



# 低温下阻遏蛋白 MogR 对单增李斯特菌鞭毛形成的影响

汪国俊<sup>#</sup>, 邓霞<sup>#</sup>, 栗绍文, 刘梅<sup>\*</sup>

华中农业大学动物医学院, 湖北 武汉 430070

汪国俊, 邓霞, 栗绍文, 刘梅. 低温下阻遏蛋白 MogR 对单增李斯特菌鞭毛形成的影响[J]. 微生物学报, 2024, 64(5): 1506-1520.

WANG Guojun, DENG Xia, LI Shaowen, LIU Mei. Role of repressor MogR in flagellar biosynthesis of *Listeria monocytogenes* at low temperatures[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2024, 64(5): 1506-1520.

**摘要:**【目的】单核细胞增生李斯特菌(简称单增李斯特菌) (*Listeria monocytogenes*, *Lm*)是食源性病原菌, 可以引发李斯特菌病(listeriosis)。 *Lm* 能在低温下生长, 对冷藏食品的安全构成严重威胁, 并对人类健康造成潜在的危害。 *Lm* 能低温生长与抑制鞭毛基因表达以减少鞭毛的合成有关。 MogR 是 *Lm* 鞭毛基因转录的阻遏蛋白, 在机体里或 37 °C 环境下具有阻遏作用, *Lm* 不产生鞭毛; 然而, 当 *Lm* 处于 20–30 °C 时 MogR 无阻遏作用, *Lm* 产生鞭毛。我们研究发现在 4 °C 生长条件下 *Lm* 鞭毛合成减少, 但具体的分子机制尚未明确。本文探究在 4 °C 下 *Lm* 鞭毛合成少与 MogR 起阻遏作用的关系。【方法】以 *Lm* ATCC 19115 为亲本株, 分别构建了 MogR 和鞭毛丝蛋白 FlaA 的缺失株  $\Delta mogR$  和  $\Delta flaA$  (作为无鞭毛对照株)及其回补株  $c\Delta mogR$  和  $c\Delta flaA$ , 测定了菌株在 4、28、37 °C 时的运动性、鞭毛产生情况和鞭毛基因表达量, 并对所构建的菌株进行了 4、28、37 °C 时生长曲线的测定。【结果】在 4 °C 时, *mogR* 缺失后, 菌株运动性显著强于亲本株 ( $P < 0.01$ ), 鞭毛合成量显著多于亲本株 ( $P < 0.001$ ), 鞭毛基因转录水平显著高于亲本株 ( $P < 0.001$ ); 缺失株  $\Delta mogR$  的生长能力显著弱于亲本株 ( $P < 0.05$ )。回补株  $c\Delta mogR$  的运动能力、鞭毛合成量和鞭毛基因转录水平与亲本株相比, 无显著性差异。【结论】在 4 °C 时, *Lm* 鞭毛产量少与 MogR 对鞭毛基因起转录抑制作用有关, 低温条件下 *Lm* 能生长繁殖与 MogR 对鞭毛基因表达的抑制作用有关。本研究结果为揭示 *Lm* 低温生长机制提供了新的信息。

**关键词:** 单增李斯特菌; MogR; 鞭毛; 低温生长

资助项目: 国家重点研发计划(2022YFD1800100)

This work was supported by the National Key Research and Development Program of China (2022YFD1800100).

<sup>#</sup>These authors contributed equally to this work.

<sup>\*</sup>Corresponding author. E-mail: liumei@mail.hzau.edu.cn

Received: 2023-11-20; Accepted: 2024-01-26; Published online: 2024-01-30

# Role of repressor MogR in flagellar biosynthesis of *Listeria monocytogenes* at low temperatures

WANG Guojun<sup>#</sup>, DENG Xia<sup>#</sup>, LI Shaowen, LIU Mei<sup>\*</sup>

College of Veterinary Medicine, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, Hubei, China

**Abstract:** [Objective] *Listeria monocytogenes* (*Lm*) is a ubiquitous foodborne pathogen causing listeriosis. *Lm* can grow at low temperatures and thus may cause safety problems of refrigerated food and threaten the public health. The growth of *Lm* at low temperatures involves the inhibition of flagellar gene expression, which restricts flagellar biosynthesis. MogR is a transcriptional repressor which represses the expression of flagellar genes during intracellular infection and during extracellular growth of *Lm* at 37 °C, resulting in no biosynthesis of flagella. Whereas MogR is deprived of repression function and the bacteria produce flagella during growth at 20–30 °C. Our studies demonstrated that *Lm* significantly reduced the flagellar production at 4 °C, but the molecular mechanism of which remained unclear. This study aims to reveal the relationship between the reduction of flagella and MogR repression at 4 °C. [Methods] We constructed the *mogR*-deleted mutant  $\Delta mogR$  and the flagellin gene *flaA*-deleted mutant  $\Delta flaA$  (as the control strain with no flagella), and their complementary strains *c* $\Delta mogR$  and *c* $\Delta flaA$  with the *Lm* strain ATCC 19115 as the parental strain. Then, we analyzed the swarming motility, flagellar biosynthesis, and transcriptional levels of flagellar genes in above five strains at 4 °C, 28 °C, and 37 °C, respectively. The growth curves of these strains were determined at 4 °C, 28 °C, and 37 °C, respectively. [Results] Compared with the parental strain,  $\Delta mogR$  showed significantly increased in motility, flagellar biosynthesis, and transcriptional levels of flagellar genes ( $P < 0.01$ , 0.001, and 0.001, respectively) at 4 °C. The growth of  $\Delta mogR$  markedly decreased compared with the parental strain ( $P < 0.05$ ) at 4 °C. The data of motility, flagellar biosynthesis, and transcriptional levels of flagellar genes in *c* $\Delta mogR$  had no significant differences compared with the parental strain. [Conclusion] The reduction in flagellar biosynthesis was associated with the repression function of MogR in *Lm* at 4 °C. The reduction in flagellar biosynthesis was of benefit to *Lm* proliferation at low temperatures. This study enriched our understanding of the mechanism of *Lm* growth at low temperatures.

**Keywords:** *Listeria monocytogenes*; MogR; flagella; growth at low temperatures

单核细胞增生李斯特菌, 简称单增李斯特菌(*Listeria monocytogenes*, *Lm*), 是不形成芽胞的革兰阳性(G<sup>+</sup>)短杆菌, 具有需氧或兼性厌氧特性, 兼性胞内寄生, 作为一种食源性病原菌(foodborne pathogen), 可导致李斯特菌病(listeriosis), 患者表现为胃肠炎、脑膜炎、败血

症、流产或死胎等, 病死率(case fatality rate)高达 20%–30%<sup>[1-3]</sup>。*Lm* 能低温生长, 最低生长温度可达-0.4 °C<sup>[4]</sup>, 对冷藏食品的安全构成严重威胁, 并对人类健康造成潜在的危害。目前, *Lm* 低温生长的具体机制不明, 研究 *Lm* 低温生长机制能为防控李斯特菌病的暴发提供理论依据。

Durack 等<sup>[5]</sup>通过分析处于低温 4 °C 条件下生长的 *Lm* 菌株的转录组数据发现,与鞭毛合成相关的基因表达明显地下调,处于被抑制状态;运动性试验结果显示,在 4 °C 培养条件下菌株运动圈的直径显著小于 25 °C 培养条件。Cordero 等<sup>[6]</sup>比较了 *Lm* 在低温 8 °C 生长条件下生长快的菌株与生长慢的菌株的运动性,发现生长快的菌株的运动性显著弱于生长慢的菌株;转录组数据显示生长快的菌株的鞭毛合成基因表达显著下调。所以, *Lm* 能低温生长与抑制鞭毛基因表达以减少鞭毛的合成有关,其具体机制未见报道。

*Lm* 鞭毛基因中的 *flaA* 是个单顺反子,其编码鞭毛丝蛋白 FlaA,其他鞭毛基因主要分布在 394、397 和 398 这 3 个操纵元上(图 1)<sup>[6-7]</sup>。*Lm* 在机体环境或 37 °C 培养条件下,鞭毛基因被阻遏蛋白 MogR 抑制,不产生鞭毛,无运动性<sup>[8-9]</sup>;当 *Lm* 处于外界环境或 20–30 °C 培养条件时, MogR 被抗阻遏蛋白 GmaR 抑制, MogR 对鞭毛基因表达的抑制被解除, *Lm* 合成鞭毛,能运动<sup>[10-11]</sup>。因此,我们推断 *Lm* 低温生长时鞭毛量减少可能与 MogR 抑制鞭毛基因表达有关。为了验证此推断,本文以 *Lm* ATCC 19115 为亲本株,构

建阻遏蛋白 MogR 基因缺失株  $\Delta mogR$  及其回补株  $c\Delta mogR$ ,同时还构建了鞭毛丝蛋白 FlaA 基因缺失株  $\Delta flaA$  (作为无鞭毛对照株)及其回补株  $c\Delta flaA$ ,测定各菌株在低温下的运动性、鞭毛形成状况和鞭毛基因表达情况,以及测定所构建的菌株在低温下的生长情况,以探究 MogR 对 *Lm* 低温下鞭毛形成的影响,为阐明 *Lm* 低温生长机制提供新的信息。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌株、质粒和引物

