

铜绿假单胞菌 *PA1550* 基因对泳动及蹭动的影响

姚宏明, 张璐, 单志英, 李迎丽, 徐海津, 乔明强*

(南开大学分子生物学研究所, 天津 300071)

摘要:【目的】: 研究与铜绿假单胞菌运动能力相关的基因。【方法】: 以一株临床分离的铜绿假单胞菌 PA68 做受体菌, 应用人工 Mu 转座技术建立了库容为 2000 的突变子文库, 从中筛选出泳动能力和蹭动能力丧失或减弱的突变子, 通过基因克隆、测序, GenBank BLAST 比对测序结果, 互补基因表达确定与铜绿假单胞菌运动能力相关的基因。【结果】: 突变子 Y46 在丧失了泳动运动能力的同时, 蹭动能力也发生了减弱。在 Y46 突变子中, Mu 转座子插入到功能完全未知的基因 *PA1550* 中。对极性效应及 *PA1550* 所在操纵子的分析表明, Mu 转座子对插入点下游的基因的转录并不造成影响。【结论】: *PA1550* 与铜绿假单胞菌的泳动及蹭动能力有关。

关键词: 铜绿假单胞菌; 人工 Mu 转座技术; 泳动能力; 蹭动能力

中图分类号: Q933 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209 (2008) 07-0959-04

铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*), 又名绿脓杆菌, 属革兰氏阴性杆菌, 是一种重要的条件致病菌, 它能在机体腔道、各种组织及体内留置的生物医学材料的表面形成生物被膜, 从而导致顽固性感染。绿脓杆菌引起的烧伤感染病例和肺部感染病例在所有细菌中更是高居前两位。

据报道, 细菌引起的感染中超过 60% 是由生物被膜造成的^[1]。鞭毛介导的泳动 (swimming motility) 和

型菌毛介导的蹭动 (twitching motility) 在生物被膜形成的早期起重要作用^[2,3], 这两种运动能力丧失的突变子, 不能正常形成生物被膜。研究参与生物被膜形成的相关基因为细菌性感染特别是难治性感染提供了崭新的途径。生物被膜形成过程中的不同环节都可作为治疗的突破口和新药设计的靶位。因此, 凡与生物被膜的动态变化和结构形成有关的分子转化、代谢活动和信号传导过程, 均可作为新药研制的目标。鞭毛及型菌毛是生物被膜形成早期所必需的细胞器, 一旦这二者的结构基因或相关调节序列受到阻遏

或打断, 就能将生物被膜的形成扼杀在起始阶段。因此, 阐明 *P. aeruginosa* 运动相关基因的功能, 并据此设计相应的药物以干扰鞭毛及 IV 型菌毛的合成将会有效的控制、治愈由生物被膜引起的感染。

本实验应用人工 Mu 转座技术^[4,5], 以 PA68 临床分离株为受体菌, 建立突变子文库, 从中筛选出运动能力缺陷型菌株, 通过基因克隆、核苷酸序列分析, 找到转座子插入失活位点, 对于其中的功能未知基因通过反式互补实验研究新基因的功能, 为深入了解生物被膜形成的机制及临床的治疗提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 质粒、菌种和人工 Mu 转座复合物: 铜绿假单胞菌菌株 PA68 为天津医科大学第二医院从一例支气管扩张患者的痰标本中培养分离, 经美国全自动微生物分析仪 VITEK-IMS60 鉴定为 *P. aeruginosa*。微量肉汤稀释法测定结果表明该菌株对卡那霉素敏感

基金项目: 国家自然科学基金 (30570089); 天津市科技发展计划项目 (06YFGZSH07100)

*通讯作者: Tel: +86-22-23503340; E-mail: mingqiangqiao@yahoo.com.cn

作者简介: 姚宏明 (1978-), 男, 吉林省长春市人, 博士研究生, 从事铜绿假单胞菌功能基因组研究。E-mail: yaohongming@eyou.com

