

GacA 对假单胞菌株 M18 两个 *phz* 基因簇和菌群传感的调控

史鸣奇, 李雅乾, 王沂, 黄娇芳, 黄显清, 许煜泉*

(上海交通大学生命科学技术学院, 教育部微生物代谢重点实验室 Bio-X 研究中心, 上海 200240)

摘要 【目的】假单胞菌株 M18 (*Pseudomonas* sp. M18) 是从甜瓜根际土壤中分离获得的一株对多种植物病原菌具有显著拮抗作用的菌株, 在菌群传感 (quorum sensing) 系统的调控下, 能分泌吩嗪-1-羧酸 (PCA) 以及多种吩嗪 (*phz*) 类衍生物的抗真菌物质。全局性因子 GacA 是 M18 菌株吩嗪类物质的合成与菌群传感系统的重要调控因子, 本文将就 GacA 对上述两者的调控做进一步研究。【方法】PCR 基因扩增和测序研究 M18 菌株中 PCA 合成基因簇, 运用 RT-PCR 及构建 *phzA-lacZ* 转录融合手段研究 M18 菌株中两个 *phz* 基因簇各自的转录特征以及受全局性因子 GacA 的调控作用, 运用翻译融合手段进一步研究 M18 菌株中 GacA 对菌群传感系统的调控作用。【结果】M18 菌株的染色体中存在着两个 PCA 合成基因簇 *phzA1-G1* 和 *phzA2-G2*, 与铜绿假单胞菌株 (*P. aeruginosa*) PAO1 的一致性达 99%。但是, M18 菌株 *phzA2-G2* 基因簇下游的非编码区与 PAO1 菌株不同, 存在着三段单位长度为 144 bp 的重复序列; 在野生菌株 M18 中, *phzA1-G1* 的转录水平明显高于 *phzA2-G2*, GacA 促进 *phzA1-G1* 转录, 抑制 *phzA2-G2* 转录, 区别性地调控两个 *phz* 基因簇的转录, GacA 在整体上抑制 *phz* 基因簇的转录, 与 PAO1 菌株中, GacA 对 *phz* 的调控方式相反; *gacA* 基因突变对菌群传感系统中 *lux* 家族基因中的 *lasI* 表达量无显著影响, 但正调控 *las* 系统下游的 *rhII* 表达量, GacA 对 *phz* 基因簇表达的调控部分通过菌群传感系统实现。【结论】在 M18 菌株和 PAO1 菌株中, GacA 对吩嗪类产物合成的调控方式相反, 对菌群传感系统的调控也存在着差异性, 这些差异可能是两个菌株在各自不同生境下长期进化的结果。

关键词: 吩嗪-1-羧酸; *phz* 合成基因簇; GacA; 菌群传感; 假单胞菌株 M18

中图分类号: Q933 **文献标识码**: A **文章编号**: 0001-6209(2009)10-1036-11

假单胞菌株 M18 (*Pseudomonas* sp. M18) 是本实验室从甜瓜根际土壤中分离获得的一株对多种植物病原菌具有显著拮抗作用的菌株, 能同时分泌吩嗪 (phenazine) 及藤黄铜绿菌素 (pyoluteorin, 简称 Plt) 等两种不同类型的抗真菌物质, 是一株在国际上首次报道的在同一菌株内产生这两种不同类型抗真菌物质的假单胞菌株^[1-2]。对 M18 菌株中多个调控蛋白, 如 GacA、GacS、RsmA、RpoS、RhlIR、VqsR 及 QscR 等的测序比对, 与铜绿假单胞菌株 PAO1 (*P. aeruginosa* PAO1) 的同源性都大于 90%, 而 16S rRNA

(AY696302) 的同源性达到 99%^[1-6], 表明假单胞菌株 M18 与 PAO1 菌株的基因组具有类似的遗传背景。但是, 在假单胞菌株 M18 中, 含有长达 30 kb 的 Plt 合成基因簇及其相关调控蛋白与荧光假单胞菌 pf-5 (*P. fluorescens* pf-5) 具有高度同源性^[2-3], 在 *P. aeruginosa* PAO1 中根本不存在。本实验对 M18 菌株中 *phz* 合成基因簇的序列及其与相邻基因间的间隔区进行了 PCR 克隆、测序与比对, 结果表明假单胞菌株 M18 的 *phz* 合成基因簇与铜绿假单胞菌株 PAO1 具有高度同源性。但是, 在 M18 菌株的

基金项目: 国家重点基础研究(2009CB118906); 上海市科委重点科技(08391911900)

* 通信作者。E-mail: xuyq@sjtu.edu.cn

作者简介: 史鸣奇(1984-)男, 上海人, 硕士研究生, 研究方向为生物化学与分子生物学。E-mail: shimingqi1984@hotmail.com

收稿日期: 2009-03-11, 修回日期: 2009-06-08

phzA2-G2 基因簇与其下游基因之间的间隔区内, 较 PAO1 菌株多存在着一个单位长度为 144 bp 的三段重复序列, 说明 M18 菌株与 PAO1 菌株在遗传上存在着差异。

GacA 是双组分调控系统 GacS/GacA 位于细胞质内的应答因子^[7]。GacS 具有激酶功能, 位于细胞膜中, 接受外界信号分子后, 能自身磷酸化并进一步活化胞内的全局性调控因子 GacA^[8]。广泛存在于假单胞菌中的 *gacS/gacA* 双组分系统, 具有高度保守性, 已经成为假单胞菌的一个遗传学标记^[9]。在各种具有促生作用的根际假单胞菌株中, 如荧光假单胞 (*P. fluorescens*) 菌株 CHA0^[10-11]、Pf-5^[12-15]、BL915^[16-17] 和 F113^[18]、绿针假单胞 (*Pseudomonas chlororaphis*) 菌株 PCL1391^[19-20]、以及致金色假单胞 (*P. aureofaciens*) 菌株 30-84^[21] 等, *gacS/gacA* 系统对次生代谢产物包括 2,4-二乙酰基间苯三酚 (2,4-DAPG)、藤黄铜绿菌素 (Plt)、及氢氰酸 (HCN) 等合成基因簇的表达具有正调控作用^[22-23]。

为了深入研究 M18 菌株中 GacA 对吩嗪类抗生物质合成基因簇 *phz* 的调控作用, 本实验室构建了 M18 菌株染色体 *gacA* 基因失活的突变菌株 M18G^[2], 结果表明在 M18G 菌株中, 吩嗪-1-羧酸 (phenazine-1-carboxylic acid, PCA) 的产量较野生型菌株有数倍增长, 与产吩嗪类的其他假单胞菌株, 如铜绿假单胞菌株 PAO1 相反^[24], 推测在假单胞菌株 M18 中, GacA 对 *phz* 基因簇的负调控作用具有菌株特异性, 对两个 *phz* 基因簇的调控作用有待具体分析。

