

假单胞菌 M18 *rsmA*⁻ 突变株的构建及其对 Plt 和 PCA 合成的区别性调控作用

王素莲 耿海峰 孙 雷 张雪洪 许煜泉*

(上海交通大学生命科学技术学院 上海 200240)

摘 要 假单胞菌(*Pseudomonas* sp.) M18 是促进植物生长的根际细菌,能产生吩嗪-1-羧酸(PCA)和藤黄绿菌素(Plt)两种不同的抗生素抑制植物病原菌,保护植物免受病害。运用 PCR 方法,从 M18 基因组中扩增出 *rsmA* 基因部分片段,并以该片段为探针,从 M18 的基因组柯斯文库中筛出阳性克隆,切取带有 *rsmA* 基因及两侧序列的 1.5kb 片段,中间插入编码 Km^r 的 DNA 片段,获得 *rsmA*⁻ 体外突变体。运用同源重组剔除技术,构建了 M18 菌株的 *rsmA* 突变株 M18R⁻。突变株 M18R⁻ 生物合成 Plt 的能力比野生型 M18 提高 4 倍,但是,PCA 产量仅为野生型的 20%。研究表明,全局性调控基因 *rsmA* 可能通过不同的机制区别性地影响 Plt 和 PCA 的生物合成。

关键词 假单胞菌 M18, *rsmA*, 吩嗪-1-羧酸, 藤黄绿菌素

中图分类号 Q786 **文献标识码** A **文章编号** 1001-6209(2004)02-0189-05

假单胞菌(*Pseudomonas* sp. M18)是本课题组从上海郊区甜瓜根际土壤中分离到的促进植物生长的根际细菌,能同时分泌藤黄绿菌素(Pyoluteorin, Plt)和吩嗪-1-羧酸(Phenazine-1-carboxylic acid, PCA)两种抗生素,对农作物病害具有广泛的抑制作用。迄今为止的文献中, M18 是唯一能同时分泌 Plt 和 PCA 的荧光假单胞菌株^[1]。

次生代谢阻遏蛋白(Repressor of secondary metabolite, Rsm)A 存在于大部分革兰氏阴性菌和某些革兰氏阳性菌如枯草芽孢杆菌中^[2]。在欧文氏菌中, Rsm 系统主要有 3 种组成成分:RsmA(一种与 RNA 结合并促进其降解的蛋白)^[3]、*rsmB*(一种不翻译的 RNA 分子,能隔离并消除 RsmA 的功能)^[4]和 RsmC(正调控 *rsmA* 基因表达,负调控 *rsmB* 水平)^[5]。

此系统对调控胞外蛋白、次生代谢物合成和菌群传感系统起着关键的作用。在荧光假单胞菌 CHA0(*Pseudomonas fluorescens* CHA0)中, RsmA 是一个负调控因子,与不被翻译的 RNA 分子结合,在转录后水平控制着受 GacA/GacS 系统调节的次生代谢相关基因的表达, GacA 和 RsmA 的调节依赖于同一个核糖体结合位点(RBS)^[6]。RsmA 在大肠杆菌和

肠沙门氏杆菌中的同源物 CsrA 与 RBS 结合,能改变 mRNA 的稳定性,从而影响细胞大小、细胞表面特征和碳代谢流^[7]。RsmA 系统对细菌的代谢和行为起着重要的全局性调控作用。

本文研究结果表明 *rsmA* 基因产物全局性地对 Plt 和 PCA 合成进行区别性的调控。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 质粒和菌种:见表 1

