



铜绿假单胞菌 *Arr* 基因突变对生物膜和 绿脓菌素合成的影响

周金凤 葛宜和 刘婷 程显好 王磊 高兴喜*

(鲁东大学生命科学学院 山东 烟台 264000)

摘要: 为了研究铜绿假单胞菌 *Arr* 基因对生物膜和绿脓菌素合成的影响, 采用抗庆大霉素基因序列(Gentamycin resistance cassette, *aacC1*)插入失活的策略构建了铜绿假单胞菌 *Arr* 基因突变株 PA-AG, 通过 96 孔板静止培养、结晶紫染色的方法检测其生物膜的形成量, 利用抽提的方法检测绿脓菌素的合成量。结果在 KMB 或 LB 培养基中, 突变株 PA-AG 形成生物膜的量均有所减少, 野生株约是突变株的 2 倍, 然而突变株合成绿脓菌素的能力却明显加强, 约为野生株的 2.5 倍。由此推测, 铜绿假单胞菌 *Arr* 基因在一定程度上促进了生物膜的形成, 抑制了绿脓菌素的合成。

关键词: 铜绿假单胞菌, *Arr*, 生物膜, 绿脓菌素, 调控

Effects of *Arr* Mutation on Biofilm and Pyocyanin Biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa*

ZHOU Jin-Feng GE Yi-He LIU Ting CHENG Xian-Hao WANG Lei GAO Xing-Xi*

(School of Life Sciences, Ludong University, Yantai, Shandong 264000, China)

Abstract: As an opportunistic pathogen, *Pseudomonas aeruginosa* can produce biofilm and pyocyanin, which play a critical role in its pathogenesis. This study aims to elucidate the function of the *Arr* gene in formation of biofilm and production of pyocyanin in *Pseudomonas aeruginosa*. Using the chromosome DNA of *Pseudomonas aeruginosa* as template, we first cloned the *Arr* gene by PCR. With the insertion of gentamycin resistance cassette (*aacC1*), the mutant PA-AG has then been constructed by homologous recombination. The formation of biofilm is determined by staining with crystal violet, and production of pyocyanin is detected with spectrophotometric method. In KMB or LB medium, biofilm formation of the parental strain PAO1 is about 2 folds higher than that of the *Arr* mutant PA-AG. The biosynthesis of pyocyanin in the *Arr* mutant PA-AG is about 2.5 folds higher than that in the parental strain PAO1. These results indicate that the *Arr* gene negatively controls the pyocyanin biosynthesis, but *Arr* could exert some positive effect on the biofilm formation. It is suggested that regulation mediated by the *Arr* gene on biofilm and biosynthesis of pyocyanin in *Pseudomonas aeruginosa* is specific and different.

Keywords: *Pseudomonas aeruginosa*, *Arr*, Biofilm, Pyocyanin, Regulation

* 通讯作者: ✉ gaoxingxi@yahoo.com.cn

收稿日期: 2009-12-27; 接受日期: 2010-03-08

铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)是革兰氏阴性细菌,是一种常见的医院内感染的条件致病菌,被世界卫生组织调查公认为医院内感染的主要病原菌之一^[1]。该菌的致病性与毒力因子的产生密切相关^[2],而绿脓菌素(Pyocyanin)不仅是其分泌的一种毒力因子,而且是铜绿假单胞菌的信号分子。它是一种蓝色的有活性的氧化还原次级代谢产物,可以诱导嗜中性粒细胞凋亡,从而破坏由其介导的免疫防御机能^[3];可以灭活 $\alpha 1$ 蛋白酶抑制因子从而影响肺丝氨酸蛋白酶活性,引发肺囊性纤维化疾病^[4];可以抑制呼吸道上皮细胞的纤毛运动能力,从而有利于铜绿假单胞菌在呼吸道内形成生物膜(Biofilm)^[5]。生物膜是细菌为了适应生存环境而形成的与浮游细胞相对应的生存形式,是指由附着于惰性或者活性实体表面的细菌细胞和包裹着细菌的水合性基质所组成的结构性细菌群落^[6]。铜绿假单胞菌生物膜的形成是一个较为复杂的过程,该过程受外界环境如营养成分、pH、温度、渗透压、水流冲刷力、介质的表面特性及铁离子浓度和氧化还原电位等的影响,而且是个动态过程^[7]。现在已知:密度感知(Quorum sensing, QS)系统可以调控生物膜的形成^[8];对氧磷酶(Paraoxonases)的表达抑制生物膜的形成^[9];在氨基糖苷类抗生素存在的情况下铜绿假单胞菌野生株形成生物膜的能力是铜绿假单胞菌 *Arr* 基因突变株的 8 倍^[10]。而 *Arr* 基因在铜绿假单胞菌中可以编码一种内膜磷酸二酯酶,底物为广泛存在于细菌中的新型第二信使 c-di-GMP,可以调节细胞的表面粘附。

