

张政, 肖金华, 张钰, 等. 单增李斯特菌谷胱甘肽过氧化物酶报告系统的构建及其调控因子筛选 [J]. 畜牧与兽医, 2025, 57 (8): 61-68.  
ZHANG Z, XIAO J H, ZHANG Y, et al. Construction of glutathione peroxidase GSH-Px reporting system for *Listeria monocytogenes* and screening of regulatory factors [J]. Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2025, 57 (8): 61-68.

## 单增李斯特菌谷胱甘肽过氧化物酶报告系统的构建及其调控因子筛选

张政<sup>1</sup>, 肖金华<sup>2</sup>, 张钰<sup>1</sup>, 杨雨婷<sup>1</sup>, 洪嘉俊<sup>1</sup>, 方春<sup>1\*</sup>, 韩旭<sup>2\*</sup>

(1. 长江大学动物科学技术学院, 湖北 荆州 434025;

2. 江西生物科技职业学院, 江西 南昌 330200)

**摘要:** 旨在构建单增李斯特菌 (LM) 谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-Px) 的绿色荧光蛋白 (GFP) 报告系统, 筛选 GSH-Px 的调控因子, 并验证调控因子对 LM 生长能力和抗氧化应激能力的影响。通过重叠延伸 PCR (SOE-PCR) 方法, 构建携带 *gsh-px* 启动子区域的 *gfp* 报告质粒 pFL516; 通过测定携带报告质粒的亲本株 10403S-pFL516 荧光蛋白表达情况来验证报告质粒 pFL516 是否构建成功; 通过测定报告质粒 pFL516 在亲本株 10403S 和各二元调控系统缺失株里的转录水平来筛选 GSH-Px 的调控因子; 生长曲线检测该调控因子缺失对 LM 生长能力的影响; 通过氧化应激存活试验, 测定该调控因子缺失对 LM 抗氧化应激能力的影响。结果: PCR 检测显示报告质粒 pFL516 成功构建并电转入 14 对二元调控系统缺失株, 其中 7 对二元调控系统的缺失导致 *gsh-px* 基因转录水平上调, 6 对二元调控系统的缺失则导致 *gsh-px* 基因转录水平下调, 1 对二元调控系统缺失后 *gsh-px* 的转录水平无显著差异。选取二元调控系统 *lmo1508/lmo1509* 进一步研究发现, 在非胁迫和金属离子胁迫条件下二元调控系统 *lmo1508/lmo1509* 缺失株的 *gsh-px* 转录水平显著高于亲本株 10403S, 说明 *lmo1508/lmo1509* 负调控 *gsh-px* 的转录水平; 生长曲线结果表明 *lmo1508/lmo1509* 基因缺失不影响 10403S 菌株的生长能力, 应激存活试验结果表明, *lmo1508/lmo1509* 缺失显著降低 LM 在氧化应激条件下的存活率, 表明 *lmo1508/lmo1509* 对 LM 的抗氧化应激能力存在正调控。结果表明, 在 LM 中成功构建 *gsh-px* 的报告系统, 并筛选出调控 *gsh-px* 的调控因子 *lmo1508/lmo1509*, 为深入了解二元调控系统与 LM 抗氧化酶 GSH-Px 之间的调控关系提供了重要的研究工具。

**关键词:** 单增李斯特菌; 谷胱甘肽过氧化物酶; 报告系统; 调控因子

**中图分类号:** S852.61 **文献标志码:** A **文章编号:** 0529-5130(2025)08-0061-08

## Construction of glutathione peroxidase GSH-Px reporting system for *Listeria monocytogenes* and screening of regulatory factors

ZHANG Zheng<sup>1</sup>, XIAO Jinhua<sup>2</sup>, ZHANG Yu<sup>1</sup>, YANG Yuting<sup>1</sup>, HONG Jiajun<sup>1</sup>, FANG Chun<sup>1\*</sup>, HAN Xu<sup>2\*</sup>

(1. College of Animal Science and Technology, Yangtze University, Jingzhou 434025, China;

2. Jiangxi Biotechnology Vocational College, Nanchang 330200, China)

**Abstract:** The aim of this study was to establish a green fluorescent protein (GFP) reporter system for glutathione peroxidase (GSH-Px) of *Listeria monocytogenes* (LM), to screen the regulatory factors of GSH-Px, and to verify the effects of the regulatory factors on the growth capacity and antioxidant stress ability of LM. The GFP reporter plasmid pFL516 carrying the *gsh-px* promoter region was constructed using the overlapping extended PCR (SOE-PCR) method. The success of the construction of the reporter plasmid pFL516 was verified by measuring the expression of the fluorescent protein in the parental strain 10403S-pFL516. The regulatory factors of GSH-Px were screened by measuring the transcription levels of the parental strain 10403S-pFL516 and each of the strains lacking the dual regulatory systems. The influence of the absence of the regulatory factors obtained through growth curve detection and screening on the growth ability of *Listeria monocytogenes* was investigated. The results of the oxidative stress survival test were used to determine the impact of the absence of the regulatory factors obtained through screening on the antioxidant stress ability of *Listeria monocytogenes*. The test results showed that the plasmid pFL516 was successfully constructed and electrically transfected into 14 dual-regulation systems. Among them, the absence of 7 pairs of dual-regulation

收稿日期: 2024-08-09; 修回日期: 2025-06-16

基金项目: 江西省教育厅科学技术研究项目 (GJJ2207208); 湖北省教育厅科学技术研究项目 (Q20221302)

