

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*  
50(3):411-417; 4 March 2010  
ISSN 0001-6209; CN 11-1995/Q  
<http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>

## *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

周金凤, 葛宜和, 刘婷, 程显好, 王磊, 高兴喜\*

(鲁东大学生命科学学院, 烟台 264000)

**摘要:**【目的】为了研究铜绿假单胞菌 *rpoS* 基因对吩嗪(Phenazine)合成基因簇 *phz1* 和 *phz2* 的调控方式与机制。【方法】采用抗庆大霉素基因(gentamycin resistance cassette, *aacC1*)插入失活的策略构建了 *rpoS* 基因突变株 PA-SG;同时利用 *lacZ* 的翻译融合表达载体 pME6015, 构建了 *phz1*'-'*lacZ* 和 *phz2*'-'*lacZ* 翻译融合表达载体 pMEZ1 和 pMEZ2。采用电转化法分别将 pMEZ1、pMEZ2 和 pME6015 导入铜绿假单胞菌突变株 PA-SG 和野生株 PAO1, 用 Miller 法检测融合  $\beta$ -半乳糖苷酶活性。【结果】在 KMB 或 PPM 培养基中, pMEZ1 在突变株 PA-SG 中的表达均增强, 为野生株的 4-5 倍;而 pMEZ2 在突变株 PA-SG 中的表达均降低, 野生株是突变株的 2-3 倍。【结论】由此推测, 铜绿假单胞菌 *rpoS* 基因对两个不同吩嗪合成基因簇的调控作用具有特异性, 在一定程度上, *rpoS* 负调控 *phz1*, 正调控 *phz2*。

**关键词:** 铜绿假单胞菌; *phz1*; *phz2*; *rpoS*; 吩嗪

**中图分类号:** Q933 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2010) 03-411-07

铜绿假单胞菌 PAO1 (*Pseudomonas aeruginosa* PAO1) 为致病性假单胞菌属的模式菌株, 是医院获得性肺炎的首要致病菌<sup>[1-2]</sup>。该菌的致病性与其毒力因子的合成与分泌紧密相关<sup>[3]</sup>, 而吩嗪及其衍生物是其产生的一类重要的毒力因子, 包括吩嗪-1-羧酸(phenazine-1-carboxylic acid, PCA)、绿脓菌素(pyocyanin)、1-羟基-吩嗪(1-hydroxyphenazine, 1-HP)和吩嗪-1-甲酰胺(phenazine-1-carboxamide, PCN)等<sup>[4]</sup>。在细胞内, PCA 等吩嗪类化合物可作为电子载体, 当细胞进行氧化还原反应时, 可将电子传递到靶细胞, 导致靶细胞中超氧化物的氧自由基增加从而使细胞死亡<sup>[5]</sup>。

通过来自假单胞菌吩嗪合成基因簇的比对分析, 结合铜绿假单胞菌 PAO1 全基因组([www.pseudomonas.com](http://www.pseudomonas.com))的检索, 结果发现, 合成吩嗪及其衍生物的基因簇共有两个<sup>[6]</sup>。一是基因簇 *phzA1B1C1D1G1* (*phz1*), 位于铜绿假单胞菌 PAO1 基因组第 4713795 至 4720062 碱基之间; 二是基因

簇 *phzA2B2C2D2G2* (*phz2*), 位于基因组第 2070685 至 2076985 碱基之间。两个吩嗪合成基因簇在 DNA 水平的同源性达到 98.3%, 距离约为 2.6 Mb, 可分别通过转录、翻译表达合成次生代谢产物吩嗪所需的全部酶。已有研究表明: *QscR* 基因能抑制这 2 个基因簇的表达, 但是 *QscR* 蛋白不能直接与它们的启动子结合<sup>[7-8]</sup>; 同时吩嗪类复合物的合成受群体感应系统(Quorum-sensing, QS)的调控<sup>[9]</sup>; 而且许多环境因素对吩嗪合成也有明显影响, 包括细胞浓度、氧、离子、磷酸浓度以及环境中的碳源<sup>[10]</sup>。目前, 许多因素对吩嗪合成基因影响的机制并不是十分清楚, 这种影响或许是通过细菌群体感应系统, 或许是由于细菌群体感应调节子独自在起作用<sup>[11]</sup>。因此, 进一步深入研究吩嗪基因簇的表达调控机理, 显然对深入了解吩嗪的代谢途径和该菌的致病性具有重要的意义。

*rpoS* 基因编码  $\sigma^S$ , 又称为 RpoS, 是细菌进入稳定期时转录并表达的一种转录调节因子。在不同生

**基金项目:** 鲁东大学科技基金(20063302); 鲁东大学实验室开放计划

\* 通信作者。Tel: +86-535-6672269; Fax: +86-535-6697636; E-mail: gaoxingxi@yahoo.com.cn

