

• 工业生物技术 •

细胞分裂蛋白编码基因的敲除对丙酮丁醇梭菌溶剂合成与细胞形态的影响

张萌^{1,2}, 薛闯^{1,2}

1 大连理工大学 生物工程学院, 辽宁 大连 116024

2 大连理工大学 大连市合成生物学应用转化工程技术研究中心, 辽宁 大连 116024

张萌, 薛闯. 细胞分裂蛋白编码基因的敲除对丙酮丁醇梭菌溶剂合成与细胞形态的影响. 生物工程学报, 2020, 36(10): 2092–2103.

Zhang M, Xue C. Effects of cell division protein-encoding genes knockout on solvent formation and cell morphology in *Clostridium acetobutylicum*. Chin J Biotech, 2020, 36(10): 2092–2103.

摘要: 丙酮丁醇梭菌是生物丁醇合成的重要菌株, 近年来, 研究者们利用基因编辑等技术对其进行菌株改造。通过对丙酮丁醇梭菌中 3 个细胞分裂蛋白 (RodA、DivIVA、DivIB) 编码基因 (*cac1251*、*cac2118*、*cac2125*) 进行敲除, 发现 *cac2118* 敲除菌株的细胞在产溶剂期为球状形态, 细胞变小, ABE 发酵的丁醇得率为 0.19 g/g, 与野生型相比提高了 5.6%。*cac1251* 敲除菌株的葡萄糖消耗量和丁醇产量与野生型相比降低了 33.9% 和 56.3%, 分别为 47.3 g/L 和 5.6 g/L。*cac1251* 和 *cac2125* 的敲除对细胞生长有显著影响, 菌体浓度最大值与野生型相比分别降低了 40.4% 和 38.3%。研究表明细胞分裂蛋白 DivIVA 对细胞的形态和大小调控起重要作用; 细胞分裂蛋白 RodA 和 DivIB 调控细胞分裂进程, 进而影响细胞生长和溶剂合成进程。

关键词: 丙酮丁醇梭菌, 细胞分裂蛋白, ABE 发酵, 溶剂合成, 细胞形态

Received: February 7, 2020; **Accepted:** March 30, 2020

Supported by: Dalian Science and Technology Innovation Fund Project (No. 2018J12SN074), National Natural Science Foundation of China (No. 21878035), Youth Top Talent Project of “LiaoNing Revitalization Talents Program” (No. XLYC1807269).

Corresponding author: Chuang Xue. Tel: +86-411-84706625; E-mail: xue.1@dlut.edu.cn

大连市科创基金项目 (No. 2018J12SN074), 国家自然科学基金 (No. 21878035), “兴辽英才计划”青年拔尖人才项目 (No. XLYC1807269) 资助。

网络出版时间: 2020-04-08

网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1998.Q.20200407.1638.007.html>

Effects of cell division protein-encoding genes knockout on solvent formation and cell morphology in *Clostridium acetobutylicum*

Meng Zhang^{1,2}, and Chuang Xue^{1,2}

¹ School of Bioengineering, Dalian University of Technology, Dalian 116024, Liaoning, China

² Engineering Research Center of Application and Transformation for Synthetic Biology, Dalian University of Technology, Dalian 116024, Liaoning, China

Abstract: *Clostridium acetobutylicum* is an important strain for bio-butanol formation. In recent years, gene-editing technology is widely used for developing the hyper-butanol-production strains. In this study, three genes (*cac1251*, *cac2118* and *cac2125*) encoding cell division proteins (RodA, DivIVA and DivIB) in *C. acetobutylicum* were knocked out. The *cac2118*-knockout strain had changed its cell morphology to spherical-shape during the solventogenesis, and obtained a higher butanol yield of 0.19 g/g, increasing by 5.5%, compared with the wild type strain. The glucose utilization and butanol production of *cac1251*-knockout strain decreased by 33.9% and 56.3%, compared the with wild type strain, reaching to 47.3 g/L and 5.6 g/L. The *cac1251*-knockout strain and *cac2125*-knockout strain exhibited poor cell growth with cell optical density decreased by 40.4% and 38.3%, respectively, compared with that of the wild type strain. The results indicate that cell division protein DivIVA made the differences in the regulation of cell morphology and size. Cell division proteins RodA and DivIB played significant roles in the regulation of cell division, and affected cell growth, as well as solventogenesis metabolism.

Keywords: *Clostridium acetobutylicum*, cell division protein, ABE fermentation, solvent formation, cell morphology

受全球环境变化和原油价格波动的影响,生物燃料作为一种重要的石油替代品,其相关研究受到人们的广泛关注。作为极具前景的新一代液体燃料,与生物乙醇相比,生物丁醇具有安全系数高、蒸汽压低、热值较高、能量密度高等优点^[1-2],利用丙酮丁醇梭菌 *Clostridium acetobutylicum* 生产丁醇的方式尤其受到关注。丙酮丁醇梭菌是一种革兰氏阳性厌氧细菌,发酵产物主要包括丙酮、丁醇、乙醇等溶剂,其发酵也被称为 ABE (Acetone-Butanol-Ethanol)发酵^[3]。由于丁醇对细胞的毒性,野生型丙酮丁醇梭菌发酵的丁醇产量较低。近年来,研究者们利用 II 型内含子插入失活技术^[4-7]、基因过表达技术^[8-9]、基于 CRISPR 系统的基因编辑^[10-12]等方式对丙酮丁醇梭菌进行分子改造,从而获得高丁醇产量、高耐性的菌株。

丙酮丁醇梭菌发酵过程分为产酸阶段和产溶剂阶段。产酸阶段发生在发酵的指数生长期,细胞分裂较快,乙酸和丁酸的生成导致培养基内 pH 的下降,胁迫环境使丙酮丁醇梭菌启动溶剂化和

孢子化生存机制,引起丙酮、丁醇和乙醇等溶剂的产生,同时通过细胞不对称分裂的方式产生高抗性孢子^[13-15]。目前对于丙酮丁醇梭菌细胞分裂蛋白的研究较少,由于丙酮丁醇梭菌与枯草芽孢杆菌 *Bacillus subtilis* 的基因组序列具有较高相似度,因此枯草芽孢杆菌的研究成果对于丙酮丁醇梭菌有重要的参考价值。在枯草芽孢杆菌的细胞分裂过程中,细胞分裂蛋白调节着细胞分裂进程^[16-17]。细胞分裂蛋白 DivIVA 在细胞分裂和产孢过程中起着重要作用,在正常细胞分裂过程中,DivIVA 调节细胞分裂抑制因子 MinCD 复合物的活性,从而帮助细胞对称分裂;在产孢过程中,DivIVA 在不对称细胞分裂前将染色体的复制起点引导到细胞极上^[18]。细胞分裂蛋白 DivIB 在枯草芽孢杆菌中调控着与细胞壁合成的相关酶,同时在孢子生长的第一轮复制过程中起到调控作用^[19],细胞分裂蛋白 RodA 在枯草芽孢杆菌的细胞伸长过程中调控肽聚糖的合成^[20]。

