

## 铜绿假单胞菌 *pcr2* 基因功能的研究

杨洪江 李明春 魏东盛 邢来君\*

(南开大学微生物系 天津市微生物功能基因组学重点实验室 天津 300071)

**摘 要:** III 型分泌系统 (type III secretion system, TTSS) 是铜绿假单胞菌的重要致病因子, *pcr2* 基因位于 TTSS 基因簇中 *popN* 操纵子的第三位, 有关该基因的具体功能研究还是空白。首先, 本研究采用定点诱变方法构建 *pcr2*<sup>-</sup> 突变体, 发现 TTSS 表达和分泌 ExoS 和 ExoT 蛋白的能力显著下降, 在 HeLa 细胞感染实验中, ExoS 和 ExoT 蛋白注入细胞的数量明显低于野生型菌株。其次, 我们采用细菌双杂交系统研究了 Pcr2 蛋白与其它蛋白结合的可能性, 发现 Pcr2 蛋白与 PscB 蛋白一起能够结合 PopN 蛋白, 同时 Western blot 实验发现 Pcr2 蛋白能够调控 PopN 蛋白的分泌。最后, 实验发现 Pcr2 蛋白本身也能够分泌到细胞外, 可能与 TTSS 分泌器的早期形成过程有关。

**关键词:** III 型分泌系统; *pcr2* 基因; 细菌双杂交系统; 铜绿假单胞菌

中图分类号: Q939 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209(2007)05-0779-06

铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) 是重要的人类致病菌, 能够感染纤维肺 (cystic fibrosis, CF) 患者并造成严重伤害甚至死亡。在烧伤或免疫力低下患者中, 也能够长期存在, 近年来发现越来越多的艾滋病患者存在该细菌的感染。铜绿假单胞菌基因组为 6.3Mbp, 编码多种致病因子, III 型分泌系统 TTSS 是其中重要致病因子之一。<sup>[1]</sup>

III 型分泌系统编码近 30kb 的基因片段, 分别属于 5 个操纵子, 包括 *popN*、*pcrG*、*pcrC*、*exsD*、*pscN*TTFFU 操纵子<sup>[2]</sup>, 这些基因编码的蛋白分别具有结构、调控和伴侣蛋白等功能。其中 *popN* 操纵子的大部分基因的功能已经被研究, *popN* 和 *pcr1* 基因编码的产物对 TTSS 起到负调控作用, *popN* 或 *pcr1* 基因缺失后, 在非诱导条件下, TTSS 也能分泌 ExoS 和 ExoT 蛋白<sup>[3,4]</sup>。*pcr3*<sup>-</sup>、*pcr4*<sup>-</sup> 和 *pcrD*<sup>-</sup> 突变体中, TTSS 分泌 ExoS 和 ExoT 蛋白的能力则完全丧失<sup>[5,6]</sup>, 目前还不清楚造成这种变化的具体原因, 估计可能与 III 型分泌系统的分泌器的形成有关。

本文重点研究了 *popN* 操纵子的 *pcr2* 基因的功能, 该基因大小为 372bp, 位于 *popN* 操纵子 7 个基因中的第三位, 是没有进行功能研究的两个基因之一, 另外一个基因为 *pcrR*。首先我们通过构建 *pcr2*<sup>-</sup> 突变体, 分析该基因对 TTSS 分泌的影响, 并利用细菌双杂交方法分析与其它基因之间可能存在的相互作用关系。同时我们实验发现 PopN 蛋白的分泌依赖

于 Pcr2 蛋白的存在, 而 Pcr2 蛋白本身也能够分泌到细胞外。

### 1 材料和方法

#### 1.1 菌株、质粒和培养基

表 1 中所列为本研究使用的菌株和质粒。大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 用 LB (L broth) 培养, 培养铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) 使用 LB 或 Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) 培养基。当需要加抗菌素时, 大肠杆菌使用浓度 (mg/L) 分别为: Ampicillin 100、Kanamycin 50、Tetracycline 10、Gentamicin 10、Chloramphenicol 34、Spectinomycin 25 和 Streptomycin 25。培养铜绿假单胞菌使用浓度 ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 分别为: Carbenicillin 150、Tetracycline 100、Gentamicin 100、Spectinomycin 200 和 Streptomycin 200。

#### 1.2 铜绿假单胞菌突变体的构建

设计合成引物 (表 2), 克隆含有 *pcr2* 基因的 DNA 片段, 采用定点诱变方法, 将 *pcr2* 基因起始编码子 ATG 改变为 ATC。改变起始编码子 ATG 的同时, 引入限制性内切酶 *Bam*H I 位点, 便于筛选正确的双交换突变体。构建的质粒通过电击方法转化进入铜绿假单胞菌 PAK 中, 按照 Hoang 的方法<sup>[12]</sup>, 筛选双交换突变体。用 PCR 扩增和内切酶 *Bam*H I 消化的方法确认交换子的正确性。

