

研究报告



东湖假单胞菌 HYS 中的精氨酸琥珀酰转移酶途径缺失对秀丽隐杆线虫毒性的影响

秦迎秋 伍婷婷 桂哲 谢志雄*

武汉大学生命科学学院 湖北 武汉 430072

摘要:【背景】东湖假单胞菌 HYS 是本实验室从武汉东湖水域中分离并鉴定的一株高产铁载体细菌，HYS 菌株对秀丽隐杆线虫具有较强毒性。前期研究发现 HYS 中编码精氨酸琥珀酰转移酶基因 (*argS*) 的插入突变可导致其对线虫毒性明显减弱。【目的】探究 *argS* 基因功能及其如何参与细菌毒性，为后续深入研究 HYS 菌株的毒性机制提供理论依据。【方法】采用生物信息学比对、遗传分析和生理生化实验确认 *argS* 基因的生物学功能及其参与的精氨酸琥珀酰转移酶 (arginine succinyltransferase, AST) 途径与细菌毒性的关系。【结果】生物信息学比对结果显示 *argS* 编码精氨酸琥珀酰转移酶，其蛋白序列与铜绿假单胞菌中精氨酸琥珀酰转移酶 β 亚基具有高达 88% 的相似度；缺失 *argS* 导致菌株不能利用精氨酸作为唯一碳源进行生长；精氨酸脱羧酶 (arginine decarboxylase, ADC)、精氨酸脱氢酶 (arginine dehydrogenase, ADH) 以及精氨酸脱亚胺酶 (arginine deiminase, ADI) 途径中关键基因缺失菌株均可正常利用精氨酸作为唯一碳源，且对线虫并无明显毒性减弱现象；添加外源精氨酸导致菌株对线虫的减毒效果更加明显，且菌株产铁载体能力显著下降。【结论】东湖假单胞菌 HYS 中 AST 途径可以通过影响菌株铁载体合成来影响其对秀丽隐杆线虫的毒性，本研究为深入了解假单胞菌精氨酸代谢和致病性机制提供了新依据。

关键词: 东湖假单胞菌 HYS, *argS* 基因, 精氨酸琥珀酰转移酶途径, 毒性

Arginine succinyltransferase pathway deficiency in *Pseudomonas donghuensis* HYS affects its toxicity to *Caenorhabditis elegans*

QIN Ying-Qiu WU Ting-Ting GUI Zhe XIE Zhi-Xiong*

College of Life Sciences, Wuhan University, Wuhan, Hubei 430072, China

Abstract: [Background] *Pseudomonas donghuensis* HYS is a high-siderophore-yielding strain isolated and identified by our laboratory from the Wuhan East Lake. HYS has strong toxicity to *Caenorhabditis elegans*. Previous studies have found that insertions in the *argS* gene in HYS can significantly reduce its toxicity to *C. elegans*. [Objective] To explore the function of *argS* gene and how it affects bacterial toxicity, and to provide a theoretical basis for further study on the mechanism of HYS toxicity. [Methods]

Foundation items: National Natural Science Foundation of China (31570090); National Infrastructure of Natural Resources for Science and Technology Program of China (NIMR-2020-8)

*Corresponding author: E-mail: zxxie@whu.edu.cn

Received: 02-02-2020; Accepted: 31-03-2020; Published online: 17-04-2020

基金项目: 国家自然科学基金(31570090); 国家微生物资源平台项目(NIMR-2020-8)

*通信作者: E-mail: zxxie@whu.edu.cn

收稿日期: 2020-02-02; 接受日期: 2020-03-31; 网络首发日期: 2020-04-17

The biological function of *argS* gene and the relationship between the arginine succinyltransferase (AST) pathway and bacterial toxicity were investigated with bioinformatics comparison, genetic analysis, physiological assays, and biochemical experiments. **[Results]** The *argS* gene in HYS encodes a protein that shares 88% similarity to the arginine succinyltransferase β subunit in *Pseudomonas aeruginosa*. The deletion of *argS* prevented the HYS strain from using arginine as the sole carbon source for growth. Deletion strains of key genes in arginine decarboxylase (ADC) pathway, arginine dehydrogenase (ADH) pathway and arginine deiminase (ADI) pathway could normally use arginine as the sole carbon source and had no significantly attenuated effect on the toxicity to *C. elegans*. Added arginine to these strains significantly attenuates the toxicity, and decreases their ability in producing siderophores. **[Conclusion]** AST pathway in *Pseudomonas donghuensis* HYS can affect the toxicity to *C. elegans* by affecting the synthesis of the siderophores. This study lays the foundation for further studies into the mechanism of arginine metabolism and pathogenicity in *Pseudomonas*.

Keywords: *Pseudomonas donghuensis* HYS, *argS* gene, AST pathway, Toxicity

假单胞菌属中有许多致病菌能够对动植物及人类引发疾病,如人类机会致病菌铜绿假单胞菌,可感染受伤、烧伤、免疫缺陷等病人并引起广泛的感染,目前常采用细菌-秀丽隐杆线虫模型来研究假单胞菌菌株的致病机理^[1-4]。东湖假单胞菌 HYS 菌株是本实验室从东湖水域中分离鉴定的一株高产铁载体的假单胞菌,可同时分泌非荧光铁载体 7-羟基环庚三烯酚酮(7-HT)和荧光铁载体 Pyoverdine, 7-羟基环庚三烯酚酮类化合物在生理 pH 下有显著的双阴离子特性,这一类化合物均表现出高度多元性的生物活性,如抑制细菌、真菌、线虫及抗疟疾等,Pyoverdine 可作为细菌产生急性毒力因子的信号分子,参与生物膜的形成^[5-7]。用东湖假单胞菌 HYS 菌株喂食秀丽隐杆线虫,发现该菌株表现出的毒性显著强于常见致病菌铜绿假单胞菌 PAO1 和 PA14 菌株^[8]。菌株 HYS 对秀丽隐杆线虫显著的毒性作用为研究微生物与宿主相互关系提供了新的研究模型,研究该菌株的毒性机制,在细菌致病机理及生物防治等方面均有重要的理论研究和应用价值^[9]。