通过查询 NCBI 数据库发现,丙酮丁醇梭菌

中 *cac1251*、*cac2118*、*cac2125* 基因分别对应编码 RodA 蛋白、DivIVA 蛋白和 DivIB 蛋白。本研究通过 II 型内含子插入失活技术对丙酮丁醇梭菌的上述 3 个编码细胞分裂蛋白的基因进行敲除, 获得基因敲除菌株 $\Delta cac1251$ 、 $\Delta cac2118$ 和 $\Delta cac2125$, 考察敲除菌株的细胞溶剂合成和细胞形态变化, 进一步分析丙酮丁醇梭菌中 3 个细胞分裂蛋白的调控作用。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 菌株和质粒

本研究所使用的丙酮丁醇梭菌 *C. acetobutylicum* ATCC 55025、大肠杆菌 *Escherichia coli* DH5 α 、大肠杆菌 *E. coli* DH10B (含 PAN1 质粒) 以及质粒载体 pSY6 均为本实验室保存。

1.1.2 主要仪器和试剂

本研究所用主要仪器包括: PCR 扩增仪 (TaKaRa Bio 公司)、电泳仪 (北京六一生物科技股份有限公司)、温控高速离心机 (德国 Eppendorf 公司)、厌氧培养箱 (英国 Don Whitley Scientific 公司)、发酵罐 (KoBioTech 公司)、气相色谱仪 (美国安捷伦科技有限公司)、液相色谱仪 (美国 Waters 公司)、Multiskan Ascent 酶标仪 (Thermo LabSystems 公司)、Leica EM UC6 超薄切片机 (徕卡显微系统贸易有限公司)、JEM-2000EX 电子显微镜 (日本电子株式会社)。

本研究所需试剂包括: DNA 聚合酶 KOD-Plus-Neo、*Taq* DNA 聚合酶、限制性内切酶 *BsrG I* 和 *Xho I*、DNA marker、T4 DNA 连接酶、引物 EBS universal、EBS 2、EBS1d 和 IBS 等购自生工生物工程 (上海) 股份有限公司; 质粒 DNA 提取试剂盒、DNA 凝胶回收试剂盒、PCR 纯化试剂盒购于大连美仑生物技术有限公司。

1.1.3 培养基和缓冲液的配制

LB 培养基、CGM 培养基、P2 培养基、玉米

培养基的配制见参考文献[21]; LB 培养基用于大肠杆菌的培养, CGM 培养基用于丙酮丁醇梭菌的培养, P2 培养基用于 ABE 发酵, 玉米培养基用于丙酮丁醇梭菌的菌株保藏。

ETM 缓冲液和 ET 缓冲液分别用于丙酮丁醇梭菌感受态细胞制备的清洗和重悬。ET 缓冲液的配方为: 蔗糖 92.5 g/L、Na₂HPO₄ 0.09 g/L、NaH₂PO₄ 0.52 g/L; ETM 缓冲液的配方为: 蔗糖 92.5 g/L、Na₂HPO₄ 0.09 g/L、NaH₂PO₄ 0.52 g/L、MgCl₂ 0.85 g/L。上述培养基及缓冲液均需在 121 °C 灭菌 15 min^[21]。

1.2 实验方法

1.2.1 表达载体构建

目标片段获取: 在 NCBI 网站上, 查找丙酮丁醇梭菌中编码细胞分裂蛋白的基因 *cac1251*、*cac2118* 和 *cac2125*, 下载基因序列信息。登录内含子片段设计网站 (<http://clostron.com>), 输入目的基因序列, 选择内含子插入位置, 设计内含子及对应 PCR 引物 (表 1)。以 pSY6 质粒为模板进行 PCR 反应, 第一轮 PCR 扩增合成片段 intron-1 和片段 intron-2, 反应体系为: KOD DNA 聚合酶 1 μ L、10 \times Buffer 5 μ L、dNTPs 5 μ L、MgSO₄ 3 μ L、质粒 pSY6 2 μ L、ddH₂O 30 μ L、引物各 2 μ L, 其中 intron-1 片段的引物为 IBS 和 EBS universal, intron-2 片段的引物为 EBS2 和 EBS1d。第二轮 PCR 以片段 intron-1 和 intron-2 为模板, 扩增合成目标内含子片段, PCR 反应体系为: KOD DNA 聚合酶 1 μ L、10 \times Buffer 5 μ L、dNTPs 5 μ L、MgSO₄ 3 μ L、片段 intron-1 和 intron-2 各 2 μ L、引物 IBS 和 EBS1d 各 2 μ L、ddH₂O 28 μ L。每轮 PCR 反应结束后, 均需用 PCR 纯化试剂盒对产物进行纯化。

酶切和连接: 在 37 °C 恒温条件下, 对目的片段和 pSY6 质粒分别进行酶切 4 h, 酶切体系为目的片段或质粒 12 μ L、酶 *BsrG I* 和 *Xho I* 各 0.5 μ L、10 \times buffer 2 μ L、ddH₂O 5 μ L。将所得酶切产物利用 DNA 凝胶回收试剂盒进行胶回收, 将所得目

表 1 本研究中所使用的引物

Table 1 Primers used in this study

Primer names	Primer sequences (5'-3')	Size (bp)	Notes
cac1251-IBS	CCGCTCGAGATAATTATCCTTAGAAATCATATACGTGCGCCC AGATAGGGTG	52	
cac1251-EBS1d	CAGATTGTACAAATGTGGTGATAACAGATAAGTCATATACG GTAACCTACCTTTCTTTGT	60	
cac1251-EBS2	TGAACGCAAGTTTCTAATTTTCGATTATTTCTCGATAGAGGA AAGTGTCT	49	
cac2118-IBS	CCGCTCGAGATAATTATCCTTAGAGAGCGACTTGGTGCGCC CAGATAGGGTG	52	
cac2118-EBS1d	CAGATTGTACAAATGTGGTGATAACAGATAAGTCGACTTGA TTAACCTACCTTTCTTTGT	60	Used for first round PCR and second round PCR
cac2118-EBS2	TGAACGCAAGTTTCTAATTTTCGATTCTCTCTCGATAGAGGA AAGTGTCT	49	
cac2125-IBS	CCGCTCGAGATAATTATCCTTAGGTGTCTTATTGGTGCGCC AGATAGGGTG	52	
cac2125-EBS1d	CAGATTGTACAAATGTGGTGATAACAGATAAGTCTTATTGG ATAACCTACCTTTCTTTGT	60	
cac2125-EBS2	TGAACGCAAGTTTCTAATTTTCGATTACACCTCGATAGAGGA AAGTGTCT	49	
EBS Universal	CGAAATTAGAACTTGC GTTCAGTAAAC	28	
cac1251-s	GCGCTTGCAAGTACATGG	18	
cac1251-a	CATCCTTCATTGCATCTAC	19	
cac2118-s	CAGAGAATTATGAGCAGC	18	Used for colony PCR
cac2118-a	CTGCTGCTTAACATTATCG	19	
cac2125-s	GAGGAAAATGAGTACATAG	19	
cac2125-a	CCATTTTCAAGGTAACC	18	

的片段和质粒的酶切产物于 16 °C 恒温连接 16 h, 获得连接产物 pSY6-intron, 连接体系为质粒双酶切产物 1.3 μL、目的片段双酶切产物 3.9 μL、酶 Solution I 5.2 μL。

