

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
55 (12):1600–1607; 4 December 2015
ISSN 0001–6209; CN 11–1995/Q
http://journals.im.ac.cn/actamicrocn
doi: 10.13343/j.cnki.wsxb.20150229

异油酸含量对铜绿假单胞菌群集运动能力的影响

于非非¹, 余祥勇¹, 于海英², 胡明杰², 曲璟秋², 朱坤^{2*}, 王梅芳^{1*}

¹广东海洋大学, 广东 湛江 524088

²中国科学院微生物研究所, 北京 100101

摘要:【目的】研究铜绿假单胞菌的脂肪酸组成对群集运动 (swarming) 的影响及可能的原因。【方法】通过双交换原理敲除铜绿假单胞菌 PAO1 脂肪酸合成的一个重要基因 *fabF*, 构建 *fabF* 缺失突变体; 构建 pUCP18Gm-*fabF* 质粒大量表达 FabF, 对缺失体进行回补。比较野生型、缺失体和回补后菌株的 swarming 能力。利用气相色谱分析野生型、缺失体和回补后菌株的脂肪酸组成变化, 以揭示 FabF 表达影响 swarming 能力的可能原因。【结果】获得了假单胞菌的 *fabF* 缺失突变体 YFF-1, 证实了 *fabF* 敲除后假单胞菌的 swarming 能力消失, *fabF* 回补后细菌的 swarming 能力得以恢复。气相色谱结果显示, 突变后脂肪酸组成发生明显变化, 异油酸 (C18:1 Δ 11) 含量由 33.6% 急剧下降至 8.9%, 不饱和脂肪酸: 饱和脂肪酸 (USA:SFA) 也由 0.96 下降至 0.74; *fabF* 回补后, 异油酸含量恢复至 20.9%, USA:SFA 也上升至 1.09。【结论】铜绿假单胞菌 *fabF* 基因的表达水平对细菌的 swarming 能力具有重要影响, 突变体中异油酸含量的下降及脂肪酸不饱和程度的降低 (尤其是异油酸含量的急剧下降), 可能是 YFF-1 swarming 能力消失的重要原因。

关键词: 铜绿假单胞菌, *fabF*, 群集运动, 异油酸, 脂肪酸饱和程度

中图分类号: Q935 **文章编号:** 0001-6209 (2015) 12-1600-08

群集运动 (swarming mobility) 是指运动细菌以群体方式在培养基表面由接种点向周围进行的依赖鞭毛和纤毛的迁移运动^[1], 它可使群集细菌迅速迁移到营养丰富的环境, 与宿主组织吸附定植成菌落, 从而给细菌提供生态学优势^[2]。群集运动是一种较为复杂的适应性活动, 与细菌的基因表达水平、遗传物质代谢水平、自身结构等诸多方面有关。

铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) 为革兰氏阴性菌, 是目前临床上重要的院内条件感染致病菌^[3]。铜绿假单胞菌具有明显的群集运动能力, 群集运动能显著增加细菌的致病性和耐药性^[4]。已有研究表明, 处于群集运动状态下的铜绿假单胞菌

细胞, 其弹性蛋白酶、蛋白酶 IV、鼠李糖基转移酶等毒力蛋白的表达较正常细胞提高了 2–13 倍^[5], 且能表现出高度的分化和协同关系, 大大增强了其对抗多种药物的能力, 如多黏菌素 B、庆大霉素、环丙沙星等^[6]。因此, 探讨铜绿假单胞菌的群集运动现象及相关影响因子, 对控制铜绿假单胞菌的致病性和耐药性具有重要的意义。

铜绿假单胞菌的群集运动可能受到多种因子的调控, 其中, 细菌的脂肪酸组成可能会影响细胞的群集运动能力^[7]。 β -酮脂酰 ACP 合成酶 (FabF) 是假单胞菌脂肪酸合成的重要酶, 负责脂肪酸链的延伸^[8], *fabF* 的缺失可能会改变细胞的脂肪酸组成,

基金项目: 国家自然科学基金 (31200081)

* 通信作者。朱坤, Tel/Fax: +86-10-57470235, E-mail: zhuk@im.ac.cn; 王梅芳, Tel/Fax: +86-759-2396182, E-mail: pearlang@126.com

作者简介: 于非非 (1980–), 女, 山东威海人, 讲师, 研究方向为分子遗传学。E-mail: yufeifei2000@163.com

收稿日期: 2015-05-20; 修回日期: 2015-08-18

从而影响铜绿假单胞菌的群集运动。

本研究中,我们利用 pEX18TC 系统进行同源重组,成功敲除了铜绿假单胞菌 PAO1 菌株的 *fabF* 基因,构建了 PAO1 FabF 缺失突变体。通过比较野生型 PAO1、FabF 突变体和 FabF 质粒过量表达的 FabF 突变体菌株的群集能力,证实 *fabF* 的缺失可消除铜绿假单胞菌的群集运动能力,*fabF* 基因的导入能恢复突变体 FabF 的群集运动能力。脂肪酸组成分析发现,铜绿假单胞菌 swarming 能力的强弱可能与异油酸的含量和脂肪酸的不饱和程度有关。本研究筛选到了能够影响铜绿假单胞菌 swarming 能力的因子,并消除了其 swarming 能力,为在临床上控制铜绿假单胞菌的传染性和相关的医药开发提供了一定的理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株、质粒和引物: 本实验所有的菌株、质粒

