

· 医药生物技术 ·

铜绿假单胞菌中 S 型绿脓杆菌素与荧光嗜铁素的功能协同性分析

陈文辉¹, 金帆^{2*}

1 中国科学技术大学 高分子科学与工程系 合肥微尺度物质科学国家研究中心, 安徽 合肥 230026

2 中国科学院深圳先进技术研究院合成生物学研究所, 广东 深圳 518055

陈文辉, 金帆. 铜绿假单胞菌中 S 型绿脓杆菌素与荧光嗜铁素的功能协同性分析[J]. 生物工程学报, 2023, 39(4): 1562-1577.

CHEN Wenhui, JIN Fan. Functional synergism of pyoverdine and the S-type pyocins of *Pseudomonas aeruginosa*[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(4): 1562-1577.

摘要: 在铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)中, S型绿脓杆菌素 S2 和 S4 与细菌中的铁载体荧光嗜铁素(pyoverdine)使用相同的摄取通道, 表明二者之间存在某些联系。本研究表征了细菌中 3 个 S 型绿脓杆菌素(Pys2、PA3866、PyoS5)的单细菌基因表达分布, 并研究了 S2 型绿脓杆菌素对细菌摄取荧光嗜铁素的影响。结果表明, 在 DNA 损伤压力下, S 型绿脓杆菌素基因的表达在细菌种群中呈现出高度分化, 外源加入 S2 型绿脓杆菌素会减少细菌对荧光嗜铁素的摄取, 因此 S2 型绿脓杆菌素的存在会阻止不合成荧光嗜铁素的“欺骗者”摄取环境中荧光嗜铁素, 进而减弱其对活性氧(reactive oxygen species, ROS)压力的抵抗能力。另外我们发现, 在细菌中过表达 SOS 响应(SOS response)调节因子 PrtN 时, 荧光嗜铁素相关合成基因的表达量显著降低, 进而导致荧光嗜铁素的总合成量和外分泌量显著降低。以上结果表明细菌中 SOS 压力响应系统与铁摄取系统的功能是存在相互联系的。

关键词: SOS 响应; 绿脓杆菌素; 荧光嗜铁素; 活性氧压力; 铜绿假单胞菌

资助项目: 国家重点研发计划(2020YFA0906900, 2018YFA0902700); 中国科学院科研仪器设备研制项目(YJKYYQ20200033)

This work was supported by the National Key Research and Development Program of China (2020YFA0906900, 2018YFA0902700) and the Scientific Instrument Developing Project of the Chinese Academy of Sciences (YJKYYQ20200033).

*Corresponding author. Tel: +86-755-26409621, E-mail: fan.jin@siat.ac.cn

Received: 2022-08-02; Accepted: 2022-11-30; Published online: 2022-12-06

Functional synergism of pyoverdine and the S-type pyocins of *Pseudomonas aeruginosa*

CHEN Wenhui¹, JIN Fan^{2*}

1 Hefei National Laboratory for Physical Sciences at the Microscale, Department of Polymer Science and Engineering, University of Science and Technology of China, Hefei 230026, Anhui, China

2 Shenzhen Institute of Synthetic Biology, Shenzhen Institutes of Advanced Technology, Chinese Academy of Sciences, Shenzhen 518055, Guangdong, China

Abstract: Pyocin S2 and S4 in *Pseudomonas aeruginosa* use the same uptake channels as the pyoverdine does in bacteria, indicating a possible connection between them. In this study, we characterized the single bacterial gene expression distribution of three S-type pyocins (Pys2, PA3866, and PyoS5) and examined the impact of pyocin S2 on bacterial uptake of pyoverdine. The findings demonstrated that the expression of the S-type pyocin genes was highly differentiated in bacterial population under DNA damage stress. Moreover, exogenous addition of pyocin S2 reduces the bacterial uptake of pyoverdine so that the presence of pyocin S2 prevents the uptake of environmental pyoverdine by non-pyoverdine synthesizing ‘cheaters’, thereby reducing their resistance to oxidative stress. Furthermore, we discovered that overexpression of the SOS response regulator PrtN in bacteria significantly decreased the expression of genes involved in the synthesis of pyoverdine, significantly decreasing the overall synthesis and exocytosis of pyoverdine. These findings imply a connection between the function of the iron absorption system and the SOS stress response mechanism in bacteria.

Keywords: SOS response; pyocin; pyoverdine; ROS stress; *Pseudomonas aeruginosa*

铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)是一种兼性厌氧、无芽孢形成的杆状革兰氏阴性菌,广泛存在于自然环境尤其是淡水和土壤中。它是一种条件性致病菌,可以感染植物和动物包括人类宿主并引发疾病。铜绿假单胞菌感染普遍发生在免疫功能不全的人身上,比如囊胞性纤维症(cystic fibrosis, CF)患者、支气管扩张患者、烧伤患者、癌症患者、艾滋病患者或者器官移植术后病人等。它可以引发一系列社区获得性感染,包括毛囊炎、刺伤导致脊髓炎、肺炎、外耳道炎症等。不管是在自然环境中,还是宿主中,细菌的生存都面临着不同的环境压力,如紫外线、抗生素、不适宜的温度和 pH 等。为了在这些极端的条件下生存下来,细菌必须感应到这些压力,

并调节自身的一些基因的表达以及蛋白的活性来应对这些压力。在亿万年的演化中,细菌中产生了各种应对不同环境压力的响应系统,比如热休克响应系统、冷休克响应系统以及各种外排泵等^[1-4]。

环境中会有很多因素会造成细菌的 DNA 损伤,如强烈的紫外线照射、喹诺酮类抗生素等^[5-6]。细菌应对 DNA 损伤的响应机制称为 SOS 响应(SOS response)。在铜绿假单胞菌中, LexA、AlpR 和 PrtR 这 3 个转录抑制子调控了 SOS 响应。LexA 蛋白调控了大量负责 DNA 修复的基因的表达, AlpR 调控了细菌的一套程序性死亡通路, PrtR 则通过调控 *prtN* 基因的表达来间接调控绿脓杆菌素(pyocin)的合成。

在铜绿假单胞菌中,绿脓杆菌素分为 R 型、F 型和 S 型^[7]。其中 R 型和 F 型绿脓杆菌素由噬菌体的尾部演化而来。S 型绿脓杆菌素是一大类蛋白质细菌素,通常由大分子量的效应蛋白和小分子量的免疫蛋白组成。效应蛋白通常包含 2 个结构域,一个结构域帮助蛋白与细菌细胞膜上特定通道蛋白结合并利用质子动势(proton motive force, PMF)进入胞内,另一个结构域通常是具有成孔功能(如 pyocin S5)、DNase 活性(如 pyocin S2)或者 tRNase 活性(如 pyocin S4)^[8]。S 型绿脓杆菌素的确切的生理学作用尚不清晰。一种可能的生理学作用是确保能够合成绿脓杆菌素的铜绿假单胞菌细菌种群在细菌生态位中的优势地位:利用绿脓杆菌素抑制绿脓杆菌素敏感型细菌的数量^[9]。绿脓杆菌素的表达还会增加细菌对环丙沙星的敏感性^[10]。此外,在临床条件下检测到绿脓杆菌素基因的表达的频率远远大于在自然环境中,同时 S 型绿脓杆菌素在缺铁条件下的抑菌能力更强,表明绿脓杆菌素的分泌可能是有位置偏好的,比如囊性纤维化患者的肺部^[11-14]。

目前已经有实验证明了 S2 型绿脓杆菌素(pyocin S2)是通过铜绿假单胞菌外膜上的 FpvAI 蛋白进入胞内的^[15]。FpvAI 同时还是铜绿假单胞菌摄取荧光嗜铁素(pyoverdine)的主要通道蛋白。本课题组之前发现,荧光嗜铁素除了能帮助细菌在缺条件下摄取环境中的铁离子之外,还能帮助细菌抵抗活性氧(reactive oxygen species, ROS)压力^[16]。这些结果表明细菌中响应不同环境压力的系统之间可能存在着重要的联系。

本研究通过构建启动子荧光报告系统,探究了不同条件下 S 型绿脓杆菌素基因的表达分布,绿脓杆菌素的表达对荧光嗜铁素合成量的影响,以及绿脓杆菌素的存在对细菌抵抗 ROS 压力的影响。结果表明,当环丙沙星超过最小抑制浓度

(minimum inhibitory concentration, MIC)时, S 型绿脓杆菌素的基因表达呈现高度分化;在 S 型绿脓杆菌素高表达的菌种中,荧光嗜铁素的表达量下降;环境中的 S2 型绿脓杆菌素可以阻止 $\Delta pvdA$ 菌株通过摄取环境中的荧光嗜铁素来减少妥布霉素带来的损伤。表明细菌中响应不同环境压力的系统之间不是相互独立的,而是存在相互作用。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 菌株和质粒

所用菌株和质粒如表 1 所示。铜绿假单胞菌菌株 PAO1 及其敲除菌株、大肠杆菌(*Escherichia coli*) Top10 和 BL21, 质粒 pUCP20、pET28a-pys2-His 均由本实验室保存。

1.1.2 主要试剂

LB 培养基:胰蛋白胨[生工生物工程(上海)有限公司] 10 g/L, 酵母粉[生工生物工程(上海)有限公司] 5 g/L, NaCl(阿拉丁试剂有限公司), 10 g/L; 固体培养基添加 20 g/L 的琼脂(阿拉丁试剂有限公司)。

FAB 培养基: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2 g/L, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 12.02 g/L, KH_2PO_4 3 g/L, NaCl 3 g/L, MgCl_2 93 mg/L, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 14 mg/L, 微量金属元素溶液 1 mL/L。试剂购自阿拉丁试剂有限公司。

SSM 培养基: $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 7.86 g/L, KH_2PO_4 3.00 g/L, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1.00 g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.20 g/L, 琥珀酸(阿拉丁试剂有限公司) 4.00 g/L, 用 NaOH 溶液调节 pH 至 7。

