论著

文章编号:1000-5404(2009)11-1032-05

铜绿假单胞菌PAO1株基因组中2个SOS盒序列的初步鉴定

张克斌[1],周世文[1],光丽霞[1],何晓梅[1],盛哈雷[1],张国斌[1],钱桂生[2] (第三军医大学新桥医院:[1]医学实验技术中心,[2]全军呼吸内科研究所,全军呼吸病研究重点实验室,重庆 400037)

摘 要:目的 鉴定铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*, *PA*)PAO1株基因组中的SOS盒序列。**方法** 挑选铜绿假单胞菌PAO1株基因组中16个可能含有SOS盒序列的DNA片段,经PCR扩增后,用纯化的LexA表达蛋白做凝胶滞后实验;将获得的2个阳性DNA片段进一步用DNase Ⅰ足纹法进行LexA蛋白结合序列即SOS盒的鉴定;分析所获得的2个SOS盒中的回文序列,以此回文序列在PAO1基因组中进行检索,初步分析出可能的SOS盒序列和可能的调控基因。**结果** 通过DNase Ⅰ足纹法初步鉴定了PAO1基因组中2个SOS盒序列,即位于基因组4 052 647~4 052 662 bp位置的CTGTCTACTTATACAG序列和5 349 888~5 349 903 bp位置的CTGTATAAATAACCAG序列,分析其回文结构为"CTG…CAG",以此回文序列在基因组中进行检索,共获得了10个候选的SOS盒序列。**结论** 初步证实了PAO1基因组中的2个SOS盒,并获得了10条SOS盒候选序列。

关键词: 铜绿假单胞菌PAO1株;SOS盒;LexA蛋白;回文序列;凝胶滞后实验;DNase Ⅰ足纹法

中图法分类号: Q503; Q755; R378.991 **文献标识码:** A

Primary identification on sequences of 2 SOS boxes in genome of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1

ZHANG Ke-bin[1], ZHOU Shi-wen[1], GUANG Li-xia[1], HE Xiao-mei[1], SHENG Ha-lei[1], ZHANG Guo-bin[1], QIAN Gui-sheng[2] ([1]Center of Medical Experiment and Technology, [2]Institute of Respiratory Diseases, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract: Objective To identify the sequences of the SOS boxes in genome of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. Methods Sixteen DNA fragments containing potential SOS box in genome of PAO1 were amplified with PCR, and then fragments were primary identified through electrophoretic mobility shift assay (EMSA) with purified LexA expressing protein. The SOS boxes sequence in the 2 positive fragments were identified by DNase Ⅰ foot printing testing, and the palindrome sequence in the 2 SOS boxes was analyzed. Based on the palindrome sequence, the putative SOS boxes and theirs regulated genes were primary searched in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. Results Two SOS boxes sequence in the genome of PAO1 were identified by DNase Ⅰ foot printing test, they are"CTGTCTACTTATACAG" sequence in the location of 4 052 647 to 4 052 662 bp and "CTGTCTACTTATACAG" sequence in the location of 5 349 888 to 5 349 903 bp in the genome of PAO1. And the palindrome sequence of the SOS boxes is "CTG…CAG". Based on this sequence, 10 putative SOS boxes and their regulated genes were searched. Conclusion Two SOS boxes sequences in genome of PAO1 are primary identified, and 10 putative SOS boxes are selected in this study.

Key words: *Pseudomonas aeruginosa* PAO1; SOS box; LexA protein; palindrome sequence; electrophoretic mobility shift assay; DNase Ⅰ foot printing

---

基金项目: 重庆市自然科学基金(2007BB5023);第三军医大学新桥医院人才基金(2007-2012)
Supported by the Natural Science Foundation of Chongqing (2007BB5023) and the Talent Foundation of Xinqiao Hospital of Third Military Medical University (2007-2012)

作者简介: 张克斌,男,四川省岳池县人,博士,副主任医师,副教授,主要从事微生物学和分子生物学方面的研究,发表论文20余篇。电话:(023)68755381,E-mail:zhangkebin12@yahoo.com.cn

