

荧光假单胞菌 M18 *rpoD* 克隆及其对抗生素合成的影响

朱栋华 徐汪节 耿海峰 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: 荧光假单胞菌 M18 对多种植物病原真菌具有显著的抑制作用。荧光假单胞菌 (*Pseudomonas fluo-rescens*) M18 能同时合成吩噻-1-羧酸 (PCA) 和藤黄绿菌素 (Plt) 两种抗生素。从 M18 的基因组中克隆了 *rpoD* 基因, 其相应的氨基酸序列与荧光假单胞菌 CHAO 中 RpoD 蛋白的氨基酸序列完全相同。利用基因重组技术和大肠杆菌-荧光假单胞菌穿梭质粒 pME6032, 将 *rpoD* 置于强启动子 P_{lac} 的控制下, 导入 M18 菌株。发现经重组质粒转化的 M18, 与对照相比, 培养基中 PCA 和 Plt 开始累积的时间分别提前 4h 和 8h, 积累量提高 1 倍和 6 倍。
关键词: 荧光假单胞菌 M18 吩噻-1-羧酸 藤黄绿菌素 *rpoD* 基因

中图分类号: Q785 文献标识码: A 文章编号: 1006-6179(2003)03-0315-09

在细菌中, 仅一种 RNA 聚合酶承担着转录细胞内全部种类 RNA 的功能。但是, RNA 聚合酶的核心酶 ($\alpha_2\beta\beta'$) 只具有转录延长和终止功能。转录因子 σ 对核心酶识别特定启动子的专一性序列和转录起始起着关键性作用^[1]。 σ^{70} (又称为 RpoD, *rpoD* 基因编码) 是主要的持家转录因子, 此外, 在 *E. coli* K12 中, 还发现了其他 6 种 σ 因子, 如 σ^{38} (又称为 RpoS), σ^{32} 、 σ^F 、 σ^E 、 σ^{fecl} 和 σ^{54} 。在细胞中, 各种 σ 转录因子对核心酶的竞争结合能力是基因转录的一种调节方式^[2]。在各种不同外界环境条件下以及在菌体生长和发育的各个时期, 各种特异性表达的基因利用不同的 σ 因子起始转录。细菌分泌次生产物抗生素与细菌的生长状态和生长环境有着极大的联系。本文探讨了 *rpoD* 基因的扩增、细菌的生长状态与次生产物合成间的相互关系。

植物根际促生细菌 (Plant Growth Promoting Rhizobacteria) 以多种方式促进植物生长并抑制土壤中的植物病原菌, 其中主要的机理之一是分泌抗生素。根际细菌分泌的抗生素主要有五大类, 其主要的化学结构分别属于吩噻类和聚酮类衍生物。已经发现在同一种细菌中能分泌几种抗菌素, 在化学结构上, 一般都属于同一种类型的抗生素衍生物, 或者分泌吩噻类, 或者分泌聚酮类^[3]。本课题组以环丙烷-1-氨基-1-羧基为唯一氮源, 从上海郊区的甜瓜根际土壤中分离获得了一株产荧光假单胞菌 M18 (*Pseudomonas fluorescent* M18)^[4]。从 M18 的菌悬液中, 分离纯化了两种不同类型的抗真菌物质, 经元素分析, 紫外、红外扫描, GC-MS 联用和核磁共振氢谱和碳谱鉴定, 确定了这两种物质的分子结构分别为吩噻-1-羧酸 (PCA, 吩噻类抗生素) 和藤黄绿菌素 (Plt, 聚酮类抗生素)。在一个假单胞菌株中, 同时分泌两类不同的抗生素, 在国内外文献中至今未见报道。PCA 对由小麦全蚀

基金项目: 国家“十五”科技攻关项目 (2001BA308A02-14); 上海市科技兴农攻关项目 (2001511)

* 通讯作者。Tel: 86-21-54743347; Fax: 86-21-54743348; E-mail: xuyuquan@hotmail.com

作者简介: 朱栋华 (1978-) 男, 硕士研究生, 上海市人, 研究方向为微生物次生代谢的分子调控。

收稿日期: 2002-08-29, 修回日期: 2002-10-14

病菌 (*Gaeamauuomyces gramiais* var. *tritici* ,Ggt)具有强大的抑制作用 ;Plt 对终极腐霉 (*Pythium ultimum*)引起的棉花、甜菜立枯病具有很强的防治效果。M18 菌株分泌两类不同的抗生素 ,扩大了该生防菌的抗菌谱 ,经离体、盆栽接种和多年的大田试验结果表明 ,M18 对甜瓜蔓枯病和黄瓜枯萎病菌有显著的防治效果^[4 5]。研究 M18 两类抗生素生物合成的调控机制 ,对分析和提高该菌株的生防机理和效果具有重要意义。

