

单核细胞增生李斯特氏菌内化素InlJ对噬菌体敏感性及生物被膜形成的影响

刘半红^{1,2}, 胡梁斌¹, 陆睿^{2,3}, 吴立婷², 包红朵², 周艳², 王冉², 张辉^{2,*}

(1.陕西科技大学食品与生物工程学院, 陕西 西安 710021;

2.江苏省食品质量安全重点实验室-省部共建国家重点实验室培育基地, 江苏省农业科学院农产品质量安全与营养研究所, 江苏 南京 210014; 3.江苏大学食品与生物工程学院, 江苏 镇江 212013)

摘要:为深入探索单核细胞增生李斯特氏菌 (*Listeria monocytogenes*, *Lm*) *inlJ*基因在噬菌体敏感性和生物被膜中的作用及功能, 本研究通过同源重组构建*inlJ*基因缺失株*Lm* NJ05- Δ *inlJ*, 鉴定其生长、黏附及侵袭特性, 解析其对噬菌体敏感性和生物被膜形成中的作用机制。结果表明: 与野生型*Lm* NJ05相比, 构建的缺失株*Lm* NJ05- Δ *inlJ*对RAW264.7细胞的黏附率和侵袭率分别为20.05%和4.42%, 黏附和侵袭能力显著减弱; *Lm* NJ05- Δ *inlJ*对李斯特菌噬菌体vB-LmoM-NJ05的成斑率提高至2.72倍; 体外裂解分析表明噬菌体vB-LmoM-NJ05对缺失株*Lm* NJ05- Δ *inlJ*裂解效果更强; 噬菌体效价分别在 10^5 PFU/mL和 10^8 PFU/mL能够完全抑制和清除*Lm* NJ05- Δ *inlJ*生物被膜; 生物被膜形成相关基因的转录分析表明, 噬菌体作用缺失株*Lm* NJ05- Δ *inlJ*后, *degU*、*agrA*、*agrD*、*luxS*、*yneA*、*recA*和*hpt*基因的转录均下调(表达水平趋向于0)。由此可见, *inlJ*基因的缺失能够增强*Lm*对噬菌体敏感性, 下调*Lm*对细胞侵袭力和生物被膜形成能力。因此, 内化素基因*inlJ*不仅具有调控*Lm*自身的作用, 还能够调节其对噬菌体的相互作用, 为噬菌体的生物防控技术开发和应用奠定基础。

关键词:单核细胞增生李斯特氏菌; 内化素InlJ; 噬菌体敏感性; 细胞黏附和侵袭; 生物被膜

Effect of Internalin InlJ of *Listeria monocytogenes* on Phage Sensitivity and Biofilm Formation

LIU Banhong^{1,2}, HU Liangbin¹, LU Rui^{2,3}, WU Liting², BAO Hongduo², ZHOU Yan², WANG Ran², ZHANG Hui^{2,*}

(1. School of Food and Biological Engineering, Shaanxi University of Science and Technology, Xi'an 710021, China;

2. Jiangsu Key Laboratory for Food Quality and Safety-State Key Laboratory Cultivation Base of Ministry of Science and Technology, Institute of Food Safe and Nutrition, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014, China;

3. School of Food and Biological Engineering, Jiangsu University, Zhenjiang 212013, China)

Abstract: In order to explore the role and function of the *inlJ* gene of *Listeria monocytogenes* (*Lm*) in phage sensitivity and biofilm, the *inlJ* gene-deficient strain *Lm* NJ05- Δ *inlJ* was constructed by homologous recombination. The growth, adhesion and invasion characteristics of the defective strain were identified. The results showed that compared with the wide-type strain *Lm* NJ05, the adhesion and invasion of RAW264.7 cells by *Lm* NJ05- Δ *inlJ* were significantly reduced to 20.05% and 4.42%, respectively. The efficiency of plaque formation was enhanced by 2.72 folds and phage vB-LmoM-NJ05 had a stronger lytic activity on *Lm* NJ05- Δ *inlJ*. Phage vB-LmoM-NJ05 at titers of 10^5 and 10^8 PFU/mL could completely inhibit and remove the biofilm of *Lm* NJ05- Δ *inlJ*, respectively. Transcriptional analysis of biofilm formation-related genes showed that the transcriptional levels of the *degU*, *agrA*, *agrD*, *luxS*, *yneA*, *recA* and *hpt* genes were significantly decreased to nearly zero in the defective strain after interacting with phage vB-LmoM-NJ05. In conclusion, deletion of the *inlJ* gene can enhance the phage sensitivity of *Lm*, and down-regulate the ability of cell invasion and biofilm formation. Therefore, the *inlJ* gene not

收稿日期: 2022-09-22

基金项目: “十三五”国家重点研发计划重点专项(2018YFE0101900); 江苏省农业科技自主创新资金项目(cx(21)1004); 江苏省重点研发计划项目(BE2022361)

第一作者简介: 刘半红(1998—)(ORCID: 0000-0003-1611-3571), 女, 硕士研究生, 研究方向为食源性致病菌致病机制。

E-mail: 2585294839@qq.com

*通信作者简介: 张辉(1978—)(ORCID: 0000-0002-6389-2988), 女, 研究员, 博士, 研究方向为致病微生物监测及生物防控技术开发。E-mail: Huiz@jaas.ac.cn

only regulate *Lm* but also affect its interaction with phage, which lays a foundation for the development and application of phage biocontrol.

