

Pseudomonas pseudoalcaligenes B50 铁载体合成 相关基因 *pyrD* 的克隆与功能分析

丁延芹 黄伟红 姚良同 于素芳 杜秉海*

(山东农业大学生命科学学院微生物学系 山东 泰安 271018)

摘要: 从棉花根际分离的一株细菌 B50 在低铁条件下可以产生铁载体。通过形态学特征、生理生化特征及其 16S rDNA 序列分析, 将其鉴定为 *Pseudomonas pseudoalcaligenes*。采用三亲本杂交的方法将转座子 Tn5-1063a (含 *luxAB*) 导入 B50 中, 进行转座子插入诱变, 获得突变株。用 TAIL-PCR 方法得到与铁吸收有关的 *pyrD* 基因序列。通过互补实验验证 *pyrD* 与铁载体的合成有关。*Pseudomonas pseudoalcaligenes* 能够产生铁载体属于首次报道。

关键词: *Pseudomonas pseudoalcaligenes*, 铁载体合成, *pyrD*

Cloning and Functional Analysis of *pyrD* Gene Involved in Siderophores Biosynthesis in *Pseudomonas pseudoalcaligenes* B50

DING Yan-Qin HUANG Wei-Hong YAO Liang-Tong YU Su-Fang DU Bing-Hai*

(Department of Microbiology, College of Life Sciences, Shandong Agricultural University, Taian, Shandong 271018, China)

Abstract: In order to study the mechanism of bacteria producing siderophore, B50 was isolated from the cotton rhizosphere. The strain B50 can produce siderophore under iron-limiting conditions. It was identified as *Pseudomonas pseudoalcaligenes* based on its morphological, physical-chemical characteristics and 16S rDNA sequence. Mutants of B50 were obtained through conjugation. The *pyrD* gene was cloned from the mutant deficient in siderophores synthesis by TAIL-PCR (Thermal asymmetric inter-laced). The *pyrD* gene is required for the synthesis of dihydroorotate which is a predecessor of deoxy-quinoline. Deoxyquinoline was the important part of several siderophores. This is the first report that the *Pseudomonas pseudoalcaligenes* can produce siderophore.

Keywords: *Pseudomonas pseudoalcaligenes*, Siderophores biosynthesis, *pyrD*

微生物铁载体是生长在低铁环境中的细菌或真菌合成的一种具有高 Fe (III) 专一性的低分子量的铁螯合剂^[1]。植物根际中具有铁载体合成能力的

微生物通过竞争铁营养, 不仅能够改善自身的营养状况, 还能达到生物防治的作用, 另一方面还供给其定殖的植物铁营养^[2]。因此, 对植物根际微生物

铁载体合成分子机制的研究具有重要的理论意义和应用价值。

研究表明与铁载体合成、转运和调节相关的基因常常位于基因组或质粒上,以操纵子的形式存在^[3-5]。铁载体合成基因又包括铁载体各个组成部分的合成基因和催化合成最终铁载体的基因。铁载体转运相关基因包括外膜受体蛋白基因、转运蛋白基因及调控基因等。

Andrew 等的研究表明 *pyrD* 受铁吸收调控转导信号因子 RitR 的调控^[6], Vincent 等研究表明 *pyrD* 与 ATPase 的活性有关,其表达受铁元素的调控^[7],这些都说明, *pyrD* 与铁的代谢有密切关系。

本文对从棉花根际分离的一株铁载体产生菌 B50 进行了鉴定,利用转座子 Tn5-1063a,进行插入诱变,筛选铁载体合成缺失突变株,并进行了相关基因的克隆和功能初步验证。

