

DeoR 家族转录因子 PsrB 调控黏质沙雷氏菌合成灵菌红素

潘学玮^{1,2}, 孙长皓^{1,2}, 尤甲甲^{1,2}, 徐美娟^{1,2}, 张显^{1,2},
邵明龙^{1,2}, 杨套伟^{1,2}, 饶志明^{*1,2}

(1. 江南大学 生物工程学院, 江苏 无锡 214122; 2. 江南大学 工业生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214122)

摘要: 灵菌红素 (prodigiosin, PG), 一种由黏质沙雷氏菌产生的次级代谢产物, 因其具有抗细菌、抗疟疾、抗肿瘤和免疫抑制等重要功能而备受关注, 然而, 对黏质沙雷氏菌合成灵菌红素的调控机制的了解依然有限。作者以黏质沙雷氏菌 JNB5-1 为出发菌株, 通过构建 Tn5G 转座子插入突变文库, 发现并解析了 DeoR 家族转录调控因子 BVG90_04085 (PsrB) 正调控黏质沙雷氏菌合成灵菌红素的分子机制。结果发现, LB 培养基中 *psrB* 突变株 SK8-61 和 Δ PsrB 产灵菌红素能力仅为出发菌株 JNB5-1 的 0.22 倍和 0.26 倍。RT-qPCR 分析菌株 JNB5-1 及 Δ PsrB 中 *pig* 基因簇的表达水平发现, 相比于出发菌株 JNB5-1, 在 *psrB* 缺失突变株 Δ PsrB 中, 灵菌红素合成途径关键基因 *pigABCDEFGHIJKLMN* 的表达水平下调了 5.81~22.93 倍。凝胶阻滞 EMSA 等实验证实转录因子 PsrB 可直接与 *pig* 基因簇启动子区域结合, 表明转录因子 PsrB 正调控黏质沙雷氏菌合成灵菌红素的分子机制可能为: PsrB 与灵菌红素合成基因簇启动子区域直接结合, 正向调控 *pig* 基因簇的转录水平, 进而影响黏质沙雷氏菌合成灵菌红素。最后, 发酵培养基中 *psrB* 过表达菌株 JNB5-1/pXW1906 可合成 8.61 g/L 的灵菌红素, 为出发菌株 JNB5-1 (5.53 g/L) 的 1.56 倍。

关键词: 黏质沙雷氏菌; 转录因子 PsrB; 灵菌红素; *pig* 基因簇

中图分类号: TS 264 文章编号: 1673-1689(2021)10-0021-13 DOI: 10.3969/j.issn. 1673-1689.2021.10.004

DeoR Family Regulator PsrB Regulates Prodigiosin Synthesis in *Serratia marcescens*

PAN Xuewei^{1,2}, SUN Changhao^{1,2}, YOU Jiajia^{1,2}, XU Meijuan^{1,2}, ZHANG Xian^{1,2},
SHAO Minglong^{1,2}, YANG Taowei^{1,2}, RAO Zhiming^{*1,2}

(1. School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Wuxi 214122, China)

Abstract: Prodigiosin (PG), a secondary metabolite produced by *Serratia marcescens*, has attracted attention owing to its anti-microbial, anti-malaria, anti-tumor and immunosuppressive activities. However, there is still limited understanding of the regulatory mechanism for prodigiosin biosynthesis

收稿日期: 2020-09-04

基金项目: 国家自然科学基金项目(31870066); 国家“十三五”重点研发计划项目(2018YFA0900300); “万人计划”科技创新领军人才项目。

* 通信作者: 饶志明(1975—), 男, 博士, 教授, 博士生导师, 主要从事应用微生物及代谢工程方面的研究。

E-mail: raozhm@jiangnan.edu.cn

in *S. marcescens*. In this study, a Tn5G transposon insertion mutant library using the strain *S. marcescens* JNB5-1 as the parental strain was constructed, and BVG90_04085(PsrB), a DeoR family transcription regulator, was identified and elucidated to positively regulate prodigiosin production in strain JNB5-1. Further, the molecular mechanism behind PsrB in regulating prodigiosin production in this strain was investigated. Results showed that when fermentation was done in LB medium, the prodigiosin productivity of *psrB* mutants SK8-61 and Δ PsrB was only 0.22 and 0.26 times as high as that of the parental strain JNB5-1. The expression level of *pig* gene cluster analyzed by RT-qPCR showed that the *psrB* deletion mutant Δ PsrB comparing with the parental strain JNB5-1, and the expression level of a key gene in the prodigiosin pathway, *pigABCDEFGHIJKLMN*, was down-regulated by 5.81 to 22.93 times. Further, electrophoretic mobility shift assay (EMSA) and other experiments confirmed that regulator PsrB could directly bind to the promoter region of the *pig* gene cluster, suggesting that the molecular mechanism by which PsrB regulated prodigiosin production in *S.marcescens* was probably through direct binding to the *pig* gene cluster, and thus positively regulated the transcriptional level of *pig* gene cluster, affecting the synthesis of prodigiosin in *S. marcescens*. Finally, the *psrB* overexpressed strain JNB5-1/pXW1906 found during prodigiosin fermented in the fermentation medium could synthesize 8.61 g/L prodigiosin, which was 1.56 times of that produced by the parental strain JNB5-1 (5.53 g/L).

Keywords: *Serratia marcescens*, regulator PsrB, prodigiosin, *pig* gene cluster

灵菌红素(Prodigiosin, PG)作为一种具有3个吡咯环的甲氧基吡咯骨架结构类物质,是一种微生物次级代谢产生的重要天然红色素^[1]。研究发现,灵菌红素具有抗细菌、抗疟疾、抗肿瘤和免疫抑制等重要功能,在医药开发、环境治理和染料制备等领域具有巨大的应用价值^[2-6]。目前,灵菌红素的制备方法主要包括化学合成法和微生物法。由于化学合成法反应步骤多、产率低,难以实现灵菌红素的大规模生产。而微生物法生产灵菌红素具有环境友好、条件温和、成本低和易于工业化生产等优点,因此近年来微生物法生产灵菌红素已成为国内外研究热点。而自然界中产灵菌红素的微生物种类主要包括:沙雷氏菌属(*Serratia* Sp.)、假单胞菌属(*Pseudomonas* Sp.)、河氏菌属(*Hahella* Sp.)、弧菌属(*Vibrio* Sp.)和海洋新细菌(*Zooshikella rubidu*)等^[7-11],其中研究最为广泛的为黏质沙雷氏菌(*Serratia marcescens*),该菌又被称为灵杆菌,是一种常见的革兰氏阴性菌,广泛存在于土壤、水、植物、昆虫和食品等环境中。

对黏质沙雷氏菌合成灵菌红素的代谢调控网络研究发现,黏质沙雷氏菌合成灵菌红素受多个基

因的共同调控,这些基因可被分为两大类:灵菌红素生物合成途径所必须基因以及编码转录调控因子相关基因。其中,黏质沙雷氏菌合成灵菌红素的代谢途径见图1。该代谢途径由*pig*基因簇上14个基因所控制,通过两个分支途径合成灵菌红素,这两个分支途径分别合成灵菌红素的两个前体物质2-甲基-3-戊基吡咯(MAP)和4-甲氧基-2,2-二吡咯-5-羧甲基乙醛(MBC),两者经缩合酶PigC作用生成灵菌红素。其中,MAP以2-辛烯醛为起始前体,在基因*pigD*、*pigE*和*pigB*的催化下氧化脱氢形成MAP。MBC的合成以L-脯氨酸为起始底物,在基因*pigI*、*pigG*、*pigA*、*pigJ*、*pigH*、*pigM*、*pigF*和*pigN*的作用下生成MBC^[12]。在黏质沙雷氏菌中,灵菌红素的合成也受到多个转录调控因子的直接或间接调控,包括灵菌红素合成负调控因子MetR^[13]、SpnR^[14]和SmaR^[15],以及正调控因子EepR^[16]、PigP^[17]和RbsR^[18]。尽管这些基因参与调控黏质沙雷氏菌合成灵菌红素,但是我们对黏质沙雷氏菌合成灵菌红素背后的调控机制的了解依然有限。

