

假单胞菌 H78 中全局调控蛋白 Crc 对 Plt 生物合成及其基因表达的调控

刘玉洁 王正 张雪洪 黄显清*

(上海交通大学生命科学技术学院 微生物代谢国家重点实验室 上海 200240)

摘要:【目的】研究 *Pseudomonas protegens* H78 中全局调控蛋白 Crc 对藤黄绿菌素(Pyoluteorin, Plt)生物合成及其基因表达的调控。【方法】通过同源重组方法无痕敲除 *crc* 基因, 并将 H78 Δ *crc* 突变株与 H78 野生株在 KMB 培养基中发酵测定 Plt 产量; 采用 *lacZ* 报告分析研究 Crc 对 *plt* 合成基因表达的调控。【结果】突变株 H78 Δ *crc* 的 Plt 产量显著下降; Crc 在整体水平、转录水平及转录后水平均正调控 *plt* 合成基因的表达。【结论】全局调控因子 Crc 对 Plt 合成及基因表达表现为正调控作用。

关键词: 假单胞菌 H78, Crc, 藤黄绿菌素 Plt, 生物合成, Plt 合成操纵子

Regulation of pyoluteorin (Plt) biosynthesis and gene expression by global control protein Crc in *Pseudomonas protegens* H78

LIU Yu-Jie WANG Zheng ZHANG Xue-Hong HUANG Xian-Qing*

(College of Life Sciences and Biotechnology, Shanghai Jiao Tong University, State Key Laboratory of Microbial Metabolism, Shanghai 200240, China)

Abstract: [Objective] The aim of this study was to study the influence of Crc (Cataboliterepression control protein) on pyoluteorin (Plt) biosynthesis and gene expression in *Pseudomonas protegens* H78. [Methods] The *crc* gene in the H78 chromosome was knocked out by homologous recombination. Plt production of H78 strain and its mutant grown in KMB was measured by HPLC. The regulation of Crc on *plt* operon expression was assessed by the *lacZ* reporter analysis. [Results] Plt production was significantly reduced in H78 Δ *crc*. Crc positively regulated the expression of *plt* biosynthetic operon at the overall level, the transcriptional level and the post-transcriptional level. [Conclusion] The global regulator Crc positively regulates Plt production and its operon expression.

Keywords: *Pseudomonas protegens* H78, Crc, Pyoluteorin (Plt), Biosynthesis, Plt biosynthetic operon

Foundation item: National Natural Science Foundation of China (No. 31270083, 31470196)

*Corresponding author: Tel: 86-21-34207047; E-mail: xqhuang66@sjtu.edu.cn

Received: January 17, 2017; Accepted: March 02, 2017; Published online (www.cnki.net): March 02, 2017
基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 31270083, 31470196)

*通讯作者: Tel: 86-21-34207047; E-mail: xqhuang66@sjtu.edu.cn

收稿日期: 2017-01-17; 接受日期: 2017-03-02; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2017-03-02

Pseudomonas protegens H78 是本实验室从油菜根际分离得到的一株生防细菌,能产生多种具有抗菌活性的次级代谢产物,其中包括藤黄绿菌素(Pyoluteorin, Plt)。Plt 是一种聚酮合酶(Polyketide synthase, PKS)和非核糖体肽合成酶(Nonribosomal peptide synthetase, NRPS)杂合的广谱抗生素,能有效抑制卵菌、细菌和真菌,尤其对植物致病菌终极腐霉有很好的抑制作用。Plt 合成及调控基因簇,主要由 *pltLABCDEFG* 与 *pltRM* 两个反向转录的操纵子组成。其中 *pltR* 编码一个转录激活子,负责 *pltL-G* 操纵子的表达及 Plt 合成的激活^[1]。研究表明 Plt 合成受到 Gac/Rsm 信号转导级联、群体感应系统、RNA 分子伴侣等调控因子复杂的调控^[2-3]。然而,参与 Plt 合成调控的潜在分子机制还有待进一步研究与探明。

Crc 蛋白(Catabolite repression control protein)广泛存在于假单胞菌中,是全局性转录后调控蛋白,在碳代谢物阻遏应答途径中起着关键作用^[4]。近年

