

假单胞菌株 M18 中 *pqsA* 突变株的构建及其对 *plt* 的调控

唐璐璐 魏雪 李赛男 许煜泉 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】根际铜绿假单胞菌 M18 能产生藤黄绿菌素(Plt)和吩嗪-1-羧酸(PCA)两种主要的抗生素。其 PqsR/PQS 群体感应系统由应答调控蛋白 PqsR 与信号分子 PQS 组成。前期研究已经表明 *pqsR* 负调控 Plt 生物合成及基因簇表达。本论文旨在研究 PQS 分子对 Plt 合成及基因表达的调控作用。【方法】从 M18 基因组中扩增 PQS 合成基因 *pqsA*, 通过同源重组技术构建假单胞菌 M18 的 *pqsA* 突变菌株 M18*pqsA*。利用 *lacZ* 报告基因分析、信号分子添加实验等, 研究 PQS 对 Plt 合成及基因表达的调控作用。【结果】在 KMB 培养基中, 分别比较野生型菌株 M18 和突变菌株 M18*pqsA* 的 Plt 产量, 突变菌株的 Plt 产量存在较小幅度的升高, 约为野生型菌株的 1.53 倍。添加 PQS 对 *plt* 表达存在一定程度但不是很显著的负调控作用。【结论】PQS 分子对 Plt 生物合成及基因表达存在部分负调控作用。

关键词: 假单胞菌株 M18, *pqsA*, 藤黄绿菌素, PQS

Construction of *Pseudomonas* sp. M18 *pqsA* mutant and its regulation on the *plt* operon

TANG Lu-Lu WEI Xue LI Sai-Nan XU Yu-Quan HUANG Xian-Qing*

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

Abstract: [Objective] The rhizobacterium *P. aeruginosa* M18 can produce two antibiotics, pyoluteorin (Plt) and phenazine-1-carboxylic acid (PCA). The PqsR/PQS quorum sensing system consists of the response regulatory protein PqsR and the signaling molecule PQS. Previous studies have shown that the *pqsR* gene negatively controls Plt biosynthesis and its gene expression. This study aims to investigate the effect of PQS on Plt biosynthesis and its gene expression. [Methods] The *pqsA* gene was amplified from the M18 genome. A chromosomal *pqsA* inactivated mutant strain of M18 was constructed by the homologous recombination technique. Plt production assay and *lacZ* reporter analysis were utilized to assess the influence of PQS on Plt biosynthesis and its gene expression. [Results] In KMB media, Plt production of *pqsA* mutant was partially increased 1.53 times as much as that of M18 strain. The addition of PQS caused a certain degree of down-regulation of *plt* expression. [Conclusion] PQS partially down-regulates Plt biosynthesis and its gene expression in M18.

Keywords: *Pseudomonas* sp. M18, *pqsA*, Pyoluteorin, PQS

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 31270083)

*通讯作者: Tel: 86-21-34204347; ✉: xqhuang66@sjtu.edu.cn

收稿日期: 2014-01-14; 接受日期: 2014-01-27; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2014-02-20

群体感应是一种广泛存在于多种细菌中典型的细胞间交流方式,通过对细胞密度作出反应进而调节一些基因的表达。PqsR/PQS 系统中,PQS 和它的前体物质 HHQ 可以作为细胞间的信号分子发挥作用。PQS 在 *pqs* 合成基因 *pqsABCD* 的作用下,由对氨基苯甲酸和 α -酮基-脂肪酸合成前体物质 HHQ,HHQ 在 PqsH 的作用下转化成 PQS^[1-2]。当细胞外介质中 PQS 的浓度达到阈值的时候,PQS 会和它的同源受体 PqsR (也称之为 MvfR)结合。这个复合体会进一步激活 *pqsABCDE* 和 *phnAB* 操纵子的表达,进而提高 PQS 和绿脓菌素的产量^[3-4]。前期已发现 *pqsR* 对 *Plt* 生物合成及基因表达具有负调控作用^[5-6],但是 PQS 信号分子对 *plt* 的调控作用未知。本课题针对 PQS 信号分子对 *plt* 调控功能展开研究。结果表明,PQS 分子对 *Plt* 合成及基因表达存在部分负调控作用。

