

# 铜绿假单胞菌蹭行运动相关基因的研究

单志英 徐海津 施兴启 乔明强\* 高才昌

(南开大学生命科学学院 天津 300071)

**摘 要** 应用 Mu 转座重组技术研究铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*) 蹭行运动(Twitching motility) 的相关基因。通过转座突变、表型筛选, 得到 8 个 Twitching motility 缺陷或减弱的突变子。经过基因克隆、核苷酸测序研究, 鉴定转座子插入到基因组中的位置。结果表明, 在其中 4 个突变子中, 转座子分别插入到与 IV 型菌毛生物合成和功能相关的 3 个已知基因中(其中有两个突变子转座子插入到同一基因的不同位置), 它们是 *pilV*, *pilQ*, *algR*。另外 4 个突变子中, 有 3 个是转座子分别插入到基因 *pilL* 基因的前端、中部和后端, 均引起 Twitching motility 功能缺失。另一个突变子中, 转座子插入到基因 PA1821 中, 引起 Twitching motility 功能减弱。*PilL* 和 PA1821 的编码产物均属于 3-类蛋白质, 它们的功能是根据其保守的氨基酸基序或基因序列与已知功能基因的相似性推测得出的。但缺乏详细的试验证据。研究结果为 *pilL* 控制 Twitching motility 提供了有力的证据。并证实基因 PA1821 与 Twitching motility 有关。将 Mu 转座重组技术应用到假单胞菌的研究中, 国内外均未见报道。由于该技术具有随机单点插入的优点, 克服了传统转座子能在染色体上迁移的缺点。保证了表型的改变与转座子插入位点的基因突变的一一对应关系。为进一步研究铜绿假单胞菌 Twitching motility 的分子机制奠定基础。

**关键词** 铜绿假单胞菌, Mu 转座重组技术, 蹭行运动

中图分类号: Q75 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209(2004)03-0319-05

铜绿假单胞菌是一种重要的条件致病菌, 常在临床上引起顽固性、难治性感染, 成为临床治疗的一大棘手问题<sup>[1]</sup>。

蹭行运动(Twitching motility) 是由细菌 IV 型菌毛介导的一种运动。IV 型菌毛是位于铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*) 等细菌细胞端部的纤毛, 它介导细菌吸附到宿主的上皮细胞, 并通过自身的收缩和伸展而使细菌在上皮组织或固相表面产生位置移动<sup>[1,2]</sup>, 这种运动称为 Twitching motility。IV 型菌毛是由单一基因 *pilA* 的编码产物形成的多聚体<sup>[3]</sup>, 但其组装及功能则需多个基因共同参与, 目前有一些环节尚不清楚。研究已经证实, IV 型菌毛及 Twitching motility 是 *P. aeruginosa* 重要的致病因子, 丧失 Twitching motility 或 IV 型菌毛缺失的突变子感染性丧失或减弱<sup>[4]</sup>。Twitching motility 还参与了生物被膜的形成<sup>[5]</sup>, 而形成生物被膜则是铜绿假单胞菌引起难治性感染的最主要的根源<sup>[6]</sup>。因此, 研究参与 Twitching motility 的相关基因, 揭示 Twitching motility 的分子机制, 对于设计相应的药物抑制生物被膜

的形成, 解决由 *P. aeruginosa* 引起的难治性感染, 有其重要的意义。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 菌种** *P. aeruginosa* PA68 是从一支气管扩张患者送检的痰中分离所得, 经美国全自动微生物分析仪 VITEK-IMS60 鉴定为 *P. aeruginosa*。微量肉汤稀释法测定其对卡那霉素敏感(MIC = 0.25 μg/mL)。大肠杆菌(*Escherichia coli*) DH5α 为本实验室保存菌种。

**1.1.2 人工 Mu 转座子、MuA 转座酶** 均为芬兰赫尔辛基大学 Savilähti 博士惠赠。

**1.1.3 试剂** 氨卞青霉素、卡那霉素购自华美生物制品公司, 胰蛋白胨、琼脂粉(Granulated agar)为 Difco 公司产品, 酵母膏(Yeast extract)为 Oxoid 公司产品。小肠碱性磷酸酶、T4 连接酶、限制性内切酶 *Bam*H I、分子量标准 DL2000, DL15000 为 TaKaRa 公司产品。其它试剂均为国产分析纯。

