

假单胞菌株 M18 *gacA* 基因对 BHL 和 HHL 合成正调控 及对 PCA 合成负调控无相关性

汤湘雍, 严安, 黄显清, 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 经初步鉴定, 假单胞菌株 (*Pseudomonas* sp.) M18 至少能产生 5 种 N-酰基高丝氨酸内酯类 (N-acyl-homoserine lactones, AHLs) 信号分子, 它们是: N-丁酰高丝氨酸内酯 (N-butyl-L-homoserine lactone, C4-HSL, BHL), N-己酰高丝氨酸内酯 (N-hexanoyl-L-homoserine lactone, C6-HSL, HHL), N-3-氧-己酰高丝氨酸内酯 [N-(3-oxohexanoyl)-L-homoserine lactone, 3-Oxo-C6-HSL, OHHL], N-3-氧-辛酰高丝氨酸内酯 [N-(3-oxooctanoyl)-L-homoserine lactone, 3-Oxo-C8-HSL, OOHL] 和 N-3-氧-癸酰高丝氨酸内酯 [N-(3-oxodecanoyl)-L-homoserine lactone, 3-Oxo-C10-HSL, ODHL]。在 *gacA* 突变菌株 M18G 中, 信号分子的积累量明显减少, 且只能检测出其中的 4 种; 同时, 吩嗪-1-羧酸 (Phenazine-1-carboxylic acid, PCA) 的合成量比野生株 M18 提高了 2 倍左右。在 M18 菌株中, 基因 *rhlI* 的编码产物参与 BHL 和 HHL 的合成。构建 *rhlI*'-'*lacZ* 翻译融合表达质粒 pMEIZ, 分别导入野生株 M18 和突变株 M18G, 突变株 M18G 的半乳糖苷酶活性比野生株 M18 下降约 40%, 表明 *GacA* 对基因 *rhlI* 的表达具有正调控作用。但是, 在野生株 M18 和突变株 M18G 的发酵液中, 分别或同时添加过量的外源 BHL 和 HHL 对 PCA 合成的影响不显著, 表明在突变株 M18G 中, PCA 合成量的增加与 BHL 和 HHL 合成量的减少没有明显的相关性。

关键词: 假单胞菌株 M18; *gacA*; 吩嗪-1-羧酸; 高丝氨酸内酯类信号分子

中图分类号: Q93 **文献标识码**: A **文章编号**: 0001-6209(2006)03-0478-04

在大多革兰氏阴性细菌中, 很多基因的表达受到菌体密度的调节, 称为菌群传感 (Quorum sensing)^[1]。菌群传感参与调控细菌多种生命活动, 如根瘤菌与植物共生、蓝细菌中异形胞分化、芽胞杆菌中感受态与芽胞形成、根癌农杆菌中 Ti 质粒接合转移、病原细菌胞外酶与毒素产生、生物膜 (Biofilm) 形成、菌体发光、色素产生、抗生素形成^[2]等。细菌通过分泌信号分子监测菌群密度。费氏弧菌中菌群传感是由 LuxI/LuxR 介导完成的, LuxI 蛋白参与信号分子的合成, 信号分子与其受体 LuxR 结合后, 经信号级联传导, 调控一系列基因的表达。在假单胞菌中也存在着类似系统, 如 LasI/LasR 和 RhlI/RhlR, 其中 RhlI 是参与合成 N-丁酰高丝氨酸内酯 (N-butyl-L-homoserine lactone, C4-HSL, BHL) 和 N-己酰高丝氨酸内酯 (N-hexanoyl-L-homoserine lactone, C6-HSL, HHL) 的蛋白因子^[3]。

在革兰氏阴性细菌中, 主要的信号分子为 N-酰基高丝氨酸内酯类 (N-acyl-homoserine lactones, AHLs)。各种信号分子的区别在于侧链的长短、饱和度及 3 位碳的取代基。在铜绿假单胞菌中, 已发现 BHL, HHL 和 N-(3-氧-十二酰)高丝氨酸内酯 [N-(3-oxododecanoyl)-L-homoserine lactone, 3-Oxo-C12-HSL, OdDHL] 等多种信号分子^[4]。根癌农杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens* NTL4), 产紫色杆菌 (*Chromobacterium violaceum* CV026) 和大肠杆菌 (*Escherichia coli* pSB401) 是经常使用的 3 种指示菌, 用于检测信号分子的种类和含量。

