



单增李斯特菌末端氧化酶亚基 QoxB 的生物学功能探究

江文玲^{1#}, 徐加利^{1#}, 董欣楠¹, 沈云勤¹, 陈丹丹¹, 江玲丽², 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 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 宁波卫生职业技术学院, 浙江 宁波 315100

江文玲, 徐加利, 董欣楠, 沈云勤, 陈丹丹, 江玲丽, 宋厚辉, 程昌勇. 单增李斯特菌末端氧化酶亚基 QoxB 的生物学功能探究[J]. 微生物学报, 2023, 63(2): 656-669.

JIANG Wenling, XU Jiali, DONG Xinnan, SHEN Yunqin, CHEN Dandan, JIANG Lingli, SONG Houhui, CHENG Changyong. Biological functions of terminal oxidase subunit QoxB in *Listeria monocytogenes*[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2023, 63(2): 656-669.

摘要:【目的】本研究旨在构建单增李斯特菌末端细胞色素 aa3 氧化酶亚基 *qoxB* 基因缺失株, 并探索其在细菌生长及感染过程中发挥的生物学功能。【方法】利用同源重组方法构建获得缺失株 $\Delta qoxB$ 后, 对野生株 EGD-e 和缺失株 $\Delta qoxB$ 的生长能力、细菌运动能力和细胞内黏附、侵袭、增殖及胞内迁移能力进行比较, 同时利用荧光定量 PCR 方法检测 $\Delta qoxB$ 中鞭毛相关基因转录水平的变化。【结果】缺失 *qoxB* 基因后细菌在体外培养过程中生长能力没有差异, 细菌的鞭毛运动能力显著降低, 在 30 °C 培养 24 h 和 48 h 后 $\Delta qoxB$ 运动圈直径分别较 EGD-e 下降 35.86% 和 34.20%, 且 22 个鞭毛相关基因转录水平显著降低。通过细胞感染试验发现缺失 *qoxB* 基因后细胞黏附、侵袭、增殖及胞内迁移能力均显著下降。【结论】本研究首次证实末端氧化酶亚基 QoxB 能降低单增

资助项目: 浙江省自然科学基金(LZ19C180001, LY19C180001); 国家自然科学基金(32172849, 31872620, 31972648); 浙江省属高校基本科研业务费专项资金(2020KJ004); 浙江农林大学学生科研训练项目(S202210341010)

This work was supported by the Natural Science Foundation of Zhejiang Province (LZ19C180001, LY19C180001), the National Natural Science Foundation of China (32172849, 31872620, 31972648), the Fundamental Research Funds for the Provincial Universities of Zhejiang (2020KJ004), and the Scientific Research Training Program for Undergraduate of Zhejiang A&F University (S202210341010).

[#]These authors contributed equally to this work.

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

Received: 2022-06-03; Accepted: 2022-07-30; Published online: 2022-08-12

李斯特菌的运动能力和对细胞的感染能力, 此研究为进一步阐明末端细胞色素氧化酶影响单增李斯特菌的致病机制提供重要依据。

关键词: 单增李斯特菌; 末端氧化酶; 运动性; 感染

Biological functions of terminal oxidase subunit QoxB in *Listeria monocytogenes*

JIANG Wenling^{1#}, XU Jiali^{1#}, DONG Xinnan¹, SHEN Yunqin¹, CHEN Dandan¹, JIANG Lingli², SONG Houhui^{1*}, CHENG Changyong^{1*}

1 College of Animal Science and Technology & College of Veterinary Medicine of Zhejiang A&F University, Key Laboratory of Applied Technology on Green-Eco-Healthy Animal Husbandry of Zhejiang Province, Zhejiang Provincial Engineering Laboratory 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, Hangzhou 311300, Zhejiang, China

2 Ningbo College of Health Sciences, Ningbo 315100, Zhejiang, China

Abstract: [Objective] *Listeria monocytogenes* is an important zoonotic foodborne intracellular pathogen. Here, we aimed to explore the biological functions of cytochrome aa3 terminal oxidase subunit QoxB in *L. monocytogenes* during bacterial growth and infection. [Methods] We constructed a *qoxB* deletion mutant $\Delta qoxB$ based on the wild-type strain EGD-e via homologous recombination. The differences regarding bacterial growth and intracellular infection were analyzed between the wild-type and the mutant strains. In addition, changes in the transcription of flagella-associated genes induced by the deletion of *qoxB* were determined by real-time quantitative reverse-transcription PCR (qRT-PCR). [Results] The deletion of *qoxB* did not affect the bacterial growth ability *in vitro*. However, the motility of $\Delta qoxB$ was significantly decreased compared with that of EGD-e. After incubation at 30 °C for 24 h and 48 h, the diameter of motility halos of $\Delta qoxB$ decreased by 35.86% and 34.2%, respectively, compared with that of EGD-e. The expression abundance of 22 flagella-associated genes reduced significantly in $\Delta qoxB$. Moreover, compared with EGD-e, $\Delta qoxB$ showed significantly reduced abilities of cell adhesion, invasion, proliferation, and intracellular spread. [Conclusion] We demonstrated for the first time that QoxB played a critical role in the motility and infection of *L. monocytogenes*. The findings lay an important basis for elucidating the role of cytochrome terminal oxidase in the pathogenesis of bacterial pathogens.

Keywords: *Listeria monocytogenes*; terminal oxidase; motility; infection

单核细胞增多性李斯特菌 (*Listeria monocytogenes*, 简称单增李斯特菌) 是一种重要的人兽共患食源性胞内病原微生物^[1], 且广泛存

在于自然环境中, 能够在酸性、氧化和高盐等条件下生存^[2-3]。单增李斯特菌常易跟随食物被摄入到人口腔中, 通过消化道黏膜, 经血液扩散到

肝脏、脾脏等靶器官造成感染^[4]。单增李斯特菌进入宿主体内后首先在酸性胃环境中激活重要毒力调控蛋白 PrfA, 后通过小肠绒毛定殖到小肠上皮细胞, 通过内化素 InlA 和 InlB 识别并与特异性受体结合进入胞内, 在磷脂酶 PlcA 和 PlcB 以及溶血素 LLO 共同作用下将吞噬泡裂解从而进入宿主细胞胞质环境。在宿主胞质内完成增殖后通过肌动蛋白聚集蛋白 ActA 使宿主细胞内肌动蛋白募集, 并聚集成彗星状尾巴推动细菌向宿主细胞表面运动, 从而有效逃逸出吞噬泡, 并带动细菌进入邻近细胞进行新一轮复制感染^[5-8]。鞭毛作为单增李斯特菌最重要的运动器官, 在促进细菌环境适应和宿主感染方面发挥重要作用。单增李斯特菌鞭毛合成过程中受转录阻遏物 MogR 和鞭毛抗阻遏物 GmaR 的相互作用影响, 并受温度严格调控。在 37 °C 条件下, MogR 抑制 *gmaR* 以及鞭毛基因的转录, 大多数单增李斯特菌不产生鞭毛且不能运动^[9]; 在 30 °C 及以下温度时, GmaR 与 MogR 结合, 从而拮抗 MogR 的抑制作用使单增李斯特菌鞭毛基因转录激活^[10]。

为逃逸宿主免疫应答从而进行持续感染, 细菌病原体会根据环境调节自身新陈代谢, 以获得最大能量进行生长, 末端氧化酶的利用是病原体优化寄主环境新陈代谢的一种机制^[11]。单增李斯特菌通过糖酵解途径将葡萄糖分解代谢为丙酮酸, 并通过底物水平磷酸化生成 ATP, 利用 II 型 NADH 脱氢酶(由基因 *lmo2389*、*lmo2638* 编码)、3-磷酸甘油脱氢酶 GlpD (由基因 *lmo1293* 编码)和甲酸脱氢酶(由基因 *lmo2586* 编码), 通过甲基萘醌^[12]将电子传递至细胞色素 bd 氧化酶或细胞色素 aa3 氧化酶, 通过电子传递链产生膜内外电势差并通过 F₀F₁-ATP 合成酶合成 ATP^[13]。在没有氧或电子传递链中断情况下, 单核细胞增生李斯特菌生长受限^[13-15]。

