

研究论文

*rpoE*基因对环境胁迫下肠炎沙门氏菌生长能力的影响

乔向欣 曾庆梅* 曾红亮 杨 晋 刘 坤

(合肥工业大学农产品生物化工教育部工程研究中心, 合肥 230009)

摘要 *rpoE*基因是普遍存在于细菌中的一类调节基因,对细菌响应各种环境胁迫起着重要的调节作用。该研究利用 λ 噬菌体的Red重组系统构建出肠炎沙门氏菌(*Salmonella enteritidis*, *S.E*)的*rpoE*基因缺陷株 $\Delta rpoE$,并考察 $\Delta rpoE$ 在不同环境胁迫条件下的生长能力。结果显示,在37 °C时, $\Delta rpoE$ 的生长能力无显著变化;而在高低温、酸、氧、高渗培养条件下, $\Delta rpoE$ 的生长能力显著弱于野生株。该研究首次获得了*S.E*的基因缺陷株 $\Delta rpoE$,并初步探索了*rpoE*基因在*S.E*中的功能,有助于进一步研究*rpoE*基因在大肠杆菌、沙门氏菌等肠杆菌科细菌在响应环境胁迫过程中表现出的生物学功能。

关键词 肠炎沙门氏菌; Red重组; $\Delta rpoE$; 环境胁迫

Influence of *rpoE* Gene on Growth Ability of *Salmonella enteritidis* under the Stress of Circumstance

Qiao Xiangxin, Zeng Qingmei*, Zeng Hongliang, Yang Jin, Liu Kun

(Engineering Research Center of Bio-process, Hefei University of Technology, Ministry of Education of PRC, Hefei 230009, China)

Abstract *rpoE* gene is one kind of regulatory genes which can be commonly found in bacteria and plays an important role to various environmental stress response. In this study, an *rpoE* gene mutant of *Salmonella enteritidis* (*S.E*) called $\Delta rpoE$ was constructed by λ -Red recombinase system and the growth ability of $\Delta rpoE$ under different stress of circumstance was inspected. The results showed that there was no difference between wild and mutant strains at 37 °C. However, the growth ability of mutant strains was significantly weaker than wild strains under the culture condition of high and low temperature, acidic, oxidative, high-osmotic. In summary, this is the first time to get the *rpoE* knock-out mutant in *Salmonella enteritidis* and the function of *rpoE* gene is preliminarily inspected, which can help to find out the further function and mechanism of the *rpoE* gene in Enterobacteriaceae such as *E.coli* and *S.E*.

Key words *Salmonella enteritidis*; Red recombination; $\Delta rpoE$; environment stress

肠炎沙门氏菌(*Salmonella enteritidis*, *S.E*)可污染各种畜、奶、蛋产品,能引发人畜发热、腹泻、呕吐等症状,是引起急性肠胃炎的主要原因^[1]。当

受到高低温、酸、氧、渗透压等生存压力的刺激时,肠炎沙门氏菌需要及时有效地调节某些基因的表达和蛋白的活性来适应新的环境。*rpoE*是普遍存在于

收稿日期: 2012-12-24 接收日期: 2013-02-22

国家自然科学基金(批准号: 31071556、30871739)和国家高技术研究发展计划(批准号: 2011AA100801)资助的课题

*通讯作者。Tel/Fax: 0551-2901862, E-mail: zengqingmei-1@163.com

Received: December 24, 2012 Accepted: February 22, 2013

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.31071556, 30871739) and the National High Technology Research and Development Program of China (Grant No.2011AA100801)

*Corresponding author. Tel/Fax: +86-551-2901862, E-mail: zengqingmei-1@163.com

网络出版时间: 2013-04-22 14:56

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20130422.1456.005.html>

细菌中的一类调节基因,在细菌响应非致死性环境胁迫的过程中起着重要的调节作用^[2]。其中,在对大肠杆菌(*Escherichia coli*, *E.coli*)响应热激的研究中,有关推测认为:在受到高温刺激时,基因*rpoE*由抑制状态变为激活状态,编码出的 σ^{24} 因子可特异性识别并引导RNA聚合酶和调控蛋白结合到热休克基因启动子区域上,诱导热休克蛋白基因的表达并产生大量的热激蛋白^[3],从而提高细胞对热的应激能力和菌体对非致死性热刺激的存活率。大肠杆菌和肠炎沙门氏菌中*rpoE*基因的同源性高达93%左右,且对应编码的蛋白序列的同源性高达99%左右。此类反应机制在大肠杆菌中的研究已有大量的报道^[2-3],但在沙门氏菌中尚未深入开展*rpoE*基因调节功能的相关研究。因此,大肠杆菌中*rpoE*基因的研究将对本课题产生重要的指导和借鉴作用。

