

## 研究报告

*rpoS* 基因在肠杆菌 CGMCC 5087 响应环境胁迫中的功能包文智<sup>1</sup> 李兴<sup>2</sup> 张海波<sup>2</sup> 峥嵘<sup>\*1</sup> 刘丽娟<sup>\*2</sup><sup>1</sup> 内蒙古师范大学生命科学与技术学院 内蒙古 呼和浩特 010020<sup>2</sup> 中国科学院青岛生物能源与过程研究所 山东 青岛 266100

**摘要:**【背景】苯乙醇(2-Phenylethanol, 2-PE)是一种具有玫瑰香气味的高级香料添加剂,被广泛应用于香水、化妆品、食品和医药等领域。目前,利用工程菌合成苯乙醇有很好的应用前景。我们分离到一株肠杆菌(*Enterobacter* sp.) CGMCC 5087,其可以通过苯丙酮酸途径合成 2-PE。然而该菌的生长受到不同环境因素导致的胁迫,进而影响苯乙醇的产量。RpoS 作为一种稳定期  $\sigma$  因子和压力应答过程中的主要调节因子,在细菌抗环境胁迫生长中起重要作用。【目的】阐明肠杆菌 CGMCC 5087 中 *rpoS* 基因在多种环境胁迫中的作用,掌握该菌在不同环境胁迫下的生物学特性。【方法】使用 CRISPR 基因编辑技术敲除 *rpoS* 基因,通过质粒表达系统构建互补菌株,检测 *rpoS* 基因缺失株  $\Delta rpoS$  与野生型 WT 菌株和互补菌株  $\Delta rpoS(rpoS)$  在高渗透压、高温、低 pH 和氧化应激环境下的生长情况,并进行统计学分析。【结果】*rpoS* 基因的缺失显著降低了肠杆菌 CGMCC 5087 的生长。在 5% NaCl 和 pH 5.0 胁迫条件下,*rpoS* 基因的缺失导致肠杆菌 CGMCC 5087 的耐受性显著降低。在 42 °C 高温条件下,*rpoS* 基因的缺失导致肠杆菌 CGMCC 5087 在对数期的耐受性显著降低,而在衰退期的耐受性增强。1 mmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 氧化胁迫条件下,*rpoS* 基因的缺失导致肠杆菌 CGMCC 5087 的延滞期延长,而进入稳定期后 *rpoS* 基因突变株耐受性较野生型菌株明显增强。【结论】在肠杆菌 CGMCC 5087 中,RpoS 在抵抗多种环境压力中均具有重要作用,而且在菌株不同的生长时期对于环境胁迫的应答也有所不同,为进一步了解肠杆菌 CGMCC 5087 的生物学特性、掌握 RpoS 在肠杆菌 CGMCC 5087 合成苯乙醇过程中的作用机制提供基础。

**关键词:** 肠杆菌 CGMCC 5087, 基因敲除, *rpoS* 基因, 环境胁迫

**Foundation item:** Natural Science Foundation of Shandong Province (ZR2019BC060)

**\*Corresponding authors:** ZHENG Rong; E-mail: zhengrong09@163.com

LIU Lijuan; Tel: 86-532-80662681; E-mail: liulj@qibebt.ac.cn

**Received:** 18-02-2020; **Accepted:** 07-04-2020; **Published online:** 03-08-2020

**基金项目:** 山东省自然科学基金(ZR2019BC060)

**\*通信作者:** 峥嵘; E-mail: zhengrong09@163.com

刘丽娟; Tel: 0532-80662681; E-mail: liulj@qibebt.ac.cn

**收稿日期:** 2020-02-18; **接受日期:** 2020-04-07; **网络首发日期:** 2020-08-03

## Functions of *rpoS* gene in response to environmental stress by *Enterobacter* sp. CGMCC 5087

BAO Wenzhi<sup>1</sup> LI Xing<sup>2</sup> ZHANG Haibo<sup>2</sup> ZHENG Rong<sup>\*1</sup> LIU Lijuan<sup>\*2</sup>

<sup>1</sup> College of Life Sciences and Technology, Inner Mongolia Normal University, Hohhot, Inner Mongolia 010020, China

<sup>2</sup> Qingdao Institute of Biomass Energy and Bioprocess Technology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao, Shandong 266100, China

**Abstract:** [Background] 2-phenylethanol is a high-grade flavoring additive with rosy scent, and widely used in perfume, cosmetics, food and medicine. At present, the synthesis of 2-phenylethanol by engineering bacteria has a good prospect. We isolated an *Enterobacter* sp. CGMCC 5087 that can synthesize 2-phenylethanol through phenylpyruvate pathway. However, the growth of the bacterium and 2-phenylethanol yield are affected by environmental stress. As a stationary phase Sigma factor and a major regulator in response to stress, RpoS plays an important role in resistant to environmental stress. [Objective] In order to elucidate the role of *rpoS* gene in *Enterobacter* sp. CGMCC 5087 under various environmental stresses. [Methods] Using CRISPR gene editing technology to knockout the *rpoS* gene, and the complementary strain was constructed by introducing the plasmid containing *rpoS* gene into  $\Delta rpoS$  strain. The growth of *rpoS* gene-deficient strain  $\Delta rpoS$ , the wild-type strain and complementary strain  $\Delta rpoS(rpoS)$  under high osmotic pressure, high temperature, low pH and oxidative stress environments was detected and statistically analyzed. [Results] Deletion of *rpoS* gene significantly reduced the growth of *Enterobacter* sp. CGMCC 5087 strain. Under the stress of 5% NaCl and pH 5.0, deletion of *rpoS* gene significantly reduced the tolerance of *Enterobacter* sp. CGMCC 5087. At 42 °C, the deletion of *rpoS* gene resulted in a significant decrease in the tolerance of *Enterobacter* sp. CGMCC 5087 in logarithmic phase, and increased during the decline phase. Under the condition of 1 mmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oxidation stress, the deletion of *rpoS* gene led to the prolongation of the delay period of *Enterobacter* sp. CGMCC 5087, and the tolerance of the mutant strain  $\Delta rpoS$  was significantly higher than that of the wild type. [Conclusion] In *Enterobacter* sp. CGMCC 5087, RpoS plays an important role in resisting to various environmental stresses, and the response to environmental stresses varies with the different growth periods of bacteria. The study provides a basis for further understanding of the biological characteristics of *Enterobacter* sp. CGMCC 5087 and the mechanism of RpoS in the synthesis of 2-phenylethanol of *Enterobacter* sp. CGMCC 5087.