见表 1,引物见表 2。

1.1.2 主要试剂: 多种限制性内切酶、T4 DNA 连接酶皆为 Fermentas (MBI) 公司产品, *Taq* DNA 聚合酶购于北京奥赛博科技有限公司,高保真 DNA 聚合酶购自 Genstar 公司,质粒提取、PCR 产物纯化与回收、DNA 胶回收等试剂盒均购自 OMEGA 公司,PIA 培养基购自 BD 公司。本研究中所涉及的引物合成、测序由生工生物工程(上海)有限公司完成。

1.1.3 培养基和培养条件: 大肠杆菌的培养采用 Luria-Bertani (LB) 培养基(1% 胰蛋白胨,0.5% 酵母提取物,1% 氯化钠)铜绿假单胞菌的培养采用 PIA 培养基(购自美国 BD 公司)。根据不同培养需要,大肠杆菌中抗生素终浓度分别为卡那霉素 (Km) 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$,盐酸四环素 (Tet) 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、庆大霉素 (Gm) 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$;铜绿假单胞菌培养基中抗生素终浓度为:Tet 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、Gm 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。常规菌体液体培养时,大肠杆菌和铜绿假单胞菌均在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、200 r/min 条件下振荡培养。

表 1. 菌株和质粒

Table 1. Strains and plasmids

Strains and plasmids	Characteristics	Reference or source
Strains		
<i>E. coli</i>		
DH5 α	$\Phi 80\text{lacZ}\Delta\text{M15 } \Delta(\text{lacZYA-argF})$ U169 <i>hsdR17 recA1endA1 thi⁻¹</i>	[9]
SM10	<i>F-thi⁻¹ thr⁻¹ leuB6 recA tonA21 lacY1 supE44 (Mu_C⁺) λ^{-} Kan^R</i>	[10]
<i>P. aeruginosa</i>		
PAO1	wild type, Spe ^R	[11]
YFF-1	<i>fabF</i> knockout mutant of PAO1, Gm ^R	This study
Plasmids		
pEX18TC	Suicide plasmid, Tet ^R	[10]
pPS856	Cb ^R Gm ^R source of FRT-Gm ^R cassette	[10]
pUCP18Gm	Gm ^R	This study
pUCP18Gm- <i>fabF</i>	pUCP18Gm with <i>fabF</i> , Gm ^R	This study

表 2. 文中所用引物

Table 2. The primers used in this study

primers	Sequence (5'→3')	Restriction site
Acp-F-1	CCATTACCGTGAATGCGGTG	
Acp-R	TCAGAGCGCTTTTGAAGCTAATTCGACACTACGACTTCCTCTTC	
Pab-F	AGGAACTCAAGATCCCCAATTCGCTGATGCTGGACTGG	
Pab-R	GTTGCACAGAAAGACCTCGTCC	
Acp-F-2	GGTACCCGTGCCGTCAATGGTGG	<i>Kpn</i> I
Pab-R-2	<u>CAAGCTT</u> ACGGGCGGAGGACCTGCTC	<i>Hind</i> III
FabF (OUT) -F	GCGCAACCCCGTGAAATGAG	
FabF (OUT) -R	CCATAGGCCAGTCCGCGATC	
FabF-F	ATGAGCTCGGTGTCGCGTAGACGCGTCTGTC	<i>Sac</i> I
FabF-R	<u>AGAAGCTT</u> CCAGGCGGCCAGGTG	<i>Hind</i> III
Gm-F	CGAATTAGCTTCAAAAGCGCTCTGA	
Gm-R	CGAATTGGGGATCTTGAAGTTCTT	

Restriction sites were underlined.

1.2 FabF 缺失体的构建

1.2.1 pEX18TC-AcpP-Gm-PabC 质粒的构建:

根据铜绿假单胞菌 PAO1 的基因组序列, *fabF* 基因的上游为 *AcpP* 基因, 下游为 *PabC* 基因。分别设计 *AcpP* 的上下游引物 Acp-F-1 和 Acp-R, 并在 Acp-R 的 5' 端加上 20 - 30 个碱基的 Gm 序列; 设计 *PabC* 的上下游引物 Pab-F 和 Pab-R, 并在 Pab-F 的 5' 端加上 20 - 30 个碱基的 Gm 序列。以 PAO1 的基因组为模板, 分别克隆完整的 *AcpP* 基因和 *PabC* 基因。利用 pPS856 质粒为模板, 设计引物 Gm-F 和 Gm-R, 克隆 Gm 序列。将以上的 *AcpP* 基因、*PabC* 基因和 Gm 片段纯化回收作为模板, 设计引物 Acp-F-2 和 Pab-R-2, 利用 overlap-PCR 技术将以上 3 个片段链接成 1 个长片段, 即 AcpP-Gm-PabC, 测序确保以上序列正确可靠。以上所用引物见表 2。

