

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
54 (12) :1419 – 1428; 4 December 2014
ISSN 0001 – 6209; CN 11 – 1995/Q
http://journals.im.ac.cn/actamicrocn
doi: 10.13343/j.cnki.wsxb.2014.12.004

PA2580 基因与铜绿假单胞菌环境压力耐受性相关

赵琳, 李娟, 陈林, 沈立新, 段康民*

西北大学生命科学学院, 西部资源及现代生物技术教育部重点实验室, 陕西 西安 710069

摘要: 【目的】研究铜绿假单胞菌 PAO1 PA2580 基因的功能。【方法】构建了 PA2580 的敲除突变体及突变体互补体, 通过最小抑制浓度测定、基因启动子活性检测、蛋白体外表达纯化等方法, 对 PA2580 基因的功能进行了深入的研究。【结果】PA2580 突变体对羧苄青霉素、氯霉素、环丙沙星的敏感性增强。PA2580 基因的表达还受到不同种类的低于抑制浓度的抗生素的调节。PA2580 蛋白产物以 NADPH 为电子供体, 能够高效还原多种醌类物质。此外, PA2580 突变体对过氧化氢敏感性增加, 过氧化氢酶编码基因在 PA2580 突变体中的表达降低, 表明 PA2580 与铜绿假单胞菌氧化压力耐受性相关。【结论】PA2580 产物是 NADPH-醌类的还原酶, 其功能与铜绿假单胞菌对环境压力的耐受密切相关。

关键词: 铜绿假单胞菌, PA2580, 压力耐受, NADPH-醌类还原酶

中图分类号: 文章编号: 0001-6209 (2014) 12-1419-10

铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) 作为一种机会致病菌, 在临床上能够引起多种感染性疾病, 尤其易感染烧伤、免疫力低下及接受重症监护的病人, 已成为医院内感染的一种主要病原菌。同时, 铜绿假单胞菌也能够引起肺囊性纤维化 (cystic fibrosis, CF) 病人的慢性肺部感染, 是引起患者死亡的重要原因。而铜绿假单胞菌又具有高内在耐药性及多重耐药性的特点, 这使得临床上针对该病原菌的治疗十分困难。铜绿假单胞菌已成为一种“超级细菌”^[1-3]。因此, 研究铜绿假单胞菌耐药机理就显得尤为重要, 这对于应对铜绿假单胞菌的耐药性、新型抗生素的研究与开发等都具有非常重要的意义。

本实验室在前期的研究工作中^[4], 利用随机转座突变的方法, 建立了含有 17000 个突变体的铜绿

假单胞菌转座突变体文库, 确定了 43 个与内在耐药性相关的基因及间隔区, 而其中大部分都是第一次发现与耐药性相关。

其中, 有 2 株转座突变体经随机 PCR 测序比对, 证实转座子均插入铜绿假单胞菌 PAO1 的 PA2580 基因中, 这两株转座突变体表现出对羧苄青霉素、氯霉素、环丙沙星这三种抗生素的敏感性增强。铜绿假单胞菌基因 PA2580 是一个功能未知的基因, 本文通过基因敲除、蛋白表达纯化等手段, 对铜绿假单胞菌 PA2580 基因的功能进行了研究。结果表明, 基因 PA2580 与铜绿假单胞菌对环境压力的应激反应有关。PA2580 产物是 NADPH-醌类的还原酶, 其功能的缺失影响了铜绿假单胞菌 PAO1 的抗生素敏感性及其氧化压力耐受性。

基金项目: 国家自然科学基金 (31370165); 教育部长江学者和创新团队 (IRT1174)

* 通信作者。Tel/Fax: + 86-29-88302132; E-mail: kduan@nwu.edu.cn

作者简介: 赵琳 (1989-), 女, 江苏江都人, 硕士研究生, 主要从事分子微生物学研究。Tel/Fax: + 86-29-88302132; E-mail: zhaolinnw@gmail.com

收稿日期: 2014-03-06; 修回日期: 2014-06-14

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株、质粒和生长条件: 实验所用到的菌株和质粒见表 1。大肠杆菌在 Luria-Bertani (LB) 固体或液体中 37°C 培养, 铜绿假单胞菌在 LB 固体或液体以及假单胞菌分离琼脂 (PIA) 平板上培养。抗生素浓度为: 对大肠杆菌, LB 培养基中抗生素浓度为: 四环素 (Tetracycline, Tc) 15 μg/mL、卡那霉素

(Kanamycin, Kan) 50 μg/mL、庆大霉素 (Gentamicin, Gm) 15 μg/mL、氨苄青霉素 (Ampicillin, Amp) 100 μg/mL。对于铜绿假单胞菌, LB 培养基中抗生素浓度为: 庆大霉素 50 μg/mL、羧苄青霉素 (Carbenicillin, Cb) 250 μg/mL、四环素 70 μg/mL、甲氧苄氨嘧啶 (Trimethoprim, TMP) (水溶, 用于固体培养) 600 μg/mL、甲氧苄氨嘧啶 (Trimethoprim, TMP) (N, N-二甲基甲酰胺溶, 用于液体检测) 300 μg/mL; 在 PIA 上的抗生素浓度为: 庆大霉素 150 μg/mL。