在荧光假单胞菌中 ,*RpoD* 基因对于聚酮类抗生素生物合成的影响国外已有所报道^[6] ,但对于吩嗪类抗生素生物合成的影响尚无研究先例。本文利用大肠杆菌-荧光假单胞菌穿梭质粒 pME6032 ,将 *rpoD* 全长基因(σ^{70} 因子的编码基因)置于强启动子 P_{tac} 的控制下 ,导入 M18 生防菌株。发现经质粒转化的 M18 ,不仅提前了 PCA、Plt 的生物合成时间 ,且产量也大大提高。结果表明 ,在荧光假单胞菌 M18 中 ,重组质粒携带 *rpoD* 基因 ,经 IPTG 诱导 ,能以直接或间接的方式增强 PCA 和 Plt 编码基因的表达和次生代谢物的生物合成。

1 材料和方法

1.1 菌株和质粒

本实验使用的菌株和质粒列于表 1。

表 1 菌株与质粒
Table 1 Strains and plasmids

Strains and plasmids	Character	Source
Strains		
<i>E. coli</i> DH5 α	<i>rec</i> A-F- <i>end</i> A1 <i>gyr</i> 96 <i>thi</i> -1 <i>hsd</i> R17(<i>rk</i> ⁻ <i>mk</i> ⁺) <i>sup</i> 44 <i>re</i> 1A1	Lab. collection
<i>E. coli</i> LE392	F ⁻ <i>hsd</i> R574 <i>sup</i> E44 <i>sup</i> F58 <i>lac</i> Y1 <i>Gal</i> K2 <i>gal</i> T22 <i>met</i> B1 <i>trp</i> R55	Promega
<i>Pseudomonas</i> sp. M18	PCA , Plt produced , Amp ^r	Lab collection
Plasmids		
pLAFR-5	IncP Tc ^R <i>cos</i> ⁺	Lab collection
pBluescript KS	pMB1 Amp ^r	Lab collection
pME6032	pVS1-p15A <i>E. coli</i> - <i>Pseudomonas</i> shuttle vector ; <i>lac</i> I ^q - P_{tac} Expression vector Tc ^r	Offered by Dieter Haas Switzerland
pGEM-Teasy	ColE , Amp ^r	Promega
pM18RA ~ pM18RF	pLAFR-5 with 28kb fragment from M18	This study
pM18R1	pGEM-T with 370bp PCR fragment	This study
Plasmids	Character	Source
pM18R2	pBluescript KS with 3 kb <i>Eco</i> RV fragment from pM18RA	This study
pM18R3	pGEM-Teasy with 1.85 kb PCR	This study
pMERpOD	pME6032 with a 1.85 kb <i>Eco</i> R I / <i>Bgl</i> II PCR fragment <i>rpoD</i> under P_{tac} control	This study

1.2 培养基和生长条件

M18 产抗生素培养基 PPM 和生长温度按文献 [4], *E. coli* 生长培养基 LB 和 LA 和生长温度按文献 [7]。实验所用抗生素剂量, *E. coli*: 四环素 25 $\mu\text{g/mL}$, 氨苄青霉素 50 $\mu\text{g/mL}$; M18: 四环素 100 $\mu\text{g/mL}$ 。

1.3 工具酶与试剂

限制性内切酶、连接酶、DNA Marker 购自 MBI, *taq*、*pfu* DNA 聚合酶购自上海生工生物工程公司 [α^{32} -P]dATP 同位素试剂盒购自华美生物工程公司, PCR 回收、胶回收、染色体 DNA 提取试剂盒购自华舜生物工程公司。建文库所用包装蛋白购自 Promega。其余化学试剂均为国产。

1.4 DNA 的操作技术

1.4.1 M18 菌株染色体 DNA 的提取: 按照华舜试剂盒说明书。

1.4.2 质粒的重组、转化和测序: DNA 的酶切、回收、连接, 其中 M18 的转化采用电转法, 按文献 [6]。上海申友生物技术有限责任公司测序。

1.4.3 M18 菌株染色体 DNA 基因组文库的构建: M18 菌株染色体 DNA 经 *Sau*3AI 部分酶切, 蔗糖梯度离心, 取 28kb 左右片段插入 pLAFR-5 的 *Bam*H I 位点, 体外包装, 转化 *E. coli* LE392。具体步骤参见 [6]。

1.4.4 探针的制备、基因组文库筛选、Southern-blotting 和 pM18R2 的构建: 根据文献 [6] 经 NCBI BLAST 同源对比, 以荧光假单胞菌属 *rpoD* 基因最保守的区域设计引物 5' :TCGGG-TATAATCCTCGGC 和 3' :CGCATGTACATGCCGAC。以 M18 总 DNA 为模板, 采用 PCR 技术, 反应体系参照 [6]。扩增出约 370bp 的靶带, 插入 pGEM-Teasy, 得到重组克隆 pM18R1, 测序予以验证。

