

LisK/R 通过调控鞭毛基因表达影响单增李斯特菌低温生长

汪国俊, 黄金梅, 栗绍文, 刘梅*

华中农业大学 动物医学院, 湖北 武汉

汪国俊, 黄金梅, 栗绍文, 刘梅. LisK/R 通过调控鞭毛基因表达影响单增李斯特菌低温生长[J]. 微生物学报, 2025, 65(7): 2889-2902.

WANG Guojun, HUANG Jinmei, LI Shaowen, LIU Mei. LisK/R plays a role in *Listeria monocytogenes* growth at low temperatures by regulating the expression of flagellar genes[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2025, 65(7): 2889-2902.

摘要: 【目的】单增李斯特菌(*Listeria monocytogenes*, *Lm*)是一种革兰阳性食源性病原菌, 可导致病死率高达 20%–30% 的人兽共患病——李斯特菌病(listeriosis)。 *Lm* 能够在低温下生长繁殖, 对食品安全和人类健康构成极大的威胁。探究 *Lm* 低温生长机制, 将为制定控制 *Lm* 低温生长的措施以及研发低温生长抑制剂提供理论依据。研究发现细菌双组分系统(two-component signal transduction system, TCS) LisK/R 对 *Lm* 低温生长具有调控作用, 但其具体机制尚未明确。因此, 本研究旨在探讨 LisK/R 对 *Lm* 低温生长的作用机制。【方法】以 *Lm* 食品分离株 LM201 为亲本株, 构建 3 个菌株: $\Delta lisR$ (LisK/R 的 RR 缺失株)、 $\Delta lisRc$ ($\Delta lisR$ 的回补株)和 $\Delta lisKc$ [LisK/R 的 HK 缺失株 $\Delta lisK$ (课题组之前已构建)的回补株]。测定亲本株、缺失株和回补株在 4 °C 下的生长曲线; 对 4 °C 下生长的缺失株 $\Delta lisK$ 和亲本株进行 RNA-Seq 及数据分析; 在 4 °C 下, 用软琼脂平板测定亲本株、缺失株和回补株的菌株运动圈直径, 用透射电镜观察菌体鞭毛形成情况, 用 RT-qPCR 测定鞭毛基因表达量。【结果】在 4 °C 低温条件下, 缺失株的生长速率显著低于亲本株 ($P < 0.05$), 而回补株的生长情况与亲本株一致。RNA-Seq 基因表达差异性分析结果显示, 与亲本株相比, 缺失株 $\Delta lisK$ 的鞭毛基因表达普遍显著上调 ($P < 0.05$)。在 4 °C 低温条件下, 缺失株的运动圈直径显著大于亲本株和回补株 ($P < 0.05$); 电镜观察的结果显示, 缺失株的鞭毛数量多, 而亲本株和回补株的鞭毛数量较少; RT-qPCR 测定结果也显示, 缺失株的鞭毛基因表达量显著高于亲本株和回补株 ($P < 0.05$)。【结论】在 4 °C 低温条件下, 生长速率低的 LisK/R 缺失株鞭毛数量多, 而生长速率高的亲本株鞭毛数量少, 表明 *Lm* 通过 LisK/R 抑制鞭毛基因的表达, 减少鞭毛产量, 从而将能量用于生长以促进 *Lm* 在低温下的生长, 其具体的分子调控机制尚需进一步研究。本研究为阐明 *Lm* 低温生长机制提供了新的信息。

关键词: 单增李斯特菌; 低温生长; 双组分系统 LisK/R; 鞭毛

资助项目: 国家重点研发计划(2022YFD1800100)

This work was supported by the National Key Research and Development Program of China (2022YFD1800100).

*Corresponding author. E-mail: liumei@mail.hzau.edu.cn

Received: 2024-11-27; Accepted: 2025-02-05; Published online: 2025-05-14

LisK/R plays a role in *Listeria monocytogenes* growth at low temperatures by regulating the expression of flagellar genes

WANG Guojun, HUANG Jinmei, LI Shaowen, LIU Mei*

College of Veterinary Medicine, Huazhong Agricultural University, Wuhan, Hubei, China

Abstract: [Objective] *Listeria monocytogenes* (*Lm*) is a Gram-positive foodborne pathogen causing human and animal listeriosis with high case fatality rates (20%–30%). *Lm* can grow at low temperatures, which brings great risks to food safety and human health. Exploring the mechanism of *Lm* growth at low temperatures will provide a theoretical basis for the formulation of measures to control *Lm* growth at low temperatures and the development of low-temperature growth inhibitors. Studies have shown that LisK/R, a two-component signal transduction system (TCS) in *Lm*, plays a role in regulating the growth of *Lm* at low temperatures, while the specific mechanism remains unclear. This study aims to reveal the mechanism of LisK/R in regulating the growth of *Lm* at low temperatures. [Methods] With the *Lm* strain LM201 isolated from foodstuff as the parental strain, we constructed three strains: $\Delta lisR$ (RR-deleted mutant of LisK/R), $\Delta lisRc$ (complementary strain of $\Delta lisR$), and $\Delta lisKc$ (complementary strain of $\Delta lisK$, which was constructed before this study in our laboratory). The growth curves of these strains were determined at 4 °C. RNA-Seq was performed for $\Delta lisK$ and the parental strain growing at 4 °C, and the obtained data were analyzed. We assayed the swarming area diameter on soft agar plate, flagellar biosynthesis by transmission electron microscopy, and transcriptional levels of flagellar genes by RT-qPCR for all the strains at 4 °C. [Results] The growth of deletion mutants was slower than that of the parental strain ($P < 0.05$), and the growth of complementary strains was consistent with that of the parental strain at 4 °C. The RNA-Seq data showed that compared with that in the parental strain, the expression of flagellar genes in $\Delta lisK$ was up-regulated ($P < 0.05$). At 4 °C, the swarming area diameters of deletion mutants on soft agar plates were bigger than those of the parental strain and complementary strains ($P < 0.05$); the deletion mutants had more flagella, while the parental and complementary strains had fewer flagella; the expression of flagellar genes in the deletion mutants was higher than that in the parental and complementary strains ($P < 0.05$). [Conclusion] At 4 °C, the LisK/R mutants with slow growth had more flagella, while the parental strain with rapid growth had fewer flagella. The results indicate that LisK/R inhibits the expression of flagellar genes in *Lm* to reduce flagellar production, and the energy is used to promote *Lm* growth at low temperatures. The specific molecular regulatory mechanism of LisK/R needs further study. This study provides new information for elucidating the mechanism of *Lm* growth at low temperatures.

Keywords: *Listeria monocytogenes*; growth at low temperatures; two-component system LisK/R; flagellum

单核细胞增生李斯特菌 (*Listeria monocytogenes*, *Lm*) 简称单增李斯特菌, 是一种

重要的食源性病原菌, 可导致人畜李斯特菌病 (listeriosis), 免疫力低下者尤为易感, 病死率

(case fatality rate)高达 20%–30%^[1-3]。*Lm* 是一种革兰氏阳性、短杆状、不形成芽胞、兼性厌氧型细菌。*Lm* 具有鞭毛基因,但在 37 °C 时不产生鞭毛,而在 25 °C 左右时有鞭毛形成^[4]。*Lm* 能够在低温下生长^[5],这无疑给冷藏食品带来了安全隐患,尤其是冷藏时间越长,隐患越大。因此,揭示 *Lm* 低温生长机制是防控李斯特菌病的重要基础。

各国学者从不同角度对 *Lm* 低温生长机制进行了研究。研究发现, *Lm* 具有 1 个低温生长调节子 *LltR*, 其编码基因为 *lltR*, *lltR* 基因突变后,菌体的低温生长能力显著下降^[6-7]。Vásquez 等^[8]发现, *Lm* 低温生长离不开对钴胺素(维生素 B₁₂)的生物合成。*Lm* 在低温下可能通过多种机制适应并生长繁殖,包括改变细胞膜脂质组分以增加不饱和脂肪酸含量^[9-14];高表达冷休克蛋白^[15-18];合成和积累抗冻剂^[19-20];利用 rRNA 甲基转移酶稳定核糖体结构和功能^[21];通过阻遏蛋白 *MogR* 减少鞭毛的产生^[22]等。此外,双组分系统的调控也是 *Lm* 低温生长的关键因素^[23-26]。

