一株食源性单增李斯特菌镉、砷耐受基因的测序分析

范荣栋[1]，赵俊仁[2]，石磊[3]，闫鹤[1]

（1.华南理工大学食品科学与工程学院，广东广州 510640）

（2.广东石油化工学院环境与生物工程学院，广东茂名 525000）（3.暨南大学食品学院，广东广州 510632）

摘要：为了探究食源性单核细胞增生李斯特菌对重金属的耐受性及耐受基因，本研究在一株食源性单增李斯特菌 LM3 中发现一段携带重金属镉耐受基因盒 *cadAC4* 及砷耐受基因盒 *arsD1A1R1D2R2A2B1B2* 的插入序列。通过琼脂稀释法测定菌株对重金属镉和砷的耐受性，PCR 及 DNA 测序、生物信息学分析，对插入序列的结构进行分析鉴定及与不同种属携带相似基因岛进行了分析。该菌株表现出低水平的镉耐受性，对砷表现为敏感。菌株携带 *cadA4*，及 *arsA1* 和 *arsA2* 基因，不携带 *cadA1*，*cadA2* 及 *cadA3* 基因。镉耐受基因 *cadAC4* 能介导低水平的镉耐受性，相反地，砷耐受基因盒 *arsD1A1R1D2R2A2B1B2* 并未表达或表达受到抑制。测得序列长 36629 bp，具有高度保守性，是亚洲国家首次在食源性单增李斯特菌中发现该插入序列。砷耐受基因盒存在位置具多样性，且可以由不同基因组合。

关键词：单核细胞增生李斯特菌；重金属耐受性；耐受基因

文章篇号：1673-9078(2017)7-63-71 DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2017.7.010

Sequencing Analysis of Cadmium and Arsenic Resistance Genes in a *Listeria monocytogenes* Strain Isolated from Meat

FAN Rong-dong[1], ZHAO Jun-ren[2], SHI Lei[3], YAN He[1]

(1.Food Science and Engineering School, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

(2.Faculty of Environmental and Biological Engineering, Guangdong Institute of Petrochemical Technology, Maoming 525000, China) (3.Department of Food Science and Engineering, Jinan University, Guangzhou 510632, China)

Abstract: In order to study the heavy metal resistance of food-borne *Listeria monocytogenes* and its resistance genes, an insertion sequence harboring a cadmium (Cd) resistance gene cassette, *cadAC4*, and an arsenic (As) resistance gene cassette, *arsD1A1R1D2R2A2B1B2*, from a single *Listeria monocytogenes* LM3 strain was identified in this experiment. The cadmium and arsenic resistance of the strain were measured by agar dilution method, and polymerase chain reaction (PCR), DNA analysis, and bioinformatics analysis were used to identify the structure of the insertion sequence and analyze the genetic islands harboring similar genes from different species. This strain exhibited a low level of cadmium resistance and was sensitive to arsenic. The strain harbored genes *cadA4*, *arsA1*, and *arsA2*, and did not harbor genes *cadA1*, *cadA2*, or *cadA3*. The cadmium resistance gene *cadAC4* could mediate the low level of cadmium resistance, while the arsenic resistance gene cassette *arsD1A1R1D2R2A2B1B2* was not expressed, or its expression was suppressed. The length of the sequence was 36629 bp, and it was highly conserved. This insertion sequence was identified for the first time in food-borne *Listeria monocytogenes* in an Asian country. The arsenic resistance gene cassette had a variety of locations and could be composed of different genes.

Key words: *Listeria monocytogenes*; heavy-metal resistance; resistance gene

单核细胞增生李斯特菌(*Listeria monocytogenes*)是革兰氏阳性短杆菌，可引起全球性的人兽共患病李斯特菌病[1]。该病可导致脑膜炎、败血症、肺炎、热性肠胃炎、流产和死胎等症状，且死亡率较高，达 30%左右[2]。单增李斯特菌在食品中具有较高分离率[3]，且在世界范围内多次引发食物中毒事件[1,4]，是许多发达国家和发展中国家重点监测的食源性致病菌[3]。1997 年，云南省一村庄曾暴发李斯特菌病，疫区内大家畜（包括牛、羊和猪等）几乎全部死亡，人的发病率达 8.5%[5]。2002~2009 年，全国 16 个省经报道的李斯特菌病例共 92 例[6]。然而，在我国尚没有美国那样完善

收稿日期：2017-01-06

基金项目：广东省科技计划项目（2014A020214001、2016A020219001）；广东省自然科学基金项目（2016A030307027）

作者简介：范荣栋（1992-），男，在读研究生，研究方向：食源微生物食品安全

通讯作者：闫鹤（1972-），女，副研究员，研究方向：主要从事食品安全微生物

的食源性疾病报告机制，各级部门监测水平参差不齐，系统的李斯特菌流行病学资料匮乏[7]。

单增李斯特菌对重金属的耐受性有利于其在环境中持续存在[8,9]，其耐受性已被广泛用于菌株的分型[10]。单增李斯特菌对重金属如镉[9]（Cd）和砷（As）的耐受性在上世纪 90 年代就有报道。根据文献报道，在欧美国家中，从食品加工环境及食品中分离的单增李斯特菌 Cd 和 As 耐受率分别为 49.3~66%和 10~21%[11~13]。重金属污染是我国主要的土壤环境污染问题[14]。我国受镉、砷、汞、铜和锌等重金属污染的耕地约有 1.5 亿亩[14]。然而，目前，国内仅有少量研究报道了单增李斯特菌对重金属的耐受性[15]。