目前如何清除铜绿假单胞菌生物膜和干预其形成已成为研究重点,然而铜绿假单胞菌生物膜和多种毒力因子经常受相同的调控系统影响。例如当铜绿假单胞菌 *rpoS* 基因突变后绿脓菌素和生物膜的形成量均增加^[11-12],虽然已知在氨基糖苷类抗生素存在的情况下铜绿假单胞菌野生株形成生物膜的能力是其 *Arr* 基因突变株的 8 倍,但是关于 *Arr* 基因对铜绿假单胞菌绿脓菌素合成的影响并未见报道。因此,为了进一步研究 *Arr* 基因对生物膜和绿脓菌素合成的影响,发掘其潜在的调控方式,本文采用抗庆大霉素基因序列(Gentamycin resistance cassette, *aacC1*)插入失活的策略构建了铜绿假单胞菌 *Arr* 基因突变株 PA-AG,通过 96 孔板静止培养、结晶紫染色的方法检测生物膜的形成量,利用抽提的方法检

测绿脓菌素的合成量。从而阐明了铜绿假单胞菌 *Arr* 基因在一定程度上促进生物膜的形成,抑制绿脓菌素的合成。这对于寻找药物作用的新靶点,解决由铜绿假单胞菌引起的难治性感染,具有极其重要的意义。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒: 本研究所涉及的菌株、质粒及其来源见表 1。

表 1 菌株和质粒 Table 1 Strains and plasmids		
Strains and plasmids	Characteristics	Source
Strains		
<i>E. coli</i>		
DH5 α	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi⁻¹ hsdR17(rk⁻mk⁻)supE44 relA1</i>	This Lab
SM10	<i>F⁻ thi⁻¹ thr⁻¹ leuB6 recA tonA21 lacY1 supE44 (MuC⁺) λ-Kan^R</i>	This Lab
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		
PAO1	Wild type	This Lab
PA-AG	<i>Arr</i> gene mutated with <i>aacC1</i> cassette in PAO1	This study
Plasmids		
pUCm-T	ColE, cloning and sequencing vector, Amp ^R	Sangon, Shanghai
pJF1	pUCm-T carrying 0.9 kb upstream part of <i>Arr</i> gene from PAO1	This study
pJF2	pUC18 carrying 0.9 kb upstream part of <i>Arr</i> gene from PAO1	This study
pJF3	855 bp- <i>Sma</i> I <i>aacC1</i> cloned into <i>EcoR</i> V of pJF2	This study
pEX18Tc	Suicide plasmid, Tet ^R	[13]
pUCGm	Resource of gentamycin resistance cassette (<i>aacC1</i>)	[14]
pEXT-AG	0.9 kb <i>Arr</i> fragment inserted with <i>aacC1</i> cassette in pEX18Tc	This study

1.1.2 培养基和培养条件: 大肠杆菌的培养基为 LB; 铜绿假单胞菌的培养基为 KMB 或 LB。LB 培养基按文献[15]配制; KMB 培养基: 每升含胰蛋白胨 20 g, K₂HPO₄ 0.392 g, 甘油 15 mL, MgSO₄ 0.732 g, pH 7.5; 相应固体培养基每升加 12.0 g 琼脂粉。根据培养需要 *E. coli* 培养基中添加抗生素的用量(mg/L)为: 氨苄青霉素(Amp) 100、庆大霉素(Gen)

20, 铜绿假单胞菌培养基中添加抗生素的用量为 (mg/L): 壮观霉素(Spe) 100、庆大霉素(Gen) 20。菌体液体培养时, 大肠杆菌在 37°C、180 r/min 条件下振荡培养; 铜绿假单胞菌在 37°C、220 r/min 条件下振荡培养。

