

假单胞菌 H78 中 PhoR/B 系统对磷元素吸收及其 藤黄绿菌素合成的调控

王正 吴玲玉 刘玉洁 张雪洪 黄显清*

(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】研究根际荧光假单胞菌(*Pseudomonas protegens*) H78 中双组分系统 PhoR/B 对 Pst 磷转运系统以及 Plt 生物合成的调控作用。【方法】通过同源重组的方法敲除 *phoR* 和 *phoB* 基因; 使用 *lacZ* 报告基因融合质粒研究 PhoR/B 系统对 Pst 磷转运系统表达的调控; 在不同磷浓度下测定 H78 野生型及 H78phoBR 突变株的生长, 并在 KMB 培养基中测定其 Plt 产量。【结果】H78 野生型中 *pstS'*-*lacZ* 融合质粒表达的 LacZ 酶活是 H78phoBR 突变株的 15 倍; 在磷饥饿条件下 H78 的生长是 H78phoBR 菌株的 3 倍; 在 KMB 培养基中, H78 的 Plt 产量为 H78phoBR 菌株的 2 倍。【结论】PhoR/B 系统正调控 Pst 转运系统的表达; 在磷饥饿条件下, PhoR/B 促进磷元素的吸收和利用; PhoR/B 同时对 Plt 生物合成存在一定程度的正调控作用。

关键词: 假单胞菌株 H78, PhoR/B, Pst 系统, 磷饥饿, 藤黄绿菌素

Regulation of PhoR/B system on utilization of phosphorus and Plt biosynthesis in *Pseudomonas* sp. H78

WANG Zheng WU Ling-Yu LIU Yu-Jie ZHANG Xue-Hong HUANG Xian-Qing*

(College of Life Sciences and Biotechnology, Shanghai Jiao Tong University, State Key Laboratory of Microbial Metabolism, Shanghai 200240, China)

Abstract: [Objective] *Pseudomonas protegens* H78 can secrete three antibiotics including pyoluteorin (Plt), pyrrolnitrin and 2,4-diacetylphloroglucinol. This study focused on regulation of the two component system PhoR/B on phosphorus absorption and utilization and Plt biosynthesis. [Methods] *phoR* and *phoB* genes were deleted using non-scar homologous recombination method. The *lacZ* reporter gene was used to assess the regulation of PhoR/B system on Pst phosphorus transport system. The cell growth of wild-type and mutant was determined, cultured in minimal medium containing different concentrations of phosphate. The production of Plt was determined in KB medium. [Results] The β -galactosidase activity of *pstS'*-*lacZ* fusion in H78 was 15 times that in mutant. The growth of H78 was three times that in mutant when phosphate starvation. The production of Plt in H78 was two times that in mutant in KMB medium. [Conclusion] PhoR/B

Foundation item: National Natural Science Foundation of China (No. 31270083, 31470196)

*Corresponding author: Tel: 86-21-34207047; E-mail: xqhuang66@sjtu.edu.cn

Received: March 29, 2016; Accepted: May 16, 2016; Published online (www.cnki.net): June 08, 2016
基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 31270083, 31470196)

*通讯作者: Tel: 86-21-34207047; E-mail: xqhuang66@sjtu.edu.cn

收稿日期: 2016-03-29; 接受日期: 2016-05-16; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2016-06-08

system positively regulates the expression of the Pst phosphorus transport system. PhoR/B facilitates phosphorus absorption and utilization during phosphate starvation and positively regulates the Plt biosynthesis as well.

