

铜绿假单胞菌群体感应抑制物筛选系统的构建及其应用

孙玮洁, 王媛, 沈立新, 段康民

西北大学生命科学学院 西部资源生物与现代生物技术教育部重点实验室, 西安 710069

摘要: 针对调控铜绿假单胞菌致病基因表达的群体感应系统, 将相关基因 *lasI* 和 *rhlA* 的启动子域与蔗糖致死基因相融合, 构建出一个能通过菌体生长量来检测群体感应系统小分子抑制物的筛选体系。并在特定条件下, 对一系列中药提取物进行筛选, 同时用荧光筛选系统对结果进行验证。以此筛选出 3 种中药提取物对铜绿假单胞菌群体感应系统有不同程度的抑制作用。这 3 种中药分别隶属于爵床科、败酱科和萝藦科植物。本研究所构建的筛选体系能有效地筛选群体感应系统的抑制物, 为进一步了解和控制细菌的致病感染过程和新药物的研究提供了一个有用的工具。

关键词: 铜绿假单胞菌, 群体感应系统抑制物, 中药提取物, 小分子物质

A novel screening system for *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing inhibitors

Weijie Sun, Yuan Wang, Lixin Shen, and Kangmin Duan

Key Laboratory of Resources Biology and Biotechnology in Western China, Ministry of Education, College of Life Sciences, Northwest University, Xi'an 710069, China

Abstract: Quorum sensing is an important gene regulatory mechanism in *Pseudomonas aeruginosa* and controls the expression of numerous virulence factors. We designed and constructed a screening system for quorum-sensing inhibitors. We developed the system by using the *lasI* and *rhlA* promoters fused with promoterless *sacB* as reporters. Using this system we screened a number of Chinese herb extracts, and identified three herb extracts containing inhibitors to the quorum-sensing system and to its regulated genes. The screening system developed was highly efficient and sensitive. It could serve as a useful tool to identify herb compounds that block infections but unlikely render antibiotic resistance in pathogens.

Keywords: *Pseudomonas aeruginosa*, quorum sensing inhibitor, Chinese herb extracts, small molecule compounds

不断蔓延的病原菌抗药性问题已对人类健康构成了巨大的威胁^[1], 以杀死细菌为目的的传统抗生素治疗方法已经面临困境, 不能满足人们的需求。为了找到新的药物来解决这一问题, 人们做了各种尝试。以抑制致病性为目标的抗生素研究是当前最有吸引力和最具潜力的新范式。如在抑制毒力因子

的致病活性方面, Merck 于 2005 年找到一种名为 hydroxymate 的小分子物质, 它能抑制炭疽病毒性因子 LF 的水解蛋白酶活性并提高细胞在巨噬细胞毒性实验中的存活率^[2-3]。在抑制致病菌毒性因子的传递性方面, 近几年的研究热点集中在分泌相关蛋白上, 如与致病性密切相关的三型分泌系统 T3SS。最

Received: February 25, 2009; Accepted: June 11, 2009

Supported by: National Natural Science Foundation of China (Nos. 30870097, 30611120520), the Ministry of Education Fund of China.

Corresponding author: Kangmin Duan. Tel: +86-29-88305288; E-mail: kduan@nwu.edu.cn

国家自然科学基金项目(Nos. 30870097, 30611120520), 教育部重点项目资助。

近在耶尔森氏假结核中化学筛选出一系列可以抑制三型分泌系统的酰基腺水杨醛^[4-5]。除了抑制毒性因子的活性和传递外,干扰致病性相关的调控机制也是极具吸引力的发展方向,其中很多是针对群体感应系统的研究。如人们发现芽孢杆菌能产生分解革兰氏阴性菌群体感应系统信号分子——高丝氨酸内酯的水解酶,从而减弱致病性^[6-7]。同样,革兰氏阳性菌的 QS 信号分子 AIP(Autoinducing peptide)的识别机制也可以被其同系物阻抑^[8]。这些方法都是针对致病菌的感染机制,近年来已有一部分被用于新药研发,来满足人们对药物的需求。

铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*, PA)是一种重要的医院获得性机会致病菌。当人体免疫力低下或患有其他病症时,会引起各种严重的并发症甚至导致死亡^[9]。PA 细胞外膜的低通透性和强大的药物外排机制限制了抗菌药物对它作用,使其造成的感染难被治愈。同时,它还可以通过多种途径获得后天药物抗性:在医院铜绿假单胞菌感染病例中,多重耐药株占临床分离株的 14.2%,它们可以同时抵抗环丙沙星、噻甲羧肟头孢菌素、亚胺培南、庆大霉素和哌拉西林等^[10-11]。

