

土壤假单胞菌 593 使用 Pcs 途径合成磷脂酰胆碱

熊敏, 吴彬, 何火光, 李洋, 王行国*

湖北大学生命科学学院, 武汉 430062

摘要:【目的】原核生物有两条代谢途径 N-甲基化途径(Pmt 途径)和磷脂酰胆碱合酶途径(Pcs 途径)合成磷脂酰胆碱(PC)。本文对土壤细菌 *Pseudomonas* sp. 593 的磷脂酰胆碱合成进行了研究, 试图弄清楚假单胞菌的磷脂酰胆碱的合成途径。【方法】通过氨基酸序列比较, 获得已报道的磷脂酰胆碱合酶(Pcs)的氨基酸保守序列, 并设计简并引物, 从 *Pseudomonas* sp. 593 总 DNA 中 PCR 扩增出磷脂酰胆碱合酶基因(*pcs*)的片段, 然后用扩增的 DNA 片段作探针, 对 *Pseudomonas* sp. 593 基因组 DNA 亚克隆文库进行菌落原位杂交, 获得 *pcs* 全基因序列; 利用同源重组原理进行活体突变, 获得 *Pseudomonas* sp. 593 *pcs*⁻ 突变体; 采用薄层层析(TLC)法分析细菌总磷脂, 检测 PC 含量以及 *pcs* 基因活性。【结果】TLC 分析显示 *Pseudomonas* sp. 593 细菌仅在添加外源胆碱的 M9 或 LB 培养基中生长时才合成 PC; 从 *Pseudomonas* sp. 593 细菌中克隆出 894 bp 的 DNA 序列, 编码的蛋白具有磷脂酰胆碱合酶活性; 活体缺失 *pcs* 基因后, *Pseudomonas* sp. 593 *pcs*⁻ 突变体在添加或不添加胆碱的条件下都不能合成 PC。【结论】Pcs 途径是土壤 *Pseudomonas* sp. 593 乃至其它假单胞菌合成磷脂酰胆碱的唯一途径。

关键词: 土壤假单胞菌, 磷脂酰胆碱合酶, 磷脂酰胆碱合酶途径, 磷脂酰胆碱

中图分类号: Q933 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2011)06-0747-09

磷脂酰胆碱(Phosphatidylcholine, PC)是真核生物膜磷脂中的主要组分, 可通过 CDP-胆碱途径和 N-甲基化途径合成。多数原核生物膜磷脂中缺乏 PC, 早期只在几种光合细菌中发现有 PC 存在。随着研究的深入, 发现越来越多的细菌含有 PC。通过分析细菌基因组数据库, Christian Sohlenkamp 等推测超过总数 10% 的细菌中可能含有 PC, 且绝大多数含 PC 的细菌都是与真核生物相关联的致病菌或共生菌^[1]。最近的研究发现细菌膜磷脂中的 PC 往往具有重要的生物学功能。如在球形红细菌 *Rhodobacter sphaeroides* 中, PC 是细菌进行光合作用不可缺少的膜组分^[2-3]; 大豆慢生根瘤菌

Bradyrhizobium japonicum 膜磷脂中 PC 的含量与细菌在豆科宿主中的共生能力相关^[4-5]; 在慢生菌 *Bradyrhizobium* sp. SEMIA 6144 中, PC 合成水平的降低使细菌的细胞大小和活动力均受到影响^[6]; 在根瘤农杆菌 *Agrobacterium tumefaciens* 中, PC 合成途径中的关键酶缺失会导致突变体不能在寄主植物上形成肿瘤^[7-8]; 嗜肺军团菌 *Legionella pneumophila* *pmtA*⁻ *pcs*⁻ 缺失双突变体的致病力也明显下降^[9]。但与野生型相比, 假单胞菌致病菌 *Pseudomonas aeruginosa* *pmtA*⁻ *pcs*⁻ 突变体尚未表现明显不同的表型^[10]。为什么假单胞菌需要合成 PC 以及 PC 的生理学或生物功能是什么仍值得深入探讨。

基金项目: 国家自然科学基金(30970076)

* 通信作者。Tel: +86-27-88661237-8066; E-mail: xgw569@hotmail.com

作者简介: 熊敏(1975-), 女, 湖北江陵人, 博士研究生, 研究方向为生化与分子生物学。

收稿日期: 2010-12-15; 修回日期: 2011-03-19

以前认为 N-甲基化途径是细菌 PC 生物合成的唯一途径。然而近来在苜蓿中华根瘤菌 *Sinorhizobium meliloti* 中发现了一个全新的磷脂酰胆碱合酶途径 (Pcs 途径)^[11]。在 Pcs 途径中,磷脂酰胆碱合酶 (Pcs) 直接以胆碱和 CDP-二脂酰甘油 (CDP-DAG) 为底物经缩合生成 PC。已发现多种共生菌和病原菌具有 Pcs 途径^[9, 12-14], 或单独或与 N-甲基化途径一起负责细菌的 PC 合成。在 Pcs 途径中,磷脂酰胆碱合酶是合成 PC 的关键酶,酶促反应所需的底物之一胆碱通常由真核宿主提供。Pcs 途径似乎是原核生物特有的 PC 合成途径,真核生物基因组中尚未发现对应的 Pcs 同源序列^[1, 15]。

Pseudomonas sp. 593 是从土壤中分离得到的一株土壤假单胞菌。为了研究磷脂酰胆碱合酶的生物学功能以及细菌在土壤中与真核生物根系的相互作用,我们测定了该土壤假单胞菌在不同培养条件下的磷脂组分,并克隆到具磷脂酰胆碱合酶活力的 *pcs* 基因。通过活体突变,发现 *pcs*⁻ 突变菌株完全丧失了 PC 合成的能力,表明 Pcs 途径是 *Pseudomonas* sp. 593 合成 PC 的唯一途径,为后续 PC 在细菌生活环

