



MvaT 调控铜绿假单胞菌吩嗪的合成机制

纪南南 杨广 梁如冰*

上海交通大学生命科学技术学院 微生物代谢国家重点实验室 上海 200240

摘要:【背景】属于 H-NS 家族的 MvaT 转录因子参与了铜绿假单胞菌的许多重要代谢过程, 如吩嗪合成代谢, 但其调控方式仍不十分明确。【目的】确定转录调控因子 MvaT 是否直接调控铜绿假单胞菌的吩嗪合成过程, 即该蛋白是否可以直接结合 2 个吩嗪-1-羧酸合成基因簇(*phzA1G1* 和 *phzA2G2*) 与 3 个分支转化基因(*phzH*、*phzS* 和 *phzM*)的上游启动子区域。【方法】以铜绿假单胞菌 SJTD-1 和其 *mvaT* 基因敲除突变株 SJTD-1($\Delta mvaT$)为研究对象, 检测其在不同培养基条件下吩嗪化合物的合成量差异。通过体外异源表达与亲和纯化, 获得重组蛋白 MvaT。利用凝胶阻滞实验, 确定 MvaT 重组蛋白对 5 个吩嗪代谢基因簇/基因上游启动子的结合情况。【结果】*mvaT* 基因敲除突变株 SJTD-1($\Delta mvaT$)的吩嗪产量较野生型显著提升。MvaT 重组蛋白被有效表达与纯化, 体外凝胶阻滞实验结果显示, 该重组蛋白可与 *phzA1G1*、*phzA2G2*、*phzM*、*phzS* 和 *phzH* 的上游启动子区域均发生特异性结合。其中, 重组蛋白 MvaT 与 *phzA1G1* 和 *phzA2G2* 的结合区域位于其上游启动子的 200 bp 以内, 而该蛋白与 *phzM*、*phzS* 和 *phzH* 的结合区域则位于其上游启动子的 100 bp 以内。【结论】MvaT 蛋白通过直接结合吩嗪合成代谢基因的上游启动子区域来直接调控假单胞菌的吩嗪类化合物合成。

关键词: 铜绿假单胞菌, MvaT, 吩嗪, 转录调控, 吩嗪代谢基因

Regulation of MvaT on phenazine synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*

JI Nan-Nan YANG Guang LIANG Ru-Bing*

School of Life Science and Biotechnology, State Key Laboratory of Microbial Metabolism, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China

Abstract: [Background] MvaT protein belonging to the H-NS transcription factor family is involved in many important metabolic processes of *Pseudomonas aeruginosa*, such as phenazine synthesis pathway. However, up to now its regulation mode is still unclear. [Objective] The goal of this work was to determine if MvaT could directly regulate the two phenazine-1-carboxylic acid synthesis gene clusters (*phzA1G1* and *phzA2G2*) and three transforming genes (*phzH*, *phzS* and *phzM*) of phenazine compounds, by detecting the binding capability of MvaT to the promoter regions of these genes. [Methods] *Pseudomonas aeruginosa* SJTD-1 was used as target and the *mvaT*-knockout strain SJTD-1($\Delta mvaT$) was constructed by homologous recombination. The yield of phenazine compounds of the two strains in different media was detected. Further the recombinant MvaT protein was obtained by the heterologous

Foundation items: National Natural Science Foundation of China (31570099, 31370152)

*Corresponding author: E-mail: icelike@sjtu.edu.cn

Received: 20-08-2018; **Accepted:** 17-10-2018; **Published online:** 26-12-2018

基金项目: 国家自然科学基金(31570099, 31370152)

*通信作者: E-mail: icelike@sjtu.edu.cn

收稿日期: 2018-08-20; 接受日期: 2018-10-17; 网络首发日期: 2018-12-26

expression and affinity purification. The electrophoretic mobility shift assay (EMSA) was performed to determine if the recombinant MvaT protein could bind to the promoter regions of the five phenazine synthetic gene clusters/genes. **[Results]** The yield of phenazine compounds of strain SJTD-1(*ΔmvaT*) was significantly higher than that of the wild type SJTD-1 strain. The recombinant MvaT protein could be expressed and purified efficiently. *In vitro* EMSA results indicated that the recombinant MvaT protein could directly bind to the promoter regions of phenazine synthetic gene clusters/genes. The binding sites of MvaT to the promoter of *phzA1G1* and *phzA2G2* gene clusters were within the upstream 200 bp region, and that to the promoter of *phzM*, *phzS* and *phzH* genes were within its upstream 100 bp region. **[Conclusion]** MvaT protein can directly bind the upstream promoter regions of the five phenazine synthetic gene clusters/genes and regulate the synthesis of phenazine compounds.

Keywords: *Pseudomonas aeruginosa*, MvaT, Phenazine, Transcriptional regulation, Phenazine synthesis genes

吩嗪类化合物是假单胞菌产生的一类重要的小分子次级代谢产物,属于多氮稠杂环化合物,主要包括绿脓菌素(Pyocyanin, PYO)、吩嗪-1-酰胺(Penazine-1-carboxamide, PCN)、2-羟基吩嗪(2-Hydroxyphenazine, 2-HPCA)和吩嗪-1-羧酸(Phenazine-1-carboxylic acid, PCA)等,参与了假单胞菌的杀菌抑菌、信号转导、基因水平转移、药物外排和生物膜形成等许多生理过程,具有重要的生理生化作用^[1-5]。绿脓菌素是条件性致病菌铜绿假单胞菌分泌的多种毒性因子之一,在其侵染过程中起重要作用^[6]。吩嗪化合物可在病原菌感染人和动物时直接干扰被侵染细胞的信号通路如 IL-8 和 NF-KB 途径,促进细菌侵染进程;同时吩嗪化合物可降低丝氨酸蛋白酶活性,导致肺的囊性纤维化^[7]。