第一作者: 张政, 男, 硕士研究生

\* 通信作者: 方春, 副教授, 研究方向为病原微生物感染与免疫, E-mail: fangchun@yangtzeu.edu.cn; 韩旭, 博士, 讲师, 研究方向为病原微生物学, E-mail: 634235643@qq.com。

systems led to an increase in the transcription level of the *gsh-px* gene, while the absence of 6 pairs of dual-regulation systems resulted in a decrease in the transcription level of the *gsh-px* gene. After the absence of 1 pair of dual-regulation systems, there was no significant difference in the transcription level of *gsh-px*. Further study on the dual regulatory system *lmo1508/lmo1509* revealed that, in the absence of stress and metal ion stress conditions, the *gfp* transcription level of the *lmo1508/lmo1509* deletion strain was significantly higher than that of the parental strain 10403-pFL516, and the transcription level of the *gsh-px* gene was upregulated, indicating that *lmo1508/lmo1509* negatively regulated the transcription level of *gsh-px*. The results of the growth capacity assay showed that *lmo1508/lmo1509* gene did not affect the growth of the 10403S strain, and the results of the stress survival test showed that *lmo1508/lmo1509* deletion significantly reduced the survival rate of LM under oxidative stress, indicating that *lmo1508/lmo1509* had a positive regulatory effect on the antioxidant stress ability of LM. The above results suggested that the reporter system of *gsh-px* was successfully constructed in LM, and the regulators of *gsh-px*, *lmo1508/lmo1509*, were screened out; which provided an important research tool for understanding the regulatory relationship between the dual regulatory system and the antioxidant enzyme GSH-Px of LM.

**Keywords:** *Listeria monocytogenes*; glutathione peroxidase; reporter system; regulator

单增李斯特菌 (*Listeria monocytogenes*, LM) 是一种革兰阳性、兼性厌氧的食源性致病菌, 通常经污染的食品进入人类和动物体内, 可穿透肠道屏障进入血液, 然后通过血液循环突破血脑屏障和胎盘屏障, 进而引发严重的李斯特菌病<sup>[1-2]</sup>。该病对老人、婴幼儿及孕妇等免疫力低下的人群危害极大, 主要症状表现为败血症、脑膜炎、流产甚至死亡<sup>[3-4]</sup>。

LM 在自然界中无处不在, 可以在多种不利环境中生存, 这一特性对食品环境安全构成了严重的威胁<sup>[5-6]</sup>。氧化应激是最常见的一种不利环境, LM 所面临的氧化应激包括活性氧 (ROS)、活性氮 (RNS)、活性氯 (RCS)<sup>[7]</sup>, 体内活性物质过多使氧化和抗氧化系统失衡造成氧化损伤, 氧化损伤会对细菌产生不良影响, 如脂质过氧化、蛋白质变性、DNA 损伤, 甚至可能导致细胞死亡<sup>[8-9]</sup>。LM 在宿主胞内存活的关键在于平衡胞内的活性物质并将损伤的 DNA 和蛋白质进行修复和清除。因此 LM 需要强大的抗氧化系统对抗因活性物质过量造成的危害。LM 的抗氧化系统主要分为两类: 非酶促和酶促, 其中非酶促抗氧化系统包含多类非酶类抗氧化物质, 如抗坏血酸、谷胱甘肽、生育酚、维生素 E、类胡萝卜素和脯氨酸等, 酶促则是 LM 可利用各类清除酶抵抗氧化应激。LM 中经典的酶促抗氧化防御系统由硫氧还蛋白、超氧化物歧化酶、过氧化氢酶、谷胱甘肽还原酶及谷胱甘肽硫转移酶等组成, 它们协同作用帮助 LM 抵抗氧化应激<sup>[10-12]</sup>。

双组分信号转导系统 (TCS), 又称二元调控系统, 广泛存在于细菌中, 参与调控细菌的一系列生物学过程, 如细胞分裂、环境代谢的适应性、群体感应、生物被膜的形成和毒力基因的表达等。典型的细菌 TCS 由组氨酸传感激酶 (HK) 和应答调节蛋白 (RR) 组成<sup>[13]</sup>。

谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-Px) 在真核生物中

是抗氧化系统中一种重要的抗氧化酶, 但在原核生物中的研究很少<sup>[14]</sup>。GSH-Px 在细胞降解过氧化氢和有机氢过氧化物的过程发挥显著作用<sup>[14]</sup>。因为绿色荧光蛋白 (GFP) 具有荧光稳定且在各物种中均能稳定表达的优点<sup>[15]</sup>, 所以为了深入研究 GSH-Px 在 LM 中的作用, 本文成功构建 GSH-Px 绿色荧光报告系统并通过该报告系统筛选调控 GSH-Px 的调控因子, 为 GSH-Px 在 LM 中的功能研究奠定了基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌株与载体

LM 参考菌株 10403S (血清型为 1/2a 型)、大肠杆菌 DH5 $\alpha$ 、携带 *gfp* 片段的质粒 pFL251、载体质粒 pERL3 均由本实验室保存; LM 的 14 个 TCS 缺失株由本实验室前期构建并保存, 其缺失的 TCS 具体信息及主要功能<sup>[16]</sup>见表 1。

表 1 LM 的 14 个 TCS 缺失株所缺基因信息

基因编号	TCS	主要功能
<i>lmo1021/lmo2022</i>	LiaS/LiaR	细胞壁压力
<i>lmo1377/lmo1378</i>	LisR/LisK	压力耐受, 毒力
<i>lmo0050/lmo0051</i>	AgrA/AgrC	黏附, 生物被膜形成
<i>lmo0691/lmo0692</i>	CheY/CheA	趋化应激
<i>lmo1060/lmo1061</i>	(-)	冷适应
<i>lmo1172/lmo1173</i>	(-)	生物膜形成
<i>lmo1508/lmo1509</i>	(-)	低温
<i>lmo1741/lmo1742</i>	VirS/VirR	毒力
<i>lmo1947/lmo1948</i>	ResE/ResD	氧化还原 (呼吸)
<i>lmo2010/lmo2011</i>	YesN/YesM	碳代谢
<i>lmo2500/lmo2501</i>	PhoR/PhoP	调控磷酸酶的合成
<i>lmo2514/lmo2515</i>	DegU	毒力, 生物膜形成
<i>lmo2582/lmo2583</i>	HssS/HssR	胞内血红素平衡, 毒力
<i>lmo2678/lmo2679</i>	KdpE/KdpD	环境渗透胁迫

