

土壤杆菌氧调控基因 *fnrN* 突变株发酵性能及基于 RNA-Seq 的基因表达

王永远 叶剑 郑志永* 高敏杰 李佳佳 詹晓北

(江南大学生物工程学院 糖化学与生物技术教育部重点实验室 江苏 无锡 214122)

摘要:【目的】研究 Crp 家族转录调节因子 *fnrN* 突变对土壤杆菌 ATCC 31749 发酵性能和基因表达的影响。【方法】利用三亲结合法将构建的自杀式质粒 pJQ-*fnrN*-kan 导入土壤杆菌 ATCC 31749 中, 从而获得 *fnrN* 基因突变株(Δ *fnrN*); 分析 Δ *fnrN* 的发酵特性; 基于 RNA-Seq 对产胶期土壤杆菌 ATCC 31749 野生菌和 Δ *fnrN* 差异表达基因进行分析。【结果】*fnrN* 的突变使土壤杆菌合成热凝胶能力下降了 22.0%, 转录组分析发现在 Δ *fnrN* 中 186 个基因表达发生显著性变化 ($|\log_2(\text{fold change})| \geq 1$ 且 $q \leq 0.001$), 其中 65% 的基因表达上调。热凝胶合成的关键基因 *crdASC* 的表达受到不同程度的抑制, *fnrN* 的突变使编码 σ 因子的 *ecfR* 和编码生物膜合成调节因子的 *sinR* 显著下调; Δ *fnrN* 菌中与细胞色素有关基因 *cydAB*、*cy2*、*fixNOPQ* 的转录水平下调 2–13 倍。【结论】*fnrN* 通过调控 *ecfR* 和 *sinR* 的表达调控热凝胶合成, 通过调控 *fixNOPQ* 等基因的表达参与氧信号调控, 该研究有助于丰富对土壤杆菌氧调控系统的认识。

关键词: 土壤杆菌, *fnrN*, 基因突变, 热凝胶, RNA-Seq

Fermentation characteristics of *Agrobacterium* sp. with oxygen regulation gene *fnrN* mutation and genes expression analysis based on RNA-Seq

WANG Yong-Yuan YE Jian ZHENG Zhi-Yong* GAO Min-Jie
LI Jia-Jia ZHAN Xiao-Bei

(Key Laboratory of Carbohydrate Chemistry and Biotechnology of Ministry of Education, School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi, Jiangsu 214122, China)

Abstract: [Objective] To study the effect of Crp family transcriptional regulator gene *fnrN* mutation on the fermentation characteristics and genes expression in *Agrobacterium* sp. ATCC 31749.

Foundation item: National Natural Science Foundation of China (No. 31271888, 31301408); Key Technologies R&D Program of China (No. 2011BAD23B04); Postgraduate Scientific Research Innovation Project of Colleges in Jiangsu Province (No. SJLX15_0544)

*Corresponding author: Tel/Fax: 86-510-85918299; E-mail: zhiyong@jiangnan.edu.cn

Received: December 20, 2016; Accepted: February 13, 2017; Published online (www.cnki.net): February 24, 2017

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 31271888, 31301408); 国家科技支撑计划项目(No. 2011BAD23B04); 江苏省普通高校研究生科研创新计划项目(No. SJLX15_0544)

*通讯作者: Tel/Fax: 86-510-85918299; E-mail: zhiyong@jiangnan.edu.cn

收稿日期: 2016-12-20; 接受日期: 2017-02-13; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2017-02-24

[Methods] A suicide plasmid pJQ-*fnrN*-*kan* was constructed and transformed into wild type strain by triparental conjugation method to obtain the *fnrN* mutation strain (Δ *fnrN*). The cell growth and fermentation characteristics of Δ *fnrN* were compared with that of the wild strain, then comparative transcriptomes with RNA-Seq were used to analyze the expression changes of genes in curdlan-producing phase due to *fnrN* mutation. **[Results]** The level of curdlan production was reduced by 22.0% because of *fnrN* mutation. Transcriptomes analysis revealed that 186 genes expressed significantly different ($|\log_2(|\text{fold change}|)| \geq 1$ and $q \leq 0.001$), and about 65% differently expressed genes were up-regulated. The key genes (*crdASC*) in curdlan synthesis were repressed in different degree, the *fnrN* mutation significantly down-regulated the expression of *ecfR* and *sinR*, coding ECF family RNA polymerase sigma factor and Fnr family regulator of biofilm formation respectively. The transcription levels of genes (*cydAB*, *cy2* and *fixNOPQ*) related with cytochrome were down-regulated 2–13 times. **[Conclusion]** The *fnrN* regulates curdlan synthesis by controlling the expression of *ecfR* and *sinR*, and takes part in oxygen signal regulation through down-regulating the expression of *fixNOPQ*, which is helpful to enrich the understanding of oxygen regulation system in *Agrobacterium* sp.

