

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*  
52(11):1326-1334; 4 November 2012  
ISSN 0001-6209; CN 11-1995/Q  
<http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>

## 铜绿假单胞菌全局调控因子 RsmA 的缺失影响 2 个吩嗪基因簇的表达

崔钦娜<sup>1#</sup>, 李芳<sup>2#</sup>, 邢伟越<sup>1</sup>, 迟晓艳<sup>1</sup>, 冯志彬<sup>1</sup>, 王艳华<sup>1\*</sup>, 葛宜和<sup>1\*</sup>, 刘林德<sup>1</sup>

<sup>1</sup>鲁东大学生命科学学院, 烟台 264025

<sup>2</sup>烟台山医院检验科, 烟台 264001

**摘要:** 【目的】为了研究铜绿假单胞菌全局调控因子 RsmA 对两个吩嗪 (Phenazine) 合成基因簇 *phz1* 和 *phz2* 的调控方式与机制。【方法】采用基因缺失和抗性基因 (gentamycin resistance cassette, *aacC1*) 插入相结合的策略构建了 *rsmA* 基因缺失突变株 PA-RG; 通过构建互补表达载体和过表达载体, 进一步确认 RsmA 对绿脓菌素的调控作用; 采用电转化方法将构建的翻译融合表达载体 pMEZ1 (*phz1*'-*lacZ*) 和 pMEZ2 (*phz2*'-*lacZ*) 分别导入铜绿假单胞菌突变株 PA-RG 和野生株 PAO1, 采用 Miller 法测定融合  $\beta$ -半乳糖苷酶活性。【结果】在 GA 培养基中, 互补分析和过表达分析表明, RsmA 抑制绿脓菌素的合成。此外, pMEZ1 在突变株 PA-RG 中的表达增强, 为野生株的 2-3 倍; 而 pMEZ2 在突变株 PA-RG 中的表达降低, 野生株是突变株的 2 倍。【结论】由此初步判定, 铜绿假单胞菌全局调控因子 RsmA 对两个不同吩嗪合成基因簇的调控作用具有特异性, 在一定程度上 RsmA 负调控 *phz1*, 正调控 *phz2*。

**关键词:** 铜绿假单胞菌, *phz1*, *phz2*, RsmA, 绿脓菌素

中图分类号: Q933 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209 (2012) 11-1326-09

作为医院院内感染的主要病原菌之一, 铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) 属条件致病菌<sup>[1-2]</sup>。该菌的致病性与其合成并分泌的多种毒力因子密切相关<sup>[3]</sup>, 而绿脓菌素等其它吩嗪衍生物是一类重要的毒力因子, 它们主要包括吩嗪-1-羧酸 (phenazine-1-carboxylic acid, PCA)、绿脓菌素 (pyocyanin, PYO)、1-羟基吩嗪 (1-hydroxyphenazine, 1-HP) 和吩嗪-1-甲酰胺 (phenazine-1-carboxamide, PCN) 等<sup>[4]</sup>。在细胞内, PCA、PYO 等吩嗪类化合物可作为电子载体, 当细胞

进行氧化还原反应时, 可将电子传递到靶细胞, 导致靶细胞中超氧化物的氧自由基提高进而促进细胞凋亡<sup>[5]</sup>。

目前已证实, 铜绿假单胞菌 PAO1 全基因组共包含两个独立的合成吩嗪及其衍生物的基因簇<sup>[6]</sup>。一是基因簇 *phzA1B1C1D1E1F1G1* (*phz1*), 位于铜绿假单胞菌 PAO1 基因组第 4713795 至 4720062 碱基之间; 二是基因簇 *phzA2B2C2D2E2F2G2* (*phz2*), 位于基因组第 2070685 至 2076985 碱基之间。两个吩嗪合成基因簇在 DNA 水平的同源性达到 98.3%,

基金项目: 山东省自然科学基金 (ZR2011CL003); 大学生科技创新基金 (2012Y068)

\* 通信作者。王艳华, Tel: +86-535-6681053, E-mail: wyh9801@163.com; 葛宜和, Tel: +86-535-6685003, E-mail: geyihe@ldu.edu.cn

作者简介: # 作者贡献相同。崔钦娜 (1990-), 女, 山东胶南人, 大学本科生, 研究兴趣为病原微生物及致病机制, E-mail: cuiqinna@163.com; 李芳 (1968-), 女, 山东莱阳人, 检验师, 研究兴趣为病原细菌的鉴定与致病机制, E-mail: yue3188@126.com

收稿日期: 2012-05-23; 修回日期: 2012-07-04

距离约为 2.6 Mb, 可分别通过转录、翻译表达合成次生代谢产物吩嗪所需的全部酶<sup>[6]</sup>。已有研究表明: *qscR* 基因能抑制这 2 个基因簇的表达, 但是 QscR 蛋白不能直接与它们的启动子结合<sup>[7-8]</sup>; 同时绿脓菌素的合成受群体感应系统 (quorum-sensing, QS) 的调控<sup>[9]</sup>; 而且许多环境因素对绿脓菌素合成也有明显影响, 包括细胞浓度、氧、离子、磷酸浓度以及环境中的碳源<sup>[10]</sup>。鉴于内、外多种因素可对绿脓菌素合成代谢产生显著影响, 这使得该菌的致病机制研究步履艰难<sup>[3]</sup>。但是, 深入研究吩嗪基因簇的表达调控路径与方式, 显然对认识绿脓菌素及其它毒力因子的合成代谢的调控机制和铜绿假单胞菌的致病性具有重要的意义。