注: (-) 表示未见报道。

## 1.2 主要试剂

2×Taq Plus Master Mix II 购于南京诺唯赞生物科技股份有限公司；核酸染料 Goldview 购于上海自赛百盛公司；琼脂糖、DNA Marker 购自擎科生物有限公司；限制性内切酶 *Sal* I 购自 NEB 公司；重组连接酶购于艾德莱生物有限公司；胶回收试剂盒、质粒提取试剂盒、红霉素 (EM) 均购自 Sigma-Aldrich 公司；脑心浸液培养基 (BHI) 购自北京拜尔迪生物技术有限公司；LB 培养基购自北京陆桥生物技术有限公司。

## 1.3 引物设计

LM 中 *lmo0983* 编码 *gsh-px*，而通过生物信息学网站 [www.biocyc.org](http://www.biocyc.org) 查询得知 *lmo0982* 和 *lmo0983* 共用 1 个启动子。以 LM 参考菌株 10403S 基因组为模板，选取 *lmo0982* 和 *lmo0983* 基因前 600 bp 序列通过启动子预测网站 (Promoter Prediction by Neural Network) 预测出 *gsh-px* 的启动子区域，并参照 *gfp* 基因序列通过 Vector NTI 软件设计扩增引物 (表 2)，引物由武汉擎科生物技术有限公司合成。

表 2 引物序列信息

引物	引物序列 (5'→3')
pFL516-A	CCGGAATCCCGGGGATCCGAGTAGATGGTAAAATCCACCTG
pFL516-B	TGAAAAGTCTTCTCCTTTACTCATAAAAAATCCTCCTTTAGTTCCG
pFL516-C	ATGAGTAAAGGAGAAGAACCTTTTCA
pFL516-D	ATATACTAACCCCTTTTTTGTATTGTATAGTTCATCCATGCC

注：下划线表示 *Sal* I 酶切位点。

## 1.4 *gsh-px* 报告质粒的构建

### 1.4.1 目的片段的扩增

以 10403S 基因组为模板，利用表 2 中的 pFL516 A/B 引物对扩增 *gsh-px* 的启动子片段 P<sub>*gsh-px*</sub>；以 pFL251 为模板，利用 pFL516 C/D 引物对扩增 *gfp* 片段，PCR 产物使用胶回收试剂盒进行回收纯化。以上述 PCR 扩增获得的 P<sub>*gsh-px*</sub> 启动子和 *gfp* 为模板，用 pFL516 A/D 引物对进行 SOE-PCR 获得 pFL516 (P<sub>*gsh-px*</sub>-*gfp*) 目的片段，使用 DNA 回收试剂盒将融合片段回收备用。

### 1.4.2 报告质粒的构建

采用重组的方法将 P<sub>*gsh-px*</sub>-*gfp* 目的片段与 *Sal* I 单酶切的载体质粒 pERL3 连接，连接产物转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$  感受态细胞，长出菌落后挑单菌落进行 PCR 鉴定。将 PCR 鉴定阳性的克隆送至武汉擎科生物技术有限公司进行测序验证。将测序正确的 *gsh-px* 报告基因重组质粒命名为 pFL516。

## 1.5 荧光蛋白表达菌株的构建

提取构建成功的 pFL516 质粒，利用电转化法将 pFL516 质粒电转入 LM 菌株 10403S 感受态细胞中，电转程序为：2.5 kV、400  $\Omega$ 、25  $\mu$ F，电击完成后加入 1 mL 含 0.5 mol/L 蔗糖的 BHI 培养基，置于 37  $^{\circ}$ C 静置培养 3 h 后涂布于含 10  $\mu$ g/mL 红霉素的 BHI 平板，37  $^{\circ}$ C 培养 24~48 h，挑取单菌落使用 pFL516 A/D 引物对进行 PCR 鉴定，PCR 产物使用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测。

## 1.6 荧光蛋白表达观察

取 10  $\mu$ L 过夜培养的 10403S-pFL516 涂布到载玻片上，使用荧光显微镜观察细菌 GFP 表达情况，同时使用未转入 pFL516 的野生株 10403S 作为对照。另取 1 mL 菌液于 1.5 mL 离心管中，12 000 r/min 离心 2 min，弃去上清液后用 1 mL PBS 将细菌沉淀重悬，重悬完全后加入到 96 孔板中，每孔 200  $\mu$ L，3 个重复，利用酶标仪检测菌液的相对荧光单位 (RFU，即荧光值)。数据结果为 3 个重复试验的平均值。

## 1.7 *gsh-px* 基因调控因子的筛选

将 *gsh-px* 的报告质粒 pFL516 电转进 TCS 缺失株中，涂布于含红霉素抗性的 BHI 平板上，置于 37  $^{\circ}$ C 培养 24~48 h，挑取单菌落进行 PCR 鉴定，经凝胶电泳检测 PCR 结果，获得携带 pFL516 报告基因的菌株。通过检测绿色荧光的强度对 *gsh-px* 基因转录水平进行评价，荧光值越高说明转录水平越高，反之则说明转录水平越低，以亲本株 10403S-pFL516 为对照组。

将携带 *gsh-px* 报告质粒的 TCS 缺失株划线于含红霉素抗性的 BHI 平板上，次日挑取单菌落于 3 mL BHI 培养基中，置于 37  $^{\circ}$ C 摇床过夜培养。每个菌株各取 1 mL 菌液于离心管中，12 000 r/min 离心 2 min 后弃去上清液，非应激样品用 1 mL PBS 将细菌沉淀充分重悬，应激样品用 5 mmol/L Cu<sup>2+</sup> 和 10 mmol/L Fe<sup>3+</sup> 应激处理 1 h 后用 1 mL PBS 将细菌沉淀充分重悬，每孔 200  $\mu$ L，3 个重复，测量细菌菌液的荧光值。试验数据使用 GraphPad Prism 5 进行统计分析并

