

DOI:10.3969/j.issn.1003-5060.2024.05.015

# 丙二酸盐克罗诺杆菌 *rpoS* 基因突变株与回补株的构建

姚悦, 叶应旺, 凌娜, 王洋, 李杨

(合肥工业大学 食品与生物工程学院, 安徽 合肥 230601)

**摘要:**丙二酸盐克罗诺杆菌(*Cronobacter malonaticus*)在面对环境胁迫时,通过自身调节机制适应压力。*rpoS* 基因作为一种稳定期  $\sigma$  因子和压力应答过程中的主要调节因子,在细菌抵抗或耐受环境胁迫压力中发挥重要作用。文章运用 red 同源重组技术和质粒表达系统,构建 *C. malonaticus* G362 的 *rpoS* 基因缺失株  $\Delta rpoS$  和回补菌株  $\Delta rpoS$ -com,为研究丙二酸盐克罗诺杆菌中 *rpoS* 基因的功能提供遗传材料。生长曲线测定结果表明,*rpoS* 基因缺失未对正常培养条件下细菌生长产生显著影响。

**关键词:**丙二酸盐克罗诺杆菌;同源重组;质粒表达;*rpoS* 基因

中图分类号:Q784

文献标志码:A

文章编号:1003-5060(2024)05-0673-05

## Construction of *rpoS* gene mutant and complement strains of *Cronobacter malonaticus*

YAO Yue, YE Yingwang, LING Na, WANG Yang, LI Yang

(School of Food and Biological Engineering, Hefei University of Technology, Hefei 230601, China)

**Abstract:** *Cronobacter malonaticus* adapts to stress through self-regulation mechanism in the face of environmental stress. As a stable phase  $\sigma$  factor and a major regulator in the process of stress response, *rpoS* gene plays an important role in bacterial resistance or tolerance to environmental stress. In this paper, red homologous recombination technology and plasmid expression system were used to construct the *rpoS* gene deletion strain  $\Delta rpoS$  and complement strain  $\Delta rpoS$ -com of *C. malonaticus* G362, providing genetic materials for studying the function of *rpoS* gene in *C. malonaticus*. The results of growth curve measurement showed that *rpoS* gene deletion had no significant effect on bacterial growth under normal culture conditions.

**Key words:** *Cronobacter malonaticus*; homologous recombination; plasmid expression; *rpoS* gene

## 0 引言

克罗诺杆菌属婴幼儿配方奶粉中的高风险致病菌,是感染新生儿导致患脑膜炎、败血症和坏死性结肠炎等疾病的元凶<sup>[1]</sup>。克罗诺杆菌共 7 种,其中除丙二酸盐克罗诺杆菌(*Cronobacter malonaticus*)外,所有亚型都证实与感染病例有关<sup>[2]</sup>。

奶粉加工与储藏过程中,采取一系列的措施来灭活或者抑制克罗诺杆菌生长,如氧化剂、乙醇、高温、低温、酸碱、高盐等<sup>[3]</sup>。克罗诺杆菌的环境耐受性很强,使得其在加工保存过程中极难被杀死,但其耐受逆境的分子机制尚未阐明<sup>[4]</sup>。调控因子 *rpoS* 在细菌非应激条件下的生长不是必需的,但是 *rpoS* 基因缺失菌株对环境应激极其敏感<sup>[5]</sup>。

收稿日期:2023-02-07;修回日期:2023-04-06

基金项目:国家自然科学基金资助项目(32102104;32230084);安徽省自然科学基金杰出青年基金资助项目(2208085J11)

作者简介:姚悦(1997—),女,安徽全椒人,合肥工业大学硕士生;

叶应旺(1977—),男,安徽合肥人,博士,合肥工业大学教授,博士生导师。

文献[6]研究表明, *rpoS* 蛋白在外部环境或者生存状态发生改变时, 具有普遍应答作用, 主要是对某些代谢途径正调控, 存在少量负调控, 并且 *rpoS* 基因对胁迫耐受性的作用与属种多样性相关。文献[2]利用 red 同源重组技术构建阪崎克罗诺杆菌 *rpoS* 缺陷株, 了解基因缺失对阪崎克罗诺杆菌的作用。但是对于丙二酸盐克罗诺杆菌 *rpoS* 基因缺失株构建的相关报道并不多。本研究构建 *C. malonaticus* 的缺失株  $\Delta rpoS$  与回补菌株  $\Delta rpoS$ -com, 为研究 *rpoS* 基因对 *C. malonaticus* 耐受性的作用提供遗传材料。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 菌株、质粒和引物

