

假单胞菌 M18 *pqsR* 突变株的构建及其对 藤黄绿菌素合成的调控

陆吉顺 李 慷 张明月 李赛男 黄显清* 许煜泉*

(上海交通大学生命科学技术学院 上海 200240)

摘 要: 假单胞菌 M18 是一株能同时合成藤黄绿菌素(Plt)和吩嗪-1-羧酸(PCA)两种抗生物质的植物根际促生细菌。运用 PCR 方法, 从 M18 基因组中扩增得到 *pqsR* 基因, 该基因编码 LysR 家族调控蛋白 PqsR。通过同源重组技术, 构建假单胞菌 M18 的 *pqsR* 突变菌株 M18PRG。比较野生型菌株 M18 和突变菌株 M18PRG 在 KMB 培养基的 Plt 产量, 发现 M18PRG 菌株合成 Plt 的量约为野生型 M18 菌株的 3~4 倍。在 *pqsR* 突变株的反式互补实验中, Plt 的产量回复到野生型水平。*pltA'*-*'lacZ* 翻译融合的测定结果进一步证明 PqsR 对 Plt 生物合成基因簇具有负调控作用。分析 M18 野生型及其 *pqsR* 突变株的生长曲线, 发现 PqsR 对细菌的生长具有抑制作用。另外, 我们还发现 *pqsR* 基因调控红色色素的产生。上述结果表明, 在假单胞菌 M18 中, PqsR 作为全局性调控因子参与了细胞内多种生理活动的调控。

关键词: *pqsR*, 群体感应系统(QS), 假单胞菌 M18, 藤黄绿菌素(Plt)

Construction of *Pseudomonas* sp. M18 *pqsR* Mutant and Its Regulation on Plt Biosynthesis

LU Ji-Shun LI Kang ZHANG Ming-Yue LI Sai-Nan HUANG Xian-Qing* XU Yu-Quan*

(College of Life Science and Biotechnology, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China)

Abstract: *Pseudomonas* sp. M18 is one of plant growth-promoting rhizobacteria capable of producing two kinds of anti-fungal agents: phenazine-1-carboxylic acid (PCA) and pyoluteorin (Plt). The *pqsR* gene, which encodes a LysR family member PqsR, was amplified from chromosomal genome of strain M18. Using the homologous recombination technique, a chromosomal *pqsR* inactivated mutant strain M18PRG was constructed in *Pseudomonas* sp. M18. To study the effect of *pqsR* gene on Plt biosynthesis, the dynamic curves of Plt production by strains M18 and M18PRG was measured in KMB media. As a result, Plt production of the *pqsR* mutant was three to four folds higher than that of its parent strain M18. The Plt production was restored to the wild-type level when strain M18PRG was complemented with *pqsR* gene *in trans*. The regulation of *pqsR* gene on Plt production was further confirmed by the *pltA'*-*'lacZ* translational fusion analysis. These results indicate that *pqsR* gene negatively controls the Plt biosynthesis. Additionally, by analyzing the growth curves of wild type strain M18 and *pqsR* mutant, we

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

* 通讯作者: Tel: 86-21-34204347; ✉: xqhuang66@sjtu.edu.cn, xuyq@sjtu.edu.cn

收稿日期: 2009-03-23; 接受日期: 2009-03-30

can readily find that PqsR has a negative influence on cell growth. It was also shown that the production of red pigments in strain M18 required the expression of *pqsR* gene. In conclusion, the data presented in this study clearly demonstrate that PqsR acts as a global regulator involved in many physiological activities in *Pseudomonas* sp. M18.