革兰氏阴性细菌中, 广泛存在着 *GacS/GacA* 全局性二元

调控系统, 与菌群传感相关联^[5]。*GacS* 是一种跨膜传感激酶, 当菌体生长达到一定密度时, 它能接受某种胞外信号 (何种物质迄今未确定^[5]), 使配位因子 *GacA* 磷酸化, *GacA* 被激活后, 在转录或转录后水平上全局性地调控各种细菌生命活动如次生代谢产物合成、蛋白质分泌、菌体移动及色素的生成等^[6,7]。

假单胞菌株 (*Pseudomonas* sp.) M18 从上海郊区甜瓜根际土壤中分离获得, 是一株植物根际促生菌^[8]。本文鉴定分析了 M18 菌株中 AHLs 的种类, 研究了基因 *gacA* 对 AHLs 类信号分子合成以及对次生代谢物吩嗪-1-羧酸 (Phenazine-1-carboxylic acid, PCA) 生物合成的调控作用, 研究结果表明 *GacA* 可能通过多条途径调控 PCA 的生物合成。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒: 本试验所用菌株和质粒见表 1。

1.1.2 培养基和培养条件: 大肠杆菌培养基采用 Luria-Bertani (LB)^[9] 37℃ 振荡培养。根癌农杆菌 (*A. tumefaciens*) NTL4 和产紫色杆菌 (*C. violaceum*) CV026 的培养基采用 LB, 28℃ 振荡培养。假单胞菌的培养基为 PPM 和 KMB^[8] 28℃ 振荡培养。产紫色杆菌 CV026 层析板培养基采用 LB 软胶, 根癌农杆菌 NTL4 则采用软胶, 28℃ 培养箱培养。LB 软胶: 每升含胰蛋白胨 10g, 酵母提取物 10g, NaCl 7.7g, 琼脂 8.5g; 软胶: 每升含葡萄糖 2g, 琼脂 8.5g, 相应固体培养基加琼脂 15g。

基金项目: 国家自然科学基金 (30370041)

* 通讯作者。Tel 86-21-54745025; Fax 86-21-54743348; E-mail xuyq@sju.edu.cn

作者简介: 汤湘雍 (1981-), 女, 上海松江人, 硕士研究生, 研究方向为微生物次生代谢的分子调控机制。E-mail tangxiayon@yahoo.com.cn

收稿日期 2005-09-01, 接受日期 2005-10-21, 修回日期 2005-11-14

胰蛋白胨购自 OXOID 公司。抗生素用量(μg/mL):卡那霉素(Km)50, 氯苯青霉素(Ap)100, 庆大霉素(Gm)40, 壮观霉素(Sp)100, 四环素(Tc)25(大肠杆菌)100(假单胞菌)。液体培

养时 摇床转速为 180r/min(大肠杆菌)或 220r/min(假单胞菌, 根癌农杆菌和产紫色杆菌)。

表 1 菌株和质粒

Table 1 Strains and plasmids		Source
Strains or plasmids	Characteristics	
Strains		
<i>Pseudomonas</i> sp. M18	Rhizosphere isolated, PCA ⁺ Pli ⁺ Ap ^r Sp ^r	This Lab
<i>P.</i> sp. M18G	PCA ⁺ Pli ⁻ Ap ^r Sp ^r Km ^r , <i>gacA</i>	This Lab
<i>P. aeruginosa</i> PAO1	Wild type	Dieter Haas
<i>E. coli</i> DH5α	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 (rk⁻ mk⁺) supE44 relA1</i>	This Lab
<i>A. tumefaciens</i> NTL4	Signal molecular reporter, Gm ^r	Dieter Haas
<i>C. violaceum</i> CV026	Signal molecular reporter, Km ^r	Dieter Haas
Plasmids		
pME6015	Pvs1-p15A <i>E. coli</i> - <i>pseudomonas</i> shuttle vector for translation <i>lacZ</i> fusions and promoter probing, Tc ^r	Dieter Haas
pMEIZ	898bp <i>EcoRI</i> - <i>PstI</i> PCR amplified fragment containing 523bp DNA sequence upstream of transcriptional start site of <i>rhlI</i> cloned into pME6015, Tc ^r	This study
pSKrhlI	pBluescript SK with 1.9kb <i>Xba</i> I and <i>Hin</i> dIII fragment carrying <i>rhlI</i> , Ap ^r	This Lab