分别利用 *Kpn* I 和 *Hind* III 酶切 *AcpP-Gm-PabC* 片段和 pEX18TC 质粒, 连接, 获得质粒 pEX18TC-AcpP-Gm-PabC, 电击转化进大肠杆菌 SM10 菌株, 涂布到同时含 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Tet 和 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Gm 的 LB 平皿中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养过夜。利用 Acp-F-2、Pab-R-2 引物或 Gm-F、Gm-R 引物 PCR, 筛选阳性克隆。以上具体操作详见文献 [9]。

1.2.2 接合实验: 以携带了 pEX18TC-AcpP-Gm-PabC 质粒的 SM10 菌株为供体, PAO1 野生型菌株为受体进行结合转移, 具体步骤为: 将 200 μL 携带质粒的 SM10 菌株培养至 OD_{600} 约为 1, 加上新培养的 PAO1 野生型菌株 50 μL , 摇匀, 37 $^{\circ}\text{C}$ 静置孵育 3 h。取 50 μL 混合菌液, 涂布到无抗性的 LB 平板上, 过夜培养。从 LB 平板上刮下一块菌体, 溶解在 100 μL 中, 涂布到 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Gm 的 PIA 培养基上培养, 以富集发生了接合作用的 PAO1 菌株。从 PIA 培养基上挑取若干克隆到无抗性 LB 液体培养基中, 摇到对数生长期, 涂布到 10% 蔗糖的含 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Gm 的 LB 固体培养基中, 培养过夜。

1.2.3 PAO1 FabF 突变体菌株 YFF-1 的筛选和鉴定: 首先为抗性筛选。有 3 种情况: 一是在含 Gm 和 Tet 的培养基上都无法生长的菌落, 此为野生型菌株; 二是在含 Gm 和 Tet 的培养基上都生长的菌落, 此为发生了单交换的菌株; 三是在含 Gm 的培养基上生长, 在含 Tet 的培养基上不长的菌落, 该菌株

fabF 基因被 *gm* 基因取代, 为双交换个体, 可初步认定为 FabF 缺失突变株。

接着进行 PCR 鉴定, 分为两步: 第一步, 以 FabF (OUT)-F 和 FabF (OUT)-R 为引物, 分别选以上 3 种生长情况的菌株 DNA 为模板进行 PCR, 发生双交换的个体扩增出来的是 *gm* 的阳性条带 (1164 bp), 发生单交换个体会出现 *gm* (1164 bp) 和 *fabF* (1347 bp) 两条带, 而野生型则只有 *fabF* 一条带 (1347 bp); 第二步, Gm-F 和 Gm-R 为引物 PCR, 以经过第一轮 PCR 鉴定为阳性的菌落 DNA 为模板, 并以野生型 PAO1 基因组 DNA 作为对照。只有发生了双交换的个体可以克隆出 *gm* 条带, 对照组没有条带产生。

进一步进行序列分析, 缺失体与野生型 PAO1 比对后, *fabF* 基因被 *gm* 基因取代的即为缺失突变株 YFF-1。

1.3 pUCP18Gm-fabF 质粒的构建

以 PAO1 基因组为模板, FabF-F 和 FabF-R 为引物扩增 *fabF* 基因, 构建 pMD18T-*fabF* 质粒。用 *Sac* I 和 *Hind* III 分别酶切 pMD18T-*fabF* 质粒和 pUCP18 Gm 载体 (pUCP18 载体上插入 Gm 基因序列即 pUCP18Gm 载体), T4 连接酶连接, 构建 pUCP18Gm-*fabF* 质粒, 电转化到大肠杆菌 DH5 α 中, 涂到含 Gm (20 mg/L) 的 LB 固体培养基上, 通过菌落 PCR 筛选阳性克隆。提取质粒, 电转化到铜绿假单胞菌 YFF-1 突变菌株中, 筛选阳性克隆用于后续实验。

1.4 Swarming 等运动能力的检测

用于检测假单胞菌 swarming 能力的固体培养基配方为: 1% 胰蛋白胍 (tryptone), 0.5% 酵母提取物 (yeast extract), 1% 氯化钠 (NaCl), 0.4% 琼脂粉 (agar), 0.5% 葡萄糖 (glucose)。分别将 PAO1 野生型、YFF-1 和 FabF 回补的 YFF-1 菌株接种到以上特定的 LB 固体培养基中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养过夜, 观察细菌的形态差异。检测 swimming 的培养基配方: 1% 胰蛋白胍, 0.5% 酵母提取物, 0.5% NaCl, 琼脂 0.35%。接种后 30 $^{\circ}\text{C}$ 培养 12 - 24 h 观察 swimming 运动。检测 twitching 的培养基配方: 1% 胰蛋白胍, 0.5% 酵母提取物, 1% NaCl, 1.0% 琼脂。接种后 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 24 h 观察 twitching 运动。

1.5 脂肪酸甲酯的提取和检测

1.5.1 脂肪酸甲酯提取: 分别挑 PAO1、YFF-1 和 FabF 大量表达的 YFF-1 菌株培养到 OD_{600} 为 1.0 左

右, 收集 10 mL 菌液, 用 1 mL H_2O 悬浮, 加 2.4 mL 甲醇/乙酸 (98: 2), 1 mL $CHCl_3$ 涡旋, 再加 1.5 mL $CHCl_3$ 、1.2 mL H_2O 涡旋, 离心分层。取下层到新管中, 加 1 mL $CHCl_3$ 到原管中再次抽提, 合并样品, 真空干燥。加入 1 - 2 mL $HCl-CH_3OH$ 涡旋, 静置过夜, 真空干燥。加 1 mL 正己烷和 2 mL H_2O , 离心分层取上层到新管中, 再加 1 mL 正己烷抽提, 合并样品, 真空干燥, 用 50 μL 正己烷溶解^[12]。

