

假单胞菌 M18 中藤黄绿菌素合成限速酶基因的鉴定及表达优化

李赛男 李慷 王姝芸 王国昊 黄显清* 许煜泉

(上海交通大学 生命科学技术学院 微生物代谢国家重点实验室 上海 200240)

摘要:【目的】假单胞菌株 M18 中负责抗真菌剂藤黄绿菌素(Plt)合成的结构基因包括 *pltLABCDEFG*、*pltM*。为了鉴定 Plt 合成限速酶的基因, 分别将 9 个结构基因过表达。

【方法】以 M18 菌株染色体 DNA 为模板, PCR 扩增这 9 个 Plt 合成基因的编码区, 分别克隆到穿梭载体 pME6032 的 *tac* 启动子下游, 构建 9 个结构基因的过表达载体, 并转入假单胞菌株 M18 中。在 KMB 培养基中进行 Plt 发酵分析。【结果】分别携带 *pltC*、*pltD*、*pltF* 过表达载体的菌株与携带空质粒的菌株相比, Plt 产量分别提高了 96%、78%、75%。对重组菌株进行 IPTG 诱导浓度和诱导时间的优化, 确定 IPTG 最佳诱导浓度为 1.0 mmol/L, 最佳诱导时间为培养 6 h。【结论】*pltC*、*pltD*、*pltF* 分别编码的 I 型聚酮合成酶、卤化酶、乙酰 CoA 合成酶可能为 Plt 生物合成的限速酶。按照优化条件发酵, 携带 *pltD*、*pltF* 过表达质粒的菌株产量分别上升 77.5%、159.1%。

关键词: 假单胞菌株, 藤黄绿菌素, 限速酶, IPTG 诱导条件优化

Identification and expression optimization of the genes encoding rate-limiting enzymes in pyoluteorin biosynthesis of *Pseudomonas* sp. M18

LI Sai-Nan LI Kang WANG Shu-Yun WANG Guo-Hao
HUANG Xian-Qing* XU Yu-Quan

(College of Life Science and Biotechnology, Shanghai Jiao Tong University, State Key Laboratory of

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 30800009); 国家 863 计划项目(No. 2007AA02Z215); 国家 973 计划项目(No. 2009CB118906)

*通讯作者: Tel: 86-21-34204347; 信箱: xquang11@gmail.com

收稿日期: 2011-12-06; 接受日期: 2012-01-09

Microbial Metabolism, Shanghai 200240, China)

Abstract: [Objective] In *Pseudomonas* sp. M18, there are nine structural genes encoding pyoluteorin (Plt) biosynthese, including *pltLABCDEFG* and *pltM*. In order to identify the gene encoding rate-limiting enzyme, 9 structural genes were overexpressed. **[Methods]** The entire ORFs of these nine genes were PCR amplified from the M18 strain chromosomal DNA template and respectively cloned into the *Pseudomonas-E. coli* plasmid pME6032, generating nine overexpression plasmids of *plt* genes. The M18 strains, carrying these overexpression plasmids, were assayed for Plt production in KMB media. **[Results]** It was showed that the Plt production of three strains respectively harboring *pltC*, *pltD*, *pltF* overexpression plasmids was raised by 96%, 78%, 75% as compared to the control. The optimal inducing concentration of IPTG was 1.0 mmol/L, and the optimal inducing time was at 6 hours after inoculation. **[Conclusion]** The genes *pltC*, *pltD*, *pltF* divergently encode polyketidesynthase, halogenase and acyl-CoA synthetase rate-limiting enzyme in Plt biosynthesis. At the optimal IPTG concentration and inducing time, pyoluteorin production of strains containing *pltD*, *pltF* overexpression plasmids was respectively increased by 77.5% and 159.1%.

Keywords: *Pseudomonas* sp. M18, Pyoluteorin, Rate-limiting enzyme, Conditional optimization of IPTG induction

生物体内代谢过程都是连续的酶促反应, 决定某一代谢过程总速度的是其中最慢的反应, 催化该反应的酶即称为该过程的限速酶。限速酶对实现代谢的控制极为重要。增加限速步骤酶基因的拷贝数, 可以提高微生物代谢产物的产量^[1-2]。

假单胞菌 M18 可以分泌两种抗生素: 吩嗪-1-羧酸和藤黄绿菌素(Pyoluteorin, Plt)^[3]。藤黄绿菌素是一种聚酮化合物, 对细菌、真菌有广谱抑菌活性^[4]。假单胞菌株 Pf-5 能合成藤黄绿菌素^[5]。在假单胞菌 M18 和 Pf-5 中, 藤黄绿菌素生物合成结构、调控、转运基因簇已经得到鉴定, 包括结构基因 *pltLABCDEFG* 和 *pltM*、调控基因 *pltR* 和 *pltZ*、转运及抗性基因簇 *pltHIJKNO*, 其中 LysR 家族转录调控子 PltR 转录激活与其反向转录的 *pltLABCDEFG* 生物合成操纵子的表达, TetR 家族转录调控子 PltZ 转录阻遏与其反向转录的

pltHIJKNO 转运操纵子的表达^[3,5-7]。Plt 能诱导自身生物合成操纵子 *pltLABCDEFG* 的表达^[7-8]。在既定的合成途径中, *pltA*、*pltD*、*pltM* 编码卤化酶, *pltB*、*pltC* 编码 I 型聚酮合成酶, *pltE* 编码乙酰 CoA 脱氢酶, *pltF* 编码乙酰 CoA 合成酶, *pltG* 编码酯酶^[3,5]。