连接产物转化: 取 10 μL 所得到的连接产物 (pSY6-intron), 热激转化至 *E. coli* DH5α 感受态细胞中, 在含有终浓度为 100 μg/mL 氨苄 (Amp) 抗性的 LB 固体培养基上培养筛选, 挑取单菌落接种于含有终浓度为 100 μg/mL 的 Amp 抗性的 LB 液体培养基中, 提取质粒后由生工生物工程 (上海) 股份有限公司进行测序, 内含子序列完全准确的即为正确重组质粒。

重组质粒甲基化: 由于丙酮丁醇梭菌中存在限制性修饰系统, 会降解外源 DNA, 故需要利用表达来自枯草芽孢杆菌噬菌体甲基化酶的大肠杆菌对所转化质粒进行甲基化修饰, 进而保护外源

质粒在丙酮丁醇梭菌中的存在。将 3 个构建好的质粒分别取 1.5 μL, 加至 *E. coli* DH10B (含 PAN1 质粒) 感受态细胞中, 冰浴 30 min 后立即在 42 °C 的水中热激 90 s, 再次放置冰上 3 min 后加入 700 μL LB 液体培养基, 在 37 °C 摇床中复苏 1 h, 将复苏后的菌液涂布于含有终浓度分别为 100 μg/mL 氨苄 (Amp) 和氯霉素 (Cm) 抗性的 LB 固体培养基上, 37 °C 过夜培养, 挑取单菌落转接至 5 mL 含有终浓度分别为 100 μg/mL 的 Amp 和 Cm 抗性的 LB 液体培养基中, 过夜培养后提取甲基化质粒。

1.2.2 基因敲除的菌株构建

梭菌感受态细胞制备: 将丙酮丁醇梭菌 ATCC 55025 在 CGM 固体培养基上进行划线, 培养 20 h 后, 挑取单菌落至 5 mL 的 CGM 液体培养基中; 过夜培养后, 接种至 50 mL CGM 培养基

中,待 OD_{600} 至 0.6 左右, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $4\ 500\ \text{r/min}$ 离心 10 min, 弃掉上清; 向菌体中加入 30 mL ETM 缓冲液, 进行重悬混匀, 冰上静置 10 min 后, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $4\ 500\ \text{r/min}$ 离心 10 min, 弃掉上清; 在菌体中加入 ET 缓冲液 2.5 mL, 进行重悬混匀。

电击转化将表达载体转入梭菌: 将 10 μL 甲基化后的重组质粒和 190 μL 丙酮丁醇梭菌 ATCC 55025 重悬缓冲液混匀, 冰上静置 10 min; 设置电转电压为 1.8 kV, 电转后立即加入 800 μL CGM 液体培养基混合均匀, 放于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 厌氧箱内复苏 4 h 后, 涂布于含有 40 $\mu\text{g/mL}$ 的红霉素 (Em) 的 CGM 固体培养基上。

阳性转化子的验证: 挑取转化子单菌落进行菌落 PCR 验证, 菌落 PCR 所用引物见表 1, 反应体系为: *Taq* DNA 聚合酶 10 μL 、s-primer 0.3 μL 、a-primer 0.3 μL 、ddH₂O 7.4 μL 、菌液 2 μL 。验证正确的单菌落在无 Em 抗性的 CGM 固体培养基上传代 3 次, 丢失外源质粒。

保菌: 挑取丢失外源质粒的阳性转化子菌落在 4 mL CGM 液体培养基中培养 12 h 后, 转接至 20 mL 的玉米培养基中, 培养 36–48 h 后, 加入等体积的 40% (V/V) 甘油溶液, 分装到 2 mL 离心管中, $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。菌株构建过程在厌氧环境下进行, 所获得基因敲除菌株名称分别为 $\Delta cac1251$ 、 $\Delta cac2118$ 和 $\Delta cac2125$ 。

1.2.3 ABE 发酵

配制 1.4 L P2 培养基, 灭菌后立即通入氮气以去除发酵罐内溶氧, 连接好冷凝水和循环水管路, 控制温度为 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, pH 不低于 5.0。将保存的 2 mL 菌液接入至 100 mL 的 CGM 液体培养基内, 培养 20 h 后接入发酵罐中。在发酵过程中, 利用酶标仪测量菌体浓度 OD_{600} ; 取 4 mL 菌液在 $12\ 000\ \text{r/min}$ 条件下离心 10 min, 收集上清液进行发酵产物分析。利用 Water 1525 高效液相色谱仪测定所收集发酵液的葡萄糖、乙酸、丁酸浓度, 色谱柱为有机酸分析柱 (30 cm \times 7.8 mm, Bio-Rad), 使用 PDA 检测器在 210 nm 的检测波长下测定酸

浓度, 流动相为 0.005 mol/L 的稀硫酸, 流速为 0.5 mL/min, 进样量为 20 μL , 处理时间为 40 min。采用内标法, 利用气相色谱仪测定所收集发酵液的丙酮、乙醇、丁醇浓度^[22], 柱温设定为 $100\text{ }^{\circ}\text{C}$, FID 检测器的温度为 $300\text{ }^{\circ}\text{C}$, 进样口温度为 $250\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。H₂ 流速为 40 mL/min, 空气流速为 400 mL/min, N₂ 流速为 40 mL/min, 进样量为 0.1 μL 。利用液相色谱仪和气相色谱仪测定样品含量还需制备标准曲线, 所用葡萄糖、乙酸、丁酸、丁醇、丙酮、乙醇、异丁醇均为阿拉丁试剂 (上海) 有限公司生产, 试剂规格为色谱纯。

1.2.4 透射电镜分析

取所构建的 3 株敲除菌株 $\Delta cac1251$ 、 $\Delta cac2118$ 、 $\Delta cac2125$ 和野生型菌株 ATCC 55025 在发酵第 32 h 的发酵液 4 mL, $12\ 000\ \text{r/min}$ 离心 10 min, 弃净上清。所获得菌体细胞用 1% (V/V) PBS 缓冲液重悬 3 次, 加入 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 预冷的 2.5% (V/V) 戊二醛溶液进行处理。待细胞固定 24 h 后, 分别在 50%、70%、80%、90%、100% 的酒精溶液 (V/V) 中依次进行脱水, 在环氧树脂包埋和 Leica EM UC6 超薄切片仪切片后, 经醋酸铀和柠檬酸铅染色液染色, 在 JEM-2000EX 电子显微镜下对样品进行观察^[23]。

2 结果与分析

2.1 敲除菌株构建验证

2.1.1 II 型内含子片段验证

以 IBS 和 EBS universal、EBS2 和 EBS1d 为引物进行第一轮 PCR, 得到两个内含子片段, 片段长度约为 200 bp 和 100 bp, 以第一轮所得两个 PCR 片段作为模板、以 IBS 和 EBS1d 为引物进行第二轮 PCR, 得到内含子片段约为 300 bp。图 1A 为两轮内含子片段的电泳结果图, 其中泳道 1、2、3、4、5、6 分别为 $\Delta cac1251$ -intron1、 $\Delta cac1251$ -intron2、 $\Delta cac2118$ -intron1、 $\Delta cac2118$ -intron2、 $\Delta cac2125$ -intron1 和 $\Delta cac2125$ -intron2 的第一轮 PCR 内含子片段, 泳道 7、8、9 分别为 $\Delta cac1251$ -

intron、 $\Delta cac2118$ -intron 和 $\Delta cac2125$ -intron 的第二轮 PCR 内含子片段,各片段大小均与预期结果相符。将第二轮得到的内含子片段与 pSY6 质粒连接并转化至 *E. coli* DH5 α 中,得到重组质粒 pSY6-intron-*cac1251*、pSY6-intron-*cac2118*、pSY6-intron-*cac2125*,将重组质粒送至生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序,测序结果与内含子片段的碱基序列完全一致。

