

Pip 介导铜绿假单胞菌吩嗪基因簇 *phz2* 的表达

张圆[#], 崔钦娜[#], 赵哲, 明永飞, 迟晓艳, 冯志彬, 程仕伟, 解卫海^{*}, 葛宜和^{*}

鲁东大学生命科学学院, 烟台 264025

摘要: 【目的】为了确定铜绿假单胞菌调控因子 Pip 对两个不同吩嗪合成基因簇 (*phz1* 和 *phz2*) 的具体调控方式与可能的调控机制。【方法】根据基因比对结果, 采用同源重组技术构建 Pip 调控因子缺失突变株 PA-PG 以及克隆 *pip* 基因作互补分析; 再以已构建的吩嗪基因簇缺失突变株 PA-Z1G 和 PA-Z2K 为受体菌, 构建突变株 PA-PD-Z1G 和 PA-PG-Z2K, 测定并比较野生株及相关突变株的吩嗪-1-羧酸和绿脓菌素的合成量, 推定 Pip 对两个不同吩嗪合成基因簇的调控方式。【结果】在 GA 培养基中, 突变株 PA-PG 的吩嗪-1-羧酸和绿脓菌素都比野生型明显减少; 互补分析显示, 突变株 PA-PG 的吩嗪-1-羧酸和绿脓菌素都显著提高并恢复到野生株 PAO1 水平; 突变株 PA-Z1G 的吩嗪-1-羧酸和绿脓菌素合成量因 Pip 缺失而显著减少; 而突变株 PA-Z2K 的吩嗪-1-羧酸和绿脓菌素合成量在 Pip 缺失后仍保持不变。【结论】初步推定, 转录调控因子 Pip 对铜绿假单胞菌吩嗪合成代谢的确具有促进作用; Pip 通过正向调控吩嗪基因簇 *phz2* 的合成功能实现对吩嗪合成代谢的调控。

关键词: 铜绿假单胞菌, Pip, 吩嗪-1-羧酸, 绿脓菌素, 代谢调控

中图分类号: Q933 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2013) 02-0127-09

铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*), 革兰阴性, 属条件致病菌。病人因长期应用激素、免疫抑制剂, 或进行肿瘤化疗、放疗等造成患者免疫功能低下时, 以及患者烧伤后或某些植入性手术 (气管插管、导尿管导尿等) 后易招致该菌感染, 故该菌为医院院内感染的重要病原菌之一^[1-2]。研究表明, 铜绿假单胞菌除了合成并分泌外毒素 A 外, 还分泌其它多种毒力因子^[3]。吩嗪及其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^[4]。深层机制研究显示, 在宿主体内, 吩嗪-1-羧酸、绿脓菌素等吩嗪类化合物可引起呼吸道上皮细胞内氧化性物质的增加、以及嗜中性粒细胞趋化因子 IL-8、白细胞三烯 B4、胞间黏附分子 ICAM-1 的表达增加^[5]。同时, 绿脓菌素还可引起呼吸道上皮中杯状细胞的增生和转化^[6]。目前已证实, 铜绿假单胞菌 PAO1 全基因组共包含两个相对独立吩嗪合成基因簇 *phz1* 和 *phz2*^[4]。每个基因簇都包含紧密排列的

基金项目: 山东省自然科学基金 (ZR2011CL003); 大学生科技创新基金 (2012Y069)

^{*} 通信作者。解卫海, Tel: +86-535-6685003, Fax: +86-535-6696598, E-mail: xieweihaiyt@126.com; 葛宜和, Tel: +86-535-6681053, Fax: +86-535-6696598, E-mail: geyihe@ldu.edu.cn

作者简介: [#]对本文具相同贡献。张圆 (1990-), 女, 山东梁山人, 大学本科生, 研究兴趣为细菌的次生代谢与调控, E-mail: zhyuan0824@sina.cn; 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

收稿日期: 2012-10-07; **修回日期:** 2012-11-12

phzABCDEF 共 7 个基因,两者同源性高达 98.3%。它们不仅相距甚远(达 2.6 Mb),而且上游启动子区域差别迥异。这一事实显示,它们可能各自遵循特定的调控策略和方式。尽管人们已发现并研究了与吩嗪及其衍生物合成相关的许多调控因子及调控方式,如 QscR、RsmA、RpoS 等调控因子抑制吩嗪及其衍生物的合成,GacA 等调控因子促进吩嗪的合成^[7]。但目前同时针对 2 个吩嗪基因簇表达的具体调控,除了在假单胞菌 M18 中有所研究^[8],在铜绿假单胞菌 PAO1 中至今鲜有报道。

在绿针假单胞菌 PCL1391 (*P. chlororaphis* PCL1391) 中,*pip* 基因编码由 222 个氨基酸组成的一种来自 TetR 家族的转录调控因子 Pip。当该基因被敲除后,突变株不能合成吩嗪-1-甲酰胺,而且 C6-HSL 信号分子表达量显著减少。这一结果表明,Pip 对绿针假单胞菌的吩嗪合成是必不可少的^[9]。序列比对结果显示,铜绿假单胞菌 PAO1 具有与该基因相似的一个读码框 PA0243 (铜绿假单胞菌 PAO1 全基因组序列号 NC_002516 或网页 www.pseudomonas.com)^[10]。该读码框编码的氨基酸序列与 Pip 的同源性达 65%。然而,(1)铜绿假单胞菌 PA0243 编码区是否编码与 Pip 功能相似的转录

