大肠杆菌生物膜关键组分缺失对细胞性能的影响

乔 君[1]，宫登科[1]，刘格尔[3]，陈玲嫣[3]，伍圆明[1]，
詹 依[1]，郭 勇[1]，孟祥宇[1]，王小元[*1,2,3]

（1. 江南大学 食品科学与资源挖掘全国重点实验室，江苏 无锡 214122；2. 江南大学 国际食品安全联合实验室，江苏 无锡 214122；3. 江南大学 生物工程学院 江苏 无锡 214122）

摘要：大肠杆菌胞外存在复杂且种类繁多的生物膜组分，这些生物膜组分不仅在合成和组装过程中耗费大量的能源和底物，且某些组分还存在巨大的致病风险。为减少这些不利影响，作者采用 Crisp-Cas9 基因编辑技术，从基因水平分别去除大肠杆菌 MG1655 中非必需生物膜组分，构建了一系列非必需生物膜组分缺失突变菌株。对突变株的细胞特性进行考察，筛选具有优异特性的突变菌株。结果显示，敲除鞭毛 *fliE-R*、*fliY-T*、*flhE-D*、4 型菌膜、唾液酸和聚-β-1,6-葡萄糖胺基因簇能促进菌株在 M9 培养基中的生长；敲除鞭毛基因簇 flgN-L 和胞外多糖类组分有利于 PHB 合成；敲除胞外多糖类组分基因簇或鞭毛的 4 个基因簇，能增强菌株膜通透性；去除大肠杆菌核心多糖能重塑代谢调控，促进克拉酸的生产。

关键词：大肠杆菌；生物膜；克拉酸；聚羟基丁酸酯

中图分类号：Q 815　**文章编号**：1673-1689(2023)11-0042-13　DOI：10.12441/spyswjs.20210918001

Absence of Key Biofilm Components Affect Cell Performances in *Escherichia coli*

QIAO Jun[1]，*GONG Dengke*[1]，*LIU Ge'er*[3]，*CHEN Lingyan*[3]，*WU Yuanming*[1]，
ZHAN Yi[1]，*GUO Yong*[1]，*MENG Xiangyu*[1]，*WANG Xiaoyuan*[*1,2,3]

（1. State Key Laboratory of Food Science and Resources，Jiangnan University，Wuxi 214122，China；2. International Joint Laboratory on Food Safety，Jiangnan University，Wuxi 214122，China；3. School of Biotechnology，Jiangnan University，Wuxi 214122，China）

Abstract：*Escherichia coli* possesses a complex and diverse array of extracellular biofilm components. These biomolecules not only consume a large amount of energy and substrates during their synthesis and assembly, but certain components also present huge risks for pathogenicity. In order to mitigate the adverse effects, Crisp-Cas9 gene-editing method was employed to remove non-essentia biofilm components from *Escherichia coli* MG1655 at the genetic level. A series of mutant strains with deleted non-essential biofilm components were constructed, and the cellular

收稿日期：2021-09-18　**修回日期**：2021-11-05

基金项目：国家重点研发计划项目(2018YFA0900300)；内蒙古自治区科技支撑计划项目(2019GG302)。

作者简介：乔 君(1985—)，男，博士，高级工程师，主要从事微生物膜壁结构改造、优良底盘菌株构建的研究。E-mail：qj851217@126.com

* **通信作者**：王小元(1965—)，男，博士，教授，博士研究生导师，主要从事微生物细胞膜和细胞膜壁组成、结构及功能的研究。E-mail：xwang@jiangnan.edu.cn

characteristics of these mutant strains were investigated to identify those with superior performances. The results showed that knockout of genes encoding flagellum (*fliE–R*, *fliY–T*, and *flhE–D*), type 4 capsule, sialic acid and poly-β-1,6-glucosamine could promote the growth of mutants in M9 medium. Deletion of flagellar gene clusters *flgN–L* and exopolysaccharide components enhanced PHB synthesis, while knocking out four gene clusters related to extracellular polysaccharide components or flagella could enhance the membrane permeability. The removal of core polysaccharides from *Escherichia coli* could remodel metabolic regulation and promote the production of colanic acid.

Keywords: *Escherichia coli*, biofilm, colanic acid, polyhydroxybutyrate

大肠杆菌生物膜由多糖、脂质、蛋白质、胞外DNA、蛋白质等组成[1-4]。生物膜在维持结构完整性和刚性[5-7]、保护菌株免受不利环境影响[8-11]以及促进细菌和宿主细胞[12-13]之间的相互作用等方面至关重要。但是，一些生物生物膜组分可对工业生产造成潜在的不利影响。例如在食品工业中，生物膜会增加产品变质或被病原微生物群污染的风险[14]；在医疗领域，植入物或针管上的生物膜会引起患者严重感染[15]。此外，含有生物膜的病原菌会导致抗生素耐药，形成休眠细胞，增加治愈难度和感染风险[16]。对于工业发酵行业而言，生物膜的形成会消耗一定的底物和能源，而这些底物和能源本可以更好地促进细胞生长。其次，生物膜会阻碍营养物质的吸收，导致菌体营养受限或生长缓慢。最后，由于生物膜可介导生物污垢的形成，从而减少设备传热，增加腐蚀，缩短发酵设备的使用寿命[17-19]。

菌毛、鞭毛和卷曲纤维是存在于细胞表面的大分子蛋白质附属物，菌毛在生物膜的形成、附着、侵袭和细胞运动等方面发挥着重要的作用[20-21]。卷曲纤维也介导细胞间黏附和侵袭，促使菌落在宿主体内定植，增加致病风险[7]。卷曲纤维由csGBAgDEFG操纵子编码合成[13,22-23]。鞭毛是另外一种存在于大肠杆菌生物膜上的大分子蛋白质附属物，在生物膜的合成、运动性和趋化性中发挥作用[24]。鞭毛的合成和组装由4个基因簇，共50个基因的参与[25-27]，分别为*flhEABcheZYBRtaptarcheWAmotBCflhCD*、*fliYZACDST*、*fliEFGHIJKLMNOPQR*、*flgNMQBCDEFGHIJKL*。

大肠杆菌的非必需生物膜组分中，除含有上述蛋白质类附属物外，还包含大量不同种类的胞外多糖。纤维素是自然界中发现的最丰富的有机聚合物，细菌通常产生纤维素作为细胞外成分，用于机械和化学保护，细菌纤维素由9个基因编码合成*bcsGFEyhjRQbcsABZC*。唾液酸是单体以独特的α-(2,8)和(或)α-(2,9)键连接的直链聚合物，具有促进婴幼儿神经系统发育的作用。唾液酸由6个基因簇编码合成*nanRATEKyhcH*。克拉酸又称M-抗原，是由肠道细菌产生的具有高质量分数的*L*-岩藻糖(约30%)的胞外多糖。据报道，由肠道微生物产生的克拉酸可以延长宿主的寿命，具有延缓衰老的作用[28-31]，克拉酸在食品、化妆品和医药等领域具有广阔的应用前景。脂多糖是微生物产生的强力毒素，由类脂A、核心多糖和O-抗原组成[32-34]。在大肠杆菌中，类脂A是必需组分，核心多糖和O-抗原是非必需生物膜组分，去除核心多糖和O-抗原能够起到减毒效果。核心多糖由14个基因参与合成*waaDFCQGPSBORYZUL*[34]。O-抗原由11个基因参与合成操纵子*rfbBDACXglfwbbHIJKL*[35]。肠杆菌共同抗原(ECA)位于许多肠致病菌外膜，是一种由3个氨基糖重复单元组成的碳水化合物抗原[33]。4型荚膜是大肠杆菌的表面保护组分，可偶联于膜蛋白质表面，为菌体提供物理、化学压力保护，在菌体与环境间的相互作用中发挥重要作用。4型荚膜主要由7个基因簇合成*ymcDCBAyccZetpyccC*[36-37]。聚-β-1,6-N-乙酰葡萄糖胺是一种新发现的胞外多糖，是主要的生物膜黏附素，对生物膜的产生及维持其完整性起着重要作用。聚-β-1,6-N-乙酰葡萄糖胺由4个基因编码合成*pgaABCD*[38]。