为进一步查明 *gacA* 基因对假单胞菌株 M18 中 *phz* 的调控网络, 运用 RT-PCR 及构建 *phzA-lacZ* 转录融合, 首次深入研究了 GacA 对 M18 菌株中两个

phz 合成基因簇 *phzA1-G1* 与 *phzA2-G2* 的区别性调控机制。

在荧光假单胞菌和绿针假单胞菌中, 已经证明 *lux* 家族类似的 *phzIM* 系统对 *phz* 基因的正调控作用^[25]。在铜绿假单胞菌株 PAO1 中, 存在着在 *lux* 家族类似的 *lasIR* 和 *rhlIR* 两套信号转递的菌群传感 (quorum sensing) 级联放大系统^[26-27], 但是, 这种这种级联放大系统对 *phz* 基因表达的调控作用有待查明。本实验室已证明假单胞菌株 M18 中也存在类似于 *rhl* 和 *las* 的菌群传感系统, 该系统能产生多种酰基高丝氨酸内酯 (AHL) 信号分子, AHL 能正调控 PCA 的合成并负调控 Plt 的合成^[4], 而 GacA 则正调控 *rhl* 菌群传感系统的表达^[28]。本实验通过构建 *lasI-lacZ* 翻译融合质粒, 测定分析比较融合质粒在野生型菌株 M18 和 *gacA* 突变菌株 M18G 中的半乳糖苷酶活性, 调查了 GacA 对 *las* 菌群传感系统的调控作用, 发现了 GacA 对 M18 菌株中 *las* 系统表达无显著影响, 即 GacA 可能直接作用于 *rhl* 系统, 而非通过 *las* 与 *rhl* 的级联放大系统正调控 *rhl* 菌群传感系统的表达。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株及培养条件: 假单胞菌株 M18 是从甜瓜土壤根际分离的一株具有产荧光活性的菌株^[1]。本实验采用的其他菌株及质粒见表 1。大肠杆菌采用 LB 培养基, 37℃ 下培养^[29]。假单胞菌株 M18 及其衍生菌株采用 KMB 培养基, 28℃ 下培养^[30]。假单胞菌株的抗生素使用浓度 (单位: μg/mL): 氨基青霉素 (Ap) 100、壮观霉素 (Sp) 100 和四环素 (Tc) 120。

表 1 本实验使用的菌株及质粒

Table 1 Strains and plasmids used in this study

Materials	Characteristics	Source
Strains		
<i>E. coli</i> DH5α	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi1 hsdR17 (rk⁻ mk⁺) supE44 re1A1</i>	Sambrook/Rossel
<i>Pseudomonas</i> sp. M-18	PCA, Plt producer, Amp ^r Sp ^r	Hu et al (2005)
<i>Pseudomonas</i> sp. M-18G	M18 <i>gacA</i> : :Km ^r , PCA, Plt producer, Amp ^r Sp ^r	Ge et al (2004)
Plasmids		
pME 6000	Broad-host-range cloning vector, Tet ^r	Maurhofer et al. (1998)
pME 6015	Pvs1 p15A <i>E. coli</i> - <i>Pseudomonas</i> shuttle vector for translational <i>lacZ</i> fusions and promoter probing, Tet ^r	Heeb et al (2000)
pME 6522	Pvs1-p15A <i>E. coli</i> - <i>Pseudomonas</i> shuttle vector for transcriptional <i>lacZ</i> fusions and promoter probing, Tet ^r	Heeb et al (2002)
pMEZA1	365-bp <i>EcoR</i> I - <i>Pst</i> I PCR amplified fragment containing <i>phzA1</i> upstream region cloned into pME 6522	This study
pMEZA2	700-bp <i>EcoR</i> I - <i>Pst</i> I PCR amplified fragment containing <i>phzA2</i> upstream region cloned into pME 6522	This study
pME6015lasI	305-bp <i>EcoR</i> I - <i>Pst</i> I PCR amplified fragment containing <i>lasI</i> upstream region cloned into pME 6015	This study
pXUG	900bp <i>EcoR</i> I - <i>Xho</i> I PCR amplified fragment containing <i>gacA</i> cloned into pME 6000	Ge et al (2004)

1.1.2 引物:引物列于表2。引物合成及PCR产物物技术有限公司完成。测序委托上海英骏生物技术有限公司及上海生工

表2 本实验设计的引物

Table 2 Primers designed for this study

Oligonucleotide	Sequence (5' → 3') and Restriction site	Source
PRSMPCAA1	CTGGTAGAATTCGTTGCTCGCCTTCATCG (EcoRI)	This study
PRSMPCAG1	CCATACAAGCTTGGCCGCTCTGCTCGATGTAG (HindIII)	This study
PRSMPCAA2	CTTATCGAATTCGGCGAAGACTTCCAGG (EcoRI)	This study
PRSMPCAG2	GAAGATAAGCTTTACCGGACGCTCCAGCAGT (HindIII)	This study
PRSMPHZMU	AGGCTGGAAGGTTGTGCG	This study
PRSMPHZMD	AGGCTGTGCCGCTGTAA	This study
PRSMPHZSU	TCTCGCGGTGGAAGTG	This study
PRSMPHZSD	CTGCGGATAGCGCTTGC	This study
PRSMQSCRU	CTCAACTCCAGCAACAAGG	This study
PRSMQSCRD	CTCGAAGATCCGCACGT	This study
PRSMPA1906U	TCGGCGGTGGAAGTGC	This study
PRSMPA1906D	CCCTGGTCTGGGTTTCT	This study
PRSMPCAU	GGCTATTGCGAGAACCACTA	This study
PRSMPCAD	CAATGCACGCAGTTTCTGTA	This study
PRSMRPOD1	GAGCGGGAGGAGCGTTTAC	Yan et al. (2007)
PRSMRPOD2	CGGGCAAAAATAAGCAGAGG	Yan et al. (2007)
PRSMPCA1U	TCAGCGGTACAGGGAAAC	This study
PRSMPCA1D	TCCGTGGTCCAGTTGC	This study
PRSMPCA2U	GGTTGAAAGGTTTACCG	This study
PRSMPCA2D	TCCGTGGTCCAGTTGC	This study
PhzA1PUP	ATATGAATTCAGCAATCCCGCATACQ (EcoRI)	This study
PhzA1PDOWN	TATACTGCAGCGGCATCGGTTATTQ (PstI)	This study
PhzA2PUP	GTCAGAATTCACCGAGATGCTCAACTQ (EcoRI)	This study
PhzA2PDOWN	ATTACTGCAGACGCAATTCAGGTTGTQ (PstI)	This study
lasIPUP	ACATGAATTCGCGGTTCTCGCCATTQ (EcoRI)	This study
lasIPDOWN	ACTGCTGCAGATAGCGGTAGTAATCGAAGC (PstI)	This study

根据铜绿假单胞菌 PAO1 的 *phzA1-G1* 和 *phzA2-G2* 基因序列设计 PRSMPCAA1、PRSMPCAG1 及 PRSMPCAA2、PRSMPCAG2 两对引物,分别扩增假单胞菌株 M18 基因组的两个 *phz* 基因簇,预计长度在 6.3 kb 左右。

根据铜绿假单胞菌株 PAO1 的 *phzA1-G1* 基因簇上游 *phzM* 基因的序列设计引物 PRSMPHZMU、PRSMPHZMD、下游 *phzS* 基因的序列设计引物 PRSMPHZSU、PRSMPHZSD;根据 PAO1 的 *phzA2-G2* 基因簇上游 *qscR* 基因的序列设计引物 PRSMQSCRU、PRSMQSCRD、下游 *PA1906* 基因的序列设计引物 PRSMPA1906U、PRSMPA1906D,分别 PCR 扩增假单胞菌株 M18 基因组的两个 *phz* 合成基因簇的上下游基因及结构基因序列。

以假单胞菌株 M18 中两个 *phz* 基因簇的第一个基因, *phzA1* 和 *phzA2* 基因作为 RT-PCR 的目标基因,这两个基因的长度均为 489 bp,具有 81.6% 的同源性,共有 399 个碱基一致。为研究 GacA 在转录水

平对 M18 菌株中 PCA 合成的总体调控作用,利用 *phzA1* 和 *phzA2* 中的同源序列,设计一对引物 PRSMPCAU 和 PRSMPCAD,对 M18 菌株 cDNA 中的 *phzA1* 和 *phzA2* 的 cDNA 一并进行 PCR 扩增,测定总体转录水平上 GacA 对 M18 菌株中 *phz* 合成基因簇的调控作用。

在 *phzA1* 和 *phzA2* 基因序列的非同源区域内设计了 PRSMPCA1U、PRSMPCA1D 及 PRSMPCA2U、PRSMPCA2D 两对引物,特异性地对 M18 菌株 cDNA 中的 *phzA1* 和 *phzA2* 的 cDNA 分别进行 PCR 扩增,用以研究 GacA 在转录水平上对每一个基因簇的特异性调控作用。选用持家基因 *rpoD*^[31] 为内标基因,以引物 PRSMRPOD1 和 PRSMRPOD2 开展 RT-PCR,校验目标基因的转录水平。

