

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
52(6):710-717; 4 June 2012
ISSN 0001-6209; CN 11-1995/Q
<http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>

生防假单胞菌 2P24 中 *mvaT* 和 *mvaV* 基因对 PcoI/PcoR 群体感应系统的调控作用

吴小刚¹, 魏亚蕊², 刘九成¹, 张力群^{1*}

¹ 中国农业大学植物病理系, 农业部植物病理学重点开放实验室, 北京 100193

² 内蒙古农业大学农学院, 呼和浩特 010018

摘要: 【目的】自小麦全蚀病自然衰退土壤分离得到的荧光假单胞菌 (*Pseudomonas fluorescens*) 2P24, 可防治多种由植物病原菌引起的土传病害。菌株 2P24 具有群体感应 (quorum-sensing, QS) 系统 PcoI/PcoR, 该系统影响生防菌 2P24 生物膜的形成以及其在小麦根围的定殖能力, 从而影响 2P24 的生防能力。本文利用遗传学方法进一步研究了 2P24 中 QS 系统的调控途径。【方法】将 QS 系统信号合成基因 *pcoI* 的转录报告质粒 p970Gm-*pcoI*p 转入 *gacA* 基因突变菌株 PM201 中, 再利用 Tn5 转座子对该菌株进行随机突变, 筛选影响 *pcoI* 基因表达的调控因子。【结果】根据菌落颜色的变化筛选到 2 株突变菌株。Tn5 插入位点和基因序列分析表明这 2 个突变体中 Tn5 破坏了同一个基因 *mvaT*; 设计引物利用 PCR 方法从 2P24 基因组中获得 *mvaT* 基因及其同源基因 *mvaV*。转录融合报告实验表明: 与野生菌株 2P24 相比, *mvaT* 及 *mvaV* 突变体中 *pcoI* 基因的表达和 *N*-乙酰高丝氨酸内酯的产量显著提高; HPLC 试验表明 *mvaT* 和 *mvaV* 基因影响抗生素 2,4-二乙酰基间苯三酚的合成。细菌双杂交试验证实, MvaT 蛋白和 MvaV 蛋白在体内发生自身互作, 这两个蛋白也可相互作用。【结论】以上结果表明 *mvaT* 和 *mvaV* 参与调控生防假单胞菌 2P24 的 PcoI/PcoR 群体感应系统, 并可能影响其生防功能基因的表达。

关键词: 荧光假单胞菌 (*Pseudomonas fluorescens*), 群体感应, 2,4-二乙酰基间苯三酚, MvaT, MvaV

中图分类号: Q933 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209 (2012)06-0710-08

假单胞菌 (*Pseudomonas* spp.) 是一类广泛分布于植物根围的革兰氏阴性细菌, 这类细菌中的许多种类可有效防治由植物病原真菌、细菌引起的土传病害, 因此被作为植物病害生防菌得到广泛研究^[1]。植物根围的定殖能力强弱在很大程度上决定了生防菌株的防病效果。生防菌株在寄主植物根围的定殖受到多种环境因素以及菌体内调控系统, 如群体感应系统 (Quorum sensing, QS) 的严格调控。

QS 系统是细菌通过感应自身产生的信号分子, 监测其群体密度的变化进而调控基因表达的一种机制^[2]。革兰氏阴性细菌中常见的信号分子是由 *luxI* 基因合成的 *N*-乙酰高丝氨酸内酯 (*N*-acyl-homoserine lactone, AHL)^[2]。当细菌中 *luxI* 基因合成的 AHL 达到特定浓度时, AHL 与转录调节子 LuxR 相结合, 并促进 LuxR 蛋白构象发生变化。结合 AHL 后的 LuxR 蛋白可调控许多靶标基因的表达。

基金项目: 国家自然科学基金 (31071725, 30871666); 国家“863 计划” (2011AA10A205)

* 通信作者。Tel/Fax: +86-10-62731464; E-mail: zhanglq@cau.edu.cn

作者简介: 吴小刚 (1979-), 男, 河南博爱人, 博士, 主要从事分子微生物学研究。E-mail: wuxiaogangcau@gmail.com

收稿日期: 2011-12-18; 修回日期: 2012-02-28

达^[3]。如菌株 *P. chlororaphis* 30-84 中 CsaI/CsaR QS 系统调控该菌株在小麦根围的定殖以及细胞表面组分的合成,缺失 *csaI* 基因显著降低该菌株在小麦根围的定殖并影响其对小麦全蚀病原菌的生防效果^[4]。同样 *P. fluorescens* 2P24 中 PcoI/PcoR QS 系统虽不影响该菌株主要生防因子——抗生素 2,4-二乙酰基间苯三酚(2,4-diacetylphloroglucinol, 2,4-DAPG)的产量,但缺失 PcoI/PcoR QS 系统任一组分都会导致该菌生物膜形成能力和根围定殖能力的下降以及对小麦全蚀病防效的降低^[5-6]。

QS 系统同样受到其他调控因子的精细调控,如 *P. aeruginosa* PAO1 中 GacS/GacA 双因子系统在转录水平正调控 AHL 合成基因的表达,影响 AHL 的产量^[7]。GacS/GacA 双因子系统由感应激酶 GacS 及其对应的反应调控因子 GacA 组成。GacS 感应外界信号后自身磷酸化,之后将磷酸基团传递给下游的反应调控因子 GacA。磷酸化的 GacA 则调控下游相关性状^[1]。前期研究表明菌株 2P24 中 GacS/GacA 系统调控 Sigma 因子编码基因 *rpoS*,而 *rpoS* 基因虽然调控 PcoI/PcoR QS 系统,但是 GacS/GacA 系统并不是通过 RpoS 调控 PcoI/PcoR 系统,表明还存在其他调控因子参与调控 PcoI/PcoR QS 系统^[8]。

