



# 葡萄糖苷转运蛋白 Lmo0738 介导单增李斯特菌毒力的作用研究

沈云勤<sup>1#</sup>, 王建峰<sup>2#</sup>, 应煜<sup>1</sup>, 翁艳岚<sup>1</sup>, 郝云<sup>1</sup>, 黄丽英<sup>1</sup>, 韩月<sup>1</sup>, 孙静<sup>1</sup>, 赵秀玲<sup>2</sup>, 宋厚辉<sup>1</sup>, 徐加利<sup>1\*</sup>, 程昌勇<sup>1\*</sup>

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 315100

沈云勤, 王建峰, 应煜, 翁艳岚, 郝云, 黄丽英, 韩月, 孙静, 赵秀玲, 宋厚辉, 徐加利, 程昌勇. 葡萄糖苷转运蛋白 Lmo0738 介导单增李斯特菌毒力的作用研究[J]. 微生物学报, 2024, 64(8): 2671-2683.

SHEN Yunqin, WANG Jianfeng, YING Yu, WENG Yanlan, HAO Yun, HUANG Liying, HAN Yue, SUN Jing, ZHAO Xiuling, SONG Houhui, XU Jiali, CHENG Changyong. The glucoside transporter Lmo0738 contributes to virulence of *Listeria monocytogenes*[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2024, 64(8): 2671-2683.

**摘要:**【目的】以单增李斯特菌葡萄糖苷转运蛋白 Lmo0738 为研究对象, 研究其介导细菌毒力发挥的生物学作用。【方法】通过细菌同源重组技术构建 *lmo0738* 基因缺失株和回补株, 研究它们在生长、溶血、细胞黏附与侵袭以及胞间迁移等方面与野生株的差异。同时, 采用荧光定量 PCR 和 Western blotting 方法检测  $\Delta lmo0738$  毒力相关基因的转录水平和毒力相关蛋白的表达情况。【结果】缺失 *lmo0738* 后, 李斯特菌体外生长能力、溶血能力、黏附和侵袭能力以及胞间迁移能力均显著减弱, 溶血素 O (listeriolysin O, LLO) 蛋白毒力表达水平和关键毒力基因转录水平均显著降低。【结论】本研究证实缺失 *lmo0738* 能够降低单增李斯特菌毒力, 为完善包括单增李斯特菌在内的重要食源性病原菌磷酸转移酶系统(phosphotransferase system, PTS)糖分解代谢及感染机制奠定了关键基础。

**关键词:** 单增李斯特菌; 葡萄糖苷转运蛋白; 毒力

资助项目: 国家重点研发计划(2023YFD1801800); 国家自然科学基金(32172849, 32302961); 浙江省自然科学基金(LY23C180002); 宁波市自然科学基金(2022J200)

This work was supported by the National Key Research and Development Program of China (2023YFD1801800), the National Natural Science Foundation of China (32172849, 32302961), the Natural Science Foundation of Zhejiang Province (LY23C180002), and the Ningbo Natural Science Foundation (2022J200).

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

\*Corresponding authors. E-mail: CHENG Changyong, lamge@zafu.edu.cn; XU Jiali, xujiali@zafu.edu.cn

Received: 2024-01-05; Accepted: 2024-04-28; Published online: 2024-05-07

# The glucoside transporter Lmo0738 contributes to virulence of *Listeria monocytogenes*

SHEN Yunqin<sup>1#</sup>, WANG Jianfeng<sup>2#</sup>, YING Yu<sup>1</sup>, WENG Yanlan<sup>1</sup>, HAO Yun<sup>1</sup>, HUANG Liying<sup>1</sup>, HAN Yue<sup>1</sup>, SUN Jing<sup>1</sup>, ZHAO Xiuling<sup>2</sup>, SONG Houhui<sup>1</sup>, XU Jiali<sup>1\*</sup>, CHENG Changyong<sup>1\*</sup>

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 315100, Zhejiang, China

**Abstract: [Objective]** To investigate the biological role played by the glucoside transporter Lmo0738 in the virulence of *Listeria monocytogenes*. **[Methods]** The *lmo0738*-deleted mutant ( $\Delta$ *lmo0738*) and complementation mutant (*C* $\Delta$ *lmo0738*) were constructed by homologous recombination. The growth, hemolytic activity, cellular adhesion and invasion, and intracellular migration of the wild type strain and the mutants were assessed by the growth curves, sheep red blood cell hemolysis assay, infection of human epithelial cells (Caco-2), and infection of mouse fibroblastic cells (L929), respectively. Additionally, the mRNA and protein levels of the virulence factor listeriolysin O (LLO) were determined by real-time quantitative reverse transcription PCR (RT-qPCR) and Western blotting, respectively. **[Results]** The *L. monocytogenes* strain with the deletion of *lmo0738* demonstrated weakened growth and diminished hemolytic activity. Notably,  $\Delta$ *lmo0738* exhibited significantly reduced cell adhesion, invasion, and intracellular migration compared with the wild type strain. In addition, the mRNA and protein levels of LLO were significantly down-regulated in  $\Delta$ *lmo0738*. **[Conclusion]** This study provides the evidence that the absence of *lmo0738* attenuates the virulence of *L. monocytogenes*, laying a crucial foundation to illustrate the mechanism of the phosphotransferase system (PTS) in regulating the sugar catabolism and the infection mechanism of major food-borne pathogens including *L. monocytogenes*.

**Keywords:** *Listeria monocytogenes*; glucoside transporter; virulence

单增李斯特菌(*Listeria monocytogenes*, LM)是一种能够在严酷的环境(如低温、氧化、高盐度)中生存的革兰氏阳性、食源性胞内致病菌<sup>[1-3]</sup>,为了在多变环境中生存,细菌可以根据外界可利用营养物质的类型和数量的不同,灵活运用多种转录调节系统,使细胞代谢适应环境变化。磷酸转移酶系统(phosphotransferase system,

PTS)是存在于大多数细菌中的碳水化合物转运系统。PTS主要由组氨酸磷酸载体蛋白(histidine-containing phosphocarrier protein, HPr)、酶I(enzyme I, EI)和酶II(enzyme II, EII)复合物等组成<sup>[4]</sup>。单增李斯特菌 Lmo0738属于EII,它具有碳水化合物特异性<sup>[5]</sup>。碳水化合物在生物体内含量丰富,是病原体的重要碳源,也是微

生物引发不同致病反应的信号。例如, 肠沙门氏菌(*Salmonella enterica*)使用 L-阿拉伯糖来调节沙门氏菌致病岛 1 中基因的表达, 在全身感染期间调控至关重要的 3 型分泌系统<sup>[6]</sup>。许多真菌病原体依赖于碳水化合物代谢途径(特别是海藻糖)在不同宿主中存活<sup>[7-9]</sup>。*frwC* 编码肺炎克雷伯菌(*Klebsiella pneumoniae*) PTS 系统中的 EII, 能够影响细菌生长、黏性和毒力<sup>[10]</sup>。在革兰氏阴性布鲁氏菌中, 研究发现缺失 *ptsN* 和 *ptsH* 基因(与 PTS 相关)能减弱细菌毒力<sup>[11]</sup>。在革兰氏阳性菌的 PTS 中, HPr 并不具有直接自我磷酸化丝氨酸位点的活性, 需要通过磷酸化蛋白酶转化为活性形式磷酸化丝氨酸位点的磷酸载体蛋白(phosphorylated serine of HPr, P-Ser-HPr)<sup>[12]</sup>。P-Ser-HPr 与碳分解代谢物蛋白 A (catabolite control protein, CcpA)结合<sup>[13]</sup>, 消除碳分解代谢物阻遏(carbon catabolite repression, CCR)。P-Ser-HPr 在作为革兰氏阳性菌碳代谢的关键调节因子的同时, 对特定病原菌的毒力也起着重要影响作用。在不存在糖源诱导的情况下, EII 可参与磷酸化 P-Ser-HPr, 从而改变它们的活性<sup>[14]</sup>。

