



转录调节因子 σ^{38} 介导铜绿假单胞菌绿脓菌素合成代谢调控

缪静[#], 迟晓艳[#], 王艳华[#], 冯志彬, 薛文文, 黄润, 张颖译, 田铃仟, 张洪倩, 翟俊杰, 葛宜和^{*}

鲁东大学生命科学学院, 山东 烟台 264025

摘要:【目的】为了进一步鉴定铜绿假单胞菌转录调控因子 σ^{38} 对2个拷贝吩嗪合成基因簇(*phzA1-G1*和*phzA2-G2*)的具体调控方式并推定介导绿脓菌素合成代谢的可能调控机制。【方法】根据铜绿假单胞菌基因组信息,利用同源重组原理构建*rpoS*基因缺失突变株 $\Delta rpoS$ 以及克隆全长*rpoS*基因作互补分析;再以单一吩嗪基因簇缺失突变株 $\Delta phz1$ 和 $\Delta phz2$ 为出发菌株,分别构建*rpoS*缺失突变株 $\Delta rpoSphz1$ 和*rpoS*插入突变株 $\Delta rpoSphz2$,测定并比较野生株及相关突变株的绿脓菌素合成量,初步推定 σ^{38} 因子对2个不同吩嗪基因簇表达的调控方式。【结果】在GA培养基中,突变株 $\Delta rpoS$ 的绿脓菌素合成量比野生株显著增加;互补分析证实, σ^{38} 可使突变株 $\Delta rpoS$ 的绿脓菌素降低并接近野生株PAO1水平;与对照株 $\Delta phz1$ 相比,突变株 $\Delta rpoSphz1$ 的绿脓菌素合成量因 σ^{38} 因子缺失而显著减少;而与对照株 $\Delta phz2$ 相比,突变株 $\Delta rpoSphz2$ 的绿脓菌素合成量因 σ^{38} 因子缺失显著增加。【结论】转录调控因子 σ^{38} 对铜绿假单胞菌绿脓菌素的合成代谢的确具有一定的负调控作用;结合已报道的研究结果,初步推定: σ^{38} 因子通过负调控吩嗪基因簇*phz1*,正调控吩嗪基因簇*phz2*的表达实现对绿脓菌素合成代谢的调控。

关键词: 铜绿假单胞菌, σ^{38} 因子, *phz1*, *phz2*, 绿脓菌素, 基因调控

作为院内感染的常见病原菌之一,铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)极易引起免疫功能低下、烧伤或某些植入性手术(气管插管、导尿管)等患者感染^[1]。研究证实,铜绿假单胞菌除了合成并分泌外毒素A外,还分泌包括绿脓菌素(Pyocyanin, PYO)、弹性蛋白酶等其它多种毒力因子^[2]。研究发现,从患者体内分离的铜绿假单胞

菌中至少90%可以合成并分泌绿脓菌素,且在囊胞性纤维症患者(Cystic fibrosis, CF)的痰液中具有较高的浓度,这些结果充分表明绿脓菌素在感染患者的过程中具有很强的致病作用^[3]。

根据基因组序列分析可知,铜绿假单胞菌PAO1拥有2个独立吩嗪合成基因簇*phz1*和*phz2*^[4],虽然它们相距甚远(约2.6 Mb),且它们上

基金项目: 山东省自然科学基金(ZR2011CL003); 山东省高等学校科技计划项目(J14LK53)

*通信作者。Tel: +86-535-6681053; Fax: +86-535-6686958; E-mail: geyihe@ldu.edu.cn

[#]并列第一作者。

收稿日期: 2016-06-15; 修回日期: 2016-08-24; 网络出版日期: 2016-09-18

游启动子区域相差迥异，但是 2 个基因簇都包含紧密排列的 *phzABCDEFG* 共 7 个基因，它们同源性高达 98.3%。研究证实，2 个基因簇都可以各自独立地表达一系列相同的酶并用于合成绿脓菌素的前体：吩嗪-1-羧酸(phenazine-1-carboxylic acid, PCA)。吩嗪-1-羧酸再经 PhzM 和 PhzS 两个酶催化最终可转变为绿脓菌素^[4]。

调节因子 σ^{38} (sigma38)是由 *rpoS* 基因在细菌进入稳定期时编码产生的与 RNA 聚合酶相结合的一种调控因子，又称作 σ^S 或 RpoS。当结合了 σ^{38} 转录因子的 RNA 聚合酶可以启动相关基因的表达。研究显示，在多种环境胁迫因子作用下，细菌通过表达 σ^{38} 因子并启动约 30 多个相关基因的表达从而使细菌适应复杂而多变的环境^[5]。在 *Escherichia coli*、*Salmonella typhimurium* 和 *Shigella flexneri* 等病原菌中， σ^{38} 因子可激活与细菌毒力相关的基因表达^[6]。

Suh 等通过构建铜绿假单胞菌 PAO1 的 *rpoS* 基因插入突变株，证实铜绿假单胞菌的 σ^{38} 因子缺

失后可显著提高绿脓菌素的合成量^[7]。然而，绿脓菌素的合成来自于 2 个吩嗪基因簇 *phz1* 和 *phz2* 合成的前体吩嗪-1-羧酸， σ^{38} 因子是否通过介导 2 个不同基因簇的表达来实现调控绿脓菌素的合成，至今未见详细报道。基于此点，我们分别以野生株 PAO1、吩嗪基因簇 *phz1* 缺失突变株 $\Delta phz1$ 和吩嗪基因簇 *phz2* 缺失突变株 $\Delta phz2$ 为出发菌株，根据同源重组的原理，采用双亲杂交方法构建并鉴定一系列 σ^{38} 因子缺失突变株 $\Delta rpoS$ 、 $\Delta rpoSphz1$ 和 $\Delta rpoSphz2$ 。针对它们绿脓菌素合成量的变化加以比较与分析，初步推定并解析 σ^{38} 因子对 2 个吩嗪合成基因簇可能的调控方式或机制。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒：本研究所使用的菌株、质粒及其来源等信息见表 1。

