

单核细胞增生性李斯特菌 *prfA* 缺失株及其亲本株胞外蛋白的比较蛋白质组学

殷月兰, 白春光, 王国梁, 贾艳艳, 渠瑾, 付红, 高云飞, 焦新安*

扬州大学, 江苏省人兽共患病学重点实验室, 扬州 225009

摘要: 【目的】PrfA 蛋白对单核细胞增生性李斯特菌致病过程中毒力基因的表达起着重要调控作用, 本文从蛋白质水平上初步探讨了 PrfA 的调控功能。【方法】对 LM4 及 LM4 $\Delta prfA$ 的胞外蛋白采用双向凝胶电泳结合基质辅助激光解析电离飞行时间质谱鉴定技术, 进行比较蛋白质组学研究。【结果】发现差异表达的有 31 个蛋白点, 质谱鉴定成功 19 个点, 对应 12 种蛋白, 其中已知的毒力相关蛋白有: InlC、ActA、LLO, 此外还发现丙氨酸丙氨酰胺酶、GW 重复表面蛋白、假定转录调节因子、天冬氨酸半醛脱氢酶和一些假定蛋白。采用实时荧光定量 PCR 方法对蛋白质组学方法获得的结果进行了验证, 结果显示 *hly*、*actA*、*inlC* 的基因表达量显著下降, 丙氨酰氨酶、GW 重复表面蛋白的 mRNA 转录水平降低。【结论】PrfA 蛋白对毒力岛 LIPI-I 和毒力岛 LIPI-II 中毒力基因的表达具有重要的调控作用, 新发现的转录调控因子和假定蛋白的功能有待于进一步深入研究。

关键词: 单核细胞增生性李斯特菌, PrfA, 分泌蛋白

中图分类号: Q816 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2013)04-0390-07

单核细胞增生性李斯特菌 (*Listeria monocytogenes*, *Lm*) 是重要的人畜共患李斯特菌病的病原, 在食品卫生领域受到广泛关注, 该菌的致病性与调控因子 PrfA 蛋白作用下毒力基因的表达有着密切的关系。PrfA 是李斯特菌最重要的毒力调控因子之一, 对李斯特菌黏附及侵袭宿主细胞、逃逸机体免疫应答中起到调控作用, 其在 *Lm* 致病中的作用尚未完全阐明。随着对李斯特菌的研究进入后基因组学时代, 仅通过基因组学信息无法了解该菌在特定时间和空间上所表达的全部蛋白质及其存在方式, 而蛋白质组学技术能在整体水平上研究蛋白

质的组成与调控活动规律, 因而从蛋白质水平上研究李斯特菌的生命活动显得尤为重要。

在李斯特菌侵袭宿主过程中, 分泌蛋白起着十分重要的作用。许多毒力因子是以分泌蛋白的形式存在的, 如李斯特菌溶血素蛋白 LLO、磷脂酶 PI-PLC 及 PC-PLC 等。分析细菌的分泌蛋白对于发现未知的毒力因子或疫苗候选抗原有重要的作用。基于 PrfA 的广泛调控作用, 本研究通过基础培养基培养法提取细菌的胞外蛋白并进行蛋白质组学研究, 以期发现 *prfA* 缺失株与其亲本株之间的差异, 发现新的受 PrfA 调控的蛋白, 为揭示其新的调控机制奠

基金项目: 国家自然科学基金 (31101841); 江苏省科技支撑计划 (BE2012367); 江苏省自然科学基金 (BK2011446)

* 通信作者。Tel: +86-514-87971136; Fax: +86-514-87311374; E-mail: xajiao@yahoo.com

作者简介: 殷月兰 (1971 -), 女, 山东青岛人, 博士, 副教授, 从事重要人兽共患病原菌的分子致病机理和免疫机理及疫苗预防相关研究。

E-mail: yulan@yzu.edu.cn

收稿日期: 2012-10-07; 修回日期: 2012-12-19

定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株: 单核细胞增生性李斯特菌 yzuLM4 由本室保存提供, LM4 Δ *prfA* 由本研究室构建。

