

## 荧光假单胞菌 2P24 中 *retS* 对抗生素 2,4-二乙酰基间苯三酚合成的影响

刘九成, 张伟, 吴小刚, 张力群\*

中国农业大学植物病理系, 农业部植物病理学重点开放实验室, 北京 100193

**摘要:**假单胞菌中 RetS 是一个位于膜上的感应激酶, 对多种基因的表达都有调控作用。在铜绿假单胞菌中, RetS 可以与另一个感应激酶 GacS 直接互作, 并抑制 GacS 的磷酸化。【目的】本文利用遗传学方法研究了荧光假单胞菌 2P24 中 RetS 对抗生素 2,4-二乙酰基间苯三酚 (2,4-DAPG) 合成的影响, 并对其可能的调控机制进行了初步探索。【方法】利用高压液相色谱法 (HPLC) 检测 2P24 及其衍生菌株中 2,4-DAPG 的产量。将 Gac/Rsm 信号途径中小 RNA 及调控蛋白的转录报告质粒转入到菌株 2P24 及其 *retS* 突变菌株中, 检查 RetS 对以上基因转录表达的影响。【结果】菌株 2P24 中缺失 *retS* 后未知红色素和抗生素 2,4-DAPG 的产量较野生型均明显升高。进一步试验表明, RetS 转录水平负调控小 RNA RsmX 和 RsmZ 的表达, 这说明 RetS 可在转录后水平影响 2,4-DAPG 的合成。然而, 同时缺失 *retS* 和 *gacS* 或同时缺失 *retS* 和 *gacA* 之后, 由 *retS* 单基因缺失所造成的未知红色素和 2,4-DAPG 合成量升高、小 RNA 转录表达增强等性状消失, 而与 *gacS* 或 *gacA* 单基因缺失突变体的表型一致。【结论】以上结果说明菌株 2P24 中 RetS 是 2,4-DAPG 及未知红色素合成的负调控因子, 并且 RetS 对 2,4-DAPG 及未知红色素合成的调控依赖于 Gac/Rsm 信号传递路径。

**关键词:** 荧光假单胞菌 (*Pseudomonas fluorescens*), 2,4-二乙酰基间苯三酚 (2,4-diacetylphloroglucinol, 2,4-DAPG), 感应激酶 RetS, Gac/Rsm 信号途径

中图分类号: Q933 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209 (2013)02-0118-09

荧光假单胞菌 (*Pseudomonas fluorescens*) 2P24, 分离自小麦全蚀病自然衰退土壤, 可以有效防治多种植物病原真菌、细菌引起的土传病害。前期研究表明该菌株能产生多种抗菌物质, 其中 2,4-二乙酰基间苯三酚 (2,4-diacetylphloroglucinol, 2,4-DAPG) 是主要防病机制<sup>[1-2]</sup>, 其合成受到 GacS/GacA 双因子系统 (two-component regulatory system) 的调控<sup>[3-4]</sup>。GacS/GacA 双因子系统由感应激酶 GacS 及其对应的反应调控因子 GacA 组成, 其调控机制

主要经由小 RNA 途径实现<sup>[5]</sup>。在 *P. fluorescens* CHA0 中, 当位于细胞膜上的感应激酶 GacS 感应到外界特定的信号刺激时, 就会发生自体磷酸化, 经过两次传递, 最终将磷酸基团传递给位于胞质中的 GacA<sup>[6]</sup>。磷酸化的 GacA 正调控 3 种小 RNA (RsmX、RsmY 和 RsmZ) 的表达, 小 RNA 大量产生后就会竞争性的与调控蛋白 (RsmA 和 RsmE) 结合, 以解除后者对目标基因转录产物 mRNA 的翻译抑制, 这样就实现了对包括 2,4-DAPG、藤黄绿菌素等

基金项目: 国家自然科学基金 (31071725, 30871666); 国家“863 计划” (2011AA10A205)

\* 通信作者。Tel/Fax: +86-10-62731464; E-mail: zhanglq@cau.edu.cn

作者简介: 刘九成 (1985 -), 男, 河北沧州人, 硕士, 主要从事分子微生物学研究。E-mail: jiucheng8866@126.com

收稿日期: 2012-08-26; 修回日期: 2012-11-16

抗生素合成基因在内的下游基因表达的转录后调控<sup>[7-8]</sup>。

研究表明, 2,4-DAPG 的合成与一种未知的红色素连锁<sup>[9]</sup>。实验室前期研究中, 以未知红色素作为筛选指标对菌株 2P24 进行 Tn5 转座子突变, 在大约 3000 株突变体中筛选到 29 个红色素产量明显增加的突变体, 其中 2 个突变体中 Tn5 破坏了 *retS*。

在 *P. aeruginosa* 中, RetS (regulator of exopolysaccharide and type III secretion) 负责激活许多与急性感染 (acute infection) 相关的基因, 例如 III 型分泌系统 (type III secretion system, TTSS) 及一些毒性因子; 而抑制与慢性感染 (chronic infection) 相关的基因, 如生物膜形成相关基因<sup>[10]</sup>。利用转座子插入突变研究 RetS 的调控路径, 发现当 GacS/GacA/RsmZ 信号传递路径中的任何一个组份发生突变时, 由 *retS* 缺失所引起的 TTSS 被抑制和生物膜过量表达等表型都可以被逆转<sup>[11]</sup>。细菌双杂交实验表明, RetS 与 GacS 能够通过激酶核心区 (HisKA/H<sup>+</sup> ATPase) 特异地结合互作<sup>[12]</sup>, 但 RetS 与 GacA 之间无直接互作<sup>[10]</sup>。RetS 与 GacS 结合后能够抑制 GacS 的自磷酸化, 同时还能够影响已磷酸化的 GacS 的稳定性, 使其去磷酸化<sup>[11]</sup>。

本文在前期研究的基础上, 从遗传学角度确认了 RetS 对 2,4-DAPG 及未知红色素合成的调控作用, 并对其可能的调控机制进行了初步的探索。研究结果表明, *P. fluorescens* 2P24 中 RetS 负调控 2,4-DAPG 及未知红色素的产量, 而且这种影响依赖于 Gac/Rsm 信号传递路径。

