



# 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

韩月<sup>1</sup>, 陈雨吉<sup>1</sup>, 罗平<sup>1</sup>, 陈歆丹<sup>1</sup>, 曹启予<sup>1</sup>, 吴宇康<sup>1</sup>, 陈绵绵<sup>1</sup>, 翟瑞东<sup>1</sup>, 周彬<sup>1</sup>, 孙静<sup>1</sup>, 管迟瑜<sup>1</sup>, 程昌勇<sup>1</sup>, 吕晓玲<sup>2\*</sup>, 宋厚辉<sup>1\*</sup>

- 1 浙江农林大学动物科技学院动物医学院, 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, 中澳动物健康大数据分析联合实验室, 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

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. 微生物学报, 2022, 62(9): 3358–3372.

Han Yue, Chen Yuj, Luo Ping, Chen Xindan, Cao Qiyu, Wu Yukang, Chen Mianmian, Zhai Ruidong, Zhou Bin, Sun Jing, Guan Chiyu, Cheng Changyong, Lv Xiaoling, Song Houhui. Stress response of the thioredoxin Lmo1609 from *Listeria monocytogenes*. Acta Microbiologica Sinica, 2022, 62(9): 3358–3372.

**摘要:**【目的】本研究旨在构建单核细胞增多性李斯特菌(*Listeria monocytogenes*)硫氧还蛋白 Lmo1609 的基因缺失株, 分析 Lmo1609 的氧化还原酶学活性, 及其在细菌生长、运动过程中发挥的作用, 并探究了 Lmo1609 参与细菌抗氧化应激和致病的生物学基础。为阐明其抗应激生物学作用以及完善李斯特菌的感染机制奠定分子基础。【方法】利用同源重组原理构建 *lmo1609* 基因缺失株及回补株。通过分子生物学、应激生物学和感染生物学等手段, 对 Lmo1609 的生物学功能进行探索。以胰岛素为底物分析其氧化还原酶学活性; 通过构建 *lmo1609* 缺失株和回补株, 比较

**基金项目:**宁波市自然科学基金(202003N4179); 国家自然科学基金(31902280, 32172849, 32002253, 32002358, 31972648, 31872620, 31770040); 浙江省自然科学基金(LQ20C180001, LZ19C180001, LQ19C180002); 浙江农林大学学生科研训练项目(2020KX0164, 2021KX0121)

Supported by the Natural Science Foundation of Ningbo City (202003N4179), by the Natural Science Foundation of China (31902280, 32172849, 32002253, 32002358, 31972648, 31872620, 31770040), by the National Natural Science Foundation of Zhejiang Province (LQ20C180001, LZ19C180001, LQ19C180002) and by the Scientific Research Training Program for Undergraduate of Zhejiang A&F University (2020KX0164, 2021KX0121)

\*Corresponding authors. Tel: +86-571-63741392; E-mail: LV Xiaoling, 170259556@qq.com, SONG Houhui, songhh@zafu.edu.cn

Received: 26 December 2021; Revised: 2 May 2022; Published online: 16 May 2022

野生株和突变株在运动性、生长能力、抗氧化应激、细胞黏附、侵袭和增殖能力等方面的差异, 进而鉴定 Lmo1609 的生物学功能。【结果】缺失 *lmo1609* 后, 单增李斯特菌在生长能力上无明显变化, 而运动能力明显减弱; 对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 的敏感性增强; 对细胞的黏附侵袭能力没有差异; 对小鼠的致病力没有显著影响。【结论】本研究首次证实了单增李斯特菌硫氧还蛋白 Lmo1609 具有还原酶学活性, 参与调控细菌的运动和对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 的氧化应激耐受, 不介导单增李斯特菌的致病性。

**关键词:** 单核细胞增多性李斯特菌; 硫氧还蛋白; 运动性; 氧化应激; 细菌感染

## Stress response of the thioredoxin Lmo1609 from *Listeria monocytogenes*

HAN Yue<sup>1</sup>, CHEN Yuji<sup>1</sup>, LUO Ping<sup>1</sup>, CHEN Xindan<sup>1</sup>, CAO Qiyu<sup>1</sup>, WU Yukang<sup>1</sup>, CHEN Mianmian<sup>1</sup>, ZHAI Ruidong<sup>1</sup>, ZHOU Bin<sup>1</sup>, SUN Jing<sup>1</sup>, GUAN Chiyu<sup>1</sup>, CHENG Changyong<sup>1</sup>, LV Xiaoling<sup>2\*</sup>, SONG Houhui<sup>1\*</sup>

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

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

**Abstract: [Objective]** The thioredoxin family plays an important role in the response of the foodborne bacterial pathogen *Listeria monocytogenes* to the oxidative stress during the adaptation to environment. Here, we explored the biological characteristics of the thioredoxin Lmo1609 in the oxidative stress tolerance and infection of *L. monocytogenes*. **[Methods]** We constructed the *lmo1609*-deleted and -complemented strains and then studied the growth, motility, oxidative stress tolerance, and pathogenicity of the strains both *in vitro* and *in vivo*. Moreover, we purified the recombinant Lmo1609 protein and then studied the oxidoreductase activity of the protein *in vitro*. **[Results]** The deletion of *lmo1609* did not affect the bacterial growth but significantly reduced the swimming motility *in vitro*. Surprisingly, it enhanced the tolerance of this bacterium to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> stress while showing no impact on bacterial infection. **[Conclusion]** This study indicates that the thioredoxin family member Lmo609 exhibiting the oxidoreductase activity contributes to the motility and oxidative stress tolerance but not *in vivo* infection of *L. monocytogenes*.

**Keywords:** *Listeria monocytogenes*; thioredoxin; motility; oxidative stress; bacterial infection

单核细胞增多性李斯特菌(*Listeria monocytogenes*, LM), 简称单增李斯特菌, 是一种重要的食源性人兽共患病原菌<sup>[1]</sup>。可感染牛、羊、禽等动

物, 后经动物性食品如肉、蛋、奶感染人, 李斯特菌病会引起孕妇流产、胎儿脑膜炎、败血症等多种疾病, 主要见于新生儿、老人、孕妇

及免疫缺陷患者，致死率高达 30%，因此被 WHO 列为“零容忍”的食源性病原菌之一<sup>[2-4]</sup>。由于单增李斯特菌能够耐受高盐、极寒、氧化等加工、储存和运输环境，相较于大部分食源性致病菌，单增李斯特菌能够耐受氧化胁迫环境。近年来，世界各地几乎每年都有单增李斯特菌引起中毒并造成死亡的报道<sup>[5-7]</sup>。因此，对该菌的感染、生存和致病性开展研究具有重要的公共卫生学意义。

氧化还原蛋白是一类参与蛋白质二硫键形成与打开，通过催化二硫键的氧化、还原和异构，保持菌体氧化还原稳态的重要酶活力调节蛋白<sup>[8-9]</sup>。已知二硫键是蛋白质维持高级构象、保持生物活性的重要开关，对细菌的生命活动至关重要，近年来，氧化还原蛋白在应激生物学中的意义，已经成为疾病预防与控制的研究热点<sup>[10]</sup>。目前对单增李斯特菌氧化还原蛋白家族中的部分成员已经展开了一定的研究，如硫氧还蛋白 TrxA、谷氧还蛋白 Grx 以及含有 CX<sub>1</sub>X<sub>2</sub>C 基序的 YjbH 等，它们在单增李斯特菌对氧化剂如金属离子铜、砷和铬的氧化应激方面发挥着不同的作用，同时，这些硫氧还蛋白家族成员在介导单增李斯特菌致病过程中也扮演着不同的角色<sup>[11-14]</sup>。据 Gopal 等研究预测，单增李斯特菌中仅有 14 个含有“CX<sub>1</sub>X<sub>2</sub>C”活性位点的同源蛋白，Lmo1609 就是其中之一<sup>[15]</sup>。Lmo1609 具有 CX<sub>1</sub>X<sub>2</sub>C 的保守结构域，属于硫氧化蛋白家族成员，是一种分子量小(12 kDa)、稳定性强、能够有效应对氧化应激的氧化还原蛋白<sup>[16]</sup>，但 Lmo1609 蛋白的具体功能尚不清楚，对其应激生物学功能进行研究有助于理解单增李斯特菌的致病机制。