目前对细菌基因功能的阐述,常需要使该基因缺失,然后比较野生菌株与缺陷菌株之间的差异,从而确切地得到该基因的功能信息^[4]。在微生物基因工程研究中, λ 噬菌体的Red重组系统是近些年来发展起来的、可使机体特定的基因失活或缺失的新型分子生物学技术,可产生精确的基因突变,也可纠正机体的基因突变,已被广泛应用于研究特定基因功能、构建特定突变工程菌、改变生物代谢途径等方面。与传统的基因敲除方法相比,该技术以其较短的同源臂和较高的重组效率等优点广泛用于大肠杆菌的基因修饰中^[5]。本课题利用 λ 噬菌体的Red重组系统对肠炎沙门氏菌的*rpoE*基因进行敲除,比对*rpoE*基因缺失前后菌体在高低温、酸、氧、高渗条件下生长情况的差异,初步探求*rpoE*基因在响应环境胁迫过程中对菌体活性的影响,为进一步研究细菌基因功能提供了理论基础和数据支撑。

1 材料与方 法

1.1 材料

1.1.1 菌株与质粒 肠炎沙门氏菌(*Salmonella enteritidis*, *S.E*)国内标准株购自中国工业微生物菌种保藏管理中心(CICC);质粒pKD4、质粒pKD46、质粒pCP20均由华东理工大学生物反应器工程国家重点实验室惠赠。质粒pKD4(含两端带有FRT位点的卡那霉素抗性基因*kan*,用作抗性模板)、pKD46(含氨苄青霉素抗性基因,用以编码同源重组酶,对温度敏感)、pCP20(含氯霉素抗性基因,用以去除抗性基因*kan*,对温度敏感)均保存于大肠杆菌DH5 α 中。

1.1.2 主要试剂 质粒抽提试剂盒购自Qiagen公司;PCR扩增试剂盒、PCR产物纯化试剂盒均购自上海生工生物工程有限公司;L-阿拉伯糖、氨苄青霉素、卡那霉素、氯霉素、琼脂糖、CaCl₂均购自BBI公司。

1.2 方法

1.2.1 引物的设计 敲除*rpoE*基因共需4条引物,其中用于同源重组的引物S1、S2分别由两部分组成,5'端加下划线的序列与*rpoE*基因两翼序列同源,3'端未加下划线的序列与质粒pKD4上卡那霉素抗性基因*kan*两侧序列互补。用于鉴定缺陷株的引物S3、S4设计在同源重组区域外侧^[6-8],序列如表1所示。引物合成由上海生工生物工程有限公司完成。

1.2.2 抗性重组片段pKD4-*kan*的制备 以含卡那霉素抗性基因*kan*的质粒pKD4为模板,S1、S2为引物进行PCR扩增反应,得到能替换*rpoE*基因、便于后期菌株抗性筛选的重组基因片段。为防止残留质粒模板影响后续实验^[6-7],将产物进行琼脂糖凝胶电泳后切胶回收纯化,并进行浓度测定。将此基因片段命名为pKD4-*kan*。

1.2.3 Red重组酶的诱导和电转化感受态的制备 将含氨苄青霉素抗性基因的质粒pKD46按常规化学法(CaCl₂法)转化到肠炎沙门氏菌中^[7],通过氨苄青霉素抗性平板筛选阳性转化子。挑选单菌落于5 mL LB液体培养基中30 °C过夜培养,按1:100的比例转接到含氨苄青霉素的LB液体培养基中30 °C培养至