本研究涉及的细菌菌株和质粒如表 1 所示。所用引物均由武汉擎科生物科技有限公司合成,引物序列见表 2 所示。

### 1.2 主要试剂

牛脑心浸出液肉汤(brain heart infusion, BHI)培养基购自青岛海博生物技术有限公司;氨苄青霉素(ampicillin, Amp)和红霉素(erythromycin, Erm)购自武汉华大至善生物科技有限公司;高保真 DNA 聚合酶和反转录试剂盒等购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司;T<sub>4</sub> DNA 连接酶和限制性内切酶等购自宝生物工程(大连)有限公司(TaKaRa);凝胶回收试剂盒和

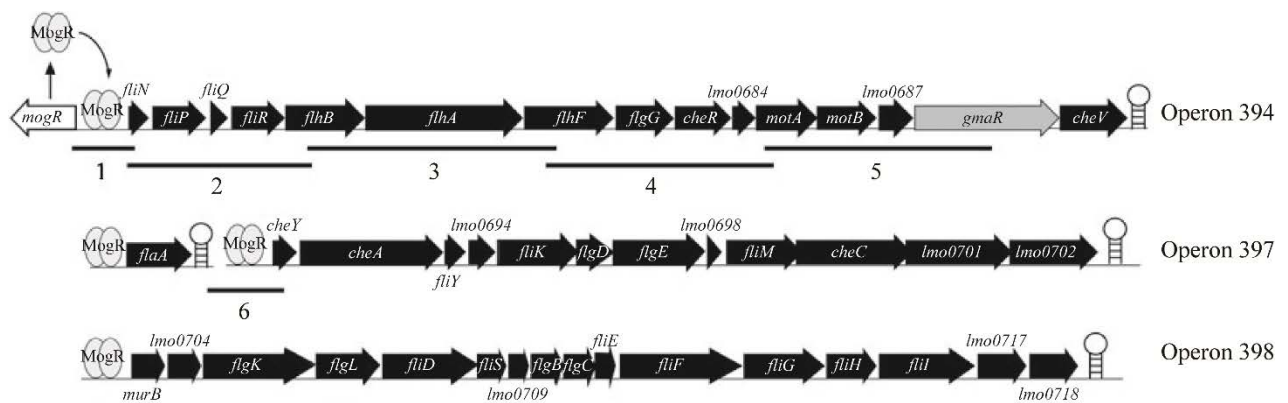


图 1 单增李斯特菌鞭毛基因操纵元<sup>[6-7]</sup>

Figure 1 *Listeria monocytogenes* flagellar genes on operons<sup>[6-7]</sup>.

表 1 细菌菌株和质粒

Table 1 Bacterial strains and plasmids used in this study

Category	Name	Relevant features	Source
Strain	ATCC 19115	<i>Listeria monocytogenes</i> , serotype 4b	Purchased from Guangdong Microbial Culture Center
	$\Delta mogR$	The <i>mogR</i> deletion strain of ATCC 19115	This study
	$\Delta flaA$	The <i>flaA</i> deletion strain of ATCC 19115	This study
	$c\Delta mogR$	Complementary strain of $\Delta mogR$	This study
	$c\Delta flaA$	Complementary strain of $\Delta flaA$	This study
Plasmid	pHT304-ts	A thermosensitive suicide vector with erythromycin and ampicillin resistance genes	Stored in this laboratory
	pHT304	A shuttle vector with erythromycin and ampicillin resistance genes	Stored in this laboratory
	p2102N	The upstream and downstream of <i>mogR</i> was cloned into pHT304-ts	This study
	p2104	The upstream and downstream of <i>flaA</i> was cloned into pHT304-ts	This study
	p2201	The gene of <i>mogR</i> including its promoter was cloned into pHT304	This study
	p2202	The gene of <i>flaA</i> including its promoter was cloned into pHT304	This study

质粒提取试剂盒购自 Omega Bio-Tek 公司; 电镜负染液磷钨酸(phosphotungstic acid, PTA)购自中国科学院武汉病毒研究所; 用于荧光定量 PCR 的 2×T5 Fast qPCR Mix (SYBR Green I)购自武汉擎科生物科技有限公司。

### 1.3 缺失株 $\Delta mogR$ 和 $\Delta flaA$ 及其回补株 $c\Delta mogR$ 和 $c\Delta flaA$ 的构建

以 ATCC 19115 为模板,用引物 *mogR*(L)-F/R 和 *mogR*(R)-F/R (表 2)扩增 *mogR* 上下游同源臂 (图 2)。Overlap PCR 连接上下游同源臂, 将同源臂融合产物连接到自杀型温敏穿梭质粒 pHT304-ts 中, 获得含有 *mogR* 上下游同源臂基因的重组质粒 p2102N。转化 p2102N 入大肠杆菌 DH5 $\alpha$  后, 由武汉天一辉远生物科技有限公司对 p2102N 中的同源臂序列进行测序, 测序结果符合预期。提取 p2102N, 电转化(2.4 kV)于 ATCC 19115 感受态细胞, 鉴定获得阳性转化子后, 利用同源重组原理筛选, 获得缺失株  $\Delta mogR$  (图 2)。除用引物 *flaA*(L)-F/R 和 *flaA*(R)-F/R (表 2)扩增 *flaA* 上下游同源臂外, 缺失株  $\Delta flaA$  的构建方法同  $\Delta mogR$ 。用引物 *mogR*-F/R (表 2)

扩增包括自身启动子的 *mogR*, 连接于穿梭载体 pHT304, 获得重组质粒 p2201, 对 p2201 中的目的基因片段进行测序, 提取测序正确的重组质粒电转化入缺失株  $\Delta mogR$  感受态细胞中, PCR 鉴定, 获得回补株  $c\Delta mogR$ 。除用引物 *flaA*-F/R (表 2)扩增包括自身启动子的 *flaA* 外, 回补株  $c\Delta flaA$  的构建方法同  $c\Delta mogR$ 。

### 1.4 运动性试验

挑取亲本株 ATCC 19115、缺失株  $\Delta mogR$  和  $\Delta flaA$ , 以及回补株  $c\Delta mogR$  和  $c\Delta flaA$  单菌落接种于 BHI 液体培养基中, 37 °C、200 r/min 培养 12 h, 随后 1:100 转接至新鲜 BHI 液体培养基中, 37 °C、200 r/min 下培养至  $OD_{600}$  为 1.0。取 5  $\mu$ L 菌液穿刺接种于 BHI 软琼脂(0.375%)平板, 分别于 4 °C 培养 20 d、28 °C 培养 48 h 和 37 °C 培养 48 h, 测量运动圈直径。每株菌 3 个重复, 试验进行 2 次, 用 GraphPad Prism 8 进行统计和数据可视化。

### 1.5 透射电镜(transmission electron microscope, TEM)观察

将菌株 ATCC 19115、 $\Delta mogR$ 、 $\Delta flaA$ 、 $c\Delta mogR$  和  $c\Delta flaA$  分别于 4、28、37 °C 下培养

表 2 本研究所用引物

Table 2 Primers used in this study

Primer name	Oligonucleotide sequence (5'→3')	Restriction site
<i>mogR</i> (L)-F	GCTCTAGATGACACCGTTCGAATATCATTATTGG	<i>Xba</i> I
<i>mogR</i> (L)-R	CACCCCTTCTAAAACAATCACATACCTCTCTATCC	
<i>mogR</i> (R)-F	TATGTGATTGTTTTAGAAGGGGTGGCAGAT	
<i>mogR</i> (R)-R	GGGGTACCTTTCAGCTATTATGGAAGCAGCTA	<i>Kpn</i> I
<i>flaA</i> (L)-F	CGGTCTAGACCAGAAAACTATCGATTGGTT	<i>Xba</i> I
<i>flaA</i> (L)-R	GAATTTGATATGTTGTGTTCCCTCCTACATTTCG	
<i>flaA</i> (R)-F	GGGAAACACAACATATCAAATTCATTTATCGAACA	
<i>flaA</i> (R)-R	TGCGGTACCATTTCCATTGCATGCGTTAAATC	<i>Kpn</i> I
<i>mogR</i> -F	CGGGATCCACCTTTCCTCCCTTCATCAGATTAC	<i>Bam</i> H I
<i>mogR</i> -R	GGGGTACCGGTATAAATTTTCGATATACATCGTGCCACC	<i>Kpn</i> I
<i>flaA</i> -F	CGGGATCCACATAAAGGCGCAGGTGTTG	<i>Bam</i> H I
<i>flaA</i> -R	GGGGTACCGGCTAAGGGTAAACAATGTTTCGAT	<i>Kpn</i> I
pHT304-F	CAGGAAACAGCTATGACC	
pHT304-R	TGTAAAACGACGGCCAGT	
16S rRNA-F	GATGCATAGCCGACCTGAGA	
16S rRNA-R	CTCCGTCAGACTTTCGTCCA	
<i>fliN</i> -qF	TCGCACGAGAAAAAGCGAAA	
<i>fliN</i> -qR	CGGAAAAGTGCTTCATTTTGGTC	
<i>flhB</i> -qF	CTTGCGGATGTCGAAGCAAG	
<i>flhB</i> -qR	TGTCGGGTTGTTACCACAA	
<i>flaA</i> -qF	TCGTGCACTTCTAGGTGCTG	
<i>flaA</i> -qR	GCGGTGTTTGGTTTGCTTGA	
<i>flgE</i> -qF	GCGGTGGCTACTTTCTCCAA	
<i>flgE</i> -qR	ATTCGCGGGACAAGTCTACG	
<i>fliM</i> -qF	TGAGCGAGCGCAGACTTTTA	
<i>fliM</i> -qR	CAACACTGACAAGCGCCATC	
<i>flgK</i> -qF	ACAAGCTGTGGATCAGACGG	
<i>flgK</i> -qR	AACGAAGCGGATTGTTTGGC	
<i>fliF</i> -qF	TCGAAGGGACACTTTCACGC	
<i>fliF</i> -qR	TTGAGGCGGTTCCCTGATTCC	
<i>fliI</i> -qF	AAAACGGCTCGATCACTGGT	
<i>fliI</i> -qR	CTAACGGAGCCGAGGACATC	

