

Pseudomonas mosselii E1 铁载体合成相关基因 *cysI* 的克隆与功能初步分析

黄伟红, 丁延芹, 姚良同, 杜志兵, 杜秉海*

(山东农业大学生命科学学院微生物学系 泰安 271018)

摘 要 从棉花根际分离的铁载体产生菌 E1, 其 16S rDNA 与 *Pseudomonas mosselii* ATCCBAA-99 的同源性为 100%。采用三亲本杂交方法将携带转座子 Tn5-1063 的质粒 pRL1063a 导入 E1 中进行转座子插入诱变。利用 CAS 法, 从 1000 个突变株中, 筛选到一株铁载体合成缺失突变株 E1-185。利用 TAIL-PCR 方法, 扩增位于 Tn5-1063 两端的侧翼序列。测序结果表明, 转座子插入到 E1 的 *cysI* 基因内。该基因与 *Pseudomonas entomophila* L48 的 *cysI* 同源性为 96%, 其 *CysI* 氨基酸序列相似性为 97%。该基因与半胱氨酸的合成密切相关, 而在加有半胱氨酸的 CAS 平板上, 突变株恢复了铁载体产生能力, 证明 *cysI* 在 E1 铁载体合成过程中具有重要作用。据推测, *cysI* 可能与铁载体合成途径中关键蛋白 acyl-S-PCPs 的形成有关。

关键词: *Pseudomonas mosselii*, 铁载体合成, *cysI*, 半胱氨酸

中图分类号: Q936 **文献标识码**: A **文章编号**: 0001-6209(2007)05-0910-04

微生物铁载体就是生长在低铁环境中的细菌和真菌合成的一种具有高 Fe(III) 专一性的低分子量的铁螯合剂^[1]。植物根际中具有铁载体合成能力的微生物通过竞争铁营养, 不仅能够改善自身的营养状况, 还能够供给植物铁营养或通过植物病原菌竞争铁营养达到生物防治的作用^[2]。

微生物铁载体的结构依产生菌不同而有很大差异, 一般根据其螯合基团的化学特性分为三大类: 羟胺类铁载体, 儿茶酚类铁载体和共同拥有以上两类螯合基团的铁载体^[3]。与铁载体合成、转运和调节相关的基因位于基因组或质粒上, 常以操纵子的形式存在^[4]。铁载体合成基因又包括铁载体各个组成部分的合成基因和催化合成最终铁载体的基因。铁载体转运相关基因包括外膜受体蛋白基因、转运蛋白基因及调控以上基因活性有关的基因。与铁载体合成相关的许多蛋白都属于非核糖体合成肽^[4]。非核糖体合成肽的合成不需要 mRNA 做模板, 肽链的延伸是由一系列的 acyl-S-enzyme 催化形成酰基硫载体蛋白(acyl-S-PCPs)来催化的^[4]。*CysI* 蛋白是硫代谢过程当中的重要酶^[5], 催化亚硫酸盐转化成硫化氢, 进而合成 L-半胱氨酸, 进一步合成辅酶 A。辅酶 A 在磷酸泛酰巯基乙胺转移酶的催化作用下, 为 PCP(酰基硫载体蛋白)提供巯基(-SH), 由 Apo-PCP 活化形成 Holo-PCP, Holo-PCP 参与到铁载体的合成过程当中形成 acyl-S-PCPs, 组成铁载体的单体分子在 acyl-S-PCPs 的转运作用下组合成铁载体^[4]。

本文对从棉花根际分离的一株铁载体产生菌 E1 进行了

鉴定, 利用转座子 Tn5-1063 进行插入诱变, 筛选铁载体合成缺失突变株, 并进行了相关基因的克隆和功能初步分析。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒: 实验采用的菌株和质粒参见表 1。

表 1 菌株和质粒

Table 1 Bacterial strains and plasmids

Strains and plasmids	Characteristic	Source
E1	Producing siderophores, Chl^+	This laboratory
E1-185	Deficiency in siderophores synthesis, Chl^+ , Kan^r	This study
<i>E. coli</i> DH5 α	Host of plasmids	This laboratory
pRL1063a	Carrying Tn5- <i>luxAB</i> , Kan^r	University of York, UK
pRK2013	Helper plasmid, Kan^r	This laboratory
pGEM-T easy	Cloning and sequencing vector, Amp^r	Promega