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 培养基和菌株生长条件: LB 培养基(g/L): 国产胰蛋白胨 10,酵母提取物 5,NaCl 10,pH 7.0; KMB 培养基(g/L):蛋白胨 20,甘油 15 mL,MgSO₄ 0.732,K₂HPO₄ 0.514,pH 7.5; 固体培养基每升加琼脂 15 g。假单胞菌 M18 培养基中抗生素用量(mg/L): 庆大霉素(Gm) 40、壮观霉素(Sp) 100、四环素(Tc) 120。大肠杆菌 LB 培养基中抗生素用量(mg/L): 庆大霉素(Gm) 10、四环素(Tc) 10。*E. coli* 在 37 °C 培养;假单胞菌在 28 °C、200 r/min 振荡培养。

1.1.3 主要试剂和仪器: *Taq* DNA 聚合酶、T4 DNA 连接酶购自 TaKaRa 公司;各种限制性内切酶购自 NEB 公司;DNA Marker 购自 Fementas 公司;DNA 胶回收试剂盒为 QIAEX II Gel Extraction Kit;质粒抽提采用 TaKaRa MiniBEST Plasmid Purification Kit Ver.4.0;基因组抽提采用 UNIQ-10 柱式基因组 DNA 抽提试剂盒;X-Gal、IPTG、抗生素购自上海 Sangon 公司。安捷伦 HPLC (型号 G1328B)、分析柱为反相 C₁₈ 色谱柱(4.6 mm i. d.×150 mm, 5 μ m) 购自安捷伦公司。

表 1 菌株与质粒 Table 1 Strains and plasmids		
Materials	Genotype and relevant characteristics*	Source
<i>E. coli</i>		
DH5 α	<i>supE44 ΔlacU169 (Φ80 <i>lacZ</i>ΔM15) <i>hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1</i></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		
M18	Wild type, Sp ^r	This lab
M18 <pqsa< p=""></pqsa<>	M18 <pqsa::gm<sup>r, Sp^r Gm^r</pqsa::gm<sup>	This study
Plasmids		
pME6522	pVS1-p15A shuttle vector for constructing the transcriptional <i>lacZ</i> fusions, Tc ^r	
pEX18Tc	Gene replacement vector with MCS from pUC18, <i>oriT⁺</i> , <i>sacB⁺</i> , Tc ^r	This lab
pUCGm	Source of Gm ^r cassette, Gm ^r	This lab
pEX-pqsA	pEX18Tc containing a 1 554 bp <i>pqsA</i> gene, Tc ^r	This study
pEX-pqsA-Gm	A <i>Sma</i> I- <i>Sma</i> I Gm ^r fragment was cloned into pEX-pqsA, Tc ^r Gm ^r	This study
p6522-pltLp	A <i>pltLp-lacZ</i> transcriptional fusion containing a 85 bp fragment upstream of the <i>pltL</i> TSS in pME6522, Tc ^r	This lab

Note: *: Antibiotics-resistant; Km: Kanamycin; Gm: Gentamicin; Sp: Spectinomycin; Tc: Tetracycline.

