

单核细胞增多性李斯特菌硫氧还蛋白 TrxA 调控磷脂酶 PlcB 研究

汪渤森[△], 韩笑[△], 马天天, 王航, 杭奕, 俞慧飞, 赵碧波, 邱阳, 叶美伶, 程昌勇*, 宋厚辉* (浙江农林大学 动物科技学院, 浙江 临安 311300)

摘要:细菌中的硫氧还蛋白 A(thioredoxin A, TrxA)能够通过对氧化受损的二硫键进行修饰进而参与蛋白质的正确折叠。磷脂酶 PlcB 作为单核细胞增多性李斯特菌(*Listeria monocytogenes*)关键的毒力因子在细菌逃逸吞噬体过程中起重要作用,但该蛋白是否受李斯特菌 TrxA 的修饰尚无报道。因此,本试验主要从转录和蛋白表达水平以及蛋白活性水平研究李斯特菌硫氧还蛋白 TrxA 对磷脂酶 PlcB 的调控关系。结果显示,单增李斯特菌野生株 EGD-e 缺失 *trxA* 基因后,PlcB 的转录及蛋白表达水平显著降低,且利用天然启动子回补 *trxA* 后能够使 PlcB 的表达恢复至野生株水平,而组成型启动子回补效率较低,表明 TrxA 能够严谨调控李斯特菌毒力因子 PlcB 的表达。体外溶脂试验发现李斯特菌缺失 *trxA* 后导致其溶脂能力显著降低,磷脂酶活性检测发现重组 PlcB 的活性高度依赖 TrxA 的存在。本研究首次发现并证实李斯特菌 PlcB 的转录和表达及其磷脂酶活性维持受 TrxA 的调控,研究结果为深入解析李斯特菌硫氧还蛋白系统在细菌感染宿主过程中的氧化还原修饰机制奠定了理论基础。

关键词:单增李斯特菌;硫氧化蛋白 A;磷脂酶 PlcB;氧化还原;调控修饰

中图分类号:S852.61 文献标志码:A 文章编号:1005-4545(2018)09-1686-07

DOI:10.16303/j.cnki.1005-4545.2018.09.09

Regulatory modification of thioredoxin A on phospholipase C in *Listeria monocytogenes*

WANG Bo-sen[△], HAN Xiao[△], MA Tian-tian, WANG Hang, HANG Yi, YU Hui-fei, ZHAO Bi-bo, QIU Yang, YE Mei-ling, CHENG Chang-yong*, SONG Hou-hui* (College of Animal Science and Technology, Zhejiang Agriculture and Forestry University, Lin'An, Zhejiang 311300, China)

Abstract: Many bacterial pathogens employ the thioredoxin A (TrxA) system to defend against oxidative stress and maintain correct disulfide bonds for proteins stability and functions. The intracellular pathogen *Listeria monocytogenes* (*L.monocytogenes*) also encodes a putative thioredoxin orthologue, TrxA, whereas its biological roles and the underlying molecular mechanisms remain unknown. Therefore, we here constructed a TrxA deletion mutant and its complemented strains by using the molecular cloning techniques and the homologous recombination strategy. In addition, the recombinant TrxA expressed and purified from *E.coli* were employed for the following experiments. We found that the key virulence factor phospholipase C (PlcB) showed significantly high transcription and expression in the wild-type and the complemented strains compared to the Δ *trxA*, by using qRT-PCR and Western-blotting methods. More importantly, loss of *trxA* markedly impaired the *in vitro* phospholipase activity of this bacterium, and the enzymatic activity of recombinant PlcB was highly dependent on the presence of TrxA. In conclusion, we here for the first time, demonstrate that *L.monocytogenes* TrxA is highly involved in maintaining expression and activity of PlcB, and potentially contributes to *Listeria* pathogenicity. This study sheds light on a novel mechanism of thioredoxin system used by *L.monocytogenes* to modify virulence factors during bacterial host infection.

收稿日期:2017-09-27

基金项目:国家自然科学基金资助项目(31470179,31402215);浙江省大学生科技创新活动计划基金资助项目(2017R412024);国家级大学生创新创业训练计划基金资助项目(2017110341029)

作者简介:汪渤森(1997-),男,在读本科生。

[△]共同第1作者;*通讯作者,E-mail: lamge@zafu.edu.cn; songhh@zafu.edu.cn

Keywords: *Listeria monocytogenes*; thioredoxin A; phospholipase C; redox modification; regulation

△Joint first authors; * Corresponding authors, E-mail: lamge@zafu.edu.cn; songhh@zafu.edu.cn

单增李斯特菌(*Listeria monocytogenes*)是一种食源性机会致病菌,可以在各种食品原料和加工制品如牛奶、乳制品以及新鲜蔬菜等中发现^[1]。单增李斯特菌可以在恶劣环境中生存繁殖^[2],其机体可形成生物被膜^[3-4]以抵抗不利的环境因素。近年来,欧洲国家李斯特菌病例数量有所增加^[5],李斯特菌病主要临床表现为败血症、脑膜炎或流产等^[6]。作为胞内寄生菌,单增李斯特菌的感染过程涉及几个关键的毒力因子^[7-9],PrfA作为中枢毒力蛋白的调控因子和应激相关的毒力因子,对维持细菌胞内环境稳态,具有重要的作用^[10],内化素(*InlA*和*InlB*)介导细菌对宿主细胞的黏附、内化,李斯特菌溶血素O(LLO)和磷脂酰肌醇磷脂酶(PlcA)裂解吞噬体膜,由此细菌从吞噬泡中逃逸并释放到胞质中。细菌在细胞间扩散依赖于两种磷脂酶C(PlcA和PlcB)对细胞膜的裂解,其中,磷脂酶PlcB在单增李斯特菌逃逸吞噬体和细胞间扩散的过程以及在激发机体细胞免疫应答、细胞间信号转导方面有重要作用^[11]。