本文利用 Tn5 随机插入突变的方法筛选 *P. fluorescens* 2P24 菌株中影响 QS 系统信号合成基因 *pcol* 表达的调控因子。研究结果表明突变 *mvaT* 和 *mvaV* 基因显著提高 *pcol* 基因的表达及 AHL 的产量;同时与野生菌株相比, *mvaT* 和 *mvaV* 突变菌株生物膜形成的能力显著提高。另外, *mvaT* 和 *mvaV* 基因也正调控抗生素 2,4-DAPG 的产生。因此 MvaT 类调控因子可能是影响菌株 2P24 生防能力的一个重要的全局性调控因子。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株、质粒和培养条件:本实验中用到的菌株和质粒列于表 1 中。*P. fluorescens* 2P24 及其突变菌株于 30℃ 在 LB 或 ABM 培养基中培养^[9]。抗生素使用浓度分别为:氨苄青霉素(Ap) 50 μg/mL,卡那霉素(Km) 50 μg/mL,四环素(Tet) 20 μg/mL,氯霉素(Cm) 20 μg/mL,庆大霉素(Gm) 50 μg/mL。用

于重组质粒筛选的 5-溴-4-氯-3-吡啶-β-D-半乳糖苷(X-Gal) 终浓度为 40 μg/mL。

1.1.2 引物:本实验中用到的引物列于表 2 中。

1.1.3 主要试剂和仪器:基因组 DNA 提取试剂盒和质粒提取试剂盒购自 Promega 公司。Ex-Taq DNA 聚合酶、限制性核酸内切酶以及 T4 DNA 连接酶均购自 TaKaRa 公司。引物由上海英俊公司合成。其他试剂均为国产或进口分析纯。

1.2 DNA 操作和序列分析

DNA 操作参照文献[11]。质粒电击转化到 *P. fluorescens* 菌株中的方法参照文献[5]。DNA 序列测序由北京诺赛基因组研究有限公司完成。核苷酸序列以及推测的蛋白序列分析由在线 BLAST 搜索引擎完成(<http://blast.ddbj.nig.ac.jp/top-e.html>)。

1.3 突变菌株的筛选及 Tn5 的定位

以含有 *pcol-lacZ* 转录报告质粒 p970Gm-*pcol* 的菌株 PM201 (*gacA*⁻) 为出发菌株,利用 Tn5 对该菌株进行随机突变,在含有 X-Gal 的 ABM 培养基中筛选菌落颜色明显变蓝(表明 *pcol* 基因表达增强)的突变菌株。利用鸟枪法克隆 Tn5 及其两侧侧翼序列基因并测序,以确定突变的基因。

1.4 *mvaT* 及 *mvaV* 基因内缺失突变菌株的构建

mvaT 基因内缺失突变菌株的获得参照文献[9]。为互补突变菌株 PM110,利用引物 MvaT1 和 MvaT2(表 2) PCR 扩增得到完整的 *mvaT* 基因并克隆到穿梭载体 pRK415 中得到互补载体 pRK415-*mvaT*,用于互补实验。

利用菌株 2P24 全基因组序列草图查找得到了 *mvaT* 的同源基因 *mvaV*。获得 *mvaV* 基因内缺失突变菌株的具体方法参照文献[9]。设计引物 *mvaVPstI* 和 *mvaVBamHI*(表 2) PCR 获得完整的 *mvaV* 基因并克隆于 pRK415 中得到互补载体 pRK415-*mvaV*。

1.5 MvaT 和 MvaV 蛋白的相互作用

设计引物对 kt25*mvaTN*/kt25*mvaTC*、ut18*CmvaTN*/ut18*CmvaTC*、kt25*mvaVN*/kt25*mvaVC* 和 ut18*CmvaVN*/ut18*CmvaVC*(表 1),分别扩增 *mvaT* 和 *mvaV* 基因并克隆于细菌双杂交系统载体 pKT25 和 pUT18C 中。将获得的相应质粒转入 *E. coli* BTH101 中,检测 MvaT 和 MvaV 蛋白之间的相互作用,具体过程参照文献[16],该实验重复 3 次。