表1 实验中所用的引物序列

Table 1 Primers and sequences used in this research

引物 Primers	序列 Sequences
S1	5'-GAA AGT TTT TCT TTC TGC ATG CCT AAT ACC TTT TCC AGT ATG GGA ATT AGC CAT GGT CC-3'
S2	5'-ATG AGC GAG CAG TTA ACG GAC CAG GTC CTG GTT GAA CGG GTG TAG GCT GGA GCT GCT TC-3'
S3	5'-GAA TCG CGG ATC AGG T-3'
S4	5'-TGC GGC TTA TGG AGT G-3'

D_{600} 约为0.2, 加入终浓度为30 mmol/L的L-阿拉伯糖继续培养90 min, 诱导质粒pKD46上*gam*、*bet*和*exo*三种基因编码的*gam*、*bet*和*exo*三种酶并充分表达^[6-8], 为抗性重组片段pKD4-*kan*和*rpoE*基因的同源重组做准备。然后按常规方法制备肠炎沙门氏菌电转化感受态细胞^[6-8], 用于下一步转化实验。

1.2.4 片段pKD4-*kan*的电转化和缺陷株*ΔrpoE-kan*的鉴定 于冰上将1 μL的pKD4-*kan*片段和100 μL制备好的感受态细胞混匀, 置于0.2 cm电击杯中进行电击转化。电击参数为: 电压2.5 kV, 电阻200 Ω, 脉冲25 μF^[6-7]。电击完成后立即加入37 °C预热的无抗性LB液体培养基, 于37 °C培养2 h^[9], 使接入抗性片段的细胞充分复苏。然后取菌液涂布至含卡那霉素的LB平板, 筛选出含抗性基因的缺陷株阳性克隆。以阳性单克隆为模板, S3、S4为引物进行PCR扩增鉴定, 查看抗性片段与*rpoE*基因的重组情况^[6,8]。将重组成功的菌株命名为*ΔrpoE-kan*。

1.2.5 质粒、抗性基因的消除及缺陷株*ΔrpoE*的鉴定 通过电转化法将编码FLP重组酶的质粒pCP20转化到菌株*ΔrpoE-kan*中^[6-7], 30 °C培养后涂布氯霉素抗性平板并筛选出转化子, 然后转接到不含抗生素的LB液体培养基中42 °C过夜培养。质粒pCP20编码的FLP重组酶能够识别*kan*两侧的FRT位点, 通过位点特异性重组将抗性基因去除。在消除*kan*的同时, 对温度敏感的质粒pKD46、pCP20在高温下会逐渐丢失^[9-12]。消除质粒的菌株为基因缺陷株阳性克隆, 以阳性单克隆为模板, S3、S4为引物进行PCR扩增鉴定, 查看抗性基因*kan*的去除情况。将去除抗性基因成功的菌株命名为缺陷株*ΔrpoE*。

1.2.6 *ΔrpoE*遗传稳定性的鉴定 挑取*ΔrpoE*单克隆于LB液体培养基中37 °C培养至对数后期, 然后按1:100的比例接种到新鲜的LB液体培养基中。如此连续传代培养10次, 每次均吸取1 μL菌液涂布于LB平板, 然后随机挑取长出的10个单菌落为模板, S3、S4为引物进行PCR扩增鉴定^[6,12], 查看基因缺陷株是否存在回复突变情况, 考查细菌基因敲除后的稳定性。

1.2.7 *ΔrpoE*的生长特性及数据的统计学分析 挑取基因缺陷株和野生株单菌体分别于5 mL LB液体培养基中37 °C培养至对数后期, 按1:100的比例接种到新鲜的LB液体培养基中, 测定接种浓度, 调节二者的 D_{600} 值相等。然后模拟常见外界胁迫环境, 设置几种不同的培养条件: 高低温条件(30 °C、37 °C、42 °C);

酸性条件(培养基pH值为5.0); 氧激条件(培养基中加入终浓度为1.5 mmol/L的H₂O₂); 高渗条件(培养基中加入终浓度为500 mmol/L的NaCl)。每隔3 h取1 mL菌液, 稀释后涂布至营养琼脂平板, 平板计数法计菌落数^[7]。为减小实验误差, 做5组平行实验取菌落数的平均值。以不同培养条件下的培养时间为横坐标, 细菌活菌数的对数为纵坐标绘制生长曲线, 观察野生株和基因缺陷株在环境胁迫条件下的生长情况。同时使用SPSS统计学分析软件对几种培养条件下二者的数据进行分析比较, 当 $P < 0.05$ 时差异具有统计学意义。

