

假单胞菌 M18 调控因子 GacA 与 RsmA 的相关性及对抗生物质合成代谢调控机制的分析

葛宜和^{1,2}, 黄显清¹, 张雪洪¹, 许煜泉^{1*}

(¹ 上海交通大学生命科学技术学院 上海 200030)

(² 鲁东大学生命科学学院 烟台 264025)

摘 要 假单胞菌 M18 是一株可同时合成并分泌吩嗪-1-羧酸(Phenazine-1-carboxylic acid, PCA)和藤黄绿脓菌素(Pyoluteorin, Plt)两种抗生物质的生防菌株。为了进一步研究假单胞菌 M18 抗生物质合成代谢的调控方式与机制,在分别构建 *gacA*、*rsmA* 等单基因突变株基础上,又构建了 *gacArsmA* 双基因突变株 M18GR 以及 *gacA'*-*lacZ* 和 *rsmA'*-*lacZ* 等翻译融合表达载体(pMEGA 和 pMERA)。通过在 PPM 和 KMB 两种培养基中发酵培养和两种抗生物质 PCA 和 Plt 的 HPLC 定量测定显示,双突变株 M18GR 的 PCA 和 Plt 的合成量不论在 PPM 还是在 KMB 培养基中都介于单突变株 M18G 和 M18R 之间。由实验结果分析推测,两种调控因子对抗生物质合成的调控作用不是发生在转录水平,很可能发生在转录后水平。由 β -半乳糖苷酶的定量分析表明,在假单胞菌 M18 中,两种调控因子不存在自诱导机制;虽然 GacA 未调控 RsmA 的合成,但 RsmA 可能部分正向调控 GacA 的表达。

关键词: 假单胞菌 M18; GacA; RsmA; 双突变; 调控机制

中图分类号: Q75 **文献标识码**: A **文章编号**: 0001-6209(2006)04-0531-06

在假单胞菌等革兰氏阴性细菌中, GacA 作为一种重要全局调控因子,在次生代谢调控中起着极其关键的作用^[1,2]。而另一种调控因子 RsmA 则是次生代谢的阻遏蛋白,同样可调控多种次生代谢物的合成^[2,3]。在 *P. fluorescens* CHA0 菌株中, *gacA* 基因的 ΩKm^R 插入突变菌株 CHA89 失去了合成如藤黄绿脓菌素、硝吡咯菌素、HCN 和胞外酶等次生代谢物的能力^[4,5]; *rsmA* 基因的 ΩKm^r 插入突变株 CHA809 却可以合成多于野生菌株的某些抗生物质及胞外酶。当借助表达质粒过表达 RsmA 时, *hcnA'*-*lacZ* 和胞外蛋白酶与 *lacZ* 的融合表达质粒 *aprA'*-*lacZ* 的 β -半乳糖苷酶的表达被抑制并减少了 6 倍^[6],说明 RsmA 过表达导致了抗生物质 HCN 和胞外分泌的蛋白酶量减少。同时,当构建 *gacS rsmA* 双突变株 CHA808 时,发现 CHA808 可以合成并分泌相当数量的胞外酶、HCN 等。而 *gacS* 突变株 CHA19 与 CHA89 的表型一样。由此可以说明 RsmA 作为一种全局调控因子在转录后水平部分抑制了次生代谢物 mRNA 的翻译^[2,6]。

在具生物防治功能的假单胞菌 M18 中,研究显示, *gacA* 基因突变株 M18G 不能合成藤黄绿脓菌素(Pyoluteorin, Plt),但超量表达吩嗪-1-羧酸(Phenazine-1-carboxylic acid, PCA)^[7]; *rsmA* 突变株 M18R 的 Plt 的合成量显著增高了,而 PCA 的合成量却减少了^[8]。

根据两种调控因子对次生代谢物质截然相反的调控方式,不难联想到并提出这样的问题:在假单胞菌 M18 中,两种调控因子 GacA 与 RsmA 在调控抗生物质次生代谢过程中,它们的关系如何?具体的机制和路径如何?基于此点,分别构建了 *gacA'*-*lacZ* 和 *rsmA'*-*lacZ* 等翻译融合表达载体以及假单胞菌 M18 的 *gacArsmA* 双基因突变株 M18GR,并对实验结果展开分析。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒 本研究所涉及的菌株、质粒及其来源列于表 1。

