

NaClO胁迫下单核细胞增生李斯特菌WaX12及其sigB基因缺失突变株抗氧化胁迫相关功能基因表达比较

周 密, 唐毓祎, 王 旭, 张炜佳, 潘迎捷, 赵 勇*
(上海海洋大学食品学院, 农业部水产品贮藏保鲜质量安全风险评估实验室,
水产品加工及贮藏工程技术研究中心, 上海 201306)

摘 要:目的: 探究单核细胞增生李斯特菌sigB基因对次氯酸钠(NaClO)胁迫的调控作用。方法: 在半致死浓度NaClO(3 mmol/L)胁迫下, 比较该菌野生株WaX12与sigB基因敲除突变株的耐受程度及菌内的活性氧水平, 并通过实时定量聚合酶链式反应技术(real-time quantitative polymerase chain reaction, RT-PCR)进一步观察lmo1433、lmo0906、lmo2344、ohrR、lmo2770基因随胁迫时间的转录水平变化。结果: 野生株和sigB突变株的表型测定结果显示, 野生株比缺失株更耐NaClO胁迫, 而且此现象在稳定期更加明显; 当胁迫时间达到30 min时, 突变株内的活性氧水平增长率比野生株高出19.97%, 进一步说明sigB基因对NaClO胁迫有一定的调控作用。RT-PCR结果表明, 基因lmo1433、lmo2344和ohrR在野生株的表达水平显著高于突变株($P < 0.01$), 而基因lmo0906、lmo2770的表达水平在野生株和缺失株中的差异并不明显。结论: 研究表明, 单核细胞增生李斯特菌sigB基因对NaClO胁迫有一定的影响作用, 且部分作用可能由激活部分调节机体氧化还原平衡的基因得以实现。

关键词: 单增李斯特菌; sigB; NaClO; 氧化胁迫; RT-PCR

Comparative Analysis of the Expression of Antioxidation Related Genes in *Listeria monocytogenes* WaX12 and Its sigB Gene Deletion Mutant under Sodium Hypochlorite Stress

ZHOU Mi, TANG Yuyi, WANG Xu, ZHANG Weijia, PAN Yingjie, ZHAO Yong*

(Shanghai Engineering Research Center of Aquatic-Product Processing & Preservation,

Laboratory of Quality Safety Risk Assessment for Aquatic Products on Storage and Preservation, Ministry of Agriculture,

College of Food Science & Technology, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

Abstract: Objective: The purpose of this study was to explore whether the sigB gene played a regulatory role in *Listeria monocytogenes* (Lm) exposed to sodium hypochlorite stress. Methods: We studied the phenotypic changes and compared the percent increases in reactive oxygen species (ROS) levels in the wild-type Lm WaX12 and its sigB deletion mutant under sodium hypochlorite stress at the median lethal concentration (3 mmol/L). The changes in the transcriptional levels of lmo1433, lmo0906, lmo2344, ohrR and lmo2770 genes were investigated during sodium hypochlorite stress. Results: The wild-type strain presented a stronger tolerance to sodium hypochlorite stress than the mutant, especially during the stationary growth phase. The percent increase in ROS levels in the wild-type strain was 19.97% higher than that in the mutant after 30 min of sodium hypochlorite stress, confirming the regulatory role of the sigB gene in Lm under sodium hypochlorite stress. Moreover, the relative expression levels of lmo1433, lmo2344 and ohrR genes in the wild-type strain were much higher than those in the mutant ($P < 0.01$), as revealed by RT-PCR. No significant differences in the expression levels of lmo0906 and lmo2770 were found between the wild-type and mutant strains. Conclusion: The sigB gene plays an important regulatory role in Lm exposed to NaClO stress, which may be partially achieved by directly or indirectly activating some genes regulating the redox balance in the body.

收稿日期: 2016-09-01

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(31271870; 31571917); 上海市科委计划项目(14DZ1205100; 14320502100);
上海市科技兴农重点攻关项目(沪农科攻字2014第3-5号; 2015第4-8号); 上海市科委工程中心建设项目(11DZ2280300)

作者简介: 周密(1991—), 女, 硕士, 研究方向为食源性致病菌。E-mail: meechyou@163.com

*通信作者: 赵勇(1975—), 男, 教授, 博士, 研究方向为食源性致病菌的快速检测技术、高效防控技术及其风险评估。

E-mail: yzhao@shou.edu.cn

Key words: *Listeria monocytogenes*; *sigB*; sodium hypochlorite; oxidative stress; RT-PCR

DOI:10.7506/spkx1002-6630-201710009

中图分类号: TS20

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630 (2017) 10-0049-06

引文格式:

周密, 唐毓玮, 王旭, 等. NaClO胁迫下单核细胞增生李斯特菌WaX12及其*sigB*基因缺失突变株抗氧化胁迫相关功能基因表达比较[J]. 食品科学, 2017, 38(10): 49-54. DOI:10.7506/spkx1002-6630-201710009. <http://www.spkx.net.cn>