PA 的致病机理复杂多样,能产生多种毒性因子,如蛋白酶(LasA 蛋白酶、蛋白酶 IV 和碱性蛋白酶)、毒素(外毒素 A 和胞外酶 S)以及溶血素(磷脂酶和鼠李糖脂)等^[12-13]。这些毒性因子相互作用,相互影响从而产生致病性。PA 中这些毒性因子的表达受到依赖于细胞密度的群体感应系统(Quorum-sensing, QS)调控^[14]。

群体感应系统(Quorum-sensing, QS)以扩散性的小分子物质为信号分子,依据菌群的密度来调控个体基因的表达。它是一种重要而全面的基因调控机制。系统中的小分子信号物质被称为自诱导物,当这些信号分子到达一定的阈值浓度时,就可以激活群体感应系统,从而调控下游基因的表达^[15]。PA 有 2 类主要的 QS 系统:一类以酰基高丝氨酸内酯(HSL)为信号分子,在调控中起主要作用;另一类以喹诺酮为信号分子^[16]。HSL 为信号分子的 QS 系统又可分为 *Las* 系统和 *Rhl* 系统^[9,17]。*Las* 系统是由合成酶 LasI 催化生成重要的自诱导物 3-oxo-C12-HSL,当

3-oxo-C12-HSL 和受体蛋白 LasR 结合后去调控下游基因的表达。而 *Rhl* 系统是由 RhlI 催化生成的自诱导物 C₄-HSL 和受体 RhlR 构成的。在 PA 中有 11% 左右的基因受到 HSL 信号的影响,所以对 QS 系统的进一步了解是研究 PA 致病性的关键^[18-19]。

因为 PA 的致病性受 QS 系统的调控,所以对 QS 系统具有影响的小分子物质的发现和研究成为近期研发 PA 药物的新方向。QS 系统并不直接参与细菌的基本生长,因此它的阻抑物只会影响细菌的毒力表达,而不会产生强烈的生存压力。相较于影响细菌生长的抗生素而言,这种小分子抑制物的研究具有更广阔的发展前景。

理想的小分子抑制物应该是对 QS 系统具有明显的特异性抑制作用,而对菌体和宿主都无毒性的物质。同时它们还应该具有稳定的化学结构,能有效地发挥抑制作用^[20]。本实验以此为目的,设计了一个铜绿假单胞菌群体感应系统抑制物的筛选体系,并且对数十种中药提取物进行了检测。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株、质粒和引物

见表 1。

1.1.2 培养基及生长条件

LB 液体培养基: 10 g/L 胰蛋白胨, 5 g/L 酵母粉, 10 g/L NaCl; LB 固体培养基: LB 液体培养基中加入 1.1% 的琼脂粉。铜绿假单胞菌和大肠杆菌的常规培养是在 LB 培养基中 37 °C 有氧培养。根据实验需要添加不同的抗生素和不同浓度的蔗糖。

1.1.3 主要试剂和仪器

酵母粉、胰蛋白胨为 OXOID 公司产品;四环素(Tetracycline, Tc)、甲氧苄氨嘧啶(Trimethoprim, Tmp)和琼脂粉来自 Wolsen 公司;DMSO 为 Amresco 公司产品。限制性内切酶 *EcoR* I、*BamH* I、*Pst* I、*Hind* III 购自美国 New England BioLabs 公司;*Taq* 酶、dNTP 均购自北京天为时代公司;DNA 产物纯化试剂盒购自鼎国公司,其他化学试剂均为分析纯。Wallac 1420 Multilabel counter 购自 PerKinElmer 公司;LAS3000 Imaging System 为 FUJIFILM 公司产品;