1.1.3 酶和试剂:Pyrobest DNA 聚合酶购自 TaKaRa 公司;各种限制性内切酶、T4 DNA 连接酶、RNA 酶及 DNA 分子量标记物购自 MBI 公司。X-Gal 购自上海 Sangon 公司。其它生化试剂级别均为分析纯。薄层层析(TLC)板 C18-F254s 购自 Merck 公司,BHL、HHL 标样购自 Fluka 公司。

1.2 DNA 常规操作技术

质粒抽提、酶切、连接、转化等操作参照文献 9 进行。

1.3 信号分子提取和薄层层析板展层及显色

信号分子提取和薄层层析及显色参照文献 4 进行。

1.4 PCR 反应

质粒 pSKrhlI 为 pBluescript SK 的衍生物,含有 M18 菌株的 *rhlI* 基因的完整片段。根据 *rhlI* 基因及其上游区域核苷酸序列设计 2 条引物。引物 1:5'-AGAGAGGAATTCAC AATTGCTCAGCGTGCTT-3'(划线序列为 *Eco*R I 酶切位点);引物 2:5'-CTCTCTCTGCAGTTGCAGGCTGGACCAGAATA-3'(划线序列为 *Pst* I 酶切位点),由上海英骏生物技术有限公司合成。以 pSKrhlI 质粒为模板,进行 PCR 反应。PCR 反应体系(50μL):10×PCR Buffer 5μL,dNTP(2.5mmol/L)4μL,引物 1 和引物 2 20pmol/μL 各 1μL,模板 DNA 0.2μL,采用 Pyrobest 酶(5U/μL)0.2μL,重蒸水 38.6μL。

1.5 *rhlI*'-'*lacZ* 翻译融合报告质粒的构建

用引物 1、2 从质粒 pSKrhlI 上 PCR 扩增出长度为 898bp 的片段(图 1-A),含有基因 *rhlI* 起始密码子 ATG 上游的 523bp(包括 *rhlI* 完整启动子区域和 RBS 结合区域等)以及下游 375bp 经 *Eco*R I 和 *Pst* I 酶切后克隆到载体 pME6015,得到带有 *rhlI*'-'*lacZ* 翻译融合的表达质粒 pMEIZ(图 1-B)。

1.6 β-半乳糖苷酶活性测定

携带 *rhlI*'-'*lacZ* 翻译融合表达质粒的假单胞菌野生型

菌株 M18 和 *gacA* 突变菌株 M18G 培养过夜,按 1% 的接种量分别接种于装有 50mL KMB 和 50mL PPM 培养基的三角瓶中(容积 250mL),28℃、220r/min 震荡培养。在不同培养时间点,取样测定 β-半乳糖苷酶活性,测定方法参照文献 9]。

1.7 生长曲线及抗生素产量测定

具体操作参照文献 10,11]菌株 M18 和突变株 M18G 在各装有 50mL KMB 或 PPM 培养基的 250mL 三角瓶中发酵,24h 后分别或同时加入 BHL(纯度终浓度 1×10⁻⁵ mol/L),HHL(纯度终浓度 1×10⁻⁶ mol/L),对照不加 BHL、HHL。每隔 12h 取样,测定 OD₆₀₀ 值及 PCA 产量 5 次重复,取平均值。

