

假单胞菌 M-18 *qscR* 突变株的构建及其对抗生素合成的调控

王 沂 严 安 黄显清 张雪洪 许煜泉*

(上海交通大学生命科学技术学院 上海 200240)

摘 要 在革兰氏阴性菌中,全局性调控因子 *QscR* 参与菌群传感调节系统,调节多种毒素因子、次生代谢产物、稳定期基因以及参与生物膜形成的基因的表达,它通过与靶基因 DNA 启动子的调节元件结合,调节基因转录。假单胞菌株(*Pseudomonas* sp.) M-18 是促进植物生长的根际细菌,能同时分泌藤黄绿菌素(pyoluterion, Plt)和吩嗪-1-羧酸(phenazine-1-carboxylic acid, PCA)。运用同源重组技术,构建了假单胞菌(*Pseudomonas* sp.) M-18 株的 *qscR* 突变菌株 M-18Q。比较野生株 M-18 和突变株 M-18Q 生物合成 PCA 和 Plt 的产量,在 28℃ 恒温条件下,在 PPM 和 KMB 培养基中 M-18Q 菌株合成 PCA 的量分别约为野生型 M-18 菌株的 4~6 倍和 3~5 倍,分别达到 480 μg/mL 和 140 μg/mL。在 PPM 培养基中,野生株 M-18 和突变株 M-18Q 几乎都没有 Plt 的合成,而在 KMB 培养基中,突变菌株和野生型 M-18 合成 Plt 的量基本一致。反式互补实验表明,在 *qscR* 突变株 M-18Q 中,PCA 生物合成受到抑制而 Plt 的生物合成却不受影响。*phzA* 基因是吩嗪合成基因簇中第一个基因,*phzA'* - '*lacZ*' 翻译融合实验表明,*qscR* 基因产物通过抑制 PCA 合成基因簇的表达,实施负调控作用。结果表明 *qscR* 基因是作为一个全局调控基因区别性地调控 PCA 和 Plt 的生物合成。

关键词: 假单胞菌株 M-18; *qscR*; 吩嗪-1-羧酸; 藤黄绿菌素

中图分类号: Q78 **文献标识码**: A **文章编号**: 0001-6209(2007)02-0254-06

在铜绿假单胞菌中,存在着两个属于 LuxR/I 家族的菌群传感系统,控制多种胞外蛋白和次生代谢产物的合成。对这两个菌群传感系统已经有了充分的研究。*Las* 系统包括转录激活蛋白 LasR 和 acyl-HSL 合成酶 LasI 及其对应的 3-氧癸酰基-L-高丝氨酸内酯(3O-C12-HSL)^[1,2]。*Rhl* 系统包括调节子 RhlR 和 acyl-HSL 合成酶 RhlI 及其对应的丁酰基-L-高丝氨酸内酯(C4-HSL)^[3-5]。*Las* 系统和 *Rhl* 系统通过级联放大方式调节与致病因子、次生代谢、II 型分泌机制、生长后期基因以及生物膜形成等基因的表达^[6]。随后又发现了一个与 LasR 和 RhlR 同源的蛋白,命名为 *QscR*,是一个单独的信号分子受体蛋白,不具有相应的 LasI 或 RhlI 的同源蛋白。*QscR* 的突变体具有超强的毒性,受到其他 acyl-HSL 信号传导系统基因的控制,也受到 *QscR* 自身的抑制。*QscR* 能抑制 5 个受菌群传感控制的基因簇的转录,这 5 个基因簇包括 2 个吩嗪合成基因簇、氢氰酸合成基因簇, *qsc105* 和 *lasB*^[7,8]。*QscR* 对 LasR 和 RhlR 激活基因的抑制作用机理可能是: *QscR* 蛋白不仅能形成

同源多聚物,还能与 LasR 和 RhlR 形成异源多聚物^[8],干扰 LasR 和 RhlR 的活性。*QscR* 还可能与 3O-C12-HSL 和 C4-HSL 结合,与 LasR 和 RhlR 竞争相关信号分子。最近的研究表明, *QscR* 蛋白直接与 PA1897 的启动子区域及其相关序列结合,并且依赖于 LasI 合成的 3O-C12-HSL。但是 *QscR* 蛋白不能直接与 *lasB*、氢氰酸合成基因簇和吩嗪合成的 2 个基因簇的启动子结合^[9]。

