

DOI: 10.13364/j.issn.1672-6510.20240088

网络首发日期: 2024-09-30; 网络首发地址: <http://link.cnki.net/urlid/12.1355.N.20240930.1251.004>

阪崎克罗诺杆菌基因 *ESA_01668* 的功能及机制研究

孙启秀, 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*) 具有较强的干燥耐受性, 但其具体耐干燥相关的分子机制尚不清楚。本课题组前期研究发现, 编码产物为假设蛋白的基因 *ESA_01668* 破坏会造成菌株耐干燥能力显著下降。为了进一步探索基因 *ESA_01668* 的功能, 通过同源重组的方法构建突变株 Δ *ESA_01668*, 并利用载体 pACYC184 构建回补株 *cpESA_01668*。通过比较野生型菌株 (WT)、 Δ *ESA_01668* 和 *cpESA_01668* 菌株的生理特性, 发现 *ESA_01668* 基因对菌株正常条件下的生长没有明显影响, 但促进菌株在高盐条件下生长。基因 *ESA_01668* 缺失会导致菌株耐干燥性、运动能力、生物膜形成及膜疏水性下降, 膜通透性上升, 脯氨酸转运及甜菜碱转运/合成受阻。研究结果为进一步阐明阪崎克罗诺杆菌 *ESA_01668* 基因耐干燥相关的功能提供参考。

关键词: 阪崎克罗诺杆菌; 耐干燥; 假设蛋白; *ESA_01668* 基因

中图分类号: TS201.3

文献标志码: A

文章编号: 1672-6510(2025)03-0010-10

Function and Mechanism Study of Gene *ESA_01668* in *Cronobacter sakazakii*

SUN Qixiu, 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 desiccation tolerance, but the specific molecular mechanism of its desiccation resistance is still unclear. Previous studies in our laboratory found that the disruption of the gene *ESA_01668*, whose encoded product is a hypothetical protein, resulted in a significant decrease in the drying resistance of the strain. In order to further explore the function of the gene *ESA_01668*, the mutant strain Δ *ESA_01668* was constructed by homologous recombination, and the complement strain *cpESA_01668* was constructed by vector pACYC184. By comparing the physiological characteristics of wild-type WT, Δ *ESA_01668* and *cpESA_01668*, it was found that the gene *ESA_01668* had no significant effect on the growth of the strain under normal condition, but promoted the strain growth under high salt condition. The deletion of the gene *ESA_01668* resulted in a decrease in the desiccation resistance, motility, biofilm formation and membrane hydrophobicity, an increase in the membrane permeability, and an inhibition on the transport of proline and transport/synthesis of betaine. This study has provided a reference for further elucidating the desiccation resistance related function of the gene *ESA_01668* in *C. sakazakii*.

Key words: *C. sakazakii*; desiccation resistance; hypothetical protein; gene *ESA_01668*

引文格式:

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.

SUN Q X, SI M H, LI P, et al. Function and mechanism study of gene *ESA_01668* in *Cronobacter sakazakii*[J]. Journal of

收稿日期: 2024-04-28; 修回日期: 2024-06-04

基金项目: 国家重点研发计划项目 (2023YFF1103900)

作者简介: 孙启秀 (2000—), 女, 山东临沂人, 硕士研究生; 通信作者: 杜欣军, 教授, xjdu@tust.edu.cn

Tianjin university of science and technology, 2025, 40 (3) : 10–19.

阪崎克罗诺杆菌 (*Cronobacter sakazakii*) 是一种革兰氏阴性、兼性厌氧致病菌^[1], 属于肠杆菌科^[2]。婴儿配方奶粉 (PIF) 是该菌最相关的传播媒介^[3-4]。阪崎克罗诺杆菌较强的干燥耐受性保证其在 PIF 中存活, 也导致其对新生儿的感染^[5-6]。阪崎克罗诺杆菌在室温 PIF 中可存活 2.5 年以上^[7-8], 婴幼儿食用受污染的奶粉后, 可引起新生儿脑膜炎、败血症和坏死性小肠结肠炎等并发症, 致死率最高可以达到 80%^[2, 9]。

细菌在极端环境中具有较强的适应能力^[10], 相比于肠杆菌科的其他菌种, 阪崎克罗诺杆菌具有更强的干燥耐受能力^[11-12], 其拥有多种机制能够耐受干燥胁迫, 以减少环境干燥带来的损害^[13-14]。阪崎克罗诺杆菌抵抗干燥环境的过程主要由两级响应构成: 第一级响应主要由钾离子转运系统构成, 通过提高胞内的离子浓度, 响应菌体外部渗透压的快速变化, 保护细胞结构; 第二级响应主要包括海藻糖、脯氨酸和甜菜碱等渗透相容性物质积累, 进一步升高胞内渗透压, 以防止细胞脱水, 保护细胞在干燥胁迫中存活^[15]。此外, 生物膜形成能力等与阪崎克罗诺杆菌的干燥耐受能力正相关。

本课题组前期随机突变研究发现, *ESA_01668* 基因破坏会造成菌株耐干燥能力的显著下降。*ESA_01668* 基因长度为 324 bp, 编码产物为假设蛋白, 该基因在阪崎克罗诺杆菌中比较保守。在 NCBI 数据库对比中发现, 阪崎克罗诺杆菌多个菌株都存在与之 100% 相似的基因, 且未发现在其他物种中有已鉴定功能的蛋白质与之相似度较高。经过 Uniprot 数据库查询, 该假设蛋白不存在信号肽。因此, 本研究通过敲除 *ESA_01668* 基因, 探索其在阪崎克罗诺杆菌耐干燥过程中可能的作用机制。

1 材料与方法

1.1 菌株与质粒

菌株与质粒见表 1。阪崎克罗诺杆菌 ATCC BAA-894、大肠杆菌 (*E. coli*) DH5 α 、大肠杆菌 S17-1 λ pir 保存在 80% 甘油中, 并放在实验室-80℃冰箱中长期冻存。活化培养条件为 37℃、200 r/min。

培养基为 Luria-Bertani (LB) 培养基: 胰蛋白胨、酵母提取物、氯化钠。当需要使用抗生素时, 氨苄青霉素和氯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 保存在-80℃冰箱中, 质粒 pCVD442-QH 和质粒 pACYC184-*ESA_01668* 为本研究构建。

