

铜绿假单胞菌水解弹性蛋白能力相关基因的筛选与鉴定

靳永新^{1,2}, 李铁梅¹, 夏惠明¹, 谷彩凤¹, 张秀明¹, 白艳玲¹, 徐海津^{1*}, 乔明强^{1,2*}

(¹南开大学生命科学学院, ²分子微生物学与技术教育部重点实验室, 天津 300071)

摘要:【目的】研究铜绿假单胞菌弹性蛋白水解能力相关基因。【方法】应用人工 Mu 转座技术构建铜绿假单胞菌野生型菌株 PA68 的转座突变文库, 从 2000 多个突变子中筛选得到 4 株弹性蛋白水解能力改变的突变子, 并通过克隆及测序获得转座子插入位点侧翼的序列。将铜绿假单胞菌弹性蛋白酶结构基因 *lasB* 的转录起始区序列整合入载体 pDN19lac Ω 并将该重组质粒电转化入野生型菌株 PA68 及 4 个突变株中, 对报告基因在不同菌株中的表达水平进行测定。【结果】发现 4 个突变株中 Mu 转座子分别插入 *lasA*、*galU*、*xcpZ* 和 *ptsP* 4 个基因。*ptsP* 基因失活的突变株中, *lasB* 基因的转录水平是野生型菌株的 7%, *xcpZ* 和 *lasA* 基因的失活使 *lasB* 基因的转录水平分别降低为野生株的 54% 和 75%, *galU* 基因的插入失活使 *lasB* 基因的转录上升了 1 倍。【结论】推测 *ptsP* 和 *galU* 基因很可能直接或间接地调控着弹性蛋白酶的生物合成。

关键词: 铜绿假单胞菌; 弹性蛋白酶; 转录水平

中图分类号: Q816 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209 (2008) 12-1623-06

铜绿假单胞菌 (PA, *Pseudomonas aeruginosa*) 是一种广宿主条件致病菌, 经常在患有支气管扩张、弥漫性泛细支气管炎、囊性肺纤维化等疾病患者的呼吸系统引起继发性感染。

铜绿假单胞菌的致病性源于它有众多的毒力因子, 如弹性蛋白酶, 碱性蛋白酶, 绿脓素, 鞭毛, 菌毛等。弹性蛋白酶能降解人肺弹性蛋白和别的基质蛋白如人和型胶原^[1]、降解免疫球蛋白 IgG 和 IgA^[2]。具有组织破坏活性, 能破坏肺结构, 是一种重要的炎症因子^[3]。最近有研究表明它还能抑制纤维原细胞的生长, 在慢性溃疡中有致病作用^[4]。铜绿假单胞菌弹性蛋白酶活性约为人白细胞弹性蛋白酶的十倍, 并且对人肺弹性蛋白有高度特异性, 对人肺弹性蛋白的水解活性约为牛弹性蛋白的 50 倍^[5]。Williams 等在大鼠急性肺损伤模型中也证明, 铜绿假单胞菌分泌的弹性蛋白酶比人嗜中性粒细胞弹性蛋

白酶有更高的酶活性。肺弹性蛋白与肺部的舒张和收缩密切相关, 因而铜绿假单胞菌分泌的弹性蛋白酶与病理机制密切相关^[6]。

铜绿假单胞菌弹性蛋白酶由 *lasB* 基因编码, 是一种中性锌金属蛋白酶, 需结合锌离子发挥其活性, 结合钙离子维持其稳定性^[7]。*lasB* 全长 1497 bp, 编码 498 个氨基酸, 含有一段信号肽序列, 成熟产物为 33 kDa^[8]。弹性蛋白酶是一种胞外蛋白酶, 在细胞质中以弹性蛋白酶原前体的形式存在, 在穿过内膜时, 信号肽被切割, 在周质空间中, 弹性蛋白酶原自身裂解切割掉前肽^[7], 但是前肽并没有与弹性蛋白酶分开, 而是以一种非共价键力结合在一起形成复合物, 这就保证了弹性蛋白酶在周质空间中不具有活性^[9]。这个复合物经由 II 型分泌系统穿过外膜后, 前肽与弹性蛋白酶分开, 至此, 形成一个有活性的成熟的弹性蛋白酶。另外, 由于弹性蛋白酶是铜绿假单胞

基金项目: 国家自然科学基金(30570089); 天津市应用基础研究计划(07JCYBJC08000); 天津市科技发展计划攻关项目(06YFGZSH07100)

