

铜绿假单胞菌随机启动子库的构建及 受铁调控基因的筛选和鉴定

王琰, 魏金花, 沈立新, 段康民*

(西北大学生命科学学院, 西部资源生物与现代生物技术教育部重点实验室, 西安 710069)

摘要:【目的】针对铁这种几乎所有微生物都必需的, 对病原菌尤为重要的营养元素, 在全基因组水平上检测铜绿假单胞菌的铁感应基因。【方法】采用含 *LuxCDABE* 报道子的质粒 pMS402 为载体, 构建了铜绿假单胞菌的随机启动子库, 建立了特定条件下研究铜绿假单胞菌全基因组基因表达变化的高通量平台。【结果】验证了 2 个已知的受铁调控的基因, 并发现了尚未报道的二氢叶酸还原酶, 磷酸葡萄糖脱水酶和柠檬酸铁转运蛋白受铁调控的现象, 发现与铁相关的四个功能未知的基因和 3 个假定蛋白的基因。【结论】研究结果对于阐明铁在铜绿假单胞菌中的调控作用, 揭示铁对细菌生理及致病性的作用机制提供了理论基础。随机启动子库的构建也为细菌基因组水平研究基因表达提供了一个有用的工具。

关键词: 铜绿假单胞菌; 随机启动子库; 铁; 基因调控

中图分类号: Q933 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209 (2008) 07-0863-06

铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) 是一种革兰氏阴性条件致病菌, 可以在人群中引起严重的急性和慢性感染, 是病人在医院期间发生感染的第三大致病菌^[1]。近年来, 铜绿假单胞菌更成为支气管扩张、慢性支气管炎、囊性肺纤维化等基础疾病继发感染的重要致病菌, 而且铜绿假单胞菌的一个重要特性是它对许多抗生素具有很高的内在抗药性^[2]。因此研究铜绿假单胞菌的致病性和抗药性机制具有重要的现实意义。

铁对几乎所有的微生物来说是一种必需的营养元素^[3]。铜绿假单胞菌喜好有氧代谢, 需要铁作为其呼吸作用中多种酶的辅助成分发生作用。然而在宿主体内, 铁离子的浓度非常低^[4], 几乎所有的铁离子都与血红蛋白、铁转运蛋白和乳铁转运蛋白相结合, 使感染微生物难以利用^[5]。铜绿假单胞菌进化出多种铁获取机制, 包括铁载体的释放, 细胞外蛋白酶的产生,

细胞外毒素和溶血素的分泌等。通常地, 这些毒性因子被铁摄取调节子 (Ferric uptake regulator, Fur)^[6] 紧密调控, 从而在铁受限的条件下破坏寄主细胞, 满足自身对铁的需求。因此, 在铜绿假单胞菌全基因组水平上对铁感应基因的研究, 有助于系统了解铜绿假单胞菌的铁代谢及铁调控途径、有助于了解假单胞菌进入宿主后基因表达的变化。

在全基因组水平进行研究的方法, 目前多用微阵列以及微分荧光感应检测等。微阵列分析的重复性及标准性使其操作上比较复杂^[7]。微分荧光感应检测 (Differential Fluorescence Induction, DFI) 在根据荧光水平通过细胞流计数进行细胞分类上存在技术挑战^[8]。而且目前使用上述两种方法检测铁在全基因组水平上对细菌影响的报道较少^[9, 10]。本实验采用 pMS402^[11] 为载体建立了铜绿假单胞菌的随机启动子库, 在此平台上采用高通量的方法通过基因的不同表

基金项目: 国家自然科学基金(30470098); 重大基础研究前期研究专项(2004CCA01700)

