

# 伪结核棒状杆菌 *lpxtg270* 敲除株的构建及其生物学特性与对小鼠的致病性评价

牛禄婷<sup>1#</sup>, 吕红<sup>1#</sup>, 龙良辉<sup>1</sup>, 张艺千<sup>1</sup>, 徐成伟<sup>1</sup>, 周新智<sup>1</sup>, 王小华<sup>2</sup>,  
王芝英<sup>1</sup>, 周作勇<sup>1\*</sup>

1 西南大学 动物医学院, 重庆

2 精华药业(成都)有限公司, 四川 成都

牛禄婷, 吕红, 龙良辉, 张艺千, 徐成伟, 周新智, 王小华, 王芝英, 周作勇. 伪结核棒状杆菌 *lpxtg270* 敲除株的构建及其生物学特性与对小鼠的致病性评价[J]. 微生物学报, 2025, 65(10): 4550-4564.

NIU Luting, LYU Hong, LONG Lianghui, ZHANG Yiqian, XU Chengwei, ZHOU Xinzhi, WANG Xiaohua, WANG Zhiying, ZHOU Zuoyong. An *lpxtg270* knockout strain of *Corynebacterium pseudotuberculosis*: construction, biological characterization, and evaluation of pathogenicity in mice[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2025, 65(10): 4550-4564.

**摘要:** 【目的】构建伪结核棒状杆菌 (*Corynebacterium pseudotuberculosis*, Cp) 宣汉株 (XH02) LPXTG 基序蛋白编码基因敲除菌株 (XH02Δ*lpxtg270*), 探究 *lpxtg270* 在 XH02 生长、生物被膜形成及感染致病过程中的作用。【方法】采用 CRISPR/Cas9 技术构建 XH02Δ*lpxtg270*, 比较该敲除菌株与野生菌株 XH02 在生物学特性、对 J774A.1 巨噬细胞的侵袭能力、体内感染小鼠致病力等方面的差异。【结果】与 XH02 相比, XH02Δ*lpxtg270* 的菌落形态、生长曲线、黏附 J774A.1 巨噬细胞的能力及胞内增殖能力均无明显变化, 但 XH02Δ*lpxtg270* 的生物被膜形成能力、对 J774A.1 的侵袭能力、感染引发 J774A.1 释放乳酸脱氢酶 (lactate dehydrogenase, LDH) 及分泌 IL-1β 的能力显著降低, XH02Δ*lpxtg270* 体内感染小鼠的致病力及在肝脏、脾脏、肾脏、肺脏和脑中的载菌水平显著下降, 引起小鼠上述脏器的病理变化较轻。【结论】本研究证实 LPXTG270 与 Cp 形成生物被膜、感染侵袭巨噬细胞的能力相关, 在 Cp 感染小鼠致病过程中发挥重要作用。

**关键词:** 伪结核棒状杆菌; LPXTG 基序蛋白基因 *lpxtg270*; 基因敲除; 生物学特性; 致病性

资助项目: 国家级大学生创新创业训练计划(202410635070); 重庆市自然科学基金(CSTB2024NSCQ-MSX1262)

This work was supported by the National College Students Innovation Training Program (202410635070) and the Chongqing Natural Science Foundation (CSTB2024NSCQ-MSX1262).

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

\*Corresponding author. Tel: +86-23-46751547, E-mail: zzyxnyy@163.com

Received: 2025-03-19; Accepted: 2025-05-09; Published online: 2025-06-24

# An *lpxtg270* knockout strain of *Corynebacterium pseudotuberculosis*: construction, biological characterization, and evaluation of pathogenicity in mice

NIU Luting<sup>1#</sup>, LYU Hong<sup>1#</sup>, LONG Lianghui<sup>1</sup>, ZHANG Yiqian<sup>1</sup>, XU Chengwei<sup>1</sup>, ZHOU Xinzhi<sup>1</sup>, WANG Xiaohua<sup>2</sup>, WANG Zhiying<sup>1</sup>, ZHOU Zuoyong<sup>1\*</sup>

1 College of Veterinary Medicine, Southwest University, Chongqing, China

2 Jinghua Pharmaceutical (Chengdu) Co., Ltd., Chengdu, Sichuan, China

**Abstract:** [Objective] To construct a strain XH02 $\Delta$ *lpxtg270* with knockout of the LPXTG motif protein-coding gene from *Corynebacterium pseudotuberculosis* XH02 and explore the role of *lpxtg270* in the growth, biofilm formation, and infection of XH02. [Methods] CRISPR/Cas9 was employed to construct XH02 $\Delta$ *lpxtg270*. The knockout strain and the wild strain XH02 were compared in terms of biological characteristics, invasion into J774A.1 macrophages, and pathogenicity in mice. [Results] Compared with XH02, XH02 $\Delta$ *lpxtg270* did not change significantly in the colony morphology, growth curve, adhesion to J774A.1 macrophages, or intracellular proliferation, while it demonstrated reductions in the biofilm formation and invasion into J774 A.1 cells. Moreover, the release of lactate dehydrogenase and secretion of interleukin-1 $\beta$  from J774 A.1 cells infected with the knockout strain decreased compared with those infected with the wild strain. Compared with XH02, XH02 $\Delta$ *lpxtg270* showed weakened pathogenicity in mice and decreased loads in the liver, spleen, kidney, lung, and brain, causing milder pathological changes of above organs in mice. [Conclusion] LPXTG270 of *C. pseudotuberculosis* is related to the biofilm formation and invasion into macrophages, playing a key role in the pathogenicity of this bacterium in mice.

**Keywords:** *Corynebacterium pseudotuberculosis*; LPXTG motif protein-coding gene *lpxtg270*; gene knockout; biological characteristic; pathogenicity

伪结核棒状杆菌 (*Corynebacterium pseudotuberculosis*, Cp) 是一种重要的兼性胞内寄生人畜共患病原菌, 可引发家畜、野生动物和人类罹患慢性炎症性传染病, 如羊的干酪样淋巴结炎 (caseous lymphadenitis, CLA)<sup>[1]</sup>、水牛的水肿性皮肤病 (oedematous skin disease, OSD)<sup>[2]</sup>、奶牛的临床型乳腺炎<sup>[3]</sup>、马的溃疡性淋巴管炎<sup>[4]</sup>及人类的坏死性淋巴结炎<sup>[5]</sup>等, 其典型特征是在淋巴结及内脏器官等部位形成脓肿和干酪样坏死等病变。Cp 在全球范围内流行感染, 临床上

以山羊和绵羊感染最为常见。据统计, 在巴西<sup>[6]</sup>、韩国<sup>[7]</sup>等国家山羊血清阳性率超过 50%; 在我国陕西<sup>[8]</sup>、四川<sup>[9]</sup>、重庆和贵州<sup>[10]</sup>等地的山羊脓肿样本中 Cp 分离率高达 57% 以上。Cp 感染致病过程与其多种毒力因子密切相关, 如磷脂酶 D (phospholipase D, PLD)、寡肽通透酶 (oligopeptide permease, Opp)、与铁摄取和调节相关的毒力因子 (fag A-D) 等<sup>[11]</sup>。此外, Cp 细胞壁上分布着与受感染宿主相互作用的蛋白质对接位点, 这些蛋白质在细菌黏附、侵袭以及与宿

主免疫系统相互作用过程中至关重要。由于革兰阳性菌细胞壁表面无外膜，仅有一层厚的肽聚糖，许多表面蛋白通过含有 LPXTG 基序的 C 末端锚定在肽聚糖上<sup>[12]</sup>。这类蛋白普遍具有细胞壁分选信号 (cell wall sorting signal, CWSS)，CWSS 位于 C 末端，由 LPXTG 基序、疏水结构域和带正电的残基尾部组成<sup>[13]</sup>。对应的分选酶能够识别 LPXTG 基序，催化该表面蛋白共价结合到细胞壁肽聚糖上，使其呈现在细胞表面并发挥重要作用。据报道，猪链球菌、肺炎链球菌、单增李斯特菌、粪肠球菌的 LPXTG 锚定蛋白在这些病原菌感染致病过程中发挥重要作用<sup>[14-17]</sup>。目前，涉及 Cp 黏附侵袭、免疫逃避及致病的具体机制尚未完全明确。Galvão 等<sup>[18]</sup>研究指出 LPXTG 蛋白在 Cp 中具有抗原特征，可认为是一类假定黏附素，但其在该病原菌感染致病过程中的具体作用尚无相关研究。

本研究利用 CRISPR/Cas9 技术构建 Cp 的 LPXTG 蛋白编码基因 (*lpxtg270*) 敲除菌株，并借助体外细胞感染模型和体内小鼠感染模型，分析该基因缺失对 Cp 感染致病的影响，以期明确 *lpxtg270* 基因在 Cp 感染致病过程中的作用提供研究资料。