其他试剂:环丙沙星、庆大霉素、妥布霉素、甘油、 FeCl_3 、阿拉伯糖、HEPES、 CuSO_4 、异丙基- β -D-硫代半乳糖苷(isopropyl- β -D-thiogalactoside, IPTG)购自阿拉丁试剂有限公司, 碘化丙啶(PI)

表 1 实验所用菌株和质粒

Table 1 Strains and plasmids used in this study

Strains and plasmids	Characteristics	Sources or references
Strains		
<i>P. aeruginosa</i> PAO1		Lab stock
$\Delta pvdA$	<i>pvdA</i> inactivated in PAO1; nonresistant.	Lab stock
$\Delta pys2$	<i>pys2</i> inactivated in PAO1; nonresistant.	Lab stock
$\Delta PA3866$	<i>PA3866</i> inactivated in PAO1; nonresistant.	Lab stock
$\Delta pyoS5$	<i>pyoS5</i> inactivated in PAO1; nonresistant.	Lab stock
$\Delta RFPyo$	R- and F-type pyocin genes (<i>PA0617-PA0642</i>) inactivated in PAO1; nonresistant.	Lab stock
$\Delta Spyo$	All S-type pyocin genes inactivated in PAO1; nonresistant.	Lab stock
Other strains		
<i>Escherichia coli</i> Top10	F- <i>mcrA</i> $\Delta(mrr-hsdRMS-mcrBC)$ $\Phi 80lacZ$ $\Delta M15$ $\Delta lacX74$ <i>recA1</i> <i>araD139</i> $\Delta(araleu)7697$ <i>galUgalK</i> <i>rpsL</i> (NaIR) <i>endA1</i> <i>nupG</i>	Lab stock
<i>Escherichia coli</i> BL21	<i>E. coli</i> B F- <i>ompTgalcdmlonhsdSβ</i> (r _B ⁻ m _B ⁻) [<i>malB</i> [*]] _{K-12} (λ^S)	Lab stock
Plasmids		
pUCP20	<i>E. coli-P. aeruginosa</i> shuttle plasmid, Gm ^r	Lab stock
S2-ImmS2-pET28a	Plasmid used to induce expression of <i>pys2</i>	Lab stock
pUCP20-P _{<i>pys2</i>} - <i>sfgfp</i> -T0T1-J23102- <i>cyofp1</i>	<i>pys2</i> transcriptional reporter, <i>sfgfp</i> driven by the <i>pys2</i> promoter and <i>cyofp1</i> driven by the J23102 promoter cloned into pUCP20. Gm ^r	This study
pUCP20-P _{<i>PA3866</i>} - <i>sfgfp</i> -T0T1-J23102- <i>cyofp1</i>	<i>PA3866</i> transcriptional reporter, <i>sfgfp</i> driven by the <i>PA3866</i> promoter and <i>cyofp1</i> driven by the J23102 promoter cloned into pUCP20. Gm ^r	This study
pUCP20-P _{<i>pyoS5</i>} - <i>sfgfp</i> -T0T1-J23102- <i>cyofp1</i>	<i>pyoS5</i> transcriptional reporter, <i>sfgfp</i> driven by the <i>pyoS5</i> promoter and <i>cyofp1</i> driven by the J23102 promoter cloned into pUCP20. Gm ^r	This study
pUCP20-P _{<i>lexA</i>} - <i>sfgfp</i> -T0T1-J23102- <i>cyofp1</i>	<i>lexA</i> transcriptional reporter, <i>sfgfp</i> driven by the <i>lexA</i> promoter and <i>cyofp1</i> driven by the J23102 promoter cloned into pUCP20. Gm ^r	This study
pUCP20-P _{<i>PA2288</i>} - <i>sfgfp</i> -T0T1-J23102- <i>cyofp1</i>	<i>PA2288</i> transcriptional reporter, <i>sfgfp</i> driven by the <i>PA2288</i> promoter and <i>cyofp1</i> driven by the J23102 promoter cloned into pUCP20. Gm ^r	This study
pUCP20-P _{<i>dinB</i>} - <i>sfgfp</i> -T0T1-J23102- <i>cyofp1</i>	<i>dinB</i> transcriptional reporter, <i>sfgfp</i> driven by the <i>dinB</i> promoter and <i>cyofp1</i> driven by the J23102 promoter cloned into pUCP20. Gm ^r	This study
pUCP20-P _{<i>pvdQ</i>} - <i>sfgfp</i> -T0T1-J23102- <i>cyofp1</i>	<i>pvdQ</i> transcriptional reporter, <i>sfgfp</i> driven by the <i>pvdQ</i> promoter and <i>cyofp1</i> driven by the J23102 promoter cloned into pUCP20. Gm ^r	This study
pUCP20-P _{<i>pvdA</i>} - <i>sfgfp</i> -T0T1-J23102- <i>cyofp1</i>	<i>pvdA</i> transcriptional reporter, <i>sfgfp</i> driven by the <i>pvdA</i> promoter and <i>cyofp1</i> driven by the J23102 promoter cloned into pUCP20. Gm ^r	This study
pUCP20-P _{<i>fpvI</i>} - <i>sfgfp</i> -T0T1-J23102- <i>cyofp1</i>	<i>fpvI</i> transcriptional reporter, <i>sfgfp</i> driven by the <i>fpvI</i> promoter and <i>cyofp1</i> driven by the J23102 promoter cloned into pUCP20. Gm ^r	This study
pUCP20-P _{<i>pvdP</i>} - <i>sfgfp</i> -T0T1-J23102- <i>cyofp1</i>	<i>pvdP</i> transcriptional reporter, <i>sfgfp</i> driven by the <i>pvdP</i> promoter and <i>cyofp1</i> driven by the J23102 promoter cloned into pUCP20. Gm ^r	This study
pUCP20-P _{<i>pvdF</i>} - <i>sfgfp</i> -T0T1-J23102- <i>cyofp1</i>	<i>pvdF</i> transcriptional reporter, <i>sfgfp</i> driven by the <i>pvdF</i> promoter and <i>cyofp1</i> driven by the J23102 promoter cloned into pUCP20. Gm ^r	This study
pUCP20-P _{<i>pvdE</i>} - <i>sfgfp</i> -T0T1-J23102- <i>cyofp1</i>	<i>pvdE</i> transcriptional reporter, <i>sfgfp</i> driven by the <i>pvdE</i> promoter and <i>cyofp1</i> driven by the J23102 promoter cloned into pUCP20. Gm ^r	This study
pUCP20-P _{<i>pvdH</i>} - <i>sfgfp</i> -T0T1-J23102- <i>cyofp1</i>	<i>pvdH</i> transcriptional reporter, <i>sfgfp</i> driven by the <i>pvdH</i> promoter and <i>cyofp1</i> driven by the J23102 promoter cloned into pUCP20. Gm ^r	This study
pUCP20-P _{<i>pvdS</i>} - <i>sfgfp</i> -T0T1-J23102- <i>cyofp1</i>	<i>pvdS</i> transcriptional reporter, <i>sfgfp</i> driven by the <i>pvdS</i> promoter and <i>cyofp1</i> driven by the J23102 promoter cloned into pUCP20. Gm ^r	This study
pUCP20-P _{<i>pys2</i>} - <i>sfgfp</i> -T0T1-J23102- <i>cyofp1</i> -T-araC-P _{BAD} - <i>prtN</i>	<i>pys2</i> transcriptional reporter, <i>sfgfp</i> driven by the <i>pys2</i> promoter, <i>cyofp1</i> driven by the J23102 promoter and cloned into pUCP20. Gm ^r	This study

(待续)

(续表 1)

Strains and plasmids	Characteristics	Sources or references
pUCP20-P _{PA3866} - <i>sfgfp</i> -T0T1- J23102- <i>cyofp1</i> -T-araC-P _{BAD} - <i>prtN</i>	<i>Sfgfp</i> driven by the PA3866 promoter, <i>cyofp1</i> driven by the J23102 promoter, <i>prtN</i> driven by the P _{BAD} promoter and cloned into pUCP20. Gm ^r	This study
pUCP20-P _{pyoS5} - <i>sfgfp</i> -T0T1- J23102- <i>cyofp1</i> -T-araC-P _{BAD} - <i>prtN</i>	<i>Sfgfp</i> driven by the <i>pyoS5</i> promoter, <i>cyofp1</i> driven by the J23102 promoter, <i>prtN</i> driven by the P _{BAD} promoter and cloned into pUCP20. Gm ^r	This study
pUCP20-P _{pvdQ} - <i>sfgfp</i> -T0T1- J23102- <i>cyofp1</i> -T-araC-P _{BAD} - <i>prtN</i>	<i>Sfgfp</i> driven by the <i>pvdQ</i> promoter, <i>cyofp1</i> driven by the J23102 promoter, <i>prtN</i> driven by the P _{BAD} promoter and cloned into pUCP20. Gm ^r	This study
pUCP20-P _{pvdA} - <i>sfgfp</i> -T0T1- J23102- <i>cyofp1</i> -T-araC-P _{BAD} - <i>prtN</i>	<i>Sfgfp</i> driven by the <i>pvdA</i> promoter, <i>cyofp1</i> driven by the J23102 promoter, <i>prtN</i> driven by the P _{BAD} promoter and cloned into pUCP20. Gm ^r	This study
pUCP20-P _{fpvI} - <i>sfgfp</i> -T0T1- J23102- <i>cyofp1</i> -T-araC-P _{BAD} - <i>prtN</i>	<i>Sfgfp</i> driven by the <i>fpvI</i> promoter, <i>cyofp1</i> driven by the J23102 promoter, <i>prtN</i> driven by the P _{BAD} promoter and cloned into pUCP20. Gm ^r	This study
pUCP20-P _{pvdP} - <i>sfgfp</i> -T0T1- J23102- <i>cyofp1</i> -T-araC-P _{BAD} - <i>prtN</i>	<i>Sfgfp</i> driven by the <i>pvdP</i> promoter, <i>cyofp1</i> driven by the J23102 promoter, <i>prtN</i> driven by the P _{BAD} promoter and cloned into pUCP20. Gm ^r	This study
pUCP20-P _{pvdF} - <i>sfgfp</i> -T0T1- J23102- <i>cyofp1</i> -T-araC-P _{BAD} - <i>prtN</i>	<i>Sfgfp</i> driven by the <i>pvdF</i> promoter, <i>cyofp1</i> driven by the J23102 promoter, <i>prtN</i> driven by the P _{BAD} promoter and cloned into pUCP20. Gm ^r	This study
pUCP20-P _{pvdE} - <i>sfgfp</i> -T0T1- J23102- <i>cyofp1</i> -T-araC-P _{BAD} - <i>prtN</i>	<i>Sfgfp</i> driven by the <i>pvdE</i> promoter, <i>cyofp1</i> driven by the J23102 promoter, <i>prtN</i> driven by the P _{BAD} promoter and cloned into pUCP20. Gm ^r	This study
pUCP20-P _{pvdH} - <i>sfgfp</i> -T0T1- J23102- <i>cyofp1</i> -T-araC-P _{BAD} - <i>prtN</i>	<i>Sfgfp</i> driven by the <i>pvdH</i> promoter, <i>cyofp1</i> driven by the J23102 promoter, <i>prtN</i> driven by the P _{BAD} promoter and cloned into pUCP20. Gm ^r	This study
pUCP20-P _{pvdS} - <i>sfgfp</i> -T0T1- J23102- <i>cyofp1</i> -T-araC-P _{BAD} - <i>prtN</i>	<i>Sfgfp</i> driven by the <i>pvdS</i> promoter, <i>cyofp1</i> driven by the J23102 promoter, <i>prtN</i> driven by the P _{BAD} promoter and cloned into pUCP20. Gm ^r	This study

