL C, GOUIN E, COSSART P. Entry of *L. monocytogenes* into cells is mediated by internalin, a repeat protein reminiscent of surface antigens from Gram-positive cocci[J]. Cell, 1991, 65(7): 1127-1141.
- [10] CABANES D, SOUSA S, CEBRIÁ A, LECUIT M, GARCÍA-DEL PORTILLO F, COSSART P. Gp96 is a receptor for a novel *Listeria monocytogenes* virulence factor, Vip, a surface protein[J]. The EMBO Journal, 2005, 24(15): 2827-2838.
- [11] REIS O, SOUSA S, CAMEJO A, VILLIERS V, GOUIN E, COSSART P, CABANES D. LapB, a novel *Listeria monocytogenes* LPXTG surface adhesin, required for entry into eukaryotic cells and virulence[J]. The Journal of Infectious Diseases, 2010, 202(4): 551-562.
- [12] BIERNE H, COSSART P. *Listeria monocytogenes* surface proteins: from genome predictions to function[J]. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 2007, 71(2): 377-397.
- [13] CABANES D, DEHOUX P, DUSSURGET O, FRANGEUL L, COSSART P. Surface proteins and the pathogenic potential of *Listeria monocytogenes*[J]. Trends in Microbiology, 2002, 10(5): 238-245.
- [14] 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): 1-19.
- [15] 林柯辰, 李豪杰, 赵秀玲, 周思, 廖俊慧, 王子念, 金戈旋, 朱富鑫, 徐加利, 孙静, 宋厚辉, 邓思敏, 程昌勇. 单增李斯特菌 LPXTG 蛋白 Lmo0880 在感染致病中的作用[J]. 微生物学报, 2024, 64(3): 893-906.
- [16] LIN KC, LI HJ, ZHAO XL, ZHOU S, LIAO JH, WANG ZN, JIN GX, ZHU FX, XU JL, SUN J, SONG HH, DENG SM, CHENG CY. Role of LPXTG-anchored protein Lmo0880 in *Listeria monocytogenes* infection[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2024, 64(3): 893-906 (in Chinese).
- [17] MATHIPA MG, THANTSHA MS, BHUNIA AK. *Lactobacillus casei* expressing Internalins A and B reduces *Listeria monocytogenes* interaction with Caco-2

- cells *in vitro*[J]. Microbial Biotechnology, 2019, 12(4): 715-729.
- [17] 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.
- [18] CHENG CY, CHEN MM, SUN J, XU JL, DENG SM, XIA J, HAN Y, ZHANG X, WANG J, LEI L, ZHAI RD, WU Q, FANG WH, SONG HH. The MICOS complex subunit Mic60 is hijacked by intracellular bacteria to manipulate mitochondrial dynamics and promote bacterial pathogenicity[J]. Advanced Science, 2024, 11(46): e2406760.
- [19] SILK BJ, DATE KA, JACKSON KA, POUILLOT R, HOLT KG, GRAVES LM, ONG KL, HURD S, MEYER R, MARCUS R, SHIFERAW B, NORTON DM, MEDUS C, ZANSKY SM, CRONQUIST AB, HENAO OL, JONES TF, VUGIA DJ, FARLEY MM, MAHON BE. Invasive listeriosis in the foodborne diseases active surveillance network (FoodNet), 2004–2009: further targeted prevention needed for higher-risk groups[J]. Clinical Infectious Diseases, 2012, 54(Suppl 5): S396-S404.
- [20] SWAMINATHAN B, GERNER-SMIDT P. The epidemiology of human listeriosis[J]. Microbes and Infection, 2007, 9(10): 1236-1243.
- [21] SEVEAU S, PIZARRO-CERDA J, COSSART P. Molecular mechanisms exploited by *Listeria monocytogenes* during host cell invasion[J]. Microbes and Infection, 2007, 9(10): 1167-1175.
- [22] MAZMANIAN SK, TON-THAT H, SCHNEEWIND O. Sortase-catalysed anchoring of surface proteins to the cell wall of *Staphylococcus aureus*[J]. Molecular Microbiology, 2001, 40(5): 1049-1057.
- [23] SCHNEEWIND O, MISSIAKAS DM. Staphylococcal protein secretion and envelope assembly[J]. Microbiology Spectrum, 2019, 7(4): 7.4.5.
- [24] LÖFLING J, VIMBERG V, BATTIG P, HENRIQUES-NORMARK B. Cellular interactions by LPxTG-anchored pneumococcal adhesins and their streptococcal homologues[J]. Cellular Microbiology, 2011, 13(2): 186-197.
