

研究报告

绿针假单胞菌 GP72 中 *aurI/aurR* 系统调控功能

马润亭 郭树奇 王威 张雪洪*

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:【背景】绿针假单胞菌(*Pseudomonas chlororaphis*) GP72 是一株可生产吩嗪类抗生素吩嗪-1-羧酸(PCA)和 2-羟基吩嗪(2-OH-PHZ)的生防根际促生菌。基因组比对发现 GP72 菌中存在 *aurI/aurR* 二元调控系统。【目的】研究该系统对 GP72 中吩嗪类物质的调控作用。【方法】将 *aurI* 基因在大肠杆菌中异源表达,用紫色杆菌 CV026 和根癌农杆菌 NTL4 做显色实验。构建基因敲除菌株和回补菌株,发酵测量突变株的生长曲线与总吩嗪产量。构建转录融合质粒,测定吩嗪合成基因启动子的转录水平。【结果】显色实验显示, *aurI* 能产生多种信号分子,使 CV026 显紫色、NTL4 显蓝色。分别单独敲除 *aurI* 和 *aurR* 基因,同时敲除 *aurI/aurR* 基因,吩嗪产量均会升高,而回补菌株吩嗪产量降为野生型水平。 β -半乳糖苷酶活性测定结果显示,突变株的酶活比野生型高。【结论】*aurI/aurR* 负调控 GP72 的吩嗪合成,通过抑制吩嗪合成启动子的转录而影响吩嗪类物质的产量。

关键词: 绿针假单胞菌 GP72, *aurI/aurR* 二元调控系统, 吩嗪类化合物, 群体感应

aurI/aurR system regulatory function in *Pseudomonas chlororaphis* GP72

MA Run-Ting GUO Shu-Qi WANG Wei ZHANG Xue-Hong*

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

Abstract: [Background] *Pseudomonas chlororaphis* GP72 is a rhizobacterium that could produce phenazine antibiotics containing phenazine-1-carboxylic acid (PCA) and 2-hydroxyphenazine (2-OH-PHZ). Based on analyzing the whole-genome sequence, *aurI/aurR* regulatory system was found existed in GP72. [Objective] This article aims to study the regulation of *aurI/aurR* on phenazine production in GP72. [Methods] The *aurI* gene was heterologously expressed in *Escherichia coli*, then *Chromobacterium violaceum* CV026 and *Agrobacterium tumefaciens* NTL4 were used in plate assays. The knockout strains and complemental strains of *aurI* and *aurR* were constructed, and the growth curve and phenazine production of mutants were measured by fermentation. A transcriptional fusion plasmid was used to assess transcription level of promoter of phenazine synthesis gene cluster. [Results] The results of plate assays showed that *aurI* could produce a variety of signal molecules that could produce blue pigment in NTL4 and purple pigment in CV026. Fermentation results showed phenazine production of knock-out

Foundation item: National Natural Science Foundation of China (31670033)

*Corresponding author: Tel: 86-21-34204854; E-mail: xuehzhong@sjtu.edu.cn

Received: 27-03-2018; Accepted: 08-05-2018; Published online: 08-06-2018

基金项目: 国家自然科学基金(31670033)

*通信作者: Tel: 021-34204854; E-mail: xuehzhong@sjtu.edu.cn

收稿日期: 2018-03-27; 接受日期: 2018-05-08; 网络首发日期: 2018-06-08

gene mutants were raised four times, and phenazine production of the complemental strains of *aurI* and *aurR* were reduced to the wild type level. It was found that the β -galactosidase activity fused with promoter of phenazine synthesis genes in the knock out strains were higher than that of the wild type. **[Conclusion]** *aurI/aurR* is a pair of negative regulation genes for phenazine in GP72. It could inhibit the transcription level of promoter of phenazine synthesis gene cluster, thereby affecting phenazine production.

Keywords: *Pseudomonas chlororaphis* GP72, *aurI/aurR* regulatory system, Phenazine, Quorum sensing

吩嗪类化合物是一类含氮的杂环化合物,属于芳香族次级代谢产物,天然吩嗪类化合物具有广谱抑菌活性,这类抗生素具有环境兼容性好、毒性低等特点,大多具有良好的应用前景^[1-2]。假单胞菌属(*Pseudomonas*)是最早被发现的吩嗪类化合物产生菌,同时也是自然界中天然吩嗪类化合物的主要来源之一。假单胞菌来源的吩嗪次级代谢产物主要有吩嗪-1-羧酸(PCA)、1-羟基吩嗪(1-OH-PHZ)、2-羟基吩嗪(2-OH-PHZ)、绿脓菌素(PYO)以及吩嗪-1-酰胺(PCN)等^[3],先由保守的吩嗪合成基因簇 *phzABCDEFG* 合成 PCA,再经修饰基因作用合成其他吩嗪类衍生物^[4-5]。

