

单核增生李斯特氏菌 LPXTG 基序锚定蛋白 Lmo0175 介导的抗氧化应激和感染生物学研究

葛泓睿¹, 李豪杰¹, 高宇杰¹, 徐加利¹, 张蕊², 宋厚辉¹, 程昌勇^{1*}, 邓思敏^{1*}

1 浙江农林大学 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管理国际科技合作基地, 同一健康和食品安全“一带一路”国际联合实验室, 中澳动物健康大数据分析联合实验室, 浙江 杭州

2 中国农业大学 动物医学院, 北京

葛泓睿, 李豪杰, 高宇杰, 徐加利, 张蕊, 宋厚辉, 程昌勇, 邓思敏. 单核增生李斯特氏菌 LPXTG 基序锚定蛋白 Lmo0175 介导的抗氧化应激和感染生物学研究[J]. 微生物学报, 2025, 65(10): 4504-4516.

GE Hongrui, LI Haojie, GAO Yujie, XU Jiali, ZHANG Rui, SONG Houhui, CHENG Changyong, DENG Simin. Oxidative resistance and infection ability mediated by LPXTG motif-anchored protein Lmo0175 in *Listeria monocytogenes*[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2025, 65(10): 4504-4516.

摘要:【目的】通过比较单核增生李斯特氏菌参考菌株 EGD-e、*lmo0175* 基因缺失株 Δ *lmo0175* 和回补株 $C\Delta$ *lmo0175* 在细菌生长、抗氧化应激、细胞和宿主感染等方面的差异, 明确 LPXTG 基序锚定蛋白 Lmo0175 在单核增生李斯特氏菌抗氧化应激和感染致病中的作用。【方法】通过构建 *lmo0175* 的基因缺失株和回补株, 探究 Lmo0175 对单核增生李斯特氏菌生长、抗氧化应激、细胞黏附、细胞侵袭、胞内增殖和组织定殖能力及小鼠致病力等方面的影响, 从而明确 Lmo0175 在该菌抗氧化应激和感染宿主中的作用。【结果】*lmo0175* 基因缺失后, 单核增生李斯特氏菌在抗氧化应激、胞内增殖和小鼠脏器定殖等方面的能力显著降低, 但在生长能力、细胞黏附和侵袭能力方面无显著差异。【结论】本研究阐明了 LPXTG 基序锚定蛋白 Lmo0175 参与单核增生李斯特氏菌抗氧化应激、胞内增殖和组织定殖等过程, 且有助于该菌对小鼠的致病力。

关键词: 单核增生李斯特氏菌; 氧化应激; 宿主感染; LPXTG 基序锚定蛋白 Lmo0175

资助项目: 国家重点研发计划(2023YFD1801800); 国家自然科学基金(32473026, 32302961); 2025年浙江省大学生科技创新活动计划暨新苗人才计划(2025R412A011); 2025年浙江省大学生创新训练项目

This work was supported by the National Key Research and Development Program of China (2023YFD1801800), the National Natural Science Foundation of China (32473026, 32302961), the Program of “Xinmiao” (Potential) Talents in Zhejiang Province in 2025 (2025R412A011), and the College Students’ Innovative Entrepreneurial Training Program in Zhejiang Province in 2025.

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

Received: 2025-03-16; Accepted: 2025-03-25; Published online: 2025-05-16

Oxidative resistance and infection ability mediated by LPXTG motif-anchored protein Lmo0175 in *Listeria monocytogenes*

GE Hongrui¹, LI Haojie¹, GAO Yujie¹, XU Jiali¹, ZHANG Rui², SONG Houhui¹, CHENG Changyong^{1*}, DENG Simin^{1*}

¹ Key Laboratory of Applied Biotechnology on Green-eco-healthy Animal Husbandry of Zhejiang Province, Zhejiang Engineering Research Center for Veterinary Diagnostics & Advanced Technology, Zhejiang International Science and Technology Cooperation Base for Veterinary Medicine and Health Management, Belt and Road International Joint Laboratory for One Health and Food Safety, China-Australia Joint Laboratory for Animal Health Big Data Analytics, College of Veterinary Medicine, Zhejiang A&F University, Hangzhou, Zhejiang, China

² College of Veterinary Medicine, China Agricultural University, Beijing, China

Abstract: [Objective] To compare the bacterial growth, oxidative resistance, and bacterial infection in cells and host among *Listeria monocytogenes* EGD-e, *lmo0175* (LPXTG motif-anchored protein)-deleted and complementary strains, so as to investigate the roles of Lmo0175 in anti-oxidative resistance and bacterial infection. [Methods] The *lmo0175*-deleted and complementary strains were constructed to compare the difference in bacterial growth, oxidative resistance, adhesion, invasion, intracellular proliferation, survival of infected mice, and bacterial loads in organs of *Listeria monocytogenes*. [Results] The deletion of *lmo0175* remarkably decreased oxidative resistance, cell proliferation, colonization in the liver and spleen, and pathogenicity in mice. However, it had no significant impact on bacterial growth, adhesion or invasion. [Conclusion] The LPXTG motif-anchored protein Lmo0175 contributes to the anti-oxidative resistance, proliferation, and colonization in specific organs of *Listeria monocytogenes*.

Keywords: *Listeria monocytogenes*; oxidative stress; host infection; LPXTG motif-anchored protein Lmo0175

单核增生李斯特氏菌(*Listeria monocytogenes*)是一种重要的人畜共患胞内病原菌,广泛存在于农场、食品加工厂和食物等环境中^[1]。该菌对人类和动物的健康构成严重威胁,并对食品安全造成挑战^[2]。单核增生李斯特氏菌感染人引起的李斯特菌病被认为是最严重的食源性疾病之一^[2],可引起老年人、孕妇、幼儿等免疫功能低下者的脑膜炎、流产或新生儿败血症等临床症状,其感染后死亡率高达30%^[3-4]。

单核增生李斯特氏菌具有较强的环境适应能力,能够耐受活性氧、酸、高渗透压、低温和高温等环境应激^[5]。其中,氧化应激是细菌最

常见的环境应激压力之一^[6]。单核增生李斯特氏菌编码多种代谢酶来感知和适应富氧环境从而抵抗氧化应激,例如超氧化物歧化酶、过氧化氢酶、硫氧还蛋白、谷胱甘肽还原酶和谷胱甘肽 S-转移酶^[7-8]。细菌对环境变化的感知和适应能力对其生存和致病至关重要^[9]。单核增生李斯特氏菌表达多种毒力或致病因子,介导细菌从应激环境向宿主细胞质的迁移,促进细菌在宿主肠道内的生存、细胞黏附与入侵、吞噬体逃逸,随后在细胞质内复制和细胞间迁移^[9]。在该致病过程中,表面蛋白和分泌蛋白发挥着至关重要的作用^[10]。LPXTG 基序锚定蛋白是一类羧

基端带有 LPXTG 保守基序并共价锚定到细胞壁肽聚糖上的表面蛋白，在感染宿主过程中发挥重要的毒力作用^[11-15]。然而，许多 LPXTG 基序锚定蛋白的生物学功能尚未明确。

本实验室前期研究发现，单核增生李斯特氏菌中的 Lmo0175 是一个功能未知的 LPXTG 基序锚定细胞壁蛋白，在基因组中被注释为肽聚糖结合蛋白(peptidoglycan-binding protein)，含有黏蛋白结合蛋白 MucBP (mucin-binding protein, 270–330 aa)和內化素 InlK_D3 (179–258 aa)结构域，提示其可能与宿主感染有关^[16-17]。此外，本实验室前期筛选还发现，Lmo0175 可能与抗氧化应激有关。因此，本研究拟通过比较单核增生李斯特氏菌 EGD-e、缺失株 Δ lmo0175 和回补株 C Δ lmo0175 在生长、抗氧化应激、细胞感染和小鼠感染等方面的差异，明确 Lmo0175 在该菌抗氧化应激和宿主感染中发挥的作用，为下一步解析其抗氧化应激和宿主感染的机制奠定重要基础。