ZHOU Mi, TANG Yuyi, WANG Xu, et al. Comparative analysis of the expression of antioxidation related genes in *Listeria monocytogenes* WaX12 and its *sigB* gene deletion mutant under sodium hypochlorite stress[J]. Food Science, 2017, 38(10): 49-54. (in Chinese with English abstract) DOI:10.7506/spkx1002-6630-201710009. <http://www.spkx.net.cn>

次氯酸钠 (NaClO) 是一种高效广谱的含氯消毒剂, 它具有极强的氧化活性, 能够有效的消灭细菌、真菌及病毒等微生物^[1-2]。NaClO不仅能够破坏机体中的DNA、脂质和蛋白质等生物分子, 还能与细胞质中的 Fe^{2+} 发生芬顿反应, 生成具有细胞毒素的活性氧类 (reactive oxygen species, ROS) 自由基^[3-4], 从而造成细胞结构破坏甚至细胞凋亡。此外, 次氯酸也是机体的有效先天性防御成分之一。具有防御功能的中性粒细胞在捕获到入侵的细菌后, 髓过氧化物酶以氯和过氧化氢为底物, 催化产生次氯酸并迅速引发细菌的中毒反应^[5]。

单核增生细胞李斯特菌 (*Listeria monocytogenes*) (以下简称单增李斯特菌) 是一种人畜共患食源性致病菌。它广泛存在于自然界, 对不良环境有极强的耐受能力^[6]。免疫力低下的人群易受单增李斯特菌感染, 感染后会引发脑膜炎、败血症、流产等症状^[7]。食物贮藏和加工环节中的消毒不彻底会造成单增李斯特菌食物污染事件甚至引起爆发流行^[8]。 σ^B (*sigB*) 因子是普遍存在于革兰氏阳性菌中的环境调节因子。细胞通过调节级联感应外界胁迫并传递信号以激活*sigB*因子, 进而激活由*sigB*基因调控的基因组转录, 随后编码蛋白执行特定功能以保护细胞抵御外界胁迫^[9-10]。*sigB*基因在单增李斯特菌抵御酸、低温、超高压及氧化等胁迫中扮演了重要的角色^[11-14]。

在单增李斯特菌中, 受*sigB*调控的基因有150多个, 但其中大部分基因编码的蛋白质功能仍不清楚^[9]。同时, 细菌抵御氧化胁迫是一个复杂的过程^[15], 细胞中除一些可以直接分解氧化剂的酶如有机氢过氧化物酶 (organic hydroperoxide resistance, *OhrR*) 外, 细胞质中大量存在的低密度巯基蛋白不但可以中和入侵的ROS, 还可以通过酰胺化修饰激活抗氧化胁迫蛋白表达^[16-18]。此外, 具有修复功能的蛋白质如硫氧还原蛋白、谷氧还原蛋白等能够通过修复受损的核酸和蛋白质来维持氧化胁迫下细菌体内的代谢和蛋白质平衡^[19-20]。 ClO^- 对巯基的选择性攻击会加剧细菌内部的抗氧化胁迫蛋白聚合^[21-22]。目前*sigB*基因对氧化胁迫的作用还没有一致定论, 一些研究表明*sigB*基因敲除菌株对氧化胁迫更加敏感^[10,17], 而另一些研究则认为*sigB*基因敲除菌株对氧化胁迫有更强的耐受能力^[23]。

因此, 本研究利用从猪肉中分离的单增李斯特菌*Lm*-WaX12菌株及构建的*sigB*基因缺失菌株WaX12- Δ *sigB*, 选取抗氧化胁迫相关基因: 谷胱甘肽 (glutathione, GSH) 合成酶基因*lmo2770*、GSH还原酶基因*lmo1433*、*lmo0906*、*lmo2344*以及*OhrR*基因*ohrR*, 通过比较2株菌的表型及基因表达差异来探寻单增李斯特菌*sigB*基因对NaClO胁迫的氧化调控作用。

1 材料与方法

1.1 菌株与试剂

菌株WaX12为上海市芦潮港菜市场购买的生猪肉中分离的野生致病菌, 经过形态学分析、生化特性以及分子生物学鉴定, 由上海海洋大学农业部水产品贮藏保鲜质量安全风险评估实验室保藏; WaX12- Δ *sigB*由王旭构建并提供^[24]。

PrimeScript™ RT reagent反转录试剂盒 宝生物工程 (大连) 有限公司; RNA提取试剂盒 上海捷瑞生物工程公司; 荧光定量SYBR Green Master 瑞士Roche公司; 脑心浸液 (brain heart infusion, BHI) 培养基、PALCAM培养基 北京陆桥技术股份有限公司; NaClO、氮蓝四唑 (nitro-blue tetrazolium, NBT) 美国Sigma公司; 甘油、丙酮、甲醇、无水乙醇、冰乙酸等均为国产分析纯。