基金项目: 国家“十五”科技攻关项目(2001BA308A02-14); 国家自然科学基金(30370041)

* 通讯作者。Tel: 86-21-34204854; Fax: 86-21-34204051; E-mail: xuyq@sjtu.edu.cn

作者简介: 葛宜和(1969-)男,江苏宿迁人,讲师,博士,研究方向为微生物次生代谢的分子调控机制。E-mail: geyihe@126.com

收稿日期: 2005-10-10; 接受日期: 2005-11-14; 修回日期: 2006-03-10

表 1 菌株和质粒

Strains and plasmids		Relevant characteristics	Sources
Strains			
<i>E. coli</i>			
DH5α	Φ80 <i>lacZ</i> Δ <i>M15</i> Δ(<i>lacZYA-argF</i>) U169 <i>hsdR17 recA1 endA1 thi-1</i>		Lab collection
HB101	<i>proA1 lacY hsdS20</i> (<i>r_B⁻ m_B⁻</i>) <i>racA56 rpsL20</i>		Lab collection
S17-1	<i>thi⁻ pro⁻ hsdR hsdM⁻ recA⁻ rpsL</i> RP4-2 (<i>Tet^R::Mu</i>) (<i>Kan^R::Tn7</i>)		Lab collection
<i>Pseudomonas</i> sp.			
M18	Wild type, <i>PCA⁺⁺⁺</i> , <i>Plt⁺⁺</i> producer, <i>Amp^R Spe^R Rif^R</i>		Lab collection
M18R	<i>PCA⁺⁺</i> , <i>Plt⁺⁺⁺</i> producer, <i>rsmA⁻</i> , <i>Kan^R Spe^R Rif^R</i> ,		[7]
M18G	<i>PCA⁺⁺⁺</i> , <i>Plt⁻</i> producer, <i>gacA⁻</i> , <i>Kan^R Spe^R</i> ,		[8]
M18GR	<i>PCA⁺⁺⁺</i> , <i>Plt⁺</i> producer, <i>rsmA⁻ gacA⁻</i> , <i>Kan^R Gen^R</i>		This study
Plasmids			
pBLSG	pBluescript SK ⁺ carrying 2.3kb <i>EcoR</i> I - <i>Pst</i> I fragment of <i>gacA</i> ; <i>Amp^R</i>		[7]
pBLSR	pBluescript SK ⁺ carrying 1.5kb <i>pst</i> I-fragment of <i>rsmA</i> ; <i>Amp^R</i>		[8]
pUCGm	Cloning vector, <i>Gen^R</i>		L. S. Thomashow
pBLSRG	<i>rsmA</i> inactivated with <i>aacC1</i> cassette in pBLSR; <i>Amp^R Gen^R</i>		This study
pME3087	Suicide vector; <i>ColEI</i> , replicon, <i>IncP-1-mob</i> , <i>Tet^R</i>		D. Haas
pME3087RG	pME3087 carrying <i>rsmA</i> inactivated with <i>aacC1</i> cassette, <i>Gen^R Tet^R</i>		This study
pME497	Mobilizing plasmid; <i>IncP-1</i> , <i>Tra</i> ; <i>RepA</i> (<i>Ts</i>); <i>Amp^R</i>		D. Haas
pME6015	pVS1-p15A shuttle vector for translational <i>lacZ</i> fusion, <i>Tet^R</i>		D. Haas
pNM482	' <i>lacZ</i> fusion vector, <i>Amp^R</i>		D. Haas
pMEGA	pME6010 with 0.4-kb <i>gacA</i> upstream fragment and a translational <i>gacA</i> '-' <i>lacZ</i> fusion carrying first 8 <i>gacA</i> codons		This study
pMERA	pME6010 with 0.6-kb <i>rsmA</i> upstream fragment and a translational <i>rsmA</i> '-' <i>lacZ</i> fusion carrying first 8 <i>rsmA</i> codons		This study

* , ++ indicates production of antibiotics by wild type strain M18 ; † , + indicates less production of antibiotics by derivative of strain M18 ; ‡ , + + + indicates more production of antibiotics by derivative of strain M18 ; § , - indicates no production of antibiotics by derivative of strain M18 .