购自日本同仁化学研究所。

1.1.3 主要仪器

倒置显微镜(奥林巴斯株式会社,型号 IX-71),去离子水机(默克密理博,型号 Advantage A10),医用型超净工作台(艺思高科技有限公司,型号 SVE-4A1),大容量振荡器摇床(太仓华大实验仪器科技有限公司,型号 HZ-6090A),NanoDrop 2000(赛默飞世尔科技公司),台式高速冷冻离心机(长沙平凡仪器仪表有限公司,型号 TGL-16A),低速离心机(北京京立离心机有限公司,型号 LD5-2B),细菌电穿孔仪(伯乐生命医学产品有限公司,型号 617BR109469),生化培养箱(上海丙林电子科技有限公司,SPX 系列),冷冻干燥机(北京博医康实验仪器有限公司,型号 FD-1A-50)。

1.2 方法

1.2.1 质粒及启动子荧光报告菌株构建

质粒构建过程中各片段通过 PCR 反应扩增得到,所涉及的引物及其序列如表 2 所示。利用 Gibson Assembly 的方法将各个片段插入

到线性化的 pUCP20 质粒^[17]。随后用化学转化法将连接产物转化到大肠杆菌 Top10 感受态细胞中。利用 PCR 反应以及测序鉴定得到正确的质粒。随后利用电化学转化法将质粒转化至 PAO1 或 $\Delta pvdA$ 菌株中,利用抗性挑选出正确的单克隆扩大培养保存至 -80 °C 冰箱,以便后续使用。所有 PCR 反应以及 Gibson Assembly 反应的组分配制和反应温度均参照试剂盒说明书。

1.2.2 荧光图像拍摄

使用倒置显微镜(IX-71 Olympus)来进行菌株的荧光数据采集。拍摄 SfGFP 和 CyOFP1 的荧光使用的激发光波长均为 488 nm, SfGFP 的发射波长为(520±28) nm, CyOFP1 的发射波长为(583±22) nm,拍摄时激发光曝光时间均为 200 ms。测定的荧光嗜铁素的荧光强度时的激发波长为 405 nm,发射波长为 450 nm;生死染色实验中 PI 荧光的激发波长为 561 nm,发射波长为 605 nm。为了统计足够多单细菌的荧光数据,每个菌种样品都采集了多个视野的数据。

表 2 文中所用引物序列

Table 2 Primer sequences used in this study

Primer name	Sequence (5'→3')	Size (bp)
promoter-test-F	GGGGACACTGTATCTGCG	18
promoter-test-R	TCTTGCGAATGACCTTGA	18
pucZL-F2	CTAGCGATCCCRACTACTATAGAGGG	27
pucZL-R2	AACTGGTTGGACTTGCCCTCCCTCT	25
add-sfgfp-F	GGAGGGCAAGTCCAACCAGTT	21
add-sfgfp-R	GTCAACC GCAAGCTCCTAGCGGCGG	25
add-cyofp1-F	GGAGCTTGCGGTTGACAGCTAGCTCAG	27
add-cyofp1-R	CGGAAGAGCGCCCAATACGC	20
add-prtN-F	GCGTATTGGGCGCTCTCCGGCCAAGCGCGCAATTAACCCTC	42
add-prtN-R	AGCGAGTCAGTGAGCGAGGAAGGCGTTTAAGGGCACCAATAAC	43
pUCP(prtN)-F	CTTCCTCGCTCACTGACTCGCT	22
pUCP(prtN)-R	CTTGCCGGAAGAGCGCCCAATACG	25
PA0923-F	AGAGGGAGGGCAAGTCCAACCAGTTTCAGCATCTGTCTGTCTTTCCGTATC	52
PA0923-R	CTCTATAGTGAGTCGGGATCGCTAGCGGCGAACCGCCAACCGCCA	45
PA3007-F	AGAGGGAGGGCAAGTCCAACCAGTTAAGAACGGCACCATCAGG	43
PA3007-R	CTCTATAGTGAGTCGGGATCGCTAGTTGAAGCCGAGTTCCCTGG	43
PA2288-F	AGAGGGAGGGCAAGTCCAACCAGTTTGCGGTATTCAACTGGCG	43
PA2288-R	CTCTATAGTGAGTCGGGATCGCTAGAGTTCGGCAAGGTTGTGG	43
PA1150-F	AGAGGGAGGGCAAGTCCAACCAGTTTCTTGAAGCACGAGGCTG	43
PA1150-R	CTCTATAGTGAGTCGGGATCGCTAGTCCTGGTGGGACAAATGG	43
PA3866-F	AGAGGGAGGGCAAGTCCAACCAGTTATCCAGGCGTTTCTTGCG	43
PA3866-R	CTCTATAGTGAGTCGGGATCGCTAGTGGTCACGACAAGTGGTG	43
PA0985-F	AGAGGGAGGGCAAGTCCAACCAGTTACCACTTTCAGCGACTCG	43
PA0985-R	CTCTATAGTGAGTCGGGATCGCTAGATCGTCTGGACCTTGTGC	43
PA2385-F	AGAGGGAGGGCAAGTCCAACCAGTTTCGCCGGTAGCGGCGAGCTAAGCGTA	50
PA2385-R	CTCTATAGTGAGTCGGGATCGCTAGATAGGCGGTCCAGCGGAT	43
PA2386-F	AGAGGGAGGGCAAGTCCAACCAGTTTGTGCGATTCTCAGTG	43
PA2386-R	CTCTATAGTGAGTCGGGATCGCTAGTGCTTGTCCAGGAACAGC	43
PA2387-F	AGAGGGAGGGCAAGTCCAACCAGTTAACATAAGCAGGGCGAGG	43
PA2387-R	CTCTATAGTGAGTCGGGATCGCTAGAAAGCCTTCGGATGCTCG	43
PA2392-F	AGAGGGAGGGCAAGTCCAACCAGTTAAGAATGGCAAGGGACGG	43
PA2392-R	CTCTATAGTGAGTCGGGATCGCTAGCCGCCAGGTCGAGCGAAGC	44
PA2396-F	AGAGGGAGGGCAAGTCCAACCAGTTATGGCGGTGTAGTGCTTC	43
PA2396-R	CTCTATAGTGAGTCGGGATCGCTAGCAGCGCAGTCTGGTTCAGCGCCT	48
PA2397-F	AGAGGGAGGGCAAGTCCAACCAGTTAATACCACCACATCGGCG	43
PA2397-R	CTCTATAGTGAGTCGGGATCGCTAGGCAAGGCGTTGTTGATGC	43
PA2413-F	AGAGGGAGGGCAAGTCCAACCAGTTACCATCAACCACACTGG	43
PA2413-R	CTCTATAGTGAGTCGGGATCGCTAGCGGAATCCGCCGCGGATAG	44
PA2426-F	AGAGGGAGGGCAAGTCCAACCAGTTACCACTGGCAACAGCATC	43
PA2426-R	CTCTATAGTGAGTCGGGATCGCTAGAGCCTGAAGAACGCATCC	43

1.2.3 基因表达水平的测定

荧光图像的细菌识别和分割是利用课题组之前开发的 MATLAB 程序实现的^[18-20]。简而言之,图像分割是用 CyOFP1 通道拍摄的荧光图片。首先利用高斯拉普拉斯算子(Laplacian of Gaussian, LoG)确定细菌的轮廓。随后利用光谱串扰(spectral crosstalk)矫正矩阵去除光谱串扰的影响,获得矫正光强。最后单细菌的基因表达水平是通过细菌轮廓内部的像素点的矫正光强的平均值直接确定。