本研究的另一个对象硫氧还蛋白(Trx)系统分布在很多的物种中,由硫氧还蛋白、腺嘌呤二核苷酸磷酸(NADP)和硫氧还蛋白还原酶(TrxR)组成^[12]。硫氧还蛋白在保护细胞免受活性氧簇(reactive oxygen species, ROS)杀伤以及维持体内的氧化还原平衡发挥了重要作用^[13]。TrxA参与组成的硫氧还蛋白系统最主要的功能是对细胞内氧化受损的二硫键进行还原^[14],帮助细胞缓解巯基类氧化剂的氧化胁迫,预防细胞内的蛋白质氧化,使受到氧化的蛋白质及时得到还原,维持原有的功能^[15]。

研究表明,硫氧还蛋白A(thioredoxin A, TrxA)可参与单增李斯特菌中PrfA的活化以及维持细菌中的氧化还原平衡,有助于细菌的感染^[16]。通过生物信息学分析发现,单增李斯特菌的参考菌株EGD-e全基因组编码一个TrxA的同源蛋白,且本实验室前期研究证实该蛋白具有经典的硫氧还蛋白酶功能。PlcB作为单增李斯特菌LIPH-1毒力岛中一个重要的毒力因子,其蛋白成熟肽含有2个半胱氨酸,如果单增李斯特菌在体外或者侵染宿主过程中受到一些氧化应激,就可能引起PlcB内的半胱氨酸发生错误折叠从而使蛋白失活,而TrxA能够还原二硫键,可能通过氧化还原修饰参与磷脂酶Pl-

cB的正确折叠,进而介导细菌的毒力。基于此点,我们利用单增李斯特菌野生株EGD-e构建*trxA*缺失株和回补株,并以此来研究硫氧还蛋白对磷脂酶PlcB调控,为进一步解析李斯特菌硫氧还蛋白系统在细菌感染宿主过程中的氧化还原修饰机制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 菌株、质粒以及引物 本试验中所用到的菌株及质粒包括:单增李斯特菌参考菌株EGD-e、大肠杆菌DH5 α 和Rosetta、重组蛋白原核表达载体pET30a(+),李斯特菌基因缺失及回补载体pKSV7和pIMK2均为本实验室保存。单增李斯特菌培养于BHI(brain heart infusion, BHI)培养基, DH5 α 和Rosetta菌株培养于LB培养基中。本试验所涉及菌株的培养条件均为37 $^{\circ}$ C(静置或震荡)培养。试验所用引物见表1。

1.2 主要试剂: BHI和LB培养基购自Oxoid公司, KOD plus Neo PCR试剂盒购自TOYOBO公司, PCR产物纯化和回收试剂盒购自上海莱枫生物科技有限公司,限制性核酸内切酶购自NEB公司,质粒提取试剂盒购自天根生化科技有限公司, BCA蛋白浓度测定试剂盒购自碧云天公司,镍柱亲和层析柱购自北京韦氏博慧色谱科技有限公司,细菌总RNA快速抽提试剂盒购自上海生工生物技术有限公司, Western-blotting显色液购自伯尚生物技术有限公司, EnzChekTM Phosphate Assay Kit试剂盒购自Thermo Fisher Scientific公司,本试验所用化学试剂均为国产分析纯。

1.3 PlcB以及TrxA原核表达载体的构建及重组菌的筛选 PlcB和TrxA蛋白原核表达均采用质粒pET30a(+)构建载体。通过NCBI数据库下载对应的基因开放阅读框(ORF)序列,利用Vector NTI软件构建重组质粒pSL1125和pSL068,并设计对应引物(表1中*trxA*-F、*trxA*-R、*plcB*-F、*plcB*-R)。表达载体及PCR扩增的目的基因片段经酶切纯化后,利用T₄连接酶连接并转化至大肠杆菌DH5 α 感受态细胞中,通过PCR筛选得到携带重组质粒的重组菌,并经测序验证正确后用于下一步的蛋白表达。

表1 本试验所需引物

引物名称	引物序列(5'→3')	长度/bp
<i>trxA</i> -F	TTTCATATGGTAAAAGAAATTACAGATGCAACATTTG	312
<i>trxA</i> -R	CCGCTCGAGAACGTATTTGTTGATGACTTCATCCAGTTC	
<i>plcB</i> -F	CATGCCATGGCATCCGCGGATAACCCGACAAATACT	711
<i>plcB</i> -R	CCGCTCGAGTTCATTTGTTTTTTTAGACCAAATTTCTAAAAAACC	
<i>plcB</i> -RT-F	AAAGGTGGTTCTAGGTATGTGCTT	101
<i>plcB</i> -RT-R	GGAGCTGCGGGTGTTTGTA	
<i>rpob</i> -RT-F	GGATGAAGAGGATAATTACGTAGTAGCG	82
<i>rpob</i> -RT-R	GATACGTGTTCCATACCTGTTCCAAC	
Δ <i>trxA</i> -A	CGCGGATCCCGCTCCTCTCACTTGCC	500
Δ <i>trxA</i> -B	TTTTAGCATAATTGATTTAATTCCTTATGACTTTTGTACACAC	
Δ <i>trxA</i> -C	GAGTGAATTAATCAATTATGCTAAAATGAAAGAAGCTTAGAACAAAC	
Δ <i>trxA</i> -D	AACTGCAGCGTTTTACTTCATTGGCAGCGTAG	
$C\Delta$ <i>trxA</i> -P _{help} -F	CATGCCATGGTAAAAGAAATTACAGATGCAACATTTG	312
$C\Delta$ <i>trxA</i> -P _{help} -R	AACTGCAGCGTTTTACTTCATTGGCAGCGTAG	
$C\Delta$ <i>trxA</i> -P _{native} -F	CGCGAGCTCACAAGTGAGCAAAAAACATGGCTCCA	392
$C\Delta$ <i>trxA</i> -P _{native} -R	CCGCTCGAGTTAAACGTATTTGTTGATGACTTCATCCAG	

