



单增李斯特菌二硫键形成蛋白 DsbG 介导酸耐受及鞭毛运动性调控

刘雨晴^{1#}, 夏菁^{1#}, 王喆¹, 费定润¹, 罗亚如¹, 陈绵绵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

刘雨晴, 夏菁, 王喆, 费定润, 罗亚如, 陈绵绵, 江玲丽, 宋厚辉, 程昌勇. 单增李斯特菌二硫键形成蛋白 DsbG 介导酸耐受及鞭毛运动性调控[J]. 微生物学报, 2023, 63(2): 700-716.

LIU Yuqing, XIA Jing, WANG Zhe, FEI Dingrun, LUO Yaru, CHEN Mianmian, JIANG Lingli, SONG Houhui, CHENG Changyong. Role of DsbG in acid tolerance and flagella-mediated motility of *Listeria monocytogenes*[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2023, 63(2): 700-716.

摘要:【目的】本研究旨在通过构建单增李斯特菌(*Listeria monocytogenes*)二硫键形成蛋白编码基因 *dsbG* 缺失株和回补株, 探究该蛋白在酸耐受和鞭毛介导的运动性中发挥的生物学功能。【方法】利用同源重组方法构建单增李斯特菌 *dsbG* 缺失株和回补株, 比较野生株和突变株在不同 pH 梯度培养基条件下的生长速率和存活率; 通过实时荧光定量 PCR 方法, 比较致死酸应激条件下野生株和缺失株酸耐受基因转录水平。通过半固体培养基、荧光定量 PCR 方法和鞭毛负染色透射电镜观察, 比较野生株和突变株的运动能力、鞭毛相关基因转录水平变化和鞭毛形态差异。【结果】与野生株相比, *dsbG* 缺失株的生长能力和速率差异不显著; 在 pH 3.5 (盐酸和柠檬酸)培养条件下, 存活率显著降低; 精氨酸合成途径基因 *argD* 和 *argF* 转录水平分别下调 2.4 和 3.7 倍。同时, *dsbG* 缺失株的运动能力减弱, 且鞭毛形成相关的 *flaA*、*flgB* 和 *flgD* 等基因转录水平显著下调(分别为 29.7、6.7 和 6.9 倍), 鞭毛形成能力减弱。【结论】本研究首次证实了单增李斯特菌二硫键形成蛋

资助项目: 浙江省自然科学基金(LQ22C180001, LY19C180001, LZ19C180001); 国家自然科学基金(31872620, 32002253, 31972648); 浙江农林大学人才启动项目(2019FR041)

This work was supported by the Natural Science Foundation of Zhejiang Province (LQ22C180001, LY19C180001, LZ19C180001), the National Natural Science Foundation of China (31872620, 32002253, 31972648), and the Talent Launching Project of Zhejiang A&F University (2019FR041).

[#]These authors contributed equally to this work.

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

Received: 2022-06-08; Accepted: 2022-09-02; Published online: 2022-09-15

白 DsbG 能感应低 pH 应激, 并形成耐受; 证实了 DsbG 通过调控鞭毛相关基因的转录进而影响细菌的鞭毛形成和运动性。本研究有助于深入了解二硫键形成蛋白家族介导单增李斯特菌环境适应的分子机制, 为食源性致病菌的防控提供理论基础。

关键词: 单增李斯特菌; 二硫键形成蛋白; 酸耐受; 运动性; 鞭毛

Role of DsbG in acid tolerance and flagella-mediated motility of *Listeria monocytogenes*

LIU Yuqing^{1#}, XIA Jing^{1#}, WANG Zhe¹, FEI Dingrun¹, LUO Yaru¹, CHEN Mianmian¹, JIANG Lingli², SONG Houhui^{1*}, CHENG Changyong^{1*}

1 College of Animal Science and Technology & College of Veterinary Medicine, Zhejiang A&F University, 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, Hangzhou 311300, Zhejiang, China
2 Ningbo College of Health Sciences, Ningbo 315100, Zhejiang, China

Abstract: [Objective] To investigate the biological roles of the disulfide bond formation protein DsbG in the acid tolerance and flagella-mediated motility of *Listeria monocytogenes* by constructing the *dsbG*-deleted and complemented strains. **[Methods]** The *dsbG*-deleted and complemented strains were constructed via the homologous recombination method. The growth and survival rates of the strains in the media at different pH gradients were analyzed. The transcriptional levels of the genes involved in acid tolerance were determined by real-time quantitative PCR and compared between the wild-type and mutant strains exposed to acid stress. The motility, transcriptional levels of flagella-associated genes, and flagellar morphology were compared between wild-type and mutant strains by semi-solid culture, real-time quantitative PCR, and transmission electron microscopy, respectively. **[Results]** The deletion of *dsbG* did not affect the growth of the bacteria in a medium with neutral pH. However, it significantly reduced the survival rate of bacteria in the media with hydrochloric acid and citric acid (pH 3.5). It down-regulated the transcriptional levels of the genes (*argD* and *argF*) in the arginine pathway by 2.4 and 3.7 times, respectively. Moreover, the lack of *dsbG* impaired the flagellum formation and bacterial motility and down-regulated the transcriptional levels of flagella-associated genes *flaA*, *flgB*, and *flgD* by 29.7, 6.7, and 6.9 times, respectively, compared with the wild-type strain. **[Conclusion]** This study for the first time, demonstrated that DsbG could sense low pH stress, play a role in the development of acid tolerance, and more importantly, contribute to the flagella-mediated motility of *L. monocytogenes* via regulating the transcription of flagella-associated genes. This study helps to understand the roles of the disulfide bond formation protein family in the environmental adaptation of *L. monocytogenes* and provides a theoretical basis for the prevention and control of foodborne pathogens.

Keywords: *Listeria monocytogenes*; disulfide bond formation protein; acid tolerance; motility; flagella

单核细胞增生李斯特菌 (*Listeria monocytogenes*), 简称单增李斯特菌, 是一种重要的食源性病原微生物, 广泛存在于多种环境中^[1]。在蔬菜水果、畜禽肉类、即食的冷藏加工肉等食品中均可检测出单增李斯特菌^[2-4]。误食被该病原菌污染的食品后, 会导致李斯特菌病^[5-6]。临床上主要表现为菌血症、脑膜脑炎以及孕妇的胎儿胎盘感染等症状, 严重者可导致死亡, 死亡率高达 20%–30%^[7-8]。

单增李斯特菌具有很强的环境适应性, 可以抵抗氧化、渗透压、低温或高温、细菌素和其他防腐添加剂等各种应激^[9]。在低 pH 条件下, 单增李斯特菌表现出适应性酸耐受, 可以诱导对胆酸盐、渗透压等应激的交叉保护, 对食品安全造成严重威胁^[10]。单增李斯特菌适应环境应激会提高细菌毒力, 引发更高的健康风险。鞭毛被认为是细菌附着在不同合成表面上的介质^[11], 单增李斯特菌特有的鞭毛相关蛋白主要存在基座和胞质中, 如鞭毛基座蛋白 FliE、FliG、FliM、FliH、FliR 等^[12]。鞭毛结构成分的表达对于完成生物膜生命周期至关重要^[13-14]。因此, 了解单增李斯特菌的抗酸机制和鞭毛形成有利于对该菌的防控。

细菌可以利用精密的氧化还原稳态修复系统, 应对体外和体内多种氧化应激, 主要包括硫氧还蛋白(thioredoxin, Trx)系统、谷氧还蛋白(glutaredoxin, Grx)系统以及二硫键形成蛋白家族(disulfide bond formation protein, Dsb)^[15]。目前单增李斯特菌已报道含有 Trx 系统和 Grx 系统, 前者通过调节蛋白质巯基/二硫键平衡, 抵御氧化应激^[16-17]; 后者通过催化蛋白质巯基与丰富的 GSSG/GSH 之间进行巯基/二硫键的可逆交换, 从而保护蛋白质巯基免受不可逆的氧化反应^[18]。而 Dsb 蛋白催化二硫键生成, 对细菌蛋白质的氧化折叠至关重要, 包括细菌毒素、分泌

系统、黏附素、鞭毛的折叠和活性等^[19]。但许多细菌并不具备完备的 Dsb 系统, 且不同菌属的 Dsb 蛋白功能机制具有明显的差异。

分析单增李斯特菌基因组发现, 除了 YjbH 曾被注释为“DsbA-like”外, 只有 *lmo1059* 被注释成 DsbG。本课题组前期已经证明 YjbH 发挥了类似硫氧还蛋白的功能^[20], 但是唯一的 Dsb 家族蛋白 DsbG 的功能尚不清楚。本研究以单增李斯特菌 EGD-e 为研究对象, 利用同源重组技术构建 *dsbG* 基因缺失株和回补株, 并通过体外生长、酸应激实验、体外运动性、鞭毛负染色电镜观察和荧光定量等方法, 探究 DsbG 对单增李斯特菌酸耐受和鞭毛形成的影响。

1 材料与方法

1.1 质粒、菌株及培养条件

单增李斯特菌标准菌株 EGD-e、大肠杆菌 DH5 α 和 Rosetta、蛋白表达质粒 pET-30a、温敏型穿梭质粒 pKSV7、整合型回补质粒 pIMK2 均为本实验室保存; 大肠杆菌 DH5 α 和 Rosetta 培养于 LB 培养基; 单增李斯特菌培养于 BHI 培养基。