精氨酸在细胞体内是蛋白质、一氧化氮、多胺、嘧啶等物质的合成前体,参与多种代谢过程。在动物体内,精氨酸主要通过 Arg/Urea、Arg/NO 两条代谢途径调节机体氮平衡、免疫、心血管等系统功能^[10]。在假单胞菌中,精氨酸的分解代谢途径主要包括精氨酸脱羧酶(arginine decarboxylase, ADC)、精氨酸脱氢

酶(arginine dehydrogenase, ADH)、精氨酸脱亚胺酶(arginine deiminase, ADI)和精氨酸琥珀酰转移酶(arginine succinyltransferase, AST)这 4 条途径,其中 AST 途径是假单胞菌的主要代谢途径^[11-13]。精氨酸琥珀酰转移酶是 AST 途径中起关键作用的酶,催化精氨酸与琥珀酰辅酶 A 生成琥珀酰精氨酸和辅酶 A^[14]。

本研究从实验室前期构建的转座子插入突变库中筛选到一株对秀丽隐杆线虫具有明显毒性减弱现象的 HYS 插入突变菌株,经序列比对提示其插入位点的基因编码精氨酸琥珀酰转移酶(*argS*)。然后,利用遗传学手段和生理生化实验验证 *argS* 基因功能,开展其参与的 AST 途径与细菌毒性的研究,发现精氨酸的积累可导致细菌铁载体产量下降,引起菌株毒性减弱,假单胞菌中尚未有报道精氨酸代谢与其致病性相关,本研究为 HYS 菌株中氨基酸代谢与毒性机制的相关性提供重要生化遗传信息,从而为假单胞菌属对秀丽隐杆线虫毒性机理提供重要的新线索。

1 材料与方法

1.1 线虫、菌株、质粒及引物

秀丽隐杆线虫: *Caenorhabditis elegans* N2, 购自 Caenorhabditis Genetics Center 公司。

本研究中所用的菌株和质粒见表 1,所用的引物见表 2。

表 1 本研究所用菌株和质粒

Table 1 Strains and plasmids used in this study

菌株和质粒	描述	来源
Strains and plasmids	Description	Reference
<i>Escherichia coli</i>		
S17-1 (λ pir)	<i>recA</i> , <i>thi</i> , <i>pro</i> , <i>hsdR</i> -M+, SmR, <RP4:2Tc:Mu:Ku:Tn7> TpR	[15]
OP50	Uracil nutritional deficiency type	Our laboratory
<i>Pseudomonas</i>		
PAO1	Wild type	Our laboratory
HYS	Cm ^R ; wild type	Our laboratory
HYS1	Kan ^R ; HYS/pBBR2	Our laboratory
HYS2	Cm ^R ; Δ <i>argS</i>	This study
HYS3	Cm ^R ; Δ <i>argN</i>	This study
HYS4	Cm ^R ; Δ <i>argN-S</i>	This study
HYS5	Cm ^R ; Δ <i>speA</i>	This study
HYS6	Cm ^R ; Δ <i>aguA-B</i>	This study
HYS7	Cm ^R ; Δ <i>gbuA</i>	This study
HYS8	Cm ^R ; Δ <i>kauB</i>	This study
HYS9	Cm ^R ; Δ <i>arcA-B-C</i>	This study
Plasmids		
pEX18GM	Gm ^R , <i>oriT</i> +, <i>sacB</i> +, gene replacement vector	[16]
pEX18GM- <i>argS</i>	Gm ^R ; gene replacement vector for <i>argS</i>	This study
pEX18GM- <i>argN</i>	Gm ^R ; gene replacement vector for <i>argN</i>	This study
pEX18GM- <i>argN-S</i>	Gm ^R ; gene replacement vector for <i>argN-S</i>	This study
pEX18GM- <i>speA</i>	Gm ^R ; gene replacement vector for <i>speA</i>	This study
pEX18GM- <i>aguA-B</i>	Gm ^R ; gene replacement vector for <i>aguA-B</i>	This study
pEX18GM- <i>gbuA</i>	Gm ^R ; gene replacement vector for <i>gbuA</i>	This study
pEX18GM- <i>kauB</i>	Gm ^R ; gene replacement vector for <i>kauB</i>	This study
pEX18GM- <i>arcA-B-C</i>	Gm ^R ; gene replacement vector for <i>arcA-B-C</i>	This study

注: Cm^R、Kan^R、Gm^R 分别代表氯霉素抗性、卡那霉素抗性和庆大霉素抗性。

Note: Cm^R, Kan^R, Gm^R resistant to chloramphenicol, kanamycin and gentamicin, respectively.

1.2 主要试剂和仪器及培养基

精氨酸, Biofrox 公司; 1 mol/L L-精氨酸溶液: 称取 1.742 g L-精氨酸粉末, 溶于 10 mL 无菌去离子水中, 0.22 μ m 微孔滤器过滤除菌小管分装, 4 °C 储存备用。体式显微镜, 宁波舜宇仪器有限公司; 紫外可见分光光度计, 岛津公司。

LB 培养基和 NGM 培养基的配制方法见参考文献[9]; M9 培养基的配制方法见参考文献[17]; MKB 培养基的配制方法见参考文献[18]。

1.3 生物信息学比较分析

采用 Glimmer V3.0 进行基因预测; 采用

SnapGene 2.3.2 绘制基因模式图; 利用 NCBI Protein BLAST 进行蛋白序列比对; 利用 NCBI 数据库中已知蛋白序列与目的蛋白序列进行同源性比对。

