

DOI:10.13364/j.issn.1672-6510.20220092

## 阪崎克罗诺杆菌 *ESA\_01393* 基因缺失及对表型的影响

李萍<sup>1</sup>, 宗文月<sup>1</sup>, 杜欣军<sup>1</sup>, 王硕<sup>2</sup>

(1. 食品营养与安全国家重点实验室, 天津科技大学食品科学与工程学院, 天津 300457;  
2. 天津市食品科学与健康重点实验室, 南开大学医学院, 天津 300071)

**摘要:** 阪崎克罗诺杆菌 (*Cronobacter sakazakii*) 是一种食源性致病菌, 可导致新生儿、老年人和免疫功能低下的人感染, 并且感染率和死亡率较高。阪崎克罗诺杆菌广泛存在于环境和食物中, 对人类的危害较大, 引起了广泛关注。然而, 关于阪崎克罗诺杆菌运动性、生物膜形成和耐干燥性的具体分子机制尚不清楚。在阪崎克罗诺杆菌 ATCC BAA-894 中, *ESA\_01393* 基因是假设蛋白。与 NCBI 中大肠杆菌 *yebG* 基因 (DNA 损伤诱导蛋白) 的蛋白序列比对结果显示, 阪崎克罗诺杆菌 *ESA\_01393* 蛋白序列与其相似度为 68%。为了探索 *ESA\_01393* 基因的功能, 通过同源重组的方法构建  $\Delta ESA_01393$  突变菌株并进行基因回补, 得到 *cpESA\_01393* 回补株。通过比较阪崎克罗诺杆菌 ATCC BAA-894 野生型 (WT)、 $\Delta ESA_01393$  和 *cpESA\_01393* 的各方面特性, 发现 *ESA\_01393* 基因对阪崎克罗诺杆菌的生长、运动性和生物膜形成没有明显影响, 但是参与了该菌耐干燥和 DNA 损伤修复过程。其作用机制可能与 *yebG* 基因类似, 但仍有待进一步研究确定。本研究为进一步阐明阪崎克罗诺杆菌 *ESA\_01393* 基因的功能提供了参考。

**关键词:** 阪崎克罗诺杆菌; *ESA\_01393*; 耐干燥; DNA 损伤修复

中图分类号: Q935 文献标志码: A 文章编号: 1672-6510(2022)06-0001-08

## Effect of Deletion and Phenotype of *ESA\_01393* Gene in *Cronobacter sakazakii*

LI Ping<sup>1</sup>, ZONG Wenyue<sup>1</sup>, DU Xinjun<sup>1</sup>, WANG Shuo<sup>2</sup>

(1. State Key Laboratory of Food Nutrition and Safety, College of Food Science and Engineering,  
Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China;

2. Tianjin Key Laboratory of Food Science and Health, School of Medicine, Nankai University, Tianjin 300071, China)

**Abstract:** *Cronobacter sakazakii*, a food-borne pathogen, can infect neonates, elderly and immunocompromised populations with a high infection and mortality rate. *C. sakazakii* is widely found in the environment and food, causing great harm, and aroused widespread concern. However, the specific molecular mechanism remains unclear regarding the motility, biofilm formation, and desiccation tolerance in *C. sakazakii*. *ESA\_01393* gene is a hypothesized protein in *C. sakazakii* ATCC BAA-894. Compared with the protein sequence of *yebG* gene (DNA damage-inducing protein) of *Escherichia coli* in NCBI, the identity of *ESA\_01393* gene in *C. sakazakii* was 68%. In order to explore the function of the *ESA\_01393* gene, in this study, the *ESA\_01393* mutant strain ( $\Delta ESA_01393$ ) was constructed using the homologous recombination method, and the *cpESA\_01393* complementary strain was obtained. By comparing the characteristics of *C. sakazakii* ATCC BAA-894 wild-type (WT),  $\Delta ESA_01393$  and *cpESA\_01393*, it was found that *ESA\_01393* gene had no significant effect on the growth, motility, and biofilm formation of *C. sakazakii*, but was involved in the process of desiccation resistance and DNA damage repair. This study suggests that the mechanism of *ESA\_01393* gene maybe similar to that of *yebG*, but remains to be determined by further research. Therefore, this study has laid a foundation for further elucidation of the function of *ESA\_01393* gene of *C. sakazakii*.

**Key words:** *C. sakazakii*; *ESA\_01393*; desiccation resistance; DNA damage repair

收稿日期: 2022-04-04; 修回日期: 2022-05-02

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (31972167); 河北省重点研发计划项目 (20372801D)

作者简介: 李萍 (1985—), 天津人, 女, 讲师, 博士; 通信作者: 杜欣军, 教授, xjdu@tust.edu.cn

阪崎克罗诺杆菌 (*Cronobacter sakazakii*) 是一种无芽孢、有周生鞭毛、能运动、兼性厌氧的革兰氏阴性杆菌<sup>[1]</sup>, 是一类能够在人和动物肠道内生存的机会致病菌, 能够引起新生儿脑膜炎和坏死性小肠结肠炎<sup>[2]</sup>. 相关研究<sup>[3]</sup>表明, 阪崎克罗诺杆菌是引起严重感染的机会病原体, 尤其是在婴儿、老年人和免疫功能低下的人中. 出生体质量小于 2.5 kg 的婴儿和出生不足 28 d 的新生儿有更高的感染风险<sup>[4]</sup>. 阪崎克罗诺杆菌主要存在于婴幼儿配方奶粉及其他婴幼儿食品中<sup>[5]</sup>, 新生儿感染后的死亡率高达 80%<sup>[6]</sup>, 幸存者往往患有严重的、不可逆转的神经系统疾病. 阪崎克罗诺杆菌在婴幼儿配方奶粉中的存活能力强, 对婴幼儿的危害较大, 引起了大众的广泛关注.