- [25] HENDRICKX APA, WILLEMS RJL, BONTEN MJM, van SCHAIK W. LPxTG surface proteins of enterococci[J]. Trends in Microbiology, 2009, 17(9): 423-430.
- [26] BIERNE H, MAZMANIAN SK, TROST M, GRACIELA PUCCIARELLI M, LIU G, DEHOUX P, JÄNSCH L, PORTILLO FG, SCHNEEWIND O, COSSART P, CONSORTIUM ELG. Inactivation of the *srtA* gene in *Listeria monocytogenes* inhibits anchoring of surface proteins and affects virulence[J]. Molecular Microbiology, 2002, 43(4): 869-881.
- [27] GARANDEAU C, RÉGLIER-POUPET H, DUBAIL I, BERETTI JL, BERCHE P, CHARBIT A. The sortase SrtA of *Listeria monocytogenes* is involved in processing of internalin and in virulence[J]. Infection and Immunity, 2002, 70(3): 1382-1390.
- [28] MARISCOTTI JF, QUEREDA JJ, GRACIELA PUCCIARELLI M. Contribution of sortase A to the regulation of *Listeria monocytogenes* LPXTG surface proteins[J]. International Microbiology, 2012, 15(1): 43-51.
- [29] LECUIT M, VANDORMAEL-POURNIN S, LEFORT J, HUERRE M, GOUNON P, DUPUY C, BABINET C, COSSART P. A transgenic model for listeriosis: role of internalin in crossing the intestinal barrier[J]. Science, 2001, 292(5522): 1722-1725.
- [30] LECUIT M, MICHAEL NELSON D, SMITH SD, KHUN H, HUERRE M, VACHER-LAVENU MC, GORDON JI, COSSART P. Targeting and crossing of the human maternofetal barrier by *Listeria monocytogenes*: role of internalin interaction with trophoblast E-cadherin[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2004, 101(16): 6152-6157.
- [31] DISSON O, GRAYO S, HUILLET E, NIKITAS G, LANGA-VIVES F, DUSSURGET O, RAGON M, le MONNIER A, BABINET C, COSSART P, LECUIT M. Conjugated action of two species-specific invasion proteins for fetoplacental listeriosis[J]. Nature, 2008, 455(7216): 1114-1118.
- [32] GHOSH P, HALVORSEN EM, AMMENDOLIA DA, MOR-VAKNIN N, O'RIORDAN MXD, BRUMELL JH, MARKOVITZ DM, HIGGINS DE. Invasion of the brain by *Listeria monocytogenes* is mediated by InlF and host cell vimentin[J]. mBio, 2018, 9(1): e00160-18.
- [33] SABET C, TOLEDO-ARANA A, PERSONNIC N, LECUIT M, DUBRAC S, POUPEL O, GOUIN E, NAHORI MA, COSSART P, BIERNE H. The *Listeria monocytogenes* virulence factor InlJ is specifically expressed *in vivo* and behaves as an adhesin[J]. Infection and Immunity, 2008, 76(4): 1368-1378.
- [34] PERSONNIC N, BRUCK S, NAHORI MA, TOLEDO-ARANA A, NIKITAS G, LECUIT M, DUSSURGET O, COSSART P, BIERNE H. The stress-induced virulence protein InlH controls interleukin-6 production during murine listeriosis[J]. Infection and Immunity, 2010, 78(5): 1979-1989.
- [35] DORTET L, MOSTOWY S, COSSART P. *Listeria* and autophagy escape: involvement of InlK, an internalin-like protein[J]. Autophagy, 2012, 8(1): 132-134.
- [36] STACHOWIAK R, JAGIELSKI T, ROESKE K, OSIŃSKA O, GUNERKA P, WIŚNIEWSKI J, BIELECKI J. Lmo0171, a novel internalin-like protein, determines cell morphology of *Listeria monocytogenes* and its ability to invade human cell lines[J]. Current Microbiology, 2015, 70(2): 267-274.
- [37] MARISCOTTI JF, QUEREDA JJ, GARCÍA-DEL PORTILLO F, PUCCIARELLI MG. The *Listeria monocytogenes* LPXTG surface protein Lmo1413 is an invasin with capacity to bind mucin[J]. International Journal of Medical Microbiology, 2014, 304(3/4): 393-404.
- [38] CHANDRABOS C, SOUDJA SM, WEINRICK B, GROS M, FRANGAJ A, RAHMOUN M, JACOBS WR Jr, LAUVAU G. The p60 and *NamA* autolysins from *Listeria monocytogenes* contribute to host colonization and induction of protective memory[J]. Cellular Microbiology, 2015, 17(2): 147-163.