

信号分子自诱导物-2 (AI-2)通过 Tar1 调节伸长盐单胞菌的趋化运动和生物膜形成

王卓^{1*}, 魏嘉倓², 杨艳艳², 郭欣², 王传旭¹, 杨静¹, 牛亚洁¹, 李新^{1,3*}

1 运城学院 生命科学系, 运城盐湖生态保护与资源利用厅市共建山西省重点实验室, 山西 运城

2 山西农业大学 食品科学与工程学院, 山西 太谷

3 忻州师范学院 生物系, 山西 忻州

王卓, 魏嘉倓, 杨艳艳, 郭欣, 王传旭, 杨静, 牛亚洁, 李新. 信号分子自诱导物-2 (AI-2)通过 Tar1 调节伸长盐单胞菌的趋化运动和生物膜形成[J]. 微生物学报, 2026, 66(2): 770-782.

WANG Zhuo, WEI Jiatan, YANG Yanyan, GUO Xin, WANG Chuanxu, YANG Jing, NIU Yajie, LI Xin. The signaling molecule autoinducer-2 regulates the chemotaxis and biofilm formation of *Halomonas elongata* via Tar1[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2026, 66(2): 770-782.

摘要: 自诱导物-2 (autoinducer-2, AI-2)是一种广泛存在于细菌中的种间群体感应信号分子, 参与调解生物发光、趋化运动以及生物膜形成等许多重要的生理过程。然而, AI-2对伸长盐单胞菌(*Halomonas elongata*)的影响及其作用机制尚未见报道。【目的】揭示伸长盐单胞菌中信号分子 AI-2 的受体蛋白, 并检测 AI-2 通过受体蛋白对伸长盐单胞菌趋化运动和生物膜形成能力产生的影响。【方法】采用毛细管定量分析法检测伸长盐单胞菌对 AI-2 的趋化响应; 通过对甲基趋化受体蛋白进行结构域分析、序列比对和分子对接找到 AI-2 的潜在受体蛋白 Tar1 及其关键氨基酸位点; 表达并纯化 Tar1 的配体结合结构域(ligand-binding domain, LBD)蛋白及其点突变蛋白, 通过哈维氏弧菌发光试验检测 Tar1-LBD 是否结合信号分子 AI-2; 运用同源重组技术构建 *tar1* 基因缺失突变体, 并通过毛细管定量分析和生物膜形成试验检测 AI-2 对伸长盐单胞菌趋化运动和生物膜形成的影响。【结果】毛细管定量分析法显示伸长盐单胞菌对信号分子 AI-2 表现出趋向性。在伸长盐单胞菌中共找到 4 个甲基受体趋化蛋白, 结构域分析、序列比对、分子对接以及哈维氏弧菌发光试验表明 Tar1-LBD 能够结合信号分子 AI-2。利用同源重组技术成功构建了伸长盐单胞菌 *tar1* 基因缺失突变体, *tar1* 基因的缺失会抑制伸长盐单胞菌对 AI-2 的趋化响应, 而互补菌株的趋化响

资助项目: 国家自然科学基金(32300111); 山西省基础研究计划(202303021212258); 山西省高等学校青年教师科研创新能力支持项目(2025Q035); 运城市科技计划(YCKJ-2024022, YCKJ-2023030); 博士来晋科研专项(QZX-2023006); 运城学院博士科研启动项目(YQ-2023005)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (32300111), the Fundamental Research Program of Shanxi Province (202303021212258), the Support Project for Research Innovation Capability of Young Faculty in Shanxi Higher Education Institutions (2025Q035), the Yuncheng Science and Technology Program (YCKJ-2024022, YCKJ-2023030), the Doctoral Scientific Startup Fund (QZX-2023006), and the Doctoral Scientific Startup Fund of Yuncheng University (YQ-2023005).

*Corresponding authors. E-mail: WANG Zhuo, wangzhuojs@ycu.edu.cn; LI Xin, lixin-eva@163.com

Received: 2025-08-21; Accepted: 2025-09-20; Published online: 2025-10-11

应可恢复到接近野生型的水平。此外, 生物膜形成试验检测显示, AI-2 能够通过 Tar1 促进伸长盐单胞菌的生物膜形成。【结论】伸长盐单胞菌对信号分子 AI-2 具有趋化性, AI-2 通过结合甲基趋化受体蛋白 Tar1 的配体结合结构域来调控伸长盐单胞菌的趋化运动和生物膜形成。

关键词: 伸长盐单胞菌; 自诱导物-2 (AI-2); 受体蛋白; 趋化性; 生物膜形成

The signaling molecule autoinducer-2 regulates the chemotaxis and biofilm formation of *Halomonas elongata* via Tar1

WANG Zhuo^{1*}, WEI Jiatan², YANG Yanyan², GUO Xin², WANG Chuanxu¹, YANG Jing¹, NIU Yajie¹, LI Xin^{1,3*}

1 Shanxi Key Laboratory of Yuncheng Salt Lake Ecological Protection and Resource Utilization, Life Sciences Department, Yuncheng University, Yuncheng, Shanxi, China

2 College of Food Science and Engineering, Shanxi Agricultural University, Taigu, Shanxi, China

3 Department of Biology, Xinzhou Normal University, Xinzhou, Shanxi, China

Abstract: As a widely conserved interspecies quorum sensing signaling molecule, autoinducer-2 (AI-2) is involved in regulating various crucial physiological processes such as bioluminescence, chemotaxis, and biofilm formation. However, the effects of AI-2 on *Halomonas elongata* and its underlying mechanisms remain unreported. **[Objective]** To reveal the receptor that regulates the chemotaxis and biofilm formation of *H. elongata* in response to AI-2. **[Methods]** The quantitative capillary assay was employed to examine the chemotactic response of *H. elongata* to AI-2. We conducted protein domain identification, sequence alignment, and molecular docking of methyl-accepting chemotaxis proteins to identify the key amino acid sites in Tar1, the potential AI-2 receptor. The ligand-binding domain (LBD) of Tar1 and single-point mutants were expressed and purified, and the binding between Tar1-LBD and AI-2 was measured by the *Vibrio harveyi* MM32 bioluminescence assay. *tar1* was deleted by homologous recombination, and the effects of AI-2 on the chemotaxis and biofilm formation of *H. elongata* were evaluated by quantitative capillary and biofilm formation assays. **[Results]** The quantitative capillary assay revealed that *H. elongata* exhibited chemotaxis to AI-2. Four methyl-accepting chemotaxis proteins were identified in *H. elongata*. Protein domain identification, sequence alignment, molecular docking, and *V. harveyi* MM32 bioluminescence assay demonstrated that Tar1-LBD bound to AI-2. The *tar1*-deleted mutant of *H. elongata* was successfully constructed by homologous recombination. The deletion of *tar1* impaired the chemotaxis of *H. elongata* to AI-2, whereas the complementation of this gene restored the chemotaxis to level comparable to that in the wild-type. Furthermore, biofilm formation assay revealed that AI-2 enhanced the biofilm formation in *H. elongata* via Tar1. **[Conclusion]** *H. elongata* exhibits chemotaxis to AI-2, and this signal molecule binds to the LBD of Tar1, thereby modulating chemotaxis and biofilm formation.