表 1. 实验所用菌株和质粒

Table 1. Strains and plasmids used in this study

strains or plasmids	genotype or phenotype	sources
<i>E. coli</i>		
DH10B	F- <i>mcrA</i> Δ (<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) Φ80 <i>lacZ</i> Δ <i>M15</i> Δ <i>lacX74</i> <i>deoR</i> <i>recA1</i> <i>endA1</i> <i>araD139</i> Δ (<i>ara</i> <i>leu</i>) 7697	invitrogen
SM10-λpir	<i>galU</i> <i>galK</i> λ ⁻ <i>rpsL</i> <i>nupG</i>	[5]
<i>P. aeruginosa</i>		
PAO1	Wild type	[6]
PAO1 (Δ2580)	PA2580 replacement mutant of PAO1; Gm ^R ,	this study
PAO1 (Δ2580) C	PAO1 (Δ2580) complemented strain; Gm ^R ,	this study
plasmids		
pEX18Tc	Broad-host-range gene replacement vector; <i>sacB</i> , Tc ^R	[7]
pZ1918- <i>lacZ</i>	Vector, source of the cassette containing promoterless <i>lacZ</i> and Gm ^R (<i>lacZ</i> -Gm ^R)	[8]
pEX18Tc-2580	pEX18Tc with a 1029bp PCR fragment of PA2580 gene; Tc ^R	this study
pEX18Tc-2580 <i>lacZ</i>	PA2580 knock out plasmid, pEX18Tc with 467 bp upstream region of PA2580, Gm ^R - <i>lacZ</i> fragment from pZ1918- <i>lacZ</i> and 562 bp downstream region of PA2580; Tc ^R , Gm ^R	this study
pRK2013	Broad-host-range helper vector; Tra ⁺ , Kan ^R	[9]
miniCTX- <i>lacZ</i>	Integration plasmid; Tc ^R	[10]
pFLP2	2.6-kb <i>Bam</i> HI- <i>Sph</i> I fragment from pALB2 ligated between the same sites of pPS908; Amp ^R	[7]
pMS402	Expression reporter plasmid carrying the promoterless <i>luxCDABE</i> ; Kan ^R , Tmp ^R	[11]
pKD-PA2580	pMS402 containing PA2580 promoter region; Kan ^R , Tmp ^R	this study
pKD- <i>sodB</i>	pMS402 containing <i>sodB</i> promoter region; Kan ^R , Tmp ^R	this study
pKD- <i>sodM</i>	pMS402 containing <i>sodM</i> promoter region; Kan ^R , Tmp ^R	this study
pKD- <i>katE</i>	pMS402 containing <i>katE</i> promoter region; Kan ^R , Tmp ^R	this study
pKD- <i>kata</i>	pMS402 containing <i>kata</i> promoter region; Kan ^R , Tmp ^R	this study
pKD- <i>katB</i>	pMS402 containing <i>katB</i> promoter region; Kan ^R , Tmp ^R	this study
pPROEX-HTa	<i>E. coli</i> expression vector with His ₆ tag, TEV protease cleavage site, and inducible <i>trc</i> promoter; Amp ^R	Gibco BRL
HTa-PA2580	pPROEX-HTa with 729 bp fragment containing PA2580; Amp ^R	this study

Kan^R: Kanamycin resistance; Gm^R: Gentamicin resistance; Tc^R: Tetracycline resistance; Amp^R: Ampicillin resistance; Tmp^R: Trimethoprim resistance.

1.1.2 主要仪器和试剂: 多功能酶标仪 Synergy 2 (Bio Tek); 离心机 Centrifuge 5415D、离心机 Centrifuge 5810R、Mastercycle gradient PCR 仪、微量可调移液器、电转化仪 Electroporator 2510 (Eppendorf); Cooling Bath CBN8-30 低温水浴 (Heto-Holtten AS); 凝胶成像系统 Gene Genius

Bioimaging system (SYNGENE); LAS-3000 (FUJIFILM); 96 孔板 (Costar); 电泳仪 Electrophoresis systems (Bio-RAD); UV-3310 紫外分光光度计 (HITACHI); 质粒微量提取试剂盒 (北京百泰克生物技术有限公司); DNA 产物纯化试剂盒、Taq 酶、dNTP (北京鼎国生物技术有限责任公司);

限制性内切酶、T4 DNA 连接酶 (New England BioLabs); 氨苄青霉素、卡那霉素、庆大霉素、四环素、甲氧苄氨嘧啶、羧苄青霉素、氯霉素、环丙沙星 (Amresco); 引物合成 (北京奥科生物技术有限责任公司); 酵母粉、蛋白胨 (北京奥博星试剂有限公司); 假单胞分离琼脂 (北京陆桥技术有限责任公司); 其它试剂均为国产分析纯。

1.2 PA2580 敲除突变体的构建

通过基因敲除的方法构建 PA2580 的突变体。首先根据基因 PA2580 序列设计引物, 因为要插入合适的限制性酶切位点, 所以将 PA2580 基因分为 2 个片段设计引物。片段 1: 正向引物 (S1) 5'-ATGGATCCGACGGTCCGCTCAACCAGACCC-3' (*Bam*HI), 反向引物 (A1) 5'-GGCAAGCTTCATCACATCCACCGGAGGAACG-3' (*Hind*III); 片段 2: 正向引物 (S2) 5'-TTGAATTCTGCTGGAGCCGCCGAG-3' (*Eco*RI), 反向引物 (A2) 5'-ATGGATCCGCCGTTGAGCAGGAGAATG-3' (*Bam*HI)。以 PAO1 为模板用上述两段引物扩增片段, 依次连接至 pEX18Tc, 得到载体 pEX18Tc-2580。用 *Bam*HI 从质粒 pZ1918-*lacZ* 上单酶切得到一段大小约 4.2 kb 的含 Gm 抗性基因的 *lacZ* 片段, 与同样用 *Bam*HI 单酶切的 pEX18Tc-2580 连接, 得到敲除用质粒 pEX18Tc-2580*lacZ*。

之后用三亲株杂交的方式进行同源重组, 利用同源重组的原理进行基因敲除。供体菌为含有质粒 pEX18Tc-2580*lacZ* 的大肠杆菌 DH10B, 受体菌为 PAO1, 协助菌为含有质粒 pRK2013 的大肠杆菌菌株。挑取在含 Gm 和 10% 蔗糖的 PIA 平板上生长的单克隆, 利用引物 A1、S2 和 *PlacZ* (5'-AGATCGCACTCCAGCCAG-3') 进行验证, 选取 A1 与 S2 不能扩增出条带, 且 A1 与 *PlacZ* 或 S2 与 *PlacZ* 能扩增出条带的单克隆为正确的敲除突变体。

1.3 PA2580 突变体互补体的构建

采用将 PA2580 整合至敲除突变体基因组的方法构建 PA2580 突变体的互补体。根据 PA2580 基因序列设计引物, 引物扩增的序列必须包括完整的启动子和开放阅读框。引物序列为 S: 5'-TAGGATCCATCCAGCGAAGCGACAC-3' (*Bam*HI), A: 5'-CTACTCGAGATCATGTTTCAGGAGCTGG-3' (*Xho*I)。以野生型 PAO1 为模板, 进行 PCR 扩增, 产物利用

*Xho*I 和 *Bam*HI 与质粒 miniCTX-*lacZ* 连接构成重组质粒。将互补质粒供体菌、PAO1 (Δ 2580)、协助菌 (pRK2013) 进行三亲株杂交, 将 PA2580 基因整合至突变体 PAO1 (Δ 2580) 的基因组中。之后需去掉基因组中的质粒背景, 将互补后的突变体 PAO1 (Δ 2580) 和 *E. coli* Sm10- λ pir (含有 pFLP2 质粒) 进行双亲株杂交。将在 Cb 平板上长出来的单克隆, 划线培养至蔗糖平板上传代 4 次, 再挑取不能在 Cb、Tc 平板上生长的单克隆进行 PCR 验证。

