

单增李斯特菌核糖-5-磷酸异构酶 B 的酶活鉴定及感染中的作用

翁艳岚¹, 朱斌杰¹, 余鑫¹, 郝云¹, 杨译哲¹, 杨文凯¹, 林淦¹, 邓思敏¹, 聂政¹, 宋厚辉¹, 程昌勇¹, 江玲丽^{2*}, 徐加利^{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 宁波卫生职业技术学院, 浙江 宁波

翁艳岚, 朱斌杰, 余鑫, 郝云, 杨译哲, 杨文凯, 林淦, 邓思敏, 聂政, 宋厚辉, 程昌勇, 江玲丽, 徐加利. 单增李斯特菌核糖-5-磷酸异构酶 B 的酶活鉴定及感染中的作用[J]. 微生物学报, 2025, 65(11): 4905-4920.

WENG Yanlan, ZHU Binjie, YU Xin, HAO Yun, YANG Yizhe, YANG Wenkai, LIN Gan, DENG Simin, NIE Zheng, SONG Houhui, CHENG Changyong, JIANG Lingli, XU Jiali. Ribose-5-phosphate isomerase B of *Listeria monocytogenes*: activity and role in infection[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2025, 65(11): 4905-4920.

摘要: 【目的】解析基因 *lmo0736* 编码的核糖-5-磷酸异构酶 B (ribose-5-phosphate isomerase B, RpiB) 的酶活功能, 并探究其对单核增生李斯特氏菌 (*Listeria monocytogenes*, LM) 感染能力的影响。【方法】采用原核表达与纯化技术获取 Lmo0736 重组蛋白 (LM Lmo0736), 利用酶活性测定试验验证其底物催化功能; 运用细菌同源重组技术构建 *lmo0736* 基因敲除株 (LM Δ *lmo0736*) 及回补株 (LM C Δ *lmo0736*); 通过生长曲线测定试验探究细菌体外生长能力的变化; 借助体外细胞模型 (Caco-2 肠道上皮细胞和 L929 成纤维细胞) 评估细菌的黏附、侵袭及胞间迁移能力; 通过 ICR 小鼠感染模型测定感染后 7 d 的存活率及 48 h 的脏器载菌量, 以此评估其对小鼠的感染能力。【结果】LM Lmo0736 具有典型的 RpiB 酶活性, 可催化 D-核糖-5-磷酸转化为 D-核酮糖-5-磷酸, 其动力学参数为: $V_{\max}=0.366 \text{ mmol}/(\text{L}\cdot\text{min})$, $K_m=4.489 \text{ mmol}/\text{L}$, $k_{\text{cat}}=12.300 \text{ s}^{-1}$, $k_{\text{cat}}/K_m=2.740 \text{ L}/(\text{mmol}\cdot\text{s})$ 。与野生株 EGD-e 及回补株相比, LM Δ *lmo0736* 在 BHI 液体培养基中的生长速度无显著差异, 表明 *lmo0736* 缺失不影响细菌基础生长能力的 LM Δ *lmo0736* 菌株在 Caco-2 细胞内的黏附、侵袭能

资助项目: 国家重点研发计划(2023YFD1801000); 国家自然科学基金(32302961, 32473026); 浙江省“尖兵领雁+X”国际科技合作载体联合研发项目(2025C04009); 宁波市公益类科技项目(2022S006); 浙江农林大学学生科研训练项目(2024kx0082)

This work was supported by the National Key Research and Development Program of China (2023YFD1801000), the National Natural Science Foundation of China (32302961, 32473026), the Key Research and Development International Cooperation Program of Zhejiang Provincial “Leading Geese+X” Plan (2025C04009), the Ningbo Science and Technology Bureau Project (2022S006), and the Scientific Research Training Program for Undergraduate of Zhejiang A&F University (2024kx0082).

*Corresponding authors. E-mail: XU Jiali, xujiali@zafu.edu.cn; JIANG lingli, jllgrace@163.com

Received: 2025-03-31; Accepted: 2025-06-09; Published online: 2025-07-08

力以及在 L929 细胞内的胞间迁移能力均显著减弱, 且在小鼠体内的脏器定殖能力降低, 提示 *lmo0736* 通过 RpiB 依赖的代谢途径调控 LM 的感染能力。【结论】本研究证实 LM Lmo0736 蛋白具有典型的 RpiB 酶活性, 其功能缺失虽未显著改变细菌的基础生长能力, 但会削弱细菌对宿主细胞的黏附、侵袭、胞内迁移能力以及在小鼠体内的脏器定殖能力, 进而显著降低菌株的感染能力。该研究成果为深入探究 RpiB 在 LM 中的生物学功能积累了实验数据, 从代谢与毒力关联的角度为完善食源性病原菌的感染机制提供了实验基础。

关键词: 单增李斯特菌; 核糖-5-磷酸异构酶 B; 酶活; 毒力

Ribose-5-phosphate isomerase B of *Listeria monocytogenes*: activity and role in infection

WENG Yanlan¹, ZHU Binjie¹, YU Xin¹, HAO Yun¹, YANG Yizhe¹, YANG Wenkai¹, LIN Gan¹, DENG Simin¹, NIE Zheng¹, SONG Houhui¹, CHENG Changyong¹, JIANG Lingli^{2*}, XU Jiali^{1*}

¹ Key Laboratory of Applied Technology on Green-Eco-Healthy Animal Husbandry of Zhejiang Province, Zhejiang Engineering Research Center for Animal Health 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 of Zhejiang A&F University, Hangzhou, Zhejiang, China

² Ningbo College of Health Sciences, Ningbo, Zhejiang, China

Abstract: [Objective] To analyze the activity of ribose-5-phosphate isomerase B (RpiB) encoded by *lmo0736* and explore its effect on the infection of *Listeria monocytogenes* (LM). **[Methods]** The recombinant protein Lmo0736 was obtained by prokaryotic expression and purification, and its catalytic activity for substrates was verified by the enzyme activity assay. The LM strain with *lmo0736* knockout (LM Δ *lmo0736*) and the complementary strain (LM C Δ *lmo0736*) were constructed by bacterial homologous recombination. The growth curves of bacteria *in vitro* were plotted. The adhesion, invasion, and intercellular migration of bacteria were evaluated by *in vitro* cell infection models (Caco-2 intestinal epithelial cells and L929 fibroblasts). The ICR mouse infection model was used to measure the 7 d survival rate and 48 h organ load of each strain, and thus the pathogenicity of strains in mice was evaluated. **[Results]** Lmo0736 had typical RpiB activity and catalyzed the conversion of D-ribose-5-phosphate to D-ribulose-5-phosphate, with $V_{\max}=0.366$ mmol/(L·min), $K_m=4.489$ mmol/L, $k_{\text{cat}}=12.300$ s⁻¹, and $k_{\text{cat}}/K_m=2.740$ L/(mmol·s). The growth rate of LM Δ *lmo0736* was not significantly different from that of the wild type EGD-e and LM C Δ *lmo0736* *in vitro*, indicating that the deletion of *lmo0736* did not affect the basic growth of bacteria. LM Δ *lmo0736* demonstrated significantly decreased adhesion and invasion in Caco-2 cells and intercellular migration in L929 cells and weakened colonization in mice, which indicated that *lmo0736* regulated the pathogenicity of LM through a RpiB-dependent metabolic pathway. **[Conclusion]** This study reveals for the first time that the Lmo0736 of LM has typical RpiB

activity. Although the functional loss of Lmo0736 does not directly affect the basic growth of the bacteria, it significantly attenuates the pathogenicity by weakening the adhesion, invasion, and intracellular migration in host cells and the colonization *in vivo*. The results accumulate experimental data for in-depth exploration of the biological functions of RpiB in LM. From the perspective of the association between metabolism and virulence, this study provides an experimental basis for delving into the infection mechanism of foodborne pathogens.

Keywords: *Listeria monocytogenes*; ribose-5-phosphate isomerase B; enzyme activity; virulence

单核增生李斯特氏菌(*Listeria monocytogenes*, LM)是一种革兰氏阳性胞内致病菌,可在高盐、低温及氧化应激等极端环境中存活,并通过污染肉制品、乳制品等食品引发人兽共患病^[1-2]。其感染可导致孕妇流产、新生儿脑膜炎及免疫缺陷患者败血症,致死率高达 30%,被世界卫生组织列为“零容忍”食源性病原体^[3]。作为重要的食源性胞内寄生菌,LM 的致病性高度依赖其代谢可塑性^[4],以应对宿主微环境中的营养限制与氧化压力^[5]。

磷酸戊糖途径(pentose phosphate pathway, PPP)是细菌碳代谢的核心枢纽。该途径通过氧化分支生成 NADPH (维持氧化还原稳态),并通过非氧化分支提供核苷酸前体(如核糖-5-磷酸),同时与糖酵解、三羧酸循环及细胞壁合成等多条通路相互作用^[6-8]。研究表明 PPP 代谢能够灵活调控细菌的环境适应性。据文献报道,七磷酸景天庚酮糖(sedoheptulose-7-phosphate, S7P)作为细胞壁组分前体可影响抗生素敏感性^[9];在大肠杆菌中编码核糖-5-磷酸异构酶的 *rpiAB* 基因缺失会增加细菌对抗生素的敏感性^[10];而在氧化应激条件下,自由基对 PPP 关键酶的靶向修饰会破坏 NADPH 合成与碳通量分配,形成代谢-氧化损伤的恶性循环^[11-12]。此外,PPP 通过整合代谢与毒力调控网络在病原菌宿主适应中发挥关键作用^[13]。新凶手弗朗西丝氏菌(*Francisella novicida*)中 PPP 基因(*tktA*、*rpiA*、*rpe*)缺失会显著抑制其在巨噬细胞内的增殖能力^[8];金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)