聚羟基丁酸酯(PHB)是微生物为储存过量碳合成的生物大分子，其在细胞内形成不溶的球形内含物或颗粒[39-41]。PHB具有生物降解性、生物相容性、压电性等性质，在生物降解塑料、组织工程支架等领域有广泛的应用[42-43]。

为考察去除大肠杆菌非必需生物膜组分对菌株生长和产物合成效率造成的影响，作者首先筛选出大肠杆菌MG1655中非必需生物膜组分，再采用Crispr-Cas9基因编辑技术敲除MG1655基因组中

各生物膜组分的合成基因簇,构建了缺失不同生物膜组分的突变菌株,并考察其生长和表型变化。鉴于微生物具有储存过量碳合成 PHB 的特性,作者以含有 PHB 合成关键基因的质粒 pBHR68 为探针,考察去除大肠杆菌的非必需生物膜组分能否节约底物和能源。作者所在实验室经前期研究发现,通过去除大肠杆菌菌毛和 ECA 可以有效减少碳源消耗,提高细菌生长速度,并显著提高 PHA 和 *L*-苏氨酸产量。因此,作者进一步对大肠杆菌 MG1655 中其他非必需生物膜组分进行研究。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器

1.1.1 主要试剂 卡那霉素、氨苄西林、壮观霉素、异丙基-*β*-D-硫代吡喃半乳糖苷(IPTG):西格玛-奥德里奇(上海)贸易有限公司;DNA 聚合酶:南京诺唯赞生物科技股份有限公司;质粒提取试剂盒和基因组提取试剂盒:上海生工生物工程有限公司;PCR 产物纯化试剂盒和凝胶纯化试剂盒:天根生化科技(北京)有限公司;其他均购自中国医药集团有限公司。

1.1.2 主要仪器设备 PCR 仪(ETC-811):广州东盛生物科技有限公司;核酸蛋白质定量仪(Nanodrop 2000):赛默飞世尔科技(中国)有限公司;紫外分光光度计(UV-1800PC):上海美谱达股份有限公司;水平核酸电泳仪(DYCP-31DN):北京六一股份有限公司;电转仪(Micro Pulser):美国伯乐股份有限公司;酶标仪(Cytation 5):美国伯腾股份有限公司;荧光分光光度计(Hitachi):日本日立公司。

1.2 菌株、质粒和引物

本研究所用菌株、质粒及其遗传特性见表 1。所用引物序列见表 2,引物由苏州金唯智生物科技有限公司合成。

表 1 本实验中所用菌株、质粒及特性

Table 1 Strains and plasmids used in this study and their characteristics

菌株和质粒		遗传特性	来源
菌株	Turbo	*E. coli*, *F′ proA*$^{+}$*B*$^{+}$ *lacI*^{q} *ΔlacZMI fhuAΔ* (*lac-proAB*) *glnV galR*(*zgb*-210 ::Tn10)	NEB
	MG1655	野生型大肠杆菌, F-λ-rph-1	CGSC 6300
	WQM013	MG1655 敲除 *fliEFGHIJKLMNOPQR*	本研究
	WQM014	MG1655 敲除 *fliYZACDST*	本研究
	WQM015	MG1655 敲除 *flgNMABCDEFGHIJKL*	本研究
	WQM016	MG1655 敲除 *flhEABcheZYBRtaptarcheWAmotBAflhCD*	本研究
	WQM017	MG1655 敲除 *csgCABDEFG*	本研究
	WQM018	MG1655 敲除 *waaQGPSBOJYZULCFD*	本研究
	WQM019	MG1655 敲除 *rfbBDACXglfwbbHIJKL*	本研究
	WQM020	MG1655 敲除 *wzawzbwzcwcaABCwzywcaEFgmdfclgmm wcaImanCBwcaJwxzKLM*	本研究
	WQM022G	MG1655 敲除 *ymcDCBAyccZetpyccC*	本研究
	WQM023	MG1655 敲除 *bcsGFEyhjRQbcsABZC*	本研究
	WQM024	MG1655 敲除 *nanRATEK yhcH*	本研究
	WQM025	MG1655 敲除 *pgaABCD*	本研究
	MG1655/pBHR68	MG1655 表达 pBHR68 质粒	本研究
	WQM013/pBHR68	WQM013 表达 pBHR68 质粒	本研究
	WQM014/pBHR68	WQM014 表达 pBHR68 质粒	本研究
	WQM015/pBHR68	WQM015 表达 pBHR68 质粒	本研究
	WQM016/pBHR68	WQM016 表达 pBHR68 质粒	本研究
	WQM017/pBHR68	WQM017 表达 pBHR68 质粒	本研究
	WQM018/pBHR68	WQM018 表达 pBHR68 质粒	本研究
	WQM019/pBHR68	WQM019 表达 pBHR68 质粒	本研究

续表 1

菌株和质粒		遗传特性	来源
	WQM020/pBHR68	WQM020 表达 pBHR68 质粒	本研究
	WQM022G/pBHR68	WQM022G 表达 pBHR68 质粒	本研究
	WQM023/pBHR68	WQM023 表达 pBHR68 质粒	本研究
	WQM024/pBHR68	WQM024 表达 pBHR68 质粒	本研究
	WQM025/pBHR68	WQM025 表达 pBHR68 质粒	本研究
质粒	pCas	*repA101*(Ts) *kan Pcas–cas9 ParaB–Red lacI^{q}Ptrc*–sgRNA–pMB1	文献[27]
	pTargetF	*pMB1 aadA* sgRNA	文献[27]
	pTargetF013	*pMB1 aadA* sgRNA–*fliEFGHIJKLMNOPQR*	本研究
	pTargetF014	*pMB1 aadA* sgRNA–*fliYZACDST*	本研究
	pTargetF015	*pMB1 aadA* sgRNA–*flgNMABCDEFGHIJKL*	本研究
	pTargetF016	*pMB1 aadA* sgRNA–*flhEABcheZYBRtaptarcheWAmotBAflhCD*	本研究
	pTargetF017	*pMB1 aadA* sgRNA–*csgCABDEFG*	本研究
	pTargetF018	*pMB1 aadA* sgRNA–*waaQGPSBOJYZULCFD*	本研究
	pTargetF019	*pMB1 aadA* sgRNA–*rfbBDACXglfwbbHIJKL*	本研究
	pTargetF020	*pMB1 aadA* sgRNA–*wzawzbwzcwcaABCwzywcaEFgmdfcl gmmwcaImanCBwcaJwxzKLM*	本研究
	pTargetF022	*pMB1 aadA* sgRNA–*ymcDCBAyccZetpyccC*	本研究
	pTargetF023	*pMB1 aadA* sgRNA–*bcsGFEyhjRQbcsABZC*	本研究
	pTargetF024	*pMB1 aadA* sgRNA–*nanRATEK yhcH*	本研究
	pTargetF025	*pMB1 aadA* sgRNA–*pgaABCD*	本研究
	pBHR68	pBluescript SK– carries *phaCAB* from *Ralstonia eutropha*	文献[28]

