

假单胞菌 M18 调控基因 *ppbR* 的克隆及功能研究

郑 斐 黄显清 许煜泉 张雪洪*

(上海交通大学生命科学技术学院 微生物代谢教育部重点实验室 上海 200240)

摘 要: 假单胞菌 (*Pseudomonas* sp.) M18 是促进植物生长的根际细菌, 能产生吩嗪-1-羧酸 (PCA) 和藤黄绿菌素 (Plt) 两种不同的抗生素。根据生物信息学分析, 铜绿假单胞菌 PA2572 基因编码蛋白可能是一个二元调控系统的应答调节子。本研究从假单胞菌 M18 基因组中扩增出 PA2572 同源基因片段 *ppbR*, 利用体外定点插入突变和同源重组技术构建了 M18 的 *ppbR* 突变株 M18P。研究结果表明, 突变株 M18P 在泳动能力和群集运动能力上有显著的下降。突变株合成 PCA 的能力比野生型有显著的下降, 在发酵液中 PCA 积累量仅为野生型的 50%。在 KMB 培养基中, 突变株 Plt 的积累量和野生型没有显著的差异。

关键词: 假单胞菌 M18, *ppbR*, 二元调控系统, 泳动能力, 群集运动能力, 吩嗪-1-羧酸

Construction and Characterization of a *ppbR* gene Mutant of *Pseudomonas* sp. M18

ZHENG Fei HUANG Xian-Qing XU Yu-Quan ZHANG Xue-Hong*

(Key Laboratory of Microbial Metabolism, Ministry of Education, College of Life Science and Biotechnology, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200240)

Abstract: *Pseudomonas* sp. M18, one of plant-growth-promoting rhizobacteria, can produce secondary metabolites including phenazine-1-carboxylic acid (PCA) and pyoluteorin (Plt). PA2572 gene coding protein is a probable two-component response regulator in *Pseudomonas* according to homologous speculations. In order to investigate its genetic function, PA2572 homologous gene, *ppbR*, was amplified from M18 genome, inactivated by inserting a Gm cassette. The resulting reconstruct was introduced into the M18 genome using homologous recombination technique, so as to obtain the null mutant M18P. The results showed that the M18P has less flagellar swimming and swarming motility, and yielded fewer PCA. The production of PCA was only 50% of the wild type. However, there was no remarkable difference between mutant and wild type in producing pyoluteorin in KMB medium.

Keywords: *Pseudomonas* sp. M18, *ppbR*, Two-component regulatory system, Swimming mobility, Swarming mobility, Phenazine-1-carboxic acid

革兰氏阴性细菌存在着与菌群传感(Quorum Sensing)相关联的二元调控系统(two-component

regulatory system)^[1], 二元系统参与调控细菌多种生命活动。铜绿假单胞菌基因组序列分析表明, 铜绿假单胞菌中有64个应答调控子基因和63个组氨酸激酶基因^[2], 然而许多二元调控系统的生物功能仍然未知, 到目前为止只有少数例如GacA-GacS、PprA-PprB等二元系统有相关生物功能的文献报道^[3,4]。

PA2572基因位于铜绿假单胞菌PAO1全基因组上, 是根据其保守氨基酸基序、结构特征及与其它已知功能的基因具有一定同源性而推测出其功能的基因, 属于类基因^[5,6]。根据生物信息学分析, PA2572编码蛋白是一个二元调控系统的应答调节子, 蛋白比对结果表明PA2572编码蛋白是一个含有REC(CheY-like)结构域和HD-GYP结构域的应答调节子, 并推测与细菌的运动力、次生代谢产物合成、蛋白质分泌以及与菌群传感系统相关联。但是所有这些功能只是通过生物信息学分析推测, 并没有得到实验验证。

