

铜绿假单胞菌泳动能力相关新基因的筛选及鉴定

李迎丽,白芳,单志英,徐海津,乔明强*

(南开大学分子生物学研究所 天津 300071)

摘 要:从 Mu 转座突变子文库中经过表型筛选,得到 12 株泳动(Swimming motility)能力缺陷的突变子,经 Mu 转座子插入位点的确认、基因克隆及测序分析发现其中 10 个突变子中 Mu 转座子分别插入到 10 个不同的与鞭毛运动和功能相关的基因中,2 个突变子中 Mu 转座子插入到功能未知的新基因(PA2950 和 PA5022)中,电镜观察结果表明这 2 个突变株均具有完整的鞭毛,初步推测这 2 个基因可能是参与鞭毛泳动的能量代谢、趋化作用或信息传递的新基因。

关键词:铜绿假单胞菌 鞭毛 泳动

中图分类号:Q75 文献标识码:A 文章编号:0001-6209(2006)01-0018-05

铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)革兰氏阴性菌,具有单端单根鞭毛,运动活泼,广泛存在于环境中如土壤、水、植物和动物组织,是一种重要的条件致病菌^[1]。在临床上常引起难治性反复性感染,其中生物被膜的形成是一个重要的因素,细菌在被膜的屏障保护作用下就具有很强的抗药性及抗吞噬、抗趋化作用。据报道,60%以上微生物感染是由细菌生物被膜造成的^[2]。

鞭毛作为主要运动器官和重要的毒力因子,对铜绿假单胞菌获得营养物质,逃避有害物质,转移到合适的寄主,找到合适的固着位点和向环境扩散传播起着重要作用^[3]。在生物被膜形成的早期依靠鞭毛的泳动(Swimming motility),菌体首先移行至异物或死亡组织表面,然后在菌毛的作用下黏附固着,增殖为微菌落进而形成生物被膜^[4-6],鞭毛所介导的泳动在生物被膜形成早期起着关键的作用。

据推测,至少有 50 个基因与鞭毛的合成和功能相关^[7],鞭毛的运动还与趋化作用有关,鞭毛结构基因、趋化作用基因或能量合成及代谢相关基因的突变,都将导致鞭毛运动能力的丧失、减弱或失去方向性。利用 Mu 转座子的随机单点插入,造成插入基因的失活,筛选泳动能力缺陷的突变子,经基因克隆和序列分析,确定引起表型改变的突变基因,进而找到一些与鞭毛泳动相关的新基因,可以为揭示鞭毛运动机理、探索与鞭毛运动相关新基因的功能,预防

和抑制生物被膜的早期形成提供理论依据,为药物设计提供新的靶位点。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 质粒和菌种:质粒 pHTH2、pUC18 和大肠杆菌(*Escherichia coli*)JM109 为本室保存,铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)PA68 是从临床一例支气管扩张患者送检的痰中分离得到的卡那霉素敏感株。经美国全自动微生物分析仪 VITEK IMS60 鉴定为 *Pseudomonas aeruginosa*。

1.1.2 培养基:LB 培养基:10g/L 胰蛋白胨,5g/L 酵母提取物,10g/L NaCl, LB 固体培养基加入 1.5% 琼脂粉;泳动能力检测培养基:10g/L 胰蛋白胨,5g/L NaCl, 0.3%(W/V)琼脂糖。

1.1.3 试剂:氨苄青霉素、卡那霉素购自华美生物制品公司;胰蛋白胨、酵母提取物为 Oxoid 公司产品;琼脂糖为 Biowest 公司产品;牛小肠碱性磷酸酶(CIAP)、T4 DNA 连接酶、限制性内切酶、DNA 纯化试剂盒、随机引物标记试剂盒、分子量标准 DL2000、DL15000 均为 TaKaRa 公司产品;鲑鱼精 DNA 购自 Sigma 公司; α -³²P dCTP 购自北京亚辉生物工程公司;尼龙膜为 Osmonics 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(30270075)