通信作者: 钱桂生,电话:(023)68755603,E-mail:qiangs@mail.tmmu.com.cn

收稿日期: 2008-12-23;**修回日期:** 2009-01-09

环境适应性是各类生物最基本的生命特征之一。细菌 SOS 反应是因各种环境因素导致细菌 DNA 损伤时产生的一种应激反应机制[1]。细菌 SOS 反应体系的调控核心为 LexA 蛋白。它在基因组中的一组识别结合序列即称 SOS 盒(SOS box),是一段含回文结构的调控序列,位于所调控基因的上游,是一些细菌重要的调控元件[2]。细菌 SOS 反应与其耐药性密切相关[3,4]。

铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*, *PA*)又称绿脓杆菌,是临床常见的机会致病菌之一,具有极强的环境适应力和抗生素耐药性[5,6]。但迄今为止,人们对 *PA* 基因组中的 SOS 盒这一重要的调控元件尚未作系统的实验鉴定。前期工作中,我们获得了纯化的 *PA* 的 LexA 表达蛋白[7]。本研究中,我们以纯化 LexA 蛋白,对 *PA* 基因组中的一些可能含有候选 SOS 盒的 DNA 片段进行凝胶滞后实验(electrophoretic mobility shift assay, EMSA),阳性片段进一步通过 DNase Ⅰ足纹法(DNase Ⅰ foot printing)进行鉴定,获得了 2 个 SOS 盒序列,以这 2 个 SOS 盒的回文序列在 PAO1 株基因组中进行检索,共获得 10 个候选的 SOS 盒序列,并对其下游调控基因进行了初步分析,旨在为下一步系统的鉴定工作打下基础。

1　材料与方法

1.1　菌种

铜绿假单胞菌 PAO1 株由第三军医大学基础医学部微生物学教研室丛延广博士惠赠,大肠杆菌 DH5α 株为本室保存。

1.2　主要试剂

KOD-plus *Taq* 酶购自 TOYOBO 生物公司,DNA 凝胶回收试剂盒、细菌基因组 DNA 提取试剂盒均购自博大泰克生物公司,DNA 标准购自北京鼎国生物公司,多核苷酸激酶 PNK 购自 TaKaRa 公司,DNA 测序试剂盒 fmol® DNA Cycle Sequencing System 购自 Promega 公司,[γ-P^{32}]ATP 购自北京市福瑞生物工程公司,放射性比浓度为 370 MBq/ml。

1.3　PAO1 株和大肠杆菌 DH5α 株基因组 DNA 的提取

采用博大泰克生物公司的细菌基因组 DNA 提取试剂盒进行,方法参照说明书进行。其中 PAO1 株培养物菌液浊度应低一些,以免产生过多的多糖影响提取效果。

1.4　PAO1 基因组中一些可能含有 SOS 盒的 DNA 片段的扩增

参照大肠埃希菌[8]和结核分枝杆菌[2]已鉴定的 SOS 盒序列和 LexA 蛋白调控基因的性质分析,结合铜绿假单胞菌 PAO1 基因组中的基因功能预测[6],我们选择了 16 条基因,主要包括 dinP 以及与基因重组相关的 rec 基因簇和与细菌紫外线照射反应相关的 uvr 基因簇,在这些基因起始密码的上游约 200 bp 的片段中,可能含有 SOS 盒即 LexA 蛋白结合序列,扩增这些片段用作下一步进行 EMSA 实验和 DNase Ⅰ足纹实验的 DNA 片段。引物的设计见表 1。

