



单增李斯特菌 LPXTG 蛋白 Lmo0880 在感染致病中的作用

林柯辰¹, 李豪杰¹, 赵秀玲², 周思¹, 廖俊慧¹, 王子念¹, 金戈旋¹, 朱富鑫¹, 徐加利¹, 孙静¹, 宋厚辉¹, 邓思敏^{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 宁波检验检疫科学技术研究院 宁波海关技术中心, 浙江 宁波 315000

林柯辰, 李豪杰, 赵秀玲, 周思, 廖俊慧, 王子念, 金戈旋, 朱富鑫, 徐加利, 孙静, 宋厚辉, 邓思敏, 程昌勇. 单增李斯特菌 LPXTG 蛋白 Lmo0880 在感染致病中的作用[J]. 微生物学报, 2024, 64(3): 893-906.

LIN Kechen, LI Haojie, ZHAO Xiuling, ZHOU Si, LIAO Junhui, WANG Zinian, JIN Gexuan, ZHU Fuxin, XU Jiali, SUN Jing, SONG Houhui, DENG Simin, CHENG Changyong. Role of LPXTG-anchored protein Lmo0880 in *Listeria monocytogenes* infection[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2024, 64(3): 893-906.

摘要:【目的】通过构建单核细胞增生李斯特菌(单增李斯特菌) LPXTG 蛋白 Lmo0880 的基因缺失菌株和回补菌株, 探究 Lmo0880 在细菌生长、细胞感染和宿主感染等方面发挥的作用。【方法】利用同源重组原理构建 *lmo0880* 的基因缺失株及回补株, 比较野生株、缺失株和回补株在生长能力、细胞黏附与侵袭和胞内增殖能力等方面的差异, 从而鉴定 Lmo0880 在单增李斯特菌感染宿主中的作用。【结果】缺失 *lmo0880* 基因后, 单增李斯特菌在生长能力上无明显变化; 对细胞的黏附能力无显著差异, 但对细胞侵袭能力、胞内增殖能力、小鼠致病力和小鼠组织定殖能力显著降低。【结论】本研究阐明了单增李斯特菌 LPXTG 蛋白 Lmo0880 在细胞侵袭、胞内增殖和组织定殖等方面发挥的重要作用。

关键词: 单增李斯特菌; LPXTG 蛋白 Lmo0880; 宿主感染

资助项目: 国家自然科学基金(32002317, 32302961); 浙江省自然科学基金(Q21C180006, LY23C180002); 宁波市自然科学基金(202003N4178)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (32002317, 32302961), the Natural Science Foundation of Zhejiang Province (Q21C180006, LY23C180002), and Ningbo Natural Science Foundation (202003N4178).

*Corresponding authors. E-mail: CHENG Changyong, lamge@zafu.edu.cn; DENG Simin, dengsm@zafu.edu.cn

Received: 2023-09-21; Accepted: 2023-12-15; Published online: 2023-12-19

Role of LPXTG-anchored protein Lmo0880 in *Listeria monocytogenes* infection

LIN Kechen¹, LI Haojie¹, ZHAO Xiuling², ZHOU Si¹, LIAO Junhui¹, WANG Zinian¹, JIN Gexuan¹, ZHU Fuxin¹, XU Jiali¹, SUN Jing¹, SONG Houhui¹, DENG Simin^{1*}, CHENG Changyong^{1*}

¹ 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, College of Animal Science and Technology & College of Veterinary Medicine, Zhejiang A&F University, Hangzhou 311300, Zhejiang, China

² Technical Center of Ningbo Customs, Ningbo Academy of Quarantine & Inspection Science and Technology, Ningbo 315000, Zhejiang, China

Abstract: [Objective] To generate *Listeria monocytogenes* strains with *lmo0880* deleted and complemented strains, so as to investigate the roles of Lmo0880 in bacterial infection in a host. [Methods] The *lmo0880*-deleted strain was generated by homologous recombination, and the complementary strain was constructed by introducing an integrative plasmid carrying *lmo0880* into the *lmo0880*-deleted strain. The growth, adhesion, invasion, and intracellular proliferation were compared between the *lmo0880*-deleted strain, complementary strain, and the wild type. [Results] The deletion of *lmo0880* did not significantly impact bacterial growth or adhesion. However, it led to notable decreases in cell invasion, proliferation, and colonization in the liver and spleen, ultimately diminishing the pathogenicity in mice. [Conclusion] The LPXTG-anchored protein Lmo0880 plays a crucial role in bacterial invasion, proliferation, and colonization in a host. These findings provide a solid foundation for deeply understanding the pathogen-host interaction during *L. monocytogenes* infection.

Keywords: *Listeria monocytogenes*; LPXTG-anchored protein Lmo0880; host infection

单核细胞增生李斯特菌 (*Listeria monocytogenes*) 简称单增李斯特菌, 是一种食源性的胞内人兽共患病原菌, 也是引起单增李斯特菌病的重要病原^[1]。当摄入受污染的食物后, 单增李斯特菌会穿过肠道上皮屏障, 通过淋巴和血液向肝脏和脾脏传播, 甚至突破血脑屏障或孕妇的胎盘屏障, 导致脑膜炎、脑膜脑炎、流产或新生儿败血症的发生, 其引起的病死率高达 20%–30%^[2]。在侵染宿主时, 单增李斯特菌进入非吞噬细胞(如上皮细胞)后被内化到吞噬泡中,

然后迅速诱导吞噬泡裂解从而进入到营养丰富的宿主胞质环境中, 并在宿主细胞质内完成增殖, 随后聚合肌动蛋白 ActA 形成“彗星尾”进而在细胞间传播^[3-4]。单增李斯特菌通过表达多种毒力因子实现该感染机制, 例如: 参与细胞黏附过程的自溶素 Ami^[5]、肌动蛋白 ActA^[6]、纤连蛋白结合蛋白 FbpA^[7]和李斯特菌黏附蛋白 Lap^[8]; 参与细胞侵袭过程的内化素 InlA^[9]、InlB^[9]、Vip^[10]和自溶素 Auto^[11]; 参与吞噬泡逃逸过程的李斯特菌溶血素 LLO^[12]、磷酸酯酶 PlcA 和 PlcB^[13-14];

参与细胞内运动和细胞间传播过程的 ActA^[15-16] 等。这些毒力因子大多是由细菌表面蛋白组成, 可见表面蛋白在细菌感染过程中参与细胞黏附、细胞入侵和免疫逃逸等至关重要的环节。在李斯特菌属中, 这些表面蛋白可分为三类: (1) 通过羧基末端 LPXTG 和 NAKTN/NPKSS 锚定基序与肽聚糖共价结合的表面蛋白, 分别由分选酶 A (sorting enzyme A, SrtA) 和分选酶 B (sorting enzyme B, SrtB) 识别^[17-19]; (2) 通过羧基末端 GW 结构域、疏水尾蛋白和类 P60 (P60-like) 蛋白与肽聚糖非共价结合的表面蛋白; (3) 通过氨基末端区域连接到表面的脂蛋白^[20]。在单增李斯特菌 EGD-e 的全基因组中发现 41 个编码 LPXTG 蛋白的基因和 2 个编码 NAKTN/NPKSS 蛋白的基因^[20-21], 其中包括重要毒力因子 InlA^[9,22]、Vip^[10] 和 LapB^[23] 等。Doumith 等^[24] 和 Hain 等^[25] 通过比较基因组学研究发现, 约 1/3 的致病性李斯特菌携带的 LPXTG 蛋白无法在非致病性李斯特菌中被检索到。说明 LPXTG 蛋白可能和李斯特菌的致病力有关, 然而目前许多 LPXTG 蛋白的生物学功能并未明确。

本研究前期通过生物信息学分析可知, Lmo0880 是一个功能未知的表面蛋白, 羧基端带有 LPXTG 锚定基序和与肽聚糖结合相关的 LysM 结构域, 提示该蛋白可能与宿主感染过程有关。因此, 本研究以单增李斯特菌 EGD-e 为参考菌株, 通过构建 *lmo0880* 的基因缺失菌株和回补菌株, 并比较 3 种菌株在生长和对宿主致病力等方面的差异, 为进一步解析 Lmo0880 在单增李斯特菌感染致病中的作用和机制奠定理论基础。