*rsmA* 基因编码共 61 个氨基酸的一种转录后调控蛋白 RsmA。该调控因子的同源产物 CsrA 在大肠杆菌中可以调控细胞大小、细胞表面性质以及碳代谢<sup>[11]</sup>。在假单胞菌属中, RsmA 作为一种转录后调控因子可以调控多种胞外产物或次生代谢物<sup>[12]</sup>。研究表明, 在铜绿假单胞菌中, 过量表达 RsmA 可以影响多种毒力因子及胞外酶的表达, 其中包括吩嗪及其绿脓菌素。作为转录后调控因子, RsmA 可以通过与某些被调控因子的转录产物 mRNA 相结合, 从而阻抑 mRNA 与核糖核蛋白体的结合, 以此达到对相关基因的表达调控<sup>[12-13]</sup>。尽管人们已明确了在铜绿假单胞菌 RsmA 的调控作用, 但 RsmA 如何精细调控两个吩嗪合成基因簇等问题此前未见文献报道, 显然需要深入的研究。基于此, 本文采用抗庆大霉素基因 (gentamycin resistance cassette, *aacC1*) 插入失活的策略构建了 *rsmA* 基因定点缺失突变株 PA-RG。同时利用已构建的 pMEZ1、pMEZ2 连同 pME6015 分别导入铜绿假单胞菌突变株 PA-RG 和野生株 PAO1, 根据融合 β-半乳糖苷酶活性, 说明 RsmA 对吩嗪基因簇的表达调控及调控方式。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 菌株和质粒:** 本部分研究所涉及的菌株、质粒及来源见表 1。

**1.1.2 培养基和培养条件:** 大肠杆菌的培养采用 Luria-Bertani (LB) 培养基; 铜绿假单胞菌的培养采用 LB 或甘油-丙氨酸培养基 (GA) 培养基。其中,

表 1 菌株和质粒

Table 1 Strains and plasmids

| Strains and plasmids | Characteristics  | Source        |
|----------------------|--|---------------|
| Strains              |  |               |
| <i>E. coli</i>       |  |               |
| DH5alpha             | Φ80 <i>lacZ</i> ΔM15 Δ ( <i>lacZYA-argF</i> )<br>U169 <i>hsdR17 recA1endA1 thi-1</i>   | 14            |
| SM10                 | <i>F-thi<sup>-1</sup> thr<sup>-1</sup> leuB6 recA tonA21</i><br><i>lacY1 supE44 (Mu<sub>c+</sub>) λ<sup>-</sup> Kan<sup>R</sup></i>    | 16            |
| <i>P. aeruginosa</i> |  |               |
| PAO1                 | Wild type, Spe <sup>R</sup>  | 6             |
| PA-RG                | <i>rsmA</i> gene deleted and inserted<br>with <i>aacC1</i> cassette in PAO1,<br>Spe <sup>R</sup> Gen <sup>R</sup>                      | This<br>study |
| Plasmids             |  |               |
| pEX18Tc              | Suicide plasmid, Tet <sup>R</sup>  | 16            |
| pEXR                 | 2.0kb up-and-down stream region<br>of the <i>rsmA</i> gene in pEX18Tc,<br>Tet <sup>R</sup>   | This<br>study |
| pUCCm                | Resource of gentamycin resistance<br>cassette ( <i>aacC1</i> ), Gen <sup>R</sup>   | 6             |
| pEXRG                | 2.0kb <i>rsmA</i> fragment inserted with<br><i>aacC1</i> cassette in pEX18Tc, Gen <sup>R</sup>   | This<br>study |
| pME6010              | Low copy vector in <i>Pseudomonas</i><br>sp., Tet <sup>R</sup>   | 18            |
| pME6015              | pVS1-p15A <i>E. coli-pseudomonas</i><br>shuttle vector for translational <i>lacZ</i><br>fusions and promoter probing, Tet <sup>R</sup> | 12            |
| pME6032              | Cloning vector for overexpression<br>under theIPTG-inducible <i>tac</i><br>promoter, Tet <sup>R</sup>                                  | 18            |
| pME10R               | 480 bps <i>rsmA</i> gene fragment cloned<br>into pME6010, Tet <sup>R</sup>   | This<br>study |
| pME32R               | pME6032 carrying 300 bps <i>rsmA</i><br>gene fragment under P <sub>mc</sub> promoter,<br>Tet <sup>R</sup>                              | This<br>study |
| pMEZ1                | pME6015 carrying 750bp<br>upstream of <i>phz1</i> fragment and<br>translational fusion <i>phz1'-lacZ</i> ,<br>Tet <sup>R</sup>         | 19            |
| pMEZ2                | pME6015 carrying 895bp upstream<br>of <i>phz2</i> fragment and translational<br>fusion <i>phz2'-lacZ</i> , Tet <sup>R</sup>            | 19            |

LB 培养基的配制参照文献 [14] 进行; GA 培养基的配制参照如下的配方进行: DL-丙氨酸 4.06 g/L, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.139 g/L, 甘油 20mL/L, MgCl<sub>2</sub> 1.90g/L, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 14.2g/L, 柠檬酸铁 0.1g/L, pH7.5; 相应固体培养基每升添加 12.0 - 15.0 g 琼脂粉<sup>[15]</sup>。根据不同培养需要, *E. coli* 培养基中抗生素的添加量分别为 (μg/mL) 为: 氨苄青霉素 (Amp) 100、盐酸四环素 (Tet) 25、庆大霉素 (Gen) 20; 铜绿假单胞菌培养基

中添加抗生素的用量 ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 为: 壮观霉素 (Spe) 100、Tet 125、Gen 40。常规菌体液体培养时, 大肠杆菌和铜绿假单胞菌均在  $37^\circ\text{C}$ 、180 r/min 条件下振荡培养; 而铜绿假单胞菌发酵一般在  $30^\circ\text{C}$ 、160 r/min 条件下进行。

**1.1.3 主要试剂:** 多种限制性内切酶、T4 DNA 连接酶、DNA 分子量标记物皆为 Fermentas (MBI) 公司产品并购买于生工生物工程(上海)有限公司; rTaq DNA 聚合酶、dNTP 购于 TaKaRa 宝生物工程(大连)有限公司; Phusion Taq DNA 聚合酶购自美国 Finenzymes 公司。本研究中 PCR 所涉及的引物(如表 2 所示)由生工生物工程(上海)有限公司和南京金斯瑞生物科技有限公司合成。细菌基因组 DNA 提取、PCR 产物纯化与回收、DNA 胶回收等试剂盒均购自生工生物工程(上海)有限公司; 5-溴-4-氢-3-吡啶- $\beta$ -D-半乳糖苷(X-gal) 和 O-硝基苯- $\beta$ -D-半乳糖苷(ONPG) 购自生工生物工程(上海)有限公司; 丙氨酸、甘油等其它生化试剂级别均为分析纯。