**作者简介:** 周金凤(1981-), 女, 山东济宁人, 理学硕士, 研究方向为细菌次生代谢调控方式与机制。E-mail: zjfl2601260@126.com

**收稿日期:** 2009-08-29; **修回日期:** 2009-12-25

长时期或不同的胁迫因子作用下,原核生物通过诱导表达不同的  $\sigma$  因子并不断与由  $\alpha^2\beta\beta'$  等亚基组成的核心酶竞争结合,从而启动不同的基因转录与表达,以此适应复杂多变的环境<sup>[12]</sup>。已有研究表明:*rpoS* 突变后,荧光假单胞菌 M18 合成 PCA 的能力明显增强<sup>[13]</sup>,铜绿假单胞菌合成绿脓菌素的量明显增多<sup>[14]</sup>。绿脓菌素不仅是一种致病因子,而且是铜绿假单胞菌的一种信号分子,而 PCA 是其合成的中间体<sup>[4]</sup>。因此为了进一步研究吩嗪的合成机制,阐明 *rpoS* 基因对不同吩嗪合成基因簇的调节途径和调控机制,本文采用抗庆大霉素基因 (gentamycin resistance cassette, *aacC1*) 插入失活的策略构建了

*rpoS* 基因突变株 PA-SG,同时构建了 *phz1'-lacZ* 和 *phz2'-lacZ* 翻译融合表达载体 pMEZ1 和 pMEZ2。分别将 pMEZ1、pMEZ2 和 pME6015 导入铜绿假单胞菌突变株 PA-SG 和野生株 PAO1,用 Miller 法检测融合  $\beta$ -半乳糖苷酶活性,从而反映吩嗪基因簇的表达强弱及 *rpoS* 基因的调控作用。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 菌株和质粒:** 本研究所涉及的菌株、质粒及其来源见表 1。

**1.1.2 培养基和培养条件:** 大肠杆菌的培养基为

表 1 菌株和质粒

Table 1 Strains and plasmids

Strains and plasmids	Characteristics	Source
Strains		
<i>E. coli</i>		Lab collection
DH5 $\alpha$	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi<sup>-1</sup> hsdR17(rk<sup>-</sup> mk<sup>+</sup>) supE44 re1A1</i>	
SM10	<i>F<sup>-</sup> thi<sup>-1</sup> thr<sup>-1</sup> leuB6 recA tonA21 lacY1 supE44 (Mu<sub>C</sub><sup>+</sup>) <math>\lambda</math><sup>-</sup> Kan<sup>R</sup></i>	Lab collection
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		
PAO1	Wild type	Lab collection
PA-SG	<i>rpoS</i> gene mutated with <i>aacC1</i> cassette in PAO1	This study
Plasmids		
pUCm-T	ColE, cloning and sequencing vector, Amp <sup>R</sup>	Sangon, Shanghai
pDY1	pUCm-T carrying 1.2 kb upstream part of <i>rpoS</i> gene from PAO1	This study
pDY2	pUCm-T carrying 1.2 kb downstream part of <i>rpoS</i> gene from PAO1	This study
pDY3	pUCm-T carrying 2.4 kb fragment of <i>rpoS</i> gene from PAO1	This study
pDY4	855 bp- <i>Sma</i> I <i>aacC1</i> cassette cloned into <i>Stu</i> I of pDY3	This study
pEX18Tc	Suicide plasmid, Tet <sup>R</sup>	[17]
pUCGm	Resource of gentamycin resistance cassette ( <i>aacC1</i> )	[16]
pEXT-RG	2.4 kb <i>rpoS</i> fragment inserted with <i>aacC1</i> cassette in pEX18Tc	This study
pME6015	pVSI-p15A <i>E. coli-pseudomonas</i> shuttle vector for translational <i>lacZ</i> fusions and promoter probing, Tc <sup>R</sup>	[21]
pMEZ1	pME6015 carrying 750 bp upstream of <i>phz1</i> fragment and translational fusion <i>phz1'-lacZ</i>	This study
pMEZ2	pME6015 carrying 895 bp upstream of <i>phz2</i> fragment and translational fusion <i>phz2'-lacZ</i>	This study

LB;铜绿假单胞菌的培养基为 KMB 或 PPM。LB 培养基按文献[15]配制;KMB 培养基:每升含胰蛋白胨 20 g, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.392 g, 甘油 15 mL, MgSO<sub>4</sub> 0.732 g, pH7.5; PPM 培养基:每升含胰蛋白胨 22 g, 葡萄糖 20 g, KNO<sub>3</sub> 5 g, pH7.5。相应固体培养基每升加 12.0 g 琼脂粉。根据培养需要, *E. coli* 培养基中添加抗生素的用量 ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 为: 氨苄青霉素 (Amp) 100、庆大霉素 (Gen) 20; 铜绿假单胞菌培养基中添加抗生素的用量 ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 为: 壮观霉素 (Spe) 100、盐酸四环素 (Tet) 50。菌体液体培养时, 大肠杆菌在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、180 r/min 条件下振荡培养; 铜绿假单胞菌在 28 $^{\circ}\text{C}$ 、220 r/min 条件下振荡培养。