设计引物 *phzA1PUP* 和 *phzA1PDOWN*,PCR 扩增 M18 菌株基因组中 *phzA1* 上游包含启动子 365 bp 的区域,以构建转录融合质粒 *phzA1-lacZ* 及 *phzA2-lacZ*。

设计引物 *lasI*PUP 和 *lasI*PDOWN, PCR 扩增 M18 菌株的基因组中长为 305 bp 的 *lasI* 启动子及结构基因中少量氨基酸编码区域, 以构建翻译融合质粒 *lasI'* - '*lacZ*'。

1.1.3 主要试剂和仪器: 限制性内切酶、DNA 聚合酶(包括用于克隆高 GC 比的 LA Taq DNA 聚合酶)、DNA 分子量标记和其他相关工具酶来自下列供应商: TaKaRa 和 MBI Fermentas, EZ 离心柱基因组 DNA 提取试剂盒(Sangon), 染色体 DNA 提取试剂盒(申能博彩), 反转录试剂盒(MBI Fermentas), SYBR Green I 染料, 常规及荧光定量 PCR 扩增仪(Eppendorf), UV-2000 紫外分光光度计(UNICO), GIS-1000 型凝胶成像系统(Tanon), 5415D 型高速台式离心机(Eppendorf)。

1.2 PCR 扩增 *phz* 基因簇

采用长片段 PCR 反应体系(50 μ L): 2 \times 高 GC 比 LA Taq DNA 聚合酶缓冲液 25 μ L, dNTP (各 2.5 mmol) 8 μ L, 引物 1 和引物 2 (20 μ mol/L) 各 1 μ L, 模板 DNA 1 (1 μ g/ μ L), TaKaRa LA Taq 聚合酶) 0.5 μ L (2.5 U), 重蒸水 13.5 μ L。PCR 反应条件: 94 $^{\circ}$ C 5 min, 94 $^{\circ}$ C 1 min, 56 $^{\circ}$ C 1 min, 72 $^{\circ}$ C 10 min, 30 次循环, 72 $^{\circ}$ C 30 min。采用申能博彩提供的试剂盒, 提取 M18 菌株的染色体 DNA。

1.3 PCR 扩增 *phz* 基因簇上、下游基因

PCR 反应体系参照生产商提供的操作规范及扩增序列的长度等因素共同决定。

1.4 RNA 提取及 RT-PCR 测定 *phz* 基因簇的转录物

在 KMB 培养基中, 当假单胞菌株 M18 和 M18G 的菌体密度(OD_{600}) 达到 2.0 ~ 2.4 时, 提取菌体总 RNA。采用 EZ 总 RNA 提取离心柱试剂盒(Sangon) 提取 RNA, 采用 MBI Fermentas 试剂盒反转录合成第一条 cDNA 链并 PCR 扩增, 依供应商提供的规范进行操作。

每个 25 μ L 的 PCR 反应体系包括 2 μ L cDNA 样品, 1 \times PCR 缓冲液, 200 μ mol/L dATP、dGTP、dCTP、dTTP, 每条引物各 1 μ mol/L, 2.5U Taq DNA 聚合酶。PCR 反应按照以下步骤: 首先在 94 $^{\circ}$ C 下反应 5 min; 然后, 以 94 $^{\circ}$ C 40 s; 54 $^{\circ}$ C 40 s; 72 $^{\circ}$ C 40 s 为一个循环, 循环 25 次。所有 cDNA 经 PCR 扩增后的产物均通过直接测序予以验证。半定量 RT-PCR 分析取 7 μ L 反应产物在 80V、2% 琼脂糖和 0.7 μ g/mL 溴乙锭的电泳体系中电泳 40 min, 在凝胶电泳成像仪中成像并采用 Gel-Pro Analyzer version 3.1 软件进行分析。荧光定量 RT-PCR 选用 SYBR Green I 作为染

料。所有 RT-PCR 反应均重复 3 次。

1.5 转录融合 *phzA1-lacZ* 及 *phzA2-lacZ* 的构建

构建图见图 3-C。设计引物 *phzA1*PUP 和 *phzA1*PDOWN(表 1), PCR 扩增 M18 菌株基因组中 *phzA1* 上游包含启动子 365 bp 的区域, 直接测序验证, 经 EcoRI-PstI 酶切插入质粒 pME6522, 以构建 pMEZA1, 即 *phzA1-lacZ* 转录融合质粒。同样, 设计引物 *phzA2*PUP 和 *phzA2*PDOWN(见表 1), PCR 扩增 M18 菌株的基因组序列中 *phzA2* 上游包含启动子的 700 bp 的区域, 测序验证后, 经 EcoRI-PstI 酶切, 插入质粒 pME6522, 以构建 pMEZA2, 即 *phzA2-lacZ* 转录融合质粒。

1.6 翻译融合 *lasI'* - '*lacZ*' 的构建

融合质粒的构建图见图 6-B。设计引物 *lasI*PUP 和 *lasI*PDOWN(表 1), PCR 扩增 M18 菌株的基因组中长为 305 bp 的 *lasI* 启动子及结构基因中少量氨基酸编码区域, 测序验证, M18 菌株的与 PAO1 菌株的 *lasI* 基因具有约 99.5% 的一致性, 经 EcoRI-PstI 酶切, 将该基因插入 pME6015 质粒, 以构建 pME6015rhIR, 即 *lasI'* - '*lacZ*' 翻译融合质粒。

1.7 β -半乳糖苷酶活性的测定

从平板中挑取单菌落, 接种于小瓶(三角瓶体积为 150 mL, 含培养基 50 mL) 在 28 $^{\circ}$ C 下震荡培养 12 h 后, 转入大瓶(三角瓶体积为 500 mL, 含培养基 150 mL) 28 $^{\circ}$ C, 220 r/min 震荡培养, 隔一段时间取样, 样品根据 Miller 的方法处理后, 并测定 β -半乳糖苷酶活性^[32]。