聚合酶链式反应 (polymerase chain reaction, PCR) 扩增引物及用途见表 1 所列。表 1 中, 下划线为酶切位点。丙二酸盐克罗诺杆菌野生株 *C. malonaticus* G362 由本实验室从食品中分离所得; *E. coli* DH5 $\alpha$ 、*E. coli*  $\beta$ 2155 购自南京诺唯赞生物有限公司; pBR322、pCVD442 购自碧森灵质粒平台。

表 1 PCR 扩增引物及用途

名称	序列(5'→3')	用途
<i>rpoS</i> -US-F	ATAGTCGACTATGTTAACCGAGCGACGGCCTTG	扩增上游同源臂片段
<i>rpoS</i> -US-R	GTGAGGGTTATTGACCAGCGCGTC	
<i>rpoS</i> -DS-F	GCCGCCGCGAAGTTACTGAAAGAG	扩增下游同源臂片段
<i>rpoS</i> -DS-R	ATAGTCGACGTTCTAATCCCACAACCGGATTACTG	
<i>rpoS</i> -Cm-F	GACGCGCTGGTCAATAACCTCACCATATGAATATCCTCCTTAGTTCCTATTC	扩增氯霉素抗性基因
<i>rpoS</i> -Cm-R	CTCTTTTCAGTAACCTTCGCGGCGGAGCTGCTTCGAAGTTCCTA	
<i>rpoS</i> -out-F	GCACTATCACTCCCGCTTCATTGC	外侧鉴定引物
<i>rpoS</i> -out-R	CTTGCGTCATGGCAATTTAGGACAAATACG	
pCVD442-F	ATTTGCAGACTACGGGCCTAAA	转化鉴定引物
pCVD442-R	ACTTAACGGCTGACATGGGAAT	
<i>rpoS</i> -com-F	CCC <u>AAGCTT</u> ATGAATCAGAATACGCTGAAAG	扩增 <i>rpoS</i> 基因片段
<i>rpoS</i> -com-R	CGCGGATCCTTATTCGCGGAACAGCG	
pBR322-F	AAATAGGCGTATCACGAGGC	转化鉴定引物
pBR322-R	AGAGCCTTCAACCCAGTCAG	

#### 1.1.2 主要试剂与仪器

细菌基因组 DNA 提取试剂盒 (离心柱型) (天根科技 (北京) 有限公司); DNA Marker, 2 $\times$  Taq PCR Master Mix (大连宝生物工程股份有限公司); PCR 产物纯化试剂盒 (生工生物工程 (上海) 股份有限公司)。各规格移液枪 (德国 Eppendorf 公司); JMY-100C 小型恒温培养振荡器 (上海久贸有限公司); DW-86L-416G 超低温冰箱 (青岛海尔有限公司); SW-CJ-1FD 无菌超净工作台 (苏州净化设备有限公司); T100 基因扩增仪 (美国 BIO-RAD 公司); GIS2020 凝胶成像系统 (上海天能科技有限公司)。

#### 1.1.3 培养基

LB 肉汤: 胰蛋白胨 10.0 g/L, 酵母浸粉 5.0 g/L, NaCl 10.0 g/L。固体 LB 培养基在 LB 肉汤中加入 15 g/L 的琼脂粉。筛选平板: 在 LB 固体培养基加入氯霉素 (CM) 和氨苄霉素 (Amp) 至终质量浓度分别为 50、17  $\mu$ g/mL; 阪崎显色培

养基<sup>[1]</sup>。

## 1.2 方法

### 1.2.1 敲除质粒的构建

融合 PCR 扩增打靶片段过程如图 1 所示, 采用融合 PCR 法 (两轮 PCR 扩增), 扩增含 *rpoS* 基因同源臂的 *Cm<sup>r</sup>* 基因 *rpoSin* :: *Cm<sup>r</sup>*。

第 1 轮 PCR 扩增得到上游同源臂 *rpoS*-US、同源臂 *rpoS*-DS、氯霉素抗性基因表达框 *Cm<sup>r</sup>*, 电泳回收条带。第 2 轮 PCR 反应体系: *rpoS*-US、*rpoS*-DS、*Cm<sup>r</sup>*、10 $\times$  pfu buffer 各 5  $\mu$ L, *rpoS*-US-F、*rpoS*-DS-R、pfu DNA polymerase (5 U/ $\mu$ L) 各 0.5  $\mu$ L, dNTP 0.4  $\mu$ L, 用去离子水补足至 50  $\mu$ L。