单增李斯特菌对镉的耐受机制目前已有 Lebrun[9]、Kuenne[16]和 Lee[17]等团队进行研究。1992 年，Lebrun 等[18]发现携带质粒的菌株对镉具有耐受性。其耐受机制与金黄色葡萄球菌中发现的 *cadAC* 基因相似[19]。目前在单增李斯特菌中已发现四个镉外排泵基因，包括：*cadA1*，位于转座子 Tn5422 上，转座子常位于质粒上[20]；*cadA2*，位于较大的质粒如 pLM80[16]上；*cadA3*，位于染色体上；*cadA4*，位于染色体保守区域一段插入序列上[17]。单增李斯特菌对砷的耐受基因研究较少。Kuenne 等[16]发现 *L. innocua CLIP* 11262 携带的质粒 pLI100 上携带砷耐受基因盒 *ars R1D2R2A2B1B2*。

2011 年，Briers 等[21]对 1983 年暴发的李斯特菌病期间从临床中广泛分离到的 4b 型单增李斯特菌 ScottA 菌株进行全基因组测序，发现一段 35 kb 的插入序列，携带镉耐受基因 *cadAC4* 及 As 耐受基因及 *arsD1A1R1D2R2A2B1B2*。如图 1 所示，单增李斯特菌 ScottA 在与 LMOf2365_2257 相同的位置插入了 35 kb 序列。

本研究以一株分离自广州市超市生猪肉的单增李斯特菌为研究对象，探究其重金属耐受性及耐受机制，发现菌株携带一段重金属耐受基因 *cadA4*，*arsA1* 及 *arsA2* 约 35 kb 插入序列基因岛，通过 PCR 及 DNA 测序、生物信息学分析，对插入序列的结构进行分析鉴定及与不同种属携带相似基因岛进行了分析。

1 材料和方法

1.1 菌株来源

1 株单核细胞增生李斯特菌 LM3 来源于实验室保存菌株，分离自广州某市区超市生猪肉，按照 GB/T 4789.30-2010 进行单增李斯特菌鉴定。分别采用了多重 PCR 及 K-B 法进行血清学分型及抗生素敏感性测定，数据简述如下：血清型为 4a 或 4c 型，该菌株对氨苄西林、氨苄西林/舒巴坦、亚胺培南、环丙沙星、左氧氟沙星、万古霉素、四环素、强力霉素、头孢噻肟、链霉素、庆大霉素、氯霉素、红霉素、利福平、头孢噻吩、甲氧苄啶和青霉素都敏感。

1.2 实验仪器与设备

恒温培养箱，德国 Binder 公司；恒温培养摇床，上海一恒科学仪器有限公司；GeneAmp PCR system 2700，美国 Applied Biosystems 公司；Gel Doc EQ 凝胶成像系统、核酸电泳仪，美国 BIO-RAD 公司；高速离心机，美国 Thermo 公司；超净工作台，美国 Baker 公司；超纯水系统，美国 Millipore 公司；高压灭菌锅、-80 ℃冰箱，日本三洋公司；电子天平，上海梅特勒托利多仪器有限公司。

1.3 培养基和主要试剂

BHI 培养基、TSB 培养基、琼脂，广东环凯微生物科技有限公司；Iso-Sensitest 培养基，美国 Oxoid 公司；无水氯化镉，德国 Sigma 公司；砷化钠（Sodium (meta)arsenite），德国 Sigma 公司；TaqDNA 聚合酶（5 U/μL）、DL2000 Marker，日本 TaKaRa 公司；细菌基因组 DNA 快速提取试剂盒，Biomed 公司；引物，由英潍捷基（上海）贸易有限公司合成。

1.4 方法

1.4.1 重金属耐受性检测

重金属镉和砷对单增李斯特菌的最小抑菌浓度测定参照 Lee[17]的方法，略有调整。从 BHI 平板上挑取单核细胞增生李斯特菌单菌落悬浮于 100 μL TSB 培养基，用无菌枪头取 5 μL 菌悬液分别点于 ISA 平板；ISA 平板含无水氯化镉浓度分别为 0、10、20、35、70、140、200 μg/mL，含砷化钠浓度分别为 0、250、500、1000 μg/mL。将平板于 37 ℃培养箱中培养 48 h，无任何菌落生长的平板的浓度判定为抑制浓度。对镉的最小抑菌浓度 MIC>35 μg/mL 为对镉具耐受性，对砷的最小抑菌浓度 MIC>500 μg/mL 为对砷具耐受性，所有试验重复两次。

1.4.2 Cd 和 As 耐受基因 PCR 分析与鉴定

DNA 提取按照 Biomed 公司 DNA 提取试剂盒说明进行。参考 Lee 等[17]的研究，确定菌株中镉（*cadA1*、*cadA2*、*cadA3* 和 *cadA4*）和砷(*arsA1* 和 *arsA2*)耐受基因携带情况，如图 1 所示，分别以引物 P4F-P4R、P4F-P2R 和 P2F-P3R 进行 PCR 反应确认 *cadA4*、*arsA1* 和 *arsA2* 基因相对位置，引物如表 1 所示。实验中 PCR

反应体系均为 25 μL：Taq 聚合酶 0.125 μL，buffer 2.5 μL，dNTP 2 μL，上下游引物各 1 μL，模板 1 μL，去离子水 17.375 μL。PCR 产物送深圳华大基因公司，将测序结果在美国国立生物技术信息中心（NCBI）数据库 www.ncbi.nlm.Nih.gov 网站进行分析，应用 Standard Nucleotide BLAST 对获得的基因序列进行同源性检索。

