

铜绿假单胞菌 LasR 基因反义核酸原核表达载体的构建及对该菌毒力的影响

张玲^{1,2)} 周俊立²⁾ 李静铭³⁾ 廖芳²⁾*

(¹⁾武汉市疾病预防控制中心, 武汉 430015; ²⁾华中科技大学同济医学院病原生物学系微生物教研室, 武汉 430030;

³⁾武汉市第十一医院, 武汉 430000)

摘要 PCR 扩增 LasR 基因, 用反向克隆法构建 LasR 基因反义核酸原核表达载体 pUCP18/*lasR*^{antisense} 并转化铜绿假单胞菌, 经酶切、PCR 及测序鉴定重组载体. RT-PCR 检测 LasB 基因和 LasI 基因 mRNA 的表达, NAD 法测定外毒素 A 的活性, 紫外分光光度计测定绿脓菌素的产生水平. 用转化 pUCP18/*lasR*^{antisense} 质粒菌株感染大鼠呼吸道并进行病理组织切片检查. PCR 扩增出约 720 bp 片段, 与 GenBank (No: NC_002516)报道的基因片段大小一致, 构建了 LasR 基因反义核酸原核表达载体 pUCP18/*lasR*^{antisense}, 并成功转化铜绿假单胞菌, 且有效表达, 使转化菌的毒力因子弹性蛋白酶、外毒素 A 和绿脓菌素表达水平均降低. 与标准株感染的大鼠比较, 转化 pUCP18/*lasR*^{antisense} 质粒菌株感染的大鼠支气管炎明显减轻. 上述结果表明, LasR 基因反义核酸原核表达载体 pUCP18/*lasR*^{antisense} 可以降低铜绿假单胞菌的毒力.

关键词 LasR 基因, 反义核酸, 细菌转化, 毒力因子

学科分类号 R378.99+1

铜绿假单胞菌 (*P. aeruginosa*, PA) 作为一种机会致病菌, 它常在机体免疫力低下状态时 (创伤、烧伤、囊性纤维化、大量使用抗生素或免疫抑制剂等) 引起各种急慢性感染. 同时, 铜绿假单胞菌也是医院内感染的重要病原菌之一. 由于铜绿假单胞菌对许多抗生素具内在不敏感性, 加上近年来广谱抗生素的大量应用, 使其耐药率及耐药谱均扩大, 给临床治疗带来极大的困难^[1]. 这促使人们开始寻找新的抗感染途径.

近年来的研究发现铜绿假单胞菌具有密度感知信号 (quorum-sensing, QS) 系统. 细菌可以根据特定信号分子的浓度来监测周围环境中自身或其他细菌的数量变化, 当信号达到一定的浓度阈值时, 即启动菌体中相关基因的表达来适应环境中的变化, 这一调控系统被称为细菌的密度感知信号系统^[2]. QS 系统在调控铜绿假单胞菌各种毒力因子表达中起重要作用, 由此我们设想能否通过阻断该系统的信号传递而抑制铜绿假单胞菌感染^[3].

本研究构建了 QS 系统 LasR 基因反义核酸原核表达载体并转化铜绿假单胞菌, 观察其对铜绿假单胞菌主要毒力因子弹性蛋白酶、绿脓菌素和外毒

素 A 表达的影响, 为进一步研究密度感知信号系统在该致病菌机制中的作用奠定基础.

1 材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 质粒与菌株. 质粒 pUCP18 由美国依阿华大学 Pradeep Singh 教授惠赠, *E. coli* DH5 α 由本室保存. PAO1 菌株由上海交通大学刘俊老师惠赠.

1.1.2 酶及主要试剂. 限制性内切酶 *Hind* III、*Sac* I、T4 DNA 连接酶、凝胶回收试剂盒和质粒提取试剂盒购自 TaKaRa 公司, Trizol 试剂和 PCR 产物纯化试剂盒购自 Invitrogen 公司, 逆转录试剂盒购自 TOYOBO 公司, 辅酶 I (NAD) 和乳酸脱氢酶 (LDH) 购自 Sigma 公司, 其他试剂均为国产分析纯.

1.1.3 引物的设计与合成. 根据 GenBank 上的序列设计 4 对引物 (表 1), 其中 LasR 基因上游引物含有 *Hind* III 酶切位点, 下游引物含有 *Sac* I 酶切位点. 引物由上海英骏生物公司合成.

