



单核细胞增多性李斯特菌 *OpuCA* 蛋白介导抗氧化应激和宿主感染研究

应煜^{1#}, 沈世宇^{2#}, 戚俊彦^{1#}, 陈绵绵¹, 徐加利¹, 袁艺萱¹, 江玲丽³, 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实验室, 动物医学与健康管理浙江省国际科技合作基地, 中澳动物健康大数据分析联合实验室, 浙江 杭州 311300
- 2 浙江农林大学集贤学院, 浙江 杭州 311300
- 3 宁波卫生职业技术学院, 浙江 宁波 315100

应煜, 沈世宇, 戚俊彦, 陈绵绵, 徐加利, 袁艺萱, 江玲丽, 宋厚辉, 程昌勇. 单核细胞增多性李斯特菌 *OpuCA* 蛋白介导抗氧化应激和宿主感染研究. 微生物学报, 2022, 62(7): 2543–2554.

Ying Yu, Shen Shiyu, Qi Junyan, Chen Mianmian, Xu Jiali, Yuan Yixuan, Jiang Lingli, Song Houhui, Cheng Changyong. *OpuCA* mediates oxidative stress tolerance and host infection of *Listeria monocytogenes*. *Acta Microbiologica Sinica*, 2022, 62(7): 2543–2554.

摘要:【目的】本文旨在研究 *opuCA* 基因在单核细胞增多性李斯特菌(单增李斯特菌)生长过程及渗透胁迫下发挥的作用, 探究 *opuCA* 基因参与细菌抗氧化应激和致病力的生物学功能, 为阐明 *OpuCA* 蛋白介导细菌环境适应和宿主内感染的机制奠定基础。【方法】利用细菌同源重组方法获得 *opuCA* 缺失株及回补株后, 通过分子生物学、感染生物学和激光共聚焦技术, 研究野生株和突变株的生长能力、抗渗透应激能力、抗氧化应激能力、细胞粘附、侵袭以及胞内增殖能力。【结果】缺失 *opuCA* 基因后, 李斯特菌体外生长能力并没有受到影响, 但在渗透条件下生长能力减弱; *opuCA* 缺失株在铜离子和镉离子中抗氧化应激能力降低, 但在巯基特异性氧化剂胍应激中无明显变化; *opuCA* 缺失株在细胞中的侵袭能力显著减弱, 且缺失该基因导致细菌聚合 *actin* 能力下降,

基金项目:浙江省自然科学基金(LY19C180001, LZ19C180001, LQ20C180001); 国家自然科学基金(31972648, 31872620, 32172849, 32002253); 浙江农林大学基本科研业务费(2020KJ004); 浙江省大学生科技创新活动计划暨新苗人才计划(2021R412021); 浙江农林大学创新训练项目(2020KX0157, 2021KX0121)

Supported by the Natural Science Foundation of Zhejiang Province (LY19C180001, LZ19C180001, LQ20C180001), by the National Natural Science Foundation of China (31972648, 31872620, 32172849, 32002253), by the Fundamental Research Funds for the Provincial Universities of Zhejiang (2020KJ004), by the Zhejiang University Student Science Technology Innovation Activity Plan (2021R412021) and by the Scientific Research Training Program for Undergraduate of Zhejiang A&F University (2020KX0157, 2021KX0121)

[#]These authors contributed equally to this work.

*Corresponding author. E-mail: lamge@zafu.edu.cn

Received: 11 October 2021; Revised: 24 December 2021; Published online: 10 March 2022

进而影响了细菌在胞间迁移。【结论】本研究首次证实了缺失 *opuCA* 基因能降低单增李斯特菌抗氧化应激能力和感染宿主能力，并且在渗透胁迫下细菌生长能力减弱，但具体的分子机制有待深入研究。本研究有助于深入理解单增李斯特菌 OpuCA 蛋白介导的细菌体外环境适应及宿主内感染的分子机制，为防控单增李斯特菌感染提供了新策略。

关键词：单核细胞增多性李斯特菌；OpuCA；渗透胁迫；氧化应激耐受；细菌感染

OpuCA mediates oxidative stress tolerance and host infection of *Listeria monocytogenes*

YING Yu^{1#}, SHEN Shiyu^{2#}, QI Junyan^{1#}, CHEN Mianmian¹, XU Jiali¹, YUAN Yixuan¹, JIANG Lingli³, SONG Houhui¹, CHENG Changyong^{1*}

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

2 Jixian Honors College, Zhejiang A&F University, Hangzhou 311300, Zhejiang, China

3 NingBo College of Health Sciences, Ningbo 315100, Zhejiang, China

Abstract: [Objective] *Listeria monocytogenes*, the important foodborne pathogen, uses *opuCA* gene to defend against osmotic stress. In this study, we explored the roles of *opuCA* gene in growth, pathopoiesis, oxidative stress resistance, and osmotic stress resistance of *L. monocytogenes*, hoping to lay a basis for clarifying the mechanism of OpuCA-mediated bacterial adaptation and infection. [Methods] We constructed the *opuCA* deletion mutant ($\Delta opuCA$) and complementary mutant ($C\Delta opuCA$) and then compared the growth, oxidative stress tolerance, osmotic stress tolerance, and cellular adhesion and invasion of the wild strain and the mutants by molecular biology technology, infection biology technology, and laser scanning confocal microscopy. [Results] *opuCA* deletion had no influence on bacterial growth but decreased the osmotic stress tolerance. Additionally, $\Delta opuCA$ showed low tolerance to Cu^{2+} and Cd^{2+} compared with the wild strain, but the tolerance to thiol-specific oxidant diamide demonstrated no obvious variation. Furthermore, loss of *opuCA* significantly reduced bacterial adhesion and invasion to Caco-2 cells, and actin aggregation, thereby influencing the intercellular migration of bacteria. [Conclusion] *opuCA* plays a critical role in bacterial osmotic stress tolerance, oxidative stress resistance, and intracellular infection. This study expands our understanding of the OpuCA-mediated *in vitro* adaption and pathopoiesis of *L. monocytogenes*, which lays a basis for the prevention and control of the foodborne diseases caused by *L. monocytogenes*.

