

糖类碳源对中慢生华癸根瘤菌群体感应基因 *mrhI/R* 表达的影响^①

朱庆成, 毛怡玲, 茅冬梅, 郑会明*, 钟增涛, 朱 军

(南京农业大学生命科学学院, 南京 210095)

摘 要:克隆了中慢生华癸根瘤菌(*Mesorhizobium huakuii*)的 *mrhI* 和 *mrhR* 群体感应基因的启动子区域, 至 LacZ 翻译融合表达质粒载体 pRA302 中, 经 β -半乳糖苷酶活性检测发现, *mrhI* 和 *mrhR* 的表达均受 *mrhI* 基因产物(自体诱导物)的正向调控。两种 PTS 糖类: 葡萄糖和果糖的外源添加可以显著增加细菌的生长量, 但却都同时抑制了 *mrhI* 和 *mrhR* 基因的表达, 暗示在中慢生华癸根瘤菌中群体感应基因的表达可能受细菌中普遍存在的碳源代谢物阻遏现象的调节。

关键词: 中慢生华癸根瘤菌; 群体感应; 葡萄糖; 果糖; 碳源代谢物阻遏

中图分类号: Q933

具有群体感应(quorum sensing)^[1-2]的细菌能产生并释放一种被称为自体诱导物(autoinducer, AI)^[3]的信号分子, 它可以被多种生物群落感知, 并随着细胞密度增加而同步增加, 当自体诱导物积累到一定浓度时会改变细菌特定基因的表达。革兰氏阴性(G-) 细菌一般利用酰基高丝氨酸环内酯类物质(Acyl-homoserine lactone, 简称 AHL)来调控基因的表达。其中 LuxI 类蛋白^[4]是发现最早也是存在最广泛的一类 AHLs 合成酶。当细胞内的 AHLs 含量随着细胞密度增加积累至阈值浓度时, 一类 LuxR 类调控蛋白结合 AHLs 分子后被激活, 正向回馈增强 *luxI* 基因的表达, 同时调控与细菌多种生理功能相关基因的表达。这些基因的生理特性包括细菌毒性^[5]、生物体发光^[6]、接合、共生、抗生素的产生、色素的形成、孢子及生物膜的形成等。

细菌群体感应系统还可能受到其他调控因子的影响。在与海洋鱼类共生的费氏弧菌(*Vibrio fischeri*)发光机制研究中, 该细菌的荧光素酶基因位于 *lux* 操纵子中, 其中 *luxI* 基因负责合成 AHLs 信号分子, 随着细胞密度的增加, AHLs 不断产生并累积至阈值浓度时会激活 *lux* 操纵子中的调控蛋白基因 *luxR*, 进而正向激活 *luxCDABE*, 启动荧光酶的合成, 细菌产生光亮。在费氏弧菌中, Nealson 等人^[7]还发现细菌的发光现象亦受到葡萄糖碳源的抑制, 这种抑制作用可能是通过 CRP(cAMP 的受体蛋白质)蛋白介导调控的。在铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)中也发现

一类 CRP 同源蛋白 Vfr 可以调控 LasR(一类 LuxR 型调控蛋白)的表达进而影响群体感应系统^[8]。在其他非 AHLs 型群体感应系统中, 也发现了类似现象, 如 *E.coli* 中 AI-2 信号分子和霍乱弧菌(*Vibrio cholerae*)中 CAI-1 的产生均被发现存在葡萄糖抑制效应^[9-10]。