Keywords: *Halomonas elongata*; autoinducer-2 (AI-2); receptor; chemotaxis; biofilm formation

群体感应(quorum sensing, QS)系统是细胞间的一种信息交流机制,广泛存在于微生物中^[1]。微生物在生长过程中会产生并分泌信号分子,随着微生物种群密度的增加,信号分子不断累积,达到阈值后与受体蛋白结合,触发细胞内的相关信号转导途径,进而调控微生物的群体行为^[2]。S-腺苷同型半胱氨酸核苷酶(S-ribosylhomocysteine lyase, LuxS)催化合成的4,5-二羟基-2,3-戊二酮经自发环化后形成的自诱导物-2(autoinducer-2, AI-2),是一种广泛存在于革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌中的信号分子,参与调控生物发光、毒素分泌、运动性以及生物膜形成等多种重要生理过程^[1-3]。

目前鉴定的AI-2受体蛋白有4类,分别为LuxP、LsrB、YeaJ以及具有dCACHE结构域的受体蛋白^[4-7]。LuxP是弧菌属(*Vibrio*)特有的受体蛋白,负责调控其生物发光等群体行为^[8];LsrB受体蛋白主要分布于大肠杆菌(*Escherichia coli*)和沙门氏菌(*Salmonella*)等肠道菌中,负责感受AI-2,并激活转运系统将其转运至胞内降解^[9];在鼠伤寒沙门氏菌(*Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium str.)中AI-2可通过YeaJ蛋白(c-di-GMP合成酶)调控胞内c-di-GMP水平,从而影响其生物膜形成和毒力^[4];dCACHE结构域家族中最大的亚家族dCache_1结构域可与多种信号输出结构域(如甲基接受趋化蛋白结构域)串联在一起,dCache_1结构域在感受到AI-2后通过别构调节改变信号输出结构域的活性,从而促进或抑制下游信号通路^[4-5,10-11]。

在自然界中,细菌面对有利于自身生长的物质会定向移动至该区域,而遇到有害物质则会主动远离,这种趋利避害的行为被称为趋化性^[12-13]。甲基趋化受体蛋白(methyl-accepting chemotaxis protein, MCP)是细菌识别外界化学信号的化学感受器,参与调控细菌趋化性、生物膜形成以及致病性等多种重要生理过程^[14-16]。

伸长盐单胞菌(*Halomonas elongata*)是一株革兰氏阴性细菌,常见于自然界中的盐碱地、

盐湖、海水等高盐环境,能够耐受5%–25%(NaCl)的盐浓度^[17]。为适应如此宽泛的盐浓度,伸长盐单胞菌能够合成四氢嘧啶和甜菜碱等多种小分子相容性溶质来稳定渗透压,从而维持自身正常代谢^[17-19]。这种独特的高盐环境生存优势使得伸长盐单胞菌可在开放和非无菌的条件下进行发酵,而不用担心染菌,同时可以节约灭菌过程所需的能源,因此在生物技术开发领域具有良好的应用前景^[19-21]。本研究通过毛细管定量分析法检测伸长盐单胞菌对信号分子AI-2的趋化响应,通过序列比对、分子对接和哈维氏弧菌生物发光等试验筛选伸长盐单胞菌中信号分子AI-2的潜在受体蛋白,并检测AI-2对伸长盐单胞菌生物膜形成能力的影响,以期为伸长盐单胞菌的环境适应机制研究和开发利用奠定基础。

1 材料与方 法

1.1 菌株、质粒及引物

本研究所使用的菌株和质粒如表1所示,所用引物信息如表2所示。

1.2 主要试剂和仪器

氯化钠、葡萄糖、硫酸镁、氯化钙、甘油、无水乙醇等常规试剂,西陇科学股份有限公司;琼脂糖、结晶紫、卡那霉素、氯霉素、氨苄青霉素等,北京索莱宝科技有限公司;蛋白胨和酵母提取物,Oxoid公司;细菌基因组提取试剂盒、胶回收和质粒小提试剂盒,天根生化科技(北京)有限公司;AI-2信号分子标准品,上海赛可锐生物科技有限公司;DNA聚合酶和限制性内切酶,宝日医生物技术(北京)有限公司;T4 DNA连接酶和基因定点突变试剂盒,上海碧云天生物技术股份有限公司。

多功能酶标仪,BioTek公司;核酸电泳仪、凝胶成像仪,上海天能科技有限公司;高速冷冻离心机和超微量分光光度计,ThermoFisher Scientific公司。

表1 本研究所使用菌株和质粒

Table 1 Bacterial strains and plasmids used in this study

Strains and plasmids	Description	Sources
Strains		
<i>Escherichia coli</i>		
TG1	Host for cloning	Laboratory collection
S17-1	λ -pir lysogen of S17-1, F ⁻ <i>thi pro hsdR</i> [RP4-2 Tc::Mu Km::Tn7 (Tp Sm)]	Laboratory collection
BL21(DE3)	F ⁻ <i>ompT hsdS</i> (r _B ⁻ , m _B ⁻) <i>gal dem</i> (DE3)	Laboratory collection
LuxS ⁻ BL21(DE3)	Δ <i>luxS</i> deletion mutant in <i>E. coli</i> BL21(DE3)	Laboratory collection
<i>Vibrio harveyi</i>		
<i>V. harveyi</i> MM32	<i>luxN::cat luxS::Tn5kan</i>	[22]
<i>Halomonas elongata</i>		
<i>Halomonas elongata</i> DSM 2581	Wild-type	GDMCC
Δ <i>tar1</i>	<i>tar1</i> deletion mutant derived from <i>H. elongata</i>	This study
Plasmids		
pK18mobsacB	<i>sacB</i> -based suicide vector for gene knockout, Kan ^r	Laboratory collection
pK18mobsacB- Δ <i>tar1</i>	Containing <i>tar1</i> knockout fragment	This study
pBBR1MCS-1	Broad-host-range vector, Chl ^r	Laboratory collection
pBBR1MCS-1- <i>tar1</i>	<i>Tar1</i> was cloned into pBBR1MCS-1	This study
pET-28a	Bacterial vector for expression of N-terminally His ₆ -tagged proteins, Kan ^r	Laboratory collection
pET-28a- <i>tar1-LBD</i>	pET-28a expressing <i>tar1-LBD</i>	This study
pET-28a- <i>tar1-LBD</i> _{R88A}	pET-28a expressing <i>tar1-LBD</i> _{R88A}	This study
pET-28a- <i>tar1-LBD</i> _{W90A}	pET-28a expressing <i>tar1-LBD</i> _{W90A}	This study
pET-28a- <i>tar1-LBD</i> _{Y106A}	pET-28a expressing <i>tar1-LBD</i> _{Y106A}	This study
pET-28a- <i>tar1-LBD</i> _{D108A}	pET-28a expressing <i>tar1-LBD</i> _{D108A}	This study

Kan: Kanamycin; Chl: Chloramphenicol.

1.3 培养基和培养条件

以大肠杆菌为基础构建的各种菌株使用 LB 培养基培养^[5], 培养条件为 37 °C、220 r/min; 以伸长盐单胞菌为基础构建的各种菌株使用 LB1M 液体培养基(LB 培养基补加 1 mol/L 氯化钠)培养, 培养条件为 30 °C、220 r/min。培养时抗生素终浓度为: 氨苄青霉素 100 μg/mL、卡那霉素 50 μg/mL、氯霉素 20 μg/mL。

1.4 趋化性检测

参照文献[5]使用毛细管定量分析法进行趋化性检测。伸长盐单胞菌培养至对数后期(*OD*₆₀₀ 为 1.3)时取 2 mL 菌液, 4 500 r/min 离心 5 min, 菌体用 2 mL M91M 基础培养基(M9 基础培养基^[5]补加 1 mol/L 氯化钠)重悬。重悬后的菌体按每孔 200 μL 的体积加入 96 孔板中。用酒精灯外

焰封闭微量毛细管一端后, 将另一端浸入 AI-2 信号分子溶液。随后取出用 M91M 基础培养基清洗外壁, 将微量毛细管穿过硅胶垫垂直浸入 96 孔板, 静置 1 h 后取出, 再用 M91M 基础培养基清洗外壁, 折断后将内部液体吹入装有 1 mL M91M 基础培养基的 1.5 mL 离心管中, 取 100 μL 涂布在 LB1M 平板上, 30 °C 倒置培养 32 h 后进行平板菌落计数。