表 1 供试菌株、质粒及引物

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

Strains, plasmids and primers	Description or sequence (5'-3')	Reference
<i>E. coli</i> DH10B	F ⁺ mcrA (mrr-hsdRMS-mcrBC)Φ80lacZM15lacX74deoR recA1 araD139 (ara leu)7697galU galK rpsL endA1 nupG	Invitrogen
<i>P. aeruginosa</i> PAO1	Wide type	[21]
Plasmid	Escherichia-Pseudomonas shuttle vector, Tetracycline ^r	This lab
pUCP26	Cloning vector with <i>sacB</i> gene	[22]
pEX18Tc	pMS402 containing <i>lasI</i> promoter region; Kn ^r , Tmp ^r	[23]
pKD- <i>lasI'</i>	pMS402 containing <i>rhIA</i> promoter region; Kn ^r , Tmp ^r	[23]
pKD- <i>rhIA'</i>		
Primers <i>sacB</i> PCR Forward	5'-cgcgaaTTCGGCATTTCCTTTGCG-3' With an underlined <i>EcoR</i> I restriction site.	
Reverse	5'-cgcgatccGGAGACATGAACGATGAACA-3' With an underlined <i>BamH</i> I restriction site.	
<i>rhIA'</i> PCR Forward	5'-catctgcaGTTGACCAGCATCACCGT-3' With an underlined <i>Hind</i> III restriction site	
Reverse	5'-ctgaagctTGCTCTTCTGCAATCCG-3' With an underlined <i>Pst</i> I restriction site	

离心机 Centrifuge5415D、Centrifuge5810R、PCR 仪 Mastercycle gradient 均购自 Eppendorf 公司; 96 孔板为 Costar 公司产品; Vector NTI 软件由 Invitrogen 公司提供。

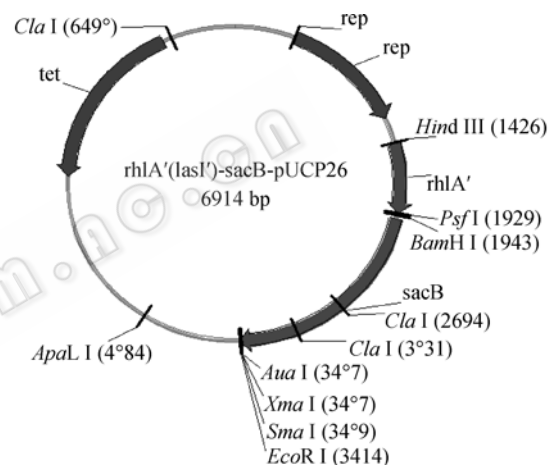
1.2 群体感应系统抑制物 (Quorum-sensing inhibitor, QSI) 筛选系统的构建方法

以 pEX18Tc 为模板, 用带有 *EcoR* I 和 *BamH* I 酶切位点的 *sacB* 引物(表 1)进行 PCR 扩增, 得到不含启动子的 *sacB* 片段。通过琼脂糖凝胶电泳回收纯化后, 用 *EcoR* I 和 *BamH* I 酶切, 然后与由同样 2 种酶酶切的 pUCP26 载体进行连接, 得到带有 *sacB* 基因的 pUCP26 载体——pUCP26-*sacB*。

用含有 *Pst* I 和 *Hind* III 酶切位点的 *rhIA* 引物(表 1), 从 PAO1 基因组中 PCR 扩增出 *rhIA* 基因的启动子域(*rhIA'*), 琼脂糖凝胶电泳纯化回收。用 *Pst* I 和 *Hind* III 分别双酶切 *rhIA'* 和 pUCP26-*sacB*, 然后连接, 构建成 pUCP26-*rhIA'*-*sacB*(图 1)^[24]。

同样, 用 *BamH* I 从 pKD-*lasI'* 中酶切出 *lasI* 的启动子域片段(*lasI'*), 酶切产物纯化后和经过 *BamH* I 酶切的 pUCP26-*sacB* 连接, 构建成 pUCP26-*lasI'*-*sacB*(图 1)。

将以上的 2 个最终连接产物电转化到 PAO1 感受态细胞中。转化物在 37 °C 恒温振荡摇床上恢复 1 h 后, 取 100 μL 涂布到含有四环素(70 μg/mL)的 LB 固体平板上, 培养 20~24 h。将平板上长出的单克隆转接到含有 LB 液体培养基(含 Tc 35 μg/mL)的 96 孔板中, 放置于 37 °C 恒温振荡摇床上过夜培养。用 48

图 1 筛选质粒 pUCP26-*rhIA'*(*lasI'*)-*sacB*Fig. 1 Screening plasmid pUCP26-*rhIA'*(*lasI'*)-*sacB*.