中慢生华癸根瘤菌(*Mesorhizobium huakuii*)是一类可以与豆科植物紫云英形成根瘤的共生固氮微生物, 紫云英主要用于水稻绿肥, 也是很好的非蜜源植物和饲料, 在东亚国家、中国长江中下游和华南地区广泛种植^[11-12]。本实验室在中慢生华癸根瘤菌 Mh93 菌株中检测到了群体感应信号分子^[13], 袁全等^[14]鉴定了 As9 菌株中的自体诱导物合成酶基因 *mrhI* 及其调控蛋白基因 *mrhR*, 并发现 *mrhI* 基因的表达受其自身基因产物的正向调控。根瘤菌无论是在自由生活的土壤生境中, 或是与宿主豆科植物共生的过程中, 均可能处于不同的营养水平状况, 这些营养水平不仅限制了根瘤菌的生长, 同时还可能改变了根瘤菌内某些基因的开启或是关闭。本文即以该中慢生华癸根瘤菌为研究材料, 探讨了糖类的供给对群体感应基因表达的影响, 以了解中慢生华癸根瘤菌中群体感应可能存在的调控系统。

1 材料与方法

1.1 供试材料

1.1.1 菌株和质粒 试验所用菌株和质粒及其他

基金项目: 国家重大基础研究“973”项目(2010CB126500-G)和国家自然科学基金面上项目(31170077)资助。

* 通讯作者(hmzheng@njau.edu.cn)

作者简介: 朱庆成(1988—), 男, 江苏大丰人, 硕士研究生, 主要从事分子微生物学与生物固氮研究。E-mail: ticky080119@163.com

们的特性见表 1。根瘤菌在 TY 培养基中于 28℃ 下培养，大肠杆菌在 LB 培养基中于 37℃ 下培养。TY 培养基：胰蛋白胨 5 g，酵母粉 3 g，CaCl₂·6H₂O 1.3 g，dH₂O 1 000 ml，pH 7.0。

表 1 供试菌株及质粒
Table 1 Strains and plasmids used in this study

菌株和质粒		特征	来源
中慢生华癭根瘤菌	As9	野生型菌株，Str ^R	本实验室保存
	HMH1	<i>mrhI</i> 基因框内缺失菌株，Str ^R	本实验室保存
	HMH2	携带 pHMZ102 质粒的 As9 菌株，Str ^R	本实验室保存
	HMH3	携带 pHMZ103 质粒的 As9 菌株，Str ^R	本实验室保存
大肠杆菌	DH5 α	克隆宿主细胞	
	SM10 λ pir	接合宿主细胞	
质粒	pRA302	翻译融合表达质粒，Spe ^R	参考文献[15]
	pEx18Gm	携带有 <i>sacB</i> 基因的 R6K 质粒载体，Gm ^R	参考文献[16]
	pMH101	携带有 <i>mrhI</i> 缺失片段的 pExGm18 重组质粒，Gm ^R	本实验室保存
	pHMZ102	携带有 <i>mrhI</i> 基因启动子区域的翻译融合表达质粒，Spe ^R	本实验室保存
	pHMZ103	携带有 <i>mrhR</i> 基因启动子区域的翻译融合表达质粒，Spe ^R	本实验室保存

1.1.2 实验试剂和仪器 PCR 试剂为 TaKaRa 产品，PCR 引物由北京华大基因公司合成，邻硝基苯-β-D-半乳糖苷(ONPG)采购于 Sigma 公司，生化与分子生物学试剂购于南京寿德仪器试剂公司。链霉素(Str) 100 μg/ml；壮观霉素(Spe)100 μg/ml；庆大霉素(Gen)20 μg/ml；5-溴-4-氯-3-吲哚-β-D-半乳糖苷(X-gal)50 μg/ml。

1.2 实验方法

1.2.1 *mrhI* 基因的框内敲除 根据袁全等^[14]克隆鉴定的 *mrhI* 基因的序列信息，分别运用 Prime STAR 高保真酶扩增 *mrhI* 基因的侧翼序列和重叠产物，克隆至自杀性质粒载体 pEx18- Gm 中。引物序列如下：*mrhI*-1：GCAAGCTTGAATGTGCGTGTTGCAATCC；*mrhI*-2：AAAGCATGCCGTCGTCTC；*mrhI*-3：CCGACCTTTGACGCGTCACCTACGGCAATCAG；*mrhI*-4：GCTCTAGATGCGGTGCGCACAG，基因的敲除操作参考文献^[17]描述方法进行。