1.1.2 试剂和培养基:DNA 聚合酶(Klenow),限制性内切酶、DNA 连接酶及 DNA 分子量标记物均购自 MBI 公司,地高辛试剂盒购自 Roche 公司。LB 培养基按文献^[8]配制,蔗糖选择培养基:LB 培养基另加 5% 蔗糖;PPM 培养基:每升含胰蛋白胨 22g,葡萄糖 20g, KNO₃ 5g, pH 7.5;King's B 培养基:每升含蛋白胨 20g, K₂HPO₄ 0.3g, 甘油 15mL, MgSO₄·7H₂O 1.5g, pH 7.5 相应固体培养基每升加 15g 琼脂。抗生素用量(μ g/mL):卡那霉素(Km)50,氨基青霉素(Ap)100,庆大霉素(Gm)40,氯霉素(Chl)100,壮观霉素(Sp)100。

基金项目:国家“十五”科技攻关项目(2001BA308A02-14)

作者简介:王素莲(1978-),女,内蒙古赤峰人,硕士研究生,研究方向为生化与分子生物学。E-mail: 2002slwang@163.com

* 通讯作者。Tel: 86-21-54743347; E-mail: xuyq@sjtu.edu.cn

收稿日期: 2003-06-09, 修回日期: 2003-10-14

表 1 菌株与质粒

Table 1 Strains and plasmids

Strains and plasmids	Characteristics	Source
Strains		
<i>Escherichia coli</i> DH5 α	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17(rk⁻ mk⁺)supE44 re1A1</i>	This Lab
<i>E. coli</i> S17-1	<i>thi ,pro ,hsdR ,recA</i> ; mobilizer strain	Simon <i>et al.</i>
<i>Pseudomonas</i> sp. M18	PCA , Plt producer , Amp ^r Sp ^r	This Lab
<i>Pseudomonas</i> sp. M18R ⁻	PCA , Plt producer , Amp ^r Sp ^r <i>rsmA</i> ⁻	This study
<i>Pseudomonas</i> sp. M18S01	pMOR-chromosome plasmid integrate	This study
Plasmids		
pDSK519	resource of kanamycin resistant cassette	N. T. Keen
pME3087	suicide vector ; ColEI replicon <i>IncP-1-mob</i> ,Tc ^r	D. Hass
pBluescript SK	ColE , Amp ^r	This Lab
pMOB3	Km ^r Cm ^r <i>SacBR</i> oriT	H. P. Schweizer
pSKrsmA	pBluescript SK with 1.5kb <i>pst</i> I fragment carrying <i>rsmA</i> ; Ap ^r	This study
pRSK8171	pSKrsmA inactivated with Km ^r ; Km ^r Ap ^r	This study

1.2 引物和 PCR 反应

根据 *E. coli* , *P. aeruginosa* 和 *E. carotovora* 中 *rsmA* 基因的保守序列 ,设计 PCR 简并引物用于扩增假单胞菌 M18 基因组的 *rsmA* 片段。引物 1 5'-CGT₋GGATCCATGCTKATTTGACTCG-3' ,引物 2 5'-TGAAT₋AAGCTTCHCGGTGWAC SGMVAC-3' ,其中简并碱基 K = G/T , Y = C/T , H = A/C/T , W = A/T , M = A/C , N = A/C/G。分别在两引物的 5' 端增添 *Bam*H I 和 *Hind* III 酶切位点 ,以利于 PCR 产物克隆。PCR 反应体系 (50 μ L) 为 :10 \times *Taq* 聚合酶缓冲液 5 μ L , MgCl₂ (25mmol/L) 3 μ L , dNTP (2.5mmol/L) 4 μ L , 引物 1 和引物 2 各 1 μ L , 模板 DNA 1 μ L , *Taq* 酶 (5U/ μ L) 0.5 μ L , 重蒸水 34.5 μ L。PCR 反应条件为 :95 $^{\circ}$ C 6min ; 95 $^{\circ}$ C 1min 57 $^{\circ}$ C 1min , 72 $^{\circ}$ C 45s , 35 个循环 ; 最后循环为 95 $^{\circ}$ C 1min 57 $^{\circ}$ C 1min , 72 $^{\circ}$ C 延伸 10min。

