

RNA 聚合酶 σ^{38} 亚基缺失对假单胞菌抗生物质合成代谢的影响

葛宜和^{1,3} 裴冬丽^{2,3} 张雪洪³ 许煜泉³

(¹ 鲁东大学生命科学学院 烟台 264015)

(² 商丘师范学院生物系 商丘 476000)

(³ 上海交通大学生命科学技术学院 上海 200240)

摘 要 :设计引物从假单胞菌 M18 基因组 DNA 中扩增并获得 *rpoS* 基因的 378bp 保守区段。以此为探针,从假单胞菌基因组文库中克隆了包括 *rpoS* 基因全序列及其相邻序列的 3.1kb *EcoR* I - *Xho* I 片段。通过抗性基因(抗庆大霉素基因)的定点插入构建了 σ^{38} 亚基缺失突变株 M18S。HPLC 检测结果显示, σ^{38} 亚基缺失引起该菌株的抗生物质合成代谢的显著变化。与野生株相比,缺失突变株的吩嗪-1-羧酸在 PPM 和 KMB 中 2 种培养基中合成量由 58 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和 10.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 分别减少到 20.4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和 0 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 而缺失突变株的藤黄绿脓菌素则相反,在 PPM 和 KMB 两种培养基中合成量由 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和 20.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 分别提高到 75.4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和 185.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。表明 σ^{38} 亚基可区别性调控假单胞菌 M18 的抗生物质合成代谢。*rpoS* 基因的互补实验和两种抗生素基因与 β -半乳糖苷酶基因的翻译融合表达实验进一步验证了上述的结果: σ^{38} 亚基正调控吩嗪-1-羧酸的表达, 而负调控藤黄绿脓菌素的表达。

关键词 :假单胞菌 M18, 藤黄绿脓菌素, 吩嗪-1-羧酸, σ^{38} 亚基, 缺失

中图分类号 :Q935 **文献标识码** :A **文章编号** :0001-6209(2006)06-0939-06

在不同生长时期或不同的胁迫因子作用下,原核生物通过诱导表达不同的 σ 因子并不断与由 $\alpha_2\beta\beta'$ 等亚基组成的核心酶竞争结合,从而启动不同的基因转录与表达并以此适应复杂多变的环境^[1]。研究显示,在多种革兰氏阴性菌和一些革兰氏阳性菌生长的不同阶段,已涉及的 σ 因子有 20 种以上。在大肠杆菌等革兰氏阴性细菌中,当细菌由对数期进入稳定期时,通过更换 σ 因子从而启动并调节细菌的次生代谢的过程^[2]。其中 σ^{38} , 即 σ^S (又称 RpoS), 就是此时转录并表达的一种重要调节因子^[3]。

σ^{38} 亚基缺失的效应是多重的。在进入对数期以后,不仅突变株对各种胁迫因子如饥饿、温度、盐浓度、 H_2O_2 及各种营养因子等的敏感性增强,而且突变株的次生代谢也受到了明显影响^[4,5]。在荧光假单胞菌 Pf-5 中,当抗性基因插入 *rpoS* 基因使 σ^{38} 因子缺失时,突变株抗生物质合成代谢的特征为:硝吡咯素(Pm)的合成完全被抑制,藤黄绿脓菌素(Plt)和 2,4-二乙酰基间苯三酚(Phl)的合成量显著增加^[4]。在荧光假单胞菌 CHAO 中,当 σ^{38} 亚基缺失后,

突变株在抗生物质合成代谢上表现出与 Pf-5 不同的调控方式^[6]。虽然在藤黄绿脓菌素的代谢上表现一致,但 *rpoS* 在突变前后的 2,4-二乙酰基间苯三酚的合成并未出现明显的变化。由此不难发现,同属假单胞菌,不同菌株的 σ^{38} 因子缺失对次生代谢的调控作用存在种间差异。此外,在有关病原菌 σ^{38} 因子的功能研究中发现,病原菌的毒力因子的合成与分泌多与 σ^{38} 亚基表达有关^[7]。