调控因子?(2)PA0243 编码的调控因子又将如何调控两个彼此独立的吩嗪合成基因簇?关于这些问题的研究至今皆无报道。

为此,我们首先构建了该区段的缺失突变株,通过互补分析,以及毒力因子吩嗪及其衍生物的定量测定,发现 PA0243 (Pip) 缺失与发生在绿针假单胞菌中影响截然不同:吩嗪及其衍生物的合成量明显减少,却没有完全被关闭。随后以已构建的吩嗪基因簇缺失突变株 PA-Z1G 和 PA-Z2K 为受体菌,我们又构建了其 Pip 缺失突变株 PA-PD-Z1G 和插入突变株 PA-PG-Z2K,根据它们吩嗪及其衍生物合成量的变化,进一步推定 Pip 对吩嗪类毒力因子的合成代谢主要通过调控吩嗪合成基因簇 *phz2* 实现的,表明了铜绿假单胞菌 Pip 调控因子在作用方式或机制上将有别于绿针假单胞菌 PCL1391。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒: 本研究所涉及的菌株、质粒及来源见表 1。

表 1 菌株和质粒

Table 1 Strains and plasmids

Strain and plasmid	Characteristics and description	Reference or source
Strains		
<i>E. coli</i>		
DH5 α	Φ 80 <i>lacZ</i> Δ M15 Δ (<i>lacZYA-argF</i>) U169 <i>hsdR17 recA1endA1 thi-1</i>	11
SM10	<i>F-thi-1 thr-1 leuB6 recA tonA21 lacY1 supE44</i> (Mu _c ⁺) λ^- Kan ^R	13
<i>P. aeruginosa</i>		
PAO1	Wild type, Spe ^R	Stephen Lory
PA-PG	<i>pip</i> gene deleted and replaced with <i>aacCI</i> in PAO1, Spe ^R Gen ^R	This study
PA-Z1G	<i>phz1</i> locus deleted and replaced with <i>aacCI</i> in PAO1, Spe ^R Gen ^R	^Δ
PA-Z2K	<i>phz2</i> locus deleted and replaced with <i>aph</i> in PAO1, Spe ^R Kan ^R	^Δ
PA-PD-Z1G	<i>pip</i> gene deleted in the mutant PA-Z1G, Spe ^R Gen ^R	This study
PA-PG-Z2K	<i>pip</i> gene deleted and replaced with <i>aacCI</i> in the mutant PA-Z2K, Spe ^R Kan ^R Gen ^R	This study
Plasmids		
pEX18Tc	Suicide plasmid, Tet ^R	13
pUCGm	Resource of gentamycin resistance cassette (<i>aacCI</i>), Gen ^R	14
pME6010	Low copy vector in <i>Pseudomonas</i> sp., Tet ^R	16
pEXP	2.0 kb up-and-down stream region of the <i>pip</i> gene in pEX18Tc, Tet ^R	This study
pEXPG	2.0 kb <i>pip</i> fragment inserted with <i>aacCI</i> cassette in pEX18Tc, Tet ^R Gen ^R	This study
pME10P	A 1217-bp fragment containing the whole <i>pip</i> gene cloned into pME6010, Tet ^R	This study

1.1.2 培养基和培养条件: 大肠杆菌 (*E. coli*) 的培养采用 Luria-Bertani (LB) 培养基;铜绿假单胞菌

^Δ 突变株 PA-Z1G 和 PA-Z2K 为我室已构建突变株,待另文发表。

(*P. aeruginosa*) 的培养采用 LB 或甘油-丙氨酸培养基 (GA) 培养基^[11-12]。根据不同培养条件和目的, *E. coli* 培养基中抗生素的添加量分别为 ($\mu\text{g}/\text{mL}$): 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需要添加的抗生素用量 ($\mu\text{g}/\text{mL}$) 为: 硫酸卡那霉素 (Kan) 750、盐酸壮观霉素 (Spe) 100、Tet 125、Gen 40。细菌常规液体培养时, 大肠杆菌和铜绿假单胞菌均在 37°C、180 r/min 条件下振荡培养; 而铜绿假单胞菌发酵一般在 30°C、160 r/min 条件下进行。

1.1.3 主要酶与试剂: 本研究中所用的限制性内切酶、T4 DNA 连接酶、DNA 分子量标准物皆为 Fermentas (MBI) 公司产品; *rTaq*、*LA Taq* 等 DNA 聚合酶、dNTP 购于 TaKaRa 宝生物 (大连) 工程有限公司; *Phusion Taq* DNA 聚合酶购自美国 Finenzymes 公司。在实验过程中, PCR 所需引物皆由南京金斯瑞生物科技有限公司合成, 引物的具体序列及酶切位点等信息详见表 2 所示。细菌基因组 DNA 提取、PCR 产物纯化与回收、DNA 胶回收等试剂盒、主要生化试剂如 D/L-丙氨酸、5-溴-4-氢-3-吡啶- β -D-半乳糖苷 (X-gal)、丙基硫代- β -D-半乳糖 (IPTG)、邻硝基苯- β -D-半乳糖吡喃糖苷 (ONPG) 及多种抗生素等均购自生工生物工程 (上海) 有限公司。此外, 三氯甲烷、丙氨酸、甘油等其它生化试剂级别均为分析纯 (或色谱纯)。