**Keywords:** *Enterobacter* sp. CGMCC 5087, gene knockout, *rpoS*, environmental stresses

苯乙醇(2-Phenylethanol, 2-PE)是一种具有玫瑰香气味的高级香料添加剂,被广泛应用于香水、化妆品、食品和医药等领域。近年来对天然苯乙醇的需求不断增长,通过微生物发酵法生产苯乙醇得到国内外研究人员的广泛关注与重视<sup>[1]</sup>。目前,微生物发酵法合成苯乙醇的主要工作集中在微生物菌种的筛选上,特别是对酵母菌的筛选,而细菌中可以合成苯乙醇的报道较少。我们分离鉴定到一株可以从头合成苯乙醇的肠杆菌(*Enterobacter* sp.)

CGMCC 5087<sup>[2]</sup>,并鉴定了苯乙醇合成的关键酶苯丙酮酸脱羧酶 KDC4427,其酶活性高于酵母中的 Aro10<sup>[3]</sup>,研究说明该菌在苯乙醇研究及生产中具有重要的研究价值。肠杆菌 CGMCC 5087 的胁迫耐受性是影响苯乙醇产量的主要因素之一,掌握该菌在不同环境胁迫下的生物学特性,对有效利用肠杆菌 CGMCC 5087 产 2-PE 具有重要意义。

在微生物发酵过程中,人们通常采取多种措施促进菌体的生长以获得目标产物,而菌株本身对胁

迫的耐受能力是评价工程菌底盘细胞性能的重要指标。细菌的  $\sigma$  因子 RpoS 是目前被发现响应多重环境胁迫的调控因子,当细菌面临营养缺乏、环境压力或者进入稳定期时, RpoS 含量会相应增加; RpoS 蛋白的表达水平影响着其他众多基因的表达,可直接或间接影响细菌受到环境胁迫后一些特性的变化<sup>[4-7]</sup>。在大肠杆菌中, RpoS 可影响该菌对饥饿、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>、高温、低 pH 等多种环境胁迫的耐受性<sup>[8]</sup>。研究表明,在溶藻胶弧菌(*Vibrio alginolyticus*)中 *rpoS* 基因的缺失可影响其在 18% (体积比)乙醇、高渗透压(2.4 mol/L NaCl)、10 mmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 和 42 °C 高温等胁迫条件下的生长,使菌体耐受性降低<sup>[9-13]</sup>。在不同的细菌中, RpoS 对胁迫耐受性的影响往往是多样的。本研究中的肠杆菌 CGMCC 5087 为一株新分离的苯乙醇合成菌株,具有潜在的研究及应用价值,然而该菌在多种环境胁迫下的耐受性尚未阐明。

因此,本研究通过 CRISPR 技术构建 *rpoS* 基因缺失株,检测肠杆菌 CGMCC 5087 中 RpoS 在高渗透压、高温、低 pH 以及 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 等多种环境胁迫中的作用,阐明 RpoS 在肠杆菌 CGMCC 5087

响应环境胁迫中的作用,以期了解该菌株的各种生物学特性及对该菌株在苯乙醇生产中的应用提供理论基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 菌株、质粒和引物

实验中所用到的菌株和质粒相关信息见表 1,所用引物由北京擎科生物科技有限公司青岛分公司合成,引物详细信息见表 2。

#### 1.1.2 主要试剂和仪器

提质粒试剂盒、胶回收试剂盒、2×Rapid Taq Master Mix、In-Fusion 无缝克隆试剂盒,南京诺唯赞生物科技股份有限公司;限制性内切酶、DNA Marker, TaKaRa 公司; 2×PCR Bestaq Master Mix, 江苏爱必梦生物科技有限公司; 卡那霉素、异丙基-β-D-硫代半乳糖苷 IPTG, 北京索莱宝科技有限公司; 壮观霉素, 上海 BBI 生命科学有限公司; L-阿拉伯糖、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 阿拉丁试剂(上海)有限公司。紫外可见分光光度计, Varian 公司; PCR 扩增仪、小型水平电泳系统、凝胶成像系统, Bio-Rad 公司。

表 1 菌株和质粒

Table 1 Strains and plasmids

菌种和质粒 Strains and plasmids	相关特性 Relevant characteristics	文献与来源 Reference or source
Strains		
<i>Escherichia coli</i> Trans5α	Amp <sup>r</sup>	TransGen
Trans5α-pTargetr	Trans5α transformed with plasmid pTargetr	This study
Trans5α-pTargetr-US-DS- <i>rpoS</i>	Trans5α transformed with plasmid pTargetr-US-DS- <i>rpoS</i>	This study
<i>Enterobacter</i> sp. CGMCC 5087	Amp <sup>r</sup>	[2]
<i>Enterobacter</i> sp. CGMCC 5087/pCas	<i>Enterobacter</i> sp. CGMCC 5087 transformed with plasmid pCas	This study
<i>Enterobacter</i> sp. CGMCC 5087/Δ <i>rpoS</i>	<i>Enterobacter</i> sp. CGMCC 5087 deleted <i>rpoS</i>	This study
<i>Enterobacter</i> sp.CGMCC5087/Δ <i>rpoS</i> ( <i>rpoS</i> )	<i>Enterobacter</i> sp. CGMCC 5087/Δ <i>rpoS</i> transformed with plasmid pTarget- <i>rpoS</i>	This study
Plasmids		
pTarget	Spc <sup>r</sup>	[14]
pTargetr	pTarget plasmid inserted sgRNA	This study
pTargetr-DS-US- <i>rpoS</i>	pTargetr plasmid inserted homologous arm sequence of <i>rpoS</i> gene	This study
pTarget- <i>rpoS</i>	pTarget plasmid inserted <i>rpoS</i>	This study
pCas	Kana <sup>r</sup>	[14]

表 2 本研究所用引物序列与扩增目的片段  
Table 2 Primer sequence and amplification target fragment used in this study