本课题组前期对于藤黄绿菌素生物合成的分子调控展开了广泛而深入的研究^[3,9-12]。本课题通过 Plt 生物合成结构基因的过表达及其对藤黄绿菌素合成的影响, 鉴定出 3 个潜在的限速酶基因 *pltC*、*pltD*、*pltF*, 并进一步优化其 IPTG 诱导时间和浓度。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种和质粒: 本研究所用的菌株、质粒及其来源见表 1。

表 1 菌株与质粒
Table 1 Strains and plasmids

Materials	Genotype and/or relevant characteristics	Source
<i>E. coli</i> DH5α	<i>supE44 ΔlacU169(Φ80 lacZΔM15) hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1</i>	This lab
<i>Pseudomonas</i> sp. M18		
Wild-type	Rhizosphere isolate, Plt ⁺ PCA ⁺ Sp ^r	This lab
Plasmids		
pME6032	pVS1-p15A <i>E. coli</i> - <i>Pseudomonas</i> shuttle vector, <i>lacI^q</i> - <i>Ptac</i> expression vector, Tc ^r	This lab
pJDLT-L	pME6032 with <i>Kpn</i> I- <i>Bgl</i> II insert of 267 bp, including gene <i>pltL</i> sequence, Tc ^r	This study
pJDLT-A	pME6032 with <i>Nco</i> I- <i>Xho</i> I insert of 1 350 bp, including gene <i>pltA</i> sequence, Tc ^r	This study
pJDLT-B	pME6032 with <i>EcoR</i> I- <i>Bgl</i> II insert of 7 266 bp, including gene <i>pltB</i> sequence, Tc ^r	This study
pJDLT-C	pME6032 with <i>Nco</i> I- <i>Bgl</i> II insert of 5 220 bp, including gene <i>pltC</i> sequence, Tc ^r	This study
pJDLT-D	pME6032 with <i>EcoR</i> I- <i>Kpn</i> I insert of 1 638 bp, including gene <i>pltD</i> sequence, Tc ^r	This study
pJDLT-E	pME6032 with <i>Kpn</i> I- <i>Bgl</i> II insert of 1 134 bp, including gene <i>pltE</i> sequence, Tc ^r	This study
pJDLT-F	pME6032 with <i>EcoR</i> I- <i>Bgl</i> II insert of 1 494 bp, including gene <i>pltF</i> sequence, Tc ^r	This study
pJDLT-G	pME6032 with <i>EcoR</i> I- <i>Bgl</i> II insert of 795 bp, including gene <i>pltG</i> sequence, Tc ^r	This study
pJDLT-M	pME6032 with <i>Kpn</i> I- <i>Bgl</i> II insert of 1 515 bp, including gene <i>pltM</i> sequence, Tc ^r	This study

Note: Plt: Pyoluteorin; PCA: Phenazine-1-carboxyl acid; r: Antibiotics-resistant; Km: Kanamycin; Tc: Tetracycline; Sp: Spectinomycin.

1.1.2 培养基和生长条件: 本实验用到的培养基包括 LB、KMB。LB 培养基按文献[13]配制; KMB 培养基: 每升含蛋白胨 20 g、甘油 15 mL、MgSO₄ 0.732 g、K₂HPO₄ 0.514 g、pH 7.5; 相应固体培养基每升加琼脂 15 g。大肠杆菌(*E. coli*)培养基中抗生素用量(mg/L): 四环素(Tet) 10。假单胞菌 M18 培养基中抗生素用量(mg/L): 壮观霉素(Sp) 100、四环素(Tet) 120。培养温度: 大肠杆菌和假单胞菌常规培养 37 °C、发酵培养 28 °C, 200 r/min 转速下振荡培养。

1.1.3 主要试剂和仪器: DNA *Taq* 聚合酶购自 TaKaRa 公司; 高保真 DNA 聚合酶 KOD 聚合酶购自 Toyobo 公司; 各种限制性内切酶、T4 DNA 连接酶、DNA 分子量标准物购自 MBI 公司; 质粒抽提试剂盒购自北京博大泰克公司; DNA 胶回收试剂盒购自 Axygen 公司。基因组抽提试剂盒、IPTG、抗生素购自上海 Sangon 公司。安捷伦高效液相色谱仪 (型号 G1328B)、分析柱为反相 C18 色谱柱