*通讯作者: Tel: +86-29-88302132; Fax: +86-29-88305288; E-mail: kduan@nwu.edu.cn

作者简介: 王琰(1982-), 女, 河南荥阳人, 硕士研究生, 主要从事铜绿假单胞菌的耐药性研究。E-mail: 900smile@163.com

收稿日期: 2008-02-03; 修回日期: 2008-03-15

达图谱筛选了铁在全基因组水平上对铜绿假单胞菌的影响,结果验证了2个已知的与铁调控相关的基因,发现了10个未经报道的与铁调控相关的基因,该方法可以高通量、高灵敏度地检测随机启动子库在多种条件下的表达情况,并且具有良好的重复性和可操作性,为在全基因组水平上研究铜绿假单胞菌提供了良好平台。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株、培养基以及生长条件:铜绿假单胞菌 PAO1^[12]、大肠杆菌 (*Escherichia coli*) DH5 α 、质粒 pMS402(图1)均为本实验室保存。pMS402载体的特性是具有卡那霉素和甲氧苄氨嘧啶的抗性基因,一个多克隆位点,以及缺失启动子的报道基因 *luxCDABE*,并带有强转录终止子。铜绿假单胞菌和大肠杆菌在常规培养用 LB 培养基中 37 有氧培养。根据需要分别添加卡那霉素 (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 和甲氧苄氨嘧啶 (300 $\mu\text{g}/\text{mL}$),低铁和高铁条件通过分别添加 200 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 2,2-联吡啶和 100 $\mu\text{mol}/\text{L}$ FeCl_3 到 LB 培养基中来实现^[13]。

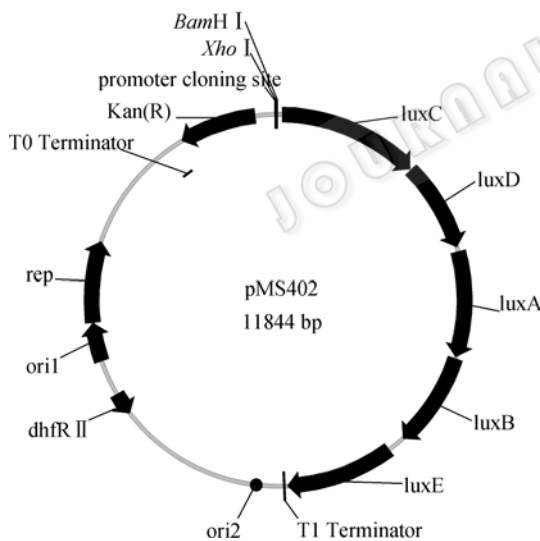


图1 报道质粒 pMS402

Fig. 1 The reporter plasmid pMS402. The features of pMS402 include strong transcriptional terminators, unique promoter cloning sites, and promoterless *luxCDABE* of *Photobacterium luminescens*. Activity of the cloned promoter can be easily detected by light production.

1.1.2 主要试剂和仪器:限制性内切酶 *Sau3A*、*BamH*、小牛肠碱性磷酸酶 (CIP) 购自美国 New England BioLabs 公司; T4DNA 连接酶由 TaKaRa 公

司提供; DNA 产物纯化试剂盒购自北京天为时代公司;卡那霉素、甲氧苄氨嘧啶、DMSO 均购自 Amresco 公司; 2,2-联吡啶购自上海化学试剂有限公司;其他化学试剂均为分析纯;实验中所用引物由上海生物工程公司合成; LAS3000 Imaging System 为 FUJIFILM 公司产品; 96 孔板、384 孔板购自 Costar 公司; Wallac 1420 Multilabel Counter 为 Perkin-Elmer 公司产品; Vector NTI 软件由 Invitrogen 公司提供。