引物名称 Primers name	引物序列 Primers sequence (5'→3')	目的片段 Target fragment
pTarget- <i>rpoS</i> -F	TCCTAGGTATAATACTAGTTTCGCACGTCGTGCTTTGCGG	pTargetr plasmid
	TTTTAGAGCTAGAAATAGC	
pTarget- <i>rpoS</i> -R	ACTAGTATTATACCTAGGACTGAGCTAGCTGTCAAG	Upstream of <i>rpoS</i> (US)
<i>rpoS</i> -US-F	GAGAACTTCTCTTCCTCCGA	
<i>rpoS</i> -US-R	TTTTTTGACGAAAGGTTGCAAGGTGGCTCCTACCCGTG	Downstream of <i>rpoS</i> (DS)
<i>rpoS</i> -DS-F	CACGGGTAGGAGCCACCTTGCAACCTTTCGTCAAAAAA	
<i>rpoS</i> -DS-R	ACATTATCGACCTCCACATT	US+DS
<i>rpoS</i> -US-DS- <i>EcoR</i> I-F	GTCGGTGCTTTTTTTgaattcGAGAACTTCTCTTCCTCCG	
<i>rpoS</i> -US-DS- <i>EcoR</i> I-R	CAGGTCGACTCTAGAgaaattcACATTATCGACCTCCACAT	Fragment carrying <i>rpoS</i> gene and the flanking regions
<i>rpoS</i> -TEST-F	TCTGAGGATTCAGGTGATCA	
<i>rpoS</i> -TEST-R	AACAATACGCAGGTGCTCAC	<i>rpoS</i>
<i>rpoS</i> - <i>Spe</i> I-F	AGTCCTAGGTATAATactagtATGAGTCAGAATACGCTGA	
<i>rpoS</i> - <i>EcoR</i> I-R	CAGGTCGACTCTAGAgaaattcTTATTCGCGGAACAGCGCT	

注：表格中小写部分代表酶切位点序列  
Note: In the table, the lowercase part represents the sequence of digestion site

1.1.3 培养基

LB 液体培养基(g/L): 胰蛋白胨 10.0, 酵母浸粉 5.0, NaCl 10.0。固体 LB 培养基加琼脂粉 10.0 g/L。LB 液体培养基基础上加入适量的 HCl、NaCl、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 作为胁迫培养基。阳性克隆子筛选平板: 固体 LB 培养基加入最终浓度为 50 μg/mL 的卡那霉素(Kan)和壮观霉素(Spc)。

1.2 方法

1.2.1 敲除质粒的构建

sgRNA 序列的设计是参照文献[14]所述的方法, 引物 pTarget-*rpoS*-F 和 pTarget-*rpoS*-R 合成之后各取 2 μL, 以 pTarget 质粒为模板进行 PCR 扩增引入 sgRNA 序列。PCR 反应体系(50 μL): 引物 pTarget-*rpoS*-F 和 pTarget-*rpoS*-R 各取 2 μL (最终摩尔分数为 0.4 μmol/L), 模板 pTarget 质粒 1 μL (最终摩尔分数为 20 ng/μL), 2×PCR Bestaq Master Mix 25 μL, ddH<sub>2</sub>O 20 μL。PCR 反应条件: 95 °C 5 min; 95 °C 30 s, 57 °C 30 s, 72 °C 45 s, 共 34 个循环。琼脂糖凝胶电泳法验证条带大小, 纯化回收片段。纯化的质粒用 *Dpn* I 酶消解后热激转化到 Trans5α-pTargetr 感受态细胞中, 涂 Spc 抗性平板 37 °C 培养过夜。挑取阳性转化子 180 r/min 振荡培

养 12 h 并提取质粒测序验证, 得到带有 sgRNA 序列的 pTargetr 质粒。以肠杆菌 CGMCC 5087 菌液为模板, 用引物 *rpoS*-US-F 和 *rpoS*-US-R 进行菌液 PCR 扩增出 *rpoS* 上游 392 bp 的同源片段 US, 用引物 *rpoS*-DS-F 和 *rpoS*-DS-R 进行菌液 PCR 扩增出下游 415 bp 大小的同源片段 DS。菌液 PCR 反应体系(50 μL): 引物 *rpoS*-US-F 和 *rpoS*-US-R (*rpoS*-DS-F 和 *rpoS*-DS-R)各取 2 μL (最终摩尔分数为 0.4 μmol/L), 菌液模板 1 μL, 2×PCR Bestaq Master Mix 25 μL, ddH<sub>2</sub>O 20 μL。PCR 反应条件: 95 °C 5 min; 95 °C 30 s, 57 °C 30 s, 72 °C 30 s, 共 34 个循环。根据 pTarget 质粒设计了带有 *EcoR* I 酶切位点的引物 *rpoS*-US-DS-*EcoR* I-F 和 *rpoS*-US-DS-*EcoR* I-R。将 US 和 DS 片段扩增 12 个循环之后加入引物对 *rpoS*-US-F 和 *rpoS*-DS-R 继续扩增 34 个循环。PCR 反应体系(50 μL): 上、下游片段两端引物各取 2 μL (最终摩尔分数为 0.4 μmol/L), 模板 1 μL (最终摩尔分数为 20 ng/μL), 2×PCR Bestaq Master Mix 25 μL, ddH<sub>2</sub>O 20 μL。PCR 反应条件: 95 °C 5 min; 95 °C 30 s, 57 °C 30 s, 72 °C 30 s, 共 56 个循环。琼脂糖凝胶电泳回收产物与用限制性内切酶 *EcoR* I 酶切好的 pTargetr 载体片

段进行 In-Fusion 无缝克隆。在 PCR 仪中 37 °C 连接 30 min。把连接产物热激转化到 Trans5 $\alpha$ -pTargetr-US-DS-*rpoS* 感受态细胞中,涂 Spc 抗性平板培养过夜,挑取阳性转化子 180 r/min 振荡培养 12 h 提质粒测序验证,得到敲除载体 pTargetr-US-DS-*rpoS*。