1.5 Tar1-LBD 序列比对和分子对接

使用 ClustalX 2.1 软件对伸长盐单胞菌 *Tar1* 的配体结合结构域(ligand-binding domain, LBD) *Tar1-LBD* 和铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) *PctA-LBD* 的氨基酸序列进行比对分析, 结果通过 ESPript 2 (<https://esript.ibcp.fr/ESPrpt/cgi-bin/ESPrpt.cgi>)在线工具导出^[23]。信号分子 AI-2 和 *Tar1-LBD* 的分子对接参照文献[4]

表2 本研究所用引物

Table 2 Primers used in this study

Primers name	Primer sequences (5'→3')	Purpose
<i>tar1</i> -UP-F	CCGGAATTCCAATACGCTCAAGCAGGAAG	To generate pK18mobsacB- $\Delta tar1$
<i>tar1</i> -UP-R	GCTCGGCATCTCGCAATGAGGTCAACAT	
<i>tar1</i> -DOWN-F	CTCATTGCGAGATGCCGAGCCAGCGTGAGG	
<i>tar1</i> -DOWN-R	CCCAAGCTTGTGGTGAAGCTGGTGATGG	
<i>tar1</i> -F	CGGGGTACCATGTTGACCTCATTGCGACT	To generate pBBR1MCS-1- <i>tar1</i>
<i>tar1</i> -R	CCCAAGCTTTCACGCTGGCTCGGCATCTT	
<i>tar1LBD</i> -HF	CGCGGATCCATGGAATCCACAACGAA	To generate pET-28a- <i>tar1-LBD</i>
<i>tar1LBD</i> -HR	ACGCGTCGACTCAGGAGGCGCTCATCAC	
<i>tar1LBD</i> _{R88A} -HF	GGGGTATGACCCGCGGAGGCCCTGGTATCGCCAGGCCGTGGA	To generate pET-28a- <i>tar1-LBD</i> _{R88A}
<i>tar1LBD</i> _{R88A} -HR	TCCACGGCCTGGCGATAACCAGGGGCGCTCGCGGGTTCATACCCC	
<i>tar1LBD</i> _{W90A} -HF	GTATGACCCGCGGAGCGCCCCGCGTATCGCCAGGCCGTGGAGGC	To generate pET-28a- <i>tar1-LBD</i> _{W90A}
<i>tar1LBD</i> _{W90A} -HR	GCCTCCACGGCCTGGCGATAACGCGGGGCGCTCGCGGGTTCATAC	
<i>tar1LBD</i> _{Y106A} -HF	GTCCACCGTGGTACC GCGCCCCGCTGAGGACGCCACGTCCGACAA	To generate pET-28a- <i>tar1-LBD</i> _{Y106A}
<i>tar1LBD</i> _{Y106A} -HR	TTGTCGGACGTGGCGTCTCAGCGGGGCGGGTGACCACGGTGGAC	
<i>tar1LBD</i> _{D108A} -HF	GGTACCGCGCCCTATGAGGCCGCCACGTCCGACAAGCTGGTGGT	To generate pET-28a- <i>tar1-LBD</i> _{D108A}
<i>tar1LBD</i> _{D108A} -HR	ACCACCAGCTTGTTCGGACGTGGCGGCCTCATAGGGGCGGGTGACC	

The underline represents the enzyme cleavage site.

并加以修改。采用 SWISS-MODEL 构建 Tar1-LBD 三维构象(<https://swissmodel.expasy.org/>)^[24]。从 R-THMF-LsrB (PDB ID: 1TJY)中提取信号分子 AI-2 结构^[25]。使用 AutoDock Vina 1.1.2 (<https://vina.scripps.edu>)进行分子对接^[26]，对接结果使用 PyMOL (<http://www.pymol.org>)软件进行可视化展示。

1.6 蛋白的异源表达和纯化

以伸长盐单胞菌基因组 DNA 为模板(使用细菌基因组 DNA 提取试剂盒进行提取)，使用引物 *tar1LBD*-HF 和 *tar1LBD*-HR 扩增 *tar1-LBD* 基因片段。PCR 反应体系(50 μ L): *LA Taq* (5 U/ μ L) 0.5 μ L (TaKaRa 公司)，2 \times GC Buffer I 25 μ L，上、下游引物(10 μ mol/L)各 1 μ L，DNA 模板 0.5 μ L，ddH₂O 22 μ L。PCR 反应条件：95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min；95 $^{\circ}$ C 变性 30 s，52 $^{\circ}$ C 退火 30 s，72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min，共 30 个循环；72 $^{\circ}$ C 终延伸 5 min。使用 *Bam*H I 和 *Sal* I 对 *tar1-LBD* 基因片段进行双酶切，纯化后将其连接至 pET-28a，获得 Tar1-LBD 表达质粒 pET-28a-*tar1-*

LBD。Tar1-LBD_{R88A}、Tar1-LBD_{W90A}、Tar1-LBD_{Y106A} 和 Tar1-LBD_{D108A} 的表达质粒以 pET-28a-*tar1-LBD* 为模板使用基因定点突变试剂盒构建。将所有表达质粒分别转入大肠杆菌 BL21 (DE3)或敲除了 *luxS* 基因的 BL21(DE3)中。在 37 $^{\circ}$ C、180 r/min 的条件下，将表达菌株用 LB 培养基培养至 *OD*₆₀₀ 为 0.5 时加入 0.3 mmol/L IPTG，22 $^{\circ}$ C、160 r/min 培养 8 h，之后 8 000 r/min 离心 5 min 收集菌体，超声破碎后使用 Ni²⁺-NTA 亲和树脂纯化目的蛋白。Tar1-LBD 点突蛋白采用类似的方法纯化得到。所有目的蛋白使用 Sephadex-G25 葡聚糖凝胶脱盐柱去除多余的咪唑，经 SDS-PAGE 检测后保存在 -80 $^{\circ}$ C 超低温冰箱待用。用于哈维氏弧菌生物发光实验时将目的蛋白超滤浓缩至 10 mg/mL 以上，70 $^{\circ}$ C 水浴加热 10 min 后，8 000 r/min 离心 5 min 收集上清液。

1.7 AI-2 活性检测

参照文献[27]采用哈维氏弧菌生物发光试验进行 AI-2 活性检测。取过夜培养的哈维氏弧菌

(*Vibrio harveyi*) MM32 菌液, 使用新鲜的 AB 培养基^[5]倍比稀释到 5×10^{-3} ; 稀释后的菌液按每孔 90 μL 的体积加入黑色 96 孔板中。随后分别取 10 μL 待测样品、1 $\mu\text{mol/L}$ AI-2 信号分子(阳性对照)以及 AB 培养基(阴性对照)加入至相应位置。30 $^{\circ}\text{C}$ 、150 r/min 振荡培养 5 h 后, 使用多功能酶标仪检测发光强度, AI-2 活性用相对发光强度表示。

1.8 *tar1* 敲除菌株和回补菌株的构建

伸长盐单胞菌突变体构建方法参照文献[28]进行。使用细菌基因组 DNA 提取试剂盒提取伸长盐单胞菌基因组, 以提取的基因组作为模板, 使用 *tar1*-UP-F 和 *tar1*-UP-R 扩增上游片段 *tar1*-UP, 使用 *tar1*-DOWN-F 和 *tar1*-DOWN-R 扩增下游片段 *tar1*-DOWN, 通过重叠 PCR 将上、下游片段连接, 得到敲除片段 $\Delta tar1$ 。PCR 反应体系 (50 μL): *LA Taq* (5 U/ μL) 0.5 μL (TaKaRa 公司), 2 \times GC Buffer I 25 μL , 上、下游引物 (10 $\mu\text{mol/L}$) 各 1 μL , DNA 模板 0.5 μL , ddH₂O 22 μL 。PCR 反应条件: 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s, 55 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 2 min, 共 30 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 终延伸 5 min。使用 *EcoR* I 和 *Hind* III 对敲除片段 $\Delta tar1$ 进行双酶切, 纯化后将其连接至 pK18mobsacB, 获得敲除质粒 pK18mobsacB- $\Delta tar1$ 并转入大肠杆菌 S17-1 后与野生型伸长盐单胞菌在 LB1M 平板上接合 24 h。随后用 LB1M 液体培养基适当稀释后涂布于含有 100 $\mu\text{g/mL}$ 氨苄青霉素和 50 $\mu\text{g/mL}$ 卡那霉素的 LB1M 平板上, 30 $^{\circ}\text{C}$ 倒置培养。PCR 验证正确的单菌落接种于无抗生素的 LB1M 液体培养基中培养过夜, 菌液适当稀释后涂布于含有 20% 蔗糖的 LB1M 平板上, 30 $^{\circ}\text{C}$ 倒置培养。长出的单菌落经卡那霉素抗性检测、PCR 验证和测序后即得到 *tar1* 缺失突变体。以伸长盐单胞菌基因组作为模板, 使用引物 *tar1*-F 和 *tar1*-R 扩增 *tar1* 片段。使用 *Kpn* I 和 *Hind* III 对 *tar1* 片段进行双酶切, 纯化后将其连接至 pBBR1MCS-1, 获得回补质粒 pBBR1MCS-1-