来研究表明 Crc 参与假单胞菌中氨基酸、糖类、碳水化合物和芳香族化合物等的分解代谢过程,并分级同化吸收碳源用于自身生长^[5-6]。Crc 蛋白的活性和 sRNA (CrcZ、CrcY)的表达量有关,研究发现这些 sRNA 包含几个 CA 结构域,可以与 Crc 蛋白结合,进而阻碍 Crc 蛋白与靶 mRNA 结合^[7-8]。Crc 蛋白在靶 RNA 的识别位点中包含一个短的 AANAANAA 结构域(CA 结构域),并在 RNA 分子伴侣 Hfq 蛋白存在时 Crc 才能与 CA 结构域结合^[9]。本研究发现在 *P. protegens* H78 中 Crc 调控蛋白对 Plt 生物合成具有显著的正调控作用。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒: 研究中使用的菌株及质粒见表 1。

1.1.2 引物: 研究中用引物委托上海华津生物科技有限公司进行合成,引物序列见表 1。

表 1 菌株、质粒及引物
Table 1 Strains, plasmids and primers used in this study

Strains, plasmids and primers	Characteristics (Primer sequence (5'→3'))	Source
Strains		
<i>Pseudomonas protegens</i>		
H78	Wild type, Sp ^f	This lab
H78Δcrc	In frame deletion of <i>crc</i>	This study
<i>Escherichia coli</i>		
DH5α	<i>supE44 ΔlacU169 (Φ80 lacZΔM15) hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1</i>	This lab
S17	<i>res⁻ pro mod⁺</i> integrated copy of RP4, <i>mob⁺</i>	This lab
Plasmids		
pK18mobSacB	Broad-host-range gene replacement vector; <i>sacB</i> , Km ^r	This lab
pK18-crc	pK18mobsacB with <i>EcoR</i> I - <i>Hind</i> III insert of 459 bp and 451 bp segments flanking <i>crc</i> , Km ^r	This study
<i>pltLp-lacZ</i>	A <i>pltLp-lacZ</i> transcriptional fusion containing a 455 bp fragment upstream of the <i>pltL</i> TSS (+1) in pME6522, Tc ^r	This study
<i>pltL'-lacZ</i>	A <i>pltL'-lacZ</i> translational fusion containing a 516 bp fragment covering -454 bp to +62 bp relative to the <i>pltL</i> TSS (+1) in pME6015, Tc ^r	This study
<i>pltLo-lacZ</i>	A <i>pltLo-lacZ</i> operator fusion containing a 72 bp fragment covering from +1 to ATG and the first 9 codons of <i>pltL</i> in pME9533, Tc ^r	This study
Primers		
crc-A1	ACATGATTACGAATTCCTTGGCTTCCTTGCGGTTGA (<i>EcoR</i> I)	This study
crc-A2	AGCCAAGTACGAAACCACGC	This study
crc-B1	GCGTGGTTTGCTCAGTTGGCTGGACTATGACTGGACGCTGACC	This study
crc-B2	GGCCAGTGCCAAAGCTTATGAACAAGTCCGCTGCCTAC (<i>Hind</i> III)	This study
<i>pltLp</i> -F	CAAAAGCTTCGAATTCCTAGCGCCTTCATTCCTAAATCC (<i>EcoR</i> I)	This study
<i>pltLp</i> -R	GCTCACAATTCCTGCAGCGTCTACAATCCTCAATAAGAA (<i>Pst</i> I)	This study
<i>pltL</i> _Δ -F	CAAAAGCTTCGAATTCCTAGCGCCTTCATTCCTAAATCC (<i>EcoR</i> I)	This study
<i>pltL</i> _Δ -R	CGAAGCTGGCTGCAGAACTTCCTCTCCGTCATAGAC (<i>Pst</i> I)	This study
<i>pltLo</i> -F	GAGAGGTACCCGGGTTTTCCCAACCCACGAT (<i>Kpn</i> I)	This study
<i>pltLo</i> -R	GAGACTGCAGCTTTTCTTAACTTCCTCTCCGTTCC (<i>Pst</i> I)	This study