注:引物序列中引入的酶切位点为下划线标出

1.4 PlcB 和 TrxA 重组蛋白的表达纯化及多克隆抗体制备 将成功构建的 *plcB* 和 *trxA* 阳性重组质粒导入大肠杆菌 Rosetta 感受态细胞中,于 LB 培养基中 37℃ 扩大培养至 $D_{600\text{ nm}}$ 为 0.6,加入终浓度为 1 mmol/L 的 IPTG 16℃ 诱导过夜使其表达大量表达目的蛋白,然后离心收集菌体并加入 50 mmol/L PBS 缓冲液超声破碎菌体,再离心收集上清与蛋白结合柱结合带有 His 标签的目的蛋白,用含有 400 mmol/L 咪唑的 PBS 溶液洗脱目的蛋白。BCA 试剂盒测定纯化的蛋白浓度,并进行 SDS-PAGE 验证蛋白纯度。最后将纯化的蛋白加入终浓度为 50% 的甘油,于 -20℃ 保存。

将通过上述方法获得的重组蛋白分别免疫新西兰长耳兔,按照常规程序进行免疫。首次免疫经皮下注射 500 μg 抗原,后 3 次分别免疫 100 μg 抗原,每次间隔 7 d。第 4 次加强免疫 7 d 后,采用心脏采血法采集兔血液,并将血液置于 37℃ 1 h 后转至 4℃ 4 h 或者过夜。待血清充分析出后 1 000 r/min 离心 15 min,上清透明液体即为多克隆抗体,加入终浓度为 50% 的灭菌甘油后分装置于 -20℃ 保存备用。

1.5 *trxA* 基因缺失株和回补株的构建 李斯特菌基因缺失策略主要基于同源重组原理。首先 PCR 扩增出 *trxA* 基因上下游各 500 bp 的同源臂序列,经 SOE-PCR 融合后克隆至李斯特菌温敏型穿梭质粒 pKSV7 上,并电转入李斯特菌参考菌株 EGD-e 感受态细胞中,获得携带重组质粒的菌株。利用温度(41℃)及抗生素(Cm,10 mg/L)双重选择压力连

续传代培养使携带 *trxA* 基因同源臂序列与李斯特菌基因组发生双交换,并在无选择压力的环境中将 pKSV7 质粒丢失,获得 *trxA* 的基因缺失株,经测序验证后命名为 Δ *trxA*。回补株的构建主要在 *trxA* 缺失株的基础上,分别将李斯特菌组成型启动子 P_{help} 以及 *trxA* 基因自身启动子 P_{trxA} 与 *trxA* 完整阅读框进行 PCR 融合,然后分别克隆至李斯特菌整合型回补质粒 pIMK2 上,利用电转将重组质粒导入 *trxA* 缺失株感受态细胞中,通过筛选后得到对应的回补株,分别命名为 $C\Delta$ *trxA*- P_{help} 和 $C\Delta$ *trxA*- P_{native} 。试验所需的引物见表 1(构建缺失株所用引物为 Δ *trxA*-A、 Δ *trxA*-B、 Δ *trxA*-C、 Δ *trxA*-D,构建回补株所用的引物为 $C\Delta$ *trxA*- P_{help} -F、 $C\Delta$ *trxA*- P_{help} -R、 $C\Delta$ *trxA*- P_{native} -F、 $C\Delta$ *trxA*- P_{native} -R)。

1.6 野生株和 *trxA* 缺失株磷脂酶 PlcB mRNA 表达水平的检测 利用细菌总 RNA 快速抽提试剂盒抽提纯化 EGD-e 与 *trxA* 缺失株的总 RNA,并以此为模版,用反转录试剂盒进行反转录得到 cDNA。设计 *plcB* 的 qRT-PCR 引物(表 1 的 *plcB*-RT-F 和 *plcB*-RT-R),以单增李斯特菌 *rpob* 基因为内参基因,设计对应引物(表 1 的 *rpob*-RT-F 和 *rpob*-RT-R)采用 qRT-PCR 法检测 *plcB* 基因的转录水平。每个样品 3 个平行,用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法处理得到的数据。

1.7 Western-blotting 方法检测野生株、*trxA* 缺失株和回补株的 PlcB 表达水平 挑取 EGD-e、 Δ *trxA*、 $C\Delta$ *trxA*- P_{help} 和 $C\Delta$ *trxA*- P_{native} 的单克隆菌落接种于 BHI 液体培养基,37℃ 震荡培养过夜,离心分别收集上清和沉淀。利用均质仪裂解菌体获得

