

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*  
51(6):769-775; 4 June 2011  
ISSN 0001-6209; CN 11-1995/Q  
<http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>

## 细菌群体感应参与铜绿假单胞菌胞内聚羟基脂肪酸酯合成的调控

徐操<sup>1,2</sup>, 李曼<sup>1,2</sup>, 黄媛媛<sup>1</sup>, 张哲<sup>1,3</sup>, 边子睿<sup>1,3</sup>, 宋水山<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>河北省科学院生物研究所, 石家庄 050051

<sup>2</sup>河北师范大学生命科学学院, 石家庄 050056

<sup>3</sup>河北工业大学化工学院, 天津 300100

**摘要:**群体感应是细菌根据细胞密度变化调控基因表达的一种调节机制。铜绿假单胞菌中 QS 系统由 *lasI* 和 *rhlI* 合成的信号分子 3OC12-HSL 和 C4-HSL 以及各自的受体蛋白 LasR、RhlR 组成, 它们以级联方式调控多个基因表达。【目的】研究细菌群体感应(QS)对聚羟基脂肪酸酯合成的调控。【方法】利用铜绿假单胞菌 PAO1 及其 QS 突变株为材料通过气相色谱、荧光定量 PCR 在生理和分子水平上研究 QS 对聚羟基脂肪酸酯合成的调控。【结果】QS 信号分子合成抑制剂阿奇霉素处理铜绿假单胞菌 PAO1 和 QS 突变株导致胞内 PHA 积累量显著减少; 铜绿假单胞菌 PAO1 中 C4-HSL 合成酶基因 *rhlI* 缺失突变株 PAO210 胞内 PHA 积累量与野生型无差别; 而 3OC12-HSL 合成酶基因 *lasI* 缺失突变株 PAO55、3OC12-HSL 受体合成酶基因 *lasR* 缺失突变株 PAO56 以及 *lasI/lasR* 双缺失突变株 PAO57 胞内 PHA 含量与野生型相比明显减少; *lasI* 和 *lasR* 的突变株体内 PHA 合成酶基因 *phaC1* 的表达量显著降低, 信号分子 3OC12-HSL 回补实验使 *phaC1* 的表达量可恢复到野生株水平, 但只可部分恢复 *lasI* 缺失导致的胞内 PHA 合成。【结论】由此推测, 铜绿假单胞菌群体感应系统中 *lasI/lasR* 系统参与胞内聚羟基脂肪酸酯合成的调控。

**关键词:** 铜绿假单胞菌, 细菌群体感应, 聚羟基脂肪酸酯

**中图分类号:** Q935    **文献标识码:** A    **文章编号:** 0001-6209 (2011)06-0769-07

群体感应(Quorum-sensing QS)是细菌通过特定信号分子的浓度来监测周围环境中自身或其他细菌的群体变化调节菌体中相关基因的表达来适应环境的一种调节机制。目前发现许多细菌利用 QS 系统调控体内特定的功能, 如固氮基因调控、抗生素产生、生物发光、质粒的接合转移、毒性基因的表达、色素产生、细菌的群游和生物膜的形成等<sup>[1]</sup>。

聚羟基脂肪酸酯(Polyhydroxyalkanoate, PHA)

是一类由多种微生物在碳、氮营养失衡的条件下作为碳源和能源贮存而合成的热塑性和生物降解性较理想的生物高聚物<sup>[2]</sup>。1994 年 Sun 等发现菌体生物发光强度和胞内 PHB 含量的变化有关, 暗示 PHB 的合成可能受哈氏弧菌 QS 系统信号分子 3-羟基丁酸高丝氨酸内酯(N-3-hydroxybutanoyl homoserine lactone)的控制<sup>[3]</sup>。随后较长时间内并无细菌 QS 系统与 PHA 合成之间相互关系的报告。近年来又

**基金项目:** 国家自然科学基金资助(30970030); 河北省自然科学基金资助(C2006000707)

\* 通信作者。Tel: +86-311-83999012; Fax: +86-311-83022636; E-mail: shuishans@hotmail.com