1.1.2 主要试剂和仪器: 限制性内切酶、DNA Marker、蛋白酶 K、IPTG 和 X-Gal 等购自 TaKaRa 公司; *Taq* DNA 聚合酶、*Pfu* DNA Polymerase、DNA 凝胶回收试剂盒和抗生素等购自上海申能博彩公司。引物的合成由上海英俊生物技术有限责任公司完成。PCR 仪器型号为 T-Gradient 96。

基金项目: 山东省优秀中青年科研奖励基金(2006BS06012)

* 通讯作者. Tel: 86-538-8242908; E-mail: bhdu@sdau.edu.cn

作者简介: 黄伟红(1980-), 女, 山东人, 硕士研究生, 主要从事分子微生物学的研究。E-mail: hwh7252@163.com

收稿日期: 2007-02-12; 接受日期: 2007-03-22; 修回日期: 2007-07-18

1.2 培养基和培养条件

E1、突变株和大肠杆菌 (*Escherichia coli*) DH5 α 均采用 LB 培养基, 在 37 $^{\circ}$ C 培养。抗生素所用浓度: E1 为 20 μ g/mL 氯霉素 (Chl) 突变株为 20 μ g/mL 氯霉素 (Chl) 和 30 μ g/mL 卡那霉素 (Kan), *E. coli* DH5 α (pRL1063a) 和 *E. coli* DH5 α (pRK2013) 为 30 μ g/mL 卡那霉素 (Kan)。

1.3 铁载体产生菌 E1 的鉴定

参照文献 [6] 对分离物进行生理生化鉴定, 16S rDNA 扩增使用通用引物 P1: 5'-CGggatccAGAGTTTGATCCTGCTCAGAACGAACGCT-3'; P6 5'-CGggatccTACGGCTACCTTGTACGACTTCACCCC-3'。

1.4 E1 铁载体合成缺失突变株的筛选及验证

转座子 Tn5-1063 对 E1 进行诱变参见文献 [7], 采用 CAS (Chrome azurol S) 法 [8] 检测突变株产铁载体能力。根据 Tn5-1063 中的 *luxA* 序列设计引物 5'-TGGATCGCTTTGTTGCGG-3' 和 5'-TCCATTAGCTTCAAATCCGCA-3', 进行 PCR 验证。

1.5 DNA 提取

E1 总 DNA 提取按文献 [7] 进行; 质粒 DNA 提取按文献 [9] 进行。

1.6 目标基因的克隆

参照文献 [10] 介绍的 TAIL-PCR 方法, 克隆突变株中 Tn5-1063 的侧翼序列, 所用的特异性引物见表 2。

表 2 TAIL-PCR 使用的特异性引物

Table 2 TAIL-PCR specific primers

Primer No.	Primer sequenc(5'→3')
TR1	TGCGGATAAAATCGGTAAGCG
TR2	ACCCCTCTGATGAGATGTTATTGA
TR3	CGAAGAGAACACAGATTTAGCCC
TL1	GGCTGCCTTCGCTACTGAT
TL2	CCCAAGATCATGTGAACITCC
TL3	CTTAGCTTATGAGTTTACACCTGCT

Notes :TR, Right specific primers ;TL, Left specific primers.