\* 通讯作者。Tel: 86-22-23508506; E-mail: xinglaj@eyou.com

作者简介: 杨洪江 (1966 - ) 男, 天津市宁河县人, 博士研究生, 主要从事分子微生物学研究。E-mail: hongjiangyang@yahoo.com

收稿日期: 2006-12-22; 接受日期: 2007-02-02; 修回日期: 2007-06-12

表 1 菌株和质粒

Table 1 Strains and plasmids used in this study

Strains and plasmids	Descriptions	References or sources
<i>E. coli</i>		
RS	BacterioMatch Two Hybrid System Reporter Strain ; Km <sup>r</sup>	Stratagene
<i>P. aeruginosa</i>		
PAK	Wild-type <i>P. aeruginosa</i> strain	[ 7 ]
PAK <sup>exsA</sup> : Ω	PAK with <i>exsA</i> disrupted by insertion of Ω cassette ; Sp <sup>r</sup> Sm <sup>r</sup> Tc <sup>r</sup>	[ 8 ]
PAKΔ <i>popN</i>	PAK deleted of the <i>popN</i> gene	[ 4 ]
PAK <sup>pcr2</sup>	Point mutation of start codon in <i>pcr2</i> gene of PAK	This study
Plasmids		
pCR2.1-TOPO	Cloning vector for the PCR products	Invitrogen
pFLAG-CTC	Fusion vector for cytoplasmic expression of C-terminal flag-tag ,Ap <sup>r</sup>	Sigma
pDN19LacΩ	Promoterless <i>lacZ</i> fusion vector ; Sp <sup>r</sup> Sm <sup>r</sup> Tc <sup>r</sup>	[ 9 ]
pDN19	Broad host range shuttle vector ,Tc <sup>r</sup>	[ 10 ]
pUCP19	Broad host range shuttle vector ; Ap <sup>r</sup>	[ 11 ]
pEX18Gm	Gene replacement vector ; Gm <sup>r</sup> ,oriT <sup>+</sup> <i>sacB</i> <sup>+</sup>	[ 12 ]
pBT	Bait vector encoding full length bacterial phage λc I protein ; Chl <sup>r</sup>	Stratagene
pTRG	Target vector encoding RNAP-alpha subunit protein ; Tc <sup>r</sup>	Stratagene
pBT-LGF2	Dimerization domain of Gal4 on bait vector ; Chl <sup>r</sup>	Stratagene
pTRG-Gal 11 <sup>P</sup>	Gal11 on target vector ; Tc <sup>r</sup>	Stratagene
pHW0006	<i>exoT-lacZ</i> fusion reporter on pDN19lacZΩ ; Sp <sup>r</sup> Sm <sup>r</sup> Tc <sup>r</sup>	[ 13 ]
pYAN0633	pYAN0629 fused with pDN19 ,Ap <sup>r</sup> Tc <sup>r</sup>	This study
pYAN0636	pFLAG-CTC fused with pDN19 ,Tc <sup>r</sup> Ap <sup>r</sup>	This study
pBT-popN	<i>popN</i> gene on pBT vector ,Chl <sup>r</sup>	This study
pBT-pcr2	<i>pcr2</i> gene on pBT vector ,Chl <sup>r</sup>	This study
pTRG-popN	<i>popN</i> gene on pTRG vector ,Tc <sup>r</sup>	This study
pTRG-pcr2	<i>pcr2</i> gene on pTRG vector ,Tc <sup>r</sup>	This study
pYAN0671	<i>pcr2</i> and <i>pscB</i> gene on pTRG vector ,Tc <sup>r</sup>	This study
pYAN0672	<i>pcr2</i> and <i>pscB</i> gene on pBT vector ,Chl <sup>r</sup>	This study

表 2 实验用 PCR 引物

Table 2 Oligonucleotides used in this study

Primers	Sequences( 5'→3' )
For PCR clone of DNA fragment containing <i>pcr2</i> gene	CGGTGGAGTCGCGCCGACATAGAGAAA TGCTGCGGATGACTCGGTGAGTCACCA
For <i>pcr2</i> gene site-directed mutagenesis	GCGCGAAGAGGAGCAGCAGGATCCACTGGGTTGAGCTGGCC GCCAGCTCAACCCAGTGGATCCTGCTCTCTTCGCGCC
For bacterial two-hybrid assay constructs	
<i>popN</i> :	GCGGCCGAATGGACATCTCCAGAGTTCTCCGCCGCGCC GTCAGAAGCCCCGATGCCATGGCCCCGCTCCCC
<i>pcr2</i> :	GCGGCCGAATGGACTGGGTTGAGCTGGCCGCTCGCCGAGTTC GTCATGCGCGCAGCACTTCGCTGCGCGCCGAGCC
<i>pscB</i> :	GCGGCCGAATGGAGCAGGAAGACGATAAAG GAATTCATCTGCGCCATGCTTAGTCCT
For C-terminal Pcr2-Flag tag fusions	CTAAGCTTGACTGGGTTGAGCTGGCCGTCGCGCAGTTC GAGGATCCTGCGCGCAGCACTTCGCTGCGCGCCGAG