**1.1.3 主要试剂和仪器:** 多种限制性内切酶、T4 DNA 连接酶、DNA 分子量标记物皆为 Fermentas (MBI) 公司产品并购于上海生工生物工程技术服务

有限公司; *Taq* DNA 聚合酶、dNTP 购于天根生化科技(北京)有限公司; PCR 产物回收、DNA 胶回收试剂盒购自华舜生物工程公司; 5-溴-4-氢-3-吡啶- $\beta$ -D-半乳糖苷 (X-gal) 和 O-硝基苯- $\beta$ -D-半乳糖苷 (ONPG) 购自上海生工生物工程技术有限公司; 其它生化试剂级别均为分析纯。本实验所需主要仪器有 PCR 仪 (BioRAD, USA)、基因导入仪 (JY 2000-1B, 宁波新芝) 和冷冻离心机 (CR3i multifunction, Thermo Electron Corporation, USA) 等。

### 1.2 *rpoS* 基因的扩增、克隆、测序和拼接

为了提高同源重组的双交换几率, 根据铜绿假单胞菌 PAO1 基因组中 *rpoS* 基因及相邻片段, 设计两对引物 (RpoS1-1: 5'-CAGCGGGCAGTACATCGT GC-3'; RpoS1-2: 5'-CGGATCAGGCCTAGGTTGCC-3'; RpoS2-3: 5'-GGCAACCTAGGCCTGATCCG-3'; RpoS2-

4;5'-TTCTCCGAAGACGAAGTGCC-3';下划线为 *Stu* I 位点),以铜绿假单胞菌基因组为模板进行 PCR,分别扩增包含部分 *rpoS* 序列的上下游两个片段 *rpoS1* 和 *rpoS2*。其中 PCR 的反应程序及条件参数为:95℃ 4 min;94℃ 1 min,45℃ 1 min,72℃ 1 min,35 个循环;72℃ 延伸 10 min。PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳检测,纯化后交于上海生工生物工程技术有限公司进行测序。

铜绿假单胞菌基因组提取、质粒抽提、限制性内切酶酶切、DNA 片段胶回收、连接、感受态细胞制备和转化等步骤均参照文献[15]或相关试剂盒提供的方法进行。PCR 获得的片段均为 1.2 kb,分别与 T 载体 pUCm-T 相连。T 载体的连接反应和 *E. coli* DH5 $\alpha$  的转化按上海生工生物工程技术有限公司试剂盒操作手册进行,所获克隆分别命名为 pDY1 和 pDY2。

为了将 *rpoS1* 和 *rpoS2* 正确拼接在一起,首先用酶 *Kpn* I 和 *Hind* III 分别对 pDY1 和 pDY2 进行酶切,琼脂糖凝胶电泳确定 *rpoS1* 和 *rpoS2* 分别在 pUCm-T vector 中的连接方向。然后用酶 *Stu* I 和 *Xho* I 分别对 pDY1 和 pDY2 进行双酶切,把胶回收得到的 *rpoS2* 插入到 pDY1 中,转化 *E. coli* DH5 $\alpha$ ,37℃ 恒温箱培养,随机挑取含氨基青霉素抗性平板中的菌落接种培养、提取质粒、酶切验证,获得的正确质粒命名为 pDY3。

### 1.3 *rpoS* 基因插入失活突变株 PA-SG 的构建

用 *Sma* I 酶切质粒 pUCGm,获得约 0.8 kb 的抗庆大霉素基因片段(gentamycin resistance cassette, *accC1*)<sup>[16]</sup>。用 *Stu* I 酶切 pDY3,然后与抗庆大霉素基因片段连接,转化 *E. coli* DH5 $\alpha$ ,所获得的阳性克隆称 pDY4。用 *EcoR* I 酶切 pDY4 质粒,切下片段(约 3.2 kb)胶回收后与用相同限制性内切酶酶切并回收的自杀质粒 pEX18Tc<sup>[17]</sup> 相连接。连接产物转化 *E. coli* DH5 $\alpha$ ,涂布于含庆大霉素的平板,37℃ 恒温箱培养。挑单克隆培养、提取质粒、酶切验证,获得的阳性克隆称 pEXT-RG,至此用于构建突变株的自杀质粒载体构建完成。

用  $\text{CaCl}_2$  转化法将 pEXT-RG 转入 *E. coli* SM10,方法见文献[15]。

以 pEXT-RG 所在的 *E. coli* SM10 为供体菌,野生型铜绿假单胞菌 PAO1 为受体菌进行固相纤维滤膜接合转移。主要步骤如下:将两种菌分别接种于 4 mL 含相应抗生素(四环素、壮观霉素)的 LB 和 KMB 培养基中,过夜培养。分别取 1 mL 菌液离心弃上清,用 1 mL 新鲜的相应培养基洗涤 2-3 次。将菌体混合并悬浮于 150  $\mu\text{L}$  新鲜 LB 中,吸取混合