假单胞菌 M18(*Pseudomonas* sp. M18) 是从甜瓜根际土壤中分离到的促进植物生长的根际细菌, 迄今为止的文献报道中唯一能同时分泌藤黄绿菌素(Pyoluteorin, Plt)和吩嗪-1-羧酸(Phenazine-1-carboxylic acid, PCA) 两种抗生素的假单胞菌株^[7]。为了进一步通过实验研究 PA2572 同源基因在假单胞菌 M18 中的功能, 本研究从 M18 基因组 DNA 中克隆

出 PA2572 同源基因 *ppbR*, 构建了基因 *ppbR* 突变株 M18P, 通过对野生株和突变株在泳动能力、群集运动能力、PCA 和 Plt 生物合成的动力学分析等相关研究, 初步研究 *ppbR* 基因在假单胞菌 M18 中的功能作用。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒: 本试验所用菌株和质粒见表 1。

1.1.2 试剂、培养基和培养条件: DNA 聚合酶、限制性内切酶、T4 DNA 连接酶均购自 TaKaRa 公司, DNA 抽提试剂盒购自上海生工生物工程有限公司。LB 培养基按文献[8]配制; 蔗糖选择培养基: LB 培养基另加 5%蔗糖; PPM 培养基: 每升含胰蛋白胨 22 g, 葡萄糖 20g, KNO₃ 1 g, NaCl 5 g, pH 7.5; KMB 培养基: 每升含蛋白胨 20 g, K₂HPO₄ 0.392 g, 甘油 15 mL, 无水 MgSO₄ 0.732 g, pH 7.5; 相应固体培养基每升加 15 g 琼脂。泳动能力(swimming mobility) 检测培养基、群集运动能力(swarming mobility) 检测培养基均按文献[9]配制。抗生素用量(μg/mL): 卡那霉素(Km) 50, 氨苄青霉素(Ap)100, 庆大霉素(Gm) 40, 壮观霉素(Sp) 100, 四环素(Tc)25(大肠杆菌)、125(假单胞菌)。培养温度: 大肠杆菌 37℃, 假单胞菌 28℃。

表 1 菌株与质粒
Table 1 Strains and plasmids

Strain/ Plasmid	Characteristics	Source
Strain		
<i>Pseudomonas</i> sp. M18	Rhizosphere isolated, PCA ⁺ Plt ⁺ Ap ^r Sp ^r	This Lab
<i>Pseudomonas</i> sp. M18P	PCA ⁻ Plt ⁻ Ap ^r Sp ^r Gm ^r , <i>ppbR</i> ⁻	This study
<i>E. coli</i> DH5α	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17(r^k m^k ⁺) supE44 relA1</i>	This Lab
<i>E. coli</i> SM10	<i>thi-1 thr leu tonA lacY supE recA::RP4-2-Tc::Mu Km^r</i>	Simon <i>et al.</i>
Plasmid		
pEX18Tc	Suicide plasmid Tet ^r	This Lab
pUCGm	Cloning vector, Gm ^r	Thomashow
pEX18TcP	pEX18Tc with 1.4kb <i>f EcoRI- HindIII</i> fragment of <i>ppbR</i> ; Tet ^r	This study
pEX18TcPGM	<i>ppbR</i> inactivated with aacC1 cassette in pEX18TcP, Tet ^r , Gm ^r	This study
pMEZA	420-bp <i>BamHI-PstI</i> PCR amplified fragment containing <i>pphzA</i> with upstream region cloned into pME6015	This lab
pMEAZ	733-bp <i>BamHI-PstI</i> PCR amplified fragment containing <i>PpltLA-pltL-pltA'</i> cloned into pME6015	This lab