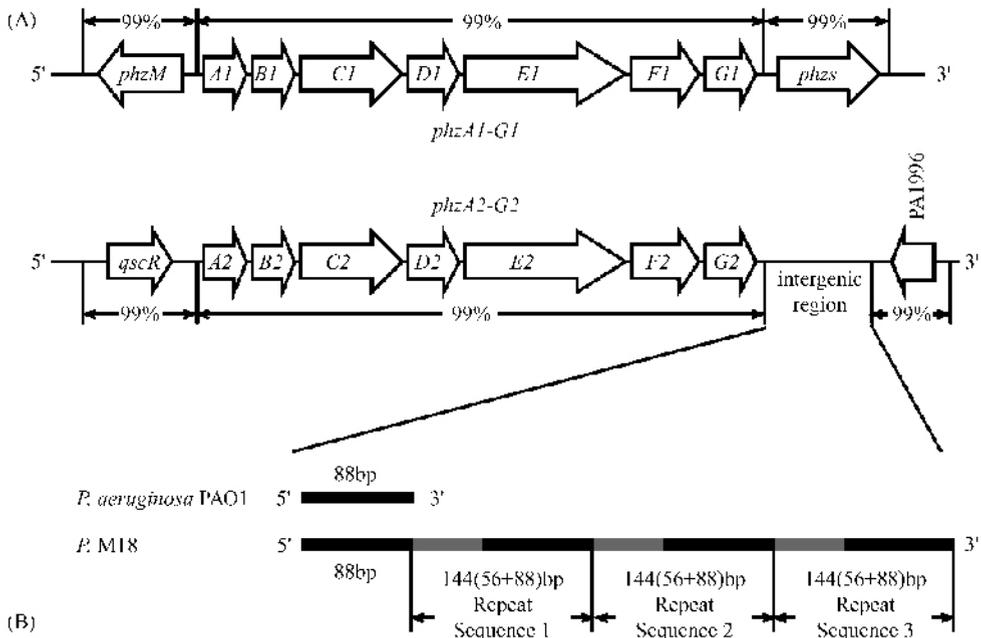
2 结果

2.1 在 M18 菌株中, 存在着两个 *phz* 合成基因簇与铜绿假单胞菌株 PAO1 高度同源

为了进一步研究 M18 菌株中 GacA 对吩嗪合成的调控作用, 首先查明了 M18 菌株中 *phz* 合成基因簇的序列。基于已研究的基因结果显示假单胞菌 M18 株和铜绿假单胞菌 PAO1 株的基因组序列具有相似的遗传背景, 以菌株 PAO1 的 2 个 *phz* 基因簇为模板设计 PRSMPCAA1 和 PRSMPCAG1 及 PRSMPCAA2 和 PRSMPCAG2 两对引物, 分别扩增 M18 菌株基因组中的 2 个 *phz* 合成基因簇, 均得到了长度与 PAO1 菌株中 2 个 *phz* 合成基因簇长度类似的 PCR 产物, 采用 DNA 步行法分段分别测序, 2 个基因簇的长度分别为 6281 bp 和 6275 bp, 测序结果与假单胞菌株 PAO1 进行序列比对, 发现 M18 菌株中的两个 *phz* 合成基因簇与 PAO1 中的一致性均

在 99% 以上。参照铜绿假单胞菌株 PAO1 中的命名,分别称为 *phzA1-G1* 和 *phzA2-G2* (图 1-A),测序

结果已经存入 GenBank,*phzA1-G1* 和 *phzA2-G2* 的登录号分别为 FJ494908 和 FJ494909。



假单胞菌株 M18 中两个 PCA 合成基因簇及其上下游基因组示意图

Fig. 1 The structure of two *phz* gene clusters and their flanking sequences. A: Homology between *P. aeruginosa* PAO1 and *P. M18*; B: The 88-bp repeat sequence (black line) and 56-bp repeat sequence (grey line) in the downstream of *phzA2-G2* in *P. aeruginosa* PAO1 and *P. sp. M18*.

2.2 在 M18 菌株中, *phzA2-G2* 下游的基因间隔区存在着一个包含 3 个重复序列的区域

在铜绿假单胞菌株 PAO1 的 *phz* 基因簇两侧存在着重要的调控及修饰基因,对 *phz* 基因簇表达及 PCA 产物的衍生起着重要的调节作用。在菌株 PAO1 中,基因簇 *phzA1-G1* 的上游基因 *phzM* 和下游基因 *phzS*,是修饰 PCA 的两个基因,在他们的共同作用下将 PCA 衍生为绿脓菌素(PYO)^[33-34]。PAO1 基因簇 *phzA2-G2* 的上游为 *qscR* 基因,该基因负调控假单胞菌的菌群传感系统,进而负调控 PCA 的合成^[35]。基因簇 *phzA2-G2* 的下游为一个功能未知的基因 *PA1906*。

由于 *phz* 基因簇的上下游基因对 PCA 及其衍生物的合成有着重要作用,本实验室同样对 M18 菌株中两个 *phz* 合成基因簇两侧的基因进行 PCR 扩增和序列分析,所使用的引物见表 1。结果如图 1a 所示,在 M18 菌株的 *phzA1* 上游存在 *phzM* 基因,*phzG1* 下游存在 *phzS* 基因,*phzA2* 上游存在 *qscR* 基因,这 3 个基因以及与 *phz* 合成基因簇之间的非编码区序列一起,与菌株 PAO1 中的同源性均超过 99%。然而,在 M18 菌株中 *phzA2-G2* 基因簇下游存在着一条长达 520 bp 的基因间隔区,除了在 5' 端存在着与铜绿

假单胞菌株 PAO1 基因组相同位置基本一致的 88 bp 碱基外,下游较 PAO1 菌株还多存在着一段长度为 432 bp 的序列。这 432 bp 的碱基又可以分为 3 段单位长度 144 bp 的重复序列,3 段序列之间的碱基一致性在 90% 以上。在 PAO1 菌株的间隔区 5' 端存在的 88 bp 的序列仅为 M18 菌株 144 bp 重复序列一部分,具有 90% 以上的相似性。即, M18 菌株中 520 bp 的间隔区是由 4 段单位长度 88 bp 的重复序列和 3 段单位长度为 56 bp 的重复序列组成的,而 PAO1 菌株相同位置则只有 1 段 88 bp 的序列(图 1-B)。测序结果存入 Genbank,登录号为 FJ494909。该重复序列的具体功能有待进一步查明。在此重复序列的下游存在着与 PAO1 菌株中 *PA1906* 高度同源的基因。

2.3 在 M18 菌株中, *GacA* 区别性地调控两个 *phz* 基因簇的转录

已有的测序结果表明, M18 菌株中两个 *phz* 基因簇各自的上游基因和附近调控区域具有完全不同的核苷酸序列, *GacA* 可能通过对该区域不同形式的调控来影响两个 *phz* 基因簇的转录。对 M18 菌株中两个 *phz* 基因簇的转录物进行了 RT-PCR 分析,分别研究了 *GacA* 对假单胞菌株 M18 中两个 *phz* 基因簇转录的影响。选择两个 *phz* 合成基因簇的第一个基

因 *phzA1* 和 *phzA2*。选取两个基因间核苷酸不同的区域设计两对引物 PRSMPCA1A、PRSMPCA1B 和 PRSMPCA2A 和 PRSMPCA2B, 用于分别测定两个基因簇的转录量。*phzA1* 和 *phzA2* 在 M18 野生型和 *gacA* 突变株 M18G 中的 mRNA 转录水平如图 2 所示, 选择 *rpoD* 作为内参基因, 产物经琼脂糖电泳分离。由图可见野生型菌株 M18 中 *phzA1* 的 mRNA 转录量要明显高于 *phzA2*, 而 *gacA* 突变株 M18G 中 *phzA1* 的 mRNA 转录量则低于 *phzA2*。同时, 在 M18 菌株中的 *phzA1* mRNA 转录量要高于突变株 M18G, 而 *phzA2* 在 M18 中的 mRNA 转录量则要低于 M18G, 表明了 GacA 对这两个基因簇的区别性调控作用, GacA 促进 *phzA1*-G1 基因簇转录, 抑制 *phzA2*-G2 基因簇的转录。

为进一步验证 GacA 对 M18 株菌中两个 *phz* 合成基因簇的区别性调控, 构建了两个转录融合质粒 *phzA1-lacZ* 和 *phzA2-lacZ*, 分别被转入野生菌株 M18

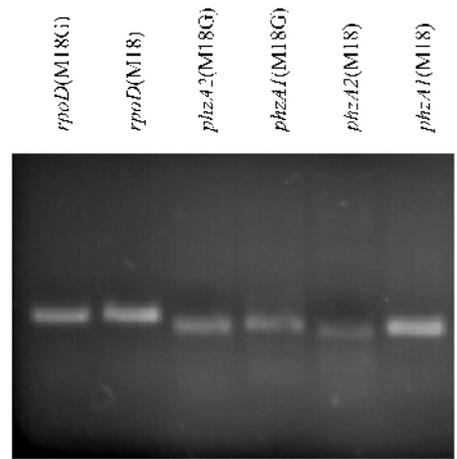


图 2 琼脂糖电泳显示 RT-PCR 测定 M18 及 M18G 菌株中 *phzA1* 及 *phzA2* 的转录量

Fig.2 Semi-quantitative RT-PCR analysis of *phzA1* and *phzA2* mRNA in *P. sp.* M18 and *P. sp.* M18G by agarose gel electrophoresis.