许多环境损伤和内源性过程可导致 DNA 损伤, 对细胞生存构成直接威胁. 在大多数细菌中, DNA 损伤通过应急反应 (SOS 反应) 的转录调控过程进行处理<sup>[7-8]</sup>. 在大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 中, SOS 反应是细胞遇到 DNA 损伤因子后被诱导的一种由 40 多个基因组成的调控机制, 其中许多基因参与了 DNA 损伤的耐受和修复, 如 *recA*、*lexA*、*umuDC*、*recN*、*sulA*、*polB*、*uvrA*、*uvrB* 和 *uvrD*<sup>[9-12]</sup>. 这个过程受 SOS 调节因子 LexA 和 RecA 的控制. SOS 反应通路是一种可诱导的 DNA 损伤修复系统<sup>[13]</sup>. 在没有 DNA 损伤的情况下, LexA 阻止 SOS 基因的转录<sup>[14]</sup>. 当 DNA 损伤时, 重组蛋白 RecA 在单链 DNA 上形成核微丝. RecA 核蛋白丝激活 LexA 自身蛋白水解, SOS 反应基因的转录被打开<sup>[8,14]</sup>. 除了两个关键的 SOS 反应调节因子 LexA 和 RecA, 其他一些压力源和压力反应也可以控制 SOS 反应的因素<sup>[15]</sup>. 细菌暴露于

DNA 损伤剂以及其他环境和细胞内因素, 这些因素会在宿主内的许多部位触发 SOS 反应<sup>[16]</sup>.

与 NCBI 中大肠杆菌的 *yebG* 基因 (DNA 损伤诱导蛋白) 序列的比对结果表明, 阪崎克罗诺杆菌中的 *ESA\_01393* 基因序列覆盖度为 67%, 相似度为 68%. 操纵子融合表明, 在大肠杆菌中 *yebG* 基因的表达受 SOS 反应调节因子 LexA 和 RecA 的调控<sup>[9,17]</sup>. Uranga 等<sup>[18]</sup>研究发现, *yebG* 基因是 SOS 反应调控的一部分, 在 DNA 受到损伤后被高度诱导. 丝裂霉素 C 处理大肠杆菌后, 会诱导 *yebG* 基因的表达<sup>[17]</sup>. 因此, 编码 DNA 损伤诱导蛋白的 *yebG* 基因被鉴定为大肠杆菌的一种新的 SOS 反应调控基因<sup>[17]</sup>, 但基因的功能尚不清楚. 为了进一步研究阪崎克罗诺杆菌中的 *ESA\_01393* 基因的功能, 本研究在阪崎克罗诺杆菌 ATCC BAA-894 中进行了基因敲除, 并对其运动能力、生物膜形成能力、耐干燥能力以及 DNA 损伤修复能力进行了评估, 为后续阪崎克罗诺杆菌的致病性及耐干燥机制研究奠定基础.

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 菌株和质粒

阪崎克罗诺杆菌 (*Cronobacter sakazakii*) ATCC BAA-894 保存在本实验室的 -80 °C 冰箱中. 质粒 pCVD442、质粒 pACYC184、大肠杆菌 (*Escherichia coli*) S17-1 $\lambda$ pir 和大肠杆菌 DH5 $\alpha$  由本实验室保存. 质粒 pCVD442-Q-H 和质粒 pACYC184-*ESA\_01393* 为本研究构建 (表 1).

表 1 本实验所用菌株和质粒

Tab. 1 Bacteria strains and plasmids used in this study

菌株和质粒	描述	参考和来源
ATCC BAA-894	分离菌株	美国模式培养物集存库 (ATCC)
$\Delta$ ESA_01393	ESA_01393 基因突变株	本研究
cpESA_01393	ESA_01393 基因缺失的回补株	本研究
DH5 $\alpha$	<i>E. coli</i> 菌株, 克隆载体宿主	本实验室保存
S17-1 $\lambda$ pir	<i>E. coli</i> 菌株, pir 相关质粒宿主	本实验室保存
pCVD442	自杀载体, Amp 抗性, <i>sacB</i>	本实验室保存
pCVD442-Q-H	带有 ESA_01393 上下游片段各 700 bp 的 pCVD442 质粒	本研究
pACYC184	P15A ori Cm <sup>r</sup> Tet <sup>r</sup>	本实验室保存
pACYC184-ESA_01393	带有 ESA_01393 基因的 pACYC184	本研究

#### 1.1.2 试剂与仪器

细菌基因组 DNA 提取试剂盒、PCR 产物纯化试

剂盒、胶回收试剂盒及质粒提取试剂盒, Omega Bio-Tek 公司; KOD 酶、Taq 酶和 dNTP mix (10 mmol/L),

宝生物工程(大连)有限公司; 氯霉素, 上海麦克林生物科技有限公司; 氨苄青霉素, BBI 生命科学有限公司; 限制性内切酶, 美国 NEB 公司; D2000 DNA marker、1 kb plus DNA marker、 $2 \times Taq$  PCR master mix 和上样缓冲液, 北京康为世纪生物科技有限公司; T4 连接酶, 赛默飞世尔科技公司; LB 培养基, 北京索莱宝科技有限公司; 平板计数培养基 (PCA 计数培养基), 青岛海博技术有限公司; 其他试剂均为国产分析纯试剂。

PCR 仪、电泳仪和凝胶成像仪, 伯乐生命医学产品(上海)有限公司; Sunrise-Basic 型酶标仪, 帝肯奥地利有限责任公司; 超微量分光光度计, 德国 Berthold 公司; 3-30 K 型台式高速冷冻离心机, 德国 Sigma 公司。

## 1.2 实验方法

### 1.2.1 PCR 引物设计

使用 NCBI 找到 *ESA\_01393* 基因 (GenBank 号为 WP\_004386660.1), 选取其上下游同源臂各 700 bp 的相应序列, 使用 Premier 5 设计 *ESA\_01393* 基因上下游同源臂的引物 *ESA\_01393-Q F/ESA\_01393-Q R* 和 *ESA\_01393-H F/ESA\_01393-H R*, 并且分别在上下游同源臂引物的 5'端加入相应的酶切位点. *ESA\_01393 1-F/ESA\_01393 1-R* 和 *ESA\_01393 2-F/ESA\_01393 2-R* 为基因敲除验证的引物, 分别位于 *ESA\_01393* 基因上和 *ESA\_01393* 基因的两端各 700 bp 处. *cpESA\_01393 F/cpESA\_01393 R* 为基因回补的引物, 位于 *ESA\_01393* 基因上, 并且在引物的 5'端加入相应的酶切位点. 引物序列见表 2.