1.2 引物和 PCR 反应

根据 *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 全基因组

数据库(www.pseudomonas.com)中 PA2572 基因的保守序列, 设计 PCR 引物用于扩增假单胞菌 M18

基因组的 *ppbR* 片段, 引物 1: 5'-atat GAATTC CCAGGCCAGACTCGG-3', 引物 2: 5'-tatg AAGCTT ATGCGCTCGTCGGTG-3', 分别在两引物的 5' 端增添 *EcoRI* 和 *Hind* 酶切位点, 以利于 PCR 产物克隆, 由上海生工生物工程有限公司合成。PCR 反应体系(50 μ L) 为: 10 \times 高保真酶缓冲液 5 μ L, dNTP (2.5 mmol/L) 4 μ L, 引物 1 和引物 2 各 0.5 μ L, 模板 DNA 0.5 μ L, 高保真酶(5 U/ μ L)0.25 μ L, 重蒸水 39.3 μ L。PCR 反应条件为: 94 5 min, 1 个循环; 94 40 s, 63 1 min, 72 2 min, 30 个循环; 72 延伸 10 min。

1.3 DNA 常规技术操作

质粒抽提、酶切、DNA 片段回收、连接、转化、感受态细胞制备等均根据文献[8]进行, 细菌结合转移根据文献[9]进行。染色体 DNA 提取使用生工生物公司试剂盒, DNA 序列测序委托上海英骏生物公司测定。

1.4 泳动能力和群集运动能力测定

具体操作方法参照文献[10]。

1.5 生长曲线及 PCA 和 Plt 的测定

具体操作方法参照文献[11]。发酵过程中, 每隔 12 h 取样, 测定 OD_{600} 及 PCA 和 Plt 的产量, 9 次重复, 取平均值。

1.6 β -半乳糖苷酶活性测定

将携带 *pltA*'-*lacZ*、*phzA*'-*lacZ* 翻译融合表达质粒的假单胞菌野生型菌株 M18 和 *ppbR* 突变菌株 M18P 的过夜培养物按 1% 的接种量分别接种于装有 150 mL KMB 培养基和 PPM 培养基的 500 mL 三角瓶中, 在 28 $^{\circ}$ C、转速为 220 r/min 的摇床中培养。分别在不同培养时间点取样测定 β -半乳糖苷酶活性, 测定方法参照文献[7]。

2 结果

2.1 *ppbR* 基因片段的扩增及序列分析

以野生型菌株 M18 总 DNA 为模板进行 PCR, 获得 1400 bp 左右的条带, 回收 PCR 产物, 将 PCR 产物进行测序, 测序结果通过软件分析和同源性比对, M18 的 *ppbR* 基因(GenBank 序列号: EF152323) 序列与 *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 的 PA2572 基因序列同源程度为 99.63%, 与 *Pseudomonas fluorescens* Pf-5, *Pseudomonas fluorescens* PfO-1, *Pseudomonas putida* KT2440 同源基因的同源程度分别为

78.10%, 76.15%, 73.89%。根据编码蛋白结构域分析, *ppbR* 基因编码蛋白含有 1 个 REC(CheY-like)结构域和 1 个 HD-GYP 结构域, 并推测与细菌的鞭毛运动能力以及次生代谢物形成有关。

2.2 *ppbR* 基因片段克隆

将 PCR 回收产物用 *EcoRI* 和 *Hind* 双酶切, 插入带有 *EcoR* 和 *Hind* 位点的质粒 pEX18T_C 中, 构建新质粒 pEX18T_CP, 转化大肠杆菌 DH5 α , 筛选转化子, 抽提质粒用 *EcoR* 和 *Hind* 双酶切验证转化子。

2.3 *ppbR* 基因的体外突变

选择 *Sac* I 作为突变位点, 质粒 pEX18T_CP 经过 *Sac* I 酶切, T4-DNA 聚合酶钝化末端, 从 pUCGm 中获得含有 Gm^r 抗性基因的片段, 长度为 850 bp, 与钝化的线性 pEX18T_CP 连接后, 转化大肠杆菌 DH5 α , 筛选转化子酶切予以验证(图 1), 阳性克隆命名为 pEX18T_CPGM。