(4.6 mm i.d.×150 mm, 5 μm)购自安捷伦公司。

1.2 引物和 PCR 反应

根据 *Pseudomonas* sp. M18 的 *plt* 基因簇序列 (GenBank 登录号 AY394844)设计引物(表 2), 以 M18 菌株基因组为模板, PCR 扩增 *pltL*、*pltA*、*pltB*、*pltC*、*pltD*、*pltE*、*pltF*、*pltG*、*pltM* 基因编码区。PCR 反应体系 (50 μL): 10×高保真 DNA 聚合酶缓冲液 5 μL、dNTPs (2.5 mmol/L) 4 μL、引物 1 和引物 2 各 1 μL、模板 DNA 0.5 μL、高保真 DNA 聚合酶 (5 U/μL) 0.25 μL、重蒸水 38.25 μL。PCR 反应条件: 95 °C 5 min; 94 °C 45 s, 60 °C 45 s, 72 °C 1 min, 30 个循环; 72 °C 10 min。PCR 延伸时间根据不同片段长度有所不同。

1.3 克隆基因片段及测序

质粒抽提、DNA 片段回收、酶切、酶连反应等均参照试剂(盒)说明书, 相关分子生物学方法参照文献[13], DNA 测序委托上海英骏生物技术有限公司和华大基因科技股份有限公司。

表 2 本研究应用的引物
Table 2 Primers used in this study

Gene	Length (nt)	Primer sequence (5'→3')	
<i>pltL</i> (pJDLT-L)	267	<i>pltL</i> -1:	GCTCGGTACCATGGATATGGAAGAGATT (<i>Kpn</i> I)
		<i>pltL</i> -2:	AATTAGATCTTCAAGCCGGTTCGGCATT (<i>Bgl</i> II)
<i>pltA</i> (pJDLT-A)	1 350	<i>pltA</i> -1:	ATATCCATGGATGGGTGATTATGATTTC (<i>Nco</i> I)
		<i>pltA</i> -2:	ATATCTCGAGTCAGAACGCCGGTCTCTGC (<i>Xho</i> I)
<i>pltB</i> (pJDLT-B)	7 266	<i>pltB</i> -1:	TAATGAATTCGGATGGTTCCGAAGG (<i>EcoR</i> I)
		<i>pltB</i> -2:	ATATAGATCTCAGTCGCTCCTGCGGT (<i>Bgl</i> II)
<i>pltC</i> (pJDLT-C)	5 220	<i>pltC</i> -1:	TCGACCATGGAAAACGAAACGTCA (<i>Nco</i> I)
		<i>pltC</i> -2:	GATAAGATCTATACGGCGTAGAGC (<i>Bgl</i> II)
<i>pltD</i> (pJDLT-D)	1 638	<i>pltD</i> -1:	GGATGAATTCATGGTTGGTATGTCCAGC (<i>EcoR</i> I)
		<i>pltD</i> -2:	ATATGGTACCCTCAACTCTCCTTGCGCAT (<i>Kpn</i> I)
<i>pltE</i> (pJDLT-E)	1 134	<i>pltE</i> -1:	TAATGGTACCATGGACTTCAACCTTGAC (<i>Kpn</i> I)
		<i>pltE</i> -2:	TATAAGATCTTCATAGGCCGAGCTCCCG (<i>Bgl</i> II)
<i>pltF</i> (pJDLT-F)	1 494	<i>pltF</i> -1:	TATAGAATTCGGCCTATGAAGCTCCTG (<i>EcoR</i> I)
		<i>pltF</i> -2:	TAGTAGATCTGTCAGTCCTCCACCAGG (<i>Bgl</i> II)
<i>pltG</i> (pJDLT-G)	795	<i>pltG</i> -1:	ATATGAATTCATGAGGCTCTCTGCGATG (<i>EcoR</i> I)
		<i>pltG</i> -2:	TTAAAGATCTTCAGAGTGTGACGAACGC (<i>Bgl</i> II)
<i>pltM</i> (pJDLT-M)	1 515	<i>pltM</i> -1:	ATATGAATTCATGAGTCGTACGTACGAC (<i>EcoR</i> I)
		<i>pltM</i> -2:	TTAAAGATCTTTGAACCCTGCACTTGCG (<i>Bgl</i> II)

1.4 Plt 产量测定

*OD*₆₀₀ 值的测定、Plt 的提取及其 HPLC 测定方法均参照文献[3]。每个实验独立重复 2 次，每次实验中每个菌株设 3 个平行样，每隔 12 h 取一次样，测定 Plt 产量与细胞生长密度(*OD*₆₀₀)。

1.5 IPTG 诱导基因表达

IPTG 诱导浓度优化时，摇床培养 6 h 后，添加终浓度为 0.1、0.4、0.7、1.0、1.5 mmol/L 的 IPTG，72 h 后测定产量。诱导时间优化时，分别在培养 6、12、18、24、30 h 后添加浓度已优化的 IPTG，培养 72 h 后测定产量。

