

研究报告

食源性单增李斯特菌与英诺克李斯特菌基因组特征比较

张璟¹, 兰光¹, 申艳琴¹, 闫静¹, 刘小菊¹, 王伟², 肖晶²

(1. 甘肃省疾病预防控制中心, 甘肃 兰州 730000; 2. 国家食品安全风险评估中心, 北京 100022)

摘要: **目的** 通过全基因组测序对甘肃省市售食品中分离的单增李斯特菌和英诺克李斯特菌基因组特征进行比较分析。**方法** 收集 2021—2022 年甘肃省市售食品中分离的 25 株单增李斯特菌和 7 株英诺克李斯特菌作为研究对象, 对菌株进行全基因组测序, 分析其系统发育谱系、克隆复合群(CC)、序列型(ST)、毒力基因、抗性基因及泛基因组。**结果** 32 株李斯特菌分属单增李斯特菌谱系 I 和 II 及英诺克李斯特菌 3 个群, 单增李斯特菌分为 10 个亚群, 英诺克李斯特菌分为 5 个亚群, 与 CC 型保持一致, 核心基因组多位点序列分型能将各谱系中不同 CC 型的菌株明显分开, 谱系 I 与英诺克李斯特菌的进化关系更近。25 株单增李斯特菌均携带李斯特菌毒力岛 LIPI-1 和内化素基因, 不携带 LIPI-3, 有 2 株 ST87 型菌株携带 LIPI-4; 7 株英诺克李斯特菌均不携带 LIPI-1 和内化素基因, 均携带 LIPI-4, 有 5 株菌株携带 LIPI-3。单增李斯特菌有 16 株携带 SSI-1, 3 株携带 SSI-2, 7 株英诺克李斯特菌均不携带 SSI-1, 有 6 株携带 SSI-2。李斯特菌的泛基因组大小随着测序基因组数目的增加呈现线性增多, 25 株单增李斯特菌当菌株数量达到 15 后核心基因数目稳定在 2 272 个, 占泛基因组基因数目的 46.2%, 25 株单增李斯特菌和 7 株英诺克李斯特菌共同的核心基因 1 487 个, 当菌株数量达到 10 后数目趋于稳定。**结论** 核心基因组多位点序列分型可将不同谱系不同克隆复合群的李斯特菌进行区分, 英诺克李斯特菌与单增李斯特菌生化特性相似与其亲缘关系相近有关, 致病性差异与英诺克李斯特菌缺失单增李斯特菌特有的毒力基因相关。

关键词: 单增李斯特菌; 英诺克李斯特菌; 全基因组测序; 毒力基因; 泛基因组**中图分类号:** R155 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-8456(2024)02-0113-07**DOI:** 10.13590/j.cjfh.2024.02.001**Comparative genomic analysis of foodborne *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua***ZHANG Jing¹, LAN Guang¹, SHEN Yanqin¹, YAN Jing¹, LIU Xiaoju¹, WANG Wei², XIAO Jing²

(1. Gansu Provincial Center for Disease Control and Prevention, Gansu Lanzhou 730000, China;

2. China National Center for Food Safety Risk Assessment, Beijing 100022, China)

Abstract: Objective To utilize whole genome sequencing to comprehensively compare and analyze the genomic characteristics of *Listeria monocytogenes* (*L. monocytogenes*) and *Listeria innocua* (*L. innocua*) isolated from commercially available foods in Gansu Province. **Methods** During 2021 and 2022, 25 strains of *L. monocytogenes* and 7 strains of *L. innocua* were isolated from commercially available food sources within Gansu Province and subjected to whole genome sequencing for phylogenetic lineage, clonal complex (CC), sequence type (ST), virulence gene, resistance gene, and pan-genome analyses. **Results** The 32 *Listeria* strains examined could be classified into three distinct groups: *L. monocytogenes* lineages I and II and *L. innocua*. Considering their CC types, further subdivision into 10 subgroups was observed for *L. monocytogenes*, whereas *L. innocua* had 5 subgroups. Core genome multi-locus sequence typing effectively differentiated strains with different CC types within each lineage, with lineage I showing a closer evolutionary relationship with *L. innocua*. All 25 *L. monocytogenes* strains carried *Listeria* pathogenicity island 1 (LIPI-1) and internalin genes; none carried LIPI-3, and 2 strains of ST87 carried LIPI-4. Conversely, none of the seven strains of *L. innocua* carried LIPI-1 or internalin genes; however, they all carried LIPI-4, and 5 carried LIPI-3. Among the *L. monocytogenes* strains, 16 carried surface sensory island 1 (SSI-1), and 3 carried SSI-2; all 7 *L. innocua* strains did not carry SSI-1, but 6 of them carried SSI-2. The pan-genome size of *L. monocytogenes* increased linearly with the number of sequenced genomes. Upon reaching 15 strains, the number of core genes stabilized at 2 272, accounting for

收稿日期: 2023-08-03

基金项目: 甘肃省科技计划项目基础研究计划自然科学基金(23JRRA1796)

作者简介: 张璟 女 副主任检验师 研究方向为食源性致病菌监测、耐药及毒力研究 E-mail: 465898370@163.com

通信作者: 肖晶 女 研究员 研究方向为食品卫生研究 E-mail: xiaojing@cfssa.net.cn

46.2% of the pan-genome genes. Furthermore, 1 487 common core genes were shared between the 25 *L. monocytogenes* strains and 7 *L. innocua* strains, with the count tending to stabilize when the strain count reached 10. **Conclusion** Multi-locus sequence typing of the core genome can effectively distinguish among *Listeria* strains originating from different lineages and CCs. The similarity in the biochemical characteristics of *L. monocytogenes* and *L. innocua* is due to their close genetic relationship, while the differences in their pathogenicity can be attributed to the presence of certain virulence genes in *L. monocytogenes*.