基金项目 国家自然科学基金资助(30270075)

\* 通讯作者。Tel 86-22-23503340; E-mail: mingqiangqiao@yahoo.com.cn

作者简介 单志英(1963-), 女, 辽宁丹东人, 副研究员, 博士。研究方向为分子遗传学。E-mail: zhiyingshan@163.com

其他作者 遇言, 张秀明, 白艳玲

收稿日期 2000-08-15, 修回日期 2003-10-20

**1.1.4 仪器** Micro pulser 电转化仪为 Bio-Rad 公司产品。HITACHI 20PR-52D 高速冷冻离心机为日立公司产品。752 分光光度计为上海分析仪器厂产品。

## 1.2 Mu 转座复合物的制备及检测

参照文献[7], 25  $\mu$ L Mu 转座复合物体系内含 1.1 pmol 人工 Mu 转座子 DNA, 4.9 pmol MuA 转座酶, 150 mmol/L Tris-HCl (pH 6.0), 50% (W/V) 甘油, 0.025% (W/V) Triton X-100, 150 mmol/L NaCl, 0.1 mmol/L EDTA。在 30℃ 水浴中, 反应 2h。取出 5  $\mu$ L 用新配制的含 87  $\mu$ g/mL BSA, 87  $\mu$ g/mL 肝素的 2% 琼脂糖凝胶电泳, 4V/cm 电压, 电泳 2.5h。紫外灯下观察结果。

## 1.3 感受态细胞的制备及电转化

将过夜培养的 *P. aeruginosa* PA68 按 1% 接种量接种到 L-broth 培养基中, 37℃, 200r/min 振荡培养。至  $OD_{540}$  为 0.5 ~ 0.6 时收集细胞, 使用 RPR16-419 转子, 在 2℃ 条件下, 7000r/min 离心 10min 收集菌体。然后, 依次用等体积、1/2 体积、1/5 体积在冰浴中预冷的 300 mmol/L 蔗糖溶液重新悬浮、洗涤菌体, 2℃, 7000r/min 离心 10min。将菌体用 300 mmol/L 蔗糖溶液混匀, 制备成浓度为  $10^{11}$  cells/mL 的感受态细胞。将 100  $\mu$ L 感受态细胞与 1  $\mu$ L MuA 转座复合物混匀。加入预冷的 0.2 cm 电转化杯中(阴性对照只加感受态细胞不加 MuA 转座复合物), 在 Bio-Rad 电转化仪上, 设置电容 25  $\mu$ F, 电阻 200  $\Omega$ , 电压 2.6 kV 进行电击, 将转化混和液取出, 加入到 37℃ 温浴的 900  $\mu$ L L-broth 培养基中, 37℃, 225r/min 复苏 1h。将菌液涂布在含 50  $\mu$ g/mL 的卡那霉素的 L-broth 筛选平板上。37℃ 过夜培养。筛选转化子。

## 1.4 Twitching motility 的检测

参照文献[8], 在塑料培养皿内铺上薄薄的一层 Twitching motility 培养基( L-Broth 培养基含 1% Granulated agar ), 将 Mu 转座后得到的转化子在 LB 琼脂培养基上活化过夜, 用牙签取单菌落, 扎透 Twitching motility 培养基, 使细菌接种到培养基下面的塑料平皿上, 37℃ 培养 24h。细胞就会依赖 IV 型菌毛的收缩和伸展在培养基与塑料平皿之间蔓延生长, 留下圆形的菌晕。将培养基轻轻揭去, 用考马司亮蓝染色, 观察 Twitching motility 产生的环。筛选 Twitching motility 丧失或减弱的突变子。

## 1.5 基因克隆和测序

按文献[9]方法提取 pUC19 质粒及突变子的基因组 DNA, 并用限制性内切酶 *Bam*H I 酶切, pUC19 的酶切产物用小肠碱性磷酸酶脱磷, 在 T4 连接酶作