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

作者简介:李迎丽(1977-),女,河南省三门峡市人,博士研究生,研究方向为分子微生物学与微生物工程。E-mail: liylyl@126.com

其他作者:林伟利,夏惠明,姚宏明,徐姝娟,张秀明,白艳玲

收稿日期:2005-06-24;接受日期:2005-07-22;修回日期:2005-08-17

1.2 引物设计与合成

用于转座子插入位点侧翼序列的测序,引物由上海博亚公司合成。P1:5'-GCAACTGTCCATACTCTG A-3'和 P2:5'-CGCTGGGTTTATCGTCCA-3'; P3:5'-GCAACTGTCCATACTCTGA-3'和 P4:5'-CGCTGGGTTT ATCGTCCA-3'。P1和P2是依据Mu转座子质粒pHTH2序列设计的,P3和P4是依据Mu转座子两侧的反向序列设计的引物。

1.3 泳动能力(Swimming motility)的检测^[4]

在无菌塑料培养皿内铺上一层泳动能力检测培养基。从Mu转座子突变文库中活化突变子菌株,用灭菌的牙签挑取菌落点种到培养基表面,30℃培养12~14h。细菌会依赖鞭毛运动在培养基的表面以接种点为圆心向周围泳动生长,形成大小不一的圆环,以野生型菌株*Pseudomonas aeruginosa* PA68为对照,筛选泳动能力减弱或丧失的突变菌株。

1.4 电转化

大肠杆菌JM109感受态细胞制备参考文献[8],使用BioRad电转化仪,0.2cm电转化杯,电击电压设置为2.5kV,电容25μF,电阻200Ω。电击后吸取转化细胞加入到37℃温浴的900μL SOC液体培养基中,37℃,200 r/min复苏1h。然后将菌液涂布到LB(Amp 100μg/mL,Kan 30μg/mL)平板上,37℃培养12~16h后筛选转化子。

1.5 基因克隆和测序

提取表型缺陷型突变子的基因组DNA,用BamH I过夜酶切基因组DNA,电泳检测酶切完全后,与用BamH I酶切并用牛小肠碱性磷酸酶(CIAP)处理的载体质粒pUC18连接,电转化入大肠杆菌JM109感受态细胞,筛选在抗性平板上长出的转化子。经PCR和酶切鉴定正确的阳性转化子以P3或P4为引物进行测序,确定Mu转座子插入位点两端的侧翼序列。

1.6 探针的制备及Southern印迹杂交

以携带人工Mu转座子的质粒pHTH2做模板,P1和P2为引物,PCR扩增得到700bp的片段,回收纯化后用 α -³²P dCTP标记,具体操作参照试剂盒说明进行,以此片段作为Southern杂交的探针。分别提取泳动能力缺陷型突变子的基因组DNA,用BamH I酶切0.8%的琼脂糖凝胶电泳检测样品是否酶切完全。参照文献[9]进行Southern blot。

1.7 鞭毛的电镜观察

挑取平板上的菌落,用无菌水将菌体洗涤一次,重悬于无菌水中,将菌体稀释到合适的浓度,点在铜

网上,磷钨酸负染色,透射电镜下观察。

2 结果

2.1 泳动能力的检测

从Mu转座子突变子文库中共筛选得到12株Swimming motility丧失的突变子(图1示意),图中野生型PA68周围有一圆环,这是由于菌体在鞭毛介导下泳动后留下的轨迹。而其它菌株周围则无相应的圆环,表明这些突变株由于Mu转座子的插入,导致相应基因的失活,从而丧失了泳动能力,菌体只能在接种处生长。

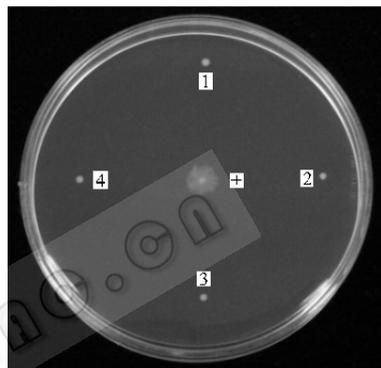


图1 突变株泳动能力的检测

Fig. 1 Detection of swimming motility of the mutants

+ : Wild strain PA68 ; 1 ~ 4 : Mutants deficient in swimming motility.

