

贾宪波, 刘方晨, 赵恪, 等. 粘质沙雷氏菌 FZSF02 中转录调控因子 OmpR 的生物学功能 [J]. 福建农业学报, 2021, 36 (12): 1491-1498.

JIA X B, LIU F C, ZHAO K, et al. Biological Functions of Transcription Factor OmpR in *Serratia marcescens* FZSF02 [J]. *Fujian Journal of Agricultural Sciences*, 2021, 36 (12): 1491-1498.

粘质沙雷氏菌 FZSF02 中转录调控因子 OmpR 的生物学功能

贾宪波¹, 刘方晨², 赵恪², 林俊杰³, 方宇¹, 陈济琛^{1*}

(1. 福建省农业科学院土壤肥料研究所, 福建 福州 350003; 2. 福建农林大学资源与环境学院, 福建 福州 350001; 3. 福建农林大学生命科学学院, 福建 福州 350001)

摘要:【目的】探索 EnvZ/OmpR 双组分调控系统的效应蛋白 OmpR 对粘质沙雷氏菌 FZSF02 灵菌红素合成及其他生物学特性的影响。【方法】同源重组法构建 *ompR* 敲除菌株, 琼脂平板产色试验和 qPCR 检测 OmpR 对菌株灵菌红素合成的影响, 结晶紫染色法和琼脂平板法等研究基因敲除菌株生物被膜形成能力, 运动性和对不同环境胁迫因素的耐受性。【结果】序列分析显示 OmpR 为序列高度保守的蛋白。PCR 验证证明 *ompR* 基因敲除成功; 与野生型菌株相比 $\Delta ompR$ 失去灵菌红素合成能力, qPCR 试验显示灵菌红素合成基因簇中 3 个关键基因 *pigA*、*pigF* 和 *pigN* 转录水平分别降低为野生型菌株的 3.8%, 2.0% 和 2.1%; $\Delta ompR$ 菌株生物被膜生成能力较野生型降低 37.5% (37 °C) 和 15.1% (27 °C); OmpR 对该菌的生长能力、运动能力和响应环境胁迫的能力无明显影响。【结论】*ompR* 为一新报道的特异性调控粘质沙雷氏菌灵菌红素合成的基因, 且该基因对该菌生物被膜的形成有重要影响。

关键词: 粘质沙雷氏菌; OmpR; 灵菌红素; 生物学特性

中图分类号: Q 939

文献标志码: A

文章编号: 1008-0384 (2021) 12-1491-08

Biological Functions of Transcription Factor OmpR in *Serratia marcescens* FZSF02

JIA Xianbo¹, LIU Fangchen², ZHAO Ke², LIN Junjie³, FANG Yu¹, CHEN Jichen^{1*}

(1. Institute of Soil and Fertilizer, Fujian Academy of Agricultural Sciences, Fuzhou, Fujian 350003, China; 2. College of Resources and Environment, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou, Fujian 350001, China; 3. College of Life Sciences, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou, Fujian 350001, China)

Abstract: 【Objective】 Biological functions of the regulatory protein ompR in the two component EnvZ/OmpR system, including prodigiosin-producing ability and other biological characteristics, of *Serratia marcescens* FZSF02 were studied.

【Methods】 Homologous recombination was used to construct ompR-knockout *S. marcescens* FZSF02. Effect of OmpR on the prodigiosin-producing ability was examined by LB agar plate incubation and qPCR. Methods of crystal violet staining, agar plate incubation, and others were applied to determine the biofilm-forming, mobility, and stress adaptation abilities of the transcription factor protein under various environmental stresses. 【Results】 OmpR was a protein with high conserved amino acid sequences. An ompR- deleted strain, FZSF02 $\Delta ompR$, was successfully obtained by homologous recombination and confirmed by PCR. As a result, FZSF02 $\Delta ompR$ lost prodigiosin-producing ability that possessed by the wild strain. The transcriptional levels of *pigA*, *pigF*, and *pigN* of the prodigiosin biosynthesis gene cluster in FZSF02 $\Delta ompR$ were respectively 3.8%, 2.0% and 2.1% of the wild type strain. The biofilm formation of FZSF02 $\Delta ompR$ declined 37.5% (at 37 °C) and 15.1% (at 27 °C) from its wild counterpart. On the other hand, OmpR exhibited no significant effect on the growth, mobility, or response to the environmental stress. 【Conclusion】 OmpR was a newly reported gene that specifically regulated the prodigiosin biosynthesis in *S. marcescens*. It also significantly affected the biofilm formation but not on the growth, mobility, or stress response.

Key words: *Serratia marcescens*; OmpR; prodigiosin; biological characteristics

收稿日期: 2021-10-08 初稿; 2021-11-12 修改稿

作者简介: 贾宪波 (1986-), 男, 博士, 助理研究员, 研究方向: 环境微生物 (E-mail: xbj2011@163.com)

* 通信作者: 陈济琛 (1964-), 男, 研究员, 研究方向: 农业微生物 (E-mail: chenjichen2001@163.com)

基金项目: 国家自然科学基金青年基金项目 (31800068); 福建省农业科学院科技创新团队建设项目 (CXTD2021002-3)