Key words: *Listeria monocytogenes*; *Listeria innocua*; whole genome sequencing; virulence genes; pan-genome

李斯特菌属(*Listeria*)普遍存在于环境中,主要包括单核细胞增生李斯特菌(简称单增李斯特菌, *Listeria monocytogenes*)、威尔斯李斯特菌(*Listeria welshimeri*)、绵羊李斯特菌(*Listeria ivanovii*)、西尔李斯特菌(*Listeria seeligeri*)、默氏李斯特菌(*Listeria murrayi*)、格氏李斯特菌(*Listeria grayi*)和英诺克李斯特菌(*Listeria innocua*)等^[1]。单增李斯特菌已被证实可使人类致病,而英诺克李斯特菌不具有溶血活性,也无致病性,因此目前对李斯特菌的研究多集中在单增李斯特菌上,对其他几种李斯特菌的研究相对较少。依据 GB 4789.30—2016《食品安全国家标准 食品微生物学检验 单核细胞增生李斯特氏菌检验》,在进行食品中单增李斯特菌分离时,英诺克李斯特菌常伴随单增李斯特菌被检出,除溶血实验和小鼠毒力实验外,其他生化试验结果均相同。

本文采用全基因组测序技术和生物信息学,分析单增李斯特菌与英诺克李斯特菌携带的毒力基因(黏附、侵袭、免疫调节剂、细胞内存活、毒素和可移动遗传元件等)和抗性基因(抗消毒剂、抗重金属等),如毒力岛(*Listeria pathogenicity island*, LIPI) 1、2、3 和 4^[2],内化素基因,应激生存岛(*Stress survival islet*, SSI) 1 和 2^[3],李斯特菌基因组岛(*Listeria genomic island*, LGI) 1、2,以及生物杀灭剂抗性基因^[4],并根据核心基因构建系统进化树,结合泛基因组分析,解析单增李斯特菌和英诺克李斯特菌毒力相关基因特征差异,可为深入认识单增李斯特菌和英诺克李斯特菌的进化关系奠定基础,也从基因组层面为单增李斯特菌食源性疾病的防控提供了依据。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株来源

本研究所用 32 株李斯特菌(25 株单增李斯特菌、7 株英诺克李斯特菌),分离自 2021—2022 年国家食品污染物和有害因素风险监测网采集的甘肃省市售肉与肉制品、乳与乳制品、水果及其制品、食用菌、饮料、冷冻饮品、调味料、坚果与籽类

及其加工制品、餐饮食品、地方特色食品。所有菌株均经过生化及溶血试验鉴定复核确认,于含 40% 甘油的脑心浸液肉汤冻存管中, -80 °C 冰箱保藏。

1.1.2 实验仪器和试剂

1.1.2.1 实验仪器

恒温培养箱(德国 MMM 公司); NanoDrop 1 000 微量紫外可见分光光度计(美国 Thermo 公司); PCR 仪(美国伯乐公司), Illumina miniSeq™ 测序平台(美国 Illumina 公司)。

1.1.2.2 试剂

脑心浸液肉汤、血琼脂平板购自北京陆桥技术股份有限公司;全基因组 DNA 提取试剂盒购自德国 Qiagen 公司;文库构建及测序试剂盒购自美国 Illumina 公司。

1.2 方法

1.2.1 全基因组测序

将待测菌株接种脑心浸液肉汤复苏后接种血琼脂平板,将新鲜培养物制备成菌悬液,使用 DNA 提取试剂盒提取 DNA, NanoDrop 1 000 微量紫外可见分光光度计检测 DNA 浓度和质量,采用 Illumina miniSeq 平台进行双末端测序,采用鸟枪法随机打断基因组 DNA,加上接头进行 Paired-End 片段(PE-150)建库,测序深度 100×,上机测序后采集下机数据。

1.2.2 全基因组分析

使用 FastQC 软件(<https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc>)和 Trimmomatic 软件(<https://github.com/usadellab/Trimmomatic>)对原始数据(Raw data)进行过滤和质控。使用 SPAdes v3.14 软件(<http://cab.spbu.ru/software/spades/>)进行基因组组装。使用 Prokka v1.14.5 软件(<https://github.com/tseemann/prokka>)进行基因组注释。使用 Roary v3.11.2 软件(<http://sanger-pathogens.github.io/Roary/>)进行核心基因分析。使用 FastTree v2.1 软件(<https://anaconda.org/bioconda/fasttree>)采用最大似然法构建进化树,参数设定为“-gtr-nt”。采用在线交互式生命树(Interactive Tree of Life, iTOL) iTOLv4 软件(<https://itol.embl.de/>)进行作图展示。

1.2.3 谱系、克隆复合群、序列型、毒力基因、应激生存岛及相关抗性基因分析

利用巴斯德李斯特菌数据库(<https://bigsdatabase.pasteur.fr/listeria/listeria.html>)分析株菌全基因组序列,得到谱系、克隆复合群(Clonal complex, CC)型、序列型(Sequence type, ST)型、毒力基因、应激生存岛及相关抗性基因。