境变迁中有何种生理作用以及在细菌与真核生物相互作用奠定了基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 主要试剂与仪器: 酵母粉和蛋白胨购自 Oxoid 公司; 氯霉素、卡那霉素和氨苄青霉素购自 Amresco 公司; pMD18-T 载体及各种酶制剂均购自大连宝生物工程有限公司; DNA 凝胶回收试剂盒和 PCR 产物清洁试剂盒购自 Axygen Scientific 公司; 地高辛 (DIG) 试剂盒购自 Roche 公司; IPTG、胆碱、磷脂标准品和报春花碱购自 Sigma 公司; 硅胶-60 板购自 Merck 公司; 其它试剂均为国产分析纯。实验仪器主要有 UV-2550 型紫外可见分光光度计 (日本岛津公司), TP600 型 PCR 仪 (日本 TaKaRa 公司), 凝胶成像分析系统 (温州新芝科学仪器厂), Tanon GIS 凝胶图像处理系统 (上海天能公司), 2510 型电转化仪 (Eppendorf 公司)。

1.1.2 实验菌株、质粒及引物: 实验中所用菌株、质粒和引物分别见表 1 和表 2。

表 1 实验菌株和质粒

Table 1 Bacterial strains and plasmids used in this study

Strains and plasmids	Characteristics	Source
<i>E. coli</i> DH5 & # 61537	F ⁻ , ϕ 80 <i>dlacZ</i> Δ M15, Δ (<i>lacZYA-argF</i>)	Invitrogen
<i>E. coli</i> BL21 (DE3) pLysS	F ⁻ , <i>ompT</i> , <i>hdsSB</i> (<i>rB</i> - <i>mB</i> -), <i>gal</i> (λ <i>cI857</i> , <i>ind1</i> , <i>Sam7nin5</i> , <i>LacUV5-T7 gene1</i>), <i>dcm</i> (<i>DE3</i>), pLysS	Novagen
<i>Pseudomonas</i> sp. 593	Amp ^r , Cm ^r	Our laboratory
pUC19- <i>sacB</i>	References ^[16-17]	Gift from Dr. Z. Chen
pTA- <i>kan</i>	Amp ^r , Kan ^r	Gift from Dr. L. T Hu
pET23a	T7-promoter, Amp ^r , His-Tag coding sequence, T7-terminator	Novagen
pBluescript SKII	Amp ^r	Stratagene

表 2 本研究所用引物

Table 2 Primers used in this study

Name	Oligo sequence(5'→3')	Restriction site
PCS-1	TRCCNCAYTTYGAYGG	
PCS-2	GGRTGNARRAAYTTCAT	
593- <i>pcs</i> -F1	AGGATCCATGGCAAGCCCAGGCCGCA	<i>Bam</i> H I
593- <i>pcs</i> -R1	AAAGCTTTCAGTTAAACCACCTCCAT	<i>Hind</i> III
593-F	AGGAAATGGTCAAGGAAGT	
593-R	ACAATTACGCCGAGCCCTT	
CF1	AGGTACCTGACCATGCTCTGCCGTGA	<i>Kpn</i> I
CR1	AGGATCCGAGTTCAGCCGGTTTTCTC	<i>Bam</i> H I
CF2	ACTCGAGAACATCGCCGTGACCTTC	<i>Xho</i> I
CR2	ATCTAGAATGTCGCCGAACGATTAC	<i>Xba</i> I
pse-CF	AGTCCGACTGACCATGCTCTGCCGTGA	<i>Sal</i> I
pse-CR	AGTCCGACATGTCGCCGAACGATTAC	<i>Sal</i> I

1.1.3 细菌培养: *Pseudomonas* sp. 593 在含有 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 氨基青霉素或 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 氯霉素的 LB 或 M9 培养基中 37°C 振荡培养。*E. coli* DH5 α #61537 和 BL21(DE3) pLysS 在 LB 培养基中 37°C 振荡培养。

1.2 细菌磷脂的抽提与鉴定

Pseudomonas sp. 593 在加或不加 1% (w/v) 胆碱、含 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 氨基青霉素或 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 氯霉素的 LB 或 M9 培养基中培养至对数后期, 4°C、8000 $\times g$ 离心收集菌体, 再参照文献^[18]建立的方法抽提细菌总磷脂。薄层层析(TLC)分析时点样 10 μL 磷脂样品, 具体操作参照文献^[18]进行。

1.3 基因组 DNA 的抽提

接种 *Pseudomonas* sp. 593 于含 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 氨基青霉素的 LB 中, 37°C 摇床培养过夜。取 1.4 mL 菌液离心收集菌体。用无菌水洗涤菌体 1 次, 加 400 μL 破菌缓冲液(200 mmol/L Tris-HCl(pH8.0), 25 mmol/L EDTA, 250 mmol/L NaCl, 5 mg/mL SDS) 悬浮菌体并 60°C 水浴 30 min。再加入 200 μL 3 mol/L NaAc(pH5.2) 混匀, -20°C 放置 10 min 后, 12000 $\times g$ 离心 15 min。将上清转入新的离心管, 加入等体积酚抽提, 上清液再用等体积氯仿-异戊醇和氯仿抽提, 乙醇沉淀 DNA。待 DNA 干燥后溶于适量 TE(pH8.0, 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ RNase)。

1.4 *pcs* 基因克隆

1.4.1 克隆 *pcs* 基因所需探针的制备: 对比搜索 GenBank(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)中的所有假单胞菌磷脂酰胆碱合酶基因的氨基酸序列, 选取两段同源性高且适合兼并引物设计的氨基酸序列(见图 1 方框所示)。

PCR 扩增 *pcs* 基因的部分区段。参照 Axygen Scientific 公司胶回收试剂盒上的操作说明回收 PCR 产物, 参照宝生物公司的产品说明书将 PCR 扩增的 DNA 片段与 pMD18-T 载体连接, 转化大肠杆菌感受态细胞 *E. coli* DH5 α #61537。参照文献^[19]制备大肠杆菌感受态细胞。将转化细胞涂布在 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 氨基青霉素的 LB 平板上, 于 37°C 培养过夜。使用 PCS-1、PCS-2(见表 2, 图 2)为引物, PCR 鉴定阳性克隆。阳性克隆送上海生工生物工程技术有限公司进行 DNA 测序。

