



天津科技大学学报

Journal of Tianjin University of Science & Technology

ISSN 1672-6510, CN 12-1355/N

《天津科技大学学报》网络首发论文

题目: 阪崎克罗诺杆菌基因 *clsA* 功能及耐干燥机制研究
作者: 丁子怡, 曹娅菲, 司默涵, 李萍, 杜欣军
DOI: 10.13364/j.issn.1672-6510.20250013
网络首发日期: 2025-06-20
引用格式: 丁子怡, 曹娅菲, 司默涵, 李萍, 杜欣军. 阪崎克罗诺杆菌基因 *clsA* 功能及耐干燥机制研究[J/OL]. 天津科技大学学报.
<https://doi.org/10.13364/j.issn.1672-6510.20250013>



网络首发: 在编辑部工作流程中, 稿件从录用到出版要经历录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿等阶段。录用定稿指内容已经确定, 且通过同行评议、主编终审同意刊用的稿件。排版定稿指录用定稿按照期刊特定版式(包括网络呈现版式)排版后的稿件, 可暂不确定出版年、卷、期和页码。整期汇编定稿指出版年、卷、期、页码均已确定的印刷或数字出版的整期汇编稿件。录用定稿网络首发稿件内容必须符合《出版管理条例》和《期刊出版管理规定》的有关规定; 学术研究成果具有创新性、科学性和先进性, 符合编辑部对刊文的录用要求, 不存在学术不端行为及其他侵权行为; 稿件内容应基本符合国家有关书刊编辑、出版的技术标准, 正确使用和统一规范语言文字、符号、数字、外文字母、法定计量单位及地图标注等。为确保录用定稿网络首发的严肃性, 录用定稿一经发布, 不得修改论文题目、作者、机构名称和学术内容, 只可基于编辑规范进行少量文字的修改。

出版确认: 纸质期刊编辑部通过与《中国学术期刊(光盘版)》电子杂志社有限公司签约, 在《中国学术期刊(网络版)》出版传播平台上创办与纸质期刊内容一致的网络版, 以单篇或整期出版形式, 在印刷出版之前刊发论文的录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿。因为《中国学术期刊(网络版)》是国家新闻出版广电总局批准的网络连续型出版物(ISSN 2096-4188, CN 11-6037/Z), 所以签约期刊的网络版上网络首发论文视为正式出版。



阪崎克罗诺杆菌基因 *clsA* 功能及耐干燥机制研究

丁子怡, 曹娅菲, 司默涵, 李 萍, 杜欣军

(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)

摘 要: 阪崎克罗诺杆菌(*Cronobacter sakazakii*)具有极强的耐干燥性能,但其具体的耐干燥机制尚不清楚。实验室前期使用随机突变库方法筛选出对耐干燥能力影响明显的心磷脂合酶基因 *clsA*, 为了进一步探索该基因在阪崎克罗诺杆菌耐干燥过程中的作用, 通过同源重组方法构建突变株 $\Delta clsA$, 并利用载体 pACYC184 构建回补株 *cpclsA*。比较野生型 (WT)、 $\Delta clsA$ 和 *cpclsA* 菌株的各种生理特性发现, 基因 *clsA* 缺失会导致菌株心磷脂含量显著降低 38.6%、干燥失活率由 $(50.7 \pm 2.9) \%$ 升高至 $(66.4 \pm 3.3) \%$ 。qRT-PCR 及具体代谢物含量分析显示, 基因 *clsA* 缺失会导致脯氨酸含量下降约 24.0%, 甜菜碱含量下降约 31.4%, 这可能是基因 *clsA* 导致菌株耐干燥能力下降的主要原因。此外, 缺失株的运动能力、生物膜形成能力、表面疏水性能也显著降低。本研究有助于进一步阐明 *clsA* 基因在阪崎克罗诺杆菌耐干燥过程中的功能及机制。

关键词: 阪崎克罗诺杆菌; 耐干燥; 心磷脂合成; *clsA*

中图分类号: TS201.3

文献标志码: A

Study on Function and Desiccation Mechanism of Gene *clsA* in *Cronobacter Sakazakii*

DING Ziyi, CAO Yafei, SI Mohan, LI Ping, DU Xinjun

(State Key Laboratory of Food Nutrition and Safety, College of Food Science and Engineering,
Tianjin University of Science and Technology, Tianjin 300457, China)

Abstract: *Cronobacter sakazakii* has strong drying resistance, and the specific desiccation resistance mechanism is unknown. The laboratory initially used a random mutation library method to screen for the *clsA* gene that significantly affects drought resistance. In order to further explore the role of cardiolipin synthase gene *clsA* in the desiccation resistance process of *Cronobacter sakazakii*, the mutant strain $\Delta clsA$ was constructed by homologous recombination method, and the complementation strain *cpclsA* was constructed by vector pACYC184. Comparing the physiological characteristics of WT, $\Delta clsA$ and *cpclsA* strains, it was found that the deletion of *clsA* would significantly reduce the content of cardiolipin by 38.6%, and the drying inactivation rate would increase from $(50.7 \pm 2.9) \%$ to $(66.4 \pm 3.3) \%$. qRT-PCR and specific metabolite content analysis showed that the deletion of gene *clsA* would lead to a decrease of about 24.0% in proline content and a decrease in betaine content of about 31.4%, which may be the main reason that gene *clsA* caused the reduced desiccation resistance ability of this strain. In addition, the motility, biofilm formation ability, and surface hydrophobic properties of the mutant strain was also significantly reduced. This study is helpful to further elucidate the function and the mechanism involved in the desiccation resistance process of *clsA* gene in *Cronobacter sakazakii*.