细胞色素 aa3 氧化酶通过维持 ATP 合成所需跨膜质子动力来维持细菌能量代谢, *qoxABCD* (基因 *lmo0013-lmo0016*)编码细胞色素 aa3 氧化酶, 由 4 个蛋白亚基构成, 是血红素-铜氧还原酶家族成员之一^[16]。在枯草芽孢杆菌中, 细胞色素 aa3 氧化酶在生长过程中占主导地位, 它的缺失导致三羧酸循环通量严重减少和溢出代谢增加^[17]。单增李斯特菌 *qoxB* (基因 *lmo0014*) 编码细胞色素 aa3 氧化酶亚基 QoxB, QoxB 由 heme a 和 CuB 组成双核金属活性中心, 其组成与真核生物线粒体细胞色素 c 氧化酶亚基 I 类似^[18]。除其生物能量作用之外, 末端氧化酶在细菌生理学中发挥多种功能, 能促进细菌病原体的毒力, 目前被认为是开发新抗生素的靶标^[19], 因此, 本文对细胞色素 aa3 氧化酶亚基 QoxB 在单增李斯特菌中生物学功能进行探索, 为进一步完善李斯特菌防控策略奠定基础。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 菌株、质粒、培养条件及引物

单增李斯特菌参考菌株 EGD-e、 Δhly 、大肠杆菌 DH5 α 和温敏型穿梭质粒 pKSV7, 以上质粒及菌株均为本实验室所有。EGD-e 菌株需接种于牛脑心浸出液肉汤培养基(brain heart infusion, BHI), DH5 α 菌株需接种于肉汤培养基(Luria Bertani, LB)。本试验所涉菌株培养条件为 37 °C 振荡或 30 °C 静置培养。本研究所用到的传代细胞均为本实验室所有。涉及细胞如下: 人肠上皮细胞 Caco-2、小鼠巨噬细胞 RAW264.7 和小鼠成纤维细胞 L929。Caco-2 细胞用 10% 胎牛血清(FBS) 1640 培养基, RAW264.7 细胞和 L929 细胞均用 10% FBS DMEM 培养基, 在 37 °C、含 5% CO₂ 细胞培养箱内静置培养。本研究涉及引物见表 1。

表 1 本研究中用到的引物

Table 1 Primers used in this study

Primers	Sequences (5'→3')
pSL-2886- <i>Bam</i> H I-fwd-a	CGCGGATCCCAAAAATATGCGATGTCTGGCATGAC
pSL-2886-rev-b	CAGATTCCATGGGTTCTCATTCCATTTCATGCCTTATGTCCC
pSL-2886-fwd-c	ATGAAATGGAATGAGAACCCATGGAATCTGTAGAAACAAA
pSL-2886- <i>Pst</i> I-rev-d	AAA <u>ACTGCAG</u> GCAAATAGACACCGGTGAAAATGAAAATCC
pSL-2886-a-front	TGATTCCAGTTGCTATCGTTATTG
pSL-2886-In-fwd	TCGAGGAAAAAATTATTTCGGTTATCCGGC
pSL-2886-In-rev	AGCCATCACCTTGTACGTAAGTGTAATAAC
pKSV7-M13-fwd	GCGATTAAGTTGGGTAACGCC
pKSV7-M13-rev	GCGGATAACAATTCACACAGGA
mogR-RT-fwd	TCTGAAATGCTCAGCCTAAA
mogR-RT-rev	TCGGAATATCTTCTACTTGGA
gmaR-RT-fwd	AGCAAGTTCATCAACCAAAAAG
gmaR-RT-rev	GTTGAGTTGTCATCGAAAGTAAGC
motB-RT-fwd	AAGCGTCGCAAGAAACCG
motB-RT-rev	GAGGCAAACAGAACGATAAATAGAG
fliF-RT-fwd	TCACCATCATGCCTATCCAGTT
fliF-RT-rev	GATGACGGCGAAGAGTAAACC
fliG-RT-fwd	CGCTTATTATTTGGAGCCTTGA
fliG-RT-rev	CGCCGTCCATTTCTTTCATT
fliM-RT-fwd	CACTCAAAGGCTATGTCACCG
fliM-RT-rev	TGCTCTGTCCGCCCTGTAT
flgB-RT-fwd	TTTTCGAGCATCCGGTCAG
flgB-RT-rev	GTTTCGTCTATGTCGGTCCAG
flgC-RT-fwd	ACAAGCGGCTCTGCGTTAA
flgC-RT-rev	GGCGTGATTTCCGATAGGAC
flgD-RT-fwd	ATTAGTAGTTTATCAGGAGCGAGTCAG
flgD-RT-rev	AGTCATCTTTGCCAAGGGTTT
flgE-RT-fwd	GCCAATGCCAACACGACA
flgE-RT-rev	CGAACCGGAACCGAAACT
flgG-RT-fwd	CCAGTTTCATTCCGATCAGTTT
flgG-RT-rev	TTGAATCGCTTCTCCAGTCG
flgK-RT-fwd	TTACGGTGACGGTGGTCTACTTG
flgK-RT-rev	GCGGATTGTTTGGCGATTT
flgL-RT-fwd	TAACTCAGAAGACGATGGCAGAT
flgL-RT-rev	TTCGGTTGTCCCCTTATAGATG
fliD-RT-fwd	AAGGTGATTCCGGCTGTTCTCG
fliD-RT-rev	CACGCCTGGGATGTAGTTGG
fliE-RT-fwd	ATGCAGCCAGCGTCTTACC
fliE-RT-rev	CTATCCAGCATTGCGTGAAG
fliH-RT-fwd	ACGTCACCACCCACCCAGAA
fliH-RT-rev	CGCCGTAATCCAGTCGCATAT
fliI-RT-fwd	CGTAACGCCAAAAGCAGACAT
fliI-RT-rev	TCCGAGGTAGCAGCAACAAT
fliP-RT-fwd	TACGGTTCTTTCTTTGTCTGCA
fliP-RT-rev	CCAAGACCCTGCCTCGTTA
fliQ-RT-fwd	TGGTAGTGATTGTGGTTGCGATTT
fliQ-RT-rev	ATCCACGGTCCAAGAATAAAGA
fliR-RT-fwd	GAACATTCCGAACAGTGTCAAGG
fliR-RT-rev	AGCGTCGTAATACCAGAAACATCCA
flhA-RT-fwd	CAGCGGAGGTAGCAGCAAGA
flhA-RT-rev	GGTTTCCATATTCAAGTAAGCACGT
flhB-RT-fwd	GAGGTTCGTGAAAGCGTTATTGT
flhB-RT-rev	CGGTGTAACATAATGAGCGTATCTAA
flaA-RT-fwd	CTTGATGACGCTGCTGGTCT
flaA-RT-rev	AGCTGAATCCGCTGTTTGA

The restriction sites are underlined.

