

## 生防绿针假单胞菌 HT66 中脂肽的鉴定与功能

熊欣 侯博文 金雪洁 彭华松\* 张雪洪

(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】脂肽(Lipopeptide, LP)是微生物合成的一类重要的生物表面活性剂,不仅影响细菌的生物学功能,还对多种植物和人类病原菌具有广谱的拮抗作用。然而至今未见绿针假单胞菌(*Pseudomonas chlororaphis*)中脂肽产物的报道。【方法】通过生物信息学手段预测绿针假单胞菌 HT66 中脂肽的氨基酸组成及顺序,构建脂肽合成基因缺失突变株 HT66 $\Delta$ clp,根据突变株缺失代谢产物的 UPLC/QTOF-MS 信息验证预测结果,并研究了脂肽对该菌株的生长、吩嗪-1-甲酰胺(PCN)合成、生物膜形成和群集运动性的影响。【结果】预测菌株 HT66 的脂肽氨基酸顺序为 L-Leu-D-Glu-D-allo-Thr-D-Val-L-Leu-D-Ser-L-Leu-D-Ser-L-Ile,通过比对野生型和突变株代谢产物的质谱信息确定该产物为黏液菌素(Viscosin);脂肽合成基因缺失后,菌株 HT66 的生长无明显变化,但其 PCN 合成、生物膜形成和群集运动性均有不同程度地下降。【结论】菌株 HT66 的脂肽产物为黏液菌素,对菌株的代谢、生物膜形成和运动性等生物学功能具有重要的调控作用。研究报道了绿针假单胞菌中一种脂肽分子的结构与功能,为研究其合成和调控机制及开发和应用奠定了基础。

**关键词:** 假单胞菌, 脂肽, 黏液菌素, 吩嗪-1-甲酰胺

Identification and characterization of a lipopeptide produced by a biocontrol *Pseudomonas chlororaphis* strain HT66

XIONG Xin HOU Bo-Wen JIN Xue-Jie PENG Hua-Song\* ZHANG Xue-Hong

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

**Abstract:** [Objective] Lipopeptides (LPs) are important biosurfactants produced by microorganisms and have significant influences on bacterial biological functions and broad-spectrum antagonistic abilities towards many botanic and human pathogens. LPs produced by *Pseudomonas chlororaphis* are not reported as yet. [Methods] This study predicted the composition and sequence of the amino

**Foundation item:** National Natural Science Foundation of China (No. 31270084); National High-Tech R&D Program of China (863 Program) (No. 2012AA022107); National Basic Research Program of China (973 Program) (No. 2012CB721005)

\*Corresponding author: Tel: 86-21-34206083; E-mail: hspeng@sjtu.edu.cn

Received: March 30, 2016; Accepted: May 30, 2016; Published online (www.cnki.net): June 08, 2016

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 31270084); 国家高技术研究发展计划项目(No. 2012AA022107); 国家重点基础研究发展计划项目(No. 2012CB721005)

\*通讯作者: Tel: 86-21-34206083; E-mail: hspeng@sjtu.edu.cn

收稿日期: 2016-03-30; 接受日期: 2016-05-30; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2016-06-08

acids within the LP produced by *P. chlororaphis* HT66. The LP biosynthetic genes deletion strain HT66 $\Delta$ clp was constructed, and subsequently the LP produced by strain HT66 was analyzed by the UPLC/QTOF-MS according to the lost metabolite in the mutant. At last, the roles of the LP on bacterial growth, phenazine-1-carboxamide (PCN) production, biofilm formation and swarming motility were studied. **[Results]** The amino acid sequence of the LP produced by strain HT66 was predicted to be L-Leu-D-Glu-D-allo-Thr-D-Val-L-Leu-D-Ser-L-Leu-D-Ser-L-Ile and the LP was verified to be viscosin via comparing the mass spectra data of the metabolites in the wild type and the mutant. Deficiency of LP was found to have no distinct effect on bacterial growth of strain HT66, however, the reduction in PCN production, biofilm formation and swarming motility were observed in the mutant. **[Conclusion]** The LP produced by strain HT66 is viscosin and it regulates several biological functions including metabolism, biofilm formation and motility. This study reported the structure and function of an LP produced by *P. chlororaphis*, which may be helpful in learning its synthesis and regulation mechanism and lay a foundation for its development and application.

**Keywords:** *Pseudomonas*, Lipopeptide, Viscosin, Phenazine-1-carboxamide

脂肽(Lipopeptide, LP)是假单胞菌和杆菌等微生物合成的生物表面活性剂,可影响细胞生长、运动、生物膜合成等功能,对多种植物和人类病原体如病毒、支原体、锥虫、细菌、真菌和卵菌具有广谱的拮抗作用,具有重要的医药开发潜力<sup>[1-3]</sup>。其中,由玫瑰孢链霉菌合成的达托霉素(Daptomycin)是第一种商业化的脂肽类抗生素,对革兰氏阳性病原菌包括一些耐药菌具有良好的抗菌作用,可抑制葡萄球菌、肠球菌的生长和繁殖,其疗效与安全性均较好<sup>[4]</sup>。

脂肽的结构具有显著的多样性,除氨基酸个数、种类和成环的位置不同外,其脂肪酸链的长度也有差异,一些还带有羟基。根据这些差异可将脂肽分为多种类型,每个类型中因其氨基酸组成的细微差异又分为数个亚型。脂肽中少量为线性脂肽,多数可形成内酯环,称为环脂肽(Cyclic lipopeptide, CLP),其分子由脂肪酸连接多肽环构成<sup>[3,5]</sup>。研究发现,脂肽合成蛋白一般由多个模块组成,每个模块负责合成脂肽分子中的一个氨基酸,且其序列具有较高的同源性<sup>[2]</sup>。基于这种规律,可研究脂肽合成蛋白中不同模块对应的基序(Motif),通过聚类分析预测脂肽的氨基酸种类<sup>[6-8]</sup>。研究表明,脂肽对假单胞菌和杆菌生物膜的形成具有重要影响,但不同类型脂肽的作用效果相差很大;另外,生物表面活性剂可改变物体