表 2 引物

Table 2 The primers used in this study

Name of primer	Sequence (5'→3') and artificial restriction enzyme site (underlined and in italics)
p-1F	CAATTAGAAATTCGAAGAATGTCAGCCTGTTG (<i>EcoRI</i>)
p-1R	CTAATA <u>CCCCGGG</u> ATCAGGCTTGGACATC (<i>SmaI</i>)
p-2F	GAATTT <u>CCCCGGG</u> TATTGCGCTACATCCGTG (<i>SmaI</i>)
p-2R	GTAATTT <u>GCAGC</u> CGCGAAGCGTTCCGC (<i>PstI</i>)
p-LF	CCTTGCCCACTGGTTGCAGCGACTG
p-LR	GGTCGAAGTGCACCTGTCCAACGTC
g-1F	GCAGCAACGATGTTACGCAG
g-1R	TGTTAGGTGGCGGCTACTTGG
g-LF	GTCACAACGCCCGCGCCAATTC
g-LR	CAGGCTTATGTCAATTCGAGCTC
p-sF	CTAATTAAGCTTCGACTTCGACGACGAGTTCC (<i>HindIII</i>)
p-sR	CAAGTTCTCGAGGTGATCTACTTTCCGCTGG (<i>XhoI</i>)

1.2 *pip* 基因的上下游片段的克隆与拼接

为构建 *pip* 基因缺失突变株, 依据铜绿假单胞菌 PAO1 基因组序列设计两对引物 p-1F/p-1R 和 p-2F/p-2R, 以铜绿假单胞菌基因组 DNA 为模板进行

PCR, 分别扩增 *pip* 基因的上、下游两个片段 P-Up 和 P-Down。PCR 采用 *Phusion Taq*, 反应程序及条件参数为: 98°C 20 s, 一个循环; 98°C 6 s、64°C 20 s、72°C 30 s, 34 个循环; 72°C 再延伸 7 min。PCR 产物经 0.8% 琼脂糖电泳检测、纯化和回收, 交由生工生物工程 (上海) 有限公司进行测序并鉴定。

铜绿假单胞菌基因组 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或相关试剂盒推荐的方法进行^[11]。P-Up 和 P-Down 两片段预期大小分别为 1036 bp 和 1045 bp, PCR 结果经测序并鉴定后, 将两个 PCR 片段混合。纯化后经 *SmaI* 酶切、纯化、连接、再纯化后作 PCR 的模板, 并以 p-1F/p-2R 作引物, 利用 *Phusion Taq* 酶进行 PCR。2.0 kb 的 PCR 产物经纯化后, 再经 *EcoRI-PstI* 双酶切, 最后克隆于质粒 pEX18Tc 中^[13], 所得质粒为 pEXP。

1.3 Pip 缺失突变株 PA-PG 的构建

将来自于 pUCGm (*SmaI* 酶切) 的 0.8 kb 抗庆大霉素基因片段 (*aacCI*) 克隆于 pEXP 载体上的 *SmaI* 位点中, 所得质粒为 pEXPG^[14]。用化学转化法将 pEXPG 转入 *E. coli* SM10^[11]。

以 *E. coli* SM10/pEXPG 为供体菌, 铜绿假单胞菌 PAO1 野生株为受体菌进行双亲杂交^[13]。依据对照平板, 筛选对 Tet 敏感而对 Gen 有抗性的克隆, 即 Pip 缺失突变株 PA-PG。

1.4 突变株 PA-PD-Z1G 和 PA-PG-Z2K 的构建

为了明确 Pip 是否对单个吩嗪基因簇具有调控作用, 我们分别利用已构建完成的单一吩嗪基因簇缺失突变株 PA-Z1G (*phz1* 缺失) 和 PA-Z2K (*phz2* 缺失) 为受体菌构建 Pip 缺失突变株 PA-PD-Z1G 和 PA-PG-Z2K。其中以 *E. coli* SM10/pEXP 为供体菌和突变株 PA-Z1G 为受体菌进行双亲杂交, 获得突变株 PA-PD-Z1G (Pip 无标记缺失突变)。而以 *E. coli* SM10/pEXPG 为供体菌和突变株 PA-Z2K 为受体菌进行双亲杂交, 获得突变株 PA-PG-Z2K (Pip 有标记缺失突变)。其步骤与筛选突变株 PA-PG 基本相同。

1.5 *pip* 基因互补载体的构建和转化

为了构建 *pip* 基因的互补表达载体, 以 PAO1 基因组 DNA 为模板, 利用引物 p-sF/p-sR 进行 PCR 获得约 1.2 kb 包含 *pip* 基因自身启动子的片段。纯化

后的 PCR 片段通过 *HindIII-XhoI* 双酶切,之后采用试剂盒纯化酶切所得的 PCR 片段,并克隆于低拷贝穿梭质粒 pME6010 相应位点中^[15],所获质粒命名为 pME10P。经测序验证后,分别将 pME6010 和 pME10P 通过化学转化方法转化野生株和突变株 PA-PG 后,进行互补分析^[16]。

1.6 发酵培养和生长曲线的测定

将野生菌株 PAO1 和突变株 PA-PG 等分别同时培养于盛有 150 mL 的 GA 培养基中(接种比例按 1:100),每个样品设 3 个重复。每隔 12 h 取样,测定 OD_{600} 。

1.7 吩嗪-4-羧酸测定

吩嗪-4-羧酸的定量测定方法基本参照文献 [17] 进行,但稍作修改。样品处理的基本流程如下:取不同发酵时间段的发酵液 900 μ L,加入 100 μ L 的浓盐酸(12 mol/L)作酸化处理,随后加入 2.7 mL 的三氯甲烷(3 \times 体积)振荡抽提 2 min。8000 \times g 条件下,离心 5 min。取下层有机相作不同程度的稀释,在 252 nm 条件下,分光光度法测定其光密度值(OD_{252}),根据如下线性方程计算发酵液中吩嗪-4-羧酸的浓度(μ g/mL): Concentration (μ g/mL) = 2.9667 \times OD_{252} - 0.0979, $R^2 = 0.9998$ 。建立该线性方程所需的吩嗪-4-羧酸纯品由原上海交通大学微生物代谢国家重点实验室许煜泉教授课题组惠赠。