### 1.2.2 *rpoS* 基因的敲除

将 pCas 质粒转入肠杆菌 CGMCC 5087 野生型菌体内,验证阳性克隆子,得到待敲除菌株 *Enterobacter* sp. CGMCC 5087/pCas。挑取 *Enterobacter* sp. CGMCC 5087/pCas 单菌落转接于 5 mL LB 液体培养基,30 °C、180 r/min 振荡培养, $OD_{600}$  为 0.4 左右时加入 10 mmol/L 的 L-阿拉伯糖诱导 RED 的表达 1 h, $OD_{600}$  为 0.6 左右时 6 000 r/min 离心 5 min 收集菌体沉淀,用冰预冷的无菌水悬洗 2 遍,冰预冷的 10% (体积比)的甘油洗 1 遍,6 000 r/min 离心 5 min,去掉上清之后用 50  $\mu$ L 10% 的甘油重悬菌体。取 5  $\mu$ L 敲除质粒 pTargetr-US-DS-*rpoS* 用 1 mm 电转杯电转(1.8 kV)转入 *Enterobacter* sp. CGMCC 5087/pCas 感受态细胞中,加入 1 mL LB 复苏 1 h 后,以 Kan、Spc 双抗平板进行筛选。30 °C 培养过夜后对克隆子进行菌液 PCR 验证。PCR 反应体系(20  $\mu$ L): *rpoS*-TEST-F 和 *rpoS*-TEST-R 引物各取 0.8  $\mu$ L (最终摩尔分数为 0.4  $\mu$ mol/L),模板为菌体,2 $\times$ Rapid Taq Master Mix 10  $\mu$ L, ddH<sub>2</sub>O 8.4  $\mu$ L。PCR 反应条件: 95 °C 5 min; 95 °C 30 s, 57 °C 30 s, 72 °C 30 s, 共 34 个循环。若基因敲除成功扩增出 1 000 bp 的条带,若敲除不成功则扩增出 2 040 bp 的条带。将验证正确的菌株接到 Kan 抗性的 LB 液体培养基,加入 0.5 mmol/L IPTG 于 37 °C 培养 20 h 后涂布 LB 平板,挑取单菌落分别转接到 Kan、Spc 抗性平板。若菌落在 Kan 平板上生长而在 Spc 平板上不生长,则丢失 pTargetr 质粒成功,再将此菌株接入液体 LB 中并在 37 °C、180 r/min 振荡培养 24 h,丢失 pCas 质粒。

### 1.2.3 互补菌株 $\Delta$ *rpoS*(*rpoS*)的构建

将限制性内切酶 *Spe* I 和 *Eco*R I 双酶切回收的

pTarget 载体片段与用引物 *rpoS*-*Spe* I-F 和 *rpoS*-*Eco*R I-R 扩增出的 *rpoS* 基因片段进行无缝克隆连接,转化到 Trans5 $\alpha$  感受态细胞中,阳性转化子提取质粒经双酶切验证成功后,再将质粒电转化到 *Enterobacter* sp. CGMCC 5087/ $\Delta$ *rpoS* 菌株中得到互补菌株 *Enterobacter* sp. CGMCC 5087/ $\Delta$ *rpoS*(*rpoS*)。感受态细胞制备过程同 1.2.2。

### 1.2.4 WT、 $\Delta$ *rpoS* 和 $\Delta$ *rpoS*(*rpoS*)生长曲线的绘制

配制 LB 液体培养基分装 50 mL 到若干个三角瓶中灭菌。将 37 °C、180 r/min 振荡培养过夜的 WT、 $\Delta$ *rpoS* 和  $\Delta$ *rpoS*(*rpoS*)菌液按 1:100 的比例转接到 50 mL LB 中,37 °C、180 r/min 振荡培养。隔 2 h 取一次样(夜间不取样)测定  $OD_{600}$  值并绘制生长曲线,然后将数据用 SPSS 17.0 软件进行独立样本 *t* 检验。

### 1.2.5 WT、 $\Delta$ *rpoS* 和 $\Delta$ *rpoS*(*rpoS*)在环境胁迫下的生长

配制含 5% NaCl 的 LB、pH 5.0 的 LB 和含 1 mmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 的 LB 液体培养基各 500 mL,比较 WT、 $\Delta$ *rpoS* 和  $\Delta$ *rpoS*(*rpoS*)这 3 种菌在高渗、pH 5.0、1 mmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 和 42 °C 4 种胁迫环境下的生长情况,接种量为 1:100,每个平行至少重复 2 次,在菌株生长对数期(12 h)、稳定期(24 h)和衰退期(48 h)取样测定  $OD_{600}$  值并作图,然后将数据用 SPSS 17.0 软件进行独立样本 *t* 检验。

## 2 结果与分析

### 2.1 $\Delta$ *rpoS* 和 $\Delta$ *rpoS*(*rpoS*)菌株的构建

为了研究肠杆菌 CGMCC 5087 *rpoS* 基因对环境胁迫耐受性的作用,使用 CRISPR 基因编辑技术对 *rpoS* 基因进行了敲除。以 *rpoS*-TEST-F 和 *rpoS*-TEST-R 为引物,对肠杆菌 CGMCC 5087 *rpoS* 基因缺失株  $\Delta$ *rpoS* 进行菌液 PCR 验证。若 *rpoS* 基因敲除成功,扩增产物大小应为 1 000 bp;若敲除未成功则为 2 040 bp。结果如图 1A 所示,野生型对照的条带大小为 2 040 bp,  $\Delta$ *rpoS* 菌落 PCR 扩增产物的条带大小为 1 000 bp,与理论一致,说

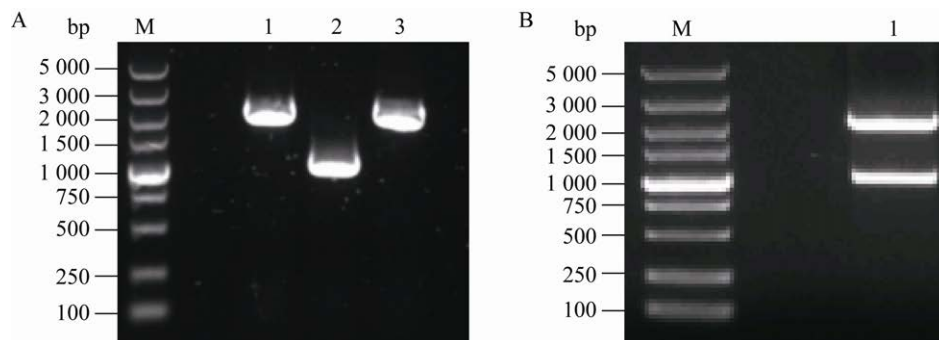


图 1 *rpoS* 基因敲除验证与质粒 pTarget-*rpoS* 双酶切验证

Figure 1 *rpoS* gene knockout verification and plasmid pTarget-*rpoS* double enzyme digestion verification