以 370bp 的 PCR 产物为探针, 筛选 M18 基因组文库, 得到 6 个阳性克隆 pM18RA ~ pM18RF 经 *Eco*R V 酶切, 进行 Southern-blotting, 得 3kb 阳性片段, 插入 pBluescript KS *Eco*R V 位点, 得到重组克隆 pM18R2, 测序验证。文库筛选、Southern-blotting 具体步骤参见 [6]。

1.4.5 重组质粒 pM18R3 的构建: 根据 pM18R2 测序结果及 pME6032 的 P_{lac} 启动子下游的酶切位点, 上下游引物设计如下:

5'-GGGGGAATTCTGGATAGGGTGTATGTCC(*Eco*R I 酶切位点及 RBS 及起始密码子 ATG);

5'-AACCAGATCTTTACTCGTCGAGGAAGGA(*Bgl* II 酶切位点)

以 pM18R2 总 DNA 为模板, 为保证准确性, 采用 *pfu* 高保真聚合酶, 反应体系参照文献 [6]。扩增条件: 95 $^{\circ}\text{C}$, 5min , 1 cycle ; 95 $^{\circ}\text{C}$, 30s ; 55 $^{\circ}\text{C}$, 45s ; 72 $^{\circ}\text{C}$, 4min ; 30 cycles ; 72 $^{\circ}\text{C}$, 6 min。1.85kb 的 PCR 产物经纯化、末端加 A 的步骤, T-A 克隆入 pGEM-Teasy, 转化 *E. coli* DH5 α , 得重组质粒 pM18R3。测序结果与 pM18R2 测序结果吻合。

1.4.6 pMERpoD 表达载体的构建及在 M18 的诱导表达: 从 pM18R3 中切出 *Eco*R I 和 *Bgl* II 片段, 插入 pME6032 的 *Eco*R I 和 *Bgl* II 的位点之间, 转化 *E. coli* DH5 α , 筛选四环素抗性转化子, 得到的重组质粒 pMERpoD, 电转入 M18 菌株, 得到 M18(pMERpoD), 挑取单菌落, 置于含有四环素(100 $\mu\text{g/mL}$) 的 PPM 培养液中, 28 $^{\circ}\text{C}$ 培养过夜, 然后按 1:20 比例放大

培养,至 $OD_{600} = 0.5$ 时,加 IPTG 至终浓度为 1mmol/L ,继续培养。

1.5 PCA 和 Plt 的定量测定和分离纯化、分子结构鉴定

取 M18 发酵液 1mL , pH 调至 4.0 后,PCA 经 3 倍体积氯仿抽提,弃上清,取 $5\mu\text{L}$ 氯仿层,进样;Plt 经等体积乙酸乙酯抽提,离心取上清,真空抽干,再溶于 1mL 甲醇中,取 $5\mu\text{L}$ 进样。HPLC 检测条件为:PCA 检测波长 248nm ,保留时间 1.78min ;Plt 检测波长 308nm ,保留时间为 3.1min ;流动相为 70% 甲醇,流速 1mL/min , C_{18} 反相分析柱。分子结构分析:抽提方法和 HPLC 检测条件同上, C_{18} 反相制备柱收集纯品,经 UV 扫描、气相-质谱和核磁氢谱和碳谱四谱分析。

1.6 PCA,Plt 生物合成的动力学分析

分别挑取 M18, M18(pME6032)和 M18(pMERpoD)的单菌落,接入 PPM 培养液中,后两者加入四环素($100\mu\text{g/mL}$) 28°C 培养过夜,然后按 1:20 比例放大, 28°C 220 r/min 连续培养。其中 M18(pMERpoD)在 $OD_{600} = 0.5$ 时,经 IPTG 诱导,每隔 2h,分别测定 OD_{600} 值、PCA 和 Plt 产量。各种处理设置 6 个重复,取平均值。

2 结果

2.1 *rpoD* 基因的克隆和序列同源性比较

从 M18 基因组文库 1920 个克隆中获得的 6 个阳性克隆,经 *EcoRV* 酶切,进行 Southern-blotting 分子杂交,最后验证其中 pM18E 为假阳性。所得的阳性片段(图 1),插入 pBluescript KS *EcoRV* 位点,得到含有 *rpoD* 完整基因的重组质粒 pM18R2。经测序和同源性比较,在起始密码上游是 GGATAG 可能的核糖体结合位点,同源性分析表明 M18 菌株中, *rpoD* 基因的核苷酸序列与荧光假单胞菌 CHAO 菌株中 *rpoD* 基因的同源性有 99.45% (1838/1848),而且其 RpoD 蛋白与 CHAO 菌株 RpoD 蛋白的序列完全一致,表明了荧光假单胞菌属 *rpoD* 基因在进化中的高度保守性(图 2)。