1 材料与方法

1.1 菌株、质粒和引物

本研究所用的单核增生李斯特氏菌参考菌

株 EGD-e，用牛脑心浸出液肉汤培养基(brain heart infusion, BHI)在 37 °C、180 r/min 摇床中振荡培养，或用 BHI 固体培养基在 37 °C 恒温生化培养箱中静置培养。大肠杆菌(*Escherichia coli*) DH5 α 菌株，用 LB 肉汤或固体培养基在 37 °C 振荡(180 r/min)或静置培养。上述菌株均由本实验室保存。本研究所用温敏型穿梭质粒 pSKV7^[18] (7.1 kb, *lac* 启动子, Amp^r, Cm^r)及在此基础上构建的用于缺失株构建的重组质粒 pSL2652 (8.0 kb, *lac* 启动子, Amp^r, Cm^r); 整合型穿梭质粒 pIMK2^[19] (6.2 kb, P_{help} 启动子, Kana^r)及用于回补株构建的重组质粒 pSL2658 (7.2 kb, *lmo0175* 启动子, Kana^r)均由本实验室保存。人肠上皮细胞 Caco-2 和小鼠巨噬细胞 RAW264.7 分别在添加 10% 胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS)的 RPMI 1640 和 DMEM 培养基中，置于 37 °C、5% CO₂ 的细胞恒温培养箱中静置培养。

本研究所涉及引物见表 1。

1.2 Δ lmo0175 缺失菌株和 C Δ lmo0175 回补菌株的构建和筛选

基于单核增生李斯特氏菌无痕基因敲除原

表1 引物序列信息

Table 1 Primers used in this study

Primers name	Primer sequences (5'→3')
<i>lmo0175</i> -up-F	CCCA <u>AAGCTT</u> AGTATCTGACAGATATCTTTGACAAGATACTT
<i>lmo0175</i> -up-R	TTTAATAAGAAAAAACTATTATTTAAAAAAGAAATAAAAAAACACCT
<i>lmo0175</i> -down-F	CTTTTAAATAATAGTTTTTCTTATTAAACATTATATAAATAACCTCTT
<i>lmo0175</i> -down-R	CCGGAATTC <u>CTCCATAAACATCCTGTTATAAAACTAATC</u>
<i>lmo0175</i> -front-F	ATAAGATGTGTACACCGAACCTTGAT
C Δ lmo0175-F	GAAGGAGAGTGAAAC <u>CCATGGATGTTTAATAAGAAAAAACTATCGCT</u>
C Δ lmo0175-R	ATCGAATTCCTGCAG <u>CCCGGGTACTGATAGTTTTTCTTCTCCTCTCA</u>
<i>lmo0175</i> -in-F	ACACATGAACGGTGACATTTAGTGTATTTG
<i>lmo0175</i> -in-R	AAAGCAAAAGTAAAGTTCGACTGGAAAACCT
<i>lmo0175</i> -out-F	ATTTCTGGTAATTCAGGCACCCC
<i>lmo0175</i> -out-R	TATAGCTGAAATAACAAGAAGATGGTAGAGGTTTT

下划线表示酶切位点

The underlines represent restriction endonuclease sites.

理构建基因缺失株^[20]。以过夜培养的单核增生李斯特氏菌 EGD-e (GenBank 登录号: NC_003210.1)菌液为基因组 DNA 模板, 以 *lmo0175-up-F/R* 和 *lmo0175-down-F/R* (表 1)为引物, 分别扩增 *lmo0175* 基因 (GenBank 登录号: NP_463706.1)的上、下游同源臂。随后以 *lmo0175* 基因的上、下游同源臂 1:1 (摩尔比)混合物为模板, 以 *lmo0175-up-F* 和 *lmo0175-down-R* 为引物, 通过重叠 PCR 获得上、下游同源臂融合片段。上述 PCR 反应体系(50 μL): $2\times\text{KOD One}^{\text{TM}}$ PCR Master Mix 25 μL , 上、下游引物(10 $\mu\text{mol/L}$)各 2 μL , DNA 模板 2 μL , ddH_2O 19 μL 。PCR 反应条件: 98 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min; 98 $^{\circ}\text{C}$ 变性 10 s, 58 $^{\circ}\text{C}$ 退火 5 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1 s, 共 35 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 终延伸 7 min。PCR 扩增得到的 *lmo0175* 上、下游同源臂融合片段与 pKSV7 质粒经 *Hind* III 和 *EcoR* I 酶切后连接, 获得重组质粒 pSL2652, 随后将 pSL2652 质粒电转至单核增生李斯特氏菌 EGD-e 感受态中。菌液在 42 $^{\circ}\text{C}$ 含 10 $\mu\text{g/mL}$ Cm^{r} 抗性的 BHI 肉汤中培养 2-3 代后涂布在含 Cm^{r} 抗性的 BHI 平板上。待长出单菌落后, 利用 *lmo0175-front-F/lmo0175-down-R* (表 1)引物筛选出发生同源重组的阳性克隆, 扩增产物大小为 1 000 bp。然后将阳性克隆在 30 $^{\circ}\text{C}$ 的 BHI 肉汤中传代培养约 10 代后, 在无抗生素的 BHI 平板上划线。待长出单菌落后, 用无菌牙签挑取数个单菌落, 同步接种于无抗生素和含 Cm^{r} 抗性的 BHI 平板中培养。观察在无抗生素的培养基中长势良好, 且在对应含 Cm^{r} 抗性的培养基中无法生长的菌落即为疑似基因缺失株。用引物 *lmo0175-front-F/lmo0175-down-R* (表 1)对筛选出的疑似基因缺失菌株进行 PCR 和测序双重验证, 最终获得基因缺失菌株 $\Delta\text{lmo0175}$ 。

参考文献[20]构建单核增生李斯特氏菌的回补菌株。以单核增生李斯特氏菌 EGD-e 菌株基因组为模板, 以 $\text{C}\Delta\text{lmo0175-F/R}$ (表 1)为引物扩增单转录本 *lmo0175* 的启动子和基因编码区。扩增产物经 *Sac* I 和 *Sma* I 双酶切后构建至

pIMK2 质粒中, 获得重组质粒 pSL2658。将 pSL2658 质粒电转至 $\Delta\text{lmo0175}$ 感受态中, 通过 Kana^{r} (50 $\mu\text{g/mL}$)抗性筛选, 并对筛选出的单克隆菌落 PCR 和测序验证后最终获得回补菌株 $\text{C}\Delta\text{lmo0175}$ 。

在 *lmo0175* 基因上、下游同源臂上设计一对外部引物 *lmo0175-out-F/R* (表 1); 在 *lmo0175* 基因内部设计一对内部引物 *lmo0175-in-F/R* (表 1), 通过 *lmo0175* 基因内外部引物对单核增生李斯特氏菌 EGD-e、 $\Delta\text{lmo0175}$ 和 $\text{C}\Delta\text{lmo0175}$ 进行 PCR 鉴定。

1.3 生长曲线的绘制和菌落计数

参考文献[21], 通过绘制生长曲线和菌落计数比较单核增生李斯特氏菌各菌株的生长能力差异。过夜培养的单核增生李斯特氏菌按 1:100 转接后, 37 $^{\circ}\text{C}$ 静置培养 12 h, 且每隔 1 h 用多功能酶标仪 SynergyTM H1 测定 OD_{600} 吸光值。将上述转接后的菌液培养至 4、6 和 8 h 时, 各取 100 μL 菌液进行倍比稀释并计数。每个菌株设置 3 个重复。

1.4 氧化应激试验

向 BHI 肉汤培养基中加入不同浓度的 H_2O_2 、金属离子氧化剂 Cu^{2+} 和 Cd^{2+} 、巯基特异性氧化剂胍(diamide), 探究 Lmo0175 对单核增生李斯特氏菌在肉汤培养基中抗氧化应激能力的影响^[20]。过夜培养的单核增生李斯特氏菌 EGD-e、 $\Delta\text{lmo0175}$ 和 $\text{C}\Delta\text{lmo0175}$ 菌液 6 000 r/min 离心 5 min 后, 用新鲜 BHI 培养基将菌体重悬并调整至相同 OD_{600} 吸光值, 然后按 1:100 转接至添加氧化剂的新鲜 BHI 培养基的 96 孔板中, 200 $\mu\text{L/孔}$, 37 $^{\circ}\text{C}$ 静置培养, 且每隔 1 h 测定 OD_{600} 吸光值。每个菌株设置 3 个重复。

