

## 铜绿假单胞菌中Ⅲ型分泌系统受 Rhl 和 PQS 群体感应系统调节

孔伟娜, 梁海华, 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, 西安 710069)

**摘要** 【目的】研究铜绿假单胞菌中群体感应系统( quorum sensing ,QS)与Ⅲ型分泌系统( type III secretion system ,T3SS )间的关系。【方法】通过基因敲除的方法破坏铜绿假单胞菌 QS 系统相关基因,将 T3SS 相关基因 *exoS*、*exoY*、*exoT*、*exsD-pscA-L* 启动子-报道子 *luxCDABE* 融合体整合到野生型菌株及 QS 系统突变菌株的染色体组上,通过检测启动子活性,比较这些基因在不同菌株中的表达情况。【结果】研究结果表明,T3SS 中的 *exoS* 与 *exoT* 在 *pqsR* 基因突变体中的表达有明显的增强,Rhl 系统对这四种基因的表达具有抑制作用,而 Las 系统存在与否对 T3SS 基本没有影响。【结论】铜绿假单胞菌中的 Rhl 系统和喹诺酮信号( *Pseudomonas* quinolone signal ,PQS)系统对 T3SS 相关基因的表达具有重要的调节作用。

**关键词**: 铜绿假单胞菌; 群体感应系统; Ⅲ型分泌系统; 基因敲除; 整合

中图分类号: Q933 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209(2009)09-1158-07

铜绿假单胞菌( *Pseudomonas aeruginosa* )是一种独特的革兰氏阴性机会致病菌,可以感染植物、动物以及人类。在人类机体免疫低下的情况下,它几乎可以感染人体的任何组织并常常可以造成病人死亡。目前临床上对于铜绿假单胞菌感染治疗效果不理想,耐药现象普遍,是医院感染死亡的主要原因之一<sup>[1]</sup>。

铜绿假单胞菌的感染由多种致病机理引起,其中的群体感应系统( quorum sensing ,QS)和Ⅲ型分泌系统( type III secretion system ,T3SS)与其致病性有很大关系<sup>[2-3]</sup>。

细菌的群体感应系统是一个依赖于细胞数量的基因调控系统。它通过产生并感应某一特定种类的信号分子-自诱导物( autoinducer ,AI)来调节众多基因的表达<sup>[4]</sup>。在铜绿假单胞菌中,至少存在 3 套完整的群体感应系统,即 acyl-homoserine lactone ( HSL)类信号分子介导的 Las 和 Rhl 系统以及 2-Alkyl-4

(1H)-quinolone ( AHQ)类信号分子介导的群体感应系统。在 Las 系统中,LasI 催化 3-O-C12-HSL ( N-3-oxododecanoyl homoserine lactones )的合成,该信号分子与转录激活蛋白 LasR 结合并使之激活<sup>[5]</sup>。同样,在 Rhl 系统中,RhII 催化 C4-HSL ( N-butyl homoserine lactones )的合成,C4-HSL 与 RhIR 结合并使之激活<sup>[6]</sup>。铜绿假单胞菌中的另一种独特的 QS 系统由 AHQ 类信号分子介导,AHQ 类信号分子主要包括 2-heptyl-3-hydroxy-4-quinolone ( *Pseudomonas* quinolone signal ,PQS)与 2-heptyl-4-quinolone ( HHQ)两种,其中 PQS 信号分子的合成需要 *pqsABCDE*、*phnAB* 及 *pqsH* 操纵子编码的酶参与,而 *pqsABCDE*、*phnAB* 操纵子的转录受到转录调节子 PqsR( MvfR)的调节<sup>[7-8]</sup>。研究表明铜绿假单胞菌中的 QS 系统参与调节多种胞内和分泌型的毒性因子的表达<sup>[2]</sup>。同时,这 3 种 QS 系统间具有级联关系<sup>[9-10]</sup>。

革兰氏阴性菌中主要有五种类型蛋白分泌系

基金项目:国家自然科学基金(30870097,30611120520)教育部重点项目资助

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

作者简介:孔伟娜(1984-),女,河南开封人,硕士研究生,研究方向为分子微生物学。E-mail: douzikwn@163.com

收稿日期: 2009-02-27; 修回日期: 2009-04-25

统,其中的 T3SS 与细菌的致病性密切相关。在铜绿假单胞菌中,细菌通过 T3SS 可以直接将几种毒素蛋白注入真核宿主细胞中,调控宿主细胞基因表达,从而抑制宿主的免疫反应及清除细菌的能力<sup>[3]</sup>。T3SS 的表达与环境条件密切相关,其中低  $Ca^{2+}$  浓度以及与宿主细胞的接触是其相关基因表达的两个诱导条件<sup>[11-12]</sup>。目前研究较多的毒素蛋白主要有 4 种:胞外酶 S (ExoS)、胞外酶 T (ExoT)、胞外酶 U (ExoU)、胞外酶 Y (ExoY)<sup>[11]</sup>,这些毒素蛋白介导的宿主组织损伤通过蔓延可以导致全身性的感染以及败血症的发生<sup>[3]</sup>。临床对照研究表明,患者感染表达 T3SS 的铜绿假单胞菌较之对照组有更高的病死率及败血症的发生率<sup>[3]</sup>。