*通讯作者。Tel: +86-22-23503340; Fax: +86-22-23503692; E-mail: mingqiangqiao@yahoo.com.cn, xuhaijin@eyou.com

作者简介: 靳永新(1982-), 女, 天津市人, 博士研究生, 研究方向为分子微生物学。E-mail: jyx.2002@eyou.com

收稿日期: 2008-04-30; 修回日期: 2008-09-02

菌非常重要的毒力因子,因此深入研究其调控的未知环节,有助于揭示铜绿假单胞菌的致病机理,为临床治疗和新药设计提供指导。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌种和质粒:铜绿假单胞菌 PA68 是一株对卡那霉素敏感的临床分离株^[10],大肠杆菌(*Escherichia coli*)DH5 α 、质粒 pBluescript (pSK) 质粒 pDN19lac Ω 为本实验室保存。

1.1.2 培养基:LB 培养基^[11];弹性蛋白酶筛选培养基^[12]。

1.1.3 主要试剂和仪器:胰蛋白胨(Tryptone)和酵母抽提物(Yeast extract)为英国 Oxoid 公司产品;琼脂粉购自北京鼎国生物技术有限责任公司;氨苄青霉素、卡那霉素、四环素购自华美生物制品公司;弹性蛋白(elastin)和弹性蛋白-刚果红(elastin-congo red)购自美国 sigma 公司;O-硝基苯基- β -D-半乳糖苷(O-Nitrophenyl- β -D-galactopyranoside, ONPG)购自 Amresco(USA)公司;限制性内切酶 *Kpn*、*EcoRI*、*BamHI*、*Sall*、小肠碱性磷酸酶(CIAP),T4 DNA 连接酶,*Taq* DNA 聚合酶,dNTP,DNA 分子量标准 DL2000、DL15000 均购自中国大连宝生物(TaKaRa)公司;其它试剂均为国产分析纯。Micro pulser 电转化仪、0.2 cm 电转化杯(Bio-Rad);PTC-200 热循环仪 MJ Research(美国);AlphaImager 分析系统(Alpha Innotech Corporation);台式高速冷冻离心机(中国江苏太仓医疗仪器厂);DY-W 电泳仪(中国北京六一仪器厂);752 分光光度计(中国上海分析仪器厂)。

1.1.4 引物:测序引物(5'-GCACCTGATTGCCGACAT-3')用于 Mu 转座子插入位点侧翼序列的测定;*lasB* 上游区引物 1(5'-ATTCCCGGCTCCACATCC-3')和引物 2(5'-CGGGATCCTCGCAACGAACAACAGGTCAA-3')。引物由 Invitrogen 公司合成。

1.2 弹性蛋白水解能力表型变化的突变子的筛选

在无菌培养皿内铺上一薄层 LB 培养基,待其凝固后再铺上一薄层弹性蛋白筛选培养基。从 Mu 转座子突变文库^[10]中活化突变子菌株,用灭菌的牙签挑取菌落点种到培养基表面,37 培养 40 h。突变子由于水解弹性蛋白的能力不同,在培养基上形成大小不一的透明水解圈。在 2000 多个突变子文库中筛选得到 4 株弹性蛋白水解能力发生明显变化的突变子 10、17、27 和 84。

1.3 弹性蛋白酶酶活的测定

参照文献[13],略有改进:将筛选得到的突变子接种于 L-Broth 培养基,37 200 r/min 培养过夜,次日转接到 20 mL 的 L-Broth 培养基中,调整转接菌的初始浓度为 $OD_{600}=0.02$,然后培养 18 h。离心取 1.0 mL 上清液,加入 10 mg 弹性蛋白-刚果红,2 mL 反应缓冲液(0.1 mol/L Tris-马来酸,1 mmol/L $CaCl_2$,pH7.0),37 振荡反应 1 h。加入 2 mL 磷酸钠缓冲液(0.7 mol/L,pH6.0)终止反应。离心取上清,在 495 nm 处测定吸光度。弹性蛋白-刚果红被弹性蛋白酶分解的产物在 495 nm 处具有最大吸光度,因此可以根据反应产物的多少判断菌株弹性蛋白酶酶活的大小。