1.2 随机启动子库的构建方法

首先提取铜绿假单胞菌的基因组 DNA, 用 *Sau3A* 进行部分酶切, 通过琼脂糖凝胶电泳切取 1~2 kb 的 DNA 片段, 用 DNA 产物纯化试剂盒纯化、回收后, 采用 T4DNA 连接酶与经 *BamH* 和小牛肠碱性磷酸酶酶切后的 pMS402 进行连接。为增加建库的效率, 连接产物首先转化到 DH5 α 感受态细胞中: 2 μL 的连接产物添加到 50 μL 的 DH5 α 感受态细胞中混和均匀后, 加入到电转化杯中, 在电击电压为 1300 V 的条件下进行电转化。转化体在 37 恒温震荡摇床上恢复 1 h, 从最终转化产物中取 100 μL 涂布到含有卡那霉素的 LB 固体平板上, 培养 12~16 h。若 LB 平板出现克隆, 则将剩余的转化产物在 LB 液体培养基中扩大培养 6~10 h 后提取质粒。取 1 μL 提取的质粒在相同条件下电转化至铜绿假单胞菌的感受态细胞中, 37 培养转化体 1 h, 将该培养液稀释至可出现单克隆的合适浓度后, 分别取 100 μL 全部涂布到含甲氧苄氨嘧啶的 LB 固体平板上, 37 培养 12 h, 在 LAS3000 Imaging System 上检测每个克隆的发光情况。将那些具有发光的克隆用无菌牙签挑取到装有 70 μL 含甲氧苄氨嘧啶的 LB 液体培养基的黑色 384 孔板中, 37 恒温震荡培养 18 h 后加入 DMSO 于 -70 保存。

1.3 启动子库的筛选方法

为了筛选出铁感应基因, 将随机启动子库中每个单克隆用 96 针转接器转接到装有含甲氧苄氨嘧啶的低铁 LB 培养基的 384 孔板中, 37 恒温震荡培养过夜, 进行活化。然后使用 96 针转接器将活化好的所有单克隆同时转接到 384 孔板的低铁和高铁培养基中, 将 384 孔板放在 Wallac 1420 Multilabel Counter 中于 37 每隔 6 h 对菌体的发光情况进行检测, 共计检测 30 h。以低铁培养基中菌体的发光值为对照, 将在高铁培养基中发光值有 3 倍或 3 倍以上变化的克隆挑出, 采用同样的方法转接至另一个 384 孔板中, 每隔 2 h 检测其发光值, 共计检测 28 h, 再将高铁条件

下发光值有 3 倍或 3 倍以上变化的克隆挑出。最后将筛选出的阳性克隆转接到底部透光的黑色 96 孔板中, 在 Wallac 1420 Multilabel Counter 中每隔 0.5 h 检测其发光值, 同时检测其生长 (OD_{595}), 共计检测 24 h^[14]。

1.4 DNA 测序和序列分析

铁感应基因的启动子使用 pZE.05(5'-CCAGCTGGCAATTCCGA-3')和 pZE.06(5'-AATCATCACTTCGGGAA-3')分别作为正向和反向引物进行 PCR 扩增^[14], 它们分别结合于载体 pMS402 启动子克隆位点 *Bam*HI 的两侧。PCR 反应程序: 94 5 min; 94 40 s 50 40 s 72 2 min 30 个循环 72 10 min。对筛选出的铁感应基因进行 PCR 扩增, 扩增产物使用 pZE.06 进行测序, 然后将序列分析结果采用 NCBI 标准核酸-核酸 BLAST 程序 blastN 与 GenBank 数据进行比对, 并使用 Vector NTI 软件进行后续分析。

2 结果

2.1 构建铜绿假单胞菌的随机启动子库

不同于构建整个基因库, 本研究构建了铜绿假单胞菌随机启动子库。该方法将经 *Sau*3A 酶切的 DNA 片段连接到 pMS402 的 *Bam*H 位点, 连接产物转化到 DH5 α 菌株进行扩增后, 提取连接质粒电转化至 PAO1 菌株, 涂布在含甲氧苄氨嘧啶的 LB 固体平板上。pMS402 载体的一个重要特性是报道子 *luxCDABE* 缺失启动子, 但是带有强转录终止子。如果连接的 DNA 片段具有启动子活性, 则不需要添加额外的底物就可以产生荧光产物, 即使启动子的活性很低也能被仪器灵敏地检测到, 而包含 pMS402 载体的菌体几乎是没有发光的。这里启动子指的是包括 RNA 聚合酶结合位点的控制基因表达的调节区域。

