论文

rsmA 调控基因的筛选及其相关表型测定

董萌萌, 余姚, 闫蓉, 张会群, 沈立新, 陈林*, 段康民*

西北大学生命科学学院, 西部资源与现代生物技术省部共建教育部重点实验室, 西安 710069

* 联系人, E-mail: chenlin@nwu.edu.cn; kduan@nwu.edu.cn

收稿日期: 2015-11-28; 接受日期: 2016-03-10; 网络版发表日期: 2016-06-29

国家自然科学基金(批准号: 31570131)和教育部创新团队发展计划(批准号: IRT-15R55)资助

摘要 为了筛选对 *rsmA* 具有调控功能的相关基因及这些基因对铜绿假单胞菌致病性的影响, 通过构建染色体组上整合有 *rsmA-luxCDABE* 报道子的铜绿假单胞菌菌株, 并以 *rsmA* 基因表达为线索进行随机转座突变, 利用发光变化筛选出对 *rsmA* 基因表达有影响的转座突变体. 最终共得到约 30000 个克隆, 经筛选得到 20 株发光明显变化的突变体, 其中 *rsmA* 表达增强的有 6 个克隆, 而 *rsmA* 表达减弱的有 14 个克隆. 通过随机 PCR 并对产物测序及比对, 最终确定 7 个被破坏的基因. 对致病性相关表型测定, 结果表明细菌运动性、绿脓菌素、鼠李糖脂和胞外多糖产量等均受到不同程度的调节. 这些基因对 *rsmA* 表达有调节作用, 并可能通过 *rsmA* 影响铜绿假单胞菌的多个致病因子及致病性.

关键词 铜绿假单胞菌, *rsmA*, 调控基因, 转座突变

铜绿假单胞菌是一种革兰氏阴性人类机会致病菌^[1], 其因代谢途径多样性, 可以在植物、动物和人体中广泛存在^[1]. 铜绿假单胞菌的广泛适应性与其严密而复杂的调控系统密切相关, 其中转录后调节子 RsmA 是一种全局调控因子^[2], 参与调控多种与致病性相关的基因表达^[3].

Rsm 转录后调控系统由调节蛋白 RsmA 及两个小分子 RNAs(RsmY 和 RsmZ)组成. RsmA 家族蛋白大都为小于 7 kD 的 RNA 结合蛋白, 可与目标 mRNA 的前导序列结合, 进而阻止核糖体与翻译起始位点识别^[4], 影响目标 mRNA 的翻译. 而 RsmY 和 RsmZ 可与游离态 RsmA 结合, 使非结合状态 RsmA 减少,

从而降低 RsmA 与 mRNA 的结合^[5].

rsmA 在多种菌体中都起到重要作用. 在大肠杆菌中, 同源基因 *csrA* 负调节细胞糖原代谢和糖酵解过程, 正调节糖异生^[6], 且其通过调节 *flhDC* 操纵子来控制鞭毛生物合成从而调控细菌运动^[7]; 在十字花科黑腐病菌中, *rsmA* 可控制碳代谢、运动性、生物被膜形成和胞外酶的产生^[8]; 在植物致病菌果胶杆菌属中, *rsmA* 控制细菌致病因子、运动、各种分泌系统和植物细胞壁降解酶合成等^[9]; 在人类致病菌铜绿假单胞菌中, *rsmA* 参与菌体多个重要的生命活动, 其可激活 III 型分泌系统(type III secretion syterm, T3SS)、群体感应系统(quorum sensing, QS)、细菌的运动、鼠李

引用格式: 董萌萌, 余姚, 闫蓉, 等. *rsmA* 调控基因的筛选及其相关表型测定. 中国科学: 生命科学, 2016, 46: 861–871

Dong M M, Yu Y, Yan R, et al. Identification of genes that regulate *rsmA* and phenotypes affected. Sci Sin Vitae, 2016, 46: 861–871, doi: 10.1360/N052016-00243

糖脂和磷脂酶合成等,抑制菌体绿脓菌素、氰化物等生物合成^[5,7].

QS 是细菌通过产生自诱导因子感知菌群密度和外界环境并调控基因表达的一个复杂的调控网络^[10,11],它可以直接或间接地影响几乎所有致病因子的表达,在致病因子和宿主免疫应答过程中起到重要作用^[12]. QS 可正调节绿脓菌素、胞外酶合成,负调节 T3SS 系统及IV型菌毛的表达^[10]. 铜绿假单胞菌除本身的 3 个系统 Las, Rhl 和 PQS 之间存在级联调控,并且与许多其他基因之间有相互调节^[13]. RsmA 通过影响高丝氨酸内酯的合成来调节 QS 及其相关的致病因子^[14,15].

T3SS 是铜绿假单胞菌中重要的致病因子^[16]. 铜绿假单胞菌中存在一套专门编码 T3SS 结构组成及其效应蛋白的基因^[17], RsmA 可激活 T3SS 的转录水平和转录后水平^[7]. 有研究表明,有氧及微氧生长条件可抑制 *rsmY/Z* 的表达,提高游离态 RsmA 浓度^[18],而游离态 RsmA 通过正调节 *exsA* 基因表达来诱导 T3SS 表达^[19]. 据报道 T3SS 基因的表达主要是通过 GacSA-RsmY/Z-RsmA-ExsA 这条途径进行调节^[20].

铜绿假单胞菌中双组分系统可以感应外界环境变化从而表达不同致病因子,是重要的信号传导机制^[21],其对 RsmA 具有负调节作用. 铜绿假单胞菌中影响急慢性感染的基因 PA1611 可与双组分系统中的 RetS 相互作用来调控 RsmA^[22]. RetS 是一个复杂的感应激酶,其可与 GacS 形成二聚体进而抑制 GacS 对 GacA 磷酸化^[23]. 磷酸化的 GacA 正调节 RsmY 和

RsmZ 这两个小 RNAs,它们可与 RsmA 蛋白结合^[24],使游离态的 RsmA 浓度降低,导致 Pel/Psl 及 VI 型分泌系统(type VI secretion system, T6SS)水平升高,进而引起慢性感染^[25].

