

研究报告

单增李斯特菌新疆分离株 *lmo0160* 基因克隆及序列分析

张奇文 凌晨 马勋* 杜冬冬 钱凌霄 李红欢

(石河子大学动物科技学院 新疆 石河子 832000)

摘要:【目的】单增李斯特菌是一种重要的食源性致病菌，常引起人和动物致病。其细胞壁表面 LPXTG 基序蛋白在单增李斯特菌致病过程中发挥重要作用，根据参考株全序列预测的 41 个 LPXTG 基序蛋白中仍有部分蛋白功能未知。对单增李斯特菌新疆绵羊脑分离株 LM90SB2 的 LPXTG 基序蛋白 *Lmo0160* 的基因进行克隆及生物信息学分析，为功能验证提供基础。【方法】根据 GenBank 中收录的 *lmo0160* 序列设计特异性引物，利用 PCR 方法对新疆分离株的 *lmo0160* 基因进行扩增，将扩增产物克隆到 pMD19-T 载体，进行 PCR、双酶切鉴定及序列测定，并对基因核苷酸序列和蛋白序列进行分析。【结果】分离株 LM90SB2 的 *lmo0160* 序列全长为 1 708 bp，包含 1 428 bp 的开放阅读框，共编码 475 个氨基酸；LM90SB2 株 *lmo0160* 核苷酸序列与 CFSAN008100 株(4b 型，美国)、CFSAN023463 株(4b 型，美国)、J2-064 株(4b 型，美国)、F2365 株(4b 型，奶酪，美国)和 NTSN 株(4b 型，绵羊脑，中国扬州)相似性为 99.0%–99.1%；与 M7 株(4a 型，牛奶，中国浙江)相似性为 97.2%，与 Finland1998 株(1/2a 型，美国)、N53-1 株(1/2a 型，熟火腿，瑞士)、N1546 株(1/2a 型，鱼，丹麦)和 EGD-e 株(1/2a 型，美国)相似性为 87.2%–91.1%；其推导的氨基酸序列与上述菌株相似性为 91.8%–99.4%。系统进化树显示，LM90SB2 菌株的 *lmo0160* 基因与 CFSAN023463、F2365 和 NSTN 菌株亲缘关系较近，处于同一分支上，而与标准株 EGD-e 菌株亲缘关系较远。蛋白质二级结构预测表明，LM90SB2 的 *Lmo0160* 蛋白为亲水性蛋白，无信号肽，不形成跨膜结构。蛋白结构域预测表明 *Lmo0160* 蛋白含有胶原蛋白结合域和 Cna B 结构域。【结论】克隆了 LM90SB2 的 *lmo0160* 基因，为进一步研究 LM90SB2 的 *lmo0160* 基因功能奠定了基础。

关键词: 单增李斯特菌，*lmo0160* 基因，克隆，生物信息学分析

Cloning and sequence analysis of *lmo0160* gene of *Listeria monocytogenes* strain from Xinjiang

ZHANG Qi-Wen LING Chen MA Xun* DU Dong-Dong
QIAN Ling-Xiao LI Hong-Huan

(College of Animal Science and Technology, Shihezi University, Shihezi, Xinjiang 832000, China)

Abstract: [Objective] *Listeria monocytogenes*, an important food-borne pathogenic bacteria, often

Foundation item: National Natural Science Foundation of China (No. 31360614)

*Corresponding author: E-mail: maxun779@126.com

Received: July 06, 2017; **Accepted:** September 11, 2017; **Published online** (www.cnki.net): September 11, 2017
基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 31360614)

*通讯作者: E-mail: maxun779@126.com

收稿日期: 2017-07-06; 接受日期: 2017-09-11; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2017-09-11

causes human and animal diseases. The cell wall surface proteins with an LPXTG motif play an important role in the pathogenic process of *L. monocytogenes*. According to the whole sequence of the reference strain, the function of some proteins among the 41 predicted LPXTG motif proteins is unknown. The aim of this study is to clone and bioinformatics analysis of the gene of LPXTG motif protein Lmo0160 of *L. monocytogenes* LM90SB2 isolated from diseased sheep in Xinjiang. It could provide the foundation for functional verification. **[Methods]** A pair of specific primers was designed according to the predicted sequence of *L. monocytogenes lmo0160* gene in GenBank. The *lmo0160* gene was amplified by PCR, and the amplified products were cloned into pMD19-T vector and verified by PCR, restriction endonuclease digestion and sequencing. In addition, the bioinformatics on nucleotide sequence of *lmo0160* gene of LM90SB2 strain as well as putative protein structure had been analyzed. **[Results]** The sequence length of LM90SB2 *lmo0160* gene was 1 708 bp, containing a 1 428 bp open reading frame (ORF) encoding 475 amino acids. The nucleotide sequence similarity of *lmo0160* gene of LM90SB2 strain was 99.0%–99.1% with FSAN008100 strain (serotype 4b, USA), CFSAN023463 strain (serotype 4b, USA), J2-064 strain (serotype 4b, USA), F2365 strain (serotype 4b, cheese isolate, USA) and NTSN strain (serotype 4b, sheep brain isolate, Yangzhou, China), 97.2% with M7 strain (serotype 4a, cow's milk isolated, Zhejiang, China), and 87.2%–91.1% with Finland 1998 strain (serotype 1/2a, USA), N53-1 strain (serotype 1/2a, fish isolate, Denmark), N1546 strain (serotype 1/2a, cooked ham isolate, Switzerland) and EGD-e strain (serotype 1/2a, USA). Its putative amino acid sequence similarity was 91.8%–99.4% with above strains. The phylogenetic tree showed that the *lmo0160* gene of LM90SB2 strain was closely relative with CFSAN023463, F2365 and NTSN strains which were in the same branch. However, it was genetically far to the international standard strain EGD-e. The secondary structure prediction showed that LM90SB2 Lmo0160 was hydrophilic protein without signal peptide and transmembrane structure. The protein domain prediction showed that Lmo0160 protein had collagen binding domain and collagen-binding surface protein Cna-like, B-type domain (Cna B). **[Conclusion]** The *lmo0160* gene of LM90SB2 strain was successfully cloned. The cloning and analysis of *lmo0160* gene provide an important foundation for further study of *lmo0160* gene.