1.2 引物和 PCR 反应

根据铜绿假单胞菌 M18 中 *pqsA* 的基因设计引物,以 M18 基因组为模板,通过 PCR 扩增全长的 *pqsA* 基因的编码序列,引物 P1 :5'-ATACGAGCTCATGTCCACATTGGCCAACCTGAC-3' (*Sac* I),下划线的碱基为 *Sac* I 的酶切位点;引物 P2 :5'-TTC AAGCTTTCAACATGCCCGTTCCTCCG-3' (*Hind* III),下划线的碱基为 *Hind* III 的酶切位点。PCR 反应体系为 :2×GC buffer 25 μL ;M18 基因组 DNA (10.0 mg/L) 1.0 μL ;dNTPs (2.5 mmol/L) 4 μL ;引物 P1 (10 μmol/L) 1.5 μL ;引物 P2 (10 μmol/L) 1.5 μL ;LA *Taq* (100 U/μL) 0.5 μL ;双蒸水 16.5 μL ;反应总体积 50.0 μL。PCR 反应条件为 :94 °C 30 s ;94 °C 30 s , 60 °C 30 s , 72 °C 90 s (1 min/kb) , 32 个循环 ;72 °C 10 min。染色体 DNA 提取采用 UNIQ-10 柱式基因组 DNA 抽提试剂盒(上海生工生物工程技术服务有限公司)。

1.3 克隆 *pqsA* 基因片段及测序

质粒抽提、酶反应、DNA 片段回收、连接、感受态细胞制备等均参照文献[7],DNA 测序委托上海英骏生物技术有限公司。

1.4 细菌接合转移

采用固相滤膜杂交方法^[8]进行细菌接合转移。

1.5 生长曲线测定及 Plt 产量的 HPLC 测定

*OD*₆₀₀ 值的测定及 Plt 的抽提和 HPLC 测定方法参照文献[9]。每种样品设有 3 个平行样,每隔 12 h 取样测其 *OD*₆₀₀ 值和 Plt 产量。

1.6 PQS 信号分子添加实验

将一定质量的 PQS 信号分子粉末,溶于一定体积的 100%甲醇中,使其浓度为 130 g/L。每 100 mL 的 KB 培养基中添加 10 μL,使得 PQS 终浓度为 13 mg/L,换算成摩尔浓度约为 50 μmol/L^[10]。分别添加同样浓度的 PQS 于 M18/p6522-pltLp 和 M18pqsA/p6522-pltLp 的发酵液中,28 °C 培养过夜。

1.7 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照文献[11],

每个样品设有 3 个平行,每隔 4 h 取样测定其 β-半乳糖苷酶活性和 *OD*₆₀₀ 值。

2 结果与分析

2.1 *pqsA* 基因的 PCR 克隆和测序比对

根据 *P. aeruginosa* M18 中的 *pqsA* 基因序列设计引物,以假单胞菌 M18 基因组 DNA 为模板进行 PCR 扩增,得到一个 1.554 kb 左右的条带,胶回收该片段,进行测序。测序结果用 NCBI 的 BLAST 程序比对分析,序列正确。

2.2 *pqsA* 基因的体外突变和突变菌株 M18pqsA 的获得

利用 *Sac* I 和 *Hind* III 两种限制性内切酶,对 *pqsA* 和质粒 pEX18Tc 进行双酶切。将纯化后的 PCR 产物连接到载体 pEX18Tc,得到 pEX-pqsA。利用 *Sma* I 对 pUCGm 进行双酶切,得到 0.855 kb 含有 Gm 抗性基因的片段,将其插入 pEX18Tc-pqsA 的 *Sma* I 酶切位点,获取重组质粒 pEX-pqsA-Gm,转化至 *E. coli* SM10。将其作为供体菌,野生型 M18 菌株作为受体菌,经固相滤膜接合转移。质粒 pEX-pqsA-Gm 转入 M18 菌株后,不能在染色体外自主复制,质粒携带的 *pqsA::Gm^r* 突变基因与受体菌 M18 的染色体同源重组。用含 Gm 和 Tc 抗生素的平板分别进行筛选。在 Tc 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 *pqsA* 基因突变菌株 M18pqsA (图 1)。抽提该菌株基因组 DNA 作为模板进行 PCR 测序验证。