这样, 通过测定菌体发光的强弱来进行基因表达水平的检测, 挑选有发光的阳性克隆构成随机启动子库。将生长在含甲氧苄氨嘧啶的 LB 固体平板上的克

隆经 LAS3000 Imaging System 检测后, 从 100 块平板的大约 100000 个克隆中初步挑选了 5760 个有发光的克隆构成了随机启动子库, 相关数据见表 1。估计每 2 kb DNA 片段有一个启动子, 而铜绿假单胞菌的基因组大小为 6.3 Mbp, 因此估计此启动子库的覆盖率大约为 1.8 倍。

2.2 用铁对随机启动子库的筛选

为了筛选铜绿假单胞菌基因组中受铁调节的基因, 同时验证所构建的铜绿假单胞菌随机启动子库的应用性能, 于 384 孔板中在低铁以及高铁条件下对随机启动子库进行筛选(图 2)。在两种条件下表达有 3 倍或 3 倍以上差别的启动子以不同的颜色示意。一些在两种条件下表达有 100 倍以上差别的铁感应基因也被观察到了。以低铁条件下的基因表达情况为对照, 初步从随机启动子库的 5760 个克隆中筛选出在高铁条件下表达情况有 3 倍或 3 倍以上变化的克隆共 1666 个, 随后对这 1666 个克隆再次在两种条件下于 384 孔板中进行为期 28 h 的进一步筛选, 弃去假阳性克隆, 得到 355 个阳性克隆。随后对这 355 个阳性克隆在底部透光的 96 孔板中进行第 3 次筛选, 同时检测菌体的生长状况, 以排除菌体生长不一致引起的菌体发光值的变化。在相同的生长状况下, 挑选发光值有 3 倍或 3 倍以上变化的克隆, 并通过 2 次平行试验进行进一步验证, 最终获得 12 个铁感应菌株, 其中受到铁激活作用的有 4 株, 受到铁抑制作用的有 8 株, 见表 2。

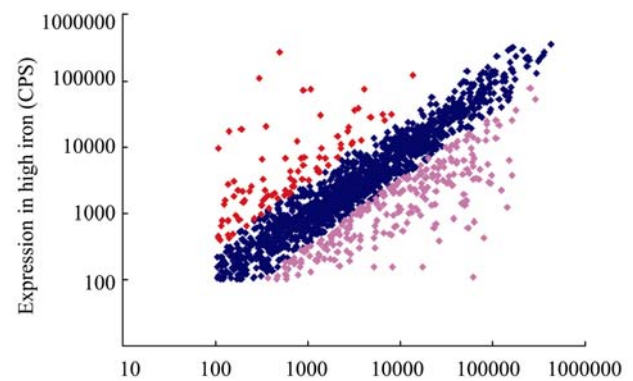


图 2 低铁和高铁条件下筛选随机启动子库的散点图

Fig. 2 Scatter plot of the initial library screening under low-versus high-iron conditions. Luminescence readings were taken at 10 h. The colored data points represent promoter clones exhibiting more than 3-fold differences in expression between the two conditions; light red and dark red represent promoters active or inhibited under low-iron condition, and blue represents promoters not influenced by iron conditions. CPS represents Counts per Second.

表 1 铜绿假单胞菌随机启动子库构建相关数据

Table 1 Statistics and summary for the construction of the *P. aeruginosa* random promoter library

Characteristic	Results
Genome size(kb)	6300
No. of predicted promoters	3150
No. of clones initially screened	100000
Size of library (No. of promoter clones)	5760
Estimated fold coverage ^a	1.8

^a Coverage with respect to predicted promoters.