2 结果

2.1 Plt 基因簇结构基因过表达质粒的构建

为了研究假单胞菌 M18 在 Plt 合成过程中起关键作用的结构基因，根据已鉴定的 Plt 基因簇序列设计引物，以 M18 基因组 DNA 为模板，PCR

扩增 9 个结构基因，采用引物上设计的酶切位点，进行酶切并克隆表达载体 pME6032 的 *tac* 启动子下游，得到 9 个 *plt* 结构基因过表达载体，经 PCR、测序验证后 (图 1)分别转化到 M18 菌株，以分析结构基因对 Plt 产量的影响。

2.2 藤黄绿菌素合成限速酶基因的确定

藤黄绿菌素(Plt)为假单胞菌株 M18 分泌的具有广谱抗真菌活性的抗生素。对携带上述 *plt* 结构基因过表达载体的 M18 菌株进行抗生素发酵分析，发酵条件为: KMB 培养基, 28 °C、200 r/min 摇床振荡培养，培养 72 h 取样，HPLC 测定 Plt 浓度。实验结果显示(图 2)，空质粒 pME6032 的转入会导致 M18 菌株 Plt 产量的小幅上调。排除空质粒的影响，9 个 Plt 结构基因的过表达都导致 Plt 产量提高，其中以 *pltC*、*pltD*、*pltF* 过表达使 Plt 产量提高最为明显，分别为 168.67 mg/L、153.04 mg/L、150.98 mg/L，与含空质粒的 M18

菌株相比, Plt 产量分别提高了 96%、78%、75%。
Plt 结构基因过表达质粒与空质粒 pME6032 的导入对细胞生长没有明显的影响。因此, 实验结果初步显示 *pltC*、*pltD*、*pltF* 可能为 Plt 生物合成限

速酶编码基因。

2.3 *plt* 结构基因表达的 IPTG 诱导浓度和时间的优化

IPTG 可以诱导 pME6032 的 *tac* 启动子表达,

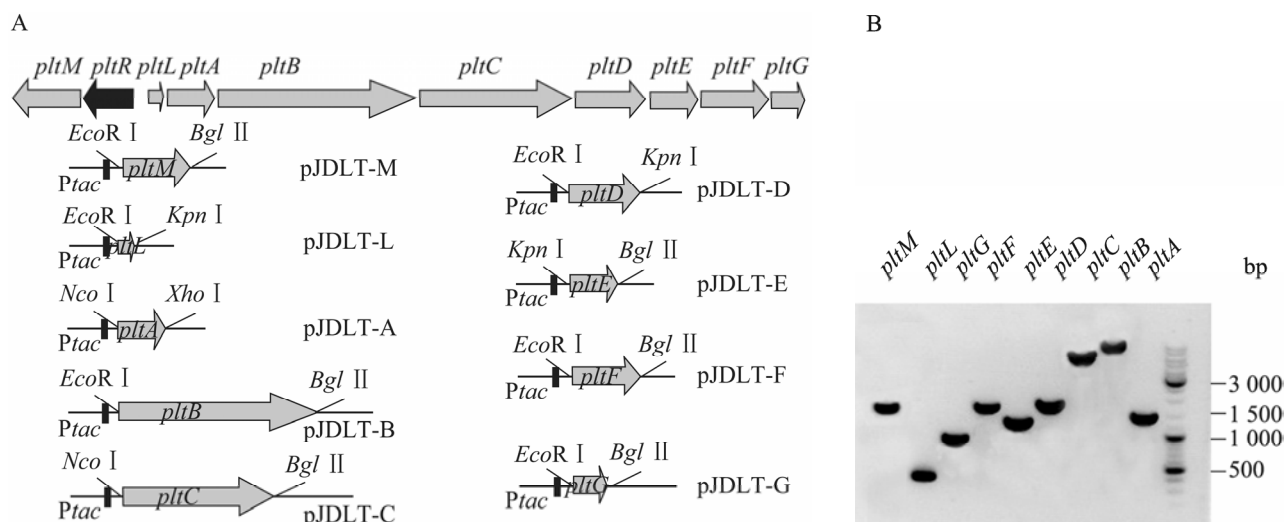


图 1 *plt* 结构基因过表达质粒的构建图谱(A)与 PCR 电泳验证(B)

Fig. 1 Construction map (A) and PCR confirmation (B) of the overexpression plasmids carrying *plt* structural genes