Keywords: *Pseudomonas* sp. H78, PhoR/B, Pst system, Phosphate starvation, Pyoluteorin

双组分系统广泛存在于微生物中,由感应外界环境信号变化的组氨酸蛋白激酶和一个应答调节蛋白组成。而磷元素作为微生物生长所需要的重要营养物质,磷离子代谢和平衡受到 PhoR/PhoB 双组分系统严格的调控,PhoR 蛋白属于组氨酸蛋白激酶,可以感受外界磷离子浓度变化,发生自我磷酸化,然后将磷酸基团转移到应答调节蛋白 PhoB,激活 PhoB 调控靶基因的表达^[1]。PhoR/B 系统存在于多种细菌中,可以调控细菌糖代谢、运动性、抗氧化性以及毒力等多个方面,也有文献报道 PhoR/B 系统可以调控抗生素的合成^[2]。

假单胞菌(*Pseudomonas protegens*) H78 分离于油菜根际,能够分泌多种抗菌物质,包括藤黄绿菌素(Plt)、硝吡咯菌素、2,4-二乙酰基间苯三酚以及氢氰酸等,具有较好的生防功能。Plt 属于聚酮类的广谱型抗生素,具有良好的抗卵菌和真菌作用^[3],尤其对植物致病菌终极腐霉具有很好的抑制作用,但其在野生型菌株中产量很低。然而 PhoR/B

系统在假单胞菌中调控研究较少,目前尚未发现关于 PhoR/B 系统对 Plt 合成调控的报道,因此研究其调控机制有重要的意义。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒: 研究中所用到的菌株和质粒见表 1。

1.1.2 培养基及菌株生长条件: LB 培养基(g/L): 蛋白胨 10.0, 酵母提取物 5.0, NaCl 10.0, pH 7.0。KMB 培养基(g/L): 蛋白胨 20.0, 甘油 15.0 mL, MgSO₄ 0.732, K₂HPO₄·3H₂O 0.514, pH 7.5。磷利用基本培养基(g/L): MgSO₄ 0.5, 柠檬酸 2.0, L-天冬氨酸 1.0, KCl 0.3, 甘油 1.0, 吐温 80 0.5, 0.5 mol/L FeCl₃ 320 μL, 1 mol/L NH₄Cl 100 μL, 其中磷源为 K₂HPO₄ (0、0.05 或 2.00 mmol/L)^[5]。固体培养基添加 1.2%琼脂粉。如需添加抗生素,假单胞菌 H78 培养基中抗生素用量(mg/L): 卡那霉素

表 1 菌株和质粒
Table 1 Strains and plasmids used in this study

Strains/Plasmids	Genotype and relevant characteristics	Reference
<i>P. protegens</i>		
H78	Wild type, Sp ^r	This lab
H78ΔphoBR	In frame deletion of <i>phoB</i> and <i>phoR</i>	This study
<i>E. coli</i>		
DH5α	<i>supE44 ΔlacU169(Φ80 lacZΔM15) hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1</i>	This lab
S17	<i>res⁻ pro mod⁺</i> integrated copy of RP4, <i>mob⁺</i>	This lab
Plasmids		
pK18mobsacB	Broad-host-range gene replacement vector; <i>sacB</i> , Km ^r	[4]
pK18-phoBR	pK18mobsacB with <i>Xba</i> I- <i>Eco</i> R I insert of 454 bp and 471 bp segments flanking <i>phoB</i> and <i>phoR</i> , Km ^r	This study
pME6015	pVS1-p15 A shuttle vector for constructing the translational <i>lacZ</i> fusions, Tc ^r	This lab
p6015-pstS	A <i>pstS'</i> - <i>lacZ</i> translational fusion containing a 252 bp fragment covering -237 bp to +15 bp (relative to the <i>pstS</i> translational start site) in pME6015, Tc ^r	This study

(Km) 50、硫酸氨基青霉素(Amp) 100、四环素(Tc) 30; 大肠杆菌 LB 培养基中抗生素用量(mg/L): 卡那霉素(Km) 50、硫酸氨基青霉素(Amp) 100、四环素(Tc) 15。大肠杆菌在 37 °C 培养; 假单胞菌在 28 °C、200 r/min 振荡培养。

1.1.3 主要试剂和仪器: LA Taq DNA 聚合酶、Solution I DNA 连接酶、质粒提取试剂盒、DNA 片段纯化试剂盒, 宝生物工程(大连)有限公司; KOD Plus Neo DNA 高保真聚合酶, 东洋纺(上海)生物科技有限公司; Easy Taq DNA 聚合酶、DNA Marker 和基因组 DNA 快速纯化试剂盒, 北京全式金生物技术有限公司; DNA 限制性内切酶, New England Biolabs (NEB)公司; ONPG、IPTG 和 X-gal, 生工生物工程(上海)股份有限公司。委托深圳华大基因科技有限公司进行测序和引物的合成。HPLC 分析柱为反相 C_{18} 色谱柱(4.6 mm \times 150 mm, 5 μ m), 安捷伦科技(中国)有限公司。