表 2 引物

Table 2 the primers designed and used in this study

| Name of primer | Sequence (5'→3') and restriction enzyme site (in italics) |
|----------------|---|
| P-1F           | AGGGTAGTGGTGGTCGCCGTTTCC                                  |
| P-1R           | GGAATTGGTACCCGACGAGTCAGAATCAGCATTC ( <i>KpnI</i> )        |
| P-2F           | CAATTAGGTACCAGAAAGAGAAAGATCAAGAGCC ( <i>KpnI</i> )        |
| P-2R           | CTTCTACAAGGAGATCGAGCTGTCC                                 |
| P-3F           | CAATTAGAAATTCAGGGCGTCGACGGCAAC ( <i>EcoRI</i> )           |
| P-3R           | GTAATTCTAGATCGAGCTGTCGGCGGCA ( <i>XbaI</i> )              |
| G-1F           | GCAGCAACGATGTTACGCAG                                      |
| G-1R           | TGTTAGCTGGCGGCTACTTGG                                     |
| G-1F           | GTCACAACGCCCGGCCAATTC                                     |
| G-1R           | CAGGCTTATGTCAATTCGAGCTC                                   |
| rsmA-F         | CTGCACACGGCCTTCGAGCTC ( <i>SacI</i> )                     |
| rsmA-R         | GTA ATTGAGCTCGGCCACCTCCGCAACAC ( <i>SacI</i> )            |
| OE-rsmA-1F     | CAATTACCATGGATCCGCCCATTTCTTTTTTTC ( <i>NcoI</i> )         |
| OE-rsmA-1R     | GTAATTCTCGACATGATACCCATCTTTAC ( <i>XhoI</i> )             |

## 1.2 rsmA 基因的上下游片段的克隆与拼接

为构建 *rsmA* 缺失突变株, 根据铜绿假单胞菌 PAO1 基因组序列设计三对引物(见表 2), 分别用 P-1F/P-1R 和 P-2F/P-2R 两对引物, 以铜绿假单胞菌基因组 DNA 为模板进行 PCR, 分别扩增 *rsmA* 基因的上、下游 2 个片段 *rsmA-U* 和 *rsmA-D*。PCR 采用 phusion 高保真 DNA 聚合酶, 反应程序及条件参数为:  $98^\circ\text{C}$  20 s, 1 个循环;  $98^\circ\text{C}$  6 s,  $65^\circ\text{C}$  20 s,  $72^\circ\text{C}$

30 s, 33 个循环;  $72^\circ\text{C}$  再延伸 7 min。PCR 产物经 1% 琼脂糖电泳检测、纯化和回收, 交由上海生工生物工程技术有限公司进行测序并鉴定。

细菌基因组 DNA 提取、质粒小量抽提、限制性内切酶酶切、DNA 片段胶回收、连接、感受态细胞制备和转化等步骤均参照文献 [14] 或相关试剂盒推荐的方法进行。*rsmA-U* 和 *rsmA-D* 两片段预期大小分别为 1062 bp 和 1071 bp, PCR 结果经测序并鉴定正确后, 将两个 PCR 片段混合。经 *KpnI* 酶切、纯化、连接、再纯化等步骤后, 产物作进一步巢式 PCR 的模板。巢式 PCR 的引物采用 P-3F 和 P-3R, 利用 phusion Taq 时进行 PCR 的退火温度为  $69^\circ\text{C}$ , 每循环延伸时间为 40 s。2.0 kb 的 PCR 产物经 *EcoRI-XbaI* 双酶切后, 克隆于质粒 pEX18Tc 中<sup>[16]</sup>, 所得质粒为 pEXR。

## 1.3 rsmA 基因缺失突变株 PA-RG 的构建

用 *KpnI* 酶切克隆载体 pUCGm, 获得约 0.8 kb 的抗庆大霉素基因片段 (gentamycin resistance cassette, *aacCI*)<sup>[17]</sup>。该片段经胶回收后, 克隆于位于 pEXR 载体上的 *KpnI* 位点中, 所得质粒为 pEXRG。

用化学转化法 ( $\text{CaCl}_2$ ) 将 pEXRG 转入 *E. coli* SM10, 方法见文献 [14]。

以 *E. coli* SM10/pEXRG 为供体菌, 铜绿假单胞菌 PAO1 野生株为受体菌进行固相纤维滤膜接合转移。主要步骤如下: 将两种菌分别接种于 5 mL 含相应抗生素的 LB 培养基中, 过夜培养。分别取 1 mL 菌液离心弃上清, 用 1 mL 新鲜的无抗 LB 培养基分别洗涤 2-3 次。菌体混合并悬浮于 150  $\mu\text{L}$  无抗 LB 培养基中后, 转移至无抗 LB 平板中央的一片圆形微孔滤膜 (孔径  $\varnothing$  0.22  $\mu\text{m}$ 、已灭菌) 上,  $37^\circ\text{C}$  培养 24 h 以上。刮取菌体重悬于 250  $\mu\text{L}$  无抗 LB 培养基中, 分取 10、20、30  $\mu\text{L}$  涂布于含 Tet125 和 Gen40 的双抗 LB 平板,  $37^\circ\text{C}$  培养 24-48 h。挑取克隆并接种于 Gen40 和 Tet125 的液体 LB 培养基中, 待菌生长至稳定期作梯度稀释并涂布于含 10% 蔗糖、Spe100 和 Gen40 的 LB 平板, 将所得单菌落同时分别接种于单抗 Tet125 和单抗 Gen40 (对照) 的 LB 平板上。筛选 Tet 平板敏感而 Gen 平板生长的相应克隆, 即铜绿假单胞菌 PAO1 的 *rsmA* 基因缺失突变株 PA-RG。

## 1.4 缺失突变株的 PCR 鉴定

接种经抗性筛选的缺失突变株 PA-RG 于含

Gen40 的 LB 培养基中, 经过夜培养的细菌再重新转接并培养 4h 后, 采用细菌基因组试剂盒推荐的方法提取基因组 DNA。以野生型菌株 PAO1 的基因组 DNA 作对照, 通过设计的引物对 (见表 2) 进行 PCR 验证: G-1F/G-1R 用于检验抗庆大霉素基因盒 (*aacC1*) 是否存在突变株的基因组中; P-1F (P-2R) / G-1F (G-1R) 用于检验抗庆大霉素基因盒是否定点插入到预定的 *rsmA* 基因缺失部位中。