表面的黏度,影响细胞分裂和运动。在植物相关环境下,微生物合成的表面活性剂可作为叶片表面疏水角质层的润滑剂,不仅可以促进细胞运动,还有利于物质的溶解和扩散<sup>[9]</sup>。

绿针假单胞菌(*Pseudomonas chlororaphis*) HT66是本实验室从水稻根际分离的生防菌株,其主要代谢产物为吩嗪-1-甲酰胺(Phenazine-1-carboxamide, PCN),即一种高效和广谱的抗真菌剂。此外,该菌株可合成铁载体 Pyoverdine (Pvd)和 Achromobactin (Acr)、杀虫蛋白 FitD (*P. fluorescens* insecticidal toxin)和氢氰酸(HCN)等产物,具有良好的生物防治潜力<sup>[10]</sup>。经生物信息学分析,该菌株基因组中存在一个完整的脂肽合成基因簇(*clpABC*),但该脂肽物质的种类和功能并不清楚。文献调研发现,虽然目前有许多微生物合成脂肽的报道,但至今未见绿针假单胞菌中脂肽化合物的研究;在数株绿针假单胞菌的基因组学研究中,也仅发现菌株 HT66 具有脂肽合成基因簇<sup>[10]</sup>。因此,在绿针假单胞菌中进行脂肽物质鉴定与功能的研究,不仅有助于了解菌株 HT66 的生物防治机制,还可以拓展人们对绿针假单胞菌中脂肽结构和功能的认识。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 菌株和质粒: 实验所用的菌株和质粒见表 1。

表 1 菌株和质粒  
Table 1 Strains and plasmids used in this study

Strains/Plasmids	Genotype and relevant characteristics	Reference
<i>P. chlororaphis</i>		
HT66	Wild type, Amp <sup>r</sup> , Sp <sup>r</sup>	This lab
HT66Δ <i>clp</i>	CLP biosynthetic gene cluster deleted in HT66	This study
<i>E. coli</i>		
DH5α	<i>supE44 ΔlacU169(Φ80 lacZΔM15) hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1</i>	This lab
S17	res <sup>-</sup> pro mod <sup>+</sup> integrated copy of RP4, mob <sup>+</sup>	This lab
Plasmids		
pK18mobsacB	Broad-host-range gene replacement vector; <i>sacB</i> , Kan <sup>r</sup>	Schäfer 等 <sup>[11]</sup>
pK18- <i>clp</i>	pK18mobsacB carrying <i>EcoR</i> I- <i>Bam</i> H I insert of 528 bp and 573 bp segments flanking <i>clp</i> ; <i>SacB</i> , Kan <sup>r</sup>	This study

注：Amp<sup>r</sup>：氨苄青霉素抗性；Sp<sup>r</sup>：壮观霉素抗性；Kan<sup>r</sup>：卡那霉素抗性。  
Note: Amp<sup>r</sup>: Ampicillin resistance; Sp<sup>r</sup>: Spectinomycin resistance; Kan<sup>r</sup>: Kanamycin resistance.

1.1.2 培养基及菌株生长条件：LB 培养基(g/L)：蛋白胨 10，酵母提取物 5，氯化钠 10，pH 7.0，固体培养基中含 14 g 琼脂粉；KB 培养基(g/L)：蛋白胨 20.000，甘油 18.915，磷酸氢二钾 0.514，硫酸镁 0.732，pH 7.5。发酵时，分装至 250 mL 挡板瓶中，装液量为 60 mL，设置 3 组平行实验；1×10<sup>5</sup> Pa 灭菌 20 min。抗生素用量(mg/L)：硫酸卡那霉素(Kan) 50，氨苄青霉素钠(Amp) 100。大肠杆菌在 37 °C、180 r/min 振荡培养；假单胞菌在 28 °C、180 r/min 振荡培养。

1.1.3 主要试剂及仪器：核酸分子实验按常规方法操作。PrimeSTAR DNA 聚合酶、限制性内切酶和 DNA Ligation Kit Ver.2.1，宝生物工程(大连)有限公司；2×*Taq* Master Mix，南京诺唯赞生物科技有限公司；基因组 DNA 提取采用 Genomic DNA Kit，质粒抽提采用 Plasmid MiniPrep Kit，电泳凝胶片段回收采用 Quick Gel Extraction Kit，酶切产物纯化采用 PCR Purification Kit，北京全式金生物技术有限公司。IPTG 和 X-gal 生工生物工程(上海)股份有限公司。超高效液相色谱-四级杆飞行时间质谱联用仪(UPLC/QTOF-MS)，Waters ACQUITY™ UPLC & Q-TOF MS Premier。蛋白序列分析和系统

发育树构建使用 BioEdit 7.2.5。

1.2 脂肽合成蛋白的聚类分析

选取绿针假单胞菌 HT66 中脂肽合成蛋白序列和其他假单胞菌中已知结构的脂肽合成蛋白序列进行模块分析，构建系统发育树；根据待预测模块序列的同源性和所处位置确定对应的氨基酸及其排列顺序。蛋白序列的确定参照文献[7]。