Keywords: *pqsR*, Quorum sensing (QS), *Pseudomonas* sp. M18, Pyoluteorin (Plt)

群体感应 (Quorum sensing, QS) 作为细菌的一种群体行为机制, 广泛存在于各种假单胞菌中, 其中对于铜绿假单胞菌中 QS 系统的研究较为透彻。目前发现铜绿假单胞菌中存在 3 个 QS 系统, 其中包括以酰基高丝氨酸内酯 (Acylhomoserine lactone, AHL) 信号分子介导的 *las* 和 *rhl* QS 系统和以假单胞菌喹啉信号分子 (*Pseudomonas* quinolone signal, PQS) 介导的 *pqsR* QS 系统^[1]。 *las* 和 *rhl* QS 系统相互级联并共同参与很多致毒因子合成的调控^[2]。 *pqsR* QS 系统是最新在铜绿假单胞菌中发现的菌群感应系统, 它由信号分子 PQS 和转录激活因子 PqsR 构成。铜绿假单胞菌对很多宿主的致病能力与 PqsR 调控子活性紧密相关, *pqsR* 基因的失活会导致其致病性明显下降。同时 *pqsR* 也能调控很多致毒因子如绿脓菌素和促弹性组织溶解蛋白酶等的合成^[3,4]。研究表明 PqsR 的调控功能是相对独立的, 并不是通过改变 *lasI/lasR* 或者 *rhlI/rhlR* 系统的表达而实现^[5]。 *pqsR* QS 系统作为全局性调控子在铜绿假单胞菌的基因表达调控方面发挥着独立而且非常重要的作用。

假单胞菌株 (*Pseudomonas* sp.) M18 是从上海郊区甜瓜根际土壤中分离筛选到的一株促进植物生长的根际细菌。它的生物防治功能主要依赖于其两种重要的次级代谢产物: 藤黄绿菌素 (Pyoluteorin, Plt) 和 吩 嗪 -1- 羧 酸 (Phenazine-1-carboxylic acid, PCA)。它是迄今国际上首次发现的能同时分泌这两种抗生素的假单胞菌株^[6]。 *las* 和 *rhl* QS 系统已分别在假单胞菌株 M18 中被鉴定, 研究发现它们都参与 Plt 合成及其它一些生理过程的调控^[7,8]。本课题针对 *pqsR* QS 系统, 在假单胞菌 M18 中构建了 *pqsR* 突变工程菌株 M18PRG, 并深入研究了 *pqsR* 基因对 Plt 生物合成的调控机制。研究结果表明, PqsR 作为全局性调控因子显著负调控 Plt 的生物合成, 同时还参与红色色素合成的调控, 并对菌体生长有一定抑制作用。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌种和质粒: 本研究所涉及的菌株、质粒及其来源见表 1。

表 1 菌株与质粒 Table 1 Strains and plasmids		
Materials	Genotype and/or relevant characteristics*	Reference
<i>E. coli</i>		
DH5a	<i>supE44 ΔlacU169(Φ80 lacZΔM15) hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1</i>	This lab
SM10	<i>thi-1 thr leu tonA lacY supE recA::RP4-2-Tc::Mu Km^r</i>	This lab
<i>Pseudomonas</i> sp. M18		
Wild-type	Rhizosphere isolate, Plt ⁺ PCA ⁺ Sp ^r	This lab
M18PRG	<i>pqsR::Gm^r, Sp^r Gm^r</i>	This study
Plasmids		
pEX18Tc	Gene replacement vector with MCS from pUC18, ori ^T sacB ⁺ , Tc ^r	This lab
pUCGm	Source of Gm ^r cassette, Gm ^r	This lab
pEXTcpqsR	pEX18Tc with <i>EcoR</i> I- <i>Hind</i> III insert of 1.55 kb, including gene <i>pqsR</i> sequence, Tc ^r	This study
pEXTcPRG	<i>pqsR</i> Gm ^r in pEX18TcpqsR, Tc ^r Gm ^r	This study
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
pOPQR	pME6032 with <i>EcoR</i> I- <i>Xho</i> I insert of 1.35 kb, including gene <i>pqsR</i> sequence, Tc ^r	This study
pMEAZ	733 bp <i>Bam</i> H I- <i>Pst</i> I PCR-amplified fragment containing <i>PpltLA-pltL-pltA'</i> cloned into pME6015, Tc ^r	This lab