表 2 引物序列

Tab. 2 Sequences of primers

引物名称	引物序列 (5'-3')	产物/bp
<i>ESA_01393-Q F</i>	ACGCGTCGAC ( <i>Sal</i> I) CTGCTCTGGGCGCAGTTTC	639
<i>ESA_01393-Q R</i>	GCTCTAGA ( <i>Xba</i> I) AACAGCTCTGGCGGATTGG	
<i>ESA_01393-H F</i>	GCTCTAGA ( <i>Xba</i> I) GCTGGTTTCTGTGCGGATTG	680
<i>ESA_01393-H R</i>	CGAGCTC ( <i>Sac</i> I) TCAGGCGAGGAGACGAGGAC	
<i>ESA_01393 1-F</i>	TGCATTTCCCGTTTTACAG	野生型 (WT): 315
<i>ESA_01393 1-R</i>	TCAGTCTGCTCGCTGGTTT	$\Delta$ <i>ESA_01393</i> : 0
<i>ESA_01393 2-F</i>	TTCACCACGCCTTCAACGA	野生型 (WT): 1 710
<i>ESA_01393 2-R</i>	AGCGGAACAGTCCATTATCG	$\Delta$ <i>ESA_01393</i> : 1 395
<i>cpESA_01393 F</i>	CCCAAGCTT ( <i>Hind</i> III) TGCATTTCCCGTTTTACAG	315
<i>cpESA_01393 R</i>	CGGGATCC ( <i>Bam</i> H I) TCAGTCTGCTCGCTGGTTT	

### 1.2.2 基因敲除及回补株的构建

采用 Ji 等<sup>[19]</sup>的方法并稍作改动, 对 *C. sakazakii* ATCC BAA-894 野生型 (WT) 进行基因突变. 使用 *ESA\_01393-Q F/ESA\_01393-Q R* 和 *ESA\_01393-H F/ESA\_01393-H R* 两对引物从 WT 的全基因组序列中扩增出待敲除基因的上下游片段 (表 2). 将上下游片段克隆到 pCVD442 自杀载体中, 产生重组载体 pCVD442-Q-H. 将重组载体转化到大肠杆菌 S17-1  $\lambda$ pir 感受态中, 通过电转化构建  $\Delta$ *ESA\_01393* 突变株.

使用 *cpESA\_01393 F* 和 *cpESA\_01393 R* 两个引物构建了含有 *ESA\_01393* 编码序列及其启动子的互补质粒 pACYC184-*ESA\_01393*. 将互补质粒克隆至  $\Delta$ *ESA\_01393* 突变株中, 获得携带 *ESA\_01393* 基因的回补株 *cpESA\_01393*. 回补株引入的酶切位点分别为 *Hind* III 和 *Bam* H I.

### 1.2.3 生长曲线的测定

根据文献[20]的方法测定细菌的生长曲线. 将菌株 WT、 $\Delta$ *ESA\_01393* 和 *cpESA\_01393* 进行过夜培

养, 菌液以 1 : 100 比例转接至新鲜的 LB 液体培养基中, 37 °C、200 r/min 培养 14 h. 从转接开始, 每隔 1 h 取样, 测定 600 nm 处的吸光度 ( $A_{600}$ ) 直至平稳期, 必要时稀释一定倍数. 用 LB 液体培养基作为空白对照, 绘制生长曲线. 每个样本重复 3 次.

### 1.2.4 运动性的测定

通过测定细菌软琼脂的迁移直径 (0.3%) 对运动性进行评估<sup>[21]</sup>. 将菌株 WT、 $\Delta$ *ESA\_01393* 和 *cpESA\_01393* 分别接种于无菌的 LB 培养基中, 37 °C 过夜培养. 分别取 10  $\mu$ L 菌液置于软琼脂运动板 (含 0.3% 琼脂的 LB 琼脂培养基) 上, 30 °C 培养 16 h, 观察菌落大小, 每个样本重复 3 次.

### 1.2.5 生物膜形成能力的测定

用结晶紫染色法测定阪崎克罗诺杆菌生物膜的形成能力<sup>[22]</sup>. 取吸光度介于 0.6 ~ 0.8 之间的菌株 WT、 $\Delta$ *ESA\_01393* 和 *cpESA\_01393* 的菌液制备悬浮液. 每孔加入 100  $\mu$ L 悬浮液, 37 °C 孵育 48 ~ 72 h; 加入 200  $\mu$ L 99% 甲醇固定生物膜, 15 min 后弃去上清

液. 在室温下风干后, 用 200  $\mu$ L 1% 结晶紫染料染色 30 min, 用无菌水洗涤 3 次; 加入 200  $\mu$ L 95% 乙醇进行脱色. 以培养基为阴性对照. 使用 Sunrise-Basic 酶标仪测定 570 nm 处吸光度, 每个样本重复 3 次.

1.2.6 耐干燥性的测定

参照 Farrow 等<sup>[23]</sup>的方法并稍加改动进行细菌干燥耐受性的评估. 将菌株 WT、 $\Delta$ ESA\_01393 和 cpESA\_01393 培养至对数期, 获得悬浮液. 为了记录初始细胞数, 将每种细菌悬浮液的 10  $\mu$ L 样品用 PBS 缓冲液稀释至 100  $\mu$ L, 然后连续稀释并接种至 PCA 计数培养基上, 37  $^{\circ}$ C 培养过夜, 计数, 此时为干燥前的菌落数. 吸取 200  $\mu$ L 的菌液置于 96 孔板中, 然后将 96 孔板放在无菌干燥器里, 再将干燥器置于温度 42  $^{\circ}$ C、相对湿度 45% 的培养箱恒温恒湿培养, 进行耐干燥性实验评估, 时间为 6 d. 为了确定菌体干燥后的死亡率, 将 100  $\mu$ L 的 PBS 置于每个干燥的样品上, 在室温下孵育 5 min, 将菌体吹吸重悬后进行梯度稀释. 使用 PBS 进行连续稀释并接种到 PCA 计数培养基上, 37  $^{\circ}$ C 培养过夜, 计数. 每个样本重复 3 次.

1.2.7 紫外线照射

根据 Oh 等<sup>[24]</sup>的方法并稍加改动, 评估紫外线 (UV) 照射后菌体的死亡率. 菌株 WT、 $\Delta$ ESA\_01393 和 cpESA\_01393 培养至  $A_{600} = 0.6 \sim 0.8$ , 然后将菌液分别放置在培养皿里, 使用紫外灯进行照射. 将分别照射了 5 min、10 min 和 15 min 的 3 种菌株用生理盐水进行梯度稀释, 涂布至 PCA 固体培养基中, 37  $^{\circ}$ C 培养箱培养后计数, 每个样本重复 3 次.