1.1.2 主要试剂: IPG 预制胶条、载体两性电解质 (Bio-Lyte Ampholyte)、矿物油均购自 Bio-Rad 公司; CHAPS、硫脲、尿素、TEMED 均购自 Amresco 公司; 碘乙酰胺、丙烯酰胺、甲叉双丙烯酰胺、考马斯亮蓝 G-250、PMSF、基础培养基组分均购自 Sigma 公司。细菌总 RNA 提取试剂盒购自天根公司, PrimeScriptTM RT reagent Kit 试剂盒、SYBR Premix Ex TaqTM II 试剂盒购自 TaKaRa 公司。

1.1.3 主要仪器: 等点聚焦仪、高通量垂直电泳系统、二维电泳分析软件 PDQuest8.0 均购自 Bio-Rad 公司、凝胶扫描成像系统 UMAX PowerLook 2100XL-USB 为国产, 7500 荧光定量实时定量 PCR 仪购自 Applied Biosystems 公司。

1.2 基础培养基 (minimal medium) 的配制方法
操作参见文献 [5]。

1.3 分泌蛋白的提取

参照文献 [6] 方法改进如下: 置于 37℃ 温箱中经过 6h 适应后, 加入 450 mL 基础培养基, 37℃ 振荡培养 24 h。离心菌液 (6000 × g, 10 min, 4℃), 取上清加入 TCA 至终浓度 10%, 4℃ 放置过夜。15000 × g 离心 30 min, 弃上清, 沉淀用冰丙酮洗两遍。待丙酮挥发后, 将蛋白保存于 -70℃ 待用。

1.4 二维电泳

根据文献 [7], 采用 pH4-7 17 cm 的 IPG 胶条水化聚焦, 蛋白上样 300 μg, 上样体积 300 μL。水化和等电聚焦设置的程序为: 17 cm 胶条水化 13 h (17℃), 250 V、30 min, 1000 V、2 h, 10000 V、5 h, 10000 V、60,000 V·h, 总计 80 000 V·h。等电聚焦后的 IPG 胶条在平衡液中平衡 30 min, 转移至 12% 聚丙烯酰胺凝胶电泳凝胶的上端, 用垂直电泳系统进行第 2 向电泳。采用文献 [8] 的方法进行考马斯亮蓝染色。

1.5 凝胶的图像分析

凝胶经扫描成像系统 UMAX PowerLook 2100XL 扫描成像, 选择光学分辨率 300dpi。电泳图谱根据 PDQuest8.0 软件指导说明进行图像分析, 主要包括: 图像编辑裁剪、归一化处理、蛋白质点检测、蛋白点匹配以及表达差异蛋白点的检测等。

1.6 质谱分析和数据库检索

比较双向电泳图谱, 选取具有 5 倍以上量变的蛋白质点, 作为进一步基质辅助激光解吸附飞行时间质谱 (MALDI-TOF/TOF-MS) 分析。将获得的肽质量指纹图谱 (PMF) 提交至 MASCOT 数据库进行检索, 检索分数 ≥ 83 分认为是统计学显著 ($p \leq 0.05$), 判定该点质谱鉴定成功。

1.7 蛋白质谱结果的 Real-Time-PCR 验证

对质谱鉴定的结果, 设计引物结合 Real-Time-PCR 技术进行验证, 引物设计见表 1。以 yzuLM4 的 cDNA 模板设置为参照样品种, 参照文献 [8] 将 *gyrB* 设为内参基因, 进行 Real-Time RT-PCR。每个样本设 3 个重复管, 同时设无模板阴性对照。