Keywords: *Agrobacterium* sp., *fnrN*, Gene mutation, Curdlan, RNA-Seq

热凝胶是一种水不溶性的线性 β -(1,3)葡聚糖^[1],具有良好的凝胶特性,有利于保持速冻食品中的纹理和水分^[2],因此被广泛地应用于冻肉、面条、饺子和面团等食品中。热凝胶于1996年被FDA批准可用作食品添加剂,此外,热凝胶还具有抗菌、抗病毒、抗过敏和调节免疫力等功能和潜力^[3-4]。

土壤杆菌(*Agrobacterium* sp.) ATCC 31749 是热凝胶合成的工业生产菌株,属于革兰氏阴性菌,其合成热凝胶过程可以分为两个阶段:菌体生长期和产胶期。土壤杆菌 ATCC 31749 在菌体生长期不合成热凝胶;氮源耗尽后菌体停止生长,开始合成热凝胶并分泌到胞外^[5]。随着热凝胶在菌体表面或周围的积累,溶氧的传递就变得愈加困难。Zhang 等^[6]研究发现在微氧和缺氧的情况下,热凝胶的合成受到严重限制,不同溶氧水平下与热凝胶合成相关基因的转录水平分析表明,所考察基因的转录水平随溶氧的增加而增强,溶氧在50%时所考察基因的转录水平最高,细胞内 *cyoA*、*catD*、*fixN*、*icd*、*sdhB*、*mdh*、*glmM* 和 *galU* 基因的转录水平是低溶氧条件下(5%)的3–6倍;戴小萌等^[7]用蛋白质二维电泳技术研究了土壤杆菌在5%、25%、50%和75%溶氧水平下产胶期胞内总蛋白的表达差异,在4个溶氧水平下鉴定出15个显著差异蛋白,其中葡萄糖磷酸变位酶(Pgm)和乳清苷5-磷酸脱羧酶(PyrF)直接参

与调控热凝胶的合成;Ruffing 等^[8]完成了土壤杆菌 ATCC 31749 基因组的测序工作,并对测序结果进行基因预测和注释,通过基因组学分析发现 *fnrN* 作为全局调节因子参与土壤杆菌 ATCC 31749 热凝胶合成的氧调控过程。在其他微生物中,关于 *fnrN* 的研究也有一些报道:Tsoy 等^[9]通过比较基因组学分析认为,在变形菌纲中,溶氧调节系统包括单组分系统 FnrN/FixK 和双组分系统 FixLJ,其中 FnrN 作为 Crp-Fnr 家族转录调节因子,通过铁硫蛋白直接感知胞内溶氧水平,而 FixLJ 系统响应的是胞外溶氧的变化;在布鲁氏菌中,低氧条件可以诱导 *fnrN* 的表达, *regA* 的突变可以使 *fnrN* 转录水平在微氧和厌氧条件下分别降低4倍和22倍^[10];而根癌土壤杆菌 C58 中, FnrN 通过调控 *nnrR* 的表达进而调节亚硝酸盐还原酶和氮氧化物还原酶的表达^[11], Ramey 等^[12]也发现在溶氧限制条件下,根癌土壤杆菌 C58 中 FNR 型转录调节因子 *sinR* 的表达需要 FnrN 的参与。

然而, *fnrN* 基因对热凝胶合成的影响及其调控机理尚不清楚。在土壤杆菌 ATCC 31749 中, *fnrN* 基因 GenBank 登录号为 333790673, 编码产物为 Crp 家族转录调节因子, BLAST 比对分析发现, 土壤杆菌 ATCC 31749 和根癌土壤杆菌 C58 中 *fnrN* 的一致性达到98%。本研究利用三亲本接合法,把含

有 *fnrN* 同源臂的自杀式质粒 pJQ-*fnrN-kan* 导入土壤杆菌 ATCC 31749 中, 构建 Δ *fnrN* 菌, 进而考察 Δ *fnrN* 菌的生长和发酵特性, 最后基于 RNA-Seq 技术分析土壤杆菌 ATCC 31749 野生菌和 Δ *fnrN* 菌在产胶期相关基因表达转录水平的差异, 以此探究 *fnrN* 对热凝胶合成的调控机理。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒: 实验采用的菌株和质粒见表 1。

1.1.2 主要试剂和仪器: 限制性内切酶购自宝生物工程(大连)有限公司; 基因组提取试剂盒、质粒提取试剂盒、胶回收试剂盒等购自生工生物工程(上海)股份有限公司; 转录组测序中所用的试剂盒和酶购自 Illumina 公司; 其他化学试剂购自国药集团化学试剂有限公司。C1000 TouchTM Thermal Cycler, Bio-Rad 公司; HiSeq 4000 测序仪, Illumina 公司。

1.1.3 培养基: 参见文献[14]。其中发酵培养基略微调整, 具体如下: 发酵培养基(g/L): 葡萄糖 55.00, 酵母粉 1.00, KH₂PO₄ 2.70, K₂HPO₄·3H₂O 2.23, (NH₄)₂SO₄ 2.50, MgSO₄ 0.50, CaCO₃ 5.00, FeCl₃·6H₂O 1.00, NaCl 0.01, CaCl₂ 0.01, MnCl₂ 0.01, pH 7.0–7.2。1×10⁵ Pa 灭菌 30 min。