1.3 *rsmA* 基因片段的克隆和测序

质粒抽提、酶切、DNA 片断回收、连接、感受态细胞制备和 ³²P 标记探针及 Southern 杂交等步骤均根据文献 [8] , 染色体 DNA 提取参照文献 [9] , 地高辛标记探针及 Southern 杂交按 Roche kit 说明书进行 , DNA 序列委托上海申友生物公司测定。

1.4 原位杂交和细菌结合转移

参照文献 [8] 进行原位杂交。采用固相滤膜杂交方法 [10] 进行细菌结合转移。

1.5 生长曲线及 PCA 和 Plt 的测定

具体操作方法参照文献 [1] , 发酵过程中 , 每隔 6h 取样 , 测定 OD₆₀₀ 及 PCA 和 Plt 的产量 , 6 次重复 ,

取平均值。

1.6 生物测定

采用平板试验。用灭菌牙签将 M18 和 M18R⁻ 单菌落接种在无菌 KB 平板的外圆周 4 等分点上 , 倒置于 28 $^{\circ}$ C 培养 36h。从果蔬腐霉 (*Pythium aphanidermatum*) 生长 3d 的平板上 , 选择均匀、旺盛生长处沿同心圆用打孔器 (孔径 5mm) 取样 , 将带有培养基的菌块点接在 M18 和 M18R⁻ 生长 36h 后的平板圆心处 , 28 $^{\circ}$ C 继续培养 60h。

2 结果

2.1 *rsmA* 基因片段的克隆及同源性比较

以野生型菌株 M18 总 DNA 为模板进行 PCR , 获得 130bp 左右的条带 , 回收 PCR 产物 , 经 *Bam*H I 和 *Hind* III 双酶切 , 插入载体 pBluescript SK , 转化大肠杆菌 DH5 α , 筛选转化子 , 进行测序。经 DNAMAN 软件分析 , M18 的 *rsmA* 基因序列与 *P. aeruginosa* , *E. carotovora* 和 *P. fluorescens* 的 *rsmA* 基因序列具有同源性 , 同源程度分别为 94.74%、68.38% 和 71.94%。与 *E. coli* 的 *csrA* 基因也具有同源性 , 相似程度为 72.79%。

2.2 M18 染色体上 *rsmA* 两侧临近基因序列的获得及序列分析

以通过 PCR 获得的 130bp *rsmA* 基因片段为探针 , 从 M18 的柯斯 (Cosmid) 文库中筛选到 5 个阳性克隆 pM18J-pM18N。对这 5 个克隆分别经 *Pst* I , *Xho* I , *Bol* II 酶切分析 (图 1-A) , 电泳结果显示这 5

个克隆中, pM18J 与 pM18M 可能为同一种克隆。 $rsmA$ 基因片段经地高辛标记, 作为探针, 进行 Southern 杂交, 结果(图 1-B)表明 5 个阳性克隆中都含有 $rsmA$ 基因片段。回收经 *Pst* I 酶切的 1.5kb 片段, 插

入 pBluescript SK, 获得 pSK $rsmA$ 。测序得知 $rsmA$ 基因片段内部含有 *Aat* II 位点。pSK $rsmA$ 经 *Pst* I 和 *Aat* II 双酶切后, 获得大约 600bp 和 900bp 两个片段, 说明 *Aat* II 几乎位于该片段的中心区。

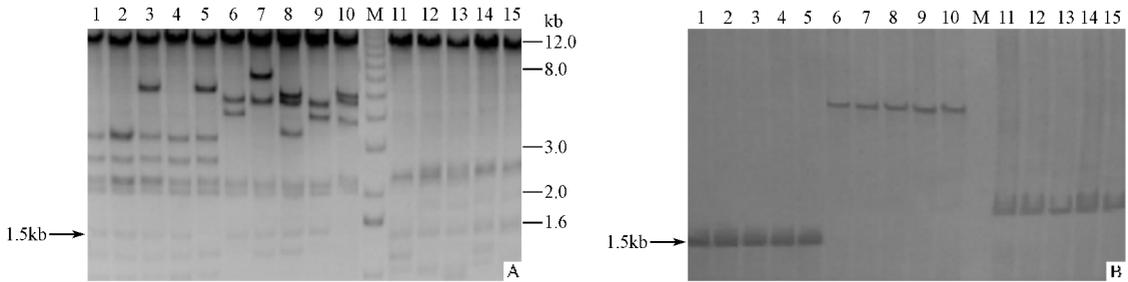


图 1 阳性克隆的酶切图谱(A)和 Southern 杂交分析(B)