表 1. 荧光定量 PCR 引物设计

Table 1. Primer pairs for real-time RT-PCR

Primer	Sequence of up-stream primer (5'→3')	Sequence of down stream primer (5'→3')	Fragment length/bp
<i>gyrB</i>	AGACGCTATTGATGCCGATGA	GTATTGCCGCTTGTCTTCGA	91
<i>prfA</i>	ATAACGTATGCCGTAGCC	CGAGTATTAGCGAGAACG	145
<i>actA</i>	ATTTAGTTCGCTGAATAGTGG	CCCGCATTCTTGAGTGT	122
<i>hly</i>	TCTGGAGGATACGTTGCT	GATGGACGATGTGAAATGAG	135
<i>inlC</i>	ACTGGCAATCCACAGGAC	AATACTGTCAAAGACCCAGA	98
8702	TTTTCAACGTCGCTGGCAGT	AGGGCACGGAAGTTGCTA	95
8801	ATTGCTGCTAAGGATTGA	GATGGTGTTATCGCACT	125
5704	GAAATAAGCCAAGTCGTGAT	CCTTCTTCGCCGCTTGTC	120
8302	CATCAATCGCTTGTCTT	ACAATATGCTCGCTCCGTA	98

1.8 差异蛋白信号肽及分泌蛋白可能性预测

利用 SignalP 4.0 软件 ([http://www.cbs.dtu.](http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/)

[dk/services/SignalP/](http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/)) 对质谱鉴定蛋白的信号肽进行了预测分析 [13]。利用 SecretomeP 2.0 软件

(<http://www.cbs.dtu.dk/services/SecretomeP/>) 对质谱鉴定蛋白是否为分泌蛋白进行了初步的预测^[22]。

2 结果

2.1 二维电泳图片分析

根据 PDQuest8.0 软件指导说明进行图像分析, 差异点标注如图 1 所示, 结果如下: yzuLM4 有而

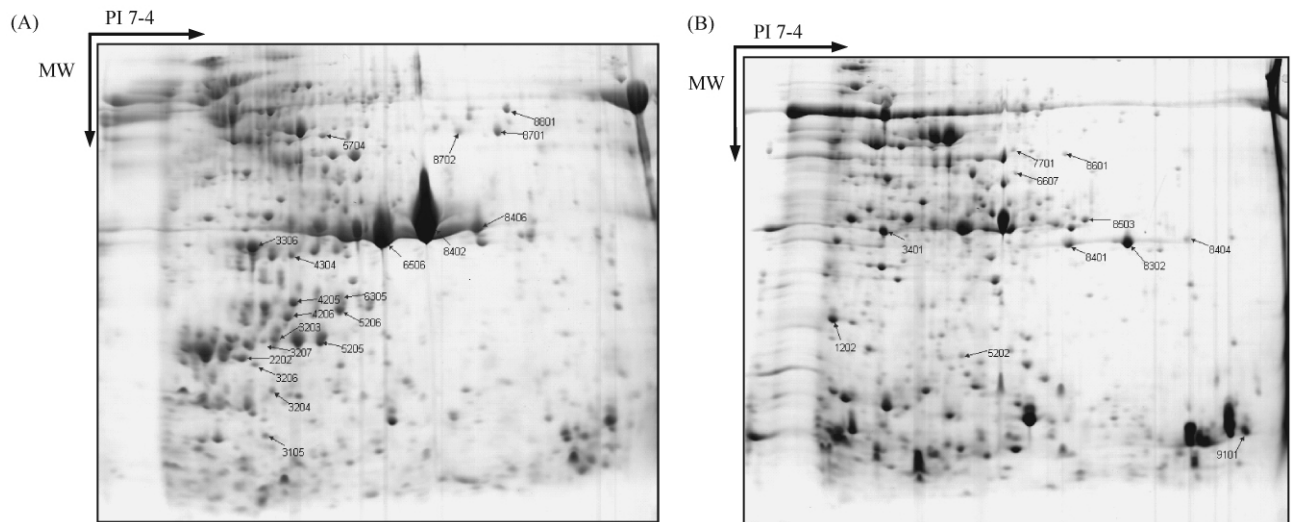


图 1. yzuLM4 和 LM4 $\Delta prfA$ 的胞外蛋白图谱

Figure 1. The 2-DE map of the extracellular proteins from yzuLM4 (A) and LM4 $\Delta prfA$ (B).