向 BHI 固体培养基中加入不同浓度的 H_2O_2 、金属离子氧化剂 Cu^{2+} 和 Cd^{2+} 、巯基特异性氧化剂胍, 探究 Lmo0175 对单核增生李斯特氏菌在固体培养基中抗氧化应激能力的影响^[20]。将上述重悬后的菌液调整 OD_{600} 为 0.6 左右(约

2×10^9 CFU/mL), 倍比稀释后取 10 μ L 菌液点在带有不同氧化剂的 BHI 平板上, 置于 37 $^{\circ}$ C 恒温生化培养箱中静置培养过夜后观察菌落生长情况。

1.5 细菌黏附和侵袭试验

参考文献[22], 利用 Caco-2 细胞比较单核增生李斯特氏菌各菌株在上皮细胞上的黏附和侵袭能力的差异。培养到 OD_{600} 为 0.6 左右的单核增生李斯特氏菌菌液, 用 $1 \times$ PBS (10 mmol/L) 洗涤菌液 2 次后, 用 RPMI 1640 培养基稀释至 2×10^6 CFU/mL 备用。稀释后的菌液以感染复数(multiplicity of infection, MOI)=10 感染 Caco-2 细胞。黏附试验: 感染 30 min 后, 用 PBS 洗涤细胞 3 次, 裂解细胞, 并将细胞悬液进行倍比稀释后涂布于 BHI 固体培养基上, 待过夜培养后对平板上的菌落进行计数。侵袭试验: 感染 1.5 h 后, 加入含 50 μ g/mL 庆大霉素的 RPMI 1640 细胞培养基处理 30 min, 洗涤细胞 3 次, 裂解细胞并涂布计数。

1.6 RAW264.7 细胞中的胞内增殖试验

利用 RAW264.7 细胞比较单核增生李斯特氏菌各菌株在巨噬细胞中的胞内增殖能力的差异^[23]。培养到 OD_{600} 为 0.6 左右的单核增生李斯特氏菌菌液, 先用 PBS 洗涤 2 次, 再用 DMEM 培养基倍比稀释至 5×10^6 CFU/mL 备用。稀释后的菌液以 MOI=10 感染 RAW264.7 细胞 30 min。洗涤细胞 2 次, 再用含 50 μ g/mL 庆大霉素的 DMEM 培养基处理 30 min。洗涤细胞 3 次, 再用含 5 μ g/mL 庆大霉素和 10% FBS 的 DMEM 培养基继续培养 1、4 和 7 h。培养结束后用 PBS 洗涤细胞 3 次, 再裂解细胞并涂布计数。

1.7 小鼠存活和组织载菌量试验

通过小鼠模型比较单核增生李斯特氏菌各菌株在小鼠脏器中的定殖能力和对小鼠的致病力差异^[24]。培养后的单核增生李斯特氏菌菌液用 PBS 洗涤 2 次并稀释至 2×10^7 CFU/mL 备用。向 6 周龄 ICR 雌性小鼠分别腹腔注射单核增生

李斯特氏菌 EGD-e、 $\Delta lmo0175$ 和 $C\Delta lmo0175$ 菌液各 200 μ L, 每株菌注射 8 只小鼠。感染 24 h 后分离脾脏(spleen)和肝脏(liver)进行组织匀浆, 并对组织悬液进行倍比稀释和涂布计数。每组去除最高值和最低值后进行数据处理。

用处理后的单核增生李斯特氏菌菌液按上述方法感染 ICR 雌性小鼠, 每株菌注射 10 只小鼠, 感染后每隔 12 h 观察和记录各组小鼠的存活情况, 累计观察 7 d。

本研究动物实验已通过浙江农林大学实验动物伦理委员会审查, 编号为 ZAFUAC202483。

1.8 数据统计与处理

使用 GraphPad Prism 8.0 进行数据处理和显著性分析。本研究均采用 t 检验进行显著性分析, 其中 ns 表示 $P > 0.05$, * 表示 $0.01 < P < 0.05$, ** 表示 $0.001 < P < 0.01$, *** 表示 $P < 0.001$ 。使用 Adobe Illustrator 2025 进行图片排版。

2 结果与分析

2.1 构建单核增生李斯特氏菌 $lmo0175$ 缺失株 $\Delta lmo0175$ 和回补株 $C\Delta lmo0175$

经 PCR 的 $lmo0175$ 上、下游同源臂条带大小分别为 500 bp (图 1A, 泳道 Up 和 Down), 融合后的同源臂片段大小为 1 000 bp (图 1A, 泳道 Overlap)。含重组质粒 pSL2652 的菌体经菌落 PCR (图 1B, 泳道 pSL2652) 和测序验证, 表明用于筛选 $lmo0175$ 缺失的 pSL2652 质粒构建成功。同样, 将 $lmo0175$ 及其上游启动子区克隆至 pIMK2 穿梭质粒中, 得到重组质粒 pSL2658。

将 pSL2652 和 pSL2658 质粒分别电转至单核增生李斯特氏菌 EGD-e 和 $\Delta lmo0175$ 中, 筛选 $lmo0175$ 缺失株和回补株。利用 $lmo0175$ 的内、外部引物对单核增生李斯特氏菌各菌株进行 PCR 验证。当用 $lmo0175$ -inner-F/R 扩增时, 仅有 EGD-e 和 $C\Delta lmo0175$ 出现 400 bp 大小的条带; 当用 $lmo0175$ -outer-F/R 扩增时, $\Delta lmo0175$ 和 $C\Delta lmo0175$ 出现 771 bp 大小的条带, 而

EGD-e 出现 1 900 bp 大小的条带(图 1C), 表明缺失株 $\Delta lmo0175$ 和回补株 $C\Delta lmo0175$ 构建成功。

2.2 *Lmo0175* 不影响单核增生李斯特氏菌的生长

通过绘制单核增生李斯特氏菌的生长曲线, 发现 EGD-e、 $\Delta lmo0175$ 和 $C\Delta lmo0175$ 在 0-12 h 的生长水平无显著差异(图 2A)。细菌培养 4、6

和 8 h 后的菌落计数结果表明, EGD-e、 $\Delta lmo0175$ 和 $C\Delta lmo0175$ 在 4-8 h 无显著差异(图 2B、2C)。结果表明, *lmo0175* 基因缺失后不影响该菌在 37 °C BHI 肉汤中的生长能力。

