

## 铜绿假单胞菌中一个新的吩嗪合成调节基因

孔丽萍, 梁海华, 董兆麟, 段康民\*, 沈立新\*

(西北大学生命科学学院, 西部资源生物与现代生物技术教育部重点实验室, 西安 710069)

**摘要:**【目的】在次抑制浓度四环素条件下, 研究铜绿假单胞菌 *phzA1* 操纵子的调节基因及调节途径。

【方法】对转座突变库中 *phzA1* 操纵子表达发生变化的突变体, 进行随机 PCR、基因测序及比对, 确定突变位点。并以发光杆菌的荧光素酶基因操纵子 *luxCDABE* 为报道基因, 研究基因调节作用及调节路径。【结果】在两株突变体 PAM0487 和 PAM0487R 中 *phzA1* 操纵子的表达降低, 这两株突变体的突变基因确定为假定钼元素转运蛋白调节子 PA0487 基因。【结论】PA0487 是 *phzA1* 操纵子表达的一个新的正向调节子, 并对密度感应系统相关基因的表达有调节作用。

**关键词:** 铜绿假单胞菌; *phzA1* 基因; 密度感应系统; 四环素

中图分类号: Q933 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209 (2008) 09-1154-06

铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*, PA) 是一个条件致病菌<sup>[1]</sup>, 它的致病性与毒性因子的产生密切相关<sup>[2]</sup>, 吩嗪类化合物是重要的毒性因子, 包括: 吩嗪-1-羧酸 (phenazine-1-carboxylic acid, PCA)、绿脓菌素 (pyocyanin)、1-羟基-吩嗪 (1-hydroxy-phenazine, 1-HP) 和吩嗪-1-甲酰胺 (phenazine-1-carboxamide, PCN) 等<sup>[3]</sup>。PCA 等吩嗪类化合物在细胞内可作为电子载体, 增加感染细胞的氧化压力, 使感染细胞中毒死亡<sup>[4]</sup>, 绿脓菌素与囊肿性纤维化病人 (CF) 的肺部感染有关<sup>[5]</sup>。PCA 为绿脓菌素、1-HP 和 PCN 合成的中间体, 而 PCA 的合成主要由 *phzA1B1C1D1G1* (*phzA1*) 操纵子的基因产物完成<sup>[3]</sup>。吩嗪类化合物的合成受密度感应系统 (quorum sensing, QS) 的调控<sup>[6]</sup>。铜绿假单胞菌有两个以酰基高丝氨酸内酯 (AHL) 为信号分子的 QS 系统, *lasI/LasR* 和 *rhlI/RhIR* 系统分别以 3-氧代十二烷基-L-高丝氨酸内酯 (N-(3-oxododecanoyl)-L-homoserine lactone, 3-oxo-C<sub>12</sub>-HSL) 和 N-丁酰基-L-高丝氨酸内酯 (N-butyl-L-homoserine lactone, C<sub>4</sub>-HSL) 作为自诱导物, 调节蛋白 LasR 和 RhIR 与自诱导物结合后

调节一系列基因的表达, 而且 LasR/3-O-C<sub>12</sub>-HSL 激活 *rhlR* 的转录。另外, 还有一个以 2-庚基-3-羟基-4-奎诺酮 (2-heptyl-3-hydroxy-4-quinolone) 作为信号分子的 PQS (*Pseudomonas* quinolone signal) 系统<sup>[7]</sup>, 其中 *pqsH* 基因和转录调节子 MvfR/PqsR 是 PQS 信号分子合成必须的<sup>[8]</sup>。PQS 系统调节 *rhlI* 的表达, 同时 PQS 的合成又受 LasR/3-O-C<sub>12</sub>-HSL 的调节<sup>[7]</sup>。在前期的研究中, 运用了转座子突变技术, 对铜绿假单胞菌进行了随机突变, 在整个基因组中, 对影响 *phzA1* 表达的基因进行了筛选<sup>[9]</sup>。本文对转座突变库中两株突变体 PAM0487 和 PAM0487R 进行了突变基因确定, 通过随机 PCR (arbitrary PCR)、基因测序及比对, 确定突变点在染色体上的位置, 并研究了突变基因对 *phzA1* 操纵子的调控作用及其与 QS 系统的关系。

### 1 材料和方法

#### 1.1 材料

**1.1.1 菌株和质粒:** 本实验所用菌株和质粒见表 1。其中突变体 PAM0487、PAM0487R 为本实验室已构建的转座突变库中菌株。

基金项目: 国家自然科学基金(30470098); 重大基础研究前期研究专项(2004CCA01700)