Key words: *Cronobacter sakazakii*; desiccation resistance; cardiolipin synthesis; *clsA*

阪崎克罗诺杆菌 (*Cronobacter sakazakii*) 是一种具有鞭毛的革兰氏阴性条件致病菌^[1], 具有较强的耐干燥能力, 可以在各类水活度较低的食品中存活, 尤其是婴幼儿配方奶粉^[2-3]。阪崎克罗诺杆菌对渗透胁迫和高温环境 (50~60 °C) 也具有极强的抗

性, 这使其在喷雾干燥和巴氏杀菌后乳制品中的残留风险加剧^[4-5]。

阪崎克罗诺杆菌有多种与氧化应激和渗透耐受性相关的响应机制, 使其能够在高渗透压、高温、低水分活度等不利环境中存活^[6]。阪崎克罗诺杆菌

对干燥环境的响应过程主要包括两个阶段：第一阶段是钾离子和谷氨酸盐通过转运体进入细胞，增加细胞内的离子浓度，进而保护细胞免受高渗透压的损伤；第二阶段主要是兼容性物质的积累，如甜菜碱、海藻糖等，从而增加细胞内的渗透压，进而帮助细胞抵御外部高渗环境的伤害^[7]。近年来，很多参与阪崎克罗诺杆菌耐干燥响应的蛋白质已经被鉴定。例如，钾离子转运的微型机械敏感通道蛋白 MscM^[8]，诱导海藻糖合成的双组分系统 EnvZ/OmpR 等^[9]。细菌生物膜形成能力与耐干燥能力之间有显著正相关关系^[10]，但是这些研究尚不能将阪崎克罗诺杆菌的耐干燥机制完全阐明。

在大多数细菌的细胞膜中，甘油磷脂（GPL）分子由 3 个主要部分组成：磷脂酰乙醇胺（PE）、心磷脂（CL）和磷脂酰甘油（PG）。CL 属于阴离子磷脂，主要分布于内外膜的两极，由心磷脂合酶 ClsA 合成^[11]。大肠杆菌的 3 种心磷脂合成酶分别为 ClsA、ClsB 和 ClsC，其中 ClsA 和 ClsB 以 PG 为磷脂酸的供体，而 ClsC 以 PE 为磷脂酸的供体^[12-13]。已有研究^[14]表明，CL 对细菌对于各种环境的适应发挥着至关重要的作用。*clsA* 可以通过介导 CL 的合成来确定脯氨酸/甜菜碱转运蛋白 ProP 的定位，并且影响其转运作用^[15]。因此，*clsA* 可能通过调控脯氨酸、甜菜碱等重要的渗透调节物质积累参与细菌耐干燥过程，但是其在阪崎克罗诺杆菌耐干燥过程中的具体作用尚不明确。

本研究从实验室前期的阪崎克罗诺杆菌随机突变库中筛选出对菌株耐干燥能力影响明显的基因 *clsA*，通过构建 *clsA* 基因缺失突变株（ $\Delta clsA$ ）和回补株（*cpclsA*），研究 *clsA* 的生物学功能及其分子机制。通过与野生型菌株比较，分析阪崎克罗诺杆菌中 *clsA* 基因在 CL 合成、运动能力、耐干燥能力和生物膜形成等方面的作用。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株与质粒

菌株与质粒见表 1。阪崎克罗诺杆菌 BAA-

894、大肠杆菌 DH5 α 、大肠杆菌（*E. coli*）S17- λ pir 保存于本实验室。菌株的活化采用 37 °C、200 r/min 的条件。

培养基为 Luria-Bertani（LB）培养基。实验中使用的氯霉素和氨苄青霉素的终质量浓度分别为 100 μ g/mL 和 10 μ g/mL。质粒 pCVD442 和质粒 pACYC184 在-80 °C冰箱中保存，质粒 pCVD442-FR 和质粒 pACYC184-*clsA* 为本研究所构建。

表 1 菌株与质粒

Tab. 1 Strains and plasmids

菌株和质粒	描述	来源
<i>Cronobacter sakazakii</i>		美国模式培养
BAA-894	野生型菌株、分离菌株	集存库
$\Delta clsA$	<i>clsA</i> 缺失株	本研究构建
<i>cpclsA</i>	<i>clsA</i> 缺失回补株	本研究构建
DH5 α	<i>E.coli</i> 克隆载体宿主	实验室保存
S17- λ pir	质粒宿主	实验室保存
pCVD442	自杀载体	实验室保存
pCVD442-FR	带有 <i>clsA</i> 上下游片段的载体	本研究构建
pACYC184	低拷贝质粒	实验室保存
pACYC184- <i>clsA</i>	带有 <i>clsA</i> 基因的载体	本研究构建

1.1.2 试剂与仪器

本研究使用的试剂与仪器有细菌基因组 DNA 提取试剂盒，天津泰进科技有限公司；胶回收试剂盒、质粒提取试剂盒和纯化回收试剂盒，美国 OMEGE 公司；总 RNA 提取试剂盒，湖南艾科瑞生物工程有限公司；氯霉素，麦克林生化科技有限公司；氨苄霉素、脯氨酸检测试剂盒和甜菜碱检测试剂盒，北京索莱宝科技有限公司；细菌心磷脂 ELISA 检测试剂盒，上海源鑫生物科技有限公司；PCR 仪和凝胶成像仪，伯乐生命医学产品（上海）有限公司；Sunrise Basic Elisa 酶标仪，帝肯奥地利有限责任公司；紫外可见光光度计，上海光谱仪器有限公司；超微量分光光度计，德国 Berthold 公司；干燥皿，天津实验仪器有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 引物的设计与合成

根据阪崎克罗诺杆菌全基因组序列，使用 Primer Premier 5 软件设计引物，具体引物信息见表 2。所有引物序列由苏州金唯智有限公司合成。

表 2 基因敲除及回补引物

Tab. 2 Primers used in gene knockout and complement

引物名称	描述	引物序列
pCVD442-F	自杀载体线性化引物	CAATAACCCTGATAAATGCTTCAA

pCVD442-R		CTCATGAGCGGATACATATTTG
<i>clsA</i> -UF	<i>clsA</i> 基因上游片段	TGATAAATGCTTCAAGGGGTAGTCACGATGGAAATGG
<i>clsA</i> -UR		CTGCCAGAAAGTGTTCTGCTGGTCTGGCCGAATCCG
<i>clsA</i> -DF	<i>clsA</i> 基因下游片段	GGCCAGACCAGCAGGAACACTTTCTGGCAGACGCTGA
<i>clsA</i> -DR		GTATCCGCTCATGAGTTTACGCACAACCCCTTTCGCAC
pACYC184-F	pACYC184 线性化引物	ATGGAAGCCGCGGCACC
pACYC184-R		ACACGGTGCCTGACTGCG
<i>clsA</i> -1F	<i>clsA</i> 基因序列	ATGACAACCTTCTACACGGT
<i>clsA</i> -1R		TCTTCAGTCCGTTGCTGTAA
<i>clsA</i> -2F	包含 <i>clsA</i> 基因上游和下游序列	CTTCGGTTCTACTACGCCTCA
<i>clsA</i> -2R		GGAGAAAGACGGCGATGAA
<i>clsA</i> -3F	pACYC184 序列的片段	CATACGGAATCCGGATGAG
<i>clsA</i> -3R		GGTTTCGCCACCACTGATT
<i>cpclsA</i> -F	<i>clsA</i> 基因序列	AACGCAGTCAGGCACCGTGTTTACAGCAACGGACTGAAGAAGTAA
<i>cpclsA</i> -R		GAGGTGCCGCCGGCTTCCATATGACAACCTTCTACACGGTAGTGA