**作者简介:** 徐操(1985-), 女, 山东菏泽人, 硕士研究生, 主要从事应用微生物研究。E-mail: 2004xucao@163.com

**收稿日期:** 2010-12-13; **修回日期:** 2011-01-30

有研究报道指出恶臭假单胞菌 (*Pseudomonas putida*) KT2442 的双组分调节系统调节菌体 PHA 的合成<sup>[4]</sup>,而双组分调节系统中的 GacA 同源物又可能和细菌的 AHL 信号分子利用相同的信号转导途径调控下游基因的表达<sup>[5]</sup>,间接说明 QS 可能参与 PHA 的调控。2005 年 Hoffman 等发现铜绿假单胞菌 PAO1 的 *rpoN* 突变株失去合成 PHA 的能力,在限氮培养时 *rpoN* 突变株中 *phaC1* 的表达不受影响,*phaC1* 基因的负调节因子 *phaF* 的表达量显著提高<sup>[6]</sup>。并且在有利于 PHA 积累的培养条件下,RT-PCR 分析显示铜绿假单胞菌 PAO1 ( $\Delta rpoN$ ) 中无基因 *phaG* 的表达<sup>[7]</sup>。另有证据表明,RpoN 在营养丰富培养条件下负调控 PAO1 中的 QS 系统<sup>[8]</sup>,在氮缺乏条件下正调控其中的 QS 系统<sup>[9]</sup>。并且生物信息学分析显示,铜绿假单胞菌 PAO1 中 *phaC1* 的启动子区域含有一个假想的 RhIR 结合域,PHA 调节蛋白基因 *phal* 的启动子序列中含有结合 LasR 的 lux 框。另外,细菌的 AHL 合成酶利用 S-腺苷甲硫氨酸和酰基载体蛋白 (acyl-ACP) 为底物合成 AHL,而脂肪酸合成途径的中间产物 acyl-ACP 也可以经 *phaG* 转化产生 acyl-coA,进而合成 PHA,这预示着细菌的 QS 系统和 PHA 合成途径可能存在着物质流的竞争<sup>[10]</sup>。同时有关报告指出,铜绿假单胞菌 PAO1 中 PHA 生物合成和鼠李糖脂的生物合成之间存在着竞争同一前体化合物(3-羟基十烷酸组分)的现象,且鼠李糖脂的生物合成基因的表达又受到 *rhl* 系统的调控<sup>[11]</sup>。综合上述文献中的报道,我们推测铜绿假单胞菌 QS 系统可能参与菌体合成 PHA 的调控。

为验证这一推论,我们以铜绿假单胞菌 PAO1 及其 QS 突变株为材料,以胞内 PHA 积累量、PHA 生物合成相关基因 *phaC1* 表达量为检测指标,采用生理生化和分子生物学技术系统的研究 QS 系统对 PHA 生物合成的影响。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 菌株、质粒和培养条件:**表 1 为本实验所用的菌株。铜绿假单胞菌 PAO1 及其 QS 突变株 PAO55、PAO56、PAO57 (由英国诺丁汉大学分子医药学院 Miguel Camara 教授惠赠) 和 PAO210 在 LB

或 MM 培养基中 37℃ 培养。抗生素使用终浓度为:庆大霉素 (Gentamicin Gm) 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

表 1 本研究所使用的菌株和质粒

Strains	Relevant characteristics	Source
PAO1	PAO1; wild-type <i>P. aeruginosa</i> ATCC 15692	This Lab
PAO55	PAO1 <i>lasI</i> ::Gm; PAO1 with Gm cartridge inserted in <i>lasI</i>	12
PAO56	PAO1 <i>lasR</i> ::Gm; PAO1 with Gm cartridge inserted in <i>lasR</i>	12
PAO57	PAO1 <i>lasRI</i> ::Gm; PAO1 with Gm cartridge replacing <i>lasR</i> and <i>lasI</i>	12
PAO210	PAO1 with $\Delta(rhlI)$ ::Gm-GFP-FRT	13

**1.1.2 培养基:**LB 培养基<sup>[14]</sup>;MM 培养基<sup>[15]</sup>。

**1.1.3 引物:**表 2 为本研究使用的引物。依据 NCBI 中各基因的上下游序列设计引物,由上海生物工程工程有限公司合成。

表 2 荧光定量 PCR 引物

Primers	Sequence (5'→3')
PhaC1 up	CAGCGGTGACATCCAGAGC
PhaC1 down	CCAGTGCACCACCACGAGT
16S up	CTGGTGGCTACTGCGATCAA
16S down	GCTTTC AACGGCACTTCCTCT

**1.1.4 主要试剂:**实验所需酶购自 TaKaRa,3-羟基己酸 (3-hydroxyhexanoate 3HH)、3-羟基辛酸 (3-hydroxyoctanoic acid 3HO)、3-羟基癸酸 (3-hydroxydecanoic acid 3HD)、3-羟基十二碳酸 (3-hydroxydodecanoate 3HDD)、阿奇霉素、N-丁酰高丝氨酸内酯 (N-butryl-L-homoserinelactone C4-HSL)、3-氧代十二烷酰高丝氨酸内酯 (N-(3-oxododecanoyl)-l-homoserine lactone 3OC12-HSL) 购自 Sigma 公司,其他化学试剂均为分析纯。