### 1.5 基因互补载体和过表达载体的构建和转化

以 PAO1 基因组 DNA 为模板, 利用引物 *rsmA*-F/*rsmA*-R 进行 PCR 获得约 480 kb 的包含 *rsmA* 基因的片段。SacI 酶切 PCR 片段, 后通过割胶回收, 克隆于低拷贝质粒 pME6010 相应位点中<sup>[18]</sup>, 所获质粒命名为 pME10R。分别将 pME6010 和 pME10R 通过电击方法转化突变株 PA-RG 后, 进行互补分析。

为构建 *rsmA* 过表达载体, 利用引物 OE-*rsmA*-1F/OE-*rsmA*-1R 进行 PCR 获得约 300 bp 且不含其启动子区的 *rsmA* 基因的片段。经 NcoI 和 XhoI 双酶切后, 克隆于位于 pME6032 的 *tac* 启动子相应位点之中<sup>[18]</sup>, 所得质粒为 pME32R。分别将 pME6032 和 pME32R 转化野生株 PAO1 和突变株 PA-RG 后。进行过表达分析时, 向培养基中添加终浓度为 1.0 mmol/L 的 IPTG 诱导 *tac* 启动子的启动与过表达。

### 1.6 翻译融合表达载体 *phz1'*-*lacZ* 和 *phz2'*-*lacZ* 的构建与转化

为了研究 *rsmA* 基因对两个不同吩嗪合成基因簇 *phz1* 和 *phz2* 的调控方式, 分别构建了 *phz1*、*phz2* 与 *lacZ* 的翻译融合表达载体 pMEZ1 和 pMEZ2。该类型载体构建的基本原理是: 通过 PCR 方法首先将待检测基因的上游启动子区及翻译起始点下游几个至十几个氨基酸编码区扩增出来, 然后通过酶切并克隆于无启动子并缺失前 7 个氨基酸编码区的  $\beta$ -半乳糖苷酶 (*'lacZ*) 基因的上游, 使之与  $\beta$ -半乳糖苷酶基因按读码框顺序相融合, 从而使融合  $\beta$ -半乳糖苷酶基因的表达被待测基因的启动子控制。

pMEZ1 和 pMEZ2 的具体构建过程参见文献 [19]。通过电转化方法把 pMEZ1、pMEZ2 和 pME6015 分别导入野生株 PAO1 及突变株 PA-RG, 菌株分别命名为 PAO1/pMEZ1、PA-RG/pMEZ1、PAO1/pMEZ2、PA-RG/pMEZ2、PAO1/pME6015 和 PA-RG/pME6015, 电转化具体方法参见相关基因导

入仪使用指南。突变株 PAO1 及相关衍生株中是否存在相应导入的质粒采用碱裂解法进行质粒抽提和酶切鉴定。

### 1.7 生长曲线的测定

将野生菌株 PAO1 和突变株 PA-RG 等分别同时培养于 GA 培养基中, 每隔 12 h 取样, 测定  $OD_{600}$ , 3 次重复取平均值。

### 1.8 绿脓菌素的测定

绿脓菌素的定量测定方法参见文献 [20] 进行。其基本步骤如下: 取不同发酵时间段的细菌发酵液 4 mL, 加入 2.4 mL 三氯甲烷振荡抽提 3-5 min。吸取下层有机相 2 mL 并向其中加入 4 mL 的 0.2 mol/L 的盐酸, 振荡混匀 3-5 min, 取上层水相 (桃红色) 作不同程度的稀释后, 在 520 nm 条件下采用分光光度计测定其光密度值 ( $OD_{520}$ ), 并依据标准曲线和消光系数 (17.072) 计算其浓度。绿脓菌素的标准品购自美国 Cayman 公司。

### 1.9 $\beta$ -半乳糖苷酶活性的测定

将方法 1.6 所获相应菌株分别用含 Tet 125 的 LB 培养基过夜培养, 根据菌体浓度 ( $OD_{600}$ ) 的高低, 分别取 250  $\mu$ L 左右培养物接种于盛有 25 mL GA 培养基的 100 mL 三角烧瓶中 (1:100 稀释), 30 $^{\circ}$ C 摇床培养, 对照为野生株 PAO1。每 12 h 取样测定融合  $\beta$ -半乳糖苷酶活性, 具体方法参照文献 [14] 进行。

## 2 结果

### 2.1 *rsmA* 缺失突变株的构建和鉴定

在筛选突变株的过程中, 铜绿假单胞菌 PAO1 的单交换菌株既抗四环素又抗庆大霉素, 而双交换菌株即 *rsmA* 基因缺失突变株因抗性基因盒 (*aacC1*) 的插入而对四环素敏感但抗庆大霉素。因此凡是在四环素平板上不生长而在庆大霉素平板上生长的菌落即初步认为是 PA-RG 突变株。为了进一步验证 *aacC1* 基因盒是否已定点插入 *rsmA* 基因缺失区域中, 我们采用来自 TaKaRa 公司的 *rTaq* DNA 聚合酶进行 PCR 验证 (图 1 所示)。PCR 验证采用两步法进行: 第一步, 以 G-1F/G-1R 为引物, 分别以野生株和突变株的基因组 DNA 为模板进行 PCR。琼脂糖凝胶电泳结果显示, 以水或者野生株 DNA 为模板, 均未出现阳性条带; 而以突变株和阳性对照菌株 PA-SG 的 DNA 为模板<sup>[19]</sup>, 均出现

抗庆大霉素基因的阳性条带(545bp),且与预期结果一致,表明抗庆大霉素基因盒(*aacC1*)的确插入到突变株的基因组中。第二步,用另外两对引物 P-1F/G-LF 和 P-2R/G-LR 进行相似的 PCR 作进一步验证,因为此次 PCR 每对引物中,一条来自抗庆大霉素基因内部,另一条来自 PAO1 的基因组 DNA 上,而且不在重组质粒 pEXRG 上。电泳结果显示,

以突变株 PA-RG 的基因组 DNA 为模板均有与预期大小相符(1.0 kb)的阳性条带,而以水或野生株 PAO1 的基因组 DNA 为模板的 PCR 均未出现相应的阳性条带,表明抗庆大霉素基因盒的确定点插入到了 *rsmA* 基因预定缺失的区域中。由此证实我们的确已获得 *rsmA* 缺失突变株,并命名为 PA-RG。