1.4 秀丽隐杆线虫慢性致死

参考文献[9]并做适当修改, 将大肠杆菌 OP50 和 HYS 及其衍生菌株接种至 LB 液体培养基中, 分别在 37 °C 和 30 °C 下 200 r/min 振荡培养 12 h。吸取 200 μ L 菌液滴加到 NGM 平板中央位置, 待菌液晾干后转移平板至 22 °C 恒温培养箱中培养 12 h。挑取 20 条同步培养的 L4 期秀丽隐杆线虫至 NGM-实验菌株平板上, 5 个重复, 即每个菌

表 2 本研究所用引物

Table 2 Primers used in this study

引物名称 Primers name	引物序列 Primers sequence (5'→3')	描述 Description
argS-up-1	CCC <u>AAGCTT</u> CAAGATTCACGTCCTGTGCGCAGTGCCA	Construction of $\Delta argS$
argS-up-2	GGCGATAAAGTGAGTCGTCATTATACGGGACGAACGATCATGCTATC	Construction of $\Delta argS$
argS-down-1	AGATAGCATGATCGTTCGTCCTCCGTATAATGACGACTCACTTTATCGCC	Construction of $\Delta argS$
argS-down-2	<u>GGAATTC</u> CCTCGTCGACCACCAGCGGGTTG	Construction of $\Delta argS$
argS-M-1	CTGCCGAAGTCAGCTTCAATGGCGAGGAG	Verification of $\Delta argS$
argS-M-2	CGGCGGAAATGAACGCCGACTGGATA	Verification of $\Delta argS$
argN-up-1	CGCGGAT <u>CC</u> CGCACCCACGGCACCCAC	Construction of $\Delta argN$
argN-up-2	TTATCGAACCCGAGGGATCACATGGTGTCACTCCTTTC	Construction of $\Delta argN$
argN-down-1	GAAAGGAGTGACACCATGTGATCCCTGCGGTTTCGATAA	Construction of $\Delta argN$
argN-down-2	CCC <u>AAGCTT</u> GACAGCGCGCCTTGCCAG	Construction of $\Delta argN$
argN-M-1	CCGGCAGACGTTGCCCTACCTGCA	Verification of $\Delta argN$
argN-M-2	GCGCCGCTCCGAGAGGAAGCAG	Verification of $\Delta argN$
argN-S-up-1	CGCGGAT <u>CC</u> ACACCCCTGAAGTGCTGG	Construction of $\Delta argN-S$
argN-S-up-2	AAAGTGAGTCGTCATTACATGGTGTCACTCCTTTCGGG	Construction of $\Delta argN-S$
argN-S-down-1	CCCGAAAGGAGTGACACCATGTAATGACGACTCACTTT	Construction of $\Delta argN-S$
argN-S-down-2	CCC <u>AAGCTT</u> AGCACGGCGGTTGCATC	Construction of $\Delta argN-S$
argN-S-M-1	TGAGCTGTGCGACAAGCACACCGCG	Verification of $\Delta argN-S$
argN-S-M-2	GGACCAGGTTGAGCACACCCGCC	Verification of $\Delta argN-S$
speA-up-1	CGCGGAT <u>CC</u> GCATCTGCAAACAGACGC	Construction of $\Delta speA$
speA-up-2	GACCCGCACCACTGATCACATTGAAGTCCCCTATATAG	Construction of $\Delta speA$
speA-down-1	CTATATAGGGGACTTCAATGTGATCAGTGGTGCGGGTC	Construction of $\Delta speA$
speA-down-2	CCG <u>GAAATTC</u> GGCTGCGCATCTGTTC	Construction of $\Delta speA$
speA-M-1	GCCTTTAAGGCTGCCGCACGCT	Verification of $\Delta speA$
speA-M-2	GCCAACGCCCTGTGCTCAATGG	Verification of $\Delta speA$
aguA-B-up-1	CGCGGAT <u>CC</u> TACTTCAAGTCACGGCTGCA	Construction of $\Delta aguA-B$
aguA-B-up-2	CTTTGCTTGCTGCACTTACATTTACTCCTCCTCGACA	Construction of $\Delta aguA-B$
aguA-B-down-1	TGTCGAGGAGGAGTAAATGTGAAGTGCAGCAAAGCAAAG	Construction of $\Delta aguA-B$
aguA-B-down-2	CCG <u>GAAATTC</u> CGCTGATCGTTACCGGTACC	Construction of $\Delta aguA-B$
aguA-B-M-1	TTGTGCCGGACATCATCACCATGGCC	Verification of $\Delta aguA-B$
aguA-B-M-2	CTGGAAGCCGGAGATGGGCTGGTAC	Verification of $\Delta aguA-B$
gbuA-up-1	CGCGGAT <u>CC</u> CGTCCATTTCCGCCAGCA	Construction of $\Delta gbuA$
gbuA-up-2	CTGGTGTGCAACCGTTACACGGTGGGCTCATCGATT	Construction of $\Delta gbuA$
gbuA-down-1	AATCGATGAGGCCGACCGTGTAAACGGTTGCACACCAG	Construction of $\Delta gbuA$
gbuA-down-2	CCG <u>GAAATTC</u> GCCAGGAACAGGTTTCAGG	Construction of $\Delta gbuA$
gbuA-M-1	GCCAGGTCCAGGCGGTTGTCC	Verification of $\Delta gbuA$
gbuA-M-2	CACGAACTGGACGATGTCGGTCAGGG	Verification of $\Delta gbuA$
kauB-up-1	CGCGGAT <u>CC</u> ACTTCCCAGGTACCCTTG	Construction of $\Delta kauB$
kauB-up-2	ATAAGGGCACCCAGGACTTACATACGAAACTCCTCCTCTTG	Construction of $\Delta kauB$
kauB-down-1	CAAGAGGAGGAGTTTCGTATGTAAGTCCCTGGGTGCCCTTAT	Construction of $\Delta kauB$
kauB-down-2	CCG <u>GAAATTC</u> TATAGCGCCACCAGACGT	Construction of $\Delta kauB$
kauB-M-1	AGGCCTTGACGCTGGTTCACATAGCG	Verification of $\Delta kauB$
kauB-M-2	GCCTCGAAGGCAGCAAACAGCGC	Verification of $\Delta kauB$
arcA-B-C-up-1	CGCGGAT <u>CC</u> AATGCCTTGTGGCTGAC	Construction of $\Delta arcA-B-C$
arcA-B-C-up-2	AAGCCCGCCCACTGCATTCACATGGTTTCATTTCCCTCCAAGT	Construction of $\Delta arcA-B-C$
arcA-B-C-down-1	ACTTGGAGGAAATGAACCATGTGAATGCAGTGGGCGGGCTT	Construction of $\Delta arcA-B-C$
arcA-B-C-down-2	CCG <u>GAAATTC</u> CCAGCTCCCACAGGATC	Construction of $\Delta arcA-B-C$
arcA-B-C-M-1	AACGTGCTGTCGCTGGGCATCATG	Verification of $\Delta arcA-B-C$
arcA-B-C-M-2	ACAGCGCGTCGTGCAGCTCTT	Verification of $\Delta arcA-B-C$