## 1 材料和方法

### 1.1 主要试剂和仪器

基因组 DNA 提取试剂盒和质粒提取试剂盒购自 Promega 公司。Ex-Taq DNA 聚合酶、限制性核酸内切酶以及 T4 DNA 连接酶均购自 TaKaRa 公司。引物由北京三博远志生物有限责任公司合成。其他试剂均为国产或进口分析纯。

### 1.2 菌株、质粒和培养条件

本实验中所用的菌株和质粒列于表 1 中。菌株的培养条件参照文献 [3]。抗生素使用浓度分别为: 氨苄青霉素 (Ap) 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 卡那霉素 (Km) 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 庆大霉素 (Gm) 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 5-溴-4-氯-3-吡

啉- $\beta$ -D-半乳糖苷 (X-Gal) 40  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

### 1.3 DNA 操作和序列分析

DNA 操作参照文献 [13]。质粒电击转化到 *P. fluorescens* 菌株中的方法参照文献 [16]。DNA 序列测定由北京三博远志生物有限责任公司完成。核苷酸序列分析由在线 BLAST 搜索引擎完成 (<http://blast.ddbj.nig.ac.jp/top-e.html>)。

### 1.4 *retS* 内缺失突变菌株的构建

菌株 2P24 的 *retS* 内缺失突变菌株通过双交换同源重组的方法得到。方法如下: 分别利用引物 *retS*-2334/*retS*-3336 和 *retS*-5106/*retS*-6380 (表 1) 通过 PCR 的方法得到 *retS* 上下两段侧翼序列, 将得到的片段酶切后克隆到载体 pBLR 中, 获得自杀载体 pBLR- $\Delta$ *retS*, 将该载体电击转入菌株 2P24 中, 二次同源交换后即获得 *retS* 内缺失突变菌株  $\Delta$ *retS*。利用互补引物对野生菌及  $\Delta$ *retS* 进行 PCR, 电泳验证缺失成功 (图未给出)。为互补突变菌株  $\Delta$ *retS*, 利用引物 *retSC*-2568 和 *retSC*-5682 (表 1), 以 2P24 基因组为模板 PCR 扩增得到完整的 *retS* 并克隆到穿梭载体 pBBR1MCS-5 中得到互补载体 pBBRGm-*retS*。互补载体转化突变体  $\Delta$ *retS* 后得到互补菌株  $\Delta$ *retSC*。

### 1.5 红色素产量变化检查

将菌株 2P24 及其衍生菌株在 LB 培养基平板上划线, 30 $^{\circ}\text{C}$  培养 48 h 后观察颜色。

### 1.6 抗生素 2,4-DAPG 的定量检查和 $\beta$ -半乳糖苷酶的活性测定

为定量检测 2,4-DAPG, 菌株 2P24 及其衍生菌株于 30 $^{\circ}\text{C}$  摇培 30 h 后, 用 10% 三氟乙酸酸化至 pH 2.0, 然后用等体积乙酸乙酯萃取, 萃取物旋转蒸发后干物质溶于 0.5 mL 甲醇。2,4-DAPG 检测方法参照文献 [17]。本实验重复 3 次。

测定  $\beta$ -半乳糖苷酶活性时, 首先将菌株 2P24 及其衍生菌株接种在 5 mL 液体 LB 培养基中, 30 $^{\circ}\text{C}$ , 135 r/min 摇培 30 h, 然后按 1:1000 (V:V) 的比例接种到 40 mL LB 培养液中继续培养, 9 h 后开始取样, 之后每隔 3 h 取样, 直到细菌生长达到稳定期,  $\beta$ -半乳糖苷酶活测定方法见文献 [18]。

## 2 结果和分析

### 2.1 *P. fluorescens* 2P24 菌株中 *retS* 筛选及鉴定

实验室前期研究中, 利用 Tn5 转座子随机插入

表 1 本实验所用菌株、质粒和引物

Table 1 Bacterial strains, plasmids, and oligonucleotides used in this study

Strains or plasmids	Characteristics	Reference or Source
<b>Strains</b>		
<i>P. fluorescens</i>		
2P24	Wild-type, Ap <sup>r</sup>	
Δ <i>gacA</i>	Derivative of 2P24, <i>gacA</i> in-frame deletion, Ap <sup>r</sup>	[4]
Δ <i>gacS</i>	Derivative of 2P24, <i>gacS</i> in-frame deletion, Ap <sup>r</sup>	[3]
Δ <i>retS</i>	Derivative of 2P24, <i>retS</i> in-frame deletion, Ap <sup>r</sup>	This study
Δ <i>gacS</i> Δ <i>retS</i>	Derivative of 2P24, <i>gacS</i> and <i>retS</i> in-frame deletion, Ap <sup>r</sup>	This study
Δ <i>gacA</i> Δ <i>retS</i>	Derivative of 2P24, <i>gacA</i> and <i>retS</i> in-frame deletion, Ap <sup>r</sup>	This study
<i>Escherichia coli</i> DH5α	F- <i>recA1 endA1 hsdR17 deoR thi-1 supE44 gyrA96 relA1</i> Δ( <i>lacZYA-argF</i> ) U169λ <sup>-</sup> (Φ80 <i>dlacZ</i> Δ <i>M15</i> )	[13]
<b>Plasmids</b>		
pBLR	Suicide plasmid for <i>Pseudomonas</i> spp., used for homologous recombination, Km <sup>r</sup>	This study
pBLR-Δ <i>retS</i>	Suicide plasmid containing deleted <i>retS</i> on pBLR, Km <sup>r</sup>	This study
pBBR1 MCS-5	Broad-host-range cloning vector, Gm <sup>r</sup>	[14]
pBBRGm- <i>retS</i>	pBBR1 MCS-5 carrying intact <i>retS</i> , Gm <sup>r</sup>	This study
p970Km- <i>rsmZp</i>	pRG970Km containing a 0.4 kb fragment of the promoter region of <i>rsmZ</i> , Km <sup>r</sup>	[15]
p970Km- <i>rsmXp</i>	pRG970Km containing a 0.26 kb fragment of the promoter region of <i>rsmX</i> , Km <sup>r</sup>	This lab
p970Gm- <i>rsmYp</i>	pRG970Gm containing a 0.33 kb fragment of the promoter region of <i>rsmY</i> , Gm <sup>r</sup>	This lab
p970Gm- <i>rsmEp</i>	pRG970Gm containing a 0.36 kb fragment of the promoter region of <i>rsmE</i> , Gm <sup>r</sup>	This lab
p970Km- <i>rsmAp</i>	pRG970Km containing a 0.4 kb fragment of the promoter region of <i>rsmA</i> , Km <sup>r</sup>	This lab
Oligonucleotides	Sequence (5' - 3')	Restriction site
<i>retS</i> deletion primers		
<i>retS</i> -2334	ATGAATTC <sup>↓</sup> CCCAAGTGTGGTGTGCGTAT	<i>EcoR</i> I
<i>retS</i> -3336	ATGGATCCTGAGCGAGTGTAGGCATAGC	<i>BamH</i> I
<i>retS</i> -5106	ATGGATCCACCGAGCGATTTCCGCAT	<i>BamH</i> I
<i>retS</i> -6380	ATGAGCTCGCTTTCAGGCCAACTTATCCG	<i>Sac</i> I
<i>retS</i> complementation primers		
<i>retS</i> C-2568	TTAAAGCTTTCGACTGGGAAGGTTGTTTC	<i>Hind</i> III
<i>retS</i> C-5682	ATGGATCCGCAGCCAGGAAGAAATGG	<i>BamH</i> I