Keywords: *Listeria monocytogenes*; OpuCA; osmotic stress; oxidative stress tolerance; bacterial infection

单核细胞增多性李斯特菌 (*Listeria monocytogenes*, 简称单增李斯特菌)是一种革兰氏阳性、食源性胞内寄生菌^[1]。单增李斯特菌

不仅存在于各种肉类和奶制品中，还存在于自然环境中，受到各种渗透应激影响^[2]。孕妇、老年人和免疫力低下者容易受其感染^[3]。单增

李斯特菌能使易感人群患腹泻、流产和脑膜炎等疾病^[4]。

渗透转运系统(如 OpuC、BetL 和 Gbu 等)能够通过转运相容性溶质(甘氨酸甜菜碱和肉碱)来帮助单增李斯特菌抵御外界渗透胁迫^[5]。OpuC 系统属于 ABC 转运蛋白家族,由 OpuCA、OpuCB、OpuCC 和 OpuCD 组成,其中 OpuCA 是一种具有 ATP 结合盒和胱硫脲- β -合酶(CBS)结构域的胞质蛋白^[6],OpuCB 和 OpuCD 是跨膜蛋白,OpuCC 是胞外底物结合蛋白^[7]。通过转运相容性溶质不仅能够维持细胞内外渗透压,还能够维持蛋白质结构和生物学功能^[8]。环二腺苷酸(c-di-AMP)是细菌中广泛存在的第二信号分子,它的合成和分解受到腺苷酸环化酶(Dac)和磷酸二酯酶(Pde)的严格调控^[9]。c-di-AMP 与 DNA 损伤反应、细胞壁结构、应激反应、钾离子转运和细菌毒力相关^[10-13]。CBS 结构域广泛存在机体内多种调节蛋白中,它与多种酶催化和信号转导有关^[14]。渗透胁迫下,c-di-AMP 能够与 OpuCA 的 CBS 结构域特异性结合,但不能与 ATP 结合盒结合^[15]。

谷氧还蛋白(Grx)系统由酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸(NADPH)、GR、谷胱甘肽(GSH)和 Grx 组成。Grx 系统具有多种生物学活性,它与 DNA 合成调控、抗氧化应激和细胞凋亡有关^[16-17]。本实验室前期构建的 *grx* 缺失株转录组测序结果显示,缺失 Grx 后 OpuCA 转录水平显著上调^[17],提示 *opuCA* 基因参与了李斯特菌的氧化应激。因此本研究构建了 *opuCA* 缺失株,并对 *opuCA* 缺失株的体外生长能力、应激生物学和感染生物学等进行研究,发现单增李斯特菌缺失 *opuCA* 后,其对环境渗透应激及氧化应激敏感性增强,但在细胞内的感染能力下降以及细菌聚合 actin 能力降低,进而影响了细菌在胞间迁移。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株、质粒、培养条件及引物

本研究需用到的单增李斯特菌 EGD-e、大肠杆菌 DH5 α 和 BL21、质粒 pKSV7 和 pIMK2,均来自于本实验室冻存库。EGD-e 菌株需接种于牛脑心浸出液肉汤(brain and heart infusion broth, BHI),DH5 α 菌株需接种于肉汤(Luria-Bertani, LB),37 °C 振荡过夜培养。除特殊说明外,菌株培养条件均为 37 °C。本研究涉及引物见表 1。

1.1.2 试剂

KOD plus Neo PCR 酶、限制性核酸内切酶、质粒提取试剂盒以及 PCR 产物纯化/回收试剂盒,分别购自 Toyobo、NEB 公司和上海惠凌生物科技有限公司;胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)、DMEM 培养基(Dulbecco's modified eagle medium, DMEM)和胰酶(0.25% Trypsin-EDTA)购自 Thermo Fisher Scientific;BHI 和 LB 培养基分别购于 OXOID 公司和生工生物工程(上海)股份有限公司。李斯特菌裂解液为本实验室自配。本研究所用化学试剂均为国产分析纯。

1.2 Δ *opuCA* 重组缺失质粒构建

对于缺失株构建所用模板为 EGD-e 菌株全基因组(GenBank 登录号为 NC_003210.1),从 NCBI 下载 *opuCA* 基因序列(基因序列编号:987882),通过 Snapgene 软件在 *opuCA* 上、下游各约 500 bp 处设计引物(pSL-2881-*Pst* I-a/pSL-2881-b 和 pSL-2881-c/pSL-2881-*Sal* 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,获得重组质粒 pSL2881,测序正确后转化至 DH5 α 中(图 1)。

表 1 本研究中用到的引物

Table 1 Primers used in this study

Primers	Sequences (5'→3')
pSL-2881-b	CCTCCTGCTTCATTTCTTCGAATTTTAAACACGCCTACACACC
pSL-2881-c	GTGTTAAAATTTCGAAGAAATGAAGCAGGAGGGATAAGCT
pSL-2881- <i>Pst</i> I-a	<u>AACTGCAGGAGGATTAGCTCGATATTTTTGGCACTATG</u>
pSL-2881- <i>Sal</i> I-d	<u>ACGCGTTCGACCAGCTAAAATCCAAAGGACGAATCCA</u>
pSL-2881-a-front	GGTTTTTGGGCGGCTGGAT
pSL-2894-F	ACTGCCAGGAATTGGGGATC
pSL-2894-R	CTTTTCCATGGGTTTCACTCTCCTTC
pSL-2894- <i>Kpn</i> I-Rev	<u>CGGGGTACCTTATCCCTCCTGCTTCATTTCTGGT</u>
pSL-2894- <i>Pst</i> I-Fwd	<u>TGCACTGCAGGTGTTAAAATTCGAACACGTAACGAAGACT</u>
pKSV7-M13-Fwd	GCGATTAAGTTGGGTAACGCC
pKSV7-M13-Rev	GCGGATAACAATTTACACAGGA

The restriction enzyme sites are underlined.