1.1.2 试剂

KOD plus Neo PCR 酶、Ligation high Ver.2 连接酶、SYBR qPCR mix 和 Real-time PCR 逆转录试剂盒, Toyobo 公司; 限制性核酸内切酶, NEB 公司; 质粒提取试剂盒以及 PCR 产物纯化/回收试剂, 上海惠凌生物科技有限公司; 胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)、dulbecco's modified eagle 培养基(DMEM)、胰酶(0.25% Trypsin-EDTA)和 roswell park memorial institute 1640 培养基(RPMI 1640)购自 Thermo Fisher Scientific; BHI 培养基, OXOID 公司; LB 培养基及柱式细菌总 RNA 抽提纯化试剂盒, 生工生物工程(上海)股份有限公司; Trizol Reagent, Invitrogen 公司。

1.2 *qoxB* 基因缺失株重组质粒的构建和基因缺失株 $\Delta qoxB$ 的构建

利用单增李斯特菌温度敏感性穿梭质粒 pKSV7 构建 *qoxB* 基因缺失株重组质粒 pSL2886, 构建路径如图 1 所示。基于同源重组原理参照本实验室已发表实验方法^[20]。以 EGD-e 菌株全基因组(GenBank 登录号为 NC_003210.1)为模板, 从 NCBI 上下载 *qoxB* 基因序列, 利用 Snapgene 软件在 *qoxB* 上、下游各约 600 bp 处设计引物(pSL2886-BamH I-fwd-a/pSL2886-rev-b 和 pSL2886-fwd-c/pSL2886-rev-Pst I-d)。利用重叠 PCR 方法获得同源重组片段, 酶切后插入 pKSV7 载体中, 后续通过转化、质粒提取和测序验证获得重组质粒 pSL2886。将 pSL2886 电转入 EGD-e 感受态中, 通过温度和氯霉素双重压力进行同源重组克隆筛选, 利用距离上游同源臂 200 bp 处设计 1 条引物(pSL2886-a-front), 并在 *qoxB* 基因上选择长约 500 bp 设计 1 对内部引物(pSL-2886-In-fwd/pSL-2886-In-rev)对筛选出的重组克隆进行 PCR 验证, 最终通过测序验证获得基因缺失株 $\Delta qoxB$ 。

1.3 生长曲线的测定

挑取 EGD-e、 $\Delta qoxB$ 单克隆菌落震荡培养

12 h 后, 按 1:100 转接至新培养基中, 并分别置于 30 °C、37 °C 培养箱振荡培养。每隔 1 h 取样并测定 OD_{600} , 连续检测至 12 h。

1.4 运动性试验

准备好新鲜配置的含有 1.00% 胰蛋白胍、0.25% 琼脂和 2.00% NaCl 半固体琼脂培养基[soft (0.25%) tryptone soya agar, TSA], 用牙签将 PBS 调好的 EGD-e、 $\Delta qoxB$ (调至 $OD_{600}=0.6$) 垂直接种到半固体培养基中, 放入 30 °C 和 37 °C 恒温培养箱, 静置培养 24 h 和 48 h 后观察细菌运动直径并拍照记录。

1.5 荧光定量 PCR 方法检测 EGD-e、 $\Delta qoxB$ 鞭毛基因的转录水平

挑取 EGD-e、 $\Delta qoxB$ 单克隆菌落震荡培养 12 h 后, 按 1:100 转接至新培养基中, 置于 30 °C 培养箱内振荡培养。当菌液 OD_{600} 到 0.6 左右时, 取 5 mL 菌液离心后弃上清。加入 1 000 μ L Trizol 后, 使用均质仪破碎菌体, 收集上清。利用细菌总 RNA 快速抽提试剂盒提取 EGD-e、 $\Delta qoxB$ 的总 RNA, 以 EGD-e、 $\Delta qoxB$ 的总 RNA 为模版, 反转录得到相应的 cDNA。采用荧光定量 PCR 方法研究 *qoxB* 基因对鞭毛基因的转录水平的影响, 试验所用引物如表 1 所示。本试验所用到的鞭毛相关基因为: *mogR* (Gene ID: 985015)、*flp* (Gene ID: 985021)、*fliQ* (Gene ID: 985022)、*fliR* (Gene ID: 985024)、*flhB* (Gene ID: 986322)、*flhA* (Gene ID: 986323)、*flgG* (Gene ID: 985030)、*motB* (Gene ID: 986861)、*gmaR* (Gene ID: 986281)、*flaA* (Gene ID: 987167)、*flgD* (Gene ID: 985038)、*flgE* (Gene ID: 985043)、*fliM* (Gene ID: 987173)、*flgK* (Gene ID: 985054)、*flgL* (Gene ID: 985052)、*fliD* (Gene ID: 985053)、*flgB* (Gene ID: 985059)、*flgC* (Gene ID: 984818)、*fliE* (Gene ID: 985062)、*fliF* (Gene ID: 985064)、*fliG* (Gene ID: 985067)、*fliH* (Gene ID: 985068)和 *fliI* (Gene ID: 985071)。

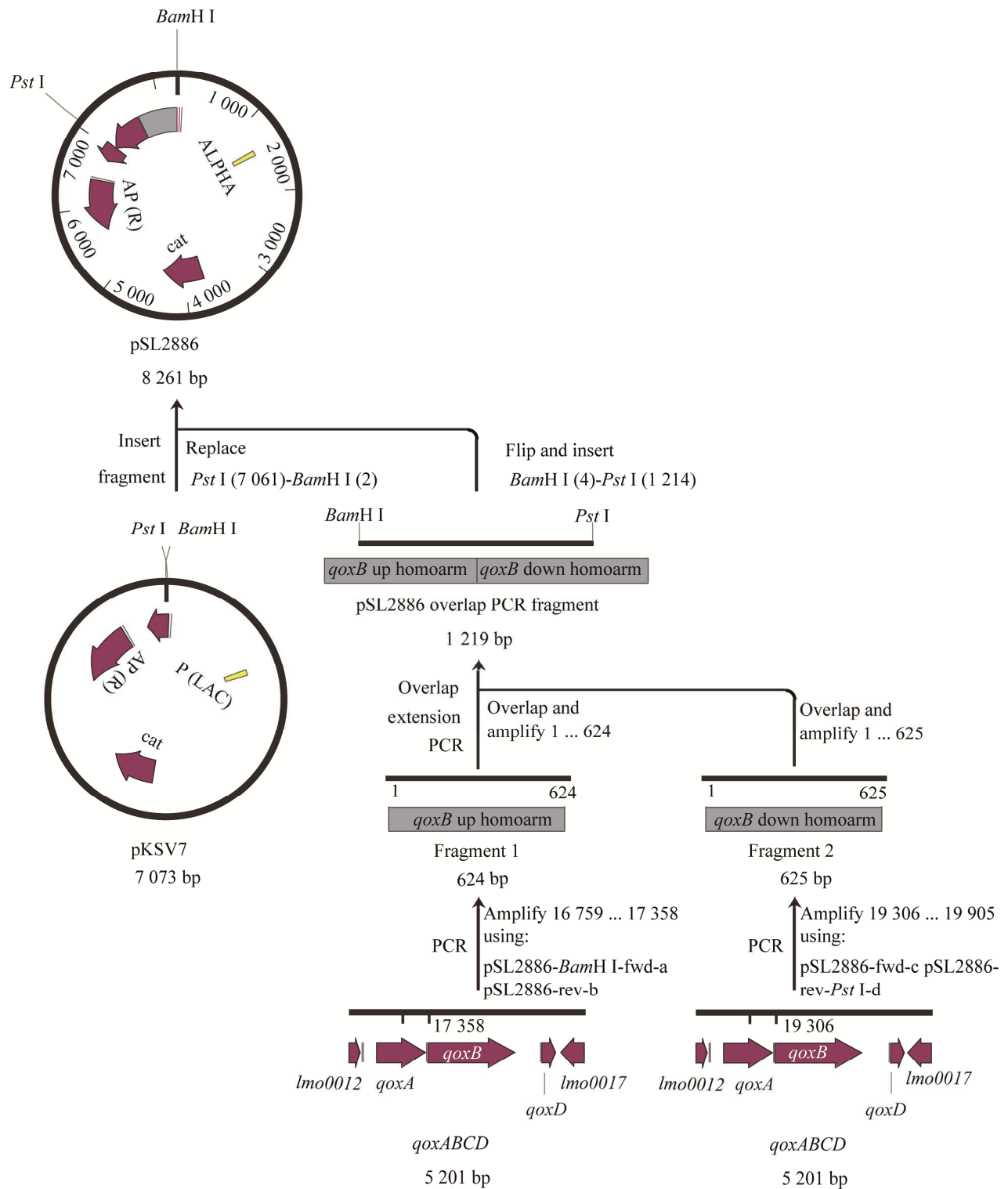


图 1 *qoxB* 基因缺失株重组质粒 pSL2886 的构建策略

Figure 1 Construction strategy of the recombinant plasmid pSL2886 for deletion of *qoxB*.