鉴于 QS 系统和 T3SS 与铜绿假单胞菌的致病性均有很大关系,因此研究两个系统间的调控关系对于了解并最终控制病原菌的致病过程具有重要意义。以前的研究表明,铜绿假单胞菌 QS 系统中的 Rhl 系统对除 *exsCBA* (T3SS 调节基因簇)之外的其它 T3SS 相关基因的表达均有抑制作用, Las 系统对

T3SS 基本没有调控作用<sup>[13-14]</sup>,而 PQS 信号分子介导的 QS 系统与 T3SS 的关系尚未有人研究。

本实验通过基因敲除的方法破坏铜绿假单胞菌 QS 系统中的相关基因,将 T3SS 相关基因启动子-报道子融合体整合到野生型菌株及 QS 系统突变菌株的染色体组上,研究 QS 系统与 T3SS 间的相互关系。研究结果表明,除 Rhl 系统对 T3SS 具有负调节作用以外, PQS 信号分子介导的 QS 系统对 T3SS 相关基因表达的也有明显的负调节作用,这一作用对铜绿假单胞菌的致病过程有重要影响。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 菌株、质粒和引物:**本实验所用菌株和质粒见表 1,引物见表 2。

**1.1.2 培养基:**LB 培养基。假单胞分离琼脂培养基(PIA)。对于大肠杆菌,在 LB 中抗生素的浓度为:氨苄青霉素(Ampicillin, Amp)100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、卡那霉素(Kanamycin, Kn)50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、庆大霉素(Gentamicin,

表 1 菌株和质粒

Table 1 Strains and plasmids used in this study

Strain or plasmid	Genotype or phenotype	Source or reference
<i>E. coli</i>		
DH10B	$F^-$ <i>merA</i> $\Delta$ ( <i>mrr-hsdRMS-merBC</i> ) 80 <i>dlacZ</i> $\Delta$ M15 $\Delta$ <i>lacX74 deoR recA1 endA1 araD139 <math>\Delta</math> <i>ara leu</i> <math>\gamma</math>697 <i>galU galK</i> <math>\lambda^-</math> <i>rpsL nupG</i></i>	Invitrogen
<i>P. aeruginosa</i>		
PAO1	Wild type lab strain	This lab
PAOD100	<i>rhlI</i> knockout mutant of PAO1	This lab
PAO1( $\Delta$ <i>pqsR</i> )	<i>pqsR</i> knockout mutant of PAO1 ;Gm <sup>r</sup>	This study
PAOD100( $\Delta$ <i>pqsR</i> )	<i>rhlI</i> and <i>pqsR</i> knockout mutant of PAO1 ;Gm <sup>r</sup>	This study
PAO214	<i>lasI</i> knockout mutant of PAO1	This lab
Plasmids		
pEX18Amp	<i>oriT</i> <sup>+</sup> <i>sacB</i> <sup>+</sup> gene replacement vector with multiple-cloning site from pUC18 ;Amp <sup>r</sup>	[ 15 ]
pZ1918-lacZ	Source plasmid of Gm <sup>r</sup> cassette	[ 16 ]
pRK2013	Broad-host-range helper vector ;Tra <sup>+</sup> ;Kn <sup>r</sup>	[ 17 ]
CTX6.1	Integration plasmid ;Tc <sup>r</sup>	This lab
pMS402	Expression reporter plasmid carrying the promoterless <i>luxCDABE</i> ;Kn <sup>r</sup> ;Tmp <sup>r</sup>	[ 18 ]
pEX18Amp- <i>pqsR</i>	pEX18Amp with a 1.1 kb PCR fragment of <i>pqsR</i> gene	This study
pEX18Amp- <i>pqsRlacZ</i>	<i>pqsR</i> knockout plasmid pEX18Amp with 537 bp upstream region ;Gm <sup>r</sup> -lacZ fragment from pZ1918-lacZ and 533 bp downstream region of <i>pqsR</i> ;Amp <sup>r</sup> ;Gm <sup>r</sup>	This study
pKD- <i>exoS</i>	pMS402 containing <i>exoS</i> promoter region ;Kn <sup>r</sup> ;Tmp <sup>r</sup>	[ 18 ]
pKD- <i>exoY</i>	pMS402 containing <i>exoY</i> promoter region ;Kn <sup>r</sup> ;Tmp <sup>r</sup>	[ 18 ]
pKD- <i>exoT</i>	pMS402 containing <i>exoT</i> promoter region ;Kn <sup>r</sup> ;Tmp <sup>r</sup>	[ 18 ]
pKD- <i>exsD</i>	pMS402 containing <i>exsD-pscA-L</i> promoter region ;Kn <sup>r</sup> ;Tmp <sup>r</sup>	This study
pKD-CTX- <i>exoS</i>	Integration plasmid ;CTX6.1 with a fragment of pKD- <i>exoS</i> ;Kn <sup>r</sup> ;Tmp <sup>r</sup> ;Tc <sup>r</sup>	This lab
pKD-CTX- <i>exoY</i>	Integration plasmid ;CTX6.1 with a fragment of pKD- <i>exoY</i> ;Kn <sup>r</sup> ;Tmp <sup>r</sup> ;Tc <sup>r</sup>	This lab
pKD-CTX- <i>exoT</i>	Integration plasmid ;CTX6.1 with a fragment of pKD- <i>exoT</i> ;Kn <sup>r</sup> ;Tmp <sup>r</sup> ;Tc <sup>r</sup>	This lab
pKD-CTX- <i>exsD</i>	Integration plasmid ;CTX6.1 with a fragment of pKD- <i>exsD</i> ;Kn <sup>r</sup> ;Tmp <sup>r</sup> ;Tc <sup>r</sup>	This study