1.5.2 气相色谱检测: 气相色谱仪是岛津 GC-2010, 氢火焰离子检测器, 毛细管色谱柱 DB-5, 程序升温条件为从 190 $^{\circ}C$ (1 min) 起始, 以 2 $^{\circ}C/min$ 速度至 200 $^{\circ}C$ (1 min), 再以 5 $^{\circ}C/min$ 至 240 $^{\circ}C$ (1 min), 进样器和检测器温度 270 $^{\circ}C$, 进样量 1 μL 。

1.5.3 脂肪酸含量计算: 以 20 个碳的饱和脂肪酸 (C20:0) 为内标测定脂肪酸的含量。分别绘制棕榈油酸 (C16: 1)、棕榈酸 (C16: 0)、油酸 (C18: 1) 和硬脂酸 (C18: 0) 四种脂肪酸的标准曲线, 用以计算脂肪酸含量。

2 结果和分析

2.1 *fabF* 缺失突变株的筛选和鉴定

经过两轮 PCR 筛选出了双交换个体、单交换个体和野生个体如图 1 所示。更确切的证据来自双交换个体与野生型序列比对, PAO1 中的 *fabF* 基因已被 *gm* 序列所替代 (图略), 至此证实我们获得了 FabF 缺失突变体。

在构建假单胞菌缺失突变体的技术中, 利用同源重组的原理、通过引入带抗性的自杀质粒以发生双交换的方法是常用的一种。本研究中我们尝试了分别引入 pk18mobSacB、pEX18ApGw 和 pEX18Tc 3 种自杀质粒, 发现只有引入 pEX18Tc 质粒最易筛选出双交换突变体, 且其操作相对简单快捷。另外, 在将 pEX18Tc-*AcpP-Gm-PabC* 质粒导入 PAO1 的过程中, 我们也比较了电击转化和接合转移的效果, 结果显示接合转移的成功率明显高于电击转化。因此,

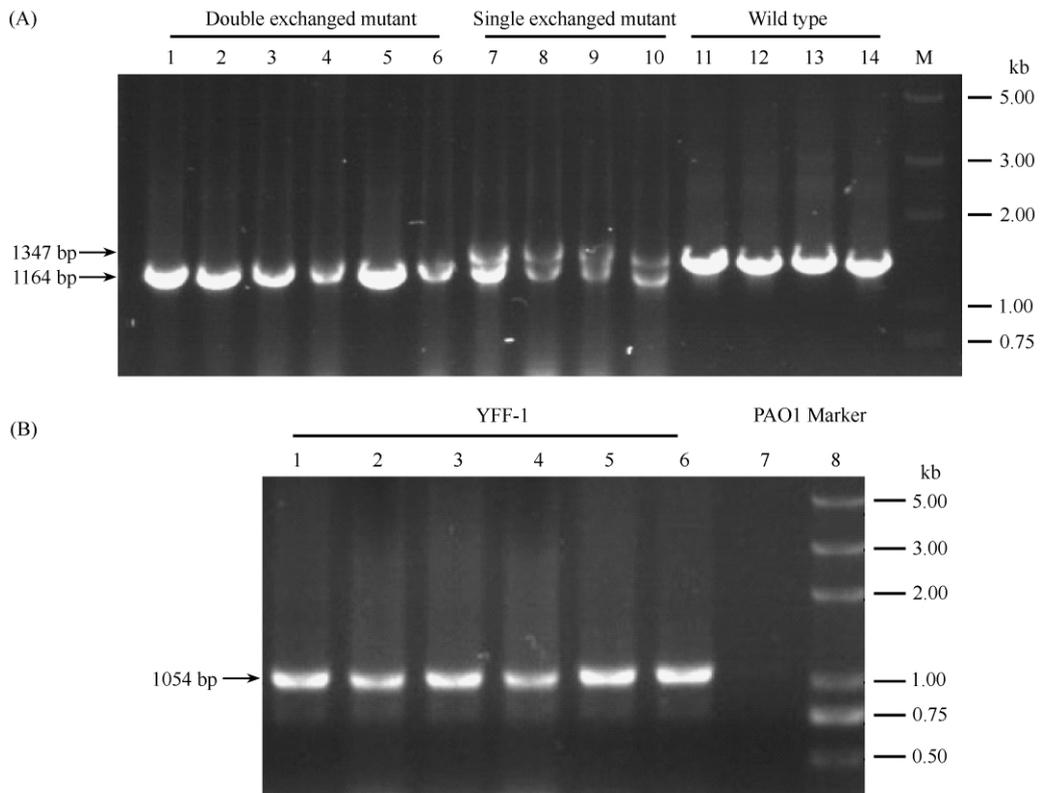


图 1. *fabF* 缺失突变体的 PCR 鉴定

Figure 1. Identification of *fabF* deletion mutants. A: PCR analysis using FabF(OUT)-F and FabF(OUT)-R as primers. lane 1 - 6, double exchanged mutant; lane 7 - 10, single exchanged mutant; lane 11 - 14, wild type; M, marker. B: PCR analysis using Gm-F and Gm-R as primers. lane 1 - 6, double exchanged mutant; lane 7, wild type; M, marker.