tar1。将构建好的回补质粒 pBBR1MCS-1-*tar1* 转化至大肠杆菌 S17-1 后通过接合转移转入伸长盐单胞菌 *tar1* 突变体中, 经 PCR 验证后即得到回补菌株 $\Delta tar1$ (*tar1*)。此外, 将 pBBR1MCS-1 质粒转入野生型伸长盐单胞菌和 *tar1* 突变体中作为对照。

1.9 生长曲线的测定

将测试菌株伸长盐单胞菌分别接种于 LB1M 液体培养基中, 30 $^{\circ}\text{C}$ 、220 r/min 培养过夜至稳定期 (OD_{600} 为 3.2) 后转接于 5 mL 的 LB1M 液体培养基中, 30 $^{\circ}\text{C}$ 、220 r/min 培养, 每 2 h 间隔取样测 OD_{600} , 绘制生长曲线。

1.10 生物膜形成能力的检测

测试菌株接种于 LB1M 液体培养基, 培养至稳定期后转接至新的含有 3 mL LB1M 液体培养基的试管中, 培养至对数后期 (OD_{600} 为 2.6) 时取各菌株菌液 20 μL , 加入含有 180 μL LB1M 液体培养基的无菌 96 孔板中, 30 $^{\circ}\text{C}$ 静置培养 48 h, 弃去菌液, 用无菌水缓慢清洗 3 次。自然风干后加入 0.1% 结晶紫染液染色 15 min, 染色结束后用无菌水清洗去除多余的染液, 风干后加入 200 μL 95% 乙醇, 振荡 15 min, 溶解结合的结晶紫染料, 使用多功能酶标仪测定 OD_{595} 值。

1.11 数据统计分析

所有试验至少设置 3 个生物学重复, 试验数据用平均值 \pm 标准偏差表示。使用 GraphPad Prism 10 软件分析结果, 采用双尾非配对 Student's *t*-test 进行显著性分析, 使用 Adobe Illustrator 2022 软件排版绘图。

2 结果与分析

2.1 伸长盐单胞菌对信号分子 AI-2 具有趋化性

为探究 AI-2 对伸长盐单胞菌趋化运动的影响, 通过毛细管定量分析法检测了伸长盐单胞菌对不同浓度 AI-2 的趋化性。如图 1A 所示,

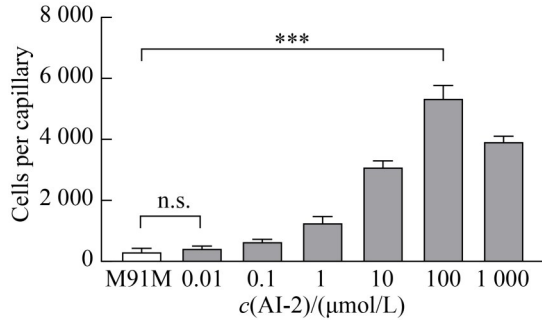


图1 伸长盐单胞菌对信号分子AI-2的趋化响应
 Figure 1 Chemotaxis of *Halomonas elongata* to AI-2. A quantitative capillary assay was used to measure the chemotaxis of *H. elongata* in response to AI-2. M91M: M9 minimal medium containing 1 mol/L NaCl. ***: $P < 0.001$; n.s.: Not significant.

在 AI-2 浓度为 0.1–1 000 μmol/L 的范围内伸长盐单胞菌均对其表现出趋化性，且呈现出先上升后下降的趋势。当 AI-2 浓度为 100 μmol/L 时

伸长盐单胞菌表现出最显著的趋化性($P < 0.001$)。

2.2 伸长盐单胞菌甲基受体趋化蛋白结构域分布特征

甲基趋化受体蛋白是细菌感知外界化学信号并调节自身趋化运动的关键感受器。根据 KEGG 数据库提供的基因组信息，伸长盐单胞菌共编码 4 个甲基受体趋化蛋白。本研究利用 HMMER (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/hmmer/>) 和 TMHMM (<https://services.healthtech.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>) 在线软件对其结构域和跨膜区进行分析(图 2A)，结果显示 4 个甲基受体趋化蛋白均含有 2 个跨膜区和 1 个配体结合结构域 (ligand binding domain, LBD)，其中 LBD 有 3 种类型(TarH、sCache_2 和 dCache_1 结构域)。此外，HELO_4338 在其氨基端还含有一个 PAS_3 结构域，推测该结构域可能用于感知胞内化学信号。为进一步挖掘伸长盐单胞菌中 AI-2 的受

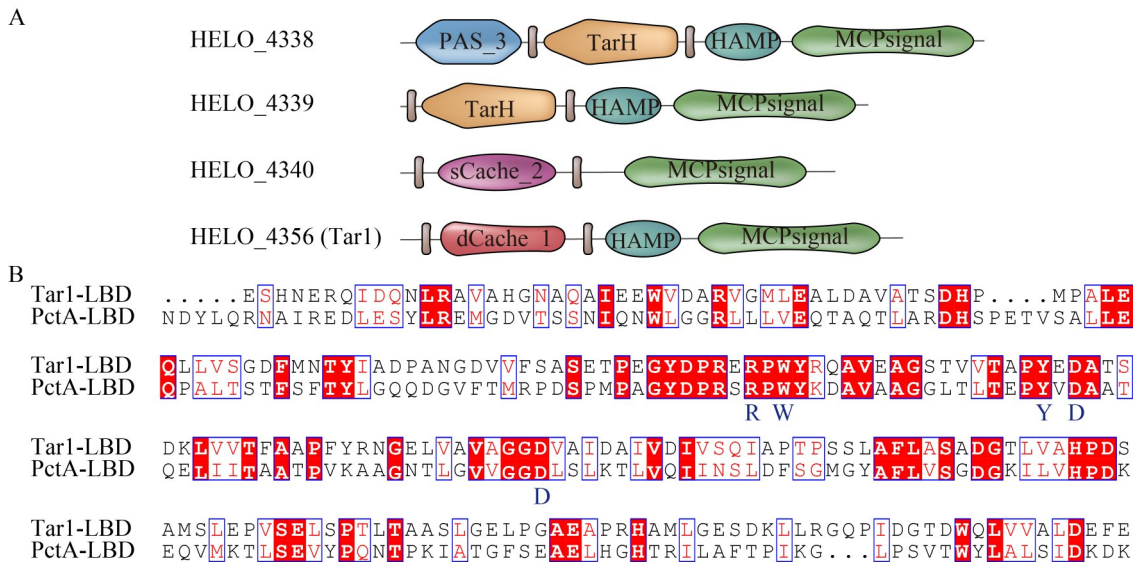


图2 伸长盐单胞菌甲基受体趋化蛋白结构域分析(A)和序列比对(B)

Figure 2 Protein domain identification (A) and sequence alignment analysis (B) of methyl-accepting chemotaxis proteins in *Halomonas elongata*. Amino acid sequence of methyl-accepting chemotaxis proteins were analyzed using SMART and TMHMM web tools. PAS: Per/ARNT/Sim domain; TarH: sCache_2 and dCache_1 are ligand binding domain; HAMP: Domain found in histidine kinases, adenylyl cyclases, methyl-binding proteins and phosphatases; MCPsignal: Methyl-accepting chemotaxis protein signalling domain. Brown bars: Transmembrane domain. The important enzyme active sites are shown in blue.