1.2.4 泛基因组分析

利用 Roary v3.11.2 软件(<http://sanger-pathogens.github.io/Roary/>)自带的 python 脚本 `roary_plot.py` 和 R 语言脚本 `create_pan_genome_plots.R`,对 1.2.4 步骤的 Roary 输出文件“`accessory_binary_genes.newick`”“`gene_presence_absence.csv`”“`number_of_new_genes.Rtab`”“`number_of_conserved_genes.Rtab`”“`number_of_genes_in_pan_genome.Rtab`”“`number_of_unique_genes.Rtab`”“`blast_identity_frequency.Rtab`”等进行分析,获得泛基因组聚类树,核心基因、软核基因、壳基因、云基因的分布图,以及泛基因组特征拟合曲线。

根据每一个同源基因里面基因覆盖的菌株数量,定义每个同源基因的保守性值(Conservative value, CV),如:对于某个同源基因有 20 个菌株均含有此基因,则此同源基因的 CV 为 20,其他同理类

推。CV 是每类同源基因在菌株中分布差异性的体现,CV 值越大说明该同源基因在细菌群体里面分布越广泛,也说明该基因在细菌中越保守。

2 结果

2.1 菌株谱系、CC 型和 ST 型

25 株单增李斯特菌分为 2 个谱系,其中谱系 II 检出最多,有 21 株,占比为 84.0%,谱系 I 有 4 株,占比 16.0%。25 株单增李斯特菌共分为 10 种 CC 型,其中 CC9 检出最多,有 7 株,占比为 28.0%,其次是 CC8 检出 4 株,CC121 检出 3 株。10 种 CC 型共分为 11 种 ST 型,除 CC155 包括 ST155 和 ST705 两种 ST 型外,其余 CC 型只包含一种 ST 型,发现 1 个新的 ST 型,即 ST3142,属于 CC7(图 1)。7 株英诺克李斯特菌共分为 5 种 ST 型,ST537 和 ST2939 各 2 株,ST637、ST1610、ST1485 各 1 株(图 1)。

2.2 基因特征分析

32 株李斯特菌基于核心基因组构建系统发育树,相同谱系、血清型和 CC 型的菌株聚集在一起,分为单增李斯特菌谱系 I、单增李斯特菌谱系 II 和英诺克李斯特菌 3 个群,其中单增李斯特菌分为 10 个亚群,英诺克李斯特菌分为 5 个亚群,与 CC 型保持一致(图 1)。

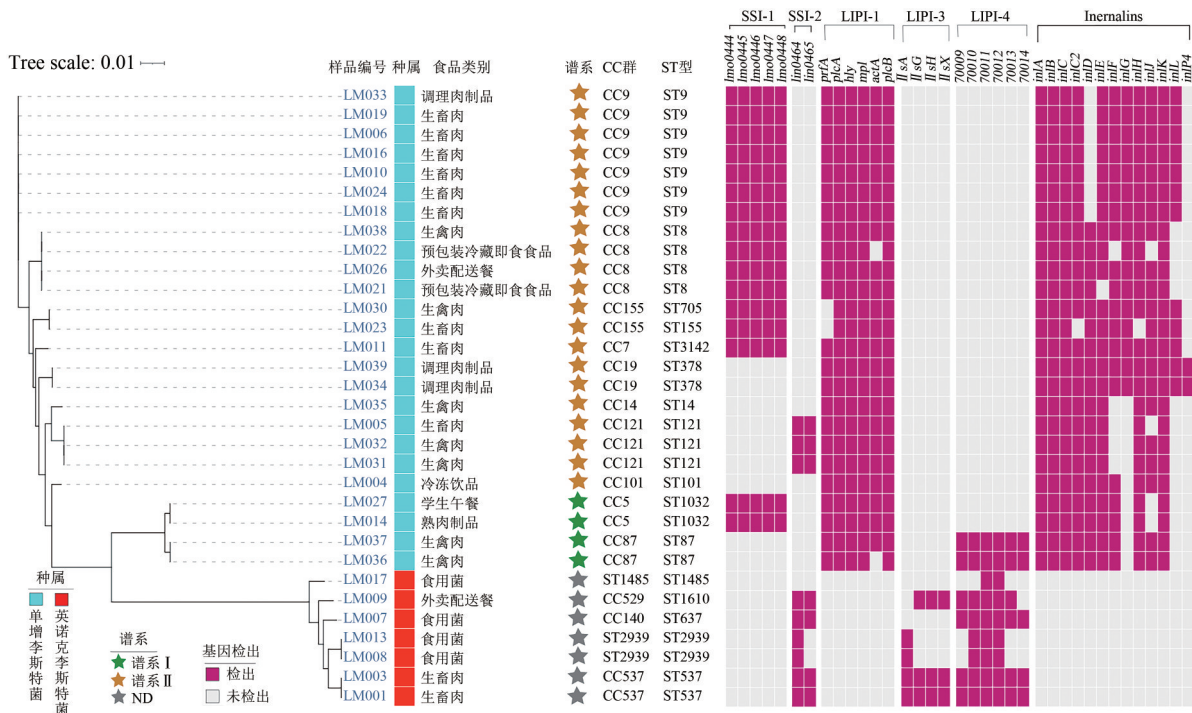


图 1 32 株李斯特菌毒力基因和应激生存岛基因分布

Figure 1 Distribution of the antimicrobial virulence genes and the stress survival islet among 32 *Listeria* strains

