

假单胞菌 M18 *relA* 突变株的构建及其 对吩嗪-1-羧酸合成的调控

王金英 张明月 王国昊 魏雪 李雅乾 黄显清* 许煜泉*

(上海交通大学生命科学技术学院 上海 200240)

摘要: 假单胞菌 M18 是一株能同时合成吩嗪-1-羧酸(PCA)和藤黄绿菌素两种抗生素的植物根际分离细菌。RelA 催化合成的效应分子 ppGpp 能介导细菌因营养饥饿引起的应激反应。以 M18 菌株染色体 DNA 为模板, PCR 扩增获得 *relA* 基因, 通过庆大霉素抗性片段插入失活与同源重组技术, 构建假单胞菌 M18 的 *relA* 突变菌株 M18RAG。在 PPM 培养基中进行 PCA 发酵分析, 发现突变菌株 M18RAG 的 PCA 产量显著升高, 约为野生型菌株的 1.5–2 倍。*relA* 基因反式互补实验以及 *phzA*'-'*lacZ* 翻译融合测定结果, 均进一步证明了 RelA 对 PCA 生物合成及其基因表达具有抑制作用。

关键词: 细菌应激反应, ppGpp 合成酶 RelA, 假单胞菌 M18, 吩嗪-1-羧酸

Construction of *Pseudomonas* sp. M18 *relA* mutant and its regulation on phenazine-1-carboxylic acid biosynthesis

WANG Jin-Ying ZHANG Ming-Yue WANG Guo-Hao WEI Xue LI Ya-Qian
HUANG Xian-Qing* XU Yu-Quan*

(College of Life Sciences and Biotechnology, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China)

Abstract: The rhizosphere bacterium *Pseudomonas* sp. M18 can simultaneously produce two antibiotics: phenazine-1- carboxylic acid (PCA) and pyoluteorin. ppGpp, which is synthesized by RelA, can mediate bacterial stringent response to nutritional starvation. The *relA* gene was PCR amplified from the M18 strain chromosomal DNA template. The *relA* mutant of M18 strain (M18RAG) was constructed through inserted inactivation of gentamicin resistance cassette and homologous recombination. PCA production was assayed in PPM media. It was showed that the *relA* mutation resulted in a significant enhancement of PCA production. PCA production of M18RAG was about 1.5 to 2 times as much as that of the wild-type strain. The negative regulation of RelA on PCA biosynthesis and its gene expression

基金项目: 国家 863 计划项目(No. 2007AA02Z215); 国家自然科学基金项目(No. 30800009); 国家 973 计划项目(No. 2009CB118906)

* 通讯作者: Tel: 86-21-34204347; ✉: xqhuang66@sjtu.edu.cn, xuyq@sjtu.edu.cn © 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>
收稿日期: 2010-11-12; 接受日期: 2010-12-14

was further confirmed by the trans complementation test of *relA* gene and the expression analysis of *phzA'-lacZ* translational fusion.

Keywords: Bacterial stringent response, ppGpp synthase RelA, *Pseudomonas* sp. M18, Phenazine-1-carboxylic acid

微生物在生长过程中, 为了适应周围环境条件的变化, 已经进化出了很多应答调控机制, 这其中就包括应激反应。应激反应普遍存在于细菌、真菌、放线菌以及植物中^[1]。应激反应的效应分子是四磷酸鸟苷(ppGpp)和五磷酸鸟苷(pppGpp), 统称为(p)ppGpp, 细菌中起主要功能的是 ppGpp。(p)ppGpp 代谢由 RelA 蛋白和 SpoT 蛋白负责; RelA 蛋白主要负责(p)ppGpp 合成, SpoT 蛋白则具有(p)ppGpp 水解酶和合成酶两个功能域。当周围环境缺乏氨基酸等营养物质时, 空载 tRNA 会结合到核糖体的 A 位点上, 引起 RelA 蛋白构象发生变化, 从而激活 ppGpp 合成^[2]。ppGpp 能够广泛抑制菌体生长相关基因的表达, 同时促进稳定期相关基因的表达^[3-5]。除了氨基酸饥饿会引起 ppGpp 增加外, 脂肪酸、磷酸、碳源和铁离子等营养饥饿也会导致 ppGpp 水平急剧升高。最初有研究显示, 在大肠杆菌中 ppGpp 是通过结合 RNA 聚合酶来抑制 rRNA 转录, 进而抑制生长、应对环境压力下的生存竞争^[6]。除此之外, 应激反应其它潜在的具体调控机理大多尚未研究清楚, 如 ppGpp 参与抗生素合成等次级代谢调控的分子机制等。