表 1　PAO1 株基因组中可能含有候选 SOS 盒的 DNA 片段扩增的引物设计

扩增 DNA 片段	引物序列(5′→3′)	产物长度(bp)	位置(bp)
Pre-dinP	正义链:CCCGGCGCTATCGCTAGT	243	1 007 691 ~ 1 007 933
	反义链:CCGGAATCTCGCTACAAG		
Pre-uvrA	正义链:GTTTCGGTACCGCTCATC	254	4 748 502 ~ 4 748 755
	反义链:AGCGGCCTCGCATGGCGG		
Pre-uvrB	正义链:AGGCTTCGTTCAGGCCAA	251	3 522 561 ~ 3 522 811
	反义链:GAAAAACCTCGCAGGGAGC		
Pre-uvrC	正义链:CAGATCGCCCAGCAACTG	264	2 925 788 ~ 2 926 051
	反义链:CTAGCTGGCGGCATCGAC		
Pre-uvrD	正义链:GGTACGCTCGATGGCGAT	266	6 130 822 ~ 6 131 087
	反义链:CGCGGCATTCTACCGGG		
Pre-recA	正义链:CGGCGAGCGGCTGGTCAG	279	4 052 583 ~ 4 052 861
	反义链:CGCGCTTCTTGTTCTCGTC		
Pre-recB	正义链:CGCTGGCCTGCCGGACCG	253	4 805 199 ~ 4 805 451
	反义链:GCCTGCTCCTCCGCGCCA		
Pre-recC	正义链:GTGGTGCTGGCGCACGC	241	4 808 711 ~ 4 808 951
	反义链:CGGTACGGCTATTCCTGG		
Pre-recD	正义链:GCCCGGAAGCGATGACCG	253	4 801 465 ~ 4 801 717
	反义链:CGCTCGGCTCCCGGCTGG		
Pre-recF	正义链:CTTTCCAACGGTTTGCTG	258	2 911 ~ 3 168
	反义链:TCAGTATGTTTAGAGCGG		
Pre-recG	正义链:CCATCCGCCACATGGTCG	227	6 012 732 ~ 6 012 958
	反义链:GCTATTTGCGGTTGTTCC		
Pre-recJ	正义链:GGCAGACCAAGGTGCTGG	246	4 172 486 ~ 4 172 731
	反义链:CAGGTCACTCGTTCGGCT		
Pre-recN	正义链:GTCTGCTGTTCGTCAGCCATGCCA	280	5 349 742 ~ 5 350 021
	反义链:GGTTTCGCCGGTGATCACGCTCAT		
Pre-recO	正义链:GCATCCTGCATATCCAT	284	840 101 ~ 840 384
	反义链:GGCGGGTCGACCGGGCG		
Pre-recQ	正义链:AACATGGGCGCGGTACTC	241	3 757 161 ~ 37 574 011
	反义链:GAAGGACTCCAAATCGAG		
Pre-recR	正义链:CAGCCTGGACGACAGCCT	244	1 672 241 ~ 1 672 484
	反义链:GCAGGACTCGTCGGATAG		

铜绿假单胞菌 PAO1 基因组 DNA 的提取参照试剂盒说明书进行。PCR 反应体系:上游引物 2.0 μl,下游引物 2.0 μl,基因组 DNA (2 μg/μl,1∶100 稀释)1.0 μl,10 × Buffer 5.0 μl,dNTP mixture 5.0 μl,$MgSO_4$ 2.5 μl,*Taq* 酶(5 U/μl) 1.0 μl,DMSO 2.5 μl,甘油 2.5 μl,H_2O 26.5 μl,总体积 50.0 μl。热循环参数:94 ℃ 3 min;94 ℃ 30 s,52 ℃ 30 s,72 ℃ 30 s,32 个循环;72 ℃ 5 min。将 PCR 产物在 1.5% 的凝胶中电泳,回收纯化,用于下游实验。

1.5　凝胶滞后实验

通常的 EMSA 实验,一般采用生物素标记 DNA 片段的 3′端,但相关试剂盒较为昂贵。本研究中,我们探索了一种无需标记 DNA 片段的改良凝胶滞后实验。在各管 20 μl 结合反应体系中,按顺序加入表 2 中各成分,37 ℃ × 30 min 反应。各管反应产物在 5% 非变性聚丙烯酰胺凝胶中电泳,方法参照文献[9]进行。电泳后取出凝胶,直接置于终浓度 5 mg/ml(以 0.5 × TBE 配制)的 EB 染液中,室温 30 min,凝胶成像。

表2 改良凝胶滞后实验的反应组分(μl)