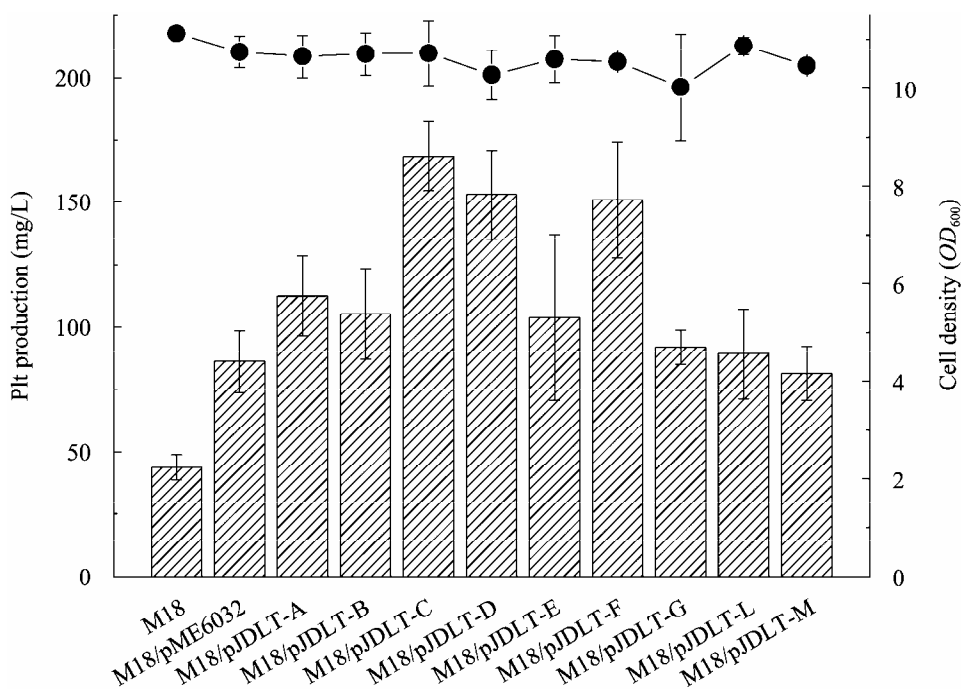


图 2 假单胞菌 M18 及携带空质粒和 9 个过表达质粒在 KMB 培养基中发酵 72 h 后细菌浓度(折线)及 Plt 产量(矩形)

Fig. 2 Plt production (broken line) and cell growth (OD₆₀₀) (rectangle) of the wild-type M18 strain and derivative strains which respectively harbor *plt* over expression plasmids or the empty plasmid pME6032 as the control, after 72 h growth in KMB broth

但是 IPTG 有一定毒性, 浓度过高对细菌生长有影响。诱导时间也会对基因表达产生一定影响。因此, 优化 IPTG 的诱导浓度和诱导时间可以增加 Plt 的产量, 对于构建高产菌株有一定的理论依据。

选择限速酶基因 *pltD* 的过表达菌株 M18/pJDLT-D 为优化对象。IPTG 浓度优化时, 在接种培养 6 h 后加入 IPTG 终浓度分别为: 0.1、0.4、0.7、1.0、1.5 mmol/L, 经摇床培养 72 h 后测定 Plt 产量, 结果如图 3A 所示, IPTG 诱导浓度

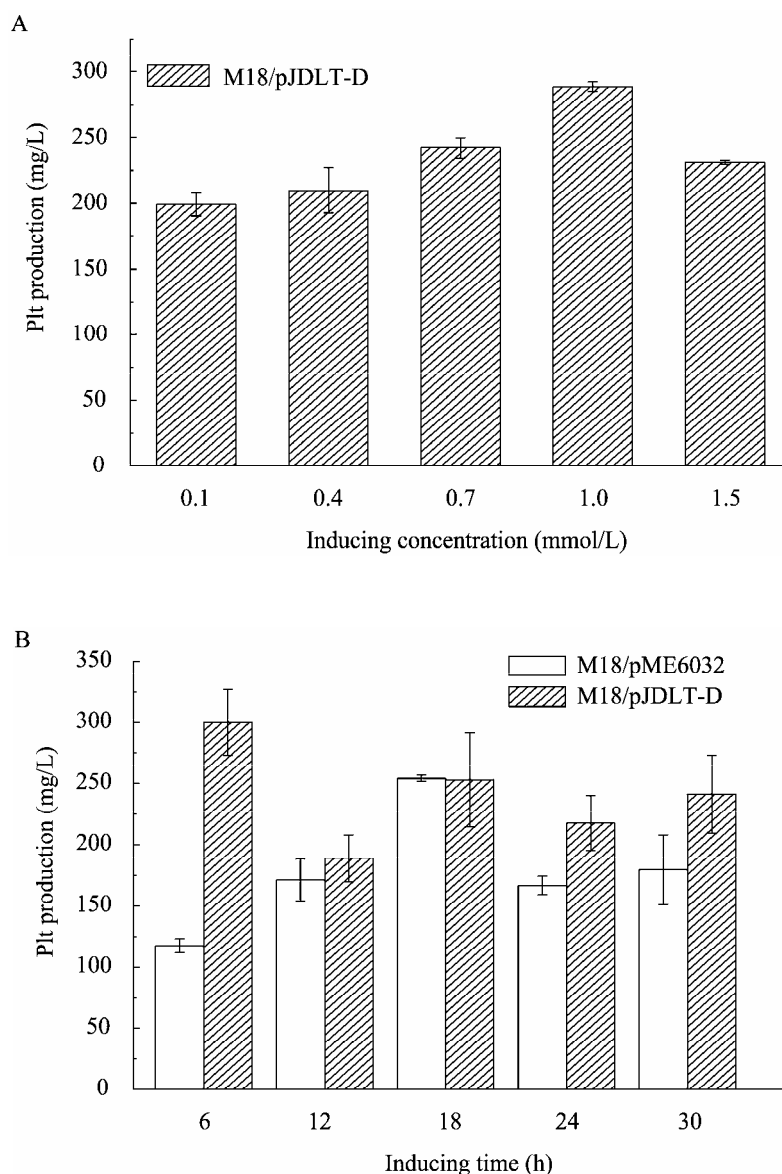


图 3 不同 IPTG 浓度(A)和不同诱导时间(B)下 M18/pJDLT-D 与 M18/pME6032 菌株在 KMB 培养基中发酵 72 h 后的 Plt 产量