1 材料与方法

1.1 菌株、质粒、细胞和培养条件

单增李斯特菌参考菌株 EGD-e 及本研究构

建的基因缺失菌株 $\Delta lmo0880$ 和回补菌株 $C\Delta lmo0880$ 均由本实验室保存。所有单增李斯特菌菌株均培养于牛脑心浸出液肉汤培养基 (brain heart infusion, BHI) 中, 除特殊说明外, 以上菌株培养条件为 37 °C 振荡或静置培养。

温敏型穿梭质粒 pKSV7 和整合型穿梭质粒 pIMK2 均为本实验室保存。

人肠上皮细胞 Caco-2、小鼠巨噬细胞 RAW264.7 和小鼠成纤维细胞 L929 均为本实验室保存。Caco-2 细胞培养于添加 10% 胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS) 的 RPMI 1640 培养基中; RAW264.7 细胞和 L929 细胞培养于添加 10% FBS 的 Dulbecco 改良的 Eagle 培养基 (Dulbecco's modified eagle medium, DMEM) 中, 上述细胞均在含有 5% CO₂、37 °C 的细胞恒温培养箱中静置培养。

1.2 主要试剂

BHI 和 LB 培养基购自 Oxoid 公司; RPMI 1640 培养基、DMEM 培养基、胰酶 (trypsin-EDTA, 0.25%) 和 FBS 购自 ThermoFisher Scientific 公司; 分子克隆用的 KOD-plus-Neo PCR 酶和 DNA 连接酶 Ligation high ver. 2 购自 TOYOBO 公司; 限制性内切酶购自 NEB 公司; 质粒快速提取试剂盒和 PCR 产物回收/纯化试剂盒购自上海惠凌生物技术有限公司。本研究所用化学试剂均为国产分析纯。

1.3 引物

本研究所涉及引物见表 1。

1.4 $\Delta lmo0880$ 缺失菌株的构建和筛选

从 NCBI GenBank 数据库中获取单增李斯特菌 EGD-e 菌株 (GenBank 登录号: NC_003210.1) 的基因组序列, 用 SnapGene 设计引物 *lmo0880*-up-F/R 和 *lmo0880*-down-F/R 分别扩增 *lmo0880* 基因的上、下游同源臂, 再通过重叠 PCR 获得用于同源重组的上下游同源臂融合片段。融合

表 1 引物序列信息

Table 1 Primers used in this study

Primers	Sequences (5'→3')
<i>lmo0880</i> -up-F	CCCAAGCTTATGAATGCATTCATGGTCGCA
<i>lmo0880</i> -up-R	TTTGGCGTCCAAATGTAACCAGCCATCTTTTTTTCATTTT
<i>lmo0880</i> -down-F	AAAAGATGGCTGGTTACATTTGGACGCAAAAGTTAAAGA
<i>lmo0880</i> -down-R	CCGGAATTCGTCGCTAACTTTAAACTGGCTTCC
<i>lmo0880</i> -front-F	AACTTCAATCTTCCGTTGCAGC
<i>CΔlmo0880</i> -F	TGGGGATCGGAATTCGAGCTCAGAACCTGATACTTACTGGATTCGTG
<i>CΔlmo0880</i> -R	ATCGAATTCCTGCAGCCCCGGGTTAACTTTTGGCGTCCAAATGTAAACA
<i>lmo0880</i> -inner-F	AACAAGGTGCAATGGATGATAAAGACT
<i>lmo0880</i> -inner-R	GCTGGCGGTGTTCTCTGT
<i>lmo0880</i> -outer-F	GATCCAAAAGAGATATGTTTCGAAACATTAGAAGCA
<i>lmo0880</i> -outer-R	TTTACATTAGCTAATTTGCAACCTGGAAATAATTTAGT

片段经限制性内切酶 *Hind* III 和 *Eco*R I 双酶切后克隆至温敏型穿梭质粒 pKSV7 中, 获得重组质粒 pKSV7_ *lmo0880*, 将其命名为 pSL2653。将重组质粒 pSL2653 电转至单增李斯特菌 EGD-e 感受态中, 通过温度和 Cm^r (10 μg/mL) 抗性双重选择压力下进行同源重组克隆的筛选, 随后用引物 *lmo0880*-front-F/*lmo0880*-down-R 对筛选出的重组克隆进行 PCR 和测序双重验证, 最终获得缺失菌株 *Δlmo0880*。

1.5 *CΔlmo0880* 回补菌株的构建和筛选

通过 BioCyc 数据库查明 *lmo0880* 基因为单转录本。因此, 用 SnapGene 设计特异性引物 *CΔlmo0880*-F/R, 并以单增李斯特菌 EGD-e 为模板, PCR 扩增 *lmo0880* 基因编码序列(coding sequence, CDS)编码区和上游启动子序列。随后将该序列用限制性内切酶 *Sac* I 和 *Sma* I 双酶切后克隆到 pIMK2 穿梭质粒上, 经筛选后获得重组质粒 pIMK2-*lmo0880*, 命名为 pSL2659。将重组质粒 pSL2659 电转至缺失菌株 *Δlmo0880* 感受态中, 用含有 Kana^r (50 μg/mL) 抗性的 LB 固体培养基进行抗性筛选。随后对筛选出的疑似菌株进行菌落 PCR 和测序双重验证后, 获得回补菌株 *CΔlmo0880*。

1.6 生长曲线的绘制和菌落计数

分别挑取单增李斯特菌 EGD-e、*Δlmo0880* 和 *CΔlmo0880* 单菌落, 接种到 5 mL BHI 肉汤培养基中, 37 °C、200 r/min 培养过夜。取过夜培养的菌液 1:100 转接至新鲜 BHI 培养基中, 取 200 μL 稀释后的菌液加入到 96 孔板中, 然后置于 37 °C 恒温培养箱中静置培养, 此时记为 0 h, 然后每隔 1 h 用多功能酶标仪 Synergy™ H1 测定波长 600 nm 处的吸光值(*OD*₆₀₀)。每个菌株设置 3 个重复。取上述过夜培养的菌液 1:100 转接至 15 mL 新鲜 BHI 培养基中, 置于 37 °C、200 r/min 培养 4、5 和 6 h 时, 分别取 100 μL 菌液稀释涂板进行菌落计数。所有结果用 GraphPad Prism 8.0 进行数据处理。

1.7 细菌黏附与侵袭增殖试验

取 1 mL 过夜培养的单增李斯特菌 EGD-e、*Δlmo0880* 和 *CΔlmo0880* 菌液 1:100 转接到新鲜培养基中, 培养至 *OD*₆₀₀ 为 0.6 左右, 然后用 10 mmol/L PBS 洗涤 2 次后用 RPMI 1640 细胞培养基倍比稀释菌液, 最终以感染复数 (multiplicity of infection, MOI)=10 感染人肠上皮细胞 Caco-2 (细胞密度约为 2×10⁵ 个/mL)。黏附: 37 °C、5% CO₂ 感染 30 min, 用 10 mmol/L PBS 洗涤 3 次细胞, 每孔加入预冷的胰酶裂解

10 min, 充分吹打混匀裂解细胞后进行稀释计数; 侵袭: 37 °C、5% CO₂感染 1.5 h 后, 加入含终浓度 50 μg/mL 庆大霉素的 RPMI 1640 细胞培养基, 在 37 °C、5% CO₂条件下培养 30 min, 利用庆大霉素杀死胞外细菌, 随后裂解细胞并稀释涂板从而对胞内细菌进行计数, 处理方法同上。所有结果用 GraphPad Prism 8.0 进行数据处理。

1.8 胞内增殖试验

单增李斯特菌作为一种侵袭性细菌病原体, 能够在许多宿主细胞(包括巨噬细胞、肠上皮细胞和肝细胞)内增殖^[26], 且越来越多的研究表明巨噬细胞是控制单增李斯特菌感染的关键^[27], 因此本研究选择 RAW264.7 细胞进行胞内增殖试验。取 1 mL 过夜培养的单增李斯特菌 EGD-e、 $\Delta lmo0880$ 和 $C\Delta lmo0880$ 菌液 1:100 转接到新鲜培养基中, 培养至 OD_{600} 为 0.6 左右, 然后用 10 mmol/L PBS 洗涤 2 次后用 DMEM 培养基倍比稀释菌液, 最终以 MOI=10 感染小鼠巨噬细胞 RAW264.7 (细胞密度约为 2×10^5 个/mL)。在感染后 30 min 用添加 50 μg/mL 庆大霉素的 DMEM 培养基 37 °C 处理细胞 30 min 以杀灭胞外细菌。处理后用 10 mmol/L PBS 洗涤细胞 3 次, 随后用添加 5 μg/mL 庆大霉素的 DMEM 培养基 (添加 10% FBS) 继续培养 2、5 和 8 h, 记为感染 3、6 和 9 h。取上述不同处理时间的细胞进行细胞裂解后对胞内细菌进行胞内细菌计数。所有结果用 GraphPad Prism 8.0 进行数据处理。