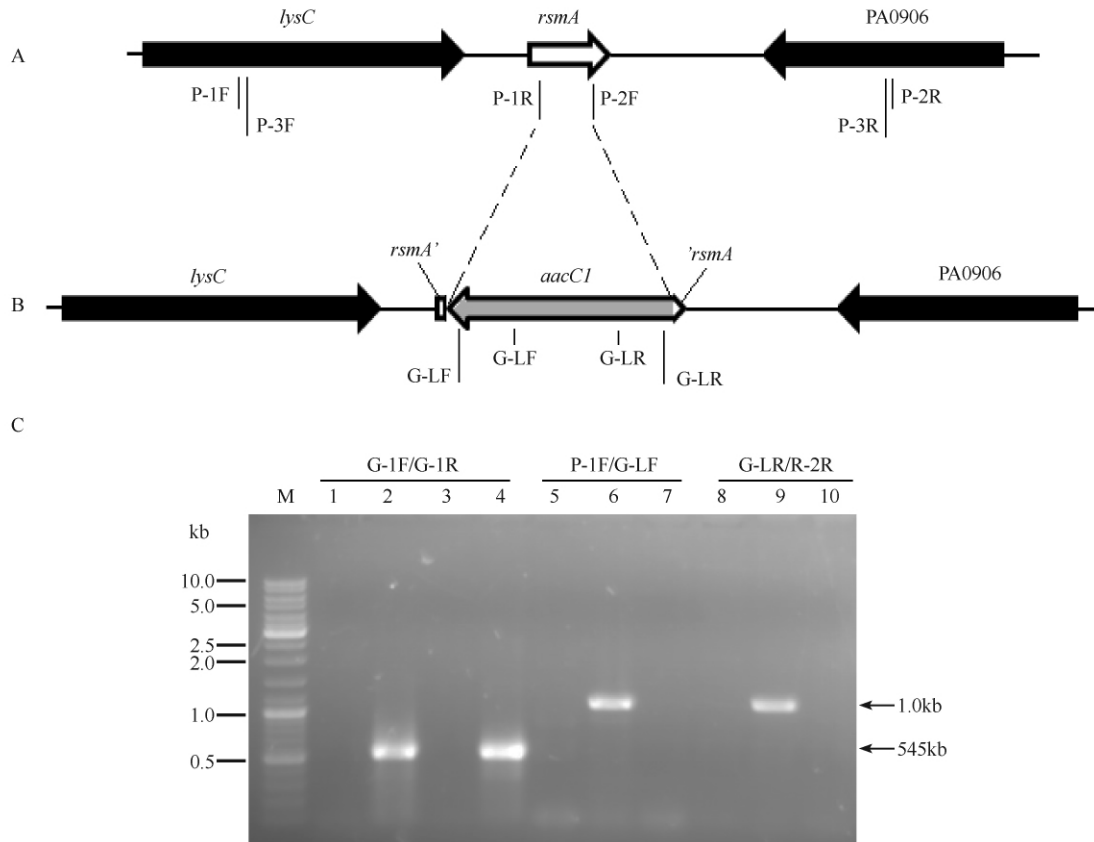


图1 *rsmA* 基因缺失突变的构建与 PCR 鉴定

Fig. 1 Generation of *rsmA* deletion mutant. (A) Diagram of the *rsmA* locus and adjacent ORFs in genome of PAO1 strain. The one open arrow presents the *rsmA* gene; the filled arrows denote the upstream gene of *lysC* and the downstream ORF of PA0906. The binding sites of six primers, i. e., P-1F to P-3F and P-1R to P-3R, are also shown. (B) Diagram of the deleted *rsmA* locus, indicating the most portions of the *rsmA* gene replaced with a gentamycin cassette. The gray arrow represents the *aacC1* cassette flanked with residual region of the *rsmA*. The binding primers used in identification of mutation were also indicated. (C) PCR verification of the *rsmA* deletion mutant. PCR products with different primers (shown at the top of lanes) or with the genomic DNA of the mutant PA-RG were shown in lane 2, Lane 6 and lane 9. PCRs were carried out with PAO1 at template shown in lane 1, lane 5 and lane 8, with ddH<sub>2</sub>O shown in lane 3, lane 7 and lane 10 as negative control, or with on mutant PA-SG shown in lane 4 as positive control.

## 2.2 *rsmA* 基因缺失突变对菌体生长和绿脓菌素的影响

为了比较突变株 PA-RG 与野生株 PAO1 的生长状况,将它们分别接种于 GA 液体培养基中,振荡培养,每12 h取样分析,600 nm波长下测定菌体的吸

光度( $OD_{600}$ )。根据结果绘制生长曲线,如图 2-A 所示,突变株 PA-RG 与野生株 PAO1 在 GA 培养基中生长状况差别明显,在相同的培养时间、温度等条件下,突变株的菌体总量几乎仅有野生株的一半左右。互补株的菌体总量在中后期与野生株差别较小。这

一结果与 RsmA 作为碳源调节因子的功能相呼应<sup>[11]</sup>。尽管生长状况在 GA 培养基中不及野生型菌株好,但其毒力因子-绿脓菌素的合成量却比野生菌株高的多,尤其在生长的中后期,可达到野生菌株的 2 倍以上(图 2-B 所示)。而互补株的绿脓菌素表达量比突变株明显下降,说明导入 *rmsA* 基因的确起到了互补作用。