Keywords: *Listeria monocytogenes*, *lmo0160* gene, Cloning, Bioinformatics analysis

李斯特菌属包括单增李斯特菌 (*Listeria monocytogenes*, LM 或 *L. monocytogenes*)、伊氏李斯特菌 (*L. ivanovii*)、英诺克李斯特菌 (*L. innocua*)、威尔斯李斯特菌 (*L. welshimeri*)、西尔李斯特菌 (*L. seeligeri*) 和格氏李斯特菌 (*L. grayi*) 6 种菌^[1], 在李斯特菌属中, LM 是唯一能引起人和动物发病的重要食源性人畜共患病病原菌。20 世纪 90 年代, LM 已被世界卫生组织 (WHO) 列为仅次于大肠杆菌 O157、沙门氏菌、志贺氏菌后的第四大重要的食源性致病菌^[2]。

LM 是革兰氏阳性短杆菌, 是一种常见的食源性致病菌, 广泛分布于自然界中, 有较强的环境适应性, 可在低温、高盐、酸碱等不利的环境条

件下生长繁殖^[3], 通过多种途径进入食品及食品加工环境。LM 作为一种具有侵袭性的胞内寄生菌, 可穿越宿主肠道屏障、胎盘屏障、血脑屏障, 入侵宿主体体后可在吞噬细胞和非吞噬细胞内存活并大量增殖。临床上引起肠胃炎、脑膜炎、败血症、流产等症状, 尤其对新生儿、妊娠母畜和免疫功能不全者的发病率和死亡率均较高^[4]。LM 的感染过程主要包括: 抵抗宿主体内环境的应激、侵袭、感染及胞间扩散等, 这些都与 LM 的一系列毒力因子表达及调控相关。

LM 共表达 2 853 种蛋白, 其中 133 种属于表面蛋白^[5]。LM 表面蛋白的数量和类型比其他任何细菌都丰富, 这些表面蛋白在 LM 感染机体过程中

起着重要的作用。其中有一类表面蛋白, 其前体蛋白 C 端含有保守基序 LPXTG (Leu-Pro-X-Thr-Gly), 这些蛋白由分选酶 Sort A 通过识别 LPXTG 保守基序, 将蛋白共价结合到细胞壁肽聚糖上, 呈现在细胞表面, 在感染机体过程中发挥重要毒力作用^[6]。

对标准株 EGD-e 全基因组序列分析发现, 该菌株含有 41 个 LPXTG 保守基序蛋白, 但目前仅有部分蛋白的功能被研究。Popowska 等^[7]对 *Lmo0327* 的研究发现, 该蛋白具有胞壁质酶水解活性, 缺失后不会降低侵染和黏附人胚胎上皮细胞的水平, 但在细胞分裂和胞壁质翻转中起到重要作用。Cummins 等^[8]通过小鼠口腔感染 *Lmo0842* 缺失株, 明显减少了在小鼠肝脏和脾脏的载菌量, 但并未证实 *Lmo0842* 缺失后对 Caco-2 细胞的侵袭具有增强的作用。Pucciarelli 等^[9]研究发现, *Lmo0433* (*InlA*)与宿主受体 E-cadherin 特异性结合可介导 LM 对上皮细胞的黏附、侵入, 提前终止 *InlA* 蛋白表达可显著降低 LM 对宿主细胞黏附和侵袭能力, 证实了该蛋白结构完整性对黏附侵袭能力及致病力起到关键作用。表面蛋白 *Lmo0160* 是预测的 41 个蛋白之一, 其功能目前尚未研究。本研究对 LM90SB2 菌株 *lmo0160* 基因进行 PCR 扩增、克隆及测序, 并对其编码蛋白进行生物信息学分析, 为探讨 *lmo0160* 基因在 LM90SB2 致病和生存中的功能奠定基础。

1 材料与方法

1.1 菌株和质粒

单增李斯特菌 LM90SB2 分离自新疆某羊场患李斯特菌病绵羊脑组织, 血清型为 4b 型; 大肠杆菌 (*Escherichia coli*) DH5 α 购自北京全式金生物技术有限公司。

1.2 主要试剂和仪器

Trans5K DNA Marker、*Pfu* Polymerase、10 \times *Pfu* PCR buffer (含 MgCl₂), 北京全式金生物技术有限公司; 细菌基因组 DNA 提取试剂盒, 天根生化科技(北京)有限公司; 琼脂糖凝胶电泳回收试剂盒,

北京诺维森生物科技有限公司; dNTP mix、ddH₂O、pMD19-T 载体宝生物工程(大连)有限公司; BHI 培养基, 青岛高科园海博生物技术有限公司; LB 培养基(g/L): 胰蛋白胨 10.0, 酵母提取物 5.0, NaCl 10.0, pH 7.4。

生物安全柜, 美国 Baker 公司; CR22E 高速冷冻离心机, 日本日立公司; 隔水式电热恒温培养箱, 北京永光明医疗仪器厂; PCR 扩增仪, 美国 Thermo 公司; 电泳凝胶成像仪, 美国 Bio-Rad 公司。