PPP 突变株(Δpgl 、 Δtkt)则表现为生物被膜形成能力减弱、氧化应激耐受下降及毒力因子表达水平降低,并伴随着广泛的代谢重编程,如流向糖酵解、三羧酸循环和几种细胞包膜前体的通量增加^[14-16]。这些发现均表明 PPP 相关酶作为抗菌靶点具有潜力,这一点在依赖 NADPH/核苷酸合成的胞内病原体中尤为突出^[17]。

核糖-5-磷酸异构酶(ribose-5-phosphate isomerase, Rpi)是 PPP 非氧化分支的关键酶,可催化 D-核糖-5-磷酸(D-ribose 5-phosphate, DR5P)与 D-核酮糖-5-磷酸(D-ribulose 5-phosphate, DRU5P)的可逆异构化反应,其特异性主要依据底物结合位点的结构特异性识别 DR5P 的醛糖形式,通过质子转移机制将其异构化为酮糖形式,或者通过可逆反应调控、辅因子以及代谢环境的调节作用为核苷酸合成与 NADPH 再生提供代谢基础^[18]。尽管 Rpi 存在 RpiA 和 RpiB2 种同工酶,但后者主要分布于各种微生物中^[19],其功能特性与致病关联尚未明确。现有研究多聚焦于 RpiB 的晶体结构及稀有糖制备的工业应用潜力^[20-21],但对其在病原菌代谢-致病网络中的调控机制尚未明确。因此,探明 LM RpiB 的生物学特性及其对感染能力的影响显得尤为重要。

本研究以 LM Lmo0736 (在生物信息学网站被注释为 RpiB 假定蛋白)为研究对象,通过蛋白表达、酶活鉴定、基因敲除、细胞和小鼠模型感染等试验验证其作为 PPP 关键酶的催化功能,并探究其对 LM 感染能力的影响,旨在为完善食源性病原菌的感染机制提供实验基础。

1 材料与amp;方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒

LM 野生型 EGD-e (37 °C、200 r/min BHI 的培养基中培养)、pKSV7 质粒、pIMK2 质粒、pET-30a(+)质粒、大肠杆菌 DH5 α 和 Rosetta 感受态均为本实验室保存。

1.1.2 培养基

LB 液体培养基(g/L): 氯化钠 10.0, 胰蛋白胨 10.0, 酵母提取物 5.0。在液体培养基中加入 15.0 g/L 琼脂粉得到 LB 固体培养基。BHI 液体培养基: BHI 粉剂 37.0 g/L。在液体培养基中加入 15.0 g/L 琼脂粉得到 BHI 固体培养基。培养基于 121 °C 灭菌 15 min。

1.1.3 实验动物

SPF 级 ICR 雌性小鼠(5 周龄)购自杭州医学院实验动物中心。

动物实验方案经浙江农林大学实验动物管理办公室(该单位已在省科技厅实验动物管理办公室完成资质备案, 备案号为 SYXK-2023-0015)审核批准, 编号为 ZAFUAC202423, 小鼠生产许可证号为 SCXK-2024-0002。所有操作严格遵循《实验动物福利伦理审查指南》要求。

1.1.4 主要试剂和仪器

10% 胎牛血清(FBS), 北京缔一生物科技有限公司; R/MINI 1640 培养基, 武汉普诺赛生命科技有限公司; DMEM 培养基, 苏州海星生物科技有限公司; 2 \times KOD PCR Master Mix, 东洋纺(上海)生物科技有限公司; 限制性内切酶, New England Biolabs 公司; 高纯度质粒小提试剂盒, 南京金斯瑞生物科技有限公司; DNA 纯化试剂盒, 广州艾基生物技术有限公司; 培养基 BHI 所用粉剂, Oxoid 公司; 0.25% 胰酶-EDTA, 北京诺为生物技术有限公司。常规抗生素工作浓度为氨苄青霉素(100 μ g/mL)、卡那霉素(50 μ g/mL)、氯霉素(10 μ g/mL), 其他化学试剂均为国产分析纯。

蛋白纯化用 Ni-NTA 亲和层析介质, 上海信裕生物科技有限公司; 凝胶过滤层析用 Superdex 系列填料、ÄKTA 纯化系统, 思拓凡生物科技(杭州)有限公司; 超声波细胞破碎仪, 宁波新芝生物科技股份有限公司; 多功能酶标仪, 伯腾仪器(上海)有限公司; 蛋白电泳仪, 伯乐生命医学产品(上海)有限公司; 核酸电泳系统, 北京六一仪器厂; 梯度 PCR 扩增仪、台式小型离心机、单通道移液器、旋涡振荡仪, Eppendorf 公司。

1.2 LM Lmo0736 蛋白序列比对及结构特征分析

从 NCBI 数据库(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>)下载获取 Lmo0736 (GenBank 登录号为 CAC98814.1)及其他已报道的 RpiB 家族同源蛋白的氨基酸序列。使用 CLC Sequence Viewer 8.0 软件进行多重序列比对, 以可视化保守基序。利用 SWISS-MODEL 在线工具(<https://swissmodel.expasy.org/>)预测 Lmo0736 的三维结构。从蛋白质数据库(PDB 数据库: <https://www.rcsb.org>)下载已解析的 RpiB 家族成员晶体结构, 采用 ChimeraX 1.6.1 软件的 Matchmaker 工具将 Lmo0736 预测结构与参考蛋白进行空间叠合。

1.3 LM Lmo0736 蛋白原核表达纯化

将从 NCBI 获取的 *lmo0736* 基因序列经 SnapGene 设计引物, 序列详见表 1。PCR 反应体系(50 μ L): 2 \times KOD PCR Master Mix 25 μ L, 上、下游引物(10 μ mol/L)各 1 μ L, DNA 模板 3 μ L, ddH₂O 20 μ L。PCR 反应条件: 98 °C 预变性 3 min; 98 °C 变性 15 s, 60 °C 退火 5 s, 68 °C 延伸 10 s, 共 35 个循环; 68 °C 终延伸 3 min。

PCR 产物经纯化后克隆至 pET-30a(+)质粒, 通过卡那霉素抗性平板筛选阳性克隆, 经 T7 通用引物及测序验证重组质粒构建正确性。将重组质粒转化至 *E. coli* Rosetta 感受态中, 以 1 mmol/L IPTG 于 16 °C、200 r/min 条件下诱导表达 16 h。菌体经 8 000 r/min 离心 10 min, 用

表1 本研究所用引物

Table 1 Primers used in this study

引物名称 Primers name	引物序列 Primer sequences (5'→3')
Lmo0736- <i>Bam</i> H I	<i>CGCGGTACCATGAAAATTGCTATTGGAAATGATCATGTTGGA</i>
Lmo0736- <i>Sal</i> I	<i>ACGCCGTCGATTAATCATTTCATCTTCAATTCTAGCAATCATTTCGAC</i>
M13-F	TGTA AAA ACGACGGCCAGT
M13-R	AGCGGATAACAATTCACACAGGA
pSL2622- <i>Pst</i> I-a-fwd	<i>AAAACTGCAGACTCAAAAAGTTAGTTGACGTCCATTTGATG</i>
pSL2622-b-rev	CCCCCTCCTTAATCATTTCAAAATTTTCATCGTAATTCCTCCATCTTTTCTTGT
pSL2622-c-fwd	GGAATTACGATGAAAATTGAAAATGATTAAGGAGGGGTTGTTATGGAG
pSL2622- <i>Kpn</i> I-d-rev	<i>CGGGGTACCTTTGTTGTTTCAATGATATCTTGAATAGAAGTTCCTGAAC</i>
in1	GAGCTTAAGCCAGTTATTGTTGC
in2	CAATTCTAGCAATCATTTCGACG
CLmo0736- <i>Sac</i> I-fwd	<i>CCGCGAGCTCCTATGTAGATGTGAAAATCGCAGA</i>
CLmo0736- <i>Pst</i> I-rev	<i>AAAACTGCAGAACCAACCCCTCCTTAATCATT</i>
pIMK2-F	ATATTGCGTTTCATCTTTAGAAGCG
pIMK2-R	ATATGGCGCTTCATAGAGTAATTCTG

斜体代表保护性碱基, 下划线代表酶切位点。

The protective bases are set to italic; The restriction enzyme sites are underlined.

10 mmol/L PBS 缓冲液重悬, 通过压力破碎仪 (200 bar, 破碎 3 min; 800 bar, 破碎 3 min) 对菌体进行破碎, 经 12 000 r/min 离心 10 min 后分离上清与沉淀, 经 SDS-PAGE 验证目的蛋白表达, 后续蛋白纯化流程参考文献[22]完成。所用引物序列见表 1。

1.4 LM Lmo0736 蛋白的酶活显色方法优化及酶活测定

重组蛋白酶活测定以 DR5P 为底物, 采用半胱氨酸-咪唑法对反应产物 DRU5P 进行显色测定^[23-24]。在酶活测定之前, 对显色条件按照最佳显色波长、最适显色温度、最适显色时间及最适冰浴时间依次进行检测优化^[24]。最适显色波长测定方法如下: 取 60 μ L 2.0 mmol/L 的 DR5P 标准溶液于离心管中, 用蒸馏水补足至 100 μ L, 加入 20 μ L 半胱氨酸氨基酸溶液和 600 μ L 70% 硫酸溶液, 混匀后立即加入 20 μ L 咪唑乙醇溶液, 60 $^{\circ}$ C 水浴保温 10 min, 取出冰上冷却, 在 450–600 nm 波长之间每隔 5 nm 测