注: M: DL5000 DNA Marker。A: 1: *rpoS* 基因敲除未成功菌株; 2: *rpoS* 基因敲除成功菌株; 3: 野生型对照, 大小为 2 040 bp。

B: 质粒 pTarget 双酶切后大小为 2 118 bp; *rpoS* 基因大小为 993 bp

Note: M: DL5000 DNA Marker. A: Lane 1 is the unsuccessful knockout strain of *rpoS* gene deletion; Lane 2 is the successful knockout strain of *rpoS* gene; Wild-type control is in lane 3 with a size of 2 040 bp. B: Plasmid ptarget is 2 118 bp after double enzyme digestion and *rpoS* gene is 993 bp

明 *rpoS* 基因敲除成功, 得到敲除菌株并将其命名为  $\Delta rpoS$ 。

互补质粒 pTarget-*rpoS* 连接之后使用 *EcoR* I 和 *Spe* I 进行双酶切验证, 如图 1B 所示, *rpoS* 基因大小为 993 bp, pTarget 质粒双酶切之后为 2 118 bp, 验证结果与理论一致, 经测序验证正确。随后将质粒 pTarget-*rpoS* 电转化到  $\Delta rpoS$  中得到互补菌株  $\Delta rpoS(rpoS)$ 。

## 2.2 WT、 $\Delta rpoS$ 、 $\Delta rpoS(rpoS)$ 生长曲线的绘制

生长曲线表示微生物体生长时细胞数量变化与生长时间关系的曲线。为了研究 *rpoS* 基因缺失之后对菌株生长的影响, 按照 1.2.4 所述方法隔特定时间取样测定  $OD_{600}$  值绘制 WT、 $\Delta rpoS$ 、 $\Delta rpoS(rpoS)$  生长曲线(图 2)。结果表明, WT 与互补菌株在 20 h 得到最高值, 而  $\Delta rpoS$  在 12 h 得到最高值, 而且最高点的菌体量明显低于 WT 与  $\Delta rpoS(rpoS)$ 。进入稳定期后  $\Delta rpoS$  与 WT 及  $\Delta rpoS(rpoS)$  相比, 菌体量显著降低( $P < 0.01$ ), 表明在 LB 培养基中, 敲除 *rpoS* 基因对肠杆菌 CGMCC 5087 的生长影响较大, 而且 *RpoS* 在对数生长期对菌体生长的影响要低于在稳定期的影响。同时观察到稳定期互补菌株的生物量也低于野生菌株, 使  $\Delta rpoS$  生长情况得到部分互补, 这可能是由于质粒表达系统造成的。

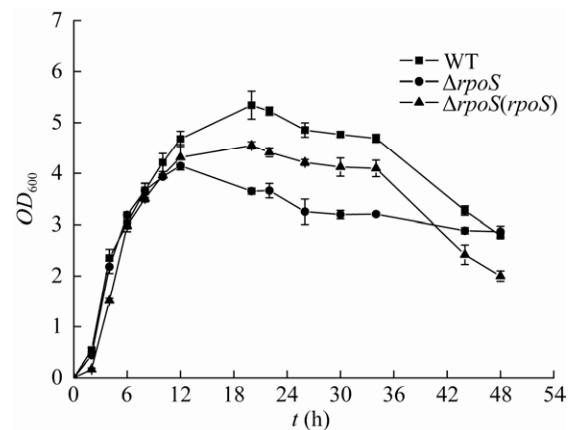


图 2 WT、 $\Delta rpoS$ 、 $\Delta rpoS(rpoS)$  生长曲线

Figure 2 Growth curve of WT,  $\Delta rpoS$  and  $\Delta rpoS(rpoS)$

## 2.3 WT、 $\Delta rpoS$ 、 $\Delta rpoS(rpoS)$ 环境胁迫耐受性分析

### 2.3.1 WT、 $\Delta rpoS$ 、 $\Delta rpoS(rpoS)$ 在高渗透压环境下的生长情况

将 WT、 $\Delta rpoS$ 、 $\Delta rpoS(rpoS)$  菌分别于含有 5% NaCl 的 LB 培养基中进行培养, 并在 12、24、48 h 各取一次样测定  $OD_{600}$  值, 比较分析发现 WT 与  $\Delta rpoS$ 、 $\Delta rpoS$  与  $\Delta rpoS(rpoS)$  的菌浓度在 12、24、48 h 均有极显著差异( $P < 0.01$ )。由此可见, 敲除 *rpoS* 基因之后肠杆菌 CGMCC 5087 的高渗透压耐受性明显降低(图 3)。

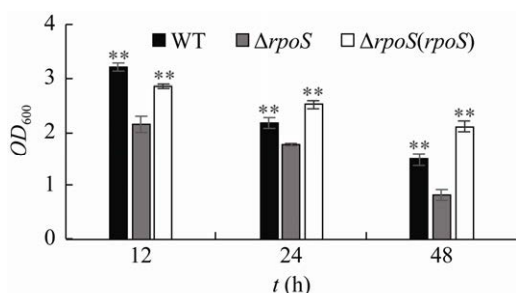


图3 WT、 $\Delta rpoS$ 、 $\Delta rpoS(rpoS)$  5% NaCl 中的生长情况  
Figure 3 Growth of WT,  $\Delta rpoS$  and  $\Delta rpoS(rpoS)$  in 5% NaCl