在单增李斯特菌中, 正调节蛋白 A (positive regulatory factor A, PrfA)是主要的毒力中枢调控蛋白<sup>[15]</sup>之一, 在单增李斯特菌重要毒力基因感染宿主细胞过程中的转录和表达中具有关键作用<sup>[16-17]</sup>。在感染过程中, PrfA 可以调控单增李斯特菌表面蛋白内化素 A (intemalin A, InlA) 和内化素 B (intemalin B, InlB)、溶血素 O (listeriolysin O, LLO)、磷脂酶 A (phospholipase A, PlcA)和磷脂酶 B (phospholipase B, PlcB)、肌动蛋白 A (actin assembly-inducing protein, ActA), 以及包含其他潜在毒力因子在内的约 140 个毒力蛋白的表达<sup>[18]</sup>。在上述毒力蛋白的作用下, 单增李斯特菌得以黏附、侵袭细胞, 逃离吞噬小泡, 进入细胞周质, 感染邻近细胞, 从而在

细胞内运动、定植和增殖。PTS 通过 CCR 途径控制调节 PrfA 的活性<sup>[19]</sup>。PTS 组分中酶的表达水平和 P-Ser-HPr 磷酸化水平会影响 PrfA 表达水平<sup>[20-21]</sup>。当 HPr 转化为 P-Ser-HPr 后, 单增李斯特菌毒力基因转录激活因子 PrfA 活性受到极大抑制<sup>[21]</sup>。

PTS 系统在调节碳氮代谢<sup>[22]</sup>、调控毒力<sup>[23]</sup>、维持金属离子平衡和介导抗应激反应等方面发挥着重要作用<sup>[24]</sup>, 特别重要的是通过调控 PrfA 活性影响细菌的毒力, 而葡萄糖苷转运蛋白 Lmo0738 属于 PTS 系统中重要的磷酸转移酶 EII, 一定程度上在细菌的生理、生存和毒力进程中发挥着重要作用。研究表明, *lmo0738* 影响单增李斯特菌在 D-allose 富集肉汤中的生长速率, 这种影响与糖代谢过程有关<sup>[25]</sup>。然而, 葡萄糖苷转运蛋白 Lmo0738 的生物学功能和分子机制尚不清晰。本研究主要通过 *lmo0738* 基因缺失株与回补株构建、溶血试验及细胞试验等对葡萄糖苷转运蛋白 Lmo0738 在单增李斯特菌中感染生物学功能进行研究, 为后续进一步探究 Lmo0738 介导细菌感染的分子机制与如何通过影响环境适应解析其存在的生物学意义奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 菌株、质粒、培养条件及产物

本研究所用菌株均为本实验室保存。野生株 EGD-c 需要使用牛脑心浸出液(brain and heart infusion broth, BHI)培养, 大肠杆菌(*Escherichia coli*) DH5 $\alpha$  菌株需要使用肉汤培养基(Luria-Bertani, LB)培养, 于 37 °C 恒温培养箱培养。本研究中所使用的抗生素为氨苄霉素(终浓度为 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )、卡那霉素(终浓度为 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )和氯霉素(终浓度为 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )。本研究所用到的传代细胞均为本实验室所有。人肠上皮细胞

(human epithelial cells, Caco-2)使用含有 14%胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)的 1640 培养基(Roswell Park Memorial Institute 1640, RPMI 1640)培养, 小鼠成纤维细胞(mouse fibroblastic cells, L929)使用含有 14% FBS DMEM 培养基(Dulbecco's modified eagle medium, DMEM)培养, 两者均放置于 37 °C细胞培养箱保存。本研究涉及引物见表 1。

### 1.1.2 主要试剂

2×KOD PCR MasterMix, 东洋纺(上海)生物科技有限公司; 限制性核酸内切酶, New England Biolabs 公司; 高浓度质粒小提试剂盒, 南京金斯瑞生物科技有限公司; DNA 纯化试剂盒, 广州艾基生物技术有限公司; RPMI 1640 培养基, 武汉普诺赛生命科技有限公司; DMEM 培养基, 苏州海星生物科技有限公司; FBS,

表 1 本研究所用引物

Table 1 Primers used in this study

Primers name	Sequences (5'→3')	Descriptions	Products (bp)
pSL2624- <i>Pst</i> I-a-fwd	AAA <u>ACTGCAG</u> CTAGGTAACGATGTCTTAA TTTTCGCTGGA	Amplification of the <i>lmo0738</i> upstream homology arm	527
pSL2624-b-rev	GTAAAGCGTATCTTCAGCCAGAATCTCT TTAGCTAGTTTTTGATAATCC		
pSL2624-c-fwd	CTAAAGAGATTCTGGCTGAAGATACGCTT TTAACACCACTACTTTAATATCGAAG	Amplification of the <i>lmo0738</i> downstream homology arm	526
pSL2624- <i>Kpn</i> I-d-rev	CGGG <u>GATACCA</u> ATGTAGGTAATCTTTGATA ATTGCTCTATCTAGCC		
<i>lmo0738</i> -In-1	CAGCAGCAGGTGCACTAGTATAT	Detection interior of <i>lmo0738</i> mutant	0/427
<i>lmo0738</i> -In-2	GCCCATAGCGTGATAAGTTGT		
pSL3943-a	GATCGGAATTCGAGCTAGTATCCTCCTTCT ATGAGTAAACGTTTTTATTACTCTA	Used for complementation of the <i>lmo0738</i> deletion mutant under its native promoter	213
pSL3943-b	GATAATCCATTTCAATTTCCACTCCTTTG AGATAACGATTACT	Used for complementation of the <i>lmo0738</i> deletion mutant under its native promoter	
pSL3943-c	AGTGGAATTTGAAATGGATTATCAAAAA CTAGCTAAAGAGATTCTGG	Used for complementation of the <i>lmo0738</i> gene	1 854
pSL3943-d	CTTGATATCGAATTCCTGCAATTAAGTAC TGGTGTTAAAAGCGTATCTTCATAATTAAC	Used for complementation of the <i>lmo0738</i> gene	
<i>prfA</i> -RT-fwd	TGCGGTCAACTTTTAATCCTG	Used for RT-qPCR	112
<i>prfA</i> -RT-rev	CGATGCCACTTGAATATCCTAACT	Used for RT-qPCR	
<i>plcB</i> -RT-fwd	ATCATACCCTCCAGGCTACCA	Used for RT-qPCR	145
<i>plcB</i> -RT-rev	CGCCCTTTTCGCATTTTC	Used for RT-qPCR	
<i>plcA</i> -RT-fwd	CGAGCAAACAGCAACGATAG	Used for RT-qPCR	94
<i>plcA</i> -RT-rev	CGTGTCTAGTTCTGGGAGTAGTGTA	Used for RT-qPCR	
<i>hly</i> -RT-fwd	TCACATCGTCCATCTATTTGCC	Used for RT-qPCR	97
<i>hly</i> -RT-rev	ATTACCGTTCTCCACCATTC	Used for RT-qPCR	
<i>inlA</i> -RT-fwd	GGTCTCACAAACAGATCTAGACCAAGT	Used for RT-qPCR	122
<i>inlA</i> -RT-rev	GTTGATTATTGCTGAAATTTATTTGTG	Used for RT-qPCR	
<i>inlB</i> -RT-fwd	GAGACTATCACCGTGCCAACG	Used for RT-qPCR	112
<i>inlB</i> -RT-rev	TTTGTGTCCTGTCATCTGTCACAC	Used for RT-qPCR	

The restriction enzyme sites are underlined.