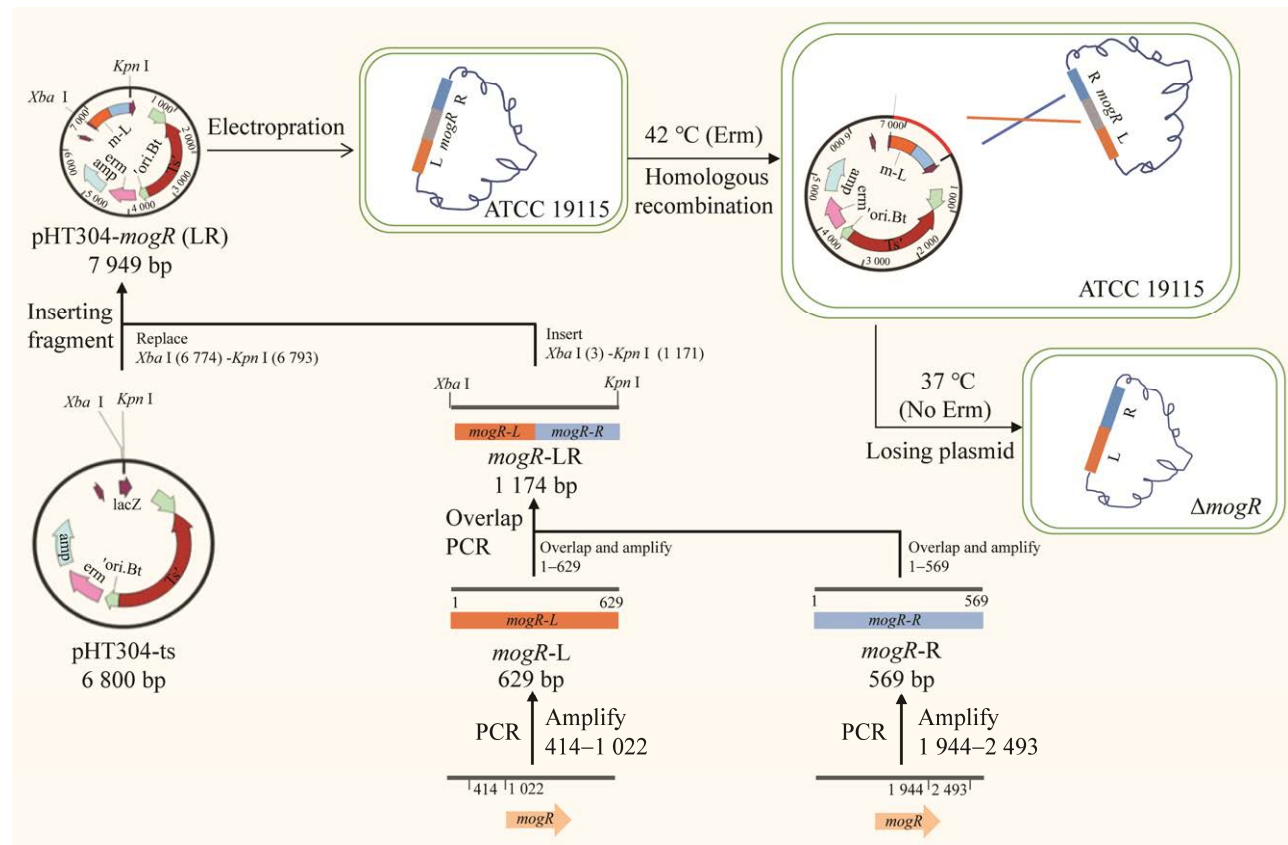
The underline represents the restriction enzyme cleavage site.

至对数期, 然后各取 1 mL 菌液于 1.5 mL EP 管中, 2 000 r/min 离心 10 min, 菌体沉淀经过 1 mL 1×PBS 洗涤后再用 1 mL 1×PBS 重悬, 即制成 TEM 试验样品。取样品、超纯水和 PTA 染液各 20 μL 滴于冷却的封口膜上, 将铜网扣在样品液滴上吸附 1 min, 滤纸吸去多余液体后再扣于超纯水液滴上并立即用滤纸吸干, 再将铜网扣于

PTA 染液上染色 1 min, 用滤纸吸干, 待铜网自然干燥后即可用 TEM 观察菌体鞭毛生长情况。统计单位样品菌量中至少含有一根鞭毛的菌株的百分比, 用 GraphPad Prism 8 进行数据可视化。

## 1.6 RT-qPCR

提取分别在 4、28、37 °C 条件下培养至对数期的 ATCC 19115、 $\Delta mogR$ 、 $\Delta flaA$ 、 $c\Delta mogR$

图 2 缺失株  $\Delta mogR$  构建流程图Figure 2 Diagram for constructing the mutant  $\Delta mogR$ .

和  $c\Delta flaA$  菌体 RNA, 用反转录试剂盒进行逆转录, 获得的产物 cDNA 即为 RT-qPCR 的模板。按照 2×T5 Fast qPCR Mix (SYBR Green I) 试剂说明书对鞭毛合成基因 *flaA*、*fliN*、*flhB*、*flgE*、*fliM*、*flgK*、*fliF* 和 *fliI* 及 16S rRNA 基因(作为内参基因)进行 RT-qPCR。用  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  相对定量法对结果进行表达差异性分析。

### 1.7 生长曲线测定

挑取 ATCC 19115、 $\Delta mogR$ 、 $c\Delta mogR$ 、 $\Delta flaA$  和  $c\Delta flaA$  单菌落接种于 BHI 液体培养基, 37 °C、200 r/min 培养 12 h, 然后按 1:100 接种量转接至新鲜 BHI 液体培养基中, 37 °C、200 r/min 培养至  $OD_{600}$  为 1.0 后按 1:100 接种量转接于 BHI 液体培养基中, 然后分别进行生长曲线测定。

(1) 4 °C 生长曲线测定: 置菌液于 4 °C 冰箱中静置培养, 每隔 1 d 测定  $OD_{600}$  值; (2) 28 °C 生长曲线测定: 把菌液转接至 96 孔蜂窝板, 将蜂窝板置于全自动生长曲线分析仪, 设置培养温度和时间, 每隔 1 h 测定  $OD_{600}$  值; (3) 37 °C 生长曲线测定同 28 °C 的测定。用 GraphPad Prism 8 绘制生长曲线。

## 2 结果与分析

### 2.1 低温下 MogR 对 *Lm* 运动能力的影响 (swarming)

在 4 °C 和 37 °C 培养条件下, 缺失株  $\Delta mogR$  的运动圈明显大于亲本株(图 3、图 4), 且随着时间的延长,  $\Delta mogR$  与亲本株的运动性存在显

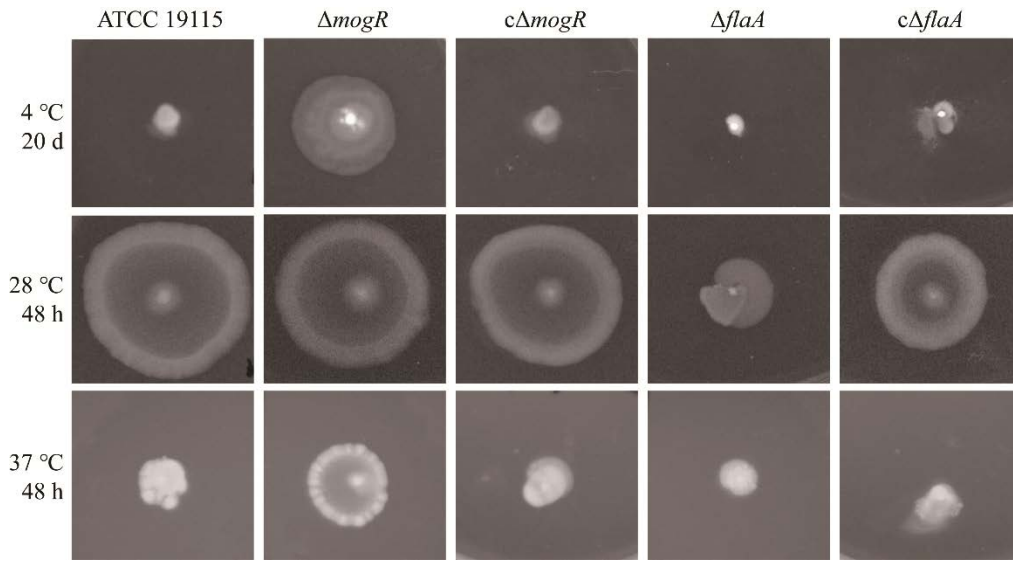


图 3 菌株 ATCC 19115、 $\Delta mogR$ 、 $c\Delta mogR$ 、 $\Delta flaA$  和  $c\Delta flaA$  分别在 4、28、37 °C 下的运动能力

Figure 3 The swarming ability of strain ATCC 19115,  $\Delta mogR$ ,  $c\Delta mogR$ ,  $\Delta flaA$  and  $c\Delta flaA$  at 4 °C, 28 °C and 37 °C, respectively.