注：本文中不同菌株在同一生长时期的统计学显著性差异已用\*标注于柱状图上方；WT 与  $\Delta rpoS$  的差异在 WT 上方标注， $\Delta rpoS(rpoS)$  与  $\Delta rpoS$  的差异在  $\Delta rpoS(rpoS)$  上方标注，若无标注则表示并无显著差异；\*：差异显著；\*\*：差异极显著；下同  
Note: The statistical significant differences of different strains in the same growth period in this paper have been marked on the top of the histogram with \*; The difference between WT and  $\Delta rpoS$  is marked on the top of WT, and the difference between  $\Delta rpoS(rpoS)$  and  $\Delta rpoS$  is marked on the top of  $\Delta rpoS(rpoS)$ ; If there is no mark, it means there is no significant difference; \*: Significant difference; \*\*: Extremely significant difference; The same below

### 2.3.2 WT、 $\Delta rpoS$ 、 $\Delta rpoS(rpoS)$ 在高温环境下的生长情况

将 WT、 $\Delta rpoS$ 、 $\Delta rpoS(rpoS)$  这 3 种菌株同时于 42 °C、180 r/min 振荡培养。结果如图 4 所示，在 42 °C 高温条件下，对数期 12 h 时  $\Delta rpoS$  的菌浓度明显低于 WT 菌浓度 ( $P < 0.05$ )，但到了衰退期  $\Delta rpoS$  的菌浓度明显高于 WT 与  $\Delta rpoS(rpoS)$  菌浓度，稳定期 WT 与  $\Delta rpoS$  无显著差异 ( $P > 0.05$ )， $\Delta rpoS(rpoS)$  与  $\Delta rpoS$  差异极显著 ( $P < 0.01$ )。该结果表明，在高温环境下， $\Delta rpoS$  菌的生长在对数期受到抑制，而在衰退期高温耐受性强于 WT 和  $\Delta rpoS(rpoS)$ 。

### 2.3.3 WT、 $\Delta rpoS$ 、 $\Delta rpoS(rpoS)$ 在低 pH 环境下的生长情况

有研究表明，RpoS 对于大肠杆菌的酸抗性非常重要<sup>[15]</sup>。本文研究了 pH 5.0 条件下 RpoS 在肠杆菌 CGMCC 5087 响应酸胁迫中的作用，结果如图 5 显示，在 pH 5.0 的环境中，对数期 12 h 时  $\Delta rpoS$  的菌浓度稍高于 WT 和  $\Delta rpoS(rpoS)$ ，但无显著差异 ( $P > 0.05$ )；在稳定期 24 h 时  $\Delta rpoS$  的菌浓度明显

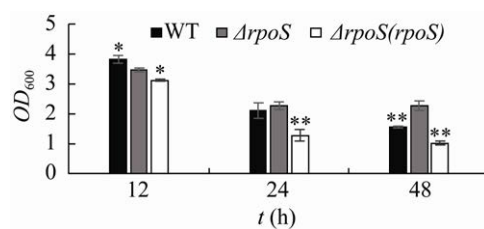


图4 WT、 $\Delta rpoS$ 、 $\Delta rpoS(rpoS)$  42 °C 高温下的生长情况  
Figure 4 Growth of WT,  $\Delta rpoS$  and  $\Delta rpoS(rpoS)$  at 42 °C

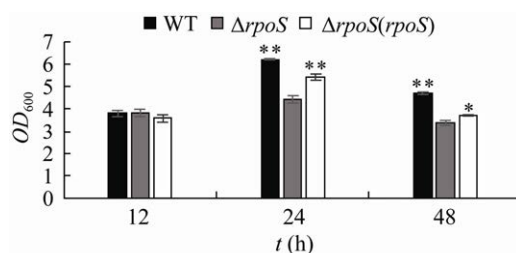


图5 WT、 $\Delta rpoS$ 、 $\Delta rpoS(rpoS)$  pH 5.0 环境中的生长情况  
Figure 5 Growth of WT,  $\Delta rpoS$  and  $\Delta rpoS(rpoS)$  in pH 5.0

低于 WT 和  $\Delta rpoS(rpoS)$  ( $P < 0.01$ )；在衰退期 48 h 时  $\Delta rpoS$  与 WT 的菌浓度有极显著差异 ( $P < 0.01$ )， $\Delta rpoS$  与  $\Delta rpoS(rpoS)$  的菌浓度有显著差异 ( $P < 0.05$ )。结果表明，在低 pH 胁迫下，肠杆菌 CGMCC 5087 中的 RpoS 主要在进入稳定期后发挥抗胁迫作用，在对数期并无明显的抗胁迫作用。

### 2.3.4 WT、 $\Delta rpoS$ 、 $\Delta rpoS(rpoS)$ 在 1 mmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 条件下的生长情况

分别检测了 1 mmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 对 WT、 $\Delta rpoS$ 、 $\Delta rpoS(rpoS)$  在对数期、稳定期、衰退期生长的影响。结果如图 6 所示，在 1 mmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 条件下，12 h 时 WT 和  $\Delta rpoS(rpoS)$  已进入对数期，而  $\Delta rpoS$  停留在延滞期，24 h 时  $\Delta rpoS$  菌浓度低于 WT 和  $\Delta rpoS(rpoS)$ ， $\Delta rpoS$  与 WT 有极显著差异 ( $P < 0.01$ )， $\Delta rpoS$  与  $\Delta rpoS(rpoS)$  无显著差异 ( $P > 0.05$ )；在衰退期 48 h 时， $\Delta rpoS$  菌浓度明显高于 WT 和  $\Delta rpoS(rpoS)$  的菌浓度 ( $P < 0.05$ )。由此可初步说明 *rpoS* 基因的敲除对肠杆菌 CGMCC 5087 的氧化耐受起到重要作用，其使肠杆菌 CGMCC 5087 的延滞期延长，严

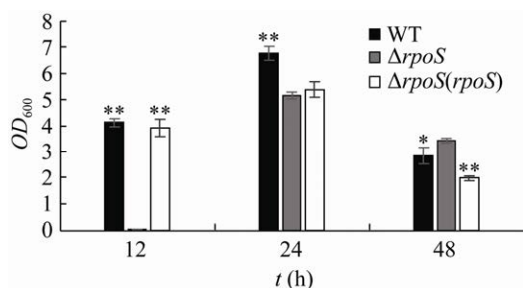


图6 WT、 $\Delta rpoS$ 、 $\Delta rpoS(rpoS)$  1 mmol/L  $H_2O_2$  环境中的生长情况

Figure 6 Growth of WT,  $\Delta rpoS$  and  $\Delta rpoS(rpoS)$  in 1 mmol/L  $H_2O_2$