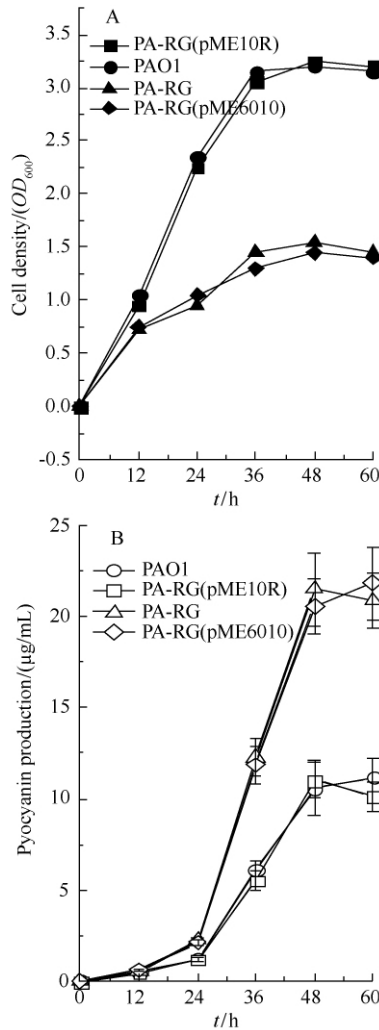


图 2 铜绿假单胞菌野生株 PAO1 及其衍生株等在 GA 培养基中的生长曲线和绿脓菌素的合成量

Fig. 2 Growth curves (A) and Pyocyanin production (B) of the wild type strain PAO1 (circle) and its derivatives, the deletion mutant PA-RG (triangle), the PA-RG mutant bearing pME6010 (diamond), and the PA-RG harboring pME10R (square), grown in GA medium, respectively. Symbols: solid, growth curves; open, pyocyanin production. All experiments were carried out in triplicate, and each value is presented as the average  $\pm$  standard deviation.

### 2.3 *rsmA* 基因的过表达分析

为了进一步确认 *rsmA* 是否介导了吩嗪及其衍

生物能力的合成,我们还构建了 *rsmA* 基因的过表达载体 pME32R。并将其通过电转化方法分别转化入突变株 PA-RG 和野生株 PAO1。GA 培养基发酵培养结果如表 3 所示,当野生株和突变株中导入过表达载体并在添加终浓度为 1mmol/L 的 IPTG 诱导情况下,毒力因子绿脓菌素的表达量都有显著降低,显然,过表达 *rsmA* 基因可以显著抑制绿脓菌素的合成。由此进一步证明,在铜绿假单胞菌中 RsmA 的确对绿脓菌素等吩嗪衍生物具有负调控作用。

表 3 突变株的过表达实验分析  
Table 3 Overexpression of the *rsmA* gene in PAO1 and its derivatives

| Strains         | Pyocyanin <sup>a</sup> |
|-----------------|------------------------|
| PAO1            | 10.58 $\pm$ 1.5        |
| PA-RG           | 21.48 $\pm$ 2.0        |
| PAO1 (pME6032)  | 10.65 $\pm$ 1.5        |
| PA-RG (pME6032) | 22.45 $\pm$ 2.0        |
| PAO1 (pME32R)   | 0.09 $\pm$ 0.02        |
| PA-RG (pME32R)  | 0.49 $\pm$ 0.20        |

<sup>a</sup>Pyocyanin production after inoculation in GA medium with IPTG induction for 48h. Each value is expressed as mean  $\pm$  SD of three independent experiments.

### 2.4 *rsmA* 基因缺失突变对不同吩嗪基因簇表达的影响

为了研究 *rsmA* 基因对 *phz1* 和 *phz2* 的调控机制,分别构建了 *phz1*、*phz2* 与 *-lacZ* 的翻译融合表达载体 pMEZ1 和 pMEZ2 (如图 3 所示)。然后将它们和 pME6015 分别用电转化法导入野生株 PAO1 及其突变株 PA-RG,然后以 PAO1 为对照分别接种于 GA 培养基中,定时取样,用 Miller 法检测融合  $\beta$ -半乳糖苷酶活性。

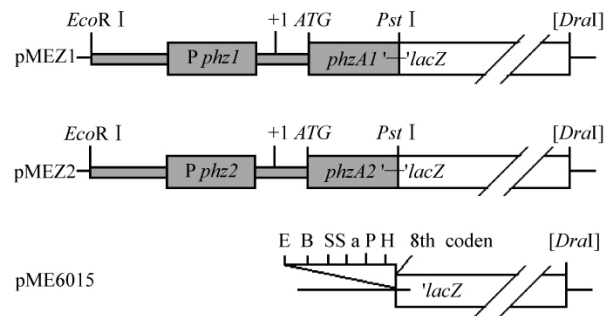


图 3 翻译融合表达载体 pMEZ1 和 pMEZ2 的结构

Fig. 3 Constructs of the translational fusions pMEZ1 and pMEZ2 derived from pME6015. Symbols: E, B, S, Sa, P, and H stand for EcoRI, BamHI, SmaI, SalI, PstI and HindIII, respectively.

根据图 4-A 显示的结果,野生株 PAO1/

pME6015 和突变株 PA-RG/pME6015 在全部生长周期中的酶活性始终很低,几乎为零。而当菌株生长从早期到稳定期以后,在野生株 PAO1 和突变株 PA-RG 中, pMEZ1 和 pMEZ2 表达明显不同, pMEZ1 基因在突变株 PA-RG 中酶活性高,在野生株 PAO1 中酶活性低,与在野生株中相比,在突变株中的表达量可高达 2 或 3 倍;此结果表明, *rsmA* 在一定程度上抑制了吩嗪基因簇 *phz1* 的表达。根据图 4-B 所示, pMEZ2 在野生株 PAO1 中表达量显然比在突变株 PA-RG 中要高,比值接近 2 倍。表明, *rsmA* 基因促进了 *phz2* 基因的表达。由此不难看出, *rsmA* 基因