表 1 本实验所用菌株和质粒

Table 1 Bacterial strains and plasmids used in this study

| Name | Relevant characteristics | Reference or source |
|---|--|---------------------|
| <i>Pseudomonas fluorescens</i> | | |
| 2P24 | Wild type | |
| PM201 | Derivative of 2P24, <i>gacA</i> gene in-frame deletion, Ap ^r | [10] |
| PM110 | Derivative of 2P24, <i>mvaT</i> gene in-frame deletion, Ap ^r | This study |
| PM113 | Derivative of 2P24, <i>mvaV</i> gene in-frame deletion, Ap ^r | This study |
| <i>Escherichia coli</i> | | |
| DH5 α | <i>supE44</i> Δ <i>lacU169</i> ((80 <i>lacZ</i> Δ M15) <i>hsdR17</i> <i>recA1</i> <i>endA1</i> <i>gyrA96</i> <i>thi-1</i> <i>relA1</i> | [11] |
| BTH101 | F ⁻ , <i>cya-99</i> , <i>araD139</i> , <i>galE15</i> , <i>galK16</i> , <i>rpsL1</i> (<i>Str</i> ^r), <i>hsdR2</i> , <i>mcrA1</i> , <i>mcrB1</i> | Euromedex |
| <i>Agrobacterium tumefaciens</i> NTL4 (pZLR4) | <i>A. tumefaciens</i> NT1 derivative carrying a <i>traG-lacZ</i> reporter fusion, AHL biosensor, Gm ^r | [12] |
| Plasmids | | |
| pUT-Km | mini-Tn5 delivery plasmid with Km ^r , Ap ^r | [13] |
| pRK600 | Helper plasmid for triparental mating, Cm ^r | [14] |
| p970Gm-pcoIp | <i>pcoI-lacZ</i> transcriptional fusion, Gm ^r | This study |
| pHSG299 | Cloning vector, Km ^r | TaKaRa |
| pHSG299- Δ <i>mvaT</i> | pHSG299 carrying a 2.4 kb <i>XbaI-EcoRI</i> insert with a deletion in <i>mvaT</i> , Km ^r | This study |
| pHSG299- Δ <i>mvaV</i> | pHSG299 carrying a 2.9 kb <i>PstI-EcoRI</i> insert with a deletion in <i>mvaV</i> , Km ^r | This study |
| pHSG399 | Cloning vector, Cm ^r | TaKaRa |
| pRK415 | Broad-host-range cloning vector, Tet ^r | [15] |
| pRK415- <i>mvaT</i> | pRK415 with a 500 bp <i>SalI</i> fragment containing <i>mvaT</i> gene of 2P24, Tet ^r | This study |
| pRK415- <i>mvaV</i> | pRK415 with a 600 bp <i>PstI-BamHI</i> fragment containing <i>mvaV</i> gene of 2P24, Tet ^r | This study |
| pKT25 | pSU40 derivative with T25 fragment of <i>CyaA</i> , Km ^r | Euromedex |
| pUT18C | pUC19 derivative with T18 fragment of <i>CyaA</i> , C-terminal fusions, Km ^r | Euromedex |
| pKT25- <i>mvaV</i> | pKT25 with <i>mvaV</i> gene, Km ^r | This study |
| pUT18C- <i>mvaV</i> | pUT18C with <i>mvaV</i> gene, Ap ^r | This study |
| pKT25- <i>mvaT</i> | pKT25 with <i>mvaT</i> gene, Km ^r | This study |
| pUT18C- <i>mvaT</i> | pUT18C with <i>mvaT</i> gene, Ap ^r | This study |
| pKT25-ZIP | pKT25 derivative with the leucine zipper of GCN4, Km ^r | Euromedex |
| pUT18C-ZIP | pUT18C derivative with the leucine zipper of GCN4, Ap ^r | Euromedex |

表 2 本实验所用引物

Table 2 Primers used in this study

| Primers | Sequence (5'→3') | Restriction site |
|-------------------------------------|--|------------------|
| <i>mvaT</i> deletion primers | | |
| <i>mvaT</i> 90 | CTTCTAGATGATAACGCAGGCCACG | <i>XbaI</i> |
| <i>mvaT</i> 1280 | TCGGTACCCAGTTTGTCTTGGGAC (1190 bp) | <i>KpnI</i> |
| <i>mvaT</i> 1470 | CAGGTACCCGCACAACGGTGAAGTC | <i>KpnI</i> |
| <i>mvaT</i> 2730 | GGGAATTCAGGGCGCAACAGTCG (1260 bp) | <i>EcoRI</i> |
| <i>mvaT</i> complementation primers | | |
| <i>MvaT</i> 1 | TCGTCGACACGCCACCTTCTCAGCGAC | <i>SalI</i> |
| <i>MvaT</i> 2 | AGTCGACGCAAGAACGATGCCAAGCGG (500 bp) | <i>SalI</i> |
| <i>mvaV</i> deletion primers | | |
| <i>mvaV</i> 240 | GTGAATTCGACCAACCTGCTGCAAGAC | <i>EcoRI</i> |
| <i>mvaV</i> 1760 | ATGGATCCTTGAAGGGCCTTTTCGGCTG (1520 bp) | <i>BamHI</i> |
| <i>mvaV</i> 2030 | ATGGATCCCGCCCTGAAAGCCTG | <i>BamHI</i> |
| <i>mvaV</i> 3440 | ATTCTGCAGCGCCGAGGCTGGATGA (1410 bp) | <i>PstI</i> |
| <i>mvaV</i> complementation primers | | |
| <i>mvaV</i> PstI | ATACTGCAGTTAACGCCCGCGATCTAT | <i>PstI</i> |
| <i>mvaV</i> BamHI | ATGGATCCTATGCAGGGCAGGCGCAG (600 bp) | <i>BamHI</i> |
| Two-hybrid construct primers | | |
| <i>mvaV</i> gene in pKT25 | | |
| kt25 <i>mvaV</i> N | ACGCTGCAGGGATGTCAGACTCGCTGAATTCG | <i>PstI</i> |
| kt25 <i>mvaV</i> C | AGGGATCCTCACTACGCAACCAGGAATCGAC | <i>BamHI</i> |
| <i>mvaV</i> gene in pUT18C | | |
| ut18C <i>mvaV</i> N | GCACTGCAGGATGTCAGACTCGCTGAATTC | <i>PstI</i> |
| ut18C <i>mvaV</i> C | AGGGATCCTCACTACGCAACCAGGAATCGAC | <i>BamHI</i> |
| <i>mvaT</i> gene in pKT25 | | |
| kt25 <i>mvaT</i> N | TCCGTGCAGGGATGTCCTTGATCAATGAATACCG | <i>PstI</i> |
| kt25 <i>mvaT</i> C | TAGGTACCCGGCCAGCAGGGTTGCCACG | <i>KpnI</i> |
| <i>mvaT</i> gene in pUT18C | | |
| ut18C <i>mvaT</i> N | GCACTGCAGGATGTCCTTGATCAATGAATACCG | <i>PstI</i> |
| ut18C <i>mvaT</i> C | TCGGTACCCGGCCAGCAGGGTTGCCACGCTT | <i>KpnI</i> |

