

单增李斯特菌 *WaxI2* 及其 *sigB* 缺失突变株在不同 pH 下生长动力学的比较

王 旭^{1,2,3}, 孙晓红^{1,2,3}, 潘迎捷^{1,2,3}, 赵 勇^{1,2,3*}

(1. 上海海洋大学 食品学院, 上海 201306; 2. 上海水产品加工及贮藏工程技术研究中心, 上海 201306; 3. 农业部水产品贮藏保鲜质量安全风险评估实验室(上海), 上海 201306)

摘要: 为了探究 σ^B 因子对单增李斯特菌(LM)的生长影响, 比较了 *LM-WaxI2* 及其 *sigma B* 缺失突变株在不同 pH 值下生长动力学的差异。作者运用重叠延伸 PCR(SOE-PCR)和同源重组的方法构建缺失 *SigB* 基因的 LM 突变株 *WaxI2-ΔsigB*; 利用 *sigB* 外围引物扩增其两侧片段鉴定突变株, 并且通过修正的 Logistic 模型拟合两个菌株在不同酸碱度下(pH 5~9)的生长曲线, 分析各生长参数之间的差异性。结果表明, 单增李斯特菌 *sigB* 缺失突变株构建成功; *WaxI2-ΔsigB* 和 *WaxI2* 在 pH 5 的环境下最大比生长速率 $\mu_{\max}$ 、延滞期 λ 与最大菌浓 MPD-OD 均存在显著性差异($P<0.05$), 而在中性和碱性环境下二者无明显差异。

关键词: 单增李斯特菌; σ^B 因子; 酸性环境; 生长动力学参数

中图分类号: Q 78 文献标志码: A 文章编号: 1673—1689(2016)05—0477—08

Comparison of Growth Kinetics of *Listeria monocytogenes* *WaxI2* and Dull *sigB* Mutant at Different pH Values

WANG Xu^{1,2,3}, SUN Xiaohong^{1,2,3}, PAN Yingjie^{1,2,3}, ZHAO Yong^{1,2,3*}

(1. College of Food Science and Technology, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 2. Shanghai Engineering Research Center of Aquatic-Product Processing & Preservation, Shanghai 201306, China; 3. Laboratory of Quality Safety Risk Assessment for Aquatic Products on Storage and Preservation (Shanghai), Shanghai 201306, China)

Abstract: To explore the effect of σ^B in the growth of *Listeria monocytogenes* (LM), we compared the growth kinetics of *LM-WaxI2* and its dull *sigB* mutant at different pH values. We used splicing by overlap extension PCR(SOE-PCR) and homologous recombination to construct the *sigmaB* gene deleted mutant; The mutant was identified by the fragments that amplified by two sides primer of *sigB*. The growth curve of *WaxI2* and *WaxI2-sigB* were fitted by modified Logistic model from pH 5 to pH 9, as well as both growth kinetic parameters were analyzed. The results showed the $\Delta sigB$ mutant was constructed correctly. The maximum exponential growth rate ($\mu_{\max}$), lag phase duration

收稿日期: 2014-11-20

基金项目: 国家自然科学基金项目(31271870); 上海市科委计划项目(14DZ1205100, 14320502100, 12391901300); 上海市科技兴农重点攻关项目(沪农科攻字 2014 第 3-5 号)。

作者简介: 王 旭(1984—), 男, 安徽芜湖人, 食品微生物博士研究生。E-mail: shouwainwang@126.com

* 通信作者: 赵 勇(1975—), 男, 湖北英山人, 理学博士, 教授, 硕士研究生导师, 主要从事食品安全与食品生物技术方面的研究。

E-mail: yzhao@shou.edu.cn

(λ) and maximum population density (MPD-OD) of *WaX12-ΔsigB* and *WaX12* had all significant difference($p<0.05$) at pH 5, but had no different significant at neutral and alkali.

Keywords: *Listeria monocytogenes*, σ^B factor, acid stress stimulate, growth kinetic parameters

单增李斯特菌 (*Listeria monocytogenes*) 是一种人畜共患病食源性致病菌^[1],在食品安全中处于 II 型,属于严重危害级别,能引起人和动物的脑膜炎、败血症、流产等症状,是 WHO 公布的四大食源性致病菌之一^[2],为典型的革兰氏阳性细菌,广泛存在于土壤、污水、动物性食品及饲草等环境中,主要通过消化道引起人和动物感染^[3]。单增李斯特菌之所以能适应多种的生存环境,与其内部环境调节因子 σ 家族有密切关系^[4]。

σ 因子是 *sigma* 基因的编码产物, σ 因子可结合在 RNA 核心酶上形成 RNA 聚合酶全酶,是 RNA 聚合酶的一个亚基。 σ 家族通过感受外界环境对自身控制的基因起到调节作用,主要是通过调控各基因的启动子来完成^[5],其中 σ 家族中的 σ^B 因子是最重要的环境调控因子: σ^B 由 *sigB* 基因编码,可使单增李斯特菌在多种逆境下生存,并且较快的适应外界环境^[6]。根据不同的血清型,单增李斯特菌能在 1~50 °C,10%的盐溶液,pH 值 4.4~9.6^[7]的范围内都可以生长,而且在一定的抗生素、光照、重金属等逆境中都可以生存^[8-9]。Becker L 等人验证了 σ^B 在稳定期对单增李斯特菌有明显的调控作用^[10],而利用转录组学对 σ^B 操纵子进行研究,发现已经有 105 个 σ^B 正调控的基因和 111 个负调控的基因^[11],而其中的有些基因分别调节单增李斯特菌在不同环境下的生长以及衰亡。