表 1 菌株与质粒
Tab. 1 Strains and plasmids

菌株和质粒	描述	来源
ATCC BAA-894	分离菌株	美国模式培养集存库
Δ <i>ESA_01668</i>	<i>ESA_01668</i> 突变株	本研究构建
<i>cpESA_01668</i>	<i>ESA_01668</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
S17-1 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>ESA_01668</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>ESA_01668</i>	带有 <i>ESA_01668</i> 基因的载体	本研究构建

1.2 试剂与仪器

质粒小提试剂盒, 天根生化科技 (北京) 有限公司; Eastep[®] Super 总 RNA 提取试剂盒, SYBR[®] Premix Ex Taq[™] II (Tli RNaseH Plus), 湖南艾科瑞生物工程有限公司; 氯化钠、结晶紫、磷酸二氢钠、磷酸氢二钠, 分析纯, 天津市化学试剂一厂; 胰蛋白胨、酵母提取物、氯霉素、氨苄青霉素、脯氨酸检测试剂盒、甜菜碱检测试剂盒, 北京索莱宝科技有限公司。

超纯水仪, 密理博公司; PCR 仪、电泳系统和凝胶成像仪, 伯乐生命医学产品 (上海) 有限公司; Sunrise Basic Elisa 型酶标仪, 帝肯奥地利有限责任公司; UV-Vis 型紫外-可见分光光度计, 上海光谱仪器有限公司; 超微量分光光度计, 德国 Berthold 公司; HYC-A 型全温摇瓶柜, 苏州培英实验设备有限公司。

1.3 实验方法

1.3.1 PCR 引物设计

在 NCBI 数据库中查找 *ESA_01668* 基因, 选择整段基因及其上下游同源臂各 1 000 bp 的序列。将整段基因序列上传至 Primer Premier 5 软件, 选择合适的长度范围, 根据 GC 含量等参数设计 *ESA_01668* 基因上游同源臂和下游同源臂的前后引物, 引物名称分别为 *ESA_01668*-QF/*ESA_01668*-QR 和 *ESA_01668*-HF/*ESA_01668*-HR。验证基因是否成功敲除和回补的构建引物见表 2。所有引物序列提交至苏州金唯智有限公司进行合成。

表 2 基因敲除引物

Tab. 2 Gene knockout primers

引物名称	描述	引物序列
<i>ESA_01668</i> -1F	<i>ESA_01668</i> 基因	ATGAGAACCACGCGCGTTAC
<i>ESA_01668</i> -1R		CGGTGCTTGCCGTTTCGCTGA
<i>ESA_01668</i> -2F	<i>ESA_01668</i> 基因序列的两端	GGCGACAGGGAAACTCATC
<i>ESA_01668</i> -2R		TTTGCTGTATGAAGTGGC
<i>ESA_01668</i> -3F	pACYC184 序列的片段	ATGGAAGCCGCGGCACC
<i>ESA_01668</i> -3R		ACACGGTGCCTGACTGCGTTAGC
<i>cpESA_01668</i> -F	<i>ESA_01668</i> 基因序列	AGTCAGGCACCGTGTATGAGAACCACGCGCGTTAC
<i>cpESA_01668</i> -R		GCCGCCGGCTTCCATTACAGCGAACGGAAGCAC
pCVD442-F	自杀载体线性化引物	CAATAACCCTGATAAATGCTTCAA
pCVD442-R		CTCATGAGCGGATACATATTG
<i>ESA_01668</i> -QF	<i>ESA_01668</i> 扩增前臂引物	TGATAAATGCTTCAATTATGGTCTGGCTGCTGATTTT
<i>ESA_01668</i> -QR		ATGCCAACCCGGAACGACCGCGTTTAAGGTTTCAAG
<i>ESA_01668</i> -HF	<i>ESA_01668</i> 扩增后臂引物	CCTTAAACGCGGTGTTTCCGGGTGGCATAGTTCAG
<i>ESA_01668</i> -HR		GTATCCGCTCATGAGATATTGCGACCGCCTTCTCAGT

1.3.2 突变株的构建

在 Ji 等^[16]方法的基础上稍加修改,使用南京诺唯赞生物科技公司的商业无缝克隆和组装试剂盒,根据制造商的说明将 PCR 片段克隆到线性化载体中。使用 pCVD442-F 和 pCVD442-R 的引物通过 PCR 程序将 pCVD442 载体线性化。使用引物 *ESA_01668*-QF/*ESA_01668*-QR 和 *ESA_01668*-HF/*ESA_01668*-HR(引物序列见表 2)从阪崎克罗诺杆菌 ATCC BAA-894 全基因组序列中扩增出 *ESA_01668* 基因的上下游片段,克隆到 pCVD442 自杀载体中并命名为 pCVD442-QH。将目的载体通过电穿孔转化大肠杆菌 S17 λ pir 感受态细胞,最后通过重组构建缺失突变体 Δ *ESA_01668*。

1.3.3 回补株的构建

以 pACYC184 为载体构建互补表达载体。分别用 *cpESA_01668*-F 和 *cpESA_01668*-R 从阪崎克罗诺杆菌 ATCC BAA-894 全基因组序列中扩增出目的基因,转化感受态细胞,成功构建互补菌株。

1.3.4 生长曲线的测定

细菌生长曲线的测定参考文献^[17]方法。菌株活化后,将过夜培养的细菌按照 1 : 100 的比例转移到 LB 培养基中。将液体培养基置于 37℃、200 r/min 摇床中,每隔 1 h 取样测定 600 nm 处吸光度(A_{600}),持续测定 15 h。从实验开始的 4 h 起,对样品进行 10 倍稀释,以减少仪器误差。高盐生长曲线的培养基中氯化钠含量为 2 g/100 mL,即普通 LB 培养基中氯化钠含量的 2 倍,其余操作与正常生长曲线测定方法保持一致。每组样品重复实验 3 次。

1.3.5 运动能力的测定

从 4℃ 冰箱中取出菌株培养平板,挑取 WT、 Δ *ESA_01668* 和 *cpESA_01668* 单菌落接种于液体 LB 培养基中,37℃、200 r/min 培养过夜,将 5 μ L 菌悬液转移至含有 0.3% 琼脂的 LB 培养基平板中。将接种后的平板轻轻放入培养箱中,25℃培养 12 h,取出测定菌落直径并计算平均值。每组样品重复实验 3 次。

1.3.6 细菌膜表面生理特性的测定

膜表面生理特性包括细菌的膜疏水性、膜透过性。菌株活化后,培养至 $A_{600} = 0.6$ 。

使用荧光探针法测定膜疏水性。避光配制 N-苯基-1-萘胺溶液,使用浓度为 40 μ mol/L。吸取 20 μ L 菌液和 480 μ L 的荧光探针溶液混合均匀,在 420 nm 荧光强度下测定。