研究认为铜绿假单胞菌中吩嗪类化合物合成是通过莽草酸代谢途径(Shikimic acid pathway),以分支酸为中间产物合成吩嗪的基本三环骨架,产生的吩嗪-1-羧酸可作为前体进一步形成其它复杂结构的吩嗪类化合物^[4]。铜绿假单胞菌中已发现 2 个独立的吩嗪合成基因簇,各自包括 7 个基因(*phzA1-G1*: *phzA1/B1/C1/D1/E1/F1/G1*)与(*phzA2-G2*: *phzA2/B2/C2/D2/E2/F2/G2*),均可实现莽草酸向吩嗪-1-羧酸(PCA)的转化^[5]。此外,由 *phzH*、*phzS* 和 *phzM* 3 个基因编码的特定酶,可将吩嗪-1-羧酸分别转化为绿脓菌素、吩嗪-1-酰胺和 2-羟基吩嗪^[5]。

转录因子 MvaT 属于 H-NS 蛋白家族,已被证实参与了甲羟戊酸代谢、细菌毒性因子表达、生

物膜形成、信号分子合成、鞭毛组装及基因水平转移等多个过程的调控,有助于细菌适应复杂多变的环境^[8-12]。有研究结果显示,敲除铜绿假单胞菌 *mvaT* 基因可提升菌株的吩嗪类化合物产量,相关合成基因簇的转录表达水平有所提升,推测该转录因子参与了吩嗪类化合物的代谢过程,但具体机制仍不十分明确^[13]。

铜绿假单胞菌 SJTD-1 是本课题组分离获得的一株石油高效降解菌株,前期比较蛋白组结果显示,在以 C18 为唯一碳源培养时, MvaT 蛋白的表达量较其在以葡萄糖为唯一碳源培养时上调了 2.45 倍^[14-15]。*mvaT* 基因敲除菌株 SJTD-1(*ΔmvaT*)的吩嗪化合物产量较野生型菌株有 2-3 倍的提升^[16]。因此,本研究以铜绿假单胞菌 SJTD-1 与 SJTD-1(*ΔmvaT*)为研究对象,检测其在不同培养基中的吩嗪类化合物产量;同时通过体外克隆与表达重组蛋白 MvaT,并结合体外凝胶阻滞实验,检测确定 MvaT 蛋白对吩嗪合成相关基因是否具有直接地调控作用,这将有助于解析 MvaT 蛋白对铜绿假单胞菌吩嗪合成过程的调控模式,也可为后续构建高产吩嗪类化合物的工程菌株提供思路。

1 材料与amp;方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒及引物

所用的菌株和质粒及引物详见表 1、表 2。

表 1 本文所用菌株与质粒

Table 1 Strains and plasmids used in this study

菌株/质粒 Strains/Plasmids	基因型/抗性/描述 Description of genotypes and resistances	来源 Sources/References
菌株 Strains		
<i>Escherichia coli</i> DH5 α	F'/endA1 <i>hsdR</i> 17 (rK ⁻ mK ⁻) <i>glnV</i> 44 <i>thi</i> ⁻¹ <i>recA</i> 1 <i>gyrA</i> (<i>NalR</i>) <i>relA</i> 1 Δ (<i>lacIZYA-argF</i>) U169	Invitrogen
<i>E. coli</i> BL21(DE3)	蛋白异源表达菌株	Novagen
<i>P. aeruginosa</i> SJTD-1	Protein allogeneic expression strain 野生型烷烃降解铜绿假单胞菌菌株	[13]
<i>P. aeruginosa</i> SJTD-1(Δ <i>mvaT</i>)	Strain with the alkane-degradation capability isolated from oil-contaminated soil, wild type <i>mvaT</i> 敲除突变株	[16]
	<i>mvaT</i> mutant of <i>P. aeruginosa</i> SJTD-1	
质粒 Plasmids		
pET28a	大肠杆菌表达载体, <i>oriT</i> , 卡那霉素抗性 <i>E. coli</i> expression plasmid, Km ^r	Novagen
pET28a- <i>mvaT</i>	<i>MvaT</i> 表达载体, <i>oriT</i> , 卡那霉素抗性 Plasmid pET28a inserted with <i>mvaT</i> gene at <i>Nde</i> I/ <i>Hind</i> III sites, Km ^r	This study

表 2 本文所用引物列表

Table 2 Primers used in this work

引物名称 Primers name	引物序列 Primers sequence (5'→3')	描述 Description
<i>mvaT</i> -orf-F	gggggCATATGtcctgatcaacaatategc	扩增 <i>mvaT</i> 编码基因片段
<i>mvaT</i> -orf-R	gggggGGATCCctgttagccgagcagggt	Amplification of <i>mvaT</i> gene fragment
<i>phzA1G1</i> -U200-F	ccaaaagaaccgggctg	扩增 <i>phzA1G1</i> 操纵子上游 450 bp 和 200 bp 片段
<i>phzA1G1</i> -U450-F	tagcaatcccctcct	Amplification of 450 bp and 200 bp promoter region of <i>phzA1G1</i> operon
<i>phzA1G1</i> -U200/450-FAM-R	FAM-gcgccgcctccgagaggg	扩增 <i>phzA2G2</i> 操纵子上游 450 bp 和 200 bp 片段
<i>phzA2G2</i> -U200-F	cctgtcaaatctgttaca	Amplification of 450 bp and 200 bp promoter region of <i>phzA2G2</i> operon
<i>phzA2G2</i> -U450-F	cgcaagectccggccattca	扩增 <i>phzS</i> 基因上游 237 bp 和 100 bp 片段
<i>phzA2G2</i> -U200/450-FAM-R	FAM-ggtgcgaatctccgccagtt	Amplification of 237 bp and 100 bp promoter region of <i>phzS</i> gene
<i>phzS</i> -U237-F	cgacaccgctgcgccggc	扩增 <i>phzH</i> 基因上游 200 bp 和 100 bp 片段
<i>phzS</i> -U100-F	cgcggttatccgcccgtgc	Amplification of 200 bp and 100 bp promoter region of <i>phzH</i> gene
<i>phzS</i> -U100/237-FAM-R	FAM-gggtgcttcttctctcagtgcttc	扩增 <i>phzM</i> 基因上游 200 bp 和 100 bp 片段
<i>phzH</i> -U200-F	cacgttttctgttctatcattg	Amplification of 200 bp and 100 bp promoter region of <i>phzM</i> gene
<i>phzH</i> -U100-F	gccaagcattctagccc	
<i>phzH</i> -U100/200-FAM-R	FAM-agggaactcctataattgatgttt	
<i>phzM</i> -U200-F	caggcagttgaaaagtcca	
<i>phzM</i> -U100-F	ggtgttctgcggtatttctc	
<i>phzM</i> -U100/200-FAM-R	FAM-ctttattctctctgttacacatttcc	

注: 下划线标示限制性酶切位点序列, FAM 表示 FAM 荧光集团标记。

Note: The underline represented the sequences of the restriction sites, and FAM represented the fluorescence group of FAM.