因此,作者利用本实验室从猪肉中分离的单增

李斯特菌 *LM-WaX12* 菌株构建其 *SigB* 基因缺失菌株 *WaX12-ΔsigB*, 利用修正的 Logistic 模型拟合原始菌株与突变株的生长情况,探究 σ^B 因子在不同 pH 值下对单增李斯特菌的生长影响,为 σ^B 因子对单增李斯特菌在酸性环境中的调控作用奠定了分子基础。

1 材料与方法

1.1 菌株、仪器与试剂

WaX12:上海市芦潮港菜市场购买的生猪肉中分离的野生致病菌,血清型为 4b,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;Premix Taq 酶、pMD-18T 载体、限制性内切酶、PrimeScript™ RT reagent 反转录试剂盒:购自 Takara;荧光定量 SYBR Green Master:购自罗氏生物;脑心浸液培养基(BHI):购自北京陆桥;穿梭质粒 pKSV7:由美国康奈尔大学 Martin Wiedmann 教授和浙江大学方维焕教授馈赠;Bioscreen C 全自动微生物生长曲线分析仪:购自芬兰 Oy Growth Curves Ab 公司;其他试剂均为进口分析纯。

1.2 引物设计

根据 NCBI 中已经公布的 *L.monocytogenes* ATCC 19117(NC_018584)全基因组序列,设计 *sigB* 基因的上游和下游序列的特异性引物,见表 1,所有引物均由上海生工合成。

表 1 引物名称和序列

Table 1 Primers and sequences

引物	5' 序列 3'	限制性内切酶	来源
<i>psigB</i> -1F	GCGAATTCAAATTACATTACAACCTCCT	<i>Eco</i> RI	本研究
<i>psigB</i> -1R	CAACTGCCCTTGTTTCATCGATCCTCTCCTCCACCTG	<i>Bam</i> HI	
<i>psigB</i> -2F	AAGCAGGTGGAGGAGAGCGATCCATGAACAAGGCAGTTG	<i>Bam</i> HI	
<i>psigB</i> -2R	ATGTCGACGATTGCAACCGATATTTCTG	<i>Sal</i> I	
<i>pSigB</i> -knockCHKf	ATTGAAATCAAAAATGTAGAGG		
<i>pSigB</i> -knockCHKr	TCTAACGCGAGAAAGAACAAGT		

1.3 *WaX12-ΔsigB* 缺失菌株的构建

1.3.1 *SigmaB* 基因的缺失 提取 *LM-WaX12* 野生株的基因组,用 *psigB*-1F 和 *psigB*-2R 扩增包含了

sigB 基因 ORF 的整个上下游臂的片段 (*sigB*1F-2R);再用 *sigB*-1F、*sigB*-1R 和 *sigB*-2F、*sigB*-2R 分别扩增上下游同源臂 *sigB*1F-1R 和 *sigB*2F-2R

(*sigB1F*-1R 长 440 bp, *sigB2F*-2R 长 427 bp); 然后以 *sigB1F*-1R 和 *sigB2F*-2R 为模版, PrimeSTAR® HS(Premix) 高保真酶对上下游臂再次扩增。利用 SOE-PCR 技术重叠融合上下游臂, 扩增无 *sigB* 的片段 $\Delta sigB1F$ -2R, 见图 1。随后构建重组质粒 pMD18T- $\Delta sigB1F$ -2R, 经过酶切验证结果正确。

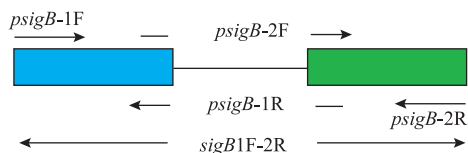


图 1 单增李斯特菌 *sigB* 基因 ORF 的去除

Fig. 1 Cleavage of *sigB* gene open reading frame in *L.monocytogenes*

1.3.2 穿梭载体的构建以及电转化 pMD18T- $\Delta sigB1F$ -2R 和 pKSV7 经过 *EcoRI*、*SalI* 双酶切, 二者用 T4 连接酶连接, 转入 DH5 α 感受态细胞, 构建重组质粒 pKSV7- $\Delta sigB1F$ -2R。用 HEPES 缓冲液配置单增李斯特菌的感受态细胞, 在其中加入重组穿梭质粒, 电击后涂布在 BHI 琼脂培养基上, 于 30 °C 培养。挑取单菌落, 进行菌液 PCR 鉴定后得到带有重组质粒的阳性菌。