### 1.2 气相色谱检测 PHA

菌体按 10% 接种量接种于 MM 培养基中,37℃ 培养 48h,9000  $\times$  g 离心 10 min。冷冻干燥,称量冻干物质 3 - 5 mg,加入 2 mL 酯化液和 2 mL 氯仿,100℃ 烘箱中酯化 4 h。冷却至室温后,加入 1 mL 蒸馏水,充分振荡混匀,取氯仿相进行气相色谱分析,PHA 含量的计算是所有 PHA 单体分别占细胞干重的百分比之和,其单体为(3HH、3HO、3HD、3HDD),具体测定方法见文献[16]。其中野生型和突变株各设 3 个重复,最后结果取其平均值。通过 DPS 软件分析数据, $P < 0.05$  确定为有统计学意义。

### 1.3 信号分子提取及检测

菌体按 10% 接种量接种于 MM 培养基中, 37°C 培养 48 h, 9000 × g 离心 10 min 收集上清。按 1:1 加入乙酸乙酯, 充分震荡, 静置待分层, 取上层。旋转蒸干, 重新溶于 1 ml 乙腈, 取 5 μL 样品液相色谱检测。详细 AHL 的测定原理和方法可参考文献 [17]。

### 1.4 Real-time PCR 分析 *phaC1* 基因的表达

菌体按 10% 接种量接种于 MM 培养基中, 37°C 培养 48 h。通过 TRNzol 法提取总 RNA, 进行 RT-PCR 反应, 反应体系: 4 μL 5 × PrimeScript™ Buffer (for Real Time), 1 μL PrimeScript™ RT Enzyme Mix I, 1 μL Oligo dT Primer (50 μM), 1 μL Random 6 mers (100 μM), 500 ng RNA 样品, 用 RNase Free dH<sub>2</sub>O 补至 10 μL。反转录反应条件: 37°C, 15 min; 85°C, 5 sec。荧光定量 PCR 反应体系: 10 μL SYBR Premix Ex Taq™, PCR Forward Primer 0.4 μL, PCR Reverse Primer 0.4 μL, 0.4 μL ROX Reference Dye II, DNA 模板 1000 ng, 灭菌蒸馏水补至 20 μL。荧光定量反应条件: 95°C, 5 s; 60°C, 31 s 共 40 个循环。反应前 95°C 变性 10 s。

## 2 结果

### 2.1 不同碳源对铜绿假单胞菌 PAO1 PHA 合成的影响

为了解不同碳源对铜绿假单胞菌 PAO1 中 PHA 合成的影响, 我们以 0.05% NH<sub>4</sub>Cl 为唯一氮源, 分别以 15g/L D-葡萄糖酸钠、葡萄糖、辛酸钠为碳源, 菌体按 10% 接种量接种于 MM 培养基中, 每 8 h 取样。结果显示铜绿假单胞菌 PAO1 在不同碳源的培养基中, 其细胞干重随着时间的增加而增加, 在 48 h 时细胞干重最大 (图 1)。气相色谱检测结果表明, 铜绿假单胞菌 PAO1 胞内 PHA 积累量在不同碳源的培养基中随着时间的增加而增加, 并在 48 h 时胞内 PHA 积累量最大。并且以 D-葡萄糖酸钠为碳源时, 48 h 细胞干重分别是葡萄糖、辛酸钠为碳源的 1.57、1.14 倍; 胞内 PHA 积累量分别是葡萄糖、辛酸钠为碳源的 2.8、1.23 倍 (图 1)。