针点样器将 96 孔板中的样转接到含有四环素(70 μg/mL)和蔗糖(10%)的 LB 固体平板上^[25], 同时用只含四环素(70 μg/mL)的 LB 固体平板作对照, 进行蔗糖致死性的筛选^[26]。

将筛选出的菌株转接后提质粒, 酶切验证。最后将菌体接入牛奶管中-70 °C 保存。

1.3 筛选系统的平板检测实验方法

将构建好的菌株接在 LB 平板(含 Tc 70 μg/mL)上 37 °C 培养过夜。挑单克隆分别转接至 LB 平板(含 Tc 70 μg/mL)和含有 10%蔗糖的 LB 平板(含 Tc 70 μg/mL), 用 PA-pUCP26 作为对照菌株, 37 °C 培养 18 h, 观察生长结果, 在 LAS-3000 荧光/化学发光成像分析系统中成像。

1.4 利用筛选系统对中药提取物的筛选方法

将带有筛选质粒 pUCP26-*rhlA'*-*sacB* 或 pUCP26-*lasI'*-*sacB* 的菌种分别接到含有四环素(70 $\mu\text{g}/\text{mL}$)的 LB 平板上, 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 18 h。挑单克隆至 2 mL LB 液体培养基(含 Tc 35 $\mu\text{g}/\text{mL}$), 37 $^{\circ}\text{C}$ 、200 r/min, 培养 12~16 h。取 50 μL 菌液转接到新鲜 LB 液体培养基(含 Tc 35 $\mu\text{g}/\text{mL}$)进行 1:20 的稀释, 37 $^{\circ}\text{C}$ 、200 r/min, 继续活化培养 3 h, 作为种子培养液。预先在 96 孔板中加入蔗糖浓度为 10% 的 LB 液体培养基(含 Tc 35 $\mu\text{g}/\text{mL}$)。然后取适量不同浓度的中药样品提取液加入 96 孔板, 使每种样品的最终浓度分别为原液浓度的 1/150、1/500、1/1000 和 1/2000。然后将 10 μL 种子培养液转接到 96 孔板进行 1:10 的稀释, 使板孔中最终菌液量为 100 μL 。

同时, 在 96 孔板中剩余的孔内, 用同体积的双蒸水代替样品, 作为抑制效果对照。用不含蔗糖的 LB 液体培养基替换含蔗糖的培养基, 作为生长对照。

最后每孔加入 50 μL 矿物油覆盖, 在 Wallac 1420 Multilabel Counter 上每隔 0.5 h 测量其生长 (OD_{600})。

1.5 荧光 QSI 筛选系统的平板检测试验

将含有 pKD-*rhlA* 或 pKD-*lasI* 的 PA 菌株分别接种到 LB 平板(含 Tmp 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$), 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养过夜。挑单克隆接至 5 mL LB 液体培养基(含 Tmp 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$), 37 $^{\circ}\text{C}$ 、转速 200 r/min, 培养 14 h。取 250 μL 菌液加入融好的 LB 固体培养基中(含 Tmp 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$), 摇匀后倒平板, 待平板上无多余水分后, 将平板分为 5 个相等的区域, 每个区放一个直径 6 mm 的滤纸片, 分别点 15 μL 的浓度为 1/5 的中药样品以及 15 μL ddH₂O 作为阴性对照, 15 μL 大蒜萃取液作为阳性对照^[27]。37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 18 h 后, 在 LAS-3000 荧光/化学发光成像分析系统中成像。

2 结果与分析

2.1 QSI 筛选系统的构建

为了能够简便而直观地对各种成分进行筛选, 从而得到有效的 QSI。本研究选取了果聚糖转移酶基因(*sacB*)——蔗糖致死基因——作为报道基因^[28], 分别将 QS 系统中的 *lasI* 及一个受 QS 系统调节的致病相关基因 *rhlA* 的启动子域作为报道基因的启

动子^[29], 构建了一个可以通过菌体生长直接反映 QS 系统调节活性的筛选体系(图 1)。当培养基中加入蔗糖, 由于 *sacB* 基因的表达, 菌体的生长会受到抑制^[30](图 2)。而 QSI 能抑制 *sacB* 基因的表达, 保护菌体生长不受抑制, 从而可以以生长的变化有效地筛选出群体感应系统的抑制物。