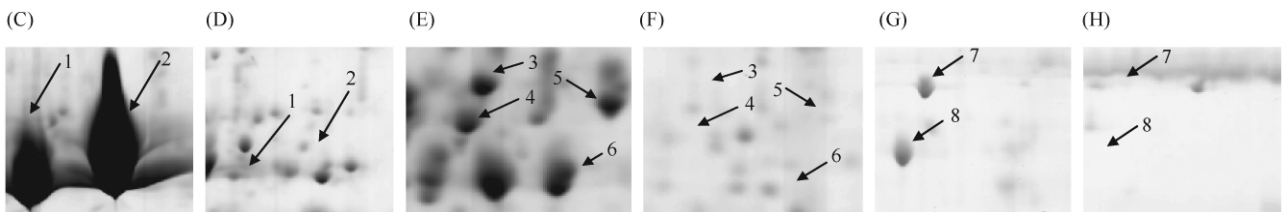


图 2. 差异蛋白的局部放大图

Figure 2. The magnified maps in the local region spots on the gels showing differentially expressed C, E, G from yzuLM4; D, F, H from LM4 $\Delta prfA$.

2.2 质谱结果查询

将指纹图谱提交至 MASCOT 数据库中进行查询, 得分 ≥ 83 分认为质谱鉴定成功。送去质谱分析的点共有 30 个, 质谱成功 19 个点, 对应 12 种蛋白。鉴定结果中, ActA、LLO、InlC 为已知的位于 LIPI-I、LIPI-II 上的毒力因子。对蛋白进行简单分类: 毒力相关的蛋白 3 个、氨基酸代谢相关蛋白 1 个、能量代谢相关蛋白 2 个、假定转录调控蛋白 1 个、功能未知的蛋白 5 个。蛋白功能具体查询结果见表 2。

LM4 $\Delta prfA$ 没有的点有 19 个 (2202、3105、3203、3204、3206、3306、3207、4205、4206、4304、5205、5206、5704、6506、8402、8406、8701、8702、8801); LM4 $\Delta prfA$ 有而 yzuLM4 中没有的点有 6 个 (1202、5202、8302、8401、8404、8503); LM4 $\Delta prfA$ 比 yzuLM4 表达量多 5 倍以上的点有 5 个 (3401、6607、7701、8601、9101)。图 2 显示的是部分差异蛋白的放大图。

通过对蛋白功能具体查询, 我们新发现了 7 个受 PrfA 调控的蛋白, 包括丙氨酸丙氨酰羧胺酶 (8702)、GW 重复表面蛋白 (8801)、假定转录调节因子 (8302、8401) 和 4 个功能未知的假定蛋白。(图 3) 为部分新发现的差异蛋白点。

此外, 根据质谱结果进行蛋白功能查询结果显示, 多个蛋白点被鉴定为同一种蛋白, 如图 4 所示的 InlC、ActA、丙氨酰羧胺酶、转录调控因子。

表 2. 胞外蛋白的质谱鉴定结果功能查询

Table 2. Extracellular protein spots identified by MS and function

Spot ID ⁽¹⁾	Protein identify	Nominal mass (Mr) / (Da)	Calculated pI value	Best score ⁽²⁾
1202	antigen A	18097	4. 51	94
4206	ActA, actin assembly inducing protein precursor	62508	5. 22	90
5704	N-Acetylmuramoyl-L-alanine amidase	46043	5. 53	194
6506	crystal structure of internalin C	29519	5. 47	126
6607	hypothetical protein	35562	5. 22	185
7701	Alanine dehydrogenase	39586	5. 24	251
8401	transcriptional regulator	34092	9. 05	199
8503	hypothetical protein	32455	5. 84	164
8601	aspartate-semialdehyde dehydrogenase	37718	5. 44	150
8701	listeriolysin O precursor	58698	6. 64	127
8702	D-alanyl-D-alanine carboxypeptidase	46761	5. 99	148
8801	GWrepeat-containing surface protein	57004	6. 11	119

⁽¹⁾ Numbers of protein spots; ⁽²⁾ Scores of Mascot Search Results.