作图。

### 1.8 生长曲线测定

分别从亲本株 10403S、缺失株  $\Delta lmo1508/lmo1509$  的固体平板上挑取单菌落接种于液体 BHI 中, 37 °C 条件下振荡培养过夜, 以 1 : 100 比例接菌至新的 BHI 培养基中, 并分装到 96 孔细胞培养板中, 37 °C 恒温培养, 使用酶标仪测定  $OD_{600\text{ nm}}$  值, 每隔 1 h 测定 1 次, 直至进入平台期, 并据此绘制出生长曲线。试验重复 3 次取平均值。

### 1.9 氧化应激试验

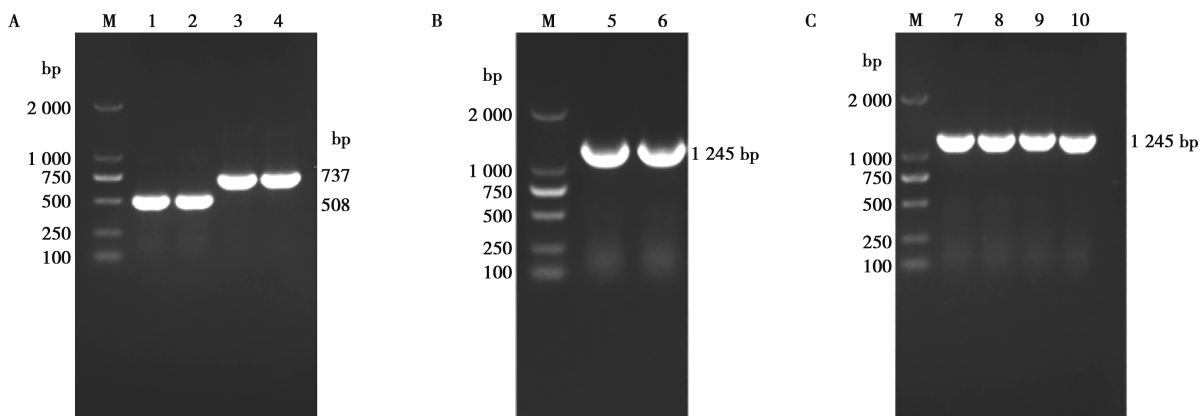
为了确定报告基因筛选出的 TCS 的调控作用, 将 pFL516 报告基因荧光值显著升高的 TCS 缺失株进行金属离子氧化应激存活试验, 参考张钰等<sup>[17]</sup>方法进行。12 000 r/min 离心 2 min 收集过夜培养的菌体, 并用 PBS 洗涤一次, 然后稀释至  $OD_{600\text{ nm}}$  值为 0.6。将稀释好的菌液分别加入终浓度为 5 mmol/L  $\text{Cu}^{2+}$  和 10 mmol/L  $\text{Fe}^{3+}$  的 BHI 培养基中, 37 °C 静置处理 1 h。应激处理后 10 倍倍比稀释菌液, 稀释菌液进行点板

后过夜培养, 并统计菌株存活率。试验重复 3 次。若 pFL516 荧光值及 5 mmol/L  $\text{Cu}^{2+}$  和 10 mmol/L  $\text{Fe}^{3+}$  金属离子氧化应激存活试验结果均有显著差异且结果一致时则可初步确定该 TCS 为 GSH-Px 的调控因子。

## 2 结果与分析

### 2.1 *gsh-px* 报告质粒的构建

利用生物信息学分析获得 *gsh-px* 基因上游的启动子序列, 以 10403S 基因组和质粒 pFL251 为模板分别扩增出 508 bp 的 *gsh-px* 启动子  $P_{gsh-px}$  和 737 bp 的 *gfp* 片段。通过 SOE-PCR 将  $P_{gsh-px}$  和 *gfp* 进行融合获得 1 245 bp 的  $P_{gsh-px}-gfp$  片段。通过重组的方法将  $P_{gsh-px}-gfp$  与 pERL3 载体连接并构建 *gsh-px* 报告质粒 pFL516。将连接产物用热激法转化至大肠杆菌 DH5 $\alpha$  感受态细胞中, 挑取单克隆并使用 pFL516 A/D 引物对进行 PCR 鉴定及测序验证, 经凝胶电泳获得 1 245 bp 的条带 (图 1), 符合预期大小且测序正确, 说明 *gsh-px* 报告质粒成功构建。



M. DNA Marker; 1、2.  $P_{gsh-px}$  片段; 3、4. *gfp* 片段; 5、6.  $P_{gsh-px}-gfp$  片段; 7~10. *gsh-px* 报告质粒 pFL516。

图 1 *gsh-px* 报告质粒的构建与鉴定

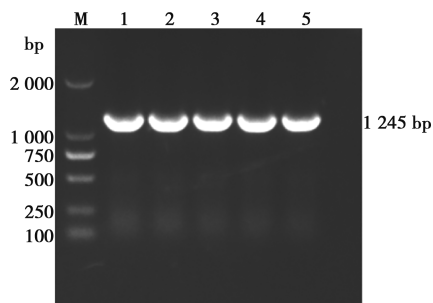
### 2.2 荧光蛋白表达菌株的构建

提取 *gsh-px* 报告系统 pFL516 质粒, 采用电转化将 pFL516 电转至 LM 菌株 10403S 感受态细胞中构建荧光蛋白表达菌株 10403S-pFL516, 挑取单克隆并使用 pFL516 A/D 引物对进行 PCR 鉴定, 获得 pFL516 目的片段 (图 2), 与预期结果一致, 表明 LM 荧光蛋白表达菌株构建成功。