1.4 最小抑制浓度 (MIC) 测定

对抗生素的液体最小抑制浓度测定采用梯度稀释法在 96 孔板中进行。将 PAO1、PAO1 (Δ 2580) 与 PAO1 (Δ 2580) C 单克隆接种于 LB 培养基中, 37°C 200 r/min 培养过夜, 次日按 10% 接种量进行转接, 使其 OD 保持一致。96 孔板中加入含有适当浓度抗生素的 LB 液体培养基, 进行梯度稀释, 将菌液按 5% 接种量接种于含有不同浓度梯度抗生素的 LB 培养基中, 矿物油覆盖, 在酶标仪 Synergy 2 上测定 OD₅₉₅, 观察生长曲线, 细菌不生长的最小抗生素浓度为该种抗生素的 MIC。

H₂O₂ 的 MIC 采用类似的方法进行测定。

1.5 启动子-报道子载体构建及基因表达水平检测

采用含无启动子的发光报道子 *luxCDABE* 的载体 pMS402 进行基因启动子活性检测。首先构建了 PA2580 的启动子-报道子载体。设计启动子序列引物, 引物序列为 S: 5'-TAGGATCCACCGTTCGATGAA GGTCTG-3' (*Bam*HI), A: 5'-CTACTCGAGATCATGTTTCAGGAGCTGG-3' (*Xho*I)。以野生型 PAO1 为模板, 进行 PCR 扩增。将产物用 *Xho*I 和 *Bam*HI 酶切后与用相同酶切的质粒 pMS402 连接得到 PA2580 的启动子-报道子载体。将载体电转入相应铜绿假单胞菌感受态细胞中, 然后在 LAS-3000 上检测挑选发光的单克隆。

采用类似方法构建了 *sodB*、*sodM*、*katE*、*katA*、*katB* 基因的启动子-报道子。

将新鲜的含有启动子-报道子载体的菌株单克隆接种于含 100 μ L 含有 TMP 的 LB 培养基的白色 96 孔板中, 37°C 200 r/min 培养过夜。次日按 5% 接种量接种于新鲜含 TMP 的 LB 培养基中, 培养 3 h。取转接后的菌液做 1:20 稀释 (培养基中加入 TMP, 必要时同时加入其它抗生素), 取 100 μ L 加入黑色底部透明的 96 孔板中, 用 50 μ L 矿物油覆盖,

在多功能酶标仪 Synergy 2 仪器上测定其 CPS (*luxCDABE* 的发光值) 和 OD_{595} 值。

1.6 PA2580 产物氨基酸序列同源比对及系统发育树构建

将 PA2580 产物的氨基酸序列进行 BLASTP 比对分析, 选取相似性较高或功能研究较为清楚的 6 种不同细菌中的同源蛋白, 利用 ClustalX 软件进行多重序列比对, 利用 DNAMAN 软件分析结果, 之后利用 MEGA6 软件, 采用邻接法 (Neighbor-Joining) 构建系统发育树 (Replications = 1000, Bootstrap 值取百分比)。

1.7 PA2580 产物体外表达、纯化及酶活性检测

设计引物扩增出 PA2580 基因的完整表达框, 要包括翻译起始位点、起始密码子和终止密码子。引物序列为 S: 5'-ATACTGCAGATCGAATTTCCGGATC ACTCG-3' (*Pst*I), A: 5'-TAAGAATTCATGAAAA CATTCTCCTGCTC-3' (*Eco*RI)。PCR 扩增产物用 *Pst*I 和 *Eco*RI 双酶切, 连接至用相同酶切的表达载体 pPROEX-HTa, 得到 HTa-PA2580, 电转化至 *E. coli* DH10B 中。将含有正确表达载体的菌株接种于含有 Amp 的 LB 液体过夜培养, 做 1:100 稀释转接至 50 mL 同样培养基中, 培养至 OD_{600} 为 0.5 - 1.0, 加入 IPTG 使终浓度为 0.5 mmol/L, 诱导培养 3 h, 低温离心收集菌体, 加入适量蛋白酶抑制剂, 低温超声破碎细胞, 取上清, 用 Ni 亲和柱纯化目的蛋白。纯化的蛋白用 Bradford 法进行定量。

PA2580 酶活性参考文献方法^[12-13], 利用 NADH/NADPH 在醌类物质作为电子受体时的氧化进行测定, 反应体系中包括 20 mmol/L Tris-HCl (pH 7.5), 0.2 mmol/L NADH 或 NADPH, 0.1 mmol/L 维生素 K₃ 等电子受体, 以及适当稀释的 10 μ L PA2580 蛋白, 反应总体积为 1 mL。反应在室温条件下进行, 从蛋白加入时开始计时, 测定 340 nm 处吸光值的降低值, 摩尔吸光系数为 6.22 L/(mmol·cm)。酶活力单位定义为每毫克蛋白中, 每分钟催化 1 微摩尔 NADPH 或 NADH 氧化的酶量。

2 结果

2.1 PA2580 突变增加铜绿假单胞菌对抗生素的敏感性

首先构建了基因 PA2580 的敲除突变体 PAO1

(Δ 2580)、突变体互补体 PAO1 (Δ 2580) C, 检测了包括野生型 PAO1 在内的 3 株菌株对羧苄青霉素、氯霉素、环丙沙星的最小抑制浓度 (MIC), 确定基因 PA2580 与抗生素敏感性的关系。结果如图 1 所示, 羧苄青霉素的 MIC 分别为 PAO1 100 μ g/mL, PAO1 (Δ 2580) 40 μ g/mL, PAO1 (Δ 2580) C 80 μ g/mL; 氯霉素的 MIC 分别为 PAO1 75 μ g/mL, PAO1 (Δ 2580) 32.5 μ g/mL, PAO1 (Δ 2580) C 75 μ g/mL; 环丙沙星的 MIC 分别为 PAO1 0.6 μ g/mL, PAO1 (Δ 2580) 0.3 μ g/mL, PAO1 (Δ 2580) C 0.6 μ g/mL。PA2580 的突变体对这 3 种抗生素的 MIC 明显小于野生型 PAO1, 分别为野生型的 1/2.5, 1/2, 1/2, 而 PA2580