Gm<sup>r</sup> :Gentamicin resistance ;Amp<sup>r</sup> :Ampicillin resistance ;Kn<sup>r</sup> :Kanamycin resistance ;Tc<sup>r</sup> :Tetracycline resistance ;Tmp<sup>r</sup> :Trimethoprim resistance.

表 2 引物

Table 2 Primers

Primer		Sequence(5'→3')	Size/bp	Restriction site
<i>pqsR</i> upstream	S1	GCGGAATTCATCGAGTCTCGACGCTT	27	<i>EcoR</i> I
	A1	ATACCCGGTTCGATGGTATGGCGATA	27	<i>Sma</i> I
<i>pqsR</i> downstream	S2	ATACCCGGGCCCGCTCAACCAGTGGC	27	<i>Sma</i> I
	A2	GCGAAGCTTCTACTCTGCTGGCGGCGC	27	<i>Hind</i> III
<i>lacZ</i>	pZ	AGATCGCACTCCAGCCAG	18	
<i>exsD-pscA-L</i> promoter	S3	CGTCTCGAGCGACATGAGCATCGTGC	26	<i>Xho</i> I
	A3	ATAGGATCCAGCCACCACGGATACCC	27	<i>Bam</i> HI

Gm)15  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、四环素(Tetracycline, Tc)15  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。对于铜绿假单胞菌,在PIA中抗生素的浓度:庆大霉素150  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

**1.1.3 主要仪器和试剂:**多功能酶标仪 Synergy 2 (BioTek);离心机 Centrifuge5415D、Centrifuge5810R、PCR仪、微量可调移液器、电转化仪 Electroporator 2510 (Eppendorf);Cooling Bath CBN 8-30 (Heto-Holten AS);凝胶成像系统 GeneGenius Bio imaging system (SYNGENE);LAS-3000 (FUJIFILM);96孔板 (Costar);电泳仪 Electrophoresis systems (Bio-RAD);质粒微量提取试剂盒 (北京博大泰克公司);DNA产物纯化试剂盒 (鼎国公司);氨苄青霉素、卡那霉素、庆大霉素、四环素、DMSO、EGTA (Amresco公司);引物合成 (北京奥科生物技术有限责任公司);Taq酶、dNTP (北京天为时代公司);酵母粉、胰蛋白胨 (OXOID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 PAO1( $\Delta pqsR$ )、PAOD100( $\Delta pqsR$ )突变体的构建

本实验通过基因敲除的方法获得目的基因突变体<sup>[15]</sup>。根据铜绿假单胞菌 PAO1 的 *pqsR* 基因序列设计引物,因 *pqsR* 序列中间没有合适的酶切位点插入 *lacZ* 序列,故需要设计两对引物。两对引物分别为 S1、A1 及 S2、A2 (表 2)。以 PAO1 基因组为模板,用上述两对引物分别进行 PCR 扩增,将扩增出的两个 *pqsR* 基因片段按顺序与 pEX18Amp 进行连接,得到质粒 pEX18Amp-*pqsR*。用 *Sma*I 从质粒 pZ1918-*lacZ*<sup>[16]</sup>上单酶切下来一段大小约 4 kb 含 Gm 抗性基因和 *lacZ* 基因的片段,将同样用 *Sma*I 酶切的 pEX18Amp-*pqsR* 与该 *lacZ* 片段进行连接,得到质粒 pEX18Amp-*pqsRlacZ*。载体构建好后用三亲株杂交的方法进行同源重组。供体菌是含有质粒 pEX18Amp-*pqsRlacZ* 的大肠杆菌 DH10B,受体菌分别为 PAO1 和 PAOD100,介导菌是 *E. coli*