以作者所在实验室先前分离至土壤中的黏质沙雷氏菌JNB5-1为研究对象^[13,19],构建转座子插入

突变文库发现, DeoR 家族转录调控因子 PsrB 正调控黏质沙雷氏菌合成灵菌红素。通过 RT-qPCR、融合报告基因的构建及 EMSA 等实验证实, 转录因子 PsrB 通过直接与黏质沙雷氏菌灵菌红素合成基因簇 *pig* 基因簇结合, 刺激 *pig* 基因簇的转录水平, 最

终影响黏质沙雷氏菌合成灵菌红素。该研究探索了黏质沙雷氏菌合成灵菌红素的调控机制, 并为代谢工程改造黏质沙雷氏菌生产灵菌红素提供了一种新的策略。

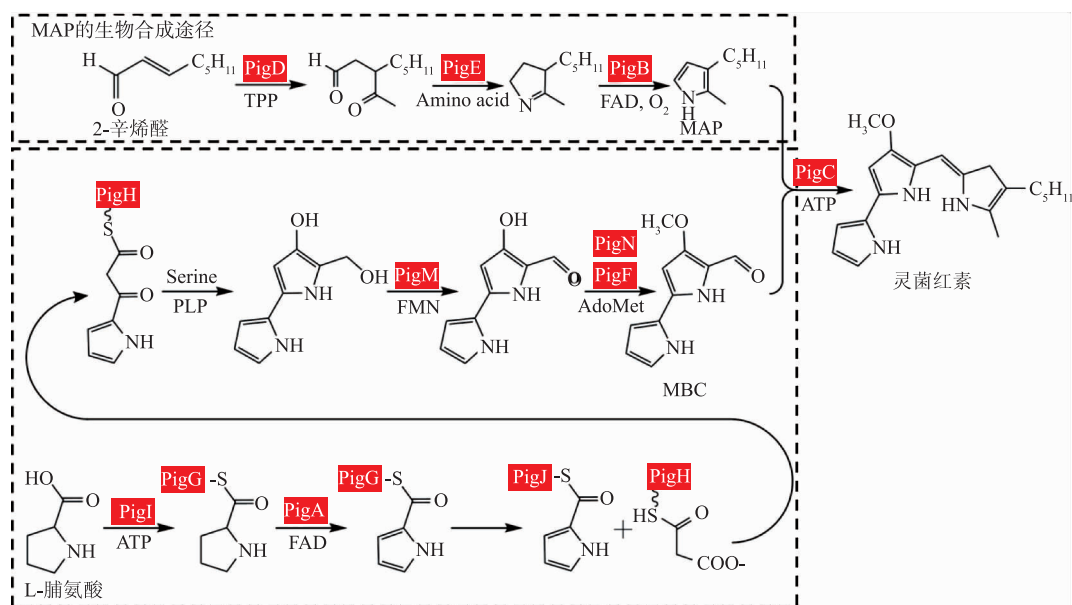


图 1 黏质沙雷氏菌中灵菌红素合成途径

Fig. 1 Prodigiosin biosynthesis pathway in *S. marcescens*

1 材料与方法

1.1 菌株与质粒

黏质沙雷氏菌 (*Serratia marcescens*) JNB5-1: 作者所在实验室先前从土壤中筛选得到^[13,19]; K8-61: 本研究筛选得到的灵菌红素合成能力显著下降 Tn5G 转座子插入突变株; ΔPsrB: 本研究构建得到基因 *psrB* 缺失突变株; 大肠杆菌 (*Escherichia coli*) DH5α 和 BL21(DE3): 购自生工生物工程(上海)股份有限公司; 质粒 pUCP18 和 pDN19lacΩ: 作者所在实验室保存; 重组质粒 pXW1906 和 pXW1905 等: 本研究构建。本研究使用的菌株和质粒见表 1。

1.2 试剂

质粒 DNA 提取试剂盒、琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒和细菌基因组 DNA 提取试剂盒: 购自上海捷瑞生物工程有限公司; ClonExpress® II One Step Cloning Kit, 2×Phanta® Max Master Mix, HiScript® II Q RT SuperMix for qPCR(+gDNA wiper) 和 ChamQ™

Universal SYBR® qPCR Master Mix: 购自南京诺唯赞生物科技有限公司; RNAprep Pure Cell/Bacteria Kit: 购自天根生化科技(北京)有限公司; *EcoR* I、*Bam*H I 和 *Hind* III 等限制性内切核酸酶: 购自宝日医生物技术(北京)有限公司; 庆大霉素、氨基青霉素和硫酸安普霉素等抗生素: 购自上海阿拉丁生化科技有限公司; 其他试剂: 均购自国药集团化学试剂有限公司。

1.3 培养基与培养条件

大肠杆菌采用 LB 培养基(蛋白胨 10 g/L, 酵母提取物 5 g/L, 氯化钠 10 g/L, pH 7.0), 于 37 °C 下 180 r/min 进行培养; 黏质沙雷氏菌采用 LB 培养基于 30 °C 下 180 r/min 进行培养; 黏质沙雷氏菌发酵产灵菌红素时, 培养基为 LB 培养基或特定的发酵培养基(蔗糖 20 g/L、牛肉膏 15 g/L、CaCl₂ 10 g/L、脯氨酸 7.5 g/L、MgSO₄·7H₂O 0.2 g/L 和 FeSO₄·7H₂O 0.06 g/L, pH 7.0)。在培养大肠杆菌时, 将向培养基中加入终质量浓度为 10 μg/mL 的庆大霉素、25 μg/mL

表 1 本研究所用的菌株及质粒

Table 1 Strains and plasmids used in this study

菌株和质粒	性状	来源
<i>E. coli</i> strains		
DH5 α	<i>hsdR recA lacZYAF80 lacZDM15</i>	BRL
BL21 (DE3)	F- <i>dcm ompT hsdS</i> (rB-mB-) <i>gal</i> λ (DE3)	作者所在实验室保存
S17-1	F- <i>recA hsdR RP</i> ₄₋₂ (Tc::Mu)(Km::Tn7) lysogenized with λ pir phage	作者所在实验室保存
DH5 α /pUCP18/pXW1905	<i>E. coli</i> DH5 α containing plasmids pUCP18 and pXW1905	本研究
DH5 α /pXW1906/pXW1905	<i>E. coli</i> DH5 α containing plasmids pXW1906 and pXW1905	本研究
<i>S. marcescens</i> strains		
JNB5-1	<i>S. marcescens</i> wild type strain	[13]
SK8-61	<i>psrB::Gm</i> ^R mutant of JNB5-1, prodigiosin lower-producing mutant	本研究
SK8-61/pXW1906	Mutant SK8-61 containing plasmid pXW1906	本研究
Δ PsrB	<i>psrB</i> deleted mutant of <i>S. marcescens</i> JNB5-1	本研究
Δ PsrB/pXW1906	Mutant Δ PsrB containing plasmid pXW1906	本研究
JNB5-1/pXW1906	<i>psrB</i> overexpressed strain of <i>S. marcescens</i> JNB5-1	本研究
JNB5-1/pXW1905	<i>S. marcescens</i> JNB5-1 containing plasmid pXW1905	本研究
SK8-61/pXW1905	<i>S. marcescens</i> SK68 containing plasmid pXW1905	本研究
Plasmids		
pRK2013Tn5G	Tn5G carrying plasmid, Km ^R Gm ^R	[20]
pMD18T	Cloning vector, 2 692 bp, Amp ^R , <i>lacZ</i>	TaKaRa
pET28a(+)	<i>E. coli</i> expression vector, Km ^R	作者所在实验室保存
pUCP18	Broad-host-range shuttle vector, Amp ^R	[21]
pXW1906	<i>psrB</i> gene driven by <i>Plac</i> promoter cloned in pUCP18, Amp ^R	本研究
pDN19lac Ω	Promoterless <i>lacZ</i> fusion vector, Sp ^R Sm ^R Tc ^R	[22]
pXW1905	Promoter of <i>pig</i> operon cloned in pDN19lac Ω plasmid, Sp ^R Sm ^R Tc ^R	本研究
pUTKm	Tn5-based delivery plasmid with Km ^R Amp ^R	[23]