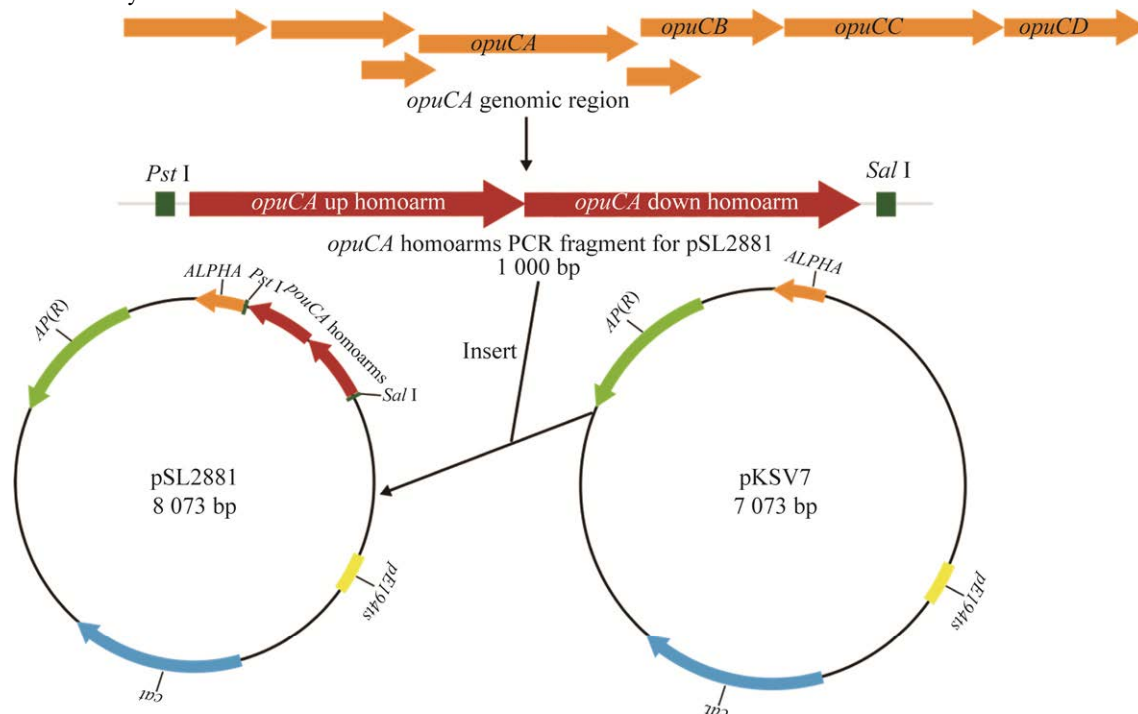
图 1 *opuCA* 缺失株重组质粒的构建策略

Figure 1 Construction strategy of the recombinant plasmid pSL2881 for gene deletion of *opuCA*.

1.3 Δ *opuCA* 缺失株筛选与验证

将上述质粒 pSL2881 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 处设计一条引物 (pSL2881-a-front) 对筛选出的重组克隆进行 PCR 验证，最终通过测序验证，所缺失基因序列与预期设计相符后获得 Δ *opuCA* 缺

失株。

1.4 $C\Delta$ *opuCA* 重组质粒的构建

从 Biocyc 数据库网站查询得知 *opuCA*、*opuCB*、*opuCC* 和 *opuCD* 为一个转录单元，通过 Snapgene 设计上下游引物 (pSL-2894-*Kpn*I-Rev/pSL-2894-*Pst*I-Fwd)，克隆至 pIMK2 载体，获得重组质粒 pSL2894 (图 2)，经测序成

功后转化至 DH5 α 中。

1.5 EGD-e 感受态和 $\Delta opuCA$ 感受态的制备

挑取单克隆摇菌, 培养过夜后吸取 1 mL 新鲜菌液, 转接至 100 mL 灭菌 BHI 中 (含有 0.5 mol/L 蔗糖), 继续培养 4 h 后, 当 OD_{600} 约为 0.2 时加入青霉素 G (终浓度为 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$)。用已过滤除菌的 1 mmol/L HEPES (含有 0.5 mol/L 蔗糖) 洗涤 2 次, 最后再用 400 μL 重悬。将 2 μg pSL2894 加至 $\Delta opuCA$ 感受态中, 将其在 25 μF 、200 Ω 、2 500 V 条件下进行电击, 37 $^{\circ}\text{C}$ 静置培养, 将菌液涂布于有卡那抗性的 BHI 固体平板, 放在 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱中培养约 12 h 后, 挑取单克隆, 用引物进行 PCR, 经鉴定呈阳性的克隆送测序公司, 测序成功后的菌株即为回补株, 命名为 $C\Delta opuCA$ 。

1.6 生长曲线的测定

挑取菌株 EGD-e、 $\Delta opuCA$ 和 $C\Delta opuCA$ 培养过夜, 调 OD_{600} 至 0.6, 菌液稀释 100 倍后,

取 200 μL 加入 96 孔板于 30 $^{\circ}\text{C}$ 和 37 $^{\circ}\text{C}$ 静置培养, 每隔 1 h 测定浓度, 12 h 后绘制生长曲线。

1.7 氧化应激试验

将菌株 EGD-e、 $\Delta opuCA$ 和 $C\Delta opuCA$ 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养过夜, 调整 OD_{600} 至 0.6, 使用 10 mmol/L PBS 将菌液依次稀释至 10^{-6} , 并按顺序分别点于不含有氧化剂的 BHI 和含有氧化剂的 BHI 固体培养基上, 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养过夜后扫描。胍(diamide)为巯基特异性氧化剂, 二价金属离子为铜(copper chloride, Cu^{2+})和镉(cadmium chloride, Cd^{2+}), 具有氧化活性。本研究中胍浓度为 1 mmol/L, Cd^{2+} 和 Cu^{2+} 分别为 0.5 mmol/L 和 1 mmol/L。

1.8 渗透胁迫下生长试验

将菌株 EGD-e、 $\Delta opuCA$ 和 $C\Delta opuCA$ 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养过夜, 调整 OD_{600} 至 0.6, 将菌液按 1:100 加入到含有 5% NaCl 的 BHI 培养基中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 、200 r/min 培养, 每隔固定时间取 200 μL 加入 96 孔板测定 OD_{600} , 并绘制生长曲线。

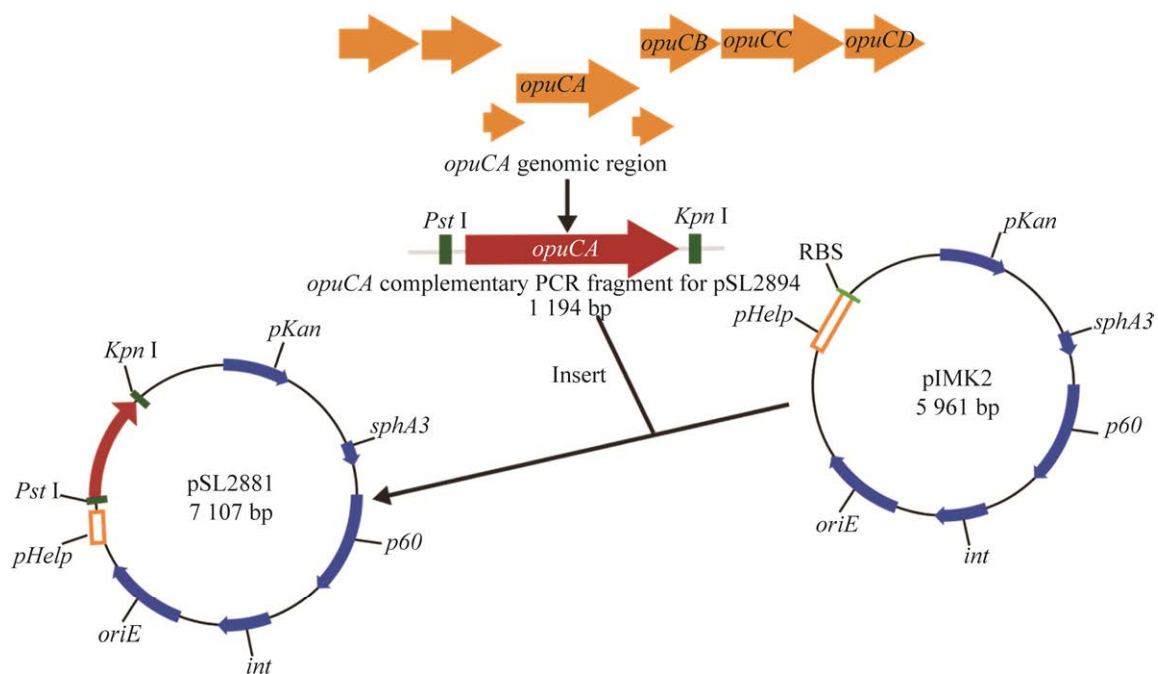


图 2 $opuCA$ 回补株重组质粒的构建策略

Figure 2 Construction strategy of the recombinant plasmid pSL2894 for $opuCA$ gene complementated *L. monocytogenes*.