在假单胞菌中, 关于应激反应的研究主要集中在铜绿假单胞菌中的 RelA 蛋白。据报道, *relA* 基因过表达后可以促进稳定期 Sigma 因子 RpoS 的转录, 同时增强菌群传感系统的表达^[7-8]。关于应激反应对是否直接参与假单胞菌抗生素等次生代谢物质合成基因表达的调控及其具体分子机制, 均未见相关报道。

假单胞菌 M18 是从土壤根际分离得到的能同时分泌吩嗪-1-羧酸(Phenazine-1-carboxylic acid, PCA)和藤黄绿菌素(Pyoluterion, Plt)两种抗生素的一株假单胞菌^[9]。课题组前期已经对假单胞菌 M18 中抗生素合成的分子调控机制展开了广泛而深入的研究^[10-12]。细菌应激反应是微生物适应土壤及培养基

环境的一种生理应答机制, 至于细菌应激反应在 M18 菌株抗生素合成中的调控作用还有待深入研究。为此, 本课题深入研究了假单胞菌株 M18 中 *relA* 基因对抗生素 PCA 合成的调控机制。研究表明, *relA* 突变菌株 M18RAG 的 PCA 产量显著提高, 约为野生型的 1.5-2 倍, 相应地, *relA* 对 PCA 生物合成基因表达也具有负调控作用。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种和质粒: 本研究所用的菌株、质粒及其来源见表 1。

1.1.2 培养基和生长条件: 本实验用到的培养基包括 LB、KMB 和 PPM。LB 培养基按文献[13]配制; KMB 培养基: 每升含蛋白胨 20 g, 甘油 15 mL, MgSO₄ 0.732 g, K₂HPO₄ 0.514 g, pH 7.5; PPM 培养基: 每升含蛋白胨 22 g, 葡萄糖 20 g, KNO₃ 5 g, pH 7.5; 相应固体培养基每升加琼脂 15 g。大肠杆菌 (*E. coli*)培养基中抗生素用量(mg/L): 庆大霉素(Gm) 10、四环素(Tet) 10。假单胞菌 M18 培养基中抗生素用量(mg/L): Gm40、壮观霉素(Sp) 100、四环素(Tet) 120。培养温度: 大肠杆菌 37 °C; 假单胞菌常规培养 37 °C、发酵培养 28 °C、200 r/min 转速下振荡培养。

1.1.3 主要试剂和仪器: DNA Taq 聚合酶购自 TaKaRa 公司; 高保真 DNA 聚合酶购自 Toyobo 公司的 KOD 聚合酶; 各种限制性内切酶、T4 DNA 连接酶、DNA 分子量标准物购自 MBI 公司; 质粒抽提试剂盒购自北京博大泰克公司; DNA 胶回收试剂盒购自 Axygen 公司。基因组抽提试剂盒、X-Gal、IPTG、抗生素购自上海 Sangon 公司。安捷伦高效液相色谱仪(型号 G1328B), 分析柱为反相 C18 色谱柱(4.6 mm i.d. × 150 mm, 5 μm) 购自安捷伦公司。