除了已知的假单胞菌属的细菌中非编码 RNA 分子 RsmY 和 RsmZ 拮抗 CsrA 的功能、枯草芽孢杆菌中 FliW 蛋白和 CsrA 结合调控 CsrA 的活性^[26]及 RsmA 蛋白可与自身编码序列前的 RsmA-binding 位点结合负反馈^[3]外,对 RsmA 的调控网络研究报道的还是很少,因此很有必要在全基因组水平上研究潜在调节 *rsmA* 表达的基因. 本研究以转录后调节基因 *rsmA* 的表达为线索,对野生型 PAO1(CTX-*rsmA*)进行转座突变,得到在 PAO1 全基因组范围内对 *rsmA* 基因表达有调节作用的突变体. 通过筛选 *rsmA* 基因表达明显变化的突变体,利用随机 PCR 及序列比对得到对 *rsmA* 具有调节作用的基因. 同时检测了这些转座突变体对细菌运动性、绿脓菌素、胞外多糖、鼠李糖脂等表型的影响. 这些结果有助于认识 *rsmA* 本身的调节网络,为了解铜绿假单胞菌的致病性机理提供了新的线索.

1 材料和方法

1.1 材料

(1) 菌株和质粒. 本实验中使用的菌株包括:铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)、大肠杆菌(*Escherichia coli* SM10- λ pir),菌株和质粒见表 1,所

表 1 本实验所使用的菌株及质粒^{a)}

菌株及质粒	描述	来源
菌株		
<i>P. aeruginosa</i>		
PAO1	Wild type	[27]
B2	<i>dnaJ</i> (PA4760) transposon mutant of PAO1; Gen ^r	本研究
C8	<i>truB</i> (PA4742) transposon mutant of PAO1; Gen ^r	本研究
E1	Intergenic of PA2029 and p2030 transposon mutant of PAO1; Gen ^r	本研究
E11	<i>gshA</i> (PA5203) transposon mutant of PAO1; Gen ^r	本研究
E12	PA5231 transposon mutant of PAO1; Gen ^r	本研究
F5	<i>hemK</i> (PA4664) transposon mutant of PAO1; Gen ^r	本研究
G6	PA2621 transposon mutant of PAO1; Gen ^r	本研究
<i>E. coli</i>		
SM10- λ pir	Mobilizing strain, RP4 integrated in the chromosome; Kan ^r	[28]
质粒		
pBT20	Mini-TnM delivery vector; Gen ^r	[29]

a) Gen^r: 庆大霉素抗生素抗性; Kan^r: 卡那霉素抗生素抗性

有菌株和质粒都为实验室保存或构建. 本实验所使用的抗生素浓度在 LB 中为庆大霉素(gentamicin, Gen)15 $\mu\text{g/mL}$, 卡那霉素(kanamycin, Kan)50 $\mu\text{g/mL}$; 在假单胞菌分离琼脂培养基(PIA)中为庆大霉素(Gen)150 $\mu\text{g/mL}$, 卡那霉素(Kan)50 $\mu\text{g/mL}$.

(2) 主要仪器. 本实验所用主要仪器: LAS-3000 成像系统(FUJIFILM, 日本); PCR 仪(Eppendorf, 德国); 凝胶成像系统(SYNGENE, 英国); 离心机(Eppendorf); 微量可调移液器(dragon-med, 芬兰; Eppendorf); 多功能酶标仪 Synergy 2(BioTek, 美国); 电泳仪(Bio-RAD, 美国); DNA mini 真空干燥机(Heto-holten, 丹麦); 超低温冰箱(Heto-holten); 低温恒温槽(Heto-holten); 一些常见仪器均为国产仪器, 如超净工作台(苏州净化设备有限公司)、摇床(上海智诚分析仪器制造有限公司)、电子天平(上海良平仪器仪表有限公司)、隔水式培养箱和干燥箱(天津市泰斯特仪器有限公司)等.

(3) 主要试剂. 本实验所使用到的试剂: 庆大霉素(genview); 酵母提取物(安琪酵母); 假单胞菌分离琼脂及 LB 肉汤培养基(北京陆桥技术有限责任公司); 胰蛋白胨(OXOID, 英国); 琼脂(Spectrum, 美国); dNTP 及 Taq Plus DNA 聚合酶(北京鼎国昌盛生物技术有限公司); 鼠李糖(北京化学试剂公司); 刚果红(Sigma-Aldrich, 美国); 琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒(北京百泰克生物技术有限公司); 无水乙醇和三氯甲烷(天津市富宇精细化工有限公司); 其他常见试剂如氯化钠等都为国产的分析纯.

1.2 转座突变体的构建

构建转座突变以基因组上整合有 *rsmA-lux* 报道子的 PAO1(CTX-*rsmA*)为受体菌, 与含有质粒 pBT20 的大肠杆菌 SM10- λ pir 供体菌进行双亲株实验^[30]. 利用 LAS-3000 检测单克隆的化学发光, 并挑取发光变化明显的单克隆. 收集这些初筛的转座突变体于 96 孔板中, 甘油保存于 -80°C .

1.3 转座突变体文库的筛选

转座突变体库的筛选主要分为固体初筛和液体复筛两步. 固体初筛是将挑选的单克隆重新划线于 LB 平板上, 通过 LAS-3000 成像系统检测其化学发光, 挑选发光变化明显的单克隆, 重复 3 次, 重新保存于含液体 LB 的 96 孔板中. 液体复筛是将初筛保存

的菌重新接至含有 100 μL 新鲜 LB 的 96 孔板中, 37°C 摇床培养 12~16 h 后, 取 5 μL 菌液转接于含 95 μL 液体 LB 培养基的黑色 96 孔板中, 并且以 50 μL 矿物油进行覆盖, 同时以染色体上整合有 *rsmA-luxCDABE* 报道子的野生型菌株 PAO1(CTX-*rsmA*)为对照. 在多功能酶标仪 Synergy 2 上每隔 30 min 测定不同菌体的发光值(count per second, CPS)和生长值(A_{600}). 将筛选到的单克隆的发光值与野生型菌株的进行比较, 选出发光变化明显的单克隆, 重复 3 次. 将最终确定的筛选出的突变体划至 LB 平板, 并于牛奶管中保存于 -80°C 冰箱中.