重影响菌体在对数期的生长。随着菌体培养时间的延长,当菌体进入衰退期时,*rpoS* 基因的敲除可以使菌体具有更好的生长优势。

### 3 讨论与结论

近年来,生物法合成苯乙醇引起了国内外研究者的广泛关注。肠杆菌 CGMCC 5087 是一种产苯乙醇的新型菌株。该菌株在环境胁迫下的耐受性对于其生产苯乙醇具有重要影响。RpoS 作为压力应答过程中的主要调节因子,对菌株应答不同环境胁迫起到重要作用。本研究用 CRISPR 基因编辑技术构建了 *rpoS* 基因缺失株  $\Delta rpoS$ ,通过检测其在不同环境胁迫下的生长情况,研究 *rpoS* 基因在肠杆菌 CGMCC 5087 应答不同胁迫条件中的作用。

我们首先绘制了  $\Delta rpoS$ 、WT 和  $\Delta rpoS(rpoS)$  的生长曲线,与野生型菌株相比, $\Delta rpoS$  的生长受到显著抑制,而且进入稳定期后差异更加明显,说明 *rpoS* 基因缺失对肠杆菌 CGMCC 5087 在稳定期的生长影响较大;互补菌株可以部分回补  $\Delta rpoS$  的生长表型,这可能是由于使用质粒互补系统造成的。然而在肠炎沙门氏菌 *rpoS* 基因特性研究中发现,*rpoS* 基因缺失株与野生型在 LB 培养基中 37 °C 下的生长情况并无显著差异<sup>[16]</sup>。由此可以看出 *rpoS* 基因在不同的菌株中其作用也不尽相同。

有研究报道,42 °C 高温条件下,*rpoS* 基因的缺失促进了鳗弧菌在对数期的生长<sup>[17]</sup>。然而在本研究中,在 42 °C 高温胁迫条件下, $\Delta rpoS$  菌的生长在对数期受到抑制,而在衰退期高温耐受性强于

WT。这些结果表明,肠杆菌 CGMCC 5087 与鳗弧菌中的 RpoS 在高温胁迫环境中起到不同作用。Zhang 等<sup>[18]</sup>对鼠伤寒沙门菌野生菌株和 *rpoS* 基因缺失菌株在高渗透压(NaCl 终浓度为 300 mmol/L)条件下的生长情况进行了检测,发现基因缺失菌株的生长明显比野生菌株慢( $P < 0.05$ )。本研究中,*rpoS* 基因在 5% NaCl 高渗透压环境中起到抗胁迫的作用,整个胁迫过程中  $\Delta rpoS$  菌体量一直显著低于 WT 和  $\Delta rpoS(rpoS)$  菌体量。由此看出 RpoS 可以提高肠杆菌 CGMCC 5087 在高渗透压环境中的适应能力。Burin 等<sup>[19]</sup>发现,在 pH 5.0 和 pH 6.0 条件下,*rpoS* 基因与沙门菌在酸性条件下的适应能力有关。在 pH 5.0 胁迫中,对数期  $\Delta rpoS$  与 WT 和  $\Delta rpoS(rpoS)$  的生长能力无明显差别,在稳定期和衰退期 *rpoS* 的缺失导致肠杆菌 CGMCC 5087 的耐受性显著降低。这说明在低 pH 胁迫下,肠杆菌 CGMCC 5087 中的 RpoS 主要在进入稳定期后发挥抗胁迫作用。1 mmol/L  $H_2O_2$  胁迫环境中, $\Delta rpoS$  的延滞期停留时间远大于 WT 和  $\Delta rpoS(rpoS)$ ,到了衰退期  $\Delta rpoS$  的菌浓度高于 WT 和  $\Delta rpoS(rpoS)$  的菌浓度,由此推断,在氧化胁迫条件下,*rpoS* 基因在衰退期对菌体生长起到不利影响。

RpoS 除了在以上胁迫环境中起到重要作用之外,还参与调节其他多种生理过程。在营养缺乏的环境中,RpoS 对菌毛的形成、三羧酸循环相关基因起到负调控作用,从而延长菌体寿命<sup>[5]</sup>。研究表明,RpoS 可以通过调控纤维素和菌毛对生物被膜的形成起到重要的作用<sup>[17]</sup>。在一些肠杆菌科细菌中,其毒力基因会受到 RpoS 蛋白的调控<sup>[20]</sup>。因此,RpoS 蛋白可以调控某些毒力基因的表达,对细菌的毒力有着较大的影响。在荧光假单胞菌中,RpoS 在菌株腐败能力和酰基高丝氨酸内酯(Acyl-Homoserine Lactone, AHL)群体感应中均具有调控作用,*rpoS* 基因的缺失降低了该菌对三文鱼汁的腐败能力,升高了长链 AHLs 信号分子的合成量<sup>[21]</sup>。研究发现,RpoS 蛋白影响绿脓杆菌对比阿培南、亚胺培南和氧氟沙星等抗生素的耐受能力<sup>[22]</sup>。这对于进一步了解肠杆菌(*Enterobacter* sp.) CGMCC

5087 中 *rpoS* 基因的功能带来了很多新的启发。

综上所述, *rpoS* 基因增强了 *Enterobacter* sp. CGMCC 5087 在高渗透压、酸胁迫中的耐受性, 降低了衰退期菌体在高温及氧化胁迫中的耐受性, 对于氧化胁迫环境中菌体从延滞期顺利进入对数期至关重要。在肠杆菌(*Enterobacter* sp.) CGMCC 5087 中, RpoS 在抵抗多种环境压力中均具有重要作用, 而且在菌株不同的生长时期对于环境胁迫的应答也有所不同, 但对于在该菌株合成苯乙醇的生物机制中起到的作用还有待进一步研究。本研究对于进一步了解 RpoS 在各种环境胁迫下的功能具有重要意义, 同时也为更好地利用肠杆菌 *Enterobacter* sp. CGMCC 5087 提供了理论基础。