1.1.3 培养基配方、抗生素用法及培养发酵条件: LB 培养基(g/L): 胰蛋白胨 10.0, 酵母提取物 5.0, NaCl 10.0, pH 7.5; KMB 培养基(g/L): 甘油 15 mL, 蛋白胨 20.000, $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ 0.514, $MgSO_4$ 0.732, pH 7.5; 固体培养基琼脂使用浓度 12 g/L。抗生素使用浓度(mg/L): 对于大肠杆菌, 四环素(Tc) 15、卡那霉素(Km) 50、硫酸氨基青霉素(Amp) 100; 对于假单胞菌, 四环素(Tc) 30、卡那霉素(Km) 50、硫酸氨基青霉素(Amp) 100。大肠杆菌培养条件为 37 °C、200 r/min 振荡培养; 假单胞菌培养条件为 28 °C、180 r/min 振荡培养。

1.1.4 主要试剂和仪器: KOD-Plus-Neo DNA 高保真聚合酶, 东洋纺(上海)生物科技有限公司; Solution I DNA 连接酶、质粒提取试剂盒、DNA 片段纯化试剂盒、胶回收试剂盒, 宝生物工程(大连)有限公司; EasyTaq Mix DNA 聚合酶、DNA Marker、EasyPure Genomic DNA 快速纯化试剂盒, 北京全式金生物技术有限公司; DNA 限制性内切酶, New England Biolabs (NEB)公司; ONPG、IPTG 和 X-Gal, 生工生物工程(上海)股份有限公司。HPLC 用于检测 Plt 产量的分析柱为反相 C₁₈ 色谱柱(4.6 mm×150 mm, 5 μm), 安捷伦科技(中国)有限公司。

1.2 DNA 操作及 PCR 反应

常规 DNA 操作方法参照文献[10]。

基因组纯化、质粒抽提、DNA 片段纯化及胶回收纯化的方法均参照试剂盒说明书。酶切、酶连反应体系及条件参照试剂使用说明书, 但视情况对反应体系进行优化。

KOD-Plus-Neo DNA 高保真聚合酶用于片段克隆, PCR 反应体系(50 μL): 10×KOD-Plus-Neo buffer 5 μL, 2.5 mmol/L dNTPs 5 μL, 25 mmol/L Mg^{2+} 3 μL, 1.0 U/μL KOD-Plus-Neo DNA 高保真聚合酶 1 μL, 10 μmol/L 引物各 1.5 μL, DNA 模板 0.5 μL, ddH₂O 32.5 μL。PCR 反应条件: 94 °C 5 min; 98 °C 10 s, 55–65 °C 30 s, 68 °C 0.5–3 min, 30 个循环; 68 °C 7.5 min。EasyTaq Mix DNA 聚合酶用于菌落 PCR 验

证, PCR 反应体系(20 μL): 2×EasyTaq Mix 10 μL, ddH₂O 8 μL, 10 μmol/L 引物各 1 μL, DNA 模板为菌落。PCR 反应条件: 95 °C 5 min; 94 °C 30 s, 55–65 °C 30 s, 72 °C 0.5–3 min, 30 个循环; 72 °C 10 min。

1.3 Plt 产量测定

Plt 产量测定方法参照文献[1]。

1.4 β-半乳糖苷酶活性测定

采用 Miller 方法进行 β-半乳糖苷酶活性测定^[10]。

本研究中所有实验均独立重复两次以上, 每个实验每个菌株均设置 3 个以上平行重复。

2 结果与分析

2.1 H78Δcrc 突变株的构建及验证

采用同源重组无痕敲除方法在 H78 基因组上敲除 *crc* 基因^[11], 突变株构建图谱如图 1A 所示。以 *crc*-A1/*crc*-A2 和 *crc*-B1/*crc*-B2 为引物, H78 基因组为模板, 采用 KOD 聚合酶体系扩增 *crc* 基因的上下游同源片段。使用 *EcoR* I /*Hind* III 双酶切使载体 pK18mobsacB 线性化, 采用 In-Fusion HD Cloning Kit 构建敲除质粒 pK18-*crc*。通过单交换、双交换及菌落 PCR 筛选突变株, 挑取阳性克隆子, 进行 PCR 验证, 图 1B 为阳性敲除菌株 PCR 产物电泳图。对 PCR 产物进一步测序分析, 发现 *crc* 确实已成功敲除, *crc* 敲除菌株命名为 H78Δ*crc*。