1.4 随机 PCR 确定转座子插入位置

为了确定突变体中转座子插入基因组的具体位置, 采用随机 PCR 方法^[30,31](引物序列见表 2). 利用 BLAST 软件将 PCR 测序的结果与铜绿假单胞菌基因组数据库的全基因组序列进行比对(www.pseudomonas.com), 确定转座子在染色体上插入的具体位置, 进而确定目的基因^[32]. 本实验中的引物合成和测序分别是由上海捷瑞生物工程有限公司及北京奥科生物技术有限公司完成.

1.5 泳动、丛动和蹭行运动

配制泳动培养基(1%胰蛋白胨, 0.5%氯化钠, 0.3%琼脂, 121°C 灭菌 20 min)、丛动培养基(0.8%营养肉汤, 0.5%葡萄糖, 0.5%琼脂, 115°C 灭菌 30 min)和蹭行培养基(0.5%酵母提取物, 1%氯化钠, 1%胰蛋白胨, 1.2%琼脂, 121°C 灭菌 20 min), 将待测菌液的 A_{600} 调至 0.2, 取 2 μL 分别点于泳动和丛动培养基的表面, 待菌液完全吸入培养基后, 将其小心地平移至 37°C 培养箱中过夜培养^[33,34]. 次日, 观察细菌的运动现象, 并用 LAS-3000 成像仪照相保存. 该实验至少重复 3 次.

将蹭行运动培养基用无菌枪头垂直刺穿直至培养基底部, 然后将菌液沿着刺穿的孔点至培养基的底部, 待菌液完全吸入培养基后, 将其倒置于 37°C 培养箱中培养 24 h. 培养结束后, 小心将培养基揭掉, 用 1%的结晶紫染液对培养基底部的运动痕迹进行染色, 室温静置 15 min. 染色结束后用水缓慢冲洗染料, 使未着色的染液洗掉, 晾干后观察蹭行运动产生的运动痕迹的大小^[34], 照相保存. 该实验至少重复 3 次.

表 2 随机引物

引物	序列(5'→3')
P7-1	CTAACAATTTCGTTCAAGCCG
P7-2	GGATGAAGTGGTTCGCATC
ARB1	GGCCACGCGTCGACTAGTACNNNNNNNNNGATAT
ARB2	GGCCACGCGTCGACTAGTAC

1.6 刚果红实验

配制刚果红培养基(1%胰蛋白胨, 1%琼脂, 121℃ 湿热灭菌 20 min, 冷却后加入 0.002%考马斯亮蓝, 0.004%刚果红). 挑取待测菌株的单克隆, 接至 5 mL LB 液体培养基中, 37℃, 200 r/min 过夜培养. 调菌液 A_{600} 约为 0.01, 取 2 μ L 点于刚果红培养基的表面. 待菌液完全被培养基吸收后, 将其倒置于 30℃培养箱中培养 3~7 天^[35]. 培养结束后, 观察细菌菌落的颜色及形态, 并照相保存.

1.7 绿脓菌素的测定

收集待测菌发酵液上清至, 用氯仿萃取, 并用 0.2 mol/L 的盐酸将萃取产物进行第二次萃取, 收集萃取上层无机相, 在 520 nm 波长处测定其吸光值. 每毫升上清产生的绿脓菌素(mg)等于其在 A_{520} 处的吸光值乘以 17.072^[36].

1.8 浓硫酸-地衣酚法测定鼠李糖脂的含量

利用地衣酚-浓硫酸混合物处理鼠李糖标准品并在 421 nm 波长处测定其吸光值, 根据所得数据绘制鼠李糖标准曲线.

收集待测菌株发酵液上清用浓盐酸调 pH 至 2.0, 用等体积的乙酸乙酯进行萃取, 8000 $\times$ g 离心 10 min, 收集上层有机相至新的离心管中, 将下层无机相进行第二次萃取. 将收集的上层有机相于室温挥发至干燥, 蒸干后加入 500 μ L 的 ddH₂O 重新溶解, 在 421 nm 波长处测定其吸光值, 并根据鼠李糖的标准曲线得出鼠李糖的含量. 其中 1 μ g 鼠李糖相当于 2.5 μ g 鼠李糖脂^[37,38].

1.9 生物膜检测

采用 O'Toole 和 Kolter^[39]的方法检测转座突变体生物被膜的产量. 用 95%的乙醇溶解 96 孔板中结合的结晶紫染色液, 并用多功能酶标仪在 600 nm 处检查吸光值.

2 结果

2.1 构建转座突变体库及突变体筛选

RsmA 作为转录后调节小蛋白, 对下游多个基因的表达进行调控, 然而其自身的调控网络却并不十分清楚, 这促使在全基因组水平寻找对 *rsmA* 具有调节作用的基因. 构建转座突变后, 从约 30000 个转座突变体中筛选 *rsmA* 的潜在调节基因, 利用 LAS-3000 成像系统挑选发光明显变化的单克隆(图 1), 这些发光变化明显的单克隆就是对 *rsmA* 基因表达有影响的转座突变体.