表1 本研究中的菌株和质粒

Table 1 Strains and plasmids used in this study

Strains and plasmids	Descriptions	Sources
Strains		
DH5α	<i>Escherichia coli</i> DH5α	Lab stock
XH02	<i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i> wild-type strain	Lab stock
XH02Δ <i>lpxtg270</i>	XH02 <i>lpxtg270</i> -knockout strain	This study
Plasmids		
pEC-XK99E	<i>E. coli</i> - <i>Corynebacterium</i> shuttle vector, P <sub>trc</sub> promoter, Km <sup>R</sup>	Provided by Dr. Sun Jibing and Liu Jiao
pCas9gRNA-ccdB	Derived from pXMJ19, IPTG induces expression of Cas9, Cm <sup>R</sup>	Provided by Dr. Sun Jibing and Liu Jiao
pEC- <i>lpxtg270</i> gRNA	Derived from pEC-XK99E, with <i>lpxtg270</i> gRNA, Km <sup>R</sup>	This study
pEC- <i>lpxtg270</i> gRNA-HDarm	Derived from pEC-XK99E, with <i>lpxtg270</i> gRNA and HDarm of <i>lpxtg270</i> , Km <sup>R</sup>	This study

## 1 材料与方法

### 1.1 主要试剂

BHI 肉汤、LB 肉汤、TSA 营养琼脂、LB 营养琼脂，北京奥博星生物技术有限责任公司；DMEM 培养液，武汉塞维尔生物科技有限公司；小牛血清，浙江天杭生物科技股份有限公司；胎牛血清，Biological Industries 公司；氯霉素、卡那霉素、质粒小提试剂盒、2×TransFast<sup>®</sup> Taq PCR SuperMix (+dye)、pEASY<sup>®</sup>-Basic Seamless Cloning and Assembly Kit，北京全式金生物技术有限公司；硫酸庆大霉素、碘化丙锭 (propidium iodide, PI)，北京索莱宝科技有限公司；DNA marker、DNA Ligation Kit、PrimeSTAR 高保真酶，宝生物工程(大连)有限公司；琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒，天根生化科技(北京)有限公司；鼠 IL-1β ELISA 检测试剂盒，Invitrogen 公司；IPTG、乳酸脱氢酶(LDH) 检测试剂盒、Opti-MEM 培养基，Gibco 公司。

### 1.2 质粒、菌株、细胞、试验动物及培养条件

所用菌株、质粒见表 1。J774A.1 巨噬细胞为本实验室保存，昆明系小鼠购自西南医科大学实验动物中心。培养基包括 LB 固体培养基

(含 5% 兔血)、BHI 肉汤(含 0.1% 吐温-80)。抗生素使用浓度: 氯霉素终浓度 20 mg/L, 卡那霉素终浓度 50 mg/L, 庆大霉素终浓度 100 mg/L。本研究所有动物实验已通过西南大学实验动物伦理审查委员会审批, 编号为 IACUC-20240806-03。

### 1.3 引物设计与合成

从 GenBank 数据库获取 Cp 基因组序列 (GenBank 登录号为 CP021251.1), 截取 803 878–804 690 之间的 LPXTG 基序锚定蛋白编码基因序列(该蛋白共 270 个氨基酸, 命名为 *lpxtg270*), 使用 SnapGene 软件设计基因敲除相关引物(表 2)。所有引物均由北京睿博兴科生物技术有限公司合成。

### 1.4 Cp *lpxtg270* 敲除株的构建和筛选

参照文献[19]的方法构建 *lpxtg270* 敲除株(XH02  $\Delta$  *lpxtg270*), 设计 20 bp 间隔序列(spacer): 5'-GTTACAGGAGGAACCCAAGG-3'。

表2 本研究所用*lpxtg270*敲除相关引物

Table 2 Primers used for *lpxtg270* deletion in this study

Primers name	Primer sequences (5'→3')	Purpose	Product length (bp)
<i>lpxtg270</i> gRNA-F	CCGGAATTC <u>GGTTACAGGAGGAACCCAAGG</u> GGTTTTAG AGCTAGAAATA	<i>lpxtg270</i> gRNA amplification	122
gRNA-R	GGGGTCGAC <u>CCCTGGAAAAA</u> AAGCACCGA		
pECjd-F	CACTCCC <u>GTTCTGG</u> AATAAT	Detect whether the pEC- <i>lpxtg270</i> gRNA plasmid was successfully constructed	471/593*
pECjd-R	TCACCGACAAACAACAGATAA		
<i>lpxtg270</i> -up-F	GGATTGATGGGATCCGATCTTCCAGTGGGCGGAC	Amplification of upstream homologous arms in <i>lpxtg270</i>	517
<i>lpxtg270</i> -up-R	AATTTTCTCACAGTTCAGTTTATT		
<i>lpxtg270</i> -dw-F	TGAACTGTGAGAAAATTCCCACACAAATT	Amplification of downstream homologous arms in <i>lpxtg270</i>	519
<i>lpxtg270</i> -dw-R	GTTCCGCTTCAATGTTTCGCTCTGGGAAACTAAC		
pEC- <i>lpxtg270</i> -F	CAGAGCGAACATTGAAGCGGAACACGtAGAAAG	Ring opening of the pEC- <i>lpxtg270</i> gRNA plasmid	7 073
pEC- <i>lpxtg270</i> -R	GAAGATCGGATCCCATCAATCCTGCCTATTTG		
<i>lpxtg270</i> -JD-F	CGATTCTTGATCCATGGGTT	Screening for <i>lpxtg270</i> knockout strains	1 349/2 162 <sup>#</sup>
<i>lpxtg270</i> -JD-R	CTTCAGCCTGCAAGTTTGA		

Underline indicates the restriction site; Wavy line indicates spacer; \* indicates that if the construction of pEC-*lpxtg270*gRNA plasmid is success, the amplified fragment is 593 bp; # indicates that the amplified fragment of the *lpxtg270* deletion strain is 1 349 bp, and the amplified fragment of wild type strain is 2 162 bp.

以 pCas9gRNA-ccdB 为模板, 以表 2 中的 *lpxtg270*gRNA-F 和 gRNA-R 为引物, 参照文献[19]通过 PCR 扩增 *lpxtg270*gRNA。扩增产物经 *EcoR*I 和 *Sal*I 双酶切后克隆至 pEC-XK99E, 得到 pEC-*lpxtg270*gRNA。以 XH02 基因组 DNA 为模板, 用 *lpxtg270*-up-F/R 和 *lpxtg270*-dw-F/R 扩增 *lpxtg270* 的上、下游同源臂, 再通过重叠 PCR 获得上下游同源臂融合片段, 将其无缝克隆至开环质粒 pEC-*lpxtg270*gRNA, 获得 pEC-*lpxtg270*gRNA-HDarm。将该质粒电转至含 pCas9gRNA-ccdB 的 XH02 感受态细胞中, 经 IPTG (0.5 mmol/L) 诱导及卡那霉素和氯霉素双抗性筛选, 利用 *lpxtg270*-JD-F/R 鉴定阳性克隆, 并进行测序验证, 最终获得 XH02 $\Delta$ *lpxtg270* (图 1)。

### 1.5 敲除 *lpxtg270* 对 Cp 菌落形态观察及生长曲线测定

分别挑取 XH02 和 XH02 $\Delta$ *lpxtg270* 单克隆, 接种于含 5% 兔血的 LB 固体培养基, 37 °C

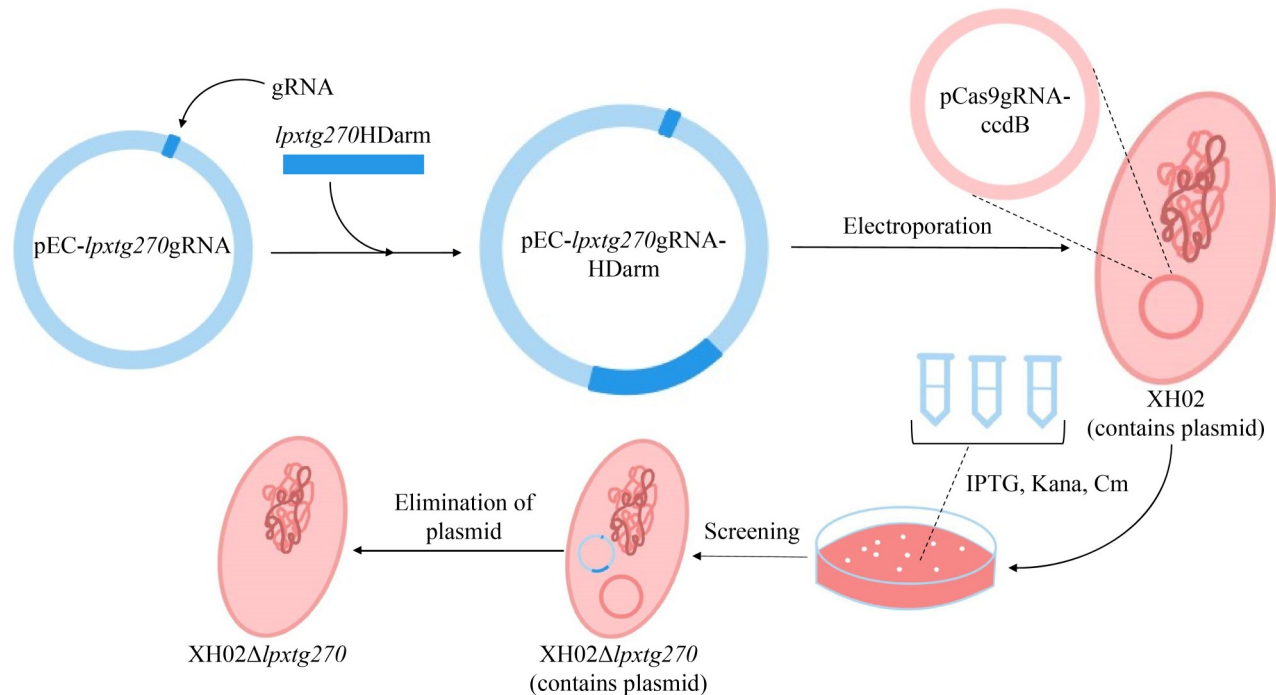


图1 XH02Δ*lpxtg270*构建流程

Figure 1 The construction process of XH02Δ*lpxtg270*.