### 2.3 荧光蛋白表达情况

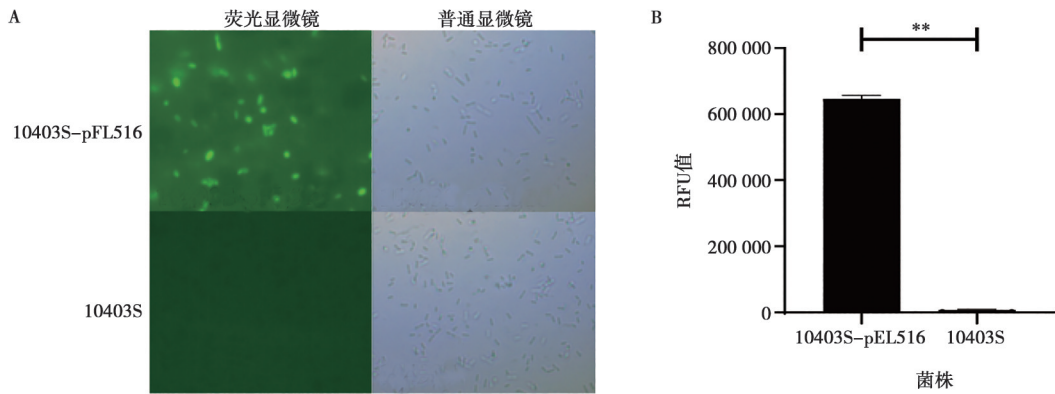
在荧光显微镜下, 携带报告质粒的 10403S-pFL516 发出绿色荧光, 而 10403S 无荧光 (图 3 A); 使用酶标仪对 10403S-pFL516 和 10403S 的荧光值进行测定, 10403S-pFL516 的荧光强度高达 656 874 RFU, 而 10403S 的荧光值只有 9 465 RFU (图 3 B),

说明该报告质粒可在 LM 中正常表达。



M. DNA Marker; 1~5. pFL516。

图 2 10403S-pFL516 的 PCR 鉴定



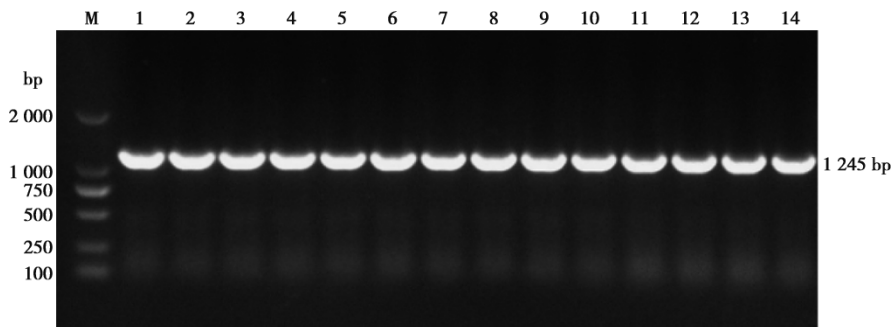
A. 显微镜下观察图像; B. 荧光值测定。\* \* 表示差异极显著 ( $P < 0.01$ )。

图3 10403S-pFL516 和 10403S 中  $P_{gsh-px-gfp}$  的表达情况

## 2.4 TCS 缺失株中 $gsh-px$ 报告系统的鉴定

将 pFL516 电转入 LM 各 TCS 缺失株感受态中, 涂布于 EM 抗性的 BHI 平板, 挑取单菌落用 pFL516

A/D 引物鉴定, 结果显示报告质粒已成功电转入 TCS 缺失株中 (图 4)。



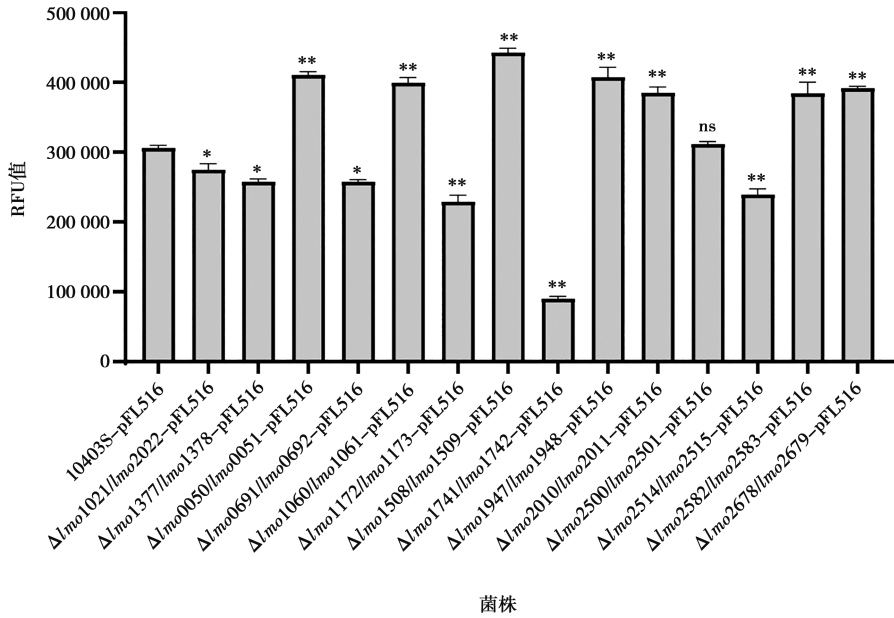
M. DL2000; 1.  $\Delta lmo1021/lmo2022$ ; 2.  $\Delta lmo1377/lmo1378$ ; 3.  $\Delta lmo0050/lmo0051$ ; 4.  $\Delta lmo0691/lmo0692$ ; 5.  $\Delta lmo1060/lmo1061$ ; 6.  $\Delta lmo1172/lmo1173$ ; 7.  $\Delta lmo1508/lmo1509$ ; 8.  $\Delta lmo1741/lmo1742$ ; 9.  $\Delta lmo1947/lmo1948$ ; 10.  $\Delta lmo2010/lmo2011$ ; 11.  $\Delta lmo2500/lmo2501$ ; 12.  $\Delta lmo2514/lmo2515$ ; 13.  $\Delta lmo2582/lmo2583$ ; 14.  $\Delta lmo2678/lmo2679$ 。