2 结果

2.1 假单胞菌株 M18 中 AHL 类信号分子的鉴定

在图 2-A 中,第 1 道为标样,上、下两点分别是 BHL(1×10⁻³ mol/L)和 HHL(1×10⁻⁵ mol/L)。在 PPM 和 KMB 培养基中,菌株 M18 产生的信号分子分别见 4、5 道,BHL 和 HHL 的合成量估计为 2×10⁻⁵ mol/L 和 4×10⁻⁶ mol/L。因为 *C. violaceum* CV026 对 3-羟基-乙酰高丝氨酸内酯(3-hydroxy-AHLs)不敏感^{12]},且 3 位有取代基的 AHLs 迁移率大于无取代基的 AHLs^[4],因此推测位于中间的斑点是 N-3-氧-乙酰高丝氨酸内酯(N-(3-oxohexanoyl)-L-homoserine lactone,3-Oxo-C6-HSL,OHHL)。A. tumefaciens NTL4 能鉴定 C4-C12 的 3-Oxo-AHLs 和 3-hydroxy-AHLs 以及 C6-C12 的无取代基的 AHLs。其中 3-Oxo-AHLs 和 3-hydroxy-AHLs 的 R_f 值相同,但 3-Oxo-AHLs 显色时拖尾,3-hydroxy-AHLs 及侧链 3 位碳上无取代基的 AHLs 显色时不拖尾^[4]。图 2-B 中 5、6 道分别是菌株 M18 在 KMB 和 PPM 培养基中的信号分子,以 *P. aeruginosa* PAO1 的信号分子^[4]为参照,表明菌株 M18 中有 2 种 AHLs,从下往上

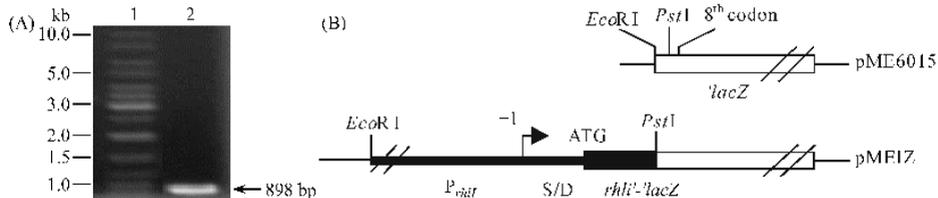


图 1 构建 *rhlI*'-'*lacZ* 翻译融合表达质粒

Fig.1 Construction of expression plasmid of translational fusion *rhlI*'-'*lacZ*. A: PCR products for constructing *rhlI*'-'*lacZ* fusion. 1. Molecular marker; 2. PCR fragments of 898bp. B: Physical map of translational *rhlI*'-'*lacZ* fusion constructs. SD, putative Shine Dalgarno sequence. *rhlI* sequences are shown by heavy black lines, *lacZ* by white boxes. P_{rhlI}, the promoter of the *rhlI* gene.

依次是：N-3-氧-癸酰高丝氨酸内酯[N(3-oxodecanoyl)-L-homoserine lactone 3-Oxo-C10-HSL ,ODHL]和 N-3-氧-辛酰高丝氨酸内酯[N(3-oxooctanoyl)-L-homoserine lactone ,3-Oxo-C8-HSL ,OOHL]。在本实验条件下,可以初步确定菌株 M18 中能产生 5 种信号分子。

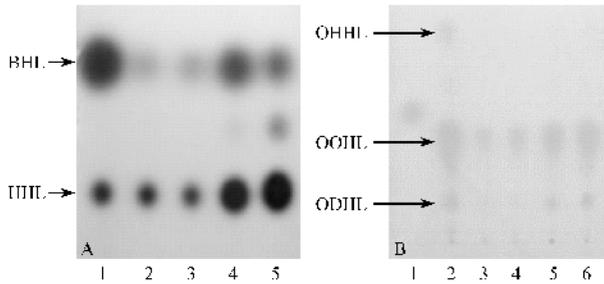


图 2 信号分子的薄层层析图

Fig.2 The TLC profile of AHLs. A : Samples were visualized with *C. violaceum* CV026 reporter strain. 1. BHL and HHL ; 2,5. AHLs from M18G and M18 respectively in KMB culture ; 3,4. AHLs from M18G and M18 respectively in PPM culture. B : Samples were visualized with *P. aeruginosa* PAO1 ; 1. BHL and HHL ; 2. AHLs from *P. aeruginosa* PAO1 ; 3,5. AHLs from M18G and M18 respectively in KMB culture ; 4,6. AHLs from M18G and M18 respectively in PPM culture.