1.8 绿脓菌素的测定

绿脓菌素的定量测定方法参见文献 [18] 进行。基本步骤如下:取不同发酵时间的细菌发酵液 4 mL,加入 2.4 mL 三氯甲烷振荡抽提 2 min,8000 \times g 条件下,离心 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,8000 \times g 条件下,离心 5 min。取上层水相(桃红色),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 数据分析

同一实验至少重复 3 次,每个实验组和对照组设 3 个重复。根据统计学原理,测定的结果除了进行算术平均数的计算,我们还进行了离差和标准差等分析。同时针对每个时段实验组和对照组的 3 个重复进行双尾 t 检验。若 $P < 0.05$,则认为差异显

著,若 $P < 0.01$,则认为实验组与对照组差异极其显著。

2 结果

2.1 PA0243 基因产物(Pip)同源性分析

根据 PA0243 基因序列可知,PA0243 可编码 222 个氨基酸。序列比对分析显示,该基因产物与多种细菌的 TetR 家族的转录调控因子有较高的同源性。其中与绿针假单胞菌 PCL1391(DQ311664)、荧光假单胞菌 F113(YP_005210469.1)、恶臭假单胞菌 KT2440(NP_745664.1)、丁香假单胞菌番茄变种 DC3000(NP_792164.1)和维涅兰德固氮菌 DJ(YP_002800926.1)等细菌的 TetR 转录调控因子的同源性分别为 65%、65%、63%、62% 和 67%。表明铜绿假单胞菌 PAO1 的 PA0243 的表达产物 Pip 可能与其它菌中的同源物具有相似的调控功能。

2.2 Pip 缺失突变株的构建和鉴定

为了进一步确认经抗性筛选所获得的 Pip 缺失突变株是否正确,我们采用 PCR 方法加以鉴定。据图 1 所示,来自于突变株 PA-PG 的 PCR 条带皆与预期大小相符,表明抗庆大霉素基因盒(*aacC1*)插入并替换了基因组中 *pip* 基因区段,证实我们确已获得 Pip 缺失突变株 PA-PG。

突变株 PA-PD-Z1G 和 PA-PG-Z2K 中的 *pip* 基因敲除同样由 PCR 鉴定(结果未显示)。

2.3 Pip 缺失突变对吩嗪-4-羧酸和绿脓菌素合成代谢的影响

为了确定 Pip 缺失是否对生长产生一定的影响,我们比较了突变株 PA-PG 与野生株 PAO1 的生长状况。将它们分别接种于 GA 或 LB 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})。生长曲线显示,在两种培养基中突变株 PA-PG 与野生株 PAO1 在 GA 培养基中生长无显著差别,在相同的培养时间、温度等条件下,突变株的菌体总量几乎与野生株无异(结果未显示)。表明,*pip* 基因的敲除对铜绿假单胞菌的生长无显著影响。

为了确定 *pip* 基因对吩嗪类的合成代谢是否具有调控作用以及调控方式,将已构建的缺失突变株 PA-PG 和野生株 PAO1 分别接种于 GA 培养基中进行发酵培养。定时取样并分析产物合成量,并根据

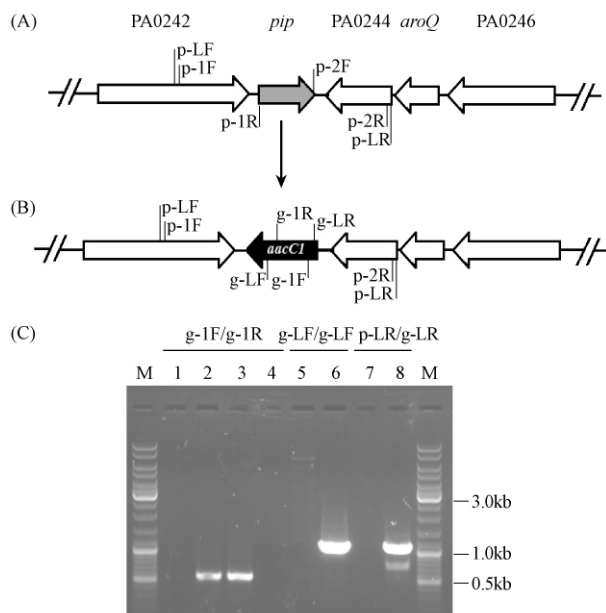


图1 *pip* 基因缺失突变的构建与 PCR 鉴定

Fig. 1 Generation of *pip* deletion mutant. (A) Genomic organization of the chromosomal region of *P. aeruginosa* PAO1 surrounding PA0243 (*pip*, grey arrow). The opened arrows denote the upstream ORF of PA0242 and the downstream ORFs of PA0244, *aroQ*, and PA0246. The primers for mutation are shown also. (B) Diagram of the deleted *pip* locus, indicating the *pip* gene is replaced with *aacCI* (black arrow). The primers used for identification are also indicated. (C) PCR identification of the *pip* deletion. PCRs were carried out with the primers shown at the top of lanes, using the genomic DNA of the mutant PA-PG as template shown in lane 2 (L2), L6 and L8, the genomic DNA of the parental strain PAO1 shown in L1, L5 and L7, double distilled H₂O shown in L4 as negative control, and the genomic DNA of the mutant PA-SG shown in L3 as positive control.