Keywords: *Listeria monocytogenes*; internalin InIj; phage sensitivity; cell adhesion and invasion; biofilm

DOI:10.7506/spkx1002-6630-20220922-219

中图分类号: TS201.3

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630(2023)16-0198-07

引文格式:

刘半红, 胡梁斌, 陆睿, 等. 单核细胞增生李斯特氏菌内化素InIj对噬菌体敏感性及其生物被膜形成的影响[J]. 食品科学, 2023, 44(16): 198-204. DOI:10.7506/spkx1002-6630-20220922-219. <http://www.spkx.net.cn>

LIU Banhong, HU Liangbin, LU Rui, et al. Effect of internalin InIj of *Listeria monocytogenes* on phage sensitivity and biofilm formation[J]. Food Science, 2023, 44(16): 198-204. (in Chinese with English abstract) DOI:10.7506/spkx1002-6630-20220922-219. <http://www.spkx.net.cn>

李斯特菌属 (*Listeria* spp.) 是一类能够引起动物和人李斯特菌病的革兰氏阳性细菌 (G^+), 其中单核细胞增生李斯特氏菌 (*L. monocytogenes*, *Lm*) 是最重要的食源性人兽共患病原菌, 感染者主要表现为肠胃炎、流产、脑炎及脑膜炎等, 住院率可达91%, 死亡率20%~30%, 在新生儿中死亡率高达50%^[1]。*Lm*在自然界中广泛分布, 常存在于人和蠕虫类动物的肠道、土壤、水以及新鲜蔬菜中^[2], 据美国FoodNet数据显示, 2017—2020年间, *Lm*在全美共引发食品中毒事件553起, 病死率高达16.25%^[3]。作为一种胞内寄生菌, *Lm*在感染过程中, 侵入细胞的主要毒力因子是其表面的内化素引发的, 通过内化素进入、生存并在吞噬和非吞噬细胞内呈指数增殖^[4]。此外, *Lm*为了在环境中生存, 通过形成丰富的生物被膜黏附于生物或非生物表面^[5], 由于生物被膜具有特殊的多层立体结构, 可作为细菌的保护机制, 帮助细菌逃避机体免疫系统的清除和药物的杀灭^[6]。

已有研究表明, 约80%细菌感染与生物被膜形成有关, 60%食源性食物中毒暴发事件均是由食源性致病菌生物被膜引起^[7]。内化素InIa是最早鉴定出与宿主细胞特异性受体结合介导*Lm*进入非吞噬细胞的毒力因子^[8], 比较基因组学发现内化素InIj与内化素InIa结构相同^[9], C-末端包含Leu-ProX-Thr-Gly (LPXTG) 基序元件, N-末端为LRR, 通过分选酶Sort A识别共价结合到细胞壁肽聚糖上^[10]。但有关InIj功能的研究报道相对较少, 目前仅有研究表明*inIj*基因缺失可导致其毒力降低^[9], 因而明确InIj功能将有助于揭示拥有LPXTG及LRR结构域蛋白的新功能。Capestany等^[11]发现牙龈卟啉单胞菌*inIj*基因的缺失减少了生物被膜的形成, 表明*inIj*基因对生物被膜形成具有重要作用。噬菌体被视为细菌克星之一, 能够有效裂解宿主菌并抑制生物被膜形成。研究表明, 噬菌体能够很好地抑制和清除铜绿假单胞菌^[12]、沙门氏菌^[13]和大肠杆菌等生物被膜的形成, 并在生物被膜相关的尿路感染、骨科感染和口腔感染^[14]等得到很好地应用。肽聚糖是在革兰氏阳性细菌的细胞壁上发现的最丰富的糖聚合物, 其介导噬菌体的相互作用^[15]。InIj是*Lm*细胞壁表

面蛋白家庭成员, 能够共价结合到细胞壁肽聚糖上, 从而可能参与噬菌体与宿主的相互作用。为了进一步解析*inIj*基因功能, 本研究利用同源重组方法构建*inIj*基因缺失菌株, 并对缺失株的生物学特性、噬菌体敏感性以及生物被膜形成进行研究, 以期更有效地揭示*inIj*基因在噬菌体与*Lm*相互作用中的调节功能。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

Lm NJ05 (1/2a血清型) 和噬菌体vB-LmoM-NJ05均由江苏省食品安全重点实验室-省部共建国家重点实验室培育基地保存和鉴定分离鉴定并保存; pKSV7温度敏感型穿梭载体由扬州大学朱国强教授惠赠。

琼脂糖凝胶电泳回收试剂盒、细菌总RNA提取试剂盒生工生物工程(上海)股份有限公司; T₄DNA连接酶、限制性核酸内切酶 美国Thermo Fisher公司; DNA Marker、细菌基因组DNA提取试剂盒 北京擎科生物科技股份有限公司; 氯霉素 上海源叶生物公司; 牛脑心浸出液 (brian heart infusion, BHI) 培养基 海博生物技术公司; 逆转录试剂盒 南京诺唯赞生物科技有限公司。

1.2 仪器与设备

SM830立式压力蒸汽灭菌器 日本Yamato公司; SW-CJ-1F超净台 苏州真田洁净设备有限公司; Ultrospec-10-pro细胞密度计 美国Amersham Biosciences公司; PowerPac HC电泳仪、MicroPulser™电穿孔仪、Universal Hood II凝胶成像系统、C1000Touch梯度聚合酶链式反应 (polymerase chain reaction, PCR) 仪 美国Bio-Rad公司; 多功能酶标仪 美国Thermo公司; 5810R高速离心机 德国Eppendorf公司。

1.3 方法

1.3.1 DNA的提取

参照细菌基因组DNA提取试剂盒说明书提取*Lm* NJ05基因组DNA。

1.3.2 引物设计

参考GenBank中标准菌株EDG-e基因组序列(NC_003210.1), 并比对同源性及分析最大开放阅读框后, 利用Primer 6.0软件设计引物和分子鉴定引物(表1), 引物P1和P2用于扩增*inlJ*基因片段确定上下游同源臂, 分别于引物P3和P4的5'端及3'端加*Bam*HI和*Kpn*I酶切位点和保护性碱基。实验引物均由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

表1 引物序列
Table 1 Primer sequences designed in this study

引物	序列(5'-3')	酶切位点	扩增产物大小/bp
P1	CAAGTGAGATTCCGACG		3 318
P2	TACTTGGTGTGGCAGATG		
P3	cagtcagcggccgggatccAATGAGACTCGATTCACTCCTTC	<i>Bam</i> HI	461
P4	agtgaattcagctcggatccGATATTCAGCTAGGAGAAGTTGGGA	<i>Kpn</i> I	
P5	TCGTGAAAATTAATCGTACCAT		332/2 888
P6	GGAATGGAAGCTTTGCCGAT		