1.2 仪器与设备

7500fast荧光定量仪 美国ABI公司; 多功能酶标仪 美国BioTek公司。

1.3 方法

1.3.1 培养条件

将单增李斯特菌WaX12及WaX12- Δ *sigB*接种至BHI液体培养基, 37℃摇床培养过夜, 按1:100 (V/V) 接种于5 mL BHI液体培养基, 37℃摇床培养备用。

1.3.2 生长曲线的测定

分别将制备好的单增李斯特菌液进行10倍梯度稀释, 再接种于10 mL BHI试管中, 使初始接种量为 $10^4 \sim 10^5$ CFU/mL。将接种后的BHI试管放入37℃培养

箱, 每2 h取样涂布于PALCAM平板, 计数测定WaX12及WaX12- $\Delta sigB$ 的生长曲线。

1.3.3 NaClO半致死浓度确定

按照Primm等^[25]的方法确定NaClO对单增李斯特菌WaX12及WaX12- $\Delta sigB$ 的半致死浓度。将菌液接种到BHI液体培养基中, 放入培养箱180 r/min、37 °C培养16 h后离心, 用生理盐水漂洗并调OD_{600 nm}至0.630±0.025。用BHI稀释菌液至OD_{600 nm}为0.025±0.005备用。在96孔板内每孔加入100 μ L BHI液体培养基, 取100 μ L的0.96 mol/L NaClO加入第1排孔板中并依次对NaClO进行2倍稀释。将10 μ L稀释好的菌液分别加入孔中, 37 °C过夜培养, 测定菌体OD_{600 nm}, 确定细菌的半致死浓度。

1.3.4 NaClO胁迫实验

将菌体接种至BHI液体培养基, 在培养箱中37 °C条件下, 180 r/min好氧培养5 h或12 h, 得到处于对数期及稳定期的菌液, 分别用生理盐水漂洗并调整菌液浓度至OD_{600 nm}为0.63±0.02, 取5 mL菌悬液, 用半致死浓度的NaClO溶液按照不同的时间梯度(0、20、40、60、80、100 min)分别胁迫2株菌, 最后加入1 mL的0.5%的Na₂S₂O₃溶液作为猝灭剂终止反应。反应结束后, 4 °C、10 000×g离心1 min, 将沉淀物用生理盐水洗涤2次, 以去除残余的NaClO。随后, 将细胞重悬于1 mL生理盐水中, 取10 μ L菌液以不同的稀释度点种于BHI培养基平板上测定单位体积菌落数。将平板放置在37 °C条件下培养48 h, 对平板上的菌落进行计数。设2个平行样。用Excel软件计算平均值和标准偏差。

1.3.5 细菌内部的ROS水平测定

取0.1 mL的细菌悬浮液(OD_{600 nm}为1.0)于pH 7.5磷酸缓冲盐溶液(phosphate buffer saline, PBS)中, 与0.5 mL的NBT(1 mg/mL)混合, 在37 °C条件下培养30 min。加入0.1 mL HCl(0.1 mol/L)溶液, 1 500×g离心10 min取沉淀, 加入0.6 mL的二甲基亚砷以提取还原态的NBT, 再加入0.8 mL PBS充分混匀, 测定混合液的OD_{575 nm}^[26]。

1.3.6 引物设计及验证

根据NCBI中已经公布的*L. monocytogenes* EGD-e全基因组序列, 采用primer 5.0软件设计*ohrR*、*lmo1433*、*lmo0906*、*lmo2344*、*lmo2770*基因的上游和下游序列的特异性引物, 通过实时定量荧光PCR绝对定量的方法筛选出相关系数 R^2 不小于0.95, 且扩增效率在95%~120%范围内的引物, 所有引物均由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

1.3.7 总RNA的提取及cDNA的合成

分别提取经3 mmol/L NaClO胁迫不同时间(0、10、20、30 min)后的野生及突变株的菌体总RNA, RNA纯化后用于cDNA的合成。将RNA逆转录成cDNA

(2 μ L RNA/20 μ L体系), 逆转录反应按照逆转录试剂盒的说明书进行, 整个过程在冰上操作。

1.3.8 抗氧化胁迫功能蛋白基因的RT-PCR分析

表1 RT-PCR引物

Table 1 Primer sequences for RT-PCR amplification

基因	正向引物 (5'→3')	反向引物 (5'→3')
<i>gap</i>	AAAGCTGGCGCTAAAAAGTTG	TTCATGGTTTACATTGTAACGATTG
<i>sigB</i>	GATGATGGATTGTAACGTGTGAA	CGCTCATCTAAAACAGGGAGAAC
<i>lmo1433</i>	GCACAGGCAGCAGGGTTAA	CGACTTTCTGGCACATTCTCG
<i>ohrR</i>	TGCTCTTGTCTCAATCCCA	AACAGAACTGGTGAGACGG
<i>lmo2344</i>	ATGCCGATTGCTTGGA	TGGCTAATGTCGCTGTTTG
<i>lmo2770</i>	GCCCTGAAGCATCTCCC	CTCGTCGCCAGGAATGAAC
<i>lmo0906</i>	AACAACCTGGCTCAGAAACG	GATAGCTGGATGGCTAAATACGAC