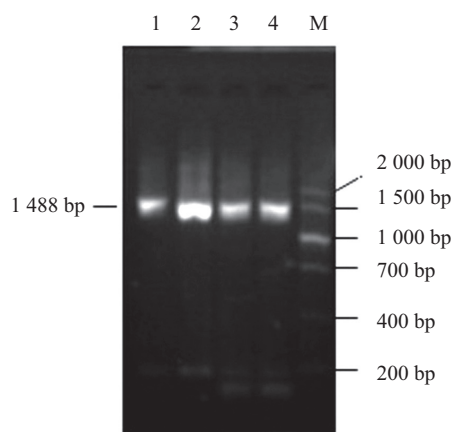
2 结果

2.1 片段pKD4-*kan*的制备结果

以质粒pKD4为模板, S1、S2为引物进行PCR扩增反应, 得到两端与*rpoE*基因上下游序列同源、中间为卡那霉素抗性基因*kan*的DNA片段。经琼脂糖凝胶电泳初步鉴定, 并由上海生工生物工程有限公司测序, 结果如图1所示。PCR产物的长度为1 488 bp, 与理论值一致, 表明片段pKD4-*kan*扩增成功^[6,8]。

2.2 缺陷株*ΔrpoE-kan*的鉴定结果

采用电转化法将片段pKD4-*kan*转化到含质粒pKD46的肠炎沙门氏菌中, 经卡那霉素抗性LB平板筛选出阳性克隆。分别以阳性单菌落和野生单菌落为模板, S3、S4为引物进行PCR扩增反应, 对pKD4-*kan*和*rpoE*基因的重组情况进行鉴定, 结果如图2所示。经测序, 阳性菌落PCR产物长度为1 707 bp, 而对照野生菌PCR产物长度为795 bp, 二者差异显著。结果证

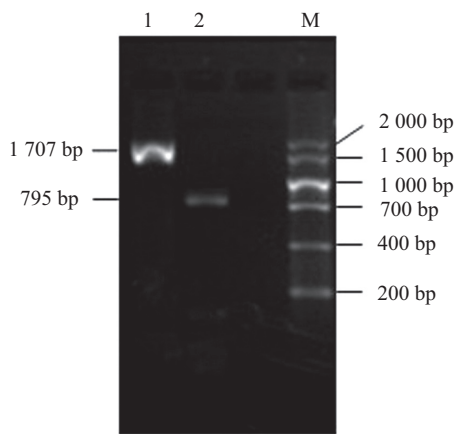


1-4: pKD4-*kan*的PCR扩增产物; M: DNA标准。

1-4: products of pKD4-*kan* amplified by PCR; M: DNA ladder.

图1 片段pKD4-*kan*的PCR鉴定

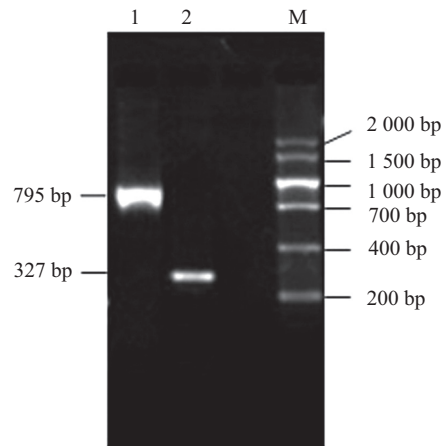
Fig.1 Identification of pKD4-*kan* by PCR



1: $\Delta rpoE$ -*kan*的PCR扩增产物; 2: *rpoE*的PCR扩增产物; M: DNA标准。
1: products of $\Delta rpoE$ -*kan* amplified by PCR; 2: products of *rpoE* amplified by PCR; M: DNA ladder.