北京缔一生物科技有限公司; 0.25% Trypsin-EDTA, 北京诺为生物技术有限公司; BHI、LB 培养基, OXOID 公司; 本研究所用化学试剂均为国产分析纯。

## 1.2 $\Delta lmo0738$ 缺失株重组质粒的构建

从 NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>) 网站下载 *lmo0738* 基因序列, 参照文献[26]单增李斯特菌缺失株的构建方法, 用 SnapGene 软件设计分别扩增 *lmo0738* 基因缺失的上、下游同源臂引物。以野生株 EGD-e 的全基因组(GenBank 登录号为 NC\_003210.1)为模板, 分别利用引物对 pSL2624-*Pst* I-a-fwd/pSL2624-b-rev 和 pSL2624-c-fwd/pSL2624-*Kpn* I-d-rev 扩增上、下游同源臂, 利用 Overlap PCR 将上、下游同源臂进行融合。PCR 反应体系(50  $\mu$ L): 2 $\times$ KOD PCR MasterMix 25  $\mu$ L, 上、下游引物(10  $\mu$ mol/L)各 1  $\mu$ L, DNA 模板 1  $\mu$ L, ddH<sub>2</sub>O 22  $\mu$ L。PCR 反应条件: 98  $^{\circ}$ C 预变性 3 min; 98  $^{\circ}$ C 变性 5 s, 58  $^{\circ}$ C 退火 5 s, 68  $^{\circ}$ C 延伸 10 s, 35 个循环; 68  $^{\circ}$ C 终延伸 5 min。将融合的同源臂和质粒 pKSV7 进行酶切连接转化, 经 PCR 验证条带大小正确后, 提取质粒送北京擎科生物科技股份有限公司测序, 测序结果正确的质粒命名为 pSL2624。所用引物序列见表 1。

## 1.3 $\Delta lmo0738$ 缺失株的筛选和验证

将测序正确的 pSL2624 质粒电转至野生株 EGD-e 感受态中, 通过温敏型质粒 pKSV7 将同源臂整合至目的基因附近, 添加氯霉素抗性和不同温度(42  $^{\circ}$ C 或 30  $^{\circ}$ C)环境共同刺激进行上、下游同源臂同源重组。利用内部引物(*lmo0738*-In-1/*lmo0738*-In-2)和外部引物(pSL3943-a/pSL3943-d)对筛选出的阳性克隆菌株进行 PCR 验证, 条带大小正确的送北京擎科生物科技股份有限公司测序, 最终通过测序验证正确的阳性菌株为 *lmo0738* 基因缺失株, 并将其命名为  $\Delta lmo0738$ 。

所用引物序列见表 1。

## 1.4 $C\Delta lmo0738$ 回补株的构建

通过 Biocyc (<https://www.biocyc.org>) 网站查询 *lmo0738* 的启动子区所处的位置, 然后通过 Softberry (<http://www.softberry.com/>) 网站预测 *lmo0738* 基因启动子, 以野生株 EGD-e 基因组为模板, 通过 SnapGene 设计引物对 pSL3943-a/pSL3943-b 扩增 *lmo0738* 基因的上游启动子区, 设计引物对 pSL3943-c/pSL3943-d 扩增 *lmo0738* 基因的编码区(coding sequence, CDS)。随后通过 Overlap PCR 使启动子区与 *lmo0738* 基因拼接成目的片段, 将目的片段和 pIMK2 载体进行重组转化, 经 PCR 验证条带大小正确后送北京擎科生物科技股份有限公司测序, 测序正确后命名 pSL3943。将 pSL3943 重组质粒电转至单增李斯特菌  $\Delta lmo0738$  缺失株感受态中, 涂布菌液到带有卡那霉素的 BHI 平板上, PCR 验证目的条带大小正确的 PCR 产物送北京擎科生物科技股份有限公司测序, 测序结果正确的对应菌株即为  $C\Delta lmo0738$  回补株。所用引物序列见表 1。

## 1.5 细菌生长曲线测定

挑取 BHI 固体培养基上的野生株 EGD-e、缺失株  $\Delta lmo0738$  和回补株  $C\Delta lmo0738$  单菌落, 然后分别接种于 BHI 液体培养基中, 在 37  $^{\circ}$ C、200 r/min 振荡条件下培养 12 h, 取 1 mL 菌液, 使用 10 mmol/L PBS 洗涤 2 次, 将菌液浓度调整至  $OD_{600}$  为 0.6, 取菌液按照 1:100 加入到 1 mL 新鲜 BHI 液体培养基中, 振荡混匀, 从中取 200  $\mu$ L 加入到 96 孔板, 计为 0 h 数据, 之后放入 37  $^{\circ}$ C 培养箱培养 12 h, 每隔 1 h 用酶标仪测量  $OD_{600}$  后, 进行细菌生长曲线的绘制。试验数据由 GraphPad Prism 9.0 绘图软件中的 *t* 检验进行统计分析。涉及到的试验结果均进行了 3 次以上平行试验, 数据结果表示为 means $\pm$ SD,  $P < 0.05$  具有统计学意义。

## 1.6 溶血活性试验

细菌培养同 1.5 方法进行操作。取 1 mL 过夜培养菌液, 12 000 r/min 离心 2 min, 取上清与 PBS (含 1 mmol/L 二硫苏糖醇) 等比例混匀, 37 °C 孵育 10 min。在圆底的 96 孔板中第 1 孔加入 200  $\mu$ L 处理后的菌液上清, 然后取 100  $\mu$ L 进行倍比稀释, 共倍比稀释 11 次。分别以 1% Triton-100 和 10 mmol/L PBS 作为阳性对照和阴性对照, 每孔加入 100  $\mu$ L 5% 绵羊红细胞-生理盐水溶液混合, 37 °C 孵育 30 min。孵育完成后, 1 000 r/min 离心 5 min, 离心完成后小心吸出 100  $\mu$ L 转移到新的 96 孔板, 经酶标仪测定  $OD_{550}$ 。试验数据由 GraphPad Prism 9.0 绘图软件进行统计。涉及到的试验结果均进行了 3 次以上平行试验, 数据结果表示为 means $\pm$ SD,  $P < 0.05$  具有统计学意义。

## 1.7 人肠上皮细胞(Caco-2)黏附和侵袭试验

细菌培养与  $OD_{600}$  设置同 1.5 方法进行操作。Caco-2 细胞铺板密度为  $2.5 \times 10^5$  个/mL, 以 MOI=10 感染 Caco-2 细胞。具体步骤参见文献[26]。试验数据由 GraphPad Prism 9.0 绘图软件中的  $t$  检验进行统计分析。涉及到的试验结果均进行了 3 次以上平行试验, 数据结果表示为 means $\pm$ SD,  $P < 0.05$  具有统计学意义。

## 1.8 小鼠成纤维细胞(L929)蚀斑试验

细菌培养与  $OD_{600}$  设置同 1.5 方法进行操作。L929 细胞铺板密度为  $1.2 \times 10^6$  个/mL, 以 MOI=0.2 感染 6 孔细胞板中的 L929 细胞。具体步骤参见文献[26]。试验数据由 GraphPad Prism 9.0 绘图软件中的  $t$  检验进行统计分析。涉及到的试验结果均进行了 3 次以上平行试验, 数据结果表示为 means $\pm$ SD,  $P < 0.05$  具有统计学意义。