1.6 人肠上皮细胞 Caco-2 黏附和侵袭试验

EGD-e、 $\Delta qoxB$ 培养 $OD_{600}=0.6$ 左右(约 1×10^9 CFU/mL),用 10 mmol/L PBS 连续 10 倍稀释 2 次,最后 10 倍稀释于 1640 细胞培养基中, Caco-2 细胞铺板后,按照 MOI=10:1 感染 Caco-2 细胞。黏附: 37 °C、5% CO₂ 感染 30 min, 此时记作 0 h, 用 10 mmol/L PBS 洗涤 3 次细胞, 每孔加入 Trypsin-EDTA (0.25%) 裂解 10 min, 充分吹打混匀后进行裂解细胞和细菌稀释涂板计数。侵袭: 其余孔随后加入终浓度为 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 庆大霉素的 DMEM 细胞培养基, 37 °C、5% CO₂ 作用 30 min 杀死胞外细菌, 继续培养 1.5 h 后进行裂解细胞和细菌稀释涂板计数。

1.7 小鼠巨噬细胞 RAW264.7 增殖试验

EGD-e、 $\Delta qoxB$ 培养 $OD_{600}=0.6$ 左右, 随后用 10 mmol/L PBS 连续 10 倍稀释 2 次, 最后 10 倍稀释于 DMEM 细胞培养基中, 以 MOI=10:1 感染细胞, 感染 30 min 后用 10 mmol/L PBS 洗涤 3 次, 加入终浓度为 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 庆大霉素的 DMEM 细胞培养基, 37 °C、5% CO₂ 作用 30 min 杀死胞外细菌后用 10 mmol/L PBS 洗涤 3 次, 加入终浓度为 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 庆大霉素的 DMEM (含 10% FBS) 细胞培养基, 此时计作细菌胞内增殖 0 h; 再培养到增殖时间分别为 2、5 和 8 h 时, 进行裂解细胞和细菌稀释涂板计数。本试验选取的对照菌株 Δhly 为单增李斯特菌 LLO 缺失株, 缺失 LLO 后单增李斯特菌丧失膜穿孔能力^[7]。

1.8 小鼠成纤维细胞 L929 空斑试验

EGD-e、 $\Delta qoxB$ 培养至 $OD_{600}=0.6$ 左右, 用 10 mmol/L PBS 连续 10 倍稀释 2 次, 最后 10 倍稀释于 DMEM 细胞培养基中, 以 MOI=1:5 感染细胞, 感染上菌液后, 不同角度水平晃动培养板, 使分布均匀, 每 15 min 晃动 1 次, 37 °C、5% CO₂

条件下培养 1 h; 10 mmol/L PBS 洗涤细胞 3 次, 加入终浓度为 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 庆大霉素的 RPMI 1640 细胞培养基, 37 °C、5% CO₂ 继续培养 1 h 杀灭胞外细菌。10 mmol/L PBS 洗涤细胞 3 次, 加入含终浓度为 0.7% 低熔点琼脂糖和 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 庆大霉素的无酚红 DMEM (含 10% FBS) 细胞培养基, 琼脂凝固后, 将 6 孔板倒置于 37 °C (含 5% CO₂) 细胞培养箱中继续培养 3 d 直至看到空斑。每孔加入 600 μL 40% 甲醛溶液, 置于 37 °C 培养箱固定 2 h, 倒扣拍掉琼脂, 每孔加入 600 μL 0.5% 的结晶紫溶液, 染色 10 min 后用 10 mmol/L PBS 冲洗拍照。

1.9 数据统计

Adobe Illustrator 2021 和 Adobe Photoshop CC 2019 进行图片处理。用 Graphpad Prism 9.0 对数据进行分析。其中 ns 表示 $P>0.05$, * 表示 $P<0.05$, ** 表示 $P<0.01$, *** 表示 $P<0.001$, **** 表示 $P<0.0001$ 。

2 结果与分析

2.1 构建单增李斯特菌 $qoxB$ 基因缺失株 $\Delta qoxB$

利用同源重组的方法框内敲除 $qoxB$ 基因并成功构建缺失株 $\Delta qoxB$, 用 PCR 扩增和 DNA 测序的方法对基因缺失株进行验证。如图 2 所示, 用内部引物 pSL-2886-In-fwd/pSL-2886-In-rev 以野生株 EGD-e 为模板扩增的条带大小为 559 bp (图 2A 泳道 1), 以 $\Delta qoxB$ 为模板扩增没有条带 (图 2A 泳道 2); 用外部引物 pSL-2886-a-front/pSL-2886-Pst I-rev-d 以 EGD-e 为模板扩增的条带大小为 3 410 bp (图 2B 泳道 1), 以 $\Delta qoxB$ 为模板扩增 1 430 bp (图 2B 泳道 2)。并通过 DNA 测序方法验证, 测序结果正确 (图 2C), 表明 $qoxB$ 基因缺失株构建成功。

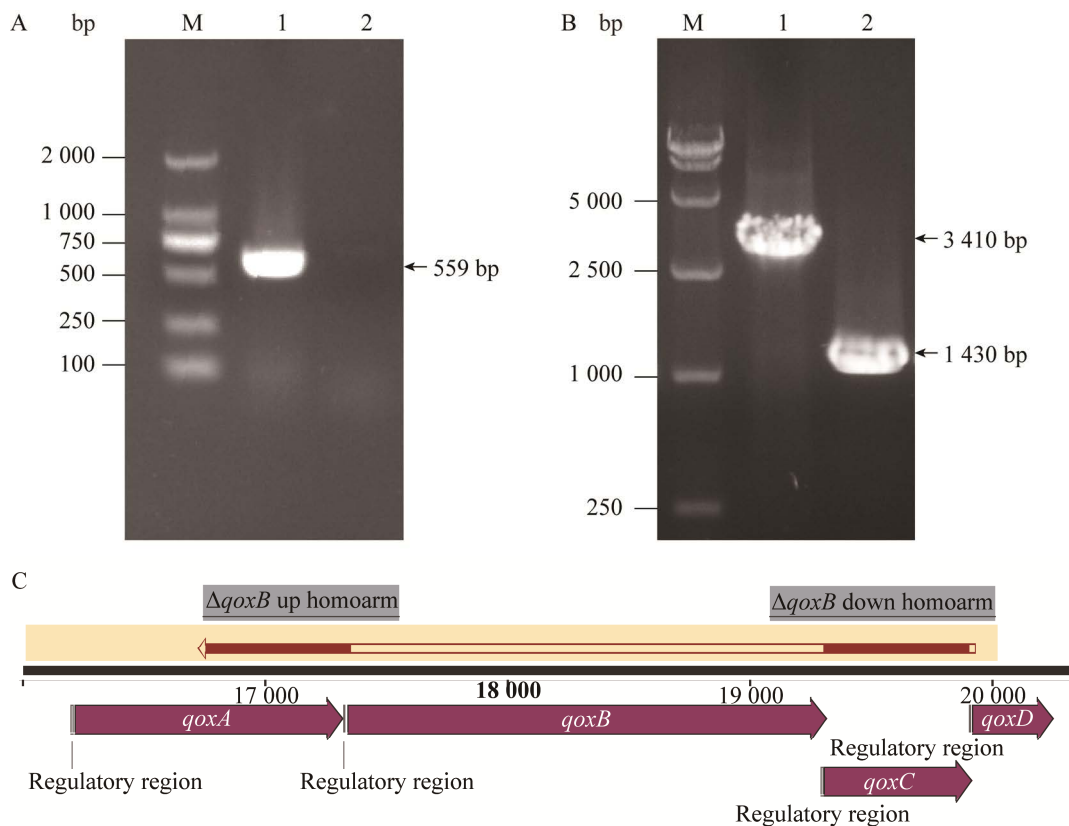


图 2 *qoxB* 基因缺失株的 PCR 鉴定和测序结果分析

Figure 2 Confirmation of *qoxB* deletion mutant $\Delta qoxB$ by PCR and sequencing analysis. A: PCR confirmation of the wild-type EGD-e and $\Delta qoxB$ strains by using internal primers. M: DL2000 DNA marker; lane 1: EGD-e; lane 2: $\Delta qoxB$. B: PCR confirmation of the wild-type EGD-e and $\Delta qoxB$ strains by using external primers. M: DL2000 DNA marker; lane 1: EGD-e; lane 2: $\Delta qoxB$. C: Sequencing analysis of $\Delta qoxB$.