表 1 菌株与质粒
Table 1 Strains and plasmids

Materials	Genotype and/or relevant characteristics	Source
<i>E. coli</i>		
DH5a	<i>supE44 ΔlacU169(Φ80 lacZΔM15) hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1</i>	This lab
SM10	<i>thi-1 thr leu tonA lacY supE recA::RP4-2-Tc::Mu Km^r</i>	This lab
<i>Pseudomonas</i> sp. M18		
Wild-type	Rhizosphere isolate, Plt ⁺ PCA ⁺ Sp ^r	This lab
M18RAG	<i>relA::Gm^r, Sp^r Gm^r</i>	This study
Plasmids		
pEX18Tc	Gene replacement vector with MCS from pUC18, oriT ⁺ sacB ⁺ , Tc ^r	This lab
pUCGm	Source of Gm ^r cassette, Gm ^r	This lab
pEXTc-relA	pEX18Tc with <i>EcoR</i> I- <i>Hind</i> III insert of 2.25kb, including the <i>relA</i> gene sequence, Tc ^r	This study
pEXTcRAG	<i>relA::Gm^r</i> in pEX18TcRelA, Tc ^r Gm ^r	This study
pME6032	pVS1-p15A <i>E. coli</i> - <i>Pseudomonas</i> shuttle vector, <i>lacI^q</i> - <i>Ptac</i> expression vector, Tc ^r	This lab
pORA	pME6032 with <i>EcoR</i> I insert of 2.25 kb, including gene <i>relA</i> sequence, Tc ^r	This study
pMEL $phz1'$ - $'lacZ$	701 bp <i>EcoR</i> I- <i>Pst</i> I PCR amplified fragment from -340 to +361 upstream <i>phzA1-G1</i> transcriptional start site cloned into pME6015, Tc ^r	This lab
pMEL $phz2'$ - $'lacZ$	572 bp <i>EcoR</i> I- <i>Pst</i> I PCR amplified fragment from -344 to +228 upstream <i>phzA2-G2</i> transcriptional start site cloned into pME6015, Tc ^r	This lab

Note: Plt: Pyoluteorin; PCA: Phenazine-1-carboxyl acid; r: Antibiotics-resistant; Km: Kanamycin; Tc: Tetracycline; Gm: Gentamicin; Sp: Spectinomycin.

1.2 引物和 PCR 反应

根据 *P. aeruginosa* PAO1 的 *relA* 基因序列设计引物, PCR 扩增假单胞菌 M18 基因组的 *relA* 基因片段。引物 1: 5'-ACCGGAATTCATGGTACAGGTGAGAG-3', 带下划线的碱基为 *EcoR* I 酶切位点; 引物 2: 5'-TAATAAGCTTTGGCCGATGCCGATGGC-3', 带下划线的碱基为 *Hind* III 酶切位点。PCR 反应体系 (50 μL): 10×高保真 DNA 聚合酶缓冲液 5 μL, dNTPs (2.5 mmol/L) 4 μL, 引物 1 和引物 2 各 1 μL, 模板 DNA 0.5 μL, 高保真酶 (5 U/μL) 0.25 μL, 重蒸水 38.25 μL。PCR 反应条件: 95 °C 5 min; 94 °C 45 s, 60 °C 45 s, 72 °C 3 min, 30 个循环; 72 °C 10 min。

1.3 克隆 *relA* 基因片段及测序

质粒抽提、DNA 片段回收、酶切酶连反应等均参照试剂(盒)说明书, 相关分子生物学方法参考文献[9], DNA 测序委托上海英骏生物技术有限公司和华大基因科技股份有限公司。

1.4 细菌结合转移

采用固相滤膜杂交方法^[9,13]进行细菌结合转移、双亲杂交、同源重组。

1.5 生长曲线测定及 PCA 产量测定

OD_{600} 值的测定、PCA 的提取及其 HPLC 测定方法均参考文献[9]。每个实验独立重复 2 次, 每次实验中每个菌株设 3 个平行样, 每隔 12 h 取一次样, 测定 PCA 产量与细胞生长密度(OD_{600})。

1.6 β-半乳糖苷酶活性的测定

β-半乳糖苷酶活性的测定方法参考文献[10], 首先从平板上挑取单菌落接种于小瓶中(容积为 250 mL, 内含 50 mL 培养基)、28 °C、200 r/min 摇床振荡培养 10–12 h 后, 转接到大瓶中(容积为 500 mL, 内含 100 mL 培养基, 接种量为终 OD_{600} =0.05), 每种菌株设 3 个平行样, 每隔 3 h 取一次样测其 β-半乳糖苷酶活性和 OD_{600} 值。每次实验独立重复 2 次以上。