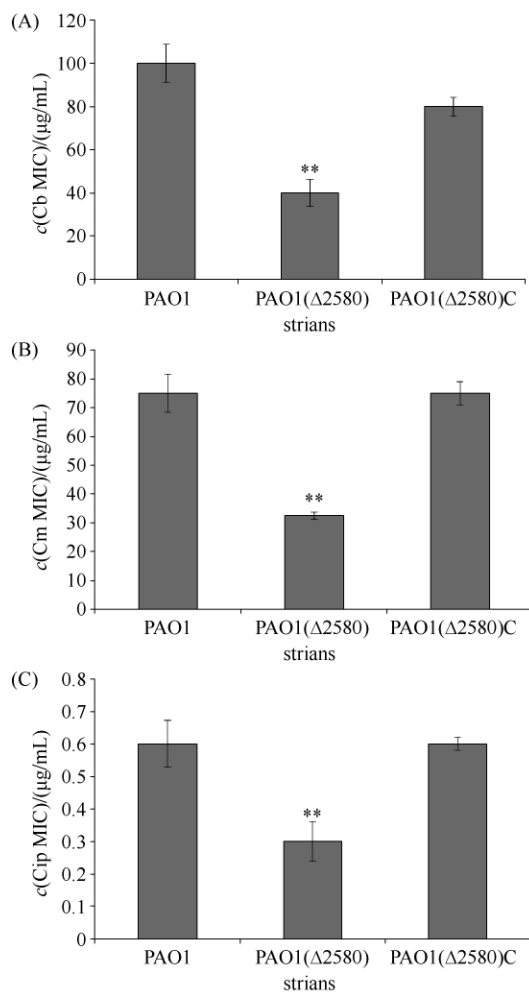


图 1. Cb、Cm 和 Cip 针对 PAO1、PAO1 (Δ 2580)、PAO1 (Δ 2580) C 的 MIC

Figure 1. The MIC values of Cb, Cm and Cip against PAO1, PAO1 (Δ 2580) and PAO1 (Δ 2580) C. A: Cb MICs; B: Cm MICs; C: Cip MICs. The mean value of three sets of experiments is presented. ** Significantly different from PAO1 ($P < 0.01$).

突变体的互补体对这 3 种抗生素的 MIC 恢复至野生状况。这一结果表明, 基因 PA2580 与铜绿假单胞菌 PAO1 的抗生素敏感性的确有关系, 该基因突变后 PAO1 对羧苄青霉素、氯霉素、环丙沙星的敏感性增强。

2.2 PA2580 表达受低于抑制浓度抗生素的调节

铜绿假单胞菌中, 与抗生素抗性相关基因常受到低于抑制浓度抗生素的诱导^[14-15], 因此构建了基因 PA2580 的启动子-发光报道子, 检测不同抗生素在低于抑制浓度条件下对 PA2580 基因表达水平的影响, 发光强弱代表基因表达水平的高低。为了排除菌体生长差异所造成的表达水平变化, 采用每 OD_{595} 值的 CPS 值来比较菌体生长一致的情况下, 基因表达的水平。图 2 的结果显示, 在添加 1/3 MIC 壮观霉素、1/2 MIC 氯霉素和 1/2 MIC 四环素时, 基因 PA2580 的表达受到明显的激活, 分别为添加相应溶剂对照组表达水平的 4.7、3.2 和 4.6 倍。

2.3 PA2580 产物是 NADPH-醌类的还原酶

进一步检测 PA2580 蛋白产物的功能。首先对 PA2580 蛋白氨基酸序列进行了 BLAST 比对, 发现其与多种细菌蛋白具有同源性, 且大多被注释为 NADPH-醌类还原酶或 MdaB。通过对 PA2580 蛋白与部分相似性较高的细菌蛋白进行氨基酸序列比对及系统发生分析, 发现 PA2580 蛋白与其他比对菌株的蛋白具有同源性 (图 3), 与大肠杆菌、幽门螺杆菌和肝螺杆菌的相似性分别为 75%、71% 和 70%, 在这 3 种菌中, 该蛋白被证实是 NADPH-醌类还原酶^[12-13, 16]。由以上结果推测 PA2580 蛋白产物也可能是一种 NADPH-醌类的还原酶。

通过对氨基酸序列在 Pfam 数据库比对^[17] 发现 PA2580 蛋白属 *Flavodoxin_2* 超家族 (PF02525), 具有一个黄素氧还蛋白样的折叠, 这与幽门螺杆菌及变异链球菌的结果类似^[12, 18]。因此首先测定了 PA2580 蛋白的特征吸收峰。结果显示, PA2580 蛋白产物在 376 nm 和 456 nm 有两个特征吸收峰, 其中 456 nm 处为主峰, 并且在 429 和 484 nm 有两肩, 该结果与大肠杆菌及幽门螺杆菌中的结果一致^[12, 19]。这表明 PA2580 蛋白产物可能也利用黄素腺嘌呤二核苷酸作为辅因子。

其次, 实验通过 NADH 或 NADPH 氧化后在 340 nm 处吸光值降低测定了 PA2580 蛋白的酶活性及底物特异性。表 2 的结果显示, 以 NADPH 为电子