1.1.3 主要试剂和仪器: 多种限制性内切酶、T4 DNA 连接酶、DNA 分子量标记物皆为 Fermentas (MBI)公司产品并购于上海生工生物工程技术服务有限公司; *Taq* DNA 聚合酶、dNTP 购于天根生化科技(北京)有限公司; 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。本实验所需主要仪器有 PCR 仪(Bio-Rad, USA)、冷冻离心机(CR3i multifunction, Thermo Electron Corporation, USA)、紫外可见分光光度计(TU-1810, 北京普析)等。

1.2 *Arr* 基因的 PCR 扩增、克隆和测序

为提高同源重组的双交换几率, 根据铜绿假单胞菌 PAO1 基因组中 *Arr* 基因及相邻片段, 设计引物 (*Arr*1: 5'-ATTGACCCGGATGACCATGC-3'; *Arr*2: 5'-TGACTTCCAGGACCAGTTGC-3'), 以铜绿假单胞菌基因组为模板进行 PCR, 其中 PCR 的反应程序及条件参数为: 94°C 4 min; 94°C 1 min, 55°C 1 min, 72°C 1 min, 35 个循环; 72°C 10 min。PCR 产物胶回收纯化后交于上海生工生物工程技术服务有限公司进行测序。铜绿假单胞菌基因组提取、质粒抽提、限制性内切酶酶切、DNA 片段胶回收、连接、感受态细胞制备和转化等步骤均参照文献[15]或相关试剂盒提供的方法进行。PCR 获得的片段约为 0.9 kb, 与 T 载体 pUCm-T 相连。T 载体的连接反应和 *E. coli* DH5 α 的转化按上海生工生物工程技术服务有限公司试剂盒操作手册进行, 所获质粒命名为 pJF1。

1.3 *Arr* 基因插入失活突变株 PA-AG 的构建

用 *Pst* I 酶切质粒 pJF1, 获得约 0.9 kb 的 *Arr* 基因片段, 与用相同酶酶切的 pUC18 质粒连接, 使 *Arr* 基因片段插入位于 pUC18 内唯一的 *Pst* I 位点中, 所获得的阳性克隆命名为 pJF2。用 *Sma* I 平端酶切质粒 pUCGm, 获得约 0.85 kb 的抗庆大霉素基因序列片段 (Gentamycin resistance cassette, *accC1*)^[14], 用 *Eco*R V 平端酶切 pJF2 质粒, 与抗庆大霉素基因序列片段连接, 所获得的正确质粒命名为 pJF3。用 *Pst* I 酶切质粒 pJF3, 切下片段胶回收后与用相同限制性内切酶酶切并回收的自杀质粒

pEX18Tc^[13]相连接。连接产物转化 *E. coli* DH5 α , 涂布于含庆大霉素的平板, 37°C 恒温培养。挑单克隆培养、提取质粒、酶切验证, 获得的阳性克隆命名为 pEXT-AG, 至此用于构建突变株的自杀质粒载体构建完成。

用 CaCl₂ 转化法将 pEXT-AG 转入 *E. coli* SM10, 方法见文献[15]。

以 pEXT-AG 所在的 *E. coli* SM10 为供体菌, 野生型铜绿假单胞菌 PAO1 为受体菌进行固相纤维滤膜接合转移。主要步骤如下: 将两种菌分别接种于 4 mL 含相应抗生素(四环素、壮观霉素)的 LB 和 KMB 培养基中, 过夜培养。分别取 1 mL 菌液离心弃上清, 用 1 mL 新鲜的相应培养基洗涤 2-3 次。将菌体混合并悬浮于 150 μ L 新鲜 LB 中, 吸取混合菌液转移至无抗生素的 LB 平板中央的一片圆形微孔滤膜(孔径 \varnothing 0.22 μ m、已灭菌)上, 37°C 恒温箱培养 24 h。刮取上述菌体涂布于含有 Spe100 和 Gen40 的筛选平板, 37°C 恒温箱培养 48-72 h。随机挑取单菌落用含 15%蔗糖的 KMB 培养基连续培养数代(> 5 代), 然后稀释法涂布于含 Gen40 的平板。挑取所获克隆分别点种于含 Gen40 和 Tet100 的平板上。筛选 Tet 平板不生长而 Gen 平板上生长的相应克隆, 即铜绿假单胞菌 PAO1 的 *Arr* 基因插入失活突变体, 命名为 PA-AG。