1.2.8 丝裂霉素 C 处理

根据 Oh 等<sup>[24]</sup>的方法并稍加改动, 评估丝裂霉素 C 处理后菌体的死亡率. 菌株 WT、 $\Delta$ ESA\_01393 和 cpESA\_01393 培养至  $A_{600} = 0.6 \sim 0.8$ , 然后将 3 种菌株的菌液分别置于离心管中, 加入 0.1% 的丝裂霉素 C, 30  $^{\circ}$ C 培养箱培养. 将分别培养了 10 min、20 min 和 30 min 的 3 种菌株用生理盐水进行梯度稀

释, 涂布至 PCA 固体培养基中, 37  $^{\circ}$ C 培养箱培养后计数, 每个样本重复 3 次.

1.3 统计学分析

统计学分析采用 SPSS 16.0 统计软件进行 Student's *t* 检验. 用 GraphPad Prism 简单单向 *t*-test 检验或多重比较, \*和\*\*分别表示组间具有显著性差异 ( $P < 0.05$ ) 和极显著差异 ( $P < 0.01$ ).

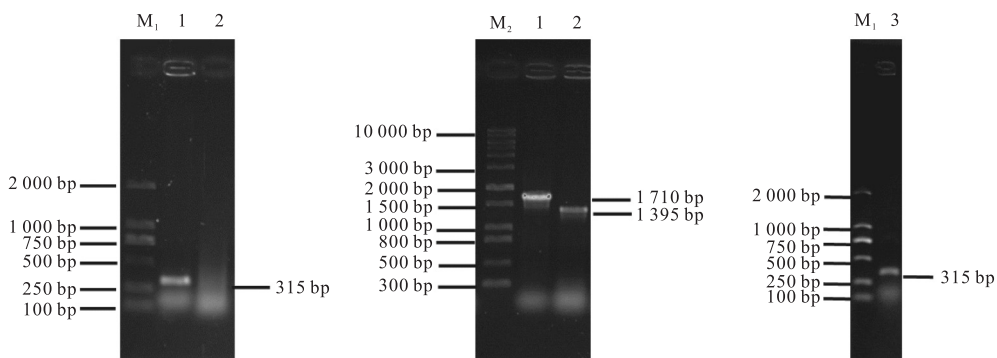
2 结果与分析

2.1 基因敲除结果的验证

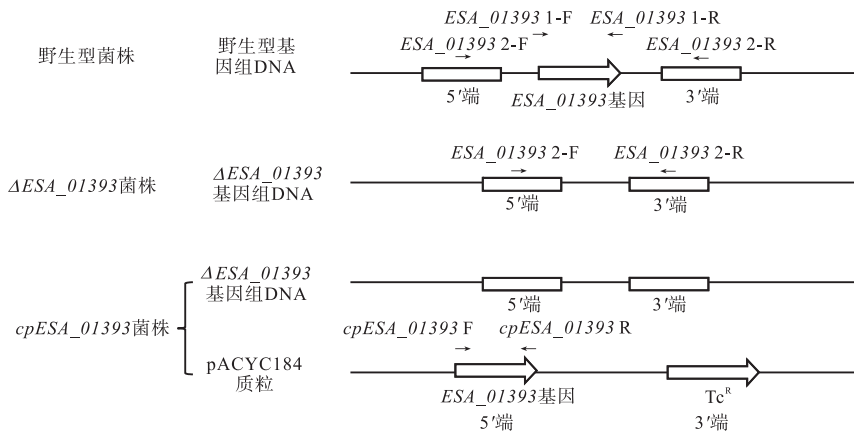
利用同源重组技术构建了突变株  $\Delta$ ESA\_01393 及其回补株 cpESA\_01393.  $\Delta$ ESA\_01393 和 cpESA\_01393 菌株通过 PCR 验证和测序验证. 分别以 WT 菌株和  $\Delta$ ESA\_01393 菌株 DNA 为模板进行 PCR. 如图 1(a) 所示, 以 ESA\_01393 1-F/ESA\_01393 1-R 为引物, WT 菌株扩增出 315 bp 的产物,  $\Delta$ ESA\_01393 菌株没有出现 DNA 条带. 如图 1(b) 所示, 以 ESA\_01393 2-F/ESA\_01393 2-R 为引物, WT 菌株扩增出 1 710 bp 的产物,  $\Delta$ ESA\_01393 菌株扩增出 1 395 bp 的产物. 如图 1(c) 所示, 以 cpESA\_01393 F/cpESA\_01393 R 为引物, cpESA\_01393 菌株扩增的 DNA 条带为 315 bp. PCR 结果表明,  $\Delta$ ESA\_01393 和 cpESA\_01393 菌株构建成功, 可以进行后续实验.

2.2 ESA\_01393 基因对阪崎克罗诺杆菌 ATCC BAA-894 生长的影响

比较阪崎克罗诺杆菌野生型、 $\Delta$ ESA\_01393 突变株及 cpESA\_01393 回补株的生长曲线, 结果如图 2 所示. 与野生型相比,  $\Delta$ ESA\_01393 突变株显示出相似的生长速率, 表明基因缺失后其生长未受影响, 同时 cpESA\_01393 回补株的  $A_{600}$  没有明显变化. 这说明 ESA\_01393 基因的缺失不影响细菌的生长, 是细菌的非致死基因, 对细胞的生长是非必需的, 同时也排除了生长规律不同对后续研究结果的影响.



(a) 引物为 ESA\_01393 1-F/ESA\_01393 1-R (b) 引物为 ESA\_01393 2-F/ESA\_01393 2-R (c) 引物为 cpESA\_01393 F/cpESA\_01393 R



(d) 引物 *ESA\_01393* 1-F/*ESA\_01393* 1-R、*ESA\_01393* 2-F/*ESA\_01393* 2-R 和 *cpESA\_01393* F/*cpESA\_01393* R 的相对位置

M<sub>1</sub>, D2000 DNA marker; M<sub>2</sub>, 1 kb plus DNA marker; 1. 以野生型菌株为模板; 2. 以  $\Delta$ *ESA\_01393* 突变株为模板; 3. 以 *cpESA\_01393* 回补株为模板

图 1 阪崎克罗诺杆菌 *ESA\_01393* 基因敲除和回补株构建结果的验证

Fig. 1 Validation of the results of *ESA\_01393* gene knock-out and *cpESA\_01393* complementary strain in *C. sakazakii*

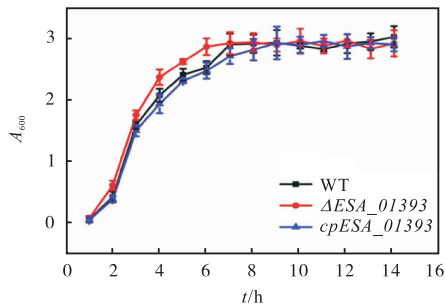


图 2 阪崎克罗诺杆菌野生型、 $\Delta$ *ESA\_01393* 突变株及 *cpESA\_01393* 回补株的生长曲线比较

Fig. 2 Comparison of growth curves for the growth of WT,  $\Delta$ *ESA\_01393* and *cpESA\_01393* strains of *C. sakazakii*