1.2.2 缺失菌株与回补菌株的构建

根据文献方法^[16]并在此基础上进行稍加改动, 利用同源重组原理敲除 *clsA* 基因。用无缝克隆的方法将 *clsA* 基因上游和下游片段连接到 pCVD442 线性化载体上, 获得靶载体 pCVD442-FR 并通过电穿孔转化到阪崎克罗诺杆菌感受态细胞中, 最后通过重组获得缺失突变体 $\Delta clsA$ 。利用 pACYC184 质粒构建互补表达载体并导入 $\Delta clsA$ 菌株中, 获得携带 *clsA* 基因的回补菌株 *cpclsA*。

1.2.3 心磷脂含量的测定

采用细菌心磷脂 ELISA 检测试剂盒对菌株的心磷脂含量进行测定。首先参照邹小琳^[17]的方法对总膜磷脂含量进行提取, 随后分别向预先包被心磷脂抗体的包被微孔的不同孔中加入提取得到总膜磷脂和标准品, 再加入辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的检测抗体, 温育 1 h 后彻底洗涤, 底物 3,3',5,5'-四甲基苯胺 (TMB) 显色, 用酶标仪测定 450 nm 处的吸光度, 进而对心磷脂含量进行定量确定。

1.2.4 生长曲线的测定

分别将过夜培养的菌株以 1 : 100 的比例转移到正常渗透环境 (10 g/L NaCl)、高渗透环境 (20 g/L NaCl) 的 LB 液体培养基中, 培养 14 h。使用光度计每隔 1 h 测定 600 nm 处的光密度 (A_{600})。

1.2.5 耐干燥能力的测定

细菌耐干燥能力的分析方法沿用了 Farrow 的方法^[18], 在此基础上稍有改动。将过夜菌株接种到新鲜的 LB 液体培养基中, 培养至对数期, 取 100 μ L

菌液加到无菌 96 孔板中, 在无水硅胶干燥皿中干燥 7 d。为了确定干燥前菌落数 ($N_{\text{干燥前}}$), 用 PBS 缓冲液连续稀释细菌悬液后, 将其接种到 PCA 计数培养基上, 37 $^{\circ}$ C 倒置培养过夜。干燥完成后, 每孔加入 100 μ L PBS 缓冲液, 室温孵育 3~5 min 后, 吹吸菌体及连续的梯度稀释, 然后接种在 PCA 计数培养基上, 37 $^{\circ}$ C 倒置培养过夜, 确定干燥后的菌落数 ($N_{\text{干燥后}}$)。每个样本重复 3 次。按照式 (1) 计算菌株的干燥失活率 (R)。

$$R = \frac{N_{\text{干燥前}} - N_{\text{干燥后}}}{N_{\text{干燥前}}} \times 100\% \quad (1)$$

1.2.6 运动性的测定

吸取对数期菌株 5~7 μ L 轻轻滴在 0.3% 软固体培养基中央位置, 在超净工作台中吹干后用封口膜密封, 置放在 30 $^{\circ}$ C 恒温培养箱中培养 10~12 h, 拍照记录菌落运动直径。

1.2.7 生物膜形成能力的测定

将对数期细菌加入无菌的 96 孔板中, 每孔 100 μ L, 用保鲜膜封好后放入恒温培养箱中培养 48 h。孔板中菌液吸出风干, PBS 缓冲液冲洗, 每孔加入 99% 甲醇溶液 200 μ L 固定形成的生物膜, 固定后再吸出甲醇溶液, 晾干孔板。每孔加入 200 μ L 0.1% 结晶紫, 避光 30 min 后吸出, 用 PBS 缓冲液将结晶紫冲洗干净; 加入 200 μ L 95% 乙醇溶液, 反应 30 min, 用酶标仪在 570 nm 处测定吸光度。

1.2.8 细菌膜表面生理特性的测定

活化后的菌株培养对数期，调节 $A_{600}=0.5 \pm 0.02$ ，用二甲苯法测定疏水性，取 $2 \mu\text{L}$ 菌液与 $800 \mu\text{L}$ 二甲苯，涡旋混合后静置 3 h ，取出水相物质测定 A_{600} ，按照式（2）计算细菌表面疏水性（ H ）。

$$H = \frac{0.5 - A_{600}}{0.5} \times 100\% \quad (2)$$

用荧光探针法测定膜通透性。取 1.92 mL 菌体和 $80 \mu\text{L}$ 荧光探针 NPN，充分振荡混匀。设置荧光光谱仪的激发波长、发射波长和宽度分别为 380 nm 、 430 nm 和 4 nm ，检测荧光强度。

1.2.9 实时荧光定量 PCR 检测相关基因转录水平

选择与阪崎克罗诺杆菌耐干燥性相关的基因进行定量实时 PCR (qRT-PCR)分析，用 Primer Premier 5.0 软件设计特异性引物(表 3)。使用通用 RNA 提取试剂盒提取菌株的总 RNA，并进行逆转录以合成 cDNA，16S rRNA 为内源对照。使用 SYBR Green Pro Taq HS 进行 qRT-PCR，反应程序为： $95 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 预变性 30 s ； $95 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 变性 5 s ， $60 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s ， 40 个循环。使用比较周期阈值法($2^{-\Delta\Delta C_t}$)分析基因表达水平，每个实验重复 3 次。