表 1. 菌株和质粒
Table 1. Strains and plasmids

| Strain and plasmid | Characteristics and description | Source or reference |
|----------------------|--|---------------------|
| Strains | | |
| <i>E. coli</i> | | |
| DH5 α | $\Phi 80 lacZ\Delta M15\Delta(lacZYA-argF)$ U169 <i>hsdR17 recA1endA1 thi-1</i> | [8] |
| SM10 | $F^- thi^-1 thr^-1 leuB6 recA tonA21 lacY1 supE44(Mu_c^+) \lambda^- Km^r$ | [10] |
| <i>P. aeruginosa</i> | | |
| PAO1 | Wild type, <i>phz1</i> and <i>phz2</i> clusters, Sp ^r | Stephen Lory |
| $\Delta phz1$ | <i>phz1</i> locus deleted and inserted with <i>aacC1</i> , Sp ^r Gm ^r | [11] |
| $\Delta phz2$ | <i>phz2</i> locus deleted and inserted with <i>aph</i> , Sp ^r Km ^r | [11] |
| $\Delta phz1phz2$ | <i>phz1</i> and <i>phz2</i> loci deleted and inserted with <i>aacC1</i> and <i>aph</i> , respectively, Gm ^r Km ^r | [11] |
| $\Delta rpoS$ | <i>rpoS</i> deleted and inserted with <i>aacC1</i> in the PAO1 strain, Sp ^r Gm ^r | This study |
| $\Delta rpoSphz1$ | <i>rpoS</i> deleted in the mutant $\Delta phz1$, Sp ^r Gm ^r | This study |
| $\Delta rpoSphz2$ | <i>rpoS</i> deleted and inserted with <i>aacC1</i> in the mutant $\Delta phz2$, Sp ^r Gm ^r Km ^r | This study |
| Plasmids | | |
| pUCm-T | T-vector, Ap ^r | Sangon (Shanghai) |
| pEX18Tc | Suicide plasmid, Tc ^r | [10] |
| pEXS | A 2.0-kb <i>rpoS</i> -flanking PCR fragment cloned in pEX18Tc, Tc ^r | This study |
| pUCGm | Resource of gentamycin resistance cassette (<i>aacC1</i>), Ap ^r Gm ^r | [12] |
| pEXSG | A 0.8-kb <i>aacC1</i> cassette cloned into pEXS, Tc ^r Gm ^r | This study |
| pME6010 | Low copy vector in <i>Pseudomonas</i> sp., Tc ^r | [13] |
| pME10S | A 1761-bp fragment containing the whole <i>rpoS</i> gene cloned into pME6010, Tc ^r | This study |

1.1.2 培养基和培养条件：大肠杆菌(*E. coli*)通常在 37 °C 条件下培养于 Luria-Bertani (LB)培养基中；铜绿假单胞菌(*P. aeruginosa*)通常在 37 °C 条件下培养于 LB 或甘油-丙氨酸补充培养基(GA)培养基中^[8-9]。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(μg/mL)：氨苄青霉素(Ap) 100、盐酸四环素(Tc) 25、硫酸庆大霉素(Gm) 20、硫酸卡那霉素(Km) 50；铜绿假单胞菌培养基中需要添加的抗生素用量(μg/mL)为：盐酸壮观霉素(Sp) 100、Tc 125、Gm 40 和 Km 300。细菌振荡培养时，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。

1.1.3 主要酶与试剂：本研究中 DNA 重组所使用的多种限制性内切酶、T4 DNA 连接酶、DNA 分子量标准物(DNA marker)皆为 Fermentas (MBI)公司产品并购于生工生物工程上海股份有限公司；*rTaq* DNA 聚合酶、dNTPs 购于 TaKaRa 宝生物(大连)工程有限公司；Phusion High-Fidelity DNA polymerase 购自 Thermo Fisher Scientific 公司(Waltham, MA, USA)。在实验过程中，PCR 扩

增所使用的引物名称、序列及人工添加的酶切位点等信息参见表 2 ,并委托生工生物工程上海股份有限公司合成。细菌基因组 DNA 提取、PCR 产物纯化与回收、DNA 胶回收等试剂盒均来自生工生物工程上海股份有限公司；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)及多种抗生素也购自生工生物工程上海有限公司。绿脓菌素的标准品购自 Cayman Chemical 公司(Ann Arbor, MI, USA)。此外，三氯甲烷、丙氨酸和甘油等其它生化试剂级别均为分析纯(或色谱纯)。

1.2 *rpoS* 相邻片段的克隆与载体构建

为构建 *rpoS* 基因缺失突变株，依据铜绿假单胞菌 PAO1 基因组序列信息在该基因的上、下游分别设计 3 对引物 S-1F/S-1R、S-2F/S-2R 和 S-3F/S-3R 以铜绿假单胞菌 PAO1 的基因组 DNA 为模板分别采用 S-1F/S-1R 和 S-2F/S-2R 两对引物进行 PCR，分别获得 *rpoS* 基因的上、下游 2 个片段 *rpoS*-Up 和 *rpoS*-Down。PCR 采用 Phusion High-Fidelity DNA Polymerase，反应程序及条件参数为：预变性，