(pRK2013)<sup>[17]</sup>。挑取杂交后长出的单克隆裂解作为模板,以 S1、A2 及 pZ 作为引物(表 2),通过 PCR 扩增验证突变株 PAO1( $\Delta pqsR$ )与 PAOD100( $\Delta pqsR$ )。

## 1.3 启动子-报道子整合体系的构建

质粒 pMS402 是带有无启动子 *luxCDABE* 报道子的载体,本实验用该质粒构建启动子-报道子融合体<sup>[18-19]</sup>。首先以 PAO1 基因组为模板,用引物 S3 与 A3 进行 PCR 扩增 *exsD-pscA-L* 操纵子(编码 T3SS 调节蛋白 *exsD* 和分泌通道组分 *Psc*)的启动子序列(表 2)得到的产物经纯化后用 *Xho*I 和 *Bam*HI 进行双酶切,与同样酶切后的 pMS402 质粒进行连接,得到质粒 pKD-*exsD*。然后用 *Pac*I 酶切该质粒,得到大小两个片段,将大片段切胶回收纯化。同时用 *Pac*I 酶切质粒 CTX6.1,该质粒可利用噬菌体结合位点进行位点专一性重组<sup>[20]</sup>。将上述大片段与 CTX6.1 进行连接,得到质粒 pKD-CTX-*exsD*。通过三亲株杂交的方法将该启动子-报道子融合体整合到 PAO1 及四种 QS 系统突变体的染色体组上。用同样的方法将 pKD-CTX-*exoS*、pKD-CTX-*exoY*、pKD-CTX-*exoT* 分别整合到上述菌株中。

## 1.4 测定 T3SS 相关基因的表达

将整合有启动子-报道子融合体的菌株在 LB 固体培养基上划线,37 $^{\circ}\text{C}$ 过夜培养。挑取单克隆接种到含 100  $\mu\text{L}$  LB 培养基的白色 96 孔板中,37 $^{\circ}\text{C}$ 、200 r/min 培养 12 h。然后按 5% 接种量转接到新鲜 LB 培养基中,继续培养 3 h。取转接后菌液用培养基做 1:20 稀释,取 100  $\mu\text{L}$  加入黑色底部透明 96 孔板中,同时用 50  $\mu\text{L}$  矿物油覆盖。在多功能酶标仪 Synergy 2 仪器上测定其 CPSX *luxCDABE* 的发光值(和  $OD_{600}$  值)。

## 2 结果

### 2.1 PAO1( $\Delta pqsR$ )、PAOD100( $\Delta pqsR$ )突变体的构建

*pqsR* 是 PQS 系统中的一个重要基因,为了研究

铜绿假单胞菌中 PQS 系统与 T3SS 的关系 本实验通过基因敲除的方法构建了两种 *pqsR* 基因突变体：PAO1( $\Delta pqsR$ )及 PAOD100( $\Delta pqsR$ )，其中 *rhlI* 与 *pqsR* 双突变株 PAOD100( $\Delta pqsR$ )的构建是为了研究 Rhl 与 PQS 两种系统对 T3SS 共同作用。敲除实验的原理是利用同源重组，将基因组相应基因的编码框去除或插入一段核苷酸序列，从而破坏正常编码框的阅读，使蛋白失去功能。将通过基因敲除方法获得的 *pqsR* 基因突变体经 PCR 扩增后进行琼脂糖凝胶电泳，PAO1 及 PAOD100 菌株能扩增出 1.1 kb 左右的条带，突变株 PAO1( $\Delta pqsR$ )、PAOD100( $\Delta pqsR$ )由于 *pqsR* 基因中间插入了一段 4 kb 左右的 *lacZ* 片段，故扩增不出 1.1 kb 的条带，而 S1 和 A2 中的一条引物可以和  $\rho Z$  扩增出 0.9 kb 左右的条带(图 1)。

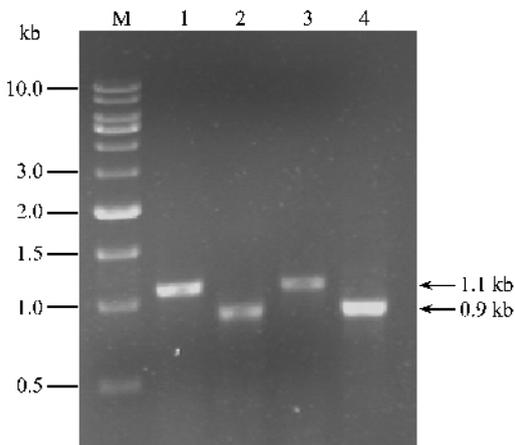


图 1 突变体 PCR 验证凝胶电泳图

Fig.1 Agarose gel electrophoresis graph of the PCR products for identifying the mutants. M, 1 kb DNA marker; 1, PAO1; 2, PAO1( $\Delta pqsR$ ); 3, PAOD100; 4, PAOD100( $\Delta pqsR$ ).