定吸光值。其余条件优化及酶活力鉴定方法均如下: 配制 pH 为 8.5 的 100.0 mmol/L Tris-HCl, 加入 25.0 μ L 10 ng/ μ L 的酶, 在 37 $^{\circ}$ C 孵育 3 min, 加入 25.0 μ L 2.0 mmol/L DR5P, 37 $^{\circ}$ C 反应 5 min, 加入 50.0 μ L 12.5 mol/L 硫酸终止反应。取 100 μ L 反应液加入 20 μ L 15 g/L 半胱氨酸溶液和 600 μ L 70% 硫酸溶液, 混匀后立即加入 20 μ L 0.12% 咪唑乙醇溶液, 以蒸馏水作为对照, 取 200 μ L 测定其吸光值。在此基础上, 根据优化后的最佳显色条件做 DRU5P 的标准品曲线, 测定 Lmo0736 的酶活动力学参数。酶活力单位(U)定义为: 以 DR5P 为底物, 每分钟催化产生 1.0 μ mol 的 DRU5P 所需的酶量。所有测定结果均为 3 次重复平行试验数据的平均值。

1.5 *lmo0736* 缺失株构建和验证

从 NCBI 下载获取 *lmo0736* 基因序列, 参考江文玲等^[25]的同源重组策略设计上下游同源臂扩增引物。分别用 pSL2622-*Pst* I-a-fwd/pSL2622-b-rev 扩增上游同源臂, pSL2622-c-fwd/

pSL2622-*Kpn* I-d-rev 扩增下游同源臂。引物序列详见表 1, PCR 反应体系和反应条件同 1.3 节。重叠延伸拼接后, 与线性化的 pKSV7 经双酶切连接, 转化至大肠杆菌感受态并筛选阳性克隆, 经测序确认重组质粒 pSL2622 构建正确。将 pSL2622 电转入 EGD-e 感受态, 经氯霉素筛选后, 先于 42 °C 下含氯霉素的 BHI 液体培养基中连续传代 5 次, 经 M13-F/R 通用引物 PCR 验证完成同源重组后, 再于 30 °C 下无抗 BHI 液体培养基中传代至质粒丢失, 最后通过抗性筛选获得无氯霉素抗性菌。用内部引物 in1/in2 检测目的基因缺失、外部引物 out1/out2 (即 pSL2622-c-fwd/pSL2622-*Kpn* I-d-rev) 验证上下游拼接, 经测序确认后获得 LM Δ *lmo0736* 基因缺失株并保藏于 -80 °C。所用引物序列见表 1。

1.6 *lmo0736* 回补株的构建

基于 BioCyc 和 Softberry 平台定位并预测 *lmo0736* 基因启动子区域, 以 EGD-e 基因组为模板, 用 SnapGene 设计引物 CL*lmo0736*-*Sac* I-fwd/CL*lmo0736*-*Pst* I-rev, 引物序列详见表 1, PCR 反应体系和反应条件同 1.3 节, 扩增 *lmo0736* 基因及其启动子区。将扩增得到的片段与 pIMK2 质粒重组连接, 转化后筛选阳性克隆, 经电泳验证和测序分析获得重组质粒 pSL2631。将该质粒电转入 LM Δ *lmo0736* 缺失株感受态细胞, 通过卡那霉素抗性筛选, 用 pIMK2 通用引物 pIMK2-F/R 进行 PCR 扩增及测序双重验证, 最终获得回补株 LM C Δ *lmo0736*。

1.7 LM Δ *lmo0736* 生长曲线的测定

选取 EGD-e、LM Δ *lmo0736* 及 LM C Δ *lmo0736* 的单克隆菌落, 分别接种于 5 mL BHI 液体培养基, 37 °C、200 r/min 进行 12 h 预培养。菌体经 10 mmol/L PBS 洗涤 2 次后调整悬液至 OD_{600} 为 0.6。按 1:100 比例接种至新鲜 BHI 培养基, 取 200 μ L 悬液加入 96 孔板作为基线样本(0 h), 剩余培养体系置于 37 °C 恒温摇床

持续培养 12 h。使用全波长酶标仪每小时动态监测各组 OD_{600} 吸光值, 每孔检测前实施 5 s 振荡混匀。实验全程设置空白培养基对照。

1.8 LM Δ *lmo0736* 对 Caco-2 肠上皮细胞黏附、侵袭试验

将 Caco-2 细胞在含 10% 胎牛血清的 R/MINI 1640 培养基中传代培养, 并以 2.5×10^5 个/mL 的密度接种于 24 孔板(每孔 500 μ L), 置于 37 °C、5% CO_2 培养箱中贴壁培养。取对数生长期即 OD_{600} 值为 0.6 的菌液, 按 1:1 000 比例稀释至预热的 R/MINI 1640 培养基。弃去细胞培养液, 10 mmol/L PBS 轻柔洗涤 2 次, 加入含菌的培养基(MOI=10), 水平摇匀后继续培养。黏附: 感染 30 min 后, 移除培养基并用预热的 10 mmol/L PBS 洗涤 2 次以去除未黏附菌体。每孔加入 500 μ L 预冷细胞裂解液, 4 °C 静置 15 min 后剧烈涡旋至产生均匀泡沫, 取 100 μ L 裂解产物进行 3 次连续 10 倍梯度稀释, 点板于 BHI 琼脂平板后, 倒置培养于 37 °C 恒温培养箱中 12-14 h, 统计菌落形成单位(CFU)以计算胞内菌量。侵袭: 感染 60 min 后, 采用含庆大霉素(100 μ g/mL)的 R/MINI 1640 培养基孵育 1 h 以清除胞外菌。使用 10 mmol/L PBS 洗涤细胞 3 次后, 按黏附部分方法裂解、稀释及培养计数。

1.9 LM Δ *lmo0736* 对 L929 鼠源成纤维细胞胞内迁移试验

将 L929 成纤维细胞在含 10% 胎牛血清的 DMEM 完全培养基中传代培养, 并以 1.2×10^6 个/mL 的密度接种于 6 孔板(每孔 2 mL), 于 37 °C、5% CO_2 培养箱中培养至完全贴壁。取 OD_{600} 值为 0.6 的菌液, 用预热的无血清 DMEM 培养基稀释至终浓度为 1×10^7 CFU/mL。弃去细胞培养液后, 用 10 mmol/L PBS 轻柔洗涤 2 次, 按 MOI=0.2 接种含菌培养基, 水平十字振荡混匀。每隔 15 min 执行 8 字形轨迹振荡(持续 5 s/次, 共 4 次), 确保细菌均匀接触细胞表面。感染 1 h

后移除培养基, 10 mmol/L PBS 洗涤 3 次并更换含庆大霉素(100 $\mu\text{g}/\text{mL}$)的 DMEM 终止胞外菌增殖。感染后 1 h, 移除培养基并经 PBS 洗涤 2 次。配制含 1.5% 低熔点琼脂糖、50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 庆大霉素的 DMEM 混合液(预热至 42 $^{\circ}\text{C}$), 每孔加入 3 mL 覆盖层。超净台通风干燥 15 min 使琼脂固化, 将培养板倒置于湿润环境中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 继续培养 48–72 h 观察空斑形成。移除琼脂层后, 每孔加入 4% 多聚甲醛 600 μL 固定 30 min。轻柔冲洗去除残留琼脂, 采用 0.1% 结晶紫溶液染色 15 min, 双蒸水洗涤至背景清晰。将培养板晾干并拍照记录空斑形态, ImageJ 软件量化空斑面积(阈值设定: 直径 ≥ 0.5 mm)。

1.10 LM $\Delta\text{lmo0736}$ 对小鼠存活和脏器定殖能力试验

将菌株 EGD-c、LM $\Delta\text{lmo0736}$ 及 LM C $\Delta\text{lmo0736}$ 于 BHI 液体培养基中培养至对数生长期, 用 PBS 缓冲液调整 OD_{600} 值为 0.6, 经 10 倍稀释后制备成 2×10^8 CFU/mL 的菌悬液; 取 SPF 级 ICR 小鼠(5 周龄, 雌性)随机分为 3 组 ($n=6$ /组), 为精准控制注射体积并减少腹腔穿刺损伤, 使用胰岛素注射器腹腔注射 100 μL 菌悬液(含 2×10^6 CFU)。于接种 48 h 后无菌采集肝脏、脾脏组织, 经预冷 PBS 漂洗后制备脏器匀浆液, 梯度稀释接种于 BHI 平板, 37 $^{\circ}\text{C}$ 倒置培养 12–14 h 后进行菌落计数; 生存分析组 ($n=9$ /组) 自接种后持续观察 7 d, 每 8 h 记录临床症状及生存状态。

1.11 数据统计与分析

所有试验均进行 3 组平行, 3 次生物学重复, 试验结果使用 GraphPad 9.0 软件进行 t -test 统计学分析, 数据用 $\text{mean} \pm \text{SD}$ 表示, ns 表示 $P > 0.05$, *表示 $P < 0.05$, **表示 $P < 0.01$, ***表示 $P < 0.001$, 使用 Adobe Illustrator 2021 进行科学图表整合与可视化呈现。

2 结果与分析

2.1 LM Lmo0736 的氨基酸同源序列和三维结构特征比对

序列比对结果如图 1A 所示, LM Lmo0736 与来自大肠杆菌(*Escherichia coli*)^[26]、热解纤维醋酸弧菌(*Acetivibrio thermocellus*)^[18]、海热袍菌(*Thermotoga maritima*)^[27]、克氏锥虫^[28]及粗球孢子菌^[29]的 RpiB 在关键氨基酸催化位点(包括红色三角形标志的开环残基和红色星形标志的催化残基)高度一致。其与前三者的序列一致性分别为 66.67%、60.42% 与 50.00%, 显示出 RpiB 在不同物种间氨基酸序列的保守性。SWISS-MODEL 模拟的 Lmo0736 的立体结构如图 1B 所示, 该蛋白呈 α - β - α 三明治构象, 包含五股平行的 β 片层核心及两侧各 3 个 α -螺旋, 与已报道 RpiB 家族结构特征一致。进一步以蛋白质数据库(PDB)中不同来源 RpiB 的晶体结构为模板, 对 LM Lmo0736 (红色标注)与其他 RpiB 进行立体结构重叠比对, 结果如图 1C 所示。RpiB 家族蛋白具有高度保守的三维构象, 核心 α - β - α 折叠结构域的拓扑相似度达 95% 以上。上述结果表明, LM Lmo0736 蛋白符合 RpiB 家族的结构特征。