2.2 Crc 对 Plt 生物合成的影响

H78 野生型菌株及 H78Δ*crc* 突变株在 KMB 培养基中进行发酵, 在 28 °C、180 r/min 振荡培养, 不同时间点分别取样测定细胞密度(OD_{600})和 Plt 产量。细胞生长及 Plt 合成曲线图谱如图 2 所示。从图 2A 中可以看出, *crc* 基因缺失对菌株生长无显著影响, 0–24 h 间两者生长几乎一致; 在 24 h 后, H78Δ*crc* 比 H78 生长略微缓慢。图 2B 显示, H78 及 H78Δ*crc* 的 Plt 产量均在 24 h 达到最高点, H78 的 Plt 产量最高约为 18 mg/L, 而 H78Δ*crc* 的 Plt 产量约为 11 mg/L。总体而言, *crc* 基因缺失导致 Plt 产量下降明显。Crc 作为全局调控蛋白, 可能间接参与并且正调控 Plt 的生物合成。

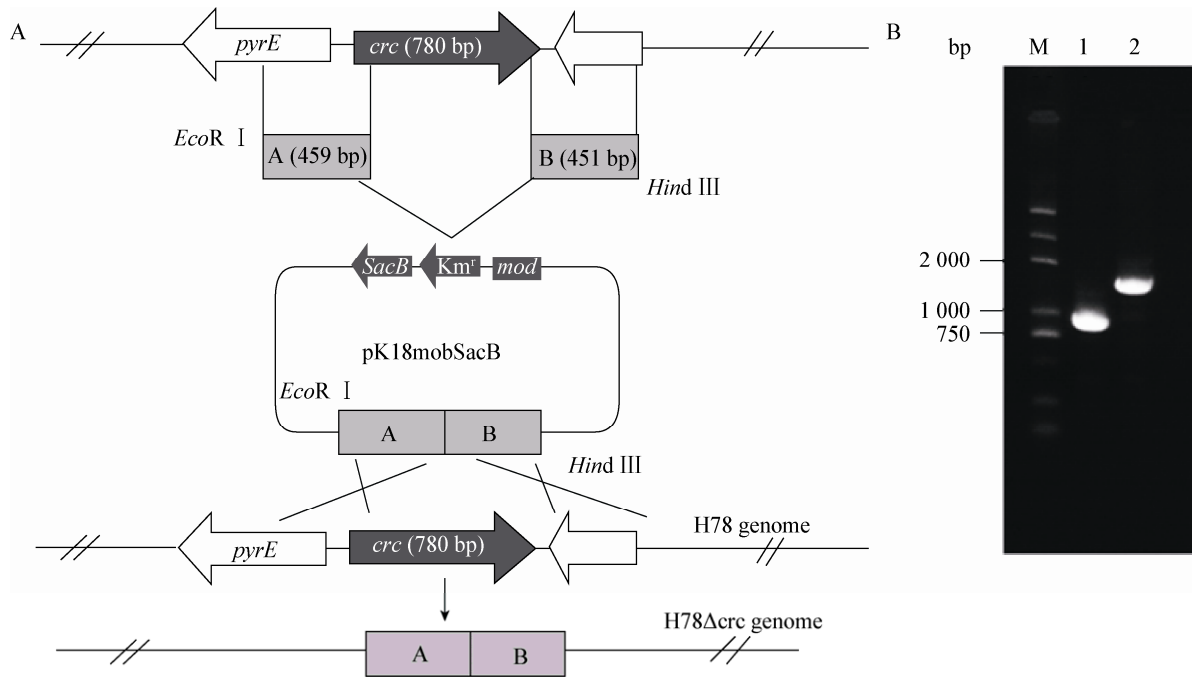


图1 H78 Δ crc 突变株构建图谱(A)和 PCR 产物电泳验证图(B)
Figure 1 Construction map (A) and PCR confirmation (B) of H78 Δ crc mutant

2.3 Crc 对 Plt 合成基因表达的调控

前期工作已通过 5'RACE 确定了 *pltL* 的转录起始位点(+1),采用 *lacZ* 报告分析进一步研究 Crc 对 Plt 合成基因表达的调控。首先构建 *pltLp-lacZ*、*pltLo-lacZ* 和 *pltL'-lacZ* 三个 *lacZ* 融合报告质粒,分别在转录水平、转录后水平以及整体水平研究