Fig.1 Restriction map of positive clones(A) and Southern blot analysis(B)

M. 1kb ladder ; 1~5. pM18J-pM18N/*Pst* I ; 6~10. pM18J-pM18N/*Xho* I ; 11~15. pM18J-pM18N/*Bgl* II .

2.3 $rsmA$ 基因的体外突变

选择 *Aat* II 作突变位点, pSK $rsmA$ 经 *Aat* II 酶切, T4-DNA 聚合酶钝化末端, 从 pDSK519 中获得含有 Km^r 抗性基因的 *Pvu* II 片段, 长度为 1.7kb, 与钝化的线性 pSK $rsmA$ 连接后, 转化大肠杆菌 DH5 α , 筛选转化子酶切予以验证, 阳性克隆命名为 pRSK8171。为便于同源重组体的筛选, *Not* I 酶切 pMOB3 质粒, 回收含有 *Sac*BR 基因的 5.8kb 片段, 插入 pRSK8171 作为同源重组的反向选择标记, *Kpn* I 酶切鉴定正确的转化子。

2.4 $rsmA^-$ 突变菌株 M18R $^-$ 的获得

将重组自杀转移质粒 pMOR 转化 *E. coli* S17-1, 以此为供体菌, 与受体 M18 菌株进行固相滤膜接合转移。质粒 pMOR 受供体菌诱导转移到 M18 菌株中, 因质粒不能自主复制, 促使质粒携带的 $rsmA$: Km^r 突变基因与受体菌的染色体 $rsmA$ 基因发生同源重组。野生型 M18 本身抗壮观霉素(Sp), 因此用含 Km 和 Sp 的 LB 平板选出共整合接合子 M18S01, 随机挑选菌落接种于含 Km 的去载体蔗糖选择培养基中, 质粒 pMOR 携带 *sacBR* 反选择基因, 受蔗糖诱导表达时对 M18 有致死效应, 借此可诱导接合子发生第二次重组, 消除共整合质粒, 即获得 $rsmA$ 基因突变的 M18 菌株, 命名为 M18R $^-$ 。

2.5 Southern 杂交验证 M18R $^-$ 突变株

分别提取野生型 M18、共整合接合子 M18S01 和 M18R $^-$ 菌株的染色体, 经 *Pst* I 酶切, 电泳, 转膜。以 *Pst* I 酶切质粒 pSK $rsmA$ 得到的 1.5kb 片段(含 $rsmA$ 基因及其临近序列)为探针($[^32P]$ 随机标记 DNA 片段), Southern 杂交结果如图 2。泳道 3 为野生型染色体 DNA, 获得长度为 1.5kb 的阳性条带,

泳道 2 为共整合接合子的染色体 DNA, 获得长度为 1.5kb 和 3.2kb 的两个阳性信号带。泳道 1 为 M18R $^-$ 染色体 DNA, 只能见到长度为 3.2kb 的阳性信号带, 比野生型的杂交条带长 1.7kb, 表明 Km^r 盒已经插入 $rsmA$ 基因内。