假单胞菌 M18 是一种从土壤中分离的对引起多种植物病害的病原真菌有抑制或杀灭作用的生防菌株。已有研究表明,其生防功能归功于分泌的吩嗪-1-羧酸(PCA)和藤黄绿脓菌素两种抗生物质^[8]。据现有文献报道,同时合成 PCA 和 Plt 的菌株仅此一种^[9]。在对另一调控因子 GacA 的研究中发现, GacA 表现出不同于其它假单胞菌的特有的调控方式和策略^[10]。为了探知 σ^{38} 转录因子对上述两种抗生物质的影响,本研究首先通过设计引物,从假单胞菌 M18 基因组中扩增并克隆了 *rpoS* 基因的部分保守区段。以该 PCR 产物作探针进行菌落原位杂交,从基因组文库中克隆了该基因的全序列及两侧的相

基金项目:国家自然科学基金(30370041);江苏省高校自然科学基金计划(05KJB180010);鲁东大学科技基金(20063302)

作者简介:葛宜和(1969-),男,江苏宿迁人,副教授,博士,研究方向为微生物次生代谢的分子调控机制。Tel:86-535-6681053;Fax:86-535-6672269;E-mail:geyihe@126.com

收稿日期:2005-12-20;接受日期:2006-01-18;修回日期:2006-05-17

邻片段。然后利用抗性基因的定点插入和基因同源重组技术,构建了 σ^{38} 因子缺失株 M18S。通过野生株和缺失株的 Plt 和 PCA 生物合成量的比较与分析,表明 σ^{38} 因子可对 Plt 和 PCA 合成代谢进行区别性的调控。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌种和质粒 本研究所涉及的菌株与质粒见表 1。

表 1 菌株和质粒

Strains and plasmids	Characteristics	Source
Strains		
<i>E. coli</i> DH5 α	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 rk⁻ mk⁺ supE44 re1A1</i>	Lab collection
<i>E. coli</i> SM10	F <i>thi-1 thr-1 leuB6 recA tonA21 lacY1 supE44(MuC₊)λ Km^r</i>	[17]
<i>Pseudomonas</i> sp. M18	Wild type, PCA, Plt producer, Spe ^R	Lab collection
<i>Pseudomonas</i> sp. M18S	PCA ⁻ , Plt ⁺⁺ producer, σ^{38-} , Spe ^R Gen ^R	This study
Plasmids		
pBluescript SK	ColE, cloning and sequencing vector, Amp ^R	Lab collection
pGEM-T	ColE, cloning and sequencing vector, Amp ^R	Promega
pGEMS	pGEM-T easy vector carrying 378bp fragment of <i>rpoS</i> , Amp ^R	This study
pBLS	pBluescript SK carrying 3.1kb <i>EcoR</i> I - <i>Xho</i> I fragment of <i>rpoS</i> , Amp ^R	This study
pBLSG	<i>rpoS</i> inserted with 0.8kb <i>aacC1</i> cassette in pBLS, Amp ^R	This study
pME6000	pBBR1MCS ori, <i>lacZ mob⁺</i> , Tet ^R	[14]
pME6000S	pME6000 carrying 3.1kb <i>EcoR</i> I - <i>Xho</i> I fragment of <i>rpoS</i> , Tet ^R	This study
pRKS1	Cosmid containing <i>rpoS</i> gene fragment, Kan ^R	This study
pRKS2	Cosmid containing <i>rpoS</i> gene fragment, Kan ^R	This study
pUCGm	Cloning vector, Gen ^R	[15]
pEX18Tc	Suicide plasmid, Tet ^R	[16]
pEXS	<i>rpoS</i> inactivated with <i>aacC1</i> gene in PEX18Tc, Tet ^R Gen ^R	This study