1.3.3 重组穿梭质粒pKSV7-*ΔinlJ*的构建

以*Lm* NJ05 DNA为模板, 通过引物P1和P2扩增, 由生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序鉴定。经Overlap PCR扩增上、下游同源臂纯化产物, 将融合产物与pUC57载体, 命名为pUC57-*ΔinlJ*, 通过大肠杆菌DH5α感受态细胞转化后测序; 以引物P3和P4扩增阳性克隆并测序鉴定。将穿梭质粒pKSV7和*ΔinlJ*目的条带分别用*Bam*HI和*Kpn*I于37℃酶切, 然后用T₄DNA连接酶16℃连接过夜, 将连接产物用热激转化法(42℃), 转化至DH5α感受态细胞, 涂布含有氨苄青霉素(50 μg/mL)的LB平板, 37℃过夜培养。随机挑取疑似阳性转化子, 经PCR鉴定阳性菌, 并送公司测序进一步验证以获得构建成功的重组质粒pKSV7-*ΔinlJ*。

1.3.4 *Lm* NJ05-*ΔinlJ*缺失株的构建、筛选和鉴定

根据Parsons等^[16]方法制备*Lm* NJ05感受态细胞。取1 μg pKSV7-*ΔinlJ*加入100 μL *Lm* NJ05感受态细胞中并混匀, 随后电击转化(2.5 kV/cm、4.8 ms), 涂布到含有氯霉素(10 μg/mL)的BHI固体平板上, 30℃恒温静置培养48 h, 随机挑取单菌落接种到含氯霉素(10 μg/mL)的BHI液体培养基中, 在氯霉素和温度(42℃)双重压力下进行同源重组, 并以P3和P4为引物, PCR扩增(反应条件同上)筛选阳性转化子。在30℃无氯霉素压力条件下传代培养约10代完成质粒pKSV7消杀过程, 将末代菌液涂布BHI平板, 挑取单菌落再次进行PCR及测序鉴定, 最终获得无氯霉素抗性的*Lm* NJ05-*ΔinlJ*缺失株。

1.3.5 *Lm* NJ05-*ΔinlJ*缺失株生长特性

将*Lm* NJ05、*Lm* NJ05-*ΔinlJ*划线于BHI固体平板, 37℃倒置过夜培养。次日, 挑取单菌落到BHI液体培养基, 37℃、200 r/min振荡培养至对数期(OD_{600 nm}约为

0.6), 再按体积比为1:100接入到新鲜BHI液体培养基中, 置于37℃培养箱中静置培养, 每隔30 min取出测定OD_{600 nm}, 用OriginPro 8.5软件绘制生长曲线。

1.3.6 *Lm* NJ05-*ΔinlJ*缺失株对细胞的黏附和侵袭性

将培养的小鼠巨噬细胞RAW264.7经胰蛋白酶消化后移至48孔细胞培养板中, 于37℃、5% CO₂条件下培养至细胞密度约为5.0×10⁵ Cell/mL。弃去培养液, 用磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS)将细胞漂洗3遍, 加入无抗改良Eagle培养基(Dulbecco's modification of Eagle's medium Dulbecco, DMEM)。每孔加入*Lm* NJ05-*ΔinlJ*缺失株培养液0.5 mL (5×10⁷ CFU/mL)培养1 h, PBS洗涤细胞3次, 加入300 μL 0.2% Triton X-100和胰蛋白酶作用15 min, 吸取各孔悬液, 稀释后涂板计数测定黏附细菌的数量。每孔中细胞用PBS洗涤2次, 并重新悬浮在含有庆大霉素(100 μg/mL)的1 mL DMEM培养基中, 以测定侵袭细菌的数量。每个实验重复3次。

1.3.7 *Lm* NJ05-*ΔinlJ*缺失株噬菌体成斑率(efficiency of plaquing, EOP)分析

取过夜培养*Lm* NJ05和*Lm* NJ05-*ΔinlJ*菌液, 调整各菌液OD_{600 nm}值为1.0 (10⁸ CFU/mL), 分别与相同浓度的vB-LmoM-NJ05噬菌体进行双层平板EOP实验, 记录噬菌斑数量, 计算*Lm* NJ05-*ΔinlJ*突变体的EOP, 判断噬菌体与突变体的反应敏感性。计算公式如下:

$$EOP = \frac{A}{B}$$

式中: *A*为测试菌株(*Lm* NJ05-*ΔinlJ*)噬菌斑形成量/(PFU/mL); *B*为标准菌株(*Lm* NJ05)噬菌斑形成量/(PFU/mL)。

1.3.8 噬菌体对*Lm* NJ05-*ΔinlJ*缺失株裂解活性

分别调整*Lm* NJ05和*Lm* NJ05-*ΔinlJ*菌液至OD_{600 nm}=1.0, 取500 μL菌液加入48孔板中, 以最佳感染复数为1加入500 μL噬菌体, 并设置相应菌株对照组, 每隔30 min通过酶标仪测定OD_{600 nm}值, 直至10 h。

1.3.9 噬菌体对生物被膜抑制和清除能力测定

噬菌体vB-LmoM-NJ05对*Lm* NJ05和*Lm* NJ05-*ΔinlJ*生物被膜的抑制和清除能力实验方法如下: BHI琼脂平板划线复苏菌株, 分别挑取单菌落至5 mL BHI肉汤, 37℃振荡过夜培养16 h, 调整到OD_{600 nm}至0.1, 加入100 μL菌液到96孔板中, 分成两组: A组抑制生物被膜实验, 加入100 μL不同浓度的噬菌体vB-LmoM-NJ05 (10⁵、10⁶、10⁷、10⁸ PFU/mL), 37℃静置培养48 h, 之后结晶紫染色; B组清除生物被膜实验, 菌液培养48 h后, 除去各孔的浮游菌, 并用PBS洗涤3次, 加入100 μL不同滴度的噬菌体vB-LmoM-NJ05 (10⁴、10⁵、10⁶、10⁷、10⁸ PFU/mL)与生物被膜在37℃孵育12 h, 然后结晶紫染色, 酶标仪测定OD_{590 nm}。