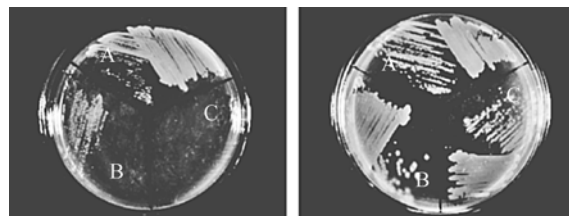


图 2 蔗糖对含有不同质粒 PA 生长量的影响

Fig. 2 Effect of sucrose on PA harbouring different plasmids. A: PA with pUCP26; B: PA with pUCP26-*rhlA'*-*sacB*; C: PA with pUCP26-*lasI'*-*sacB*. The left plate contains 10% sucrose and the right is the control without sucrose.

2.2 利用筛选系统对中药提取物进行检测

本实验用构建好的筛选系统在 96 孔板中对 30 种中药水粗提浓缩物进行筛选, 以寻找具有抑制效果的药物。经过筛选, 在这 30 种中药材中, 有一种爵床科(Acanthaceae)植物提取物和一种败酱科(Valerianaceae)植物提取物对于 QS 系统有明显的抑制。图 3A 是爵床科植物提取物对于 *rhlA'* 表达的影响, 图 3B 是败酱科植物提取物对 *lasI'* 表达的影响。同时也发现一种萝藦科(Asclepiadaceae)植物的提取物对于 *lasI'* 的表达有少量的抑制作用, 结果见图 3C。

从图 3 中可以看出, 这 3 种中药提取物的抑制效果随着样品浓度的降低而减小, 最低有效浓度可达 1/1000 左右。

2.3 荧光 QSI 筛选系统的平板检测实验

为了更灵敏、快速地检测 QSI, 本研究同时又建立了一组由荧光素酶基因及其底物合成基因为报道子的筛选体系。在荧光 QSI 筛选系统中, pKD-*rhlA'* 和 pKD-*lasI'* 分别是由基因启动子域 *rhlA'* 和 *lasI'* 与荧光基因报道子 *luxCDABE* 相连构成。通过荧光的强弱反映 QS 系统的活性, 从而用来筛选抑制物。当有 QSI 存在时, 发光减弱。