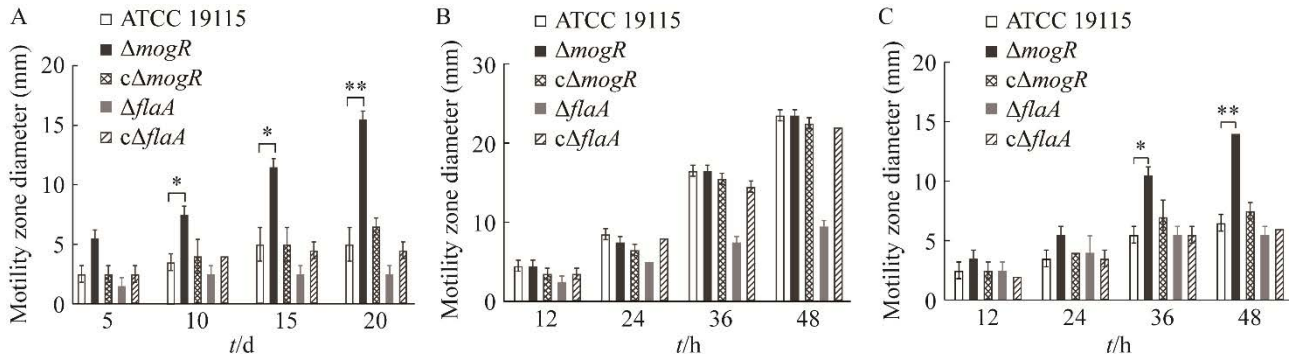


图 4 菌株 ATCC 19115、 $\Delta mogR$ 、 $c\Delta mogR$ 、 $\Delta flaA$  和  $c\Delta flaA$  分别在 4 °C (A)、28 °C (B) 和 37 °C (C) 下的运动圈直径大小

Figure 4 The motility zone diameters of strain ATCC 19115,  $\Delta mogR$ ,  $c\Delta mogR$ ,  $\Delta flaA$  and  $c\Delta flaA$  at 4 °C (A), 28 °C (B) and 37 °C (C), respectively. \*\*:  $P < 0.01$ ; \*:  $P < 0.05$ .

显著性差异 ( $P < 0.01$ ) (图 4)。 $c\Delta mogR$ 、 $\Delta flaA$  和  $c\Delta flaA$  在 4 °C 和 37 °C 条件下均与亲本株一样无明显运动圈 (图 3、图 4)。在 28 °C 条件下, 仅  $\Delta flaA$  无运动性, 其他菌株均有明显运动圈 (图 3、图 4)。结果表明, *MogR* 在 4 °C 时对鞭毛基因表达有抑制作用, 从而降低了 *Lm* 的运动性。

## 2.2 低温下 *MogR* 对 *Lm* 鞭毛合成的影响 (TEM)

TEM 结果显示, 在 4 °C 条件下, 缺失株

$\Delta mogR$  含鞭毛菌株比例高于亲本株 ATCC 19115 (图 5)。统计分析结果表明, 在 4 °C 和 37 °C 条件下,  $\Delta mogR$  鞭毛数量均显著高于亲本株 ( $P < 0.001$ ), 回补株  $c\Delta mogR$  鞭毛量与亲本株无显著性差异 (图 6A、6C); 在 28 °C 条件下,  $\Delta mogR$  和  $c\Delta mogR$  鞭毛数量与亲本株无显著性差异 (图 6B)。在 4、28、37 °C 三个温度条件下, 缺失株  $\Delta flaA$  均未产生鞭毛, 回补株  $c\Delta flaA$  鞭毛量均与亲本株无

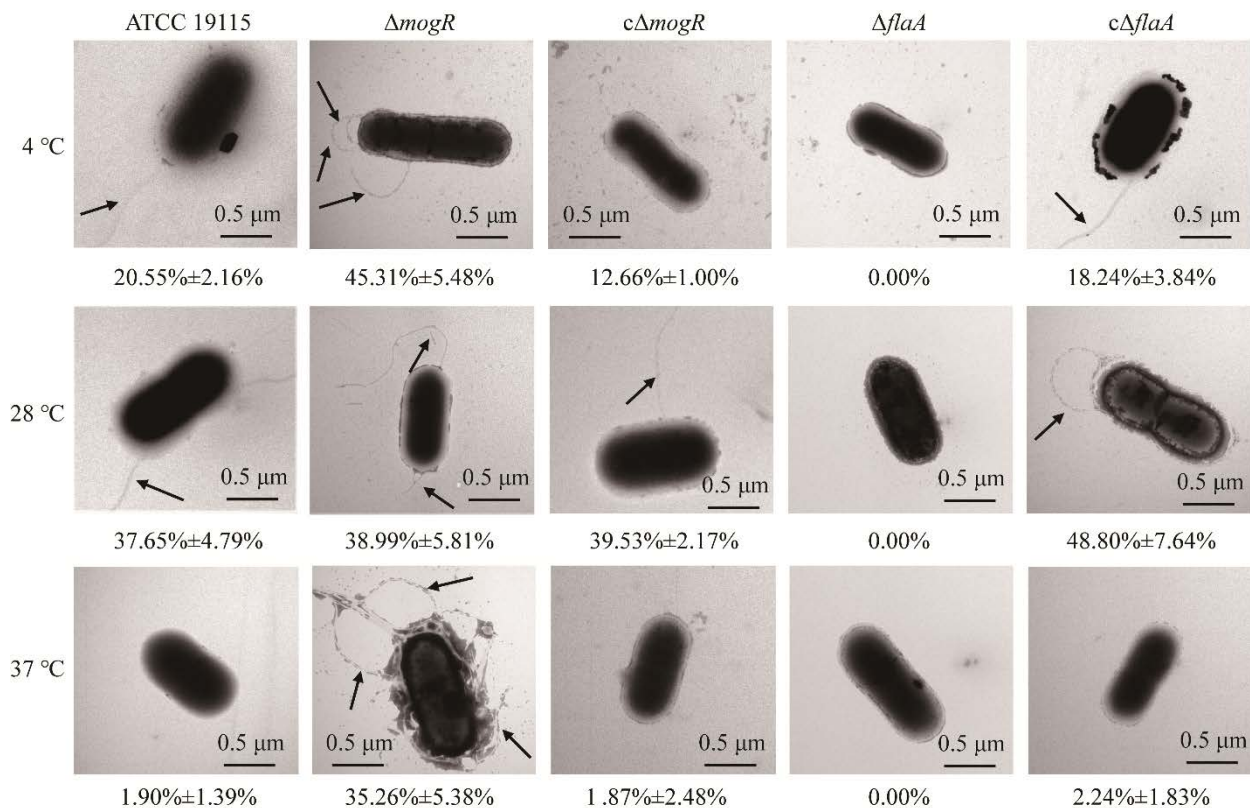


图5 透射电镜(TEM)下观察到的菌株 ATCC 19115、 $\Delta mogR$ 、 $c\Delta mogR$ 、 $\Delta flaA$  和  $c\Delta flaA$  分别在 4、28、37 °C 时的鞭毛生长情况 显示在图像下方的数值是单位样品菌量中至少含有一根鞭毛的菌株的百分比

Figure 5 Production of flagella in strain ATCC 19115,  $\Delta mogR$ ,  $c\Delta mogR$ ,  $\Delta flaA$  and  $c\Delta flaA$  at 4 °C, 28 °C and 37 °C, respectively, by transmission electron microscopy (TEM). The percentage (%) of bacterial amount within a population that produced at least one visible flagellum was shown at the bottom of each image.

显著差异(图 5、图 6)。亲本株在 4 °C 时有少量鞭毛产生, 但其数量显著低于 28 °C 时的数量( $P < 0.001$ ) (图 6D)。  $\Delta mogR$  鞭毛量在 3 个温度下无显著性差异(图 6D)。TEM 结果表明, 在 4 °C 条件下, MogR 对 *Lm* 鞭毛的产生有抑制作用。

### 2.3 低温下 MogR 对 *Lm* 鞭毛基因表达的影响(RT-qPCR)

首先测定了 4、28、37 °C 条件下 ATCC 19115、 $\Delta mogR$ 、 $\Delta flaA$ 、 $c\Delta mogR$  和  $c\Delta flaA$  的鞭毛丝蛋白基因 *flaA* 的转录表达水平(图 7)。在 4 °C 时, 与亲本株 ATCC 19115 相比, 缺失株  $\Delta mogR$  的 *flaA* 表达量极其显著上调( $P < 0.001$ ),

回补株  $c\Delta mogR$  的 *flaA* 表达量则无显著性差异(图 7A); 缺失株  $\Delta flaA$  的 *flaA* 表达量为 0, 其回补株  $c\Delta flaA$  有 *flaA* 表达(图 7A), 表明缺失株和回补株构建成功。温度之间的比较结果显示: 缺失株  $\Delta mogR$  在 4 °C 和 37 °C 时的 *flaA* 表达量与 28 °C 时的相比无显著性差异(图 7B), 即 *mogR* 缺失后, 菌株在不同温度下的 *flaA* 表达量不存在差异性; 亲本株 ATCC 19115 和回补株  $c\Delta mogR$  在 4 °C 和 37 °C 时 *flaA* 表达量均显著低于 28 °C 时的表达量(亲本株的 4 °C 与 28 °C 相比  $P < 0.01$ , 其余均为  $P < 0.001$ ) (图 7B)。结果表明, 在低温 4 °C 时, MogR 抑制了 *Lm* 鞭毛丝蛋白基因 *flaA* 的转录表达。