双组分系统 (two-component signal transduction system, TCS) 是细菌响应温度变化等环境因素的重要调控系统^[27-28]。一个细菌可以拥有多个 TCS, 一个典型的 TCS 由膜结合感应激酶(membrane-bound sensory kinase), 即组氨酸激酶(histidine kinase, HK)和胞质中应答调节子(response regulator, RR)组成, 少数 TCS 不包含 HK 组分, 仅包含 RR 组分, 称为孤儿 RR^[29]。HK 感知胞外信号后发生自体磷酸化, 随后将磷酸基团转移给配对的 RR, 使其活化。活化的 RR 作为转录因子结合到靶基因启动子序列上, 对靶基因的表达进行上调或下调, 从而开启菌体应对新环境的生存模式^[30]。

本课题组以从食品中分离的一株血清型为 4b 的 *Lm* 分离株(命名为 LM201)为研究材料, 通过对 LM201 全基因组测序^[31]和 TCS 分析发现, LM201 拥有 14 个 TCS (HK/RR)和 2 个孤儿

RR^[32]。除必需 HK 基因 *ycyG* 外, 本课题组构建了 13 个 TCS 的 HK 缺失株并测定了这些缺失株在低温 4 °C 下的生长情况, 发现与 37 °C 相比, HK 基因 *lisK* 缺失株 $\Delta lisK$ 的生长速率显著下降。Chan 等^[23-24]发现, 与 37 °C 相比, 在 4 °C 下 *Lm* 菌株 10403S 的 *lisK* 表达水平显著上调, 而与之配对的 RR 基因 *lisR* 缺失株 $\Delta lisR$ 在 4 °C 下生长受限, 但在 37 °C 时能正常生长。同样地, 与 37 °C 相比, 在 3 °C 下 *Lm* 菌株 EGD-e 的 *lisK* 表达水平显著上调, 而当缺失 *lisK* 后, 菌株在 3 °C 下生长受限, 但在 37 °C 时与亲本株无差异^[25]。上述研究表明, LisK/R 这对 TCS 对 *Lm* 低温生长具有调控作用, 但其具体机制尚不明确。鉴于此,本研究以 LisK/R 为切入点, 探寻影响 *Lm* 低温生长的因素, 从而为解析 *Lm* 低温生长机制提供新的信息。

1 材料与方法

1.1 菌株、质粒和引物

表 1 详细列出了本研究所用的菌株与质粒信息。本研究构建缺失株和回补株以及用于 RT-qPCR 的引物见表 2, 引物均由武汉金开瑞生物工程有限公司合成。

1.2 主要试剂和仪器

BHI 培养基, BD 公司; 氨苄青霉素(ampicillin, AMP)、红霉素(erythromycin, ERY), 武汉华大至善生物科技有限公司; 电镜负染液磷钨酸(phosphotungstic acid, PTA), 中国科学院武汉病毒研究所; 高保真 DNA 聚合酶、反转录试剂盒, 南京诺唯赞生物科技股份有限公司; SYBR qPCR Master Mix, 武汉擎科生物科技有限公司; 凝胶回收试剂盒和质粒提取试剂盒, Omega Bio-Tek 公司; T4 DNA 连接酶、限制性内切酶, 宝生物工程(大连)有限公司(TaKaRa 公司)。

超净工作台, 哈尔滨东联电子技术开发有限公司; PCR 仪、荧光定量 PCR 仪和凝胶成像系统, Bio-Rad 公司; 核酸电泳仪, 北京六一生

表1 本研究所用菌株和质粒

Table 1 Strains and plasmids used in this study

Strain or plasmid	Genotype or relevant characteristic	Source
Strains		
LM201	<i>Lm</i> strain isolated from foodstuff ^[31]	This laboratory
S0192($\Delta lisK$)	In-frame deletion of the <i>lisK</i> gene with 1 452 bp in LM201	This laboratory
S2001($\Delta lisR$)	In-frame deletion of the <i>lisR</i> gene with 681 bp in LM201	This study
S0192c($\Delta lisKc$)	Complementary strain of S0192($\Delta lisK$)	This study
S2001c($\Delta lisRc$)	Complementary strain of S2001($\Delta lisR$)	This study
DH5 α /p1001	p1001 in <i>Escherichia coli</i> DH5 α	This study
Plasmids		
pHT304-ts	Temperature-sensitive shuttle plasmid	This laboratory
pHT304	The shuttle vector plasmid	This laboratory
p1001	pHT304-ts containing <i>lisR</i> up- and downstream homologous region of LM201	This study
<i>plisKc</i>	pHT304 containing 1 452 bp coding sequence of <i>lisK</i> gene	This study
<i>plisRc</i>	pHT304 containing 681 bp coding sequence of <i>lisR</i> gene	This study

物科技有限公司；紫外-可见分光光度计、100 kV 透射电镜和冷冻高速离心机，Hitachi 公司；电热恒温水浴锅，北京市长风仪器仪表公司；全温度振荡培养箱(摇床)，苏州培英实验室设备有限公司；水平离心机，上海安亭科学仪器厂；小型高速离心机，Eppendorf 公司；4 °C 和 -30 °C 冰箱，Haier 公司。

1.3 缺失株和回补株的构建

依照汪国俊等^[22]的方法，以 *Lm* 菌株 LM201 的 DNA 为模板，利用表 2 中的引物 *lisR*(L)-F/R 和 *lisR*(R)-F/R 对 *lisR* 的上、下游同源臂进行 PCR 扩增。利用 Overlap PCR 将扩增获得的上、下游同源臂进行连接，将连接产物克隆至温敏型自杀载体 pHT304-ts，从而得到携带 *lisR* 同源臂的重组质粒 p1001。将该重组质粒转化至 *Escherichia coli* DH5 α 感受态细胞，获得重组菌株 DH5 α /p1001。对 p1001 中的同源臂序列进行验证性测序(武汉天一辉远生物技术公司)，测序结果符合预期。将纯化的 p1001 质粒通过电转化法(参数 2.4 kV)导入 LM201 感受态细胞，经筛选获得阳性转化子后，利用同源重组技术成功构建 *lisR* 缺失株 S2001($\Delta lisR$)。为构

建回补菌株，用引物 *lisKc*-F/R (表 2) 扩增 *lisK* 基因片段，并将其插入穿梭载体 pHT304，获得重组质粒 *plisKc*。经测序验证正确的 *plisKc* 质粒通过电转入缺失株 S0192 ($\Delta lisK$) 感受态细胞，最终通过 PCR 鉴定获得回补菌株 S0192c ($\Delta lisKc$)。值得注意的是，重组质粒 *plisRc* 和回补株 S2001c($\Delta lisRc$) 的构建流程与上述过程基本一致，仅将扩增引物更换为 *lisRc*-F/R (表 2)。

1.4 生长曲线测定

依照汪国俊等^[22]的方法，挑取 LM201、S0192($\Delta lisK$)、S2001($\Delta lisR$)、S0192c($\Delta lisKc$) 和 S2001c($\Delta lisRc$) 单菌落，接种于 BHI 液体培养基，在 37 °C、200 r/min 条件下活化培养 12 h，然后按 1:100 转接至新鲜 BHI，在 37 °C、200 r/min 条件下培养至 OD_{600} 值为 1.0，再次以相同接种量转接至新鲜 BHI 用于 4 °C 和 37 °C 条件下的菌株生长曲线测定：菌液于 4 °C 恒温环境中静置培养，每隔 1 d 测定 OD_{600} 值，连续培养 15 d；菌液于 37 °C、200 r/min 振荡培养，每隔 1 h 测定 OD_{600} 值，连续培养 12 h。每个菌株设 3 个重复，实验重复 3 次。使用 GraphPad Prism 8 对数据进行统计分析和绘制生长曲线图。

