

生防荧光假单胞菌 2P24 中 EnvZ/OmpR 双因子系统克隆与 OmpR 原核表达

孙冰冰¹, 张伟², 段红英³, 李伟¹, 田涛¹, 张力群²

(1. 天津市植物保护研究所, 天津 300381; 2. 中国农业大学 植物病理学系, 北京 100193; 3. 天津市西青区植物保护站, 天津 300380)

摘要:用 Mini-Tn5 转座子随机突变荧光假单胞菌野生型菌株 2P24, 得到抗生素 2,4-二乙酰基间苯三酚(2,4-diacetylphloroglucinol, 2,4-DAPG)产量提高的突变体 Sesu-25。对转座子侧翼序列分析表明, 转座子插入到 EnvZ/OmpR 双因子系统的反应调节因子 *ompR* 基因。克隆得到包含完整 EnvZ/OmpR 系统, 全长约为 5.9 kb 的 DNA 片段。该双因子系统中的 *envZ* 基因和 *ompR* 基因与 *P. fluorescens* F113 的 *envZ* 基因和 *ompR* 基因同源性分别为 93% 和 96%。将 *ompR* 基因克隆到表达载体 pET-22b(+) 中, 得到重组表达载体 pET-*ompR*。将 pET-*ompR* 转入 *Escherichia coli* BL21 中得到重组菌株 BL21-*ompR*, 用 IPTG 诱导表达和亲和柱层析法纯化的 OmpR 蛋白, 经 SDS-PAGE 电泳分析表明 *ompR* 基因得到成功表达和纯化。

关键词: 荧光假单胞菌; 随机突变; EnvZ/OmpR; 双因子系统

中图分类号: Q785 文献标识码: A 文章编号: 1000-7091(2014)03-0041-05

Cloning of EnvZ/OmpR Two-component System from *Pseudomonas fluorescens* 2P24 and Prokaryotic Expression of OmpR

SUN Bing-bing¹, ZHANG Wei², DUAN Hong-ying³, LI Wei¹, TIAN Tao¹, ZHANG Li-qun²

(1. Tianjin Institute of Plant Protection, Tianjin 300381, China; 2. Department of Plant Pathology, China Agricultural University, Beijing 100193 China; 3. Plant Protection Station of Xiqing District, Tianjin 300380, China)

Abstract: Using the colour of colony as the selective marker, the random mutagenesis of mini-Tn5 was performed to wild-type biocontrol strain *Pseudomonas fluorescens* 2P24 for the screening of mutants, which might have altered yields of polyketide metabolite 2,4-diacetylphloroglucinol(2,4-DAPG). The strain Sesu-25 with a increased yield of 2,4-DAPG was screened from the mutant pool. The analysis of flank sequence of transposon implied that the response regulator OmpR of EnvZ/OmpR two-component regulatory system(TCS) was disrupted in mutant strain Sesu-25. A DNA fragment harbouring a intact EnvZ/OmpR TCS was obtained by subcloning. The *envZ* and *ompR* of *P. fluorescens* 2P24 shared a identity of 93% and 96% with *P. fluorescens* F113, respectively. The *ompR* was ligated into the expression vector pET-22b(+) to obtain the recombinated plasmid pET-*ompR*, and the plasmid pET-*ompR* was transformed into *E. coli* BL21 to generate the strain BL21-*ompR*. The His-tagged OmpR was purified by affinity chromatography and verified by SDS-PAGE electrophoresis analysis.

Key words: *Pseudomonas fluorescens*; Random mutagenesis; EnvZ/OmpR; Two-component regulatory system

生防荧光假单胞菌(*P. fluorescens*) 2P24 分离自山东小麦全蚀病自然衰退土壤, 对小麦全蚀病、番茄青枯病、沙打旺根腐病等具有较好的防效^[1]。该菌株能够产生 2,4-DAPG、HCN、嗜铁素、蛋白酶等多种次生代谢物质, 其中 2,4-DAPG 是菌株 2P24 具有

生防作用的关键性因子^[2]; 在菌株 2P24 中, 2,4-DAPG 的生物合成受温度、碳源等环境因子以及 GacS/GacA、PhlF、RpoS、Hfq、以及 sRNA 和 EmhABC 等影响, 构成精细而复杂的调控网络^[1-3]。