表 3 qRT-PCR 引物
Tab. 3 qRT-PCR primers

名称	基因功能	引物序列
<i>proP</i>	脯氨酸/甜菜碱转运蛋白	F: GGTAACGCGATGGAGTGGT; R: TCCCTTTCTTATCCGTCCG
<i>proA</i>	γ 谷氨酰还原酶	F: TTAGAAGCGAACGCCGAAGA; R: CAGACCGCCGTCAATCACC
<i>proB</i>	谷氨酸 5-激酶	F: TCGTGCCGGTGATTAACGAA; R: CAGCAGCAGTTTATCGGCAC
<i>proC</i>	吡咯啉-5-羧酸还原酶	F: AAGACTCGCTGGTGGTTTCC; R: TCCCGGATATCTTCCTCGCT
<i>proV</i>	甘氨酸甜菜碱/脯氨酸甜菜碱转运系统 ATP 结合蛋白	F: GGCTCGGGTAAATCCACTA; R: CATCAGCGCAAATGACTGG
<i>proW</i>	甘氨酸甜菜碱/脯氨酸甜菜碱转运系统渗透酶蛋白	F: TGAACGCCTTCCAGCAGC; R: TCGCAACACCCATACCCAC
<i>proX</i>	甘氨酸甜菜碱/脯氨酸甜菜碱结合周质蛋白	F: TCAGAACACGGCGTATGG; R: GGCGTCCAGGTGTAATAGAG
<i>betA</i>	氧依赖性胆碱脱氢酶	F: GACTGCCTGCCCTACTACCG; R: TAGAAGCAGGCGTGACGGC
<i>betB</i>	NAD/NADP 依赖性甜菜碱醛脱氢酶	F: GACGCTGAAAGAGGTGACGA; R: ACTTCTACAGCTCAGGCCAGG
<i>betT</i>	高亲和力胆碱转运蛋白	F: CTCCGGCTCGTTGGTGCTT; R: AACACGACGGTTATCATGGG
<i>betI</i>	HTH 型转录调节因子	F: GTAGGAATGCAGCCGATACGG; R: TCTCGGCAGGCATTATTAGCC
<i>treB</i>	胞质中性海牙菌素酶	F: GAATATCGCAACCGTTAGCC; R: GGACAGTTTCAGGTGGTGATT
<i>treD</i>	PTS 系统葡萄糖特异性 EIIA 组分	F: TTCGGTGATAAAGGCAATA; R: CTCTGCGAACACTACATCC
<i>otsB</i>	海藻糖磷酸酶	F: CGGGCAAATGCGTAGTGGA; R: ATCTACCCGACGAAGCCGG
16S rRNA	内参基因	F: TTACGACCAGGGCTACACACG; R: CGGACTACGACGCACTTTATGAG

1.2.10 脯氨酸和甜菜碱含量的测定

采用脯氨酸含量测定试剂盒测定菌株脯氨酸含量。取 0.1 mL 对数期菌体样本加入 1 mL 提取液，冰浴匀浆，转移至 1.5 mL EP 管， $90 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 水浴振荡 10 min ， 12000 r/min 离心 10 min ，取上清液，冷却后待测。根据式（3）计算脯氨酸的含量（ ρ_{Pro} ）。

$$\rho_{\text{Pro}} = \frac{(\Delta A + 0.0064)(V + V_2)}{V_2 \times V_1} \times D \quad (3)$$

式中： ρ_{Pro} 为脯氨酸的含量， $\mu\text{g/mL}$ ； V 为提取液的总体积， 1 mL ； V_1 为加入反应体系提取液的体积， 0.15 mL ； V_2 为液体样品量， 0.1 mL ； D 为稀释倍

数，未稀释即为 1 ； $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}}$ 。

使用甜菜碱含量检测试剂盒，严格按照说明书的要求及步骤，收集细菌并提取甜菜碱。甜菜碱在强酸条件下可以与雷氏盐发生反应产生沉淀，沉淀用丙酮溶解形成红色溶液，在 525 nm 处有特征吸收峰，使用酶标仪测定 525 nm 下的 $A_{\text{标准}}$ 、 $A_{\text{测定}}$ 。甜菜碱含量（ ρ_{Bet} ）按照式（4）计算。

$$\rho_{\text{Bet}} = \frac{A_{\text{测定}} \times \rho_{\text{标准}} \times V_{\text{标准}}}{A_{\text{标准}} \times V_0} \quad (4)$$

式中： ρ_{Bet} 为甜菜碱的含量， $\mu\text{g/mL}$ ； $\rho_{\text{标准}}$ 为标准品质量浓度， 1 mg/mL ； $V_{\text{标准}}$ 为标准品体积， 1 mL ； V_0

为菌液体积, mL。

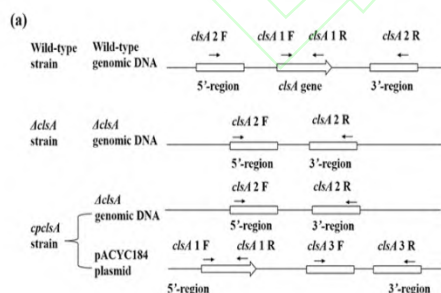
1.3 统计学分析

使用 GraphPad Prism 8.0 进行统计分析和数据处理(单向 *t* 检验分析或多因素多重比较), *、**、*** 和**** 分别表示组间差异显著 $P<0.05$ 、 $P<0.01$ 、 $P<0.001$ 、 $P<0.0001$, ns 表示无显著差异。每个实验至少重复 3 次。

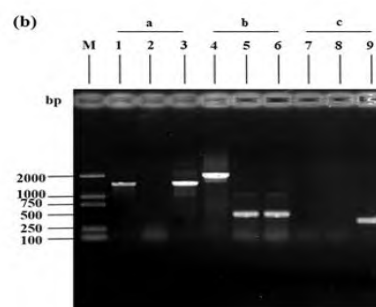
2 结果与分析

2.1 基因敲除及回补

阪崎克罗诺杆菌的基因敲除和回补菌株的 PCR 验证结果如图 1 所示。3 对验证引物(*clsA*-1F/R、*clsA*-2F/R、*clsA*-3F/R)的位置如图 1(a)所示, PCR 扩增结果如图 1(b)所示。*clsA*-1F/R 位于基因 *clsA* 内部, 对该基因是否存在进行验证; *clsA*-2F/R 位于基因 *clsA* 外的基因组上, 对临近基因进行验证; *clsA*-3F/R 位于 pACYC184 质粒上, 对回补质粒进行验证。*clsA*-1F/R 进行扩增后, 以野生型菌株(WT)和 *cpclsA* 基因组为模板分别产生了大小约为目的基因 *clsA* 长度的 1461 bp 特异性条带, 以突变株 Δ *clsA* 为模板则没有相应条带; *clsA*-2F/R 引物对扩增后, 以 WT 为模板产生约为跨越并包含目的基因 *clsA* 以外片段长度的 1913 bp 条带、而以突变株 Δ *clsA* 及 *cpclsA* 菌株为模板则产生 452 bp 条带, 以上可以证明构建出突变株 Δ *clsA*。*clsA*-3F/R 引物对扩增, 仅在 *cpclsA* 的菌株模板时, 产生大小约为 pACYC184 质粒上特定的片段长度 882 bp 特异条带, 以上结果证明, 已经成功构建回补株 *cpclsA*。