2 结果

2.1 *relA* 基因突变株 M18RAG 的构建

为了研究 *relA* 基因在 M18 菌株中的功能, 我们采用抗生素抗性片段插入失活、双亲杂交、同源重组的方法构建 *relA* 基因的染色体突变株 M18RAG。

以野生型假单胞菌株 M18 的染色体 DNA 为模板, 进行 PCR 扩增, 获得长度为 2.25 kb 左右的片段, 测序结果用 NCBI 的 BLAST 程序比对分析, 发现 M18 中 *relA* 基因序列和 *P. aeruginosa* PAO1 中 *relA* 序列同源性高达 99%。PCR 片段经 *EcoR* I 和 *Hind* III 双酶切后, 插入载体 pEX18Tc, 获得重组质粒 pEXTc-*relA*。用 *Bgl* II 单酶切 pEXTc-*relA* 上的 *relA* 基因, 同时用 *Bgl* II 的同尾酶 *Bam*H I 单酶切质粒 pUCGm 回收长度为 0.85 kb 的 Gm^r 抗性片段, 两者酶连后, 获得携带 *relA*::Gm^r 体外突变体的重组质粒 pEXTcRAG(图 1), 将该质粒转化至 *E. coli* SM10。以其作为供体菌, 野生型 M18 作为受体菌, 经固相滤膜接合转移。质粒 pEXTcRAG 转入 M18 菌株后, 不能在染色体外自主复制, 质粒携带的 *relA*::Gm^r 突变基因与受体菌 M18 染色体上的 *relA* 基因发生同源重组。用含 Gm 和 Tet 抗生素的平板进行双抗筛选。在 Tet 平板上不生长而在 Gm 平板上生长的相应克隆, 表明为已经发生双交换的重组子, 即获得假单胞菌 M18 的 *relA* 基因突变株 M18RAG。抽提该菌株基因组 DNA 作为模板, 进行 PCR 并测序验证(图 2)。

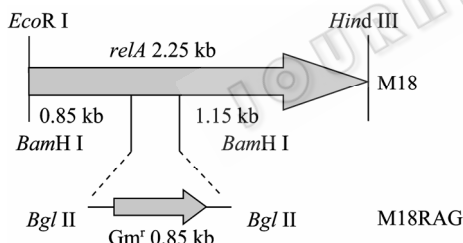


图 1 *relA* 基因插入 Gm^r 抗性片段的物理图谱

Fig. 1 Physical map of the *relA* gene with inserted Gm^r gene cassette

2.2 *relA* 基因对 PCA 生物合成及细菌生长的调控

PCA (吩嗪-1-羧酸) 是假单胞菌株 M18 分泌的具有广谱抗真菌活性的抗生素。本研究分析了 *relA* 基因突变对 PCA 生物合成的影响, 发酵条件为: PPM 培养基, 28 °C、200 r/min 摇床振荡培养, 每隔 12 h 取一次样, HPLC 测定 PCA 浓度。结果显示, *relA* 基因突变株的 PCA 产量是 M18 野生型菌株的 1.5–2 倍, 表明 *relA* 基因对 PCA 合成具有负调控作用, 而 *relA* 基因突变对生长没有产生明显的影响(图 3)。

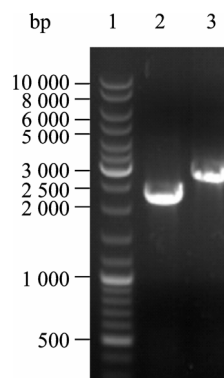


图 2 重组突变株 M18RAG 的 PCR 验证

Fig. 2 PCR confirmation of the *relA* mutant M18RAG

注: 1: DNA 分子量 Marker; 2: 野生型菌株 M18 中 *relA* 基因扩增片段; 3: 突变株 M18RAG 中 *relA*::Gm^r 的扩增片段。

Note: 1: DNA marker; 2: The *relA* gene; 3: The *relA* gene with inserted Gm^r gene cassette.