表 1 本文使用的菌株和质粒

Table 1 Strains and plasmids used in this work

名称 Name	特性 Characteristic	来源 Source
Strains		
<i>Agrobacterium</i> sp. ATCC 31749	Str ^R	Laboratory stock ^[13]
<i>E. coli</i> JM109	Cloning vector	Laboratory stock
<i>E. coli</i> DH5 α λ pir	λ pir, cloning vector	Laboratory stock
Plasmids		
PRK2013	Kn ^R , helper plasmid	Laboratory stock
pCAMBIA3300	Kn ^R , with <i>kan</i> gene	Laboratory stock
pJQ200KS	Gm ^R , SacB, suicide plasmid	Laboratory stock
pMD- <i>fnrN</i>	Amp ^R , with <i>fnrN</i> gene	This work
pMD- <i>kan</i>	Kn ^R , with <i>kan</i> gene	This work
pMD- <i>fnrN-kan</i>	Amp ^R , Kn ^R	This work
pJQ- <i>fnrN-kan</i>	Kn ^R , Gm ^R , SacB	This work

1.2 方法

1.2.1 种子培养: 从斜面上挑取一环菌, 接入装有 50 mL 种子培养基的 500 mL 三角瓶中, 30 °C、200 r/min 摇床培养 18 h。

1.2.2 摇瓶发酵培养及 RNA 提取: 取 2.5 mL 种子液接入装有 50 mL 发酵培养基的 500 mL 三角瓶, 30 °C、200 r/min 摇床发酵 84 h。在发酵 24 h 时, 土壤杆菌 ATCC 31749 和 Δ *fnrN* 菌分别取样 5 000 r/min 离心 5 min 收集菌体, 热酚法提取细菌总 RNA, 送上海丰恒生物科技有限公司进行 RNA-Seq 测序。土壤杆菌 ATCC 31749 野生菌和 Δ *fnrN* 菌分别做两个生物学重复。

1.2.3 生物量、热凝胶含量和残糖测定: 参见于丽珺等的方法^[14]。

1.2.4 硫酸铵含量测定: 靛酚蓝-分光光度计法^[15]。

1.2.5 *fnrN* 和 *kan* 基因的克隆: 根据 NCBI 中 *Agrobacterium* sp. ATCC 31749 中 *fnrN* 基因及其上下游序列, 设计引物 *fnrN*-F/R, 以基因组 DNA 为模板进行 PCR 扩增, 将纯化回收的 *fnrN* 片段连接到 pMD19-T Simple 载体上, 阳性克隆质粒命名为 pMD-*fnrN*。根据 pCAMBIA3300 质粒中 *kan* (Kanamycin resistance gene) 序列设计引物并扩增 *kan* 片段, 纯化后连接到 pMD19-T Simple 载体, 阳性克隆质粒命名为 pMD-*kan*。克隆的基因和构建的载体均经生工生物工程(上海)股份有限公司测序验证。实验所用引物名称及序列见表 2。

1.2.6 自杀式重组质粒 pJQ-*fnrN-kan* 的构建: 将 pMD-*kan* 和 pMD-*fnrN* 分别用 *Hind* III 和 *Sal* I 双酶切, 胶回收后连接, 将 *kan* 基因片段插入到 *fnrN* 内部, 转化, 经氨苄青霉素和卡那青霉素抗性平板筛选, 得到阳性克隆, 菌落 PCR 和测序双重验证后, 得到质粒 pMD-*fnrN-kan*。将正确插入 *kan* 的质粒 pMD-*fnrN-kan* 和自杀质粒 pJQ200KS 分别用 *Bam*HI 和 *Xba* I 进行双酶切, 胶回收后, *fnrN-kan* 片段和线性 pJQ200KS 连接, 转化 *E. coli* DH5 α λ pir 感受态中, 经卡那霉素和庆大霉素抗性平板筛选, 得到阳性克隆, 菌落 PCR 和测序双重验证后, 得到本研究所需的自杀式重组质粒, 命名为 pJQ-*fnrN-kan*。

表 2 PCR 引物
Table 2 The primers for PCR

Primers	Sequences (5'→3')	Sizes (bp)
<i>fnrN</i> -F	CGGGATCC <u>T</u> ACACGGCAATCGGCTCGT	27
<i>fnrN</i> -R	GCTCTAGATCATGAGCAAGGGGCTGCA	27
<i>kan</i> -F	GTCGACCACACAGGAAACAGACCATGATTGAACAAGATGGATTGC	45
<i>kan</i> -R	CAAGCTTAGTCCCGCTCAGAAGAAC	25
<i>fnrN</i> double exchange-F	CATCAGGCTGACCATGTCATCAGG	24
<i>fnrN</i> double exchange-R	TTTCGGAAGCCGAATACAAACGC	23

注：引物序列中带有下划线的大写字母表示酶切位点。

Note: Capital letters underlined represent restriction enzyme cutting sites in the sequences of primers.

1.2.7 *Agrobacterium* sp. ATCC 31749 *fnrN* 基因突变株的构建：分别取对数生长期含自杀重组质粒 pJQ-*fnrN*-*kan* 的 *E. coli* DH5 α λ pir 菌液、含辅助质粒 PRK2013 的 *E. coli* DH5 α 菌液和 *Agrobacterium* sp. ATCC 31749 菌液 1、1 和 2 mL 于 10 mL 离心管中混合，4 000 r/min 离心 5 min，收集的菌体用种子培养基洗涤 3 次。最终的菌体沉淀用 200 μ L 种子培养基重悬，然后转移至铺有玻璃纸的种子培养基固体平板上，30 $^{\circ}$ C 正置培养 12 h。将玻璃纸上的菌体洗下，稀释一定倍数后涂布于含 10% 蔗糖、50 mg/L Str 和 50 mg/L Kan 的种子培养基平板上。以 *fnrN* double exchange-F/R 为引物进行菌落 PCR 验证，只出现 3 100 bp 大小条带的菌为同源双交换的菌。再经测序，最终确定结构被破坏的 *fnrN*-*kan* 片段经过同源双交换整合到 *Agrobacterium* sp. ATCC 31749 的染色体基因组上，突变株命名为 Δ *fnrN*，并进行多代转接后保存。