突变的方法在大约 3000 株突变体中筛选得到 2 株红色素产量明显增加的突变体, 遗传学分析表明 2 株突变体中的插入突变都发生在 *retS* 上(图 1)。菌

株 2P24 中推测的 *retS* 长 2778 bp, 与其他假单胞菌中的 *retS* 具有高度的一致性(数据未列出)。

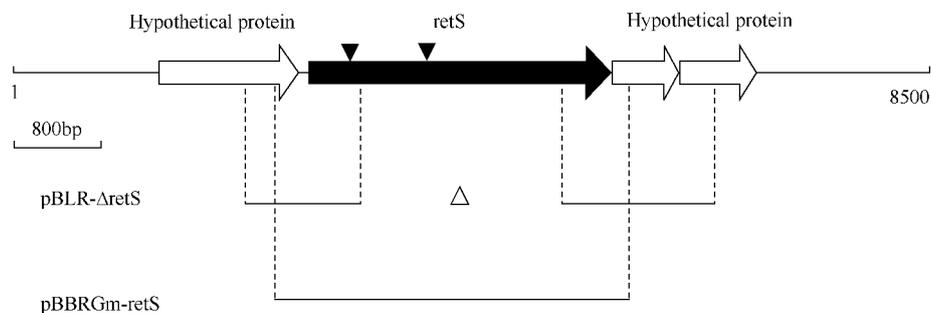
图 1 *P. fluorescens* 2P24 中 *retS* 结构示意图

Fig. 1 Schematic diagram of the *retS* in *P. fluorescens* 2P24. The single-headed arrows represent the location and orientation of the genes in *P. fluorescens* 2P24 chromosome. Locations of the Tn5-transposon insertion are indicated as solid triangle. The construction of plasmids pBLR-Δ*retS* and pBBRGm-*retS* is described in Materials and Methods. The bars designate the fragments cloned into the vector pBLR to give pBLR-Δ*retS*, and into pBBR1MCS-5 to give pBBRGm-*retS*. The fragment inserted in pBBRGm-*retS* was used to complement the *retS* mutation in Δ*retS*. Δ = region deleted in strain Δ*retS*.

## 2.2 RetS 负调控未知红色素及抗生素 2,4-DAPG 的合成

与野生菌 2P24 相比, 缺失 *retS* 可明显提高红色素的合成量, 菌苔及培养基呈红褐色, 而将含有完整 *retS* 的互补质粒 pBBR<sub>Gm-retS</sub> 导入到  $\Delta retS$  后, 菌体颜色即可恢复到野生型水平 (图 2-A), 这表明 RetS 负调控红色素的合成。

前期研究报道 2,4-DAPG 的合成与红色素的合成连锁, 所以 RetS 可能对 2,4-DAPG 也有调控作用。利用 HPLC 对野生菌 2P24、 $\Delta retS$  和  $\Delta retS$  中抗生素 2,4-DAPG 的产量进行了定量检测。结果表明缺失 *retS* 后, 2,4-DAPG 的产量较野生菌 2P24 明显升高, 而其互补菌株 2,4-DAPG 的产量则远远低

于野生菌 2P24 (图 2-B), 这可能是由于多拷贝 *retS* 的导入使 2,4-DAPG 合成基因的表达受到强烈抑制的结果。为了验证这一推测, 我们将 *retS* 互补质粒导入到野生菌 2P24 中并检测其 2,4-DAPG 产量, 结果表明其抗生素产量同样明显低于野生菌 2P24, 而与  $\Delta retS$  中 2,4-DAPG 的产量基本相当 (图 2-B)。

这些结果表明在菌株 2P24 中 RetS 对抗生素 2,4-DAPG 和红色素的合成有着明显的抑制作用, 是 2,4-DAPG 和红色素合成的负调控因子。

## 2.3 RetS 对 2,4-DAPG 及红色素合成的负调控依赖于 GacS/GacA 双因子系统

在菌株 2P24 中, GacS/GacA 双因子系统正调控 2,4-DAPG 的产生, *gacA* 缺失突变体的 2,4-DAPG 产量与野生型 2P24 相比下降了大约 50 倍<sup>[4]</sup>。已知在 *P. aeruginosa* 中 RetS 是通过与 GacS 直接互作调控下游基因表达的<sup>[10]</sup>, 推测 RetS 可能通过与 GacS/GacA 双因子系统互作调控 2,4-DAPG 的合成。

利用 HPLC 分别对菌株  $\Delta retS$ 、 $\Delta gacS$ 、 $\Delta gacS\Delta retS$ 、 $\Delta gacA$ 、 $\Delta gacA\Delta retS$  所产生的 2,4-DAPG 进行了定量。结果表明, 双缺失突变体  $\Delta gacS\Delta retS$ 、 $\Delta gacA\Delta retS$  的 2,4-DAPG 产量分别与  $\Delta gacS$ 、 $\Delta gacA$  的 2,4-DAPG 产量基本相当, 而都明显低于  $\Delta retS$  的 2,4-DAPG 产量 (图 3-A)。真菌对峙培养试验也表明菌株  $\Delta gacS\Delta retS$ 、 $\Delta gacA\Delta retS$  都丧失了对病原菌 *Rhizoctonia solani* 的拮抗作用, 而与  $\Delta gacS$ 、 $\Delta gacA$  的表型一致 (数据未列出)。这些结果说明 RetS 对 2,4-DAPG 合成的调控依赖于 GacS/GacA 双因子调控系统。