1.9 细菌空斑试验

鉴于 L929 细胞形态为成纤维细胞样, 贴壁生长, 易于形成较致密的单层细胞, 且该状态能维持较长时间, 因此采用该细胞系进行细菌空斑试验。取 1 mL 过夜培养的单增李斯特菌 EGD-e、 $\Delta lmo0880$ 和 $C\Delta lmo0880$ 菌液 1:100 转接到新鲜 BHI 培养基中培养至 OD_{600} 为 0.6 左右, 以 MOI=0.2 感染小鼠成纤维细胞 L929 (细

胞密度约为 1×10^6 个/mL)。感染细胞置于 37 °C、5% CO₂条件下培养 1 h, 培养过程中每隔 15 min 水平晃动培养板 1 次, 使细菌分布均匀; 10 mmol/L PBS 洗涤细胞 3 次, 加入含终浓度 50 μg/mL 庆大霉素的 DMEM 细胞培养基, 37 °C、5% CO₂继续培养 1 h 杀灭胞外细菌; 覆盖琼脂: 10 mmol/L PBS 洗涤细胞 3 次, 加入 3 mL 含终浓度为 0.7% 的低熔点琼脂糖和 10 μg/mL 庆大霉素的无酚红 DMEM (含 10% FBS) 细胞培养基, 待琼脂凝固后, 将 6 孔板倒置于 37 °C (含 5% CO₂) 细胞培养箱中继续培养 3 d 直至出现空斑。固定与染色: 每孔加入 600 μL 40% 甲醛溶液置于 37 °C 培养箱固定 2 h, 倒扣掉琼脂, 每孔加入 600 μL 0.5% 的结晶紫溶液染色 10 min, 随后用 ddH₂O 冲洗后测量空斑大小。所有结果用 GraphPad Prism 8.0 进行数据处理。

1.10 细菌存活和组织定殖试验

取 1 mL 过夜培养的单增李斯特菌 EGD-e、 $\Delta lmo0880$ 和 $C\Delta lmo0880$ 菌液用 10 mmol/L PBS 调整至 OD_{600} 为 0.6 左右 (约 1×10^9 CFU/mL), 并连续 2 次 10 倍比稀释备用。将 48 只 6 周龄 ICR 小鼠 (动物伦理编号: ZAFUAC2023035) 平均分成 6 组, 8 只/组, 每只 ICR 小鼠腹腔注射 200 μL 稀释后菌液 (约 1×10^6 CFU/mL), 在小鼠感染后的 24 h 分离小鼠脾脏 (spleen) 和肝脏 (liver), 加入 10 mmol/L PBS 后用均质仪匀浆并稀释点板计数。另取 30 只 ICR 小鼠, 分成 3 组, 10 只/组, 用同样的方法与剂量感染小鼠, 感染后每隔 12 h 对各组小鼠进行存活统计, 一共观察 7 d, 用 GraphPad Prism 8.0 软件对上述组织载菌量和小鼠存活的结果进行统计分析。

2 结果与分析

2.1 单增李斯特菌 LPXTG 蛋白 Lmo0880 的生物信息学分析

LPXTG 蛋白可被分选酶 SrtA 识别并与细菌

肽聚糖共价结合，从而锚定到细胞壁上。通过 MEME/MAST (<http://meme-suite.org/tools/mast>) 在单增李斯特菌 EGD-e 中检索到 LPXTG 蛋白 Lmo0880。通过 NCBI 的 CD search (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>) 结构域预测发现 Lmo0880 羧基端带有 LPNTG 锚定基序(433–437 aa)和与肽聚糖结合相关的 LysM 结构域(292–416 aa) (图 1A)。通过 Uniprot 蛋白质数据库(<https://www.uniprot.org/>)预测 Lmo0880 是一个功能未知的细胞壁蛋白，在该数据库中链接的 AlphaFoldDB 三维结构预测中发现 Lmo0880 (AlphaFoldDB 登录号: Q8Y8L7) 的 LysM 结构域具有高度保守的 $\beta\alpha\alpha\beta$ 二级结构，其中 2 条 β 折叠链(353–359 aa 和 396–402 aa)形成反向平行的 β 片，然后 2 条 α 螺旋(366–373 aa 和 377–384 aa)折叠到 β 片的同侧(图 1B)。

2.2 单增李斯特菌 *lmo0880* 基因缺失菌株和回补菌株的构建

以单增李斯特菌 EGD-e 基因组为模板扩增出 *lmo0880* 的大小为 500 bp 的上、下游同源臂(图 2A, 泳道 1 和 2)，并通过重叠 PCR (overlap PCR) 将上、下游同源臂融合成大小为 1 000 bp 的同源臂片段(图 2A, 泳道 3)，然后将其克隆至 pKSV7 穿梭质粒中，通过菌落 PCR (图 2B, 泳道 1) 和测序验证，表明成功获得构建 *lmo0880* 缺失的重组质粒 pSL2653。同样以单增李斯特菌 EGD-e 基因组为模板扩增出 *lmo0880* 的大小为 1 798 bp 的 *lmo0880* 及其上游启动子区的基因片段(图 2B, 泳道 2)，并将其克隆至 pIMK2 穿梭质粒中，通过菌落 PCR (图 2B, 泳道 3) 和测序验证，表明成功获得构建 *lmo0880* 回补的重组质粒 pSL2659。

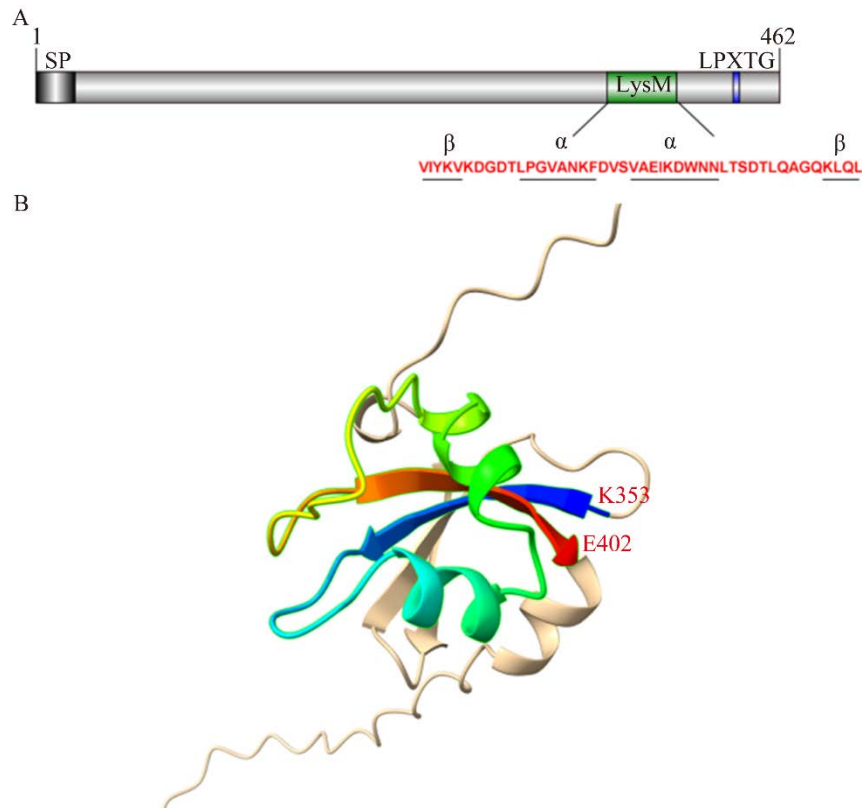


图 1 Lmo0880 的结构预测 A: 结构域预测. B: 三维结构模型预测

Figure 1 The structure prediction of protein Lmo0880. The predicted features (A) and three dimensional structure (B) of Lmo0880.