的硫酸链霉素、25 μ g/mL 的壮观霉素、50 μ g/mL 的卡那霉素或 50 μ g/mL 氨苄青霉素；培养黏质沙雷氏菌时，将向培养基中加入终质量浓度为 50 μ g/mL 的庆大霉素、25 μ g/mL 的硫酸链霉素、25 μ g/mL 的壮观霉素、50 μ g/mL 的硫酸安普霉素或 150 μ g/mL 氨苄青霉素。

1.4 转座子插入突变文库的构建以及突变株 SK8-61 的筛选

以大肠杆菌 *E. coli*/pRK2013 Tn5G 为供体菌，黏质沙雷氏菌 *S. marcescens* JNB5-1 为受体菌，利用接合转移的方式构建 Tn5G 转座子插入突变文库，得到黏质沙雷氏菌 Tn5G 转座子插入突变文库^[13]。突变文库中的突变子经在含抗生素庆大霉素 (50 μ g/mL) 和氨苄青霉素 (50 μ g/mL) 的双抗平板上过夜培养 24 h 后，观察菌落的颜色，挑取菌落颜色显著下降的突变株作为灵菌红素合成能力显著下降的潜在突变株。然后将这些突变株及野生型菌株

JNB5-1 接种至 LB 培养基中进行过夜培养后 (16 h)，按照体积分数 4% 接种至新鲜的 LB 培养基中进行发酵培养，以进一步确定突变株合成灵菌红素能力，最终筛选得到灵菌红素合成能力显著下降的突变株 SK8-61。

1.5 突变株 SK8-61 中 Tn5G 转座子插入位点的鉴定

突变株 SK8-61 中 Tn5G 转座子插入位点的鉴定按照文献[24]的反向 PCR 方法进行。提取得到菌株 SK8-61 基因组 DNA 后，用限制性内切酶 *Taq* I 酶切突变株基因组 DNA，之后 DNA 连接酶自连得到环状的 DNA 片段。然后以环状的 DNA 片段为模板，利用引物 OTn1 和 OTn2 进行反向 PCR 得到 DNA 片段。扩增得到的 DNA 片段经测序后与 NCBI 数据库进行比对 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)，以确定 Tn5G 转座子的插入位点。为进一步验证被阻断基因的功能，以黏质沙雷氏菌 JNB5-1 基因组 DNA

为模板, P_{srB}-F1 和 P_{srB}-R1 为引物扩增得到被破坏基因的完整序列并克隆至载体 pUCP18 上得到重组质粒 pXW1906。将重组质粒转移至突变株 SK8-61 中进行功能互补实验, 以证实转录因子 P_{srB} 对于黏质沙雷氏菌合成灵菌红素的重要性。本研究中所用到的引物见表 2。

1.6 *psrB* 缺失突变株 ΔP_{srB} 及 *psrB* 过表达菌株 JNB5-1/pXW1906 的构建

如采用基因替换的方法对菌株 JNB5-1 的 *psrB* 基因进行失活^[13]。通过对引物扩增得到靶基因 *psrB* 基因的上下游片段和 *aacC3* 抗性基因的 DNA 片段。通过重叠延伸 PCR 将 *aacC3* 基因整合到目标基因上下游片段的中间, 然后将该 PCR 产物克隆至 pUTKm 载体中得到重组质粒 pUTKm-P_{srB}。将得到的质粒 pUTKm-P_{srB} 转化至大肠杆菌 S17-1 中得到重组菌株 S17-1/pUTKm-P_{srB}。最后以大肠杆菌 *E. coli* S17-1/pUTKm-P_{srB} 为供体菌、黏质沙雷氏菌 JNB5-1 为受体菌, 通过接合转移的方法对黏质沙雷氏菌 JNB5-1 的 *psrB* 基因进行敲除。*psrB* 过表达菌株 JNB5-1/pXW1906 的构建方法, 是将构建得到的携带有 *psrB* 基因的重组质粒 pXW1906 导入至菌株 JNB5-1 中得到重组菌株 JNB5-1/pXW1906。

1.7 生长曲线的测定

测定菌株 JNB5-1、SK8-61、SK8-61/pXW1906、ΔP_{srB}、ΔP_{srB}/pXW1906 及 JNB5-1/pXW1906 的生长曲线。对数生长期细胞(OD₆₀₀=0.8)转接至新鲜的液体 LB 培养基中, 于 30 °C、180 r/min 下连续培养, 每隔 0、2、4、6、8、10、12、24 h 检测培养液的光密度 A_{600 nm}, 绘制得到菌株 JNB5-1、SK8-61、SK8-61/pXW1906、ΔP_{srB}、ΔP_{srB}/pXW1906 及 JNB5-1/pXW1906 的生长曲线^[13]。

1.8 RNA 的提取和 RT-qPCR

为验证转录因子 P_{srB} 对黏质沙雷氏菌灵菌红素合成基因簇 *pig* 基因簇基因表达水平的影响, 将过夜培养的黏质沙雷氏菌野生型菌株 JNB5-1 及 *psrB* 突变株 ΔP_{srB}, 以 4% 的接种体积分数分别接种于新鲜的液体 LB 培养基中, 于 30 °C、180 r/min 培养 12 h, 取 1 mL 样品用 RNAPrepPure Cell/Bacteria Kit (DP430) 试剂盒 (Tiangen Biotech, China) 提取样品总 RNA, 然后利用 HiScript[®] II Q RT SuperMix for qPCR (+gDNA wiper) (R223-01) 试剂盒 (Vazyme Biotech, China) 对 RNA 进行反转录获得

cDNA, 再利用 StepOnePlus 荧光定量 PCR 仪 (Applied Biosystems) 进行 RT-qPCR 分析, 以分析基因 *pigABCDEFGHIJKLMN* 在菌株 JNB5-1 及 SK8-61 中的表达水平。RT-qPCR 具体操作参照 ChamQ[™] Universal SYBR[®] qPCR Master Mix (Q311) 试剂盒说明书进行, 反应条件为: 95 °C 预变性 30 s, 95 °C 10 s, 60 °C 30 s, 共 40 个循环, 然后 95 °C 15 s, 60 °C 60 s, 95 °C 15 s。每个目的基因均进行 3 次生物学重复, 计算平均阈值循环。编码 16S rDNA 的基因被作为内参基因进行定量, 最后使用 2^{-ΔΔC_t} 方法计算相对表达水平。

1.9 转录融合报告基因的构建

参考文献[25-26]的方法构建转录融合报告基因^[25-26]。首先根据黏质沙雷氏菌 UMH8 基因组序列 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/CP018927.1>), 设计引物 PigA-F 和 PigA-R, 以黏质沙雷氏菌 JNB5-1 基因组 DNA 为模板, 扩增得到携带有 *pig* 操纵子启动子区域的 DNA 片段, 然后将该 DNA 片段连接至载体 pDN19lacΩ 中得到重组质粒 pXW1905。重组质粒 pXW1905 转化 *E. coli* DH5α 感受态细胞, 在含硫酸链霉素 (50 μg/mL) 和壮观霉素 (50 μg/mL) 的双抗平板上筛选得到转化子。提取转化子中的质粒, 经 *EcoR* I 和 *Bam*H I 双酶切后验证重组菌株 *E. coli* DH5α/pXW1905 是否构建成功。为检测野生型菌株 JNB5-1 及 *psrB* 缺失突变株 SK8-61 中 *pig* 基因簇的表达差异, 重组质粒 pXW1905 将通过电转的方式分别转移至菌株 JNB5-1 及 SK8-61 中得到重组菌株 JNB5-1/pXW1905 和 SK8-61/pXW1905。为体内证实转录因子 P_{srB} 与 *pig* 基因簇启动子区域间的直接相互作用, 质粒 pXW1906 和 pUCP18 将分别转移至菌株 *E. coli* DH5α/pXW1905 中, 得到重组菌株 *E. coli* DH5α/pUCP18/pXW1905 和 *E. coli* DH5α/pXW1906/pXW1905。