1.1.2 培养基和培养条件 :大肠杆菌采用 Luria-Bertani (LB)培养基在 37℃ 条件下振荡培养^[9]。假单胞菌 M18 分别采用适合合成 PCA 的 PPM 培养基和适合合成 Plt 的 KMB 培养基^[10]。相应固体培养基每升加 15g 琼脂。假单胞菌 M18 在液体培养时温度为 28℃。液体培养时 摇床转速为 180r/min(大肠杆菌)和 220r/min(假单胞菌)。抗生素用量 (μg/mL) :卡那霉素(Kan)50 ,氨基青霉素(Amp)100 ,庆大霉素(Gen)40 ,氯霉素(Chl)100 ,壮观霉素(Spe)100 ,四环素(Tet)125。

1.1.3 酶和试剂 :DNA 聚合酶(Klenow) 各种限制性内切酶、T4 DNA 连接酶及 DNA 分子量标记物均购自 MBI 公司 ;Southern 杂交探针制备所用同位素 [α-³²P] 购自北京亚辉生物科技公司 ;其它生化试剂均为分析纯。

1.2 *rsmA* 基因的体外插入突变

为了构建 *gacA rsmA* 双突变株 ,首先选取 *rsmA* 基因作抗性基因插入突变。其步骤是 :用限制性内切酶 *Aat* II 消化含有 *rsmA* 基因的质粒 pBLSR。胶回收并纯化线性质粒 pBLSR 后 ,用 T4 polymerase 将线性 pBLSR 的 *Aat* II 酶切得到的 3'端削平。削平方法和步骤均按 MBI 公司推荐的方法进行。削平后的产物经酶失活 ,酚-氯仿抽提两次、乙醇沉淀和 70% 乙醇洗涤两次后与来自 pUCGm 的 855bp 庆大霉素基因(*aacC1*) *Sma* I 片段相连接。连接产物转化

E. coli DH5α 并涂含有 20μg/mL 庆大霉素的 LB 固体平板。挑取阳性克隆培养并酶切验证。由此获得的阳性克隆称 pBLSRG。

用限制性内切酶 *Pst* I 消化 pBLSRG ,采用胶回收法回收 2.3kb 的插有 *aacC1* 抗庆大霉素基因的 *rsmA* 基因片段。将所得片段克隆到自杀质粒 pME3087 的 *Pst* I 位点处。由此得到的阳性克隆称为 pME3087RG。该质粒转化 *E. coli* S17-1 后用于三亲杂交。

1.3 三亲杂交

将受体菌 *gacA* 基因突变株 M18G、供体菌 *E. coli* S17-1(pME3087RG)和三亲杂交辅助菌 *E. coli* HB101(pME497)分别在一定的抗生素浓度条件下液体培养过夜。分别取 3 种菌 500μL 经离心、洗涤后混合并悬浮于 100μL 的 LB 培养基中。将此混合菌液点于无抗生素的平板上 37℃ 培养 18 ~ 24h 后 ,刮取菌斑悬浮于一定的 LB 培养基中并涂布于 *Spe*¹⁰⁰和 *Gen*⁴⁰的双抗平板。将该种平板上的克隆再同时对应点于分别含 *Gen*⁴⁰和 *Tet*¹²⁵的两种平板。凡是在含 *Gen*⁴⁰的 LB 平板上生长而在含 *Tet*¹²⁵的平板上不生长的克隆即为双交换的阳性克隆菌株。所得 *gacA rsmA* 双突变株命名为 M18GR。