吩嗪类化合物的生物合成普遍是以莽草酸代谢途径的终产物分支酸为起点^[3],其生物合成受到复杂的调控网络调控,随着人们对吩嗪类化合物生产菌株的深入研究,发现主要存在二元调控系统、群体感应系统、小 RNA 控制的转录后调控等^[6]。二元调控系统在吩嗪类化合物的合成中起着关键作用,典型的二元调控系统包括一个跨膜蛋白激酶和一个细胞质内调节蛋白两部分,蛋白激酶感应外界环境的变化,进而调控相关基因的表达^[7],例如 GacA/GacS、RpeB/RpeA、CzcR/CzcS 等。群体感应(Quorum sensing, QS)是细菌数量达到一定数目才会发生的感应现象,一般情况下由信号分子合成酶 LuxI 合成信号分子(Acyl-homoserine lactone, AHL),AHL 可以由细胞内向外扩散,随着菌体密度的不断增加,信号分子浓度超过一定的阈值时,能够与转录调控蛋白 LuxR 形成复合物,从而启动下游基因的表达^[8]。

绿针假单胞菌 GP72 是一株分离自上海郊区的

甜椒根际土壤的吩嗪类化合物产生菌,主要产生 PCA 和 2-OH-PHZ,具有生长迅速、环境友好等特点,是一株很好的生防菌株^[9]。相关文献^[10-12]表明,假单胞菌中存在 *aurI/aurR* 二元调控系统,属于一对群体感应基因。目前该系统只在 *Pseudomonas chlororaphis* subsp. *aurantiaca* StFRB508 (StFRB508) 和 *Pseudomonas chlororaphis* subsp. *aurantiaca* PB-St2 (PB-St2)中有过报道^[10-12]。*aurI* 可以产生多种信号分子 AHL,与 AurR 蛋白结合共同调控次级代谢产物吩嗪的合成。信号分子可用指示菌紫色杆菌(*Chromobacterium violaceum*) CV026 和根癌农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*) NTL4 检测。通过基因组比对发现,GP72 中存在 *aurI/aurR* 二元调控系统,本文研究该二元调控系统在 GP72 中的调控作用。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株、质粒及引物

研究所用的菌株、质粒及引物见表 1。

1.1.2 培养基和菌株生长条件

LB 培养基(g/L): 胰蛋白胨 10.0, 酵母提取物 5.0, NaCl 10.0。固体培养基加琼脂 15.0 g/L。

KB 培养基(g/L): 蛋白胨 20.0, 甘油 15.0 mL, MgSO₄ 0.732, K₂HPO₄ 0.514。固体培养基加琼脂 15.0 g/L。

MM 培养基(g/L): KH₂PO₄ 4.5, K₂HPO₄ 10.5, 甘露醇 2.0, 硫酸铵(NH₄)₂SO₄ 2.0, 七水合硫酸镁 0.16, 再加入 5 mg/mL 七水合硫酸亚铁 1 mL, 11 mg/mL 二水合氯化钙 1 mL, 2 mg/mL 四水合氯化锰 1 mL。1/2LB 为各成分减为原来的一半配制。

表 1 菌株、质粒及引物

Table 1 Strains, plasmids and primers

Materials	Genotype, relevant characteristics and sequence (5'→3')	Source
<i>E. coli</i>		
DH5 α	<i>E. coli</i> F- Φ 80lacZ Δ M15 Δ (<i>lacZYA-argF</i>) U169 <i>recA1 endA1 hsdR17</i> (rk-mk-) <i>phoA supE44 thi</i> ⁻¹ <i>gyrA96 relA1</i>	Lab stock
<i>S17-1</i> (λ <i>pir</i>)	res- pro mod+ integrated copy of RP4, mob+, used for incorporating constructs into <i>P. chlororaphis</i>	Lab stock
Strains		
GP72	<i>P. chlororaphis</i> GP72 wild-type strain	Lab stock
GP72 Δ <i>aurI</i>	<i>aurI</i> in-frame deletion mutant of GP72	This study
GP72 Δ <i>aurR</i>	<i>aurR</i> in-frame deletion mutant of GP72	This study
GP72 Δ <i>aurI</i> Δ <i>aurR</i>	<i>aurI/aurR</i> in-frame deletion mutant of GP72	This study
Plasmids		
pBbB5K-GFP	pBBR1; Km ^r <i>lacI</i> Plac-UV5	Lab stock
pBbB5K- <i>aurI</i>	Plasmid for <i>aurI</i> heterologous expression	This study
pBbB5K- <i>aurR</i>	Plasmid for <i>aurR</i> heterologous expression	This study
pK18mobsacB	Broad-host-range gene replacement vector, <i>sacB</i> , Km ^r	Lab stock
pK18- <i>aurI</i>	pK18mobsacB containing <i>aurI</i> flanking region	This study
pK18- <i>aurR</i>	pK18mobsacB containing <i>aurR</i> flanking region	This study
pK18- <i>aurI/aurR</i>	pK18mobsacB containing <i>aurI/aurR</i> flanking region	This study
pME6522	pVS1-p15A shuttle vector for constructing the transcriptional <i>lacA</i> fusion, Tc ^r	Lab stock
pME6522- <i>phz</i>	pME6522 containing promoter region of phenazine synthesis gene cluster	Lab stock
Primers		
<i>GaurIF</i>	ATGGATAGTCGACTAAAATACTCGG	This study
<i>GaurIR</i>	TCAGAGGATGCCCTGGCG	This study
<i>AurIF1</i>	TAACCAGTTACAACCACCCGG	This study
<i>AurIR1</i>	CGCAGGCCATACAAAATCGG	This study
<i>AurIF2</i>	CGCCTGAATCAGAGGATGCC	This study
<i>AurIR2</i>	GCGAAGTGGCCCCTCTTATT	This study
<i>AurRF1</i>	ACGAGCGCACCTACCT	This study
<i>AurRR1</i>	GCCAGGGCATCCTCTGATT	This study
<i>AurRF2</i>	TCGACTATCCATGTCATGAGCTC	This study
<i>AurRR2</i>	TACAGCCAGATTGCCGCC	This study
<i>AurIRF1</i>	TAACCAGTTACAACCACCCGG	This study
<i>AurIRR1</i>	AGTCGAGCGCGTGAAATT	This study
<i>AurIRF2</i>	TCGACTATCCATGTCATGAGC	This study
<i>AurIRR2</i>	GGAACCCGATCTCGATCAT	This study

Note: ^r: Antibiotics-resistant; Km: Kanamycin; Tc: Tetracycline.