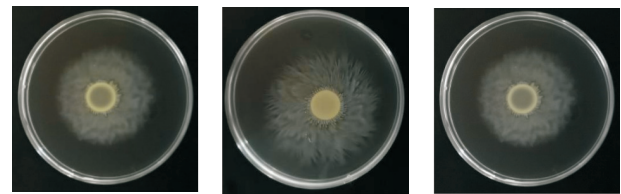
### 2.3 *ESA\_01393* 基因对阪崎克罗诺杆菌 ATCC BAA-894 运动能力的影响

阪崎克罗诺杆菌野生型、 $\Delta$ *ESA\_01393* 突变株及 *cpESA\_01393* 回补株的运动性鉴定结果如图 3 所示. 阪崎克罗诺杆菌野生型、 $\Delta$ *ESA\_01393* 突变株及 *cpESA\_01393* 回补株在 0.3% 的琼脂培养基上形成大小相似的运动环; 与野生型比较,  $\Delta$ *ESA\_01393* 突变株运动能力没有较大变化, 回补株运动能力也与野生型相似. 运动环直径的测量结果表明, 基因 *ESA\_01393* 的缺失不影响阪崎克罗诺杆菌的运动能力.

### 2.4 *ESA\_01393* 基因对阪崎克罗诺杆菌 ATCC BAA-894 生物膜形成能力的影响

生物膜的形成取决于细菌诱导 SOS 反应的能力<sup>[25]</sup>. 为了验证 *ESA\_01393* 基因对阪崎克罗诺杆菌 ATCC BAA-894 生物膜形成能力的影响, 评估了野生型、突变株和回补株的生物膜形成量(图 4). 与野生型相比,  $\Delta$ *ESA\_01393* 突变株所形成的生物膜形成量

略有减少, 但没有显著性. *cpESA\_01393* 回补株显示出与野生型菌株相似的生物膜形成能力. 生物膜的形成过程可能受到多种因子的调节, 基因 *ESA\_01393* 可能不是主要的调控因子.

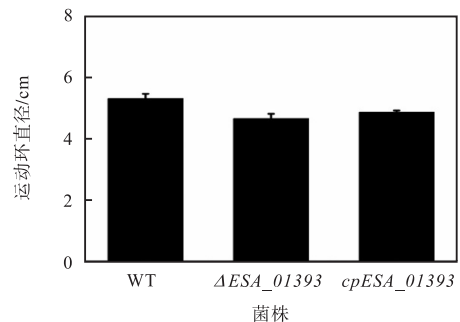


WT

$\Delta$ *ESA\_01393*

*cpESA\_01393*

(a) 运动环



(b) 运动环直径

图 3 阪崎克罗诺杆菌野生型、 $\Delta$ *ESA\_01393* 突变株及 *cpESA\_01393* 回补株的运动性鉴定

Fig. 3 Mobility identification of WT,  $\Delta$ *ESA\_01393* and *cpESA\_01393* strain of *C. sakazakii*

### 2.5 *ESA\_01393* 基因对阪崎克罗诺杆菌 ATCC BAA-894 耐干燥性的影响

阪崎克罗诺杆菌野生型、 $\Delta$ *ESA\_01393* 突变株及 *cpESA\_01393* 回补株的干燥死亡率如图 5 所示. 与野生型相比,  $\Delta$ *ESA\_01393* 突变株干燥死亡率更高, 回

补株表现出与野生型相似的干燥死亡率. 因此, *ESA\_01393* 的缺失会降低阪崎克罗诺杆菌耐干燥环境的能力, 该基因能够在一定程度上抵抗干燥环境的压力.

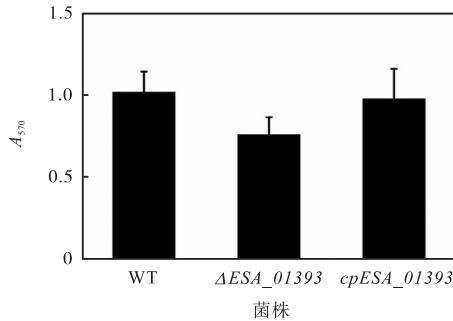


图4 阪崎克罗诺杆菌野生型、ΔESA<sub>01393</sub> 突变株及 cpESA<sub>01393</sub> 回补株的生物膜合成能力比较

Fig. 4 Comparison of biofilm formation of the WT, ΔESA<sub>01393</sub> and cpESA<sub>01393</sub> strain of *C. sakazakii*

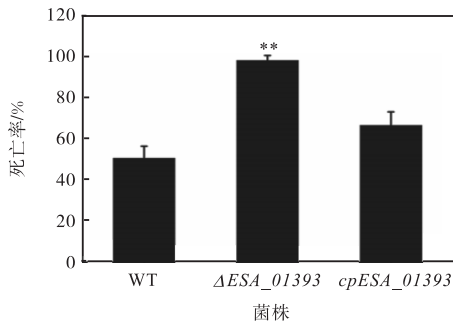


图5 阪崎克罗诺杆菌野生型、ΔESA<sub>01393</sub> 突变株及 cpESA<sub>01393</sub> 回补株的干燥死亡率

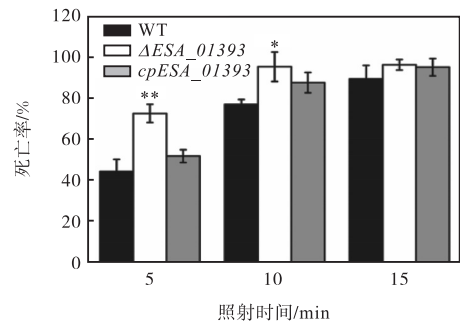
Fig. 5 Drying mortality rate of WT, ΔESA<sub>01393</sub> and cpESA<sub>01393</sub> strain of *C. sakazakii*