表 1 镉及砷耐受基因引物

Table 1 Primers used for Cd and As resistance genes

基因	引物名称	引物序列	参考 GI	参考文献
cadA1	cadA1-F	CAGAGCACTTTACTGACCATCAATCGTT	L28104	[17]
	cadA1-R	CTTCTTCATTTAACGTTCCAGCAAAAA	L28104	[17]
cadA2	cadA2-F	ACAAGTTAGATCAAAAGAGTCTTTTATT	AADR01000058	[17]
	cadA2-R	ATCTTCTTCATTTAGTGTTCCTGCAAAT	AADR01000058	[17]
cadA3	cadA3-F	TGGTAATTTCTTTAAGTCATCTCCCATT	AL591977	[17]
	cadA3-R	GCGATGATTGATAATGTCGATTACAAAT	AL591977	[17]
cadA4	cadA4-F（P1F）	GCATACGTACGAACCAGAAG	AFGI01000005.1	[17]
	cadA4-R(P1R)	CAGTGTTTCTGCTTTTGCTCC	AFGI01000005.1	[17]
arsA1	arsA1-F(P2R)	CAACTTTGACCCTGTGGAG	AFGI01000005.1	[17]
	arsA1-R(P2R)	CTTTCCATTCAATCACTGCG	AFGI01000005.1	[17]
arsA2	arsA2-F(P3R)	CAACCAGATCAGTTACCATTAAC	NC_003383	[17]
	arsA2-R(P3R)	TGCTTCTCCAGAGATTTCTTCTG	NC_003383	[17]
	P4F	ACATTGCGAGAACACCTTGG	NC_002973.6	[17]
	P4R	GATTTATCGGCGCAATGACG	NC_002973.6	[17]

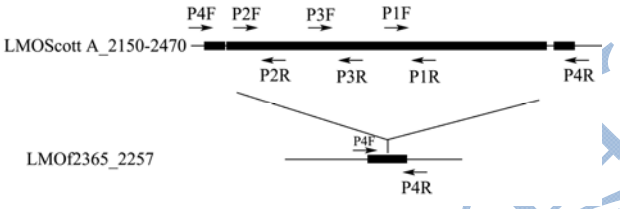


图 1 单增李斯特菌 Scott A 中携带镉及砷耐受基因盒 35 kb 插入序列的基因结构

Fig.1 Genetic organization of the ca. 35 kb genetic island harboring arsenic and cadmium resistance cassettes in *L. monocytogenes* Scott A

注：LMOScott A_2150-2470 为单增李斯特菌 ScottA 染色体上携带 Cd 及 As 耐受基因盒的 35 kb 基因岛；LMOf2365_2257 为参考菌株单增李斯特菌 F2365 染色体上基因组上保守区域；箭头为引物所在位置。基因序列从 NCBI 数据库中下载。

1.4.3 重金属耐受基因侧翼序列引物设计

为了确定镉和砷耐受基因侧翼序列，根据单增李斯特菌 Scott A(GenBank accession no. AFGI01000005.1) 染色体基因序列利用 Primer 5.0 软件设计 Cd 和 As 耐受基因侧翼序列引物，引物如表 2 所示。

1.4.4 重金属耐受基因侧翼序列 PCR 鉴定与生物信息学分析

细菌全基因组作为 PCR 分析的模板。实验中 PCR 反应体系均为 25 μL：Taq 聚合酶 0.125 μL，buffer 2.5 μL，dNTP 2 μL，上下游引物各 1 μL，模板 1 μL，去离子水 17.375 μL。测序结果用 Contigexpress 进行拼接，在美国国立生物技术信息中心（NCBI）数据库 www.ncbi.nlm.nih.gov 网站对测得的序列进行分析，应用 Standard Nucleotide BLAST 对获得的基因序列进行同源性检索。

表 2 35 kb 插入序列测序引物列表

Table 2 Primers used for the sequencing of the 35 kb island identified in this study

引物名称	序列（5'-3'）	位点	长度	参考文献
H3	TTAGGGAAGACTAGCTGATG	217617	2317	this study
H4	ATCCGAATCGTATTTATCTC	219934		this study
H2	TGCGGTCTCATTCTCATCTA	219753	1926	this study
H1	GAGACTCCTTGACGGCTGAT	221679		this study

转下页

接上页

arsA1F	CAACTTTGACCCTGTGGAG	221413	1446	[17]
arsA1R	CTTTCCATTCAATCACTGCG	222859		[17]
QT1	CGCACCAACAGGTCATACAC	222514	1975	this study
QT2	TTCCCTCTAAATGGTCCTAC	224489		this study
arsA2F	CAACCAGATCAGTTACCATTAAC	224231	1678	[17]
arsA2R	TGCTTCTCCAGAGATTTCTTCTG	225909		[17]
S1	TTATGAATCTATGCGACTAC	225715	2558	this study
S2	CTTCCTCTGTATTTCGTCTA	228273		this study
S3	TCATTATCGTTTACCGCAGC	228011	1855	this study
S4	GTTAGAGGCGAGCATTTGGG	229868		this study
S5	TGTAATAAGGGCGTAACTGG	229762	1683	this study
S6	GTCCCAACTAAGATACTCCT	231445		this study
S7	TATGGGCGGCTTCTCCTATA	231436	1277	this study
S8	AATAACGCTAACTTCAACCA	232713		this study
cadA4F	GCATACGTACGAACCAGAAG	232758	1114	[17]
cadA4R	CAGTGTTTCTGCTTTTGCTCC	233872		[17]
T1	CACTAACAGAGGGAGTATTT	233795	1696	this study
T2	AAAGGACACCGAGAATACGA	235491		this study
T3	CATAACGATAATCATAGCCT	235261	1260	this study
T4	AAACCTTATGCTTTACTCAA	236521		this study
T5	AAATAGTAGTGAGGGGAAGA	236757	1696	this study
T6	ATTTGATATTGACAGTTTCC	237599		this study
TS1	ATCTAATGCCAGAACAAGGT	237483	1260	this study
TS2	GTTATGCTTTGACCGACTTA	239202		this study
TQ1	GTACGAATCCGACTACGACA	239104	1526	this study
TQ2	CTATTTAACCGAGTTGAGCC	240630		this study
TQ3	TATGCCCAAATACAAAGGTC	240559	1719	this study
TQ4	TTCGCAAAGAACAAACCACA	242053		this study
TQ5	GTAATGAAAGGCTGTAGAAA	241961	1364	this study
TQ6	TCTCAAACTATCTTGCTCCT	243337		this study
TQ7	AAATAGTGAATGGCTGGGTG	243328	1655	this study
TQ8	CTAAAAGCACGACAAGCAGG	244983		this study
Q7	AGGAACTCCTGAGCCACTAT	244956	2525	this study
Q8	TCAAGAGCCACTTCTACTGC	247481		this study
Q5	TACGAACGCCTGTATCTGGT	247388	1898	this study
Q6	CAAAATCGGAAAAATGAAAT	249286		this study
Q3	GATAGTTGGGAAGGGTGGTA	249305	1847	this study
Q4	TTTGGACATCCCACTTATCT	251153		this study
Q1	TTTTGAAGATAAGTGGGATG	251147	2022	this study
Q2	TTACCATTTACTCCAGGTTT	253169		this study