## 2.2 诱导或非诱导条件下 T3SS 相关基因的表达

T3SS 相关基因的表达受多种因素的影响，其中低  $Ca^{2+}$  浓度是其表达的主要诱导条件。实验中通过添加  $Ca^{2+}$  螯合剂 5 mmol/L EGTA 与 20 mmol/L  $MgCl_2$  到 LB 培养基中来实现 T3SS 诱导条件，以 LB 培养基作为 T3SS 非诱导条件<sup>[14]</sup>。在 96 孔板中分别检测这两种条件下 *exoS*、*exoY*、*exoT* 基因及 *exsD-pscA-L* 操纵子在 PAO1 菌株的表达情况和菌株生长情况，结果见图 2。

图 2 结果显示，在 T3SS 诱导条件下，整合有 *exoS* 基因启动子的 PAO1 菌株的发光强度较非诱导条件下有明显增强，同时  $OD_{600}$  值有些下降，这可能与一些和生长相关的金属离子被螯合有关。其它 3 种基因或操纵子也有同样的表现(数据未附)。这一结果说明，上述四种 T3SS 相关基因的高表达均需依赖低  $Ca^{2+}$  浓度。

## 2.3 T3SS 相关基因在不同 QS 突变体中的表达

为了研究铜绿假单胞菌中 QS 系统与 T3SS 的关系，在 96 孔板中分别检测 *exoS*、*exoY*、*exoT* 基因及 *exsD-pscA-L* 操纵子在 PAO1、PAOD100、PAO1( $\Delta pqsR$ )、PAOD100( $\Delta pqsR$ )、PAO214 等 5 种菌株中的表达情况和生长情况。在生长情况基本一致的情况下(生长曲线未附)，T3SS 诱导条件下的表达情况见图 3 和表 3。

图 3 结果显示，在生长情况基本一致的情况下，*exoS*、*exoT*、*exoY*、*exsD-pscA-L* 在 PAOD100 及 PAOD100( $\Delta pqsR$ )两种菌株中的表达较野生型菌株 PAO1 均有明显的增强，表明这四种 T3SS 相关基因的表达均受到 *rhlI* 基因的负调节。

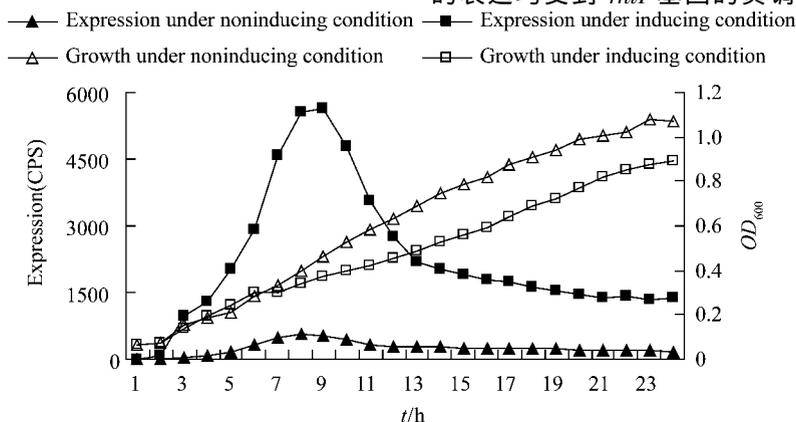


图 2 诱导或非诱导条件下 *exoS* 基因在 PAO1 菌株中的表达曲线和菌株生长曲线

Fig.2 Expression of *exoS* in PAO1 and the growth of the strain under inducing or non-inducing conditions. The left Y-axis indicates CPS value, the right shows  $OD_{600}$  value, the X-axis represents times course. The expression levels are shown as solid symbols and growth in hollow symbols. Inducing condition is represented by squares and non-inducing condition by triangles. The experiments were repeated at least three times and the data shown are representatives of similar results.