本文中我们主要描述了通过引入 pEX18Tc 自杀质粒、利用接合转移的方式获得 FabF 突变体的操作过程,该操作系统可大大提高工作效率。

2.2 *fabF* 缺失突变体失去 swarming 能力

将 PAO1 野生型、YFF-1 缺失体和 FabF 大量表达的 YFF-1 菌株分别点到含 0.4% 琼脂糖的 LB 固体培养基中心,37 °C 培养过夜,细菌的形态出现明显差异(图 2)。野生型 PAO1 出现明显的 swarming 现象,YFF-1 缺失体的菌落始终是一个小圆点,而 FabF 大量表达的 YFF-1 菌株恢复了 swarming 现象。这说明 *fabF* 的缺失可以使铜绿假单胞菌失去 swarming 能力,而 FabF 的大量表达则能够回补缺失体的 swarming 能力。这暗示着 FabF 的表达水平与 swarming 运动能力间存在着紧密的关系。

2.3 气相色谱检测脂肪酸组成的变化

为了进一步探讨 *fabF* 表达水平与 PAO1 swarming 能力的关系,我们分析了 PAO1 野生型、YFF-1 和 FabF 大量表达的 YFF-1 菌株的脂肪酸组成。根据气相色谱检测结果显示(图 3),*fabF* 缺失或大量表达后各种脂肪酸的比例都发生了一定的变化,其中最为明显的是十八碳烯酸(异油酸, C18:1)的含量,在野生型中为 33.6%,在 YFF-1 中急剧下降至 8.9%,*fabF* 回补后恢复至 20.9%(表 3)。另外,脂肪酸的饱和程度也有一定的变化,*fabF* 缺失后 UFA:SFA 比值由 0.96 下降至 0.74;*fabF* 回补后

恢复至 1.09。棕榈油酸(C16:1)的含量虽然在 *fabF* 缺失后由 15.5% 提高至 33.7%,但在 *fabF* 回补后,其含量仍保持在 31.3% 左右,这暗示着棕榈油酸并不是影响铜绿假单胞菌 swarming 能力的关键因素。异油酸含量和脂肪酸不饱和程度的变化,特别是异油酸含量的降低,可能是 YFF-1 swarming 运动能力消失的主要原因。

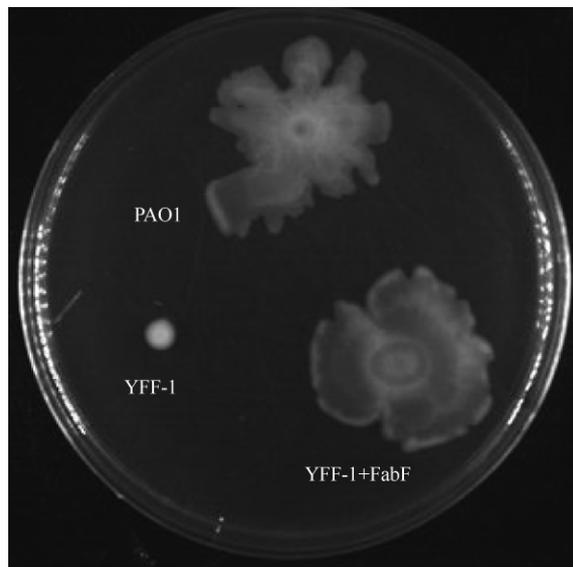


图 2. PAO1、YFF-1 和 FabF 大量表达的 YFF-1 菌株 swarming 能力的检测

Figure 2. The swarming assay of PAO1, YFF-1 and YFF-1 with pUCP18Gm-*fabF* in LB medium.

表 3. PAO1 和 YFF-1 的脂肪酸组成

Table 3. The composition of fatty acids in PAO1 and YFF-1

Strains	Fatty acid composition				
	C16:0/%	C16:1/%	C18:0/%	C18:1/%	UFA: SFA
PAO1	34.6	15.5	16.3	33.6	0.96
YFF-1	37.9	33.7	19.5	8.9	0.74
YFF-1 + <i>fabF</i>	30.6	31.3	17.1	20.9	1.09

3 讨论

Swarming 运动是受细胞间信号介导的一种多细胞运动,与细菌的致病性、耐药性等多种功能密切相关^[13]。为了研究可降低假单胞菌 swarming 能力的相关因子及其诱发原因,本文构建了 *fabF* 的缺失突变菌株 YFF-1 和 *fabF* 表达质粒 pUCP18Gm-*fabF*,经检测 *fabF* 基因的缺失可消除 PAO1 的 swarming 运动能力,而 *fabF* 的回补可恢复缺失体的 swarming 能力。*fabF* 缺失对其它运动 swimming 和 twitching 的影