2.3 毒力基因携带情况

单增李斯特菌除了有 2 株 CC155 不携带 *prfA* 基因,1 株 CC8 和 CC87 不携带 *actA*,其他单增李斯

特菌均携带了 LIPI-1 所涵盖的 6 个毒力基因 *prfA*、*plcA*、*hly*、*mpl*、*actA*、*plcB*,英诺克李斯特菌均不携带 LIPI-1。未发现有菌株携带 LIPI-2。单增李斯特菌

均不携带 LIPI-3, 7 株英诺克李斯特菌有 5 株携带 LIPI-3 的 4 个基因 *II sA*、*II sG*、*II sH*、*II sX*, 其中仅 2 株 ST2939 和 2 株 ST537 株菌携带 *II sA* 基因, 仅 1 株 ST1610 和 2 株 ST537 株菌携带 *II sG*、*II sH*、*II sX* 基因。仅 2 株 ST87 单增李斯特菌携带 LIPI-4, 其 6 个基因 *70009*、*70010*、*70011*、*70012*、*70013* 和 *70014* 均为阳性。7 株英诺克李斯特菌均携带 LIPI-4 的 *70010*、*70011*、*70012* 基因(图 1)。

25 株单增李斯特菌中共携带了 13 种内化素基因 *inlA*、*inlB*、*inlC*、*inlC2*、*inlD*、*inlE*、*inlF*、*inlG*、*inlH*、*inlJ*、*inlK*、*inlL* 和 *inlP4*, 其中所有菌株均携带 *inlA*、*inlB*、*inlC*、*inlK*。仅 2 株 ST378 携带 13 种内化素基因, 且仅这 2 株 ST378 携带 *inlP4* 基因, 其他菌株均不携带该基因。此外, 1 株 ST155 株菌不携带 *inlC2* 和 *inlH* 基因。7 株 ST9 菌株均不携带 *inlD* 基因。1 株 ST8 株菌不携带 *inlE* 基因。1 株 ST8、1 株 ST14 和 3 株 CC121 株菌不携带 *inlF* 基因。1 株 ST14、4 株 ST121、2 株 ST1032、2 株 ST87 株菌均不携带 *inlG* 和 *inlL* 基因, 同时 4 株 ST8 的菌株也均不携带 *inlL*。1 株 ST8、1 株 ST121 和 2 株 ST1032 株菌不携带 *inlJ* 基因(图 1)。

2.4 应激生存岛及相关抗性基因携带情况

25 株单增李斯特菌有 16 株 (64.0%) 携带 SSI-1, 其中 4 株谱系 I 菌株中仅有 2 株 CC5 携带 SSI-1, 携带率为 50.0% (2/4), 21 株谱系 II 菌株中有 14 株 (1 株 CC7、4 株 CC8、7 株 CC9、2 株 CC155)

携带 SSI-1, 携带率为 66.7% (14/21), 7 株英诺克李斯特菌均不携带 SSI-1。4 株谱系 I 菌株均不携带 SSI-2, 21 株谱系 II 中有 3 株 CC121 携带 SSI-2, 携带率为 14.3% (3/21), 7 株英诺克李斯特菌中有 6 株携带 SSI-2, 携带率为 85.7% (6/7) (表 1)。32 株李斯特菌均未发现基因组岛 LGI1 (含有抗季铵盐类消毒剂基因 *bcrABC*、*emrE*、*emrC*、*qacA* 和 *qacH*), 也未发现基因组岛 LGI2 (由抗重金属镉基因 *cadA* 和 *cadC* 以及抗重金属砷基因 *arsD1*、*arsA1*、*arsR1*、*arsD2*、*arsR2*、*arsA2*、*arsB1*、*arsB2* 组成) 及相关转座子。

表 1 32 株李斯特菌的应激生存岛 (SSI-1, SSI-2) 携带情况

		携带菌数/总菌数(携带率%)	
		应激生存岛 (SSI-1)	应激生存岛 (SSI-2)
单增李斯特菌	谱系 I	2/4(50.0)	0/4(0.0)
	谱系 II	14/21(66.7)	3/21(14.3)
英诺克李斯特菌		0/7(0.0)	6/7(85.7)

2.5 泛基因组分析

25 株单增李斯特菌的泛基因组有 4 918 类基因簇, 25 株单增李斯特菌和 7 株英诺克李斯特菌的共有泛基因组有 6 632 类基因簇, 聚类分析如图 2、图 3 所示, 根据 CV 值从大到小将泛基因组分为核心基因、软核基因、壳基因、云基因 4 类, 基因数目如图 4 所示, 菌株的核心基因组由核心基因和软核基因两部分组成, 25 株单增李斯特菌的泛基因组中 4 918 类基因簇矩阵