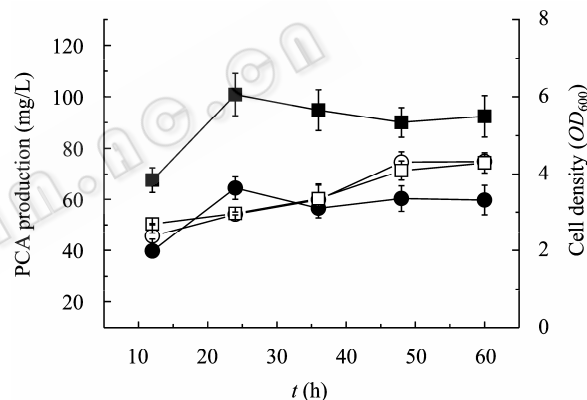


图 3 假单胞菌 M18 和 M18RAG 菌株在 PPM 培养基中的 PCA 生物合成和细胞生长的动力学曲线

Fig. 3 PCA production and cell growth (OD_{600}) of the wild-type M18 strain and the *relA* mutant strain M18RAG in PPM broth

注: ●: 假单胞菌 M18 在 PPM 培养基中的 PCA 生物合成; ○: 假单胞菌 M18 在 PPM 培养基中细胞生长的动力学曲线; ■: M18RAG 菌株在 PPM 培养基中的 PCA 生物合成; □: M18RAG 菌株在 PPM 培养基中细胞生长的动力学曲线。

Note: ●: PCA production of the wild-type M18 strain in PPM broth; ○: Cell growth (OD_{600}) of the wild-type M18 strain in PPM broth; ■: PCA production of the *relA* mutant strain M18RAG in PPM broth; □: Cell growth (OD_{600}) of the *relA* mutant strain M18RAG in PPM broth.

为了进一步证实 *relA* 基因对 PCA 合成的负调控作用, 本研究将 *relA* 基因克隆在 *E. coli*-*Pseudomonas* 穿梭载体 pME6032 的 *tac* 启动子下游, 构建了 *relA* 基因的过表达重组载体 pORA。将 pORA 与空质粒 pME6032 分别导入 M18 菌株及

其 *relA* 基因突变菌株 M18RAG, 发酵条件: PPM 培养基, 28 °C、200 r/min 振荡培养, 培养 72 h 后检测 PCA 产量。结果如图 4 所示, *relA* 基因突变菌株 M18RAG 在转入过表达质粒 pORA 后, PCA 发酵水平恢复到野生型水平。同样, 携带 pORA 的 M18 野生型菌株其 PCA 产量比携带空质粒对照菌株显著下降。这些结果进一步证实了 *relA* 基因对 PCA 生物合成的负调控作用。

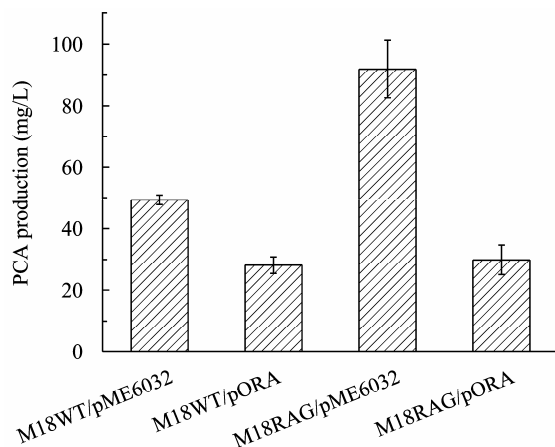


图 4 携带 pME6032 或 pORA 的野生型 M18 和突变株 M18RAG 在 PPM 培养基中发酵 72 h 后的 PCA 产量

Fig. 4 PCA production of the wild-type M18 strain or the *relA* mutant M18RAG strain, which harbored the *relA* over expression plasmid pORA or the empty vector pME6032 as the control, after 72 h of growth in PPM broth

2.3 *relA* 基因区别性调控两个 *phz* 基因簇的表达

已有的测序结果表明, M18 菌株中两个 *phz* 基因簇各自上游的非编码区具有完全不同的核苷酸序列, RelA 很可能通过对该区域不同形式的调控来影响两个 *phz* 基因簇的表达。为此, 将两个 *phz* 基因簇与 *lacZ* 报告基因的翻译融合质粒 pMEL*phz1*'-*lacZ* 和 pMEL*phz2*'-*lacZ*, 分别转入 M18WT 和 M18RAG 菌株中, 测定每个重组菌株中的 β -半乳糖苷酶活性, 结果见图 5。结果显示, pMEL*phz1*'-*lacZ* 在 M18RAG 的 β -半乳糖苷酶活性表达量比 M18 野生型菌株中有部分提高 (图 5A); 而整个培养过程中, pMEL*phz2*'-*lacZ* 在 M18RAG 中的 β -半乳糖苷酶活性表达量为 M18 野生型菌株中的 1.5 倍以上 (图 5B), 这与 PCA 发酵产量结果一致, 说明 *relA* 基因主要通过调控 *phz2* 基因表达来控制 PCA 合成。