引物见表1, 实验采用*gap*为内标基因^[24], 内标基因与目的基因各设3个平行反应管。实时定量聚合酶链式反应(real-time quantitative polymerase chain reaction, RT-PCR)体系(20 μ L)为: 10 μ L SYBR Solution、上下游引物各1 μ L、cDNA 2 μ L、无菌ddH₂O 5 μ L。反应条件: 95 °C 15 s; 95 °C 15 s, 60 °C 34 s, 循环40次; 95 °C 15 s, 60 °C 1 min读取荧光值, 同时进行ROX值校正, 最后进行荧光PCR产物溶解曲线分析。

1.4 统计学处理

实验结果为3次重复的平均值, 采用SPSS 19.0统计软件进行实验数据的统计与分析。检验水准为0.05, 运用最小显著性差异(least significant difference, LSD)法比较, 以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 NaClO胁迫下的不同生长期的单增李斯特菌WaX12及WaX12- $\Delta sigB$ 的生长差异

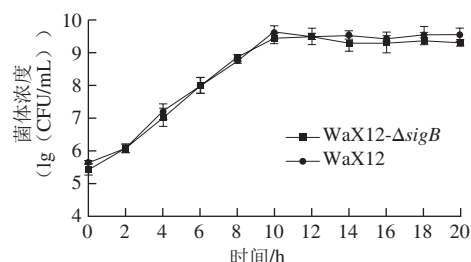


图1 野生株WaX12及WaX12- $\Delta sigB$ 的生长曲线

Fig. 1 Growth curves of the wild-type strain (WaX12) and the mutant (WaX12- $\Delta sigB$)

将WaX12及WaX12- $\Delta sigB$ 接种至BHI液体培养基中, 初始接种量为 $10^4 \sim 10^5$ CFU/mL, 每2 h取样涂布于PALCAM平板, 计数测定WaX12及WaX12- $\Delta sigB$ 的生长曲线。如图1所示, WaX12- $\Delta sigB$ 与WaX12生长情况相似, 表明*sigB*基因并不影响WaX12- $\Delta sigB$ 菌株正常生长。

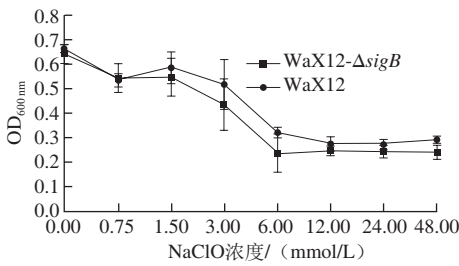


图2 不同浓度NaClO胁迫下野生株WaX12及WaX12-ΔsigB OD_{600nm}的变化情况

Fig. 2 OD_{600nm} of the wild-type (WaX12) and the mutant (WaX12-ΔsigB) at different concentrations of NaClO stress

由图2可知,单增李斯特菌WaX12对NaClO的抵御能力略高于WaX12-ΔsigB,但两者的半致死浓度(3 mmol/L)并无明显差异。

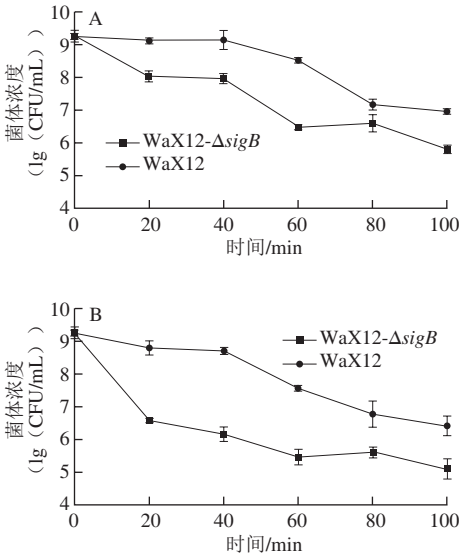


图3 野生株和突变株在对数期(A)和稳定期(B)不同NaClO胁迫时间下的菌体浓度

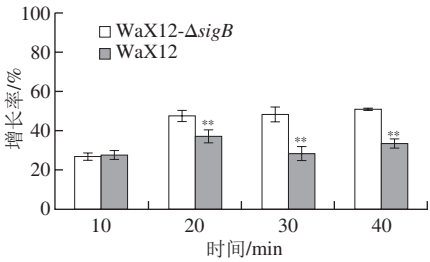
Fig. 3 Cell density of the wild-type and mutant strains at the log (A) and stationary (B) growth phases as a function of 0.03 mol/L NaClO stress time