收稿日期: 2007-12-17; 修回日期: 2008-04-03

(MIC=0.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$) ; 大肠杆菌 (*Escherichia coli*) DH5 α 及质粒 pUC18 为本实验室保存; 质粒 pDN18 为美国 Florida 大学医学院 Jin 教授惠赠, 穿梭质粒, 四环素抗性 (Tc^r), 能在铜绿假单胞菌中稳定遗传。

1.1.2 培养基 LB 培养基^[1]、泳动能力检测培养基^[2]; 蹭动能力检测培养基^[2]。

1.1.3 主要试剂和仪器: 电转化仪为美国 Bio-rad 公司产品; 胰蛋白胨、酵母抽提物为英国 Oxoid 公司产品; Granulated-agar 为美国 Difco 公司产品; 牛小肠碱性磷酸酶 (CIAP)、T4 DNA 连接酶、DNA 琼脂糖凝胶回收试剂盒、限制性内切酶 *Kpn*I、*Bam*H、*Hind*、分子量标准 DL2000、DL15000、PCR 用 *ExTaq* 聚合酶、dNTP 均为大连宝生物公司 (TaKaRa) 产品; 氨苄青霉素 (Amp)、卡那霉素 (Km)、四环素 (Tc)、X-gal 及 IPTG 均为华美生物制品公司产品; 其它试剂均为国产分析纯。

1.2 引物设计及合成

Mu 突变子检测引物 pk1、pk2, Mu 末端的反向测序引物 seq1、seq2, PA1550 互补片断扩增引物 p1、p2, 均委托 Invitrogen 公司合成 (表 1)。

表 1 PCR 实验所用引物
Table 1 Primers used for PCR experiments

Primers	Sequence(5' - 3')	Length /bp
pk1	ATGGGAAGCCCGATGC	609
pk2	AGCCGTTTCTGTAATGAAGG	
seq1	ATCAGCGGCCGCGATCC	2700
seq2	TTATTTCGGTCGAAAAGGATCC	
p1	CGCGGATCCCAAGGATCAGCAGGACCACA	
p2	CCCAAGCTTGGGCAAGGCTTCGGGATT	

Black words are *Bam*H and *Hind* restriction enzymes, respectively.

1.3 Mu 突变子文库的建立

参照单志英、徐海津等的方法建立库容为 2000 的 Mu 突变子文库^[6]。

1.4 泳动能力及蹭动能力的筛选^[1]

在塑料培养皿内铺上较薄的一层泳动检测培养基, 在室温下过夜干燥。用灭菌过的牙签挑取在 LB 琼脂培养基上过夜培养的 PA68 的 Mu 转座突变子, 接种到泳动培养基表面。将培养皿外面包上一层保鲜膜, 30 $^{\circ}\text{C}$ 培养 12~14 h。细菌会依赖鞭毛运动在培养基的表面以接种点为圆心向周围泳动生长, 筛选出泳动能力减弱或丧失的突变子。

在塑料培养皿内铺上薄薄的一层蹭动检测培养基, 室温晾干。用灭菌过的牙签挑取在 LB 琼脂培养基上过夜活化的 PA68 的 Mu 转座突变子, 扎透蹭动

培养基, 将细菌接种到培养基下面的塑料平皿上, 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 24 h。细菌就会依赖 IV 型菌毛的收缩和伸展在培养基下面的塑料表面以接种点为圆心, 向周围蔓延生长, 产生圆形的菌晕。将培养基轻轻揭去, 用考马司亮兰染色液 (10% 乙酸, 0.06% 考马司亮兰) 染色塑料平皿 20 min, 倒掉染液, 用自来水冲洗平皿 1 min, 观察细菌因蹭动而产生的环, 筛选蹭动能力丧失或减弱的突变子。

