



铜绿假单胞菌 *cntRLMN* 操纵子介导锌离子摄取的功能鉴定

林金水^{1,2*}, 牛艳婷¹, 王帅涛¹, 王贵锋¹, 田野¹, 张恒¹, 朱旭飞¹,
司青坡¹, 成娟丽¹, 艾亚楠¹, 赵文静¹, 张向前²

¹延安大学生命科学学院, 陕西 延安 716000

²陕西省红枣重点实验室(延安大学), 陕西 延安 716000

摘要: 【目的】本研究以铜绿假单胞菌PAO1 (*Pseudomonas aeruginosa* PAO1, 菌种编号ATCC15692)为对象, 研究*cntRLMN*在锌离子摄取中的功能。【方法】在 $\Delta znuBC$ 的基础上, 以同源重组的方法构建了*cntRLMN*的各种突变菌株, 通过质粒接合转移的方法构建其互补菌株及*lacZ*转录融合报告菌株, 运用 β -半乳糖苷酶酶活检测研究了Zur蛋白对*cntRLMN*的转录调控, 凝胶阻滞实验(EMSA)检验Zur蛋白与*cnt*启动子及*cnt*启动子的突变片段的体外结合, 并进一步通过生长曲线分析对*cntRLMN*中*cntR*、*cntL*、*cntN*等基因的锌离子摄取功能进行了分析和鉴定。最终, 通过构建大蜡螟幼虫的侵染模型来研究*cntRLMN*对铜绿假单胞菌毒力发挥的影响。【结果】*lacZ*转录融合的酶活分析显示*cntRLMN*受Zur蛋白的负调控, 其表达以Zur蛋白依赖的方式受锌离子饥饿的诱导; EMSA实验的结果显示*cntRLMN*的启动子可以与His-Zur结合形成DNA-蛋白质复合物, 结合位点为GCGTTATAGTATATCAT; 生长曲线和大蜡螟幼虫侵染实验的分析结果显示ZnuBC和CntRLMN的功能存在互补性, 仅znuBC和cntRLMN双缺失突变时菌株在限锌培养条件下的生长和对大蜡螟幼虫的毒性才受到显著抑制, 说明CntRLMN代表另一种独立的锌离子摄取系统。【结论】*cntRLMN*是受Zur直接负调控的另一种独立的铜绿假单胞菌锌离子摄取系统, 对铜绿假单胞菌毒力的发挥起重要作用。

关键词: 铜绿假单胞菌, 锌摄取, *cntRLMN*, 锌离子摄取调控蛋白 Zur, 凝胶阻滞实验

基金项目: 国家自然科学基金(31700031, 31860012); 陕西省自然科学基金基础研究计划(2018JQ3004); 陕西省教育厅重点实验室科研计划(17JS138); 陕西省社发一般项目(2018SF-165); 陕西省普通高等学校青年杰出人才支持计划; 延安大学博士科研启动项目(YDBK2016-01, YDBK2016-11); 国家级大学生创新创业训练项目(201813008, 201813019); 陕西省大学生创新创业训练项目(S201910719043, S201910719081)

*通信作者。Tel: +86-911-2332030; E-mail: linjinshui@yau.edu.cn

收稿日期: 2019-07-20; 修回日期: 2019-10-29; 网络出版日期: 2020-03-10

锌是生物体内含量第二丰富的过渡金属元素。在很多原核生物体内, 大约 6% 的蛋白质可以结合锌离子, 锌离子在这些蛋白质的结构和催化功能方面有很重要的作用^[1], 同时它也在病原细菌的致病和抗生素耐药方面起重要作用^[2]。目前新型抗菌药物开发包括干扰或抑制细胞的锌离子摄取^[3]。临床上由细菌感染而引起如菌血症、泌尿系统感染、呼吸系统感染、烧伤感染等多种疾病, 往往是由铜绿假单胞菌作为主要感染的致病菌株^[4-5], 同时由于存在严重抗生素耐药性, 它在 2017 年世界卫生组织发布的首份急需新型抗生素的重点病原体清单中位列首位^[2]。人体内因为游离的锌被转运或储藏起来, 或与钙网蛋白等螯合在一起, 成为缺乏锌的环境, 这样形成人体先天的免疫防御系统, 铜绿假单胞菌等病原微生物必须从人体中获得锌来满足其生长和感染^[2,6-7]。

高亲和力锌离子摄取系统 ZnuABC 在许多细菌应对锌饥饿中起主要作用^[8]。ZnuABC 系统在肠道沙门氏菌、鼠伤寒杆菌等细菌中是唯一的锌离子高亲和性的摄取系统, 突变 ZnuABC 系统的基因将使致病菌几乎不能感染任何宿主。与这些细菌一样, 铜绿假单胞菌也拥有一个属 ATP 结合盒 (ATP-binding cassette, ABC) 蛋白家族的锌离子高亲和性的 ZnuABC 摄取系统。其中 ZnuA 是一个周质空间锌结合蛋白, ZnuB 是一个内膜透性酶, ZnuC 是一个 ATP 酶。ZnuA 负责投递锌离子给内膜上的 ZnuBC 转运蛋白复合体。在脑膜炎奈瑟氏菌中, ZnuD 与 ZnuABC 偶联, 负责胞外锌离子穿过外膜进入到周质空间。铜绿假单胞菌基因组中 PA0781 蛋白与脑膜炎奈瑟氏菌 ZnuD 达 27% 相似性^[9]。原核生物的锌摄取受锌离子摄取调控蛋白

(Zn²⁺-uptake regulator, Zur) 的负调控, 这种负调控依赖于锌离子浓度, 铜绿假单胞菌中锌离子摄取也受调控蛋白 Zur 负调控^[10]。在限锌条件下培养单独突变 *znuA*、*znuB*、*znuC* 或全部突变 *znuABC* 基因的菌株仅微弱影响铜绿假单胞菌的生长^[9-10]。这表明铜绿假单胞菌中除 ZnuABC 外还存在其他有效的锌离子摄取系统, 它们对 ZnuABC 锌离子摄取系统的功能缺失有补偿作用。

通过生物信息学分析、基因敲除、遗传互补和表型分析, 本研究在铜绿假单胞菌中揭示了一种新的独立的锌离子摄取系统, 该系统由 PA4834–PA4837 操纵子(本研究命名为 *cntRLMN*, PA4834 命名为 *CntN*, PA4835 命名为 *CntM*, PA4836 命名为 *CntL*, PA4837 命名为 *CntR*) 所编码, 其表达响应胞外锌离子的水平并直接受 Zur 蛋白的负调控, 也对铜绿假单胞菌毒力的发挥起重要作用。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株、质粒和引物: 见表 1 和表 2。

1.1.2 培养条件: 大肠杆菌、铜绿假单胞菌 PAO1、本研究中铜绿假单胞菌各菌株均 37 °C 下培养, 在摇床中振荡培养时, 使用的转速为 220 r/min, 实验中使用的各培养基如下。

LB 液体和固体培养基(g/L): NaCl 10, YEAST EXTRACT 5, TRYPTONE 10, 在配制的液体培养基中加入 1.5% 琼脂粉制成固体培养基。

TSB 培养基(g/L): 在无菌水中溶解 0.3% TSB。

M9 基础培养基(mL/L): 5×M9 盐溶液 200, 1 mol/L MgSO₄ 2, 20% 葡萄糖 20。

5×M9 盐溶液(g/L): Na₂HPO₄·7H₂O 64, KH₂PO₄ 15, NaCl 2.5, NH₄Cl 5, 溶解于 1 L 去离子水中, 121 °C 灭菌 20 min; 20% 葡萄糖, 115 °C 灭菌 30 min。

1.1.3 主要试剂: 琼脂糖、TRYPTONE、YEAST EXTRACT、TSB 培养基购自 OXOID; 琼脂粉购自北京索莱宝科技有限公司; DNA 纯化回收试剂盒、质粒小提试剂盒购自天根生化科技有限公司; DNA 聚合酶购自全式金生物技术有限公司; 限制

性内切酶购自 TaKaRa 生物公司; 连接酶购自 NEB; N, N, N', N'-4-(2-吡啶甲基)乙二胺(TPEN)购自百灵威科技有限公司; O-NITROPHENYL B-D-GALACTOPYRANOSIDE(ONPG)、4-(2-吡啶偶氮)-间苯二酚(PAR)购自 Sigma-Aldrich 西格玛奥德里奇(上海)贸易有限公司; N-2-羟乙基哌嗪-N'-2-乙磺酸(HEPES)购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司; 庆大霉素(Gentamicin, Gm)、卡那霉素(Kanamycin, Km)、氯霉素(Chloramphenicol,