1.1.2 培养基和生长条件 假单胞菌 M18 产抗生素培养基 PPM 和 KMB 的配制以及培养条件参见文献 [8]。大肠杆菌 (*Escherichia coli*) LB 培养基中抗生素用量 ($\mu\text{g}/\text{mL}$): 卡那霉素 (Kan) 50、氨苄青霉素 (Amp) 100、庆大霉素 (Gen) 20、壮观霉素 (Spe) 50、四环素 (Tet) 20。假单胞菌 M18 培养基中抗生素用量 ($\mu\text{g}/\text{mL}$): 卡那霉素 (Kan) 50、氨苄青霉素 (Amp) 100、庆大霉素 (Gen) 40、壮观霉素 (Spe) 100、四环素 (Tet) 125。

1.1.3 酶和试剂 多种限制性内切酶、T4 DNA 连接酶、DNA Marker 购自华美生物工程公司; *Taq* DNA 聚合酶购自上海生工生物工程技术有限公司, 同位素 [$\alpha\text{-}^{32}\text{P}$] dCTP 购自北京亚辉生物科技公司, PCR 产物回收、DNA 胶回收试剂盒购自华舜生物工程公司。其它生化试剂级别均为分析纯。

1.2 基因组 DNA 的提取

假单胞菌 M18 基因组 DNA 的提取参照文献 [11] 进行。

1.3 *rpoS* 基因片段的扩增、克隆与测序

根据假单胞菌等几种革兰氏阴性菌 *rpoS* 基因保守区段设计一对引物 P1 和 P2^[4, 5, 7, 12]。引物序列为 P1: 5'-TTGGACGCAACGCAGCTG-3', P2: 5'-

CGCAGGTAGACGTTGAGC-3'。以 M18 的基因组 DNA 为模板, PCR 扩增 *rpoS* 基因。反应条件: 94 $^{\circ}\text{C}$ 8min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 1min, 55 $^{\circ}\text{C}$ 1.5min, 72 $^{\circ}\text{C}$ 2min, 30 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 10min。

回收 PCR 产物 (约 400bp) 并与 pGEM-T easy 载体连接后转化 *E. coli* DH5 α , 筛选阳性克隆 pGEMS。其中质粒提取、DNA 酶切、电泳、DNA 胶回收和连接、感受态细胞制备和质粒 DNA 转化均参照相关文献 [13] 进行。酶切验证后的 pGEMS 委托上海博亚生物技术公司测序。

1.4 菌落原位杂交和 *rpoS* 基因及相邻片段的克隆

为获得假单胞菌 M18 的 *rpoS* 基因全序列, 用同位素标记的 378bp *rpoS* 基因 PCR 片段探针进行菌落原位杂交。将所得的阳性柯斯质粒 pRKS1 和 pRKS2 分别用几种常见内切酶酶切后进行 Southern 杂交。得到一条 3.1kb 的 *EcoR* I -*Xho* I 片段分别克隆于 pBluescript SK 和 pME6000^[14]。其中探针标记、菌落原位杂交和 Southern 杂交等方法按文献 [13] 进行。

1.5 σ^{38} 缺失突变株 M18S 的构建

从 pUCGm 中切取 0.8kb *Sma* I 片段 (含有 *aacC1* 抗庆大霉素基因盒)^[15], 插入 pBLS 中经

Klenow fragment (DNA polymerase I) 补平的 *Bam*HI 位点。从所获质粒中切取 3.9kb 的 *Eco*R I - *Xho* I 片段, 克隆于自杀质粒 pEX18Tc 中^[16]。所得质粒 pEXS 以电击法转化 *E. coli* SM10^[17]。将携带 pEXS 的 SM10、受体菌株 M18 分别接种于 3mL 含有相应抗生素的 LB 液体培养基中, 37°C 振荡培养过夜。分别从两种菌悬液中取 500 μ L 离心, 弃上清。经 1mL LB 培养基洗涤后将菌体混匀于 150 μ L 的 LB 中, 点种于无抗生素 LB 平板中央的直径为 2cm 无菌微孔滤膜上, 并在 37°C 下培养 10 ~ 18h。然后, 刮取菌体稀释于 1mL 的 LB 培养基中, 涂布于含 Gen40、Spe100 和 8% 蔗糖的 LB 筛选平板并在 37°C 下培养 48 ~ 72h。挑取所得克隆分别用无菌牙签接种于含 Gen40 和含 Tet125 平板的一一对应位置。凡是在 Tet 平板不生长而在 Gen 平板上生长的相应克隆表明已发生双交换, 即获得假单胞菌 M18 的 σ^{38} 亚基缺失突变株 M18S。