### 2.2 群体感应基因缺失对菌体合成 PHA 的影响

通过对铜绿假单胞菌 PAO1 及其 QS 突变株在 48h 胞内 PHA 积累量的分析, 我们发现, C4-HSL 合

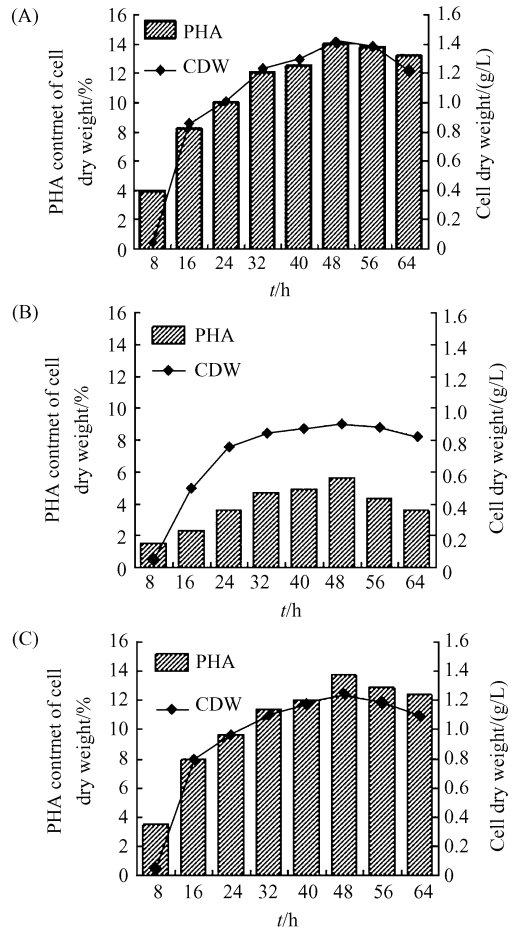


图 1 不同碳源对铜绿假单胞菌 PAO1 合成 PHA 的影响

Fig. 1 Production of PHA in *P. aeruginosa* PAO1 grown on different carbon sources. For each carbon source, the experiment was repeated six times. A: Bacterial cells were grown in MM medium with D-Gluconate as the sole carbon source. B: Bacterial cells were grown in MM medium with glucose as the sole carbon source. C: Bacterial strains were grown in MM medium with Octanoate as the sole carbon source.

成酶基因 *rhII* 缺失突变株 PAO210 胞内 PHA 积累量与野生型无差别; 3OC12-HSL 合成酶基因 *lasI* 缺失突变株 PAO55、3OC12-HSL 受体合成酶基因 *lasR* 缺失突变株 PAO56 以及 *lasI/lasR* 双缺失突变株 PAO57 与野生型存在显著性差异 (图 2), 分别为野生型胞内 PHA 积累量的 0.25、0.28、0.16 倍。同时检测铜绿假单胞菌 PAO1 及其 QS 突变株 48h 时信号分子的含量, 发现在 PAO56 和野生型并无区别, PAO210 中只含有 3OC12-HSL 并不含有 C4-HSL, PAO55、PAO57 中只含有 C4-HSL 并不含有 3OC12-HSL (结果未显示)。

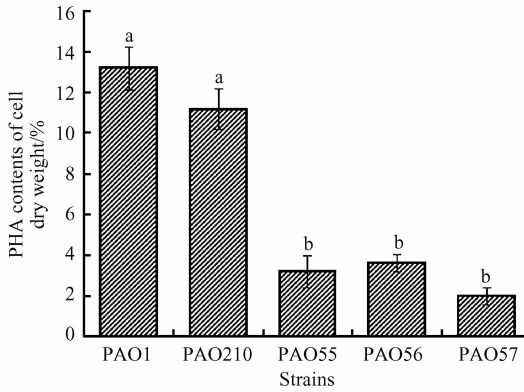


图2 野生菌与突变株胞内 PHA 含量比较

Fig. 2 Comparison of content of PHA between wide type strain and the mutants. Results are the mean  $\pm$  standard deviations of three independent experiments, a, b:  $P < 0.05$ , compared with PAO1.

### 2.3 阿奇霉素对 PHA 合成的影响

据文献报道阿奇霉素影响细菌群体感应信号分子的合成<sup>[18]</sup>。随着阿奇霉素的增加,铜绿假单胞菌 PAO1 的生长有所抑制,但阿奇霉素浓度低于  $2 \mu\text{g/mL}$  时,铜绿假单胞菌 PAO1 的生长几乎不受影响(图 3-A),因此在生长初期培养基中添加该浓度阿奇霉素,48 h 后气相检测,发现阿奇霉素处理过的 PAO1、PAO210、PAO55 胞内 PHA 积累量均降低,阿奇霉素处理 PAO1 胞内 PHA 积累量比未处理对照降低了 36%;PAO210 与未处理对照相比较降低了 63%;PAO55 降低 64%(图 3-B)。进一步确定阿奇霉素抑制铜绿假单胞菌 PAO1 胞内 PHA 的合成是由于阿奇霉素抑制信号分子的合成。我们提取铜绿假单胞菌 PAO1 48 h 时信号分子,经液相检测发现经  $2 \mu\text{g/mL}$  阿奇霉素处理后,3OC12-HSL 与 C4-HSL 浓度比未处理对照分别降低 78 和 59%(图 3-C),综合图(3-B)、图(3-C)结果表明,阿奇霉素可能通过抑制信号分子合成间接参与铜绿假单胞菌 PAO1 胞内 PHA 的调控。