促进植物生长的根际细菌,能分泌多种抗生物物质抑制土壤病原菌的繁殖,保护植物免受病原菌感染,已经成为一类重要的生物防治菌受到广泛关注。假单胞菌株(*Pseudomonas* sp.) M-18 是从上海郊区甜瓜根际土壤中分离到的一个 PGPR 菌株,是国际上首次发现的能同时分泌藤黄绿菌素(pyoluterion, Plt)和吩嗪-1-羧酸(phenazine-1-carboxylic acid, PCA)的假单胞菌株^[10]。本文构建了 *qscR* 突变的工程菌株 M-18Q,深入研究了假单胞菌株 M-18 中 *QscR* 对 Plt 和 PCA 的调控方式,研究结果表明, *QscR* 作为整体调控因子,对这两种抗生物物质的合成具有区别性调控

基金项目: 国家自然科学基金(30370041, 20676081)

* 通讯作者。Tel: 86-21-34204854; Fax: 86-21-34204051; E-mail: xuyq@sjtu.edu.cn

作者简介: 王 沂(1983-),女(回族),湖北宜昌人,硕士研究生,研究方向为生化与分子生物学。E-mail: wangyi1983113@yahoo.com.cn

其他作者: 胡洪波

收稿日期: 2006-06-05; 接受日期: 2006-07-11; 修回日期: 2006-10-27

作用 ,对 PCA 基因簇具有负调控作用 ,而对 Plt 基因簇没有明显的调控作用。

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。

1.1.2 培养基 :LB 培养基按文献 [11] 配制。蔗糖选择培养基 :LB 培养基另加 5% 蔗糖 ;KMB 培养基 :每升含蛋白胨 20g ,甘油 15mL ,MgSO₄ · 7H₂O 1.5g , K₂HPO₄ 0.3g ,pH 7.5 ;PPM 培养基 :每升含胰蛋白胨

22g ,葡萄糖 20g ,KNO₃ 5g ,pH 7.5 ;相应固体培养基每升加琼脂 15g。 抗生素用量(μg/mL):卡那霉素 (Km)50 ,氨基青霉素(Ap)100 ,庆大霉素(Gm)15 ,壮观霉素(Sp)100 ,四环素(Tet)120。

1.1.3 主要试剂和仪器 :高保真 DNA 聚合酶 ,DNA 聚合酶(Klenow) ,限制性内切酶、DNA 连接酶及 DNA 分子量标记物购自上海生工生物工程公司。高效液相仪(HPLC ,型号 SHIMADZU LC-8A)购自岛津仪器有限公司。分析柱为反相 C-18 色谱柱(4.6mm i. d. × 150mm ,Phenomenex LUNA) 购自迪马科技有限公司。

表 1 菌株和质粒

Table 1 Strains and plasmids		
Strains and plasmids	Characteristics	Source
Strains		
<i>E. coli</i> SM10	<i>thi-1 thr leu tonA lacy supE recA</i> : RP4-2-Tc : Mu Km ^r	This lab
<i>E. coli</i> DH5α	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi 1 hsdR17(rk⁻ mk⁺) supE44 re1A1</i>	This lab
<i>Pseudomonas</i> sp. M-18	PCA , Plt producer , Amp ^r Sp ^r	This lab
<i>Pseudomonas</i> sp. M-18Q	PCA , Plt producer , Amp ^r Sp ^r <i>qscR</i> ⁻	This study
Plasmids		
pBluescript SK	ColE , Amp ^r	This lab
pSKQ	pBluescript SK with 1.0kb <i>Xba</i> I - <i>Hind</i> III fragment carrying <i>qscR</i> gene ; Ap ^r	This study
pUCGM	Source of Gm ^r cassette ; Ap ^r , Gm ^r	This lab
pSKQG	pSKQ inactivated with Gm ^r ; Gm ^r Ap ^r	This study
pEX18Tc	Gene replacement vector with multiple cloning sites from pUC 18	This study
pEX 18TcQG	1.8-kb fragment from pSKQ in pEX18Tc	This study
pME6032	<i>Nru</i> I - <i>Eco</i> R I <i>lacI</i> ^H - <i>P</i> _{tac} fragment of pJF118EH subcloned in <i>Bam</i> H I - <i>Eco</i> R I double digested pME6031 ; <i>lacI</i> ^H - <i>P</i> _{tac} expression vector	This lab
pME6032Q	pME6032 with 1.0 kb fragment carrying <i>qsc^R</i> gene ; Tet ^r	This study
pMEZA	420-bp <i>Bam</i> H I - <i>Pst</i> I PCR amplified fragment containing <i>phzA</i> with upstream region cloned into pME 6015	This lab