2.2 Mu转座子插入突变子筛选及单点插入的确认

用Southern印迹杂交验证突变子是否为Mu转座子的单点插入。先检测泳动能力缺陷型突变子基因组中是否有Mu转座子的插入,以P1和P2为引物PCR扩增得到目的片段,预期大小为700bp,PCR结果与预期大小一致,表明突变子基因组DNA中均有Mu转座子的插入。并且Southern blot的结果显示(图略)探针和酶切后的基因组DNA只出现一条杂交带,表明所得到的12株泳动能力丧失的菌株中均为Mu转座子单点插入,证明了泳动能力缺陷表型的改变与Mu转座子插入位点处相应基因突变的一一对应关系。

2.3 转座子插入位点侧翼序列的克隆

将Mu转座子插入处的侧翼序列克隆到pUC18的BamH I位点处,筛选转化子。PCR检测,以P1和P2为引物,PCR扩增的产物大小为700bp,提取转化子质粒,用BamH I酶切后电泳检测均有一条2.7kb的pUC18载体带和一条或几条大小不一的外源片段带,选取阳性转化子进行测序。

2.4 泳动能力缺陷型突变子测序结果及分析

将筛选出的12株泳动能力丧失的突变子全部

经基因克隆测序,其测序结果(表1)在 GenBank Blast 或 *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 全基因组数据库 (www.pseudomonas.com) 中进行序列比对。*P. aeruginosa* 全基因组序列分析对 54.2% 的开放阅读框架 (Open reading frame, ORF) 进行了大致的功能定位,功能已知的基因属于 I 类基因(class 1),通过同源性比较与其它菌中已知功能的相关基因有高度同源性的基因,属于 II 类基因(class 2),根据其保守氨基酸基序、结构特征或者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 III 类基因(class 3),功能完全未知的基因属于 IV 类基因(class 4)^[10]。由于 Mu 转座子的插入造成基因插入

位点处 5 个碱基的重复,成为 Mu 转座子插入位点的识别标记。在筛选出的 12 株突变子中, Mu 转座子分别插入到 12 个不同的基因中,包括 2 个 I 类基因、5 个 II 类基因、3 个 III 类基因中, PA2552 推测为脂酰基辅酶 A 脱氢酶、PA0740 推测为 β -内酰胺酶和 PA0547 推测为转录调控因子,其功能是根据保守的氨基酸结构域、结构特征和一定同源性推测出来的,但尚未得到实验证实,本实验为它们功能的研究提供了实验依据; 2 个 IV 类基因 PA2950 和 PA5022 是两个功能未知的新基因,本实验初步证实其与鞭毛的泳动能力相关。

表 1 转座子插入位点及靶位点的位置

Table 1 Transposon insertion sites and target site location

Mutant	Sequence	Genetic location ^b			Transposon orientation ^c	Protein name (Protein name confidence) ^d
		Gene	Coordinates	Section		
B60 : Mu	agcctcatgGCCAA (Km-Mu)AGCCAAgctgttcgcc	PA2552 (<i>acdB</i>)	3967 ~ 3971	244	-	probable acyl-CoA dehydrogenase (Class 3)
B101 : Mu	caagccgggACCGA (Km-Mu)ACCGAgctgccggc	PA0740 (<i>yjcS</i>)	3268 ~ 3272	70	+	probable beta-lactamase (Class 3)
B136 : Mu	ggatccagctCGGCC (Km-Mu)CGGCCctgtgccgga	<i>topA</i>	2529 ~ 2533	287	+	DNA topoisomerase I (Class 2)
B137 : Mu	ctacgagctCGCTT (Km-Mu)CGCTTccagctccgc	PA5022 (<i>aeiA</i>)	5068 ~ 5072	476	+	conserved hypothetical protein (Class 4)
G34 : Mu	gtggctttcACTTC (Km-Mu)ACTTCgctcagctcg	<i>aceF</i>	3760 ~ 3764	475	-	dihydrolipoamide acetyltransferase (Class 1)
I69 : Mu	gatctgcagTCCGG (Km-Mu)TCCGGgtgacttcc	PA2950	5074 ~ 5078	282	+	hypothetical protein (Class 4)
K120 : Mu	ggccactggGCCAG (Km-Mu)GCCAGgtctctctgt	PA0547	2826 ~ 2830	52	+	probable transcriptional regulator (Class 3)
N6 : Mu	atggaagattTCCAG (Km-Mu)TCCAGgtggacatca	<i>ruvB</i>	7147 ~ 7181	91	+	Holliday junction DNA helicase RuvB (Class 1)
N44 : Mu	gtggcctgatAGGAC (Km-Mu)AGGACgttgcgcac	<i>rep</i>	5278 ~ 5282	503	-	ATP-dependent DNA helicase Rep (Class 2)
N139 : Mu	gccaccgaagAAATC (Km-Mu)AAATCgctgaacaca	<i>dnaJ</i>	9008 ~ 9012	450	+	DnaJ protein (Class 2)
N211 : Mu	gcgctcagaAACCA (Km-Mu)AACCAacaagccagg	<i>adhA</i>	3709 ~ 3713	516	+	alcohol dehydrogenase (Class 2)
N234 : Mu	ggttctccagGTACC (Km-Mu)GTACCagcgcacggt	<i>rmlB</i>	1357 ~ 1361	490	-	dTDP-D-glucose 4 β -dehydratase (Class 2)