表 2 测序确定的受铁调节的基因或操纵子
Table 2 List of the iron-regulated genes identified

PA number of the gene or Operon	Gene name	Fold change ^a	Function or Class
inhibited			
PA4228~4231	<i>pchDCBA</i>	-15	Pyochelin biosynthesis
PA2396	<i>pvdF</i>	-12	Pyoverdine synthetase F
PA5106		-12	Conserved hypothetical protein
PA2572		-9	Probable two-component response regulator
PA3899~3901	<i>fecA</i>	-8	Probable sigma-70 factor, ECF subfamily (3899); probable transmembrane sensor (3900); Fe() dicitrate transport protein FecA
PA3194~3187	<i>edd,glk,gltR</i>	-8	Phosphogluconate dehydratase (<i>edd</i>); glucokinase (<i>glk</i>); two-component response regulator GltR (<i>gltR</i>);probable two component sensor(3191); probable component of ABC sugar transporter
PA4980~4978		-5.5	Probable enoyl-CoA hydratase/isomerase (4980);probable acyl-CoA dehydrogenase (4979);hypothetical protein (4978)
PA3849		-5.5	Conserved hypothetical protein
active			
PA0350	<i>folA</i>	6.5	Dihydrofolate reductase
PA3402~3399		6	Hypothetical protein
PA0508		5.5	Probable acyl-CoA dehydrogenase
PA0920~0918		3	Hypothetical protein;cytochrome b561 (0918)

^aFold change of gene expression under low- versus high-iron conditions

2.3 对筛选获得的铁感应基因进行测序及分析

对筛选获得的 12 个铁感应基因进行 PCR 扩增并经核酸序列测定后,采用 NCBI 标准核酸-核酸 BLAST 程序 blastN 与 GenBank 的数据进行比对,通过 Vector NTI 软件进行分析并作出基因图谱,结果见表 2。其中 *pchD*^[15, 16]和 *pvdF*^[17-19]是经证实的受 Fur 调节的铁感应基因,其余的 10 个基因中除 3 个为功能已知的基因外,剩余的 7 个均为功能未知的基因,据推测它们可能是转运系统组成蛋白、细胞周质蛋白、膜相关蛋白、氧化还原蛋白及双组分调节子等。这些新受铁

调控基因的发现为今后进一步研究铁对铜绿假单胞菌的调节作用奠定了基础。图 3 和图 4 分别表明铁对 PA4228 基因表达的抑制和对 PA0920 基因表达的激活。

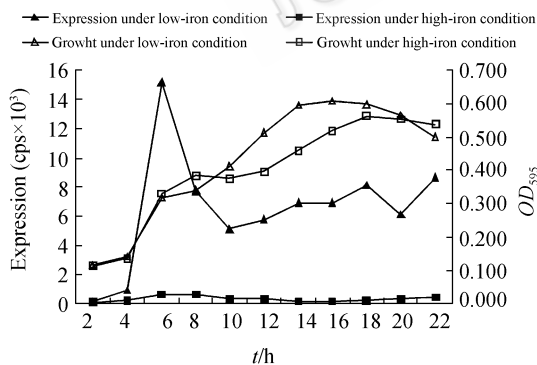


图 3 低铁和高铁条件下基因 PA4228 受铁抑制的基因表达曲线和生长曲线

Fig. 3 Expression of PA4228 and the growth of the strain harboring the PA4228 reporter plasmid under low- and high-iron conditions. The left Y-axis indicates CPS value; the right shows OD value; the X-axis represents times course. The expression levels are shown as solid symbols and growth in hollow symbols. Low-iron condition is represented by triangles and high iron condition by squares. This experiment has been repeated at least three times, and curves shown are representatives of similar results.