1.2.2 *mrhI* 和 *mrhR* 基因翻译融合表达质粒的构建和转化 运用 Prime STAR 高保真酶扩增 *mrhI* 和 *mrhR* 的启动子区域并克隆至翻译融合表达质粒载体 pRA302 中，所用引物序列如下：*pmrhI*-EcoRI：GGAA TTCCATGGCGACCAGTACC；*pmrhI*-XbaI：GCTCTA GAAGCGCAGGCGATGGAC；*pmrhR*-EcoRI：GGAAT TCCCAGGAACCTCCATTG；*pmrhR*-XbaI：GCTCTA GACGGTCAGACCGAAATC。将构建完成的质粒 pHMH102 和 pHMZ103 电转化至中慢生华癭根瘤菌 As9 中，在 Str(100 μg/ml)、Spe(100 μg/ml)的 TY 固体培养基平板中筛选阳性菌株。

1.2.3 根瘤菌生长曲线的测定 将活化至 OD₆₀₀ 约 1.0 的新鲜菌液 1% 接种至 TY(CK)、TY + 0.8% 葡萄糖、TY + 0.2% 葡萄糖、TY + 0.8% 果糖和 TY + 0.2% 果糖的液体培养基中，每隔 12 h 无菌取样，测定其 OD₆₀₀ 值并进行相应 β-半乳糖苷酶活力测定。

1.2.4 β-半乳糖苷酶的活性的检测 按照 Miller^[18] 的方法进行检测。

1.3 数据分析

本文所有数据均运用软件 Graphpad 分析处理。

2 结果与分析

2.1 *mrhR* 和 *mrhI* 基因的表达均受 *mrhI* 基因产物自体诱导物分子的正向调控

袁全等^[14]利用转座子随机插入失活的方法鉴定了中慢生华癭根瘤菌 As9 中的自体诱导物合成酶基因 *mrhI* 及其对应的调控蛋白基因 *mrhR*，通过对 *mrhI* 插入失活菌株中 AHLs 分子活性的检测，初步确定 *mrhI* 基因负责了 As9 菌株中所有 AHLs 分子的合成。为了解中慢生华癭根瘤菌 As9 中可能的调控群体感应系统的因子尤其是糖源的影响，本文克隆构建了 *mrhI* 和 *mrhR* 基因的启动子融合表达质粒，该质粒载体中 β-半乳糖苷酶表达的水平可以指示 *mrhI* 和 *mrhR* 基因表达强度(图 1)。如图 1 所示，在中慢生华癭根瘤菌野生型菌株中，自体诱导物合成酶基因 *mrhI* 的表达强度较高(Miller Units 为 1 063)，作为调控蛋白基因存在的 *mrhR* 基因相对较低(Miller Units 为 233)，这类似于天山中慢生根瘤菌中 *mrtI* 和 *mrtR* 的不同表达水平^[17]。将 *mrhI*、*mrhR*

启动子融合表达质粒 pHMH102、pMH103 分别导入至 *mrhI* 框内基因缺失株中,如图 1 所示,*mrhI* 和 *mrhR* 的启动子转录都基本完全丧失了表达活性,这表明在中慢生华癭根瘤菌 As9 中,自体诱导物合成酶基因 *mrhI* 确实是受自身基因产物正向调控的,这跟袁全等人^[14]得出的结论一致。此外该结果还表明调控蛋白基因 *mrhR* 的表达也是依赖于 *mrhI* 基因,这种 LuxR 型转录调控蛋白的表达依赖于对应的自体诱导物合成酶基因产物的现象在天山中慢生根瘤菌和豌豆根瘤菌中均有报道^[19-21]。因此,本文通过质粒融合检测报告基因酶活性的方式是可以表征中慢生华癭根瘤菌 As9 中 *mrhI* 基因和 *mrhR* 基因的表达情况的,也为下文研究糖类碳源物质的添加对群体感应系统表达的影响提供了合适的研究材料。