膜通透性采用二甲苯法测定,细菌培养至 $A_{600} = 0.5$,将菌液转移至 10 mL 离心管,每个管中加入 1 mL 菌液和 400 μ L 二甲苯,室温静置 3 h,使用移液枪小心吸弃上层的二甲苯,测定菌液的 A_{600} 。细菌膜疏水性(R)按照式(1)计算。

$$R = \frac{0.5 - A_{600}}{0.5} \times 100\% \tag{1}$$

1.3.7 生物膜形成能力的测定

阪崎克罗诺杆菌 WT、 Δ *ESA_01668* 和 *cpESA_01668* 菌株在 37℃条件下生长过夜,然后接种于 96 孔板中,37℃培养 24 h,弃菌液,用 200 μ L 磷酸盐缓冲液(PBS)轻轻洗涤培养孔 3 次,室温静置晾干。每孔加入 200 μ L 99% 甲醇固定生物膜,15 min 后弃去上清液,静置干燥后,用 0.1% 结晶紫溶液对生

物膜进行染色并孵育 30 min, 加入 200 μ L 95% 乙醇洗脱 30 min, 使用酶标仪测定 590 nm 处的吸光度。每组样品重复实验 3 次。

1.3.8 耐干燥能力的测定

在测定菌株的耐干燥性能中, 无水硅胶和玻璃干燥器经过 121 $^{\circ}$ C 高温灭菌 20 min 后, 放入经过 75% 乙醇消毒并使用紫外线照射后的无菌烘箱中烘干备用。菌株活化后, 将待测菌株以 1 : 100 的比例稀释, 培养至对数生长期, 以确保菌株的活性。使用 PBS 洗涤 3 次, 去除 LB 培养基中的营养成分, 使用新鲜的基础培养基重新悬浮菌体, 吸取 100 μ L 接种到无菌 96 孔板中, 使用封口膜密封后放在 37 $^{\circ}$ C 恒温培养箱中静置培养 24 h, 用涂板计数法测定干燥处理前的菌株初始存活量。随后, 将 96 孔板放置无菌干燥器

中, 再将其放入 37 $^{\circ}$ C 培养箱中静置 7 d。结束后取出 96 孔板, 并向每个孔中加入 100 μ L 新鲜基础培养基, 均匀吹吸, 确保培养基与菌株充分混合, 再次进行涂板计数, 确定菌株经过干燥处理后的菌体存活量。每组样品重复实验 3 次。

1.3.9 实时荧光定量 PCR

选用 RNA 提取试剂盒提取 WT 和 Δ *ESA_01668* 菌株的 RNA, 然后用艾科瑞公司提供的 PrimeScripTMRT 试剂盒将 RNA 反转录为 cDNA。以 cDNA 为模板, 通过 MasterCycle[®]EP Realplex 系统和 TB GreenTMPreMix Ex TaqTMII 进行实时定量聚合酶链式反应 (qRT-PCR), 通过检测溶解曲线分析扩增产物的特异性, 用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法定量相对基因表达水平。该过程用到的所有引物见表 3。

表 3 qRT-PCR 引物
Tab. 3 qRT-PCR primers

引物名称	基因功能	引物序列
16S rRNA F	内参基因	TTACGACCAGGGCTACACACG
16S rRNA R		CGGACTACGACGCACTTTATGAG
<i>proP</i> F	脯氨酸/甜菜碱转运蛋白	GGTAACGCGATGGAGTGGT
<i>proP</i> R		TCCCTTTCTTATCCGTCCG
<i>proV</i> F	甘氨酸甜菜碱/脯氨酸甜菜碱转运系统 ATP 结合蛋白	GGCTCGGGTAAATCCACTA
<i>proV</i> R		CATCAGCGCAAATGACTGG
<i>otsB</i> F	6-磷酸海藻糖磷酸酶	CGGGCAAATGCGTAGTGGA
<i>otsB</i> R		ATCTCACCGACGAAGCCGG
<i>treD</i> F	磷酸转移酶 (PTS) 系统葡萄糖特异性 EIIA 组分	TTCGGTGATAAAGGCAATA
<i>treD</i> R		CTCTGCGAACACTACATCC
<i>betT</i> F	高亲和力和胆碱转运蛋白	CTCCGGCTCGTTGGTGCTT
<i>betT</i> R		AACACGACGGTTATCATGGG
<i>betI</i> F	HTH 型转录调节因子	GTAGGAATGCAGCCGATACGG
<i>betI</i> R		TCTCGGCAGGCATTATTAGCC
<i>mscMF</i>	钾离子外排通道	TTACGCCATTACCACTATCACC
<i>mscMR</i>		CCGAAACCGAGCCCTACA
<i>mscL</i> F	大导电机械敏感通道	CATTATCGGTGCGGCTTTTCG
<i>mscL</i> R		CATGATGACCGCTGGCGTAT

1.3.10 脯氨酸含量的测定

细菌中的脯氨酸含量按照脯氨酸检测试剂盒说明书进行测定。吸取 100 μ L 对数生长期的 3 种细菌样品置于 2 mL 无菌离心管中, 再向离心管中加入 1 mL 提取液, 超声破碎菌体, 将破碎后的混合物转移至新的、预冷的离心管中, 4 $^{\circ}$ C、12 000 r/min 离心 10 min, 将上清液转移到新的 1.5 mL 离心管中。将离心管放置在水浴锅 (90 $^{\circ}$ C) 中振荡加热 10 min, 25 $^{\circ}$ C、12 000 r/min 离心 10 min, 将上清液转移至新管, 冷却至室温。使用移液枪分别吸取样品各 300 μ L, 加入等量冰醋酸以及 600 μ L 试剂 1, 移液枪吹打混合均匀。同时设置对照组, 使用 300 μ L 无菌超纯水代替样品,

其余操作不变。混合后的所有样本 95 $^{\circ}$ C 水浴加热 0.5 h, 使用紫外分光光度计分别测定 520 nm 处样品和空白对照组的吸光度并计算差值, 通过公式计算出脯氨酸的含量。每组样品重复实验 3 次。