2.2 突变菌株 M18G 中 AHL 类信号分子的鉴定

突变株 M18G 的构建见文献 [8]。在 KMB 和 PPM 培养基中,突变株 M18G 产生的信号分子见图 2-A 第 2、3 道。与标样相比,突变株 M18G 中,BHL 和 HHL 的合成量估计为 2×10^{-6} mol/L 和 4×10^{-7} mol/L,但检测不出 OHHL。图 2-B 第 3、4 道分别是突变株 M18G 在 KMB 和 PPM 培养基中的信号分子。与 *P. aeruginosa* PAO1 相比,突变株 M18G 中只能检测出 2 种信号分子,从下往上依次是 ODHL、OOHL。这样,突变株 M18G 中共检测出 4 种信号分子,但与野生株 M18 相比积累量明显下降。

2.3 *gacA* 基因对 *rhlI*'-'*lacZ* 翻译融合表达的调控作用

为了阐明 GacA 正调控信号分子的作用机理,构建 *rhlI*'-'*lacZ* 翻译融合表达质粒 pMEIZ,分别导入野生型菌株 M18 和突变菌株 M18G,测定 β -半乳糖苷酶活性,分析 *gacA* 基因的突变对 *rhlI*'-'*lacZ* 翻译融合表达的影响。在 KMB 和 PPM 培养基中,菌株 M18(pMEIZ)和 M18G(pMEIZ)的生长曲线见图 3-A,两个菌株的生长情况(OD_{600})无明显差异。然而整个生长周期中菌株 M18(pMEIZ)的 *rhlI*'-'*lacZ* 翻译融合表达水平无论在 KMB 还是在 PPM 培养基中都高于菌株 M18G(pMEIZ) (图 3-B)。6h、12h、18h、24h、30h 和 36h 的 β -半乳糖苷酶活性(Miller units)测定结果显示,在 KMB 和 PPM 培养基中,突变株 M18G(pMEIZ)的 β -半乳糖苷酶活性仅为野生株 M18(pMEIZ)的一半左右表明 *gacA* 基因的突变使 *rhlI*'-'*lacZ* 翻译融合表达水平下降,说明 GacA 在基因表达水平上正调控 *rhlI* 基因的表达。

2.4 添加过量外源 BHL 和 HHL 对突变株 M18G 合成 PCA 的影响

在 KMB 和 PPM 培养基中,突变株 M18G 发酵培养 24h 后,分别加入 BHL 和 HHL,检测外源信号分子对 PCA 产量的影响。分别或同时添加 BHL、HHL 后,与不添加信号分子相比,突变株 M18G 的生长无显著变化,PCA 的产量也无显著变化。实验结果说明在突变株 M18G 中,添加过量 BHL 和 HHL 对 PCA 的合成没有显著影响。

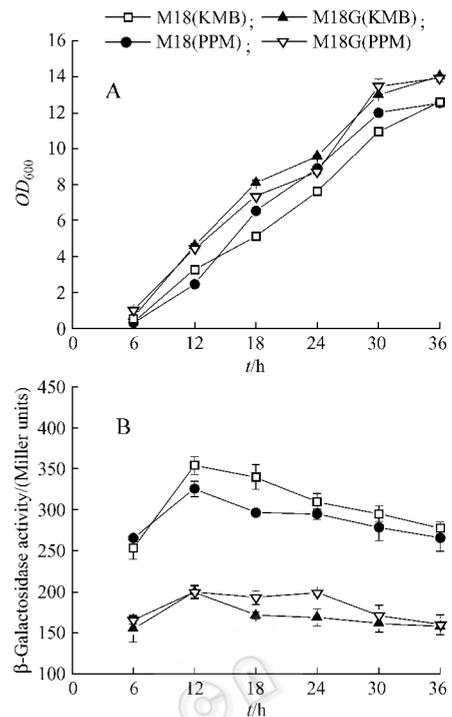


图 3 *gacA* 对 *rhlI*'-'*lacZ* 翻译融合表达的影响

Fig.3 Influence of *gacA* on translational *rhlI*'-'*lacZ* fusion expression.