2.3 Plt 生物合成的动力学分析和细菌的生长曲线分析

Plt 是生防假单胞菌 M18 产生的重要抗生素之一。为研究 PQS 对 Plt 合成的调控作用,分别将野生型菌株 M18 与不产 PQS 分子的突变菌株 M18pqsA 在 KMB 培养基中,于 28 °C、220 r/min 振荡培养。定时取样,在不同的时间点取 500 μL 菌液,测 *OD*₆₀₀。发酵 60 h 后,取 200 μL 菌液,利用高效液相色谱(HPLC)测定样品中 Plt 的浓度变化。每个样品均是 3 个平行样,重复 2–3 次。

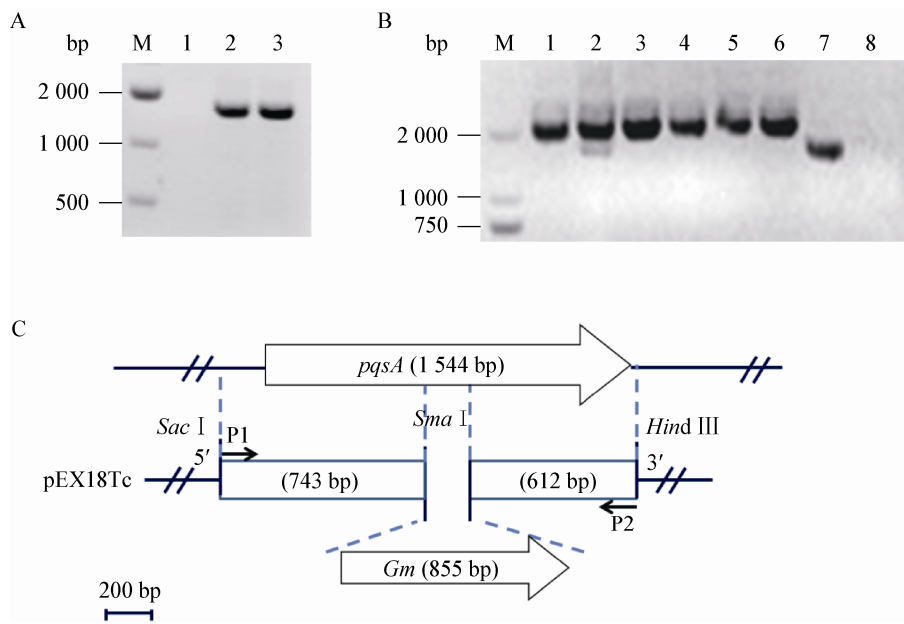


图 1 *pqsA* 的 PCR 扩增(A), 突变株 M18*pqsA* 的 PCR 鉴定(B)及 *pqsA* 序列插入 *Gm^r* 抗性片段的物理图谱(C)
Figure 1 PCR product of *pqsA* (A), confirmation of the *pqsA* mutant M18*pqsA* by PCR (B), and Physical map of the *pqsA* gene with inserted *Gm^r* gene cassette (C)

注：M：DNA marker. A：1：以水为模板的阴性对照；2，3：M18 中 *pqsA* 基因的 PCR 扩增片段. B：1-6：突变株 M18*pqsA* 中 *pqsA* 基因之抗性基因插入后的扩增片段；7：M18 中 *pqsA* 基因扩增片段；8：以水为模板的阴性对照.

Note: M: DNA marker. A: 1: Negative control; 2, 3: PCR product of *pqsA*. B: 1-6: PCR product of the *pqsA* gene with inserted *Gm^r* gene cassette in M18*pqsA*; 7: PCR product of *pqsA* in M18; 8: Negative control.