1.4 翻译融合表达载体 *gacA*'-'*lacZ* 和 *rsmA*'-'*lacZ* 的构建

为了检验调控因子 *GacA* 和 *RsmA* 在调控抗生

物质合成代谢过程中的相互关系,分别构建了 *gacA*、*rsmA* 与 *lacZ* 的融合表达载体 pMEGA 和 pMERA。pMEGA 的构建过程如下:首先设计一对引物 TGA1 (5'-GGATCCGAATTCGCTATGGAGAAGTCC-3',下划线为 *EcoR* I 位点)和 TGA2 (5'-GATTACCTGCAGGACCACCAGCACCTT-3',下划线为 *Pst* I 位点)。其中上游引物 TGA1 与 *gacA* 基因读码框的上游 600bp 处退火,而下游引物 TGA2 与 *gacA* 的第 8 个氨基酸的基因处退火。然后以 pBLSG 为模板进行 PCR。将纯化后的 PCR 产物以 *EcoR* I 和 *Pst* I 进行双酶切,之后将纯化的 PCR 产物与位于 pME6010 上的来自于 pNM482 的 *lacZ* 按正确的读码顺序相连接。相应的融合质粒称为 pMEGA。

同样,以 TRA1 (5'-TGGCTAGAATTCAGAAGTACCTGGAAC-3',下划线为 *EcoR* I 位点)和 TRA2 (5'-GATACCCTGCAGACGAGTCAGAATCAG-3',下划线为 *Pst* I 位点)作为引物和 pBLSR 为模板进行 PCR。500bp 的 PCR 产物经过 *EcoR* I 和 *Pst* I 双酶切、电泳、回收等,按 *lacZ* 正确的读码顺序克隆于 pME6015 的相同位点处。所得的翻译融合质粒 *rsmA*'-'*lacZ* 称为 pMERA。

两种翻译融合质粒的插入位点及顺序由测序鉴定。它们分别借助电击方法导入假单胞菌株及其衍生菌株。假单胞菌及其衍生菌株中是否存在相应导入的质粒采用碱裂解质粒抽提法验证。

1.5 PCA 和 Plt 的定量测定

为了确定 *gacA* *rsmA* 双基因突变后对假单胞菌 M18 抗生物质合成代谢的影响。将 M18GR、M18G、M18R 和 M18 分别在两种培养基 PPM 和 KMB 中同时发酵培养。PCA 和 Plt 样品处理与 HPLC 法定量测定方法可参考文献 [7,11]。

1.6 β-半乳糖苷酶活性的测定

进行 β-半乳糖苷酶定量测定的菌株培养条件为:菌株接种于盛有 50mL KMB 培养基的 250mL 三角瓶中,28℃、220r/min 摇床培养。定时取样测定。具体测定方法参照 Miller 法[9]进行。

2 结果

2.1 *gacA* *rsmA* 双基因突变株 M18GR 菌体生长曲线的制作

为了比较双突变株 M18GR 与野生株 M18 和相关衍生株的生长状况,将 4 种菌株分别接种在 PPM 和 KMB 培养基中于 28℃、220r/min 下振荡培养,定时取样测定其光密度(*OD*₆₀₀)。根据测定结果绘制

生长曲线(图 1)。该曲线图显示,双突变株 M18GR 的生长情况与 M18G、M18R 分别在两种培养基中生长状况相似。同时在 PPM 中,3 种突变株的生长状况优势于野生株。

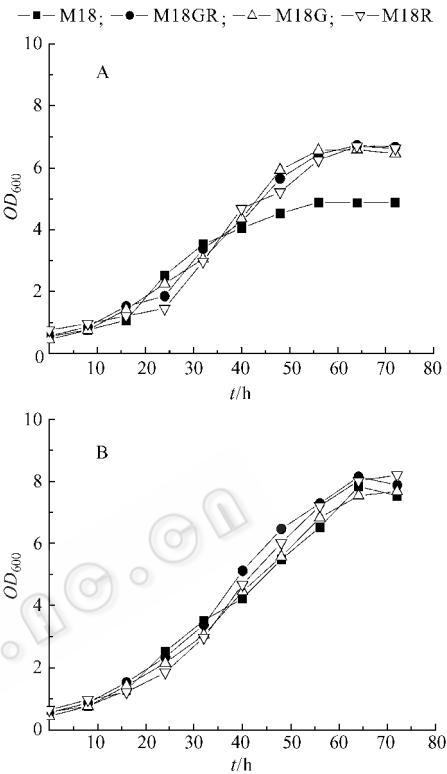


图1 假单胞菌野生株 M18 及衍生株 M18G、M18R 和 M18GR 在 PPM (A) 和 KMB (B) 培养基中生长曲线

Fig.1 Growth curves of wild type strain M18 and its derivatives M18G, M18R and M18GR in PPM (A) or KMB (B) medium.