高压蒸汽 1×10^5 Pa 灭菌 30 min。培养基中抗生素浓度(mg/L): 氨苄霉素(Amp) 100, 卡那霉素(Km) 50, 庆大霉素(Gm) 100, 四环素(Tc) 30。

大肠杆菌在 37 °C、200 r/min 培养, 假单胞菌在 28 °C、180 r/min 培养。根癌农杆菌 NTL4 和紫色杆菌 CV026 均在 28 °C 条件下培养。

1.1.3 主要试剂和仪器

Taq DNA 聚合酶、Solution I 连接酶、KOD-Plus-Neo 高保真聚合酶、各种限制性内切酶、DNA Marker, TaKaRa 公司; DNA 纯化试剂盒、质粒抽提试剂盒、基因组 DNA 提取试剂盒, 北京全式金生物技术有限公司; IPTG、X-gal、抗生素、乙腈, 生工生物工程(上海)股份有限公司。

旋转蒸发仪, 上海亚荣生化仪器厂; 安捷伦 HPLC、分析柱为反相 C18 色谱柱, 安捷伦公司。

1.1.4 引物和 PCR 反应

根据绿针假单胞菌 GP72 基因组序列设计引物(表 1), 委托上海华津生物技术有限公司合成。以克隆 *aurI* 基因为例, GP72 基因组为模板, 通过 PCR 扩增全长的 *aurI* 基因的编码序列。片段扩增用 KOD-Plus-Neo 高保真聚合酶。PCR 反应体系(50.0 μ L): GP72 基因组模板(10 mg/L) 0.5 μ L, KOD 酶(1 U/ μ L) 1 μ L, 10 \times Buffer 5 μ L, MgCl₂ 3 μ L, dNTPs (2.5 mmol/L) 5 μ L, 引物 F 和 R (10 μ mol/L) 各 1.5 μ L, DMSO 1.5 μ L, 加双蒸水 31 μ L。PCR 反应条件: 94 °C 30 min; 94 °C 10 s, 58 °C 30 s(退火温度比 T_m 值低 3 °C), 68 °C 50 s(1 min/kb, 根据片段长度设置延伸时间), 30 个循环; 68 °C 10 min。

1.2 方法

1.2.1 构建异源表达的大肠杆菌 pBbB5K-*aurI*

以 GP72 基因组为模板, 设计克隆 *aurI* 的一对引物(表 1 中 *GaurIF* 及 *GaurIR*), 通过 PCR 扩增目的基因 *aurI* 的序列, 克隆片段与 pBbB5K 质粒分别用限制性内切酶 *EcoR* I 与 *Xho* I 进行双酶切, 接下来用 Solution I 酶连接过夜, 构建表达质粒 pBbB5K-*aurI*。将表达质粒转化大肠杆菌 DH5a 感

受态细胞, 在 LB 平板上涂板, 培养过夜。挑取白色克隆, PCR 验证, PCR 产物测序。其中基因组提取、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北京全式金生物技术有限公司相关试剂盒说明书进行, DNA 测序委托上海桑尼生物科技有限公司完成。

1.2.2 信号分子的萃取及报告菌株的检测

将包含表达质粒 pBbB5K-*aurI* 的大肠杆菌 DH5a 接种过夜培养, 取适量菌液转接至 100 mL 的 LB 发酵瓶中, 加卡那霉素 100 μ L, 16 °C、180 r/min 培养至 OD_{600} 为 0.1 后加 100 μ L 诱导剂 IPTG。再将温度调至 37 °C、180 r/min 发酵培养 16 h。取所有发酵液以 12 000 r/min 离心 10 min 去除菌体。用 3 倍体积的乙酸乙酯萃取上清液 2 次, 旋转蒸发仪蒸干浓缩, 放通风橱中干燥, 再用 1 mL 乙腈溶解, 12 000 r/min 离心 5 min 去除沉淀, 置于 -20 °C 保存。

分别挑选活化过的 NTL4 和 CV026 单菌落至 LB 液体培养基中 28 °C、180 r/min 培养过夜。再分别取 100 mL 的 MM 固体培养基和 1/2LB 固体培养基融化, 温度降至 45 °C 左右, 当 NTL4 和 CV026 长至 OD_{600} 为 4.0-5.0 时, 分别将 10 mL 菌液全部加入 MM 培养基和 1/2LB 培养基, 混合均匀倒平板。平板在超净台中打孔, 发酵液蒸干样品用乙腈溶解, 取 20 μ L 加入检测平板的孔内, 20 μ L 乙腈作为阴性对照。在 28 °C 培养箱中培养 36 h, 观察平板颜色变化^[13-14]。