用下, 将 *Bam*H I 酶切后的突变子基因组 DNA 与 pUC19 连接。取 2  $\mu$ L 连接产物电转化入 *E. coli* DH5 $\alpha$  中。用双抗培养基( Km 30  $\mu$ g/mL, Amp 100  $\mu$ g/mL) 筛选重组子。将重组子提取质粒进行检测。并以转座子两端的反向序列做引物, 测定转座子插入位点侧翼的核苷酸序列。测序引物为 primer1: 5'-GCAACTGTCCATACTCTGA-3', primer2: 5'-CGCTGGG-TTTATCGTCGA-3'。引物合成及测序反应均委托上海生工生物工程技术服务有限公司完成。

## 2 结果

### 2.1 MuA 转座复合物的检测

人工 Mu 转座子是由 Mu 两端的重复序列, 中间携带一个卡那霉素抗性基因(用于筛选重组子)而组成的, 人工 Mu 转座子与 MuA 转座酶在 30℃ 水浴中反应 2h 后, 转座酶四聚体与人工 Mu 转座子结合形成了稳定的结构, 即转座复合物。结果见图 1。由于反应液中不含镁离子, 得到的转座复合物没有转座活性。

通过电转化将转座复合物导入受体细胞中。在细胞内镁离子的作用下, 转座子 DNA 随机地插入到受体菌基因组中<sup>[7]</sup>, 引起插入位点基因的失活和相应表型的改变, 可以直接而有效地筛选出与功能相关的所有基因群。

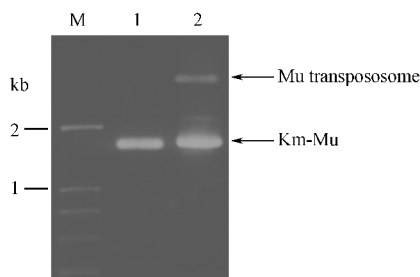


图 1 Mu 转座复合物的检测

Fig.1 Mu transposition complexes formation with Km-Mu and MuA transposase analyzed by agarose gel electrophoresis

M. DNA marker; 1. Km-Mu; 2. MuA transposome.

### 2.2 Twitching motility 的检测

从 Mu 转座复合物电转化 *P. aeruginosa* PA68 得到的转化子中筛选出 8 株 Twitching motility 缺陷或减弱的突变子。由图 2 可见, *P. aeruginosa* PA68 有一个大的圆环, 这是细菌由于 Twitching motility 留下的轨迹。L11 有较弱的运动能力, 其余菌株无。说明 Mu 转座子的插入引起它们的 Twitching motility 功能缺陷。

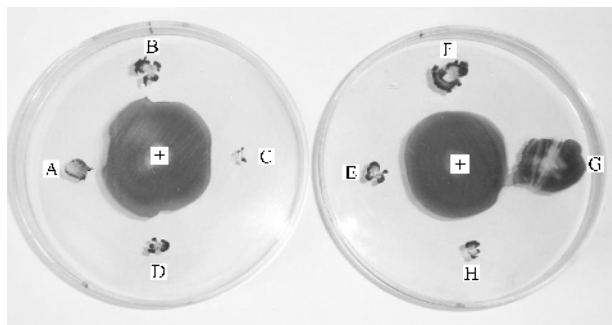


图2 Twitching motility 的检测

Fig.2 Twitching motility assay

+ :Wide-type PA68 ; A-H : Twitching motility deficient mutant A13 , E20 , E123 , F9 , F57 , C68 , L11 , L16 respectively .