1.6 *rpoS* 基因的互补实验

为了证实 σ^{38} 亚基缺失对次生代谢的影响以及 *rpoS* 基因定点突变真实性, 将携带 *rpoS* 基因的穿梭质粒 pME6000S 分别转化野生株 M18 和缺失株 M18S。测定抗生物质 PCA 和 Plt 的产量并比较分析。

1.7 翻译融合表达载体的构建与 β -半乳糖苷酶活性测定

为进一步验证 σ^{38} 对抗生物质 PCA 和 Plt 合成代谢的影响, 利用已分别构建的翻译融合表达载体 pMEZA (*phzA'*-*lacZ*) 和 pMEAZ (*pltA'*-*lacZ*)^[10] 转化野生株和缺失株。分别同时在 KMB 培养基中培养, 参照 Miller 法^[12] 测定 β -半乳糖苷酶活性。

1.8 PCA 和 Plt 的定量测定

为了确定 σ^{38} 亚基缺失后对 PCA 和 Plt 合成的影响。将野生菌株 M18 和缺失菌株 M18S 分别接种于 PPM 和 KMB 培养基中进行 28°C 发酵培养。接种过程为: 挑取相应的单克隆接种于 50mL 的 KMB 种子培养基中, 28°C、220r/min 条件下培养 12h。按 5% 的接种量将种子放大发酵。具体做法为: 用移液管吸取 7.5mL 发酵后的种子培养基, 接种于含有 150mL PPM 或者 KMB 液体培养基的 500mL 三角烧瓶中, 在 28°C、220r/min 条件下进行发酵。每 8h 取样分析, 对两种抗生物质进行 HPLC 定量测定^[10]。

2 结果

2.1 *rpoS* 基因的克隆、测序和同源性分析

根据设计的引物, 以 M18 的基因组 DNA 为模板

扩增所得 378bp 的 PCR 产物片段, 经 T 载体克隆、测序和序列同源性比对, 结果表明, PCR 所得序列为该菌株的 *rpoS* 基因保守区段。以 [α -³²P]dCTP 同位素标记该 PCR 片段, 并从基因组文库中钓得 3.1kb 阳性片段 (GenBank: No. AY728157)。比对的结果显示, 该片段第 553 ~ 1557 区间的 1005 个核苷酸正是该基因的开放阅读框, 是完整的 *rpoS* 基因。M18 的 *rpoS* 基因与铜绿假单胞菌 PAO1 (*P. aeruginosa* PAO1) *rpoS* 序列的同源性最高, 达到 99%。此外该基因与 *Azotobacter vinelandii*、*P. chlororaphis* O6、*P. putida* KT2440、*P. syringae* pv. *aptata* CC125 等菌株同类基因的同源性分别达到 84%、83%、83%、81%。相应的氨基酸残基比对的结果显示, M18 的 σ^{38} 亚基与 *P. aeruginosa* PAO1 的 σ^{38} 同源性最高, 达到 99.5%。

2.2 缺失株 M18S 的 Southern 杂交验证

为了验证突变株抗性基因的插入真实性, 分别提取野生型与突变型菌株的基因组 DNA 并分别用 *Eco*R I、*Pst* I 进行双酶完全酶切。杂交结果如图 1 所示, 野生型的阳性带位置约在 3.1kb 左右, 而突变株的阳性带约在 3.9kb 左右, 与预期的结果相符 (3.1kb 序列中插入 0.8kb 的 *aacC1* 抗庆大霉素基因)。

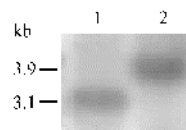


图 1 *rpoS* 基因插入突变株的 Southern 杂交

Fig. 1 Southern blot verification of *rpoS* gene mutation. 1. M18; 2. M18S.