EnvZ/OmpR 双因子系统(Two-component regu-

收稿日期: 2014-03-05

基金项目: 天津市自然科学基金重点项目(12JCZDJC23100); 国家高技术研究发展计划项目(2011AA10A205); 天津市农科院院长基金项目(11004;13011)

作者简介: 孙冰冰(1986-), 女, 山东聊城人, 助理研究员, 硕士, 主要从事植物病害生物防治和细菌遗传学。

通讯作者: 田涛(1974-), 男, 山西临汾人, 副研究员, 博士, 主要从事植物病害生物防治和细菌遗传学研究。

latory system)由感受激酶(Sensor kinase)EnvZ 和反应调节因子(Response regulator)OmpR 组成。镶嵌于细胞膜上的感受激酶 EnvZ 识别环境信号,通过磷酸基团转移将信号传导到位于胞内的调节因子 OmpR 上,磷酸化的 OmpR 激活或阻遏下游基因的转录^[4-5]。在 *P. fluorescens* WCS365 中,EnvZ 感受环境因子的刺激,将信号传递给 OmpR 从而调控其在宿主植物的定殖行为^[6]。在多种病原细菌中,OmpR 直接作用于编码膜孔道蛋白 OmpC 及 OmpF 的基因的启动子区(在 *Escherichia coli* K-12 中其识别序列为 3 次重复的'TGAAACATCT'),从而对外界渗透压、酸等以及毒性物质等胁迫作用做出反应^[4,7]。另外,有 OmpR 对蛋白酶和脂肪酶的分泌以及群游(Swarming)、鞭毛蛋白基因、三型分泌系统具有调控作用的报道^[8-9]。

在本研究中,以菌落颜色变化为指标,用转座子随机突变荧光假单胞野生型菌株 2P24,得到菌落颜色变化的突变体,以期发现新的影响抗生素 2,4-DAPG 生物合成的调控因子,从而进一步阐明荧光假单胞菌(*P. fluorescens*)2P24 中抗生素 2,4-DAPG

生物合成的调控机制。经转座子突变得多个颜色变化的突变体,并对转座子插入部位的基因进行克隆分析。其中突变体 Sesu-25 中转座子插入到 EnvZ/OmpR 双因子系统中,这可能是调控 2,4-DAPG 生物合成的全新机制。因此,对菌株 2P24 中 EnvZ/OmpR 双因子系统进行克隆并对反应调节因子 OmpR 进行原核表达。

1 材料和方法

1.1 试验材料

菌株、载体及培养条件:本试验中所用菌株和质粒的主要性状列于表 1,所用的引物列于表 2。*P. fluorescens* 2P24 及其衍生菌株在 LB 培养基中,于 28 ℃ 培养 18~24 h 可至对数生长后期。*Escherichia coli* 在 LB 培养基中,于 37 ℃ 培养 12~16 h 可至对数生长后期。三亲交配后在 ABM 培养基上筛选转化子。筛选相应的抗生素抗性质粒所用抗生素浓度分别为:氨苄青霉素 50 μg/mL,卡那霉素 50 μg/mL,氯霉素 20 μg/mL,四环素 20 μg/mL,X-gal 20 μg/mL。

表 1 菌株和质粒

Tab. 1 Bacterial strains and plasmids

菌株和质粒 Strains or plasmids	性状 Description	参考或来源 Reference or source
<i>E. coli</i>	<i>F⁻ recA1 endA1 hsdR17 deoR thi-1 supE44 gyrA96 relA1 Δ(lacZYA-argF) U169⁻ (Φ80dlacZ ΔM15)</i>	This lab
DH5α(λ-pir)	<i>F⁻ recA1 endA1 hsdR17 deoR thi-1 supE44 gyrA96 relA1 Δ(lacZYA-argF) U169⁻ (Φ80dlacZ ΔM15) λ pir</i>	This lab
BL21	<i>F⁻ ompT hsdSB(rB⁻ mB⁻) gal dcm</i>	This lab
BL21-ompR	BL21 containing pET22b-ompR	This study
<i>P. fluorescens</i>		
2P24	Wild-type <i>P. fluorescens</i> strain 2P24, Ap ^r	This lab
Sesu-25	<i>ompR::Tn5</i> in 2P24; Ap ^r , Km ^r	This study
pBluescript II SK(+)	Cloning vector, Ap ^r	Stratagene
pET22b(+)	Expression vector, Ap ^r	Novagen
pUCT	Cloning T vector with T at 3' end	Novagen
pUTKm	Delivery plasmid for Tn5; R6K replicon, Ap ^r Km ^r	This lab
pRK600	Helper plasmid for triparental mating, Cm ^r	This lab
pRK415	<i>Escherichia-Pseudomonas</i> shuttle vector, Tc ^r	This lab
pRK415-ompR	<i>ompR</i> was cloned downstream of the <i>lac promoter</i> in pRK415, Tc ^r	This study
pLAF-5-envZ/ompR	Cosmid clone containing entire <i>envZ</i> and <i>ompR</i> , Tc ^r	This study
pBS- envZ/ompR	pBluescript II SK(+) containing entire <i>envZ</i> and <i>ompR</i> , Ap ^r	This study
pET22b-ompR	pET22b(+) containing intact <i>ompR</i> , Ap ^r	This study