已知红色素的合成与 2,4-DAPG 连锁, 所以 RetS 对红色素合成的调控作用应该也是依赖于 GacS/GacA 双因子系统的。试验结果表明, 在 *retS* 缺失的基础上再缺失 *gacS* 或 *gacA* 后, 由 *retS* 缺失所引起的红色素合成量升高的现象消失 (图 3-B)。据此可知, RetS 对未知红色合成的调控依赖于 GacS/GacA 双因子系统。

## 2.4 RetS 对小 RNA 和调控蛋白转录的影响

GacS/GacA 双因子调控系统对于下游基因的调控经由小 RNA 以及调控蛋白 RsmA 和 RsmE 进行<sup>[5]</sup>。菌株 2P24 中现已发现 3 个小 RNA (RsmX、RsmY 和 RsmZ)。本研究中将 3 个小 RNA 的转录融合报告质粒 (p970K<sub>m-rsmXp</sub>、p970G<sub>m-rsmYp</sub>、p970K<sub>m-rsmZp</sub>) 分别导入野生菌 2P24 和  $\Delta retS$  中,

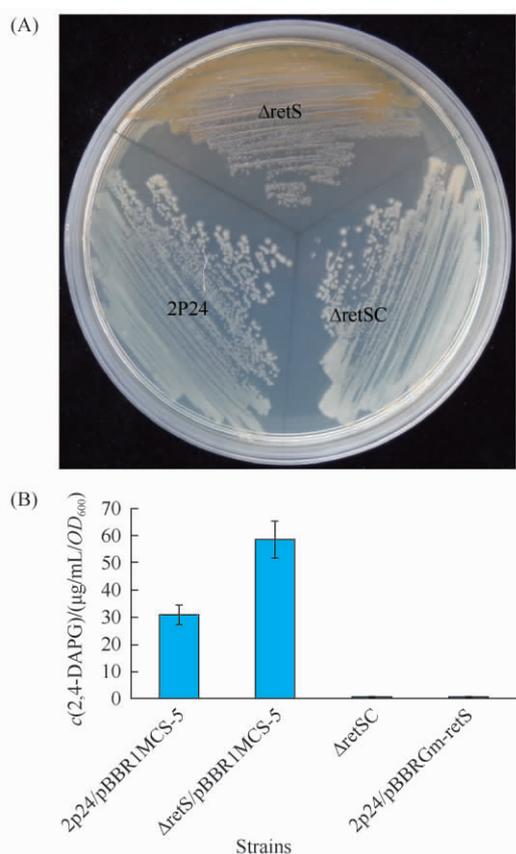


图 2 RetS 负调控菌株 2P24 中红色素 (A) 和 2,4-DAPG (B) 的合成

Fig. 2 Production of red pigment (A) and 2,4-DAPG (B) was negatively regulated by RetS. Red pigment production of *P. fluorescens* 2P24, its *retS* deletion mutant ( $\Delta retS$ ) and the complemented strain ( $\Delta retSC$ ) on LB plate (A). *P. fluorescens* 2P24 and variants were assayed for the level of 2,4-DAPG production by HPLC. The 2,4-DAPG quantification was performed in triplicate, and the mean values  $\pm$  SD are indicated (B).

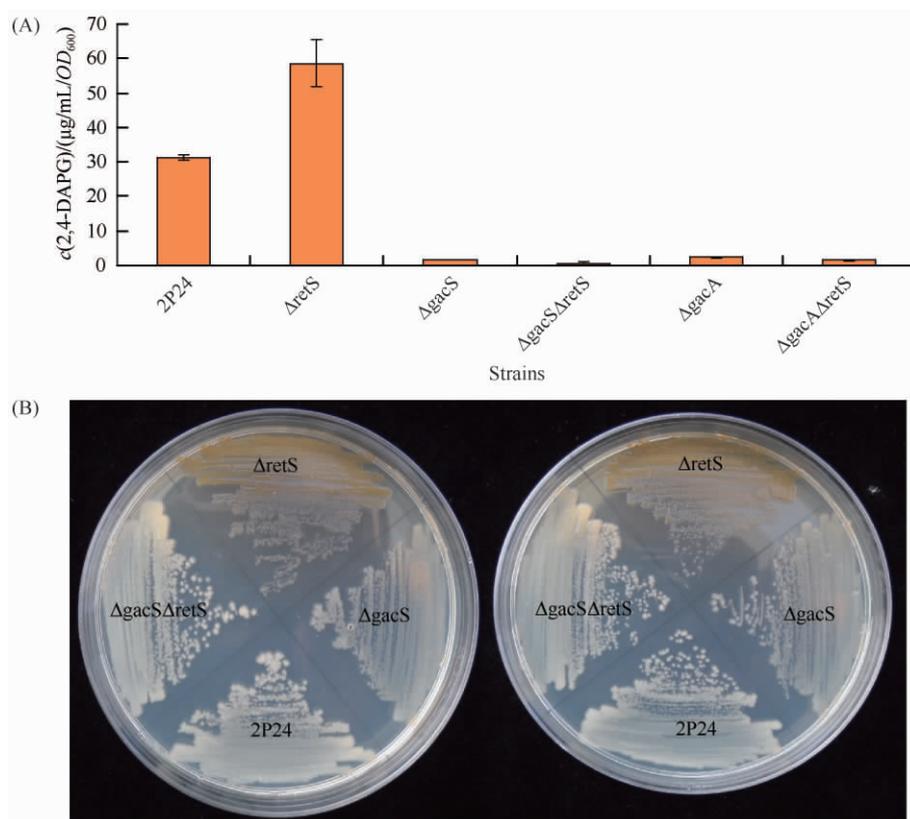


图3 RetS对2,4-DAPG及红色素产量的影响依赖于GacS/GacA双因子调控系统

Fig. 3 Effect of RetS on production of 2,4-DAPG (A) and red pigment (B) was dependent on GacS/GacA two-component regulatory system. The level of 2,4-DAPG production in strain 2P24,  $\Delta retS$ ,  $\Delta gacS$ ,  $\Delta gacS\Delta retS$ ,  $\Delta gacA$ ,  $\Delta gacA\Delta retS$  was detected by HPLC using the method described by Shanahan *et al.* (1992). All experiments were performed in triplicate, and the error bars indicate the standard deviations (A).