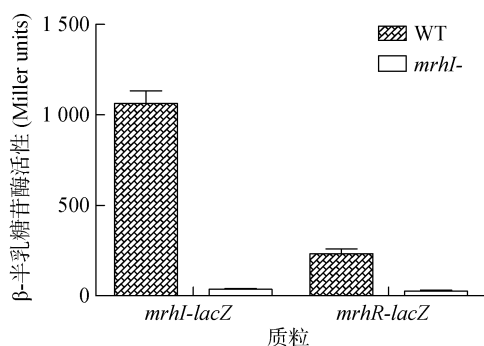


图 1 *mrhI* 基因对 *mrhI* 和 *mrhR* 启动子表达的影响
Fig. 1 Effect of *mrhI* deletion on *mrhI*/*mrhR* promoter expression

2.2 葡萄糖、果糖会抑制 *mrhI* 基因的表达

在霍乱弧菌(*V. cholerae*)、大肠杆菌(*E. coli*)和铜绿假单胞菌(*P. aeruginosa*)中均发现葡萄糖的添加可以强烈地抑制相应自体诱导物的产量^[8-10]。为了考察葡萄糖效应是否也参与调节了中慢生华癭根瘤菌的群体感应系统,将含有 *mrhI* 启动子融合表达质粒的菌株分别在添加了不同含量葡萄糖和果糖的 TY 培养基中生长,同时以普通 TY 培养基作为对照,每间隔 12 h 取样,测定根瘤菌生长量和 *mrhI*-lacZ 的表达活性(图2)。如图 2A 所示,在 TY 培养基下,中慢生华癭根瘤菌培养至 48 h 时到达生长稳定期,其 OD₆₀₀ 约为 4.376;添加了 0.2% 单糖碳源后,生长量显著性地提高(葡萄糖中为 5.99,果糖中为 6.78);添加了 0.8% 单糖碳源后,其生长量大幅提高(葡萄糖中为 8.23,果糖中为 10.14),这显示了过量营养物质对细菌生长量的正向效应。

与糖源的添加可以增加细菌生长量相反的是,*mrhI* 基因的表达量受外源糖源添加的抑制。如图

2B 所示,在高浓度的糖源添加量下(0.8%),对数生长期时(36 h)糖源对 *mrhI* 基因的抑制作用表现得更为明显(普通培养基中 *mrhI*-lacZ 表达量为 1 311,而 0.8% 葡萄糖碳源下为 322,0.8% 果糖碳源下为 213)。然而随着细菌生长期的延长,糖类对 *mrhI* 基因表达的抑制程度逐渐减弱,这可能是由于培养基中的碳源被细菌逐渐消耗,其表现出的抑制效应也逐渐减弱。在 0.2% 单糖糖源添加量下,在 36 h 的对数生长期时,葡萄糖和果糖的添加都明显地抑制了 *mrhI* 基因的表达;但在 36 h 和 48 h 时,则高于 0.8% 碳源添加水平下 *mrhI* 的表达量,因此糖源添加量越高,对 *mrhI* 基因的抑制作用越强。这进一步表明了,外界单糖碳源的存在会抑制中慢生华癭根瘤菌中的群体感应基因的表达。