本研究通过同源重组方法获得了 *lmo1609* 的基因缺失株与回补株，从体外生物学、应激

生物学、感染生物学等几个方面初步分析了 Lmo1609 的功能。本研究发现 Lmo1609 具有还原酶学活性，可以催化胰岛素二硫键还原，参与细菌抗氧化过程，而对细胞感染和对小鼠的致病力与野生株相比，均未有显著差异。表明 Lmo1609 参与单增李斯特菌的抗氧化应激但并不影响其致病性。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌株、载体及试剂

本研究使用的菌株均为本实验室保存，所涉及的菌株有：单增李斯特菌野生株 EGD-e、大肠杆菌 DH5 $\alpha$  和 Rosetta。质粒有：表达载体 pET30a、温度敏感性质粒 pKSV7、整合型穿梭载体 pIMK2。大肠杆菌 DH5 $\alpha$  和 Rosetta 培养于 LB (Luria-Bertani)培养基，单增李斯特菌 EGD-e 及其突变菌株培养于 BHI (brain heart infusion)培养基。除突变株筛选需要用到 30 °C 和 42 °C 培养外，其他培养条件均为 37 °C 培养；根据需要添加抗生素，氨苄青霉素、氯霉素和卡那霉素的终浓度分别为 100、30、50  $\mu$ g/mL。BHI 和 LB 培养基均购自 Oxoid 公司。

### 1.2 引物

根据 GenBank (NC-003210.1) 公布的 *lmo1609* 基因序列，分别设计用于扩增 *lmo1609* 上、下游同源臂的 2 对引物 *lmo1609*-UF/UR 和 *lmo1609*-DF/DR；设计用于鉴定 *lmo1609* 基因缺失株的 2 对引物 *lmo1609*-a front/*lmo1609*-DR 和 pKSV7-M13-Fwd/pKSV7-M13-Rev；设计用于构建回补质粒的引物 pSL2154-BamH I -F/pSL2154-Sac I -R；设计用于构建表达质粒的引物 pSL1605-Nde I -F/pSL1605-Xho I -R。所用引物均由杭州有康生物科技有限公司合成，引物序列详见表 1。

表 1 本研究所用引物

Table 1 Primers used in this study

Primers	Sequences (5'→3')	Products/bp
<i>lmo1609</i> -UF	GAGAAGCTGCCCAAGTGC GGTAATCGGTG	492
<i>lmo1609</i> -UR	CGCGGATCCTTTCCACACGCTCCTTCTTATCTCATACT	
<i>lmo1609</i> -DF	CCTGCAGGAAAAAGTGACTGCTTTTTATGGAAGGGGA	502
<i>lmo1609</i> -DR	CGCACGAAGAAATAAGAGAAGCTGCCCAAGTGCG	
<i>lmo1609</i> -a front	CCGCAGTATCTAGTAAAAACTCACGCA	1 076/1 388
pSL2154- <i>Bam</i> H I -F	CGCGGATCCTTATATCGCAGCTAGAAAATCATTAAATTTCTTCTTTTGT TTTTC	436
pSL2154- <i>Sac</i> I -R	AGCGAGCTCAAAGTTTAGCTCCTTACTAGAGCTGGG	
pSL1605- <i>Nde</i> I -F	GGAATTCATATGAAAACTTAGAATCAGTTGAACAATTTAATGCTATTAAAT CAGAAGG	319
pSL1605- <i>Xho</i> I -R	CCGCTCGAGTATCGCAGCTAGAAAATCATTAAATTTCTTCTTTTGT TTTTC	
pKSV7-M13-Fwd	GCGATTAAGTTGGGTAACGCC	1 113
pKSV7-M13-Rev	GCGGATAACAATTCACACAGGA	

### 1.3 载体构建

以单增李斯特菌 EGD-e 基因组为模板, 使用引物 *lmo1609*-UF/*lmo1609*-UR 和 *lmo1609*-DF/*lmo1609*-DR 分别扩增 *lmo1609* 的上、下游同源臂。使用重叠 PCR 方法获得同源重组片段, 使用 *Pst* I 和 *Bam*H I 双酶切后连接至 pKSV7 上, 构建 *lmo1609*-pKSV7 重组质粒, 测序正确后命名为 pSL056 (图 1A)。

### 1.4 $\Delta$ *lmo1609* 缺失株构建

参照文献[11]进行感受态细胞的制备。将上述重组质粒 pSL056 电转化入 EGD-e 感受态细胞中, 通过温度和氯霉素抗性双重选择压力进行同源重组克隆筛选, 使用引物(*lmo1609*-a front-UF/*lmo1609*-DR)对筛选出的重组克隆进行 PCR 验证。

### 1.5 $C\Delta$ *lmo1609* 回补株构建

*lmo1609* 为单转录本, 从 Promoter 3.0 获得该基因启动子后, 通过 Snapgene 设计扩增 *lmo1609* 基因的上游启动子区及 CDS 区的引物, 克隆至 pIMK2 载体, 转化至 *E. coli* DH5 $\alpha$  中, 经测序正确后命名为 pSL2154 (图 1B)。将 pSL2154 电转化至单增李斯特菌  $\Delta$ *lmo1609* 缺失株感受态中, 通过卡那霉素抗性筛选、菌落 PCR

验证及测序验证, 获得回补株。

### 1.6 *Lmo1609* 蛋白表达载体的构建

本试验利用乳糖操纵子调控系统及蛋白质融合 His 标签与镍柱亲和层析技术进行体外重组蛋白的原核表达与纯化。设计引物 pSL1605-*Nde* I -F/pSL1605-*Xho* I -R, 扩增 *Lmo1609* CDS 序列, 酶切连接至 pET30a, 转化入 DH5 $\alpha$ , 经菌落 PCR 及 Sanger 测序正确后命名为 pSL1605。

### 1.7 蛋白表达与纯化

重组蛋白的原核表达参照文献[17]进行。将 1.6 中获得的表达质粒 pSL1605 热转化入 Rosetta 中获得重组表达菌, 从新鲜培养基中挑取重组蛋白表达菌 Rosetta (pSL1605) 的单菌落, 接种至 5 mL LB (卡那霉素) 培养基中于 37 °C 培养过夜, 将过夜培养的细菌按照 1:100 的比例转接于 500 mL LB (卡那霉素) 培养基中, 37 °C、200×g 振荡培养至  $OD_{600}$  约为 0.6, 向菌液中加入终浓度为 1 mmol/L 的 IPTG, 37 °C 振荡培养约 4 h 以诱导蛋白表达。收集菌体、离心、洗涤、经超声破碎后, 使用镍柱亲和层析纯化上清以获得目的蛋白, 经 SDS-PAGE 验证重组蛋白的表达和纯化情况后使用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒测定蛋白浓度, 保存备用。