1.6 N-乙酰高丝氨酸内酯(AHL)和 2,4-二乙酰基间苯三酚(2,4-DAPG)的提取及检测

用于提取信号分子 AHL 的 *P. fluorescens* 2P24 及其突变菌株在 28℃ 培养 30h 后, 将培养上清液用等体积的乙酸乙酯萃取, 萃取物旋转蒸发后重新悬浮于 0.1 mL 的甲醇中。定量检测 AHL 时, 将 3 μL 样品加到 0.2 mL 的 AHL 报告菌 *A. tumefaciens* NTL4 (pZLR4) ($OD_{600} = 0.8$) 中, 培养 3 h 后, 检测报告菌 *A. tumefaciens* NTL4 (pZLR4) 的 β-半乳糖苷酶活性, 本实验重复 3 次。β-半乳糖苷酶活性的检测方法参照文献 [17]。

为定量检测 2,4-DAPG, 菌株 2P24 及其衍生菌株于 28℃ 培养 30h 后, 上清用 1 mol/L HCL 酸化至 pH 2.0, 然后用等体积乙酸乙酯萃取, 萃取物旋转蒸发后干物质溶于 0.5 mL。2,4-DAPG 检测方法参照文献 [18]。本实验重复 3 次。

2 结果和分析

2.1 *P. fluorescens* 2P24 菌株中 *mvaT* 及 *mvaV* 基因筛选及鉴定

本研究利用 Tn5 转座子在大约 10000 株突变体中筛选得到 2 株可明显提高 *pcoI* 基因表达的突变体。利用鸟枪法将这两株突变体中 Tn5 侧翼序列克隆到质粒 pHSG399 上并进行测序, 序列分析表明这两株突变体中 Tn5 都破坏了 *mvaT* 基因。推测的 MvaT 蛋白与其他假单胞菌中 MvaT 蛋白一致性达 90% 以上 (数据未列出)。

MvaT 属于 H-NS DNA 结合蛋白家族, 最初在 *P. mevalonii* 中作为甲羟戊酸代谢途径的正调控因子, 之后根据结构和功能相似性在其他假单胞菌中也发现了其同源物 [19]。 *Pseudomonas* 属中存在多个 MvaT 类调控蛋白, 如 *P. fluorescens* Pf0-1 中存在 3 个这类调控蛋白, 菌株 Pf-5 中也存在 3 个, 但菌株 CHA0 中仅有 2 个 [19]。本研究在 2P24 全基因组草图中找到了 MvaT 类的另一个调控蛋白 MvaV 编码基因, 推测的氨基酸序列与 2P24 的 MvaT 蛋白具有 49.6% 的一致性 (数据未列出)。

2.2 *mvaT* 及 *mvaV* 基因调控 *pcoI* 基因并影响 AHL 信号分子的产量

将 *pcoI* 基因转录报告融合质粒 p970Gm-pcoIp 分别转入菌株 2P24、*mvaT* 突变菌株 (PM110) 和

mvaV 突变菌株 (PM113) 中, 检测 *pcoI* 基因的表达情况。实验结果表明突变 *mvaT* 基因或 *mvaV* 基因后 *pcoI* 基因的表达可显著提高 3 - 5 倍。将互补质粒 pRK415-*mvaT* 和 pRK415-*mvaV* 转入相应的突变菌株后 *pcoI* 基因的转录水平恢复到野生型菌株 2P24 的表达水平。这些结果表明 *mvaT* 和 *mvaV* 基因负调控 *pcoI* 基因的表达 (图 1-A)。利用检测报告菌 *A. tumefaciens* NTL4 (pZLR4) 检测了菌株 2P24 及相

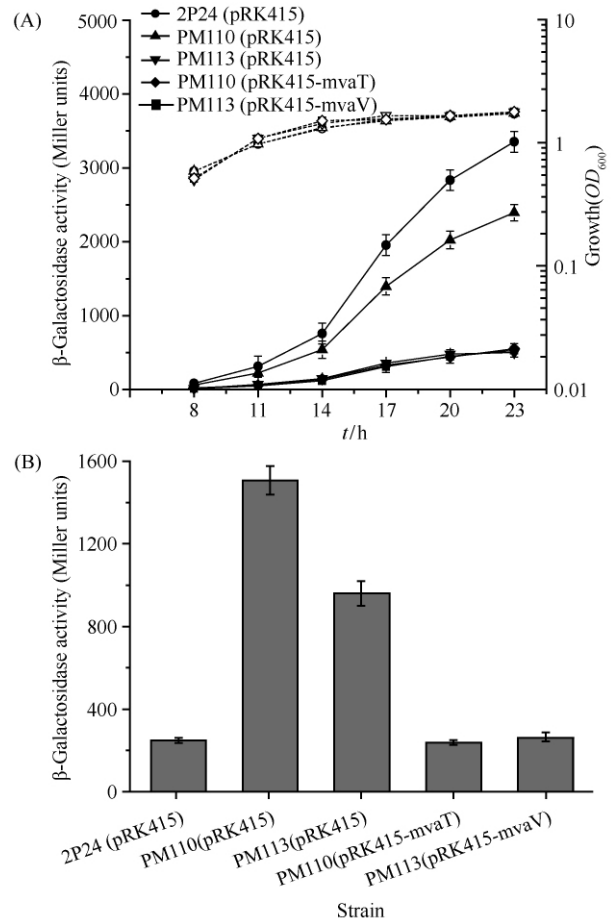


图 1 *mvaT* 和 *mvaV* 基因转录水平负调控 *pcoI* 基因的表达 (A) 及 AHL 的产量 (B)