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

1.1.2 培养基和生长条件: LB 培养基按文献[9]配制; KMB 培养基: 每升含蛋白胨 20 g, 甘油 15 mL, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.5 g, K_2HPO_4 0.3 g, pH 7.5; PPM 培养基: 每升含蛋白胨 22 g, 葡萄糖 20 g, KNO_3 5 g, pH 7.5; 相应固体培养基每升加琼脂 15 g。大肠杆菌(*E. coli*) LB 培养基中抗生素用量($\mu\text{g/mL}$): 卡那霉素(Kan) 50、氨苄青霉素(Amp) 100、庆大霉素(Gen) 20、壮观霉素(Sp) 50、四环素(Tet) 20。假单胞菌 M18 培养基中抗生素用量($\mu\text{g/mL}$): 卡那霉素(Kan) 50、氨苄青霉素(Amp) 100、庆大霉素(Gen) 40、壮观霉素(Sp) 100、四环素(Tet) 125。培养温度: 大肠杆菌 37°C; 假单胞菌 28°C, 220 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、各种限制性内切酶、T4 DNA 连接酶以及 DNA 分子量标记物购自 MBI 公司。X-Gal 和 IPTG 购自上海 Sangon 公司。高效液相色谱仪(型号 SHIMADZU LC28A)购自岛津仪器有限公司。分析柱为反相 C18 色谱柱(4.6 mm i. d. \times 150 mm, Phenomenex LUNA) 购自迪马科技有限公司。

1.2 引物和 PCR 反应

根据 *P. aeruginosa* PA01 的 *pqsR* 基因序列设计引物, PCR 扩增假单胞菌 M18 基因组的 *pqsR* 基因片段。引物 1: 5'-TATAGAATTCACATGCCGGCATGCC AG-3', 带下划线的碱基为 *EcoRI* 酶切位点; 引物 2: 5'-TAATAAGCTTTGGCCGATGCCGATGGC-3', 带下划线的碱基为 *Hind* 酶切位点。PCR 反应体系 (50 μL): 10 \times 高保真 DNA 聚合酶缓冲液 5 μL , dNTP (2.5 mmol/L) 4 μL , 引物 1 和引物 2 各 1 μL , 模板 DNA 3 μL , 高保真酶 (5 U/ μL) 0.2 μL , 重蒸水 35.8 μL 。PCR 反应条件: 94°C 5 min; 94°C 40 s, 65°C 1.5 min, 72°C 90 s, 30 个循环; 72°C 10 min。染色体 DNA 提取采用 UNIQ-10 柱式基因组 DNA 抽提试剂盒(上海生工生物工程技术服务有限公司)。

1.3 克隆 *pqsR* 基因片段及测序

质粒抽提、酶反应、DNA 片段回收、连接、感受态细胞制备等均参照文献[9], DNA 测序委托英骏生物技术有限公司。

1.4 细菌结合转移

采用固相滤膜杂交方法^[10]进行细菌结合转移。

1.5 生长曲线测定及 Plt 产量的 HPLC 测定

OD_{600} 值的测定及 Plt 的抽提和 HPLC 测定方法参照文献[11]。每种样品设有 4 个平行样, 每隔 12 h 取样测其 OD_{600} 值和 Plt 产量。