1.10 β-半乳糖苷酶酶活的测定

将过夜培养的菌株 *S.marcescens* JNB5-1/pXW1905 和 SK8-61/pXW1905、*E. coli* DH5α/pUCP18/pXW1905 和 DH5α/pXW1906/pXW1905 分别转接至新鲜的液体 LB 培养基, 30 °C 或 37 °C 振荡培养至 A_{600 nm} 为 3.0, 按照标准的 Miller 方法检测由 *lacZ* 基因编码的 β-半乳糖苷酶酶活, 即取上述菌液于试管中, 向试管中加入 80 μL 质量分数 0.1%

SDS, 80 μ L 氯仿, 3 mL Z-buffer, 800 μ L ONPG (4 g/L), 待反应液变黄后, 加入 1 mol/L 碳酸钠溶液终止反应并记录反应时间。将反应液离心, 吸取上清测定 $A_{420\text{nm}}$ 下的吸光值, 利用公式 $M_{\text{nit}} = (1000 \times A_{420\text{nm}}) / (T \times A_{600\text{nm}})$ 计算酶活。

1.11 凝胶迁移实验 (EMSA)

参照文献[25]报道的 EMSA 实验方法, 证明转录因子 PsrB 是否直接与 *pig* 操纵子启动子区域结合^[25]。EMSA 实验的流程为: 1) 以黏质沙雷氏菌 JNB5-1 基因组 DNA 为模板, 表 2 中所列的引物对 PsrB-F2/PsrB-R2 为引物, 扩增得到 *psrB* 基因, 并将 PCR 产物克隆至携带有 His 标签的 pET28a(+) 表达载体中得到重组菌株 BL21/pET28a(+)-PrsB, 该菌

株经过 IPTG 诱导 *psrB* 基因表达后, 纯化得到 PsrB 蛋白; 2) 以黏质沙雷氏菌 JNB5-1 基因组 DNA 为模板, 表 2 中所列的引物对 PigA-F/PigA-R 为引物, 扩增得到携带有 *pig* 操纵子启动子区域的 DNA 片段; 3) 将纯化的携带有 *pig* 操纵子启动子区域的 DNA 片段与 PsrB 蛋白的系列稀释液在添加有 2 \times 结合缓冲液 (40 mmol/L Tris HCl, 4 mmol/L MgCl₂, 100 mmol/L NaCl, 10% 甘油, 2 mmol/L DTT, 0.2 mg/mL BSA 和 1 mmol/L EDTA) 的 EP 管中一起室温静置 30 min; 4) 在 5 g/dL 的非变性 PAGE 凝胶上进行电泳, 用溴化乙啶染色, 以显示 PsrB 蛋白是否能与携带有 *pig* 操纵子启动子区域的 DNA 片段结合。

表 2 本研究所用到的引物

Table 2 Primers used in this study

引物	引物序列(5'-3')	功能
OTn1	GATCCTGGAAAACGGGAAAG	Identification of Tn5G in mutant SK8-61
OTn2	CCATCTCATCAGAGGTAGT	
PsrB-F1	CGCGAATTCGTGATACCTGTAGAACGCCATCAACA	Amplification of <i>psrB</i> gene for complement experiment
PsrB-R1	CGCGGATCCTTATTCTTCTCCGCGCTCAGCA	
PsrB-F2	CGCGGATCCGTGATACCTGTAGAACGCCATCAACA	Overexpression of <i>psrB</i> gene in plasmid pET28a(+)
PsrB-R2	CGCAAGCTTTTATTCTTCTCCGCGCTCAGCA	
PigA-F	CGCGGATCCGACGAACCTCCGCCATTGGGTTG	Amplification of the <i>pig</i> operon promoter region
PigA-R	CGCGAATTCCTTTTCTCCGGAATGCTCCTGC	
PigA-RT-F	ATGGCTTTATGGGCGTGTC	qPCR primers, coding region of gene <i>pigA</i>
PigA-RT-R	GAGAGGCAATCTTTCCGGCT	
PigB-RT-F	AACCGACGACGACTTACCC	qPCR primers, coding region of gene <i>pigB</i>
PigB-RT-R	CGGTCTGAGCGGCGTATATAAATC	
PigC-RT-F	AAGTTCACGACCCGCTACGC	qPCR primers, coding region of gene <i>pigC</i>
PigC-RT-R	GGGGCCATAGGGTTTTTGTAC	
PigD-RT-F	TGATAGGTATTGATGACGGACAGAC	qPCR primers, coding region of gene <i>pigD</i>
PigD-RT-R	CCATCCGAGTTGCTGAATAAA	
PigE-RT-F	GGGTGTTCTTCAGCAACTCCG	qPCR primers, coding region of gene <i>pigE</i>
PigE-RT-R	CGGCGGTGTTTGTCTCGTC	
PigF-RT-F	CTCGCCCATAGCGGATACA	qPCR primers, coding region of gene <i>pigF</i>
PigF-RT-R	GTTGAGCGACGAACCCCACT	
PigG-RT-F	TCCTGACGCAGAAAATCCACC	qPCR primers, coding region of gene <i>pigG</i>
PigG-RT-R	TGAATGCTCAAACCCCGCTG	
PigH-RT-F	CAAACGAAGCCGCTAACCC	qPCR primers, coding region of gene <i>pigH</i>
PigH-RT-R	CACGGCGGAACACTTCAATATG	
PigI-RT-F	CGAAGTGCTCAGATCAAAGGC	qPCR primers, coding region of gene <i>pigI</i>
PigI-RT-R	CTTCAGGCTCCACAGGCACC	

续表 2

引物	引物序列(5'-3')	功能
PigJ-RT-F	ATGGCGTGAGCGGTGTAGG	qPCR primers, coding region of gene <i>pigJ</i>
PigJ-RT-R	CATCGACTATCAGCCCATCACC	
PigK-RT-F	GCCTGGTAATCGGTCGTCTCC	qPCR primers, coding region of gene <i>pigK</i>
PigK-RT-R	GCTAAAAGACATCGCCACCCG	
PigL-RT-F	ACGGTTGTCCACTCGCCTCAT	qPCR primers, coding region of gene <i>pigL</i>
PigL-RT-R	CCTCTGTGCGCGGTGAAAAA	
PigM-RT-F	GCTCGGCACTTTCGTCGTTC	qPCR primers, coding region of gene <i>pigM</i>
PigM-RT-R	CTTTCAAGTGGCGTTTCATCCTC	
PigN-RT-F	AACATCGGGCGAGTGTCTCTG	qPCR primers, coding region of gene <i>pigN</i>
PigN-RT-R	TTGCCCTGCTGGCGTTTATTA	
16S rRNA-RT-F	CACACCGCCCCGTCACACCA	qPCR primers, coding region of gene 16S rRNA
16S rRNA-RT-R	CGCAGGTTCCCCTACGGTTAC	
P _s rB-D-U-F	TAGGCCGAATTCGAGCTCGGTACCCGATTTGGGGCAGATAGTCGC	The upstream fragment for knocking out the <i>psrB</i> gene
P _s rB-D-U-R	TTGAATGTATTTAGAAAAATAACAAATAGGGTTCCGCGGTTCCCTCTCGTTGCTGCG	
P _s rB-D-D-F	ATCGGAAGAATGCGATGCGGCTCGCCAGTCGATTGGCTGAGCGGGAGGCCATTGAGCAAG	The downstream fragment for knocking out the <i>psrB</i> gene
P _s rB-D-D-R	ATTACAGCCGGATCCCCGGGTACCGCG-GACTATGGCTACCCGCT	
AacC3-D-F	CGCGGAACCCCTATTTGTTTATTTTCT	Amplification of <i>aacC3</i> gene for gene knocking out
AacC3-D-R	TCAGCCAATCGACTGGCGAGC	