2 结果与讨论

2.1 重金属耐受性及耐受基因检测结果

本研究中，如图 2 所示，单增李斯特菌 LM3 的 Cd 和 As 的 MIC 值分别为 70 μg/mL 和 250 μg/mL。对重金属耐受基因检测及测序，发现菌株携带 *cadA4*，及 *arsA1* 和 *arsA2* 基因。在 NCBI 数据库上经 Standard

Nucleotide BLAST 分析，结果表明：相比参考菌株 Scott A(GenBank accession no. AFGI01000005.1)，*cadA4*，及 *arsA1* 和 *arsA2* 基因同源性为 100%。

如图 2 所示，引物 P4F-P4R 的 PCR 结果为阴性，引物 P4F-P2R、P2F-P3R 的 PCR 结果为阳性。结果说明砷耐受基因盒位于染色体上，且插入在与参考菌株单增李斯特菌 F2365 染色体上基因组上保守区域 LMOf2365_2257 相同的位置上。

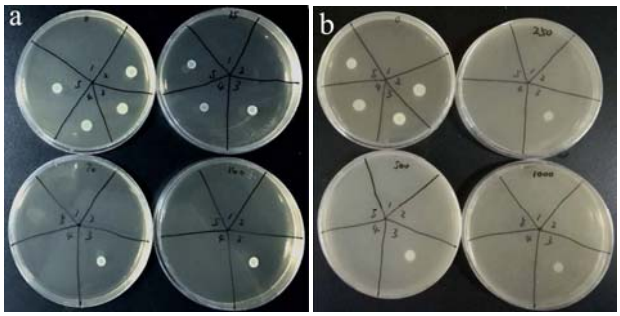


图 2 单增李斯特菌 LM3 镉及砷耐受性

Fig.2 Cd and As resistance of *L. monocytogenes* LM3

注：a 表示镉耐受性结果；b 表示砷耐受性结果。1 表示空白对照；2 表示阴性对照；3 表示阳性对照；4 表示单增李斯特菌 LM3；5 表示单增李斯特菌 ATCC19115。

菌株 LM3 携带的镉耐受基因盒 *cadAC4* 具有高度保守性，菌株 LM3 在 35 μg/mL 镉浓度下能正常生长，在 70 μg/mL 镉浓度下无法生长，MIC 值为 70 μg/mL。与 Lee 等[17]人的研究一致，能介导低水平的镉耐受性。

该插入序列上携带 As 耐药基因盒 *arsD1A1R1D2R2A2B1B2*，菌株对砷敏感。Lee 等[17]人的研究中，发现单增李斯特菌中对砷表现出耐受性的菌株单独携带 *arsA2* 或同时携带 *arsA1* 和 *arsA2* 基因，未发现单独携带 *arsA1* 的菌株，无论携带 *arsA2* 或同时携带 *arsA1* 和 *arsA2* 基因的菌株具有相似的 MIC 值。本研究中，菌株并未对 As 表现出耐受性，说明 As 耐受基因并未表达或表达受到抑制。

2.2 35 kb 插入序列的生物信息学分析

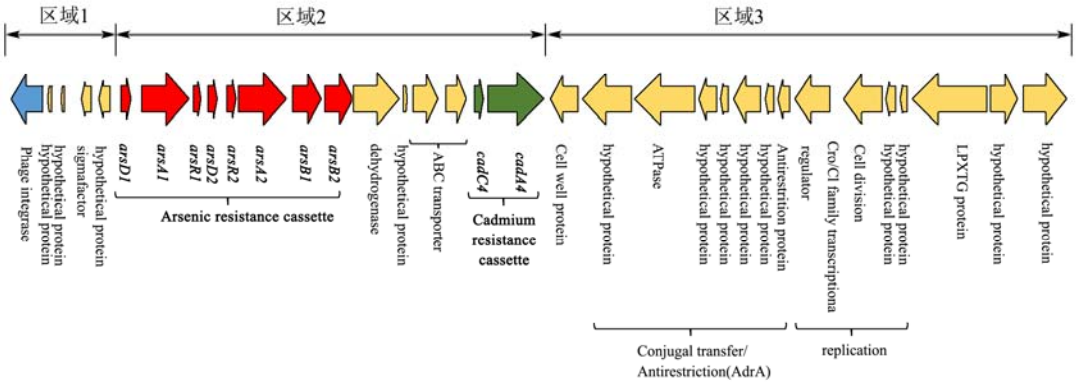


图 3 单增李斯特菌 LM3 上具有砷及镉耐受基因盒的插入序列基因结构

Fig.3 Genetic organization of the ca. 35 kb island harboring arsenic and cadmium resistance cassettes in *L. monocytogenes* LM3

注：箭头表示基因的位置和方向；蓝色实心箭头表示噬菌体整合酶；红色实心箭头表示砷耐受基因盒；，绿色实心箭头表示镉耐受基因盒（cadAC4）；序列上的不同区域用箭头标注，分别为区域 1，区域 2 和区域 3。