表 2　本实验中用到的引物

Table 2　All primers used in this study

引物名称	引物序列(5′→3′)
F1–013	TGGGTGGGTTACCAGTTC
R1–013	AAGAGATGCCGACAGTCAGCAAAAAGCCTCAGTTTCTATGC
F2–013	GCATAGAAACTGAGGCTTTTTGCTGACTGTCGGCATCTCTT
R2–013	GCTGACTGTTAGAAGCATCGT
TF–013–F	GCCGTCGAATTCACGCACGGGTTTTAGAGCTAGAAATAGC
TF–013–R	CCGTGCGTGAATTCGACGGCACTAGTATTATACCTAGGACTGAG
T–013–F	GCCGTCGAATTCACGCACGG
T–R	ACTAGTATTATACCTAGGACTGAG
F1–014	GCAACTTCCTGTACGTGTTC
R1–014	TATATCAGAAGAAGGCAGGCACAACGAAAGCAAGGTAAAG
F2–014	CTTTACCTTGCTTTCGTTGTGCCTGCCTTCTTCTGATATA
R2–014	AGCCTCCGATGTGTGTTG
TF–014–F	AAACTCACCATTCAACAAGGGTTTTAGAGCTAGAAATAGC
TF–014–R	CCTTGTTGAATGGTGAGTTTACTAGTATTATACCTAGGACTGAG
T–014–F	AAACTCACCATTCAACAAGG
F1–015	CTGATTGTAGTGAAAGTGTTGG
R1–015	TCGCTACCTAATGAATCCAGTCAGGAACCGACGCTATAT
F2–015	ATATAGCGTCGGTTCCTGACTGGATTCATTAGGTAGCGA

续表 2

引物名称	引物序列(5′→3′)
R2-015	TGAACCTGAAGTTGTTGCTC
TF-015-F	CCAGACACTGAATCAACAGGGTTTTAGAGCTAGAAATAGC
TF-015-R	CCTGTTGATTCAGTGTCTGGACTAGTATTATACCTAGGACTGAG
T-015-F	CCAGACACTGAATCAACAGG
F1-016	CCCACAAGCAGAAGAAGG
R1-016	ACTTCCCAGATAAATCGCATGATAGAGTGCTCCAAGGC
F2-016	GCCTTGGAGCACTCTATCATGCGATTTATCTGGGAAGT
R2-016	GCGTAACAGCCGTCTAAAA
TF-016-F	ACGCACTATGCGTCGCATGGGTTTTAGAGCTAGAAATAGC
TF-016-R	CCATGCGACGCATAGTGCGTACTAGTATTATACCTAGGACTGAG
T-016-F	ACGCACTATGCGTCGCATGG
F1-017	AACGGAAGATGAGAGCGA
R1-017	ACTCAACTTCGTCAAAGCAACGAACGAACCTGTTATGCTG
F2-017	CAGCATAACAGGTTCGTTCGTTGCTTTGACGAAGTTGAGT
R2-017	TGCTGTTGCCTGACTTTTA
TF-017-F	TTGACTATTACCCAGCATGGGTTTTAGAGCTAGAAATAGC
TF-017-R	CCATGCTGGGTAATAGTCAAACTAGTATTATACCTAGGACTGAG
T-017-F	TTGACTATTACCCAGCATGG
F1-018	CCATTTATGCTGTGAACCA
R1-018	GATAAAAACTCTGCGTGCGCCGTCTTTCAGGTTGTCCA
F2-018	TGGACAACCTGAAAGACGGCGCACGCAGAGTTTTTATC
R2-018	AACACCAGTTTAGGGTCGA
TF-018-F	GGGGTTAAGCCATTTAACGGGTTTTAGAGCTAGAAATAGC
TF-018-R	CCGTTAAATGGCTTAACCCCACTAGTATTATACCTAGGACTGAG
T-018-F	GGGGTTAAGCCATTTAACGG
F1-019	GGGTGACCTCTCTGAATACTCC
R1-019	GGAACATAATGAAGTCTGACACCGCCACCAGTAACAAGTATTTTCAC
F2-019	GTGAAAATACTTGTTACTGGTGGCGGTGTCAGACTTCATTATGTTCC
R2-019	AGTTCTTCGTTGGTGAGGTTC
TF-019-F	TGTTACGGATAAGCAACGAGGTTTTAGAGCTAGAAATAGC
TF-019-R	CTCGTTGCTTATCCGTAACAACTAGTATTATACCTAGGACTGAG
T-019-F	TGTTACGGATAAGCAACGAG
F1-020	ACGGAGTATTCAGAGAGGTCA
R1-020	CATCAAACAGCAGGACGCCTAACATTGAGATGAAGCGTG
F2-020	CACGCTTCATCTCAATGTTAGGCGTCCTGCTGTTTGATG
R2-020	TGTGTGGGATTATTGCTGTC
TF-020-F	AATGAAACAACACAACAGCGGTTTTAGAGCTAGAAATAGC
TF-020-R	CGCTGTTGTGTTGTTTCATTACTAGTATTATACCTAGGACTGAG
T-020-F	AATGAAACAACACAACAGCG
F1-022G	CGTGAGAAACAGGACGAAA
R1-022G	CTGAAGCAACAAACGGGACCGCCGCTTACAGTTACGGCTAT
F2-022G	ATAGCCGTAACTGTAAGCGGCGGTCCCGTTTGTTGCTTCAG

续表 2

引物名称	引物序列(5′→3′)
R2-022G	AGCCATCCGTCATCCATA
TF-022G-F	ACCTGACAGAGACTTCACGGGTTTTAGAGCTAGAAATAGC
TF-022G-R	CCGTGAAGTCTCTGTCAGGTACTAGTATTATACCTAGGACTGAG
T-022G-F	ACCTGACAGAGACTTCACGG
F1-023	ATGGAATGGTAAGCAAGACA
R1-023	CGTAGAGCAGGAAATGGCTTCAATACCAGGATAAACCGT
F2-023	ACGGTTTATCCTGGTATTGAAGCCATTTCCTGCTCTACG
R2-023	CCTGTGGCTGTAACCAAATA
TF-023-F	TGGATGCGACATCAACCCGGGTTTTAGAGCTAGAAATAGC
TF-023-R	CCGGGTTGATGTCGCATCCAACTAGTATTATACCTAGGACTGAG
T-023-F	TGGATGCGACATCAACCCGG
F1-024	CACCGCAGAGAGACGACTT
R1-024	TAATCTCTCCAGGCTCGCCCAAATGCGTTCATAAGGC
F2-024	GCCTTATGAACGCATTTGGGCGAGCCTGGAGAGATTA
R2-024	GCTAATCAAGCGACTATCAAAG
TF-024-F	ACACTGGCGATTGATATCGGGTTTTAGAGCTAGAAATAGC
TF-024-R	CCGATATCAATCGCCAGTGTACTAGTATTATACCTAGGACTGAG
T-024-F	ACACTGGCGATTGATATCGG
F1-025	AGAAGAATCGGTCACCTCG
R1-025	TTTTAGCAGCGAGTCCCGGCAACTACAAAAAAGCCACA
F2-025	TGTGGCTTTTTTGTAGTTGCCGGGACTCGCTGCTAAAA
R2-025	CTGCTTGTCAAACGCTCC
TF-025-F	AGGCAGTATTCAAAAAACAGGTTTTAGAGCTAGAAATAGC
TF-025-R	CTGTTTTTTGAATACTGCCTACTAGTATTATACCTAGGACTGAG
T-025-F	AGGCAGTATTCAAAAAACAG
T-PHB-F	GCAAGTCCCAACCATTCA
T-PHB-R	CAGAAACACCGTATGTCCCT