及其 *gacA* 突变株 M18G 中, 分别测定每个菌株中的 β -半乳糖苷酶活性。如图 3 所示, 融合质粒 *phzA1*-

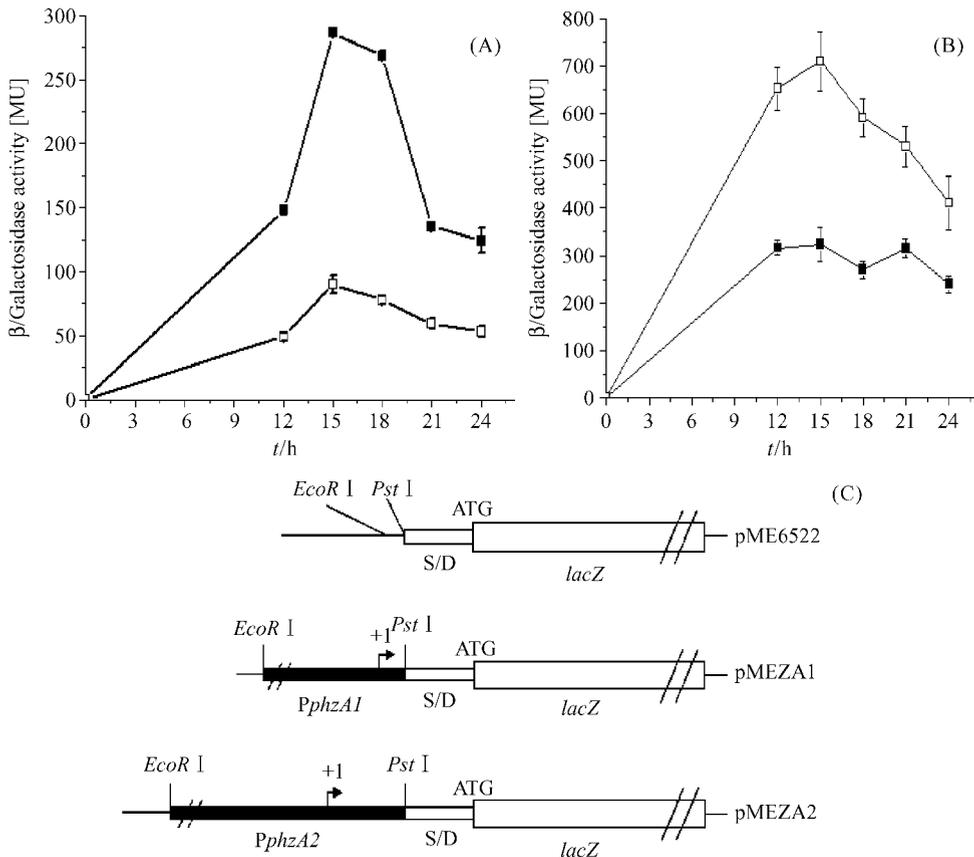


图 3 GacA 对 *phzA1* 和 *phzA2* 基因转录水平的区别性调控

Fig.3 Differential effects of GacA on the *phzA1* and *phzA2* gene expression levels. β -Galactosidase expression (Miller units, relative activity) of the *phzA1-lacZ* transcriptional fusion expression plasmid pMEZA1 (A) and the *phzA2-lacZ* transcriptional fusion expression plasmid pMEZA2 (B) was followed over time in cultures of wild type M18 (solid square) and M18G (empty square). Values were the means (\pm SD) for triplicate cultures. (C) Maps of the *phzA1-lacZ* transcriptional fusion expression plasmid pMEZA1 and the *phzA2-lacZ* transcriptional fusion expression plasmid pMEZA2. S/D, putative Shine-Dalgarno sequence. +1, putative transcriptional start site of the *phzA1* or *phzA2*. The putative promoter region of *phzA1* or *phzA2* and its flanking sequence are shown as a thick black line.

lacZ 在 M18 菌株中的 β -半乳糖苷酶活性为 M18G 中的 3 倍多,而融合质粒 *phzA2-lacZ* 在 M18 中的 β -半乳糖苷酶活性则仅为突变株 M18G 中的一半。

上述 RT-PCR 及转录翻译融合的实验结果都表明 *GacA* 区别性地调控着两个 *phz* 基因簇的转录,对 *phzA1-G1* 的转录为正调控,对 *phzA2-G2* 的转录为负调控。

2.4 *GacA* 在整体上对 M18 菌株 *phz* 合成基因簇的转录实施负调控作用

本实验室已有的结果表明,*gacA* 基因的失活会导致突变株 M18G 中 PCA 产量的提高^[2]。为进一步验证此结果,研究 *GacA* 对假单胞菌 M18 菌株中 PCA 两个合成基因簇在整体水平上的转录的调控作用,对 M18 菌株中两个 *phz* 合成基因簇的转录产物进行了 RT-PCR 分析。选择 2 个 *phz* 合成基因簇的第一个基因 *phzA1* 和 *phzA2*。由于这两个基因之间的核苷酸序列具有 81.6% 的同源性,即 399 个碱基具有一致性,因此,可以在同源区域来设计一对引物 (PRSMPCAU 和 PRSMPCAD),运用 RT-PCR 测定的 *phzA* (*phzA1* + *phzA2*) 总体转录物产量。同时,为进一步验证实验结果的准确性,将带有完整 *gacA* 基因的质粒 pXUG 转入 M18G 突变株中构建互补菌株 M18G/pXUG,并将质粒 pME6000 的分别转入 M18 菌株和突变株 M18G 一起作为对照进行 RT-PCR 分析。图 4 显示的是总 *phzA* 转录物在 M18 菌株的野生型、*gacA* 突变株 M18G 以及 M18G 互补菌株中的 mRNA 转录量,以 *rpoD* 为内参基因。由图可见野生型 M18 菌株中总 *phzA* 的 mRNA 转录量要明显低于突变菌株 M18G,而互补菌株 M18G/pXUG 中总 *phzA* 的 mRNA 转录量又恢复到了类似野生型 M18 株的水平,表明 *GacA* 在总体水平上对于 M18 菌株中 2 个

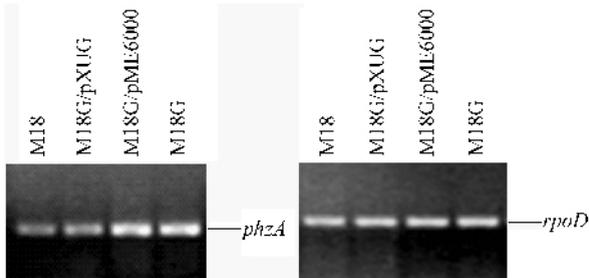


图 4 琼脂糖电泳显示 RT-PCR 测定菌株 M18、M18G、M18G/pME6000 及 M18G/pXUG 总 *phzA* (*phzA1* + *phzA2*) 基因簇的转录量

Fig.4 Semi-quantitative RT-PCR analysis of total *phzA* (*phzA1* plus *phzA2*) mRNA in *P. sp.* M18, *P. sp.* M18G, *P. sp.* M18G/pME6000 and *P. sp.* M18G/pXUG by agarose gel electrophoresis.

phz 合成基因簇转录实施负调控的作用。

2.5 荧光定量 RT-PCR 对 M18 菌株 *phz* 合成基因簇的受 *GacA* 调控的验证

为进一步验证 2.3 与 2.4 的半定量 RT-PCR 结果,进一步采用荧光定量 RT-PCR 分别分析 *GacA* 对 M18 菌株两个 *phz* 合成基因簇和总基因簇的影响,选用 SYBR Green I 做染料。实验结果见图 5。

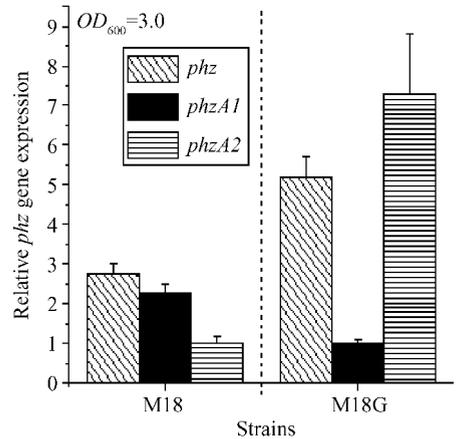


图 5 M18 菌株和 M18G 菌株 *phzA1*、*phzA2*、*phz* 基因簇荧光定量 RT-PCR 实验结果

Fig.5 Real-time RT-PCR analysis of *phzA1*, *phzA2* and total *phz* mRNA in *P. sp.* M18 and *P. sp.* M18G.