体蛋白, 将已知的 AI-2 受体 PctA^[5] 的 LBD 氨基酸序列与伸长盐单胞菌的 4 个甲基受体趋化蛋白 LBD 氨基酸序列进行 BLAST 比对, 结果显示 PctA-LBD 与 Tar1-LBD 的序列一致性最高 (31%)。此外, PctA-LBD 中参与 AI-2 结合的 5 个关键氨基酸残基位点 (R126、W128、Y144、D146 和 D173) 在 Tar1-LBD 中均可找到对应位点 (R88、W90、Y106、D108 和 D135) (图 2B), 这暗示着 Tar1-LBD 具有结合 AI-2 的能力。

2.3 Tar1 是伸长盐单胞菌中信号分子 AI-2 的受体

为检测 Tar1-LBD 是否能结合信号分子 AI-2, 本研究首先使用 AutoDockVina 1.1.2 进行 Tar1-LBD 与 AI-2 的分子对接, 对接后的最佳构

象如图 3A 所示, 结合能为 -5.5 kcal/mol。此外, PyMOL 所展示的构象图表明, 共有 7 个氨基酸残基 (Y63、E78、R88、W90、Y106、D108 和 A109) 参与 Tar1-LBD 与 AI-2 的相互作用 (图 3A)。通过 US-align 对 Tar1-LBD 和 PctA-LBD (PDB ID: 5T65) 的三维结构进行比对, 结果显示 2 个结构之间的 RMSD 值为 0.84, TM-core 值为 0.95, 说明 2 个结构之间的折叠方式高度相似 (图 3B)。基于 Tar1-LBD 和 PctA-LBD 序列比对结果以及分子对接的最佳构象图, 本研究将 Tar1-LBD 的 R88、W90、Y106 和 D108 位点分别突变为丙氨酸, 并分别纯化了 Tar1-LBD 蛋白和 4 种点突变蛋白, 之后将纯化好的蛋白浓缩热变性, 并取上清液进行哈维氏弧菌生物发

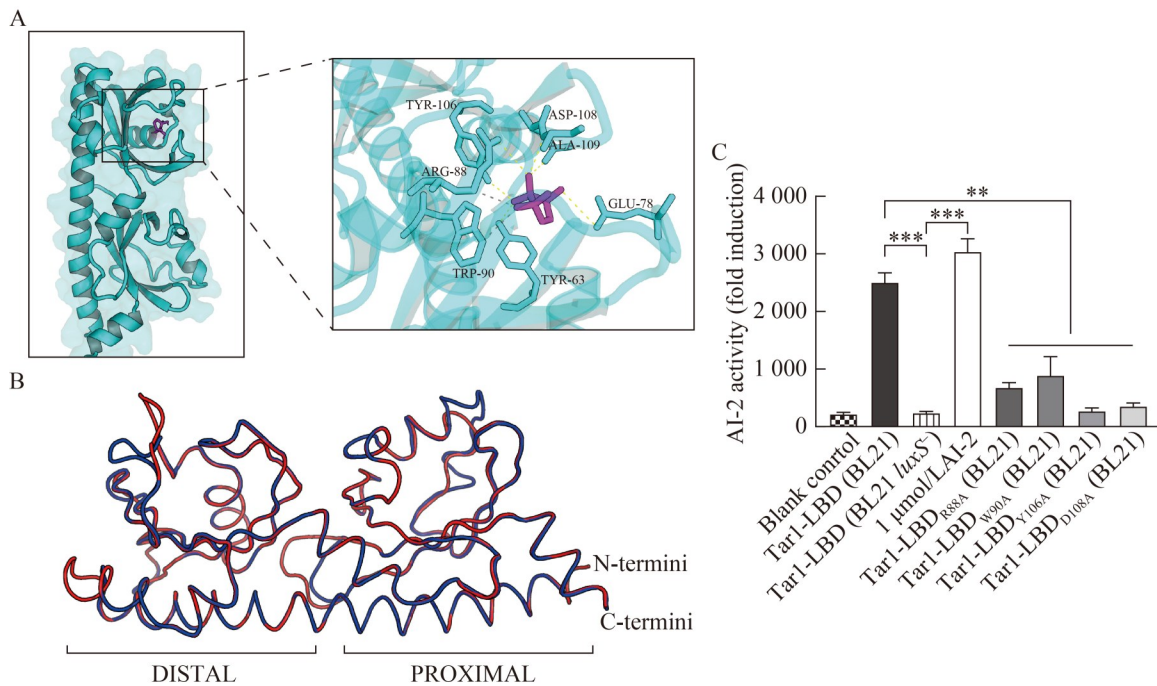


图3 Tar1是伸长盐单胞菌中信号分子AI-2的受体蛋白

Figure 3 Tar1 is the receptor of AI-2 in *Halomonas elongata*. A: Predicted binding mode of AI-2 in the amino acid-binding pocket of Tar1-LBD; B: The 3D structures of Tar1-LBD and PctA-LBD (PDB ID: 5T65) were aligned using US-align (The TM-score was normalized by the length of PctA-LBD. Structures of Tar1-LBD and PctA-LBD are colored in blue and red, respectively. The N- and C-termini as well as the membrane-proximal and membrane-distal modules of Tar1-LBD and PctA-LBD are labeled); C: AI-2 activity detection. **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$.

光试验。结果显示,从 BL21(DE3)表达菌株中纯化的 Tar1-LBD 蛋白热变性后释放到上清液中的配体能够诱导哈维氏弧菌发光,且与 4 种点突变蛋白变性上清液诱导的发光强度存在显著性差异($P<0.01$),而从 *luxS* 基因缺失后无法合成 AI-2 的表达菌株中纯化的 Tar1-LBD 蛋白变性上清液则无法诱导哈维氏弧菌发光(图 3C),这些结果证明 Tar1-LBD 能够结合 AI-2,也表明 Tar1 是伸长盐单胞菌中信号分子 AI-2 的受体。

2.4 Tar1 介导伸长盐单胞菌对信号分子 AI-2 的趋化反应

为进一步探讨 *tar1* 在伸长盐单胞菌响应 AI-2 趋化运动中的影响,本研究通过同源重组技术构建了 *tar1* 的缺失突变体。分别用引物 *tar1*-UP-F/*tar1*-DOWN-R 和 *tar1*-F/*tar1*-R 对野生型伸长盐单胞菌和 $\Delta tar1$ 进行 PCR 鉴定,并经过测序验证确认获得了伸长盐单胞菌的 *tar1* 缺失突变体(图 4A、4B)。通过毛细管定量分析法分别检测野生型伸长盐单胞菌[WT (vector)]、*tar1* 缺

失突变体 [$\Delta tar1$ (vector)] 和 *tar1* 回补菌株 [$\Delta tar1$ (*tar1*)] 对信号分子 AI-2 的趋化性。如图 4C 所示,野生型伸长盐单胞菌对 AI-2 表现出趋化性,*tar1* 缺失突变体则未表现出趋化性,而在 *tar1* 缺失突变体回补 *tar1* 后又能够恢复其对 AI-2 的趋化响应,说明 *tar1* 介导了伸长盐单胞菌对信号分子 AI-2 的趋化响应。