\*通讯作者。Tel/Fax: +86-29-88305288; E-mail: shenlx68@nwu.edu.cn; kduan@nwu.edu.cn

作者简介: 孔丽萍(1982-), 女, 江苏省新沂市人, 硕士研究生, 主要进行铜绿假单胞菌毒性因子的研究。E-mail: kongliping0516@163.com

收稿日期: 2008-02-19; 修回日期: 2008-04-16

表 1 供试菌株和质粒  
Table 1 List of bacterial strains and plasmids used

Strains and plasmids	Genotype or phenotype	References
<i>E. coli</i>		
DH10B	F <i>mcrA</i> ( <i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i> ) $\Phi$ 80 <i>lacZ</i> M15 <i>lacX74</i> <i>deoR recA1 araD139</i> ( <i>ara leu</i> )7697 <i>galU galK rpsL endA1 nupG</i>	Invitrogen
<i>P. aeruginosa</i>		
PAO1	Wild type lab strain	[10]
PAM0487	PA0487 transposon mutant of PAO1; Gm <sup>r</sup>	Constructed by lab
PAM0487R	PA0487 transposon mutant of PAO1; Gm <sup>r</sup>	Constructed by lab
plasmids		
pMS402	vector with <i>luxCDABE</i> reporter; Kn <sup>r</sup> , Tmp <sup>r</sup>	[1]
pKD-phzA1	pMS402 containing 844-bp promoter region of the <i>phzA1</i> operon cloned between <i>Xho</i> I and <i>Bam</i> HI sites; Kn <sup>r</sup> , Tmp <sup>r</sup>	[1]
pKD-rhII	pMS402 containing <i>rhII</i> promoter region; Kn <sup>r</sup> , Tmp <sup>r</sup>	[1]
pKD-rhIR	pMS402 containing <i>rhIR</i> promoter region; Kn <sup>r</sup> , Tmp <sup>r</sup>	[1]
pKD-lasI	pMS402 containing <i>lasI</i> promoter region; Kn <sup>r</sup> , Tmp <sup>r</sup>	[1]
pKD-lasR	pMS402 containing <i>lasR</i> promoter region; Kn <sup>r</sup> , Tmp <sup>r</sup>	[1]
pKD-znuA	pMS402 containing <i>znuA</i> promoter region; Kn <sup>r</sup> , Tmp <sup>r</sup>	[1]
pKD-pqsR	pMS402 containing 940-bp promoter region of the <i>pqsR</i> cloned between <i>Xho</i> I and <i>Bam</i> H sites; Kn <sup>r</sup> , Tmp <sup>r</sup>	This study
pKD-pqsH	pMS402 containing 826-bp promoter region of the <i>pqsH</i> cloned between <i>Xho</i> I and <i>Bam</i> HI sites; Kn <sup>r</sup> , Tmp <sup>r</sup>	This study

Tmp<sup>r</sup>: Trimethoprim resistance; Gm<sup>r</sup>: Gentamicin resistance; Kn<sup>r</sup>: Kanamycin resistance.

**1.1.2 主要试剂、培养基和仪器:** 大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 和铜绿假单胞菌 PAO1 均在 LB 液体 (酵母粉及胰蛋白胨均购自 Oxoid 公司、NaCl 购自天津化学试剂厂) 或 LB 固体 (含 1.2% 琼脂粉, 琼脂粉购自 Oxoid 公司) 培养基中于 37 °C 培养; 根据实验需要添加特定的抗生素, 所用抗生素浓度为: 氨甲氧嘧啶 (Tmp) 300  $\mu$ g/mL、庆大霉素 (Gm) 50  $\mu$ g/mL, 卡那霉素 (Kn) 50  $\mu$ g/mL, 四环素 (Tet) 1.56  $\mu$ g/mL (1/4MIC), 所有抗生素均购自 Amersco。Wallac 1420 Multilabel counter: 珀金埃尔默公司; 荧光/化学发光成像分析系统 LAS-3000: 富士公司; 紫外分光光度计 (UV-3310): 日立公司。