1.1.2 主要试剂和仪器

蛋白胨和酵母粉, Oxoid 公司; 所有无机化学试剂, 国药集团化学试剂有限公司(上海); 十二烷基磺酸钠(SDS)、丙烯酰胺、琼脂粉、乙二胺四乙酸(EDTA)、N,N,N',N'-四甲基乙二胺(TEMED)、尿素等缓存液试剂, 生工生物工程(上海)股份有限公司; *rTaq* 酶, TaKaRa 公司; PCR 产物纯化试剂盒和细菌基因组提取试剂盒, 天根生物技术有限公司; 限制性内切酶, Thermo Fisher 公司; 亲和层析介质 Ni-TA, Bio-Rad 公司。

低温台式离心机、梯度 PCR 仪, Eppendorf 公司; 紫外分光光度计与数显式稳压稳流电泳仪, 上海精科实业有限公司; Nanodrop 核酸分析仪, Nanodrop Technologies 公司; 蛋白电泳仪与凝胶成像仪, Bio-Rad 公司。

1.1.3 培养基和培养条件

LB 液体培养基(g/L): 蛋白胨 10.0, 酵母提取物 5.0, NaCl 8.0 (pH 7.0–7.2)。LB 固体培养基: 在 LB 液体培养基中加入 1.5%–2% 琼脂粉。KB 培养基(g/L): 蛋白胨 20.0, 甘油 15 mL, K_2HPO_4 0.392, 无水 $MgSO_4$ 0.732 (pH 7.5)。PB 培养基(g/L): 蛋白胨 20.0, $MgCl_2$ 1.4, K_2SO_4 10.0 (pH 7.0–7.2)。PPM 培养基(g/L): 蛋白胨 20.0, 葡萄糖 18.0, NaCl 1.0, KNO_3 5.0 (pH 7.0–7.2)。所有培养基均 100 kPa 灭菌 20 min 后备用。所有大肠杆菌和铜绿假单胞菌的菌株均在 37 °C、200 r/min 振荡培养。

1.2 方法

1.2.1 吩嗪化合物含量的测定

吩嗪化合物含量测定方法参考文献[17]。具体步骤如下: 先将铜绿假单胞菌菌株 SJTD-1 和 SJTD-1($\Delta mvaT$)在 LB 固体培养基活化后, 挑取单菌落接种到 LB 培养基中培养至 OD_{600} 为 0.5。收集细胞, 无菌水洗 3 次后重悬菌体。以初始 OD_{600} 为 0.05 时转接入 500 mL 的 PPM、PB、KB、LB 培养基

中培养, 在不同时间点取样 2 mL; 加入等体积氯仿, 振荡混匀, 静置 30–60 min。8 000 r/min 离心 5 min 后吸取有机相, 加入 0.2 mol/L 盐酸 2 mL, 振荡混匀混合, 静置 30 min。取上层盐酸相测定 OD_{520} 值, 吩嗪含量(mg/L) = $OD_{520} \times 17.072$, 取 3 次独立实验的平均值计算。

1.2.2 MvaT 蛋白异源表达菌株的构建

利用引物 *mvaT*-orf-F/R PCR 扩增 *mvaT* 基因编码区片段。利用 *Nde* I 和 *Hind* III 酶切连接后, 将其插入同样酶切处理后的表达载体 pET28a 中, 化学法转入 *E. coli* DH5 α 感受态中以获得阳性克隆。提取质粒转化 *E. coli* BL21(DE3)细胞, 获得 MvaT 蛋白表达菌株。

1.2.3 蛋白异源表达与亲和纯化

蛋白异源表达与亲和纯化方法参照文献[18]。将 MvaT 蛋白表达菌株接种到 500 mL LB 液体培养基中培养至 OD_{600} 为 0.6, 以 1:1 000 比例加入 1 mg/mL IPTG 诱导培养 3–5 h。8 000 r/min 离心 10 min 后收集菌体, 超声破碎细胞。4 °C、12 000 r/min 离心 30 min 后收集上清。利用镍亲和层析纯化获得重组 MvaT 蛋白, SDS-PAGE 电泳检测纯化的重组 MvaT 蛋白, BCA 法测定蛋白质浓度。

1.2.4 凝胶阻滞实验(Electrophoretic mobility shift assay, EMSA)

PCR 扩增带 FAM 标记的 *phzA1G1*、*phzA2G2*、*phzH*、*phzS* 和 *phzM* 基因上游启动子区片段, 引物见表 2; 纯化 PCR 产物并测定浓度。20 μ L 结合反应体系: dsDNA 片段(0.3 μ mol/L) 1 μ L, MvaT 蛋白 1–5 μ L, 10 \times Binding buffer 2 μ L, 去离子 H_2O 补足 20 μ L。8%非变性聚丙烯酰胺凝胶 50 mL: 30% 丙烯酰胺 13.3 mL, 10 \times TBE 5 mL, H_2O 31.4 mL, 10% AP 350 μ L, TEMED 33 μ L。将纯化蛋白与目标 DNA 片段在室温结合 30 min 后, 通过 8%非变性聚丙烯酰胺凝胶进行检测, 利用凝胶成像系统拍照。

2 结果与分析

2.1 *mvaT* 基因缺失可显著提高铜绿假单胞菌 SJTD-1 的吩嗪类化合物产量

检测了野生菌株 SJTD-1 和 *mvaT* 基因敲除突变株 SJTD-1($\Delta mvaT$) 在 4 种不同培养基中培养 24 h 和 72 h 后的吩嗪化合物产量, 结果(图 1)显示, 与野生型菌株相比, *mvaT* 基因敲除突变株 SJTD-1($\Delta mvaT$) 的吩嗪类化合物产量均有显著提升, 不同培养基中的提升倍数不同, 可达 3–8 倍; 在 PB 培养基中该突变株的吩嗪化合物产量可达 9 mg/L, 而野生菌株 SJTD-1 在 4 种培养基中的吩嗪化合物产量均低于 3 mg/L。该结果与已有的报道一致, 铜绿假单胞菌 PAO1 的 *mvaT* 敲除菌株所产生的绿脓菌素是野生菌株的 2 倍以上^[13]。