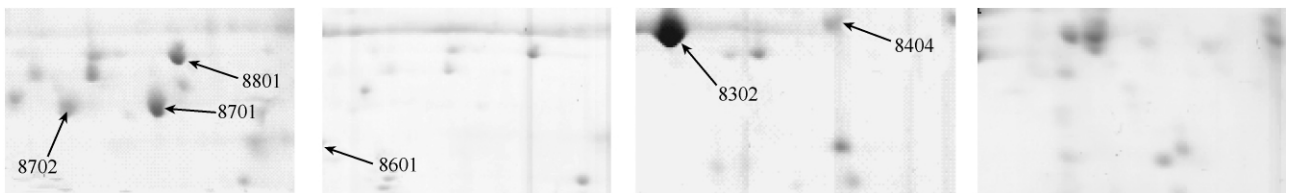


图 3. 新发现的受 PrfA 调控的蛋白

Figure 3. Un-reported proteins spots regulated by PrfA.

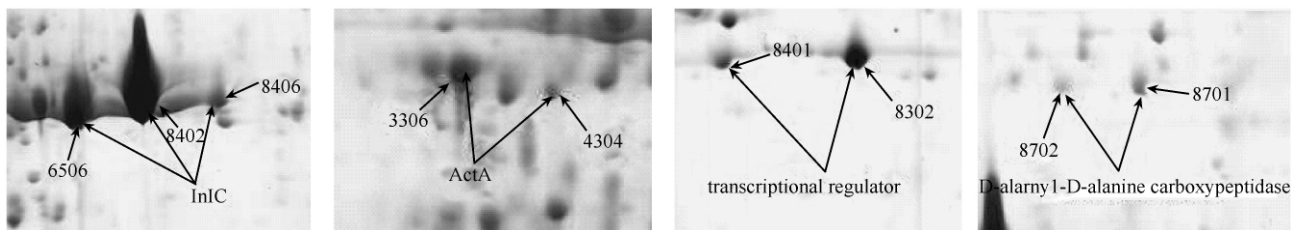


图 4. 多个蛋白点质谱鉴定为同一种蛋白

Figure 4. A number of protein spots identified as the same protein with MS.

2.3 *Lm* 相关基因在 *prfA* 基因缺失株中的转录水平分析

应用实时荧光定量 PCR 的方法对亲本株和缺失株与 *prfA* 相关基因的表达水平进行了测定。以亲本株中靶基因的转录水平设定为 100%，缺失株中每个靶基因的转录水平是相对于亲本菌株的百分数进行作图(图 5)，由图中可以看出，*hly*、*actA*、*inlC*、*plcA*、*plcB* 的基因表达量显著下降，丙氨酰氨羧肽酶、GW 重复表面蛋白的合成也有降低，但假定蛋白、假定转录调节因子的表达量与亲本株之间的差异不明显。此外 *LM4ΔprfA* 的 *prfA* 没有表达，证明了 *prfA* 基因被完全缺失掉。荧光定量 PCR 实验从分子水平上证明了 PrfA 对 LIPI-I、LIPI-II 上毒力基因的调控作用。

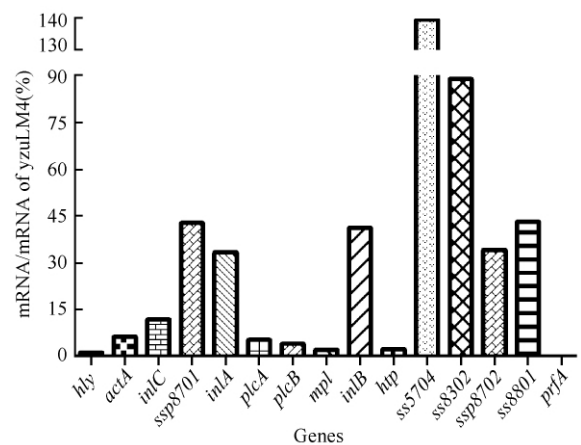


图 5. *Lm* 相关基因在 *prfA* 基因缺失株中的转录水平分析

Figure 5. Real-time fluorescence PCR of difference protein genes.