1.12 黏质沙雷氏菌 JNB5-1、SK8-61、ΔP_srB 及 JNB5-1/pXW1906 发酵产灵菌红素能力分析 参照文献[27]的方法^[27],对黏质沙雷氏菌 JNB5-1、SK8-61、SK8-61/pXW1906、ΔP_srB/pXW1906 及 JNB5-1/pXW1906 于 LB 培养基或发酵培养基中发酵产灵菌红素能力进行分析。上述菌株对数生长期初期 (OD₆₀₀=0.8) 细胞以 4% 的接种体积分数转接至 LB 培养基或发酵培养基中, 间隔相应时间点取样, 溶于酸性乙醇 (pH 3.0) 中, 然后室温静置 8 h, 离心取上清液, 测定波长 A₅₃₅ 下样品的吸光值, 最后根据公式 $Y=1.193\ 6X-0.001$ 计算不同时间点各菌株产灵菌红素量 (Y 表示发酵液溶于酸性乙醇 (pH 3.0) 时, 于波长 A₅₃₅ 下测定得到的吸光值; X 表示菌株产灵菌红素的量)。

2 结果与分析

2.1 P_srB 对黏质沙雷氏菌合成灵菌红素的影响

为筛选得到黏质沙雷氏菌合成灵菌红素相关基因, 按照图 2(a) 所示的方法, 以大肠杆菌 *E. coli*

pRK2013 Tn5G 为供体菌, 黏质沙雷氏菌 *S. marcescens* JNB5-1 为受体菌, 构建 Tn5G 转座子插入突变文库, 筛选得到了黏质沙雷氏菌合成灵菌红素能力显著下降突变株 SK8-61。反向 PCR 鉴定突变株 SK8-61 被阻断基因发现, 突变株 SK8-61 被阻断基因为 *BVG90_04085*, 转座子 Tn5G 插入位点位于基因 *BVG90_04085* 编码区第 94 bp 和第 95 bp 之间, 见图 2(b)。进一步通过生物信息学分析发现, 基因 *BVG90_04085* 编码的转录调控因子 *BVG90_04085* 在其 N 端具有一个螺旋转角螺旋 (HTH) 的 DNA 结合域, C 端具有一个 DeoRC 的结构域。

摇瓶发酵分析突变株 SK8-61 及野生型菌株 JNB5-1 于 LB 培养基中合成灵菌红素能力发现, 较野生型菌株 JNB5-1 相比, 突变株 SK8-61 合成灵菌红素能力显著降低, 发酵 24 h 后, 野生型菌株 JNB5-1 可合成 51.22 mg/L 的灵菌红素, 而突变株 SK8-61 仅合成 11.21 mg/L 的灵菌红素, 为野生型菌株的 0.22 倍, 见图 3。在功能互补实验中, 将基因

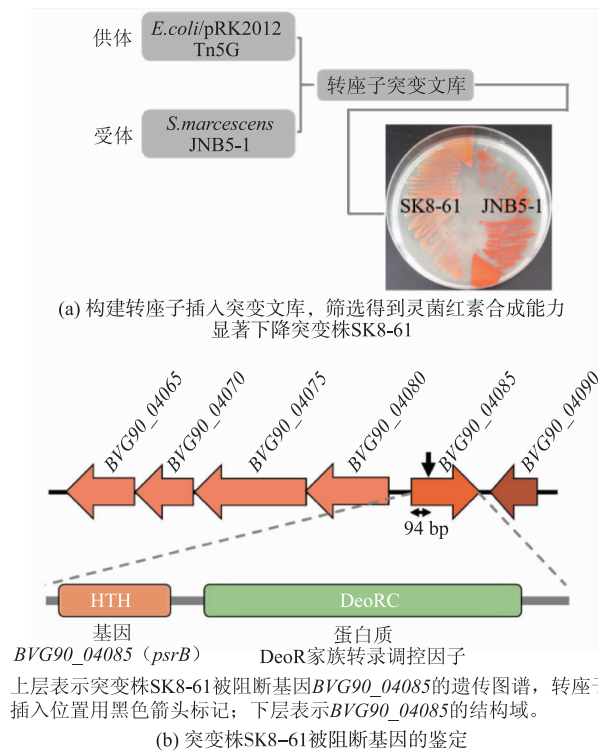


图2 黏质沙雷氏菌合成灵菌红素相关基因 *psrB* 的发现
Fig. 2 Identification of prodigiosin biosynthesis related gene *psrB* in *S. marcescens*

BVG90_04085 整合至载体 pUCP18 中,得到重组质粒 pXW1906,并转移至突变株 SK8-61 中得到重组菌株 SK8-61/pXW1906。摇瓶发酵分析重组菌株 SK8-61/pXW1906 合成灵菌红素能力发现,重组菌株 SK8-61/pXW1906 发酵 24 h,灵菌红素产量可达 50.20 mg/L,显著高于突变株 SK8-61(11.21 mg/L),接近于野生型菌株 JNB5-1(51.22 mg/L),表明转录因子编码基因 *BVG90_04085* 参与黏质沙雷氏菌合成灵菌红素。鉴于转录因子 *BVG90_04085* 编码基因 *BVG90_04085* 具有影响黏质沙雷氏菌合成灵菌红素的能力,将该基因命名为 *psrB* (Prodigiosin synthesis related gene B)。为进一步验证基因 *psrB* 的功能,构建了 *psrB* 缺失突变株 Δ PsrB 和 *psrB* 过表达菌株 JNB5-1/pXW1906。摇瓶发酵分析菌株 Δ PsrB 和 JNB5-1/pXW1906 发酵产灵菌红素能力发现,菌株 Δ PsrB 和 JNB5-1/pXW1906 发酵 24 h,可分别合成 13.28 mg/L 和 108.46 mg/L 的灵菌红素。上述结果表明,PsrB 为黏质沙雷氏菌合成灵菌红素刺激因子。

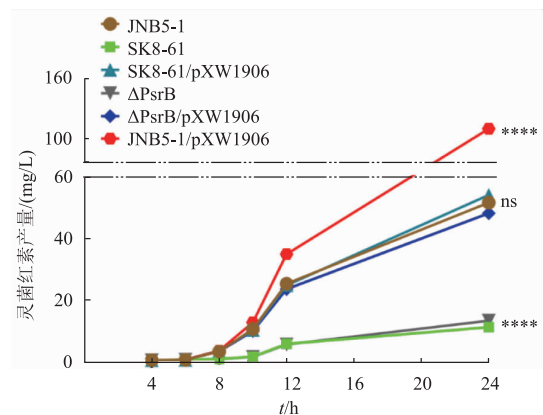


图3 摇瓶发酵分析菌株 JNB5-1,SK8-61,SK8-61/pXW1906, Δ PsrB, Δ PsrB/pXW1906 和 JNB5-1/pXW1906 合成灵菌红素能力

Fig. 3 Shake flask fermentation to determine the ability of JNB5-1,SK8-61,SK8-61/pXW1906, Δ PsrB, Δ PsrB/pXW1906 and JNB5-1/pUCP16 strains to synthesize prodigiosin

2.2 PsrB 对黏质沙雷氏菌细胞生长的影响

为分析转录因子 PsrB 正调控黏质沙雷氏菌合成灵菌红素的原因,首先分析 PsrB 是否影响黏质沙雷氏菌的细胞生长速率。如图 4 所示,测定野生型菌株 JNB5-1、*psrB* 突变株 SK8-61 和 Δ PsrB、功能互补菌株 SK8-61/pXW1906 和 Δ PsrB/pXW1906 和 *psrB* 过表达菌株 JNB5-1/pXW1906 细胞生长曲线发现,5 株菌株生长无明显差异,表明 PsrB 不影响细胞生物量的合成,因而不影响黏质沙雷氏菌合成灵菌红素。

分析菌株 JNB5-1、SK8-61、 Δ PsrB、SK8-61/pXW1906、 Δ PsrB/pXW1906 和 JNB5-1/pXW1906 单个细胞合成灵菌红素能力发现,较野生型菌株 JNB5-1 相比,*psrB* 突变株 SK8-61 和 Δ PsrB 合成灵菌红素能力显著降低,而 *psrB* 过表达菌株 JNB5-1/pXW1906 合成灵菌红素能力显著提高,见图 5。表明转录因子 PsrB 可能通过影响灵菌红素合成关键基因簇的表达水平来影响黏质沙雷氏菌合成灵菌红素。