1.6 β -半乳糖苷酶活性的测定

β -半乳糖苷酶活性的测定方法参照文献[12], 每个样品设有 3 个平行, 每隔 3 h 取样测定其 β -半乳糖苷酶活性和 OD_{600} 值。

2 结果

2.1 *pqsR* 基因的 PCR 克隆和测序比对

根据 *P. aeruginosa* PA01 中的 *pqsR* 基因序列, 设计引物, 以假单胞菌 M18 基因组 DNA 为模板进行 PCR 扩增, 得到一个 1.5 kb 左右的条带, 胶回收该片段, 进行测序。假单胞菌 M18 中的 *pqsR* 核苷酸序列在 GenBank 登录号: FJ597756。测序结果用 NCBI 的 Blast 程序比对分析, 发现 M18 中 *pqsR* 基因序列和 *P. aeruginosa* PA01 中 *pqsR* 序列同源性高达 99%。为了进一步研究 *pqsR* 基因在 M18 中的功能, 我们利用 M18 菌株构建了 *pqsR* 的突变株 M18PRG。

2.2 *pqsR* 基因的体外突变和突变菌株 M18PRG 的获得

将纯化后的 PCR 产物直接连到载体 pMD19-T (TaKaRa 公司 pMD19-T Simple Vector 试剂盒)上, 得到 pMDpqsR。从 pUCGm 酶切得到 0.85 kb 含有 Gm 抗性基因的 *Bam*H 片段, 将其插入 pMDpqsR 的 *Bam*H 酶切位点, 获得阳性克隆 pMDPRG (图 1)。用 *Eco*R 和 *Hind* 从质粒 pMDPRG 切取含有 *pqsR* :: Gm^r 突变基因的 2.4 kb 片段, 插入经 *Eco*R 和 *Hind* 双酶切处理的 pEX18Tc 质粒, 获重组质粒 pEXTcPRG, 转化至 *E. coli* SM10。将其作为供体菌, 野生型 M18 菌株作为受体菌, 经固相滤膜接合转移。质粒 pEXTcPRG 转入 M18 菌株后, 不能在染色体外自主复制, 质粒携带的 *pqsR* :: Gm^r 突变基因与受体菌 M18 的染色体同源重组。用含 Gm 和 Tet 抗生素的平板分别进行筛选。在 Tet 平板不生长而在 Gm 平板上生长的相应克隆表明已发生双交换, 即获得假单胞菌 M18 的 *pqsR* 基因突变株 M18PRG。抽提该菌株基因组 DNA 作为模板进行 PCR 测序验证。

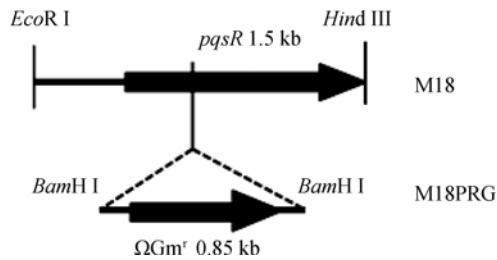


图 1 *pqsR* 基因及其侧翼序列插入 Gm^r 抗性片段的物理图谱

Fig. 1 Physical map of the *pqsR* gene and its flanking region with inserted Gm^r gene cassette

2.3 *pqsR* 基因过表达载体 pOPQR 的构建

设计引物 3: 5'-CGCGGAATTCGGGATGCCTATTTCATAACC-3' (带下划线碱基为 *EcoR* 酶切位点) 和引物 4: 5'-ATATCTCGAGGAACGCTCTACTCTGGTGC-3' (带下划线碱基为 *Xho* 酶切位点), 以野生型 M18 菌株的基因组为模板, PCR 扩增得到 *pqsR* 基因编码区约 1.35 kb 左右片段(PCR 条件参照 *pqsR* 基因的 PCR 扩增)。并将其克隆至质粒 pME6032 中, 获得 *pqsR* 基因过表达质粒 pOPQR。在该质粒中, *pqsR* 基因位于 *tac* 强启动子的下游, 受其控制。