蛋白样品;将上清用 $0.22 \mu\text{m}$ 滤膜过滤除菌,加入 TCA 沉淀 8 h 后离心,并用 DAB buffer 洗涤沉淀,收集分泌到胞外的蛋白样品。将样品进行 SDS-PAGE,然后将凝胶上的蛋白利用半干转膜法转移到 PVDF 膜上。把转移完成的 PVDF 膜放入 5% 脱脂奶粉中封闭过夜,然后在 37°C 条件下以 1:1000 加入抗 PlcB 的兔多克隆抗体孵育 1 h,再加入 HRP 标记的羊抗兔 IgG 继续孵育 1 h,最后利用 Western-blotting 成像系统拍摄照片,分析结果,并以目的蛋白条带的灰度值与 GAPDH 蛋白条带的灰度值的比值表示目的蛋白的相对表达量。试验重复 3 次。

1.8 野生株、*trxA* 缺失株和回补株溶脂活性以及 PlcB 的酶活检测 溶脂活性的检测:把 5 mL 新鲜的卵黄加入 100 mL BHI 固体培养基,混匀后制成卵黄琼脂平板冷却备用;将 EGD-e, ΔtrxA , $C \Delta\text{trxA-P}_{\text{help}}$, $C \Delta\text{trxA-P}_{\text{native}}$ 挑取单克隆培养于 BHI 液体培养基中, 37°C 震荡过夜培养,用 10 mmol/L PBS 缓冲液调至 $D_{600 \text{ nm}}$ 均为 0.6,各取 10 μL 滴至卵黄琼脂平板,置于 37°C 培养箱培养 48 h 以上,观察结果。

检测 TrxA 对 PlcB 酶活的影响:利用 Enz-Chek™ Phosphate Assay Kit 试剂盒,参照使用手册配置检测工作液和 1U/mL 磷脂酶 C(来源于 *Bacillus subtilis*, BcPlcB) 标准品。利用先前纯化的 PlcB 和 TrxA 作为样品,分为 5 组,分别为 PlcB 组、TrxA 组、PlcB+TrxA 组,阳性对照组,阴性对照组,每组中含有等量的 TrxA 或 PlcB 蛋白。将待测样品预先放入 37°C 培养箱孵育 1 h,然后将样品与工作液 1:1 混合,室温下避光反应 1 h,最后利用多功能酶标仪检测 $D_{490/520 \text{ nm}}$ 的值,比较 TrxA 对 PlcB 酶活的影响。其中用标准品作阳性对照,50 mmol/L PBS 缓冲液作为阴性对照。

2 结果

2.1 PlcB 以及 TrxA 原核表达重组菌的验证 结果如图 1,2 所示。利用 PCR 技术,将 PCR 产物进行 DNA 核酸电泳后,在紫外光下观察结果。理论上 *plcB* 重组质粒的大小为 711 bp,*trxA* 重组质粒的大小为 312 bp。由图中可以看到,312,711 bp 处出现了明显的条带,而且经过测序,结果比对正确,成功获得导入 *plcB* 和 *trxA* 阳性重组质粒的重组菌,可备后续研究。

2.2 *trxA* 基因缺失株和回补株的鉴定 为了验证 *trxA* 的缺失是否对 PlcB 的表达产生影响,我们首

先以单增李斯特菌 EGD-e 为参考菌株,构建 *trxA* 基因的缺失突变株。我们利用 EGD-e 为阳性对照,利用 PCR 方法鉴定,并用 Western-blotting 方法验证 TrxA 蛋白的表达情况,对于回补株采用同样的方法验证是否回补成功。结果如图 3 所示,阳性验证为 EGD-e,PCR 大小为 1309 bp,缺失 312 bp 后 PCR 大小为 997 bp。*trxA* 缺失株 PCR 扩增的条带大小皆与预期相符,且经过测序对比验证正确,表明 *trxA* 缺失株的构建成功;回补株阳性克隆验证中 DNA 电泳阳性条带大小分别为 312,392 bp,表明在回补株中携带 *trxA* 的穿梭质粒成功回补到菌株上。Western-blotting 结果如图 4,缺失株不表达 TrxA,而 2 个回补株均可以成功表达 TrxA。上述结果证实我们确已获得 *trxA* 缺失株和回补株。

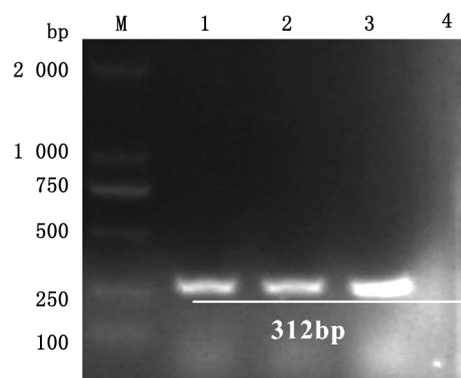


图 1 PCR 方法验证原核表达 TrxA 重组菌的构建 M. DL2000 DNA Marker;1.以超纯水为模板扩增 *plcB* 基因的 PCR 产物;2.以 EGD-e 为模板扩增 *plcB* 基因的 PCR 产物;3~8.以 *plcB* 重组质粒为模板扩增 *plcB* 基因的 PCR 产物

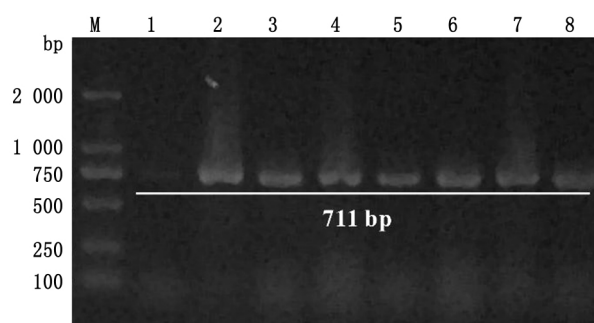


图 2 PCR 方法验证原核表达 PlcB 重组菌的构建 M. DL2000 DNA Marker;1.以超纯水为模板扩增 *plcB* 基因的 PCR 产物;2.以 EGD-e 为模板扩增 *plcB* 基因的 PCR 产物;3~8.以 *plcB* 重组质粒为模板扩增 *plcB* 基因的 PCR 产物