注:Ap^r、Km^r、Cm^r和 Tc^r分别表示氨苄青霉素,卡那霉素,氯霉素和四环素抗性。

Note: Ap^r, Km^r, Cm^r, and Tc^r indicate resistance to ampicillin, kanamycin, chloromphenical and tetracycline, respectively.

1.2 试验方法

1.2.1 Tn5 转座诱变及突变子的筛选 将含有 Tn5 转座子的质粒 pUTKm 和助手质粒 pRK600 分别

转化到 *E. coli* DH5α(λ-pir) 感受态细胞中,用其作为供体菌和助手菌,以野生型 *P. fluorescens* 2P24 菌株为受体菌,采用三亲交配法,即利用助手质粒

pRK600 将 pUTkm 转入 2P24。Tn5 的转座功能将使其随机插入菌株 2P24 染色体上。将过夜培养的供体菌悬液、助手菌悬液及受体菌悬液以 1:1:1 (V: V: V) 于 1.5 mL 离心管中混合, 收集菌体, 无菌水冲洗 1 次, 再次收集菌体悬浮于 100 μ L 的无菌水中, 将菌液涂布于 LB 平板, 30 $^{\circ}$ C 培养 6~8 h 后, 收集菌体, 稀释后涂于含 Km 的 ABM 平板上, 28 $^{\circ}$ C 培养 48 h, 长出的菌落即为 Tn5 转座突变菌。

表 2 引物

Tab. 2 Oligonucleotides in this study

引物 Primer	序列 5' - 3' Sequence 5' - 3'	酶切位点 Restrict enzyme
Zhang-O	GCGGCCGCACTGTGTAT	
Zhang-I	CTAGCGGCCAGATCTGATC	
EnvZ-NdeF	GGAATTCATATGAAAACCCCGTTTGTTTC	Nde I
EnvZ-HinR	ATGAAGCTTCACCGCATCCGCGGCAA	Hind III
OmpR-NdeF	CAGCATATGAGCAGCACTGCACAACTG	Nde I
OmpR-HinR	TAGAAGCTTACCGCGGCCCAT	Hind III

注: 划线部分为限制性内切酶酶切位点。

Note: Specified restriction sites are underlined.

将突变菌转接在 LB 平板上, 筛选菌株颜色变深突变体。将初选的菌落编号并初步用 HPLC 测定其抗生素 2,4-DAPG 的含量。

1.2.2 抗生素 2,4-DAPG 的提取及定量检测 胞外 2,4-DAPG 的提取: 将菌株 2P24 及其衍生菌株分别接种于 30 mL LB 培养液中, 28 $^{\circ}$ C 培养至对数生长期。8 000 r/min 离心 10 min, 将上清液用 1 mol/L HCl 酸化 (pH 值 2.0)。用等体积的乙酸乙酯萃取, 旋转蒸发抽干有机相, 然后将干物质溶于 0.2 mL 甲醇。

将溶解于甲醇的萃取物进行 HPLC (UV2002 型高效液相色谱仪) 测定。HPLC 使用 C₁₈ 反向色谱柱: 150 \times 4.6 mm (i. d.); 检测波长: 270 nm; 进样体积: 10 μ L; 流动相: 乙腈: 水 (V: V) = 55: 45, 0.1% H₃PO₄; 流量: 1.0 mL/min; 滞留时间: 5.12 min。