阪崎克罗诺杆菌具有一些重要的毒力相关因子或应激生存因子, 尤其是在各种不利环境条件下仍能存活的能力, 最显著的是耐干燥和耐渗透胁迫的能力<sup>[26]</sup>. 细菌不断地暴露在变化和压力的环境中. 全部调节系统的协调反应使细菌能够生存并适应各种环境压力<sup>[27]</sup>. 多因子和冗余分子机制参与了持久性和耐受性细胞的生成和生存<sup>[28-29]</sup>, 其中最著名的耐压机制包括应激反应、SOS 反应、抗氧化能力、毒素-抗毒素系统 (TA)、群体感应、能量代谢和药物外排泵<sup>[29-32]</sup>. 最近有研究<sup>[15]</sup>表明, 虽然 SOS 反应最初被认为是调节 DNA 损伤修复, 但其对细菌的耐受性也有着重要影响. 在大肠杆菌中, SOS 反应在细胞持续形成的过程中增加了细菌的抗生素耐药性<sup>[33-34]</sup>. 在阪崎克罗诺杆菌中, SOS 反应参与了生物膜的形成、K<sup>+</sup>的积累<sup>[35]</sup>、海藻糖和甜菜碱的合成<sup>[36]</sup>等过程, 因此

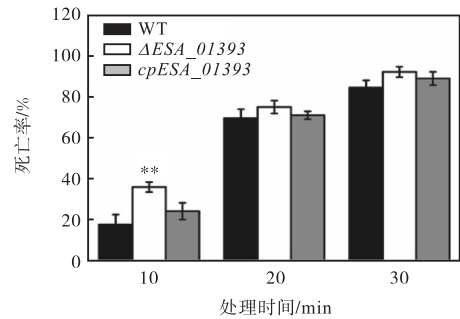
很可能经由以上途径间接参与该菌的耐干燥调控. 然而到目前为止, 在阪崎克罗诺杆菌中还没有 SOS 反应基因参与耐干燥机制的报道. 在大肠杆菌中, *yebG* 基因被鉴定为一种新的 SOS 反应调控基因<sup>[17]</sup>, 而阪崎克罗诺杆菌中 *yebG* 基因的同源物 *ESA\_01393* 基因可能通过 SOS 反应参与该菌的耐干燥过程.

### 2.6 *ESA\_01393* 基因对阪崎克罗诺杆菌 ATCC BAA-894 受到 UV 照射和丝裂霉素 C 处理的影响

UV 照射和丝裂霉素 C 处理后, 比较阪崎克罗诺杆菌野生型、ΔESA<sub>01393</sub> 突变株及 cpESA<sub>01393</sub> 回补株的死亡率, 结果如图 6 所示. 由图 6(a)可知: 在短时间内 (5 min 和 10 min), 菌株的 DNA 受到损伤时, 与野生型相比, ΔESA<sub>01393</sub> 菌株的死亡率显著升高. 由图 6(b)可知: 当长时间 UV 照射 (15 min) 和丝裂霉素 C 处理 (30 min) 时, 菌株的 DNA 受到严重损伤, 菌株 WT、ΔESA<sub>01393</sub> 和 cpESA<sub>01393</sub> 显示出相似的菌株死亡率, 且死亡率均达到 90% 以上. 这可能是由于 DNA 损伤比较严重, 引起细菌细胞大量死亡. 结果表明, 阪崎克罗诺杆菌 *ESA\_01393* 基因参与了 DNA 损伤修复过程.



(a) UV 照射



(b) 丝裂霉素 C 处理

图6 UV 照射和丝裂霉素 C 处理后, 野生型、ΔESA<sub>01393</sub> 突变株及 cpESA<sub>01393</sub> 回补株的死亡率比较

Fig. 6 Comparison of mortality rates of the WT, ΔESA<sub>01393</sub> and cpESA<sub>01393</sub> strain after UV irradiation and treated with mitomycin C

细菌的 SOS 反应是一种广泛存在的处理 DNA 损伤的转录调控机制<sup>[37]</sup>。SOS 反应是由含有损伤的 DNA 复制过程中单链 DNA 的积累引起的<sup>[38]</sup>。当 DNA 聚合酶在 DNA 损伤处停止而复制解旋酶继续解开 DNA 时,就会产生单链 DNA<sup>[39]</sup>。SOS 反应需要多个基因的表达,这些基因在 DNA 损伤反应中发挥多种功能,包括切除修复、同源重组、翻译 DNA 复制和细胞分裂停止<sup>[12]</sup>。DNA 损伤修复后恢复正常生理状态, DNA 损伤较广泛时可能会导致细胞死亡<sup>[40]</sup>。因此,当发生 DNA 损伤时,细菌会激活 SOS 反应,以适应 DNA 损伤压力<sup>[41-42]</sup>。最常见的引起 DNA 损伤的因素包括了紫外线照射和复制抑制剂抗生素丝裂霉素 C 暴露<sup>[43]</sup>。研究<sup>[41-42]</sup>发现紫外线照射后的大肠杆菌通过 SOS 反应进行 DNA 损伤修复,也有研究<sup>[9]</sup>表明 *yebG* 基因受 SOS 反应诱导表达,但没有明确该基因的功能。本研究证实了阪崎克罗诺杆菌中 *yebG* 基因的同源物 *ESA\_01393* 基因参与 UV 照射和丝裂霉素 C 处理引起的 DNA 损伤修复过程,并发挥了重要的作用。

### 3 结 论

采用同源重组的方法敲除了阪崎克罗诺杆菌 *ESA\_01393* 基因,并对 *ESA\_01393* 基因的功能进行研究。比较了阪崎克罗诺杆菌野生型、*ΔESA\_01393* 突变株及 *cpESA\_01393* 回补株在生长曲线、运动性、生物膜形成、耐干燥性和 DNA 损伤修复能力等方面的差异。研究发现 *ESA\_01393* 基因对阪崎克罗诺杆菌的生长、运动性和生物膜形成没有明显影响,但是可能作为细菌 SOS 反应的一部分,参与了该菌耐干燥和 DNA 损伤修复过程。本研究为了解阪崎克罗诺杆菌 *ESA\_01393* 基因的功能及其在阪崎克罗诺杆菌中的分子机制提供了参考。