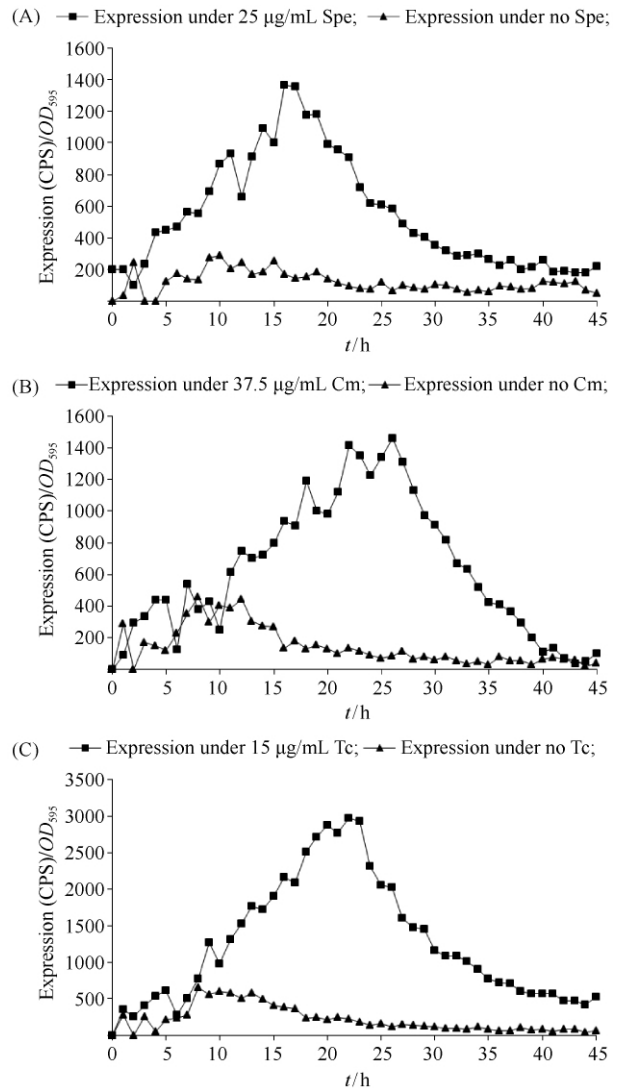


图 2. 低于抑制浓度抗生素条件下 PA2580 基因在 PAO1 菌株中的表达曲线

Figure 2. Expression of gene PA2580 in the presence of sub-inhibitory concentrations of antibiotics. A: with 1/3 MIC of spectinomycin; B: with 1/2 MIC of chloramphenicol; C: with 1/2 MIC of tetracycline. The Y-axis indicates CPS per OD_{595} value; the X-axis represents time. The expression in the presence of sub-inhibitory concentrations of antibiotics conditions are represented by squares and no antibiotics conditions by triangles. The experiments were repeated at least three times and the data shown are representatives of similar results.

供体时, PA2580 蛋白产物能够还原所选择的 5 种电子受体, 酶活力从 23 U/mg 至 75 U/mg 不等, 而 NADH 虽也可作为电子供体, 但效率很低, 所测酶活仅为 NADPH 的 2% - 4%。体系中不加电子受体或 PA2580 蛋白的反应体系作为阴性对照, 并且均未检

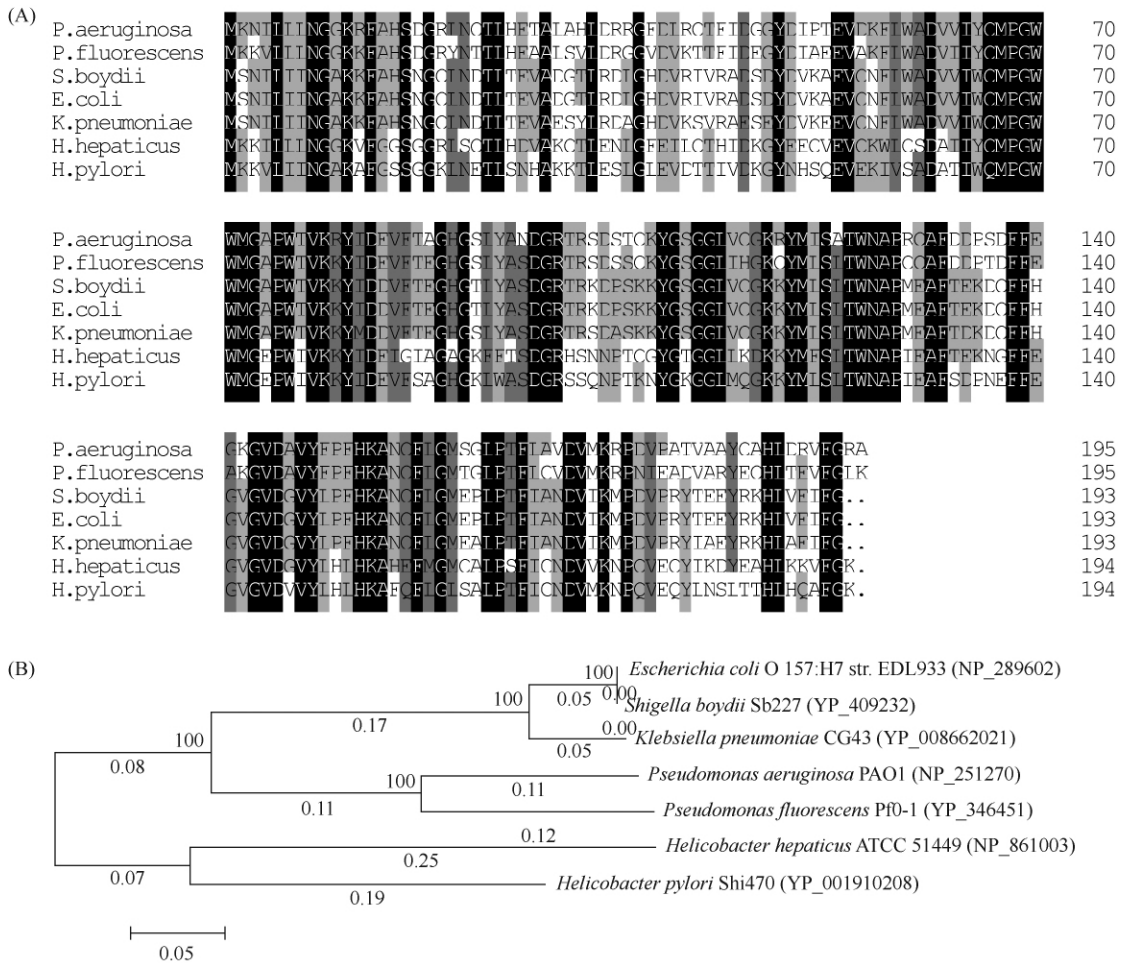


图 3. PA2580 蛋白与其他同源蛋白的多序列比对及系统发生分析

Figure 3. Multiple sequence alignment and phylogenetic tree of PA2580 protein with six other homologous proteins. A: multiple sequence alignment of PA2580 protein with homologous proteins, 100% homology level residues are shadowed with black, 75% homology level residues with dark gray and 50% homology level residues with light gray; B: phylogenetic tree of PA2580 protein with homologous proteins. The PA2580 protein homologues are from *Pseudomonas fluorescens* Pf0-1 (YP_346451), *Shigella boydii* Sb227 (YP_409232), *Escherichia coli* O157:H7 str. EDL933 (NP_289602), *Klebsiella pneumoniae* CG43 (YP_008662021), *Helicobacter hepaticus* ATCC 51449 (NP_861003) and *Helicobacter pylori* Shi470 (YP_001910208).