1.2 引物和 PCR 反应

常规分子生物学实验方法参照文献[6]。依据假单胞菌株 H78 的全基因组序列设计引物。扩增用于 *phoBR* 基因敲除的上游片段, 所用引物对: *phoBR*-P1: 5'-GCTCTAGATGTGGTTGTCAGGAA TCGGAC-3' (下划线为 *Xba* I 的识别位点, 下同); *phoBR*-P2: 5'-TGGTGATGTAGTCGTCGGCTCC-3'。扩增用于 *phoBR* 基因敲除的下游片段, 所用引物对: *phoBR*-P3: 5'-AGCCGACGACTACATCA CCACATCACCTGGAAGCCGACG-3'; *phoBR*-P4: 5'-GCGAATTC $\overline{CAAGTTACGCAATGTAGCGGC}$ -3' (*Eco*R I)。以 *pstS*'-F: 5'-CCGGAATTC $\overline{CCACCACCCTGTAGCCGCTCAGG}$ -3' (*Eco*R I) 和 *pstS*'-R: 5'-AAA $\overline{ACTGCAGACGCTTCAGTTTCATGCCTTACT}$ -3' (*Pst* I) 为引物对, H78 基因组为模板扩增 DNA 片段, 构建 *pstS*'-*lacZ* 融合质粒命名为 p6015-*pstS* 翻译融合质粒。

PCR 反应体系(50 μ L): 10 \times KOD Plus Neo buffer 5 μ L, dNTPs (2.5 mmol/L) 5 μ L, Mg^{2+} (25 mmol/L) 3 μ L, KOD Plus Neo DNA 聚合酶 1 μ L, 引物

(10 μ mol/L)各 1.5 μ L, DNA 模板 0.5 μ L, ddH $_2$ O 32.5 μ L。PCR 反应条件: 94 °C 5 min; 98 °C 10 s, 55–65 °C 30 s, 68 °C 0.5–3 min, 共 30 个循环; 68 °C 10 min。

1.3 *phoB* 和 *phoR* 基因及上下游片段的克隆、连接到 pK18 mobsacB 质粒上及测序

DNA 片段纯化、质粒抽提、酶切、酶连等均参照试剂(盒)说明书方案进行操作, DNA 测序委托深圳华大基因科技有限公司。

1.4 *phoB* 和 *phoR* 基因敲除

采用同源重组无痕敲除的方法将 *phoB* 和 *phoR* 基因同时敲除, 具体方法参照文献[7]。

1.5 Plt 产量测定

Plt 测定方法参照文献[8-9]。每隔 12 h 取样一次, 每个菌株每次实验中设 3 个平行样, 测定 Plt 产量及细胞生长密度(OD_{600})。独立重复实验 2–3 次。

1.6 β -半乳糖苷酶活性的测定

β -半乳糖苷酶活性测定按照文献方法进行操作^[3,10], 每个样品设 3 个平行, 独立重复 2–3 次。

2 结果与分析

2.1 *phoB* 和 *phoR* 基因的克隆及比对

以荧光假单胞菌 H78 基因组为模板扩增 *phoB* 和 *phoR* 基因, 通过 NCBI BLAST 发现 *phoB* 基因共 690 bp, 与荧光假单胞菌 CHA0 和荧光假单胞菌 Pf-5 均有 99% 的相似性; 而与铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) M18 有 88% 的相似性。*phoR* 基因全长为 1 329 bp, 与荧光假单胞菌 CHA0 和荧光假单胞菌 Pf-5 的 *phoR* 基因均有 99% 的相似性, 与铜绿假单胞菌 M18 中的 *phoR* 基因有 84% 的相似性。