2.2 *gacA* *rsmA* 双基因突变株的杂交验证

以来自 pBLSR 的 1.5kb 的 *rsmA* 基因部分酶切片段作探针,与经过 *Pst* I 完全酶切的基因组 DNA 进行杂交(图 2)。突变株 M18GR 中插有抗庆大霉素基因的 *rsmA* 基因片段(长度约为 2.3kb)比野生型菌株 M18 的 *rsmA* 基因长,与预期结果相符。

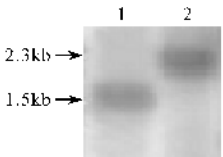


图2 *gacA* *rsmA* 双基因突变株 M18GR 的 Southern 杂交

Fig.2 Southern blot verification of *rsmA* gene mutation in strain M18GR. 1. Wild-type M18; 2. Strain M18GR.

2.3 *gacA* *rsmA* 双基因突变对 PCA 和 Plt 合成的影响

为了鉴定 *gacA* *rsmA* 双突变株 M18GR 对抗生物质合成代谢的影响,将突变株 M18G、M18R、M18GR

以及野生株 M18 分别同时接种于 PPM 和 KMB 培养基中进行发酵培养。接种比例与振荡培养条件参考文献 [7] 进行,发酵 72h 后取样,提取 PCA 和 Plt 并通过 HPLC 定量测定(图 3-A、B)。

图 3-A 显示,在培养基 PPM 中,与野生株相比,抗生物质 PCA 在突变株 M18G 中提高 2 倍,在突变株 M18R 中降低近 3 倍,而双突变株 M18GR 中 PCA 的合成量比突变株 M18G 低但比突变株 M18R 高,即合成量介于两者中间。抗生物质 Plt 在 PPM 培养基中的合成情况则不同,在突变株 M18G 中无 Plt 检测峰面,在突变株 M18R 中 Plt 的合成量由野生型菌株的 0.1 $\mu\text{g/mL}$ 提高到 78.8 $\mu\text{g/mL}$,而双突变株 M18GR 中 Plt 的合成量为 15.8 $\mu\text{g/mL}$ 。这一比值显然比突变株 M18G 高但比突变株 M18R 低,Plt 合成量依然介于突变株 M18G 和 M18R 两者中间。

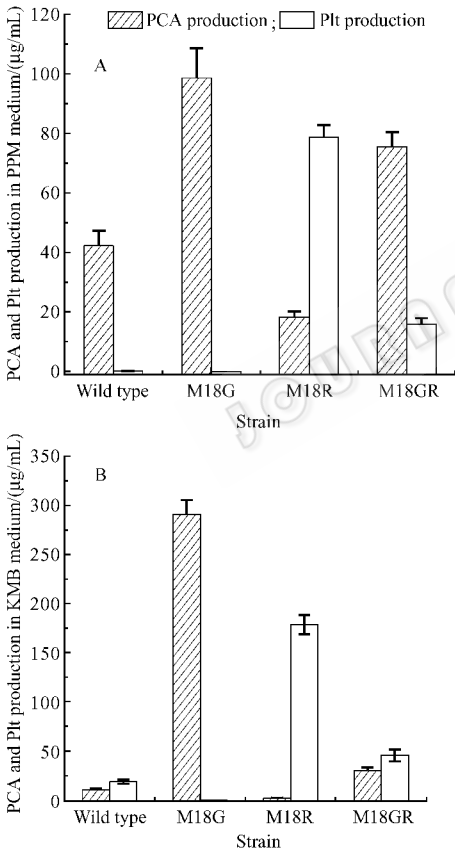


图 3 假单胞菌 M18 及其突变株在 PPM(A)和 KMB(B)培养基中 PCA 和 Plt 合成比较

Fig.3 PCA and Plt, two secondary metabolites, biosynthesized in PPM (A) and KMB (B) medium in shake-flask measured after inoculation with 72 hours.