同样,为了检测 *pqsR* 基因与 T3SS 间的关系,分别测定了这 4 种基因在 PAO1( $\Delta pqsR$ )和 PAOD100( $\Delta pqsR$ )突变体中的表达情况。在生长情况基本一致的情况下,*exoS* 与 *exoT* 基因在 PAO1( $\Delta pqsR$ )及 PAOD100( $\Delta pqsR$ )两种菌株中的表达较 PAO1 有不同程度的增强(图 3-A,C)。而 *exoY* 与 *exsD-pscA-L* 在

PAO1( $\Delta pqsR$ )中的表达情况与在 PAO1 中基本一致,在 PAOD100( $\Delta pqsR$ )中的表达情况与 PAOD100 基本一致(图 3-B,D)。这说明 *exoS* 与 *exoT* 基因的表达受到 *pqsR* 基因的负调节,而 *pqsR* 对 *exoY* 与 *exsD-pscA-L* 的表达基本没有影响。

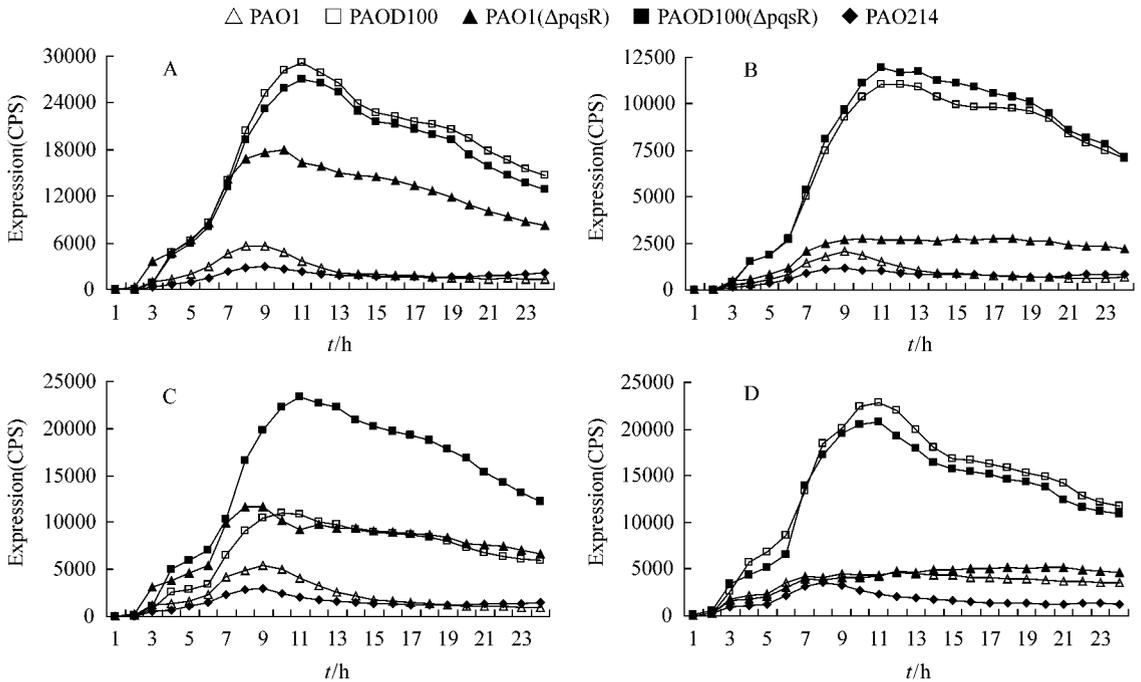


图 3 诱导条件下 T3SS 相关基因在不同菌株中的表达曲线

Fig.3 Expression of T3SS genes in different strains under inducing condition. A The expression of *exoS*; B The expression of *exoY*; C The expression of *exoT*; D The expression of *exsD-pscA-L*. The Y-axis indicates CPS value; the X-axis represents times course. PAO1: hollow triangles; PAOD100: hollow squares; PAO1( $\Delta pqsR$ ): solid triangles; PAOD100( $\Delta pqsR$ ): solid squares; PAO214: solid diamonds. The experiments were repeated at least three times, and curves shown are representatives of similar results.

表 3 T3SS 相关基因在各种条件下的表达情况

Table 3 Expression of T3SS genes under different conditions

Gene	Fold induction in $Ca^{2+}$ depletion	Fold induction in PAOD100	Fold induction in PAO1( $\Delta pqsR$ )	Fold induction in PAOD100( $\Delta pqsR$ )	Fold induction in PAO214
<i>exoS</i>	10	5.2	3.2	4.8	No change
<i>exoY</i>	20	5.4	No change	5.8	No change
<i>exoT</i>	14.7	2	2.2	4.3	No change
<i>exsD-pscA-L</i>	5.1	5	No change	4.5	No change

The values represent fold activation compared to wild type or calcium rich conditions.