1.2 引物和 PCR 反应

根据 *P. aeruginosa* PAO1 的 *qscR* 基因序列 ,设计引物 ,PCR 扩增假单胞菌 M-18 基因组的 *qscR* 基因片段^[8]。引物 1 : 5'-CGGCTATCTAGAAATGTACTTCCAGGTCCGGCTTGAT-3' ; 引物 2 : 5'-GGCCTTAAGCTTACTAGCGTGCCGGACAACAGGAGGA-3'。在引物的 5' 端分别增添 *Xba*I 或 *Hind*III 酶切位点。PCR 反应体系(50μL) : 10 × 高保真 DNA 聚合酶缓冲液 5μL , dNTP (2.5mmol/L) 4μL ,引物 1 和引物 2 各 1μL ,模板 DNA 3μL ,高保真酶(5U/μL) 0.2μL ,重蒸水 36μL。PCR 反应条件 : 94℃ 5min ; 94℃ 40s , 62℃ 1min , 72℃ 1min 30s , 30 次循环 , 72℃ 10min。染色体 DNA 提取采用申能博彩的试剂盒。

1.3 克隆 *qscR* 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 [11] 进行 ,DNA 序列委托英骏生物技术有限公司测定。

1.4 细菌结合转移

采用固相滤膜杂交方法^[12]进行细菌结合转移。

1.5 生长曲线测定及 PCA 和 Plt 的定量测定

每种样品设 3 次重复 ,每隔 12h 取样 ,测定 OD₆₀₀ 值及 PCA 和 Plt 产量(HPLC) ,取平均值。OD₆₀₀ 值的测定及 PCA 和 Plt 的提取和定量测定方法参照文献 [13]。发酵时 ,摇床转速 220r/min。

1.6 β-半乳糖苷酶活性的测定

从平板中挑取单菌落 ,接种于小瓶(150mL 三角瓶 ,含培养基 50mL)在 28℃ 下震荡培养 12h 后 ,转入大瓶(500mL 三角瓶 ,培养基 150mL) ,28℃、220r/min 震荡培养 ,隔一定时间取样 ,样品根据 Miller^[14]的方法处理并测定 β-半乳糖苷酶活性。

2 结果

2.1 *qscR* 基因的 PCR 克隆和测序

以野生型菌株 M-18 的染色体 DNA 为模板进行

PCR 扩增, 获得长度为 1.0kb 左右的片段, *Xba*I 和 *Hind*III 酶切后, 插入载体 pBluescript SK, 获得质粒 pSKQ 并测序。经 DNAMAN 软件分析, M-18 的 *qscR* 基因序列与 *P. aeruginosa* PAO1 的 *qscR* 基因的同源程度为 99%。因为 *qscR* 基因中存在单一的 *Pst*I 和 *Eco*R I 酶切位点, 并且两个位点间相距 400bp, 质粒 pSKQ 经 *Pst*I 和 *Eco*R I 双酶切后, 获得长度约为 400bp 的片段, 表明 *qscR* 基因位于该质粒中。

2.2 *qscR* 基因的体外突变和突变菌株 M-18Q 的获得

从 pUCCm 获得含有 Gm^r 抗性基因, 长度为 0.8kb 的 *Sma*I 片段, 插入质粒 pSKQ 经 Klenow 大片段末端钝化的 *Pst*I 酶切位点, 获阳性克隆 pSKQG (图 1)。将 *qscR*: Gm^r 突变基因从质粒 pSKQG 转入穿梭质粒 pEX18Tc 中, 切取含有 Gm^r 抗性标记的 *qscR* 基因的 *Xba*I - *Hind*III 双酶切片段 1.8kb, 插入经 *Xba*I - *Hind*III 双酶切处理的 pEX18Tc 质粒, 获重组质粒 pEX18TcQG, 转化 *E. coli* DH5 α 。