25株单增李斯特菌的聚类树

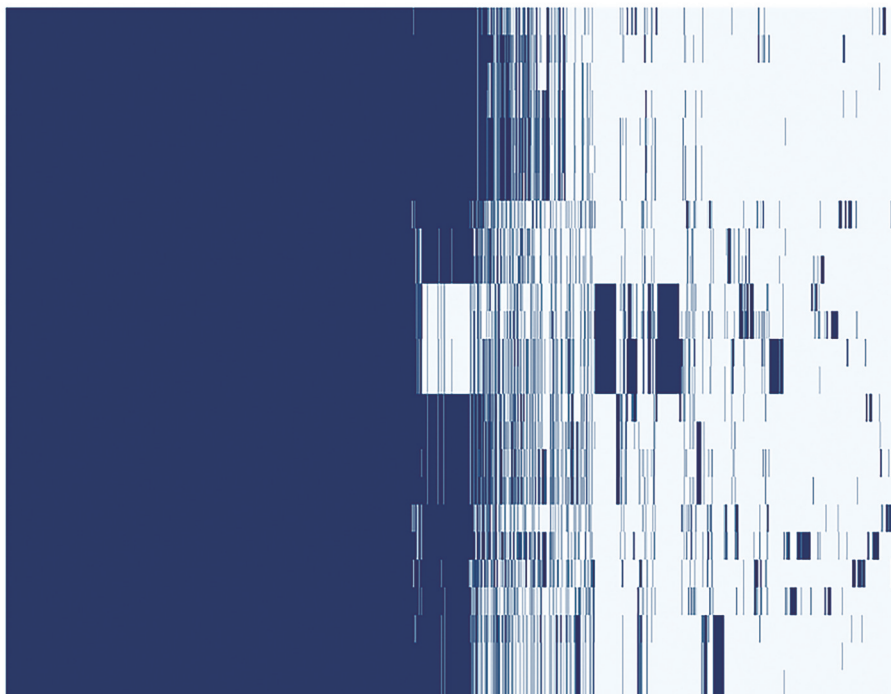
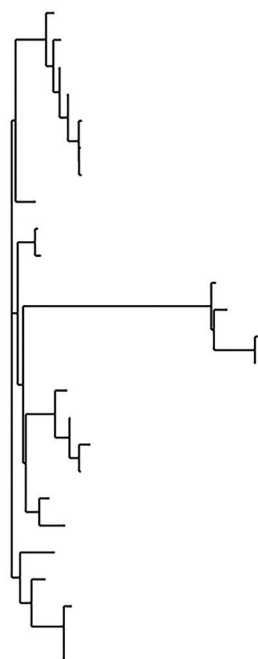


图 2 25 株单增李斯特菌泛基因组中的 4 918 类基因簇的聚类树

Figure 2 Clustering tree of 4 918 gene cluster in the pan-genome of 25 *L. monocytogenes*

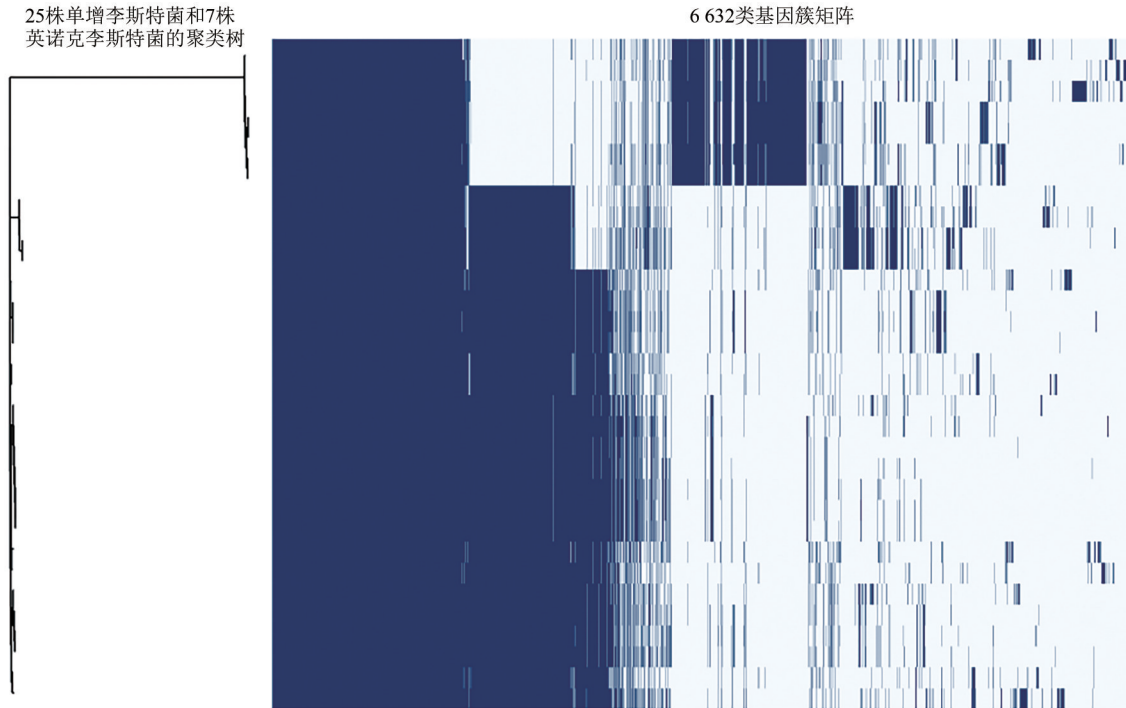


图3 32株李斯特菌泛基因组中的6 632类基因簇的聚类树

Figure 3 Clustering tree of 6 632 gene cluster in the pan-genome of 32 *Listeria*