1 材料与方 法

1.1 菌株和质粒

实验采用的菌株和质粒见表 1。

菌株和质粒名称 Strains and plasmids	特性 Characteristic	来源 Source
B50	Producing siderophores, Chl ⁺ , Kan ^s	This laboratory
B50-472	Deficient in siderophores synthesis, Chl ⁺ , Kan ^r	This study
B50-1358	Deficient in siderophores synthesis, Chl ⁺ , Kan ^r	This study
B50-1657	Deficient in siderophores synthesis, Chl ⁺ , Kan ^r	This study
B50-1723	Deficient in siderophores synthesis, Chl ⁺ , Kan ^r	This study
<i>E. coli</i> DH5 α	Host of plasmids	This laboratory
pRL1063a	Carrying Tn5- <i>luxAB</i> , Chl ^s , Kan ^r	University of York, UK
pRK2013	Helper plasmid, Kan ^r	This laboratory
pGEM-T easy	Cloning and sequencing vector, Amp ^r	Promega

1.2 主要试剂和仪器

使用的缓冲液均按照参考文献[8]进行配制。限制性内切酶、DL2000、 λ -Hind III digest DNA Marker、RNase、蛋白酶 K、异丙基- β -D-硫代半乳糖苷(IPTG)和 5-溴-4-氯-3-吡啶- β -D-半乳糖苷(X-Gal)等购自

TaKaRa 公司, *Taq* DNA 聚合酶、*Pfu* DNA Polymerase、DNA 凝胶回收试剂盒购自上海申能博彩公司; Eppendorf centrifuge 5810R 离心机(Eppendorf 公司); T-Gradient 96 PCR 仪(Biometra 公司); DYY-8C 型电泳仪(北京市六一仪器厂); 美国 UVP 凝胶成像系统。

1.3 培养基和培养条件

B50 及其突变株和 *E. coli* DH5 α 均采用 LB 培养基,在 37°C 培养。抗生素所用浓度: B50 为 20 mg/L 氯霉素,突变株为 20 mg/L 氯霉素和 30 mg/L 卡那霉素, *E. coli* DH5 α (pRL1063a) 和 *E. coli* DH5 α (pRK2013) 为 30 mg/L 卡那霉素。

1.4 铁载体产生菌 B50 的鉴定

参照《常见细菌鉴定手册》对分离物进行生理生化鉴定,分子生物学操作参见文献[8],16S rDNA 扩增使用通用引物 P1 和 P6。

1.5 Tn5-1063a 插入诱变及铁载体合成缺失突变株的筛选

将供体菌 *E. coli* DH5 α (pRL1063a) 和辅助菌 *E. coli* DH5 α (pRK2013) 分别接种于含 30 mg/L 卡那霉素的 LB 培养基中 37°C 过夜培养;取出 0.5 mL 菌液继续培养 3-4 h,至 OD 值为 1.0 左右;将受体菌 B50 接种于含 20 mg/L 氯霉素的 LB 液体培养基中,以 160 r/min 振荡培养 18 h,至 OD 值为 1.5 左右;将供体菌、辅助菌、受体菌按 2:2:1 的比例混合后,在 12000 r/min 离心 5 min,菌泥转移到含 20 mg/L 氯霉素和 30 mg/L 卡那霉素 LB 平板上的 0.22 μ m 的微孔滤膜上,于 37°C 培养 12 h;将滤膜上的菌泥用无菌水洗下,涂布在含 20 mg/L 氯霉素和 30 mg/L 卡那霉素 LB 平板上,37°C 培养 1-2 d,挑选单菌落保存在 30 mg/L 卡那霉素 LB 平板上^[9-11],保存备用。

采用 CAS 平板法^[12]检测突变株产铁载体能力。将突变株分别接种于 CAS 平板上,37°C 培养 1-2 d,以野生型为对照观察变色圈的大小。

1.6 Tn5-1063a 插入验证

用 Tn5 转座子中的 *luxA* 设计特异性引物 5'-TGGATCGCTTTGTTCCGGC-3'和 5'-TCCATTAGC TTCAAATCCGCA-3',以野生型、pRL1063a 质粒和突变株的总 DNA 为模板进行扩增。

1.7 目标基因的克隆

用 TAIL-PCR (Thermal asymmetric interlaced

PCR)方法,克隆突变株中转座子 Tn5-1063a 的侧翼序列^[13]。以突变株的总 DNA 为模板,根据转座子 Tn5-1063a 末端序列设计特异性引物,随机的简并引物序列见表 2。TAIL-PCR 共分为 3 次反应,反应条件见表 3。