1.3.3 *WaxI2*- $\Delta sigB$ 缺失株的筛选与鉴定 将带有重组质粒的阳性菌接种于含 Cm(10 μ g/mL) 的液体 BHI 中, 41 °C 传代 6 次, 涂布于固体培养基上, 培养出单菌落后挑取至 30 °C 培养 10 h, 涂布于 BHI+Cm 上, 挑取单菌落分别接种于 BHI 和 BHI+Cm 固体培养基上过夜培养。为了去除穿梭质粒的干扰, 以 *sigB* 基因的外围序列设计引物 *psigB*-knockCHKf, *psigB*-knockCHKR, 挑取可疑的单菌落进行菌液 PCR 验证, 获得缺失 *sigB* 的突变株 *WaxI2*- $\Delta sigB$ 。

1.4 *WaxI2* 和 *WaxI2*- $\Delta sigB$ 不同 pH 值下生长情况 将 *WaxI2* 和 *WaxI2*- $\Delta sigB$ 挑取单菌落至 5 mL BHI 液体培养基, 37 °C 培养 12 h 至 OD₆₀₀ 约 0.6 (9lgCFU/mL), 菌液进行 10 倍梯度稀释至 10⁴ CFU/mL。在全自动微生物生长曲线分析仪配套的 100 微孔板中进行梯度稀释, 分别吸取 20 μ L 接种至 180 μ L 不同浓度的 BHI (用 HCl 和 NaOH 分别调至 pH 4, pH 5, pH 6, pH 7, pH 8 和 pH 9) 中, 保证每孔中的菌落数为 10³ CFU/mL。用全自动微生物生长曲线分析仪设置为每 30 分钟读取 OD₆₀₀ 值

一次, 测定 37 °C 下两株菌的生长曲线, 每个菌株做 3 个孔平行。

1.5 生物动力学参数的计算方法

应用微生物模型修正 Logistic 方程^[12]拟合 37 °C 下的生长曲线, 并且计算出两株菌在不同 pH 值下的 λ (λ 为单增李斯特菌菌液的 OD₆₀₀) 达到 Bioscreen C 全自动微生物生长曲线分析仪可检测水平 (10⁷ CFU/mL) 时的时间 (h); μ_{max} 为单增李斯特菌最大比生长速率 (OD/h); MPD-OD 为单增李斯特菌达到最大菌液浓度时候的 OD₆₀₀ 值。

修正 Logistic 方程: $\lg N_t = A + C / (1 + \exp(-B(t - M)))$

其中 $\lg N_t$ 是 t 时间 (h) 时的菌数 OD 值, A 是初始菌数 OD 值, C 是初始菌数和最大菌数之间 OD 值, M 是达到相对最大生长速率的时间 (h), B 是最大生长速率 μ_{max} , 把修正 Logistic 方程的 A 、 C 、 B 和 M 参数赋予微生物学意义, 即 λ 为 $M - (2/B)$, MPD-OD(最大菌浓)为 $A + C$ 。

1.6 数据处理

实验结果为 3 次重复的平均值, 采用 SAS 8.2 进行实验数据的统计与分析, 运用 LSD 法 ($P < 0.5$) 比较生长动力学参数。

2 结果与讨论

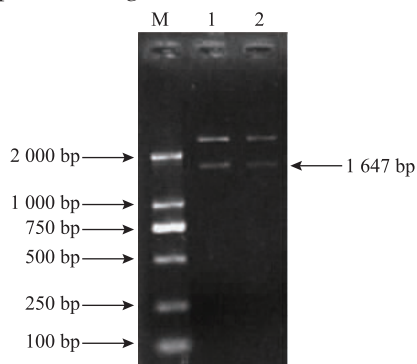
2.1 *SigmaB* 突变株的构建

2.1.1 *sigB*-1F-2R 全长的扩增 以野生菌株 *WaxI2* 的基因组为模版, 以 *psigB*-1F 和 *psigB*-2R 为引物扩增得到与预期大小一致的 1 647 bp 的片段 (*sigB* 基因上游臂 440 bp, *sigB* 基因下游臂 427 bp 和 *sigB* 基因 780 bp), 连接 pMD-18T, 构建 pMD18T-*sigB*-1F-2R, 酶切验证见图 2。结果表明含有 *sigB* 开放阅读框和上下游臂的这段 DNA 序列正确插入到 pMD-18T 中, 表明 pMD18T-*sigB*-1F-2R 载体构建成功。

2.1.2 pKSV7- $\Delta sigB$ 穿梭载体的构建 将 *sigB* 基因上游臂 *sigB*-1F-1R(440 bp) 和下游臂 *sigB*-2F-2R 片段 (427 bp) 分别连接 pMD-18T, 获得 pMD18T-*sigB*-1F-1R 和 pMD18T-*sigB*-2F-2R 载体; 再以两个载体为模版, 用高保真酶分别扩增 *sigB*-1F-1R 和 *sigB*-2F-2R 片段。将两个片段经过重叠 PCR 得到缺失 *sigB* 的片段 $\Delta sigB$ -1F-2R, 见图 3, 结果大小与预测相符, 为 867 bp。