组分	蛋白空白对照管	BSA 对照组管	LexA 蛋白结合管
100 mmol/L Tris-Cl(pH 8.0)	2	2	2
100 mmol/L $MgCl_2$	1	1	1
50% 甘油	1	1	1
1 mol/L NaCl	2	2	2
JM109 基因组 DNA(3.5 μg/μl)	1	1	1
各扩增 DNA 片段(约 1.0 μg/μl)	6	6	6
纯化 LexA 蛋白(约 2.5 μg/μl)	–	–	7
BSA(约 3.0 μg/μl)	–	7	–
ddH_2O	7	–	–
总反应体系	20	20	20

1.6 DNase Ⅰ足纹实验

凝胶滞后实验结果显示,Pre-recA 和 Pre-recN 片段在和 LexA 蛋白结合后,出现滞后现象。将这 2 个 DNA 片段进一步做 DNase Ⅰ足纹法实验。

1.6.1 引物标记 将 Pre-recA 和 Pre-recN 片段的扩增上游引物用同位素[γ-P^{32}]ATP 标记。10 μl 反应体系:上游引物 10 pmol(10 μmol/L×1 μl),[γ-P^{32}]ATP 10 pmol(370 μBq/μl ×5 μl),T_4 PNK Buffer(10×) 1 μl,T_4 PNK 酶(10 U/μl) 0.5 μl,无菌 ddH_2O。反应管置 37 ℃×30 min 反应后,置 90 ℃×2 min 灭活 PNK 酶。

1.6.2 PCR 反应 上步标记引物 5 μl,相应下游引物(10 μmol/L) 0.5 μl,模板 DNA(纯化 PCR 产物,3 μg/μl,1∶500 稀释) 1 μl,10×PCR Buffer 1 μl,*Taq* 酶 0.5 μl,DMSO 0.5 μl,甘油 0.5 μl。热循环参数:94 ℃ 3 min;94 ℃ 30 s,52 ℃ 30 s,72 ℃ 30 s, 32 个循环;72 ℃ 5 min。产物置 –20 ℃保存备用。

1.6.3 测序反应 采用 Promega 公司的 fmol® DNA Cycle Sequencing System 试剂盒,DNA 双脱氧测序。方法参照试剂盒说明书进行。热循环结束后,各管加入测序终止液,混匀,置 –20 ℃ 保存备用。凝胶电泳上样前,各管置 70 ℃加热 2 min,每孔加 3 μl 反应产物上样电泳。

1.6.4 LexA 蛋白结合和 DNase Ⅰ酶切保护反应 按表3 加入 LexA 蛋白结合的各反应组分。37 ℃×30 min 反应后,各管加入 50 μl 室温的 Ca^{2+}/Mg^{2+} 缓冲液,室温孵育 1 min; 加入 3 μl 已稀释的 RNase-Free 的 DNase Ⅰ(15 mU/μl),轻柔混匀,室温孵育 1 min;每管加入 90 μl 的 stop solution,混匀;各管分别用 200 μl 的酚/氯仿/异戊醇抽提,取上清于另一管中,加入 500 μl 无水乙醇,冰上 20 min;14 000×*g* 离心 5 min,轻轻弃掉上清,用 70% 乙醇洗涤沉淀,风干;将沉淀 DNA 用 8 μl 的 loading solution 和 2 μl 的1 mol/L尿素混匀, –20 ℃保存。电泳上样前,于 95 ℃加温 2 min 后迅速置冰上最少 2 min。变性聚丙烯酰胺凝胶的制备、上样、电泳、放射自显影和 DNA 序列的读取均参照文献[10]的方法进行。

表3 LexA 蛋白结合反应组分(μl)

组分	对照管	结合反应管
Binding Buffer	25	25
JM109 基因组 DNA(3 μg/μl, 1∶30 稀释)	1	1
LexA 蛋白(约 33 μg/μl)	–	3
ddH_2O	21	19
[γ-P^{32}]ATP 引物	2	2
总反应体系	50	50