表 1. 菌株和质粒汇总表

Table 1. List of strains and plasmids used in this study

| Strains and plasmids | Relevant characteristics | Source |
|-------------------------------|---|------------|
| Strains | | |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | | |
| PAO1(ATCC15692) | Wild-type | This lab |
| $\Delta cntL$ | Mutant of knockout <i>cntL</i> in PAO1 | This study |
| Δzur | Mutant of knockout <i>zur</i> in PAO1 | This study |
| $\Delta zur\Delta cntL$ | Mutant of knockout <i>zur/cntL</i> in PAO1 | This study |
| $\Delta zur\Delta cntN$ | Mutant of knockout <i>zur/cntN</i> in PAO1 | This study |
| ΔBC | Mutant of knockout <i>znuB/znuC</i> in PAO1 | This lab |
| ΔBCL | Mutant of knockout <i>znuB/znuC/cntL</i> in PAO1 | This study |
| PAO1-V | PAO1 containing plasmid pME6032 | This study |
| $\Delta BC-V$ | Mutant of knockout <i>znuB/znuC</i> containing plasmid pME6032 | This study |
| $\Delta BCL-cntL$ | Mutant of knockout <i>znuB/znuC/cntL</i> containing plasmid pME6032- <i>cntL</i> | This study |
| $\Delta BCL-znuBC$ | Mutant of knockout <i>znuB/znuC/cntL</i> containing plasmid pME6032- <i>znuBC</i> | This study |
| $\Delta BCR-cntR$ | Mutant of knockout <i>znuB/znuC/cntR</i> containing plasmid pME6032- <i>cntR</i> | This study |
| $\Delta BCN-cntN$ | Mutant of knockout <i>znuB/znuC/cntN</i> containing plasmid pME6032- <i>cntN</i> | This study |
| $\Delta BCRL-cntR$ | Mutant of knockout <i>znuB/znuC/cntR/cntL</i> containing plasmid pME6032- <i>cntR</i> | This study |
| <i>Escherichia coli</i> | | |
| TG1 | [F'traD36proABlacIqZ Δ M15]supEthi-1 Δ (lac-proAB) Δ (mcrB-hsdSM)5(rK-mK-) | This lab |
| S17-1 | RP4-2(Km::Tn7, Tc::Mu-1), pro-82, LAMpir, recA1, endA1, thiE1, hsdR17, creC510 | This lab |
| Plasmids | | |
| pK18 <i>mobSacB</i> | Km ^r ; sacB-based gene replacement vector | This lab |
| p34s-Gm | Amp ^r ; Gm resistant cassette carrying vector | This lab |
| pME6032 | Shuttle vector between <i>Pseudomonas</i> and <i>E. coli</i> containing <i>lacI^A-Ptac</i> fragment for gene expression; source of <i>tetA</i> gene cassette, Tc ^r | This lab |
| pME6032- <i>cntL</i> | <i>cntL</i> cloned into pME6032 for complementation | This study |
| pME6032- <i>zur</i> | <i>zur</i> cloned into pME6032 for complementation | This study |
| pME6032- <i>znuBC</i> | <i>znuBC</i> cloned into pME6032 for complementation | This study |
| pME6032- <i>cntR</i> | <i>cntR</i> cloned into pME6032 for complementation | This study |
| pME6032- <i>cntN</i> | <i>cntN</i> cloned into pME6032 for complementation | This study |
| pMini-CTX:: <i>lacZ</i> | Ω -FRT-attP-MCS, ori, int, oriT, Tc ^r | This lab |
| pET28a | Expression vector with N-terminal hexahistidine affinity tag, Km ^r | This lab |
| pET28a- <i>zur</i> | pET28a derivative for expression of <i>zur</i> | This study |

表 2. 引物汇总表
Table 2. List of primers used in this study

| Primers | Sequences (5'→3') | Description |
|-------------------|--|---------------------------------------|
| <i>cntL</i> F | CTCGGGATCCAACGCCTCGAAATCCTTC | Detection primers of <i>cntL</i> |
| <i>cntL</i> R | GTGTCGTACAGGCGAATCTCGCATTCCAG | |
| <i>cntL</i> U | CGAGATTCGCCTGTACGACACCCTGATCC | |
| <i>cntL</i> L | CTCGAAGCTTCCTGCTCGGAAAGTATCC | Amplification primers of <i>cntL</i> |
| <i>cntL</i> BU F | CTCGGAATTCATGCAAGGACGCACACCG | |
| <i>cntL</i> BU R | CTCGCTCGAGTCATCGACCGGCCCTTCTC | |
| <i>cntR</i> F | CTCGGGATCCATGCAGCGGATCGAGCAG | Detection primers of <i>cntR</i> |
| <i>cntR</i> R | GCGACGATCGACACCGAGGACAAGCGAC | |
| <i>cntR</i> U | CCTCGGTGTCGATCGTCTACTACGAGC | |
| <i>cntR</i> L | CTCGAAGCTTCACCAGCGAAGCGATCAG | Detection primers of <i>cntN</i> |
| <i>cntN</i> F | CTCGGGATCCTACGTGCACAGTCCGTTTC | |
| <i>cntN</i> R | CCAGAACAGCATCACGCTGAAGGTGAAG | |
| <i>cntN</i> U | CAGCGTGATGCTGTTCTGGAGCGAGGTG | Amplification primers of <i>cntN</i> |
| <i>cntN</i> L | CTCGAAGCTTAGACTCAATGCCTGGACC | |
| <i>cntN</i> BU F | CTCGGAATTCATGGTCTCGACCTGCTG | |
| <i>cntN</i> BU R | CTCGAGATCTCCGGAGGCTCAGCCCTTC | Amplification primers of <i>cntR</i> |
| <i>cntR</i> BU F | CTCGGAATTCATGAGAGTCAGTGTGTCG | |
| <i>cntR</i> BU R | CTCGAGATCTTAGAGGGCTCAGTAGTTC | |
| <i>zur</i> F | CTCGGGATCCAAGCTTGCCAGGCGTTC | Detection primers of <i>zur</i> |
| <i>zur</i> R | CGACGGTCTGGCTGACGCACTGGCTGTG | |
| <i>zur</i> U | GTGCGTCAGCCAGACCGTCGAGGTGGTC | |
| <i>zur</i> L | CTCGCTGCAGGCGTGGTCTGTGATGGTGG | Amplification primers of <i>zur</i> |
| <i>zur</i> BU F | CTCGGAATTCATGTACAAGATTGCGCCCAAG | |
| <i>zur</i> BU R | CTCGCTCGAGCGTTGTCCATCAGGCGTC | |
| <i>znuBC</i> BU F | CTCGGAATTCATGGACAACGCGCTGGTG | Amplification primers of <i>znuBC</i> |
| <i>znuBC</i> BU R | CTCGAGATCTTCGCCAGATTCTACACCG | |
| PentR* F | CTCGGGTACCCATGCAGCGGATCGAGCAG | |
| PentR* R | GAAGACTTCTCGTGGTTGCTACCAGTTCGATTCCGGCCTC | |
| PentR* U | GTAGCAACCACGAGGAAGTCTTCTTTTCTGGTGCATTTC | |
| PentR* L | CTCGCTGCAGCTGGGGCTTCTTGGTTCAC | |
| EMSA F | TCGAGCAGCATGAACAGC | For EMSA |
| EMSA R | ACAGTGAGGACCTCCAGC | |

Cm)、四环素(Tetracyclin, Tc)、氨苄青霉素(Ampicillin, Amp)和异丙基-β-D-硫代半乳糖苷(IPTG)等购自北京索莱宝科技有限公司。其他常规试剂均使用国产分析纯。

1.2 基因敲除及互补

基因敲除和互补菌株的构建按照文献[11]报

道的方法执行。(1) 基因敲除: 本研究用引物分别扩增了该基因的上游和下游 DNA 片段, 通过重叠延伸 PCR 构建该基因缺失突变的目的片段。将获得的的目的基因片段经过双酶切克隆至自杀载体 pK18*mobSacB*, 从 p34s-Gm 上酶切 Gm 抗性基因, 连接到上一步构建的载体上, 进一步转化进大肠

杆菌 S17-1 构建重组菌株, 并通过结合作用将重组自杀载体导入相应菌株。在双抗平板上获得的单菌落经 PCR 检验合格后即为一次重组菌体。再经含有相应抗性的 12% 蔗糖的 LB 平皿筛选, 通过测序检验, 若正确则为目的基因缺失突变株。

(2) 基因互补: 将需要基因经 PCR 扩增后, 酶切、连接到融合型载体 pME6032 上, 构建互补载体。经电击转化的方法将互补载体电转入突变菌株中, 经抗性筛选获得遗传互补菌株。