1.3 脂肽合成基因簇缺失株构建

依据菌株 HT66 全基因组序列进行引物设计。扩增脂肽合成基因簇 *clp* 上游同源臂的引物对为：clp-F1：5'-CGGAATTCAGCATCTTCGCCGCAAA CAG-3' (*EcoR* I)；clp-R1：5'-CCGGGATGAATGG GTAGTCG-3'。扩增 *clp* 下游同源臂的引物对为：clp-F2：5'-ACTACCCATTCATCCCGGCGGGCTAT GGATGGGTTCG-3'；clp-R2：5'-CGGATCCTGGA GATCGCCGCGTCTTC-3' (*Bam*H I)。PCR 体系和程序参照文献[7]进行。基因组 DNA 提取、质粒抽提、电泳凝胶片段回收、酶切、产物纯化和连接等均按试剂盒说明书进行操作。采用同源重组的无痕敲除方法对相关序列进行突变株构建，相关方法参照文献[12]。以菌株 HT66 基因组为模板，使用 clp-F1 和 clp-R1、clp-F2 和 clp-R2 分别扩增脂肽

合成基因簇上、下游同源臂。将产物纯化, 作为模板, 用引物 clp-F1 和 clp-R2 扩增获得融合片段。将融合片段和质粒 pK18mobsacB 酶切并连接, 转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$  感受态细胞, 进行蓝白斑筛选和 PCR 验证, 测序正确后, 获得重组质粒 pK18-clp。抽提质粒, 转化大肠杆菌 S17 感受态细胞, 在 Kan、Amp 双抗培养基中与菌株 HT66 共培养, 获得接合转移的单交换菌株。将菌液稀释, 涂布于含 10% 蔗糖的 LB 平板上, 分别在 LB 和含 Kan 的 LB 平板中进行影印筛选, 仅能在 LB 平板中生长的为双交换菌株。最后, 使用 clp-F1 和 clp-R2 进行筛选, 可扩增出与融合片段条带一致者为菌株 HT66 的脂肽合成基因缺失突变株 HT66 $\Delta$ clp。

#### 1.4 脂肽产物的质谱分析

使用氯仿-甲醇(2:1, 体积比)溶液抽提脂肽产物, 取有机相并用氮气吹干<sup>[13]</sup>。粗提物以乙腈溶解, 过滤后用 UPLC/QTOF-MS 检测。色谱柱为 Waters CORTECS 1.6  $\mu$ m (2.1 mm $\times$ 100 mm), 柱温为 45  $^{\circ}$ C, 进样量为 1  $\mu$ L, 流速为 0.4 mL/min, 检测波长为 254 nm 和 210 nm; 梯度洗脱条件为: 0 min, 水 95%, 乙腈 5%; 1.5 min, 水 80%, 乙腈 20%; 3.5 min, 水 60%, 乙腈 40%; 5 min, 水 40%, 乙腈 60%; 7 min, 水 15%, 乙腈 85%; 8–11 min, 乙腈 100%; 11.5–13 min, 水 95%, 乙腈 5%。选用正离子化模式, 分子量范围为 50–2 000。

#### 1.5 生长曲线的绘制和 PCN 产量的测定

菌株活化后, 接种至 KB 培养基中, 初始

$OD_{600}$  值为 0.02, 培养并取样, 方法见 1.1.2, 使用分光光度计检测  $OD_{600}$  值; 样品制备后, 使用高效液相色谱(HPLC)测定 PCN 产量。HPLC 使用的色谱柱为 WondaSil-WR C-18 反相柱 5  $\mu$ m (4.6 mm $\times$ 250 mm)。样品制备方法和 PCN 的 HPLC 检测条件参照文献[14]。

#### 1.6 生物膜的分析

菌株活化后, 在 24 孔板中静置培养 48 h, 吸去菌液后, 以结晶紫对生物膜进行染色, 然后乙醇脱色并用酶标仪检测脱色液的  $OD_{600}$  值。具体方法参照文献[15]。

#### 1.7 群集运动分析

在运动性检测平板上进行菌株的群集运动实验, 相关操作参照文献[16]。

## 2 结果与分析

#### 2.1 脂肽结构的预测

蛋白序列分析发现, 菌株 HT66 的脂肽合成蛋白含有 9 个模块, 表明合成的脂肽产物由 9 个氨基酸组成。从 NCBI 数据库中找到了 4 株能合成脂肽且其分子结构已鉴定的假单胞菌(表 2), 共收集脂肽合成基因簇中的 39 个模块序列及其对应的氨基酸种类, 与菌株 HT66 的脂肽合成基因簇一起建库, 构建系统发育树(图 1), 分析各个模块中的保守序列。

由图 1 可知, 脂肽分子中相同氨基酸呈现了较好的聚类关系, 因此我们推测菌株 HT66 所产脂肽的氨基酸序列应为 L-Leu-D-Glu-D-allo-Thr-D-Val-

表 2 用于聚类分析的脂肽  
Table 2 CLPs used in cluster analysis

菌株 Strains	脂肽 CLP	基因簇 Gene cluster	模块个数 No. of modules
<i>P. protegens</i> Pf-5	Orfamide A <sup>[2]</sup>	<i>ofaABC</i>	10
<i>P. fluorescens</i> SS101	Massetolide A <sup>[3,5]</sup>	<i>massABC</i>	9
<i>P. fluorescens</i> BBc6R8	Viscosin <sup>[3,5,9]</sup>	<i>viscABC</i>	9
<i>Pseudomonas</i> sp. MIS38	Arthrofactin <sup>[3,17]</sup>	<i>arfABC</i>	11