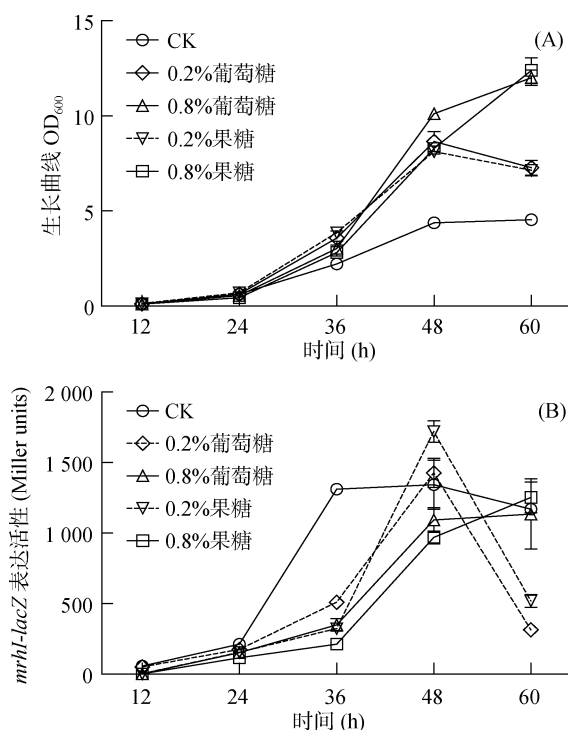


图 2 葡萄糖和果糖对菌体的生长(A)和 *mrhI* 启动子表达(B)的影响
Fig. 2 Effects of glucose and fructose on bacterial growth (A) and *mrhI* promoter expression (B)

2.3 葡萄糖、果糖会抑制 *mrhR* 调节基因的表达

在霍乱弧菌(*V. cholerae*)中,葡萄糖对 CAI-1 自体诱导物产生的抑制作用是通过降低调控蛋白 *hapR* 的 mRNA 水平介导的^[10]。为鉴别葡萄糖等对 *mrhI* 基因表达的抑制是通过糖类代谢活动直接作用于 *mrhI* 基因,还是通过调控蛋白 *mrhR* 发挥作用的,将 *mrhR*-lacZ 翻译融合质粒 pHMH103 电击转化至中慢生华癭根瘤菌 As9 野生型菌株中,检测了不同种类和浓度下以上两种糖原对 *mrhR* 调控蛋白基因

表达的影响(图3)。结果如图3A所示,随着单糖碳源浓度的增加,根瘤菌同样表现出了生长量随之增加的现象。图3B显示,无论是葡萄糖或是果糖的添加都显著性地降低了 *mrhR* 的表达量,这表明糖类对群体感应的调节作用可能是通过影响了调节基因 *mrhR* 的活性进行作用的。随着根瘤菌 As9 生长期的延伸,糖源对 *mrhR* 抑制的强度也逐渐减弱,这可能仍然与以上提及的糖类不断被根瘤菌代谢和消耗的因素有关。不同糖类浓度(图3B, 0.2% 和 0.8%)对 *mrhR* 的表达没有表现出显著性差别。

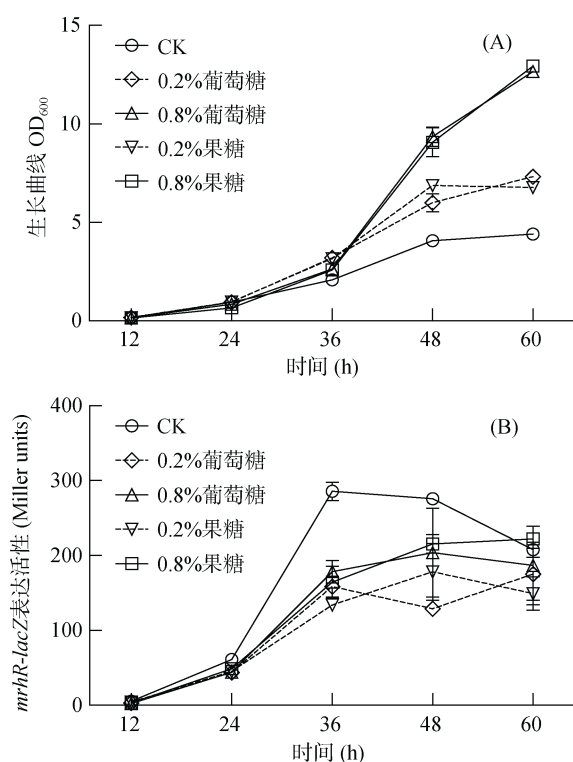


图3 葡萄糖和果糖对菌体的生长(A)和 *mrhR* 启动子表达(B)的影响

Fig. 3 Effects of glucose and fructose on bacterial growth (A) and *mrhR* promoter expression (B)