1.4 生长曲线的测定

将野生菌株 PAO1 和突变株 PA-AG 分别同时培养于 KMB 和 LB 中, 37°C 摇床培养, 每隔 12 h 取样, 稀释涂布培养, 数菌落个数, 3 次重复取平均值。

1.5 绿脓菌素含量的测定

将铜绿假单胞菌野生型 PAO1 和突变体 PA-AG 菌株分别在试管中用 LB 和 KMB 两种培养基过夜培养, 稀释至 0.1×10^6 CFU/mL, 分别取 1 mL 相应接种于含有 50 mL KMB 和 LB 培养基的 250 mL 三角瓶中, 在 37°C、220 r/min 摇床培养 72 h, 测定绿脓菌素的表达量, 即: 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, 每毫升培养上清液产生的绿脓菌素(毫克)的量等于在 OD₅₂₀ 处的消光系数乘以 12.8 g/L^[16]。重复 3 次, 取平均值。

1.6 生物膜体外膜型的建立

生物膜体外模型的建立参照文献[17], 并有所改进。将铜绿假单胞菌野生株 PAO1 和突变株 PA-AG 分别在 LB 和 KMB 两种培养基中过夜培养, 稀释至 1×10^5 CFU/mL, 使无菌的 96 孔板的每孔加入等量的菌, 并作多个重复, 阴性对照只含有 LB 和 KMB 培养基, 于 37°C 条件下培养, 每 24 h 换培养基 1 次, 连续培养数天, 将在气液交界处形成稳定的细菌生物膜。

1.7 生物膜检测--结晶紫染色法

利用生物膜内物质对某些染料的结合, 可以通过染色的办法对生物膜进行定量。最常用的就是结晶紫^[18], 将已形成稳定生物膜的 96 孔板用蒸馏水冲洗 3 次, 洗去浮游菌, 用福尔马林固定 5 min, 结晶紫染色 30 min, 再用蒸馏水冲洗 3 次。放置干燥后用 400 μ L 95%乙醇脱色 30 min, 所得有色溶液用分光光度计测 590 nm 处吸光值。

2 结果

2.1 *Arr* 基因序列分析

根据设计的引物, 以 PAO1 的基因组 DNA 为模板进行 PCR。通过优化 PCR 反应条件获得了一条约 0.9 kb 的阳性条带, 该条带大小与预期结果相符, 且测序结果与 *Pseudomonas* Genome Database 中 *Arr* 基因序列完全一致(序列号为 PA2818)。将其克隆于 pUCm-T 载体中, 所获质粒 pJF1 分别用酶 *Bam*H I 酶切, 琼脂糖凝胶电泳表明(结果未显示), pJF1 质粒得到大小约为 0.7 kb 和 2.9 kb 两个片段, 根据得到的片段大小, 可以确定 pJF1 构建成功。

2.2 *Arr* 基因插入失活突变株的构建和鉴定

铜绿假单胞菌 PAO1 的单交换菌株既抗四环素又抗庆大霉素, 而双交换菌株即 *Arr* 基因插入失活突变株对四环素敏感但抗庆大霉素。因此凡是在四环素平板上不生长而在庆大霉素平板上生长的菌落即为铜绿假单胞菌 PA-AG 突变株。为了进一步验证其 *Arr* 基因是否已插入有 *aacC1* 基因序列, 我们采用 PCR 的方法进行验证。分别提取野生株 PAO1 和突变株 PA-AG 的基因组 DNA, 以 *Arr*1 和 *Arr*2 为引物, 分别以野生株和突变株的基因组 DNA 为模板进行 PCR。琼脂糖凝胶电泳表明: 野生株的 PCR 条带约 0.9 kb, 而突变株 PCR 条带约 1.5 kb, 与预期结果一致。这是因为插入的抗庆大霉素基因序列(*aacC1*)

约为 0.85 kb, 而在构建自杀质粒载体 pEXT-AG 的过程中 *Arr* 基因被酶切掉约 250 bp, 如图 1 所示。PCR 产物胶回收纯化后交于上海生工生物工程技术有限公司进行测序, 测序结果经比对表明突变株的 *Arr* 基因中已插入有抗庆大霉素基因序列(*aacC1*), 证实已获得 *Arr* 基因插入失活突变株 PA-AG。