对于一个包含 SfGFP、CyOFP1、荧光嗜铁素 3 种荧光物质的体系,体系中 3 种荧光物质的真实浓度分别用 c_1 、 c_2 、 c_3 表示,3 个荧光通道拍摄的荧光强度分别用 I_a 、 I_b 、 I_c 表示,由于光谱串扰的原因,荧光强度 I 和真实浓度 c 之间满足如下关系:

$$\begin{bmatrix} I_a & I_b & I_c \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} c_1 & c_2 & c_3 \end{bmatrix} \begin{bmatrix} \beta_{a1} & \beta_{b1} & \beta_{c1} \\ \beta_{a2} & \beta_{b2} & \beta_{c2} \\ \beta_{a3} & \beta_{b3} & \beta_{c3} \end{bmatrix} \quad (1)$$

其中 β_{ij} 是 j 荧光物质在 i 荧光通道中的权重系数。因此真实浓度的确定可以通过如下公式:

$$c = I\beta^{-1} \quad (2)$$

β^{-1} 是权重系数矩阵的逆矩阵。权重系数矩阵的确定是通过只包含提纯的某一种荧光物质的体系来确定的。比如,体系中只存在 SfGFP 荧光蛋白,拍摄 SfGFP、CyOFP1、荧光嗜铁素通道的荧光图像,确定各通道中的荧光强度,此时荧光强度 I 和真实浓度 c 满足如下关系:

$$\begin{bmatrix} I_a & I_b & I_c \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} c_1 \end{bmatrix} \begin{bmatrix} \beta_{a1} & \beta_{a2} & \beta_{a3} \end{bmatrix} \quad (3)$$

1.2.4 细菌溶液中和胞内荧光嗜铁素浓度测定

本研究用荧光嗜铁素的荧光强度来表示荧光嗜铁素的浓度。在 Fe^{3+} 最终浓度为 $1 \mu\text{mol/L}$ 的 SSM 培养基中过夜培养 PAO1 和导入了过表达 PrtN 的启动子荧光报告质粒的菌株。在 1:200

稀释至新鲜的含铁 SSM 培养基中,并加入最终含量为 1% 的阿拉伯糖。5 h 或 10 h 后,取 $5 \mu\text{L}$ 菌液至显微镜下拍摄荧光照片(激发波长 405 nm,接收波长 450 nm),背景的平均荧光强度表示细菌溶液中的荧光嗜铁素的浓度。胞内的荧光嗜铁素的浓度测量则是将 1 mL 菌液进行离心,去除上清液,再加入新鲜培养基重悬。取 $5 \mu\text{L}$ 重悬后菌液至显微镜下拍摄荧光照片,菌身荧光强度表示细菌胞内的荧光嗜铁素浓度。

1.2.5 提取荧光嗜铁素

将菌株 PAO1 接种至 200 mL 的不含铁的 SSM 培养基中,37 °C 培养至对数期。将菌液分装至 50 mL 离心管中,4 °C、6 000 r/min 离心 10 min,收集上清液。使用孔径为 0.22 μm 的滤膜过滤上清液之后,再使用 1 mol/L 的 HEPES (pH 7.0,含 100 mmol/L 的 NaCl)重悬,随后以 5 mL/h 的流速通过提前平衡好整合的琼脂糖胶快速通流柱。整合柱平衡步骤为先后以 5 mL/h 的流速通流 50 mL 去离子水,2.5 mL 的 0.1 mol/L 的 CuSO_4 溶液,50 mL 去离子水和 30 mL HEPES 溶液(pH 7)。上清液通过整合柱之后,先用 50 mL 的 20 mmol/L 的 HEPES 冲洗,随后用 20 mmol/L 的乙酸盐缓冲液(pH 5.0,含 100 mmol/L 的 NaCl)冲流,每 5 mL 收集一次,用 NanoDrop 2000 测量含量(400 nm 处的峰高)。将浓度合适的样品冻干,再重新溶解于 1 mL 的 10 mmol/L EDTA 水溶液中,最后将溶液用去离子水为流动相过 Sephadex G-15 柱,每 4 mL 收集一次,测量紫外-可见光的吸收谱。将 385 nm 处峰较高的样品合并。

1.2.6 S2 型绿脓杆菌素提取

将 BL21::S2-ImmS2-pET28a 菌株的 2 mL 过夜培养物转移到 200 mL 新鲜 LB 培养基中,培养至对数前期($OD_{600}=0.2-0.3$),加入 1 mmol/L 的 IPTG,随后在 16 °C 下以 200 r/min 的转速振荡培养 20 h。通过离心(5 000 r/min, 10 min)收获

大肠杆菌细胞,重悬于 TGE 缓冲液(50 mmol/L Tris-HCl (pH 7.5), 1 mmol/L EDTA, 10%甘油和 10 mmol/L 咪唑),并通过脉冲超声破碎细胞。4 °C、8 000 r/min 离心 30 min,除去细胞碎片。将上清液装入由 AKTA™ FPLC 系统集成的 Hi-Trap FF 柱(奇异医疗),使用洗脱缓冲液(20 mmol/L Tris-HCl, pH 7.5, 1 mol/L 咪唑)洗脱 His 标签蛋白质。再用 Precast-GelHepes SDS-PAGE 4%–15% [生工生物工程(上海)有限公司]检验 His 标签蛋白质的纯度。纯化的蛋白质在透析缓冲液(20 mmol/L Tris-HCl, pH 7.5, 150 mmol/L NaCl)中透析。使用 BCA 蛋白测定试剂盒(赛默飞世尔科技公司)测定蛋白浓度。最终汇集的纯蛋白在-20 °C下分装于 1.5 mL 的 EP 管中,在每次操作前在 4 °C下单独解冻。

2 结果与分析

2.1 启动子荧光报告系统的构建

为了在单细菌层次上观察不同基因的转录情况,需要构建不同基因的启动子荧光报告系

统。构建启动子荧光报告系统的第一步是构建一个模板质粒(图 1A),随后利用 Gibson Assembly 技术将目的基因的启动子插入到质粒的特定位置(target promoter insert location)。构建质粒上包含了由目的基因启动子控制表达的绿色荧光蛋白基因 *sfgfp* 和由组成型启动子 J23102 控制表达的橙色荧光蛋白基因 *cyofp1*。SfGFP 的表达量反映了目的启动子的转录强度,而 CyOFP1 则是用于荧光图像处理程序对细菌轮廓的识别,同时用于 SfGFP 表达量的归一化,减少细菌之间状态差异对结果的影响。此外模板质粒的基础上,插入 *araC*-P_{BAD}-*prtN* 片段(图 1B),即可实现在诱导表达 *PrtN* 的同时观测目的启动子的表达。最后将构建好的质粒导入到实验菌株中,即可在不同培养条件下探究目的基因的表达。

2.2 S 型绿脓杆菌素基因在 SOS 响应条件下的表达的异质性

环丙沙星是一种喹诺酮类抗生素,是一种重要的治疗铜绿假单胞菌感染的抗生素,可以诱导细菌的 SOS 响应。在限制性培养基 FAB 中将分

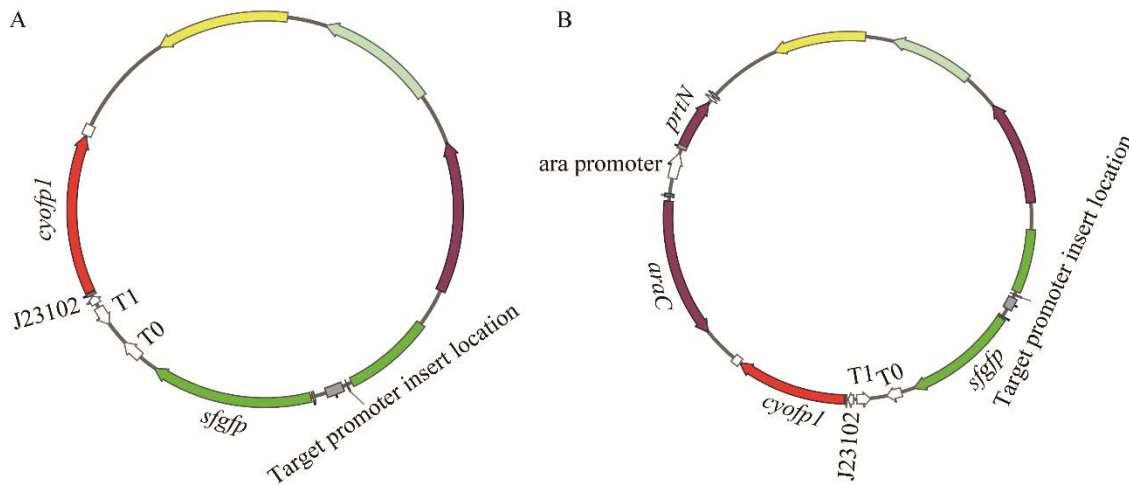


图 1 荧光报告质粒图谱

Figure 1 Fluorescent reporter plasmid mapping. A: A high-copy-number and broad-host-range plasmid, pUCP22, is used to construct the fluorescent transcriptional reporters. The target promoter controls the transcription of *sfgfp* and the constitutive promoter J23102 controls the transcription of *cyofp1* with the same ribosome binding site, B0034. B: On the basis of fluorescent transcriptional reporters (A), a sequence was inserted for the inducible expression of *prtN*.