3 讨论

本文构建了中慢生华癭根瘤菌 As9 自体诱导物合成酶基因 *mrhI* 和调控蛋白基因 *mrhR* 的启动子融合表达质粒,通过 β -半乳糖苷酶活性的高低来指示 *mrhI* 基因和 *mrhR* 基因在中慢生华癭根瘤菌中转录表达的水平。在普通 TY 培养基中, *mrhI* 和 *mrhR* 基因的表达均随着细胞密度的增加而增强,在 36 h 时达到最高表达水平,符合群体感应基因表达特征。而外源添加葡萄糖或果糖后, *mrhI* 和 *mrhR* 基因的表达仍然表现出随细胞密度增加而增强的特征,但其表达水平均明显低于普通培养基培养下的表达水平,因此在中慢生华癭根瘤菌 As9 中,葡萄糖

和果糖会抑制群体感应基因的表达。

糖类的存在会抑制群体感应基因表达的现象在其他细菌中也有报道,如霍乱弧菌(*V. cholerae*)中葡萄糖会显著抑制群体感应信号分子 CAI-1 的产量^[10],在 *E. coli* 中 PTS(磷酸转移酶转运系统)糖源的存在会影响 AI-2 类信号分子的合成水平^[9],创伤弧菌(*Vibrio vulnificus*)中也有葡萄糖抑制 AI-2 信号分子合成的报道^[22]。AI-2 是是呋喃酰硼酸二酯类信号分子,在 G+ 与 G- 细菌中均有存在。以上报道内容所涉及的糖类均局限为 PTS 类糖源。自然界中存在多种糖类化合物,根据其被利用特征分成两类,一类以葡萄糖为典型,包括甘露糖、甘露醇和果糖等,通过与葡萄糖类似的 PTS 系统进入细胞;另一类包括阿拉伯糖、麦芽糖、乳糖、木糖和半乳糖等,它们通过非 PTS 的透性酶系统进入细胞^[15-16],它们和葡萄糖等 PTS 糖源同时加入培养基中后,细菌会优先利用 PTS 糖源。本文选取了两种类别的 PTS 糖源:葡萄糖和果糖,结果发现这两种糖类均表现出抑制群体感应基因 *mrhI* 和 *mrhR* 表达的现象,而这种抑制效应很可能是通过 CRP(cAMP 受体蛋白)蛋白介导的,即碳源代谢物阻遏(CCR, carbon catabolite repression)现象。

在细菌体内,CRP 可以结合 cAMP 形成蛋白复合物直接调控细菌内 200 多个启动子的转录起始^[23]。葡萄糖水平决定了胞内的 cAMP 含量的高低,葡萄糖代谢物会抑制腺苷酸环化酶 CyaA 的活力,从而降低了 CyaA 合成产物 cAMP 的合成,而 CRP 的活力则需要与 cAMP 结合后才得以激活,进而发挥,这种作用被称为葡萄糖效应。在费氏弧菌(*V. fischeri*)中,CRP 作为上游调节因子直接激活 *luxR* 基因的表达^[24-25],但同时 *luxR* 基因还受 ArcA 调节基因的负向调控,以及转录后水平上 GroEL 对其的调节作用,这种多样性存在的调控方式可能是细菌适应外界不同环境因子或营养物质的一种调节机制。在霍乱弧菌(*V. cholerae*)中 CRP 通过调控 CAI-1 自体诱导物合成酶基因 *cqsA* 和对应调控蛋白基因 *hapR* 的表达水平影响 CAI-1 的产量^[10],进一步研究发现这种调控作用是通过 camp 对 *cqsA* 基因 mRNA 稳定性来提高 CAI-1 产量的^[26]。在 *E. coli* 中 CRP 可以降低 AI-2 分子的合成,但细菌对 AI-2 的摄取则需要 CRP 调控蛋白的激活^[9]。

在本文中观察到的葡萄糖和果糖糖源抑制群体感应基因表达的现象,很可能也存在以上通过 cAMP-CRP 介导的类似调节机制。此外,随着生长期的延伸,糖源的可利用水平逐渐下降,群体感应基因被抑