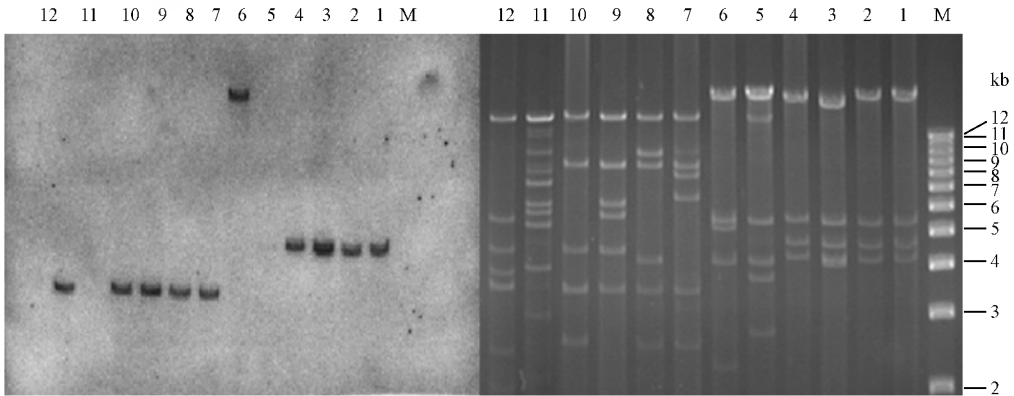


图 1 阳性克隆酶切图谱及 Southern blotting 杂交

Fig.1 Restriction endonuclease digestion of the positive clones and Southern blotting
M.1kb ladder; 1~6. pM18A-pM18F/*Hind*III; 7~12. pM18A-pM18F/*EcoRV*. Because there was positive signal in the 5 and 7 lanes, pM18E clone screened by in-situ hybridization was identified as an artificial positive clone.

ggatagggtgtt

atgtccggaagcgcaacagcagctctgcctcaagagtgtgatcagccgtggacgtgagcagggttacctgacttacgcggaggtcaaf
M S G K A Q Q Q S R L K E L I S R G R E Q G Y L T Y A E V N
gaccacctgccggagataattcagatccggaaacaggttggaagacatcatccgatcatcaacgacgtggggtatcagagagt
T T C R R I F O I R N R W K T S S A Z S T T W G S T Y S R V
gctccggatgcggatgccctttttgttgccgaagccgataccgacgaagcagcagctgaaagaagccgccgacggttgccggtgtggaa
L R M R M P F C W P K P I P T K Q Q L K K P P Q R W R L W K
accgacattgctgcactaccgaccagctgcgcatgtacatcgcgcaaatgggcacggctgcagctgtcacacgtgaaggcgaaatcgaa
T D I G R T T D P V R M Y M R E M G T V E L L T R E G E I E
atcgccaagcgtatcgaagagggtatccgtgaagtgatggcgcaatccgaccttgacacggttgatcacatctctcccgatgac
I A K R I E E G I R E V M G A I A H F P G T V D H I L S E Y
actcgcgtcaccaccgaaggtggacgcctgtccgacgttctcagcgggtacatcgacccggatgacggcattacgccgctgccgccgaa
T R V T T E G G R L S D V L S G Y I D P D D G I T P P A A E
gtgccccgctgtgcacaccaagaccgcaagcggatgacgacagcgaagcgaagaagcgaagcgaagcgaagaagaagcc
V P P P V D T K T A K A A D D S E D E E A A A T E D E E A
gaaagcgggtccggatccggtcatcgccgcacagcgcctttggcgcggtgccgaccagatggaagtaccgcgaaggcgtgaagaacac
E S G P D P V I A A Q R F G A V A D Q M E V T R K A L K K H
ggccgcgagaacaagcaagccatcgccgaaatgtgcccctggctgaactgttcacgcatcaaatgggtccgaagcaattcggaagc
G R E N K Q A I A E M L A L A E L F M P I K L V P K Q F E G
ctggtgcgaacgtgtacgagtcgcccgtgacgtgcgccagcaggaacgcccatcatgcagctctgctgctgctgacgtcccgatgccca
L V E R V S A L D R L R Q Q E R A I M Q L C V R D A R M P
cgtgccgactctcgtccgagttccggggcaacgaagtggatgaaagctggaccgacgccctggccaaaggcaagagcaagtacgccgaa
R A D F L R Q F P G N E V D E S W T D A L A K G K S K Y A E
gccatcgcccgctgcagccggacatcatccgttgcagcagaagctgaccgctcttgaagtcgaaacaggcttgaagatcgccgagatc
A I A R L Q P D I I R C Q Q K L T A L E V E T G L K I A E I
aaggacatcaaccgtcgtatgcatggtgagggccaagggcccgccggcggaagaaagagatggttggaagccaacctgcgtctgtgtgatc
K D I N R R M S I G E A K A R R A K K E M V E A N L R L V I
tccatcgccaagaagtacaccaacctgtgacctgctgacacctgatccaggaagcgaacatcggttgatgaaagccgttgacaag
S I A K K Y T N R G L Q F L D L I Q E G N I G L M K A V D K
ttcgaataccgtcgcggtacaaagtctcgaactatgccacctgtggtatccgtcagcgcgcatcactgcctgcgcatcgccgcatcaggccgc
F E Y R G Y R K F S T Y A T W W I R Q A I T R S I A D Q A R
accattcgtattccggtgcacatgatcgacgatcaacaagctcaaccgtatttccggcagatgctgcaggaaatgggtcggaaccg
T I R I P V H M I E T I N K L N R I S R Q M L Q E M G R E P
actccgaagagctggcggaacgcatgggaatgctgaggaagaatccgcaagtgatgaaatcgccaagagccgatccatccatgaa
T P E E L G E R M E M P E D K I R K V L K I A K E P I S M E
acccgcatcggtgatgacgaagatcccatctggcgacttcatcgaagactcgaccatgcagtcgccaatcgatgtgccacagttgag
T P I G D D E D S H L G D F I E D S T M Q S P I D V A T V E
agcctgaagggaagcactcgcgaagtactctccggcctcactgccgtgaagccaaggtactgcgcatcgcttcggcatcgacatgaat
S L K E A T R E V L S G L T A R E A K V L R M R F G I D M N
accgaccataccctcgaggaagtcggtgaagcagttcgtatgacccgtgagcgatccgcagatcggaagccaaggcgctgcgcaagctg
T D H T L E E V G K Q F D V T R E R I R Q I E A K A L R K L
cgccaccgacgcgaagcagcatctgcgtccttctcctcgacagtaa
R H P T R S E H L R S F L D E *