表2 本研究所用引物

Table 2 Primers used in this study

Primers name	Oligonucleotide sequences (3'→5')	Restriction site
Mutant strain construction		
<i>lisR</i> (R)-F	AATTCCTTTTACCCGATCAGCAGTAAACCGGATTG	
<i>lisR</i> (R)-R	CTACTAGGCCGACATGAACTACCCATGGCGT	<i>Kpn</i> I
<i>lisR</i> (L)-F	ATCAGGTAAATGGTCAAGGAGATCTGGC	<i>Xba</i> I
<i>lisR</i> (L)-R	ACTGGCTTCTCTCCCAATCCGGTTTACTGCTGAT	
Complementary strain construction		
<i>lisKc</i> -F	CCTTTTACCCGATCAGCAGTAAGATCTGGC	<i>Xba</i> I
<i>lisKc</i> -R	GGAATGTAACCTGGTTTATGTTTATTCCATGGCGT	<i>Kpn</i> I
<i>lisRc</i> -F	GTAGAAGATGCTAATTATAAGATAAGTAAGATCTGGC	<i>Xba</i> I
<i>lisRc</i> -R	CCATACACTACGCATGTACTCCATGGCGT	<i>Kpn</i> I
Primers for RT-qPCR		
16S rRNA-F	AGAGTCCAGCCGATACGTAG	
16S rRNA-R	ACCTGCTTTCAGACTGCCTC	
<i>pduB</i> -F	GCAGATGTAAGCGTTAGTGATCCG	
<i>pduB</i> -R	CCACCACTGCTACAAAGTCTACAC	
<i>flhA</i> -F	GCAATAGTAGACTAGGCAGTT	
<i>flhA</i> -R	GTAGCCGATAGCATGCGTTA	
<i>mngB</i> -F	GCGAAGAACGGTAAGAAGACGA	
<i>mngB</i> -R	GGCTAAATGAGATAGCAGGTCCAGC	
<i>flgB</i> -F	CGTTTGAGCTCGGTTCACTA	
<i>flgB</i> -R	CAGTTGCAGTGAAGACTTTAC	
<i>inlB</i> -F	AGGAACTCGCTTGAATCCAGGA	
<i>inlB</i> -R	TCACTATAACACGGTGAACGTCC	
<i>fliM</i> -F	CTAAAGACCACTCTAACCTAC	
<i>fliM</i> -R	GAGCCACCTTCTCTAATACTT	
<i>motA</i> -F	TTTACCACAGGTTTCGTGC	
<i>motA</i> -R	CCTTTTCCCTTCTTTTGCTCT	
<i>dhaL</i> -F	TGGTTAGCGAACCAGCTCTAGTG	
<i>dhaL</i> -R	AGTCGTTTCAACCACCGCGTA	
<i>flgC</i> -F	CCTCGAATGAAGGTAGGTAAC	
<i>flgC</i> -R	CAAGCTTTGTGCGAAATTGTCC	
<i>rpiB</i> -F	GTACCAGACTTCGTTACCGTTGA	
<i>rpiB</i> -R	GGCTCTGAGCGATAATGGCAATCA	
<i>manX</i> -F	AGTGGCACTCAACGCTCCTA	
<i>manX</i> -R	ACCTTCGACGTTAACGTAGGAA	
<i>fliF</i> -F	GCAGTGGTAAAACAAGGC	
<i>fliF</i> -R	TTTTTGTTGGGTCGGGAAC	
<i>flgD</i> -F	TTCCTTTCAACGCGGT	
<i>flgD</i> -R	TTTGAGCGGAACGTTAG	
<i>flhF</i> -F	GTCGATAACGGTGAAGTGAG	
<i>flhF</i> -R	CCTTGATCGTGTAGCTGC	
<i>fliR</i> -F	TTTTGACCGTTGAGCCGA	
<i>fliR</i> -R	TAAGGTCACCGTTGTACC	
<i>motB</i> -F	GTAGCGGAAGTTCTGACG	
<i>motB</i> -R	TCGTCGTCGTCGGAATGAA	

1.5 RNA-Seq 及验证

采用 TRIzol 法提取 4 °C 静置培养 10 d (低温对数期) 的 S0192($\Delta lisK$) 和 LM201 的总 RNA, RNA 的纯度和浓度采用 NanoDrop 2000c 进行检测, RNA 的完整性通过 1% 琼脂糖凝胶电泳进行检测。将检测合格的样品送至武汉博越致和生物科技有限公司进行转录组测序(RNA-Seq)。使用 Hisat2 软件将测序获得的 clean reads 比对到参考基因组(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/CP031141.1>), 并使用 R 语言包 DESeq2 分析差异表达基因, 筛选差异表达基因(differentially expressed genes, DEGs)的阈值为 P -value<0.05 且 $|\log_2 \text{fold change}|>1$ 。

以 16S rRNA 为内参基因^[33], 按照 SYBR qPCR Mix 说明书(武汉擎科生物科技有限公司), 对随机挑选的 RNA-Seq 差异基因 *rpiB*、*dhaL*、*pduB*、*mngB*、*manX*、*inlB*、*flhA* 和 *motA* 进行 RT-qPCR 验证, 采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 相对定量法对结果进行表达差异性分析, 以验证 RNA-Seq 数据的可靠性。

1.6 菌株运动性测定

参照 Cheng 等^[34]描述的方法, 用 0.25% 琼脂含量的 BHI 软平板进行菌株运动性测定。挑取菌株 LM201、S0192($\Delta lisK$)、S2001($\Delta lisR$)、S0192c($\Delta lisKc$)和 S2001c($\Delta lisRc$)单菌落, 接种于 BHI 液体培养基进行活化培养, 37 °C、200 r/min 培养 12 h 后, 以 1:100 接种量转接至新鲜 BHI 培养基继续培养, 直至菌液 OD_{600} 值达到 1.0, 获得运动性测定的菌悬液。取 5 μ L 菌悬液, 穿刺接种于 0.25% 琼脂含量的 BHI 软平板, 分别置于 4 °C 培养 8 d 和 37 °C 培养 48 h, 然后测量平板接种点菌体生长圈直径。每个菌株设 3 个重复, 实验重复 2 次。实验数据通过 GraphPad Prism 8 软件进行统计学分析及图形化。

1.7 透射电子显微镜观察

依照汪国俊等^[22]的方法, 将 LM201、S2001($\Delta lisR$)、S0192($\Delta lisK$)、S2001c($\Delta lisRc$) 和

S0192c($\Delta lisKc$)分别在 4 °C 静置培养 10 d (低温对数期)和 37 °C、200 r/min 培养 8 h (适温对数期), 收集菌液 1 mL, 置于 1.5 mL EP 管中, 以 2 000 r/min 离心 10 min。弃上清后, 用 1 mL 无菌 1×PBS 缓冲液充分洗涤菌体沉淀, 然后用同体积 PBS 重悬菌体, 重悬的菌体即可作为透射电子显微镜 (transmission electron microscope, TEM) 的观察样品。在预冷的封口膜表面依次滴加 3 个液滴, 分别为 20 μ L 样品、超纯水和 PTA 染液。将铜网首先浸入样品液滴, 吸附约 1 min, 用滤纸吸除多余液体; 然后转移至超纯水液滴进行漂洗, 吸干; 最后浸入 PTA 染液液滴, 负染约 1 min, 吸除多余染液。铜网置于室温干燥后, 通过 TEM 观察细菌鞭毛形成情况。

1.8 鞭毛基因转录组 RT-qPCR 测定

依照汪国俊等^[22]的方法, 收集 4 °C 静置培养 10 d (低温对数期)的 LM201、S0192($\Delta lisK$)、S2001($\Delta lisR$)、S0192c($\Delta lisKc$)和 S2001c($\Delta lisRc$)菌体, 提取 RNA, RNA 的纯度和浓度采用 NanoDrop 2000c 进行检测, RNA 的完整性通过 1% 琼脂糖凝胶电泳进行检测。用反转录试剂盒将总 RNA 逆转录为 cDNA, 作为 RT-qPCR 的模板。按照 SYBR qPCR Mix 的标准化流程, 以 16S rRNA 为内参基因, 检测鞭毛合成基因 *flgB*、*flgC*、*flgD*、*fliF*、*fliM*、*fliR*、*flhA*、*flhF*、*motA* 和 *motB* 的转录水平。采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 相对定量法对结果进行表达差异性分析。

1.9 数据统计分析

实验数据以 mean \pm SD 表示, 使用双尾 t 检验进行差异显著性分析, *表示 $P<0.05$ (差异显著); **表示 $P<0.01$ (差异非常显著); ***表示 $P<0.001$ (差异极其显著)。