* 通讯联系人.

Tel: 13971417951, E-mail: liaofang@mails.tjmu.edu.cn

收稿日期: 2007-01-27, 接受日期: 2007-05-24

Table 1 Synthesis of primers

Primer		5'-3' sequence	Length/bp
lasR	P1	ACGAAGCTTATGGCCTTGTTGACGGTT	721
	P2	GCGGAGCTCTCAGAGAGTAATAAGACCCA	
lasB	P3	TTCTACCCGAAGGACTGATAC	153
	P4	AACACCCATGATCGCAAC	
lasI	P5	TCGACGAGATGGAAATCGATG	363
	P6	GCTCGATGCCGATCTTCAG	
16 S rRNA	P7	TACACACGTGCTACAATGGTCG	101
	P8	TCGAGTTGCAGACTGCGATC	

1.2 实验方法

1.2.1 制备模板. 分离培养铜绿假单胞菌标准株 PAO1, 从固体培养基上刮取适量菌落, 加 20 μ l 去离子水, 煮沸 10 min, 10 000 r/min 离心 5 min, 上清液 (模板) -20℃ 保存备用.

1.2.2 PCR 扩增 LasR 基因. 煮沸获得铜绿假单胞菌 PAO1 基因组作为模板, P1, P2 作为引物 (表 1) 进行 PCR 循环. 条件为: 94℃ 预变性 5 min, 94℃ 变性 30 s, 50℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 1 min, 共 30 个循环; 72℃ 延伸 5 min. 产物经纯化试剂盒纯化.

1.2.3 反向克隆法构建 LasR 基因反义核酸原核表达载体 pUCP18/*lasR*^{antisense}. PCR 产物及载体 pUCP18 经 *Hind*Ⅲ 和 *Sac* I 双酶切后, 凝胶回收试剂盒回收大片段, 二者大片段用 T4 连接酶连接. 我们在引物设计时, 令上游引物的酶切位点与质粒载体插入位点的下游酶切位点保持一致, 下游引物的酶切位点和质粒载体插入位点的上游酶切位点亦一致, 这样 LasR 基因就反向插入质粒 pUCP18 中, 从而获得 pUCP18/*lasR*^{antisense} 载体.

1.2.4 pUCP18/*lasR*^{antisense} 载体转化、筛选及鉴定. pUCP18/*lasR*^{antisense} 载体经 $MgCl_2$ 法转化铜绿假单胞菌^[4], 转化产物均匀涂布含 300 mg/L 羧苄青霉素培养基培养, 取转化子接种于含 300 mg/L 羧苄青霉素的 LB 培养基中培养, 试剂盒提取质粒, 质粒经酶切和 PCR 鉴定, 最后通过测序确定序列和方向. 同时转化 pUCP18 质粒作对照.

1.2.5 RT-PCR 检测弹性蛋白酶 (LasB) 和 LasI 基因 mRNA 的表达水平.

a. 细菌总 RNA 制备. 分别地挑取标准株 PAO1、pUCP18/*lasR*^{antisense} 菌株和 pUCP18 菌株单个菌落置 2 ml LB 培养液 37℃ 振荡培养过夜, 菌液 4℃ 离心 (所有实验用物品均经 0.1% DEPC 水处理), 沉淀细菌加入 1 ml Trizol, 按试剂说明书提

取 RNA, 核酸测定仪检测总 RNA 的质量和浓度^[5].

b. RT-PCR. 采用随机引物法将细菌 RNA 逆转录成 cDNA, 具体步骤按照试剂盒说明书操作. 然后分别取上述 3 个菌株的 cDNA 为模板, 用引物 P3、P4, P5、P6, P7、P8 (表 1) 分别进行 LasB 基因、LasI 基因以及参照 16 S rRNA 的扩增. LasB 基因的扩增条件: 95℃ 预变性 5 min, 94℃ 1 min, 52℃ 1min, 72℃ 1.5 min, 32 个循环后 72℃ 终延伸 10 min. LasI 基因和 16 S rRNA 的扩增条件: 95℃ 预变性 5 min, 95℃ 30 s, 58℃ 60 s, 72℃ 90 s, 32 个循环后 72℃ 终延伸 10 min, 各扩增产物行 1% 琼脂糖凝胶电泳, HMIAS-2000 高清晰度彩色医学图文分析系统分析 2 组待测基因及内参的平均吸光度值, 平行实验 3 次, 平均吸光度值的比值进行统计学分析.