图2 M18 菌株中 *rpoD* 核苷酸测序结果及其推测的氨基酸顺序

Fig.2 Nucleotide sequence of M18 strain and the deduced amino acid sequence

The sequence sites of *rpoD* which are different from CHAO strain are boldface and the putative ribosome-binding site (RBS) is underlined.

2.2 PCA 和 PIt 的分子结构鉴定

从 M18 的菌悬液中 ,分离纯化了两种不同类型的抗真菌物质 ,经元素分析 ,紫外、红外扫描 ,GC-MS 联用和核磁共振氢谱和碳谱鉴定 ,确定了这两种物质的分子结构分别为吩噻-1-羧酸(PCA ,吩噻类抗生素)和藤黄绿菌素(PIt ,聚酮类抗生素) 。PCA 和 PI t 的紫外吸收和 GC-MS 质谱特征 ,分别见图 3 和图 4。

2.3 M18 菌株中 *rpoD* 基因扩增对于 PCA 和 PI t 生物合成的影响

以 M18 野生型、M18 带有 pME6032 为对照 ,M18(pMERpoD)在菌体浓度 $OD_{600} = 0.5$

时用 IPTG 诱导 ,每隔 2h 测 OD_{600} 值、PCA 和 Plt 产量。结果见图 5。

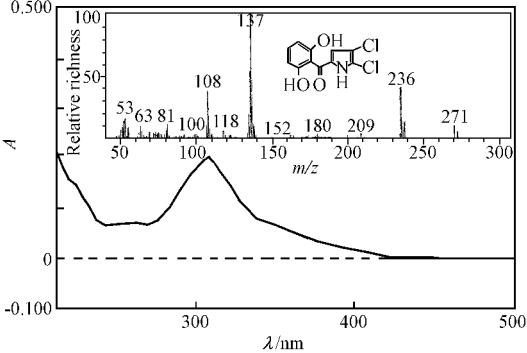
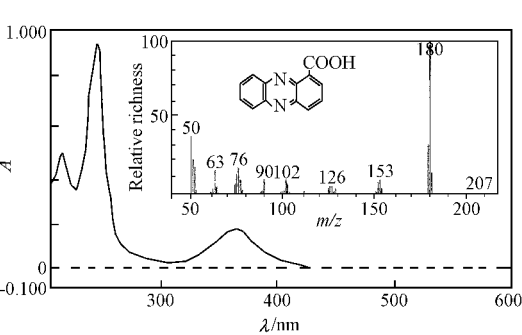