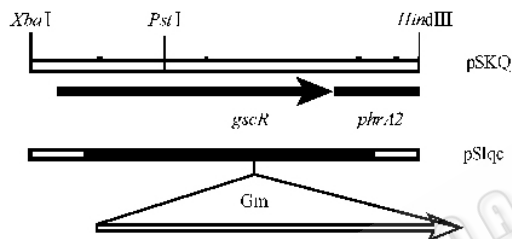


图 1 *qscR* 基因及其侧翼序列插入 Gm^r 抗性片段的物理图谱

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

以 pEX18TcQG 转化的 *E. coli* SM10 为供体菌, 野生菌株 M-18 为受体菌, 经固相滤膜接合转移。质粒 pEX18TcQG 转入 M-18 菌株后, 不能在染色体自主复制, 质粒携带的 *qscR*: Gm^r 突变基因与受体菌 M-18 的染色体同源重组。野生型 M-18 抗壮观霉素 (Sp), 在含 Gm 和 Sp 的 LB 平板中, 选出共整合接合子, 随机挑选菌落接种于含 Gm 的去载体蔗糖选择培养基中, 质粒 pEX18TcQG 携带蔗糖反选择基因 *sacBR*, 经蔗糖诱导表达, 对 M-18 致死, 借此可诱导结合子发生第二次重组, 消除共整合质粒后, 从而获得 *qscR* 基因突变的 M-18 菌株, 命名为 M-18Q。采用 PCR 法验证 M-18Q 突变株, 采用野生型染色体 DNA 为模板, 获得长度为 1.0kb 的条带, 采用 M-18Q 染色体 DNA 为模板, 获得长度为 1.8kb 的条带, 比野生型的条带长 0.8kb, 表明 Gm^r 抗性片段已经插入到 *qscR* 基因内。

2.3 *qscR* 基因过表达载体 pME6032Q 的构建

从质粒 pSKQ 中获得 1.0kb 的含有 *qscR* 基因的 DNA 片段, 将这一片段克隆到质粒 pME6032 中, 获得 *qscR* 基因过表达载体, 命名为 pME6032Q。在该质粒中, *qscR* 基因位于强启动子 *tac* 的下游, 受强启动子 *tac* 的控制^[8]。

2.4 PCA 和 Plt 生物合成的动力学分析

假单胞菌 M-18 和 M-18Q 菌株在 PPM 和 KMB 培养基中的 PCA 生物合成和细胞生长的动力学曲线见图 2。无论以 KMB 还是 PPM 作为发酵的培养基, PCA 都是在菌体进入对数生长期后期至停滞期合成, 在 PPM 培养基中突变菌株 PCA 的产量是野生型的 4~6 倍 (图 2-A); 在 KMB 培养基中, 突变菌株 PCA 的产量是野生型 3~5 倍 (图 2-B), 表明 *qscR* 突变型可以促进 PCA 的合成, 也可以说 *QscR* 阻遏 PCA 的合成。