2.3 *Lmo0175* 参与单核增生李斯特氏菌在固体培养条件下的抗氧化应激

比较单核增生李斯特氏菌 EGD-e、 $\Delta lmo0175$ 和 $C\Delta lmo0175$ 在添加不同浓度常见氧化剂 H_2O_2 、

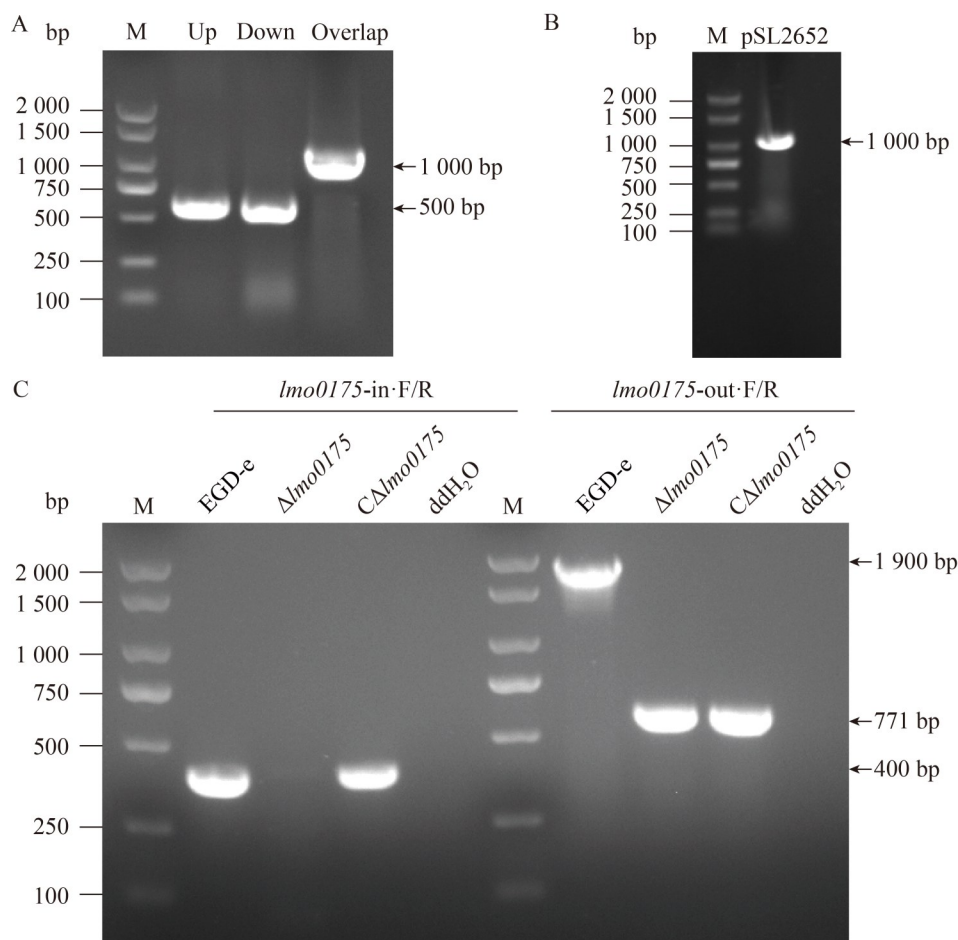


图1 单核增生李斯特氏菌*lmo0175*缺失株和回补株的构建与鉴定。A: PCR扩增*lmo0175*上、下游同源臂及其融合片段; B: pSL2652重组质粒PCR鉴定; C: 单核增生李斯特氏菌EGD-e、 $\Delta lmo0175$ 和 $C\Delta lmo0175$ 的基因组PCR鉴定(泳道M: DNA分子量标准, 100-2 000 bp)。

Figure 1 Constructed and identified of *lmo0175* gene-deletion and complementary strains of *Listeria monocytogenes*. A: Upstream, downstream and overlapping fragments of *lmo0175* were amplified; B: Recombinant plasmid pSL2652 was identified; C: *L. monocytogenes* EGD-e, $\Delta lmo0175$, and $C\Delta lmo0175$ were identified by genomic PCR. Lane M: DNA marker, 100-2 000 bp.

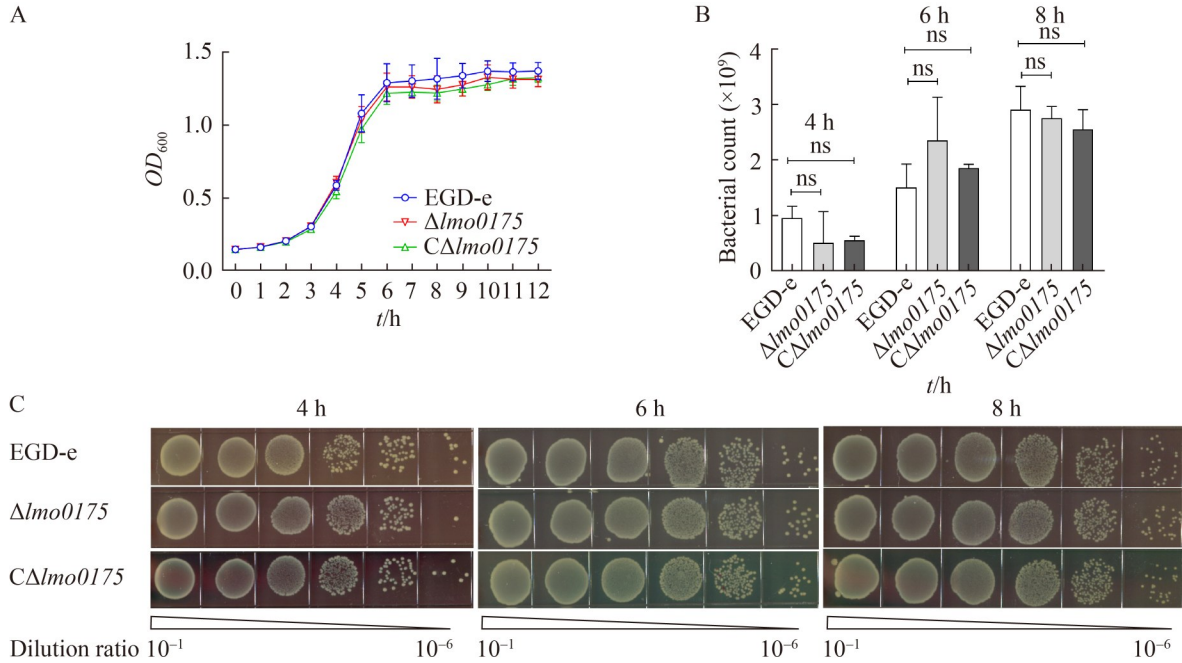


图2 *lmo0175*基因缺失不影响单核增生李斯特氏菌的生长。A: Bacterial growth curve; B: 细菌生长计数; C: 细菌生长点板。

Figure 2 The deletion of *lmo0175* had no effect on the growth of *Listeria monocytogenes*. A: Bacterial growth curve; B: Bacterial CFU counts; C: Bacterial growth on plates. ns: $P > 0.05$.

Cu^{2+} 、 Cd^{2+} 和胍的 BHI 固体培养基中的生长差异，探究 *Lmo0175* 在抗氧化应激中的作用。如图 3 所示，发现在 10 mmol/L 和 15 mmol/L H_2O_2 的 BHI 平板上，3 株菌在 10^{-1} – 10^{-6} 稀释度的生长无显著差异。在 CuCl_2 氧化剂的应激平板上，EGD-e 和 $\text{C}\Delta\text{lmo0175}$ 均在最高稀释度 10^{-6} (0.25 mmol/L CuCl_2)、 10^{-6} (0.5 mmol/L CuCl_2) 和 10^{-3} (1 mmol/L CuCl_2) 存在大量菌落生长，而 $\Delta\text{lmo0175}$ 能在上述应激平板上大量生长的最高稀释度分别为 10^{-5} (0.25 mmol/L CuCl_2)、 10^{-3} (0.5 mmol/L CuCl_2) 和 10^{-1} (1 mmol/L CuCl_2)，因此 $\Delta\text{lmo0175}$ 与 EGD-e 和 $\text{C}\Delta\text{lmo0175}$ 相比在 0.25、0.5 和 1 mmol/L CuCl_2 氧化剂的应激平板上分别表现出 1、3 和 2 个数量级的显著差异。在 0.25、0.5 和 1 mmol/L CdCl_2 氧化剂的应激平板上， $\Delta\text{lmo0175}$ 与 EGD-e 和 $\text{C}\Delta\text{lmo0175}$ 相比均表现出 1 个数量级的显著差异。在 1、1.5 和 2 mmol/L 胍氧化剂的应激平板上， $\Delta\text{lmo0175}$ 与

EGD-e 和 $\text{C}\Delta\text{lmo0175}$ 相比均表现出 1 个数量级的显著差异。因此，在添加 Cu^{2+} 、 Cd^{2+} 和胍的固体培养基中，*Lmo0175* 参与单核增生李斯特氏菌的抗氧化应激。

2.4 *Lmo0175* 参与单核增生李斯特氏菌在肉汤培养条件下的抗氧化应激

比较单核增生李斯特氏菌 EGD-e、 $\Delta\text{lmo0175}$ 和 $\text{C}\Delta\text{lmo0175}$ 在添加不同浓度常见氧化剂 H_2O_2 、 Cu^{2+} 、 Cd^{2+} 和胍的 BHI 肉汤培养基中的生长差异，探究 *Lmo0175* 在抗氧化应激中的作用。如图 4 所示，EGD-e、 $\Delta\text{lmo0175}$ 和 $\text{C}\Delta\text{lmo0175}$ 在不同浓度 H_2O_2 BHI 培养基中生长无显著差异。与 EGD-e 和 $\text{C}\Delta\text{lmo0175}$ 相比， $\Delta\text{lmo0175}$ 在 1 mmol/L 和 1.5 mmol/L CuCl_2 BHI 培养基中生长显著变慢，尤其是在 1.5 mmol/L CuCl_2 BHI 培养基中， $\Delta\text{lmo0175}$ 的对数期和稳定期生长均显著变慢。 $\Delta\text{lmo0175}$ 在 1.5 mmol/L CdCl_2 BHI 培养