1.3 引物设计与合成

参考菌株 LM F2365 (GenBank 登录号为 AE017262)公布的基因序列, 运用 Primer 5.0 软件设计 *lmo0160* 序列特异性引物, 预期扩增片段长度为 1 708 bp。*lmo0160*-F: 5'-CGGAATTCATGAAGAAACGCACGACAAT-3' (含 *EcoR* I 酶切位点和保护碱基); *lmo0160*-R: 5'-AACTGCAGAAA TAGCTACGAGCAGTATTCCC-3' (含 *Pst* I 酶切位点和保护碱基)。引物由北京六合华大基因科技有限公司合成。

1.4 菌株培养及基因组 DNA 提取

将实验室保存的 LM90SB2 菌株接种于 BHI 平板, 37 °C 培养 16–18 h, 挑取单个菌落接种于 BHI 液体培养基中 37 °C、180 r/min 培养 16–18 h, 用 1.5 mL 试管收集菌体, 参考细菌基因组 DNA 提取试剂盒说明书提取 LM90SB2 全基因组 DNA, 于 -20 °C 保存备用。

1.5 PCR 扩增目的条带

以 LM90SB2 全基因组 DNA 为模板, 以 *lmo0160*-F 和 *lmo0160*-R 为上下游引物扩增目的片段。PCR 反应体系(50 μ L): 10 \times *Pfu* PCR buffer (含 MgCl₂) 5.0 μ L, dNTP mix (2.5 mmol/L) 2.0 μ L, *Pfu* Polymerase (5 U/ μ L) 0.5 μ L, 上下游引物 (10 μ mol/L)各 1.0 μ L, DNA 模板 1.0 μ L、ddH₂O 补足 50 μ L。PCR 反应条件: 95 °C 5 min; 95 °C 30 s, 60 °C 30 s, 72 °C 2.5 min, 35 个循环; 72 °C 10 min。同时设置空白对照组。取 7 μ L 扩增产物

于 1% 琼脂糖凝胶电泳检测。

1.6 目的基因克隆及测序

PCR 扩增产物经琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒回收后, 与 pMD19-T 载体连接过夜, 冷热激法将连接产物转化至大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞, 涂布于含 Amp^r (100 μ g/mL) 的 LB 固体培养基上, 37 $^{\circ}$ C 培养 12–16 h。挑取单菌落通过菌液 PCR 筛选出阳性克隆菌送北京六合华大基因科技有限公司测序。

1.7 生物信息学分析

用 DNAMAN 软件进行序列比对, 用 MEGA 6.0 软件构建不同来源菌株 *lmo0160* 基因系统进化树; 利用 ProtParam 软件 (<http://web.expasy.org/protparam/>) 分析 *lmo0160* 基因序列的基本理化性质; 利用 SignalP 4.1 Server 软件 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) 预测蛋白质的信号肽; 利用 TMHMM 软件 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>) 分析蛋白质跨膜结构; 利用 TargetP 1.1 Server 在线软件 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/>) 预测 Lmo0160 蛋白在细胞内的定位; 利用 SMART 软件 (http://smart.embl-heidelberg.de/smart/set_mode.cgi?NORMAL=1) 预测蛋白质的结构域; 利用 SOPMA 软件 (https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_sopma.html) 和 SWISS-MODEL 软件 (<http://swissmodel.expasy.org/>) 预测蛋白质二级结构和三级结构。

2 结果与分析

2.1 *lmo0160* 基因 PCR 扩增及克隆测序

利用特异性引物扩增出 *lmo0160* 基因序列, 经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测得到约 1 708 bp 片段, 目的条带清晰、单一, 与预期片段大小一致(图 1)。经测序 *lmo0160* 基因序列长为 1 708 bp, 结果显示获得阳性转化子。在 NCBI 上对获得的 *lmo0160* 基因序列进行分析, 该基因开放阅读框为 1 428 bp, 共编码 475 个氨基酸。

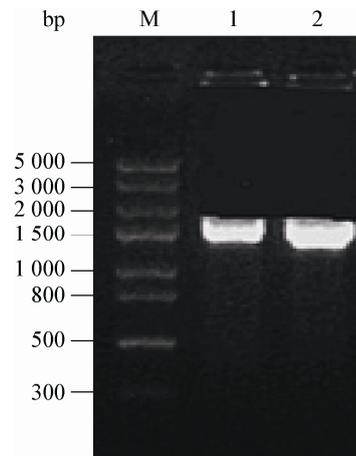


图 1 LM90SB2 *lmo0160* 基因 PCR 扩增结果

Figure 1 Amplification product of *lmo0160* gene from LM90SB2 by PCR

注: M: Trans5K DNA Marker; 1, 2: LM90SB2 菌株 *lmo0160* 基因扩增产物。

Note: M: Trans5K DNA Marker; 1, 2: *lmo0160* gene amplification products of LM90SB2.