(a) WT、*clsA*、*cpclsA* 菌株引物位置



(b) PCR 扩增结果

M. D2000 marker; 泳道 1、4、7. WT 菌株; 泳道 2、5、8. Δ *clsA* 菌株; 泳道 3、6、9. *cpclsA* 菌株。a. 引物 *clsA* 1F/R 扩增泳道; b. 引物 *clsA* 2F/R 扩增泳道; c. 引物 *clsA* 3F/R 扩增泳道。

图 1 基因敲除和回补菌株的 PCR 验证

Fig. 1 PCR validation of the mutant and complementation strains

2.2 心磷脂合成能力的测定

为了确定基因 *clsA* 缺失是否会对阪崎克罗诺杆菌的 CL 含量产生影响, 测定 WT、 Δ *clsA* 和 *cpclsA* 菌株的 CL 含量, 结果如图 2 所示。WT、 Δ *clsA* 和 *cpclsA* 菌株的心磷脂含量分别为 (32.90 ± 2.89) ng/mL, (20.20 ± 3.00) ng/mL 和 (31.07 ± 1.89) ng/mL。与 WT 相比, Δ *clsA* 中 CL 含量降低了 38.6%, 而 *cpclsA* 的 CL 含量没有显著变化。实验结果证明, *clsA* 基因的缺失会对阪崎克罗诺杆菌内的 CL 含量造成影响。这与在大肠杆菌中的报道类似, 即 *clsA* 的缺失会导致 CL 含量降低^[19]。

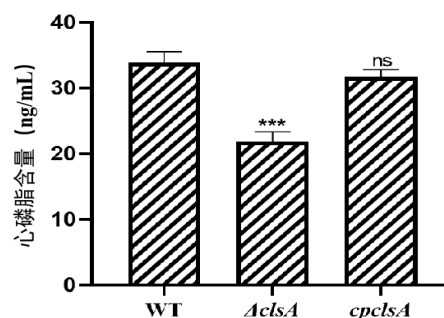


图 2 WT、 Δ *clsA*、*cpclsA* 菌株心磷脂含量

Fig. 2 Cardiolipin content of WT, Δ *clsA* and *cpclsA* strains

2.3 生长曲线

为了确定 *clsA* 基因缺失是否会影响菌株的生长, 对 WT、 Δ *clsA* 和 *cpclsA* 菌株的生长曲线进行比较, 结果如图 3 所示。

3 种菌株在 2 h 后进入指数生长阶段, Δ *clsA* 和 WT 的生长速率几乎相同, 表明在正常渗透 (10 g/L NaCl) 培养条件下, *clsA* 基因并不影响菌株生长。

在高渗透环境（20 g/L NaCl）培养条件下 WT、 Δ *clsA* 和 *cpclsA* 的生长速率均受到渗透胁迫。 Δ *clsA* 菌株在高渗透环境下对数后期的生长速率低于 WT 和 *cpclsA* 菌株。这表明 *clsA* 基因的缺失可能导致细胞更容易受到高渗透压条件的胁迫。

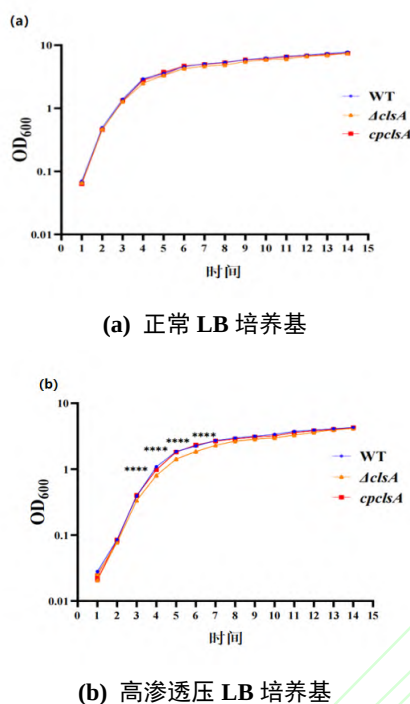


图3 WT、 Δ *clsA*、*cpclsA* 菌株生长曲线

Fig. 3 Growth curves of WT, Δ *clsA* and *cpclsA* strains

类似于干旱条件，盐度胁迫常导致细胞内水分丧失、渗透压急剧上升，并诱导包括蛋白质合成受阻、细胞膜完整性受损及代谢活动紊乱等一系列应激反应。这些环境压力不仅制约生物体的生长发育，还可能重塑其代谢途径与基因表达模式，进而削弱其环境适应能力^[20-21]。因此，在高渗透压环境下培养菌株可以模拟其在干燥胁迫下生存状况。实验中观察到，相较于 WT 菌株， Δ *clsA* 菌株在高渗透压培养基中对数后期的生长速率显著降低，这一发现在一定程度上也验证了 *clsA* 基因的缺失会降低菌株的耐干燥能力。

2.4 耐干燥能力的测定

为了研究 *clsA* 基因对阪崎克罗诺杆菌 BAA-894 耐干燥能力的影响，将 WT、 Δ *clsA* 和 *cpclsA* 菌株分别放置于低水分活度条件下培养 7 d 后，分别进行计数，WT、 Δ *clsA*、*cpclsA* 菌株的干燥失活率如图 4 所示。WT、 Δ *clsA* 和 *cpclsA* 菌株的干燥失活率分别为 $(50.73 \pm 2.91) \%$ ， $(66.40 \pm 3.30) \%$ 和 $(55.75 \pm 1.39) \%$ 。与 WT 菌株相比， Δ *clsA* 菌株的干燥失活率更高，而 *cpclsA* 菌株的干燥失活率与

WT 菌株没有显著差异。这表明 *clsA* 基因会对阪崎克罗诺杆菌的耐干燥能力产生影响，且该基因的存在有利于阪崎克罗诺杆菌在干燥条件下存活。

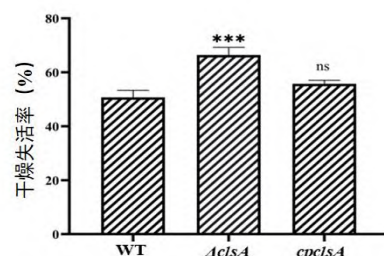


图4 WT、 Δ *clsA*、*cpclsA* 菌株的干燥失活率

Fig. 4 Drying inactivation rates of WT, Δ *clsA* and *cpclsA* strains

2.5 运动能力的测定

为了确定 *clsA* 基因对阪崎克罗诺杆菌运动能力的影响，比较了 WT、 Δ *clsA*、*cpclsA* 菌株的运动能力，结果如图 5 所示。WT、 Δ *clsA* 与 *cpclsA* 的泳动圈直径分别为 $(3.0 \pm 0.1) \text{ cm}$ 、 $(2.0 \pm 0.1) \text{ cm}$ 、 $(2.9 \pm 0.1) \text{ cm}$ 。 Δ *clsA* 菌株的泳动圈与 WT 菌株相比显著减小，*cpclsA* 菌株的泳动圈直径相比于 WT 略小，但是没有显著差异。这表明 *clsA* 基因缺失会导致阪崎克罗诺杆菌的运动能力下降。