结果绘制发酵产物合成曲线。

据图 2-A 显示,与野生株 PAO1 相比,在发酵 24h 后突变株 PA-PG 合成的吩嗪-1-羧酸明显减少,其合成量只有野生株 PAO1 的一半 ($P < 0.01$)。此结果表明,*pip* 基因的缺失在一定程度上抑制了吩嗪-1-羧酸的合成。据图 2-B 显示,绿脓菌素的合成量在突变株和野生株中的表现与吩嗪-1-羧酸相似,突变株 PA-PG 的绿脓菌素的合成量比野生株 PAO1 显著降低 ($P < 0.01$),不足野生株的 1/2。此结果显示,*pip* 基因的缺失一定程度上也抑制了绿脓菌素的合成。由此不难推测,*pip* 基因的表达与 Pip 的存在应该对吩嗪及其衍生物的合成代谢具有一定的促进作用。

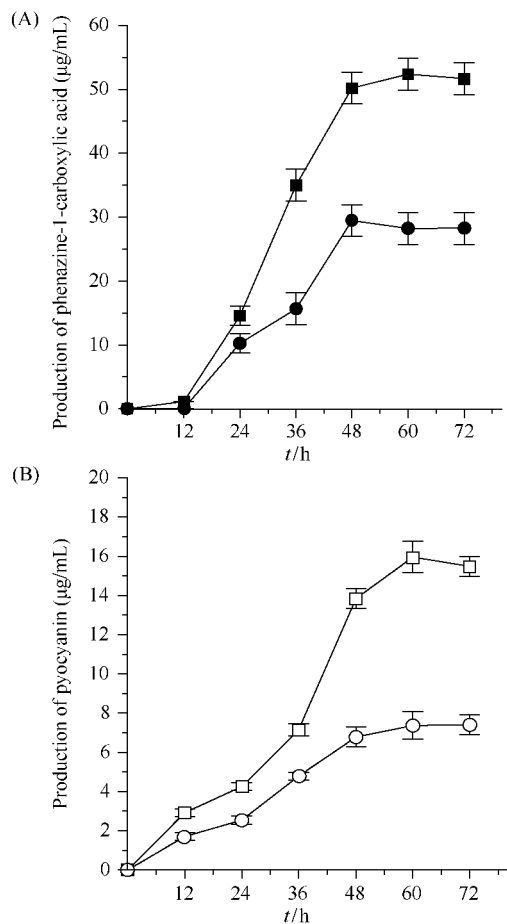


图2 铜绿假单胞菌 PAO1 与突变株 PA-PG 在 GA 培养基中吩嗪类合成量

Fig. 2 Production of phenazine-1-carboxylic acid (A, solid) and pyocyanin (B, open) of the wild type strain PAO1 (square) and the *pip* deletion mutant PA-PG (circle) in GA medium. All experiments were carried out in triplicate, and each value is presented as the average \pm standard deviation.

2.5 *pip* 基因的互补分析

为了进一步证实突变株 PA-PG 吩嗪及其衍生物的合成量的变化确为 *pip* 基因缺失引起,我们构建了 *pip* 基因的互补表达载体 pME10P,并同时用 pME6010 做阴性对照分别转化突变株 PA-PG 和野生株 PAO1。转化子经质粒抽提验证后,接种 GA 发酵培养基进行发酵培养,并定时测定吩嗪及其衍生物的合成量。发酵培养结果如表 3 所示,当突变株 PA-PG 重新引入 *pip* 基因以后,其吩嗪-1-羧酸和绿脓菌素的合成量都有显著提高,并与野生株相应产物的表达量相差无几。当 pME6010 引入野生株和相关突变株,并未带来铜绿假单胞菌的吩嗪合成代

谢上的显著变化。结合突变株中吩嗪及其衍生物的变化,据此互补分析的结果可以确定,在铜绿假单胞

菌中 Pip 的确对吩嗪及其衍生物合成具有促进作用(正向调控)。

表 3 突变株的互补实验分析

Table 3 Complementation of the *pip* gene in PAO1 and its derivatives

	PCA ^a	PYO ^b
PAO1	16.85 ± 1.5	4.50 ± 0.4
PA-PG	8.86 ± 1.0 (PAO1 as control, $P \ll 0.01$)	2.50 ± 0.2 (PAO1 as control, $P \ll 0.01$)
PAO1 (pME6010)	17.10 ± 1.0 (PAO1 as control, $P = 0.411$)	4.45 ± 0.3 (PAO1 as control, $P = 0.435$)
PA-PG (pME6010)	9.04 ± 1.5 (PA-PG as control, $P = 0.435$)	2.65 ± 0.2 (PA-PG as control, $P = 0.205$)
PA-PG (pME10P)	17.50 ± 1.0 (PAO1 as control, $P = 0.283$)	5.25 ± 0.5 (PAO1 as control, $P = 0.056$)

^a Phenazine-1-carboxylic acid production after inoculation in GA medium for 24h.

^b Pyocyanin production after inoculation in GA medium for 24h.

Each value is expressed as mean ± SD of three independent experiments.