1.3 β -半乳糖苷酶活性的检测

实验以 ONPG 为底物使用米勒的方法测定转录融合报告菌株的 β -半乳糖苷酶活^[12]。方法如下: 在离心管中依次加入 Z Buffer 420 μ L、待测菌液 100 μ L、氯仿 20 μ L、0.1% SDS 10 μ L 混匀, 30 $^{\circ}$ C 条件下放置至少 1 h。开始酶活检测之前 30 min, 在底物缓冲液中加入 0.004 g/mL ONPG, 充分溶解, 在菌液中加入 100 μ L, 30 $^{\circ}$ C 下开始酶活检测。反应完成后, 加入 250 μ L 的 1 mol/L Na_2CO_3 终止反应, 并记录反应时间, 最后分别检测反应液在 420 nm 和 550 nm 处的吸光值, 依据公式计算相应转录融合报告菌株的 β -半乳糖苷酶活。米勒酶活单位 = $1000 \times (OD_{420} - 1.75 \times OD_{550}) / [(菌液 OD_{600}) \times (体积) \times (反应时间)]$ 。

Z Buffer: 100 mmol/L Na_2HPO_4 、40 mmol/L NaH_2PO_4 、10 mmol/L KCl、1 mmol/L MgSO_4 和 5.4 μ L/mL β -巯基乙醇。

底物缓冲液: 60 mmol/L Na_2HPO_4 、40 mmol/L NaH_2PO_4 、2.7 μ L/mL β -巯基乙醇和 4 mg/mL ONPG。

本研究中所有的数据均为至少 3 次独立实验的结果。

1.4 蛋白的异源表达及纯化

1.4.1 pET28a-zur 载体的构建: 以铜绿假单胞菌 PAO1 的 DNA 为模板, 扩增 zur 片段, 经酶切与 pET28a 连接构建 pET28a-zur 载体。并进一步转化到大肠杆菌 Transetta (DE3) 菌株中。

1.4.2 蛋白表达与纯化: 将培养过夜的菌株按 1% 的转接量, 转接至新鲜培养基中培养至指数生长期, 加入终浓度为 1 mmol/L 的 IPTG, 22 $^{\circ}$ C 诱导表达过夜。离心收集菌体, 加入裂解液悬浮并超声波破碎; 将破碎液上清过 Ni-NTA (Novagen) 纯化柱, 接着用洗涤缓冲液洗去杂蛋白, 最后用洗脱缓冲液洗脱获得纯的目的蛋白。透析后的蛋白浓度用 NanoDrop 1000 分光光度计 (Thermo Scientific) 测定, 于 -80 $^{\circ}$ C 保存备用。

1.5 凝胶阻滞实验

凝胶阻滞实验 (electrophoretic mobility shift assay, EMSA) 按照文献 [13] 报道的方案执行。EMSA 的反应终体积为 20 μ L, 其体系为 10 mmol/L Tris-HCl (pH 7.5)、40 mmol/L KCl、10 mmol/L MgCl_2 、1 mmol/L DTT、1 μ mol/L ZnSO_4 、50 μ g/mL ploy(dI-dC)、5% 甘油、200 ng 启动子区 DNA、400–500 ng 蛋白质。室温下将加好体系的反应液孵育 30 min, 经 6% Native-PAGE 电泳, 胶体在 0.05% 的 GlodView I 型核酸染料中染色 30 min。

1.6 锌载体 (zincophore) 的提取

1.6.1 培养基上清液中 zincophore 的提取: 将培养过夜的细菌, 按 1% 的转接量转接至 TSB 培养基中振荡培养至稳定期, 取培养液上清, 按与上清 3 : 1 的比例加入乙酸乙酯, 充分混匀, 静置分层, 取上层有机相浓缩得到溶质, 1 mL 菌液的提取物使用 1 μ L DMSO 溶解溶质。

1.6.2 胞内 zincophore 的提取: 将培养过夜的细

菌,按 1%的转接量转接至 TSB 培养基中振荡培养至稳定期,离心取细胞沉淀,无菌水悬浮细胞并超声破碎,加入等体积的乙酸乙酯充分混匀,静置分层,取上层有机相浓缩得到溶质,1 mL 菌液的提取物使用 1 μ L DMSO 溶解。

1.7 PAR 实验

采用金属指示剂染料 4-(2-吡啶偶氮)-间苯二酚(PAR)进行 Zn^{2+} 结合试验^[14]。在没有 Zn^{2+} 的情况下,PAR 的反应液颜色为浅黄色,在 490–500 nm 处的吸光度较低,OD 值小;与 Zn^{2+} 结合后形成的络合物,颜色变橙红色,在该波长下吸光度显著增加,OD 值变大。为了测定铜绿假单胞菌培养物无细胞上清液对 Zn^{2+} 的螯合能力,将相应菌株在加入 200 μ mol/L TPEN 的 M9 培养基中 37 $^{\circ}$ C 培养至 $OD_{600}=0.5$ (酶标仪检测)后,经 0.22 μ m 滤膜过滤得培养物的无细胞上清液,执行 PAR 实验(总体积 1 mL)。反应体系如下:先将 1 mol/L 的 HEPES-KOH (pH 7.4) 40 μ L、10 mmol/L 的 $ZnCl_2$ 10 μ L 和无细胞上清液 940 μ L (或 5 μ L DMSO 溶解的培养物无细胞上清提取物和 935 μ L 的 M9 培养基)混匀,在室温下孵育 15 min,然后加入 5 mmol/L 的 PAR 乙醇溶液 10 μ L,再孵育 5 min 后,用酶标仪测定 497 nm 处的吸光度。以添加和不添加 $ZnCl_2$ 的 M9+200 μ mol/L TPEN 培养基(或 5 μ L DMSO 溶解的培养基提取物和 935 μ L 的 M9 培养基)作为对照。 OD_{497} 的值越小表示无细胞上清液的 Zn^{2+} 螯合能力越强。该实验至少设 3 个生物学平行并且独立重复 3 次。

1.8 大蜡螟(*Galleria mellonella*)幼虫的致死实验

将培养至 OD_{620} 为 0.8 的菌株,离心取细胞沉淀,使用 0.85% NaCl 洗涤细胞后稀释细胞浓度,在相同状态(5 龄第一天)的大蜡螟幼虫的最后左腹

足内使用微量进样器将 1×10^5 个细胞注射入体内^[15],每种菌体每次注射 50 个大蜡螟幼虫,每隔 12 h 统计 1 次死亡率。实验至少设 3 个生物学平行并独立重复 3 次。

1.9 统计分析

实验结果以平均值加减标准偏差的形式体现,使用 Student's *t*-test (双尾不配对)对显著性进行分析。用 GraphPad Prism version 5.00 软件(GraphPad software Inc.; San Diego, CA, USA)对结果进行统计学分析并作图, P 值 <0.05 代表显著。*: $P<0.05$; **: $P<0.01$; ***: $P<0.001$ 。所有的实验都至少设 3 个生物学平行并且独立重复 2 次。

2 结果和分析

2.1 不同细菌 staphylopine 生物合成基因簇的比较

生物信息学分析显示铜绿假单胞菌基因组中存在与金黄色葡萄球菌 staphylopine 生物合成基因簇同源的 *cntRLMN* 操纵子(*cnt* 操纵子) (同源比对使用在线软件 EMBOSS Stretcher, https://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss_stretcher/) (图 1)。铜绿假单胞菌的 CntL 蛋白与金黄色葡萄球菌的烟草胺合成酶 SaCntL (SAV2469)的氨基酸序列的一致性为 29.0%,相似性为 43.8%,铜绿假单胞菌的 CntM 蛋白则与金黄色葡萄球菌的 staphylopine 脱氢酶 SaCntM (SAV2468)的氨基酸序列的一致性为 32.8%,相似性为 50.4%。相比金黄色葡萄球菌的操纵子,铜绿假单胞菌 *cntRLMN* 操纵子中多出两个独特的基因 *cntR* 和 *cntN*,*cntN* 基因编码一个有 284 个氨基酸并包含 EamA 结构域的细胞质膜

蛋白, 而 *cntR* 基因则编码一个有 708 个氨基酸的假定的铁载体外膜受体蛋白, 但是缺少 *cntK* 基因和 *cntABCDEF* 基因簇。最近, Arnoux 团队在金黄色葡萄球菌中鉴定了一种新型的多功能金属载体 staphylopin, 它是植物产生的金属螯合剂烟草胺的类似物, 能够同时结合并介导镍、铁、钴、铜和锌的转运, 在金黄色葡萄球菌致病性和适应性方面起重要作用^[16]。该金属载体的生物合成和转运由 *SacntABCDEFKLM* 操纵子所介导。*SacntKLM* 基因簇编码 staphylopin 的生物合成途径, SaCntK 是组氨酸消旋酶, SaCntL 与烟草胺合成酶同源, SaCntM 是 staphylopin 脱氢酶, 而编码 staphylopin 的 *SacntABCDEF* 基因簇转运途径中, staphylopin 的分泌由 SaCntE 负责, 而螯合了金属的 staphylopin 向胞内的转运则由 SaCntA-F 负责^[16]。目前还发现金黄色葡萄球菌并不是唯一可以产生 staphylopin 的细菌, 铜绿假单胞菌及其他微生物病原体基因组中也存在 staphylopin 生物合成的同源基因^[16]。本研究中的生物信息学分析结果显示铜绿假单胞菌中的 *cntRLMN* 与金黄色葡萄球菌控制合成 staphylopin

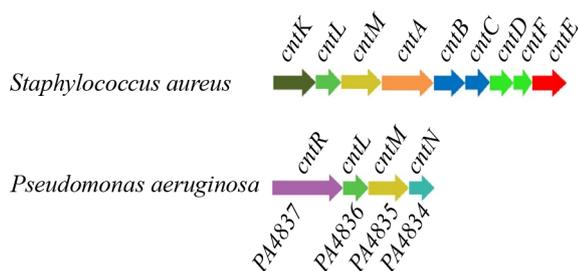


图 1. 铜绿假单胞菌和金黄色葡萄球菌 staphylopin 生物合成基因簇的比较

Figure 1. The comparison of staphylopin biosynthetic gene clusters between *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*.