### 1.3 TTSS 的表达和 Western blot 检测

一般情况下,细菌过夜培养物以 1% 的比例转接到含有 5mmol/L EGTA ( Ethyleneglycol bis( 2-aminoethyl-ether)tetraacetic acid ,乙二醇双( 2-氨基乙醚)四乙酸)的 LB 培养基中,37℃ 振荡培养 3h,进行 TTSS 诱导反应。当培养基为 DMEM 时,加入 5% 胎牛血清(fetal bovine serum, FBS),在二氧化碳温箱中,

37℃ 静止培养 3.5h。收集上清,加入等体积的蛋白质上样溶液,煮沸 10min,然后进行 SDS-PAGE,根据细菌培养物的浓度(OD<sub>600</sub>),调整每个样品的上样体积,保证细胞数量的相同。

### 1.4 β-半乳糖苷酶活性的检测

将携带报告基因 *exoT-LacZ* 的质粒转化进入待测菌株中,细菌过夜培养物以 1% 的比例转接到含有 5mmol/L EGTA 的 LB 培养基中,37℃ 振荡培养诱导 4h,收集细胞,按 Miller 的方法检测 β-半乳糖苷酶的活性<sup>[14]</sup>。

### 1.5 HeLa 细胞感染实验

HeLa 细胞接种在 6 孔板上,经过 24h 培养后细胞密度(confluency)达到 50%,对数生长期的细菌用于感染 HeLa 细胞,通过 OD<sub>600</sub> 读数确定细菌生长状态,感染系数(multiplicity of infection, MOI)为 20。感染 2h 后,刮下 HeLa 细胞,500xg 离心 5min 收集 HeLa 细胞,高速离心上清液 5min 除去细菌。HeLa 细胞中加入 50μL 含有 0.25% Triton X-100 的 PBS 缓冲液,冰浴 5min,4℃ 高速离心 15min,上清含有 HeLa 细胞细胞质蛋白,与相同体积 2x 蛋白上样缓冲液混合,培养液的上清用 15% TCA 沉淀,离心后沉淀用丙酮洗一次,烘干,蛋白上样缓冲液。所有蛋白样

品煮沸 10min 后上样,10% SDS-PAGE,然后进行 Western blot 分析。

### 1.6 突变体细胞毒性的检测

接种 HeLa 细胞于 24 孔板中,浓度为  $5 \times 10^4$  细胞/孔,培养基为含有 5% FBS 的 DMEM。二氧化碳温箱中 37℃ 培养 24h。细菌过夜培养物转接培养至对数生长期,用 1XPBS 洗一次,并用细胞培养液重新悬起,按 HeLa 细胞数与细菌数 1:20 的比例,加入细菌,感染 4h 后,吸出培养液,用 1XPBS 洗两次,用 0.05% 结晶紫染色 5min,吸出染色液,平板用水洗两次,每个孔加入 250 $\mu$ L 的 95% 乙醇溶液,室温轻轻振荡洗脱染液 30min,在 590nm 波长检测乙醇溶液的吸光度值,培养板上吸附的细胞越多,读数越高。

### 1.7 细菌双杂交方法确定 Pcr2 蛋白与其它蛋白 PopN、PscB 之间相互结合关系

BacterioMatch II Two-Hybrid Vector 试剂盒 (Stratagene) 用来检测蛋白之间的相互结合。首先,所有基因通过 PCR 方法克隆到 pCR2.1-TOPO 载体上,然后分别亚克隆到载体 pBT 和 pTRG。PCR 引物见表 2。所有基因插入内切酶 *Not* I 和 *Eco* R I 或 *Xho* I 位点之间,通过 DNA 序列测定检测构建质粒的正确性。需要检测的每对基因同时采用电击方法同时转化进入 RS (reporter strain) 中,转化子过夜培养物在 LB 培养基中稀释 5 倍,并加入终浓度为 10 $\mu$ mol/L 的 IPTG,继续培养 5h,所有培养都要在 30℃ 条件下完成。收集细胞并参照 Miller 的方法测定  $\beta$ -galactosidase 的活性。每个分析实验至少重复 3 次,实验结果分别与阳性和阴性对照比较<sup>[14]</sup>。

### 1.8 PopN 蛋白分泌的检测

在 TTSS 诱导条件下,收集各菌株 LB 培养物的上清液,加入 15% 的 TCA (trichloroacetic acid),冰浴 30min 后高速离心,沉淀用冷的丙酮洗一次,加入 1/10 体积的蛋白质上样缓冲液,煮沸 10min 后上样进行 SDS-PAGE 电泳,蛋白质转移到 PVDF-PLUS 膜上后,一抗采用兔抗 PopN 蛋白的血清。