2.4 *pqsR* 基因对假单胞菌 M18 色素产生的影响

野生型 M18 菌株在 KMB 培养基中, 28°C 下培养 48 h 后, 会产生大量的红色色素。而我们发现 *pqsR* 突变菌株 M18PRG 在 KMB 培养基中, 不能产生这一红色色素, 而携带有 *pqsR* 过表达质粒 pOPQR 的突变株 M18PRG 又恢复了产红色色素的能力, 对照菌株 M18PRG/pME6032 不产红色色素, 这排除了质粒对于红色色素产生的影响(图 2)。综上所述, M18 菌株产生红色色素的能力依赖于 *pqsR* 基因的存在。

2.5 Plt 生物合成的动力学分析和细菌的生长曲线分析

Plt 是生防假单胞菌 M18 产生的重要抗生素之一。为研究 *pqsR* 基因对 Plt 合成的调控作用, 我们分别将野生型 M18 菌株和突变菌株 M18PRG 在 KMB 培养基中, 于 28°C、220 r/min 振荡培养。定时取样, 利用高效液相色谱(HPLC)测定样品中 Plt 的浓度变化。结果如图所示, 突变菌株 M18PRG 的 Plt 产量是野生型菌株的 3~4 倍, 显著高于野生型菌株, 突变株 Plt 产量峰值为 149 $\mu\text{g/mL}$ 而野生型的峰值仅为 37.5 $\mu\text{g/mL}$ 。这一结果表明 *pqsR* 基因对 Plt



图 2 在 KMB 培养基中, 红色色素在野生型菌株 M18(左上)、*pqsR* 突变株 M18PRG(右上)、携带有对照空质粒菌株 M18PRG/pME6032(左下) 和反式互补菌株 M18PRG/pOPQR(右下) 中的产生情况

Fig. 2 Pigments produced by the strains M18 (top-left), M18PRG (top-right), the *pqsR* mutant M18PRG harboring plasmid pME6032 (bottom-left) or plasmid pOPQR (bottom right) grown on KMB agar

生物合成具有显著的负调控作用。同时, 从图中我们还可以发现: 在指数生长期突变菌株长势明显优于野生型, 到 48 h 时都达到最高值。当菌体生长进入平稳期阶段, 突变菌株和野生型菌株的生长速率都有一定的下降, 但是在 KMB 培养基中突变株 M18PRG 的生长还是比野生型菌株好。在下面的 LacZ 酶活测定实验中(图 4)也发现了这一现象。

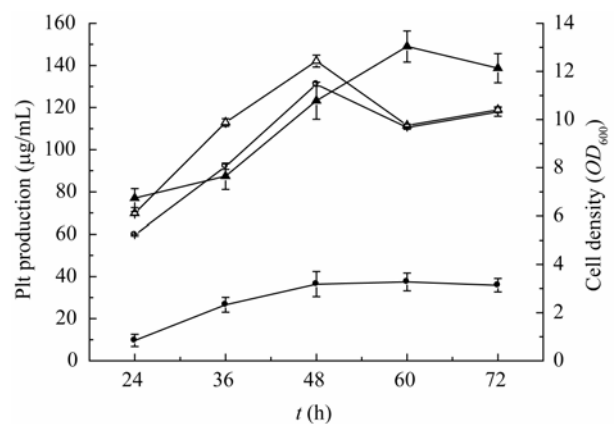


图 3 假单胞菌 M18 (●, ○) 和 M18PRG 菌株 (▲, △) 在 KMB 培养基中的 Plt 生物合成(实心)和细胞生长的动力学曲线(空心)

Fig. 3 Plt production and cell growth (OD_{600}) of the wild-type M18 strain (●, ○) and the *pqsR* mutant M18PRG strain (▲, △) in KMB broth. Solid symbols denote Plt production; open symbols OD_{600}