2.2 Lmo0736 蛋白的原核表达及纯化

将构建的 Lmo0736 原核表达质粒热转到 *E. coli* Rosetta 感受态细胞, 经 IPTG 诱导表达后对菌体裂解液进行镍柱亲和层析纯化, 并通过 SDS-PAGE 分析纯化产物。结果如图 2A 所示, 重组蛋白大小符合预期, 为 20.2 kDa。随后利用凝胶过滤层析对咪唑洗脱的重组蛋白进行进一步纯化, SDS-PAGE 结果如图 2B 所示, 目标蛋白条带单一性显著提高, 表明获得了高纯度蛋白。

2.3 半胱氨酸显色法优化及 Lmo0736 蛋白酶活鉴定

半胱氨酸显色法可以测定酮糖的吸光值,

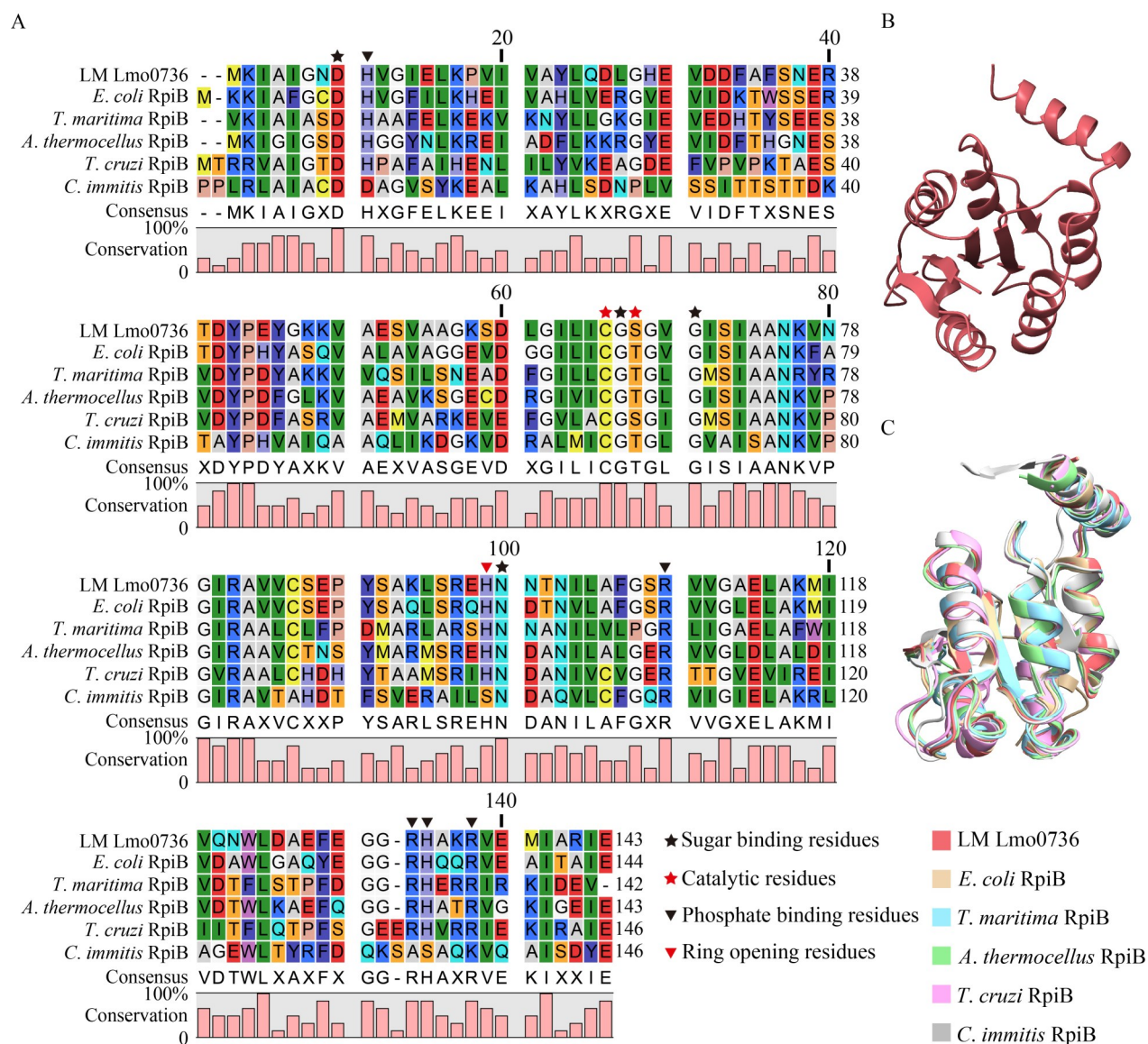


图1 LM Lmo0736与其他已报道的RpiB的氨基酸多序列比对与立体结构分析

Figure 1 Amino acid multiple sequences alignment and three-dimensional structure analysis of LM Lmo0736 and other reported RpiB. A: Amino acid homologous sequences alignment [*Escherichia coli* (*E. coli*) RpiB (GenBank accession number is CAD602296.1), *Thermotoga maritima* (*T. maritima*) RpiB (GenBank accession number is AE000512.0), *Acetivibrio thermocellus* (*A. thermocellus*) RpiB (GenBank accession number is XDO41004.1), *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*) RpiB (GenBank accession number is 3M1P_B), and *Coccidioides immitis* (*C. immitis*) RpiB (GenBank accession number is XM_001240768.1)]; B: Three-dimensional structure simulation (Simulated via the SWISS-MODEL online tool); C: Three-dimensional structure alignment (Yellow: *E. coli* RpiB (PDB ID: 1NN4); Blue: *T. maritima* RpiB (PDB ID: 1O1X); Cyan: *A. thermocellus* RpiB (PDB ID: 3HE8); Purple: *T. cruzi* RpiB (PDB ID: 3K7O); Grey: *C. immitis* RpiB (PDB ID: 3QD5); Red: LM Lmo0736).

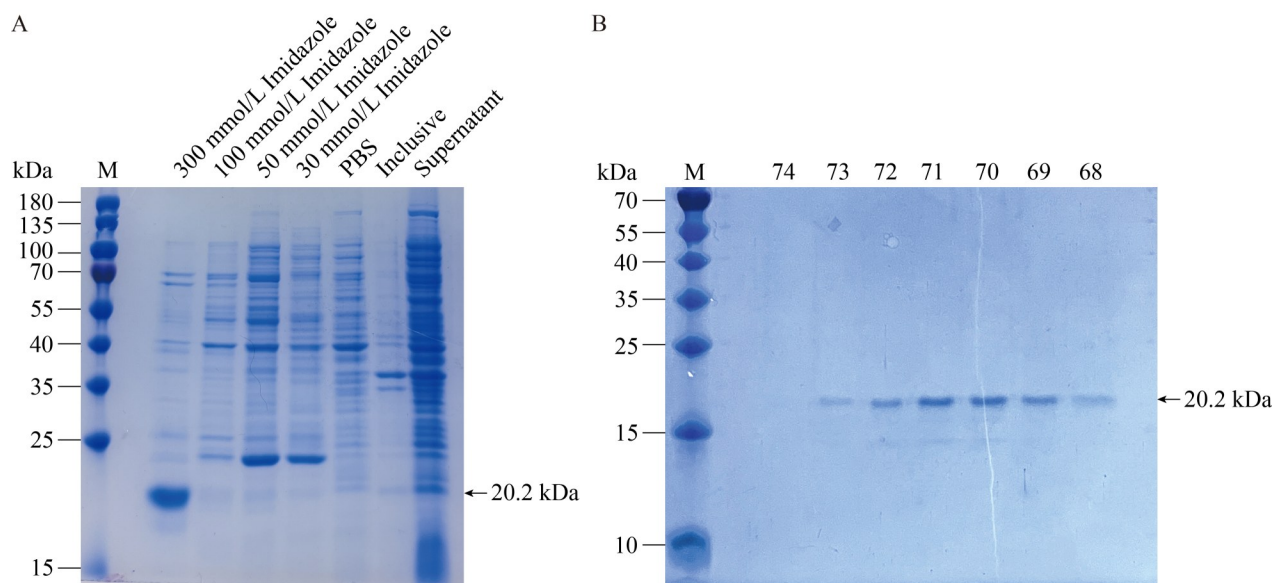


图2 SDS-PAGE鉴定RpiB重组蛋白的纯化

Figure 2 SDS-PAGE analysis for RpiB recombinant protein purification. A: Purification results of the recombinant RpiB protein by nickel column; B: Gel filtration chromatography purification results. Lane M: Protein marker; Lanes 68–74 are the main peak fractions corresponding to the elution profile of gel filtration chromatography.