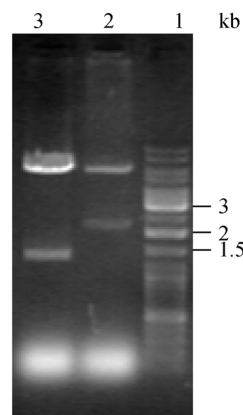


图 1 阳性克隆的酶切图谱

Fig.1 Restriction map of positive clones.
1: Marker; 2: pEX18T_CPGM; 3: pEX18T_CP

2.4 *ppbR* 突变菌株 M18P 的获得和验证

将新得到的质粒 pEX18T_CPGM 转化至大肠杆菌 *E.coli* SM10, 平板筛选带有 Gm 抗性的 SM10, 并以此为供体菌, 与受体菌株 M18 进行固相滤膜接合转移。质粒受 pEX18T_CPGM 供体菌诱导转移到菌株 M18 中。质粒不能自主复制, 使质粒携带的 *ppbR*::Gm^r 突变基因盒与受体菌的染色体 *ppbR* 基因发生同源重组。因为质粒 pEX18T_CPGM 带有 Gm 和 Tet 抗性基因, 用含有 Gm 和 Tet 抗生素的 LB 平板选出共整合接合子, 挑取所获克隆(单交换株)接种于无抗或含 Gm30 的 LB 液体培养基转代培养, 之后

稀释涂布 Gm30 平板, 用灭菌牙签挑取单一克隆同时分别点于含适量 Gm 和 Tet 抗生素的平板, 诱导接合子发生第二次重组, 凡是在 Tet 平板上不生长而在 Gm 平板上生长的相应克隆表明已发生双交换, 即获得假单胞菌 M18 的 *ppbR* 基因突变株, 命名为 M18P。以 M18P 基因组为模版, 用引物 1、引物 2 进行 PCR 扩增并测序, 得到比原来片断多 850 bp 的片段, 表明突变成功。

2.5 泳动能力的检测

28 培养 30 h, 图 2(A)显示野生型 M18 和突变株 M18P 周围都有一圆环, 这是由于菌体在鞭毛介导下泳动后留下的轨迹。两者圆环的大小差别较大, 突变株相对于野生型菌株泳动能力减弱, 对于菌圈直径的测定, 突变型泳动菌圈直径大约是野生型的二分之一。

2.6 群集运动能力的检测

28 培养 48 h, 见图 2(B), 结果表明突变型 M18P 只是形成非常有限的菌落, 表面扩散能力显著下降, 这说明突变株群集运动能力明显下降。

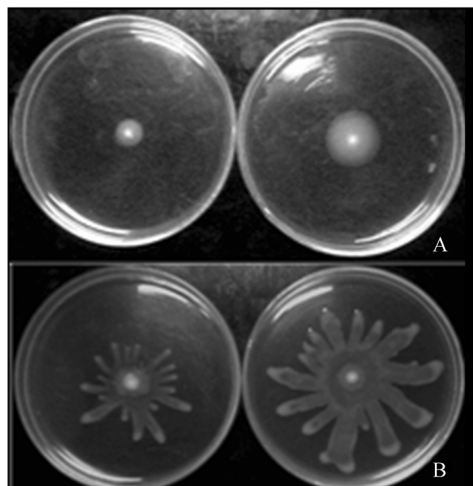


图 2 M18 和 M18P 运动能力检测

Fig.2 Cell motility assays of the M18 and M18P
A and B: Swimming (A) and swarming (B) motilities were assayed on corresponding plates incubated at 28°C. In all the plate tests, mutant M18P was patched on the left and M18 on the right.