介导锌离子摄取的 *cntKLM* 操纵子同源, 这与文献[16]报道的结果相一致。这暗示铜绿假单胞菌中的 *cnt* 操纵子可能与金黄色葡萄球菌 *cntKLM* 操纵子的功能类似, 参与铜绿假单胞菌锌离子的摄取。

2.2 *cnt* 操纵子参与铜绿假单胞菌锌离子的摄取

为了验证铜绿假单胞菌中的 *cnt* 操纵子参与锌离子的摄取这一假设, 本研究在不同 Zn^{2+} 浓度下比较了野生型 PAO1 菌株、*cnt* 操纵子中的各个基因单独突变菌株之间的生长情况。结果相比野生型 PAO1 菌株, 在各种不同 Zn^{2+} 浓度下各菌株生长均没有显著差异。这可能是由于铜绿假单胞菌中本身其他锌离子摄取系统(如 *ZnuABC*)的功能缺失有补偿作用而掩盖了 *cnt* 突变株在限锌培养条件下的生长缺陷表型。为了排除 *ZnuABC* 锌离子摄取系统的干扰, 本研究以 *znuBC* 突变株 (ΔBC)作为出发菌株构建了 ΔBCL 、 ΔBCR 、 ΔBCN 及其遗传互补菌株 ΔBCL -*cntL*、 ΔBCR -*cntR*、 ΔBCN -*cntN*。各菌株的生长情况结果如图 2 所示。

图 2-A 和图 2-B 中分别为 PAO1、 ΔBC 、 ΔBCL 、 $\Delta cntL$ 四种菌株在 Zn^{2+} 充足的培养基 ($M9+10 \mu mol/L ZnSO_4$) 和 Zn^{2+} 缺乏的培养基 ($M9+200 \mu mol/L TPEN$) 中的生长曲线。可以看到在锌离子充足的环境下, 尽管 ΔBC 、 ΔBCL 菌株显示出微弱的生长滞后现象, 但是各突变株与野生铜绿假单胞菌 PAO1 之间没有明显生长差异, 然而在限锌环境中 ΔBCL 菌株的生长比其他菌株却明显减慢, 说明只有 *znuBC* 和 *cntL* 同时缺失才会显著影响在限锌的环境中细菌对锌离子的摄取。由于 *CntL* 与金黄色葡萄球菌的烟草胺合成酶 SaCntL 同源, 本研究推测 *CntL* 也通过控制合成 staphylopin 类似物而参与锌离子的摄取。为了验证这一推测, 本研究通过 PAR 实验检测细菌培养

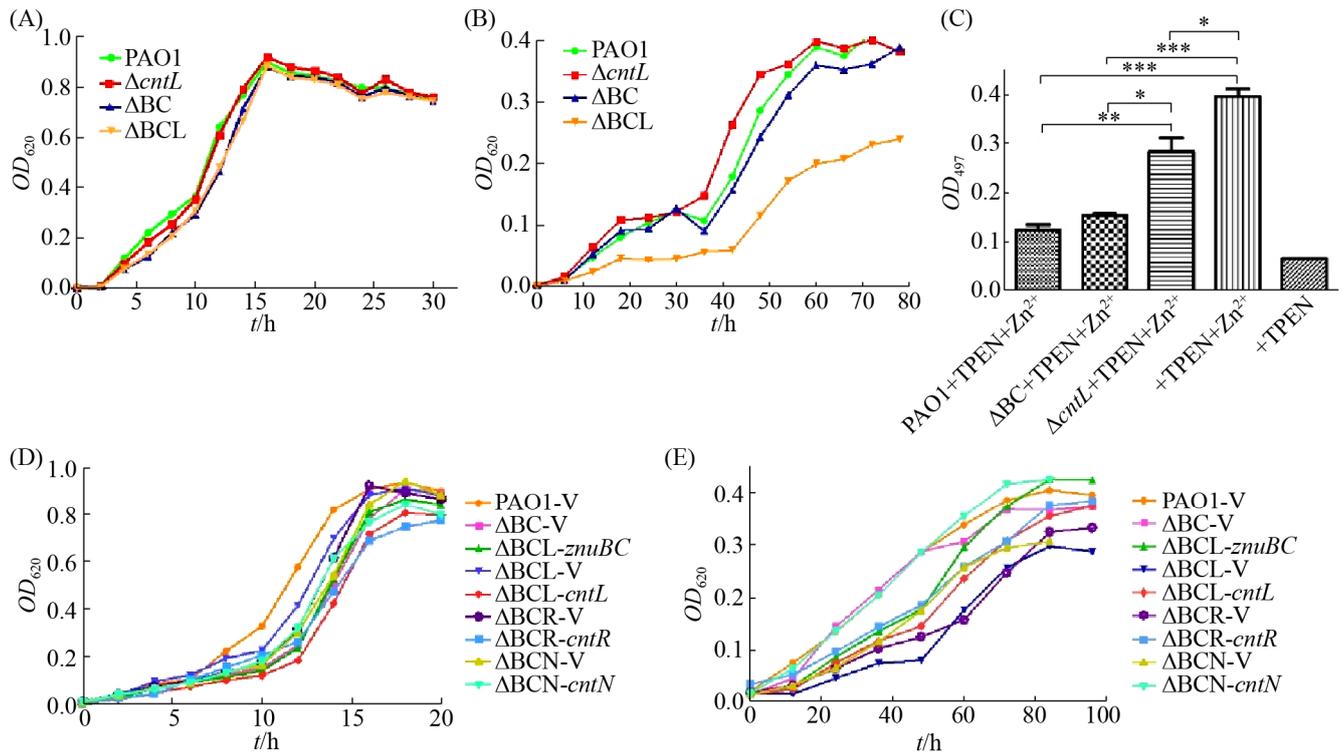


图 2. *cnt* 操纵子参与铜绿假单胞菌锌离子的摄取

Figure 2. The *cnt* operon participates in the uptake of zinc ions in *Pseudomonas aeruginosa*. All data are representative of at least three independent. *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$.

物无细胞上清液的锌离子螯合能力,结果如图 2-C 所示。

图 2-C 中 TPEN 浓度为 $200 \mu\text{mol/L}$, Zn^{2+} 浓度为 $100 \mu\text{mol/L}$ 。限锌培养条件下,相比 PAO1 和 ΔBC 菌株, *cntL* 突变株培养物无细胞上清液的锌离子螯合能力显著降低,这印证了 CntL 控制合成 staphylopin 类似物 zincophore 的推测。说明 CntL 通过介导 staphylopin 的类似物 zincophore 的合成而参与细胞对胞外锌离子的摄取,从而在功能上与 ZnuBC 形成互补。

图 2-D 和图 2-E 为各菌株在富锌和限锌的培养基中的生长曲线。可以看到在锌离子充足的环境中,培养的各菌株之间没有明显的生长差异,而在锌离子缺乏的环境中 $\Delta\text{BCL-V}$ 、 $\Delta\text{BCR-V}$ 、

$\Delta\text{BCN-V}$ 的生长状况明显低于 PAO1-V 和 $\Delta\text{BC-V}$ 菌株,并且各遗传互补菌株恢复到野生菌株的生长表型。

2.3 Zur 蛋白负调控 *cnt* 操纵子的表达

原核生物的锌摄取受锌离子摄取调控蛋白 Zur 的负调控,为了研究 *cnt* 操纵子是否也受锌离子调控蛋白 Zur 调控,本研究构建了含有 *cnt* 操纵子的启动子 PcntR' 的 *lacZ* 转录融合报告菌株,通过检测 β -半乳糖苷酶在不同 Zn^{2+} 浓度下的活性,来反映 Zur 调控 *cnt* 操纵子的情况,结果如图 3 所示。

图 3 中的黑色柱体为 PAO1-V、 $\Delta\text{zur-V}$ 、 $\Delta\text{zur-zur}$ 菌株在 $\text{M9}+10 \mu\text{mol/L ZnSO}_4$ 中培养测得 β -半乳糖苷酶活性,图 3 中的灰色柱体为各菌株在 $\text{M9}+200 \mu\text{mol/L TPEN}$ [$\text{N}, \text{N}, \text{N}', \text{N}'\text{-4}$ (2-吡啶甲

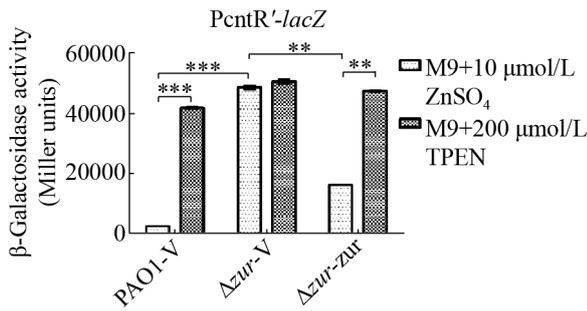


图 3. *cnt* 操纵子启动子 PcntR' 的 β-半乳糖苷酶活性检测

Figure 3. The Beta galactosidase activity assay of the *cnt* operon promoter PcntR'. All data are representative of at least three independent. *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$.