PCR 扩增反应程序如下: 95  $^{\circ}$ C、5 min, 95  $^{\circ}$ C、30 s, 58  $^{\circ}$ C、60 s, 72  $^{\circ}$ C、1 min, 共计 34 个循环; 72  $^{\circ}$ C、10 min。琼脂糖凝胶电泳验证条带大小, 纯化回收片段。

取 pCVD442、*rpoSin* :: *Cm<sup>r</sup>* 使用 *sa* II 核酸内切酶 16  $^{\circ}$ C 过夜酶切, 再使用 T4 DNA ligase 连

接,得到敲除质粒 pCVD442-*rpoS*in::Cm<sup>r</sup>(具体步骤按照说明书操作)。热激<sup>[2]</sup>后转化到 *E. coli* DH5 $\alpha$  感受态细胞中,涂布于筛选平板中过夜培养。

挑取阳性单菌落于 LB 肉汤(含有 Amp 和 Cm)中,37 °C、180 r/min 培养 12 h。使用 pCVD442-F/R 引物进行菌落 PCR,选取 3 800 bp 左右目的条带的菌落,送上海生工测序验证。菌落 PCR 反应体系(20  $\mu$ L):2 $\times$ PCR Mix10  $\mu$ L,引物 F 0.5  $\mu$ L,引物 R0.5  $\mu$ L,菌液 1  $\mu$ L,ddH<sub>2</sub>O 23  $\mu$ L。

菌落 PCR 反应程序如下:95 °C、5 min,95 °C、30 s,58 °C、30 s,72 °C、1 min,共 3 个循环。

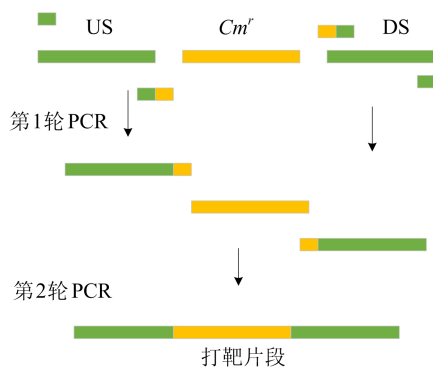


图1 融合 PCR 扩增打靶片段

### 1.2.2 基因的敲除

从菌液中提取质粒,将质粒电转化<sup>[2]</sup>进入  $\beta$ 2155 菌株,检验阳性克隆,得到结合转化供体菌株  $\beta$ 2155/pCVD442-*rpoS*in::Cm<sup>r</sup>。*C. malonaticus* 受体菌株划线培养,挑取单菌落接种于 LB 肉汤中培养至 A 值为 0.4~0.6。各取 500  $\mu$ L 于 EP 管中混合,4 000 r/min 离心 3 min,并收集菌体<sup>[7]</sup>。将菌体重悬于新鲜 LB(含 0.5 mmol/L DAP)中,取 100  $\mu$ L 铺到 0.22  $\mu$ m 无菌滤膜上,30 °C 过夜培养<sup>[8]</sup>。生理盐水吹洗滤膜,取混合菌液涂布于阪崎显色培养基(含 17  $\mu$ g/mL 的氯霉素)上,30 °C 过夜培养。挑取颜色为绿色的单克隆,接种于含有 17  $\mu$ g/mL 氯霉素和 1% 蔗糖的 LB 培养基,3 °C 下 180 r/min 摇床过夜培养,进行菌落 PCR(引物 *rpoS*-out-F/R)。同源重组过程如图 2 所示,若基因敲除成功,则扩增出 2 000~2 500 bp 电泳条带;若敲除失败则扩增出大约 1 000 bp 的条带;若同时扩增出 2 个条带,则疑似有一部分菌丢失了 pCVD442-*rpoS*in::Cm<sup>r</sup> 质粒,平板划线挑取单克隆放入含有 1% 蔗糖的 LB 肉汤中培养,继续