2.3 PlcB 和 TrxA 重组蛋白的表达和纯化 通过 UniProt 网站以及 Vector NTI 软件分析,单增李斯特菌的 PlcB 成熟肽相对分子质量大小为 27 700,与 His-tag 融合表达后相对分子质量约为 35 000; TrxA 的相对分子质量大小为 12 700,与 His-tag 融合表达后相对分子质量约为 15 000。我们利用大肠杆菌表达系统以及蛋白纯化方法获得了较纯的目的蛋白。将纯化得到的蛋白经 SDS-PAGE 分析,由图中可以看到,15 000,35 000 处检测到目的蛋白条带,纯度高达 90%,可以用于多克隆抗体的制备及蛋白酶活研究。

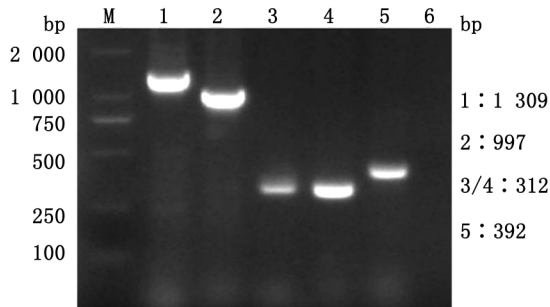


图3 利用 PCR 方法验证 *trxA* 基因缺失株和回补株的构建情况 M,DL2000DNA Marker; 1.以 EGD-e 为模板扩增 *trxA* 基因上下游序列的 PCR 产物; 2.以 *trxA* 缺失株为模板扩增 *trxA* 基因上下游序列的 PCR 产物; 3.以 EGD-e 为模板扩增 *trxA* 基因的 PCR 产物; 4.以 $C\Delta trxA_P_{help}$ 为模板扩增 *trxA* 基因的 PCR 产物; 5.以 $C\Delta trxA_P_{native}$ 为模板扩增 *trxA* 基因的 PCR 产物; 6.以超纯水为模板扩增 *trxA* 基因的 PCR 产物

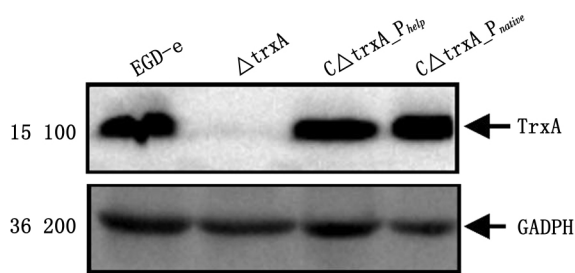


图4 Western-blotting 方法验证 *trxA* 基因缺失株和回补株的构建情况

2.4 *plcB* 在野生株和 *trxA* 缺失株中的转录水平差异 将抽提纯化的野生株和 *trxA* 缺失株的 mRNA 反转录为 cDNA, *rpob* 作为内参基因,利用 qRT-PCR 方法检测缺失 *trxA* 后 *plcB* 的表达情况,运用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法处理所得到的数据,并与测序得到的转录组进行比对。结果如图 7 所示。将前期对转录组测序结果与荧光定量 RT-PCR 的结果相对比,可见 EGD-e 的 *plcB* 转录水平是 *trxA* 缺失株的 1.92 倍,说明缺失

trxA, *plcB* 的转录的确受到较为明显的影响。

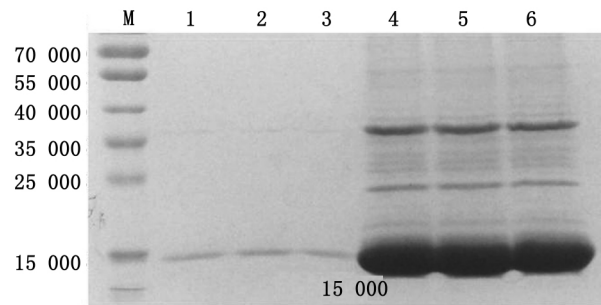


图5 SDS-PAGE 方法验证该重组蛋白的表达和纯化 M,蛋白Marker; 1~6.咪唑洗脱后的重组 TrxA 蛋白

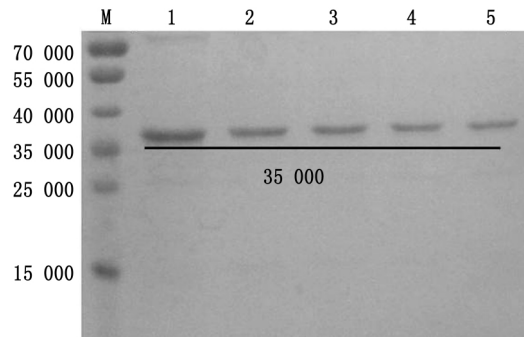


图6 SDS-PAGE 方法验证该重组蛋白的表达和纯化 M,蛋白Marker; 1~5.咪唑洗脱后的重组 PlcB 蛋白

2.5 Western-blotting 检测 *trxA* 缺失以及回补株中 PlcB 蛋白的表达 前期通过 qRT-PCR 方法分析发现缺失 *trxA* 后 *plcB* 基因的转录水平出现下调,在此研究基础上利用 PlcB 多克隆抗体,采用 Western-blotting 方法对 *trxA* 缺失以及回补株进行 PlcB 蛋白表达水平的分析。分析结果如图 8 所示,在 *trxA* 缺失株中 PlcB 的表达量显著降低。灰度分析显示,利用天然启动子回补 *trxA* 后能够使 PlcB 的表达基本恢复至野生株水平,而组成型启动子回补效率较低,这表明在单增李斯特菌中 TrxA 能够严谨调控 PlcB 的表达。