2 结果与分析

2.1 低温 4 °C 下缺失株生长情况

将亲本株(LM201)、2 个缺失株[S0192($\Delta lisK$) 和 S2001($\Delta lisR$)]以及 2 个回补株[S0192c($\Delta lisKc$)

和 S2001c($\Delta lisRc$))分别在 4 °C 和 37 °C 下培养, 用测定的菌液 OD_{600} 值绘制出每个菌的生长曲线。在 4 °C 生长条件下, 2 个缺失株在对数期及稳定期的生长速率显著低于亲本株($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 而 2 个回补株的生长情况与亲本株保持一致(图 1A)。在 37 °C 生长条件下, 亲本株、缺失株和回补株的生长表型未见显著差异(图 1B)。结果表明, 双组分系统 LisK/R 对 *Lm* 的低温生长具有调控作用。

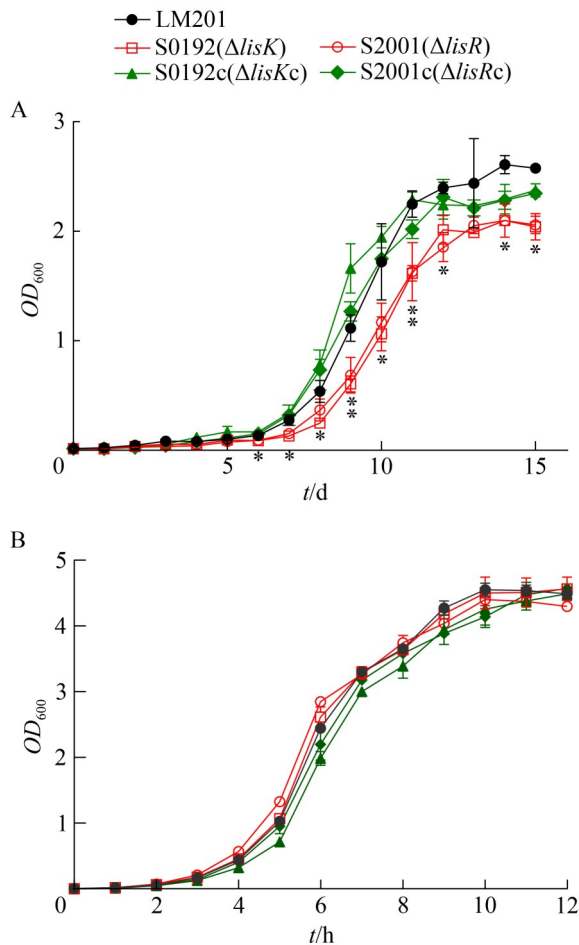


图 1 LM201、S0192($\Delta lisK$)、S2001($\Delta lisR$)、S0192c($\Delta lisKc$)和S2001c($\Delta lisRc$)在4 °C (A)和37 °C (B)条件下的生长曲线

Figure 1 Growth curves of LM201, S0192($\Delta lisK$), S2001($\Delta lisR$), S0192c($\Delta lisKc$), and S2001c($\Delta lisRc$) at 4 °C (A) and 37 °C (B). *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$.

2.2 缺失株 S0192($\Delta lisK$) 与亲本株 LM201 在 4 °C 下生长的转录组测序分析

为了探明低温 4 °C 下缺失株生长速率显著下降的原因, 本研究对 4 °C 条件下生长的缺失株 S0192($\Delta lisK$)和亲本株 LM201 进行了转录组测序(RNA-Seq), 并对测序结果通过 RT-qPCR 进行验证。结果显示, 测序结果与 RT-qPCR 检测结果的相关系数为 0.816 7 (图 2), 表明转录组测序结果可信。

分析 RNA-Seq 结果发现, 与亲本株相比, 缺失株的鞭毛合成基因表达普遍显著上调($P < 0.05$) (图 3、表 3), 这提示在低温 4 °C 条件下, LisK/R 这对双组分系统对鞭毛基因的转录表达具有负向调控作用。

2.3 低温 4 °C 下缺失株的运动情况、鞭毛形成情况和鞭毛基因表达情况

为了验证在 4 °C 生长条件下双组分系统 LisK/R 对鞭毛合成基因表达具有负向调控作用这一转录组测序结果分析的推测, 本研究测定了亲本株(LM201)、2 个缺失株[S0192($\Delta lisK$)和

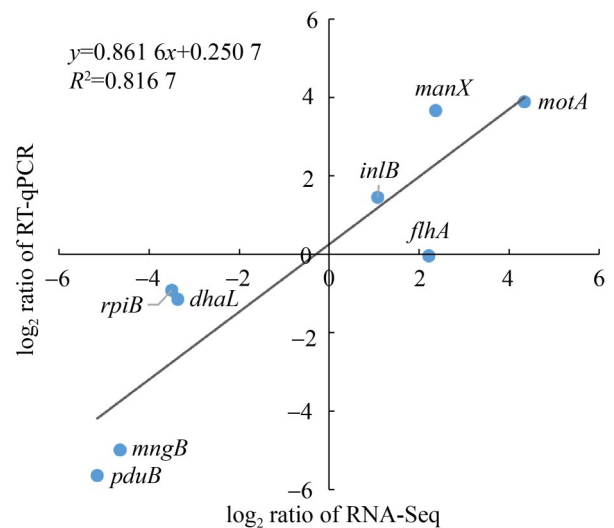


图2 RNA-Seq数据的RT-qPCR验证

Figure 2 Reverse transcription quantitative PCR (RT-qPCR) validation of the RNA-Seq data.

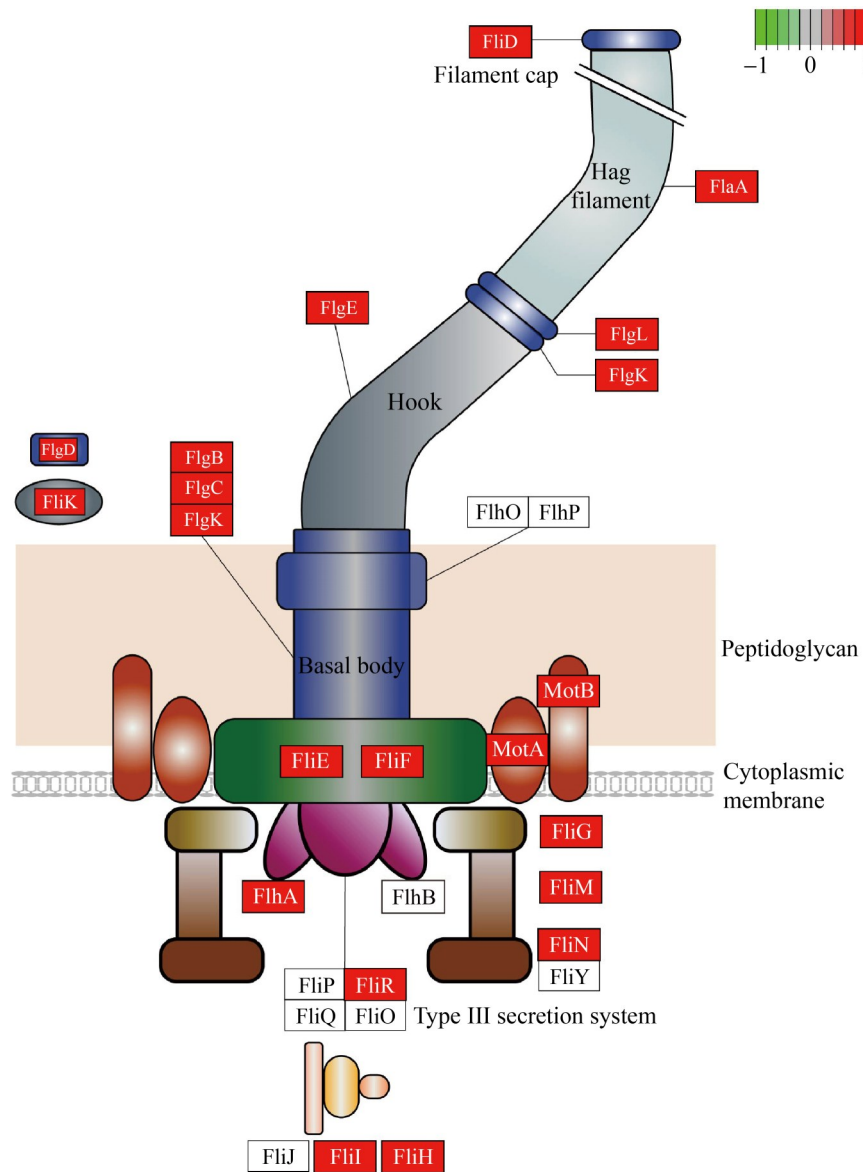


图3 RNA-Seq数据中缺失株S0192($\Delta lisK$)与亲本株LM201相比差异表达上调的鞭毛基因(红色)示意图

Figure 3 Outline of flagellar genes up-regulated (red color) in mutant S0192($\Delta lisK$) compared with the parental strain LM201 from RNA-Seq.