2.4 分泌蛋白预测结果

信号肽序列预测结果显示,除差异蛋白 8601、4206 和 6607 蛋白点之外,其他蛋白均有信号肽序列(表 3);通过软件 SecretomeP 2.0 的预测结果显示蛋白点 8503、8801、8701、8702、5704 和 6506 是分

泌蛋白。已知细菌可通过多种方式将蛋白分泌到环境中去,其中不乏一些无信号肽的分泌蛋白,至于实验中所得到的质谱鉴定蛋白哪些是真正的分泌蛋白还有待于进一步的实验验证。

表 3. 质谱鉴定蛋白中的分泌蛋白预测

Table 3. Secretome prediction of protein identify

Spot	8503	8401	8601	8801	8701	8702	8302	5704	1202	4206	6506	6607	7701
Signal prediction	1-33	1-15	-	1-26	1-24	1-20	1-15	1-28	1-41	-	1-34	-	1-18
Secretome	+	-	-	+	+	+	-	+	-	-	+	-	-

"-" means no signal peptide or not secretome "+" means secretome.

3 讨论

蛋白质组学作为一种技术可以从环境(如温度、pH、盐离子)、种属特异性、细胞不同组分蛋白等方面进行研究^[9-12]。对于病原菌来说,许多胞外蛋白是毒素、粘附素或决定毒力的酶。对于革兰氏阳性胞内寄生菌来说,蛋白可以通过 Sec 分泌途径、双精氨酸转运途径、假纤毛蛋白运输途径、ATP 结合(ABC)途径、ESAT-6 途径等分泌到胞外,从而发挥作用^[6]。本研究中通过 Signal P 4.0 软件对质谱鉴定的胞外蛋白的信号肽序列进行了预测,结果表明,所获得的 3/4 的胞外蛋白具有信号肽序列^[13];用分泌蛋白预测软件 SecretomeP 2.0 的预测结果表明有 6 个蛋白为含有信号肽序列的分泌蛋白。由此表明,分泌蛋白是 *Lm* 胞外蛋白的重要组成部分。除对应 ActA 蛋白的 4206 蛋白点外,其他 2 个无信号肽序列的差异蛋白是否为其他分泌途径释放到培养基的蛋白还是与细胞表面结合的脱落蛋白,还有待于进一步考证。

我们对电泳图像利用软件分析并质谱鉴定,发现已知受 PrfA 调控的毒力因子有 LLO(8701)、ActA(4206)、InlC(6506),这些毒力因子参与李斯特菌在体内感染过程中与宿主细胞表面的结合、侵入后裂解吞噬体、逃离吞噬体并在胞浆中生存繁殖以及在胞内的极向运动^[14-17]。此外,我们还发现了新的受 PrfA 调控的蛋白,包括丙氨酰氨羧肽酶(5704)、GW 重复表面蛋白(8801)、假定转录调控子(8401)、假定蛋白(8503)。其中的 GW 重复表面蛋白可能与细菌的致病性有关,在 C 末端含有 3 个 GW 的重复多肽,据报道,这种 GW 重复序列可以介导蛋白以非

共价键的方式与细菌表面的磷壁酸之间相对松弛的结合,分泌到胞外后可能在侵袭和感染宿主细胞中发挥作用^[18]。以上新发现的蛋白与 PrfA 调控的关系及其功能目前还不清楚,需今后通过基因敲除的方式等开展深入的研究。

本研究中发现,在对编码 *Lm* 的重要调控因子 *prfA* 进行敲除后,所表达的胞外蛋白的种类和数量发生较大的变化,这和 Toledo-Arana 等用基因芯片的方法获得的信息一致,他们从转录水平的研究结果显示,在缺失 *prfA* 基因后,近 150 个基因的体外转录水平发生不同程度的上调或下调表达^[19-21]。由于目前我们只对蛋白表达有无的差异点及表达差异在 5 倍以上的蛋白点进行了质谱鉴定,其中部分蛋白点尚未得到质谱鉴定结果。但总的来看,PrfA 对于 *Lm* 的胞外蛋白表达有着重要的调控作用,它的缺失不仅将影响到主要毒力基因表达的抑制,还会影响到物质的代谢以及其他调控因子的作用等,从而影响到细菌的生长、代谢及致病性。