1.4.2 Southern blot: 参照 DIG 试剂盒的使用说明, 将已测序的 *pcs* 基因片段进行 DIG 标记制备探针。用限制性酶 *Pst* I 消化 *Pseudomonas* sp. 593 总 DNA, 在 60 μL 反应体系中, 1 μL 12 U/ μL *Pst* I, 6 μL H buffer, 20 μg DNA, 加 ddH₂O 至 60 μL , 37°C 酶切 12 小时。0.7% 琼脂糖凝胶电泳分离后将 DNA 转移至硝酸纤维素膜上, 用 DIG 标记 DNA 探针与膜杂交, 具体杂交方法见参考文献^[19-20]。待确定杂交条带位置后在紫外灯下从凝胶上切取定位的 DNA 条带, 并用 Axygen Scientific 公司胶回收试剂盒回收 DNA 片段。

1.4.3 完整 *pcs* 基因的克隆: 用限制性酶 *Pst* I 酶切 pBluescript SK II 质粒(方法同 1.4.2)并参照宝生物产品说明书做去磷酸化处理, 然后与 1.4.2 中回收的 DNA 片段连接并转化 *E. coli* DH5 α #61537, 构建亚基因组文库。用 DIG 标记的探针经菌落原位杂交^[21]对亚基因组文库进行筛选, 找到含有假单胞菌 593 *pcs* 基因的阳性克隆。然后经上海生工生物工程技术有限公司 DNA 测序确定假单胞菌 593 *pcs* 基因的全序列。

<i>Pseudomonas-aeruginosa</i> -PA01	ARKYEVKEMLPHF \square FDGSLDLVIDYLT 87	LAALTLTRMKFLHPFRVRRQFMPL 187
<i>Pseudomonas-aeruginosa</i> -2192	ARKYEVKEMLPHF \square FDGSLDLVIDYLT 87	LAALTLTRMKFLHPFRVRRQFMPL 187
<i>Pseudomonas-aeruginosa</i> -C3719	ARKYEVKEMLPHF \square FDGSLDLVIDYLT 87	LAALTLTRMKFLHPFRVRRQFMPL 187
<i>Pseudomonas-aeruginosa</i> -UCBPP-3	ARKYEVKEMLPHF \square FDGSLDLVIDYLT 87	LAALTLTRMKFLHPFRVRRQFMPL 187
<i>Pseudomonas-mendocina</i> -ymp	ARRYDVKGVLPHF \square FDGSLDLVIDYLT 100	LAGLTLTKMKFLHPFRVRRQFMPL 200
<i>Pseudomonas-fluorescens</i> -Pfo-1	ARKVHVQSVLP \square PSFDGSLDLVIDYLT 93	LALLTVTRMKFLHPFRVRRFMP I 193
<i>Pseudomonas-syringae</i> -pv.	ARKVHTTSVLPHF \square FDGSLDLVIDYLT 84	LALLTMTRMKFLHPFRVRRFMP L 184
	** : . . * ** **	** * . * * ** ** * ** *

图 1 用于设计简并引物的假单胞菌磷脂酰胆碱合酶的氨基酸序列

Fig. 1 Conserved amino acid sequences shown in rectangular box were used for designing degenerate primers.

根据图 1 方框中的氨基酸序列设计一对简并引物 PCS-1、PCS-2(见表 2), 以假单胞菌 *Pseudomonas* sp. 593 基因组 DNA 为模板, 94°C 变性 5 min; 94°C 变性 30 s, 52°C 复性 90 s, 72°C 延伸 30 s, 30 个循环

1.5 *pcs* 基因活性鉴定

根据克隆并测序的假单胞菌 593 DNA 序列设计引物 593-*pcs*-F1 和 593-*pcs*-R1(见表 2, 图 2), 以假单胞菌 593 基因组 DNA 为模板扩增 *pcs* 基因。除

退火温度改为 64℃, 延伸时间 1 min 外, PCR 反应和操作程序与 1.4.1 相同。PCR 产物回收后用 *Bam*H I 和 *Sal* I 进行双酶切, 并插入 pET23a 表达载体, 转化大肠杆菌 BL21 (DE3) pLysS 感受态细胞。用含有 100 μg/mL 氨苄青霉素的 LB 固体平板 37℃ 培养 12 小时, 筛选阳性转化子。

将含 pET23a-*pcs* 重组质粒的阳性转化子接种到含 100 μg/mL 氨苄青霉素的 LB 液体培养基中 37℃ 培养过夜。次日按 1:100 体积比将菌液转接至含 100 μg/mL 氨苄青霉素和 1% 胆碱的 LB 培养基中培养至 OD_{600} 为 0.6, 加入 IPTG 至终浓度为 0.5 mmol/L, 继续培养 6–8 h。4℃ 8000 × g 离心收集菌体, 并按文献^[18]报道的方法抽提磷脂和 TLC 分析。用仅含有 pET23a 质粒的 BL21 (ED3) pLysS 作对照。

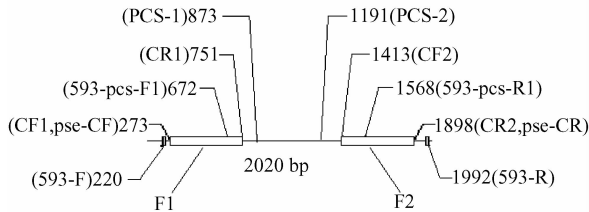


图 2 活体突变用引物在 *Pseudomonas* sp. 593 基因组上的位置关系

Fig. 2 The diagram showing locations of primers used for *in vivo* mutagenesis on *Pseudomonas* sp. 593 genomic DNA fragment containing *pcs* gene.