1.3 培养基及培养条件

1.3.1 培养基 LB 培养基、M9 培养基和 PHB 发酵培养基中。根据实验需要加入卡那霉素(50 mg/L)、壮观霉素(50 mg/L)或氨苄青霉素(100 mg/L)维持筛选压力。

1.3.2 培养条件 PHB 发酵条件参见文献[44]。

1.4 生长曲线测定

活化的大肠杆菌菌株分别接入 LB 和 M9 培养基中,于 37 ℃、200 r/min 培养,每隔 2 h 取样测定 OD_{600},直至 OD_{600} 基本稳定。

1.5 质粒、突变株和 PHB 生产菌株的构建

1.5.1 质粒的构建 基因敲除中以 pTargetF 为模板构建 pTargetF013-025 系列质粒。以 pTargetF013 为例,使用引物 TF-013-F/TF-013-R 反向 PCR 扩增获得质粒片段,再用凝胶纯化试剂盒纯化。纯化后的质粒片段用 T4 DNA 连接酶连接,将此反应体系化转入大肠杆菌 Turbo 感受态细胞,37 ℃复苏 1 h 后涂布壮观霉素抗性平板,用 T-013-F/T-R 引物筛选菌落并测序验证质粒正确性。其他敲除质粒采用相同的方法和对应的质粒构建。

1.5.2 突变菌株的构建 采用 Crispr-Cas9 双质粒无痕基因编辑技术敲除大肠杆菌 MG1655 基因组中的相关基因簇,该方法需要包含 pTargetF 系列质粒和供体 DNA。pTargetF 系列质粒构建如 1.5.1 所述,供体 DNA 的获得以 WQM013 的构建为例进行详细说明。以大肠杆菌 MG1655 基因组为模板,分别用引物对 F1-013/R1-013 和 F2-013/R2-013 扩增获得上下游同源臂片段。获得的产物经DNA 纯化

回收试剂盒纯化后，以该上下游同源臂片段为模板，用引物 F1-013/R2-013 重叠 PCR，再利用 DNA 纯化回收试剂盒纯化后，即得到供体 DNA。将供体 DNA(400 ng)和 pTargetF013(100 ng)混合后电转入 MG1655/pCas 感受态细胞中。复苏后涂布于含有卡那霉素和壮观霉素的平板，在 30 ℃下培养 48 h，用引物 F1-013/R2-013 挑选突变株，并测序验证其正确性。其他突变株使用相同的方法构建。

1.5.3 PHB 生产菌株的构建 将携带基因 PHB 合成关键基因 *phaCAB* 的 pBHR68 质粒电转到野生型 MG1655 和突变株 WQM013 -020、WQM022G、WQM023-025 中，用引物 T-PHB-F 和 T-PHB-R 验证正确性。

1.6 镜检及膜通透性

1.6.1 结晶紫染色 大肠杆菌细胞固定后，加入质量分数 1%结晶紫静置 30 s，无菌水冲洗后晾干，在光学显微镜下观察菌体形态。

1.6.2 胞外多糖染色 采用单宁媒染染色法进行胞外多糖染色[29]。大肠杆菌细胞在 LB 和 M9 固体培养基上培养 24 h，挑取单菌落并固定在载玻片上，加入品红溶液(0.3 mL 品红碱、90 mL 体积分数 5%苯酚、10 mL 体积分数 95%乙醇)染色 3 min，无菌水冲洗后加媒染液(2 g/L 硫酸铝钾饱和溶液、0.3 g/L $FeCl_3$、1.5 g/L 单宁体积比为 5∶2∶3)染色 3 h，无菌水冲洗后用 质量分数 1% 亚甲蓝处理 30 s，无菌水冲洗晾干后在油镜下观察样品。

1.6.3 膜通透性检测 膜通透性评价采用 N-苯基-α-萘胺(NPN)法[29,32]。细胞培养 12 h 后，收集菌体并洗涤 2 次，菌体重悬于 1.92 mL 磷酸盐缓冲液(pH 7.2)中。细胞悬液中加入 1 mmol/L NPN，使菌体浓度 OD_{600} 为 0.5，然后用荧光分光光度计测定荧光强度(激发和发射波长分别为 350 nm 和 420 nm)。

1.7 PHB 定量分析

使用尼罗红染色法对产 PHB 菌株进行高通量筛选，PHB 发酵结束后，离心收集菌体，加入 TSE 蔗糖缓冲液 (10 mmol/L Tris-HCl、pH 7.5，20 g/dL 蔗糖溶液，2.5 mmol/L Na-EDTA 溶液)，使其 OD_{600} 为 0.4，冰上孵育 10 min，离心收集菌体，用 1 mmol/L 氯化镁溶液重悬至相同菌体浓度。将 3 μL 尼罗红溶液(1 mg/mL DMSO 溶解)添加到 1 mL 细胞悬液中，混匀后在 37 ℃避光孵育 30 min，立即用酶标仪在 37 ℃下检测荧光强度，激发波长为 485 nm，发射波长为 565 nm。

1.8 基因转录分析

全转录组分析按已报道的方法执行[29]。大肠杆菌 MG1655 和 WQM018 分别培养至对数中期，4 ℃、12 000 r/min 收集菌体，磷酸缓冲液洗涤 2 次后用液氮速冻。大肠杆菌 MG1655 基因组用于序列读取、比对和分析。RNA 文库的提取、构建和测序委托苏州金唯智生物技术公司操作。原始转录组序列数据已上传到 NCBI Sequence Read Archive 数据库(SRA)，项目序号为 PRJNA603230。

2 结果与分析

2.1 大肠杆菌非必需生物膜组分筛选及突变株的构建

为了考察去除非必需生物膜组分对菌株生长和表型产生的影响，作者选择大肠杆菌 MG1655 模式菌株为研究对象。首先查阅比对大肠杆菌 MG1655 基因组，筛选出非必需生物膜组分 11 个，分别是：菌毛、鞭毛、卷曲纤维、核心多糖、O-抗原、克拉酸、肠杆菌共同抗原、4 型荚膜、纤维素、唾液酸和聚-β-1,6-N-乙酰葡萄糖胺。其中，菌毛、鞭毛和卷曲纤维属于大分子蛋白质聚合物类，其他 8 种属于胞外多糖类。前期研究发现，去除大肠杆菌菌毛和 ECA 可以促进菌株生长并提高生产效率[44]。因此，作者分别敲除鞭毛、卷曲纤维、核心多糖、O-抗原、克拉酸、4 型荚膜、纤维素、唾液酸和聚-β-1,6-N-乙酰葡萄糖胺的 11 个操纵子，构建出突变株 WQM013、WQM014、WQM015、WQM016、WQM017、WQM018、WQM019、WQM020、WQM022G、WQM023、WQM024 和 WQM025，见图 1。

2.2 非必须生物膜组分缺失突变株的生长改变

11 个突变菌株分别在富营养的 LB 培养基和营养缺乏的 M9 培养基中培养，其生长曲线见图 2。在 LB 培养基中，WQM018、WQM019、WQM020 和 WQM023 的生长速度和生物量不及对照菌株 MG1655，涉及的组分为核心多糖、O-抗原、克拉酸和纤维素，说明这 4 种组分对菌株的生长至关重要，去除它们可能会造成生物膜变薄或破损，对菌株产生不利影响。其他突变株的生长与对照菌株相当，这可能是由于 LB 培养基中的营养比较丰富，不能明显体现出去除生物膜组分可节约能源和底物及对菌株的促进效果。在 M9 培养基中，WQM013、