Fig. 3 Plt production of the wild-type M18 strain which harbored the *pltD* over expression plasmid pJDLT-D or the empty vector pME6032 as the control induced with IPTG at different concentration (A) or at different time (B), after 72 h of growth in KMB broth

为 1.0 mmol/L 时, Plt 产量最高, 为 288.85 mg/L。确定 IPTG 最佳诱导浓度为 1.0 mmol/L。

IPTG 诱导时间优化时, 选择 IPTG 优化后确定的浓度, 分别在培养 6、12、18、24、30 h 后添加 IPTG。培养 72 h 后测定 Plt 产量, 结果如图 3B 所示, 在培养 6 h 后诱导, Plt 的产量最高, 为 300.11 mg/L, 比携带空质粒的菌株提高了 156%, 差异最为显著。因此, IPTG 的最佳诱导时间是培养 6 h 后诱导。

2.4 在优化的 IPTG 诱导条件下, 限速酶基因过表达菌株的 Plt 合成

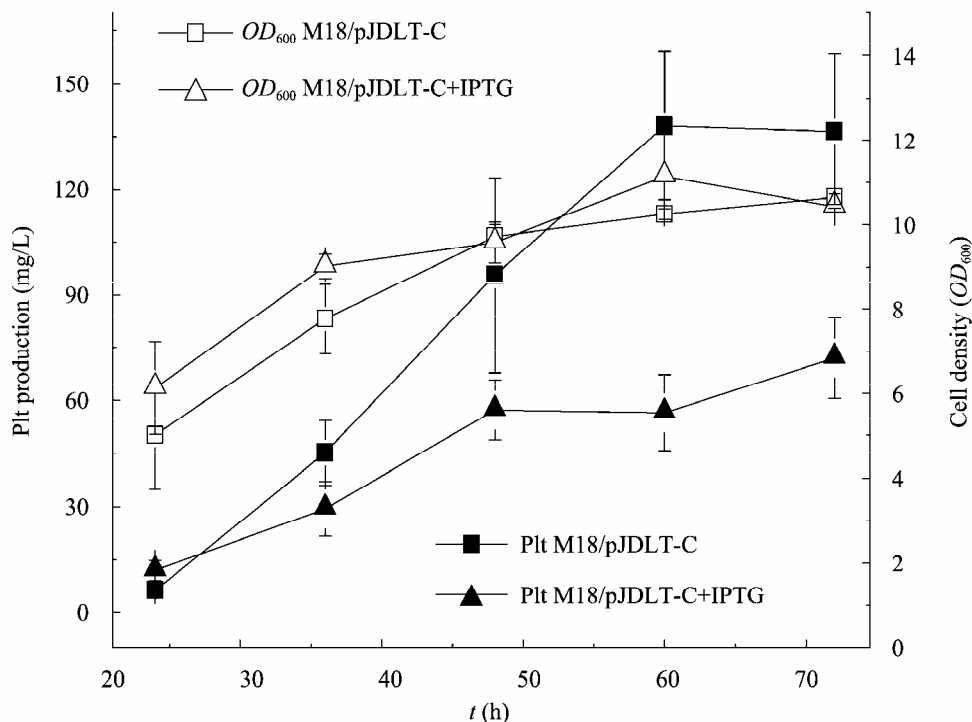
将携带 3 个限速酶基因 *pltC*、*pltD*、*pltF* 的过表达菌株, 按照 IPTG 优化条件发酵, 一方面验证 IPTG 诱导浓度与诱导时间的有效性, 另一方面为了进一步提高 Plt 产量, 为构建高产菌株提供一定的理论依据。M18/pJDLT-C、M18/pJDLT-D、M18/pJDLT-F 培养 6 h 后, 添加终浓度为 1.0 mmol/L 的 IPTG 诱导, 发酵 72 h 后检

测 Plt 产量。3 个 *plt* 基因过表达菌株在生长方面没有明显差异, 藤黄绿菌素合成在 48 h 后差异变得显著。由图 4A 看出, IPTG 诱导后, 藤黄绿菌素的产量反而降低了, 这表明 IPTG 可能对 *pltC* 编码的酶有负影响, 或者这一优化条件并不适用于 *pltC* 过表达菌株。图 4B 显示, *pltD* 过表达后, 藤黄绿菌素产量提高了 77.5%, 而 *pltF* 过表达后藤黄绿菌素产量升高了 159.1% (图 4C)。这表明优化的 IPTG 诱导条件对 *pltD*、*pltF* 过表达菌株是适用的, 藤黄绿菌素产量都有很大提高。