表 2. 引物

Table 2. The primers employed in this study

| Primers | Sequences (5'-3') and artificial restriction enzyme sites (underlined and in italics) |
|---------|---|
| S-1F | GTGCACCTGAACGCGACCGAGC |
| S-1R | CTATTA <u><i>CTAGA</i></u> AGAATGGCCTGTCGAGTGACG (<i>Xba</i> I) |
| S-2F | GAATTA <u><i>CTAGAG</i></u> TGCCATGTCGTTATCCCTTGC (<i>Xba</i> I) |
| S-2R | CTCAACGCCCCGATCGCCTGAG |
| S-3F | GAATTAG <u><i>GAGCTC</i></u> AAAGCGCCTGGAAACCACCAGC (<i>Sac</i> I) |
| S-3R | CTAATA <u><i>CTGCAG</i></u> ATGGATAAGGGGAAGGATTGAG (<i>Pst</i> I) |
| g-1F | GCAGCAACGATGTTACGCAG |
| g-1R | TGTTAGGTGGCGGTACTTGG |
| g-LF | GTCACAACGCCGCGCCAATTC |
| g-LR | CAGGCTTATGTCAATTCGAGCTC |
| S-CF | CGATTCCCAGTGCTCCCGCAACCTG |
| S-CR | GACCAAGCCTACCCCGGTTCCACCC |

98 °C 20 s, 1 个循环;变性:98 °C 6 s,退火:64 °C 20 s,延伸反应:72 °C 30 s,33–35 个循环;72 °C 再延伸 7 min,1 个循环。为了直接克隆 PCR 产物,在后延伸阶段中补加一定量的 *rTaq* DNA 聚合酶,使 PCR 产物的 3'-末端添加 A。然后经 0.8%–1.0% 琼脂糖电泳检测、纯化与回收,克隆于 T-载体 (pUCm-T)后,交由生工生物工程上海股份有限公司进行测序。

铜绿假单胞菌基因组 DNA 提取、大肠杆菌的质粒小量抽提、限制性内切酶消化、酶切 DNA 片段回收与纯化、连接反应、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^[8]。*rpoS*-Up 和 *rpoS*-Down 两 PCR 片段预期大小分别为 1196 和 1072 bp,PCR 结果经测序鉴定后,将上、下游 PCR 片段混合,经纯化、*Xba* I 酶切、纯化、连接、再纯化等步骤处理后产物作 PCR 模板,并以 S-3F/S-3R 作引物,利用 Phusion *Taq* 酶进行 PCR 扩增。将扩增获得的长度约 2.0 kb 的 PCR 产物经纯化后,再经 *Sac* I-*Pst* I 双酶切,克隆于质粒 pEX18Tc 相应位点中^[10],所获得质粒命名为 pEXS。然后,用 *Xba* I 酶切克隆载体 pUCGm,获得约 878 bp 的抗庆大霉素基因片段 (*aacC1*)^[12]。该片段经胶回收后,克隆于 pEXS 载体上的 *rpoS* 基因相邻片段的中间 *Xba* I 位点中,所得质粒命名为 pEXSG。

1.3 *rpoS* 基因插入突变株 $\Delta rpoS$ 的构建

用化学转化法(CaCl_2 法)将 pEXS、pEXSG 分别转化 *E. coli* SM10 λ pir,方法见文献[8]。

以 *E. coli* SM10/pEXSG 为供体菌,铜绿假单胞菌 PAO1 野生株为受体菌进行双亲杂交。杂交后,混合菌涂布于 Tc125/Gm40 的双抗 LB 平板,挑取该平板上的单克隆于含 Gm40 的 LB 液体培养基中作传代培养,每隔 12 h 传代 1 次,传代 3 d

后作梯度稀释并涂布于含 10%蔗糖/Gm40 的 LB 平板上,将所得单菌落同时分别接种于单抗 Tc125 和单抗 Gm40 (对照)的 LB 平板上。筛选 Tc 平板敏感而 Gm 平板生长的相应克隆,即铜绿假单胞菌 PAO1 的 *rpoS* 基因缺失突变株 $\Delta rpoS$ 。

1.4 突变株 $\Delta rpoSphz1$ 和 $\Delta rpoSphz2$ 的构建

为了明确 σ^{38} 因子是否对单个吩嗪基因簇的功能具有调控作用,我们分别利用实验室已构建的吩嗪基因簇缺失突变株 $\Delta phz1$ 和 $\Delta phz2$ 为受体菌构建突变株 $\Delta rpoSphz1$ 和 $\Delta rpoSphz2$ ^[11]。其中以 *E. coli* SM10/pEXS 为供体菌和突变株 $\Delta phz1$ 为受体菌进行双亲杂交,获得缺失突变株 $\Delta rpoSphz1$ (*rpoS* 无抗性标记缺失突变)。步骤与筛选突变株 $\Delta phz1$ 稍有区别,具体如下:双亲杂交后涂布 Sp100/Tc125 获得单交换菌株,传代 LB 培养基只添加 Sp100 (不添加 Tc125),传代后稀释涂布于含 10%蔗糖/Sp100 的 LB 平板进一步筛选突变株(双交换),由于没有抗性标记基因的插入,筛选平板上获得的 Tc 敏感的克隆也有可能是回复突变株,因此通过 PCR 剔除回复突变株是必要的步骤。而以 *E. coli* SM10/pEXSG 为供体菌和突变株 $\Delta phz2$ 为受体菌进行双亲杂交,获得突变株 $\Delta rpoSphz2$ (*rpoS* 抗庆大霉素标记缺失突变),其步骤与筛选突变株 $\Delta rpoS$ 完全相同。