菌落 PCR 验证,直至只有 2 000~2 500 bp 的条带出现<sup>[9]</sup>。

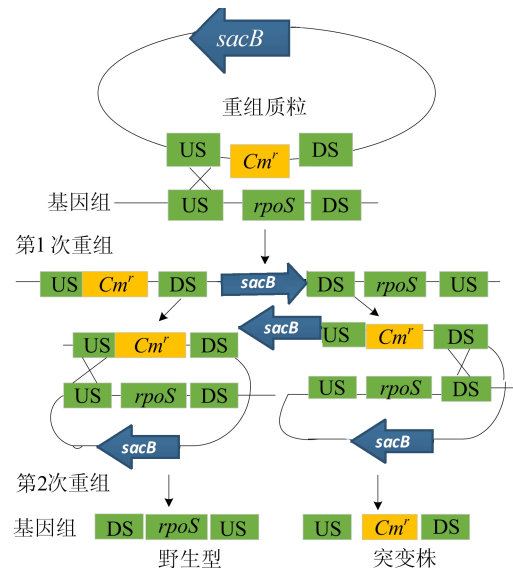


图2 同源重组过程示意图

### 1.2.3 回补菌株的构建

PCR 扩增(引物 *rpoS*-com-F/R)出 *rpoS* 带有 *Hind* III *Bam* H I 酶切位点的片段,并提取质粒 pBR322。经过限制性核酸内切酶进行双酶切,并且电泳回收,回收产物 T4 DNA ligase 连接,得到回补质粒 pBR322-*rpoS*。将回补质粒热激转化至 *E. coli* DH5 $\alpha$  感受态中,涂布于含有 50  $\mu$ g/mL Amp 的 LB 平板上。挑取阳性单克隆于 LB 肉汤中,37 °C、180 r/min 过夜培养,使用引物 pBR322-F/R 进行菌落 PCR,挑取条带为 1 500 bp 左右条带的菌落,送与上海生物工程公司测序验证。提取质粒 pBR322-*rpoS*,将质粒电转化进入  $\beta$ 2155 菌株<sup>[1]</sup>。结合转化实验同上,将 pBR322-*rpoS* 转入 *C. malonaticus* 体内,菌落 PCR 验证。

### 1.2.4 不同菌株生长曲线绘制

配制 LB 肉汤各 5 mL 装入 100 mL 小锥形瓶中灭菌。将过夜培养的野生型(wild type, WT)、 $\Delta$ *rpoS* 和  $\Delta$ *rpoS*-com 菌株以 1% 的接种量接种于 LB 肉汤中。每隔 1 h 取样,测定 A<sub>600</sub> 值,并使用 Origin 绘制生长曲线。在 3、4、6、12 h 的数据用 SPSS 软件进行 ANOVA 单因素分析<sup>[10]</sup>。

## 2 结果与分析

### 2.1 $\Delta$ *rpoS* 和 $\Delta$ *rpoS*-com 菌株的构建结果

重组质粒构建结果如图 3a 所示。图 3a 中:

泳道 1 为融合 PCR 产物;泳道 2 为重组质粒载体。由图 3a 可知,成功获得了打靶片段与重组质粒。

同源重组结果如图 3b 所示。图 3b 中:泳道 4 重组未成功;泳道 3 的菌株产生 2 个条带,疑似有部分菌株重组成功。

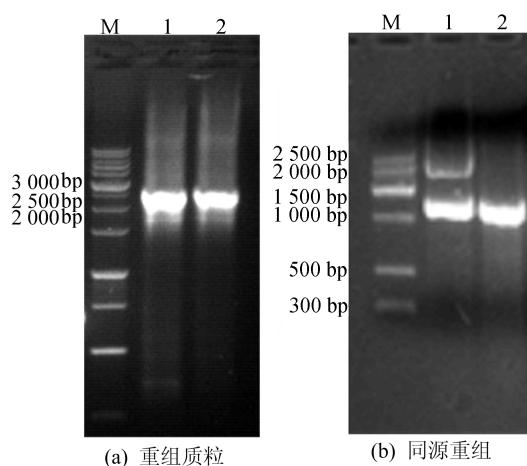


图 3 重组质粒与同源重组

同源重组验证结果如图 4a 所示。图 4a 中:泳道 1 为  $\Delta rpoS$  缺陷株,大小约为 2 265 bp;泳道 2 为 WT 野生株,大小约为 1 200 bp。采用 red 同源重组技术将  $rpoS$  基因与氯霉素表达框  $Cm^r$  交换。以  $rpoS$ -out-F/R 为引物,对 *C. malonaticus* 基因缺失株行菌落 PCR 验证。若插入失败,扩增产物大小为 1 256 bp;若插入成功,扩增产物大小为 2 265 bp。由图 4a 可知,成功构建了突变菌株  $\Delta rpoS$ 。