将 $\Delta sigB$ -1F-2R 与 pKSV7 连接, 构建穿梭载

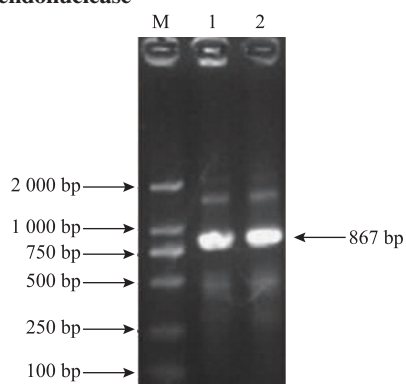
体 pKSV7- $\Delta sigB$ -1F-2R, 酶切验证见图 4。表明含有 *sigB* 上下游臂的 DNA 序列正确插入到穿梭载体 pKSV7, pKSV7- $\Delta sigB$ 构建成功, 见图 5。



M: DL 2000 Plus DNA marker; 1, 2: pMD18T-*sigB*-1F-2R digested with *EcoRI* and *SalI*

图 2 pMD18T-*sigB*-1F-2R 的酶切验证

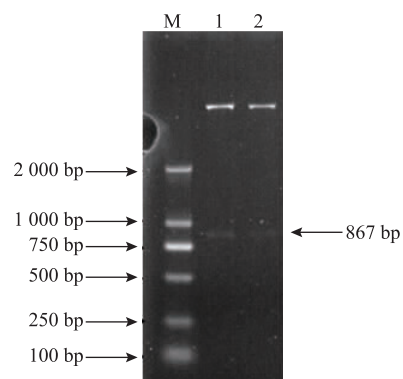
Fig. 2 pMD18T-*sigB*-1F-2R digested by restriction endonuclease



M: DL 2000 Plus DNA marker; 1, 2: Amplification of $\Delta sigB$ -1F-2R by pfuPrime STAR polymerase

图 3 高保真酶扩增 $\Delta sigB$ -1F-2R 片段

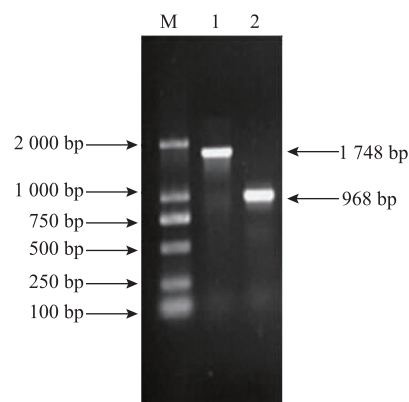
Fig. 3 Amplification of $\Delta sigB$ -1F-2R



M: DL 2000 Plus DNA marker; 1, 2: pKSV7- $\Delta sigB$ gene digested with *EcoRI* and *SalI*

图 4 pKSV7- $\Delta sigB$ 的酶切验证

Fig. 4 pKSV7- $\Delta sigB$ digested by restriction endonuclease



M: DL 2000 Plus DNA marker; 1: Genome PCR of *WaxI2*; 2: Genome PCR of *WaxI2-ΔsigB*

图 5 重组菌的突变株鉴定

Fig. 5 Identification of recombinant mutation

2.1.3 *SigB* 缺失突变株的筛选与鉴定 挑取电转化的单转化子并且过夜培养, 用 *psigB*-1F 和 *psigB*-2R 为引物进行菌液 PCR 鉴定。挑取以上阳性转化子进行同源重组, 筛选缺失菌株, 见图 6。提取疑似缺失单菌落 (在 BHI+Cm 上不生长但在 BHI 上生长, 图中红框标出) 的基因组 DNA。以 *sigB* 基因的外围引物 *psigB*-knockCHKf, *psigB*-knockCHKR 为引物鉴定, 筛选出缺失菌株命名为 *WaxI2-ΔsigB*。基因组 PCR 结果与预期值相符, 用 *WaxI2* 基因组扩增的结果为 1748 bp, 而以缺失株 *WaxI2-ΔsigB* 基因组扩增的结果为 968 bp, 鉴定了阳性菌为稳定传代, 即同源重组成功, 获得了 *WaxI2-ΔsigB* 基因敲除突变株。

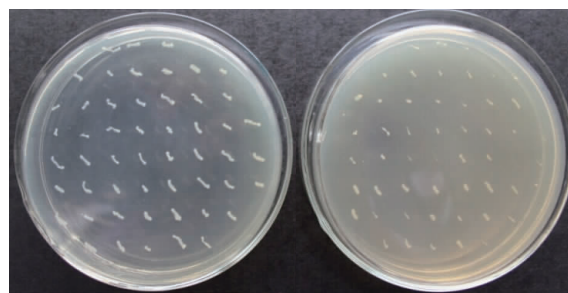


图 6 疑似阳性 *sigB* 缺失突变株的筛选

Fig. 6 Screen of suspected *sigB* gene-knock mutant

2.2 *WaxI2* 和 *WaxI2-ΔsigB* 生长动力学比较

通过修正的 Logistic 生长模型拟合 *WaxI2* 和 *WaxI2-ΔsigB* 在不同 pH 值下 (pH 5~9) 的生长曲线, 并根据拟合的生长曲线计算生长动力学参数最