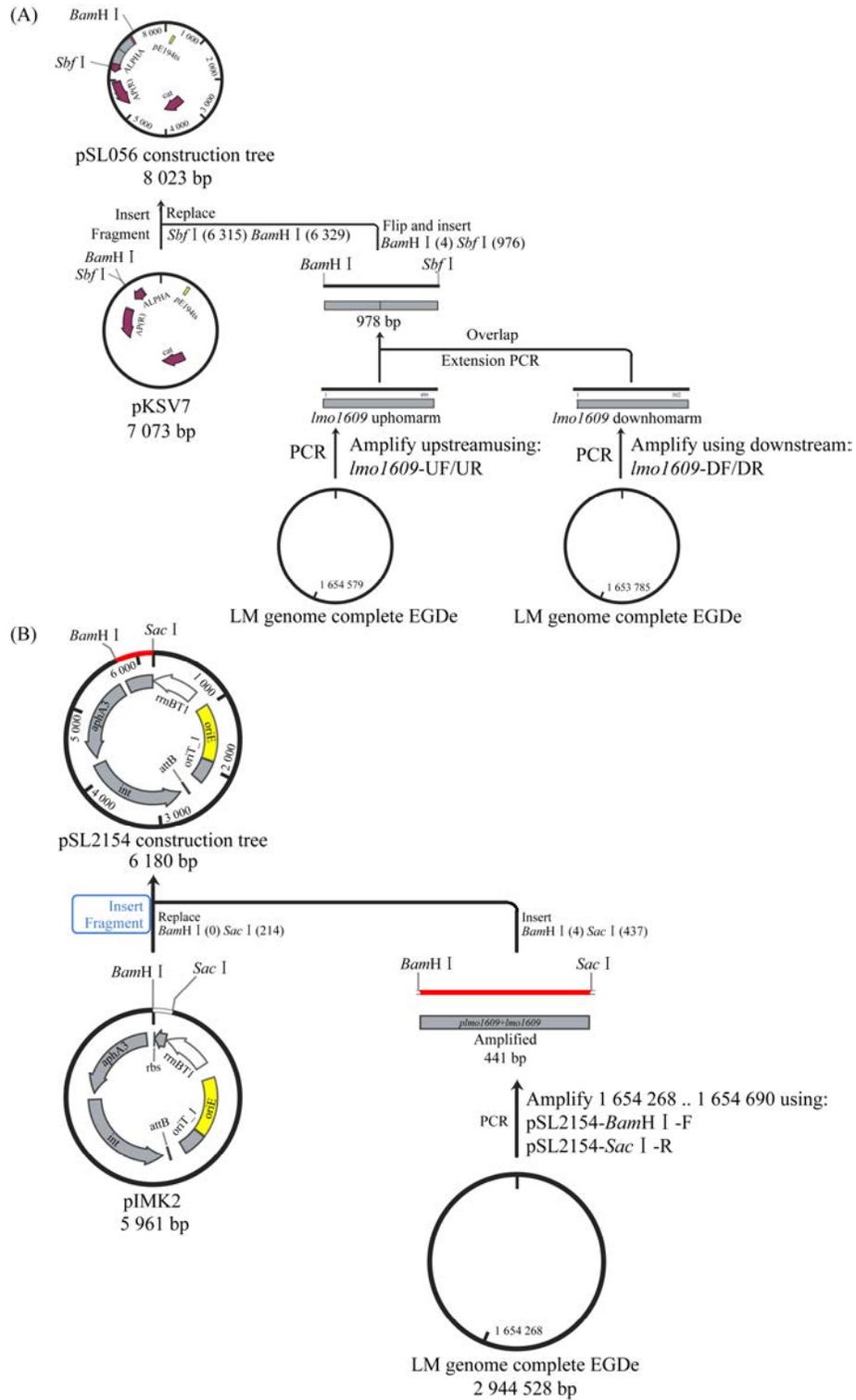


图 1 *lmo1609* 基因缺失和回补株重组质粒 *pSL056* 和 *pSL2154* 的构建策略

Figure 1 Construction strategy of the recombinant plasmids for *lmo1609* gene deletion and complementation. A: the strategy of *pSL056* construction for *lmo1609* gene knockout; B: the strategy of *pSL2154* construction for *lmo1609* gene complementation.

## 1.8 Lmo1609 的还原酶学活性测定

本研究采用经典的胰岛素二硫键还原试验检测重组蛋白的还原酶学活性。胰岛素由 2 个二硫键连接的 A 链和 B 链组成, 在二硫苏糖醇(dithiothreitol, DTT)等还原剂存在条件下, 胰岛素的二硫键被还原导致 B 链沉降, 溶液变浑浊, B 链的沉淀量可以通过检测波长  $OD_{650}$  处的吸收峰来测定, 此时胰岛素二硫键被还原的速度是极缓慢的。如果在反应体系中同时添加具有还原酶活性的蛋白, 胰岛素二硫键被 DTT 还原的速度则会显著加快, 溶液浑浊度增加, B 链的沉降量增多,  $OD_{650}$  数值升高, 提示胰岛素被还原的程度越高, 也表明外加蛋白的还原酶学活性越强<sup>[18]</sup>。将浓度为 1、5、10 和 30  $\mu\text{mol/L}$  的 Lmo1609 重组蛋白, 150  $\mu\text{mol/L}$  胰岛素(底物), 1 mmol/L DTT 电子供体和 2 mmol/L EDTA 混合在 10 mmol/L PBS 缓冲液中, 于 25  $^{\circ}\text{C}$  反应 150 min, 每个反应设置 3 个平行实验, 间隔 10 min 使用多功能酶标仪测定  $OD_{650}$  处吸光值, 并使用 GraphPad Prism 软件绘制酶活时间曲线图。

根据上述实验结果确定 Lmo1609 蛋白的最佳工作浓度, 选用不同浓度的胰岛素(15、30、60、90 和 120  $\mu\text{mol/L}$ )作为底物, 其余反应体系同上, 于 25  $^{\circ}\text{C}$  反应 150 min, 间隔 10 min 使用多功能酶标仪对  $OD_{650}$  处吸光值进行测定, 并使用 GraphPad Prism 软件绘制酶活时间曲线图。

## 1.9 生长曲线的测定

挑取野生株 EGD-e、缺失株  $\Delta\text{lmo1609}$  和回补株  $C\Delta\text{lmo1609}$  的单菌落接种至 5 mL BHI 培养基中于 37  $^{\circ}\text{C}$ 、200 $\times$ g 条件下培养 12 h。然后取 1 mL 菌液, 使用 10 mmol/L PBS 洗涤 1 次, 并调整菌液  $OD_{600}$  至 0.6, 起始菌液使用 BHI 培养基稀释 100 倍后, 按 200  $\mu\text{L}$ /孔的量加入 96 孔板中于 37  $^{\circ}\text{C}$  静置培养 12 h, 间隔 1 h 取样, 测定  $OD_{600}$  值, 使用 GraphPad Prism 绘

制细菌生长曲线。

## 1.10 运动性试验

分别挑取野生株 EGD-e、缺失株  $\Delta\text{lmo1609}$  和回补株  $C\Delta\text{lmo1609}$  单菌落接种至 5 mL BHI 培养基振荡培养过夜, 次日按 1:100 转接至新的 5 mL BHI 培养基中, 培养至  $OD_{600}$  至 0.6, 用牙签蘸取菌液, 竖直点在 TSA 半固体培养基(0.25%琼脂、2%氯化钠及 1.5%胰蛋白胨)中, 分别于 30  $^{\circ}\text{C}$  以及 37  $^{\circ}\text{C}$  静置培养 24 h、48 h 后观察并记录细菌的运动圈直径。

## 1.11 氧化应激试验

挑取野生株 EGD-e、 $\Delta\text{lmo1609}$  株和  $C\Delta\text{lmo1609}$  回补株的单菌落接种至 5 mL BHI 培养基中振荡培养过夜, 调整  $OD_{600}$  至 0.6, 并依次点板于含有不同浓度氧化剂的 BHI 固体培养基上, 37  $^{\circ}\text{C}$  静置培养过夜后观察并拍照。氧化应激以  $\text{H}_2\text{O}_2$  为直接氧化剂, 胍为硫醇特异性氧化剂, 铜(Copper, Cu)、镉(Cadmium chloride, Cd)二价金属离子为氧化活性胁迫性氧化剂。双氧水、胍、 $\text{Cd}^{2+}$  和  $\text{Cu}^{2+}$  的浓度分别为 5.0、1.0、1.0 和 0.5 mmol/L。

## 1.12 黏附和入侵和增殖试验

细胞实验参照文献[11-12]进行。在 25  $\text{cm}^2$  细胞培养瓶中使用含有 10 mL 10%胎牛血清(FBS)的 DMEM 培养基将 Caco-2 细胞置于的于 37  $^{\circ}\text{C}$ 、含有 5%的  $\text{CO}_2$  培养箱中培养。用 DMEM 细胞培养基对 Caco-2 细胞进行铺板, 密度为  $10^6$  个/mL。分别将野生株 EGD-e、 $\Delta\text{lmo1609}$  和  $C\Delta\text{lmo1609}$  菌液浓度调整至  $OD_{600}$  至 0.6, 细菌按照感染复数(MOI)=10:1 的比例感染 Caco-2 细胞, 黏附用细胞感染 30 min 后, 用 PBS 洗涤 3 次, 并用 100  $\mu\text{L}$  Trypsin-EDTA (0.25%)和 400  $\mu\text{L}$  冰浴后的 ddH<sub>2</sub>O 吹打裂解细胞, 稀释到合适梯度涂布至 BHI 平板。入侵用细胞在细菌感染 1.5 h 后, 使用终浓度为 50  $\mu\text{g/mL}$  庆大霉素杀菌 1.5 h,

并用 PBS 洗涤 3 次后裂解细胞, 随后对裂解液进行稀释点板, 并计算黏附和侵袭至 Caco-2 细胞中的细菌数。

胞内增殖用的 RAW264.7 巨噬细胞置于含 10% FBS 血清的 DMEM 培养基中, 过夜培养使细胞充分贴壁。以 MOI=10:1 的比例加入细菌, 1 h 后用 PBS 洗涤 3 次, 用 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  庆大霉素杀菌 1 h 后, 记为 2 h, 分别在细菌感染 2 h、6 h 和 12 h 后裂解细胞, 通过稀释点板进行细菌计数, 使用 GraphPad Prism 软件作图并比较野生株、缺失株和回补株感染巨噬细胞 2 h、6 h 和 12 h 后在 RAW264.7 胞内的增殖能力。