观察 M18 菌株与 M18G 菌株中 *phzA1* 和 *phzA2* 在转录水平的差异,发现 *GacA* 突变株 M18G 中 *phzA1* 的转录量较野生型 M18 菌株下降了约 60%,*GacA* 正调控 *phzA1* 的转录;M18G 中 *phzA2* 的转录量则是野生型 M18 菌株的 7.5 倍,*GacA* 负调控 *phzA2* 的转录。同时,在野生型 M18 菌株中,*phzA1* 的转录量约是 *phzA2* 的 2.5 倍,*phzA1* 在转录水平占优;在 M18G 菌株中 *phzA1* 转录量则仅有 *phzA2* 的 12%,表明在 *GacA* 突变株中,*phzA2* 代替 *phzA1*,在转录水平占优。

观察 M18 菌株与 M18G 菌株中 *phz* 基因簇的整体转录水平差异,M18G 菌株中 *phz* 的转录量约为 M18 菌株中的 1.9 倍。该结果充分表明 *GacA* 在总体水平上对于 M18 菌株中两个 *phz* 合成基因簇转录实施负调控的作用,并为本实验室先前发表的结果,即 *gacA* 基因的失活会导致突变株 M18G 中 PCA 产量的提高^[2]提供了新的证据。

2.6 *GacA* M18 菌株的 *las* 菌群传感系统无显著调控作用

研究了假单胞菌株 M18 中 *GacA* 对菌群传感系统的影响。构建了重组质粒 pME6015*lasI*,即翻译融

合质粒 *lasI'* - '*lacZ*。将该质粒分别导入野生菌株 M18 和 *gacA* 失活突变菌株 M18G 中, 分别测定每个菌株中的 β -半乳糖苷酶活性, 结果见图 6。结果表明, 在 M18G 菌株中, pME6015*lasI* 的 β -半乳糖苷酶活性在 M18 菌株和 M18G 菌株中没有显著差异, 表明 *GacA* 对 *lasI* 基因的表达无显著调控作用。

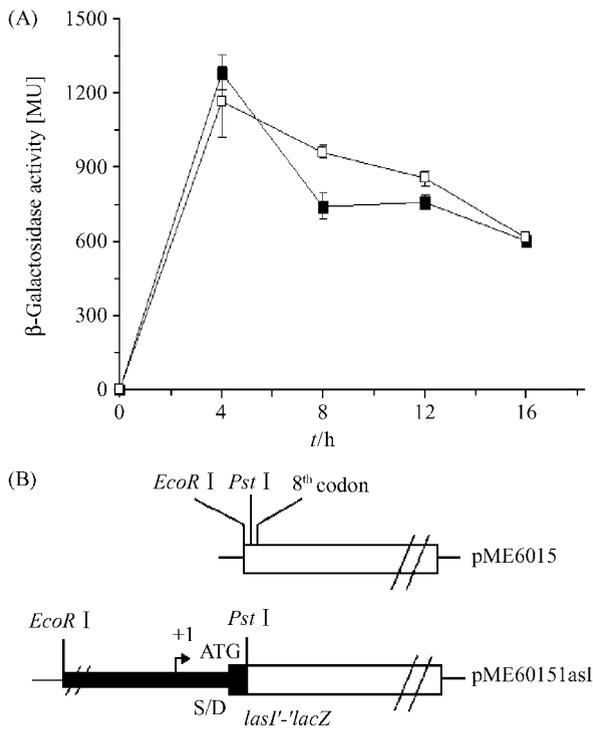


图 6 *gacA* 对 *lasI* 基因的调控

Fig. 6 Effect of *gacA* on *lasI* gene expression levels. β -Galactosidase expression (Miller units, relative activity) of the *lasI'* - '*lacZ* translational fusion expression plasmid pME6015*lasI* (A) was followed over time in cultures of wild type M18 (solid square) and M18G (empty square). Values were the means (\pm SD) of triplicate cultures. (B) Maps of plasmid pME6015*lasI*, putative Shine-Dalgarno sequence, +1, putative transcriptional start site. The putative promoter region and its flanking sequence are shown as a thick black line.

3 讨论

本实验室已经证明假单胞菌株 M18 中 *gacA* 基因的失活会对 *Plt* 合成基因簇的表达产生抑制作用, 对 *phz* 合成基因簇的表达则有着明显的促进作用, *gacA* 突变菌株 M18G 能使 PCA 的产量成倍提高^[2], 表明假单胞菌株 M18 与铜绿假单胞菌株不同, 在 M18 菌株中, *GacA* 存在着一套特殊的调控机制。本文就 *GacA* 在对 *phz* 合成基因簇转录水平的调控作用进行深入研究。

首先, 确定了 M18 菌株中两个 *phz* 基因簇的组成及其特点。在铜绿假单胞菌株 PAO1 中, 存在 2

个高度同源的 *phz* 合成基因簇 *phzA1-G1* 和 *phzA2-G2*, 每个基因簇含有命名为 *phzA* 到 *phzG* 的 7 个基因, 这 2 个基因簇的结构基因在 DNA 水平的一致性达到 98%, 但这 2 个基因簇上游的启动子区域及上、下游基因的种类则完全不同。近来的研究表明该 2 个合成基因簇都具有与大肠杆菌中 *lac* 启动子调控区类似的调节区域^[34]。本文运用 PCR 对 M18 菌株中 *phz* 合成基因簇及其上下游基因进行扩增, 并运用 DNA 步行方进行测序和比对。结果表明, 假单胞菌株 M18 具有和铜绿假单胞菌 PAO1 高度同源的 2 个 *phz* 合成基因簇及其上下游基因, 但是, 在 M18 菌株中, *phzA2-G2* 基因簇与其下游 PA1906 同源基因之间的间隔区较 PAO1 菌株多存在着一个全长为 432 bp 的间隔区, 由单位长度为 144 bp 的三重复序列组成, 表明假单胞菌株 M18 与铜绿假单胞菌株 PAO1 菌株在遗传上的差异性。

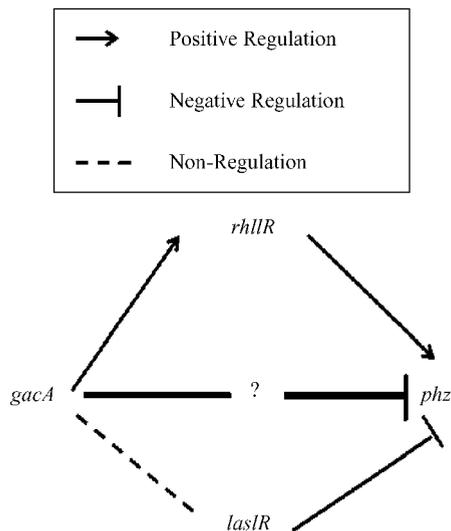
本文运用 RT-PCR 分别测定了在野生型 M18 菌株和 *gacA* 失活突变的 M18G 菌株中, 2 个 *phz* 合成基因簇的转录物总量, 再一次证实了 *GacA* 在整体上对 *phz* 合成基因簇的 mRNA 合成实施负调控作用, 与原先发表的结果一致^[2]。本文又进一步阐明了 *gacA* 对 M18 菌株中两个 *phz* 基因簇在转录水平的区别性调控作用。运用 RT-PCR 分别测定 2 个 *phz* 合成基因簇的转录物, 发现在野生型 M18 菌株中, 两个基因簇的转录水平显著不同, 在野生型 M18 菌株中, *phzA1-G1* 的转录水平显著高于 *phzA2-G2* 的转录水平, 但是, 在 *gacA* 失活突变菌株 M18G 中, *phzA1-G1* 的转录量下降 70%, 而 *phzA2-G2* 的转录量则提升了 4 倍多, *phzA1-G1* 在转录水平优势明显降低, 表明 *GacA* 在转录水平正调控 *phzA1-G1* 的转录而负调控 *phzA2-G2* 的转录, 对两个基因簇实施着区别性的调控作用。通过构建转录融合质粒 *phzA1-lacZ* 和 *phzA2-lacZ*, 分析它们在 M18 菌株和 *gacA* 突变株 M18G 中 β -半乳糖苷酶活性, 进一步验证了 RT-PCR 获得的实验结论。