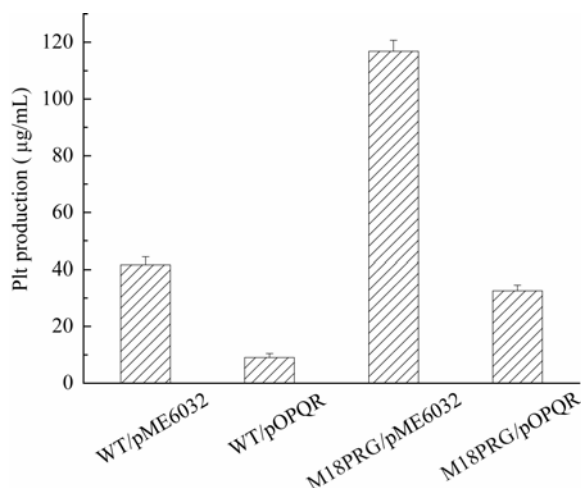


图4 携带 pME6032 或 pOPQR 的野生型 M18 和突变株 M18PRG 在 KMB 培养基中发酵 60 h 后的 Plt 产量

Fig. 4 Plt production of the wild-type M18 strain or the *pqsR* mutant M18PRG strain, which harbored the *pqsR* overexpression plasmid pOPQR or the empty vector pME6032 as the control, after 60 h of growth in KMB media

以上结果表明 *pqsR* 基因对 M18 菌株的菌体生长具有一定的抑制作用。

为进一步证实 *pqsR* 基因对 Plt 的负调控作用, 我们又将 *pqsR* 过表达载体 pOPQR 转入突变菌株 M18PRG 中, 该质粒能够导致 *pqsR* 基因的多拷贝以及在强启动子 *tac* 控制下的 *pqsR* 基因的过表达。我们以带有空质粒的突变株 M18PRG 和野生株 M18、以及带有过表达质粒的野生型菌株分别作为对照, 监测反式互补菌株 M18PRG/pOPQR 的 Plt 生物合成情况。结果表明, 反式互补菌株 M18PRG/pOPQR 中 Plt 的产量回复到了携带有空质粒的野生型水平 (M18/pME6032)。而在野生型菌株中过表达 *pqsR* 基因相对于菌株 M18/pME6032 而言, Plt 的产量却有明显的减少。上述结果进一步证明了 *pqsR* 基因对 Plt 合成具有负调控作用。

2.6 *PqsR* 对 Plt 生物合成基因表达的影响

为进一步探索 *pqsR* 基因对于 Plt 生物合成基因表达的调控作用, 我们又进行了 β -半乳糖苷酶活性的测定实验。*pltLA* 是 Plt 生物合成基因簇 *pltLABCDEFG* 操纵子中的前两个基因, 其表达情况能反映 Plt 生物合成基因表达情况。质粒 pMEAZ 含有一个 *pltA'*-*lacZ* 翻译融合片段^[11]。质粒 pMEAZ 分别被转入到 M18 和 M18PRG 菌株中, 测定各自的 β -半乳糖苷酶活性。结果发现 *pqsR* 基因的失活导致突变菌株表达酶活有显著的提高, 是野生型菌株的