A. Strains' growth was measured as OD_{600} ; B. β -Galactosidase activity.

2.5 添加过量外源 BHL 和 HHL 对野生株 M18 合成 PCA 的影响

在 KMB 和 PPM 培养基中,菌株 M18 发酵培养 24h 后,分别加入 BHL、HHL、BHL 和 HHL,检测外源信号分子对 PCA 产量的影响。分别或同时添加 BHL、HHL 后,与不添加信号分子相比,野生株 M18 的生长无显著变化,菌株 M18 在分别或同时添加 BHL、HHL 后 PCA 的产量也无明显变化。实验结果表明在野生型菌株 M18 中,添加过量的 BHL 和 HHL 对 PCA 合成无明显作用。

3 讨论

无论在 KMB 还是 PPM 培养基中,假单胞菌株 M18 都能产生至少 5 种 AHLs :BHL、HHL、OHHL、OOHL 和 ODHL。在突变株 M18G 中,能检测出 4 种 AHLs :BHL、HHL、OOHL 和 ODHL,突变株 M18G 中的 4 种信号分子合成量较少,表明 *gacA* 基因对信号分子的合成起着正调控的作用。但是,*gacA* 基因突变后,信号分子并没有完全消失,说明信号分子合成并不完全依赖于 GacA 的调控作用。本研究结果还显示,*gacA* 基因编码产物对 *rhlI*'-'*lacZ* 翻译融合表达具有促进作用,翻译融合构建包括翻译水平和转录水平两个层次,*gacA* 基因可能在翻译水平、转录水平或同时在这两种水平上正调控 *rhlI* 基因的表达。Pessi 等 [13] 在 *P. aeruginosa* PAO1 及其 *gacA* 突变株 PAO6281 中证明 GacA 最终在转录水平上正调控 *rhlI* 基因的表达,菌株 M18 中的 *gacA* 基因对 *rhlI* 基因的调控水平有待进一步研究。

突变株 M18G 中的信号分子 BHL 和 HHL 的合成量与野生株 M18 相比明显减少,是否可假设 GacA 对 PCA 合成的负调控作用 [6] 是通过调节 BHL 和 HHL 的表达量实现的?但是,添加过量外源 BHL 和 HHL 的实验证明,无论在 KMB 还是 PPM 培养基中,野生株 M18 和突变株 M18G 中的 PCA 产量

都没有明显变化,表明上述假设不成立。据文献报道,AHLs 通常在 1×10^{-7} mol/L 的浓度激活诱导(或抑制)相关靶基因的转录^[14]。在菌群传感级联放大系统中,PCA 合成基因簇主要受到 *rhlI* 基因的正调控^[15],实验结果表明,突变株 M18G 中的 BHL 和 HHL 的量有一定程度的降低,但可能已经超过开启 PCA 合成基因簇表达所需要的阈值,因此 PCA 能够正常合成。由于 *GacA* 对 *rhlR* 的转录有正调控作用^[16],突变株 M18G 中 *RhlR* 表达量减少,鉴于“短板效应”,过量添加的外源 BHL 和 HHL 不能结合到 *RhlR* 上,从而具有调控活性的 BHL-*RhlR* 或 HHL-*RhlR* 复合物总量并没有增加,因此无法过量合成 PCA。野生株 M18 中 *RhlI* 和 *RhlR* 表达量都处在正常水平,因此过量加入 BHL 和 HHL 也无法过量合成 PCA。通过以上实验和分析可以得出推测,假单胞菌株 M18 中 *gacA* 基因对 BHL 和 HHL 合成的正调控作用及其对 PCA 合成的负调控作用之间没有明显的相关性;菌株 M18 中 *GacA* 对 PCA 合成的负调控作用,可能是直接或通过非 AHLs 类中间调节因子间接地作用于 PCA 合成基因簇来实现的。

参 考 文 献

[1] Miller MB, Bassler BL. Quorum sensing in bacteria. *Annu Rev Microbiol*, 2001, **55**: 165 - 199.
 [2] 周 玥,刘小锦,朱晨光,等. 细菌中群体感应调节系统. *微生物学报*, 2004, **44**(1): 122 - 126.
 [3] Jiang Y, Camara M, Chhabra SR, et al. In vitro biosynthesis of the *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing signal molecule N-butanoyl-L-homoserine lactone. *Mol Microbiol*, 1998, **28**(1): 193 - 203.
 [4] Shaw PD, Ping G, Daly SL, et al. Detecting and characterizing N-acyl-homoserine lactone signal molecules by thin-layer chromatography. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, **94**: 6036 - 6041.
 [5] Schmidt-Eisenlohr H, Gast A, Baron C. Inactivation of *gacS* does not affect the competitiveness of *Pseudomonas chlororaphis* in the *Arabidopsis thaliana* Rhizosphere. *Appl Environ Microbiol*, 1998,