1.5 Mu 转座子插入位点侧翼序列的克隆及测序

提取运动能力缺陷型突变子的基因组 DNA^[7], 经 *Kpn* 过夜酶切后, 与用 *Kpn* 酶切并经牛小肠碱性磷酸酶 (CIAP) 处理过的载体质粒 pUC18 连接, 电转化入大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞中, Km^r/Amp^r 双抗平板筛选出转化子。经 PCR 及酶切验证后以 seq1、seq2 为引物分别向 Mu 两端进行双向测序, 确定 Mu 转座子的插入位点。

1.6 突变株的反式互补

根据 *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 全基因组数据库 (www.pseudomonas.com) 设计 PA1550 基因的 PCR 引物 p1、p2, 以 PA68 基因组为模板进行 PCR 扩增, 得到含有启动子、SD 序列等转录翻译必需元件在内的完整 PA1550 基因的片段, 连接到穿梭载体 pDN18^[8], 得到互补质粒 pDN-1550, 转入突变株, 检测泳动及蹭动能力^[9]。

2 结果

2.1 泳动能力及蹭动能力的检测

突变子 Y46 丧失了泳动运动能力的同时, 蹭动能力也发生了减弱 (图 1)。

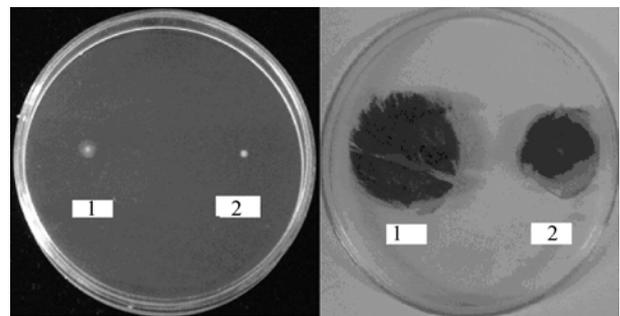


图 1 鞭毛泳动能力及 IV 型菌毛蹭动能力的检测

Fig. 1 swimming and twitching motility assay (The left is swimming assay and the right is twitching assay. 1, 2 is PA68 and Y46, respectively).

2.2 转座子插入位点侧翼序列的克隆、测序及序列分析

按前文所述方法进行 Mu 插入位点侧翼序列的克

隆,挑选阳性克隆子提取质粒酶切鉴定。以 pk1、pk2 为引物进行 PCR,得到 609bp 的特异性产物。以 seq1、seq2 为引物进行测序,得到了转座子插入位点的侧翼序列。

Pseudomonas aeruginosa PAO1 全基因组数据库对 PAO1 基因组的开放阅读框进行了功能定位,并将所有 ORF 分为:功能已知的基因(class1),通过同源性比较与其他菌中已知功能的相关基因有高同源性的基因(class2),根据其保守氨基酸序列、结构特征或者与其他已知功能的基因具有一定同源性而推测出其功能的基因(class3),功能完全未知的基因(class4)^[10]。突变株 Y46 测序结果显示,转座子插入到基因 PA1550 (class4)。

PA1550 是一个功能完全未知的基因,全长 540bp,该基因与其它细菌中任何已知功能的基因没有高同源性,PA68 的 PA1550 核苷酸序列与模式菌株 PAO1 的同源性高达 98%(GenBank: EF108329)。

2.3 PA1550 基因失活的突变子 Y46 的反式互补实验

将互补质粒 pDN-1550,转入突变株,同时将 pDN18 质粒转入到突变株中作为对照,检测泳动及蹭动能力,结果表明携带 PA1550 基因的质粒 pDN-1550 未能使突变子的运动能力恢复到野生型水平(图 2)。

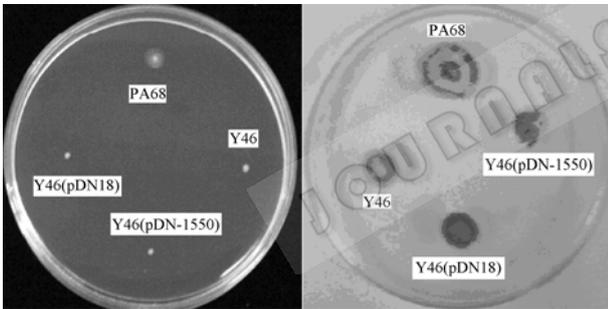


图 2 PA1550 基因失活的突变子 Y46 的反式互补
Fig. 2 Trans-complementation of PA68 PA1550 gene mutant Y46 (The left is swimming assay, and the right is twitching assay).