利用 *lmo0880* 的内外部引物 *lmo0880*-outer-F/R 与 *lmo0880*-inner-F/R 对 EGD-e、筛选出的 *lmo0880* 基因缺失株和回补株进行 PCR 验证。如图 2C 所示, 当用内部引物扩增时, EGD-e 和 C Δ *lmo0880* 在 400 bp 的位置出现目的条带,

而 Δ *lmo0880* 无明显条带; 当用外部引物扩增时, Δ *lmo0880* 和 C Δ *lmo0880* 在 400 bp 的位置出现目的条带, 而野生株在 1 800 bp 的位置出现目的条带, 表明 *lmo0880* 的基因缺失菌株和回补菌株构建成功。

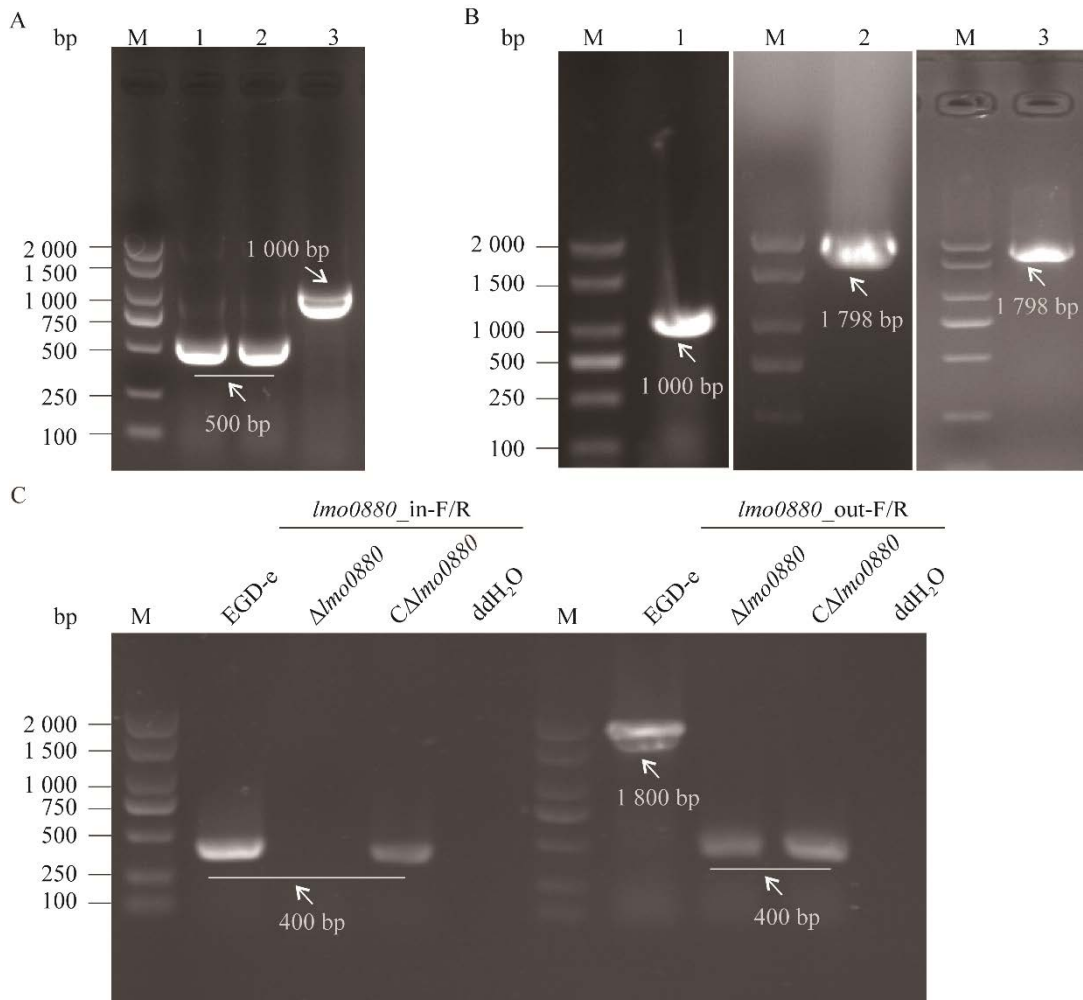


图 2 单增李斯特菌 EGD-e *lmo0880* 基因缺失菌株和回补菌株的构建与 PCR 验证 A: *lmo0880* 基因上、下游同源臂和融合片段的 PCR 扩增. Lane 1: *lmo0880* 的上游同源臂; Lane 2: *lmo0880* 的下游同源臂; Lane 3: 融合片段. B: 重组质粒 pSL2653 和 pSL2659 菌落 PCR 验证. Lane 1: pSL2653; Lane 2: *lmo0880* 及其上游启动子的 PCR 扩增产物; Lane 3: pSL2659. C: 基因组 PCR 验证 EGD-e、 Δ *lmo0880* 和 C Δ *lmo0880* 菌株; M: Marker

Figure 2 Construction and genome PCR confirmation of *Listeria monocytogenes* EGD-e *lmo0880* gene deletion and complementary strains. A: PCR amplification of up/downstream homologous arm and overlapping fragments of *lmo0880*. Lane 1: Upstream; Lane 2: Downstream; Lane 3: Overlapping fragment. B: Verification of recombinant plasmid pSL2653 and pSL2659 by bacterial colony PCR. Lane 1: pSL2653; Lane 2: PCR amplification of *lmo0880* and its upstream promoter; Lane 3: pSL2659. C: Confirmation of EGD-e, Δ *lmo0880* and C Δ *lmo0880* by genome PCR. M: Marker.

2.3 *lmo0880* 基因的缺失不影响单增李斯特菌的生长

比较单增李斯特菌 EGD-e、 $\Delta lmo0880$ 和 $C\Delta lmo0880$ 在 37 °C 下的生长能力。如图 3 所示, 在 BHI 肉汤培养基中 EGD-e、 $\Delta lmo0880$ 和 $C\Delta lmo0880$ 在 0–12 h 的生长水平没有差异(图 3A)。取对数中期 4–6 h 的菌液进行倍比稀释点板计数, 结果发现, 在 4、5 和 6 h $\Delta lmo0880$ 的菌数分别是 EGD-e 的 1.72 倍($0.01 < P < 0.05$)、1.16 倍($P > 0.05$)和 1.53 倍($0.01 < P < 0.05$), 但是 EGD-e、 $\Delta lmo0880$ 和 $C\Delta lmo0880$ 的菌数 CFU 数

量级相同(图 3B)。综上所述表明单增李斯特菌 *lmo0880* 基因缺失后不影响单增李斯特菌的生长。

2.4 *lmo0880* 基因的缺失使单增李斯特菌在上皮细胞上的侵袭能力显著降低

通过体外感染人肠上皮细胞 Caco-2, 比较单增李斯特菌 EGD-e、 $\Delta lmo0880$ 和 $C\Delta lmo0880$ 的黏附和侵袭能力的差异。在感染 0.5 h 时, EGD-e、 $\Delta lmo0880$ 和 $C\Delta lmo0880$ 的黏附率无显著差异; 在感染 1.5 h 时, $\Delta lmo0880$ 的侵袭率与 EGD-e 和 $C\Delta lmo0880$ 相比分别下降了 19.94% 和 18.04% (图 4A、4B)。表明 *lmo0880* 基因的缺失

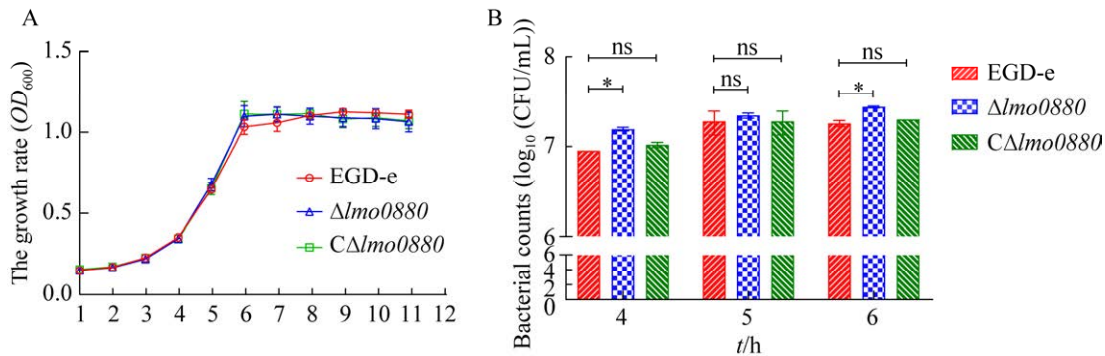


图 3 单增李斯特菌 EGD-e、 $\Delta lmo0880$ 和 $C\Delta lmo0880$ 的生长能力评估 A: 生长曲线. B: 点板计数

Figure 3 The growth abilities of *Listeria monocytogenes* EGD-e, $\Delta lmo0880$ and $C\Delta lmo0880$. A: The growth curve. B: The bacterial counts. *: $0.01 < P < 0.05$; ns: $P > 0.05$.