以检测 RetS 对小 RNA 转录的影响。结果表明,  $\Delta retS$  中 *rsmX*、*rsmZ* 的转录水平明显高于 2P24 野生型,这说明 RetS 负调控小 RNA 基因 *rsmX* 和 *rsmZ* 的转录(图 4-A、C); *retS* 缺失后 *rsmY* 的转录也有一定程度的提高,但变化不像 *rsmX*、*rsmZ* 那样明显(图 4-B)。据此推测,在 RetS 调控 2,4-DAPG 合成的过程中 3 种小 RNA 所发挥的作用或其作用机制可能并不完全相同。

目前 2P24 中已经发现有 2 种调控蛋白 RsmA 和 RsmE,它们对 2,4-DAPG 合成起着负调控作用<sup>[15]</sup>。分别将其转录报告载体(p970Km-*rsmA*、p970Gm-*rsmE*)导入到野生菌 2P24 和  $\Delta retS$  中,以研究 RetS 对调控蛋白编码基因转录的影响。结果表明,缺失 *retS* 对 *rsmE* 转录基本没有影响(图 4-E),而 *rsmA* 的转录略有升高(图 4-D)。

## 2.5 RetS 对小 RNA 转录的负调控依赖于 GacS/GacA 双因子系统

将小 RNA 基因启动子的报告质粒分别导入菌株  $\Delta retS$ 、 $\Delta gacS$ 、 $\Delta gacS\Delta retS$ 、 $\Delta gacA$ 、 $\Delta gacA\Delta retS$  中,通过检测各个菌株的  $\beta$ -半乳糖苷酶活性来确定它们之间的关系。结果表明,当同时缺失 *retS* 和 *gacS* 后,菌株中小 RNA 的转录表达量远远低于单独缺失 *retS* 的突变体  $\Delta retS$ ,而与 *gacS* 单缺失突变所造成的表型基本一致(图 5-A、C)。所以,RetS 对小 RNA 基因的调控依赖于野生型 GacS。同理 RetS 对小 RNA 基因的调控依赖于野生型 GacA(图 5-B、D)。以上结果说明 RetS 对小 RNA 转录的调控依赖于 GacS/GacA 双因子调控系统。

这些结果说明 RetS 是通过 Gac/Rsm 调控系统负调控 2,4-DAPG 合成的。

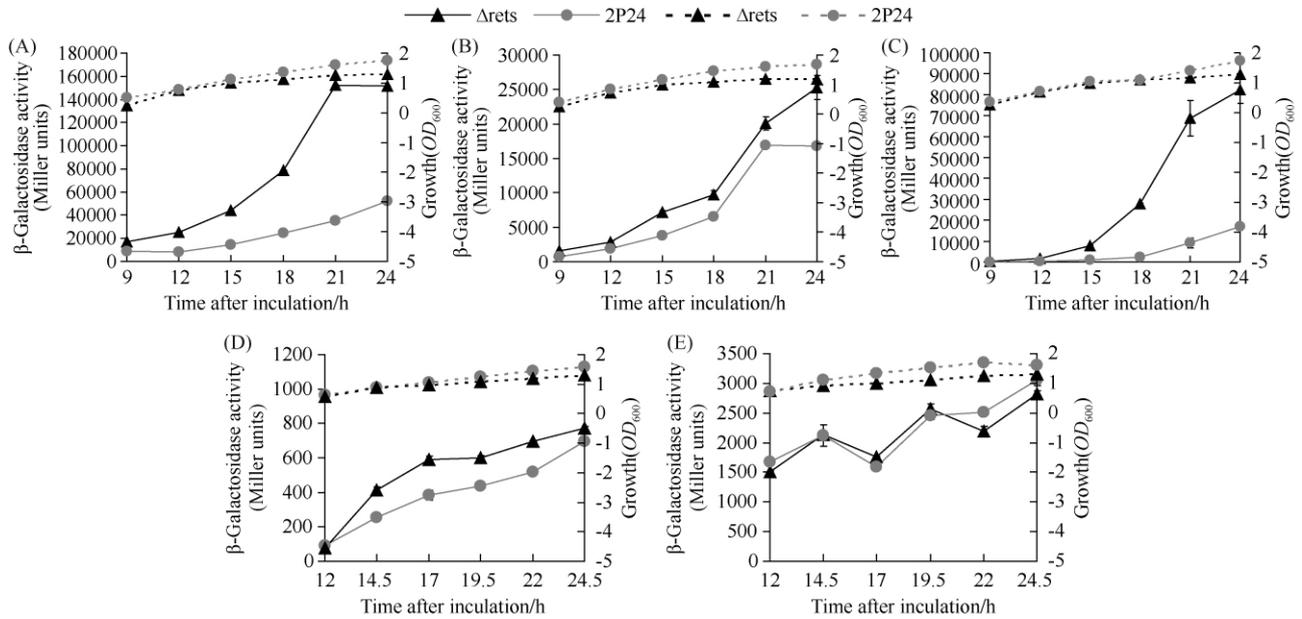


图 4 RetS 对小 RNA *RsmX/RsmZ/RsmY* 及调控蛋白 *RsmA/RsmE* 转录水平的影响

Fig. 4 Transcriptional regulation of the small RNA genes and regulatory protein genes by RetS.  $\beta$ -Galactosidase activities of the plasmid p970Km-rsmXp (A), p970Gm-rsmYp (B), p970Km-rsmZp (C), p970Km-rsmAp (D), p970Gm-rsmEp (E) in *P. fluorescens* strains were measured at various time points after inoculation. Strains were grown in liquid LB medium at 30°C. Growth curve was indicated by dotted lines. All experiments were performed in triplicate, and the error bars indicate the standard deviations.