### 1.9 Pcr2 融合蛋白分泌的检测

设计引物扩增 *pcr2* 基因(引物序列见表 2)。首先,将 PCR 产物克隆到 pCR2.1-TOPO 载体上 (Invitrogen),测序确认。然后亚克隆到 Flag-tag 标记的 pFlag-CTC 载体 (Sigma),通过测序确定融合序列读码框是否正确。*pcr2* 基因由载体上的 *tac* 启动子控制,构建的质粒通过 *Bam*H I 切点与质粒 pDN19 连接,用于 Pcr2 蛋白分泌实验和互补实验。pFlag-CTC 载体与质粒 pDN19 连接的产物作为载体对照。

## 2 结果

### 2.1 *pcr2*<sup>-</sup> 突变体的构建和互补实验

首先通过 PCR 方法克隆含有 *pcr2* 基因的 4.1kb 片段,测序确定后将该片段亚克隆到质粒 pEX18Gm,采用定点诱变的方法,将 *pcr2* 基因起始编码子 ATG 改变为 ATC,使翻译不能起始。按照材料和方法中所述,筛选 *pcr2*<sup>-</sup> 双交换突变体,选择对抗菌素 Gm 敏感的菌落,同时,用限制性内切酶 *Bam*H I 消化 PCR 扩增产物,正确的双交换突变体中引入了 *Bam*H I 位点。

在 TTSS 诱导条件下,分别测定 *pcr2*<sup>-</sup> 突变体在 LB 或含有 5% FBS 的 DMEM 培养基中,ExoS 和 ExoT 蛋白的分泌情况,如图 1 所示,与野生型对照相比,*pcr2*<sup>-</sup> 突变体分泌 ExoS 和 ExoT 蛋白的能力明显下降。

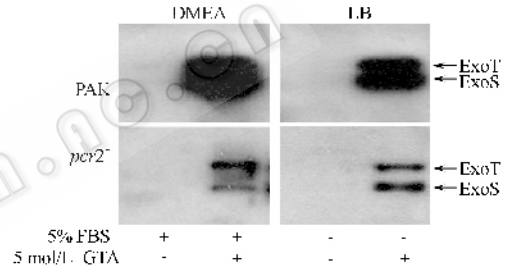


图 1 *pcr2*<sup>-</sup> 突变体 TTSS 诱导实验

Fig.1 TTSS secretion assay of *pcr2*<sup>-</sup> mutant. Wild type strain PAK was used as control. TTSS was conducted in both LB and DMEM with 5% FBS.

为了验证 *pcr2*<sup>-</sup> 突变体的正确性,我们将为携带 *pcr2* 基因的质粒转化进入 *pcr2*<sup>-</sup> 突变体,进行 TTSS 诱导实验,发现 *pcr2* 基因互补后,确实能够提高菌株 ExoS 和 ExoT 蛋白的分泌水平(图 2)。

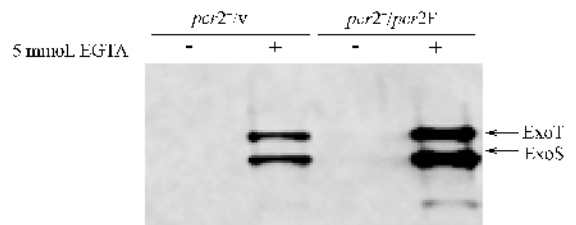


图 2 *pcr2*<sup>-</sup> 突变体的互补实验

Fig.2 Complementation of *pcr2*<sup>-</sup> mutant. TTSS induction assay were conducted in LB medium. Rabbit anti-ExoS serum was used as first antibody in the Western blot. V: vector control, pYAN0636; pcr2F: plasmid containing flag-tagged *pcr2* gene pYAN0633.

### 2.2 TTSS 的诱导及表达水平的测定 $\beta$ -半乳糖苷酶活性检测

在 TTSS 诱导和非诱导条件下,测定不同菌株  $\beta$ -半乳糖苷酶的活性,野生型菌株 PAK 和 *popN*<sup>-</sup> 突变

体作为对照,结果如图3所示,在诱导条件下,PAK菌株 TTSS 的表达水平明显高于非诱导条件下的表达水平,而 *popN*<sup>-</sup> 突变体的表达水平不受 EGTA 的影响,与报道的结果一致<sup>[3]</sup>。与对照菌株相比,*pcr2*<sup>-</sup> 突变体 TTSS 的表达水平存在着显著差别,与前面 ExoS 和 ExoT 蛋白分泌实验结果相一致。这些实验结果显示,*pcr2*<sup>-</sup> 突变体中 TTSS 的表达和分泌水平都受到影响。