1.6 *pcs* 基因活体突变与鉴定

1.6.1 同源重组载体的构建: 以假单胞菌 593 基因组 DNA 为模板, 以引物 CF1、CR1 和引物 CF2、CR2 分别扩增 *pcs* 基因上游同源臂 F1 和下游同源臂 F2 (见表 2, 图 2)。除了引物 CF1、CR1 和引物 CF2、CR2 的退火温度均为 58℃ 外, PCR 反应和操作程序与 1.4.1 相同。将经 *Kpn* I 和 *Bam*H I 双酶切的 F1 片段和经 *Xho* I 和 *Xba* I 双酶切的 F2 片段分别插入载体 pTA-*kan* 的 *kan* 基因的两侧, 构建新的重组质粒 pTA-F1-*kan*-F2。再以 *pse*-CF、*pse*-CR 为引物 (见表 2, 图 2), 从 pTA-F1-*kan*-F2 质粒 DNA 中扩增出 F1-*kan*-F2 片段。除退火温度变为 64.1℃, 延伸时间为 2.5 min, PCR 反应和操作程序与 1.4.1 相同。PCR 扩增的 DNA 片段经 *Sal* I 酶切、回收, 并与 *Sal* I 酶切的 pUC19-*sacB* 载体连接, 最后转化 *E. coli* DH5α #61537。用

50 μg/mL 卡那霉素 LB 平板 37℃ 培养筛选阳性克隆子 pUC19-*sacB*-F1-*kan*-F2。

1.6.2 假单胞菌 593 *pcs*⁻ 突变菌株的筛选鉴定: 假单胞菌 593 电转感受态细胞的制备及电转化方法参照文献^[22-23]。电转时将 200 ng pUC19-*sacB*-F1-*kan*-F2 DNA 加入 150 μL 假单胞菌 593 电转感受态细胞中, 使用 2 mm 电转化杯, 1800 V 电击 3.5 s。尔后置细菌于 37℃、200 r/min 摇床复苏过夜。将复苏菌液涂布含 5% 蔗糖和 50 μg/mL 卡那霉素的 LB 平板, 37℃ 培养箱倒置培养 12 小时。从卡那霉素 LB 平板上挑取转化子, 接种含 50 μg/mL 氨苄青霉素的 LB 培养基中, 37℃ 摇床培养过夜。次日, 按 1:100 体积比分别转接于含 50 μg/mL 卡那霉素、5% 蔗糖和 1% 胆碱的 LB 培养基中, 培养至对数后期。抽取细菌的总 DNA 和磷脂, 对其进行 PCR 分析和 TLC 检测, 鉴定突变体。

2 结果和分析

2.1 *Pseudomonas* sp. 593 的磷脂组分

Pseudomonas sp. 593 是本实验室从野外土壤中分离的一种细菌。细菌既可利用 *Pcs* 合成途径合成磷脂酰胆碱, 也可通过 N-甲基化合成途径合成磷脂酰胆碱。鉴于假单胞菌致病菌 *Pseudomonas aeruginosa* 磷脂中含有 PC^[10], 为了弄清 *Pseudomonas* sp. 593 细菌是否合成 PC 以及合成 PC 的代谢途径, 将细菌分别接种在加或不加胆碱的 M9 基本培养基中 37℃ 培养。如在加胆碱的 M9 培养基中培养的细菌合成 PC 而在不含胆碱的 M9 培养基中生长时细菌不能合成 PC, 提示 *Pseudomonas* sp. 593 仅利用 *Pcs* 途径合成 PC。如果在不加胆碱的 M9 培养基中培养的细菌能合成 PC 则提示 *Pseudomonas* sp. 593 可利用 N-甲基化合成途径合成 PC。将 *Pseudomonas* sp. 593 菌株分别接种在含有和不含 1% (w/v) 胆碱的 M9 基本培养基中培养至对数后期, 抽取总磷脂进行 TLC 检测, 结果见图 3。图 3 显示 *Pseudomonas* sp. 593 只在添加胆碱的 M9 培养基中生长时能合成 PC, 而在未加胆碱的 M9 培养基中生长时则未检测出 PC。使用含和不含 1% (w/v) 胆碱的 LB 培养基中培养细菌, TLC 分析总磷脂的结果 (未显示) 与图 3 一致。说明土壤 *Pseudomonas* sp. 593 在添加外源的胆碱才能合成

PC, 其合成途径可能为 Pcs 途径。

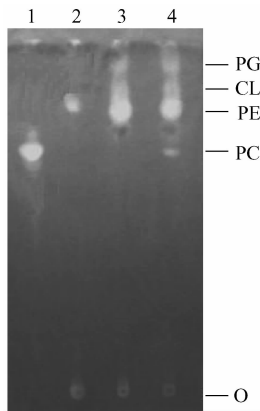


图3 *Pseudomonas sp. 593* 的总磷脂的 TLC 分析结果

Fig. 3 TLC analysis of total phospholipids extracted from *Pseudomonas sp. 593*. Lane 1: standard PC; lane 2: standard PE; lane 3: total phospholipids of *Pseudomonas sp. 593* growing in the M9 medium; lane 4: total phospholipids of *Pseudomonas sp. 593* growing in the M9 medium containing 1% choline.