菌液转移至无抗生素的 LB 平板中央的一片圆形微孔滤膜(孔径  $\text{\O} 0.22 \mu\text{m}$ 、已灭菌)上,37℃ 恒温箱培养 24 h。刮取上述菌体涂布于含有 Spe100 和 Gen40 的筛选平板,37℃ 恒温箱培养 48-72 h。随机挑取单菌落用含 15% 蔗糖的 KMB 培养基连续培养数代(>5 代),然后稀释法涂布于含 Gen40 的平板。挑取所获克隆分别点种于含 Gen40 和 Tet100 的平板上。筛选 Tet 平板不生长而 Gen 平板上生长的相应克隆,即铜绿假单胞菌 PAO1 的 *rpoS* 基因插入失活突变体,命名为 PA-SG。

### 1.4 翻译融合表达载体 *phz1*'-'*lacZ* 和 *phz2*'-'*lacZ* 的构建

pME6015 质粒带有无启动子且敲除了前 8 个氨基酸编码序列的 *lacZ* 报告基因,在多克隆位点插入外源启动子及几个氨基酸编码子后,可通过融合  $\beta$ -半乳糖苷酶活性的高低显示启动子的强弱,从而反映基因的表达状况。为了研究 *rpoS* 基因对吩嗪合成基因簇 *phz1* 和 *phz2* 的调控方式,分别构建了 *phz1*、*phz2* 与 *lacZ* 的翻译融合表达载体 pMEZ1 和 pMEZ2。pMEZ1 的构建过程如下:首先根据 *phz1* 的上游部分和编码区序列设计一对引物 FA11 (5'-CTAAGAATTCGTCGATCCCCGCTCTC-3',下划线为 *EcoR* I 位点)和 FA12 (5'-TAATCTGCAGTTCCTGTACCGCTC-3',下划线为 *Pst* I 位点)。以 PAO1 基因组为模板进行 PCR,反应程序及条件参数为:94℃ 4 min;94℃ 1 min,55℃ 1 min,72℃ 1 min,35 个循环;72℃ 延伸 10 min。750 bp 的 PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳检测,然后用限制性内切酶 *EcoR* I 和 *Pst* I 双酶切、电泳、胶回收后按 *lacZ* 正确的读码顺序克隆于 pME6015 的相同位点处。所得的翻译融合质粒 *phz1*'-'*lacZ* 称为 pMEZ1。同样以 FA21 (5'-TATAGAATTCACGGCATCCGTCAC-3',下划线为 *EcoR* I 位点)和 FA22 (5'-CTTAGGATCCCAACCGTTGCTACTC-3',下划线为 *Bam*H I 位点)为引物,PAO1 基因组为模板进行 PCR,反应条件同 pMEZ1,895 bp 的 PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳检测,然后用限制性内切酶 *EcoR* I 和 *Bam*H I 双酶切、电泳、胶回收后按 *lacZ* 正确的读码顺序克隆于 pME6015 的相同位点处,所得的翻译融合质粒 *phz2*'-'*lacZ* 称为 pMEZ2。两种翻译融合质粒的插入位点及顺序由测序鉴定。然后借助电转化方法把 pMEZ1、pMEZ2 和 pME6015 分别导入野生株 PAO1 及突变株 PA-SG,菌株分别命名为 PAO1/pMEZ1、PA-SG/pMEZ1、PAO1/pMEZ2、PA-SG/pMEZ2、PAO1/pME6015 和 PA-SG/pME6015,电转化方法参见文献[18]。PAO1 及 PA-SG 中是否存在相应导入的质粒采用碱

裂解法进行质粒抽提验证。

### 1.5 生长曲线的测定

将野生菌株 PAO1 和突变株 PA-SG 分别同时培养于 KMB 和 PPM 中,每隔 12 h 取样稀释涂布培养,数菌落个数,3 次重复取平均值。

### 1.6 $\beta$ -半乳糖苷酶活性的测定

将方法 1.4 所获相应菌株分别在试管中用 PPM 和 KMB 两种培养基过夜培养,稀释至  $0.1 \times 10^6$  CFU/mL,分别取 1 mL 相应接种于盛有 50 mL KMB 和 PPM 培养基的 250 mL 三角瓶中,培养基中含 Tet 50,摇床培养,对照为野生株 PAO1。每 12 h 取样测定  $\beta$ -半乳糖苷酶活性,具体方法参照文献[15]。

## 2 结果

### 2.1 *rpoS1*、*rpoS2* 序列分析与拼接

根据设计的引物,以 PAO1 的基因组 DNA 为模板进行 PCR。通过优化 PCR 反应条件均获得了一条约 1.2 kb 的阳性条带,该条带大小与预期结果相符,且测序结果与 *Pseudomonas* Genome Database 中 *rpoS* 基因序列完全一致(*rpoS* 基因在 *Pseudomonas* Genome Database 中的序列号为:PA3622)。将它们分别克隆于 pUCm-T 载体中,所获质粒 pDY1 和 pDY2 分别用酶 *Kpn* I 和 *Hind* III 酶切,琼脂糖凝胶电泳表明(结果未显示):pDY1 质粒得到大小约为 3.7 kb 和 0.25 kb 两个片段;pDY2 质粒得到大小约为 3.6 kb 和 0.35 kb 两个片段。根据得到的片段大小,可以判断出 *rpoS1* 和 *rpoS2* 分别在 pUCm-T vector 中的连接顺序。