测到酶活性(数据未列出)。该结果表明, PA2580 蛋白具有 NADPH-醌类还原酶的活性, 并且具有 NADPH 的底物特异性, 是一种 NADPH-醌类的还原酶。

2.4 PA2580 突变体氧化压力耐受性及过氧化氢酶基因表达水平降低

通过测定 PA2580 突变体、突变体互补体及野生型 PAO1 对 H_2O_2 的最小抑制浓度 (MIC), 发现与野生型 PAO1 相比, PA2580 突变体对氧化压力的耐受性明显降低, 而突变体互补体对氧化压力的耐受性明显恢复(图 4)。该结果表明, PA2580 在铜绿假单胞菌 PAO1 对氧化压力的耐受中具有重要作用,

PA2580 功能的缺失导致菌体的氧化压力耐受性降低。

为了进一步了解 PA2580 影响铜绿假单胞菌氧化压力耐受性的原因, 构建了铜绿假单胞菌氧化压力耐受性中的 2 个关键酶——超氧化物歧化酶及过氧化氢酶基因的发光报道子。这些报道子包括 pKD-*sodB*、pKD-*sodM*、pKD-*katE*、pKD-*katA* 和 pKD-*katB*。研究检测了它们在 PAO1 (Δ 2580) 及野生型 PAO1 中的表达情况。结果如图 5 所示, 在生长基本一致的状况下, PA2580 的缺失能够明显抑制 *katE* 基因的表达, 其他基因表达水平没有明显变化(数据未列出)。*katE* 基因表达的降低可能是 PA2580

突变体氧化压力耐受性下降的重要原因。

表 2. PA2580 纯化蛋白的 NADPH-醌还原酶活性

Table 2. NADPH-quinone reductase activities of purified PA2580 protein

electron acceptor	enzyme activity with following	
	electron donor	
	NADH	NADPH
coenzyme Q ₀	1.29 ± 0.38	70.96 ± 2.40
vitamin K ₃	1.31 ± 0.38	64.96 ± 1.08
1,4-Naphthoquinone	2.37 ± 0.11	55.56 ± 2.71
ferricyanide	1.79 ± 0.05	75.24 ± 2.51
dicholophenol-indophenol	0.86 ± 0.05	24.07 ± 2.05

Enzymatic activity was determined spectrometrically by measuring the oxidation of NADPH or NADH (decrease at 340 nm). One unit of activity is defined as the amount of enzyme catalyzing the oxidation of 1 μmol of NADPH or NADH per minute per milligram of protein. Each value is the mean of three sets of experiments with the standard deviation.

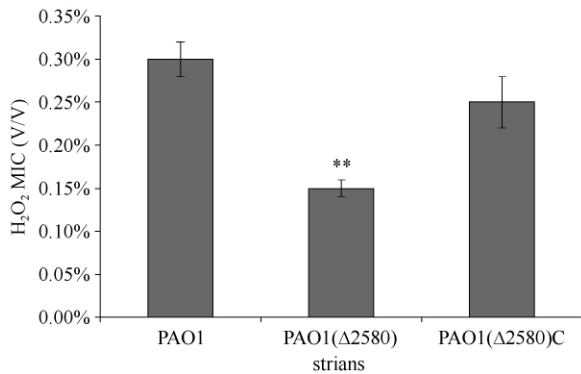


图 4. H₂O₂ 对 PAO1、PAO1 (Δ2580)、PAO1 (Δ2580) C 的 MIC

Figure 4. The MIC of H₂O₂ against PAO1, PAO1 (Δ2580) and PAO1 (Δ2580) C. The means and standard deviations of three independent experiments are presented. * * Significantly different from PAO1 ($P < 0.01$).

3 讨论

铜绿假单胞菌作为一种机会致病菌,在其生存与致病过程中会遭受来自环境及宿主的多种压力条件,例如不适温度、不利的营养条件、氧化压力和抗生素作用等。铜绿假单胞菌基因组上具有数量庞大及功能众多的调节基因,组成了复杂的代谢调控网络,从而对外界环境条件的改变产生快速应答,以应对多种不同的环境压力^[20]。

本实验室的前期研究通过构建转座突变体库的

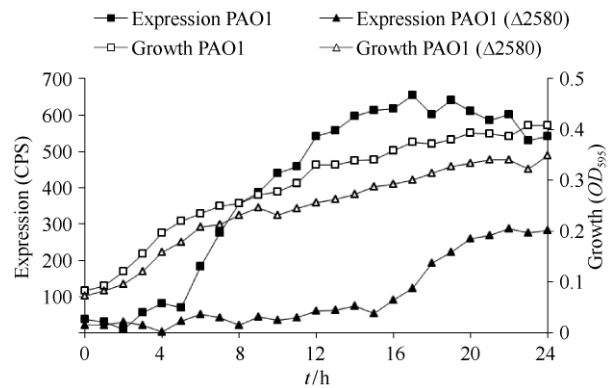


图 5. 过氧化氢酶编码基因 *katE* 在 PAO1 (Δ2580) 和 PAO1 中的表达曲线和菌株生长曲线

Figure 5. Expression of catalase gene *katE* in PAO1 (Δ2580) and PAO1 and the bacterial growth. The left Y-axis indicates expression levels (CPS value); the right shows OD₅₉₅ value; the X-axis represents time. The expression levels are shown as solid symbols and growth in hollow symbols. Expression of *katE* in PAO1 and the growth of the strain are represented by squares; expression of *katE* in PAO1 (Δ2580) and the growth of the strain represented by triangles. The experiments were repeated at least three times and the data shown are representatives of similar results.