通过固体初筛和液体复筛, 共得到 20 株对 *rsmA* 基因表达有影响的转座突变菌株. 以其中 4 株转座突变体发光值(CPS)及生长情况(optical density, OD)为例(图 2), 在生长基本一致(图 2A)的情况下与野生型 PAO1(CTX-*rsmA*)相比, 转座突变体 F5 中 *rsmA* 基因几乎不表达, G6 中 *rsmA* 的发光值也明显地降低, 而突变菌株 A8 和 C7 中 *rsmA* 表达较野生型有明显增强(图 2B). 从这些结果可以确定, 在铜绿假单胞菌基因组上存在多个影响 *rsmA* 表达的基因. 在这发光明显变化的 20 株突变体中, 表达增强的有 6 株菌, 而表达减弱的有 14 株菌.

2.2 转座子插入位点基因的确定

为了确定这些转座子插入的位置, 即破坏的具体基因, 利用随机 PCR、测序及与假单胞菌网站进行序列比对等方法, 寻找转座子插入的具体位点, 最终确定了 7 个被破坏的基因^[30,40]. 表 3 是突变菌对应的被破坏的基因及其基本信息. 其中 B1, B2 转座突变体的转座子插入了同一个基因 PA4760(*dnaJ*), 该基

图 1 LAS-3000 下化学发光照片

图片为 LAS-3000 成像系统下单克隆的化学发光照片, 左边箭头所指圆圈标注的是发光明显加强的单克隆, 右边箭头所指圆圈标注的是发光明显减弱的单克隆

图 2 4 株转座突变体的生长曲线及表达曲线

A: 生长曲线; B: 发光表达曲线. 与野生型 PAO1(*CTX-rsmA*)相比, 突变体 G6(菱形)和 F5(方形)表达增强, 突变体 A8(圆形)和 C7(米形)表达减弱

表 3 随机 PCR 产物测序结果与序列对比得到的转座子插入位点基因^{a)}

ID	突变基因	基因名称	产物信息	分类
B1, B2	PA4760**	<i>dnaJ</i>	DnaJ protein	Class 2
C8	PA4742*	<i>truB</i>	tRNA pseudouridine 55 synthase	Class 2
G6, C12	PA2621**		conserved hypothetical protein	Class 4
E1	PA2029--		PA2029:hypothetical protein	Class 4
	PA2030*		PA2030:hypothetical protein	Class 4
E11	PA5203*	<i>gshA</i>	glutamate-cysteine ligase	Class 3
E12	PA5231*		probable ATP-binding/permease fusion ABC transporter	Class 3
F5, B62	PA4664**	<i>hemK</i>	probable methyl transferase	Class 3

a) 假单胞菌网站(www.pseudomonas.com)将铜绿假单胞菌基因根据其基因功能的认知程度分为 4 类: I 类基因(class 1)是功能已知的基因; II 类基因(class 2)是与在其他菌中功能已知的相关基因具有高度同源性的基因; III 类基因(class 3)是该基因的功能是根据其保守氨基酸序列、结构特征或与其他功能已知的基因具有一定同源性来进行的推断; IV 类基因(class 4)则是功能完全未知的基因. *: 转座突变体个数; --: 基因间隔区

因属于 II 类基因, 编码 DnaJ 蛋白, DnaJ 蛋白涉及细菌的 DNA 复制及热激反应^[41]; F5 及 B62 两个突变体的转座子插入位点基因同为 PA4664(*hemK*), 属于 III 类基因, 假单胞菌网站预测 *hemK* 编码甲基转移酶. 在大肠杆菌中, HemK 具有甲基转移酶活性, 可甲基化释放因子 RF1 和 RF2, 扮演着翻译终止的角色^[42]. 突变体 C8 的转座子插入到 PA4742(*truB*)中, 编码 tRNA 假尿嘧啶核苷合成酶; 突变体 E1 的转座子插入基因 PA2029 与 PA2030 之间, PA2029 和 PA2030 都属于 IV 类基因, 而且都编码假定蛋白; 突变体 E11 的转座子插入位点基因为 PA5203(*gshA*), 编码谷氨酸-半胱氨酸连接酶, 属于 III 类基因; E12 的转座子插入的位点是 PA5231, 该基因也属于 III 类基因, 与 ATP 结合或者编码 ABC 转运蛋白通透酶相关; C12, G6 两个转座突变体的转座子都插入了同一个基因 PA2621, 属于 IV 类基因, 编码保守的假定蛋白, 功能

未知.

2.3 转座突变体的运动性和鼠李糖脂测定

已报道 RsmA 正调节菌体运动, 因此通过检测转座突变体运动情况也可以进一步验证这些基因对 *rsmA* 表达的影响. 结果如图 3 所示, 与野生型 PAO1(*CTX-rsmA*)相比, 转座突变体 F5, E11, B2 的泳动能力明显降低, F5 的丛动和蹭行能力均降低, E1 和 E11 的丛动也降低, B2, C8 的丛动几乎丧失, 其他突变体的运动表型无明显变化.

鼠李糖脂在细菌感染中起到重要作用^[43]. 作为表面活性剂^[44], 鼠李糖脂本身可以提高菌体表面运动, 同时保护菌体不受碳氢类化合物的破坏, 且可促使有害物溶解, 从而使菌体免受侵害^[45]. 同样, RsmA 正调节鼠李糖脂的合成, 因此, 本实验检测了转座突变体中鼠李糖脂的产量, 从图 4B 中可以看出, 和野生型 PAO1(*CTX-rsmA*)相比, 转座突变体 E1,

图3 转座突变株的运动实验结果图

A: 泳动实验结果; B: 丛动实验结果; C: 爬行实验结果. 其中 PAO1 均为 PAO1(CTX-*rsmA*)

图4 转座突变体鼠李糖脂合成量的检测

A: 标准曲线; B: 转座突变体的鼠李糖脂合成量. 其中 PAO1 为 PAO1(CTX-*rsmA*). *: *t* 检验, $P<0.05$, 具有显著差异; **: *t* 检验, $P<0.01$, 具有极显著差异

E12, B2, E11 和 C8 的鼠李糖脂合成量都明显增多, 而突变体 F5 的鼠李糖脂产量降低, G6 鼠李糖脂合成量无明显变化.