2.1.2 内含子片段转入梭菌的验证

挑取电转涂板后的单菌落进行菌落 PCR 验证:在目的基因插入位点上下游各 200 bp 左右的位置设计引物,经菌落 PCR 反应,若内含子未插入到丙酮丁醇梭菌中,则该片段长 400 bp 左右;若内含子已整合到目的基因中,则该片段长 1 600 bp 左右。图 1B 为菌落 PCR 的电泳结果,其中泳道 2、3、4 分别为 $\Delta cac1251$ 、 $\Delta cac2118$ 和 $\Delta cac2125$ 的菌落 PCR 条带,大小约为 1 600 bp 左右,说明丙酮丁醇梭菌中对应的基因 *cac1251*、*cac2118* 和 *cac2125* 均得到了有效的敲除。

2.2 透射电镜分析

图 2A-D 分别为菌株 ATCC 55025、 $\Delta cac1251$ 、 $\Delta cac2118$ 、 $\Delta cac2125$ 在发酵第 32 h 的透射电镜图,其中左侧图片的放大倍数为 10 000 倍,右侧图片

的放大倍数为 25 000 倍。从图中可以看出,菌株 ATCC 55025 的细胞呈现了典型的杆状形态,在电镜视野中细胞较为密集。而菌株 $\Delta cac1251$ 的细胞与野生型细胞相比已发生裂解,在电镜视野中没有找到生长良好的细胞,说明细胞在这一时期已经提前进入衰老期,大部分细胞出现了凋亡现象。菌株 $\Delta cac2118$ 在电镜视野中细胞较为密集,但细胞的大小与野生型细胞相比明显变小,细胞的形态有明显的变化,呈现为球状形态;菌株 $\Delta cac2125$ 在电镜视野中的细胞与野生型相比较为稀疏,细胞呈现为典型的杆状形态,细胞的大小与野生型相比无明显差异。

在野生型菌株的透射电镜图片中,呈现肿胀、明亮状态的物质是由葡萄糖合成的淀粉粒,与细胞的孢子化进程相关^[24]。菌株 $\Delta cac2118$ 和菌株 $\Delta cac2125$ 的透射电镜图片中也能够观察到淀粉粒的存在,但是细胞中淀粉粒的数量与野生型相比明显减少,说明这两个编码细胞分裂蛋白的基因敲除后,影响了细胞中葡萄糖合成淀粉粒的进程,进而可能会对细胞的孢子化进程产生影响。而菌株 $\Delta cac1251$ 在发酵第 32 h 的电镜图片中大部分细胞发生裂解,无法检测到成熟细胞内淀粉粒的数量。

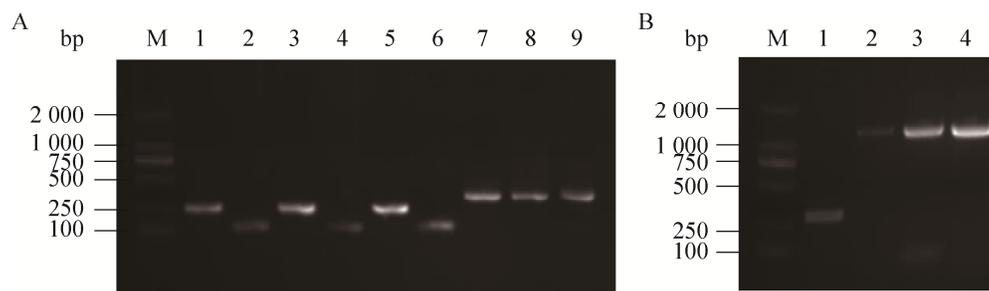


图 1 电泳结果图 (A: 内含子片段电泳结果图; B: 菌落 PCR 的电泳结果图)

Fig. 1 Results of electrophoresis. (A) Results of intron fragment electrophoresis. M: DL2 000 DNA marker; 1: $\Delta cac1251$ -intron1; 2: $\Delta cac1251$ -intron2; 3: $\Delta cac2118$ -intron1; 4: $\Delta cac2118$ -intron2; 5: $\Delta cac2125$ -intron1; 6: $\Delta cac2125$ -intron2; 7: $\Delta cac1251$ -intron; 8: $\Delta cac2118$ -intron; 9: $\Delta cac2125$ -intron. (B) Results of colony PCR electrophoresis. M: DL2 000 DNA marker, 1: PCR product from ATCC 55025, 2: PCR product from $\Delta cac1251$, 3: PCR product from $\Delta cac2118$, 4: PCR product from $\Delta cac2125$.

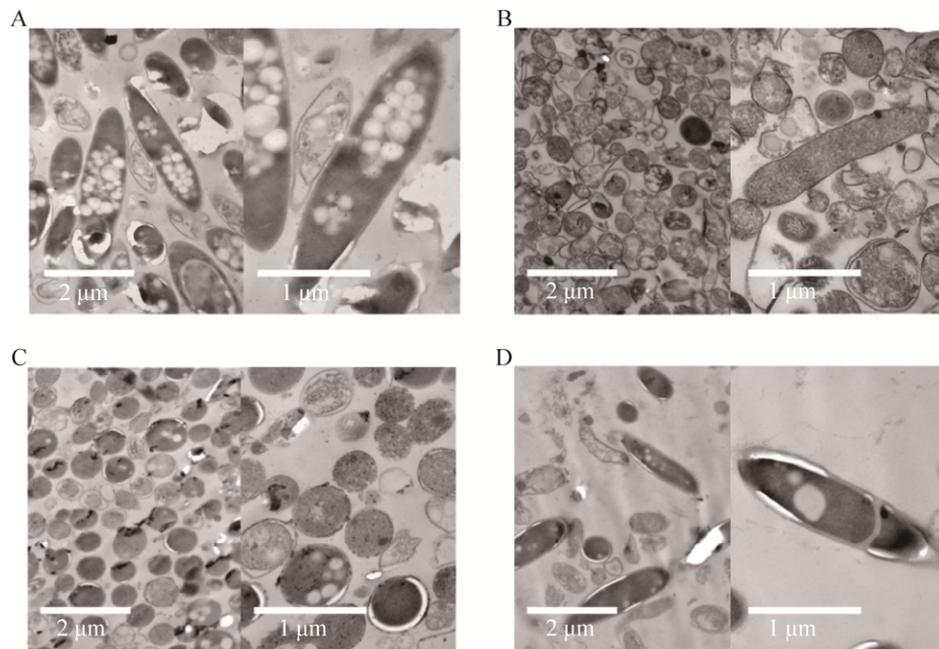


图 2 四种菌株在发酵第 32 h 的透射电镜图 (A: 丙酮丁醇梭菌 ATCC 55025; B: 菌株 $\Delta cac1251$; C: 菌株 $\Delta cac2118$; D: 菌株 $\Delta cac2125$). 左侧图片的放大倍数为 10 000 倍, 右侧图片的放大倍数为 25 000 倍)

Fig. 2 Transmission electron microscope image of *C. acetobutylicum* in fermentation (32 h). (A) ATCC 55025. (B) $\Delta cac1251$. (C) $\Delta cac2118$. (D) $\Delta cac2125$. Left were the magnification of 10 000 \times , and right were the magnification of 25 000 \times .