因此被用于核糖-5-磷酸异构酶的酶活测定^[30]。如图 3 所示, 检测波长为 OD_{535} , 显色温度 $80\text{ }^{\circ}\text{C}$, 显色时间 25 min, 冰浴 35 min 为最佳显色条件。如图 3D 所示, 通过比较 LM Lmo0736 蛋白酶实验组与蒸馏水对照组(即仅含有底物 DR5P 和与 LM Lmo0736 同体积的蒸馏水)可确定 Lmo0736 具有典型的 RpiB 酶活性, 能催化 DR5P 转化为 DRU5P。

2.4 Lmo0736 蛋白酶活动力学参数的测定

首先分别取浓度为 0.0、0.2、0.4、0.6、0.8 mg/mL 的 DRU5P 标准溶液, 并根据优化后的显色条件绘制产物 DRU5P 的标准曲线, 如图 4A 所示。在此基础上, 测定 LM Lmo0736 重组蛋白的酶活, 结果如图 4B 所示。经计算后得到 V_{\max} 为 $0.366\text{ mmol}/(\text{L}\cdot\text{min})$, K_m 为 $4.489\text{ mmol}/\text{L}$, k_{cat} 为 12.300 s^{-1} , k_{cat}/K_m 为 $2.740\text{ L}/(\text{mmol}\cdot\text{s})$ 。通过查阅文献可知, LM Lmo0736 的 K_m 值显著

低于热纤梭菌 $[(17.0\pm 0.4)\text{ mmol}/\text{L}]$ 与嗜热海栖菌 $[(37.0\pm 1.8)\text{ mmol}/\text{L}]$ ^[19]的 RpiB, 但高于大肠杆菌 RpiB ($1.230\text{ mmol}/\text{L}$), 这表明 Lmo0736 对底物具有相对较高的结合亲和力。

2.5 LM Δ lmo0736 和 LM $C\Delta$ lmo0736 菌株 PCR 验证与体外生长能力比较

通过同源重组技术成功构建 LM Δ lmo0736 基因缺失株, 并利用重组质粒 pSL2631 电转化至 LM Δ lmo0736 感受态细胞中获得回补株 LM $C\Delta$ lmo0736。通过 PCR 扩增验证发现目的片段大小符合预期结果(图 5A)。经北京擎科生物科技股份有限公司测序验证分析, 最终确定缺失株与回补株构建成功。各菌株体外生长情况如图 5B 所示, 缺失株 LM Δ lmo0736 在 BHI 液体培养基中连续 12 h 的增殖速率与野生株及回补株无差异, 证实 lmo0736 基因缺失不影响 LM 在 BHI 培养基中的生长能力。

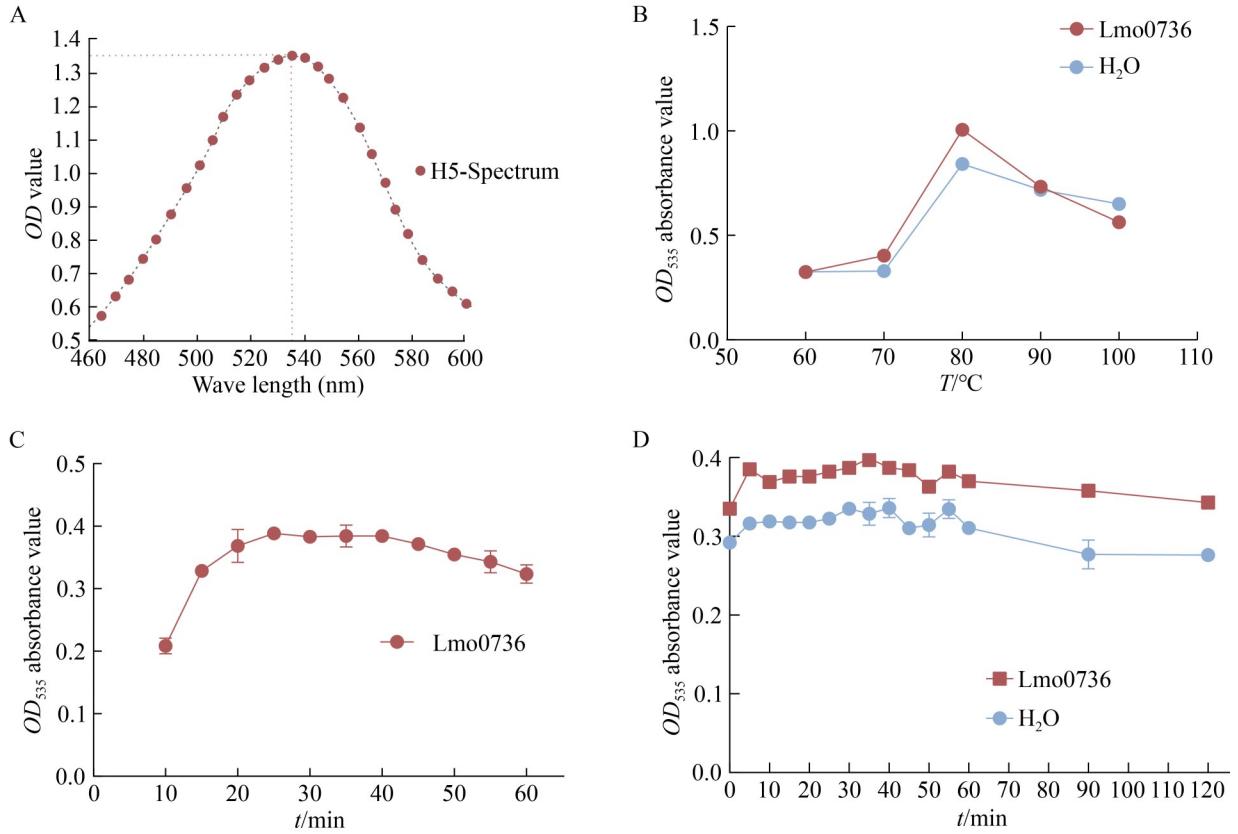


图3 半胱氨酸卡唑法最适显色条件的优化

Figure 3 Optimization of the optimal chromogenic conditions for cysteine carbazole method. A: Determination of the optimum coloration wave length; B: Determination of the optimum coloration temperature; C: Determination of the optimum coloration time; D: Determination of the optimum ice bath time.

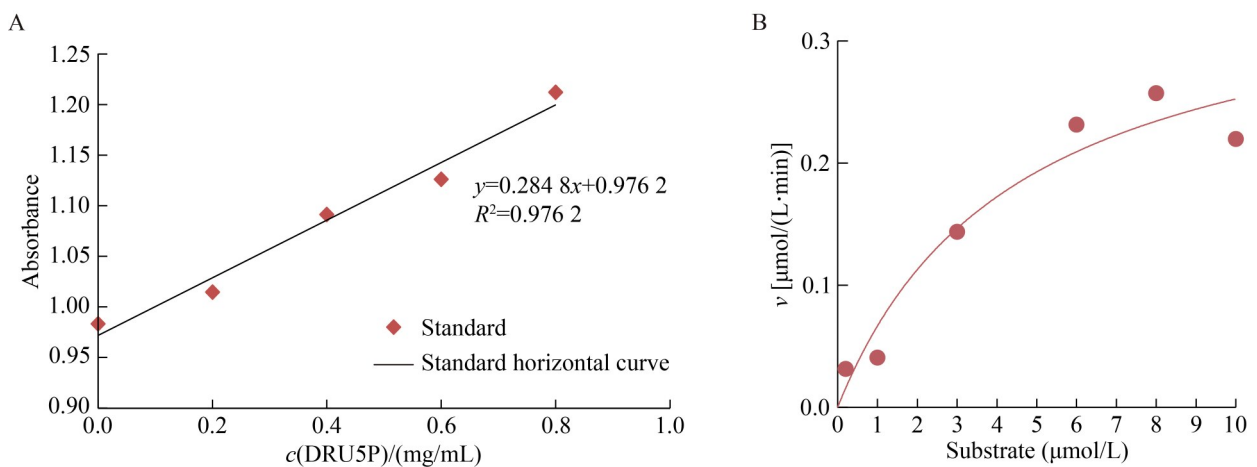


图4 LM Lmo0736蛋白酶活动力学参数的测定

Figure 4 Determination of kinetic parameters of LM Lmo0736 protease activity. A: Standard curve of DRU5P; B: Assay of RpiB recombinant protease activity.

2.6 *lmo0736* 基因缺失减弱了 LM 的黏附侵袭能力

LM 作为重要的食源性致病菌，可通过耐受低 pH 等极端环境特性突破宿主胃肠道屏障。为解析 *lmo0736* 基因在细菌侵袭过程中的生物学

功能，选用可模拟肠道上皮屏障功能的 Caco-2 细胞模型进行验证。如图 6 所示，感染 Caco-2 细胞 0.5 h 和 3 h 后，统计学分析表明 LM $\Delta lmo0736$ 的黏附率和侵袭率较 EGD-e 均显著降低 ($P < 0.05$)。与此同时，LM $C\Delta lmo0736$ 的黏附

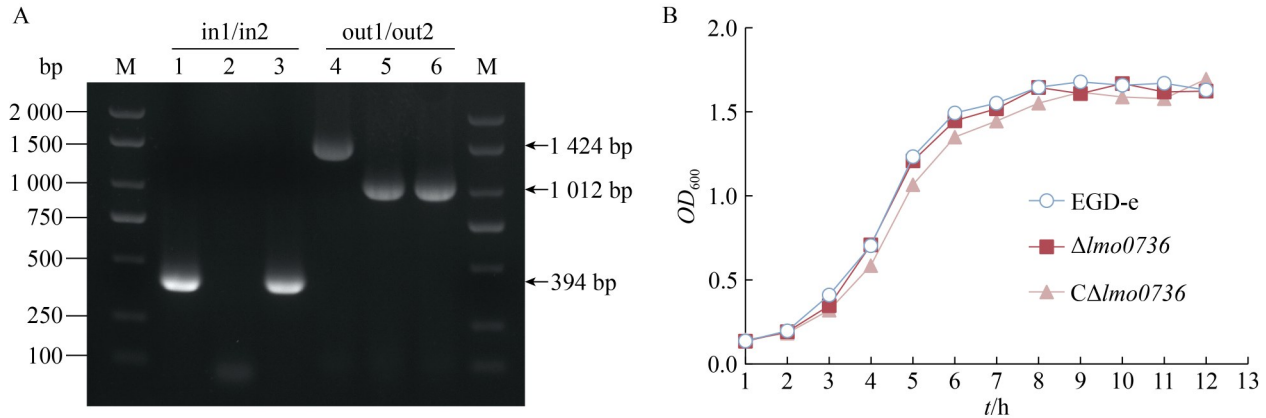


图5 LM $\Delta lmo0736$ 和LM $C\Delta lmo0736$ 的PCR验证及生长曲线测定

Figure 5 Confirmation of *lmo0736* gene deletion strain LM $\Delta lmo0736$ and the complement strain LM $C\Delta lmo0736$ by PCR and growth curves of them in BHI broth. A: PCR confirmation of the EGD-e, LM $\Delta lmo0736$, and LM $C\Delta lmo0736$ strains by using in1/in2 and out1/out2 primers (Lane M: DL2000 DNA marker; Lanes 1 and 4: EGD-e; Lanes 2 and 5: LM $\Delta lmo0736$; Lanes 3 and 6: LM $C\Delta lmo0736$); B: Growth curves of EGD-e, LM $\Delta lmo0736$, and LM $C\Delta lmo0736$ strains in BHI broth.