图2 缺陷株 $\Delta rpoE$ -*kan*的PCR鉴定

Fig.2 Identification of $\Delta rpoE$ -*kan* by PCR



1: *rpoE*的PCR扩增产物; 2: $\Delta rpoE$ 的PCR扩增产物; M: DNA标准。
1: products of *rpoE* amplified by PCR; 2: products of $\Delta rpoE$ amplified by PCR; M: DNA ladder.

图3 抗性基因*kan*去除的PCR鉴定

Fig.3 Identification of elimination of the *kan* gene by PCR

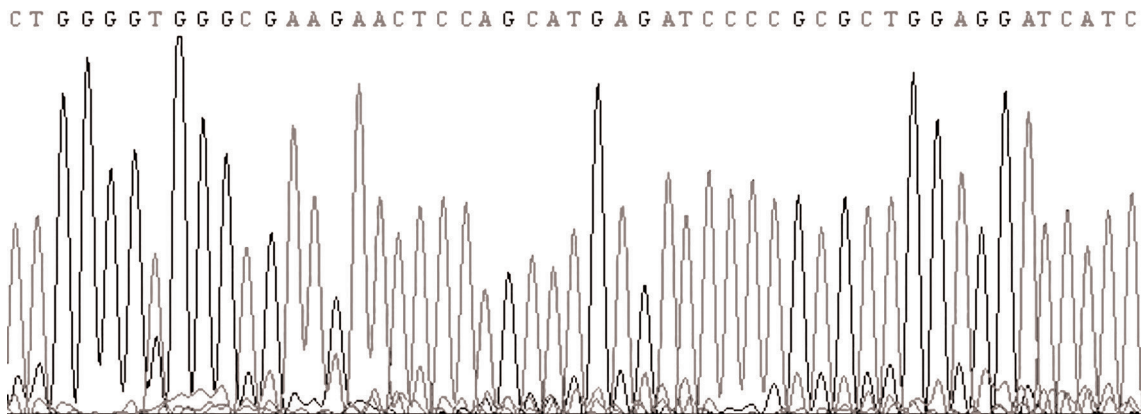


图4 缺陷株的 $\Delta rpoE$ 的部分DNA序列分析

Fig.4 Partial sequence analysis of $\Delta rpoE$

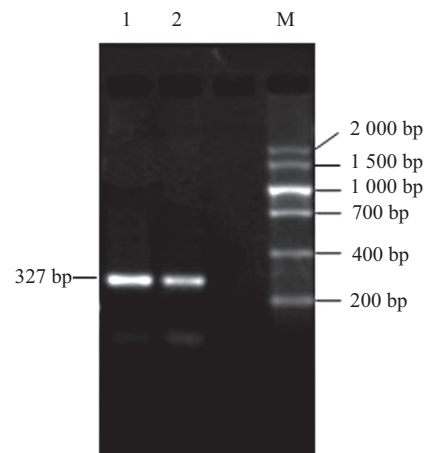
明*rpoE*基因被替换, 基因缺陷株 $\Delta rpoE$ -*kan*构建成功。

2.3 缺陷株 $\Delta rpoE$ 的鉴定结果

采用电转化法将质粒pCP20转入菌株 $\Delta rpoE$ -*kan*中, 最终取菌液涂布LB平板获得阳性克隆。以阳性单菌落为模板, S3、S4为引物进行PCR扩增反应, 对抗性基因*kan*的去除结果进行鉴定并测序, 结果如图3和图4所示。PCR产物长度为327 bp, 对照野生株PCR产物为795 bp, 二者差异显著。结果证明*kan*基因已被消除, 而仅在原来的抗性基因单侧留下一个FRT位点和一些残余序列^[6,11], 证明基因缺陷株 $\Delta rpoE$ 构建成功。