1.9 人肠上皮细胞(Caco-2)粘附和侵袭试验

挑取 EGD-e、 $\Delta opuCA$ 和 $C\Delta opuCA$ 单菌落 37 °C 培养过夜, Caco-2 细胞铺板密度为 5×10^5 个/mL, 细菌和细胞比例(MOI)为 10:1。将 EGD-e、 $\Delta opuCA$ 和 $C\Delta opuCA$ 按照 MOI 加入至 24 孔板后放置于细胞培养箱培养, 0.5 h 后用 10 mmol/L PBS 冲洗 3 遍, 并用灭菌水和胰酶吹打裂解, 灭菌水和胰酶比例为 4:1, 倍比稀释之后将合适梯度吸取 10 μ L 点于 BHI 培养基上。Caco-2 另一个 24 孔板在 1.5 h 后用 10 mmol/L PBS 洗 3 次, 用终浓度为 50 μ g/mL 庆大霉素杀菌 1.5 h 后(同 0.5 h 裂解操作步骤), 倍比稀释之后将合适梯度吸取 10 μ L 点于 BHI 培养基上。在 37 °C 培养过夜后进行细菌计数。

1.10 激光共聚焦观察胞内细菌量

挑取带有 GFP 标签的 EGD-e 和 $\Delta opuCA$ 单菌落 37 °C 培养过夜, HeLa 细胞铺板密度为 3×10^5 个/mL (24 孔板为例), 铺板前需将灭菌洁净爬片置于细胞培养板底部, 将带有 GFP 标签的 EGD-e 和 $\Delta opuCA$ 按照 MOI (500:1) 加入至 24 孔板后置于细胞培养箱培养, 1 h 后洗涤细胞 3 次, 每孔加入含 50 μ g/mL 庆大霉素的 DMEM 后继续培养 5 h。弃去培养基, 洗涤细胞 3 次后加入 300 μ L 4% 多聚甲醛溶液以固定细胞, 条件为 37 °C、10 min, 固定结束后洗涤细胞 2 次, 每孔加入 300 μ L 0.5% Triton X-100 溶液以增加细胞通透性, 条件为 37 °C、10 min, 作用结束后洗涤细胞 2 次, 洗涤细胞两次后加入细胞骨架染色剂(phalloidine stock solution-ALEXA Flour 594) 37 °C 染色 1 h, 洗涤细胞 2 次后加入细胞核染色剂(DAPI) 37 °C 染色 10 min, 洗涤细胞 2 次后用镊子夹取边缘缓慢放下, 将指甲油涂于盖玻片边缘, 封片固定, 使用激光共聚焦显微镜观察。

1.11 数据统计

上述结果使用 Adobe Illustrator 2021、Adobe Photoshop CC 2019 和 GraphPad Prime 9.0 进行图片和数据处理。

2 结果与分析

2.1 $\Delta opuCA$ 和 $C\Delta opuCA$ 菌株验证

根据 $\Delta opuCA$ 重组质粒构建方法(图 1, 方法同 1.2, 引物见表 1), $\Delta opuCA$ 上游同源臂条带为 524 bp (图 3A, 第 1 列), 下游同源臂为 525 bp (图 3A, 第 2 列)。重叠 PCR 得到目的片段为 1 018 bp (图 3B, 第 1 列)。将验证正确的质粒电转化入 EGD-e 感受态, 42 °C 同源重组后, 在 30 °C 传代丢失 pKSV7 质粒后, 用引物(pSL-2881-a-front/pSL2881-d) 扩增菌落得到 1 236 bp 阳性克隆(图 3C 第 1 列, 第 2 列是以野生株为模板的阳性对照)。将 PCR 产物送生物公司测序验证 $\Delta opuCA$ (图 3E) 所得基因序列与预期设计相符后获得 *opuCA* 缺失株。

根据 $C\Delta opuCA$ 重组质粒(图 2, 方法同 1.4) 构建方法, 以 EGD-e 为模板, 用引物(pSL-2894-*Kpn* I-Rev/pSL-2894-*Pst* I-Fwd) 扩增目的片段, 将目的片段电转化入 $\Delta opuCA$ 感受态中后, 用引物(pSL-2894-*Kpn* I-Rev/pSL-2894-*Pst* I-Fwd) 验证得到阳性条带(图 3D, 第 2 列)。用引物(pSL-2894-R/pSL-2894-F) 扩增菌落可得到 255 bp (图 3D, 第 1 列) 的启动子区域, 用引物(pSL-2894-*Kpn* I-Rev/pSL-2894-F) 扩增菌落获得的 1 436 bp (图 3D, 第 3 列) 为启动子 *pHelp* 和框内敲除 *opuCA* 片段大小。最后经测序验证构建 $C\Delta opuCA$ 与预期相符(图 3F)。

2.2 单增李斯特菌缺失 *opuCA* 基因后对渗透胁迫敏感

我们对菌株 EGD-e、 $\Delta opuCA$ 和 $C\Delta opuCA$ 进行了生长曲线测定。结果显示, 突变株与 EGD-e 在 30 °C (图 4A) 及 37 °C (图 4B) 培养时

的生长曲线无明显差异, 说明缺失 *opuCA* 并不会对单增李斯特菌生长产生影响。在含有 5% NaCl BHI 中, 缺失 *opuCA* 影响细菌生长速率(图