1.2.3 无痕敲除 *aurI*、*aurR*、*aurI/aurR* 基因片段

敲除方法以 *aurI* 基因为例, 无痕敲除通过同源重组实现。在 *aurI* 基因的上下游分别取大约 500 bp 的片段作为上下游同源臂, 各设计一对引物。以 GP72 基因组为模板, 分别扩增上下游同源臂; 再以上下游同源臂为模板, 扩增融合 PCR 产物, 该 PCR 片段为上下游同源臂的融合片段, 不包含 *aurI* 基因。融合片段和 pK18 质粒酶切酶连, 方法同异源表达质粒的构建, 测序验证得到敲除质

粒 pK18-*aurI*。接下来敲除质粒转化到 *E. coli* S17 中, 以此作为供体菌, GP72 野生型菌株作为受体菌, 在无抗平板上共培养。质粒 pK18-*aurI* 转入 GP72 后, 不能在染色体外自主复制, 可与 GP72 基因组发生同源重组。用含 Amp 和 Km 抗生素的双抗性平板筛选单交换菌株, 再在含 10% 蔗糖的 LB 平板上促使其完成双交换, 点板法将蔗糖平板上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, 即为发生双交换的菌株, PCR 验证。无痕敲除 *aurR*、*aurI/aurR* 基因片段方法类似。

1.2.4 构建突变株的回补菌株

构建表达质粒 pBbB5K-*aurI*、pBbB5K-*aurR*, 制备 GP72 Δ *aurI*、GP72 Δ *aurR* 电转感受态。通过电击转化将表达质粒分别转入对应敲除株, 空质粒 pBbB5K 电转 GP72 Δ *aurI*、GP72 Δ *aurR* 作为对照, 发酵测定回补菌株的总吩嗪产量。质粒 pBbB5K 需要诱导才能启动表达, 开始发酵 4 h 后, 菌液 OD_{600} 在 0.4–0.6 之间, 添加诱导剂 IPTG 至终浓度为 1 mmol/L。

1.2.5 突变菌株和回补菌株生长曲线及总吩嗪产量的测定

OD_{600} 值的测定、吩嗪类化合物(含 PCA、2-OH-PHZ)的萃取和 HPLC 测定方法参照文献[15]。分别将野生型菌株和突变菌株在 KB 培养基中活化, 接种后培养过夜, 再接入发酵瓶发酵培养, 发酵条件为 28 °C、180 r/min。每隔 12 h 取样, 测菌液 OD_{600} 值, 发酵液 12 000 r/min 离心 5 min,

取上清液, 用乙酸乙酯萃取上清液中的吩嗪类化合物, 高效液相色谱(HPLC)分析, 测定吩嗪类化合物的总含量。每个样品设 3 个平行。

1.2.6 β -半乳糖苷酶活性的测定

质粒 pME6522 上存在编码 β -半乳糖苷酶的 *LacZ* 基因。将吩嗪合成基因簇的启动子通过酶切酶连在 *LacZ* 基因的上游, 构建转录融合质粒 pME6522-*phz*, 如图 1 所示。野生型 GP72、GP72 Δ *aurI*、GP72 Δ *aurR* 中的 β -半乳糖苷酶活性可以反映吩嗪合成基因启动子的表达水平。通过测定酶活, 研究 *aurI/aurR* 二元系统对吩嗪合成基因启动子的调控作用。酶活测定按照文献[16]方法进行, 每个样品设 3 个平行。

2 结果与分析

2.1 *aurI* 基因合成信号分子的显色情况

为了研究菌株 GP72 中 *aurI* 信号分子的合成情况, 构建了 *aurI* 的异源表达质粒, 在大肠杆菌 DH5 α 表达后萃取其发酵液。用报告菌株 NTL4 和 CV026 平板检测, NTL4 可以检测长链信号分子, CV026 可以检测短链信号分子。实验结果如图 2 所示。*aurI* 产生的信号分子能使 NTL4 平板变蓝色, CV026 平板变紫色, 证明 *aurI* 基因能同时产生长链信号分子和短链信号分子, 乙腈对照组平板周围均无变色。

2.2 GP72 无痕敲除 *aurI*、*aurR*、*aurI/aurR* 片段

相关文献^[10-11]研究表明 *aurI/aurR* 是存在于假

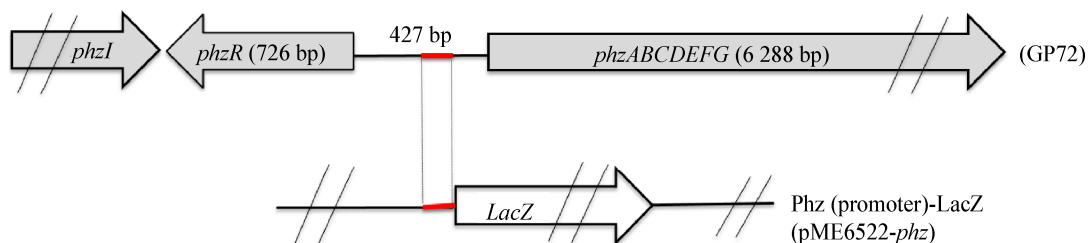


图 1 pME6522-*phz* 转录融合质粒构建示意图

Figure 1 Sketch map of the constructing translational fusion plasmid pME6522-*phz*