图4 TCS 缺失株中 pFL516 的 PCR 鉴定

## 2.5 TCS 缺失株中荧光值的检测

将  $gsh-px$  的报告质粒 pFL516 电转入各 TCS 缺失株感受态中, 通过检测携带 pFL516 报告质粒的各 TCS 缺失株的荧光值发现: 在已敲除 TCS 的 LM 菌株中,  $lmo0050/lmo0051$ 、 $lmo1060/lmo1061$ 、 $lmo1508/lmo1509$ 、 $lmo1947/lmo1948$ 、 $lmo2010/lmo2011$ 、 $lmo2678/lmo2679$ 、 $lmo2582/lmo2583$  这 7 个 TCS 的缺失使得其荧光值相对于亲本株 10403S-pFL516 极显著升高; 而  $lmo1021/lmo2022$ 、 $lmo1377/lmo1378$ 、 $lmo0691/lmo0692$  这 3 个 TCS 的缺失使得荧光值相对于亲本株 10403S-pFL516 显著降低;  $lmo1172/lmo1173$ 、 $lmo2514/lmo2515$ 、 $lmo1741/lmo1742$  这 3

个 TCS 的缺失使得荧光值相对于亲本株 10403S-pFL516 极显著降低;  $lmo2500/lmo2501$  的缺失使得其荧光值相对于亲本株 10403S-pFL516 无显著差异 (图 5)。荧光值越大转录水平越高, 反之则表示转录表达水平越低, 说明  $lmo0050/lmo0051$ 、 $lmo1060/lmo1061$  等 7 个 TCS 二元调控系统的缺失导致  $gsh-px$  基因转录水平上调, 它们与  $gsh-px$  启动子之间存在负调控关系;  $lmo1021/lmo2022$ 、 $lmo1377/lmo1378$  等 6 个 TCS 的缺失则导致  $gsh-px$  基因转录水平下调, 它们与  $gsh-px$  启动子之间存在正调控关系。



注：与对照组（10403S-pFL516）相比，ns表示差异不显著（ $P>0.05$ ），\*表示差异显著（ $P<0.05$ ），\*\*表示差异极显著（ $P<0.01$ ）。下同。

图5 不同 TCS 缺失株中 *gsh-px* 报告基因的表达水平

### 2.6 氧化条件下 $\Delta lmo1508/lmo1509$ 缺失株中荧光值的检测

选择转录水平上升幅度最高且具有显著差异性的  $\Delta lmo1508/lmo1509$  进一步研究，TCS 缺失株  $\Delta lmo1508/lmo1509$  的荧光值在 BHI、5 mmol/L  $Cu^{2+}$  和 10 mmol/L  $Fe^{3+}$  环境下极显著高于参考菌株 10403S (图 6)，说明 *lmo1508/lmo1509* 对 *gsh-px* 具有负调控作用。

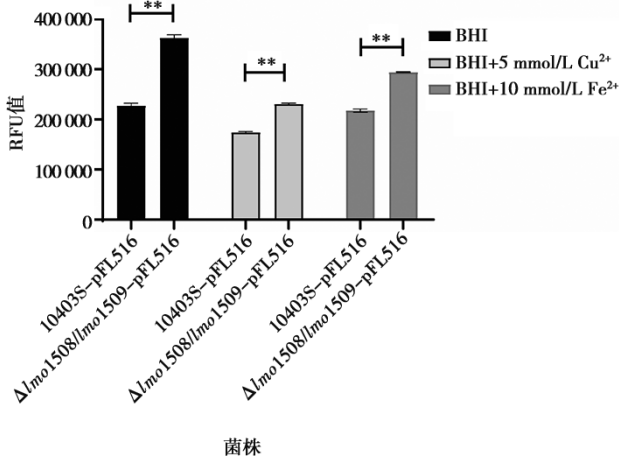


图6  $\Delta lmo1508/lmo1509$  中 pFL516 的表达

### 2.7 *lmo1508/lmo1509* 缺失对 LM 生长能力的影响

生长能力测定结果显示，缺失株  $\Delta lmo1508/lmo1509$  与亲本株 10403S 在 BHI 培养基中的生长趋

势相似 (图 7)，表明 *lmo1508/lmo1509* 基因不影响菌株 10403S 的生长能力。

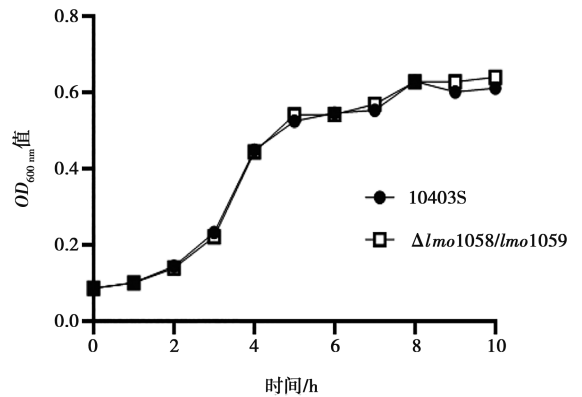


图7 亲本株 10403S 和缺失株  $\Delta lmo1508/lmo1509$  生长曲线测定

### 2.8 *lmo1508/lmo1509* 缺失对 LM 抗氧化应激能力的影响

通过氧化应激试验结果得知，在 5 mmol/L  $Cu^{2+}$  应激处理后，*lmo1508/lmo1509* 缺失使得 LM 的存活能力显著降低，10 mmol/L  $Fe^{3+}$  的应激处理后，*lmo1508/lmo1509* 缺失使得 LM 的存活能力极显著降低 (图 8)，说明 *lmo1508/lmo1509* 对 LM 的抗氧化应激能力存在正调控影响。