图 3-B 同样显示,在 KMB 培养基中,抗生物质 PCA 在野生型菌株 M18 中表达量只有 10.2 $\mu\text{g/mL}$ 。而突变株 M18G 中其合成量可高达 315.4 $\mu\text{g/mL}$,即

提高了近 30 倍。在突变株 M18R 中 PCA 的合成量为 2.2 $\mu\text{g/mL}$,与野生型菌株 M18 相比降低了 5 倍。而双突变株 M18GR 中 PCA 合成量为 30.2 $\mu\text{g/mL}$,比突变株 M18G 低但比突变株 M18R 高,即合成量介于两者中间。抗生物质 Plt 在 KMB 培养基中的合成情况则相反,在突变株 M18G 中仍无 Plt 检测峰面,在突变株 M18R 中 Plt 合成量由野生型菌株的 18.5 $\mu\text{g/mL}$ 提高到 178.5 $\mu\text{g/mL}$,而双突变株 M18GR 中 Plt 合成量为 45.3 $\mu\text{g/mL}$ 。显然 Plt 合成量依然介于突变株 M18G 和 M18R 两者中间。

2.4 调控因子 GacA 和 RsmA 的关系

在关于生防菌株 M18 的研究中,首次提出 GacA 与 RsmA 两种调控因子是否存在自调控及两者之间是否存在相互调控的关系的问题。针对这一问题,分别构建了 *gacA* 基因和 *rsmA* 基因与 *lacZ* 的翻译融合表达载体 pMEGA 和 pMERA。然后将它们分别通过电击法导入野生型菌株及其衍生菌株 M18G 和 M18R。分别接种于 KMB 培养基中,定时取样,Miller 法测定 β -半乳糖苷酶活性(表 2)。

根据表 2 显示的结果,在野生型菌株 M18 和 *gacA* 基因突变株 M18G 中, pMEGA 表达的 β -半乳糖苷酶活性处于相同水平,但当 pMEGA 导入 *rsmA* 基因突变株 M18R 后,其 β -半乳糖苷酶的活性却只有在野生型菌株中的 1/4。该结果说明,调控因子 GacA 不存在自调控的机制,但部分受到 RsmA 的正向调控。

当 *rsmA*'-'*lacZ* 翻译融合质粒 pMERA 分别导入野生型菌株 M18 和 *rsmA* 基因突变株 M18R 时,它们 β -半乳糖苷酶表达的活性相似。而在 *gacA* 基因突变株 M18G 中 pMERA 表达的 β -半乳糖苷酶活性比在野生型菌株 M18 中稍微低一些。该实验结果表明,调控因子 RsmA 也不存在自调控的机制, GacA 不能调控 RsmA 的表达。

表 2 翻译融合表达载体 *gacA*'-'*lacZ* 和 *rsmA*'-'*lacZ* 的 β -半乳糖苷酶活性

Plasmid	β -Galactosidase activity*(Miller units)		
	M18	M18G	M18R
pMEGA	560 \pm 20	550 \pm 15	140 \pm 10
pMERA	120 \pm 8	80 \pm 10	110 \pm 6
pME6015(CK)	ND	ND	ND

* β -Galactosidase activity were determined in the wild type strain M18, the mutants M18G and M18R grown in KMB medium to an OD_{600} of 1.0 ; Data are the means \pm standard deviation of two measurements ; ND : No detected.

3 讨论

研究表明,作为两种全局调控因子,GacA 和 RsmA 在假单胞菌 M18 抗生物物质 PCA 和 Plt 合成代谢的调控路径中占据重要位置。据文献报道,荧光假单胞菌 CHA0 的 GacA 是通过与目标基因的 RBS 位点附近作用而影响羧氨酸合成酶和胞外蛋白酶等基因的翻译^[3]。另有研究表明,RsmA,另一种调控因子是与 GacA 竞争并结合于相关基因的 RBS 位点附近。当 RBS 位点结合有 RsmA 以后,必然影响了 mRNA 进一步与核糖核蛋白体的结合,从而阻碍了其翻译。由此看来,似乎 GacA 的结合位点就是 RsmA 与 mRNA 相结合的位点^[2,6]。然而,至今并没有 GacA 与 DNA 和 RNA 结合或作用的直接证据报道^[2]。因此,GacA 可能是间接作用,或者 GacA 激活一种至今未知的蛋白或者其他因子参与次生代谢调控作用。事实上,在荧光假单胞菌 CHA0、欧文氏菌(*Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*)的后续相关的研究报告中,RsmZ、RsmB 都是一类受到 GacA 正调控的并与 RsmA 相结合的具有调控作用的一类 RNA^[12,13]。当它们与 RsmA 结合后阻止了 RsmA 进一步与调控的目标基因的 RBS 位点结合,释放 mRNA 使之与核糖核蛋白体顺利结合并促进翻译。