### 1.13 细菌存活及小鼠脏器增殖试验

雌性 ICR 小鼠(16–22 g)购自浙江省杭州医学院, 适应环境 3 d 后随机分组, 每组 24 只。

分别挑取野生株 EGD-e、缺失株  $\Delta lmo1609$  和回补株  $C\Delta lmo1609$  的单菌落至 5 mL BHI 液体培养基中, 37  $^{\circ}\text{C}$  振荡培养过夜; 使用 10 mmol/L PBS 洗涤 1 次, 随后调整  $OD_{600}$  至 0.6 (细菌浓度约为  $2 \times 10^9$  CFU/mL), 将菌液稀释 100 倍后用于腹腔感染小鼠; 每只小鼠腹腔注射 100  $\mu\text{L}$  菌液(感染量约为  $2 \times 10^6$  CFU), 观察小鼠在 14 d 内的存活和死亡数。统计野生株 EGD-e、缺失株  $\Delta lmo1609$  和回补株  $C\Delta lmo1609$  对小鼠的致病力。同时在感染后 24 h 和 48 h 分别从每组中取 8 只小鼠分离脾脏和肝脏, 加入 1 mL 10 mmol/L PBS, 使用组织匀浆仪研磨组织, 将匀浆液稀

释至合适的倍数后点板于 BHI 培养基进行细菌计数。研究野生株 EGD-e、缺失株  $\Delta lmo1609$  和回补株  $C\Delta lmo1609$  在小鼠肝脏和脾脏中的增殖情况。该试验进行 2 次重复。

## 2 结果和分析

### 2.1 Lmo1609 氨基酸序列生物信息学分析

将 Lmo1609 与单增李斯特菌的硫氧还蛋白 TrxA、大肠杆菌的硫氧还蛋白 TrxA 和 TrxC 以及枯草芽孢杆菌的硫氧还蛋白 TrxA 通过 CLC sequence viewer 8 软件进行比较, 分析单增李斯特菌 Lmo1609 与已知硫氧还蛋白的同源性和特殊结构域, 发现 Lmo1609 在 69–72 aa 区域具有保守的双半胱氨酸活性基序  $\text{CX}_1\text{X}_2\text{C}$ , 由 Cys-Gly-Asp-Cys (CGDC) 构成, 与大肠杆菌、枯草芽孢杆菌和单增李斯特菌的 TrxA 的 CGPC 基序存在一个关键氨基酸的突变(图 2)。因此, 可以推论 Lmo1609 属于硫氧还蛋白家族成员, 且其功能可能与突变的 Asp 位点密切相关。

### 2.2 lmo1609 缺失株及回补株的构建

#### 2.2.1 单增李斯特菌 lmo1609 缺失株构建及筛选验证

根据单增李斯特菌无痕基因敲除原理, 利用引物 *lmo1609*-UF/UR 和 *lmo1609*-DF/DR, 分别扩增出长度为 476 bp 的上游同源臂和 485 bp 的下游同源臂, 将上下游同源臂通过重叠 PCR 方法得到大小为 961 bp 的同源重组片段, 随后

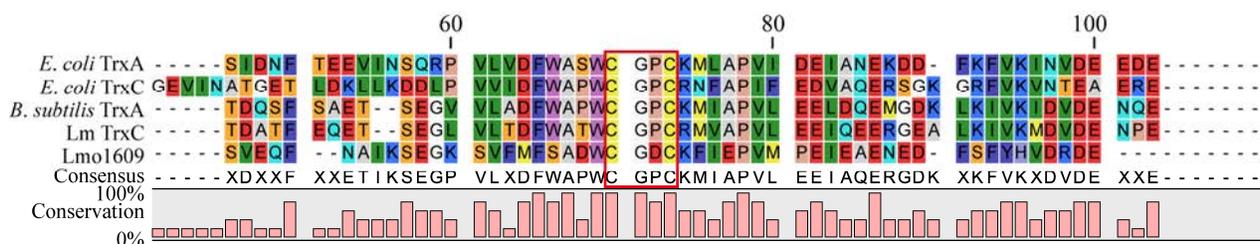


图 2 Lmo1609 同源蛋白氨基酸序列比对

Figure 2 Amino acid sequence alignment of Lmo1609 homologous from bacterial species.

将重叠 PCR 产物连接至 pKSV7 缺失载体中。42 °C 同源重组后, 使用引物 *lmo1609*-a front/*lmo1609*-DR 扩增菌落, 获得条带大小为 1 076 bp 的产物(图 3A, 泳道 1), 较野生株 EGD-e (图 3A, 泳道 2) 1 388 bp 减少了 312 bp, 缺少的碱基数与 *lmo1609* 的 CDS 区大小相符。在 30 °C 传代丢失 pKSV7 质粒后, 使用引物 pKSV7-M13-Fwd/pKSV7-M13-Rev 进行菌落 PCR 验证, 无条带, 说明质粒已丢失, 突变株构建成功。经测序验证已经完成基因敲除, 并将该缺失株命名为  $\Delta lmo1609$ 。

### 2.2.2 单增李斯特菌 *lmo1609* 回补株的构建及筛选验证

根据  $C\Delta lmo1609$  重组质粒构建方法, 将构建好的回补质粒 pSL2154 电转化入  $\Delta lmo1609$  感受态细胞, 使用引物 pSL2154-Fwd-BamH I / pSL2154-Rev-Sac I 扩增菌落, 得到  $C\Delta lmo1609$  重组质粒目的片段 436 bp (图 3B), 与预期的 *lmo1609* 启动子区和回补的 *lmo1609* CDS 区大小相符。经测序验证正确后命名为  $C\Delta lmo1609$ 。

## 2.3 $\Delta lmo1609$ 的体外生物学功能研究

### 2.3.1 单增李斯特菌生长能力分析

将单增李斯特菌 EGD-e、 $\Delta lmo1609$  和  $C\Delta lmo1609$  转接至 BHI 液体培养基中培养 12 h,

每小时取 200  $\mu$ L 培养液于  $OD_{600}$  处进行吸光值测定, 并绘制如图 4A 所示生长曲线, 结果发现  $\Delta lmo1609$  缺失株的生长速率与野生株和回补株相似, 无显著差异, 表明 *lmo1609* 基因缺失不影响单增李斯特菌生长。

### 2.3.2 单增李斯特菌运动性分析

配制半固体琼脂培养基, 利用半固体琼脂扩散试验验证  $\Delta lmo1609$  缺失株、 $C\Delta lmo1609$  回补株以及野生株在体外的运动能力是否发生变化。结果如图 4B 所示, 在 30 °C 静置培养条件下,  $\Delta lmo1609$  缺失株在 24 h 及 48 h 的运动扩散面积较野生株 EGD-e 分别下降 75%和 33%, 回补株  $C\Delta lmo1609$  在 24 h 及 48 h 的运动扩散面积未恢复至野生株水平, 推测该基因存在更为复杂的调控方式来影响细菌的运动能力。

## 2.4 $\Delta lmo1609$ 的氧化应激功能研究

细菌的生长与外界环境息息相关, 为验证  $\Delta lmo1609$  是否有抗氧化应激能力, 利用不同氧化剂: 5 mmol/L  $H_2O_2$ 、0.5 mmol/L  $Cu^{2+}$ 、1 mmol/L  $Cr^{2+}$  和 1 mmol/L 胍, 在相同的培养条件下进行氧化应激试验。最后通过稀释点板对其生长能力进行分析。结果如图 5 所示, 在以  $H_2O_2$