1.5 *rpoS* 基因互补表达载体的构建和转化

为了构建 *rpoS* 基因的互补表达载体,以 PAO1 基因组 DNA 为模板,利用引物 S-CF/S-CR 进行 PCR 获得约 1840 bp 包含 *rpoS* 基因自身启动子的片段。PCR 片段通过 *Hind* III-*Acc*65 I 双酶切,经纯化获得的约 1761 bp 片段克隆于低拷贝穿梭质粒 pME6010 相应位点中^[13],所获质粒命名为 pME10S。经测序验证后,分别将 pME6010 和

pME10S 通过化学转化法转化野生株 PAO1 和突变株 $\Delta rpoS$ 后, 进行互补分析。

1.6 发酵培养和生长曲线的测定

将野生株 PAO1 和突变株 $\Delta rpoS$ 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 绿脓菌素的测定

绿脓菌素的定量测定方法参照文献[14]进行。其基本步骤如下: 取不同发酵时间点的细菌发酵液 4 mL, 加入 2.4 mL 三氯甲烷振荡抽提 2 min, 10000×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, 10000×g 条件下, 离心 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。

1.8 数据分析

同一实验一般重复 3 次, 每个实验组和对照组一般设 3 个重复, 每隔 12 h 取样分析。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。同时针对每个时间节点实验组和对照组的 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 结果和分析

2.1 σ^{38} 因子缺失突变株的构建和鉴定

为了验证 σ^{38} 因子缺失是否影响绿脓菌素的合成代谢, 我们首先以铜绿假单胞菌 PAO1 为受体

菌(图 1-A), 构建 $rpoS$ 基因的带庆大霉素抗性标记的缺失突变株(图 1-B)。在构建过程中, 首先利用蔗糖(反选)和抗生素抗性(正选)双重筛选初步获得突变株($\Delta rpoS$)。为了进一步鉴定是否真正获得了 $rpoS$ 基因缺失突变株(双交换突变株), 我们分别提取野生株 PAO1、突变株 $\Delta rpoS$ 和阳性对照株 $\Delta phz1$ 的基因组 DNA 为模板, 采用来自 TaKaRa 公司的 $rTaq$ DNA 聚合酶或 LA Taq DNA 聚合酶进行 PCR 鉴定(图 1-C)。若采用 g-1F/g-1R、S-1F/g-LR 和 g-LF/S-2R 3 对引物分别进行 PCR 扩增, 以突变株 $\Delta rpoS$ 基因组 DNA 为模板扩增的条带预期大小分别为 546 bp、1.2 kb 和 1.2 kb。据图 1-C 所示, 实际 PCR 扩增的条带大小皆与预期相符, 表明不仅抗庆大霉素基因盒($aacCI$)插入到突变株的基因组中, 而且该基因盒的确定点插入到了 $rpoS$ 缺失的位点中, 证实我们确已获得 σ^{38} 因子缺失突变株 $\Delta rpoS$ 。

突变株 $\Delta rpoSphz1$ 和 $\Delta rpoSphz2$ 中的 $rpoS$ 基因敲除同样由 PCR 鉴定(结果未显示)。

2.2 σ^{38} 因子缺失对绿脓菌素合成代谢的影响

为了确定 σ^{38} 因子缺失是否对细菌生长产生一定的影响, 我们比较了突变株 $\Delta rpoS$ 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})并绘制生长曲线。据图 2 所示, 突变株 $\Delta rpoS$ 与野生株 PAO1 在 LB 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。但在 GA 培养基中, σ^{38} 因子敲除对铜绿假单胞菌的生长尤其在后期, 菌体的密度稍有降低, 该结果表明, 在碳源和氮源较为单一的培养基中, σ^{38} 因子缺失后, 细菌的生长对营养因子的变化较为敏感, 该结果也与以往研究结果相一致^[7]。