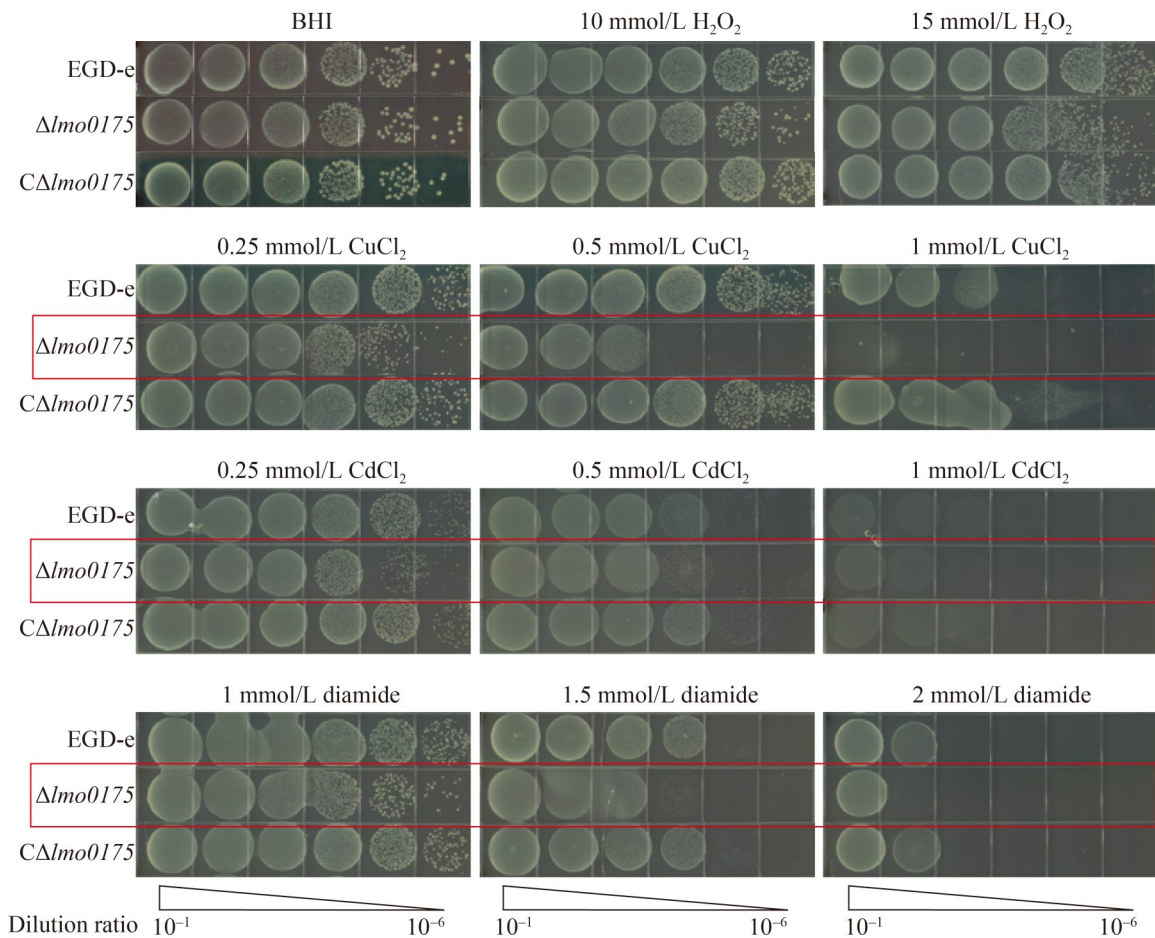


图3 *Lmo0175*参与单核增生李斯特氏菌在固体培养条件下的抗氧化应激

Figure 3 *Lmo0175* contributed to anti-oxidative resistance of *Listeria monocytogenes* in solid media.

基中的生长较 EGD-e 和 $C\Delta lmo0175$ 显著变慢。 $\Delta lmo0175$ 在 1、1.5 和 2 mmol/L 胨 BHI 培养基中生长均显著变慢。各生长条件下 EGD-e 和 $C\Delta lmo0175$ 的生长均无显著差异。结果表明, 在添加 Cu^{2+} 、 Cd^{2+} 和胨氧化剂的肉汤培养基中, *Lmo0175* 参与单核增生李斯特氏菌的抗氧化应激。

2.5 *Lmo0175* 有助于单核增生李斯特氏菌在吞噬细胞中的增殖

通过体外黏附和侵袭试验, 探究 *Lmo0175* 对单核增生李斯特氏菌黏附和侵袭人肠上皮细胞 Caco-2 的影响。结果表明, 与 EGD-e 和 $C\Delta lmo0175$ 相比, $\Delta lmo0175$ 的黏附率(图 5A)和

侵袭率(图 5B)均无显著差异。

通过体外感染小鼠巨噬细胞 RAW264.7, 比较单核增生李斯特氏菌 EGD-e、 $\Delta lmo0175$ 和 $C\Delta lmo0175$ 在巨噬细胞中增殖能力的差异。结果表明, 与 EGD-e 和 $C\Delta lmo0175$ 相比, $\Delta lmo0175$ 在感染 0.5 h 时的黏附率和 1.5 h 时的侵袭率均无显著差异。在感染 3 h (增殖时间 2 h) 时, 各菌株的增殖率无显著差异; 在感染 6 h (增殖时间 5 h) 时, EGD-e 和 $C\Delta lmo0175$ 的增殖率分别是 $\Delta lmo0175$ 的 2.55 倍和 3.05 倍; 在感染 9 h (增殖时间 8 h) 时, 与 $\Delta lmo0175$ 相比, EGD-e 和 $C\Delta lmo0175$ 增殖率分别提高了 149.88% 和 182.02% (图 5C)。因此, 缺失