图 3 PCA 的紫外吸收和 GC-MS 质谱特征

Fig.3 The UV spectra and GC-MS spectral characteristics of PCA

图 4 Plt 的紫外和 GC-MS 质谱特征

Fig.4 The UV spectra and GC-MS spectral characteristics of Plt

结果表明 ,在 M18 野生型和 M18 带有 pME6032 的对照中 ,Plt 在 PPM 培养基中的积累始于培养后的 18h ,在 25h 后 ,Plt 在达到最大值约为 12.5 μ g/mL。经 pMERpoD 转化的 M18 ,未经 IPTG 诱导 ,其 Plt 在培养液中的积累过程与对照类似 ,经 IPTG 诱导后 ,Plt 在培养基中的积累始于培养后的 10h ,25h 后在培养液中的积累量达到最大值约为 75 μ g/mL。与对照相比 ,Plt 的积累时间提前 8h ,积累量增加 6 倍。在 M18 野生型、M18 带有 pME6032 以及 M18 带有 pMERpoIX (未经 IPTG 诱导)的 3 种培养液中 ,PCA 的生物合成都始于培养后的 6h ,但是 ,带有 pMERPOD 的 M18 经 IPTG 诱导 ,PCA 的累积始于培养后的 2h ,经 24h 培养后 ,PCA 的积累量达到了 100 μ g/mL ,与野生型 M18、M18 带有 pME6032 (不携带 *rpoD*) 相比 ,PCA 的积累时间提前 4 h ,产量提高 1 倍。(M18 带有 pMERpoD 的培养液中 ,不经 IPTG 诱导其生物合成 Plt 和 PCA 的动力学特征与野生型和 M18 带有 pME6032 相同 ,结果未显示)。

实验结果表明经 pMERpoD 转化 M18 ,由于 *rpoD* 基因经质粒扩增和 IPTG 诱导 ,能改变 PCA 和 Plt 生物合成的动力学 ,使 PCA 和 Plt 的积累时间分别提前 4h 和 8h ,并同时使 PCA 和 Plt 产量分别提高 1 倍和 6 倍。说明在 M18 菌株中 ,质粒携带的 *rpoD* 基因 ,经 IPTG 诱导 ,使 *rpoD* 基因的表达量增加 ,可能以某种间接或直接的方式促进 PCA 和 Plt 的生物合成。

3 讨论

PCA 和 Plt 都是生防菌株 M18 的次生代谢物 ,通常是在对数期后期至平稳期前期这一段时间内开始产生 PCA 和 Plt ,营养条件的限制及高细胞密度是这一时期典型的特征 ,符合革兰氏阴性细菌分泌次生代谢物的一般规律^[8]。荧光假单胞菌中抗生素的产生受到复杂的、由众多元件组成的级联放大的调控系统控制 ,*rpoD*、*rpoS*、*gacA*、*apdA* 和 *rsmA* 都可能是其中的组成部分^[9,10] ,而 σ 因子作为所有原核基因转录的必需因子 ,应该是这个级联放大系统中的一个重要环节。

在大肠杆菌中至少有 3 个 σ 因子(σ^{70} 、 σ^{38} 和 σ^{32})参与平稳期时的基因表达^[11]。在大肠

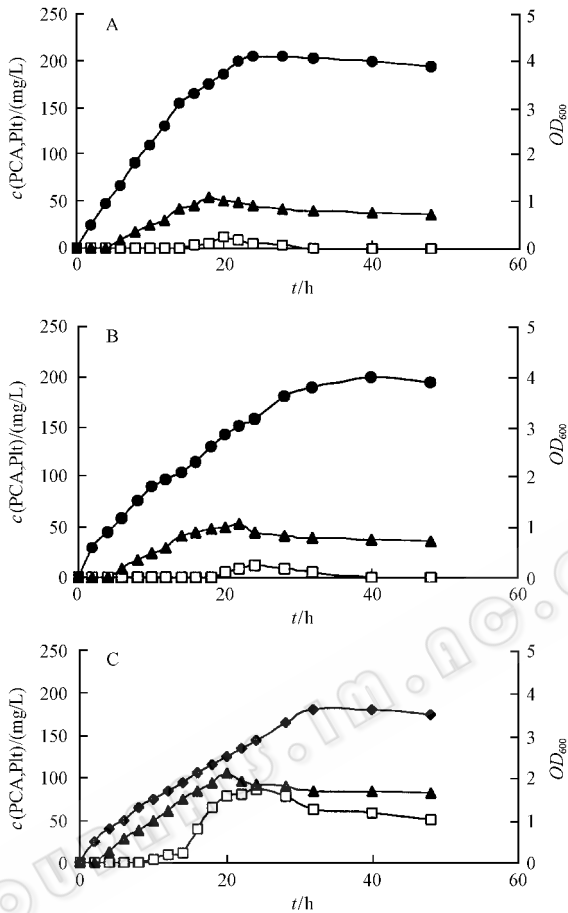


图 5 RpoD 对于 PCA 和 Plt 在 M18 菌株中生物合成的影响

Fig.5 Influence of RpoD expression on PCA and Plt production in M18 strain

A. M18 wild type ; B. M18 with plasmid pME6032 ; C. M18 with the-*rpoD* P_{lac} plasmid pMERpoD ;

—◆—Strains' growth was measured as OD₆₀₀ ; —▲—PCA production ; —□—Plt production.