### 2.4 信号分子的添加对 PHA 合成的影响

为了解信号分子对 PHA 合成的影响,据前期的研究结果,选用终浓度为  $4 \mu\text{mol/L}$  信号分子处理铜绿假单胞菌 QS 突变株。结果如图 4 所显示,培养基中添加 C4-HSL 对 PAO210 胞内 PHA 的积累量无明显影响。培养基中添加 3OC12-HSL 的 PAO56、PAO57 胞内 PHA 的积累量与未处理对照相比较无明显差异,但 PAO55 胞内 PHA 积累量增加至未处理对照的 2 倍。结果表明,C4-HSL 对铜绿假单胞菌

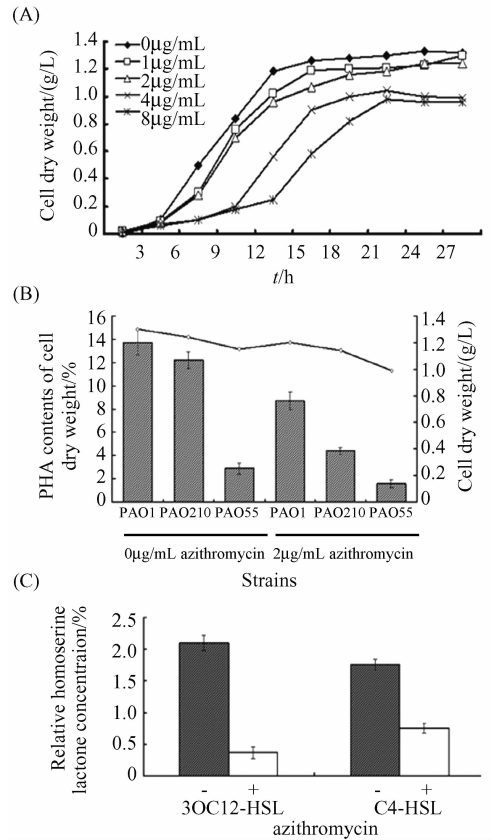


图3 阿奇霉素对 PAO1 生长 (A)、PHA 积累 (B) 和信号分子 (C) 的影响

Fig. 3 Effect of azithromycin on *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 growth (A), PHA accumulation (B), AHL production (C). (A) Bacterial cells were grown in MM medium in the absence or in the presence ( $1 \mu\text{g/mL}$ ;  $2 \mu\text{g/mL}$ ;  $4 \mu\text{g/mL}$ ;  $8 \mu\text{g/mL}$ ) of azithromycin. (B) Bacterial cells were grown for 48h in MM medium containing no or  $2 \mu\text{g/mL}$  azithromycin and analyzed for PHA content by GC. (C) Bacterial cells were grown for 48 h in MM medium containing no or  $2 \mu\text{g/mL}$  azithromycin. The supernatants were extracted with ethylacetate, and the 3OC12-HSL and C4-HSL concentrations were measured using HPLC. The relative AHL concentration were means  $\pm$  standard deviations based on five independent experiments.

PAO1 胞内 PHA 合成的调控作用不明显,3OC12-HSL 促进铜绿假单胞菌 PAO1 胞内 PHA 合成。

### 2.5 群体感应对 *phaC1* 基因表达的影响

为探索 *phaC1* 表达是否受 QS 的调控,采用实时荧光定量 PCR 分析绿假单胞菌 PAO1、QS 突变株以及分别经  $4 \mu\text{mol/L}$  3OC12-HSL 信号分子处理后 48 h 时 *phaC1* 表达情况。结果显示,与铜绿假单胞菌 PAO1 相比较,PAO55、PAO56、PAO57 菌株 *phaC1* 基因表达量分别下调 68%、56%、67.5%。互补

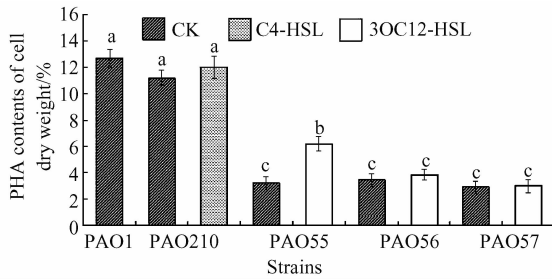


图4 信号分子对 PHA 合成的影响

Fig. 4 Effect of AHLs on PHA accumulation. Results are the mean  $\pm$  standard deviations of three independent experiments, a, b, c;  $P < 0.05$ , compared with PAO1.