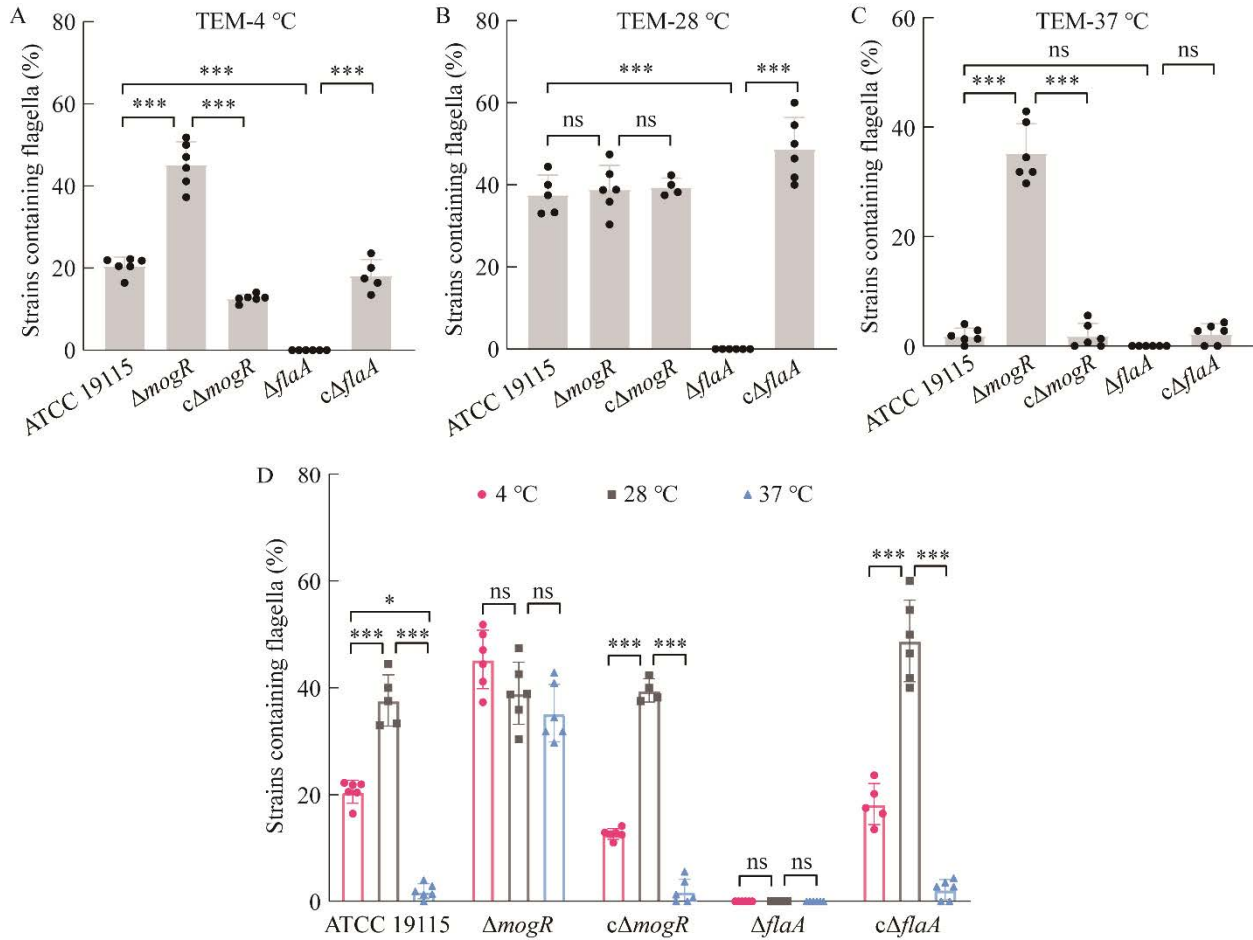


图 6 通过 TEM 观察的菌株 ATCC 19115、 $\Delta mogR$ 、 $c\Delta mogR$ 、 $\Delta flaA$  和  $c\Delta flaA$  分别在 4 °C (A)、28 °C (B) 和 37 °C (C) 时的单位样品菌量中至少含有一根鞭毛的菌株的百分比柱状图及同一菌株在不同温度下的菌株的百分比柱状图(D)

Figure 6 The graphs of the percentage of strain ATCC 19115,  $\Delta mogR$ ,  $c\Delta mogR$ ,  $\Delta flaA$  and  $c\Delta flaA$  at 4 °C (A), 28 °C (B) and 37 °C (C), respectively, within a population that produced at least one visible flagellum, and the graph of the percentage of each strain at three temperatures (D) by TEM. \*\*\*:  $P < 0.001$ ; \*:  $P < 0.05$ ; ns: No significant.

除 *flaA* 外, 本研究根据 *Lm* 鞭毛蛋白的功能及其基因在操纵元上的分布(图 1), 还选择 *fliN*、*flhB*、*flgE*、*fliM*、*flgK*、*fliF* 和 *fliI* 这 7 个鞭毛基因(表 3)进行了在 4、28、37 °C 条件下在缺失株  $\Delta mogR$ 、回补株  $c\Delta mogR$  和亲本株 ATCC 19115 中的转录表达水平的测定。结果显示, 4 °C 时,  $\Delta mogR$  的 7 个鞭毛基因表达量显著高于亲本株( $P < 0.01$  或  $P < 0.001$ ),  $c\Delta mogR$  的与亲

本株的无显著性差异(图 8A); 28 °C 时,  $\Delta mogR$  和  $c\Delta mogR$  的 7 个鞭毛基因表达量与亲本株的均无显著性差异(图 8B); 37 °C 与 4 °C 的情况相似(图 8C)。结果表明, 4 °C 时 *MogR* 对鞭毛操纵元上的基因表达均有抑制作用。

RT-qPCR 结果与运动性结果和 TEM 结果相对应, 表明 *MogR* 低温 4 °C 时, 同在 37 °C 时一样, 抑制了鞭毛基因的表达。

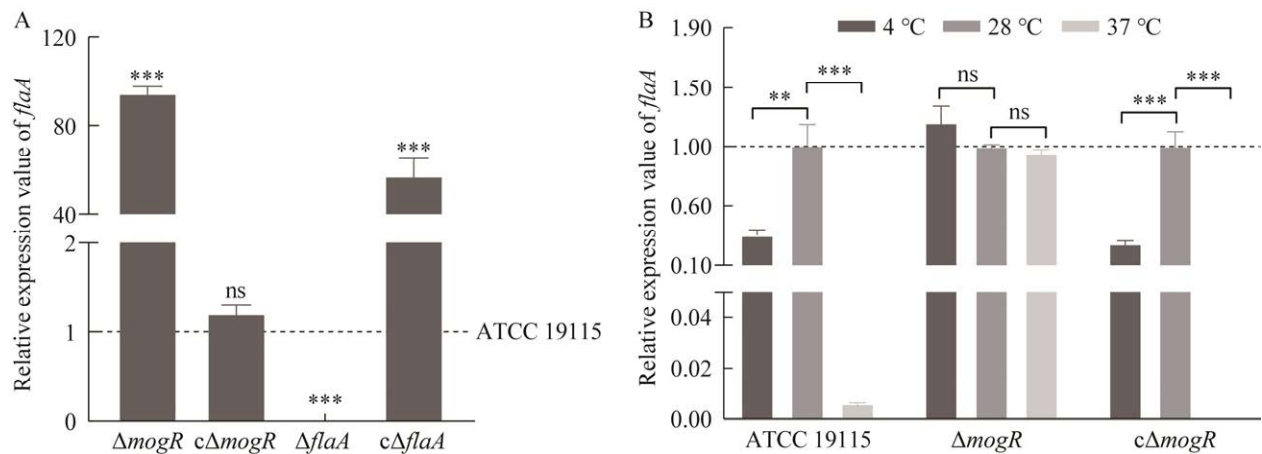


图 7 鞭毛丝蛋白基因 *flaA* 的转录表达水平 A: 4 °C条件下与亲本株 ATCC 19115 相比,  $\Delta mogR$ 、 $c\Delta mogR$ 、 $\Delta flaA$  和  $c\Delta flaA$  的 *flaA* 的相对表达量. B: 与 28 °C相比, 4 °C和 37 °C条件下 ATCC 19115、 $\Delta mogR$  和  $c\Delta mogR$  的 *flaA* 的相对表达量

Figure 7 Relative transcriptional expression levels of flagellin gene *flaA*. A: Relative transcriptional expression levels of *flaA* in  $\Delta mogR$ ,  $c\Delta mogR$ ,  $\Delta flaA$  and  $c\Delta flaA$  at 4 °C, compared with the parental strain ATCC 19115. B: Relative transcriptional expression levels of *flaA* in ATCC 19115,  $\Delta mogR$  and  $c\Delta mogR$  at 4 °C and 37 °C, compared with at 28 °C, respectively. \*\*\*:  $P < 0.001$ ; \*\*:  $P < 0.01$ ; ns: No significant.