2.3 细胞生长比较

将菌株 $\Delta cac1251$ 、 $\Delta cac2118$ 、 $\Delta cac2125$ 和野生型菌株 ATCC 55025 进行 ABE 发酵, 各设置 3 个发酵平行实验, 图 3A 为发酵过程中细胞生长情况。菌株 ATCC 55025 在发酵第 32 h 的 OD_{600} 值最大, 为 4.7; 菌株 $\Delta cac1251$ 在发酵第 48 h 的 OD_{600} 值最大, 为 2.9, 与野生型相比降低了 38.3%; 菌株 $\Delta cac2118$ 在发酵第 32 h 的 OD_{600} 值最大, 为 4.5, 与野生型相比降低了 4.3%; 菌株 $\Delta cac2125$ 在发酵第 32 h 的 OD_{600} 值最大, 为 2.8, 与野生型相比降低了 40.4%。在发酵的指数生长期, 菌株 ATCC 55025 的生长速率最快, 菌株 $\Delta cac2118$ 的生长速率仅次于 ATCC 55025, 而菌株 $\Delta cac1251$ 、 $\Delta cac2125$ 的生长速率较为缓慢。结果表明 $cac2125$ 和 $cac1251$ 的敲除影响了细胞在指数生长期的生长速率, 最大 OD_{600} 值也与野生型相比分别降低了 40.4% 和 38.3%, 而 $cac2118$ 的敲除对

细胞生长速率和最大 OD_{600} 值无明显影响。

2.4 底物利用比较

利用液相色谱仪对 4 种菌株在发酵液中的葡萄糖含量进行测定, 图 3B 为 4 种菌株的葡萄糖消耗情况。菌株 ATCC 55025 在发酵前 32 h 的葡萄糖消耗速率为 2.1 g/(L·h); 在发酵第 32–72 h 的葡萄糖消耗量较小; 发酵结束时的葡萄糖消耗量为 71.6 g/L。菌株 $\Delta cac1251$ 在发酵前 20 h 的葡萄糖消耗速率明显低于其他 3 个菌株, 仅为 0.5 g/(L·h), 说明菌株 $\Delta cac1251$ 存在延迟生长的现象; 而在发酵第 21–32 h, 菌株 $\Delta cac1251$ 的葡萄糖消耗速率增大, 为 1.6 g/(L·h); 在发酵第 32–72 h 的葡萄糖消耗量较小; 发酵结束时的葡萄糖消耗量仅为 47.3 g/L。菌株 $\Delta cac2118$ 在发酵前 32 h 的葡萄糖消耗速率为 1.9 g/(L·h), 仅次于菌株 ATCC 55025; 在发酵第 32–72 h 的葡萄糖消耗量较小; 发酵结束时的葡萄糖消耗量为 70.1 g/L。菌株

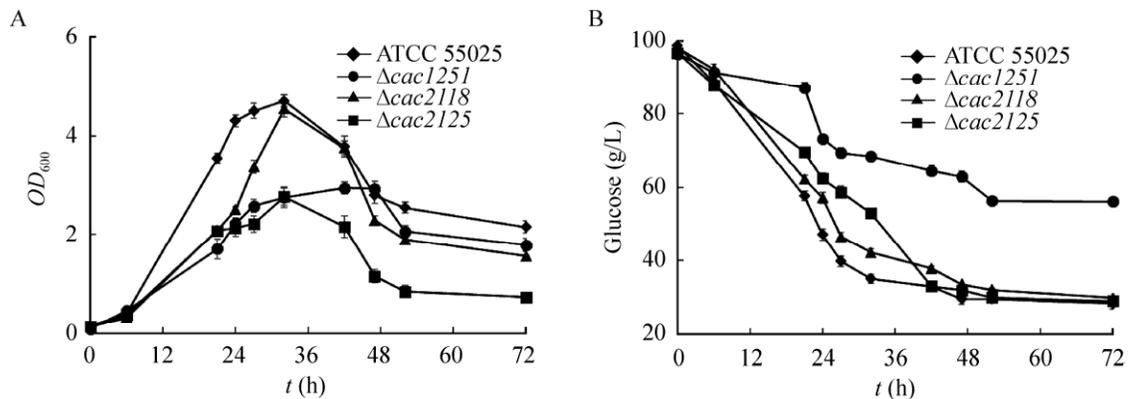


图3 四种菌株细胞生长和葡萄糖消耗比较图 (A: 4种菌株细胞生长情况 (OD_{600}) 比较; B: 葡萄糖消耗情况比较, 每个菌株的发酵均设置3个平行实验)

Fig. 3 Comparative of optical density and glucose consumption for four strains. (A) Comparative of optical density (OD_{600}) for four strains. (B) Comparative of glucose consumption for four strains. Three parallel experiments were set up for the fermentation using each strain.

$\Delta cac2125$ 在发酵前 32 h 的葡萄糖消耗速率为 1.5 g/(L·h); 在发酵第 32–42 h 的葡萄糖消耗量增大, 消耗速率为 1.7 g/(L·h); 发酵结束时的葡萄糖消耗量为 70.9 g/L。结果表明 *cac1251* 的敲除对细胞葡萄糖的消耗影响较大, 葡萄糖消耗量与野生型相比下降了 33.9%, 而 *cac2118* 和 *cac2125* 的敲除对于细胞葡萄糖的消耗无明显影响。

2.5 中心碳代谢比较

利用液相色谱仪对 4 种菌株发酵过程中乙酸和丁酸产量进行测定, 图 4A 比较了 4 种菌株的乙酸产量, 4 种菌株的乙酸产量均呈现了上升的趋势。从乙酸生成速率来看, 4 种菌株在前 6 h 的乙酸生成速率最快, 菌株 ATCC 55025 和 $\Delta cac2125$ 的乙酸生成速率在发酵第 6–21 h 较高, 而菌株 $\Delta cac1251$ 和 $\Delta cac2118$ 的乙酸生成速率较低, 均仅为 0.001 g/(L·h)。在发酵结束时, 菌株 ATCC 55025、 $\Delta cac1251$ 、 $\Delta cac2118$ 、 $\Delta cac2125$ 的乙酸产量分别为 5.2 g/L、4.0 g/L、4.4 g/L、3.8 g/L, 野生型菌株的乙酸产量比其他菌株高。

图 4B 比较了 4 种菌株的丁酸生成情况, 由于在发酵过程中丁酸重吸收生成丁醇, 4 种菌株的丁酸产量均呈现了先上升后下降的趋势。菌株 ATCC 55025 在发酵第 21 h 的丁酸产量达到最大,