1.2 主要试剂

BHI 培养基购自 Oxoid 公司; LB 培养基和柱式总 RNA 提取试剂盒购自生工生物工程(上海)股份有限公司; KOD plus Neo PCR 酶、Ligation high Ver.2.0 购自 TOYOBO 公司; 限制性核酸内切酶、质粒快速提取试剂盒和 BCA 蛋白浓度测定试剂盒分别购自 NEB 公司、惠凌生物技术(上海)有限公司和碧云天生物技术(上海)有限公司; 本研究所用化学试剂均为国产分析纯。

1.3 引物

本研究所用引物均由有康生物科技(杭州)有限公司合成, 序列详见表 1。

表 1 研究所用引物

Table 1 Primers used in this study

Primers	Sequences (5'→3')
<i>ΔdsbG</i> -up- <i>Bam</i> H I -fwd	<u>TTGGGATCCAAGT</u> GAAAGAAGCATACGGTTTAGA
<i>ΔdsbG</i> -up-rev	CATCATCAAGTAGCGAACGTAACCTACTTCTGCTTTAATTTGACTAATATCCA
<i>ΔdsbG</i> -down-fwd	TTAAAGCAGAAGTAGAGTTACGTTTCGCTACTTGGATGATGAATTAGCTAAATA
<i>ΔdsbG</i> - <i>Hind</i> III-down-rev	<u>TTCAAGCTTTCATCTTCTTCAGAGAGCGCCG</u> TCA
<i>CΔdsbG</i> _P _{help} - <i>Nco</i> I -fwd	<u>CATGCATGGATATTAGTCAAATTAAGCA</u>
<i>CΔdsbG</i> _P _{help} - <i>Bam</i> H I -rev	<u>CGCGGATCCTTAGGCGTAGTCCGGCACGT</u>
<i>CΔdsbG</i> _P _{native} -up- <i>Sac</i> I-fwd	<u>GCGAGCTCAGTTATGTACTACCAATCTTCTCTGTTTT</u>
<i>CΔdsbG</i> _P _{native} -up-rev	TGACTAATATCCATATGCGTCTCCTCCTCATCAA
<i>CΔdsbG</i> _P _{native} -down-fwd	GGAGGAGACGCATATGGATATTAGTCAAATTAAGCAGAAGTAGT
<i>CΔdsbG</i> _P _{native} -down- <i>Bam</i> H I -rev	<u>CGGGATCCTTATTTAGCTAATTCATCATCAAGTAGCGAACG</u>
M13-fwd	GTTTCCCAGTCACGAC
M13-rev	AGCGGATAACAATTTTCACACAGGA
<i>ΔdsbG</i> -a-front	ATCAAATTATTACGCTTGGCACCATG
<i>gmaR</i> -RT-fwd	AGCAAGTTCCATCAACCAAAAAG
<i>gmaR</i> -RT-rev	GTTGAGTTGTCATCGAAAGTAAGC
<i>mogR</i> -RT-fwd	TCGGAATATCTTCTACTTGG
<i>mogR</i> -RT-rev	TCTGAAATGCTCAGCCTAAA
<i>motB</i> -RT-fwd	AAGCGTCGCAAGAAACCG
<i>motB</i> -RT-rev	GAGGCAAACAGAACGATAAATAGAG
<i>fliR</i> -RT-fwd	GAACATCCGAACAGTGTCAAGG
<i>fliR</i> -RT-rev	AGCGTCGTAATACCAGAAACATCCA
<i>fliP</i> -RT-fwd	TACGGTTCTTTCTTTGTCTGCA
<i>fliP</i> -RT-rev	CCAAGACCCTGCCTCGTTA
<i>fliG</i> -RT-fwd	CGCTTATTATTTGGAGCCTTGA
<i>fliG</i> -RT-rev	CGCCGTCCATTTCTTTTATT
<i>fliH</i> -RT-fwd	ACGTCACCACCCACCCAGAA
<i>fliH</i> -RT-rev	CGCCGTAATCCAGTCGCATAT
<i>fliD</i> -RT-fwd	AAGGTGATTCGGCTGTTCTCG
<i>fliD</i> -RT-rev	CACGCCTGGGATGTAGTTGG
<i>fliI</i> -RT-fwd	CGTAACGCCAAAGCAGACAT
<i>fliI</i> -RT-rev	TCCGAGGTAGCAGCAACAAT
<i>fliF</i> -RT-fwd	TCACCATCATGCCTATCCAGTT
<i>fliF</i> -RT-rev	GATGACGGCGAAGAGTAAACC
<i>flgB</i> -RT-fwd	TTTGGGAGCATCCGGTCAG
<i>flgB</i> -RT-rev	GTTTCGTCTATGTCGGTTCCAG
<i>flgC</i> -RT-fwd	ACAAGCGGCTCTGCGTTAA
<i>flgC</i> -RT-rev	GGCGTGATTTCCGATAGGAC
<i>flgD</i> -RT-fwd	ATTAGTAGTTTATCAGGAGCGAGTCAG
<i>flgD</i> -RT-rev	AGTCATCTTTGCCAAGGGTTT
<i>flgE</i> -RT-fwd	GCCAATGCCAACACGACA
<i>flgE</i> -RT-rev	CGAACCAGGAACTGAACT
<i>flgG</i> -RT-fwd	CCAGTTTCAATCCGATCAGTTT
<i>flgG</i> -RT-rev	TTGAATCGCTTCTCCAGTCG
<i>flgK</i> -RT-fwd	TTACGGTGACGGTGGTCTACTTG
<i>flgK</i> -RT-rev	GCGGATTGTTTGGCGATT
<i>flgL</i> -RT-fwd	TTCGGTTGTCCGTTATAGATG
<i>flgL</i> -RT-rev	TAACTCAGAAGACGATGGCAGAT

(待续)

(续表 1)

Primers	Sequences (5'→3')
<i>lmo0708</i> -RT-fwd	TGAACAAATTCGCCAAATGC
<i>lmo0708</i> -RT-rev	TGTTTCATCACTCCCTCGTAGC
<i>flhB</i> -RT-fwd	GAGGTCGTGAAAGCGTTATTGT
<i>flhB</i> -RT-rev	CGGTGTAACATAATGAGCGTATCTAA
<i>fliM</i> -RT-fwd	CACTCAAAGGCTATGTCACCG
<i>fliM</i> -RT-rev	TGCTCTGTCCGCCCTGTAT
<i>flaA</i> -RT-fwd	CTTGATGACGCTGCTGGTCT
<i>flaA</i> -RT-rev	AGCTGAATCCGCTGTTTGTA
<i>rpoB</i> -RT-fwd	CTACACTTAGGTATGGCTGCTCG
<i>rpoB</i> -RT-rev	GGCTTCTTCCACTGTGCTCC
<i>sigB</i> -RT-fwd	TATTTGGATTGCCGTTACC
<i>sigB</i> -RT-rev	TTCGGGCGATGGACTCTAC
<i>sigH</i> -RT-fwd	GGCTGAGGATGATGTGGACTG
<i>sigH</i> -RT-rev	CGCTTGTGACTTGTCTAGTTGAC
<i>gadD1</i> -RT-fwd	ATCGACTTGACCGAGAAGATGC
<i>gadD1</i> -RT-rev	CTTGTTCAAGAAACAGCCTTATCCA
<i>gadD2</i> -RT-fwd	ATGGATAAAGAGCACATGCAACTC
<i>gadD2</i> -RT-rev	ATACCGAGGATGCCGACCA
<i>gadD3</i> -RT-fwd	TAGTGAAGACGACAAGCGAAAA
<i>gadD3</i> -RT-rev	AGTTGATAAGCAATGCGAGGTT
<i>gadT1</i> -RT-fwd	TTTTATTTCGCTCCGGCAGAC
<i>gadT1</i> -RT-rev	CGTCCCTATCATCGCTTTTCT
<i>gadT2</i> -RT-fwd	GGGAAATACACTCGGGGAACG
<i>gadT2</i> -RT-rev	GAGTGCGGGAAAATCAAATACATAG
<i>argR</i> -RT-fwd	CCGATAATAGTTTCAACCCACATC
<i>argR</i> -RT-rev	TGCACCAACCGAGTTTCCAT
<i>arcA</i> -RT-fwd	CTAGAAGGCGAGAGTCAATA
<i>arcA</i> -RT-rev	ACGGTCTCTTCATTTCAGAA
<i>arcB</i> -RT-fwd	ATTGACACGCAAGAAGATT
<i>arcB</i> -RT-rev	ATTATCGGCAGGTAGACTAT
<i>arcD</i> -RT-fwd	CCGAAGAAGAGCGAATGA
<i>arcD</i> -RT-rev	TATGGAGCATCAAGCACTT
<i>arcC</i> -RT-fwd	GGACAACCTATGATGATGAAG
<i>arcC</i> -RT-rev	TTCTACAAACAATACCGCTAAA
<i>argB</i> -RT-fwd	CAACCTGATGCTACAACAA
<i>argB</i> -RT-rev	TTAATGAAACCGCTACTTTATCTA
<i>argS</i> -RT-fwd	TGGAAGCAGATAGGTTAAGT
<i>argS</i> -RT-rev	GCCAATCGTGTTCACTATT
<i>argC</i> -RT-fwd	ACCGTATTGTCCGTTACT
<i>argC</i> -RT-rev	GTGCTGTCTTAATAAGTGCTA
<i>argH</i> -RT-fwd	CGAATCCAACCAGAGAATG
<i>argH</i> -RT-rev	ATCAATCACAGAAAACGATAGTAAT
<i>argD</i> -RT-fwd	ATCAAGTTGCGACAGACA
<i>argD</i> -RT-rev	GAGCGTGTGTAAATGTGTA
<i>argF</i> -RT-fwd	GGAGGGTTTCTGATAGGTAT
<i>argF</i> -RT-rev	AAGATTCGTAGCACATTTCG
<i>argG</i> -RT-fwd	GCCTGATTACCACTTCTTAC
<i>argG</i> -RT-rev	CCTATTTCCCGCTTGTTG

The restriction enzyme sites are underlined.