2.4 $\Delta rpoE$ 遗传稳定性的鉴定结果

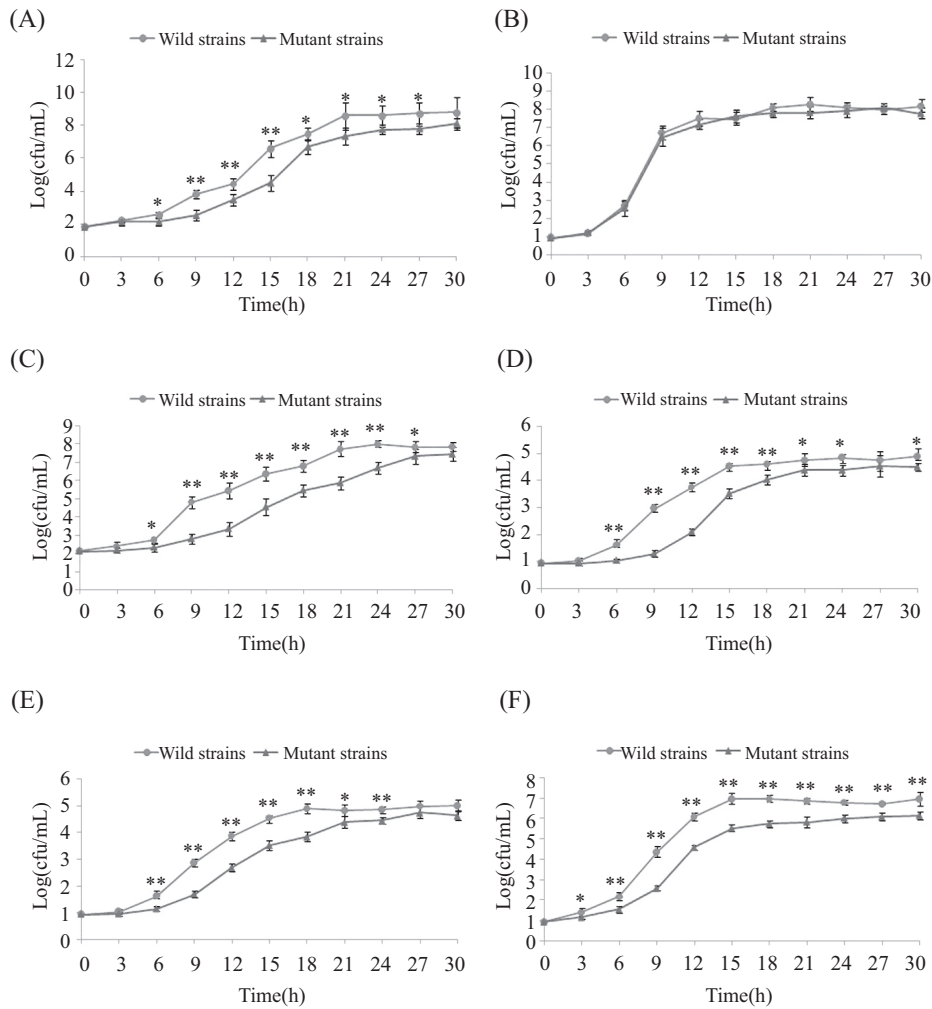
将基因缺陷株在体外连续传代培养10次并每次取1 μ L涂布LB平板, 随机在每个平板中挑取10个



1,2: $\Delta rpoE$ 的PCR扩增产物; M: DNA标准。
1,2: products of $\Delta rpoE$ amplified by PCR; M: DNA ladder.

图5 $\Delta rpoE$ 稳定性的PCR鉴定

Fig.5 Identification of stability of the $\Delta rpoE$ by PCR



A: 野生株和缺陷株在30 °C的生长曲线; B: 野生株和缺陷株在37 °C的生长曲线; C: 野生株和缺陷株在42 °C的生长曲线; D: 野生株和缺陷株在酸性条件下的生长曲线; E: 野生株和缺陷株在氧激条件下的生长曲线; F: 野生株和缺陷株在高渗条件下的生长曲线。* $P<0.05$, ** $P<0.01$ 。
 A: the growth curve of wild strains and mutant strains at 30 °C; B: the growth curve of wild strains and mutant strains at 37 °C; C: the growth curve of wild strains and mutant strains at 42 °C; D: the growth curve of wild strains and mutant strains in acidic condition; E: the growth curve of wild strains and mutant strains in oxidative condition; F: the growth curve of wild strains and mutant strains in high-osmotic condition. * $P<0.05$, ** $P<0.01$.