**1.2 次抑制浓度四环素条件下从转座突变库中筛选突变体**

本实验室构建的转座突变库中的菌株均带有报道载体 pKD-phzA1。通过 LAS-3000 检测后, 挑选发光的突变体至含有氨甲氧嘧啶的 LB 液体培养基中, 以野生型 PAO1 (pKD-phzA1) 为对照, 于 37 °C、200 r/min 培养过夜。培养物转接到新鲜的含有氨甲氧嘧啶的 LB 培养基中培养 3 h, 取 3  $\mu$ L 培养物分别转接到装有 97  $\mu$ L 含终浓度为 1/4MIC 的四环素或 97  $\mu$ L LB 液体培养基的底部透明的 96 孔黑板中, 置于 Wallac 1420 Multilabel counter 里, 于 37 °C 检测菌体的发光值和生长 ( $OD_{600}$ ) 与 PAO1 (pKD-phzA1)

发光值相比较, 挑出发光值增强或降低的菌株。筛选 3 次, 排除假阳性。

**1.3 随机 PCR 及基因测序确定转座子插入位点**

将筛选的突变体中的两个 (PAM0487、PAM0487R) 进行随机 PCR 以确定转座子的插入位点<sup>[11]</sup>。随机 PCR 要进行两次 PCR 扩增, 先以突变体的基因组为模板, 以 P7-1 (5'-CT AACAATTCGTTCAAGCCG-3') 和 arb1 (5'-GGCCACGCGTCGACTAGTACNNNNNNNNN NNGATAT-3') 为引物, 进行第一次 PCR 扩增。其中 P7-1 是以整个转座子的序列设计的引物; arb1 是随机引物, 其碱基不确定的部分可以和染色体 DNA 的任意部分结合, 碱基确定的部分在进行第二次 PCR 时与随机引物 arb2 结合。扩增条件: 95 °C 5 min; 95 °C 30 s, 30 °C 30 s, 72 °C 1.5 min, 6 个循环; 95 °C 30 s, 45 °C 30 s, 72 °C 2 min, 30 个循环; 72 °C 5 min。以第一次 PCR 产物为模板, 以 P7-2 (5'-GGATGCGTCTAAAAGCCTGC-3') 和 arb2 (5'-GGCCA CGCGTCGACTAGTAC-3') 为引物, 进行第二次 PCR 扩增, 其中 P7-2 是以转座子上 3 端一段序列设计的引物, 这段序列位于转座子与染色体 DNA 的结合部位, arb2 引物是 arb1 的 5 端的确定碱基部分, 可以与第一次 PCR 产物的 arb15 端的确定碱基部分结合。扩增条件: 95 °C 1 min; 95 °C 30 s, 52 °C 30 s, 72 °C 2 min, 30 个循环; 72 °C 5 min。第

二次 PCR 产物纯化后用于测序, 测序引物序列为 P7-2, 由北京博尚生物技术有限公司测序。

#### 1.4 质粒 pKD-pqsR 的构建

pMS402 质粒带有无启动子的 *luxCDABE* 报道基因, 在多克隆位点上插入外源启动子后, 通过 *luxCDABE* 发光值 (CPS 值) 的大小表明启动子的活性, 从而推断基因的表达状况。

根据铜绿假单胞菌 PAO1 的 *pqsR* 基因启动子区序列设计引物。正向引物 GGAAGATCTG CGGTGT-GCGACTTGCGC (下划线部分为 *Bg*III 位点), 反向引物 ATACTCGAGCGATGCT CGGCGCTCTCC (下划线部分为 *Xho* 位点)。PCR 扩增条件: 95 °C 2 min; 95 °C 40 s, 55 °C 40 s, 72 °C 1.5 min, 30 个循环; 72 °C 10 min。PCR 产物用 0.8% 琼脂糖凝胶电泳检测后以 *Bgl* I、*Xho* I 酶切, 然后连接到经过 *Bam*H I、*Xho* I 酶切的 pMS402 质粒上。连接产物电转化至大肠杆菌 DH10B 感受态细胞中, 转化产物涂布到含卡那霉素的 LB 平板上, 挑选单克隆扩大培养后提取质粒, 酶切验证后得到质粒 pKD-pqsR。

#### 1.5 QS 系统相关基因在 PAO1 及突变菌株中的发光值测定

为了将其它报道载体转化到突变体中, 将带有 pKD-phzA1 质粒的突变体在不加抗生素的情况下培养, 使质粒丢失。由于突变体带有庆大霉素抗性基因, 而 pKD-phzA1 质粒带有氨甲氧嘧啶素抗性基因。所以如果单菌落只在含庆大霉素的 LB 平板上生长, 而不在庆大霉素和氨甲氧嘧啶的 LB 平板上生长, 即可说明质粒已经丢失。