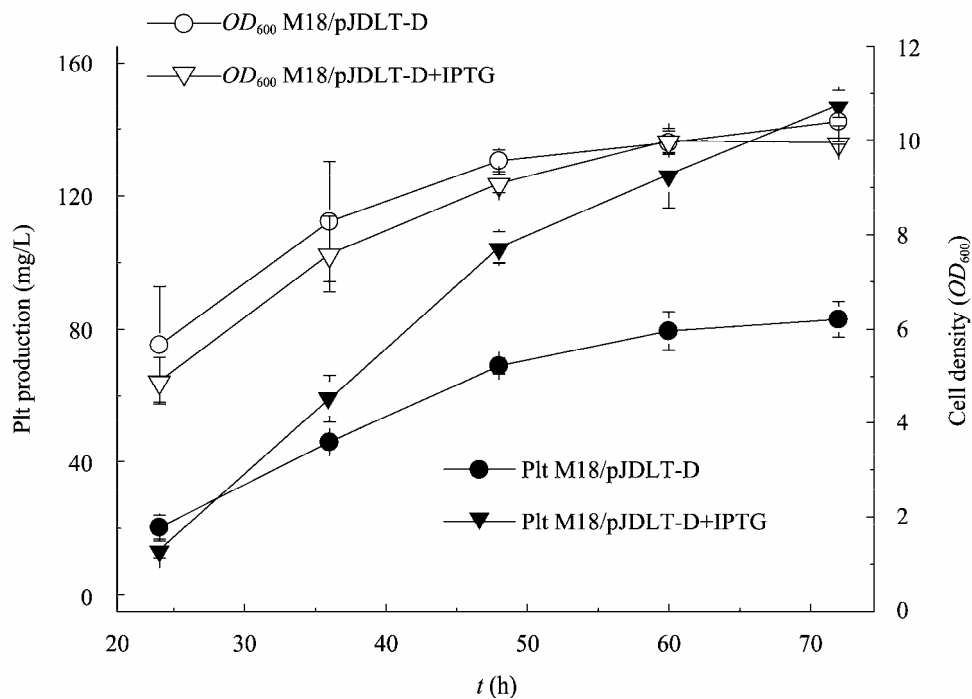
3 讨论

鉴定生物合成过程中的限速酶, 对于构建高产工程菌株有很大意义。本研究通过分析假单胞菌 M18 中藤黄绿菌素生物合成结构基因的过表达对藤黄绿菌素合成的影响, 来鉴定限速酶编码基因。9 个结构基因分别过表达后, 藤黄绿菌素产量都有所提高, 其中以 *pltC*、*pltD*、*pltF* 过表达

A



B



C

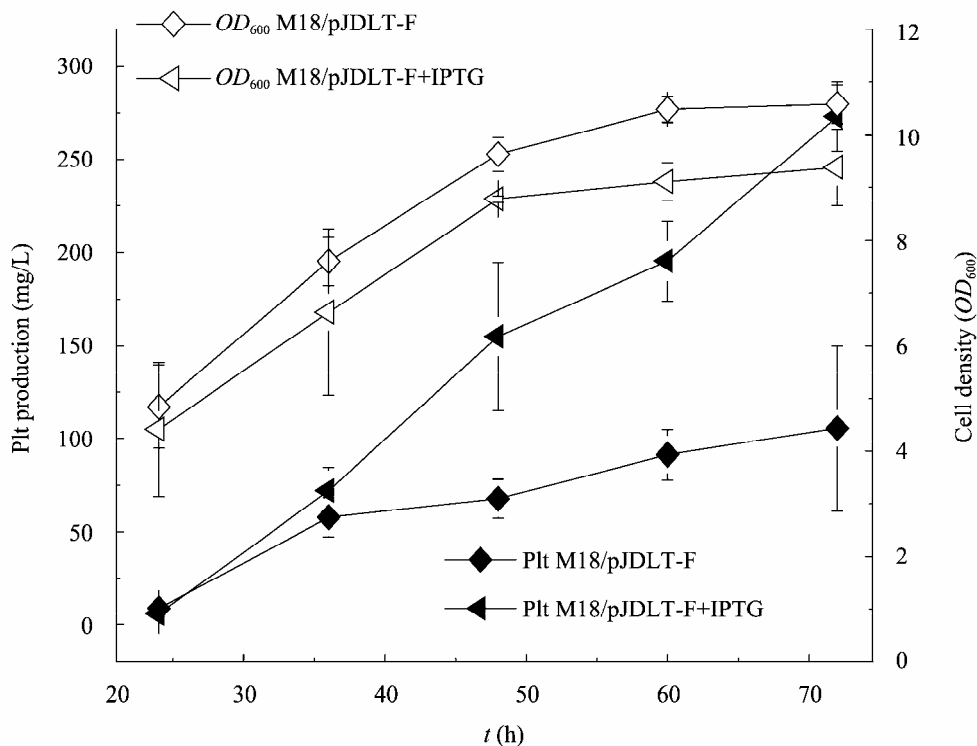


图 4 *pltC* (A)、*pltD* (B)、*pltF* (C) 过表达菌株在 IPTG 优化浓度/时间条件下与没有 IPTG 诱导条件下的藤黄绿菌素合成分析