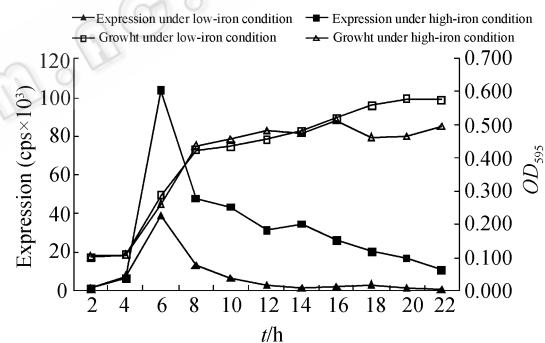


图 4 低铁和高铁条件下基因 PA0920 受铁激活作用的表达曲线和生长曲线

Fig. 4 Expression of PA0920 and the growth of the strain harboring the PA0920 reporter plasmid under low- and high-iron conditions. The left Y-axis indicates CPS value; the right shows OD value; the X-axis represents times course. The expression levels are shown as solid symbols and growth in hollow symbols. Low-iron condition is represented by triangles and high iron condition by squares. This experiment has been repeated at least three times, and curves shown are representatives of similar results.

3 讨论

本实验采用将随机的 DNA 片段克隆到缺失启动子的以 *luxCDABE* 基因作为报道子的载体上,从而检测在不同条件下该启动子受调节的情况。即使在启动子活性很低的情况下仪器也能够灵敏地检测到, *luxCDABE* 基因的表达强弱直接体现了启动子活性的

大小,因此,构建以及筛选这样一个随机启动子库非常适用于整个基因水平的表达研究。

铁对大多数生物体来说是必需的,对革兰氏阴性致病菌的毒性作用也是必需的^[17]。尽管铁是地壳中的主要成分,但是它的生物可利用程度非常低:在有氧条件或生理 pH 条件下,铁会形成难溶的氢氧化铁沉淀,使微生物难以利用。当致病菌入侵宿主体内时,其可从宿主中获得除铁以外的任何营养成分,铁的竞争性获取对致病菌成功入侵宿主具有关键作用。因此,研究低铁和高铁条件下铜绿假单胞菌基因表达的变化将有利于发现铁的获取机制,揭示铁在菌体内的代谢与调控途径,从而以铁获取和铁代谢途径为靶点,阻断其对铁的利用,发现潜在的抗感染药物。在本研究所测序的铁反应启动子中,包括了 2 个已证实的受铁调控的基因,即 *pchD* 和 *pvdF*。除此之外,还观察到了 10 个受铁调控的基因,其中 3 个为功能已知的基因,即磷酸葡萄糖脱水酶基因,二氢叶酸还原酶基因和柠檬酸铁转运蛋白基因,其余 7 个均为功能未知的基因,据推测它们可能是转运系统组成蛋白、细胞周质蛋白、膜相关蛋白、氧化还原蛋白及双组分调节子。其中磷酸葡萄糖脱水酶基因(*edd*)及其相关基因 *glk* 在葡萄糖异化为丙酮酸盐和磷酸甘油醛的过程中起到重要作用,他们的表达受到三羧酸循环(TCA)中降解阻遏物的调节作用,因此推测在铜绿假单胞菌体内铁的获取与代谢途径可能与碳源物质的利用相关^[20]。二氢叶酸还原酶是多种药物作用的靶点,因此,通过铁对二氢叶酸还原酶的调节作用可形成新的作用靶点,发现潜在的药物。柠檬酸铁转运蛋白基因编码 FecA 蛋白,与铁的转运有直接的关系,进一步证实了该基因与铁调控的关系。其余 7 个未知功能的基因受铁调控的现象为进一步阐明铁的调控途径提供了理论依据。

采用这种构建随机启动子库,在整个基因组水平上检测基因表达图谱的方法是对目前已有基因组学检测方法的有效补充。微阵列分析操作上比较复杂并且代价昂贵,而随机启动子库这种报告检测系统操作上比较简单,在多种条件下的筛选方法是通用的,并且花费很低。同时,其检测灵敏度高,具有良好的重复性和可操作性,即使基因微弱地表达,仪器也能灵敏地检测到发光,并可以在不损伤细胞的情况下对基因表达进行连续监测。然而这种方法也存在自身的缺陷,比如有漏失启动子的可能性,即只有在实验所用