1.2.3 Southern 杂交 提取突变体基因组 DNA, 接着将 DNA 用 Hind III、Sal I 等限制性内切酶进行酶切, 经电泳分开, 然后再经碱变性使 DNA 成为单链, 有利于结合于膜上和进行下一步杂交。转移是根据毛细管作用原理进行的。单链 DNA 经高温烘烤定于膜上。杂交是根据靶 DNA 单链与探针之间的碱基互补的原则进行。本试验采用的探针为 0.8 kb 的转座子 Mini-Tn5 部分片段。探针用非放射性标记物地高辛 (DIG) 标记。杂交条带通过抗 DIG 碱性磷酸酶及其酶底物显色。

1.2.4 突变子侧翼序列的克隆 突变子侧翼序列采用鸟枪法进行克隆, 大量提取目标菌株的染色体

DNA, 分别用 Hind III、Sal I 等限制性内切酶进行酶切, 并与相应限制性酶切的质粒载体 pBS 连接, 转化大肠杆菌 DH5 α 。涂于含有 50 μ g/mL Km 的 LB 平板, 长出的菌落提取质粒, 酶切鉴定。用特异引物 Zhang-O 和 Zhang-I 测序, 得知突变体的 Tn5 转座子插入到 EnvZ/OmpR 双因子调控系统中的 ompR 基因中。

1.2.5 EnvZ/OmpR 双因子系统的克隆 根据测序结果的序列信息分别设计能够扩增 envZ 和 ompR 全长基因的 2 对引物 EnvZ-NdeF、EnvZ-HinR 和 OmpR-HinR、OmpR-NdeF, 并利用该引物筛选 2P24DNA 文库, 得到包含完整 EnvZ/OmpR 双因子系统的粘粒 pLAF-5-EnvZ/OmpR。进一步亚克隆得到 pBS-envZ/ompR, 该质粒包含全长 4.5 kb 的 DNA 片段, 片段上具有完整 EnvZ/OmpR 双因子系统。

1.2.6 表达载体的构建及融合蛋白表达 用引物 OmpR-HinR 和 OmpR-NdeF 扩增出 ompR 基因, 用限制性内切酶 Nde I 和 Hind III 双酶切后, 将其与相应的限制性内切酶酶切后的表达载体 pET22b 连接, 得到重组载体 pET22b-ompR。将重组载体 pET22b-ompR 转化 E. coli BL21 感受态细胞, 培养 16 h 后挑取单个菌落, 37 $^{\circ}$ C 振荡培养 12 h, 将培养物 100 μ L 接种到 5 mL LB 培养基中, 培养至 OD₆₀₀ 为 0.6 时分别加入浓度为 0.1, 0.2, 0.4, 1.0 mmol/L 的 IPTG 诱导 2 h。离心收集菌体, 加入 100 μ L 上样缓冲液经煮沸破碎后, 离心收集上清进行 SDS-PAGE 电泳检测。目的蛋白用柱层析纯化试剂盒纯化。

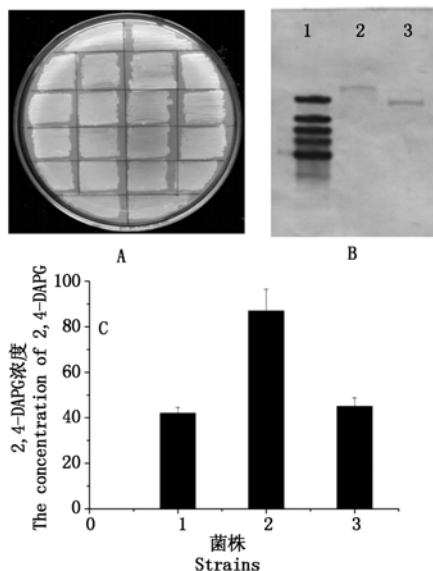
2 结果与分析

2.1 突变体的筛选

以野生型 *P. fluorescens* 2P24 为出发菌株, 利用 miniTn5 转座子在基因组中随机插入突变的方法, 构建了菌株 2P24 的随机突变体文库。很多荧光假单胞菌能够产生一种未知的红色色素, 这种色素的产生与一些生防假单胞的重要生防因子 2,4-DAPG 的产生是连锁的^[10]。在本研究中, 分别对野生型菌株 2P24 及其衍生菌株的色素产生情况进行检测。以菌落颜色变化为指标对该文库中的大约 5 000 个突变体菌株进行筛选, 得到在 LB 平板上颜色显著变红的突变体 Sesu-25 (图 1-A)。