1.4 对弹性蛋白水解能力表型突变子的基因克隆及序列测定

将突变子 10、17、27 和 84 的基因组分别用 *kpn*、*Sal* 或 *BamHI* 酶切,连入用同样酶切并去磷酸化的 pSK 载体上。利用电转化将连接产物导入 *E.coli* DH5 α 感受态细胞中,在含有 30 μ g/mL 卡那霉素,100 μ g/mL 氨苄青霉素 LB 平板上进行重组子筛选(Mu 转座子 DNA 带有卡那霉素抗性基因)。经过酶切进行重组子鉴定。然后,使用测序引物对 Mu 转座子插入位点侧翼的核苷酸序列进行测定。

1.5 Southern 杂交验证突变株中 Mu 转座子单点插入

探针为 Mu 中 610 bp 片段 PCR 产物,菌株基因组选用 *Apa* 酶切(*Apa* 在铜绿假单胞菌基因组中的酶切位点较多,且 Mu 中没有该酶切位点)。使用 DIG High Primer DNA labeling and Detection starter kit I(Roche)。具体操作参见试剂盒中的说明书。

1.6 报告基因融合质粒的构建, β -半乳糖苷酶酶活的测定

应用启动子分析数据库 <http://www.softberry.com> 和 <http://www.fruitfly.org/> 进行启动子的预测,寻找 *lasB* 基因上游可能的启动子序列,以 PA68 基因组 DNA 为模板,将该 *lasB* 基因上游的一段序列扩增,扩增序列包括预测的启动子区和 *lasB* 基因编码区的头部,使用引物 1 和引物 2(加 *BamHI* 位点),扩增产物为 854 bp,在 379 bp 处有一个 *EcoRI* 切点,反应产物内部不含 *BamHI* 位点。扩增的产物用 *EcoRI* 和 *BamHI* 酶切后连入同样酶切处理的 pSK 载体,转化入 *E.coli* DH5 α 感受态细胞,在含有 100 μ g/mL 氨苄青霉素 LB 平板上筛选白色菌落。对酶切验证过的转化子进行测序,完成 pSKPB 的构建。从 pSKPB 上用

EcoRI 和 *BamHI* 酶切回收外源片段,并连接入该双酶切的 pDN19lac Ω 载体上。转化入感受态的 *E.coli* DH5 α 中,在含四环素(50 μ g/mL)并涂布有 IPTG 和 X-gal 的 LB 培养基上筛选转化子。挑取蓝色菌落(这是由于外源启动子使 pDN19lac Ω 载体的 *lacZ* 基因表达),提取质粒酶切鉴定,构建完成 pDN19P_{lasB}-*lacZ* 报告基因融合质粒(图 1)。将质粒电转化入 PA68, 10, 17, 27 和 84 菌株中,测定其 β -半乳糖苷酶活性^[11]。

1.7 突变子绿脓素的测定

主要参照文献[11]进行操作。

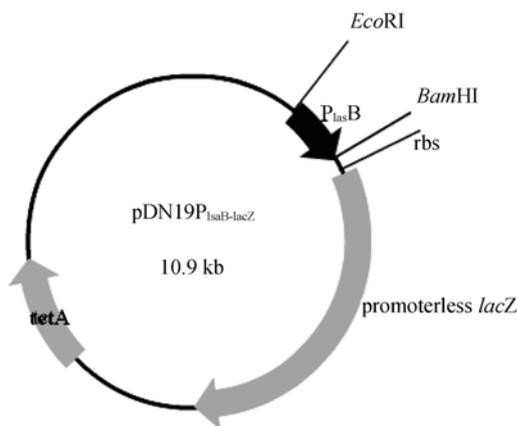


图 1 pDN19P_{lasB}-*lacZ* 重组质粒图

Fig.1 Plasmid pDN19P_{lasB}-*lacZ*.

2 结果和讨论

2.1 突变子的筛选及表型鉴定

从 2000 多个 Mu 转座突变子中筛选得到 4 株弹性蛋白水解能力改变的突变子 10、17、27 和 84。在弹性蛋白平板上进行筛选的结果见图 2。为了进一步检测突变株分泌到胞外的弹性蛋白酶的酶活,我们使用刚果红显色法对培养物上清中的弹性蛋白酶酶活进行测定,结果见表 1。



图 2 弹性蛋白培养基筛选突变子

Fig.2 Mutants on the elastin agar.