1.2.8 荧光定量 RT-PCR：在 7 L NBS 发酵罐上，通气量 4 L/min，转速 400 r/min，菌体生长期不控制溶氧，15 h 后菌体进入产胶期，分别控制溶氧为 50% 和 5%，维持 3 h 后分别取样，提取总 RNA，以 16S rRNA 基因作为内参，利用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 值计算 9 个目的基因的相对转录水平。实验所用引物略。

1.2.9 RNA-Seq 技术转录组测序：提取样品的总 RNA，磁珠法去除 rRNA (Ribo-Zero Magnetic Kit)；离子打断 mRNA (TruSeq RNA Sample Prep Kit)；合成双链 cDNA；文库富集，PCR 扩增 15 个循环；用磁珠对 PCR 产物进行纯化，然后使用 Qubit 2.0 进行文库定量，稀释文库到 1 ng/ μ L，随后通过

Bioanalyzer 2100 (Agilent, CA, USA) 对文库片段进行检测同时进行定量，按比例混合上机。建库质检合格后 Illumina HiSeq 4000 测序仪测序。原始数据质控检测合格后过滤，与基因组比对，然后进行基因注释和表达量分析，并筛选出样品间差异表达基因。

2 结果与分析

2.1 *fnrN* 基因的扩增及序列分析

从土壤杆菌 ATCC 31749 野生菌基因组中 PCR 扩增得到 *fnrN* 片段，连接克隆载体 pMD19-T Simple 得到 pMD-*fnrN*，测序显示 *fnrN* 片段大小为 1 565 bp，将测序结果在 NCBI 中进行 BLAST 比对，测序结果与 *Agrobacterium* sp. ATCC 31749 染色体基因组上 *fnrN* 基因序列一致性达到 100%，确认克隆得到的基因片段是正确的。

2.2 *fnrN* 突变菌株的筛选

通过三亲接合的方法，将自杀式质粒 pJQ-*fnrN*-*kan* 导入到野生菌中，质粒中 *fnrN*-*kan* 两端序列与基因组上 *fnrN* 两端发生同源重组，*fnrN*-*kan* 片段重组到原 *fnrN* 的位置，通过抗生素筛选、菌落 PCR 和测序验证获得 Δ *fnrN* 突变株。抗性筛选结果表明突变株能在 50 mg/L Kan 平板上生长，而野生株不能。PCR 显示从 *fnrN* 突变株中只扩增到预期大小的 *fnrN*-*kan* 片段，而从野生菌株中只扩增到 *fnrN* 片段(图 1)。将扩增得到的 *fnrN*-*kan* 片段进行测序分析，分析显示扩增的条带是 *fnrN*-*kan* 片段，以上三方面结果均证明自杀式质粒整合到基因组 DNA 上，*fnrN* 基因结构被破坏。

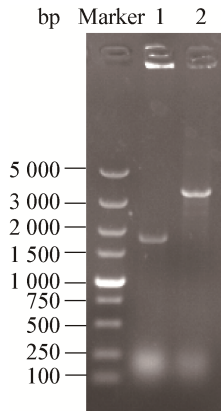


图1 PCR产物的凝胶电泳

Figure 1 Gel electrophoresis of the PCR products

注: 1: 野生菌的 *fnrN* PCR 产物; 2: $\Delta fnrN$ 菌的 *fnrN* PCR 产物.

Note: 1: *fnrN* PCR product in wild strain; 2: *fnrN* PCR product in $\Delta fnrN$ strain.

2.3 野生型菌株和 $\Delta fnrN$ 突变株的生长特性和发酵特性比较

通过摇瓶发酵实验, 比较分析了 $\Delta fnrN$ 突变株与野生菌株在硫酸铵消耗速率和生长期生物量之间的差异, 土壤杆菌进入产胶期后, 由于氮源耗尽, 生物量不再增加, 所以只测定了生长期的生物量。如图 2 所示, 菌体生长期结束时, $\Delta fnrN$ 突变株生物量(4.76 g/L)仅比野生菌株(4.88 g/L)降低了 2.46%, 其变化并不明显, 属于误差范围; 野生菌和 $\Delta fnrN$ 突变菌对硫酸铵的利用速率也基本一致。这说明 *fnrN* 的突变并不影响菌体对氮源的利用和菌体生物量的积累。

UDP-Glucose (UDPG)是热凝胶合成的前体物质, 热凝胶的合成需要不断地消耗葡萄糖^[16]。实验研究分析了 $\Delta fnrN$ 突变株和野生菌株在葡萄糖利用和热凝胶合成方面的差异。如图 2 所示, 氮源耗尽后, $\Delta fnrN$ 和野生菌株均进入产胶期, 开始合成热凝胶。在产胶期, $\Delta fnrN$ 对葡萄糖的消耗速率一直低于野生菌, 同时其合成热凝胶的速率也低于野生菌株, 特别是在发酵 60 h 后, $\Delta fnrN$ 突变株合成热凝胶的速率明显低于野生菌株。