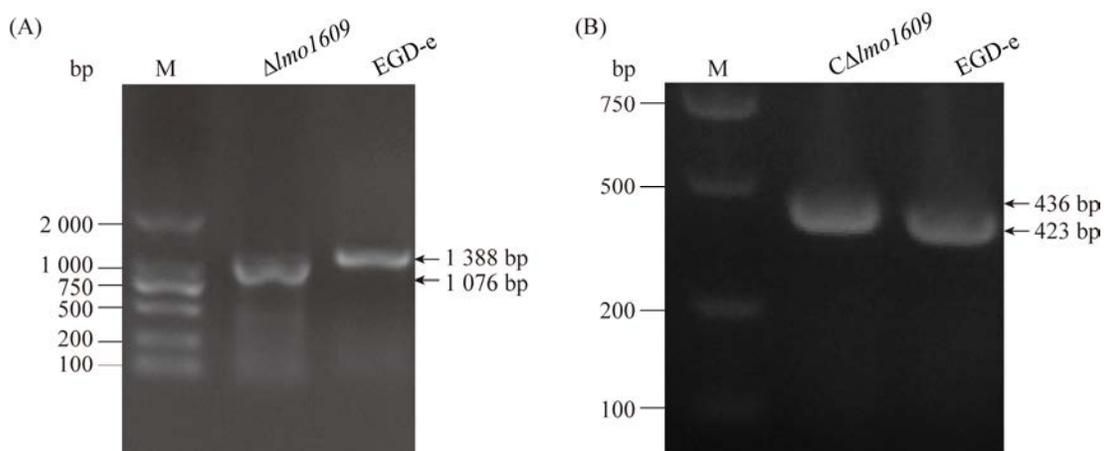


图 3 缺失株  $\Delta lmo1609$  (A)和回补株  $C\Delta lmo1609$  (B)的 PCR 验证

Figure 3 Confirmation of *lmo1609* mutant strain (A) and complementation strain (B) by PCR. M: DNA marker.

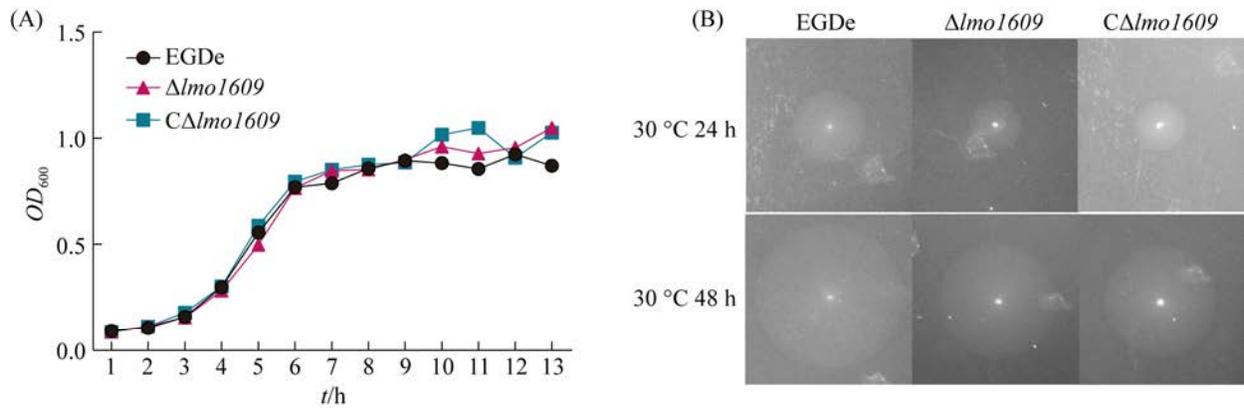


图 4 EGD-e、 $\Delta lmo1609$  和  $C\Delta lmo1609$  的生长曲线测定(A)及运动能力分析(B)

Figure 4 *In vitro* growth (A) and motility (B) of wild-type EGD-e,  $\Delta lmo1609$  and  $C\Delta lmo1609$  in BHI broth.

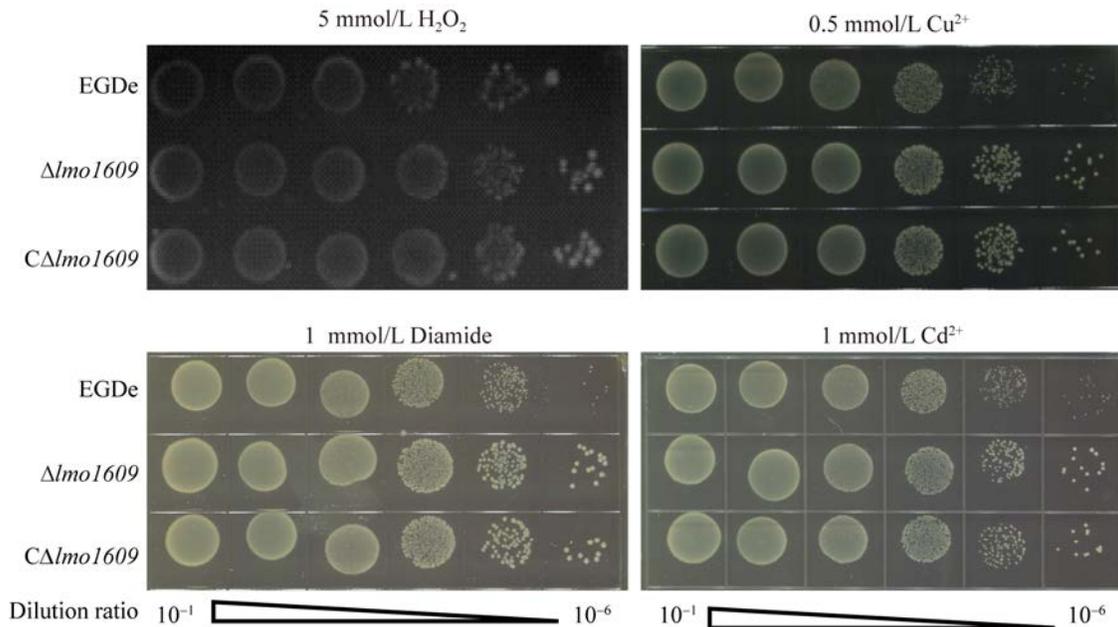


图 5 EGD-e、 $\Delta lmo1609$  和  $C\Delta lmo1609$  在  $H_2O_2$ 、Diamide、 $Cu^{2+}$  和  $Cd^{2+}$  氧化应激条件下稀释点板

Figure 5 Oxidative tolerance of wild-type EGD-e and  $lmo1609$  mutants exposed to different concentrations of  $H_2O_2$ , Diamide,  $Cu^{2+}$  or  $Cd^{2+}$ .

为氧化剂的应激平板上,菌液稀释至  $10^{-4}$ 、 $10^{-5}$  和  $10^{-6}$  时,可见缺失株  $\Delta lmo1609$  的菌落数比野生株多,表明  $lmo1609$  基因缺失后,单增李斯特菌对氧化剂  $H_2O_2$  的应激能力增强。对氧化剂  $Cu^{2+}$ 、 $Cr^{2+}$  和胍的应激能力显示,  $lmo1609$  基因突变后,细菌菌落数没有明显改变,只是在低稀释度时缺失株的菌落形态较野生株增大,结

合  $lmo1609$  基因缺失不影响细菌生长速率但是减弱其运动能力这一结果提示  $lmo1609$  基因有可能通过影响单增李斯特菌鞭毛运动进而影响了细菌菌落扩散。回补株  $C\Delta lmo1609$  对氧化剂的应激能力未恢复至野生株水平,推测  $lmo1609$  基因通过整合回补至基因组后涉及更为复杂的调控网络来影响细菌的氧化应激能力。

### 2.5 *Δlmo1609* 的感染生物学功能研究

Caco-2 和 RAW264.7 细胞是研究单增李斯特菌在肠道上皮细胞黏附、侵袭以及在巨噬细胞内增殖能力较为理想与经典的细胞模型<sup>[19]</sup>。通过计算不同时间点感染细胞的细菌量, 分析细菌在细胞中的黏附、侵袭与增殖能力。结果如图 6 所示, *Δlmo1609* 株、回补株和野生株 EGD-e 在感染 Caco-2 细胞 0.5 h 和 1.5 h 时均未有显著差异( $P>0.05$ )。在细菌感染 RAW264.7 细胞 2、6、12 h 后统计各菌株在巨噬细胞中的增殖数量, 发现缺失株在 RAW264.7 细胞中的增殖能力与野生株相比无显

著差异( $P>0.05$ ), 表明 *lmo1609* 基因缺失不影响单增李斯特菌对细胞的黏附、侵袭和增殖能力。

### 2.6 *Δlmo1609* 对小鼠的致病力分析

#### 2.6.1 *Δlmo1609* 对单增李斯特菌在 ICR 小鼠脏器内的增殖能力的影响

细菌在 ICR 小鼠肝脏和脾脏中的定殖量如图 7 所示, 使用 GraphPad Prism 对结果进行了输入、整理和输出, 经 *t*-test 检验进行结果分析, 发现细菌感染小鼠 24 h 和 48 h 后, *Δlmo1609* 缺失株在肝脏和脾脏中的细菌量与野生株相比无显著差异( $P>0.05$ )。