那么,在假单胞菌 M18 中,全局调控因子 GacA 和 RsmA 因子是如何调控 PCA 和 Plt 两种抗生物物质的合成代谢?就 Plt 的调控分析,由于突变株 M18G 和 M18R 与其它假单胞菌相应的 *gacA* 和 *rsmA* 基因突变株表型相似,因此在 M18 中,完全可能以多种假单胞菌共有的调控方式与机制对 Plt 及其它次生代谢物的合成代谢实施调控。即 GacA 是多种次生代谢物的正调控因子,RsmA 是多种次生代谢物的负调控因子。然而针对 PCA 的调控,由于 GacA、RsmA 的缺失分别导致 PCA 合成代谢提高、降低,使得假单胞菌 M18 中的 PCA 调控方式完全不同于其它已报道的假单胞菌。根据此实验结果,推测在假单胞菌 M18 中,GacA 和 RsmA 在对 PCA 合成进行调控时,可能存在一种未知的特殊的调控通路。其中可能会有一些至今未被发现的调控因子参与。

根据双突变株 M18GR 两种抗生物物质合成结果,推测 GacA、RsmA 对抗生物物质 PCA 和 Plt 的调控作用很可能发生在转录后水平上。因为不论在 PPM 还是在 KMB 培养基中,突变株 M18G 中都无法合成 Plt 产物,说明 GacA 对 Plt 合成存在正调控作用。假设 GacA 正向调控 Plt 基因簇的转录过程,当 *gacA* 基因

突变后 M18G 菌体中无法转录合成 Plt 的相关 mRNA。既然如此,在双突变株 M18GR 中不论 *rsmA* 基因表达状态如何,都不应该有 Plt 产物积累。但事实上 M18GR 合成出比突变株 M18G 和野生株多得多的藤黄绿脓菌素。说明突变株 M18G 始终存在 Plt 的基因转录产物 mRNA。因此,尽管不知它们的调控是直接的还是间接的,但有理由推测 GacA 与 RsmA 一样,极有可能在转录后水平上参与抗生物物质合成代谢的调控。

在调控因子 GacA 与 RsmA 相关性研究中,尽管发现 RsmA 对 GacA 合成具一定的正调控作用。但根据相关突变株抗生物物质合成代谢的变化分析,却无法得到圆满解释,表明假单胞菌 M18 次生代谢分子调控路径与机制的复杂性。因此,揭示其精确的调控机制尚需进一步深入研究。

参 考 文 献

- [1] Laville J, Voisard C, Keel C, et al. Global control in *Pseudomonas fluorescens* mediating antibiotic synthesis and suppression of black root rot of tobacco. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992, **89**:1562 - 1566.
- [2] Haas D, Keel C. Regulation of antibiotic production in root-colonizing and relevance for biological of plant disease. *Annu Rev Phytopathol*, 2003, **41**:117 - 153.
- [3] 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.
- [4] Keel CU, Schnider U, Maurhofer M, et al. Suppression of root diseases by *Pseudomonas fluorescens* CHA0: importance of the bacterial secondary metabolite 2,4-diacetylphloroglucinol. *Mol Plant Microbe Interact*, 1992, **5**:4 - 13.
- [5] Laville J, Blumer C, Von Schroetter C, et al. Characterization of the *hcnABC* gene cluster encoding hydrogen cyanide synthesis and anaerobic regulation by ANR in the strictly aerobic biocontrol agent *Pseudomonas fluorescens* CHA0. *J Bacteriol*, 1998, **180**:3187 - 3196.
- [6] Heeb S, Blumer C, Haas D. Regulatory RNA as mediator in GacA/RsmA-dependent global control of exoproduct formation in *Pseudomonas fluorescens* CHA0. *J Bacteriol*, 2002, **184**:1046 - 1056.
- [7] Ge YH, Huang XQ, Wang SL, et al. Pyoluteorin is positively regulated and phenazine-1-carboxylic acid negatively regulated by *gacA* in *Pseudomonas* sp. M18. *FEMS Microbio Letts*, 2004, **237**:41 - 47.
- [8] 王素连,耿海峰,孙雷,等.荧光假单胞菌 M18 *rsmA* 突变株的构建及其对 Plt 和 PCA 合成的区别性调控作用. *微生物学报* 2004, **2**:189 - 193.