2.7 PCA 和 Plt 生物合成的动力学分析

野生型菌株 M18 和突变株 M18P 在 KMB 及 PPM 中的生长曲线见图 3-A, 结果表明, 突变株和野生型在两种培养基中的生长基本是一致的, 没有区别, 这说明 *ppbR* 基因对 M18 的生长是没有影

响的。

野生型菌株和突变菌株在 KMB 及 PPM 两种培养基中生物合成 PCA 的动力学曲线分别见图 3-B 和 3-C, 结果表明, 无论在 PPM 培养基还是在 KMB 培养基中, 突变株 M18P 在发酵液中 PCA 积累量都要低于野生株 M18, 特别是在 PPM 培养基中, M18P 发酵液中 PCA 最高积累量只有野生株 M18 的 50% 左右。

野生型 M18 和突变株 M18P 在 KMB 培养基中生物合成 Plt 的动力学曲线见图 3-D, 数据表明, M18P 在 KMB 发酵液中 Plt 的积累量略低于野生株 M18, 但是不管在哪个时段, 两者都没有明显的差别。在 PPM 发酵液中, M18 与 M18P 都没有合成可检测到的 Plt 量。

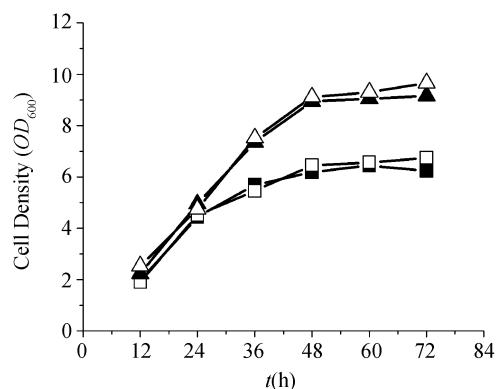


图 3-A PPM、KMB 培养基中 M18、M18P 生长曲线

Fig.3-A Cell growth of M18 strain and M18P strain growing in PPM medium or KMB medium.

Symbol ▲, △, OD_{600} of M18, M18P in KMB; symbol ■, □, OD_{600} of M18, M18P in PPM

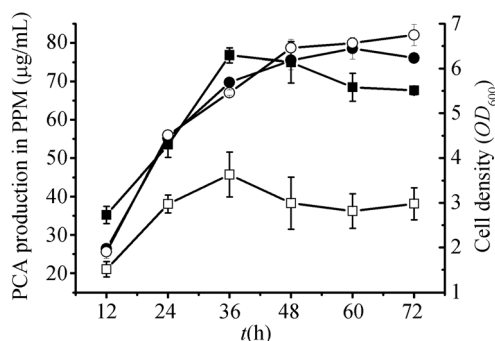


图 3-B PPM 培养基中 M18、M18P 生物合成 PCA 的曲线

Fig.3-B PCA production of M18 and M18P in PPM medium
Symbol ●, ○, OD_{600} of M18, M18P; symbol ■, □, antibiotics produced by M18, M18P

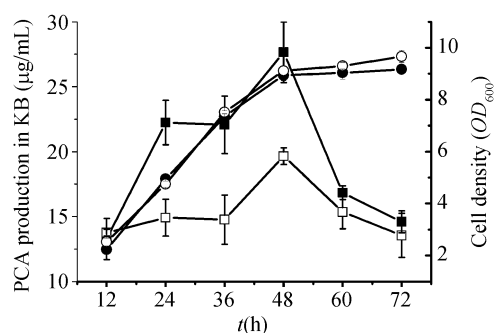


图 3-C KMB 培养基中 M18、M18P 生物合成 PCA 的曲线

Fig.3-C PCA production of M18 and M18P in KMB medium
Symbol ●, ○, OD_{600} of M18, M18P; symbol ■, □, antibiotics produced by M18, M18P.

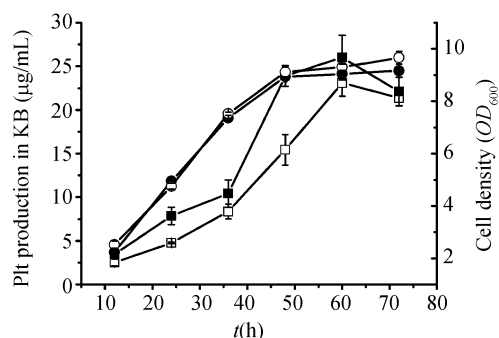


图 3-D KMB 培养基中 M18、M18P 生物合成 Plt 的曲线

Fig.3-D Plt production of M18 and M18P in KMB medium
Symbol ●, ○, OD_{600} of M18, M18P; symbol ■, □, antibiotics produced by M18, M18P.