1.2.6 NAD (辅酶 I) 法测定外毒素 A 的活性. 根据金晓琳等^[6]建立的 NAD (辅酶 I) 依赖的显色系统测定铜绿假单胞菌外毒素 A 的活性. 分别挑取标准株 PAO1、pUCP18/*lasR*^{antisense} 菌株和 pUCP18 菌株单个菌落置 5 ml 1% 甘油 TSB 培养液, 37℃ 振荡培养过夜至细菌 A_{540} 值为 2.5~2.6 时, 菌液 4℃ 10 000 r/min 离心 1 h, 取上清 10 μ l 加到各 Ep 管, 然后向每管中加入 NAD 溶液 2 μ l (即 0.5 μ g), 混匀后 25℃ 水浴 30 min, 再向每管中加入 0.2 ml pH 7.4 的 10 mmol/L PBS, 将上清 (含毒素) 处理过的 NAD 加入显色系统相应各测定管中, 各测定管预先加入碘化硝基四氮唑蓝 (INT) 溶液 0.2 ml、吩嗪二甲酯硫酸盐 (PMS) 溶液 0.8 ml、乳酸脱氢酶 (LDH) 溶液 0.1 ml 及乳酸钠溶液 1.8 ml, 并置 37℃ 水浴 10 min. 将上述各测定管溶液混匀后 37℃ 水浴 5 min, 每管加入 0.1 ml HCl (2 mol/L) 终止反应, 在 490 nm 下比色测定. 实验设阴、阳性对照, 阳性对照管中含同等量的 NAD 但不含毒素, 阴性对照

管中不含 NAD, 其余条件与测定管相同, A_{490} 比色测定时用阴性对照管调零, 计算出显色抑制率: 抑制率 (RI) = $100 - \text{毒素处理管 } A_{490} \text{ 值} / \text{阳性参照管 } A_{490} \text{ 值} \times 100\%$. 平行实验 5 次进行统计学分析.

1.2.7 绿脓菌素的检测. 分别挑取标准株 PAO1、pUCP18/*lasR*^{antisense} 菌株和 pUCP18 菌株单个菌落置 10 ml GA 培养液 (1% 甘油 (体积比), 6 g/L L-丙氨酸, 2 g/L MgSO₄, 0.1 g/L K₂HPO₄, 0.018 g/L FeSO₄) 37℃ 振荡培养至细菌 A_{540} 值为 2.5~2.6 时, 菌液 4℃ 10 000 r/min 离心 1 h, 取 5 ml 上清与 5 ml 氯仿混合, 下层被分离出来后加 1.5 ml 0.2 mol/L HCl, 取色素层溶液用紫外分光光度计 A_{520} 检测^[7]. 平行实验 5 次进行统计学分析.

1.2.8 统计学处理. 结果采用单因素方差分析, 组间差异比较采用 Dunnett t 检验, 用 SPSS11.5 for Windows 软件进行统计学分析.

1.2.9 动物体内试验评估 *LasR* 基因反义核酸原核表达载体 pUCP18/*lasR*^{antisense} 对 PA 毒力的影响. 用转化 pUCP18/*lasR*^{antisense} 质粒菌株和标准株 PAO1 分别感染大鼠呼吸道, 2 周后处死大鼠, 并取病变部位做病理切片检查.

2 结 果

2.1 铜绿假单胞菌 *LasR* 基因的扩增

利用 PCR 技术可从铜绿假单胞菌基因组中扩增出预期大小的全长 *LasR* 基因片段(721 bp, 图 1).

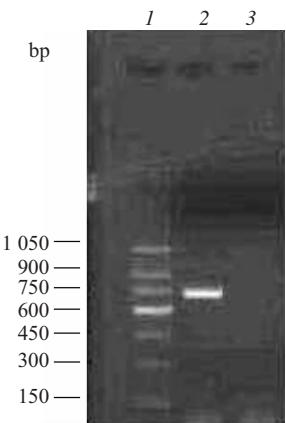


Fig. 1 *LasR* gene extension
1: 150 bp DNA ladder marker; 2: Extended products of *LasR* gene; 3: Negative control of PCR.