0 引言

【研究意义】粘质沙雷氏菌 (*Serratia marcescens*) 是肠杆菌科中的一类革兰氏阴性短杆状细菌, 该菌在土壤、水体等环境中广泛分布^[1]。粘质沙雷氏菌发现于 1819 年, 20 世纪 70 年代确认该种中某些菌株为条件致病菌^[2]。近年陆续发现, 粘质沙雷氏菌可以产生多种有潜力的次生代谢物质, 如肽类抗生素, 生物表面活性剂 serrawettin W1 和灵菌红素^[3-5]等。该菌也可作为底盘微生物高产 N-乙酰神经氨酸^[6]、乙偶姻和丁二醇等高附加值产品^[7-8]。因此, 粘质沙雷氏菌已成为有重要前景的工业微生物菌种, 研究其产物合成及调控相关基因以揭示其产物合成机制有助于挖掘其生产潜力。【前人研究进展】灵菌红素类物质由于具有抗菌和抗肿瘤等生物活性而成为近年研究热点, 粘质沙雷氏菌是特异性产灵菌红素的最主要菌种^[9]。研究表明, 粘质沙雷氏菌合成灵菌红素受多个基因调控, 包括细菌群体感应相关基因, 双组分系统相关基因和其他调控基因^[10]。双组分调控系统广泛存在于细菌中, 参与压力响应、细菌形态、运动性、菌毛合成及毒力表现等^[11], 典型的双组分系统由作为传感器的跨膜组氨酸激酶和作为效应分子的一个细胞质蛋白组成^[12]。目前已知双组分系统 PigQ/PigW、PhoB/PhoR 和 EepR/EepS 正调控粘质沙雷氏菌灵菌红素的合成^[13-15], 双组分系统 RssB/RssA^[16]对灵菌红素的合成起到负调控作用。更多灵菌红素合成相关调控基因的揭示有助于理解该类菌株合成灵菌红素的调控机制和规律。【本研究切入点】EnvZ/OmpR 是一个典型的双组分调控系统, 但是其对粘质沙雷氏菌灵菌红素合成及其他生物学特性的影响知之甚少。【拟解决的关键问题】利用从一株高产灵菌红素粘质沙雷氏菌 FZSF02 菌株^[17]的 Tn5 转座子突变体库中获得一株 *ompR* 突变株, 检测 *ompR* 敲除对菌株生物学特性的影响, 初步揭示 EnvZ/OmpR 双组分调控系统对粘质沙雷氏菌的作用。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 菌株和质粒 大肠杆菌 DH5 α 由本实验室保存, 粘质沙雷氏菌 FZSF02 由本实验室自土壤中分离, 粘质沙雷氏菌 FZSF02*ompR*:: Tn5 源自本实验室由 FZSF02 构建的 Tn5 转座子突变体库。

1.1.2 主要试剂和仪器 供试培养基及抗生素购自生工生物工程 (上海) 股份有限公司, 高保真 DNA 聚

合酶 PrimeSTAR[®] Max DNA Polymerase (Takara, R045A), 克隆试剂盒 Zero Background pTOPO-Blunt Simple Cloning Kit 购自北京艾德莱生物科技有限公司, 转座子突变试剂盒 EZ-Tn5[™] <KAN-2>Tnp Transposome[™] Kit (TSM99K2, Epicentre), 细菌总 RNA 提取试剂盒 (TIANGEN, DP430) 购自天根生化科技 (北京) 有限公司, 琼脂粉 (BD: Becton, Dickinson and Company), 吐温 80 (国药集团), 脱脂奶粉 (BD: Becton, Dickinson and Company), 血琼脂平板 (青岛海博生物), 96 孔细胞培养板 (Greiner Bio-One, No.655180), 美国 MD SpectraMax190 全波长酶标仪, 电转化仪 Gene Pulser Xcell (Bio-Rad)。

1.2 试验方法

1.2.1 目的基因的序列分析 调取目的基因的编码蛋白序列, 通过 NCBI (National Center for Biotechnology Information) 网站中 blastp 功能比对查找与目的蛋白同源的蛋白序列并预测蛋白的功能, 挑选隶属不同种属的同源蛋白序列, 应用 MEGA5.0 软件 Neighbor-joining 法构建该蛋白的系统发育树。

1.2.2 电击转化感受态细胞的制备 LB 琼脂平板上挑取 FZSF02 菌株 1 个单菌落置于 50 mL 液体 LB 培养基中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 、180 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 培养 12 h 作为种子液, 以 1% (v/v) 的接种量转接至 50 mL 液体 LB 培养基中 37 $^{\circ}\text{C}$ 、180 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 培养至 OD_{600} 约 1.0 时将盛有菌液的摇瓶冰浴 30 min, 冰浴结束后转移至 50 mL 离心管于 4 $^{\circ}\text{C}$ 离心机中 5 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10 min; 弃上清后用 40 mL 预冷的无菌水洗涤后 4 $^{\circ}\text{C}$ 离心 10 min, 重复用无菌水洗涤离心 1 次; 用 40 mL 的冰预冷的 10% 甘油洗涤后 4 $^{\circ}\text{C}$ 离心 10 min, 重复用 10% 甘油洗涤离心一次; 用 0.5 mL, 10% 甘油悬浮菌体沉淀, 以 100 μL 每管分装至 1.5 mL 离心管后保存在 -80 $^{\circ}\text{C}$ 备用。

1.2.3 突变株及敲除菌株的获得 *ompR* 突变株的构建应用转座子突变试剂盒 EZ-Tn5[™] <KAN-2>Tnp Transposome[™] Kit (TSM99K2, Epicentre)。转座子插入位置的鉴定应用 High TAIL-PCR^[18-19]。*ompR* 基因的敲除应用同源重组法, 扩增含有启动子的卡那抗性基因, 应用 *ompR* 前端引物 OmpRFF 和 OmpRFR 扩增 *ompR* 上游同源臂, 应用 OmpRBF 和 OmpRBR 扩增 *ompR* 基因的下游同源臂, 将 3 段序列通过重叠 PCR (Overlap PCR) 拼接后连接 Zero Background pTOPO-Blunt 质粒, 在氨苄青霉素和卡那霉素双抗性 LB 琼脂平板上筛选阳性克隆子。以阳性克隆子质粒为模板应用引物 OmpRFF 和 OmpRBR 扩增获得含有 *ompR* 上游同源臂、卡那霉素抗性基因和 *ompR* 下游

同源臂的 DNA 片段，片段经纯化后用灭菌超纯水洗脱。上述 PCR 扩增所用引物详细序列见表 1。通过电击转化将上述 DNA 片段转化 FZSF02 野生型菌株，电转参数为：25 μF , 200 ohm , 1 800 V。在卡那霉素质量浓度为 100 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 LB 琼脂平板上挑取单克隆验证。

1.2.4 细菌生长曲线测定 挑单菌落至 50 mL 液体培养基中，37 $^{\circ}\text{C}$ 、180 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 培养 FZSF02 野生型菌株 WT 和基因敲除菌株 ΔompR 过夜作为种子液，调整种子液含量至 OD_{600} 为 1.0，分别以 0.5% 的接种量转接 WT 和 ΔompR 至 50 mL 的 LB 液体培养基中，分别于 27 $^{\circ}\text{C}$ 和 37 $^{\circ}\text{C}$ ，180 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 培养，每隔 3 h 取样测定菌液的 OD_{600} 值，绘制生长曲线。

