



根癌农杆菌化学受体 MCP₁₉₁₂ 调节趋化响应功能的鉴定

宗仁杰, 高苗苗, 张梦琪, 王浩, 徐楠, 郭敏亮*

扬州大学生物科学与技术学院, 江苏 扬州 225009

宗仁杰, 高苗苗, 张梦琪, 王浩, 徐楠, 郭敏亮. 根癌农杆菌化学受体 MCP₁₉₁₂ 调节趋化响应功能的鉴定. 微生物学报, 2022, 62(5): 1949–1961.

Zong Renjie, Gao Miaomiao, Zhang Mengqi, Wang Hao, Xu Nan, Guo Minliang. Functional identification of *Agrobacterium tumefaciens* chemoreceptor MCP₁₉₁₂ in regulating chemotactic response. *Acta Microbiologica Sinica*, 2022, 62(5): 1949–1961.

摘要: 【目的】本研究以根癌农杆菌 C58 为材料, 鉴定其甲基趋化受体蛋白(methyl-accepting chemotaxis protein, MCP) MCP₁₉₁₂ 能够识别的配体, 并研究该蛋白在调控根癌农杆菌趋化响应中的具体功能。【方法】通过异源表达 MCP₁₉₁₂ 的配体结合结构域(ligand binding domain, LBD), 获得带有 His 标签的 LBD 蛋白(LBD₁₉₁₂)。利用基于荧光的热位移测定法(fluorescence-based thermal shift assay, TSA)筛选出 LBD₁₉₁₂ 的潜在配体; 通过等温滴定量热(isothermal titration calorimetry, ITC), 进一步确定筛选出的潜在配体, 并测定 LBD₁₉₁₂ 与配体结合之后的解离平衡常数 K_D 。利用基于同源重组的精准 DNA 片段删除方法, 敲除根癌农杆菌 C58 中编码 MCP₁₉₁₂ 的基因 *atu1912*, 获得 MCP₁₉₁₂ 缺失突变体(Δ MCP₁₉₁₂); 以质粒回补的方法, 获得 Δ MCP₁₉₁₂ 回补株(Δ MCP₁₉₁₂C)。利用毛细管趋化测定法, 测定根癌农杆菌及其突变体对筛选出来的 MCP₁₉₁₂ 潜在配体的趋化响应, 并最终确定 MCP₁₉₁₂ 在调控根癌农杆菌 C58 趋化响应中的具体功能。【结果】通过 TSA, 筛选出 5 种能引起 LBD₁₉₁₂ 的溶解温度(T_m)变化大于 2 °C 的潜在配体(大于 2 °C 意味着可能结合), 这 5 种潜在配体是丙酮酸、L-乳酸、丙酸、乙酸和乙醇酸。ITC 实验进一步确定, 只有丙酮酸和丙酸能与 LBD₁₉₁₂ 特异性结合。丙酮酸与 LBD₁₉₁₂ 的结合是放热过程, K_D 为 $(17.0 \pm 0.9) \mu\text{mol/L}$, 而丙酸与 LBD₁₉₁₂ 的结合是吸热过程, K_D 为 $(31.5 \pm 5.4) \mu\text{mol/L}$ 。毛细管趋化试验证实, 根癌农杆菌 C58 能够被丙酮酸吸引和躲避丙酸, MCP₁₉₁₂ 的缺失, 完全消除了根癌农杆菌对这两种物质的趋化响应, MCP₁₉₁₂ 的回补能够恢复其对这两种物质的趋化

基金项目: 国家自然科学基金(31870118, 21808196, 31170073)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (31870118, 21808196, 31170073)

*Corresponding author. E-mail: guoml@yzu.edu.cn

Received: 2 November 2021; Revised: 29 November 2021; Published online: 16 December 2021

响应。【结论】化学受体 MCP₁₉₁₂ 识别的配体是丙酸和丙酮酸，MCP₁₉₁₂ 介导 C58 对于丙酮酸的吸引趋化响应以及躲避丙酸的趋化响应。

关键词：根癌农杆菌；甲基趋化受体蛋白；趋化响应；吸引物；驱避剂；配体结合结构域

Functional identification of *Agrobacterium tumefaciens* chemoreceptor MCP₁₉₁₂ in regulating chemotactic response

ZONG Renjie, GAO Miaomiao, ZHANG Mengqi, WANG Hao, XU Nan, GUO Minliang*

College of Bioscience and Biotechnology, Yangzhou University, Yangzhou 225009, Jiangsu, China

Abstract: [Objective] To identify the chemoeffectors recognized by *Agrobacterium tumefaciens* C58 chemoreceptor MCP₁₉₁₂ (MCP: methyl-accepting chemotaxis protein), and to verify the function of this MCP in regulating the chemotactic response of *A. tumefaciens*. [Methods] The ligand binding domain (LBD) of MCP₁₉₁₂ was fused with His tag and expressed as an individual recombinant protein (named LBD₁₉₁₂) through heterologous expression. We employed fluorescence-based thermal shift assay (TSA) to screen the potential ligands of LBD₁₉₁₂, and isothermal titration calorimetry (ITC) to test the binding of the potential ligands to LBD₁₉₁₂ and to determine the equilibrium dissociation constant (K_D) of the ligand-LBD₁₉₁₂ complex. We used homologous recombination-based DNA fragment deletion method to construct MCP₁₉₁₂ deletion mutant (Δ MCP₁₉₁₂). We introduced the plasmid expressing MCP₁₉₁₂ into Δ MCP₁₉₁₂ to construct the complemented strain (Δ MCP₁₉₁₂C). Then, we adopted the capillary chemotaxis assay to test the chemotactic response of various *A. tumefaciens* strains to the potential MCP₁₉₁₂ ligands and to confirm the function of MCP₁₉₁₂ in regulating the chemotactic response of C58. [Results] Data acquired through TSA showed that 5 chemicals, pyruvate, L-lactate, propionic acid, acetic acid, and glycolate, might be the potential ligands of LBD₁₉₁₂. ITC further confirmed that only pyruvate and propionic acid could specifically bind to LBD₁₉₁₂. The binding of pyruvate to LBD₁₉₁₂ is exothermic with K_D of (17.0±0.9) μ mol/L, while the binding of propionic acid to LBD₁₉₁₂ is endothermic with K_D of (31.5±5.4) μ mol/L. The capillary chemotaxis assay verified that C58 manifested the attractant response to pyruvate and the repellent response to propionic acid. The deficiency of MCP₁₉₁₂ completely eliminated the chemotactic response of *A. tumefaciens* to pyruvate and propionic acid. The complementation of MCP₁₉₁₂ could restore the chemotactic response of MCP₁₉₁₂-deficient strain to pyruvate and propionic acid. [Conclusion] The chemoeffectors recognized by the chemoreceptor MCP₁₉₁₂ are propionate and propionic acid. MCP₁₉₁₂ mediates the attractant response to pyruvate and the repellent response to propionic acid.