检测条件下具有活性的启动子才能被用于建库并最终包含在启动子库中。已有研究表明^[11],在多种培养基的检测条件下,包括添加了甘油的 LB 培养基和 M9 培养基,添加各种碳源的 LB 培养基,厌氧条件下的 LB 培养基, pH5.5 的 LB 培养基以及添加了 300 mmol/L NaCl 的 LB 培养基,启动子的活性是基本一致的,大约 95% 的启动子在常用的合成培养基及丰富培养基两种条件下即可被检测收集到。在此次筛选过程中,由于更注重原理和方法验证,采用了比较苛刻的筛选条件,即对于任何一个在筛选过程中表达变化等于和小于 3 倍的克隆我们都按阴性样品对待,所以最终确定的研究对象为 12 个作用显著且稳定经过多次挑选的克隆。很多受铁调节的基因在这一过程中可能被排除在外。同时,由于铁是在氧充足的条件下对细菌起作用的,而筛选时是在多孔板中进行,其溶氧量可能有一定限制,加之有矿物油在表层覆盖,有些受铁调节的克隆可能因作用不明显而被去除。

总之,使用启动子-报道子融合获得的实时表达图谱可用来揭示基因调控网络的细微之处,因为它允许体内生理条件下的交互作用,是在微生物体内正常生理代谢进行的条件下检测的;根据基因表达的强弱,基因表达的时间先后将有可能在基因组水平对基因进行分类,从而为研究复杂的基因调控网络提供依据。将这些信息与蛋白质组学和代谢组学相联系将最终促进基因调控网络的模式建立。

参 考 文 献

- [1] Ochsner UA, Vasil AI, Johnson Z, et al. *Pseudomonas aeruginosa* fur overlaps with a gene encoding a novel outer membrane lipoprotein, OmlA. *J Bacteriol*, 1999, 181 (4): 1099-1109.
- [2] Poole K. Multidrug efflux pumps and antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa* and related organisms. *J Mol Microbiol Biotechnol*, 2001, 3 (2): 255-264.
- [3] Guerinot ML. Microbial iron transport. *Annu Rev Microbiol*, 1994, 48: 743-772.
- [4] Vasil ML, Ochsner UA. The response of *Pseudomonas aeruginosa* to iron: genetics, biochemistry and virulence. *Mol Microbiol*, 1999, 34 (3): 399-413.
- [5] Visca P, Leoni L, Wilson MJ, et al. Iron transport and regulation, cell signalling and genomics: lessons from *Escherichia coli* and *Pseudomonas*. *Mol Microbiol*, 2002, 45 (5): 1177-1790.
- [6] Xiong A, Singh VK, Cabrera G, et al. Molecular characterization of the ferric-uptake regulator, fur, from *Staphylococcus aureus*. *Microbiology*, 2000, 146 (Pt 3): 659-568.