Fig. 1 Transcriptional regulation of *pcoI* gene (A) and AHL production (B) by the *mvaT* and *mvaV* genes. β-Galactosidase activities of the plasmid p970Gm-*pcoI* in *P. fluorescens* 2P24, the *mvaT* mutant (PM110) or *mvaV* mutant (PM113) were measured at various time points tested after inoculation into LB medium. For quantification of AHL, the β-galactosidase activity of *traG-lacZ* fusion in *A. tumefaciens* NTL4 (pZLR4) was measured after incubation with AHL signals from strain 2P24 and its derivatives. Growth is indicated by the dotted line. All experiments were performed in triplicate, and the $x \pm s$ are indicated.

应突变菌株 AHL 产量。同样 *mvaT* 突变菌株或 *mvaV* 突变菌株中,其 AHL 的产量是野生菌株 2P24 AHL 的产量的 4-6 倍;而相应的互补菌株 AHL 产量与野生菌株基本相同(图 1-B)。以上结果表明 *mvaT* 和 *mvaV* 基因转录水平负调控 AHL 的产量及 AHL 信号合成基因 *pcol* 的表达。

2.3 *mvaT* 及 *mvaV* 基因对生物膜形成的影响

菌株 2P24 中 PcoI/PcoR QS 系统正调控生物膜的形成^[4],而 *mvaT* 和 *mvaV* 基因负调控 *pcol* 基因及 AHL 的产生,本研究进一步检查了 *mvaT* 和 *mvaV* 基因突变菌株生物膜形成能力的变化。结果表明,*mvaT* 或 *mvaV* 突变菌株形成的生物膜其 OD_{570} 吸收值分别为 0.95 和 0.67,而野生菌株形成的生物膜其 OD_{570} 吸收值仅为 0.23;将互补质粒 pRK415-*mvaT* 或 pRK415-*mvaV* 转入相应突变菌株,其形成的生物膜可恢复到野生型菌株的水平(图 3)。表明 MvaT 和 MvaV 对生物膜的形成起负调控作用。

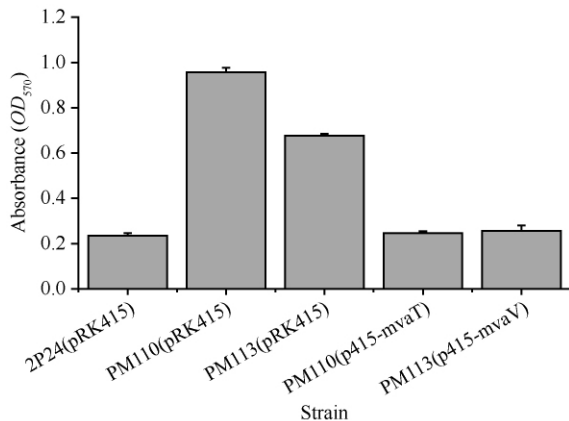


图2 *mvaT* 和 *mvaV* 基因负调控菌株 2P24 生物膜形成

Fig.2 The negative regulation of *mvaT* and *mvaV* genes on biofilm formation in *P. fluorescens* 2P24. Biofilm formed by strain 2P24, the *mvaT* mutant (PM110) or *mvaV* mutant (PM113) on PVC plastic was quantified. The samples were incubated for 24 h at 30°C and stained with crystal violet. The residual dye was solubilized and determined at 570 nm. All experiments were performed in triplicate, and the $x \pm s$ are indicated.

2.4 *mvaT* 及 *mvaV* 基因对抗生素 2,4-DAPG 产量的影响

抗生素 2,4-DAPG 是菌株 2P24 防治植物土传病害的另一重要生防因子。HPLC 结果表明突变 *mvaT* 和 *mvaV* 后其 2,4-DAPG 产量仅为 $24.8 \mu\text{g}$

$\text{mL}^{-1} OD_{600}$ 和 $10.3 \mu\text{g mL}^{-1} OD_{600}$,而野生菌株 2P24 其 2,4-DAPG 产量约为 $50 \mu\text{g mL}^{-1} OD_{600}$ 。*mvaT* 和 *mvaV* 基因突变菌株相应的互补菌株 2,4-DAPG 的产量则恢复到野生菌株水平(图 3)。这些结果表明 MvaT 和 MvaV 对抗生素 2,4-DAPG 的产生起正调控作用。

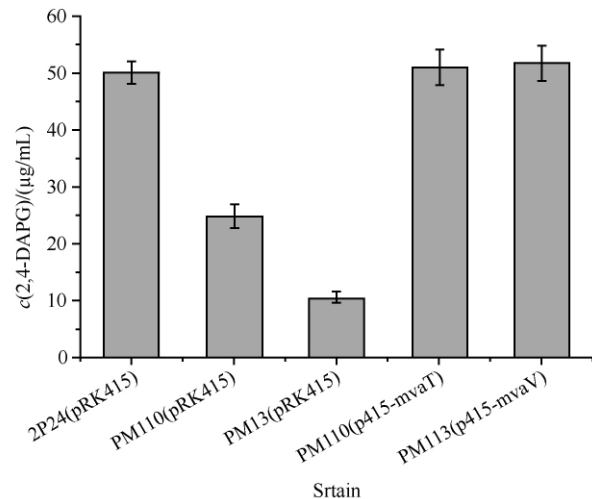


图3 *mvaT* 和 *mvaV* 基因正调控抗生素 2,4-DAPG 的产生

Fig.3 Regulation of 2,4-DAPG production by the *mvaT* and *mvaV* genes. The level of 2,4-DAPG production in strain 2P24, the *mvaT* mutant (PM110) or *mvaV* mutant (PM113) was detected by HPLC using the method described by Shanahan et al. (1992). All experiments were performed in triplicate, and the $x \pm s$ are indicated.