4C), 突变株相较于野生株生长缓慢, 这说明 *opuCA* 在单增李斯特菌对抗渗透胁迫过程中具有重要作用。

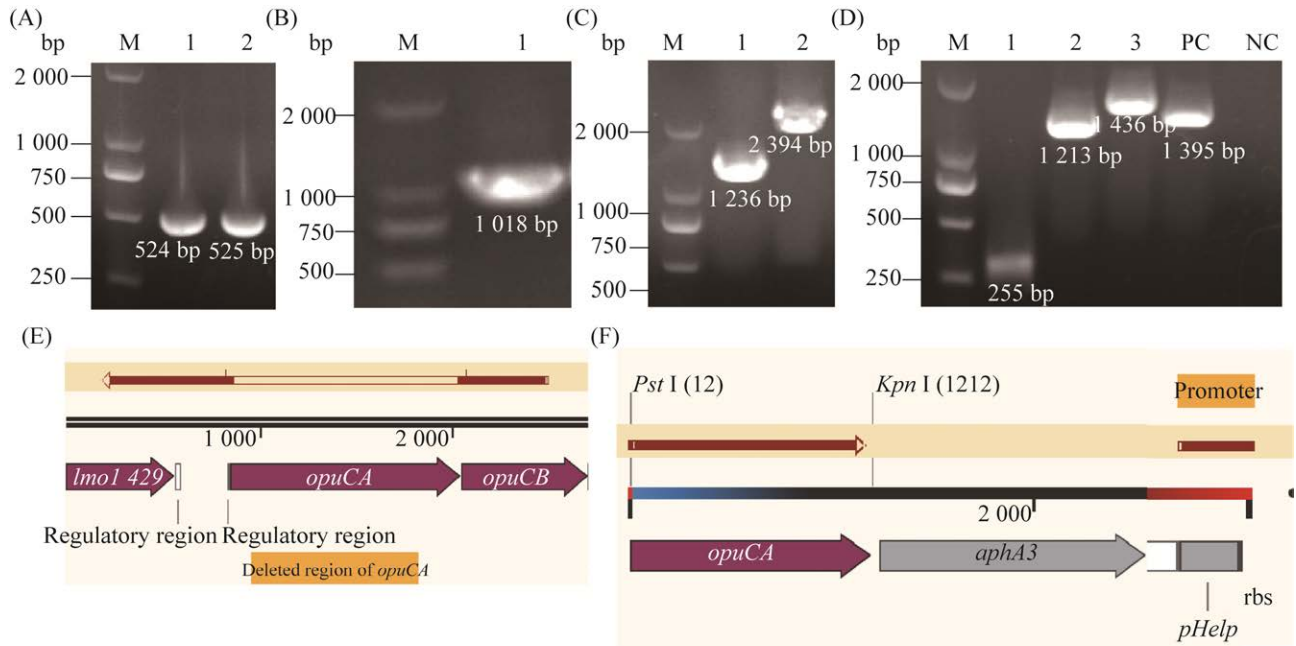


图 3 缺失株构建重组质粒(A、B)、缺失株 $\Delta opuCA$ (C)和回补株 $C\Delta opuCA$ (D)的 PCR 验证及缺失和回补测序结果(E、F)

Figure 3 Confirmation of *OpuCA* deletion plasmid (A, B), the deletion (C) and complementation (D) strains by PCR and sequencing analysis (E, F). A–B: PCR fragments of homologous arms from the wild-type strain; C: PCR screening for the *opuCA* deletion colonies (lane 1–2: PCR genomic DNA isolated from wild-type and deletion mutant); D: PCR screening for the *opuCA* complemented colony (lane 1: PCR fragment amplifying the promoter region of help; lane 2: PCR fragment amplifying the *opuCA* gene region; lane 3: PCR fragment amplifying the *opuCA* gene along with the help promoter region). M: DL2000 DNA marker; PC: wild-type strain genomic DNA; NC: negative control.

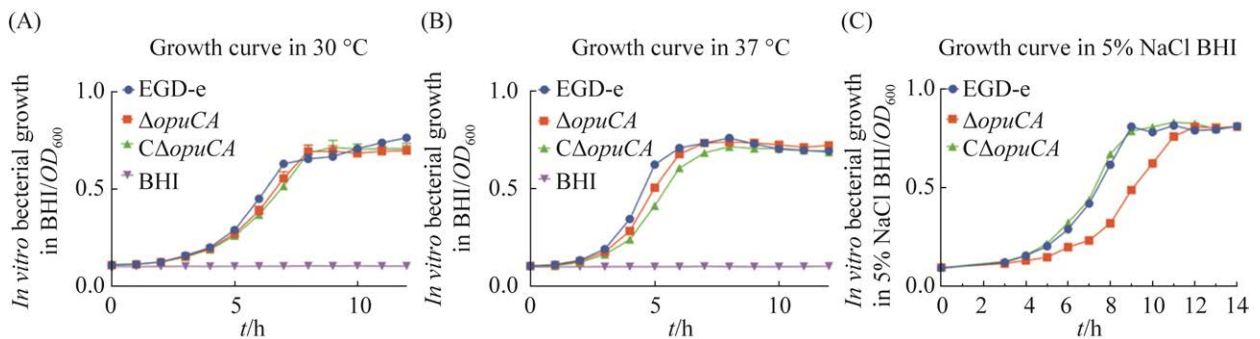


图 4 菌株 EGD-e、 $\Delta opuCA$ 和 $C\Delta opuCA$ 在 30 °C (A)、37 °C (B)及含有 5% NaCl BHI (C)中的生长曲线测定

Figure 4 *In vitro* growth of the wild-type EGD-e, $\Delta opuCA$ and $C\Delta opuCA$ in BHI broth at 30 °C (A) or 37 °C (B) and in BHI broth containing 5% NaCl at 37 °C (C).

2.3 单增李斯特菌缺失 *opuCA* 后抗氧化应激能力减弱

缺失谷氧还蛋白 Grx 后, 单增李斯特菌抗氧化能力显著增强, 同时, 引起了 *opuCA* 转录水平上调^[17], 那么 *opuCA* 是否也具有抗氧化应激能力。我们选择常见氧化剂胍、 Cu^{2+} 、 Cd^{2+} , 探究 *opuCA* 在抗氧化应激过程中发挥的作用(图 5)。结果显示, 在 1 mmol/L 胍培养条件下, 3 株菌株无明显差异(图 5B), 在含 0.5 mmol/L 和 1 mmol/L 的 Cu^{2+} 和 Cd^{2+} 培养条件下, ΔopuCA 生长能力相较于 EGD-e 和 $\text{C}\Delta\text{opuCA}$ 均显著减

弱(图 5C–F), 说明 *opuCA* 能帮助单增李斯特菌抵抗金属离子氧化剂 Cu^{2+} 和 Cd^{2+} 的作用。

2.4 单增李斯特菌缺失 *opuCA* 后肠上皮细胞侵袭力显著减弱

上述结果表明, 缺失 *opuCA* 能够减弱菌株体外抗氧化能力。单增李斯特菌在进入宿主消化道后首先入侵肠上皮细胞, 为进一步探究 *opuCA* 对于细菌感染生物学功能, 我们研究了 Caco-2 细胞中的粘附、侵袭能力, 结果显示, ΔopuCA 不影响细菌的黏附率(图 6A), 但使其侵袭率显著下降(图 6B)。此外, 为了更直观地