2.3 σ^{38} 因子缺失对 PCA 合成的影响

根据 PCA 合成的曲线 (图 2), 发现缺失株 M18S 的 PCA 的合成受到了显著的影响。在 PPM 培养基中, 野生株 M18 的 PCA 产量可以达到 58 μ g/mL, 而缺失株 M18S 的最大产量只有 20.4 μ g/mL。说明在 PPM 培养基中 σ^{38} 因子缺失导致了 PCA 合成部分抑制。推测 σ^{38} 因子可能对 PCA 的合成呈正调控作用。在 KMB 培养基中, 野生株 M18 的 PCA 的合成只有 10.2 μ g/mL, 而缺失株 M18S 的发酵液中却检测不出 PCA 的存在。由此说明在该种培养基条件下, 缺失株 M18S 的 PCA 合成因 σ^{38} 因子缺失受到了完全抑制。两种菌株在两种培养基中的 PCA 合成量以及受影响程度的差异, 主要由于两种培养基的成分不同造成的 (在 Plt 的检测中也同样有此现象)。综合两种培养基中 PCA 的产量以及与野生型菌株的

PCA 产量的比较,有理由推测 σ^{38} 因子对抗生物物质 PCA 的合成代谢有明显的正调控作用。

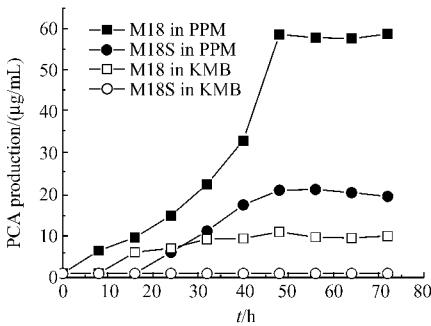


图2 缺失株 M18S 和野生株 M18 在两种培养基中的 PCA 合成动力学曲线

Fig.2 PCA production of the wild-type strain M18 or the mutant M18S in PPM or KMB medium, respectively.

2.4 σ^{38} 因子缺失对 Plt 合成的影响

在测定上述 PCA 的同时,又分别取样检测了 Plt 的合成动态情况。测定结果绘制的曲线如图 3 所示。野生菌株 M18 在 PPM 培养基中 Plt 的最高合成量为 $0.5\mu\text{g/mL}$,在 KMB 培养基中 Plt 的最高合成量为 $20.5\mu\text{g/mL}$ 。对于缺失株 M18S 来说,在 PPM 培养基中 Plt 的最高合成量为 $75.4\mu\text{g/mL}$,在 KMB 培养基中 Plt 的最高合成量达 $185.6\mu\text{g/mL}$ 。由此说明缺失株因 σ^{38} 因子缺失导致了 Plt 合成的显著提高。可以推测 σ^{38} 对抗生物物质 Plt 的合成代谢有明显的负调控作用。

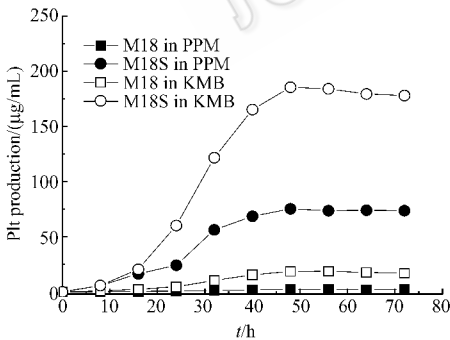


图3 缺失株 M18S 和野生株 M18 在两种培养基中的 Plt 合成动力学曲线

Fig.3 Plt production of the wild-type strain M18 or the mutant M18S in PPM or KMB medium, respectively.