2.2 *Pseudomonas sp. 593* 菌株拥有磷脂酰胆碱合酶基因

Pcs 途径中的关键酶是磷脂酰胆碱合酶。为了

证明 *Pseudomonas sp. 593* 菌株确实拥有 Pcs 途径, 使用简并引物 PCS-1 和 PCS-2 从 *Pseudomonas sp. 593* 基因组中扩增到一段长 318 bp 的片段。测序结果表明该片段中含有磷脂酰胆碱合酶核心保守序列 $DG(X)_2AR(X)_8K(X)_3P(X)_3G(X)_3D(X)_3D$, 并且由 DNA 序列翻译出来的氨基酸序列与基因库报道的相应的磷脂酰胆碱合酶氨基酸序列相似。因此, PCR 扩增出的 318 bp DNA 片段被确认为 *Pseudomonas sp. 593* 细菌的磷脂酰胆碱合酶基因的部分片段。

用 DIG 标记克隆的 318 bp DNA 作探针, 与经 *Pst* I 限制酶消化后的 *Pseudomonas sp. 593* 基因组 DNA 进行 Southern 杂交。在 *Pst* I 酶切消化的总 DNA 出现分子量较小的阳性杂交条带约为 2 kb。回收该 DNA 条带并构建亚基因组文库。再用 DIG 标记克隆的 318 bp DNA 探针与文库中的菌落进行原位杂交, 获得阳性克隆。抽取 4 个阳性克隆的质粒 DNA 并分别测序, 经分析发现 *Pseudomonas sp. 593* 基因组中一个 894 bp 的开放阅读框编码磷脂酰胆碱合酶(见图 4), 其 DNA 和氨基酸序列已保存

	10	20	30	40	50	60	70	80	90
1	ATGGCAAGCCCAGGCGCAACGGCGTATGCTGCCGACTCCACCGCCGACGGTGGCTGTGAGAAAAACCGGCTGAACCTCGGCCGCTCC								
1	M A S P G R N G V C C R L H R R T V R C E K N R L N S A A S								
	100	110	120	130	140	150	160	170	180
91	CCGGTGTCCCATGTGCAGTGGTTTCGTCAGGGATGGACTACCGTCTTAGTGTAGCTCCCGTGCACCCGCGTCCAAAGGAAGAGAGCCGAC								
31	P V F P C A V V R Q G W T T V L G S S P A P A V Q R K R A D								
	190	200	210	220	230	240	250	260	270
181	GTGAACCTGATCCTATCGCCAATGAACCTGAGCAAGCCAAAGGCCGAGCGCCATGCGGTGACCTCCAGCGGTGTCATCTCGCGCTG								
61	V N L I L S P M N L S K A K A W S A H A V T S S G V I L A L								
	280	290	300	310	320	330	340	350	360
271	CTCGCGTCCCTGCGCTGGTCGACAACAAGCCCCAGGCCGCTGCTGCTGTTGGCTGGCGTGGCGCTGCTGGTGGACGGCCCTCGACGGCACC								
91	L A L L A L V D N K P Q A C L L W L G V A L L V D G L D G T								
	370	380	390	400	410	420	430	440	450
361	CTGGCGCGCAAGTTCGACGTCAAGGCGGTGCTGCCGACTTCGACGGCTCGACCCCTGGACCTGGTGTGATCGACTACCTACCTACGCTCTC								
121	L A R K F D V K A V L P H F D G S T L D L V I D Y L T Y V F								
	460	470	480	490	500	510	520	530	540
451	ATCCCCGCTATCTTATCTATCGCTACGTGCCGCTGCCGCTGCACACCGAACTGCTGGCGGTGGGGGTGATCTGGTGTCTCTCGCTGTTC								
151	I P A I F I Y R Y V P L P V H T E L L A V G V I L V S S L F								
	550	560	570	580	590	600	610	620	630
541	TGCTTCTGCAACGTC AACATGAAGAGCAAGGACAACACTACTTCGTCGGCTTCCCGGCCCTGGAACGTTGGTGGCGGTGTAITTTCTTCGTG								
181	C F C N V N M K S K D N Y F V G F P A A W N V V A V Y F F V								
	640	650	660	670	680	690	700	710	720
631	CTCGACCTGCATCCCTGGGTAGCTTCGTCACCGTGTGGTGTGGCGCGCTGACCTGACCCCGCATGAAGTTCCTGCACCCCTTCGCG								
211	L D L H P W V S F V T V L V L A A L T L T R M K F L H P F R								
	730	740	750	760	770	780	790	800	810
721	GTGGCCAGTTCATGCCGCTGAACATCGCCGTGACCTTCGCTGATGCTCAGCAGTGGCTGATCTCCAGCAGCCAAACGGACCAA								
241	V R Q F M P L N I A V T F V W M L S S A L L I L Q Q P T D Q								
	820	830	840	850	860	870	880	890	
811	CCCTGGCTGCTCGGTTTGTGGTTCGACGCTCGCCCTACTTCGTCGGCTGCTGGCTGTTGGCGCACGGCGATGGAGTGGTTTAACTGA								
271	P W L L G L W F A A S A Y F V G V C V W R T A M E W F N *								

图4 *Pseudomonas sp. 593* 的 pcs 基因全序列及编码的氨基酸序列

Fig. 4 The nucleic acid sequence and corresponding amino acid sequence of *Pseudomonas sp. 593 pcs* gene (GenBank ID HQ699619).

在 GenBank (ID HQ699619)。DNA 序列功能分析 (<http://searchlauncher.bcm.tmc.edu/seq-search/gene-search.html>) 没有发现开放阅读框 5' 端前面 197 bp 未编码区有典型的启动子。

为了进一步验证克隆的 *pcs* 基因编码磷脂酰胆碱合酶, 将克隆得到的 894 bp DNA 片段插入表达载体 pET23a 并转化 *E. coli* BL21 (DE3) pLysS, 然后在含有胆碱的 LB 培养基中 37°C 培养至对数后期。用 0.5 mmol/L IPTG 诱导 *pcs* 基因表达。TLC 分析结果 (见图 5) 显示仅转化带有克隆片段重组质粒的大肠杆菌的磷脂中含有 PC 而转化 pET23a 质粒的大肠杆菌的磷脂中未见 PC, 说明克隆的 894 bp DNA 片段的确是 *Pseudomonas sp.* 593 磷脂酰胆碱合酶的编码序列, 并且具有磷脂酰胆碱合酶活性。

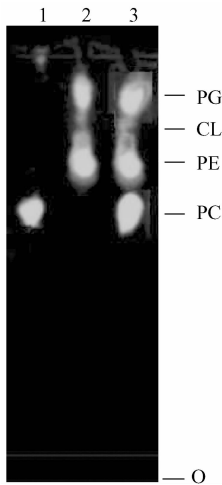


图 5 转化细菌总磷脂的 TLC 分析结果

Fig. 5 TLC analysis of total phospholipids extracted from *E. coli* BL21 (DE3) pLysS. Lane 1: standard PC; lane 2: BL21 (DE3) pLysS transformed with pET23a; lane 3 BL21 (DE3) pLysS transformed with pET23a-*pcs*.