说明 *mvaT* 基因敲除可有效提升菌株 SJTD-1 中吩嗪化合物的产量。

2.2 *mvaT* 基因的异源表达与 MvaT 重组蛋白的亲纯化

为了研究 MvaT 蛋白是否可以直接调控菌株 SJTD-1 的吩嗪合成基因, 对其编码基因进行了序列比对、异源表达与亲和层析纯化。氨基酸序列比对结果显示该 MvaT 蛋白与不同来源 H-NS 家族中的 MvaT 亚家族蛋白有较高的一致性, 序列保守性较高(图 2A), 这之前报道一致^[8]。利用含有 *mvaT* 基因的表达质粒, 在大肠杆菌 BL21(DE3) 中实现了基因的异源表达与亲和纯化, 重组 MvaT 蛋白分子量大小约为 14 kD, 产量约为 30 mg/L (图 2B、2C)。

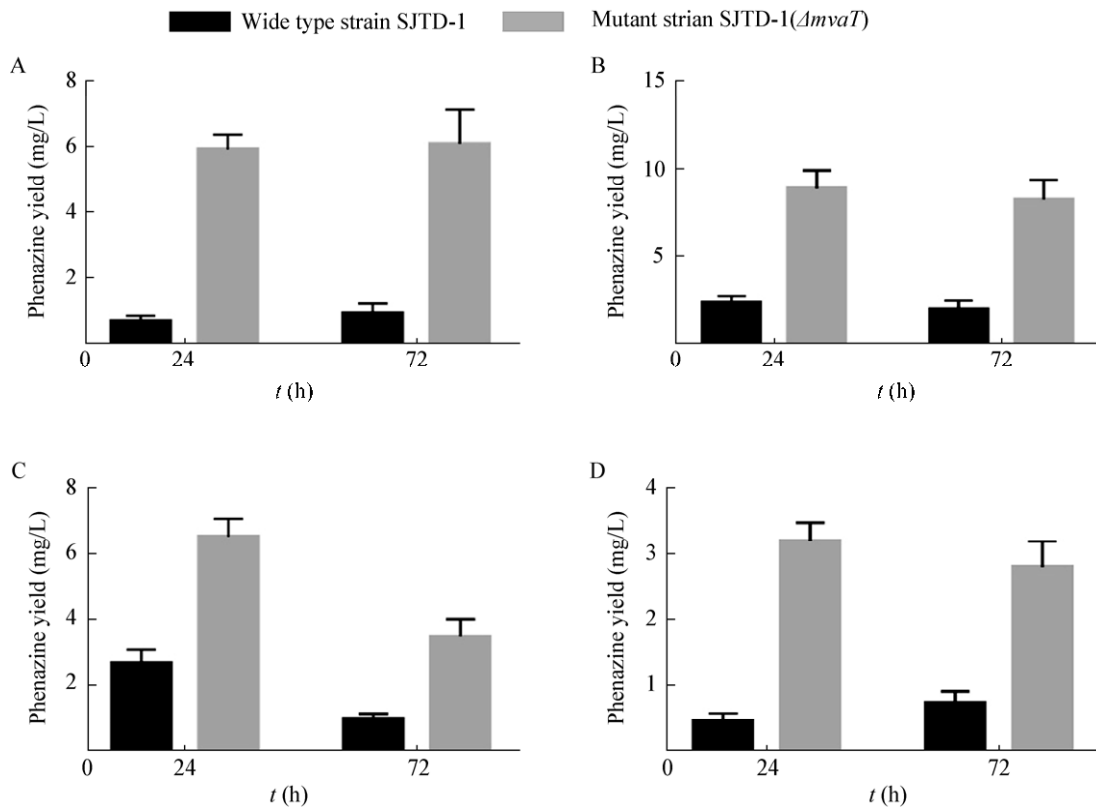


图 1 两个菌株在 PPM (A)、PB (B)、KB (C)、LB (D) 培养基中的吩嗪化合物产量

Figure 1 Phenazine compounds yield of two strains cultured in PPM (A), PB (B), KB (C), and LB (D) media

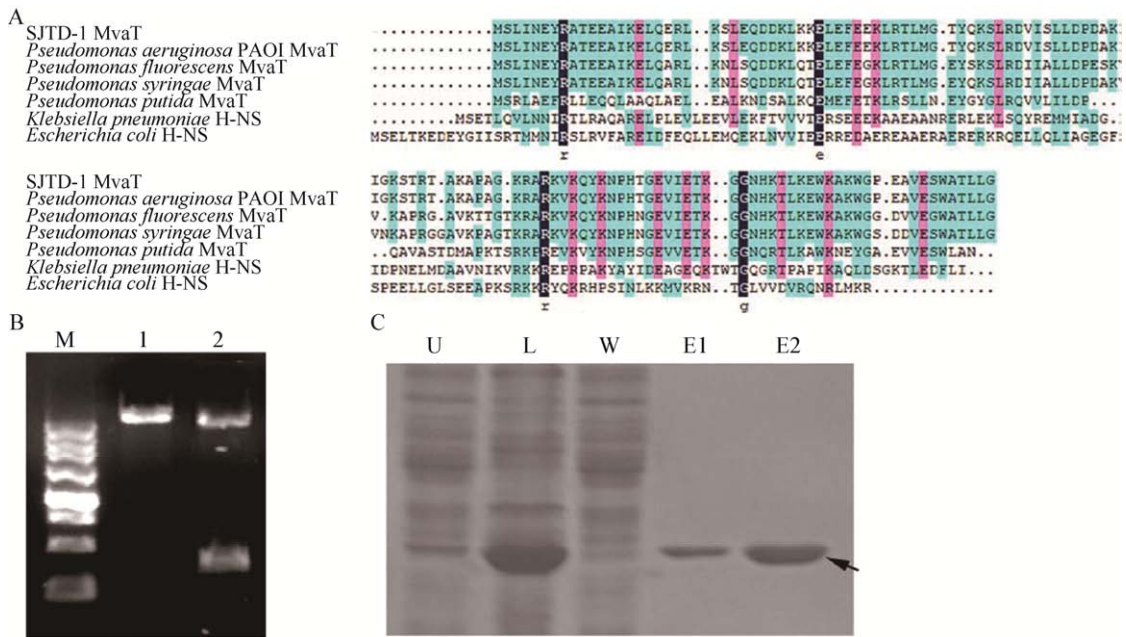


图 2 MvaT 蛋白的氨基酸序列比对与重组质粒鉴定及重组蛋白纯化图

Figure 2 The amino acid sequence alignment, the recombinant plasmids analysis and the protein purification of MvaT protein