S2001($\Delta lisR$)以及2个回补株[S0192c($\Delta lisKc$)和S2001c($\Delta lisRc$)]在4 °C生长条件下的运动性、鞭毛形成情况和鞭毛基因表达量。

2.3.1 菌株的运动性

将菌株接种于0.25%琼脂含量的BHI软平板上,分别置于4 °C培养8 d和37 °C培养48 h,通过测量细菌的生长圈直径大小来判断菌株的

运动性。结果显示,在4 °C培养条件下,缺失株的生长圈直径显著大于亲本株($P < 0.05$),而回补株的生长圈直径与亲本株无显著差异;在37 °C培养条件下,亲本株、缺失株和回补株之间无显著差异(图4、图5)。结果表明,当菌株处于4 °C低温时,LisK/R缺失株的运动性显著强于亲本株。

表3 RNA-Seq数据中缺失株S0192(Δ lisK)与亲本株LM201相比差异表达的鞭毛基因Table 3 Differentially expressed genes of flagellum in mutant S0192(Δ lisK) compared with the parental strain LM201 from RNA-Seq

Gene_ID	Gene name	Gene description	log ₂ fold change	P-value	Regulate
gene0738	<i>motA</i>	Flagellar motor stator protein MotA	4.365 318	2.38×10 ⁻¹⁴	Up
gene0743	<i>flaA</i>	MULTISPECIES: FliC/FljB family flagellin	4.144 634	7.50×10 ⁻²⁰	Up
gene0761	<i>fliS</i>	MULTISPECIES: flagellar protein FliS	4.139 050	2.22×10 ⁻¹⁵	Up
gene0742	<i>cheV</i>	MULTISPECIES: chemotaxis protein	4.100 357	2.43×10 ⁻⁴⁷	Up
gene0739	<i>motB</i>	Flagellar motor protein MotB	3.809 529	5.06×10 ⁻¹⁵	Up
gene0744	<i>cheY</i>	MULTISPECIES: response regulator	3.751 984	1.45×10 ⁻¹⁸	Up
gene0748	-	Flagellar hook-length control protein FliK	3.729 361	5.26×10 ⁻²⁰	Up
gene0753	<i>fliN</i>	Flagellar motor switch protein	3.537 165	4.45×10 ⁻¹⁶	Up
gene0749	<i>flgD</i>	MULTISPECIES: flagellar basal body rod modification protein FlgD	3.394 462	2.41×10 ⁻¹⁴	Up
gene0760	<i>fliD</i>	Flagellar hook-associated protein 2	3.373 229	2.51×10 ⁻¹⁷	Up
gene0750	<i>flgE</i>	Flagellar hook protein FlgE	3.358 998	2.67×10 ⁻¹⁷	Up
gene0767	<i>fliG</i>	Flagellar motor switch protein FliG	3.325 708	4.46×10 ⁻²⁶	Up
gene0759	<i>flgL</i>	Flagellar hook-associated protein 3	3.300 846	2.72×10 ⁻¹³	Up
gene0768	<i>fliH</i>	FliH/SctL family protein	3.271 808	1.22×10 ⁻²⁴	Up
gene0765	<i>fliE</i>	MULTISPECIES: flagellar hook-basal body complex protein FliE	3.271 007	2.30×10 ⁻¹³	Up
gene0752	<i>fliM</i>	MULTISPECIES: flagellar motor switch protein FliM	3.162 440	2.96×10 ⁻¹³	Up
gene0766	<i>fliF</i>	Flagellar basal-body MS-ring/collar protein FliF	3.151 362	3.41×10 ⁻²⁰	Up
gene0763	<i>flgB</i>	Flagellar basal body rod protein FlgB	3.074 186	7.43×10 ⁻²⁹	Up
gene0758	<i>flgK</i>	Flagellar hook-associated protein FlgK	3.042 255	2.32×10 ⁻¹⁶	Up
gene0764	<i>flgC</i>	MULTISPECIES: flagellar basal body rod protein FlgC	3.021 742	1.97×10 ⁻³⁰	Up
gene0735	<i>flgG</i>	Flagellar basal-body rod protein FlgG	3.011 324	3.16×10 ⁻⁸	Up
gene0769	<i>fliI</i>	Flagellar protein export ATPase FliI	2.750 155	1.74×10 ⁻¹⁴	Up
gene0745	<i>cheA</i>	Chemotaxis protein CheA	2.697 812	1.65×10 ⁻²⁴	Up
gene0734	<i>flhF</i>	Flagellar biosynthesis protein FlhF	2.690 537	5.29×10 ⁻⁸	Up
gene0733	<i>flhA</i>	Flagellar biosynthesis protein FlhA	2.142 607	7.07×10 ⁻⁵	Up

2.3.2 透射电镜(TEM)观察菌体鞭毛形成情况

将制备的 4 °C (10 d)和 37 °C (8 h)培养条件下的菌体样品, 通过 TEM 观察菌体鞭毛形成情况。镜检结果显示, 在 4 °C条件下, 2 个缺失株均呈现出密集的周身鞭毛, 其鞭毛数量远多于亲本株; 回补株 S0192c(Δ lisKc)未见鞭毛, 回补株 S2001c(Δ lisRc)仅有少量鞭毛(图 6)。在 37 °C条件下, 所有菌株均未见鞭毛生长(图 6)。结果表明, 在低温 4 °C时, LisK/R 缺失株的鞭毛形

成量明显多于亲本株。

2.3.3 RT-qPCR 测定鞭毛基因表达量

制备 4 °C条件下培养至对数期(10 d)菌体的 RNA, 通过 RT-qPCR 测定鞭毛基因转录表达量。结果显示, 与亲本株相比, 2 个缺失株的鞭毛基因 *flgB*、*flgD*、*fliF*、*fliM*、*fliR*、*motA* 和 *motB* 表达均显著上调($P < 0.05$); 与缺失株相比, 对应的 2 个回补株的这些鞭毛基因表达显著下调(图 7、图 8)。结果表明, 在低温 4 °C时, LisK/R 缺失株的鞭毛基因转录本表达量显著高

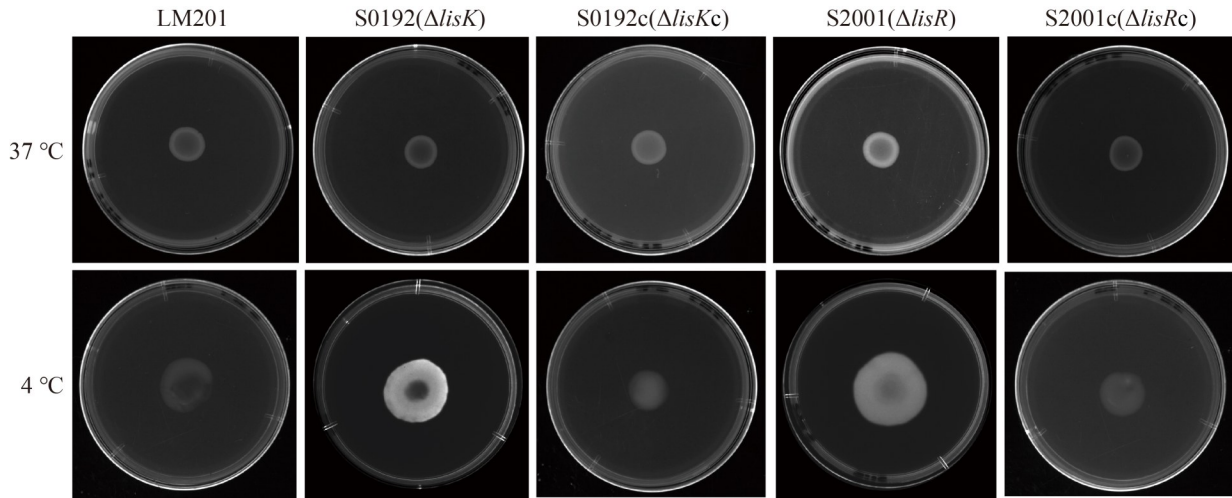


图4 菌株LM201、S0192($\Delta lisK$)、S2001($\Delta lisR$)、S0192c($\Delta lisKc$)和S2001c($\Delta lisRc$)在37 °C和4 °C条件下的运动情况

Figure 4 Swarming motility of strain LM201, S0192($\Delta lisK$), S2001($\Delta lisR$), S0192c($\Delta lisKc$), and S2001c($\Delta lisRc$) at 37 °C and 4 °C, respectively.