2.2 缺失 *qoxB* 基因后不影响单增李斯特菌体外生长能力

比较 EGD-e 和 $\Delta qoxB$ 分别在 30 °C (图 3A) 和 37 °C (图 3B) 条件下 BHI 液体培养基中培养的生长情况。结果显示, 在对数期和稳定期 $\Delta qoxB$ 生长趋势略低于野生株 EGD-e, 但总体生长趋势与 EGD-e 相比差异并不显著, 说明缺失 *qoxB* 基因并不影响单增李斯特菌的体外生长能力。

2.3 缺失 *qoxB* 基因后单增李斯特菌的运动能力显著下降

为探究 *qoxB* 基因是否能影响细菌的运动性, 通过半固体培养基 TSA 对 EGD-e、 $\Delta qoxB$ 运动能力进行测定。如图 4A、4B 所示, 在 30 °C

培养条件下, $\Delta qoxB$ 的体外运动能力较 EGD-e 显著降低。在培养 24 h 后 $\Delta qoxB$ 运动圈直径为 15.48 mm, 小于 EGD-e 运动圈直径 24.13 mm, 运动性下降 35.86%; 在培养 48 h 后, $\Delta qoxB$ 运动圈直径为 35.59 mm, 相比较 EGD-e 的 54.10 mm 下降 34.2% (图 4B)。试验结果显示, 单增李斯特菌缺失 *qoxB* 基因后运动能力显著减弱, 表明 *qoxB* 基因与单增李斯特的运动能力相关。

为进一步探索 *qoxB* 基因在单增李斯特菌运动能力中发挥的作用, 利用荧光定量 PCR 方法对 EGD-e 和 $\Delta qoxB$ 的鞭毛相关基因转录水平进行检测。如图 4C 所示, 与 EGD-e 相比, 鞭毛马

达蛋白基因 *motB*、*fliM*，鞭毛基座蛋白基因 *flgB*、*flgD*、*flgG*、*fliE*、*flhA*、*fliI*、*fliP*、*fliQ*、*fliG*、*flgC*、*fliF*、*fliH*、*fliR*，鞭毛钩蛋白基因 *fliD*、*flgE*、*flgK*、*flgL*，鞭毛温度调控蛋白基因 *gmaR*

和 *mogR*，鞭毛丝蛋白基因 *flaA* 共 22 个基因转录水平均显著下降，鞭毛基座蛋白基因 *flhB* 转录水平无差异。表明 *qoxB* 基因可通过影响鞭毛基因的转录进而影响单增李斯特菌的运动能力。

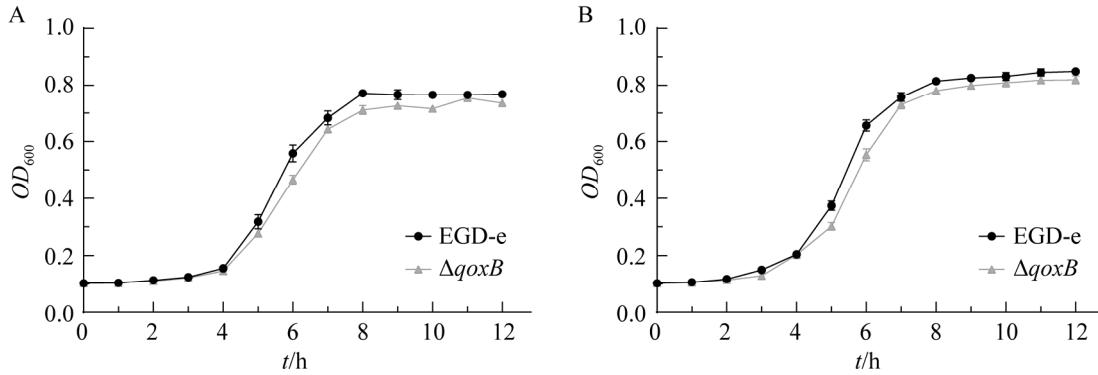


图 3 EGD-e 和 $\Delta qoxB$ 在不同温度下培养的生长曲线测定

Figure 3 Growth curves of the wild-type EGD-e and $\Delta qoxB$ strains in BHI broth at 30 °C or 37 °C. A: Growth curves of the wild-type EGD-e and $\Delta qoxB$ strains in BHI broth at 30 °C. B: Growth curves of the wild-type EGD-e and $\Delta qoxB$ strains in BHI broth at 37 °C.

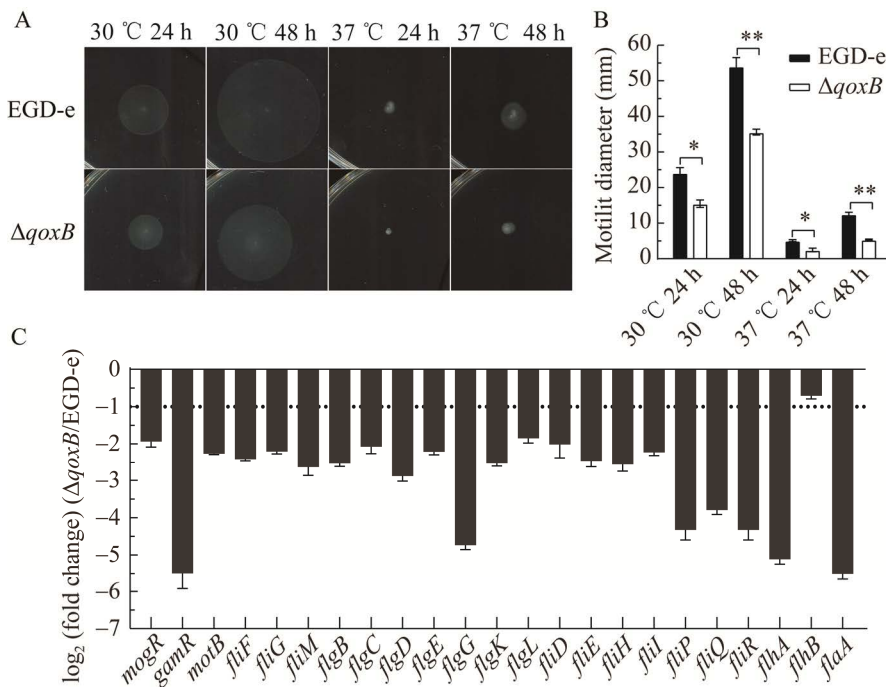


图 4 EGD-e 和 $\Delta qoxB$ 的运动能力分析

Figure 4 Motility assay of wild-type EGD-e and $\Delta qoxB$ strains. A: Motility of wild-type EGD-e and $\Delta qoxB$ strains incubated at 30 °C or 37 °C. B: After incubation at 30 °C for 24 h and 48 h, the diameters of motility halos of wild-type EGD-e and $\Delta qoxB$ were measured. C: Effects of *qoxB* on changes in the transcription of the flagella-associated genes. *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$.

