



研究报告

XRE 家族转录因子 XrpA 调控粘质沙雷氏菌的耐酸能力

孙长皓 潘学玮 杨套伟 张显 徐美娟 邵明龙 藤田盛久* 饶志明*

江南大学生物工程学院 工业生物技术教育部重点实验室 江苏 无锡 214122

摘要:【背景】工业菌株的耐酸能力是发酵过程中的一大挑战。粘质沙雷氏菌(*Serratia marcescens*)作为肠杆菌科的一种细菌,可生成 2,3-丁二醇、乙偶姻和灵菌红素等高附加值产品。然而目前对于粘质沙雷氏菌耐酸能力的分子机制尚不清楚。【目的】通过对转录调控因子 XrpA 的挖掘以及对其功能的研究,探究粘质沙雷氏菌耐酸能力的分子机制,为改善工业菌株耐酸能力提供新的策略。【方法】通过对粘质沙雷氏菌进行转座子插入突变,构建了一个 Tn5G 转座子插入突变文库,利用文库筛选了一株酸敏感型突变株,并对其进行测序鉴定;同时还对突变菌株中与耐酸相关关键基因的转录水平以及细胞膜通透性、细胞膜完整性和 H^+ -ATPase 的活性变化进行检测。【结果】发现了一个响应酸胁迫的转录调控因子 BVG90_23400,其属于 XRE 超级家族转录调控因子,命名为 XrpA。在酸性条件下,与野生型菌株(JNB5-1)相比,xrpA 被阻断后导致了粘质沙雷氏菌多种表型的变化,其中包括生物量显著下降、 H^+ -ATPase 活性降低、细胞膜的通透性以及完整性受到破坏。【结论】XrpA 影响粘质沙雷氏菌耐酸能力的分子机制是通过调节细胞膜通透性、细胞膜完整性以及 H^+ -ATPase 活性的正向调节来维持细胞在酸性条件下的内环境稳态。同时,XrpA 可以通过调节酸性应激反应基因的转录水平来影响细胞内环境稳态,从而调控粘质沙雷氏菌对低 pH 的耐受能力。

关键词: 酸胁迫, 环境压力, 细胞膜, 转录调控因子 XrpA, 粘质沙雷氏菌

XRE-superfamily transcriptional regulator XrpA controls acid tolerance in *Serratia marcescens*SUN Chang-Hao PAN Xue-Wei YANG Tao-Wei ZHANG Xian XU Mei-Juan
SHAO Ming-Long Morihisa Fujita* RAO Zhi-Ming*

Key Laboratory of Industrial Biotechnology of Ministry of Education, School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi, Jiangsu 214122, China

Abstract: [Background] The acid tolerance of industrial strains is a significant challenge in the

Foundation items: National Key Research and Development Program of China (2018YFA0900300); National Natural Science Foundation of China (31870066); Ten Thousand Talents Program Science and Technology Innovation Leading Talent Project

*Corresponding authors: Morihisa Fujita: E-mail: fujita@jiangnan.edu.cn

RAO Zhi-Ming: Tel: 86-510-85916881; E-mail: raozhm@jiangnan.edu.cn

Received: 24-12-2019; **Accepted:** 23-03-2020; **Published online:** 09-05-2020

基金项目: 国家重点研发计划(2018YFA0900300); 国家自然科学基金(31870066); “万人计划”科技创新领军人才

*通信作者: 藤田盛久: E-mail: fujita@jiangnan.edu.cn

饶志明: Tel: 0510-85916881; E-mail: raozhm@jiangnan.edu.cn

收稿日期: 2019-12-24; **接受日期:** 2020-03-23; **网络首发日期:** 2020-05-09

fermentation process. The bacterium *Serratia marcescens* is part of the *Enterobacteriaceae* family of eubacteria. It can produce 2,3-butanediol, acetoin, prodigiosin and other high value-added products. However, the molecular mechanism behind *S. marcescens* acid resistance is not properly understood. **[Objective]** By mining of the transcriptional regulator XrpA and studying its functions, the molecular mechanism of acid tolerance of *S. marcescens* was preliminarily investigated, and a new direction was provided for improving the acid-resistant ability of industrial strains. **[Methods]** A Tn5G transposon insertion mutant library was constructed by transposon insertion mutation of *S. marcescens*, and an acid-sensitive mutant strain was screened from the library for sequencing identification. Then, the transcription level of key genes related to acid tolerance and the changes of cell membrane permeability, cell membrane integrity and H^+ -ATPase activity in the mutant strain were detected. Finally, the mechanism of XrpA regulating the acid tolerance of the *S. marcescens* was studied by analyzing the experimental data. **[Results]** We screened for novel regulators that respond to acidic conditions and found mutations in a gene encoding for the HTH_XRE super-family regulatory protein member, here named *xrpA*. We showed that the *xrpA* disruption conferred pleiotropic phenotype changes, including highly decreased biomass, H^+ -ATPase activity, and deficiency of cell membrane permeability and integrity, compared with those of the parent (JNB5-1) strain at low pH. **[Conclusion]** These data revealed that the molecular mechanism by which *xrpA* affects acid resistance of *S. marcescens* is through positive regulation of cell membrane permeability, integrity, and H^+ -ATPase activity to maintain intracellular homeostasis at low pH. Meanwhile, these results indicated that XrpA regulates tolerance to low pH by transcriptional regulation of acid stress response genes to maintain cell membrane function in *S. marcescens*.

Keywords: Acidic stress, Environmental stress, Cell membrane, Transcriptional regulation factor XrpA, *Serratia marcescens*

工业微生物的发酵过程是一个复杂的多维过程^[1]。在发酵过程中,工业菌株通常会受到环境胁迫,主要是高渗透压、高温、高浓度副产物以及低pH等^[2-5],这些是限制发酵生产最大产量的主要瓶颈。微生物在发酵过程中会分泌多种不同类型的酸性物质并留存于发酵体系中^[6],这些酸性物质可能会抑制工业菌株的生长和代谢,抑制有机酸^[7]、氨基酸^[8]、乙醇^[9]等多种生物制品的发酵生产效率。为了提高目的产物的浓度、产量以及生产效率,需要提高工业微生物对环境胁迫的耐受能力,获得工业性能优良的改良菌株,从而保持生物产品的市场竞争力^[2,10-11]。因此,研究人员开始尝试构建一种全局转录调控工程的方法来突破这一瓶颈,这是一种定向进化的方法,可以改变细胞基因转录的整体水平来获得相应的表型,进而提高工业微生物对环境胁迫的耐受能力。在先前的研究中,这一策略已被应用于在遗传和细胞水平来改善微生物细胞,以提高其应对环境胁迫的

抗逆性^[12]。但是,目前只有少数几类调控因子在细胞面对环境胁迫的过程中起到了至关重要的作用,比如 σ 因子和常见的全局转录调控因子^[13-14],但利用转录调控因子工程提高工业菌株对环境胁迫的耐受能力将会是未来的发展趋势。

由于粘质沙雷氏菌是发酵生产2,3-丁二醇、乙偶姻和灵菌红素等多种高附加值生物制品常用的工业微生物,且在粘质沙雷氏菌发酵生产过程中常常会由于有机酸等副产物的分泌导致发酵体系中pH下降,因此,提高粘质沙雷氏菌对酸的耐受能力是很有必要的。本研究建立了粘质沙雷氏菌转座子插入突变文库,从突变文库中发现了一株酸敏感性显著提高的突变株SX1-25,通过反向PCR验证了突变株SX1-25中Tn5G转座子插入并阻断了HTH_XRE超级家族调控蛋白BVG90-23400(XrpA),XrpA的破坏导致突变株SX1-25的耐酸能力显著下降。随后,还研究了在低pH条件下转录因子XrpA在各种细胞代谢途径调控中的关键作