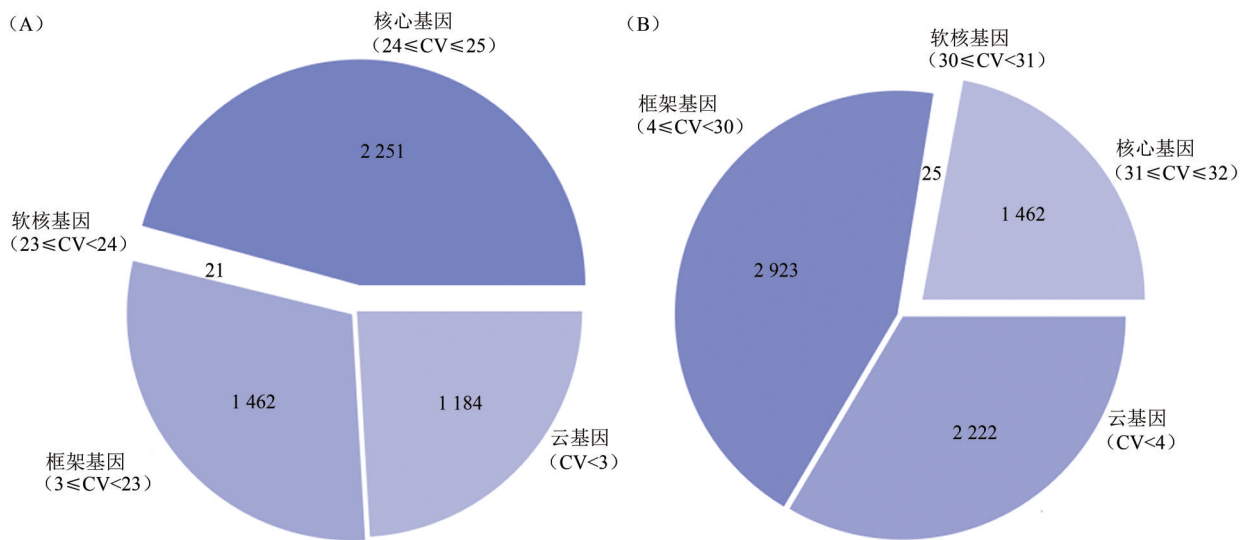


图4 25株单增李斯特菌(A)和32株李斯特菌(B)不同CV值的基因数目分布

Figure 4 Gene numbers with different CV values of 25 *L. monocytogenes* (A) and 32 *Listeria* (B)

CV 值为 24、25 的核心基因数量为 2 251 个(占比 45.8%),CV 值为 23 的软核基因数量为 21 个(占比 0.4%), $3 \leq CV < 23$ 的壳基因总数为 1 462 个(占比 29.7%),CV 值 < 3 的云基因,即菌株特有的基因,数目为 1 184 个(占比 24.1%)。25 株单增李斯特菌和 7 株英诺克李斯特菌的共有泛基因组中 CV 值为 31、32 的核心基因数量为 1 462 个(占比 22.0%),CV 值为 30 的软核基因数量为 25 个(占比 0.4%), $4 \leq CV < 30$ 的壳基因总数为 2 923 个(占比 44.1%),CV 值 < 4 的云基因,即菌株特有的基因,数目为 2 222 个(占比 33.5%)。通过计算英诺

克李斯特菌的核心基因与单增李斯特菌的 64.9% (1 462/2 251)的核心基因同源。

计算得到李斯特菌泛基因组大小、核心基因数目与菌株数量的关系曲线(图 5)。泛基因组曲线特征表现为随着测序菌株数量的不断增加,泛基因组的基因数目也呈现线性增加,分析 25 株单增李斯特菌,当菌株数量达到 15 后,核心基因数目趋于稳定,并基本稳定在 2 272 左右。25 株单增李斯特菌和 7 株英诺克李斯特菌共同分析时,当菌株数量达到 10 后,核心基因数目趋于稳定,并基本稳定在 1 487 左右,即单增李斯特菌和英诺克李斯特菌共

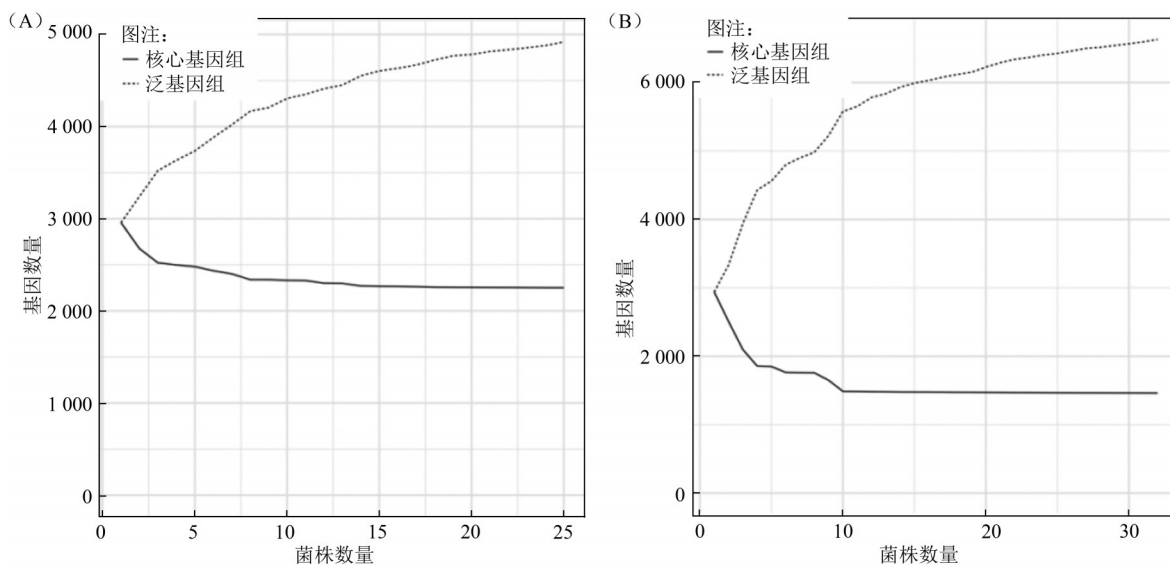


图5 25株单增李斯特菌(A)和32株李斯特菌(B)的泛基因组特征拟合曲线

Figure 5 Fitting curve of pan-genomic characteristics of 25 *L. monocytogenes* (A) and 32 *Listeria* (B)