注：下划线表示酶切位点。

Note: The restriction enzyme cutting sites were underlined.

株喂食 100 条线虫。将含有线虫的 NGM-实验菌株平板置于 22 °C 培养箱中恒温培养, 每天采用体式显微镜观察线虫状态并计数, 转移存活线虫至新鲜的 NGM-实验菌株平板上。线虫全部死亡后采用 SPSS 18.0 绘制生存函数曲线, 并分析各个菌株对线虫毒性大小。采用大肠杆菌 OP50 作为对照。

1.5 HYS 缺失菌株的构建

利用待缺失基因上、下游片段的特异性引物, 扩增上、下游片段, 将其插入敲除质粒 pEX18GM 后转入 *E. coli* S17-1(λ pir)。重组敲除质粒通过细菌接合的方式从 *E. coli* S17-1(λ pir)中转移到 HYS 菌株内, 通过等位基因交换敲除目的基因, 并先后在含有 50 μ g/mL 庆大霉素和 25 μ g/mL 氯霉素双重抗性的液体 LB 中和含有 10%蔗糖的 LB 固体平板上进行重组子的筛选, 通过 PCR^[9]和测序进一步检测正确的基因缺失突变体。以单一敲除菌株为出发菌株, 同法构建双缺失菌株。

1.6 单一碳源实验

参照文献[17]并做适当修改, 将 HYS 菌株及其衍生菌株接种于营养丰富的 LB 液体培养基中, 30 °C、200 r/min 振荡培养 16 h 左右至稳定期, 将各个菌株菌液的 OD_{600} 调至 0.5, 用无菌 M9 培养基洗涤菌液 3 次, 以 1:100 转接于单一碳源培养基中, 30 °C、200 r/min 振荡培养, 定期测 OD_{600} 。

1.7 细菌培养上清扫描检测铁载体

参照文献[6]并做适当修改, 将 HYS 菌株及其衍生菌株接种于 5 mL MKB 液体培养基中, 30 °C、200 r/min 振荡培养 24 h, 测定各个菌株的 OD_{600} 值并记录。吸取 1 mL 菌液于 1.5 mL 离心管中 12 000 r/min 离心 2 min, 取 100 μ L 上清于新的离心管中, 采用新鲜的 MKB 液体培养基将各个菌株的 OD_{600} 调至 0.5。运用紫外可见分光光度计对样品进行检测, 设定所需的光谱范围为 300–450 nm。荧光铁载体 Pyoverdine 在 405 nm 处有特征吸收峰, 另外一个是非荧光铁载体 7-羟基环庚三烯酚酮(7-HT), 其在 330 nm 和 392 nm 处有特征吸收峰, 峰高代表了菌株合成量的多少^[6]。

2 结果与分析

2.1 *argS* 的生物信息学分析

实验室前期研究得到一株对线虫具有明显毒性减弱现象的转座子插入突变菌株, 且确认其插入位点位于 HYS 基因组上序列号为 UW3_RS0124905 的基因内部^[9]。本研究对此基因进行生物信息学分析, NCBI 中注释其编码精氨酸琥珀酰转移酶, 参与菌株精氨酸分解代谢, 将其命名为 *argS*。在对 *argS* 上、下游基因进行分析时发现, 位于 *argS* 上游编号为 UW3_RS0124900 的基因注释编码的蛋白也为精氨酸琥珀酰转移酶, 将此基因命名为 *argN*。

将 ArgN 和 ArgS 的蛋白序列在 NCBI 中分别进行 BLASTp 比对, ArgN 和 ArgS 均属于 AstA 蛋白超家族, 且 ArgN 属于精氨酸琥珀酰转移酶 α 家族蛋白。据文献报道, 大肠杆菌 *E. coli* 中 *astA* 对应铜绿假单胞菌 PAO1 中两个基因, 分别是 *aruG* 和 *aruF*^[18], 即精氨酸琥珀酰转移酶在大肠杆菌中以一个单独的蛋白形式存在, 而在铜绿假单胞菌中对应两个基因分别编码两个蛋白亚基, *aruG* 编码 β 亚基、*aruF* 编码 α 亚基。HYS 菌株中 *argS* 和 *argN* 与铜绿假单胞菌相似。AruG 与 ArgS、AruF 与 ArgN 的蛋白序列相似度均达到 85%以上, 可初步推测 HYS 菌株中的 *argN*、*argS* 分别编码其精氨酸琥珀酰转移酶的 α 和 β 亚基(表 3)。