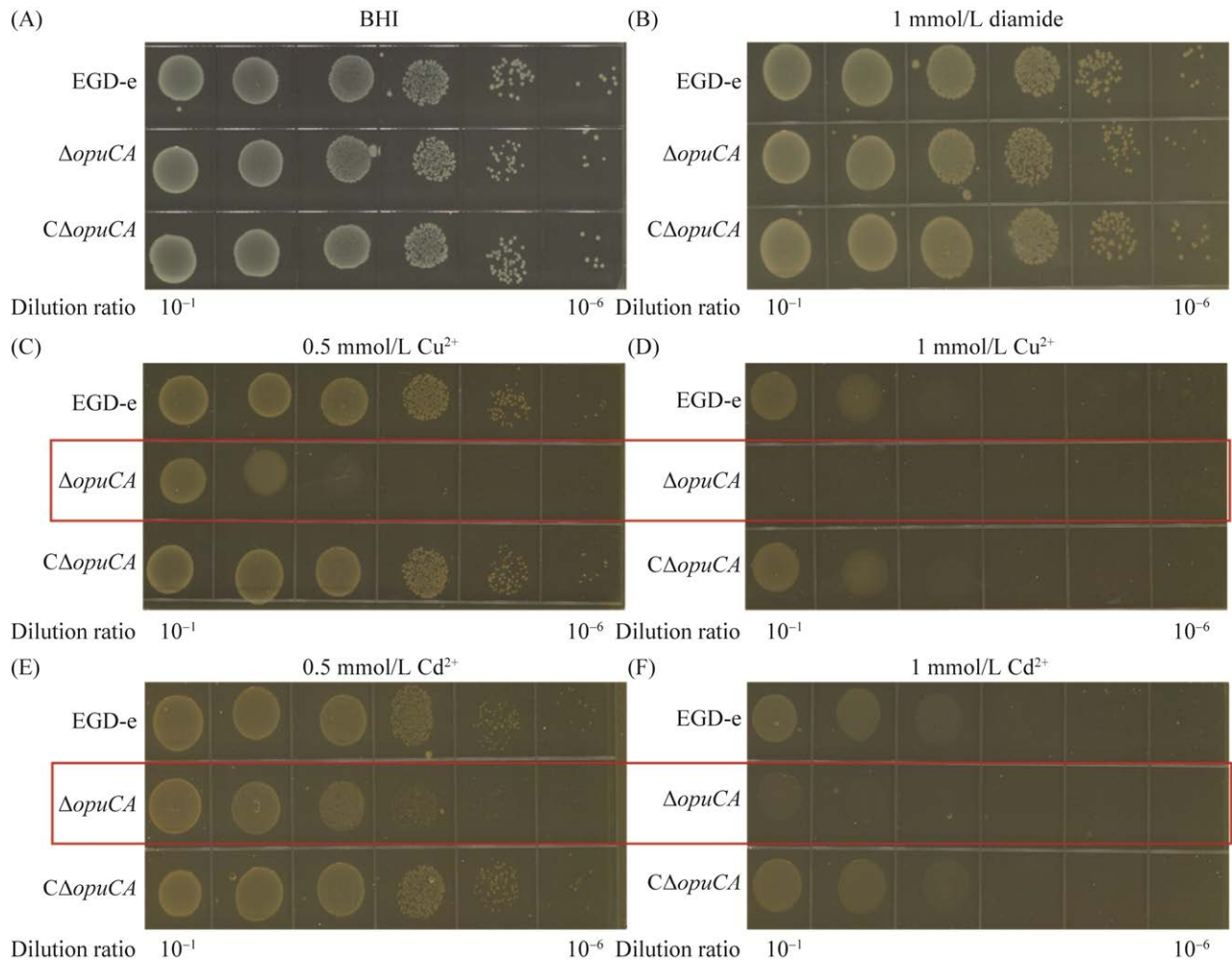


图 5 菌株 EGD-e、 ΔopuCA 和 $\text{C}\Delta\text{opuCA}$ 在胍(B)、 Cu^{2+} (C、D) 和 Cd^{2+} (E、F) 氧化应激条件下的生长能力
Figure 5 Oxidative tolerance of wild-type EGD-e and *opuCA* mutants exposed to control (A) or different concentrations of diamide (B), Cu^{2+} (C, D), or Cd^{2+} (E, F).

显示缺失 *opuCA* 后细菌在胞内增殖情况, 我们构建了带有 GFP 标签的 EGD-e 和 Δ *opuCA* 菌株, 感染 HeLa 细胞 6 h 后用共聚焦显微镜观察。结果表明, 共聚焦显微镜可以观察到胞内增殖细菌, 且 *opuCA* 缺失导致细菌聚集 actin 的能力有所下降(即视野中绿色细菌与红色 actin 共定位形成的黄色叠加减少)。单增李斯特菌主要依靠宿主细胞 actin 聚合并推动其感染

和迁移), 进一步说明, *opuCA* 在细菌胞内增殖和胞间迁移过程中发挥了一定作用(图 6C)。氧化还原反应转录调节因子 Rex 能够抑制入侵肠道的毒力因子^[18], 可见单增李斯特菌抗氧化能力对于感染宿主细胞至关重要。细胞试验结果与氧化应激试验结果一致, 说明 *opuCA* 能介导毒力因子调控, 并影响细菌的入侵和感染能力。