2.2 重组质粒的构建和鉴定

从转化菌中提取重组质粒 pUCP18/*lasR*^{antisense}, 经 PCR 和 *Hind* III、*Sac* I 双酶切, 琼脂糖凝胶电泳

后, 均可显示约 720 bp 的目的片段(图 2). 测序结果证实目的片段插入方向正确, 与报道的铜绿假单胞菌 *LasR* 基因 (GenBank No. NC_002516) 一致.

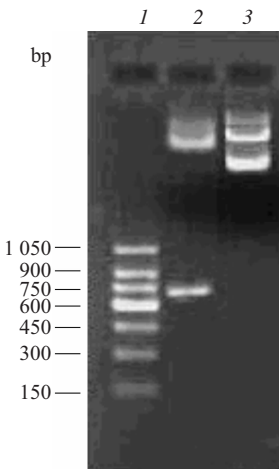


Fig. 2 pUCP18/*lasR*^{antisense} Bi-enzyme cutting
1: 150 bp DNA ladder marker; 2: pUCP18/*lasR*^{antisense} enzyme cutting product; 3: pUCP18 product.

2.3 RT-PCR 方法检测 *LasI* 基因和 *LasB* 基因 mRNA 的表达水平

从图 3 和表 2 可以看出, pUCP18 菌株和标准株 PAO1 比较未见明显变化 ($P > 0.05$), pUCP18/*lasR*^{antisense} 菌株的 *LasB* 基因和 *LasI* 基因 mRNA 的表达水平明显下降 ($P < 0.05$).

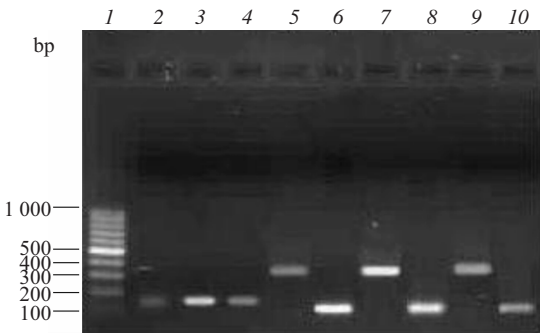


Fig. 3 mRNA expression product to gene *LasI* and *LasB*
1: 150 bp DNA ladder marker; 2, 3, 4: Considered as *LasB* RT-PCR products of pUCP18/*lasR*^{antisense} strain, blank plasmid pUCP18 strain and standard strain respectively; 5, 6: *LasI* and 16sRNA of pUCP18/*lasR*^{antisense} strain; 7, 8: *LasI* and 16sRNA of blank plasmid pUCP18 strain; 9, 10: *LasI* and 16sRNA of standard strain.

Table 2 mRNA expression of *LasB* gene and *LasI* gene

Objective gene	Standard strain PAO1	pUCP18 strain	pUP18/ <i>lasR</i> ^{antisense} strain
<i>lasB</i>	0.7105 ± 0.0491	0.6967 ± 0.0444	0.0753 ± 0.0172 ¹⁾
<i>lasI</i>	1.0899 ± 0.0498	1.0702 ± 0.0450	0.1827 ± 0.0353 ¹⁾

¹⁾ $\bar{x} \pm s$, $n = 3$. ¹⁾ Compared with PAO1, $P < 0.05$.

2.4 外毒素 A 的活性检测

表 3 结果显示, pUCP18 菌株和标准株 PAO1 比较, 外毒素 A 的活性差异没有显著性 ($P > 0.05$), pUCP18/*lasR*^{antisense} 菌株和标准株 PAO1 比较, pUCP18/*lasI*^{antisense} 菌株的外毒素 A 的活性被明显抑制 ($P < 0.05$).

Table 3 Suppression rate of exotoxin A to develop reaction

Strain	Standard strain PAO1	pUCP18 strain	pUCP18/ <i>lasR</i> ^{antisense} strain
RI	63.66 ± 1.42	61.68 ± 2.47	21.10 ± 2.82 ¹⁾

¹⁾ Compared with PAO1, $P < 0.05$.

2.5 绿脓菌素的检测

图 4 结果显示, pUCP18 菌株和标准株 PAO1 绿脓菌素的产生水平没有显著性差异 ($P > 0.05$), 而 pUCP18/*lasR*^{antisense} 菌株基本没有产生绿脓菌素

($P < 0.01$), 说明绿脓菌素的产生受到很强的抑制.