1.3.10 RNA提取、cDNA合成及逆转录实时PCR (reverse transcription real-time PCR, RT-real-time PCR)

为了阐明内化素InI在生物被膜形成及其在噬菌体敏感性中的作用,利用RT-real-time PCR分析生物被膜相关基因 (*hpt*、*agrD*、*yneA*、*agrA*、*degU*、*luxS*、*flaA*和*recA*) 转录表达水平,引物信息见表2。简而言之,将1 mL *Lm* NJ05和*Lm* NJ05- Δ *inlJ* (10^8 CFU/mL) 分别与1 mL噬菌体 vB-LmoM-NJ05 (10^8 PFU/mL) 37 °C静置2 h,将混合物 $10\ 000\times g$ 离心5 min,将*Lm* NJ05和*Lm* NJ05- Δ *inlJ*作为对照组。根据产品说明提取总RNA,逆转录试剂盒进行cDNA合成。real-time PCR体系^[17]: 2 μ L cDNA、0.5 μ L上下游引物、10 μ L SYBR Green qPCR Supermix和7.5 μ L RNase-free H₂O进行real-time PCR,反应终体积为20 μ L。real-time PCR的循环参数如下: 95 °C预变性30 s、95 °C变性10 s、56 °C退火30 s、72 °C延伸60 s,40个循环。

表2 RT-real-time PCR引物
Table 2 RT-real-time PCR primers

基因	引物	序列 (5'-3')
<i>hpt</i>	<i>hpt</i> -F	ATGTCATTATTCAGTTTAAAAAG
	<i>hpt</i> -R	TTATAGATGTAAAACCTTTTGC
<i>agrD</i>	<i>agrD</i> -F	ATGAAAAATATGAATAAATCAGTTG
	<i>agrD</i> -R	TTATTTATTTTCGTTTTTTTCTTGC
<i>yneA</i>	<i>yneA</i> -F	TGACTTTAAAATTAATTTGGGAT
	<i>yneA</i> -R	TTACTGATTTGCTAGTTGAATTG
<i>agrA</i>	<i>agrA</i> -F	ATGCTACCGGTTTTTATTG
	<i>agrA</i> -R	TTATAAACTCAAGCTTTTAATT
<i>degU</i>	<i>degU</i> -F	ATGGCACTCAAATCATGATTG
	<i>degU</i> -R	TTAGCGAATGTATACCCAGC
<i>luxS</i>	<i>luxS</i> -F	ATGGCAGAAAAATGAATGTAG
	<i>luxS</i> -R	TTATTCACCAAACACATTTTTC
<i>flaA</i>	<i>flaA</i> -F	ATGAAAGTAAATACTAATATCA
	<i>flaA</i> -R	TTAGCTGTAATTAATTGAGTT
<i>recA</i>	<i>recA</i> -F	GTGAATGATCGTCAAGCGG
	<i>recA</i> -R	TTATTCATCATCTAGTAACTTA

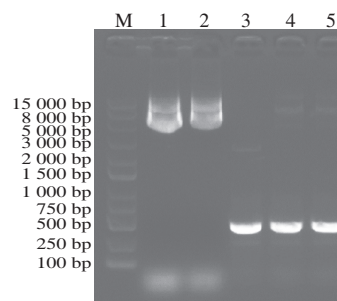
1.4 数据处理与统计分析

运用SPSS20.0软件进行单因素方差分析,组间差异采用*t*检验。采用OriginPro 8.5和GraphPad Prism 9.0.0软件进行绘图。

2 结果与分析

2.1 重组穿梭质粒pKSV7- Δ *inlJ*的鉴定

对穿梭载体pKSV7和基因片段 Δ *inlJ*酶切, T₄ DNA连接酶连接,转化至DH5 α ,挑选阳性克隆,测序结果表明, Δ *inlJ*缺失序列分别由上游222 bp和下游239 bp组成,全长共461 bp。电泳结果和预期大小相符,测序结果比一致,表明重组穿梭质粒pKSV7- Δ *inlJ*构建成功(图1)。



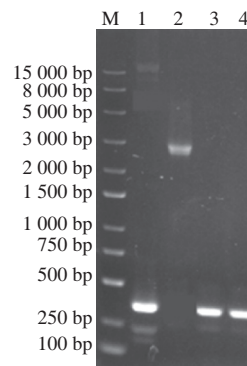
M. DNA分子质量标准,下同; 1、2. pKSV7- Δ *inlJ*重组质粒; 3、4.缺失片段 Δ *inlJ*; 5. pUC57- Δ *inlJ*为模板PCR扩增的*inlJ*缺失片段。

图1 重组质粒pKSV7- Δ *inlJ*鉴定

Fig. 1 Identification of recombinant plasmid pKSV7- Δ *inlJ*

2.2 *Lm* NJ05- Δ *inlJ*构建、筛选与鉴定

如图2所示, pKSV7- Δ *inlJ*质粒和*inlJ*基因缺失株扩增产物均为332 bp,未扩增出*inlJ*序列;而*Lm* NJ05野生株扩增产物为2 888 bp的*inlJ*基因序列(图2),表明*inlJ*基因完全缺失,成功构建稳定的*inlJ*基因缺失株,命名为*Lm* NJ05- Δ *inlJ*。



1. pKSV7- Δ *inlJ*质粒; 2. *Lm* NJ05; 3、4. *Lm* NJ05- Δ *inlJ*。

图2 缺失株*Lm* NJ05- Δ *inlJ*鉴定

Fig. 2 Identification of *Lm* NJ05- Δ *inlJ*

2.3 *Lm* NJ05- Δ *inlJ*生长曲线测定

将*Lm* NJ05和*Lm* NJ05- Δ *inlJ*在37 °C条件下培养10 h,通过酶标仪检测其OD_{600 nm}值,根据结果绘制生长曲线见图3,显示缺失株*Lm* NJ05- Δ *inlJ*与野生株*Lm* NJ05在0~3 h时间段内均处于适应期,3~7 h时间段内处于对数期,生长趋势无显著差异,由此可见, *inlJ*基因的缺失对其生长特性无显著影响。