注: A: 不同来源 MvaT 蛋白的氨基酸序列比对结果。B: pET28a-*mvaT* 质粒酶切鉴定图, M: Marker; 1: pET28a-*mvaT* 质粒; 2: 酶切后的 pET28a-*mvaT* 质粒。C: 重组 MvaT 蛋白的 SDS-PAGE 电泳图谱, U: 超声后上清; L: 上柱流出液; W: 洗杂液; E1 和 E2: 目标蛋白洗脱液。

Notes: A: The multiple sequences alignment of MvaT proteins from different organisms. B: The restriction enzyme analysis of plasmid pET28a-*mvaT*, M: Marker; 1: Plasmid pET28a-*mvaT*; 2: Enzyme-treated plasmid pET28a-*mvaT*. C: SDS-PAGE analysis of the recombinant MvaT protein, U: Supernatant solution of sonication; L: Solution after loading on the column; W: Solution after wash buffer; E1 and E2: Solution after elution.

2.3 MvaT 蛋白可在体外特异性结合吩嗪合成基因的上游启动子区域

为确定 MvaT 蛋白是否直接调控吩嗪合成的基因, 将体外纯化的重组 MvaT 蛋白分别与 2 个吩嗪-1-羧酸合成基因簇(*phzA1G1* 和 *phzA2G2*)和 3 个吩嗪-1-羧酸转化基因(*phzH*、*phzS* 和 *phzM*)的上游启动子区进行结合, 用体外凝胶阻滞实验来检测此蛋白与不同 DNA 片段的结合情况。

2.3.1 MvaT 蛋白可与 *phzA1G1* 和 *phzA2G2* 基因簇的启动子区结合

分别以 5'端带有 FAM 标记的 *phzA1G1* 和 *phzA2G2* 基因簇上游的 450 bp 片段和 200 bp 片段作为目标 DNA 片段, 检测其与重组 MvaT 蛋白的结合情况。凝胶阻滞实验结果显示, MvaT 蛋白加入会产生明显的阻滞条带, 且该阻滞现象随蛋白

浓度增加而加强; 空白 DNA 片段对照和加入牛血清白蛋白(Bovine serum albumin, BSA)的对照均无阻滞条带出现(图 3)。这表明 MvaT 蛋白与 *phzA1G1* 和 *phzA2G2* 基因簇的上游区域存在特异性结合。因不同长度 DNA 片段与 MvaT 蛋白结合时均只出现一条结合条带, 说明该 MvaT 蛋白与 DNA 的结合区域是位于基因簇上游的 200 bp 以内。MvaT 蛋白可能直接调控了 *phzA1G1* 和 *phzA2G2* 基因簇的转录。

2.3.2 MvaT 蛋白可在体外特异性结合 *phzH*、*phzS* 和 *phzM* 基因的上游启动子区

以 5'端带有 FAM 标记的 *phzH*、*phzS* 和 *phzM* 上游 200 bp 片段和 100 bp 片段为目标 DNA 片段, 检测其与 MvaT 蛋白的结合情况。结果显示, MvaT 蛋白也可与 *phzH*、*phzS* 和 *phzM* 的上游片段发生特异性结合, 出现阻滞条带, 同样具有浓度依赖性(图 4)。

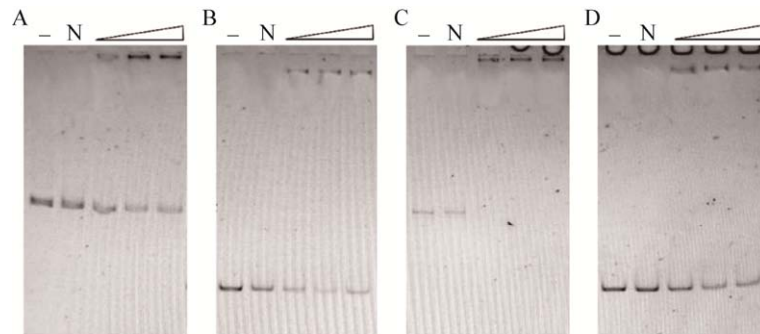


图3 MvaT蛋白与 *phzA1G1* 和 *phzA2G2* 基因簇上游片段结合的 EMSA 图谱

Figure 3 The EMSA results of MvaT protein binding with the upstream regions of *phzA1G1* and *phzA2G2* clusters

注: A-D 的目标 DNA 片段依次为 *phzA1G1*-450 bp、*phzA1G1*-200 bp、*phzA2G2*-450 bp、*phzA2G2*-200 bp; DNA 投入量均为 3 pmol; -: 空白对照; N: BSA 阴性对照; MvaT 蛋白/DNA 摩尔比依次为: 50/1, 100/1, 200/1.

Notes: Target DNA fragments of A-D were *phzA1G1*-450 bp, *phzA1G1*-200 bp, *phzA2G2*-450 bp and *phzA2G2*-200 bp, respectively; The input of all the DNA fragments were 3 pmol; -: The blank control; N: The negative control added with BSA protein; The molar ratio of MvaT/DNA was 50/1, 100/1, and 200/1, respectively.