1.4 *dsbG* 缺失株重组质粒的构建和筛选

从 NCBI 数据库中下载基因 *dsbG* 及其前后共 5 个基因序列, 使用 Snapgene 软件在开放阅读框内部两侧分别设计引物 $\Delta dsbG$ -up-BamH I-fwd/ $\Delta dsbG$ -up-rev 和 $\Delta dsbG$ -down-fwd/ $\Delta dsbG$ -Hind III-down-rev。以单增李斯特菌标准菌株 EGD-e 基因组(GenBank 登录号: NC_003210.1)为模板, 扩增上下游同源臂, 并通过 Overlap PCR 方法连接同源

臂获得重组片段, 克隆至 pKSV7 载体, 获得重组质粒 pSL021 (图 1), 经测序正确后转化至 DH5 α 中。

1.5 *dsbG* 回补株重组质粒的构建和筛选

针对 *dsbG* 基因设计相应的引物 C $\Delta dsbG$ -P_{help}-Nco I-fwd 和 C $\Delta dsbG$ -P_{help}-BamH I-rev。扩增得到目的片段双酶切后连接至整合型回补质粒 pIMK2, 获得重组质粒 pSL074 (图 2), 经测序验证正确后转化至 DH5 α 中。

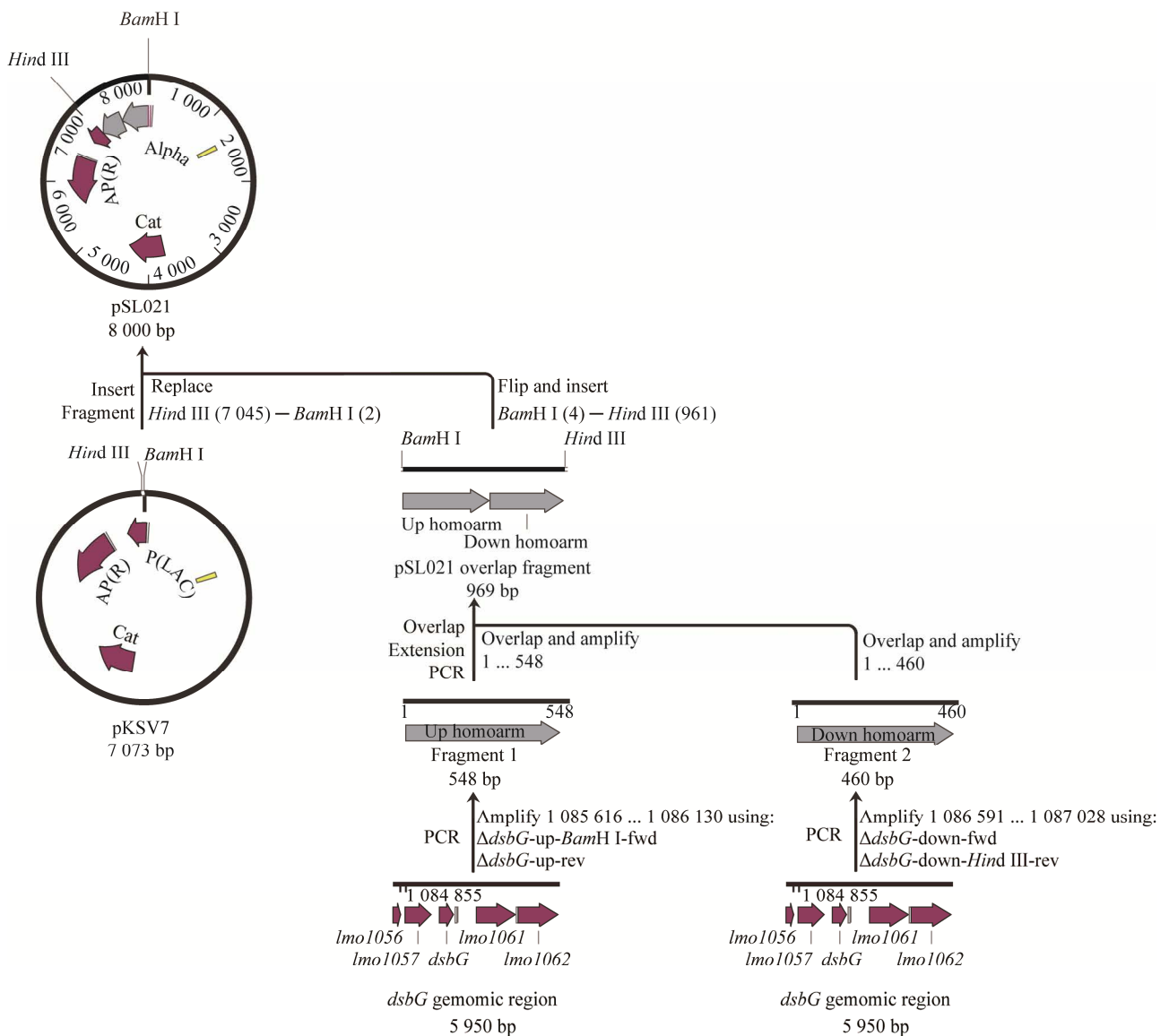


图 1 *dsbG* 缺失株重组质粒 pSL021 的构建路径

Figure 1 Construction strategy of the recombinant plasmid pSL021 for *dsbG* gene deletion.

由于 pIMK2 质粒自身携带了增强型启动子 *help* (P_{help}), 考虑到会影响回补目的序列在菌体自然的转录水平, 使用 Softberry 生物启动子网站(linux1.softberry.com)预测 *dsbG* 基因的操纵子区域基因的启动子; 在此基础上设计引物 $C\Delta dsbG_{P_{native-up-SacI-fwd}}/C\Delta dsbG_{P_{native-up-rev}}$ 、 $C\Delta dsbG_{P_{native-down-fwd}}/C\Delta dsbG_{P_{native-down-BamHI-rev}}$,

扩增天然启动子和 *dsbG* 基因片段, 通过 Overlap PCR 方法连接获得目的片段, 克隆至 pIMK2 载体, 获得重组质粒 pSL1979 (图 3), 并经测序正确后转化至 DH5 α 中。

1.6 *dsbG* 缺失株和回补株的构建和筛选

将 *dsbG* 缺失株重组质粒 pSL021 电转至 EGD-e 感受态, 通过温度和氯霉素抗性双重选

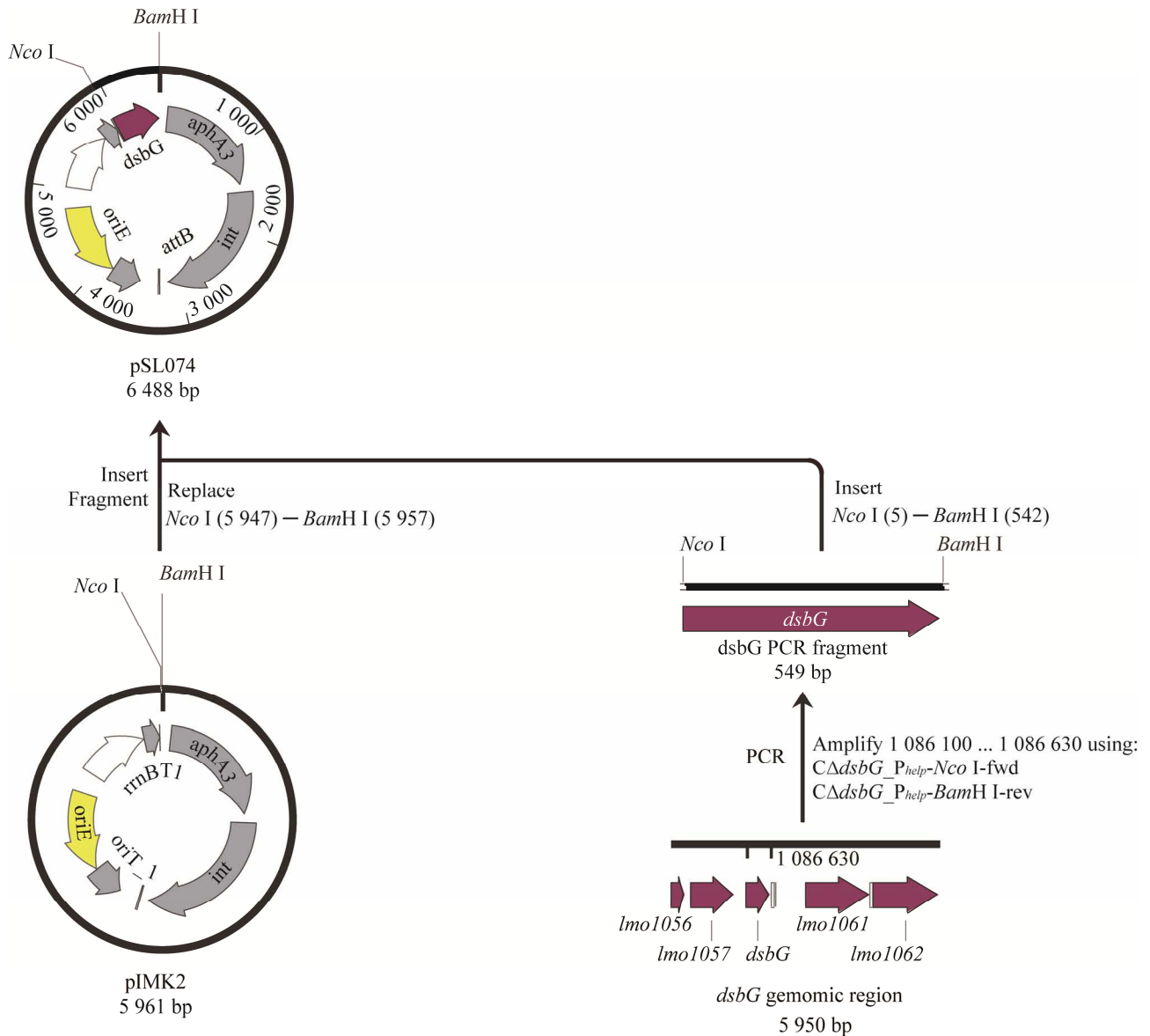


图 2 *dsbG* 过表达回补株重组质粒 pSL074 的构建路径

Figure 2 Construction strategy of the recombinant plasmid pSL074 for *dsbG* overexpression complementation.