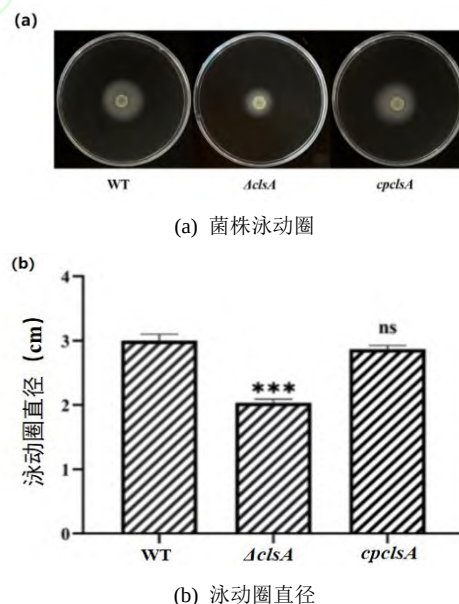


图5 WT、 Δ *clsA*、*cpclsA* 的运动能力的测定

Fig. 5 Determination of the exercise capacity of WT, Δ *clsA*, and *cpclsA* strains

趋化性和运动性使细菌能够灵活应对外部环境的变化。细菌可以通过调节鞭毛的旋转方向和速度实现定向运动，从而感知并响应环境中的化学梯度、温度变化或其他物理化学因素。这种精细的调

节机制使细菌在复杂的环境中能够优化自身生存策略, 增强其在恶劣条件下的适应性和竞争力^[22]。鞭毛合成缺陷会对细菌的耐干燥性能造成显著影响^[23]。CL 缺乏可以激活荚膜异多糖合成调节 (RCS) 的包膜应激反应, 从而抑制鞭毛合成^[24]。在幽门螺杆菌中 *clsC* 基因突变会导致鞭毛组装的损伤^[25]。因此, 基因 *clsA* 的缺失可能会通过引起鞭毛合成缺陷进而导致阪崎克罗诺杆菌的运动能力和耐干燥能力下降。

2.6 生物膜形成能力的测定

采用结晶紫染色方法评价基因 *clsA* 对阪崎克罗诺杆菌生物膜形成能力的影响, 结果如图 6 所示。与 WT 菌株相比, $\Delta clsA$ 的生物膜形成能力显著降低, *cpclsA* 的生物膜形成能力与 WT 无显著差异。

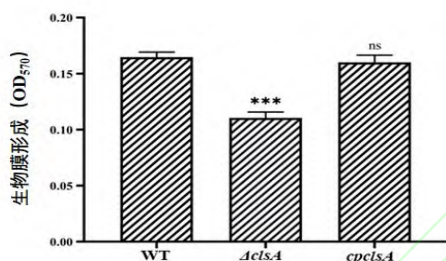


图 6 WT、 $\Delta clsA$ 、*cpclsA* 的生物膜形成能力的测定

Fig. 6 Determination of the biofilm-forming capacity of WT, $\Delta clsA$, and *cpclsA* strains

生物膜的形成是一个复杂的过程, 涉及大量的转录和生理变化, 这些变化对于细菌的生存至关重要^[24]。阪崎克罗诺杆菌形成生物膜主要由多糖、蛋白质、脂多糖和细胞外 DNA 组成的细胞外基质将菌体细胞包裹起来, 进而可以对细胞起到一定的保护作用^[26]。生物膜的形成是细菌在干燥环境中长期存活的重要保护机制^[27]。CL 是细菌的内膜的主要脂质成分之一^[28], CL 含量的降低会导致早期生物膜表面附着和后期生物膜形成的急剧减少, 破坏 CL 的生物合成会通过激活 RCS 包膜应激反应影响生物膜的形成^[24]。球状细胞中 CL 的缺失会导致细胞膜的阴离子组成的改变, 从而影响细胞的表面电荷和它们与表面的附着能力, 进而影响生物膜形成^[29]。 $\Delta clsA$ 的生物膜合成能力的下降与耐干燥性能的降低具有相似的趋势, 这也进一步印证了阪崎克罗诺杆菌基因 *clsA* 缺失导致的 CL 含量降低, 可能通过影响生物膜形成, 进而导致耐干燥能力下降。

2.7 细菌膜表面生理特征

为了研究 *clsA* 基因的缺失对阪崎克罗诺杆菌表

面生理特征的影响, 测定 WT、 $\Delta clsA$ 和 *cpclsA* 菌株的表面疏水性和膜透过性能, 结果如图 7 所示。与 WT 菌株相比, $\Delta clsA$ 和 *cpclsA* 菌株的表面疏水性均有所下降。 $\Delta clsA$ 的表面疏水性比 WT 株降低了约 21.7%, *cpclsA* 菌株在一定程度上回补了这一缺陷, 但与 WT 菌株相比仍降低约 5.4%。CL 属于一种阴离子甘油磷脂, 由 1 个小的甘油头基和 1 个由 4 个酰基链组成的大疏水尾巴组成^[30]。因此, $\Delta clsA$ 的表面疏水性降低可能是由于 *clsA* 基因缺失导致 CL 含量降低引起的。 $\Delta clsA$ 菌株的膜透过性与 WT 菌株相比显著提高 14.5%, 而 *cpclsA* 菌株与 WT 菌株没有显著差异。这表明基因 *clsA* 缺失会导致阪崎克罗诺杆菌膜透过性增加。

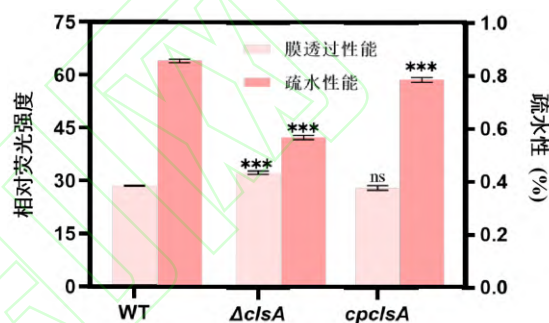


图 7 WT、 $\Delta clsA$ 、*cpclsA* 菌株的疏水性能和膜透过性能

Fig. 7 Hydrophobic properties and membrane permeability of WT, $\Delta clsA$, and *cpclsA* strains