然后将质粒 pKD-rhlI、pKD-rhlR、pKD-lasI、pKD-lasR、pKD-pqsR、pKD-pqsH、pKD-znuA 分别电转化到野生型 PAO1 及去除 pKD-phzA1 质粒的突变体 PAM0487、PAM0487R 中, 采用与 1.4 相同的方法, 在 Wallac 1420 Multilabel counter 中于 37 °C 测定菌体的发光值和生长状况。

#### 1.6 绿脓菌素含量的测定

挑取野生型 PAO1 及突变体 PAM0487、PAM0487R 的单菌落, 分别在无四环素条件下和分别含 1/8MIC、1/4MIC 四环素的 LB 液体培养基中 37 °C 培养 16 h, 测定绿脓菌素的表达量并测定  $OD_{600}$ , 即<sup>[12]</sup>将发酵液 4500 r/min 离心 1 min 得上清液, 取 5 mL 上清液与 3 mL 的氯仿混合, 4500 r/min 离心 8 min 后, 将氯仿相转移到另一离心管中, 加入 1 mL 0.2 mol/L 盐

酸, 混合后 4500 r/min 离心 8 min, 取上层无机相在 520 nm 处测吸光值。重复 3 次取平均值。

## 2 结果

### 2.1 从转座突变库中筛选获得突变体

次抑制浓度的抗生素可以作为信号分子调节病原菌致病因子的表达<sup>[13]</sup>。本实验室前期研究发现: PAO1 中在加入 1/4MIC 四环素后, *phzA1* 操纵子的表达上升了 10 倍, 我们运用转座子突变技术, 对铜绿假单胞菌进行了随机突变, 在整个基因组中, 1/4MIC 四环素条件下, 筛选对吩嗪合成基因 *phzA1* 表达有影响的基因<sup>[9]</sup>。

其中的两个突变体 PAM0487 和 PAM0487R 中, *phzA1* 操纵子的表达有不同程度的降低(图 1)。由图可见: 与 PAO1 (pKD-phzA1) 相比较, 在 PAM0487 (pKD-phzA1) 和 PAM0487R (pKD-phzA1) 中, *phzA1* 操纵子的最大表达量具有不同程度的降低。1/4MIC 四环素条件下, *phzA1* 操纵子在 PAO1 (pKD-phzA1) 中的最大表达量与在 PAM0487 (pKD-phzA1) 和 PAM0487R (pKD-phzA1) 中最大表达量的比分别为 1.5 和 30。说明突变体 PAM0487R 中, 突变的基因对 *phzA1* 操纵子的表达具有正向调节作用。

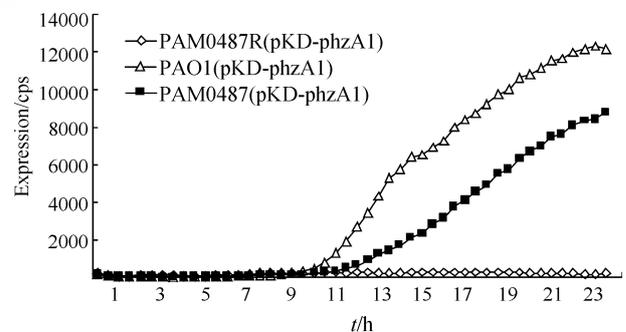


图 1 1/4MIC 四环素存在情况下, *phzA1* 操纵子在野生型 PAO1 和突变体 PAM0487R、PAM0487 中的表达

Fig. 1 The expression of *phzA1* in wild type PAO1 and the mutants in the presence of 1/4 MIC Tet.

图 2 为无四环素和 1/4MIC 四环素条件下 *phzA1* 操纵子在突变体 PAM0487R 中的表达情况, 从图中可以看出: 不同浓度四环素条件下, *phzA1* 操纵子在突变体 PAM0487R 中的表达没有变化, 即在突变体 PAM0487R 中, 四环素对 *phzA1* 操纵子表达的调节作用消失了, 说明突变体 PAM0487R 突变的基因可能与次抑制浓度四环素对 *phzA1* 操纵子的调节有关。

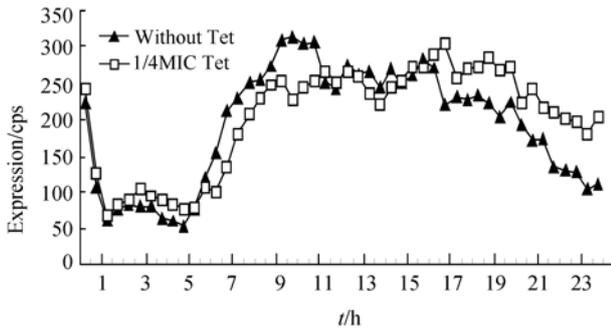


图2 无四环素、1/4 MIC 四环素条件下, *phzA1* 在突变体 PAM0487R 中的表达

Fig. 2 The expression of *phzA1* in PAM0487R in the presence of 1/4 MIC Tet and without Tet.