1.3.11 甜菜碱含量的测定

按照甜菜碱检测试剂盒说明书要求, 将细菌转移至离心管, 去除液体 LB 培养基, 加入 1 mL 提取液, 60 $^{\circ}$ C 振荡提取 30 min; 添加 3 mg 试剂 4, 振荡后室温高速离心 15 min; 取出上清液, 70 $^{\circ}$ C 蒸发去除甲醇 (剩余约 0.2 mL), 再用水定容至 1 mL。取 30 μ L 样本并与 300 μ L 试剂 1 混合均匀, 4 $^{\circ}$ C 反应 2 h, 室温高速离心 15 min, 弃上清液; 加入 300 μ L 试剂 2, 离心

10 min, 弃上清液; 最后加入 300 μ L 试剂 3, 溶解沉淀, 吸取 200 μ L 测定 $A_{\text{标准}}$ 、 $A_{\text{测定}}$ 和 $A_{\text{空白}}$, 则 $\Delta A_{\text{标准}} = A_{\text{标准管}} - A_{\text{空白管}}$, $\Delta A_{\text{测定}} = A_{\text{测定管}} - A_{\text{空白管}}$ 。

1.4 统计学分析

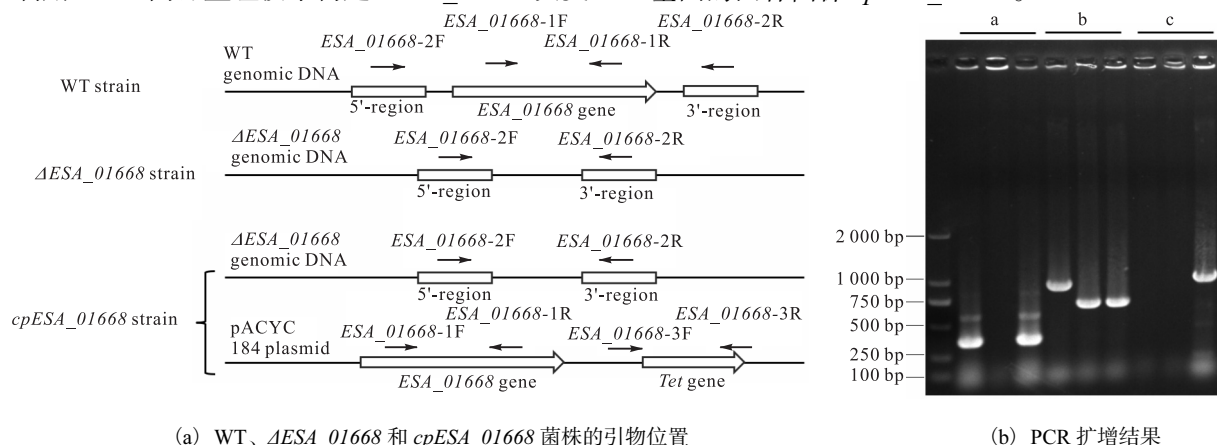
所有统计结果用 GraphPad Prism 10.1.2 软件进行分析, 组间数据差异比较采用常规单因素方差分析。经 Dunnett 多重比较检验 P 值, $P < 0.05$ 表明有统计学意义, 其中*表示 $P < 0.05$, **表示 $P < 0.01$, ***表示 $P < 0.001$, ns 表示无显著差异。

2 结果与分析

2.1 基因敲除及回补

利用 λ -Red 同源重组技术构建 ΔESA_{01668} 突变

株。阪崎克罗诺杆菌基因敲除和回补的 PCR 验证结果如图 1 所示。设计 3 条引物 (ESA_{01668} -1F/R、 ESA_{01668} -2F/R 和 ESA_{01668} -3F/R), 分别以野生型、突变株和回补株的基因组 DNA 为模板, 扩增不同的片段, 以检验基因敲除和回补的结果。PCR 结果如图 1(b) 所示, 运用 ESA_{01668} -1F/R 进行扩增后, WT 与 $cpESA_{01668}$ 菌株都产生了 324 bp 的特异性条带, 但突变株 ΔESA_{01668} 的样本中没有相应条带; 使用 ESA_{01668} -2F/R 进行扩增后, 3 个菌株的条带大小分别是 908 bp、584 bp 以及 584 bp。用 ESA_{01668} -3F/R 进行扩增后, 仅在 $cpESA_{01668}$ 菌株模板中发现大小约为 1036 bp 的特异条带。结果证明, 已经成功构建突变体 ΔESA_{01668} 及 ESA_{01668} 基因的回补菌株 $cpESA_{01668}$ 。



(a) WT、 ΔESA_{01668} 和 $cpESA_{01668}$ 菌株的引物位置

(b) PCR 扩增结果

M. D2000 marker; 泳道 1、4、7. WT; 泳道 2、5、8. ΔESA_{01668} ; 泳道 3、6、9. $cpESA_{01668}$ 。a. 引物 ESA_{01668} -1F/R 扩增泳道; b. 引物 ESA_{01668} -2F/R 扩增泳道; c. 引物 ESA_{01668} -3F/R 扩增泳道。

图 1 阪崎克罗诺杆菌基因敲除和回补的 PCR 验证

Fig. 1 PCR verification of gene knockout and complementation of *C. sakazakii*

2.2 生长曲线

通过比较阪崎克罗诺杆菌 WT、 ΔESA_{01668} 、 $cpESA_{01668}$ 的生长曲线(图 2), 判断 ESA_{01668} 基因缺失是否影响菌株的生长。在正常条件下, 突变株的生长速率略低于野生型, 这种微小差异在培养 10 h 后消失。在高盐条件下, 突变株的生长速率显著低于野生型和回补株, 在连续培养 10 h 后差异逐渐消失。 ESA_{01668} 基因的缺失在正常情况下不会影响菌株生长, 而在高盐条件下会影响菌株的生长速率, 说明 ESA_{01668} 属于细菌的非致死型基因。

虽然盐度和干旱胁迫是不同类型的水分缺乏, 但盐度胁迫通常被称为“生理干旱”^[18-19]。这两种胁迫过程的主要区别在于离子比的变化。在盐胁迫条件下, 由于选择性离子吸收(或释放), 所以离子比发生变化。相反, 在干燥过程中, 除了离子浓度增加外, 离

子比基本保持不变。即使如此, 微生物对于盐胁迫和干燥胁迫的适应机制也近似, 这可能是由于它们都会影响细胞内部的渗透势^[19]。因此, 盐胁迫可以在一定程度上模拟干燥胁迫条件。突变株 ΔESA_{01668} 在高盐培养基中生长速率的降低也在一定程度上验证了 ESA_{01668} 基因对菌株耐干燥能力的影响。