用, 以此来解析转录调控因子 XrpA 调控粘质沙雷氏菌耐酸能力的分子机制。本研究以期为提高工业菌株的耐酸能力提供一种新的策略。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒

所用细菌菌株以及质粒均由本实验室保藏或本研究构建获得(表 1)。

1.1.2 主要试剂和仪器

琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒、质粒小量提取试剂盒、细菌 DNA 基因组提取试剂盒购于上海捷瑞生物工程有限公司; 细菌 DNA 提取试剂盒、细菌 RNA 提取试剂盒购于天根生化科技(北京)有限公司; 反转录试剂盒 HiScript® II Q Select RT SuperMix for qPCR 和 ChamQ™ SYBR Color qPCR Master Mix 试剂盒购于南京诺唯赞生物科技有限公司。

生化培养箱购于上海跃进医疗器械有限公司; 紫外可见分光光度计购于尤尼柯(上海)仪器有

限公司; 冷冻离心机购于 Sigma 公司; PCR 扩增仪、电转化仪购于 Bio-Rad 公司。

1.1.3 培养基

LB 液体培养基(g/L): 胰蛋白胨 10.0, 酵母粉 5.0, NaCl 10.0, pH 4.0 或 pH 7.0, 加入琼脂 20.0 g/L 得到 LB 固体培养基。

牛肉膏蛋白胨琼脂培养基(g/L): 牛肉膏 3.0, 蛋白胨 10.0, NaCl 10.0, 琼脂 20.0, pH 7.0–7.2。

1.2 实验方法

1.2.1 细菌培养条件

将粘质沙雷氏菌冻管菌划线于 LB 固体培养基上, 在 30 °C 培养箱中进行活化后在 30 °C、180 r/min 条件下培养。

1.2.2 转座子插入突变文库的构建以及突变菌株的筛选

以大肠杆菌(*Escherichia coli*) pRK2013Tn5G 为供体菌, 粘质沙雷氏菌 JNB5-1 为受体菌, 利用接合转移的方式构建转座子插入突变文库, 得到粘质沙雷氏菌 Tn5G 转座子插入突变文库。然后将突

表 1 实验中使用的菌株及质粒

Table 1 Strains and plasmids used in this study

菌株与质粒 Strains and plasmids	描述 Description	来源 Source
<i>S. marcescens</i> strains		
JNB5-1	<i>S. marcescens</i> wild type strain	Laboratory collection
SX1-25	<i>xrpA</i> ::Gm ^R mutant of JNB5-1, low pH sensitive mutant strain	This study
SX1-25/pSX1314	Low pH-sensitive mutants SX1-25 with plasmid pSX1314	This study
JNB5-1/pET28a	<i>S. marcescens</i> wild type strain with plasmid pSX1314	This study
SX1-25/pET28a	Low pH-sensitive mutants SX1-25 with plasmid pET28a(+)	This study
<i>E. coli</i> strains		
S17-1	F- <i>recA hsdR</i> RP4-2 (Tc::Mu)(Km::Tn7) lysogenized with λpir phage	Laboratory collection
BL21(DE3)	F-dcm ompT hsdS (rB-mB-) gal λ(DE3)	Laboratory collection
△SfsB	Knock-out partial of <i>sfsB</i> gene in BL21	This study
△SfsB/pCH1086	Mutant △SfsB with plasmid pCH1086	This study
Plasmids		
pRK2013Tn5G	Tn5G carrying plasmid, Km ^R Gm ^R	This study
pMD18T	Cloning vector, 2 692 bp, Amp ^R , lacZ	TaKaRa
pET28a (+)	<i>E. coli</i> expression vector, Km ^R	Laboratory collection
pSX1314	<i>xrpA</i> gene with its promoter cloned in pET28a(+), Km ^R	This study
pCH1086	Low pH-sensitive mutants SX1-25 with plasmid pSX1314	This study

变文库中的突变株在 30 °C、180 r/min 培养 16 h 后,按照 4%的接种量依次接种到加入 200 μ L pH 4.0 LB 液体培养基的 96 孔板当中,30 °C、180 r/min 培养 24 h,利用酶标仪测定其生物量,最终从 10 000 个突变株中筛选得到耐酸能力明显下降的突变株 SX1-25。研究使用的菌株和质粒见表 1。

1.2.3 平板生长实验

将粘质沙雷氏菌 JNB5-1、JNB5-1/pET28a、SX1-25、SX1-25/pSX1314 和 SX1-25/pET28a 对数生长期的细胞用无菌水稀释至 OD_{600} 为 0.8。将菌液进行梯度稀释(10 倍)并吸取 1 μ L 点板到不同 pH 值(pH 4.0 和 pH 7.0)的 LB 平板上。在 30 °C 下培养 24 h 观察平板上菌落形成情况。

1.2.4 细胞存活率分析

为了考察低 pH 条件下菌体的生长情况,将菌株 JNB5-1 (WT)、JNB5-1/pET28a、*xrpA* 突变株 SX1-25、功能互补菌株 SX1-25/pSX1314 以及 SX1-25/pET28a 分别在 100 mL pH 7.0 的 LB 液体培养基中培养至对数生长期后,4 000 r/min 离心 15 min,洗涤并收集菌体,再分别转移至 100 mL pH 4.0 的 LB 培养基中,30 °C、180 r/min 进行培养,定期取样,用稀释平板法计数活菌,计算菌体存活率。菌体存活率计算公式为: $Viability = (V_t/V_0) \times 100\%$,其中 V_t 和 V_0 分别表示冲击时间为 t 和 0 时的残余活细胞数。

1.2.5 转座子插入位点的鉴定

提取突变株 SX1-25 基因组 DNA,经限制性内切酶 *Taq* I 酶切、DNA 连接酶自连后,得到环状的 DNA 片段。然后利用引物 RP1-F (5'-GATCCTGG AAAACGGGAAAG-3')和 RP1-R (5'-CCATCTCATC AGAGGGTAGT-3')进行反向 PCR 鉴定突变株 SX1-25 中转座子 Tn5G 插入位点。将获得的序列与 NCBI 数据库进行比对(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>),以确定 Tn5G 转座子插入位点。将被破坏的基因及其启动子扩增并克隆到载体 pET-28a 上得到重组质粒 pSX1314。将重组质粒转移到突变株 SX1-25 上进行功能互补实验。通过一系列表型实验证明转

录调控因子 *XrpA* 对于粘质沙雷氏菌耐受酸胁迫的重要性。

反向 PCR 反应体系: 2 \times *Taq* Master Mix 25 μ L,引物 RP1-F、RP1-R (10 μ mol/L)各 2.5 μ L,处理后获得的环状 DNA 片段 2 μ L,补双蒸水至 50 μ L。反向 PCR 反应条件: 95 °C 5 min; 95 °C 45 s, 58 °C 30 s, 72 °C 1 min, 30 个循环; 72 °C 5 min, 10 °C 10 min。

反向 PCR 产物分别进行 1%和 2%的琼脂糖凝胶电泳检测和切胶回收,对回收的 DNA 送金唯智生物科技(苏州)有限公司进行测序分析。

1.2.6 RT-qPCR 对基因转录水平的分析

提取细菌总 RNA: 将粘质沙雷氏菌 JNB5-1 (WT)和 SX1-25 (*xrpA* 突变株)划线于终浓度为 50 μ g/mL 的氨苄青霉素 LB 抗性平板上,在 30 °C 恒温培养箱中活化,然后挑取 JNB5-1 和 SX1-25 单菌落接种至 10 mL 液体 LB 培养基中,30 °C、180 r/min 条件下培养至对数生长期,分别转接到 pH 7.0 和 pH 4.0 的 50 mL LB 培养基中,将细胞培养至 OD_{600} 为 0.8–1.0,4 °C、4 000 r/min 离心 10 min 收集菌体,用 RNA 提取试剂盒提取细菌总 RNA,并检测 RNA 的浓度和质量。