2.5 σ^{38} 因子的互补验证与 β -半乳糖苷酶活性分析

为了检验 *rpoS* 基因突变导致 σ^{38} 因子缺失所引起的细胞次生代谢方面的变化,将含有 *rpoS* 基因自身启动子和开放读码框(ORF)的质粒 pME6000S 导入缺失株 M18S 中,互补实验统计数据显示(表 2),*rpoS* 基因的导入使缺失株 M18S 恢复了野生株相关

抗生物物质代谢的水平。互补实验证明,缺失株的抗生物物质的变化确与 σ^{38} 因子缺失相关。

根据 Miller 法测定的结果表明(图 4),翻译融合载体 *phzA'*-*lacZ* 在野生株中的表达量可达缺失株中的 9 倍以上。而翻译融合载体 *pltA'*-*lacZ* 在缺失株中的表达量可达野生株中的 10 倍以上。该结果相对于缺失株和野生株中的抗生物物质 PCA 和 Plt 的代谢变化趋势是一致的。

表 2 野生菌株 M18 及缺失株发酵抗生物物质的合成量比较

Table 2 Antibiotic production in the wild type strain M18, the mutant strain M18S and their derivatives

Strains	Pyoluteorin ^a (µg/mL)		Phenazine-1-carboxylic acid ^b (µg/mL)	
	PPM	KMB	PPM	KMB
M18	1.0	18.0 ± 1.5	48.0 ± 2.0	10.6 ± 1.5
M18 (pME6000)	0.5	21.5 ± 1.5	46.5 ± 2.5	11.4 ± 2.0
M18S	75.5 ± 2.0	185.6 ± 5	20.5 ± 2.0	ND
M18S (pME6000)	77.5 ± 2.5	178.5 ± 5	21.5 ± 2.0	ND
M18S (pME6000S)	0.5	16.8 ± 2.0	50.5 ± 3.0	15.2 ± 1.4

^a Pyoluteorin production after inoculation in PPM or KMB medium for 64 hours. ^b Phenazine-1-carboxylic acid production after inoculation in PPM or KMB medium for 64 hours. Each value is expressed as mean SD of three independent experiments. ND, not detected.

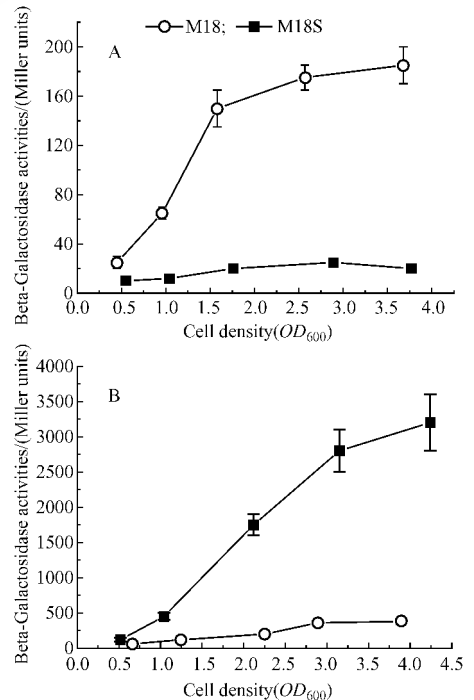


图4 野生株和缺失株对 β -半乳糖苷酶表达活性的影响

Fig.4 Influence of absence of σ^{38} subunit on *phzA*, *pltA* genes expression. β -galactosidase activities resulting from (A) a translational *phzA'*-*lacZ* fusion on pMEZA and (B) a translational *pltA'*-*lacZ* fusion on pMEAZ were determined in wild type strain M18 (circles) and its derivative M18S (squares) growing in KMB medium. Each value is the mean ± standard deviation from three experiments.