2.2 H78*phoBR* 突变株的构建

采用同源重组的方法敲除 *phoB*-*phoR* 基因, 命名为 H78*phoBR*。如图 1A 所示, 以 H78 基因组为模板, 利用 *phoBR*-P1/*phoBR*-P2 和 *phoBR*-P3/*phoBR*-P4 两对引物对分别扩增 *phoB*-*phoR* 基因上、下游片段, 其中上游片段大小

为 454 bp 和下游片段大小 471 bp, 然后通过融合 PCR 连接上下游片段。采用 *EcoR* I/ *Xba* I 双酶切融合片段, 将酶切片段克隆到 pK18mobsacB 质粒中, 得到 pK18-phoBR 重组质粒。将重组质粒转化到 *E. coli* S17 中, 将其作为供体菌, H78 野生型菌株作为受体菌, 在无抗平板上共培养。质粒 pK18-phoBR 转入 H78 菌株后, 不能在染色体外自主复制, 可与 H78 基因组发生同源重组。用含 Amp 和 Km 抗生素的平板进行筛选单交换菌株。然后将双抗平板上生长的菌涂布在含 10% 蔗糖的 LB 平板上, 促使其完成双交换, 将该平板上生长的单克隆分别影印在含 Amp 和 Km 抗生素的平板上, 在 Amp 平板上生长而在 Km 平板不生长, 即发生双交换, PCR 筛选突变株, 结果如图 1B 所示。

2.3 PhoR/B 对 Pst 磷转运系统的调控

Pst 系统是磷特异转运系统, 由 4 个蛋白 PstS、PstC、PstA 和 PstB 组成一个 ABC 转运系统, 可以高效捕捉细胞周质中的无机磷低速转运

到细胞质中^[11]。PstS 蛋白是细胞周质蛋白, 对无机磷具有高效的亲和力; PstC 和 PstA 是细胞膜通道蛋白, 形成 P_i 的转运通道; PstB 是依赖 ATP 的通透酶, 用来提供 P_i 转运所需要的能量。与 *pstS*、*pstC*、*pstA* 和 *pstB* 相邻的基因还包括 *phoU*, PhoU 蛋白能够抑制 PhoR/B 的活性。Pst 转运系统基因结构以及构建 *pstS'*-*lacZ* 融合质粒 p6015-*pstS* 示意图, 如图 2 所示。

通过测定 p6015-*pstS* 质粒在 H78 以及 H78phoBR 菌株中的 LacZ 酶活, 研究 PhoR/B 对 *pstS* 基因表达的调控作用, 实验结果如图 3 所示。从实验结果可以看出 *pstS'*-*lacZ* 融合质粒在野生型 H78 菌株中 LacZ 酶活大约有 450 Miller unit, 而在 H78phoBR 突变株中只有约 30 Miller unit。由 LacZ 酶活数据可知, 两个菌株中 *pstS* 的表达量相差约 15 倍。表明 PhoR/B 蛋白对 *pstS* 操纵子表达存在正调控作用, 因此 PhoR/B 蛋白可以通过调控 Pst 系统进而调控无机磷的吸收。

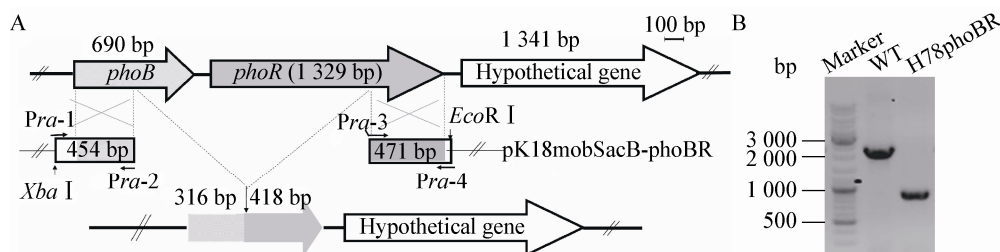


图 1 *phoB* 和 *phoR* 基因突变的物理图谱(A)和突变株 H78phoBR 的 PCR 鉴定(B)

Figure 1 Physical map for the knockout of *phoB* and *phoR* (A) and confirmation of the *phoB* and *phoR* mutant by PCR (B)
注: WT: H78 野生型菌株 PCR 片段; H78phoBR: 突变株 PCR 片段。

Note: WT: PCR fragment of H78; H78phoBR: PCR amplifying fragment of H78phoBR genome.