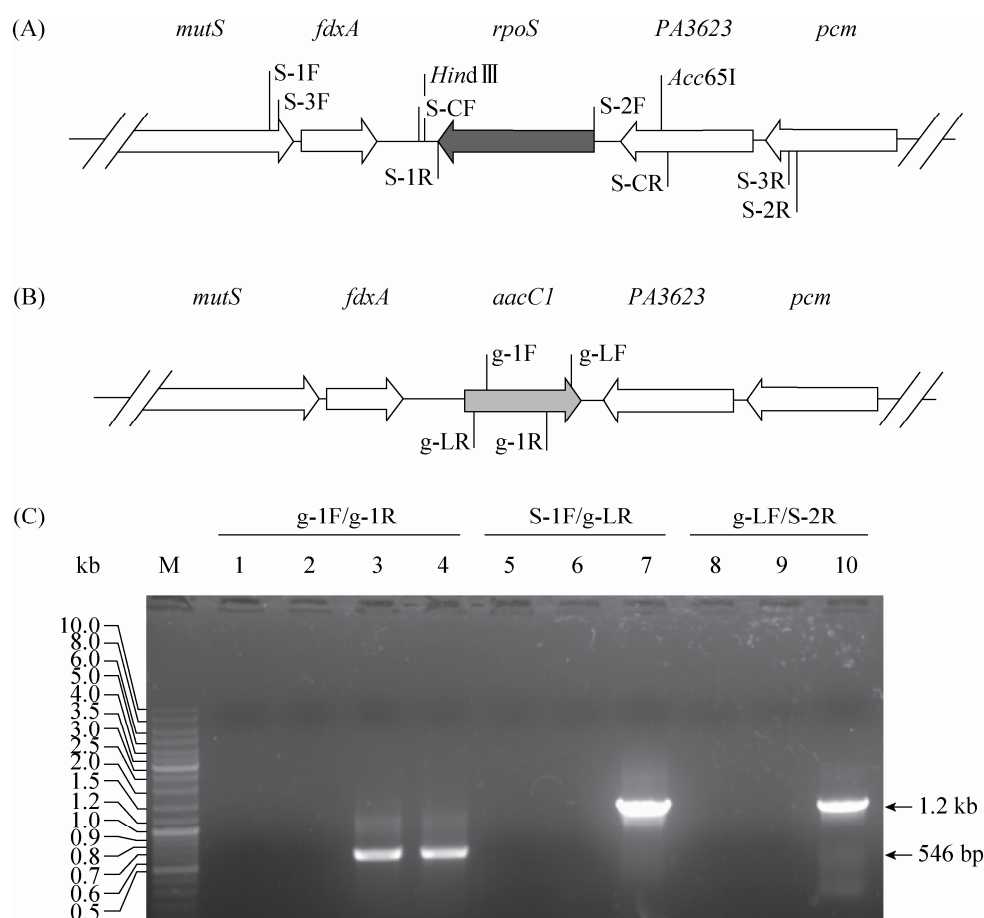


图 1. *rpoS* 基因缺失突变株的构建与鉴定

Figure 1. Generation and identification of *rpoS* deletion mutant. A: genomic organization of the chromosomal region of *P. aeruginosa* PAO1 surrounding the *rpoS*. The one dark grey arrow presents the *rpoS*, the opened arrows denote the upstream ORFs of PA3623, *pcm* and the downstream ORFs of *fdxA*, and *mutS*. The binding sites of some primers used with construction of *rpoS*-deletion mutants and restriction enzymes sites used with creation of complementary vector are shown also. B: diagram of the deleted *rpoS* locus, indicating the *rpoS* is replaced with a gentamycin cassette. The light grey arrow represents the *aacC1* cassette. The primers used in identification of mutation are also indicated. C: PCR verification of the *rpoS* deletion mutant. PCRs were performed with different primers shown at the top of lanes, using the genomic DNA of the mutant $\Delta rpoS$ as template shown in lane 4, 7 and 10; the genomic DNA of the wild-type PAO1 as template shown in lane 2, 6 and 9, double-distillation H_2O as template (negative control) shown in lane 1, 5 and 8; and the genomic DNA of the mutant $\Delta phz1$ as template (positive control) shown in lane 3. M labeled in first lane means DNA standard marker (Fermentas No. SM0331).

为了进一步验证 σ^{38} 因子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 $\Delta rpoS$ 和野生株 PAO1 分别同时接种于 GA 培养基中进行发酵培养, 并以吩嗪基因簇双缺失突变株 $\Delta phz1 phz2$ 为阴性对照。定时取样并分析绿脓菌素合成量, 并根据结果绘制产物合成

曲线。

据图 3 所示, 与野生株 PAO1 相比, 在发酵 24 h 后突变株 $\Delta rpoS$ 合成的绿脓菌素明显增加, 其合成量比野生株 PAO1 的绿脓菌素多近 1 倍 ($P < 0.01$)。此结果表明, σ^{38} 因子的缺失在一定程度上促进了绿脓菌素的合成。

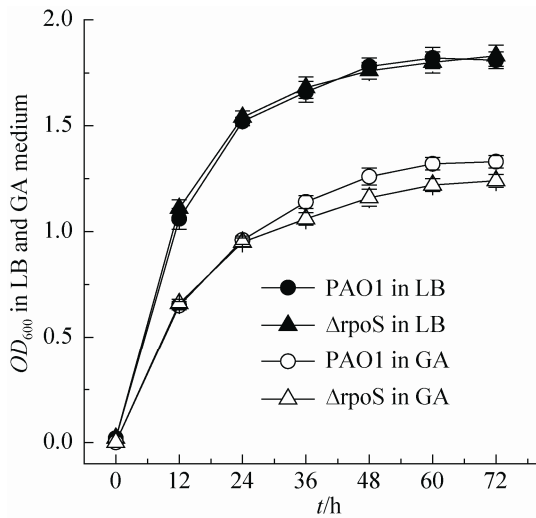


图 2. 铜绿假单胞菌 PAO1 和突变株 ΔrpoS 在不同培养基中的生长曲线

Figure 2. Growth curves of the wild-type strain PAO1 and the mutant ΔrpoS in LB and GA medium. All experiments were carried out in triplicate, and each value is presented as the average±standard deviation.

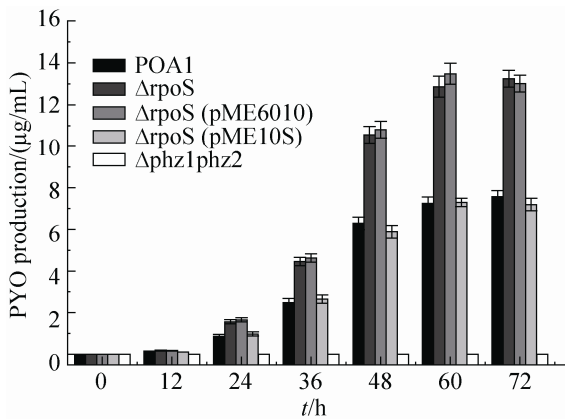


图 3. 铜绿假单胞菌野生株 PAO1、突变株 ΔrpoS 及相关互补株在 GA 培养基中绿脓菌素合成量

Figure 3. Pyocyanin production of the wild-type strain PAO1 (black), the *rpoS*-deleted mutant ΔrpoS (dark grey), the mutant ΔrpoS bearing pME6010 (grey), and the mutant ΔrpoS harboring pME60S (light grey) in GA medium. The PYO-deficient mutant Δphz1phz2 (white) was used as a negative control. All experiments were carried out in triplicate, and each value is presented as the average±standard deviation.