#### 参考文献:

- [ 1 ] FEENEY A , KROPP K A , O'CONNOR R , et al. *Cronobacter sakazakii* : stress survival and virulence potential in an opportunistic foodborne pathogen[J]. Gut microbes, 2014, 5(6) : 711-718.
- [ 2 ] JING C, DU X, LI P, et al. Transcriptome analysis of *Cronobacter sakazakii* ATCC BAA-894 after interaction with human intestinal epithelial cell line HCT-8[J]. Applied microbiology and biotechnology, 2016, 100(1) : 311-322.
- [ 3 ] CARVALHO G G, CALARGA A P, TEODORO J R, et al. Isolation, comparison of identification methods and antibiotic resistance of *Cronobacter* spp. in infant foods [J]. Food research international, 2020, 137: 109643.
- [ 4 ] FAKRUDDIN M, RAHAMAN M, AHMED M M, et al. Stress tolerant virulent strains of *Cronobacter sakazakii* from food[J]. Biological research, 2014, 47(1) : 1-12.
- [ 5 ] LING N, JIANG Y, ZENG H, et al. Advances in our understanding and distribution of the *Cronobacter* genus in China[J]. Journal of food science, 2021, 86(2) : 276-283.
- [ 6 ] LAI K K E W. *Enterobacter sakazakii* infections among neonates, infants, children, and adults: case reports and a review of the literature[J]. Medicine, 2001, 80(2) : 113-122.
- [ 7 ] ERILL I, CAMPOY S, BARBÉ J. Aeons of distress: an evolutionary perspective on the bacterial SOS response[J]. FEMS Microbiology reviews, 2007, 31(6) : 637-656.
- [ 8 ] BAHAROGLU Z, MAZEL D. SOS , the formidable strategy of bacteria against aggressions[J]. FEMS Microbiology reviews, 2014, 38(6) : 1126-1145.
- [ 9 ] FERNÁNDEZ DE HENESTROSA A R , OGI T , AOYAGI S , et al. Identification of additional genes belonging to the LexA regulon in *Escherichia coli*[J]. Molecular microbiology, 2000, 35(6) : 1560-1572.
- [ 10 ] WALKER G C, SMITH B T, SUTTON M D. The SOS response to DNA damage[M]//STORZ G, HENGGE R. Bacterial stress responses. Washington D. C. : American Society for Microbiology, 2000: 131-144.
- [ 11 ] WALKER G C. Mutagenesis and inducible responses to deoxyribonucleic acid damage in *Escherichia coli*[J]. Microbiological reviews, 1984, 48(1) : 60-93.
- [ 12 ] MASLOWSKA K H , MAKIELA-DZBENSKA K , FIJALKOWSKA I J. The SOS system: a complex and tightly regulated response to DNA damage[J]. Environmental and molecular mutagenesis , 2019 , 60(4) : 368-384.
- [ 13 ] RADMAN M. SOS repair hypothesis: phenomenology of an inducible DNA repair which is accompanied by mutagenesis[J]. Basic life sciences, 1975, 5: 355-367.
- [ 14 ] SIMMONS L A, FOTI J J, COHEN S E, et al. The SOS regulatory network[J]. EcoSal plus , 2008 , 3(1) : 267045992.
- [ 15 ] PODLESEK Z, ŽGUR-BERTOK D. The DNA damage inducible SOS response is a key player in the generation

- of bacterial persister cells and population wide tolerance [J]. *Frontiers in microbiology*, 2020, 11: 1785.
- [ 16 ] DE MAJUMDAR S, VELEBA M, FINN S, et al. Elucidating the regulon of multidrug resistance regulator RarA in *Klebsiella pneumoniae*[J]. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 2013, 57(4): 1603–1609.
- [ 17 ] LOMBA M R, VASCONCELOS A T, PACHECO A B F, et al. Identification of *yebG* as a DNA damage-inducible *Escherichia coli* gene[J]. *FEMS Microbiology letters*, 1997, 156(1): 119–122.
- [ 18 ] URANGA L A, BALISE V D, BENALLY C V, et al. The *Escherichia coli* DinD protein modulates RecA activity by inhibiting postsynaptic RecA filaments[J]. *Journal of biological chemistry*, 2011, 286(34): 29480–29491.
- [ 19 ] JI X, LU P, XUE J, et al. The lipoprotein NlpD in *Cronobacter sakazakii* responds to acid stress and regulates macrophage resistance and virulence by maintaining membrane integrity: identification and characterization of a novel factor involved in acid tolerance and virulence in *Cronobacter sakazakii*[J]. *Virulence*, 2021, 12(1): 415–429.
- [ 20 ] LIU J, ZHANG D, LIAN S, et al. Mechanism of nitrite transporter NirC in motility, biofilm formation, and adhesion of avian pathogenic *Escherichia coli*[J]. *Archives of microbiology*, 2021, 203(7): 4221–4231.
- [ 21 ] YANG K Y, KAO C Y, SU M S W, et al. Glycosyltransferase Jhp0106 (PseE) contributes to flagellin maturation in *Helicobacter pylori*[J]. *Helicobacter*, 2021, 26(2): e12787.
- [ 22 ] HAZHIRKAMAL M, ZAREI O, MOVAHEDI M, et al. Molecular typing, biofilm production, and detection of carbapenemase genes in multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* isolated from different infection sites using ERIC-PCR in Hamadan, west of Iran[J]. *BMC Pharmacology and toxicology*, 2021, 22(1): 1–7.
- [ 23 ] FARROW J M, WELLS G, PESCI E C. Desiccation tolerance in *Acinetobacter baumannii* is mediated by the two-component response regulator BfmR[J]. *PLOS ONE*, 2018, 13(10): e0205638.
- [ 24 ] OH T J, KIM I G. Identification of genetic factors altering the SOS induction of DNA damage-inducible *yebG* gene in *Escherichia coli*[J]. *FEMS Microbiology letters*, 1999, 177(2): 271–277.
- [ 25 ] COSTA S B, CAMPOS A C C, PEREIRA A C M, et al. Adherence to abiotic surface induces SOS response in *Escherichia coli* K-12 strains under aerobic and anaerobic conditions[J]. *Microbiology*, 2014, 160(9): 1964–1973.
- [ 26 ] FEENEY A, SLEATOR R D. An in silico analysis of osmotolerance in the emerging gastrointestinal pathogen *Cronobacter sakazakii*[J]. *Bioengineered bugs*, 2011, 2(5): 260–270.
- [ 27 ] BJEDOV I, TENAILLON O, GERARD B, et al. Stress-induced mutagenesis in bacteria[J]. *Science*, 2003, 300(5624): 1404–1409.
- [ 28 ] MOLINA-QUIROZ R C, SILVA-VALENZUELA C, BREWSTER J, et al. Cyclic AMP regulates bacterial persistence through repression of the oxidative stress response and SOS-dependent DNA repair in uropathogenic *Escherichia coli*[J]. *mBio*, 2018, 9(1): e02144-17.
- [ 29 ] TRASTOY R, MANSO T, FERNÁNDEZ-GARCÍA L, et al. Mechanisms of bacterial tolerance and persistence in the gastrointestinal and respiratory environments[J]. *Clinical microbiology reviews*, 2018, 31(4): e00023-18.
- [ 30 ] DÖRR T, LEWIS K, VULIĆ M. SOS response induces persistence to fluoroquinolones in *Escherichia coli*[J]. *PLOS Genetics*, 2009, 5(12): e1000760.
- [ 31 ] KWAN B W, VALENTA J A, BENEDIK M J, et al. Arrested protein synthesis increases persister-like cell formation[J]. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 2013, 57(3): 1468–1473.
- [ 32 ] HARMS A, MAISONNEUVE E, GERDES K. Mechanisms of bacterial persistence during stress and antibiotic exposure[J]. *Science*, 2016, 354(6318): 1390.
- [ 33 ] COHEN N R, LOBRITZ M A, COLLINS J J. Microbial persistence and the road to drug resistance[J]. *Cell host & microbe*, 2013, 13(6): 632–642.
- [ 34 ] WINDELS E M, MICHIELS J E, FAUVART M, et al. Bacterial persistence promotes the evolution of antibiotic resistance by increasing survival and mutation rates[J]. *The ISME journal*, 2019, 13(5): 1239–1251.
- [ 35 ] DU X, WANG X, DONG X, et al. Characterization of the desiccation tolerance of *Cronobacter sakazakii* strains[J]. *Frontiers in microbiology*, 2018, 9: 2867.
- [ 36 ] HU S, YU Y, WU X, et al. Comparative proteomic analysis of *Cronobacter sakazakii* by iTRAQ provides insights into response to desiccation[J]. *Food research international*, 2017, 100: 631–639.