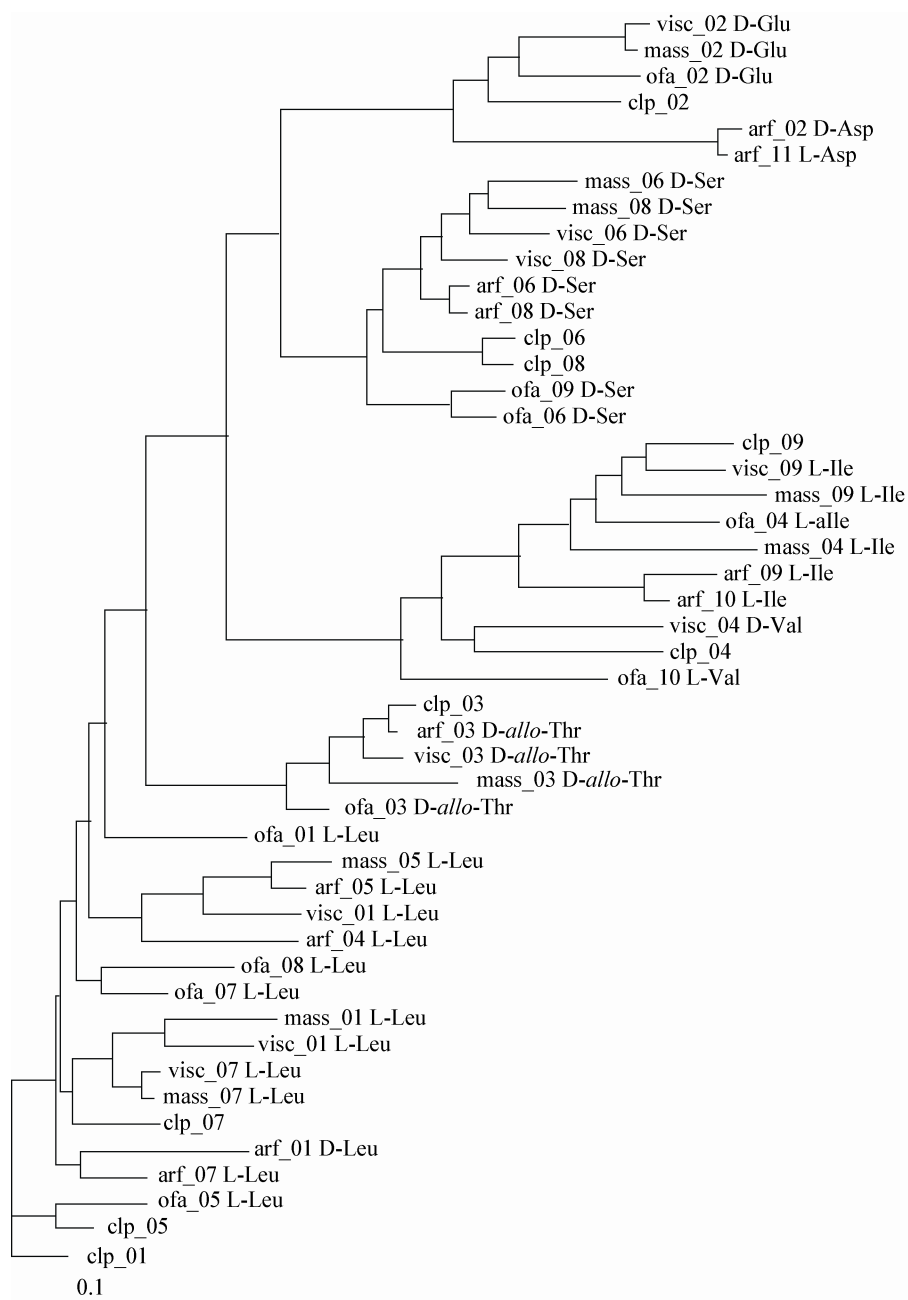


图 1 不同脂肽中氨基酸模块的聚类分析

Figure 1 Cluster analysis of amino acid modules of CLPs

注：clp：菌株 HT66 合成的脂肽；标尺为遗传距离。

Note: clp: The CLP synthesized by strain HT66; The scale shows the genetic distance.

L-Leu-D-Ser-L-Leu-D-Ser-L-Ile，与文献报道的脂肽化合物 Viscosin 的氨基酸种类及顺序<sup>[3,5,9]</sup>一致。

2.2 脂肽缺失突变株 HT66Δclp 的构建

为进一步鉴定菌株 HT66 脂肽产物的结构，构建了菌株 HT66 的脂肽合成基因缺失突变株

HT66Δclp。在突变株中，可用 clp-F1 和 clp-R2 扩增出长约 1 kb 的 clp 上下游同源臂融合片段，而在野生株基因组中该对引物间的序列长达 33 kb，无法使用 PCR 扩增出特异性片段，这表明突变株构建成功(图 2)。

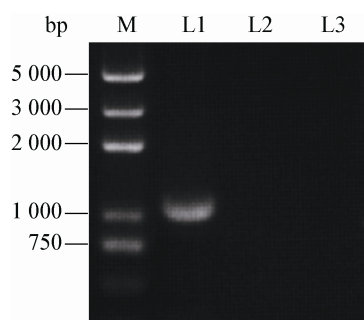


图2 菌株 HT66 $\Delta$ clp 的 PCR 验证图谱

Figure 2 Confirmation of strain HT66 $\Delta$ clp by PCR

注：引物对 clp-F1 和 clp-R2 扩增；L1：以菌株 HT66 $\Delta$ clp 的基因组为模板；L2：以菌株 HT66 的基因组为模板；L3：以 ddH<sub>2</sub>O 为模板；M：Marker。

Note: Amplification using primers clp-F1 and clp-R2; L1: Genome of strain HT66 $\Delta$ clp as the template; L2: Genome of strain HT66 as the template; L3: ddH<sub>2</sub>O as the template; M: Marker.