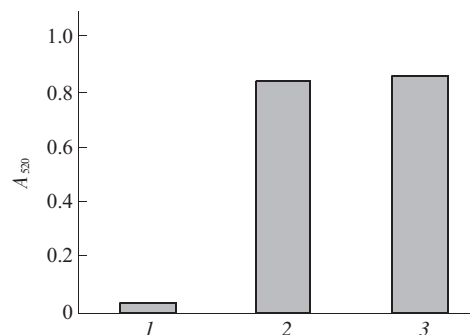


Fig. 4 Expression of pyocyanin

1: Converted pUCP18/*lasI*^{antisense} strain; 2: Converted blank plasmid pUCP18 strain; 3: Standard strain PAO1.

2.6 病理组织切片检查

图 5 结果显示, 与标准株 PAO1 感染的大鼠比较, 用 pUCP18/*lasR*^{antisense} 菌株感染的大鼠, 支气管炎明显减轻.

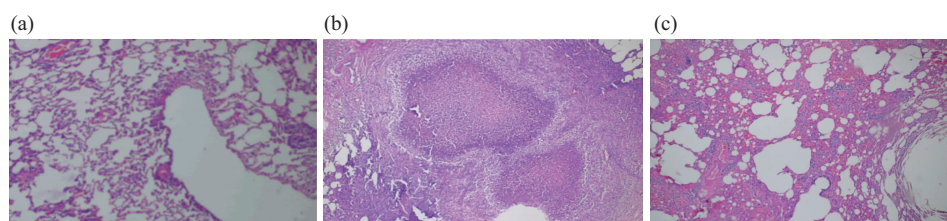


Fig. 5 The inflammatory reaction of rats infected by PA

(a) Normal tissue. (b) Infected by PAO1 (abscess-formation). (c) Infected by converted pUCP18/*lasI*^{antisense} strain.

3 讨 论

随着对细菌 QS 系统的深入研究和认识, 发现 QS 系统与许多致病性因素有关^[8]. 在革兰阴性致病菌中, 对铜绿假单胞菌的 QS 系统研究较多. 经研究发现, 铜绿假单胞菌拥有 Las 和 Rhl 2 个密度感知信号系统^[9,10]. Las 系统由 LasR 基因和 LasI 基因及相关基因组成, 分别编码转录激活蛋白 LasR 和信号分子 N-3-oxododecanoyl-L-homoserine lactone (3-oxo-C12-HSL) 合酶^[11]. Rhl 系统则包含 RhlR 基因和 RhlI 基因及相关基因, 分别编码 RhlR 蛋白和丁基高丝氨酸内酯 (N-butyryl homoserine lactones, C4-HSL)^[12~14]. 3-oxo-C12-HSL 和 C4-HSL 作为信号分子增加到一定浓度时便可分别与 LasR 和 RhlR 蛋白特异性结合并激活一系列下游致病基因的表达. 同时, 有研究发现, 2 个密度感知信号系统间

具有级联关系^[15], Las 系统在转录和转录后水平均对 Rhl 系统有调控作用. 因此, 严格控制 LasR 基因的表达, 就可控制铜绿假单胞菌 QS 系统信号的传递, 从而抑制毒力因子的表达, 降低细菌的致病性. 因此, 我们在本研究中构建了 LasR 基因反义核酸原核表达载体在菌体中, 并转化铜绿假单胞菌, 在菌体中转录出 LasR 基因反义 mRNA, 封闭其翻译, 降低 LasR 的水平, 使下游毒力因子的表达受到抑制.

为了检测载体是否构建成功并转化到铜绿假单胞菌中, 本实验采用羧苄青霉素筛选阳性克隆并提取质粒, 然后经双酶切、PCR 和测序鉴定证实, 反义核酸原核表达载体 pUCP18/*lasR*^{antisense} 构建成功并转化到铜绿假单胞菌中, 且目的基因方向正确.

为检测反义核酸原核表达载体 pUCP18/*lasR*^{antisense} 对细菌毒力因子表达有抑制作用,

我们通过 RT-PCR 检测 *LasB* 基因和 *LasI* 基因的表达水平, 结果显示, pUCP18/*lasR*^{antisense} 菌株的 *LasB* 基因表达明显下降, 而 pUCP18 菌株和标准株 PAO1 的 *LasB* 基因表达基本上没有变化, 说明我们设计的反义核酸对 *LasB* 基因和 *LasI* 基因有明显的抑制作用(图 3 和表 2)。