表 2 TAIL-PCR 使用的引物
Table 2 TAIL-PCR primers

引物编号 Primer No.	引物序列 Primer sequence
TR1	5'-TGCGGATAAATCGGTAAAGCG-3'
TR2	5'-ACCCTCTGATGAGATGGTTATTGA-3'
TR3	5'-CGAAGAGAACACAGATTTAGCCC-3'
TL1	5'-GGCTGCCTTCGTCCTGAT-3'
TL2	5'-CCCAAGATCATGTGAACCTCC-3'
TL3	5'-CTTAGCTTATGAGTTTCACCTGGT-3'
AD1	5'-NTCGA(G/C)T(A/T)T(G/C)G(A/T)GTT-3'
AD2	5'-NGTCGA(G/C)(A/T)GANA(A/T)GAA-3'
AD3	5'-(A/T)GTGNAG(A/T)ANCANAGA-3'
AD4	5'-TG(A/T)GNAG(A/T)ANCA(G/C)AGA-3'
AD5	5'-AG(A/T)GNAG(A/T)ANCA(A/T)AGG-3'
AD6	5'-CA(A/T)CGICNGAIA(G/C)GAA-3'
AD7	5'-TC(G/C)TICGNACIT(A/T)GGA-3'
1657 P1	5'-TATTGGGCGCGGATATGG-3'
1657 P2	5'-AACCTCAGCCGTGAAGGT-3'
1657 P3	5'-ACTGGCTGGTGAGTTGTCC-3'

表 3 TAIL-PCR 的循环条件
Table 3 Cycle setting for TAIL-PCR

反应编号 Reaction	循环数 Cycle No.	反应条件 Thermal settings
第 1 次反应 Primary	1	93°C 2 min, 94°C 1 min
	5	94°C 1 min, 57°C 1 min, 72°C 3 min
	1	94°C 1 min, 25°C 3 min, ramping to 72°C over 3 min, 72°C 3 min
	15	94°C 30 s, 58°C 1 min, 72°C 3 min 94°C 30 s, 58°C 1 min, 72°C 3 min
		94°C 30 s, 44°C 1 min, 72°C 3 min
	1	72°C 5 min
第 2 次反应 Secondary	1	94°C 1 min
	12	94°C 30 s, 56°C 1 min, 72°C 3 min 94°C 30 s, 56°C 1 min, 72°C 3 min 94°C 30 s, 44°C 1 min, 72°C 3 min
	1	72°C 5 min
第 3 次反应 Tertiary	1	94°C 1 min
	20	94°C 1 min, 44°C 1 min, 72°C 3 min
	1	72°C 5 min

以野生型菌株 B50 总 DNA 为模板,根据已经测定的基因序列设计引物(pyrP1: 5'-AGCTGCGCGGC TATAATC-3'; pyrP2: 5'-CAGGATCACTCCCGAC TTC-3'),用 *Pfu* DNA polymerase 扩增完整的目标基因。

1.8 DNA 序列测定和分析

PCR 产物连接到 pGEM-T Easy 载体上,转化 *E. coli* DH5 α , 采用蓝白斑筛选的方法筛选重组子^[8], 序列的测定由上海英俊生物技术有限公司完成。通过 GenBank 进行序列同源性和功能分析。

2 结果

2.1 铁载体产生菌 B50 的鉴定

从棉花根际分离的铁载体产生菌 B50 可以利用葡萄糖作为碳源,在 pH 7.5 的环境下生长,耐受 0.001% 溶菌酶,生长温度范围为 4°C–65°C,没有明胶液化能力,不能水解 Tween 80,不能水解淀粉,无反硝化能力等。这些生理生化特性属于 *Pseudomonas* 的特征。B50 的 16S rDNA (GenBank accession No. DQ837704)与 *Pseudomonas pseudoalcaligenes* ATCC17400 的相似性为 99%。