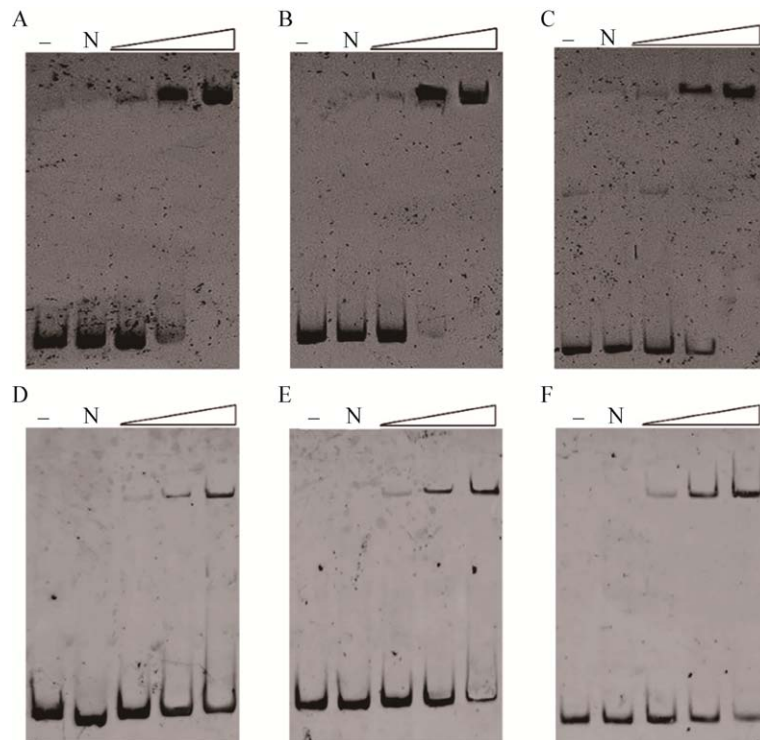


图4 MvaT蛋白与 *phzH*、*phzS* 和 *phzM* 基因上游片段结合的 EMSA 图谱

Figure 4 The EMSA results of MvaT protein with the upstream fragments of *phzH*, *phzS* and *phzM* genes

注: A-F 的目标 DNA 片段依次为 *phzH*-200 bp、*phzS*-200 bp、*phzM*-200 bp、*phzH*-100 bp、*phzS*-100 bp、*phzM*-100 bp; DNA 投入量均为 3 pmol; -: 空白对照; N: BSA 阴性对照; MvaT 蛋白/DNA 摩尔比依次为: 50/1, 100/1, 200/1.

Notes: Target DNA fragments of A-F were *phzH*-200 bp, *phzS*-200 bp, *phzM*-200 bp, *phzH*-100 bp, *phzS*-100 bp and *phzM*-100 bp, respectively; The input of all the DNA fragments were 3 pmol; -: The blank control, N: The negative control added with BSA; The molar ratio of MvaT/DNA was 50/1, 100/1, and 200/1, respectively.

跟 MvaT 蛋白与 *phzA1G1* 和 *phzA2G2* 基因簇上游区域的结合不同的是, MvaT 蛋白与 *phzH*、*phzS* 和 *phzM* 的结合区域位于其上游 100 bp 以内, MvaT 蛋白也可能直接调控了这 3 个基因的转录。

3 讨论与结论

吩嗪类化合物作为假单胞菌尤其是铜绿假单胞菌的一种重要的毒力因子, 其生物合成受群体感应系统(Quorum sensing, QS)和 GacA/GacS 双组分调控系统(Two-component regulatory systems, TCSs)等多个系统调控; 吩嗪类化合物也可作为信号分子对多种基因, 包括生物膜合成、细菌运动、细菌致病和生物发光等基因加以调控, 并调控自身生物合成, 提高菌株的环境适应能力^[19-23]。如铜绿假单胞菌的吩嗪-1-羧酸合成基因簇 *phzA1G1* 上游具有 QS 感应元件 *las-box*, 可通过与 PqsR 和 RhlR 结合正调控 PCA 的合成代谢; 而在 *phzA2G2* 上游则存在负调控因子 QscR 的结合区域, 负调控因子 QscR 可通过抑制基因 *las* 和 *rhl* 的表达对吩嗪的合成起到负调控的效果^[21]。GacA/GacS 双组分调控系统可通过活化小 RNA RsmY 和 RsmZ, 实现吩嗪合成代谢的抑制系统去阻遏, 促进 HCN、PYO 等吩嗪类化合物的生成^[22], 而转录调节因子 σ^S 则会抑制绿脓菌素的合成^[23-25]。研究显示, 铜绿假单胞菌 PAO1 中存在的 2 个典型 H-NS 家族转录因子蛋白 MvaT 和 MvaU 可调控绿脓菌素合成。单敲除 *mvaT* 或 *mvaU* 基因, 绿脓菌素产量均有 2-3 倍提高, 这与本研究的结果一致, 但如果双敲除 *mvaT* 和 *mvaU* 基因, 则未能检测到绿脓菌素的合成^[13], 说明 MvaT 蛋白在吩嗪的合成过程中起到重要作用。同时, 群体感应信号因子 PQS [2-Heptyl-3-hydroxy-4(1H)-quinolone] 可促进绿脓菌素的合成, 其基因缺失则可阻断绿脓菌素合成, 它可通过负调控 MvaT 和 RsmA 来实现促进 PA-IL 凝集素合成基因 *lecA* 的转录^[9,26-27]。由于本文结果显示 MvaT 可与吩嗪合成基因的上游启动子区域发生直接结合, 因而推测 PQS 对吩嗪

合成过程的作用很可能是通过抑制 *mvaT* 基因的转录, 减少 MvaT 与吩嗪合成基因上游启动子的结合进而启动吩嗪合成基因转录来实现的。因此, MvaT 蛋白可直接调控吩嗪化合物的合成, 同时也可以介导其它因子对吩嗪合成的间接调控作用。另一方面, 由于绿脓菌素或吩嗪-1-羧酸等可实现高效的电子传递, 介导微生物燃料电池中阳极胞外电子的传递过程^[28-29], 通过基因改造提升绿脓菌素的产量可提高细胞外电子传递效率和电流的输出功率, 增加产电量^[16,30]。*mvaT* 基因敲除突变株 SJTD-1(*ΔmvaT*)的吩嗪化合物产量增加, 细胞存活时间延长, 因此放电时间更持久, 总放电量更多^[16]。此外, 有研究发现吩嗪类化合物浓度可影响假单胞菌 NY3 对十六烷烃的降解效率, 两者呈正相关, 这是由于吩嗪类化合物可与 NADH 或 GSH 反应产生超氧负离子自由基和/或羟基自由基, 产生的羟基自由基进攻碳原子, 形成碳自由基, 促进十六烷的降解氧化^[31]。因此, 深入解析调控吩嗪类化合物合成的分子机制, 并基于此来构建特定的工程菌株, 有助于推进其理论研究与应用进程。