反转录: 用反转录试剂盒 HiScript[®] II Q Select RT SuperMix for qPCR 将 RNA 反转录为 cDNA。具体操作步骤参考试剂盒说明书。

荧光定量 PCR: cDNA 混合物稀释到 100 ng/ μ L,用 ChamQ[™] SYBR Color qPCR Master Mix 试剂盒进行 RT-qPCR,具体反应条件参考试剂盒说明书。所用引物见表 2。

1.2.7 细胞膜完整性分析

粘质沙雷氏菌细胞的培养: 将粘质沙雷氏菌 JNB5-1 (WT)、SX1-25 (*xrpA* 突变株)和 SX1-25/pSX1314 (功能互补菌株)划线于 LB 抗性平板上,在 30 °C 培养箱中活化,将待测粘质沙雷氏菌活化菌株单菌落接种至 10 mL 液体 LB 培养基中,于 30 °C、180 r/min 条件下培养至对数生长期,转接至 pH 7.0 和 pH 4.0 的 LB 培养基培养至 OD_{600} 为

1.2.9 质子泵 H^+ -ATPase 活性的测定

粘质沙雷氏菌细胞的培养方式如 1.2.7 所述。 H^+ -ATPase 的活性测定分为无机磷标准曲线的测定、细胞膜的提取和 H^+ -ATPase 的活性检测三部分, 定义 H^+ -ATPase 的酶活单位为每分钟每毫克酶蛋白消耗 ATP 的毫摩尔数。具体检测分析方法参考文献[18]。

1.2.10 XrpA 同源蛋白多序列比对分析

利用NCBI数据库中的BLASTp (protein- protein BLAST)检索非冗余蛋白序列(nr), 研究 XrpA 同源基因在微生物中的分布情况。从 5 个不同的细菌属中选择了 9 个同源蛋白进行多序列比对分析。

1.2.11 CRISPR/Cas 介导的 *E. coli* 中 *sfsB* 的敲除

E. coli BL21(DE3)用于构建突变体菌株, 感受态细胞的制备参见文献[19]。首先将 pCas 转化到 *E. coli* BL21(DE3)中, 然后挑取含有 pCas 的 *E. coli* BL21(DE3)单克隆, 加入 50 mg/L 卡那霉素的 LB 培养基中, 30 °C、220 r/min 培养至 OD_{600} 为 0.2 时, 向摇瓶中加入终浓度为 10 mmol/L 的阿拉伯糖, 诱导 pCas 载体上 λ -Red 蛋白的表达, 培养至 OD_{600} 约为 0.4–0.5 时回收菌体制备电转感受态。电转化时, 向 40 μ L 的感受态细胞中加入 80 ng 的 pTarget F 质粒和 400 ng 同源臂 DNA 片段, 轻柔混合后, 加入到预冷的 1 mm 电转杯中, 在 1.8 kV 的条件下放入电转仪中电转, 电转完后迅速加入 1 mL 的 LB 培养基(室温), 30 °C、180 r/min 培养 1 h 进行复苏, 然后接种菌体于含 50 mg/L 卡那霉素和 50 mg/L 壮观霉素的 LB 双抗固体培养基上, 30 °C 培养过夜获得转化子, 转化子用 PCR 进行检测。

2 结果与分析

2.1 控制粘质沙雷氏菌低 pH 耐受能力转录调控因子 XrpA 的发现

为筛选得到粘质沙雷氏菌耐受低 pH 的相关基因, 通过如图 1A 所示的方法, 以大肠杆菌 pRK2013Tn5G 为供体菌, 以粘质沙雷氏菌 JNB5-1 为受体菌, 构建得到了 Tn5G 转座子插入突变文库, 从突变文库中筛选出对低 pH 耐受能力下降的

突变体, 在这些突变体中 SX1-25 与野生型菌株 JNB5-1 相比其酸耐受能力显著下降。进一步通过反向 PCR 和测序分析, 鉴定了 Tn5G 转座子在突变株 SX1-25 中的插入位点, 发现转座子 Tn5G 插入位点为基因 *BVG90_23400*, 该基因编码功能未知的转录调控因子(图 1B)。进一步通过生物信息学分析发现, *BVG90_23400* 编码 XRE 家族假定的 DNA 结合蛋白(XRE family regulator protein, XrpA), 其具有一个属于 XRE 超家族的螺旋-转角-螺旋(helix-turn-helix)的 DNA 结合域(图 1C)。在平板点种实验中, 与野生型菌株 JNB5-1 和携带有空载的重组菌株 JNB5-1/pET28a 相比, 缺失 *xrpA* 的突变株 SX1-25 和携带有空载的重组菌株 SX1-25/pET28a 在 pH 4.0 时生长明显减慢。在功能互补实验中, 将携带有 *xrpA* 的重组质粒导入到突变株 SX1-25 中, 互补菌株恢复了对低 pH 值的耐受能力(图 1D)。这些结果表明 XRE 家族转录调控因子 XrpA 为粘质沙雷氏菌耐受低 pH 环境所必需。

2.2 XrpA 显著影响粘质沙雷氏菌的耐受酸胁迫能力

为了进一步分析 XrpA 对粘质沙雷氏菌耐受低 pH 环境的影响, 分别测定并绘制了野生型菌株 JNB5-1、*xrpA* 突变菌株 SX1-25、功能互补菌株 SX1-25/pSX131、重组菌株 JNB5-1/pET28a 和 SX1-25/pET28a 五株菌在 pH 4.0 条件下的生长曲线。如图 2A 所示, 在 pH 4.0 条件下, SX1-25 菌株和携带有空载的重组菌株 SX1-25/pET28a 其生长受到严重影响, 最终生物量比野生型菌株 JNB5-1 和携带有空载的重组菌株 JNB5-1/pET28a 下降了 93.6%。此外, 从细胞存活率的结果中发现, 与 WT 和携带有空载的重组菌株 JNB5-1/pET28a 相比, 突变株 SX1-25 在酸性条件下的存活率下降了 60.93% (图 2B)。这些结果与图 1D 的平板点种实验分析结果一致, 表明突变菌株 SX1-25 和携带有空载的重组菌株 SX1-25/pET28a 在 pH 4.0 时的生长明显低于 WT 和携带有空载的重组菌株 JNB5-1/pET28a。为了证实 XrpA 对粘质沙雷氏菌细胞生长

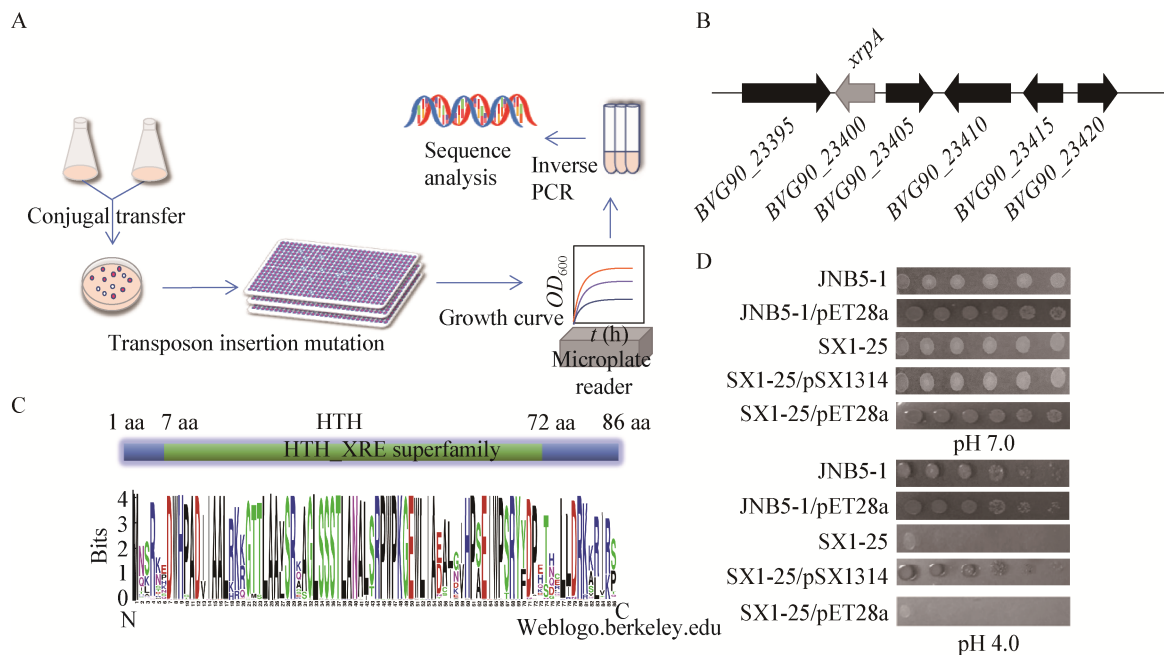


图 1 粘质沙雷氏菌耐受低 pH 环境必需基因 *xrpA* 的发现

Figure 1 The discovery of *xrpA* gene was necessary for *S. marcescens* to tolerate low pH environments