## 2.2 突变基因相关信息的确定

为了确定突变点所在的基因及这一基因的相关信息,通过随机 PCR 及产物测序,将测序结果在 <http://www.pseudomonas.com> 网站上进行 BLAST,确定了突变体 PAM0487 的突变位点在 PA0487 基因起始密码子前 25 bp 处,突变体 PAM0487R 的突变位点在 PA0487 基因起始密码子前 13 bp 处。由此推断突变点位于 PA0487 基因的启动子区,即对 *phzA1* 操纵子起正向调节作用的基因是 PA0487 基因。<http://www.pseudomonas.com> 网站报道:PA0487 基因与大肠杆菌中钼元素的转运调节子同源。

## 2.3 野生型 PAO1 及突变体中绿脓菌素的表达

*phzA1* 操纵子是吩嗪类化合物 PCA 合成基因,而 PCA 是绿脓菌素合成过程中的中间体<sup>[3]</sup>。为了验证转录水平的变化与表型变化相一致,本实验测定了野生型 PAO1 与突变体中绿脓菌素的表达量。

结果见图 3。在未加入四环素的 LB 液体培养基中,PAO1 野生型菌株的绿脓菌素生成量与突变体 PAM0487 相比变化不大。但是野生型 PAO1 的绿脓

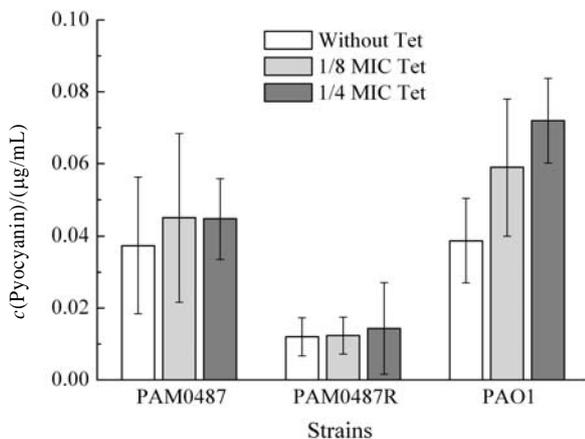


图3 绿脓菌素测定结果  
Fig. 3 Pyocyanin production.

菌素的生成量与突变体 PAM0487R 的绿脓菌素生成量的比值为 3。在含 1/4MIC 四环素的 LB 液体培养基中,野生型 PAO1 的绿脓菌素生成量与突变体 PAM0487 和 PAM0487R 中生成量的比值分别是 1.3 和 5,表明 PA0487 基因对 *phzA1* 操纵子在转录水平的正向调节作用也表现在表型上。

由图还可以看出:在不同浓度四环素存在的条件下,PAM0487R 的绿脓菌素生成量无明显变化,说明突变体 PAM0487R 中四环素对 *phzA1* 操纵子对的调节作用消失了。

## 2.4 次抑制浓度四环素条件下 PA0487 基因与 QS 关系的研究

*phzA1* 操纵子的表达受到 QS 系统的调节<sup>[6]</sup>。为了进一步研究 PA0487 基因对 *phzA1* 操纵子调节与 QS 系统的关系,测定了 QS 系统相关基因 *rhIR*、*lasR*、*lasI*、*rhII*、*pqsR*、*pqsH* 在 PAO1 及两个突变体 PAM0487、PAM0487R 中的表达。图 4 表明了 *rhIR* 基因表达情况。与 PAO1 (pKD-*rhIR*) 相比,*rhIR* 在 PAM0487 (pKD-*rhIR*) 和 PAM0487R (pKD-*rhIR*) 中的最大表达量都有所降低:无四环素条件下,*rhIR* 在 PAO1 (pKD-*rhIR*) 中的最大表达量与 PAM0487R (pKD-*rhIR*) 中最大表达量的比值为 2.5(图 4-A);在 1/4MIC 四环素情况下,*rhIR* 在 PAO1 (pKD-*rhIR*) 中最大表达量与 PAM0487 (pKD-*rhIR*) 和 PAM0487R (pKD-*rhIR*) 中最大表达量的比值分别为 4、5(图 4-B)。说明 PA0487 对 *rhIR* 基因的表达具有正向