对两个吩嗪基因簇的调控存在明显差异,且对 *phz1* 的调控能力强于 *phz2*。

### 3 讨论

作为一种常见而重要的病原细菌,铜绿假单胞菌的致病机制与其合成并分泌的多种毒力因子密切相关,而吩嗪-1-羧酸和绿脓菌素及其它吩嗪类衍生物是一类重要的毒力因子。为了深入研究 *rsmA* 基因对不同吩嗪基因簇合成与代谢的调控机制,本文采用抗庆大霉素基因插入失活的策略构建了 *rsmA* 基因突变株 PA-RG,通过互补分析和过表达分析,皆肯定了 RsmA 对绿脓菌素等的合成代谢具有显著的负调控作用。已有研究显示:*rsmA* 突变后,铜绿假单胞菌合成绿脓菌素的量可以达到野生株的 5 倍<sup>[12]</sup>;我们的发酵结果产物的量虽不及那么高,但突变株的绿脓菌素也已达野生株的 2 倍,显然我们的结果与已报道的 RsmA 在 GA 培养基中调控的方式和趋势是相同的。虽然同为一种菌株,但不同克隆也许存在一定的差异,同时培养条件的细微差别也可引起发酵结果彼此不完全相同。此外,我们根据已构建包含 *phz1*'-*lacZ* 和 *phz2*'-*lacZ* 翻译融合表达载体的 pMEZ1 和 pMEZ2,分别将 pMEZ1、pMEZ2 和 pME6015 电转化铜绿假单胞菌突变株 PA-RG 和野生株 PAO1,依据测定的融合  $\beta$ -半乳糖苷酶活性的高低,反映并说明吩嗪基因簇的表达强弱。而结果表明, *rsmA* 基因对吩嗪合成的两个基因簇的调控具有显著的差异性,即:负调控 *phz1*,正调控 *phz2*。据此可以推测,突变株 PA-RG 绿脓菌素合成量的增加主要通过增强吩嗪基因簇 *phz1* 的表达来实现的。不过,此前多数研究显示,野生株中吩嗪合成基因簇 *phz1* 负责细胞中主要吩嗪及其衍生物的合成<sup>[21]</sup>。而在野生株自然条件下, RsmA 调控因子的存在可能在某种程度上抑制了吩嗪基因簇 *phz1* 的表达,却促进了吩嗪基因簇 *phz2* 的表达,或者说没有在较大程度上抑制了 *phz2* 的表达。因此,这一结果不仅有趣,而且也表明吩嗪基因簇 *phz2* 对细胞中吩嗪合成的贡献不该被忽视,尤其是在野生株中。此外,该结果也充分说明了细胞中吩嗪合成代谢调控的复杂程度。

尽管两个吩嗪合成基因簇同源性高达 98.3%,但基因组序列分析表明,两个基因簇的上游区段差

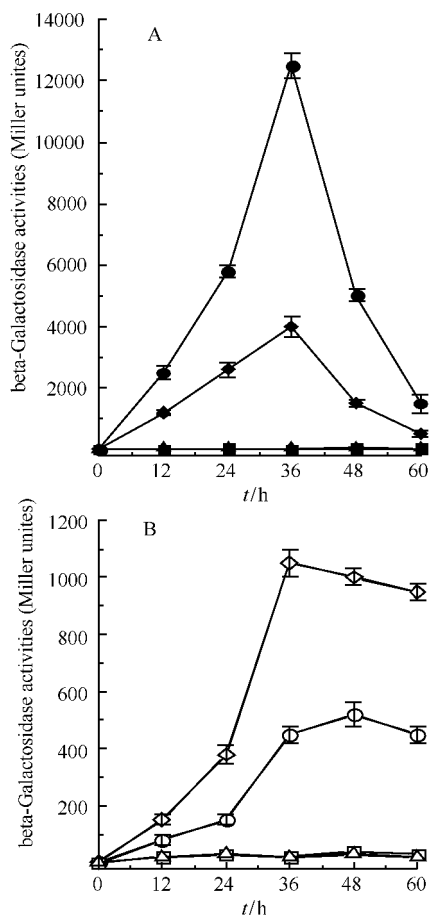


图 4 翻译融合表达载体 *phz1*'-*lacZ* (A) 和 *phz2*'-*lacZ* (B) 在 GA 培养基中的  $\beta$ -半乳糖苷酶活性

Fig. 4 beta-Galactosidase activities of the translational fusion *phz1*'-*lacZ* (A) and *phz2*'-*lacZ* (B) in the wild type strain PAO1 (diamond) and its derivatives, the deletion mutant PA-RG (circle), the wild type strain bearing pME6015 (triangle), the mutant harboring pME6015 (square) in GA medium. Symbols: solid, pMEZ1; open, pMEZ2. All experiments were carried out in triplicate, and each value is presented as the average  $\pm$  standard deviation.

异显著:在 *phz1* 操纵子的启动子区域存在 1 个类似 *las-box* 的组成元件,该元件为群体感应(Quorum sensing)系统的顺式调控元件。预示可以通过 *lasR-lasI* 和 *rhIR-rhII* 两个系统进行调控。而在 *phz2* 操纵子的上游没有 *las-box* 元件,却存在一个基因 *qscR*,该基因产物通过抑制 *lasR-lasI* 系统从而负调控许多群体感应控制基因的表达<sup>[21]</sup>。显然这种差异为 RsmA 差别性调控两个吩嗪合成基因簇提供了平台。但 RsmA 如何介导两个吩嗪基因簇差异表达的详细路径有待进一步研究。