a. Km-Mu means mini Mu transposon with kanamycin resistance gene. Target site duplications are in capital letters.

b. Compared to the genomic sequences shown, the transcription from the transposon proceeds from left to right(+) or from right to left(-).

c. Genetic locations were determined by comparison to the PAO1 complete genome.

d. Protein Name Confidence, class 1: Function experimentally demonstrated in *P. aeruginosa*; class 2: Function of strongly homologous gene experimentally demonstrated in another organism; class 3: Function proposed based on presence of conserved amino acid motif, structural feature or limited homology; class 4: Homologs of previously reported genes of unknown function, or no homology to any previously reported sequences.

2.5 电镜观察

电镜照片(图2)显示已丧失泳动能力的 2 株突变株,仍具有完整的鞭毛,表明其泳动能力的丧失并不是由于鞭毛的缺失,推测这 2 个新基因不是鞭毛合成的结构基因,而可能是鞭毛正常泳动所需要的

能量代谢或信息传递的相关基因。

3 讨论

人工组建的 Mu 转座重组系统具有体外组装、体内重组的特点,与传统转座子相比的优点之一是

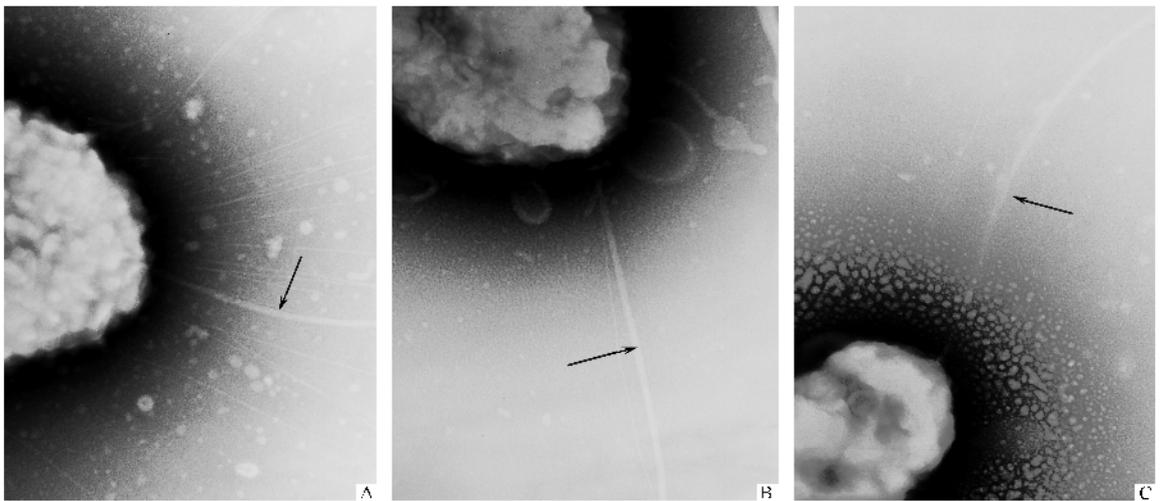


图2 野生株和突变株鞭毛的扫描电镜观察

Fig.2 Flagella of the wild and mutants under the electron microscope

The black arrow is flagella. A : PA68 ; B : B137 ; C : I69.