恒温培养 48 h，观察菌落形态。将 XH02 和 XH02Δ*lpxtg270* 单克隆接种于 1 mL 含 0.1% 吐温-80 的 BHI 肉汤，37 °C、200 r/min 培养 12 h，调整  $OD_{595}$  至约 0.2，取 100 μL 菌液至 10 mL 新鲜 BHI 培养基中，在相同条件下培养 30 h，每隔 6 h 测量  $OD_{595}$ ，绘制生长曲线。

## 1.6 敲除 *lpxtg270* 对 Cp 生物被膜形成能力的影响

### 1.6.1 结晶紫测定生物被膜形成

参照文献[20]进行生物被膜测定。挑取 XH02、XH02Δ*lpxtg270* 单克隆分别接种于 1 mL 含 0.1% 吐温-80 的 BHI 肉汤，37 °C、200 r/min 培养过夜，用新鲜 BHI 肉汤稀释菌液，调整  $OD_{595}$  至约 0.2，各取 200 μL 加入到 96 孔微孔板中，37 °C 恒温静置培养 12、24、36 和 48 h。弃去孔中培养液，每孔加入 100 μL PBS 轻柔润

洗 3 次，吸净液体；每孔加入 100 μL 99% 甲醇液，固定 10 min，吸净、挥干；每孔加入 100 μL 结晶紫溶液，染色 20 min，吸净、挥干；再加入 PBS 润洗 3 次，吸净，每孔加入 100 μL 33% 醋酸溶液，溶解吸附的结晶紫，在  $OD_{595}$  处测定吸光值。

### 1.6.2 扫描电镜观察生物被膜形成情况

分别挑取 XH02 和 XH02Δ*lpxtg270* 单克隆，接种于 1 mL 含 0.1% 吐温-80 的 BHI 肉汤，37 °C、200 r/min 培养过夜。用新鲜 BHI 肉汤稀释菌液，调整  $OD_{595}$  至约 0.2。在 12 孔细胞板内放置圆形玻片，加入 1 mL 新鲜 BHI 肉汤，每孔加入 100 μL 菌液，37 °C 恒温培养 24 h。弃去培养基，用 PBS 轻柔漂洗，弃去 PBS 后加入 3% 戊二醛，转移至 4 °C 固定 6 h。将样品送至成都里来生物科技有限公司制样，并用扫描电镜观察生物被膜形成的差异。

## 1.7 体外试验评价敲除 *lpxtg270* 对 Cp 感染 J774A.1 巨噬细胞活力和 IL-1 $\beta$ 分泌的影响

### 1.7.1 敲除 *lpxtg270* 对 Cp 感染 J774A.1 巨噬细胞活力的影响

参照文献[19]的方法,以 LDH 释放水平和 PI 染色比例评价细胞活力。将 J774A.1 细胞接种于 48 孔细胞板( $2.5 \times 10^5$  细胞/孔,用于 LDH 检测)或 12 孔细胞板( $1 \times 10^6$  细胞/孔,用于 PI 染色),在 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 细胞培养箱中培养,待细胞贴壁后,以感染复数 (multiplicity of infection, MOI) 为 10 的 XH02 和 XH02 $\Delta$ *lpxtg270* 侵染 1 h,之后用 PBS 洗涤,加入含 100 mg/L 庆大霉素的 Opti-MEM (用于 LDH 检测)或 DMEM (用于 PI 染色),培养 12 h。根据 LDH 检测试剂盒说明书检测 LDH 释放水平。PI 染色时,弃上清后加入 100  $\mu$ L 10  $\mu$ g/mL 的 PI 溶液,染色 10 min 后再以 PBS 洗涤,加入 50  $\mu$ L 含 DAPI 的抗荧光淬灭封片液。通过荧光显微镜拍照,采用公式(1)计算 PI 染色细胞含量。

$$\text{PI染色细胞含量} = \frac{\text{PI染成红色的细胞数}}{\text{细胞总数}} \times 100\% \quad (1)$$

### 1.7.2 敲除 *lpxtg270* 对 Cp 感染 J774A.1 巨噬细胞 IL-1 $\beta$ 分泌的影响

将 J774A.1 细胞接种于 12 孔细胞板 ( $1 \times 10^6$  细胞/孔),在 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养过夜。以 XH02 和 XH02 $\Delta$ *lpxtg270* 侵染(MOI=10) 1 h, PBS 洗涤后加入含 100 mg/L 庆大霉素的 DMEM,培养 24 h。收集细胞上清,按鼠 IL-1 $\beta$  ELISA 检测试剂盒说明书检测 IL-1 $\beta$  分泌水平。

## 1.8 敲除 *lpxtg270* 对 Cp 黏附、侵袭以及在 J774A.1 巨噬细胞内增殖的影响

取 1 mL 过夜培养的 XH02、XH02 $\Delta$ *lpxtg270* 菌液,10 000 r/min 离心 1 min,弃上清,用 PBS 洗涤 3 次后用 DMEM 稀释至 MOI=10,侵染 J774A.1 巨噬细胞(12 孔板,  $1 \times 10^6$  细胞/孔)。侵染 30 min 后,弃去培养液,用 PBS 洗涤

3 次,每孔加入 100  $\mu$ L 0.1% Triton X-100 裂解细胞 1 min,用 PBS 稀释后涂布 TSA 平板,在 37 °C 培养 48 h,统计菌落数。侵染 1 h 后,弃培养液,用 PBS 洗涤 3 次,加入含 100 mg/L 庆大霉素的 DMEM,在 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养 1 h,弃培养液,用 PBS 洗涤 3 次,按上述方法裂解细胞并涂 TSA 板,统计菌落数。以侵袭试验时间点为  $T_0$ ,在 10 h ( $T_{10}$ )裂解细胞并进行菌落计数,计算 Cp 在胞内的增殖情况。

## 1.9 体内试验评价敲除 *lpxtg270* 对 Cp 感染小鼠致病力的影响

### 1.9.1 被感染小鼠生存曲线观察

将 24 只昆明系小鼠[体重( $23.5 \pm 0.5$ ) g]随机分为 3 组(XH02 组、XH02 $\Delta$ *lpxtg270* 组和 PBS 对照组),每组 8 只。将过夜培养的 XH02、XH02 $\Delta$ *lpxtg270* 菌液 10 000 r/min 离心 1 min,弃去上清液,用 PBS 洗涤 3 次后稀释至  $8 \times 10^7$  CFU/mL (本研究后续的菌液培养及稀释方法与此相同)。试验组小鼠分别腹腔注射对应菌液(0.2 mL/只),PBS 组小鼠采用相同方法注射 0.2 mL PBS。记录小鼠 14 d 内的死亡情况,并绘制生存曲线。

### 1.9.2 被感染小鼠脏器载菌量检测及病理变化观察

将昆明系小鼠[体重( $25.0 \pm 1.0$ ) g]随机分为 XH02 组、XH02 $\Delta$ *lpxtg270* 组和 PBS 对照组,每组 3 只。用 PBS 将 Cp 稀释至  $8 \times 10^7$  CFU/mL,对应组小鼠分别腹腔注射 XH02、XH02 $\Delta$ *lpxtg270* 或 PBS (均为 0.2 mL/只)。参考文献[21]的方法,于感染后 3 d 采集小鼠眼球血、肝脏、脾脏、肾脏、肺脏和脑。取血清 100  $\mu$ L 直接涂板,脏器则加入灭菌 PBS,用匀浆机充分匀浆后,以 PBS 稀释涂板计数,统计小鼠血清和上述脏器的载菌量。

将 9 只昆明系小鼠[体重( $25.0 \pm 1.0$ ) g]随机分为 XH02 组、XH02 $\Delta$ *lpxtg270* 组和 PBS 对照组。用 PBS 将 Cp 稀释至  $5 \times 10^6$  CFU/mL,对应组小

鼠分别腹腔注射 XH02、XH02 $\Delta$ *lpxtg270* 或 PBS (均为 0.2 mL/只)。在感染第 8 天剖检小鼠, 观察肝脏、脾脏、肾脏、肺脏和脑的大体病变。同时, 取小鼠上述脏器用 10% 甲醛固定后, 送成都里来生物科技有限公司制作组织切片, HE 染色后用显微镜观察组织病理变化。

### 1.10 数据统计与分析

利用 GraphPad Prism 10.0 进行统计学检验, 分析组间差异。 $P < 0.05$  为差异有统计学意义 (\*:  $P < 0.05$ ; \*\*:  $P < 0.01$ ; \*\*\*:  $P < 0.001$ ),  $P > 0.05$  时, 视为差异无统计学意义(ns)。