Fig. 4 Pyoluteorin production of the *pltC* (A), *pltD* (B), *pltF* (C) overexpression strains without or with induction of the optimal IPTG condition and time

菌株提高最为显著,产量提高近一倍。这表明这3个基因所编码的酶在藤黄绿菌素合成过程中发挥相对重要的作用。经IPTG诱导浓度和时间优化后,*pltD*、*pltF*过表达菌株中藤黄绿菌素产量分别提高了77.5%、159.1%。研究证明,在藤黄绿菌素合成过程中,*pltC*、*pltD*、*pltF*分别编码的聚酮酶、卤化酶、乙酰CoA合成酶,可能为藤黄绿菌素合成的关键酶。实验结果表明,在3个编码卤化酶的基因中,*pltD*比较重要;在编码聚酮酶的2个基因中,*pltC*比较重要。这表明藤黄绿菌素的合成过程中可能存在多个限速步骤,其中IPTG诱导效果最明显的是*pltF*基因编码的乙酰CoA。如果同时过表达多个限速酶基因,可能更多地提高藤黄绿菌素的产量。

研究藤黄绿菌素合成过程中的限速酶,将有助于进一步了解藤黄绿菌素的合成途径和机理,通过提高限速酶基因的拷贝数可以有效提高藤黄绿菌素产量,这对于通过代谢工程手段构建高产工程菌株有重要意义。

参 考 文 献

- [1] Ikeda M. Towards bacterial strains overproducing L-tryptophan and other aromatics by metabolic engineering[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2006, 69(6): 615–626.
- [2] Sprenger GA. From scratch to value: engineering *Escherichia coli* wild type cells to the production of L-phenylalanine and other fine chemicals derived from chorismate[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2007, 75(4): 739–749.
- [3] Huang XQ, Zhu DH, Ge YH, et al. Identification and characterization of *pltZ*, a gene involved in the repression of pyoluteorin biosynthesis in *Pseudomonas* sp. M18[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2004, 232(2): 197–202.
- [4] Bender CL, Rangaswamy V, Loper J. Polyketide production by plant-associated *Pseudomonads*[J]. *Annual Review of Phytopathology*, 1999, 37(1): 175–196.
- [5] Nowak-Thompson B, Chaney N, Wing JS, et al. Characterization of the pyoluteorin biosynthetic gene cluster of *Pseudomonas fluorescens* Pf-5[J]. *Journal of Bacteriology*, 1999, 181(7): 2166–2174.
- [6] Brodhagen M, Paulsen I, Loper JE. Reciprocal regulation of pyoluteorin production with membrane transporter gene expression in *Pseudomonas fluorescens* Pf-5[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2005, 71(11): 6900–6909.
- [7] Huang XQ, Yan A, Zhang XH, et al. Identification and characterization of a putative ABC transporter PltHIJKN required for pyoluteorin production in *Pseudomonas* sp. M18[J]. *Gene*, 2006, 376(1): 68–78.
- [8] Brodhagen M, Henkels MD, Loper JE. Positive autoregulation and signaling properties of pyoluteorin, an antibiotic produced by the biological control organism *Pseudomonas fluorescens* Pf-5[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2004, 70(3): 1758–1766.
- [9] Chen Y, Wang XL, Huang XQ, et al. Las-like quorum-sensing system negatively regulates both pyoluteorin and phenazine-1-carboxylic acid production in *Pseudomonas* sp. M18[J]. *Science in China Series C: Life Sciences*, 2008, 51(2): 174–181.
- [10] Huang XQ, Zhang XH, Xu YQ. PltR expression modulated by the global regulators GacA, RsmA, LasI and RhII in *Pseudomonas* sp. M18[J]. *Research in Microbiology*, 2008, 159(2): 128–136.
- [11] Lu JS, Huang XQ, Li K, et al. LysR family transcriptional regulator PqsR as repressor of pyoluteorin biosynthesis and activator of phenazine-1-carboxylic acid biosynthesis in *Pseudomonas* sp. M18[J]. *Journal of Biotechnology*, 2009, 143(1): 1–9.
- [12] Yan A, Huang XQ, Liu HM, et al. An *rhl*-like quorum-sensing system negatively regulates pyoluteorin production in *Pseudomonas* sp. M18[J]. *Microbiology*, 2007, 153(1): 16–28.
- [13] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. 分子克隆实验指南[M]. 金冬雁, 黎孟枫, 等译. 第3版. 北京: 科学出版社, 2002.