氨基酸序列比对显示, *Pseudomonas sp.* 593 Pcs 与 4 个 *Pseudomonas aeruginosa* Pcs 蛋白 (strains UCBPP-P, PA01, 2192, C3719) 和 3 个同属不同种 (*P. mendocina* ymp, *P. fluorescens* Pf0 and *P. syringae* pv) 的 Pcs 蛋白有 81% 的同源性。Pcs 蛋白分子进化分析显示 *Pseudomonas sp.* 593 Pcs 介于 *P. aeruginosa* Pcs 蛋白与 *P. mendocina* ymp, *P. fluorescens* Pf0 and *P. syringae* pv Pcs 蛋白之间 (结果未显示)。这些结果显示 *Pseudomonas sp.* 593 Pcs 是一个尚未报道的磷脂酰胆碱合酶, 同时也表明 *Pseudomonas sp.* 593 是一个尚未报道的新的假

单胞菌。

2.3 *pcs*⁻ 突变体菌株不能合成磷脂酰胆碱

为了进一步弄清楚 *Pseudomonas sp.* 593 细菌活体内是否仅利用 Pcs 途径, 我们还进行了 *pcs* 基因活体突变。自杀性载体 pUC19-*sacB*^[16] 是一类带有 *sacB* 基因的严紧型自杀性载体, *sacB* 基因编码果聚糖蔗糖酶, 在蔗糖存在的条件下会使质粒自身消除。质粒 pTA-*kan* 是一种含有卡那霉素基因 (本身带有启动子序列) 的克隆载体, 并且在 *kan* 基因的两侧各有 2 个单一的酶切位点 *Kpn* I, *Bam*H I 和 *Xho* I, *Xba* I。用引物 CF1、CR1 扩增 *pcs* 基因上游同源臂 F1 (与 *pcs* 基因 5' 端有大约 80 bp 的重叠区域), 引物 CF2、CR2 扩增 *pcs* 基因下游同源臂 F2 (与 *pcs* 基因 3' 端有大约 150 bp 的重叠区域)。将 F1 和 F2 同源臂分别插入质粒 pTA-*kan* 的 *kan* 基因的两侧, 构建 pTA-F1-*kan*-F2 质粒。再用引物 pse-CF, pse-CR 从质粒 pTA-F1-*kan*-F2 中 PCR 扩增出 F1-*kan*-F2 片段, 插入 pUC19-*sacB* 载体的 *Sal* I 酶切位点形成重组质粒。使用电脉冲法将重组质粒导入 *Pseudomonas sp.* 593 细菌内, 通过与基因组 DNA 发生同源重组交换, 缺失 *pcs* 基因。通过蔗糖耐受性和卡那霉素抗性筛选突变体。引物 593-F、593-R 分别位于 *Pseudomonas sp.* 593 *pcs* 基因同源臂 F1 和 F2 的侧翼 (见表 2, 图 2), 用这对引物从突变体基因组 DNA 中扩增时, 获得一条约 2.45 kb 的片段, 而从野生型株基因组 DNA 中扩增的片段仅为 1.78 kb。与预期的一致, 突变体 *pcs* 基因被 F1-*kan*-F2 片段替换。将野生型和 *pcs*⁻ 突变体接种到含或不含 1% 胆碱的 M9 培养基中培养并对细菌磷脂进行 TLC 分析, 结果显示 *Pseudomonas sp.* 593 的 *pcs* 基因缺失后, 无论在培养基中添加或不添加胆碱, 细菌都不能合成 PC (见图 6), 表明磷脂酰胆碱合酶途径 (Pcs 途径) 是 *Pseudomonas sp.* 593 细菌 PC 合成的唯一途径。

3 讨论

细菌有两条磷脂酰胆碱合成途径, N-甲基化途径 (Pmt 途径) 和磷脂酰胆碱合酶途径 (Pcs 途径), 但并非每种细菌都具有 Pmt 和 Pcs 合成途径。有些细菌既拥有 Pmt 也拥有 Pcs 途径, 如苜蓿中华根瘤菌 *Sinorhizobium meliloti*^[10]、根瘤农杆菌

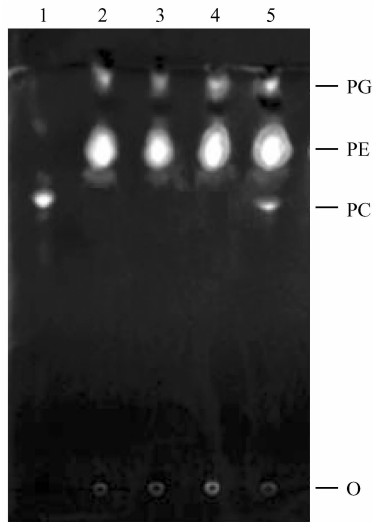


图 6 *Pseudomonas* sp. 593 野生型和 *pcs*⁻ 突变体的磷脂 TLC 分析

Fig. 6 TLC analysis of total phospholipids extracted from *Pseudomonas* sp. 593 wild type and *pcs*⁻ mutant. Lane 1: standard PC; lane 2: *pcs*⁻ mutant growing in the M9 medium; lane 3: *pcs*⁻ mutant growing in the M9 medium containing 1% choline; lane 4: wild type strain growing in the M9 medium; lane 5: wild type strain growing in the M9 medium containing 1% choline.