## REFERENCES

- [1] Hua DL, Xu P. Recent advances in biotechnological production of 2-phenylethanol[J]. *Biotechnology Advances*, 2011, 29(6): 654-660
- [2] Zhang HB, Cao ML, Jiang XL, Zou HB, Wang C, Xu X, Xian M. *De-novo* synthesis of 2-phenylethanol by *Enterobacter* sp. CGMCC 5087[J]. *BMC Biotechnology*, 2014, 14: 30
- [3] Liu CQ, Zhang K, Cao WY, Zhang G, Chen GQ, Yang HY, Wang Q, Liu HB, Xian M, Zhang HB. Genome mining of 2-phenylethanol biosynthetic genes from *Enterobacter* sp. CGMCC 5087 and heterologous overproduction in *Escherichia coli*[J]. *Biotechnology for Biofuels*, 2018, 11: 305
- [4] Lacour S, Landini P.  $\sigma^S$ -dependent gene expression at the onset of stationary phase in *Escherichia coli*: function of  $\sigma^S$ -dependent genes and identification of their promoter sequences[J]. *Journal of Bacteriology*, 2004, 186(21): 7186-7195
- [5] Patten CL, Kirchhof MG, Schertzberg MR, Morton RA, Schellhorn HE. Microarray analysis of RpoS-mediated gene expression in *Escherichia coli* K-12[J]. *Molecular Genetics and Genomics*, 2004, 272(5): 580-591
- [6] Vijayakumar SRV, Kirchhof MG, Patten CL, Schellhorn HE. RpoS-regulated genes of *Escherichia coli* identified by random lacZ fusion mutagenesis[J]. *Journal of Bacteriology*, 2004, 186(24): 8499-8507
- [7] Dong T, Kirchhof MG, Schellhorn HE. RpoS regulation of gene expression during exponential growth of *Escherichia coli* K12[J]. *Molecular Genetics and Genomics*, 2008, 279(3): 267-277
- [8] Wang SX, Wei JT, Li TB, Yang XS. Research on regulation of protein RpoS expression and its function in bacteria[J]. *Biotechnology Bulletin*, 2011(10): 24-31 (in Chinese)  
王淑娴, 魏鉴腾, 李天保, 杨秀生. 细菌中 RpoS 蛋白的表达调控及其功能的研究进展[J]. *生物技术通报*, 2011(10): 24-31
- [9] Lin YH, Miyamoto C, Meighen EA. Cloning, sequencing, and functional studies of the *rpoS* gene from *Vibrio harveyi*[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2002, 293(1): 456-462
- [10] Hülsmann A, Rosche TM, Kong IS, Hassan HM, Beam DM, Oliver JD. RpoS-dependent stress response and exoenzyme production in *Vibrio vulnificus*[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2003, 69(10): 6114-6120
- [11] Tian Y, Wang Q, Liu Q, Ma Y, Cao XD, Zhang YX. Role of RpoS in stress survival, synthesis of extracellular autoinducer 2, and virulence in *Vibrio alginolyticus*[J]. *Archives of Microbiology*, 2008, 190(5): 585-594
- [12] Chen WL, Oliver JD, Wang HC. Adaptation of *Vibrio vulnificus* and an *rpoS* mutant to bile salts[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2010, 140(2/3): 232-238
- [13] Tan HJ, Liu SH, Oliver JD, Wong HC. Role of RpoS in the susceptibility of low salinity-adapted *Vibrio vulnificus* to environmental stresses[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2010, 137(2/3): 137-142
- [14] Jiang WY, Bikard D, Cox D, Zhang F, Marraffini LA. RNA-guided editing of bacterial genomes using CRISPR-Cas systems[J]. *Nature Biotechnology*, 2013, 31(3): 233-239
- [15] Price SB, Cheng CM, Kaspar CW, Wright JC, DeGraves FJ, Penfound TA, Castanie-Cornet MP, Foster JW. Role of *rpoS* in acid resistance and fecal shedding of *Escherichia coli* O157: H7[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2000, 66(2): 632-637
- [16] Zeng HL. Construction *rpoS* gene deletion mutant of *Salmonella Enteritidis* and its characteristics[D]. Hefei: Master's Thesis of Hefei University of Technology, 2013 (in Chinese)  
曾红亮. 肠炎沙门氏菌 *rpoS* 基因缺陷株的构建及其特性研究[D]. 合肥: 合肥工业大学硕士学位论文, 2013
- [17] Guo DS. Study on *rpoS* function of *Vibrio anguillarum*[D]. Qingdao: Master's Thesis of Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, 2009 (in Chinese)  
郭东升. 鳃弧菌 *rpoS* 功能的研究[D]. 青岛: 中国科学院研究生院(海洋研究所)硕士学位论文, 2009
- [18] Zhang X, Zhu CW, Yin J, Sui Y, Wang YC, Zhai GH. RpoS affects gene expression in *Salmonella enterica* serovar typhi under early hyperosmotic stress[J]. *Current Microbiology*, 2017, 74(6): 757-761
- [19] Burin RCK, Silva Jr A, Nero LA. Influence of lactic acid and acetic acid on *Salmonella* spp. growth and expression of acid tolerance-related genes[J]. *Food Research International*, 2014, 64: 726-732
- [20] Dong T, Schellhorn HE. Role of RpoS in virulence of pathogens[J]. *Infection and Immunity*, 2010, 78(3): 887-897
- [21] Shen BM, Wu TX, Zhu JJ, Xu LN, Liu XX, Zhu LJ. Effects of *rpoS* deletion on stress resistance, quorum sensing and spoilage potential of *Pseudomonas fluorescens*[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2018, 58(9): 1563-1572 (in Chinese)  
沈碧妙, 吴淘翔, 朱俊杰, 徐琳娜, 刘小香, 朱军莉. *rpoS* 基因缺失突变对荧光假单胞菌胁迫耐受性、群体感应及腐败活性的影响[J]. *微生物学报*, 2018, 58(9): 1563-1572
- [22] Murakami K, Ono T, Viducic D, Kayama S, Mori M, Hirota K, Nemoto K, Miyake Y. Role for *rpoS* gene of *Pseudomonas aeruginosa* in antibiotic tolerance[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2005, 242(1): 161-167