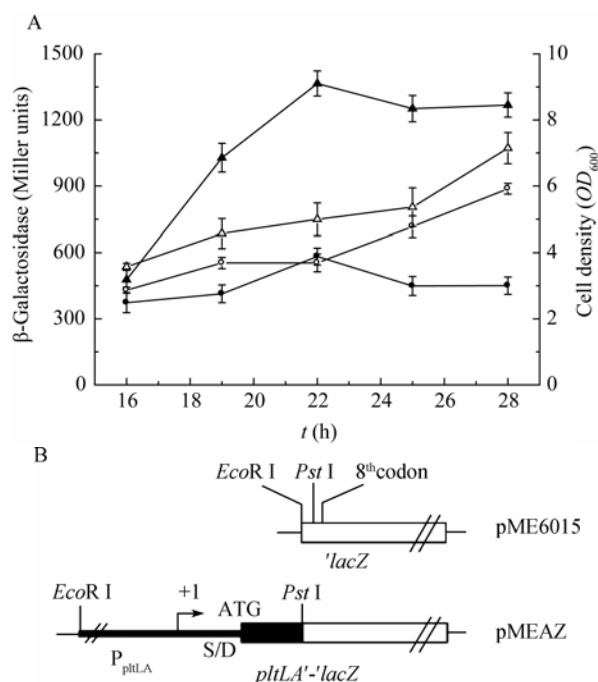


图5 在 KMB 培养基中 *pqsR* 基因对 Plt 生物合成基因表达的影响

Fig. 5 Influence of *pqsR* on Plt biosynthetic gene expression

注: A: *pltA'*-*lacZ* 翻译融合在野生型菌株 M18(●,○)和突变株 M18PRG(▲,△)中的 β -半乳糖苷酶活性表达情况, 实心表示 β -半乳糖苷酶活性, 空心表示 OD₆₀₀ 值; B: *pltA'*-*lacZ* 翻译融合表达质粒的构建。SD: 推测的 SD 序列, *pltLA* 用深黑色线表示, *lacZ* 用白框表示, *P_{pltLA}* 表示 *pltLA* 的启动子区域。

Note: A: β -Galactosidase activities, resulting from the *pltA'*-*lacZ* translational fusion on pMEAZ were determined in the wild-type M18 strain (●,○) and the *pqsR* mutant M18PRG strain (▲,△) in KMB broth. Solid symbols, β -Galactosidase activities; open symbols, OD₆₀₀; B: Physical map of translational *pltA'*-*lacZ* fusion constructs. SD: Putative Shine Dalgarno sequence. *pltLA* sequences are shown by heavy black lines, *lacZ* by white boxes. *P_{pltLA}*, the promoter of the *pltLA* gene.

2~4 倍左右。这一结果表明, *pqsR* 突变菌株 M18PRG 和野生菌株 M18 的 Plt 产量的差异是由于 Plt 生物合成基因表达水平上的差异造成的, 进一步证实了 *pqsR* 对 Plt 生物合成的负调节作用。

3 讨论

本研究旨在探究菌群传感系统 *pqsR* QS 系统在假单胞菌株 M18 中的调控作用和机制。为此我们将该系统中最重要负责编码 LysR 家族调控蛋白的 *pqsR* 基因进行染色体失活, 构建了 *pqsR* 突变株 M18PRG。首先, 我们发现突变株 M18PRG 失去了产红色素的能力, 反式互补实验证明了 M18 的这一能力依赖于 *pqsR* 基因。其次, 对假单胞菌株 M18

及其工程菌株 M18PRG 合成 Plt 的动力学分析表明, PqsR 作为负调控因子, 对 Plt 合成具有显著的抑制作用, 同时 *pqsR* 反式互补实验以及 *pltA*'-'*lacZ* 翻译融合分析进一步证明了 *pqsR* 通过抑制 Plt 生物合成基因簇 *pltABCDEFGHI* 的表达来负调控 Plt 的合成。同时, 在反式互补实验结果中我们发现携带有 *pqsR* 表达质粒的野生型菌株要比携带该质粒的突变株 M18PRG 产 Plt 的量更低, 这说明 *pqsR* 对于 Plt 的负调控可能依赖于 *pqsR* 基因的基因剂量。LysR 家族蛋白通常在细菌中作为重要的转录激活子存在^[13], 而 PqsR 对 Plt 合成的负调控机制可能是该蛋白通过激活 Plt 合成的阻遏蛋白发挥作用, Plt 合成的调控通路有待更深入的研究。除此之外, 通过对假单胞菌 M18 和突变株 M18PRG 的生长曲线的分析, 发现 PqsR 蛋白参与菌群密度的调控, 对菌体生长有抑制作用。PqsR 这一功能与最近我们课题组报道的 *las* QS 系统对菌体生长的调控方式一致^[7]。*pqsR* QS 系统和 *las* QS 系统可能在控制菌群密度方面采用相同调控机制, 共用一个相同中间调控因子。这种生长调控现象与铜绿假单胞菌中 QS 系统的缺失有利于细菌的生存相似^[14], 具体调控机制还有待深入探究。