对于 Las 系统突变体,在生长情况基本一致的情况下,这四种 T3SS 相关基因在 PAO214 菌株中的表达情况较 PAO1 差别不大(图 3),这说明 *lasI* 基因对 T3SS 相关基因的表达没有明显的调节作用。

同时,在 T3SS 非诱导条件下测定的结果与以上结果基本一致(数据未附)。

### 3 讨论

在铜绿假单胞菌中,群体感应系统及 III 型分泌系统与该菌致病性有很大关系,前者调节多种毒性因子的表达,后者是铜绿假单胞菌最重要的毒性因子系统之一。以前的研究表明,Rhl 系统对除

*exsCBA* 操纵子之外的其它 T3SS 相关基因的表达均有抑制作用,这也是目前在铜绿假单胞菌中发现的唯一 1 个受 Rhl 系统抑制的致病因子系统<sup>[14]</sup>。

铜绿假单胞菌中主要存在 3 套完整的群体感应系统,这 3 种 QS 系统间具有级联关系。其中,PQS 系统是连接 Las 系统和 Rhl 系统的纽带。一方面,PQS 系统调控 Rhl 系统基因的表达,*pqsR* 基因编码的蛋白 PqsR 对 *rhlI* 基因的表达有激活作用<sup>[9]</sup>;另一方面,PQS 的合成受到 Las 和 Rhl 系统的控制,合成 PQS 所需基因 *pqsR* 的转录分别受到 LasR 蛋白的正调控和 RhlR 蛋白的负调控<sup>[10]</sup>。本文着重研究了 PQS 系统与 T3SS 的关系。

本文采用基因敲除的方法构建 QS 系统突变体,将 T3SS 相关基因启动子-报道子 *luxCDABE* 融合体整合到不同菌株染色体组上,使其能够更稳定的复制与表达。通过对 T3SS 相关基因在这些突变菌株中的表达情况进行检测,可以很直观的研究这两个系统之间的关系。由实验结果可知,T3SS 相关基因的高表达均需依赖低  $Ca^{2+}$  浓度(图 2)。此外,Rhl 系统对 4 种 T3SS 相关基因的表达均有抑制作用,而 Las 系统对 T3SS 基本没有调控作用(图 3,表 3),这与以往的研究结果一致<sup>[13-14]</sup>。同时,实验结果首次表明,铜绿假单胞菌 PQS 系统中的 *pqsR* 基因对 T3SS 中 *exoS* 与 *exoT* 基因的表达有不同程度的抑制作用,但对 *exoY* 及 *exsD-pscA-L* 没有调节作用(图 3,表 3)。

以前的研究表明,*pqsR* 基因编码的蛋白 PqsR 对 *rhlI* 基因的表达有激活作用<sup>[9]</sup>,故 PQS 系统对 T3SS 的调节有可能是通过激活 Rhl 系统而表现出来的。如果如此,T3SS 相关基因在 Rhl 系统单突变体及 Rhl 与 PQS 系统双突变体中的表达应该一致。从图 3A 我们可以看到,*exoS* 的表达正是如此。然而在图 3C 和表 3 中我们可以看到,*exoT* 基因在这两种突变体中的表达并不一致。其中 *exoT* 基因在 *rhlI* 突变体中的表达较野生型菌株增加了 2 倍,在 *pqsR* 突变体中的表达增加了 2.2 倍,而在 *rhlI* 及 *pqsR* 双突变体中的表达增加了 4.3 倍,这一现象说明 Rhl 系统与 PQS 系统作为两种不同的途径,均参与了对 *exoT* 基因表达的调节。因此,QS 对 T3SS 相关基因的调节是一个复杂的过程,对于 T3SS 中的不同成员,QS 的调节也不相同。为了最终了解铜绿假单胞菌这一重要致病菌的致病机理,进一步研究 QS 与 T3SS 之间的关系将很有必要。