为 7.5 g/L, 随后丁酸产量逐渐下降, 到发酵结束时丁酸产量仅为 1.0 g/L。菌株 $\Delta cac2118$ 在发酵第 32 h 的丁酸产量最大, 为 4.1 g/L, 在发酵结束时的丁酸产量仅为 1.0 g/L。菌株 $\Delta cac1251$ 在发酵第 42 h 的丁酸产量最大, 为 6.8 g/L, 在发酵结束时的丁酸产量为 4.7 g/L; 菌株 $\Delta cac2125$ 在发酵第 21 h 的丁酸产量最大, 为 4.9 g/L, 在发酵结束时的丁酸产量为 2.9 g/L。结果表明 *cac1251* 和 *cac2125* 的敲除降低了细胞内丁酸重吸收生成丁醇的能力。

利用气相色谱仪对 4 种菌株发酵过程中丙酮、乙醇、丁醇产量进行测定, 图 4C、4D 分别比较了 4 种菌株的丁醇产量和总溶剂产量。从丁醇生成情况看, 菌株 ATCC 55025 在发酵前 6 h 无丁醇生成, 发酵第 21–47 h 中的丁醇产量明显增加, 丁醇生成速率为 0.4 g/(L·h), 发酵结束时丁醇产量达到 12.8 g/L。菌株 $\Delta cac1251$ 在发酵前 21 h 均无丁醇产生, 在发酵第 21–47 h 的丁醇生成速率仅为 0.1 g/(L·h), 在发酵第 47–52 h 的生成速率较大, 达到 0.5 g/(L·h), 发酵结束时丁醇产量仅为 5.6 g/L, 与野生型相比降低了 56.3%。菌株 $\Delta cac2118$ 的丁醇生成情况与野生型相似, 在发酵前 6 h 无丁醇生成, 发酵第 21–47 h 中的丁醇生成速率为 0.3 g/(L·h), 发酵结束时丁醇产量达到

12.7 g/L。菌株 $\Delta cac2125$ 在发酵前6 h无丁醇生成,发酵第21–47 h中的丁醇生成速率为0.3 g/(L·h),发酵结束时丁醇产量为11.1 g/L,与野生型相比降低了13.3%。4种菌株的总溶剂生成情况与丁醇生成情况相似,菌株 $\Delta cac2118$ 的丙酮和乙醇产量分别为4.9 g/L和1.6 g/L,菌株ATCC 55025的丙酮

和乙醇产量分别为4.3 g/L和1.2 g/L,故菌株 $\Delta cac2118$ 的总溶剂产量比菌株ATCC 55025高,分别为19.2 g/L和18.4 g/L;菌株 $\Delta cac2125$ 的总溶剂产量为17.1 g/L,而菌株 $\Delta cac1251$ 的总溶剂产量仅为7.5 g/L。表2为4种菌株的丁醇得率和总溶剂得率,菌株 $\Delta cac2118$ 的丁醇得率和总溶剂

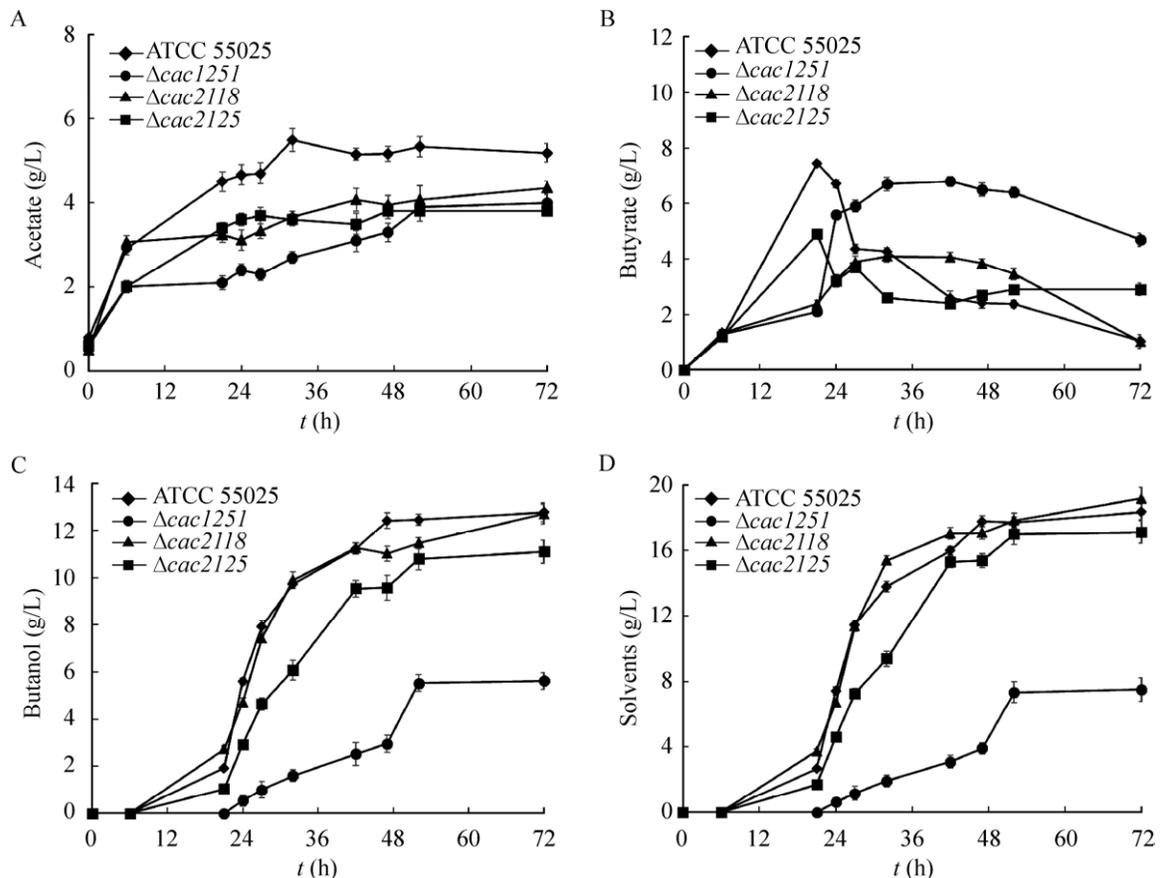


图4 四种菌株中心碳代谢产物的产量比较图 (A: 乙酸含量; B: 丁酸含量; C: 丁醇含量; D: 总溶剂含量)

Fig. 4 Comparative of central carbon metabolites production for four strains. (A) The concentration of acetate. (B) The concentration of butyrate. (C) The concentration of butanol. (D) The concentration of total solvents.