基)乙二胺是一种锌离子螯合剂]中培养测得的 β-半乳糖苷酶活性。

PAO1-V 在富锌的环境中培养时与在限锌的环境中相比 β-半乳糖苷酶的酶活显著下降, 说明在富锌的环境中 *cntR* 基因的表达受到抑制, 在限锌的环境中 *cntR* 基因的表达受到激活, 即环境中锌离子浓度的负调控于 *cnt* 操纵子的表达; 而相比 PAO1-V, Δ*zur*-V 菌株在富锌和限锌培养条件下的 β-半乳糖苷酶酶活没有显著差异, 说明 Δ*zur*-V 菌株中 *cntR* 基因的表达不受环境中锌离子浓度的影响, 表明 PAO1-V 菌株中 *cnt* 操纵子的表达对锌离子浓度的响应依赖于 Zur 蛋白。另外, 在富锌的环境中 Δ*zur*-V 与 PAO1-V 相比 β-半乳糖苷酶酶活显著升高, 说明在富锌的环境中 *zur* 突变显著激活铜绿假单胞菌 *cntR* 基因的表达, 同时互补 *zur* 基因使 Δ*zur* 菌株中 *cntR* 基因的表达水平得到明显回复, 说明在富锌的环境中 Zur 蛋白阻遏 *cnt* 操纵子的表达, 即 Zur 蛋白负调控 *cnt* 操纵子的表达。综合以上的实验结果说明 Zur 蛋白的负调控于 *cnt* 操纵子且以 Zur 蛋白依赖的形式受到锌离子的抑制。

2.4 Zur 蛋白与 *cnt* 启动子的体外结合

本研究通过 EMSA 实验进一步判断 Zur 调控蛋白对 *cnt* 操纵子的调控是直接还是间接, 如图 4 所示: 通过参考 Ellison 等^[10]预测的 PcntR' 上假定的 Zur 蛋白结合位点(GCGTTATAGTATATCAT) (上端黄色区域), 红色碱基为 PcntR' 的-10 区。本实验的对照是使用 *cntR* 基因内部的任意一段序列替换假定的 Zur 蛋白结合位点(下端黄色区域), 突变的启动子命名为 PcntR*; 之后将异源表达纯化到的 Zur 蛋白与 *cnt* 操纵子的启动子 PcntR'、*cnt* 操纵子的突变启动子 PcntR* 进行体外结合实验, 结果如图 5 所示。

图 5 中以 BSA (500 ng) 作为蛋白质的阴性对照, PcntR* 作为 DNA 的阴性对照, His-Zur 蛋白用量分别为 400 ng 和 500 ng。可以看到增加

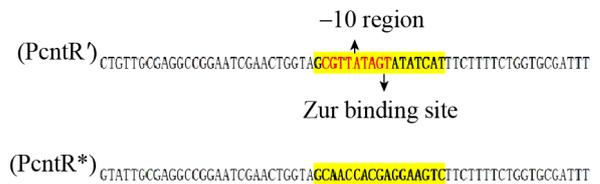


图 4. 野生型和突变型的启动子碱基序列图

Figure 4. The sequence map of wild-type promoter and mutant promoter.

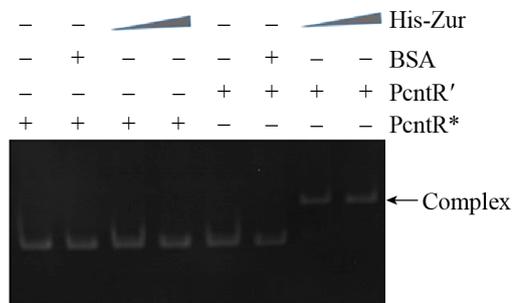


图 5. Zu 和 PcntR' 启动子的互作

Figure 5. The interaction between Zur and PcntR' promoter.

His-Zur 蛋白量始终可以与 PcntR'形成 DNA-蛋白质复合物, 而无论增加 His-Zur 蛋白量与否, His-Zur 始终不能与 PcntR*结合, 并且对照蛋白 BSA 与 PcntR'、PcntR*都不进行结合。这些结果说明 GCGTTATAGTATATCAT 是 His-Zur 与 PcntR'启动子的结合位点, 该蛋白能够直接结合 PcntR'启动子, 这些结果表明 Zur 调控蛋白对 *cnt* 操纵子的调控是直接的。

2.5 CntR 是 zincophore-Zn²⁺的外膜受体

通过前面的实验我们已经确定 CntL 通过介导 staphylopine 类似物-zincophore 的合成而参与铜绿假单胞菌锌离子的摄取, 同样 *cntR* 基因也参与铜绿假单胞菌中锌离子的摄取, 但是我们并不清楚 *cntR* 基因参与锌离子摄取的具体功能。生物信息

分析显示铜绿假单胞菌中 CntR 是依赖 TonB 的外膜受体, 所以本研究假设 CntR 是摄取 zincophore-Zn²⁺的外膜受体。因此, 本研究构建了 Δzur 、 $\Delta zur\Delta cntL$ 两种突变菌株(由于突变 *zur* 基因可显著诱导 *cnt* 操纵子的表达而促进 zincophore 的合成, 为了确保从培养物中提取获得 zincophore, 所以本研究以 Δzur 作为发酵提取 zincophore 的出发菌株), $\Delta BCRL-V$ 、 $\Delta BCRL-cntR$ 两种遗传互补菌株。分别提取 Δzur 、 $\Delta zur\Delta cntL$ 上清物中的活性物质(staphylopine 类似物-zincophore), 并对上清中活性物质的锌离子螯合能力进行检测, 将获得的上清提取物分别加到 $\Delta BCRL-V$ 、 $\Delta BCRL-cntR$ 遗传互补菌株中, 其生长结果如图 6 所示。

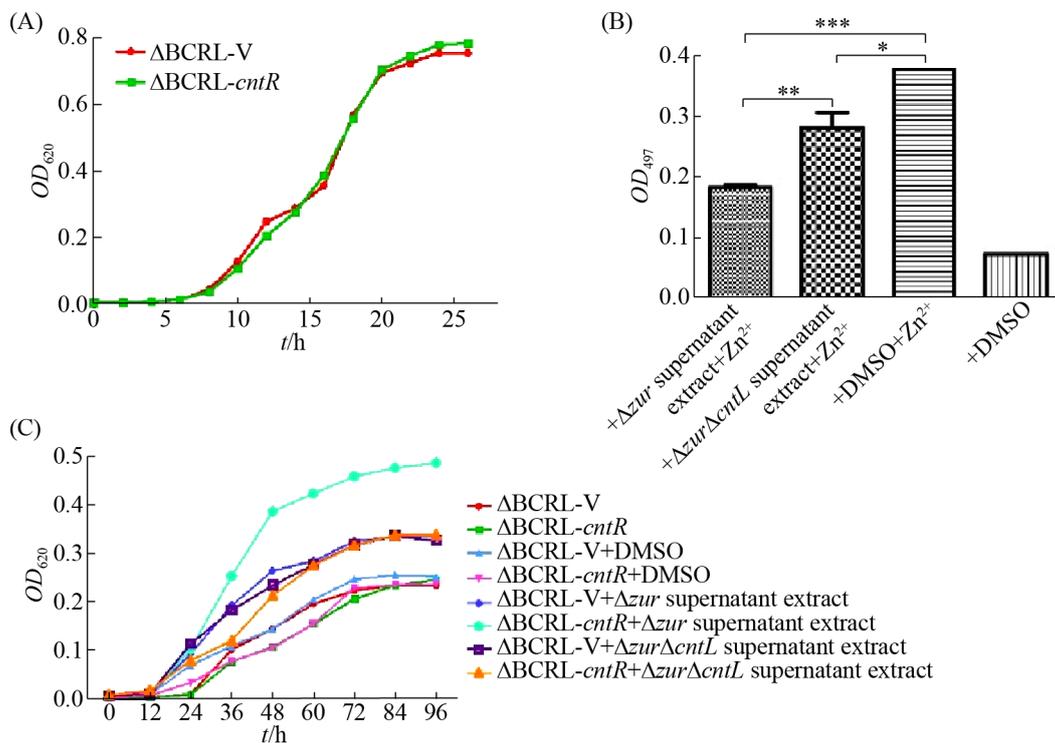


图 6. CntR 是 zincophore-Zn²⁺的外膜受体

Figure 6. CntR is the outer membrane receptor for zincophore-Zn²⁺. All data are representative of at least three independent. *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$.