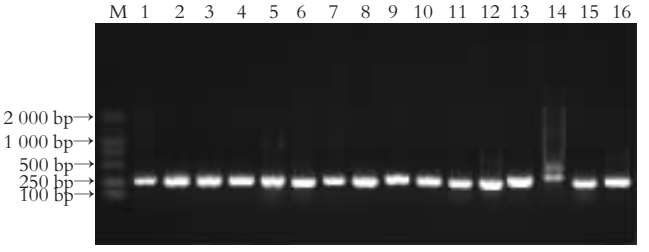
1.7 PAO1 株基因组中候选 SOS 盒及 lexA 调控基因的检索

采用“Palindrome”软件对回文序列“CTG…CAG”在 PAO1 基因组中进行检索,初步筛选出候选 SOS 盒序列,并根据附近基因的分布位置,分析其可能调控的基因即 lexA 调控基因。

2 结果

2.1 PAO1 基因组中一些可能含有 SOS 盒的 DNA 片段扩增结果

以铜绿假单胞菌 PAO1 基因组 DNA 为模板,共扩增了 16 条可能含有 SOS 盒的 DNA 片段(图1)。其中 14 号即 Pre-recO 由于引物质量的关系,出现明显非特异性条带,但进一步纯化目的条带后作为模板,则扩增出特异条带。回收纯化各 DNA 片段,用于凝胶滞后实验。

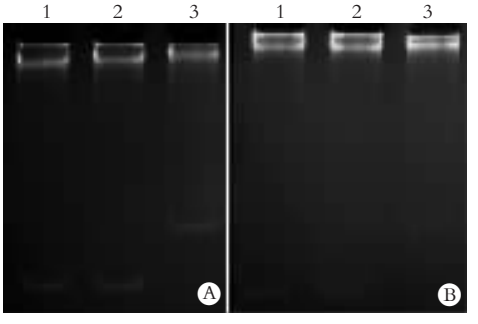


M:DNA 标准(DL 2000);1:Pre-dinP;2:Pre-uvrA;3:Pre-uvrB;4:Pre-uvrC;5:Pre-uvrD;6:Pre-recA;7:Pre-recB;8:Pre-recC;9:Pre-recD;10:Pre-recF;11:Pre-recG;12:Pre-recJ;13:Pre-recN;14:Pre-recO;15:Pre-recQ;16:Pre-recR

图1 可能含有 SOS 盒的 DNA 片段扩增结果

2.2 凝胶滞后实验结果

在共 16 个可能含有 SOS 盒的 DNA 片段中,通过凝胶滞后实验,结果显示 2 个 DNA 片段在与 LexA 蛋白结合后,出现滞后现象,即 Pre-recA 和 Pre-recN 片段(图2)。



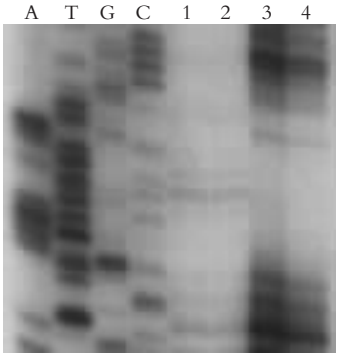
A:Pre-recA; B:Pre-recN 1:DNA 片段对照;2:DNA 片段+BSA 结合对照;3:DNA 片段+LexA 蛋白结合

图2 2 个 DNA 片段凝胶滞后的实验结果

2.3 DNase Ⅰ足纹实验结果

Pre-recA 片段与 LexA 蛋白结合后的 DNase Ⅰ足纹实验结果见图3。从图中读出保护碱基序列为“AATAATACTGTCTACTTATACAGTTG”,其中下划线部分为含回文序列的 SOS 盒。在 PAO1 基因组中检索该段序列,确定其位置为 PAO1 基因组 4 052 647 ~ 4 052 662 bp,距 recA 基因(4 051 563 ~ 4 052 603 bp,负链)起始密码位置 43 bp。同时,其反向序列上存在 recX 基因,不排除

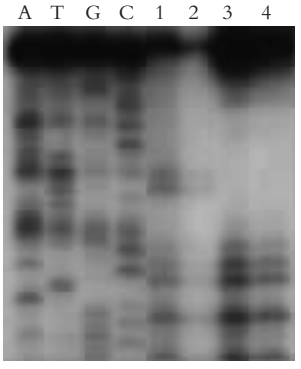
该 SOS 盒参与了这 2 个基因的表达调控。



A、T、G、C:测序泳道,由下往上读取;1,2:Pre-recA + BSA 蛋白/DNase Ⅰ消化;3,4:Pre-recA + LexA 蛋白/DNase Ⅰ消化