- [9] Sambrook J, Frisch EF, Maniatis T. Molecular cloning: A Laboratory Manual. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbour Laboratory Press, 1989.
- [10] 朱栋华,徐汪节,耿海峰,等. 荧光假单胞菌 M18 *rpoD* 基因克隆及其对抗生素合成的影响. 微生物学报 2003 43 58–62.
- [11] Huang XQ, Zhu DH, Ge YH, *et al.* Identification and characterization of *pltZ*, a gene involved in the repression of pyoluteorin biosynthesis in *Pseudomonas* sp. M18. *FEMS Microbiol Lett*, 2004, 232: 197–202.
- [12] Cui 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.
- [13] Heurlier K, Williams F, Heeb S, *et al.* Positive control of swarming, rhamnolipid synthesis, and lipase production by the posttranscriptional RsmA/RsmZ system in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *J Bacteriol*, 2004, 186: 2936–2945.

Analysis of mechanism and relationship of GacA and RsmA, two regulators of antibiotics production in *Pseudomonas* sp. M18

GE Yi-he^{1,2}, HUANG Xian-qing¹, ZHANG Xue-hong¹, XU Yu-quan^{1*}

(¹ School of Life Science & Biotechnology, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200240, China)

(² School of Life Science, Ludong University, Yantai 264025, China)

Abstract : In previous study, it has already been confirmed that the wild type strain of *Pseudomonas* sp. M18 isolated from the agricultural soil can produce two antifungal agents phenazine-1-carboxylic acid (PCA) and pyoluteorin (Plt). Biosynthesis and secretion of these secondary metabolites contribute to its biological control and suppression of soilborne pathogenic fungi. As main regulators, GacA and RsmA differentially exert global regulation on production of PCA and Plt, respectively. In order to study the regulatory mechanism of secondary metabolites production in *Pseudomonas* sp. M18, a *gacArsmA* double mutant, designated as M18GR, was constructed with insertional mutation. Then, the mutant M18G, M18R, M18GR and the wild type strain M18 were inoculated into PPM or King's medium B (KMB), respectively. During cultivation of strain M18 and its derivatives, their PCA and Plt were respectively detected with High Performance Liquid Chromatography (HPLC). The results showed that PCA production in the mutant M18GR was lower than that in the mutant M18G and higher than that in the mutant M18R. Plt production in the mutant M18GR was, however, much less than that in the mutant M18R and much more than that in the strain M18 and the mutant M18G. With these observations, it is tempting to suggest that biosynthesis of PCA and Plt regulated by GacA or RsmA seem to occur at posttranscriptional level, not at transcriptional level. This regulation on secondary metabolites seems to be indirectly mediated by other unknown factors. Meanwhile, based on the construction of two translational fusions, *gacA'*-*lacZ* and *rsmA'*-*lacZ*, the assay of β -galactosidase activities in KMB medium indicated that both GacA and RsmA did not have autoinduction of their own gene expression, respectively. Although GacA did not influence expression of the *rsmA* gene, RsmA could exert some positive influence on the *gacA* gene expression in *Pseudomonas* sp. M18.

Keywords : *Pseudomonas* sp. M18; GacA; RsmA; Double mutation; Regulatory mechanism

Foundation item : The 10th Five-Year Program of Chinese National Science (2001BA308A02-14); Chinese National Natural Science Foundation (30370041)

* Corresponding author. Tel 86-21-34204854; Fax: 86-21-34204051; E-mail: xuyq@sjtu.edu.cn

Received :10 October 2005/Accepted :14 November 2005/Revised :10 March 2006