2.6 Pip 缺失对单个吩嗪基因簇的合成功能影响

鉴于铜绿假单胞菌具有 2 个拷贝的吩嗪基因簇,且它们都参与了吩嗪及其衍生物的合成,为了进一步推定 Pip 是否对 *phz1* 和 *phz2* 两个基因簇的表达有一定的调控作用,分别以已构建的单一吩嗪基因簇缺失突变株 PA-Z1G 和 PA-Z2K 为受体菌,再次构建 Pip 的缺失突变,产生新的突变株 PA-PD-Z1G 和 PA-PG-Z2K。

为了确认 Pip 缺失是否影响了吩嗪基因簇 *phz1* 的合成代谢,我们采用突变株 PA-PG-Z2K 接种 GA 培养基进行发酵培养,同时以 PA-Z2K 为对照。定时取样,测定吩嗪-1-羧酸和绿脓菌素的合成量。据图 3 显示,突变株 PA-PG-Z2K 的吩嗪-1-羧酸和绿脓菌素的合成量与突变株 PA-Z2K 的合成量无显著差异 ($P > 0.05$)。由于 PA-Z2K 中吩嗪及其衍生物的合成由吩嗪基因簇 *phz1* 承担,因此我们推定 Pip 的缺失并未影响 *phz1* 的合成功能。

Pip 既然对吩嗪基因簇 *phz1* 的合成代谢无显著影响,而 Pip 缺失的确造成了吩嗪及其衍生物合成量的明显减少,据此我们推断,Pip 的缺失很可能抑制了吩嗪基因簇 *phz2* 的合成功能。为了证明这一推定,我们以 PA-Z1G 为对照,发酵培养突变株 PA-PD-Z1G。

据图 4 所示,在发酵早期 (<24 h),实验株 PA-PD-Z1G 与对照株 PA-Z1G 相比,吩嗪-1-羧酸和绿脓菌素的合成量差异不显著。但发酵进入中后期以后,实验株 PA-PD-Z1G 的吩嗪-1-羧酸和绿脓菌素比对照株 PA-Z1G 明显减少。互补实验也表明,Pip 缺失的确导致了实验株 PA-PD-Z1G 的吩嗪及其衍生物的合成量减少(结果未显示)。由于出发菌株 PA-Z1G 中吩嗪基因簇 *phz1* 缺失,实验株 PA-PD-Z1G 吩

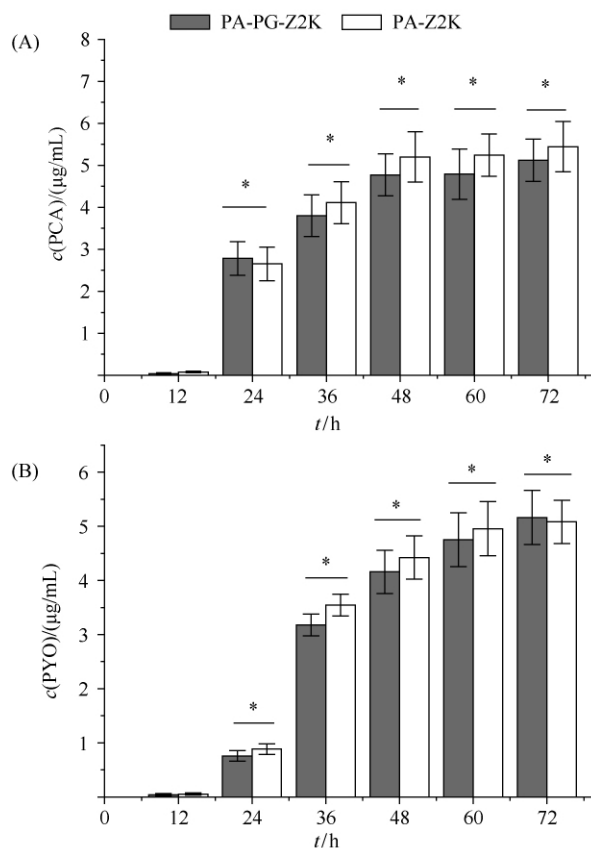


图 3 突变株 PA-Z2K 和 PA-PG-Z2K 在 GA 培养基中吩嗪及其衍生物的合成量

Fig. 3 Phenazine-1-carboxylic acid (A) and pyocyanin (B) production in the mutant PA-Z2K and PA-PG-Z2K after inoculation in GA medium for 72 h. Each value is expressed as mean ± SD of three independent experiments. * indicating $P > 0.05$, two-tailed paired Student's *t* test.

嗪及其衍生物的减少显然由 Pip 的缺失负调控了 *phz2* 的合成功能而引起的,这一结果与我们的推定相符。

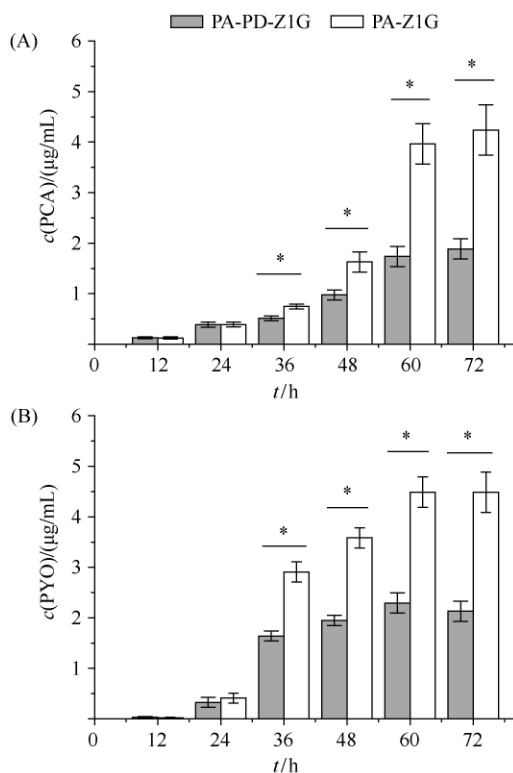


图4 突变株 PA-Z1G 和 PA-PD-Z1G 在 GA 培养基中吩嗪及其衍生物的合成量

Fig. 4 Phenazine-1-carboxylic acid (A) and pyocyanin (B) production in the mutant PA-PD-Z1G and PA-Z1G after inoculation in GA medium for 72 h. Each value is expressed as mean \pm SD of three independent experiments. * indicating $P < 0.01$, two-tailed paired Student's *t* test.