2.4 转座突变体的胞外多糖和生物被膜的测定

生物被膜是菌群外的、由胞外多聚复合物 (extracellular polymeric substances, EPS) 构成的基质, 其可使微生物在附着表面集聚在一起, 为菌体提供一个避难所, 保护菌体免受各种压力、抗生素抗菌治疗等的伤害或免疫系统自主清除^[46,47]. 胞外多聚复合物主要由胞外多糖、胞外 DNA(eDNA) 和多肽组成, 形成一种高度含水的极性混合物, 构成了生物被膜

的整体结构支架^[48,49]. 本实验检测了转座突变体的生物被膜量, 结果如图 5 所示, 转座突变体 E11 的生物被膜合成量与野生型 PAO1(CTX-*rsmA*) 相比明显减少, 而转座突变体 F5 的生物被膜量比野生型中高, 其他转座突变体的生物被膜量较野生型中相比并无明显变化.

胞外多糖与铜绿假单胞菌的致病性相关^[50]. 已知 RsmA 负调节涉及产生胞外多糖的 *Pel/Psl* 基因^[51], 为了确定转座突变体产生胞外多糖的产量是否发生变化, 利用刚果红实验测定了转座突变体的胞外多糖产量^[35]. 实验结果如图 6 所示, 与野生型 PAO1 (CTX-*rsmA*) 相比, F5 突变体菌落的颜色明显变红, 这

图 5 转座突变体生物被膜的检测

图 6 转座突变体的胞外多糖检测实验

说明该突变体对应基因被破坏会使菌体的胞外多糖产量明显增多; E11 突变体的菌落成透明状, 说明此突变体对应的基因对胞外多糖的合成很重要, 此基因被破坏, 菌体胞外多糖的合成能力几乎丧失; E12, B2 和 C8 突变体菌落颜色无明显变化, 说明这几个突变体不影响胞外多糖产量。

2.5 转座突变体的绿脓菌素测定实验

铜绿假单胞菌的致病性与多种致病因子密切相关, 其中绿脓菌素是一种重要的致病因子^[52], 其可以导致靶细胞中超氧化物的氧自由基提高, 进而促进靶细胞凋亡^[53]. RsmA 分别调控两个吩嗪合成基因簇, 其通过直接与 *phz* 簇的 5'端 RsmA 潜在位点结合, 负调控 *phzA1* 基因簇, 正调控 *phzA2* 基因簇^[54,55], 可显著地降低绿脓菌素的生物合成, 因此有必要对筛选的转座突变体的绿脓菌素产量进行检测. 测定结果如图 7 所示, 与野生型 PAO1(CTX-*rsmA*)的绿脓菌素产量相比, 突变体 B2($P=2.14905 \times 10^{-5} < 0.01$)、F5($P=6.97101 \times 10^{-5} < 0.01$)的绿脓菌素产量明显降低, 特别

图 7 转座突变体绿脓菌素产量的测定

PAO1 为 PAO1(CTX-*rsmA*). **: *t* 检验, $P < 0.01$, 差异极显著

是突变体 F5 几乎不产生绿脓菌素; 突变体 E11 ($P=0.00394 < 0.01$)的绿脓菌素也比野生型的产量减少, 可以说明这些突变体对应的基因在不同程度上都影响绿脓菌素的合成. 突变体 E1($P=0.4127 > 0.05$)与野生型相比绿脓菌素产量没有明显变化。

3 讨论

转录后调节系统 Gac/Rsm 对于细菌的新陈代谢和致病过程具有重要的调控作用^[5,56]. RsmA 作为全局调节因子, 对多个基因表达具有调节作用, 其可与其他系统相关联形成一个复杂的调控网络, 调节铜绿假单胞菌对多种环境的适应^[2,3]. 因此, 在全基因组水平上筛选对 *rsmA* 可能的调节子对于认识 *rsmA* 的上游调控网络和铜绿假单胞菌致病性尤为重要。

本研究通过构建染色体组上整合 *rsmAlux-CDABE* 报道子的铜绿假单胞菌, 利用转座突变在全基因组水平上筛选出 20 个对 *rsmA* 表达具有调节作用的转座突变体. 经序列比对确定转座子插入位点, 其中多个基因是首次发现与 *rsmA* 相关, 还有一些基因的功能完全未知. 而突变体表型测定的结果显示, 受 RsmA 调节的细菌运动性、绿脓菌素及胞外多糖等均有不同程度的变化, 特别是 B2 和 F5 两个转座突变体丛动能力(图 3B)、鼠李糖脂(图 4)和绿脓菌素合成能力(图 7)基本丧失, 而 F5 胞外多糖合成相较野生型明显增多(图 6), 说明这两个突变体对应的基因 *danJ* 和 *hemK* 对铜绿假单胞菌的毒性和致病性很重要。

本实验两个转座突变体 B1 和 B2 的转座子均插入基因 *dnaJ* 中, 而基因 *dnaJ* 编码一个热激蛋白, 从

表达水平可以看出 *dnaJ* 正调节 *rsmA* 的表达(图 1)。检测结果显示, *dnaJ* 基因破坏后突变体的泳动能力明显降低(图 3A), 而从动能力基本丧失(图 3B)。铜绿假单胞菌中存在另一个与蛋白 DnaJ 功能相似的 ATP 依赖的热激蛋白 Lon, 其影响细菌泳动和从动能力, 且这两个热激蛋白都具有 ATP 结合结构域。在 *Pseudomonas protegens* 中 *lon* 突变后, 胞内 GacA 蛋白在菌群指数生长时期会大量合成, 从而使受双组分系统调节的小 RNAs(RsmY 和 RsmZ)合成量明显增多, RsmY 和 RsmZ 对 RsmA 具有亲和性, 使胞内游离态 RsmA 量降低, 即 *lon* 正调节 RsmA^[56,57]。