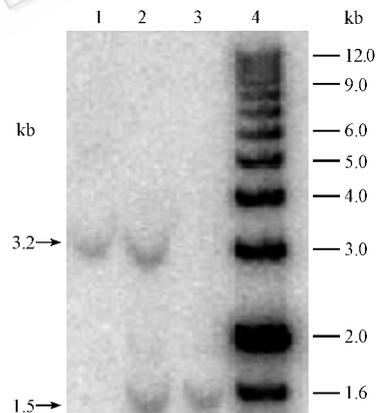


图 2 $rsmA$ 基因突变的 Southern 杂交印证

Fig.2 Southern blot verification of $rsmA$ gene mutation

1. M18R $^-$; 2. M18S01; 3. M18; 4. Molecular marker.

2.6 PCA 和 Pli 生物合成的动力学分析

M18 野生型菌株和 M18R $^-$ 突变株, 在 King's B 及 PPM 中的生长曲线见图 3-A, 结果表明, 在两种不同的培养基中, RsmA 对菌体生长表现出不同的效应。在 King's B 培养基中, M18R $^-$ 在对数期的生长速度略低于野生型, 达到停滞期的时间比野生型推迟约 6h, 说明 $rsmA$ 基因突变不利于菌体的生长。但是, 在 PPM 培养基中, M18 几乎在 30h 以后停止生长, 最大 OD 值仅为 4.0 左右。而 M18R $^-$ 仍迅速生长, 突变菌株比野生型菌株晚 12h 进入停滞期, 最大 OD 值可达 7.0 左右, 又表明在这种培养条件下 $rsmA$ 突变可以促进菌体的生长。

野生型菌株和突变菌株生物合成 Plt 和 PCA 的动力学曲线分别见 4C 和 4B。无论以 King's B 还是以 PPM 作发酵培养基,Plt 都在菌体进入对数生长期后期至停滞期合成,60h 后,M18R⁻ 在 KB 发酵液中积累 Plt 的量比野生型提高 4 倍以上。在 PPM 发酵液中,M18 不能合成可检测的 Plt 量,M18R⁻ 仍能合

成大量的 Plt。在 PPM 培养基中,野生型菌株在菌体生长的对数期大量合成 PCA,最高积累量为 M18R⁻ 的 5 倍。在 King's B 培养基中,无论 M18R⁻ 或 M18 都只分泌少量 PCA,前者的分泌量略低于后者,两者合成 PCA 的能力无显著差别。

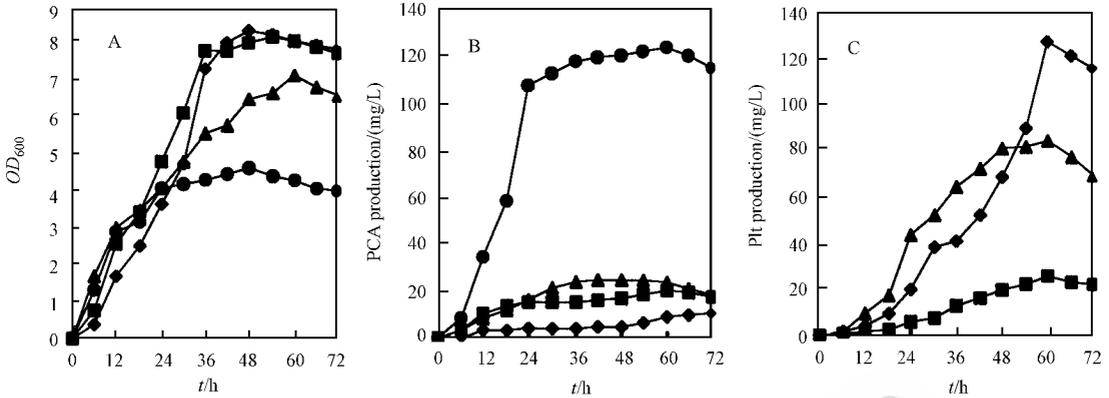


图 3 在 KB 及 PPM 培养基中 M18R⁻ 和 M18 的生长曲线 (A) 及生物合成 PCA (B) 及 Plt (C) 曲线

Fig.3 Growth (A), PCA (B) and Plt (C) production of M18R⁻ and M18 in KB and PPM culture

—◆— M18R⁻(KB); —■— M18(KB); —▲— M18R⁻(PPM); —●— M18(PPM).