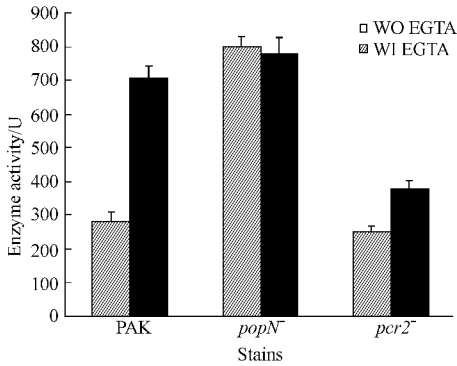


图3  $\beta$ -半乳糖苷酶活性检测

Fig.3 Beta-galactosidase activity assay of strains carrying *exoT*-LacZ fusion reporter gene (pHW0006). Wild type strain PAK and *popN*<sup>-</sup> mutants as controls. WO EGTA: non-inducing condition, without adding EGTA; WI EGTA: induction condition, with the addition of EGTA to the cultures.

### 2.3 HeLa 细胞感染实验

培养包括 *pcr2*<sup>-</sup> 突变体在内的铜绿假单胞菌,感染 HeLa 细胞。用 Western blot 的方法分析将 ExoS 和 ExoT 蛋白注入到细胞质内的能力有无变化。实验按方法中所述进行,结果如图4所示,PAK 能够将一定数量的 ExoS 和 ExoT 蛋白转运到细胞内,而 *popN*<sup>-</sup> 突变体的转运能力明显高于野生型菌株 PAK,虽然 *pcr2*<sup>-</sup> 突变体在感染时间内,同样能引起

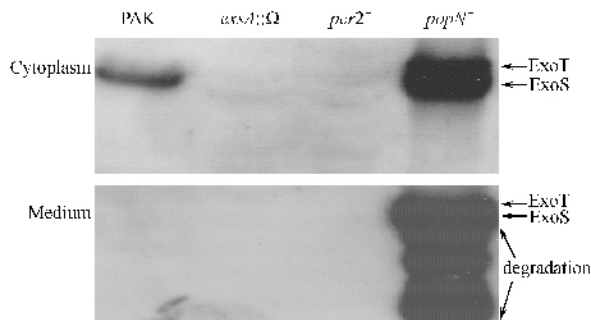


图4 *pcr2*<sup>-</sup> 突变体 HeLa 细胞感染实验

Fig.4 HeLa cell infection assay of *Pseudomonas aeruginosa* strains. PAK, wild type strain as positive control; *exsA*: $\Omega$  as negative control; *popN*<sup>-</sup> is mutant with constitutive secretion of effector proteins. Cytoplasm, samples from HeLa cell cytoplasm. Medium, samples from cell culture media.

几乎 100% HeLa 细胞圆形化 (rounding),但是 Western blot 不能检测到细胞内 ExoS 和 ExoT 蛋白,说明 *pcr2*<sup>-</sup> 突变体将 ExoS 和 ExoT 蛋白注入到细胞质内的能力,也受到明显损害。另外,该结果也从一个方面说明,只需要很少的 ExoS 蛋白,就能引起细胞凋亡的发生。细胞培养基中,野生型 PAK 和 *pcr2*<sup>-</sup> 突变体都无法检测到 ExoS 和 ExoT 蛋白,说明细胞接触信号具有很强的方向性,而 *popN*<sup>-</sup> 突变体为组成型表达,因此能够分泌大量的 ExoS 和 ExoT 蛋白。

### 2.4 细胞毒性分析

为进一步确认 *pcr2*<sup>-</sup> 突变体对宿主细胞的感染能力,进行细胞毒性实验,结果显示(图5),*pcr2*<sup>-</sup> 突变体感染的样品,大部分细胞从培养板上脱离,与野生型或 *popN*<sup>-</sup> 突变体相比,*OD*<sub>590</sub> 的读值没有明显差别,具有同样的细胞杀伤能力。

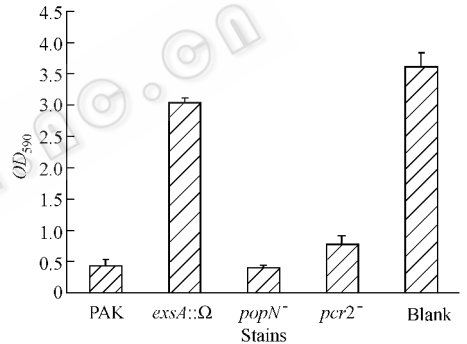


图5 细胞毒性实验

Fig.5 Cytotoxicity assay of *Pseudomonas aeruginosa* strains. PAK, wild type strain as positive control; *exsA*: $\Omega$  as negative control; *popN*<sup>-</sup> is mutant with constitutive secretion of effector proteins; blank is control without adding any bacteria during the assay.