### 2.3 Mu 转座子插入位置两侧序列的克隆

按材料方法 1.2.4 将 Mu 转座子及其侧翼的宿主基因组序列克隆到质粒 pUC19 的 *Bam*H I 位点中 通过抗性筛选、得到重组子。提取重组子的质粒 并用限制性内切酶 *Bam*H I 酶切检测。所有的转化子均含有质粒 ,分子量大小不一 ,经 *Bam*H I 酶切后 ,得到约 2.7kb 的 pUC19 线性带和大小不一 ,条数不同的外源片段。

### 2.4 转座子插入位点侧翼的核苷酸测序结果和序列分析

对 8 个 Twitching motility 缺陷的突变子转座子插入位点两侧的基因组序列进行核苷酸测序 ,对每个突变子做了两个测序反应。每个反应测出约 600bp 的核苷酸序列。测序结果在铜绿假单胞菌 PAO<sub>1</sub> 的基因组数据库( [www.pseudomonas.com](http://www.pseudomonas.com) )或 GenBank 的 BLAST 中进行序列比对 ,结果表明 ,所测序的 PA2002068 的序列与 *P. aeruginosa* 标准株 PAO1 基因组的相应序列一致性( Identities )达 97% ~ 99%。在 8 个突变子中 ,转座子分别插入到 5 个不同基因内部。Mu 转座导致了插入位点两侧 5 个核苷酸的复制 ,成为 Mu 转座子插入位点的标记(表 1)。其中 ,*pilQ* , *pilV* , *algR* 3 个基因均为与 IV 型菌毛生物合成及功能有关的基因。它们所编码蛋白质的功能已在 *P. aeruginosa* 中得到试验证实 ,属于 1 类蛋白。而 *pilL* 和 PA1821 的编码产物属于 3 类蛋白质 ,*pilL* 可能编码趋化作用信号传导系统的一个组分 ;PA1821 可能编码烯酰辅酶 A 水合酶/异构酶 (表 2)。

表 1 转座子整合位置及靶位点的复制

| Table 1 Transposon integration sites and target site duplications |   |                                     |                               |               |         |
|---|---|-------------------------------------|-------------------------------|---------------|---------|
| Mutant  | Sequence <sup>a</sup>                   | Transposon orientation <sup>b</sup> | Genetic location <sup>c</sup> |               |         |
|   |   |                                     | Gene                          | Coordinates   | Section |
| A13 :Mu   | ggcccccggccGAGCC( Km-Mu )GAGCCggcctgtcc | -                                   | <i>pilL</i>                   | 7470 - 7474   | 39      |
| E123 :Mu  | ccgtgcgcgcGCCG( Km-Mu )GCCGCgtgtctatac  | +                                   | <i>pilQ</i>                   | 5479 - 5483   | 478     |
| E20 :Mu   | ccagcgcgttGCGGT( Km-Mu )GCGGTggatgcgcac | +                                   | <i>algR</i>                   | 6561 - 6565   | 499     |
| F57 :Mu   | ggaaggccgcCTGG( Km-Mu )CTGGCggtcagcccg  | +                                   | <i>pilL</i>                   | 9540 - 9544   | 39      |
| F9 :Mu  | gtatagccacGCCG( Km-Mu )GCGGCgacggctcg   | +                                   | <i>pilQ</i>                   | 5479 - 5483   | 478     |
| C68 :Mu   | cccgctggaaATGGA( Km-Mu )ATGGAaccgtattcg | -                                   | <i>pilL</i>                   | 11572 - 11577 | 39      |
| L11 :Mu   | cgacctgcggGTGG( Km-Mu )GTGGCgatggccgcg  | +                                   | PA1821                        | 9676 - 9680   | 169     |
| L16 :Mu   | ccgcgcacagCAGCC( Km-Mu )CAGCCgcgacacctc | +                                   | <i>pilV</i>                   | 1719 - 1723   | 430     |

<sup>a</sup>( Km-Mu )means mini-Mu transposon with kanamycin resistance gene. Target site duplications are in boldface capital letters ;<sup>b</sup>Compared to the genomic sequences shown ,the transcription from the transposon proceeds from left to right ( + )or from right to left ( - ) ;<sup>c</sup>Genetic locations were determined by comparison to the PAO1 complete genome .