2.3 耐干燥能力

阪崎克罗诺杆菌野生型 WT、突变株 ΔESA_{01668} 和回补株 $cpESA_{01668}$ 经过 7 d 干燥处理后, 菌株的干燥失活率如图 3 所示。基因 ESA_{01668} 被敲除后, 突变株的干燥失活率显著增高, 相比野生型, 突变株干燥失活率增加 13.6%, 回补株死亡率略有增加, 但与野生型相比没有显著性差异。这说明基因 ESA_{01668} 对阪崎克罗诺杆菌的耐干燥能力确实有较大的影响。

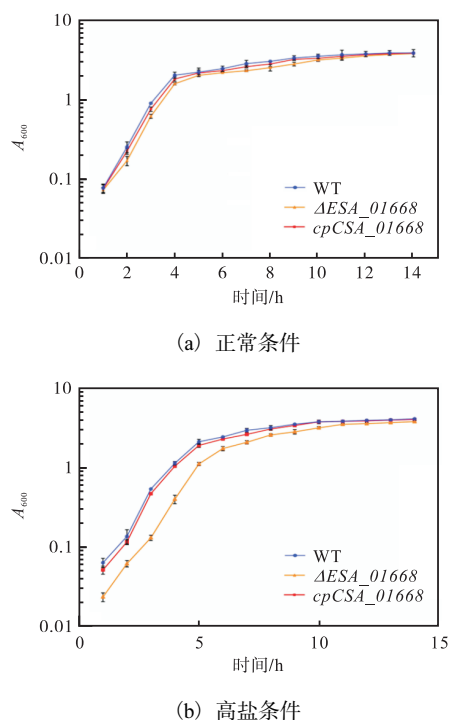


图 2 阪崎克罗诺杆菌 WT、 ΔESA_{01668} 、 $cpESA_{01668}$ 菌株生长曲线

Fig. 2 Growth curves of *C. sakazakii* WT, ΔESA_{01668} and $cpESA_{01668}$ strains

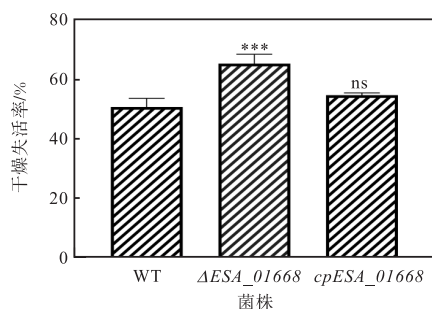


图 3 WT、 ΔESA_{01668} 、 $cpESA_{01668}$ 菌株的干燥失活率

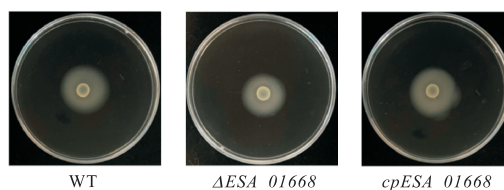
Fig. 3 Drying inactivation rates of WT, ΔESA_{01668} and $cpESA_{01668}$ strains

2.4 运动能力的比较

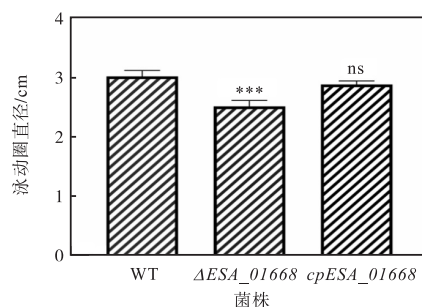
阪崎克罗诺杆菌 WT、 ΔESA_{01668} 、 $cpESA_{01668}$ 菌株运动能力的比较结果如图 4 所示。突变株的泳动圈大小与野生型相比显著减小, 回补株的泳动圈直径略小于野生型, 但是没有显著性差异。突变株与回补株相比, 运动能力也显著降低。野生型 WT、突变株 ΔESA_{01668} 、回补株 $cpESA_{01668}$ 的泳动圈直径分别为 (3.0 ± 0.1) cm、 (2.5 ± 0.1) cm、 (2.8 ± 0.1) cm。这表明 *ESA_01668* 基因的缺失会影响阪崎克罗诺杆菌的运动能力。

在细菌运动过程中, 鞭毛通常被认为起到最为主要的作用^[20], 而鞭毛本身也被认为会对细菌的耐干

燥性产生影响^[18]。若鞭毛本身受损, 细菌的运动能力将受到极大限制^[21]。鞭毛的着生位置与细菌的菌膜紧密相连, 细菌运动是由于鞭毛局部弯曲, 从基部向顶端波浪式推进的结果^[22], 一旦菌膜受到破坏, 鞭毛的固定会受到干扰, 从而影响其运动能力。鞭毛的运动还依赖于 ATP 的周期性水解, 如果细菌细胞体内的 ATP 供应不足或受到干扰, 也会影响鞭毛的正常运动^[23]。因此, 基因 *ESA_01668* 缺失引起的细菌运动能力下降, 可能与鞭毛或菌膜的直接受损或能力代谢降低等原因相关。



(a) 菌株泳动圈



(b) 泳动圈直径

图 4 阪崎克罗诺杆菌 WT、 ΔESA_{01668} 、 $cpESA_{01668}$ 菌株运动能力的比较

Fig. 4 Comparison of motility ability of *C. sakazakii* WT, ΔESA_{01668} and $cpESA_{01668}$ strains

2.5 生物膜的形成能力

为了验证基因 *ESA_01668* 对阪崎克罗诺杆菌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能力, 结果如图 5 所示。 ΔESA_{01668} 的生物膜形成能力显著低于野生株和回补株, 回补株的生物膜形成能力得到很好的恢复, 与野生型相比无显著差异。

阪崎克罗诺杆菌可以形成生物膜, 分泌主要由多糖、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, 从而对细胞起到保护作用。这种保护作用对于阪崎克罗诺杆菌的干燥抗性至关重要, 其生物膜合成能力也被证实与耐干燥能力正相关^[24]。研究^[25-27]表明, 生物膜的形成会受到多种因素影响, 其中也包括了鞭毛和菌毛组装系统的调节。此外, 菌膜囊泡的分泌也会影响生物膜的形成^[28]。突变