## 1.9 毒力蛋白表达水平检测

细菌培养同 1.5 方法进行操作, 将过夜菌液按 1:100 转接至新培养基中, 置于 37 °C 培养

箱内振荡培养。当菌液  $OD_{600}$  到 0.6 左右时, 4 °C、3 700 r/min 离心 20 min 收集菌体, 弃上清。向沉淀中加入 50 mmol/L PBS 涡旋振荡后, 4 °C、3 700 r/min 离心 20 min, 随后加入 1 mL *Listeria* Lysis Buffer, 重悬沉淀, 混匀后加入 5 mm 钨珠。使用均质仪对菌体进行裂解, 裂解后将样品 4 °C、14 000 r/min 离心 5 min, 收集上清。采用 BCA 蛋白定量试剂盒测定全菌蛋白浓度。取 40  $\mu$ g 总蛋白上样, 经 10% SDS-PAGE 2 h, 转膜 1 h, 封闭液封闭 1 h, 洗膜 3 次, 每次 15 min。加入一抗 LLO 兔抗(1:1 000)孵育 2 h, 漂洗步骤同上。加入二抗 P60 兔抗(1:1 000)孵育 50 min, 漂洗步骤同上。之后将辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)化学发光液的 A 液和 B 液按 1:1 比例混合配制成化学发光液, 加入配制好的化学发光液显色, 免疫印迹成像后读取灰度值, 目的蛋白的相对表达量为目的条带与内参条带的平均灰度值的比值。GAPDH 为本研究的内参。试验数据由 GraphPad Prism 9.0 绘图软件中的  $t$  检验进行统计分析。涉及到的试验结果均进行了 3 次以上平行试验, 数据结果表示为 means $\pm$ SD,  $P < 0.01$  具有统计学意义。

## 1.10 毒力基因转录水平检测

细菌培养与  $OD_{600}$  设置同 1.9 方法进行操作之后, 取 6 mL 菌液, 4 °C、3 700 r/min 离心 20 min 收集菌体沉淀。利用 TRIzol 法分别提取 EGD-e、 $\Delta$ lmo0738 和 C $\Delta$ lmo0738 的 RNA, 反转录得到 cDNA。本研究根据 GenBank 中 *inlA*、*inlB*、*plcA*、*plcB*、*prfA* 和 *hly* 基因序列(Gene ID 分别是 985151、986892、987032、987036、987031 和 985502), 采用 Integrated DNA technologies (<https://sg.idtdna.com/scitools/Applications/RealTimePCR/>) 网站设计检测上述基因荧光定量 PCR (real-time quantitative reverse transcription PCR, RT-qPCR) 引物对 *inlA*-RT-fwd/*inlA*-RT-rev、*inlB*-RT-fwd/*inlB*-

RT-rev、*plcA*-RT-fwd/*plcA*-RT-rev、*plcB*-RT-fwd/*plcB*-RT-rev、*prfA*-RT-fwd/*prfA*-RT-rev、*hly*-RT-fwd/*hly*-RT-rev。采用上述引物,通过 RT-qPCR 方法研究 *Lmo0738* 对毒力因子转录水平的影响,所用引物序列见表 1。试验数据由 GraphPad Prism 9.0 绘图软件中的 *t* 检验进行统计分析。涉及到的试验结果均进行了 3 次以上平行试验,数据结果表示为 means±SD,  $P < 0.05$  具有统计学意义。

## 2 结果与分析

### 2.1 $\Delta lmo0738$ 和 $C\Delta lmo0738$ 菌株 PCR 验证

通过同源重组的方法、利用 PCR 验证和 DNA 测序方法验证  $\Delta lmo0738$  缺失株构建是否成功。如图 1A、1B 所示,以 EGD-e 为扩增模板时,利用外部引物对 pSL2624-*Pst* I-a-fwd/pSL2624-*Kpn* I-d-rev PCR 扩增出的目的条带大小为 2 877 bp (图 1A,泳道 1);以  $\Delta lmo0738$  缺失株为扩增模板时,PCR 扩增出的目的条带大

小为 1 053 bp (图 1A,泳道 2)。以 EGD-e 为扩增模板时,利用内部引物对 *lmo0738*-In-1/*lmo0738*-In-2 PCR 扩增出的目的条带大小为 427 bp (图 1B,泳道 1);以  $\Delta lmo0738$  缺失株为扩增模板时,则无扩增条带(图 1B,泳道 2)。将 PCR 产物送至北京擎科生物科技股份有限公司进行测序,测序结果经比对完全正确,表明成功获得基因缺失株  $\Delta lmo0738$ 。

将测序正确的 pSL3943 重组质粒电转到缺失株  $\Delta lmo0738$  感受态,获得带有卡那霉素抗性的阳性克隆,用引物对 pSL-3943-a/pSL-3943-b 扩增出条带大小为 213 bp (图 1C,泳道 1)的启动子区域,用引物对 pSL-3943-c/pSL-3943-d 扩增出条带大小为 1 854 bp (图 1C,泳道 2)的 *lmo0738* 基因目的片段扩增片段,用引物对 pSL-3943-a/pSL-3943-d 扩增出条带大小为 2 086 bp 的目的片段(图 1C,泳道 3),扩增片段大小均与理论值一致,经 DNA 测序比对,表明获得回补株  $C\Delta lmo0738$ 。

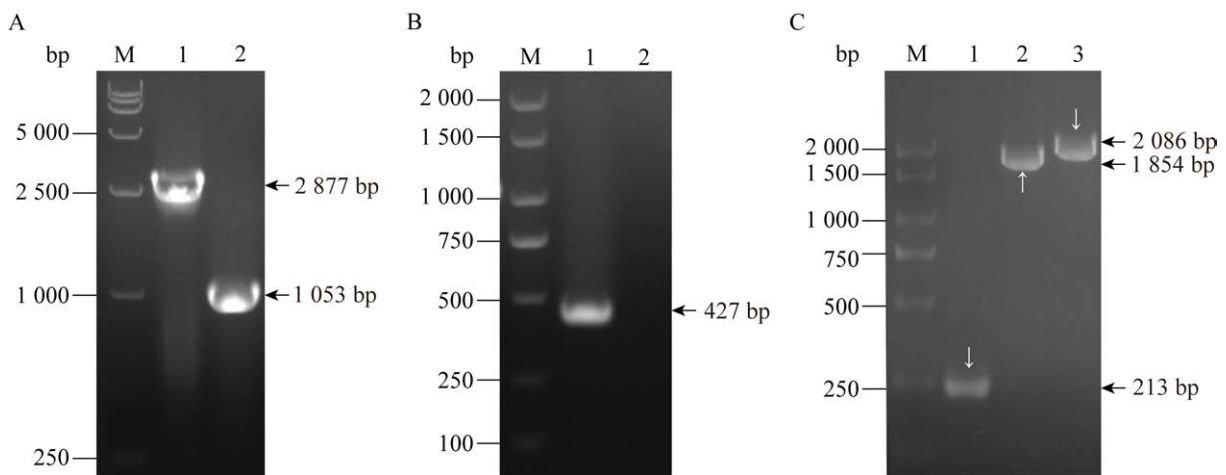


图 1 *lmo0738* 基因缺失株(A、B)和回补株 PCR 验证(C)

Figure 1 Confirmation of *lmo0738* deletion mutant  $\Delta lmo0738$  and the complement strain  $C\Delta lmo0738$  by PCR. A: PCR confirmation of the wild type EGD-e and  $\Delta lmo0738$  mutants by using pSL2624-*Pst* I-a-fwd and pSL2624-*Kpn* I-d-rev primers. M: DL5000 DNA Marker; Lane 1: EGD-e; Lane 2:  $\Delta lmo0738$ . B: PCR confirmation of the wild type EGD-e and  $\Delta lmo0738$  mutants by using *lmo0738*-In-1 and *lmo0738*-In-2 primers. M: DL2000 DNA Marker; Lane 1: EGD-e; Lane 2:  $\Delta lmo0738$ . C: PCR confirmation of the  $C\Delta lmo0738$  mutants by using different primers. M: DL2000 DNA Marker; Lane 1: Promoter region; Lane 2: *lmo0738* gene; Lane 3: *lmo0738* gene and its promoter.