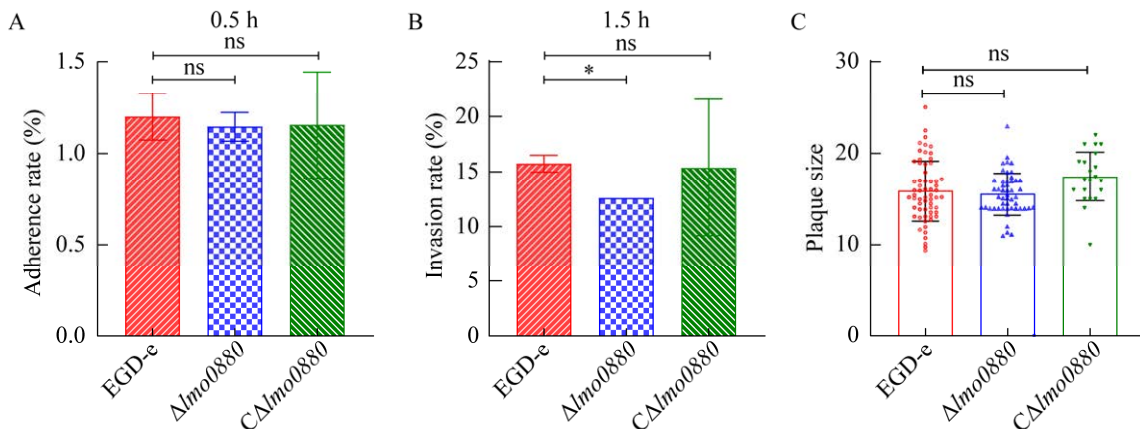


图 4 单增李斯特菌 EGD-e、 $\Delta lmo0880$ 和 $C\Delta lmo0880$ 黏附(A)、侵袭(B)和胞间迁移(C)能力的比较

Figure 4 The adherence (A), invasion (B) and intercellular migration (C) abilities of *Listeria monocytogenes* EGD-e, $\Delta lmo0880$ and $C\Delta lmo0880$ in Caco-2 cells. *: $0.01 < P < 0.05$; ns: $P > 0.05$.

使得单增李斯特菌在人肠上皮细胞 Caco-2 上的侵袭能力显著下降。通过体外感染小鼠成纤维细胞 L929 模型, 比较单增李斯特菌 EGD-e、 $\Delta lmo0880$ 和 $C\Delta lmo0880$ 的胞间迁移能力的差异。EGD-e、 $\Delta lmo0880$ 和 $C\Delta lmo0880$ 的蚀斑大小均无显著差异(图 4C), 可见 *lmo0880* 基因的缺失并不影响单增李斯特菌在小鼠成纤维细胞 L929 中的胞间迁移能力。综上结果表明, *lmo0880* 基因的缺失不影响单增李斯特菌的细胞黏附和胞间迁移能力, 但使其细胞侵袭能力显著降低。

2.5 *lmo0880* 基因的缺失使单增李斯特菌在巨噬细胞中的增殖能力显著降低

通过体外感染 RAW264.7 细胞, 比较单增李斯特菌 EGD-e、 $\Delta lmo0880$ 和 $C\Delta lmo0880$ 在 RAW264.7 细胞中增殖能力的差异。在感染 3 h 时, EGD-e、 $\Delta lmo0880$ 和 $C\Delta lmo0880$ 的增殖率均无显著差异; 在感染 6 h 和 9 h 时, EGD-e 的增殖率分别是 $\Delta lmo0880$ 的 2.43 倍和 1.65 倍, 而 EGD-e 和 $C\Delta lmo0880$ 的增殖率无显著差异(图 5)。表明 *lmo0880* 基因的缺失使得单增李斯特菌在小鼠巨噬细胞 RAW264.7 中增殖能力显著下降。

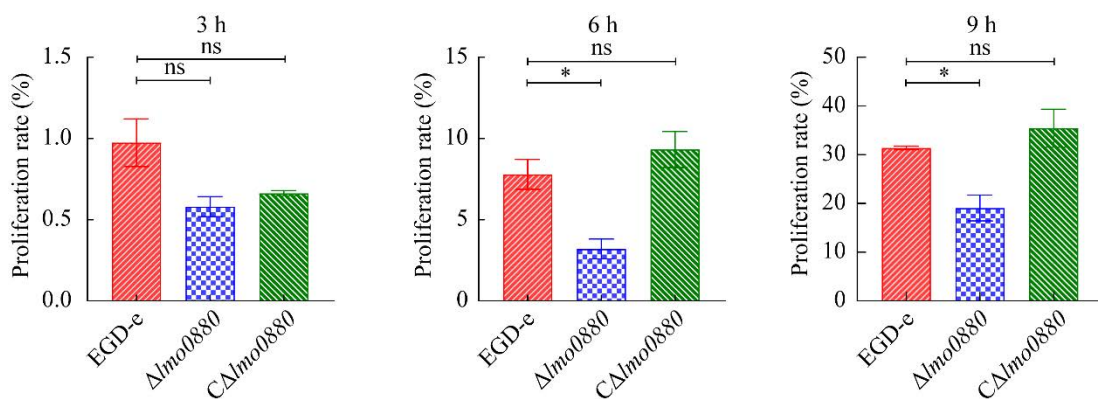


图 5 单增李斯特菌 EGD-e、 $\Delta lmo0880$ 和 $C\Delta lmo0880$ 在 RAW264.7 中的增殖能力的比较

Figure 5 The proliferation abilities of *Listeria monocytogenes* EGD-e, $\Delta lmo0880$ and $C\Delta lmo0880$ in RAW264.7 cells. *: $0.01 < P < 0.05$; ns: $P > 0.05$.

2.6 *lmo0880* 基因的缺失降低了单增李斯特菌对小鼠的致病力

为了探究缺失 *lmo0880* 基因对单增李斯特菌致病力的影响, 将 30 只 ICR 小鼠平均分成 3 组(10 只/组), 分别腹腔注射感染 1×10^6 CFU/mL 的单增李斯特菌 EGD-e、 $\Delta lmo0880$ 和 $C\Delta lmo0880$, 然后每隔 12 h 观察小鼠的存活情况。在感染后 60 h, EGD-e、 $\Delta lmo0880$ 和 $C\Delta lmo0880$ 的存活率分别为 20%、80%和 40%, $\Delta lmo0880$ 在感染后 84 h 时存活率从 70%降至 40%, 而 EGD-e 此时存活率为 0(图 6A)。因此, *lmo0880* 基因缺失使得小鼠感染单增李斯特菌后的存活能力显著升高, 表明 *lmo0880* 基因的缺失降低了单增李斯特菌对小鼠的致病力。进一步通过小鼠组织载菌量试验探究缺失 *lmo0880* 基因后对单增李斯特菌在小鼠中的组织定殖能力的影响。用 EGD-e、 $\Delta lmo0880$ 和 $C\Delta lmo0880$ 分别感染小鼠, 在感染 24 h 后对小鼠肝脏和脾脏进行细菌计数。结果表明, 感染 $\Delta lmo0880$ 的小鼠肝脏载菌量相较于感染 EGD-e 和 $C\Delta lmo0880$ 的小鼠肝脏载菌量分别下降了 8.65%和 4.71%; 感染 $\Delta lmo0880$ 的小鼠脾脏载菌量相较于 EGD-e 和 $C\Delta lmo0880$ 分别下降了 9.12%和 6.10%; 而 EGD-e