WQM014、WQM016 和 WQM024 生长速度和生物量明显优于对照株，涉及组分鞭毛和唾液酸，这可能是由于 M9 培养基（基础培养基）营养匮乏，细菌需要通过自身先合成必需氨基酸或其他关键物质用于鞭毛或唾液酸合成，而去除鞭毛或唾液酸后，细胞可以节约底物和能源用于生长。

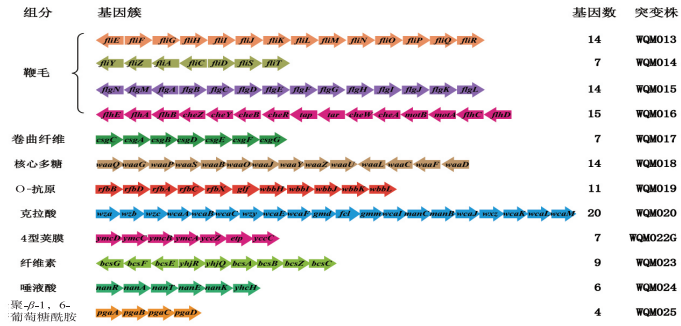


图 1　大肠杆菌 MG1655 的非必需生物膜组分

Fig. 1　Non–essential biofilm components in *E. coli* MG1655

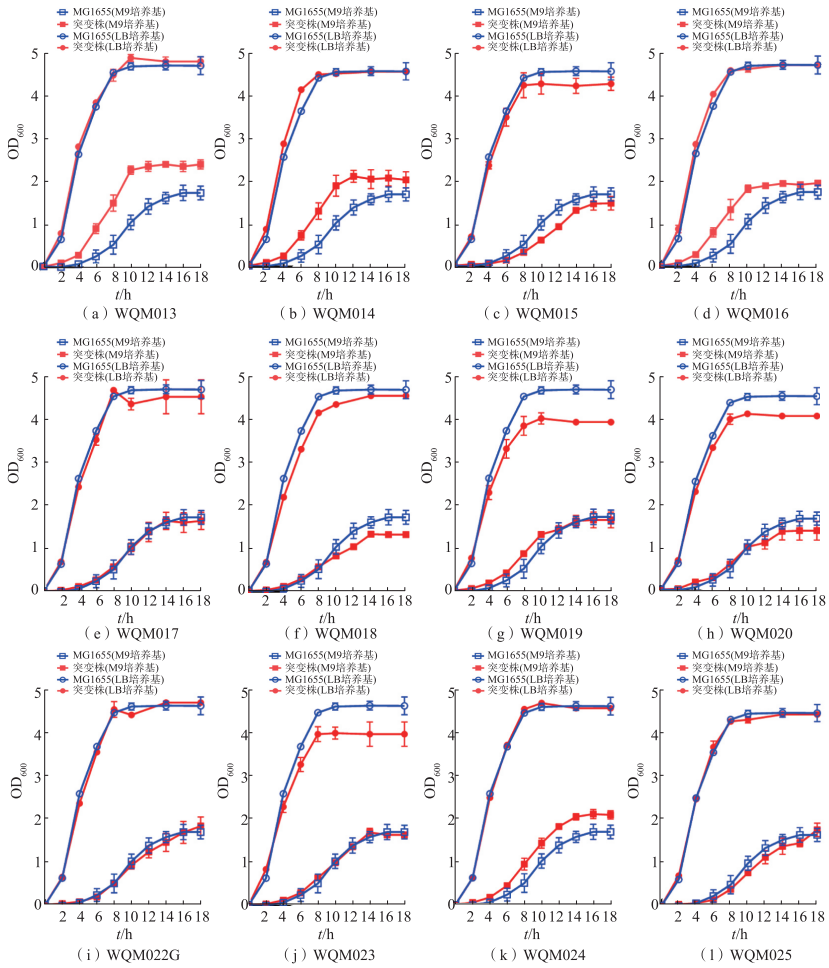


图 2　突变株在 LB 和 M9 培养基中生长曲线

Fig. 2　Growth curves of mutants cultured in LB and M9 medium

2.3 缺失大肠杆菌非必需生物膜组分对膜通透性的影响

大肠杆菌非必需生物膜组分位于细胞外膜和周质空间，它们的缺失会导致生物膜厚度的改变，进而改变膜通透性。有研究表明，敲除 ECA 相关基因后，大肠杆菌膜通透性显著提高[44]。如图 3 所示，突变株 WQM013、WQM014、WQM015、WQM016、WQM018、WQM020 和 WQM024 通透性增加，尤其突变株 WQM018 膜通透性比对照株提高了近 40%。而 WQM013、WQM014、WQM015 和 WQM016 均属于鞭毛缺失突变株，后续实验可以考察 4 个鞭毛基因簇全部敲除后膜通透性的变化。此外，敲除克拉酸和唾液酸基因簇也能显著增加膜通透性，这会更有利于营养物质的吸收以及发酵产物的外排，减少致病菌的耐药性和致病风险。

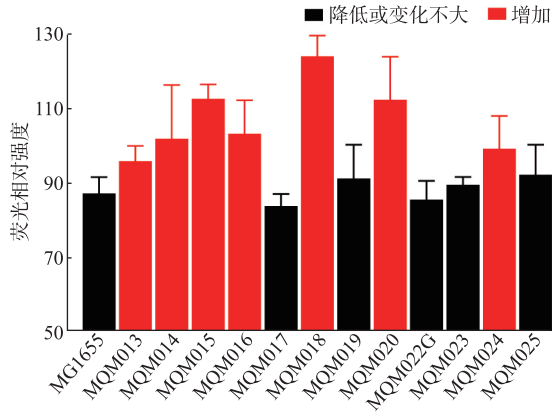


图 3 大肠杆菌非必需生物膜组分缺失突变株的膜通透性

Fig. 3 Membrane permeability of *E. coli* mutants lacking non-essential biofilm components

2.4 大肠杆菌非必需生物膜组分缺失对 PHB 合成的影响

将含有 PHB 合成关键基因 *phaCAB* 的pBHR68 质粒分别导入对照菌株 MG1655 和各突变株，构建了重组菌株 MG1655/pBHR68、WQM013-020/pBHR68、WQM022G/pBHR68、WQM023-025/pBHR68。如图 4 所示，所有含有 pBSK 空载质粒的菌株不能合成 PHB，当转入 PHB 合成质粒后，PHB 产量明显增加。所有突变株在 LBG 培养基中 PHB 的产量与对照菌株相当，产量较低。在 M9G 培养基中，WQM015/pBHR68、WQM018/pBHR68、WQM019/pBHR68、WQM020/pBHR68、WQM022G/pBHR68、WQM023/pBHR68、WQM024/pBHR6-8、WQM025/pBHR68 的 PHB 产量较野生型有所提高，其中 WQM018/pBHR68 的 PHB 产量最高，比对照菌株提高了 35.32%。通过显微镜观察，可以看到突变株WQM015/pBHR68、WQM018/pBHR68、WQM019/pBHR68、WQM020/pBHR68、WQM022G/pBHR68、WQM023/pBHR68、WQM024/pBHR68、WQM025/pBHR68 菌体变长变粗，胞内产生白色 PHB 颗粒，而对照菌株 MG1655/pBHR68 为肉眼不可见白色 PHB 颗粒，见图 5。此外，8 个产 PHB 突变株中，除 W-QM015/pBHR68 为鞭毛突变株外，其他均为胞外多糖突变株。初步判定去除核心多糖、O-抗原、克拉酸、4 型荚膜、纤维素、唾液酸和聚-β-1,6-葡萄糖胺后，可以节约能源和底物，用于 PHB 合成。