## 2 结果与分析

### 2.1 Cp 的 *lpxtg270* 敲除结果

成功构建重组质粒 pEC-*lpxtg270*gRNA 与 pEC-*lpxtg270*gRNA-HDarm, PCR 扩增 DNA 片段结果证实所构建质粒正确(图 2A、2B)。挑取单个菌落鉴定, XH02 的 PCR 扩增条带为 2 162 bp, XH02 $\Delta$ *lpxtg270* 的 PCR 扩增条带为 1 349 bp, 验证结果正确(图 2C)。测序比对(图 2D)证实成功敲除了 XH02 的 *lpxtg270* 全部序列。

### 2.2 XH02 和 XH02 $\Delta$ *lpxtg270* 菌落形态及生长曲线测定结果

比较 XH02 和 XH02 $\Delta$ *lpxtg270* 在 LB 固体培养基上的菌落形态以及在 BHI 肉汤中的生长能力。结果显示, XH02 和 XH02 $\Delta$ *lpxtg270* 在含 5% 兔血的 LB 固体培养基上培养时生长良好, 菌落均呈乳白色, 表面干燥, 肉眼观察菌落形态无明显差异(图 3A、3B), 2 株菌在 BHI 肉汤中培养, 在 0–30 h 期间生长状态无显著差异(图 3C)。上述结果表明, 敲除 *lpxtg270* 后不影响 Cp 体外培养的菌落形态和生长过程。

### 2.3 XH02 和 XH02 $\Delta$ *lpxtg270* 生物被膜形成能力测定结果

采用结晶紫染色检测生物被膜, 发现培养 24、36 和 48 h 时 XH02 $\Delta$ *lpxtg270* 形成生物被膜的能力显著低于 XH02 (图 4A)。扫描电镜观察

显示: XH02 可形成大面积的生物被膜, 而 XH02 $\Delta$ *lpxtg270* 仅形成少量生物被膜(图 4B)。这表明敲除 *lpxtg270* 会影响 Cp 的生物被膜形成能力。

### 2.4 敲除 *lpxtg270* 对 Cp 侵染 J774A.1 细胞活力的影响结果

相较于 XH02 菌株, XH02 $\Delta$ *lpxtg270* 菌株感染 J774A.1 细胞后 LDH 释放量显著减少(图 5A), PI 阳性细胞的比例极显著降低(图 5B)。这表明敲除 *lpxtg270* 可降低 Cp 对被感染巨噬细胞的损伤作用。

### 2.5 敲除 *lpxtg270* 对 Cp 感染 J774A.1 巨噬细胞 IL-1 $\beta$ 分泌水平的影响结果

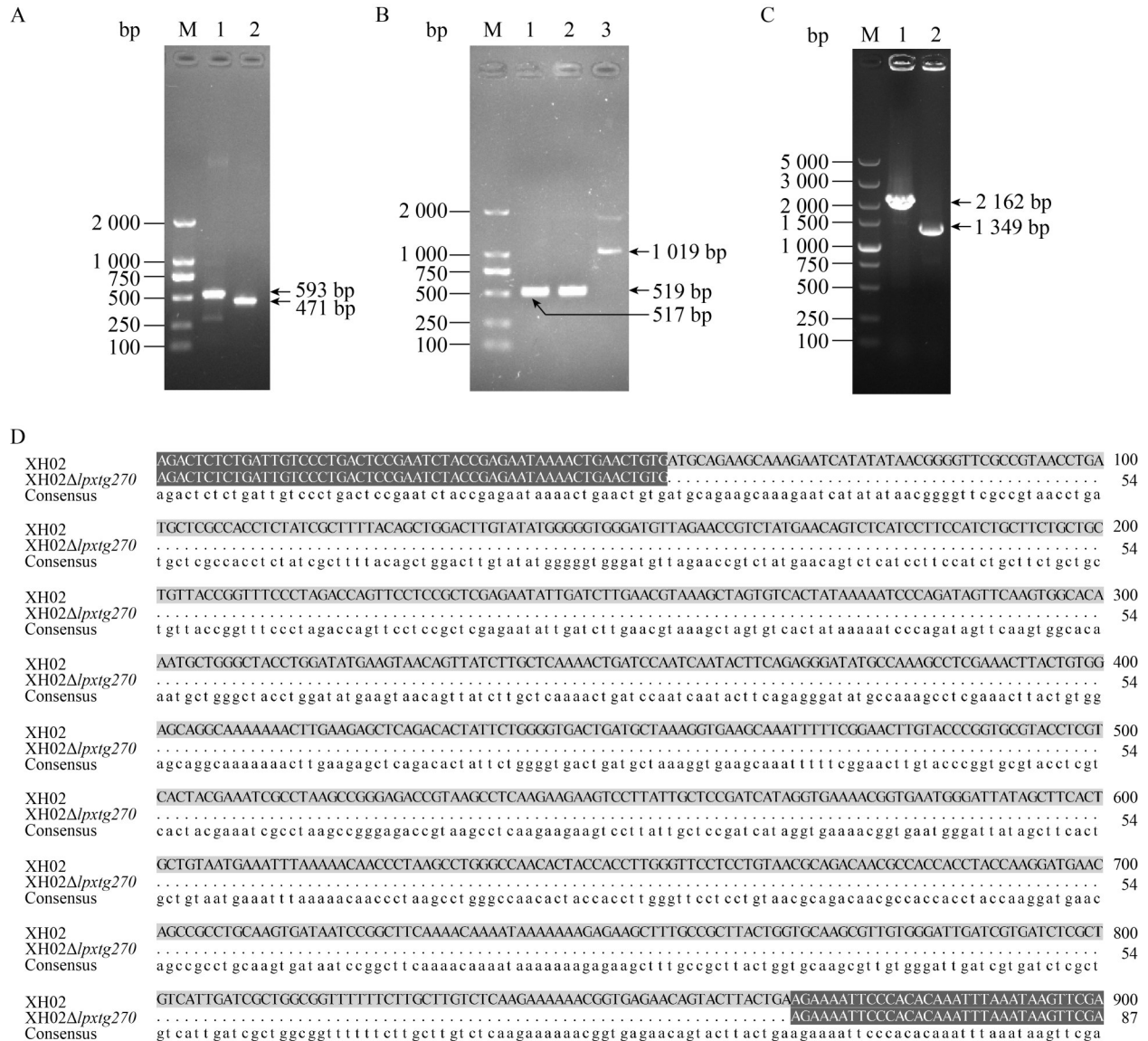
相较于 XH02 菌株, XH02 $\Delta$ *lpxtg270* 菌株感染 J774A.1 细胞后 IL-1 $\beta$  的分泌量极显著下降(图 6)。这表明敲除 *lpxtg270* 会使 Cp 感染诱导巨噬细胞分泌 IL-1 $\beta$  的能力下降。

### 2.6 敲除 *lpxtg270* 对 Cp 黏附、侵入 J774A.1 巨噬细胞及胞内增殖的影响结果

与 XH02 相比, XH02 $\Delta$ *lpxtg270* 黏附 J774A.1 巨噬细胞及在胞内增殖的能力无显著变化, 但其对 J774A.1 的侵袭能力显著降低(图 7A–7C)。

### 2.7 XH02 $\Delta$ *lpxtg270* 体内感染小鼠的生存曲线、脏器载菌量测定及大体病变观察结果

与 XH02 感染组相比, XH02 $\Delta$ *lpxtg270* 感染组小鼠的死亡率下降 25%(图 8A)。XH02 $\Delta$ *lpxtg270* 感染小鼠的肝、脾、肾、肺和脑的载菌量均显著低于 XH02 感染小鼠(图 8B–8F); 而血清中未检测到 Cp, 在 XH02 $\Delta$ *lpxtg270* 感染小鼠的脑组织中也未检测到 Cp。观察病程较长的小鼠发现, XH02 感染组部分小鼠出现不自主颤抖、呼吸困难、食欲下降和消瘦等症状, 而 XH02 $\Delta$ *lpxtg270* 感染组小鼠仅出现食欲下降和消瘦。剖检显示 XH02 感染组有 3 只小鼠的脾脏严重肿大、肝脏



**图2** XH02Δ*lpxt270*构建结果。A: pEC-*lpxt270*gRNA构建结果(泳道M: 2 000 bp DNA marker; 泳道1: pEC-*lpxt270*gRNA; 泳道2: pECXK99E空载体); B: pEC-*lpxt270*gRNA-HDarm构建结果(泳道M: 2 000 bp DNA marker; 泳道1: *lpxt270*上游同源臂; 泳道2: *lpxt270*下游同源臂; 泳道3: *lpxt270*上、下游同源臂的连接); C: Cp *lpxt270*基因敲除结果(泳道M: 5 000 bp DNA marker; 泳道1: XH02; 泳道2: XH02Δ*lpxt270*); D: 测序对比结果。

Figure 2 Construction results of XH02Δ*lpxt270*. A: Results of the pEC-*lpxt270*gRNA construction (M: 2 000 bp DNA marker; Lane 1: pEC-*lpxt270*gRNA; Lane 2: pECXK99E empty vector); B: Results of the pEC-*lpxt270*gRNA-HDarm construction (M: 2 000 bp DNA marker; Lane 1: *lpxt270* upstream homologous arm; Lane 2: *lpxt270* downstream homologous arm; Lane 3: Connection of upstream and downstream homologous arms of *lpxt270*); C: Results of Cp *lpxt270* gene knockout (M: 5 000 bp DNA marker; Lane 1: XH02; Lane 2: XH02Δ*lpxt270*); D: Alignment of *lpxt270* sequences in XH02 and XH02Δ*lpxt270*.