参考文献

- [1] Ahn SM, Simpson R, Lee B. Genomics and proteomics in stem cell research: the road ahead. *Anatomy and Cell Biology*, 2010, 43(1): 1-14.
- [2] Wilkins MR, Sanchez J C, Gooley AA, Appel RD, Humphery-Smith I, Hochstrasser DF, Williams KL. Progress with proteome projects: why all proteins expressed by a genome should be identified and how to do it. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*, 1996, 13: 19-50.
- [3] Pandey A, Mann M. Proteomics to study genes and genomes. *Nature*, 2000, 405(6788): 837-846.
- [4] Zeng R, Xia Q. The progress and development of

- proteomic research. *Bulletin of the Chinese Academy of Sciences*, 2002, 17 (3) : 166-169. (in Chinese)
- 曾嵘, 夏其昌. 蛋白质组学研究进展与趋势. 中国科学院院刊, 2002, 17 (3) : 166-169.
- [5] Premaratne RJ, Lin W J, Johnson EA. Development of an improved chemically defined minimal medium for *Listeria monocytogenes*. *Applied and Environmental Microbiology*, 1991, 57 (10) : 3046-3048.
- [6] Trost M, Wehmhoner D, Kärst U, Dieterich G, Wehland J, Jänsch L. Comparative proteome analysis of secretory proteins from pathogenic and nonpathogenic *Listeria* species. *Proteomics*, 2005, 5 (6) : 1544-1557.
- [7] 张晨菊. 三株致病性李斯特菌的蛋白质组学研究. 扬州大学, 硕士学位论文, 2010.
- [8] 陈健舜. 单核细胞增生性李斯特菌分子进化与酸应激功能基因组学研究. 浙江大学, 博士学位论文, 2010.
- [9] Bierne H, Cossart P. *Listeria monocytogenes* surface proteins: from genome predictions to function. *Microbiol and Molecular Biology Review*, 2007, 71 (2) : 377-397.
- [10] Schaumburg J, Diekmann O, Hagendorff P, Bergmann S, Rohde M, Hammerschmidt S, Jänsch L, Wehland J, Kärst U. The cell wall subproteome of *Listeria monocytogenes*. *Proteomics*, 2004, 4 (10) : 2991-3006.
- [11] Mujahid S, Pechan T, Wang C. Improved solubilization of surface proteins from *Listeria monocytogenes* for 2-DE. *Electrophoresis*, 2007, 28 (21) : 3998-4007.
- [12] Tannu NS, Hemby SE. Two-dimensional fluorescence difference gel electrophoresis for comparative proteomics profiling. *Nature Protocols*, 2006, 1 (4) : 1732-1742.
- [13] Petersen TN, Brunak S, von Heijne G, Nielsen H. SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. *Nature Methods*, 2011, 8 : 785-786.
- [14] Stavru F, Archambaud C, Cossart P. Cell biology and immunology of *Listeria monocytogenes* infections: novel insights. *Immunology Review*, 2011, 240 (1) : 160-184.
- [15] Gouin E, Adib-Conquy M, Balestrino D, Nahori MA, Villiers V, Colland F, Dramsi S, Dussurget O, Cossart P. The *Listeria monocytogenes* InlC protein interferes with innate immune responses by targeting the I {kappa} B kinase subunit IKK {alpha}. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2010, 107 (40) : 17333-17338.
- [16] Vázquez-Boland JA, Kuhn M, Berche P, Chakraborty T, Domínguez-Bernal G, Goebel W, González-Zorn B, Wehland J, Kreft J. *Listeria* pathogenesis and molecular virulence determinants. *Clinical Microbiology Review*, 2001, 14 (3) : 584-640.
- [17] de las Heras A, Cain RJ, Bielecka MK, Vázquez-Boland JA. Regulation of *Listeria* virulence: PrfA master and commander. *Current Opinion in Microbiology*, 2011, 14 (2) : 118-127.
- [18] Bierne H, Cossart P. InlB, a surface protein of *Listeria monocytogenes* that behaves as an invasin and a growth factor. *Journal of Cell Science*, 2002, (115) : 3357-3367.
- [19] Toledo-Arana A, Dussurget O, Nikitas G, Sesto N, Guet-Revillet H, Balestrino D, Loh E, Gripenland J, Tiensuu T, Vaitkevicius K, Barthelémy M, Vergassola M, Nahori MA, Soubigou G, Régnauld B, Coppée JY, Lecuit M, Johansson J, Cossart P. The *Listeria* transcriptional landscape from saprophytism to virulence. *Nature*, 2009, 459 (7249) : 950-956.
- [20] Milohanic E, Glaser P, Coppée JY, Frangeul L, Vega Y, Vázquez-Boland JA, Kunst F, Cossart P, Buchrieser C. Transcriptome analysis of *Listeria monocytogenes* EGDe identifies three groups of genes differently regulated by PrfA. *Molecular Microbiology*, 2003, 47 (6) : 1613-1625.
- [21] Marr AK, Joseph B, Mertins S, Ecker R, Müller-Altröck S, Goebel W. Overexpression of PrfA leads to growth inhibition of *Listeria monocytogenes* in glucose-containing culture media by interfering with glucose uptake. *Journal of Bacteriology*, 2006, 188 (11) : 3887-3901.
- [22] Bendtsen JD, Jensen LJ, Blom N, Von Heijne G, Brunak S. Feature based prediction of non-classical and leaderless protein secretion. *Protein Engineering Design and Selection*, 2004, 17 (4) : 349-356.