Keywords: *Agrobacterium tumefaciens*; methyl-accepting chemotaxis protein; chemotaxis; attractant; repellent; ligand binding domain

细菌在复杂环境中感知化学效应物，并不
断调整自己的运动状态寻找最适生长环境的过

程，被称为趋化响应^[1]。趋化响应受化学感觉
信号通路控制，该通路广泛分布于细菌和古细

菌中^[2]。趋化信号通路,始于化学效应物(又称配体)与化学受体的特异性结合,化学受体在趋化信号转导系统中,又称甲基趋化受体蛋白(methyl-accepting chemotaxis protein, MCP)。大多数 MCP 是由配体结合结构域(LBD)、HAMP(histidine kinases, adenylyl cyclases, methyl-accepting chemotaxis proteins and phosphatases, HAMP)结构域和细胞质信号转换结构域组成,化学效应物与 LBD 结合,引起 LBD 构象改变并产生信号刺激^[3]。这种刺激通过胞质 HAMP 结构域传递给偶联蛋白 CheW 和组氨酸激酶 CheA,并改变 CheA 的自磷酸化活性。磷酸化的 CheA 将其磷酸基团传递给响应调节蛋白 CheY,磷酸化的 CheY 与鞭毛马达蛋白结合并调节鞭毛马达的运动,最终调节细菌的运动方向导致趋化响应^[3-4]。根据微生物在感应到化学效应物后的游动方向不同,可分为吸引趋化响应和躲避趋化响应^[4]。除了介导趋化,化学感觉信号通路还参与多种生物过程的调控,如生物膜的形成^[5]、胞外多糖产生^[6]、鞭毛生物合成^[7]和致病性^[8-9]等。

趋化多样性产生的核心是 MCP。细菌已经进化出大量的 MCP 来感知大量不同的化学效应物。因为 MCP 的细胞质信号域高度保守,所以其多样性主要取决于其 LBD。因此, MCP 可以根据其包含的 LBD 类型进行分类^[10]。在化学受体的配体结合域中发现了近百种已知的蛋白质结构域模式,但常见的 LBD 类型只有少数。最丰富的 3 种 LBD 类型是 4HB_MCP、Cache-like 和 PAS,占化学受体中已知 LBD 的 80%以上,其中 Cache-like 型 LBD 又细分为 double Cache LBD (dCache)和 single Cache LBD (sCache)^[10-11]。鉴定 MCP 功能的一个核心问题是,确定 MCP 可以识别何种化学效应物。LBD 的快速进化,导致了 LBD 的序列同源性极低,而序列的巨大

差异,意味着它们的生物学功能大相径庭。此外,同一类 LBD 可以结合不同的化学效应物,而同一化学效应物,也可以结合结构上完全不同的 LBD,因此我们很难通过同源性来诠释化学受体的功能^[11]。总之,确定一个特定的化学受体所识别的化学效应物仍然具有挑战性,需要许多实验结果来确定化学受体的配体和功能。

根据 MCP 是否有跨膜区域,可分为 2 类,即跨膜化学受体和可溶性细胞质化学受体^[3,10]。跨膜化学受体具有周质 LBD,两侧有 2 个跨膜区域。现有证据表明,大多数跨膜化学受体的 LBD 都可以作为单个重组蛋白表达,并保持其原有的配体结合特性^[12],因此, LBD 重组蛋白可用于潜在配体的筛选。如果一种化学效应物能与 LBD 结合,会改变 LBD 的稳定性,因而改变其溶解温度(T_m),通过测定 LBD 与潜在配体化合物混合前后的 T_m 变化就可以判断两者是否能够结合。蛋白质的 T_m 可以通过荧光热位移法(TSA,也称差式扫描荧光法,DSF)测定。蛋白质变性后会暴露更多的疏水区域,改变蛋白质与荧光染料的结合,导致荧光发生变化,通过监测荧光随温度的变化可以测定蛋白质的 T_m 。因此, TSA 为筛选 LBD 的配体提供了一种高通量方法^[12]。等温滴定量热(ITC)是一种更加精确地检测配体和 LBD 结合的方法。如果某个化合物能够与蛋白质特异性结合并形成具有一定稳定性的复合物,根据热力学原理,这一结合过程必然会有热量的变化,形成的复合物越稳定,结合过程中的热量变化应该越明显。当少量配体加入到蛋白质溶液时,能够迅速形成复合物,热量变化较大。当配体逐渐增加时,游离蛋白逐渐减少,复合物的生成速度变慢,复合物的净生成量减少,热量变化逐渐减小。通过测定某化合物滴定蛋白质过程中的热量变化不仅能进一步验证两者是否能特异性结合,还能定量计

算出两者结合的热力学参数。因此，它可以同时测定 LBD 与配体结合的焓变、熵变和结合的化学计量比以及所形成复合物的解离常数(K_D)。实践证明，TSA 和 ITC 结合不仅可以快速地，而且能够有效地确定新型 MCP 的配体^[12-13]。

根癌农杆菌是一种植物病原菌，可侵染大多数双子叶植物引发冠瘿瘤病。它作为一种能动的 α -变形杆菌，对多种营养物质、宿主信号化学物质和土壤污染物具有高度敏感的趋化响应^[14]。根癌农杆菌 C58 基因组中有 20 个 MCP 的编码基因，13 个在环状染色体上，5 个在线型染色体上，1 个在 pAt 质粒上，1 个在 pTi 质粒上^[15]。然而，20 个 MCP 中没有一个 MCP 的配体被实验确定过。趋化响应是根癌农杆菌识别宿主并被吸引到易感染位点的第一步，但目前尚不清楚哪些 MCP 以及多少 MCP 参与了宿主信号化学物的识别^[16-17]。因此，MCP 配体及功能的鉴定，对于深入了解根癌农杆菌趋化响应和识别宿主信号的机制具有重要意义。在本工作中，我们以 MCP₁₉₁₂ 作为研究对象，采用 TSA 和 ITC 的方法来筛选可以结合 MCP₁₉₁₂ 的配体。通过毛细管法，鉴定 MCP₁₉₁₂ 在趋化响应中的具体功能，并确认与 MCP₁₉₁₂ 结合的配