综合分析推定,铜绿假单胞菌 PA0243 的确编码了 Pip 调控因子且对吩嗪及其衍生物合成代谢具正向调控作用;同时,Pip 对吩嗪类合成代谢的调控主要通过介导吩嗪基因簇 *phz2* 的合成功能来实现的,对吩嗪基因簇 *phz1* 无调控作用。

3 讨论

作为一种最常见的病原细菌之一,铜绿假单胞菌尽管合成并分泌多种毒力因子,但主要的毒力因子包括吩嗪类、外毒素 A 和弹性蛋白酶三类^[19]。为了探讨 *pip* 基因是否对吩嗪及其衍生物的合成具有调控作用,本文采用抗庆大霉素基因插入失活的策略构建了 Pip 缺失突变株 PA-PG。通过发酵培养发现,不论吩嗪-1-羧酸,还是绿脓菌素,缺失突变株 PA-PG 的合成量与野生株相比明显减少。表明,铜

绿假单胞菌 PA01 的 Pip 对吩嗪的合成具有正向的调控作用。为了进一步探索 Pip 针对两个吩嗪合成基因簇的具体调控方式与机制,我们又相继构建了 PA-PD-Z1G 和 PA-PG-Z2K 突变株。发酵结果表明,Pip 对 *phz1* 无调控作用,对 *phz2* 具有正向调控作用。

在绿针假单胞菌 PCL1391 中,*pip* 基因突变导致突变株 PCL1114 不再合成 PCN,因为在发酵过程中检测不到 PCN 的存在^[9]。而在铜绿假单胞菌 PA01 中,Pip 的缺失导致次生代谢物吩嗪及其衍生物的明显减少,因为发酵过程中我们仍然可以检测到吩嗪及其衍生物的存在,只是合成量降低罢了。因此,铜绿假单胞菌 PA01 的 Pip 调控因子对吩嗪的调控作用与绿针假单胞菌 PCL1391 相比具有明显的差异。

Pip 在调控吩嗪合成方面,两种菌株之所以表现出明显的差异,应源于它们迥然不同的合成吩嗪的基因簇和调控通路。首先,铜绿假单胞菌具有两个同源性极高,功能相同的两个吩嗪基因簇 *phz1* 和 *phz2*^[4,20],而在绿针假单胞菌 PCL1391 中,目前鉴定仅存在一个吩嗪合成基因簇。其次,铜绿假单胞菌 PA01 两个吩嗪基因簇尽管结构基因部分同源性高,但是它们的上游调控区段的序列截然不同: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;在 *phz2* 操纵子的上游却存在另一个调控基因 *qscR*^[21]。在绿针假单胞菌 PCL1391 中,吩嗪基因簇可以被 *phzI/phzR* 调控。这些结构上的差异,显然为它们各自采取不同的调控方式与机制提供了平台和空间。第三,在铜绿假单胞菌 PA01 中,目前已鉴定的参与毒力因子代谢调控的系统至少包括 *lasR-lasI*、*rhlR-rhII* 和 *qscR* 等调控系统,而在绿针假单胞菌 PCL1391 中,调控通路和调控机制就简单得多。由此看来,尽管铜绿假单胞菌 PA01 和绿针假单胞菌 PCL1391 的 Pip 因子同源性达 65%,但由于 PA01 中调控通路的复杂性致使 Pip 表现出不同于绿针假单胞菌的调控方式,这一结果的出现是完全可以发生的。

根据我们的实验结果,在铜绿假单胞菌 PA01 中,Pip 仅对吩嗪基因簇 *phz2* 的合成代谢具有一定的正向调控作用。由于对 *phz1* 的合成代谢没有调控作用,因此针对为何突变株 PA-PG 的吩嗪及其衍生物的合成量减少的原因就不难理解了。尽管如

此,作为一种转录调控因子,Pip如何调控吩嗪基因簇 *phz2* 的转录与表达,即针对 *phz2* 的 Pip 调控的路径和机制等问题,我们目前一无所知。显然,针对这些问题有待进一步研究。

致谢 感谢原上海交通大学许煜泉教授课题组惠赠的吩嗪-1-羧酸样品;感谢 University of Nottingham 的 Stephan Heeb 惠赠的 pME6010 等穿梭质粒;感谢鲁东大学统计学教研室的柏新富教授对实验设计与统计学分析的指导;特别感谢我院 2010 级生物技术专业的张凯、谭玉萌及生物工程专业的杨雪等同学对吩嗪-1-羧酸和绿脓菌素的测定。