Comparative proteomics analysis of extracellular proteins from *Listeria monocytogenes* and its isogenic *prfA* deletion mutant

Yuelan Yin, Chunguang Bai, Guoliang Wang, Yanyan Jia, Jin Qu, Hong Fu, Yunfei Gao, Xin'an Jiao*

Jiangsu Key Laboratory of Zoonosis, Yangzhou University, Yangzhou 225009, China

Abstract: [Objective] Positive regulatory factor A (PrfA) protein plays a key role in the pathogenicity of *Listeria monocytogenes* by regulating the expression of virulence genes. We studied the regulation functions of PrfA and its role in *Listeria monocytogenes* (*Lm*) virulence. [Method] Extracellular proteins were obtained from the supernatants of parental strain LM4 and mutant strain LM4 Δ *prfA* cultured in minimal medium. We used two-dimensional gel electrophoresis and matrix associated laser dissociation/ionization time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF-MS) to analyze the differences of secreted proteins between LM4 and LM4 Δ *prfA*. [Results] The electrophoresis results show that 31 different spots, 19 spots corresponding 12 proteins were identified by MALDI-TOF-MS. Some virulence related proteins were verified, such as InlC, ActA and LLO. Some new proteins that are regulated by PrfA include D-alanyl-D-alanine carboxypeptidase, dipeptide Glycine and Tryptophan (GW) repeat-containing surface protein, transcriptional regulator and some hypothetical proteins with unknown functions. Real-time quantitative PCR was conducted to verify the proteomics results. The mRNA expression level of *hly*, *actA* and *inlC* gene was significantly reduced, and that of D-alanyl-D-alanine carboxypeptidase and GW repeat-containing surface protein's synthesis also had a reduction in LM4 Δ *prfA* strain. [Conclusion] PrfA plays key roles on the regulation of genes in LIPI-I and LIPI-II.

Keywords: *Listeria monocytogenes*, PrfA, secretory proteins

(本文责编:王晋芳)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (31101841) and by the Provincial Government of Jiangsu, China (BE2012367, BK2011446)

* Corresponding author. Tel: +86-514-87971136; Fax: +86-514-87311374; E-mail: jiao@yzu.edu.cn

Received: 7 October 2012/Revised: 19 December 2012

微生物学一直是生命科学中领先的学科

微生物学学科的研究对象决定了它有如下两方面的显著特点:

微生物作为最简单的生命体而成为生命科学研究不可替代的基本材料,由此也奠定了微生物学在生命科学中的基础地位;

微生物极其丰富的生物多样性决定了它们具有代谢产物多样性,同时又与人类、动植物和环境有着密切的相互作用,使得微生物学也成为应用领域里十分活跃的一门学科。

摘自《国家自然科学基金 1999 年度项目指南》