2.5 核心多糖缺失对克拉酸合成的影响

作者在构建非必需生物膜组分缺失的突变株时，发现敲除核心多糖的 WQM018 突变株在平板上能长出黏液状菌落。进一步对其产生条件和种类进行初步分析发现，对照株 MG1655 在 37 ℃培养时，无论是在 LB 还是 M9 培养基培养都不产生黏液状菌落，胞外多糖染色视野中看不到媒染的蓝色胞外多糖；而 WQM018 在 M9 培养基中，菌落略显黏稠，镜检视野有少量蓝色媒染的胞外多糖。在 30 ℃培养时，MG1655 在 M9 平板上的菌落略显黏稠，染色后视野微蓝，而 WQM018 在 LB 和 M9 培养基中均能长出明显的黏液状菌落，镜检视野中含有大量的媒染的蓝色胞外多糖，见图 6。

从镜检图片可以看出，WQM018 产生了大量的胞外多糖。为推断所产胞外多糖的种类，以 MG1655 为对照，对 WQM018 的转录水平进行考察。从图 7 可以看出，所有与克拉酸合成和组装相关的基因大幅上调，推断 WQM018 产生的胞外多糖为克拉酸，这与文献报道的截短核心多糖促进克拉酸合成相符[29]。此外，卷曲纤维及菌毛合成的相关基因显著下调，见图 8。结合 WQM018 的膜通透性明显增强的结果，推测促进克拉酸合成的原因为：大肠杆菌 MG1655 去除核心多糖后，突变株 WQM018 膜通透性增强，导致 WQM018 合成大量的克拉酸以维持适当的胞内渗透压。胞外大量克拉酸的积累和分泌又导致了菌毛及卷曲纤维合成的减少。至于为何产生克拉酸维持渗透压，不是其他种类的胞外多糖，还需深入研究。

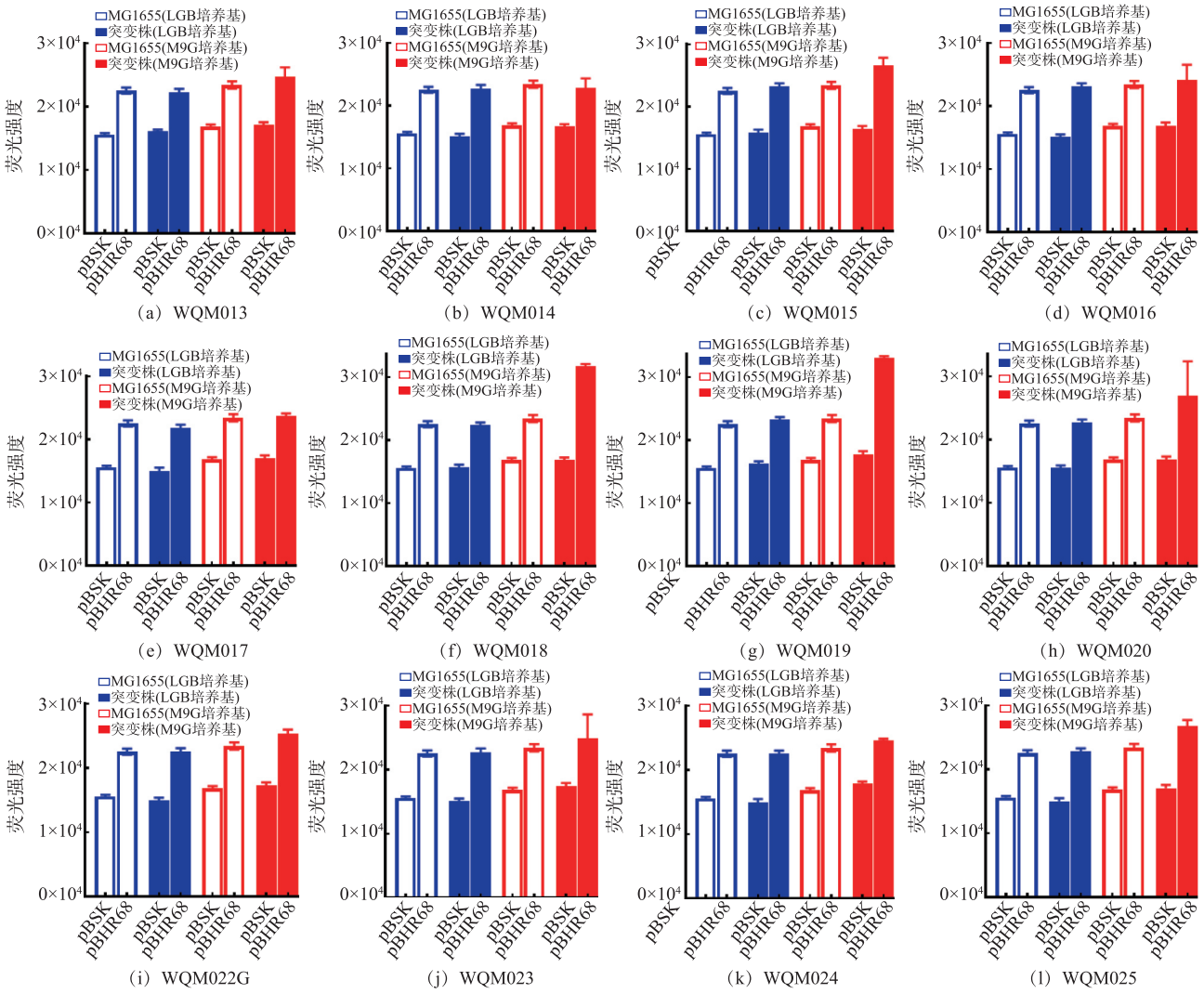


图 4　含有 PHB 生产质粒的突变株产 PHB 能力分析

Fig. 4　Analysis of PHB production ability of mutants containing PHB-producing plasmid