2.7 生物测定

瓜果腐霉是一种植物病原真菌,侵染植物幼苗引起腐烂。Plt 能够高效抑制瓜果腐霉保护幼苗免受侵染^[11]。图 4 给出了 M18R⁻ 和 M18 对病原菌瓜果腐霉的抑制效果。测定结果显示两种菌株的菌斑呈现不同的表型:M18 的菌斑呈扩散型,边缘不规则,M18R⁻ 的菌斑不易扩散,边缘呈光滑型。突变株的抑菌圈明显大于野生型菌株,表明 M18R⁻ 生物合成 Plt 的能力远远大于野生型菌株。在 KB 培养基中,突变菌株 M18R⁻ 和野生型菌株的 PCA 产量都很少,而且没有明显差别,尽管 PCA 和 Plt 均可以抑制瓜果腐霉,在 KB 平板上的抑制作用主要归功于 Plt。

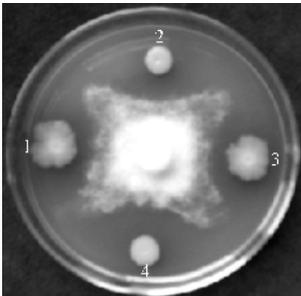


图 4 KB 平板上两种菌株对瓜果腐霉的抑制作用

Fig.4 Inhibition of two strains on *P. aphiderratum* on KB plate

1 and 3: M18; 2 and 4: M18R⁻.

3 讨论

在 KB 培养基中,M18R⁻ 和 M18 菌斑的表型不同,M18R⁻ 对数期的生长速度减缓,而在 PPM 培养基中突变株在对数后期的生长速度增加,都表明了 *rsmA* 是一种全局性调控基因,但是,在不同的环境条件下,表现出一种区别性的全局调控。在大肠杆菌中,*rsmA* 的同源物 *csrA* 突变后导致糖原累积^[9],用碘蒸气染色在 Kornberg 平板上生长的菌体,突变菌株和野生型菌株会显示不同的颜色。经过多次实验证实,荧光假单胞菌 M18 和 *rsmA* 突变株碘蒸气染色的颜色相同,*rsmA* 突变没有引起糖原累积(结果未显示),又似乎表明 RsmA 在不同的菌株中全局性的调控性质具有差异性。

RsmA 作为全局性的转录调控元件,能直接或间接地通过菌群传感途径调控许多次级代谢物的产生。在假单胞菌 M18 中,无论是在 King's B 还是在 PPM 培养基中的动力学分析以及生物测定的结果,都表明 *rsmA* 基因的产物抑制 Plt 的合成,而促进 PCA 的合成。已有的文献资料报道,RsmA 是一种 mRNA 结合蛋白,抑制翻译,从而影响相关基因产物所催化的代谢途径。实验结果表明,尽管以 PPM 作发酵培养基时 Plt 生物合成基因簇可能是打开的,但是 RsmA 对 Plt 基因簇的产物 mRNA 可能具有较强的降解作用,所以野生型菌株在 PPM 发酵液中几

乎检测不出 Plt 的分泌,突变菌株 Plt 的生物合成量大幅度提高。从 PCA 的发酵结果来看,在两种培养基中, *rsmA* 基因都正调控 PCA 的合成,这种对次级代谢产物的调控作用方式,在假单胞菌 M18 中首次发现,推测可能是因为 RsmA 结合并降解了一种 mRNA,而这种 mRNA 编码的蛋白因子能够抑制 PCA 的合成,因此 RsmA 间接促进了 PCA 的产生。KB 和 PPM 培养基的检测结果都证实了两种抗生素合成的调控途径存在显著的差别,但是其中详细的调控机理,尤其对 PCA 来说,究竟是否存在与 *rsmA* 基因调控作用有关的抑制因子还是存在其它的调控机制,还有待于做进一步的研究。但是,无论如何,在不同的环境条件下, *rsmA* 基因产物表现出一种区别性的全局调控作用。