### 3 讨论

前期遗传学研究已经证明抗生素 2,4-DAPG 是生防菌株 *P. fluorescens* 2P24 防治植物病害的主要因子<sup>[1-2]</sup>, 对其合成调控的研究有助于进一步了解 2P24 的生防机制。文献报道 2,4-DAPG 的合成与一种未知的红色素连锁, 当向 13 株不产生 2,4-DAPG 的假单胞菌中导入 *P. fluorescens* Q2-87 的 2,4-DAPG 合成基因簇时, 它们可以同时获得产生 2,4-DAPG 和红色素的能力<sup>[9]</sup>。

本研究中我们克隆了菌株 2P24 中的 *retS*。序列比对分析表明, 该基因与其它荧光假单菌中的相应基因具有高度的一致性。菌株 2P24 中 RetS 对 2,4-DAPG 的合成具有负调控作用, 而且这种调控是通过 Gac/Rsm 途径进行的。当在缺失 *retS* 的同时再缺失 *gacS* 或 *gacA* 后, *retS* 缺失所引起 2,4-DAPG 产量升高、小 RNA 转录增加等表型则被逆转。根据在 *P. aeruginosa* 中 RetS 通过与 GacS 直接结合互作调控下游基因的表达等已知的结论, 并结合本研究的结果, 我们推测了 RetS 对 2,4-DAPG 合成基因簇 *phlACBD* 表达调控的可能过程 (图 6): 首先 RetS 与

GacS 互作, 抑制或解除后者的磷酸化, 这样 GacA 就无法接受磷酸基团, 从而失去了对下游小 RNA 转录表达的激活作用。此时没有被小 RNA 结合的调控蛋白 RsmA 和 RsmE 则处于自由状态, 可以与 *phlACBD* 转录的 mRNA 中的核糖体结合位点结合, 阻碍其翻译, 从而实现 RetS 对 *phlACBD* 表达的抑制作用; 当缺失 *retS* 后, GacS 可以自由磷酸化并把信号传递给 GacA, GacA 正调控小 RNA 大量产生, 这样小 RNA 就可以竞争性地与调控蛋白结合, 从而解除调控蛋白对 mRNA 的抑制, *phlACBD* 得以大量表达, 2,4-DAPG 产量升高。真菌平板拮抗试验 (图未给出) 及红色素表型都佐证了以上推测。

*retS* 缺失后 RsmA 转录表达有所增强, 这与 *retS* 缺失后 2,4-DAPG 合成量升高的表型相悖。一种可能的解释是, *rsmA* 的表达量虽有升高但其升高量有限, 不足以抵消小 RNA 表达量的增加, 所以并不能改变最终抗生素产量升高的表型。

RetS 负调控小 RNA 的转录, 这一结果在其他细菌中也得到了证实<sup>[11,19]</sup>。但是我们的结果进一步发现 RetS 对 3 种小 RNA 调控的程度并不相同, RetS 对 *rsmZ* 和 *rsmX* 的调控明显强于对 *rsmY* 的调控。这说明 3 种小 RNA 在 RetS 调控抗生素合成的

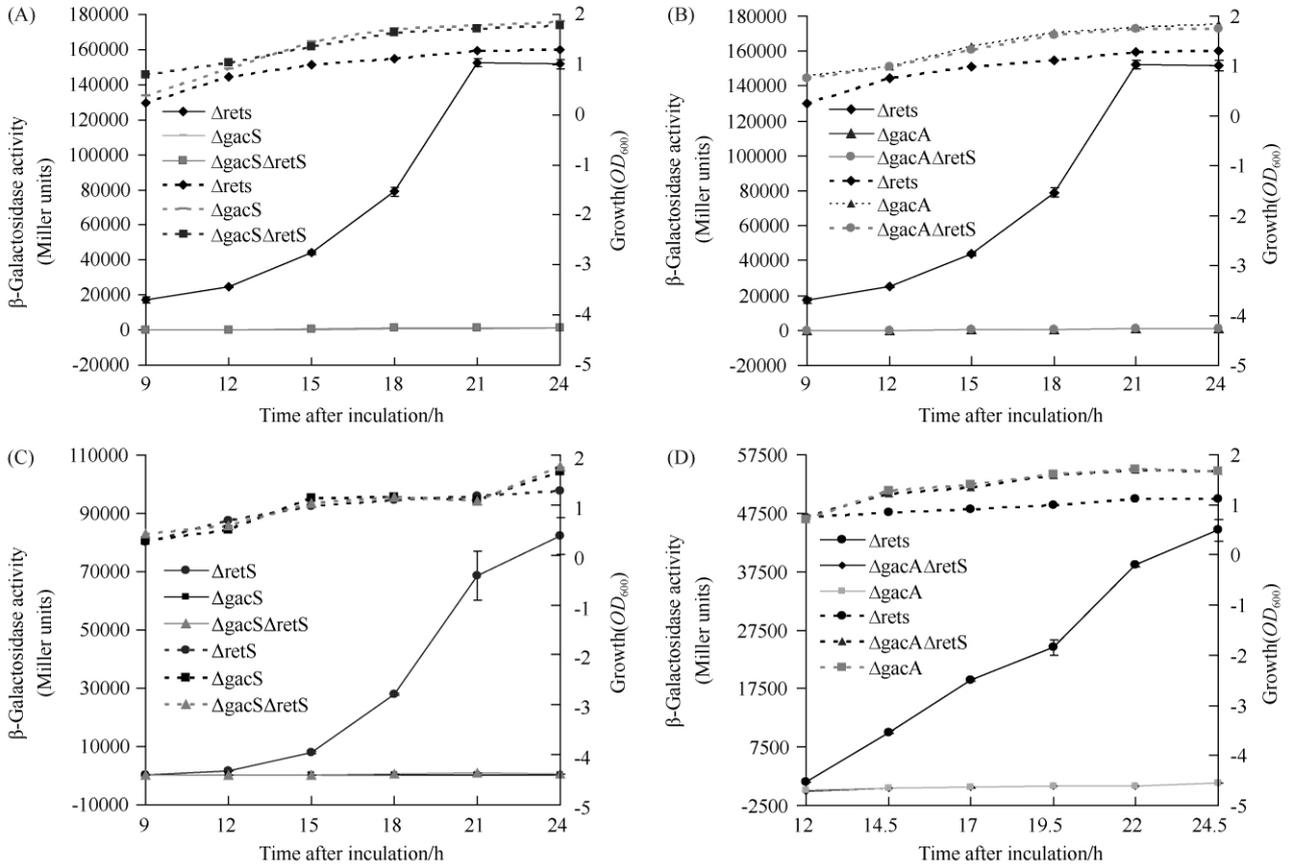


图 5 RetS 对 *rsmX* 和 *rsmZ* 转录的调控依赖于 GacS/GacA 双因子调控系统

Fig. 5 The effect of RetS on transcription of *rsmX* and *rsmZ* was dependent on GacS/GacA two-component regulatory system. (A) / (B) p970Km-rsmXp , (C) / (D) p970Km-rsmZp. Growth was indicated by dotted lines. All experiments were performed in triplicate, and the error bars indicate the standard deviations.