突变体 F5 中转座子插入一个 III 类基因 PA4664(*hemK*), 其与大肠杆菌中的 *hemK* 具有 68% 的同源性, 被预测为甲基转移酶编码基因。有文献报道假结核耶尔森氏菌的 *vagH* 基因与大肠杆菌的 *hemK* 基因具有同源性, 且在假结核耶尔森氏菌中, *vagH* 基因突变使其 III 型分泌系统受到抑制^[58]。在铜绿假单胞菌中 RsmA 对 III 型分泌系统具有诱导作用^[18], 而本实验发现 *hemK* 正调控 *rsmA* 的表达(图 2), 这和已报道的结果一致。

鼠李糖脂的合成受 QS 系统转录水平的直接调控, 而 QS 可正调节绿脓菌素, 生物膜等致病因子^[10]。QS 的 3 个系统 Las 系统、Rhl 系统和 PQS 系统之间级联调节并受其他转录调控因子, 如 Vfr, RsmA 等的

调控, 影响鼠李糖脂的合成^[59], 且在 *rsmA* 突变体中鼠李糖脂的合成明显减少^[60]。本实验筛选的突变体中, 有 5 个突变体的鼠李糖脂合成量较野生型增高, 这些基因对鼠李糖脂的影响不是通过 *rsmA* 实现的。RsmA 负调控绿脓菌素生物合成^[55], 本实验检测转座突变体 B2, F5, E1 和 E11 的绿脓菌素合成量均明显降低, 这些转座突变体对应的基因对绿脓菌素生物合成的调控也不是通过 RsmA 来实现的。

铜绿假单胞菌可以产生至少 3 种胞外多糖——藻酸盐、Pel 和 Psl, 其决定了生物被膜结构的稳定性^[61]。RsmA 可直接抑制 Psl 的合成, 并通过降低胞内 c-di-GMP 水平降低 Pel 和藻酸盐的生物合成来调控胞外多糖^[62]。刚果红实验检测到转座突变体 E11 的菌落几乎透明, 即不产生胞外多糖, 说明它被破坏的基因 *gshA* 对胞外多糖的影响不是通过 *rsmA*; 转座突变体 F5 菌落颜色比野生型的变深, 其胞外多糖较野生型增多, 说明其被破坏的基因 *hemK* 对胞外多糖的调控是通过 *rsmA*。生物被膜检测实验结果显示, 与野生型相比, 转座突变体 E11 的生物被膜合成量降低, F5 的生物被膜合成量升高(图 5), 这与胞外多糖检测结果相一致。

本研究筛选鉴定的这些新的潜在 *rsmA* 调节基因, 有助于认识 *rsmA* 本身的调节网络, 为了解铜绿假单胞菌的致病机制提供了新的线索。

参考文献

- Malone J G. Role of small colony variants in persistence of *Pseudomonas aeruginosa* infections in cystic fibrosis lungs. *Infect Drug Resist*, 2015, 8: 237-247
- 郑丽平, 赵振芳, 冯永君. 细菌全局性调控蛋白 CsrA 的结构与功能. *中国生物化学与分子生物学报*, 2013, 8: 711-718
- Jean-Pierre F, Perreault J, Deziel E. Complex autoregulation of the post-transcriptional regulator RsmA in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology*, 2015, 161: 1889-1896
- Andresen L, Frolova J, Pollumaa L, et al. Dual role of RsmA in the coordinated regulation of expression of virulence genes in *Pectobacterium wasabiae* strain SCC3193. *Microbiology*, 2015, 161: 2079-2086
- Vakulskas C A, Potts A H, Babitzke P, et al. Regulation of bacterial virulence by Csr (Rsm) systems. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2015, 79: 193-224
- Yang H, Liu M Y, Romeo T. Coordinate genetic regulation of glycogen catabolism and biosynthesis in *Escherichia coli* via the CsrA gene product. *J Bacteriol*, 1996, 178: 1012-1017
- Andrade M O, Farah C S, Wang N. The post-transcriptional regulator *rsmA/csrA* activates T3SS by stabilizing the 5' UTR of *hrpG*, the master regulator of *hrp/hrc* genes, in *Xanthomonas*. *PLoS Pathogens*, 2014, 10: e1003945
- 黄明慧, 陈承晓, 覃振萍, 等. 大肠杆菌转录后调控蛋白 CsrA 的 C 末端具有抑制十字花科黑腐病菌胞外蛋白酶活性的功能. *基因组学与应用生物学*, 2012, 4: 341-348
- Koiv V, Andresen L, Broberg M, et al. Lack of RsmA-mediated control results in constant hypervirulence, cell elongation, and hyperflagellation in *Pectobacterium wasabiae*. *PLoS One*, 2013, 8: e54248
- Lee J, Zhang L. The hierarchy quorum sensing network in *Pseudomonas aeruginosa*. *Protein Cell*, 2015, 6: 26-41