为了将 *rpoS1* 和 *rpoS2* 正确拼接,用酶 *Stu* I 和 *Xho* I 分别对 pDY1 和 pDY2 进行双酶切,电泳(结果未显示),质粒 pDY1 仅得到大小约为 3.9 kb 的一条带,而 pDY2 得到大小约为 1.2 kb 和 2.7 kb 的两条带,胶回收后将 1.2 kb 的 *rpoS2* 插入 pDY1 中,所得质粒命名为 pDY3。如果 1.2 kb 的 *rpoS2* 基因片段和 3.9 kb 的 pDY1 片段连接成功,将得到大小约为 5.1 kb 的质粒。电泳表明提取的质粒大小约为 5.1 kb,用 *Eco*R I 酶切得到了大约 2.4 kb 和 2.7 kb 的片段(结果未显示),从而初步判断 *rpoS2* 连接到 pDY1 中。经上海生工生物工程技术服务有限公司测序比对后,证明 pDY3 构建成功。

### 2.2 *rpoS* 基因插入失活突变株的构建和鉴定

铜绿假单胞菌 PAO1 的单交换菌株既抗四环素又抗庆大霉素,而双交换菌株即 *rpoS* 基因插入失活突变株对四环素敏感但抗庆大霉素。因此凡是在四

环素平板上不生长而在庆大霉素平板上生长的菌落即为 PA-SG 突变株。为了进一步验证 *aacC1* 基因盒是否已定点插入 *rpoS* 基因中,我们采用 PCR 的方法进行验证。以 Hrpos-1 和 Hrpos-2 为引物(Hrpos-1: 5'-GGAAGTCCACTTCGC-3'; Hrpos-2: 5'-TGACC ACATGGATCG-3'),分别以野生株和突变株的基因组 DNA 为模板进行 PCR。琼脂糖凝胶电泳表明:野生株的 PCR 条带约 0.3 kb,而突变株 PCR 条带约 1.1 kb,与预期结果一致,这是因为插入的抗庆大霉素基因盒(*aacC1*)约 0.8 kb,如图 1。PCR 产物胶回收纯化后交于上海生工生物工程技术服务有限公司进行测序,测序结果经比对表明突变株的 *rpoS* 基因中已插入有抗庆大霉素基因盒(*aacC1*),证实已获得 *rpoS* 基因插入失活突变株 PA-SG。

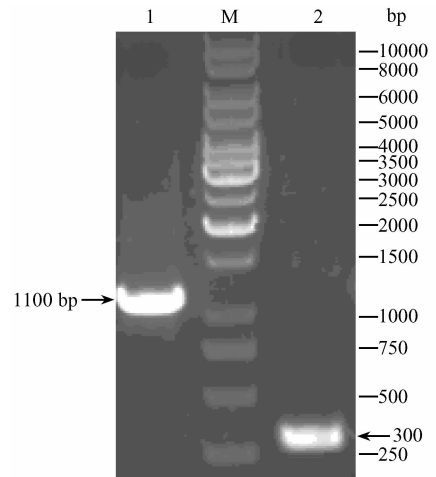


图 1 *rpoS* 基因突变的 PCR 验证

Fig. 1 PCR verification of *rpoS* gene mutation. 1. PA-SG; M. 1kb DNA marker; 2. PAO1.

### 2.3 *rpoS* 基因失活对菌体生长的影响

为了比较突变株 PA-SG 与野生株 PAO1 的生长状况,将它们分别接种于 PPM 和 KMB 两种培养基中,振荡培养,每 12 h 取样稀释涂布培养,数菌落个数。根据结果绘制生长曲线,如图 2 所示,突变株 PA-SG 与野生株 PAO1 在 KMB 培养基中生长状况基本一致,但是在 PPM 培养基中,至生长的中后期,随着菌体密度的增大、菌体总量的增加和培养基中营养因子消耗速率的加快,突变株 PA-SG 的菌体密度比野生株略小。菌体在两种培养基中生长状况的细微差别可能是由两种培养基中碳源等营养因子的不同所造成的。在 PPM 培养基中突变株 PA-SG 的菌体密度略小,说明 *rpoS* 基因突变后菌体生长对环境因子的变化比野生株敏感,该结果与徐汪节、Suh 等人的研究结果相似<sup>[13-14]</sup>。