2.4 缺失 *qoxB* 基因后单增李斯特菌对细胞的黏附、侵袭能力显著减弱

细菌鞭毛在增强单增李斯特菌黏附侵袭上皮细胞过程中发挥巨大作用^[21]。Caco-2 作为肠上皮细胞,是研究单增李斯特菌在体内黏附、侵袭能力较为理想与经典的细胞模型。为进一步探究 *QoxB* 对细菌入侵宿主细胞能力的影响,以 EGD-e 和 $\Delta qoxB$ 为研究对象,利用 Caco-2 进行黏附和侵袭试验。试验结果显示在黏附和侵袭过程中, $\Delta qoxB$ 黏附在 Caco-2 细胞表面菌量 ($P=0.0009$) (图 5A) 及侵袭到胞内菌量 ($P=0.013$) (图 5B) 均显著少于 EGD-e, 结果表明单增李斯特菌缺失 *qoxB* 基因后对细胞的黏附和侵袭能力显著减弱。

2.5 缺失 *qoxB* 基因后单增李斯特菌在胞内的逃逸吞噬能力显著减弱

鉴于缺失 *qoxB* 基因后单增李斯特菌对肠上皮细胞的黏附和侵袭能力下降,我们为进一步探究 $\Delta qoxB$ 胞内逃逸吞噬能力,为模拟细菌在宿主体内耐受免疫细胞清除过程,分别以 EGD-e 和 $\Delta qoxB$ 为研究对象,采用 RAW264.7 细胞作为细菌在免疫细胞攻击下胞内存活的感染细胞

模型,进行细菌胞内增殖试验。如图 6A 所示,EGD-e、 $\Delta qoxB$ 在感染 0.5 h 及 2 h 后在巨噬细胞内存活细菌数量无明显变化。在感染 5 h ($P=0.0173$) 和 8 h ($P=0.0122$) 后,与 EGD-e 相比, $\Delta qoxB$ 在巨噬细胞内存活细菌数量显著减少,且与 LLO 缺失株 Δhly 相比胞内存活细菌数无显著差异(图 6B),表明缺失 *qoxB* 基因后胞内逃逸吞噬能力大大减弱。

2.6 缺失 *qoxB* 基因后单增李斯特菌在细胞间的迁移能力显著减弱

单增李斯特菌作为胞内寄生菌,其细胞间迁移能力对于细菌感染至关重要。细胞蚀斑试验是比较用来检验单增李斯特菌在细胞间迁移能力的经典方法,以 EGD-e、 $\Delta qoxB$ 为研究对象,选用 L929 细胞对细胞间迁移感染能力进行探索。蚀斑直径越大,表明细菌在细胞间迁移能力越强。如图 7A 所示, $\Delta qoxB$ 蚀斑直径明显小于 EGD-e, Δhly 则不形成蚀斑。经统计学分析后发现 $\Delta qoxB$ 形成蚀斑直径大小相较于野生株显著减小 ($P<0.0001$),表明单增李斯特菌缺失 *qoxB* 基因后在 L929 细胞中迁移能力明显减弱。

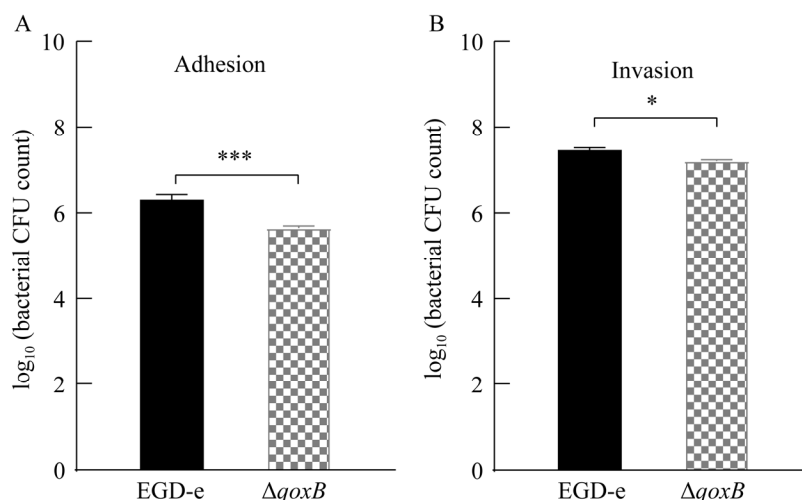


图 5 EGD-e 和 $\Delta qoxB$ 在 Caco-2 细胞中的黏附率和侵袭率分析

Figure 5 Analysis of adhesion (A) and invasion (B) of wild-type EGD-e and $\Delta qoxB$ strains in Caco-2 cells. *: $P<0.05$; ***: $P<0.001$.

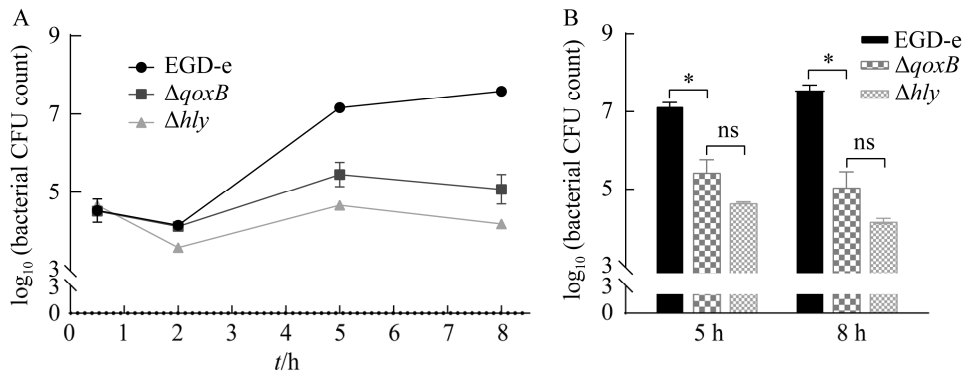


图 6 EGD-e、 $\Delta qoxB$ 和 Δhly 在 RAW264.7 巨噬细胞内增殖能力分析

Figure 6 Analysis of intracellular growth of wild-type EGD-e, $\Delta qoxB$ and Δhly strains in RAW264.7 macrophages. A: Intracellular growth of wild-type EGD-e, $\Delta qoxB$ and Δhly strains in RAW264.7 macrophages. Gentamycin (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) was added 30 min post infection. B: The RAW264.7 macrophages infected with wild-type EGD-e, $\Delta qoxB$ and Δhly strains were lysed at the indicated time points (5 and 8 h). The mutant strain Δhly , which is completely unable to spread during cell infection, was taken as a reference negative control. ns: $P > 0.05$; *: $P < 0.05$.

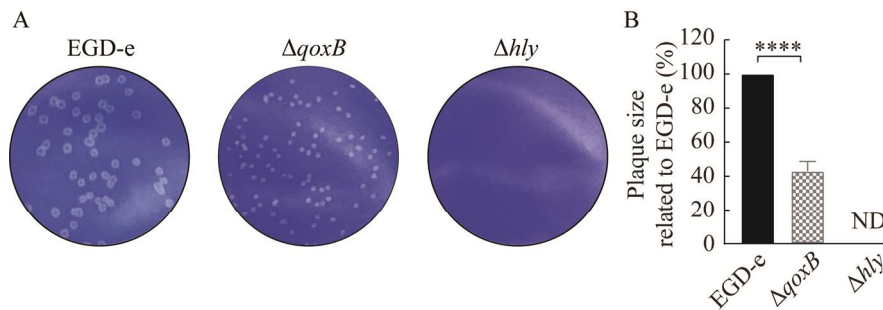


图 7 EGD-e、 $\Delta qoxB$ 和 Δhly 在 L929 细胞间的迁移能力分析

Figure 7 Plaque assay of wild-type EGD-e, $\Delta qoxB$ and Δhly strains performed using L929 fibroblasts. A: Plaque assay performed on the L929 fibroblast monolayers infected by wild-type EGD-e, $\Delta qoxB$ and Δhly strains. B: The plaque sizes of wild-type EGD-e, $\Delta qoxB$ and Δhly strains were indicated as a percentage of those formed by EGD-e. The mutant strain Δhly , which is completely unable to spread during cell infection, was taken as a reference negative control. ****: $P < 0.0001$; ND: Not detectable.