体对于根癌农杆菌生长的影响。

1 材料与方法

1.1 菌株、质粒、培养基和生长条件

大肠杆菌用溶源性肉汤(lysogeny broth, LB)液体培养基于 37 °C 摇床(210 r/min)中培养，根癌农杆菌用甘露醇-谷氨酸钠/溶源性肉汤(mannitol-glutamate/lysogeny broth, MG/L)液体培养基于 28 °C 摇床(200 r/min)培养^[16-17]，在液体培养基中添加 1.5%的琼脂即为固体培养基。必要时，在培养基中加入相关抗生素，各种抗生素使用终浓度：大肠杆菌，卡那霉素(Km)，50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ；根癌农杆菌，卡那霉素(Km)，100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。本实验中使用和新构建的菌株见表 1。

1.2 基因缺失突变体和回补菌株的构建

DNA 的扩增、酶切和连接等实验操作采用标准的分子生物学实验方法，根癌农杆菌 C58 基因序列参照已公布的基因组序列(基因组登录号: AE007869.2)。采用 TIANprep Mini plasmid Kit (天根生物公司，北京，中国)纯化质粒 DNA。采用 TaKaRa MiniBEST Agrose Gel DNA Extraction Kit Ver 4.0 (TaKaRa 公司，大连，中国)进行 PCR 产物和 DNA 片段的纯化。大肠杆菌感受态细胞

表 1 试验使用细菌菌株

Table 1 Bacterial strains used in this study

Strains	Relevant features	Sources or references
<i>Escherichia coli</i>		
DH5 α	EndA1 <i>hsdR17 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 (argF-lacZYA)</i> U169 ϕ 80 <i>dlacZ</i> , for DNA cloning	Bethesda research laboratories
BL21(DE3)	F-ompT <i>hsdSB(rB-mB-)</i> gal dcm (DE3), for protein expression	Invitrogen
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>		
C58	Nopaline type strain; pTiC58, pAtC58	Thomashow et al. ^[18] Knauf and Nester ^[19]
ΔMCP_{1912}	Derivative of C58 in which MCP ₁₉₁₂ open reading frame (ORF) was deleted	This study
$\Delta\text{MCP}_{1912}\text{C}$	Derivative of ΔMCP_{1912} in which <i>atu1912</i> expression was restored by plasmid pCB301 carrying <i>atu1912</i>	This study

购自中国上海威迪生物公司。限制性内切酶购自 TaKaRa 公司。采用无连接克隆系统(ABM 公司, 温哥华, 加拿大)构建重组质粒。pEX18Km 携带一个阳性选择标记(卡那霉素抗性基因)和一个反选择标记(自杀基因 *sacB*), 用于构建基因替换质粒。

根癌农杆菌 C58 基因 *atu1912* 的阅读框内精准删除是根据我们实验室以前建立的基因精准替换方法来构建^[20-21]。质粒通过电穿孔转移法转到根癌农杆菌细胞内, 通过 PCR 从经过正向和反向 2 次选择的转化子中, 筛选所需的突变体, 并通过 DNA 测序验证所筛选到的 *atu1912* 缺失突变体 Δ MCP₁₉₁₂。将表达 *atu1912* 基因的质粒导入 Δ MCP₁₉₁₂ 中, 构建 Δ MCP₁₉₁₂ 的回补菌株 Δ MCP₁₉₁₂C。为构建该质粒, 采用 PCR 法从根癌农杆菌 C58 基因组 DNA 中扩增

出 *atu1912* 基因及其启动子区(起始密码子上游 500 bp), 将其连接到质粒 pCB301 中。将连接好的质粒通过热激转化法转移到大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞中, 在含卡那霉素的 LB 平板上选择转化子, 所得重组质粒经插入区和侧翼区测序验证, 将已验证的重组质粒转移到 Δ MCP₁₉₁₂ 中进行遗传回补试验。具体使用的质粒及引物见表 2。

1.3 蛋白表达和纯化

通过 PCR 扩增编码 LBD₁₉₁₂ 的 DNA 序列, 并将 PCR 产物克隆到 pET30a 质粒中, 导入大肠杆菌 DH5 α 中, 在含卡那霉素的 LB 平板上选择转化子。通过测序验证 pET30a-LBD₁₉₁₂ 质粒的插入区和侧翼区, 然后将正确的质粒转移到大肠杆菌 BL21(DE3)中, 以表达带 His 标签的 LBD₁₉₁₂ 蛋白。在 1 L 的锥形烧瓶中加入 500 mL