图 3　Pre-recA 片段与 LexA 蛋白结合后的 DNase Ⅰ足纹实验结果

Pre-recN 片段与 LexA 蛋白结合后的 DNase Ⅰ足纹实验结果见图 4。从图中读出保护碱基序列为"GAAAAAATACTGTATAAATAACCAGACA",其中下划线部分为含回文序列的 SOS 盒。在 PAO1 基因组中检索该段序列,确定其位置为 PAO1 基因组 5 349 888 ~ 5 349 903 bp,距 RecN 基因(5 349 928 ~ 5 351 604 bp)起始密码位置 24 bp。



A、T、G、C:测序泳道,由下往上读取;1,2:Pre-recN + BSA 蛋白/DNase Ⅰ消化;3,4:Pre-recN + LexA 蛋白/DNase Ⅰ消化

图 4　Pre-recN 片段与 LexA 蛋白结合后的 DNase Ⅰ足纹实验结果

2.4　PAO1 株基因组中 SOS 盒回文序列的推定和其他 SOS 盒序列的初步推测

根据本研究获得的 2 个 SOS 盒回文序列"CTG…CAG",采用"Palindrome"软件,在 PAO1 基因组中进行检索,并结合上下游基因的相对位置,分析出 PAO1 基因组中存在的 10 个推定的 SOS 盒序列,它们在 PAO1 基因组中的定位以及可能调控的开放阅读框(ORF)或基因名称等信息见表 4。

3　讨论

细菌 SOS 反应是因各种环境因素导致细菌 DNA 损伤时产生的一种应激反应机制[1]。SOS 反应体系的调控核心为一种阻遏蛋白(repressor)——LexA 蛋白和另一种核蛋白 RecA。LexA 蛋白在非诱导条件下识别并结合于基因组上一段特异性 DNA 序列,称为 SOS 盒,是一段含回文序列的调控序列,位于所调控基因的上游,限制其下游基因的表达[2]。当细菌 DNA 损伤发生时,在 DNA 损伤或复制阻断区域(blockage of replication)的单链 DNA 增加,RecA 蛋白结合于单链 DNA 区域后,形成一种核蛋白丝状物(nucleoprotein filament),这种复合物能刺激 LexA 的自身催化降解,LexA 降解片段不能再结合于 SOS 盒,使 SOS 盒序列暴露,从而开启一系列基因的表达,进而完成细菌 DNA 损伤后修补及适应环境的生理功能[1]。

细菌 SOS 反应体系不仅对其环境适应性至关重要,同时也通过多种机制参与细菌致病性和耐药性方面的相关生理活动,包括:①细菌耐药基因的水平转移,如 Beaber 等[3] 和 Hastings 等[4] 报道在霍乱弧菌(*Vibrio cholerae*)中,当发生 DNA 损伤 SOS 反应时,由整合 DNA 元件(integrating DNA element)在细菌间转移耐药基因的频率显著增加;②染色体突变,如 Boshoff 等[8] 研究表明,结核分枝杆菌中因环境 DNA 损伤因素刺激发生 SOS 反应时,易错 DNA 聚合酶(error-prone DNA polymerase)DnaE2 高水平表达,从而使细菌