图6 野生株和缺陷株在不同环境胁迫条件下的生长曲线

Fig.6 The growth curve of wild strains and mutant strains in different environmental stress conditions

单克隆进行菌落PCR扩增反应, 结果如图5所示, 每次PCR产物长度依然为327 bp, 证明传代培养过程中没有出现回复突变, 构建的缺陷株 $\Delta rpoE$ 非常稳定。

2.5 *ArpoE*的生长特性及数据的统计学分析

在低高温条件(30 °C、37 °C、42 °C)、酸性条件(培养基pH值为5.0)、氧激条件(培养基中加入终浓度为1.5 mmol/L的 H_2O_2)、高渗条件(培养基中加入终浓度为500 mmol/L的NaCl)下, 分别以培养时间为横坐标, 细菌活菌数的对数为纵坐标绘制野生株和缺陷株的生长曲线, 结果如图6所示。经SPSS统计学分析软件对5组数据进行差异分析处理并进行误差分析, 结果显示在37 °C最适温度条件下, 野生

株和缺陷株的生长数据无显著差异($P>0.05$), 二者生长情况几乎无差别; 而在30 °C低温、42 °C高温、酸性、氧激、高渗条件下, 缺陷株和野生株数据间的差异具有统计学意义($P<0.05$), 二者生长情况具有显著差异。以上结果表明, 在最适温度条件下, *rpoE*基因对细菌活性几乎无影响; 而在其他几种培养条件下, *rpoE*基因会显著影响细菌的活性, 基因的缺失会导致细菌对环境胁迫(低温、高温、酸、氧、高渗)的耐受能力显著降低。

3 讨论

在利用Red重组系统对肠炎沙门氏菌的*rpoE*基

因进行敲除的过程中,设计引物制备抗性重组片段时,两侧同源序列的长度是影响重组效率的关键点。目前,国内外通过Red重组进行基因修饰所使用的引物同源臂长度主要在40-60 bp之间,过短的同源臂容易被降解,导致重组效率偏低^[5,8,13]。经过本实验验证,发现当同源臂长度为39 bp时,重组片段的重组效率较高。在进行重组酶的诱导时,L-阿拉伯糖的浓度和诱导时间也直接影响了重组效率。发现选择L-阿拉伯糖的浓度为30 mmol/L、诱导时间为90 min时比诱导时间为60 min效率高。通过连续传代培养观察缺陷株的基因稳定性,发现基因敲除后菌体非常稳定,不存在基因回复突变的情况。在测定野生株和缺陷株的生长曲线时,由于多次在同一种培养基中取样,增大了污染杂菌的可能性;且取样量较少,样品中菌量可能不足以代表整个培养基中的活菌数,因此做了5组平行实验,取样品中菌量的平均值来绘制生长曲线。

通过对比野生株和缺陷株在几种不同环境胁迫下的生长情况,推测*rpoE*基因对肠炎沙门氏菌活性的影响可能是:在适宜生长条件时,*rpoE*基因活性受到抑制,不参与应激反应,不影响菌体的正常生理活性。在受到低温、高温、酸、氧、高渗等环境胁迫影响时,*rpoE*基因抑制被解除,活性得以发挥,从而使菌体对环境胁迫的耐受能力显著提高。在大肠杆菌的研究中,目前细菌响应热激的机制认为:在热应激后,细胞外膜错折叠不能正确装配,从而促使内膜蛋白水解酶degS、rseP激活,水解rseA,解除对*rpoE*的抑制。使*rpoE*活化释放到细胞质,激活80余种基因的表达,包括热休克蛋白rpoH、greA、其他分子伴侣、折叠催化剂的启动和促进脂多糖修复,并最终能指导外膜应激受损蛋白重新正确装配^[14-17]。*rpoE*启动的这些基因中,*rpoH*已被证实是可以直接被*rpoE*诱导表达从而启动其下游相关基因的表达的,使细菌响应热激得以生存^[14,18-19]。本课题利用Red重组系统成功构建了*rpoE*基因缺陷株,并优化了实验条件,初步考察了*rpoE*基因在肠炎沙门氏菌响应环境胁迫过程中的调节作用,为该技术在其他菌种中的应用提供了借鉴,并为进一步研究*rpoE*基因在原核生物中的调节功能奠定了基础。