3 讨论

本文通过 Mu 转座子插入失活的方法获得了一株泳动能力及蹭动能力缺陷型突变子,核苷酸测序显示 Mu 转座子插入到基因 PA1550 中,首次发现并初步证明其参与了鞭毛和型菌毛的运动。

通过反式互补实验将携带有完整的 PA1550 基因的 pDN-1550 质粒转入到突变子 Y46 中,突变子的表性并未得到恢复,对于可能存在的原因进行了以下分析。

转座子常常引起插入位点下游基因的极性效应,

为了验证 Mu 转座子的插入是否会引起极性效应,选取了突变文库中多个突变子,对插入点下游基因 mRNA 的含量进行了半定量测定,结果显示,所有测量的突变株中, Mu 的插入均未引起极性效应^[11, 12]。PA1550 是一个短的开放阅读框,由 540 个核苷酸组成,经 Pfam 信息平台对其编码的蛋白产物进行结构域分析,未发现与任何已知的蛋白具有同源性。PAO1 全基因组数据库显示,位于 PA1550 的上游的 PA1557 到 PA1551 这 7 个基因均与能量传递相关,而 PA1550 下游的 PA1549 基因编码的则是一个孔道蛋白,并且 PA1550 及其下游基因 PA1549、PA1548 及 PA1547 均有多个跨膜结构域,很可能这些基因共同参与物质、能量的转运。推测 PA1550 很可能与周围的一些基因一起组成一个大的信号传导系统,而这个系统所传递的能量可能是鞭毛和型菌毛的运动所必需的。

为了进一步验证 PA1550 基因与运动能力之间的关系,可以通过基因敲除的方法,将模式菌株中正常的 PA1550 基因用失活的 PA1550 基因替换,来观察菌株的运动能力是否发生变化,对 PA1550 基因的功能进行验证。

参 考 文 献

- [1] Lewis K. Riddle of biofilm resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2001, 45(4): 999-1007.
- [2] Rashid MH, Kornberg A. Inorganic polyphosphate is needed for swimming, swarming, and twitching motilities of *Pseudomonas aeruginosa*. *PNAS*, 2000, 97: 4885
- [3] Mattick JS. Type IV pili and twitching motility. *Annu Rev Microbiol*, 2002, 56: 289-314.
- [4] Lamberg A, Nieminen S, Qiao M, et al. Efficient insertional mutagenesis strategy for bacterial genomes by electroporation of in vitro assembled DNA transposition complexes of bacteriophage Mu. *Appl Environ Microbiol*, 2002, 68: 705-712.
- [5] Savilahti H, Rice PA, Mizuuchi K. The phage Mu transpososome core: DNA requirements for assembly and function. *EMBO J*, 1995, 14: 4893-4903.
- [6] 单志英, 徐海津, 施兴启, 等. 铜绿假单胞菌最佳电转化条件的研究. *遗传学报(Journal of Genetics and Genomics)*, 2004, 3: 311-316.
- [7] 卢圣栋. 现代分子生物学实验技术. 第二版, 北京: 中国协和医科大学出版社, 1999, pp106-107.
- [8] Nunn DN, Lory S. Components of the Protein-Excretion Apparatus of *Pseudomonas aeruginosa* are Processed by the Type IV Prepilin Peptidase. *PNAS*, 1992, 89: 47-51.

- [9] 单志英, 徐海津, 施兴启, 等. 铜绿假单胞菌蹭行运动相关基因的研究. 微生物学报(*Acta Microbiologica Sinica*), 2004, 44(3): 49-54.
- [10] Stover CK, Pham XQ, Erwin AL, et al. Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. *Nature*, 2000, 406(31): 959-964.
- [11] 徐海津. 铜绿假单胞菌色素相关基因功能的研究. 南开大学博士学位论文, 2006.
- [12] 李迎丽. 铜绿假单胞菌运动能力相关新基因的研究. 南开大学博士学位论文, 2007.