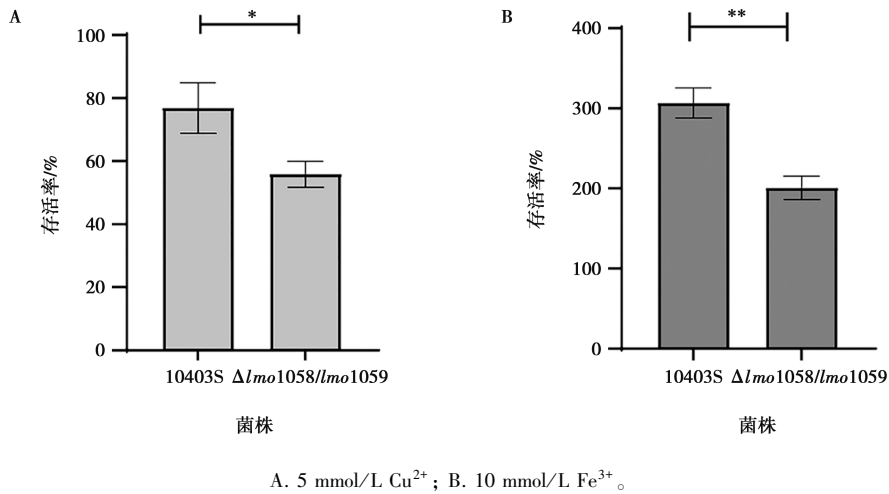


图8  $\Delta lmo1508/lmo1509$  在金属离子中的存活率比较

### 3 讨论

LM 入侵宿主的过程中会遇到多种应激条件，氧化应激是最常见的一种。为了避免氧化损伤，LM 产生强大的酶促抗氧化系统使胞内促氧因子和抗氧因子保持平衡。

GSH-Px 是一种重要的抗氧化酶，广泛存在于真核生物和原核生物中。虽已知真核生物中 GSH-Px 可以利用 GSH 作为电子供体将过氧化物还原为水和氧，在介导细胞抗氧化应激的过程中作用显著，但是人们对原核生物中的 GSH-Px 知之甚少。此前，在原核生物中很少有关于 *gsh-px* 基因的报道。大肠杆菌中有编码 *gsh-px* 的同源基因 *btuE*，对其功能研究表明，这种酶可以防止各种氧化剂的有害影响，让细胞对氧化应激不那么敏感<sup>[18]</sup>。脑膜炎奈瑟菌中 *gsh-px* 的同源基因 *gpoA* 的失活增加了该突变体对氧化还原循环剂百草枯诱导的氧化应激的敏感性<sup>[19]</sup>。这些研究均表明 *gsh-px* 参与了氧化应激防御。另有研究发现，在小鼠皮下感染模型中，敲除 *gpoA* 的脑膜炎奈瑟菌毒力明显受损，首次为 *gsh-px* 参与细菌致病性提供了证据<sup>[20]</sup>。GSH-Px 或许在原核生物的抗逆性和细菌毒力方面起着重要作用，但其具体的转录调控机制目前仍不清楚。目前报告系统是研究转录调控的重要方法<sup>[21]</sup>，其中 GFP 是一种经典的报告系统。将目的基因的启动子与 GFP 相连后，对 GFP 的荧光强度进行测定即可检测基因的转录表达水平，具有易于检测、灵敏度高、荧光性质稳定、对细胞无毒害、可直接用于活细胞检测等优点<sup>[22-23]</sup>，具有极广泛的应用前景。

本研究成功构建 *gsh-px* 报告质粒并将其电转入 LM 野生株 10403S 感受态中。通过荧光显微镜和酶标

仪检测  $P_{gsh-px}$  的表达情况，携带报告质粒的 LM 菌株 10403S-pFL516 在显微镜下发出明亮的绿色荧光，且通过酶标仪测得的荧光强度显著高于野生对照株，该质粒在 LM 中可表达 GFP，表明该质粒中携带的 *gsh-px* 启动子具有转录活性，为下一步试验奠定了良好基础和技术平台。

LM 10403S 基因组编码 16 组 TCS，为了筛选可能参与调控 *gsh-px* 的 TCS，我们试图分别敲除每组 TCS，但最终只成功敲除了 14 组。将报告质粒分别电转入 14 对 TCS 缺失株感受态中，通过测定荧光值，证实其中 7 个 TCS 的缺失导致 *gsh-px* 基因转录水平上调，说明它们与 *gsh-px* 启动子之间存在负调控关系；6 个 TCS 的缺失则导致 *gsh-px* 基因转录水平下调，说明它们与 *gsh-px* 启动子之间存在正调控关系，*lmo2500/lmo2501* 的缺失使得其荧光值相对于亲本株而言无显著差异。前期的研究中发现 GSH-Px 对  $H_2O_2$  带来的氧化应激不敏感，对铜和铁金属离子带来的氧化应激敏感<sup>[17]</sup>。进一步对转录水平上升幅度最高且具有显著差异性的 *lmo1508/lmo1509* 这一 TCS 研究发现，在 BHI、5 mmol/L  $Cu^{2+}$  和 10 mmol/L  $Fe^{3+}$  条件下， $\Delta lmo1508/lmo1509$  的荧光值极显著高于亲本株 10403S，说明 *lmo1508/lmo1509* 对 *gsh-px* 具有负调控作用。生长能力测定结果表明 *lmo1508/lmo1509* 基因不影响菌株的生长；氧化应激试验结果显示，相对于亲本株， $\Delta lmo1508/lmo1509$  的抗氧化应激能力显著降低，说明 *lmo1508/lmo1509* 对 LM 的抗氧化应激能力存在正调控影响。