方式,筛选得到了 43 个与铜绿假单胞菌内在耐药性相关的基因^[4],本文对其中的 PA2580 基因进行了深入的研究。研究结果证明 PA2580 与铜绿假单胞菌对外界环境压力的耐受性相关。

PA2580 是一个功能未知的 IV 型基因,产物与多种细菌中的 MdaB 同源(图 3),与大肠杆菌的 MdaB 具有 75% 的相似性^[21]。在大肠杆菌中,MdaB 是一种酶类,其活性与哺乳动物中的 DT-硫辛酸脱氢酶类似^[19]。而在哺乳动物中,DT-硫辛酸脱氢酶是一种 NAD(P)H-醌类的氧化还原酶类,能够进行一种两电子的氧化还原机制与单电子氧化还原途径竞争底物,来减少由于单电子途径对细胞所产生的有害的氧化压力损伤^[16, 22]。

虽然在许多细菌中都发现了 MdaB 的同源蛋白,但细菌中关于 MdaB 功能的报道并不多。在幽门螺杆菌与肝螺杆菌中,MdaB 蛋白具有 NADPH-醌类的还原酶活性,同时具有 NADPH 的底物特异性^[12-13],在大肠杆菌中,MdaB 仅能以 NADPH 作为电子供体,不能以 NADH 为底物催化反应进行^[19]。本文的研究结果与这 3 种菌中的结果类似,PA2580 蛋白产物也具有 NADPH-醌类还原酶的活性,能够还原多种电子受体,尤其是以 NADPH 为电子供体

时具有更高的效率,具有 NADPH 的底物特异性(表 2)。表明 PA2580 蛋白是 NADPH-醌类的还原酶。

同时,在幽门螺杆菌与肝螺杆菌这两种微需氧菌中,*mdaB* 的突变体表现出对高氧浓度的耐受性下降,以及对 H₂O₂ 等氧化压力物质的抑菌圈直径变大的现象,说明 *mdaB* 与这两种细菌对氧化压力的耐受性都有密切的关系^[12-13]。本研究也得到了类似的结果,PA2580 突变体对 H₂O₂ 的耐受性降低,而其互补菌株表型能够恢复(图 4)。推测铜绿假单胞菌 PA2580 的产物与幽门螺杆菌和肝螺杆菌的 MdaB 蛋白类似,确实具有帮助菌体抵抗氧化压力的重要功能,但其作用机制,还需要进一步更为深入的研究。

在肝螺杆菌 *mdaB* 突变体中,超氧化物歧化酶基因 *sodB* 的表达上调,推测可能是 *mdaB* 功能缺失后菌体表现出的一种补偿应答^[13]。而本研究的结果表明,在 PA2580 突变体中,*sodB* 的表达水平并未发生变化,而过氧化氢酶基因 *katE* 的表达水平降低(图 5),这并不同于肝螺杆菌中的结果。铜绿假单胞菌作为一种专性好氧菌,其补偿机制可能与肝螺杆菌并不相同。而 *katE* 的表达水平降低可能是细菌对 H₂O₂ 耐受性降低的重要原因,PA2580 与 *katE* 间可能也存在某种联系,这还有待于进一步的研究。

同时,本研究中也发现,PA2580 还与铜绿假单胞菌抗生素的敏感性密切相关,PA2580 功能的缺失导致铜绿假单胞菌对羧苄青霉素、氯霉素、环丙沙星的敏感性增强(图 1),而相关报道并不多见。在幽门螺杆菌中,*mdaB* 与细菌对甲硝唑的敏感性相关,而其机制是由于 *mdaB* 产物具有硝基还原酶的活性^[23],而该种机制似乎与本研究中铜绿假单胞菌对羧苄青霉素、氯霉素和环丙沙星的敏感性无关。在大肠杆菌中,*mdaB* 与 DMP840、阿霉素和依托泊苷这三种抗肿瘤药物的敏感性相关,当其过量表达时细菌对这 3 种药物的耐受性增强^[21]。在本研究中,*mdaB* 的与铜绿假单胞菌多重耐药性相关的现象,尚属首次发现。

羧苄青霉素、氯霉素和环丙沙星是 3 种不同类型的抗生素,其抗菌机理各不相同,因而 PA2580 突变体对这 3 种抗生素的敏感性增强可能并不是由于改变了某种抗生素的作用靶点而导致的。然而,抗生素的杀菌作用除与靶点作用外,还可能诱导产生活性氧簇,进而增加细菌胞内的氧化压力^[24]。由于

PA2580 与菌体对氧化压力的耐受性相关,PA2580 突变体对抗生素敏感性增加的原因可能是由于 PA2580 突变导致细菌对抗生素在胞内产生的氧化压力耐受降低。在大肠杆菌中,诺氟沙星对过氧化氢酶基因 *katG* 突变体的致死性增加,氨基青霉素和卡那霉素对烷基过氧化氢还原酶 *ahpC* 突变体的致死性也增强^[25],也有研究表明大肠杆菌中与氧化压力有关的谷胱甘肽合成相关基因(*gshA*、*gshB*)的突变导致其对甲硝唑的敏感性增强^[26],说明与氧化压力相关的基因可能与细菌对抗生素的敏感性确实有一定的关系。本文的结果也表明 PA2580 基因受到低于抑制浓度抗生素的诱导(图 2),其机制可能是由于抗生素增加了细菌胞内的氧化压力,作为一种氧化压力应答机制导致了 PA2580 基因上调。

然而也有研究认为,抗生素的作用与细菌产生活性氧无关^[27],因而,PA2580 与抗生素敏感性相关的机理有待于进一步研究。

同时,一定意义上氧化压力及抗生素都是环境压力,PA2580 与两者都相关,那么 PA2580 也许同时参与铜绿假单胞菌对其他环境压力的应答调节,这也有待于进一步研究。

参考文献

- [1] Lyczak JB, Cannon CL, Pier GB. Establishment of *Pseudomonas aeruginosa* infection: lessons from a versatile opportunist. *Microbes and Infection*, 2000, 2 (9) : 1051-1060.
- [2] Kerr K, Snelling A. *Pseudomonas aeruginosa*: a formidable and ever-present adversary. *Journal of Hospital Infection*, 2009, 73 (4) : 338-344.
- [3] Breidenstein E, de la Fuente-Núñez C, Hancock RE. *Pseudomonas aeruginosa*: all roads lead to resistance. *Trends in Microbiology*, 2011, 19 (8) : 419-426.
- [4] Chen L, Yang L, Zhao X, Shen L, Duan K. Identification of *Pseudomonas aeruginosa* genes associated with antibiotic susceptibility. *Science China Life Sciences*, 2010, 53 (10) : 1247-1251.
- [5] Simon R, Priefer U, Pühler A. A broad host range mobilization system for *in vivo* genetic engineering: transposon mutagenesis in gram negative bacteria. *Nature Biotechnology*, 1983, 1 (9) : 784-791.
- [6] Holloway B, Römling U, Tümmler B. Genomic mapping of *Pseudomonas aeruginosa* PAO. *Microbiology*, 1994,