对野生型 2P24 和突变菌株分别在对数生长期提取其抗生素 2,4-DAPG, 并用 HPLC 分别检测其 2,4-DAPG 的产量, 结果表明在突变体 Sesu-25 中, 2,4-DAPG 的产量提高约 1.2 倍, 突变体互补菌株 Sesu-25-pRK415-ompR 的 2,4-DAPG 的产量恢复到野

生型水平(图 1-C)。为了验证在突变体菌株 Sesu-25 中转座子是否为单拷贝插入,提取菌株 Sesu-25 的基因组后,分别用限制性内切酶 *Sal* I 和 *Hind* III 进行酶切并经 Southern 杂交进行验证,结果表明,在突变体 Sesu-25 中转座子是单拷贝插入(图 1-B)。因此,在突变体 Sesu-25 中引起抗生素 2,4-DAPG 产量变化可能是单基因作用的结果。



A. 突变体 Sesu-25 菌落颜色变深;B. Southern 杂交结果:1. DNA 分子量标准;2. 突变体 Sesu-25 基因组用 *Hind* III 酶切;3. 突变体 Sesu-25 基因组用 *Sal* I 酶切。C. 菌株 2P24 及其衍生菌株 2,4-DAPG 产量。2,4-DAPG 从 30 mL LB 液体培养基中抽提,用 HPLC 检测,3 次重复;横轴数字 1~3 分别代表菌株 2P24-pRK415、Sesu-25-pRK415、Sesu-25-pRK415-*ompR*,纵轴代表 2,4-DAPG 产量。

A. Changed colony colour of mutant Sesu-25; B. Southern blot of mutant Sesu-25; 1. Standarded molecular weight of DNA; 2. Genome of Sesu-25 digested by *Hind* III; 3. Genome of Sesu-25 digested by *Sal* I; C. The analysis of 2,4-DPGA production by 2P24 and its derivatives. Extractions were made from at least 3 independent cultures in 30 mL of LB medium, and the 2,4-DAPG production level was determined by HPLC; The numbers 1-3 of x axis represent the strains 2P24-pRK415, Sesu-25-pRK415, and Sesu-25-pRK415-*ompR*, respectively. All experiments were performed in triplicate, and the error bars indicate the standard deviations.

图 1 突变体的筛选验证

Fig. 1 Screening and verification of mutant

2.2 转座子侧翼序列的克隆分析

为了确定转座子插入的靶标基因导致了菌株颜色和 2,4-DAPG 产量的变化,根据 Southern 杂交的结果,用 *Sal* I 酶切菌株 Sesu-25 的基因组并用克隆载体 pBluescript II SK(+) 对转座子插入位点的侧翼序列进行克隆。对克隆到的片段经用引物 Zhang-O 和 Zhang-I 测序分析表明:在菌株 Sesu-25 中转座子插入到 *EnvZ/OmpR* 双因子调控系统中的 *ompR* 基因的第 120 位碱基处(图 2)。根据已知序列设计引物 *OmpR*-HinR 和 *OmpR*-NdeF 筛选 2P24 基因组粘粒文库,亚克隆得到全长约 4.5 kb 的 DNA 片段,包含完整的 *envZ* 基因和 *ompR* 基因和 2 个部分阅读

框,进一步克隆补齐 2 个部分阅读框得到全长 5 893 kb DNA 片段 (GenBank accession No. KF900275)。该片段包含 4 个完整的阅读框(图 2),第 1 和第 4 个阅读框分别编码 S1 RNA binding domain protein 以及 Ribosomal protein S6 modification protein;第 2 个阅读框全长 741 个碱基,编码 *ompR* 基因;第 3 个阅读框全长 1 314 个碱基,编码 *envZ* 基因。在菌株 2P24 中,*envZ* 和 *ompR* 两基因的核苷酸序列和 *P. fluorescens* F113 (GenBank accession No. CP003150.1) 中 *envZ* 和 *ompR* 基因的一致性分别为 93%,96%,与 *P. protegens* CHA0 (GenBank accession No. CP003190.1) 菌株的 *envZ* 和 *ompR* 基因的核苷酸序列一致性分别达到 85%,89%。