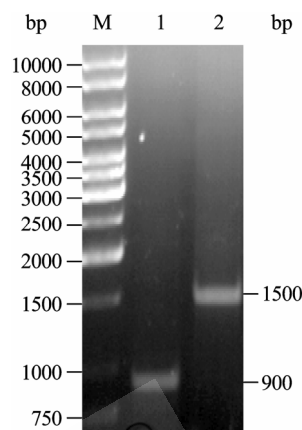


图 1 *Arr* 基因突变的 PCR 验证

Fig. 1 PCR verification of *Arr* gene mutation

Note: M: 1 kb DNA marker; 1: PAO1; 2: PA-AG.

2.3 *Arr* 基因失活对菌体生长的影响

为了比较铜绿假单胞菌突变株 PA-AG 与野生株 PAO1 的生长状况, 将它们分别接种于 LB 和 KMB 两种培养基中, 振荡培养, 每 12 h 取样稀释涂布培养, 数单菌落个数。根据结果绘制生长曲线。根据图 2 结果显示: 突变株 PA-AG 与野生株 PAO1 无论在 LB 培养基中还是在 KMB 培养基中生长状况都基本相似, 说明 *Arr* 基因突变对菌体生长基本没有影响。

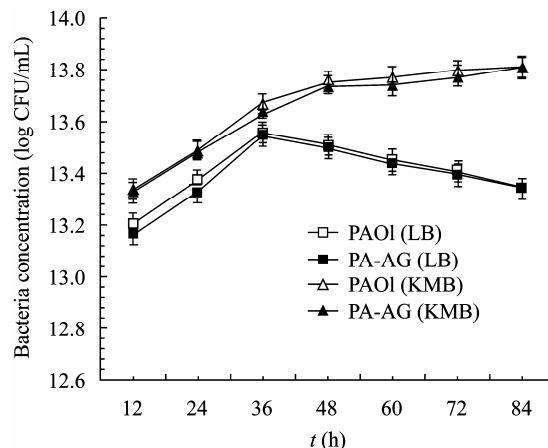


图 2 铜绿假单胞菌野生株 PAO1 及突变株 PA-AG 在 LB 和 KMB 培养基中生长曲线

Fig. 2 Growth curves of wild type strain PAO1 and its mutant PA-AG in LB and KMB medium

2.4 *Arr* 基因失活对绿脓菌素合成的影响

发酵培养铜绿假单胞菌的野生株 PAO1 和突变株 PA-AG, 用抽提的方法检测绿脓菌素合成量。根据测定结果绘制图表, 如图 3 所示, 无论在 KMB 培养基还是在 LB 培养基中, 突变株 PA-AG 合成绿脓菌素的量都明显高于野生株 PAO1, 统计分析表明突变株大约是野生株的 2.5 倍, 说明铜绿假单胞菌 *Arr* 基因在一定程度上抑制了绿脓菌素的合成。

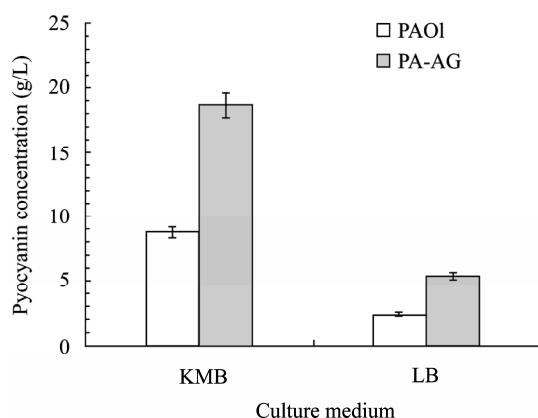


图 3 绿脓菌素测定结果

Fig. 3 Pyocyanin production

2.5 *Arr* 基因失活对生物膜形成的影响

为了检测 *Arr* 基因失活后对生物膜形成的影响, 用 96 孔板静止培养 PAO1 及 PA-AG, 并且每隔 3 d 检测生物膜的合成量, 根据检测结果绘制曲线。根据图 4 发现, 在 KMB 培养基中, 野生株 PAO1 3 d 就可以形成最大量的生物膜, 以后的时间里即使更换培养基继续培养, 生物膜的量也基本不再增加;