在铜绿假单胞菌株 PAO1 中, *las* 和 *rhl* 组成的菌群传感系统具有级联放大的功能, *las* 系统的表达对 *rhl* 系统的表达具有促进作用。在荧光假单胞菌 2-79 和其他假单胞菌中, *rhlI* 和 *rhlR* 基因类似的 *phzIR* 的突变能完全抑制吩嗪类化合物的产生^[36], 正调控绿脓菌素 (PYO) 的产量。然而, 在 M18 菌株中, *las* 菌群传感系统却负调控 PCA 的产量, 其突变可使 PCA 产量提高^[37], 而 *rhl* 菌群传感系统则正调控 PCA 的产量, 其突变可使 PCA 产量降低^[4]。故推断

在假单胞菌株 M18 中, *las* 和 *rhl* 菌群传感系统并非通过级联放大作用调控 PCA 的合成, 这与铜绿假单胞菌株 PAO1 中菌群传感系统对 PYO 的调控形式不同。

通过对 M18 菌株中 *GacA* 对菌群传感系统的研究表明, *GacA* 对 *rhl* 菌群传感系统呈正调控^[27], 而对 *las* 菌群传感系统的影响不显著, 同样也表明了 *GacA* 并非经由 *las* 菌群传感系统间接调控 *rhl* 菌群传感系统的表达, 而是其他途径直接或间接地调控 *rhl* 系统的表达。

综上所述, M18 菌株中 *GacA* 对 PCA 的负调控作用可能并非主要经由 *las* 和 *rhl* 菌群传感系统实现。根据已经获得的证据表明, *las* 菌群传感系统负调控 PCA 的产量, 但不受到 *GacA* 的调控。*rhl* 菌群传感系统正调控 PCA 的产量, 同时又受到 *GacA* 的正调控, 故 *GacA* 的缺失使得 *rhl* 系统表达量降低, 进而导致 PCA 等吩嗪类化合物表达量的降低。然而, 在 M18 菌株中, *GacA* 突变能使 PCA 产量成倍增加^[21], 说明上述 *gacA-rhl-phz* 途径只是 *GacA* 对 PCA 调控网络的一部分, *GacA* 可能通过其他未知调控网络负调控 PCA 的合成, 且在调控力度上远远大于 *gacA-rhl-phz* 途径对 PCA 合成的调控作用, 上述结果总结为示意图 7。



7 M18 菌株中, *gacA* 和菌群传感系统对 *phz* 基因簇表达的调控网络

Fig.7 The regulation network of *gacA* and the quorum sensing system over *phz* gene cluster expression.

本实验室已证明在 M18 菌株中, 两个 *phz* 合成基因簇的上游启动子区域的核苷酸序列显著不同, 并且 *GacA* 正调控 *phzA1-G1* 基因簇而负调控 *phzA2-G2* 基因簇, 推断 *GacA* 可能通过 *rhl* 菌群传感系统

正调控 *phzA1-G1* 基因簇, 同时通过其他未知途径负调控 *phzA2-G2* 基因簇, 且对 *phzA2-G2* 基因簇的调控作用大于 *phzA1-G1* 基因簇, 使得 *GacA* 在整体上负调控 M18 中 PCA 的合成, 但具体的调控机制还有待进一步深入研究。

尽管已有证据表明假单胞菌株 M18 与铜绿假单胞菌株 PAO1 的基因组具有很高的同源性, 上述实验结论却与早先对假单胞菌株 PAO1 进行研究所得出的结论明显不同。鉴于假单胞菌株 M18 是从土壤分离出来的根际促生菌, 而非如 PAO1 菌株从人体中分离所得, 我们推测可能由于环境和进化的压力致使假单胞菌株 M18 和铜绿假单胞菌 PAO1 中 *GacA* 对合成基因簇的调控、两条 PCA 合成基因簇的各自的表达水平以及 PCA 及其衍生物的产量产生了明显的不同。

参考文献

- [1] Hu HB, Xu YQ, Zhang XH, et al. Isolation and characterization of a new fluorescent *Pseudomonas* strain that produces both phenazine 1-carboxylic acid and pyoluteorin. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2005, 15 : 86 - 90.
- [2] Ge YH, Huang XQ, Xu YQ, et al. Phenazine-1-carboxylic acid is negatively regulated and pyoluteorin positively regulated by *gacA* in *Pseudomonas* sp. M18. *FEMS Microbiology Letters*, 2004, 237 : 41 - 47.
- [3] Zhang XH, Wang SL, Xu YQ, et al. Differential regulation of *rsmA* gene on biosynthesis of pyoluteorin and phenazine-1-carboxylic acid in *Pseudomonas* sp. M18. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2005, 21 : 883 - 889.
- [4] Yan A, Huang XQ, Xu YQ, et al. An *rhl*-like quorum-sensing system negatively regulates pyoluteorin production in *Pseudomonas* sp. M18. *Microbiology (SGM)*, 2007, 153 : 16 - 28.
- [5] Huang XQ, Zhang XH, Xu YQ, et al. Positive regulation of pyoluteorin biosynthesis in *Pseudomonas* sp. M18 by quorum-sensing regulator VqsR. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2008, 15 (1) : 86 - 90.
- [6] Wang Y, Huang XQ, Xu YQ, et al. QscR acts as an intermediate in *gacA*-dependent regulation of PCA biosynthesis in *Pseudomonas* sp. M-18. *Current Microbiology*, 2008, 56 (4) : 339 - 345.
- [7] Heeb S, Blumer C, Haas D. Regulatory RNA as mediator in *GacA/RsmA*-dependent global control of exoproduct formation in *Pseudomonas fluorescens* CHA0. *Journal of Bacteriology*, 2002, 184 : 1046 - 1056.
- [8] Laville J, Voisard C, Keel C, et al. Global control in *Pseudomonas fluorescens* mediating antibiotic synthesis and suppression of black root rot of tobacco. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1992, 89 (5) : 1562 - 1566.