株 ΔESA_01668 生物膜合成能力的下降与运动能力下降具有相似的趋势。这也进一步证实了基因 ESA_01668 的功能缺失可能导致鞭毛或菌膜受损。

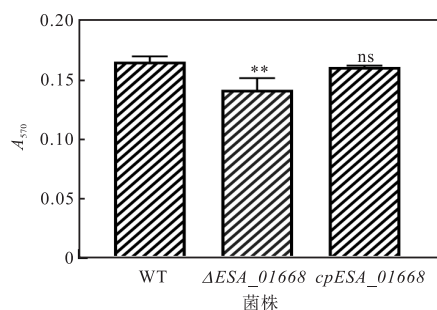


图5 WT、 ΔESA_01668 、 $cpESA_01668$ 菌株生物膜的形成能力

Fig. 5 Biofilm formation ability of WT, ΔESA_01668 and $cpESA_01668$ strains

2.6 细菌膜表面生理特性

WT、 ΔESA_01668 、 $cpESA_01668$ 菌株膜表面生理特性如图6所示。

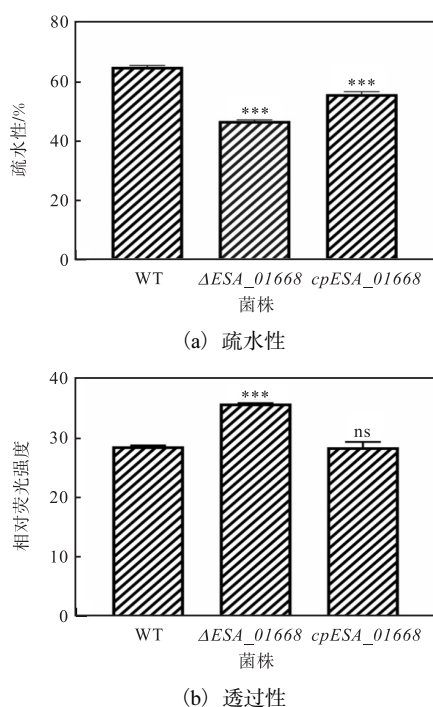


图6 WT、 ΔESA_01668 、 $cpESA_01668$ 菌株膜表面生理特性

Fig. 6 Physiological characteristics of membrane surface of WT, ΔESA_01668 and $cpESA_01668$ strains

菌株 ΔESA_01668 的细胞膜疏水性与菌株 WT 相比显著降低, 菌株 $cpESA_01668$ 的细胞膜疏水性虽然比突变株有一定程度的升高, 但是与菌株 WT 相比仍然有显著差异。细胞膜通透性与疏水性相反, 如图6(b)所示, 菌株 WT 和 $cpESA_01668$ 在 420 nm

激发波长下的相对荧光强度相似, 菌株 ΔESA_01668 的膜通透性出现了明显的提高, 提示菌膜完整性受损, 这也可能进一步导致细菌抗逆能力的下降。

2.7 qRT-PCR基因表达分析

qRT-PCR 测定相关耐干燥基因的表达结果如图7所示。以野生型为对照, 突变株与脯氨酸/胆碱转运蛋白 ProP 和体外胆碱转运关键蛋白 BetT 显著下调, 这说明基因 ESA_01668 可以调控基因 $proP$ 和 $betT$ 的表达, 而其他基因的表达没有受到显著影响。

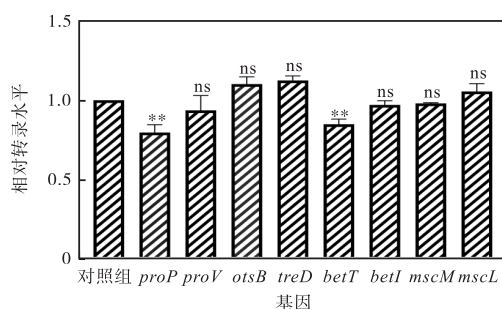


图7 qRT-PCR测定相关耐干燥基因的表达

Fig. 7 Expression of related desiccation-resistant genes determined by qRT-PCR

本研究测定的基因包括钾离子转运相关的钾离子外排通道基因 $mscM$ 和大导电机敏敏感通道基因 $mscL$, 甘氨酸甜菜碱/脯氨酸甜菜碱转运系统相关基因 $proP$ 和 $proV$, 海藻糖合成相关的 6-磷酸海藻糖磷酸酶基因 $otsB$ 和磷酸转移酶 (PTS) 系统组分基因 $treD$, 甜菜碱合成相关的高亲和力胆碱转运蛋白基因 $betT$ 和相关转录调控因子 $betI$ 。结果证实基因 ESA_01668 对钾离子转运及海藻糖合成没有显著影响, 而对脯氨酸的转运以及甜菜碱的转运及合成有促进作用。

$proP$ 基因编码 ProP 跨膜系统, 可向细胞内导入甜菜碱、脯氨酸、肉碱和四氢嘧啶^[29-31], 该基因受 RpoS 调控^[32]。RpoS 是一种重要的应激诱导因子, 在一般应激反应期间上调抗激相关基因^[30, 33]。已有研究证明 $proP$ 基因表达水平在干燥过程中显著上调^[34], 促进脯氨酸及甜菜碱等渗透相容性物质在细胞中积累, 进而增加细菌对干旱/渗透胁迫的耐受性^[35]。高亲和力胆碱转运蛋白 BetT 可以从胞外向胞内转运胆碱, 胆碱在胞内可在胆碱氧化酶的催化下转化为甜菜碱, 提高钠-钾泵的功能, 为蛋氨酸和高半胱氨酸的循环传递甲基, 调节体内渗透压, 在高盐及干燥环境中为细胞提供渗透保护^[36-37]。脯氨酸和甜菜碱的转运及合成下调, 可能是 ESA_01668 基因突变株耐干燥能力下降的主要原因之一。

2.8 脯氨酸含量

由 qRT-PCR 结果可知, 基因 *ESA_01668* 会影响脯氨酸转运途径上的关键基因 *proP* 的转录, 因此进一步采用试剂盒测定突变株脯氨酸的含量是否出现显著变化, 结果如图 8 所示。野生型菌株、*ΔESA_01668* 和 *cpESA_01668* 菌株的脯氨酸含量分别为 $(0.812 \pm 0.051) \mu\text{g/mL}$ 、 $(0.705 \pm 0.014) \mu\text{g/mL}$ 、 $(0.757 \pm 0.008) \mu\text{g/mL}$ 。突变株的脯氨酸含量比野生型脯氨酸含量显著降低, 回补株的脯氨酸含量与野生株无显著差异, 这证明基因 *ESA_01668* 正向调控脯氨酸的摄取。