1.2.5 产灵菌红素能力的检测 用接种环分别挑取野生型菌株 WT，转座子突变菌株 FZSF02 $\text{ompR}::\text{Tn5}$ 和基因敲除菌株 FZSF02 ΔompR 划线于分为三区的 LB 固体琼脂平板上，平板倒置于 27 $^{\circ}\text{C}$ 的恒温培养箱中培养 36 h 后观察菌株的产色能力。

表 1 供试引物

Table 1 Primers used in this study

引物 Primer	序列 Sequence (5'-3')
OmpRFF	ATGCAAGAGAATCATAAGATCCTG
OmpRFR	CATCGATGATGGTTGAGAGTCGGCGCCGATTTCAGCCCCA
OmpRBF	CTCGATGAGTTTTTCTAAGGCAAATTCAAACTGAACCTCGGC
OmpRBR	TCATGCCTTGCTGCCGTCCGGTAC
KanF	TCTCAACCATCATCGATGAATTGT
KanR	TTAGAAAACTCATCGAGCATCAA
pigAF	CGCCATCTTCCACGATTCAA
pigAR	CATTAGCCGACACTGTTCCA
pigFF	CACGGTATTCGGCGATGAC
pigFR	CACGGTGTTGCGAGAAGT
pigNF	CGTTACCTCTGGTCTATTG
pigNR	TGTCAGCACGATGTTTCAT
16SF	CGTTACTCGCAGAAGAAGCA
16SR	TCACCGCTACACCTGGAA

1.2.6 qPCR 试验 用细菌 RNA 提取试剂盒 (TIANGEN, DP430) 提取菌株的总 RNA，应用 FastKing gDNA Dispelling RT SuperMix (TIANGEN, KR118) 进行反转录获取菌株 cDNA，应用 TransStart[®] Green qPCR SuperMix (TransGen, AQ101) 进行 qPCR 扩增。qPCR 以 16SrDNA 作为内参基因 (引物为 16SF 和 16SR)，分别应用引物 pigAF/pigAR，pigFF/pigFR 和 pigNF/pigNR 检测灵菌红素合成基因簇中 *pigA*，*pigF* 和 *pigN* 基因的转录水平变化。qPCR 引物序列信息见表 1。

1.2.7 细菌生物被膜形成能力测定 分别挑取 WT

和 *ompR* 菌株单菌落至 50 mL 液体培养基中，于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、180 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 培养过夜作为种子液，调整 2 个种子液含量至 OD_{600} 值为 1.0 后以 0.5% 的接种量转接至 50 mL 的 LB 液体培养基中，从接种后的培养基中吸取 200 μL 至 96 孔细胞培养板中分别置于 27 $^{\circ}\text{C}$ 和 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养，设置多个复孔作为重复。培养 36 h 测定各孔 OD_{600} 后将培养板中的菌液吸出，用 PBS 缓冲液清洗各孔 5 次，倒置在滤纸上 10 min 以彻底除去孔中的 PBS，向各孔加入 200 μL 1% 的结晶紫染料，染色 30 min 后吸出结晶紫，用 PBS 清洗各孔 5 次，倒置放置培养板 10 min 除去残留的 PBS，用 200 μL 无水乙醇溶解各孔中的结晶紫，测定各孔 OD_{595} 值。菌株的产膜能力用各菌株 OD_{595}/OD_{600} 值表示。

1.2.8 细菌运动性测定 配制琼脂含量分别为 0.3% (m/V) 和 0.7% (m/V) 的 LB 琼脂平板，分别吸取 2 μL OD_{600} 值为 2.0 的 WT 和 ΔompR 菌液滴至各平板的中心位置，置于 27 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱培养，观察琼脂含量为 0.3% (m/V) 的平板上菌株的游动 (swimming) 能力，0.7% 琼脂平板上菌株的涌动 (swarming) 能力。

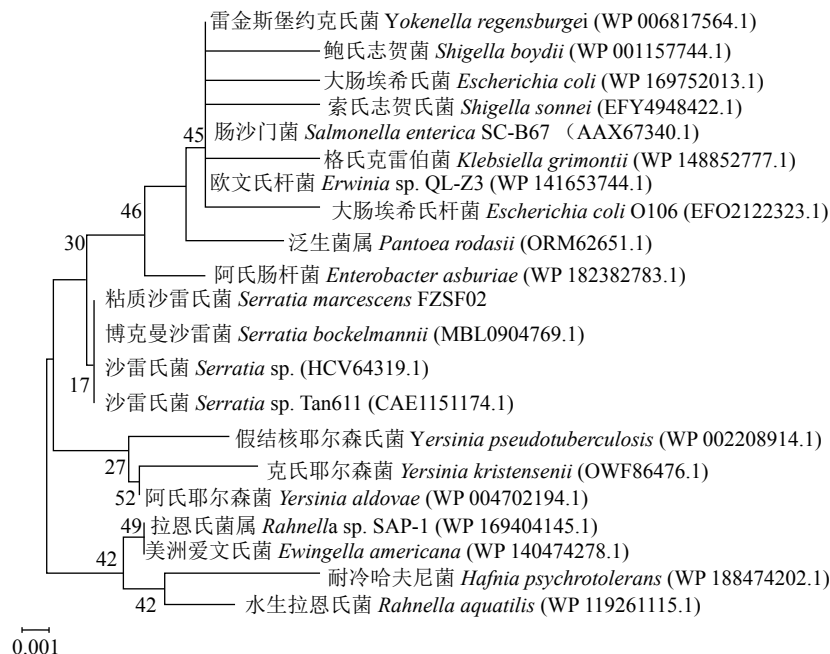
1.2.9 细菌产酶能力测定 制备脱脂奶粉含量为 1% (m/V) 的 LB 琼脂平板用以检测蛋白酶产生能力，吐温 80 含量为 1% (V/V) 的 LB 琼脂平板用以检测脂肪酶产生能力，应用血琼脂平板检测菌株的溶血素产生能力。将 2 μL OD_{600} 值为 1.0 的菌液滴于琼脂平板上，置于 27 $^{\circ}\text{C}$ 培养 48 h 通过观察蛋白酶和脂肪酶酶活圈的有无和大小比较菌株的产酶能力；27 $^{\circ}\text{C}$ 培养 24 h 和 7 d 观察溶血素活性。