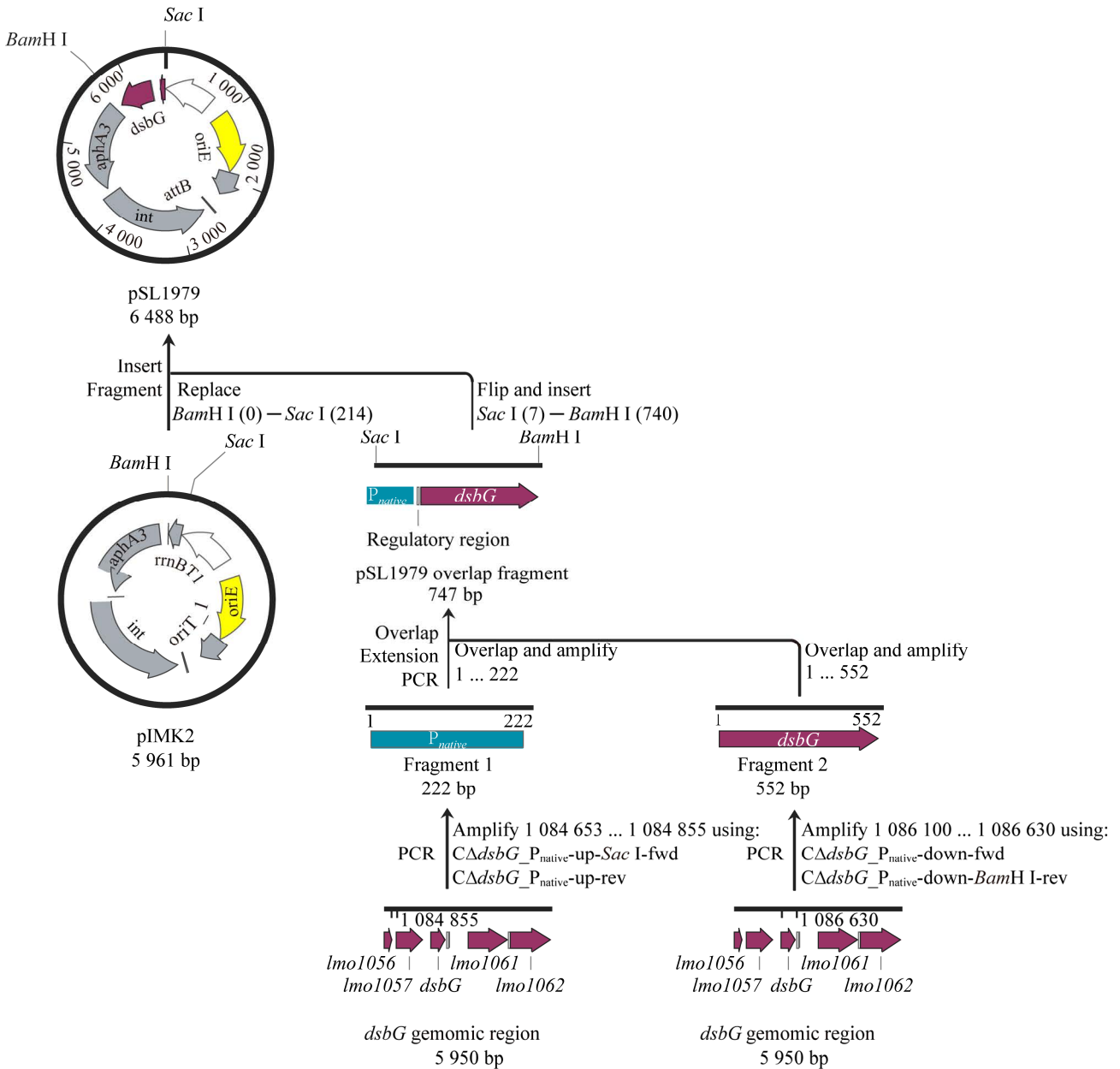


图 3 *dsbG* 天然回补株重组质粒 pSL1979 的构建路径

Figure 3 Construction strategy of the recombinant plasmid pSL1979 for *dsbG* natural complementation.

择压力进行同源重组克隆筛选，并使用引物 $\Delta dsbG$ -afont/ $\Delta dsbG$ -HindIII-down-rev 对筛选出的重组克隆进行 PCR 验证，最终经测序验证，所缺失的基因序列与预期设计相符后得到 $\Delta dsbG$ 缺失株。在 *dsbG* 缺失株构建成功的基础上，制备 $\Delta dsbG$ 感受态，将构建成功的 *dsbG* 回补株重组质粒 pSL074 和 pSL1979 分别电转至

$\Delta dsbG$ 感受态中，通过挑选单菌落进行 PCR 验证获得阳性克隆，最终经测序验证基因序列与预期相符后得到 *dsbG* 回补株 $C\Delta dsbG$ -P_{help} 和 $C\Delta dsbG$ -P_{native}。

1.7 Western blotting 验证 *dsbG* 缺失株和回补株

提取 EGD-e、 $\Delta dsbG$ 、 $C\Delta dsbG$ -P_{native} 和

C Δ dsbG_P_{heip}全菌蛋白并定量,取等质量蛋白进行 SDS-PAGE。将蛋白转印至 PVDF 膜上,用 5%的脱脂牛奶室温封闭 1 h;分别加入 DsbG 多抗[生工生物工程(上海)股份有限公司]和内参 GAPDH 多抗[华安生物技术(杭州)有限公司],室温孵育 1 h;加入 HRP 标记的羊抗兔 IgG [宝科生物技术(杭州)有限公司],室温孵育 1 h;避光滴加显影液,化学发光成像仪曝光并保存结果。

1.8 生长曲线的测定

37 °C 过夜振荡培养 EGD-e、 Δ dsbG、C Δ dsbG_P_{native}和 C Δ dsbG_P_{heip}菌株,调节 OD₆₀₀ 为 0.6,起始菌液稀释 100 倍后,放于 37 °C 振荡培养,每隔 1 h 检测样品,连续检测 12 h 并绘制生长曲线。同时进行 6 h 菌液点板,将菌液倍比稀释至 10⁻⁵,点板至 BHI 固体培养基,置于 37 °C 恒温箱培养过夜,观察生长情况。

1.9 酸应激生长曲线检测

37 °C 过夜振荡培养 EGD-e、 Δ dsbG、C Δ dsbG_P_{native}和 C Δ dsbG_P_{heip}菌株,调节 OD₆₀₀ 为 0.6,1:50 转接至预先调好 pH 的酸性 BHI 培养基中(用盐酸 HA、乙酸 AA 和柠檬酸 CA 调整 BHI 的 pH 至 4.5、5.5 和 6.5),并置于 96 孔板中于 37 °C 静置培养 14 h,每隔 1 h 检测样品的 OD₆₀₀,利用 Excel 及 GraphPad Prism 8 软件进行数据分析。

1.10 酸应激存活实验

37 °C 过夜振荡培养 EGD-e、 Δ dsbG、C Δ dsbG_P_{native}和 C Δ dsbG_P_{heip}菌株,调节 OD₆₀₀ 为 0.6,1:50 转接至预先调好 pH 的酸性 BHI 培养基中(HA、AA 和 CA 调整 BHI 至 pH 3.5),37 °C 静置培养 1 h 后吸取不同稀释度的菌液点板,37 °C 培养 16 h 后进行细菌计数。利用 GraphPad Prism 8 软件进行数据分析。

1.11 体外运动性实验

制备含 0.25% Agar、2% NaCl 和 1.5%

Tryptone 的半固体培养基,将过夜培养的 EGD-e、 Δ dsbG、C Δ dsbG_P_{native}和 C Δ dsbG_P_{heip}的菌液的 OD₆₀₀ 调至 0.6,用灭菌的牙签蘸取微量菌液穿刺接种至于半固体培养基中,分别于 37 °C 和 30 °C 静置培养,在 24 h、48 h 后观察细菌运动圈。利用 GraphPad Prism 8 软件进行数据分析。

1.12 体外鞭毛形态观察

将 EGD-e、 Δ dsbG、C Δ dsbG_P_{native}和 C Δ dsbG_P_{heip}菌株分别划线于 BHI 固体培养基,30 °C 静置培养 16 h,轻轻刮取菌落于 10 mmol/L PBS,轻柔吹散洗涤,5 000 r/min 离心 5 min 收集菌体;沿管壁缓慢加入 2.5%戊二醛溶液固定细菌,送研趣信息技术(杭州)有限公司进行鞭毛负染色透射电镜观察。