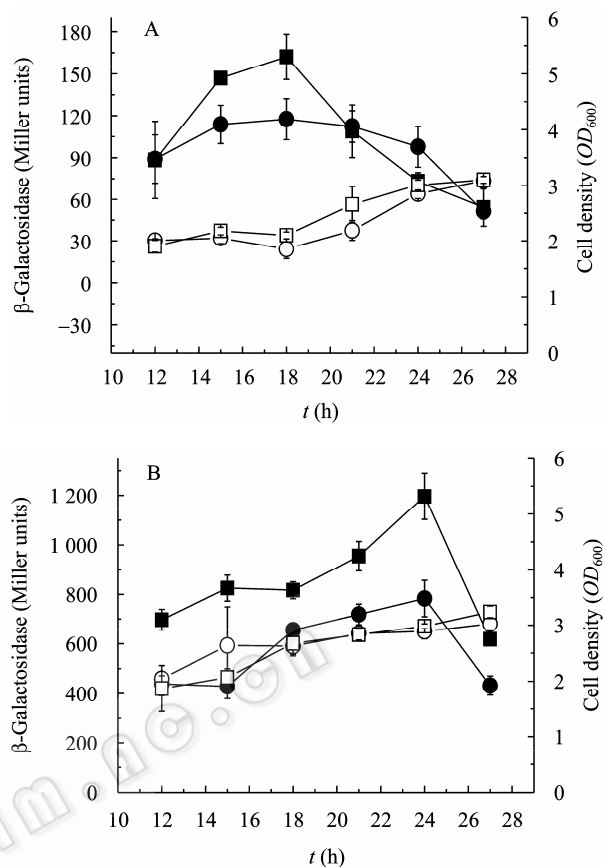


图 5 在 PPM 培养基中 *relA* 对 PCA 生物合成基因表达的影响

Fig. 5 Influence of *relA* on PCA biosynthetic gene expression in PPM

注: *phz1*'-*lacZ* 和 *phz2*'-*lacZ* 翻译融合在野生型菌株 M18 (●, ○) 和突变株 M18RAG (■, □) 中的 β -半乳糖苷酶活性表达情况。实心表示 β -半乳糖苷酶活性, 空心表示 OD₆₀₀ 值。

Note: β -Galactosidase activities, resulting from the *phz1*'-*lacZ* and *phz2*'-*lacZ* translational fusion on pMEL*phz1*'-*lacZ* and pMEL*phz2*'-*lacZ* were determined in the wild-type M18 strain (●, ○) and the *relA* mutant M18RAG strain (■, □) in PPM broth. Solid symbols denote β -Galactosidase activities; open symbols denote OD₆₀₀.

3 讨论

ppGpp 介导的应激反应是细菌中普遍存在的营养饥饿应答机制, 了解应激反应在假单胞菌抗生素合成等次级代谢中的调控作用具有重要意义。本文重点研究 ppGpp 合成酶编码基因 *relA* 对吩噻-1-羧酸 (PCA) 生物合成及其基因表达的影响。染色体上 *relA* 基因的失活导致 PCA 显著升高, *relA* 基因突变体 M18RAG 的 PCA 产量约为野生型菌株的 1.5–2 倍,