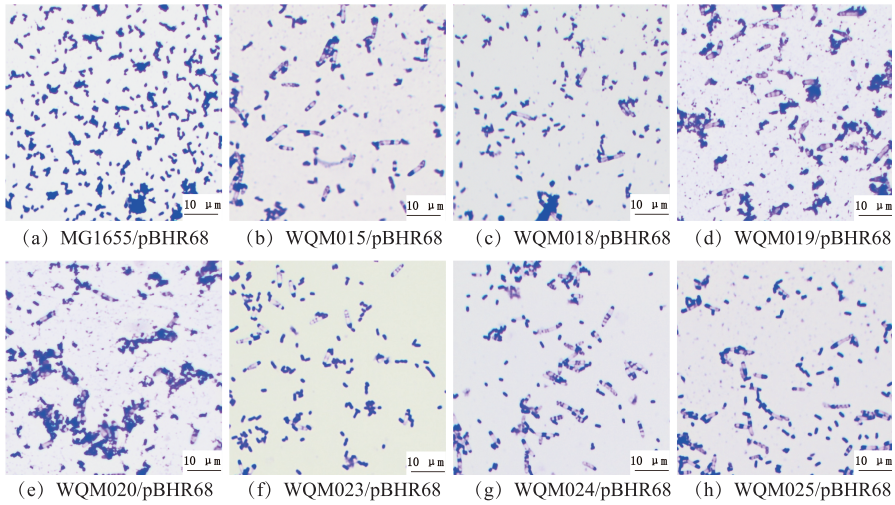


图 5　镜检观察 M9G 培养基中的 PHB 合成菌株

Fig. 5　Microscopic observation of PHB-producing strains in M9G medium

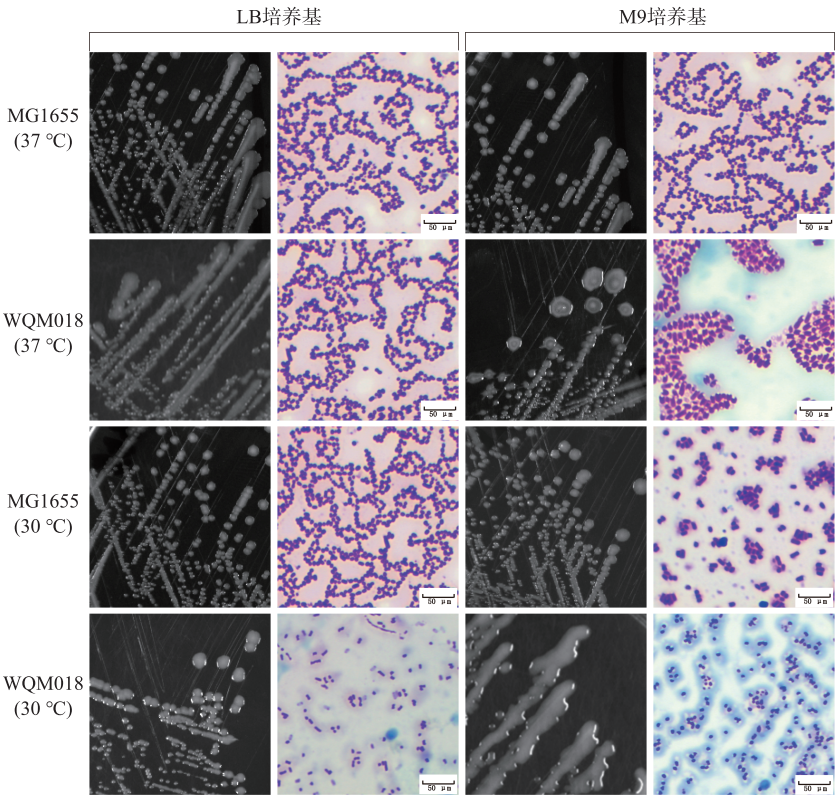


图 6　MG1655 和 WQM018 产胞外多糖观察

Fig. 6　Observation of exopolysaccharides produced by MG1655 and WQM018

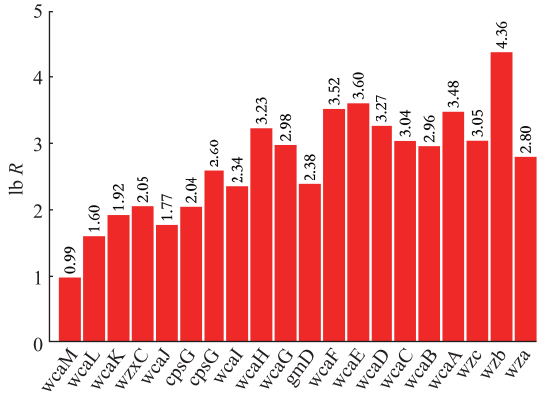


图 7　WQM018 中克拉酸合成基因的转录水平

Fig. 7　Transcriptional levels of genes related to colanic acid biosynthesis in WQM018

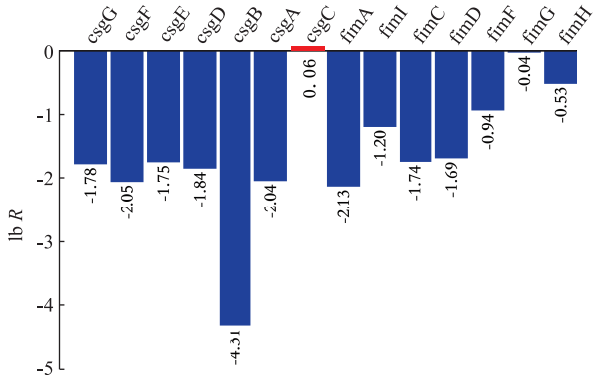


图 8　WQM018 中卷曲纤维和菌毛合成基因的转录水平

Fig. 8　Transcriptional levels of genes related to curl and fimbriae biosynthesis in WQM018

3 结　语

大肠杆菌因其具有清晰的遗传背景和宽松的培养条件常被作为模式菌株,广泛应用于生物工程和工业微生物的研究中。与此同时,大肠杆菌具有复杂且种类繁多的生物膜组分,这些组分在菌体趋化性、抵御外界压力和侵染等方面发挥着重要作用。但是在发酵工业中,这些生物膜组分的合成和组装需要耗费大量的能源和底物,而且某些生物膜组分还存在巨大的安全隐患。

作者以提高菌株优良性能并减少致病风险为出发点,汇总了大肠杆菌生物膜的 11 种非必需生物膜组分,从基因水平分别去除这些生物膜组分,考察其生长、膜通透性、节约碳源和重塑代谢等方面的变化。整体而言,突变株在 LB 培养基中表现出抑制生长或变化不明显。敲除鞭毛 *fliE–R*、*fliY–T* 和

flhE–D 基因簇,构建的 WQM013、WQM014 和 WQM016 在 M9 培养基中生长优于对照菌株。敲除鞭毛基因簇 *flgN–L*,构建的突变株 WQM015 生长变差,但有利于 PHB 合成。分别敲除鞭毛的 4 个基因簇后,通透性都得到增强,因此,应深入研究组合敲除鞭毛 4 个基因簇的突变株。去除胞外多糖类组分基本都能积累 PHB 和增强菌株通透性,下一步应构建组合敲除菌株,进一步增强膜通透性和提高 PHB 产量。但是,在所用胞外多糖组分中,仅敲除 4 型荚膜、唾液酸和聚–β–1,6–葡萄糖胺能促进其在 M9 培养基中的生长。因此,应重点考察这 3 种组分缺失的突变株及鞭毛突变株,进一步提高生长性能。其次,去除大肠杆菌核心多糖能重塑代谢调控,促进克拉酸的生产。这些结果为大肠杆菌非必需生物膜组分存在必要性的研究提供了理论依据,也为其他菌株的改造和发酵产物的产量提高提供了新思路。

参考文献:

[1] FLEMMING H C,WINGENDER J,SZEWZYK U,et al. Biofilms:an emergent form of bacterial life[J]. **Nature Reviews Microbiology**,2016,14(9):563-575.

[2] HOBLEY L,HARKINS C,MACPHEE C E,et al. Giving structure to the biofilm matrix:an overview of individual strategies and emerging common themes[J]. **FEMS Microbiology Reviews**,2015,39(5):649-669.

[3] VACCA I. Biofilms:building up the matrix[J]. **Nature Reviews Microbiology**,2017,15(9):512-513.

[4] SERRA D O,RICHTER A M,HENGGE R. Cellulose as an architectural element in spatially structured *Escherichia coli* biofilms [J]. **Journal of Bacteriology**,2013,195(24):5540-5554.

[5] BRANDA S S,CHU F,KEARNS D B,et al. A major protein component of the *Bacillus subtilis* biofilm matrix[J]. **Molecular Microbiology**,2006,59(4):1229-1238.

[6] BORLEE B R,GOLDMAN A D,MURAKAMI K,et al. *Pseudomonas aeruginosa* uses a cyclic-di-GMP-regulated adhesin to reinforce the biofilm extracellular matrix[J]. **Molecular Microbiology**,2010,75(4):827-842.