2.5 信号分子 AI-2 通过 Tar1 增强伸长盐单胞菌的生物膜形成能力

为探究信号分子 AI-2 对伸长盐单胞菌生物膜形成能力的影响,本研究进行了生物膜定量检测。如图 5 所示,加入信号分子 AI-2 后,野生型伸长盐单胞菌的生物膜形成量显著提高($P<0.001$)。然而, AI-2 对于 *tar1* 缺失突变体的生物膜形成则无明显影响,回补菌株则表现出与野生型相同的表型。为排除野生型、突变体以及回补菌株之间的生长差异,以及 AI-2 对生长速度的影响导致的生物膜形成能力差异,本研究检测了 AI-2 对野生型、*tar1* 缺失突变体以

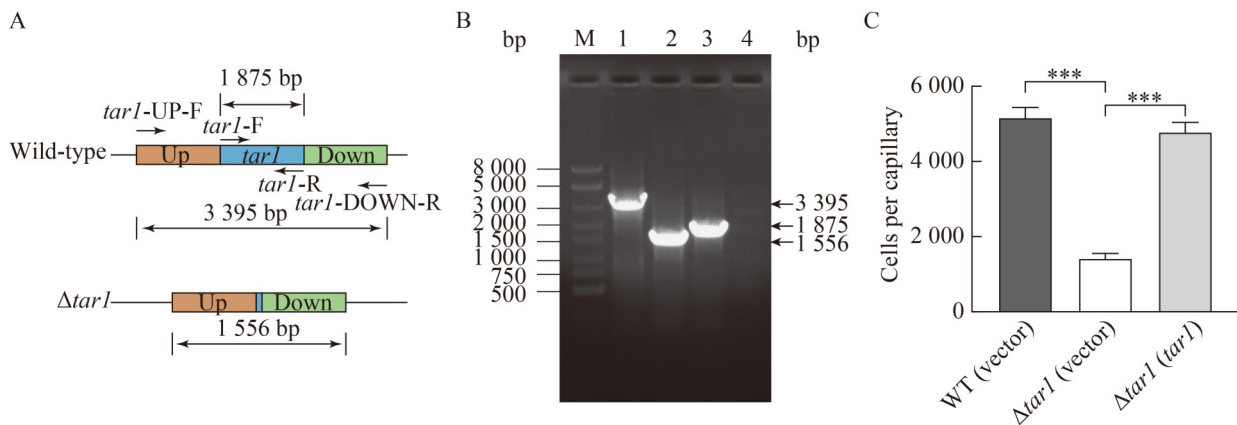


图4 Tar1介导伸长盐单胞菌对AI-2的趋化响应

Figure 4 Tar1 mediates the chemotaxis of *Halomonas elongata* to AI-2. A: The map of upstream and downstream regions of wild-type *H. elongata* and $\Delta tar1$ mutant; B: The PCR analysis result of wild-type and $\Delta tar1$ mutant [Lane M: DNA marker; The bands amplified by PCR with primers *tar1*-UP-F and *tar1*-DOWN-R are shown for wild-type *H. elongata* (lane 1) and the $\Delta tar1$ mutant (lane 2); The bands amplified by PCR with primers *tar1*-F and *tar1*-R are shown for wild-type *H. elongata* (lane 3) and the $\Delta tar1$ mutant (lane 4)]; C: Quantitative capillary assay was used to measure the chemotaxis of wild-type, $\Delta tar1$ mutant, and its complementary strain $\Delta tar1$ (*tar1*) in response to AI-2. ***: $P<0.001$.

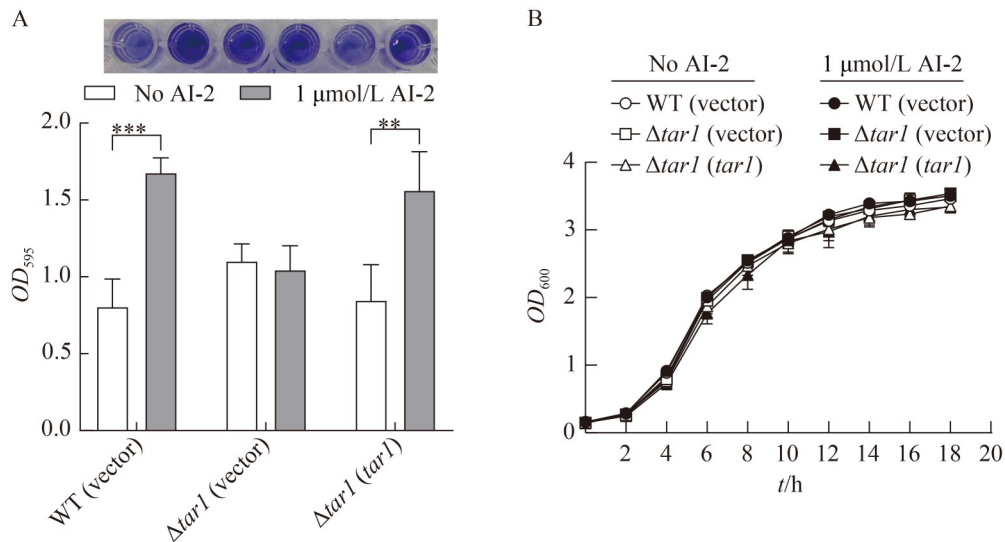


图5 Tar1介导信号分子AI-2对伸长盐单胞菌生物膜形成的作用

Figure 5 AI-2 regulates *Halomonas elongata* biofilm formation via Tar1. The effect of AI-2 on the biofilm formation (A) and growth curves (B) of wild-type *H. elongata* and $\Delta tar1$ mutant. **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$.

及回补菌株生长情况的影响。结果表明, AI-2 不影响野生型、突变体和回补菌株的生长(图 5B)。上述结果表明, 信号分子 AI-2 可以通过 Tar1 增强伸长盐单胞菌的生物膜形成能力。

3 讨论与结论

AI-2 作为一种广泛存在于细菌中的种间群体感应信号分子, 参与调节细菌生物发光、趋化运动、抗生素合成、生物膜形成等许多重要的生理过程^[29]。细菌通过何种受体来感知 AI-2 进而调节自身的生理行为, 仅在哈维氏弧菌、鼠伤寒沙门氏菌、大肠杆菌和铜绿假单胞菌等细菌中有相关报道^[4-6,9,30]。在嗜盐微生物领域尚无 AI-2 受体蛋白的相关研究报道。本研究通过毛细管定量分析法、序列比对、分子对接和哈维氏弧菌生物发光试验等方法在伸长盐单胞菌中发现一个甲基受体趋化蛋白 Tar1 是信号分子 AI-2 的受体蛋白, 进一步发现 AI-2 可以通过 Tar1 调节伸长盐单胞菌的趋化响应和生物膜形成能力。

甲基受体趋化蛋白是细菌感受外界化学物

质浓度变化, 实现趋利避害行为的化学感受器^[31]。经典的甲基受体趋化蛋白包含配体结合结构域、组氨酸激酶结构域和甲基接受趋化蛋白结构域等, 多种类型的配体结合结构域是细菌识别不同化学物质的关键所在^[32-33]。本研究在伸长盐单胞菌中共找到 4 个甲基受体趋化蛋白, 其中 HELO_4338、HELO_4339 和 HELO_4340 在基因组上成簇排列且转录方向一致, 推测其有可能在一类化学感应途径中发挥协同作用。通过毛细管定量分析法发现伸长盐单胞菌对信号分子 AI-2 具有趋化性。结构域分析和序列比对表明, 在伸长盐单胞菌的 4 个甲基受体趋化蛋白中 Tar1 的配体结合结构域与铜绿假单胞菌中已知 AI-2 受体蛋白 PctA 的配体结合结构域序列一致性最高, 并且 PctA 中参与 AI-2 结合的 5 个关键氨基酸残基在 Tar1 中均可找到。分子对接显示 Tar1-LBD 与 AI-2 的最佳构象结合能为 -5.5 kcal/mol, 与已报道的 AI-2-TlpQ-LBD^[5]复合物的结合能 (-5.7 kcal/mol) 基本一致。哈维氏弧菌生物发光试验检测 Tar1-LBD 蛋白和关键氨基酸残基点突变蛋白的变性上清