3 讨论

假单胞菌 M18 能够合成并分泌两种抗生物质 PCA 和 Plt, 而目前国际上未见分泌此两种抗生物质的其他菌株报道。该菌株因其特殊性具有相当的研究价值。同时因抗生物质 PCA 和 Plt 对多种植物的真菌病害及一些细菌病害有广泛的抑制作用, 所以该菌株在现代生态型、绿色农业的发展中具有潜在的应用前景。针对于抗生物质合成的相关次生代谢调控机制的研究, 将有利于进一步挖掘该菌株的生防功效, 扩大其在未来农业中的应用。

本部分研究涉及 *rpoS* 基因的克隆、测序、定点突变及 σ^S 缺失突变株构建。结果显示 σ^S 功能的缺失使抗生物质 PCA 和 Plt 的合成代谢受到显著影响, 并呈现明显的区别性调控作用。即对 PCA 呈正调控作用, 对 Plt 则呈负调控作用。

E. coli 中至少有 3 种 σ 因子 (σ^{32} 、 σ^{38} 、 σ^{70}) 在稳定期表达并参与相关基因的表达^[18]。在 *E. coli* 和假单胞菌等革兰氏阴性菌株中, 常常通过控制 σ^{38} 和 σ^{70} 的比值来调控相关基因的表达^[12]。在稳定期前, σ^{70} 的表达及量占主导地位, 即 σ^{70}/σ^{38} 的比值高, 控制着一定持家基因的表达。而当菌体生长进入稳定期时, σ^{38} 的表达明显占优且量会超过 σ^{70} , 即 σ^{70}/σ^{38} 的比值要低, 此时 σ^{38} 与 σ^{70} 竞争结合于 RNA 聚合酶, 从而启动依赖于 σ^{38} 的稳定期表达的基因表达。以往的实验表明, M18 中的 σ^{70} 过表达可以提高 PCA 和 Plt 的合成量, 同时无法得到 σ^{70} 基因的抗性基因插入突变株^[8]。说明 M18 的 σ^{70} 因子与荧光假单胞菌 CHA0 的 σ^{70} 因子相似, 为抗生物质合成代谢所必需。

根据上述实验可以推论, 假单胞菌的 PCA、Plt、Phl 和 P_m 等抗生物质的合成受到 σ^{70}/σ^{38} 直接或间接的调控。在荧光假单胞菌 Pf-5 中, 由于 P_m 结构基因的转录可能依赖于 σ^{38} 因子, 所以当 *rpoS* 突变时, P_m 的合成途径被终止了。在假单胞菌 M18 中, σ^{38} 因子对 PCA 合成的调控可能与 Pf-5 中的 P_m 的合成调控相似。而 σ^{38} 因子缺失导致 Plt 的合成明显提高可能有两种解释: (i) 一些编码 Plt 生物合成的阻遏蛋白的基因是依赖 σ^{38} 因子进行转录的; (ii) σ^{38} 因子作为一种负调节物与相关的 Plt 合成所必需的 σ 因子竞争结合 RNA 聚合酶。对于两种解释的真实性

有待进一步研究证实。

参 考 文 献

- [1] Kolter R, Siegele DA, Tormo A. The stationary phase of the bacterial life cycle. *Annu Rev Microbiol*, 1993, **47**: 855 - 874.
- [2] Hengge-Aronis R. Survival of hunger and stress: the role of *rpoS* in early stationary phase gene regulation in *Escherichia coli*. *Cell*, 1993, **72**: 165 - 168.
- [3] Loewen PC, Hu B, Strutinsky J, et al. Regulation in the *rpoS* regulon of *Escherichia coli*. *Can J Microbiol*, 1998, **44**: 707 - 717.
- [4] Sarniguet A, Kraus J, Loper JE, et al. The sigma factor σ^S affects antibiotic production and biological control activity of *Pseudomonas fluorescens* Pf-5. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, **92**: 12255 - 12259.
- [5] Subsin B, Thomas MS, Katzenmeier G, et al. Role of the stationary growth phase sigma factor RpoS of *Burkholderia pseudomallei* in response to physiological stress conditions. *J Bacteriol*, 2003, **185**: 7008 - 7014.
- [6] 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.
- [7] Lin YH, Miyamoto C, Meighen EA. Cloning, sequencing and functional studies of the *rpoS* gene from *Vibrio harveri*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2002, **293**: 456 - 462.
- [8] 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** (1): 315 - 323.
- [9] 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. *EMS Microbiol Letts*, 2004, **232**: 197 - 202.
- [10] 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 Microbiol Letts*, 2004, **237**: 41 - 47.
- [11] Chen WP, Kuo TT. A simple and rapid method for the preparation of Gram-negative genomic DNA. *Nucleic Acids Res*, 1993, **21**: 2260 - 2261.
- [12] Fujita M, Tannaka 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. *Mol Microbiol*, 1994, **13**: 1071 - 1077.
- [13] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular cloning: A Laboratory Manual. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- [14] Maurhofer M, Reimann C, Schmidli-Sacherer P, et al. Salicylic acid biosynthesis genes expressed in *Pseudomonas fluorescens* strain P3 improve the induction of systemic resistance in tobacco against tobacco necrosis virus. *Phytopathology*, 1998, **88**: 678 - 684.
- [15] Schweizer HP. Small broad-host-range gentamycin resistance cassettes for site-specific insertion and deletion mutagenesis. *BioTechniques*, 1993, **15**: R31 - R34.