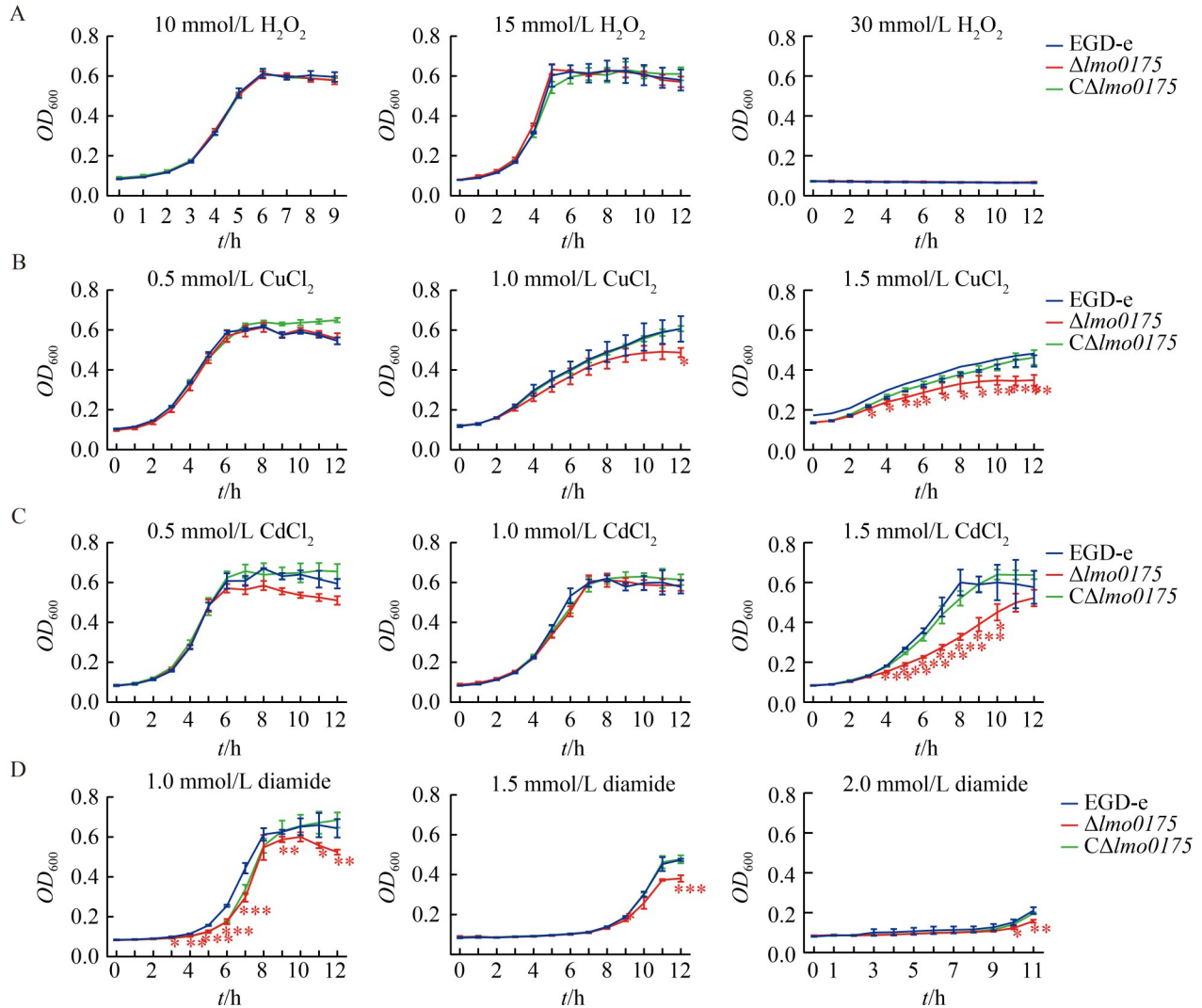


图4 比较单核增生李斯特氏菌 $\Delta lmo0175$ 和 $C\Delta lmo0175$ 在 H_2O_2 (A)、 Cu^{2+} (B)、 Cd^{2+} (C)和脲氧化剂(D)应激下的生长差异

Figure 4 The comparison of growth abilities among *Listeria monocytogenes* $\Delta lmo0175$ and $C\Delta lmo0175$ strains under the stress of H_2O_2 (A), Cu^{2+} (B), Cd^{2+} (C) and diamide (D). *: $0.01 < P < 0.05$; **: $0.001 < P < 0.01$; ***: $P < 0.001$.

lmo0175 导致单核增生李斯特氏菌在小鼠巨噬细胞 RAW264.7 中的增殖能力显著降低。结果表明, *Lmo0175* 有助于单核增生李斯特氏菌在细胞内的增殖, 但不影响细菌的黏附和侵袭。

2.6 *Lmo0175* 有助于单核增生李斯特氏菌对小鼠的致病力

通过小鼠存活曲线比较感染单核增生李斯

特氏菌 EGD-e、 $\Delta lmo0175$ 和 $C\Delta lmo0175$ 的小鼠存活情况。结果发现在感染 60 h 时, 感染 EGD-e、 $\Delta lmo0175$ 和 $C\Delta lmo0175$ 的小鼠存活率分别为 20%、80% 和 40%; 在感染 84 h 时, 感染 EGD-e 和 $C\Delta lmo0175$ 的小鼠存活率均降至 0, 而感染 $\Delta lmo0175$ 的小鼠在感染 84 h 及之后的整个观察期内的存活率均为 40% (图 6A)。因此, 缺失

lmo0175 的单核增生李斯特氏菌感染小鼠的存活能力显著提高。

通过感染小鼠组织载菌量试验比较单核增生李斯特氏菌 EGD-e、 $\Delta lmo0175$ 和 $C\Delta lmo0175$ 在小鼠组织中的定殖能力。结果表明, 在感染 24 h 时, 与 EGD-e 相比, 感染 $\Delta lmo0175$ 的小

鼠肝脏和脾脏载菌量分别下降了 8.03% 和 10.35%; 与 $C\Delta lmo0175$ 相比, 感染 $\Delta lmo0175$ 的小鼠肝脏和脾脏载菌量分别下降了 0.80% 和 8.63%; 而 EGD-e 和 $C\Delta lmo0175$ 的肝脏和脾脏载菌量无显著差异(图 6B)。因此, 缺失 *lmo0175* 基因导致单核增生李斯特氏菌在小鼠组织中的

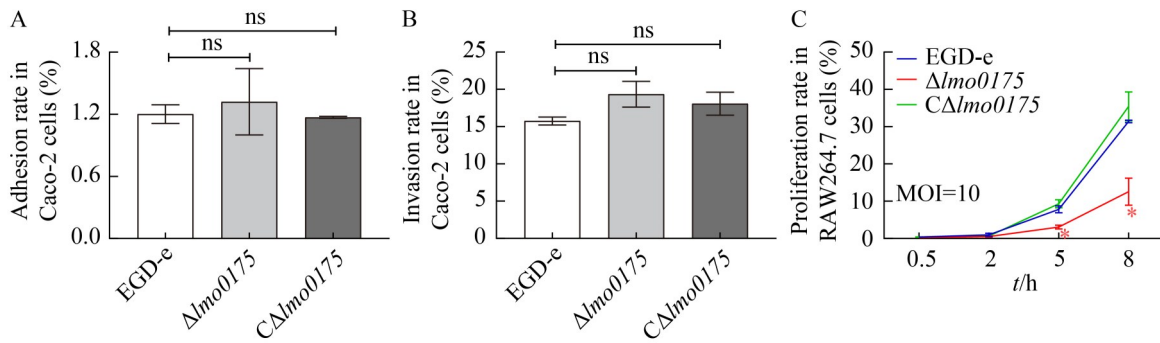


图5 单核增生李斯特氏菌EGD-e、 $\Delta lmo0175$ 和 $C\Delta lmo0175$ 的黏附(A)、侵袭(B)和胞内增殖能力(C)比较

Figure 5 The comparison of adherence (A), invasion (B), and proliferation (C) abilities of *Listeria monocytogenes*. *: $0.01 < P < 0.05$; ns: $P > 0.05$.

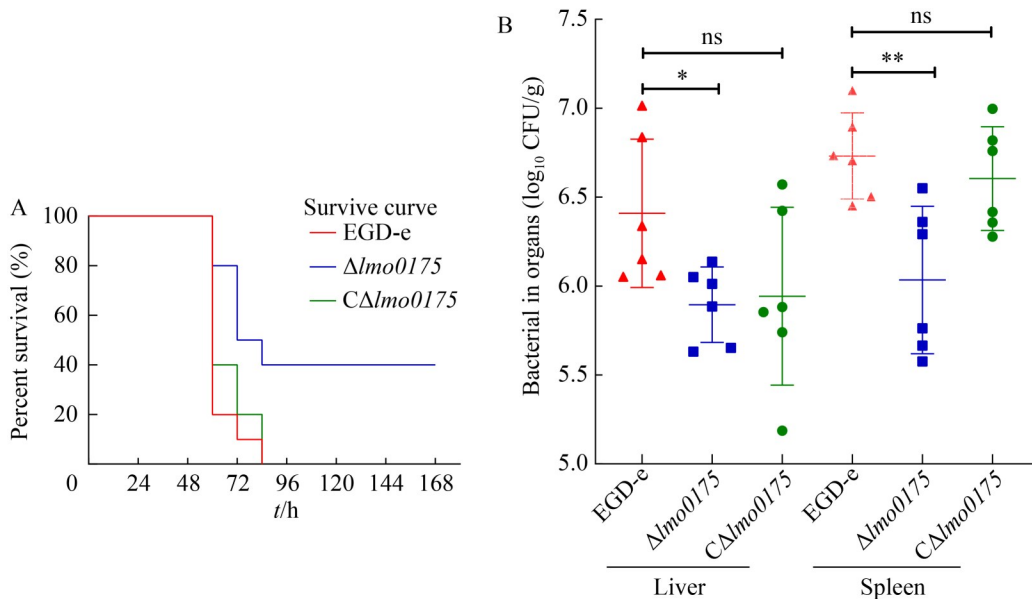


图6 比较单核增生李斯特氏菌EGD-e、 $\Delta lmo0175$ 和 $C\Delta lmo0175$ 感染小鼠的致病力(A)和在脏器中定殖能力(B)

Figure 6 The comparison of pathogenicity (A) and bacterial loads in liver and spleen (B) of *Listeria monocytogenes* EGD-e, $\Delta lmo0175$, and $C\Delta lmo0175$ infection mice. *: $0.01 < P < 0.05$; **: $0.001 < P < 0.01$; ns: $P > 0.05$.