表 4　PAO1 株基因组中推定的 10 个 SOS 盒及其可能调控的基因

序号	推定的 SOS 盒序列	推定的 SOS 盒序列在 PAO1 基因组中的位置	可能调控的 ORF	可能调控的基因名	距起始密码距离	调控基因在 PAO1 基因组中的位置
1	**CTG**GAT**A**AAAAACA**CAG**	3 367 877 ~ 3 367 892 bp	PA3007	lexA	9 bp	3 367 902 ~ 3 368 516 bp
			PA3008	sulA		3 368 528 ~ 3 369 013 bp
2	**CTG**TAT**G**GATAAC**CAG**	3 819 948 ~ 3 819 964 bp	PA3413	yebG	40 bp	3 820 005 ~ 3 820 271 bp
			PA3414			3 820 307 ~ 3 820 891 bp
3	**CTG**TAT**A**AATAAC**CAG**	5 349 888 ~ 5 349 903 bp	PA4763	recN	24 bp	5 349 928 ~ 5 351 604 bp
4	**CTG**TAT**G**AATGTA**CAG**	2 516 348 ~ 2 516 355 bp	PA2288		41 bp	2 516 021 ~ 2 516 308 bp△
5	**CTG**TCT**A**CTTATA**CAG**	4 052 647 ~ 4 052 662 bp	PA3617	recA	43 bp	4 051 563 ~ 4 052 603 bp△
			PA3616	recX		4 051 096 ~ 4 051 557 bp△
6	**CTG**GAT**A**AATTTT**CAG**	1 129 382 ~ 1 129 397 bp*	PA1044		60 bp	1 128 857 ~ 1 129 321 bp△
7	**CTG**GAT**A**AATTTT**CAG**	1 129 382 ~ 1 129 397 bp*	PA1045	dinG	54 bp	1 129 451 ~ 1 131 595 bp
8	**CTG**TAT**C**CATATA**CAG**	81 080 ~ 81 095 bp	PA0069	phl	20 bp	81 116 ~ 82 174 bp
9	**CTG**TAT**A**TTCGTA**CAG**	1 007 601 ~ 1 007 615 bp	PA0922		52 bp	1 007 234 ~ 1 007 548 bp△
10	**CTG**TAT**T**TACATA**CAG**	732 790 ~ 732 805 bp	PA0671	sulA2	137 bp	732 102 ~ 732 653 bp△
			PA0669	dnaE2		727 608 ~ 730 703 bp△
			PA0670	imuB		730 679 ~ 732 094 bp△

字体加粗碱基为 100% 保守序列;*:正负链上基因共用的 SOS 盒序列;△:基因位于负链上

突变频率增高,而这种突变频率的增高对于结核分枝杆菌耐药性和体内生存能力至关重要;③此外,细菌SOS反应体系还参与噬菌体的去溶原和毒力因子的产生等[11],从而影响细菌的毒力和致病性。由此可见,细菌SOS反应体系可通过多种机制使细菌产生毒力改变耐药性,对细菌SOS反应体系进行深入研究,不但能指导一些抗生素的有效合理使用,同时也可为解决细菌耐药性问题提供新的靶点。

铜绿假单胞菌(*PA*)又称绿脓杆菌,是人类和许多动物体重要的机会致病菌之一,属于革兰阴性杆菌,广泛分布于自然界的水、土壤、植物体表、动物及人体体表和体内[12]。该菌为人体第一大机会致病菌,在烧伤、免疫功能低下及肺囊性纤维化患者中可引起原发性感染,也可继发于其他感染。*PA*具有极强的环境适应力和药物耐受性,测序结果显示其基因组大小为6.3 Mb,比其他细菌基因组均大,且基因组中含有大量的转录调控因子[6]。这些转录调控因子赋予*PA*极强的环境适应力和抗生素耐药性。但迄今为止,人们对*PA*基因组中的SOS盒这一重要的调控元件尚未作系统的实验鉴定,同时对其SOS反应相关基因也缺乏系统研究。

通过分析其他细菌如大肠埃希菌[8]和结核分枝杆菌[2]已鉴定的SOS盒序列,发现SOS盒一般位于其调控基因起始密码的上游200 bp范围之内。故本研究结合LexA蛋白调控基因的性质分析和铜绿假单胞菌PAO1基因组中基因功能预测[6],选择了16条基因的起始密码的上游约200 bp的片段,与前期研究中所获得纯化PAO1的LexA表达蛋白[7]进行EMSA实验和DNase Ⅰ足纹法实验,初步鉴定到2个SOS盒序列,对这2条SOS盒序列的回文序列进行分析比对,确定了铜绿假单胞菌PAO1的SOS盒回文序列为"CTG…CAG",SOS盒的序列构成为CTG $(N)_{10}$CAG。