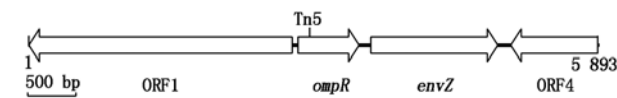


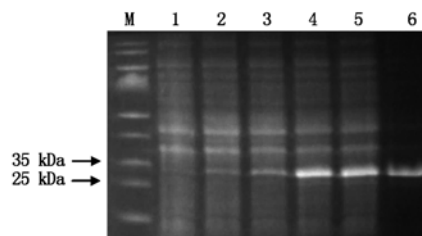
图 2 菌株 2P24 中 Tn5 转座子插入 *ompR* 基因示意图

Fig. 2 Sketch map of Tn5 inserted *ompR* gene in strain PM201

2.3 表达载体的构建和原核表达

以菌株 2P24 基因组为模板,用引物 *OmpR*-HinR 和 *OmpR*-NdeF 扩增出 *ompR* 基因,将 PCR 产物连接到 T 载体上,用限制性内切酶 *Nde* I 和 *Hind* III 将连接在 T 载体上的 *ompR* 基因切下与用对应的内切酶酶切后的表达载体 pET22b(+) 连接,得到重组质粒 pET22b-*ompR*。重组载体经酶切鉴定和测序验证表明:目的基因在表达载体上的插入位置、方向及阅读框均正确无误。

将重组载体 pET22b-*ompR* 转入大肠杆菌 BL21 中,得到包含重组载体 pET22b-*ompR* 的菌株 BL21-*ompR*。菌株 BL21-*ompR* 经 IPTG 诱导后,裂解菌体取上清液经 SDS-PAGE 电泳检测分别出现特异性条带,与预期的 27.3 kDa 相吻合。用镍离子亲和柱层析后纯化产物其大小与预期一致,说明 *OmpR* 重组蛋白均得到正确的表达和纯化(图 3)。



M. 蛋白分子量标准;1. pET22b(+) 空载体对照;2~5. 载体 pET22b-*ompR* 用不同浓度的 IPTG 诱导(0.005,0.01,0.1,0.5 mmol/L);6. 纯化的 *OmpR* 蛋白。

M. Protein molecular weight Marker; 1. Control of vector pET22b(+); 2~5. Vector pET22b-*ompR* induced with different concentration of IPTG (0.005,0.01,0.1,0.5 mmol/L); 6. Purified *OmpR* protein.

图 3 *OmpR* 在大肠杆菌中表达产物 SDS-PAGE 电泳分析

Fig. 3 SDS-PAGE analysis of *OmpR*

3 讨论

抗生素 2,4-DAPG 是多种生防荧光假单胞菌的重要生防因子,其合成受多种环境因素和调控基因的影响^[2-3],构成复杂而精细的调控网络,但是目前的研究结果还不足以完全揭示其调控机制,可能仍有重要的调控因子参与抗生素 2,4-DAPG 生物合成的调控网络^[11]。在利用颜色变化为指标筛选影响 2,4-DAPG 生物合成的基因过程中,我们得到多个颜色显著变化的突变体,其中突变体 Sesu-25 是 Tn-5 转座子插入 EnvZ/OmpR 双因子调控系统中的转录调节因子 *ompR* 基因中。与野生型菌株 2P24 相比,该突变体的 2,4-DAPG 产量提高了 1.2 倍,这说明 EnvZ/OmpR 双因子系统影响了抗生素 2,4-DAPG 的生物合成。EnvZ/OmpR 双因子系统通过感受激酶 EnvZ 识别环境信号,通过磷酸基团转移活化转录调节因子 OmpR,从而影响下游基因的表达。现有的研究表明,EnvZ/OmpR 系统对蛋白酶、脂肪酶的分泌以及群游(Swarming)、鞭毛基因、三型分泌系统等多种生理活动有调控作用^[8-9,12]。目前尚未见到有关 EnvZ/OmpR 影响 2,4-DAPG 生物合成的报道,这可能是新的调控 2,4-DAPG 合成的途径,因此,其在 2,4-DAPG 生物合成调控网络的功能和地位有待于进一步的研究。