图 6-A 为菌株在富锌条件下的生长曲线, 实验结果显示在富锌环境中 Δ BCRL-*cntR*、 Δ BCRL-V 菌株的生长无显著差异。

图 6-B 通过 PAR 实验检测细菌培养物无细胞上清液提取物的锌离子螯合能力, Zn^{2+} 浓度为 100 μ mol/L, 实验结果显示 Δ zur 培养物无细胞上清提取物的 OD_{497} 明显小于 Δ zur Δ cntL 培养物无细胞上清提取物的 OD_{497} , 说明 Δ zur 培养物无细胞上清提取物的锌离子螯合能力显著高于 Δ zur Δ cntL 培养物无细胞上清提取物的锌离子螯合能力, 暗示 Δ zur 培养物无细胞上清提取物中存在 CntL 介导合成的 zincophore。

图 6-C 为菌株限锌条件下的生长曲线, 可以看到 Δ zur 的上清提取物可以显著恢复 Δ BCRL-*cntR* 遗传互补菌株的生长, 但是 Δ BCRL-V 菌株的生长并没有恢复, 表明这种生长促进作用依赖于 CntR; Δ zur Δ cntL 的上清提取物可以部分恢复 Δ BCRL-*cntR*、 Δ BCRL-V 菌株的生长, 但是它们之间的生长无显著差异且这种生长促进作用明显低于 Δ zur 上清提取物对 Δ BCRL-*cntR* 菌株的生长促进作用, 表明这种生长促进作用也依赖于 CntL 介导合成的

zincophore。

综合上述结果表明 CntR 作为铜绿假单胞菌摄取 zincophore- Zn^{2+} 的外膜受体, 在限锌的环境中介导胞外 zincophore- Zn^{2+} 向胞内转运。

2.6 CntN 是 zincophore 的转运蛋白

与 *cntL* 类似, 本研究也发现 *cntN* 参与铜绿假单胞菌中的锌离子摄取, 但并不清楚 *cntN* 基因在该过程中的具体功能。相比金黄色葡萄球菌的 *cnt* 操纵子, 铜绿假单胞菌的 *cnt* 操纵子中缺少 *cntABCDEF* 基因簇, 而多出 2 个独特的基因 *cntR* 和 *cntN*, 本研究已确定 CntR 作为铜绿假单胞菌 zincophore- Zn^{2+} 摄取的外膜受体, 其功能与金黄色葡萄球菌 SaCntA-F 介导螯合了金属的 staphylopin 向胞内转运的功能类似, 这暗示作为细胞质膜蛋白的 CntN 可能与 SaCntE 相似, 都参与 zincophore 的分泌。为了验证这一假设, 本研究分别提取了 Δ zur、 Δ zur Δ cntN 培养液上清中的 zincophore 以及 Δ zur、 Δ zur Δ cntN 胞内的 zincophore, 对各种提取物中 zincophore 的含量进行分析, 并检测各种提取物对 Δ BCL 菌株生长的影响, 如图 7 所示。

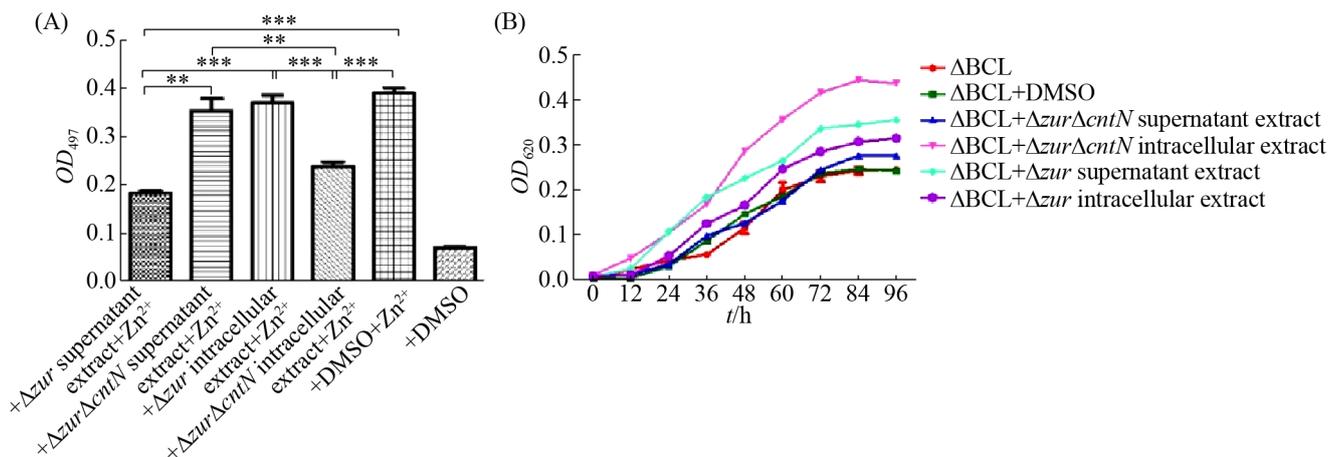


图 7. CntN 是 zincophore 的转运蛋白

Figure 7. CntN is a transporter of zincophore. All data are representative of at least three independent. *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$.

图 7-A 通过 PAR 实验检测细菌培养物无细胞上清提取物的锌离子螯合能力, Zn^{2+} 浓度为 $100 \mu\text{mol/L}$, DMSO 作为提取物的溶剂, 提取物的加入量为 $5 \mu\text{L/mL}$ 。 Δzur 培养物无细胞上清提取物的 OD_{497} 明显小于 $\Delta zur\Delta cntN$ 培养物无细胞上清提取物的 OD_{497} , 说明 Δzur 培养物无细胞上清提取物的锌离子螯合能力显著高于 $\Delta zur\Delta cntN$ 培养物无细胞上清提取物的锌离子螯合能力, 说明 $cntN$ 的缺失导致胞外的 zincophore 显著减少; 而 $\Delta zur\Delta cntN$ 胞内提取物的 OD_{497} 明显小于 Δzur 胞内提取物的 OD_{497} , 表明 $\Delta zur\Delta cntN$ 胞内提取物的锌离子螯合能力显著高于 Δzur 胞内提取物的锌离子螯合能力, 说明 $cntN$ 的缺失导致大量的 zincophore 在胞内积累。

图 7-B 为菌株在 $M9+200 \mu\text{mol/L}$ TPEN 条件下的生长曲线。用 5 mL 的培养基对菌体进行培养分别加入 DMSO(培养基提取物)、 Δzur 上清提取物、 $\Delta zur\Delta cntN$ 上清提取物、 Δzur 胞内提取物、 $\Delta zur\Delta cntN$ 胞内提取物。在限锌的培养环境培养 ΔBCL 时, 加入 $\Delta zur\Delta cntN$ 胞内提取物时菌株生长显著优于加入 Δzur 胞内提取物, 但加入 $\Delta zur\Delta cntN$ 上清提取物时菌株的生长明显弱于加入 Δzur 上清提取物。这些结果与提取物中 zincophore 含量分析的结果相一致, 均暗示 CntN 蛋白介导 zincophore 的分泌。

综上所述, 在胞内合成的 zincophore 可通过细胞质膜蛋白 CntN 被转运分泌到胞外参与锌离子摄取。

2.7 *cnt* 操纵子在铜绿假单胞菌毒力发挥中的作用

由于 *cnt* 操纵子与铜绿假单胞菌锌离子的摄

取有关, 因此我们很容易想到突变 *cnt* 操纵子可能对铜绿假单胞菌的毒力产生影响。为了验证这一想法, 本研究仍以铜绿假单胞菌中负责 zincophore 合成的 *cntL* 基因的突变株为代表, 利用大蜡螟幼虫作为模型, 用培养的 PAO1-V、 $\Delta cntL$ -V、 ΔBC -V、 ΔBCL -V、 ΔBCL -*cntL* 注射到大蜡螟幼虫体内, 12 h 统计一次死亡率, 结果如图 8 所示。