目前, 在假单胞菌属中发现了多种 H-NS 家族的类 MvaT 家族蛋白, 在铜绿假单胞菌存在 MvaT 和 MvaU 2 个蛋白, 荧光假单胞菌中有 3 个, 丁香假单胞菌中有 4 个, 恶臭假单胞菌中则存在 5 个, 在棕色固氮菌中也发现了一个 MvaT 家族蛋白。所有 MvaT 蛋白的氨基酸序列一致性可达 47%^[8]。转录因子 MvaT 在微生物许多重要生命活动中发挥重要作用。研究发现, MvaT 蛋白可调控包括细菌鞭毛组装、生物膜形成及信号分子的合成等重要的生理生化过程。在假单胞菌株 Y1000 中, 过表达 *mvaT* 基因可显著降低细菌在半固体培养基上的运动能力, MvaT 可直接影响细菌 IV 型纤毛的合成与组装^[10]。在铜绿假单胞菌中 *mvaT* 基因突变会导致信号分子 N-乙酰高丝氨酸内酯(N-acyl-homoserine lactones, AHL)和 PA-IL 凝集素的含量上升^[9]。此外, MvaT 可通过调控 QS 系统来影响下游的生物

膜合成基因,抑制生物膜的形成^[11]。在生防假单胞菌 2p24 中, MvaT 蛋白与其同源蛋白 MvaV 相互作用,影响生物膜形成与抗生素 2,4-二乙酰基间苯三酚(2,4-Diacetylphloroglucinol, 2,4-DAPG)的生物合成过程^[12]。尽管前期研究发现铜绿假单胞菌的 *mvaT* 基因缺失菌株的吩嗪类化合物产量增加,且相关合成基因簇的转录水平均有所提升,推测该转录因子参与了吩嗪类化合物的代谢过程,但是并未有证据表明 MvaT 蛋白是否直接调控了吩嗪类化合物的合成或者通过其它因子来实现。本文首次通过体外实验证实 MvaT 蛋白对吩嗪合成相关基因上游启动子区存在结合作用,说明 MvaT 蛋白对吩嗪类化合物的合成具有直接的转录调控作用。

本文初步研究了石油降解铜绿假单胞菌 SJTD-1 中 MvaT 蛋白是否调控了吩嗪类化合物合成代谢过程。体内外实验结果显示, MvaT 蛋白与 5 个吩嗪类化合物合成基因(*phzA1G1*、*phzA2G2*、*phzM*、*phzS* 和 *phzH*)的上游启动子区均有特异性结合,说明 MvaT 蛋白极有可能直接参与了这 5 个基因的转录调控过程。后续我们将继续对 MvaT 与 DNA 结合的具体位点和调控模式进行深入研究。本文结果不仅可推进 MvaT 调控吩嗪合成的分子机制研究,同时结合吩嗪类化合物可作为电子介质进行电子传递的特性,及其产生菌即石油降解菌 SJTD-1 的特点,有助于开发通过降解烷烃污染物、高产吩嗪类化合物进而搭建微生物燃料电池平台,实现环境污染物的高效处理与有效转化。

REFERENCES

- [1] Dietrich Lars EP, Price-Whelan A, Petersen A, et al. The phenazine pyocyanin is a terminal signalling factor in the quorum sensing network of *Pseudomonas aeruginosa*[J]. *Molecular Microbiology*, 2006, 61(5): 1308-1321
- [2] Mavrodi DV, Blankenfeldt W, Thomashow LS. Phenazine compounds in fluorescent *Pseudomonas* spp. biosynthesis and regulation[J]. *Annual Review of Phytopathology*, 2006, 44: 417-445
- [3] Haas D, Défago G. Biological control of soil-borne pathogens by *Fluorescent pseudomonads*[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2005, 3(4): 307-319
- [4] Pierson LS, Pierson EA. Metabolism and function of phenazines in bacteria: impacts on the behavior of bacteria in the environment and biotechnological processes[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2010, 86(6): 1659-1670
- [5] Mavrodi DV, Bonsall RF, Delaney SM, et al. Functional analysis of genes for biosynthesis of pyocyanin and phenazine-1-carboxamide from *Pseudomonas aeruginosa* PAO1[J]. *Journal of Bacteriology*, 2001, 183(21): 6454-6465
- [6] Hunter RC, Klepac-Ceraj V, Lorenzi MM, et al. Phenazine content in the cystic fibrosis respiratory tract negatively correlates with lung function and microbial complexity[J]. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 2012, 47(6): 738-745
- [7] Britigan EB, Railsback MA, Cox CD. The *Pseudomonas aeruginosa* secretory product pyocyanin inactivates $\alpha 1$ protease inhibitor: implications for the pathogenesis of cystic fibrosis lung disease[J]. *Infection and Immunity*, 1999, 67(3): 1207-1212
- [8] Tendeng C, Soutourina OA, Danchin A, et al. MvaT proteins in *Pseudomonas* spp.: a novel class of H-NS-like proteins[J]. *Microbiology*, 2003, 149(Pt11): 3047-3050
- [9] Diggle SP, Winzer K, Lazdunski A, et al. Advancing the quorum in *Pseudomonas aeruginosa*: MvaT and the regulation of N-acylhomoserine lactone production and virulence gene expression[J]. *Journal of Bacteriology*, 2002, 184(10): 2576-2586
- [10] Vallet I, Diggle SP, Stacey RE, et al. Biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa*: fimbrial cup gene clusters are controlled by the transcriptional regulator MvaT[J]. *Journal of Bacteriology*, 2004, 186(9): 2880-2890
- [11] Diggle SP, Stacey RE, Dodd C, et al. The galactophilic lectin, LecA, contributes to biofilm development in *Pseudomonas aeruginosa*[J]. *Environmental Microbiology*, 2006, 8(6): 1095-1104
- [12] Wu XG, Wei YR, Liu JC, et al. MvaT and MvaV transcriptionally regulate PcoI/PcoR quorum-sensing system in *Pseudomonas fluorescens* 2P24[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2012, 52(6): 710-717 (in Chinese)
吴小刚, 魏亚蕊, 刘九成, 等. 生防假单胞菌 2P24 中 *mvaT* 和 *mvaV* 基因对 PcoI/PcoR 群体感应系统的调控作用[J]. *微生物学报*, 2012, 52(6): 710-717
- [13] Li CR, Wally H, Miller SJ, et al. The multifaceted proteins MvaT and MvaU, members of the H-NS family, control arginine metabolism, pyocyanin synthesis, and prophage activation in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1[J]. *Journal of Bacteriology*, 2009, 191(20): 6211-6218
- [14] Liu H, Liang RB, Tao F, et al. Genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* strain SJTD-1, a bacterium capable of degrading long-chain alkanes and crude oil[J]. *Journal of Bacteriology*, 2012, 194(17): 4783-4784
- [15] Liu H, Sun WB, Liang RB, et al. iTRAQ-based quantitative proteomic analysis of *Pseudomonas aeruginosa* SJTD-1: A global response to n-octadecane induced stress[J]. *Journal of Proteomics*, 2015, 123: 14-28
- [16] You T, Liu JH, Liang RB, et al. Survival elongation of