液, 结果表明 Tar1-LBD 能够结合 AI-2, 而且 *tar1* 基因的缺失会抑制伸长盐单胞菌对 AI-2 的趋化响应, 这充分证明 Tar1 是伸长盐单胞菌中 AI-2 的受体蛋白, 也表明伸长盐单胞菌可以通过感知信号分子 AI-2, 从而参与细菌间的信息交流。

具有 dCACHE 结构域的 AI-2 受体蛋白最早发现于铜绿假单胞菌, 在 26 个甲基受体趋化蛋白中 PctA 和 TlpQ 分别通过各自的 dCACHE 结构域来感受 AI-2, 生物信息学分析表明 dCACHE 结构域通过 5 个关键的氨基酸残基(R/W/Y/D/D) 来结合 AI-2^[5]。在恶臭假单胞菌 (*Pseudomonas putida*) KT2440 中, McpU 作为甲基受体趋化蛋白同样是通过 dCACHE 结构域来感知 AI-2^[34]。在类志贺邻单胞菌 (*Plesiomonas shigelloides*) 中 AI-2 通过 dCACHE 结构域来别构调节 c-di-GMP 代谢酶 DosC 的酶活, 改变其胞内 c-di-GMP 水平, 进而调节运动性和生物膜^[10]。此外, 在弗尼斯弧菌 (*Vibrio furnissii*) 中 AI-2 通过调节双组分系统中具有 dCACHE 结构域的膜激酶 AsrK 的活性来调节其响应调节蛋白 AsrR 的 c-di-GMP 水解酶活性, 进而促进弗尼斯弧菌抵抗氧胁迫和 DNA 损伤的能力^[11]。DosC 具有与 AI-2 结合的 5 个关键残基, 本研究的 Tar1 同样具有这 5 个关键残基, 这也进一步证明了 dCACHE 结构域能够结合 AI-2。值得注意的是, TlpQ 和 McpU 含有与 AI-2 结合的 4 个关键残基(W/Y/D/D), 而在 AsrK 中则仅有 3 个(Y/D/D), 推测有可能存在尚未被识别的 AI-2 结合模式。此外, 大多数报道表明 dCACHE 结构域的配体主要为氨基酸、组胺、多胺、季胺以及有机酸等^[35], Tar1 能否感知这些配体还有待进一步研究探讨。

细菌在自然界中有 2 种生活状态, 一种是能够自由运动的浮游态, 另一种是许多细菌堆叠在一起被多糖、蛋白质、脂质等多种复杂成分的胞外基质包裹在一起组成生物膜的固着态^[36-37]。生物膜是细菌为了抵抗不良生存环境

而形成的一种生存方式, 胞外基质作为一道天然的屏障赋予细菌许多抗性, 从而使其免受不良环境的影响^[38-40]。细菌由浮游态向固着态转变形成生物膜的过程中涉及群体协同行为, 群体感应系统在此过程中发挥了重要作用^[41-42]。本研究发现 AI-2 能够通过 Tar1 促进伸长盐单胞菌的生物膜形成。得益于独特的盐适应性, 能够在开放和非无菌的条件下进行发酵, 使得包括伸长盐单胞菌在内的许多盐单胞菌被认为是下一代工业中生物制造的重要载体^[21,43]。通过信号分子 AI-2 来调节伸长盐单胞菌生物膜形成能力, 以进一步增强其在恶劣环境下的生存能力可以作为一种新的策略, 为伸长盐单胞菌的环境适应机制研究和深度开发利用提供新的思路。

作者贡献声明

王卓: 研究构思和设计、数据收集和处理、论文撰写和修改; 魏嘉佚: 协助实验操作、数据收集和处理; 杨艳艳: 协助实验操作、参与论文讨论; 郭欣: 协助实验操作; 王传旭: 参与论文讨论、提供技术支持; 杨静: 参与论文讨论、论文修改; 牛亚洁: 参与论文讨论; 李新: 研究构思和论文修改。

作者利益冲突公开声明

作者声明不存在任何可能会影响本文所报告工作的已知经济利益或个人关系。

参考文献

- [1] WHITELEY M, DIGGLE SP, GREENBERG EP. Progress in and promise of bacterial quorum sensing research[J]. *Nature*, 2017, 551(7680): 313-320.
- [2] ZENG XY, ZOU YM, ZHENG J, QIU SY, LIU LL, WEI CY. Quorum sensing-mediated microbial interactions: mechanisms, applications, challenges and perspectives[J]. *Microbiological Research*, 2023, 273: 127414.
- [3] WANG YS, BIAN ZR, WANG Y. Biofilm formation and inhibition mediated by bacterial quorum sensing[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2022, 106(19): 6365-6381.
- [4] LI SY, SUN HX, LI JH, ZHAO YJ, WANG RY, XU L, DUAN CY, LI JL, WANG Z, LIU QM, WANG Y, OUYANG SY, SHEN XH, ZHANG L. Autoinducer-2 and bile salts induce c-di-GMP synthesis to repress the T3SS via a T3SS chaperone[J]. *Nature Communications*,