## 2.2 单增李斯特菌缺失 *lmo0738* 基因后体外生长能力检测

对 EGD-e、 $\Delta lmo0738$  和  $C\Delta lmo0738$  进行了 37 °C 培养下的生长曲线测定。结果如图 2 所示，与野生株 EGD-e 相比，缺失 *lmo0738* 基因后单增李斯特菌在对数生长期和平台期生长速率都显著降低 ( $P < 0.01$ )。

## 2.3 单增李斯特菌缺失 *lmo0738* 基因后溶血活性检测

由于单增李斯特菌能够分泌 LLO，因此具有很强的溶血活性。为了验证单增李斯特菌缺失 *lmo0738* 基因是否影响细菌溶血活性，本研究对 EGD-e、 $\Delta lmo0738$  和  $C\Delta lmo0738$  进行了溶血活性比较。结果如图 3A、3B 所示，单增李斯特菌缺失 *lmo0738* 基因后溶血能力降低。

## 2.4 单增李斯特菌缺失 *lmo0738* 基因后黏附侵袭能力检测

单增李斯特菌是一种可以在低 pH 等多种极端条件生存的食源性致病菌，在感染生物体的过程中首先入侵肠道。人源肠上皮细胞(Caco-2)是实验室常用的细胞模型，体外培养时其在形态结构和生化功能上的分化与肠道细胞类似，是

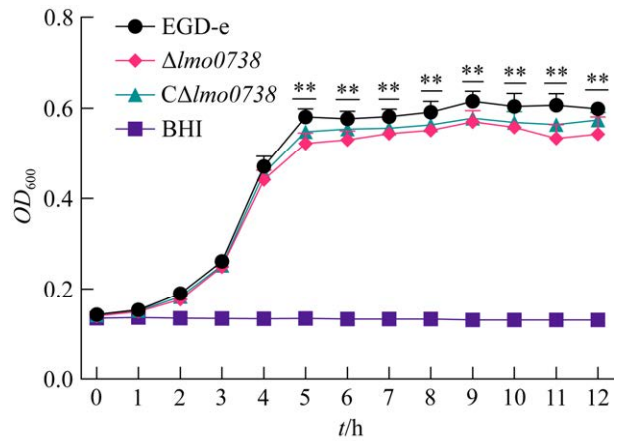


图 2 BHI 液体培养基中野生株 EGD-e、 $\Delta lmo0738$  和  $C\Delta lmo0738$  缺失株生长曲线

Figure 2 Growth curves of wild type EGD-e,  $\Delta lmo0738$ , and  $C\Delta lmo0738$  strains in BHI broth. \*\*:  $P < 0.01$ .

研究单增李斯特菌黏附侵袭能力的良好工具。本研究使用 EGD-e、 $\Delta lmo0738$  和  $C\Delta lmo0738$  分别感染 Caco-2 细胞，从而探究单增李斯特菌在宿主体内侵袭过程中 *Lmo0738* 发挥的作用。结果如图 4 所示，单增李斯特菌感染 Caco-2 细胞 0.5 h 和 1.5 h 后， $\Delta lmo0738$  较 EGD-e 感染细胞的黏附率和侵袭率均显著降低 ( $P < 0.05$ )。

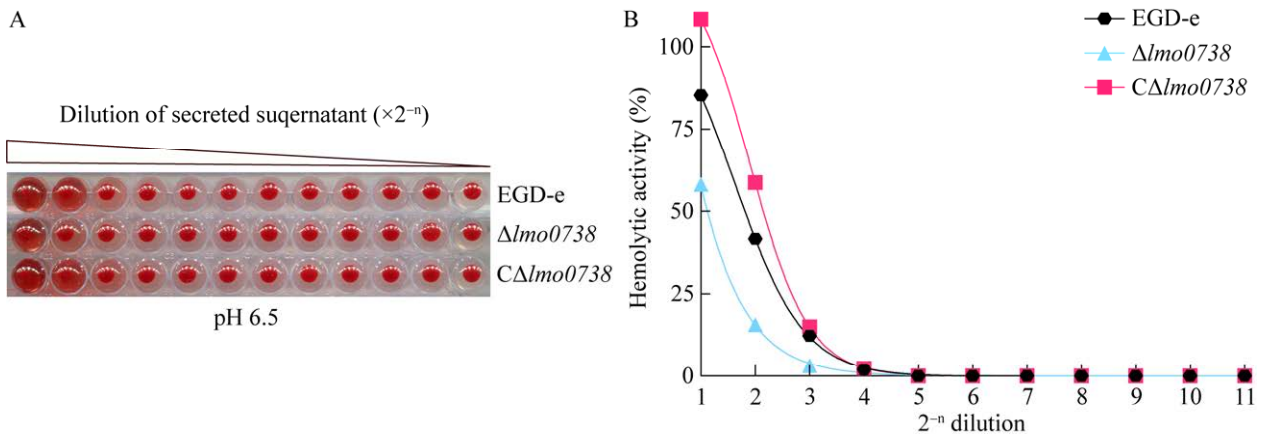


图 3 EGD-e、 $\Delta lmo0738$  和  $C\Delta lmo0738$  菌株在圆底 96 孔板中的溶血活性比较(A)及溶血活性分析(B)  
Figure 3 Comparison of hemolytic activity of wild type EGD-e,  $\Delta lmo0738$ , and  $C\Delta lmo0738$  strains in a round bottom 96-well plate (A) and analysis of hemolytic activity (B).



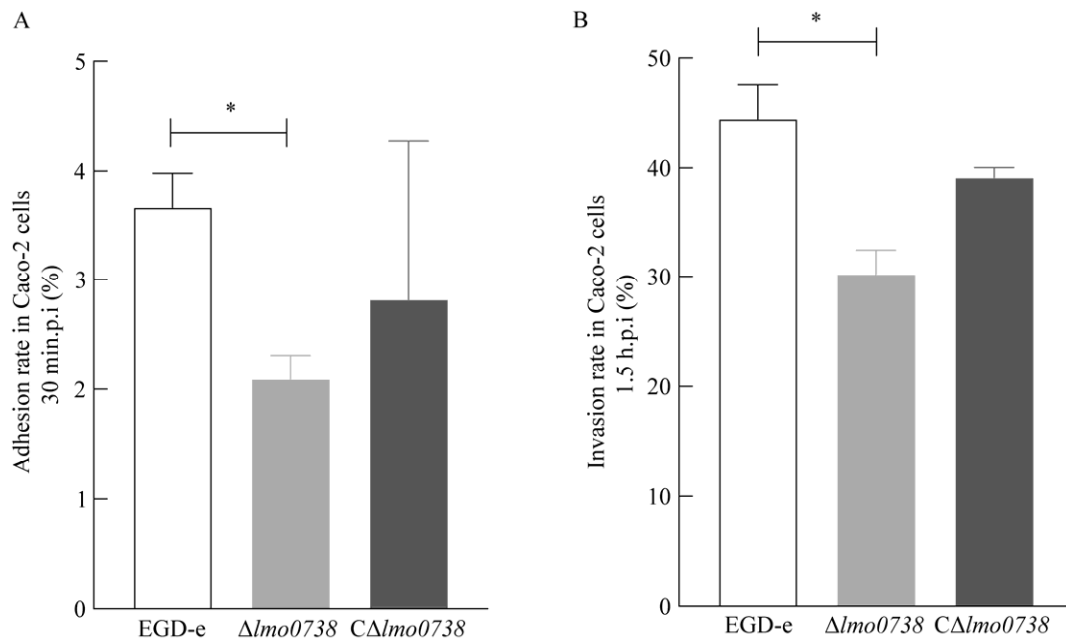


图 4 EGD-e、 $\Delta lmo0738$  和 C $\Delta lmo0738$  菌株感染 Caco-2 细胞后的黏附率(A)和侵袭率(B)

Figure 4 Adhesion (A) and invasion (B) rate of wild type EGD-e,  $\Delta lmo0738$ , and C $\Delta lmo0738$  strains in Caco-2 cells. \*:  $P < 0.05$ .