### 2.5 *pcr2* 和 *pscB* 基因编码的蛋白与 PopN 蛋白存在相互反应

耶尔森氏菌 (*Yersinia enterocolitica*) 的研究表明, SycN 和 YscB 蛋白形成的复合体是 YopN 的伴娘蛋白,而 *syncN*, *yscB* 和 *yopN* 基因分别与 *pcr2*, *pscB* 和 *popN* 基因具有高度的同源性,因此我们推测 *pcr2*, *pscB* 和 *popN* 基因产物之间可能存在类似的相互结合。实验过程中,我们采用细菌双杂交方法,研究 *pcr2*, *pscB* 和 *popN* 基因之间是否存在蛋白之间的相互结合。按方法中所述,将目的基因分别克隆到 pBT 和 pTRG 载体上,构建的质粒同时转入宿主 RS (reporter strain) 中,挑选不同菌落用于液体培养,测定 beta-galactosidase 活性,根据活性确定蛋白之间是否存在相互结合。结果如表3所示,PopN 与 Pcr2 或 PscB 蛋白之间实验结果为阴性,不存在蛋白之间的结合,而3种基因同时存在时,检测结果为阳性,说

明 Pcr2 或 PscB 蛋白的复合体与 PopN 之间存在相互结合的关系。

表 3 细菌双杂交系统研究蛋白之间的相互作用

Table 3 Proteins interactions study with bacterial two-hybrid system

pBT-	pTRG-				
	Vector	Gal11 <sup>P</sup>	<i>popN</i>	<i>pcr2</i>	<i>pcr2-pscB</i>
Vector	-	-	-	-	-
LGF2	-	+++*	nt	nt	nt
<i>popN</i>	-	nt	-	-	+
<i>pcr2</i>	-	nt	-	-	-
<i>pcr2-pscB</i>	-	nt	+	-	-

\* Positive control provided by the kit. -, no interaction ( $\beta$ -galactosidase activities < 150); +, positive interaction ( $\beta$ -galactosidase activities of 250-350 350-450 and >450 are marked as +, ++, +++, respectively; nt, not tested.

### 2.6 在 *pcr2*<sup>-</sup> 突变体中 PopN 蛋白无法分泌到胞外

细菌双杂交实验结果显示, *pcr2* 基因编码蛋白可能是 PopN 蛋白的伴侣蛋白(chaperon), 具有维持 PopN 蛋白构像, 促进分泌的功能。为了研究这一推论的正确性, 我们采用 Western blot 方法, 检测 *pcr2*<sup>-</sup> 突变体中 PopN 蛋白的分泌情况, 结果如图 6 所示, 尽管 *pcr2*<sup>-</sup> 突变体细胞内和野生型菌株 PAK 细胞内的 PopN 蛋白的数量相似, 但是在 *pcr2*<sup>-</sup> 突变体的上清液中几乎无法检测到 PopN 蛋白, 该结果显示, *pcr2* 基因缺失影响 PopN 蛋白的分泌。

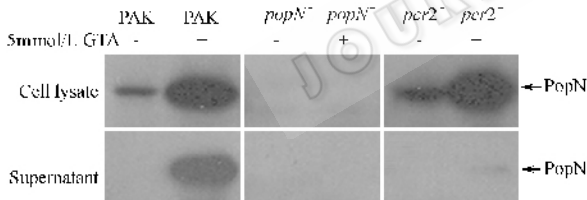


图 6 Pcr2 蛋白影响 PopN 蛋白的分泌

Fig. 6 Secretion of PopN protein in different *Pseudomonas aeruginosa* strains. Rabbit anti-PopN serum was first purified with affinity method and used in the detection of PopN protein in both cell associated and supernatant samples. Wild type strain PAK was used as controls, *popN*<sup>-</sup> mutant was used as negative control. WO EGTA: non-inducing condition, without addition of EGTA; WI EGTA: inducing condition, with EGTA in the cultures.

### 2.7 Pcr2 蛋白可以分泌到细胞外

为了研究 Pcr2 蛋白是否可以通过 III 型分泌系统分泌到细胞外, 我们构建了相应质粒(见材料与与方法)分别转化进入 *pcr2*<sup>-</sup> 突变体中。在 TTSS 诱导和非诱导条件下, 分别检测上清液中是否存在 Pcr2 蛋白。上清液经过 TCA 沉淀浓缩后上样, 我们采用鼠抗 flag 的单克隆抗体作为一抗, 用于 Western blot, 结果发现 Pcr2 蛋白可以分泌到细胞外(图 7)。