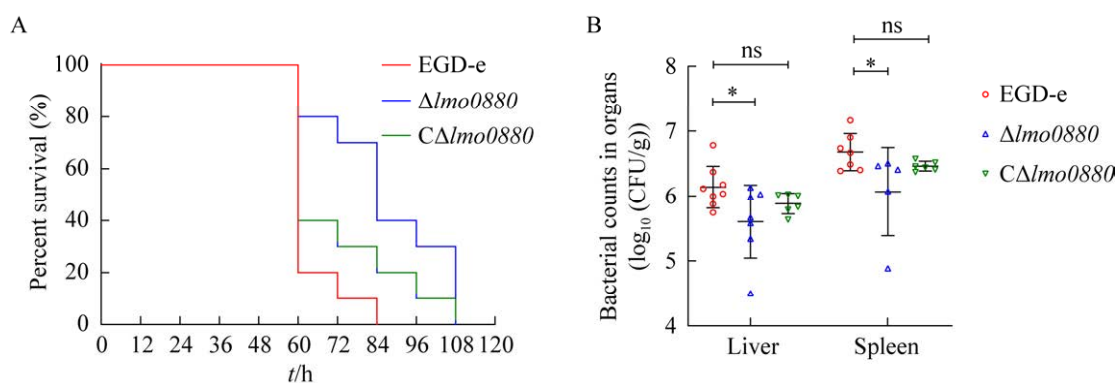


图 6 单增李斯特菌 EGD-e、 $\Delta lmo0880$ 和 $C\Delta lmo0880$ 对小鼠致病力的比较 A: 感染小鼠的存活能力。B: 组织载菌量

Figure 6 The pathogenicity of *Listeria monocytogenes* EGD-e, $\Delta lmo0880$ and $C\Delta lmo0880$ to mice. A: The survival ability of infected mice. B: The bacterial loads in liver and spleen of mice. *: $0.01 < P < 0.05$; ns: $P > 0.05$.

和 $C\Delta lmo0880$ 在肝脏和脾脏中的载菌量无显著差异(图 6B)。这表明单增李斯特菌缺失 *lmo0880* 基因后在小鼠脏器中的定殖能力显著降低。综上所述, *lmo0880* 基因的缺失使单增李斯特菌对小鼠致病力显著减弱。

3 讨论与结论

单增李斯特菌在老人、孕妇、新生儿和免疫力低下者中易感, 感染后引起胃肠炎、致命性脑膜炎、流产或死胎等临床症状, 是食源性疾病中病死率最高的致病菌之一, 严重威胁公共卫生安全^[28-29]。单增李斯特菌通过表达多种毒力相关蛋白侵袭非吞噬细胞, 抵抗巨噬细胞的胞内杀伤, 介导胞内增殖和胞间传递, 逃避体液免疫反应等来实现宿主感染^[20]。表面蛋白对于革兰阳性菌在环境中的存活和宿主感染都是至关重要的, 而 LPXTG 蛋白是表面蛋白的重要组成部分。因此, 本研究构建了功能未知的 LPXTG 蛋白 *Lmo0880* 的基因缺失菌株 $\Delta lmo0880$ 和回补菌株 $C\Delta lmo0880$, 并比较了参考菌株 EGD-e、 $\Delta lmo0880$ 和 $C\Delta lmo0880$ 在生长、细胞感染和小鼠感染等方面的差异, 结

果表明 *Lmo0880* 在单增李斯特菌的细胞侵袭、胞内增殖、组织定殖等过程发挥重要作用, 最终影响感染小鼠的存活能力, 这为解析单增李斯特菌介导宿主感染的机制奠定了重要的理论基础。

本研究通过细胞模型发现 *lmo0880* 基因缺失使单增李斯特菌在人肠道上皮细胞 Caco-2 上的侵袭能力 ($0.01 < P < 0.05$)、小鼠巨噬细胞 RAW264.7 中增殖能力 ($0.01 < P < 0.05$) 和在小鼠组织器官中的定殖能力 ($0.01 < P < 0.05$) 均显著降低, 最终使得 $\Delta lmo0880$ 感染的小鼠存活率升高。该结果表明 LPXTG 锚定蛋白 *Lmo0880* 在单增李斯特菌的细胞侵袭、胞内增殖和组织定殖等感染过程中发挥重要作用。分选酶 SrtA 能够识别含有 LPXTG 基序的蛋白质并锚定在细胞壁上, 与链球菌^[30]、葡萄球菌^[31-32]、肠球菌^[33] 和李斯特菌^[20] 等多种革兰阳性菌的毒力息息相关。*srtA* 基因缺失导致单增李斯特菌的内化素的表达和定位在细菌表面的能力受损, 感染宿主细胞的侵袭能力和对小鼠的致病力显著降低^[34-35]。InlA 是第一个被鉴定的李斯特菌 LPXTG 蛋白, 在跨越肠道和胎盘屏障中起着关键作用^[36-38]。

另一个 LPXTG 蛋白 Vip 能够与宿主 gp96 相互作用, 该机制是单增李斯特菌侵袭哺乳动物细胞和发挥毒力所必需的^[10]。LPXTG 蛋白 InlJ 是单增李斯特菌在宿主体内感染时特异性表达的黏附素, 也是该菌发挥完整毒力的必需因子^[39]。LPXTG 表面蛋白 LapB 是一种黏附素, 对于单增李斯特菌侵袭哺乳动物细胞和人工感染小鼠中的致病力具有重要意义^[23]。李斯特菌侵袭素 LmiA (Lmo1413) 通过促进细菌与宿主黏蛋白的相互作用, 从而介导细菌的侵袭^[40]。因此 LPXTG 蛋白在单增李斯特菌宿主感染方面的作用和机制值得进一步探索。

通过氨基酸序列分析发现假定细胞壁蛋白 Lmo0880 含有 LysM 结构域和 LPXTG 锚定基序 (图 1)。LysM 是一个高度保守的碳水化合物结合结构域, 存在于动物、植物和微生物等几乎所有生物体中 (除古生菌以外), 可特异性识别含有 N-乙酰氨基葡萄糖 (N-acetylglucosamine, GlcNAc) 残基的多糖, 如细菌细胞壁上的肽聚糖。碳水化合物识别与许多重要的生物学过程有关, 如细菌细胞壁降解^[41-42]、细菌和病毒与宿主相互作用^[43]、病原体免疫应答调节^[44-45]和信号转导^[46-47]等。原核生物中的多个蛋白质都含有高度保守的 LysM 结构域 (1-12 个不等); 多个 LysMs 通常呈间隔排列, 并主要位于蛋白质的末端。LysM 结构域也是肽聚糖水解酶中最常见的结构域^[48], 该结构域以非共价方式与细菌细胞壁的肽聚糖结合^[49-51]。在单增李斯特菌中, 有 6 种蛋白携带 1-4 个 LysMs 结构域, 包括 MurA、P60、Lmo1941、Lmo0880、Lmo1303 和 Lmo2522^[21]。自溶素 MurA 和 P60 不仅有 LysM 结构域, 还存在降解细胞壁的酶活性结构域, 通过降解细菌细胞壁介导细胞生长、分裂和致病等重要过程^[52-54]; Lmo1941 仅含有 LysM 结构域, 目前发现与头孢菌素敏感

性有关^[55]; 其余 3 个含 LysM 结构域的蛋白功能未知。对 Lmo0880 结构分析发现其不存在酶活性结构域, 并且与已知的细胞壁水解酶如 MurA、P60、Ami、Auto 和 P45 的序列相似性都较低, 推测 Lmo0880 可能以非共价的方式结合到细胞壁上, 但并不具有细胞壁降解活性, 其 LysM 结构域可能也在 Lmo0880 参与单增李斯特菌的侵袭、胞内增殖和组织定殖等感染过程中起作用。

因此, 本研究通过生物信息学分析、遗传操作技术、细胞模型和动物模型等手段探索了单增李斯特菌假定细胞壁蛋白 Lmo0880 的感染生物学特性, 发现具有 LysM 肽聚糖识别结构域和 LPXTG 锚定基序的蛋白 Lmo0880 在单增李斯特菌感染的侵袭、胞内增殖和组织器官定殖等过程发挥重要作用。该研究为丰富携带 LysM 结构域和 LPXTG 锚定基序的蛋白群的功能注释和进一步解析 Lmo0880 介导细菌感染的机制奠定了重要基础; 也对单增李斯特菌的防控有着重要意义。