## 2.5 单增李斯特菌缺失 *lmo0738* 基因后胞间迁移能力检测

将 EGD-e、 $\Delta lmo0738$  和 C $\Delta lmo0738$  这 3 种菌株分别感染小鼠成纤维细胞 L929, 并检测其在细胞间的迁移能力, 结果如图 5 所示,  $\Delta lmo0738$  空斑直径和数量显著小于 EGD-e 和 C $\Delta lmo0738$ , 而  $\Delta hly$  则不形成蚀斑(图 5A)。经统计学分析发现,  $\Delta lmo0738$  空斑直径显著变小( $P < 0.001$ ) (图 5B), 同时,  $\Delta lmo0738$  产生的空斑数量也显著减少( $P < 0.05$ ) (图 5C)。试验结果表明, 缺失 *lmo0738* 基因后单增李斯特菌在 L929 细胞中的胞内增殖能力、胞间迁移能力均显著下降。

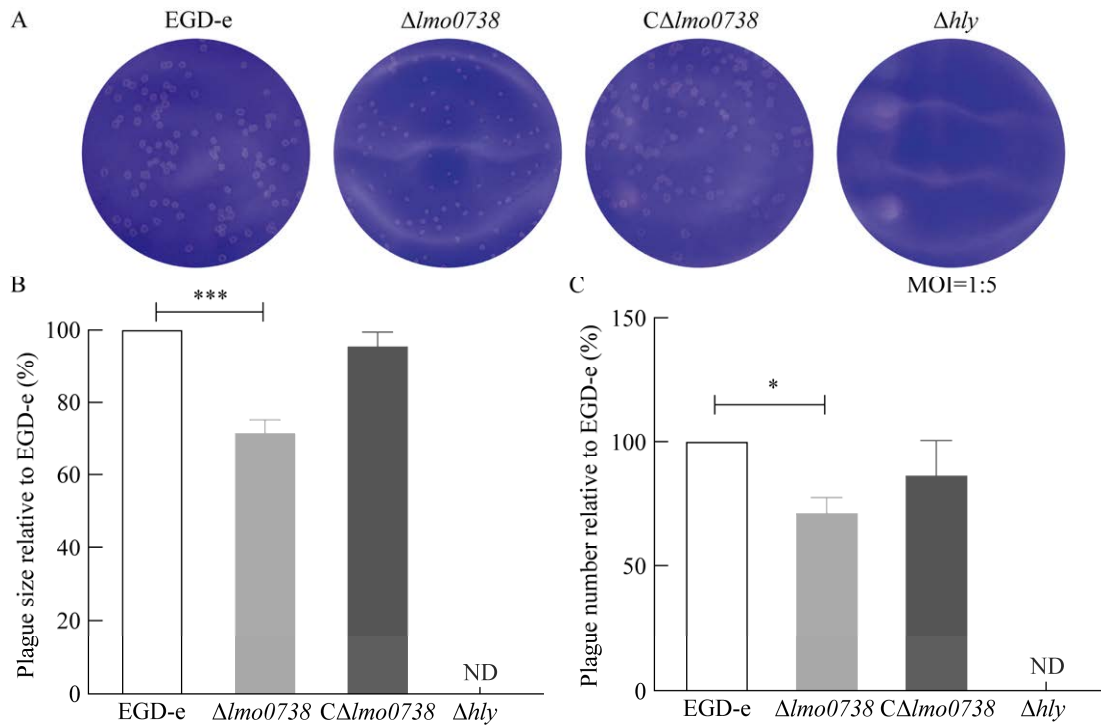
## 2.6 单增李斯特菌缺失 *lmo0738* 基因后 LLO 蛋白表达水平检测

本研究选择了 6 个主要毒力蛋白(InlA、InlB、LLO、PlcA、PlcB 和 PrfA)进行检测。结果如图 6 所示, LLO 在  $\Delta lmo0738$  中的表达水

平显著低于野生株 EGD-e ( $P < 0.001$ ), 解释了图 3 中单增李斯特菌缺失 *lmo0738* 后的溶血能力降低的原因。

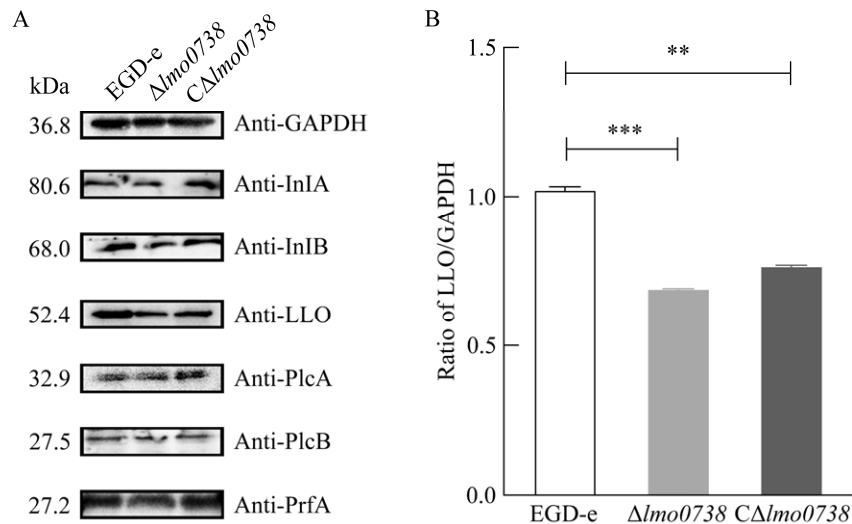
## 2.7 单增李斯特菌缺失 *lmo0738* 基因后毒力基因转录水平检测

为进一步探究单增李斯特菌关键毒力基因转录水平, 本研究以 EGD-e 和  $\Delta lmo0738$  作为研究对象进行实时荧光定量 PCR 检测。结果如图 7 所示,  $\Delta lmo0738$  较 EGD-e、*inlB*、*plcA*、*plcB* 和 *prfA* 基因的转录水平显著降低( $P < 0.05$ ); *hly* 基因的转录水平有降低, 但数据统计分析其差异不显著; *inlA* 基因的转录水平未见明显差异。以上结果表明, 单增李斯特菌缺失 *lmo0738* 基因后, 重要毒力因子相关基因 *plcA*、*inlB*、*plcB* 和 *prfA* 的转录水平降低, 可能是导致细菌在细胞中的黏附、侵袭能力下降的重要因素, 其具体作用机制仍需后续进行研究。



**图 5** EGD-e、 $\Delta lmo0738$ 、 $C\Delta lmo0738$  和  $\Delta hly$  感染 L929 小鼠成纤维细胞后的胞间迁移能力

Figure 5 Plaque assay of wild type EGD-e,  $\Delta lmo0738$ ,  $C\Delta lmo0738$ , and  $\Delta hly$  strains performed using L929 fibroblasts. A: Plaque assay. B: Plaque size assay. C: Plaque number assay. The mutant strain  $\Delta hly$ , which is completely unable to spread during cell infection, was taken as a reference negative control. \*:  $P < 0.05$ ; \*\*\*:  $P < 0.001$ ; ND: No detectable.



**图 6** 缺失 *lmo0738* 基因后对相关毒力蛋白表达水平的影响(A)和灰度分析(B)

Figure 6 Effects of *lmo0738* on expression level of virulence proteins by Western blotting (A) and analysis on grayscale of LLO (B). \*\*:  $P < 0.01$ ; \*\*\*:  $P < 0.001$ .