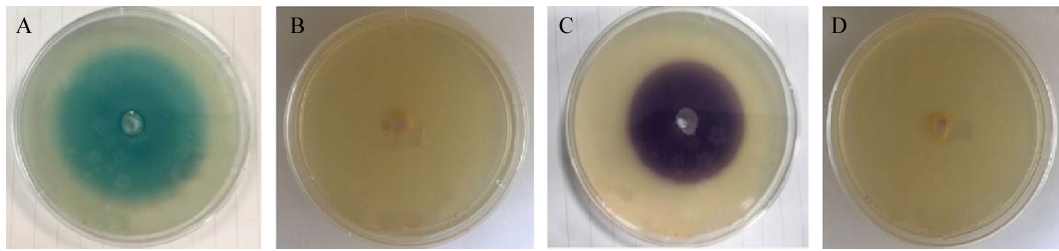


图 2 MM 培养基中 NTL4 指示菌显色(A)和空白对照组(B), 1/2LB 培养基中 CV026 指示菌显色(C)和空白对照组(D)
Figure 2 NTL4 indicator bacteria in MM medium (A) and blank control group (B), CV026 indicator bacteria in 1/2LB medium (C) and blank control group (D)

单胞菌中的另一组群体感应元件,在绿针假单胞菌 StFRB508 中 *aurI* 对次级代谢产物产量无明显影响。为了研究绿针假单胞菌 GP72 中该二元调控系统对次级代谢产物吩嗪的调控作用,构建了敲除突变株 GP72 Δ *aurI*、GP72 Δ *aurR*、GP72 Δ *aurI* Δ *aurR*。以上游同源臂的 F 端引物和下游同源臂的 R 端引物进行 PCR 验证,敲除突变株的 PCR 产物条带更小,结果如图 3 所示。

2.3 敲除突变株的生长和总吩嗪产量测定

假单胞菌 GP72 产生的吩嗪类抗生素主要有

PCA 和 2-OH-PHZ。通过对突变菌株的发酵研究了 *aurI/aurR* 对于菌株生长及次级代谢产物 PCA 和 2-OH-PHZ 合成的影响。结果如图 4 所示,突变株的生长情况和野生型无异,说明 *aurI/aurR* 对菌株的生长无明显影响,*aurI* 基因产生的信号分子和 AurR 蛋白结合调控吩嗪基因簇的表达,不影响其生长。当单独敲除 *aurI*、*aurR* 或者同时敲除 *aurI/aurR*, 突变株的吩嗪产量均有明显提高,约是野生型的 4 倍。

2.4 回补菌株的生长和吩嗪产量测定

为了确定突变株的吩嗪产量升高是由敲除 *aurI*、

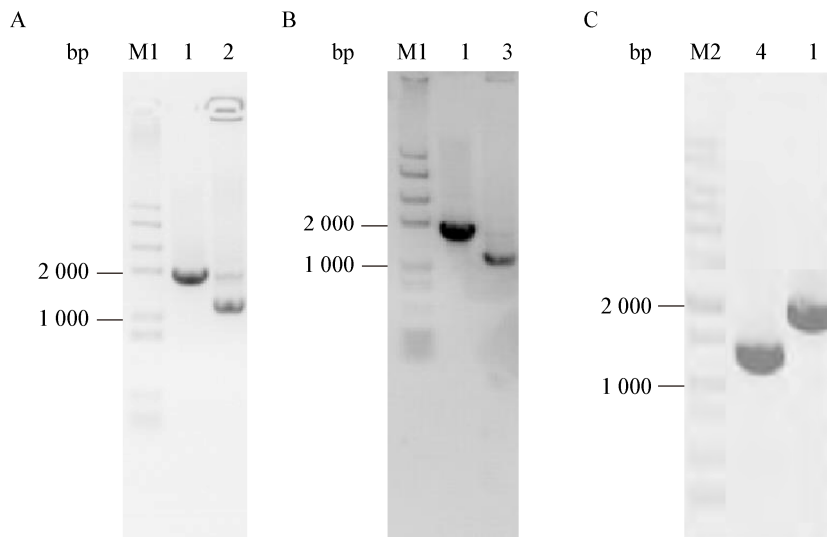


图 3 敲除株 GP72 Δ *aurI* (A)、GP72 Δ *aurR* (B)、GP72 Δ *aurI* Δ *aurR* (C)的电泳验证图谱

Figure 3 Verification of GP72 Δ *aurI* (A), GP72 Δ *aurR* (B), GP72 Δ *aurI* Δ *aurR* (C) by PCR

注: M1: DL8000 marker; M2: DL10000 marker; 1: 野生型; 2: 敲除株 GP72 Δ *aurI*; 3: 敲除株 GP72 Δ *aurR*; 4: 敲除株 GP72 Δ *aurI* Δ *aurR*。

Note: M1: DL8000 marker; M2: DL10000 marker; 1: Wild type; 2: GP72 Δ *aurI* mutant; 3: GP72 Δ *aurR* mutant; 4: GP72 Δ *aurI* Δ *aurR* mutant.