2.2 铁载体合成缺失突变株的筛选

利用 Tn5-1063a 对 B50 进行随机插入诱变,获得了 2000 个突变株。通过 CAS 平板检测,从中筛选出 4 个铁载体合成缺失突变株,分别定名为 B50-472、B50-1358、B50-1657 和 B50-1723。4 个铁载体合成缺失突变株在 LB 平板上均能够正常生长, B50-472、B50-1358 和 B50-1723 在 CAS 平板上生长较弱,产生的变色圈明显的小于野生型 B50 产生的变色圈; B50-1657 在 CAS 平板上不生长。

用 1.6 中特异性引物验证突变株(图 1),结果表明,突变株 B50-472、B50-1358、B50-1657 及 B50-1723 和 pRL1063a 质粒均有相同大小的特异性

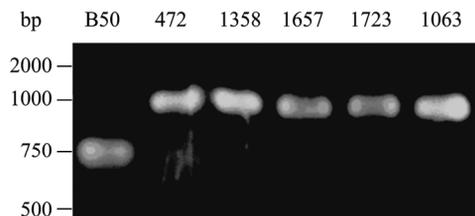


图 1 B50 和突变株: B50-472、B50-1358、B50-1657、B50-1723 的 *luxA* 扩增产物电泳图谱
Fig. 1 PCR products of the *luxA* DNA fragments in B50, B50-472, B50-1358, B50-1657 and B50-1723

条带, 而野生型 B50 则没有特异性条带。通过序列测定进一步证实扩增产物为 *luxA* 片段。说明突变株 B50-472、B50-1358、B50-1657 和 B50-1723 铁载体合成能力的缺失是由于 Tn5-1063a 插入到野生型 B50 基因组的相关基因中所引起的。

2.3 突变株 B50-1657 基因组中 Tn5-1063a 侧翼 DNA 片段的分离和序列测定

采用 TAIL-PCR 方法, 以突变株 B50-1657 的总 DNA 为模板, 分别用特异性引物 TL1、TL2、TL3 和随机简并引物, 扩增 Tn5-1063a 左侧序列, 用特

异性引物 TR1、TR2、TR3 和随机简并引物, 扩增 Tn5-1063a 右侧序列(图 2)。用设计的引物 1657 P1、1657 P2 和 1657 P3 进行第 3 次 TAIL-PCR。将 3 次 TAIL-PCR 测序结果拼接得到 *pyrD* 全序列并进行互联网检索(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)。

根据 DNA 序列分析, 该基因与 *Pseudomonas putida* KT2440 的 *pyrD* 相似性为 84%, 与 *Pseudomonas entomophila* str. L48 的 *pyrD* 相似性为 83%。对由 DNA 序列衍生的氨基酸序列在 GenBank 的蛋白质库中进行比较, 其 PyrD 氨基酸序列相似性

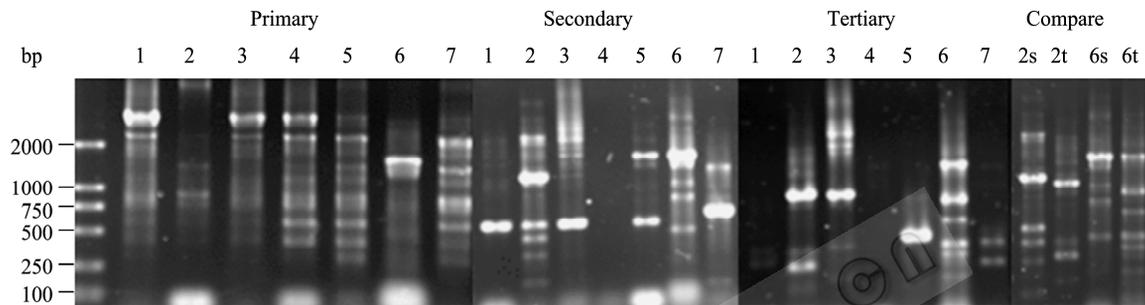


图 2 B50-1657 基因组的 TAIL-PCR 产物电泳图谱

Fig. 2 Products of TAIL-PCR of the mutant B50-1657

注: Primary、Secondary 和 Tertiary: 3 次 TAIL-PCR 反应; 1-7: 由随机简并引物 AD1-AD7 扩增的产物。

Note: Primary PCR, Secondary PCR, Tertiary PCR, three PCR reactions of TAIL-PCR; 1-7: TAIL-PCR products using the arbitrary degenerate primers AD1-AD7, respectively.