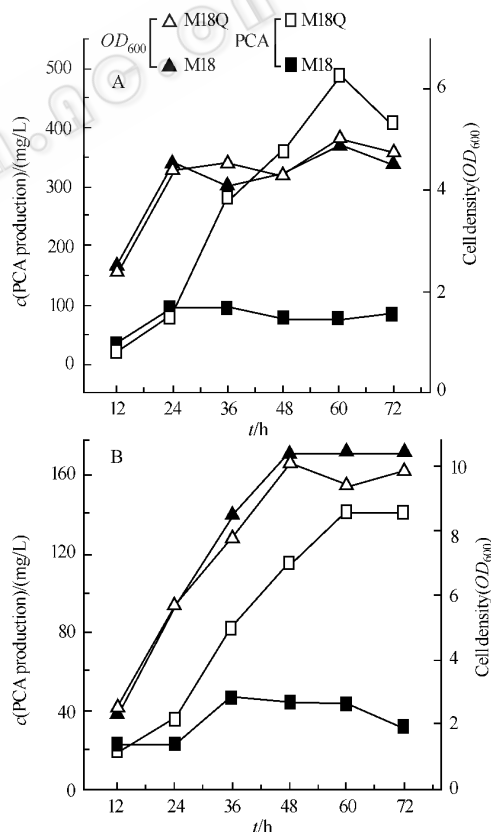


图 2 假单胞菌 M-18 和 M-18Q 菌株在 PPM (A) 和 KMB (B) 培养基中的 PCA 生物合成和细胞生长的动力学曲线

Fig.2 Dynamic curves of PCA production and cell growth of the strain M-18 and M-18Q both in PPM (A) or KMB (B) media respectively.

为了进一步证明 *QscR* 对 PCA 生物合成的抑制作用。我们监测了在 PPM 和 KMB 中含有高拷贝重组质粒 pME6032Q 的 M-18Q 菌株的 PCA 生物合成情

况,质粒 pME6032Q 能够导致 *qscR* 基因的多拷贝以及在强启动子 *tac* 控制下的 *qscR* 基因的过表达。我们采用只含有质粒 pME6032 的 M-18Q 菌株作为对照(图 3)。结果显示,在 PPM 和 KMB 培养基中,*qscR* 基因的过表达导致 M-18Q 菌株的 PCA 的生物合成降低到野生型,甚至比野生型更低的水平。这些结果进一步确认了 *qscR* 的基因产物是 PCA 生物合成的抑制因子。

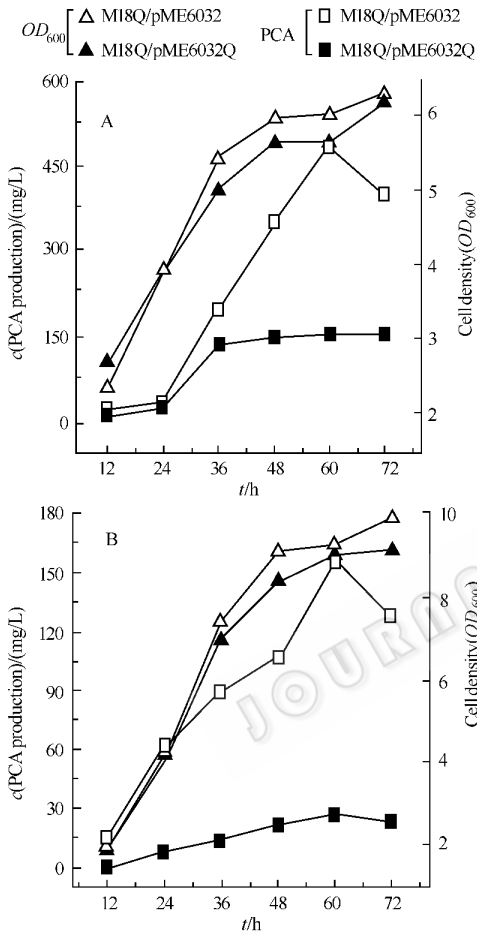


图 3 在 PPM(A) 和 KMB(B) 培养基中 *qscR* 基因的过表达抑制 M-18Q 菌株中 PCA 生物合成

Fig.3 In the strain M-18Q, the overexpression of *qscR* gene suppresses the PCA biosynthesis both in PPM(A) and KMB(B) medium.

野生型菌株和突变菌株生物合成 Plt 的动力学曲线见图 4。在 PPM 培养基中,野生型菌株和突变菌株基本检测不到 Plt 的产出(数据没有给出),而在 KMB 培养基中,Plt 的生物合成动力学曲线在野生型和突变型中没有明显的改变。在 *qscR* 基因的过表达试验中,Plt 的生物合成动力学曲线在含有质粒 pME6032 的 M-18Q 和含有质粒 pME6032Q 的 M-18Q 菌株中基本一致(图 5),可以推测 *qscR* 基因在 M-18 菌株中不影响 Plt 的生物合成。