2.2 *lmo0160* 核苷酸序列同源性比对

将克隆测序所得 LM90SB2 的 *lmo0160* 核苷酸序列与 GenBank 上公布的 10 株不同来源的 *lmo0160* 核苷酸序列进行同源性比对。结果显示, LM90SB2 的 *lmo0160* 核苷酸序列与国际标准株 EGD-e 株(1/2a 型)的相似性为 87.2%; 与 F2365 株(4b 型, 奶酪, 美国)、NTSN 株(4b 型, 绵羊脑, 中国扬州)、CFSAN008100 株(4b 型, 美国)、CFSAN023463 株(4b 型, 美国)和 J2-064 株(4b 型, 美国)相似性均达到 99.0% 以上; 与 M7 株(4a 型, 牛奶, 中国浙江)相似性为 97.2%; 与 Finland 株(1/2a 型, 美国)、N53-1 株(1/2a 型, 熟火腿, 瑞士)和 N1546 株(1/2a 型, 鱼, 丹麦)相似性均为 91.1% (图 2)。

2.3 *lmo0160* 编码氨基酸的同源性比对

利用 DNASTar 软件推导出 LM90SB2 的 *lmo0160* 编码的氨基酸序列, 将其与 10 株不同来源 *lmo0160* 编码的氨基酸序列进行同源性比对。结果显示, LM90SB2 的 *lmo0160* 编码的氨基酸序列与 F2365 株(4b 型, 美国)、CFSAN008100 株(4b 型, 美国)、CFSAN023463 株(4b 型, 美国)、J2-064 株(4b

型, 美国)和 NTSN 株(4b 型, 中国扬州)相似性为 99.2%–99.4%; 与 M7 株(4a 型, 中国浙江)相似性为 96.2%; 与国际标准株 EGD-e 株(1/2a 型)、美国 Finland 株(1/2a 型)、瑞士 N53-1 株(1/2a 型)和丹麦 N1546 株(1/2a 型)相似性均为 91.8% (图 2)。

2.4 *lmo0160* 基因序列的系统进化分析

为了研究 LM90SB2 *lmo0160* 基因的分子进化关系, 使用 MEGA 6.0 软件, 采用邻接法 (Neighbor-Joining, NJ), 利用自举分析 (Bootstrap, 1 000 次重复) 检验各分支的置信度, 构建该基因及 GenBank 中检索到的 10 株其他来源基因编码区序列的分子系统进化树。如图 3 所示, 分子系统进化关系与血清型有密切关系, 而与菌株来源关系不大。其中 LM90SB2 与 4b 血清型菌株 (NTSN、F2365、CFSAN023463、J2-064 和 CFSAN008100) 形成一支, 与中国 M7 株(4a 型) 聚类成一个类群, 它们亲缘性关系较近; 而 1/2a 血清型的国际标准株 EGD-e 株、Finland1998 株、N1546 株和 N53-1 株形成另一个分支, 与

LM90SB2 株亲缘性关系较远。

2.5 *lmo0160* 蛋白理化性质分析

利用 ExPASy 在线软件中 ProtParam 工具分析 LM90SB2 的 *lmo0160* 基因编码蛋白的理化性质, 该蛋白分子质量约为 51.83 kD, 其分子式为 $C_{2307}H_{3603}N_{589}O_{761}S_2$, 含有 51 个强碱性氨基酸(R、H、K)、73 个强酸性氨基酸(D、E)、174 个疏水性氨基酸(A、I、L、M、F、P、W、V); 极性氨基酸总数 301 个: 177 个极性不带电氨基酸(N、C、Q、G、S、T、Y)、51 个极性带正电氨基酸(R、H、K)、73 个极性带负电氨基酸(D、E); 理论等电点 (PI) 为 4.61; 带负电荷的残基总数为 73 个, 带正电荷的残基总数为 45 个; 不稳定指数为 19.89, 根据 Guruprasad 方法表明 *Lmo0160* 蛋白为稳定性蛋白; 脂溶指数为 75.45, 总疏水性平均数为 -0.578。ProtScale 在线工具进一步预测表明, *Lmo0160* 氨基酸序列中疏水最大值为 1.978, 最小值为 -3.000, 大部分氨基酸属于亲水性氨基酸, 可见该蛋白属于亲水性蛋白(图 4)。

核苷酸一致性 Nucleotide percent identity (%)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11		
1	▲	99.1	99.1	87.2	99.0	91.1	99.1	97.2	91.1	91.1	99.0	1	▲ <i>Listeria monocytogenes</i> LM90SB2
2	99.4	▲	100.0	89.7	99.7	91.4	100.0	97.5	91.4	91.4	99.7	2	<i>Listeria monocytogenes</i> CFSAN008100
3	99.2	99.8	▲	89.7	99.7	91.4	100.0	97.5	91.4	91.4	99.7	3	<i>Listeria monocytogenes</i> CFSAN023463
4	91.8	94.6	94.6	▲	89.5	99.9	89.7	91.0	99.9	99.9	89.5	4	<i>Listeria monocytogenes</i> EGD-e
5	99.2	99.8	99.7	94.4	▲	91.3	99.7	97.4	91.2	91.3	100.0	5	<i>Listeria monocytogenes</i> F2365
6	91.8	94.7	94.7	99.8	94.6	▲	91.4	91.6	99.8	99.8	91.3	6	<i>Listeria monocytogenes</i> Finland1998
7	99.4	100.0	99.8	94.6	99.8	94.7	▲	97.5	91.4	91.4	99.7	7	<i>Listeria monocytogenes</i> J2-064
8	96.2	98.4	98.3	94.2	98.2	94.4	98.4	▲	91.4	91.4	97.4	8	<i>Listeria monocytogenes</i> M7
9	91.8	94.7	94.7	99.8	94.6	100.0	94.7	94.4	▲	99.9	91.2	9	<i>Listeria monocytogenes</i> N53-1
10	91.8	94.6	94.6	100.0	94.4	99.8	94.6	94.2	99.8	▲	91.3	10	<i>Listeria monocytogenes</i> N1546
11	99.2	99.8	99.8	94.4	100.0	94.6	99.8	98.4	94.6	94.4	▲	11	<i>Listeria monocytogenes</i> NTSN
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11		

氨基酸一致性 Amino percent identity (%)

图 2 不同菌株 *lmo0160* 核苷酸和氨基酸序列与参考菌株同源性比对分析

Figure 2 Homology analysis of nucleotide and amino acid sequences of *lmo0160* gene in various strains

注: 右上角表示 *lmo0160* 基因核苷酸同源性, 左下角表示 *lmo0160* 基因氨基酸同源性。

Note: The right corner of *lmo0160* nucleotide homology and the left corner of *lmo0160* amino acid homology.