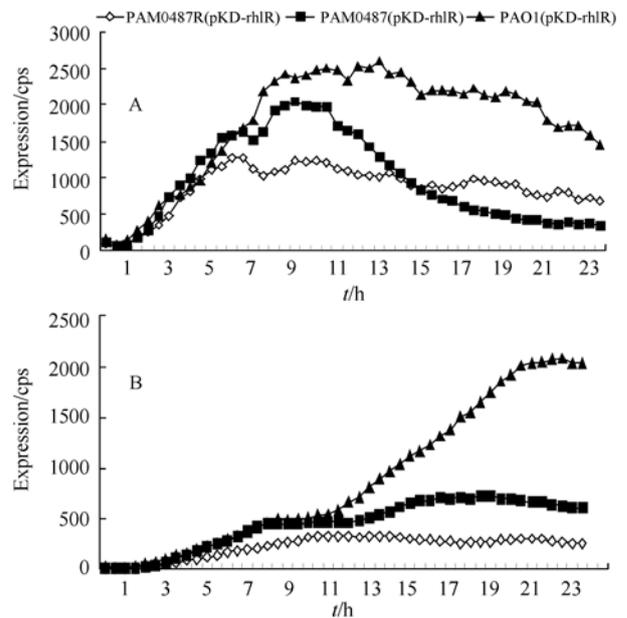


图4 无四环素(A)及 1/4MIC 四环素(B)条件下 *rhIR* 基因在野生型 PAO1 和突变体 PAM0487R、PAM0487 中的表达  
Fig. 4 The expression of *rhIR* in wild type PAO1 and the PA0487 mutants in the presence of 1/4 MIC Tet(A) and without Tet(B).

调节作用。

其他以 AHL 为信号分子的 QS 系统的相关基因 *lasR*、*lasI*、*rhlI* 在两突变体中的表达都比野生型 PAO1 的低 (数据未列出), 说明 PA0487 基因对以 AHL 为信号分子的 QS 系统具有正向调控作用。

类似地, PQS 信号分子合成的相关基因 *pqsR* 和 *pqsH* 在两个突变体 PAM0487、PAM0487R 中的表达也降低, 其中 *pqsR* 表达变化情况见图 5。其中 1/4MIC 四环素条件下, *pqsR* 在 PAO1 中的最大表达量与在突变体 PAM0487R 中的最大表达量之比约为 20 (图 5-B)。说明 PA0487 基因对喹诺酮类信号分子系统基

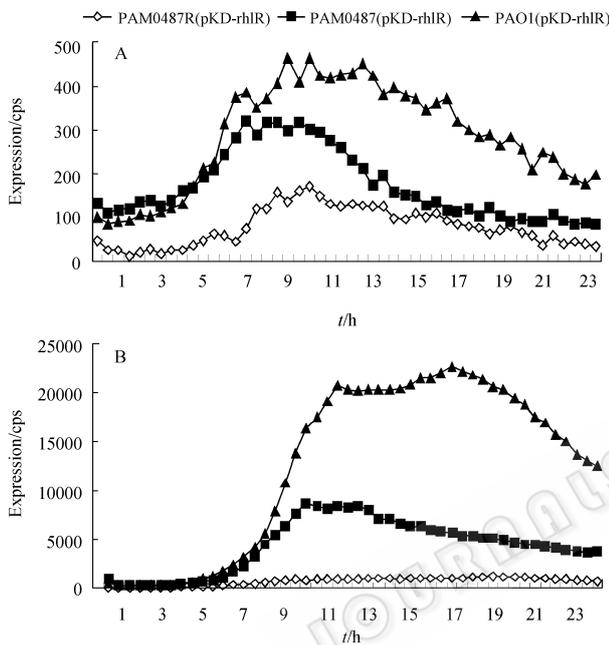


图 5 无四环素(A)及 1/4 MIC 四环素(B)条件下, *pqsR* 基因在野生型 PAO1 和突变体 PAM0487R、PAM0487 中的表达  
Fig. 5 The expression of *pqsR* in wild type PAO1 and the PA0487 mutants in the presence of 1/4 MIC Tet(A) and without Tet(B).