Crc 对 *plt* 合成基因表达的调控。pME6522-*pltLp* 及 pME6015-*pltL* 均采用 In-Fusion HD Cloning Kit 进行构建,融合质粒 pME9533-*pltLo* 采用酶切、酶连方法进行构建,构建图谱如图 3 所示。经测序证实 3 个 *lacZ* 融合报告质粒均构建成功。

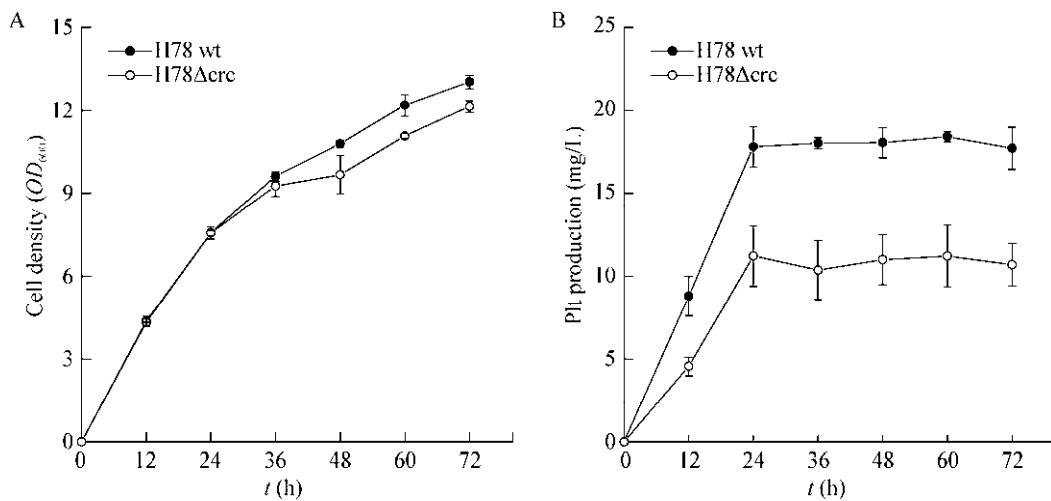


图2 野生株 H78 与突变株 H78 Δ crc 在 KMB 培养基中细胞密度 OD_{600} (A)和 Plt 产量测定(B)
Figure 2 Assay of cell growth (OD_{600}) (A) and Plt production (B) of H78 and the mutant H78 Δ crc in KMB broth

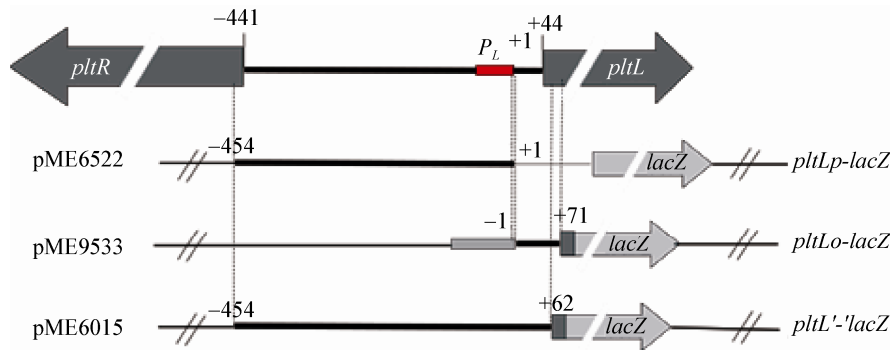


图 3 *plitL-lacZ* 融合报告质粒构建图谱

Figure 3 Construction map of *plitL-lacZ* reporter plasmids

2.3.1 Crc 在整体水平上对 *plit* 合成基因表达的调控: 通过构建 *plitL'-lacZ* 融合质粒(-454 bp 到+62 bp, 即 *plitR-plitL* 之间的全部非编码区域以及 ATG 下游的 6 个密码子), 用于研究 Crc 在整体水平上对 *plit* 合成基因表达的调控。H78 和 H78 Δ crc 分别在 KMB 培养基中进行发酵, 28 °C、180 r/min 振荡培养, 12、16、20、24 h 时分别取样测定细胞密度(OD_{600})和 β -半乳糖苷酶活性。实验结果如图 4 所示, 与 H78 相比, 突变株 H78 Δ crc 中的 *plitL'-lacZ* 表达显著下降, 表明 Crc 蛋白在整体水平上对 *plit* 生物合成基因表达具有正调控作用。