表 3 单增李斯特菌 LM3 中 35 kb 插入序列核苷酸相似性分析

Table 3 Analysis of nucleotide homogeneity in the 35 kb island from *L. monocytogenes* LM3

ORF	位点	基因长度/bp	产物	% nt 同源性	参考 GI
1	803~1993	1191	Phage integrase	100.00	AFGI01000005.1
2	2073~2279	207	Hypothetical protein	100.00	AFGI01000005.1
3	2901~3101	201	Hypothetical protein	100.00	AFGI01000005.1
4	3167~3571	405	RNA polymerase subunit sigma-70	99.99	AFGI01000005.1
5	3588~4047	459	Hypothetical protein	100.00	AFGI01000005.1
6	4315~4626	312	Transcriptional regulator arsD1	100.00	AFGI01000005.1
7	4646~6385	1740	Arsenical pump-driving ATPase arsA1	100.00	AFGI01000005.1
8	6476~6769	294	ArsR family transcriptional regulator arsR1	100.00	AFGI01000005.1
9	6771~7142	372	Transcriptional regulator arsD2	100.00	AFGI01000005.1

转下页

接上页

10	7275~7640	366	ArsR family transcriptional regulator	100.00	AFGI01000005.1
11	7676~9418	1743	Arsenical pump-driving ATPase arsA2	100.00	AFGI01000005.1
12	9501~10577	1077	Arsenic resistance protein ArsB1	100.00	AFGI01000005.1
13	10607~11662	1056	Arsenic resistance protein ArsB2	100.00	AFGI01000005.1
14	11683~13356	1674	Dehydrogenase	99.99	AFGI01000005.1
15	13381~13560	180	Hypothetical protein	100.00	AFGI01000005.1
16	13638~14573	936	ABC transporter	100.00	AFGI01000005.1
17	14566~15336	771	ABC transporter ATPase	100.00	AFGI01000005.1
18	15675~16031	357	Cadmium transporter	100.00	AFGI01000005.1
19	16048~18150	2103	CadA4	100.00	AFGI01000005.1
20	18302~19327	1026	Cell wall protein	100.00	AFGI01000005.1
21	19314~21101	1788	Hypothetical protein	100.00	AFGI01000005.1
22	21114~23636	2523	ATPase	100.00	AFGI01000005.1
23	23651~24340	690	Hypothetical protein	100	AFGI01000005.1
24	24343~24681	339	Hypothetical protein	100	AFGI01000005.1
25	24682~25701	1020	Hypothetical protein	99.99	AFGI01000005.1
26	25706~26080	375	Hypothetical protein	100	AFGI01000005.1
27	26077~26562	486	Antirestriction protein	100	AFGI01000005.1
28	26575~27876	1302	Cro/Cl family transcriptional regulator	100	AFGI01000005.1
29	28251~29687	1437	Cell division protein FtsK	99.99	AFGI01000005.1
30	29704~30102	399	Hypothetical protein	100	AFGI01000005.1
31	30118~30438	321	Hypothetical protein	100	AFGI01000005.1
32	30498~33191	2694	Collagen-binding protein	100	AFGI01000005.1
33	33392~34453	1071	Hypothetical protein	100	AFGI01000005.1
34	34434~36107	1695	Hypothetical protein	100	AFGI01000005.1

表 4 携带 35 kb 插入序列单增李斯特菌菌株信息

Table 4 Information of *L. monocytogenes* harboring 35 kb island

	血清型	国家	来源	同源性	参考 GI
WSLC 1018	4e	英国	鸡	99.9%	CP013285.1
WSLC1033（ATCC 19117）	4d	瑞士	未知	99.9%	CP013289.1
WSLC1047	4d	瑞士	未知	99.9%	CP013289.1
WSLC 1042(ATCC 23074)	4b	德国	未知	99.9%	CP007210.1|
Astr. 81-0861	4b	加拿大	沙拉	99.9%	CP006874.1
SLCC2378	4e	德国	未知	99.9%	FR733644.1
J1-108		加拿大	沙拉	99.9%	CP006596.1
J1-220	4b	美国	临床	99.9%	CP006046 .1
scottA	4b	美国	临床	99.8%	AFGI01000005.1

本研究对单增李斯特菌 LM3 中插入序列的结构进行分析。根据单增李斯特菌 Scott A(GenBank accession no. AFGI01000005.1)序列设计引物进一步 PCR 及测序分析，引物见表 1，根据测序结果可知，通过测序一共获得 36629 bp 的核苷酸序列。在 NCBI 数据库上经 Standard Nucleotide BLAST 分析，比对结果如图 3 及表 3 所示，插入序列与单增李斯特菌 Scott A(GenBank accession no. AFGI01000005.1)中的 35 kb 插入序列具有 99.8%同源性。该插入序列包含 34 个编码基因，其中末端基因编码为噬菌体整合酶。根据基因的功能将该插入序列分为区域 1（1~4314 bp）、区域 2(4315~18150 bp)和区域 3(18151~36107 bp)。区域 1 包含噬菌体整合酶，假拟蛋白，及 sigma 因子，区域 2 为耐药基因盒，包含砷耐受基因盒 *arsD1A1R1D2*

R2A2B1B2，镉耐受基因盒 *cadAC4*，脱氢酶(dehydrogenase)及功能未知的 ABC 家族转运蛋白(ABC transporter)。区域 3 为接合转移蛋白及与膜蛋白，以及多个假拟蛋白，基因的同源性如表 2 所示。同源性差异主要位于非编码区及开放读码框。