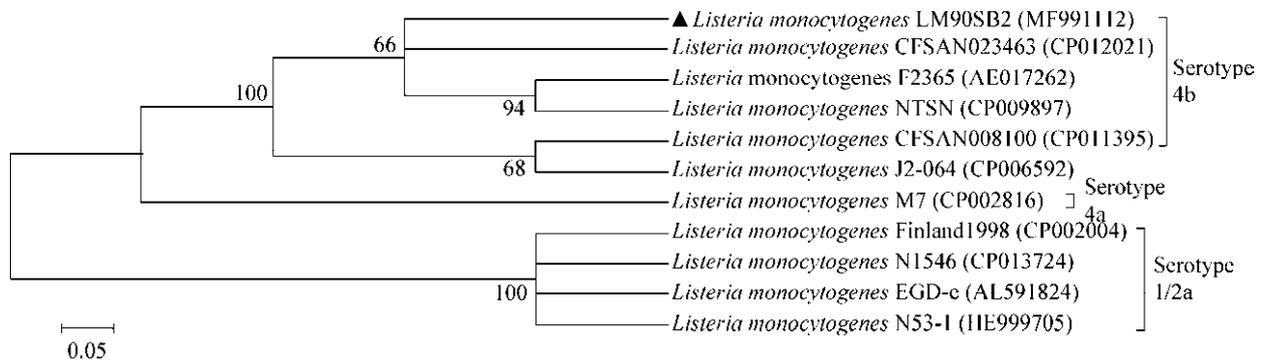


图3 LM90SB2的 *lmo0160* 核苷酸序列的系统进化树分析

Figure 3 Phylogenetic tree analysis of nucleotide sequences of *lmo0160* gene of LM90SB2

注：括号中的序号表示 GenBank 登录号；分支上的数字表示 Bootstrap 检验值(>60 的 Bootstrap 值较为可信)；标尺表示每单位核苷酸的变化(0.05 表示在两个序列中有 5% 的变化)。

Note: The numbers in parenthesis represent GenBank accession numbers; The numbers on each branch indicate the bootstrap values (believable if >60); Scale represents the nucleotide changes in per unit (0.05 means 5% changes were observed between two sequences).

2.6 Lmo0160 蛋白跨膜区及信号肽分析

利用 TMHMM 2.0 Server 在线服务器分析 Lmo0160 蛋白跨膜结构域, 结果显示 Lmo0160 蛋白无跨膜螺旋, 均处于膜外, 不存在跨膜结构。利用 SignalP 4.1 Server 在线服务器分析发现, 该蛋白无信号肽序列。

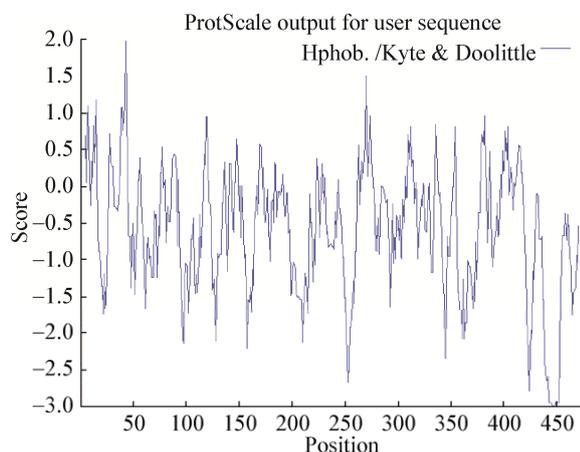


图4 LM90SB2的 Lmo0160 蛋白疏水性分析

Figure 4 Analysis hydrophobicity of Lmo0160 protein of LM90SB2

注：横轴为氨基酸位置, 纵轴为疏水性得分; 正值表示疏水性, 负值表示亲水性。

Note: The horizontal axis stands for the position of amino acids in this protein and vertical axis stands for the hydrophobicity. The positive value of vertical axis represent hydrophobicity and the negative value represent hydrophobicity.

2.7 Lmo0160 蛋白结构预测

利用 ExPASy 软件中 TargetP 程序分析 Lmo0160 蛋白进行亚细胞定位显示, 分泌信号通路位点(SP)占比为 0.112, 说明该蛋白不属于分泌型蛋白。利用 SMART 软件对 Lmo0160 蛋白结构域预测, 结果表明, Lmo0160 蛋白的 100–226 位氨基酸为胶原结合域; 259–329 位和 351–420 位氨基酸为 Cna B 结构域(图 5)。利用 SOPMA 软件预测 Lmo0160 蛋白的二级结构发现, 无规卷曲 234 个, 占 49.26%; 延伸链 139 个, 占 29.26%; α -螺旋 58 个, 占 12.21%; β -转角 44 个, 占 9.26% (图 6)。SWISS-MODEL 分析平台预测该蛋白的三级结构(图 7), 进一步验证了二级结构的预测。