- [7] Heller MJ. DNA microarray technology: devices, systems, and applications. *Annu Rev Biomed Eng*, 2002, 4: 129–153.
- [8] Valdivia RH, Falkow S. Flow cytometry and bacterial pathogenesis. *Curr Opin Microbiol*, 1998, 1 (3): 359–363.
- [9] Paustian ML, May BJ, Cao D, *et al.* Transcriptional response of *Pasteurella multocida* to defined iron sources. *J Bacteriol*, 2002, 184 (23): 6714–6720.
- [10] Ochsner UA, Wilderman PJ, Vasil AI, *et al.* GeneChip expression analysis of the iron starvation response in *Pseudomonas aeruginosa*: identification of novel pyoverdine biosynthesis genes. *Mol Microbiol*, 2002, 45 (5): 1277–1287.
- [11] Duan K, Dammel C, Stein J, *et al.* Modulation of *Pseudomonas aeruginosa* gene expression by host microflora through interspecies communication. *Mol Microbiol*, 2003, 50 (5): 1477–1491.
- [12] Holloway BW. Genetic recombination in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Gen Microbiol*, 1955, 13 (3): 572–581.
- [13] Leoni L, Ciervo A, Orsi N, *et al.* Iron-regulated transcription of the *pvdA* gene in *Pseudomonas aeruginosa*: effect of Fur and PvdS on promoter activity. *J Bacteriol*, 1996, 178 (8): 2299–2313.
- [14] Bjarnason J, Southward CM, Surette MG. Genomic profiling of iron-responsive genes in *Salmonella enterica* serovar typhimurium by high-throughput screening of a random promoter library. *J Bacteriol*, 2003, 185 (16): 4973–4982.
- [15] Serino L, Reimann C, Visca P, *et al.* Biosynthesis of pyochelin and dihydroaeruginosic acid requires the iron-regulated *pchDCBA* operon in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol*, 1997, 179 (1): 248–257.
- [16] Serino L, Reimann C, Baur H, *et al.* Structural genes for salicylate biosynthesis from chorismate in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Gen Gene t*, 1995, 249 (2): 217–228.
- [17] Wirth C, Meyer-Klaucke W, Pattus F, *et al.* From the periplasmic signaling domain to the extracellular face of an outer membrane signal transducer of *Pseudomonas aeruginosa*: crystal structure of the ferric pyoverdine outer membrane receptor. *J Mol Biol*, 2007, 368 (2): 398–406.
- [18] Mossialos D, Ochsner U, Baysse C, *et al.* Identification of new, conserved, non-ribosomal peptide synthetases from fluorescent *pseudomonads* involved in the biosynthesis of the siderophore pyoverdine. *Mol Microbiol*, 2002, 45 (6): 1673–1685.
- [19] Lamont IL, Martin LW. Identification and characterization of novel pyoverdine synthesis genes in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology*, 2003, 149 (Pt 4): 833–842.
- [20] Temple L, Sage A, Christie GE, *et al.* Two genes for carbohydrate catabolism are divergently transcribed from a region of DNA containing the *hexC* locus in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *J Bacteriol*, 1994, 176 (15): 4700–4709.

Construction of a *Pseudomonas aeruginosa* random promoter library and identification of novel iron-regulated genes by high-throughput library screening

Yan Wang, Jinhua Wei, 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] Iron is an essential element for bacterial survival and pathogenesis. Using a random promoter library we screened for iron-responsive genes in *P. aeruginosa* genome. [Method] Plasmid pMS402 containing a promoterless luminescence reporter, *LuxCDABE*, was used as the vector to construct a *P. aeruginosa* random promoter library with a size of about 5700 clones. It enabled real-time, *in vivo* high-throughput gene expression profiling at genomic scale. [Results] Two previously reported iron-regulated genes were identified, and ten new iron-regulated genes were uncovered. The genes encoding dihydrolipoamide acetyltransferase, phosphogluconate dehydratase and Fe () dicitrate transporter were found to be iron-regulated together with four function-unknown genes and three putative protein encoding genes. [Conclusion] These results provide a basis for elucidating the complex iron regulation network in *P. aeruginosa* and help our understanding of the roles of iron in bacterial physiology and pathogenesis. The random promoter library system also offers a useful tool in bacterial genomic studies.

Keywords: *Pseudomonas aeruginosa*; random promoter library; iron; gene regulation

Supported by the National Natural Science Foundation of China (30470098) and MOST(2004CCA01700)

*Corresponding author. Tel: +86-29-88302132; Fax: +86-29-88305288; E-mail: kduan@nwu.edu.cn

Received: 3 February 2008/ Revised: 15 March 2008