1.2.10 菌株胁迫耐受性测定 菌株的胁迫耐受性实验参考 Brzostek 等^[20] 和 Gao 等^[21] 的方法进行。菌株分别在 pH 3.0 处理 10 min、55 $^{\circ}\text{C}$ 处理 5 min、15 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 过氧化氢处理 10 min 和 2 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的氯化钠处理 1 h 后稀释涂布 LB 琼脂平板进行菌落计数，以不经胁迫处理的菌株的菌数作为对照，分别计算经各胁迫因素处理后菌株的存活率。

2 结果与分析

2.1 OmpR 序列分析

粘质沙雷氏菌 FZSF02 菌株 *ompR* 基因有 720 个碱基 (NCBI 序列号：JQU42212.1)，编码由 239 个氨基酸组成的 OmpR 蛋白。序列比对分析显示其氨基酸序列在不同物种间较为保守，与从前 100 个目标序列 (Max target sequences) 中所选代表不同属种的 20 株菌的相似性为 99.16%~100.00%，系统发育树也显示出类似结果 (图 1)。其中，与 3 株沙雷氏菌属菌株的序列相似性为 100.00%，与大肠杆菌等其他序列相似性为 99.16%~99.58%。



注：括号中是对应物种蛋白在 GenBank 中的序列编号

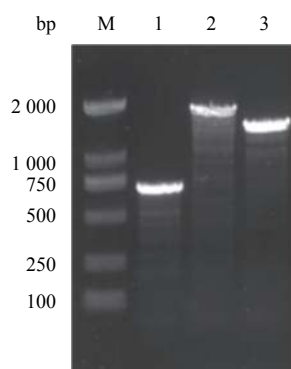
Note: Numbers in brackets are GenBank sequence accession for respective proteins.

图 1 粘质沙雷氏菌 FZSF02 菌株 *OmpR* 基于氨基酸序列的系统发育分析

Fig. 1 Phylogenetic analysis on *OmpR* from *S. marcescens* FZSF02 with its homologous proteins

2.2 基因敲除菌株的构建及鉴定

应用同源重组法构建 *ompR* 缺失菌株，挑取具卡那霉素抗性的疑似单菌落应用引物 *OmpRFF* 和 *OmpRBR* 验证，分别以 FZSF02 野生株和 Tn5 转座子突变株 FZSF02 *ompR*::Tn5 作为对照。结果（图 2）显示，以野生株 FZSF02 基因组为模板扩增得到大小



注：应用引物 *OmpRFF* 和 *OmpRBR* 进行 PCR。泳道 M：DNA 分子量标准；泳道 1：FZSF02 野生型；泳道 2：*ompR* 基因 Tn5 转座子插入突变体 FZSF02 *ompR*::Tn5；泳道 3：*ompR* 基因被敲除 120 bp 的菌株 FZSF02Δ*ompR*。

Note: PCR were carried out with primers *OmpRFF* and *OmpRBR*. Lane M: DNA marker; Lane 1: wild type FZSF02; Lane 2: FZSF02 *ompR*::Tn5 with *ompR* inserted by Tn5 transposon; Lane 3: FZSF02Δ*ompR* with 120 bp *ompR*-knockout.

图 2 粘质沙雷氏菌 FZSF02 菌株 *ompR* 基因敲除验证

Fig. 2 Agarose gel electrophoresis identification of *ompR*-knockout *S. marcescens* FZSF02

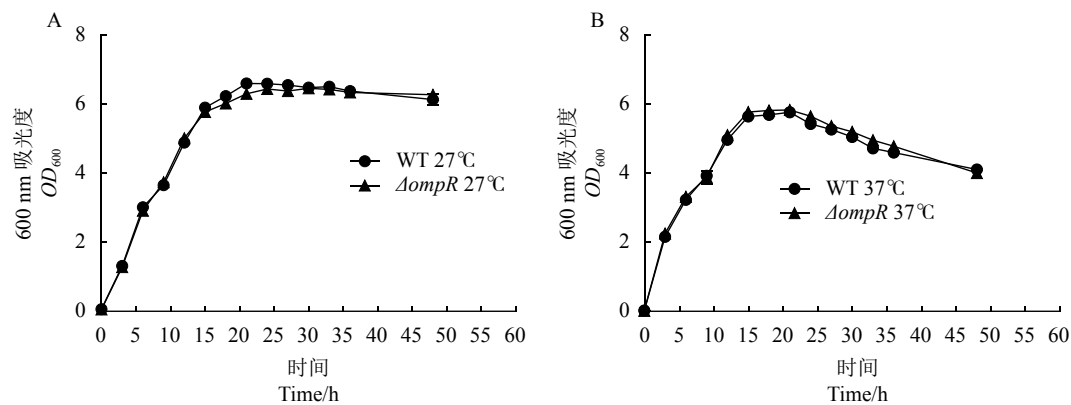
为 720 bp 的单一一条带，为 *ompR* 完整序列；以 FZSF02 *ompR*::Tn5 基因组为模板扩增得到 1 920 bp 的单一一条带，该序列由 1 200 bp 的 Tn5 转座子序列和被其插入的 720 bp 的 *ompR* 序列组成；以 FZSF02Δ*ompR* 基因组为模板扩增得到大小为 1 540 bp 的条带，该序列由 *ompR* 上游 300 bp，下游 300 bp 和中间 940 bp 的卡那抗性基因组成。琼脂糖凝胶电泳和测序结果均表明由卡那抗性基因替换掉 120 bp *ompR* 基因序列的 *ompR* 缺失菌株 FZSF02Δ*ompR* 构建成功。

2.3 生长能力检测

生长曲线显示 FZSF02 和 FZSF02Δ*ompR* 在 27 ℃（图 3-A）和 37℃（图 3-B）条件下在 LB 液体培养基中的生长能力相似。FZSF02 在 27 ℃ 培养条件下 24 h OD_{600} 值达到最大值 6.60，48 h 降至 6.13；菌株 Δ*ompR* 24 h 最高值为 6.44，48 h 降至 6.27。37 ℃ 培养条件下，FZSF02 在第 21 h OD_{600} 值达到最大 5.74，此后逐步降低至 48 h 4.1；Δ*ompR* 21 h 达到最大值 5.80，48 h 降低至 4.0。上述数据说明 *ompR* 基因的缺失对该菌的生长无明显影响。