- ation[J]. Food and bioproducts processing, 2015, 94: 90-100.
- [12] BHUDSAWAN H, SAKAMON D. Enhancement of microwave-assisted extraction via intermittent radiation: extraction of carotenoids from carrot peels[J]. Journal of food engineering, 2014, 126: 17-26.
- [13] YAN F, FAN K, JIE H E, et al. Ultrasonic-assisted solvent extraction of carotenoids from rapeseed meal: optimization using response surface methodology[J]. Journal of food quality, 2016, 38(6): 377-386.
- [14] STRATI I F, GOGOU E, OREOPOULOU V. Enzyme and high pressure assisted extraction of carotenoids from tomato waste[J]. Food and bioproducts processing, 2015, 94: 668-674.
- [15] HOSSEINI S R P, TAVAKOLI O, SARRAFZADEH M H. Experimental optimization of SC-CO<sub>2</sub> extraction of carotenoids from *Dunaliella sauna*[J]. Journal of supercritical fluids, 2017, 121: 89-95.
- [16] SOWBHAGYA H B, CHITRA V N. Enzyme-assisted extraction of flavorings and colorants from plant materials[J]. Critical reviews in food science and nutrition, 2010, 50(2): 146-161.
- [17] 张海涛, 蒋文艳, 淡瑞芳. 胡萝卜粉中类胡萝卜素的提取工艺优化[J]. 甘肃农业大学学报, 2012, 47(5): 139-142.
- [18] 郑坚强, 叶豪, 司俊玲, 等. 响应面优化萃取宁夏枸杞类胡萝卜素工艺研究[J]. 江苏农业科学, 2019, 47(7): 197-201.
- [19] 王岁楼, 谢雯丽. 红辣椒中类胡萝卜素提取方法及工艺条件优化研究[J]. 农产品加工, 2020(21): 39-41.
- [20] 李小玉, 肖丽凤, 杨懋勋. 超声萃取-超高效液相色谱法快速测定烤烟中的类胡萝卜素[J]. 化工时刊, 2019, 33(12): 10-13.
- [21] 倪玉洁, 马文霞, 谢倩, 等. 超声辅助提取福橘果皮类胡萝卜素的工艺优化[J]. 食品工业科技, 2020, 41(24): 162-167.
- [22] 蒋耀瑛, 霍湘芸, 董子钰, 等. 红叶石楠提取类胡萝卜素的工艺条件研究[J]. 农产品加工, 2020(1): 29-31.
- [23] 孔凡华, 徐佳佳, 郭倩, 等. 高效液相色谱法测定虾青素油中虾青素的含量[J]. 食品与发酵工业, 2021, 47(6): 214-220.
- [24] YUAN J P, CHEN F. Purification of trans-astaxanthin from a high-yielding astaxanthin ester-producing strain of the microalga *Haematococcus pluvialis*[J]. Food chemistry, 2000, 68(4): 443-448.
- [25] 苏芳. 类胡萝卜素在藻虾蟹鱼中的结构分布特征及虾青素异构化研究[D]. 青岛: 中国科学院大学(中国科学院海洋研究所), 2018: 23-24.
- [26] SAINI R K, KEUM Y S. Carotenoid extraction methods: a review of recent developments[J]. Food chemistry, 2018, 240: 90-103.
- [27] PINGRET D, FABIANO-TIXIER A S, CHEMAT F. Degradation during application of ultrasound in food processing: a review[J]. Food control, 2013, 31(2): 593-606.

责任编辑: 郎婧

(上接第8页)

- [37] SÁNCHEZ-OSUNA M, CORTÉS P, LEE M, et al. Non-canonical LexA proteins regulate the SOS response in the Bacteroidetes[J]. Nucleic acids research, 2021, 49(19): 11050-11066.
- [38] SASSANFAR M, ROBERTS J W. Nature of the SOS-inducing signal in *Escherichia coli*: the involvement of DNA replication[J]. Journal of molecular biology, 1990, 212(1): 79-96.
- [39] HIGUCHI K, KATAYAMA T, IWAI S, et al. Fate of DNA replication fork encountering a single DNA lesion during oriC plasmid DNA replication in vitro[J]. Genes to cells, 2003, 8(5): 437-449.
- [40] D'ARI R. The SOS system[J]. Biochimie, 1985, 67(3/4): 343-347.
- [41] RADMAN M. Phenomenology of an inducible mutagenic DNA repair pathway in *Escherichia coli*: SOS repair hypothesis[EB/OL]. [2022-04-03]. <https://www.osti.gov/biblio/4213519>.
- [42] BRIDGES B A. Error-prone DNA repair and translesion DNA synthesis: II: the inducible SOS hypothesis[J]. DNA repair, 2005, 4(6): 725-739.
- [43] ZHAO X, DRLICA K. Reactive oxygen species and the bacterial response to lethal stress[J]. Current opinion in microbiology, 2014, 21: 1-6.

责任编辑: 郎婧