2.2 *argS* 基因功能验证

为探究 *argS* 和 *argN* 的功能, 分别构建了 *argS*、

表 3 AruG 与 ArgS、AruF 与 ArgN 的蛋白序列同源性比对

Table 3 Comparison of protein sequence homology between AruG and ArgS, AruF and ArgN

蛋白名称 Protein names	<i>E</i> 值 Expect	一致性 Identities	缺失或插入 Gaps
AruG and ArgS	0.0	296/338 (88%)	0/338 (0%)
AruF and ArgN	0.0	290/339 (86%)	1/339 (0%)

argN 及 *argN-S* 缺失突变株, 以葡萄糖作为对照进行单一碳源实验, 研究其是否参与精氨酸利用。结果如图 1 所示, 与野生型 HYS 菌株相比, $\Delta argS$ 菌株和 $\Delta argN-S$ 均不能利用精氨酸作为唯一碳源进行正常生长, 而 $\Delta argN$ 在以精氨酸为唯一碳源的培养基中可以正常生长, 说明 *argS* 在精氨酸分解代谢中发挥重要作用。

2.3 HYS 菌株中 4 条精氨酸代谢途径及其与毒性关系的探究

2.3.1 4 条精氨酸代谢途径对精氨酸利用能力的检测

分别构建了其他 3 条途径中关键基因缺失的 HYS 缺失菌株, 即 ADC 途径中的 $\Delta speA$ 、 $\Delta aguAB$ 和 ADI 途径中的 $\Delta gbuA$ 、 $\Delta kauB$ 及 ADH 途径中的 $\Delta arcA-B-C$, 分别检测各代谢途径在精氨酸利用中发挥的作用。结果(图 2)发现, 所有基因缺失菌株

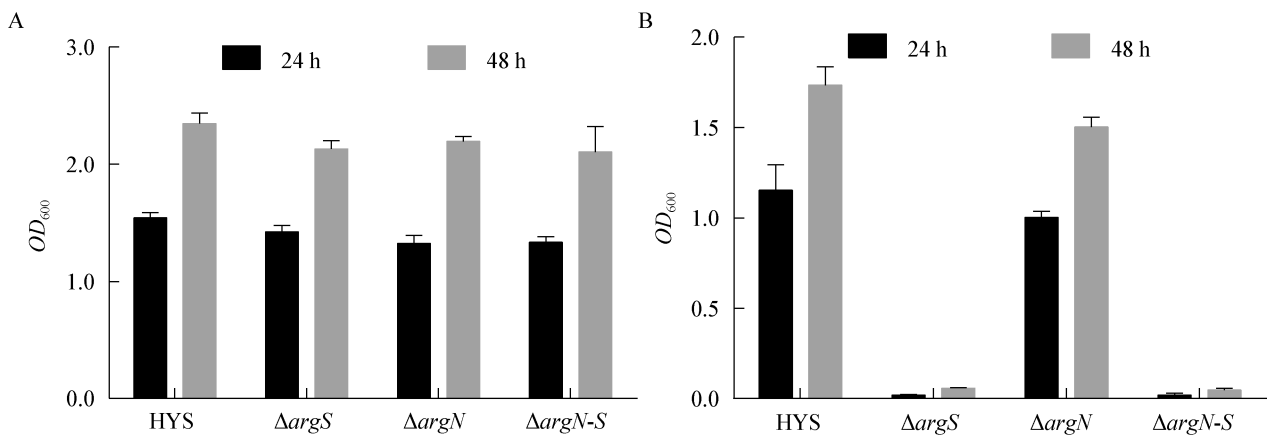


图 1 HYS 及各个缺失菌株在单一碳源中的生长情况

Figure 1 Growth of HYS and various deletion strains in a single carbon source

注: A: 0.4%葡萄糖为单一碳源; B: 20 mmol/L L-精氨酸为单一碳源。

Note: A: M9 basic culture medium with 0.4% glucose as a single carbon source; B: M9 basic culture medium with 20 mmol/L L-arginine as a single carbon source.

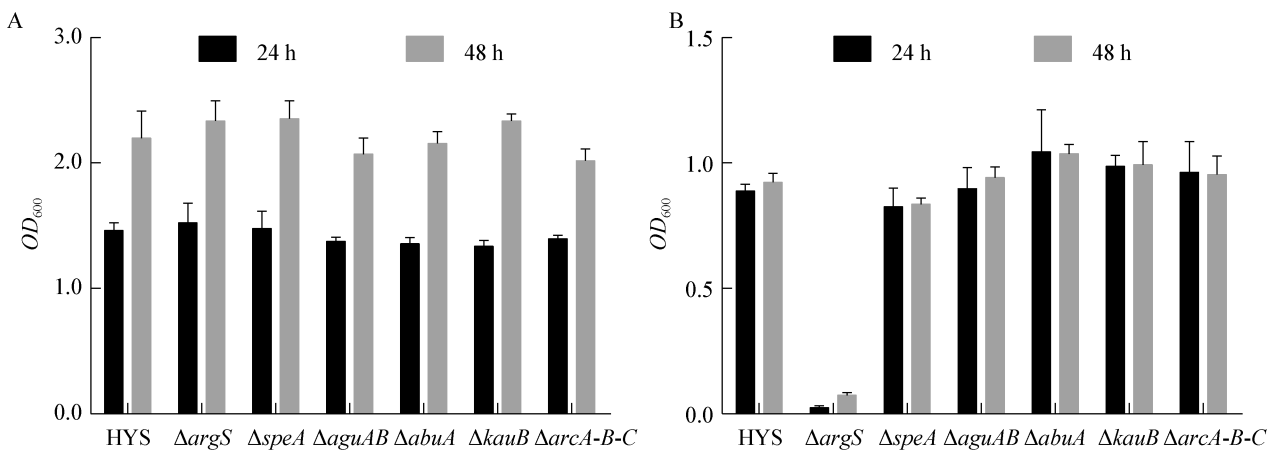


图 2 HYS 菌株及 4 条途径相关缺失菌株在单一碳源中的生长情况

Figure 2 Growth of HYS strains and four pathway-related deletion strains in a single carbon source

注: A: 0.4%葡萄糖为单一碳源; B: 20 mmol/L L-精氨酸为单一碳源。

Note: A: M9 basic culture medium with 0.4% glucose as a single carbon source; B: M9 basic culture medium with 20 mmol/L L-arginine as a single carbon source.