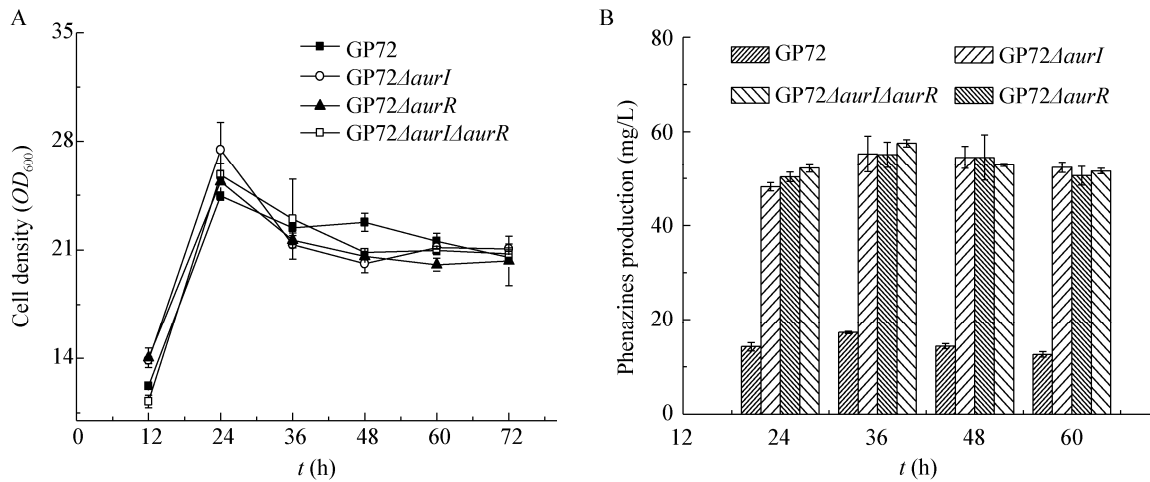


图4 GP72、GP72 Δ aurI、GP72 Δ aurR、GP72 Δ aurI Δ aurR 菌株生长曲线(A)及吩嗪类抗生素的产量(B)
Figure 4 Cell growth (OD_{600}) (A) and phenazines production (B) of the wild-type GP72, mutant strains GP72 Δ aurI, GP72 Δ aurR, and GP72 Δ aurI Δ aurR

aurR 引起的, 将表达质粒 pBbB5K-aurI、pBbB5K-aurR 分别电转入对应敲除株 GP72 Δ aurI、GP72 Δ aurR, 得到回补菌株 GP72AI/RI、GP72AR/RR, 空质粒 pBbB5K 电转 GP72 Δ aurI、GP72 Δ aurR 的菌株 GP72AI/pBbB5K、GP72AR/pBbB5K 作为对照, 发酵结果如图 5 所示, 回补表达中总吩嗪的产量基本降为野生型水平, 说明吩嗪产量的升高是由 aurI、aurR 的敲除引起的。

2.5 aurI、aurR 对吩嗪基因簇启动子表达的影响

aurI/aurR 对吩嗪合成基因簇转录的调控通过 β -半乳糖苷酶活性反应, 结果图 6 所示。GP72 野生型菌株中酶活大约为 60 Miller unit, 敲除突变株 GP72 Δ aurI、GP72 Δ aurR 中的酶活约是 240 Miller unit, 是野生型的 4 倍左右。说明分别敲除 aurI/aurR 二元调控系统基因都会引起吩嗪

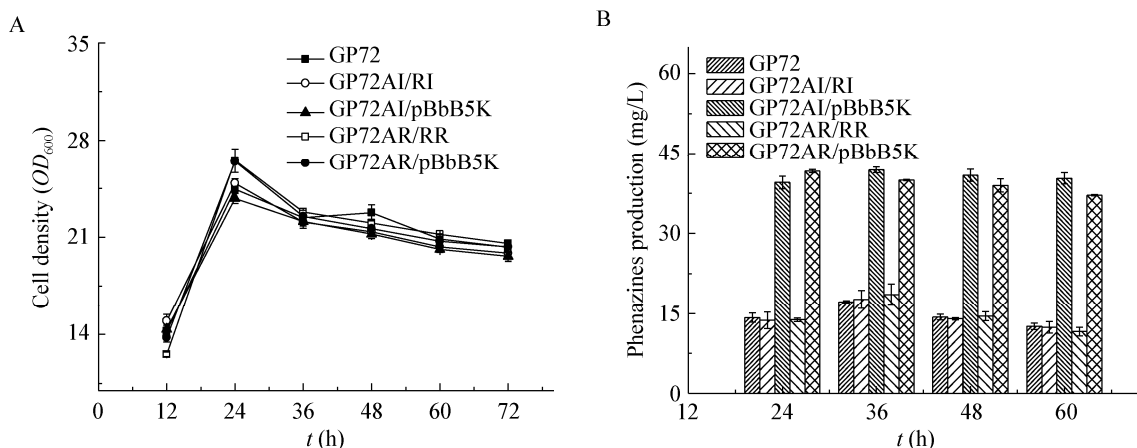


图5 野生型菌株 GP72、回补菌株 GP72AI/RI、GP72AR/RR 生长曲线(A)及吩嗪类抗生素的产量(B)
Figure 5 Cell growth (OD_{600}) (A) and phenazines production (B) of the wild-type GP72, complement strain GP72AI/RI, GP72AR/RR