杆菌和荧光假单胞菌中，细胞内的 σ^{70} 和 σ^{38} 比值受到精密的调控。 σ^{38} 与持家因子 σ^{70} 竞争性地与 RNA 聚合酶结合，随着细菌进入平稳期， σ^{38}/σ^{70} 的比值增加，使一些依赖于 σ^{38} 因子的基因进行区别性地表达^[12]。在 *P. fluorescens* Pf5 菌株中，*rpoS* 基因(编码 σ^{38} 因子)的失活使 Plt 和 2,4-二乙酰藤黄酚(Phl)产量有所提高，同时另一种抗生素硝吡咯菌素(Pm)却停止合成^[13]。在 *P. fluorescens* CHAO 菌株中，*rpoD* 基因的过表达也会使 Plt 和 Phl 的产量提高^[6]。在本次实验中，即在 M18 菌株中，*rpoD* 的过量表达，同时增强 Plt 和 PCA 两类不同抗生素的生物合成。*rpoD* 基因在 CHAO 菌株和 M18 菌株中所起的作用是不可缺少的，与 CHAO 菌株中的情况一样，在 M18 菌株中，也无法得到 *rpoD* 基因失活的突变株。

根据以上结果，可以大致推论：荧光假单胞菌中 PCA、Plt、Phl 和 Pm 等抗生素的产生受到 RpoS/RpoD 直接或间接的调控。在 Pf5 菌株中由于 Pm 结构基因的转录可能依赖于 σ^{38} 因子，因此当 *rpoS* 基因失活时，Pm 的合成就停止了。在 Pf5、M18、CHAO 菌株中，*rpoS*

的失活或 *rpoD* 的过表达都会使 Plt、Phl 和 PCA 的产量提高。可能的解释有两种 (1) 一些编码 Plt、Phl、PCA 的生物合成阻遏蛋白的基因, 是依赖 σ^{38} 因子进行转录的 (2) σ^{38} 因子作为一种负调节物与这些抗生素合成所必需的 σ 因子 (如 σ^{70}) 竞争结合 RNA 聚合酶。 σ^{70} 因子的过表达或者 σ^{38} 因子的缺乏, 都有可能提高那些由依赖 σ^{70} 因子识别的、由弱启动子所驱动的基因的表达。

到目前为止, 对 RpoS/RpoD 调控 PCA、Phl、Plt 和 Pm 等的具体机制的了解还不清楚。最近报道, 在 *P. aeruginosa* PAO1 菌株中, *rpoS* 的失活使 5-甲基-1-羟基吩嗪 (PYO, pyocyanin, 绿脓菌素, 吩嗪类衍生物) 的产量增加、产生时间提前。其原因归咎于 σ^{38} 因子可以抑制 *rhlI* 基因 (RhlI 酶负责合成 C_4 -HSL, 它是一种种群感应信号分子, quorum-sensing signal) 的表达, 虽然这种抑制作用相对较弱, 但由于 C_4 -HSL 在指数期前期时的含量很低, *rhlI* 在表达水平上细小的变化, 都会大大影响 C_4 -HSL 的水平。随着 C_4 -HSL 出现时刻的前移和水平的提高, 绿脓菌素的产生发生相应变化^[14]。这个结果启示: 在荧光假单胞菌 M18 中同样存在着许多结构类似的种群感应信号分子 (如 AHL, 高丝氨酸内脂类)。PCA 和 Plt 的生物合成可能受到两个不同的信号分子的调控。 σ^{38}/σ^{70} 相对含量的变化对不同的信号分子造成的影响程度不同, 最后导致 PCA、Plt 在生物合成的动力学上的变化也不尽相同, 正如本次实验所得的结果那样: PCA 的积累时间提前 4 h, 产量提高 1 倍, Plt 的积累时间提前 8 h, 积累量增加 6 倍。当然, 上述的假设还需要进一步的实验验证。