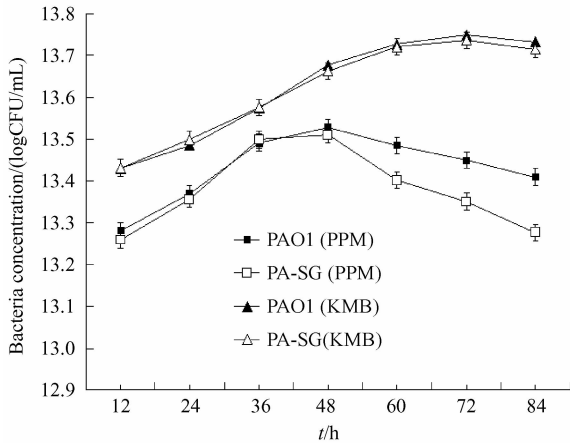


图2 铜绿假单胞菌野生株 PAO1 及突变株 PA-SG 在 PPM 和 KMB 培养基中的生长曲线

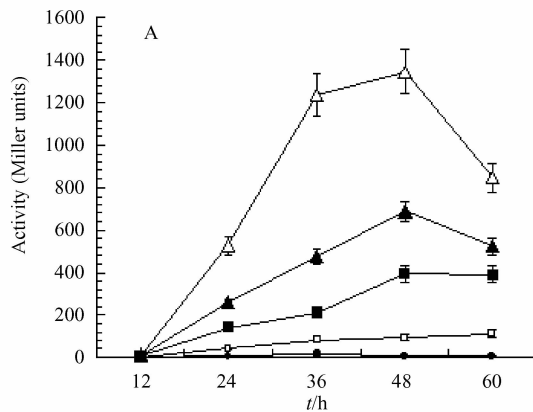
Fig. 2 Growth curves of the wild type strain PAO1 and its mutant PA-SG in PPM or KMB medium.

## 2.4 *rpoS* 基因与 *phz1*、*phz2* 的关系

为了研究 *rpoS* 基因对 *phz1* 和 *phz2* 的调控机

制,分别构建了 *phz1*、*phz2* 与 *lacZ* 的翻译融合表达载体 pMEZ1 和 pMEZ2。然后将它们和 pME6015 分别用电转化法导入野生株 PAO1 及其突变株 PA-SG,然后以 PAO1 为对照分别接种于 KMB 和 PPM 两种培养基中,定时取样,用 Miller 法检测融合  $\beta$ -半乳糖苷酶活性。根据图 3 显示的结果,野生株 PAO1、PAO1/pME6015 和 PA-SG/pME6015 的酶活性始终很弱。而当菌株生长到稳定期以后,在野生株 PAO1 和突变株 PA-SG 中,pMEZ1 和 pMEZ2 表达明显不同,pMEZ1 基因无论在 KMB 还是 PPM 培养基中均是突变株 PA-SG 酶活性高,野生株 PAO1 低,统计分析表明表达量的比值约为 5 或 4,而 pMEZ2 却相反,野生株表达量高,与突变株表达量的比值约为 3 或 2。该结果说明,在一定程度上,*rpoS* 基因抑制了 *phz1* 基因的表达,促进了 *phz2* 基因的表达,为区别性调控机制,且对 *phz1* 的调控能力强于 *phz2*。此外我们还发现,在相同的外界条件下,对 *phz2* 基因

—□— PAO1/pMEZ1; —△— PAO1/pMEZ2; —●— PAO1/pME6015; —■— PA-SG/pMEZ1;  
—▲— PA-SG/pMEZ2; —○— PA-SG/pME6015; — — PAO1



—□— PAO1/pMEZ1; —■— PA-SG/pMEZ1; —△— PAO1/pMEZ2; —▲— PA-SG/pMEZ2;  
—○— PAO1/pME6015; —●— PA-SG/pME6015; — — PAO1

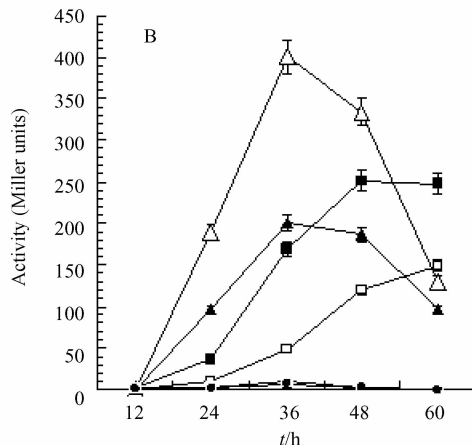


图3 翻译融合表达载体 *phz1*'-*lacZ* 和 *phz2*'-*lacZ* 在 KMB (A) 和 PPM (B) 两种培养基中的  $\beta$ -半乳糖苷酶活性

Fig. 3 Expression of the translational fusion *phz1*'-*lacZ* or *phz2*'-*lacZ* in the wild type strain PAO1 and its mutant PA-SG in KMB (A) or PPM (B) medium.