1.13 荧光定量 PCR 方法检测 EGD-e、 Δ dsbG 耐酸应激及鞭毛基因的转录水平

使用细菌总 RNA 快速抽提试剂盒[生工生物工程(上海)股份有限公司]分别提取致死酸应激条件下和 30 °C 静置培养条件 EGD-e、 Δ dsbG 的总 RNA,反转录得到相应的 cDNA。耐酸应激和鞭毛形成相关基因荧光定量 PCR 引物见表 1。转录水平变化使用 2^{- $\Delta\Delta$ Ct} 方法分析,利用 GraphPad Prism 8 软件对所得数据进行处理分析。

2 结果与分析

2.1 构建 dsbG 缺失株和回补株

以 EGD-e 基因组为模板分别扩增出大小为 514 bp 的上游同源臂(图 4A,泳道 1)和 437 bp 的下游同源臂(图 4A,泳道 2),然后通过 Overlap PCR 扩增出大小为 965 bp 的目的片段(图 4C,泳道 1);经 PCR 验证和测序比对,表明成功获得缺失 dsbG 的重组质粒 pSL021。同样以 EGD-e 基因组为模板分别扩增出长度为 221 bp dsbG 启动子区域(图 4B,泳道 1)和 551 bp 目的基因片段(图 4B,泳道 2),然后通过 Overlap PCR 扩增

出大小为 745 bp 的目的片段(图 4C, 泳道 2), 经 PCR 验证和测序比对, 表明获得天然回补重组质粒 pSL1979。根据引物 $C\Delta dsbG_{P_{help}}-NcoI-fwd$ 、 $C\Delta dsbG_{P_{help}}-BamHI-rev$ 扩增出大小为 565 bp 的目的片段(图 4D, 泳道 1), 进行 PCR 验证和测序比对, 对比结果正确, 表明获得过表达回补重组质粒 pSL074。

利用同源重组原理构建 $dsbG$ 缺失株和回补株, 30 °C 连续传代后, 用引物 $\Delta dsbG-a-front/\Delta dsbG-HindIII-down-rev$ 扩增验证, 缺失 $dsbG$ 后, PCR 片段大小为 957 bp (图 4E, 泳道 1、2), 而以 EGD-e 作为阳性对照扩增的片段大小约为 1 412 bp 的片段(图 4E, 泳道 PC); 经测序验证结果正确, 表明 $dsbG$ 缺失株构建成功, 命名为

$\Delta dsbG$ 。通过引物 $C\Delta dsbG_{P_{help}}-NcoI-fwd$ 、 $C\Delta dsbG_{P_{help}}-BamHI-rev$ 扩增过表达回补阳性克隆, PCR 片段大小为 565 bp (图 4F, 泳道 1), 将此菌株测序验证, 测序结果正确, 表明 $dsbG$ 过表达回补株构建成功, 命名为 $C\Delta dsbG_{P_{help}}$ 。以引物 $C\Delta dsbG_{P_{native}}-up-SacI-fwd$ 和 $C\Delta dsbG_{P_{native}}-down-BamHI-rev$ 扩增 $dsbG$ 过表达阳性克隆, 扩增产物大小为 1 978 bp (图 4F, 泳道 2), 将此菌株送测序, 结果正确, 表明 $dsbG$ 天然回补株构建成功, 命名为 $C\Delta dsbG_{P_{native}}$ 。Western blotting 检测结果显示野生株 EGD-e、回补株 $C\Delta dsbG_{P_{help}}$ 和 $C\Delta dsbG_{P_{native}}$ 中 DsbG 表达水平无显著差异, $\Delta dsbG$ 中 DsbG 不表达(图 4G), 表明 $dsbG$ 缺失株和回补株构建成功。

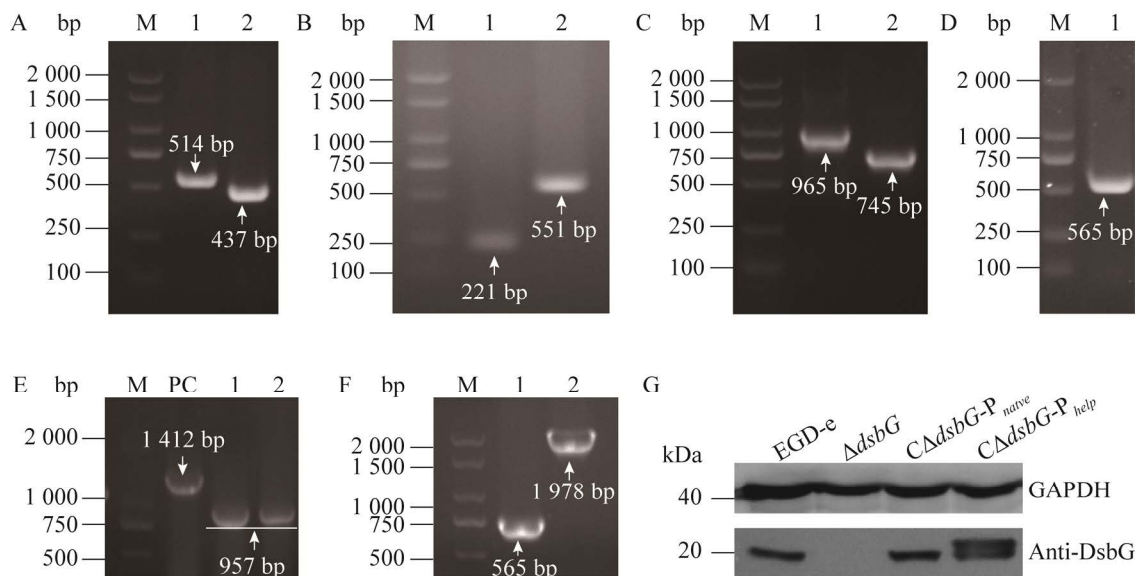


图 4 $dsbG$ 缺失株和回补株的构建和验证

Figure 4 Verification of the $\Delta dsbG$, $C\Delta dsbG_{P_{native}}$ and $C\Delta dsbG_{P_{help}}$ by PCR. A: Lane 1 and 2 are the up/downstream homologous arm PCR bands of $dsbG$ respectively. B: Lane 1 is the natural promoter of $dsbG$, and lane 2 is the $dsbG$ gene fragment. C: Lane 1 is up/down homologous arm overlap PCR band; Lane 2 is $dsbG$ natural promoter and $dsbG$ gene fragment overlap PCR band. D: Lane 1 is $dsbG$ gene fragment. E: Lane 1 and 2 are the PCR verification of $\Delta dsbG$ strains. F: Lane 1 is the $C\Delta dsbG_{P_{help}}$ strain verification; Lane 2 is the $C\Delta dsbG_{P_{native}}$ strain validation. G: Western blotting analysis of DsbG protein expression levels in wild-type, $dsbG$ deletion and complement strains. M: DL 2000 DNA marker; PC: Positive control.

2.2 *dsbG* 缺失不影响菌株体外生长能力

图 5 为 EGD-e、 $\Delta dsbG$ 、 $C\Delta dsbG_{P_{native}}$ 和 $C\Delta dsbG_{P_{help}}$ 在 37 °C 培养时的生长曲线。结果发现 *dsbG* 回补株能够使细菌的生长能力恢复到野生株 EGD-e 水平, 同时缺失 *dsbG* 与野生株 EGD-e 的生长趋势一致(图 5A), 表明敲除基因 *dsbG* 不影响单增李斯特菌的生长速率。对生长 6 h 的菌液进行稀释点板, 发现 $\Delta dsbG$ 与 EGD-e 在同一时期的 CFU 数量级相同(图 5B), 结果表明缺失基因 *dsbG* 不影响单增李斯特菌体外生长能力。

2.3 *dsbG* 缺失后单增李斯特菌在致死酸条件下存活能力减弱

单增李斯特菌 EGD-e、 $\Delta dsbG$ 、 $C\Delta dsbG_{P_{native}}$ 和 $C\Delta dsbG_{P_{help}}$ 在 pH 6.5、pH 5.5、pH 4.5 的酸环境应激条件下的生长曲线如图 6 所示, 在含有 HA (图 6A)、AA (图 6B)、CA (图 6C) 的 BHI 培养基中, $\Delta dsbG$ 与 EGD-e 相比, 单增李斯特菌对 AA 应激最为敏感, 对 HA 的敏感程度与 CA 相当, 但是生长曲线趋于一致; 结果表明, 单增李斯特菌缺失基因 *dsbG* 在无机酸 HA、CA 和有机酸 AA 应激条件下生长能力无显著差异。

在 pH 3.5 的 HA、AA 和 CA 致死条件下, 60 min 后检测细菌存活数, 结果如图 7 所示, 单增李斯特菌对 AA 的应激抵抗能力最弱, 细菌无法存活; 同时发现, 在 pH 3.5 的 HA 和 CA 应激下, $\Delta dsbG$ 的致死存活率显著低于野生株 ($P < 0.05$), 我们推测 *dsbG* 参与酸应激调控, 与酸性环境适应相关。