2.5 MvaT 及 MvaV 蛋白之间的相互作用

将 *mvaT* 和 *mvaV* 基因分别克隆与细菌双杂交系统的两个载体 pKT25 和 pUT18C 中得到相应的重组质粒,检测 MvaT 和 MvaV 蛋白自身及两者之间的是否互作。结果表明同时转化含有 *mvaT* 或 *mvaV* 基因的质粒(即同时转化 pKT25-*mvaT* 和 pUT18C-*mvaT* 或同时转化 pKT25-*mvaV* 和 pUT18C-*mvaV*),其 β -半乳糖苷酶活性约为 450 Miller 单位,而阴性对照菌株或仅含有 *mvaT*(*mvaV*) 基因的对照菌株其 β -半乳糖苷酶活性约为 50 Miller 单位(图 4);共同转化含有 *mvaT* 和 *mvaV* 基因的质粒(即同时转化 pKT25-*mvaT* 和 pUT18C-*mvaV* 或同时转化 pKT25-*mvaV* 和 pUT18C-*mvaT*) 其 β -半乳糖苷酶活性也显著高于阴性对照菌株(即含空质粒 pKT25 和 pUT18C)或仅含有 *mvaT*(*mvaV*) 基因的菌株(图 4)。这些结果表明:MvaT 和 MvaV 蛋白在体内自身可相互作用,同时 MvaT 蛋白和 MvaV 蛋白之间也可相互

作用。

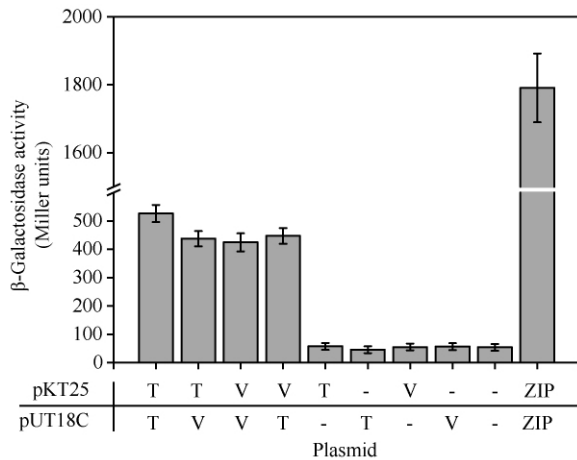


图4 MvaT 蛋白及 MvaV 蛋白之间的相互作用

Fig. 4 Protein-protein interactions between MvaT and MvaV. Conjugative proteins were fused with adenylate cyclase domains and co-produced in *E. coli* BTH101. The assay controls were BTH101 cells containing pUT18C and pKT25 (negative control), and pUT18C-leucine zipper with pKT25-leucine zipper (positive control). All experiments were performed in triplicate, and the $x \pm s$ are indicated.

3 讨论

本研究利用 Tn5 随机突变筛选到影响 PcoI/PcoR QS 系统中信号合成基因 *pcol* 表达的转录调控因子 MvaT, 并进一步证明 *mvaT* 基因及其同源基因 *mvaV* 基因负调控 *pcol* 基因的表达以及 AHL 的产生。MvaT 类调控蛋白仅存在于 *Pseudomonas* 属菌株中, 该类蛋白属于 H-NS DNA 结合蛋白家族^[18]。MvaT 最初是作为甲羟戊酸代谢途径调控因子被发现的, 之后根据蛋白结构及功能相似性在许多 *Pseudomonas* 属菌株中发现了其同源蛋白, 如 *P. putida* 菌株中发现 5 个 MvaT 类蛋白, *P. syringae* 中有 3 个, *P. fluorescens* 中有 3 个, *P. aeruginosa* 中有 2 个^[19]。菌株 2P24 中利用简并引物及不完整的全基因组序列仅发现 2 个 MvaT 类蛋白: MvaT 和 MvaV。 *Pseudomonas* 属菌株中不同的 *mvaT* 类似基因对靶标基因的调控效果并不相同^[19]。菌株 2P24 中 MvaT 作为主要的抑制因子调控 QS 系统信号合成基因 *pcol* 的表达及生物膜的形成, 而 MvaV 对这些靶标基因或性状的抑制作用小于 MvaT, 可能作为次要抑制因子参与 QS 系统的调控(图 2, 3), 这与