表 2 试验使用质粒及引物

Table 2 Plasmids and primers used in this study

Plasmids and primers	Relevant features	Sources or references
Plasmids		
pEX18Km	Derivative of pEX18Tc in which Tc ^r was replaced by <i>nptIII</i> from pCB301; Km ^r , Sur ^s	Guo et al ^[22]
pCB301	A minim binary vector plasmid without promoter	Guo et al ^[22]
pCB301- <i>atu1912</i>	A minim binary vector plasmid carrying the <i>atu1912</i> ORF with its promoter; Km ^r	This study
pET30a	Expression vector; Km ^r	Novagen
pET30a-LBD ₁₉₁₂	An expression vector carrying the LBD ₁₉₁₂ ORF; Km ^r	This study
Primers		
<i>atu1912</i> -delete-1	5'-GACTCTAGAGGATCCATCGATGATCAGGTGCCA-3'	To amplify the upstream sequence
<i>atu1912</i> -delete-2	5'-CGGATCAAATCAAGCCATAGAGATTGTTACGTTTTTC-3'	To amplify the upstream sequence
<i>atu1912</i> -delete-3	5'-GTAACAATCTCTATGGCTTGATTTGATCCGTTTTT-3'	To amplify the downstream sequence
<i>atu1912</i> -delete-4	5'-TGCTGCCAACTCGAGGAACATGACACCATGACC-3'	To amplify the downstream sequence
pCB301- <i>atu1912</i> -F	5'-AGAAGTACTGGATCCGGATTCTGCCAGGCCGCT-3'	To amplify the sequence of <i>atu1912</i> inserting to pCB301
pCB301- <i>atu1912</i> -R	5'-CTTGATATCGAATTCTCAAGCCGCCGCGAAAC-3'	To amplify the sequence of <i>atu1912</i> inserting to pCB301
pET30a-LBD ₁₉₁₂ -F	5'-ATCGGATCCGAATTCAGTTATCGTGAGATGGAGCG-3'	To amplify the sequence of LBD ₁₉₁₂ sequence inserting to pET30a
pET30a-LBD ₁₉₁₂ -R	5'-GTGGTGGTGTCTCGAGTTACGCGTCACGCCAGAATAC-3'	To amplify the sequence of LBD ₁₉₁₂ sequence inserting to pET30a

Km^r=kanamycin resistance; Sur^s=sucrose sensitivity; ORF=open reading frame.

含 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 卡那霉素的 LB 培养基, 将能够表达 LBD₁₉₁₂ 蛋白的菌株接种到培养基中培养。当 OD_{600} 为 0.6 时, 加入 0.6 mmol/L 异丙基- β -D-硫代半乳糖苷(IPTG)诱导 LBD₁₉₁₂ 的表达, 并在 25 $^{\circ}\text{C}$ 持续培养 5 h, 然后用离心(5 000 r/min, 10 min)方法从培养液中收集细胞, 将收集的细胞重悬在缓冲液 A (25 mmol/L HEPES, 300 mmol/L NaCl, pH 8.0)中, 用 Scientz- iid 超声细胞破碎机(新芝生物公司, 宁波, 中国)破碎细胞。细胞破碎后的混悬液经 12 000 r/min 的速率离心 20 min 后, 收集上清液。上清液加到 5 mL HisTrap 柱上, 用含 10–500 mmol/L 咪唑的缓冲液 A 梯度洗脱结合在 HisTrap 柱上的 LBD₁₉₁₂ 蛋白。然后用缓冲液 A 多次透析, 以去除蛋白中所含的咪唑。

1.4 荧光热位移

荧光热位移(TSA)法参照 Fernández 等所述的程序进行^[12]。用缓冲液 A 配制待筛选的配体母液, 浓度为 10 mmol/L, pH 为 8.0。用缓冲液 A 配制浓度为 50 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 的 LBD₁₉₁₂ 蛋白溶液。SYPRO orange (5 000 \times)染料母液购自 Thermo Fisher 公司, 使用时稀释 80 倍。使用 96 孔 PCR 板作为筛选板, 每孔中分别加入 2.5 μL 配体母液、20.5 μL LBD₁₉₁₂ 蛋白溶液和 2 μL SYPRO orange 染料稀释液。对照孔中, 用 2.5 μL 的缓冲液 A 替代配体母液。用 StepOnePlus™ 实时荧光定量 PCR 仪(Thermo Fisher Scientific)以每分钟升温 1 $^{\circ}\text{C}$ 的速率将样品从 30 $^{\circ}\text{C}$ 加热到 90 $^{\circ}\text{C}$, 并记录样品孔中蛋白质所结合的 SYPRO Orange 的荧光强度随温度变化的曲线, 通过荧光强度随温度变化的负导数来确定蛋白的溶解温度。潜在配体化合物引起蛋白质溶解温度的偏移(ΔT_m)等于加入配体的样品孔中蛋白质的 T_m 减去未加配体的对照孔中蛋白质的 T_m 。试验数据的处理分析使用 StepOne Software v2.3 完成。

1.5 等温滴定量热

ITC 使用 Microcal VP-ITC 滴定量热仪(Microcal, Amherst, MA)在 25 $^{\circ}\text{C}$ 下进行。LBD₁₉₁₂ 用缓冲液 B (25 mmol/L HEPES, 300 mmol/L NaCl, pH 7.4)透析, 并用缓冲液 B 调整至蛋白质浓度为 30 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 。所有待检测配体用缓冲液 B 配成浓度为 450 $\mu\text{mol}/\text{L}$, pH 为 7.4 的溶液, 使用前需脱气。每次试验, 样品池中加入 1.44 mL LBD₁₉₁₂ 样品, 滴定器中加入 280 μL 配体溶液。搅拌速度为 307 r/min, 每次滴加 10 μL , 间隔时间为 3 min。所得数据均用配体滴加到缓冲液 B 中所测得的热量变化进行校正。数据处理使用 MicroCal PEAQ-ITC Analysis Software 完成。

1.6 毛细管测定趋化响应的方法

趋化响应的测试遵循我们实验室之前的程序^[21]。将 C58、 ΔMCP_{1912} 和 $\Delta\text{MCP}_{1912}\text{C}$ 接种于 5 mL MG/L 培养基中, 28 $^{\circ}\text{C}$ 振荡培养过夜。必要时加入卡那霉素, 其最终浓度为 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。将所得菌液转入 AB-蔗糖培养基^[20]培养数小时, 至 OD_{600} 为 0.4–0.6。用离心方法小心收集并洗涤细菌细胞, 细菌重悬在趋化缓冲液(0.1 mmol/L EDTA, 10 mmol/L KH_2PO_4 , pH 7.0)中, 至 OD_{600} 为 0.1。取 300 μL 菌悬液以形成菌液池, 在一端封闭的毛细管内吸入不同浓度的配体溶液(pH 7.0), 然后将吸入配体溶液的毛细管的开口端浸入菌液池中。28 $^{\circ}\text{C}$ 静置 1 h 后, 将毛细管从菌液池中取出, 用清水轻轻冲洗毛细管表面以去除表面细菌。将迁移入毛细管内的细菌完全转移到含 0.85%生理盐水的 1 mL 的 Eppendorf 管中, 按 10 倍的梯度稀释, 在平板上培养 36 h 后计算细菌数。