表明 *relA* 对 PCA 合成有抑制作用。同时, *relA* 的反式互补实验以及 *lacZ* 融合报道分析结果进一步证实了 *relA* 对 PCA 生物合成及其基因表达的抑制作用。然而, *relA* 基因对 PCA 生物合成的调控并不是特别强烈, 假单胞菌株中除了 RelA 蛋白具有 ppGpp 合成酶活性外, SpoT 蛋白也可能携带 ppGpp 合成酶活性, 因此 *relA* 单突变体中估计还会合成部分 ppGpp^[14], 因此, 如果要彻底详细研究 ppGpp 对假单胞菌抗生素合成等次级代谢的调控机制, 进一步工作还需构建 *relA spoT* 的双突变体, 即 ppGpp⁽⁰⁾ 突变体。通过详细分析 ppGpp⁽⁰⁾ 对抗生素生物合成及其基因表达的影响来阐明 ppGpp 介导的应激反应在假单胞菌次级代谢中调控机制。

研究 ppGpp 介导的应激反应对假单胞菌抗生素合成的调控机制以及 ppGpp 本身合成所受到的调控, 将有助于我们深入了解假单胞菌次级代谢的分子及环境调控途径与网络, 同时对于通过代谢工程手段构建抗生素高产工程菌株具有重要意义。

参 考 文 献

- [1] Braeken K, Moris M, Daniels R, et al. New horizons for (p) ppGpp in bacterial and plant physiology[J]. *Tren Microbiol*, 2006, 14(1): 45–54.
- [2] Potrykus K, Cashel M. (p)ppGpp: still magical[J]? *Annu Rev Microbiol*, 2008, 62: 35–51.
- [3] Durfee T, Hansen AM, Zhi HJ, et al. Transcription profiling of the stringent response in *Escherichia coli*[J]. *J Bacteriol*, 2008, 190(3): 1084–1096.
- [4] Eymann C, Homuth G, Scharf C, et al. *Bacillus subtilis* functional genomics: global characterization of the stringent response by proteome and transcriptome analysis[J]. *J Bacteriol*, 2002, 184(9): 2500–2520.
- [5] Traxler MF, Summers SM, Nguyen HT, et al. The global ppGpp-mediated stringent response to amino acid starvation in *Escherichia coli*[J]. *Mol Microbiol*, 2008, 68(5): 1128–1148.
- [6] Magnusson LU, Farewell A, Nyström T. ppGpp: a global regulator in *Escherichia coli*[J]. *Tren Microbiol*, 2005, 13(5): 236–242.
- [7] Van Delden C, Comte R, Bally AM. Stringent response activates quorum sensing and modulates cell density-dependent gene expression in *Pseudomonas aeruginosa*[J]. *J Bacteriol*, 2001, 183(18): 5376–5384.
- [8] Erickson DL, Lines JL, Pesci EC, et al. *Pseudomonas aeruginosa relA* contributes to virulence in *Drosophila melanogaster*[J]. *Infect Immun*, 2004, 72(10): 5638–5645.
- [9] Huang XQ, Zhu DH, Ge YH, et al. Identification and characterization of *phzZ*, a gene involved in the repression of pyoluteorin biosynthesis in *Pseudomonas* sp. M18[J]. *FEMS Microbiol Lett*, 2004, 232(2): 197–202.
- [10] Huang XQ, Yan A, Zhang XH, et al. Identification and characterization of a putative ABC transporter PltHIJKN required for pyoluteorin production in *Pseudomonas* sp. M18[J]. *Gene*, 2006, 376(1): 68–78.
- [11] Lu JS, Huang XQ, Li K, et al. LysR family transcriptional regulator PqsR as repressor of pyoluteorin biosynthesis and activator of phenazine-1-carboxylic acid biosynthesis in *Pseudomonas* sp. M18[J]. *J Biotechnol*, 2009, 143(1): 1–9.
- [12] Huang JF, Xu YQ, Zhang HY, et al. Temperature-dependent expression of *phzM* and its regulatory genes *lasI* and *ptsP* in rhizosphere isolate *Pseudomonas* sp. strain M18[J]. *Appl Environ Microbiol*, 2009, 75(20): 6568–6580.
- [13] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. 分子克隆实验指南[M]. 金冬雁, 黎孟枫, 等译. 第 3 版. 北京: 科学出版社, 2002.
- [14] Boes N, Schreiber K, Schobert M. SpoT-triggered stringent response controls *usp* gene expression in *Pseudomonas aeruginosa*[J]. *J Bacteriol*, 2008, 190(21): 7189–7199.