2.3.2 Crc 在转录水平及转录后水平对 *plit* 合成中基因表达的调控: 构建 *plitLp-lacZ* 转录融合质粒(-454 bp 到+1 bp, 即从 *plitL* 的转录起始位点到其上游 454 bp 区域)和 *plitLo-lacZ* 转录后融合质粒(+1 bp 到+71 bp, 即从 *plitL* 的转录起始位点到其下游 71 bp 区域), 分别用于研究 Crc 在转录水平及对转录后水平对 *plit* 合成基因表达的调控。发酵条件参考 2.3.1。

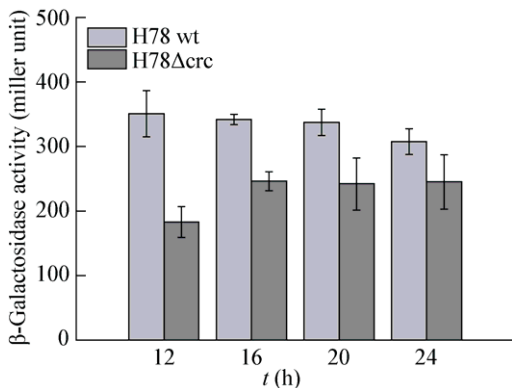


图 4 Crc 在整体水平上对 *plit* 合成基因表达的调控
Figure 4 Regulation of Crc on the expression of *plit* biosynthetic operon at the overall level

图 5A 所示, 与 H78 相比较, 突变株 H78 Δ crc 中的 β -半乳糖苷酶表达显著下降, 表明 Crc 蛋白在转录水平上正调控 *plit* 合成基因的表达。同样, 如图 5B 所示, *crc* 突变导致 *plitLo-lacZ* 表达显著下降, 表明 Crc 对 *plit* 合成基因表达存在转录后水平的正调控作用。

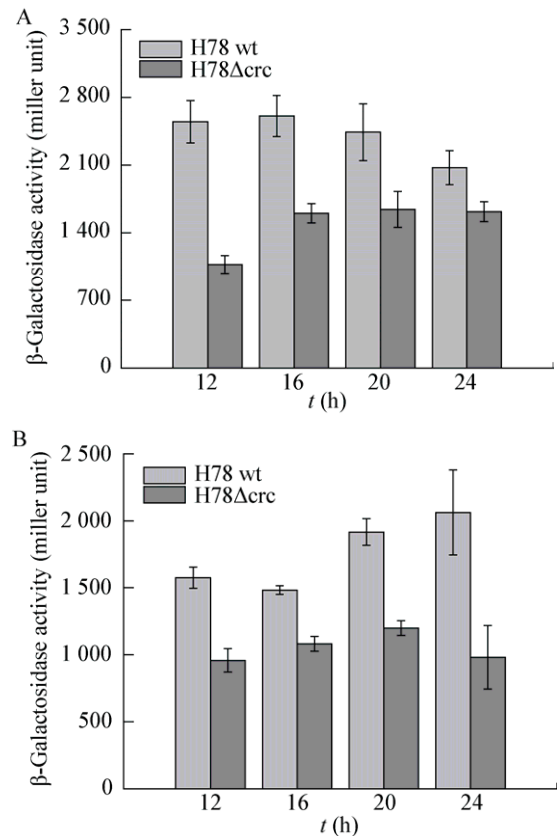


图 5 Crc 在转录及转录后水平对 *plit* 合成基因表达的调控
Figure 5 Regulation of Crc on the expression of *plit* biosynthetic operon at the transcriptional level and the post-transcriptional level

Note: A: *plitLp-lacZ*; B: *plitLo-lacZ*.