本研究首次在假单胞菌中报道了 *pqsR* 基因对 Plt 生物合成具有显著的负调控作用, 这一分子机制的发现有利于我们通过基因工程的手段构建 Plt 高产工程菌株, 提高 M18 菌株的生防能力以及对环境的适应性。

参 考 文 献

- [1] Sifri CD. Quorum sensing: bacteria talk sense. *Clinical Infectious Diseases*, 2008, **47**(8): 1070–1076.
- [2] Schuster M, Lostroh CP, Ogi T, *et al.* Identification, timing, and signal specificity of *Pseudomonas aeruginosa* quorum-controlled genes: a transcriptome analysis. *J Bacteriol*, 2003, **185**(7): 2066–2079.
- [3] Cao H, Krishnan G, Goumnerov B, *et al.* A quorum sensing-associated virulence gene of *Pseudomonas aeruginosa* encodes a LysR-like transcription regulator with a unique self-regulatory mechanism. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, **98**(25): 14613–14618.
- [4] Rahme LG, Tan MW, Le L, *et al.* Use of model plant hosts to identify *Pseudomonas aeruginosa* virulence factors. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, **94**(24): 13245–13250.
- [5] Deziel E, Gopalan S, Tampakaki AP, *et al.* The contribution of MvfR to *Pseudomonas aeruginosa* pathogenesis and quorum sensing circuitry regulation: multiple quorum sensing-regulated genes are modulated without affecting *lasRI*, *rhlRI* or the production of N-acyl-L-homoserine lactones. *Mol Microbiol*, 2005, **55**(4): 998–1014.
- [6] 朱栋华, 徐汪节, 耿海峰, 等. 荧光假单胞菌 M18 *rpoD* 克隆及其对抗生素合成的影响. *微生物学报*, 2003, **43**(3): 315–323.
- [7] Chen Y, Wang X, Huang X, *et al.* Las-like quorum-sensing system negatively regulates both pyoluteorin and phenazine-1-carboxylic acid production in *Pseudomonas* sp. M18. *Sci China C Life Sci*, 2008, **51**(2): 174–181.
- [8] Yan A, Huang X, Liu H, *et al.* An *rhl*-like quorum-sensing system negatively regulates pyoluteorin production in *Pseudomonas* sp. M18. *Microbiology*, 2007, **153**(Pt 1): 16–28.
- [9] Sambrook J, Russell DW. *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*. 3rd ed. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory, 2001.
- [10] Wang Y, Huang X, Hu H, *et al.* QscR acts as an intermediate in *gacA*-dependent regulation of PCA biosynthesis in *Pseudomonas* sp. M18. *Curr Microbiol*, 2008, **56**(4): 339–345.
- [11] Huang X, Zhu D, Ge Y, *et al.* Identification and characterization of *pltZ*, a gene involved in the repression of pyoluteorin biosynthesis in *Pseudomonas* sp. M18. *FEMS Microbiol Lett*, 2004, **232**(2): 197–202.
- [12] Zhang XH, Wang SL, Geng HF, *et al.* Differential regulation of *rsmA* gene on biosynthesis of pyoluteorin and phenazine-1-carboxylic acid in *Pseudomonas* sp. M18. *World J Microbiol Biotechnol*, 2005, **21**(6-7): 883–889.
- [13] Maddocks SE, Oyston PC. Structure and function of the LysR-type transcriptional regulator (LTTR) family proteins. *Microbiology*, 2008, **154**(12): 3609–3623.
- [14] Heurlier K, Denervaud V, Haenni M, *et al.* Quorum-sensing-negative (*lasR*) mutants of *Pseudomonas aeruginosa* avoid cell lysis and death. *J Bacteriol*, 2005, **187**(14): 4875–4883.