同包含的核心基因数目约为 1 487。

3 讨论

单增李斯特菌作为一种重要的食源性致病菌,可以在不同种类的食物及食物相关环境长期存活和增殖,英诺克李斯特菌与其相比具有相似的生化特性,但又不具有致病性,本文采用全基因组测序技术对食源性单增李斯特菌和英诺克李斯特菌基因组特征进行分析比较,旨在深入了解两种菌基因组特征差异和系统发育关系。

李斯特菌的致病性与其毒力基因之间存在紧密关联,缺失毒力基因使其致病性明显减弱甚至完全丧失。有资料表明 LIPI-1 与单增李斯特菌的致病性密切相关,包含了细菌侵袭宿主和增殖调控的关键基因,是细菌在细胞内生存必不可少的,具有高度的保守性^[5],单增李斯特菌除了 2 株谱系 II CC155 *prfA* 基因,1 株谱系 II CC8 和 1 株谱系 I CC87 *actA* 基因有缺失外,其余基因均未缺失,具有较高的稳定性,而英诺克李斯特菌均不携带 LIPI-1。本研究未发现有菌株携带 LIPI-2。LIPI-3 由 8 个基因组成,编码第二溶血素,又名李斯特菌素 S(LLS),可致使宿主细胞发生溶血,且可调节宿主肠道内的微生物菌群^[6],尽管本文中单增李斯特菌均没有携带,仅 6 株英诺克李斯特菌携带 4 个 LIPI-3 的基因,但根据资料显示 LIPI-3 常从谱系 I 的部分单增李斯特菌及英诺克李斯特菌中检出^[7],由此也可解释李斯特菌病暴发病例中临床占比较高的谱系 I 的单增李斯特菌具有高毒力的原因。LIPI-4 是新发现的一个毒力岛,共含有 6 个基因,与单增李斯特菌的神经感染和母胎感染密切相关,能增强侵袭感

染能力^[8],有的资料显示 LIPI-4 仅谱系 I 中包含 ST87 在内的少数型别携带^[2],这与我们的研究结果一致,也进一步证实了谱系 I 中如 ST87 具有高毒力的原因,同时提示该食品(生禽肉)存在较高的食品安全风险,应加强检测或食源性疾病的防控,此外,7 株英诺克李斯特菌也携带 LIPI-4 的全部或部分基因。此外单增李斯特菌携带了多个内化素基因,该基因与宿主非吞噬细胞的黏附和內化有关,本研究中单增李斯特菌中 *inlA*、*inlB*、*inlC*、*inlK* 的检出率达 100.0%,其他内化素基因在单增李斯特菌的特定基因型别中有缺失,这与已有的研究结果一致^[9],英诺克李斯特菌均不携带内化素基因。综合分析以上毒力基因的携带情况,单增李斯特菌均携带 LIPI-1 和内化素基因,而英诺克李斯特菌却完全缺失,说明这两部分毒力基因对单增李斯特菌毒力的表达至关重要,其中 LIPI-1 中的 *prfA* 作为中心转录调控因子,可调控 *actA*、*hly*、*plcA*、*plcB* 等与李斯特菌致病相关的毒力因子的表达^[10],*prfA* 的激活被认为是单增李斯特菌从环境生物向哺乳动物宿主感染的关键^[11],*prfA* 毒力调控机制相当复杂^[12],目前尚未完全确定。因此我们推测英诺克李斯特菌即使携带了 LIPI-3 和 LIPI-4 的全部或部分毒力基因,也因其缺失了 LIPI-1 和内化素大量毒力基因,尤其是缺少了 *prfA* 对其他毒力基因的转录调控而无法被表达出来,最终导致完全没有毒力。

应激生存岛 SSI-1 与单增李斯特菌对高浓度 NaCl、高浓度胆盐、低 pH 等环境因素的耐受性有关^[3],本研究中单增李斯特菌大多型别均携带,而英诺克李斯特菌均不携带;应激生存岛 SSI-2 有助于携带的菌株在碱性、氧化胁迫等逆性环境下存活,

如食品加工环境^[13],我们发现 ST121 和 85.7%(6/7)的英诺克李斯特菌携带,目前单增李斯特菌除了 ST121,没有在其他型别中发现携带 SSI-2 基因岛的报道^[14]。由此可以推测英诺克李斯特菌具有不耐高浓度 NaCl、高浓度胆盐、低 pH,大多耐碱、抗氧化的特性,但有待进一步验证。随着基因测序技术的不断普及和检测费用的逐步降低,有条件和能力的实验室可采用基因测序的方法对基因组进行分析从而发现高毒力及特殊抗性的菌株,为食源性疾病的精准防控提供理论依据。