参考文献

- [1] KOOPMANS MM, BROUWER MC, VÁZQUEZ-BOLAND JA, van de BEEK D. Human listeriosis[J]. *Clinical Microbiology Reviews*, 2023, 36(1): e0006019.
- [2] RADOSHEVICH L, COSSART P. *Listeria monocytogenes*: towards a complete picture of its physiology and pathogenesis[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2018, 16(1): 32-46.
- [3] PIZARRO-CERDÁ J, COSSART P. *Listeria monocytogenes*: cell biology of invasion and intracellular growth[J]. *Microbiology Spectrum*, 2018, 6(6): GPP3-0013-2018.
- [4] JOHANSSON J, FREITAG NE. Regulation of *Listeria monocytogenes* virulence[J]. *Microbiology Spectrum*, 2019, 7(4): GPP3-0064-2019.
- [5] MILOHANIC E, JONQUIÈRES R, COSSART P, BERCHE P, GAILLARD JL. The autolysin Ami

- contributes to the adhesion of *Listeria monocytogenes* to eukaryotic cells via its cell wall anchor[J]. *Molecular Microbiology*, 2001, 39(5): 1212-1224.
- [6] SUAREZ M, GONZALEZ-ZORN B, VEGA Y, CHICO-CALERO I, VAZQUEZ-BOLAND JA. A role for ActA in epithelial cell invasion by *Listeria monocytogenes*[J]. *Cellular Microbiology*, 2001, 3(12): 853-864.
- [7] DRAMSI S, BOURDICHON F, CABANES D, LECUIT M, FSIHI H, COSSART P. FbpA, a novel multifunctional *Listeria monocytogenes* virulence factor[J]. *Molecular Microbiology*, 2004, 53(2): 639-649.
- [8] WAMPLER JL, KIM KP, JARADAT Z, BHUNIA AK. Heat shock protein 60 acts as a receptor for the *Listeria* adhesion protein in Caco-2 cells[J]. *Infection and Immunity*, 2004, 72(2): 931-936.
- [9] GAILLARD JL, BERCHE P, FREHEL C, GOUIN E, COSSART P. Entry of *L. monocytogenes* into cells is mediated by internalin, a repeat protein reminiscent of surface antigens from Gram-positive cocci[J]. *Cell*, 1991, 65(7): 1127-1141.
- [10] CABANES D, SOUSA S, CEBRIÁ A, LECUIT M, GARCÍA-DEL PORTILLO F, COSSART P. Gp96 is a receptor for a novel *Listeria monocytogenes* virulence factor, Vip, a surface protein[J]. *The EMBO Journal*, 2005, 24(15): 2827-2838.
- [11] CABANES D, DUSSURGET O, DEHOUX P, COSSART P. Auto, a surface associated autolysin of *Listeria monocytogenes* required for entry into eukaryotic cells and virulence[J]. *Molecular Microbiology*, 2004, 51(6): 1601-1614.
- [12] SCHNUPF P, PORTNOY DA. Listeriolysin O: a phagosome-specific lysin[J]. *Microbes and Infection*, 2007, 9(10): 1176-1187.
- [13] VAZQUEZ-BOLAND JA, KOCKS C, DRAMSI S, OHAYON H, GEOFFROY C, MENGAUD J, COSSART P. Nucleotide sequence of the lecithinase operon of *Listeria monocytogenes* and possible role of lecithinase in cell-to-cell spread[J]. *Infection and Immunity*, 1992, 60(1): 219-230.
- [14] WEI ZY, ZENEWICZ LA, GOLDFINE H. *Listeria monocytogenes* phosphatidylinositol-specific phospholipase C has evolved for virulence by greatly reduced activity on GPI anchors[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2005, 102(36): 12927-12931.
- [15] KOCKS C, GOUIN E, TABOURET M, BERCHE P, OHAYON H, COSSART P. *L. monocytogenes*-induced actin assembly requires the *actA* gene product, a surface protein[J]. *Cell*, 1992, 68(3): 521-531.
- [16] LAMBRECHTS A, GEVAERT K, COSSART P, VANDEKERCKHOVE J, van TROYS M. *Listeria* comet tails: the actin-based motility machinery at work[J]. *Trends in Cell Biology*, 2008, 18(5): 220-227.
- [17] BIERNE H, GARANDEAU C, PUCCIARELLI MG, SABET C, NEWTON S, GARCIA-DEL PORTILLO F, COSSART P, CHARBIT A. Sortase B, a new class of sortase in *Listeria monocytogenes*[J]. *Journal of Bacteriology*, 2004, 186(7): 1972-1982.
- [18] BIERNE H, MAZMANIAN SK, TROST M, PUCCIARELLI MG, LIU G, DEHOUX P, JÄNSCH L, PORTILLO FGD, SCHNEEWIND O, COSSART P. Inactivation of the *srtA* gene in *Listeria monocytogenes* inhibits anchoring of surface proteins and affects virulence[J]. *Molecular Microbiology*, 2002, 43(4): 869-881.
- [19] MARISCOTTI JF, PORTILLO FGD, PUCCIARELLI MG. The *Listeria monocytogenes* sortase-B recognizes varied amino acids at position 2 of the sorting motif[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2009, 284(10): 6140-6146.
- [20] CABANES D, DEHOUX P, DUSSURGET O, FRANGEUL L, COSSART P. Surface proteins and the pathogenic potential of *Listeria monocytogenes*[J]. *Trends in Microbiology*, 2002, 10(5): 238-245.
- [21] BIERNE H, COSSART P. *Listeria monocytogenes* surface proteins: from genome predictions to function[J]. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2007, 71(2): 377-397.
- [22] LINGNAU A, DOMANN E, HUDEL M, BOCK M, NICHTERLEIN T, WEHLAND J, CHAKRABORTY T. Expression of the *Listeria monocytogenes* EGD *inlA* and *inlB* genes, whose products mediate bacterial entry into tissue culture cell lines, by PrfA-dependent and-independent mechanisms[J]. *Infection and Immunity*, 1995, 63(10): 3896-3903.
- [23] REIS O, SOUSA S, CAMEJO A, VILLIERS V, GOUIN E, COSSART P, CABANES D. LapB, a novel *Listeria monocytogenes* LPXTG surface adhesin, required for entry into eukaryotic cells and virulence[J]. *Journal of Infectious Diseases*, 2010, 202(4): 551-562.
- [24] DOUMITH M, CAZALET C, SIMOES N, FRANGEUL L, JACQUET C, KUNST F, MARTIN P,