3OC12-HSL 信号分子于 PAO 56、PAO 57 与未处理对照比较 *phaCI* 基因表达量没有改变, 而 PAO55 菌株 *phaCI* 基因表达量上调至野生菌水平(图 5), 由此可见, 群体感应 *las* 系统对 *phaCI* 基因的转录具有正调控作用。

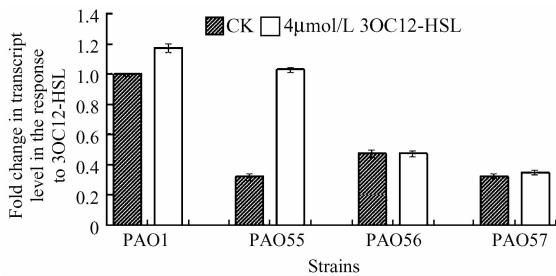


图5 化合物 3OC12-HSL 对 *phaCI* 基因表达的影响

Fig. 5 Effect of 3OC12-HSL addition on the expression of *phaCI*. Results are the mean  $\pm$  standard deviations of three independent experiments.

### 3 讨论

细菌 QS 具有全局调控功能, 通过自诱导物全面调控细菌的代谢、生理、生长和运动等多种生命过程, 尤其是细菌的次生代谢产物。Sun 等研究发现调控系统信号分子的受体 LuxR 是哈氏弧菌合成 PHB 所必须的<sup>[19]</sup>, 初步表明细菌 QS 参与胞内 PHA 的合成。随后关于这方面的研究较少, 目前文献报道只能间接的表明 QS 参与 PHA 的调控, 正因如此, 根据相关文献报道, 我们以铜绿假单胞菌为材料, 进一步研究 QS 对 PHA 的调控。本研究表明在限氮的情况下, 随着铜绿假单胞菌 PAO1 生长至稳定期, 信号分子浓度与细胞的生物量成正比(结果未显示)。并且在 D-葡萄糖酸钠为碳源 48 h 时细胞干重、胞内 PHA 含量最高, 其 PHA 的主要成分为 3HO 和 3HD,

这与 Timm 等研究相一致<sup>[15]</sup>。铜绿假单胞菌体内存在两种 QS 系统, 其中蛋白 LasI 合成 3OC12-HSL, 其受体蛋白为 LasR; RhlI 合成 C4-HSL, 其受体蛋白为 RhlR; 其调节机制是信号分子扩散到细胞外后, 随着细胞密度的增加而积累, 当这种信号密度积累到临界密度时就与相应受体蛋白结合, 结合后的复合物激活相关的基因。在铜绿假单胞菌体内两套 QS 系统既相独立, 又相互联系<sup>[20]</sup>, 并且这两套 QS 系统中 *las* 系统处于主导位置, *rhl* 系统需在 *las* 控制下进一步激活目的基因<sup>[21]</sup>。本实验通过检测铜绿假单胞菌 PAO1 与 QS 突变株胞内 PHA 积累量, 发现 *las* 突变株胞内 PHA 积累量比野生型铜绿假单胞菌 PAO1 含量明显减少, 而 *rhl* 突变株胞内 PHA 含量与野生株相比较并没有区别, 说明在铜绿假单胞菌 PAO1 中, 对于 PHA 的调控, *las* 系统起着主要调控作用。

铜绿假单胞菌中 QS 系统主要产生两种 AHL 信号分子, 3OC12-HSL 和 C4-HSL。因此, 我们对 QS 突变株通过添加信号分子抑制剂阿奇霉素以及信号分子研究 QS 对铜绿假单胞菌 PHA 合成的调控。本实验表明当阿奇霉素浓度低于 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  时, 铜绿假单胞菌 PAO1 的生长几乎不受影响, 并且有关研究也表明 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的阿奇霉素能抑制铜绿假单胞菌 PAO1 中 3OC12-HSL、C4-HSL 的产生, 且铜绿假单胞菌 PAO1 处于稳定期时才对阿奇霉素敏感<sup>[22]</sup>。因此当菌株处于生长初期时, 向培养基中添加 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  阿奇霉素, 发现经阿奇霉素处理 PAO1、PAO210、PAO55 的胞内 PHA 积累量均降低, 间接说明 QS 参与 PHA 的调控。经信号分子处理 PAO55 胞内 PHA 的积累量是未处理对照的 2 倍, 虽 PHA 积累量明显增加但没有恢复到野生型水平。而分子水平分析 *phaCI* 基因表达量, 经信号分子处理后 PAO 55 *phaCI* 基因表达量恢复到野生型水平, 结果与气相分析结果有些出入, 我们猜测由于细菌体内代谢流的调控相当复杂, 而 Real-time PCR 仅仅是在转录水平上进行分析, 转录之后存在各种因素可能导致 PHA 含量达不到野生型水平。综合上述结果表明 QS 系统参与菌体 PHA 生物合成的调控。