如表 3 所示, 发酵结束时野生菌的热凝胶产量达到 20.5 g/L, 突变株只能达到 16.0 g/L, 同比降低 22.0%。土壤杆菌合成热凝胶的理论转化率为 0.74^[17], 在发酵 84 h 后, 突变菌株产物对碳源的转化率比野生菌株降低 13.8%。在土壤杆菌 ATCC 31749 中, 碳源的消耗主要用于热凝胶的合成、菌体生长繁殖和有机酸合成或 CO₂ 的释放, *fnrN* 基因的突变使土壤杆菌在产胶期对葡萄糖的消耗量由野生菌的 30.7 g/L 减少为 27.8 g/L, 降低 9.45%, 同时产物的生产强度也由 301 mg/(L·h)减少为 250 mg/(L·h), 降低 16.9%。野生菌和 $\Delta fnrN$ 菌的实验条件相同, 仅仅是 *fnrN* 基因发生突变, 因此认为 *fnrN* 可能参与热凝胶的合成调控。

2.4 荧光定量 RT-PCR 结果

利用荧光定量 RT-PCR 技术, 分析产胶期土壤杆菌野生菌目的基因在 50%和 5%溶氧条件下的转录水平差异, 如图 3 所示, 与 50%溶氧相比, 5%溶氧条件下, *cydAB* 和 *fixK* 的转录水平提高了 2–3 倍,

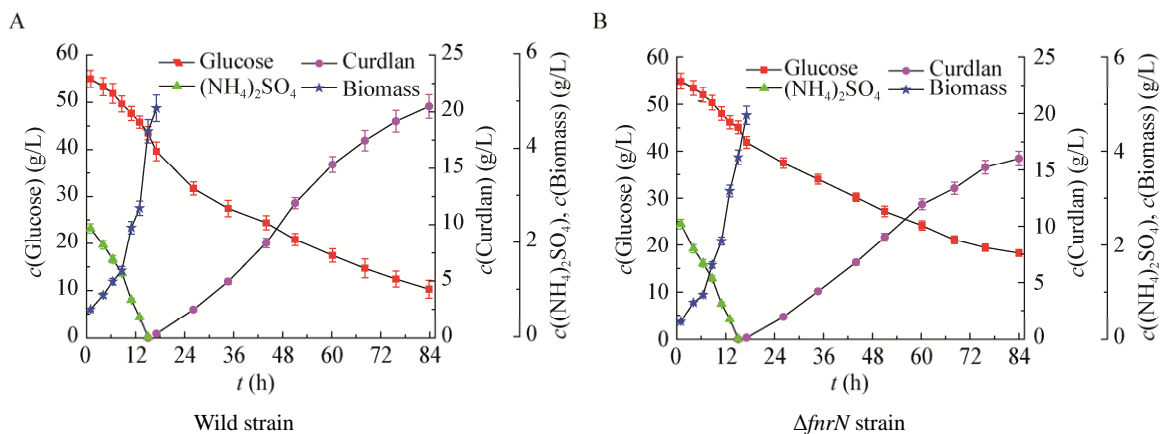


图 2 土壤杆菌野生菌株(A)和 $\Delta fnrN$ 菌株(B)发酵过程曲线
Figure 2 Fermentation process curves of *Agrobacterium* sp. wild strain (A) and $\Delta fnrN$ (B)

表3 野生型和 $\Delta fnrN$ 突变株的产胶特性比较Table 3 Comparison of curdlan production characteristics between wild type strain and $\Delta fnrN$ mutant

特性 Characteristics	野生菌株 Wild strain	$\Delta fnrN$ 突变株 $\Delta fnrN$ strain
Glucose consumption in curdlan-producing phase (g/L)	30.7	27.8
Product concentration (g/L)	20.5	16.0
Conversion rate of carbon substrate into product (g/g)	0.668	0.576
Product productivity (mg/(L·h))	301	250

fixG 和 *fixH* 的转录水平提高了 8 倍, 而 *fixN*、*fixQ* 的转录水平提高了 23 倍, 编码生物膜合成调节因子的 *sinR* 转录水平提高了 17 倍。在土壤杆菌 ATCC 31749 中, *fixGHIS* 共用一个启动子, 而 *fixNOPQ* 共用一个启动子, 因此可以推测, 在微氧条件下 *fixGHIS* 和 *fixNOPQ* 的转录表达水平会显著提高。

2.5 基于 RNA-Seq 技术的差异基因分析

2.5.1 差异基因筛选: 利用 Cufflinks 对每个样品的基因表达进行定量, 采用 FPKM^[18](Fragments Per Kilobase of exon per Million fragments mapped)算法求基因的表达量, 从而计算野生菌和 $\Delta fnrN$ 菌之间的差异基因。我们认为 $q < 0.05$ 的基因是差异基因, 两组间共获得了 1 149 个差异基因, 占比对基因总数(4 724 个)的 24.32%。以 $|\log_2(\text{fold change})| \geq 1$ 且 $q \leq 0.001$ 为筛选标准, 如图 4 所示, $\Delta fnrN$ 菌中共获得 186 个显著差异表达基因, 其中 121 个基因表达上调, 65 个基因表达下调。在这 186 个基因中,