均可以正常利用葡萄糖作为唯一碳源,而在以精氨酸作为唯一碳源的培养基中, *argS* 缺失菌株不能正常生长,而其他 3 条途径相关缺失菌株均可以正常生长,说明 AST 途径是 HYS 中精氨酸代谢的主要途径。

2.3.2 4 条精氨酸代谢途径对线虫毒性的验证

为探究 HYS 菌株精氨酸代谢与毒性的关系,将 ADC、ADH、ADI 三条途径中关键基因缺失菌株与 $\Delta argS$ 、 $\Delta argN$ 、 $\Delta argN-S$ 一同喂食线虫以观察各代谢途径在其毒性中的作用。结果如图 3 所示, $\Delta argS$ 和 $\Delta argN-S$ 菌株对线虫均有明显减毒效果,其半数致死时间 LT_{50} 均由 HYS 菌株的 3.55 ± 0.55 d 延长至 5.67 ± 0.26 d, $\Delta argN$ 和其他 3 条途径的缺失菌株对线虫均无毒性减弱现象或毒性减弱不明显,说明 *argS* 参与的 AST 途径参与 HYS 菌株对线虫的毒性过程,即 HYS 菌株中精氨酸分解代谢途径与其毒性相关。

2.4 精氨酸代谢途径参与 HYS 菌株毒性的机制研究

argS 参与 HYS 菌株精氨酸的 AST 分解代谢途径,推测 *argS* 缺失可能导致 HYS 精氨酸分解代谢受阻,精氨酸在细菌体内积累,导致菌株毒性减弱。

本研究在菌株培养过程中添加终浓度为 20 mmol/L 的外源精氨酸喂食线虫。结果如图 4 所示,添加了外源精氨酸的 HYS 菌株和 $\Delta argS$ 菌株对线虫的毒性都出现了很大程度上的减弱, HYS 菌株的 LT_{50} 由 3.55 ± 0.08 d 延长到 6.74 ± 0.27 d, $\Delta argS$ 菌株由 5.55 ± 0.19 d 延长至 8.31 ± 0.29 d,且外源精氨酸对其生长并无影响。此结果表明,精氨酸的积累抑制了 HYS 菌株毒性,造成其对线虫毒性减弱。

2.5 添加精氨酸影响菌株铁载体的合成

HYS 菌株可同时分泌非荧光铁载体 7-HT 和荧光铁载体 Pyoverdine,铁载体参与细菌对其他金属离子的转运以及致病性。为明确精氨酸的积累是否影响 HYS 体内铁载体的合成从而导致菌株毒性发生变化,通过细菌上清吸收光谱的全波段扫描检测了各个菌株产铁载体的能力。结果发现, $\Delta argS$ 菌株的两个峰相较于 HYS 都较低,证明 *argS* 的缺失导致 7-HT 和 Pyoverdine 产量下降。HYS 添加外源精氨酸之后,其 330 nm 处的特征吸收峰完全消失,表明 7-HT 合成被抑制,仅产 Pyoverdine; $\Delta argS$ 添加外源精氨酸导致其完全不产铁载体,包括 7-HT 和 Pyoverdine (图 5),即添加精氨酸使菌株铁载体产量下降,导致菌株对线虫毒性降低。

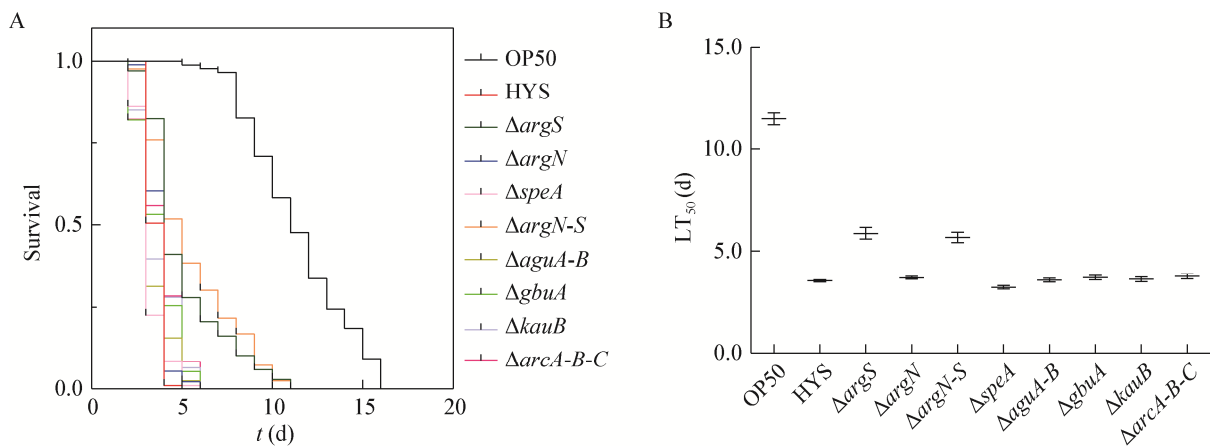


图 3 HYS 菌株及 4 条途径相关缺失菌株对秀丽隐杆线虫毒性的影响

Figure 3 Effects of HYS and four pathway-related deletion strains on toxicity to *C. elegans*

注: A: 秀丽隐杆线虫生存曲线; B: 秀丽隐杆线虫半数致死时间。

Note: A: Survival curves of *C. elegans*; B: LT_{50} values of *C. elegans*.