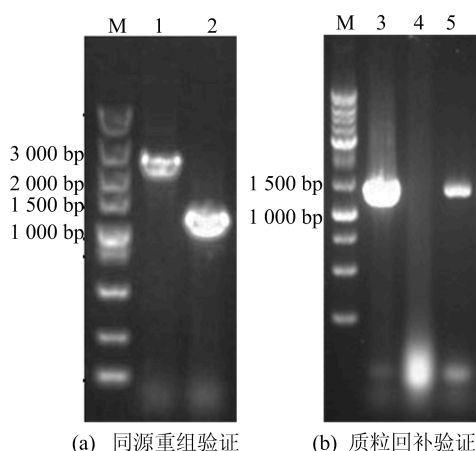


图 4 同源重组验证与质粒回补验证

质粒回补验证结果如图 4b 所示。图 4b 中:泳道 3 为 pBR322- $rpoS$  质粒,大小为 1 259 bp;泳

道 4 为野生型,没有条带;泳道 5 为  $\Delta rpoS$ -com,大小为 1 259 bp。因为 pBR322 的复制子与 pCVD442 不同,所以可以将 pBR322- $rpoS$  质粒导入基因缺失株  $\Delta rpoS$  中获得回补菌株  $\Delta rpoS$ -com。以 pBR322-F/R 为引物进行菌落 PCR 验证,若回补失败则不出现条带,若回补完成,扩增产物大小为 1 300 bp 左右。由图 4b 可知,成功构建了回补菌株  $\Delta rpoS$ -com。

## 2.2 生长曲线的绘制分析

生长曲线表示微生物生长时间与细胞数量变化的关系<sup>[11]</sup>。一般认为  $A_{600}$  值在 0.4~0.6 之间时,细菌生长进入对数期。按照 1.2.4 的方法检测并绘制生长曲线,如图 5 所示。由图 5 可知:菌株 WT、 $\Delta rpoS$ 、 $\Delta rpoS$ -com 在 3、6、12 h 没有显著性差异( $P>0.01$ ),达到对数期的时间都在 3 h 左右,在 9 h 基本达到稳定期;但在 4 h 时,WT 株的  $A$  值为 1.760,显著性( $P<0.05$ )高于  $\Delta rpoS$  的  $A$  值 0.862,与回补株的  $A$  值 1.460 没有显著性差异。基因缺失株到达稳定期的时间也要慢于野生株和回补菌株。从总体上看, $rpoS$  基因的缺失会使丙二酸盐克罗诺杆菌在正常条件下的生长滞后,但是影响较小,这一结果与在沙门氏菌<sup>[5]</sup>中的结果一致。

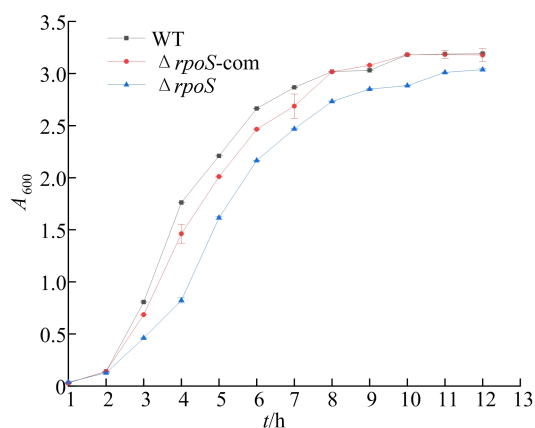


图 5 WT、 $\Delta rpoS$ 、 $\Delta rpoS$ -com 的生长曲线

## 3 结 论

本实验主要对丙二酸盐克罗诺杆菌  $rpoS$  基因进行研究,成功构建丙二酸盐克罗杆菌  $rpoS$  基因的突变株与回补株。整体上看, $rpoS$  基因缺失没有显著影响丙二酸盐克罗诺杆菌在 LB 培养基中的生长,为  $rpoS$  的生物学功能研究提供良好的遗传材料。