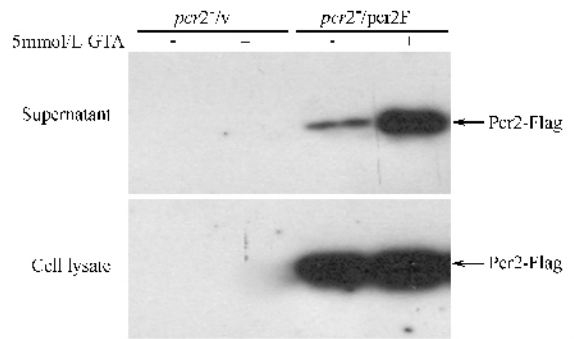


图 7 Pcr2-Flag 蛋白可以分泌到细胞外

Fig. 7 Secretion of Pcr2-flag fusion protein during TTSS induction assay. Anti-flag monoclonal antibody was used as first antibody during western blot and HRP conjugated sheep anti-mouse antibody was used as secondary antibody. V: vector control pYAN0636; pcr2F: plasmid containing flag tagged *pcr2* gene pYAN0633.

## 3 讨论

本研究选择 *pcr2* 基因作为研究对象, 从多个方面分析了 *pcr2*<sup>-</sup> 突变体 TTSS 表型的变化, 发现该突变体分泌能力显著下降, 转运细胞毒素至宿主细胞内的数量也明显降低。为了分析造成这些表型变化的原因, 我们设计了细菌双杂交系统实验, 发现 *pcr2*、*pscB* 和 *popN* 这三个基因之间可能存在相互结合的关系。通过 DNA 序列比较, 我们知道铜绿假单胞菌的 *pcr2*、*pscB* 和 *popN* 基因, 分别与耶尔森氏菌 (*Yersinia enterocolitica*) *syncN*、*yscB* 和 *yopN* 基因具有很高的同源性, *SycN* 和 *YscB* 蛋白形成的复合体能够与 *YopN* 蛋白结合, 调节 TTSS 的表达和分泌<sup>[15]</sup>, 间接证实了本文实验结果的正确性。对耶尔森氏菌 *syncN*<sup>-</sup> 突变体研究发现, TTSS 的表达和分泌 Yops 蛋白的水平明显低于野生型, 与 *pcr2*<sup>-</sup> 突变体的表型非常相似<sup>[15, 16]</sup>。

在 PopN 蛋白的分泌实验中, *pcr2*<sup>-</sup> 突变体的上清液中无法检测到 PopN 蛋白, 显示 Pcr2 蛋白对 PopN 蛋白分泌的重要性。因此, 我们推论 Pcr2 蛋白可能通过与 PopN 蛋白的结合, 调节 TTSS 的表达和分泌。近来的研究表明, PopN 蛋白对 TTSS 的表达起负调控作用, 但是其调控方式还没有明确。目前有两种模型, 一种为“帽子结构 (cap structure) 模型”, 另一种为“塞子结构 (plug structure)”<sup>[16-18]</sup>。我们的研究结果表明, Pcr2 蛋白是 PopN 蛋白的伴侣蛋白, PopN 蛋白的分泌依赖于 Pcr2 蛋白的存在(表 3, 图 6)。同时我们也注意到, *pcr2*<sup>-</sup> 突变体与 *popN*<sup>-</sup> 突变体的表型, 存在着显著区别, 因此, 关于这些基因如何参与 TTSS 的调控还无法明确。另外, 本文发现 Pcr2 蛋白同样能分泌到细胞外, 而其同源蛋白 *SycN* 在耶尔森氏菌中, 则不能分泌, 只具有伴侣蛋白的作