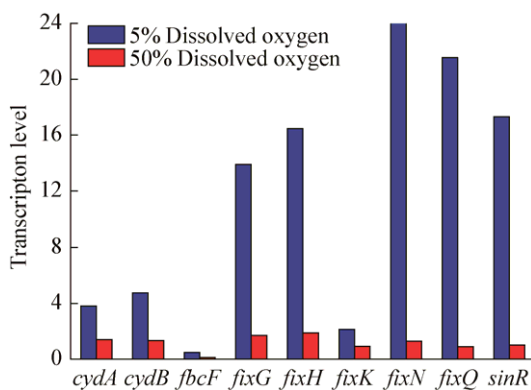
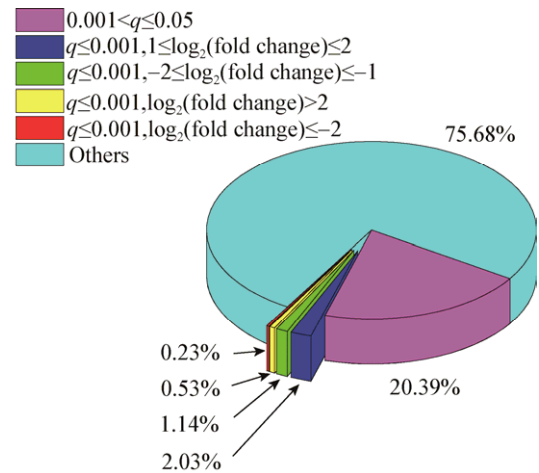


图3 RT-PCR 结果

Figure 3 Results of RT-PCR

图4 野生菌与 $\Delta fnrN$ 菌差异表达基因分布Figure 4 Distribution of differentially expressed genes in wild strain and $\Delta fnrN$ strain

有 36 个基因表达量差异超过了 4 倍, 其中 25 个基因上调, 11 个基因下调。

2.5.2 *fnrN* 突变对热凝胶合成相关基因的影响: 如表 4 所示, 在 $\Delta fnrN$ 菌中, 参与热凝胶合成的 *crdA*、*crdS* 和 *crdC* 均有不同程度的下调。 σ 因子可能是热凝胶合成的转录调节因子, Ruffing 敲除了一个编码 σ 因子的基因 *rpoN*, 使热凝胶的产量提高了 30%^[8]。土壤杆菌 ATCC 31749 基因组信息中共有 12 个 σ 因子, 本研究发现 $\Delta fnrN$ 中只有编码 ECF 家族 RNA 聚合酶 σ 因子的 *ecfR* 显著下调, σ 因子可能通过与 RNA 聚合酶的竞争机制来调控热凝胶的合成。

sinR 编码产物是一种生物膜合成调节因子, *fnrN* 突变会使其表达量下调 69 倍。在与土壤杆菌亲缘关系较近的根癌土壤杆菌中有研究报道, *sinR* 可由微氧条件或 *fnrN* 诱导表达, 并且 *sinR* 的过表达可以加速生物膜的合成^[12]。荧光定量 PCR 分析土壤杆菌野生菌在不同溶氧条件下产胶期样本基因表达差异发现, 在 5% 溶氧条件下 *sinR* 基因的表达量是 50% 溶氧的 17 倍(图 3)。戴小萌研究发现, 在 5% 溶氧条件下土壤杆菌生产热凝胶的能力会大大降低^[7]。*fnrN* 的突变显著影响 *sinR* 的表达, 而胞外多糖的合成与生物膜有着密不可分的关系, *fnrN* 可能通过调节 *sinR* 的表达来调控热凝胶的合成。

表 4 $\Delta fnrN$ 菌中部分差异表达基因的功能分类
Table 4 Potential functions of different expressed genes in $\Delta fnrN$ strain

类别 Categories	基因 Gene	变化倍数 Fold change	描述 Description
Curdlan biosynthesis	<i>crdA</i>	-1.9	Hypothetical protein
	<i>crdS</i>	-1.7	β -1,3-glucan synthase catalytic subunit
	<i>crdC</i>	-1.3	Hypothetical protein
	<i>ecfR</i>	-2.0	ECF family RNA polymerase sigma factor
	<i>sinR</i>	-69.0	Fnr family regulator of biofilm formation
C-di-GMP biosynthesis	<i>AGRO_2215</i>	1.6	GGDEF family protein
	<i>AGRO_1294</i>	1.5	GGDEF family protein
	<i>AGRO_1185</i>	1.5	GGDEF family protein
	<i>AGRO_4075</i>	1.5	GGDEF family protein
Oxygen signaling associated	<i>cydA</i>	-2.1	Cytochrome D oxidase
	<i>cydB</i>	-1.9	Cytochrome D oxidase
	<i>cy2</i>	-2.4	Cytochrome C 2
	<i>fixQ</i>	-4.0	Cytochrome C oxidase
	<i>fixP</i>	-3.6	Cytochrome C oxidase
	<i>fixO</i>	-12.4	Cytochrome C oxidase
	<i>fixN</i>	-13.6	Cytochrome C oxidase
	<i>AGRO_4698</i>	136.0	Phosphopantetheinyl transferase