以 E1 总 DNA 为模板, 根据序列设计引物, *cysI*P1: 5'-TGCATGCTAGCCTGAGACA-3'; *cysI*P2: 5'-GGCTGTCT-TAATGATTCCG-3' 用 *Pfu* DNA polymerase, 扩增完整的目标

基因。

1.7 DNA 序列测定和分析

将 PCR 产物连接到 pGEM-T easy 载体上, 转化大肠杆菌 (*Escherichia coli*) DH5 α 。序列测定由上海英俊生物技术有限责任公司完成。通过 GenBank 进行序列同源性分析。

1.8 互补验证实验

分别接种新鲜的 E1、E1-185 于不含半胱氨酸和含半胱氨酸 25 μ g/mL 的 CAS 平板上, 37 $^{\circ}$ C 培养 1~2d, 观察其生长及产生铁载体的情况 [11]。

2 结果

2.1 铁载体产生菌 E1 的鉴定

从棉花根际分离的铁载体产生菌 E1 可以利用葡萄糖作为碳源, 在 pH7.5 的环境下生长, 具有明胶液化能力, 水解淀粉, 耐受 0.001% 溶菌酶, 生长温度范围为 4 $^{\circ}$ C~41 $^{\circ}$ C, 不能耐受酯酶 Tween80, 无反硝化能力等。这些生理生化特性表明 E1 属于 *Pseudomonas*。E1 的 16S rDNA (GenBank Accession No. DQ837709) 与 *Pseudomonas mosselii* sp. nov. ATCCBAA-99 [12] 的同源性为 100%。

2.2 铁载体合成缺失突变株的筛选

利用 Tn5-1063 对 E1 进行随机插入诱变, 获得了 1000 个突变株。通过 CAS 平板检测, 从中筛选出 1 个铁载体合成缺失突变株 E1-185。E1-185 在 LB 平板上能够正常生长, 在 CAS 平板上生长较弱。分别以 E1、E1-185 的总 DNA 和 pRL1063a 质粒为模板, 根据 Tn5-1063 的 *luxA* 序列设计引物, 进行 PCR 扩增, 并进行序列测定。PCR 产物大小和测序结果证实, E1-185 铁载体合成能力的缺失是由于 Tn5-1063 插入到 E1 基因组的相关基因中所引起的。

2.3 E1-185 基因组中 Tn5-1063 侧翼 DNA 片段的分离和序列测定

采用 TAIL-PCR 方法, 以突变株 E1-185 的总 DNA 为模板, 分别用特异性引物 TL1、TL2、TL3 和随机兼并引物, 扩增 Tn5-1063 左侧序列 (图 1), 用特异性引物 TR1、TR2、TR3 和随机兼并引物, 扩增 Tn5-1063 右侧序列。将第三轮 PCR 产物连接到 pGEM-T easy 载体上, 进行序列测定, 将得到的序列去掉同向重复的靶序列 GACCTGGAC, 并接得到完整序列。将该序列进行互联网检索 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)。根

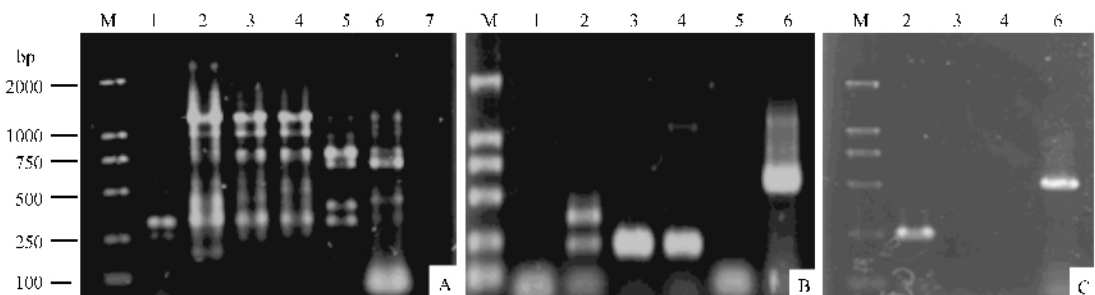


图 1 E1-185 基因组的 TAIL-PCR 产物电泳图谱

Fig.1 Products of TAIL-PCR of the mutant E1-185. A : Primary PCR ; B : Secondary PCR ; C : Tertiary PCR ; M : 2000bp

DNA ladder ; 1~7 : TAIL-PCR products using the arbitrary degenerate primers AD1~AD7, respectively.