别导入了 3 种 S 型绿脓杆菌素基因(*pyocin* S2、S4、S5, 对应基因分别是 *pys2*、*PA3866*、*pyoS5*) 的野生型 PAO1 培养至对数期, 然后加入终浓度为 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的环丙沙星, 继续培养 4 h。最后利用荧光显微镜测量这 3 个基因在未加入抗生素和抗生素处理 4 h 之后的表达量。

结果如图 2A 所示, 在 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 浓度的环丙沙星条件下, 3 种 S 型绿脓杆菌素基因的表达在群体中呈现出了高度分化, 即一部分细菌的表达量没有明显的上升, 而另外一部分细菌的表达量明显提高(图 2A)。

进一步在相同的条件下观察了另外 3 个受到 LexA 调控的参与 SOS 响应的基因(*lexA*、*dinB*、*PA2288*)的表达(图 2B)。结果表明 3 个基因的表达在抗生素处理之后, 表达均有明显上升, 但是细菌个体与个体之间的表达量没有明显差异。

S 型绿脓杆菌素基因的表达均受到 PrtN 的调控。因此我们又观察了用 1% 的阿拉伯糖诱导导入了包含 *araC-P_{BAD}-prtN* 片段的启动子荧光报告质粒的野生型 PAO1 中 S 型绿脓杆菌素基因的表达。结果如图 2C 所示, 3 个基因的表达量均有明显上升, 但是个体与个体之间没有明显差异。

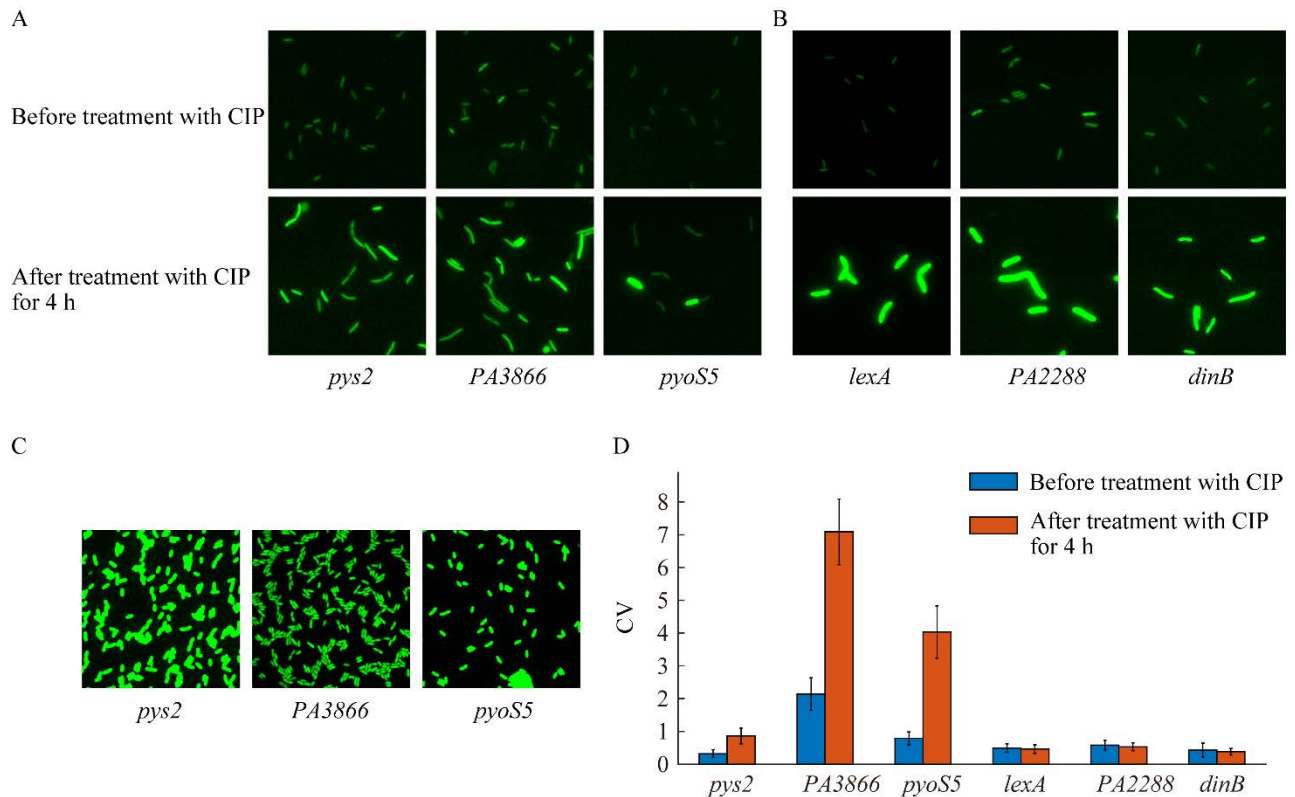


图 2 S 型绿脓杆菌素基因在 SOS 响应条件下表达的异质性^[21]

Figure 2 Heterogeneity in S-type pyocin gene expression under SOS-responsive circumstances^[21]. A, B: Fluorescence images were acquired before and four hours after the addition of 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of ciprofloxacin after strain PAO1 that had been introduced with various promoter fluorescent reporter plasmids were grown to log phase in the FAB medium. A: Three pyocin genes. B: Three LexA-regulated genes. C: Fluorescence images of strains PAO1 introduced with different fluorescent reporter plasmids capable of overexpressing PrtN. D: Before and after ciprofloxacin therapy, the CV values of three pyocin genes and three LexA-regulated genes were calculated^[21]. The error bars in three replicate experiments show the standard deviation. CIP: Ciprofloxacin.

利用变异系数(coefficient of variation, CV, 标准差与平均值的比值)来定量这种个体与个体之间的基因表达差异, CV 的值越大, 表示个体与个体之间的差异越大。结果如图 2D 所示, 在存在 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 浓度的环丙沙星的培养基中培养 4 h 之后, LexA 直接调控的基因(*lexA*、*dinB*、*PA2288*)的表达的变异系数与未经抗生素处理时没有明显差异, 而 S 型绿脓杆菌素基因的表达的变异系数明显增大; 同时在过表达 PrtN 蛋白的情况下, S 型绿脓杆菌素基因的表达的变异系数减小。此外, 未经抗生素处理之前, S 型绿脓杆菌素基因的表达也有一定的分化, 其中 *PA3866* 最为明显。这种分化可能是由于 *prtN* 基因的基础表达造成的, 即使在未经抗生素处理的情况下, 细胞中仍然有一定浓度的 PrtN 蛋白, 可以诱导绿脓杆菌素基因的表达。3 种绿脓杆菌素基因之间的差异可能是由于其启动子和 PrtN 的亲亲和度的差异, 在相同条件下, *PA3866* 基因更容易受到 PrtN 的调控^[22]。

2.3 过表达 PrtN 会使细菌中荧光嗜铁素的合成量降低

根据文献报道, S2 和 S4 型绿脓杆菌素是通过铜绿假单胞菌外膜上的 FpvA1 通道蛋白进入细菌, 而 S5 型绿脓杆菌素是通过 FptA 通道蛋白进入细菌的^[23-24]。这两个通道蛋白对于细菌来说, 另一个重要的功能是用来摄取环境中的铁元素。铜绿假单胞菌可以合成两种螯铁小分子: 荧光嗜铁素(pyoverdine)和螯铁素(pyochelin)。细菌将合成的荧光嗜铁素和螯铁素分泌到细胞外, 荧光嗜铁素和螯铁素可以螯合环境中的三价铁离子 Fe^{3+} , 随后螯合物 $\text{Fe(III)-pyoverdine}$ 和 Fe(III)-pyochelin 分别从 FpvA 和 FptA 通道蛋白进入细菌胞内^[25]。

为了探究绿脓杆菌素的表达和荧光嗜铁素的合成量之间的关系, 首先需要过表达多种绿脓

杆菌素来监测荧光嗜铁素的胞内含量。由于绿脓杆菌素在通常条件下表达量是非常低的, 在抗生素作用下虽然可以表达, 但是只有部分细菌的表达量明显上升。在铜绿假单胞菌中, SOS 响应调节因子 PrtN 正好可以同时调节多种不同类型的绿脓杆菌素的表达。因此我们选择在过表达 PrtN 的菌株中来观察荧光嗜铁素的合成量。此外, Fe^{3+} 的浓度高低会显著影响细菌中荧光嗜铁素的合成水平, 造成一定的干扰^[26]。为了严格控制培养基中 Fe^{3+} 的浓度, 因此选择使用限制性培养基 SSM 来进行实验, 外源加入的 Fe^{3+} 浓度恒定为 1 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 。

结果如图 3A 所示, 未诱导时, 过表达 PrtN 菌株细菌胞内的荧光嗜铁素的含量和细菌溶液中的荧光嗜铁素的含量均和野生型 PAO1 相差不多, 表明质粒的存在对荧光嗜铁素的合成影响很小。而在 1% 的阿拉伯糖诱导下, 不管是细菌胞内还是溶液中的荧光嗜铁素的含量, 相较于未诱导和野生型菌株, 均有明显下降。在 5 h 时, 未诱导条件下的细菌胞内的荧光嗜铁素含量大约是 1% 诱导条件下的 3.3 倍。而溶液中的含量差异更明显, 未诱导条件下的溶液中的荧光嗜铁素浓度大约是 1% 诱导条件下的 15 倍; 在 10 h 时, 未诱导条件下的细菌胞内的荧光嗜铁素含量是 1% 诱导条件下的 1.9 倍, 未诱导条件下的溶液中的荧光嗜铁素浓度大约是 1% 诱导条件下的 3.7 倍。在两个时刻, 细菌溶液中的荧光嗜铁素的量的差异都大于胞内的量的差异, 这可能说明在过表达 PrtN 不仅会降低荧光嗜铁素的表达, 可能还会减少其分泌。

转录调节因子 PrtN 除了调控 S 型绿脓杆菌素基因的表达之外, 也调控 R 型和 F 型绿脓杆菌素基因的表达。因此过表达 PrtN 菌株中荧光嗜铁素的合成量降低了并不能说明是 S 型绿脓杆菌素表达导致的。进一步地, 在敲除绿脓杆菌素