2.3 PsrB 对灵菌红素合成基因簇 *pig* 基因簇的转录水平的影响

黏质沙雷氏菌中灵菌红素的合成途径由位于同一操纵子上的 *pigA*、*pigB*、*pigC*、*pigD*、*pigE*、*pigF*、*pigG*、*pigH*、*pigI*、*pigJ*、*pigK*、*pigL*、*pigM* 和 *pigN* 等 14 个基因组成,见图 6(a)。为进一步解析 PsrB 如何促

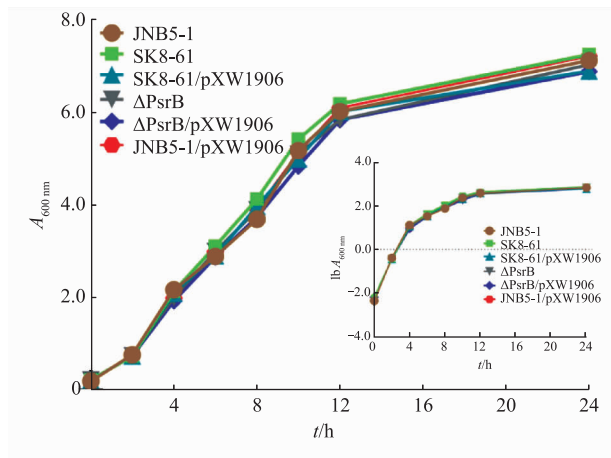


图 4 菌株 JNB5-1、SK8-61、 Δ PsrB、SK8-61/pXW1906、 Δ PsrB/pXW1906 和 JNB5-1/pXW1908 的生长曲线
Fig. 4 Growth curves of JNB5-1, SK8-61, Δ PsrB, SK8-61/pXW1906, Δ PsrB/pXW1906 and JNB5-1/pXW1908 strains

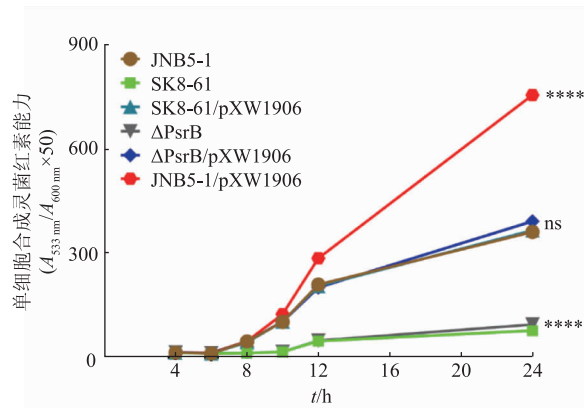


图 5 菌株 JNB5-1、SK8-61、 Δ PsrB、SK8-61/pXW1906、 Δ PsrB/pXW1906 和 JNB5-1/pXW1906 单个细胞合成灵菌红素能力
Fig. 5 Analysis of unit cell to synthesize prodigiosin in JNB5-1, SK8-61, Δ PsrB, SK8-61/pXW1906, Δ PsrB/pXW1906 and JNB5-1/pXW1906 strains

进黏质沙雷氏菌合成灵菌红素,作者通过 RT-qPCR 分析了野生型菌株 JNB5-1 及 *psrB* 缺失突变株 Δ PsrB 中灵菌红素合成基因簇 *pig* 基因簇的表达水平。如图 6(b)所示,相比于野生型菌株 JNB5-1,突变株 Δ PsrB 中,基因 *pigABCDEFGHIJKLMN* 的表达水平均显著下降,分别下调 5.81~22.93 倍,表明 *PsrB* 参与调控灵菌红素合成基因簇 *pig* 基因簇的表达水平。

为进一步确定 *PsrB* 参与调控 *pig* 基因簇的表达水平,作者以黏质沙雷氏菌 JNB5-1 基因组 DNA 为模板,扩增得到了含有 *pig* 基因簇启动子区域的

DNA 片段,并将其置于不含启动子的 *lacZ* 基因的前面,构建得到了携带有融合报告基因 *PpigA-lacZ* 的重组质粒 pXW1905 (pDN19lac Ω -PpigA),并分别导入菌株 JNB5-1 及 Δ PsrB 中得到重组菌株 JNB5-1/pXW1905 和 Δ PsrB/pXW1905,最终通过测定菌株 JNB5-1 及 Δ PsrB 中 β -半乳糖苷酶的酶活,分析了野生型菌株 JNB5-1 及 *psrB* 突变株 Δ PsrB 中 *pig* 基因簇的表达差异。如图 6(c)所示,在野生型菌株 JNB5-1 中, β -半乳糖苷酶的酶活显著高于 *psrB* 突变株 Δ PsrB,表明 *PsrB* 正调控黏质沙雷氏菌 *pig* 基因簇的表达水平。综上所述,*PsrB* 正调控灵菌红素

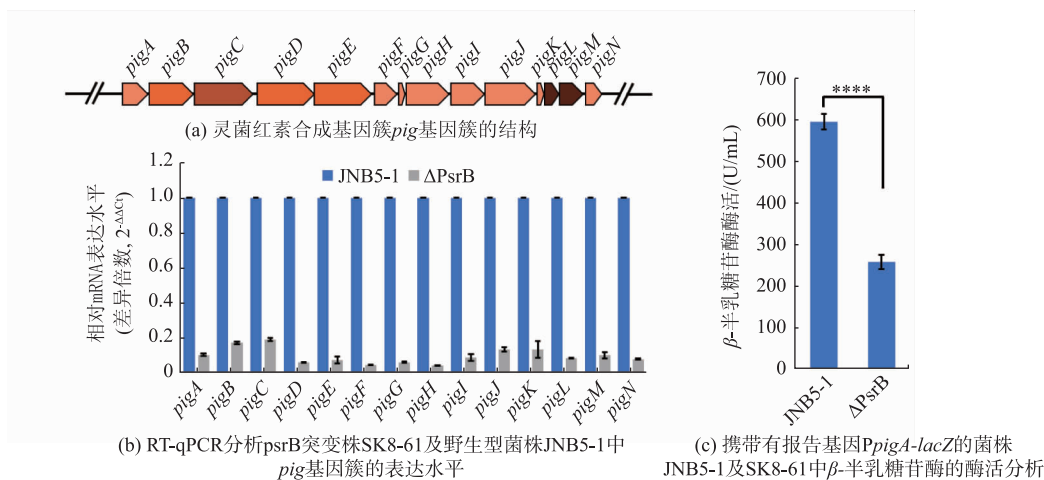


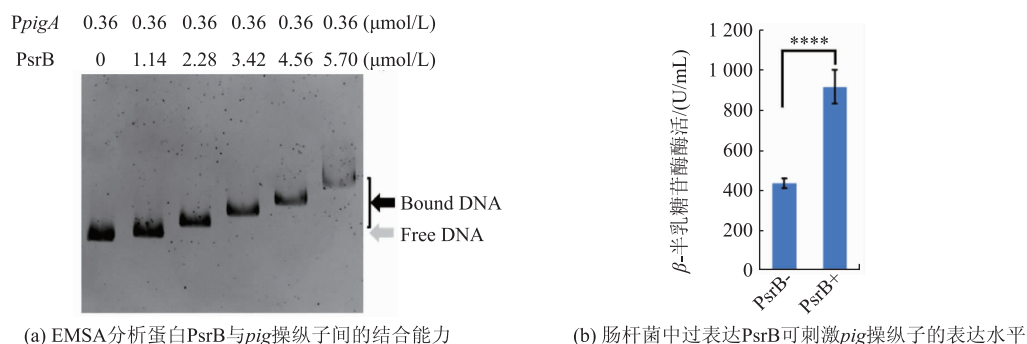
图 6 *PsrB* 正调控灵菌红素合成基因簇 *pig* 基因簇的转录水平
Fig. 6 The transcription of *pig* gene cluster positively regulated by *PsrB*