本研究提供了铜绿假单胞菌中 QS 系统参与 PHA 生物合成调控作用的实验证据, 对于丰富群体感应系统的生物学功能具有一定的意义。根据本文研究, 我们知道铜绿假单胞菌中 QS 系统可能具有调控 PHA 生物合成新功能, 但对于铜绿假单胞菌中群体感应系统怎样参与 PHA 生物合成的调控机制

并不是很清楚。依据本文研究以及相关文献,我们猜测 *rhl* 系统与铜绿假单胞菌 PAO1 中 *phaC1* 的启动子区域中 RhIR 结合域结合参与 PHA 的合成,但 *rhl* 系统需在 *las* 控制下才能被激活;或者 *las* 系统直接调节 *phal* 的启动子序列中 LasR 的 *lux* 框参与 PHA 的合成。目前这些问题正在研究中。

## 参考文献

- [ 1 ] Whithead NA, Banard AML, Slater H, Simpson NJL, Salmond GPC. Quorum-sensing in Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiology Letters*, 2002, 25: 364-404.
- [ 2 ] Lee S Y, Choi J, Wong HH. Recent advances in polyhydroxyalkanoate production by bacterial fermentation: mini-review. *International Journal of Biological Macromolecules*, 1999, 25: 31-36.
- [ 3 ] Sun WQ, Cao JG, Teng K, Meighen EA. Biosynthesis of poly-3-hydroxybutyrate in the luminescent bacterium, *Vibrio harveyi*, and regulation by the lux autoinducer, N-(3-hydroxybutanoyl) homoserine lactone. *Journal of Biological Chemistry*, 1994, 269: 20785-20790.
- [ 4 ] Chatterjee A, Cui YY, Yang HH, Collmer A, Alfano JA, Chatterjee AK. GacA, the response regulator of a two-component system, acts as a master regulator in *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000 by controlling regulatory RNA, transcriptional activators, and alternate sigma factors. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2003, 16: 1106-1117.
- [ 5 ] Reimann C, Beyeler M, Latifi A, Winteler H, Foglino M, Lazdunski A, Haas D. The global activator GacA of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 positively controls the production of the autoinducer *N*-butyryl-homoserine lactone and the formation of the virulent factors pyocyanin, cyanide and lipase. *Molecular Microbiology*, 1997, 24: 309-319.
- [ 6 ] Hoffman N, Rehm BHA. Nitrogen-dependent regulation of medium-chain length polyhydroxyalkanoate biosynthesis genes in pseudomonas. *Biotechnology Letters*, 2005, 27: 279-282.
- [ 7 ] Homann N, Rehm BHA. Regulation of polyhydroxyalkanoate biosynthesis in *Pseudomonas putida* and *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiology Letters*, 2004, 237:1-7.
- [ 8 ] Heurlier K, Dénervaud V, Pessi G. Negative control of quorum sensing by RpoN ( $\sigma^{54}$ ) in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Journal of Bacteriology*, 2003, 185: 2227-2235.
- [ 9 ] Lyndal S, Thompson LS, Jeremy S, Reimann C, Haas D. The alternative sigma factor RpoN regulates the quorum sensing gene *rhlI* in *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiology Letters*, 2003, 220: 187-195.
- [ 10 ] Parsek MR, Val DL, Hanzelka BL, Cronan JE, Greenberg EP. Acyl-homoserine lactone quorum-sensing signal generation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1999, 96, 4360-4365.
- [ 11 ] Choi MH, Xu J, Gutierrez M. Metabolic relationship between polyhydroxyalkanoic acid and rhamnolipid synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*: Comparative (13) C NMR analysis of the products in wild-type and mutants. *Journal of Bacteriology*, 2010, 10; 151(1):30-42.
- [ 12 ] Beatson SA, Whitchurch CB, Semmler ABT, Mattick JS. Quorum sensing is not required for twitching motility in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology*, 2002, 184(13): 3698-3604.
- [ 13 ] Hoang TT, Karkhoff-Schweizer RR, Kutchma AJ, Schweizer HP. 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.
- [ 14 ] Sambrook J, Frisch EF, Maniatis T. Molecular cloning: A Laboratory Manual. 2nded. New York: Cold Spring Harbour Laboratory Press, 1989.
- [ 15 ] Timm A, Steinbüchel A. Formation of polyesters consisting of medium-chain-length 3-hydroxyalkanoic acids from gluconate by *Pseudomonas aeruginosa* and other *Fluorescent pseudomonas*. *Applied and Environmental Microbiology*, 1990, 11: 3360-3367.
- [ 16 ] Brandl H, Gross RA, Lenz, Fuller RC. *Pseudomonas oleovorans* as a source of poly(3-hydroxyalkanoates) for potential applications as biodegradable polyesters. *Applied Environmental Microbiology*, 1988, 54: 1977-1982.
- [ 17 ] McClean KH, Winson MK, Leigh Fish L, Taylor A, Chhabra SR, Camara M, Daykin M, Lamb JH, Swift S, Bycroft BW, Stewart GSAB, Williams P. Quorum sensing and *Chromobacterium violaceum*: exploitation of violacein production and inhibition for the detection of *N*-acylhomoserine lactones. *Microbiology*, 1997, 143: 3703-3711.
- [ 18 ] Tateda K, Comte R, Pechere JC, Köhler T, Yamaguchi K, Delden CV. Azithromycin inhibit quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2001, 6(45): 1930-1933.
- [ 19 ] Miyamoto AM, Sun WQ, Meighen EA. The LuxR regulator protein controls synthesis of polyhydroxybutyrate in *Vibrio harveyi*. *Biochimic et Biophysica Acta*, 1998, 1384: 356-364.