- [9] Souza JT ; Mazzola , M Raaijmakers JM , et al. Conservation of the response regulator gene *gacA* in *Pseudomonas* species. *Environmental Microbiology* , 2003 , 5(12) : 1328 - 1340.
- [10] Bull CT , Duffy B , Haas D , et al. Characterization of spontaneous *gacS* and *gacA* regulatory mutants of *Pseudomonas fluorescens* biocontrol strain CHA0. *Antonie Leeuwenhoek* , 2001 , 79 : 327 - 336.
- [11] Duffy B K , Défago G. Controlling instability in *gacS-gacA* regulatory genes during inoculants production of *Pseudomonas fluorescens* biocontrol strains. *Applied and Environment Microbiology* , 2000 , 66 : 3142 - 3150.
- [12] Corbell N , Loper JE. A global regulator of secondary metabolite production in *Pseudomonas fluorescens* Pf-5. *Journal of Bacteriology* , 1995 , 177 : 6230 - 6236.
- [13] Kraus J , Loper JE. Lack of evidence for a role of antifungal metabolite production by *Pseudomonas fluorescens* Pf-5 in biological control of *Pythium* damping-off of cucumber. *Phytopathology* , 1992 , 82 : 264 - 271.
- [14] Pfender W F , Kraus J , Loper J E. A genomic region from *Pseudomonas fluorescens* Pf-5 required for pyrrolnitrin production and inhibition of *Pyrenophora tritici-repentis* in wheat straw. *Phytopathology* , 1993 , 83 : 1223 - 1228.
- [15] Whistler CA , Corbell NA , Loper J E , et al. The two-component regulators GacS and GacA influence accumulation of the stationary-phase sigma factor σ^S and the stress response in *Pseudomonas fluorescens* Pf-5. *Journal of Bacteriology* , 1998 , 180 : 6635 - 6641.
- [16] Gaffney TD , Lam ST , Ligon J , et al. Global regulation of expression of antifungal factors by a *Pseudomonas fluorescens* biological control strain. *Molecular Plant-Microbe Interactions* , 1994 , 7 : 455 - 463.
- [17] Ligon JM , Hill DS , Hammer PE , et al. Natural products with antifungal activity from *Pseudomonas* biocontrol bacteria. *Pest Management Science* , 2000 , 56 : 688 - 695.
- [18] Aarons S , Abbas A , Adams C , et al. A regulatory RNA (PrtB RNA) modulates expression of secondary metabolite genes in *Pseudomonas fluorescens* F113. *Journal of Bacteriology* , 2000 , 182 : 3913 - 3919.
- [19] Chin-A-Woeng , T F C. Molecular basis of biocontrol of tomato and root rot by *Pseudomonas chlororaphis* strain PCL1391 , 2000 , Ph. D. thesis. University of Leiden , Leiden , The Netherlands.
- [20] Chin-A-Woeng T F C , van den Broek D , de Voer G , et al. Phenazine-1-carboxamide production in the biocontrol strain *Pseudomonas chlororaphis* PCL1391 is regulated by multiple factors secreted into the growth medium. *Molecular Plant-Microbe Interactions* , 2001 , 14 : 969 - 979.
- [21] Chancey ST , Wood DW , Pierson LS III . Two-component transcriptional regulation of *N*-acyl-homoserine lactone production in *Pseudomonas aureofaciens*. *Applied and Environment Microbiology* , 1999 , 65 : 2294 - 2299.
- [22] Heeb S , Itoh Y , Nishijyo T , et al. Small , stable shuttle vectors based on the minimum pVS1 replicon for use in Gram-negative , plant-associated bacteria. *Molecular Plant-Microbe Interactions* , 2000 , 13 : 232 - 237.
- [23] Thomashow LS , Weller DM. Current concepts in the use of introduced bacteria for biological disease control : mechanisms and antifungal metabolites. *Molecular Plant-Microbe Interactions* , 1996 , vol. 1 , pp. 187 - 236. Edited by G. Stacey & N. T. Keen. New York : Chapman & Hall.
- [24] Reimmann C , Beyele M , Latifi A , et al. The global activator GacA of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 positively controls the production of the autoinducer *N*-butyryl-homoserine lactone and the formation of the virulence factors pyocyanin , cyanide , and lipase. *Molecular Microbiology* , 1997 , 24(2) : 309 - 19.
- [25] Khan SR , Mavrodi DV , Jog GJ , et al. Activation of the *phz* operon of *Pseudomonas fluorescens* 2-79 requires the LuxR homolog PhzR , *N*-(3-OHhexanoyl)-l-homoserine lactone produced by the LuxI homolog PhzI , and a cis-acting *phz* box. *Journal of Bacteriology* , 2005 , 187 : 6517 - 6527.
- [26] Gambello MJ , Iglewski BH. Cloning and characterization of the *Pseudomonas aeruginosa lasR* gene , a transcriptional activator of elastase expression. *Journal of Bacteriology* , 1991 , 173 : 3000 - 3009.
- [27] Ochsner UA , Koch AK , Fiechter A , et al. Isolation and characterization of a regulatory gene affecting rhamnolipid biosurfactant synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology* , 1994 , 176 : 2044 - 2054.
- [28] 汤湘雍 , 严安 , 黄显清 , 等. 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. 微生物学报 (*Acta Microbiologica Sinica*) , 2006 , 46(3) : 478 - 481.
- [29] Sambrook J , Fritsch EF , Maniatis T. *Molecular Cloning : a Laboratory Manual* , 2nd edn , 1989 , Cold Spring Harbor , NY : Cold Spring Harbor Laboratory.
- [30] Chen WP , Kuo TT. A simple and rapid method for the preparation of Gram-negative genomic DNA. *Nucleic Acids Research* , 1993 , 21 : 2260 - 2261.
- [31] Savil H , Karadenizli A , Kolayli F , et al. Expression stability of six housekeeping genes : a proposal for resistance gene quantification studies of *Pseudomonas aeruginosa* by real-time quantitative RT-PCR. *Journal of Medical Microbiology* , 2003 , 52 : 403 - 408.
- [32] Sambrook J , Russell DW. *Molecular Cloning : A Laboratory Manual*. 3rd ed , 2001 , Cold Spring Harbor , NY : Cold Spring Harbor Laboratory.
- [33] Mavrodi DV , Bonsall RF , Delaney SM , et al. Functional analysis of genes for biosynthesis of pyocyanin and phenazine-1-carboxamide from *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Journal of Bacteriology* , 2001 , 183(21) : 6454 - 6465.

- [34] Parsons JF , Greenhagen BT , Shi K , et al. Structural and functional analysis of the pyocyanin biosynthetic protein PhzM from *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochemistry* , 2007 , 46 :1821 – 1828 .
- [35] Chugani SA , Whiteley M , Lee KM , et al. QscR , a modulator of quorum-sensing signal synthesis and virulence in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* , 2001 , 98 (5) : 2752 – 2757 .
- [36] Smith RS , Iglewski BH. *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing systems and virulence. *Current opinion in microbiology* , 2003 , 6 (1) : 56 – 60 .
- [37] Chen Y , Wang XL , Xu YQ , et al. Las-like quorum-sensing negatively regulates both pyoluteorin and phenazine-1-carboxylic acid production in *Pseudomonas* sp. M18. *Science in China Series C : Life Sciences* , 2008 , 51 (2) : 174 – 181 .

Regulation of GacA on two *phz* gene clusters and quorum sensing in *Pseudomonas* sp. M18

Mingqi Shi , Yaqian Li , Yi Wang , Jiaofang Huang , Xianqing Huang , Yuquan Xu *

(College of Life Science , Shanghai Jiaotong University , Shanghai 200240 , China)

Abstract [Objective] The regulatory function investigation of two component system *gacS/gacA* on two *phz* gene clusters expression and quorum sensing system (QS) in *Pseudomonas* . sp. M18. **[Methods]** The two *phz* gene clusters were sequenced and the expressional features by GacA were analyzed using RT-PCR and *phzA-lacZ* transcriptional fusions , the regulation of GacA over QS system was studied also in *P* . sp. M18. **[Results]** Two phenazine structural clusters , namely , *phzA1-G1* and *phzA2-G2* in *P* . sp. M18 shared 99% identities with those in *P* . *aeruginosa* PAO1. However , in the non-coding region downstream the *phzA2-G2* , *P* . sp. M18 has a three-144 bp-repeat sequence which does not exist in *P* . *aeruginosa* PAO1. *PhzA1-G1* expressed at a higher level than *phzA2-G2* in the wide type M18 strain. GacA functioned differently over these two *phz* gene clusters but negatively regulating the two clusters expression at the whole level , which was opposite to that in *P* . *aeruginosa* PAO1. The inactivation of *gacA* gene can reduce *rhII* expression while has no effect on *lasI* expression , indicating that the *phz* gene expression regulated by GacA via QS was a minor part and the major *phz* expression was regulated by GacA through an unknown pathway instead of QS in *P* . sp. M18. **[Conclusion]** The different regulation of GacA activity on secondary metabolites and QS in *P* . sp. M18 and *P* . *aeruginosa* PAO1 may be the results imposed by the environmental selective pressure during evolution pathway .

Keywords : phenazine-1-carboxyl ; phenazine biosynthesis clusters ; GacA ; quorum-sensing systems ; *Pseudomonas* sp. M18

(本文责编 : 王晋芳)