表 1 弹性蛋白酶活性

Table 1 Elastase activity of the mutants

Strain	Times ^{1*}	Elastase activity ^{2*}	Mutants/Wild type ^{3*}
10	3	8.4 \pm 1.67	51% \pm 9%
17	3	21.7 \pm 2.40	131% \pm 20%
27	3	1.3 \pm 0.33	8% \pm 2%
84	3	2.2 \pm 0.53	13% \pm 3%
68	3	16.6 \pm 0.87	100%

^{1*}Times: number of assays performed for each strain. ^{2*}*OD*₄₉₅/*OD*₆₀₀(100%). ^{3*}Results are shown as the ratio of the elastase activity(Mutants /Wild type PA68) and are means \pm standard deviations based on three independent experiments.

突变子 27 和 84 的培养物上清中弹性蛋白酶的活性大幅降低,突变子 17 的培养物上清中弹性蛋白酶活性增加,这与平板筛选的结果一致。

有报道铜绿假单胞菌弹性蛋白酶和绿脓素均受到 QS 系统的正调控。绿脓素含量测定结果(数据未显示)表明突变子 10、17、27 绿脓素水平仅稍低于野生型 PA68,84 菌株绿脓素产量明显高于 PA68(是野生型的 6 倍)。以上结果说明:铜绿假单胞菌中弹性蛋白酶与绿脓素这两种次级代谢产物的产生还应该受到其它系统的调节,使得二者并非同步增加或降低。

2.2 突变基因及其影响

筛选出的弹性蛋白水解能力发生改变的突变株,经基因克隆后进行测序,测序结果在 GenBank 进行 BLAST 比对,发现 4 株弹性蛋白水解能力变化的突变子中 Mu 转座子分别插入了 *lasA*、*galU*、*xcpZ* 和 *ptsP* 基因(表 2)。

表 2 突变子中 Mu 转座子插入的靶位点

Table 2 Mu transposon insertional locus of the mutants

Mutant	Inactive gene	Insertion site ^{1*}	Sequence similarity ^{2*} /%
10	<i>lasA</i>	305/1257	97
17	<i>galU</i>	525/840	98
27	<i>xcpZ</i>	199/525	97
84	<i>ptsP</i>	1800/2280	96

^{1*} Insertion site provides the transposon location and the length of the ORF. ^{2*} Sequence similarity with PAO1.

为验证上述突变体为 Mu 单点插入突变体我们进行了 Southern blot 实验,实验结果表明 Mu 转座子单点插入到 10、17、27 菌株的基因组中,结果见图 3(Southern 杂交图中 P 泳道显示有几条带,较浅的几条为 Mu DNA 片段的二聚体或多聚体)。84 突变株的 Southern blot 表明 Mu 转座子单点插入到其基因组中^[12]。

影响弹性蛋白酶活性的因素除了 *lasB* 基因的转

录水平外, 还有翻译、翻译后加工, 蛋白酶的分泌等过程。为了检测 *lasA*, *galU*, *xcpZ*, *ptsP* 这 4 个基因是否直接影响 *lasB* 转录水平, 我们将弹性蛋白酶结构基因 *lasB* 的转录起始区序列 (P_{lasB}) 与报告基因 (*lacZ*) 融合, 构建重组质粒 pDN19P_{*lasB*}-*lacZ*, 并测定了含有该质粒的四个突变株及野生型菌株 β -半乳糖苷酶活, 结果见表 3。

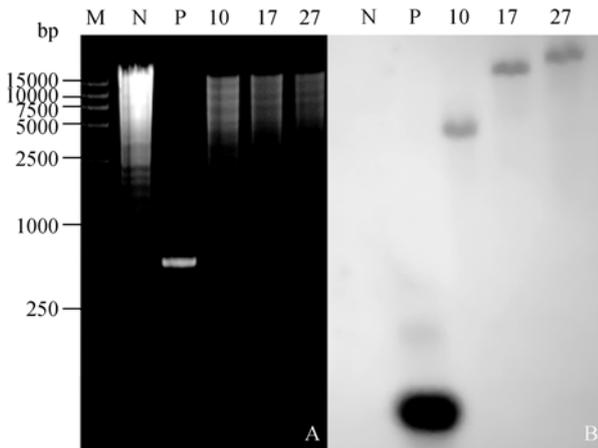


图 3 突变株基因组 Southern 杂交结果

Fig.3 Southern blot of the Mutants. A: Agarose gel electrophoresis; B: Southern blot. M, DNA molecular weight marker, DL15000; N, genomic DNA of PA68 digested with *ApaI* as negative control; P, PCR generated Mu fragment as positive control; 10, 17, 27 are genomic DNA of 10, 17, 27 digested with *ApaI* respectively.