由图3A可知,胁迫60 min时,在对数时期的野生株的菌体浓度降低至(8.51±0.06)(lg(CFU/mL)),同一时期突变株的菌体浓度为(6.47±0.07)(lg(CFU/mL))。而在图3B中,胁迫40 min时,稳定期的野生株和突变株的菌体浓度分别为(8.68±0.06)(lg(CFU/mL))、(6.16±0.23)(lg(CFU/mL))。实验结果表明突变株对NaClO胁迫更加敏感,这一现象在稳定期更加明显。

2.2 NaClO胁迫下的单增李斯特菌WaX12及WaX12-ΔsigB体内的ROS水平比较

图4为稳定期野生株和突变株在不同胁迫时间下细菌内部的ROS水平增长率变化。胁迫时间为10 min

时,两菌胞内的ROS水平增长率无明显差异。当胁迫时间为20、30 min以及40 min时,突变株胞内的ROS增长水平较野生株呈现明显差异($P<0.01$)。其中在胁迫时间达到30 min时,两者之间的ROS水平增长率差异达到最大,突变株内的ROS增长水平比野生株高出(19.97±3.14)%。



**,差异极显著($P<0.01$)。

图4 野生株和突变株在不同NaClO胁迫时间下的ROS水平增长率变化
Fig. 4 Percent increase in ROS levels in the wild-type and mutant strains as a function of NaClO stress time

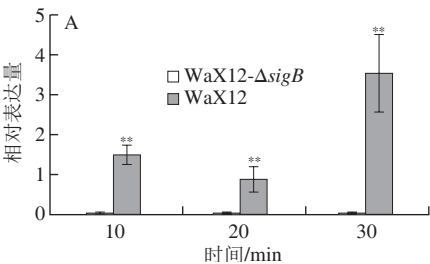
2.3 NaClO胁迫下的单增李斯特菌WaX12及WaX12-ΔsigB与抗氧化胁迫相关基因表达水平比较

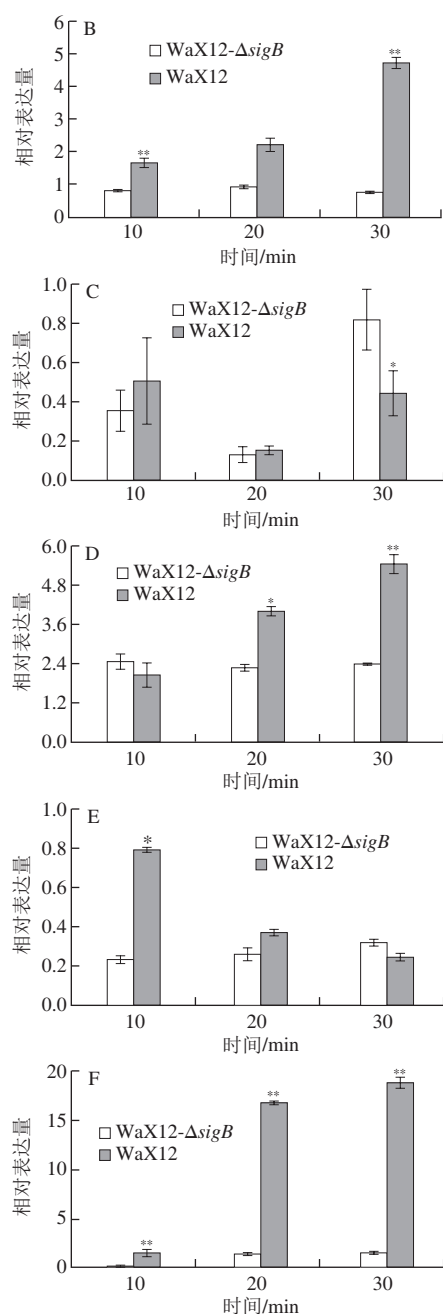
表2 引物的扩增效率及拟合优度

Table 2 Amplification efficiency values and fitness for target genes

基因	扩增效率/%	R^2	引物长度/bp
<i>lmo1433</i>	98.687	0.957	224
<i>ohrR</i>	109.147	0.999	128
<i>lmo2344</i>	109.658	0.994	148
<i>lmo2770</i>	98.86	0.998	186
<i>lmo0906</i>	113.534	0.925	488