- 11 刘琳, 谭小娟, 贾爱群. 细菌群体感应与细菌生物被膜形成之间的关系. 微生物学报, 2012, 3: 271–278
- 12 Kalia M, Yadav V K, Singh P K, et al. Effect of cinnamon oil on quorum sensing-controlled virulence factors and biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa*. PLoS One, 2015, 10: e0135495
- 13 梁海华, 沈立新, 马艳玲, 等. 铜绿假单胞菌中群体感应系统研究进展. 微生物学通报, 2010, 7: 1048–1053
- 14 Cui Y, Chatterjee A, Liu Y, et al. Identification of a global repressor gene, *rsmA*, of *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* that controls extracellular enzymes, *N*-(3-oxohexanoyl)-L-homoserine lactone, and pathogenicity in soft-rotting *Erwinia* spp. J Bacteriol, 1995, 177: 5108–5115
- 15 Sheng J Y, Chen T T, Tan X J, et al. The quorum-sensing inhibiting effects of stilbenoids and their potential structure-activity relationship. Bioorg Med Chem Lett, 2015, 25: 5217–5220
- 16 王宁, 左国营, 谢俊杰, 等. 铜绿假单胞菌III型分泌系统与致病毒力因子的研究进展. 解放军药学报, 2015, 5: 443–445
- 17 Frank D W. The exoenzyme S regulon of *Pseudomonas aeruginosa*. Mol Microbiol, 2003, 26: 621–629
- 18 O'Callaghan J, Reen F J, Adams C, et al. Low oxygen induces the type III secretion system in *Pseudomonas aeruginosa* via modulation of the small RNAs *rsmZ* and *rsmY*. Microbiology, 2011, 157: 3417–3428
- 19 Intile P J, Diaz M R, Urbanowski M L, et al. The AlgZR two-component system recalibrates the RsmAYZ posttranscriptional regulatory system to inhibit expression of the *Pseudomonas aeruginosa* type III secretion system. J Bacteriol, 2014, 196: 357–366
- 20 Yamazaki A, Li J, Zeng Q, et al. Derivatives of plant phenolic compound affect the type III secretion system of *Pseudomonas aeruginosa* via a GacS-GacA two-component signal transduction system. Antimicrob Agents Chemother, 2011, 56: 36–43
- 21 Okkotsu Y, Little A S, Schurr M J. The *Pseudomonas aeruginosa* AlgZR two-component system coordinates multiple phenotypes. Front Cell Infect Microbiol, 2014, 4: 82
- 22 Kong W, Chen L, Zhao J, et al. Hybrid sensor kinase PA1611 in *Pseudomonas aeruginosa* regulates transitions between acute and chronic infection through direct interaction with RetS. Mol Microbiol, 2013, 88: 784–797
- 23 Yu X, Chen M, Jiang Z, et al. The two-component regulators GacS and GacA positively regulate a nonfluorescent siderophore through the Gac/Rsm signaling cascade in high-siderophore-yielding *Pseudomonas* sp. strain HYS. J Bacteriol, 2014, 196: 3259–3270
- 24 Zhang Q, Xiao Q, Xu J, et al. Effect of *retS* gene on antibiotics production in *Pseudomonas fluorescens* FD6. Microbiol Res, 2015, 180: 23–29
- 25 Marden J N, Diaz M R, Walton W G, et al. An unusual CsrA family member operates in series with RsmA to amplify posttranscriptional responses in *Pseudomonas aeruginosa*. Proc Natl Acad Sci USA, 2013, 110: 15055–15060
- 26 尚立国, 战崙华, 弓湃, 等. 细菌全局性调控因子 CsrA 功能及其作用机制研究进展. 中国农业科技导报, 2014, 4: 79–86
- 27 Holloway B W, Romling U, Tumbler B. Genomic mapping of *Pseudomonas aeruginosa* PAO. Microbiology, 1994, 140: 2907–2929
- 28 Simon R, Priefer U, Pühler A. A broad host range mobilization system for *in vivo* genetic engineering: transposon mutagenesis in gram negative bacteria. Nat Biotechnol, 1983, 1: 784–791
- 29 Kulasekara H D, Ventre I, Kulasekara B R, et al. A novel two-component system controls the expression of *Pseudomonas aeruginosa* fimbrial cup genes. Mol Microbiol, 2005, 55: 368–380
- 30 张悦, 梁文, 祁婧, 等. 铜绿假单胞菌对碳青霉烯类抗生素耐药相关基因的筛选. 中国科学: 生命科学, 2014, 44: 1159–1167
- 31 Das S, Noe J C, Paik S, et al. An improved arbitrary primed PCR method for rapid characterization of transposon insertion sites. J Microbiol Methods, 2005, 63: 89–94
- 32 Jacobs M A, Alwood A, Thaipisuttikul I, et al. Comprehensive transposon mutant library of *Pseudomonas aeruginosa*. Proc Natl Acad Sci USA, 2003, 100: 14339–14344
- 33 Kohler T, Curty L K, Barja F, et al. Swarming of *Pseudomonas aeruginosa* is dependent on cell-to-cell signaling and requires flagella and pili. J Bacteriol, 2000, 182: 5990–5996
- 34 Rashid M H, Kornberg A. Inorganic polyphosphate is needed for swimming, swarming, and twitching motilities of *Pseudomonas aeruginosa*. Proc Natl Acad Sci USA, 2000, 97: 4885–4890
- 35 Bordi C, Lamy M C, Ventre I, et al. Regulatory RNAs and the HptB/RetS signalling pathways fine-tune *Pseudomonas aeruginosa* pathogenesis. Mol Microbiol, 2010, 76: 1427–1443
- 36 Xu H, Lin W, Xia H, et al. Influence of *ptsP* gene on pyocyanin production in *Pseudomonas aeruginosa*. FEMS Microbiol Lett, 2005, 253: 103–109
- 37 Pham T H, Webb J S, Rehm B H. The role of polyhydroxyalkanoate biosynthesis by *Pseudomonas aeruginosa* in rhamnolipid and alginate production as well as stress tolerance and biofilm formation. Microbiology, 2004, 150: 3405–3413
- 38 Wilhelm S, Gdynia A, Tielen P, et al. The autotransporter esterase EstA of *Pseudomonas aeruginosa* is required for rhamnolipid