2.4 *dsbG* 缺失后单增李斯特菌酸耐受基因转录下调

为了进一步探究致死酸应激条件下缺失 *dsbG* 是否影响酸耐受基因的转录, 通过实时荧光定量方法对谷氨酸脱羧酶 (glutamate decarboxylase, GAD) 系统的基因 *gadD1*、*gadD2*、*gadD3*、*gadT1* 和 *gadT2*, 精氨酸脱氨酶 (arginine deiminase, ADI) 系统精氨酸分解代谢途径的基因 *arcA*、*arcB*、*arcC*、*arcD* 和 *argR*, 精氨酸合成途径的 *argB*、*argC*、*argD*、*argH*、*argG*、*argF* 和 *argS*, 应激调节因子 *sigB* 和 *sigH* 基因进行定量分析。结果显示, 在酸性 BHI (CA 调整至 pH 3.5) 应激 1 h 后, $\Delta dsbG$ 中 *argB*、*argD*、*argH*、*argF* 和 *argS* 表达量下调, 其中基因 *argD* 和 *argF* 分别下调 2.4 和 3.7 倍(图 8)。

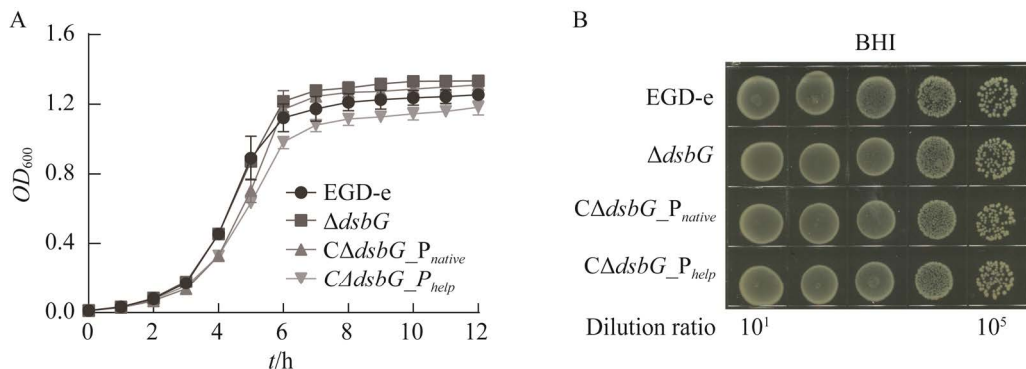


图 5 EGD-e、*dsbG* 缺失株及回补株的生长曲线(A)和菌液稀释点板(B)

Figure 5 Growth curves of EGD-e, *dsbG* deletion and complement strains in BHI medium (A) and plate culture after 6 h growth in liquid medium (B). Data are expressed as means \pm SD of three independent experiments.

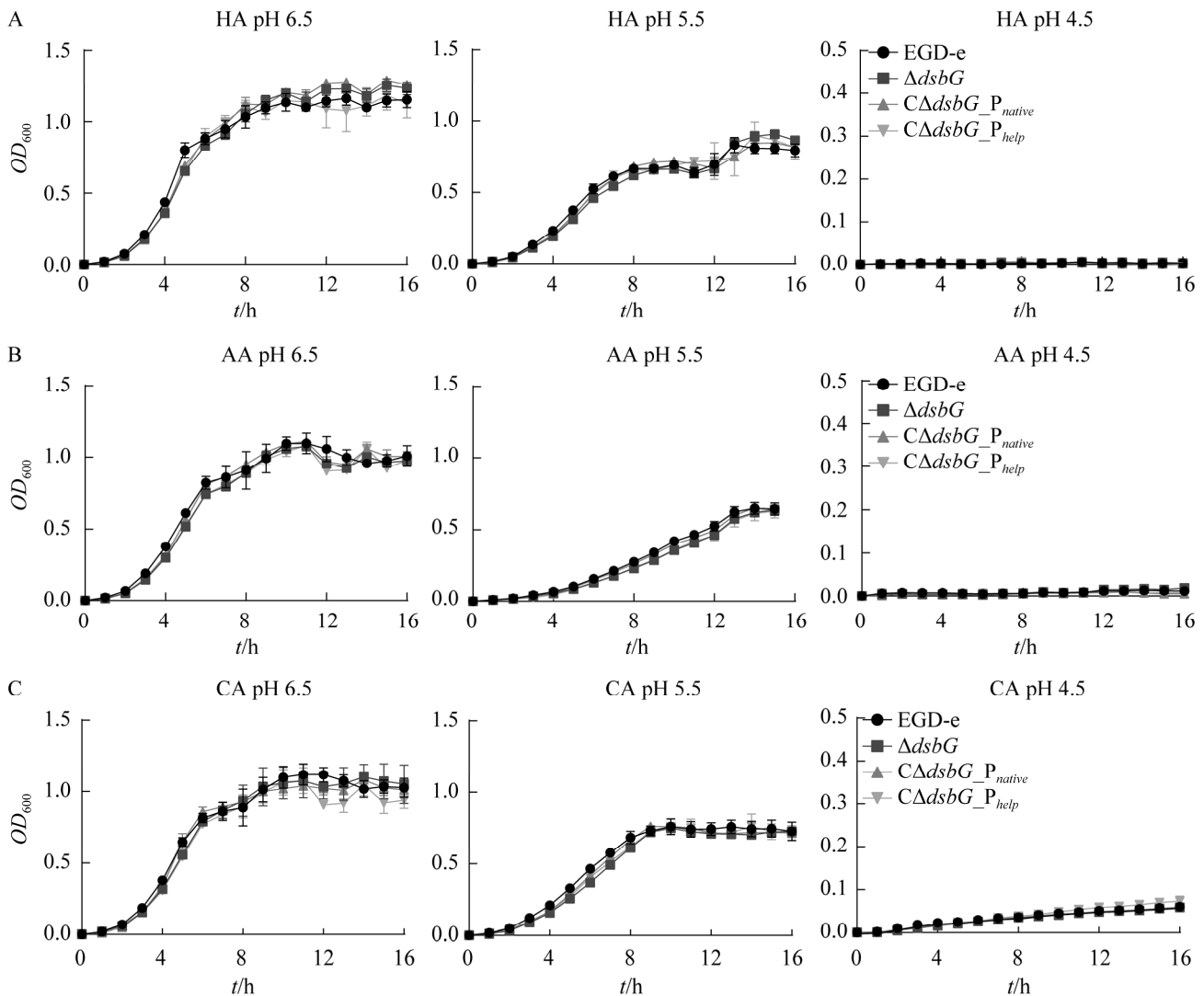


图 6 野生株 EGD-e、*dsbG* 缺失株及回补株在 pH 6.5、pH 5.5 和 pH 4.5 的 HA (A)、AA (B) 和 CA (C) 中的生长比较

Figure 6 Changes in growth capacity of EGD-e and *dsbG* deletion and complement strains under stress in HA (A), AA (B) and CA (C) at pH 6.5, pH 5.5 and pH 4.5. Data are expressed as means \pm SD of three independent experiments.

2.5 *dsbG* 缺失后单增李斯特菌体外运动能力和鞭毛形成能力减弱

测定 EGD-e、 $\Delta dsbG$ 、 $C\Delta dsbG_{P_{native}}$ 和 $C\Delta dsbG_{P_{help}}$ 在 37 °C 和 30 °C 时的体外运动能力结果如图所示(图 9A、9B)。在 30 °C 条件下, 无论是培养 24 h 还是 48 h, $\Delta dsbG$ 的运动圈与 EGD-e、回补株 $C\Delta dsbG_{P_{native}}$ 相比直径显著变

小($P < 0.05$, 图 9C)。当培养条件为 37 °C 时, 未检测到运动性(图 9B、9D)。结果表明缺失基因 *dsbG* 单增李斯特菌的体外运动能力减弱。由于过表达回补株中 $C\Delta dsbG_{P_{help}}$ 的转录水平略高于野生株, 而细菌中 *dsbG* 的表达受到严谨调控, 过表达可能也会影响细菌胞质内的氧化还原平衡进而影响细菌的生物学功能。

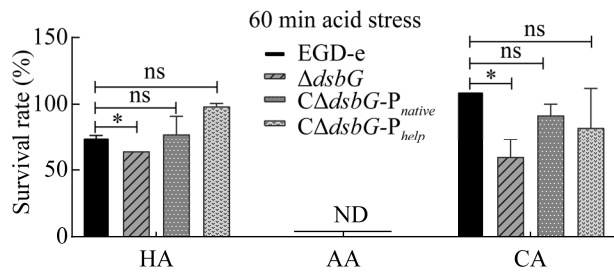


图 7 野生株 EGD-e、*dsbG* 缺失株及回补株在 pH 3.5 的 HA、AA 和 CA 致死环境下细菌存活能力的比较

Figure 7 Comparison of survivability of EGD-e, *dsbG* deletion and complement strains under HA, AA and CA stress of pH 3.5. ND: Not detectable; *: $P < 0.05$.

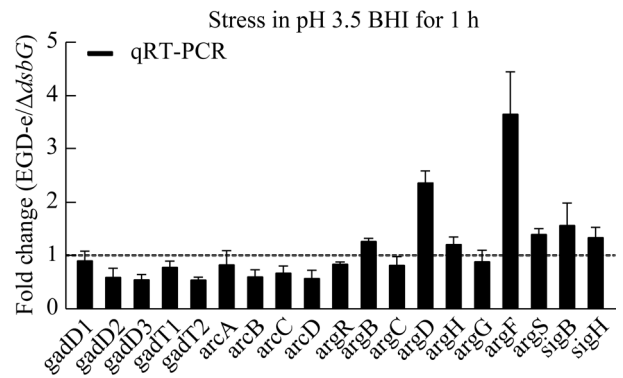


图 8 *dsbG* 缺失后影响单增李斯特菌酸耐受基因的转录

Figure 8 Effects of *dsbG* on transcriptional changes of the acid tolerance genes. Data are expressed as means \pm SD of three independent experiments.