## 3 讨论

Twitching motility 介导了细菌在宿主体内定植并激活宿主的免疫应答反应 ,引起机体发病<sup>[10~13]</sup> ;同时还 在生物被膜的形成过程中起着至关重要的作用<sup>[5,6,8]</sup>。生物被膜一旦形成 ,被膜深层细菌对抗生素的抗性最高可达浮游细菌的 1000 倍<sup>[14]</sup> ,且被膜内部向周围环境缓慢释放浮游菌 ,引起反复性、难治性

感染。当 Twitching motility 丧失时 ,*P. aeruginosa* 则不能启动生物被膜的形成<sup>[5]</sup>。

目前已经证实 ,几乎有 40 个基因的表达参与了 *P. aeruginosa* 的 Twitching motility。这些基因有的参与 IV 型菌毛的生物合成和功能 ,有的参与转录调节和化学感受途径 ,控制 Twitching motility 系统的表达或活动<sup>[12,15,16,17]</sup>。但控制 Twitching motility 的信号传导方面仍存在许多未知的领域需要探索<sup>[12]</sup>。

表 2 突变基因及其所编码的蛋白质  
Table 2 Genes inactivated and putative proteins

| Mutant   | Gene          | Protein name confidence | Amino acids | Product  |
|----------|---------------|-------------------------|-------------|--|
| A13 :Mu  | <i>pilL</i>   | class 3                 | 2472        | Probable component of chemotactic signal transduction system     |
| E123 :Mu | <i>pilQ</i>   | class 1                 | 714         | Type 4 fimbrial biogenesis outer membrane protein PilQ precursor |
| E20 :Mu  | <i>algR</i>   | class 1                 | 247         | Alginate biosynthesis regulatory protein AlgR                    |
| F57 :Mu  | <i>pilL</i>   | class 3                 | 2472        | Probable component of chemotactic signal transduction system     |
| F9 :Mu   | <i>pilQ</i>   | class 1                 | 719         | Type 4 fimbrial biogenesis outer membrane protein PilQ precursor |
| C68 :Mu  | <i>PilL</i>   | class 3                 | 2472        | Probable component of chemotactic signal transduction system     |
| L11 :Mu  | <i>PA1821</i> | class 3                 | 270         | Probable enoyl-CoA hydratase/isomerase                           |
| L16 :Mu  | <i>pilV</i>   | class 1                 | 185         | Type 4 fimbrial biogenesis protein PilV                          |

Class1 :Function experimentally demonstrated in *P. aeruginosa* ; Class 2 :Function of highly similar gene experimentally demonstrated in another organism ( and gene context consistent in terms of pathways its involved in , if known ) ; Class 3 :Function proposed based on presence of conserved amino acid motif , structural feature or limited sequence similarity to an experimentally studied gene.

本文应用 Mu 转座重组技术 ,从反向遗传学的角度 ,研究与 Twitching motility 有关的基因。Mu 转座重组技术具有体外组装、体内重组的特点 ,与过去许多转座子工具不同的是 ,人工 Mu 转座子 DNA 不编码转座酶 ,它是在体外与纯化的 Mu 转座酶形成复合物 ,再通过电转移进入细菌细胞 ,进而与受体菌发生重组。在外源转座酶很快被降解而又无新的转座酶产生的情况下 ,就保证了转座子插入的单一性并且避免了转座子在基因上的迁移<sup>[7]</sup>。通过筛选 Twitching motility 缺陷型突变子 ,进而通过基因克隆、遗传互补等实验 ,必将发掘出一批未知的、与 Twitching motility 功能相关的新基因 ,将此技术应用到 *P. aeruginosa* 的研究中 ,国内外尚未见报道。

*P. aeruginosa* PAO1 全基因组测序的完成<sup>[18]</sup>为研究 *P. aeruginosa* 的功能基因组提供了信息平台。用生物信息学的方法分析 PAO1 的基因组序列 ,推测有一些功能未知的基因可能与 Twitching motility 有关<sup>[19]</sup> ,但缺乏详细的试验证据 ,如 PA0413 就是这样一个基因。根据 GenBank 的 BLAST 分析结果 ,突变子 A13 :Mu ,F57 :Mu 及 C68 :Mu 的转座子分别插入到 *P. aeruginosa* 基因组中第 39 节 PA0413 基因的内部 ,插入的位点分别为 39 节中第 7470 ,9540 ,11572 个核苷酸处 ,PA0413 是一个从此节第 5766 到 13184 个核苷酸组成的具有 7419 个核苷酸的大基因 ,一个 IV 型菌毛生物合成基因簇 *pilGHIJK* 位于这个基因的上游 ,几个控制细菌运动的趋化作用组分 *chpBCDE* 位于该基因的下游。通过 *Pseudomonas aeruginosa* Community Annotation Project ( PseudoCAP ) ( <http://www.pseudomonas.com/GenomeSearchU.asp> ) 的