据 DNA 序列分析,该基因与 *Pseudomonas entomophila* L48 的 *cysI* 同源率为 96%。对由 DNA 序列衍生的氨基酸序列在 GenBank 的蛋白质库中进行比较,其 *CysI* 氨基酸序列相似性为 97%。根据测序结果,设计上游和下游引物,通过高保真 PCR 扩增,获得 *P. mosselii* E1 的 *cysI* (GenBank Accession No. EF143991) 大小为 1653bp,编码 550 个氨基酸。转座子 Tn5-1063 插入到 *cysI* 的第 1315 个碱基处,为第 437 和 438 个氨基酸之间。该区域是亚硝酸盐和亚硫酸盐还原酶 4Fe-4S 功能域,该功能域为半胱氨酸的合成提供巯基。

2.4 *P. mosselii* E1 *cysI* 的功能验证

将 E1 和突变株 E1-185 分别接种于不含半胱氨酸和含有 25 μ g/mL 半胱氨酸的 CAS 平板上,在 37 $^{\circ}$ C 下进行培养。结果表明,在添加半胱氨酸的 CAS 平板上,突变株 E1-185 恢复了铁载体合成能力(图 2)。这说明, *cysI* 不仅与半胱氨酸合成有关,而且与 E1 铁载体的合成有关。

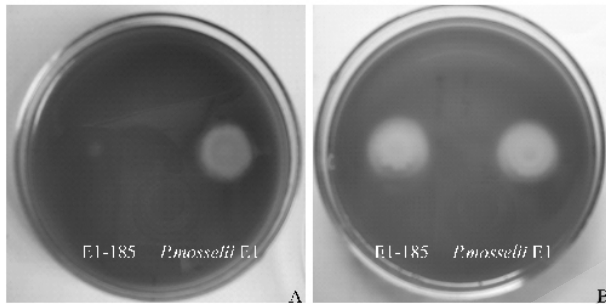


图 2 E1-185 在普通 CAS 平板上和含有半胱氨酸的 CAS 平板上的生长情况

Fig. 2 Phenotypic analysis of siderophores production by E1 and the mutant E1-185. A: CAS plate; B: CAS plate with 25 μ g/mL cysteine.

3 讨论

本实验获得了 E1 菌株的铁载体合成缺失突变株 E1-185。E1-185 完全丧失了合成铁载体的能力,在高铁环境下生长微弱,在含有 25 μ g/mL 半胱氨酸的 CAS 平板上生长正常并且能够产生铁载体。对 E1-185 的基因组进行 TAIL-PCR 扩增和测序,研究表明,转座子 Tn5-1063 插入到 E1 基因组的 *cysI* 的亚硝酸盐和亚硫酸盐还原酶 4Fe-4S 功能域当中,亚硝酸盐和亚硫酸盐还原酶 4Fe-4S 功能域的突变影响巯基的形成,微生物不能合成半胱氨酸,导致合成铁载体能力缺失。Patel 等对非核糖体肽类铁载体的合成过程的研究表明, L-半胱氨酸可以和 aminoacyl-S-enzyme 产生共价结合形成酰基硫载体蛋白(acyl-S-PCPs)^[13]。这些都说明,半胱氨酸直接参与了铁载体的合成, *cysI* 是铁载体合成相关基因。这也进一步证明铁载体的合成与生物的硫代谢过程是密切相关的^[11]。Dabboussi 等认为 *Pseudomonas mosselii* sp. nov. 能够

产生 pyoverdine 类型的铁载体^[12]。本文首次报导了其铁载体合成相关的 *cysI*。

致谢 本文所使用的质粒 pRL1063a 和 pRK2013 由中国农业大学杨苏声教授实验室提供。在此谨表感谢!