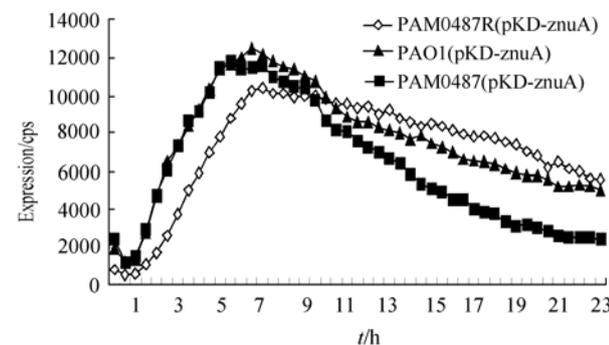


图 6 1/4 MIC 四环素条件下, *znuA* 基因在野生型 PAO1 和突变体 PAM0487R、PAM0487 中的表达  
Fig. 6 The expression of *znuA* in wild type PAO1 and the PA0487 mutants in the presence of 1/4 MIC Tet.

因也有正向调节作用。

为了进一步验证以上的结果, 测定了与 QS 系统无关的基因 *znuA* 在 PAO1 及两个突变体 PAM0487、PAM0487R 中的表达。发现无论四环素存在与否, 基因的表达无变化。其中, 1/4MIC 四环素条件下 *znuA* 的表达情况见图 6。

### 3 讨论

在前期研究中, 运用转座子突变技术, 在铜绿假单胞菌整个基因组中, 筛选了对吩嗪合成基因 *phzA1* 的表达有影响的基因。本文对其中两株突变体 PAM0487 和 PAM0487R 进行了深入研究。PAM0487R 和 PAM0487 中, *phzA1* 操纵子的表达有不同程度的降低 (图 1), 而且表型也发生了相应的变化 (图 2)。两株突变菌株 PAM0487R 和 PAM0487 突变点都在 PA0487 基因前, 分别距 PA0487 基因 13 bp 和 25 bp, 都位于 PA0487 基因启动子区内, 因此对 *phzA1* 操纵子有调节作用的基因是 PA0487 (图 1), 这一基因与大肠杆菌中的钼元素的转运调节子有同源性, 表明它可能编码转录调节蛋白。

突变体 PAM0487R、PAM0487 虽然在突变位点上只相差 12 bp, 但 *phzA1* 操纵子、QS 系统相关基因在其中的表达以及表型变化上都表现了一定的差异 (图 1、图 2、图 4、图 5), 即: 与在野生型 PAO1 的表达相比较, 在突变体 PAM0487 中的表达变化弱于在 PAM0487R 中表达的变化。可能是由于 PAM0487R 的突变位点更接近于 PA0487 基因的编码起始位点, 所以与野生型相比变化更明显, 同时也说明: 基因 PA0487 中两个突变点相差的这 12 bp 的碱基对其表达和调控很重要。

已有的研究报道表明次抑制浓度的抗生素可以作为信号分子调节致病基因的表达<sup>[13, 14]</sup>。前期研究表明次抑制浓度的四环素对 *phzA1* 操纵子的表达具有调节作用。但是野生型 PAO1 中次抑制浓度的四环素对 *phzA1* 操纵子表达的调节作用在突变体 PAM0487R 中消失 (图 2、图 3), 推测 PA0487 基因可能是次抑制浓度四环素调节 *phzA1* 操纵子表达途径中的一员。

*phzA1* 操纵子的表达与 QS 系统有关<sup>[1]</sup>。本实验研究发现 QS 系统相关基因在突变体中的表达降低 (图 4、图 5), 表明 PA0487 基因对 QS 系统相关基因的表达具有正向调节作用。