2.6 TrxA 对于 PlcB 溶脂能力的影响以及在 TrxA 影响下 PlcB 的酶活 将 EGD-e、 $\Delta trxA$ 、 $C\Delta trxA_P_{help}$ 和 $C\Delta trxA_P_{native}$ 培养至 $D_{600\text{ nm}}$ 相同时,同时取等量菌液点于卵黄琼脂平板,通过 37℃ 下 48 h 的培养后,结果如图 9 所示,野生株的溶脂直径是 *trxA* 缺失株的 2 倍,回补株的溶脂直径是 *trxA* 缺失株的 1.7 倍。该结果说明缺失 *trxA*,单增李斯特菌溶脂活性下降。

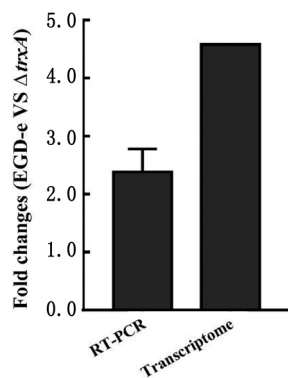


图7 利用 qRT-PCR 方法研究 TrxA 对 PlcB 的转录和蛋白表达水平的调控

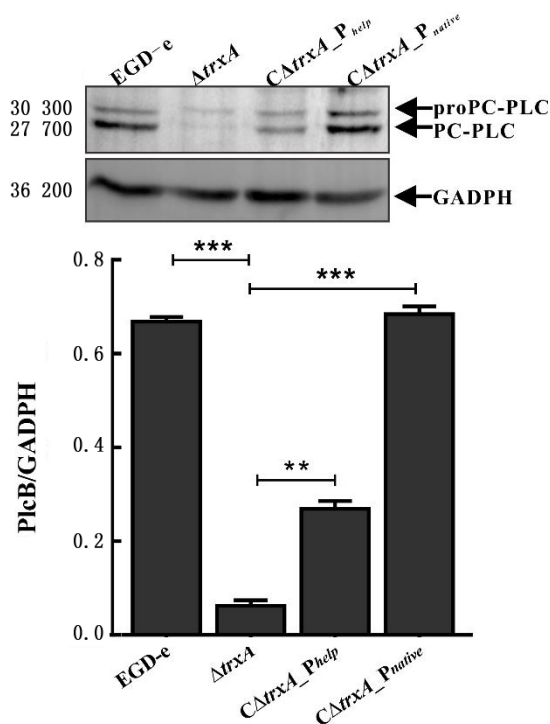


图8 Western-blotting 方法研究 TrxA 对 PlcB 的转录和蛋白表达水平的调控

由于 37℃ 是硫氧还蛋白发挥作用的适宜温度，因此将样品放置 37℃ 预先反应 1 h，使 TrxA 与 PlcB 充分的互相作用，然后将样品与工作液以 1 : 1 混匀，室温反应避光反应 1 h，多功能酶标仪检测结果如图 10 所示，结果表明，在适宜的温度下，TrxA 能够与 PlcB 相互作用使 PlcB 的酶活大大提高。

3 讨论

目前的研究已经证实磷脂酶 PlcB 参与李斯特菌逃逸吞噬泡和在细胞间扩散的过程，而且 IVAN TATTOLI 等^[17]的研究发现，李斯特菌的磷脂酶 C 能够通过阻止前自噬体的结构使得细菌从宿主自噬防御中逃脱，从而避免被机体清除，从而显著增强了