3 讨论与结论

末端氧化酶の利用使细菌能够应对环境氧含量的快速变化。结核分枝杆菌在从急性感染到慢性感染的转变过程中，下调细胞色素 aa3 氧化酶并上调细胞色素 bd 氧化酶，该过程有助于在 NO 增加和 O_2 水平降低的情况下产生能量，且结核分枝杆菌细胞色素 bd 氧化酶缺失株不能进

行持续性肺部感染^[22]。细胞色素 bd 氧化酶的缺失影响大肠杆菌在鼠肠道模型的定殖，并能够导致福氏志贺氏菌毒力减弱，以上结果表明细胞色素 bd 氧化酶在缺氧条件下发挥重要作用^[12,23]。本研究证实了单增李斯特菌细胞色素 aa3 亚基 $\Delta qoxB$ 缺失株在正常氧存在水平下对单增李斯特菌体外环境的运动能力及感染过程均有显著影响。金黄色葡萄球菌 *cydB* 缺失株在液体培养基中培养时不

表现出生长缺陷, 但 $\Delta qoxB$ 缺失株在有氧生长中略有生长缺陷, 表明在金黄色葡萄球菌中细胞色素 aa3 氧化酶是有氧生长条件下细菌使用的主要末端氧化酶^[24]。缺失 $qoxB$ 基因不影响单增李斯特菌正常生长, 但在对数期和稳定期, $\Delta qoxB$ 生长趋势略低于野生株 EGD-e, 结果与金黄色葡萄球菌 $\Delta qoxB$ 缺失株在有氧生长中略有生长缺陷结果一致, 表明细胞色素 aa3 氧化酶是单增李斯特菌在有氧生长条件下使用的主要末端氧化酶。

单增李斯特菌中有几十种鞭毛相关蛋白, 它们作为调节蛋白、结构蛋白、辅因子和 ATP 酶等, 在鞭毛合成和运动中这些蛋白起着不可替代的作用^[25]。FliI 是鞭毛装置的 ATP 酶, 并自组装成同型六聚体发挥其 ATP 酶活性^[26]。在大肠杆菌中, 通过 FoF1-ATP 合成酶通过其 β 亚基与鞭毛开关蛋白 FliG 相互作用, NADH-泛醌氧化还原酶与 FliG、FliM 相互作用对细菌鞭毛运动进行能量供给, 在邻近鞭毛马达的膜区可测得比其他膜区更高的 ATP 合成速率、ATP 水解速率和电子传递速率^[27], 证实鞭毛合成和运动离不开末端氧化酶参与电子传递进行供能, 推测在鞭毛进行合成或运动时需要大量 ATP, 单侧电子传递速率已经无法支持鞭毛运动所需能量。我们的试验结果表明, 缺失 $qoxB$ 基因后鞭毛相关基因的转录水平显著下降, 且运动能力也显著下降。单增李斯特菌鞭毛基因的表达在某种程度上也会对细菌的生长有所影响。而 $\Delta qoxB$ 在 30 °C 或 37 °C 对数期和稳定期生长都较慢, 可能与鞭毛基因表达量下降有关, 缺失 $qoxB$ 基因后影响末端氧化酶与鞭毛相关 ATP 酶的相互作用, 使细菌鞭毛运动不能进行能量供给, 导致细菌生长变慢。

Sec 系统是原核生物中经典且最重要的蛋白质转运系统, 使含有 N 端信号肽的多肽能够跨胞质膜转运, 与膜表面结合或进一步释放到细胞外环境中^[28]。已有证据证明 LLO、PlcA、PlcB

和 ActA 的分泌需要 Sec 系统参与^[29]。SecA 需要与 ATP 结合后, 通过 ATP 水解依赖性构象变化与蛋白质易位结合起来^[30]。除 SecA 外, 革兰氏阳性菌 Sec 系统中表达一个额外的 SecA ATP 酶 (SecA2), 表明 Sec 分泌系统更加依赖于 ATP 的产生^[31]。本试验证实 $qoxB$ 基因缺失显著减弱单增李斯特菌对细胞黏附侵袭、胞内增殖及胞间迁移能力。表明在缺失 $qoxB$ 基因的条件下, 电子传递速率明显下降, 膜内外电势差减小影响 ATP 合成, 从而导致毒力蛋白分泌速率下降, 使 $\Delta qoxB$ 对细胞黏附侵袭、胞内增殖及胞间迁移能力均下降。

ResDE 双组分调节系统调节解淀粉芽孢杆菌 SQR9 中的生物膜形成^[32]。缺失 ResD/E 会影响细胞色素装置的转录水平, 且 ResD 可以直接与 $qoxABCD$ 和 $ctaCDEF$ 启动子结合^[33]。当细菌感知氧含量降低时激活 ResDE 系统, 之后磷酸化的 ResD 蛋白通过直接结合启动子区域的方式来激活末端氧化酶的表达, 末端氧化酶可以与 KinB 相互作用以激活生物膜的形成, KinB 调节参与芽孢杆菌生物膜形成的主要 Spo0A 途径, KinB 活性由细胞色素装置控制^[34]。在表皮葡萄球菌中, SrrAB 与枯草芽孢杆菌的 ResDE 具有相当大的同源性, 在有氧条件下, SrrAB 通过正向调节 $qoxABCD$ 转录来调节电子传递链活性^[35]。关于单增李斯特菌末端氧化酶是否由双组分系统调控, 能否对生物膜的形成也造成影响仍有待进一步研究。此外, 本研究在构建 $qoxB$ 基因互补株过程中遇到整合型质粒与基因本身启动子搭配效果差的问题。因此, 针对本文中的相关实验结果是因为缺失 $qoxB$ 基因所导致, 或是缺失 $qoxB$ 基因影响了其他(鞭毛、蛋白转运系统或双组分系统)相关基因的表达调控所导致还有待进一步验证。