而言,随着培养基中营养因子的消耗,无论在 KMB 还是在 PPM 培养基中呈现最大表达量之后,该基因的表达量都有明显的下降趋势,而 *phz1* 则没有这种现象产生,或者说没有 *phz2* 明显,但是在 KMB 培养基中基因 *phz2* 的表达能力无论是在野生株 PAO1 还是在突变株 PA-SG 中都始终强于基因 *phz1* 的表达能力,而且在 PPM 培养基中一定时期内基因 *phz2* 的表达能力也明显的强于基因 *phz1* 的表达能力。这表明:(1)在同样的外界条件下,铜绿假单胞菌在一定的时期内,基因 *phz2* 的表达能力强于基因 *phz1* 的表达能力。(2)与基因 *phz1* 相比,基因 *phz2* 的表达程度对外界环境条件敏感,这与 Rij 等人的研究结论一致:许多环境因素对吩嗪合成基因调节也有很大影响,包括氧、离子、磷酸浓度以及环境中的碳源<sup>[10]</sup>。

### 3 讨论

铜绿假单胞菌的致病机理与其合成并分泌的多种毒力因子密切相关,而吩嗪及其衍生物是一类重要的毒力因子。因此深入研究吩嗪基因簇的表达调控机理,对进一步了解吩嗪的代谢途径和该菌的致病性具有重要的意义。本文的研究结果表明,*rpoS* 基因对吩嗪合成的两个基因簇的调控具有显著地差异性,即:负调控 *phz1*,正调控 *phz2*,但对 *phz1* 的调控能力强于 *phz2*。已有研究表明:*rpoS* 突变后,荧光假单胞菌 M18 合成 PCA 的能力明显增强<sup>[13]</sup>,铜绿假单胞菌合成绿脓菌素的量明显增多<sup>[14]</sup>; *phz1* 和 *phz2* 两个基因簇可分别或同时表达合成 PCA 所需要的酶<sup>[6]</sup>,而 PCA 是绿脓菌素合成的中间体<sup>[4]</sup>,因此可推测,在 *rpoS* 基因突变后,突变株可能主要通过 *phz1* 基因簇合成 PCA,然后用于合成绿脓菌素。从而进一步解释了徐汪节等人的研究结果 *rpoS* 突变后荧光假单胞菌 M18 合成 PCA 的能力为何增强,也验证了转录水平的变化与表型变化的一致性。

尽管两个基因簇同源性高达 98.3%,但它们却相距甚远(2.6 Mb),且上下游基因和转录调控元件不同。基因组分析表明,在 *phz1* 操纵子的启动子区域存在 1 个 *las-box* 元件,为群体感应系统的顺式调控元件<sup>[6]</sup>。群体感应是一种细菌细胞与细胞间的通讯系统,即细菌通过可扩散的小分子信号分子感知细胞群体的密度,从而引起一些特定基因在细菌群体中的协调表达。在铜绿假单胞菌中有多个群体感应系统,其中两个相级联的系统 *lasR-lasI* 和 *rhIR-rhII*,*lasR-lasI* 占主导地位<sup>[19]</sup>。而在 *phz2* 操纵子的上游没有 *las-box* 元件,但存在一个基因 *QscR*,该基因产物通过抑制 *lasR-lasI* 系统从而负调控许多群体感应控制基因的表达<sup>[20]</sup>。因此 *rpoS* 基因对 2 个基

因簇的特异性调控,很可能与它们各自上游的特异性调控元件密切相关。

Mavrodi DV 等人预测铜绿假单胞菌存在两个如此高同源性却上下游元件不同的吩嗪合成基因簇,这有利于该菌在自身生长的不同阶段产生不同数量或种类的吩嗪,更有利于增强它对环境的适应能力<sup>[6]</sup>。但是 *rpoS* 如何介导两个不同基因簇的表达调控的详细路径有待进一步研究。

**致谢** 本文突变株 PA-SG 的构建由我院本科毕业生牟岱英和姜恒秀同学参与并完成,在此向她们致以诚挚的感谢。

### 参考文献

- [1] Lee SC, Hua CC, Yu TJ, et al. Risk factors of mortality for nosocomial pneumonia: importance of initial antimicrobial therapy. *International Journal of Clinical Practice*, 2005, 59(1): 39-45.
- [2] 王辉,陈民钧. 1994-2001 年中国重症监护病房非发酵糖细菌的耐药变迁. *中华医学杂志 (National Medical Journal of China)*, 2003, 83(5): 385-390.
- [3] Leduc D, Beaufort N, de-Bentzmann S. The *Pseudomonas aeruginosa* LasB metalloprotease regulates the human urokinase-type plasminogen activator receptor through domain-specific endoproteolysis. *Infection and Immunity*, 2007, 75(8): 3848-3858.
- [4] Dietrich LE, Price-Whelan A, Petersen A, et al. The phenazine pyocyanin is a terminal signalling factor in the quorum sensing network of *Pseudomonas aeruginosa*. *Molecular Microbiology*, 2006, 61(5): 1308-1321.
- [5] Hassett DJ, Woodruff WA, Wozniak DJ, et al. Cloning and characterization of the *Pseudomonas aeruginosa* *sodA* and *sodB* genes encoding manganese and iron-cofactored superoxide dismutase: demonstration of increased manganese superoxide dismutase activity in alginate-producing bacteria. *Journal of Bacteriology*, 1993, 175(23): 7658-7665.
- [6] Mavrodi DV, Bonsall RF, Delaney SM, et al. Functional analysis of genes for biosynthesis of pyocyanin and phenazine-1-carboxamide from *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Journal of Bacteriology*, 2001, 183(21): 6454-6465.
- [7] Ledgham F, Ventre I, Soscia C, et al. Interactions of the quorum sensing regulator *QscR*; interaction with itself and the other regulators of *Pseudomonas aeruginosa* LasR and RhIR. *Molecular Microbiology*, 2003, 48(1): 199-210.
- [8] Joon-Hee L, Yannick L, Peter G. Activity of purified *QscR*, a *Pseudomonas aeruginosa* orphan quorum-sensing transcription factor. *Molecular Microbiology*, 2006, 59(2): 602-609.
- [9] Carty NL, Layland N, Colmer-Hamood JA, et al. *PtxR* modulates the expression of QS-controlled virulence factors in the *Pseudomonas aeruginosa* strain PAO1. *Molecular Microbiology*, 2006, 61(3): 782-794.