为了测试躲避趋化响应, 将丙酸 pH 调至 7.0 后, 以指定的浓度添加到菌液池中。将吸入缓冲液的毛细管浸入含有丙酸的菌液池中, 若菌液池中的细菌躲避丙酸, 则会游动到毛细管

内。同样, 将毛细管内细菌转移、稀释、培养、计数。以上测定均重复 3 次。

2 结果与分析

2.1 荧光热位移筛选 MCP₁₉₁₂ 的潜在配体

为了确定化学受体 MCP₁₉₁₂ 的 LBD, 使用在线预测软件 TMHMM 对其序列进行分析。结果显示, MCP₁₉₁₂ 的 LBD 位于第 33–187 位氨基酸残基肽段。利用 HMMER 进一步分析该肽段 (LBD) 的结构, 预测 LBD₁₉₁₂ 含有 sCache_2 结构域。由于许多含 sCache 结构域的 LBD 被报道能结合有机酸^[23], 所以我们把配体的筛选范围缩小到有机酸类。将编码 LBD₁₉₁₂ 的 DNA 片段克隆到表达载体中, 并将表达载体转入 BL21

中进行蛋白表达和纯化。

在 TSA 法筛选潜在配体的过程中, 直接记录的是荧光强度随温度变化的曲线, 即蛋白质的热变性曲线(或称溶解曲线)。由于直接从热变性曲线来判断蛋白质的 T_m 值误差较大, 因此, 一般情况下, 将热变性曲线转换成它的负一阶导数 ($-dF/dT$) 曲线, 负一阶导数曲线的最低峰即为蛋白质的熔解温度 T_m 。多数情况下, 小分子配体与蛋白质的结合会稳定蛋白质结构, 使蛋白质的 T_m 值升高。通常认为, 如果某化合物能够使某种蛋白质的 T_m 值升高 2 °C 以上, 即认为该化合物能够结合该蛋白质; 如果某化合物的加入不会改变蛋白质的 T_m 值, 即认为该化合物不能结合该蛋白质。图 1A 是在 LBD₁₉₁₂ 的溶液中

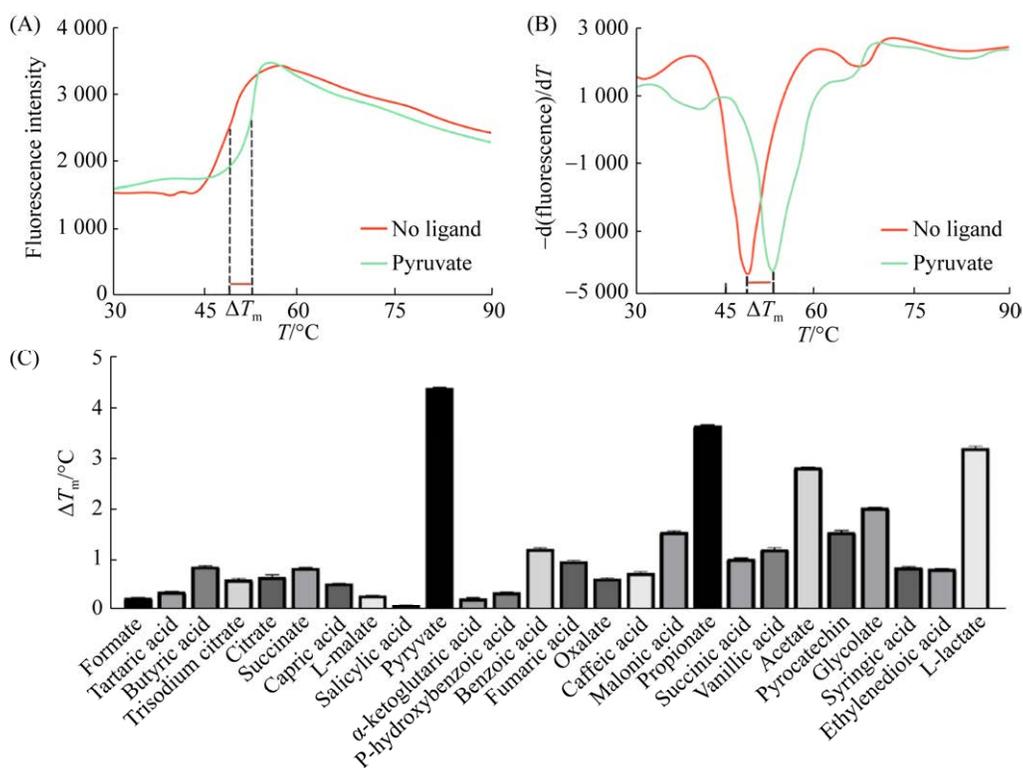


图 1 荧光热位移筛选 LBD₁₉₁₂ 的潜在配体

Figure 1 Screening of the potential ligands for LBD₁₉₁₂ by using fluorescence-based thermal shift assay (TSA). A: the melting curve of LBD₁₉₁₂ without or with pyruvate. The binding of pyruvate to LBD₁₉₁₂ increases the stability of LBD₁₉₁₂ and causes a shift of LBD₁₉₁₂ T_m to a higher temperature. B: the negative first derivative of the melting curve A. The negative peak indicates the melting temperature (T_m). C: the shift of LBD₁₉₁₂ T_m caused by the addition of various compounds. ΔT_m is the mean of triplicate.

未加和加入丙酮酸的热变性曲线。图 1B 是热变性曲线 A 的负一阶导数曲线。26 种有机酸的加入所引起的 LBD₁₉₁₂ T_m 值的变化见图 1C。丙酮酸、丙酸、L-乳酸、乙酸和乙醇酸 5 种化合物均能引起 LBD₁₉₁₂ T_m 的增加超过 2 °C，丙酮酸引起的 LBD₁₉₁₂ 的 T_m 变化最大，高达 4.38 °C。

2.2 用 ITC 确认潜在配体与 LBD₁₉₁₂ 的结合

通过 TSA，检测到一些化合物可以引起 LBD₁₉₁₂ 的 $\Delta T_m > 2$ °C，因此继续用 ITC 评估这些化合物与 LBD₁₉₁₂ 的结合并测定其解离平衡常数 K_D 。图 2A 是用丙酮酸溶液滴定 LBD₁₉₁₂ 溶液的热量变化结果。丙酮酸与 LBD₁₉₁₂ 的结合是