## 参考文献

- [1] Bodey GP, Bolivar R, Fainstein V, Jadeja L. Infections caused by *Pseudomonas aeruginosa*. 1983, *Review of Infectious Diseases*, 5 (2) :279-313.
- [2] 孔伟娜,梁海华,申立新,段康民.铜绿假单胞菌中 III 型分泌系统受 Rhl 和 PQS 群体感应系统调节.微生物学报(*Acta Microbiologica Sinica*),2009,49(9):1158-1164.
- [3] Jimenez PN, Koch G, Thompson JA, Xavier KB, Cool RH, Quax WJ. The multiple signaling systems regulating virulence in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2012,76(1):46-65.
- [4] Dietrich LE, Price-Whelan A, Petersen A, Whiteley M, Newman DK. The phenazine pyocyanin is a terminal signalling factor in the quorum sensing network of *Pseudomonas aeruginosa*. *Molecular Microbiology*, 2006, 61(5):1308-1321.
- [5] Caldwell CC, Chen Y, Goetzmann HS, Hao Y, Borchers MT, Hassett DJ, Young LR, Mavrodi DV, Thomashow LS, Lau GW. *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin pyocyanin causes cystic fibrosis airway pathogenesis. *The American Journal of Pathology*, 2009, 175:2473-2488.
- [6] Mavrodi DV, Bonsall RF, Delaney SM, Soule MJ, Phillips G, Thomashow LS. Functional analysis of genes for biosynthesis of pyocyanin and phenazine-1-carboxamide from *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Journal of Bacteriology*, 2001, 183(21):6454-6465.
- [7] Ledgham F, Ventre I, Soscia C, Foglino M, Sturgis JN, Lazdunski A. Interactions of the quorum sensing regulator QscR: interaction with itself and the other regulators of *Pseudomonas aeruginosa* LasR and RhIR. *Molecular Microbiology*, 2003, 48(1):199-210.
- [8] Joon-Hee L, Yannick L, Peter G. Activity of purified QscR, a *Pseudomonas aeruginosa* orphan quorum-sensing transcription factor. *Molecular Microbiology*, 2006, 59(2):602-609.
- [9] Carty NL, Layland N, Colmer-Hamood JA, Calfee MW, Pesci EC, Hamood AN. PtxR modulates the expression of QS-controlled virulence factors in the *Pseudomonas aeruginosa* strain PAO1. *Molecular Microbiology*, 2006, 61(3):782-794.
- [10] Rij ET, Wesselink M, Chin-A-Woeng TF, Bloemberg GV, Lugtenberg BJ. Influence of environmental conditions on the production of phenazine-1-carboxamide by *Pseudomonas chlororaphis* PCL1391. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2004, 17(5):557-566.
- [11] Yakhnin H, Yakhnin AV, Baker CS, Sineva E, Berezin I, Romeo T, Babitzke P. Complex regulation of the global regulatory gene *csrA*: CsrA-mediated translational repression, transcription from five promoters by  $E\sigma^{70}$  and  $E\sigma(S)$ , and indirect transcriptional activation by CsrA. *Molecular Microbiology*, 2011,81(3):689-704.
- [12] Pessi G, Williams F, Hindle Z, Heurlier K, Holden MT, Cámara M, Haas D, Williams P. The global posttranscriptional regulator RsmA modulates production of virulence determinants and N-acylhomoserine lactones in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology*, 2001, 183(22):6676-6683.
- [13] Heurlier K, Williams F, Heeb S, Dormond C, Pessi G, Singer D, Cámara M, Williams P, Haas D. Positive control of swarming, rhamnolipid synthesis, and lipase production by the posttranscriptional RsmA/RsmZ system in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Journal of Bacteriology*, 2004,186(10):2936-2945.
- [14] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular cloning: A Laboratory Manual. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbour Laboratory Press, 1989.
- [15] Chieda Y, Iiyama K, Yasunaga-Aoki C, Lee JM, Kusakabe T, Shimizu S. Pathogenicity of *gacA* mutant of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 in the silkworm, *Bombyx mori*. *FEMS Microbiology Letters*, 2005, 244(1):181-186.
- [16] Hoang TT, Karkhoff-Schweizer RR, Kutchma AJ, Schweizer HP. 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(1):77-86.
- [17] Schweizer HP. Small broad-host-range gentamycin resistance cassettes for site-specific insertion and deletion mutagenesis. *BioTechniques*, 1993,15(5):831-834.



- [18] Heeb S, Itoh Y, Nishijyo T, Schnider U, Keel C, Wade J, Walsh U, O'Gara F, Haas D. Small, stable shuttle vectors based on the minimal pVS1 replicon for use in gram-negative, plant-associated bacteria. *Molecular Plant-Microbe Interaction*, 2000, 13 (2) :232-237.
- [19] 周金凤, 葛宜和, 刘婷, 程显好, 王磊, 高兴喜. RpoS 基因插入突变对铜绿假单胞菌两个吩嗪合成基因簇的调控. *微生物学报 (Acta Microbiologica Sinica)*, 2010, 50 (3) :411-417.
- [20] Liang H, Li L, Dong Z, Surette MG, Duan K. The YebC family protein PA0964 negatively regulates the *Pseudomonas aeruginosa* quinolone signal system and pyocyanin production. *Journal of Bacteriology*, 2008, 190 (18) :6217-6227.
- [21] Chugani SA, Whiteley M, Lee KM, D'Argenio D, Manoil C, Greenberg EP. QscR, a modulator of quorum-sensing signal synthesis and virulence in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2001, 98 :2752-2757.

## Differential expression of two phenazine-producing loci mediated by deficiency of the global regulator RsmA in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1

Qinna Cui<sup>1#</sup>, Fang Li<sup>2#</sup>, Weiyue Xing<sup>1</sup>, Xiaoyan Chi<sup>1</sup>, Zhibin Feng<sup>1</sup>, Yanhua Wang<sup>1\*</sup>, Yihe Ge<sup>1\*</sup>, Linde Liu<sup>1</sup>

<sup>1</sup>School of Life Sciences, Ludong University, Yantai 264025, China

<sup>2</sup>Clinical Microbiology Laboratory, Yantaishan Hospital, Yantai 264003, China

**Abstract:** In many *Pseudomonas*, RsmA mediates the production of a set of secondary metabolites or virulence factors. **[Objective]** Our aim is to evaluate the function and regulation of the *rsmA* gene on two phenazine-producing operons in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. **[Methods]** We first cloned the upstream and downstream fragments of the *rsmA* gene from the chromosomal DNA. With the insertion of gentamycin resistance cassette (*aacC1*), the deletion mutant PA-RG was created and verified with PCR. To complement and overexpress the *rsmA* gene, pME10R and pME32R were also constructed. By constructing the translational fusion plasmids *phz1'-lacZ* pMEZ1 and *phz2'-lacZ* pMEZ2, we introduced them into the wild type strain PAO1 and the mutant PA-RG, respectively. Activities of beta-galactosidase were determined with Miller method. **[Results]** In glycerol-alanine medium, overexpression of the *rsmA* gene results in dramatical decrease of pyocyanin production in PA-RG and PAO1 strain. In addition, beta-galactosidase activity of *phz1'-lacZ* in the mutant PA-RG was much higher than that in the wild type strain. However, beta-galactosidase activity of *phz2'-lacZ* in the wild type strain was 2fold more than that in the mutant PA-RG. **[Conclusion]** The regulation mediated by RsmA on two phenazine loci is specific and differential.

**Keywords:** *Pseudomonas aeruginosa*, *phz1*, *phz2*, RsmA, Pyocyanin

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the Natural Science Foundation in Shandong Province (ZR2011CL003) and by the College Students' Science and Technology Innovation Fund (2012Y068)

\* Corresponding authors. Yanhua Wang, Tel: +86-535-6681053, Fax: +86-535-6696598, E-mail: wyh9801@163.com; Yihe Ge, Tel: +86-535-6685003, E-mail: geyihe@ldu.edu.cn

Received: 23 May 2012/Revised: 4 July 2012