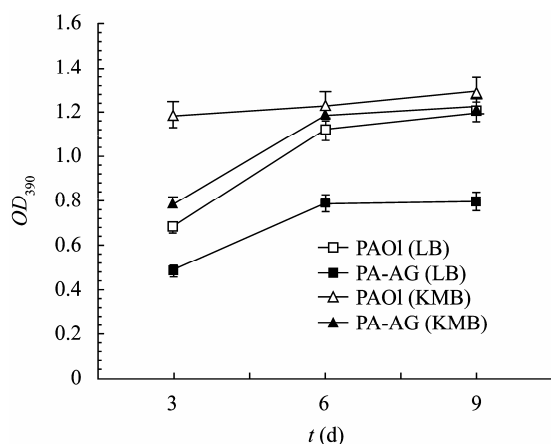


图 4 铜绿假单胞菌野生株 PAO1 及突变株 PA-AG 在 LB 和 KMB 培养基中生物膜的形成

Fig. 4 The formation of bacterial biofilm about wild type strain PAO1 and its mutant PA-AG in LB and KMB medium

而在 LB 培养基中则需 6 d 才可以形成最大量的生物膜, 并且在形成稳定的生物膜以前无论是在 KMB 还是在 LB 培养基中均表现为 *Arr* 基因突变抑制了生物膜的形成, 统计分析表明野生株与突变株最大比值约为 2。这说明在铜绿假单胞菌中: (1) 生物膜的形成与营养条件有一定的关系, 而且在一定的空间内, 生物膜的形成量具有饱和性; (2) *Arr* 基因在一定程度上促进了生物膜的形成。

3 讨论

铜绿假单胞菌的致病机理与其合成并分泌的多种毒力因子密切相关, 绿脓菌素是该菌产生的重要毒力因子之一, 而生物膜的形成极大的增强了它的抗药性, 为临床治疗带来很大的困难。本文的研究结果表明: 在一定程度上, 铜绿假单胞菌 *Arr* 基因抑制了绿脓菌素的合成, 促进了生物膜的形成, 从而为临床治疗提供了一定的理论依据。Hoffman 等人的研究表明: 次抑菌浓度的氨基糖苷类抗生素可以诱导铜绿假单胞菌和大肠杆菌生物膜的形成, 而且在氨基糖苷类抗生素存在的情况下铜绿假单胞菌野生株形成生物膜的能力是其 *Arr* 基因突变株的 8 倍, 而本文的研究结果表明在无任何抗生素存在的情况下铜绿假单胞菌野生株形成生物膜的能力仅为 *Arr* 基因突变株的 2 倍, 说明 *Arr* 基因对生物膜形成的影响程度远远小于氨基糖苷类抗生素对其产生的影响。但本文的研究结果与 Hoffman 等人的研究结果一致, 即铜绿假单胞菌 *Arr* 基因促进了生物膜的形成。

铜绿假单胞菌色素合成与调控机制十分复杂, 多个基因、操纵子和调控系统参与其中。绿脓菌素由色氨酸合成的重要中间产物分枝酸(Chorismic acid)开始, 由 *phzA1B1C1D1E1F1G1* 和 *phzA2B2C2D2E2F2G2* 操纵子控制合成中间产物酚嗪-1-羧酸, 再由酚嗪-1-羧酸经过甲基化和脱羧(分别由 *phzM* 和 *phzS* 基因控制)合成^[19]。在 *phzA1B1C1D1E1F1G1* 操纵子的启动子区域存在 1 个 *las-box*, 是密度感知系统的顺式调控元件^[20]。现在已知绿脓菌素的合成受密度感知系统的调控, 细菌间通过自身合成的信号分子——酰基高丝氨酸内酯(N-acylhomoserine lactone, AHL)传递信息, AHL 与相应的调控蛋白结合后启动下游基因的表达, 导致绿脓菌素等毒力因子合成增加^[21];

人和哺乳动物的对氧磷酶 1 (Paraoxonase 1, PON1) 具有AHL内酯酶活性, 能够水解AHL, 阻断铜绿假单胞菌的密度感知系统, 从而减少绿脓菌素的生成。而当*Arr*基因突变后铜绿假单胞菌绿脓菌素的合成量明显增加, 因此推测*Arr*基因可能通过密度感知系统直接或间接的参与铜绿假单胞菌绿脓菌素的合成, 但具体的调控机制还有待进一步研究。