核苷酸第二信使(c-di-GMP)是一种全局调节因子,能调控纤维质、褐藻胶等胞外多糖的合成,而合成 c-di-GMP 的蛋白通常含有 GGDEF 特征区域。在土壤杆菌基因组中有 21 个基因编码产物可能含有 GGDEF 区域,其中只有 *AGRO_2215*、*AGRO_1294*、*AGRO_1185* 和 *AGRO_4075* 在 $\Delta fnrN$ 菌中上调 1.5 倍以上,但这 4 个基因是否参与调控热凝胶的合成还需进一步实验的验证。

2.5.3 *fnrN* 突变对氧调控相关基因的影响: *cydAB*、*cy2*、*fixNOPQ* 等这些与细胞色素有关的基因在 $\Delta fnrN$ 菌中均显著下调,可能是由于 *fnrN* 的突变,氧气的传递过程受阻,细胞中氧信号通路被迫发生改变。在根瘤菌中,*fnrNd* 能在微氧的情况下上调 *fixNOPQd* 启动子的表达^[19]; Schlüter 等也发现无论是在独立生存的条件还是在根瘤共生区,在微氧的情况下 *fixN* 都会被诱导表达,并且 *fnrN* 突变株和 *fixL* 突变株中,*fixN* 的表达量受到严重影响^[20]。本研究发现,*fnrN* 的突变会使编码细胞色素氧化酶的 *fixO*、*fixN* 的表达量均下调 10 倍以上,我们认为在土壤杆菌中 *fnrN* 通过调控 *fixNOPQ* 的表达参与溶氧调控。

在 $\Delta fnrN$ 菌中,*AGRO_4698* 表达上调 136 倍,其编码产物为磷酸泛酰巯基乙胺基转移酶,与载体蛋白的激活有关。GO (Gene ontology)注释分析表明

AGRO_4698 与肠菌素的合成、酰基载体蛋白合成酶活性或者镁离子接合有关。微生物系统中,肠菌素是一种亲和力较高的含铁载体,主要结合三价铁离子。而细菌中的铁硫蛋白是氧化应激的传感器^[21],还有学者认为细菌主要依靠含有铁硫集群或亚铁血红素的感应蛋白来调节基因的表达以应对外界环境中溶氧的变化^[22],*fnrN* 的突变使氧调控的一条途径受阻,但 *fnrN* 并不影响细胞生长繁殖,说明 *AGRO_4698* 可能参与氧调控的某一支路。

3 结论与讨论

土壤杆菌 ATCC 31749 合成热凝胶是一个非常复杂的过程,其中氮信号级联、以核苷酸为基础的第二信使 c-di-GMP、溶氧等都会影响热凝胶的合成。本研究构建了 $\Delta fnrN$ 菌株,发现该基因突变并不影响菌体生长,但突变株合成热凝胶的能力严重减弱, RNA-Seq 分析结果发现 $\Delta fnrN$ 菌株中热凝胶合成关键基因的表达量均有所下降,*fnrN* 通过调控 *ecfR* 和 *sinR* 的表达进而影响热凝胶的合成,并且通过下调 *fixNOPQ* 的表达来参与氧信号调控。本研究也发现,*fnrN* 基因突变株在低氧条件下培养一段时间后,其菌液会逐渐变为砖红色,这可能与编码细胞色素相关基因的转录下调有关。

在大肠杆菌中 *fnr* 是 Crp-Fnr 家族的调节因子, *fnr* 通过铁硫蛋白簇接受氧信号, 并调节许多基因的转录来适应外界溶氧的变化^[23], 对大肠杆菌 *fnr* 和土壤杆菌 *fnrN* 编码的蛋白质结构域进行分析发现, 两者均含有 CAP_ED 结构域和 HTH_CRP (螺旋-转角-螺旋) 结构域, 这说明 *fnrN* 很可能是类似于 *fnr* 的一个溶氧调节的全局调节因子。已有文献报道证明氧通过信号转导途径调控微生物多糖的合成, 在 *Agrobacterium tumefaciens* 中 *fnrN* 既与氧信号转导有关, 也与琥珀酰葡聚糖合成有关^[12]。

本研究通过构建 $\Delta fnrN$ 突变株, 证明了 *fnrN* 与热凝胶合成的相关性, 利用 RNA-Seq 分析出 $\Delta fnrN$ 菌中的差异表达基因, 并对 *fnrN* 调控热凝胶合成的可能途径进行分析, 发现编码 σ 因子的 *ecfR* 和编码生物膜合成调节因子 *sinR* 是主要的中间调节因子。此外, 本研究发现了 *cydAB* 和 *fixGHISNOPQ* 的表达与溶氧有关, 并且 *fnrN* 通过调控 *cydAB* 和 *fixNOPQ* 的表达参与氧信号调控。本研究将有利于全面掌握热凝胶合成过程中的氧信号转导途径。