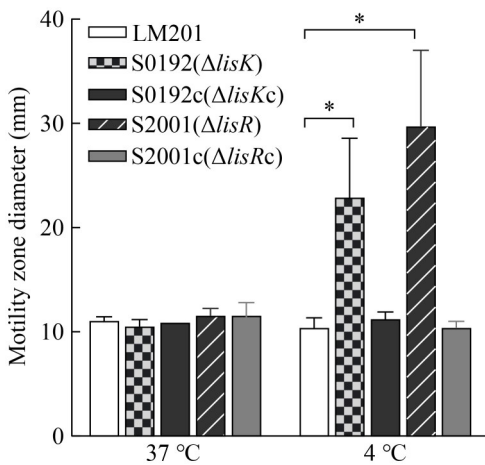


图5 菌株LM201、S0192($\Delta lisK$)、S2001($\Delta lisR$)、S0192c($\Delta lisKc$)和S2001c($\Delta lisRc$)在37 °C (48 h)和4 °C (8 d)条件下的运动圈直径大小

Figure 5 The motility zone diameters of strain LM201, S0192($\Delta lisK$), S2001($\Delta lisR$), S0192c($\Delta lisKc$), and S2001c($\Delta lisRc$) at 37 °C (48 h) and 4 °C (8 d), respectively. *: $P < 0.05$.

于亲本株。

综上所述，在低温4 °C时，LisK/R缺失株的鞭毛基因转录本表达量高于亲本株，导致缺

失株的鞭毛数量多于亲本株，进而使其运动性强于亲本株。这3个结果进一步印证了转录组测序的分析结果。

3 讨论

3.1 TCS对细菌鞭毛形成的调控作用

不同细菌的TCS对鞭毛形成的调控方式各异，有的是正向调控，即激活鞭毛基因的表达，例如空肠弯曲菌(*Campylobacter jejuni*)的FlgS/R^[35]；而有的则是负向调控，即抑制鞭毛的形成，例如支气管败血波氏菌(*Bordetella bronchiseptica*)的BvgS/A^[36]。在本研究中，4 °C低温条件下，LisK/R缺失株的运动能力显著强于亲本株(图4、图5)，电镜观察显示缺失株的鞭毛数量多于亲本株(图6)，且缺失株的鞭毛基因转录本表达量显著高于亲本株(图7、图8)，表明LisK/R在4 °C低温下对*Lm*的鞭毛形成具有抑制作用，其具体的分子机制正在探究中。

3.2 *Lm*鞭毛形成的温度依赖性

鞭毛是细菌的运动器官。*Lm*具有鞭毛基因，但在37 °C时不产生鞭毛，仅在30 °C及以

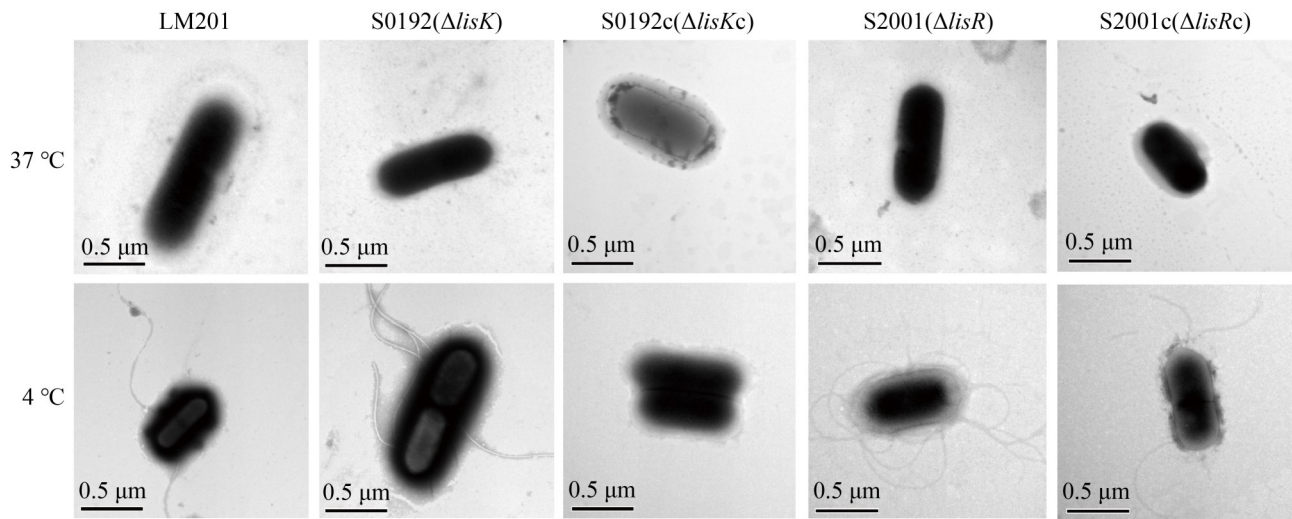


图6 菌株LM201、S0192($\Delta lisK$)、S2001($\Delta lisR$)、S0192c($\Delta lisKc$)和S2001c($\Delta lisRc$)在37 °C和4 °C条件下用透射电镜(TEM)观察到的菌株鞭毛生长情况

Figure 6 Production of flagella in strain LM201, S0192($\Delta lisK$), S2001($\Delta lisR$), S0192c($\Delta lisKc$), and S2001c($\Delta lisRc$) at 37 °C and 4 °C, respectively, by transmission electron microscopy (TEM).

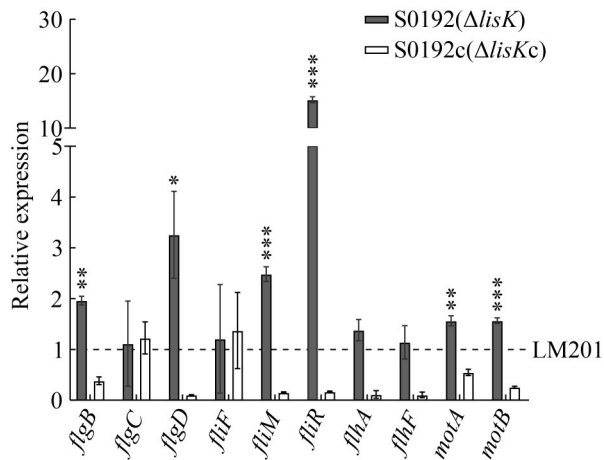


图7 在4 °C条件下S0192($\Delta lisK$)和S0192c($\Delta lisKc$)对数期的鞭毛基因 $flgB$ 、 $flgC$ 、 $flgD$ 、 $fliF$ 、 $fliM$ 、 $fliR$ 、 $flhA$ 、 $flhF$ 、 $motA$ 和 $motB$ 相较于亲本株LM201的相对转录表达水平

Figure 7 Relative transcriptional expression levels of flagellar genes $flgB$, $flgC$, $flgD$, $fliF$, $fliM$, $fliR$, $flhA$, $flhF$, $motA$, and $motB$ in S0192($\Delta lisK$) and S0192c($\Delta lisKc$) in the logarithmic growth phase at 4 °C, compared with the parental strain LM201. *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$.