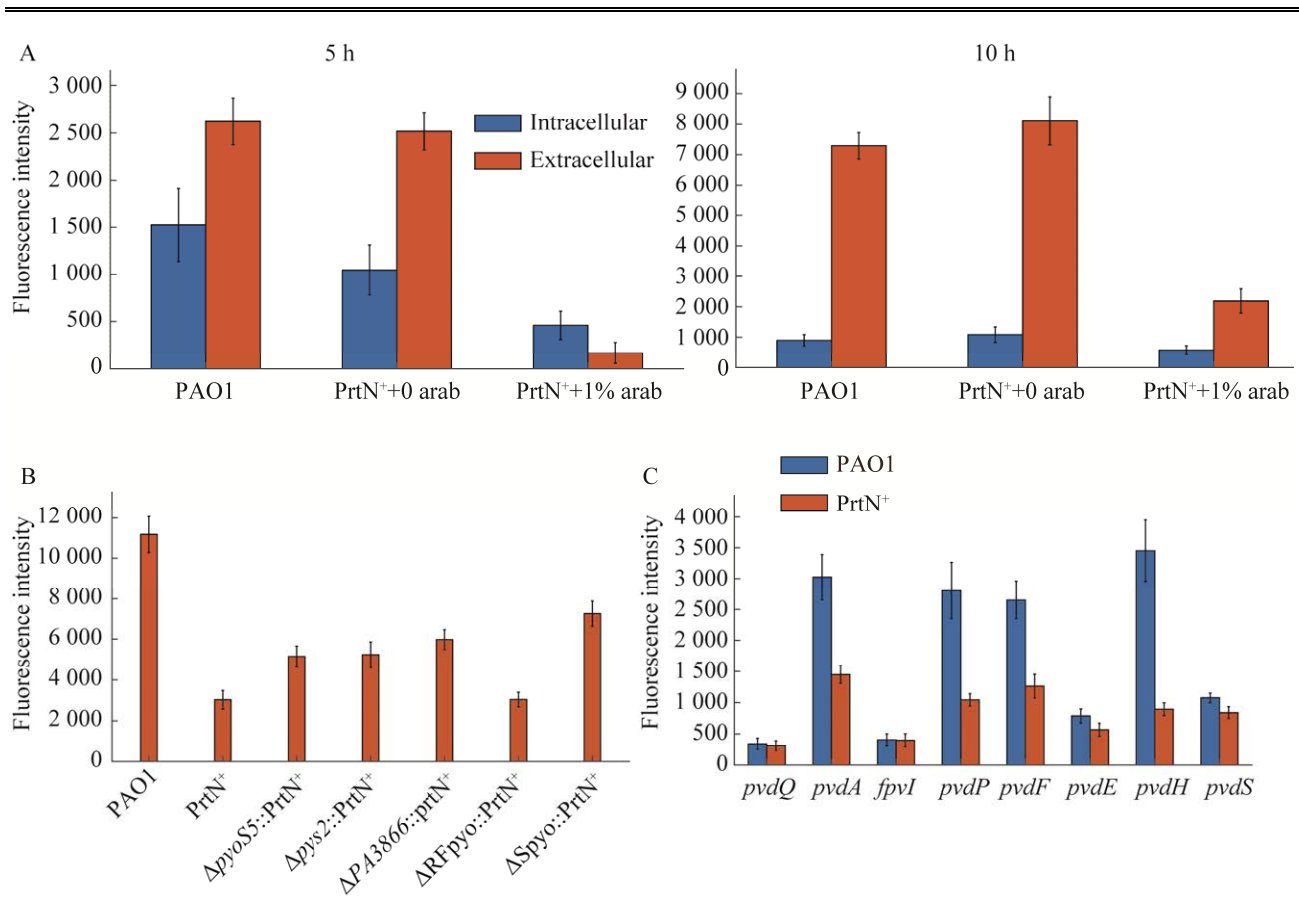


图3 过表达 PrtN 会使细菌中荧光嗜铁素的合成量降低

Figure 3 Overexpression of PrtN results in reduced pyoverdine synthesis in bacteria. A: Pyoverdine's fluorescence in solution and in the bacterial cell were both assessed after 5 or 10 hours of incubation in SSM media. B: Different strains' ability to synthesize pyoverdine. C: Expression of several pyoverdine synthesis-related genes in strains that overexpress PrtN and wild type. The error bars in three replicate experiments show the standard deviation.

的菌种中过表达 PrtN，并测量其胞外荧光嗜铁素的浓度。结果如图 3B 所示，在敲除 R 型和 F 型绿脓杆菌素基因(*PA0617-PA0642*)的菌株内过表达 PrtN，胞外荧光嗜铁素的浓度与野生型菌株过表达 PrtN 无差异，说明 R 型和 F 型绿脓杆菌素并不影响荧光嗜铁素的合成。而分别敲除 3 种 S 型绿脓杆菌素基因，荧光嗜铁素的合成量有所恢复；在 3 种 S 型绿脓杆菌素基因菌敲除的菌株中，荧光嗜铁素的合成量比单独敲除任意一种 S 型绿脓杆菌素基因的菌株中都要高，但是还是不

能恢复到未诱导时的表达量。这可能说明 PrtN 本身可能直接调控了荧光嗜铁素的合成或者 PrtN 还调控绿脓杆菌素基因之外的基因表达，从而间接调控了荧光嗜铁素的合成。

为了探究过表达 PrtN 如何影响荧光嗜铁素的合成，测量了 8 个和荧光嗜铁素合成相关基因的启动子在过表达 PrtN 时的表达量。结果如图 3C 所示，过表达 PrtN 时，*pvdA*、*pvdP*、*pvdF*、*pvdH* 四个基因的表达明显下降，*pvdE* 和 *pvdS* 基因的表达略微下降。

2.4 S2 型绿脓杆菌素可以减少荧光嗜铁素的摄取

已有研究证明 S2 型绿脓杆菌素与 FpvA1 蛋白的结合常数还大于荧光嗜铁素和 FpvA1 的结合常数^[27], 这表示 S2 型绿脓杆菌素的摄入可能会占用 FpvA1 通道, 从而导致细菌难以摄取荧光嗜铁素。为了探究 S2 型绿脓杆菌素对荧光嗜铁素摄取的影响, 我们外源加入不同浓度的 S2 型绿脓杆菌素和荧光嗜铁素, 观测 $\Delta pvdA$ 胞内的荧光嗜铁素的浓度。 $\Delta pvdA$ 菌株由于丧失了合成荧光嗜铁素的关键基因 *pvdA*, 本身无法合成荧光嗜铁素, 因此实验中观测到的细菌胞内的荧光嗜铁素信号全部来源于细菌通过 FpvA1 通道的外界摄取。

$\Delta pvdA$ 菌株在含有 10 $\mu\text{mol/L}$ 的荧光嗜铁素和不同浓度的 S2 型绿脓杆菌素中孵育 2 h 之后, 离心去除上清液之后, 加入新鲜培养基重悬菌液, 检测细菌胞内的荧光嗜铁素的浓度。结果如图 4A 所示, 随着培养基中 S2 型绿脓杆菌素的浓度增加, 细菌胞内的荧光嗜铁素的浓度越来越

低。其中图中背景(background)是指 10 $\mu\text{mol/L}$ 的荧光嗜铁素的溶液的荧光强度。当 S2 型绿脓杆菌素的浓度达到 20 $\mu\text{g/mL}$ 时, 细菌胞内的荧光嗜铁素的浓度已经显著低于溶液中荧光嗜铁素的浓度。结果表明, 环境中的 S2 型绿脓杆菌素会减少 $\Delta pvdA$ 摄取荧光嗜铁素。

如图 4B 所示, 加入了 S2 型绿脓杆菌素之后, PAO1 胞内的荧光嗜铁素的荧光显著下降。造成这种差异的原因有两个, 一是 S2 型绿脓杆菌素的存在会减少野生型 PAO1 荧光嗜铁素的合成量, 使得未加入 S2 型绿脓杆菌素的样品的溶液中荧光嗜铁素的荧光更强。溶液中的荧光强度的差异显著小于 PAO1 胞内的荧光强度的差异, 因此还有一个原因是 S2 型绿脓杆菌素会减少 PAO1 摄取荧光嗜铁素。

2.5 S2 型绿脓杆菌素可以帮助细菌杀死“欺骗者”

课题组之前的研究表明, 当铜绿假单胞菌处于 UV 照射或者妥布霉素压力条件下时, 细菌内

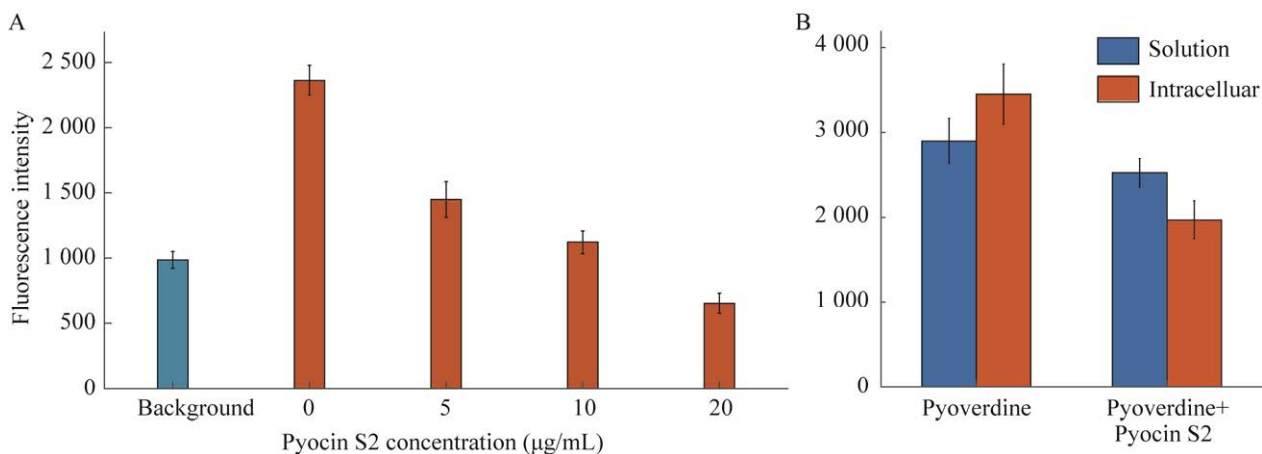


图 4 S2 型绿脓杆菌素可以减少荧光嗜铁素的摄取

Figure 4 Pyocin S2 reduces bacterial uptake of pyoverdine. A: Fluorescence pictures of pyoverdine channels were taken after 2 hours of incubation of $\Delta pvdA$ strains unable to synthesize pyoverdine in media containing 10 $\mu\text{mol/L}$ of pyoverdine and different concentrations of pyocin S2. The background (blue bar) represents the fluorescence intensity of a 10 $\mu\text{mol/L}$ pyoverdine solution. B: Pyoverdine's fluorescence intensity in solution and in PAO1 cells after two hours of exogenous addition of either 10 mol/L of pyoverdine or both 10 mol/L of pyoverdine and 10 g/mL of pyocin S2. The error bars in three replicate experiments show the standard deviation.