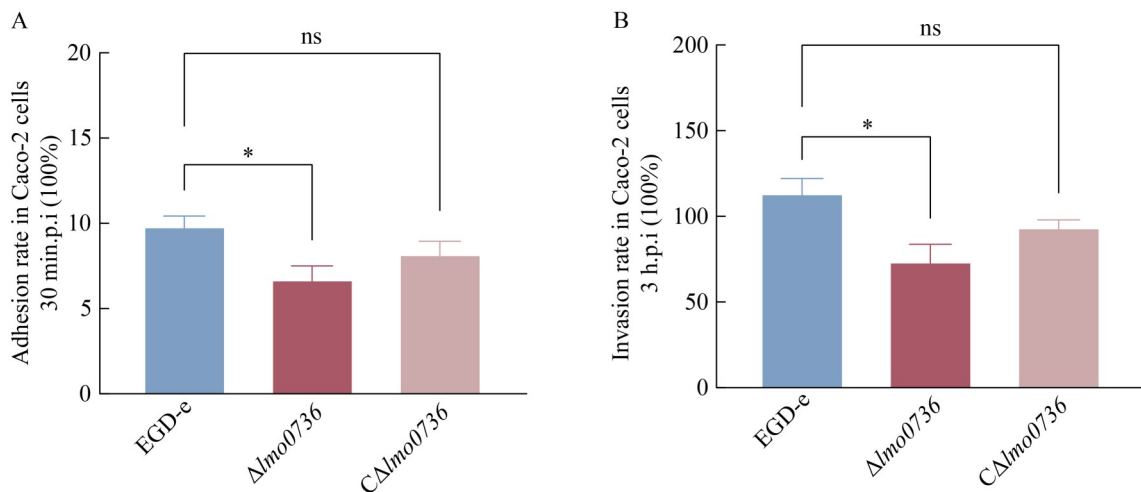


图6 EGD-e、LM $\Delta lmo0736$ 和LM $C\Delta lmo0736$ 在Caco-2细胞中黏附、侵袭能力测定

Figure 6 Determination of adhesion and invasion ability of EGD-e, LM $\Delta lmo0736$, and LM $C\Delta lmo0736$ in Caco-2 cells. A: Bacterial adhesion rate after infection of Caco-2 cells; B: Bacterial invasion rate after infection of Caco-2 cells. ns: No significant difference; *: $P < 0.05$.

率与侵袭率均恢复至野生型水平($P>0.05$)。上述结果表明, *lmo0736* 基因缺失显著削弱了细菌对宿主细胞的黏附和侵袭能力。

2.7 *lmo0736* 基因缺失减弱了 LM 的胞间迁移能力

胞间迁移能力是 LM 逃逸宿主免疫清除的关键致病机制, 其效率与细菌的胞内增殖能力共同决定感染进程。为系统解析 *lmo0736* 基因对胞间迁移的调控作用, 本研究采用小鼠成纤维细胞系 L929 模型, 通过空斑形成试验评估野生株 EGD-e、LM $\Delta lmo0736$ 及 LM $C\Delta lmo0736$ 的胞内增殖与迁移表型(空斑数量与直径分别反映上述功能, 二者呈显著正相关)。空斑形态如图 7A 所示, 缺失 *lmo0736* 后空斑直径较野生株有所减小。使用 ImageJ 软件量化空斑直径并定量分析后结果如图 7B 所示, LM $\Delta lmo0736$ 菌株的空斑直径较野生株极显著减少($P<0.001$), 而 LM $C\Delta lmo0736$ 的空斑直径与野生株相比无明显差异($P>0.05$)。通过统计空斑数量发现, 缺失 *lmo0736* 后空斑数量也显著减少($P<0.05$)。上述结果表明, *lmo0736* 基因缺失后降低了李斯特菌

的胞间迁移能力和胞内增殖能力。

2.8 *lmo0736* 基因缺失减弱了 LM 对小鼠的脏器定殖能力

为验证 *lmo0736* 基因对 LM 在小鼠体内感染能力的影响, 本研究采用 5 周龄 ICR 雌性小鼠建立腹腔感染模型。实验组分别接种 2×10^6 CFU 的野生株 EGD-e、LM $\Delta lmo0736$ 及 LM $C\Delta lmo0736$, 观察感染进程并检测脏器细菌载量。存活曲线如图 8A 所示, 3 组感染小鼠均在接种后 56 h 陆续死亡, LM $\Delta lmo0736$ 组与 EGD-e 组的累计死亡率无显著差异($P>0.05$)。感染小鼠 48 h 后脏器定殖情况如图 8B 所示, LM $\Delta lmo0736$ 在肝脏和脾脏的细菌载量均显著低于 EGD-e 组($P<0.05$), 而 LM $C\Delta lmo0736$ 组载菌量与野生株相比无显著差异($P>0.05$)。实验结果表明, *lmo0736* 基因缺失降低了 LM 在小鼠体内的脏器定殖能力。

3 讨论与结论

LM 是重要的人畜共患病原菌, 兼具环境耐受能力与高宿主致病力, 其致病机制与代谢网络的关联是当前研究热点。磷酸戊糖途径作为中心碳代谢的关键支路, 不仅为核苷酸合成提

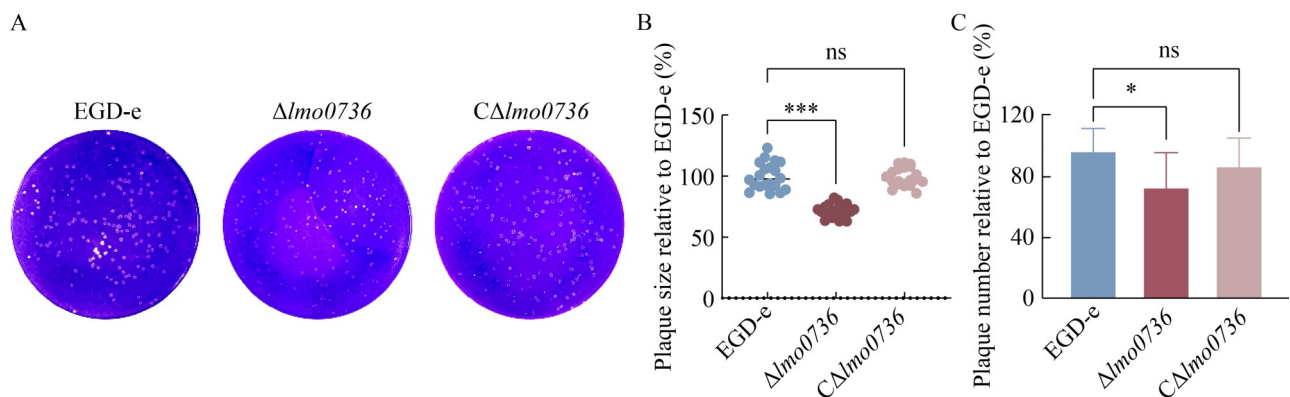


图7 细菌在细胞间迁移能力的检测

Figure 7 Comparison of intercellular migration ability of EGD-e, LM $\Delta lmo0736$, and LM $C\Delta lmo0736$ in L929 cells. A: Plaque assays of EGD-e, LM $\Delta lmo0736$, and LM $C\Delta lmo0736$ in L929 cells; B: Plaque diameters formed in plaque assays; C: Plaque numbers formed in plaque assays. ns: No significant difference; *: $P<0.05$; ***: $P<0.001$.

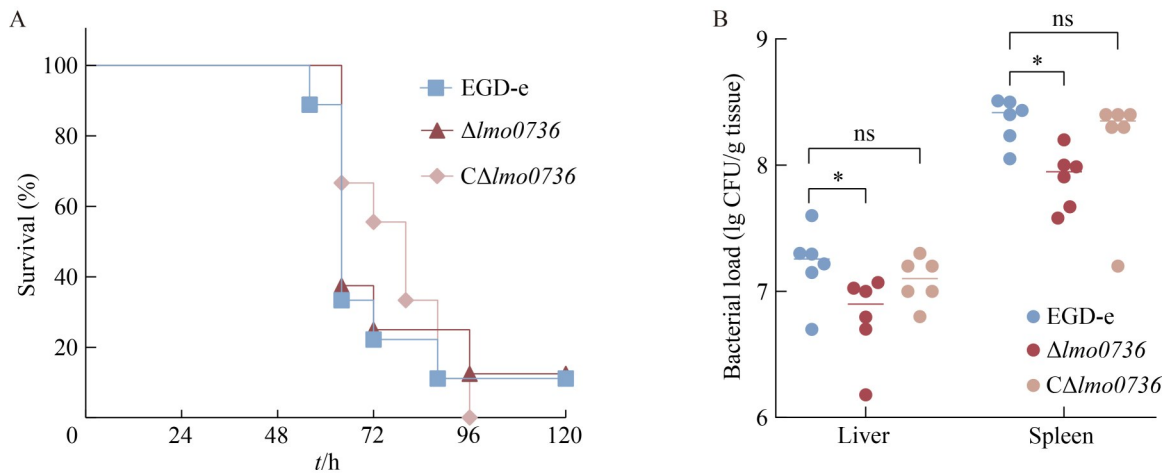


图8 EGD-e、LM $\Delta lmo0736$ 和LM $C\Delta lmo0736$ 感染ICR小鼠存活及定殖试验

Figure 8 EGD-e, LM $\Delta lmo0736$, and LM $C\Delta lmo0736$ infection of ICR mice survival and colonization test. A: Survival curves; B: Colonization ability of each strain in organs of ICR mice. ns: No significant difference; *: $P < 0.05$.