2.4 *OmpR* 缺失对 FZSF02 产灵菌红素的影响

LB 固体平板试验显示，*ompR* 转座子插入突变菌株 FZSF02 *ompR*::Tn5 和缺失菌株 FZSF02Δ*ompR* 均丧失灵菌红素产生能力（图 4-A）。*Pig* 基因簇大小约 20 kb，由 14 个基因 *pigA*-*pigN* 按顺序排列；*pigA*，*pigF* 和 *pigN* 分别是基因簇第 1 个、第 6 个和第 14 个



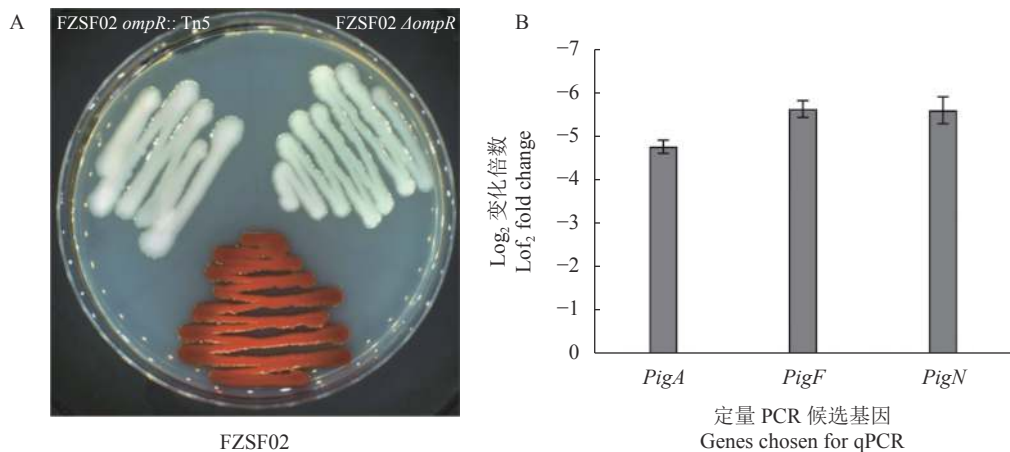
注：A：野生型菌株 WT 和基因敲除菌株 FZSF02 $\Delta ompR$ 在 27 °C 条件的生长曲线。B：野生型菌株 WT 和基因敲除菌株 FZSF02 $\Delta ompR$ 在 37 °C 条件的生长曲线。

Note: A: Growth curves of WT and FZSF02 $\Delta ompR$ at 27 °C. B: Growth curves of WT and FZSF02 $\Delta ompR$ at 37 °C.

图 3 FZSF02 野生菌株与 *ompR* 敲除菌株 FZSF02 $\Delta ompR$ 的生长曲线
Fig. 3 Growth curves of WT and $\Delta ompR$ of FZSF02

基因，上述三个基因的表达水平可以反映该基因簇总体表达水平。qPCR 显示，FZSF02 $\Delta ompR$ 菌株中灵菌红素合成基因簇中 *pigA*、*pigF* 和 *pigN* 基因的表

达水平分别降低为野生型菌株的 3.8%、2.0% 和 2.1% (图 4-B)，说明 OmpR 对灵菌红素合成的影响是通过调控灵菌红素合成基因簇的转录实现的。



注：A：野生型菌株 FZSF02，*ompR* 转座子突变菌株和 *ompR* 敲除菌株在 LB 琼脂平板上的生长情况。FZSF02，FZSF02 *ompR::Tn5* 和 FZSF02 $\Delta ompR$ 分别代表野生型菌株，Tn5 插入突变菌株和 *ompR* 敲除菌株。B：*ompR* 基因敲除对零菌红素合成基因的影响。*pigA*、*pigF* 和 *pigN* 为零菌红素合成基因簇上的 3 个基因。 $\log_2$ 倍数变化值代表上述三个基因在基因敲除菌株 FZSF02 $\Delta ompR$ 中相对野生型菌株的表达量变化。

Note: A: Prodigiosin-producing abilities of FZSF02, *ompR* mutant strain, and *ompR*-knockout strain on LB agar at 27 °C. FZSF02, FZSF02 *ompR::Tn5*, and FZSF02 $\Delta ompR$ were WT strain, Tn5 transposon insertion strain, and *ompR*-knockout strain, respectively. B: Deletion of *ompR* on expression of prodigiosin biosynthesis genes. *pigA*, *pigF*, and *pigN* were 3 genes in prodigiosin biosynthesis gene cluster. $\log_2$ fold change values represent expression levels of these genes in FZSF02 $\Delta ompR$ as compared to WT FZSF02.

图 4 OmpR 对 *Serratia marcescens* FZSF02 产灵菌红素能力及灵菌红素合成基因表达的影响

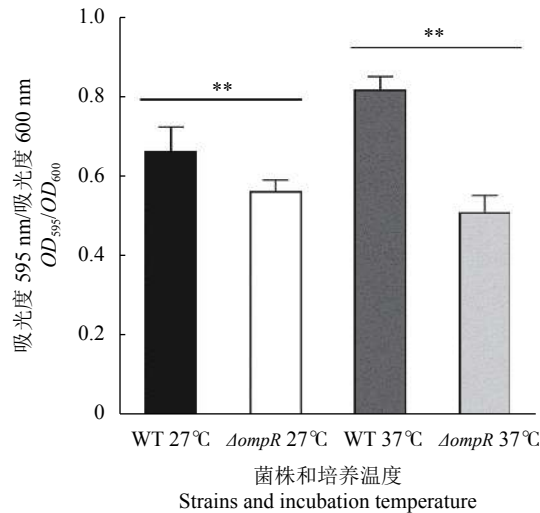
Fig. 4 Effects of OmpR on prodigiosin-producing ability and expressions of prodigiosin biosynthesis genes of *S. marcescens* FZSF02

2.5 *ompR* 缺失影响 FZSF02 生物被膜形成能力

生物被膜测定结果显示 *ompR* 部分缺失后生物被膜形成能力降低，37 °C 培养条件下 FZSF02 $\Delta ompR$ 的生物膜量较 FZSF02 野生型菌株降低 37.5% ($P<0.01$)，27 °C 培养条件下生物被膜量降低 15.1% ($P<0.01$)，表明 OmpR 参与了该菌生物被膜的合成 (图 5)。