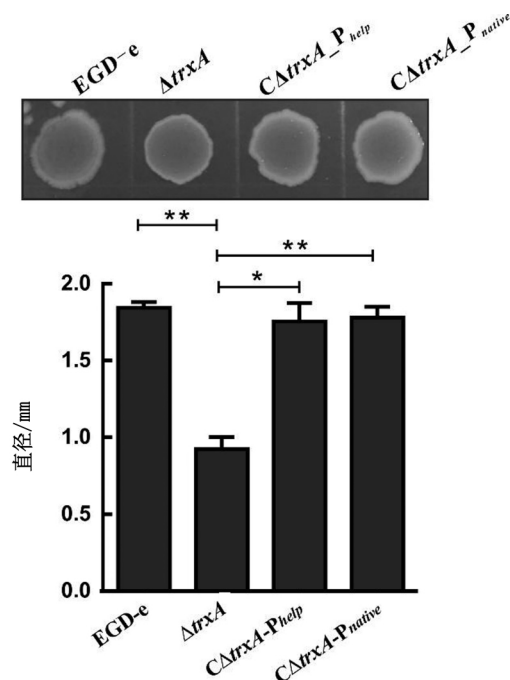


图9 利用体外溶脂实验研究 TrxA 对 PlcB 蛋白活性的调控

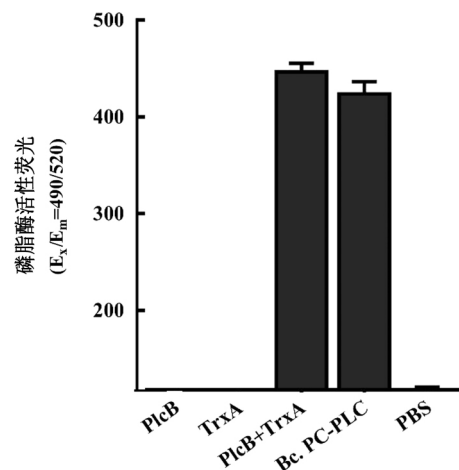


图10 磷脂酶活性检测研究 TrxA 对 PlcB 蛋白活性的调控

细菌的毒力。我们通过 qRT-PCR 等试验观察到，在单增李斯特菌中缺失 *trxA* 对磷脂酶 PlcB 的表达具有显著影响。PlcB 是由 proPC-PLC 活化得到，MARQUIS 等^[18]的研究显示，在细胞感染的过程中，proPC-PLC 的激活有 Mpl 介导的途径和半胱氨酸蛋白酶介导的途径。由于 proPC-PLC 中含有 3 个半胱氨酸，且 proPC-PLC 的成熟有赖于半胱氨酸蛋白酶的介导。而半胱氨酸的错误折叠可能会影响 PlcB 的功能，使得细菌的毒力降低。而 TrxA 又能够通过二硫键的氧化还原修饰^[13]，还原二硫键中的巯基，修复错误折叠的蛋白结构，因此 TrxA 可能通过调控半胱氨酸蛋白酶介导的 proPC-PLC 激活

途径,间接实现对于磷脂酶 PlcB 的调控。

PrfA 作为单增李斯特菌中关键的毒力蛋白,调控细菌内的主要毒力因子^[9]。较低的温度会使 *prfA* 的 mRNA 形成稳定的二级结构,屏蔽核糖体结合位点-SD 序列,使 *prfA* 无法表达,从而使 PlcA、PlcB 等毒力因子的表达减弱^[19]。CHENG 等^[16]发现,TrxA 能够与 PrfA 互作,为 PrfA 结构的维持提供一个高度还原的环境。而且 *trxA* 的缺失会导致 PrfA 表达水平的显著下调,并且在小鼠体内呈现较弱的毒力。TrxA 和 PrfA 的互作过程会破坏 *prfA* 形成的稳定 mRNA 二级结构,使 *prfA* 正常表达,从而调控李斯特菌的毒力。因此,TrxA 也可能是通过对 PrfA 的氧化还原修饰,使 PrfA 能够正常表达,进而实现对 PlcB 的调控。而且在上述研究中发现,由于毒性二酰胺分子在细胞内会导致蛋白质的二硫键损伤,耗尽 TrxA 的李斯特菌会暴露于二酰胺中发生显著的生长缺陷,因此硫氧还蛋白还维持着细胞中的硫平衡以保护细胞免受毒害^[20]。

TrxA 的失活会造成细胞的脱氧核糖核苷和半胱氨酸或蛋氨酸营养缺陷。在枯草芽孢杆菌中涉及细菌在胞外发生膜结合的硫醇二硫化物氧化还原酶有 CcdA、ResA 和 StoA,其中 ResA 能够少细胞色素 c 成熟期,StoA 对于合成内生孢子皮层很关键^[21-22],MIRJA 等^[23]发现缺乏 TrxA 会使得内生孢子和细胞色素 c 发生合成缺陷,而且 WIEP 等^[24]通过对枯草芽孢杆菌转录组的分析发现 TrxA 还参与其氧化应激、硫代谢和细胞分化的过程。因此硫氧还蛋白通过参与维持细菌体内氧化还原平衡的机制进而细菌不同的生物学过程。基于本研究基础,下一步将系统探究李斯特菌硫氧还蛋白调控修饰关键毒力因子的具体分子机制,为最终解析包括李斯特菌在内的重要食源性人兽共患病原硫氧还蛋白系统在细菌感染宿主过程中的氧化还原修饰机制奠定基础。

参考文献:

- [1] Rocourt J, Bille J. Foodborne listeriosis [J]. World Health Stat Q, 1997, 50(1/2): 67-73.
- [2] VIVANT A L, GARMYN D, PIVETEAU P. *Listeria monocytogenes*, a down-to-earth pathogen [J]. Front Cell Infect Microbiol, 2013, 3: 87.
- [3] OLIVEIRA M M D, BRUGNERA D F, ALVES E, et al. Biofilm formation by *Listeria monocytogenes* on stainless steel surface and biotransfer potential [J].