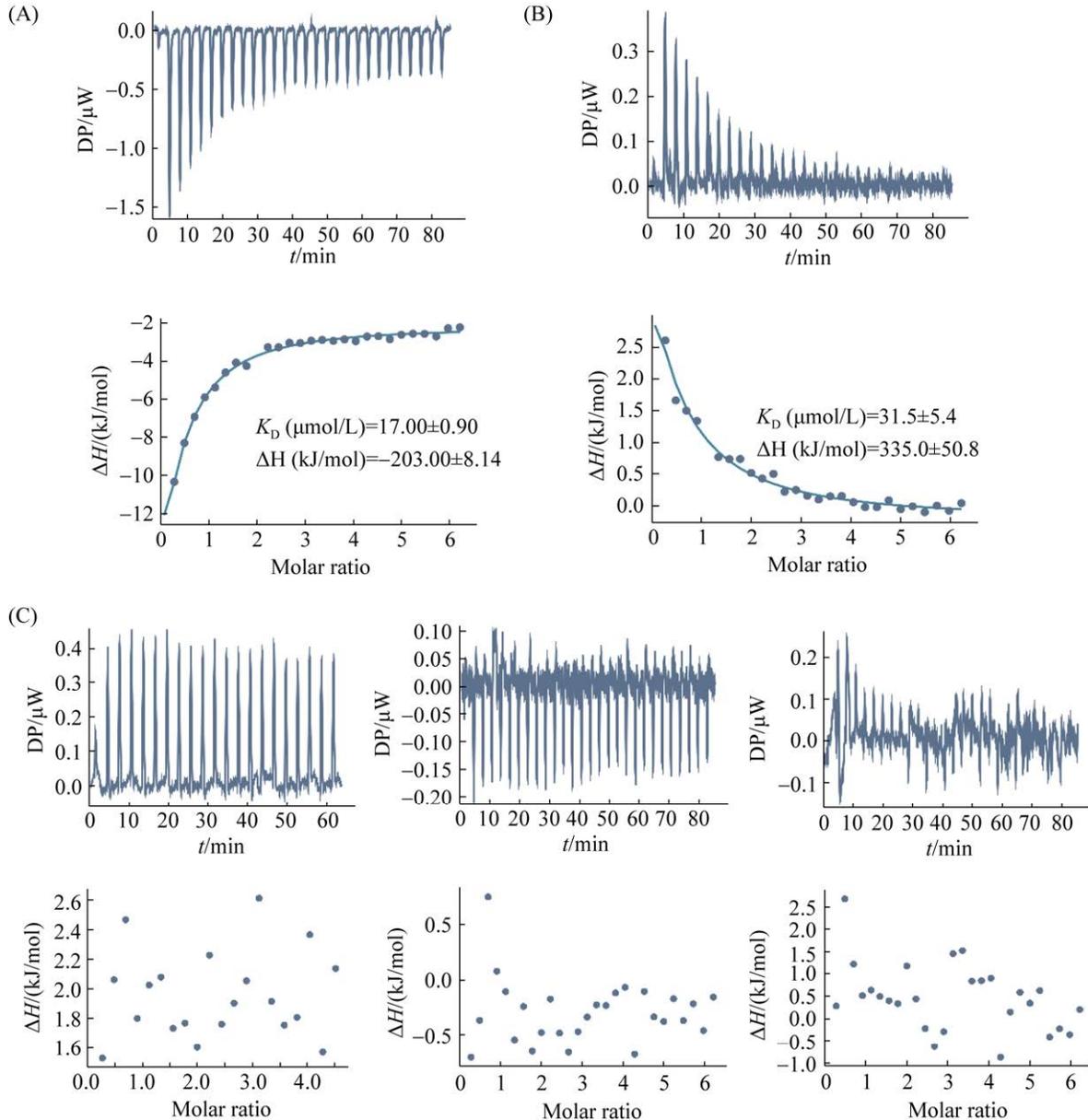


图 2 用不同的潜在配体滴定 LBD₁₉₁₂ 所得的恒温量热 (ITC) 结果

Figure 2 ITC data of LBD₁₉₁₂ titrated with potential ligands. A: LBD₁₉₁₂ titrated with pyruvate; B: LBD₁₉₁₂ titrated with propionate; C: LBD₁₉₁₂ titrated with L-lactate, acetate or glycolate (from left to right); DP: differential power to maintain a zero-temperature difference between the reference and sample cells; W: watt.

一个放热过程,符合一个蛋白质分子结合一分子配体的结合曲线。通过结合曲线拟合,计算出丙酮酸-LBD₁₉₁₂复合物的解离常数 $K_D=(17.0\pm 0.9)$ $\mu\text{mol/L}$ 。而用丙酮酸溶液滴定 LBD₁₉₁₂溶液时,显示丙酮酸与 LBD₁₉₁₂的结合是吸热过程,所形成复合物的解离常数 $K_D=(31.5\pm 5.4)$ $\mu\text{mol/L}$ (图 2B)。其他化合物在所指示的浓度下滴定 30 $\mu\text{mol/L}$ 的 LBD₁₉₁₂溶液所得的热量变化曲线见图 2C。

2.3 MCP₁₉₁₂ 介导根癌农杆菌对丙酮酸的吸引趋化响应

虽然近年来发现 MCP 参与调控多种不同的生物学过程,但 MCP 的主要功能是介导对特定化学效应物的趋化响应。为了进一步确认 MCP₁₉₁₂ 的生物学功能,首先考虑的就是 MCP₁₉₁₂ 对根癌农杆菌趋化响应的影响。根据前面所得到的结果,丙酮酸可能是 MCP₁₉₁₂ 识别的化学效应物,因此,用毛细管法测定了根癌农杆菌对丙酮酸的趋化响应,结果显示,0.5 mmol/L 到 5 mmol/L 浓度范围内的丙酮酸对