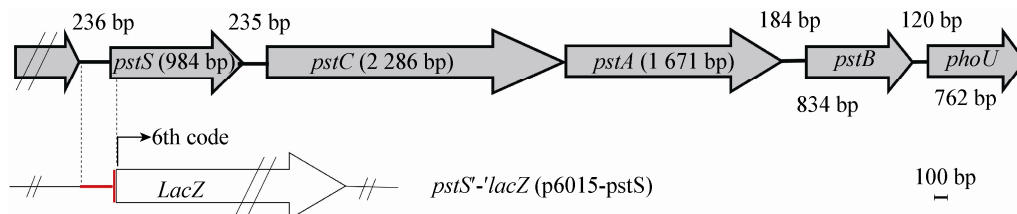
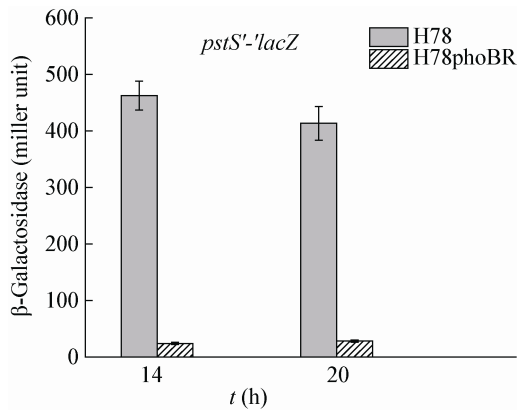


图 2 Pst 转运系统基因物理图谱以及 p6015-*pstS* 翻译融合质粒构建示意图

Figure 2 Physical map of the Pst transport system and sketch map of the constructing translational fusion plasmid p6015-*pstS*

图3 PhoR/B 对 *pstS* 基因表达的影响Figure 3 Effect of PhoR/B on expression of the *pstS*

2.4 磷饥饿条件下 PhoR/B 对 H78 菌株生长的影响

PhoR/B 正调控 *pstS* 基因的表达, 因此 PhoR/B 可以通过调控 Pst 系统调控无机磷的吸收。分别在磷饥饿和磷丰富的条件下, 研究 H78 和 H78phoBR 菌株的生长情况。磷利用基本培养基以 K_2HPO_4 作为磷源, 设计了 3 个磷元素的浓度: 0、0.05 和 2.00 mmol/L K_2HPO_4 。H78 及 H78phoBR 在磷利用基本培养基培养时初始接种 OD_{600} 为 0.05, 28 °C、180 r/min 培养。实验结果如图 4 所示, 当培养基中不加 K_2HPO_4 时 H78 和 H78phoBR 生长受到严重的影响, 并且 H78phoBR 生长的更差, 最大 OD_{600} 为 0.1, 而 H78 最大 OD_{600} 为 0.32, 其生长相差约为 3 倍, 说明在极度缺乏磷元素时 PhoR/B 可以正调控无机磷吸收以维持细胞生长。当培养基中加入 0.05 mmol/L K_2HPO_4 时, 培养基处于磷饥饿状态, 此时 H78 和 H78phoBR 生长存在较大的差异, H78phoBR 在 12 h 达到最大 OD_{600} 约为 0.32; 而 H78 在 12 h 后继续生长, 在 36 h 时 OD_{600} 达到了 0.89, 其生长差异也达到了约 3 倍。当培养基中加入 2.00 mmol/L K_2HPO_4 时, 培养基中含有丰富磷元素, 此时 H78 和 H78phoBR 生长基本无差异, 在 12 h 左右生长达到的最大 OD_{600} 约为 2.4。综上所述, PhoR/B 可以在磷元素缺乏时正调控磷元素的吸收和利用, 以便维持细胞的正常生长。