3 结论与讨论

本研究初步鉴定了 Crc 对 Plt 生物合成具有正调控作用,在总体水平、转录水平以及转录后水平均正调控 *plt* 合成基因的表达。Crc 是一种 RNA 结合蛋白,能够识别靶 mRNA 起始密码子 ATG 附近的特定的核苷酸序列(CA 结构域),阻碍翻译起始复合体的形成,从而直接阻碍基因表达^[9,12-13]。此外,Crc 在转录水平上间接调控基因表达,例如在恶臭假单胞菌 *Pseudomonas putida* 中,Crc 抑制 *alkS* 基因的表达,而 *alkS* 在烷烃降解通路中是转录激活因子,因此 Crc 间接在转录水平上影响烷烃降解^[14]。综上所述,Crc 在转录、转录后及总体水平上均正调控 *plt* 合成基因表达,然而 Crc 对 *plt* 合成基因在转录水平调控,还是转录后水平调控的具体的分子调控机制,均有待进一步研究阐明。本研究为进一步阐明 Plt 合成的调控机制与网络奠定基础,同时为开展基因及代谢工程提供依据。

参考文献

- [1] Huang XQ, Zhu DH, Ge YH, et al. Identification and characterization of *pltZ*, a gene involved in the repression of pyoluteorin biosynthesis in *Pseudomonas* sp. M18[J]. FEMS Microbiology Letters, 2004, 232(2): 197-202
- [2] Wei X, Huang XQ, Tang LL, et al. Global control of GacA in secondary metabolism, primary metabolism, secretion systems, and motility in the rhizobacterium *Pseudomonas aeruginosa* M18[J]. Journal of Bacteriology, 2013, 195(15): 3387-3400
- [3] Wang GH, Huang XQ, Li SN, et al. The RNA chaperone Hfq regulates antibiotic biosynthesis in the rhizobacterium *Pseudomonas aeruginosa* M18[J]. Journal of Bacteriology, 2012, 194(10): 2443-2457
- [4] Rojo F. Carbon catabolite repression in *Pseudomonas*: optimizing metabolic versatility and interactions with the environment[J]. FEMS Microbiology Reviews, 2010, 34(5): 658-684
- [5] La Rosa R, Behrends V, Williams HD, et al. Influence of the Crc regulator on the hierarchical use of carbon sources from a complete medium in *Pseudomonas*[J]. Environmental Microbiology, 2016, 18(3): 807-818
- [6] La Rosa R, de La Peña F, Prieto MA, et al. The Crc protein inhibits the production of polyhydroxyalkanoates in *Pseudomonas putida* under balanced carbon/nitrogen growth conditions[J]. Environmental Microbiology, 2014, 16(1): 278-290
- [7] Sonnleitner E, Bläsi U. Regulation of Hfq by the RNA CrcZ in *Pseudomonas aeruginosa* carbon catabolite repression[J]. PLoS Genetics, 2014, 10(6): e1004440
- [8] Moreno R, Fonseca P, Rojo F. Two small RNAs, CrcY and CrcZ, act in concert to sequester the Crc global regulator in *Pseudomonas putida*, modulating catabolite repression[J]. Molecular Microbiology, 2012, 83(1): 24-40
- [9] Moreno R, Marzi S, Romby P, et al. The Crc global regulator binds to an unpaired A-rich motif at the *Pseudomonas putida alkS* mRNA coding sequence and inhibits translation initiation[J]. Nucleic Acids Research, 2009, 37(22): 7678-7690
- [10] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular Cloning: a Laboratory Manual[M]. Translated by Jin DY and Li MF. 2nd Edition. Beijing: Science Press, 1992 (in Chinese)
萨姆布鲁克 J, 弗里奇 EF, 曼尼阿蒂斯 T. 分子克隆实验指南[M]. 金冬雁, 黎孟枫, 译. 第 2 版. 北京: 科学出版社, 1992
- [11] Huang XQ, Zhang XH, Xu YQ. PltR expression modulated by the global regulators GacA, RsmA, LasI and RhII in *Pseudomonas* sp. M18[J]. Research in Microbiology, 2008, 159(2): 128-136
- [12] Madhushani A, Del Peso-Santos T, Moreno R, et al. Transcriptional and translational control through the 5'-leader region of the *dmpR* master regulatory gene of phenol metabolism[J]. Environmental Microbiology, 2015, 17: 119-133
- [13] Moreno R, Hernández-Arranz S, La Rosa R, et al. The Crc and Hfq proteins of *Pseudomonas putida* cooperate in catabolite repression and formation of ribonucleic acid complexes with specific target motifs[J]. Environmental Microbiology, 2015, 17: 105-118
- [14] Moreno R, Ruiz-Manzano A, Yuste L, et al. The *Pseudomonas putida* Crc global regulator is an RNA binding protein that inhibits translation of the AlkS transcriptional regulator[J]. Molecular Microbiology, 2007, 64(3): 665-675