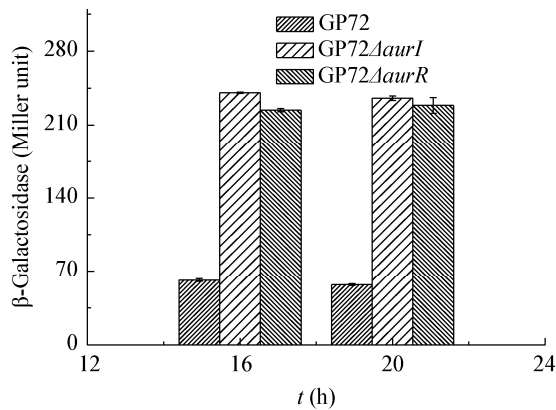


图6 *aurI/aurR* 对吩嗪合成基因簇启动子表达的调控
Figure 6 Regulation of *aurI/aurR* on the expression of phenazine gene cluster

合成基因簇启动子的转录水平升高, 从而引起吩嗪类物质产量的升高。

3 讨论与结论

绿针假单胞菌 GP72 能产生 PCA 和 2-OH-PHZ, 具有很好的生防应用前景, 因此, 研究其合成的调控机制有很大的意义。据文献报道, 假单胞菌 StFRB508 中存在二元调控系统 *aurI/aurR*, 其中 *aurI* 基因能产生信号分子 C6-HSL 和 3-Oxo-C6-HSL^[10-11]。假单胞菌 PB-St2 基因组上 *aurI* 基因可以产生信号分子 C4-HSL、C6-HSL、C8-HSL、3-Oxo-C6-HSL、3-Oxo-C8-HSL^[12]。通过对 GP72 基因组序列比对分析, 发现其基因组上也存在 *aurI/aurR* 系统, 我们的研究表明, 指示菌显色实验证明 *aurI* 基因可以产生信号分子。液质联用高分辨质谱分析显示 *aurI* 基因产生信号分子 C5-HSL、C6-HSL、3-OH-C8-HSL、3-Oxo-C6-HSL、3-Oxo-C8-HSL (数据未显示)。3 株菌中 *aurI* 基因序列的相似性高于 97%, 且都产生信号分子, 说明 *aurI/aurR* 系统在假单胞菌中是相对保守的。因信号分子种类和浓度差异, *aurI* 基因的调控途径有所区别。

GP72 和 StFRB508 两菌株的 *aurI* 基因相似性为 97.83%, 氨基酸的相似性为 97%, 但对吩嗪合成的调控方式不同。在 GP72 中分别敲除 *aurI* 和

aurR 基因, 同时敲除 *aurI/aurR* 基因, 次级代谢产物吩嗪类物质产量都升高, 均为野生型的 4 倍左右, 说明 *aurI* 基因产生的 AHL 可能是和 AurR 蛋白直接结合调控下游基因, 进而调控吩嗪的合成, 二者敲除一个或者同时敲除对产物产量的影响是相同的。 β -半乳糖苷酶活性反应实验也说明 *aurI* 和 *aurR* 基因对吩嗪合成的调控作用是一致的, 二者负调控吩嗪的合成。GP72 中 *phzI/phzR* 系统正调控吩嗪合成^[17], *aurI/aurR* 系统负调控吩嗪合成, 两个系统之间是否存在相互作用还有待研究, 但从菌的生长影响分析, *aurI/aurR* 系统对 GP72 的影响不如 *phzI/phzR* 系统。在 StFRB508 中, *aurI/aurR* 和 *phzI/phzR* 二元调控系统均正调控吩嗪物质的产量, 当两个系统同时存在时, *phzI/phzR* 起主要调控作用, *aurI/aurR* 对吩嗪类物质的调控作用很小; 当 *phzI/phzR* 被破坏后, *aurI/aurR* 对吩嗪类物质的影响变大^[10-11]。

假单胞菌中存在着复杂的调控机制, *P. chlororaphis* 449 和 *P. aureofaciens* 30-84 菌株中的二元调控系统 *csaI/csaR* 会影响细胞表面特性^[18-19]。假单胞菌 30-84 的 *rpeA/rpeB* 系统和 *phzI/phzR* 系统互相作用调节吩嗪合成基因的表达^[20]。在 30-84 菌株中, *gacA* 或 *gacS* 基因的缺失不能合成吩嗪类物质, 其通过直接调节 RpoS 及非编码的 sRNA (RsmX、RsmY、RsmZ) 间接调控吩嗪的生产^[21], RsmA 和 RsmE 还会影响诸如 *hcnA*、*phlA*、*aprA* 等次级代谢基因的表达^[22]。本研究初步鉴定了 GP72 菌株中的 *aurI/aurR* 二元调控系统在转录水平上负调控吩嗪合成基因的表达, 相关结果在一定程度上阐释了 GP72 中的调控机制, 为后续进一步研究 *aurI/aurR* 系统和其他二元调控系统的调控关系提供了理论基础, 在此基础上可以将此系统作为遗传改造的靶标, 为构建高产吩嗪及吩嗪衍生物的工程菌株提供理论依据。