表 3 本研究选择的 8 个单增李斯特菌鞭毛基因的信息

Table 3 The information of 8 *Listeria monocytogenes* flagellar genes involved in this study

Gene name	Operon No.	Function	References
<i>flaA</i>	Monocistronic	Flagellin protein	[12]
<i>fliN</i>	394	Flagellar motility switch protein FliN	[13]
<i>flhB</i>	394	Flagellar type III secretion system protein FlhB	[14]
<i>flgE</i>	397	Flagellar hook protein FlgE	[13]
<i>fliM</i>	397	Flagellar motility switch protein FliM	[14]
<i>flgK</i>	398	Flagellar hook-related protein FlgK	[13]
<i>fliF</i>	398	Flagellar basal body M-ring protein FliF	[15]
<i>fliI</i>	398	Flagellin export ATPase FliI	[15]

## 2.4 *mogR* 的缺失对 *Lm* 低温生长的影响 (growth curve)

本研究分别在 4、28、37 °C条件下培养菌株 ATCC 19115、 $\Delta mogR$ 、 $c\Delta mogR$ 、 $\Delta flaA$  和  $c\Delta flaA$ , 测定菌液  $OD_{600}$  值, 绘制生长曲线(图 9), 计算曲线下面积(area under the curve, AUC) (图 10A–10C)和曲线下面积差异( $\Delta AUC$ ) (图 10D), 以分析鞭毛的产生对 *Lm* 低温生长的影响。

结果显示, 在 4 °C时, 与亲本株 ATCC 19115 相比, 缺失株  $\Delta mogR$  (图 9A)和回补株  $c\Delta flaA$  (图 9B)的生长能力下降, 其 AUC 值分别为 13.2 和 13.5 (图 10A), 比亲本株的 AUC 值 (14.6)低 9.84%和 8.07% ( $P < 0.05$ ) (图 10D); 回补株  $c\Delta mogR$  (图 9A)和缺失株  $\Delta flaA$  (图 9B)在对数期和稳定期的生长均高于亲本株, 其 AUC 值分别为 16.6 和 20.7 (图 10A), 比亲本株的

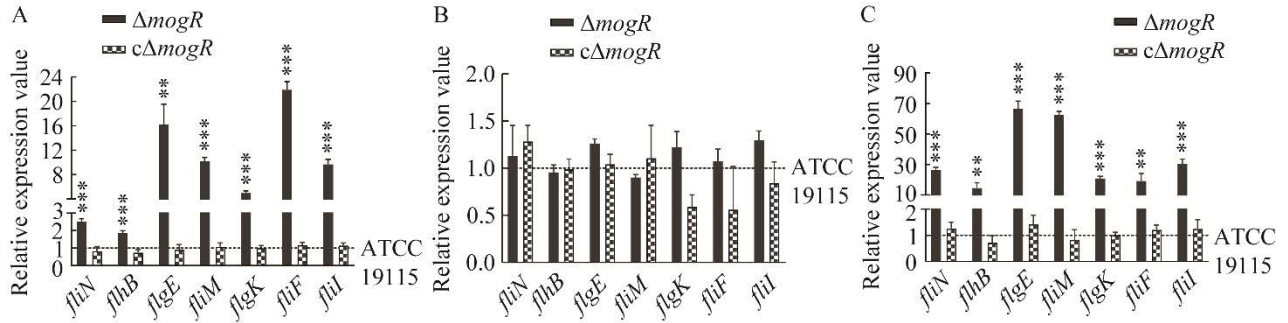


图 8  $\Delta mogR$  和  $c\Delta mogR$  的鞭毛基因 *fliN*、*flhB*、*flgE*、*fliM*、*flgK*、*fliF* 和 *fliI* 在 4 °C (A)、28 °C (B) 和 37 °C (C) 条件下相比于亲本株 ATCC 19115 的相对转录表达水平

Figure 8 Relative transcriptional expression levels of flagellar genes *fliN*, *flhB*, *flgE*, *fliM*, *flgK*, *fliF* and *fliI* in  $\Delta mogR$  and  $c\Delta mogR$  at 4 °C (A), 28 °C (B) and 37 °C (C), compared with the parental strain ATCC 19115, respectively. \*\*\*:  $P < 0.001$ ; \*\*:  $P < 0.01$ .

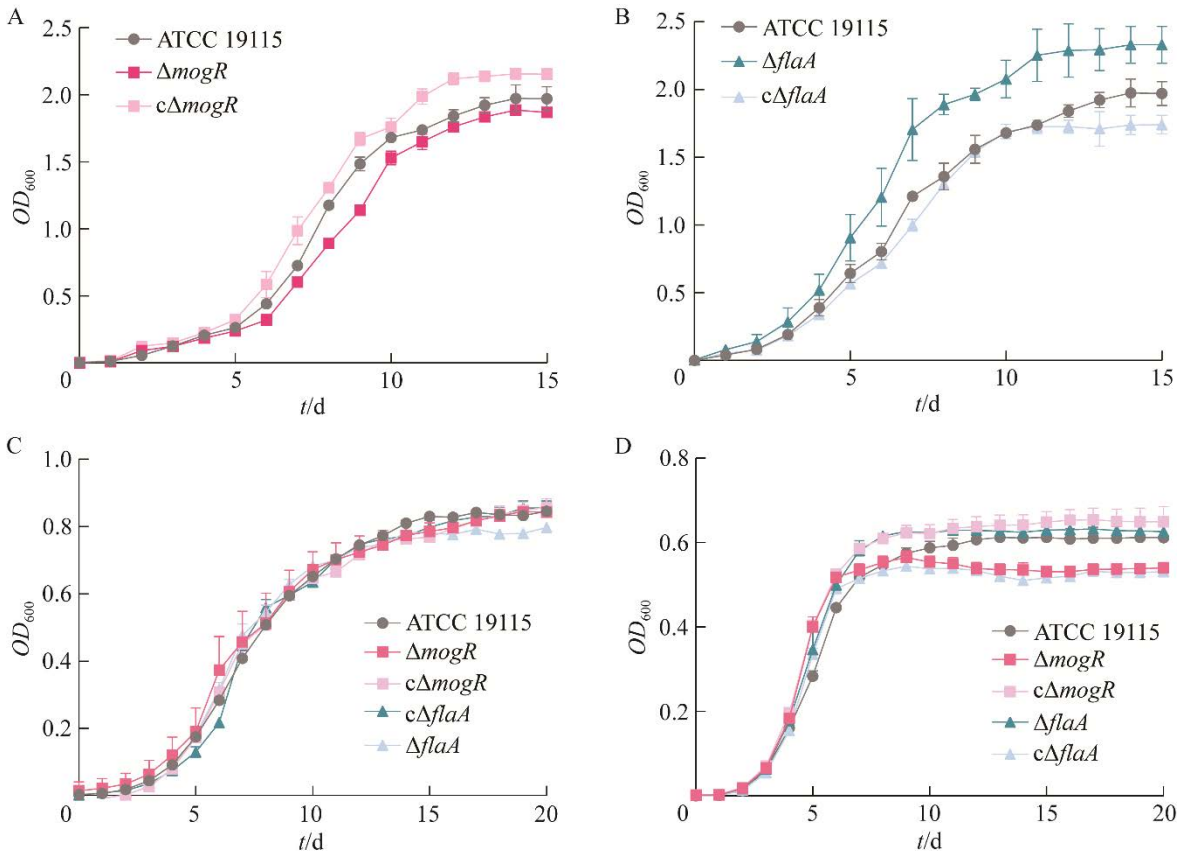


图 9 ATCC 19115、 $\Delta mogR$ 、 $c\Delta mogR$ 、 $\Delta flaA$  和  $c\Delta flaA$  在 4 °C (A 和 B)、28 °C (C) 和 37 °C (D) 条件下的生长曲线

Figure 9 Growth curves of ATCC 19115,  $\Delta mogR$ ,  $c\Delta mogR$ ,  $\Delta flaA$  and  $c\Delta flaA$  at 4 °C (A and B), 28 °C (C) and 37 °C (D).