2.8 β-半乳糖苷酶活性测定

将携带 *plmA*'-*lacZ*、*phzA*'-*lacZ* 翻译融合表达质粒的假单胞菌野生型菌株 M18 和突变菌株 M18P, 测定 β-半乳糖苷酶活性, 分析 *ppbR* 基因的突变对 *plmA*'-*lacZ*、*phzA*'-*lacZ* 翻译融合表达的影响。见图 4, 携带有 *phzA*'-*lacZ* 翻译融合表达质粒的 M18 与 M18P 在 PPM 发酵液中生长情况并没有显著差异, 然而在整个生长周期中, 特别是在 12 h~30 h 阶段, M18 菌株的 *phzA*'-*lacZ* 翻译融合表达水平明显高于突变株 M18P, 表达水平在 18 h 达到顶峰, M18 菌株表达水平高达 105 个单位, 而突变株 M18P 只有约 50 个单位。由于 *ppbR* 基因的突变, *phzA*'-*lacZ* 翻译融合表达水平显著下降。携带有 *plmA*'-*lacZ* 翻译融合表达质粒的 M18 与 M18P 在 KMB 发酵液中翻译融合表达水平在整个生长周期中都没有显著差异 (数据未给出), 说明 *ppbR* 基因的突变并没有影响

plmA'-*lacZ* 翻译融合的表达水平。

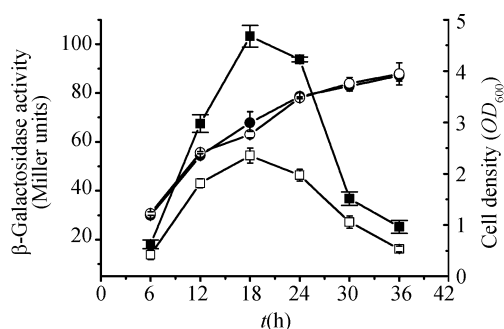


图 4 *ppbR* 对 *phzA*'-*lacZ* 翻译融合表达的影响

Fig.4 Influence of *ppbR* on translational *phzA*'-*lacZ* fusion expression

Symbol ●, ○, OD_{600} of M18, M18P; symbol ■, □, β-Galactosidase activity of M18, M18P, harboring the translational fusion.

3 讨论

通过对假单胞菌 M18 的 *ppbR* 基因测序, 并与其他假单胞菌株同源性比较, 与 *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 的 PA2572 基因序列同源性最高, 同源程度为 99.63%。*ppbR* 及其同源基因之前在国内外文献中并未对其生物功能作过报道。本研究通过构建 *ppbR* 突变株首次对 *ppbR* 基因在假单胞菌 M18 中的功能作了初步研究和探讨。

研究表明, 在 M18 中, *ppbR* 基因与鞭毛泳动能力和群集运动能力相关, *ppbR* 突变株 M18P 在泳动能力和群集运动能力上有显著的下降。同时, *ppbR* 基因影响着 M18 菌株 PCA 的合成产量, 突变株 M18P 在发酵液中 PCA 的积累量有显著下降, 将近野生株 M18 积累量的 50%, 通过对 *phzA*'-*lacZ* 翻译融合表达水平的分析, *ppbR* 突变株翻译融合水平也有明显下降, 但是由于翻译融合表达包括翻译水平和转录水平两个层次, 所以 *ppbR* 到底在翻译水平上还是在转录水平上调控还有待进一步的研究。而 *ppbR* 在 M18 中对 Plt 的生物合成没有明显的影响。