大比生长速率 $\mu_{\max}$ 、延滞期 λ (h) 和最大细菌浓度 MPD-OD。结果表明,两株菌在 pH 4 的情况下均不能生长,而在 pH 5~9 的环境生长并能够用修正的

Logistic 生长模型较好的拟合 ($R^2>0.99$)。

原始菌株与突变株在不同 pH 条件下的生长曲线与修正 Logistic 模型拟合的生长动力学参数见图 7 及表 2。结果表明,pH 5 条件下,两株菌的生长存在明显差异。通过模型拟合得到的 λ (*WaxI2*- $\Delta sigB$) 为 20.543 h,而 λ (*WaxI2*) 为 17.934 h,表明突变株(*WaxI2*- $\Delta sigB$)的延滞期显著大于原始菌株

($P<0.05$)。此外, $\mu_{\max}$ (*WaxI2*- $\Delta sigB$) 为 0.065 OD/h, $\mu_{\max}$ (*WaxI2*) 为 0.077 OD/h,表明突变株的最大比生长速率显著低于原始菌株($P<0.05$)。同时,比较原始菌株与突变株的 MPD-OD 发现,MPD-OD (*WaxI2*- $\Delta sigB$) 为 0.411,MPD-OD (*WaxI2*) 为 0.492,表明 *SigB* 的缺失显著降低了菌株的最大细菌浓度 ($P<0.05$)。上述结果进一步说明,细菌在低酸性条件 (pH 5) 下, σ^B 因子对其生长具有重要的调控作用。而在 pH 8 和 pH 9 的条件下,原始菌株与突变株的生长不存在显著差异。