本实验中我们还用 NAD 依赖的显色系统来测定铜绿假单胞菌外毒素 A 的活性. 在该系统中, NAD 接受 LDH 从乳酸脱下来的氢, 再通过 PMS 传递给 INT, 使后者还原而显色. 如果外毒素 A 分解 NAD, 就会打断递氢链而抑制显色反应. 显色系统中, NAD 含量与显色有良好线性关系^[4]. 通过检测外毒素 A 对显色系统的抑制反应可以很好地反映出外毒素 A 的活性. 我们做了 5 次平行实验, 并进行统计学分析, 结果显示, pUCP18 菌株和标准株 PAO1 比较外毒素 A 活性基本没有差异, pUCP18/*lasR*^{antisense} 菌株和标准株 PAO1 相比较有显著性差异, 说明反义核酸通过对 *LasR* 基因表达的抑制从而抑制下游毒力基因——外毒素 A 基因的表达。

同时我们还检测了绿脓菌素的表达. 研究显示, 绿脓菌素是重要的细菌毒力因子, 可使呼吸道纤毛摆动逐步降低, 最后发展为广泛的纤毛停滞, 导致上皮损伤^[6], 同时还会降低支气管粘液流动速度, 有利于绿脓杆菌定植于呼吸道^[7], 还可刺激上皮细胞 IL-8 表达, 引起炎症反应^[18]. 本实验结果显示, pUCP18 菌株与标准株 PAO1 的绿脓菌素比较没有差别, 而 pUCP18/*lasR*^{antisense} 菌株绿脓菌素基本没有产生, 近乎完全被抑制. 以上结果说明, *LasR* 基因反义核酸载体对弹性蛋白酶和绿脓菌素的表达有明显的抑制作用, 对外毒素 A 的活性有较强的抑制作用, 也就是说, QS 系统中 *LasR* 基因可以调控铜绿假单胞菌弹性蛋白酶和绿脓菌素的表达, 对外毒素 A 的表达也有较强的调控作用^[19]。

综上所述, QS 系统中 *LasR* 基因可以调控铜绿假单胞菌的毒力, 本实验通过反义核酸抑制 *LasR* 基因后, 铜绿假单胞菌毒力因子的表达均受到明显抑制, 说明对 QS 系统的干扰可以降低铜绿假单胞菌致病率和死亡率^[20], 是一种很有前途的治疗手段, 可以作为铜绿假单胞菌治疗的一个新的突破口, 特别是 *LasR* 基因可以作为治疗的一个新的靶位点, 可为解决细菌耐药问题的研究奠定基础。

参 考 文 献

- 1 de Kievit T R, Iglewski B H. Bacterial quorum sensing in pathogenic relationships. *Infect Immun*, 2000, **68**: 4839~4848
- 2 Whiteley M, Lee K M, Greenberg E P. Identification of genes controlled by quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, **96**: 13904~13909
- 3 Smith R S, Iglewski B H. *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing systems and virulence. *Curr Opin Microbiol*, 2003, **6** (1): 56~60
- 4 Whiteley M, Parsek M R, Greenberg E P. Regulation of quorum sensing by RpoS in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol*, 2000, **182** (15): 4356~4360
- 5 周丹秋, 李敏, 蒋晓飞, 等. 全耐药铜绿假单胞菌中多药外排泵 mRNA 表达的定量 RT-PCR 检测. *临床检验杂志*, 2006, **24** (2): 103~105
Zhou D Q, Li M, Jiang X F, et al. Chinese J Clinical Laboratory Science, 2006, **24** (2): 103~105
- 6 金晓琳, 黎庶, 胡福泉. NADase 细菌毒素的非放射性测定法. *第三军医大学学报*, 1999, **21** (1): 53~55
Jin X L, Li Z, Hu F Q. Academic Journal of Third Military Medical University, 1999, **21** (1): 53~55
- 7 Schaber J A, Carty N L, McDonald N A. Analysis of quorum sensing-deficient clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Med Microbiol*, 2004, **53** (Pt 9): 841~853
- 8 Gallagher L A, McKnight S L, Kuznetsova M S. Functions required for extracellular quinolone signaling by *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol*, 2002, **184** (23): 6472~6480
- 9 Kiratisin P, Tucker K D, Passador L. LasR, a transcriptional activator of *Pseudomonas aeruginosa* virulence genes, functions as a multimer. *J Bacteriol*, 2002, **184** (17): 4912~4919
- 10 Erickson D L, Endersby R, Kirkham A. *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing systems may control virulence factor expression in the lungs of patients with cystic fibrosis. *Infect Immun*, 2002, **70** (4): 1783~1790
- 11 Smith R S, Harris S G, Phipps R. The *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing molecule N-3-oxododecanoyl homoserine lactone contributes to virulence and induces inflammation *in vivo*. *J Bacteriol*, 2002, **184** (4): 1132~1139
- 12 Diggle S P, Winzer K, Lazdunski A. Advancing the quorum in *Pseudomonas aeruginosa*: MvaT and the regulation of N-acylhomoserine lactone production and virulence gene expression. *J Bacteriol*, 2002, **184** (10): 2576~2586
- 13 Fuqua C, Parsek M R, Greenberg E P. Regulation of gene expression by cell-to-cell communication: acyl-homoserine lactone quorum sensing. *Annu Rev Genet*, 2001, **35**: 439~468
- 14 Pearson J P, Passador L, Iglewski B H, et al. A second N-acylhomoserine lactone signal produced by *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, **92** (5): 1490~1494
- 15 Winans S C, Bassler B L. Mob psychology. *J Bacteriol*, 2002, **184** (4): 873~883
- 16 Wilson R, Pitt T, Taylor G. Pyocyanin and 1-hydroxyphenazine