64 2710 - 2715.
 [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] Chancey ST, Wood DW, Pierson LS. Two-component transcriptional regulation of N-acyl-homoserine lactone production in *Pseudomonas aureofaciens*. *Appl Environ Microbiol*, 1999, **65**: 2294 - 2299.
 [8] 葛宜和,黄显清,王素莲,等. 假单胞 *gacA* 插入突变对藤黄绿脓菌素和吩嗪-1-羧酸合成代谢的差异性调控. *微生物学报*, 2004, **44**(6): 761 - 765.
 [9] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. 分子克隆实验指南. 金冬雁,黎孟枫,等译. 第二版,北京:科学出版社,1999.
 [10] 朱栋华,徐汪节,耿海峰,等. 荧光假单胞菌 M18 *rhoD* 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.
 [11] Huang XQ, Zhu DH, Ge YH, et al. Identification and characterization of *plZ*, a gene involved in the repression of pyoluteorin biosynthesis in *Pseudomonas* sp. M18. *FEMS Microbiol Lett*, 2004, **232**(2): 197 - 202.
 [12] Brelles-Marino G, Bedmar EJ. Detection, purification and characterisation of quorum-sensing signal molecules in plant-associated bacteria. *J Biotechnol*, 2001, **91**: 197 - 209.
 [13] Pessi G, Hass D. Dual control of hydrogen cyanide biosynthesis by the global activator GacA in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *FEMS Microbiol Lett*, 2001, **200**: 73 - 78.
 [14] 许 扬. 铜绿假单胞菌生物被膜密度感应系统. *华西医学*, 2005, **20**(2): 406.
 [15] Whiteley M, Lee KM, Greenberg EP. Identification of genes controlled by quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, **96**: 13904 - 13909.
 [16] Pessi G, Williams F, Hindle Z, et al. The global posttranscriptional regulator RsmA modulates production of virulence determinants and N-acylhomoserine lactones in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Biotechnol*, 2001, **183**: 6676 - 6683.

Negative regulation on PCA production is not correlated with positive regulation on BHL and HHL synthesis by *gacA* in *Pseudomonas* sp. M18

TANG Xiang-yong, YAN An, HUANG Xian-qing, ZHANG Xue-hong, XU Yu-quan*

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

Abstract: At least 5 kinds of N-acyl-homoserine lactones (AHLs) were identified in *Pseudomonas* sp. M18. They were: N-butyryl-L-homoserine lactone (C4-HSL, BHL), N-hexanoyl-L-homoserine lactone (C6-HSL, HHL), N-(3-oxohexanoyl)-L-homoserine lactone (3-Oxo-C6-HSL, OHHL), N-(3-oxooctanoyl)-L-homoserine lactone (3-Oxo-C8-HSL, OOHHL) and N-(3-oxodecanoyl)-L-homoserine lactone (3-Oxo-C10-HSL, ODHL). Compared with the wide-type strain M18, the variety of the AHLs in the *gacA* mutant strain M18G reduced to 4 species with the decreased quantity. But the phenazine-1-carboxylic acid (PCA) production was increased by about 2-fold. The product of *rhlI* plays an important role in synthesizing BHL and HHL. The *rhlI*-*lacZ* translational fusion expression plasmid pMEIZ was constructed in vector pME6015 and then was introduced into the wild-type strain M18 and the *gacA* mutant strain M18G. The galactosidase activity in chromosomal *gacA* disruption mutant was only 60% of that in the wild-type strain M18. This result suggested that *GacA* could regulate the *rhlI* expression positively. There was no influence on PCA production by adding exogenous BHL and HHL and both together to the culture of strains M18 and M18G. This result suggested that there was no relation between *GacA*'s negative regulation on PCA production and positive regulation on BHL and HHL synthesis.

Keywords: *Pseudomonas* sp. M18; *gacA*; Phenazine-1-carboxylic acid; AHLs

Foundation item: Chinese National Natural Science Foundation (30370041)

* Corresponding author. Tel: 86-21-54743347; Fax: 86-21-54743348; E-mail: xuyq@sjtu.edu.cn

Received: 1 September 2005/Accepted: 21 October 2005/Revised: 14 November 2005