2.3 *rpoS* 基因的互补分析

为了进一步证实突变株 ΔrpoS 绿脓菌素的合成量的变化确由 σ^{38} 因子缺失引起, 我们构建了 *rpoS* 基因的互补表达载体 pME10S, 并同时用 pME6010 做阴性对照转化突变株 ΔrpoS。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, 并定时测定绿脓菌素的合成量。发酵培养结果如图 3 所示, 当突变株 ΔrpoS 重新引入 *rpoS* 基因以后, 其绿脓菌素的合成量显著降低, 并与野生株绿脓菌素的合成量相差无几 ($P>0.05$)。当 pME6010 引入突变株, 并未带来突变株绿脓菌素合成代谢上的显著变化 ($P>0.05$)。据此互补分析的结果可以确定, 在铜绿假单胞菌中 σ^{38} 因子的确对绿脓菌素合成具有抑制作用(负调控)。

2.4 σ^{38} 因子缺失对 *phz2* 介导的绿脓菌素合成的影响

鉴于铜绿假单胞菌具有 2 个拷贝的吩嗪合成基因簇, 且它们都参与了吩嗪及其衍生物的合成, 为了进一步推定 *rpoS* 是否对 *phz1* 和 *phz2* 两个基因簇的表达有一定的调控作用, 以已构建的吩嗪基因簇缺失突变株 Δphz1 和 Δphz2 为出发菌(受体菌), 再次构建 σ^{38} 因子缺失突变, 产生新的突变株 ΔrpoSphz1 和 ΔrpoSphz2。

为了推定 σ^{38} 因子缺失是否影响了吩嗪基因簇 *phz2* 介导的绿脓菌素的合成, 我们将突变株 ΔrpoSphz1 接种于 GA 培养基进行发酵培养, 同时以突变株 Δphz1、Δphz1phz2 为对照株。定时取样, 测定绿脓菌素的合成量。

据图 4-A 所示, 与对照株 Δphz1 相比, 突变株 ΔrpoSphz1 绿脓菌素的合成量显著减少 ($P<0.01$)。由于突变株 Δphz1 中绿脓菌素的合成仅

由吩嗪基因簇 *phz2* 单独介导并参与, 因此我们推定 σ^{38} 因子缺失可能通过抑制了 *phz2* 的表达来实现降低绿脓菌素的合成。

2.5 σ^{38} 因子缺失对 *phz1* 介导的绿脓菌素合成的影响

假设 σ^{38} 因子缺失致使吩嗪基因簇 *phz2* 表达受抑制这一推定成立, 绿脓菌素合成量减少; 但事实是 σ^{38} 因子缺失却引起了突变株 $\Delta rpoS$ 绿脓菌素合成量的明显增加, 因此我们推测, 只有 σ^{38} 因子缺失促进了由吩嗪基因簇 *phz1* 介导并参与的绿脓菌素的合成, 才能实现突变株 $\Delta rpoS$ 中绿脓菌素合成增加的这一事实。为了证实这一推定, 我们将突变株 $\Delta rpoSphz2$ 接种于 GA 培养基进行发酵培养, 同时以 $\Delta phz2$ 和 $\Delta phz1phz2$ 为对照。定时取样, 测定毒力因子绿脓菌素的合成量。

据图 4-B 所示, 在发酵 12 h 之前, 实验株 $\Delta rpoSphz2$ 与对照株 $\Delta phz2$ 、 $\Delta phz1phz2$ 相比, 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 $\Delta rpoSphz2$ 的绿脓菌素比对照株

$\Delta phz2$ 显著增加 ($P < 0.01$)。互补实验分析显示, 当 pME10S 转化实验株 $\Delta rpoSphz2$ 后, 其绿脓菌素的合成显著降低, 且与对照株 $\Delta phz2$ 水平相当, 该结果进一步确认了 σ^{38} 因子敲除的确促进了实验株 $\Delta rpoSphz2$ 的绿脓菌素合成 (结果未显示)。由于 $\Delta phz2$ 中吩嗪基因簇 *phz2* 的敲除, 只有吩嗪基因簇 *phz1* 介导并参与绿脓菌素的合成, 实验株 $\Delta rpoSphz2$ 中绿脓菌素合成量增加表明 σ^{38} 因子很可能负调控了 *phz1* 的表达, 这一结果与我们的推断相符。

此前, 本课题组周金凤等通过构建 *phz1'-lacZ* 和 *phz2'-lacZ* 翻译融合表达载体的系列实验已证实 *rpoS* 基因插入突变引起了吩嗪基因簇 *phz1* 表达的增强, *phz2* 的表达降低^[15]。鉴于吩嗪基因簇表达是铜绿假单胞菌合成绿脓菌素等吩嗪类毒力因子的关键性第一步, 结合这一已有研究结果, 我们初步推定: 转录调节因子 σ^{38} 对铜绿假单胞菌毒力因子绿脓菌素的生物合成具有负调控作用; 同时, 对绿脓菌素合成代谢的调控可能通过负调控吩嗪基因簇 *phz1*、正调控吩嗪基因簇 *phz2* 的表达来实现。