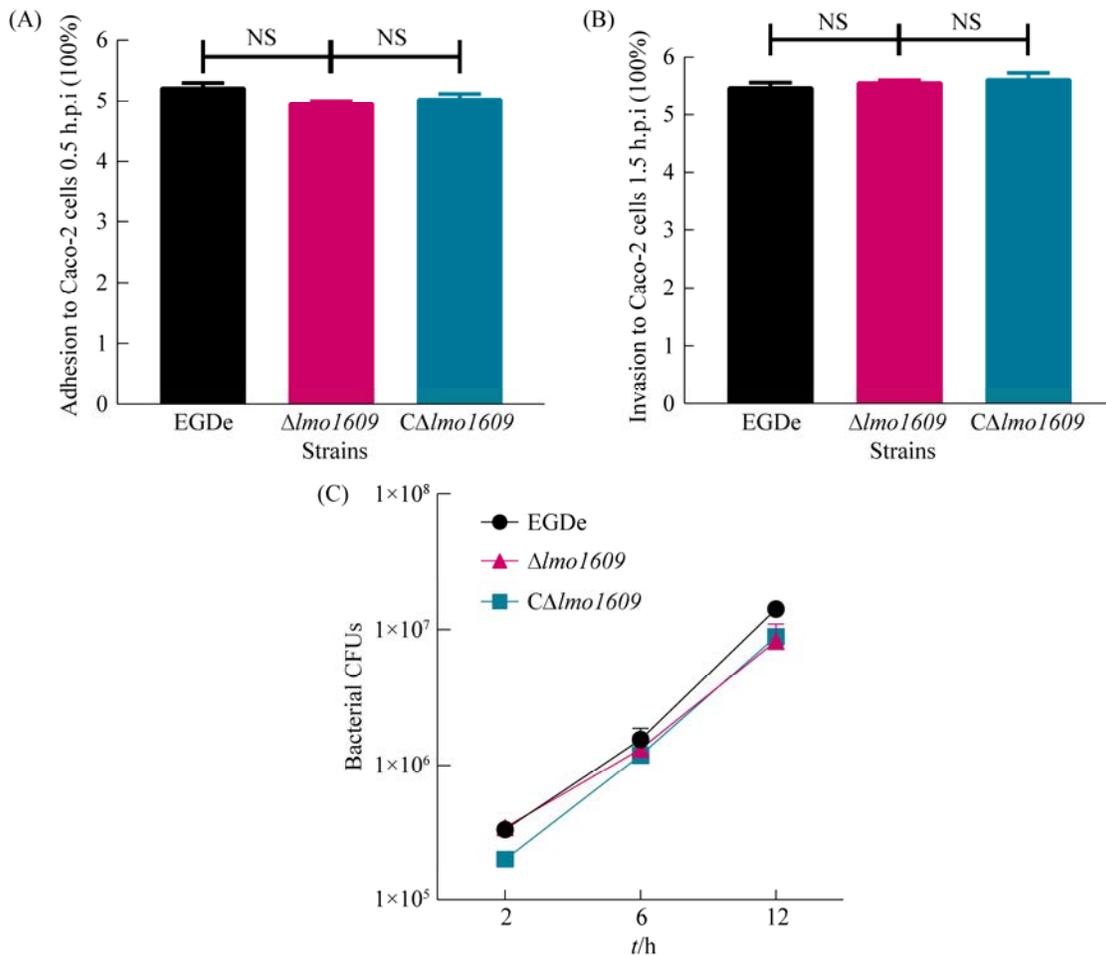


图 6 EGD-e、*Δlmo1609* 和 *CΔlmo1609* 在 Caco-2 的黏附(A)、侵袭(B)以及 RAW264.7 增殖能力(C)分析  
 Figure 6 Analysis of adhesion (A), invasion (B) in Caco-2 and infection of wild-type EGD-e and *Δlmo1609* mutants in RAW264.7 macrophages (C).

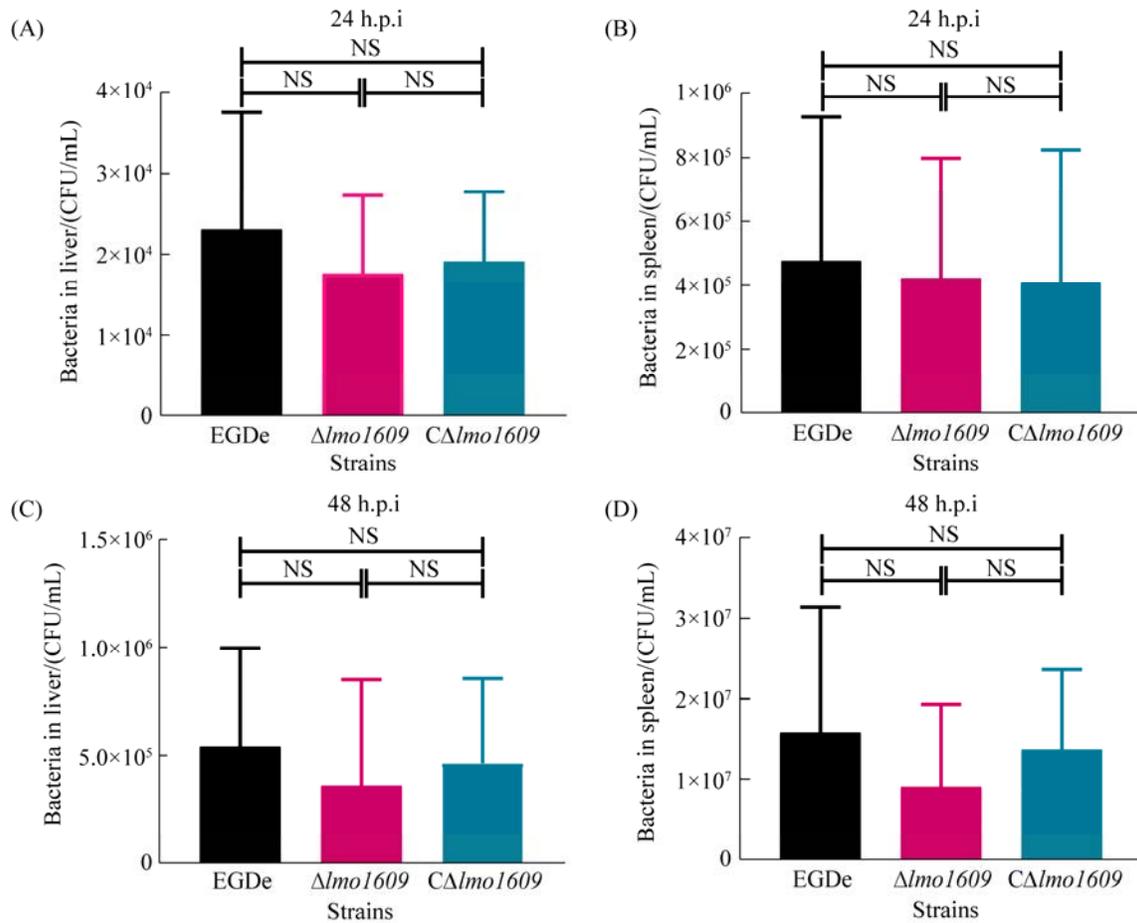


图7 野生株 EGD-e、 $\Delta lmo1609$  和  $C\Delta lmo1609$  在小鼠肝脏(A、C)和脾脏(B、D)内的增殖能力检测  
Figure 7 Detection of wild-type EGD-e and  $lmo1609$  mutants proliferation in mice livers (A, C) and spleens (B, D).