注射 $\Delta cntL$ -V、 ΔBC -V 后大蜡螟幼虫的死亡率相较于对照菌株 PAO1-V 并没有显著差异, 说明 *cntL* 和 *znuBC* 单独突变对铜绿假单胞菌的毒力影响不显著, 而注射 ΔBCL -V 菌株大蜡螟幼虫死亡率明显降低。同时, 实验还发现注射了各突变菌株的大蜡螟幼虫的平均死亡时间与野生菌相比缓慢了 12 h 左右。但是遗传互补菌株 ΔBCL -*cntL* 并没有完全恢复突变株对大蜡螟幼虫的毒力, 这种原因可能是由于本研究使用的是携带 *cntL* 基因的质粒在表达互补时造成的不同基因剂量导致的。这些结果表明铜绿假单胞菌在毒力发挥时 *cnt* 操纵子也起到重要作用。

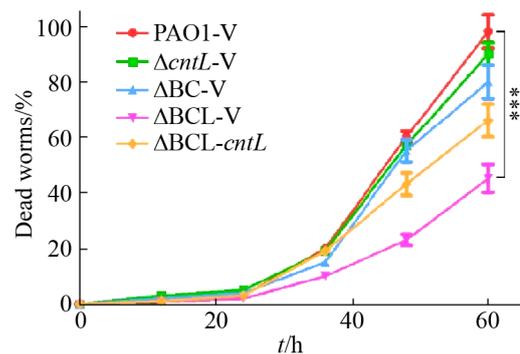


图 8. 铜绿假单胞菌对大蜡螟幼虫的毒力作用

Figure 8. The virulence of *Pseudomonas aeruginosa* to the larva of wax moth. All data are representative of at least three independent, *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$.

3 结论和讨论

本研究通过 β -半乳糖苷酶活性的测定和 EMSA 实验表明 Zur 蛋白能够直接结合 PcntR'启动子, 结合位点为 GCGTTATAGTATATCAT。而且 Zur 蛋白负调控 *cnt* 操纵子的表达并以 Zur 蛋白依赖的形式受到锌离子的抑制。分别在富锌和限锌环境下的生长曲线分析表明, ZnuBC 和 CntL、CntR、CntN 都对铜绿假单胞菌摄取锌离子起重要作用, 由于 ZnuBC 是已报道的锌离子摄取系统, 因此 CntRLMN 是一种在功能上与 ZnuBC 互补的新的锌离子摄取系统。通过对外源添加细胞提取物的生长曲线分析以及 PAR 实验表明在 *cnt* 操纵子中 CntL 通过控制合成 zincophore 参与锌离子的摄取; CntN 作为细胞质膜转运蛋白, 介导 zincophore 的分泌。CntR 是外膜受体, 介导胞外

zincophore-Zn²⁺的摄取。另外通过将 *cnt* 操纵子的突变菌株和互补菌株对大蜡螟幼虫侵染后的存活率统计表明 *cnt* 操纵子突变抑制了铜绿假单胞菌的毒力。

结合 Lhospice 等^[17]和 Mastropasqua 等^[18]对铜绿假单胞菌 *cnt* 操纵子各基因功能的报道, 本研究提出了铜绿假单胞菌 *cnt* 操纵子的功能模型图 (图 9): 锌离子匮乏环境中, Zur 蛋白调控 CntL 合成 zincophore, 转运蛋白 CntN 将 zincophore 释放到胞质空间, 再经细胞外膜某一未知通道分泌到胞外, 在胞外环境中螯合游离锌离子形成 zincophore-Zn²⁺复合物, 此时 zincophore-Zn²⁺进一步通过外膜受体 CntR 和一个未知的内膜转运蛋白进入细胞, 完成锌离子的转运。当锌离子在胞内大量积累时, 锌离子会与 Zur 蛋白结合从而抑制 *cnt* 操纵子的表达。

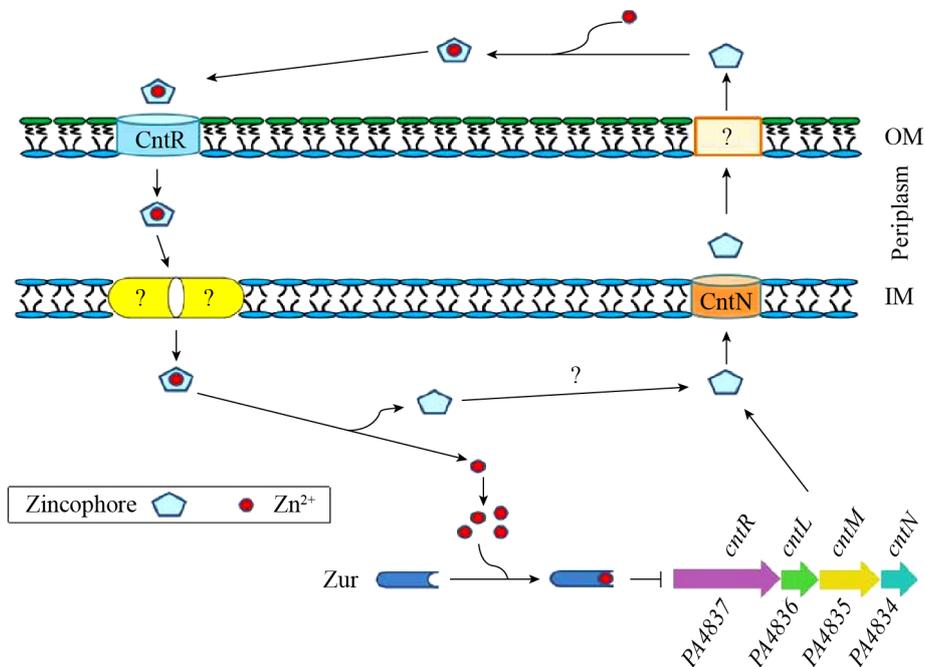


图 9. 铜绿假单胞菌 *cntRLMN* 操纵子的功能模型

Figure 9. The functional model diagram of *cntRLMN* operon of *Pseudomonas aeruginosa*.

本研究中只有在 *znuBC* 缺失的基础上突变 *cntL* 基因, 在限锌环境下才显示出明显参与锌离子的摄取作用, 但是 Δ BCL 突变菌株在限锌环境下仍然不能完全抑制生长, 这些都说明了还有其他的锌离子摄取系统在铜绿假单胞菌中有待进一步发现。最近对 PAO1 进行的转录组分析发现的额外假定金属转运系统也有助于细菌体内锌的平衡^[9], 以及 Lewinson 等发现的 P 型泵(HmtA), 可以调节铜和锌的摄取^[19], 都证明了以上所提的设想。此外本研究提出的模型中缺乏的负责转运锌载体的外膜输出蛋白和内膜输入蛋白, 这些蛋白可能由基因组其他部位基因负责编码, 这些基因也有待于进一步的研究发现。

Pederick 等^[9]在限锌培养条件下对铜绿假单胞菌 *znuA* 突变株进行转录组分析, 结果显示除 *znuABC* 和 *hmtA* 等两套已知的锌离子摄取系统的表达显著上调外, 还有多个未知功能操纵子的表达也明显上调, 其中包括 *cnt* 操纵子。Hermansen 等^[20]分离了已经在丹麦许多囊性纤维化患者身上传播了 40 多年的铜绿假单胞菌 DK2, 并对其 *cnt* 操纵子的启动子进行了详细的研究。结果表明在临床分离的 DK2 野生株及其大部分突变株的 *cnt* 操纵子的启动子均表现出在限锌条件下表达活性升高, 而在富锌培养基或者外源补加锌离子后表达活性降低的现象。本文研究的 PAO1 菌种中 *cnt* 操纵子的启动子也出现相同的表达模式。

已有研究显示, 铜绿假单胞菌的 *cnt* 操纵子在一些临床表型如囊性纤维化病人痰液^[21]、外伤病人伤口^[22]及导管插入病人的导管表面的黏液^[23]中也出现了显著的表达, 这进一步支持了本研究的毒力实验结果。另外, 当铜绿假单胞菌感染囊性纤维化患者肺部时, 会在气管黏液中分泌一种

未知的铁载体, 该铁载体由 *cntRLMN* 操纵子介导合成^[23], 暗示这种铁载体可能就是 CntRLMN 所介导合成的 zincophore, 显示 CntRLMN 可能同时具有介导铁离子摄取的功能。