表2 四种菌株的丁醇得率和总溶剂得率情况

Table 2 Butanol yield and total solvents yield for four strains

	ATCC 55025	$\Delta cac1251$	$\Delta cac2118$	$\Delta cac2125$
Butanol yield (g/g)	0.18	0.14	0.19	0.16
Total solvents yield (g/g)	0.26	0.19	0.28	0.25

得率分别比野生型菌株高5.6%和7.7%,而菌株 $\Delta cac1251$ 的丁醇和总溶剂得率则比野生型菌株低22.2%和40.0%。

3 讨论

在丙酮丁醇梭菌中,对细胞分裂蛋白的研究

大多为转录组学和蛋白质组学的数据分析^[25-26], 没有编码细胞分裂蛋白的基因敲除对细胞溶剂合成和细胞形态影响的研究。作为目前较为成熟的基因编辑技术, 基于 II 型内含子的基因失活技术在丙酮丁醇梭菌中一直被广泛应用^[27-29], 本研究利用该技术成功构建了丙酮丁醇梭菌中 3 个编码细胞分裂蛋白基因的敲除菌株 $\Delta cac1251$ 、 $\Delta cac2118$ 和 $\Delta cac2125$, 通过对 3 种菌株进行 ABE 发酵和透射电镜照射, 进一步分析编码细胞分裂蛋白的基因敲除对发酵过程中溶剂合成和细胞形态的影响。由于丙酮丁醇梭菌的发酵先后经历产酸期和产溶剂期, 本研究中发酵前 12–20 h 为典型的产酸期和指数生长期, 发酵 20 h 后, 细胞进入产溶剂期。而在 ABE 发酵的 32 h 左右, 细胞处于产溶剂期的中期, 溶剂合成较为旺盛, OD_{600} 值最大。在这一时期进行透射电镜分析, 既能观察到更多的细胞, 也能全面分析不同细胞在溶剂生成期的变化, 故选取发酵第 32 h 的样品作为透射电镜分析的取样点。在 ABE 发酵过程中对细胞生长(OD_{600})、葡萄糖消耗量、酸和溶剂的产量进行测定并分析。

在其他细菌中, 细胞分裂蛋白的研究对本研究的分析有重要参考意义。Costa 等^[30]将鼠伤寒沙门氏菌 *Salmonella typhimurium* 中编码 RodA 蛋白的基因敲除后, 细胞出现了延迟分裂的情况, 敲除菌株的 OD_{650} 值也比野生型低; 在丙酮丁醇梭菌中, 对编码细胞分裂蛋白 RodA 的基因 *cac1251* 敲除后, 细胞会提前进入凋亡期, 菌株的最大 OD_{600} 值也比野生型低。Ni 等^[31]将猪链球菌 *Streptococcus suis* 编码 DivIVA 蛋白的基因敲除后, 细胞出现隔膜位置异常和不对称分裂等情况, 细胞存活率与野生型相比下降; 在本研究中, 敲除编码 *cac2118* 基因后对细胞形态和大小有所影响, 但并没有对 ABE 发酵过程中的细胞生长情况产生影响。Bottomley 等^[32]在金黄色葡萄球菌 *Staphylococcus aureus* 中发现, 编码 DivIB 蛋白的

基因敲除会导致细胞存在分裂隔膜的错位, 细胞会出现不止一个分裂起始点, 进而发生溶解破坏; 在本研究中, 菌株 $\Delta cac2125$ 透射电镜下的细胞稀疏, 可能由于细胞发生溶解破坏, 影响了细胞的分裂, 导致成活细胞数量的减少。

将野生型菌株和敲除菌株在 ABE 发酵过程中的细胞生长、葡萄糖利用、溶剂生成等方面进行比较, 在细胞生长方面, 细胞最大 OD_{600} 值由大到小的顺序为: 菌株 ATCC 55025 > 菌株 $\Delta cac2118$ > 菌株 $\Delta cac1251$ > 菌株 $\Delta cac2125$; 在葡萄糖利用方面, 葡萄糖消耗量由高至低的顺序为: 菌株 ATCC 55025 > 菌株 $\Delta cac2118$ > 菌株 $\Delta cac2125$ > 菌株 $\Delta cac1251$; 在溶剂生成方面, 溶剂产量由高至低的顺序为: 菌株 ATCC 55025 > 菌株 $\Delta cac2118$ > 菌株 $\Delta cac2125$ > 菌株 $\Delta cac1251$, 溶剂得率由高至低的顺序为: 菌株 $\Delta cac2118$ > 菌株 ATCC 55025 > 菌株 $\Delta cac2125$ > 菌株 $\Delta cac1251$ 。根据上述结果分析, 菌株 $\Delta cac2118$ 的 ABE 发酵与野生型菌株发酵大致相似, 葡萄糖消耗量、酸和溶剂的产量与野生型相比无明显差异, 发酵结束时, 丁醇得率由野生型的 0.18 g/g 略提高至 0.19 g/g, 说明菌株 $\Delta cac2118$ 利用葡萄糖转化丁醇的能力有所提高。菌株 $\Delta cac1251$ 的最大 OD_{600} 值虽然比菌株 $\Delta cac2125$ 高, 但是菌株 $\Delta cac1251$ 在发酵第 32 h 的透射电镜图像中, 大部分细胞均已发生凋亡, 说明细胞代谢活性较低, 导致葡萄糖的利用和丁醇的产量受到影响; 相反, 菌株 $\Delta cac2125$ 在发酵第 32 h 的透射电镜图像中虽然细胞分布稀疏, 但是细胞呈现典型的杆状形态, 生长情况良好, 故菌株能够有效利用葡萄糖并生产丁醇, 上述分析也能够说明菌株 $\Delta cac2125$ 的葡萄糖利用率和丁醇的产量比菌株 $\Delta cac1251$ 高。值得注意的是, 虽然菌株 $\Delta cac2125$ 葡萄糖的消耗量与菌株 $\Delta cac2118$ 大致相同, 但在发酵结束时丁醇产量比菌株 $\Delta cac2118$ 低 1.6 g/L, 这可能是因为菌株 $\Delta cac2125$ 产酸能力要比菌株 $\Delta cac2118$ 强, 菌株 $\Delta cac2125$ 有

机酸的产量比菌株 $\Delta cac2118$ 高 1.4 g/L。

本研究分别敲除 3 种编码细胞分裂蛋白的基因, 分析了 3 种细胞分裂蛋白各自在丙酮丁醇梭菌中对溶剂合成和细胞生长的作用, 实验结果表明细胞分裂蛋白 DivIVA 对细胞的形态和大小调控起重要作用; 细胞分裂蛋白 RodA 和 DivIB 调控细胞分裂进程, 进而影响溶剂合成和细胞生长进程。但是细胞分裂蛋白的作用都是由多蛋白、多基因水平共同调控, 研究细胞分裂蛋白在丙酮丁醇梭菌的分子机制与生理机理, 应从分子、代谢和组学等方面深入、全面地整合分析, 以期阐明细胞分裂蛋白在丙酮丁醇梭菌中的详细机制。