数据库来对 PA0413 进行分析 ,其编码产物 PilL 是一个有多个结构域的蛋白质 ,既有菌毛合成蛋白的结构特征 ,又有趋化蛋白的结构特征 ,因此该基因又叫做 *pilL* 或 *chpA* ,可能的功能是参与运动和吸附、趋化作用和参与双组分调节系统。因此 ,*pilL* 很可能与上游和下游的基因共同组成了 *P. aeruginosa* 的一个趋化作用信号传导系统( *pilGHIJKL-chpABC-DE* )控制 IV 型菌毛的运动<sup>[12 ,19]</sup>。但由于 *pilL* 基因太大 ,很难用常规方法进行研究 ,因而缺乏详细的试验证据。本试验中 ,转座子分别插入到 *pilL* 基因的前端、中部和后端 3 个不同位置 ,均引起 Twitching motility 的丧失 ,为该基因的表达控制 Twitching motility 提供了确凿的证据 ,但其通过何种方式参与 Twitching motility 的控制尚有待于进一步的研究。

根据 GenBank 的 BLAST 分析结果 ,在 L11 :Mu 中 Mu 插入 *P. aeruginosa* 的 169 节中第 9676 个核苷酸处 ,即基因 PA1821 的内部 ; PA1821 是该节从 8918 到 9730 个核苷酸组成的基因 ,其上游和下游均没有已知的参与 IV 型菌毛生物合成或控制 Twitching motility 的相关基因。通过 PseudoCAP 的数据库分析 ,发现 PA1821 的编码产物仅与 *Rattus norvegicus* 中的过氧化物烯酰水合酶具有 68% 的相似性 ,目前未见任何报道证实其与 Twitching motility 有关。由于转座子插入到这个基因的尾部 ,且其下游有连续 4 个功能完全未知的基因。有可能该基因的突变通过极性效应影响了下游基因的表达。本实验室拟通过基因失活、遗传互补等技术对 PA0413 ,PA1821 控制 Twitching motility 的具体机制进行深入的研究。