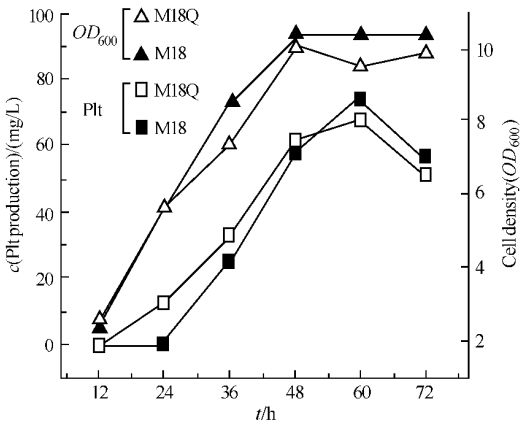


图 4 假单胞菌 M-18 和 M-18Q 菌株在 KMB 培养基中的 Plt 生物合成和细胞生长的动力学曲线

Fig.4 Dynamic curves of Plt production and cell growth of the strain M-18 and M-18Q in KMB medium.

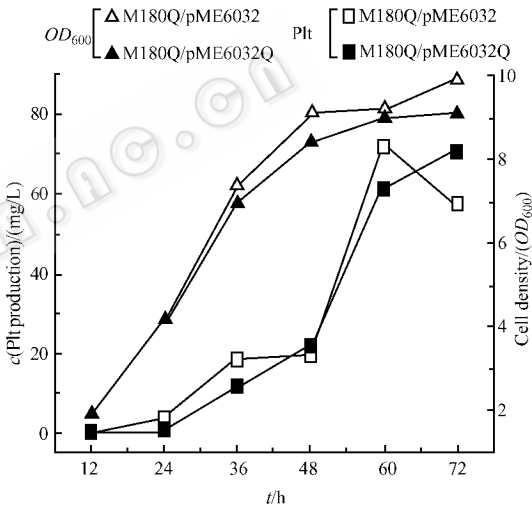


图 5 在 KMB 培养基中 *qscR* 基因的过表达不影响 M-180Q 菌株中 Plt 的生物合成

Fig.5 In the strain M-180Q, the overexpression of *qscR* gene does not influence the Plt biosynthesis in KMB medium.

2.5 QscR 对 PCA 生物合成基因表达的影响

本研究进行了 β -半乳糖苷酶活性的测定以进一步探索 QscR 对 PCA 生物合成基因的负调控作用。PhzA1 基因是 PCA 生物合成基因簇 *phzA1* ~ *G1* 里的第一个基因,该基因的表达情况与 PCA 的生物合成情况是一致的,*QscR* 对 *phzA1* 基因表达的影响会直接反映在 PCA 产量的变化上。质粒 pMEZA 含有一个 *phzA'* - '*lacZ*' 翻译融合^[14],质粒 pMEZA 被分别转入到 M-18 和 M-18Q 菌株中,测定各自的 β -半乳糖苷酶活性。在 PPM 和 KMB 培养基中,突变株 M-18Q 中的 *phzA'* - '*lacZ*' 翻译融合的表达水平分别是野生型中的 2 ~ 3 倍(图 6-A)和 2 倍左右(图 6-3)。 β -半乳糖苷酶活性测定的结果与 M-18 和 M-

18Q 菌株 PCA 生物合成产量分析的结果一致。结果表明, *qscR* 突变菌株 M-18Q 和野生菌株 M-18 的 PCA 产量的差异是由于 PCA 生物合成基因表达水平上的差异造成的, 进一步证实了 *qscR* 在 PCA 的生物合成中起着负调节因子的作用。