将蔗糖致死筛选系统检测出的 3 种有效中药提取物在荧光 QSI 筛选系统中进行平板检测。图 4 是

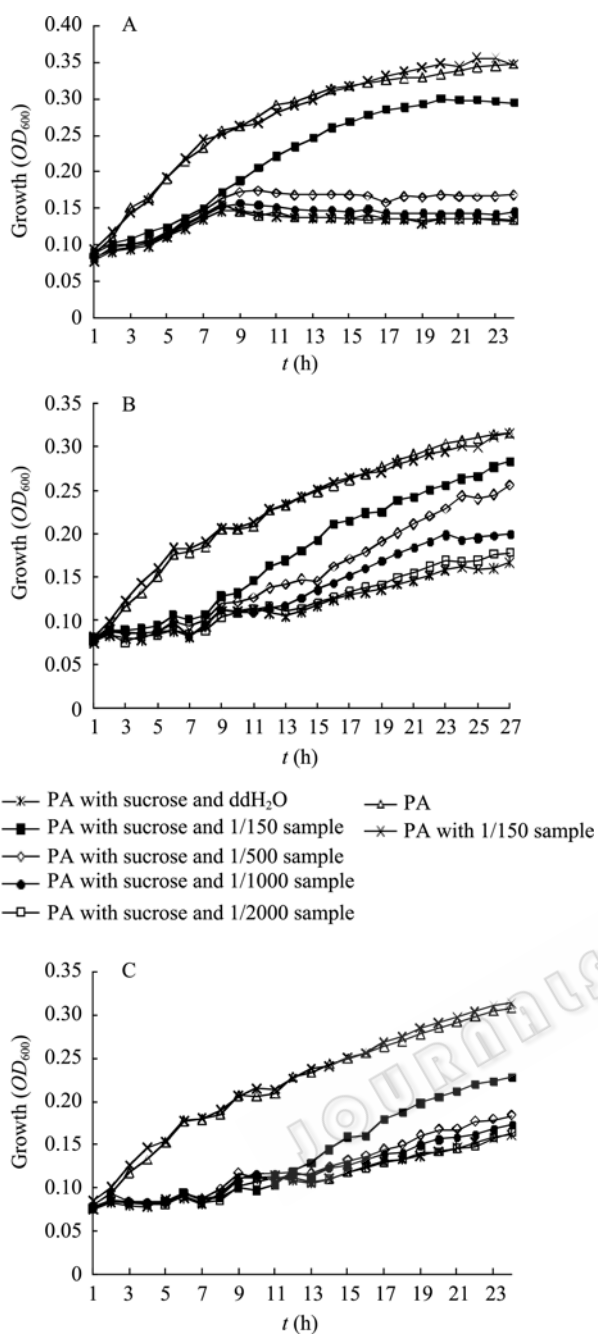


图3 中药样品对于 *sacB* 致死筛选系统的影响
 Fig. 3 Effect on the *sacB* screening system for QSI by herbal extracts. (A) Inhibition of *rhIA'* expression by *Acanthaceae*. (B) Inhibition of *lasI'* expression by *Valerianaceae*. (C) Inhibition of *lasI'* expression by *Asclepiadaceae*.

提取物对含有 pKD-*rhIA'* 和 pKD-*lasI'* 的 PA 荧光 QSI 筛选系统作用结果。从图中可以看出, 这 3 种中药提取物和阴性对照 ddH₂O、阳性对照大蒜萃取液对 PA 的生长均无影响(图 4a、4c), 爵床科植物提取物和败酱科植物提取物的滤纸片周围细菌发光减弱明显, 而点蓼科植物提取物的滤纸片在 pKD-*rhIA'* 系

统中, 周围细菌发光有微弱的降低, 而对于 pKD-*lasI'* 系统几乎没有影响。阴性对照 ddH₂O 滤纸片的周围细菌发光情况没有变化, 而含阳性对照物大蒜萃取液的滤纸片周围细菌发光减弱(图 4b、4d)。这表明: 爵床科植物提取物和败酱科植物提取物对于 QS 系统有抑制作用, 同时降低了 *Las* 系统和 *Rhl* 系统相关基因启动子的活性, 使荧光素酶基因 *luxCDABE* 的表达量降低, 导致细菌发光减弱。而蓼科植物提取物的抑制药效较弱, 对 *Rhl* 系统有抑制, 而对 *Las* 系统抑制不明显。

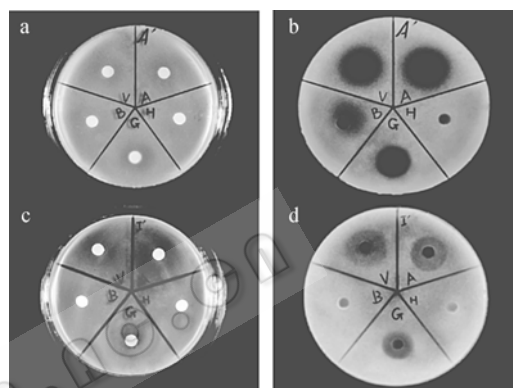


图4 三种中药提取物对荧光筛选系统的影响
 Fig. 4 Effect on the fluorescence screening system for QSI by three extracts. (a) Growth of PA with pKD-*rhIA'*. (b) Chemiluminescence of PA with pKD-*rhIA'*. (c) Growth of PA with pKD-*lasI'*. (d) Chemiluminescence of PA with pKD-*lasI'*. V: *Valerianaceae*; A: *Acanthaceae*; B: *Asclepiadaceae*; H: ddH₂O; G: garlic.

3 讨论

本实验将铜绿假单胞菌中受体感应系统相关基因的启动子域克隆到缺失启动子的蔗糖致死基因 *sacB* 前, 使 *sacB* 的表达受到 QS 系统的调控, 从而构建了一个可以通过对比不同条件下 PA 菌体的生长情况来检测其 QSI 的筛选体系。该筛选体系可以直接从菌体的生长量进行检测, 其生长值的高低直接体现了筛选药品对于 QS 系统抑制作用的大小。因此, 该系统适用于大量样品快速而灵敏的检测。

中药是具有悠久历史的天然医用药材。在品种繁多的中医药材中, 有很多具有强效的抗细菌感染作用。这些药材对于现今处于困境的抗生素研究开发具有巨大的价值。本实验利用针对铜绿假单胞菌