定殖能力显著减弱。

综上所述, Lmo0175 有助于单核增生李斯特氏菌在组织脏器中的定殖和对小鼠的致病力。

3 讨论与结论

单核增生李斯特氏菌广泛存在于土壤和水源中, 人食用受该菌污染的食物可引起菌血症, 免疫功能低下者和老人常并发脑膜脑炎, 孕妇则会发生胎儿-胎盘感染而流产或产死胎^[25]。在过去的几十年里, 它作为一种主要的食源性病原体, 在西方国家和最近的非洲造成了多次疫情^[26]。单核增生李斯特氏菌不仅环境适应能力强, 还能通过表达多种因子介导细菌从应激环境向宿主细胞质的迁移, 并促进细菌在宿主肠道内的生存、黏附和吞噬体逃逸^[9]。单核增生李斯特氏菌被巨噬细胞吞噬后暂时驻留在液泡的氧化环境中^[27]。细菌内化后分泌的李斯特氏菌溶血素 O (LLO)和 2 种磷脂酶(PlcA 和 PlcB)迅速介导其从氧化吞噬体逃逸到高度还原的细胞质中^[28-30], 从而促进存活、细胞内复制, 并最终扩散到邻近细胞中^[31]。因此, 单核增生李斯特氏菌是研究宿主感染过程中细菌对氧化还原变化的适应性反应的良好模型系统^[32-33]。本研究通过比较单核增生李斯特氏菌在生长、抗氧化应激和感染致病中的作用, 明确了 Lmo0175 在单核增生李斯特氏菌抗氧化应激和感染宿主中的作用。

本研究通过比较单核增生李斯特氏菌在添加不同氧化剂的肉汤和固体培养基中的生长能力差异, 发现 Lmo0175 有助于该菌在金属离子氧化剂 Cu^{2+} ($P<0.05$)、 Cd^{2+} ($P<0.05$)和巯基特异性氧化剂 diamide ($P<0.05$)中的抗氧化应激。通过细胞和动物模型发现 Lmo0175 有助于单核增生李斯特氏菌的胞内增殖、肝脾组织中的定殖及在小鼠中的致病力。之前的研究发现过氧化物酶 Lmo0367、谷胱甘肽过氧化物酶 Lmo0983、硫醇过氧化物酶 Tpx (Lmo1583)、硫氧还蛋白 Lmo1609 和氢过氧化物酶 OhrA (Lmo2199)在有

氧生长、急性过氧化物解毒和细胞感染中均是必不可少的^[34]。因此, 单核增生李斯特氏菌中存在多种参与氧化应激耐受和宿主感染的蛋白质。然而也有研究发现, 假定血红素过氧化物酶 ChdC (Lmo2113)和血红素依赖过氧化氢酶 Kat (Lmo2785)是体外有氧生长所必需的; 铁蛋白 Fri (Lmo0943)和过氧化物氧还酶 AhpA (Lmo1604)是单核增生李斯特氏菌在急性氧化应激中生存所必需的; 尽管在巨噬细胞感染期间 Fri、AhpA 和 Kat 的表达量均增加, 但只有 Fri 被证明是胞浆生长所必需的^[34]。由此可见, 并非所有参与体外抗氧化应激的蛋白质都参与宿主感染期间的氧化应激调控过程。本研究发现 Lmo0175 参与抵抗体外氧化应激, 又与宿主感染期间单核增生李斯特氏菌在巨噬细胞中的增殖有关, 并最终影响小鼠致病力。提示 Lmo0175 可能利用其抗氧化应激能力帮助单核增生李斯特氏菌在宿主免疫细胞的氧化环境中存活和增殖, 从而介导在小鼠感染中的致病力。

革兰氏阳性菌通过分选酶 SrtA 识别 LPXTG 保守基序并在其苏氨酸和甘氨酸之间切割蛋白质, 然后催化苏氨酸的羧基与肽聚糖五甘氨酸跨桥上的氨基形成酰胺键, 从而将表面蛋白锚定到细胞壁上^[35]。前期分析发现 Lmo0175 为 LPXTG 基序锚定肽聚糖结合蛋白, 含有 MucBP 和 InlK_D3 结构域, 提示其与宿主感染有关。最近在金黄色葡萄球菌^[36]、罗伊氏乳杆菌^[37]、单核增生李斯特氏菌^[38]等食源菌中也有 LPXTG 基序锚定蛋白参与环境应激的报道。此外, 结核分枝杆菌 ArfA (Rv0899)能够与肽聚糖结合并有助于该菌在酸性应激条件下的生长^[39]。结核分枝杆菌细胞锚定酯酶 Rv1288 能够结合肽聚糖, 在营养缺陷条件下表达上调, 且有助于该菌在营养缺陷下的生长; 耻垢分枝杆菌中的该同源蛋白还与细胞壁脂质含量、耐药性及细胞内存活有关^[40]。因此, LPXTG 基序锚定蛋白除了公认的参与多种革兰氏阳性菌的宿主感染过程之外, 越来越多的研究明确其与环境适应之

间的关系。

综上所述, 本研究通过构建 *lmo0175* 的缺失株和回补株明确了 *Lmo0175* 在单核增生李斯特氏菌抗氧化应激和宿主感染中的生物学功能。这一发现为进一步解析 *Lmo0175* 介导抗氧化应激和宿主感染的机制及明确 LPXTG 基序锚定蛋白的功能奠定了重要基础。

作者贡献声明

葛泓睿: 主要的实验操作, 数据收集和處理; 李豪杰: 指导和协助实验操作; 高宇杰: 协助实验操作和数据收集; 徐加利: 协助部分实验操作; 张蕊: 提供技术支持; 宋厚辉: 提供实验平台和试验材料; 程昌勇: 研究构思和设计审核, 论文审核; 邓思敏: 研究构思和设计, 指导实验操作和数据處理, 论文撰写与修改。

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] NICAOGÁIN K, O'BYRNE CP. The role of stress and stress adaptations in determining the fate of the bacterial pathogen *Listeria monocytogenes* in the food chain[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2016, 7: 1865.
- [2] European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and Control (EFSA and ECDC). The European union one health 2018 zoonoses report[J]. *EFSA Journal*, 2019, 17(12): e05926.
- [3] BALLOM KF, TSAI HC, TAYLOR M, TANG JM, ZHU MJ. Stability of *Listeria monocytogenes* in non-fat dry milk powder during isothermal treatment and storage[J]. *Food Microbiology*, 2020, 87: 103376.
- [4] DROLIA R, TENGURIA S, DURKES AC, TURNER JR, BHUNIA AK. *Listeria* adhesion protein induces intestinal epithelial barrier dysfunction for bacterial translocation[J]. *Cell Host & Microbe*, 2018, 23(4): 470-484.e7.
- [5] WALES AD, DAVIES RH. Co-selection of resistance to antibiotics, biocides and heavy metals, and its relevance to foodborne pathogens[J]. *Antibiotics*, 2015, 4(4): 567-604.
- [6] EZRATY B, GENNARIS A, BARRAS F, COLLET JF. Oxidative stress, protein damage and repair in bacteria[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2017, 15(7): 385-396.
- [7] IMLAY JA. The molecular mechanisms and physiological consequences of oxidative stress: lessons from a model bacterium[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2013, 11(7): 443-454.
- [8] WHITELEY AT, RUHLAND BR, EDROZO MB, RENIERE ML. A redox-responsive transcription factor is critical for pathogenesis and aerobic growth of *Listeria monocytogenes*[J]. *Infection and Immunity*, 2017, 85(5): e00978-16.
- [9] SIBANDA T, BUYS EM. *Listeria monocytogenes* pathogenesis: the role of stress adaptation[J]. *Microorganisms*, 2022, 10(8): 1522.
- [10] CHEN C, NGUYEN BN, MITCHELL G, MARGOLIS SR, MA D, PORTNOY DA. The listeriolysin O PEST-like sequence co-opts AP-2-mediated endocytosis to prevent plasma membrane damage during *Listeria* infection[J]. *Cell Host & Microbe*, 2018, 23(6): 786-795.e5.
- [11] 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.
- [12] BIERNE H, MAZMANIAN SK, TROST M, GRACIELA PUCCIARELLI M, LIU G, DEHOUX P, JÄNSCH L, PORTILLO FG, SCHNEEWIND O, COSSART P, CONSORTIUM ELG. Inactivation of the *srtA* gene in *Listeria monocytogenes* inhibits anchoring of surface proteins and affects virulence[J]. *Molecular Microbiology*, 2002, 43(4): 869-881.
- [13] GHOSH P, HALVORSEN EM, AMMENDOLIA DA, MOR-VAKNIN N, O'RIORDAN MXD, BRUMELL JH, MARKOVITZ DM, HIGGINS DE. Invasion of the brain by *Listeria monocytogenes* is mediated by InlF and host cell vimentin[J]. *mBio*, 2018, 9(1): e00160-18.
- [14] DORTET L, MOSTOWY S, COSSART P. *Listeria* and autophagy escape: involvement of InlK, an internalin-like protein[J]. *Autophagy*, 2012, 8(1): 132-134.
- [15] 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 InlJ is specifically expressed *in vivo* and behaves as an adhesin[J]. *Infection and Immunity*, 2008, 76(4): 1368-1378.
- [16] MCGUCKIN MA, LINDÉN SK, SUTTON P, FLORIN TH. Mucin dynamics and enteric pathogens[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2011, 9(4): 265-278.
- [17] NEVES D, JOB V, DORTET L, COSSART P, DESSEN A. Structure of internalin InlK from the human pathogen *Listeria monocytogenes*[J]. *Journal of Molecular Biology*, 2013, 425(22): 4520-4529.
- [18] SMITH K, YOUNGMAN P. Use of a new integrational vector to investigate compartment-specific expression of the *Bacillus subtilis* spoIIIM gene[J]. *Biochimie*, 1992, 74(7/8): 705-711.
- [19] MONK IR, GAHAN CGM, HILL C. Tools for functional postgenomic analysis of *Listeria monocytogenes*[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2008, 74(13):