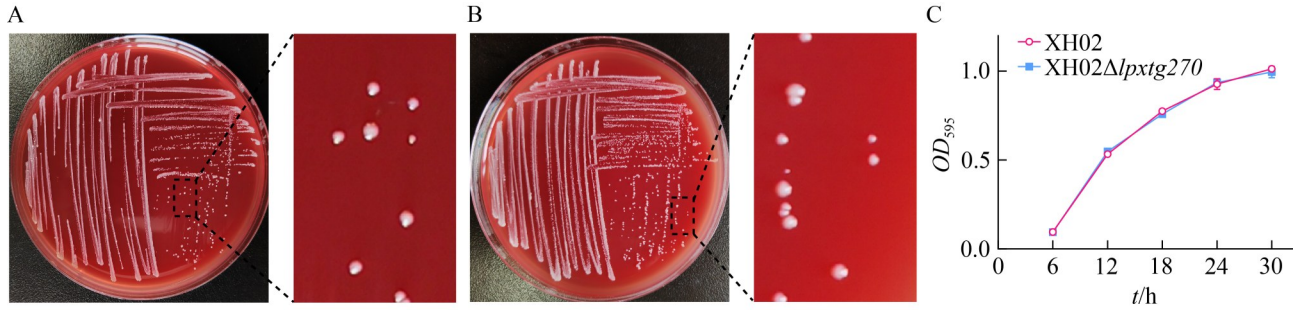


图3 XH02和XH02 $\Delta$ lpxtg270的菌落形态及生长曲线测定结果。A: XH02的菌落形态; B: XH02 $\Delta$ lpxtg270的菌落形态; C: XH02和XH02 $\Delta$ lpxtg的生长曲线。

Figure 3 Determination of colony morphology and growth curve of XH02 and XH02 $\Delta$ lpxtg270. A: Colony morphology of XH02; B: Colony morphology of XH02 $\Delta$ lpxtg270; C: Growth curves of XH02 and XH02 $\Delta$ lpxtg.

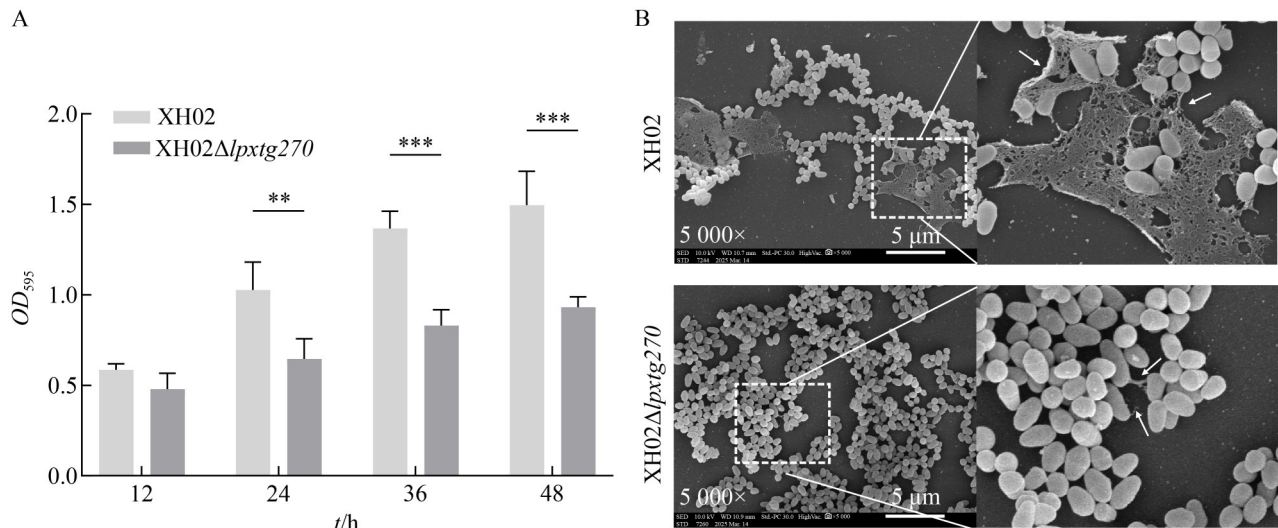
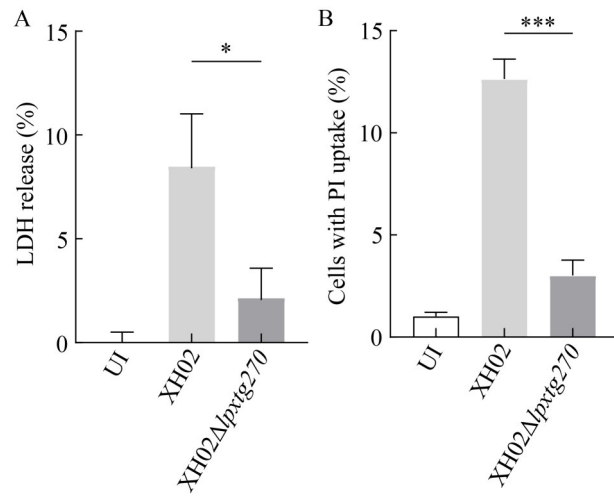


图4 XH02和XH02 $\Delta$ lpxtg270的生物被膜形成能力测定结果。A: 结晶紫测定生物被膜结果; B: 扫描电镜观察XH02和XH02 $\Delta$ lpxtg270的生物被膜。

Figure 4 The biofilm-forming capability of XH02 and XH02 $\Delta$ lpxtg270. A: Crystal violet determination of biofilm results (\*\*:  $P < 0.01$ ; \*\*\*:  $P < 0.001$ ); B: The biofilm morphology of XH02 and XH02 $\Delta$ lpxtg270 observed by electron microscopy. The white arrows indicate the biofilm.

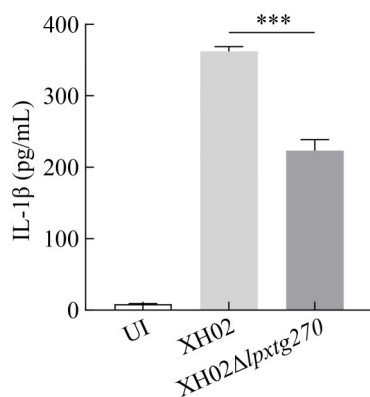
上有脓肿; 而 XH02 $\Delta$ lpxtg270 感染小鼠仅有 1 只脾脏严重肿大(图 8G), 且小鼠肺脏和脑的外观病变不明显(图 8G)。观察病理切片发现, 与 PBS 组小鼠相比, XH02 感染小鼠的脑组织内部分毛细血管结构不完整, 间隙内可见少量纤维蛋白, 个别神经元细胞核部分溶解; 肺部出现明显炎症, 肺泡壁增厚, 肺泡壁上可见少量嗜中性粒细胞和红细胞, 肺泡中出现均质红染的

蛋白浆液; 肝细胞严重肿大变圆, 胞浆中可见大量蛋白颗粒, 部分肝细胞的细胞核溶解、碎裂, 肝血窦闭锁; 整个脾组织内弥漫性分布着大量红细胞和纤维蛋白; 肾小球高度肿大, 可见散在分布的红细胞, 肾小囊内可见少量纤维蛋白。XH02 $\Delta$ lpxtg270 组小鼠的组织病理变化比 XH02 组小鼠轻, 脑组织无明显病变, 肺部出现轻微炎症, 肝组织内仅有少数肝细胞轻微肿胀,



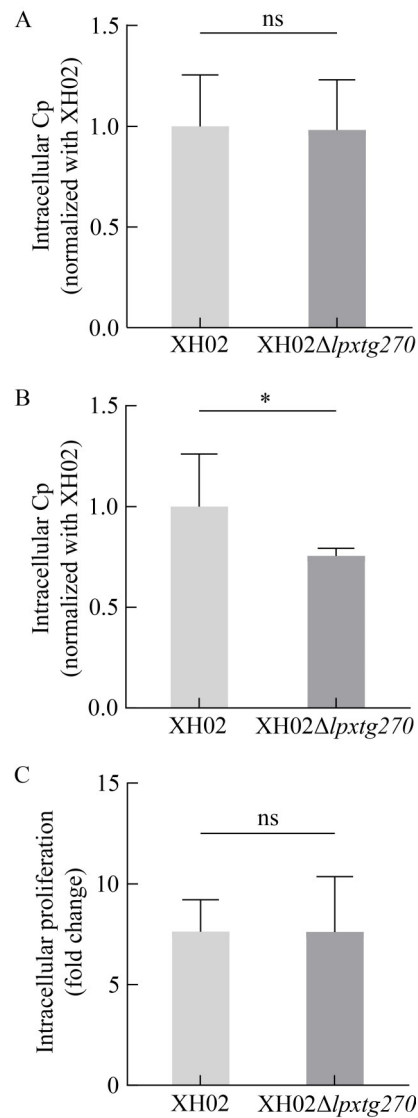
**图5** XH02和XH02Δlpxtg270感染J774A.1细胞的LDH释放水平及PI染色比例检测结果。A: XH02和XH02Δlpxtg270感染J774A.1细胞的LDH释放水平检测结果; B: XH02和XH02Δlpxtg270感染J774A.1细胞PI染色比例检测结果。

Figure 5 Results of LDH release and PI stain proportion in J774A.1 infected with XH02 and XH02Δlpxtg270. A: The level of LDH release in J774A.1 infected with XH02 or XH02Δlpxtg270; B: PI staining proportion of J774A.1 infected with XH02 or XH02Δlpxtg270. \*:  $P < 0.05$ ; \*\*\*:  $P < 0.001$ ; UI: Uninfected J774A.1.