参考文献 (References)

1 杨保伟,张秀丽,曲东,席美丽,崔生辉,申进玲,等. 2007-2008陕西部分零售畜禽肉沙门氏菌血清型和基因型. 微生物

- 学报(Yang Baowei, Zhang Xiuli, Qu Dong, Xi Meili, Cui Shenghui, Shen Jinling, *et al.* Serotypic and genotypic characterization of *Salmonella* Serovars from retail meat in Shaanxi province (2007-2008). *Acta Microbiologica Sinica* 2010; 50(5): 654-60.
- 2 Kazmierczak MJ, Wiedmann M, Boor KJ. Alternative sigma factors and their roles in bacterial virulence. *Microbiol Mol Biol Rev* 2005; 69(4): 527-43.
- 3 Kanehara K, Ito K, Akiyama Y. YaeL proteolysis of RseA is controlled by the PDZ domain of YaeL and a Gln-rich region of RseA. *EMBO J* 2003; 22(23): 6389-98.
- 4 李樊,刘义,何钢. 基因敲除技术研究进展. 生物技术通报(Li Fan, Liu Yi, He Gang. Status of gene knockout. *Biotechnol Bull*) 2008; 19(2): 80-2.
- 5 张雪,温廷益. Red重组系统用于大肠杆菌基因修饰研究进展. 中国生物工程杂志(Zhang Xue, Wen Tingyi. Advances of Red recombination system in *Escherichia coli* gene modification. *China Biotechnology*) 2008; 28(12): 89-93.
- 6 Datsenko KA, Wanner BL. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97(12): 6640-5.
- 7 张维铭. 现代分子生物学实验手册. 第二版. 北京: 科学出版社(Zhang Weiming. *Beijing: Science Press*), 2007, 546.
- 8 Yu D, Ellis HM, Lee EC. An efficient recombination system for chromosome engineering in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97(11): 5978-83.
- 9 Murphy KC. Use of bacteriophage recombination functions to promote gene replacement in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 1998; 180: 2063-71.
- 10 Serra-Moreno R, Aeosta S, Hernalsteens JP. Use of the lambda Red recombinase system to produce recombinant prophages carrying antibiotic resistance genes. *BMC Mol Biol* 2006; 7: 31.
- 11 Poteete AR. What makes the bacteriophage lambda Red system useful for genetic engineering: Molecular mechanism and biological function. *FEMS Microbiol Lett* 2001; 201(1): 9-14.
- 12 Muylers JP, Zhang Y, Stewart AF. ET-cloning: Think recombination first. *Genet Eng(NY)* 2000; 22(1): 77-98.
- 13 Liu PT, Jenkins NA, Copeland NG. A highly efficient recombineering-based method for generating conditional knockout mutations. *Genome Res* 2003; 13(3): 476-84.
- 14 杜鸿,邹昕,夏秋风,高宇琳,黄新祥. 伤寒沙门菌*rpoE*基因缺陷变异株的制备及其生存能力. 苏州大学学报(医学版)(Du Hong, Zou Xin, Xia Qiufeng, Gao Yulin, Huang Xinxiang. Construction of a *rpoE* gene-deleted mutant in *Salmonella Enterica* Serovar typhi and its survival ability. *Suzhou University Journal of Medical Science*) 2009; 29(2): 232-6.
- 15 Arsène F, Tomoyasu T, Bukau B. The heat shock response of *Escherichia coli*. *Int J Food Microbiol* 2000; 55: 3-9.
- 16 Raivio TL, Silhavy TJ. Periplasmic stress and ECF sigma factors. *Annu Rev Microbiol* 2001; 55: 591-624.
- 17 Ra RG, Raivio TL. A third envelope stress signal transduction pathway in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 2002; 45: 1599-611.
- 18 Rhodius VA, Suh WC, Nonaka G. Conserved and variable functions of the σ^E stress response in related genomes. *PLoS Biol* 2006; 4(1): e2.
- 19 Mecsas J, Rouviere PE, Erickson JW. The activity of sigma E, an *Escherichia coli* heat-inducible sigma-factor, is modulated by expression of outer membrane proteins. *Genes Dev* 1993; 7: 2618-28.