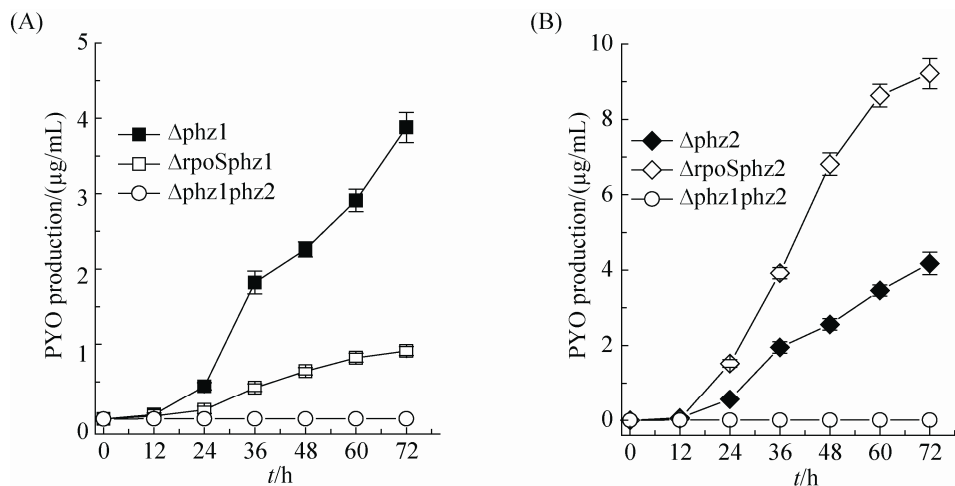


图 4. *rpoS* 基因敲除对铜绿假单胞菌不同吩嗪基因簇表达的影响

Figure 4. Pyocyanin (PYO) production in the mutant $\Delta phz1$ and $\Delta rpoSphz1$ (A) and in the mutant $\Delta phz2$ and $\Delta rpoSphz2$ (B) after inoculation in GA medium for 72 h. The PYO-deficient mutant $\Delta phz1phz2$ was employed as a negative control. Each value is expressed as mean \pm standard deviation of three independent experiments.

3 讨论

作为最常见的病原细菌之一,铜绿假单胞菌分泌 3 类主要毒力因子:外毒素 A、绿脓菌素和弹性蛋白酶^[7]。此前已有研究报道, σ^{38} 因子(σ^S 或 RpoS)的缺失突变可以促进绿脓菌素的合成,但绿脓菌素合成量增加的这一事实与 2 个吩嗪合成基因簇的表达水平是否直接相关却未见详细报道。为了解决该问题,本研究首先采用抗庆大霉素基因插入失活的策略构建了 σ^{38} 因子缺失突变株 $\Delta rpoS$ 。通过发酵培养证实,缺失突变株 $\Delta rpoS$ 的绿脓菌素合成量与野生株相比明显增加,表明 σ^{38} 因子可以负调控绿脓菌素的合成,且这一结果与已有的报道相符。为了进一步确认 σ^{38} 因子针对 2 个吩嗪合成基因簇的具体调控方式是否与绿脓菌素合成调控直接相关,我们相继又构建了突变株 $\Delta rpoSphz1$ 和 $\Delta rpoSphz2$ 。发酵结果显示,当 σ^{38} 因子缺失时,由吩嗪基因簇 *phz1* 介导合成的绿脓菌素显著增加;而当 *rpoS* 基因敲除时,由吩嗪基因簇 *phz2* 介导合成的绿脓菌素显著降低。结合已报道的研究结果,我们初步推定:绿脓菌素合成代谢的调控可能通过 σ^{38} 因子负调控吩嗪基因簇 *phz1*、正调控吩嗪基因簇 *phz2* 的表达来实现。鉴于绿脓菌素必定不是吩嗪基因簇 *phz* 的直接表达产物,而是吩嗪-1-羧酸通过 PhzM 和 PhzS 2 个酶作用并转化而来,因此, σ^{38} 因子的缺失是否影响了 *phzM* 和 *phzS* 基因的表达仍需另外实验证实。

目前已有研究证实,铜绿假单胞菌 PAO1 2 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^[16-17];在 *phz2* 操纵子的上游却存在另

一个调控基因 *qscR*^[18]。这些结构上的差异无疑为差别性调控 2 个吩嗪基因簇的表达奠定了物质基础,为细菌在不同的环境因子或其它条件下诱导毒力因子的合成提供了差别基础。这显然对于维持病原细菌的毒力或感染能力是有利的。

现如今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* 介导的群体感应系统和 *qscR* 等调控系统,这些都显示了铜绿假单胞菌毒力因子合成代谢的复杂性。而 σ^{38} 因子(RpoS)研究最多的是其作为许多调控通路的下游元件去调控一系列相关基因的表达^[5]。可诱导或调控 σ^{38} 因子表达的包括 Vfr、PsrA、the *las* system、the *rhl* system、GacA/RsmA、RelA、ppGpp 等系统^[5-6]。但对 σ^{38} 因子如何介导特定基因的表达,知之甚少。在针对铜绿假单胞菌 2 个吩嗪基因簇的调控方式的研究中,我们已报道了 Pip(TetR family)对吩嗪基因簇 *phz1* 无明显的调控作用,却正调控吩嗪基因簇 *phz2* 的表达^[19]。同时我们也发现 RsmA 也以 σ^{38} 因子相似的方式介导 2 个吩嗪基因簇的表达(结果未发表)。因此,作为一种转录调控因子, σ^{38} 因子如何具体差别性调控吩嗪基因簇 *phz1* 和 *phz2* 的表达,以及它与 Pip 和 RsmA 等调控因子在绿脓菌素合成代谢的调控通路上有什么关系等,目前仍是个谜。显然,针对这些问题有待进一步深入研究。