响较 swarming 轻微,所以没有作为主要研究内容。

脂肪酸是细菌细胞膜的重要组成部分,脂肪酸可调控多种细菌行为,包括运动能力、毒性、生长速度和分化能力等^[7]。Swarming 现象是细菌的一种重要运动能力,swarming 能力的强弱与细胞内外环境的脂肪酸组成也存在紧密的联系。Liaw^[14] 和 Lai^[15] 等分别在培养 *Proteus mirabilis* 和 *Serratia marcescens* 时添加十二烷酸(C12:0)、十四烷酸(C14:0)、十六烷酸(C16:0)和十八烷酸(C18:0)等脂肪酸,均可抑制细菌的 swarming 现象以及溶血素的产生,证明直链饱和脂肪酸可抑制细菌的群集运

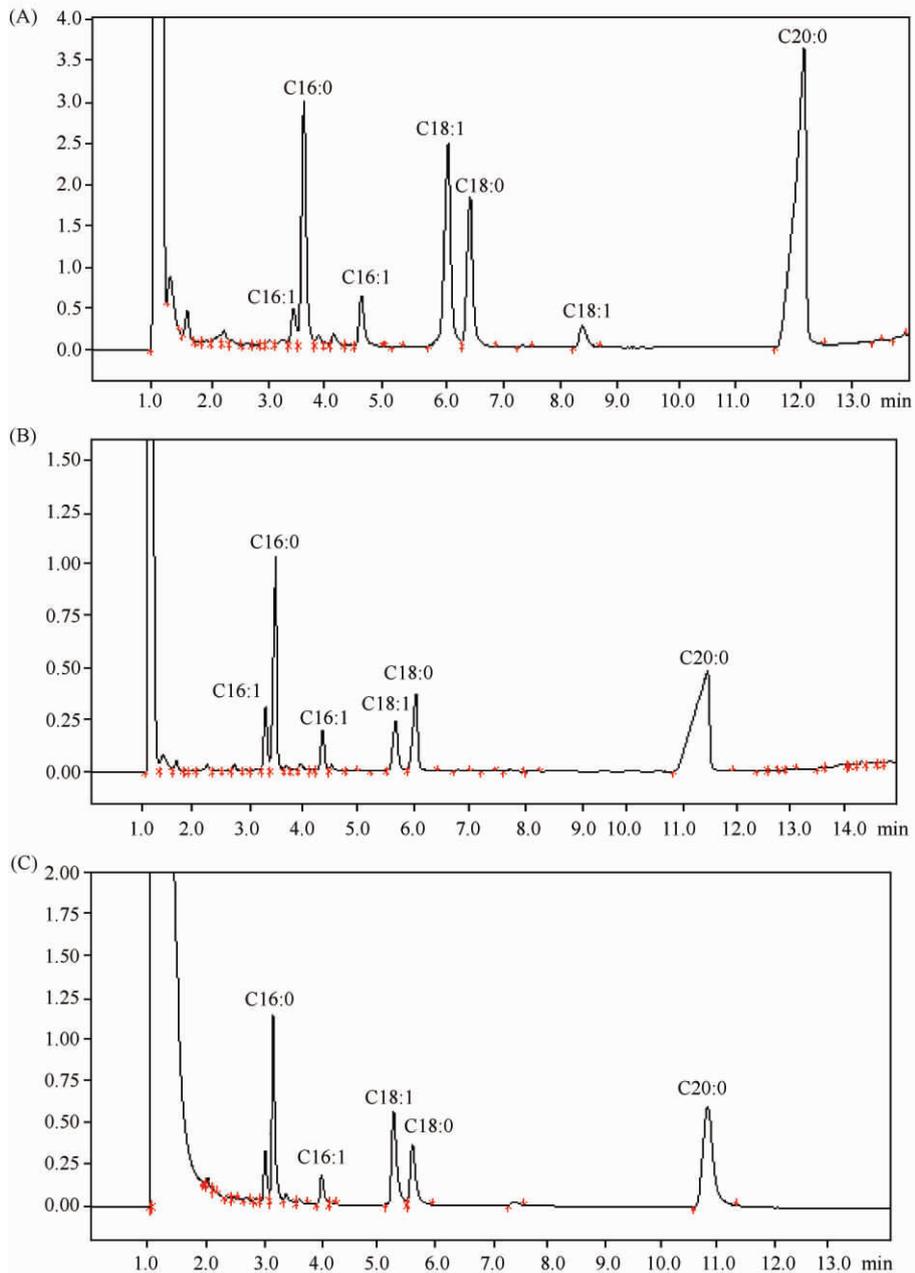


图 3. PAO1、YFF-1 和 FabF 大量表达的 YFF-1 菌株脂肪酸组成的检测。

Figure 3. The fatty acid composition assay of PAO1, YFF-1 and YFF-1 with pUCP18Gm-fabF in LB medium. A: PAO1; B: YFF-1; C: YFF-1 + FabF.