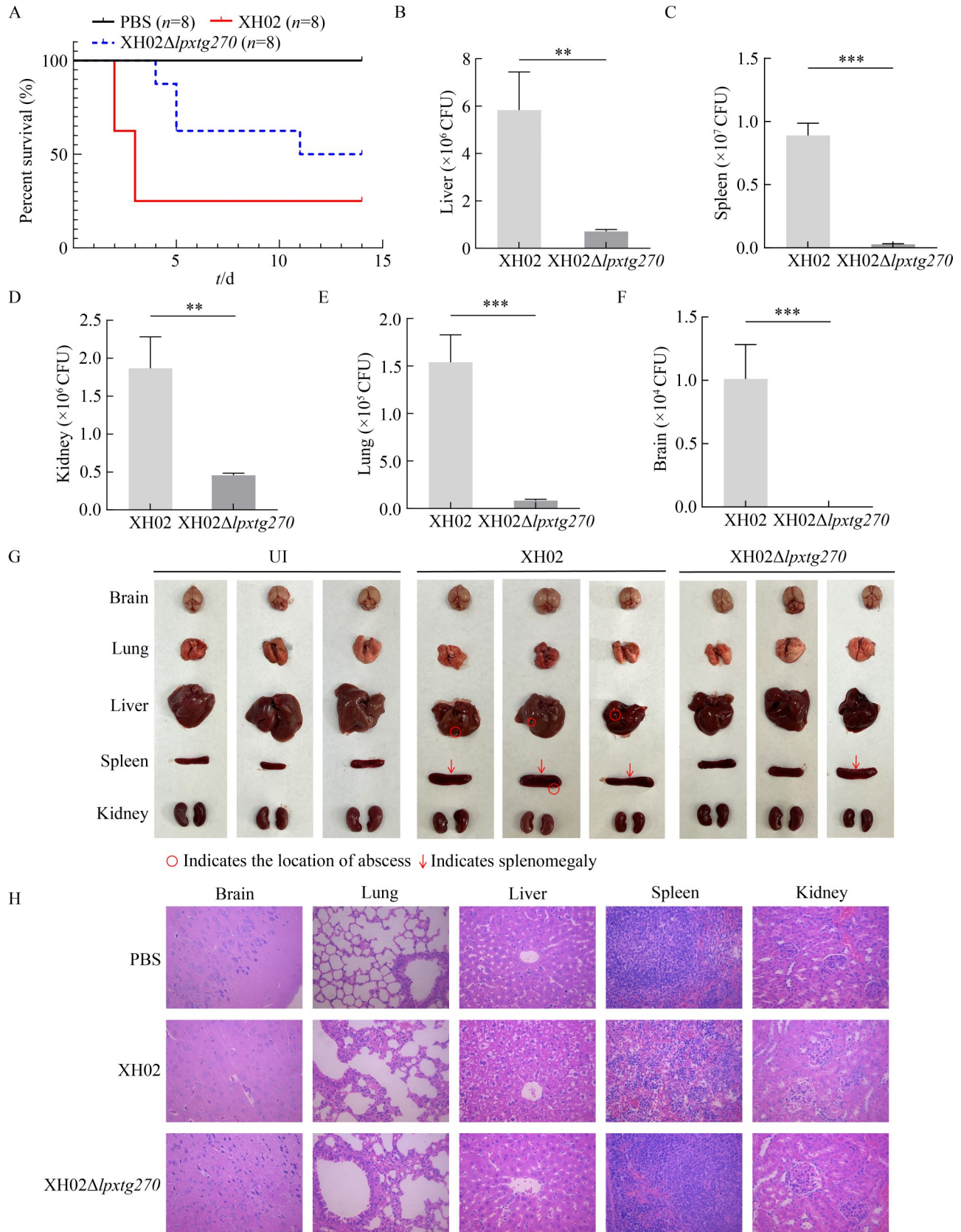
**图6** XH02和XH02Δlpxtg270感染J774A.1细胞IL-1β分泌水平检测结果

Figure 6 Results of IL-1β secretion in J774A.1 infected with XH02 and XH02Δlpxtg270. \*\*\*:  $P < 0.001$ ; UI: Uninfected J774A.1.



**图7** XH02和XH02Δlpxtg270对J774A.1的黏附、侵袭及其在胞内增殖的结果。A: XH02与XH02Δlpxtg270对J774A.1的黏附结果; B: XH02与XH02Δlpxtg270对J774A.1的侵袭结果; C: XH02与XH02Δlpxtg270在J774A.1内的增殖结果。

Figure 7 Results of adhesion and invasion in J774A.1 by XH02 and XH02Δlpxtg270, and their proliferation within J774A.1. A: The Cp recovered from J774A.1 infected with XH02 and XH02Δlpxtg270 (0.5 h) (ns: Not significant); B: The Cp recovered from J774A.1 infected with XH02 and XH02Δlpxtg270 (2 h) (\*:  $P < 0.05$ ); C: Proliferation of XH02 and XH02Δlpxtg270 within J774A.1 (ns: Not significant).



**图8** XH02和XH02 $\Delta$ *lpxtg270*感染小鼠生存曲线、脏器载菌量测定及病理变化观察结果。A: XH02和XH02 $\Delta$ *lpxtg270*感染KM小鼠生存曲线; B-F: 感染XH02和XH02 $\Delta$ *lpxtg270*的KM小鼠的肝、脾、肾、肺和脑的载菌量; G: XH02和XH02 $\Delta$ *lpxtg270*感染小鼠的大体病变; H: 小鼠肝、脾、肾、肺和脑的病理变化。

Figure 8 Survival curve of mice, organ bacterial load and pathological changes from mice infected with XH02 and XH02 $\Delta$ *lpxtg270*. A: Survival curve of KM mice infected with XH02 and XH02 $\Delta$ *lpxtg270*; B-F: Bacterial loads in liver, spleen, kidney, lung, and brain of KM mice infected with XH02 and XH02 $\Delta$ *lpxtg270*; G: The gross lesions of XH02 and XH02 $\Delta$ *lpxtg270* infected mice were observed; H: Pathological changes in brains, lungs, livers, spleens and kidneys of mice. UI: Uninfected J774A.1; CFU: Colony-forming unit; \*\*:  $P < 0.01$ ; \*\*\*:  $P < 0.001$ .

肝血窦和中央静脉可见少量红细胞, 脾小结周边的淋巴细胞轻微减少, 肾小球轻微肿胀(图 8H)。这表明敲除 *lpxtg270* 可使 Cp 感染小鼠的致病力下降。

### 3 讨论与结论

#### 3.1 关于 LPXTG270 影响 Cp 生物被膜形成的探讨

革兰阳性菌表面蛋白通过介导宿主细胞黏附、免疫逃逸及生物被膜形成等过程, 在其环境适应与致病过程中发挥关键作用<sup>[22]</sup>。大多数革兰阳性菌表面蛋白通过保守的 LPXTG 基序实现细胞壁锚定, 该基序能被分选酶 A (sortase A) 特异性识别并催化转肽反应<sup>[23]</sup>, 进而使其发挥相应功能。研究表明金黄色葡萄球菌的 CifA、链球菌的 M 蛋白等典型 LPXTG 蛋白均直接参与病原-宿主互作<sup>[24-25]</sup>。然而, 不同菌属中 LPXTG 蛋白的功能特异性及其在生物被膜动态调控中的作用机制仍待探索。本研究采用基因敲除方法研究 LPXTG 基序锚定蛋白(LPXTG270)在 Cp 生长特性及致病性中的作用。研究发现敲除 *lpxtg270* 不影响 Cp 在体外培养时的菌落形态及生长曲线, 提示 *lpxtg270* 并非维持 Cp 菌落形态和生长繁殖的必需基因, 相似结果在李斯特菌的研究中也有报道<sup>[16]</sup>, 说明细菌表面蛋白可能与致病性有关, 但与其存活无关<sup>[12]</sup>。生物被膜的形成是细菌致病性的重要因素之一。生物