部会产生 ROS，此时细菌会通过抑制荧光嗜铁素的分泌来使细菌胞内累积更多的荧光嗜铁素^[16]。胞内的荧光嗜铁素可以保护细菌免受 ROS 的损伤并增加细菌在 ROS 压力条件下的存活率。当环境中同时存在能够合成荧光嗜铁素的野生型铜绿假单胞菌和不合成荧光嗜铁素的“欺骗者”时，“欺骗者”能够摄取野生型菌株分泌的荧光嗜铁素。一旦胞内产生 ROS 压力，那么“欺骗者”也能摄取环境中的荧光嗜铁素来获取保护。接下来，我们希望探究环境中同时存在荧光嗜铁素和 S2 型绿脓杆菌素时，再施加 ROS 压力能否杀死“欺骗者”。

在含有 1 $\mu\text{mol/L}$ 的 Fe^{3+} 的 SSM 培养基中将 $\Delta pvdA$ 菌株或野生型 PAO1 培养至对数期，随后实验组的 $\Delta pvdA$ 菌株的处理为在培养基中加入最终浓度为 10 $\mu\text{mol/L}$ 的荧光嗜铁素和 10 $\mu\text{g/mL}$ 的 S2 型绿脓杆菌素，对照组的 $\Delta pvdA$ 菌株的培养基中只加入最终浓度为 10 $\mu\text{mol/L}$ 的荧光嗜铁素，野生型 PAO1 的培养基中只加入最终浓度为 10 $\mu\text{g/mL}$ 的 S2 型绿脓杆菌素。2 h 后，在所有的培养基中加入最终浓度为 2 $\mu\text{g/mL}$ 的妥布霉素，5 h 之后加入最终浓度为 1 $\mu\text{g/mL}$ 的碘化丙啶进行生死染色。

生死染色的结果如图 5 所示，当环境中只有

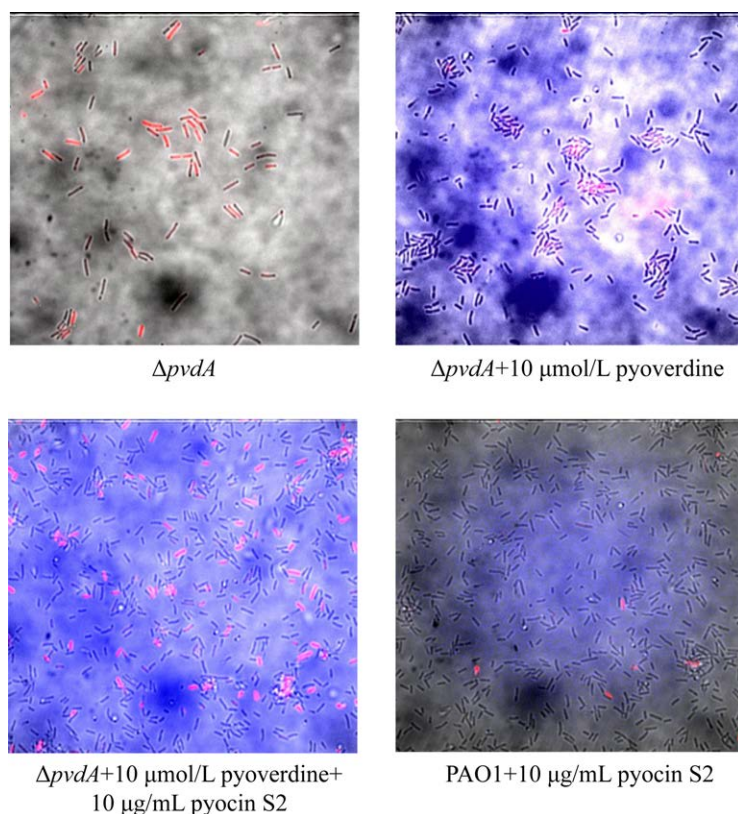


图 5 S2 型绿脓杆菌素可以帮助细菌杀死“欺骗者”

Figure 5 Pyocin S2 can help bacteria kill “cheaters”. The $\Delta pvdA$ strain was inoculated into SSM medium with 10 $\mu\text{mol/L}$ of pyoverdine added exogenously. The medium was also incubated in the presence or absence of 10 $\mu\text{g/mL}$ of pyocin S2. PAO1 was inoculated into SSM medium containing 10 $\mu\text{g/mL}$ of pyocin S2. Two hours later, a final concentration of 2 $\mu\text{g/mL}$ of tobramycin was added to all media. After five hours of continued incubation, staining for life and death was performed. The images show the results of multiple passages of merge, the red color represents dead bacteria, and the blue color in the background is the fluorescence of pyoverdine.

外源加入的荧光嗜铁素时,加入 ROS 压力并不能杀死不能合成荧光嗜铁素的 $\Delta pvdA$ 菌株;而在环境中同时存在荧光嗜铁素和 S2 型绿脓杆菌素时,加入 ROS 压力会杀死大量的 $\Delta pvdA$ 菌株。另外,即使环境中开始不存在荧光嗜铁素但是存在 S2 型绿脓杆菌素,也不会影响野生型 PAO1 菌株通过自身合成的荧光嗜铁素来抵抗 ROS 压力。最终统计死亡率的结果表明,环境中同时存在荧光嗜铁素和 S2 型绿脓杆菌素时, $\Delta pvdA$ 菌株的死亡率(16.5%±2.2%)远远高于没有 S2 型绿脓杆菌素的条件下的 $\Delta pvdA$ 菌株的死亡率(1.6%±0.5%)。

3 讨论

对于细菌特别是致病菌来说,环境压力随时都可能来临,所以压力响应是至关重要的。SOS 响应的研究从 20 世纪 70 年代开始,经过几十年的发展,对于 LexA 和 RecA 调控的 SOS 调控网络已经有相当深的了解^[28]。在绿脓杆菌中, *PrtR* 和 *AlpR* 也是 SOS 响应的重要调节蛋白,其中 *PrtR* 通过调控 *priN* 基因的表达间接调控 S 型绿脓杆菌素基因的表达。在以往的研究中,更多地认为铜绿假单胞菌分泌 S 型绿脓杆菌素是为了亚种之间的种间竞争^[29]。因为 S 型绿脓杆菌素只能通过特定的通道蛋白进入细菌胞内行使功能,而这些通道蛋白一般只有自身和近亲的绿脓杆菌素亚种才拥有。绿脓杆菌素的表达同时会伴随着其免疫蛋白的表达,因此自身可以免疫绿脓杆菌素,而不能表达免疫蛋白的亚种则因为无法免疫而在种间竞争中被淘汰^[7]。鉴于已有的研究结果,为了进一步探究 S 型绿脓杆菌素在 SOS 响应中的表达以及和荧光嗜铁素之间的联系,我们构建了启动子荧光报告系统来探索相关基因的表达,并通过显微镜实验探究绿脓杆菌素对表型的影响。

本研究结果表明,在 SOS 响应中,细菌种群的 S 型绿脓杆菌素基因的表达出现了高度分化,一部分细菌继续保持低表达,而另外一部分细菌大幅度提高表达量。这可能是由于绿脓杆菌素的合成对于细菌个体本身来说是一种消耗,并不能帮助个体本身缓解 SOS 压力,而且已有的研究表明,绿脓杆菌素的合成通常伴随着细菌裂解^[5]。因此分化表达可以使得种群既分泌了绿脓杆菌素,行使其种间竞争和其他可能的功能,又能够让减少种群中其他个体的消耗。

S 型绿脓杆菌素进入细菌胞内的通道和细菌摄取螯铁小分子的通道是相同的,这表明二者之间是存在联系的。我们测量了过表达 *PrtN* 菌株中荧光嗜铁素的合成量。结果表明,过表达 *PrtN* 会大幅度减少荧光嗜铁素的合成量,敲除 S 型绿脓杆菌素基因可以使荧光嗜铁素的合成量有所恢复,但是无法恢复到未过表达时的量。这表明 *PrtN* 可能还通过其他方式直接或间接调控荧光嗜铁素的合成。最后通过测量参与荧光嗜铁素合成的基因的表达量,发现荧光嗜铁素合成量的下降是通过下调部分合成基因的表达量实现的。荧光嗜铁素的合成受到非常复杂的调控,最主要的是西格玛因子(sigma factor) *PvdS*,除此之外还有 *OxyR*、*AlgR*、*CysB*、*AmgR* 等^[30]。因此虽然在过表达 *PrtN* 菌株中 *pvdS* 的转录水平变化并不大,但是 *PrtN* 可能影响了其他参与调控荧光嗜铁素合成的转录调控因子的表达。此外 *PvdS* 在胞内有两种状态,与 *FpvR* 蛋白结合以及自由状态,只有自由的 *PvdS* 可以调控下游基因的表达^[31-32]。所以还有一种可能是, *PrtN* 会减少胞内自由 *PvdS* 的含量,从而导致荧光嗜铁素的合成量下降。