Impact of *Pseudomonas aeruginosa* gene PA1550 on its swimming and twitching motility

Hongming Yao, Lu Zhang, Zhiying Shan, Yingli Li, Haijin Xu, Mingqiang Qiao*

(Institute for Molecular Biology, Nankai University, Tianjin 300071, China)

Abstract: [Objective] Studying the genes involved in swimming and twitching motility of *Pseudomonas aeruginosa*. [Methods] We used Mu transposition technique, gene cloning, nucleotide sequencing and the trans-complementation experiment to study the genes involved in twitching motility and swimming motility of *P. aeruginosa* strain PA68 isolated from a patient with bronchiectasis. [Results] A mutant deficient in both swimming and twitching motility was isolated out of about 2000 mini-Mu insertion mutants. The result of GenBank BLAST showed that the mini-Mu transposon had inserted into the gene *PA1550* with unknown function. Analyses on the operon of *PA1550* and the polar effect revealed that Mu transposon had no effect on the transcription of the downstream genes of *PA1550*. [Conclusion] *PA1550* is involved in the swimming and twitching motility of *Pseudomonas aeruginosa*.

Keywords: *Pseudomonas aeruginosa*; artificial Mu transposition technique; swimming motility; twitching motility

Supported by the National Natural Science Foundation of China (30570089) and the Science and Technique Development Project of Tianjin (06YFGZSH07100)

*Corresponding author. Tel: +86- 22-23503340; E-mail: mingqiangqiao@yahoo.com.cn

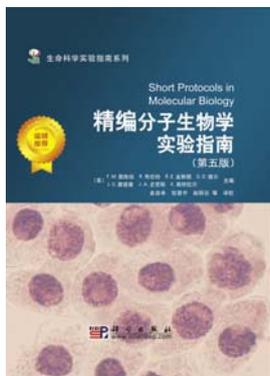
Received: 17 December 2007/ Revised: 3 April 2008

科学出版社科学出版中心生物分社新书推介(2008-05)

精编分子生物学实验指南(第五版)

【美】F.M.奥斯伯, R.布伦特, R.E.金斯顿, D.D.穆尔, J.G.塞德曼, J.A.史密斯, K.斯特拉尔, 等主编; 金由辛, 包慧中, 赵丽云, 等译校

978-7-03-020336-2 ¥180.00 2008年5月30日出版



本书是知名度很高、不断更新的《最新分子生物学实验方法汇编》(Current Protocols in Molecular Biology)系列的精编版本。新版对原有内容进行了修订和更新, 包括: 大肠杆菌、质粒和噬菌体, DNA 的制备和分析, DNA 和 RNA 的酶学操作, RNA 的制备和分析, 重组 DNA 文库的构建, 重组 DNA 文库的筛选, DNA 序列测定, 克隆化 DNA 的诱变, DNA 导入哺乳动物细胞, 蛋白质分析, 免疫学, DNA 蛋白质相互作用, 酿酒酵母, 原位杂交和免疫组织化学, 聚合酶链反应, 蛋白质的表达, 蛋白质磷酸化的分析, 生物信息学, 蛋白质相互作用的分析等; 又新增了染色质的装配与分析, 核酸阵列, 组合文库的建立和使用, 单个细胞或一群细胞间差异表达基因的发现和分析四章内容。

本书可供高等院校和科研机构从事分子生物学研究的科研工作者和研究生参考。

欢迎各界人士邮购科学出版社各类图书(免邮费)

邮购地址: 北京东黄城根北街16号 科学出版社 科学销售中心 邮编: 100717

联系人: 周文宇 联系电话: 010-64031535 (带传真)

更多精彩图书请登陆网站 <http://www.lifescience.com.cn>, 欢迎致电索要书目