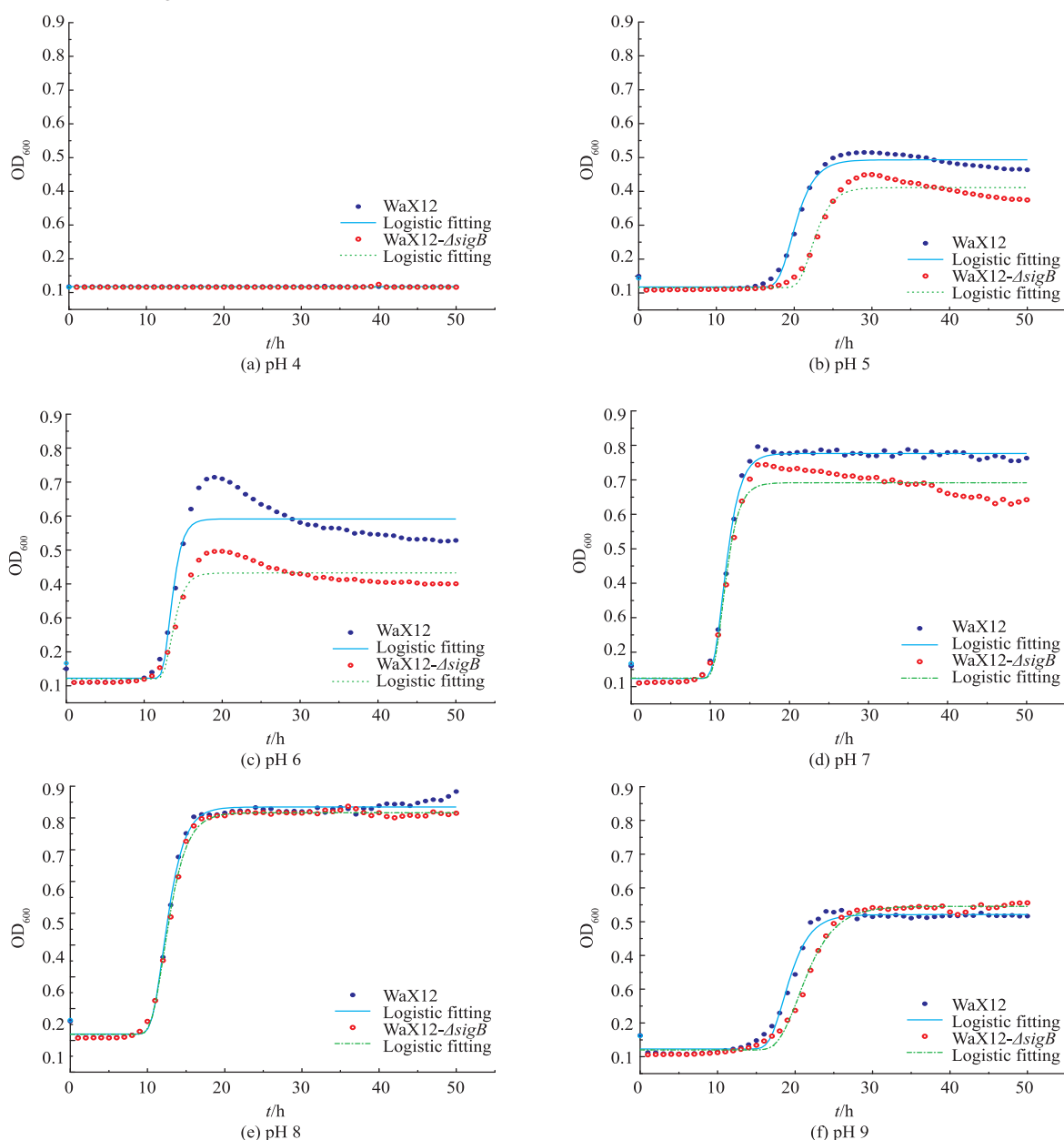


图 7 *WaxI2*- $\Delta sigB$ 与 *WaxI2* 在不同 pH 值下的生长曲线

Fig. 7 Growth curve of *WaxI2*- $\Delta sigB$ and *WaxI2* at different pH values

表 2 *WaX12-ΔsigB* 与 *WaX12* 在不同 pH 值下的 3 种生长动力学参数Table 2 Three different parameters of *WaX12-ΔsigB* and *WaX12* at different pH values

pH	μ_{max}		λ (h)		MPD-OD	
	<i>WaX12</i>	$\Delta sigB$	<i>WaX12</i>	$\Delta sigB$	<i>WaX12</i>	$\Delta sigB$
4	NF	NF	NF	NF	NF	NF
5	0.077±0.001 ^a	0.065±0.003 ^b	17.934±1.424 ^a	20.543±0.340 ^b	0.492±0.005 ^a	0.411±0.01 ^b
6	0.165±0.005 ^a	0.105±0.005 ^a	12.285±0.077 ^a	12.419±0.096 ^a	0.592±0.022 ^a	0.432±0.052 ^a
7	0.187±0.006 ^a	0.017±0.018 ^a	10.363±0.013 ^a	10.409±0.105 ^a	0.776±0.011 ^a	0.691±0.081 ^a
8	0.172±0.009 ^a	0.154±0.005 ^a	10.615±0.153 ^a	10.561±0.141 ^a	0.833±0.048 ^a	0.815±0.075 ^a
9	0.074±0.007 ^a	0.058±0.006 ^a	16.632±0.463 ^a	17.835±0.738 ^a	0.520±0.023 ^a	0.543±0.085 ^a

单增李斯特菌 *SigmaB* 基因做为单增李斯特菌中应激环境变化的因子,在外界变化中存在调控作用,提高细菌适应外界环境变化的能力。修正的 Logistic 预测模型能够较好地拟合 *WaX12* 以及 *WaX12-ΔsigB* 缺失突变株在不同 pH 值下的生长情况,两株菌的从 pH 5 到 pH 7 的生长速率都变快,延滞期变短,最大菌浓也上升,而从 pH 7 到 pH 9 的生长速率变慢,延滞期变长,最大菌浓下降,表明 pH 7 最适合两株菌的生长。但是在酸性情况下, *WaX12-ΔsigB* 各参数之间与 *WaX12* 存在显著性差异,表明 σ^B 因子在 pH 5 下对生长最敏感,这与 O'Driscoll 等^[13]人研究的单增李斯特菌亚致死有关,亚致死是生存与死亡的临界状态,相对于原始菌株有一定的细胞损伤,而在同样细胞受损的 *sigB* 基因缺失突变株,其适应环境的能力明显下降; FERREIRA^[14]等人做了在 pH 2.5 的情况下,原始菌株比缺失 *sigB* 的突变株的耐酸能力有提高,并且在 2 h 之内原始菌株的衰亡率没有降低,而原始菌株和 $\Delta sigB$ 经过亚致死情况的驯化后,其适应环境的能力都有轻微提高,这为 σ^B 因子对 LM 亚致死机制的研究奠定了一定的分子基础。

同时,ATR(Acid Tolerance Response)是 LM 在受到酸刺激情况下所表现出的耐受因子,它可以增加 LM 的抗酸性,并且 σ^B 因子可以调控 ATR 的活性^[15]。 σ^B 因子促使 LM 耐受酸性条件的作用机理可能是 σ^B 因子能调控一些与耐受酸性环境相关基因的表达,比如 ATR、GAD 等^[16]。单增李斯特菌的 GAD 系统(谷氨酸脱羧酶,glutamate-decarboxylase)对细菌在胃液(pH 2.5)中的存活至关重要,而单增李斯特菌的 σ^B 因子亦与细菌在胃液(pH 2.5)中的存活相关^[17],即 σ^B 因子可能参与调控 GAD 系统。这个系统除了 GAD 还有 Glu/γ-氨基丁酸(γ-aminobutyric