注: A: 构建转座子插入突变体文库, 筛选与粘质沙雷氏菌耐受低 pH 相关的基因; B: *xrpA* 及其周围基因的遗传图谱; C: XrpA 蛋白结构; D: 平板点种实验表明, XrpA 为粘质沙雷氏菌在低 pH 条件下生长所必需的。

Note: A: The transposon insertion mutant library was constructed to screen the genes related to the low pH tolerance of *S. marcescens*; B: Genetic map of the *xrpA* gene and surrounding genes; C: XrpA protein structure; D: Spot assay showed that XrpA was required for *S. marcescens* growth at low pH.

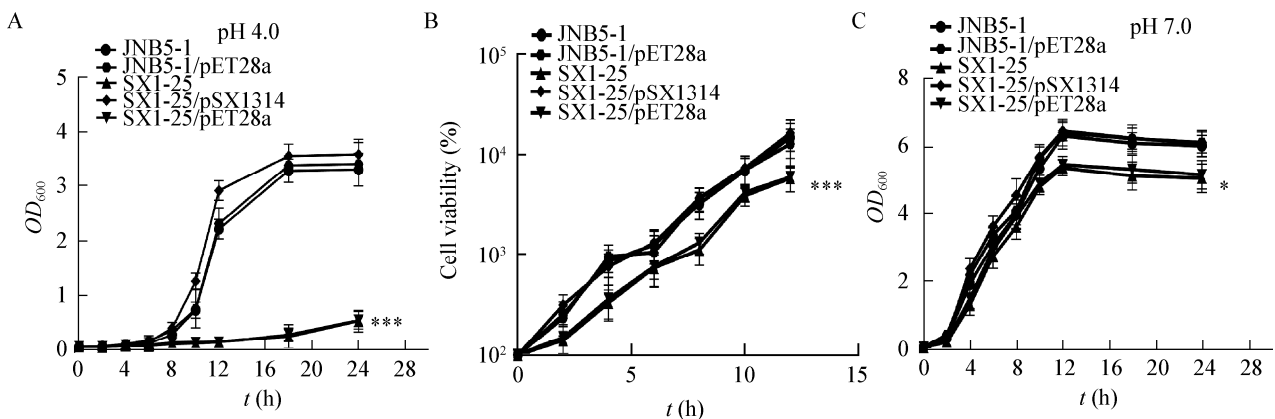


图 2 XrpA 的破坏导致了粘质沙雷氏菌生长能力和细胞活力的降低

Figure 2 Disruption of XrpA decreased cell growth and cell viability

注: A: 野生型菌株(JNB5-1)、SX1-25、SX1-25/pSX1314、JNB5-1/pET28a 和 SX1-25/pET28a 菌株在 pH 4.0 条件下的生长曲线; B: 5 株菌在 pH 4.0 时的细胞存活率; C: 野生型菌株(JNB5-1)、SX1-25、SX1-25/pSX1314、JNB5-1/pET28a 和 SX1-25/pET28a 在 pH 7.0 条件下的生长曲线。*: 与野生型菌株相比 $P \leq 0.05$; ***: 与野生型菌株相比 $P \leq 0.001$, 由 t 检验确定。下同。

Note: A: Growth curves of the parent (JNB5-1), SX1-25, SX1-25/pSX1314, JNB5-1/pET28a and SX1-25/pET28a strains at 600 nm at pH 4.0; B: Cell viability of all five strains at pH 4.0; C: Growth curves of the parent (JNB5-1), SX1-25, SX1-25/pSX1314, JNB5-1/pET28a and SX1-25/pET28a at 600 nm at pH 7.0. *: $P \leq 0.05$ compared with the parent strain; ***: $P \leq 0.001$ compared with the parent strain, as determined by the t -test. The same below.

的影响只是由于受到了 pH 的影响而不是受到 XrpA 自身缺失的影响,还分析了这 5 株菌株在 pH 7.0 时的生长曲线。在 pH 7.0 条件下,突变株 SX1-25 和携带有空载的重组菌株 SX1-25/pET28a 的生长较 WT 和携带有空载的重组菌株 JNB5-1/pET28a 略有下降,最终生物量下降约 19.6%,而互补菌株 SX1-25/pSX1314 与 WT 和携带有空载的重组菌株 JNB5-1/pET28a 的生长无明显差异(图 2C)。这些结果表明,在低 pH 条件下,转录调控因子 XrpA 在调节粘质沙雷氏菌的耐酸能力中起关键作用。

2.3 RT-qPCR 验证突变菌株中与耐酸能力相关基因转录水平变化

上述结果表明,粘质沙雷氏菌缺失转录调控因子 XrpA 后该菌对酸耐受能力显著下降,而已有报道表明,微生物对于环境胁迫的耐受能力通常与细胞膜及其功能密切相关^[20]。因此,我们选取了之前研究过的一些与细胞耐酸能力和脂肪酸生物合成代谢相关的基因,包括 *SMWW4_RS19360* (编码酸休克蛋白)^[21]以及细胞膜合成相关基因

ompA^[22]、*fadR*^[23-24]、*fadA*^[25]、*fabR*^[26]和 *fabB*^[27]等,其中 *SMWW4_RS19360*、*ompA* 和 *fabR* 在细胞耐酸能力方面起正调控作用,而 *fadR*、*fadA* 和 *fabB* 在细胞耐酸能力方面起负调控作用。RT-qPCR 结果表明,与 WT 相比,突变株 SX1-25 在 pH 7.0 的条件下 *SMWW4_RS19360*、*ompA*、*fadA*、*fabR* 和 *fabB* 的转录水平增加而 *fadR* 的转录水平减少(图 3A);但在 pH 4.0 条件下 *SMWW4_RS19360*、*ompA* 和 *fabR* 的转录水平显著下降,而 *fadR*、*fadA* 和 *fabB* 基因的转录水平显著增加(图 3B)。这些结果表明,转录调控因子 XrpA 可能通过影响酸休克蛋白编码基因 *SMWW4_RS19360* 以及细胞膜合成相关基因 *ompA*、*fadR*、*fadA*、*fabR* 和 *fabB* 的转录水平,从而影响粘质沙雷氏菌的耐酸性。

2.4 XrpA 为维持粘质沙雷氏菌细胞膜通透性和完整性所必需

在工业微生物发酵过程中,微生物膜的完整性和通透性在耐受胁迫条件方面起着至关重要的作用^[28]。进一步研究 XrpA 在细胞膜完整性中所起到的作用,将菌株 JNB5-1、SX1-25、SX1-25/