2.6 OmpR 对 FZSF02 运动和产酶能力的影响

检测野生型菌株和基因敲除菌株 FZSF02 $\Delta ompR$ 在琼脂含量为 0.3% 的 LB 平板上的游动能力 (swimming)，菌株 FZSF02 和 $\Delta ompR$ 的菌落直径分别为 7.32 cm 和 7.18 cm；在 0.7% 琼脂含量的 LB 平板上的涌动力 (swarming) 试验显示 FZSF02 和 $\Delta ompR$ 的菌落直径分别为 5.51 cm 和 5.67 cm，数值



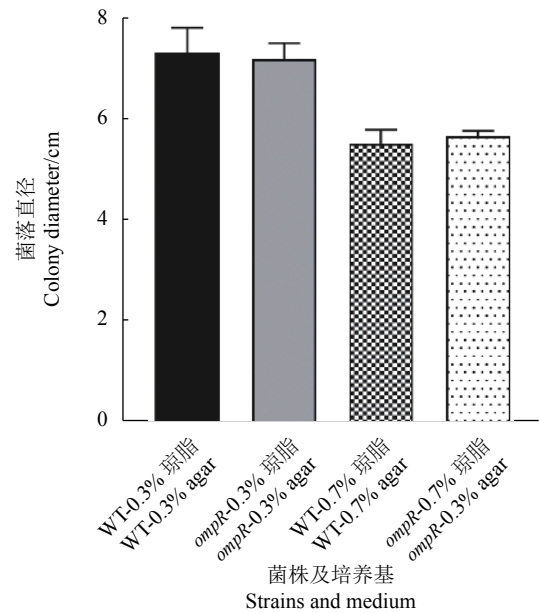
注：27 °C 和 37 °C 液体培养条件下野生型菌株 WT 和基因敲除菌株 $\Delta ompR$ 的产生物被膜能力检测。

Note: Biofilm-producing ability of WT and $\Delta ompR$ were assayed after incubation in liquid LB at 27 °C and 37 °C for 36 h.

图 5 *OmpR* 对 *Serratia marcescens* FZSF02 生物膜合成能力的影响

Fig. 5 Effect of *OmpR* on biofilm-producing ability of *S. marcescens* FZSF02

无显著性差异 (图 6)，说明 *OmpR* 对该菌的运动性无明显影响。野生型菌株 WT 和 FZSF02 $\Delta ompR$ 均有产蛋白酶能力 (酶活圈直径分别为 2.1 cm 和 2.2 cm)



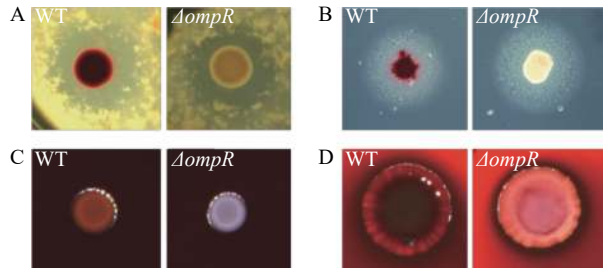
注：在 0.3% (w/v) 和 0.7% (w/v) 琼脂的 LB 固体平板上检测 *Serratia marcescens* FZSF02 和基因敲除菌株 FZSF02 $\Delta ompR$ 运动的菌落直径。

Note: Mobility diameters of *S. marcescens* FZSF02 and FZSF02 $\Delta ompR$ were assayed on solid LB plates containing 0.3% (w/v) and 0.7% (w/v) agar, respectively.

图 6 *Serratia marcescens* FZSF02 和 FZSF02 $\Delta ompR$ 的运动能力

Fig. 6 Mobility of *S. marcescens* FZSF02 and FZSF02 $\Delta ompR$

(图 7-A) 和脂肪酶能力 (酶活圈直径分别为 1.6 cm 和 1.7 cm) (图 7-B)，从酶活圈直径评价二者产酶能力无明显区别。WT 和 FZSF02 $\Delta ompR$ 溶血能力相似，在培养第 24 h 时均无明显溶血圈 (图 7-C)，培养至第 7 天时都产生微弱的溶血圈 (图 7-D)。



注：WT 和 $\Delta ompR$ 分别代表 *Serratia marcescens* FZSF02 野生型菌株和 *ompR* 敲除菌株。A：在含 1% (w/v) 脱脂奶粉的 LB 固体琼脂培养基上的蛋白酶产生能力。B：在含 1% (v/v) tween 80 的固体琼脂培养基上的脂肪酶产生能力。C 和 D：在血琼脂培养基上 27 °C 条件下培养 24 小时和 7 天观察溶血素产生能力。

Note: WT and $\Delta ompR$ represent WT and *ompR*-knockout *S. marcescens* FZSF02, respectively. A: Protease-producing ability on LB agar plates containing 1% (w/v) of skim milk. B: Lipase-producing ability on LB agar plates containing 1% (v/v) of tween 80. C and D: Hemolysin-producing abilities on blood agar base medium after incubation at 27 °C for 24 h (C) and 7 days (D), respectively.

图 7 *Serratia marcescens* FZSF02 和 FZSF02 $\Delta ompR$ 的产酶能力
Fig. 7 Enzyme-producing abilities of *S. marcescens* FZSF02 and FZSF02 $\Delta ompR$

2.7 *ompR* 对 FZSF02 响应胁迫的影响

检测了野生型菌株和基因敲除菌株 FZSF02 $\Delta ompR$ 在高温，低 pH，高盐和强氧化环境下的存活能力。55 °C 高温处理后野生型菌株和 $\Delta ompR$ 的存活率分别为 0.15% 和 0.11%；pH3.0 条件下处理后存活率分别为 22.72% 和 28.35%；2 mol·L⁻¹ NaCl 处理后的存活率分别为 92.45% 和 90.65%；氧化剂 0.22 mol·L⁻¹ H₂O₂ 处理后的存活率分别为 22.40% 和 23.84%。说明上述胁迫条件下二者存活率无明显差异 (表 2)。

表 2 胁迫条件下 WT 与 $\Delta ompR$ 的存活率
Table 2 Survival rates of WT and $\Delta ompR$ under stress
(单位: %)