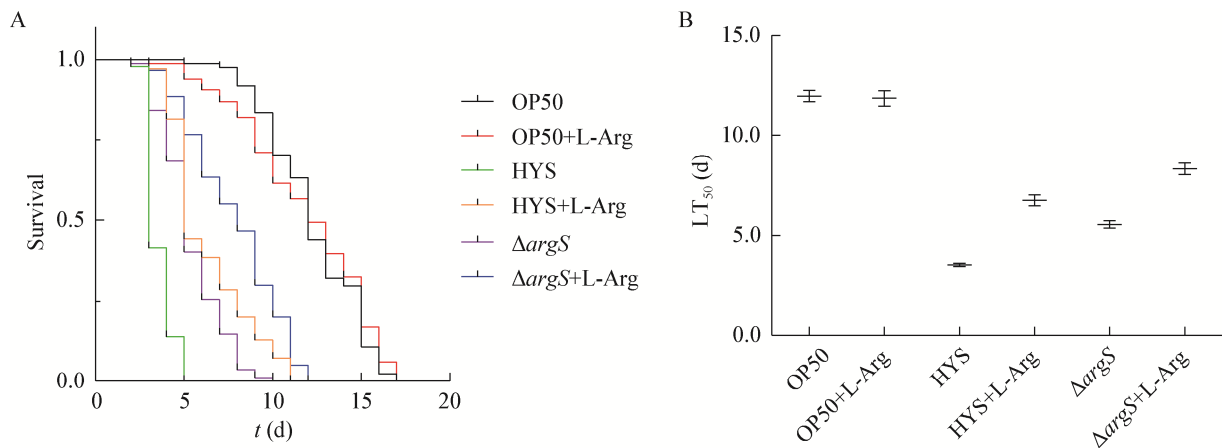


图4 HYS菌株培养时添加外源精氨酸对秀丽隐杆线虫毒性的影响

Figure 4 Effects of additional arginine in HYS strains culture on toxicity to *C. elegans*

注: A: 秀丽隐杆线虫生存曲线; B: 秀丽隐杆线虫半数致死时间。

Note: A: Survival curves of *C. elegans*; B: LT_{50} values of *C. elegans*.

3 讨论与结论

假单胞菌种类多样, 其中致病性菌株在生物防治及细菌致病机理等方面均有重要的研究和应用价值。秀丽隐杆线虫是一种自由生活的非寄生线虫, 因生命周期短、个体形态较小、易于大量培养及其基因组与人类相似度较高等特点, 被广泛应用于致病菌对宿主毒性机制的研究^[19]。本实验室前期研究发现 HYS 菌株相较于常见的铜绿假单胞菌对线虫的毒性更强, 推测 HYS 菌株可能具有新的致病机制^[8]。

实验室前期发现 HYS 基因组中 *argS* 基因插入突变可引起菌株对秀丽隐杆线虫毒性减弱^[9]。本研

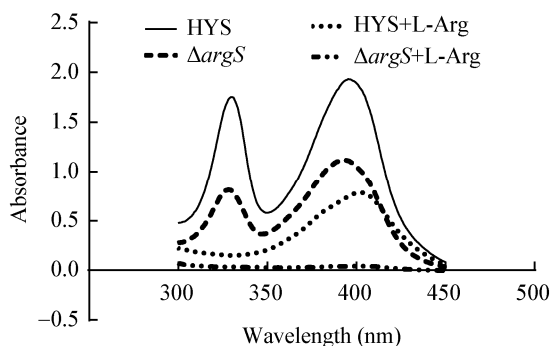


图5 添加外源精氨酸培养的相关菌株上清扫描

Figure 5 Scanning of additional arginine related strains

究通过生物信息学比对分析推测此 *argS* 基因编码精氨酸琥珀酰转移酶 β 亚基, 通过遗传分析和单一碳源实验验证在东湖假单胞菌 HYS 菌株中, ArgS 是精氨酸 AST 分解代谢途径的关键酶, 与 *E. coli* O157 和 *P. aeruginosa* PAO1 菌株^[20-22]一致。本研究证实 *argS* 缺失导致 HYS 菌株的精氨酸代谢 AST 途径中断且对秀丽隐杆线虫毒性减弱, 这是首次在假单胞菌中发现精氨酸分解代谢 AST 途径的阻断会导致胞内精氨酸含量增加, 与 *Corynebacterium crenatum* 菌株^[23]一致。在文献报道以及实验室前期研究中均发现荧光铁载体 Pyoverdine 和非荧光铁载体 7-羟基环庚三烯酚酮 (7-HT) 具有一定的生物毒性^[24-26], 本研究发现额外的精氨酸可导致菌株中这两种铁载体产量出现不同程度的下降, 因此推测在东湖假单胞菌中精氨酸积累可通过影响菌株铁载体合成来影响菌株毒性。

假单胞菌致病机理多种多样, 但精氨酸代谢参与菌株毒性并未有相关报道。本研究在假单胞菌中发现 AST 途径参与对线虫的毒性作用, 为假单胞菌对秀丽隐杆线虫的毒性机制研究提供重要补充。同时, 本研究初步发现精氨酸代谢与菌株铁载体合成有关, 为研究菌株铁载体合成机制以及生物活性提供了指导意义, 然而精氨酸影响铁载体合成的具体