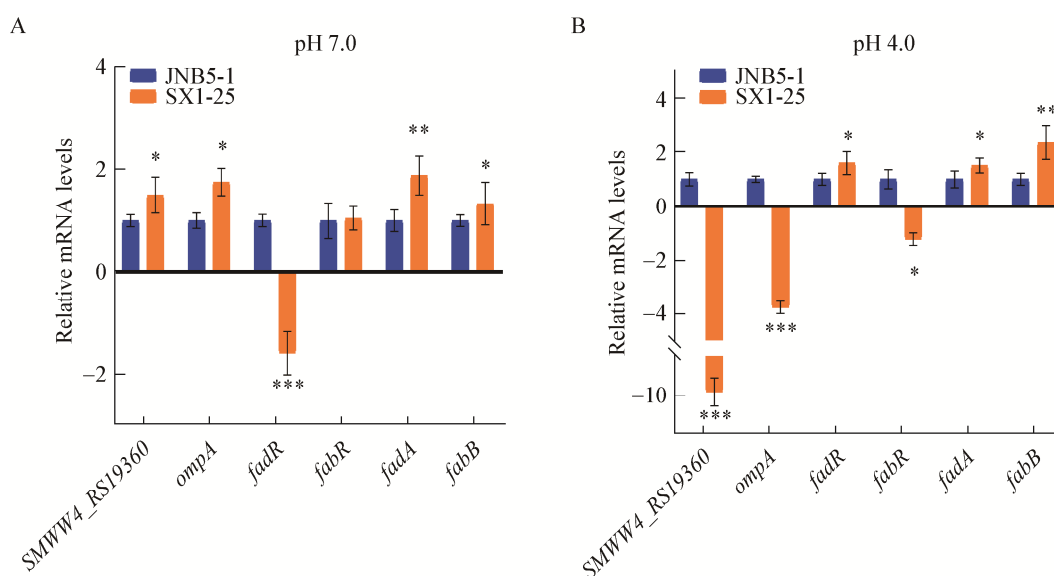


图 3 XrpA 对 pH 7.0 (A)和 pH 4.0 (B)条件下抗酸胁迫关键基因表达的影响

Figure 3 Effect of the disruption of XrpA on the key genes of resist acid stress expression at pH 7.0 (A) and pH 4.0 (B)

注:与野生型菌株在 pH 7.0 (A)和 pH 4.0 (B)条件下相比,突变株 SX1-25 抗酸胁迫基因表达的变化情况。*: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$ 。
Note: Changes in the gene of resist acid shock expression in the SX1-25 strain compared with the parent strain at pH 7.0 (A) and pH 4.0 (B). *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$.

pSX1314、JNB5-1/pET28a 和 SX1-25/pET28a 分别在酸性条件(pH 4.0)和中性条件(pH 7.0)下培养 12 h, 然后再分别对 5 株菌进行 PI 处理以及分析。实验结果表明, 在 pH 7.0 条件下, 野生型菌株 JNB5-1 的 PI 感染率为 7.09%, 功能互补菌株 SX1-25/pSX1314 的 PI 感染率为 6.87%, 突变菌株 SX1-25 的 PI 感染率为 11.30%, 重组菌株 JNB5-1/pET28a 的 PI 感染率为 6.64%, 重组菌株 SX1-25/pET28a 的 PI 感染率为 10.90%; 而在 pH 4.0 条件下, 亲本菌株 JNB5-1、功能互补菌株 SX1-25/pSX1314、突变菌株 SX1-25、重组菌株

JNB5-1/pET28a 和 SX1-25/pET28a 的 PI 感染率分别为 15.5%、14.8%、82.1%、15.2%和 82.8% (图 4A、B)。这些结果表明, XrpA 为粘质沙雷氏菌细胞膜完整性所必需的。

为了研究 *xrpA* 缺失后粘质沙雷氏菌细胞膜通透性的变化, 比较了 WT、*xrpA* 突变菌株 SX1-25、功能互补菌株 SX1-25/pSX1314、重组菌株 JNB5-1/pET28a 和 SX1-25/pET28a 的 PI 吸收因子。实验结果发现, 在 pH 7.0 条件下, 互补菌株 SX1-25/pSX1314 的 PI 感染细胞的 PI 吸收因子较野生型菌株 JNB5-1 和携带有空载的重组菌株 JNB5-1/

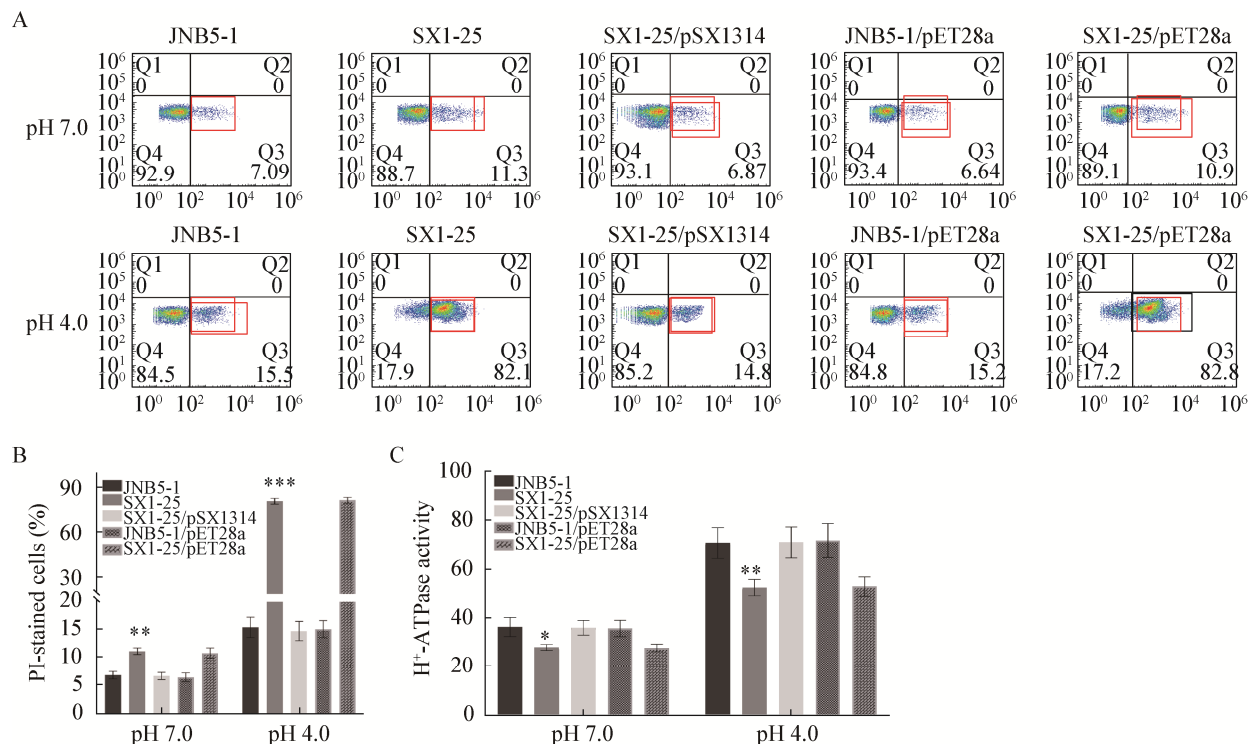


图 4 XrpA 对细胞膜完整性和通透性的影响

Figure 4 XrpA affects membrane integrity and permeability

注: A: 流式细胞术检测野生型菌株(JNB5-1)、SX1-25、SX1-25/pSX1314、JNB5-1/pET28a 和 SX1-25/pET28a 菌株在 pH 7.0 和 pH 4.0 时的细胞膜完整性。B: 在 pH 7.0 和 pH 4.0 条件下, 分别对野生型菌株(JNB5-1)、SX1-25、SX1-25/pSX1314、JNB5-1/pET28a 和 SX1-25/pET28a 菌株细胞膜完整性的定量分析。C: 在 pH 7.0 和 pH 4.0 条件下, 分别对野生型菌株(JNB5-1)、SX1-25、SX1-25/pSX1314、JNB5-1/pET28a 和 SX1-25/pET28a 菌株进行膜通透性的测定。