- 2022, 13: 6684.
- [5] ZHANG L, LI SY, LIU XZ, WANG Z, JIANG M, WANG RY, XIE LG, LIU QM, XIE XR, SHANG DH, LI MY, WEI ZY, WANG Y, FAN CP, LUO ZQ, SHEN XH. Sensing of autoinducer-2 by functionally distinct receptors in prokaryotes[J]. *Nature Communications*, 2020, 11: 5371.
- [6] CHEN X, SCHAUDER S, POTIER N, van DORSSELAER A, PELCZER I, BASSLER BL, HUGHSON FM. Structural identification of a bacterial quorum-sensing signal containing boron[J]. *Nature*, 2002, 415(6871): 545-549.
- [7] TAGA ME, MILLER ST, BASSLER BL. Lsr-mediated transport and processing of AI-2 in *Salmonella typhimurium*[J]. *Molecular Microbiology*, 2003, 50(4): 1411-1427.
- [8] JUNG SA, CHAPMAN CA, NG WL. Quadruple quorum-sensing inputs control *Vibrio cholerae* virulence and maintain system robustness[J]. *PLoS Pathogens*, 2015, 11(4): e1004837.
- [9] ZHANG YX, QI KZ, JING YW, ZUO JK, HU JG, LV XL, CHEN ZG, MI RS, HUANG Y, YU SQ, HAN XG. LsrB-based and temperature-dependent identification of bacterial AI-2 receptor[J]. *AMB Express*, 2017, 7(1): 188.
- [10] 谢晓荣, 尚道涵, 沈锡辉, 张磊. AI-2通过调节c-di-GMP代谢酶DosC影响类志贺邻单胞菌生物膜形成及运动性[J]. *微生物学报*, 2022, 62(7): 2808-2823.
- XIE XR, SHANG DH, SHEN XH, ZHANG L. AI-2 affects biofilm formation and motility of *Plesiomonas shigelloides* by regulating the c-di-GMP-metabolizing enzyme DosC[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2022, 62(7): 2808-2823 (in Chinese).
- [11] ZHANG H, ZHAO WJ, YANG WG, ZHANG HM, QIAN XY, SUN K, YANG Q, SHEN XH, ZHANG L. Autoinducer-2 enhances the defense of *Vibrio furnissii* against oxidative stress and DNA damage by modulation of c-di-GMP signaling via a two-component system[J]. *mBio*, 2025, 16(2): e0292224.
- [12] MOORE JP, EMONET T. Physics of bacterial chemotaxis[J]. *Current Biology*, 2024, 34(20): R972-R977.
- [13] KEEGSTRA JM, CARRARA F, STOCKER R. The ecological roles of bacterial chemotaxis[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2022, 20(8): 491-504.
- [14] FU RX, FENG HC. Deciphering bacterial chemorepulsion: the complex response of microbes to environmental stimuli[J]. *Microorganisms*, 2024, 12(8): 1706.
- [15] HUANG ZW, PAN XY, XU N, GUO ML. Bacterial chemotaxis coupling protein: structure, function and diversity[J]. *Microbiological Research*, 2019, 219: 40-48.
- [16] ALI AHMED A, HIDA A, TAJIMA T, KATO J. Identification and characterization of a methyl-accepting chemotaxis protein in *Ralstonia pseudosolanacearum* using chemically undefined materials[J]. *The Journal of General and Applied Microbiology*, 2025, 70(5): 220-227.
- [17] VANDRICH J, PFEIFFER F, ALFARO-ESPINOZA G, KUNTE HJ. Contribution of mechanosensitive channels to osmoadaptation and ectoine excretion in *Halomonas elongata*[J]. *Extremophiles*, 2020, 24(3): 421-432.
- [18] HOBMEIER K, CANTONE M, NGUYEN QA, PFLÜGER-GRAU K, KREMLING A, KUNTE HJ, PFEIFFER F, MARIN-SANGUINO A. Adaptation to varying salinity in *Halomonas elongata*: much more than ectoine accumulation[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2022, 13: 846677.
- [19] KHANH HC, KAOTHIEH-NAKAYAMA P, ZOU ZY, NAKAYAMA H. Metabolic pathway engineering of high-salinity-induced overproduction of L-proline improves high-salinity stress tolerance of an ectoine-deficient *Halomonas elongata*[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2024, 90(9): e0119524.
- [20] ADELPOUR T, SHAHVERDI AR, AMINI M, ALI FARAMARZI M, MOJTABAVI S. A novel halophilic laccase from *Halomonas elongata*: purification, characterization, and application in green synthesis of salicylic acid[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2025, 319: 145172.
- [21] BENÍTEZ-MATEOS AI, PARADISI F. *Halomonas elongata*: a microbial source of highly stable enzymes for applied biotechnology[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2023, 107(10): 3183-3190.
- [22] BASSLER BL, WRIGHT M, SHOWALTER RE, SILVERMAN MR. Intercellular signalling in *Vibrio harveyi*: sequence and function of genes regulating expression of luminescence[J]. *Molecular Microbiology*, 1993, 9(4): 773-786.
- [23] ROBERT X, GOUET P. Deciphering key features in protein structures with the new ENDscript server[J]. *Nucleic Acids Research*, 2014, 42(Web Server issue): W320-W324.
- [24] WATERHOUSE A, BERTONI M, BIENERT S, STUDER G, TAURIELLO G, GUMIENNY R, HEER FT, de BEER TAP, REMPFER C, BORDOLI L, LEPORE R, SCHWEDE T. SWISS-MODEL: homology modelling of protein structures and complexes[J]. *Nucleic Acids Research*, 2018, 46(W1): W296-W303.
- [25] MILLER ST, XAVIER KB, CAMPAGNA SR, TAGA ME, SEMMELHACK MF, BASSLER BL, HUGHSON FM. *Salmonella typhimurium* recognizes a chemically distinct form of the bacterial quorum-sensing signal AI-2[J]. *Molecular Cell*, 2004, 15(5): 677-687.
- [26] MORRIS GM, HUEY R, LINDSTROM W, SANNER MF, BELEW RK, GOODSSELL DS, OLSON AJ. AutoDock4 and AutoDockTools4: automated docking with selective receptor flexibility[J]. *Journal of Computational Chemistry*, 2009, 30(16): 2785-2791.
- [27] LIU XZ, LIU QM, SUN SH, SUN HX, WANG Y, SHEN XH, ZHANG L. Exploring AI-2-mediated interspecies communications within rumen microbial communities[J]. *Microbiome*, 2022, 10(1): 167.
- [28] WANG Z, WANG TT, CUI R, ZHANG ZX, CHEN KQ, LI MY, HUA YY, GU HW, XU L, WANG Y, YANG YT, SHEN XH. HpaR, the repressor of aromatic compound metabolism, positively regulates the expression of T6SS4 to resist oxidative stress in *Yersinia pseudotuberculosis*[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2020, 11: 705.
- [29] WANG Y, LIU BB, GRENIER D, YI L. Regulatory

- mechanisms of the LuxS/AI-2 system and bacterial resistance[J]. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2019, 63(10): e01186-19.
- [30] SILVA AJ, PARKER WB, ALLAN PW, AYALA JC, BENITEZ JA. Role of methylthioadenosine/S-adenosylhomocysteine nucleosidase in *Vibrio cholerae* cellular communication and biofilm development[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2015, 461(1): 65-69.
- [31] SALAH UD-DIN AIM, ROUJEINIKOVA A. Methyl-accepting chemotaxis proteins: a core sensing element in prokaryotes and archaea[J]. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2017, 74(18): 3293-3303.
- [32] 金佳凡, 舒国靖, 朱四东, 杨季芳, 陈吉刚. 阿拉伯海假交替单胞菌N1230-9两个甲基受体趋化蛋白的功能鉴定[J]. *微生物学报*, 2024, 64(5): 1641-1653.
JIN JF, SHU GJ, ZHU SD, YANG JF, CHEN JG. Functions of two methyl-accepting chemotaxis proteins of *Pseudoalteromonas arabiensis* N1230-9[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2024, 64(5): 1641-1653 (in Chinese).
- [33] 李孝丹, 吴浪涛, 方芳. 运动细菌的趋化性及其对微生物群落的影响[J]. *微生物学通报*, 2025, 52(5): 2018-2032.
LI XD, WU LT, FANG F. Chemotaxis of motile bacteria and its impact on microbial communities[J]. *Microbiology China*, 2025, 52(5): 2018-2032 (in Chinese).
- [34] 谢来工, 赵文瑾, 张磊. AI-2通过甲基化趋化受体McpU调控恶臭假单胞菌KT2440的趋化运动及生物膜形成[J]. *微生物学报*, 2022, 62(2): 628-639.
XIE LG, ZHAO WJ, ZHANG L. Autoinducer-2 regulates the chemotaxis and biofilm formation of *Pseudomonas putida* KT2440 by the methyl-accepting chemotaxis protein McpU[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2022, 62(2): 628-639 (in Chinese).
- [35] MATILLA MA, KRELL T. Bacterial amino acid chemotaxis: a widespread strategy with multiple physiological and ecological roles[J]. *Journal of Bacteriology*, 2024, 206(10): e0030024.
- [36] FLEMMING HC, WINGENDER J. The biofilm matrix[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2010, 8(9): 623-633.
- [37] WANG Z, SONG L, LIU XZ, SHEN XH, LI X. Bacterial second messenger c-di-GMP: emerging functions in stress resistance[J]. *Microbiological Research*, 2023, 268: 127302.
- [38] LIU XB, ZOU L, LI BQ, DI MARTINO P, RITTSCHOF D, YANG JL, MAKI J, LIU WJ, GU JD. Chemical signaling in biofilm-mediated biofouling[J]. *Nature Chemical Biology*, 2024, 20(11): 1406-1419.
- [39] JEONG GJ, KHAN F, TABASSUM N, CHO KJ, KIM YM. Bacterial extracellular vesicles: modulation of biofilm and virulence properties[J]. *Acta Biomaterialia*, 2024, 178: 13-23.
- [40] KIM S, LI XH, HWANG HJ, LEE JH. Thermoregulation of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2020, 86(22): e01584-20.
- [41] SOLANO C, ECHEVERZ M, LASA I. Biofilm dispersion and quorum sensing[J]. *Current Opinion in Microbiology*, 2014, 18: 96-104.
- [42] TESCHLER JK, NADELL CD, DRESCHER K, YILDIZ FH. Mechanisms underlying *Vibrio cholerae* biofilm formation and dispersion[J]. *Annual Review of Microbiology*, 2022, 76: 503-532.
- [43] CHEN GQ, JIANG XR. Next generation industrial biotechnology based on extremophilic bacteria[J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2018, 50: 94-100.