本研究对 25 株单增李斯特菌和 7 株英诺克李斯特菌的核心基因和泛基因进行探索性分析,从基于核心基因构建的系统发育树分析单增李斯特菌和英诺克李斯特菌之间的进化关系,我们发现谱系 I 的单增李斯特菌和英诺克李斯特菌的进化关系较谱系 II 更近(图 1)。有学者提出,两种李斯特菌是从同一个祖先进化而来的,并且在进化过程中部分菌株因毒力基因缺失而形成无致病性的英诺克李斯特菌^[15]。泛基因组学对于研究细菌中基因组组成、特征以及某特定细菌群体内基因数量的动态变化提供了一个新的视角^[16]。32 株李斯特菌的泛基因组核心基因数目的变化曲线可以观察到,随着基因组数目的增加,泛基因组大小也呈线性增加,故此可以推断李斯特菌具有开放型的泛基因组,单增李斯特菌共有核心基因 2 272 个,而英诺克李斯特菌与单增李斯特菌共有的核心基因则有 1 487 个,说明英诺克李斯特菌与单增李斯特菌有很近的亲缘关系,同时也可以解释这两种菌生化特性具有较高相似性的原因。本研究因菌株数量少,因此代表性有限,对李斯特菌泛基因组更深入的研究有待更多的菌株基因组的加入,随着更多的新菌株基因组加入可能会发现新的同源基因,因而这些菌株特有基因将会被归类为非必须基因。

参考文献

- [1] RAMASWAMY V, CRESENCE V M, REJITHA J S, et al. *Listeria*-review of epidemiology and pathogenesis[J]. *Journal of Microbiology, Immunology, and Infection*, 2007, 40(1): 4-13.
- [2] WANG Y, LUO L J, LI Q, et al. Genomic dissection of the most prevalent *Listeria monocytogenes* clone, sequence type ST87, in China[J]. *BMC Genomics*, 2019, 20(1): 1014.
- [3] RYAN S, BEGLEYM, HILL C, et al. A five-gene stress survival islet (SSI-1) that contributes to the growth of *Listeria monocytogenes* in suboptimal conditions[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2010, 109(3): 984-995.
- [4] LEE S M, WARD T J, JIMA D D, et al. The arsenic resistance-associated *Listeria* genomic island LGI2 exhibits sequence and integration site diversity and a propensity for three *Listeria monocytogenes* clones with enhanced virulence[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2017, 83(21): e01189-17.
- [5] VÁZQUEZ-BOLAND J A, KUHN M, BERCHE P, et al. *Listeria* pathogenesis and molecular virulence determinants[J]. *Clinical Microbiology Reviews*, 2001, 14(3): 584-640.
- [6] CLAYTON E M, HILL C, COTTER P D, et al. Real-time PCR assay to differentiate Listeriolysin S-positive and -negative strains of *Listeria monocytogenes*[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2011, 77(1): 163-171.
- [7] ORSI R H, DEN BAKKER H C, WIEDMANN M. *Listeria monocytogenes* lineages: Genomics, evolution, ecology, and phenotypic characteristics[J]. *International Journal of Medical Microbiology*, 2011, 301(2): 79-96.
- [8] MAURY M M, TSAI Y H, CHARLIER C, et al. Uncovering *Listeria monocytogenes* hypervirulence by harnessing its biodiversity[J]. *Nature Genetics*, 2016, 48(3): 308-313.
- [9] 刘二龙, 袁慕云, 吕英姿, 等. 单增李斯特菌三重实时荧光 PCR 检测的建立及其毒力基因在分离菌株中分布[J]. *中国人兽共患病学报*, 2016, 32(5): 451-456.
- [9] LIU E L, YUAN M Y, LYU Y Z, et al. Development of triplex TaqMan MGB-probe real-time PCR assay for detection of *Listeria monocytogenes* and the distribution of virulence gene in isolates[J]. *Chinese Journal of Zoonoses*, 2016, 32(5): 451-456.
- [10] PORT G C, FREITAG N E. Freitag N E. Identification of novel *Listeria monocytogenes* secreted virulence factors following mutational activation of the central virulence regulator, PrfA[J]. *Infection and Immunity*, 2007, 75(12): 5886-5897.
- [11] GRAY M J, FREITAG N E, BOOR K J, et al. How the bacterial pathogen *Listeria monocytogenes* mediates the switch from environmental Dr. Jekyll to pathogenic Mr. Hyde[J]. *Infection and Immunity*, 2006, 74(5): 2505-2512.
- [12] JOHANSSON J, MANDIN P, RENZONI A, et al. An RNA thermosensor controls expression of virulence genes in *Listeria monocytogenes*[J]. *Cell*, 2002, 110(5): 551-561.
- [13] HARTE E, WAGNER E M, ZAISER A, et al. Stress survival islet 2, predominantly present in *Listeria monocytogenes* strains of sequence type 121, is involved in the alkaline and oxidative stress responses[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2017, 83(16): e00827-17.
- [14] PAINSET A, BJÖRKMAN J T, KIIL K, et al. LiSEQ-whole-genome sequencing of a cross-sectional survey of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods and human clinical cases in Europe[J]. *Microbial Genomics*, 2019, 5(2): e000257.
- [15] DEN BAKKER H C, CUMMINGS C A, FERREIRA V, et al. Comparative genomics of the bacterial genus *Listeria*: Genome evolution is characterized by limited gene acquisition and limited gene loss[J]. *BMC Genomics*, 2010, 11(1): 688.
- [16] TOUCHON M, HOEDE C, TENAILLON O, et al. Organised genome dynamics in the *Escherichia coli* species results in highly diverse adaptive paths[J]. *PLoS Genetics*, 2009, 5(1): e1000344.