根癌农杆菌具有明显的吸引作用,最适浓度为 0.5 mmol/L(图 3A)。接着,同时测定了野生菌株 C58、MCP₁₉₁₂ 缺失菌株 ΔMCP_{1912} 和 MCP₁₉₁₂ 回补菌株 $\Delta\text{MCP}_{1912}\text{C}$ 对丙酮酸的趋化响应,图 3B 结果显示, MCP₁₉₁₂ 缺失后,根癌农杆菌对丙酮酸的趋化响应完全消失, MCP₁₉₁₂ 的回补能够恢复根癌农杆菌对丙酮酸的趋化响应,证明 MCP₁₉₁₂ 是介导根癌农杆菌对丙酮酸趋化响应的化学受体。为了验证 MCP₁₉₁₂ 调控根癌农杆菌对丙酮酸的趋化响应是否具有特异性,还测定了这 3 种菌株对 10^{-6} mol/L 的蔗糖的趋化响应,结果显示 MCP₁₉₁₂ 的缺失不影响根癌农杆菌对蔗糖的趋化响应(结果未展示)。

2.4 MCP₁₉₁₂ 介导根癌农杆菌对丙酮酸的躲避趋化响应

根据 ITC 实验结果, LBD₁₉₁₂ 能够结合丙酮酸,因此,测定了根癌农杆菌对丙酮酸的趋化响应。结果显示,在 0.5 $\mu\text{mol/L}$ 到 50 mmol/L 的丙酮酸浓度范围内,都无法检测到根癌农杆菌 C58 被丙酮酸吸引的趋化响应。反而观察到,进

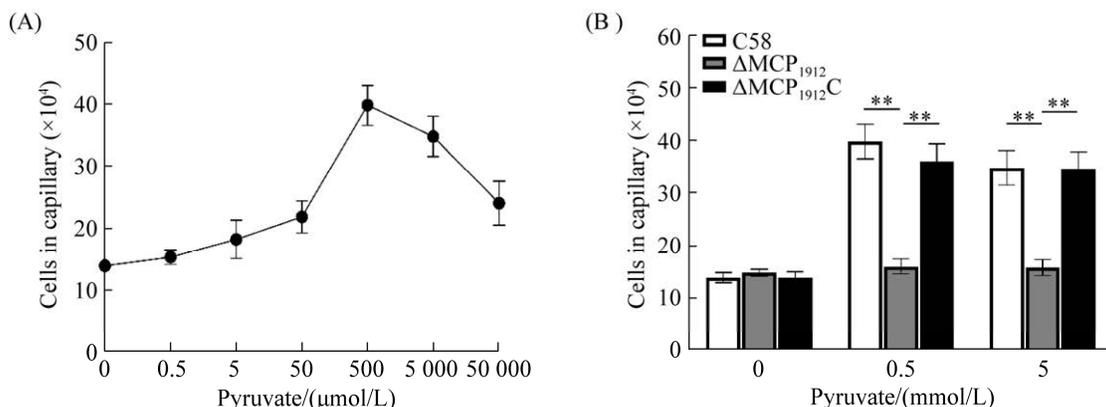


图 3 毛细管法检测根癌农杆菌对丙酮酸的吸引趋化响应

Figure 3 Capillary assay of the chemotactic response of *Agrobacterium tumefaciens* to pyruvate. A: chemotactic response of wild-type strain C58 to pyruvate with different concentrations. B: chemotactic response of C58, ΔMCP_{1912} and $\Delta\text{MCP}_{1912}\text{C}$ to pyruvate at the optimal concentrations. Shown are arithmetic means and standard deviations from three independent experiments conducted in triplicate. The bars connected by “***” mark indicate significant differences ($P<0.05$; student’s t -test).

入含丙酸的毛细管中的活菌数低于不含丙酸的对照毛细管中的活菌数。这预示根癌农杆菌可能能够躲避丙酸。于是，调整了趋化响应测定方法，将丙酸加到菌液池中，把不含丙酸的毛细管插入含有丙酸的菌液池中。如果根癌农杆菌具有躲避丙酸的能力，就会从含有丙酸的菌液池中迁入无丙酸的毛细管中。结果发现根癌农杆菌对 0.5 mmol/L 到 5 mmol/L 浓度范围内的丙酸表现出明显的躲避趋化响应，引起根癌农杆菌躲避的最适丙酸浓度是 5 mmol/L (图 4A)。为了明确 MCP₁₉₁₂ 是否为调控根癌农杆菌躲避丙酸的化学受体，用同样的方法同时测定了野生菌株 C58、MCP₁₉₁₂ 缺失菌株 Δ MCP₁₉₁₂ 和 MCP₁₉₁₂ 回补菌株 Δ MCP₁₉₁₂C 躲避 0.5 mmol/L 和 5 mmol/L 丙酸的情况。结果见图 4B，MCP₁₉₁₂ 的缺失使根癌农杆菌失去了躲避丙酸的能力，MCP₁₉₁₂ 的回补能完全恢复其躲避丙酸的能力，证明 MCP₁₉₁₂ 是介导根癌农杆菌躲避丙酸的趋化受体。

2.5 丙酮酸和丙酸对根癌农杆菌 C58 生长的影响

由于丙酮酸是糖酵解的终产物，可被大多数生物利用。而丙酸却对很多细菌的生长具有抑制作用。既然根癌农杆菌对这 2 种物质都有趋化响应，因此，先检测了根癌农杆菌是否能够利用这两种物质作为碳源。将合成培养基——AB 培养基^[19]的碳源蔗糖分别替换为等量的丙酮酸或丙酸，然后，分别用这两种碳源被替换的培养基培养根癌农杆菌，并测定根癌农杆菌在这两种培养基中的生长曲线，结果如图 5A。24 h 后，在以丙酮酸为碳源的培养基中，根癌农杆菌能够生长，OD₆₀₀ 由 0.01 增长至 1.3；而在以丙酸为碳源的培养基中，根癌农杆菌不能生长，OD₆₀₀ 没有变化。这说明根癌农杆菌可以利用丙酮酸作为碳源，而不能利用丙酸为碳源。为了进一步测定丙酸是否会抑制根癌农杆菌的生长，在 MG/L 培养基中添加不同浓度的丙酸，然后观察根癌农杆菌在