[7] BARNHART M M,CHAPMAN M R. Curli biogenesis and function[J]. **Annual Review of Microbiology**,2006,60:131-147.

[8] BROWN M R W,GILBERT P. Sensitivity of biofilms to antimicrobial agents[J]. **Journal of Applied Bacteriology**,1993,74 (22):87S-97S.

[9] GUALDI L,TAGLIABUE L,BERTAGNOLI S,et al. Cellulose modulates biofilm formation by counteracting curli-mediated colonization of solid surfaces in *Escherichia coli*[J]. **Microbiology**,2008,154(7):2017-2024.

[10] KOBAYASHI K,IWANO M. BslA(YuaB) forms a hydrophobic layer on the surface of *Bacillus subtilis* biofilms[J]. **Molecular Microbiology**,2012,85(1):51-66.

[11] HOBLEY L,OSTROWSKI A,RAO F V,et al. BslA is a self-assembling bacterial hydrophobin that coats the *Bacillus subtilis* biofilm[J]. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**,2013,110(33):13600-13605.

[12] SERRA D O,RICHTER A M,KLAUCK G,et al. Microanatomy at cellular resolution and spatial order of physiological differentiation in a bacterial biofilm[J]. **mBio**,2013,4(2):e00103-e00113.

[13] CHAPMAN M R,ROBINSON L S,PINKNER J S,et al. Role of *Escherichia coli* curli operons in directing amyloid fiber formation[J]. **Science**,2002,295(5556):851-855.

[14] CARPENTIER B,CERF O. Biofilms and their consequences,with particular reference to hygiene in the food industry[J]. **The Journal of Applied Bacteriology**,1993,75(6):499-511.

[15] DONLAN R M. Biofilms:microbial life on surfaces[J]. **Emerging Infectious Diseases**,2002,8(9):881-890.

[16] FISHER R A,GOLLAN B,HELAINE S. Persistent bacterial infections and persister cells[J]. **Nature Reviews Microbiology**, 2017,15(8):453-464.

[17] SUNG B H,LEE C H,YU B J,et al. Development of a biofilm production-deficient *Escherichia coli* strain as a host for biotechnological applications[J]. **Applied and Environmental Microbiology**,2006,72(5):3336-3342.

[18] COETSER S E,CLOETE T E. Biofouling and biocorrosion in industrial water systems[J]. **Critical Reviews in Microbiology**, 2005,31(4):213-232.

[19] VAN HOUDT R,MICHIELS C W. Role of bacterial cell surface structures in *Escherichia coli* biofilm formation[J]. **Research in Microbiology**,2005,156(5/6):626-633.

[20] WURPEL D J,BEATSON S A,TOTSIKA M,et al. Chaperone-usher fimbriae of *Escherichia coli*[J]. **PLoS One**,2013,8(1):e52835.

[21] YEO H J. How and why chaperone-usher pilus rods stretch[J]. **Structure**,2017,25(12):1783-1784.

[22] YAN Z F,YIN M,CHEN J N,et al. Assembly and substrate recognition of curli biogenesis system[J]. **Nature Communications**,2020,11(1):241.

[23] NUCCIO S P,BÄUMLER A J. Evolution of the chaperone/usher assembly pathway:fimbrial classification goes Greek[J]. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**,2007,71(4):551-575.

[24] ALTEGOER F,SCHUHMACHER J,PAUSCH P,et al. From molecular evolution to biobricks and synthetic modules:a lesson by the bacterial flagellum[J]. **Biotechnology & Genetic Engineering Reviews**,2014,30(1/2):49-64.

[25] APEL D,SURETTE M G. Bringing order to a complex molecular machine:the assembly of the bacterial flagella[J]. **Biochimica et Biophysica Acta**,2008,1778(9):1851-1858.

[26] MACNAB R M. How bacteria assemble flagella[J]. **Annual Review of Microbiology**,2003,57:77-100.

[27] ALDRIDGE P,HUGHES K T. Regulation of flagellar assembly[J]. **Current Opinion in Microbiology**,2002,5(2):160-165.

[28] GOEBEL W F. Colanic acid[J]. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**,1963,49(4):464-471.

[29] WANG C H,ZHANG H L,WANG J L,et al. Colanic acid biosynthesis in *Escherichia coli* is dependent on lipopolysaccharide structure and glucose availability[J]. **Microbiological Research**,2020,239:126527.

[30] HAN B,SIVARAMAKRISHNAN P,LIN C J,et al. Microbial genetic composition tunes host longevity[J]. **Cell**,2018,173(4):1058.

[31] HAN H M,KIM I J,YUN E J,et al. Overproduction of exopolysaccharide colanic acid by *Escherichia coli* by strain engineering and media optimization[J]. **Applied Biochemistry and Biotechnology**,2021,193(1):111-127.

[32] CHEN S S,CHEN S,WANG J L,et al. Characterization of a gene cluster containing four genes relevant to biosynthesis of inner core of lipopolysaccharide in *Cronobacter sakazakii*[J]. **Biotechnology and Applied Biochemistry**,2022,69(3):1080-1093.

[33] RAI A K,MITCHELL A M. Enterobacterial common antigen:synthesis and function of an enigmatic molecule[J]. **mBio**,2020,11(4):e01914-e01920.

[34] WANG J L,MA W J,FANG Y,et al. Truncating the structure of lipopolysaccharide in *Escherichia coli* can effectively improve poly-3-hydroxybutyrate production[J]. **ACS Synthetic Biology**,2020,9(5):1201-1215.

[35] LIU B,FUREVI A,PEREPELOV A V,et al. Structure and genetics of *Escherichia coli* O antigens[J]. **FEMS Microbiology Reviews**,2020,44(6):655-683.

[36] WHITFIELD C. Biosynthesis and assembly of capsular polysaccharides in *Escherichia coli*[J]. **Annual Review of Biochemistry**,2006,75:39-68.

[37] WHITFIELD C,WEAR S S,SANDE C. Assembly of bacterial capsular polysaccharides and exopolysaccharides[J]. **Annual Review of Microbiology**,2020,74:521-543.

[38] WANG Y,ANDOLE PANNURI A,NI D C,et al. Structural basis for translocation of a biofilm-supporting exopolysaccharide across the bacterial outer membrane[J]. **The Journal of Biological Chemistry**,2016,291(19):10046-10057.

[39] MADISON L L,HUISMAN G W. Metabolic engineering of poly(3-hydroxyalkanoates):from DNA to plastic[J]. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**,1999,63(1):21-53.

[40] ANDERSON A J,DAWES E A. Occurrence,metabolism,metabolic role,and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates[J]. **Microbiological Reviews**,1990,54(4):450-472.

[41] ZINN M,WITHOLT B,EGLI T. Occurrence,synthesis and medical application of bacterial polyhydroxyalkanoate[J]. **Advanced Drug Delivery Reviews**,2001,53(1):5-21.

[42] LEE S Y. Bacterial polyhydroxyalkanoates[J]. **Biotechnology and Bioengineering**,1996,49(1):1-14.

[43] CHANPRATEEP S. Current trends in biodegradable polyhydroxyalkanoates[J]. **Journal of Bioscience and Bioengineering**,2010,110(6):621-632.

[44] QIAO J,TAN X,HUANG D Y,et al. Construction and application of an *Escherichia coli* strain lacking 62 genes responsible for the biosynthesis of enterobacterial common antigen and flagella[J]. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**,2021,69(14):4153-4163.