Note: A: Flow cytometry analysis of membrane integrity in the parent (JNB5-1), SX1-25, SX1-25/pSX1314, JNB5-1/pET28a and SX1-25/pET28a strains at pH 7.0 and pH 4.0. B: Quantification of membrane integrity in the parent (JNB5-1), SX1-25, SX1-25/pSX1314, JNB5-1/pET28a and SX1-25/pET28a strains at pH 7.0 and pH 4.0. C: Membrane permeability assays in the same strains as for panel B at pH 7.0 and pH 4.0.

pET28a 相比没有显著差异;而缺失 *xrpA* 的突变株 SX1-25 和携带有空载的重组菌株 SX1-25/pET28a 的 PI 吸收因子比 WT 增加了 21.3% (图 4C)。在 pH 4.0 的条件下,检测到突变株 SX1-25 和携带有空载的重组菌株 SX1-25/pET28a 的 PI 感染细胞的 PI 吸收因子与 WT 相比发生了显著变化,其中突变株 SX1-25 和携带有空载的重组菌株 SX1-25/pET28a 的 PI 吸收因子与 WT 和携带有空载的重组菌株 JNB5-1/pET28a 相比增加了 56.3%,而互补菌株 SX1-25/pSX1314 与 WT 和携带有空载的重组菌株 JNB5-1/pET28a 相比没有明显变化。以上结果充分说明了转录调控因子 XrpA 被破坏后,粘质沙雷氏菌细胞膜的通透性显著增强,从而降低了粘质沙雷氏菌耐受低 pH 环境的能力。

2.5 XrpA 在维持细胞膜 H⁺-ATPase 活性中的作用

细胞内环境 pH 值的快速恢复是通过质子流出实现的,对于维持细胞内 pH 值在生理范围内至关重要。一般来说,质子流出主要取决于质膜 H⁺-ATPase 质子泵的活性^[29]。因此,分别在 pH 7.0 和 pH 4.0 条件下测定了野生型菌株 JNB5-1、*xrpA* 突变菌株 SX1-25、互补菌株 SX1-25/pSX1314、重组菌株 JNB5-1/pET28a 和 SX1-25/pET28a 五株菌株的质膜 H⁺-ATPase 活性。在 pH 7.0 条件下,突变株 SX1-25 和携带有空载的重组菌株 SX1-25/pET28a 的 H⁺-ATPase 活性较野生型菌株 JNB5-1 和携带有空载的重组菌株 JNB5-1/pET28a 下降了 13.1%,互补菌株 SX1-25/pSX1314 的 H⁺-ATPase 活性与 WT 和携带有空载的重组菌株 JNB5-1/pET28a 无明显差异(图 5)。在 pH 4.0 的条件下,突变株 SX1-25 和携带有空载的重组菌株 SX1-25/pET28a 的 H⁺-ATPase 活性较亲本菌株 JNB5-1 下降了 25.7%,而互补菌株 SX1-25/pSX1314 的 H⁺-ATPase 活性与 WT 和携带有空载的重组菌株 JNB5-1/pET28a 相比无明显变化。这些结果表明,在低 pH 条件下,XrpA 通过影响 H⁺-ATPase 的活性来维持细胞内质子稳态,从而调节细胞内环境的 pH。综上所述,细胞中 *xrpA* 的缺失会显著影响 H⁺-ATPase 的活性,尤其是在酸性

条件下,由于细胞膜通透性增强,会进一步影响细胞膜的完整性。综上所述,转录调控因子 XrpA 通过影响粘质沙雷氏菌细胞膜通透性、细胞膜完整性和 H⁺-ATPase 活性而在粘质沙雷氏菌耐酸能力方面扮演重要角色。

2.6 XrpA-like 蛋白参与调控大肠杆菌耐酸能力

上述实验结果表明,转录调控因子 XrpA 参与调控粘质沙雷氏菌低 pH 耐受性等重要细胞过程,影响粘质沙雷氏菌的多种表型。为研究 XrpA-like 蛋白在其他物种是否也有类似的功能,本研究中,我们在 NCBI 中比对了对 *E* value 小于 5×10^{-10} 的调节蛋白 XrpA 的同源蛋白。其中有 9 种蛋白相似度在 63.95%–100%,主要分布于肠杆菌科。从 5 个不同的菌属中选择了 9 个同源蛋白进行多序列比对分析(图 6A)。随后,在大肠杆菌 BL21(DE3)中敲除了编码 XrpA 同源蛋白 SfsB 的 *sfsB*,在不同 pH 的 LB 琼脂平板上进行点板实验,发现缺失 *sfsB* 基因后的 *E. coli* Δ SfsB 在 pH 值逐渐降低时其生长受到严重影响,对低 pH 值的耐受能力显著下降(图 6B)。因此,XrpA 及其相似蛋白分布在多种细菌当中,且结构较为保守,可能在其他细菌中也具有类似的功能。

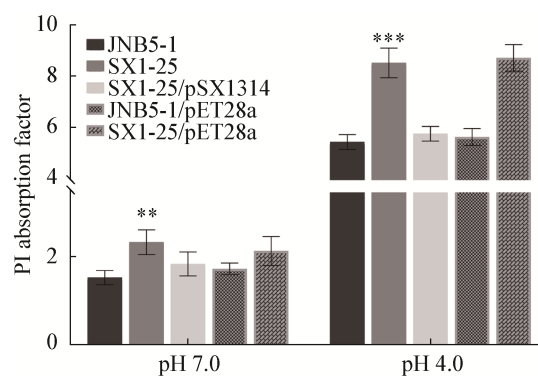


图 5 XrpA 对 H⁺-ATPase 活性的影响

Figure 5 Effect of XrpA on H⁺-ATPase activity

注:在 pH 7.0 和 pH 4.0 条件下,分别对野生型菌株(JNB5-1)、SX1-25、SX1-25/pSX1314、JNB5-1/pET28a 和 SX1-25/pET28a 菌株进行 H⁺-ATPase 活性的测定。

Note: H⁺-ATPase activity assays in the parent (JNB5-1), SX1-25, SX1-25/pSX1314, JNB5-1/pET28a and SX1-25/pET28a strains at pH 7.0 and pH 4.0.