动能力。Inoue 等^[7]发现,在培养基中添加 12-甲基十四烷酸 (anteiso-C15:0) 能够抑制 *Pseudomonas aeruginosa* 的 swimming 和 swarming 现象,证明支链饱和脂肪酸也能够抑制铜绿假单胞菌的运动能力。然而,不饱和脂肪酸对 swarming 的影响研究者们看法不一。Inoue 等^[7]在培养基中添加了一定量肉蔻油酸 (C14:1)、棕榈油酸 (C16:1)、油酸 (C18:1) 和亚油酸 (C18:2),发现不同程度地抑制了 *P.*

aeruginosa 的 swarming 现象;而 Chatterjee 等^[16]则证明 *Vibrio cholerae* 中的油酸、亚油酸 (C18:2)、花生四烯酸 (C20:4) 能够增加 *flrA* 基因的表达,因为该基因是 *V. cholerae* 运动能力调控通路的第一个基因,从而提高了细菌的运动能力。在我们的研究中,*fabF* 缺失菌株的 UFA:SFA 值由 0.96 降为 0.74, swarming 能力随之消失;*fabF* 回补后 UFA:SFA 升至 1.09, swarming 能力也相应地恢复至野生型水平,这

进一步印证了 Chatterjee 的结果,即细菌不饱和程度的降低可能是导致 swarming 能力下降的原因之一。我们分析之前的研究结果之所以不一致,很可能是因为在 Inoue 通过在培养基中添加外源脂肪酸的方式改变脂肪酸组成,而 Chatterjee 探讨的则是细菌本身脂肪酸组成的变化。在培养基中添加外源脂肪酸的方式可能会很大程度地改变培养基本身的湿润程度和表面张力,改变了细菌生长的外环境,从而从表观上影响了细菌的 swarming 现象。

特别值得注意的是,根据我们的结果,*fabF* 缺失所导致的脂肪酸含量变化中最突出的就是异油酸的变化,在 *fabF* 缺失体中异油酸含量由 33.6% 急剧降至 8.9%, swarming 现象也随之消失;*fabF* 回补后异油酸含量恢复至 20.9%, swarming 现象也得以恢复。根据已有报道, Liaw^[14] 通过在培养基中添加外源油酸,提高了 *P. mirabilis* swarming 运动能力; Chatterjee 等^[16] 检测了 *V. cholerae* 胞内异油酸含量,证明高比例油酸和异油酸可提高 swarming 运动能力。这两个研究分别从内源和外源分析了油酸含量改变的影响,都暗示了油酸含量的提高对细菌运动能力的积极作用,侧面为我们的研究提供了佐证。

异油酸 (C18:1 Δ 11) 是细胞脂肪酸合成的一种脂肪酸,我们的研究中所添加的是较低成本的油酸 (C18:1 Δ 9),两者虽然双键的位置有所不同,但理化性质相差不大,在脂肪酸添加实验的研究中常常用价格低的油酸替代异油酸。

我们的结果表明,异油酸的含量对调控假单胞菌 swarming 能力起到至关重要的作用,脂肪酸不饱和程度也可在一定程度上影响假单胞菌的 swarming 能力。我们推测,*fabF* 缺失导致了细胞异油酸含量的下降和不饱和程度的下降,这种脂肪酸组成的改变可能在一定程度上影响了假单胞菌生物膜的形成,降低了细胞膜的流动性^[17],从而影响了 swarming 的能力;脂肪酸组成的改变也可能通过降低细胞分泌鼠李糖脂 (rhamnolipids) 和细菌表多糖 (exopolysaccharide) 等渗透剂的能力^[7,18],降低了细胞表面的湿度和张力,进而影响 swarming 的能力。

参考文献

[1] Butler MT, Wang QF, Harshey RM. Cell density and mobility protect swarming bacteria against antibiotics. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2010, 107 (8) : 3776-3781.

- [2] Verstraeten N, Braeken K, Debkumari B, Fauvart M, Franssaer J, Vermant J, Michiels J. Living on a surface: swarming and biofilm formation. *Trends in Microbiology*, 2008, 16 (10) : 496-506.
- [3] Zhu YY, Yi Y, Yang X, Lv N, Li J, Zhu BL, Hu YF. Discovery of new structure of class 1 integron in MDR *Pseudomonas aeruginosa* and its association with drug-resistance. *Acta Microbiologica Sinica*, 2013, 53 (9) : 927-932. (in Chinese)
朱玉莹, 易勇, 杨犀, 律娜, 李晶, 朱宝利, 胡永飞. 多重耐药铜绿假单胞菌中 I 型整合子新结构的发现及其与耐药的相关性. *微生物学报*, 2013, 53 (9) : 927-932.
- [4] Wang LL, Zhang CL, Gong FY, Li HT, Xie XH, Xia C, Chen J, Song Y, Shen AX, Song JX. Influence of *Pseudomonas aeruginosa* *pvdQ* gene on altering antibiotic susceptibility under swarming conditions. *Current Microbiology*, 2011, 63 (4) : 377-386.
- [5] Overhage J, Bains M, Brazas MD, Hancock REW. Swarming of *Pseudomonas aeruginosa* is a complex adaptation leading to increased production of virulence factors and antibiotic resistance. *Journal of Bacteriology*, 2008, 190 (8) : 2671-2679.
- [6] Schuster M, Greenberg EP. A network of networks: quorum-sensing gene regulation in *Pseudomonas aeruginosa*. *International Journal of Medical Microbiology*, 2006, 296 (2/3) : 73-81.
- [7] Inoue T, Shingaki R, Fukui K. Inhibition of swarming motility of *Pseudomonas aeruginosa* by branched-chain fatty acids. *FEMS Microbiology Letters*, 2008, 281 (1) : 81-86.
- [8] Kutchma AJ, Hoang TT, Schweizer HP. Characterization of a *Pseudomonas aeruginosa* fatty acid biosynthetic gene cluster: purification of acyl carrier protein (ACP) and malonyl-coenzyme A: ACP transacylase (FabD). *Journal of Bacteriology*, 1999, 181 (17) : 5498-5504.
- [9] Sambrook J, Frisch EF, Maniatis T. Molecular cloning: a laboratory manual. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbour Laboratory Press, 1989.
- [10] 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.
- [11] 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.