acid,GABA)反向转运子,反向转运子起到了维持体内 pH 的恒定。LM 中 GAD 由 *gadA*, *gadB* 和 *gadD* 基因编码,反向转运子由 *gadC* 和 *gadE* 基因编码,在基因 *gadCB* 和 *gadD* 启动子上游分别具有 σ^B 的结合位点^[18-19]。从而使 σ^B 因子在酸性应激条件下,开始调控 GAD 系统基因的表达^[20]。其中 *gadD* 基因中分为 *gadD1*, *gadD2* 和 *gadD3* 等,其中 GadD2 在单增李斯特菌受低酸中对其生长能力起到了主要作用^[21]。 σ^B 因子则是在酸性环境中可以正调控 *gadD2* 和 *gadD3*,缺失了 σ^B 因子的单增李斯特菌对酸性环境的适应能力有所降低。Wemekamp 等人^[22]将 *sigB* 缺失菌株与原始菌株同时在 pH 4.5 的酸中暴露 1 h 后,通过荧光定量的方法发现 *gadA* 的表达量几乎没有变化,而其余的 *gad* 家族的基因表达则减少,揭示了 σ^B 因子可能通过直接或间接的方式转录调控除 *gadA* 外的 *gad* 家族的表达来介导 LM 对酸性环境的耐受。由此机理看出,在低酸的情况下, *sigB* 缺失株比原始菌株耐受环境的能力有所降低。而在高 pH 值下的结果表明, *sigB* 缺失株对高 pH 值下的应激能力稍低于野生菌株,但是 LM 耐受碱的机制尚不明确^[23]。

作者通过修正 Logistic 预测模型,更加直观的获得了 *WaX12-ΔsigB* 与 *WaX12* 在不同 pH 值下的生长动力学差异,但是本实验的不足之处在于没有将不同 pH 值与不同温度相互结合起来进行研究 σ^B 因子的敏感性,后续实验会对 pH 值和温度正交实验并逐步分析。

3 结 语

作者构建了敲除了 *SigmaB* 基因开放阅读框(ORF)的突变株 *WaX12-ΔsigB*,通过修正的 Logistic 模型揭示了 σ^B 因子对 LM 应对环境反应过程中起

到了重要的作用, 得出在 pH 5 的盐酸环境下, *WaxI2-ΔsigB* 和 *WaxI2* 的最大比生长速率 $\mu_{\max}$ 、延滞期 λ 与最大细菌浓度 MPD-OD 均存在显著性差

异, 为下一步研究 σ^B 对 LM 在酸性环境下对毒力基因以及生长情况的调控作用提供了重要的分子理论依据。

参考文献:

- [1] 孟庆玲, 乔军, 才学鹏, 等. 单核细胞增多性李氏杆菌缺失株 InlB 的分子特性及其表达和纯化研究 [J]. 微生物学报, 2007, 47(6): 1098-1101.
MENG Qinlin, QIAO Jun, CAI Xuepeng, et al. Molecular characteristics of InlB protein of *Listeria monocytogenes* wild strain and its expression and purification[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2007, 47(6): 1098-1101. (in Chinese)
- [2] Rocourt J, Benembarek P, Toyofuku H, et al. Quantitative risk assessment of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods: the FAO/WHO approach[J]. *Fems Immunology and Medical Microbiology*, 2003, 35(3): 263-267.
- [3] 罗勤, 张晓莉, 李兵, 等. 单核细胞增生李斯特菌 PrfA 蛋白转录调控毒力基因表达的分子机制[J]. 微生物学通报, 2008, 35(2): 275-280.
LUO Qin, ZHANG Xiaoli, LI Bing, et al. Regulation of PrfA-dependent virulence genes expression in *Listeria monocytogenes* [J]. *Microbiology China*, 2008, 35(2): 275-280. (in Chinese)
- [4] Okada Y, Okada N, Makino S, et al. The sigma factor RpoN(σ^{54}) is involved in osmotolerance in *Listeria monocytogenes* [J]. *Fems Microbiology Letters*, 2006, 263: 54-60.
- [5] Van Schaik W, Abee T. The role of σ^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.
- [6] Wiedmann M, Arvik T, Hurley R, et al. General stress transcription factor sigmaB and its role in acid tolerance and virulence of *Listeria monocytogenes* [J]. *Journal of Bacteriology*, 1998, 180(14): 3650-3656.
- [7] McClure P J, Roberts T A, Otto Oguru P. Comparison of the effects of sodium chloride, pH and temperature on the growth of *Listeria monocytogenes* on gradient plates and in liquid medium[J]. *Letters in Applied Microbiology*, 1989, 9: 95-99.
- [8] Ondrusch N, J Kreft. Blue and red light modulates SigB-Dependent gene transcription, swimming motility and invasiveness in *Listeria monocytogenes* [J]. *Plos One*, 2011, 6(1): 15-21.
- [9] Palmer M, Wiedmann M, Boor K, et al. *Sigma* (B) and *sigma* (L) contribute to *Listeria monocytogenes* 10403S response to the antimicrobial peptides SdpC and Nisin[J]. *Foodborne Pathogens and Disease*, 2009, 6(9): 1057-1065.
- [10] Becker L, Cetin M, Hutkins R, et al. Identification of the gene encoding the alternative sigma factor *sigmaB* from *Listeria monocytogenes* and its role in osmotolerance[J]. *Journal of Bacteriology*, 1998, 180(17): 4547-4554.
- [11] Schaik V, Abee T. The role of σ^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.
- [12] Zwietering M H, Jongenburger L, Rombouts F M, et al. Modeling of the bacterial growth curve[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1990, 56(6): 1875-1881.
- [13] O'driscoll B, GAHAN C G M, Hill C. Adaptive acid tolerance response in *Listeria monocytogenes*: isolation of an acid-tolerant mutant which demonstrates increased virulence[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1996, 62(5): 1693-1698.
- [14] Ferreira A, Sue D, O'Byrne, CP, et al. Role of *Listeria monocytogenes sigmaB* in survival of lethal acid conditions and in the acquired acid tolerance response[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2003, 69(5): 2692-2698.
- [15] Werbrouck, H, Vermeulen A, Van Coillie E, et al. Influence of acid stress on survival, expression of virulence genes and invasion capacity into Caco-2 cells of *Listeria monocytogenes* strains of different origins[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2009, 134(1): 140-146.
- [16] Neuhaus K, Satorhelyi P, Schauer K, et al. Acid shock of *Listeria monocytogenes* at low environmental temperatures induces PrfA, epithelial cell invasion, and lethality towards *Caenorhabditis elegans* [J]. *BMC Genomics*, 2013, 14: 285.
- [17] Smith J L, Liu Y H, Paoli G C. How does *Listeria monocytogenes* combat acid conditions [J]. *Canadian Journal of Microbiology*, 2013, 59(3): 141-152.
- [18] Chaturongakul S, Kathryn J Boor. σ^B Activation under environmental and energy stress conditions in *Listeria monocytogenes* [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2006, 72(8): 5197-5203.