- COSSART P, GLASER P, BUCHRIESER C. New aspects regarding evolution and virulence of *Listeria monocytogenes* revealed by comparative genomics and DNA arrays[J]. *Infection and Immunity*, 2004, 72(2): 1072-1083.
- [25] HAIN T, GHAI R, BILLION A, KUENNE CT, STEINWEG C, IZAR B, MOHAMED W, ABU MRAHEIL M, DOMANN E, SCHAFFRATH S, KÄRST U, GOESMANN A, OEHM S, PÜHLER A, MERKL R, VORWERK S, GLASER P, GARRIDO P, RUSNIOK C, BUCHRIESER C, et al. Comparative genomics and transcriptomics of lineages I, II, and III strains of *Listeria monocytogenes*[J]. *BMC Genomics*, 2012, 13(1): 1-17.
- [26] BERCHE P, GAILLARD JL, RICHARD S. Invasiveness and intracellular growth of *Listeria monocytogenes*[J]. *Infection*, 1988, 16(suppl_2): S145-S148.
- [27] SWANSON JA. The role of the activated macrophage in clearing *Listeria monocytogenes* infection[J]. *Frontiers in Bioscience*, 2007, 12: 2683-2692.
- [28] SILK BJ, DATE KA, JACKSON KA, POUILLOT R, HOLT KG, GRAVES LM, ONG KL, HURD S, MEYER R, MARCUS R, SHIFERAW B, NORTON DM, MEDUS C, ZANSKY SM, CRONQUIST AB, HENAO OL, JONES TF, VUGIA DJ, FARLEY MM, MAHON BE. Invasive listeriosis in the foodborne diseases active surveillance network (FoodNet), 2004–2009: further targeted prevention needed for higher-risk groups[J]. *Clinical Infectious Diseases*, 2012, 54(suppl_5): S396-S404.
- [29] SWAMINATHAN B, GERNER-SMIDT P. The epidemiology of human listeriosis[J]. *Microbes and Infection*, 2007, 9(10): 1236-1243.
- [30] LÖFLING J, VIMBERG V, BATTIG P, HENRIQUES-NORMARK B. Cellular interactions by LPxTG-anchored pneumococcal adhesins and their streptococcal homologues[J]. *Cellular Microbiology*, 2011, 13(2): 186-197.
- [31] MAZMANIAN SK, TON-THAT H, SCHNEEWIND O. Sortase-catalysed anchoring of surface proteins to the cell wall of *Staphylococcus aureus*[J]. *Molecular Microbiology*, 2001, 40(5): 1049-1057.
- [32] SCHNEEWIND O, MISSIAKAS DM. Staphylococcal protein secretion and envelope assembly[J]. *Microbiology Spectrum*, 2019, 7(4): GPP3-0070-2019.
- [33] HENDRICKX APA, WILLEMS RJL, BONTEN MJM, van SCHAIK W. LPxTG surface proteins of enterococci[J]. *Trends in Microbiology*, 2009, 17(9): 423-430.
- [34] GARANDEAU C, RÉGLIER-POUPET H, DUBAIL I, BERETTI JL, BERCHE P, CHARBIT A. The sortase SrtA of *Listeria monocytogenes* is involved in processing of internalin and in virulence[J]. *Infection and Immunity*, 2002, 70(3): 1382-1390.
- [35] MARISCOTTI JF, QUEREDA JJ, PUCCIARELLI MG. Contribution of sortase A to the regulation of *Listeria monocytogenes* LPxTG surface proteins[J]. *International Microbiology*, 2012, 15(1): 43-51.
- [36] LECUIT M, VANDORMAEL-POURNIN S, LEFORT J, HUERRE M, GOUNON P, DUPUY C, BABINET C, COSSART P. A transgenic model for listeriosis: role of internalin in crossing the intestinal barrier[J]. *Science*, 2001, 292(5522): 1722-1725.
- [37] LECUIT M, NELSON DM, SMITH SD, KHUN H, HUERRE M, VACHER-LAVENU MC, GORDON JJ, COSSART P. Targeting and crossing of the human maternofetal barrier by *Listeria monocytogenes*: role of internalin interaction with trophoblast E-cadherin[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2004, 101(16): 6152-6157.
- [38] DISSON O, GRAYO S, HUILLET E, NIKITAS G, LANGA-VIVES F, DUSSURGET O, RAGON M, le MONNIER A, BABINET C, COSSART P, LECUIT M. Conjugated action of two species-specific invasion proteins for fetoplacental listeriosis[J]. *Nature*, 2008, 455(7216): 1114-1118.
- [39] SABET C, TOLEDO-ARANA A, PERSONNIC N, LECUIT M, DUBRAC S, POUPEL O, GOUIN E, NAHORI MA, COSSART P, BIERNE H. The *Listeria monocytogenes* virulence factor InJ is specifically expressed *in vivo* and behaves as an adhesin[J]. *Infection and Immunity*, 2008, 76(4): 1368-1378.
- [40] MARISCOTTI JF, QUEREDA JJ, GARCÍA-DEL PORTILLO F, PUCCIARELLI MG. The *Listeria monocytogenes* LPxTG surface protein Lmo1413 is an invasin with capacity to bind mucin[J]. *International Journal of Medical Microbiology*, 2014, 304(3-4): 393-404.
- [41] BATEMAN A, RAWLINGS ND. The CHAP domain: a large family of amidases including GSP amidase and peptidoglycan hydrolases[J]. *Trends in Biochemical Sciences*, 2003, 28(5): 234-237.

- [42] BIRKELAND NK. Cloning, molecular characterization, and expression of the genes encoding the lytic functions of lactococcal bacteriophage phi LC3: a dual lysis system of modular design[J]. *Canadian Journal of Microbiology*, 1994, 40(8): 658-665.
- [43] BALZARINI J. Large-molecular-weight carbohydrate-binding agents as HIV entry inhibitors targeting glycoprotein gp120[J]. *Current Opinion in HIV and AIDS*, 2006, 1(5): 355-360.
- [44] MIYA A, ALBERT P, SHINYA T, DESAKI Y, ICHIMURA K, SHIRASU K, NARUSAKA Y, KAWAKAMI N, KAKU H, SHIBUYA N. CERK1, a LysM receptor kinase, is essential for chitin elicitor signaling in *Arabidopsis*[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2007, 104(49): 19613-19618.
- [45] BOLTON MD, van ESSE HP, VOSSSEN JH, de JONGE R, STERGIPOULOS I, STULEMEIJER IJE, van den BERG GCM, BORRÁS-HIDALGO O, DEKKER HL, de KOSTER CG, de WIT PJGM, JOOSTEN MHAJ, THOMMA BPHJ. The novel *Cladosporium fulvum* lysin motif effector Ecp6 is a virulence factor with orthologues in other fungal species[J]. *Molecular Microbiology*, 2008, 69(1): 119-136.
- [46] de JONGE R, PETER van ESSE H, KOMBRINK A, SHINYA T, DESAKI Y, BOURS R, van der KROL S, SHIBUYA N, JOOSTEN MHAJ, THOMMA BPHJ. Conserved fungal LysM effector Ecp6 prevents chitin-triggered immunity in plants[J]. *Science*, 2010, 329(5994): 953-955.
- [47] RABINOVICH GA, TOSCANO MA. Turning 'sweet' on immunity: galectin-glycan interactions in immune tolerance and inflammation[J]. *Nature Reviews Immunology*, 2009, 9(5): 338-352.
- [48] VISWESWARAN GRR, DIJKSTRA BW, KOK J. Murein and pseudomurein cell wall binding domains of bacteria and archaea—a comparative view[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2011, 92(5): 921-928.
- [49] STEEN A, BUIST G, LEENHOUTS KJ, EL KHATTABI M, GRIJPSTRA F, ZOMER AL, VENEMA G, KUIPERS OP, KOK J. Cell wall attachment of a widely distributed peptidoglycan binding domain is hindered by cell wall constituents[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2003, 278(26): 23874-23881.
- [50] ECKERT C, LECERF M, DUBOST L, ARTHUR M, MESNAGE S. Functional analysis of AtlA, the major N-acetylglucosaminidase of *Enterococcus faecalis*[J]. *Journal of Bacteriology*, 2006, 188(24): 8513-8519.
- [51] TARAHOMJOO S, KATAKURA Y, SHIOYA S. Expression of C-terminal repeat region of peptidoglycan hydrolase of *Lactococcus lactis* IL1403 in methylotrophic yeast *Pichia pastoris*[J]. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2008, 105(2): 134-139.
- [52] CARROLL SA, HAIN T, TECHNOW U, DARJI A, PASHALIDIS P, JOSEPH SW, CHAKRABORTY T. Identification and characterization of a peptidoglycan hydrolase, MurA, of *Listeria monocytogenes*, a muramidase needed for cell separation[J]. *Journal of Bacteriology*, 2003, 185(23): 6801-6808.
- [53] PILGRIM S, KOLB-MÄURER A, GENTSCHEV I, GOEBEL W, KUHN M. Deletion of the gene encoding p60 in *Listeria monocytogenes* leads to abnormal cell division and loss of actin-based motility[J]. *Infection and Immunity*, 2003, 71(6): 3473-3484.
- [54] SCHMIDT RL, FILAK HC, LEMON JD, POTTER TA, LENZ LL. A LysM and SH3-domain containing region of the *Listeria monocytogenes* p60 protein stimulates accessory cells to promote activation of host NK cells[J]. *PLoS Pathogens*, 2011, 7(11): e1002368.
- [55] KRAWCZYK-BALSKA A, KORSAK D, POPOWSKA M. The surface protein Lmo1941 with LysM domain influences cell wall structure and susceptibility of *Listeria monocytogenes* to cephalosporins[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2014, 357(2): 175-183.