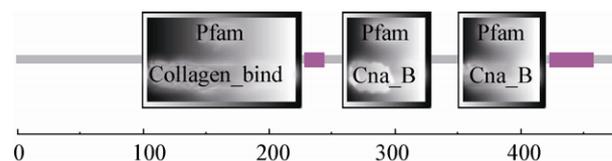
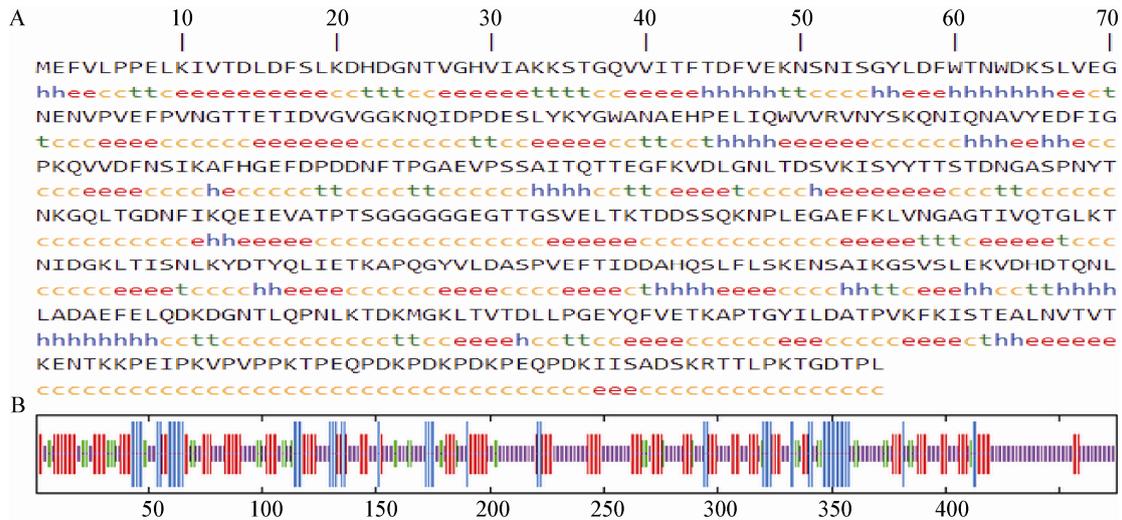


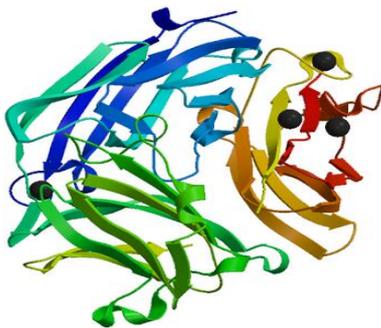
图5 LM90SB2的 Lmo0160 蛋白的结构域预测

Figure 5 The predicted structure domain of Lmo0160 protein of LM90SB2

图 6 LM90SB2 *Lmo0160* 蛋白的二级结构预测Figure 6 The predicted secondary structure of *Lmo0160* protein of LM90SB2

注: A: h: α -螺旋; t: β -转角; c: 无规则卷曲; e: 延伸链。B: 图中线条按照从长到短依次代表 α -螺旋、延伸链、 β -转角和无规则卷曲。

Note: A: h: Alpha helix; t: Beta turn; c: Random coli; e: Beta extended strand. B: The lines in the picture represent alpha helix, beta extended strand, beta turn and random coli respectively by the length.

图 7 LM90SB2 *Lmo0160* 蛋白的三级结构预测Figure 7 The predicted tertiary structure of *Lmo0160* protein of LM90SB2

3 讨论

细菌表面蛋白参与细胞各种生理和生化过程的调节, 其结构与功能十分复杂。例如参与细菌生长、应激、耐受环境压力胁迫、致病性、黏附与侵袭宿主细胞、免疫防御等重要过程。同样, 表面蛋白对 LM 也至关重要, 可使其广泛生存于不同环境中, 包括食物和真核细胞胞质^[10-12]。EGD-e 含有 133 个表面蛋白, 根据不同的锚定系统和潜在

结构域, 将其表面蛋白分为 4 种, 分别为 LPXTG 表面蛋白、疏水性尾部蛋白、GW 蛋白和脂蛋白^[13]。其中 LPXTG 表面蛋白可通过分选酶 Sort A 锚定到细菌细胞壁表面, 在感染机体过程中发挥重要毒力作用^[14]。

对 LM 参考菌株全基因组进行生物信息学研究, 预测 LM 表面有 41 个 LPXTG 基序蛋白。目前, 国内外已有研究者对部分 LPXTG 基序蛋白进行了初步研究, 如 InlA (Lmo0433)^[15]、InlF^[16]、InlJ^[17-19]、Lmo2085^[20]、Vip (lmo0320)^[21]、LapB (lmo1666)^[22-23]、InlH (lmo0263)^[24]、Lmo0327^[7]、Lmo0842^[25]、Lmo1413^[13]、Lmo1290^[26]、P60^[27]等, 但 Lmo0130、Lmo0160、Lmo0610、Lmo0842、Lmo0880、Lmo0159、Lmo2714 等这些 LPXTG 基序蛋白功能未见相关报道。本试验采用 PCR 方法从 LM90SB2 菌株克隆 *lmo0160* 基因, 经测序、拼接和比对后获得 *lmo0160* 全长序列 1 708 bp, 开放阅读框为 1 428 bp, 共编码 475 个氨基酸。同源性比对分析显示: LM90SB2 菌株 *lmo0160* 核苷酸序列与 4b 血清型菌株相似性较高,

为 99.0%–99.1%，其次与 4a 血清型菌株相似性为 97.2%，与 1/2a 血清型菌株相似性为 87.2%–91.1%；而其编码氨基酸序列相似性均较高，为 91.8%–99.4%。系统进化树结果显示，LM90SB2 菌株 *lmo0160* 基因与 4b 血清型菌株亲缘关系较近，处在同一分支上。*lmo0160* 基因同源性和进化树结果发现，同一血清型菌株 *lmo0160* 基因序列相似性高且聚集在同一进化分支上，提示 *lmo0160* 基因可能在不同血清型菌株中有一定变异，利用 *lmo0160* 基因构建进化树可将同一血清型聚类。本试验结果与童文彬^[28]利用肠道病毒的核苷酸序列构建进化树判断毒株血清型的结果一致。