- Braz J Microbiol, 2010, 41(41): 97-106.
- [4] LATORRE A A, KESSEL J S V, KARNS J S, et al. Biofilm in milking equipment on a dairy farm as a potential source of bulk tank milk contamination with *Listeria monocytogenes* [J]. J Dairy Sci, 2010, 93(6): 2792.
- [5] GOULET V, HEDBERG C, LE MONNIER A, et al. Increasing incidence of listeriosis in France and other European countries [J]. Emerg Infect Dis, 2008, 14(5): 734-740.
- [6] MEAD P S, SLUTSKER L, DIETZ V, et al. Food-related illness and death in the United States [J]. Emerg Infect Dis, 1999, 5(5): 607-625.
- [7] CAMEJO A, CARVALHO F, REIS O, et al. The arsenal of virulence factors deployed by *Listeria monocytogenes* to promote its cell infection cycle [J]. Virulence, 2011, 2(5): 379-394.
- [8] JAGLIC Z, DESVAUX M, WEISS A, et al. Surface adhesins and exopolymers of selected foodborne pathogens [J]. Microbiology, 2014, 160(12): 2561-2582.
- [9] VAZQUEZ-BOLAND J A, KUHN M, BERCHE P, et al. *Listeria* pathogenesis and molecular virulence determinants [J]. Clin Microbiol Rev, 2001, 14(3): 584-640.
- [10] KAZMIERCZAK M J, WIEDMANN M, BOOR K J. Contributions of *Listeria monocytogenes* sigmaB and PrfA to expression of virulence and stress response genes during extra- and intracellular growth [J]. Microbiology, 2006, 152(6): 1827-1838.
- [11] 田德斌,袁舟,殷月兰,等.产单核细胞李斯特菌 *plcB* 基因的克隆与原核表达 [J]. 中国人兽共患病学报, 2007(7): 652-655.
- [12] HOLMGREN A. Thioredoxin [J]. Annu Rev Biochem, 1985, 54: 237-271.
- [13] LU J, HOLMGREN A. The thioredoxin superfamily in oxidative protein folding [J]. Antioxid Redox Signal, 2014, 21(3): 457-470.
- [14] YOSHIDA T, OKA S, MASUTANI H, et al. The role of thioredoxin in the aging process: involvement of oxidative stress [J]. Antioxid Redox Sign, 2003, 5(5): 563-570.
- [15] LI K, PASTERNAK C, KLUG G. Expression of the *trxA* gene for thioredoxin 1 in *Rhodobacter sphaeroides* during oxidative stress [J]. Arch Microbiol, 2003, 180(6): 484-489.
- [16] CHENG C, DONG Z, HAN X, et al. Thioredoxin A Is Essential for Motility and Contributes to Host

- [15] PANCIERA R J, MATHEW J S, EWING S A, et al. Skeletal lesions of canine hepatozoonosis caused by *Hepatozoon americanum*[J]. *Vet Pathol*, 2000, 37(3): 225-230.
- [16] PENNISI M G, PERSICHETTI M F, SERRANO L, et al. Ticks and associated pathogens collected from cats in Sicily and Calabria (Italy)[J]. *Parasit Vectors*, 2015, 8:512.
- [17] KUBO S, TATENO M, ICHIKAWA Y, et al. A molecular epidemiological survey of *Babesia*, *Hepatozoon*, *Ehrlichia* and *Anaplasma* infections of dogs in Japan[J]. *J Vet Med Sci*, 2015, 77(10):1275-1279.
- [18] HODZIC A, ALIC A, FUEHRER H P, et al. A molecular survey of vector-borne pathogens in red foxes (*Vulpes vulpes*) from Bosnia and Herzegovina[J]. *Parasit Vectors*, 2015, 8:88.
- [19] SUMRANDEE C, BAIMAI V, TRINACHARTVANIT W, et al. *Hepatozoon* and *Theileria* species detected in ticks collected from mammals and snakes in Thailand[J]. *Ticks Tick Borne Dis*, 2015, 6(3): 309-315.
- [20] HAN H, WU Y, DONG H, et al. First report of *Hepatozoon* (Apicomplexa: Adeleorina) from king ratsnakes (*Elaphe carinata*) in Shanghai, with description of a new species[J]. *Acta Parasitol*, 2015, 60(2):266-274.
- [21] XU D, ZHANG J, SHI Z, et al. Molecular detection of vector-borne agents in dogs from ten provinces of China[J]. *Parasit Vectors*, 2015, 8:501.

(上接 1692 页)

- Infection of *Listeria monocytogenes* via Redox Interactions[J]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2017, 7:287.
- [17] TATTOLI I, SORBARA M T, YANG C, et al. *Listeria* phospholipases subvert host autophagic defenses by stalling pre-autophagosomal structures[J]. *EMBO J*, 2013, 32(23):3066-3078.
- [18] MARQUIS H, GOLDFINE H, PORTNOY D A. Proteolytic pathways of activation and degradation of a bacterial phospholipase C during intracellular infection by *Listeria monocytogenes*[J]. *J Cell Biol*, 1997, 137(6):1381-1392.
- [19] 陈健舜, 江玲丽, 方维焕. 李斯特菌毒力因子及其进化[J]. *微生物学报*, 2007(4):738-742.
- [20] UZIEL O, BOROVOK I, SCHREIBER R, et al. Transcriptional regulation of the *Staphylococcus aureus* thioredoxin and thioredoxin reductase genes in response to oxygen and disulfide stress[J]. *J Bacteriol*, 2004, 186(2):326-334.
- [21] ERLÉNDSOHN L S, ACHESON R M, HEDERSTEDT L, et al. *Bacillus subtilis* ResA is a thiol-disulfide oxidoreductase involved in cytochrome c synthesis[J]. *J Biol Chem*, 2003, 278(20):17852-17858.
- [22] ERLÉNDSOHN L S, MOLLER M, HEDERSTEDT L. *Bacillus subtilis* StoA Is a thiol-disulfide oxidoreductase important for spore cortex synthesis[J]. *J Bacteriol*, 2004, 186(18):6230-6238.
- [23] MOLLER M C, HEDERSTEDT L. Extracytoplasmic processes impaired by inactivation of *trxA* (thioredoxin gene) in *Bacillus subtilis*[J]. *J Bacteriol*, 2008, 190(13):4660-4665.
- [24] SMITS W K, DUBOIS J Y, BRON S, et al. Tricky business: transcriptome analysis reveals the involvement of thioredoxin A in redox homeostasis, oxidative stress, sulfur metabolism, and cellular differentiation in *Bacillus subtilis* [J]. *J Bacteriol*, 2005, 187(12): 3921-3930.