两个突变点相差的这 12 bp 碱基的作用及 PA0487 基因对 *phzA1* 操纵子调节的具体路径需要后

继实验的进一步研究。

### 参 考 文 献

- [1] Duan KM, Dammel C, Stein J, *et al.* Modulation of *Pseudomonas aeruginosa* gene expression by host microflora through interspecies communication. *Mol Microbiol*, 2003, 50(5): 1477–1491.
- [2] Leduc D, Beaufort N, de Bentzmann S. The *Pseudomonas aeruginosa* LasB metalloprotease regulates the human urokinase-type plasminogen activator receptor through domain-specific endoproteolysis. *Infect Immun*, 2007, 75(8): 3848–3858.
- [3] Dietrich LE, Price-Whelan A, Petersen A, *et al.* The phenazine pyocyanin is a terminal signalling factor in the quorum sensing network of *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Microbiol*, 2006, 61(5): 1308–1321.
- [4] Hassett DJ, Woodruff WA, Wozniak DJ, *et al.* Cloning and characterization of the *Pseudomonas aeruginosa* *sodA* and *sodB* genes encoding manganese and iron-cofactored superoxide dismutase: demonstration of increased manganese superoxide dismutase activity in alginate-producing bacteria. *J Bacteriol*, 1993, 175(23): 7658–65.
- [5] Girard G, Barends S, Rigali S, *et al.* Pip, a novel activator of phenazine biosynthesis in *Pseudomonas chlororaphis* PCL1391. *J Bacteriol*, 2006, 188(23): 8283–8293.
- [6] Carty N, Layland N, Colmer-Hamood JA, *et al.* PtxR modulates the expression of QS controlled virulence factors in the *Pseudomonas aeruginosa* strain PAO1. *Mol Microbiol*, 2006, 61(3): 782–794.
- [7] Diggle SP, Winzer K, Lazdunski A, *et al.* Advancing the quorum in *Pseudomonas aeruginosa*: MvaT and the regulation of N-acylhomoserine lactone production and virulence gene expression. *J Bacteriol*, 2002, 184(10): 576–2586.
- [8] Xiao G, Deziel E, He J, *et al.* MvfR, a key *Pseudomonas aeruginosa* pathogenicity LTTR-class regulatory protein, has dual ligands. *Mol Microbiol*, 2006, 62(6): 1689–1699.
- [9] 梁海华, 铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)致病因子受低于最小抑制浓度抗生素调节的研究. 西北大学学位论文, 2006.
- [10] Holloway BW, Krishnapillai V, Morgan AF. Chromosomal genetics of *Pseudomonas*. *Microbiol Rev*, 1979, 43(1): 73–102.
- [11] Friedman L, Kolter R. Two genetic loci produce distinct carbohydrate-rich structural components of the *Pseudomonas aeruginosa* biofilm matrix. *J Bacteriol*, 2004, 186(14): 4457–4465.
- [12] Essar DW, Eberly L, Hadero A, Crawford IP. Identification and characterization of genes for a second anthranilate synthase in *Pseudomonas aeruginosa*: interchange ability of the two anthranilate synthases and evolutionary implications. *J Bacteriol*, 1990, 172(2): 884–900.
- [13] Linares JF, Gustafsson I, Baquero F, *et al.* Antibiotics as inter-microbial signaling agents instead of weapons. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103(51): 19484–19489.
- [14] Garske LA, Beatson SA, Leech AJ, *et al.* Sub-inhibitory concentrations of ceftazidime and tobramycin reduce the quorum sensing signals of *Pseudomonas aeruginosa*. *Pathology*, 2004, 36(6): 571–575.

## A novel transcriptional regulator of the *phzA1* operon in *Pseudomonas aeruginosa*

Liping Kong, Haihua Liang, Zhaolin Dong, Kangmin Duan\*, Lixin Shen\*

(Key Laboratory of Resources Biology and Biotechnology in Western China, Ministry of Education, Faculty of Life Sciences, Northwest University, Xi'an 710069, China)

**Abstract:** [Objective] The aim was to investigate the regulator of *phzA1B1C1D1E1F1* (*phzA1*) operon in *Pseudomonas aeruginosa*. [Methods] Mutants affecting *phzA1* expression in the presence of subinhibitory concentrations of tetracycline were selected by screening a transposon mutagenesis library. The transposon insertion sites in the mutants were determined by arbitrary PCR and subsequent PCR product sequencing. [Results] We found two mutants affecting the *phzA1* operon expression. The transposon insertion sites in these two mutants were at the promoter region of gene PA0487 encoding a probable molybdenum transport regulator. Some genes involved in quorum sensing were also down-regulated in the mutant. [Conclusion] PA0487 was involved in regulating the expression of *phzA1*, possibly through the quorum sensing system.

**Keywords:** *Pseudomonas aeruginosa*; *phzA1* gene; quorum-sensing; Tetracycline

Supported by the National Natural Science Foundation of China(30470098) and the Major Basic Research Program Preliminary Project (2004CCA01700)

\*Corresponding author. Tel/Fax: +86-29-88305288; E-mail: shenlx68@nwu.edu.cn, kduan@nwu.edu.cn

Received: 19 February 2008/ Revised: 16 April 2008