被膜能使细菌抵抗宿主免疫系统的攻击及抗生素的治疗, 在细菌的慢性感染中发挥关键作用<sup>[26]</sup>。本研究发现, 敲除 *lpxtg270* 后 Cp 形成生物被膜的能力下降。该结果与 Shi 等报道的敲除单增李斯特菌 LPXTG 表面蛋白基因 *lmo0159* 显著降低该病原形成生物被膜的能力相似<sup>[27]</sup>, 提示敲除 *lpxtg270* 直接或间接地影响 Cp 形成生物被膜的能力。表面蛋白影响革兰氏阳性菌生物被膜形成的机制包括: (1) 作为表面黏附素介导菌体-基质初始附着, 如金黄色葡萄球菌 SasG 通过 LPXTG 锚定促进生物被膜的积累<sup>[28]</sup>; (2) 通过蛋白-蛋白相互作用形成细胞间连接网络, 类似分选酶依赖的菌毛组装机理<sup>[29]</sup>。LPXTG270 是否通过上述机制影响 Cp 的生物被膜形成还有待进一步研究。

#### 3.2 LPXTG270 对 Cp 黏附、入侵巨噬细胞及在胞内增殖的影响分析

Cp 作为一种兼性胞内寄生菌, 可感染并在巨噬细胞内存活<sup>[30]</sup>, 引起巨噬细胞分泌炎症介质 IL-1 $\beta$ <sup>[31]</sup>, 还能诱导巨噬细胞死亡, 其特点为被感染细胞 LDH 释放增加及 PI 染色细胞比例提高<sup>[12]</sup>。本研究发现, 敲除 *lpxtg270* 使 Cp 感染 J774A.1 巨噬细胞的 LDH 释放量显著减少、PI 染色比例下降、IL-1 $\beta$  分泌水平降低, 提示 *lpxtg270* 是影响 Cp 感染损伤巨噬细胞及诱发 IL-1 $\beta$  分泌的重要因子。本研究还发现, 敲除 *lpxtg270* 显著降低 Cp 对 J774A.1 巨噬细胞的入

侵能力,但不影响 Cp 对 J774A.1 的黏附以及在该病原在胞内的增殖能力。Shi 等<sup>[27]</sup>报道 LPXTG 表面蛋白基因 *lmo0159* 的敲除显著降低单增李斯特菌对 RAW264.7 巨噬细胞黏附和侵袭能力;而林柯辰等<sup>[16]</sup>发现 LPXTG 蛋白基因 *Lmo0880* 敲除不影响单增李斯特菌对人肠上皮细胞 Caco-2 的黏附能力,但其对 Caco-2 的侵袭能力显著降低。出现这些差异的原因可能有:(1)即使是相似的 LPXTG 基序蛋白,病原类别以及细胞类别的不同可能影响细菌 LPXTG 基序蛋白对相应细胞的黏附及入侵;(2)含 LPXTG 基序蛋白种类多,不同的蛋白在病原菌感染宿主细胞中发挥的作用不完全相同。据报道,LPXTG 基序蛋白数量的差异可能是白喉棒状杆菌不同菌株之间黏附性能变化的原因<sup>[32]</sup>。虽然黏附到宿主细胞被认为是宿主-病原体相互作用的初始步骤,但黏附可能并非病原微生物表现出完全毒力的必要条件<sup>[33]</sup>。例如四环素处理的白喉棒状杆菌仍然能够附着在宿主细胞上,但失去了侵入细胞的能力<sup>[34]</sup>。LPXTG270 影响 Cp 入侵 J774A.1 巨噬细胞的具体机制尚有待进一步研究。

### 3.3 LPXTG270 在 Cp 体内感染小鼠致病中的作用探讨

本研究发现敲除 *lpxtg270* 降低 Cp 对感染小鼠的致病力以及被感染小鼠肝脏、脾脏、肾脏、肺脏和脑的载菌水平以及上述脏器的组织病理损伤,这与敲除单增李斯特菌 LPXTG 基序蛋白基因 *lmo0880*、*lmo0159* 降低该病原对小鼠的致病力<sup>[16,27]</sup>,以及敲除 LPXTG 蛋白 SspB 基因降低猪链球菌 2 型对小鼠的致病力<sup>[14]</sup>相似,表明 *lpxtg270* 是影响 Cp 致病的相关基因。本研究发现 Cp 攻毒小鼠的死亡高峰在第 3 天。因此进一步检测了感染小鼠血清中 Cp 情况,结果未检出该病原,提示引起小鼠死亡的原因并非 Cp 感染导致的菌血症。根据脏器载菌量结果,推测可能是由于多器官损伤引起的急性死亡,但其具

体原因有待进一步探索。Cp 感染致病与其多种毒力因子相关,如 PLD 水解动物细胞膜鞘磷脂而增加血管渗透性,促进 Cp 从嗜中性粒细胞逃逸;而 OppD 缺失导致 Cp 对巨噬细胞黏附和感染能力下降等<sup>[11]</sup>。本研究进一步拓展了 Cp 毒力相关因子类别,即 LPXTG270 影响 Cp 对小鼠的致病力。本研究发现 *lpxtg270* 和 *cp40*<sup>[19]</sup> 2 个完全不同的基因敲除在该病原的表型及引起巨噬细胞损伤和 IL-1 $\beta$  分泌中表现相似,提示该病原感染损伤巨噬细胞及介导 IL-1 $\beta$  分泌的毒力相关因子并非唯一。这些毒力相关因子是像 PLD 一样直接发挥毒力作用,还是通过影响 Cp 入侵等间接发挥作用,尚待深入研究。后期可考虑表达获得 LPXTG270 重组蛋白研究其影响 Cp 致病性的机制。此外,本研究发现 Cp 感染可引起部分小鼠表现出神经症状,同时在脑组织中检测到该病原的定殖。Glass 等报道在出现神经症状山羊的脑部脓肿中观察到形态和染色特征与 Cp 一致的细菌<sup>[35]</sup>,表明该病原感染可入侵大脑。病理组织学检查显示,XH02 感染导致小鼠脑组织内部分毛细血管结构不完整,间隙内出现少量纤维蛋白,以及个别神经元细胞核部分溶解,提示 Cp 能穿透血脑屏障,导致脑组织炎症及损伤。