- [10] Rij ET, Wesselink M, Chin-A-Woeng TF, et al. Influence of environmental conditions on the production of phenazine-1-carboxamide by *Pseudomonas chlororaphis* PCL1391. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2004, 17(5):557-566.
- [11] Kim EJ, Zeng AP, Deckwer WD, et al. Expression of the quorum-sensing regulatory protein LasR is strongly affected by iron and oxygen concentrations in cultures of *Pseudomonas aeruginosa* irrespective of cell density. *Microbiology*, 2005, 151(4):1127-1138.
- [12] Kolter R, Siegele DA, Tormo A. The stationary phase of the bacterial life cycle. *Annual Review of Microbiology*, 1993, 47:855-874.
- [13] 徐汪节, 朱栋华, 张雪洪, 等. 假单胞菌 M18 的 *rpoS* 基因克隆及其功能分析. *微生物学报 (Acta Microbiologica Sinica)*, 2004, 44(3):309-314.
- [14] Suh SJ, Silo-Suh L, Woods DE, et al. Effect of *rpoS* mutation on the stress response and expression of virulence factors in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology*, 1999, 181(13):3890-3897.
- [15] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular cloning: A Laboratory Manual*. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbour Laboratory Press, 1989.
- [16] Schweizer HP. Small broad-host-range gentamycin resistance cassettes for site-specific insertion and deletion mutagenesis. *BioTechniques*, 1993, 15(5):831-834.
- [17] Hoang TT, Karkhoff-Schweizer RR, Kutchma AJ, et al. 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.
- [18] Choi KH, Kumar A, Schweizer HP. A 10-min method for preparation of highly electrocompetent *Pseudomonas aeruginosa* cells; Application for DNA fragment transfer between chromosomes and plasmid transformation. *Journal of Microbiological Methods*, 2006, 64(3):391-397.
- [19] Reimmann C, Ginot N, Michel L, et al. Genetically programmed autoinducer destruction reduces virulence gene expression and swarming motility in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Microbiology*, 2002, 148:923-932.
- [20] Chugani SA, Whiteley M, Lee KM, et al. *QscR*, a modulator of quorum-sensing signal synthesis and virulence in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2001, 98:2752-2757.
- [21] Schnider-Keel U, Seematter A, Maurhofer M, et al. Autoinduction of 2,4-diacetylphloroglucinol biosynthesis in the biocontrol agent *Pseudomonas fluorescens* CHA0 and repression by the bacterial metabolites salicylate and pyoluteorin. *Journal of Bacteriology*, 2000, 182:1215-1225.

## Effect of *rpoS* mutation on two gene clusters of phenazine in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1

Jinfeng Zhou, Yihe Ge, Ting Liu, Xianhao Cheng, Lei Wang, Xingxi Gao\*  
(School of Life Sciences, Ludong University, Yantai 264000, China)

**Abstract:** [ **Objective** ] As an opportunistic pathogen, *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 can produce phenazine and its derivatives, which play a critical role in their pathogenesis. In many bacteria, RpoS, the product of *rpoS* gene, mediates biosynthesis of a set of secondary metabolites. [ **Objective** ] This study aims to elucidate *rpoS* gene's function and regulation on two phenazine gene clusters in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. [ **Methods** ] The *rpoS* gene and its upstream and downstream fragments were cloned from the chromosome of *Pseudomonas aeruginosa*. With the insertion of gentamycin resistance cassette (*aacC1*), the mutant PA-SG has been created by homologous recombination. Translational fusion plasmids *phz1'*-*lacZ*(pMEZ1) and *phz2'*-*lacZ*(pMEZ2) were constructed, and then were introduced into the wild type strain PAO1 and the mutant PA-SG, respectively. Activities of beta-galactosidase in them were determined with Miller method. [ **Results** ] In KMB or PPM medium, beta-galactosidase activity of *phz1'*-*lacZ* in the mutant PA-SG is much more than that in the wild type strain. However, beta-galactosidase activity of *phz2'*-*lacZ* in the wild type strain is 2-3 folds more than that in the mutant PA-SG. [ **Conclusion** ] With these results, it is suggested that regulation mediated by *rpoS* gene on two phenazine loci is specific and different.

**Keywords:** *Pseudomonas aeruginosa*; *phz1*; *phz2*; *rpoS*; phenazine

(本文责编:张晓丽)