在提取野生株和突变株在不同胁迫时间下(10、20、30 min)的总RNA后,以未经胁迫的细菌为参照,通过RT-PCR相对定量法观察*sigB*、*lmo1433*、*lmo0906*、*lmo2344*、*ohrR*和*lmo2770*随胁迫时间的转录水平变化。根据NCBI中已经公布的*L. monocytogenes* EGD-e全基因组序列,采用primer 5.0软件设计*ohrR*、*lmo1433*、*lmo0906*、*lmo2344*、*lmo2770*基因的上游和下游序列的特异性引物,通过RT-PCR绝对定量的方法筛选出拟合优度 R^2 不小于0.95,且扩增效率在95%~120%范围内的引物(表2)。





*. 差异显著 ($P < 0.05$); **. 差异极显著 ($P < 0.01$)。

图5 野生株和突变株在不同时间的NaClO胁迫下基因*sigB* (A)、*lmo1433* (B)、*lmo0906* (C)、*lmo2344* (D)、*lmo2770* (E)、*ohrR* (F) 的相对表达水平

Fig. 5 Relative expression levels of *sigB* (A), *lmo1433* (B), *lmo0906* (C), *lmo2344* (D), *lmo2770* (E), and *ohrR* (F) during different sodium hypochlorite stress in the wild-type and mutant strains

图5A为野生株*sigB*基因的表达情况,*sigB*基因的表达量在菌体受到胁迫后明显增加,在胁迫30 min时相对表达量达到 3.56 ± 0.96 。用0.03 mol/L NaClO分别胁迫野生株和突变株,结果发现,野生株的*lmo1433*基因表达量显著高于突变株,差异在胁迫30 min时达到最大(图5B)。而GSH还原酶基因*lmo0906*在野生株和突变株

中的表达量差异并不明显(图5C)。图5D中,NaClO胁迫下野生株的*lmo2344*基因的表达水平在胁迫20、30 min时均显著高于突变株。GSH合成酶*lmo2770*基因在NaClO胁迫后两株菌的表达量均较低且差异不明显(图5E)。此外,基因*ohrR*在WaX12野生株受到NaClO胁迫中有较高的表达量,NaClO胁迫30 min突变株的表达量(18.86 ± 2.93)显著高于缺失株的表达量(1.61 ± 0.09) ($P < 0.01$) (图5F)。

3 讨论

NaClO具有极强的氧化性,能够迅速对微生物造成氧化损伤^[1]。单增李斯特菌对外界的氧化胁迫有良好的适应性,其重要压力调控基因*sigB*在菌体抵御不良环境的胁迫中扮演了重要的角色。然而,*sigB*基因对氧化胁迫,尤其对NaClO的胁迫的调控机理尚不明确。为了探究*sigB*基因在机体抵御NaClO的胁迫中的调控作用,比较了单增李斯特菌野生株WaX12与突变株在受到NaClO胁迫的表型及重要抗氧化胁迫基因的差异表达。

本研究发现,相同浓度NaClO (3 mmol/L) 胁迫下,野生株的菌体浓度明显高于突变株,这种差异在稳定期更加显著。说明*sigB*基因在稳定期对NaClO胁迫有更强的耐受能力(图3),同样的现象也出现在单增李斯特菌面对酸、高渗透压胁迫中^[11,27]。在进一步的研究中,比较了野生株和突变株在NaClO胁迫下的胞内ROS水平增长率差异,发现NaClO胁迫下的野生株体内的ROS水平增长率较突变株更低(图4)。这一现象说明缺失株在NaClO胁迫下产生了更多的ROS。NaClO胁迫会导致细胞内部ROS水平增加,从而对细菌造成伤害,而细菌体内的防御机制能够在一定程度上降低胞内ROS水平^[19,20]。结果表明*sigB*基因对NaClO的部分调控作用可能通过激活调节机体氧化还原平衡基因来实现。

进一步研究了*sigB*基因对氧化胁迫的调控作用,提取了稳定期细菌在半致死浓度NaClO不同胁迫时间下的总RNA,运用荧光定量PCR的方法观察野生株和突变株在NaClO胁迫下基因轮廓的变化。结果显示,野生株的*sigB*基因在NaClO胁迫下的表达活跃(图5A),说明*sigB*基因在NaClO胁迫中扮演了重要的角色。此外,GSH还原酶基因*lmo1433*、*lmo2344*及*OhrR*基因*ohrR*在NaClO胁迫下的野生株中有较高的表达量,且表达量显著高于突变株 ($P < 0.01$)。而GSH还原酶基因*lmo0906*及GSH合成酶基因*lmo2770*表达量在野生株和突变株中均较低,且没有显著差异(图5)。在单增李斯特菌中,GSH、*OhrR*、*lmo2344*是重要的抗氧化胁迫蛋白。GSH是一种低密度巯基蛋白,它不但能够中和入侵的ROS,还可以通过谷氨酰胺化修饰激活抗氧化相关蛋