## [参 考 文 献]

- [1] 汪馨. *Psp* 系统在丙二酸盐克罗诺杆菌干燥胁迫中的作用探讨[D]. 合肥:合肥工业大学,2021.
- [2] 战捷. 调控因子 *RpoS* 和 *SspA* 在阪崎克罗诺杆菌抗环境胁迫中的作用[D]. 无锡:江南大学,2021.
- [3] 凌娜. 中国即食蔬菜食品中克罗诺杆菌的遗传多样性与酸胁迫响应机制研究[D]. 广州:华南理工大学,2019.
- [4] FG A, MPA B, MIGUEL P, et al. The role of the general stress response regulator *RpoS* in *Cronobacter sakazakii* biofilm formation-science direct[J]. Food Research International, 2020, 136(1):0963-9969.
- [5] 梁运改, 桂荫, 王顺, 等. 鼠伤寒沙门菌 *rpoS* 基因缺失菌株的构建及 *rpoS* 因子在环境胁迫下的作用[J]. 食品科学, 2018, 39(6):141-147.
- [6] ADNAN M, SOUSA A M, MACHADO I, et al. Role of *boLA* and *rpoS* genes in biofilm formation and adherence pattern by *Escherichia coli* K-12 MG1655 on polypropylene, stainlesssteel, and silicone surfaces[J]. Acta Microbiologica Et Immunologica Hungarica, 2017, 64(2):1-11.
- [7] BAZIRE A, DIAB F, JEBBAR M, et al. Influence of high salinity on biofilm formation and benzoate assimilation by *Pseudomonas aeruginosa*[J]. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 2007, 34:5-8.
- [8] ALVAREZ-ORDONEZ A, BEGLEY M, HILL C, et al. Polymorphisms in *rpoS* and stress tolerance heterogeneity in natural isolates of *Cronobacter sakazakii*[J]. Applied & Environmental Microbiology, 2012, 78(11):3975-3984.
- [9] AMEELAH M, DEWANTI-HARIYADI R, NURJANAH S, et al. 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, 27:915-920.
- [10] XU Z, LIU Z, SOTEYOME T, et al. Impact of *pmrA* on *Cronobacter sakazakii* planktonic and biofilm cells: a comprehensive transcriptomic study[J]. Food Microbiology, 2021, 98:103785-103789.
- [11] GAO Z J, GE C T, BAKER R C, et al. Evaluation of potential for butyl and heptyl para-hydroxybenzoate enhancement of thermal inactivation of *Cronobacter sakazakii* during rehydration of powdered infant formula and nonfat dry milk[J]. Journal of Food Protection, 2022, 85(8):1133-1141.
- (责任编辑 张 镛)
- 
- (上接第 659 页)
- [5] BEAK S, VAN HIEU B, PARK G, et al. A new binary tree algorithm implementation with huffman decoder on FPGA [C]//2010 Digest of Technical Papers International Conference on Consumer Electronics (ICCE). [S. l. : s. n. ], 2010: 437-438.
- [6] RIGLER S, BISHOP W, KENNINGS A. FPGA-based lossless data compression using huffman and LZ77 algorithms [C]//2007 Canadian Conference on Electrical and Computer Engineering. [S. l. : s. n. ], 2007:1235-1238.
- [7] BONNY T, HENKEL J. Efficient code density through look-up table compression[C]//Automation & Test in Europe Conference & Exhibition 2007 Design. [S. l. : s. n. ], 2007:1-6.
- [8] DUDA J. Asymmetric numeral systems[EB/OL]. [2023-02-05]. <https://www.semanticscholar.org/paper/Asymmetric-numeral-systems-Duda/3b003beb9d8186c51b4912933b1ff75eef0a3c6c>.
- [9] DUDA J, NIEMIEC M. Lightweight compression with encryption based on asymmetric numeral systems [EB/OL]. [2023-02-05]. <https://dl.acm.org/doi/10.34768/amcs-2023-0004>.
- [10] NAJMABADI S M, TUNGAL H S, TRAN T H, et al. Hardware-based architecture for asymmetric numeral systems entropy decoder[C]//2017 Conference on Design and Architectures for Signal and Image Processing (DA-SIP). [S. l. : s. n. ], 2017:1-6.
- [11] DUDA J. Asymmetric numeral systems: entropy coding combining speed of huffman coding with compression rate of arithmetic coding [EB/OL]. [2023-02-05]. <https://www.semanticscholar.org/paper/Asymmetric-numeral-systems%3A-entropy-coding-speed-of-Duda/bbcd5711d2f02e5fe07316669264334d193e88>.
- [12] YOKOO H. On the stationary distribution of Asymmetric Binary Systems[C]//2016 IEEE International Symposium on Information Theory (ISIT). [S. l. ]: IEEE, 2016: 11-15.
- (责任编辑 张 镛)