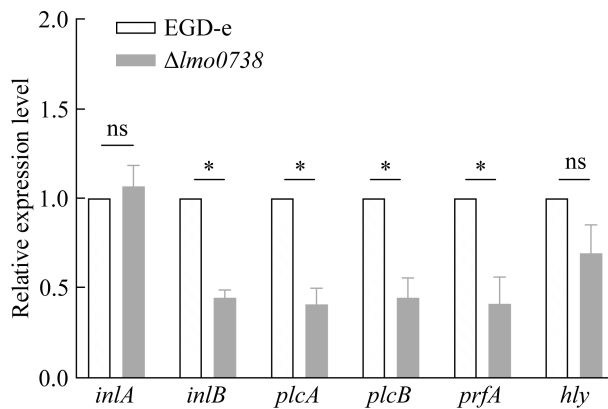


图 7 缺失 *lmo0738* 基因后对毒力相关基因转录的影响

Figure 7 Effects of *lmo0738* on transcriptional changes of virulence genes. \*:  $P < 0.05$ ; ns: No significance.

### 3 讨论与结论

单增李斯特菌之所以能够在各种极端条件下生长,其中一个重要原因是它能够灵活利用各种糖类。在单增李斯特菌中,识别到了迄今为止在细菌物种中数量最多的 PTS 相关基因<sup>[27]</sup>。PTS 系统相关蛋白能够介导细菌毒力,单增李斯特菌将碳源(葡萄糖、果糖等)转运入胞内时,会抑制毒力基因激活因子 PrfA 的作用,从而抑制毒力基因的表达<sup>[23]</sup>。葡萄糖苷转运蛋白 Lmo0738 是 PTS 系统中重要成分。因此,研究 Lmo0738 介导细菌毒力发挥的生物学作用,对深入了解单增李斯特菌 PTS 系统所发挥的生物学功能及意义具有十分重要的作用。

本研究通过构建 *lmo0738* 基因缺失株  $\Delta lmo0738$  和回补株  $C\Delta lmo0738$ ,利用分子生物学和细胞生物学等手段,比较了野生株和缺失株的体外生长能力、溶血活性、细胞黏附、侵袭及胞间迁移能力。单增李斯特菌 InlA 和 InlB 同属于内化素家族,在感染宿主细胞侵袭过程中发挥着重要作用,而缺失 *lmo0738* 基因后,

细菌感染 Caco-2 细胞的黏附和侵袭能力显著降低,表明 *lmo0738* 基因的缺失影响了细菌表面内化素蛋白的转录表达。InlB 含有甘氨酸色氨酸(glycine-tryptophan, GW)结构,可以通过非共价键的形式锚定在细菌的细胞壁上,与 Clq 受体(gClqR)、糖胺聚糖(GAGs)和 Met 结合,促进单增李斯特菌进入宿主细胞<sup>[28-29]</sup>。InlB 与 Met 结合后,能够导致 Met 瞬时磷酸化,招募并磷酸化 Cbl、Gab1、Shc 和 CrkII 等接头蛋白,最终激活 PI3 激酶(PI3K)<sup>[30]</sup>。在正常培养条件下,发现缺失 *lmo0738* 基因后单增李斯特菌 *inlB* 的转录水平显著下降,由此,推测缺失 *lmo0738* 基因后,使 Met 与其接头蛋白磷酸化水平降低,从而降低 *inlB* 转录水平,后续需要进一步开展试验进行验证。

在 L929 小鼠成纤维细胞胞间迁移试验中,胞间迁移和增殖能力显著减弱,这可能由于缺失 *lmo0738* 基因后影响了与细菌逃逸相关的毒力蛋白,例如 LLO。LLO 是由单增李斯特菌主要毒力基因 *hly* 编码的一种成孔毒素,具有膜穿孔活性和逃逸吞噬体的能力<sup>[31]</sup>,在单增李斯特菌中,LLO 的表达受到 PrfA 调控。本研究结果表明,单增李斯特菌缺失 *lmo0738* 基因后,细菌溶血活性显著降低,Western blotting 结果也表明与野生株相比,LLO 蛋白表达量显著降低,而 *hly* 基因的转录水平未显著降低。在化脓性链球菌中,溶血素 S (streptolysin S, SLS) 是最重要的毒力蛋白之一,SLS 表达受 *sag* 操纵子调控,*pstI* 基因可编码 EI,在小鼠皮下感染模型中,缺失株  $\Delta ptsI$  造成感染的面积比化脓性链球菌标准菌株大,毒力显著增强,缺失株  $\Delta ptsI$  中 *sag* 转录水平显著增加,这表明 EI 抑制了 SLS 的表达<sup>[32]</sup>。据此推测,Lmo0738 可能增强了 LLO 的表达和分泌能力,但对其转录水平的影响并不显著,后续需要进一步试验进行探究。

综上所述, 本研究证实了葡萄糖苷转运蛋白 Lmo0738 影响细菌的体外生长能力和溶血能力, 降低其感染细胞的黏附侵袭能力以及迁移能力, 揭示了 Lmo0738 参与单增李斯特菌的毒力作用, 但其具体分子机制有待后续深入研究。本研究结果为进一步完善重要胞内致病菌的 PTS 系统及侵入机体机制打下重要基础, 对抵制人畜共患的细菌感染并确保人类健康至关重要。