参考文献

- [1] Bodey GP, Bolivar R, Fainstein V, Jadeja L. Infections caused by *Pseudomonas aeruginosa*. *Review of Infectious Diseases*, 1983, 5 (2) :279-313.
- [2] Kung VL, Khare S, Stehlik C, Bacon EM, Hughes AJ, Hauser AR. An *rhs* gene of *Pseudomonas aeruginosa* encodes a virulence protein that activates the inflammasome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2012, 109 (4) : 1275-1280.
- [3] 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.
- [4] 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.
- [5] Caldwell, CC, Chen Y, Goetzmann HS, Hao Y, Borchers MT, Hassett DJ, Young LR, Mavrodi D, Thomashow LS, Lau GW. *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin pyocyanin causes cystic fibrosis airway pathogenesis. *The American Journal of Pathology*, 2009, 175 :2473-2488.
- [6] Hao Y, Kuang Z, Walling BE, Bhatia S, Sivaguru M, Chen Y, Gaskins HR, Lau GW. *Pseudomonas aeruginosa* pyocyanin causes airway goblet cell hyperplasia and metaplasia and mucus hypersecretion by inactivating the transcriptional factor FoxA2. *Cellular Microbiology*, 2012, 14:401-415.
- [7] 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.
- [8] Li Y, X Du, ZJ Lu, D Wu, Y Zhao, B Ren, J Huang, X Huang, Y Xu, Y Xu. Regulatory feedback loop of two *phz* gene clusters through 5'-untranslated regions in *Pseudomonas* sp. M18. *PLoS One*, 2011, 6 (4) : e19413.
- [9] Girard G, Barends S, Rigali S, van Rij ET, Lugtenberg BJJ, Bloemberg GV. Pip, a novel activator of phenazine biosynthesis in *Pseudomonas chlorophis* PCL1391. *Journal of Bacteriology*, 2006, 188 (23) :8283-8293.
- [10] Winsor GL, Lam DK, Fleming L, Lo R, Whiteside MD, Yu NY, Hancock RE, Brinkman FS. *Pseudomonas* Genome Database: improved comparative analysis and population genomics capability for *Pseudomonas* genomes. *Nucleic Acids Research*, 2011, 39 :D596-600.
- [11] Sambrook J, Frisch EF, Maniatis T. *Molecular cloning: A Laboratory Manual*. 2nd eds. New York: Cold Spring Harbour Laboratory Press, 1989.
- [12] 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.
- [13] Hoang TT, Karkhoff-Schweizer RR, Kutchma AJ, Schweizer HP. A broad-host-range *F_lp-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.
- [14] Schweizer HP. Small broad-host-range gentamicin resistance cassettes for site-specific insertion and deletion mutagenesis. *BioTechniques*, 1993, 15 (5) : 831-834.
- [15] Heeb S, Itoh Y, Nishijyo T, Schneider 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.
- [16] Heeb S, Valverde C, Gigot-Bonnefoy C, Haas D. Role of the stress sigma factor RpoS in *GacA/RsmA*-controlled secondary metabolism and resistance to oxidative stress in *Pseudomonas fluorescens* CHA0. *FEMS Microbiology Letters*, 2005, 243 (1) :251-258.
- [17] Kim KJ. Phenazine-1-carboxylic acid resistance in phenazine-1-carboxylic acid producing *Bacillus* sp. B-6. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 2000, 33

- (4) :332-336.
- [18] 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.
- [19] Suh SJ, Silo-Suh L, Woods DE, Hassett DJ, West SE, Ohman DE. Effect of *rpoS* mutation on the stress response and expression of virulence factors in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology*, 1999, 181 :3890-3897.
- [20] Whiteley M, Lee KM, Greenberg EP. Identification of genes controlled by quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1999, 96 (24) : 13904-13909.
- [21] 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.

Positive regulation in expression of the phenazine-producing operon *phz2* mediated by Pip in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1

Yuan Zhang[#], Qinna Cui[#], Zhe Zhao, Yongfei Ming, Xiaoyan Chi, Zhibin Feng, Shiwei Cheng, Weihai Xie^{*}, Yihe Ge^{*}

School of Life Sciences, Ludong University, Yantai 264025, China

Abstract: *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogenic bacterium, produces phenazine and its derivatives which play a critical role in pathogen-host interaction during its infection. In a biological control strain *P. chlororaphis* PCL1391, Pip positively regulates PCN production. **[Objective]** Our aim is to identify the function and regulation of an ORF of PA0243 (the homolog of Pip) in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. **[Methods]** We first cloned the fragment of the *pip* gene from the chromosomal DNA of *P. aeruginosa* PAO1 and constructed the *pip*-defect mutant PA-PG with the insertion of gentamycin resistance cassette (*aacCI*). With construction and introduction of pME10P (containing the whole *pip* gene region), complementation of the *pip* was then carried out. With creation of the mutants PA-PD-Z1G and PA-PG-Z2K, phenazine-1-carboxylic acid and pyocyanin were measured in GA medium in relative mutants, respectively. **[Results]** In GA medium, production of phenazine-1-carboxylic acid and pyocyanin in the mutant PA-PG decreased dramatically in comparison with that produced in the wild type strain PAO1. The amounts of phenazine-1-carboxylic acid and pyocyanin, however, were recovered with complementation of the derivative PA-PG bearing pME10P. The production of phenazine-1-carboxylic acid and pyocyanin in mutant PA-PG-Z2K were same to those in parental strain PA-Z2K. Phenazine-1-carboxylic acid and pyocyanin produced by the mutant PA-PD-Z1G were lower than those in the original strain PA-Z1G. **[Conclusion]** With these results, it is suggested that Pip exerts positively regulation in phenazine biosynthesis by specifically modulating expression of the *phz2* operon, not by mediating expression of the *phz1* operon in *P. aeruginosa* PAO1.

Keywords: *P. aeruginosa*, Pip, phenazine-1-carboxylic acid, pyocyanin, metabolic control

(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 (2012Y069)

^{*} Corresponding authors. Weihai Xie, Tel: +86-535-6685003, Fax: +86-535-6686958, E-mail: xieweihaiyt@126.com; Yihe Ge, Tel: +86-535-6681053, Fax: +86-535-6686958, E-mail: geyihe@ldu.edu.cn

Received: 7 October 2012/Revised: 12 November 2012