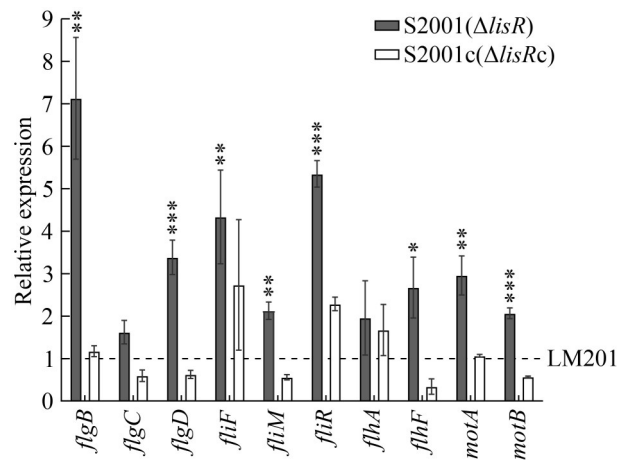


图8 在4 °C条件下S2001($\Delta lisR$)和S2001c($\Delta lisRc$)对数期的鞭毛基因 $flgB$ 、 $flgC$ 、 $flgD$ 、 $fliF$ 、 $fliM$ 、 $fliR$ 、 $flhA$ 、 $flhF$ 、 $motA$ 和 $motB$ 相较于亲本株LM201的相对转录表达水平

Figure 8 Relative transcriptional expression levels of flagellar genes $flgB$, $flgC$, $flgD$, $fliF$, $fliM$, $fliR$, $flhA$, $flhF$, $motA$, and $motB$ in S2001($\Delta lisR$) and S2001c($\Delta lisRc$) in the logarithmic growth phase at 4 °C, compared with the parental strain LM201. *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$.

下时才产生鞭毛^[4]，这一特性与 *Lm* 既是腐生菌又是胞内寄生菌的特性密切相关^[37]。在 37 °C 下，对应于宿主的生理环境，若产生鞭毛则不利于菌体在宿主体内的生存，因为鞭毛会被宿主免疫细胞的模式识别受体识别，从而刺激宿主清除细菌^[38]，因此，*Lm* 在 37 °C 时抑制鞭毛基因的表达；在 30 °C 下，对应于腐生环境，鞭毛基因的抑制被解除，菌体产生鞭毛，便于细菌寻找营养^[39]。然而，Durack 等^[40]发现，在 4 °C 低温下 *Lm* 的鞭毛基因表达下调，运动性降低。本课题组的研究也显示，在 4 °C 低温下 *Lm* 菌株 ATCC 19115 的运动性、鞭毛产量和鞭毛基因表达量均显著低于 28 °C 时的水平^[22]，表明低温下 *Lm* 的鞭毛基因表达受到抑制。本研究结果进一步表明，在 4 °C 低温下鞭毛基因表达受到双组分系统 LisK/R 的抑制。

3.3 鞭毛形成与 *Lm* 低温生长的关系

为什么 *Lm* 在低温下会抑制鞭毛基因的表达以减少鞭毛产量？鞭毛的合成和运动是细菌在细胞外环境中的一种有益生存机制，细菌通过鞭毛运动向最佳生长环境移动，反之则从不利环境中撤出，然而鞭毛的合成和运动对能量的需求极高^[41]。Wösten 等^[35]发现，无鞭毛的空肠弯曲菌 FlgS/R 突变株在肉汤培养基中的生长速率比野生株快 3 倍。本研究结果也显示，在 4 °C 低温下鞭毛多的 LisK/R 缺失株 S0192 和 S2001 在 BHI 液体培养基中的生长速率显著低于鞭毛少的亲本株(图 1、图 6)，这提示细菌可能采取了通过抑制鞭毛基因表达以减少鞭毛产量，从而将有限的能量用于生长繁殖的生存策略。

3.4 低温下 LisK 缺失后除鞭毛基因外其他基因的表达变化

本研究分析了 4 °C 下生长的缺失株 $\Delta lisK$ 和亲本株的转录组测序结果，发现与亲本株相比，除鞭毛基因显著上调外， $\Delta lisK$ 中涉及磷酸转移酶系统(phosphotransferase system, PTS)的基因有

88.6% (31/35) 发生下调，其中 *manXa* 基因(编码 PTS 系统中的甘露糖转运蛋白 EIIA)下调极其显著(\log_2 fold change 为 -5.14)。另外，*murR* 基因(属于 MurR/RpiR 家族转录调控因子)也显著下调(\log_2 fold change 为 -1.67)。MurR 参与细菌细胞壁肽聚糖的再循环，调控肽聚糖中 N-乙酰胞壁酸(N-acetylmuramic acid, MurNAc)的分解代谢^[42]。这提示在低温下 MurNAc 的分解代谢可能在 LisK/R 的调控下对 *Lm* 的低温生长发挥作用，相关研究尚未见报道，本课题组正在对此进行深入研究。

4 结论

本研究表明，在 4 °C 低温条件下生长速率较低的 LisK/R 缺失株鞭毛数量较多，而生长速率较高的亲本株鞭毛数量较少。鞭毛基因的表达及其组装过程需要消耗大量能量。在低温环境下通过降低鞭毛基因的表达、减少鞭毛的生成，并将节省的能量用于生长，是 *Lm* 采取的一种适应低温的生长策略。本研究结果进一步证实，双组分系统 LisK/R 通过抑制鞭毛基因的表达，促进了 *Lm* 在低温条件下的生长。然而，其具体的分子调控机制仍有待进一步研究。

作者贡献声明

汪国俊：实验设计、实施、结果分析、稿件的撰写和修改；黄金梅：实验菌株的构建、结果分析；栗绍文：实验设计、稿件撰写指导；刘梅：实验设计、实施指导、结果分析、稿件的撰写和修改。

作者利益冲突公开声明

作者声明不存在任何可能会影响本文所报告工作的已知经济利益或个人关系。

参考文献

- [1] De NOORDHOUT CM, DEVLEESSCHAUWER B, ANGULO FJ, VERBEKE G, HAAGSMA J, KIRK M, HAVELAAR A, SPEYBROECK N. The global burden of