## 参考文献

- [1] SCHAEFER K, AUSTHOF E, BOYD K, ARMSTRONG A, HOFFMAN S, POGREBA-BROWN K. Septicemia due to *Listeria monocytogenes* infection: a systematic review and meta-analysis[J]. *Foodborne Pathogens and Disease*, 2022, 19(2): 104-114.
- [2] SCHLECH WF 3rd, LAVIGNE PM, BORTOLUSSI RA, ALLEN AC, HALDANE EV, WORT AJ, HIGHTOWER AW, JOHNSON SE, KING SH, NICHOLLS ES, BROOME CV. Epidemic listeriosis: evidence for transmission by food[J]. *The New England Journal of Medicine*, 1983, 308(4): 203-206.
- [3] GABALLA A, GUARIGLIA-OROPEZA V, WIEDMANN M, BOOR KJ. Cross talk between SigB and PrfA in *Listeria monocytogenes* facilitates transitions between extra- and intracellular environments[J]. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*: MMBR, 2019, 83(4): e00034-19.
- [4] STOLL R, GOEBEL W. The major PEP-phosphotransferase systems (PTSs) for glucose, mannose and cellobiose of *Listeria monocytogenes*, and their significance for extra- and intracellular growth[J]. *Microbiology*, 2010, 156(Pt 4): 1069-1083.
- [5] BARABOTE RD, JR SAIER MH. Comparative genomic analyses of the bacterial phosphotransferase system[J]. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2005, 69(4): 608-634.
- [6] LÓPEZ-GARRIDO J, PUERTA-FERNÁNDEZ E, COTA I, CASADESÚS J. Virulence gene regulation by L-arabinose in *Salmonella enterica*[J]. *Genetics*, 2015, 200(3): 807-819.
- [7] TOURNU H, FIORI A, van DIJCK P. Relevance of trehalose in pathogenicity: some general rules, yet many exceptions[J]. *PLoS Pathogens*, 2013, 9(8): e1003447.
- [8] LOWE RGT, LORD M, RYBAK K, TRENGOVE RD, OLIVER RP, SOLOMON PS. Trehalose biosynthesis is involved in sporulation of *Stagonospora nodorum*[J]. *Fungal Genetics and Biology*, 2009, 46(5): 381-389.
- [9] NGAMSKULRUNGROJ P, HIMMELREICH U, BREGER JA, WILSON C, CHAYAKULKEEREE M, KROCKENBERGER MB, MALIK R, DANIEL HM, TOFFALETTI D, DJORDJEVIC JT, MYLONAKIS E, MEYER W, PERFECT JR. The trehalose synthesis pathway is an integral part of the virulence composite for *Cryptococcus gattii*[J]. *Infection and Immunity*, 2009, 77(10): 4584-4596.
- [10] 林迪斯, 徐丽, 李飞雨, 汪静杰, 李蓓. 肺炎克雷伯菌果糖磷酸转移酶系统 EIIC 编码基因 *frwC* 缺失株的构建及表型分析[J]. *西安交通大学学报(医学版)*, 2018, 39(6): 788-792.  
LIN DS, XU L, LI FY, WANG JJ, LI B. Construction of mutant strain of *Klebsiella pneumoniae* fructose-specific phosphotransferase systems subunit IIC encoded by *frwC* gene and analysis of its phenotypes[J]. *Journal of Xi'an Jiaotong University (Medical Sciences)*, 2018, 39(6): 788-792 (in Chinese).
- [11] WU QM, PEI JW, TURSE C, FICHT TA. Mariner mutagenesis of *Brucella melitensis* reveals genes with previously uncharacterized roles in virulence and survival[J]. *BMC Microbiology*, 2006, 6: 102.
- [12] CHRISTENSEN DP, BENSON AK, HUTKINS RW. Mutational analysis of the role of HPr in *Listeria monocytogenes*[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1999, 65(5): 2112-2115.
- [13] DEUTSCHER J, FRANCKE C, POSTMA PW. How phosphotransferase system-related protein phosphorylation regulates carbohydrate metabolism in bacteria[J]. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2006, 70(4): 939-1031.
- [14] SUNDAR GS, ISLAM E, GERA K, Le BRETON Y, McIVER KS. A PTS EII mutant library in group A *Streptococcus* identifies a promiscuous man-family PTS transporter influencing SLS-mediated hemolysis[J]. *Molecular Microbiology*, 2017, 103(3): 518-533.
- [15] SCORTTI M, MONZÓ HJ, LACHARME-LORA L, LEWIS DA, VÁZQUEZ-BOLAND JA. The PrfA virulence regulon[J]. *Microbes and Infection*, 2007, 9(10): 1196-1207.
- [16] de LAS HERAS A, CAIN RJ, BIELECKA MK, VÁZQUEZ-BOLAND JA. Regulation of *Listeria* virulence: PrfA master and commander[J]. *Current Opinion in Microbiology*, 2011, 14(2): 118-127.

- [17] HANSEN S, HALL M, GRUNDSTRÖM C, BRÄNNSTRÖM K, SAUER-ERIKSSON AE, JOHANSSON J. A novel growth-based selection strategy identifies new constitutively active variants of the major virulence regulator PrfA in *Listeria monocytogenes*[J]. *Journal of Bacteriology*, 2020, 202(11): e00115-20.
- [18] dos SANTOS PT, 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*[J]. *Journal of Bacteriology*, 2020, 202(15): e00156-20.
- [19] JOSEPH B, MERTINS S, STOLL R, SCHÄR J, UMESHA KR, LUO Q, MÜLLER-ALTROCK S, GOEBEL W. Glycerol metabolism and PrfA activity in *Listeria monocytogenes*[J]. *Journal of Bacteriology*, 2008, 190(15): 5412-5430.
- [20] MERTINS S, JOSEPH B, GOETZ M, ECKE R, SEIDEL G, SPREHE M, HILLEN W, GOEBEL W, MÜLLER-ALTROCK S. Interference of components of the phosphoenolpyruvate phosphotransferase system with the central virulence gene regulator PrfA of *Listeria monocytogenes*[J]. *Journal of Bacteriology*, 2007, 189(2): 473-490.
- [21] DEUTSCHER J, HERRO R, BOURAND A, MIJAKOVIC I, PONCET S. P-Ser-HPr: a link between carbon metabolism and the virulence of some pathogenic bacteria[J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2005, 1754(1/2): 118-125.
- [22] KENTACHE T, MILOHANIC E, CAO TN, MOKHTARI A, AKÉ FM, MA PHAM QM, JOYET P, DEUTSCHER J. Transport and catabolism of pentitols by *Listeria monocytogenes*[J]. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 2016, 26(6): 369-380.
- [23] CAO TN, JOYET P, AKÉ FMD, MILOHANIC E, DEUTSCHER J. Studies of the *Listeria monocytogenes* cellobiose transport components and their impact on virulence gene repression[J]. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 2019, 29(1/2/3/4/5/6): 10-26.
- [24] 刘倩钰, 吴丽雯, 牛建军, 赵西林. 细菌磷酸转移酶系统(PTS)的组成与功能研究进展[J]. *微生物学通报*, 2020, 47(7): 2266-2277.
- LIU QY, WU LW, NIU JJ, ZHAO XL. Research progress of the composition and function of bacterial phosphotransferase system[J]. *Microbiology China*, 2020, 47(7): 2266-2277 (in Chinese).
- [25] ZHANG L, WANG Y, LIU DX, LUO LJ, WANG Y, YE CY. Identification and characterization of *als* genes involved in D-allose metabolism in lineage II strain of *Listeria monocytogenes*[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2018, 9: 621.
- [26] 江文玲, 徐加利, 董欣楠, 沈云勤, 陈丹丹, 江玲丽, 宋厚辉, 程昌勇. 单增李斯特菌末端氧化酶亚基 QoxB 的生物学功能探究[J]. *微生物学报*, 2023, 63(2): 656-669.
- JIANG WL, XU JL, DONG XN, SHEN YQ, CHEN DD, JIANG LL, SONG HH, CHENG CY. Biological functions of terminal oxidase subunit QoxB in *Listeria monocytogenes*[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2023, 63(2): 656-669 (in Chinese).
- [27] GLASER P, FRANGEUL L, BUCHRIESER C, RUSNIOK C, AMEND A, BAQUERO F, BERCHE P, BLOECKER H, BRANDT P, CHAKRABORTY T, CHARBIT A, CHETOUANI F, COUVÉ E, de DARUVAR A, DEHOUX P, DOMANN E, DOMÍNGUEZ-BERNAL G, DUCHAUD E, DURANT L, DUSSURGET O, et al. Comparative genomics of *Listeria* species[J]. *Science*, 2001, 294(5543): 849-852.
- [28] JONQUIÈRES R, PIZARRO-CERDÁ J, COSSART P. Synergy between the N- and C-terminal domains of InlB for efficient invasion of non-phagocytic cells by *Listeria monocytogenes*[J]. *Molecular Microbiology*, 2001, 42(4): 955-965.
- [29] BRAUN L, GHEBREHIWET B, COSSART P. gC1q-R/p32, a C1q-binding protein, is a receptor for the InlB invasion protein of *Listeria monocytogenes*[J]. *EMBO Journal*, 2000, 19(7): 1458-1466.
- [30] IRETON K, PAYRASTRE B, CHAP H, OGAWA W, SAKAUE H, KASUGA M, COSSART P. A role for phosphoinositide 3-kinase in bacterial invasion[J]. *Science*, 1996, 274(5288): 780-782.
- [31] NGUYEN BN, PETERSON BN, PORTNOY DA. Listeriolysin O: a phagosome-specific cytolysin revisited[J]. *Cellular Microbiology*, 2019, 21(3): e12988.
- [32] GERA K, LE T, JAMIN R, EICHENBAUM Z, McIVER KS. The phosphoenolpyruvate phosphotransferase system in group A *Streptococcus* acts to reduce streptolysin S activity and lesion severity during soft tissue infection[J]. *Infection and Immunity*, 2014, 82(3): 1192-1204.