参 考 文 献

- [1] Hua JL, Um HJ, Yin CJ, et al. Proteomic analysis of curdlan-producing *Agrobacterium* sp. in response to pH downshift[J]. Journal of Biotechnology, 2008, 138(3/4): 80-87
- [2] Shin HD, Liu L, Kim MK, et al. Metabolic engineering of *Agrobacterium* sp. ATCC 31749 for curdlan production from cellobiose[J]. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 2016, 43(9): 1323-1331
- [3] Zhu FM, Du B, Xu BJ. A critical review on production and industrial applications of beta-glucans[J]. Food Hydrocolloids, 2016, 52: 275-288
- [4] Kawashima S, Hirose K, Iwata A, et al. β -glucan curdlan induces IL-10-producing CD4⁺ T cells and inhibits allergic airway inflammation[J]. The Journal of Immunology, 2012, 189(12): 5713-5721
- [5] Gummadi SN, Kumar K. Production of extracellular water insoluble β -1,3-glucan (Curdlan) from *Bacillus* sp. SNC07[J]. Biotechnology and Bioprocess Engineering, 2005, 10(6): 546-551
- [6] Zhang HT, Zhan XB, Zheng ZY, et al. Sequence and transcriptional analysis of the genes responsible for curdlan biosynthesis in *Agrobacterium* sp. ATCC 31749 under simulated dissolved oxygen gradients conditions[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2011, 91(1): 163-175
- [7] Dai XM, Yang LB, Zheng ZY, et al. Proteomic analysis of curdlan-producing *Agrobacterium* sp. ATCC 31749 in response to dissolved oxygen[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2015, 55(8): 1018-1025 (in Chinese)
- 戴小萌, 杨利博, 郑志永, 等. 溶氧影响土壤杆菌 ATCC 31749 发酵生产热凝胶的蛋白质组学[J]. 微生物学报, 2015, 55(8): 1018-1025
- [8] Ruffing AM. Metabolic engineering and omics analysis of *Agrobacterium* sp. ATCC 31749 for oligosaccharide synthesis[D]. Atlanta: Doctoral Dissertation of Georgia Institute of Technology, 2010
- [9] Tsoy OV, Ravcheev DA, Čuklina J, et al. Nitrogen fixation and molecular oxygen: comparative genomic reconstruction of transcription regulation in Alphaproteobacteria[J]. Frontiers in Microbiology, 2016, 7: 1343
- [10] Abdou E, Deredjian A, de Bagüés MPJ, et al. RegA, the regulator of the two-component system RegB/RegA of *Brucella suis*, is a controller of both oxidative respiration and denitrification required for chronic infection in mice[J]. Infection and Immunity, 2013, 81(6): 2053-2061
- [11] Baek SH, Hartsock A, Shapleigh JP. *Agrobacterium tumefaciens* C58 uses ActR and FnrN to control *nirK* and *nor* expression[J]. Journal of Bacteriology, 2008, 190(1): 78-86
- [12] Ramey BE, Matthyse AG, Fuqua C. The FNR-type transcriptional regulator SinR controls maturation of *Agrobacterium tumefaciens* biofilms[J]. Molecular Microbiology, 2004, 52(5): 1495-1511
- [13] Yu LJ, Wu JR, Liu J, et al. Enhanced curdlan production in *Agrobacterium* sp. ATCC 31749 by addition of low-polyphosphates[J]. Biotechnology and Bioprocess Engineering, 2011, 16(1): 34-41
- [14] Yu LJ, Lu J, Wu JR, et al. Influence of low-polyphosphates on curdlan production by *Alcaligenes faecalis* var. *myxogene*[J]. Microbiology China, 2010, 37(5): 664-670 (in Chinese)
- 于丽珺, 路敬, 吴剑荣, 等. 低聚磷酸盐对粪产碱杆菌合成热凝胶的影响[J]. 微生物学通报, 2010, 37(5): 664-670
- [15] Zhou X, Wang SY, Song LX, et al. Developing complex probiotics used in treating resoluble nitrogen wastewater from seawater culture[J]. Microbiology China, 2010, 37(4): 543-546 (in Chinese)
- 周鑫, 王素英, 宋霖霞. 海水养殖含氮废水处理的复合微生物制剂研制[J]. 微生物学通报, 2010, 37(4): 543-546
- [16] Zhan XB, Lin CC, Zhang HT. Recent advances in curdlan biosynthesis, biotechnological production, and applications[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2012, 93(2): 525-531
- [17] Zheng ZY, Lee JW, Zhan XB, et al. Effect of metabolic structures and energy requirements on curdlan production by *Alcaligenes faecalis*[J]. Biotechnology and Bioprocess Engineering, 2007, 12(4): 359-365
- [18] Mortazavi A, Williams BA, McCue K, et al. Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-Seq[J]. Nature Methods, 2008, 5(7): 621-628
- [19] Lopez O, Morera C, Miranda-Rios J, et al. Regulation of gene expression in response to oxygen in *Rhizobium etli*: role of FnrN in *fixNOQP* expression and in symbiotic nitrogen fixation[J]. Journal of Bacteriology, 2001, 183(24): 6999-7006
- [20] Schlüter A, Patschkowski T, Quandt J, et al. Functional and regulatory analysis of the two copies of the *fixNOQP* operon of *Rhizobium leguminosarum* strain VF39[J]. Molecular Plant-Microbe Interactions, 1997, 10(5): 605-616
- [21] Kobayashi K, Fujikawa M, Kozawa T. Oxidative stress sensing by the iron-sulfur cluster in the transcription factor, SoxR[J]. Journal of Inorganic Biochemistry, 2014, 133: 87-91
- [22] Taabazuing CY, Hangasky JA, Knapp MJ. Oxygen sensing strategies in mammals and bacteria[J]. Journal of Inorganic Biochemistry, 2014, 133: 63-72
- [23] Kiley PJ, Beinert H. Oxygen sensing by the global regulator, FNR: the role of the iron-sulfur cluster[J]. FEMS Microbiology Reviews, 1998, 22(5): 341-352