致谢: 本文突变株 PA-AG 的构建由我院本科毕业生张翠霞同学参与, 在此向她致以诚挚的感谢。

参 考 文 献

- [1] Philippon A, Arlet G, Jacoby GA. Plasmid-determined AmpC-type β -lactamases. *Antimicrob Agents Chemother*, 2002, **46**(1): 1–11.
- [2] Leduc D, Beaufort N, de Bentzmann S. The *Pseudomonas aeruginosa* LasB metalloprotease-inase regulates the human urokinase-type plasminogen activator receptor through domain-specific endoproteolysis. *Infect Immun*, 2007, **75**(8): 3848–3858.
- [3] Lynne RU, Roderick AL, Geary I, et al. Induction of neutrophil apoptosis by the *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin pyocyanin: a potential mechanism of persistent infection. *The Journal of Immunology*, 2002(168): 1861–1868.
- [4] Bradley EB, Railsback MA, Cox CD. The *Pseudomonas aeruginosa* secretory product pyocyanin inactivates a1 protease inhibitor: implications for the pathogenesis of cystic fibrosis lung disease. *Infect Immune*, 1999, **67**(3): 1207–1212.
- [5] Wilson R, Pitt T, Taylor G, et al. Pyocyanin and 1-hydroxyphenazine produced by *Pseudomonas aeruginosa* inhibit the beating of human respiratory cilia *in vitro*. *J Clin Invest*, 1987, **79**(1): 221–229.
- [6] Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science*, 1999, **284**(5418): 1318–1322.
- [7] O'Toole G, Kaplan HB, Kolter R. Biofilm formation as microbial development. *Annu Rev Microbiol*, 2000(54): 49–79.
- [8] Irie Y, Parsek MR. Quorum sensing and microbial biofilms. *Curr Top Microbiol Immunol*, 2008(322): 67–84.
- [9] Ma F, Wang Y, Zhang Y, et al. Heterologous expression of human paraoxonases in *Pseudomonas aeruginosa* inhibits biofilm formation and decreases antibiotic resistance. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2009, **83**(1): 135–141.
- [10] Hoffman LR, D'Argenio DA, MacCoss MJ, et al. Aminoglycoside antibiotics induce bacterial biofilm formation. *Nature*, 2005, **436**(25): 1171–1175.
- [11] Suh SJ, Silo-Suh L, Woods DE, et al. Effect of *rpoS* mutation on the stress response and expression of virulence factors in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol*, 1999, **181**(13): 3890–3897.
- [12] Whiteley M, Bangera MG, Bumgarner RE, et al. Gene expression in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Nature*, 2001(413): 860–864.
- [13] 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**(1): 77–86.
- [14] Schweizer HP. Small broad-host-range gentamycin resistance cassettes for site-specific insertion and deletion mutagenesis. *Bio Techniques*, 1993, **15**(5): 831–834.
- [15] Sambrook J, Frisch EF, Maniatis T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbour Laboratory Press, 1989: 87–96.
- [16] Essar DW, Eberly L, Hadero A, et al. 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.
- [17] Stepanovic S, Cirkovic I, Mijac V, et al. Influence of the incubation temperature, atmosphere and dynamic conditions on biofilm formation by *Salmonella* spp.. *Food-Microbiology*, 2003, **20**(3): 339–343.
- [18] Dong YH, Wang LH, Xu JL, et al. Quenching quorum-sensing dependent bacterial infection by an N-acyl homoserine lactonase. *Nature*, 2001(411): 813–817.
- [19] Mavrodi DV, Ksenzenko VN, Bonsall RF, et al. A seven-gene locus for synthesis of phenazine-1-carboxylic acid by *Pseudomonas fluorescens* 2-79. *J Bacteriol*, 1998, **180**(9): 2541–2548.
- [20] Mavrodi DV, Bonsall RF, Delaney SM, et al. Functional analysis of genes for biosynthesis of pyocyanin and phenazine-1-carboxamide from *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *J Bacteriol*, 2001, **183**(21): 6454–6465.
- [21] 谢丽丽, 熊盛道. 密度感知——治疗铜绿假单胞菌感染的新靶位. 国外医学: 内科学分册, 2004, **31**(7): 284–287.