## 2.3 脂肽的质谱鉴定

将菌株 HT66 和 HT66 $\Delta$ clp 分别在 KB 培养基中发酵，取 24 h 发酵液抽提脂肽粗提物，以 UPLC/QTOF-MS 进行分析，结果如图 3 所示。当使用芳香环化合物的特征波长 254 nm 进行检测时，菌株 HT66 和 HT66 $\Delta$ clp 的脂肽分析谱图未发现明显差异(图 3 中 A1、A2)，说明该脂肽化合物不含芳香族氨基酸。当使用 210 nm 波长进行检测时，野生型在约 7.7 min 处有一吸收峰(图 3 中 B1)，而菌株 HT66 $\Delta$ clp 的分析谱图中无该峰(图 3 中 B2)，推断该物质为脂肽。此外，从基峰离子色谱图(BPI)则可明显发现，野生型在 7.7 min 处存在

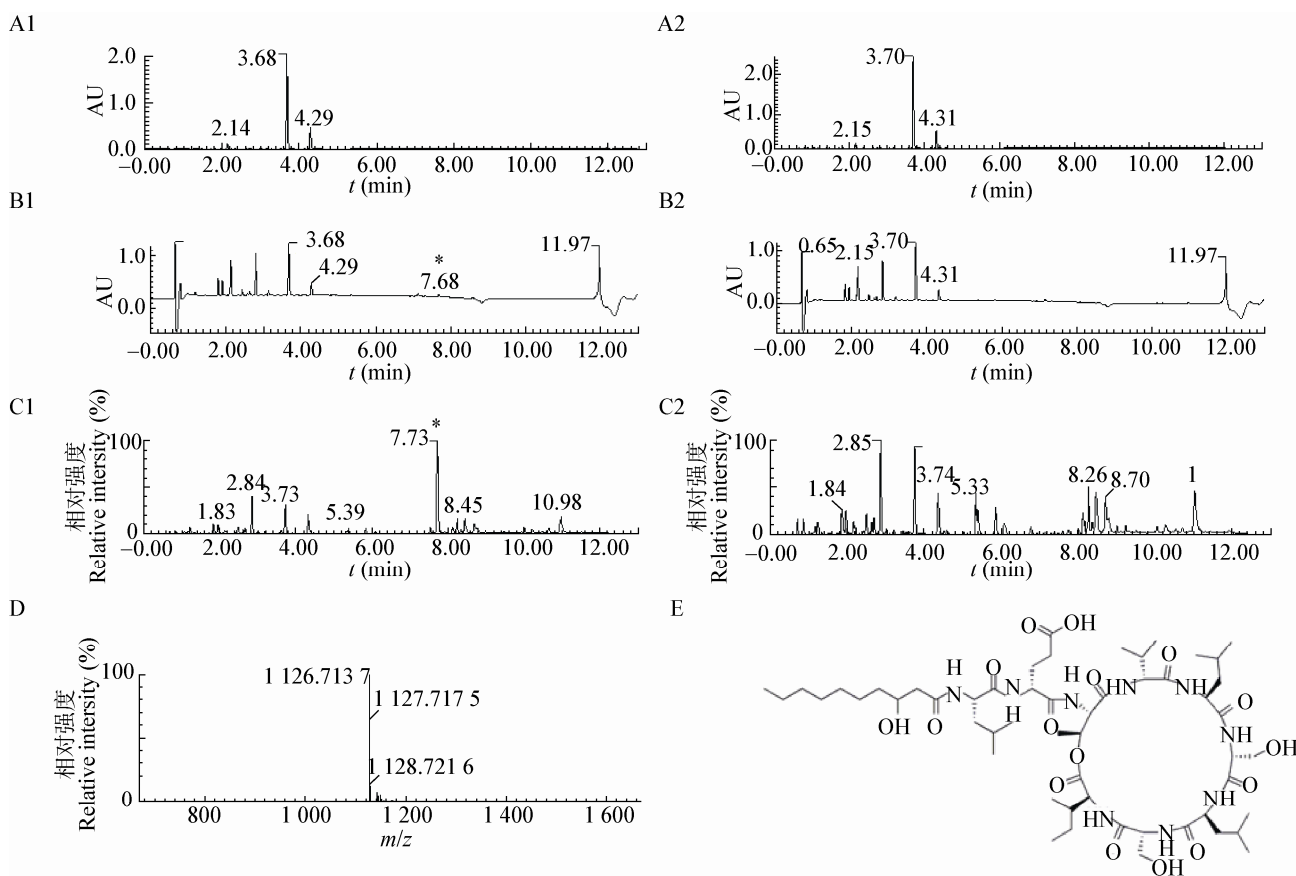


图3 脂肽的 UPLC/QTOF-MS 验证

Figure 3 Confirming of CLP by UPLC/QTOF-MS

注：A1、A2：分别为菌株 HT66 和 HT66 $\Delta$ clp 的脂肽粗提物在 254 nm 下的 UPLC 图；B1、B2：分别为菌株 HT66 和 HT66 $\Delta$ clp 的脂肽粗提物在 210 nm 下的 UPLC 图；C1、C2：分别为 HT66 和 HT66 $\Delta$ clp 的脂肽粗提物的基峰离子色谱图(BPI)；D：菌株 HT66 中脂肽产物的质谱图；E：Viscosin 的结构式。

Note: A1, A2: UPLC analysis of LP crude extracts of strain HT66 and HT66 $\Delta$ clp under 254 nm, respectively; B1, B2: UPLC analysis of LP crude extracts of strain HT66 and HT66 $\Delta$ clp under 210 nm, respectively; C1, C2: Base peak ion (BPI) chromatograms of LP crude extracts of strain HT66 and HT66 $\Delta$ clp, respectively; D: Mass spectrogram of the LP produced by strain HT66; E: Structure formula of viscosin.