2.5 PhoR/B 对 Plt 生物合成的影响

为了研究双组分调控系统 PhoR/PhoB 对 Plt 合

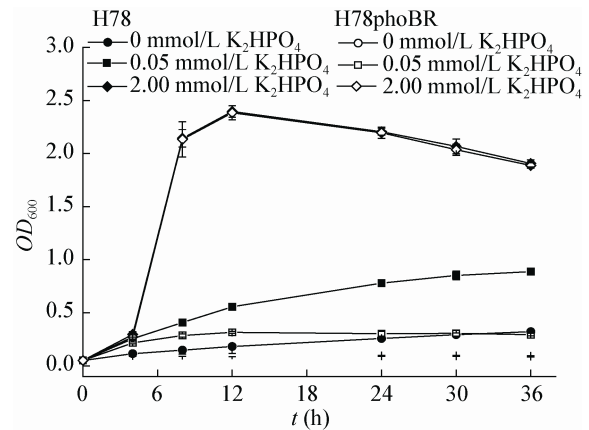


图4 H78 和 H78phoBR 菌株在不同磷元素的浓度下生长情况

Figure 4 Growth of H78 and H78phoBR in different concentration of K_2HPO_4

成的调控作用, 在 KMB 培养基中测定其生长以及 Plt 产量。其生长结果如图 5A 所示, 在整个培养过程中, H78 和 H78phoBR 菌株在 KMB 培养基中细菌生长差异不大, 在其生长后期时, 突变株 H78phoBR 要比野生型 H78 生长略差。分析可能由于培养后期, 培养基中磷元素的含量较低, 而突变株 H78phoBR 中调控磷利用和吸收的调控元件被破坏, 影响磷元素的吸收, 进而影响细胞生长。

PhoR-PhoB 对 Plt 合成的调控结果如图 5B 所示, 突变株 H78phoBR 的 Plt 产量比 H78 的略低。培养 12 h 时细胞处于对数生长期, 分泌的 Plt 量较少; 当培养到 36 h 时 Plt 的产量达到最大值。野生型 H78 的 Plt 产量大约为 20 mg/L, 而突变株 H78phoBR 的 Plt 产量大约为 12 mg/L, 突变株的 Plt 产量比野生型降低了约 1 倍。结果表明, PhoR/B 对 Plt 合成存在一定程度的正调控作用。

3 讨论

PhoB 作为一个广泛存在各种细菌中的全局性调控蛋白, 参与调控多种生物学功能。研究发现在假单胞菌 H78 中 PhoR/B 系统对 Pst 磷转运系统和 Plt 的合成都有一定的调控作用。PhoB 蛋白磷酸化后构象会发生改变, 沿着 $\alpha 4$ - $\beta 5$ - $\alpha 5$ 面形成二聚体^[12],

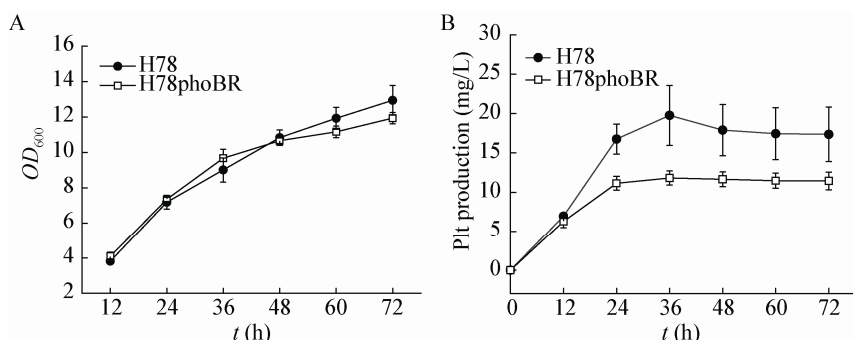


图5 假单胞菌 H78 和 H78phoBR 菌株细胞生长曲线(A) Plt 产量测定(B)

Figure 5 Cell growth (A) and Plt production (B) of the wild-type H78 strain and H78phoBR strain in KMB broth