- production, cell motility, and biofilm formation. J Bacteriol, 2007, 189: 6695–6703
- 39 O'Toole G A, Kolter R. Initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* WCS365 proceeds via multiple, convergent signalling pathways: a genetic analysis. Mol Microbiol, 1998, 28: 449–461
- 40 陈林, 杨亮, 赵兴艳, 等. 铜绿假单胞菌耐药性相关基因的筛选及鉴定. 中国科学: 生命科学, 2010, 40: 978–982
- 41 Clarke D J, Jacq A, Holland I. A novel DnaJ-like protein in *Escherichia coli* inserts into the cytoplasmic membrane with a Type III topology. Mol Microbiol, 2006, 20: 1273–1286
- 42 Pustelny C, Brouwer S, Musken M, et al. The peptide chain release factor methyltransferase PrmC is essential for pathogenicity and environmental adaptation of *Pseudomonas aeruginosa* PA14. Environ Microbiol, 2013, 15: 597–609
- 43 Reimmann C, Ginet N, Michel L, et al. Genetically programmed autoinducer destruction reduces virulence gene expression and swarming motility in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. Microbiology, 2002, 148: 923–932
- 44 Zhang Y, Miller R M. Enhanced octadecane dispersion and biodegradation by a *Pseudomonas* rhamnolipid surfactant (biosurfactant). Appl Environ Microbiol, 1992, 58: 3276–3282
- 45 Noordman W H, Janssen D B. Rhamnolipid stimulates uptake of hydrophobic compounds by *Pseudomonas aeruginosa*. Appl Environ Microbiol, 2002, 68: 4502–4508
- 46 Bjarnsholt T. The role of bacterial biofilms in chronic infections. APMIS Suppl, 2013, 136: 1–51
- 47 Donlan R M. Biofilms: microbial life on surfaces. Emerg Infect Dis, 2002, 8: 881–890
- 48 Branda S S, Vik S, Friedman L, et al. Biofilms: the matrix revisited. Trends Microbiol, 2005, 13: 20–26
- 49 Flemming H C, Wingender J. The biofilm matrix. Nat Rev Microbiol, 2010, 8: 623–633
- 50 Kim H S, Park S J, Lee K H. Role of NtrC-regulated exopolysaccharides in the biofilm formation and pathogenic interaction of *Vibrio vulnificus*. Mol Microbiol, 2009, 74: 436–453
- 51 Irie Y, Starkey M, Edwards A N, et al. *Pseudomonas aeruginosa* biofilm matrix polysaccharide Psl is regulated transcriptionally by RpoS and post-transcriptionally by RsmA. Mol Microbiol, 2010, 78: 158–172
- 52 Jimenez P N, Koch G, Thompson J A, et al. The multiple signaling systems regulating virulence in *Pseudomonas aeruginosa*. Microbiol Mol Biol Rev, 2012, 76: 46–65
- 53 Caldwell C C, Chen Y, Goetzmann H S, et al. *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin pyocyanin causes cystic fibrosis airway pathogenesis. Am J Pathol, 2009, 175: 2473–2488
- 54 Ren B, Shen H, Lu Z J, et al. The *phzA2-G2* transcript exhibits direct RsmA-mediated activation in *Pseudomonas aeruginosa* M18. PLoS One, 2014, 9: e89653
- 55 崔钦娜, 李芳, 邢伟越, 等. 铜绿假单胞菌全局调控因子 RsmA 的缺失影响 2 个吩嗪基因簇的表达. 微生物学报, 2012, 11: 1326–1334
- 56 Takeuchi K, Tsuchiya W, Noda N, et al. Lon protease negatively affects GacA protein stability and expression of the Gac/Rsm signal transduction pathway in *Pseudomonas protegens*. Environ Microbiol, 2014, 16: 2538–2549
- 57 Breidenstein E B, Janot L, Strehmel J, et al. The Lon protease is essential for full virulence in *Pseudomonas aeruginosa*. PLoS One, 2012, 7: e49123
- 58 Garbom S, Olofsson M, Bjornfot A C, et al. Phenotypic characterization of a virulence-associated protein, VagH, of *Yersinia pseudotuberculosis* reveals a tight link between VagH and the type III secretion system. Microbiology, 2007, 153: 1464–1473
- 59 杜瑾, 郝建安, 张晓青, 等. 微生物合成鼠李糖脂生物表面活性剂的研究进展. 化学与生物工程, 2015, 4: 5–11
- 60 Heurlier K, Williams F, Heeb S, et al. Positive control of swarming, rhamnolipid synthesis, and lipase production by the posttranscriptional RsmA/RsmZ system in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. J Bacteriol, 2004, 186: 2936–2945
- 61 Ghafoor A, Hay I D, Rehm B H. Role of exopolysaccharides in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation and architecture. Appl Environ Microbiol, 2011, 77: 5238–5246
- 62 Rasamiravaka T, Labtani Q, Duez P, et al. The formation of biofilms by *Pseudomonas aeruginosa*: a review of the natural and synthetic compounds interfering with control mechanisms. Biomed Res Int, 2015, 2015: 759348

Identification of Genes that Regulate *rsmA* and Phenotypes Affected

DONG MengMeng, YU Yao, YAN Rong, ZHANG HuiQun, SHEN LiXin, CHEN Lin
& DUAN KangMin

Key Laboratory of Resources Biology and Biotechnology in Western China, Ministry of Education, Faculty of Life Sciences, Northwest University,
Xi'an 710069, China

RsmA is a key post-translational regulator that controls multiple virulence factors in human pathogen *Pseudomonas aeruginosa*. In this study, we used an *rsmA-luxCDABE* reporter integrated on the chromosome of *P. aeruginosa* to identify genes that influence the expression of *rsmA*. We screened a transposon mutant library of 30,000 clones for mutants that exhibited either increased or decreased expression of *rsmA*. Of the total of 20 confirmed mutants, 14 demonstrated a reduced expression of *rsmA* and 6 increased expression. Seven genes disrupted by transposon insertion were eventually identified by arbitrary PCR and sequence alignment. In agreement with the important roles of RsmA, bacterial motility, pyocyanin and extracellular polysaccharide production were affected at various degrees in these mutants. Identification of these putative regulators of *rsmA* provides not only new information of the complex regulatory networks that govern the pathogenicity of *P. aeruginosa*, but also potential new targets for controlling *P. aeruginosa* virulence.

***Pseudomonas aeruginosa*, *rsmA*, regulator, transposon mutation**

doi: 10.1360/N052016-00243