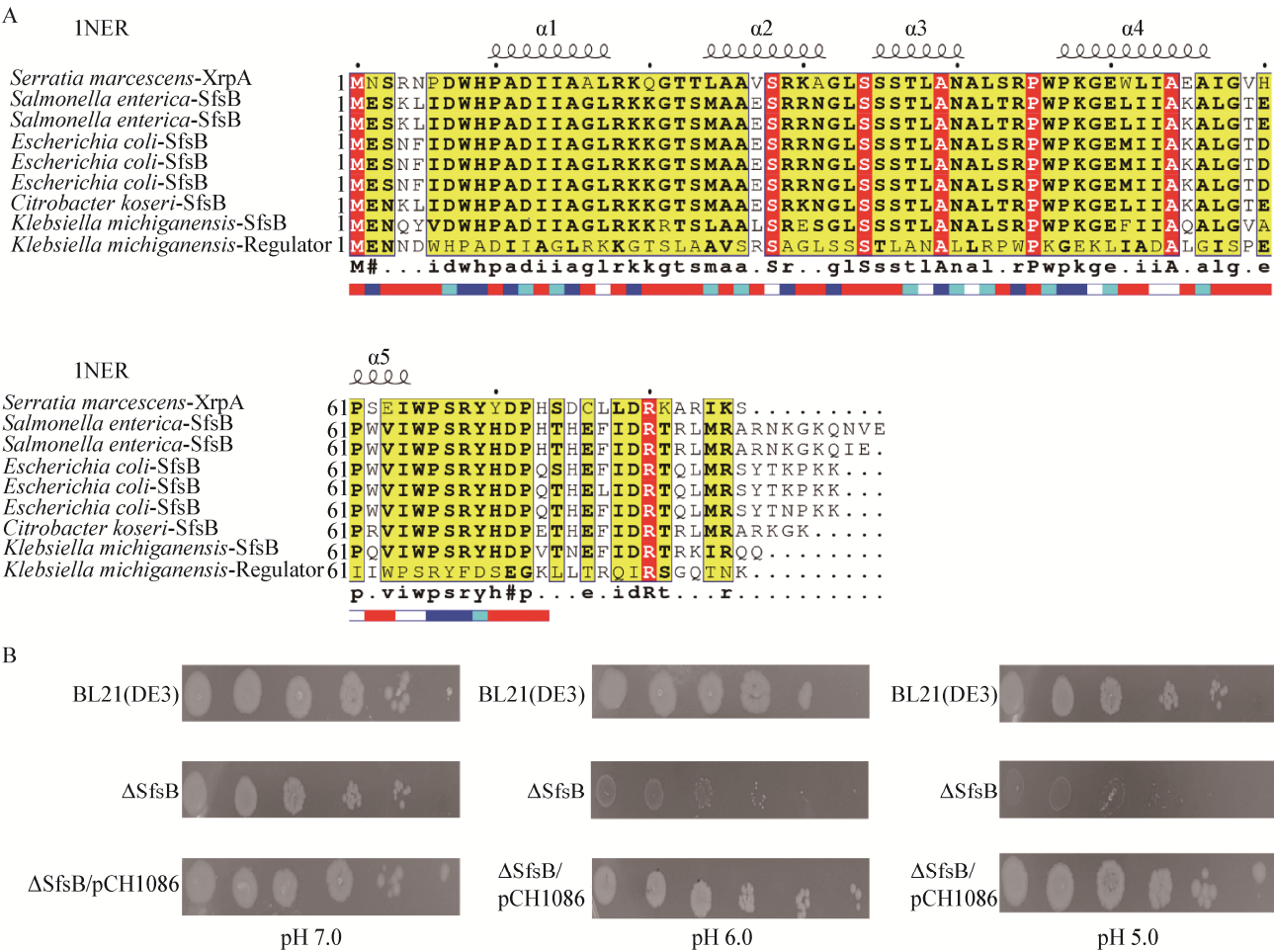


图 6 XrpA-like 蛋白 SfsB 控制大肠杆菌耐受低 pH 环境
Figure 6 The XrpA-like protein SfsB regulates the tolerance of *Escherichia coli* at low pH environment

注：A：使用 ESPript^[30]生成的来自 5 种不同细菌的多序列比对结果，其中包括粘质沙雷氏菌、肠道沙门氏菌、大肠杆菌、克氏柠檬酸杆菌和密歇根克雷伯氏菌；B：在不同 pH 条件下的 LB 培养基上野生型菌株 BL21(DE3)、ΔSfsB、ΔSfsB/pCH1086 菌株的生长情况，平板生长实验表明，SfsB 是大肠杆菌在低 pH 条件下生长所必需的。

Note: A: Multiple sequence alignment from the five different bacteria, including *S. marcescens*, *Salmonella enterica*, *Escherichia coli*, *Citrobacter koseri*, and *Klebsiella michiganensis* generated with ESPript^[30]; B: Growth profiles of the parent BL21(DE3), ΔSfsB, and ΔSfsB/pCH1086 strains grown on LB medium at different pH. Spot assays showed that SfsB is required for *E. coli* growth at low pH.

3 讨论与结论

本研究发现了一种 XRE 家族转录调控因子 XrpA，其控制着粘质沙雷氏菌的耐酸胁迫能力。通过研究发现 XrpA 在调节脂质代谢相关基因的表达中起重要作用，并影响粘质沙雷氏菌的细胞膜完整性、通透性和 H⁺-ATPase 活性。进一步研究证明，在低 pH 条件下，XrpA-like 蛋白 SfsB 对于调控肠杆菌科中另外一种菌株大肠杆菌的酸耐受能力同样至关重要。

首先，通过转座子插入突变获得了一个酸敏感的粘质沙雷氏菌突变株 SX1-25，发现其在转录调节因子 XrpA 被阻断的情况下对酸胁迫的耐受能力明显下降。研究结果表明，在转录调控因子 XrpA 被破坏的情况下，突变菌株 SX1-25 与亲本菌株 JNB5-1 相比，在 pH 7.0 时生物量下降了 19.6%，而在 pH 4.0 时生物量下降了 93.61%，存活率下降了 60.93%。表明 *xrpA* 对于调控粘质沙雷氏菌在酸性条件下的耐受能力至关重要(图 2)。

同时, 本研究结果表明, 与亲本菌株 JNB5-1 相比, 在 pH 4.0 时由于缺失 XrpA 导致突变菌株 SX1-25 中涉及参与脂肪酸代谢与合成的基因以及酸休克蛋白基因在转录水平上发生了显著变化。有研究表明, 这些基因参与合成脂肪酸中双键的长度和数量, 影响磷脂形成的类型^[28], 进而影响细胞应对各种形式的环境压力与胁迫^[24,31]。本研究对粘质沙雷氏菌的 RT-qPCR 数据进行分析发现, 相较于 WT, 在 pH 4.0 时, 突变株 SX1-25 中编码酸休克蛋白的基因 *SMWW4_RS19360*、编码外膜蛋白基因 *ompA*、编码脂肪酸代谢核心调控因子基因 *fabR* 的转录水平明显下降, 编码脂肪酸代谢核心调控因子的基因 *fadR*、编码乙酰辅酶 A 乙酰基转移酶的基因 *fadA* 和编码 β -酮基-ACP 合成酶 I 的基因 *fabB* 的转录水平明显升高。该结果与先前研究报道酸休克蛋白 *SMWW4_RS19360* 和细胞膜脂质合成及代谢相关基因在多数细菌中对酸的耐受性起着重要作用^[21]的结果一致。其中, 酸休克蛋白 *SMWW4_RS19360* 正调控细胞耐酸能力, *OmpA* 通过增加饱和脂肪酸(saturated fatty acids)^[25]与不饱和脂肪酸(unsaturated fatty acids)^[22]的比例来维持细胞膜完整性^[32]。*FadR* 可以通过正向调控 2 个关键酶 *FabA* (3-hydroxydecanoyl-ACP dehydratase)和 *FabB* (β -ketoacyl-ACP synthase I)的表达进而调控 UFA 的合成; *FadR* 的缺失将导致 SFA/UFA 的比例提高, 提高细胞对溶剂的耐受能力, 即调控蛋白 *FadR* 的表达与细胞对溶剂耐受能力负相关^[33]。本研究结果显示, 突变菌株 SX1-25 在 pH 4.0 时 *FadR* 和 *FabB* 的表达显著增加, 这可能是导致其对酸性溶剂耐受能力下降的主要原因(图 3)。结果表明, XrpA 通过影响脂肪酸合成与代谢相关基因的表达水平而降低细胞膜的完整性, 从转录水平解释了 XrpA 如何降低细胞膜的完整性。

本研究发现在 pH 4.0 条件下, SX1-25 突变菌株与 WT 相比, SX1-25 细胞膜的通透性和完整性存在缺陷, H^+ -ATPase 活性下降了 25.7%。这些结果与基因 *ompA*、*fadR*、*fadA*、*fabR* 和 *fabB* 的转录

水平在 WT 和突变株 SX1-25 中表达差异结果一致。因此, 可以推断转录调控因子 XrpA 是通过调控部分细胞膜合成相关基因的表达来控制细胞膜功能, 进而调控细胞的抗酸胁迫的能力。