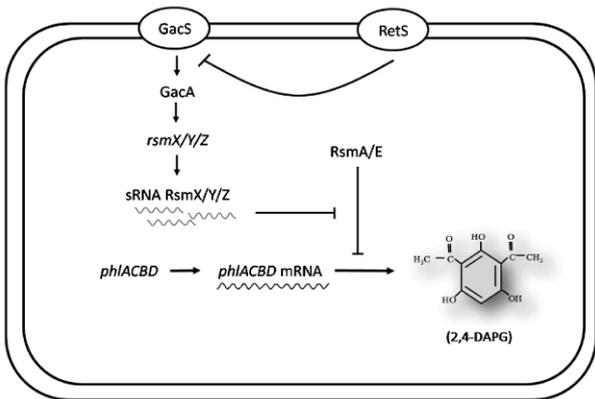


图 6 假单胞菌 2P24 中 RetS 通过 Gac/Rsm 系统负调控 2,4-DAPG 合成的示意图

Fig.6 RetS negatively regulates the production of antibiotic 2,4-DAPG through the Gac/Rsm pathway in *P. fluorescens* 2P24.

过程中所发挥的作用可能并不完全相同。在 *P. fluorescens* CHA0 中,过量表达 *rsmY* 或 *rsmZ* 可以补

偿由 *gacS* 或 *gacA* 缺失所造成的对下游基因表达的影响,而在 *rsmX/rsmY/rsmZ* 3 基因缺失突变体中过量表达 *rsmX* 可以在一定程度上补偿 3 基因缺失对下游基因表达所造成的影响<sup>[20-21]</sup>。另外,3 种小 RNA 对 RsmA 和 RsmE 的结合能力基本相同,依此推断它们在功能上应该是冗余的<sup>[22]</sup>。但是它们的表达时期却存在着差异:*rsmX* 和 *rsmY* 的表达会随着细菌生长而增加,而 *rsmZ* 在生长后期才表达<sup>[22]</sup>,从这一方面来看三者的功能可能是有差别的。这也为我们之前的推测提供了一定的依据,而至于 3 种小 RNA 具体的功能还有待于进一步的研究。

参考文献

[1] Wei HL, Wang Y, Zhang LQ, Tang WH. Identification and characterization of biocontrol bacterial strain 2P24 and CPF-10. *Acta Phytopathologica Sinica*, 2004, 34 (1) : 80-85. (in Chinese) .

- 魏海雷, 王焯, 张力群, 唐文华. 生防菌株 2P24 与 CPF-10 的鉴定及其生防相关性状的初步分析. 植物病理学报, 2004, 34 (1): 80-85.
- [2] Wei HL, Zhou HY, Zhang LQ, Wang Y, Tang WH. Experimental evidence on the functional agent of 2, 4-diacetylphloroglucinol in biocontrol activity of *Pseudomonas fluorescens* 2P24. *Acta Microbiologica Sinica*, 2004, 44 (5): 663-666. (in Chinese).
- 魏海雷, 周洪友, 张力群, 王焯, 唐文华. 抗生素 2, 4-二乙酰基间苯三酚作为荧光假单胞菌 2P24 菌株生防功能因子的实证分析. 微生物学报, 2004, 44 (5): 663-666.
- [3] Wei HL, Zhou HY. Cloning and functional characterization of the *gacS* gene of the biocontrol strain *Pseudomonas fluorescens* 2P24. *Acta Microbiologica Sinica*, 2005, 45 (3): 368-372. (in Chinese).
- 魏海雷, 张力群. 荧光假单胞杆菌 2P24 中生防相关调控基因 *gacS* 的克隆和功能分析. 微生物学报, 2005, 45 (3): 368-372.
- [4] Yan XX, Zhang LQ, Yang WZ, Tang WH. The role of regulatory gene *gacA* in the suppression of soil-borne diseases by *Pseudomonas fluorescens* 2P24. *Acta Phytopathologica Sinica*, 2004, 34 (3): 272-279. (in Chinese).
- 闫小雪, 张力群, 杨之为, 唐文华. 调控基因 *gacA* 在荧光假单胞菌 2P24 防治土传病害中的作用. 植物病理学报, 2004, 34 (3): 272-279.
- [5] Brenic A, Mcfarland KA, Mcmanus HR, Castang S, Mogno I, Dove SL, Lory S. The GacS/GacA signal transduction system of *Pseudomonas aeruginosa* acts exclusively through its control over the transcription of the RsmY and RsmZ regulatory small RNAs. *Molecular Microbiology*, 2009, 73 (3): 434-445.
- [6] Heeb S, Haas D. Regulatory roles of the GacS/GacA two-component system in plant-associated and other gram-negative bacteria. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2001, 14 (12): 1351-1363.
- [7] Haas D, D'efago G. Biological control of soil-borne pathogens by fluorescent pseudomonads. *Nature Reviews Microbiology*, 2005, 3 (4): 307-319.
- [8] Wang SL, Geng HF, Sun L, Zang XH, Xu YQ. Construction of *Pseudomonas fluorescent sp.* M18 *rsmA*-mutant and its different regulation on biosynthesis of PCA and Plt. *Acta Microbiologica Sinica*, 2004, 44 (2): 189-193. (in Chinese).
- 王素莲, 耿海峰, 孙雷, 张雪洪, 许煜泉. 假单胞菌 M18 *rsmA*-突变株的构建及其对 Plt 和 PCA 合成的区别性调控作用. 微生物学报, 2004, 44 (2): 189-193.
- [9] Bangera MG, Thomashow LS. Identification and characterization of a gene cluster for synthesis of the polyketide antibiotic 2, 4-diacetylphloroglucinol from *Pseudomonas fluorescens* Q2-87. *Journal of Bacteriology*, 1999, 181 (10): 3155-3163.
- [10] Goodman AL, Kulasekara B, Rietsch A, Boyd D, Smith RS, Lory S. A signaling network reciprocally regulates genes associated with acute infection and chronic persistence in *Pseudomonas aeruginosa*. *Developmental Cell*, 2004, 7 (5): 745-754.
- [11] Goodman AL, Merighi M, Hyodo M, Hyodo M, Ventre I, Filloux A, Lory S. Direct interaction between sensor kinase proteins mediates acute and chronic disease phenotypes in a bacterial pathogen. *Genes & Development*, 2009, 23 (2): 249-259.
- [12] Workentine ML, Chang L, Ceri H, Turner RJ. The GacS-GacA two-component regulatory system of *Pseudomonas fluorescens*: a bacterial two-hybrid analysis. *FEMS Microbiology Letters*, 2009, 292 (1): 50-56.
- [13] Maniatis T, Fritsch EF, Sambrook J. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1982.
- [14] Kovach ME, Elzer PH, Hill DS, Robertson GT, Farris MA, Roop RM 2nd, Peterson KM. Four new derivatives of the broad-host-range cloning vector pBBR1MCS, carrying different antibiotic-resistance cassettes. *Gene*, 1995, 166 (1): 175-176.
- [15] Jiang WF, Wu XG, Yan Q, Zhang LQ. Regulation of *gacA*, *dsbA* and *phoP/phoQ* genes on the transcription of small RNA Gene RsmZ in *Pseudomonas fluorescens* 2P24. *Acta Microbiologica Sinica*, 2008, 48 (12): 1588-1594. (in Chinese).
- 姜维芳, 吴小刚, 闫庆, 张力群. 荧光假单胞菌 2P24 中 *gacS*、*dsbA* 和 *phoP/phoQ* 基因对小 RNA 因子 RsmZ 的转录调控. 微生物学报, 2008, 48 (12): 1588-1594.
- [16] Wei HL, Zhang LQ. Quorum-sensing system influences root colonization and biological control ability in *Pseudomonas fluorescens* 2P24. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 2006, 89 (2): 267-280.
- [17] Shanahan P, O'Sullivan DJ, Simpson P, Simpson P, Glennon JD, O'gara F. Isolation of 2, 4-diacetylphloroglucinol from a fluorescent pseudomonad and investigation of physiological parameters influencing its production. *Applied and Environmental Microbiology*, 1992, 58 (1): 353-358.