实验结果如图 2 所示。图 2A 中，在整个测定周期，野生型与 *pqsA* 突变菌株的生长并没有显著的差异。Plt 测定结果如图 2B 所示，突变株 M18*pqsA* 的 Plt 产量与野生型比较有所升高，约为野生型产量的 1.53 倍。由于 M18*pqsA* 菌株不产 PQS 信号分子，因此间接说明 PQS 对 Plt 合成存在部分负调控作用。

2.4 PQS 对 *plt* 基因表达的调控作用

为了进一步查证 PQS 对 *plt* 表达的调控作用，将 *plt* 基因簇第一个基因启动子序列与 *lacZ* 报告基因的 *pltLp-lacZ* 转录融合质粒 p6522-*pltLp*，分别转入 M18 野生型菌株与 M18*pqsA* 突变菌株，在培养基中添加终浓度为 50 $\mu\text{mol/L}$ 的 PQS 分子，进行 β -半乳糖苷酶活性分析。同时设置仅添加甲醇(PQS 用 100%甲醇溶解)的对照组，以排除甲醇对于酶活的影响。M18*pqsA* 中，由于 *pqsA* 基因序列的缺失，不合成 PQS 分子，但是 *pqsR* 基因序列是完整

存在的。分别于 12、16、20 h 取样，测定酶活，分析 PQS 对于 *plt* 基因表达的影响。

图 3A 显示，在 M18/p6522-*pltLp* 中，单独添加甲醇后， β -半乳糖苷酶活性会有所上升，但是变化不大。而添加 PQS 信号分子后， β -半乳糖苷酶活性明显下降。在 M18*pqsA*/p6522-*pltLp* 中，由于 *pqsA* 突变其本身并不合成 PQS 分子。图 3B 显示，添加甲醇后， β -半乳糖苷酶活性会上下有所浮动；添加 PQS 信号分子后， β -半乳糖苷酶活性明显的较大幅度下降。结果表明添加 PQS 在一定程度上负调控 *plt* 基因表达。对比图 3A 和 3B 可以看到，*pqsA* 基因突变后，*pltLp-lacZ* 表达的酶活水平并没有回升，甚至在 20 h 出现部分下降，可见 *plt* 基因在转录后水平的表达并没有受到抑制。以上结果说明，PQS 在一定程度上增强了对 *plt* 的阻遏调控作用，但是 PQS 本身对 *plt* 基因表达并没有显著的阻遏作用。

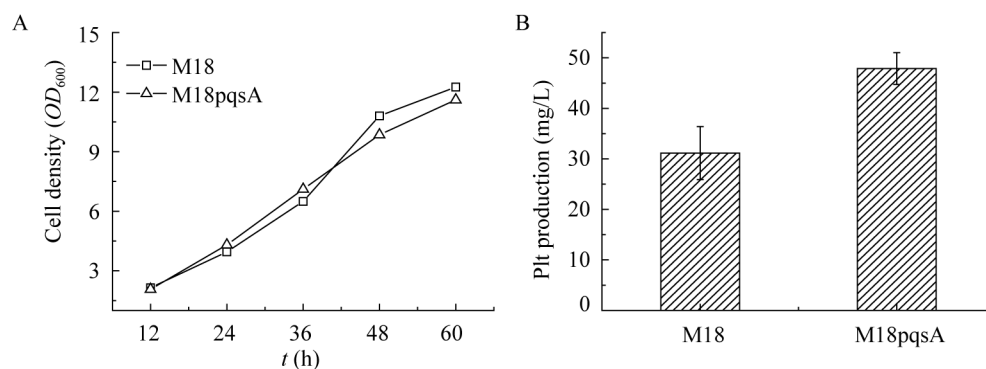


图2 假单胞菌 M18 和 M18pqsA 菌株细胞生长曲线(A)及 Plt 的生物合成(B)

Figure 2 Cell growth (OD_{600}) (A) and Plt production (B) of the wild-type M18 strain and M18pqsA strain in KMB broth