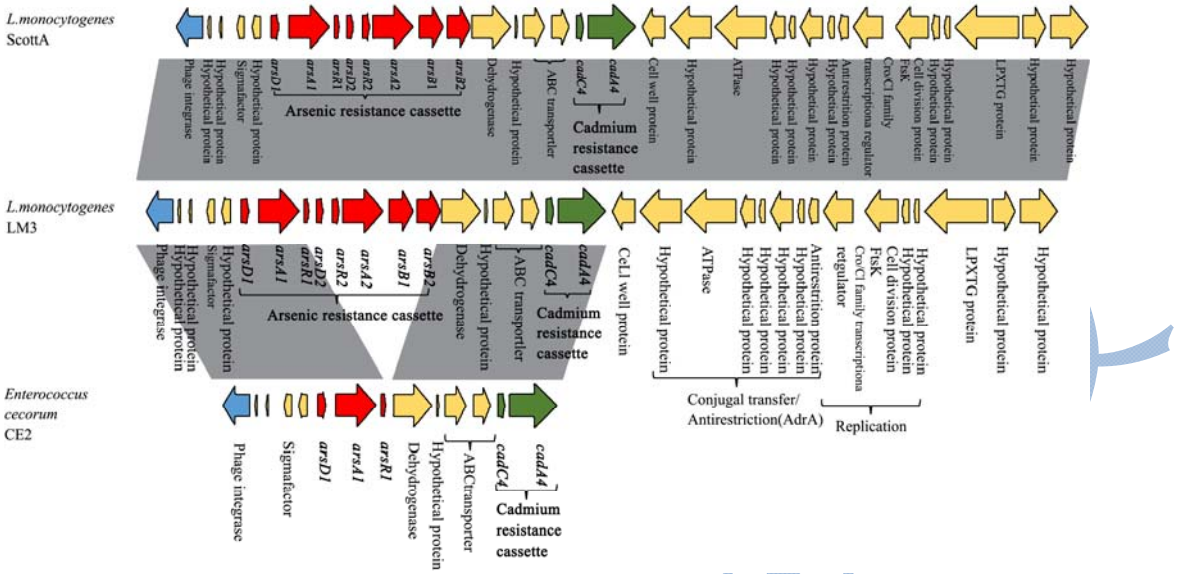


图 4 单增李斯特菌 LM3 插入序列与盲肠球菌 CE2 基因结构对比

Fig.4 Comparative structural analyses of the insertion sequence of *L. monocytogenes* LM3 with *Enterococcus cecorum* CE2

注：箭头表示基因的位置和方向；蓝色实心箭头表示整合酶；红色实心箭头表示砷耐受基因盒；绿色实心箭头表示镉耐受基因盒（cadAC4）；不同菌株中的相似基因结构用阴影表示。

Lee 等[17]人的研究显示，45 株临床分离的 4b 型单增李斯特菌中，有 13 株携带该插入序列，其中，9 株具有与单增李斯特菌 scottA 相同的侧翼序列，另外 4 株侧翼序列未知。到目前为止，在美国国立生物技术信息中心（NCBI）数据库上，仅有 8 株菌具有相同插入序列，且插入序列所在位点与单增李斯特菌 scottA 相同。这些菌株主要在欧美国家发现，来源包括蔬菜、禽肉和临床等，血清型主要为 4b 和 4d 和 4e 型。在 NCBI 上，将携带该插入序列的菌株进行 *L. monocytogenes*LM3 中发现的插入序列与其它含有插入序列的菌株进行 Standard Nucleotide BLAST 分析，结果如表 4 所示，不同菌株携带的 35 kb 插入序列同源性达 99.8%，该序列具有高度保守性。

如图 4 所示，根据 Standard Nucleotide BLAST 结果，插入序列部分结构与盲肠球菌 CE2(GenBank accession no. CP010062)染色体结构相似，区域 1（1~5653 bp）和区域 2 部分结构（10805~17065 bp）与盲肠球菌 CE2 的染色体序列(Gene Bank accession no. CP010062)同源性达 99.9%。与单增李斯特菌 LM3 上插入序列相比，盲肠球菌 CE2 染色体上含有 *arsA1* 及 *cadA4* 基因，不含 *arsD2R2A2B1B2* 基因，dehydrogenase 基因有 200 bp 的缺失，不含 LM3 插入序列上区域 3 部分。LM3 中 35 kb 插入序列及 CE2 均含有噬菌体整合酶（phage integrase）及相似的重金属耐药基因盒，说明砷及镉基因盒可随该插入序列在不同菌属间进行转移[22]。

2.3 镉耐受基因及其耐受机制分析

目前已发现的单增李斯特菌对重金属镉的耐受机制为 cadAC 基因编导的外排泵[19]。在 Mullapudi[11]和 Xu[12]等人的研究中，镉 MIC 值大于 70 μg/mL 的菌株具有耐受性。Lee 等[17]检测了临床分离的 135 株 4b 型单增李斯特菌对镉的最小抑菌浓度，发现携带 *cadA1*、*cadA2* 或 *cadA3* 的菌株的镉 MIC 值为 140~180 μg/mL；携带 *cadA4* 的菌株镉 MIC 值为 70 μg/mL，结果表明 *cadA1*、*cadA2* 或 *cadA3* 基因介导高浓度的镉耐受性，*cadA4* 介导低水平的镉耐受性。本研究中，菌株 LM3 仅携带 *cadA4*，不携带 *cadA1*,*cadA2* 及 *cadA3* 基因。菌株的镉 MIC 值为 70 μg/mL，与 Lee 等[17]人的研究一致，能介导低水平的镉耐受性。*cadA4* 能介导的低水平镉耐受性的原因仍未知，可能是因为 *cadA4* 与 *cadA1*、*cadA2* 及 *cadA3* 所编码的蛋白同源性较低[17]。

2.4 砷耐受基因及其耐受机制分析

到目前为止，仅有少量研究检测了单增李斯特菌中的砷耐受基因，主要为 *arsA2*[17]。如图 5 所示，在 *L.innocus* 质粒 pLI100（GenBank accession no. AL592102.1）中存在砷耐受基因盒 *ars R1D2R2A2*