### 2.6.2 $\Delta lmo1609$ 在 ICR 小鼠体内的存活试验

经腹腔注射的方式感染小鼠，每只小鼠接种约  $4 \times 10^6$  CFU 的菌量，观察并记录小鼠在 7 d 内的死亡情况，结果如图 8 所示，与野生株相比，缺失株  $\Delta lmo1609$  和回补株  $C\Delta lmo1609$  对小鼠的致病力没有明显差异( $P > 0.05$ )，结合细胞试验及定殖试验结果，可确定  $lmo1609$  基因的缺失不影响单增李斯特菌的致病力。

## 2.7 单增李斯特菌 Lmo1609 蛋白酶学活性的测定

### 2.7.1 蛋白表达与纯化

经 PCR 鉴定和 Sanger 测序验证，蛋白表达

载体 pSL065 构建成功，经过 IPTG 体外诱导表达、细胞破碎和镍柱亲和层析获得了重组蛋白 Lmo1609。将分离纯化的蛋白稀释成不同浓度进行 SDS-PAGE，结果如图 9A 所示，可见一条与目的蛋白理论分子量大小(11.7 kDa)基本一致的主蛋白条带，表明蛋白表达成功。进一步使用 Western blotting 方法验证 Lmo1609 蛋白的表达，如图 9B 所示，在 11.7 kDa 处发现该蛋白与多克隆抗体的反应强度随着蛋白浓度的增加而增强，反应条带与 SDS-PAGE 一致，可以满足蛋白酶学活性测定需要。图 9B 中在大约 25 kDa 处显示有一 Western blotting 的反应条带，根据

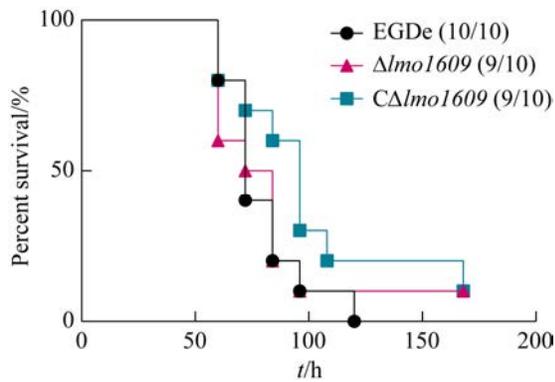


图 8 野生株 EGD-e、 $\Delta lmo1609$  和  $C\Delta lmo1609$  在小鼠体内的存活能力分析

Figure 8 Analysis of the survival rate of wild-type EGD-e and  $\Delta lmo1609$  mutants in mice.

抗体的专一性和特异性，可以认为这一条带应是重组蛋白 Lmo1609 的二聚体。

### 2.7.2 Lmo1609 还原酶学活性测定

采用经典的胰岛素二硫键还原试验，首先是使用不同浓度的重组蛋白催化浓度为 150  $\mu\text{mol/L}$  的胰岛素，以还原酶学活性较高的硫氧还蛋白 TrxA 为阳性对照，以仅加胰岛素的组别为阴性对照。由于反应体系中含有 DTT，随着反应时间的增加胰岛素逐渐被还原(空白对照组)，但是

该进程非常缓慢。随着加入的 Lmo1609 蛋白浓度的增加，相同时间点测得的  $OD_{650}$  数值越高，表明随着 Lmo1609 蛋白浓度增加，胰岛素被还原的程度增加，其中 10  $\mu\text{mol/L}$  Lmo1609 还原的胰岛素的量最多(图 10A)。为进一步分析该酶的催化活性，选择 10  $\mu\text{mol/L}$  Lmo1609 蛋白催化底物浓度分别为 15、30、60、90 和 120  $\mu\text{mol/L}$  的胰岛素，观察 Lmo1609 蛋白在 150 min 内催化胰岛素还原的能力，结果如图 10B 所示。当胰岛素浓度为 15  $\mu\text{mol/L}$  和 30  $\mu\text{mol/L}$  时，检测到的  $OD_{650}$  增加的数值较低，且随着检测时间的增加， $OD_{650}$  数值未有明显变化，说明底物量较少时，Lmo1609 瞬间就可以将胰岛素催化完全；当胰岛素浓度为 60  $\mu\text{mol/L}$  时，在 10 min 时， $OD_{650}$  基本就达到最高值；而随着胰岛素浓度进一步增加，Lmo1609 需要经过一段时间才能催化底物完全还原，所以不同底物浓度呈现出的反应曲线不尽相同。结果表明，在体外单增李斯特菌 Lmo1609 重组蛋白可以将含有二硫键的氧化型胰岛素还原，因此该蛋白具有硫氧还蛋白还原酶活性。

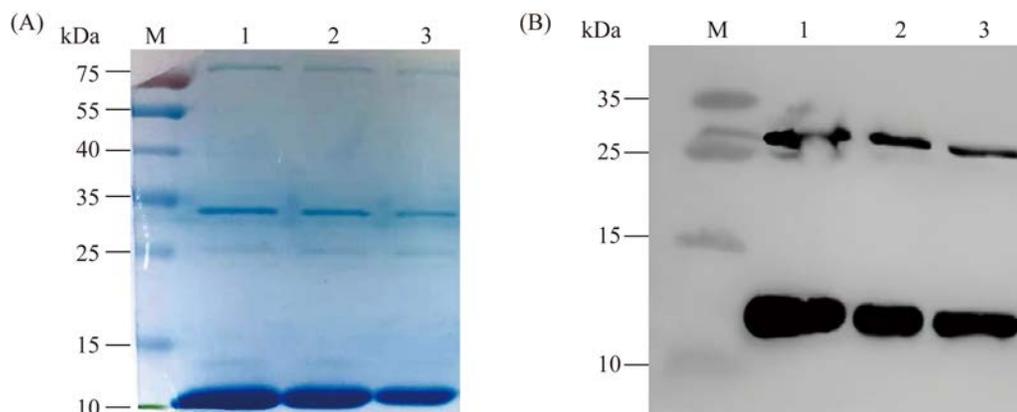


图 9 Lmo1609 蛋白表达的 SDS-PAGE 验证(A)与 Western blotting 分析(B)

Figure 9 Identification of protein Lmo1609 by SDS-PAGE (A) and Western blotting (B). Lane 1: 1  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  of Lmo1609; lane 2: 0.5  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  of Lmo1609; lane 3: 0.25  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  of Lmo1609. M: protein marker.

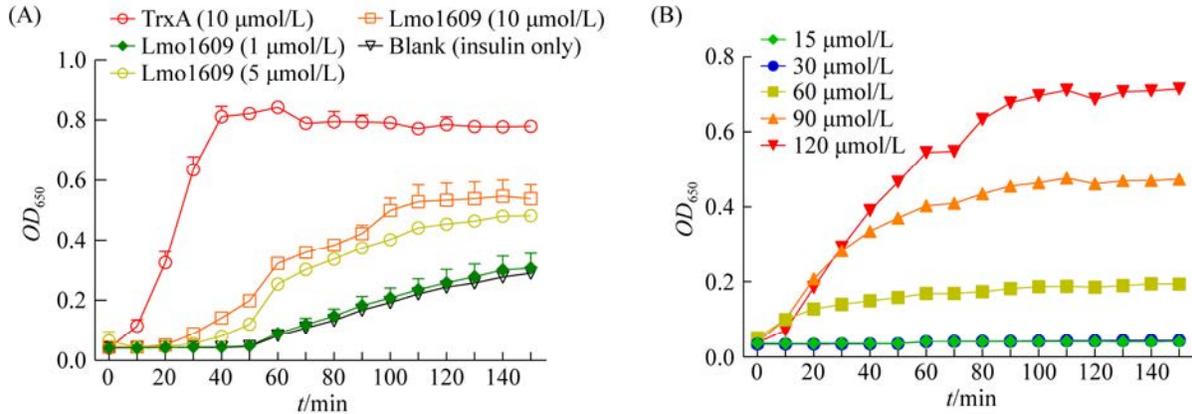


图 10 Lmo1609 蛋白酶活测定

Figure 10 Determination of protease activity of Lmo1609. A: insulin was catalyzed by Lmo1609 at different concentration; B: 10 μmol/L of Lmo1609 was used to catalyze insulin at different concentration of insulin.