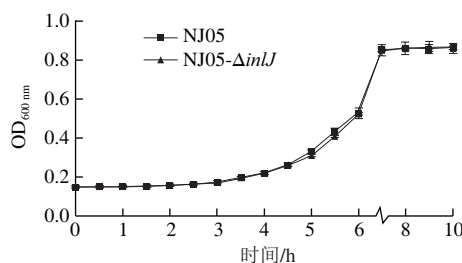


图3 *Lm* NJ05- Δ *inlJ*缺失株生长曲线

Fig. 3 Growth curve of *Lm* NJ05- Δ *inlJ*

2.4 黏附性与侵袭性

通过RAW264.7细胞分析缺失株*Lm* NJ05- Δ *inlJ*对细胞黏附和侵袭活性的变化,由图4可知,*Lm* NJ05和*Lm* NJ05- Δ *inlJ*对RAW264.7细胞的黏附率分别为33.5%和20.05%(图4),*Lm* NJ05- Δ *inlJ*的黏附能力显著降低($P < 0.05$)。对RAW264.7细胞的侵袭性结果表明,*Lm* NJ05和*Lm* NJ05- Δ *inlJ*对RAW264.7细胞的侵袭力分别为8.25%和4.42%(图5),缺失株侵袭力显著下降($P < 0.01$)。综上所述,*inlJ*基因缺失对细胞的黏附和侵袭性均减弱。

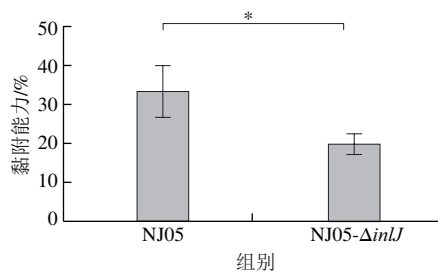


图4 *Lm* NJ05和*Lm* NJ05- Δ *inlJ*对细胞的黏附能力
Fig. 4 Cell adhesion of *Lm* NJ05 and *Lm* NJ05- Δ *inlJ*

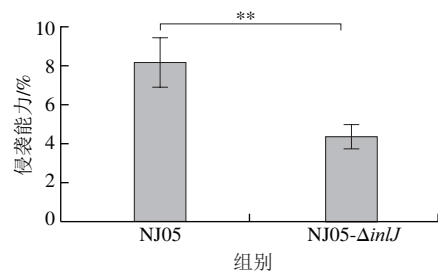


图5 *Lm* NJ05和*Lm* NJ05- Δ *inlJ*对细胞的侵袭能力
Fig. 5 Cell invasion of *Lm* NJ05 and *Lm* NJ05- Δ *inlJ*

2.5 *Lm* NJ05- Δ *inlJ*对噬菌体vB-LmoM-NJ05敏感性

通过EOP分析*Lm* NJ05和*Lm* NJ05- Δ *inlJ*对噬菌体的敏感性。结果表明,*Lm* NJ05- Δ *inlJ* EOP较*Lm* NJ05高至2.72倍(表3),表明*inlJ*基因缺失会影响噬菌体和宿主菌株之间的敏感性,成斑效果增强。此外,与野生株*Lm* NJ05相比,缺失株*Lm* NJ05- Δ *inlJ*形成的噬菌体斑更加清晰透明(图6),进一步表明缺失*inlJ*基因能够增强其与噬菌体的敏感性。

表3 噬菌体vB-LmoM-NJ05的EOP
Table 3 EOP of phage vB-LmoM-NJ05

菌株	效价/(10^9 PFU/mL)	EOP
<i>Lm</i> NJ05	1.0 ± 0.018	1.0
<i>Lm</i> NJ05- Δ <i>inlJ</i>	2.72 ± 0.01	2.72

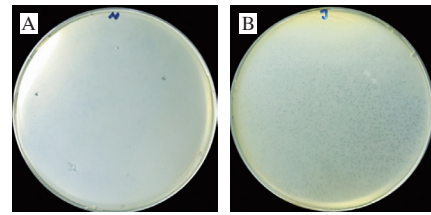


图6 *Lm* NJ05 (A)和*Lm* NJ05- Δ *inlJ* (B) EOP分析
Fig. 6 EOP analysis of *Lm* NJ05 (A) and *Lm* NJ05- Δ *inlJ* (B)

2.6 *Lm* NJ05- Δ *inlJ*对噬菌体vB-LmoM-NJ05裂解活性

由图7可知,噬菌体vB-LmoM-NJ05对*Lm* NJ05- Δ *inlJ*抑制效果更显著。在作用2 h内,噬菌体对*Lm* NJ05和*Lm* NJ05- Δ *inlJ*作用效果相似,但在2 h后至10 h,噬菌体对*Lm* NJ05- Δ *inlJ*的敏感性明显增强,与*Lm* NJ05相比呈显著差异。由此可见,*inlJ*基因缺失能够增强其对噬菌体vB-LmoM-NJ05裂解活性。

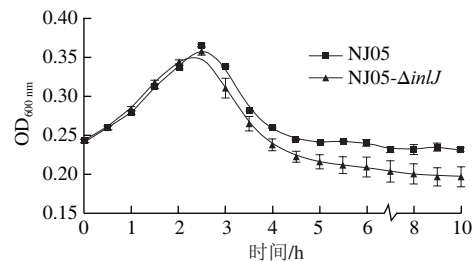


图7 噬菌体对*Lm* NJ05和*Lm* NJ05- Δ *inlJ*体外裂解活性
Fig. 7 Lytic activity of phage on *Lm* NJ05 and *Lm* NJ05- Δ *inlJ*