参 考 文 献

- [1] Winkelmann G. Microbial siderophore-mediated transport. *Biochem Soc Trans*, 2002, **30**(4): 691 – 696.
- [2] Haas D, D'efago G. Biological control of soil-borne pathogens by fluorescent pseudomonads. *Nat Rev Microbiol*, 2005, **3**(4): 307 – 319.
- [3] Ding YQ, Du BH. Screening of PGPR strains isolated from the rhizosphere of maize. *Soils and Fertilizers*, 2001, **3**: 41 – 43.
- [4] Crosa JH, Walsh CT. Genetics and assembly line enzymology of siderophore biosynthesis in bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2002, **66**(2): 223 – 249.
- [5] Willson PJ, Gerlach GF, Klashinsky S, et al. Cloning and characterization of the gene coding for NADPH-sulfite reductase hemoprotein from *Actinobacillus pleuropneumoniae* and use of the protein product as a vaccine. *Can J Vet Res*, 2001, **65**(4): 206 – 212.
- [6] 东秀珠,蔡妙英,等. 常见细菌系统鉴定手册. 北京: 科学出版社, 2001.
- [7] Du BH, Li XH, Lin RS, et al. Study on isolation of *noeB* of *Sinorhizobium meliloti* 042BM by Tn5-1063 mutagenesis. *Acta Microbiologica Sinica*, 2004, **44**(2): 206 – 209.
- [8] Schwyn B, Neilands JB. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophore. *Anal Biochem*, 1987, **160**(1): 47 – 56.
- [9] Sambrook J, Russell DW. 分子克隆. 黄培堂, 等译. 第三版. 北京: 科学出版社, 2002.
- [10] Liu YG, Mitsukawa N, Oosumi T, et al. Efficient isolation and mapping of *Arabidopsis thaliana* T-DNA insert junctions by thermal asymmetric interlaced PCR. *Plant J*, 1995, **8**(3): 457 – 463.
- [11] Farmer KL, Thomas MS. Isolation and characterization of *burkholderia cenocepacia* mutants deficient in pyochelin production: pyochelin biosynthesis is sensitive to sulfur availability. *J Bacteriol*, 2004, **186**(2): 270 – 277.
- [12] Dabboussi F, Hamze M, Singer E, et al. *Pseudomonas mosselii* sp. nov., a novel species isolated from clinical specimens. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2002, **52**(2): 363 – 376.
- [13] Patel HM, Tao J, Walsh CT. Epimerization of an L-cysteinylyl to a D-cysteinylyl residue during thiazoline ring formation in siderophore chain elongation by pyochelin synthetase from *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochemistry*, 2003, **42**(35): 10514 – 10527.

Cloning and functional analysis of *cysI* gene involved in siderophores biosynthesis in *Pseudomonas mosselii* E1

HUANG Wei-hong, DING Yan-qin, YAO Liang-tong, DU Zhi-bing, DU Bing-hai*

(Department of Microbiology, College of life sciences, Shandong Agricultural University, Tai'an 271018, China)

Abstract : A siderophores-producing strain E1 was isolated from the rhizosphere of cotton. Its 16S rDNA is identical to that of *Pseudomonas mosselii* sp. nov. at 100% level. The suicide plasmid pRL1063a carrying Tn5-1063 was introduced into E1 by triparental mating and 1000 transposon insertion mutants were subsequently screened using CAS assay. One mutant deficiency in siderophores production was obtained, namely, E1-185. DNA sequences flanking Tn5-1063 of E1-185 was amplified by TAIL-PCR. According to the DNA sequencing results, it is found that Tn5-1063 was inserted into *cysI* gene. The *cysI* of E1 is identical to that of *Pseudomonas entomophila*. L48 at 96% level, and similarity of amino acid sequences of their *CysI* is 97%. The *cysI* gene is required for the synthesis of cysteine. However, The ability in siderophores production of E1-185 on the plate of CAS with cysteine was recovered. It is indicated that *cysI* play an important role during the synthesis of siderophores. It was supposed that *cysI* is involved in the synthesis of acyl-S-PCPs, which is the key protein in the synthesis pathway of siderophores.

Keywords : *Pseudomonas mosselii* ; siderophores synthesis ; *cysI* ; cysteine

Foundation item : Shandong Provincial outstanding young and middle-aged research incentive fund (2006BS06012)

* Corresponding author. Tel : 86-538-8242908 ; E-mail : bhdu@sdau.edu.cn

Received : 12 February 2007 / Accepted : 22 March 2007 / Revised : 18 July 2007