- listeriosis: a systematic review and meta-analysis[J]. The Lancet Infectious Diseases, 2014, 14(11): 1073-1082.
- [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] European Food Safety Authority (EFSA), European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). The European Union One Health 2022 Zoonoses Report[J]. EFSA Journal, 2023, 21(12): e8442.
- [4] PEEL M, DONACHIE W, SHAW A. Temperature-dependent expression of flagella of *Listeria monocytogenes* studied by electron microscopy, SDS-PAGE and western blotting[J]. Journal of General Microbiology, 1988, 134(8): 2171-2178.
- [5] LIU M, DING Y, YE Q, WU S, GU Q, CHEN L, ZHANG Y, WEI X, DENG M, ZHANG J, WU Q, WANG J. Cold-tolerance mechanisms in foodborne pathogens: *Escherichia coli* and *Listeria monocytogenes* as examples[J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2024: 1-15.
- [6] HAUF S, MÖLLER L, FUCHS S, HALBEDEL S. PadR-type repressors controlling production of a non-canonical FtsW/RodA homologue and other trans-membrane proteins[J]. Scientific Reports, 2019, 9(1): 10023.
- [7] KIM J, PARK J, CHOI Z, HONG M. Structure-based molecular characterization of the LltR transcription factor from *Listeria monocytogenes*[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2022, 600: 142-149.
- [8] VÁSQUEZ L, PARRA A, QUESILLE-VILLALOBOS AM, GÁLVEZ G, NAVARRETE P, LATORRE M, TORO M, GONZÁLEZ M, REYES-JARA A. Cobalamin *cbiP* mutant shows decreased tolerance to low temperature and copper stress in *Listeria monocytogenes*[J]. Biological Research, 2022, 55(1): 9.
- [9] HINGSTON P, CHEN J, ALLEN K, TRUELSTRUP HANSEN L, WANG S. Strand specific RNA-sequencing and membrane lipid profiling reveals growth phase-dependent cold stress response mechanisms in *Listeria monocytogenes*[J]. PLoS One, 2017, 12(6): e0180123.
- [10] HINGSTON PA, TRUELSTRUP HANSEN L, POMBERT JF, WANG S. Characterization of *Listeria monocytogenes* enhanced cold-tolerance variants isolated during prolonged cold storage[J]. International Journal of Food Microbiology, 2019, 306: 108262.
- [11] SEEL W, FLEGLER A, ZUNABOVIC-PICHLER M, LIPSKI A. Increased isoprenoid quinone concentration modulates membrane fluidity in *Listeria monocytogenes* at low growth temperatures[J]. Journal of Bacteriology, 2018, 200(13): e00148-18.
- [12] FLEGLER A, ISWARA J, MÄNZ AT, SCHOCKE FS, FAßBENDER WA, HÖLZL G, LIPSKI A. Exogenous fatty acids affect membrane properties and cold adaptation of *Listeria monocytogenes*[J]. Scientific Reports, 2022, 12: 1499.
- [13] TOUCHE C, HAMCHAoui S, QUILLERÉ A, DARSONVAL M, DUBOIS-BRISSENET F. Growth of *Listeria monocytogenes* is promoted at low temperature when exogenous unsaturated fatty acids are incorporated in its membrane[J]. Food Microbiology, 2023, 110: 104170.
- [14] QUILLERÉ A, DARSONVAL M, PAPADOCHRISTOPOULOS A, AMOROS A, NICOLAS P, DUBOIS-BRISSENET F. Deciphering the impact of exogenous fatty acids on *Listeria monocytogenes* at low temperature by transcriptome analysis[J]. Frontiers in Microbiology, 2024, 15: 1441784.
- [15] HORN G, HOFWEBER R, KREMER W, KALBITZER HR. Structure and function of bacterial cold shock proteins[J]. Cellular and Molecular Life Sciences, 2007, 64(12): 1457-1470.
- [16] SCHMID B, KLUMPP J, RAIMANN E, LOESSNER MJ, STEPHAN R, TASARA T. Role of cold shock proteins in growth of *Listeria monocytogenes* under cold and osmotic stress conditions[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2009, 75(6): 1621-1627.
- [17] LEE JH, JEONG KW, KIM YM. Purification and structural characterization of cold shock protein from *Listeria monocytogenes*[J]. Bulletin of the Korean Chemical Society, 2012, 33(8): 2508-2512.
- [18] MUCHAAMBA F, von AH U, STEPHAN R, STEVENS MJA, TASARA T. Deciphering the global roles of cold shock proteins in *Listeria monocytogenes* nutrient metabolism and stress tolerance[J]. Frontiers in Microbiology, 2022, 13: 1057754.
- [19] ANGELIDIS AS, SMITH GM. Role of the glycine betaine and carnitine transporters in adaptation of *Listeria monocytogenes* to chill stress in defined medium[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2003, 69(12): 7492-7498.
- [20] SHIVAJI S, PRAKASH JSS. How do bacteria sense and respond to low temperature[J]. Archives of Microbiology, 2010, 192(2): 85-95.
- [21] WU Y, PANG X, LIU X, WU Y, ZHANG X. Functional genomics identified novel genes involved in growth at low temperatures in *Listeria monocytogenes*[J]. Microbiology Spectrum, 2022, 10(4): e0071022.
- [22] 汪国俊, 邓霞, 栗绍文, 刘梅. 低温下阻遏蛋白 MogR 对单增李斯特菌鞭毛形成的影响[J]. 微生物学报, 2024, 64(5): 1506-1520.
- WANG GJ, DENG X, LI SW, LIU M. Role of repressor MogR in flagellar biosynthesis of *Listeria monocytogenes* at low temperatures[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2024, 64(5): 1506-1520 (in Chinese).
- [23] CHAN YC, RAENGPRADUB S, BOOR KJ, WIEDMANN M. Microarray-based characterization of the *Listeria monocytogenes* cold regulon in log- and stationary-phase cells[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2007, 73(20): 6484-6498.
- [24] CHAN YC, HU YW, CHATURONGAKUL S, FILES KD, BOWEN BM, BOOR KJ, WIEDMANN M. Contributions of two-component regulatory systems, alternative sigma factors, and negative regulators to *Listeria monocytogenes* cold adaptation and cold growth[J]. Journal of Food Protection, 2008, 71(2): 420-425.

- [25] PÖNTINEN A, MARKKULA A, LINDSTRÖM M, KORKEALA H. Two-component-system histidine kinases involved in growth of *Listeria monocytogenes* EGD-e at low temperatures[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2015, 81(12): 3994-4004.
- [26] ALEJANDRO-NAVARRETO X, FREITAG NE. Revisiting old friends: updates on the role of two-component signaling systems in *Listeria monocytogenes* survival and pathogenesis[J]. *Infection and Immunity*, 2024, 92(4): e0034523.
- [27] BOURRET RB, SILVERSMITH RE. Two-component signal transduction[J]. *Current Opinion in Microbiology*, 2010, 13(2): 113-115.
- [28] ISHII E, EGUCHI Y. Diversity in sensing and signaling of bacterial sensor histidine kinases[J]. *Biomolecules*, 2021, 11(10): 1524.
- [29] PAPON N, STOCK AM. Two-component systems[J]. *Current Biology*, 2019, 29(15): R724-R725.
- [30] CASINO P, RUBIO V, MARINA A. The mechanism of signal transduction by two-component systems[J]. *Current Opinion in Structural Biology*, 2010, 20(6): 763-771.
- [31] WU Y, ZHENG J, WANG Y, LI S, JIN H, LI Z, BI D, SUN M, LIU M. Draft genome sequence of *Listeria monocytogenes* LM201, isolated from foodstuff[J]. *Genome Announcements*, 2015, 3(1): e01417-14.
- [32] 张娜, 欧娅, 郑金水, 刘梅. 单增李斯特菌食品分离株 LM201 的双组分信号转导系统的生物信息学分析[J]. *微生物学杂志*, 2018, 38(1): 96-104.
ZHANG N, OU Y, ZHENG JS, LIU M. Bioinformatics analysis of double-component signal transduction systems of *Listeria monocytogenes* LM201 isolated strain from foodstuff[J]. *Journal of Microbiology*, 2018, 38(1): 96-104 (in Chinese).
- [33] TASARA T, STEPHAN R. Evaluation of housekeeping genes in *Listeria monocytogenes* as potential internal control references for normalizing mRNA expression levels in stress adaptation models using real-time PCR[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2007, 269(2): 265-272.
- [34] CHENG C, DONG Z, HAN X, WANG H, JIANG L, SUN J, YANG Y, MA T, SHAO C, WANG X, CHEN Z, FANG W, FREITAG NE, HUANG H, SONG H. Thioredoxin A is essential for motility and contributes to host infection of *Listeria monocytogenes* via redox interactions[J]. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2017, 7: 287.
- [35] WÖSTEN MM, WAGENAAR JA, van PUTTEN JP. The FlgS/FlgR two-component signal transduction system regulates the fla regulon in *Campylobacter jejuni*[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2004, 279(16): 16214-16222.
- [36] AKERLEY BJ, MONACK DM, FALKOW S, MILLER JF. The bvgAS locus negatively controls motility and synthesis of flagella in *Bordetella bronchiseptica*[J]. *Journal of Bacteriology*, 1992, 174(3): 980-990.
- [37] FREITAG NE, PORT GC, MINER MD. *Listeria monocytogenes*-from saprophyte to intracellular pathogen[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2009, 7(9): 623-628.
- [38] HAYASHI F, SMITH KD, OZINSKY A, HAWN TR, YI EC, GOODLETT DR, ENG JK, AKIRA S, UNDERHILL DM, ADEREM A. The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5[J]. *Nature*, 2001, 410(6832): 1099-1103.
- [39] GRÜNDLING A, BURRACK LS, BOUWER HG, HIGGINS DE. *Listeria monocytogenes* regulates flagellar motility gene expression through MogR, a transcriptional repressor required for virulence[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2004, 101(33): 12318-12323.
- [40] DURACK J, ROSS T, BOWMAN JP. Characterisation of the transcriptomes of genetically diverse *Listeria monocytogenes* exposed to hyperosmotic and low temperature conditions reveal global stress-adaptation mechanisms[J]. *PLoS One*, 2013, 8(9): e73603.
- [41] ARMITAGE JP. Bacterial tactic responses[J]. *Advances in Microbial Physiology*, 1999, 41: 229-289.
- [42] JAEGER T, MAYER C. The transcriptional factors MurR and catabolite activator protein regulate N-acetylmuramic acid catabolism in *Escherichia coli*[J]. *Journal of Bacteriology*, 2008, 190(20): 6598-6608.