Agrobacterium tumefaciens^[7-8]、豌豆根瘤菌 *Rhizobium leguminosarum*^[15]、百脉根根瘤菌 *Mesorhizobium loti*^[15]、军团菌 *Legionella pneumophila*^[9] 和 *Legionella bozemanii*^[14] 等。而另一些细菌则只有其中一条途径有活性, 如关节炎致病螺旋菌 *Borrelia burgdorferi*^[24]、免疫抑制和慢性肺炎致病菌 *Pseudomonas aeruginosa*^[10] 等仅利用 Pcs 途径来合成 PC, 而甲烷氧化菌 *Methylococcus capsulatus*、动物鼻疽致病菌 *Burkholderia mallei* 和类鼻疽致病菌 *Burkholderia pseudomallei* 则只利用 N-甲基化途径合成 PC^[1]。*Pseudomonas* sp. 593 细菌是一种土壤假单胞菌。在没有胆碱存在的条件下 *Pseudomonas* sp. 593 细菌不合成 PC, 只有在添加外源胆碱时细菌才合成 PC, 且 PC 含量仅占总磷脂的 5% 左右。虽然不清楚该细菌是否拥有编码 N-甲基化途径的关键酶磷脂-N-甲基转移酶的基因 (*pmtA*), 但我们利用其它已报道的 Pmt 的保守序列设计的引物并没有从 *Pseudomonas* sp. 593 细菌总 DNA 中 PCR 扩增出相应的 DNA 片段。在几种已解序的假单胞菌 *Pseudomonas aeruginosa*、*Pseudomonas fluorescens*、*Pseudomonas syringae* 的基因组中搜索, 也未见与

Sinorhizobium meliloti 型或 *Rhodobacter sphaeroides* 型 Pmt 高度同源的完整 ORF。鉴于 *Pseudomonas* sp. 593 野生型和 *pcs*⁻ 突变体细菌在 M9 和 LB 培养基中培养都无 PC 合成, 推测该菌基因组中可能不存在编码活性 Pmt 酶的基因。将克隆的 894 bp DNA 片段编码的氨基酸序列与 *Pseudomonas aeruginosa*、*Pseudomonas fluorescens*、*Pseudomonas syringae* 和 *Pseudomonas mendocina* 的 Pcs 序列比较, *Pseudomonas* sp. 593 的 Pcs 在 N-端多 60 多个氨基酸, 16S rDNA 比对也不与其中一种完全相同(结果未显示), 说明它们分属不同的种。鉴于已报道的几种假单胞菌基因组 DNA 中都没有与 Pmt 高度同源的序列, *Pseudomonas aeruginosa* 和 *Pseudomonas* sp. 593 仅利用 Pcs 途径合成 PC, 提示位于 γ -群的假单胞菌可能都只有 Pcs 途径而缺乏 N-甲基化途径。

无论是致病还是非致病假单胞菌都能在土壤中共生存, 植物的根系能有效地分泌胆碱^[10, 25], 当假单胞菌靠近植物根系区域时, 细菌可利用植物根系分泌的胆碱并通过 Pcs 途径合成 PC, 而在无胆碱的条件下则不合成 PC。PC 在细菌生活环境变迁中有何种生理作用以及在细菌与真核生物相互作用中发挥何种功用是一个值得深入探讨的课题。*Pseudomonas* sp. 593 或许可用来作为一个细菌模型, 通过深入的研究也许能帮助我们分子水平上解开这些谜团。

参考文献

- [1] Sohlenkamp C, Lopez-Lara IM, Geiger O. Biosynthesis of phosphatidylcholine in bacteria. *Progress in Lipid Research*, 2003, 42 (2): 115-162.
- [2] Arondel V, Benning C, Somerville CR. Isolation and functional expression in *Escherichia coli* of a gene encoding phosphatidylethanolamine methyltransferase (EC 2.1.1.17) from *Rhodobacter sphaeroides*. *The Journal of Biological Chemistry*, 1993, 268: 16002-16008.
- [3] Kim EJ, Kim MS, Lee JK. Phosphatidylcholine is required for the efficient formation of photosynthetic membrane and B800-850 light-harvesting complex in *Rhodobacter sphaeroides*. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2007, 17 (2): 373-377.
- [4] Minder AC, de Rudder KE, Narberhaus F, Fischer