综上所述, XRE 家族转录调控因子 XrpA 具有调控粘质沙雷氏菌对酸胁迫耐受能力的功能, 这具有相当重要的意义, 可为指导实验室使用调控因子工程来提高工业菌株的耐酸能力和获得更强大的底盘细胞提供新的思路 and 选择。同时, 本研究将保守的 XRE 家族蛋白的已知功能扩展到调控粘质沙雷氏菌在低 pH 条件下的耐酸能力和影响细胞膜功能。此外, 需要继续深入研究转录调节因子 XrpA 的功能, 而且其相似蛋白也有巨大的潜力有待开发。

REFERENCES

- [1] Song X, Zhang SH, Chen T, et al. Research progress of regulator engineering and stress tolerances with *Escherichia coli*[J]. Chemical Industry and Engineering Progress, 2008, 37(7): 2780-2789 (in Chinese)
宋鑫, 张双虹, 陈涛, 等. 大肠杆菌调控因子工程及其菌株耐受性研究进展[J]. 化工进展, 2018, 37(7): 2780-2789
- [2] Lin ZL, Zhang Y, Wang JQ. Engineering of transcriptional regulators enhances microbial stress tolerance[J]. Biotechnology Advances, 2013, 31(6): 986-991
- [3] Mukhopadhyay A. Tolerance engineering in bacteria for the production of advanced biofuels and chemicals[J]. Trends in Microbiology, 2015, 23(8): 498-508
- [4] Martien JJ, Amador-Noguez D. Recent applications of metabolomics to advance microbial biofuel production[J]. Current Opinion in Biotechnology, 2017, 43: 118-126
- [5] Peabody GL, Winkler J, Kao KC. Tools for developing tolerance to toxic chemicals in microbial systems and perspectives on moving the field forward and into the industrial setting[J]. Current Opinion in Chemical Engineering, 2014, 6: 9-17
- [6] Nicolaou SA, Gaida SM, Papoutsakis ET. A comparative view of metabolite and substrate stress and tolerance in microbial bioprocessing: from biofuels and chemicals, to biocatalysis and bioremediation[J]. Metabolic Engineering, 2010, 12(4): 307-331
- [7] Trček J, Mira NP, Jarboe LR. Adaptation and tolerance of bacteria against acetic acid[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2015, 99(15): 6215-6229
- [8] Kisumi M, Takagi T, Chibata I. Construction of an L-arginine-producing mutant in *Serratia marcescens*: use of

- the wide substrate specificity of acetylornithinase[J]. *Journal of Biochemistry*, 1978, 84(4): 881-890
- [9] Zhang MM, Xiong L, Tang YJ, et al. Enhanced acetic acid stress tolerance and ethanol production in *Saccharomyces cerevisiae* by modulating expression of the de novo purine biosynthesis genes[J]. *Biotechnology for Biofuels*, 2019, 12(1): 116
- [10] Julleson D, David F, Pfleger B, et al. Impact of synthetic biology and metabolic engineering on industrial production of fine chemicals[J]. *Biotechnology Advances*, 2015, 33(7): 1395-1402
- [11] Lee SY, Kim HU. Systems strategies for developing industrial microbial strains[J]. *Nature Biotechnology*, 2015, 33(10): 1061-1072
- [12] Bajwa PK, Shireen T, D'Aoust F, et al. Mutants of the pentose-fermenting yeast *Pichia stipitis* with improved tolerance to inhibitors in hardwood spent sulfite liquor[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2009, 104(5): 892-900
- [13] Geddes CC, Mullinnix MT, Nieves IU, et al. Simplified process for ethanol production from sugarcane bagasse using hydrolysate-resistant *Escherichia coli* strain MM160[J]. *Bioresource Technology*, 2011, 102(3): 2702-2711
- [14] Shi DJ, Wang CL, Wang KM. Genome shuffling to improve thermotolerance, ethanol tolerance and ethanol productivity of *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 2009, 36(1): 139-147
- [15] McKenna SL, Cotter TG. Inhibition of caspase activity delays apoptosis in a transfected NS/0 myeloma cell line[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2000, 67(2): 165-176
- [16] Adan A, Alizada G, Kiraz Y, et al. Flow cytometry: basic principles and applications[J]. *Critical Reviews in Biotechnology*, 2017, 37(2): 163-176
- [17] Wu CJ. Physiological mechanism of transcription factor CgRds2 in response to environmental stress in *Candida glabrata*[D]. Wuxi: Master's Thesis of Jiangnan University, 2019 (in Chinese)
- 吴承晋. 光滑球拟酵母转录因子 CgRds2 应答环境胁迫的生理机制[D]. 无锡: 江南大学硕士学位论文, 2019
- [18] Nakamura K, Niimi M, Niimi K, et al. Functional expression of *Candida albicans* drug efflux pump *cdr1p* in a *Saccharomyces cerevisiae* strain deficient in membrane transporters[J]. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2001, 45(12): 3366-3374
- [19] Xia J, Zheng MG, Wang L, et al. Knocking out phosphoenolpyruvate carboxylase gene by CRISPR/Cas and its influence on fatty acid metabolism in *Escherichia coli*[J]. *Microbiology China*, 2016, 43(8): 1864-1871 (in Chinese)
- 夏军, 郑明刚, 王玲, 等. 运用 CRISPR/Cas 系统敲除大肠杆菌磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶基因及其对脂肪酸代谢的影响[J]. *微生物学通报*, 2016, 43(8): 1864-1871
- [20] Robertson JL. The lipid bilayer membrane and its protein constituents[J]. *Journal of General Physiology*, 2018, 150(11): 1472-1483
- [21] Foster JW. *Salmonella* acid shock proteins are required for the adaptive acid tolerance response[J]. *Journal of Bacteriology*, 1991, 173(21): 6896-6902
- [22] Wang Y. The function of OmpA in *Escherichia coli*[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2002, 292(2): 396-401
- [23] Cronan JE Jr, Subrahmanyam S. FadR, transcriptional co-ordination of metabolic expediency[J]. *Molecular Microbiology*, 1998, 29(4): 937-943
- [24] Iram SH, Cronan JE. Unexpected functional diversity among FadR fatty acid transcriptional regulatory proteins[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2005, 280(37): 32148-32156
- [25] Luo LH, Seo PS, Seo JW, et al. Improved ethanol tolerance in *Escherichia coli* by changing the cellular fatty acids composition through genetic manipulation[J]. *Biotechnology Letters*, 2009, 31(12): 1867-1871
- [26] Zhang YM, Marrakchi H, Rock CO. The FabR (YijC) transcription factor regulates unsaturated fatty acid biosynthesis in *Escherichia coli*[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2002, 277(18): 15558-15565
- [27] Feng YJ, Cronan JE. *Escherichia coli* unsaturated fatty acid synthesis: complex transcription of the *fabA* gene and *in vivo* identification of the essential reaction catalyzed by FabB[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2009, 284(43): 29526-29535
- [28] Qi YL, Liu H, Chen LX, et al. Engineering microbial membranes to increase stress tolerance of industrial strains[J]. *Metabolic Engineering*, 2019, 53: 24-34
- [29] Nasution O, Lee YM, Kim E, et al. Overexpression of *OLE1* enhances stress tolerance and constitutively activates the MAPK HOG pathway in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2017, 114(3): 620-631
- [30] Gouet P, Robert X, Courcelle E. ESPript/ENDscript: extracting and rendering sequence and 3D information from atomic structures of proteins[J]. *Nucleic Acids Research*, 2003, 31(13): 3320-3323
- [31] Yan D, Lin XB, Qi YL, et al. Crz1p regulates pH homeostasis in *Candida glabrata* by altering membrane lipid composition[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2016, 82(23): 6920-6929
- [32] Choi U, Lee CR. Distinct roles of outer membrane porins in antibiotic resistance and membrane integrity in *Escherichia coli*[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2019, 10: 953
- [33] Oh HY, Lee JO, Kim OB. Increase of organic solvent tolerance of *Escherichia coli* by the deletion of two regulator genes, *fadR* and *marR*[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2012, 96(6): 1619-1627