- 140 (11) : 2907-2929.
- [7] 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.
- [8] Schweizer HP. Two plasmids, X1918 and Z1918, for easy recovery of the *xylE* and *lacZ* reporter genes. *Gene*, 1993, 134 (1) : 89-91.
- [9] Ditta G, Stanfield S, Corbin D, Helinski DR. Broad host range DNA cloning system for gram-negative bacteria: construction of a gene bank of *Rhizobium meliloti*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1980, 77 (12) : 7347-7351.
- [10] Hoang TT, Kutchma AJ, Becher A, Schweizer HP. Integration-proficient plasmids for *Pseudomonas aeruginosa*: site-specific integration and use for engineering of reporter and expression strains. *Plasmid*, 2000, 43 (1) : 59-72.
- [11] Bjarnason J, Southward CM, Surette MG. Genomic profiling of iron-responsive genes in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium by high-throughput screening of a random promoter library. *Journal of Bacteriology*, 2003, 185 (16) : 4973-4982.
- [12] Wang G, Maier RJ. An NADPH quinone reductase of *Helicobacter pylori* plays an important role in oxidative stress resistance and host colonization. *Infection and Immunity*, 2004, 72 (3) : 1391-1396.
- [13] Hong Y, Wang G, Maier RJ. The NADPH quinone reductase MdaB confers oxidative stress resistance to *Helicobacter hepaticus*. *Microbial Pathogenesis*, 2008, 44 (2) : 169-174.
- [14] Masuda N, Sakagawa E, Ohya S, Gotoh N, Tsujimoto H, Nishino T. Contribution of the MexX-MexY-OprM efflux system to intrinsic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2000, 44 (9) : 2242-2246.
- [15] Bagge N, Schuster M, Hentzer M, Ciofu O, Givskov M, Greenberg EP, Høiby N. *Pseudomonas aeruginosa* biofilms exposed to imipenem exhibit changes in global gene expression and β -lactamase and alginate production. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2004, 48 (4) : 1175-1187.
- [16] Adams MA, Iannuzzi P, Jia Z. MdaB from *Escherichia coli*: cloning, purification, crystallization and preliminary X-ray analysis. *Acta Crystallographica Section F: Structural Biology and Crystallization Communications*, 2005, 61 (2) : 235-238.
- [17] Bateman A, Coin L, Durbin R, Finn RD, Hollich V, Griffiths - Jones S, Khanna A, Marshall M, Moxon S, Sonnhammer EL. The Pfam protein families database. *Nucleic Acids Research*, 2004, 32 (suppl 1) : D138-D141.
- [18] Wang Z, Li L, Dong YH, Su XD. Structural and biochemical characterization of MdaB from cariogenic *Streptococcus mutans* reveals an NADPH-specific quinone oxidoreductase. *Acta Crystallographica. Section D, Biological Crystallography*, 2014, 70 (Pt 4) : 912-921.
- [19] Hayashi M, Ohzeki H, Shimada H, Unemoto T. NADPH-specific quinone reductase is induced by 2-methylene-4-butyrolactone in *Escherichia coli*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1996, 1273 (2) : 165-170.
- [20] Stover C, Pham X, Erwin A, Mizoguchi S, Warrener P, Hickey M, Brinkman F, Hufnagle W, Kowalik D, Lagrou M. Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. *Nature*, 2000, 406 (6799) : 959-964.
- [21] Chatterjee PK, Sternberg NL. A general genetic approach in *Escherichia coli* for determining the mechanism (s) of action of tumoricidal agents: application to DMP 840, a tumoricidal agent. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1995, 92 (19) : 8950-8954.
- [22] Adams MA, Jia Z. Modulator of Drug Activity B from *Escherichia coli*: Crystal Structure of a Prokaryotic Homologue of DT-diaphorase. *Journal of Molecular Biology*, 2006, 359 (2) : 455-465.
- [23] Jorgensen MA, Trend MA, Hazell SL, Mendz GL. Potential involvement of several nitroreductases in metronidazole resistance in *Helicobacter pylori*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2001, 392 (2) : 180-191.
- [24] Dwyer DJ, Kohanski MA, Collins JJ. Role of reactive oxygen species in antibiotic action and resistance. *Current Opinion in Microbiology*, 2009, 12 (5) : 482-489.
- [25] Wang X, Zhao X. Contribution of oxidative damage to antimicrobial lethality. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2009, 53 (4) : 1395-1402.

- [26] Tamae C, Liu A, Kim K, Sitz D, Hong J, Becket E, Bui A, Solaimani P, Tran KP, Yang H. Determination of antibiotic hypersensitivity among 4, 000 single-gene-knockout mutants of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 2008, 190(17) : 5981-5988.
- [27] Keren I, Wu Y, Inocencio J, Mulcahy LR, Lewis K. Killing by bactericidal antibiotics does not depend on reactive oxygen species. *Science*, 2013, 339(6124) : 1213-1216.

PA2580 is involved in *Pseudomonas aeruginosa* resistance to environmental stress

Lin Zhao, Juan Li, Lin Chen, Lixin Shen, Kangmin Duan*

Key Laboratory of Resources Biology and Biotechnology in Western China, Ministry of Education, Faculty of Life Sciences, Northwest University, Xi'an 710069, Shaanxi Province, China

Abstract: [Objective] To investigate the function of gene PA2580 in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. [Methods] We constructed a PA2580 knockout mutant of PAO1 and a complemented strain of the mutant. We studied the function of the gene PA2580 using both genetic and biochemical methods, including antibiotic minimum inhibition concentration (MIC) comparison, measurement of gene expression levels in different conditions, protein expression and purification *in vitro* and enzymatic activity detection. [Results] PA2580 mutant was more sensitive to carbenicillin, chloramphenicol and ciprofloxacin. PA2580 expression was regulated by sub-inhibitory concentrations of antibiotics. PA2580 protein reduced various quinones efficiently using NADPH as the electron donor. PA2580 mutant was more sensitive to hydrogen peroxide and the mutant showed decreased expression of catalase. These results indicate that PA2580 is involved in the tolerance of oxidative stress in *P. aeruginosa*. [Conclusion] The *P. aeruginosa* PA2580 protein physiologically functions as an NADPH quinone reductase which plays an important role in dealing with environment stress.

Keywords: *Pseudomonas aeruginosa*, PA2580, stress resistance, NADPH quinone reductase

(本文责编:张晓丽)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (31370165) and by the Development Plan of Ministry of Education, Changjiang Scholars and Innovative Research Team (IRT1174)

* Corresponding author. Tel/Fax: +86-29-88302132; E-mail: kduan@nwu.edu.cn

Received: 6 March 2014 /Revised: 14 June 2014