单点插入^[11],应用 Mu 转座重组技术构建了 Mu 转座子突变文库,从文库中筛选表型缺陷型突变子,再推测引起表型改变相对应的突变基因,这是一种研究基因功能常用的反向遗传学的方法。*P. aeruginosa* APO1 全基因组序列测序工作于 2000 年完成,这为研究 *P. aeruginosa* 基因功能提供了信息平台^[10]。经分析铜绿假单胞菌中有 8.4% 的基因是参与调控的基因,这个比例远远高于其它已测序的细菌基因组。

本文从突变文库中筛选得到 2 个可能参与鞭毛泳动的新基因。鞭毛大约有 20 种蛋白组成,另外还有大约 30 种蛋白参与鞭毛的组装和运动的调节^[12-14]。但目前对于鞭毛运动相关基因的功能、各基因间如何调节表达尚存在不少疑问。本实验筛选得到的突变子 I69 : :Mu 丧失了泳动能力,序列分析其对应的突变基因 PA2950 和已报道的基因没有同源性,在 Pfam Data 也没有其相似结构域的分析,通过 *Pseudomonas aeruginosa* Community Annotation Project (PseudoCAP) (www.pseudomonas.com) 分析,其下游的两个基因 *etfA* (PA2951) 和 *etfB* (PA2952) 分别是电子传递黄素蛋白的 α 亚基和 β 亚基,核苷酸与反硝化副球菌 (*Paracoccus denitrificans*) 的电子传递黄素蛋白 α 和 β 亚基的同源性分别为 77% 和 76%, 功能是参与能量代谢。经分析推测,PA2950、2951 和 2952 可能是在同一个启动子下,组成一个操纵子。根据以上信息分析,初步推测 PA2950 可能是通过某种途径参与鞭毛泳动中能量代谢的基因,电镜结果也表明其突变株具有完整的鞭毛,导致其丧失泳动

能力的不是鞭毛合成的结构基因,而可能是泳动能力所必需的能量代谢调节基因,下一步我们将用酵母双杂交的方法来阐明 PA2950 与 PA2951、PA2952 的关系。

另一个泳动能力丧失的突变株 B137 : :Mu, 测序结果表明 Mu 转座子插入到 PA5022 基因中。PA5022 与 *Escherichia coli* 的 AefA 蛋白有 59% 的相似性。在 *E. coli* 中 AefA (即 KefA) 是一个具有多结构域的蛋白,属于动力敏感离子通道家族蛋白 (Mechanosensitive channel, MscS family) 成员,功能可能是参与调控胞内离子的动态平衡^[15]。在 *P. aeruginosa* 中功能尚不清楚,Man-Wah Tan 利用 *TnphoA* 随机插入铜绿假单胞菌基因组后,发现与 *E. coli* 中的 *aefA* 有部分同源的 PA5022 基因突变后,杀线虫的毒力减弱,推测该基因的编码产物可能与铜绿假单胞菌的毒力因子有关^[16],但并未确定是何种毒力因子,本文的实验结果首次证明该基因与鞭毛的泳动能力相关,鞭毛是 *P. aeruginosa* 的一种重要的毒力因子,我们初步推断可能是由于 PA5022 基因的突变,使鞭毛泳动能力丧失,从而导致其毒力减弱。电镜观察结果突变株 B137 具有完整的鞭毛,推测 PA5022 基因可能是参与泳动能力所需的信息传递或趋化作用的基因。

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,本实验首次报道了 2 个功能未知的新基因与鞭毛的泳动能力相关,但是它们在鞭毛泳动能力中起什么作用,通过何种途径影响鞭毛的泳