- 3921-3934.
- [20] CHENG CY, HAN X, XU JL, SUN J, LI K, HAN Y, CHEN MM, SONG HH. YjbH mediates the oxidative stress response and infection by regulating SpxA1 and the phosphoenolpyruvate-carbohydrate phosphotransferase system (PTS) in *Listeria monocytogenes*[J]. *Gut Microbes*, 2021, 13(1): 1-19.
- [21] 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 KC, LI HJ, ZHAO XL, ZHOU S, LIAO JH, WANG ZN, JIN GX, ZHU FX, XU JL, SUN J, SONG HH, DENG SM, CHENG CY. Role of LPXTG-anchored protein Lmo0880 in *Listeria monocytogenes* infection[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2024, 64(3): 893-906 (in Chinese).
- [22] MATHIPA MG, THANTSHA MS, BHUNIA AK. *Lactobacillus casei* expressing internalins A and B reduces *Listeria monocytogenes* interaction with Caco-2 cells *in vitro*[J]. *Microbial Biotechnology*, 2019, 12(4): 715-729.
- [23] XIA J, LUO YR, CHEN MM, LIU YQ, WANG Z, DENG SM, XU JL, HAN Y, SUN J, JIANG LL, SONG HH, CHENG CY. Characterization of a DsbA family protein reveals its crucial role in oxidative stress tolerance of *Listeria monocytogenes*[J]. *Microbiology Spectrum*, 2023, 11(6): e0306023.
- [24] CHENG CY, CHEN MM, SUN J, XU JL, DENG SM, XIA J, HAN Y, ZHANG X, WANG J, LEI L, ZHAI RD, WU Q, FANG WH, SONG HH. The MICOS complex subunit Mic60 is hijacked by intracellular bacteria to manipulate mitochondrial dynamics and promote bacterial pathogenicity[J]. *Advanced Science*, 2024, 11(46): e2406760.
- [25] LECUIT M. *Listeria monocytogenes*, a model in infection biology[J]. *Cellular Microbiology*, 2020, 22(4): e13186.
- [26] THOMAS J, GOVENDER N, MCCARTHY KM, ERASMUS LK, DOYLE TJ, ALLAM M, ISMAIL A, RAMALWA N, SEKWADI P, NTSHOE G, SHONHIWA A, ESSEL V, TAU N, SMOUSE S, NGOMANE HM, DISENYENG B, PAGE NA, GOVENDER NP, DUSE AG, STEWART R, et al. Outbreak of listeriosis in South Africa associated with processed meat[J]. *New England Journal of Medicine*, 2020, 382(7): 632-643.
- [27] MYERS JT, TSANG AW, SWANSON JA. Localized reactive oxygen and nitrogen intermediates inhibit escape of *Listeria monocytogenes* from vacuoles in activated macrophages[J]. *Journal of Immunology*, 2003, 171(10): 5447-5453.
- [28] VADIA S, ARNETT E, HAGHIGHAT AC, WILSON-KUBALEK EM, TWETEN RK, SEVEAU S. The pore-forming toxin listeriolysin O mediates a novel entry pathway of *L. monocytogenes* into human hepatocytes[J]. *PLoS Pathogens*, 2011, 7(11): e1002356.
- [29] JONES S, PORTNOY DA. Characterization of *Listeria monocytogenes* pathogenesis in a strain expressing perfringolysin O in place of listeriolysin O[J]. *Infection and Immunity*, 1994, 62(12): 5608-5613.
- [30] GEDDE MM, HIGGINS DE, TILNEY LG, PORTNOY DA. Role of listeriolysin O in cell-to-cell spread of *Listeria monocytogenes*[J]. *Infection and Immunity*, 2000, 68(2): 999-1003.
- [31] TILNEY LG, PORTNOY DA. Actin filaments and the growth, movement, and spread of the intracellular bacterial parasite, *Listeria monocytogenes*[J]. *Journal of Cell Biology*, 1989, 109(4 Pt 1): 1597-1608.
- [32] RENIERE ML, WHITELEY AT, PORTNOY DA. An *in vivo* selection identifies *Listeria monocytogenes* genes required to sense the intracellular environment and activate virulence factor expression[J]. *PLoS Pathogens*, 2016, 12(7): e1005741.
- [33] RUHLAND BR, RENIERE ML. Sense and sensor ability: redox-responsive regulators in *Listeria monocytogenes*[J]. *Current Opinion in Microbiology*, 2019, 47: 20-25.
- [34] CESINGER MR, SCHWARDT NH, HALSEY CR, THOMASON MK, RENIERE ML. Investigating the roles of *Listeria monocytogenes* peroxidases in growth and virulence[J]. *Microbiology Spectrum*, 2021, 9(1): e0044021.
- [35] SIEGEL SD, REARDON ME, TON-THAT H. Anchoring of LPXTG-like proteins to the Gram-positive cell wall envelope[J]. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 2017, 404: 159-175.
- [36] WANG H, MA K, SHEN JW, FANG MC, PEI H, LI Y, ZHU CF, SHU F, LI BB, XUE T. Genes associated with desiccation stress in foodborne *Staphylococcus aureus* as revealed by transposon insertion mutagenesis[J]. *Food Research International*, 2023, 163: 112271.
- [37] ZHANG A, OU MJ, WU P, ZHENG KG, ZHANG HQ, YU YX, GUO YX, ZHANG T, PAN DD, WU Z. Coupled effect of nutritional food molecules and *Lactobacillus reuteri* surface protein interaction on the bacterial gastrointestinal tolerance[J]. *Foods*, 2024, 13(22): 3685.
- [38] BALANDYTÉ L, BRODARD I, FREY J, OEVERMANN A, ABRIL C. Ruminant rhombencephalitis-associated *Listeria monocytogenes* alleles linked to a multilocus variable-number tandem-repeat analysis complex[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2011, 77(23): 8325-8335.
- [39] YAO Y, BARGHAVA N, KIM J, NIEDERWEIS M, MARASSI FM. Molecular structure and peptidoglycan recognition of *Mycobacterium tuberculosis* ArfA (Rv0899)[J]. *Journal of Molecular Biology*, 2012, 416(2): 208-220.
- [40] MAAN P, KUMAR A, KAUR J, KAUR J. Rv1288, a two domain, cell wall anchored, nutrient stress inducible carboxyl-esterase of *Mycobacterium tuberculosis*, modulates cell wall lipid[J]. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2018, 8: 421.