制的程度也逐渐减弱,也暗示了以上的推测。为了进一步探究该糖类抑制现象的产生是否确实如上推论,后续研究需要将 cAMP 合成酶基因 *cya* 或者 CRP 蛋白基因进行缺失,考察是否还存在类似的葡萄糖抑制效应。

参考文献:

- [1] Fuqua WC, Winans SC, Greenberg EP. Quorum sensing in bacteria: The LuxR-LuxI family of cell density-responsive transcriptional regulators[J]. *Journal of Bacteriology*, 1994, 176(2): 269
- [2] Miller MB, Bassler BL. Quorum sensing in bacteria. *Annu Rev Microbiol*, 2001, 55: 165–199
- [3] Waters CM, Bassler BL. Quorum sensing: cell-to-cell communication in bacteria[J]. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, 2005, 21: 319–346
- [4] Schaefer AL, Val DL, Hanzelka BL, Cronan JE Jr, Greenberg EP. Generation of cell-to-cell signals in quorum sensing: acyl homoserine lactone synthase activity of a purified *Vibrio fischeri* LuxI protein[J]. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1996, 93(18): 9 505–9 509
- [5] Von Bodman SB, Bauer WD, Coplin DL. Quorum sensing in plant-pathogenic bacteria[J]. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 2003, 41: 455–482
- [6] Eberhard A, Burlingame AL, Eberhard C, Kenyon GL, Nealson KH, Oppenheimer NJ. Structural identification of autoinducer of *Photobacterium fischeri* luciferase[J]. *Biochemistry*, 1981, 20(9): 2 444–2 449
- [7] Nealson KH, Eberhard A, Hastings JW. Catabolite repression of bacterial bioluminescence: Functional implications[J]. *Proc Natl Acad. Sci. USA*, 1972, 69(5): 1 073–1 076
- [8] Albus AM, Pesci EC, Runyen-Janecky LJ, West SE, Iglewski BH. Vfr controls quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*[J]. *J. Bacteriol.*, 1997, 179(12): 3 928–3 935
- [9] Wang L, Hashimoto Y, Tsao CY, Valdes JJ, Bentley WE. Cyclic AMP (cAMP) and cAMP receptor protein influence both synthesis and uptake of extracellular autoinducer 2 in *Escherichia coli*[J]. *J. Bacteriol.*, 2005, 187(6): 2 066–2 076
- [10] Liang W, Pascual-Montano A, Silva AJ, Benitez JA. The cyclic AMP receptor protein modulates quorum sensing, motility and multiple genes that affect intestinal colonization in *Vibrio cholerae*[J]. *Microbiology*, 2007, 153(Pt 9): 2 964–2 975
- [11] Tan ZY, Xu XD, Wang ET, Gao JL, Martinez-Romero E, Chen WX. Phylogenetic and genetic relationships of *Mesorhizobium tianshanense* and related rhizobia. *International journal of systematic bacteriology*, 1997, 47(3): 874–879
- [12] Chen WX, Li GS, Qi YL, Wang ET, Yuan HL, Li JL. *Rhizobium huakuii* sp. nov. isolated from the root nodules of *Astragalus sinicus*[J]. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 1991, 41(2): 275–280
- [13] Zhu J, Chai Y, Zhong Z, Li S, Winans SC. Agrobacterium bioassay strain for ultrasensitive detection of N-acylhomoserine lactone-type quorum-sensing molecules: detection of autoinducers in *Mesorhizobium huakuii*[J]. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2003, 69(11): 6 949–6 953
- [14] 袁全, 杨梦华, 郑会明, 钟增涛, 朱军. 中慢生型华癭根瘤菌 *Mesorhizobium huakuii* AS9 自体诱导物合成酶基因的筛选及其功能分析[J]. *土壤*, 2009, 41(3): 459–463
- [15] Akakura R, Winans SC. Mutations in the *occQ* operator that decrease OccR-induced DNA bending do not cause constitutive promoter activity[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2002, 277(18): 15 773–15 780