LM90SB2 菌株 Lmo0160 蛋白的理化性质分析显示，该蛋白是一种偏酸性(PI 理论值为 4.61)、稳定(不稳定指数为 19.89<40.00 为稳定性蛋白)、亲水性蛋白质。Lmo0160 蛋白结构域分析显示，该蛋白无跨膜区域，无信号肽区域，但含有 3 个结构域；Lmo0160 蛋白二级结构预测发现，该蛋白是含有 234 个无规卷曲(49.26%)、139 个延伸链(29.26%)、58 个 α -螺旋(12.21%)、44 个 β -转角(9.26%)的混合模型，其中以无规则卷曲为主；Lmo0160 蛋白具有多个高亲水性区域，由此推断该蛋白具有 B 细胞表位形成的结构基础。

金黄色葡萄球菌 *Cna* 黏附素由 *Cna* 基因编码，该黏附素能够结合胶原蛋白，在细菌侵袭过程中起重要作用^[29]。Elasri 等^[30]研究发现，骨骼中的金黄色葡萄球菌表面蛋白 *Cna* 可通过结合宿主的胶原蛋白，黏附于组织(如软骨)表面后侵袭骨骼，最终引起人和动物的关节炎和骨髓炎。Hienz 等^[31]构建的 *Cna* 基因缺失株可减弱结合胶原蛋白的能力，同时在小鼠毒力试验中发现其毒力减弱。*Cna* 基因序列由一个非重复 A 域和重复 B 域组成，*Cna* A 域决定 *Cna* 的活性，*Cna* B 域由 B₁–B₄ 重复序列组成，该域既不结合胶原蛋白，又不影响黏附素的活性，但 *Cna* A 通过 *Cna* B 的介导作用结合胶原蛋白^[32–35]。Lmo0160 蛋白结构域预测显示，该蛋白含

有 1 个胶原蛋白结合域(第 100–226 位)和 2 个 *Cna* B 域，分别位于第 259–329 位和 351–420 位，推测该蛋白可能参与细菌的黏附过程，在 LM90SB2 的致病过程中发挥重要作用。这为正确认识 Lmo0160 蛋白的结构、功能、分类、作用部位等特性提供参考。

本研究首次克隆了 *lmo0160* 基因，并利用生物学软件对其结构进行预测，为今后研究该蛋白在 LM90SB2 菌株的致病作用及其机制提供了理论基础。但要确定该基因的具体功能，还需通过构建 *lmo0160* 基因缺失株并进行动物试验和侵袭细胞来进一步验证。

参 考 文 献

- [1] Hain T, Chatterjee SS, Ghai R, et al. Pathogenomics of *Listeria* spp.[J]. International Journal of Medical Microbiology, 2007, 297(7/8): 541-557
- [2] Gandhi M, Chikindas ML. *Listeria*: a foodborne pathogen that knows how to survive[J]. International Journal of Food Microbiology, 2007, 113(1): 1-15
- [3] Cao SZ, Ma X, Chen S, et al. Construction and expression of eukaryotic expressing vector of ACTG1 from human brain microvascular endothelial cells[J]. Journal of Shihezi University (Natural Science), 2016, 34(6): 713-717 (in Chinese)
曹树珠, 马勋, 陈朔, 等. 人脑微血管内皮细胞 ACTG1 基因真核表达载体的构建及表达[J]. 石河子大学学报: 自然科学版, 2016, 34(6): 713-717
- [4] Chen YF. Construction and partial biological characteristics of *Listeria monocytogenes* Δ InlAB, Δ InlABC mutant strains[D]. Xinjiang: Master's Thesis of Shihezi University, 2015 (in Chinese)
陈云飞. 单增李斯特菌 Δ InlAB、 Δ InlABC 突变株的构建及部分生物学特性研究[D]. 新疆: 石河子大学硕士学位论文, 2015
- [5] Li ZQ. Production of antibodies of high specificity and affinity for constitutively and stably expressed *Listeria monocytogenes* surface antigens[D]. Guangdong: Master's Thesis of Jinan University, 2012 (in Chinese)
李志清. 单增李斯特菌特异性的膜表面蛋白的抗体的制备[D]. 广东: 暨南大学硕士学位论文, 2012
- [6] Mariscotti JF, Quereda JJ, Pucciarelli MG. Contribution of sortase A to the regulation of *Listeria monocytogenes* LPXTG surface proteins[J]. International Microbiology, 2012, 15(1): 43-51
- [7] Popowska M, Markiewicz Z. Characterization of *Listeria monocytogenes* protein Lmo0327 with murein hydrolase activity[J]. Archives of Microbiology, 2006, 186(1): 69-86
- [8] Cummins J, Casey PG, Joyce SA, et al. A mariner transposon-based signature-tagged mutagenesis system for the