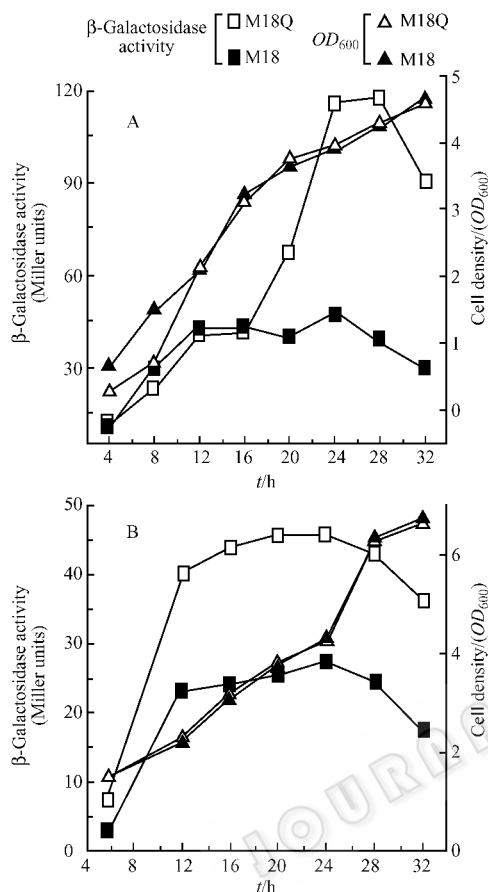


图6 PPM(A)和KMB(B)培养基中 *qscR* 基因影响 M-18 菌株中 PCA 生物合成基因簇的表达

Fig.6 The influence of *qscR* gene on expression of the PCA biosynthetic gene cluster. β -Galactosidase activity resulting from *phzA*'-'*lacZ* translational fusion of the strain M-18 and M-18Q in the PPM(A) and KMB(B) mediums respectively.

3 讨论

为了深入研究假单胞菌株 M-18 中, *qscR* 基因对 PCA 和 Plt 两种抗生素代谢的调控机制, 构建了突变株 M-18Q。对假单胞菌株 M-18 及其 *qscR* 突变的工程菌株 M-18Q 的生长曲线和合成 Plt 及 PCA 的动力学分析表明, *qscR* 基因产物对它们的合成具有差异性的调控作用, 它对 PCA 的合成具有显著的抑制作用, 而对 Plt 合成没有明显作用。这些结果表明, 在假单胞菌株 M-18 中, *QscR* 参与到了 PCA 生物合成的负调控作用中, 但是并没有直接参与到 Plt 的生物合成中。本实验室在 M-18 菌株中曾经研究

了 *rsmA* 和 *gacA* 基因对 PCA 和 Plt 的生物合成的调节作用^[14,15], 结果显示在对 PCA 和 Plt 生物合成的调节上存在差异性, 这里这个结论得到了进一步的确认。*QscR* 对 PCA 和 Plt 两种抗生素代谢的差异性调控也表明在假单胞菌株 M-18 中, PCA 和 Plt 的生物合成有他们各自特异的代谢调控途径。

已有研究表明, *QscR* 蛋白作为一个转录抑制因子, 在细菌对数生长期的后期负调节着大量基因的表达。这些基因涉及到抗生素合成、胞外弹性蛋白酶的合成以及菌群传感系统。但在这里 *QscR* 作为一个全局性的调控蛋白, 差异性地调控着 PCA 和 Plt 的生物合成, 说明 *QscR* 并不对全部次生代谢都表现为同一的抑制作用。*qscR* 基因对 PCA 和 Plt 差异性调控的分子机制有待进一步研究。

qscR 基因对 PCA 和 Plt 差异性调控的分子机制的发现给我们提供了一个契机, 能够通过对 M-18 菌株进行基因修饰的方法以提高 PCA 的产量, 增强 M-18 菌株的生防能力和对环境的适应性。

参考文献

- [1] 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.
- [2] Wagner VE, Bushnell D, Passador L, et al. Microarray analysis of *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing regulons: effects of growth phase and environment. *J Bacteriol* 2003, **185**(7): 2080 - 2095.
- [3] Fuqua C, Greenberg EP. Listening in on bacteria: acyl-homoserine lactone signaling. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2002, **3**(9): 685 - 695.
- [4] Fuqua C, Parsek MR, Greenberg EP. Regulation of gene expression by cell-to-cell communication: acyl-homoserine lactone quorum sensing. *Annu Rev Genet*, 2001, **35**: 439 - 468.
- [5] Smith RS, Iglewski BH. *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing as a potential antimicrobial target. *J Clin Invest* 2003, **112**(10): 1460 - 1465.
- [6] Withers H, Swift S, Williams P. Quorum sensing as integral component of gene regulatory networks in Gram-negative bacteria. *Curr Opin Microbiol* 2001, **4**(19): 186 - 193.
- [7] Chugani SA, Whiteley M, Lee KM, et al. *QscR*, a modulator of quorum-sensing signal synthesis and virulence in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci*, 2001, **98**(5): 2752 - 2757.
- [8] Ledgham F, Ventre I, Soscia C, et al. Interaction of the quorum sensing regulator *QscR*: interaction with itself and the other regulators of *Pseudomonas aeruginosa* LasR and RhIR. *Molecular Microbiology*, 2003, **48**(1): 199 - 210.
- [9] Lee JH, Lequette Y, Greenberg EP. Activity of purified *QscR*, a *Pseudomonas aeruginosa* orphan quorum-sensing transcription factor.