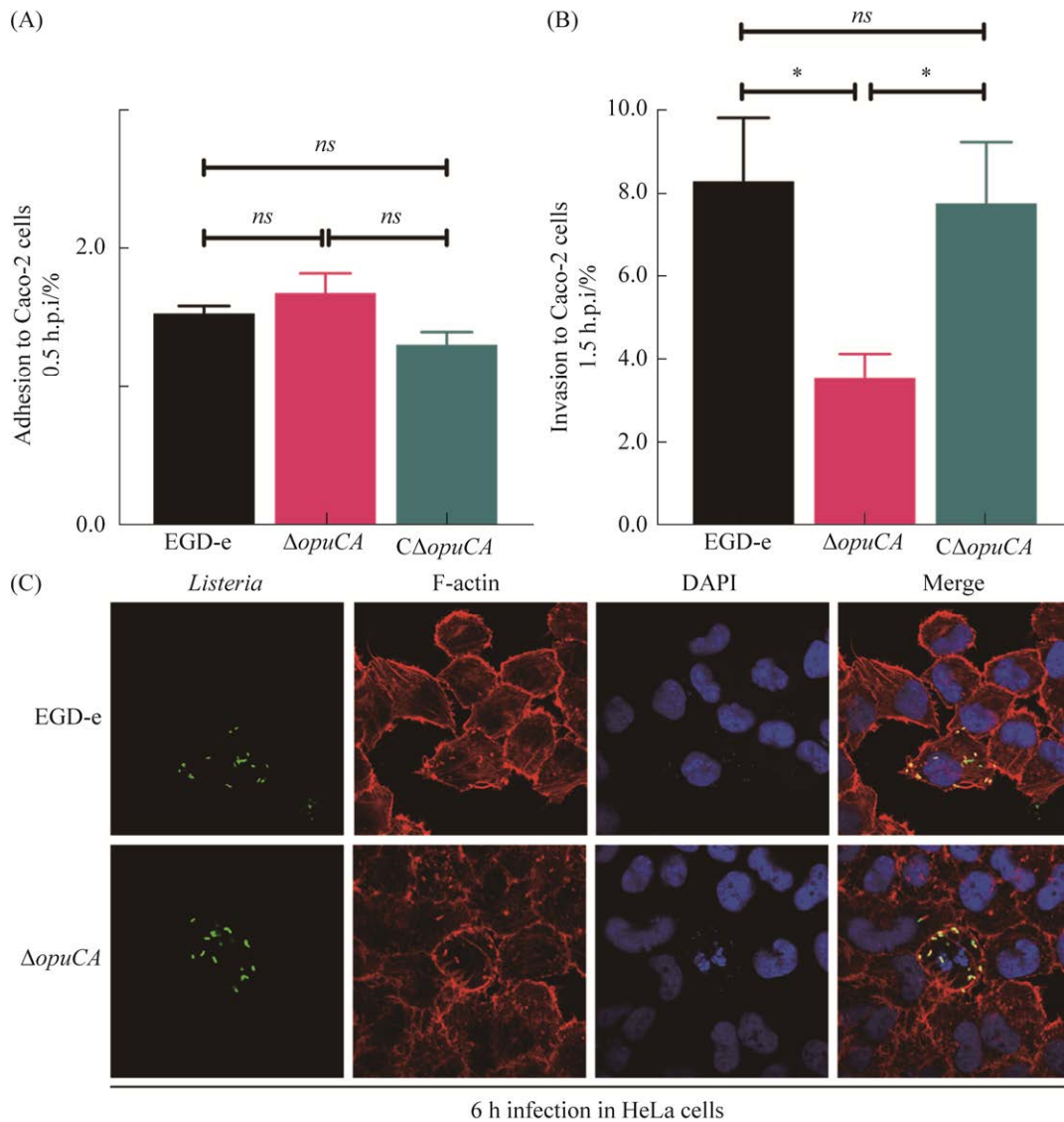


图 6 菌株 EGD-e、 Δ *opuCA* 和 $C\Delta$ *opuCA* 在 Caco-2 的黏附率(A)和侵袭率(B)分析及 EGD-e、 Δ *opuCA* 在 HeLa 细胞中的胞内增殖(C)

Figure 6 Analysis of adhesion (A) and invasion (B) of wild-type EGD-e and *opuCA* mutants in Caco-2 cells. Intracellular growth (C) of wild-type EGD-e and *opuCA* mutants in HeLa cells by confocal microscopy.

3 讨论

本研究构建了 *opuCA* 基因缺失株和回补株, 并通过分子生物学、应激生物学和细胞生物学等手段, 研究了单增李斯特菌和突变株间的体外生长能力、抗氧化应激能力、细胞黏附、侵袭及胞内增殖能力。结果显示, 缺失 *opuCA* 后细菌抗渗透胁迫能力、抗氧化应激、细胞感染能力均显著减弱, 激光共聚焦结果显示, 缺失 *opuCA* 后细菌聚集 *actin* 能力下降进而影响了细菌的胞间迁移能力。本研究为下一步深入研究单增李斯特菌相关应激效应蛋白在抵抗渗透胁迫、氧化应激以及宿主内感染过程中的作用机制提供了基础。

本文证实了缺失 *opuCA* 不影响单增李斯特菌的生长速率, 但在含有 5% NaCl 的 BHI 培养基中, 突变株生长速率显著变慢, 这与缺失 *opuC* 家族后单增李斯特菌生长变慢结果一致^[19], 说明 *opuCA* 在 *OpuC* 转运系统中发挥着至关重要的作用。*opuCA* 具有 ATP 结合盒和 CBS 结构域。*c-di-AMP* 能结合 *opuCA* 来控制肉碱和甘氨酸甜菜碱的转运, *c-di-AMP* 过多时抑制机体从外界摄取相容性溶质^[15]。综上所述, 我们猜测突变株在渗透胁迫下生长变缓, 一方面可能是因为 *opuCA* 缺失导致机体内 *c-di-AMP* 的量增多, 进而抑制相容性溶质摄取; 另一方面, 可能是 *opuCA* 具有 ATP 结合能力, 缺失 *opuCA* 后, 将无法为 *OpuC* 蛋白转运家族提供足够的能量进行主动转运相容性溶质。*OpuC*、*BetL* 和 *Gbu* 转运系统是帮助单增李斯特菌抵御外界渗透胁迫的 3 个主要系统, 溶质转运蛋白 *GbuA* (*lmo1014*) 结构与 *OpuCA* 结构相似且含有 CBS 结构域, 然而 *GbuA* 却不能与 *c-di-AMP* 特异性结合^[20]。胆汁酸转运系统 *BilE* (*lmo2067*) 含有 ATP 结合位点和 CBS 结构域, 但其 CBS

结构域相比于 *OpuCA* 的 CBS 结构域短, 它也不能和 *c-di-AMP* 特异性结合^[21]。除此之外, 单增李斯特菌中 *lmo1009* 和 *lmo0553* 含有 CBS 结构域并能和信号分子 *c-di-AMP* 特异性结合^[22]。以上结果表明, CBS 结构域虽然广泛存在于单增李斯特菌中, 但它与 *c-di-AMP* 发生相互作用的功能元件却不同。因此, 后续将针对转运蛋白 *OpuCA*、*BilE* 和 *GbuA* 以及 *Lmo1009* 和 *Lmo0553* 中的 CBS 结构域进行系统分析, 并将这些蛋白与 *c-di-AMP* 结合差异进行更深入的探究, 为完善李斯特菌溶质摄取系统抗渗透胁迫作用机理提供基础。

枯草芽孢杆菌中存在 *opcR* 和 *gbsR* 调节基因, 在盐应激条件下, 枯草芽孢杆菌会通过上调这 2 个基因来控制 *OpuC* 的转录^[23]。而在单增李斯特菌中, 由 *sigB* 基因编码的 *SigB* 是其受到环境胁迫时的主要应激调控因子, 它能够调控 *OpuC* 的转录^[24]。缺失 *opuC* 导致单增李斯特菌肠道定殖能力减弱^[25]。下一步我们将利用生物信息学分析单增李斯特菌中是否存在 *OpcR* 和 *GbsR* 同源蛋白, 探究 *OpuCA* 介导细菌毒力和渗透应激中的相关机制。本研究有助于深入理解单增李斯特菌在宿主内外环境中的适应机制, 为防控单增李斯特菌提供研究基础, 对于防控食源性单增李斯特菌和保障人类公共卫生学具有重要意义。