- Pseudomonas aeruginosa* improves power output of microbial fuel cells[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2017, 33(4): 601-608 (in Chinese)
游婷, 刘季华, 梁如冰, 等. 铜绿假单胞菌存活时间延长可提高生物燃料电池的产电量[J]. 生物工程学报, 2017, 33(4): 601-608
- [17] Liang HH, Li LL, Dong ZL, et al. The YebC family protein PA0964 negatively regulates the *Pseudomonas aeruginosa* quinolone signal system and pyocyanin production[J]. Journal of Bacteriology, 2008, 190(18): 6217-6227
- [18] Lu Z, Liang R, Liu X, et al. RNase HIII from *Chlamydomonas reinhardtii* can efficiently cleave double-stranded DNA carrying a chimeric ribonucleotide in the presence of manganese[J]. Molecular Microbiology, 2012, 83(5): 1080-1093
- [19] Withers H, Swift S, Williams P. Quorum sensing as an integral component of gene regulatory networks in Gram-negative bacteria[J]. Current Opinion in Microbiology, 2001, 4(2): 186-193
- [20] Passador L, Cook JM, Gambello MJ, et al. Expression of *Pseudomonas aeruginosa* virulence genes requires cell-to-cell communication[J]. Science, 1993, 260(5111): 1127-1130
- [21] Bertani I, Ševo M, Kojic M, et al. Role of GacA, LasI, RhlI, Ppk, PsrA, Vfr and ClpXP in the regulation of the stationary-phase sigma factor rpoS/RpoS in *Pseudomonas*[J]. Archives of Microbiology, 2003, 180(4): 264-271
- [22] Baehler E, Maurhofer M, Keel C. Henolic signal metabolites from bacteria and plants affect production of antifungal compounds in the biocontrol agent *Pseudomonas fluorescens* CHA0 in Abstr[A]/The Proceedings of the 9th International Symposium Microbiology Ecology[C]. Amsterdam, 2001: 266
- [23] Sarniguet A, Kraus J, Henkels MD, et al. The sigma factor σ^S affects antibiotic production and biological control activity of *Pseudomonas fluorescens* Pf-5[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1995, 92(26): 12255-12259
- [24] Zhou JF, Ge YH, Liu T, et al. Effect of *rpoS* mutation on two gene cluster of phenazine in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2010, 50(3): 411-417 (in Chinese)
周金凤, 葛宜和, 刘婷, 等. *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[J]. 微生物学报, 2010, 50(3): 411-417
- [25] Miao J, Chi XY, Wang YH, et al. Regulation of pyocyanin biosynthesis by transcriptional factor σ^{38} in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2017, 57(2): 229-239 (in Chinese)
缪静, 迟晓艳, 王艳华, 等. 转录调节因子 σ^{38} 介导铜绿假单胞菌绿脓菌素合成代谢调控[J]. 微生物学报, 2017, 57(2): 229-239
- [26] Diggle SP, Winzer K, Chhabra SR, et al. The *Pseudomonas aeruginosa* quinolone signal molecule overcomes the cell density-dependency of the quorum sensing hierarchy, regulates *rhl*-dependent genes at the onset of stationary phase and can be produced in the absence of LasR[J]. Molecular Microbiology, 2003, 50(1): 29-43
- [27] McKnight SL, Iglewski BH, Pesci EC. The *Pseudomonas* quinolone signal regulates *rhl* quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*[J]. Journal of Bacteriology, 2000, 182(10): 2702-2708
- [28] Rabaey K, Boon N, Siciliano SD, et al. Biofuel cells select for microbial consortia that self-mediate electron transfer[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2004, 70(9): 5373-5382
- [29] Pham TH, Boon N, Aelterman P, et al. Metabolites produced by *Pseudomonas* sp. enable a Gram-positive bacterium to achieve extracellular electron transfer[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2008, 77(5): 1119-1129
- [30] Yong XY, Shi DY, Chen YL, et al. Enhancement of bioelectricity generation by manipulation of the electron shuttles synthesis pathway in microbial fuel cells[J]. Bioresource Technology, 2014, 152: 220-224
- [31] Nie HY. Studies on characteristics of the secretion of extracellular small active compounds by *P. aeruginosa* NY3 and their promotion mechanisms to the efficiency of biodegradation of hydrocarbon[D]. Xi'an: Doctoral Dissertation of Xi'an University of Architecture and Technology, 2017 (in Chinese)
聂红云. 铜绿假单胞菌 NY3 胞外小分子活性物及其促进烃类降解的作用机制研究[D]. 西安: 西安建筑科技大学博士学位论文, 2017