综上所述,本研究证实 *lpxtg270* 是 Cp 感染致病相关基因,为深入探究 LPXTG270 在该病原感染致病中的作用机制奠定了基础。

### 作者贡献声明

牛禄婷:试验设计、试验操作、数据分析和论文撰写;吕红:试验设计、试验操作、数据分析和论文修改;龙良辉:试验操作和数据收集;张艺千:数据收集;徐成伟:审阅文章;周新智:试验操作;王小华:研究构思和设计;王芝英:提供技术支持;周作勇:研究构思和设计,数据整理和处理,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] BAIRD GJ, FONTAINE MC. *Corynebacterium pseudotuberculosis* and its role in ovine caseous lymphadenitis[J]. Journal of Comparative Pathology, 2007, 137(4): 179-210.
- [2] VIANA MVC, FIGUEIREDO H, RAMOS R, GUIMARÃES LC, PEREIRA FL, DORELLA FA, SELIM SAK, SALAHDELDEAN M, SILVA A, WATTAM AR, AZEVEDO V. Comparative genomic analysis between *Corynebacterium pseudotuberculosis* strains isolated from buffalo[J]. PLoS One, 2017, 12(4): e0176347.
- [3] SILVA A, SCHNEIDER MPC, CERDEIRA L, BARBOSA MS, RAMOS RTJ, CARNEIRO AR, SANTOS R, LIMA M, D'AFONSECA V, ALMEIDA SS, SANTOS AR, SOARES SC, PINTO AC, ALI A, DORELLA FA, ROCHA F, de ABREU VAC, TROST E, TAUCH A, SHPIGEL N, et al. Complete genome sequence of *Corynebacterium pseudotuberculosis* I19, a strain isolated from a cow in Israel with bovine mastitis[J]. Journal of Bacteriology, 2011, 193(1): 323-324.
- [4] HAAS DJ, DORNELES EMS, SPIER SJ, CARROLL SP, EDMAN J, AZEVEDO VA, HEINEMANN MB, LAGE AP. Molecular epidemiology of *Corynebacterium pseudotuberculosis* isolated from horses in California[J]. Infection, Genetics and Evolution, 2017, 49: 186-194.
- [5] TROST E, OTT L, SCHNEIDER J, SCHRÖDER J, JAENICKE S, GOESMANN A, HUSEMANN P, STOYE J, DORELLA FA, ROCHA FS, SOARES SD, D'AFONSECA V, MIYOSHI A, RUIZ J, SILVA A, AZEVEDO V, BURKOVSKI A, GUIISO N, JOIN-LAMBERT OF, KAYAL S, et al. The complete genome sequence of *Corynebacterium pseudotuberculosis* FRC41 isolated from a 12-year-old girl with necrotizing lymphadenitis reveals insights into gene-regulatory networks contributing to virulence[J]. BMC Genomics, 2010, 11: 728.
- [6] SEYFFERT N, GUIMARÃES AS, PACHECO LGC, PORTELA RW, BASTOS BL, DORELLA FA, HEINEMANN MB, LAGE AP, GOUVEIA AMG, MEYER R, MIYOSHI A, AZEVEDO V. High seroprevalence of caseous lymphadenitis in Brazilian goat herds revealed by *Corynebacterium pseudotuberculosis* secreted proteins-based ELISA[J]. Research in Veterinary Science, 2010, 88(1): 50-55.
- [7] JUNG BY, LEE SH, KIM HY, BYUN JW, SHIN DH, KIM D, KWAK D. Serology and clinical relevance of *Corynebacterium pseudotuberculosis* in native Korean goats (*Capra hircus coreanae*)[J]. Tropical Animal Health and Production, 2015, 47(4): 657-661.
- [8] 魏宇辰, 王斌, 白新栋, 王小园, 王晨骁, 王娟, 杨增岐. 奶山羊不同组织来源干酪性脓肿中伪结核棒状杆菌的分离及毒力基因和耐药性检测[J]. 中国兽医学报, 2023, 43(5): 945-950.  
WEI YC, WANG B, BAI XD, WANG XY, WANG CX, WANG J, YANG ZQ. Isolation of *Corynebacterium pseudotuberculosis* from different caseous abscesses tissues of dairy goats and detection of virulence genes and antimicrobial resistance of isolates[J]. Chinese Journal of Veterinary Science, 2023, 43(5): 945-950 (in Chinese).
- [9] 张斯旂, 刀筱芳, 李垚, 马媛, 杨发龙. 山羊皮下脓肿的病原分离与鉴定[J]. 中国畜牧兽医, 2019, 46(3): 949-956.  
ZHANG SQ, DAO XF, LI Y, MA Y, YANG FL. Isolation and identification of etiological bacteria of subcutaneous abscess in goats[J]. China Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2019, 46(3): 949-956 (in Chinese).
- [10] 宋艳, 袁永丰, 钱虹宇, 李鑫灿, 罗洪艳, 王芝英, 周作勇. 羊伪结核棒状杆菌的分离鉴定及部分生物学特性分析[J]. 畜牧兽医学报, 2024, 55(2): 680-687.  
SONG Y, YUAN YF, QIAN HY, LI XC, LUO HY, WANG ZY, ZHOU ZY. Identification and partial biological characteristics analysis of *Corynebacterium pseudotuberculosis* isolated from goats[J]. Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica, 2024, 55(2): 680-687 (in Chinese).
- [11] 周作勇, 李和贤, 杨浩钺, 王芝英. 伪结核棒状杆菌毒力因子的研究进展[J]. 中国人兽共患病学报, 2017, 33(12): 1115-1119.  
ZHOU ZY, LI HX, YANG HY, WANG ZY. Research advances on the virulence factors of *Corynebacterium pseudotuberculosis*[J]. Chinese Journal of Zoonoses, 2017, 33(12): 1115-1119 (in Chinese).
- [12] FISCHETTI VA. Surface proteins on Gram-positive bacteria[J]. Microbiology Spectrum, 2019, 7(4): 10.1128.
- [13] 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.
- [14] BAI QK, MA JL, ZHANG Z, ZHONG XJ, PAN ZH, ZHU YC, ZHANG Y, WU ZF, LIU GJ, YAO HC. YSIRK-G/S-directed translocation is required for *Streptococcus suis* to deliver diverse cell wall anchoring effectors contributing to bacterial pathogenicity[J]. Virulence, 2020, 11(1): 1539-1556.
- [15] ROBB M, HOBBS JK, WOODIGA SA, SHAPIRO-WARD S, SUITS MDL, MCGREGOR N, BRUMER H, YESILKAYA H, KING SJ, BORASTON AB. Molecular characterization of N-glycan degradation and transport in *Streptococcus pneumoniae* and its contribution to virulence[J]. PLoS Pathogens, 2017, 13(1): e1006090.
- [16] 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).
- [17] CRETÍ R, FABRETTI F, KOCH S, HUEBNER J, GARSIN DA, BALDASSARRI L, MONTANARO L, ARCIOLA CR. Surface protein EF3314 contributes to virulence properties of *Enterococcus faecalis*[J]. *The International Journal of Artificial Organs*, 2009, 32(9): 611-620.
- [18] GALVÃO CE, FRAGOSO SP, de OLIVEIRA CE, FORNER O, PEREIRA RRB, SOARES CO, ROSINHA GMS. Identification of new *Corynebacterium pseudotuberculosis* antigens by immunoscreening of gene expression library[J]. *BMC Microbiology*, 2017, 17(1): 202.
- [19] 吕红, 李鑫灿, 牛禄婷, 王芝英, 周作勇. 基于 CRISPR/Cas9 构建伪结核棒状杆菌 cp40 敲除株及其生物学特性与致病性研究[J]. *微生物学报*, 2024, 64(7): 2453-2464.
- LÜ H, LI XC, NIU LT, WANG ZY, ZHOU ZY. Biological characteristics and pathogenicity of *Corynebacterium pseudotuberculosis* cp40-deleted strains constructed by CRISPR/Cas9[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2024, 64(7): 2453-2464 (in Chinese).
- [20] CHEN HW, WUBBOLTS RW, HAAGSMAN HP, VELDHUIZEN EJA. Inhibition and eradication of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms by host defence peptides[J]. *Scientific Reports*, 2018, 8: 10446.
- [21] 赵夏薇, 李晓霞, 袁永丰, 宋艳, 杨睿, 易文毅, 谭静梅, 宋振辉, 王芝英, 周作勇. 伪结核棒状杆菌 *pld* 基因无痕缺失株构建及其生物学特性及致病性研究[J]. *微生物学报*, 2022, 62(9): 3387-3398.
- ZHAO XW, LI XX, YUAN YF, SONG Y, YANG R, YI WY, TAN JM, SONG ZH, WANG ZY, ZHOU ZY. Traceless deletion of *pld* in *Corynebacterium pseudotuberculosis* and biological characteristics and pathogenicity of the mutant[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2022, 62(9): 3387-3398 (in Chinese).
- [22] SCHNEEWIND O, MISSIAKAS D. Sec-secretion and sortase-mediated anchoring of proteins in Gram-positive bacteria[J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 2014, 1843(8): 1687-1697.
- [23] MARRAFFINI LA, DEDENT AC, SCHNEEWIND O. Sortases and the art of anchoring proteins to the envelopes of Gram-positive bacteria[J]. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2006, 70(1): 192-221.
- [24] FOSTER TJ, GEOGHEGAN JA, GANESH VK, HÖÖK M. Adhesion, invasion and evasion: the many functions of the surface proteins of *Staphylococcus aureus*[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2014, 12(1): 49-62.
- [25] OEHMCKE S, SHANNON O, MÖRGELIN M, HERWALD H. Streptococcal M proteins and their role as virulence determinants[J]. *Clinica Chimica Acta; International Journal of Clinical Chemistry*, 2010, 411(17/18): 1172-1180.
- [26] FLEMMING HC, van HULLEBUSCH ED, LITTLE BJ, NEU TR, NIELSEN PH, SEVIOUR T, STOODLEY P, WINGENDER J, WUERTZ S. Microbial extracellular polymeric substances in the environment, technology and medicine[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2025, 23(2): 87-105.
- [27] SHI WD, ZHANG QW, LI HH, DU DD, MA X, WANG J, JIANG JJ, LIU CX, KOU LJ, REN JJ. Biofilm formation, motility, and virulence of *Listeria monocytogenes* are reduced by deletion of the gene *lmo0159*, a novel listerial LPXTG surface protein[J]. *Microorganisms*, 2024, 12(7): 1354.
- [28] GEOGHEGAN JA, CORRIGAN RM, GRUSZKA DT, SPEZIALE P, O'GARA JP, POTTS JR, FOSTER TJ. Role of surface protein SasG in biofilm formation by *Staphylococcus aureus*[J]. *Journal of Bacteriology*, 2010, 192(21): 5663-5673.
- [29] KHARE B, V L NARAYANA S. *Pilus biogenesis* of Gram-positive bacteria: roles of sortases and implications for assembly[J]. *Protein Science*, 2017, 26(8): 1458-1473.
- [30] STEFAŃSKA I, GIERYŃSKA M, RZEWUSKA M, BINEK M. Survival of *Corynebacterium pseudotuberculosis* within macrophages and induction of phagocytes death[J]. *Polish Journal of Veterinary Sciences*, 2010, 13(1): 143-149.
- [31] ZHOU ZY, LI HX, TIAN SQ, YI WY, ZHOU Y, YANG HY, LI X, WU B, LI XX, WU JJ, WANG ZY, HU SJ, FANG RD. Critical roles of NLRP3 inflammasome in IL-1 $\beta$  secretion induced by *Corynebacterium pseudotuberculosis* *in vitro*[J]. *Molecular Immunology*, 2019, 116: 11-17.
- [32] SANGAL V, BLOM J, SUTCLIFFE IC, von HUNOLSTEIN C, BURKOVSKI A, HOSKISSON PA. Adherence and invasive properties of *Corynebacterium diphtheriae* strains correlates with the predicted membrane-associated and secreted proteome[J]. *BMC Genomics*, 2015, 16: 765.
- [33] OTT L. Adhesion properties of toxigenic corynebacteria[J]. *AIMS Microbiology*, 2018, 4(1): 85-103.
- [34] OTT L, SCHOLZ B, HÖLLER M, HASSELT K, ENSSER A, BURKOVSKI A. Induction of the NF $\kappa$ -B signal transduction pathway in response to *Corynebacterium diphtheriae* infection[J]. *Microbiology*, 2013, 159(Pt 1): 126-135.
- [35] GLASS EN, de LAHUNTA A, JACKSON C. Brain abscess in a goat[J]. *The Cornell Veterinarian*, 1993, 83(4): 275-282.