- analysis of oral infection by *Listeria monocytogenes*[J]. *PLoS One*, 2013, 8(9): e75437
- [9] Pucciarelli MG, Calvo E, Sabet C, et al. Identification of substrates of the *Listeria monocytogenes* sortases A and B by a non-gel proteomic analysis[J]. *Proteomics*, 2005, 5(18): 4808-4817
- [10] 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
- [11] McGann P, Ivanek R, Wiedmann M, et al. Temperature-dependent expression of *Listeria monocytogenes* internalin and internalin-like genes suggests functional diversity of these proteins among the *Listeriae*[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2007, 73(9): 2806-2814
- [12] Jiang JJ. Disruption of *inlC2* enhances the internalization of *Listeria monocytogenes* by epithelial cells[D]. Xinjiang: Doctoral Dissertation of Shihezi University, 2011 (in Chinese)
蒋建军. 缺失 *inlC2* 突变株增强单核细胞增多症李斯特菌对上皮细胞的内化作用的研究[D]. 新疆: 石河子大学博士学位论文, 2011
- [13] Mariscotti JF, Quereda JJ, García-Del Portillo F, et al. The *Listeria monocytogenes* LPXTG surface protein Lmo1413 is an invasin with capacity to bind mucin[J]. *International Journal of Medical Microbiology*, 2014, 304(3/4): 393-404
- [14] Cabanes D, Dehoux P, Dussurget O, et al. Surface proteins and the pathogenic potential of *Listeria monocytogenes*[J]. *Trends in Microbiology*, 2002, 10(5): 238-245
- [15] Wang HY, Liu ZX, Shi XH, et al. Research progress of *Listeria monocytogenes* and its surface proteins[J]. *Inspection and Quarantine Science*, 2006, 16(2): 76-80 (in Chinese)
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, 16(2): 76-80
- [16] Kirchner M, Higgins DE. Inhibition of ROCK activity allows *InlF*-mediated invasion and increased virulence of *Listeria monocytogenes*[J]. *Molecular Microbiology*, 2008, 68(3): 749-767
- [17] Bublitz M, Holland C, Sabet C, et al. Crystal structure and standardized geometric analysis of *InlJ*, a listerial virulence factor and leucine-rich repeat protein with a novel cysteine ladder[J]. *Journal of Molecular Biology*, 2008, 378(1): 87-96
- [18] 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
- [19] 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
- [20] Samarin S, Romero S, Kocks C, et al. How VASP enhances actin-based motility[J]. *Journal of Cell Biology*, 2003, 163(1): 131-142
- [21] Cabanes D, Sousa S, Cebriá A, et al. Gp96 is a receptor for a novel *Listeria monocytogenes* virulence factor, Vip, a surface protein[J]. *The EMBO Journal*, 2005, 24(15): 2827-2838
- [22] Reis O, Sousa S, Camejo A, et al. LapB, a novel *Listeria monocytogenes* LPXTG surface adhesin, required for entry into Eukaryotic cells and virulence[J]. *The Journal of Infectious Diseases*, 2010, 202(4): 551-562
- [23] Sievers S, Lillebæk EMS, Jacobsen K, et al. A multicopy sRNA of *Listeria monocytogenes* regulates expression of the virulence adhesin LapB[J]. *Nucleic Acids Research*, 2014, 42(14): 9383-9398
- [24] Personnic N, Bruck S, Nahori MA, et al. The stress-induced virulence protein *InlH* controls interleukin-6 production during murine *Listeriosis*[J]. *Infection and Immunity*, 2010, 78(5): 1979-1989
- [25] Cummins J, Casey PG, Joyce SA, et al. A mariner transposon-based signature-tagged mutagenesis system for the analysis of oral infection by *Listeria monocytogenes*[J]. *PLoS One*, 2013, 8(9): e75437
- [26] Dortet L, Mostowy S, Louaka AS, et al. Recruitment of the major vault protein by *InlK*: a *Listeria monocytogenes* strategy to avoid autophagy[J]. *PLoS Pathogens*, 2011, 7(8): e1002168
- [27] Pilgrim S, Kolb-Mäurer A, Gentschev I, et al. Deletion of the gene encoding p60 in *Listeria monocytogenes* leads to abnormal cell division and loss of actin-based motility[J]. *Infection and Immunity*, 2003, 71(6): 3473-3484
- [28] Tong WB. Correlation between enterovirus nucleotide sequences and serotype[J]. *Journal of Preventive Medicine Information*, 2007, 23(2): 163-167 (in Chinese)
童文彬. 肠道病毒核苷酸序列和血清型的相关性[J]. *预防医学情报杂志*, 2007, 23(2): 163-167
- [29] Patti JM, Allen BL, McGavin MJ, et al. MSCRAMM-mediated adherence of microorganisms to host tissues[J]. *Annual Review of Microbiology*, 1994, 48: 585-617
- [30] Elasm MO, Thomas JR, Skinner RA, et al. *Staphylococcus aureus* collagen adhesin contributes to the pathogenesis of osteomyelitis[J]. *Bone*, 2002, 30(1): 275-280
- [31] Hienz SA, Schennings T, Heimdahl A, et al. Collagen binding of *Staphylococcus aureus* is a virulence factor in experimental endocarditis[J]. *The Journal of Infectious Diseases*, 1996, 174(1): 83-88
- [32] Deivanayagam CCS, Rich RL, Carson M, et al. Novel fold and assembly of the repetitive B region of the *Staphylococcus aureus* collagen-binding surface protein[J]. *Structure*, 2000, 8(1): 67-78
- [33] Symersky J, Patti JM, Carson M, et al. Structure of the collagen-binding domain from a *Staphylococcus aureus* adhesin[J]. *Nature Structural Biology*, 1997, 4(10): 833-838
- [34] Gillaspay AF, Patti JM, Pratt Jr FL, et al. The *Staphylococcus aureus* collagen adhesin-encoding gene (*cna*) is within a discrete genetic element[J]. *Gene*, 1997, 196(1/2): 239-248
- [35] Rich RL, Demeler B, Ashby K, et al. Domain structure of the *Staphylococcus aureus* collagen adhesin[J]. *Biochemistry*, 1998, 37(44): 15423-15433