动能力尚不清楚,我们将用遗传互补和同源重组等方法进一步证实这两个新基因的功能。

致谢 感谢芬兰赫尔辛基大学 Dr. Savilahti Harri 为本实验提供 pHTH2 质粒。

参 考 文 献

- [1] Wilson R, Dowling RB. *Pseudomonas aeruginosa* and other related species. *Lung Infections*, 1998, **53** (3): 213 – 219.
- [2] Lewis K. Riddle of biofilm. *Resistance Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2001, **45** (4): 999 – 1007.
- [3] Heydon A, Ersbøll B, Kato J, et al. Statistical analysis of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development: impact of mutations in genes involved in twitching motility, cell-to-cell signaling, and stationary-phase sigma factor expression. *Appl Envir Microbiol*, 2002, **68**: 2008 – 2017.
- [4] Davey ME, O' toole GA. Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2000, **64** (4): 847 – 867.
- [5] Rashid MH, Korner A. Inorganic polyphosphate is needed for swimming, swarming, and twitching motilities of *Pseudomonas aeruginosa*. *PANS*, 2000, **97**: 4885 – 4890.
- [6] Molin S, Tim TN. Gene transfer occurs with enhanced efficiency in biofilms and induces enhanced stabilization of the biofilm structure. *Current Opinion in Biotechnology*, 2003, **14**: 255 – 261.
- [7] Feldman M, Bryan R, Rajan S, et al. Role of flagella in pathogenesis of *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect Immun*, 1998, **66**

(1): 43 – 51.

- [8] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989, 50.
- [9] 卢圣栋. 现代分子生物学实验技术. 第二版, 北京: 中国协和医科大学出版社, 1999, 195 – 217.
- [10] Stover CK, Pham XQ, Erwin AL, et al. Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. *Nature*, 2000, **406** (31): 959 – 964.
- [11] Lamberg A, Nieminen S, Qiao MQ, et al. Efficient insertion mutagenesis strategy for bacterial genomes involving electroporation of *in vitro*-assembled DNA transposition complexes of bacteriophage Mu. *Applied and Environment Microbiology*, 2002, **68** (2): 705 – 712.
- [12] Macnab RM. The bacterial flagellum: reversible rotary propeller and type III export apparatus. *J Bacteriol*, 1999, **181**: 7149 – 7153.
- [13] Macnab RM. How bacteria assemble flagella. *Annu Rev Microbiol*, 2003, **57**: 77 – 100.
- [14] Aldridge P, Hughes KT. Regulation of flagellar assembly. *Curr Opin Microbiol*, 2002, **5**: 160 – 165.
- [15] Levina N, Töttemeyer S, Stokes NR, et al. Protection of *Escherichia coli* cells against extreme turgor by activation of MscS and MscL mechanosensitive channels: identification of genes required for MscS activity. *The EMBO Journal*, 1999, **18**: 1730 – 1737.
- [16] Tan MW, Rahme LG, Jeffrey A, et al. *Pseudomonas aeruginosa* killing of *Caenorhabditis elegans* used to identify *P. aeruginosa* virulence factors. *Microbiology*, 1999, **96** (5): 2408 – 2413.

Identification of two new genes involved in swimming motility of *Pseudomonas aeruginosa*

LI Ying-li, BAI Fang, SHAN Zhi-ying, XU Hai-jin, QIAO Ming-qiang*

(Institute for Molecular Biology, Nankai University, Tianjin 300071, China)

Abstract: *Pseudomonas aeruginosa*, a typical opportunistic pathogen, has a single polar flagella which provides swimming motility and virulence. Twelve of insertional mutants with Mu transposition complexes into genomic DNA of *Pseudomonas aeruginosa* were screened on the changes of swimming motility. After gene cloning and DNA sequencing of those mutants, ten of them were illustrated that defective mutations on swimming motility were caused by insertions of Mu transposon into 10 of different functional genes which may involved in biosynthesis of flagella and gene regulations, but another two mutants were resulted from the insertion of two new genes (PA2950, PA5022) with function unknown. Observation of these two mutants with an integrity flagellum under electron microscope showed that two new genes were not involved in construction of flagella, but probably in energy metabolism and gene regulation of swimming motility.

Keywords: *Pseudomonas aeruginosa*; Flagellum; Swimming motility

Foundation item: National Natural Science Foundation of China (30270075)

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

Other authors: LIN Wei-li, XIA Hui-ming, YAO Hong-ming, XU Shu-wa, ZHANG Xiu-ming, BAI Yan-ling

Received: 24 June 2005/Accepted: 22 July 2005/Revised: 17 August 2005