供糖前体, 还通过生成 NADPH 参与维持胞内氧化还原平衡。这一代谢过程在病原菌适应宿主微环境中起核心作用。包括 Rpi 酶在内的 PPP 关键酶, 已在金黄色葡萄球菌、新生弗朗西斯菌等病原菌中被证实通过代谢-毒力偶联机制调控致病过程^[8-14]。然而, 在 LM 中 RpiB 的代谢功能及其与感染能力之间的关联尚未明确。因此, 本研究通过酶活分析、基因敲除技术及感染能力评价, 系统解析 LM Lmo0736 在 LM 代谢网络与感染过程中的作用。

Rpi 酶家族分为 RpiA 与 RpiB, 具有不同的结构起源与相似的功能。前者几乎存在于自然界所有生物中, 而 RpiB 主要存在于微生物中。Rpi 酶都通过 2 个主要的连续步骤进行催化反应。以 RpiB 催化 R5P 转化为 RU5P 的过程为例, 前者的呋喃糖环的打开依赖于组氨酸(H) (图 1A 中红色三角形标记) 为 O_4 提供质子^[31], 一旦环打开, 立即发生异构化, 首先由催化碱 [半胱氨酸(C), 图 1A 中红色星形标记] 从 C_2 中提取质子开始, 随后在苏氨酸(T)或丝氨酸(S) (图 1A 中红色星形标记) 的参与下依次进行 O_1 质子化和 O_2 去质子化, 同时形成烯二醇(酸)中间

体^[32], 最后, C_1 接受从初始催化碱释放的质子形成 RU5P^[32]。在本研究中, 多序列比对结果显示 LM Lmo0736 的 99 位开环残基与 66 位催化残基分别为组氨酸和半胱氨酸(与文献报道一致), 68 位催化残基为丝氨酸(与克氏锥虫一致), 其他的糖结合残基(黑色星形)和磷酸盐结合残基(黑色三角形)与文献报道的高度一致。这表明 RpiB 在不同物种间的核心催化位点具有高度保守性。

从现有研究可知, RpiB 的底物特异性表现出显著的多多样性与复杂性。不同微生物来源的 RpiB 不仅在底物特异性与活性方面存在较大差异, 而且其最佳醛糖底物也各不相同。值得注意的是, 所有研究报道的 RpiB 均能识别 DR5P 作为底物^[19]。因此开展酶活试验, 验证其将 DR5P 催化为 DRU5P 的能力有助于明确 LM Lmo0736 作为 RpiB 家族成员的身份。本研究通过酶动力学分析证实, LM Lmo0736 能够催化 DR5P 转化为 DRU5P, 与典型 RpiB 功能特征一致, 证实了该酶具有典型的 RpiB 活性, 提示其具备保守的催化机制。后续研究中可在现有基础上进一步借助代谢物分析或质谱手

段精准验证催化方向与效率；同时，鉴于 LM Lmo0736 关键氨基酸催化位点的高度保守性可聚焦于关键催化位点功能验证、非保守区域功能挖掘及翻译后修饰调控机制研究，以系统揭示其独特生物学特性。

表型分析表明，LM Δ Lmo0736 在基础培养基中的生长能力较野生株和回补株无显著差异，但其在宿主细胞内的黏附、侵袭及胞间迁移能力均显著降低，且感染小鼠后脏器定殖能力明显下降，提示 *lmo0736* 编码的 RpiB 在感染过程中可能具有不可替代的调控功能。未来研究需结合代谢通量分析技术，进一步解析 RpiB 同工酶的功能分化及其在宿主微环境中的动态调控机制。相关文献报道，LM 毒力因子(如内化素 InlA 或肌动蛋白 ActA)的表达通常依赖 NADPH/GSH 氧化还原平衡的调控机制^[33-34]。RpiB 可能通过代谢物供应失衡影响致病力：一方面，RpiB 催化的 RU5P 生成是 PPP 非氧化支路的关键节点，其缺失可能导致 NADPH 合成减少，削弱细菌应对宿主氧化应激的能力^[35-36]；另一方面，PPP 代谢物可通过直接或间接结合转录调控蛋白(如全局转录调控因子 CodY 或 RNA 聚合酶结合转录因子 DksA)影响毒力基因表达^[37-38]。相比之下，RpiB 影响 LM 毒力的具体机制和代谢途径仍需进一步深入研究。

综上所述，本项工作对 LM 中 *lmo0736* 编码的 RpiB 开展了相关研究，初步鉴定了其酶活性以及对细菌感染能力可能产生的影响，结果表明 RpiB 在 LM 的感染过程中发挥一定的作用。本研究为食源性病原菌感染的机制研究提供了实验基础，为食源性病原菌的防控提供了理论依据。

作者贡献声明

翁艳岚：实验实施、数据分析、论文撰写和修改；朱斌杰：数据收集与监管、协助细胞感染试验操作；余鑫：数据收集与监管、方法论；郝云：协助基因缺失株和回补株构建试验

操作；杨译哲：数据收集与监管、协助蛋白表达试验操作；杨文凯：协助酶活试验操作；林淦：协助试验操作、验证；邓思敏：提供技术支持、数据分析；聂政：提供技术支持、软件使用；宋厚辉：提出概念、获取基金、提供资源；程昌勇：获取基金、提供资源、审阅文章；江玲丽：获取基金、研究构思和设计、论文讨论；徐加利：获取基金、研究构思和设计、数据分析、论文修改。

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] CHENG CY, DONG ZM, HAN X, WANG H, JIANG L, SUN J, YANG YC, MA TT, SHAO CY, WANG XD, CHEN ZW, FANG WH, FREITAG NE, HUANG HR, SONG HH. Thioredoxin 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.
- [2] BELIAS A, BOLTEN S, WIEDMANN M. Challenges and opportunities for risk-and systems-based control of *Listeria monocytogenes* transmission through food[J]. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 2024, 23(6): e70071.
- [3] KOOPMANS MM, BROUWER MC, VÁZQUEZ-BOLAND JA, van de BEEK D. Human listeriosis[J]. *Clinical Microbiology Reviews*, 2023, 36(1): e00060-19.
- [4] ABDELHAMED H, RAMACHANDRAN R, NARAYANAN L, ISLAM S, OZAN O, FREITAG N, LAWRENCE ML. Role of FruR transcriptional regulator in virulence of *Listeria monocytogenes* and identification of its regulon[J]. *PLoS One*, 2022, 17(9): e0274005.
- [5] BHAGWAT A, HALDAR T, KANOJIYA P, SAROJ SD. Bacterial metabolism in the host and its association with virulence[J]. *Virulence*, 2025, 16(1): 2459336.
- [6] MOHD KAMAL K, MAHAMAD MAIFIAH MH, ZHU Y, ABDUL RAHIM N, HASHIM YZH, ABDULLAH SANI MS. Isotopic tracer for absolute quantification of metabolites of the pentose phosphate pathway in bacteria[J]. *Metabolites*, 2022, 12(11): 1085.
- [7] GAN ZD, ZHAO MY, XIA YY, YAN YQ, REN WK. Carbon metabolism in the regulation of macrophage functions[J]. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, 2024, 35(1): 62-73.
- [8] RYTTER H, JAMET A, ZIVERI J, RAMOND E, COUREUIL M, LAGOUGE-ROUSSEY P, EUPHRASIE D, TROS F, GOUDIN N, CHHUON C, NEMAZANY I, de MORAES FE, LABATE C, GUERRERA IC,