综上所述, 本研究首次证实末端氧化酶亚基 QoxB 影响单增李斯特菌的运动能力和细胞的黏附侵袭、胞内增殖及胞间迁移能力, 其具体的分

子机制有待后续深入研究。本研究结果为深入理解单增李斯特菌能量代谢与细菌感染之间存在的关系奠定基础,对于进一步完善李斯特菌防控策略具有深远意义。

参考文献

- [1] 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.
- [2] 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-e00118.
- [3] HARRIS J, PAUL O, PARK SH, WHITE SJ, BUDACHETRI K, MCCLUNG DM, WILSON JG, OLIVIER AK, THORNTON JA, BROADWAY PR, RICKE SC, DONALDSON JR. Oxygen deprivation influences the survival of *Listeria monocytogenes* in gerbils[J]. *Translational Animal Science*, 2019, 3(1): 304-314.
- [4] RADOSHEVICH L, COSSART P. *Listeria monocytogenes*: towards a complete picture of its physiology and pathogenesis[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2018, 16(1): 32-46.
- [5] MITCHELL G, CHENG MI, CHEN C, NGUYEN BN, WHITELEY AT, KIANIAN S, COX JS, GREEN DR, MCDONALD KL, PORTNOY DA. *Listeria monocytogenes* triggers noncanonical autophagy upon phagocytosis, but avoids subsequent growth-restricting xenophagy[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2018, 115(2): E210-E217.
- [6] BONAZZI M, LECUIT M, COSSART P. *Listeria monocytogenes* internalin and E-cadherin: from bench to bedside[J]. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 2009, 1(4): a003087.
- [7] OSBORNE SE, BRUMELL JH. Listeriolysin O: from bazooka to Swiss army knife[J]. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 2017, 372(1726): 20160222.
- [8] PILLICH H, PURI M, CHAKRABORTY T. ActA of *Listeria monocytogenes* and its manifold activities as an important listerial virulence factor[J]. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 2017, 399: 113-132.
- [9] GRÜNDLING A, BURRACK LS, BOUWER HGA, HIGGINS DE. *Listeria monocytogenes* regulates flagellar motility gene expression through MogR, a transcriptional repressor required for virulence[J]. *PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA*, 2004, 101(33): 12318-12323.
- [10] SHEN A, KAMP HD, GRÜNDLING A, HIGGINS DE. A bifunctional O-GlcNAc transferase governs flagellar motility through anti-repression[J]. *Genes & Development*, 2006, 20(23): 3283-3295.
- [11] GÖTZ F, MAYER S. Both terminal oxidases contribute to fitness and virulence during organ-specific *Staphylococcus aureus* colonization[J]. *mBio*, 2013, 4(6): e00976-e00913.
- [12] WAY SS, SALLUSTIO S, MAGLIOZZO RS, GOLDBERG MB. Impact of either elevated or decreased levels of cytochrome bd expression on *Shigella flexneri* virulence[J]. *Journal of Bacteriology*, 1999, 181(4): 1229-1237.
- [13] MÜLLER-HERBST S, WÜSTNER S, MÜHLIG A, EDER D, FUCHS TM, HELD C, EHRENREICH A, Scherer S. Identification of genes essential for anaerobic growth of *Listeria monocytogenes*[J]. *Microbiology*, 2014, 160(4): 752-765.
- [14] SAUER JD, HERSKOVITS AA, O'RIORDAN MXD. Metabolism of the Gram-positive bacterial pathogen *Listeria monocytogenes*[J]. *Microbiology Spectrum*, 2019, 7(4): 10.1128/microbiolspec.GPP3-10.1128/microbiolspec.0066-2019.
- [15] CHEN GY, MCDUGAL CE, D'ANTONIO MA, Portman JL, Sauer JD. A genetic screen reveals that synthesis of 1,4-dihydroxy-2-naphthoate (DHNA), but not full-length menaquinone, is required for *Listeria monocytogenes* cytosolic survival[J]. *mBio*, 2017, 8(2): e00119-e00117.
- [16] SOUSA FL, ALVES RJ, RIBEIRO MA, PEREIRA-LEAL JB, TEIXEIRA M, PEREIRA MM. The superfamily of heme-copper oxygen reductases: types and evolutionary considerations[J]. *Biochimica et Biophysica Acta: BBA - Bioenergetics*, 2012, 1817(4): 629-637.
- [17] ZAMBONI N, SAUER U. Knockout of the high-coupling cytochrome *aa₃* oxidase reduces TCA cycle fluxes in *Bacillus subtilis*[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2003, 226(1): 121-126.

- [18] von WACHENFELDT C, HALLGREN J, HEDERSTEDT L. YtkA (CtaK) and YozB (CtaM) function in the biogenesis of cytochrome c oxidase in *Bacillus subtilis*[J]. *Molecular Microbiology*, 2021, 116(1): 184-199.
- [19] KALIA NP, HASENOEHRL EJ, AB RAHMAN NB, KOH VH, ANG MLT, SAJORDA DR, HARDS K, GRÜBER G, ALONSO S, COOK GM, BERNEY M, PETHE K. Exploiting the synthetic lethality between terminal respiratory oxidases to kill *Mycobacterium tuberculosis* and clear host infection[J]. *PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA*, 2017, 114(28): 7426-7431.
- [20] 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.
- [21] O'NEIL HS, MARQUIS H. *Listeria monocytogenes* flagella are used for motility, not as adhesins, to increase host cell invasion[J]. *Infection and Immunity*, 2006, 74(12): 6675-6681.
- [22] SHI LB, SOHASKEY CD, KANA BD, DAWES S, NORTH RJ, MIZRAHI V, GENNARO ML. Changes in energy metabolism of *Mycobacterium tuberculosis* in mouse lung and under *in vitro* conditions affecting aerobic respiration[J]. *PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA*, 2005, 102(43): 15629-15634.
- [23] JONES SA, CHOWDHURY FZ, FABICH AJ, ANDERSON A, SCHREINER DM, HOUSE AL, AUTIERI SM, LEATHAM MP, LINS JJ, JORGENSEN M, COHEN PS, CONWAY T. Respiration of *Escherichia coli* in the mouse intestine[J]. *Infection and Immunity*, 2007, 75(10): 4891-4899.
- [24] HAMMER ND, RENIERE ML, CASSAT JE, ZHANG YF, HIRSCH AO, INDRIATI HOOD M, SKAAR EP. Two heme-dependent terminal oxidases power *Staphylococcus aureus* organ-specific colonization of the vertebrate host[J]. *mBio*, 2013, 4(4): e00241-e00213.
- [25] 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*[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2018, 9: 208.
- [26] BAI F, MORIMOTO YV, YOSHIMURA SDJ, HARA N, KAMI-IKE N, NAMBA K, MINAMINO T. Assembly dynamics and the roles of FliI ATPase of the bacterial flagellar export apparatus[J]. *Scientific Reports*, 2014, 4(1): 6528.
- [27] ZARBIV G, LI H, WOLF A, CECCHINI G, CAPLAN SR, SOURJIK V, EISENBACH M. Energy complexes are apparently associated with the switch-motor complex of bacterial flagella[J]. *Journal of Molecular Biology*, 2012, 416(2): 192-207.
- [28] DESVAUX M, HÉBRAUD M. The protein secretion systems in *Listeria*: inside out bacterial virulence[J]. *FEMS Microbiology Reviews*, 2006, 30(5): 774-805.
- [29] CARVALHO F, SOUSA S, CABANES D. How *Listeria monocytogenes* organizes its surface for virulence[J]. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2014, 4: 48.
- [30] CATIPOVIC MA, BAUER BW, LOPARO JJ, RAPOPORT TA. Protein translocation by the SecA ATPase occurs by a power-stroke mechanism[J]. *The EMBO Journal*, 2019, 38(9): e101140.
- [31] BRAUNSTEIN M, BENSING BA, SULLAM PM. The two distinct types of SecA2-dependent export systems[J]. *Microbiology Spectrum*, 2019, 7(3): 10.1128/microbiolspec.PSIB-10.1128/microbiolspec.0025-2018.
- [32] QIU MH, XU ZH, LI XX, LI Q, ZHANG N, SHEN QR, ZHANG RF. Comparative proteomics analysis of *Bacillus amyloliquefaciens* SQR9 revealed the key proteins involved in *in situ* root colonization[J]. *Journal of Proteome Research*, 2014, 13(12): 5581-5591.
- [33] NAKANO MM, ZUBER P, GLASER P, DANCHIN A, HULETT FM. Two-component regulatory proteins ResD-ResE are required for transcriptional activation of *fnr* upon oxygen limitation in *Bacillus subtilis*[J]. *Journal of Bacteriology*, 1996, 178(13): 3796-3802.
- [34] KOLODKIN-GAL I, ELSHOLZ AKW, MUTH C, GIRGUIIS PR, KOLTER R, LOSICK R. Respiration control of multicellularity in *Bacillus subtilis* by a complex of the cytochrome chain with a membrane-embedded histidine kinase[J]. *Genes & Development*, 2013, 27(8): 887-899.
- [35] WU YC, WU Y, ZHU T, HAN HY, LIU HY, XU T, FRANCOIS P, FISCHER A, BAI L, GÖTZ F, QU D. *Staphylococcus epidermidis* SrrAB regulates bacterial growth and biofilm formation differently under oxic and microaerobic conditions[J]. *Journal of Bacteriology*, 2015, 197(3): 459-476.