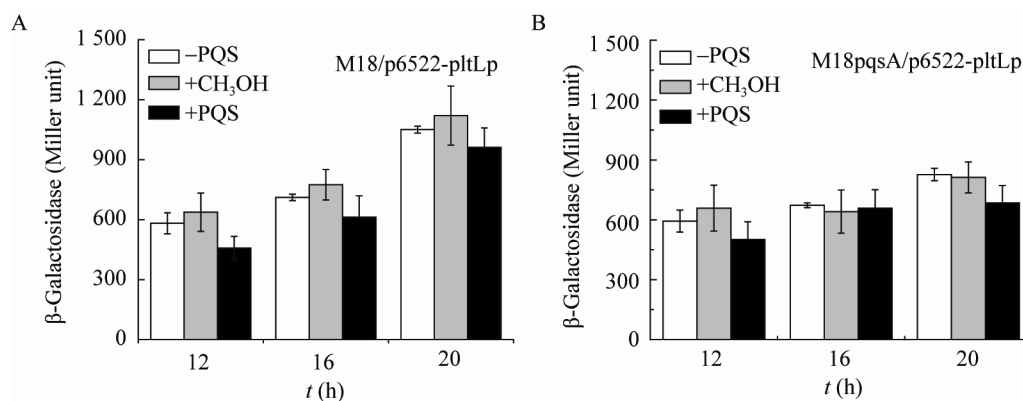


图3 PQS 对菌株 M18/p6522-pltLp (A)及 M18pqsA/p6522-pltLp (B)中 *plt* 基因表达的影响

Figure 3 Effect of PQS on expression of the *plt* operon in strain M18/p6522-pltLp (A) and M18pqsA/p6522-pltLp (B)

3 讨论

本文重点研究了 PQS 分子对 Plt 合成及基因表达的调控作用,对于进一步阐明群体感应系统阻遏 Plt 合成的分子机理与网络奠定了一定的基础。通过同源重组技术构建了 *pqsA* 突变菌株,并研究发现 *pqsA* 突变对 Plt 合成具有部分促进作用,说明 PQS 信号分子对于 Plt 的合成存在一定程度的负调节作用。*lacZ* 报告基因表达分析及信号分子添加实验进一步证实了 PQS 在一定程度上对 *plt* 表达存在部分阻遏作用。PQS 的添加,会引起 M18/p6522-pltLp 和 M18pqsA/p6522-pltLp 菌株的 β -半乳糖苷酶活性表达部分下降。但是 *pqsA* 基因的突变并没有引起 *pltLp-lacZ* 的 β -半乳糖苷酶活性表达明显上升,说明 PQS 在 PqsR 对 *plt* 的阻遏调控中并非必需。总之,本研究表明了 PQS 对 Plt

合成及基因表达存在部分负调控作用,但 PQS 在 PqsR 负调控 *plt* 表达中并不是必需的,它仅在一定程度上增强 PqsR 对 *plt* 的阻遏调控。

参考文献

- [1] Bredenbruch F, Nimtz M, Wray V, et al. Biosynthetic pathway of *Pseudomonas aeruginosa* 4-hydroxy-2-alkylquinoline-s[J]. Journal of Bacteriology, 2005, 187(11): 3630-3635.
- [2] Farrow JM III, Pesci EC. Two distinct pathways supply anthranilate as a precursor of the *Pseudomonas* quinolone signal[J]. Journal of Bacteriology, 2007, 189(9): 3425-3433.
- [3] Cao H, Krishnan G, Goumnerov B, et al. A quorum sensing-associated virulence gene of *Pseudomonas aeruginosa* encodes a LysR-like transcription regulator with a unique self-regulatory mechanism[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2001, 98(25): 14613-14618.
- [4] Deziel E, Gopalan S, Tampakaki AP, et al. The contribution of MvfR to *Pseudomonas aeruginosa* pathogenesis and quorum sensing circuitry regulation: multiple quorum sensing-regulated genes are modulated without affecting *lasR*, *rhlR* or the production of N-acyl-L-homoserine