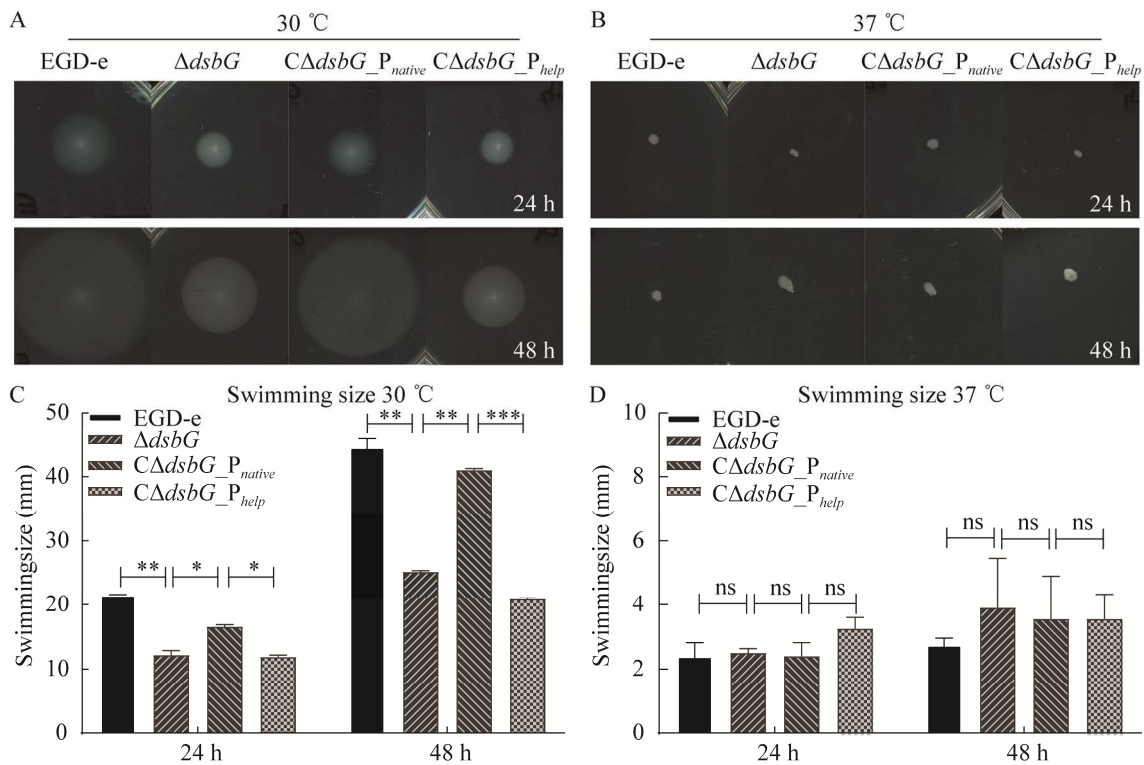


图 9 野生株 EGD-e、*dsbG* 缺失株及回补株在 30 °C (A 和 C) 和 37 °C (B 和 D) 条件下的运动能力分析
Figure 9 Motility assay of the EGD-e, *dsbG* deletion and complement strains at 30 °C (A and C) and 37 °C (B and D). *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$.

通过实时荧光定量 PCR 方法研究 *dsbG* 缺失后鞭毛基因的表达量变化情况, 结果如图 10A 所示。缺失 *dsbG* 基因后, 鞭毛基体杆蛋白基因

flgD 和 *flgC*; 基座蛋白基因 *fliR*、*fliP*、*flgB*、*flhB*、*fliG*、*fliH* 等鞭毛基因的转录水平显著下降, 其中鞭毛丝蛋白基因 *flaA* 的转录水平的下降最为

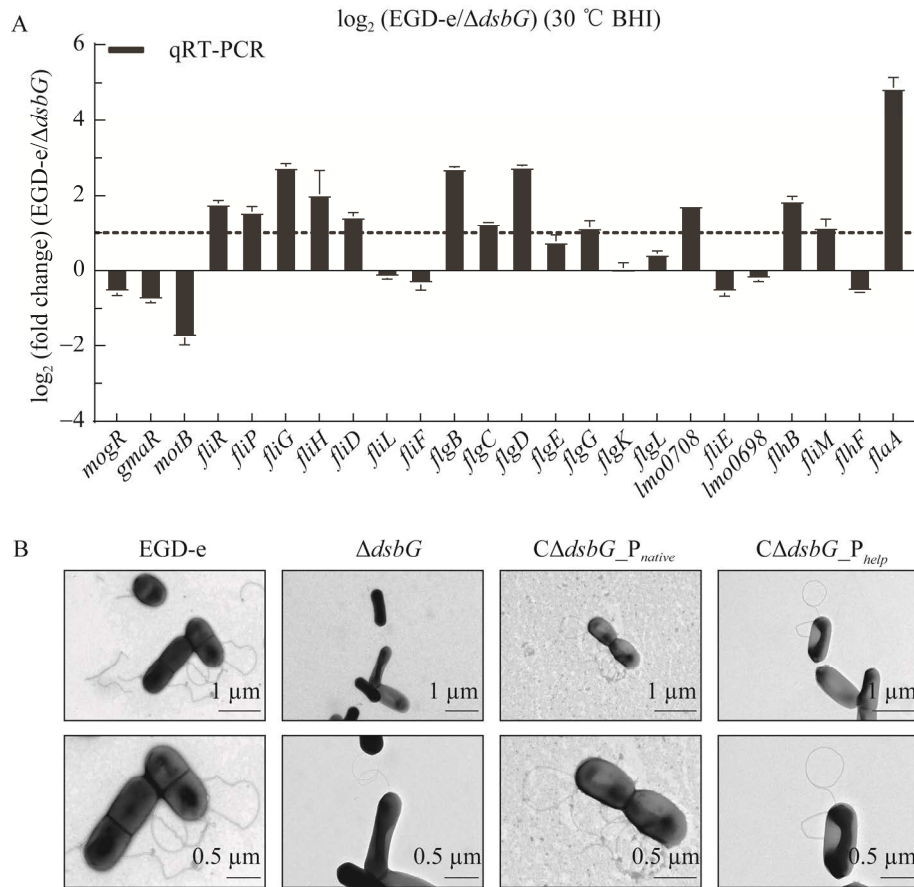


图 10 *dsbG* 缺失后对鞭毛相关基因转录(A)和鞭毛形态(B)的影响

Figure 10 Effects of *dsbG* on transcriptional changes of the flagella-associated genes (A) and the flagella morphology (B). Data are expressed as means \pm SD of three independent experiments.

显著(29.7 倍); 鞭毛温度调控蛋白基因 *gmaR*, 鞭毛基因转录抑制因子 *mogR*, 鞭毛马达蛋白基因 *motB* 和 *fliF* 等转录水平上升; 基座蛋白基因 *flgG*、*flgE* 和 *fliM* 转录水平差异不显著。利用透射电子显微镜观察 30 °C 生长条件下 EGD-e 以及 *dsbG* 突变株的鞭毛形态, 结果如图 10B 所示。 $\Delta dsbG$ 的菌体周围鞭毛与 EGD-e 及 $C\Delta dsbG_P_{native}$ 相比变少且短, 结果表明缺失 *dsbG* 菌株鞭毛形成能力明显减弱。

3 讨论与结论

当单增李斯特菌进入机体, 遇到胃内的酸性、微需氧条件时, 菌体的 2 个调节内部氢离子

浓度的酶系统(GAD 和 ADI)被激活^[21-22]。本研究将 *dsbG* 缺失株暴露于致死性 pH 的 HA 和 CA 环境中, *dsbG* 缺失株的存活率明显降低。单增李斯特菌通过 ADI 途径的分解代谢基因(包括 *arcA* 和 *arcC*)和精氨酸合成基因(由 *arg* 基因编码)调节细胞内的稳态从而适应胞外环境的变化^[23-24], 提高在致死酸性条件下的存活率。本研究证实, *dsbG* 缺失后单增李斯特菌精氨酸合成途径的基因 *argD* 和 *argF* 转录水平显著降低, 表明 DsbG 可能通过调控 *argD* 和 *argF* 基因的转录表达促进精氨酸的合成从而影响 ADI 系统, 参与酸耐受。

单增李斯特菌具有很强的抗应激能力, 可以

暴露在高盐、低 pH 值、低温、氧化或杀菌蓝光等环境中,并在含有消毒剂食品加工环境中持续存在^[25-26]。当单增李斯特菌应激体感应到外界应激时,会整合环境信号,激活应激转录调节因子 SigB 进行转录调控,并对新的环境条件作出适当的反应^[27]。同时据报道,单增李斯特菌的另一应激调控因子 SigH,在低 pH 条件下的表达量会增加^[28]。然而本研究结果显示,酸应激条件下,缺失 DsbG 的单增李斯特菌中,主要的应激调控因子 *sigB/sigH* 表达量分别下调 1.4 和 1.6 倍,差异不显著,提示 DsbG 与 SigB/SigH 在酸应激中不存在调控关系,那么 DsbG 是否参与其他应激环境的应激耐受反应,在其他的应激环境中与 SigB/SigH 是否存在调控关系,具体情况及分子机制还有待深入探究。