参 考 文 献

- [1] Burgess R P, Travers A A, Dunn J J, *et al.* Factor stimulating transcription by RNA polymerase. *Nature*, 1969, **221**: 43 ~ 46.
- [2] Richard R B, Larry A. How sigma docks to RNA polymerase and what sigma does. *Current Opinion in Microbiol*, 2001, **4** (2): 126 ~ 131.
- [3] Thomashow L S. Biological control of plant root pathogens. *Current Opinion in Biotechnology*, 1996, **7**: 343 ~ 347.
- [4] 许煜泉, 唐玮宁, 郑有丽, 等. 筛选假单胞菌株 M18 防治大棚黄瓜枯萎病害. 上海交通大学学报, 1999, **33** (2): 210 ~ 213.
- [5] 祝新德、冯镇泰、许煜泉, 等. 荧光假单胞菌 M18 防治甜瓜蔓枯病害. 上海交通大学学报, 2001, **35** (7): 1062 ~ 1065.
- [6] Schnider U, Keel C, Blumer C, *et al.* Amplification of the housekeeping sigma factor in *Pseudomonas fluorescens* CHA0 enhances antibiotic production and improves biocontrol abilities. *Journal of Bacteriology*, 1995, **177**: 5378 ~ 5392.
- [7] J. 萨姆布鲁克, E. F. 弗里奇, T. 曼尼阿蒂斯. 分子克隆实验指南. 第二版. 北京: 科学出版社, 1999.
- [8] Haas D, Blumer C, Keel C. Biocontrol ability of fluorescent pseudomonads genetically dissected: importance of positive feedback regulation. *Current Opinion in Biotechnology*, 2000, **11**: 290 ~ 297.
- [9] Corbell N A, Loper J E. The two-component regulators GacS and GacA influence accumulation of the stationary-phase sigma factor sigma S and the stress response in *Pseudomonas fluorescens* Pf-5. *Journal of Bacteriology*, 1995, **177** (21): 6230 ~ 6236.
- [10] 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.
- [11] Williams M D, Ouyang T X, Flickinger M C. Starvation-induced expression of SspA and SspB: the effects of a null mutation in *sspA* on *Escherichia coli* protein synthesis and survival during growth and prolonged starvation. *Molecular Microbiology*, 1994, **11**: 1029 ~ 1043.

- [12] Fujita M ,Tanaka K ,Takahashi H , *et al.* Transcription of the principal sigma-factor genes , *rpoD* and *rpoS* , in *Pseudomonas aeruginosa* is controlled according to the growth phase. *Molecular Microbiology* ,1994 ,**13** :1071 ~ 1077.
- [13] Samiguet A , Kraus J ,Henkels M D , *et al.* The sigma factor sigma S affects antibiotic production and biological control activity of *Pseudomonas fluorescens* Pf-5. *Proc Natl Acad Sci USA* ,1995 ,**92** :12255 ~ 12259.
- [14] Whiteley M ,Parsek M R ,Greenberg E P. Regulation of quorum sensing by RpoS in *Pseudomonas aeruginosa* . *Journal of Bacteriology* , 2000 ,**182** (15) :4356 ~ 4360.

Gene Cloning of *rpoD* and its Impact on Biosynthesis of Antibiotics in *Fluorescent pseudomonas* M18

Zhu Donghua Xu Wangjie Geng Haifeng Zhang Xuehong Xu Yuquan*

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

Abstract : *Fluorescent pseudomonas* M18 , one of plant growth promoting rhizobacteria which can inhibit growth of several phytopathogenes , produces several secondary metabolites including antibiotics phenazine-1-carboxylic acid (PCA) and pyoluteorin (Plt). The *rpoD* gene encoding the housekeeping sigma factor σ^{70} was cloned and sequenced from M18. Through sequencing and homogeneous comparison , the deduced RpoD amino acid sequence between M18 strain and *Pseudomonas fluorescens* CHAO shows 100% identity. It indicates that *rpoD* gene is very conserved in different members of fluorescent pseudomonads. The *rpoD* gene was placed downstream of the constitutive P_{lac} promoter in the shuttle vector pME6032 between *E. coli* and *Pseudomonas fluorescens* and the recombinant plasmid was introduced into M18. It was found that the time of both PCA and Plt began to accumulate was 4 and 8 hours earlier and the yield of these antibiotics was increased one and six times more respectively in M18 in comparison with the control.

Key words : *Pseudomonas fluorescens* M18 , Phenazine-1-carboxylic acid , Pyoluteorin , *rpoD*

Foundation item :The 10th Five Years Programs of Chinese National Science and Technology Development (2001BA308A02-14)

* Corresponding author. Tel 86-21-54743347 ,Fax 86-21-54743348 ,E-mail : xuyuquan@hotmail.com

Received date 08-29-2002

《微生物学报》综述文章投稿说明

近一时期 ,我刊一些综述类来稿存在一些问题 ,主要表现为 :篇幅庞大 ,罗列文献 ,内容空泛 ,缺乏观点。为使此栏目更加新颖并更具可读性 ,特提出几点说明 ,欢迎大家根据要求 ,踊跃投稿 ,并提出你们对该栏目的建议和想法。

1. 本刊主要刊登微型综述 (Mini review) ,来稿字数最好控制在 5000 字以内 (不包括参考文献)。
2. 综述的选题要有新意 ,对读者及同行确有一定的启发作用和参考价值。
3. 参考文献应控制在 40 篇以内 ,近 3 年发表的文献不少于 10 篇。
4. 应结合文献扼要评述国内外学者在本领域的研究进展 ,不要泛泛罗列文献 ,只述不评。
5. 应结合自己的研究工作 ,就该研究领域存在的问题和解决的途径提出自己的观点。
6. 欢迎投送“能够反映国际研究热点、对学科发展有指导意义”的述评类文章。