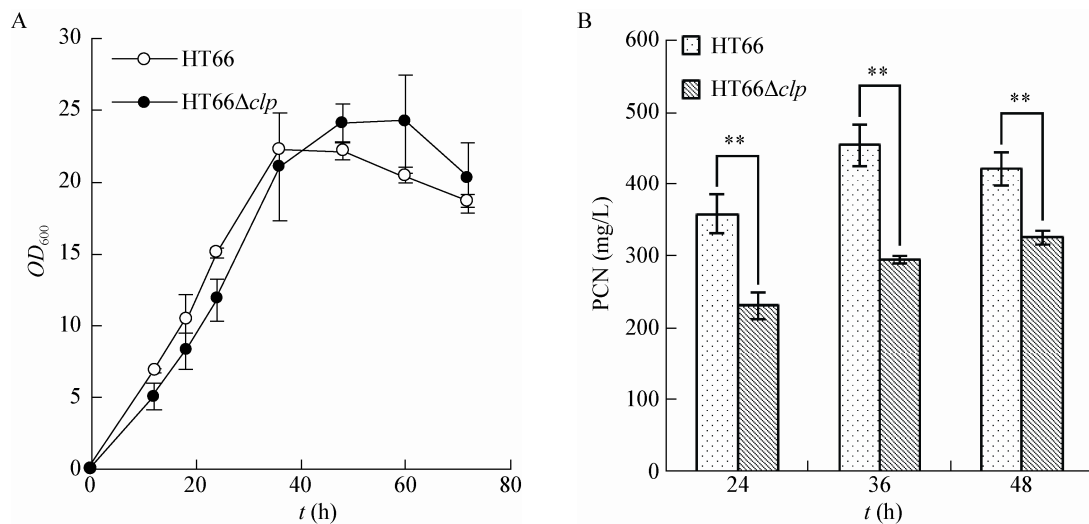


图4 脂肽对菌株 HT66 生长(A)和 PCN 合成(B)的影响

Figure 4 Effects of CLP on the growth (A) and PCN production (B) of strain HT66

注: \*:  $P < 0.05$ ; \*\*:  $P < 0.01$ . 下同.Note: \*:  $P < 0.05$ ; \*\*:  $P < 0.01$ . The same below.

一个较高的离子峰(图 3 中 C1), 而菌株 HT66Δclp 则没有该峰(图 3 中 C2), 说明其很可能是脂肽离子化后形成的离子峰。

提取该峰的质谱图(图 3 中 D)发现, 该物质最大丰度的质荷比( $[M+H]^+$ )为 1 126.713 7, 而根据数据库预测, 该产物的最大丰度质荷比( $[M+H]^+$ )应为 1 126.70 (100%), 其次为 1 127.70 (64.0%) 和 1 128.71 (19.0%), 与文献报道 Viscosin 的质谱信息相符合<sup>[8]</sup>(图 3 中 E), 表明菌株 HT66 合成的脂肽物质应为 Viscosin。

#### 2.4 脂肽对菌株 HT66 生物学功能的影响

将菌株 HT66 和 HT66Δclp 在相同条件下培养, 分别测定其生长曲线(图 4A)和 PCN 产量(图 4B)。可见, 脂肽合成基因缺失后, 菌株 HT66 的生长没有明显差异, 但稳定期菌体量更高。此外, 脂肽缺失后, PCN 合成量显著减少, 在 48 h 时约减少 22.7%。

为考察脂肽对菌株 HT66 生物膜形成的影响, 以新鲜培养基作为对照, 测定菌株 HT66 和 HT66Δclp 的生物膜形成能力, 结果如图 5 所示。相比野生型, 敲除脂肽合成基因簇后, 菌株

HT66 生物膜形成量大幅减少, 约为野生型的 49.3%。

在运动性平板上检测菌株 HT66 和 HT66Δclp 的群集运动情况, 结果如图 6 所示。可见二者菌苔形态类似, 均呈现分枝状, 并带有晕圈, 但脂肽缺失后, 运动半径减小, 表明菌株 HT66 群集运动能力明显下降。

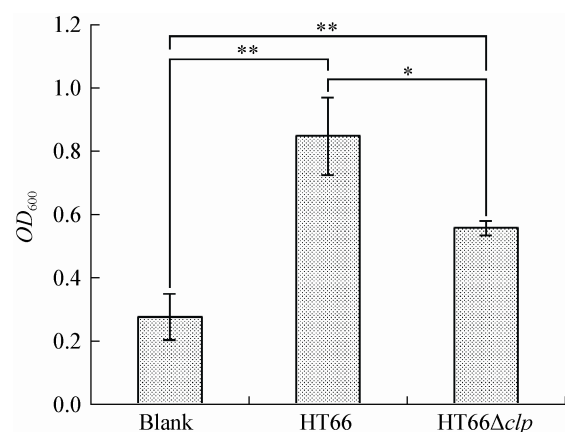


图5 脂肽对菌株 HT66 生物膜形成的影响

Figure 5 Effect of CLP on the biofilm formation of strain HT66



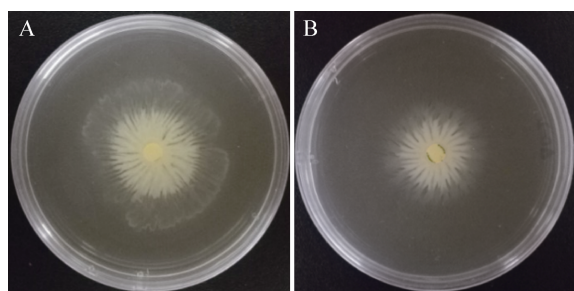


图 6 脂肽对菌株 HT66 群集运动性的影响

Figure 6 Effect of CLP on the swarming motility of strain HT66

Note: A: HT66; B: HT66 $\Delta$ clp.