参 考 文 献

- [1] Capdevila DA, Wang JF, Giedroc DP. Bacterial strategies to maintain Zinc metallostasis at the host-pathogen interface. *Journal of Biological Chemistry*, 2016, 291(40): 20858–20868.
- [2] Gonzalez MR, Ducret V, Leoni S, Perron K. *Pseudomonas aeruginosa* zinc homeostasis: key issues for an opportunistic pathogen. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms*, 2019, 1862(7): 722–733.
- [3] Battistoni A, Ammendola S, Chiancone E, Ilari A. A novel antimicrobial approach based on the inhibition of zinc uptake in *Salmonella enterica*. *Future Medicinal Chemistry*, 2017, 9(9): 899–910.
- [4] Streeter K, Katouli M. *Pseudomonas aeruginosa*: a review of their pathogenesis and prevalence in clinical settings and the environment. *Infection, Epidemiology and Medicine*, 2016, 2(1): 25–32.
- [5] Ding CY, Yang ZR, Wang J, Liu XR, Cao Y, Pan YT, Han LZ, Zhan SY. Prevalence of *Pseudomonas aeruginosa* and antimicrobial-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in patients with pneumonia in mainland China: a systematic review and meta-analysis. *International Journal of Infectious Diseases*, 2016, 49: 119–128.
- [6] Palmer LD, Skaar EP. Transition metals and virulence in bacteria. *Annual Review of Genetics*, 2016, 50: 67–91.
- [7] Schalk IJ, Cunrath O. An overview of the biological metal uptake pathways in *Pseudomonas aeruginosa*. *Environmental Microbiology*, 2016, 18(10): 3227–3246.
- [8] Cerasi M, Ammendola S, Battistoni A. Competition for zinc binding in the host-pathogen interaction. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2013, 3: 108.
- [9] Pederick VG, Eijkelkamp BA, Begg SL, Ween MP, McAllister LJ, Paton JC, McDevitt CA. ZnuA and zinc homeostasis in *Pseudomonas aeruginosa*. *Scientific Reports*,

- 2015, 5: 13139.
- [10] Ellison ML, Matthew Farrow III J, Parrish W, Danell AS, Pesci EC. The transcriptional regulator Np20 is the Zinc uptake regulator in *Pseudomonas aeruginosa*. *PLoS One*, 2013, 8(9): e75389.
- [11] Lin JS, Cheng JL, Chen KQ, Guo CH, Zhang WP, Yang X, Ding W, Ma L, Wang Y, Shen XH. The *icmF3* locus is involved in multiple adaptation- and virulence-related characteristics in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2015, 5: 70.
- [12] Miller JH. A short course in bacterial genetics: a laboratory manual and handbook for *Escherichia coli* and related bacteria. Cold Spring Harbor, NY, USA: Laboratory Press, 1992.
- [13] Wilderman PJ, Sowa NA, Fitzgerald DJ, Fitzgerald PC, Gottesman S, Ochsner UA, Vasil ML. Identification of tandem duplicate regulatory small RNAs in *Pseudomonas aeruginosa* involved in iron homeostasis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2004, 101(26): 9792–9797.
- [14] Hunt JB, Neece SH, Ginsburg A. The use of 4-(2-pyridylazo)resorcinol in studies of zinc release from *Escherichia coli* aspartate transcarbamoylase. *Analytical Biochemistry*, 1985, 146(1): 150–157.
- [15] Jander G, Rahme LG, Ausubel FM. Positive correlation between virulence of *Pseudomonas aeruginosa* mutants in mice and insects. *Journal of Bacteriology*, 2000, 182(13): 3843–3845.
- [16] Ghssein G, Brutesco C, Ouerdane L, Fojcik C, Izaute A, Wang SL, Hajjar C, Lobinski R, Lemaire D, Richaud P, Voulhoux R, Espaillat A, Cava F, Pignol D, Borezée-Durant E, Arnoux P. Biosynthesis of a broad-spectrum nicotianamine-like metallophore in *Staphylococcus aureus*. *Science*, 2016, 352(6289): 1105–1109.
- [17] Lhospice S, Gomez NO, Ouerdane L, Brutesco C, Ghssein G, Hajjar C, Liratni A, Wang SL, Richaud P, Bleves S, Ball G, Borezée-Durant E, Lobinski R, Pignol D, Arnoux P, Voulhoux R. *Pseudomonas aeruginosa* zinc uptake in chelating environment is primarily mediated by the metallophore pseudopaline. *Scientific Reports*, 2017, 7: 17132.
- [18] Mastropasqua MC, D'Orazio M, Cerasi M, Pacello F, Gismondi A, Canini A, Canuti L, Consalvo A, Ciavardelli D, Chirullo B, Pasquali P, Battistoni A. Growth of *Pseudomonas aeruginosa* in zinc poor environments is promoted by a nicotianamine-related metallophore. *Molecular Microbiology*, 2017, 106(4): 543–561.
- [19] Lewinson O, Lee AT, Rees DC. A P-type ATPase importer that discriminates between essential and toxic transition metals. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2009, 106(12): 4677–4682.
- [20] Hermansen GMM, Hansen ML, Khademi SMH, Jelsbak L. Intergenic evolution during host adaptation increases expression of the metallophore pseudopaline in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology*, 2018, 164(8): 1038–1047.
- [21] Son MS, Matthews Jr WJ, Kang Y, Nguyen DT, Hoang TT. In vivo evidence of *Pseudomonas aeruginosa* nutrient acquisition and pathogenesis in the lungs of cystic fibrosis patients. *Infection and Immunity*, 2007, 75(11): 5313–5324.
- [22] Bielecki P, Komor U, Bielecka A, Müsken M, Puchalka J, Pletz MW, Ballmann M, Martins dos Santos VAP, Weiss S, Häussler S. Ex vivo transcriptional profiling reveals a common set of genes important for the adaptation of *Pseudomonas aeruginosa* to chronically infected host sites. *Environmental Microbiology*, 2013, 15(2): 570–587.
- [23] Gi M, Lee KM, Kim SC, Yoon JH, Yoon SS, Choi JY. A novel siderophore system is essential for the growth of *Pseudomonas aeruginosa* in airway mucus. *Scientific Reports*, 2015, 5: 14644.

Characterization of zinc ion uptake mediated by *cntRLMN* operon in *Pseudomonas aeruginosa*

Jinshui Lin^{1,2*}, Yanting Niu¹, Shuaitao Wang¹, Guifeng Wang¹, Ye Tian¹, Heng Zhang¹, Xufei Zhu¹, Qingpo Si¹, Juanli Cheng¹, Yanan Ai¹, Wenjing Zhao¹, Xiangqian Zhang²

¹ College of Life Sciences, Yan'an University, Yan'an 716000, Shaanxi Province, China

² Shaanxi Key Laboratory of Chinese Jujube (Yan'an University), Yan'an 716000, Shaanxi Province, China

Abstract: [Objective] We characterized the function of *cntRLMN* in zinc ion uptake of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 (ATCC15692). [Methods] On the basis of the mutant strain $\Delta znuBC$, we built $\Delta cntRLMN$ using homologous recombination. We also constructed its complementary strain and *lacZ* fusion report strain through plasmid conjugation transfer. Transcriptional regulation of Zur protein on *cntRLMN* was studied by beta-galactoside enzyme activity assay. *In vitro* binding of Zur protein to *cnt* promoter and mutated fragments of *cnt* promoter was tested using EMSA. The zinc ion uptake function of *cntR*, *cntL*, *cntN* and other genes in the *cntRLMN* operon was examined through growth curve analysis. Finally, the influence of *cntRLMN* mutation on the virulence of *P. aeruginosa* was studied using the infection model of the wax moth larva. [Results] The enzyme activity analysis of *lacZ* transcription and fusion showed that *cntRLMN* was negatively regulated by Zur protein, and its expression was induced by zinc ion starvation in a Zur-dependent manner. The EMSA results showed that the promoter of *cntRLMN* could bind His-Zur to form a DNA-protein complex, where the binding site was GCGTTATAGTATATCAT. The growth curve and the infection experiment of the wax moth larva showed that *ZnuBC* and *CntRLMN* were functionally complementary; when grown in Zn-restricted culture, the toxicity of *P. aeruginosa* to the wax moth larvae was significantly inhibited only in the *znuBC* and *cntRLMN* double-deleted strain. [Conclusion] The *cntRLMN*, which plays an important role in toxicity of *P. aeruginosa*, is likely an alternative zinc ion uptake system directly and negatively regulated by the Zur protein.

Keywords: *Pseudomonas aeruginosa*, zinc intake, *cntRLMN*, Zur, EMSA

(本文责编: 李磊)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (31700031, 31860012), by the Natural Science Basic Research Plan in Shaanxi Province of China (2018JQ3004), by the Scientific Research Program Funded by the Shaanxi Provincial Education Department (17JS138), by the General Social Development Project of Shaanxi Province (2018SF-165), by a Grant from the Outstanding Young Talent Support Plan of the Higher Education Institutions of Shaanxi Province, by the Startup Foundation for Doctors of Yan'an University (YDBK2016-01, YDBK2016-11), by the National Innovation and Entrepreneurship Training Program for College Students (201813008, 201813019), and by the Shaanxi University Student Innovation and Entrepreneurship Training Project (S201910719043, S201910719081)

*Corresponding author. Tel: +86-911-2332030; E-mail: linjinshui@yau.edu.cn

Received: 20 July 2019; Revised: 29 October 2019; Published online: 10 March 2020