表 3 β -半乳糖苷酶活
Table 3 β -galactosidase activity of the mutants

Strain	Times ^{1*}	Miller units	Mutants/PA68
10	8	501 \pm 43	75% \pm 11.5%
17	8	1340 \pm 148	201% \pm 29.9%
27	10	362 \pm 42	54% \pm 7.3%
84	9	46 \pm 10	7% \pm 0.58%
PA68	8	666 \pm 89	100%

^{1*}Times: number of assays performed for each strain. Plasmids containing P_{lasB} -*lacZ* were introduced into strain PA68, 10, 17, 27 and 84. β -galactosidase activity was measured at $OD_{600} = 3.0-4.0$. Results are means \pm standard deviations based on duplicate β -gal assay from at least four separate assays.

ptsP 基因失活的突变株中, *lasB* 基因的转录水平大幅下降, 只有野生型菌株的 7%, *xcpZ* 和 *lasA* 基因的失活使 *lasB* 基因的转录水平分别降低为野生株的 54% 和 75%, *galU* 基因的插入失活使 *lasB* 基因的转录上升了 1 倍。

lasA 基因全长 1257 bp, 其产物为 LasA 蛋白,

定位在膜外, 在分类上属于溶菌酶, 是一种依赖于 Zn^{2+} 的金属酶, 参与 LasB 弹性蛋白酶的成熟与包装和弹性蛋白的水解^[14]。LasA 蛋白功能在铜绿假单胞菌中已经有实验证据, 但它对铜绿假单胞菌分解弹性蛋白能力的贡献还不十分清楚。pDN19P_{*lasB*}-*lacZ* 融合质粒 β -半乳糖苷酶活测定的结果表明: *lasA* 基因的插入失活使 *lasB* 基因在转录水平上降低了 25%。除了转录水平的影响外, 我们推测 LasA 对弹性蛋白水解能力可能还存在着其他的作用: (1) 使弹性蛋白折叠为更具活性的形式; (2) 修饰激活弹性蛋白酶^[14]; (3) 使弹性蛋白酶更有效地分泌; (4) 在底物的某些特异性位点水解底物, 利于弹性蛋白酶对底物的作用。

galU 基因全长 840 bp, 编码产物为 UDP-葡萄糖 1-磷酸尿苷酰基转移酶, 该酶由 279 个氨基酸组成, 推测其定位在细胞质中, 与细胞表面多糖和脂多糖的生物合成和降解有关。未见 *galU* 基因在弹性蛋白酶水解能力中发挥作用的报道。 β -半乳糖苷酶活的测定结果表明: *galU* 基因的失活使 *lasB* 基因的转录效率上升了一倍, 刚果红显色反应结果也表明弹性蛋白酶活性上升, 这说明 *galU* 基因直接或间接地负调控着弹性蛋白酶基因的转录表达, 其作用机理还有待进一步研究。

铜绿假单胞菌中有两个相互独立的 II 型分泌系统: Xcp 和 Hxc^[15]。Xcp 系统包含 12 个成分, XcpP-Z 和 XcpA, Xcp 系统受到 QS 系统的正调控。弹性蛋白酶是通过 II 型分泌系统运输到细胞外的。从 27 突变株的刚果红显色反应测定结果看, 还存在着较弱的弹性蛋白酶活性, 推测可能的原因为: (1) *xcpZ* 基因的失活, 并没有完全阻止弹性蛋白酶的胞外运输, 仅是降低了这种运输的能力; (2) *xcpZ* 基因失活后, 另一个 II 型分泌系统 Hxc 某个未知的相应的成分起到了部分替代作用, 就像最近有研究表明: *xcpP* 突变株中仍有残留的蛋白酶的分泌, 而该突变株中缺失 *xphA* 基因后, 残存的分泌也消失了^[16]。(3) 铜绿假单胞菌培养过程中细胞自溶, 弹性蛋白酶渗出到培养基上清中。为了验证 27 突变株中弹性蛋白酶是否被阻止在了周质空间中, 我们采用渗透休克的方法, 获得了突变株 27, PA68 周质空间中的蛋白, 并且同样进行了刚果红显色反应的测定, 发现突变株中周质空间释放物中存在的弹性蛋白酶活性, 远超过野生型菌株(数据未显示), 这进一步证明了 *xcpZ* 基因的失活,