### 3 讨论

本文通过生物信息学手段推测脂肽产物为 Viscosin, 然后通过无痕敲除构建菌株 HT66 的脂肽合成基因簇缺失株 HT66 $\Delta$ clp, 对比突变株与野生株的 UPLC/QTOF-MS 信息, 认为该菌株的脂肽产物为 Viscosin。

Viscosin 最初由 Kochi 等在 1951 年分离于 *P. viscosa* 菌株并公布了结构<sup>[18]</sup>, 该物质具有良好的抗病毒能力, 可保护胚卵免受支气管病毒感染, 并能抑制小鼠中甲型流感病毒感染<sup>[19]</sup>。1971 年, Hiramoto 等修正了该物质的结构<sup>[20]</sup>。Viscosin 的结构为 FA( $\beta$ -OH)-L-Leu-D-Glu-D-allo-Thr-D-Val-L-Leu-D-Ser-L-Leu-D-Ser-L-Ile<sup>[3,5,9]</sup>, 分子式为 C<sub>54</sub>H<sub>95</sub>N<sub>9</sub>O<sub>16</sub>, 分子量为 1 126.38, 表面张力为 26.5 mN/m, 临界胶束浓度 (Critical micell concentration) 为 0.15 g/L<sup>[21]</sup>。除 *P. fluorescens* BBc6R8 外, *P. fluorescens* SBW25<sup>[22]</sup>、A7B<sup>[23]</sup>、*P. libanensis* M9-3<sup>[24]</sup>等菌株均可合成该物质。

脂肽不仅是假单胞菌的重要代谢产物, 对细菌的代谢和表型也具有调控作用, 但是脂肽对假单胞菌生长和吩嗪合成的影响未见报道。因此, 我们研究了该产物对菌株 HT66 生长、PCN 合成、生物膜形成和群集运动性的影响。研究发现, 脂肽对菌株 HT66 生长的影响不显著, 但脂肽合成基因缺失后, PCN 产量显著下降, 说明脂肽对假单胞菌次级代谢产物合成具有重要的调控作用, 其

机理可能在于脂肽可改变产物在培养基中的溶解度, 以及改变培养基的表面张力, 从而影响细菌代谢。

脂肽对不同假单胞菌生物膜的影响各异<sup>[9]</sup>。如 *P. putida* PCL1445、267 缺失 Putisolvin<sup>[9,25]</sup>、*Pseudomonas* sp. MIS38 缺失 Arthrfactin<sup>[17]</sup>会导致生物膜水平提高, *P. protegens* Pf-5 缺失 Orfamide<sup>[7]</sup>不会对生物膜形成造成明显影响, 而 *P. fluorescens* SS101 缺失 Massetolide A<sup>[9,26]</sup>、*P. fluorescens* SBW25 缺失 Viscosin<sup>[8]</sup>则会导致生物膜水平下降。生物膜对细菌生存和功能具有重要意义, 如在条件致病菌铜绿假单胞菌 PAO1 中, 生物膜与细菌毒性有重要关联, 且高强度的生物膜是细菌耐药的主要因素<sup>[27]</sup>。敲除菌株 HT66 的脂肽合成基因后, 生物膜量降低, 这一结果可以扩充人们对脂肽乃至生物表面活性剂对假单胞菌生物膜形成影响的认知。

脂肽对假单胞菌的运动有促进作用, 如 *P. protegens* Pf-5 缺失 Orfamide<sup>[7,28]</sup>、*P. putida* PCL1445 缺失 Putisolvin<sup>[25]</sup>会导致细菌运动能力下降, *P. fluorescens* SS101 缺失 Massetolide A<sup>[26]</sup>、*P. fluorescens* SBW25 缺失 Viscosin<sup>[8]</sup>, *Pseudomonas* sp. MIS38 缺失 Arthrfactin<sup>[17]</sup>、*P. syringae* pv. *tomato* DC3000 缺失 Syringafactin<sup>[29]</sup>则会导致细菌运动能力丧失。这些结果表明, 脂肽类生物表面活性剂可改变物体表面黏度, 促进菌体运动, 对菌株在自然环境中的生存至关重要。在菌株 HT66 中, 脂肽对菌体运动同样具有明显的促进作用。

本研究首次在绿针假单胞菌 HT66 中鉴定了脂肽产物 Viscosin 的结构并对其进行了功能验证, 对了解菌株 HT66 的生防功能和研究绿针假单胞菌脂肽产物的合成与调控具有重要意义, 同时可丰富我们对脂肽生物学功能的认识。由于 Viscosin 具有一定的生理和临床研究价值, 本研究也为其应用和开发提供了参考。