综上所述，本研究利用 *gfp* 成功构建了可以反映 *gsh-px* 启动子转录活性的 pFL516 报告质粒，并成功筛选出调控 GSH-Px 的双元调控系统 *lmo1508/lmo1509*，为进一步探究该 TCS 在 LM 中如何调控

GSH-Px 的功能奠定了基础。

## 参考文献:

- [1] RANJBAR R, HALAJI M. Epidemiology of *Listeria monocytogenes* prevalence in foods, animals and human origin from Iran: a systematic review and meta-analysis [J]. BMC Public Health, 2018, 18 (1): 1057.
- [2] VÁZQUEZ-BOLAND J A, KUHN M, BERCHE P, et al. *Listeria* pathogenesis and molecular virulence determinants [J]. Clin Microbiol Rev, 2001, 14 (3): 584-640.
- [3] DE NOORDHOUT C M, DEVLEESSCHAUWER B, ANGULO F J, et al. The global burden of listeriosis: a systematic review and meta-analysis [J]. Lancet Infect Dis, 2014, 14 (11): 1073-1082.
- [4] VARMA J K, SAMUEL M C, MARCUS R, et al. *Listeria monocytogenes* infection from foods prepared in a commercial establishment: a case-control study of potential sources of sporadic illness in the United States [J]. Clin Infect Dis, 2007, 44 (4): 521-528.
- [5] RUIZ L, AERTSEN A, NGUYEN-THE C, et al. Editorial: industrial and host associated stress responses in food microbes. Implications for food technology and food safety [J]. Front Microbiol, 2017, 8: 1522.
- [6] 夏叶, 李春华, 孙莹慧, 等. 单核细胞增生李斯特菌 RsbS 蛋白的抗应激机制作用研究 [J]. 中国预防兽医学报, 2022, 44 (1): 66-72.
- [7] LINLEY E, DENYER S P, MCDONNELL G, et al. Use of hydrogen peroxide as a biocide: new consideration of its mechanisms of biocidal action [J]. J Antimicrob Chemother, 2012, 67 (7): 1589-1596.
- [8] 洪嘉俊, 肖金华, 张政, 等. sod 基因缺失对单增李斯特菌 10403S 抗氧化应激作用的影响 [J]. 中国畜牧兽医, 2025, 52 (4): 1776-1783.
- [9] EZRATY B, GENNARIS A, BARRAS F, et al. Oxidative stress, protein damage and repair in bacteria [J]. Nat Rev Microbiol, 2017, 15 (7): 385-396.
- [10] LAROSA V, REMACLE C. Insights into the respiratory chain and oxidative stress [J]. Biosci Rep, 2018, 38 (5): BSR20171492.
- [11] MATÉS J M. Erratum to 'Effects of antioxidant enzymes in the molecular control of reactive oxygen species toxicology' [J]. Toxicology, 2001, 163 (2/3): 219.
- [12] 田篮鑫, 杨雨婷, 秦祎, 等. 谷氨酸脱氢酶 *gdhA* 基因缺失对单增李斯特菌抗氧化应激的影响 [J]. 中国畜牧兽医, 2024, 51 (9): 3771-3779.
- [13] 汪国俊. 双组分系统 LisK/R 通过调控鞭毛基因表达影响单增李斯特菌低温生长 [D]. 武汉: 华中农业大学, 2021.
- [14] BATHIGE S D N K, UMASUTHAN N, GODAHEWA G I, et al. Two variants of selenium-dependent glutathione peroxidase from the disk abalone *Haliotis discus Discus*: molecular characterization and immune responses to bacterial and viral stresses [J]. Fish Shellfish Immunol, 2015, 45 (2): 648-655.
- [15] 吴沛桥, 巴晓革, 胡海, 等. 绿色荧光蛋白 GFP 的研究进展及应用 [J]. 生物医学工程研究, 2009, 28 (1): 83-86.
- [16] 郭骞. 双组分系统 VirS/VirR 调控运动性介导单增李斯特菌生物被膜形成 [D]. 荆州: 长江大学, 2024.
- [17] ZHANG Y, GUO Q, FANG X, et al. Destroying glutathione peroxidase improves the oxidative stress resistance and pathogenicity of *Listeria monocytogenes* [J]. Front Microbiol, 2023, 14: 1122623.
- [18] ARENAS F A, DÍAZ W A, LEAL C A, et al. The *Escherichia coli* *btuE* gene, encodes a glutathione peroxidase that is induced under oxidative stress conditions [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2010, 398 (4): 690-694.
- [19] MOORE T D, SPARLING P F. Interruption of the *gpxA* gene increases the sensitivity of *Neisseria meningitidis* to paraquat [J]. J Bacteriol, 1996, 178 (14): 4301-4305.
- [20] MOORE T D, SPARLING P F. Isolation and identification of a glutathione peroxidase homolog gene, *gpxA*, present in *Neisseria meningitidis* but absent in *Neisseria gonorrhoeae* [J]. Infect Immun, 1995, 63 (4): 1603-1607.
- [21] 陈敏娜, 李春兰, 刘静. 转录因子 STAT5A 启动子荧光素酶报告基因质粒的构建及鉴定 [J]. 癌变·畸变·突变, 2022, 34 (1): 53-56.
- [22] 汪恒英, 周守标, 常志州, 等. 绿色荧光蛋白 (GFP) 研究进展 [J]. 生物技术, 2004 (3): 70-72.
- [23] 唐孝青, 李斌, 伍小兵, 等. 绿色荧光蛋白及其应用的研究进展 [J]. 陕西农业科学, 2007 (1): 123-124.