- [20] Pesci EC, Milbank JBJ, Pearson JP, McKnight S, Kende AS, Greenberg EP, Iglewski BH. Quinone signaling in the cell-to-cell communication system of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1999, 96 (20): 11229-11234.
- [21] McKnight SL, Iglewski BH, Pesci EC. The pseudomonas quinolone signal regulates rhl quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology*, 2000, 182 (10): 2702-2708.
- [22] Imamura Y, Higashiyama Y, Tomono K, Izumikawa K, Yanagihara K, Ohno H, Miyazaki Y, Hirakata Y, Mizuta Y, Kadota J, Iglewski BH, Kohno S. Azithromycin exhibits bactericidal effects on *Pseudomonas aeruginosa* through interaction with the outer membrane. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2005, 49(4): 1377-1380.

## Involvement of quorum-sensing in biosynthesis of polyhydroxyalkanoates in *Pseudomonas aeruginosa*

Cao Xu<sup>1,2</sup>, Man Li<sup>1,2</sup>, Yuanyuan Huang<sup>1</sup>, Zhe Zhang<sup>1,3</sup>, Zirui Bian<sup>1,3</sup>, Shuishan Song<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Biology Institute, Hebei Academy of Sciences, Shijiazhuang 050051, China

<sup>2</sup> School of Life Science, Hebei Normal University, Shijiazhuang 050056, China

<sup>3</sup> College of Chemistry and Engineering, Hebei University of Technology, Tianjin 300130, China

**Abstract:** Quorum-sensing (QS) is a regulatory mechanism with which bacteria regulate the gene expression according to their population density. *Pseudomonas aeruginosa* regulates the expression of multiple genes via a hierarchical quorum-sensing cascade through LasR and RhlR and their cognate signal molecules N-(3-oxododecanoyl)-L-homoserine lactone (3O-C12-HSL) and N-(butanoyl)-L-homoserine lactone (C4-HSL). [ **Objective** ] It aims to explore the regulation of QS on biosynthesis of polyhydroxyalkanoates (PHA) in *P. aeruginosa*. [ **Methods** ] Wild-type *P. aeruginosa* PAO1 and its QS mutants were used to investigate the effects of quorum-sensing on biosynthesis of PHA by GC and real-time PCR at physiological and molecular level. [ **Results** ] After treated with QS signal molecule synthesis inhibitor azithromycin, the accumulation of PHA significantly decreased in *P. aeruginosa* PAO1 and its QS mutant strains. The content of PHA in C4-HSL synthase gene *rhlI* mutant strain PAO210 had no significant difference compared with that of the wild type. However, the PHA contents were significantly affected in 3O-C12-HSL synthase gene *lasI* mutant strain PAO55, 3O-C12-HSL transcriptional regulator gene *lasR* mutant strain PAO56 and *lasI/lasR* double mutant strain PAO57. PHA synthase gene *phaCI* expression exhibited a significant reduction in *lasI* mutant and *lasR* mutant strains. 3O-C12-HSL signal molecules complementary experiment shows that the expression of *phaCI* can be recovered to the level of the wild type, but the synthesis of PHA is only partially restored in *lasI* mutant strain. [ **Conclusion** ] The results implicates that *lasI/lasR* system might be involved in the regulation of intracellular PHA biosynthesis in *P. aeruginosa* PAO1.

**Keywords:** *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, quorum sensing, polyhydroxyalkanoates

(本文责编:王晋芳)

Supported by the National Natural Science Foundation (Y30970030) and by the Hebei Natural Science Foundation (YC2006000707)

\* Corresponding author. Tel: +86-311-83999012; Fax: +86-311-83022636; E-mail: shuishans@hotmail.com

Received: 13 December 2010/ Revised: 30 January 2011