## 参考文献

- [ 1 ] Bodey GP ,Bolivar R ,Fainstein V ,et al. Infections caused by *Pseudomonas aeruginosa* . *Reviews of Infectious Diseases* , 1983 5( 2 ) 279 - 313 .
- [ 2 ] Smith RS ,Iglewski BH. *P. aeruginosa* quorum-sensing systems and virulence . *Current opinion in Microbiology* , 2003 6 56 - 60 .
- [ 3 ] Roy-Burman A ,Savel RH ,Racine S ,et al. Type III protein secretion is associated with death in lower respiratory and systemic *Pseudomonas aeruginosa* infections . *The Journal of infectious diseases* 2001 ,183 :1767 - 1774 .
- [ 4 ] Greenberg EP. Bacterial communication :tiny teamwork . *Nature* 2003 424 :134 .
- [ 5 ] Gambello MJ ,Iglewski BH. Cloning and characterization of the *Pseudomonas aeruginosa lasR* gene , a transcriptional activator of elastase expression . *Journal of bacteriology* , 1991 ,173 3000 - 3009 .
- [ 6 ] Pearson JP ,Passador L ,Iglewski BH , et al. A second N-acylhomoserine lactone signal produced by *Pseudomonas aeruginosa* . *Proceedings of the National Academy of Sciences* ,1995 92 :1490 - 1494 .
- [ 7 ] Diggle SP ,Cornelis P ,Williams P , et al. 4-quinolone signalling in *Pseudomonas aeruginosa* :old molecules ,new perspectives . *International Journal of Medical Microbiology* , 2006a 296 83 - 91 .
- [ 8 ] Deziel E ,Lepine F ,Milot S , et al. Analysis of *Pseudomonas aeruginosa* 4-hydroxy-2-alkylquinolines ( HAQs ) reveals a role for 4-hydroxy-2-heptylquinoline in cell-to-cell communication . *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2004 ,101 :1339 - 1344 .
- [ 9 ] Diggle SP ,Winzer K ,Chhabra SR ,et al. The *Pseudomonas aeruginosa* quinolone signal molecule overcomes the cell density-dependency of the quorum sensing hierarchy , regulates *rhl*-dependent genes at the onset of stationary phase and can be produced in the absence of LasR . *Molecular Microbiology* 2003 50 29 - 43 .
- [ 10 ] McGrath S ,Wade DS ,Pesci EC. Dueling quorum sensing systems in *Pseudomonas aeruginosa* control the production of the *Pseudomonas* quinolone signal ( PQS ) . *FEMS Microbiology Letters* 2004 230 27 - 34 .
- [ 11 ] Frank DW. The exoenzyme S regulon of *Pseudomonas aeruginosa* . *Molecular Microbiology* ,1997 , 26 621 - 629 .
- [ 12 ] Vallis AJ ,Yahr TL ,Barbieri JT ,et al. Regulation of ExoS production and secretion by *Pseudomonas aeruginosa* in response to tissue culture conditions . *Infection and immunity* ,1999 67 914 - 920 .

- [ 13 ] Hogardt M , Roeder M , Schreff AM , et al. Expression of *Pseudomonas aeruginosa* *exoS* is controlled by quorum sensing and RpoS. *Microbiology* 2004 ,150 :843 – 851 .
- [ 14 ] Bleves S , Soscia C , Nogueira-Orlandi P , et al. Quorum sensing negatively controls type III secretion regulon expression in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Journal of bacteriology* 2005 ,187 :3898 – 3902 .
- [ 15 ] Hoang TT , Karkhoff-Schweizer RR , Kutchma AJ , et al. Schweizer. 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 :77 – 86 .
- [ 16 ] Schweizer HP. Two plasmids ,X1918 and Z1918 ,for easy recovery of the *xylE* and *lacZ* reporter genes. *Gene* ,1993 ,134 :89 – 91 .
- [ 17 ] Ditta G , Stanfield S , Corbin D , et al. 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 :7347 – 7351 .
- [ 18 ] Duan KM , Dammel C , Stein J , et al. Modulation of *Pseudomonas aeruginosa* gene expression by host microflora through interspecies communication. *Molecular Microbiology* 2003 ,50(5) :1477 – 1491 .
- [ 19 ] Liang HH , Li LL , Dong ZL , et al. The YebC family protein PA0964 negatively regulates the *Pseudomonas aeruginosa* quinolone signal system and pyocyanin production. *Journal of Bacteriology* 2008 ,190 :6217 – 6227 .
- [ 20 ] Hoang TT , Kutchma AJ , Becher A , et al. Integration-proficient plasmids for *Pseudomonas aeruginosa* : site-specific integration and use for engineering of reporter and expression strains. *Plasmid* 2000 ,43 :59 – 72 .

## Regulation of type III secretion system by Rhl and PQS quorum sensing systems in *Pseudomonas aeruginosa*

Weina Kong , Haihua Liang , 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 , China )

**Abstract** [ **Objective** ] To investigate the relationship between quorum sensing ( QS ) and type III secretion system ( T3SS ) in *Pseudomonas aeruginosa* . [ **Methods** ] We constructed several gene knockout mutants of QS systems . The promoters of the T3SS genes , *exoS* , *exoY* , *exoT* and *exsD-pscA-L* were cloned and fused upstream of the luminescence reporter gene cluster , *luxCDABE* . The reporter constructs were integrated on the chromosome in the wild type strain PAO1 and the QS mutants respectively , and the expression of the T3SS genes in these strains was compared . [ **Results** ] The expression of *exoS* and *exoT* in *pqsR* mutant was increased significantly . The Rhl system repressed the activities of the four T3SS genes and the Las system had no effect . [ **Conclusion** ] The results indicate that the Rhl and *Pseudomonas* quinolone signal ( PQS ) systems play an important role in regulating T3SS gene expression in *Pseudomonas aeruginosa* .

**Keywords** : *Pseudomonas aeruginosa* ; quorum sensing ; type III secretion system ; gene knockout ; integration

( 本文责编 : 王晋芳 )