B1B2。Lee 等[17]人的研究中，发现单增李斯特菌中对砷表现出耐受性的菌株携带 *arsA2* 或同时携带 *arsA1* 和 *arsA2* 基因，未发现单独携带 *arsA1* 的菌株。经 blast 后，在 NCBI 上发现盲肠球菌 CE2（GenBank accession no. CP010062）上存在砷耐受基因盒 *arsD1A1R1*，说明 *arsA1* 可单独存在。粪肠球菌 ATCC 29212（GenBank accession no. CP010062）质粒中存在 *arsR1D2R2A2* 基因盒。在细菌染色体上或质粒上均有发现砷耐受基因盒，说明砷耐受基因盒存在位置具多样性，且可以由不同基因组合。从比对结果推断，*arsA* 基因所编码的膜蛋白，在砷耐受基因盒可能起了至关重要的作用。到目前为止，对单增李斯特菌砷耐受基因的研究较少，其耐药基因的调控机制还不明确。在 Lee 等[17]人的研究中，无论是单独携带 *arsA2* 或同时携带 *arsA1* 和 *arsA2* 基因的菌株，具有相近的 MIC 值。在本研究中，菌株 LM3 同时含 *arsA1* 和 *arsA2* 基因，且高度保守，但菌株并未对砷表现出耐受性，说明砷耐药基因的表达可能还有其他影响因素，还需进一步研究。

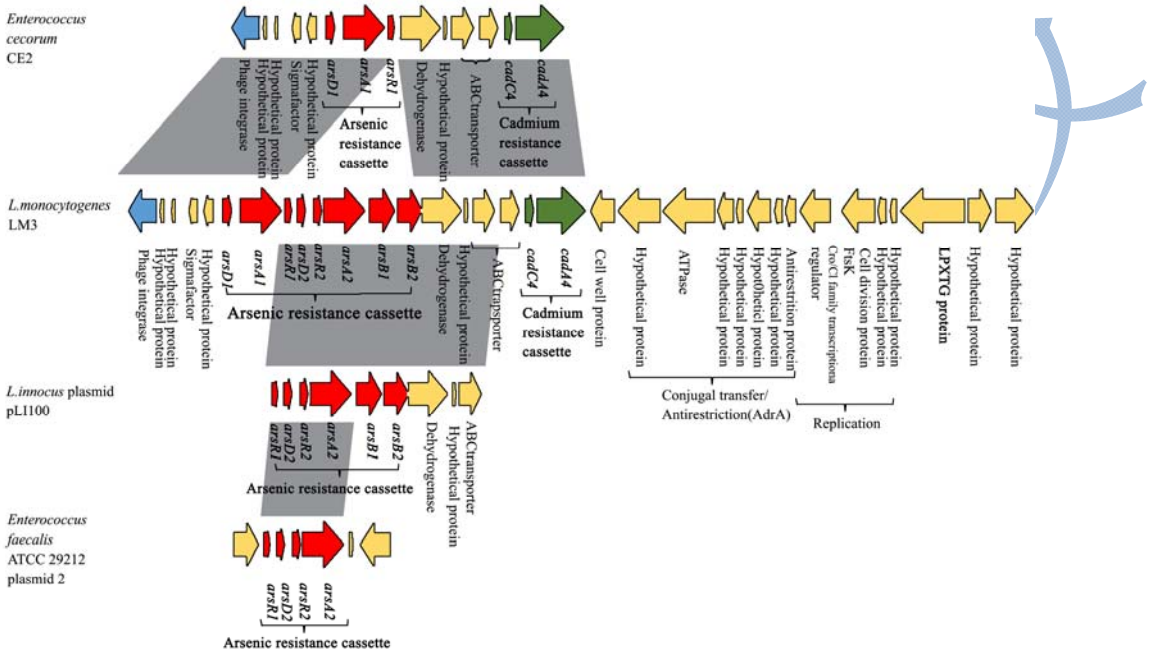


图 5 单增李斯特菌 LM3 插入序列与盲肠球菌 CE2、无害李斯特菌质粒 pLI100 和粪肠球菌 ATCC 29212 plasmid 2 上砷耐药基因盒对比

Fig.5 Comparative structural analyses of the insertion sequence of *L. monocytogenes* LM3 with the arsenic resistance cassettes of *Enterococcus cecorum* CE2, *L. innocu* splasmid pLI100, and *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 plasmid 2

注：箭头表示基因的位置和方向；下对角线箭头表示粪肠球菌 L11 插入序列侧翼结构；蓝色实心箭头表示整合酶；红色实心箭头表示砷耐受基因盒；绿色实心箭头表示镉耐受基因盒（cadAC4）；不同菌株中的相似基因结构用阴影表示。

3 结论

3.1 本研究中，单增李斯特菌 LM3 的 Cd 和 As 的 MIC 值分别为 70 μg/mL 和 250 μg/mL，携带 *cadA4*，及 *arsA1* 和 *arsA2* 基因。菌株 LM3 携带的镉耐受基因盒 *cadAC4* 能介导低水平的镉耐受机制，As 耐受基因并未表达或表达受到抑制。

3.2 本研究发现的插入序列，与暴发型李斯特病人分离菌株 scottA 中的插入序列具有 99.8%同源性，是亚洲国家首次在食源性单增李斯特菌中发现该插入序列。该插入序列可能随噬菌体在不同菌属中转移。

3.3 砷耐受基因盒存在位置具多样性，且可以由不同基因组合。

参考文献

[1] N Romanova, S Favrin, M W Griffiths. Sensitivity of *Listeria monocytogenes* to sanitizers used in the meat processing industry [J]. Applied & Environmental Microbiology, 2002, 68(12): 6405-6409

[2] Liu D. Identification, subtyping and virulence determination of *Listeria monocytogenes*, an important foodborne pathogen [J]. Journal of Medical Microbiology, 2006, 55(6): 645-659