细菌鞭毛所产生的运动性是适应不同环境条件时的优势,通过调控鞭毛基因表达以响应外部刺激,避免有害条件而向有利环境移动可使细菌受益^[29]。本研究证实在体外 30 °C 环境下,缺失基因 *dsbG* 影响 *flgB*、*flaA* 等鞭毛基因的转录,影响鞭毛的形成,从而导致 *dsbG* 缺失株在半固体培养基中的运动圈显著变小,即体外运动能力减弱。本研究发现缺失基因 *dsbG* 后 *flaA* 表达量下调 29.7 倍,而有报道发现 FlhB、FliM 和 FliY 不仅介导李斯特菌的运动,而且还参与了鞭毛合成的调节,同时缺失基因 *flhB* 后,鞭毛基因 *flaA* 也显著下调^[30]。在 30 °C 条件下, DegU 与 *fliN-gmaR* 启动子区域结合,激活并表达 GmaR 蛋白,从而与 MogR 结合,抑制鞭毛的形成,同时 DegU 通过转录后调控机制进一步调节 FlaA 表达水平^[31]。另外,在其他一些细菌中,因为 Dsb 系统通过正确引入二硫键,催化细菌鞭毛的蛋白正确地氧化折叠,缺失 DsbA 和 DsbB 后将无法形成鞭毛而丧失运动能力^[32-33]。我们推测 *dsbG* 可能是通过直接催化鞭毛蛋白的正确折叠

影响细菌的鞭毛的形成,也可能通过诱导 DegU 的转录从而影响鞭毛的形成,但具体的分子机制有待进一步深入研究。

本研究首次证实单增李斯特菌二硫键形成蛋白 DsbG 能感应低 pH 环境,通过调控精氨酸合成途径的 *argD* 和 *argF* 基因参与细菌酸耐受。同时证实了 DsbG 通过调控鞭毛相关基因的转录从而影响细菌鞭毛形成及运动性。本研究有助于深入理解单增李斯特菌体外环境适应的分子机制,对于食源性病原菌的污染防控具有重要的公共卫生意义。

参考文献

- [1] BUCHANAN RL, GORRIS LGM, HAYMAN MM, JACKSON TC, WHITING RC. A review of *Listeria monocytogenes*: an update on outbreaks, virulence, dose-response, ecology, and risk assessments[J]. *Food Control*, 2017, 75: 1-13.
- [2] TRUONG HN, GARMYD D, GAL L, FOURNIER C, SEVELLEC Y, JEANDROZ S, PIVETEAU P. Plants as a realized niche for *Listeria monocytogenes*[J]. *MicrobiologyOpen*, 2021, 10(6): e1255.
- [3] LI WW, BAI L, FU P, HAN HH, LIU JK, GUO YC. The epidemiology of *Listeria monocytogenes* in China[J]. *Foodborne Pathogens and Disease*, 2018, 15(8): 459-466.
- [4] ZHAO Q, HU P, LI QQ, ZHANG SS, LI HX, CHANG J, JIANG QJ, ZHENG Y, LI YS, LIU ZS, REN HL, LU SY. Prevalence and transmission characteristics of *Listeria* species from ruminants in farm and slaughtering environments in China[J]. *Emerging Microbes & Infections*, 2021, 10(1): 356-364.
- [5] TIENSUU T, GUERREIRO DN, OLIVEIRA AH, O'BYRNE C, JOHANSSON J. Flick of a switch: regulatory mechanisms allowing *Listeria monocytogenes* to transition from a saprophyte to a killer[J]. *Microbiology: Reading, England*, 2019, 165(8): 819-833.
- [6] DEMAITRE N, van DAMME I, De ZUTTER L, GEERAERD AH, RASSEHAERT G, De REU K. Occurrence, distribution and diversity of *Listeria monocytogenes* contamination on beef and pig carcasses after slaughter[J]. *Meat Science*, 2020, 169: 108177.

- [7] DESAI AN, ANYOHA A, MADOFF LC, LASSMANN B. Changing epidemiology of *Listeria monocytogenes* outbreaks, sporadic cases, and recalls globally: a review of ProMED reports from 1996 to 2018[J]. *International Journal of Infectious Diseases*, 2019, 84: 48-53.
- [8] RAMASWAMY V, CRESENCE VM, REJITHA JS, LEKSHMI MU, DHARSANA KS, PRASAD SP, VIJILA HM. *Listeria*-review of epidemiology and pathogenesis[J]. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*, 2007, 40(1): 4-13.
- [9] WALES AD, DAVIES RH. Co-selection of resistance to antibiotics, biocides and heavy metals, and its relevance to foodborne pathogens[J]. *Antibiotics: Basel, Switzerland*, 2015, 4(4): 567-604.
- [10] O'DRISCOLL B, GAHAN CG, HILL C. Adaptive acid tolerance response in *Listeria monocytogenes*: Isolation of an acid-tolerant mutant which demonstrates increased virulence[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1996, 62(5): 1693-1698.
- [11] CALY D, TAKILT D, LEBRET V, TRESSE O. Sodium chloride affects *Listeria monocytogenes* adhesion to polystyrene and stainless steel by regulating flagella expression[J]. *Letters in Applied Microbiology*, 2009, 49(6): 751-756.
- [12] DESVAUX M, HEBRAUD M. The protein secretion systems in *Listeria*: inside out bacterial virulence[J]. *FEMS Microbiology Reviews*, 2006, 30(5): 774-805.
- [13] JUNG YC, LEE MA, KIM HS, LEE KH. Role of DegQ in differential stability of flagellin subunits in *Vibrio vulnificus*[J]. *Npj Biofilms and Microbiomes*, 2021, 7: 32.
- [14] BELAS R. Biofilms, flagella, and mechanosensing of surfaces by bacteria[J]. *Trends in Microbiology*, 2014, 22(9): 517-527.
- [15] EZRATY B, GENNARIS A, BARRAS F, COLLET JF. Oxidative stress, protein damage and repair in bacteria[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2017, 15(7): 385-396.
- [16] ZELLER T, KLUG G. Thioredoxins in bacteria: functions in oxidative stress response and regulation of thioredoxin genes[J]. *Naturwissenschaften*, 2006, 93(6): 259-266.
- [17] 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[J]. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2017, 7: 287.
- [18] XIAO ZG, La FONTAINE S, BUSH AI, WEDD AG. Molecular mechanisms of glutaredoxin enzymes: versatile hubs for thiol-disulfide exchange between protein thiols and glutathione[J]. *Journal of Molecular Biology*, 2019, 431(2): 158-177.
- [19] HERAS B, SHOULDICE SR, TOTSIKA M, SCANLON MJ, SCHEMBRI MA, MARTIN JL. DSB proteins and bacterial pathogenicity[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2009, 7(3): 215-225.
- [20] 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.
- [21] FEEHILY C, FINNERTY A, CASEY PG, HILL C, GAHAN CGM, O'BYRNE CP, KARATZAS KA G. Divergent evolution of the activity and regulation of the glutamate decarboxylase systems in *Listeria monocytogenes* EGD-e and 10403S: roles in virulence and acid tolerance[J]. *PLoS One*, 2014, 9(11): e112649.
- [22] CHENG CY, DONG ZM, HAN X, SUN J, WANG H, JIANG L, YANG YC, MA TT, CHEN ZW, YU J, FANG WH, SONG HH. *Listeria monocytogenes* 10403S arginine repressor ArgR finely tunes arginine metabolism regulation under acidic conditions[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2017, 8: 145.
- [23] RYAN S, BEGLEY M, GAHAN CGM, HILL C. Molecular characterization of the arginine deiminase system in *Listeria monocytogenes*: regulation and role in acid tolerance[J]. *Environmental Microbiology*, 2009, 11(2): 432-445.
- [24] ARCHAMBAUD C, NAHORI MA, SOUBIGOU G, BECAVIN C, LAVAL L, LECHAT P, SMOKVINA T, LANGELLA P, LECUIT M, COSSART P. Impact of lactobacilli on orally acquired listeriosis[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2012, 109(41): 16684-16689.
- [25] NICAOGAIN K, O'BYRNE CP. The role of stress and stress adaptations in determining the fate of the bacterial pathogen *Listeria monocytogenes* in the food chain[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2016, 7: 1865.
- [26] BURGESS CM, GIANOTTI A, GRUZDEV N, HOLAH J, KNØCHEL S, LEHNER A, MARGAS E, ESSER SS, SELA (SALDINGER) S, TRESSE O. The response of foodborne pathogens to osmotic and

- desiccation stresses in the food chain[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2016, 221: 37-53.
- [27] GUERREIRO DN, ARCARI T, O'BYRNE CP. The σ^B -mediated general stress response of *Listeria monocytogenes*: life and death decision making in a pathogen[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2020, 11: 1505.
- [28] MEDRANO ROMERO V, MORIKAWA K. *Listeria monocytogenes* σ^H contributes to expression of competence genes and intracellular growth[J]. *Journal of Bacteriology*, 2016, 198(8): 1207-1217.
- [29] SOUTOURINA OA, BERTIN PN. Regulation cascade of flagellar expression in Gram-negative bacteria[J]. *FEMS Microbiology Reviews*, 2003, 27(4): 505-523.
- [30] 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, FlhM, and FlhY are required for flagellar-associated protein expression in *Listeria monocytogenes*[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2018, 9: 208.
- [31] 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.
- [32] AGUDO D, MENDOZA MT, CASTANARES C, NOMBELA C, ROTGER R. A proteomic approach to study *Salmonella typhi* periplasmic proteins altered by a lack of the DsbA thiol: disulfide isomerase[J]. *Proteomics*, 2004, 4(2): 355-363.
- [33] HAYASHI S, ABE M, KIMOTO M, FURUKAWA S, NAKAZAWA T. The *dsbA-dsbB* disulfide bond formation system of *Burkholderia cepacia* is involved in the production of protease and alkaline phosphatase, motility, metal resistance, and multi-drug resistance[J]. *Microbiology and Immunology*, 2000, 44(1): 41-50.