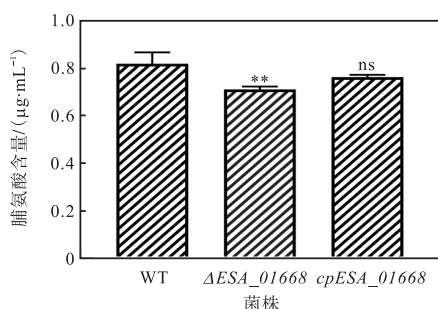


图 8 脯氨酸含量
Fig. 8 Proline content

2.9 甜菜碱含量

由 qRT-PCR 结果可知, 基因 *ESA_01668* 也会调控甜菜碱转运途径基因 *proP* 及合成途径的关键基因 *betT* 的转录, 因此采用试剂盒测定突变株的甜菜碱含量是否出现显著变化, 结果如图 9 所示。突变株的甜菜碱含量比野生型菌株甜菜碱含量显著降低, 回补株的甜菜碱含量与野生型菌株相比无显著差异, 这也证明了基因 *ESA_01668* 对菌株甜菜碱合成的促进作用。

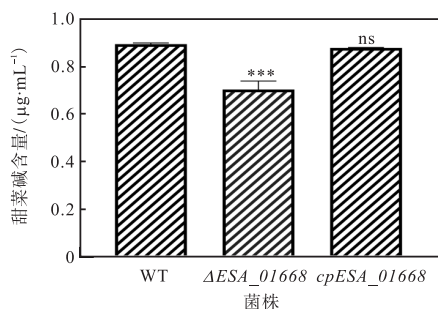


图 9 甜菜碱含量
Fig. 9 Betaine content

3 结 论

利用 λ -Red 同源重组技术成功敲除了阪崎克罗诺杆菌耐干燥相关 *ESA_01668* 基因, 并对该基因的

生物学作用进行深入研究。通过比较阪崎克罗诺杆菌的野生型 WT、突变株 *ΔESA_01668* 以及回补株 *cpESA_01668* 之间在生长速率、耐干燥能力、运动能力、生物膜形成能力、细菌膜疏水性、膜透过性以及耐干燥相关基因表达水平等多个方面的表现, 探究 *ESA_01668* 基因在这些方面所体现出的具体作用和潜在机制。结果表明: *ESA_01668* 基因对阪崎克罗诺杆菌正常条件下的生长速度没有显著影响, 但在高盐条件下促进菌株生长。突变株 *ΔESA_01668* 的耐干燥能力、运动能力、生物膜形成能力以及膜疏水性均显著降低, 菌膜通透性升高。脯氨酸及甜菜碱转运及合成相关基因下调, 菌体内含量降低。因此推测, *ESA_01668* 基因可能通过维持菌膜完整性, 促进菌体脯氨酸及甜菜碱积累, 提升菌株的耐干燥能力。本文通过基因缺失回补的方法对假设蛋白基因 *ESA_01668* 的功能进行研究, 为进一步揭示其在该菌体内的分子调控机制提供了新的见解和探索方向。

参考文献:

- [1] AKINEDEN Ö, HEINRICH V, GROSS M, et al. Reassessment of *Cronobacter* spp. originally isolated as *Enterobacter sakazakii* from infant food[J]. Food microbiology, 2017, 65: 44–50.
- [2] PARRA-FLORES J P, AGUIRRE J, JUNEJA V, et al. Virulence and antibiotic resistance profiles of *Cronobacter sakazakii* and *Enterobacter* spp. involved in the diarrheic hemorrhagic outbreak in Mexico[J]. Frontiers in microbiology, 2018, 9: 2206.
- [3] 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.
- [4] 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.
- [5] HENNEKINNE R B, GUILLIER L, FAZEUILH L, et al. Survival of *Cronobacter* in powdered infant formula and their variation in biofilm formation[J]. Letters in applied microbiology, 2018, 66 (6): 496–505.
- [6] SCHARINGER E J, DIETRICH R, WITTEW T, et al. Multiplexed lateral flow test for detection and differentiation of *Cronobacter sakazakii* serotypes 01 and 02[J]. Frontiers in microbiology, 2017, 8: 1826.

- [7] SINAMO K N, DEWANTI-HARIYADI R. Application of pGFPuv mutant to study *Cronobacter sakazakii* survival in corn flour during storage[J]. IOP Conference series: earth and environmental science, 2024, 1302(1): 012101.
- [8] HUERTAS J P, ALVAREZ-ORDÓÑEZ A, MORRISSEY R, et al. Heat resistance of *Cronobacter sakazakii* DPC 6529 and its behavior in reconstituted powdered infant formula[J]. Food research international, 2015, 69: 401–409.
- [9] YAN Q Q, CONDELL O, POWER K, et al. *Cronobacter* species (formerly known as *Enterobacter sakazakii*) in powdered infant formula: a review of our current understanding of the biology of this bacterium[J]. Journal of applied microbiology, 2012, 113(1): 1–15.
- [10] BACCI G, MERIGGI N, CHENG C L Y, et al. Species-specific gill's microbiome of eight crab species with different breathing adaptations[J]. Scientific reports, 2023, 13(1): 21033.
- [11] 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.
- [12] PHAIR K, PEREIRA S G, KEALEY C, et al. Insights into the mechanisms of *Cronobacter sakazakii* virulence[J]. Microbial pathogenesis, 2022, 169: 105643.
- [13] ESBELIN J, SANTOS T, HÉBRAUD M. Desiccation: an environmental and food industry stress that bacteria commonly face[J]. Food microbiology, 2018, 69: 82–88.
- [14] ZHAN J, QIAO J, WANG X Y. Role of sigma factor RpoS in *Cronobacter sakazakii* environmental stress tolerance[J]. Bioengineered, 2021, 12(1): 2791–2809.
- [15] DU X J, WANG X Y, DONG X, et al. Characterization of the desiccation tolerance of *Cronobacter sakazakii* strains[J]. Frontiers in microbiology, 2018, 9: 02867.
- [16] JI X M, 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[J]. Virulence, 2021, 12(1): 415–429.
- [17] LI P, ZONG W Y, ZHANG Z Y, et al. Effects and molecular mechanism of flagellar gene *flgK* on the motility, adhesion/invasion, and desiccation resistance of *Cronobacter sakazakii*[J]. Food research international, 2023, 164: 112418.
- [18] 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.
- [19] 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.
- [20] ALDUBYAN M A, ALMAMI I S, BENSLIMANE F M, et al. Comparative outer membrane protein analysis of high and low-invasive strains of *Cronobacter malonaticus*[J]. Frontiers in microbiology, 2017, 8: 2268.
- [21] LING N, WANG X, LIU D Y, et al. Role of *fliC* on biofilm formation, adhesion, and cell motility in *Cronobacter malonaticus* and regulation of *luxS*[J]. Food and chemical toxicology, 2021, 149: 111940.
- [22] NAKAMURA S, MINAMINO T. Flagella-driven motility of bacteria[J]. Biomolecules, 2019, 9(7): 279.
- [23] KÜHN M J, SCHMIDT F K, FARTHING N E, et al. Spatial arrangement of several flagellins within bacterial flagella improves motility in different environments[J]. Nature communications, 2018, 9: 5369.
- [24] LIANG H X, DE HAAN W P, CERDÀ-DOMÈNECH M, et al. Detection of faecal bacteria and antibiotic resistance genes in biofilms attached to plastics from human-impacted coastal areas[J]. Environmental pollution, 2023, 319: 120983.
- [25] HARTMANN I, CARRANZA P, LEHNER A, et al. Genes involved in *Cronobacter sakazakii* biofilm formation[J]. Applied and environmental microbiology, 2010, 76(7): 2251–2261.
- [26] LAURIANO C M, GHOSH C, CORREA N E, et al. The sodium-driven flagellar motor controls exopolysaccharide expression in *Vibrio cholerae*[J]. Journal of bacteriology, 2004, 186(15): 4864–4874.
- [27] LEMON K P, HIGGINS D E, KOLTER R. Flagellar motility is critical for *Listeria monocytogenes* biofilm formation[J]. Journal of bacteriology, 2007, 189(12): 4418–4424.
- [28] BAEZA N, MERCADE E. Relationship between membrane vesicles, extracellular ATP and biofilm