- [18] Miller JH. Experiments in Molecular Genetics. Cold Spring Harbor. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1972.
- [19] Humair B, González N, Mossialos D, Reimann C, Haas D. Temperature-responsive sensing regulates biocontrol factor expression in *Pseudomonas fluorescens* CHA0. *The ISME Journal*, 2009, 3 (8) : 955-965.
- [20] Heeb S, Blumer C, Haas D. Regulatory RNA as mediator in GacA/RsmA-dependent global control of exoproduct formation in *Pseudomonas fluorescens* CHA0. *Journal of Bacteriology*, 2002, 184 (4) : 1046-1056.
- [21] Valverde C, Heeb S, Keel C, Haas D. RsmY, a small regulatory RNA, is required in concert with RsmZ for GacA-dependent expression of biocontrol traits in *Pseudomonas fluorescens* CHA0. *Molecular Microbiology*, 2003, 50 (4) : 1361-1379.
- [22] Kay E, Dubuis C, Haas D. Three small RNAs jointly ensure secondary metabolism and biocontrol in *Pseudomonas fluorescens* CHA0. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2005, 102 (47) : 17136-17141.

## Effect of *retS* gene on biosynthesis of 2, 4-diacetyl-phloroglucinol in *Pseudomonas fluorescens* 2P24

Jiucheng Liu, Wei Zhang, Xiaogang Wu, Liqun Zhang\*

Department of Plant Pathology, China Agricultural University; Key Laboratory of Plant Pathology, Ministry of Agriculture; Beijing 100193, China

**Abstract:** Regulator of exopolysaccharide and type III secretion (RetS) is a hybrid sensor kinase/response regulator protein located on bacterial membrane, and essential for expression of numerous genes. In *Pseudomonas aeruginosa*, RetS modulates the phosphorylation state of another kinase GacS via a direct interaction. **[Objective]** The goal of this study is to study the effect of *retS* on the antibiotic 2,4-diacetyl-phloroglucinol (2,4-DAPG) production in *P. fluorescens* 2P24. **[Methods]** Production of 2,4-DAPG in strain 2P24 and its mutants was quantified by HPLC. To determine the effect of RetS on the Gac/Rsm pathway, the promoters of the small RNA genes *rsmX/rsmY/rsmZ* and regulatory genes *rsmA/rsmE* in the Rsm pathway were fused with a promoterless *lacZ*, and the promoter activities were measured in 2P24 and the *retS*-deficient mutants. **[Results]** Genetic inactivation of the *retS* in strain 2P24 increased the production of an uncharacterized red pigment and the antibiotic 2,4-DAPG. RetS negatively regulated the transcription of the small RNAs RsmX and RsmZ. In the *retS* and *gacS* double mutant or the *retS* and *gacA* double mutant, all the phenotypic changes caused by the *retS* deletion were reversed to the level of *gacS* or *gacA* single gene mutant. **[Conclusion]** In *P. fluorescens* 2P24, RetS negatively regulates the production of antibiotic 2,4-DAPG through the Gac/Rsm pathway.

**Keywords:** *Pseudomonas*, 2,4-diacetylphloroglucinol, RetS, Gac/Rsm

(本文责编:王晋芳)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (31071725, 30871666) and by the National Programs for High Technology Research and Development of China (2011AA10A205)

\* Corresponding author. Tel/Fax: +86-10-62731464; E-mail: zhanglq@cau.edu.cn

Received: 26 August 2012/Revised: 16 November 2012