- lactones[J]. Molecular Microbiology, 2005, 55(4): 998-1014.
- [5] Lu J, Huang X, 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]. Journal of Biotechnology, 2009, 143(1): 1-9.
- [6] 陆吉顺, 李慷, 张明月, 等. 假单胞菌 M18 pqsR 突变株的构建及其对吩嗪绿菌素合成的调控[J]. 微生物学通报, 2009, 36(7): 1092-1097.
- [7] 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.
- [8] Wang Y, Huang X, Hu H, et al. QscR acts as an intermediate in *gacA*-dependent regulation of PCA biosynthesis in *Pseudomonas* sp. M18[J]. Current Microbiology, 2008, 56(4): 339-345.
- [9] Huang X, Zhu D, Ge Y, 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.
- [10] Xiao G, Deziel E, He J, et al. MvfR, a key *Pseudomonas aeruginosa* pathogenicity LTTR-class regulatory protein, has dual ligands[J]. Molecular Microbiology, 2006, 62: 1689-1699.
- [11] Zhang XH, Wang SL, Geng HF, et al. Differential regulation of *rsmA* gene on biosynthesis of pyoluteorin and phenazine-1-carboxylic acid in *Pseudomonas* sp. M18[J]. World Journal of Microbiol & Biotechnology, 2005, 21(6/7): 883-889.

(上接 p.2089)

征 稿 简 则

3.3 摘要写作注意事项

3.3.1 英文摘要: 1) 建议使用第一人称, 以此可区分研究结果是引用文献还是作者得出的; 2) 建议用主动语态, 被动语态表达拖拉模糊, 尽量不用, 这样可以避免长句, 以求简单清晰; 3) 建议使用过去时态, 要求语法正确, 句子通顺; 4) 英文摘要的内容应与中文摘要一致, 但可比中文摘要更详尽, 写完务必请英文较好且专业知识强的专家审阅定稿后再返回编辑部。5) 摘要中不要使用缩写语, 除非是人人皆知的, 如: DNA, ATP 等; 6) 在英文摘要中, 不要使用中文字体标点符号。

3.3.2 关键词: 应明确、具体, 一些模糊、笼统的词语最好不用, 如基因、表达……

4 特别说明

4.1 关于测序类论文

凡涉及测定 DNA、RNA 或蛋白质序列的论文, 请先通过国际基因库 EMBL (欧洲) 或 GenBank (美国) 或 DDBJ (日本), 申请得到国际基因库登录号 (Accession No.) 后再投来。

4.2 关于版权

4.2.1 本刊只接受未公开发表的文章, 请勿一稿两投。

4.2.2 凡在本刊通过审稿、同意刊出的文章, 所有形式的 (即各种文字、各种介质的) 版权均属本刊编辑部所有。作者如有异议, 敬请事先声明。

4.2.3 对录用的稿件编辑部有权进行文字加工, 但如涉及内容的大量改动, 将请作者过目同意。

4.2.4 文责自负。作者必须保证论文的真实性, 因抄袭剽窃、弄虚作假等行为引发的一切后果, 由作者自负。

4.3 审稿程序及提前发表

4.3.1 来稿刊登与否由编委会最后审定。对不录用的稿件, 一般在收稿 2 个月之内通过 E-mail 说明原因, 作者登陆我刊系统也可查看。稿件经过初审、终审通过后, 作者根据编辑部返回的退修意见进行修改补充, 然后以投稿时的用户名和密码登陆我刊系统上传修改稿, 待编辑部复审后将给作者发稿件录用通知单, 稿件按照投稿先后排队发表。

4.3.2 对投稿的个人和单位一视同仁。坚持文稿质量为唯一标准, 对稿件采取择优先登的原则。如作者要求提前发表, 请在投稿的同时提出书面报告, 说明该研究成果的重要性、创新性、竞争性和提前发表的必要性, 经过我刊的严格审查并通过后, 可予提前刊出。

5 发表费及稿费

论文一经录用, 将在发表前根据版面收取一定的发表费并酌付稿酬、赠送样刊。

6 联系方式

地址: 北京市朝阳区北辰西路 1 号院 3 号中国科学院微生物研究所《微生物学通报》编辑部(100101)

Tel: 010-64807511

E-mail: tongbao@im.ac.cn

网址: <http://journals.im.ac.cn/wwxtbcn>