用,这一结果显示 Pcr2 蛋白可能参与分泌器的早期形成。

### 参 考 文 献

- [ 1 ] Finck-Barbancon V ,Goranson J ,Zhu L ,*et al.* ExoU expression by *Pseudomonas aeruginosa* correlates with acute cytotoxicity and epithelial injury. *Mol Microbiol* ,1997 **25** :547 – 557.
- [ 2 ] Yahr TL ,Mende-Mueller LM ,Friese MB ,*et al.* Identification of type III secreted products of the *Pseudomonas aeruginosa* exoenzyme S regulon. *J Bacteriol* ,1997 **179** :7165 – 7168.
- [ 3 ] Sundin C ,Thelaus J ,Broms JE ,*et al.* Polarisation of type III translocation by *Pseudomonas aeruginosa* requires PcrG ,PerV and PopN. *Microb Pathog* 2004 **37** :313 – 322.
- [ 4 ] Yang H ,Shan Z ,Kim J ,*et al.* Regulatory role of PopN and its interacting partners on type III secretion of *Pseudomonas aeruginosa* . *J Bacteriol* 2007 **189** :2599 – 2609.
- [ 5 ] Broms JE ,Edqvist PJ ,Carlsson KE ,*et al.* Mapping of a YscY binding domain within the LcrH chaperone that is required for regulation of *Yersinia* type III secretion. *J Bacteriol* ,2005 **187** :7738 – 7752.
- [ 6 ] Hornet M ,Roggenkamp A ,Geiger AM ,*et al.* Triggering the ExoS regulon of *Pseudomonas aeruginosa* : A GFP-reporter analysis of exoenzyme ( Exo ) S ,ExoT and ExoU synthesis. *Microb Pathog* , 2000 **29** :329 – 343.
- [ 7 ] Bradley TJ ,Khan NH. The production of extracellular lipids by *Pseudomonas aeruginosa* NCTC 2000 in stationary liquid media containing macrogols. *J Pharm Pharmacol* ,1974 **26** :900 – 902.
- [ 8 ] Frank DW ,Nair G ,Schweizer HP. Construction and characterization of chromosomal insertional mutations of the *Pseudomonas aeruginosa* exoenzyme S trans-regulatory locus. *Infect Immunol/Lun* ,1994 **62** :554 – 563.
- [ 9 ] Totten PA ,Lory S. Characterization of the type a flagellin gene from *Pseudomonas aeruginosa* PAK. *J Bacteriol* ,1990 **172** :7188 – 7199.
- [ 10 ] Nunn D ,Bergman S ,Lory S. Products of three accessory genes , *pilB* ,*pilC* ,and *pilD* ,are required for biogenesis of *Pseudomonas aeruginosa* pili. *J bacterial* ,1990 **172** :2911 – 2919.
- [ 11 ] Schweizer HP. *Escherichia-Pseudomonas* shuttle vectors derived from pUC18/19. *Gene* ,1991 **97** :109 – 121.
- [ 12 ] Hoang TT ,Karkhoff-Schweizer RR ,Kutchma AJ ,*et al.* A broad-host-range Flp-FRT recombination system for site-specific excision of chromosomally-located DNA sequences : application for isolation of unmarked *Pseudomonas aeruginosa* mutants. *Gene* ,1998 **212** :77 – 86.
- [ 13 ] Ha U ,Jin S. Growth phase-dependent invasion of *Pseudomonas aeruginosa* and its survival within HeLa cells. *Infect Immunol/Lun* , 2001 **69** :4398 – 4406.
- [ 14 ] Miller JH. Experiments in molecular genetics. Cold Spring Harbor , NY ,Cold Spring Harbor Laboratory Press ,1972.
- [ 15 ] Day JB ,Plano GV. A complex composed of SycN and YscB functions as a specific chaperone for YopN in *Yersinia pestis* . *Mol Microbiol* , 1998 **30** :777 – 788.
- [ 16 ] Forsberg A ,Viitanen AM ,Skumik M ,*et al.* The surface-located YopN protein is involved in calcium signal transduction in *Yersinia pseudotuberculosis* . *Mol Microbiol* ,1991 **5** :977 – 986.
- [ 17 ] Iriarte M ,Sory MP ,Boland A ,*et al.* TyeA ,a protein involved in control of Yop release and in translocation of *Yersinia* Yop effectors. *EMBO J* ,1998 **17** :1907 – 1918.
- [ 18 ] Kenjale R ,Wilson J ,Zenk SF ,*et al.* The needle component of the type III secretin of *Shigella* regulates the activity of the secretion apparatus. *J Biol Chem* 2005 **280** :42929 – 42937.

## Characterization of *pcr2* gene of *Pseudomonas aeruginosa*

YANG Hong-jiang ,LI Ming-chun ,WEI Dong-sheng ,XING Lai-jun \*

( Tianjin Key Laboratory of Microbial Functional Genomics ,Department of Microbiology ,  
Nankai University ,Tianjin 300071 ,China )

**Abstract** :Type III secretion system ( TTSS ) is an important virulence factor encoding by *pseudomonas aeruginosa* . About 40 genes are involved and they function as structure proteins ,chaperons ,regulators ,and effectors proteins ,respectively. Although some genes have been studied previously ,functions of many genes remained unknown. *Pcr2* gene is the third gene of *popN* operon that is one of the five operons of the TTSS gene clusters. Its functions were investigated in this study. First ,by characterization of the phenotypes of *pcr2*<sup>-</sup> mutant ,we found that the abilities of secreting or translocating effectors proteins were significantly damaged in the absence of Pcr2 protein ,suggesting that Pcr2 protein involved in both the secretion and translocation processes of TTSS. Second ,evidences were provided that no PopN protein was detectable in supernatant of *pcr2*<sup>-</sup> mutant culture. Combined with the data from the bacterial two-hybrid system ,we can conclude that Pcr2 protein might function as part of a chaperone complex for the PopN protein. Third ,Pcr2 protein was found secreted in a TTSS-dependent manner ,suggesting that secreted Pcr2 may play a role in the TTSS needle biogenesis.

**Keywords** : type III secretion system ; *pcr2* gene ; bacterial two-hybrid system ; *Pseudomonas aeruginosa*

\* Corresponding author. Tel 86-22-23508506 ,E-mail xinglaij@eyou.com

Received : 2 December 2006/ Accepted : 2 February 2007/ Revised : 12 June 2007