REFERENCES

- [1] Chin-A-Woeng TFC, Bloemberg GV, Lugtenberg BJJ. Phenazines

- and their role in biocontrol by *Pseudomonas* bacteria[J]. *New Phytologist*, 2003, 157(3): 503-523
- [2] Pierson III LS, Pierson EA. Metabolism and function of phenazines in bacteria: impacts on the behavior of bacteria in the environment and biotechnological processes[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2010, 86(6): 1659-1670
- [3] Mavrodi DV, Blankenfeldt W, Thomashow LS. Phenazine compounds in *Fluorescent pseudomonas* spp. biosynthesis and regulation[J]. *Annual Review of Phytopathology*, 2006, 44: 417-445
- [4] Delaney SM, Mavrodi DV, Bonsall RF, et al. *phzO*, a gene for biosynthesis of 2-hydroxylated phenazine compounds in *Pseudomonas aureofaciens* 30-84[J]. *Journal of Bacteriology*, 2001, 183(1): 318-327
- [5] Chin-A-Woeng TFC, Thomas-Oates JE, Lugtenberg BJJ, et al. Introduction of the *phzH* gene of *Pseudomonas chlororaphis* PCL1391 extends the range of biocontrol ability of phenazine-1-carboxylic acid-producing *Pseudomonas* spp. strains[J]. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2001, 14(8): 1006-1015
- [6] Heeb S, Blumer C, Haas D. Regulatory RNA as mediator in GacA/RsmA-dependent global control of exoproduct formation in *Pseudomonas fluorescens* CHA0[J]. *Journal of Bacteriology*, 2002, 184(4): 1046-1056
- [7] Stock AM, Robinson VL, Goudreau PN. Two-component signal transduction[J]. *Annual Review of Biochemistry*, 2010, 69(1): 183-215
- [8] de Maeyer K, D'ae J, Hua GKH, et al. *N*-Acylhomoserine lactone quorum-sensing signalling in antagonistic phenazine-producing *Pseudomonas* isolates from the red cocoyam rhizosphere[J]. *Microbiology*, 2011, 157(2): 459-472
- [9] Liu HM, He YJ, Jiang HX, et al. Characterization of a phenazine-producing strain *Pseudomonas chlororaphis* GP72 with broad-spectrum antifungal activity from green pepper rhizosphere[J]. *Current Microbiology*, 2007, 54(4): 302-306
- [10] Morohoshi T, Wang WZ, Suto T, et al. Phenazine antibiotic production and antifungal activity are regulated by multiple quorum-sensing systems in *Pseudomonas chlororaphis* subsp. *aurantiaca* StFRB508[J]. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2013, 116(5): 580-584
- [11] Morohoshi T, Yamaguchi T, Xie XN, et al. Complete genome sequence of *Pseudomonas chlororaphis* subsp. *aurantiaca* reveals a triplicate quorum-sensing mechanism for regulation of phenazine production[J]. *Microbes and Environments*, 2017, 32(1): 47-53
- [12] Bauer JS, Hauck N, Christof L, et al. The systematic investigation of the quorum sensing system of the biocontrol strain *Pseudomonas chlororaphis* subsp. *aurantiaca* PB-St2 unveils *aurI* to be a biosynthetic origin for 3-Oxo-Homoserine lactones[J]. *PLoS One*, 2016, 11(11): e0167002. DOI: 10.1371/journal.pone.0167002
- [13] Ouyang Y, Peng HS, Wang W, et al. Function of the PhzI-PhzR system in *Pseudomonas chlororaphis* HT66[J]. *Journal of Shanghai Jiaotong University (Agricultural Science)*, 2016, 34(1): 5-10 (in Chinese)
欧阳夷, 彭华松, 王威, 等. 假单胞菌 HT66 的 PhzI-PhzR 调控系统的功能研究[J]. *上海交通大学学报: 农业科学版*, 2016, 34(1): 5-10
- [14] Sun S, Zhou L, Jin KM, et al. Quorum sensing systems differentially regulate the production of phenazine-1-carboxylic acid in the rhizobacterium *Pseudomonas aeruginosa* PA1201[J]. *Scientific Reports*, 2016, 6: 30352. DOI: 10.1038/srep30352
- [15] Huang L, Chen MM, Wang W, et al. Enhanced production of 2-hydroxyphenazine in *Pseudomonas chlororaphis* GP72[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2011, 89(1): 169-177
- [16] 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
- [17] Peng HS, Ouyang Y, Bilal M, et al. Identification, synthesis and regulatory function of the *N*-acylated homoserine lactone signals produced by *Pseudomonas chlororaphis* HT66[J]. *Microbial Cell Factories*, 2018, 17: 9
- [18] Veselova MA, Klein S, Bass IA, et al. Quorum sensing systems of regulation, synthesis of phenazine antibiotics, and antifungal activity in rhizospheric bacterium *Pseudomonas chlororaphis* 449[J]. *Russian Journal of Genetics*, 2008, 44(12): 1400-1408
- [19] Zhang ZG, Pierson III LS. A second quorum-sensing system regulates cell surface properties but not phenazine antibiotic production in *Pseudomonas aureofaciens*[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2001, 67(9): 4305-4315
- [20] Wang DP, Yu JM, Pierson III LS, et al. Differential regulation of phenazine biosynthesis by RpeA and RpeB in *Pseudomonas chlororaphis* 30-84[J]. *Microbiology*, 2012, 158(Pt 7): 1745-1757
- [21] Wang DP, Lee SH, Seeve C, et al. Roles of the Gac-Rsm pathway in the regulation of phenazine biosynthesis in *Pseudomonas chlororaphis* 30-84[J]. *MicrobiologyOpen*, 2013, 2(3): 505-524
- [22] Kay E, Dubuis C, Haas D. Three small RNAs jointly ensure secondary metabolism and biocontrol in *Pseudomonas fluorescens* CHA0[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2005, 102(47): 17136-17141