为 95%。根据测序结果, 设计上游和下游引物, 通过高保真 PCR 扩增, 获得 *P. pseudoalcaligenes* 的 *pyrD* (GenBank accession No. EF143992), 大小为 1023 bp, 编码 340 个氨基酸。转座子 Tn5-1063a 插入到 *pyrD* 的第 40 个碱基处, 为第 13 和 14 个氨基酸之间。该区域是二氢乳清酸脱氢酶和二氢嘧啶脱氢酶的黄素单核苷酸(FMN)的结合区域^[14]。*pyrD* 的突变阻断了乳清酸的合成导致 B50 丧失了合成铁载体的能力。

2.4 *P. pseudoalcaligenes* B50 *pyrD* 的功能验证

将 B50 和 B50-1657 分别接种在 LB 培养基平板、涂有乳清酸饱和溶液的 LB 培养基平板、CAS 培养基平板、涂有乳清酸饱和溶液的 CAS 培养基平板上, 37°C 培养, 观察他们的生长情况。

B50-1657 在 LB 培养基平板上生长较弱, 形成薄薄一层菌苔, 在涂有乳清酸的 LB 培养基平板上生长较迅速而且形成的菌苔较厚(图略); B50-1657 在 CAS 培养基平板上不生长, 在涂有乳清酸的 CAS 平板上可以产生变色圈(图 3), 但不如出发菌株产生的变色圈大。说明, B50-1657 铁载体合成能力有一定的恢复。

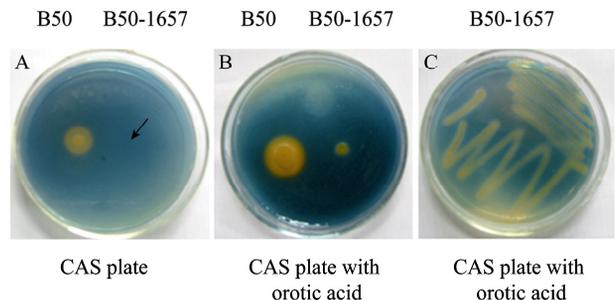


图 3 B50 和 B50-1657 在 CAS 培养基和含有乳清酸的 CAS 培养基上的生长

Fig. 3 Phenotypic analysis of siderophores production by B50 and the mutant B50-1657

注: A: CAS 平板; B、C: 含有乳氨酸的 CAS 平板。

Note: A: CAS plate; B,C: CAS plate with orotic acid.

3 讨论

利用转座子 Tn5-1063a 对 B50 进行转座诱变, 并使用 TAIL-PCR 的方法克隆基因是行之有效的。本实验获得了 4 个铁载体合成缺失突变株 B50-472、B50-1358、B50-1657 和 B50-1723, 其合成铁载体能力都有不同程度的减小。B50-1657 完全丧失了合成

铁载体的能力, 在低铁环境下不生长。

对 B50-1657 的基因组进行 TAIL-PCR 扩增和测序, 研究表明, 转座子 Tn5-1063a 插入到 B50 基因组的 *pyrD* 的黄素单核苷酸(FMN)的结合区域。*pyrD* 编码的二氢乳清酸脱氢酶催化二氢乳清酸转化成乳清酸, 这是尿嘧啶从头合成的第 4 步, 也是尿嘧啶合成过程中唯一的一步氧化还原反应。尿嘧啶又是所有嘧啶合成的前体物质。有报道称铁载体 Pyoverdine Pm 的合成与嘧啶的合成密切相关^[14]。*pyrD* 的突变影响了 B50-1657 的二氢乳清酸脱氢酶的活性, 导致 B50-1657 铁载体合成的缺失。由此推断二氢乳清酸脱氢酶在微生物铁载体的合成过程中起着重要的作用。*pyrD* 是铁载体合成的相关基因。