白表达^[16-18]。GSH合成需要GSH合成酶(Imo2770)的参与^[28], NaClO胁迫能够将GSH氧化成氧化型谷胱甘肽(glutathione disulfide, GSSG), 但这一反应是可逆的, GSSG在GSH还原酶(Imo1433、Imo0906)的作用下能重新生成GSH^[17]。OhrR是一种重要的抗氧化胁迫蛋白, 在枯草芽孢杆菌中, *ohrR*基因在NaClO胁迫后的表达量高达220倍^[17]。此外Imo2344是重要的抗氧化还原蛋白, 能够还原部分重要蛋白在氧化胁迫过程产生的二硫键以维持机体氧化还原水平平衡^[29]。本研究发现, *sigB*基因虽对Imo0906和Imo2344转录无影响, 但对*ohrR*、Imo2344及Imo1433有正向调控作用。因此推测, *sigB*对GSH合成没有直接影响, 而通过调控基因Imo1433而不是Imo0906还原NaClO胁迫造成的GSH氧化伤害。*sigB*基因除了本身参与抗NaClO胁迫外, 在单增李斯特菌抗氧化体系中发挥了重要的作用。

4 结 论

本研究通过比较单增李斯特菌Wax12-*sigB*缺失株和野生株在抵御NaClO胁迫过程中基因表达轮廓差异, 从基因角度初步阐释了单增李斯特菌*sigB*基因对的调控作用。并发现*sigB*基因对GSH系统中谷氧还原蛋白和GSH还原酶基因Imo1433及重要的抗氧化基因*ohrR*有显著的影响作用。不足的是, 有研究表明*sigB*基因对细菌遭遇NaClO氧化胁迫的调控作用也可能受NaClO胁迫下产生的非氧化损伤影响^[7], 而本研究只观察了*sigB*因子对氧化胁迫基因的调控作用。后续将进一步从NaClO胁迫产生的非氧化损伤的角度完善单增李斯特菌*sigB*基因对NaClO胁迫的调控机制研究。

参考文献:

- GOMES B P F A, MARTINHO F C, VIANNA M E. Comparison of 2.5% sodium hypochlorite and 2% chlorhexidine gel on oral bacterial lipopolysaccharide reduction from primarily infected root canals[J]. *Journal of Endodontics*, 2009, 35(10): 1350-1353. DOI:10.1016/j.joen.2009.06.011.
- 姜晓杰, 王文杰, 祁美荣, 等. 一种含氯消毒液杀菌效果观察[J]. *中国消毒学杂志*, 2013(2): 112-113.
- ROSEN H, KLEBANOFF S J, WANG Y, et al. Methionine oxidation contributes to bacterial killing by the myeloperoxidase system of neutrophils[J]. *PNAS*, 2009, 106(44): 18686-18691. DOI:10.1073/pnas.0909464106.
- LEICHERT L I, GEHRKE F, GUDISEVA H V, et al. Quantifying changes in the thiol redox proteome upon oxidative stress *in vivo*[J]. *PNAS*, 2008, 105(24): 8197-8202. DOI:10.1073/pnas.0707723105.
- GREEN J N, KETTLE A J, WINTERBOURN C C. Protein chlorination in neutrophil phagosomes and correlation with bacterial killing[J]. *Free Radical Biology and Medicine*, 2014, 77: 49-56. DOI:10.1016/j.freeradbiomed.2014.08.013.
- SONI K A, NANNAPANENI R, TASARA T. The contribution of transcriptomic and proteomic analysis in elucidating stress adaptation responses of *Listeria monocytogenes*[J]. *Foodborne Pathogens and Disease*, 2011, 8(8): 843-852. DOI:10.1089/fpd.2010.0746.
- 吴淑燕, 张超, 陈国薇, 等. 单增李斯特菌入侵宿主分子机理研究进展[J]. *食品科学*, 2014, 35(19): 290-294. DOI:10.7506/spkx1002-6630-201419058.
- WELCH D F, SWORD C P, BREHM S, et al. Relationship between superoxide dismutase and pathogenic mechanisms of *Listeria monocytogenes*[J]. *Infection and Immunity*, 1979, 23(3): 863-872.
- van SCHAIK W, ABEE T. The role of sigma B in the stress response of Gram-positive bacteria-targets for food preservation and safety[J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2005, 16(2): 218-224. DOI:10.1016/j.copbio.2005.01.008.
- FERREIRA A, O'BYRNE C P, BOOR K J. Role of σ^B in heat, ethanol, acid, and oxidative stress resistance and during carbon starvation in *Listeria monocytogenes*[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2001, 67(10): 4454-4457. DOI:10.1128/aem.67.10.4454-4457.2001.
- HUANG Y N, ELLS T C, HANSEN L T. Role of *sigB* and osmolytes in desiccation survival of *Listeria monocytogenes* in simulated food soils on the surface of food grade stainless steel[J]. *Food Microbiology*, 2015, 46: 443-451. DOI:10.1016/j.fm.2014.09.007.
- 王莉, 冯飞飞, 张强, 等. Sigma B对单核细胞增生李斯特菌耐受抗生素作用的影响[J]. *微生物学杂志*, 2011, 31(2): 1-6. DOI:10.3969/j.issn.1005-7021.2011.02.001.
- 莘似韵, 孙晓红, 万群, 等. 超高压对单增李斯特菌*sigB*基因缺失菌株及其生物被膜形成能力的影响[J/OL]. *山东农业大学学报(自然科学版)*, (2016-05-30)[2016-08-01]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/37.1132.S.20160530.1547.004.html>.
- 丁娇娇, 王旭, 刘海泉, 等. 不同培养条件下*sigB*对单增李斯特菌生物被膜形成的影响[J]. *上海海洋大学学报*, 2016, 25(4): 634-640. DOI:10.12024/jsou.20151201610.
- HENNINGHAM A, DOHRMANN S, NIZET V, et al. Mechanisms of group A *Streptococcus* resistance to reactive oxygen species[J]. *FEMS Microbiology Reviews*, 2015, 39(4): 488-508. DOI:10.1093/femsre/fuu009.
- CHI B K, BUSCHE T, van LAER K, et al. Protein S-mycothiolation functions as redox-switch and thiol protection mechanism in *Corynebacterium glutamicum* under hypochlorite stress[J]. *Antioxid Redox Signal*, 2014, 20(4): 589-605. DOI:10.1089/ars.2013.5423.
- CHI B K, GRONAU K, MADER U, et al. S-bacillithiolation protects against hypochlorite stress in *Bacillus subtilis* as revealed by transcriptomics and redox proteomics[J]. *Molecular and Cellular Proteomics*, 2011, 10(11): M111. DOI:10.1074/mcp.M111.009506.
- MASIP L, VEERAVALLI K, GEORGIU G. The many faces of glutathione in bacteria[J]. *Antioxid Redox Signal*, 2006, 8(5/6): 753-762. DOI:10.1089/ars.2006.8.753.
- SUO Y J, HUANG Y Y, LIU Y H, et al. The expression of superoxide dismutase (SOD) and a putative abc transporter permease is inversely correlated during biofilm formation in *Listeria monocytogenes* 4b G[J]. *PLoS ONE*, 2012, 7(10): e48467. DOI:10.1371/journal.pone.0048467.
- DAHL J U, GRAY M J, JAKOB U. Protein quality control under oxidative stress conditions[J]. *Journal of Molecular Biology*, 2015, 427(7): 1549-1563. DOI:10.1016/j.jmb.2015.02.014.
- DAVIES M J. The oxidative environment and protein damage[J]. *Biochimica et Biophysica Acta-Proteins and Proteomics*, 2005, 1703(2): 93-109. DOI:10.1016/j.bbapap.2004.08.007.
- IMLAY J A. Pathways of oxidative damage[J]. *Annual Review of Microbiology*, 2003, 57: 395-418. DOI:10.1146/annurev.micro.57.030502.090938.
- MOORHEAD S M, DYKES G A. The role of the *sigB* gene in the general stress response of *Listeria monocytogenes* varies between a strain of serotype 1/2a and a strain of serotype 4c[J]. *Current Microbiology*, 2003, 46(6): 461-466. DOI:10.1007/s00284-002-3867-6.
- 王旭, 孙晓红, 潘迎捷, 等. 单增李斯特菌Wax12及其*sigB*缺失突变株在不同pH下生长动力学的比较[J]. *食品与生物技术学报*, 2016, 35(5): 477-484. DOI:10.3969/j.issn.1673-1689.2016.05.005.
- PRIMM T P, FRANZBLAU S G. Recent advances in methodologies for the discovery of antimycobacterial drugs[J]. *Current Bioactive Compounds*, 2007, 3(3): 201-208. DOI:10.2174/157340707781695550.
- PÁEZ P L, BECERRA M C, ALBESA I. Effect of the association of reduced glutathione and ciprofloxacin on the antimicrobial activity in *Staphylococcus aureus*[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2010, 303(1): 101-105. DOI:10.1111/j.1574-6968.2009.01867.x.
- ABRAM F, STARR E, KARATZAS K A, et al. Identification of components of the Sigma B regulon in *Listeria monocytogenes* that contribute to acid and salt tolerance[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2008, 74(22): 6848-6858. DOI:10.1128/AEM.00442-08.
- van LOI V, ROSSIUS M, ANTELMANN H. Redox regulation by reversible protein S-thiolation in bacteria[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2015, 6: 187. DOI:10.3389/fmicb.2015.00187.
- GLEASON F K, ARNE H. Thioredoxin and related proteins in procaryotes[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 1988, 54(4): 271-297. DOI:10.1016/0378-1097(88)90247-9.