2.8 *clsA* 基因对耐干燥相关途径基因表达的影响

采用 qRT-PCR 分析 *clsA* 基因缺失对耐干燥途径相关基因表达情况的影响, 结果如图 8 所示, 与 WT 菌株相比, 在选取的所有 14 个基因当中, $\Delta clsA$ 菌株的基因 *proP*、*betT*、*proV* 表达显著下降, 基因 *proW*、*proX*、*proA* 和 *proB* 表达显著上升。

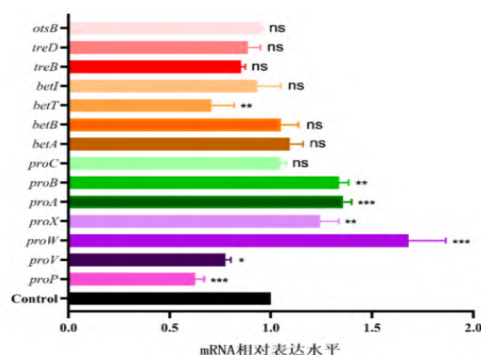


图 8 $\Delta clsA$ 菌株中耐干燥相关基因的表达变化

Fig. 8 The expression changes of genes related to desiccation tolerance in $\Delta clsA$ strain

2.9 脯氨酸和甜菜碱含量的测定

为了验证 qRT-PCR 的结果, 对菌株的脯氨酸和甜菜碱的含量进行测定, 结果如图 9 所示。 $\Delta clsA$ 中

脯氨酸的含量显著低于 WT 菌株, 脯氨酸含量下降约 24.0%, 而 *cpclsA* 菌株与野生型菌株不存在显著差异。 *ΔclsA* 菌株中甜菜碱的含量显著低于 WT 菌株, 甜菜碱含量下降约 31.4%, 而 *cpclsA* 菌株中 *clsA* 基因的回补在一定程度上提高了菌体内部甜菜碱的含量, 但并未恢复到与野生型菌株完全一致的水平。

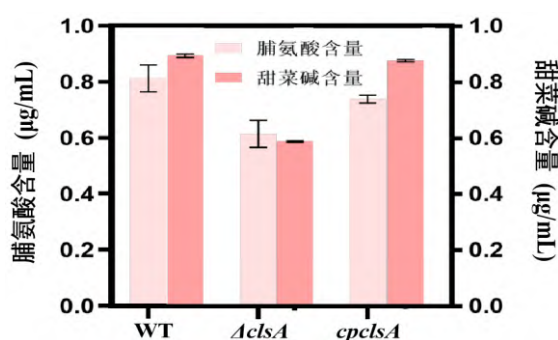


图9 WT、*ΔclsA*、*cpclsA* 菌株的脯氨酸和甜菜碱含量

Fig. 9 Determination of proline and betaine content content of WT, *ΔclsA*, and *cpclsA* strains

脯氨酸主要存在于细胞质中, 在细菌抗逆过程中作为有效渗透调节物质, 可以保持原生质与环境的渗透平衡, 防止细胞失水, 也可以保护酶和膜的结构和功能的稳定性^[31]。甜菜碱也是一种常见的渗透调节物质^[32]。添加甜菜碱可以提高金黄色葡萄球菌在基础培养基中的渗透压耐受能力^[33]。qRT-PCR结果显示, *ΔclsA* 菌株的脯氨酸/甜菜碱转运蛋白 ProP、脯氨酸甜菜碱转运系统 ABC 转运蛋白 ProV 和甜菜碱合成相关的胆碱转运蛋白 BetT 表达显著下降, 同时细胞内脯氨酸和甜菜碱含量下降。研究^[15]报道, 心磷脂可以直接影响脯氨酸/甜菜碱转运蛋白 ProP 的定位及其转运作用。因此, 可以推测 *clsA* 基因缺失引起的 CL 浓度降低, 可能会通过阻碍 ProP 等膜相关转运蛋白的定位、渗透感应以及表达, 影响脯氨酸、甜菜碱及相关合成原料胆碱等物质的摄入或合成, 从而导致胞内重要的渗透调节物质脯氨酸及甜菜碱含量下降, 进一步造成阪崎克罗诺杆菌的耐干燥能力显著降低。

3 结 语

本研究利用 λ -Red 同源重组技术成功的对阪崎克罗诺杆菌中的心磷脂合成酶基因 *clsA* 进行敲除, 以及构建相应的回补株。通过比较 WT、*ΔclsA* 和 *cpclsA* 菌株的生理特性, 探究 *clsA* 基因在阪崎克罗

诺杆菌耐干燥过程中的具体作用以及潜在机制。结果表明, 该基因显著影响心磷脂的合成, 并且可能通过对该菌鞭毛合成、生物膜形成以及脯氨酸和甜菜碱转运等膜相关代谢途径的调控, 影响细菌的耐干燥能力。这为进一步研究 *clsA* 基因在阪崎克罗诺杆菌中的分子调控机制提供了新的思路和方向。

参考文献:

- [1] LEPUSCHITZ S, RUPPITSCH W, PEKARD-AMENITSCH S, et al. Multicenter study of *Cronobacter sakazakii* infections in humans, Europe, 2017[J]. Emerging infectious diseases, 2019, 25(3): 515-522.
- [2] CHAUHAN R, SINGH N, PAL G K, et al. Trending biocontrol strategies against *Cronobacter sakazakii*: a recent updated review[J]. Food research international, 2020, 137: 109385.
- [3] PARRA-FLORES J, MAURY-SINTJAGO E, RODRIGUEZ-FERNÁNDEZ A, et al. Microbiological quality of powdered infant formula in Latin America[J]. Journal of food protection, 2020, 83(3): 534-541.
- [4] FAKRUDDIN M, RAHAMAN M, AHMED M M, et al. Stress tolerant virulent strains of *Cronobacter sakazakii* from food[J]. Biological research, 2014, 47: 1-12.
- [5] AMALARADJOU M A R, VENKITANARAYANAN K. Effect of trans-cinnamaldehyde on reducing resistance to environmental stresses in *Cronobacter sakazakii*[J]. Foodborne pathogens and disease, 2011, 8(3): 403-409.
- [6] PING L, ZHENGYANG Z, MOHAN S, et al. Effects and molecular mechanism of sugar transporter *ESA_RS15745* on desiccation resistance, motility, and biofilm formation of *Cronobacter sakazakii*[J]. Journal of food science, 2024, 89(1): 581-595.
- [7] GRALLA J D, VARGAS D R. Potassium glutamate as a transcriptional inhibitor during bacterial osmoregulation[J]. The EMBO journal, 2006, 25(7): 1515-1521.
- [8] 张正阳. 阪崎克罗诺杆菌耐干燥性相关基因及功能研究[D]. 天津: 天津科技大学, 2023.
- [9] WANG Y, LING N, JIAO R, et al. A universal mechanism on desiccation tolerance of *Cronobacter* based on intracellular trehalose accumulation regulated by EnvZ/OmpR[J]. Food microbiology, 2024, 119: 104455.
- [10] JAVED M Q, KOVALCHUK I, YEVTUSHENKO D, et al. Relationship between desiccation tolerance and biofilm formation in shiga toxin-producing *Escherichia coli*[J]. Microorganisms, 2024, 12(2): 243.