将初步获得的铜绿假单胞菌PAO1株的SOS盒序列与其他细菌的SOS盒序列进行比较发现,各种细菌的SOS盒序列还是有很大的差别。如在大肠杆菌及其他肠科细菌SOS盒序列为TAGTGTATATATATACAGTA,而*Rhizobia*菌的SOS盒为GAAC$(N)_7$GTAC,枯草芽胞杆菌的SOS盒为CGAACRNRYGTTCG,结核分枝杆菌的SOS盒为TCGAAC$(N)_4$GTTCGA。其中,铜绿假单胞菌PAO1株的SOS盒序列的回文序列最短,仅为6 bp。这种序列上的差异可能是由于各种细菌的LexA蛋白结构的差异造成其识别和结合序列不同。

根据本研究获得的2个SOS盒回文序列"CTG…CAG",采用"Palindrome"软件,在PAO1基因组中进行搜索,并结合上下游基因的相对位置,分析出PAO1基因组中存在的10个推定的SOS盒序列,并分析出这些SOS盒可能调控的共15个ORFs。

本研究通过DNase Ⅰ足纹法得到的LexA蛋白所保护的DNA序列,在SOS盒回文序列的2侧,还有不对称数量的多个碱基对,这是由于LexA蛋白结合DNA序列后,形成了一定的空间位阻,使双侧的部分非特异性碱基得到了保护,以免受DNase Ⅰ的消化。下一步工作中,我们将通过替代碱基突变法精确鉴定SOS盒序列及其回文结构,进一步采用DNA损伤剂丝裂霉素C作用于铜绿假单胞菌,芯片法检测这些推定lexA调控基因群表达水平的改变,以筛选出铜绿假单胞菌lexA调控基因即SOS反应相关基因。本研究结果将为进一步系统研究铜绿假单胞菌的DNA损伤SOS反应及染色体耐药等问题提供基础。

参考文献:

[1] Campoy S, Hervas A, Busquets N, *et al*. Induction of the SOS response by bacteriophage lytic development in *Salmonella enterica*[J]. Virology,2006,351(2): 360-367.

[2] Davis E O, Dullaghan E M, Rand L. Definition of the Mycobacterial SOS box and use to identify LexA-regulated genes in *Mycobacterium tuberculosis*[J]. J Bacteriol,2002,184(12): 3287-3295.

[3] Beaber J W, Hochhut B, Waldor M K. SOS response promotes horizontal dissemination of antibiotic resistance genes[J]. Nature, 2004, 427(6969): 72-74.

[4] Hastings P J, Rosenberg S M, Slack A. Antibiotic-induced lateral transfer of antibiotic resistance[J]. Trends Microbiol,2004,12(9): 401-404.

[5] Kurz C L,Ewbank J J. Infection in a dish: high-throughput analyses of bacterial pathogenesis[J]. Curr Opin Microbiol,2007,10(1): 10-16.

[6] 张克斌,金晓琳,朱军民,等. 铜绿假单胞菌噬菌体PaP3基因组测序[J]. 第三军医大学学报, 2002, 24(4): 378-380.

[7] 张克斌,周世文,光丽霞,等. 铜绿假单胞菌LexA蛋白在大肠杆菌中的表达与纯化[J]. 中国人兽共患病学报,2006,22(5): 410-413,418.

[8] Boshoff H I, Reed M B, Barry C E 3rd, *et al*. DnaE2 polymerase contributes to *in vivo* survival and the emergence of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*[J]. Cell, 2003, 113(2): 183-193.

[9] 卢圣栋. 现代分子生物学实验技术[M]. 第2版. 北京:中国协和医科大学出版社,1999:87-88.

[10] 萨姆布鲁克 J,拉塞尔 D W. 分子克隆实验指南[M]. 黄培堂,译. 第3版. 北京:科学出版社,2002:1039-1054.

[11] Goerke C, Koller J, Wolz C. Ciprofloxacin and trimethoprim cause phage induction and virulence modulation in *Staphylococcus aureus*[J]. Antimicrob Agents Chemother,2006,50(1): 171-177.

[12] 邓予晖. 铜绿假单胞菌及其外毒素A对人单个核细胞TNF-α分泌的影响[J]. 郑州大学学报:医学版, 2005, 40(3): 422-423.

(编辑 王小寒)