2.7 噬菌体对*Lm*生物被膜抑制及清除效果

由图8可知,*inlJ*基因缺失之后,*Lm* NJ05- Δ *inlJ*生物被膜形成能力显著降低($P < 0.01$),当噬菌体vB-LmoM-NJ05以 10^5 PFU/mL作用*Lm*,能够有效抑制生物被膜的形成,且对*Lm* NJ05- Δ *inlJ*抑制能力更强($P < 0.05$),同样以 $10^6 \sim 10^8$ PFU/mL噬菌体作用后,能够完全抑制生物被膜形成。利用噬菌体清除生物被膜的结果表明,当以 10^8 PFU/mL噬菌体作用时,能够完全清除*Lm* NJ05- Δ *inlJ*形成的生物被膜,与*Lm* NJ05呈显著差异(图9, $P < 0.001$)。由此可见,*inlJ*基因的缺失,使其生物被膜的形成能力减弱,从而使噬菌体对其清除力更为显著。

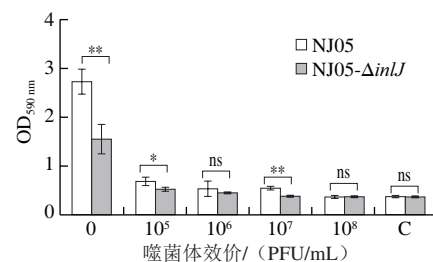


图8 噬菌体对*Lm* NJ05和*Lm* NJ05- Δ *inlJ*生物被膜抑制能力
Fig. 8 Biofilm inhibitory effect of phage against *Lm* NJ05 and *Lm* NJ05- Δ *inlJ*

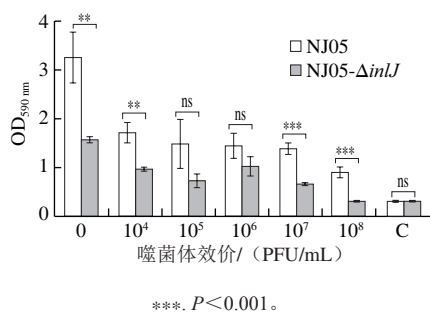


图9 噬菌体对*Lm* NJ05和*Lm* NJ05-Δ*inlJ*生物被膜清除能力
Fig. 9 Biofilm removal capacity of phage against *Lm* NJ05 and *Lm* NJ05-Δ*inlJ*

2.8 生物被膜形成相关基因的转录分析

flaA、*degU*、*agrA*、*agrD*和*luxS*等基因参与早期生物被膜形成，而*yneA*、*recA*和*hpt*等基因作用于生物被膜成熟阶段^[18]。RT-real-time PCR的结果表明，与*Lm* NJ05相比，*Lm* NJ05-Δ*inlJ*编码生物被膜相关基因*degU*、*agrA*、*agrD*、*luxS*、*yneA*、*recA*和*hpt*的转录水平平均下降（图10）。当噬菌体vB-LmoM-NJ05作用缺失株后，生物被膜相关基因转录水平下降极为明显，均呈下调趋势。由此可见，*inlJ*基因缺失负调控生物被膜形成相关基因的表达，降低生物被膜的形成能力。此外，当噬菌体作用后，生物被膜形成相关基因转录下调极为显著，从而缺失株生物被膜形成能力减弱，噬菌体对其更具清除能力。

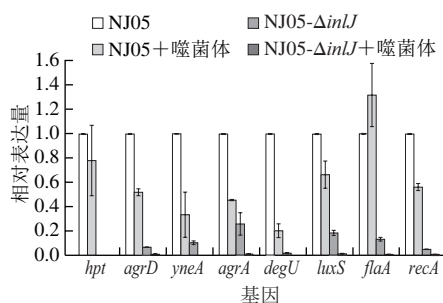


图10 生物被膜形成相关基因的表达分析
Fig. 10 Relative expression levels of biofilm formation-related genes

3 讨论

*Lm*表面蛋白是细菌代谢、群体感应、生物被膜形成和毒力基因表达调控的重要调节因子，与细菌致病性密切相关。由于表面蛋白的存在使*Lm*能够在低温环境中^[19]复制增殖，并且感染多种真核细胞^[20]。迄今为止，在*Lm*基因组中发现了41个编码LPXTG蛋白的基因^[21]，*inlA*是最早被发现的介导*Lm*入侵宿主细胞的LPXTG表面蛋白基因，其主要作用机制是与宿主细胞上的特异性受体结合，诱导非吞噬细胞将菌体内吞进入细胞内部寄生，许多研究表明*inlA*在穿透肠道屏障的过程中发挥重要

作用^[22]。*inlJ*是编码LPXTG蛋白的基因之一，任静静等^[23]发现，*inlJ*缺失株对小鼠的感染能力和毒力均降低。本研究中，*Lm* NJ05-Δ*inlJ*对RAW264.7细胞侵袭和黏附均显著降低，由此表明，*inlJ*参与了*Lm*的毒力作用机制。

噬菌体作为天然生物抑菌剂已在食品及医药领域受到越来越多的关注^[24]，由于其在去除致病菌污染^[25]和消除生物被膜^[26]的形成的优势，已被尝试用于水果、即食食品^[27]、奶酪和牛奶^[28]等食品的保鲜抑菌和人类疾病的临床治疗中^[29]。细菌可以通过多种方式避免被噬菌体感染^[30]，例如吸附阻断和阻碍噬菌体DNA的进入。在本研究中，重点分析了食源性*Lm* NJ05中*inlJ*基因作用特性，结果表明*inlJ*基因缺失使其对噬菌体vB-LmoM-NJ05的敏感性增强。缺失株*Lm* NJ05-Δ*inlJ*对噬菌体的EOP增加到2.72倍，噬菌斑更清晰透明，且噬菌体对*Lm* NJ05-Δ*inlJ*抑制活性更强。由此可见*inlJ*基因参与*Lm*与噬菌体的相互作用。