本研究还测试了环境中 S2 型绿脓杆菌素对细菌摄取荧光嗜铁素的影响,结果表明绿脓杆菌素的存在会减少细菌摄取荧光嗜铁素,这也与之

前的研究结论相符^[27]。在同一个环境中, 荧光嗜铁素是一种种群内的公共产物。当种群内出现只摄取而不生产荧光嗜铁素的“欺骗者”时, 由于“欺骗者”可以不消耗能量生产公共产物而获得更快的生长速度, 最终会导致可以生产公共产物的菌株在种群发展过程中处于劣势。即使是有 ROS 的压力的存在, “欺骗者”也可以利用环境中存在的荧光嗜铁素来获取保护。这最终会导致合作关系崩溃。但是铜绿假单胞菌在数亿年的演化过程中, 保留了这种合作关系, 表明可能存在另外的机制来维持这种关系。我们的结果表明, 当环境中存在 S2 型绿脓杆菌素时, 环境压力可以帮助种群淘汰“欺骗者”。

绿脓杆菌素是细菌 SOS 响应的产物, 而荧光嗜铁素则在 ROS 压力响应中发挥重要作用。我们的实验结果可能表明细菌内这两种压力响应系统之间存在协同作用。但是在我们的实验中, 还未发现有自然条件可以使得细菌在表达分泌大量的绿脓杆菌素的同时还需要荧光嗜铁素来抵抗 ROS 压力, 即同时存在 SOS 响应和 ROS 压力响应。要更进一步地验证两种压力响应之间的协同作用, 需要在细菌的真实生存条件中, 同时观测到两种压力响应, 并探究两者之间的联系。

REFERENCES

- [1] SCHURR MJ, YU H, BOUCHER JC, HIBLER NS, DERETIC V. Multiple promoters and induction by heat shock of the gene encoding the alternative sigma factor AlgU (sigma E) which controls mucoidy in cystic fibrosis isolates of *Pseudomonas aeruginosa*[J]. Journal of Bacteriology, 1995, 177(19): 5670-5679.
- [2] KINDRACHUK KN, FERNÁNDEZ L, BAINS M, HANCOCK REW. Involvement of an ATP-dependent protease, PA0779/AsrA, in inducing heat shock in response to tobramycin in *Pseudomonas aeruginosa*[J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2011, 55(5): 1874-1882.
- [3] GILLELAND HE JR, MURRAY RG. Ultrastructural study of polymyxin-resistant isolates of *Pseudomonas aeruginosa*[J]. Journal of Bacteriology, 1976, 125(1): 267-281.
- [4] CHUANCHUEN R, KARKHOFF-SCHWEIZER RR, SCHWEIZER HP. High-level triclosan resistance in *Pseudomonas aeruginosa* is solely a result of efflux[J]. American Journal of Infection Control, 2003, 31(2): 124-127.
- [5] PENTERMAN J, SINGH PK, WALKER GC. Biological cost of pyocin production during the SOS response in *Pseudomonas aeruginosa*[J]. Journal of Bacteriology, 2014, 196(18): 3351-3359.
- [6] CIRZ RT, O'NEILL BM, HAMMOND JA, HEAD SR, ROMESBERG FE. Defining the *Pseudomonas aeruginosa* SOS response and its role in the global response to the antibiotic ciprofloxacin[J]. Journal of Bacteriology, 2006, 188(20): 7101-7110.
- [7] MICHEL-BRIAND Y, BAYSSE C. The pyocins of *Pseudomonas aeruginosa*[J]. Biochimie, 2002, 84(5/6): 499-510.
- [8] ELFARASH A, DINGEMANS J, YE LM, HASSAN AA, CRAGGS M, REIMMANN C, THOMAS MS, CORNELIS P. Pore-forming pyocin S5 utilizes the FptA ferripyochelin receptor to kill *Pseudomonas aeruginosa*[J]. Microbiology: Reading, England, 2014, 160(Pt 2): 261-269.
- [9] FRANK SA. Spatial polymorphism of bacteriocins and other allelopathic traits[J]. Evolutionary Ecology, 1994, 8(4): 369-386.
- [10] LONG YQ, FU WX, WANG S, DENG X, JIN YX, BAI F, CHENG ZH, WU WH. Fis contributes to resistance of *Pseudomonas aeruginosa* to ciprofloxacin by regulating pyocin synthesis[J]. Journal of Bacteriology, 2020, 202(11): e00064-e00020.
- [11] GOVAN JR. *In vivo* significance of bacteriocins and bacteriocin receptors[J]. Scandinavian Journal of Infectious Diseases Supplementum, 1986, 49: 31-37.
- [12] BROWN MRW, ANWAR H, LAMBERT PA. Evidence that mucoid *Pseudomonas aeruginosa* in the cystic fibrosis lung grows under iron-restricted conditions[J]. FEMS Microbiology Letters, 1984, 21(1): 113-117.
- [13] AL-DAHMOUSHI HO, AL-KHAFAJI NS, AL-JEBOURI LA, ALWAN ZH, AL-ALLAK MH, ARIDHEE, ASA. Type III secretion systems among clinical *Pseudomonas aeruginosa*[J]. Drug Invention Today, 2019, 11(11): 2904-2908.
- [14] OLUYOMBO O, PENFOLD CN, DIGGLE SP. Competition in biofilms between cystic fibrosis

- isolates of *Pseudomonas aeruginosa* is shaped by R-pyocins[J]. *mBio*, 2019, 10(1): e01828-e01818.
- [15] DENAYER S, MATTHIJS S, CORNELIS P. Pyocin S2 (Sa) kills *Pseudomonas aeruginosa* strains via the FpvA type I ferripyoverdine receptor[J]. *Journal of Bacteriology*, 2007, 189(21): 7663-7668.
- [16] JIN ZY, LI JH, NI L, ZHANG RR, XIA AG, JIN F. Conditional privatization of a public siderophore enables *Pseudomonas aeruginosa* to resist cheater invasion[J]. *Nature Communications*, 2018, 9: 1383.
- [17] GIBSON DG, YOUNG L, CHUANG RY, VENTER JC, HUTCHISON CA, SMITH HO. Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases[J]. *Nature Methods*, 2009, 6(5): 343-345.
- [18] HAN JD, XIA AG, HUANG YJ, NI L, CHEN WH, JIN ZY, YANG S, JIN F. Simultaneous visualization of multiple gene expression in single cells using an engineered multicolor reporter toolbox and approach of spectral crosstalk correction[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2019, 8(11): 2536-2546.
- [19] PU L, YANG S, XIA AG, JIN F. Optogenetics manipulation enables prevention of biofilm formation of engineered *Pseudomonas aeruginosa* on surfaces[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2018, 7(1): 200-208.
- [20] YANG S, CHENG XY, JIN ZY, XIA AG, NI L, ZHANG RR, JIN F. Differential production of psl in planktonic cells leads to two distinctive attachment phenotypes in *Pseudomonas aeruginosa*[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2018, 84(14): e00700-e00718.
- [21] CHEN W, ZHANG J, LI F, WANG C, ZHANG Y, XIA A, NI L, JIN F. Genome-wide analysis of gene expression noise brought about by transcriptional regulation in *Pseudomonas aeruginosa*[J]. *Msystems*, 2022: e00963-22.
- [22] BRAZAS MD, HANCOCK RE. Ciprofloxacin induction of a susceptibility determinant in *Pseudomonas aeruginosa*[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2005, 49(8): 3222-3227.
- [23] ELFARASH A, WEI Q, CORNELIS P. The soluble pyocins S2 and S4 from *Pseudomonas aeruginosa* bind to the same FpvAI receptor[J]. *MicrobiologyOpen*, 2012, 1(3): 268-275.
- [24] BEHRENS H M. How the protein antibiotic pyocin S5 kills *Pseudomonas aeruginosa*[D]. Oxford, South East England. UK University of Oxford, 2019.
- [25] CORNELIS P, MATTHIJS S, van OEFFELEN L. Iron uptake regulation in *Pseudomonas aeruginosa*[J]. *BioMetals*, 2009, 22(1): 15-22.
- [26] VISCA P, IMPERI F, LAMONT IL. Pyoverdine siderophores: from biogenesis to biosignificance[J]. *Trends in Microbiology*, 2007, 15(1): 22-30.
- [27] WHITE P, JOSHI A, RASSAM P, HOUSDEN NG, KAMINSKA R, GOULT JD, REDFIELD C, MCCAUGHEY LC, WALKER D, MOHAMMED S, KLEANTHOS C. Exploitation of an iron transporter for bacterial protein antibiotic import[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2017, 114(45): 12051-12056.
- [28] MICHEL B. After 30 years of study, the bacterial SOS response still surprises us[J]. *PLoS Biology*, 2005, 3(7): e255.
- [29] PARRET AHA, de MOT R. Bacteria killing their own kind: novel bacteriocins of *Pseudomonas* and other γ -*Proteobacteria*[J]. *Trends in Microbiology*, 2002, 10(3): 107-112.
- [30] CORNELIS P, TAHRIOUI A, LESOUHAITIER O, BOUFFARTIGUES E, FEUILLOLEY M, BAYSSE C, CHEVALIER S. High affinity iron uptake by pyoverdine in *Pseudomonas aeruginosa* involves multiple regulators besides Fur, PvdS, and FpvI[J]. *BioMetals*, 2022: 1-7.
- [31] LAMONT IL, BEARE PA, OCHSNER U, VASIL AI, VASIL ML. Siderophore-mediated signaling regulates virulence factor production in *Pseudomonas aeruginosa*[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2002, 99(10): 7072-7077.
- [32] EDGAR RJ, XU X, SHIRLEY M, KONINGS AF, MARTIN LW, ACKERLEY DF, LAMONT IL. Interactions between an anti-sigma protein and two sigma factors that regulate the pyoverdine signaling pathway in *Pseudomonas aeruginosa*[J]. *BMC Microbiology*, 2014, 14: 287.

(本文责编 郝丽芳)