现有的报道表明,转录调节因子 OmpR 通过直接作用在靶标基因的启动子区域影响其表达,为了进一步解析 EnvZ/OmpR 系统影响 2,4-DAPG 生物合成的机理,有必要对 OmpR 进行表达和纯化,从而对未来深入解析 EnvZ/OmpR 系统影响其生物合成的机理奠定基础。为此,我们将 *ompR* 基因进行克隆,经序列分析表明,在 *P. fluorescens* 菌株 2P24 中 *envZ* 和 *ompR* 基因和 *P. fluorescens* F113 中的 *envZ* 和 *ompR* 基因具有较高的同源性,其核苷酸序列一致性达到 93%,96%,这说明 EnvZ/OmpR 双因子系统在进化上具有一定的保守性。我们进一步将 *ompR* 基因克隆到表达载体 pET22b(+) 中,并将其转入宿主菌株 BL21 中。经 SDS-PAGE 电泳检测证明,在菌株 BL21 中 *ompR* 基因成功进行了原核表达,这为未来深入解析 EnvZ/OmpR 双因子系统在菌株 2P24 中的功能奠定了基础。

参考文献:

[1] Zhou H Y, Wei H L, Liu X L, et al. Improving biocontrol activity of *Pseudomonas fluorescens* through chromosomal

inte-gration of 2, 4-diacetylphloroglucinol biosynthesis genes[J]. Chinese Science Bulletin, 2005, 50(8): 775 - 781.

- [2] 魏海雷,王 烨,张力群,等. 生防菌株 2P24 与 CPF-10 的鉴定及其生防相关性状的初步分析[J]. 植物病理学报, 2004, 34(1): 80 - 85.
- [3] Tian T, Wu X G, Duan H M, et al. The resistance-nodulation-division efflux pump EmhABC influences the production of 2,4-diacetylphloroglucinol in *Pseudomonas fluorescens* 2P24[J]. Microbiology-GSM, 2010, 156(1): 39 - 48.
- [4] Bang I S, Audia J P, Park Y K, et al. Autoinduction of the *ompR* response regulator by acid shock and control of the *Salmonella enterica* acid tolerance response[J]. Molecular Microbiology, 2002, 44(5): 1 235 - 1 250.
- [5] 董洪燕,彭大新,焦新安,等. 肠炎沙门氏菌鸡源株 *ompR* 基因缺失株的构建及生物学特性与亲本株的比较[J]. 微生物学报, 2011, 51(9): 1256 - 1262.
- [6] Dekkers L C, Bloemendaal C P, De Weger L A, et al. A two-component system plays an important role in the root-colonizing ability of *Pseudomonas fluorescens* strain WCS365[J]. Molecular Plant-Microbe Interactions, 1998, 11(1): 45 - 56.
- [7] Jubelin G, Vianney A, Beloin C, et al. CpxR/OmpR interplay regulates curli gene expression in response to osmolarity in *Escherichia coli*[J]. Journal of Bacteriology, 2005, 187(6): 2038 - 2049.
- [8] Garmendia J, Beuzon C R, Ruiz-Albert J, et al. The roles of SsrA SsrB and OmpR EnvZ in the regulation of genes encoding the *Salmonella typhimurium* SPI-2 type III secretion system[J]. Microbiology-GSM, 2003, 149(9): 2385 - 2396.
- [9] McCarthy C N, Woods R G, Beacham I R. Regulation of the *aprX-lipA* operon of *Pseudomonas fluorescens* B52: Differential regulation of the proximal and distal genes, encoding protease and lipase, by ompR-envZ[J]. FEMS Microbiology Letters, 2004, 241: 243 - 248.
- [10] Bangera M G, Thomashow L S. Identification and characterization of a gene cluster for synthesis of the polyketide antibiotic 2, 4-diacetylphloroglucinol from *Pseudomonas fluorescens* Q2-C87[J]. J Bacteriol, 1999, 181: 3155 - 3163.
- [11] 田 涛,孙淑琴,杨秀荣,等. 植物病害生防细菌的筛选策略综述[J]. 天津农业科学, 2012, 18(5): 162 - 165.
- [12] 岳东霞,张要武,刘玉凤. 黄瓜内生枯草芽孢杆菌 B10 抗菌活性物质稳定性研究[J]. 天津农业科学, 2012, 18(4): 4 - 6.