致谢

感谢鲁东大学生命科学学院统计学教研室的柏新富教授对实验设计与数据分析的指导。感谢鲁东大学生命科学学院 2014 级生物工程专业的杨亭亭和 2014 级生物科学专业的王笑同学参与绿脓菌素的发酵测定实验。

参考文献

- [1] 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.
- [2] 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.
- [3] Hunter RC, Klepac-Ceraj V, Lorenzi MM, Grotzinger H, Martin TR, Newman DK. Phenazine content in the cystic fibrosis respiratory tract negatively correlates with lung function and microbial complexity. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 2012, 47(6): 738–745.
- [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] Potvin E, Sanschagrin F, Levesque RC. Sigma factors in *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiology Review*, 2008, 32(1): 38–55.
- [6] Dong T, Schellhorn HE. Role of RpoS in virulence of pathogens. *Infection and Immunity*, 2010, 78(3): 887–897.
- [7] 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(13): 3890–3897.
- [8] Sambrook J, Frisch EF, Maniatis T. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- [9] 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.
- [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] Cui QN, Lv HN, Qi ZZ, Jiang B, Xiao B, Liu LD, Ge YH, Hu XM. Cross-regulation between the *phz1* and *phz2* operons maintain a balanced level of phenazine biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *PLoS One*, 2016, 11(1): e0144447.
- [12] Schweizer HD. Small broad-host-range gentamycin resistance gene cassettes for site-specific insertion and deletion mutagenesis. *BioTechniques*, 1993, 15(5): 831–834.
- [13] 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.
- [14] Liang HH, Li LL, Dong ZL, Surette MG, Duan KM. The YebC family protein PA0964 negatively regulates the *Pseudomonas aeruginosa* quinolone signal system and pyocyanin production. *Journal of Bacteriology*, 2008, 190(18): 6217–6227.
- [15] Zhou JF, Ge YH, Liu T, Cheng XH, Wang L, Gao XX. Effect of *rpoS* mutation on two gene clusters of phenazine in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Acta Microbiologica Sinica*, 2010, 50(3): 411–417. (in Chinese)
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*, 2010, 50(3): 411–417.
- [16] 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.
- [17] 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.
- [18] Lee JH, Lequette Y, Greenberg EP. Activity of purified QscR, a *Pseudomonas aeruginosa* orphan quorum-sensing transcription factor. *Molecular Microbiology*, 2006, 59(2): 602–609.
- [19] Zhang Y, Cui QN, Zhao Z, Ming YF, Chi XY, Feng ZB, Cheng SW, Xie WH, Ge YH. Positive regulation in expression of the phenazine-producing operon *phz2* mediated by Pip in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Acta Microbiologica Sinica*, 2013, 53(2): 127–135. (in Chinese)
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. Pip 介导铜绿假单胞菌吩嗪基因簇 *phz2* 的表达. *微生物学报*, 2013, 53(2): 127–135.

Regulation of pyocyanin biosynthesis by transcriptional factor sigma³⁸ in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1

Jing Miao[#], Xiaoyan Chi[#], Yanhua Wang[#], Zhibin Feng, Wenwen Xue, Run Huang, Haoyi Zhang, Lingqian Tian, Hongqian Zhang, Junjie Zhai, Yihe Ge^{*}

School of Biological Sciences, Ludong University, Yantai 264025, Shandong Province, China

Abstract: Pyocyanin, an important virulence factor, is synthesized and secreted by *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 and plays a critical role in pathogen-host interaction during infection. Sigma³⁸ (σ^{38} , σ^S) is a central regulator for many virulence production in pathogens. **[Objective]** Our aim is to identify expression and regulation of two phenazine-producing operons mediated by the sigma³⁸ factor in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. **[Methods]** We first cloned the flanking fragments of *rpoS* from the chromosomal DNA of *P. aeruginosa* PAO1 and constructed the deletion mutant $\Delta rpoS$ with the insertion of gentamycin resistance cassette (*aacC1*). Complementation of *rpoS* was then carried out after construction and introduction of pME10S (containing the whole *rpoS* region). Finally, we created the mutant $\Delta rpoSphz1$ and $\Delta rpoSphz2$, and measured pyocyanin production by these mutants in GA medium, using the parental strain $\Delta phz1$ and $\Delta phz2$ as controls. **[Results]** In GA medium, pyocyanin production by mutant $\Delta rpoS$ increased dramatically in comparison with the wild-type strain PAO1. Production of pyocyanin, however, was decreased to the level of the wild-type strain with complementation of the derivative $\Delta rpoS$ harboring pME10S. Mutant $\Delta rpoSphz2$ produced much more pyocyanin than mutant $\Delta phz2$. Mutant $\Delta rpoSphz1$, however, produced much less pyocyanin than mutant $\Delta phz1$. **[Conclusion]** By positively regulating the expression of *phz2* and negatively regulating the *phz1*, sigma³⁸ factor exerts negative modulation on pyocyanin biosynthesis in *P. aeruginosa* PAO1.

Keywords: *Pseudomonas aeruginosa*, sigma³⁸, *phz1*, *phz2*, pyocyanin, regulation

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the Natural Science Foundation in Shandong Province (ZR2011CL003) and by the Project of Shandong Province Higher Educational Science and Technology Program (J14LK53)

*Corresponding author. Tel: +86-535-6681053; Fax: +86-535-6686958; E-mail: geyihe@ldu.edu.cn

[#]These authors contributed equally to this paper.

Received: 15 June 2016; Revised: 24 August 2016; Published online: 18 September 2016