使弹性蛋白酶的分泌被全部或部分地阻止在了周质空间中。 β -半乳糖苷酶酶活的测定结果表明：*xcpZ* 基因的失活在转录水平上降低了 *lasB* 基因的转录，推测这可能是因为细胞内积累的 LasB 蛋白对 *lasB* 基因的转录具有负反馈抑制作用。

ptsP 基因最早发现于大肠杆菌基因组，产物为磷酸烯醇式丙酮酸-蛋白磷酸转移酶，协调碳代谢和氮代谢之间的关系，由 759 个氨基酸组成。前期研究表明，*ptsP* 通过负调控群体密度感知系统(QS 系统)，从而影响绿脓素的合成，在 *ptsP* 基因失活的菌株中，*lasI* 和 *rhII* 这两个 QS 系统相关基因的转录水平分别是野生型菌株中的 2 和 3 倍^[17]。本研究结果中，*ptsP* 基因失活的菌株绿脓素合成量是野生型菌株的 6 倍， β -半乳糖苷酶酶活测定的结果显示 *ptsP* 基因的失活，造成 *lasB* 基因在转录水平有很大的降低，与之一致的是，刚果红显色反应中弹性蛋白酶的活性仅为野生型的 13%。根据现有文献报道，铜绿假单胞菌的毒力因子弹性蛋白酶与绿脓素均受到 QS 系统的正调控，而在 *ptsP* 基因的失活突变株中，绿脓素的表达量上升了，而弹性蛋白酶的合成量却下降了。我们推测很有可能弹性蛋白酶的表达除了受到 QS 系统的正调控之外，还受到其它基因直接或间接的调控，而这些调控因素又受到 *ptsP* 基因的影响。

参 考 文 献

- [1] Heck LW, Morihara K, McRae WB, *et al.* Specific cleavage of human type III and IV collagens by *Pseudomonas aeruginosa* elastase. *Infection and Immunity*, 1986, 51(1): 115–118.
- [2] Heck LW, Alarcon PG, Kulhavy RM, *et al.* Degradation of IgA proteins by *Pseudomonas aeruginosa* elastase. *The Journal of Immunology*, 1990, 144(6): 2253–2257.
- [3] Yanagihara K, Tomono K, Kaneko Y, *et al.* Role of elastase in a mouse model of chronic respiratory *Pseudomonas aeruginosa* infection that mimics diffuse panbronchiolitis. *Journal of Medical Microbiology*, 2003, 52(6): 531–535.
- [4] Schmidtchen A, Holst E, Tapper H, *et al.* Elastase-producing *Pseudomonas aeruginosa* degrade plasma proteins and extracellular products of human skin and fibroblasts, and inhibit fibroblast growth. *Microb Pathog*– 2003, 34(1): 47–55.
- [5] Hamdaoui A, Wund-Bisseret F, Bieth JG. Fast solubilization of human lung elastin by *Pseudomonas aeruginosa* elastase. *Am Rev Respir Dis*, 1987, 135(4): 860–863.
- [6] Williams JC, Lucas BJ, Knee C, *et al.* Acute lung injury induced by *Pseudomonas aeruginosa* elastase in hamsters. *Exp Lung Res*, 1992, 18(1): 155–171.
- [7] McIver KS, Olson JC, Ohman DE. *Pseudomonas aeruginosa lasB1* mutants produce an elastase, substituted at active-site His-223, that is defective in activity, processing, and secretion. *Journal of Bacteriology*, 1993, 175(13): 4008–4015.
- [8] Bever RA, Iglewski BH. Molecular characterization and nucleotide sequence of the *Pseudomonas aeruginosa* elastase structural gene. *Journal of Bacteriology*, 1988, 170(9): 4309–4314.
- [9] Braun P, Ockhuijsen C, Eppens E, *et al.* Maturation of *Pseudomonas aeruginosa* elastase. formation of the disulfide bonds. *The Journal of Biological Chemistry*, 2001, 276(28): 26030–26035.
- [10] 单志英, 徐海津, 施兴启, 等. 铜绿假单胞菌弹性蛋白酶基因的研究. *微生物学报(Acta Microbiologica Sinica)*, 2004, 44(3): 49–54.
- [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] 陈启和, 何国庆, 邬应龙. 弹性蛋白酶产生菌的筛选及其发酵条件的初步研究. *浙江大学学报(农业与生命科学版)(Journal of Zhejiang University Agriculture and Life Science)*, 2003, 29 (1): 59–64.
- [13] Ohman DE, Cryz SJ, Iglewski BH. Isolation and characterization of *Pseudomonas aeruginosa* PAO mutant that produces altered elastase. *Journal of Bacteriology*, 1980, 142(3): 836–842.
- [14] Schad PA, Iglewski BH. Nucleotide sequence and expression in *Escherichia coli* of the *Pseudomonas aeruginosa lasA* gene. *Journal of Bacteriology*, 1988, 170(6): 2784–2789.
- [15] Ball G, Durand E, Lazdunski A, *et al.* A novel type secretion system in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Microbio*, 2002, 43(2): 475–85.
- [16] Michel GPF, Durand E, Filloux A. XphA/XqhA, a Novel GspCD Subunit for Type II Secretion in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology*, 2007, 189(10): 3776–3783.
- [17] Xu HJ, Lin WL, Xia HM, *et al.* Influence of *ptsP* gene on pyocyanin production in *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiol Lett*, 2005, 253(1): 103–109.