QS 系统抑制物的筛选体系对一些具有药用价值的中药材粗提物进行检测。在实验过程中,对于每个样品都同时做了 2 个对照:一个是在含有蔗糖的培养基中加入水作对照,以筛选出具有抑制效果的样品;另一个是在 LB 培养基中只加入样品作对照,从而保证筛选出的样品对于菌的生长没有影响。这样筛选出的样品发挥作用时只会对 QS 系统进行抑制,影响 PA 毒性因子的表达,降低致病性,而不会因为生长压力的作用使细菌产生耐药性。这是很多现今的抗生素药物所不能达到的。经过双重对照筛选出的样品具有更好的医用发展前景。

经过筛选,本实验得到了 3 种具有抑制作用的中药材提取物:分别是一种爵床科植物、一种败酱科植物和一种萝藦科植物。这 3 种科属的植物大多数都有清热解毒的作用,常见于抑菌消炎的中药古方中。从结果图中,可以发现蔗糖致死筛选(*sacB*-QS)系统液体实验中用到的爵床科植物和败酱科植物对于 *lasI*' 和 *rhlA*' 的表达都有作用,但是影响的强弱程度不同:爵床科植物提取物主要作用于 *rhlA*' 的表达而败酱科植物提取物则对 *lasI*' 影响明显。液体实验中萝藦科属植物提取物对 *lasI*' 和 *rhlA*' 的表达抑制作用较微弱。

然后通过荧光 QSI 筛选系统的平板实验再次对筛选出的提取物进行检测,证实 *sacB*-QSI 系统的筛选效率。荧光 QSI 筛选系统是由 QS 系统调控的基因启动子域和荧光基因报道子所构成的。通过荧光的强弱反映筛选物的抑制效果。从实验结果看,抑制效果相同,但是在抑制程度上 2 个系统的结果略有不同。

以上结果可知,中药抑制物对于受 QS 调控的不同致病性基因的作用是有强弱特异性的。可以通过替换筛选体系中 PA 毒力基因启动子,从而有针对性地筛选药物。或可以结合筛选出的药物对铜绿假单胞菌临床病症的影响来判定该筛选系统中的致病基因和临床表型之间的关系。

总之,本实验构建了一个将菌体生长量和筛选效果相关联的铜绿假单胞菌群体感应抑制物检测系统。它相比于产色素等模式具有细菌背景低、灵敏度高、能进行实时定量检测等优点,为研究相关致病性基因与群体感应的关系和高通量筛选群体感应

抑制物提供了可行的技术平台。根据筛选物对致病基因的影响,有可能进一步了解细菌的致病分子机理,为开发新型的致病抗菌药物打下了基础。

REFERENCES

- [1] Clatworthy AE, Pierson E, Hung DT. Targeting virulence: a new paradigm for antimicrobial therapy. *Nat Chem Biol*, 2007, **3**(9): 541–548.
- [2] Shoop WL, Xiong Y, Wiltsie J, et al. Anthrax lethal factor inhibition. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, **102**(22): 7958–7963.
- [3] Krantz BA, Melnyk RA, Zhang S, et al. A phenylalanine clamp catalyzes protein translocation through the anthrax toxin pore. *Science*, 2005, **309**(5735): 777–781.
- [4] Kauppi AM, Nordfelth R, Uvell H, et al. Targeting bacterial virulence: inhibitors of type III secretion in *Yersinia*. *Chem Biol*, 2003, **10**(3): 241–249.
- [5] Nordfelth R, Kauppi AM, Norberg HA, et al. Small-molecule inhibitors specifically targeting type III secretion. *Infect Immun*, 2005, **73**(5): 3104–3114.
- [6] Dong YH, Xu JL, Li XZ, et al. AiiA, an enzyme that inactivates the acylhomoserine lactone quorum-sensing signal and attenuates the virulence of *Erwinia carotovora*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, **97**(7): 3526–3531.
- [7] Dong YH, Wang LH, Xu JL, et al. Quenching quorum-sensing-dependent bacterial infection by an N-acyl homoserine lactonase. *Nature*, 2001, **411**(6839): 813–817.
- [8] Lyon GJ, Wright JS, Christopoulos A, et al. Reversible and specific extracellular antagonism of receptor-histidine kinase signaling. *J Biol Chem*, 2002, **277**(8): 6247–6253.
- [9] Bjarnsholt T, Givskov M. The role of quorum sensing in the pathogenicity of the cunning aggressor *Pseudomonas aeruginosa*. *Anal Bioanal Chem*, 2007, **387**(2): 409–414.
- [10] Stover CK, Pham XQ, Erwin AL, et al. Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PA01, an opportunistic pathogen. *Nature*, 2000, **406**(6799): 959–964.
- [11] Mesaros N, Nordmann P, Plesiat P, et al. *Pseudomonas aeruginosa*: resistance and therapeutic options at the turn of the new millennium. *Clin Microbiol Infect*, 2007, **13**(6): 560–578.
- [12] Zhu H, Bandara R, Conibear TC, et al. *Pseudomonas aeruginosa* with *lasI* quorum-sensing deficiency during corneal infection. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2004, **45**(6): 1897–1903.
- [13] Smith RS, Iglewski BHP. *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing systems and virulence. *Curr Opin Microbiol*, 2003, **6**(1): 56–60.
- [14] Tateda K, Ishii Y, Kimura S, et al. Suppression of *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing systems by macrolides: a promising strategy or an oriental mystery? *J*