- produced by *Pseudomonas aeruginosa* inhibit the beating of human respiratory cilia *in vitro*. J Clin Invest, 1987, **79** (1): 221~2291
- 17 Munro N C, Rarker A, Rutman A. Effect of pyocyanin and 1-hydroxyphenazine on *in vivo* tracheal mucus velocity. J Appl Physiol, 1989, **67** (1): 316~3231
 - 18 Massion P P, Inoue H, Eisenstat J R. Novel *Pseudomonas* product stimulates interleukin-8 release by airway epithelial cells *in vitro*. J Clin Invest, 1994, **93** (2): 26~321
 - 19 Nouwens A S, Beatson S A, Whitchurch C B. Proteome analysis of extracellular proteins regulated by the las and rhl quorum sensing systems in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. Microbiology, 2003, **149** (Pt5): 1311~1322
 - 20 Pearson J P, Feldman M, Iglewski B H, *et al.* *Pseudomonas aeruginosa* cell-to-cell signaling is required for virulence in a model of acute pulmonary infection. Infect Immun, 2000, **68** (7): 4331~4334

Construction of Prokaryotic Expression Vectors of Antisense Nucleic Acid of LasR Gene and Its Effect on The Virulence of *Pseudomonas aeruginosa*

ZHANG Ling^{1,2)}, ZHOU Jun-Li²⁾, LI Jing-Ming³⁾, LIAO Fang^{2)*}

¹⁾Wuhan Centers for Disease Prevention & Control, Wuhan 430015, China;

²⁾Department of Pathogenic Biology, Tongji Medical College of Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China;

³⁾Wuhan No.11 Hospital, Wuhan 430000, China)

Abstract The LasR gene was amplified from the genome of *Pseudomonas aeruginosa* by PCR and recombined with plasmid pUCP18 reversely. The recombinant pUCP18/*lasR*^{antisense} was verified with restriction analysis, PCR and sequence and was transformed in *Pseudomonas aeruginosa*. The biological effect of pUCP18/*lasR*^{antisense} was detected by RT-PCR, NAD method and the assay of pyocyanin. The air tubes of rats were infected by pUCP18/*lasR*^{antisense} strain and then carried on histopathologic slide check. Expected full length LasR fragment (721bp) can be extended from *Pseudomonas aeruginosa* gene with PCR technology. And it is consistent with LasR gene of *Pseudomonas aeruginosa* covered in GenBank (NO. NC_002516). The recombinant plasmid was constructed and transformed into *Pseudomonas aeruginosa* successfully. Compared with the rats which were infected by standard strain, the bronchitis of the rats which were infected by pUCP18/*lasR*^{antisense} strain was obviously eased. It can be concluded that the antisensenucleic acid of LasR gene can depress the virulence of *Pseudomonas aeruginosa* and reveal a new target site for treatment.

Key words LasR gene, antisensenucleic acids, bacterial transformation, virulence factor

*Corresponding author.

Tel:13971417951, E-mail: liaofang@mails.tjmu.edu.cn

Received: January 27, 2007 Accepted: May 24, 2007