生物被膜能够保护微生物在不利环境中持续生长，使环境各介质之间反复交叉污染^[31]。王少辉等^[32]研究表明，*inlK*基因的缺失会导致*Lm*生物被膜形成能力显著降低。本研究中*inlJ*基因的缺失降低了*Lm*生物被膜的形成，这可能是InlJ与InlK一样同属于*Lm*表面蛋白，与细菌胞外蛋白或组织表面的物质发生相互作用，有利于*Lm*黏附在物体表面促进生物被膜的形成。此外，本研究发现噬菌体vB-LmoM-NJ05也能够很好地抑制和清除*Lm*生物被膜，特别是对于*Lm* NJ05-Δ*inlJ*缺失株，抑制效果更为明显，这可能与InlJ表面蛋白的缺失导致生物被膜的形成能力降低，噬菌体vB-LmoM-NJ05对*Lm* NJ05-Δ*inlJ*敏感性增强相关。*Lm*生物被膜的形成与很多因素相关，例如鞭毛糖蛋白相关因子FlaA、DegU，群体感应系统相关因子Agr、LuxS和胞外基质相关因子yneA、Hpt等^[33-36]。本研究发现*inlJ*基因的缺失导致参与生物被膜形成的相关基因表达降低，并且在*Lm* NJ05-Δ*inlJ*与噬菌体vB-LmoM-NJ05相互作用后，使这些基因几乎无应答。由此表明，*inlJ*基因缺失影响生物被膜基因表达，降低*Lm*生物被膜的形成能力，与噬菌体作用之后，生物被膜形成相关基因表达持续降低，以此抑制和清除生物被膜。综上所述，LPXTG蛋白会参与噬菌体与*Lm*间的识别及互作，目前暂未见相关报道，但其为LPXTG蛋白在噬菌体敏感性中的功能揭示将为噬菌体对抗菌和治疗中提供重要的理论支撑。

4 结论

通过同源重组技术成功构建了缺失株*Lm* NJ05-Δ*inlJ*，*inlJ*基因缺失对细胞的黏附和侵袭性下降，减弱了生物被膜形成能力，但对噬菌体的敏感性显著增强，进

而使噬菌体对缺失株*Lm* NJ05- Δ *inlJ*生物被膜的抑制和清除能力得到了显著提高,生物被膜形成相关基因的表达呈下调趋势。由此可见,作为LPXTG蛋白成员的InlJ参与噬菌体与*Lm*间的识别及相互作用,这为LPXTG蛋白新功能的揭示奠定了重要依据,为噬菌体的生物防治提供了新的理论依据。

参考文献:

- [1] FENG Y, WU S, VARMA J K, et al. Systematic review of human listeriosis in China, 1964-2010[J]. *Tropical Medicine & International Health*, 2013, 18(10): 1248-1256. DOI:10.1111/tmi.12173.
- [2] KLJUJEV I, RAICEVIC V, JOVICIC-PETROVIC J, et al. *Listeria monocytogenes*-danger for health safety vegetable production[J]. *Microb Pathogenesis*, 2018, 120: 23-31. DOI:10.1016/j.micpath.2018.04.034.
- [3] RAY L C, COLLINS J P, GRIFFIN P M, et al. Decreased incidence of infections caused by pathogens transmitted commonly through food during the COVID-19 pandemic-foodborne diseases active surveillance network, 10 U.S. Sites, 2017-2020[J]. *Morbidity and Mortality Weekly Report*, 2021, 70(38): 1332-1336. DOI:10.15585/mmwr.mm7038a4.
- [4] KHELEF N, LECUIT M, BUCHRIESER C, et al. *Listeria monocytogenes* and the genus *Listeria* in the prokaryotes: an evolving electronic resource for the microbiological community[M]. 3rd ed. New York: Springer, 2005.
- [5] COSTERTON J W, LEWANDOWSKI Z, DEBEER D, et al. Biofilms, the customized microniche[J]. *Journal of Applied Bacteriology*, 1994, 176(8): 2137-2142. DOI:10.1128/jb.176.8.2137-2142.1994.
- [6] 温绍霞, 孙竞. 细菌生物膜形成及相关耐药性治疗研究进展[J]. *海南医学*, 2014, 25(9): 1331-1333.
- [7] 王园, 孙琳珺, 程颖, 等. 食品加工环境胁迫因素对单核细胞增生李斯特菌生物膜形成的影响研究进展[J]. *食品科学*, 2021, 42(21): 246-255. DOI:10.7506/spkx1002-6630-20200702-034.
- [8] GRVNDLER T, QUEDNAU N, STUMP C, et al. The surface proteins InlA and InlB are interdependently required for polar basolateral invasion by *Listeria monocytogenes* in a human model of the blood-cerebrospinal fluid barrier[J]. *Microbes and Infection*, 2013, 15(4): 291-301. DOI:10.1016/j.micinf.2012.12.005.
- [9] SABET C, LECUIT M, CABANES D, et al. LPXTG protein InlJ, a newly identified internalin involved in *Listeria monocytogenes* virulence[J]. *Infection and Immunity*, 2005, 73(10): 6912-6922. DOI:10.1128/IAI.73.10.6912-6922.2005.
- [10] SABET C, TOLEDO-ARANA A, PERSONNIC N, et al. The *Listeria monocytogenes* virulence factor InlJ is specifically expressed *in vivo* and behaves as an adhesin[J]. *Infection and Immunity*, 2008, 76(4): 1368-1378. DOI:10.1128/IAI.01519-07.
- [11] CAPESTANY C A, KUBONIWA M, JUNG I Y, et al. Role of the *Porphyromonas gingivalis* InlJ protein in homotypic and heterotypic biofilm development[J]. *Infection and Immunity*, 2006, 74(5): 3002-3005. DOI:10.1128/IAI.74.5.3002-3005.2006.
- [12] CHEGINI Z, KHOSHAYANH A, TAATI M M, et al. Bacteriophage therapy against *Pseudomonas aeruginosa* biofilms: a review[J]. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*, 2020, 19(1): 45. DOI:10.1186/s12941-020-00389-5.
- [13] GONG C, JIANG I X. Application of bacteriophages to reduce *Salmonella* attachment and biofilms on hard surfaces[J]. *Poultry Science*, 2017, 96(6): 1838-1848. DOI:10.3382/ps/pew463.
- [14] ŁUSIAK-SZELACHOWSKA M, WEBER-DABROWSKA B, GÓRSKI A. Bacteriophages and lysins in biofilm control[J]. *Virologica Sinica*, 2020, 35(2): 125-133. DOI:10.1007/s12250-019-00192-3.
- [15] SHEN Y, BOULOS S, SUMRALL E, et al. Structural and functional diversity in *Listeria* cell wall teichoic acids[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2017, 292(43): 17832-17844. DOI:10.1074/jbc.M117.813964.
- [16] PARSONS C, AZIZOGLU R, ELHANAFI D, et al. Mutant construction and integration vector-mediated genetic complementation in *Listeria monocytogenes*[J]. *Methods in Molecular Biology*, 2021, 2220: 177-185. DOI:10.1007/978-1-0716-0982-8_14.
- [17] TIAN Y, WU L, ZHU M, et al. Non-coding RNA regulates phage sensitivity in *Listeria monocytogenes*[J]. *PLoS ONE*, 2021, 16(12): e0260768. DOI:10.1371/journal.pone.0260768.
- [18] 柯春林, 方维焕. 单增李斯特菌生物膜及其形成机制的研究进展[J]. *中国微生态学杂志*, 2011, 23(6): 574-577. DOI:10.13381/j.cnki.cjm.2011.06.004.
- [19] BOREZEE E, PELLEGRINI E, BERCHE P. OppA of *Listeria monocytogenes*, an oligopeptide-binding protein required for bacterial growth at low temperature and involved in intracellular survival[J]. *Infection and Immunity*, 2000, 68(12): 7069-7077. DOI:10.1128/IAI.68.12.7069-7077.2000.
- [20] 王海艳, 刘中学, 石新华, 等. 单增李斯特菌及其表面蛋白的研究进展[J]. *检验检疫科学*, 2006(2): 76-80.
- [21] CABANES D, SOUSA S, CEBRIAA, et al. Gp96 is a receptor for a novel *Listeria monocytogenes* virulence factor, Vip, a surface protein[J]. *EMBO Journal*, 2005, 24: 2827-2838.
- [22] BONAZZI M, ESTEBAN V, PIZARRO-CERDÁ J, et al. Successive post-translational modifications of E-cadherin are required for InlA mediated internalization of *Listeria monocytogenes*[J]. *Cellular Microbiology*, 2008, 10(11): 2208-2222. DOI:10.1111/j.1462-5822.2008.01200.x.
- [23] 任静静. 单增李斯特菌 Δ *inlABJ*缺失株构建及炎性因子对小鼠鼠脑屏障损伤作用研究[D]. 石河子: 石河子大学, 2020. DOI:10.27332/d.cnki.gshzu.2020.000002.
- [24] SULAKVELIDZE A. Using lytic bacteriophages to eliminate or significantly reduce contamination of food by foodborne bacterial pathogens[J]. *Journal of the Science Food and Agriculture*, 2013, 93(13): 3137-3146. DOI:10.1002/jsfa.6222.
- [25] 阮红日. 金黄色葡萄球菌噬菌体的分离鉴定及其对生物被膜的作用研究[D]. 大庆: 黑龙江八一农垦大学, 2021. DOI:10.27122/d.cnki.ghlnu.2021.000074.
- [26] 田爽. 嗜麦芽芽孢单胞菌噬菌体TS-10的分离鉴定及对细菌生物膜作用的研究[D]. 长春: 吉林大学, 2022. DOI:10.27162/d.cnki.gjlin.2022.001240.
- [27] GUENTHER S, HERZIG O, FIESELER L, et al. Biocontrol of *Salmonella* Typhimurium in RTE foods with the virulent bacteriophage FO1-E2[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2012, 154(1/2): 66-72. DOI:10.1016/j.ijfoodmicro.2011.12.023.
- [28] 孙新城, 赵成鑫, 胡旭阳, 等. 噬菌体在食品安全领域中的应用[J]. *中国病原生物学杂志*, 2022, 17(4): 479-482. DOI:10.13350/j.cjpb.220423.
- [29] 钟彦伟, 成军, 施双双, 等. HBsAg人源噬菌体单抗抗体的筛选及其在临床诊断中的应用[J]. *中华实验和临床病毒学杂志*, 2002(03): 23-25.
- [30] LABRIE S J, SAMSON J E, MOINEAU S. Bacteriophage resistance mechanisms[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2010, 8(5): 317-27. DOI:10.1038/nrmicro2315.
- [31] 张园园, 周聪, 郭依萍, 等. 肉及肉制品中单核细胞增生李斯特菌交叉污染的研究进展[J]. *食品科学*, 2022, 43(11): 293-300. DOI:10.7506/spkx1002-6630-20210505-026.
- [32] 王少辉, 刘萍萍, 魏建超, 等. 单增李斯特菌*inlK*基因缺失株的构建及其生物学特性分析[J]. *中国动物传染病学报*, 2017, 25(4): 19-23. DOI:10.16431/j.cnki.1671-7236.2022.05.027.
- [33] 柯春林, 方维焕. 单增李斯特菌生物膜及其形成机制的研究进展[J]. *中国微生态学杂志*, 2011, 23(6): 574-577. DOI:10.13381/j.cnki.cjm.2011.06.004.
- [34] MURRAY J E, KILEY T B, STANLEY-WALL N R. A pivotal role for the response regulator DegU in controlling multicellular behaviour[J]. *Microbiology*, 2009, 155: 1-8. DOI:10.1099/mic.0.023903-0.
- [35] AURÉLIE R, STÉPHANIE W, DOMINIQUE G, et al. Agr system of *Listeria monocytogenes* EGD-e: role in adherence and differential expression pattern[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2007, 73(19): 6125-6133. DOI:10.1128/AEM.00608-07.
- [36] CHALLAN B S, GAL L, MARGIEWES S, et al. Assessment of the roles of LuxS, S-ribosyl homocysteine, and autoinducer 2 in cell attachment during biofilm formation by *Listeria monocytogenes* EGD-e[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2006, 72(4): 2644-2650. DOI:10.1128/AEM.72.4.2644-2650.2006.