合成基因簇 *pig* 基因簇的表达水平。

2.4 PsrB 与灵菌红素合成基因簇 *pig* 基因簇间的相互作用

研究转录因子 PsrB 是否直接作用于 *pig* 基因簇以影响 *pig* 基因簇的表达水平, 并进而影响黏质沙雷氏菌合成灵菌红素。通过凝胶阻滞实验(EMSA assay)分析了 PsrB 与 *pig* 基因簇启动子间的相互作用能力, 发现转录因子 PsrB 的加入将阻碍 DNA 片段 *PpigA* 的迁移, 见图 7(a)。表明转录因子 PsrB 可直接作用于灵菌红素合成基因簇 *pig*, 进一步证实 PsrB 与 *pig* 基因簇间的直接相互作用。将携带有 *psrB* 基因的重组质粒 pXW1906 和 pUCP18 质粒分别导入至大肠杆菌 *E. coli* DH5 α 中得到了重组菌

株 DH5 α /pXW1906 和 DH5 α /pUCP18, 并将重组质粒 pXW1905 分别导入至菌株 DH5 α /pXW1906 和 DH5 α /pUCP18 得到了重组菌株 DH5 α /pUCP18/pXW1905 和 DH5 α /pXW1906/pXW1905, 测定了两株菌中 β -半乳糖苷酶的酶活。如图 7(b)所示, 在携带有 SmPsrB 的大肠杆菌 DH5 α /pXW1906 - pXW1905 中, β -半乳糖苷酶的酶活明显高于 SmPsrB 缺失的大肠杆菌 DH5 α /pUCP18/pXW1905, 表明 PsrB 可直接作用于 *pig* 基因簇, 并正调控 *pig* 基因簇的表达水平。综上所述, 转录因子 PsrB 通过直接作用于 *pig* 基因簇启动子区域, 正调控灵菌红素合成基因簇的转录水平, 最终达到正调控黏质沙雷氏菌合成灵菌红素的目的。



(a) EMSA分析蛋白PsrB与*pig*操纵子间的结合能力

(b) 肠杆菌中过表达PsrB可刺激*pig*操纵子的表达水平

图 7 PsrB 直接调控 *pig* 基因簇的表达水平

Fig. 7 Synthesis of prodigiosin genes directly regulated by PsrB

2.5 转录因子 PsrB 对黏质沙雷氏菌发酵产灵菌红素的影响

为进一步验证转录因子 PsrB 对黏质沙雷氏菌发酵产灵菌红素的影响, 作者分析了野生型菌株 JNB5-1、*psrB* 突变株 Δ PsrB、功能互补菌株 Δ PsrB/pXW1906 及 *psrB* 过表达菌株 JNB5-1/pXW1906 发酵产灵菌红素能力。如图 8 所示, 与野生型菌株 JNB5-1 相比, *psrB* 过表达菌株 JNB5-1/pXW1906 发酵 72 h 后可合成 8.61 g/L 的灵菌红素, 为出发菌株 JNB5-1 (5.53 g/L) 的 1.56 倍。而 *psrB* 缺失突变株 Δ PsrB 发酵 72 h 仅可合成 1.46 g/L 的灵菌红素, 为出发菌株的 0.26 倍。这些结果再次证实转录调控因子 PsrB 正调控黏质沙雷氏菌合成灵菌红素, 为代谢工程改造黏质沙雷氏菌合成灵菌红素提供了一种新的策略。

3 结语

灵菌红素是一种由黏质沙雷氏菌产生的天然红色线状三吡咯色素, 具有免疫抑制、抗细菌和抗肿瘤等生物活性^[12]。研究表明, 黏质沙雷氏菌灵菌红素的生物合成受到多种转录调控因子的调控, 包括正调控因子 EepR^[16]、PigP^[17]、GumB^[28]和 RbsR^[18], 以及负调控因子 MetR^[13]、CopA^[29]、CRP^[30]、HexS^[31]、RssB^[32]、SmaR^[15]和 SpnR^[14]。其中, 转录调控因子 HexS、EepR、PigP 和 RssB 直接与灵菌红素合成基因簇 *pig* 基因簇的启动子区域结合, 调节黏质沙雷氏菌合成灵菌红素^[16-17, 31-32]。CRP 通过与转录因子 EepR 的启动子区域结合, 间接调节黏质沙雷氏菌合成灵菌红素^[33]。转录因子 MetR 通过与灵菌红素合成正调控因子 PigP 的启动子区域结合, 负调控黏质沙雷氏菌合成灵菌红素^[13]。尽管这些转录因子已

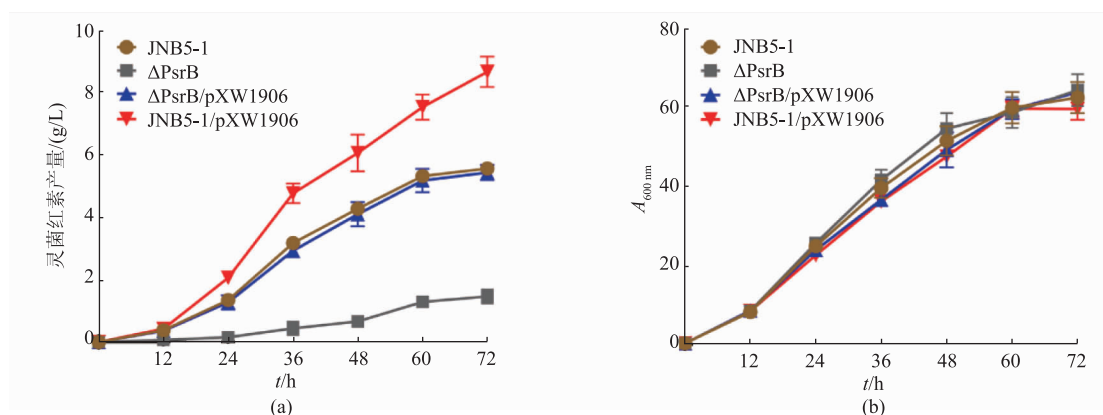


图 8 发酵培养基中菌株 JNB5-1、 Δ PsrB、 Δ PsrB/pXW1906 和 JNB5-1/pXW1906 发酵产灵菌红素分析及生长曲线的测定
Fig. 8 Analysis of prodigiosin production and growth curves of JNB5-1, Δ PsrB, Δ PsrB/pXW1906 and JNB5-1/pXW1906 strains in fermentation medium

被报道参与调控黏质沙雷氏菌合成灵菌红素,但是我们对黏质沙雷氏菌合成灵菌红素的调控网络的理解依然有限。通过构建一个随机的转座子插入突变体文库,发现 DeoR 家族转录因子 PsrB 是一个灵菌红素合成正调控因子。与野生型菌株 JNB5-1 相比,*psrB* 过表达菌株 JNB5-1/pXW1906 在 LB 培养基中的产量是野生型菌株的 2.12 倍。分析灵菌红素合成基因簇 *pig* 基因簇上 *pigABCDEFGHIJKLMN* 的表达水平发现,*psrB* 缺失突变株 Δ PsrB 中基因 *pigABCDEFGHIJKLMN* 的表达水平显著下调。EMSA 分析转录因子 PsrB 与 *pig* 基因簇启动子区域间的相互作用发现,PsrB 可直接与 *pig* 基因簇的启

动子区域结合。因此,转录因子 PsrB 正调控黏质沙雷氏菌合成灵菌红素的分子机制是 PsrB 直接与 *pig* 基因簇的启动子区域结合,刺激 *pig* 基因簇的转录水平,进而提高黏质沙雷氏菌合成灵菌红素。从黏质沙雷氏菌合成灵菌红素发酵培养基^[27]中发酵菌株 JNB5-1/pXW1906 产灵菌红素中发现,菌株 JNB5-1/pXW1906 发酵 72 h,可合成 8.61 g/L 的灵菌红素,为出发菌株 JNB5-1(5.53 g/L)的 1.56 倍。该实验结果进一步证明,转录因子 PsrB 正调控黏质沙雷氏菌合成灵菌红素。同时,本研究也为代谢改造黏质沙雷氏菌合成灵菌红素提供了一种新的思路。

参考文献:

- [1] STANKOVIC N,SENEROVIC L,ILIC-TOMIC T,et al. Properties and applications of undecylprodigiosin and other bacterial prodigiosins[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*,2014,98(9):3841-3858.
- [2] WILLIAMSON N R,FINERAN P C,GRISTWOOD T,et al. Anticancer and immunosuppressive properties of bacterial prodiginines[J]. *Future Microbiology*,2007,2(6):605-618.
- [3] ZHOU W,ZENG C,LIU R,et al. Antiviral activity and specific modes of action of bacterial prodigiosin against *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus in vitro[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*,2016,100(9):3979-3988.
- [4] ZHANG H,PENG Y,ZHANG S,et al. Algicidal effects of prodigiosin on the harmful algae *Phaeocystis globosa*[J]. *Frontiers in Microbiology*,2016,7(602):1-10
- [5] LAPENDA J C,SILVA P A,VICALVI M C,et al. Antimicrobial activity of prodigiosin isolated from *Serratia marcescens* UFPEDA 398[J]. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*,2015,31(2):399-406.
- [6] VAISHNAV P,DEMAIN A L. Unexpected applications of secondary metabolites[J]. *Biotechnology Advances*,2011,29(2):223-229.
- [7] HARRIS A K P,WILLIAMSON N R,SLATER H,et al. The *Serratia* gene cluster encoding biosynthesis of the red antibiotic,

- prodigiosin, shows species- and strain-dependent genome context variation[J]. **Microbiology**, 2004, 150(11): 3547-3560.
- [8] 李厚金, 蔡创华, 周毅频, 等. 大亚湾海洋细菌 *Pseudomonas* sp. 中的红色素[J]. 中山大学学报(自然科学版), 2003, 42(3): 102-104.
- [9] JEONG H, YIM J H, LEE C, et al. Genomic blueprint of *Hahella chejuensis*, a marine microbe producing an algicidal agent[J]. **Nucleic Acids Research**, 2005, 33(22): 7066-7073.
- [10] KUMAR N R, NAIR S. *Vibrio rhizosphaerae* sp. nov., a red-pigmented bacterium that antagonizes phytopathogenic bacteria[J]. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, 2007, 57(10): 2241-2246.
- [11] LEE J S, KIM Y S, PARK S, et al. Exceptional production of both prodigiosin and cycloprodigiosin as major metabolic constituents by a novel marine bacterium, *Zooshikella rubidus* S1-1[J]. **Applied and Environmental Microbiology**, 2011, 77(14): 4967-4973.
- [12] 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): 887-899.
- [13] PAN X, SUN C, TANG M, et al. LysR-Type transcriptional regulator MetR controls prodigiosin production, methionine biosynthesis, cell motility, H₂O₂ tolerance, heat tolerance, and exopolysaccharide synthesis in *Serratia marcescens*[J]. **Applied and Environmental Microbiology**, 2020, 86(4): 1-18.
- [14] HORNG Y T, DENG S C, DAYKIN M, et al. The LuxR family protein SpnR functions as a negative regulator of N-acylhomoserine lactone-dependent quorum sensing in *Serratia marcescens*[J]. **Molecular Microbiology**, 2002, 45(6): 1655-1671.
- [15] COULTHURST S J, WILLIAMSON N R, HARRIS A K, et al. Metabolic and regulatory engineering of *Serratia marcescens*: mimicking phage-mediated horizontal acquisition of antibiotic biosynthesis and quorum-sensing capacities[J]. **Microbiology**, 2006, 152(7): 1899-1911.
- [16] SHANKS R M, STELLA N A, LAHR R M, et al. Suppressor analysis of *eepR* mutant defects reveals coordinate regulation of secondary metabolites and serralyisin biosynthesis by EepR and HexS[J]. **Microbiology**, 2017, 163(2): 280-288.
- [17] SHANKS R M, LAHR R M, STELLA N A, et al. A *Serratia marcescens* PigP homolog controls prodigiosin biosynthesis, swarming motility and hemolysis and is regulated by cAMP-CRP and HexS[J]. **PLoS One**, 2013, 8(3): e57634.
- [18] LEE C M, MONSON R E, ADAMS R M, et al. The lacI-family transcription factor, RbsR, is a pleiotropic regulator of motility, virulence, siderophore and antibiotic production, gas vesicle morphogenesis and flotation in *Serratia*[J]. **Frontiers in Microbiology**, 2017, 8: 1-14.
- [19] 李子武, 张显, 徐美娟, 等. 一株产灵菌红素黏质沙雷氏菌的筛选、鉴定及发酵条件[J]. 食品与生物技术学报, 2012, 31(10): 1018-1024.
- [20] NUNN D N, LORY S. Components of the protein-excretion apparatus of *Pseudomonas aeruginosa* are processed by the type IV prepilin peptidase[J]. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 1992, 89(1): 47-51.
- [21] SCHWEIZER H P. *Escherichia-Pseudomonas* shuttle vectors derived from pUC18/19[J]. **Gene**, 1991, 97(1): 109-121.
- [22] TOTTEN P A, LORY S. Characterization of the type a flagellin gene from *Pseudomonas aeruginosa* PAK[J]. **Journal of Bacteriology**, 1990, 172(12): 7188-7199.
- [23] HERRERO M, DE LORENZO V, TIMMIS K N. Transposon vectors containing non-antibiotic resistance selection markers for cloning and stable chromosomal insertion of foreign genes in gram-negative bacteria[J]. **Journal of Bacteriology**, 1990, 172(11): 6557-6567.
- [24] WANG J, MUSHEGIAN A, LORY S, et al. Large-scale isolation of candidate virulence genes of *Pseudomonas aeruginosa* by in vivo selection[J]. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 1996, 93(19): 10434-10439.

- [25] YANG X, ZHANG Z, HUANG Z, et al. A putative LysR-type transcriptional regulator inhibits biofilm synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*[J]. **Biofouling**, 2019, 35(5): 541-550.
- [26] YOU J, SUN L, YANG X, et al. Regulatory protein SrpA controls phage infection and core cellular processes in *Pseudomonas aeruginosa*[J]. **Nature Communications**, 2018, 9(1): 1846.
- [27] PAN X, SUN C, TANG M, et al. Loss of Serine-Type D-Ala-D-Ala carboxypeptidase DacA enhances prodigiosin production in *Serratia marcescens*[J]. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, 2019, 7(367): 1-14.
- [28] STELLA N A, BROTHERS K M, CALLAGHAN J D, et al. An IgaA/UmoB family protein from *Serratia marcescens* regulates motility, capsular polysaccharide biosynthesis, and secondary metabolite production[J]. **Applied and Environmental Microbiology**, 2018, 84(6): 1-14.
- [29] WILLIAMSON N R, SIMONSEN H T, HARRIS A K, et al. Disruption of the copper efflux pump (CopA) of *Serratia marcescens* ATCC 274 pleiotropically affects copper sensitivity and production of the tripyrrole secondary metabolite, prodigiosin[J]. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, 2006, 33(2): 151-158.
- [30] STELLA N A, SHANKS R M. Cyclic-AMP inhibition of fimbriae and prodigiosin production by *Serratia marcescens* is strain-dependent[J]. **Archives of Microbiology**, 2014, 196(5): 323-330.
- [31] STELLA N A, FENDER J E, LAHR R M, et al. The LysR transcription factor, HexS, is required for glucose inhibition of prodigiosin production by *Serratia marcescens*[J]. **Advancements of Microbiology**, 2012, 2(4): 511-517.
- [32] HORNG 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.
- [33] STELLA N A, LAHR R M, BROTHERS K M, 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.

科 技 信 息

欧盟评估经巴氏灭菌的嗜黏蛋白阿克曼菌作为新型食品的安全性

2021年9月1日,据欧盟食品安全局(EFSA)消息,欧盟营养、新型食品和食物过敏源(NDA)研究小组就经巴氏灭菌的嗜黏蛋白阿克曼菌(pasteurised *Akkermansia muciniphila*)作为新型食品的安全性发表科学意见。根据文献数据,并通过将不确定因素应用于大鼠90 d重复剂量口服毒性研究的未观察到不良反应水平(NOEL),小组得出结论,如果NF中的活细胞数量 < 10 CFU/g(即检测限),那么对目标人群来说, 3.4×10^{-10} 个/d是安全的。

[信息来源]EFSA Journal. Safety of pasteurised *Akkermansia muciniphila* as a novel food pursuant to Regulation (EU) 2015/2283 [EB/OL]. (2021-9-1).<https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.2903/j.efsa.2021.6780>