机制, 以及铁载体如何发挥其生物活性影响细菌毒性还有待进一步开展深入探究。

REFERENCES

- [1] Mahajan-Miklos S, Tan MW, Rahme LG, et al. Molecular mechanisms of bacterial virulence elucidated using a *Pseudomonas aeruginosa*-*Caenorhabditis elegans* pathogenesis model[J]. Cell, 1999, 96(1): 47-56
- [2] Wood, RE. *Pseudomonas*: the compromised host[J]. Hospital Practice, 1976, 11(8): 91-100
- [3] Saiman L, Siegel J. Infection control in cystic fibrosis[J]. Clinical Microbiology Reviews, 2004, 17(1): 57-71
- [4] Vigneshkumar B, Pandian SK, Balamurugan K. Regulation of *Caenorhabditis elegans* and *Pseudomonas aeruginosa* machinery during interactions[J]. Archives of Microbiology, 2012, 194(4): 229-242
- [5] Aznar A, Chen NWG, Rigault M, et al. Scavenging iron: a novel mechanism of plant immunity activation by microbial siderophores[J]. Plant Physiology, 2014, 164(4): 2167-2183
- [6] Chen M, Wang PN, Xie ZX. A complex mechanism involving LysR and TetR/AcrR that regulates iron scavenger biosynthesis in *Pseudomonas donghuensis* HYS[J]. Journal of Bacteriology, 2018, 200(13): e00087-18
- [7] Meck C, D'Erasmus MP, Hirsch DR, et al. The biology and synthesis of α -hydroxytropolones[J]. Medchemcomm, 2014, 5(7): 842-852
- [8] Gao JW, Yu XY, Xie ZX. Draft genome sequence of high-siderophore-yielding *Pseudomonas* sp. strain HYS[J]. Journal of Bacteriology, 2012, 194(15): 4121
- [9] Xie GF, Zeng M, You J, et al. *Pseudomonas donghuensis* HYS virulence towards *Caenorhabditis elegans* is regulated by the Cbr/Crc system[J]. Scientific Reports, 2019, 9(1): 8772
- [10] Liu ZJ, Yin YL, Deng D, et al. Research on nutrition and physiology of arginine[J]. Amino Acids & Biotic Resources, 2005, 27(4): 54-57 (in Chinese)
刘兆金, 印遇龙, 邓敦, 等. 精氨酸生理营养研究[J]. 氨基酸和生物资源, 2005, 27(4): 54-57
- [11] Newman J, Seabrook S, Surjadi R, et al. Determination of the structure of the catabolic N-succinylornithine transaminase (AstC) from *Escherichia coli*[J]. PLoS One, 2013, 8(3): e58298
- [12] Yang Z, Lu CD. Functional genomics enables identification of genes of the arginine transaminase pathway in *Pseudomonas aeruginosa*[J]. Journal of Bacteriology, 2007, 189(11): 3945-3953
- [13] Lu CD, Yang Z, Li W. Transcriptome analysis of the ArgR regulon in *Pseudomonas aeruginosa*[J]. Journal of Bacteriology, 2004, 186(12): 3855-3861
- [14] Jann A, Stalon V, Wauven CV, et al. N^2 -Succinylated intermediates in an arginine catabolic pathway of *Pseudomonas aeruginosa*[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1986, 83(13): 4937-4941
- [15] Simon R, Priefer U, Pühler, A. A broad host range mobilization system for *in vivo* genetic engineering: transposon mutagenesis in gram negative bacteria[J]. Bio/Technology, 1983, 1(9): 784-791
- [16] 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[J]. Gene, 1998, 212(1): 77-86
- [17] Wang TH, Pentt M, Gao PJ. Expression of xylose metabolic key genes of *Trichoderma reesei* on various carbon sources measured by a series of northern hybridizations[J]. Acta Microbiologica Sinica, 1999, 39(6): 503-509 (in Chinese)
汪天虹, Penttil M, 高培基. 瑞氏木霉木糖代谢关键酶基因在不同碳源条件下的表达[J]. 微生物学报, 1999, 39(6): 503-509
- [18] Itoh Y. Cloning and characterization of the *aru* genes encoding enzymes of the catabolic arginine succinyltransferase pathway in *Pseudomonas aeruginosa*[J]. Journal of Bacteriology, 1997, 179(23): 7280-7290
- [19] Markaki M, Tavernarakis N. Modeling human diseases in *Caenorhabditis elegans*[J]. Biotechnology Journal, 2010, 5(12): 1261-1276
- [20] Chou HT, Hegazy M, Lu CD. L-Lysine catabolism is controlled by L-arginine and ArgR in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1[J]. Journal of Bacteriology, 2010, 192(22): 5874-5880
- [21] Tocilj A, Schrag JD, Li YG, et al. Crystal structure of *N*-succinylarginine dihydrolase AstB, bound to substrate and product, an enzyme from the arginine catabolic pathway of *Escherichia coli*[J]. Journal of Biological Chemistry, 2005, 280(16): 15800-15808
- [22] Shirai H, Mizuguchi K. Prediction of the structure and function of AstA and AstB, the first two enzymes of the arginine succinyltransferase pathway of arginine catabolism[J]. FEBS Letters, 2003, 555(3): 505-510
- [23] Xu MJ, Rao ZM, Dou WF, et al. The role of ARGR repressor regulation on L-arginine production in *Corynebacterium crenatum*[J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2013, 170(3): 587-597
- [24] Jiang Z, Chen M, Yu XY, et al. 7-Hydroxytropolone produced and utilized as an iron-scavenger by *Pseudomonas donghuensis*[J]. BioMetals, 2016, 29(5): 817-826
- [25] Sugawara K, Ohbayashi M, Shimizu K, et al. BMV-28438 (3,7-dihydroxytropolone), a new antitumor antibiotic active against B16 melanoma[J]. The Journal of Antibiotics, 1988, 41(7): 862-868
- [26] Calcott MJ, Owen JG, Lamont IL, et al. Biosynthesis of novel pyoverdines by domain substitution in a nonribosomal peptide synthetase of *Pseudomonas aeruginosa*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2014, 80(18): 5723-5731