另外, 乳清酸在常温下是一种微溶的化合物, 100 mL 纯水当中只能溶解 0.18 g, 浓度为 0.01153 mol/L, 突变株 B50-1657 铁载体合成能力不能完全恢复, 原因可能是补充的乳清酸达不到 B50-1657 代谢所需的浓度, 微生物主要从代谢过程中获取乳清酸。

许多假单胞菌都能够产生铁载体, 例如 *P. aeruginosa*、*P. syringae* pv. *Tomato* DC3000、*P. putida* KT2440、*P. fluorescens* sp. fo-1、*P. entomophila* L48、*P. fluorescens* ATCC17400 等^[4], 本文首次报道了 *P. pseudoalcaligenes* 可以产生铁载体, 且二氢乳清酸脱氢酶与微生物铁载体的合成有密切关系。*P. pseudoalcaligenes* 所产生的铁载体的种类以及二氢乳清酸在铁载体合成过程中的作用机制还有待于进一步研究。

参 考 文 献

- [1] Winkelmann G. Microbial siderophore-mediated transport. *Biochem Soc Trans*, 2002, **30**(4): 691–696.
- [2] Haas D, Défago G. Biological control of soil-borne pathogens by fluorescent pseudomonads. *Nat Rev Microbiol*, 2005, **10**(3): 1–13.
- [3] Jorge H Crosa, Christopher T Walsh. Genetics and assembly line enzymology of siderophore biosynthesis in bacteria. *Microbio Mol Biol Rev*, 2002(6): 223–249.
- [4] Payne SM, Wyckoff EE, Muphy ER, et al. Iron and pathogenesis of *Shigella*: iron acquisition in the intracellular environment. *Biometals*, 2006, **19**(2): 173–180.
- [5] Wandersman C, Delepelaire P. Bacterial iron sources: from siderophores to hemophores. *Annu Rev Microbiol*, 2004(58): 611–647.
- [6] Andrew T, Ulijasz David R, Andes Jeremy D, et al. Regulation of iron transport in *Streptococcus pneumoniae* by RitR, an orphan response regulator. *J Bacteriol*, 2004(186): 8123–8136.
- [7] Vincent D, Johe HE, José H, et al. Transcriptional profiling of *Actinobacillus pleuropneumoniae* under iron-restricted conditions. *BMC Genomics*, 2007(8): 72.
- [8] Sambrook J, David W Russell. Molecular Cloning. 3rd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2002.
- [9] Du BH, Li XH, Lin RS, et al. Study on isolation of *noeB* of *Sinorhizobium meliloti* 042BM by Tn5-1063 mutagenesis. *Acta Microbiologica Sinica*, 2004, **44**(2): 206–209.
- [10] Wolk CP, Cai Y, Panoff JM. Use of a transposon with luciferase as a reporter to identify environmentally responsive genes in a cyanobacterium. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991, **88**(12): 5355–5359.
- [11] Milcamps A, Ragatz DM, Lim P, et al. Isolation of carbon- and nitrogen-deprivation-induced loci of *Sinorhizobium meliloti* 1021 by Tn5-luxAB mutagenesis. *Microbiol*, 1998, **144**(11): 3205–3218.
- [12] Schwyn B, Neilands JB. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophore. *Analy Biochem*, 1987(160): 47–56.
- [13] Liu YG, Mitsukawa N, Oosumi T, et al. Efficient isolation and mapping of *Arabidopsis thaliana* T-DNA insert junctions by thermal asymmetric interlaced PCR. *J plant*, 1995, **8**(3): 457–463.
- [14] Maksimova NP, Blazhevich OV, Fomichev IuK. The role of pyrimidines in the biosynthesis of the fluorescing pigment pyoverdine Pm in *Pseudomonas putida* M. *Mol Gen Mikrobiol Virusal*, 1993(5): 22–26.