- formation in antarctic gram-negative bacteria[J]. Microbial ecology, 2021, 81 (3) : 645–656.
- [29] FEENEY A, SLEATOR R D. Functional screening of the *Cronobacter sakazakii* BAA-894 genome reveals a role for *ProP*(*ESA_02131*) in carnitine uptake[J]. Bio-engineered, 2015, 6 (3) : 161–165.
- [30] FEENEY A, SLEATOR R D. An in silico analysis of osmotolerance in the emerging gastrointestinal pathogen *Cronobacter sakazakii*[J]. Bioeng bugs, 2011, 2 (5) : 260–270.
- [31] MA Y, ZHANG Y Y, CHEN K, et al. The role of *PhoP/PhoQ* two component system in regulating stress adaptation in *Cronobacter sakazakii*[J]. Food microbiology, 2021, 100: 103851.
- [32] JAMEELAH M, DEWANTI-HARIYADI R, NURJANAH S. Expression of *rpoS*, *ompA* and *hfq* genes of *Cronobacter sakazakii* strain Yrt2a during stress and viable but nonculturable state[J]. Food science and biotechnology, 2018, 27 (3) : 915–920.
- [33] IWASE T, OKAI C, KAMATA Y, et al. A straightforward assay for measuring glycogen levels and RpoS[J]. Journal of microbiological methods, 2018, 145: 93–97.
- [34] SRIKUMAR S, CAO Y, YAN Q Q, et al. RNA Sequencing-based transcriptional overview of xerotolerance in *Cronobacter sakazakii* SP291[J]. Applied and environmental microbiology, 2019, 85 (3) : e01993–18.
- [35] YANG C L, ZHOU Y, FAN J, et al. SpBADH of the halophyte *Sesuvium portulacastrum* strongly confers drought tolerance through ROS scavenging in transgenic *Arabidopsis*[J]. Plant physiology and biochemistry, 2015, 96: 377–387.
- [36] MALEK A A, CHEN C L, WARGO M J, et al. Roles of three transporters, CbcXWV, BetT1, and BetT3, in *Pseudomonas aeruginosa* choline uptake for catabolism[J]. Journal of bacteriology, 2011, 193 (12) : 3033–3041.
- [37] BREISCH J, AVERHOFF B. Identification of osmo-dependent and osmo-independent betaine-choline-carnitine transporters in *Acinetobacter baumannii*: role in osmoprotection and metabolic adaptation[J]. Environmental microbiology, 2020, 22 (7) : 2724–2735.

责任编辑: 郎婧

(上接第 9 页)

- 2021, 410: 124534.
- [48] WANG H, ZHANG M, SONG Y, et al. Carbon dots promote the growth and photosynthesis of mung bean sprouts[J]. Carbon, 2018, 136: 94–102.
- [49] ZHANG M, WANG H, SONG Y, et al. Pristine carbon dots boost the growth of *Chlorella vulgaris* by enhancing photosynthesis[J]. ACS Applied bio materials, 2018, 1 (3) : 894–902.
- [50] WANG H, KANG Y, YANG N, et al. Inhibition of UV-B stress in lettuce through enzyme-like *Scutellaria baicalensis* carbon dots[J]. Ecotoxicology and environmental safety, 2022, 246: 114177.
- [51] JI Y, YUE L, CAO X, et al. Carbon dots promoted soybean photosynthesis and amino acid biosynthesis under drought stress: reactive oxygen species scavenging and nitrogen metabolism[J]. Science of the total environment, 2023, 856: 159125.
- [52] 王硕, 贾潇倩, 何璐, 等. 作物对于旱胁迫的响应机制及提高作物抗旱能力的调控措施研究进展[J]. 中国农学通报, 2022, 38 (29) : 31–44.
- [53] WATCHARAMONGKOL T, KHAOPUEAK P, SEESUEA C, et al. Green hydrothermal synthesis of multifunctional carbon dots from cassava pulps for metal sensing, antioxidant, and mercury detoxification in plants[J]. Carbon resources conversion, 2024, 7 (2) : 100206.
- [54] WANG C, JI Y, CAO X, et al. Carbon dots improve nitrogen bioavailability to promote the growth and nutritional quality of soybeans under drought stress[J]. ACS Nano, 2022, 16 (8) : 12415–12424.
- [55] 许荣华. 叶面喷施碳点降低土壤镉对水稻植物毒性的机制研究[D]. 保定: 河北大学, 2024.
- [56] CHEN Q, LIU B, MAN H, et al. Enhanced bioaccumulation efficiency and tolerance for Cd(II) in *Arabidopsis thaliana* by amphoteric nitrogen-doped carbon dots[J]. Ecotoxicology and environmental safety, 2019, 190: 110108.

责任编辑: 郎婧