胁迫条件 Stress factor	WT 存活率 Survival rate of WT	$\Delta ompR$ 存活率 Survival rate of $\Delta ompR$
pH=3	22.72 ± 3.40 a	28.35 ± 4.10 a
55 °C	0.15 ± 0.01 a	0.11 ± 0.05 a
2 mol·L ⁻¹ NaCl	92.45 ± 2.60 a	90.65 ± 3.80 a
0.22 mol·L ⁻¹ H ₂ O ₂	22.40 ± 1.30 a	23.84 ± 1.10 a

3 讨论与结论

本研究成功构建了粘质沙雷氏菌 FZSF02 的

ompR 敲除菌株, 通过对突变体和野生型的对比研究了 OmpR 对粘质沙雷氏菌 FZSF02 灵菌红素产生能力, 生物膜形成能力, 产酶能力, 运动性和适应胁迫等生物学特性的影响。

粘质沙雷氏菌合成灵菌红素受已报道的 30 多种基因调控^[22], 双组分调控系统是其中重要的一类调控基因。目前在粘质沙雷氏菌菌株中发现的参与色素合成调控的双组分系统有 PigQ/PigW^[13] (与 BarA/UvrY 系统高度同源^[23])、PhoB/PhoR^[14]、RssB/RssA^[16] 和 EepR/EepS^[15]。PigQ/PigW, PhoB/PhoR 和 eepR/eepS 双组分系统是通过效应蛋白直接与 *pigA* 上游启动子区结合激活灵菌红素基因簇的表达而正向调控灵菌红素合成^[13-15]; RssB/RssA 调控系统通过 RssB 与 *pigA* 上游启动子直接结合抑制灵菌红素基因簇表达从而负调控灵菌红素的合成^[16]。本研究 EnvZ/OmpR 双组分调控系统效应蛋白基因 *ompR* 敲除后菌株完全丧失灵菌红素合成能力, 对 *pigA*-N 基因簇中分别处于基因簇上游、中游和下游的 *pigA*、*pigF* 和 *pigN* 基因转录水平应用 qPCR 检测, 结果显示 *ompR* 敲除菌株中灵菌红素合成基因簇中 3 个基因转录水平明显降低, 说明转录调控因子 OmpR 正调控该菌株灵菌红素的合成, 该调控可能通过影响整个基因簇的转录实现。*ompR* 是本研究新鉴定的参与粘质沙雷氏菌灵菌红素合成调控的双组分系统效应基因, 有别于已报道的其他 4 种双组分调控系统, 其是否与 PigQ/PigW, PhoB/PhoR 和 eepR/eepS 双组分系统类似通过与 *pigA* 上游启动子直接结合从而正调控灵菌红素基因簇的表达有待通过凝胶迁移试验和 DNaseI 足迹试验等进一步研究。

OmpR 对多种微生物生物膜的形成有重要影响。*ompR* 缺失或突变降低大肠杆菌^[24-25], *Yersinia enterocolitica*^[26] 和肠炎沙门氏菌 *Salmonella enteritidis*^[27] 生物被膜的形成, 但是对 *Acinetobacter baumannii* Strain AB5075 生物被膜形成能力无影响^[28]。菌株 FZSF02 *ompR* 缺失菌株生物被膜形成量在 37 °C 时降低 37.5%, 降低程度与 *Yersinia enterocolitica* 的 *ompR* 突变株类似 (降低 33%)^[26], 小于肠炎沙门氏菌 *Salmonella enteritidis* (降低 75% 以上)^[27]。上述结果暗示 OmpR 对细菌生物被膜形成的影响有一定的普遍性。

OmpR 影响细菌多个微生物学特性, 虽然在不同种属间 OmpR 序列高度保守, 但是在不同菌株中其作用不同甚至相反。*ompR* 敲除后 *Acinetobacter baumannii* Strain AB5075 的游动和涌动力下降^[26], 但是在 *Xenorhabdus nematophila*^[29] 中运动能力显著增

强。*Xenorhabdus nematophila ompR* 基因敲除菌株蛋白酶, 脂肪酶和溶血能力均明显增强^[29]; *Yersinia enterocolitica* 菌株 *ompR* 基因敲除后对高盐渗透压、低 pH、过氧化氢和高温胁迫条件的适应性均明显降低^[20]; 但是 *Yersinia pestis ompR* 基因敲除菌株对高盐、低 pH 和高温条件较野生型菌株更为敏感, 但是对过氧化氢耐受性增强^[21]。本研究对菌株 FZSF02 上述生物学特性进行探讨, 显示 *ompR* 敲除后该菌运动性, 产酶能力及环境胁迫的适应性均无明显变化。说明 OmpR 在粘质沙雷氏菌 FZSF02 菌株中功能与已报道的菌株不同, 这反映了 OmpR 在不同微生物中调控功能的多样性和复杂性。

综上, 本研究发现在粘质沙雷氏菌 FZSF02 菌株中 OmpR 特异性正调控灵菌红素的合成, 同时一定程度上影响生物被膜的形成。EnvZ/OmpR 代表一个新的灵菌红素合成调控系统, 其具体调控机制有待深入研究。

参考文献:

- [1] MA H Y, YANG B, WANG H W, et al. Application of *Serratia marcescens* RZ-21 significantly enhances peanut yield and remediates continuously cropped peanut soil [J]. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2016, 96 (1): 245-253.
- [2] MAHLEN S D. *Serratia* infections: from military experiments to current practice [J]. *Clinical Microbiology Reviews*, 2011, 24 (4): 755-91.
- [3] WILLIAMSON N R, FINERAN P C, LEEPER F J, et al. The biosynthesis and regulation of bacterial prodiginines [J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2006, 4 (12): 887-99.
- [4] GERC A J, SONG L, CHALLIS G L, et al. The insect pathogen *Serratia marcescens* Db10 uses a hybrid non-ribosomal peptide synthetase-polyketide synthase to produce the antibiotic althiomycin [J]. *Plos One*, 2012, 7 (9): e44673.
- [5] ARAUJO H W C, ANDRADE R F S, MONTERO R D, et al. Sustainable biosurfactant produced by *Serratia marcescens* UCP 1549 and its suitability for agricultural and marine bioremediation applications [J]. *Microbial Cell Factories*, 2019, 18(1).
- [6] YAN Q, FONG S S. Design and modularized optimization of one-step production of N-acetylneuraminic acid from chitin in *Serratia marcescens* [J]. *Biotechnology & Bioengineering*, 2018, 115 (9): 2255-2267.
- [7] BAI F M, DAI L, FAN J Y, et al. Engineered *Serratia marcescens* for efficient (3R)-acetoin and (2R, 3R)-2, 3-butanediol production [J]. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 2015, 42 (5): 779-786.
- [8] LV X, DAI L, BAI F M, et al. Metabolic engineering of *Serratia marcescens* MG1 for enhanced production of (3R)-acetoin [J]. *Bioresources & Bioprocessing*, 2016, 3 (1): 52.
- [9] SUN Y, WANG L J, PAN X W, et al. Improved prodiginosin production by relieving CpxR temperature-sensitive inhibition [J].

- Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 2020 (8) : 344.
- [10] 尤忠毓, 王玉洁, 孙诗清, 等. 微生物发酵法生产灵菌红素研究进展 [J]. 生物工程学报, 2016, 32 (10) : 1332–1347.
- YOU Z Y, WANG Y J, SUN S Q, et al. Progress in microbial production of prodigiosin [J]. *Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao*, 2016, 32 (10) : 1332–1347. (in Chinese)
- [11] PRUB B M. Involvement of two-component signaling on bacterial motility and biofilm development [J]. *Journal of Bacteriology*, 2011, 199 (18) : 00259–17.
- [12] 王栋, 王少辉, 张焕容, 等. 双组分系统 *rscC* 基因影响禽致病性大肠杆菌的致病性及相关生物学特性 [J]. 微生物学报, 2019, 59 (3) : 468–477.
- WANG D, WANG S H, ZHANG H R, et al. Two-component system *rscC* gene affects pathogenicity and associated biological characteristics of avian pathogenic *Escherichia coli* [J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2019, 59 (3) : 468–477. (in Chinese)
- [13] PETER C, FINERAN, HLLY S, et al. Biosynthesis of tripyrrole and β -lactam secondary metabolites in *Serratia*: integration of quorum sensing with multiple new regulatory components in the control of prodigiosin and carbapenem antibiotic production [J]. *Molecular microbiology*, 2005, 56 (6) : 1495–1517.
- [14] TZMZIN G, PETER C F, LEE E, et al. The PhoBR two-component system regulates antibiotic biosynthesis in *Serratia* in response to phosphate [J]. *BMC microbiology*, 2009, 9 (1) : 112.
- [15] NICHOLAS A S, RONI M L, KIMBERLY M B, et al. *Serratia marcescens* cyclic AMP receptor protein controls transcription of EepR, a novel regulator of antimicrobial secondary metabolites [J]. *Journal of Bacteriology*, 2015, 197 (15) : 2468–2478.
- [16] HOMG Y T, CHANG K C, LIU Y N, et al. The RssB/RssA two-component system regulates biosynthesis of the tripyrrole antibiotic, prodigiosin, in *Serratia marcescens* [J]. *International Journal of Medical Microbiology*, 2010, 300 (5) : 304–312.
- [17] LIN C Q, JIA X B, FANG Y, et al. Enhanced production of prodigiosin by *Serratia marcescens* FZSF02 in the form of pigment pellets [J]. *Electronic Journal of Biotechnology*, 2019, 40: 58–64.
- [18] LIU Y G, CHEN Y. High-efficiency thermal asymmetric interlaced PCR for amplification of unknown flanking sequences [J]. *Biotechniques*, 2007, 43 (5) : 649–654.
- [19] JIA X B, LIN X J, CHEN J C. Linear and exponential TAIL-PCR: a method for efficient and quick amplification of flanking sequences adjacent to Tn5 transposon insertion sites [J]. *AMB Express*, 2017, 7 (1) : 195.
- [20] BRZOSTEK K, RACZKOWSKA A, ZASADA A. The osmotic regulator OmpR is involved in the response of *Yersinia enterocolitica* O: 9 to environmental stresses and survival within macrophages [J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2010, 2: 265–271.
- [21] GAN H, ZHANG Y Q, HAN Y P, et al. Phenotypic and transcriptional analysis of the osmotic regulator OmpR in *Yersinia pestis* [J]. *BMC Microbiology*, 2011, 11 (1) : 39.
- [22] PAN X W, TANG M, YOU J J, et al. Regulator RcsB controls prodigiosin synthesis and various cellular processes in *Serratia marcescens* JNB5-1 [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2021, 87 (2) : e02052–20.
- [23] NABIL M W, GEORGE P C S. The stationary phase sigma factor, RpoS, regulates the production of a carbapenem antibiotic, a bioactive prodigiosin and virulence in the enterobacterial pathogen *Serratia* sp. ATCC 39006 [J]. *Microbiology*, 2012, 158 (3) : 648–658.
- [24] VIDAL O, LONGIN R, PRIGENT C C, et al. Isolation of an *Escherichia coli* K-12 mutant strain able to form biofilms on inert surfaces: involvement of a new ompR allele that increases curli expression [J]. *Journal of Bacteriology*, 1998, 180 (9) : 2442–2449.
- [25] PRUSS B, BESEMANN C, DENTON A, et al. A complex transcription network controls the early stages of biofilm development by *Escherichia coli* [J]. *Journal of Bacteriology*, 2006, 188: 3731–3739.
- [26] MENG J, BAI J Q, XU J H, et al. Differential regulation of physiological activities by RcsB and OmpR in *Yersinia enterocolitica* [J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2019, 366 (17) : 1–9.
- [27] 董洪燕, 彭大新, 焦新安, 等. 肠炎沙门氏菌鸡源株 *ompR* 基因缺失株的构建及生物学特性与亲本株的比较 [J]. 微生物学报, 2011, 51 (9) : 1256–1262.
- DONG H Y, PENG D X, JIAO X A, et al. Construction and characterization of an *ompR* gene deletion mutant from *Salmonella enteritidis* [J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2011, 51 (9) : 1256–1262. (in Chinese)
- [28] TIPTON K A, RATHER P N. An ompR-envZ Two-component system ortholog regulates phase variation, osmotic tolerance, motility, and virulence in *Acinetobacter baumannii* strain AB5075 [J]. *Journal of Bacteriology*, 2016, 199 (3) : 705–716.
- [29] PARK D, FORST S. Co-regulation of motility, exoenzyme and antibiotic production by the EnvZ-OmpR-FlhDC-FlhA pathway in *Xenorhabdus nematophila* [J]. *Molecular Microbiology*, 2010, 61 (6) : 1397–1412.

(责任编辑: 林海清)