- [16] Metcalf WW, Jiang W, Daniels LL, Kim SK, Haldimann A, Wanner BL. Conditionally replicative and conjugative plasmids carrying *lacZ* alpha for cloning, mutagenesis, and allele replacement in bacteria[J]. *Plasmid*, 1996. 35(1): 1–13.
- [17] Zheng H, Zhong Z, Lai X, Chen WX, Li S, Zhu J. A LuxR/LuxI-type quorum-sensing system in a plant bacterium, *Mesorhizobium tianshanense*, controls symbiotic nodulation[J]. *Journal of bacteriology*, 2006, 188(5): 1 943–1 949
- [18] Miller JH. *Experiments in Molecular Genetics* [M]. Vol. 60. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1972
- [19] Cao H, Yang M, Zheng H, Zhang J, Zhong Z, Zhu J. Complex quorum-sensing regulatory systems regulate bacterial growth and symbiotic nodulation in *Mesorhizobium tianshanense*[J]. *Archives of Microbiology*, 2009, 191(3): 283–289
- [20] 赖欣, 戴俊, 郑会明, 钟增涛, 朱军. 植物细菌天山根瘤菌调控基因 *mrtR* 在群体感应中的作用[J]. *土壤学报*, 2008, 45(4): 705–709
- [21] Lithgow JK, Wilkinson A, Hardman A, Rodelas B, Wisniewski-Dyé F, Williams P, Downie JA. The regulatory locus *cinRI* in *Rhizobium leguminosarum* controls a network of quorum-sensing loci[J]. *Mol. Microbiol.*, 2000, 37(1): 81–97
- [22] Kim SP, Kim CM, Shin SH. Cyclic AMP and cyclic AMP-receptor protein modulate the autoinducer-2-mediated quorum sensing system in *Vibrio vulnificus*[J]. *Current Microbiology*, 2012, 65(6): 701–710
- [23] Gosset G, Zhang Z, Nayyar S, Cuevas WA, Saier MH Jr. Transcriptome analysis of Crp-dependent catabolite control of gene expression in *Escherichia coli*[J]. *Journal of Bacteriology*, 2004, 186(11): 3 516–3 524
- [24] Dunlap PV, Greenberg EP. Control of *Vibrio fischeri* luminescence gene expression in *Escherichia coli* by cyclic AMP and cyclic AMP receptor protein[J]. *J. Bacteriol.*, 1985. 164(1): 45–50
- [25] Dunlap PV, Greenberg EP. Control of *Vibrio fischeri* lux gene transcription by a cyclic AMP receptor protein-luxR protein regulatory circuit[J]. *Journal of bacteriology*, 1988, 170(9): 4 040–4 046
- [26] Liang W, Sultan SZ, Silva AJ, Benitez JA. Cyclic AMP post-transcriptionally regulates the biosynthesis of a major bacterial autoinducer to modulate the cell density required to activate quorum sensing[J]. *FEBS Lett.*, 2008, 582(27): 3 744–3 750

Effect of Sugar Carbon Source on Quorum Sensing Genes *mrhI/mrhR* Expression

ZHU Qing-cheng, MAO Yi-ling, MAO Dong-mei, ZHENG Hui-ming^{*}, ZHONG Zeng-tao, ZHU Jun
(College of Life Science, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract: The promoter regions of two quorum sensing genes, *mrhI* and *mrhR*, were cloned into a translational fusion plasmid vector pRA302. Detections of β -galactosidase activity indicated that, expression of both *mrhI* and *mrhR* genes were dependent on autoinducer activity which was produced by *mrhI* itself. It also was shown that induction of PTS sugar source, e.g glucose and fructose, could significantly increase bacteria growth biomass, but inhibit both two genes expression on the other hand. These results implied that Quorum Sensing system in *Mesorhizobium huakuii* might be regulated by carbon catabolite repression which generally exist in bacteria.

Key words: *Mesorhizobium huakuii*, Quorum sensing, Glucose, Sucrose, Carbon catabolite repression