- [19] Chaturongakul S, Raengpradub S, Wiedmann M, et al. Modulation of stress and virulence in *Listeria monocytogenes* [J]. **Trends in Microbiology**, 2008, 16(8):388-396.
- [20] Ferreira A, O'byrne C, Boor K J, et al. 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.
- [21] Paul D C, Sheila R, Cormac G M G, et al. Presence of GadD1 glutamate decarboxylase in selected *Listeria monocytogenes* strains is associated with an ability to grow at low pH [J]. **Applied and Environmental Microbiology**, 2005, 71(6):2832-2839.
- [22] Wemekamp-kamphuis H H, Wouters J A, de Leeuw P P L A, et al. Identification of sigma factor sigma (B)-controlled genes and their impact on acid stress, high hydrostatic pressure, and freeze survival in *Listeria monocytogenes* EGD-e [J]. **Applied and Environmental Microbiology**, 2004, 70(6):3457-3466.
- [23] Singh V K, Schmidt J L, Jayaswal R K, et al. Impact of *sigB* mutation on *Staphylococcus aureus* oxacillin and vancomycin resistance varies with parental background and method of assessment [J]. **International Journal of Food Microbiology**, 2003, 21(3):256-261.

会 议 信 息

会议名称(中文): 第五届全国生物化学与分子生物学教学研讨会

开始日期: 2016-07-22

结束日期: 2016-07-25

所在城市: 安徽省 合肥市

具体地点: 中国科学技术大学生命科学学院

主办单位: 中国生物化学与分子生物学会、中国生物化学与分子生物学会生物化学与分子生物学教学专业委员会

协办单位: 中国科学技术大学教师教学发展中心

承办单位: 中国科学技术大学生命科学学院、安徽省生物化学与分子生物学会

摘要截稿日期: 2016-05-30

全文截稿日期: 2016-06-20

联系人: 白永胜、叶菁

联系电话: 0551-63601440、0551-63602242

E-MAIL: jiaoxue_ustcbio@126.com

会议网站: <http://www.csmb.org.cn/newsmore.asp?id=1014>

会议背景介绍: 为进一步推进生物化学与分子生物学教学水平的提高, 探讨教学改革规律, 交流教学经验, 创新生物化学与分子生物学人才培养模式, 第五届全国生物化学与分子生物学教学研讨会将在 2016 年 7 月 22-25 日在安徽省合肥市中国科学技术大学召开。届时将邀请国内知名专家和同行代表作专题报告, 交流教学经验, 现诚挚邀请您积极参加。征文范围: 生物化学与分子生物学理论课和实验课教学创新与改革。

会议名称(中文): 2016 年全国糖生物学会会议

开始日期: 2016-08-05

结束日期: 2016-08-07

所在城市: 江苏省 南通市

主办单位: 中国生物化学与分子生物学会糖复合物专业委员会

承办单位: 南通大学

联系人: 沈爱国 18251378991

联系电话: 0513-85051999

E-MAIL: shag@ntu.edu.cn

会议网站: <http://www.csmb.org.cn/newsmore.asp?id=1024>

会议背景介绍: 为促进我国糖生物学研究工作者的学术交流, 提高我国糖生物学的整体水平, 由中国生物化学与分子生物学会糖复合物专业委员会主办, 南通大学承办的 2016 年全国糖生物学会与拟定于 2016 年 8 月 5-7 日在江苏南通举行。本次学术会议将以糖蛋白、糖链、糖脂以及相关糖基转移酶等糖复合物在疾病中的功能为主题, 邀请在国内外糖化学及糖生物学研究领域有重要影响的科学家做大会特邀报告, 同时也为活跃在本领域的中青年工作者提供学术交流的平台。诚挚欢迎各位专家、学者、研究生踊跃投稿、积极参会, 共同交流最新研究成果。