- [10] 朱栋华,徐汪节,耿海峰,等. 荧光假单胞菌 M-18 *rpoD* 基因克隆及其对抗生素合成的影响. 微生物学报, 2003, 43(1): 58-62.
- [11] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. 分子克隆实验指南. 金冬雁, 黎孟枫, 等译. 第二版. 北京: 科学出版社, 1999.
- [12] 张惠展. 途径工程——第三代基因工程. 北京: 中国轻工业出版社, 2002.
- [13] 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. M-18. *FEMS Microbiol Lett*, 2004, 232(2): 197-202.
- [14] Zhang XH, Wang SL, Ge YH, et al. Differential regulation of *rsmA* gene on biosynthesis of pyoluteorin and phenazine-1-carboxylic acid in *Pseudomonas* sp. M-18. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 2005, 21(6-7): 883-888.
- [15] Ge YH, Huang XQ, Wang SL, et al. Phenazine-1-carboxylic acid is negatively regulated and pyoluteorin positively regulated by *gacA* in *Pseudomonas* sp. M-18. *FEMS Microbiol Lett*, 2004, 237(1): 41-47.

Construction of *Pseudomonas* sp. M18 *qscR*⁻ mutant and its regulation on biosynthesis of PCA and Plt

WANG Yi, YAN An, HUANG Xian-qing, ZHANG Xue-hong, XU Yu-quan*

(School of Life Science & Biotechnology, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200240, China)

Abstract: In Gram-negative bacteria, global regulator QscR controls the expression of many virulence determinants, secondary metabolites, stationary phase genes and genes involved in biofilm formation through quorum sensing (QS) systems. QscR binds the promoter region of target genes and regulates the gene expression at the transcriptional level. Using homologous recombination technique a chromosomal *qscR* inactivated mutant strain M-18Q was constructed in *Pseudomonas* sp. M-18, a strain of plant-growth-promoting rhizobacteria, which could inhibit several soilborn phytopathogens by producing secondary metabolites including phenazine-1-carboxylic acid (PCA) and pyoluteorin (Plt) in one single strain. To further study the effect of QscR on the synthesis of Plt and PCA in the wild type strain M-18, the dynamic curves of Plt and PCA produced respectively by M-18 and M-18Q strains were measured in both KMB and PPM mediums. The synthesis of PCA was much more activated in the mutant than in the wild type both in KMB and PPM mediums. The PCA production in the mutant strain is four-to-six fold over that in the wild type in the PPM medium, reaching 480 µg/mL, and three-to-five fold in the KMB medium, reaching 140 µg/mL. The synthesis of Plt, however, was not detected in PPM medium and was nearly not influenced by the QscR protein in KMB medium. PCA production was inhibited but Plt biosynthesis was not altered after complementation with *qscR* gene *in trans* in the strain of M-18Q. The regulation of *qscR* gene on PCA production was further confirmed by the analysis of β-galactosidase activities from the translational *phzA'* - '*lacZ* fusion, in which *phzA* is the first enzyme gene of the phenazine biosynthesis pathway. These results indicate that QscR can control PCA production negatively but not Plt production in M-18, and show that QscR functions as a global regulator to differently regulate the synthesis of PCA and Plt on the gene expression level.

Keywords: *Pseudomonas* sp. M-18; *qscR*; phenazine-1-carboxylic acid; pyoluteorin