- [11] ROSSI R M, YUM L, AGAISSE H, et al. Cardiolipin synthesis and outer membrane localization are required for *Shigella flexneri* virulence[J]. MBio, 2017, 8(4): 01199-17.
- [12] RAETZ C R, DOWHAN W. Biosynthesis and function of phospholipids in *Escherichia coli*[J]. Journal of biological chemistry, 1990, 265(3): 1235-1238.
- [13] TAN B K, BOGDANOV M, ZHAO J, et al. Discovery of a cardiolipin synthase utilizing phosphatidylethanolamine and phosphatidylglycerol as substrates[J]. Proceedings of the national academy of sciences, 2012, 109(41): 16504-16509.
- [14] DONG H, ZHANG Z, TANG X, et al. Structural insights into cardiolipin transfer from the Inner membrane to the outer membrane by PbgA in Gram-negative bacteria[J]. Scientific reports, 2016, 6(1): 30815.
- [15] ROMANTSOV T, GONZALEZ K, SAHTOUT N, et al. Cardiolipin synthase A colocalizes with cardiolipin and osmosensing transporter ProP at the poles of *Escherichia coli* cells[J]. Molecular microbiology, 2018, 107(5): 623-638.
- [16] GURTLE J B, KORNACKI J L, BEUCHAT L R. *Enterobacter sakazakii*: a coliform of increased concern to infant health[J]. International journal of food microbiology, 2005, 104(1): 1-34.
- [17] 邹小琳. 不同磷含量条件下根瘤菌细胞膜脂组成分析及无磷脂硫苷脂 (SL) 生物合成基因 *sqdB* 序列分析[D]. 雅安: 四川农业大学, 2012.
- [18] CHOI Y, KIM S, HWANG H, et al. Plasmid-encoded MCP is involved in virulence, motility, and biofilm formation of *Cronobacter sakazakii* ATCC29544[J]. Infection and immunity, 2015, 83(1): 197-204.
- [19] SEKIMIZU K, KORNBERG A. Cardiolipin activation of dnaA protein, the initiation protein of replication in *Escherichia coli*[J]. Journal of biological chemistry, 1988, 263(15): 7131-7135.
- [20] ZILAIE M N, ARANI A M, ETESAMI H, et al. Improved salinity and dust stress tolerance in the desert halophyte *Haloxylon aphyllum* by halotolerant plant growth-promoting rhizobacteria[J]. Frontiers in plant science, 2022, 13: 948260.
- [21] BACSI I, FIGLER A, SIMON E, et al. Salinity tolerance and desalination properties of a *Haematococcus lacustris* strain from eastern Hungary[J]. Frontiers in microbiology, 2024, 15: 1332642.
- [22] XU R, YANG Z H, ZHENG Y, et al. Metagenomic analysis reveals the effects of long-term antibiotic pressure on sludge anaerobic digestion and antimicrobial resistance risk[J]. Bioresource technology, 2019, 282:179-188.
- [23] LING N, WANG X, LIU D Y, et al. Role of fliC on biofilm formation, adhesion, and cell motility in *Cronobacter malonicus* and regulation of luxS[J]. Food and chemical toxicology, 2021, 149: 111940.
- [24] NEPPER J F, LIN Y C, WEIBEL D B. Rcs phosphorelay activation in cardiolipin-deficient *Escherichia coli* reduces biofilm formation[J]. Journal of bacteriology, 2019, 201(9): 1-15.
- [25] CHU J K, ZHU S, HERRERA C M, et al. Loss of a cardiolipin synthase in *Helicobacter pylori* G27 blocks flagellum assembly[J]. Journal of bacteriology, 2019, 201(21): 1-17.
- [26] 孙启秀, 司默涵, 李萍, 等. 阪崎克罗诺杆菌基因 *ESA_01668* 的功能及机制研究[J]. 天津科技大学学报, 2025, 40 (3): 10-19.
- [27] BARRON J C, FORSYTHE S J. Dry stress and survival time of *Enterobacter sakazakii* and other *Enterobacteriaceae* in dehydrated powdered infant formula[J]. Journal of food protection, 2007, 70(9): 2111-2117.
- [28] NEPPER J F, WEIBEL D B. Membrane fluidity modulates biofilm formation in *E. coli* via the Rcs phosphorelay[J]. Biophysical journal, 2017, 112(3): 281a.
- [29] LIN T Y, SANTOS T M A, KONTUR W S, et al. A cardiolipin-deficient mutant of *Rhodobacter sphaeroides* has an altered cell shape and is impaired in biofilm formation[J]. Journal of bacteriology, 2015, 197(21): 3446-3455.
- [30] HUANG K C, RAMAMURTHI K S. Macromolecules that prefer their membranes curvy[J]. Molecular microbiology, 2010, 76(4): 822-832.
- [31] 郭春芳, 孙云. 干旱胁迫下植物的渗透调节及脯氨酸代谢研究进展[J]. 福建教育学院学报, 2015, 16(1): 114-118.
- [32] PIZARRO M, CONTRERAS R A, Köhler H, et al. Desiccation tolerance in the Antarctic moss *Sanionia uncinata*[J]. Biological research, 2019, 52: 1-11.
- [33] WANG Q, ZHAO Y, MCCLELLAND M, et al. The RcsCDB signaling system and swarming motility in *Salmonella enterica* serovar typhimurium: dual regulation of flagellar and SPI-2 virulence genes[J]. Journal of bacteriology, 2007, 189(23): 8447-8457.