- [16] Hoang TT , Karkhoff-Schweizer RR , Kutchma AJ , *et al.* . A broad-host-range Flp-*FRT* recombination system for site-specific excision of chromosomally-located DNA sequences : application for isolation of unmarked *Pseudomonas aeruginosa* mutants. *Gene* , 1998 , **212** :77 – 86.
- [17] Simon R , Prierer U , Pihler A. A broad host range mobilization system for *in vivo* genetic engineering : transposon mutagenesis in gram negative bacteria. *Biol Technology* , 1983 , **1** :784 – 791.
- [18] Williams MD , Ouyang TX , Flichinger MC. 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. *Mol Microbiol* , 1994 , **11** :1029 – 1043.

Effects of σ^{38} subunit deletion of RNA polymerase on antibiotics biosynthesis in *Pseudomonas*

GE Yi-he^{1,3*} , PEI Dong-li^{2,3} , ZHANG Xue-hong³ , XU Yu-quan³

(¹ School of Life Science , Ludong University , Yantai 264025 , China)

(² Department of Biology , Shanghai Normal University , Shanghai 476000 , China)

(³ School of Life Science & Biotechnology , Shanghai Jiaotong University , Shanghai 200240 , China)

Abstract : With the designed primers , PCR was carried out using the genomic DNA of *Pseudomonas* sp. M18 as a template and a 378bp DNA fragment of the *rpoS* gene was amplified. Then , a 3.1kb *EcoR* I - *Xho* I fragment containing the *rpoS* gene and its flanking sequence was obtained by screening the genomic DNA library of *Pseudomonas* sp. M18. A σ^{38} -subunit-deficient mutant M18S was constructed with insertional gentamycin gene cassette. In PPM medium , the mutant M18S produced 20.4 μ g/mL of PCA and 75.4 μ g/mL of Plt. In KMB medium , the mutant M18S produced no PCA and 185.6 μ g/mL of Plt. It is obvious that the deficiency of σ^{38} subunit in the mutant M18S leads less or no PCA production and much more Plt production than those in the wild type strain M18. PCA and Plt production were restored to the levels in wild type strain after complementation with *rpoS* gene in *trans* in strain M18S. Moreover , β -galactosidase activities of the translational fusions *phzA'*-*'lacZ* and *pltA'*-*'lacZ* in strain M18S confirmed the effects of σ^{38} subunit on PCA and Plt biosynthetic operons. With these results , it is suggested that σ^{38} subunit gives a differential impacts on PCA and Plt biosynthesis , i. e , PCA production is positively regulated but Plt production is negatively influenced by σ^{38} subunit in *Pseudomonas* sp. M18.

Keywords : *Pseudomonas* spp. ; Pyoluteorin ; Phenazine-1-carboxylic acid ; σ^{38} subunit ; Deletion