- HM, Hennecke H, Geiger O. Phosphatidylcholine levels in *Bradyrhizobium japonicum* membranes are critical for an efficient symbiosis with the soybean host plant. *Molecular Microbiology*, 2001, 39: 1186-1198.
- [5] Hacker S, Gödeke J, Lindemann A, Mesa S, Pessi G, Narberhaus F. Global consequences of phosphatidylcholine reduction in *Bradyrhizobium japonicum*. *Molecular Genetics and Genomics*, 2008, 280 (1): 59-72.
- [6] Medeot DB, Sohlenkamp C, Dardanelli MS, Geiger O, de Lema MG, López-Lara IM. Phosphatidylcholine levels of peanut-nodulating *Bradyrhizobium sp.* SEMIA 6144 affect cell size and motility. *Federation of European Microbiological Societies Microbiology Letters*, 2010, 303 (2): 123-131.
- [7] Wessel M, Klusener S, Godeke J, Fritz C, Hacker S, Narberhaus F. Virulence of *Agrobacterium tumefaciens* requires phosphatidylcholine in the bacterial membrane. *Molecular Microbiology*, 2006, 62 (3): 906-915.
- [8] Klüsener S, Aktas M, Thormann KM, Wessel M, Narberhaus F. Expression and physiological relevance of *Agrobacterium tumefaciens* phosphatidylcholine biosynthesis genes. *The Journal of Bacteriology*, 2009, 191 (1): 365-374.
- [9] Conover GM, Martinez-Morales F, Heidtman MI, Luo ZQ, Tang M, Chen C, Geiger O, Isberg RR. Phosphatidylcholine synthesis is required for optimal function of *Legionella pneumophila* virulence determinants. *Cellular Microbiology*, 2008, 10 (2): 514-528.
- [10] Wilderman PJ, Vasil AI, Martin WE, Murphy RC, Vasil ML. *Pseudomonas aeruginosa* synthesizes phosphatidylcholine by use of the phosphatidylcholine synthase pathway. *The Journal of Bacteriology*, 2002, 184: 4792-4799.
- [11] de Rudder KE, Sohlenkamp C, Geiger O. Plant-exuded choline is used for rhizobial membrane lipid biosynthesis by phosphatidylcholine synthase. *The Journal of Biological Chemistry*, 1999, 274: 20011-20016.
- [12] Casao MA, Leiva J, Diaz R, Gamazo C. Anti-phosphatidylcholine antibodies in patients with brucellosis. *Journal of Medical Microbiology*, 1998, 47: 49-54.
- [13] Sohlenkamp C, de Rudder KE, Rohrs V, Lopez-Lara IM, Geiger O. Cloning and characterization of the gene for phosphatidylcholine synthase. *The Journal of Biological Chemistry*, 2000, 275 (25): 18919-18925.
- [14] Palusinska-Szys M, Janczarek M, Kalitynski R, Dawidowicz AL, Russa R. *Legionella bozemanii* synthesizes phosphatidylcholine from exogenous choline. *Microbiological Research*, 2011, 166: 87-98.
- [15] Martínez-Morales F, Schobert M, López-Lara IM, Geiger O. Pathways for phosphatidylcholine biosynthesis in bacteria. *Microbiology*, 2003, 149 (12): 3461-3471.
- [16] 王玉飞, 陈泽良, 乔凤, 汪舟佳, 杜昕颖, 苑锡铜, 黄留玉. 布鲁氏菌自杀载体的改建及其在突变株构建中的应用. 世界华人消化杂志 (*World Chinese Journal of Digestology*), 2007, 15 (27): 2934-2937.
- [17] 王玉飞, 陈泽良, 赵红庆, 苑锡铜, 黄留玉. 以克隆载体为自杀载体快速构建布鲁氏菌的无痕缺失突变株. 微生物学通报 (*Microbiology*), 2007, 34 (4): 642-645.
- [18] 蔡雪丽, 李洋, 宣文静, 王行国. 掺入 *E. coli* 膜中的磷脂酰胆碱(PC)影响青霉素 β -内酰胺酶的分泌. 微生物学报 (*Acta Microbiologica Sinica*), 2008, 48 (4): 486-491.
- [19] Sambrook J, Russell DW. 分子克隆实验指南. 第三版. 黄培堂, 王嘉玺等译. 北京: 科学出版社, 2002.
- [20] Evans MR, Bertera AL, Harris DW. The Southern Blot. *Molecular Biotechnology*, 1994, 1 (1): 1-12.
- [21] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. 分子克隆实验指南. 第二版. 金冬雁, 黎孟枫等译. 北京: 科学出版社, 1992.
- [22] Solaiman DKY. Genetic transformation of *Pseudomonas oleovorans* by electroporation. *Biotechnology Techniques*, 1998, 12 (11): 829-832.
- [23] Smith AW, Iglewskil BH. Transformation of *Pseudomonas aeruginosa* by electroporation. *Nucleic Acids Research*, 1989, 17 (24): 10509.
- [24] Wang X-G, Scagliotti JP and Hu LT. Phospholipid synthesis in *Borrelia burgdorferi*: BB0249 and BB0721 encode functional phosphatidylcholine synthase and phosphatidylglycerolphosphate synthase proteins. *Microbiology*, 2004, 150: 391-397.
- [25] Kortstee GJ. The aerobic decomposition of choline by microorganisms. I. The ability of aerobic organisms, particularly coryneform bacteria, to utilize choline as the sole carbon and nitrogen source. *Archives of Microbiology*, 1970, 71 (3): 235-44.

Soil bacterium *Pseudomonas* sp. 593 synthesizes phosphatidylcholine via phosphatidylcholine synthase pathway

Min Xiong, Bin Wu, Huoguang He, Yang Li, Xingguo Wang*

Faculty of Life Sciences, Hubei University, Wuhan 430062, China

Abstract: [**Objective**] Prokaryotes synthesize phosphotidylcholine by using phospholipid N-methylation or phosphatidylcholine synthase pathway or both. To confirm which pathway the soil bacterium *Pseudomonas* sp. 593 utilizes, we tested its phosphotidylcholine synthesis, cloned the *pcs* gene encoding phosphatidylcholine synthase, examined Pcs activity, and constructed a *pcs*⁻ mutant. [**Methods**] To clone the *pcs* gene from *Pseudomonas* sp. 593 genomic DNA, we firstly aligned amino acid sequences of phosphatidylcholine synthases in different *pseudomonas* strains reported in databases. Then we designed degenerate primers based on two amino acid segments conserved in sequences of phosphatidylcholine synthases. A partial fragment of the *pcs* gene was finally amplified from *Pseudomonas* sp. 593 genomic DNA. The amplified partial fragment was labeled with digoxigenin-dUTP (DIG) as a probe, sub-cloning library of *Pseudomonas* sp. 593 genomic DNA was prepared and then screened using DIG-labelled probe via *in situ* colony hybridization. DNA homologous recombination *in vivo* was preformed to delete *pcs* gene of *Pseudomonas* sp. 593. Thin-layer chromatography (TLC) assay was used to analyze total phospholipids, detect phosphotidylcholine content and determine *pcs* gene activity. [**Results**] TLC analysis revealed that *Pseudomonas* sp. 593 growing in the M9 or LB medium with choline was able to synthesize phosphotidylcholine, but wasn't without addition of choline. A 894 bp DNA fragment coded a protein with phosphatidylcholine synthase activity was cloned from *Pseudomonas* sp. 593. The *pcs*⁻ mutant obtained from *in vivo* mutagenesis was unable to form phosphotidylcholine, no matter choline was presented in the medium or not. [**Conclusion**] Phosphatidylcholine synthase pathway is a sole way for phosphotidylcholine synthesis in soil bacterium *Pseudomonas* sp. 593 or other *Pseudomonas* strains.

Keywords: *pseudomonas* in soil, phosphatidylcholine synthase, phosphatidylcholine synthase pathway, phosphatidylcholine

(本文责编:张晓丽)