Mutational analysis of genes involved in elastin hydrolysis in *Pseudomonas aeruginosa*

Yongxin Jin^{1,2}, Tiemei Li¹, Huiming Xia¹, Caifeng Gu¹, Xiuming Zhang¹, Yanling Bai¹,
Haijin Xu^{1*}, Mingqiang Qiao^{1,2*}

(¹College of Life Science, Nankai University, ²The Key Laboratory of Molecular Microbiology and Technology,
Ministry of Education, Tianjin 300071, China)

Abstract: [Objective] *Pseudomonas aeruginosa* is an opportunistic pathogen responsible for a wide range of acute and chronic infections. When growing in the host, it secretes a lot of virulence factors including elastase. This work aimed to explore the genes involved in hydrolyzing ability of *Pseudomonas aeruginosa* towards elastin. [Methods] We performed a transposon mutagenesis analysis of *P. aeruginosa* PA68 to identify candidate genes involved in elastin hydrolysis. We also monitored the promoter activity of the *lasB*, a gene encoding the elastase, in the mutants and the wild-type by introducing a P_{lasB} -*lacZ* transcriptional fusion. [Results] Four mutants with altered levels of elastase production were isolated (elastase activity relative to wild-type was shown in parenthesis): 10 (51%), 17 (131%), 27 (8%) and 84 (13%). Locations of the transposon were mapped to the genome *lasA*, *galU*, *xcpZ* and *ptsP*, respectively. The results of the *lasB* promoter's activity were consistent with the elastase activity data (β -galactosidase activity relative to wild-type was shown in parenthesis): 10(75%), 17(201%), 27(54%) and 84(7%). [Conclusion] Taken together, the data build up a connection of these four genes with elastase production. This is the first report that gene *galU* and *ptsP* may be employed in the regulation of the biosynthesis of elastase.

Keywords: *Pseudomonas aeruginosa*; elastase; transcriptional level

Supported by the National Natural Science Foundation of China (30570089), the Plan of Application and Foundation Research of Tianjin (07JCYBJC08000) and the Developing Plan of Science and Technology of Tianjin (06YFGZSH07100)

*Corresponding author. Tel: +86-22-23503340; Fax: +86-22-23503692; E-mail: mingqiangqiao@yahoo.com.cn, xuhaijin@eyou.com

Received: 30 April 2008/ Revised: 2 September 2008

《微生物学报》投稿方式

2007年12月修订

从2006年起,本刊采用“稿件远程处理系统”,全面试行网上投稿、网上审稿、网上查询等方式进行工作。欢迎广大作者通过登陆本刊网站进行投稿和查询。

(1) 远程投稿:请先登录本刊网站 <http://journals.im.ac.cn>,进入《微生物学报》,点击“作者投稿”。如果您是第一次通过“远程”给本刊投稿,请先点击进行“注册”,注册成功后再进行投稿。如果曾在本刊网站投过稿,则可直接投稿。如果忘了用户名和密码,请联系本刊编辑部找回登录口令。

(2) 邮寄纸样:所有来稿均需要邮寄1份纸稿、介绍信。

(3) 稿件受理费:投稿时请随寄100元受理费,务必通过邮局汇款,切忌随信邮寄!

注:务请在汇款单上注明“第一作者姓名”和“稿件编号”。