## 参 考 文 献

- [ 1 ] Semmler A B T, Whitchurch C B, Leech J, *et al.* Identification of a novel gene, *fimV*, involved in twitching motility in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology*, 2002, **146**: 1321 – 1332.
- [ 2 ] Rashid M H, Rumbaugh K, Passador L, *et al.* Polyphosphate kinase is essential for biofilm development, quorum sensing, and virulence of *Pseudomonas aeruginosa*. *PNAS*, 2000, **97**: 9636 – 9641.
- [ 3 ] Bradelly D E. A function of *Pseudomonas aeruginosa* PAO pili: twitching motility. *Can J Microbiol*, 2000, **26**: 146 – 154.
- [ 4 ] Comolli J C, Hauser A R, Waite L, *et al.* *Pseudomonas aeruginosa* gene products *PilT* and *PilU* are required for cytotoxicity *in vitro* and virulence in a mouse model of acute pneumonia. *Infect Immune*, 1999, **67**: 3625 – 3630.
- [ 5 ] O'Toole G A, Kolter R. Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Mol Microbiol*, 1998, **30**: 295 – 304.
- [ 6 ] Costerton J W, Stewart P S, Greenberg E P. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infection. 1999, *Science*, **284**: 1318 – 1322.
- [ 7 ] Lamberg A, Nieminen S, Qiao M Q, *et al.* Efficient insertion mutagenesis strategy for bacterial genomes involving electroporation of *in vitro*-assembled DNA transposition complexes of bacteriophage Mu. *Appl Environ. Microbiol*, 2002, **68**: 705 – 712.
- [ 8 ] Rashid M H, Kornberg A. Inorganic polyphosphate is needed for swimming, swarming, and twitching motilities of *Pseudomonas aeruginosa*. *PANS*, 2000, **97**: 4885 – 4890.
- [ 9 ] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. 分子克隆实验指南. 金冬雁, 黎孟枫, 等译. 第二版. 北京: 科学出版社, 1998, 17 – 19.
- [ 10 ] Merz A J, So M. Interactions of pathogenic neisseriae with epithelial cell membranes. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2000, **16**: 423 – 457.
- [ 11 ] Kang P J, Hauser A R, Apodaca G, *et al.* Identification of *Pseudomonas aeruginosa* genes required for epithelial cell injury. *Mol Microbiol*, 1997, **24**: 1249 – 1262.
- [ 12 ] Mattick J S. Type IV pili and twitching motility. *Annu Rev Microbiol*, 2002, **56**: 289 – 314.
- [ 13 ] McBride M J. Bacterial gliding motility: multiple mechanisms for cell movement over surfaces. *Annu Rev Microbiol*, 2001, **55**: 49 – 75.
- [ 14 ] Thien-Fah C M, O'Toole G A. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trend Microbiol*, 2001, **9**: 34 – 38.
- [ 15 ] Alm A M, Mattick J S. Genes involved in the biogenesis and function of type-4 fimbriae in *Pseudomonas aeruginosa*. *Gene*, 1997, **192**: 89 – 98.
- [ 16 ] Beatson S A, Whitchurch C B, Sargent J L, *et al.* Differential regulation of twitching motility and elastase production by *Vfr* in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol*, 2002, **184**: 3605 – 3613.
- [ 17 ] Whitchurch C B, Alm R A, Mattick J S. The alginate regulator *AlgR* and an associated sensor *FimS* are required for twitching motility in *Pseudomonas aeruginosa*. *PANS*, 1996, **93**: 9839 – 9843.
- [ 18 ] Stover C K, Pham X Q, Erwin A L, *et al.* Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. *Nature*, 2000, **406**: 959 – 964.
- [ 19 ] Croft L, Beatson S A, Whitchurch C B, *et al.* An interactive web-based *Pseudomonas aeruginosa* genome database: discovery of new genes, pathways and structures. *Microbiology*, 2000, **146**: 2351 – 2364.

Study on Genes Involved in Twitching Motility of *Pseudomonas aeruginosa*

SHAN Zhi-Ying XU Hai-Jin SHI Xing-Qi QIAO Ming-Qiang\* GAO Cai-Chang

( College of Life Sciences, Nankai University, Tianjin 300071, China )

**Abstract:** *Pseudomonas aeruginosa* is an important opportunistic pathogen of humans. Twitching motility mediated by type IV pili plays an important role in the pathogenesis of this organism. In this paper, Mu transposition recombination technique was utilized to study a cluster of genes required for twitching motility of *P. aeruginosa*. Mu DNA transposition complexes were formed *in vitro*, and then were electroporated into *P. aeruginosa*. The complexes were integrated into bacterial genomes randomly resulting in gene inactivation and phenotypical change. Eight mutants deficient in twitching motility were obtained. Gene cloning and sequencing of the flanking region of the inserted artificial Mu transposon revealed that five genes cause loss of twitching motility. Among them, the function of gene *pilV*, *pilQ* and *algR* has been previously experimentally demonstrated in *P. aeruginosa*. They are required for biogenesis and function of type IV pili. Gene *pilL* (PA0413) encodes a probable component of a chemotactic signal transduction system. Its function was predicted according to its conserved amino acid motif. This result suggests that PA0413 is involved in regulation of twitching motility. PA1821 is also a class 3 gene, its putative product is enoyl-CoA hydratase/isomerase.

**Key words:** *Pseudomonas aeruginosa*, Mu transposition technique, Twitching motility

Foundation item: Chinese National Natural Science Foundation (30270075)

\* Corresponding author. Tel: 86-22-23503340; E-mail: mingqiangqiao@yahoo.com.cn

Other authors: YU Yan, ZHANG Xiu-Ming, BAI Yan-Ling

Received date: 08-15-2003