参 考 文 献

- [1] 朱栋华,徐汪节,耿海峰,等. 荧光假单胞菌 M18 *ropD* 基因克隆及其对抗生素合成的影响. 微生物学报, 2003, **43**(1): 58 - 62.
- [2] Romeo T. Global regulation by the small RNA-binding protein CsrA and the noncoding RNA molecule CsrB. *Mol Microbiol*, 1998, **29**(6): 1321 - 1330.
- [3] Cui Y 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.
- [4] Cui Y, Chatterjee A, Chatterjee A K. Effects of the two component system comprising GacA and GacS of *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* on the production of global regulatory *rsmB* RNA and extracellular enzymes and harpinEcc. *Mol Plant-Microbe Interact*, 2001, **14**(4): 516 - 526.
- [5] Cui Y, Mukherjee A, Dumenyo C K, et al. RsmC of the soft-rotting bacterium *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* negatively controls extracellular enzyme and harpin production virulence by modulating the levels of regulatory RNA (*rsmB*) and RNA binding protein (RsmA). *J Bacteriol*, 1999, **182**: 6042 - 6052.
- [6] Blumer C, Heeb S, Pessi G, et al. Global GacA-steered control of cyanide and exoprotease production in *Pseudomonas fluorescens* involves specific ribosome binding sites. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, **96**: 14073 - 14078.
- [7] Romeo T, Gong M, Liu M Y, et al. Identification and molecular characterization of *csrA*, a pleiotropic gene from *Escherichia coli* that affects glycogen biosynthesis, gluconeogenesis, cell size, and surface properties. *J Bacteriol*, 1993, **175**: 4744 - 4755.
- [8] 萨姆布鲁克 J, 弗里奇 E F, 曼尼阿蒂斯 T. 金冬雁, 黎孟枫等译. 分子克隆实验指南. 第二版. 北京: 科学出版社, 1999.
- [9] 奥斯特伯 F, 布伦特 R, 金斯顿 R E, 等. 颜自颖等译. 精编分子生物学实验指南. 北京: 科学出版社, 1999.
- [10] 张惠展. 途径工程—第三代基因工程. 北京: 中国轻工业出版社, 2002.
- [11] Kraus J, Loper J E. Characterization of a genomic region required for production of the antibiotic pyoluteorin by the biological control agent *Pseudomonas fluorescens* Pf-5. *Appl Environ Microbiol*, 1995, **61**: 849 - 854.

Construction of *Pseudomonas fluorescens* sp. M18 *rsmA*⁻ Mutant and Its Different Regulation on Biosynthesis of PCA and Plt

WANG Su-Lian GENG Hai-Feng SUN Lei ZHANG Xue-Hong XU Yu-Quan*

(School of Life Science & Biotechnology, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200240, China)

Abstract: *Pseudomonas fluorescens* sp. M18, one of plant-growth-promoting rhizobacteria, can inhibit several soilborn phytopathogens by producing secondary metabolites including phenazine-1-carboxylic acid (PCA) and pyoluteorin (Plt). Partial segment of *rsmA* was amplified from M18 genome and used as probe to screen M18 gene library, the 1.5kb sequence containing *rsmA* gene was obtained by digesting one of positive clones, then kanamycin resistant cassette was inserted into *rsmA* gene to inactivate it in vitro. Through homologous recombination, mutant M18R⁻ was constructed. Result of dynamic analysis shows that Plt yield in the mutant increases four times and PCA is only 20% of the level of wild type. This study suggests that *rsmA* gene in *Pseudomonas fluorescens* sp. M18 regulates PCA and Plt production differently.

Key words: *Pseudomonas fluorescens* sp. M18, *rsmA*, Phenazine-1-carboxylic acid, Pyoluteorin