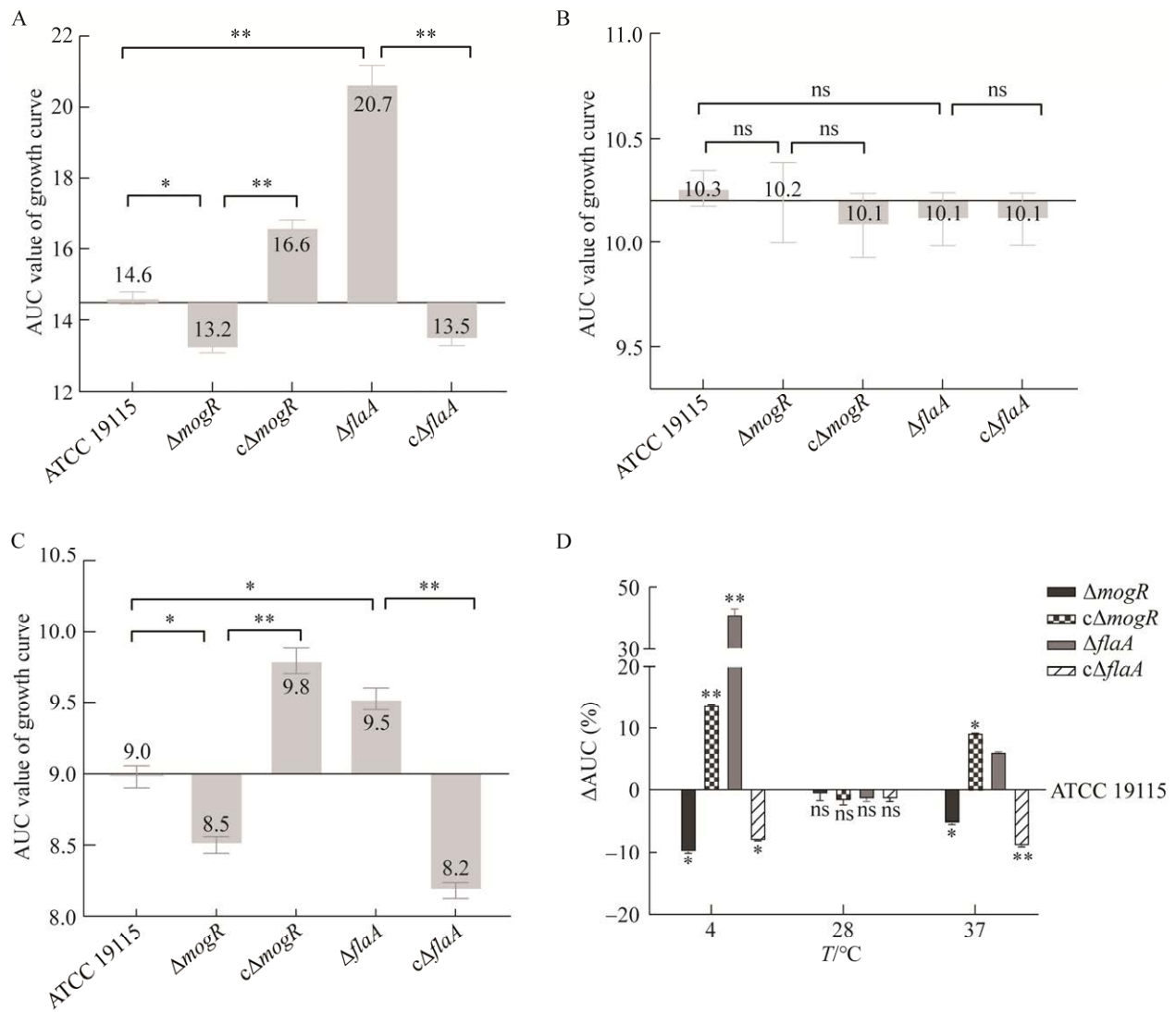


图 10 ATCC 19115、 $\Delta mogR$ 、 $c\Delta mogR$ 、 $\Delta flaA$  和  $c\Delta flaA$  在 4 °C (A)、28 °C (B) 和 37 °C (C) 条件下的生长曲线的曲线下面积值和与亲本株相比的曲线下面积差异  $\Delta AUC$  (D)

Figure 10 Area under curve (AUC) values of the growth curves of ATCC 19115,  $\Delta mogR$ ,  $c\Delta mogR$ ,  $\Delta flaA$  and  $c\Delta flaA$  at 4 °C (A), 28 °C (B) and 37 °C (C), respectively, and the differences of AUC ( $\Delta AUC$ ), compared with the parental strain ATCC 19115 (D). \*\*:  $P < 0.01$ ; \*:  $P < 0.05$ ; ns: No significant.

AUC 值(14.6)高 13.67% 和 41.22% ( $P < 0.01$ ) (图 10D)。在 28 °C 时, 5 个菌株的生长无显著性差异 (图 9C、图 10B 和 10D)。5 个菌株在 37 °C 时的情况与 4 °C 时的相似 (图 9D、图 10C 和 10D)。结果表明, 4 °C 时 *MogR* 对鞭毛合成的抑制作用有助于 *Lm* 低温生长。

### 3 讨论

#### 3.1 低温下 *Lm* 的运动能力和鞭毛表达量不具有血清型特异性

*Lm* 有 14 个血清型: 1/2a、1/2b、1/2c、3a、3b、3c、4a、4ab、4b、4c、4d、4e、7<sup>[16]</sup> 和 4h<sup>[17]</sup>, 其中 1/2a、1/2b、1/2c 和 4b 是食品和临床病例

中最常分离到的血清型，约占所有血清型的95%<sup>[18-19]</sup>。本研究选取来自这4个血清型的菌株 ATCC 19115 (4b)、ATCC 19111 (1/2a)、YSP2019032612 (1/2b)和 Lm210722566 (1/2c)，通过运动性试验和 RT-qPCR 测定了菌株在 4、28、37 °C 生长时的运动能力和鞭毛基因表达情况，发现所有菌株 4 °C 时的结果均显著低于 28 °C 时的结果 ( $P < 0.01$  或  $P < 0.001$ )，且所有菌株 37 °C 时的结果与 4 °C 时的相似(图 11、图 12)，表明低温 4 °C 时 *Lm* 鞭毛表达低是非血清型特异性的，因此本研究选择 *Lm* ATCC 19115 (4b) 菌株为亲本株进行了深入的研究。

### 3.2 MogR 的抑制蛋白 GmaR 在鞭毛基因表达中发挥作用

*Lm* 在 20–30 °C 条件下，MogR 被抗阻遏蛋白 GmaR 抑制，MogR 对鞭毛基因表达的抑制被解除，*Lm* 产生鞭毛<sup>[7,10,20]</sup>。GmaR 是温度感应蛋白，在 37 °C 时，GmaR 单体蛋白凝集在一

起，无法与 MogR 结合，不能发挥抗阻遏作用，导致 MogR 抑制鞭毛基因表达；在 30 °C 时，GmaR 单体蛋白与 MogR 结合，使 MogR 离开鞭毛基因启动子，从而使鞭毛基因得以表达<sup>[11]</sup>。本研究结果表明 4 °C 时 MogR 抑制了 *Lm* 鞭毛的形成，说明 MogR 未被 GmaR 抑制。那么 4 °C 时 GmaR 是否如同在 37 °C 时一样处于单体聚集状态，不与 MogR 结合，不发挥抗 MogR 阻遏作用，使 MogR 发挥抑制鞭毛基因表达的功能？我们正在进行这方面的探究。

### 3.3 MogR 对 *Lm* 鞭毛基因表达的抑制作用与 DegU 相关

*Lm* 在 20–30 °C 条件下能形成鞭毛，除了 GmaR 发挥对 MogR 的抑制作用外，还需要双组分系统(HK/RR)中的孤儿 RR DegU 的正调控作用。DegU 结合到 *fliN-gmaR* 操纵元(即 operon 394)的启动子区域以调控 *gmaR* 的表达(图 1)，DegU 的结合位点不与 MogR 的结合位点重叠，

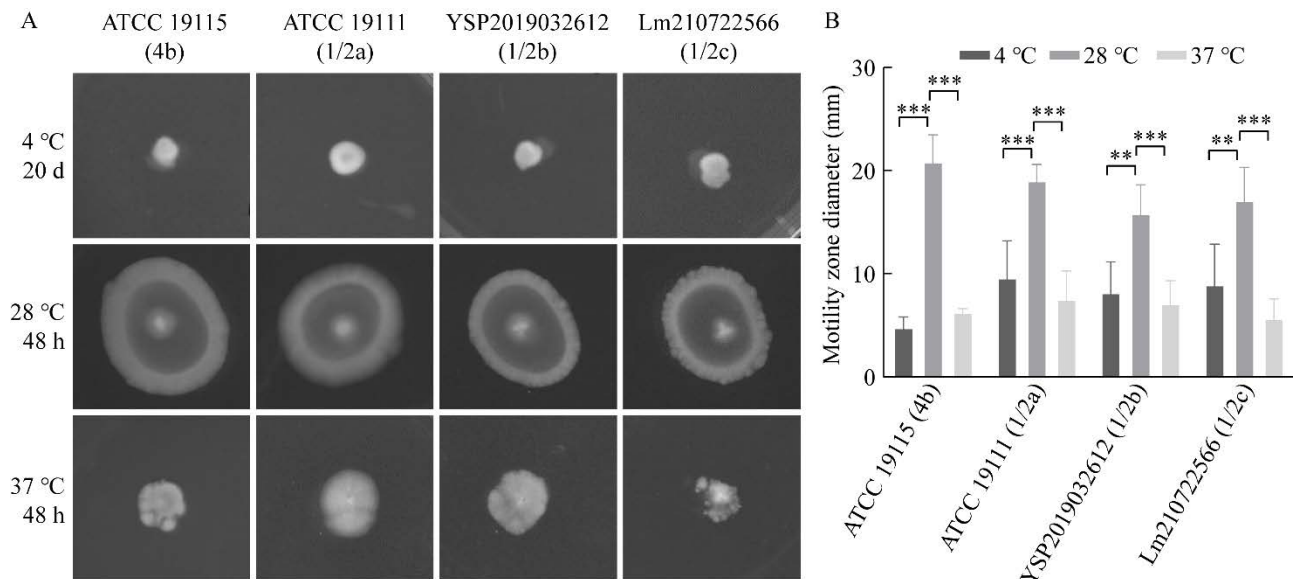


图 11 *Lm* 菌株 ATCC 19115、ATCC 19111、YSP2019032612 和 Lm210722566 分别在 4、28、37 °C 下的运动能力(A)及运动圈的直径大小(B)

Figure 11 The swarming ability (A) and motility zone diameters (B) of *Lm* strains ATCC 19115, ATCC 19111, YSP2019032612 and Lm210722566 at 4 °C, 28 °C and 37 °C, respectively. \*\*\*:  $P < 0.001$ ; \*\*:  $P < 0.01$ .