REFERENCES

- [1] Xiao M, Wu YD, Xue C. Biorefinery and research progress of butanol production. *Chin J Bioprocess Eng*, 2019, 17(1): 60–71 (in Chinese).
肖敏, 吴又多, 薛闯. 丁醇的生物炼制及研究进展. *生物加工过程*, 2019, 17(1): 60–71.
- [2] Ge H, Lu WQ, Guo ZQ. Industry development status and prospects of novel renewable energy cellulose butanol. *Chin Biotechnol*, 2016, 36(2): 115–121 (in Chinese).
葛慧, 陆文钦, 郭志强. 新型能源纤维素丁醇产业化发展现状及前景分析. *中国生物工程杂志*, 2016, 36(2): 115–121.
- [3] Xue C, Zhao JB, Chen LJ, et al. Recent advances and state-of-the-art strategies in strain and process engineering for biobutanol production by *Clostridium acetobutylicum*. *Biotechnol Adv*, 2017, 35(2): 310–322.
- [4] Xue C, Du GQ. Genome editing tools and metabolic engineering in *Clostridium acetobutylicum*. *J Microbiol*, 2019, 39(4): 1–9 (in Chinese).
薛闯, 杜广庆. 丙酮丁醇梭菌的基因编辑工具及代谢工程改造. *微生物学杂志*, 2019, 39(4): 1–9.
- [5] Kuit W, Minton NP, López-Contreras AM, et al. Disruption of the acetate kinase (*ack*) gene of *Clostridium acetobutylicum* results in delayed acetate production. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2012, 94(3): 729–741.
- [6] Harris LM, Desai RP, Welker NE, et al. Characterization of recombinant strains of the *Clostridium acetobutylicum* butyrate kinase inactivation mutant: Need for new phenomenological models for solventogenesis and butanol inhibition? *Biotechnol Bioeng*, 2000, 67(1): 1–11.
- [7] Xu MM, Zhao JB, Yu L, et al. Engineering *Clostridium acetobutylicum* with a histidine kinase knockout for enhanced n-butanol tolerance and production. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2015, 99(2): 1011–1022.
- [8] Mann M, Dragovic Z, Schirmacher G, et al. Over-expression of stress protein-encoding genes helps *Clostridium acetobutylicum* to rapidly adapt to butanol stress. *Biotechnol Lett*, 2012, 34(9): 1643–1649.
- [9] Liao ZP, Yang XT, Fu HX, et al. The significance of aspartate on NAD(H) biosynthesis and ABE fermentation in *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. *AMB Express*, 2019, 9: 142.
- [10] Li Q, Chen J, Minton NP, et al. CRISPR-based genome editing and expression control systems in *Clostridium acetobutylicum* and *Clostridium beijerinckii*. *Biotechnol J*, 2016, 11(7): 961–972.
- [11] Wasels F, Jean-Marie J, Collas F, et al. A two-plasmid inducible CRISPR/Cas9 genome editing tool for *Clostridium acetobutylicum*. *J Microbiol Methods*, 2017, 140: 5–11.
- [12] Xin X, Chen LJ, Xue C. Advance in and application of CRISPR-Cas9 technology in bacteria. *J Microbiol*, 2018, 38(6): 97–102 (in Chinese).
信欣, 陈丽杰, 薛闯. CRISPR-Cas9 技术在细菌中的研究进展及应用. *微生物学杂志*, 2018, 38(6): 97–102.
- [13] Jones SW, Paredes CJ, Tracy B, et al. The transcriptional program underlying the physiology of clostridial sporulation. *Genome Biol*, 2008, 9(7): R114.
- [14] Al-Hinai MA, Jones SW, Papoutsakis ET. The *Clostridium* sporulation programs: diversity and preservation of endospore differentiation. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2015, 79(1): 19–37.
- [15] Dürre P, Böhringer M, Nakotte S, et al. Transcriptional regulation of solventogenesis in *Clostridium acetobutylicum*. *J Mol Microbiol*

- Biotechnol, 2002, 4(3): 295–300.
- [16] Paredes CJ, Alsaker KV, Papoutsakis ET. A comparative genomic view of clostridial sporulation and physiology. *Nat Rev Microbiol*, 2005, 3(12): 969–978.
- [17] Xue C, Zhang M, Chen LJ. The advance of kinomics in prokaryotes. *J Microbiol*, 2017, 37(5): 1–7 (in Chinese).
薛闯, 张萌, 陈丽杰. 激酶组学在原核生物中的研究进展. *微生物学杂志*, 2017, 37(5): 1–7.
- [18] Stahlberg H, Kutejová E, Muchová K, et al. Oligomeric structure of the *Bacillus subtilis* cell division protein DivIVA determined by transmission electron microscopy. *Mol Microbiol*, 2004, 52(5): 1281–1290.
- [19] Rowland SL, Katis VL, Partridge SR, et al. DivIB, FtsZ and cell division in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol*, 1997, 23(2): 295–302.
- [20] Henriques AO, Glaser P, Pigeot PJ, et al. Control of cell shape and elongation by the *rodA* gene in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol*, 1998, 28(2): 235–247.
- [21] Li Y. Molecular modification of PTS^{ManII}-encoding genes in *Clostridium acetobutylicum* L7 and ABE fermentation [D]. Dalian: Dalian University of Technology, 2018 (in Chinese).
李颖. 丙酮丁醇梭菌 PTS^{ManII} 系统的分子改造及发酵研究[D]. 大连: 大连理工大学, 2018.
- [22] Wu YD, Fu YS, Qi GX, et al. Acetone-butanol-ethanol fermentation using mixture of glucose and fructose with different portions. *Chem Ind Eng Prog*, 2014, 33(6): 1539–1544 (in Chinese).
吴又多, 付友思, 齐高相, 等. 基于果糖与葡萄糖不同混合比例的丙酮丁醇发酵. *化工进展*, 2014, 33(6): 1539–1544.
- [23] Qu SX, Lü GY, Gao CZ, et al. Sample preparation methods of TEM using semi-thin paraffin sections. *J Dali Med Univ*, 2009, 31(4): 355–356, 360 (in Chinese).
曲淑贤, 吕广艳, 高船舟, 等. 石蜡半薄切片制作透射电镜的方法. *大连医科大学学报*, 2009, 31(4): 355–356, 360.
- [24] Reysenbach AL, Ravenscroft N, Long S, et al. Characterization, biosynthesis, and regulation of granulose in *Clostridium acetobutylicum*. *Appl Environ Microbiol*, 1986, 52(1): 185–190.
- [25] Patakova P, Branska B, Sedlar K, et al. Acidogenesis, solventogenesis, metabolic stress response and life cycle changes in *Clostridium beijerinckii* NRRL B-598 at the transcriptomic level. *Sci Rep*, 2019, 9: 1371.
- [26] Mao SM, Luo YAM, Zhang TR, et al. Proteome reference map and comparative proteomic analysis between a wild type *Clostridium acetobutylicum* DSM 1731 and its mutant with enhanced butanol tolerance and butanol yield. *J Proteom Res*, 2010, 9(6): 3046–3061.
- [27] Heap JT, Pennington OJ, Cartman ST, et al. The ClosTron: A universal gene knock-out system for the genus *Clostridium*. *J Microbiol Methods*, 2007, 70(3): 452–464.
- [28] Shao LJ, Hu SY, Yang Y, et al. Targeted gene disruption by use of a group II intron (targetron) vector in *Clostridium acetobutylicum*. *Cell Res*, 2007, 17(11): 963–965.
- [29] Heap JT, Pennington OJ, Cartman ST, et al. A modular system for *Clostridium* shuttle plasmids. *J Microbiol Methods*, 2009, 78(1): 79–85.
- [30] Costa CS, Antón DN. Conditional lethality of cell shape mutations of *Salmonella typhimurium*: *rodA* and *mre* mutants are lethal on solid but not in liquid medium. *Curr Microbiol*, 1999, 38(3): 137–142.
- [31] Ni H, Fan WW, Li CL, et al. *Streptococcus suis* DivIVA protein is a substrate of Ser/Thr kinase STK and involved in cell division regulation. *Front Cell Infect Microbiol*, 2018, 8: 85.
- [32] Bottomley AL, Kabli AF, Hurd AF, et al. *Staphylococcus aureus* DivIB is a peptidoglycan-binding protein that is required for a morphological checkpoint in cell division. *Mol Microbiol*, 2014, 94(5): 1041–1064.

(本文责编 郝丽芳)