[3] 王茂起,冉陆,王竹天,等.2001 年中国食源性致病菌及其耐药性主动监测研究[J].卫生研究,2004,33(1):49-54
WANG Mao-qi, RAN Lu, WANG Zhu-tian, et al. Study on national active monitoring for food borne pathogens and antimicrobial resistance in China 2001 [J]. Journal of Hygiene Research, 2004, 33(1): 49-54

[4] Hain T, Ghai R, Billion A, et al. Comparative genomics and transcriptomics of lineages I, II, and III strains of *Listeria*

monocytogenes [J]. BMC Genomics, 2012, 13: 144

[5] 肖义泽,任丽娟,王金玉,等.云南省首次动物源性李斯特菌病暴发的流行病学调查[J].中华流行病学杂志,2000,21(3): 236
XIAO Yi-ze, REN Li-juan, WANG Jin-yu, et al. Epidemiological investigation of the first animal source listeria outbreak in Yunnan [J]. Chinese Journal of Epidemiology, 2000, 21(3): 236

[6] 冯延芳,冉陆,张立实.2000-2009 年中国李斯特菌病文献报告病例分析[J].疾病监测,2011,26(8):654-659
FENG Yan-fang，RAN Lu，ZHANG Li-shi. *Listeriosis* cases reported in medical literatures in China， 2000-2009[J]. Disease Surveillance, 2011, 26(8): 654-659

[7] V Goulet, C Hedberg, M A Le, et al. Increasing Incidence of *Listeriosis* in France and other European countries [J]. Emerging Infectious Diseases, 2008, 14(5): 734-740

[8] J Harvey, A Gilmour. Characterization of recurrent and sporadic *Listeria monocytogenes* isolates from raw milk and nondairy foods by pulsed-field gel electrophoresis, monocin typing, plasmid profiling, and cadmium and antibiotic resistance determination [J]. Applied & Environmental Microbiology, 2001, 67(2): 840-847

[9] Lebrun M, Loulergue J, Chaslus-Dancla E, et al. Plasmids in *Listeria monocytogenes* in relation to cadmium resistance [J]. Applied & Environmental Microbiology, 1992, 58(9): 3183-3186

[10] McLauchlin J, Hampton M D, Shah S, et al. Subtyping of *Listeria monocytogenes* on the basis of plasmid profiles and arsenic and cadmium susceptibility [J]. J. Appl. Microbiol., 1997, 83(3): 381-388

[11] Mullapudi S, Siletzky R M, Kathariou S. Heavy-metal and benzalkonium chloride resistance of *Listeria monocytogenes* isolates from the environment of turkey-processing plants [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2008, 74(5): 1464-1468

[12] Xu D, Li Y, Shamim Hasan Zahid M, et al. Benzalkonium chloride and heavy-metal tolerance in *Listeria monocytogenes* from retail foods [J]. International Journal of Food Microbiology, 2014, 190(3): 24-30

[13] Ratani S S, Siletzky R M, Dutta V, et al. Heavy metal and disinfectant resistance of *Listeria monocytogenes* from foods and food processing plants [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2012, 78(19): 6938-6945

[14] 周建军,周桔,冯仁国.我国土壤重金属污染现状及治理战略[J].中国科学院院刊,2014,3:315-320
ZHOU Jian-jun , ZHOU Ju , FENG Ren-guo. Status of China's heavy metal contamination in soil and its remediation strategy [J]. Bulletin of the Chinese Academy of Sciences, 2014, 3: 315-320

[15] 何建华,徐冬旸,刘星宇,等.食源性单核细胞增生李斯特菌的重金属镉抗性及其与抗生素耐药性的关系研究[J].现代食品科技,2013,3:479-482
HE Jian-hua, XU Dong-yang, LIU Xing-yu, et al. Cadmium resistance of food-borne *Listeria monocytogenes* and the relationships between cadmium resistance and antibiotic resistance [J]. Modern Food Science and Technology, 2013, 3: 479-482

[16] C Kuenne, S Voget, J Pischimarov, et al. Comparative analysis of plasmids in the genus *Listeria* [J]. Plos One, 2010, 5(9): e12489-e12489

[17] Lee S, Rakic-Martinez M, Graves L M, et al. Genetic determinants for cadmium and arsenic resistance among *Listeria monocytogenes* serotype 4b isolates from sporadic human *Listeriosis* patients [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2013, 79(7): 2471-2476

[18] Aase B, Sundheim G, Langsrud S, et al. Occurrence of and a possible mechanism for resistance to a quaternary ammonium compound in *Listeria monocytogenes* [J]. International Journal of Food Microbiology, 2000, 62(1-2): 57

[19] M Lebrun, A Audurier, P Cossart. Plasmid-borne cadmium resistance genes in *Listeria monocytogenes* are similar to cadA and cadC of *Staphylococcus aureus* and are induced by cadmium [J]. Journal of Bacteriology, 1994, 176(10): 3040-3048

[20] M Lebrun, A Audurier, P Cossart. Plasmid-borne cadmium resistance genes in *Listeria monocytogenes* are present on Tn5422, a novel transposon closely related to Tn917 [J]. Journal of Bacteriology, 1994, 176(10): 3049

[21] Y Briers, J Klumpp, M Schuppler, et al. Genome sequence of *Listeria monocytogenes* Scott A, a clinical isolate from a food-borne *Listeriosis* outbreak [J]. Journal of Bacteriology, 2011, 193(16): 4284-5

[22] 祝令伟,蔡雪辉,刘军,等.猪链球菌 2 型新基因岛 SSGI4 的发现[J].中国人兽共患病学报,2009,25(7):615-618
ZHU Ling-wei , CAI Xue-hui , LIU Jun ,et al. A novel genomic island SSGI4 in *Streptococcus suis* serotype 2 [J]. Chinese Journal of Zoonoses, 2009, 25(7): 615-618