### 3 讨论与结论

本研究构建了 *lmo1609* 基因缺失株、回补株及表达菌株，并通过分子生物学、应激生物学和细胞生物学等手段，分析了 Lmo1609 蛋白的酶学活性，比较了野生株和突变株在体外生长、运动、抗氧化应激、细胞黏附、侵袭和增殖及对 ICR 小鼠致病性等方面的生物学差异。结果显示，Lmo1609 具有硫氧化蛋白的还原酶学活性，缺失 *lmo1609* 后细菌的运动性降低、抵抗 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 的氧化应激能力增强。表明硫氧化蛋白 Lmo1609 在细菌运动、抗 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 氧化应激及毒力方面发挥着不同的作用，为丰富硫氧化蛋白功能，深入研究硫氧化蛋白介导应激和感染的作用机制奠定了基础。

本研究证实了缺失 *lmo1609* 不影响单增李斯特菌的生长速率，但在 30 °C 时能使细菌运动性降低。本实验室前期研究表明，与 Lmo1609 同样具有氧化还原酶学活性的其他氧化还原蛋白 DsbA、TrxA 和 YjbH 等的缺失均会影响细菌运动能力<sup>[20]</sup>，由此，我们推测 Lmo1609 影响了鞭毛相关基因的表达。其中 TrxA 与鞭毛关键蛋

白 MogR 之间存在互作，且 TrxA 缺失后影响鞭毛基因 *fliG*、*fliE* 等基因的转录与翻译<sup>[12]</sup>。除了已经报道的鞭毛相关合成蛋白，相对于革兰氏阴性菌，单增李斯特菌鞭毛形成的具体机制尚不明确<sup>[21]</sup>。有研究表明，糖基化酶可以同时介导单增李斯特菌鞭毛运动和环境耐受，提示细菌鞭毛运动和环境耐受之间可能存在联系<sup>[22]</sup>。因此我们推测单增李斯特菌鞭毛合成相关蛋白中含有二硫键，需要氧化还原蛋白的参与来实现鞭毛蛋白二硫键的正确定位与氧化和还原进而发挥功能。但是 Lmo1609 究竟影响了哪些鞭毛合成相关基因的表达还有待进一步研究。后续我们将针对包括 Lmo1609 在内的硫氧化蛋白在调控鞭毛基因合成及运动性中的差异机制进行深入探索，完善单增李斯特菌氧化还原蛋白在调控细菌运动行为中发挥作用的机理。

本研究已经证实单增李斯特菌 Lmo1609 属于硫氧化蛋白家族，具有经典的“CX<sub>1</sub>X<sub>2</sub>C”基序和氧化还原酶活性。CX<sub>1</sub>X<sub>2</sub>C 基序是包括大肠杆菌、枯草芽孢杆菌、单增李斯特菌等在内的细菌氧化还原蛋白应对氧化应激的关键活性位点<sup>[23-25]</sup>。生物信息学分析发现 Lmo1609 的活性

位点与硫氧还蛋白家族成员 TrxA 仅有一个氨基酸的差别。那么  $X_1X_2$  序列对活性位点有何影响还有待进一步研究。

因此, 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。基于本研究基础, 下一步将系统探究单增李斯特菌硫氧还蛋白活性位点参与细菌酶活及调控细菌致病力过程的具体分子机制, 为最终解析硫氧还蛋白系统在细菌感染宿主过程中的氧化还原修饰机制奠定基础。

## 参考文献

- [1] Townsend A, Strawn LK, Chapman BJ, Dunn LL. A systematic review of *Listeria* Species and *Listeria monocytogenes* prevalence, persistence, and diversity throughout the fresh produce supply chain. *Foods*, 2021, 10(6): 1427.
- [2] Angelo KM, Conrad AR, Saupe A, Dragoo H, West N, Sorenson A, Barnes A, Doyle M, Beal J, Jackson KA, Stroika S, Tarr C, Kucerova Z, Lance S, Gould LH, Wise M, Jackson BR. Multistate outbreak of *Listeria monocytogenes* infections linked to whole apples used in commercially produced, prepackaged caramel apples: United States, 2014–2015. *Epidemiology and Infection*, 2017, 145(5): 848–856.
- [3] Shamloo E, Hosseini H, Abdi Moghadam Z, Halberg Larsen M, Haslberger A, Alebouyeh M. Importance of *Listeria monocytogenes* in food safety: a review of its prevalence, detection, and antibiotic resistance. *Iranian Journal of Veterinary Research*, 2019, 20(4): 241–254.
- [4] Boura M, Brensone D, Karatzas KAG. A novel role for the glutamate decarboxylase system in *Listeria monocytogenes*: protection against oxidative stress. *Food Microbiology*, 2020, 85: 103284.
- [5] Jensen AK, Björkman JT, Ethelberg S, Kiil K, Kemp M, Nielsen EM. Molecular typing and epidemiology of human listeriosis cases, Denmark, 2002–2012. *Emerging Infectious Diseases*, 2016, 22(4): 625–633.
- [6] Jordan K, McAuliffe O. *Listeria monocytogenes* in foods. *Advances in Food and Nutrition Research*, 2018, 86: 181–213.
- [7] Schlech WF. Epidemiology and clinical manifestations of *Listeria monocytogenes* infection. *Microbiology Spectrum*, 2019, 7(3). DOI: 10.1128/microbiolspec.GPP3-0014-2018.
- [8] Ezraty B, Gennaris A, Barras F, Collet JF. Oxidative stress, protein damage and repair in bacteria. *Nature Reviews Microbiology*, 2017, 15(7): 385–396.
- [9] 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. *微生物学报*, 2021, 61(2): 346–356.  
Han Y, Ye JW, Cheng CY, Song HH. Thioredoxin system in *Listeria monocytogenes*. *Acta Microbiologica Sinica*, 2021, 61(2): 346–356. (in Chinese)
- [10] Hayes JD, Dinkova-Kostova AT, Tew KD. Oxidative Stress in Cancer. *Cancer Cell*, 2020, 38(2): 167–197.
- [11] 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*. *Gut Microbes*, 2021, 13(1): 1884517.
- [12] 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. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2017, 7: 287.
- [13] Rea R, Hill C, Gahan CGM. *Listeria monocytogenes* PerR mutants display a small-colony phenotype, increased sensitivity to hydrogen peroxide, and significantly reduced murine virulence. *Applied and Environmental Microbiology*, 2005, 71(12): 8314–8322.
- [14] Ruhland BR, Reniere ML. YjbH Requires its thioredoxin active motif for the nitrosative stress response, cell-to-cell spread, and protein-protein interactions in *Listeria monocytogenes*. *Journal of Bacteriology*, 2020, 202(12): e00099-20.
- [15] 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. *In Silico Biology*, 2009, 9(5/6): 407–414.
- [16] Joardar N, Guevara-Flores A, Martínez-González JJ, Sinha Babu SP. Thiol antioxidant thioredoxin reductase: a prospective biochemical crossroads between anticancer and antiparasitic treatments of the modern era. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2020, 165(Pt A): 249–267.
- [17] 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*. *Virulence*, 2019, 10(1): 910–924.
- [18] Wu CQ, Zhang T, Zhang WW, Shi MT, Tu F, Yu A, Li MM, Yang MH. Two DsbA proteins are important for *Vibrio parahaemolyticus* pathogenesis. *Frontiers in Microbiology*, 2019, 10: 1103.
- [19] 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. 浙江农林大学硕士学位论文, 2017.
- [20] Palmer AD, Slauch JM. Envelope stress and regulation of the *Salmonella* pathogenicity island 1 Type III secretion system. *Journal of Bacteriology*, 2020, 202(17): e00272-20.
- [21] Cheng CY, Wang H, Ma TT, Han X, Yang YC, Sun J, Chen ZW, Yu HF, Hang Y, Liu FD, Fang WH, Jiang LL, Cai C, Song HH. Flagellar basal body structural proteins FlhB, FliM, and FliY are required for flagellar-associated protein expression in *Listeria monocytogenes*. *Frontiers in Microbiology*, 2018, 9: 208.
- [22] Zhang T, Bae D, Wang C. *Listeria monocytogenes* DNA glycosylase AdIP affects flagellar motility, biofilm formation, virulence, and stress responses. *Applied and Environmental Microbiology*, 2016, 82(17): 5144–5152.
- [23] Whiteley AT, Ruhland BR, Edrozo MB, Reniere ML. A redox-responsive transcription factor is critical for pathogenesis and aerobic growth of *Listeria monocytogenes*. *Infection and Immunity*, 2017, 85(5): e00978-16.
- [24] Banaś AM, Bocian-Ostrzycka KM, Jagusztyn-Krynicka EK. Engineering of the Dsb (disulfide bond) proteins—contribution towards understanding their mechanism of action and their applications in biotechnology and medicine. *Critical Reviews in Microbiology*, 2019, 45(4): 433–450.
- [25] Zheng CK, Guo S, Tennant WG, Pradhan PK, Black KA, dos Santos PC. The thioredoxin system reduces protein persulfide intermediates formed during the synthesis of thio-cofactors in *Bacillus subtilis*. *Biochemistry*, 2019, 58(14): 1892–1904.

(本文责编 李磊)