参考文献

- [1] Anaya-Sanchez A, Feng Y, Berude JC, Portnoy DA. Detoxification of methylglyoxal by the glyoxalase system is required for glutathione availability and virulence activation in *Listeria monocytogenes*. *PLoS Pathogens*, 2021, 17(8): e1009819.
- [2] Roberts BN, Chakravarty D, Gardner JC, Ricke SC, Donaldson JR. *Listeria monocytogenes* response to anaerobic environments. *Pathogens*, 2020, 9(3): 210.
- [3] Gerner-Smidt P, Besser J, Concepción-Acevedo J,

- Folster JP, Huffman J, Joseph LA, Kucerova Z, Nichols MC, Schwensohn CA, Tolar B. Whole genome sequencing: bridging one-health surveillance of foodborne diseases. *Frontiers in Public Health*, 2019, 7: 172.
- [4] Christina M, Stefanie M, Dhivyaa R, Coyne CB. Inflammasome signaling in human placental trophoblasts regulates immune defense against *Listeria monocytogenes* infection. *Journal of Experimental Medicine*, 2021, 218(1): e20200649.
- [5] Harasgama JC, Kasthuriarachchi TDW, Kwon H, Wan Q, Lee J. Molecular and functional characterization of a mitochondrial glutathione reductase homolog from redlip mullet (*Liza haematocheila*): disclosing its antioxidant properties in the fish immune response mechanism. *Developmental and Comparative Immunology*, 2020, 113: 103785.
- [6] Vivant AL, Desneux J, Pourcher AM, Piveteau P. Transcriptomic analysis of the adaptation of *Listeria monocytogenes* to lagoon and soil matrices associated with a piggery environment: comparison of expression profiles. *Frontiers in Microbiology*, 2017, 8: 1811.
- [7] Santos T, Viala D, Chambon C, Esbelin J, Hébraud M. *Listeria monocytogenes* biofilm adaptation to different temperatures seen through shotgun proteomics. *Frontiers in Nutrition*, 2019, 6: 89.
- [8] Bremer E, Krämer R. Responses of microorganisms to osmotic stress. *Annual Review of Microbiology*, 2019, 73: 313–334.
- [9] Sabrina F, Tazin F, Port GC, Hong CK. C-di-AMP-regulated K⁺ importer KtrAB affects biofilm formation, stress response, and *SpeB* expression in *Streptococcus pyogenes*. *Infection and Immunity*, 2021, 89(4): e00317-20.
- [10] Corrigan RM, Gründling A. Cyclic di-AMP: another second messenger enters the fray. *Nature Reviews Microbiology*, 2013, 11(8): 513–524.
- [11] Commichau FM, Dickmanns A, Gundlach J, Ficner R, Stülke J. A jack of all trades: the multiple roles of the unique essential second messenger cyclic di-AMP. *Molecular Microbiology*, 2015, 97(2): 189–204.
- [12] Cereija TB, Guerra JPL, Jorge JMP, MoraisCabral JH. C-di-AMP, a likely master regulator of bacterial K⁺ homeostasis machinery, activates a K⁺ exporter. *PNAS*, 2021, 118(14): e2020653118.
- [13] Krüger L, Herzberg C, Rath H, Pedreira T, Ischebeck T, Poehlein A, Gundlach J, Daniel R, Völker U, Mäder U, Stülke J. Essentiality of c-di-AMP in *Bacillus subtilis*: bypassing mutations converge in potassium and glutamate homeostasis. *PLoS Genetics*, 2021, 17(1): e1009092.
- [14] Anashkin VA, Orlov VN, Lahti R, Baykov AA. An arginine residue involved in allosteric regulation of cystathionine β-synthase (CBS) domain-containing pyrophosphatase. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2019, 662: 40–48.
- [15] Huynh TN, Choi PH, Sureka K, Ledvina HE, Campillo J, Tong L, Woodward JJ. Cyclic di-AMP targets the cystathionine beta-synthase domain of the osmolyte transporter OpuC. *Molecular Microbiology*, 2016, 102(2): 233–243.
- [16] Kim G, Omeka WKM, Liyanage DS, Lee J. Molecular characterization, redox regulation, and immune responses of monothiol and dithiol glutaredoxins from disk abalone. *Fish & shellfish immunology*, 2020, 107(Pt A): 385–394.
- [17] Sun J, Hang Y, Han Y, Zhang X, Gan L, Cai C, Chen ZW, Yang Y, Song QJ, Shao CY, Yang YC, Zhou YS, Wang XD, Cheng CY, Song HH. Deletion of glutaredoxin promotes oxidative tolerance and intracellular infection in *Listeria monocytogenes*. *Virulence*, 2019, 10(1): 910–924.
- [18] Halsey CR, Glover RC, Thomason MK, Reniere ML. The redox-responsive transcriptional regulator Rex represses fermentative metabolism and is required for *Listeria monocytogenes* pathogenesis. *PLoS Pathogens*, 2021, 17(8): e1009379.
- [19] Lee J, Ha J, Kim S, Lee S, Lee H, Yoon Y, Choi KH. The correlation between NaCl adaptation and heat sensitivity of *Listeria monocytogenes*, a foodborne pathogen through fresh and processed meat. *Korean Journal for Food Science of Animal Resources*, 2016, 36(4): 469–475.
- [20] Fernández-Rodríguez C, Oyenarte I, Conter C, González-Recio I, Núñez-Franco R, Gil-Pitarch C, Quintana I, Jiménez-Osés G, Dominici P, Martínez-Chantar ML, Astegno A, Martínez-Cruz LA. Structural insight into the unique conformation of cystathionine β-synthase from *Toxoplasma gondii*. *Computational and structural biotechnology journal*,

2021, 19: 3542–3555.

- [21] Santos Patrícia TD, Thomasen RSS, Green MS, Færgeman NJ, Kallipolitis BH. Free fatty acids interfere with the DNA binding activity of the virulence regulator PrfA of *Listeria monocytogenes*. *Journal of Bacteriology*, 2020, 202(15): e00156-20.
- [22] Sikkema HR, Den Noort Marco V, Jan R, Marijn DB, Krepel ST, SchuurmanWolters GK, Cristina P, Bert P. Gating by ionic strength and safety check by cyclic-di-AMP in the ABC transporter OpuA. *Science Advances*, 2020, 6(47): eabd7697.
- [23] Warmbold B, Ronzheimer S, Freibert SA, Seubert A, Hoffmann T, Bremer E. Two MarR-type repressors balance precursor uptake and glycine betaine synthesis in *Bacillus subtilis* to provide cytoprotection against sustained osmotic stress. *Frontiers in Microbiology*, 2020, 11: 1700.
- [24] 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. *Microbiology: Reading, England*, 2019, 165(8): 819–833.
- [25] Parsons C, Azizoglu RO, Elhanafi D, Kathariou S. Mutant construction and integration vector-mediated genetic complementation in *Listeria monocytogenes*. Fox EM, Bierne H, Stessl B (eds) *Listeria Monocytogenes*. Methods in Molecular Biology, New York: Humana, 2021, 2220: 177–185.

(本文责编 李磊)