二聚体的 PhoB 可以结合在特定的保守 DNA 序列 (*pho box*), 进而可以促进靶基因的转录^[13]。通过 X-ray 晶体学和点突变技术发现, PhoB 可以促使 σ^{70} 与 -35 序列的结合^[14]。在大肠杆菌中, *pho box* 典型的序列为 CTGTCAT-A(AT)A(TA)-CTGT (CA)A(CT)^[15-16], 同样的在新月柄杆菌(*Caulobacter crescentus*)也发现类似的序列, 即一段富含 AT 区域两边存在一个 6 bp 的正向重复序列^[11]。同时在假单胞菌 H78 中发现, *pstS* 基因起始密码子 ATG 上游 -78 bp 到 -94 bp (起始密码子 ATG 为 +1) 之间存在 TTCATC-TAATT-GTCATA 类似 *pho box* 的序列。预测 PhoB 可能结合在此位点, 促进 *pstS* 转录, 进而促进无机磷的转运。然而, 在 *pltL* 和 *pltR* 基因的非编码区发现到有类似的序列, 分析 PhoB 对 Plt 的合成调控作用可能是间接的。综上所述, 通过本文研究初步鉴定 PhoB 对 Pst 磷转运系统和 Plt 的调控作用, 为遗传改造假单胞菌 H78 从而提高其生物防治效果奠定了一定的基础。

参考文献

- [1] Lubin EA, Henry JT, Fiebig A, et al. Identification of the PhoB regulon and role of PhoU in the phosphate-starvation response of *Caulobacter crescentus*[J]. *Journal of Bacteriology*, 2015, 198(1): 187-200
- [2] Gristwood T, Fineran PC, Everson L, et al. The PhoBR two-component system regulates antibiotic biosynthesis in *Serratia* in response to phosphate[J]. *BMC Microbiology*, 2009, 9(1): 112
- [3] 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
- [4] Schäfer A, Tauch A, Jäger W, et al. Small mobilizable multi-purpose cloning vectors derived from the *Escherichia coli* plasmids pK18 and pK19: selection of defined deletions in the chromosome of *Corynebacterium glutamicum*[J]. *Gene*, 1994, 145(1): 69-73
- [5] Gebhard S, Tran SL, Cook GM. The Phn system of *Mycobacterium smegmatis*: a second high-affinity ABC-transporter for phosphate[J]. *Microbiology*, 2006, 152(11): 3453-3465
- [6] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*[M]. Translated by Jin DY and Li MF. 2nd Edition. Beijing: Science Press, 1992 (in Chinese)
- [7] Du XL, Li YQ, Zhou Q, et al. Regulation of gene expression in *Pseudomonas aeruginosa* M18 by phenazine-1-carboxylic acid[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2015, 99(2): 813-825
- [8] 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
- [9] 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
- [10] Ge YH, Huang XQ, Zhang XH, et al. Analysis of mechanism and relationship of GacA and RsmA, two regulators of antibiotics production in *Pseudomonas* sp. M18[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2006, 46(4): 531-536 (in Chinese)
- [11] van Dien SJ, Keasling JD. A dynamic model of the *Escherichia coli* phosphate-starvation response[J]. *Journal of Theoretical Biology*, 1998, 190(1): 37-49
- [12] Mack TR, Gao R, Stock AM. Probing the roles of the two different dimers mediated by the receiver domain of the response regulator PhoB[J]. *Journal of Molecular Biology*, 2009, 389(2): 349-364
- [13] Blanco AG, Sola M, Gomis-Rüth FX, et al. Tandem DNA recognition by PhoB, a two-component signal transduction transcriptional activator[J]. *Structure*, 2002, 10(5): 701-713
- [14] Blanco AG, Canals A, Bernués J, et al. The structure of a transcription activation subcomplex reveals how σ^{70} is recruited to PhoB promoters[J]. *The EMBO Journal*, 2011, 30(18): 3776-3785
- [15] Baek JH, Lee SY. Novel gene members in the Pho regulon of *Escherichia coli*[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2006, 264(1): 104-109
- [16] Yang C, Huang TW, Wen SY, et al. Genome-wide PhoB binding and gene expression profiles reveal the hierarchical gene regulatory network of phosphate starvation in *Escherichia coli*[J]. *PLoS One*, 2012, 7(10): e47314