参与鞭毛泳动的基因包括鞭毛合成的结构基因、参与能量代谢途径、调控、信息传递及与趋化作用相关的基因^[6], *ppbR* 基因通过何种途径影响 M18 的泳动能力尚不清楚; *ppbR* 正调控 PCA 的生物合成, 但是它对 PCA 合成调控的分子机制还不清楚; *ppbR* 基因在假单胞菌中对信号分子的合成有没有影响, 对何种信号分子的合成有影响, 对假单胞菌其他生命活动、对其他与菌群传感相关的基因表达

有没有作用, 这些都有待深入研究并进一步确定该基因的相关主要功能。

参 考 文 献

- [1] Miller MB, Bassler BL. Quorum sensing in bacteria. *Annu Rev Microbiol*, 2001, **55**: 165–199.
- [2] Rodrigue A, Quentin Y, Lazdunski A, *et al*. Two-component systems in *Pseudomonas aeruginosa*: why so many? *Trends Microbiol*, 2000, **8**: 498–504.
- [3] Blumer C, Heeb S, Pessi G, *et al*. Global GacA-steered control of cyanide and exoprotease production in *Pseudomonas fluorescens* involves specific ribosome binding sites. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, **96**: 14073–14078.
- [4] Dong YH, Zhang XF, Soo HM, *et al*. The two-component response regulator PprB modulates quorum-sensing signal production and global gene expression in *Pseudomonas aeruginosa*. *Molecular Microbiology*, 2005, **56**: 1287–1301.
- [5] Stover CK, Pham XQ, Erwin AL, *et al*. Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. *Nature*, 2000, **406**: 959–964.
- [6] 李迎丽, 白 芳, 单志英, 等. 铜绿假单胞菌泳动能力相关新基因的筛选及鉴定. *微生物学报*, 2006, **46** (1): 18–22.
- [7] 王素莲, 耿海峰, 孙 雷, 等. 假单胞菌 M18 rsmA⁻ 突变株的构建及其对 Plt 和 PCA 合成的区别性调控作用. *微生物学报*, 2004, **44**(2): 189–193.
- [8] 萨姆布鲁克 J, 弗里奇 EF, 曼尼阿蒂斯 T. 金冬雁, 黎孟枫等译. 分子克隆实验指南. 第二版. 北京: 科学出版社, 1999.
- [9] 张惠展. 途径工程—第三代基因工程. 北京: 中国轻工业出版社, 2002.
- [10] Cornelia R, Nathalie G, Laurent M, *et al*. Genetically programmed autoinducer destruction reduces virulence gene expression and swarming motility in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Microbiology*, 2002, **148**: 923–932.
- [11] 朱栋华, 徐汪节, 耿海峰, 等. 荧光假单胞菌 M18 rpoD 基因克隆及其对抗生素合成的影响. *微生物学报*, 2003, **43** (1): 58–62.



稿件规范化与标准化

专论与综述论文的撰写要点

专论与综述是本刊重要栏目之一, 主要反映国内外微生物学各分支学科研究最新成果和进展, 其内容要求新颖丰富, 观点明确, 论述恰当, 最好包含作者自己的工作内容和见解。因此, 作者在动笔之前必须明确选题, 一般原则上应选择在理论和实践中具有重要意义的学科专题进行论述。围绕专题所涉及的各个方面, 在综合分析和评价已有资料基础上提出其演变规律和趋势。即掌握其内在的精髓, 深入到专题研究的本质, 论述其发展前景。作者通过回顾、观察和展望, 提出合乎逻辑并具有启迪性的看法和建议。另外, 作者也可以采用以汇集文献资料为主的写作方法, 辅以注释, 客观而有少量评述, 使读者对该专题的过去、现在和将来有一个全面、足够的认识。

需要特别说明的是: 在专论与综述中引用的文献应该主要是近 5 年国内外正式发表的研究论文, 引用文献数量不限。