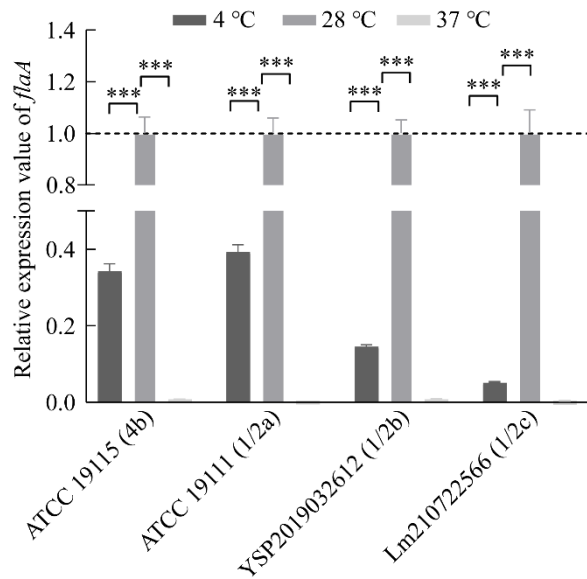


图 12 与 28 °C 相比, 4 °C 和 37 °C 条件下 *Lm* 菌株 ATCC 19115、ATCC 19111、YSP2019032612 和 Lm210722566 的鞭毛丝蛋白基因 *flaA* 的相对表达量

Figure 12 Relative transcriptional expression levels of flagellin gene *flaA* in *Lm* strains ATCC 19115, ATCC 19111, YSP2019032612 and Lm210722566 at 4 °C and 37 °C, compared with at 28 °C, respectively. \*\*\*:  $P < 0.001$ .

而且能以非磷酸化形式起作用<sup>[7,20-21]</sup>。本研究结果表明低温 4 °C 时 MogR 对 *Lm* 的鞭毛基因表达有抑制作用, 说明 GmaR 未阻遏 MogR 的作用。那么是否表明, 低温 4 °C 时 *gmaR* 的表达未受到 DegU 的正调控, *gmaR* 没有表达出 GmaR 蛋白而无法行使对 MogR 的阻遏作用? 这还有待进一步探究。

### 3.4 鞭毛的产生与 *Lm* 低温生长的关系

研究发现, 在冷藏温度 4–8 °C 时, *Lm* 下调鞭毛基因表达量以降低其运动性来维持生长, 生长快的菌株的鞭毛基因表达量显著低于生长慢的菌株, 且随着时间的推移, 生长慢的菌株运动性会更强, 但未阐明具体机制<sup>[5-6]</sup>。本研究结果显示, 在 4 °C 时, *mogR* 缺失后, *Lm* 的鞭

毛基因转录不被抑制, 鞭毛基因表达量显著高于亲本株(图 7、图 8), 鞭毛合成量显著多于亲本株(图 5、图 6), 运动性显著强于亲本株(图 4), 生长能力显著弱于亲本株(图 9、图 10), 表明鞭毛的产生会降低 *Lm* 在 4 °C 时的生长速率。

## 4 结论

本研究构建了 *Lm* 鞭毛基因转录阻遏蛋白 MogR 和鞭毛丝蛋白 FlaA 的缺失株  $\Delta mogR$  和  $\Delta flaA$ , 以及相应的回补株  $c\Delta mogR$  和  $c\Delta flaA$ , 测定了菌株分别在 4、28、37 °C 时的运动性、鞭毛产生情况和鞭毛基因表达量, 结果表明 *Lm* 在 4 °C 时鞭毛产量少与 MogR 的抑制作用有关; 本研究测定了菌株分别在 4、28、37 °C 时的生长曲线, 通过分析发现, 在低温条件下 *Lm* 能生长繁殖与 MogR 对鞭毛基因表达的抑制作用有关。本研究为揭示 *Lm* 低温生长机制提供了新的信息。

## 参考文献

- [1] McCOLLUM JT, CRONQUIST AB, SILK BJ, JACKSON KA, O'CONNOR KA, COSGROVE S, GOSSACK JP, PARACHINI SS, JAIN NS, ETTESTAD P, IBRAHEEM M, CANTU V, JOSHI M, DuVERNOY T, FOGG NW Jr, GORNY JR, MOGEN KM, SPIRES C, TEITELL P, JOSEPH LA, et al. Multistate outbreak of listeriosis associated with cantaloupe[J]. The New England Journal of Medicine, 2013, 369(10): 944-953.
- [2] THOMAS J, GOVENDER N, McCARTHY KM, ERASMUS LK, DOYLE TJ, ALLAM M, ISMAIL A, RAMALWA N, SEKWADI P, NTSHOE G, SHONHIWA A, ESSEL V, TAU N, SMOUSE S, NGOMANE HM, DISENYENG B, PAGE NA, GOVENDER NP, DUSE AG, STEWART R, et al. Outbreak of listeriosis in south Africa associated with processed meat[J]. The New England Journal of Medicine, 2020, 382(7): 632-643.
- [3] LACHMANN R, HALBEDEL S, LÜTH S, HOLZER A, ADLER M, PIETZKA A, AL DAHOUK S, STARK

- K, FLIEGER A, KLETA S, WILKING H. Invasive listeriosis outbreaks and salmon products: a genomic, epidemiological study[J]. *Emerging Microbes & Infections*, 2022, 11(1): 1308-1315.
- [4] CHAN YC, WIEDMANN M. Physiology and genetics of *Listeria monocytogenes* survival and growth at cold temperatures[J]. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2009, 49(3): 237-253.
- [5] DURACK J, ROSS T, BOWMAN JP. Characterisation of the transcriptomes of genetically diverse *Listeria monocytogenes* exposed to hyperosmotic and low temperature conditions reveal global stress-adaptation mechanisms[J]. *PLoS One*, 2013, 8(9): e73603.
- [6] CORDERO N, MAZA F, NAVEA-PEREZ H, ARAVENA A, MARQUEZ-FONTT B, NAVARRETE P, FIGUEROA G, GONZÁLEZ M, LATORRE M, REYES-JARA A. Different transcriptional responses from slow and fast growth rate strains of *Listeria monocytogenes* adapted to low temperature[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2016, 7: 229.
- [7] KAMP HD, HIGGINS DE. Transcriptional and post-transcriptional regulation of the GmaR antirepressor governs temperature-dependent control of flagellar motility in *Listeria monocytogenes*[J]. *Molecular Microbiology*, 2009, 74(2): 421-435.
- [8] GRÜNDLING A, BURRACK LS, BOUWER HG, 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.
- [9] SHEN A, HIGGINS DE. The MogR transcriptional repressor regulates nonhierarchical expression of flagellar motility genes and virulence in *Listeria monocytogenes*[J]. *PLoS Pathogens*, 2006, 2(4): e30.
- [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] CHO SY, NA H, OH HB, KWAK YM, SONG WS, PARK SC, JEON WJ, CHO H, OH BC, PARK J, KANG SG, LEE GS, YOON S. Structural basis of flagellar motility regulation by the MogR repressor and the GmaR antirepressor in *Listeria monocytogenes*[J]. *Nucleic Acids Research*, 2022, 50(19): 11315-11330.
- [12] DONS L, RASMUSSEN OF, OLSEN JE. Cloning and characterization of a gene encoding flagellin of *Listeria monocytogenes*[J]. *Molecular Microbiology*, 1992, 6(20): 2919-2929.
- [13] DESVAUX M, HÉBRAUD M. The protein secretion systems in *Listeria*: inside out bacterial virulence[J]. *FEMS Microbiology Reviews*, 2006, 30(5): 774-805.
- [14] CHENG C, WANG H, MA T, HAN X, YANG Y, SUN J, CHEN Z, YU H, HANG Y, LIU F, FANG W, JIANG L, CAI C, SONG H. 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.
- [15] BIGOT A, PAGNIEZ H, BOTTON E, FRÉHEL C, DUBAIL I, JACQUET C, CHARBIT A, RAYNAUD C. Role of FliF and FliI of *Listeria monocytogenes* in flagellar assembly and pathogenicity[J]. *Infection and Immunity*, 2005, 73(9): 5530-5539.
- [16] ALLERBERGER F. *Listeria*: growth, phenotypic differentiation and molecular microbiology[J]. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 2003, 35(3): 183-189.
- [17] YIN YL, YAO H, DOJAD S, KONG SW, SHEN Y, CAI XX, TAN WJ, WANG YT, FENG YW, LING ZT, WANG GL, HU YC, LIAN K, SUN XY, LIU YL, WANG CB, JIAO KH, LIU GP, SONG RL, CHEN X, PAN ZM, LOESSNER MJ, CHAKRABORTY T, JIAO XA. A hybrid sub-lineage of *Listeria monocytogenes* comprising hypervirulent isolates[J]. *Nature Communications*, 2019, 10: 4283.
- [18] DOUMITH M, BUCHRIESER C, GLASER P, JACQUET C, MARTIN P. Differentiation of the major *Listeria monocytogenes* serovars by multiplex PCR[J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 2004, 42(8): 3819-3822.
- [19] DOUMITH M, JACQUET C, GERNER-SMIDT P, GRAVES LM, LONCAREVIC S, MATHISEN T, MORVAN A, SALCEDO C, TORPDAHL M, VAZQUEZ JA, MARTIN P. Multicenter validation of a multiplex PCR assay for differentiating the major *Listeria monocytogenes* serovars 1/2a, 1/2b, 1/2c, and 4b: toward an international standard[J]. *Journal of Food Protection*, 2005, 68(12): 2648-2650.
- [20] KAMP HD, HIGGINS DE. A protein thermometer controls temperature-dependent transcription of flagellar motility genes in *Listeria monocytogenes*[J]. *PLoS Pathogens*, 2011, 7(8): e1002153.
- [21] OH HB, LEE S, YOON S. Structural and biochemical analyses of the flagellar expression regulator DegU from *Listeria monocytogenes*[J]. *Scientific Reports*, 2022, 12: 10856.