- CHARBIT A. The pentose phosphate pathway constitutes a major metabolic hub in pathogenic *Francisella*[J]. *PLoS Pathogens*, 2021, 17(8): e1009326.
- [9] SEREGINA TA, PETRUSHANKO IY, ZARIPOV PI, SHAKULOV RS, A SKLYAROVA S, MITKEVICH VA, MAKAROV AA, MIRONOV AS. Activation of purine biosynthesis suppresses the sensitivity of *E. coli gmhA* mutant to antibiotics[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2023, 24(22): 16070.
- [10] SEREGINA TA, SHAKULOV RS, SKLYAROVA SA, MIRONOV AS. Disruptions of *rpiAB* genes encoding ribose-5-phosphate isomerases in *E. coli* increases sensitivity of bacteria to antibiotics[J]. *Cells*, 2024, 13(22): 1915.
- [11] REYES JS, CORTÉS-RÍOS J, FUENTES-LEMUS E, RODRIGUEZ-FERNANDEZ M, DAVIES MJ, LÓPEZ-ALARCÓN C. Competitive oxidation of key pentose phosphate pathway enzymes modulates the fate of intermediates and NADPH production[J]. *Free Radical Biology and Medicine*, 2024, 222: 505-518.
- [12] FUENTES-LEMUS E, REYES JS, FIGUEROA JD, DAVIES MJ, LÓPEZ-ALARCÓN C. The enzymes of the oxidative phase of the pentose phosphate pathway as targets of reactive species: consequences for NADPH production[J]. *Biochemical Society Transactions*, 2023, 51(6): 2173-2187.
- [13] MACHELART A, WILLEMART K, ZÚÑIGA-RIPA A, GODARD T, PLOVIER H, WITTMANN C, MORIYÓN I, de BOLLE X, van SCHAFTINGEN E, LETESSON JJ, BARBIER T. Convergent evolution of zoonotic *Brucella* species toward the selective use of the pentose phosphate pathway[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2020, 117(42): 26374-26381.
- [14] KIM J, KIM GL, NORAMBUENA J, BOYD JM, PARKER D. Impact of the pentose phosphate pathway on metabolism and pathogenesis of *Staphylococcus aureus*[J]. *PLoS Pathogens*, 2023, 19(7): e1011531.
- [15] ZEDEN MS, GALLAGHER LA, BUENO E, NOLAN AC, AHN J, SHINDE D, RAZVI F, SLADEK M, BURKE Ó, O'NEILL E, FEY PD, CAVA F, THOMAS VC, O'GARA JP. Metabolic reprogramming and altered cell envelope characteristics in a pentose phosphate pathway mutant increases MRSA resistance to β -lactam antibiotics[J]. *PLoS Pathogens*, 2023, 19(7): e1011536.
- [16] TAN X, RAMOND E, JAMET A, BARNIER JP, DECAUX-TRAMONI B, DUPUIS M, EUPHRASIE D, TROS F, NEMAZANYI I, ZIVERI J, NASSIF X, CHARBIT A, COUREUIL M. Transketolase of *Staphylococcus aureus* in the control of master regulators of stress response during infection[J]. *The Journal of Infectious Diseases*, 2019, 220(12): 1967-1976.
- [17] HAEUSSLER K, BERNEBURG I, JORTZIK E, HAHN J, RAHBARI M, SCHULZ N, PREUSS J, ZAPOL'SKII VA, BODE L, PINKERTON AB, KAUFMANN DE, RAHLFS S, BECKER K. Glucose 6-phosphate dehydrogenase 6-phosphogluconolactonase: characterization of the *Plasmodium vivax* enzyme and inhibitor studies[J]. *Malaria Journal*, 2019, 18(1): 22.
- [18] JUNG J, KIM JK, YEOM SJ, AHN YJ, OH DK, KANG LW. Crystal structure of *Clostridium thermocellum* ribose-5-phosphate isomerase B reveals properties critical for fast enzyme kinetics[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2011, 90(2): 517-527.
- [19] CHEN JJ, WU H, ZHANG WL, MU WM. Ribose-5-phosphate isomerases: characteristics, structural features, and applications[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2020, 104(15): 6429-6441.
- [20] TANG HT, JU X, ZHAO J, LI LZ. Engineering ribose-5-phosphate isomerase B from a central carbon metabolic enzyme to a promising sugar biocatalyst[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2021, 105(2): 509-523.
- [21] ZHANG XF, XU XQ, YAO XM, WANG R, TANG HT, JU X, LI LZ. Exploring multifunctional residues of ribose-5-phosphate isomerase B from *Ochrobactrum* sp. CSL1 enhancing isomerization of D-allose[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2020, 68(11): 3539-3547.
- [22] 冯昱超, 徐加利, 朱斌杰, 吴泽斌, 王雯静, 丁桢, 蔡孜萌, 陈绵绵, 孙静, 江玲丽, 宋厚辉, 夏菁, 程昌勇. 单增李斯特菌毒力因子溶血素关键氨基酸位点在感染过程中的作用研究[J]. *微生物学报*, 2024, 64(4): 1219-1232.
- FENG YC, XU JL, ZHU BJ, WU ZB, WANG WJ, DING A, CAI ZM, CHEN MM, SUN J, JIANG LL, SONG HH, XIA J, CHENG CY. Roles of key amino acid residues of the virulence factor listeriolysin O in *Listeria monocytogenes* infection[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2024, 64(4): 1219-1232 (in Chinese).
- [23] 朱婧斐. L-阿拉伯糖异构酶在枯草芽孢杆菌中的芽孢表面展示及酶学性质研究[D]. 镇江: 江苏大学, 2016.
- ZHU JF. Surface display of L-arabinose isomerase on *Bacillus subtilis* spores and analysis of recombinant enzyme properties[D]. Zhenjiang: Jiangsu University, 2016 (in Chinese).
- [24] 屈亚平, 张智俊, 王超莉, 王蕾, 吴林军. 毛竹阿拉伯糖-5-磷酸异构酶的基因克隆、原核表达及纯化[J]. *浙江农林大学学报*, 2016, 33(6): 928-934.
- QU YP, ZHANG ZJ, WANG CL, WANG L, WU LJ. Gene cloning, expression, and purification of the arabinose-5-phosphate isomerase from *Phyllostachys edulis*[J]. *Journal of Zhejiang A&F University*, 2016, 33(6): 928-934 (in Chinese).
- [25] 江文玲, 徐加利, 董欣楠, 沈云勤, 陈丹丹, 江玲丽, 宋厚辉, 程昌勇. 单增李斯特菌末端氧化酶亚基 QoxB 的生物学功能探究[J]. *微生物学报*, 2023, 63(2): 656-669.
- JIANG WL, XU JL, DONG XN, SHEN YQ, CHEN DD, JIANG LL, SONG HH, CHENG CY. Biological functions of terminal oxidase subunit QoxB in *Listeria monocytogenes*[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2023, 63(2): 656-669 (in Chinese).
- [26] ZHANG RG, ANDERSSON CE, SKARINA T, EVDOKIMOVA E, EDWARDS AM, JOACHIMIAK A, SAVCHENKO A, MOWBRAY SL. The 2.2 Å resolution structure of RpiB/AlsB from *Escherichia coli* illustrates a new approach to the ribose-5-phosphate isomerase reaction[J]. *Journal of Molecular Biology*, 2003, 332(5): 1083-1094.
- [27] XU QP, SCHWARZENBACHER R, McMULLAN D,

- von DELFT F, BRINEN LS, CANAVES JM, DAI XP, DEACON AM, ELSLIGER MA, ESHAGI S, FLOYD R, GODZIK A, GRITTINI C, GRZECHNIK SK, JAROSZEWSKI L, KARLAK C, KLOCK HE, KOESEMA E, KOVARIK JS, KREUSCH A, et al. Crystal structure of a ribose-5-phosphate isomerase RpiB (TM1080) from *Thermotoga maritima* at 1.90 Å resolution[J]. *Proteins*, 2004, 56(1): 171-175.
- [28] STERN AL, NAWORYTA A, CAZZULO JJ, MOWBRAY SL. Structures of type B ribose 5-phosphate isomerase from *Trypanosoma cruzi* shed light on the determinants of sugar specificity in the structural family[J]. *The FEBS Journal*, 2011, 278(5): 793-808.
- [29] EDWARDS TE, ABRAMOV AB, SMITH ER, BAYDO RO, LEONARD JT, LEIBLY DJ, THOMPSON KB, CLIFTON MC, GARDBERG AS, STAKER BL, van VOORHIS WC, MYLER PJ, STEWART LJ. Structural characterization of a ribose-5-phosphate isomerase B from the pathogenic fungus *Coccidioides immitis*[J]. *BMC Structural Biology*, 2011, 11: 39.
- [30] 翁玮慧. L-阿拉伯糖异构酶的酶学性质及酶法制备塔格糖研究[D]. 无锡: 江南大学, 2006.
WENG WH. Properties of L-arabinose isomerase and enzymatic preparation of D-tagatose[D]. Wuxi: Jiangnan University, 2006 (in Chinese).
- [31] ROOS AK, MARIANO S, KOWALINSKI E, SALMON L, MOWBRAY SL. D-ribose-5-phosphate isomerase B from *Escherichia coli* is also a functional D-allose-6-phosphate isomerase, while the *Mycobacterium tuberculosis* enzyme is not[J]. *Journal of Molecular Biology*, 2008, 382(3): 667-679.
- [32] WANG J, YANG WT. Concerted proton transfer mechanism of *Clostridium thermocellum* ribose-5-phosphate isomerase[J]. *The Journal of Physical Chemistry B*, 2013, 117(32): 9354-9361.
- [33] MATSUDA Y, YAMAUCHI H, HARA H. Activation of inflammasomes and mechanisms for intracellular recognition of *Listeria monocytogenes*[J]. *Microbiology and Immunology*, 2023, 67(10): 429-437.
- [34] ZHANG Y, GUO Q, FANG XW, YUAN M, HU WJ, LIANG XY, LIU J, YANG YY, FANG C. Destroying glutathione peroxidase improves the oxidative stress resistance and pathogenicity of *Listeria monocytogenes*[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2023, 14: 1122623.
- [35] BROUWER S, JESPERSEN MG, ONG CY, de OLIVEIRA DMP, KELLER B, CORK AJ, DJOKO KY, DAVIES MR, WALKER MJ. *Streptococcus pyogenes* hijacks host glutathione for growth and innate immune evasion[J]. *mBio*, 2022, 13(3): e0067622.
- [36] HOU S, GAO C, LIU J, CHEN XL, WEI WQ, SONG W, HU GP, LI XM, WU J, LIU LM. Med3-mediated NADPH generation to help *Saccharomyces cerevisiae* tolerate hyperosmotic stress[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2024, 90(8): e0096824.
- [37] SCHIAVOLIN L, DENEUBOURG G, STEINMETZ J, SMEESTERS PR, BOTTEAUX A. Group A *Streptococcus* adaptation to diverse niches: lessons from transcriptomic studies[J]. *Critical Reviews in Microbiology*, 2024, 50(2): 241-265.
- [38] WEAVER JW, PROSHKIN S, DUAN WQ, EPSHTEIN V, GOWDER M, BHARATI BK, AFANASEVA E, MIRONOV A, SERGANOV A, NUDLER E. Control of transcription elongation and DNA repair by alarmone ppGpp[J]. *Nature Structural & Molecular Biology*, 2023, 30(5): 600-607.