### 参 考 文 献

[1] D'aes J, Kieu NP, Leclerc V, et al. To settle or to move? The



- interplay between two classes of cyclic lipopeptides in the biocontrol strain *Pseudomonas* CMR12a[J]. *Environmental Microbiology*, 2014, 16(7): 2282-2300
- [2] Loper JE, Gross H. Genomic analysis of antifungal metabolite production by *Pseudomonas fluorescens* Pf-5[J]. *European Journal of Plant Pathology*, 2007, 119(3): 265-278
- [3] Raaijmakers JM, Bruijn ID, Kock MJDD. Cyclic lipopeptide production by plant-associated *Pseudomonas* spp.: diversity, activity, biosynthesis, and regulation[J]. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2006, 19(7): 699-710
- [4] Humphries RM, Pollett S, Sakoulas G. A current perspective on daptomycin for the clinical microbiologist[J]. *Clinical Microbiology Reviews*, 2013, 26(4): 759-780
- [5] Roongsawang N, Washio K, Morikawa M. Diversity of nonribosomal peptide synthetases involved in the biosynthesis of lipopeptide biosurfactants[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2010, 12(1): 141-172
- [6] Scholz-Schroeder BK, Soule JD, Gross DC. The *sypA*, *sypB*, and *sypC* synthetase genes encode twenty-two modules involved in the nonribosomal peptide synthesis of syringopeptin by *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* B301D[J]. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2003, 16(4): 271-280
- [7] Gross H, Stockwell VO, Henkels MD, et al. The genomisotopic approach: a systematic method to isolate products of orphan biosynthetic gene clusters[J]. *Chemistry & Biology*, 2007, 14(1): 53-63
- [8] de Bruijn I, de Kock MJ, Yang M, et al. Genome-based discovery, structure prediction and functional analysis of cyclic lipopeptide antibiotics in *Pseudomonas* species[J]. *Molecular Microbiology*, 2007, 63(2): 417-428
- [9] Raaijmakers JM, de Bruijn I, Nybroe O, et al. Natural functions of lipopeptides from *Bacillus* and *Pseudomonas*: more than surfactants and antibiotics[J]. *FEMS Microbiology Reviews*, 2010, 34(6): 1037-1062
- [10] Chen YW, Shen XM, Peng HS, et al. Comparative genomic analysis and phenazine production of *Pseudomonas chlororaphis*, a plant growth-promoting rhizobacterium[J]. *Genomics Data*, 2015, 4: 33-42
- [11] Schäfer A, Tauch A, Jäger W, et al. Small mobilizable multi-purpose cloning vectors derived from the *Escherichia coli* plasmids pK18 and pK19: selection of defined deletions in the chromosome of *Corynebacterium glutamicum*[J]. *Gene*, 1994, 145(1): 69-73
- [12] Du XL, Li YQ, Zhou WP, et al. Phenazine-1-carboxylic acid production in a chromosomally non-scar triple-deleted mutant *Pseudomonas aeruginosa* using statistical experimental designs to optimize yield[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2013, 97(17): 7767-7778
- [13] Smyth TJ, Rudden M, Tsaousi K, et al. Protocols for the isolation and analysis of lipopeptides and bioemulsifiers[A]//Springer Protocols Handbooks[M]. New York: Humana Press, 2014: 1-26
- [14] Tan J, Xiong X, Liang WL, et al. Breeding of a phenazine-1-carboxamid-producing strain by ARTP mutation and its optimization of fermentation[J]. *Biotechnology Bulletin*, 2016, 32(1): 174-179 (in Chinese)
- 谭剑, 熊欣, 梁万利, 等. ARTP 技术选育吩嗪-1-甲酰胺高产菌株及发酵优化[J]. *生物技术通报*, 2016, 32(1): 174-179
- [15] Selin C, Fernando WD, de Kievit T. The PhzI/PhzR quorum-sensing system is required for pyrrolnitrin and phenazine production, and exhibits cross-regulation with RpoS in *Pseudomonas chlororaphis* PA23[J]. *Microbiology*, 2012, 158(4): 896-907
- [16] 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
- [17] Roongsawang N, Hase KI, Haruki M, et al. Cloning and characterization of the gene cluster encoding arthrofacin synthetase from *Pseudomonas* sp. MIS38[J]. *Chemistry & Biology*, 2003, 10(9): 869-880
- [18] Kochi M, Weiss D, Pugh L, et al. Viscosin, a new antibiotic[J]. *Bacteriological Proceedings*, 1951(1): 29-30
- [19] Groupé V, Pugh LH, Weiss D, et al. Observations on antiviral activity of viscosin[J]. *Experimental Biology and Medicine*, 1951, 78(1): 354-358
- [20] Hiramoto M, Okada K, Nagai S. The revised structure of viscosin, a peptide antibiotic[J]. *Tetrahedron Letters*, 1970, 11(13): 1087-1090
- [21] Neu TR, Härtner T, Poralla K. Surface active properties of viscosin: a peptidolipid antibiotic[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 1990, 32(5): 518-520
- [22] de Bruijn I, Raaijmakers JM. Diversity and functional analysis of LuxR-type transcriptional regulators of cyclic lipopeptide biosynthesis in *Pseudomonas fluorescens*[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2009, 75(14): 4753-4761
- [23] Braun PG, Hildebrand PD, Ellis TC, et al. Evidence and characterization of a gene cluster required for the production of viscosin, a lipopeptide biosurfactant, by a strain of *Pseudomonas fluorescens*[J]. *Canadian Journal of Microbiology*, 2001, 47(4): 294-301
- [24] Saini HS, Barragán-Huerta BE, Lebrón-Paler A, et al. Efficient purification of the biosurfactant viscosin from *Pseudomonas libanensis* strain M9-3 and its physicochemical and biological properties[J]. *Journal of Natural Products*, 2008, 71(6): 1011-1015
- [25] Kuiper I, Lagendijk EL, Pickford R, et al. Characterization of two *Pseudomonas putida* lipopeptide biosurfactants, putisolvin I and II, which inhibit biofilm formation and break down existing biofilms[J]. *Molecular Microbiology*, 2004, 51(1): 97-113
- [26] de Bruijn I, de Kock MJD, de Waard P, et al. Massetolide A biosynthesis in *Pseudomonas fluorescens*[J]. *Journal of Bacteriology*, 2008, 190(8): 2777-2789
- [27] Rasamiravaka T, Vandeputte OM, Pottier L, et al. *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation and persistence, along with the production of quorum sensing-dependent virulence factors, are disrupted by a triterpenoid coumarate ester isolated from *Dalbergia trichocarpa*, a tropical legume[J]. *PLoS One*, 2015, 10(7): e0132791
- [28] Hassan KA, Johnson A, Shaffer BT, et al. Inactivation of the GacA response regulator in *Pseudomonas fluorescens* Pf-5 has far-reaching transcriptomic consequences[J]. *Environmental Microbiology*, 2010, 12(4): 899-915
- [29] Berti AD, Greve NJ, Christensen QH, et al. Identification of a biosynthetic gene cluster and the six associated lipopeptides involved in swarming motility of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000[J]. *Journal of Bacteriology*, 2007, 189(17): 6312-6323