- Infect Chemother*, 2007, **13**(6): 357–367.
- [15] Juhas M, Eberl L, Tummli B. Quorum sensing: the power of cooperation in the world of *Pseudomonas*. *Environ Microbiol*, 2005, **7**(4): 459–471.
- [16] Diggle SP, Crusz SA, Camara M. Quorum sensing. *Curr Biol*, 2007, **17**(21): R907–R910.
- [17] Venturi V. Regulation of quorum sensing in *Pseudomonas*. *FEMS Microbiol Rev*, 2006, **30**(2): 274–291.
- [18] Whiteley M, Lee KM, Greenberg EP. Identification of genes controlled by quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, **96**(24): 13904–13909.
- [19] Schuster M, Greenberg EP. A network of networks: quorum-sensing gene regulation in *Pseudomonas aeruginosa*. *Int J Med Microbiol*, 2006, **296**(2-3): 73–81.
- [20] Rasmussen TB, Givskov M. Quorum sensing inhibitors: a bargain of effects. *Microbiology*, 2006b, **152**(Pt 4): 895–904.
- [21] Holloway BW. Genetic recombination in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Gen Microbiol*, 1955, **13**(3): 572–581.
- [22] Hoang TT, Karkhoff-Schweizer RR, Kutchma AJ, et al. A broad-host-range FLP-FRT recombination system for site-specific excision of chromosomally-located DNA sequences: application for isolation of unmarked *Pseudomonas aeruginosa* mutants. *Gene*, 1998, **212**(1): 77–86.
- [23] Duan K, Dammel C, Stein J, et al. Modulation of *Pseudomonas aeruginosa* gene expression by host microflora through interspecies communication. *Mol Microbiol*, 2003, **50**(5): 1477–1491.
- [24] Morici LA, Carterson AJ, Wagner VE, et al. *Pseudomonas aeruginosa* AlgR represses the Rhl quorum-sensing system in a biofilm-specific manner. *J Bacteriol*, 2007, **189**(21): 7752–7764.
- [25] Pelicic V, Reyrat JM, Gicquel B. Expression of the *Bacillus subtilis* *sacB* gene confers sucrose sensitivity on mycobacteria. *J Bacteriol*, 1996, **178**(4): 1197–1199.
- [26] Zhao XY, Liang HH, Duan KM, et al. Screen and identification of genes involved in multidrug resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Acta Microbiol Sin*, 2008, **48**(8): 1019–1024.
赵兴艳, 梁海华, 段康民, 等. 铜绿假单胞菌多重耐药基因的筛选及鉴定. *微生物学报*, 2008, **48**(8): 1019–1024.
- [27] Rasmussen TB, Givskov M. Quorum-sensing inhibitors as anti-pathogenic drugs. *Int J Med Microbiol*, 2006a, **296**(2-3): 149–161.
- [28] Quenee L, Lamotte D, Polack B. Combined *sacB*-based negative selection and cre-lox antibiotic marker recycling for efficient gene deletion in *Pseudomonas aeruginosa*. *Biotechniques*, 2005, **38**(1): 63–67.
- [29] Ochsner UA, Reiser J. Autoinducer-mediated regulation of rhamnolipid biosurfactant synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, **92**(14): 6424–6428.
- [30] Gay P, Le Coq D, Steinmetz M, et al. Cloning structural gene *sacB*, which codes for exoenzyme levansucrase of *Bacillus subtilis*: expression of the gene in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, 1983, **153**(3): 1424–1431.