P. putida KT2440 中 TurA (MvaT 同源蛋白) 和 TurB (MvaV 同源蛋白) 对同一靶标基因起到不同调控效果的结论一致^[19]。本研究中通过遗传学方法构建了菌株 2P24 的 *mvaT* 和 *mvaV* 单基因缺失突变菌株, 但一直无法得到 *mvaT* 基因和 *mvaV* 基因的双缺失突变菌株, 表明 MvaT 和 MvaV 对菌株 2P24 的生长很可能是必需的。同样 *P. aeruginosa* 中可以得到 *mvaT* 或 *mvaU* 突变菌株, 而 *mvaT* 和 *mvaU* 基因的双突变体则是致死的^[20]。虽然菌株 2P24 中 *mvaT* 和 *mvaV* 基因转录水平调控 *pcol* 基因的表达, 但这种调控作用可能是间接的, EMSA 实验表明 MvaT 蛋白并不结合 *pcol* 基因启动子区域(数据未显示)。另外 *P. aeruginosa* 中 ChIP-on-Chip 实验结果表明 MvaT 类蛋白可调控转录因子 RpoS、小 RNA RsmZ 等编码基因的表达, 而这些基因也参与调控 QS 系统^[20]。这些数据进一步表明菌株 2P24 中可能还有其他因子与 MvaT 类蛋白一起参与对 *pcol* 基因的调控。

生物膜的形成是一个复杂的过程, 菌毛驱动细菌在固体表面附着的过程是生物膜形成的第一个阶段。前期研究表明 *pcol* 基因正调控生物膜的形成^[3], 菌株 2P24 中 MvaT 和 MvaV 虽然调控 *pcol* 基因表达和生物膜的形成(图 3), 但 MvaT 和 MvaV 对生物膜形成的影响可能不仅仅是通过调控 QS 系统实现的。最近的研究发现 *P. aeruginosa* 中参与菌毛组装的调控基因 *cupA* 突变后菌株不能附着在固体表面上形成成熟的生物膜。而 *cupA* 基因受 *mvaT* 基因的负调控, *mvaT* 基因突变体中 *cupA* 基因的表达显著提高, 生物膜形成的能力也显著提高^[21]。这些数据表明菌株 2P24 中 MvaT 类蛋白对生物膜的影响也可能是对多个调控系统综合调控的结果。

MvaT 类调控蛋白主要作为抑制子调控假单胞菌基因的表达^[20]。然而菌株 2P24 中 *mvaT* 类基因除负调控 QS 系统信号合成基因外, 也作为激活因子参与调控该菌株生防相关基因的表达, 如 MvaT 和 MvaV 正调控抗生素 2, 4-DAPG 的产生(图 3)。初步研究表明菌株 2P24 中 MvaT 类蛋白可在转录水平调控 2, 4-DAPG 合成基因 *phlA* 的表达(未发表数据)。假单胞菌中 MvaT 蛋白主要通过结合靶基因启动子区域中富含 AT 区域, 影响靶标基因的转录^[20]。对 *phlA* 基因启动子的分析发现其 -10 区 AT 含量显著高于 2P24 基因组 AT 含量的平均值, 然而

该区域是否是 MvaT 蛋白结合的区域还需要进一步的实验证据。

细菌双杂交试验表明在体内 MvaT 蛋白或 MvaV 蛋白自身可相互作用,同样 MvaT 蛋白和 MvaV 蛋白也可相互作用(图 4)。 *P. aeruginosa* 中研究表明 MvaT 类蛋白在体内以二聚体或多聚体行使其功能^[21],另外 *E. coli* 中表达纯化的 MvaT 类蛋白其分子量至少为 90 kDa (MvaT 和 MvaV 蛋白分子量约为 14 kDa) ,MvaT 类蛋白可能与其他蛋白有很高的亲和性 构成了一个复合体^[21]。这些蛋白在菌株 2P24 中是否有对应的同源物,这些同源物是否也参与对菌株 2P24 中生防相关基因的调控 将是我們下一步的研究工作。