- [12] Qu JQ, Liu CH, Liu WF, Tao Y, Zhu K. Construction of *Escherichia coli* gene knock-out mutants for engineering of fatty acid metabolism. *Acta Microbiologica Sinica*, 2013, 53 (6): 608-614. (in Chinese)

曲璟秋, 刘翠花, 刘伟丰, 陶勇, 朱坤. 应用基因敲除快速构建大肠杆菌突变体改造脂肪酸代谢途径. *微生物学报*, 2013, 53 (6): 608-614.

- [13] Arora SK, Neely AN, Blair B, Lory S, Ramphal R. Role of motility and flagellin glycosylation in the pathogenesis of *Pseudomonas aeruginosa* burn wound infections. *Infection and Immunity*, 2005, 73 (7): 4395-4398.
- [14] Liaw SJ, Lai HC, Wang WB. Modulation of swarming and virulence by fatty acids through the RsbA protein in *Proteus mirabilis*. *Infection and Immunity*, 2004, 72 (12): 6836-6845.
- [15] Lai HC, Soo PC, Wei JR, Yi WC, Liaw SJ, Horng YT, Lin SM, Ho SW, Swift S, Williams P. The RssAB two-

component signal transduction system in *Serratia marcescens* regulates swarming motility and cell envelope architecture in response to exogenous saturated fatty acids. *Journal of Bacteriology*, 2005, 187 (10): 3407-3414.

- [16] Chatterjee A, Dutta PK, Chowdhury R. Effect of fatty acids and cholesterol present in bile on expression of virulence factors and motility of *Vibrio cholerae*. *Infection and Immunity*, 2007, 75 (4): 1946-1953.
- [17] Yu FF, Liu XP, Tao Y, Zhu K. High saturated fatty acids proportion in *Escherichia coli* enhances the activity of ice-nucleation protein from *Pantoea ananatis*. *FEMS Microbiology Letters*, 2013, 345 (2): 141-146.
- [18] Zhu K, Rock CO. RhlA converts β -hydroxyacyl-acyl carrier protein intermediates in fatty acid synthesis to the beta-hydroxydecanoyl- β -hydroxydecanoate component of rhamnolipids in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology*, 2008, 190 (9): 3147-3154.

Effect of *cis*-vaccinate acid on swarming ability of *Pseudomonas aeruginosa*

Feifei Yu¹, Xiangyong Yu¹, Haiying Yu², Mingjie Hu², Jingqiu Qu², Kun Zhu^{2*}, Meifang Wang^{1*}

¹Guangdong Ocean University, Zhanjiang 524088, Guangdong Province, China

²Institute of Microbiology Chinese Academy of Science, Beijing 100101, China

Abstract: [Objective] To study the effect of fatty acids composition on swarming mobility in *Pseudomonas aeruginosa*. [Methods] We constructed a *fabF*-knockout mutant of PAO1 (YFF-1) by double exchange principle, overexpressed FabF in YFF-1 mutant to recover the mobility, and compared the swarming ability of wild type, YFF-1 mutant and mutant with plasmid pUCP18*Gm-fabF*. The change of fatty acids composition was analyzed using gas chromatography to explain the difference of swarming ability. [Results] Swarming ability disappeared in YFF-1 mutant and was recovered in YFF-1 with plasmid pUCP18*Gm-fabF*. Gas chromatography analysis revealed that fatty acids composition changed in YFF-1. The *cis*-vaccinate acid (C18:1 Δ 11) content decreased from 33.6% to 8.9%, and the ratio of unsaturated fatty acids to saturated fatty acids (UFA:SFA) was deduced from 0.96 to 0.74. The recovery of *cis*-vaccinate acid content was 20.9% and UFA:SFA 1.09 after expression of *fabF*. [Conclusion] Expression level of FabF played an important role in regulating swarming ability of PAO1. The decrease of *cis*-vaccinate acid content and unsaturation degree of fatty acids, especially the sharp decrease of *cis*-vaccinate acid, may be vital causes of swarming ability disappearance in YFF-1.

Keywords: *Pseudomonas aeruginosa*, *fabF*, swarming, *cis*-vaccinate acid, saturation degree of fatty acid

(本文责编:李磊)

Supported by National Natural Science Foundation of China (31200081)

* Corresponding author. Kun Zhu, Tel/Fax: +86-10-57470235, E-mail: zhuk@im.ac.cn; Meifang Wang, Tel/Fax: +86-759-2396182, E-mail: pearlang@126.com

Received: 20 May 2015/Revised: 18 August 2015