参考文献

- [1] Haas D , Défago G. Biological control of soil-borne pathogens by fluorescent pseudomonads. *Nature Reviews Microbiology* , 2005 , 3 (4) : 307-319.
- [2] Miller MB , Bassler BL. Quorum sensing in bacteria. *Annual Review of Microbiology* , 2001 , 55 (1) : 165-199.
- [3] Whitehead NA , Barnard AM , Slater H , Simpson NJ , Salmond GP. Quorum-sensing in Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiology Reviews* , 2001 , 25 (4) : 365-404.
- [4] Zhang Z , Pierson LS III. A second quorum-sensing system regulates cell surface properties but not phenazine antibiotic production in *Pseudomonas aureofaciens*. *Applied and Environmental Microbiology* , 2001 , 67 (9) : 4305-4315.
- [5] Wei HL , Zhang LQ. Quorum-sensing system influences root colonization and biological control ability in *Pseudomonas fluorescens* 2P24. *Antonie Van Leeuwenhoek* , 2006 , 89 (2) : 267-280.
- [6] 吴小刚 , 付承梅 , 张力群. 假单胞菌 2P24 中 PcoI-PcoR 群体感应系统的自体反馈调控. *微生物学通报 (Microbiology)* , 2009 , 36 (7) : 981-987.
- [7] Reimmann 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 virulence factors pyocyanin , cyanide , and lipase. *Molecular Microbiology* , 1997 , 24 (2) : 309-319.
- [8] Yan Q , Wu XG , Wei HL , Wang HM , Zhang LQ. Differential control of the PcoI/PcoR quorum-sensing system in *Pseudomonas fluorescens* 2P24 by sigma factor RpoS and the GacS/GacA two-component regulatory system. *Microbiological Research* , 2009 , 164 (1) : 18-26.
- [9] 魏海雷 , 张力群. 荧光假单胞杆菌 2P24 中生防相关调控基因 *gacS* 的克隆和功能分析. *微生物学报 (Acta Microbiologica Sinica)* , 2005 , 45 (3) : 368-372.
- [10] 闫小雪 , 张力群 , 杨之为 , 唐文华. 调控基因 *gacA* 在荧光假单胞菌 2P24 防治土传病害中的作用. *植物病理学报 (Acta Phytopathologica Sinica)* , 2004 , 34 (3) : 272-279.
- [11] Maniatis T , Fritsch EF , Sambrook J. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press , 1982.
- [12] Cha C , Gao P , Chen YC , Shaw PD , Farrand SK. Production of acyl-homoserine lactone quorum-sensing signals by Gram-negative plant-associated bacteria. *Molecular Plant-Microbe Interactions* , 1998 , 11 (11) : 1119-1129.
- [13] Herrero M , Lorenzo VD , Timmis KN. Transposon vectors containing non-antibiotic resistance selection markers for cloning and stable chromosomal insertion of foreign genes in gram-negative bacteria. *Journal of Bacteriology* , 1990 , 172 (11) : 6557-6567.
- [14] Sharma SB , Signer ER. Temporal and spatial regulation of the symbiotic genes of *Rhizobium meliloti* in planta revealed by transposon Tn5-*gusA*. *Genes and Development* 1990 , 4 (3) : 344-356.
- [15] Keen NT , Tamaki S , Kobayashi D , Trollinger D. Improved broad-host-range plasmids for DNA cloning in gram-negative bacteria. *Gene* , 1988 , 70 (1) : 191-197.
- [16] Karimova G , Ullmann A , Ladant D. Protein-protein interaction between *Bacillus stearothermophilus* tyrosyl-tRNA synthetase subdomains revealed by a bacterial two-hybrid system. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology* , 2001 (1) , 3 : 73-82.
- [17] Miller JH. *Experiments in Molecular Genetics*. Cold Spring Harbor. New York: Cold Spring Harbor Laboratory , 1972.
- [18] Shanahan PD. O'Sullivan J , Simpson P , Glennon JD , O'Gara F. Isolation of 2,4-diacetylphloroglucinol from a fluorescent pseudomonad and investigation of physiological parameters influencing its production. *Applied and Environmental Microbiology*. 1992 , 58 (1) : 353-358.

- [19] Renzi F, Rescalli E, Galli E, Bertoni G. Identification of genes regulated by the MvaT-like paralogues TurA and TurB of *Pseudomonas putida*. *Environmental Microbiology*, 2010, 12 (1): 254-263.
- [20] Castang S, McManus HR, Turner KH, Dove SL. H-NS family members function coordinately in an opportunistic pathogen. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2008, 105 (48): 18947-18952.
- [21] Vallet I, Diggle SP, Stacey RE, Camara M, Ventre I, Lory S, Lazdunski A, Williams P, Filloux A. Biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa*: fimbrial cup gene clusters are controlled by the transcriptional regulator MvaT. 2004, *Journal of Bacteriology*, 186 (9): 2880-2890.

MvaT and MvaV transcriptionally regulate PcoI/PcoR quorum-sensing system in *Pseudomonas fluorescens* 2P24

Xiaogang Wu¹, Yarui Wei², Jiucheng Liu¹, Liqun Zhang^{1*}

¹Department of Plant Pathology, China Agricultural University; The Key Laboratory of Plant Pathology, Ministry of Agriculture; Beijing 100193, China

²College of Agriculture, Inner-Mongolia Agricultural University, Hohhot 010018, China

Abstract: [Objective] *Pseudomonas fluorescens* 2P24 is an effective biocontrol agent for soil-borne plant diseases caused by microbial pathogens. The PcoI/PcoR quorum-sensing system, which influences the colonization ability of 2P24 on wheat rhizosphere, is an important factor for disease suppression. In this study we performed random mutagenesis to screen novel regulators of the *pcol* gene, a biosynthesis gene responsible for *N*-acyl-homoserine lactone (AHL) production. [Methods] A *gacA* gene mutant carrying a *pcol-lacZ* fusion was employed as the reporter strain and subjected to a random mini-Tn5 insertion mutagenesis. Expression of *pcol* kept at a low level under the *gacA*⁻ negative background. The Tn5-mutants with increased *pcol* transcription were selected. [Results] Two mutants with significantly increased *pcol* expression were identified from ~10000 Tn5-inserted colonies. The interrupted locus in the mutants was identified as the *mvaT* gene, a global regulator belonging to the H-NS family. A homolog of the *mvaT* gene, named *mvaV*, was also found in the genome draft sequence of 2P24. Genetic inactivation of *mvaT* or *mvaV* gene resulted in increased transcription of *pcol* and the production of AHL molecules. Further quantification by HPLC showed that the 2,4-diacetylphloroglucinol (2,4-DAPG) levels in culture supernatant of the *mvaT* and *mvaV* mutants were significantly lower than that of the wild type strain. Furthermore, the *mvaT* or *mvaV* mutation drastically improved biofilm formation in 2P24. [Conclusion] MvaT and MvaV may function as an important regulatory complex controlling biocontrol capacity of *P. fluorescens* 2P24.

Keywords: *Pseudomonas fluorescens*, quorum sensing, 2,4-DAPG, MvaT, MvaV

(本文责编:王晋芳)

Supported by the Natural Science Foundation of China (31071725, 30871666) and by the National Programs for High Technology Research and Development of China (2011AA10A205)

* Corresponding author. Tel/Fax: 86-10-62731464; E-mail: zhanglq@cau.edu.cn

Received: 18 December 2011 / Revised: 28 February 2012