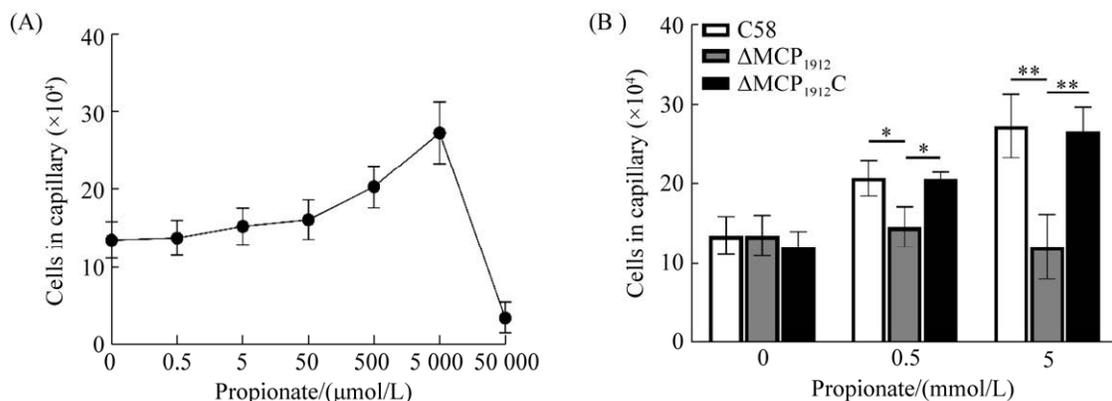


图 4 毛细管法检测根癌农杆菌对丙酸的躲避趋化响应

Figure 4 Capillary assay of the chemotactic response of *Agrobacterium tumefaciens* to propionate. A: repellent response of C58 to propionate with different concentrations. B: repellent responses of C58, Δ MCP₁₉₁₂ and Δ MCP₁₉₁₂C to propionate at the optimal concentrations. All values are the means and standard deviations from three biological replicates. The bars connected by “***” and “*” marks mean that they are different in a statistically significant manner at $P < 0.05$ and 0.1, respectively via the unpaired student’s *t*-test.

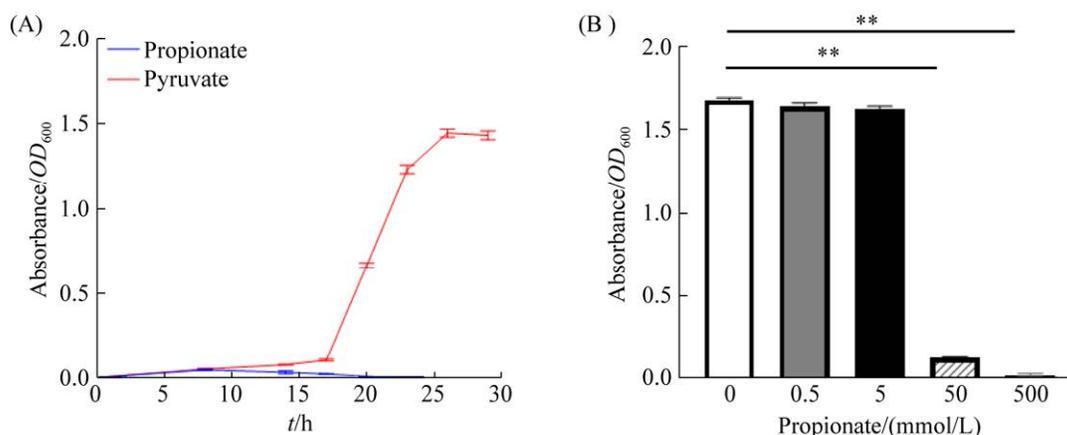


图 5 丙酮酸和丙酸对根癌农杆菌 C58 生长的影响

Figure 5 Effects of pyruvate and propionate on the growth of *Agrobacterium tumefaciens* C58. A: growth curves of *A. tumefaciens* C58 growing in the defined medium (AB medium) with pyruvate or propionate as the carbon source instead of sucrose. B: the OD_{600} values of the agrobacterial culture after cultured for 16 h in MG/L medium with different concentrations of propionate.

这些含有不同浓度的丙酸的 MG/L 培养基中的生长状况, 结果发现, 50 mmol/L 的丙酸就基本上能够完全抑制根癌农杆菌在丰富培养基 MG/L 中的生长(图 5B)。

3 讨论与结论

根癌农杆菌能够在土壤、植物根际和宿主的瘤组织等多种环境中生存。在这些复杂的生存环境中, 根癌农杆菌需要识别环境和宿主的各种信号物质, 因此, 进化出 20 种不同的化学受体。遗憾的是, 在最早完成测序的 C58 菌株基因组所注释的这 20 种化学受体中, 没有一种化学受体的配体和功能得到过实验的鉴定和验证。本文对 *atu1912* 基因编码的化学受体 MCP₁₉₁₂ 的配体和生物学功能进行了实验鉴定和验证。

通过对 MCP₁₉₁₂ 的氨基酸序列分析, 预测 MCP₁₉₁₂ 的 LBD 位于第 33–187 位氨基酸残基的肽段, 含有 sCache₂ 结构域。它属于 Cache (calcium channels and chemotaxis) 超级家族结构

域。Cache 结构域的结构与 PAS 超级家族结构域的结构相似, 是原核生物细胞外化学受体的主要结构域模式^[23–24]。Cache 超级家族结构域包括 Cache₁、Cache₂、Cache₃、YkuI_C、DUF4153 和 DUF4173 等 6 个家族结构域。有些化学受体仅含一个 Cache 结构域称为单 Cache 结构域(single Cache domain, sCache)受体, 有些化学受体含两个 Cache 结构域称为双 Cache 结构域(double Cache domain, dCache)受体。MCP₁₉₁₂ 为含有单个 Cache₂ 结构域的化学受体。根据现有的实验结果, 含有 Cache 结构域的化学受体主要是识别氨基酸和有机酸, 而含 sCache 结构域的受体多数识别有机酸^[23]。用 TSA 筛选时, 我们发现 5 种有机酸可以显著提高 LBD₁₉₁₂ 的热稳定性。然而, 用 ITC 进一步验证时, 只有丙酮酸和丙酸表现出能与 LBD₁₉₁₂ 结合。ITC 的实验结果显示, 丙酮酸与 LBD₁₉₁₂ 结合是放热过程, 而丙酸与 LBD₁₉₁₂ 结合却是吸热过程, 这说明这两种物质与 LBD₁₉₁₂ 的结合机理不同, 或者说它们通

过不同的作用力与 LBD₁₉₁₂ 结合。由于 ITC 被认为是研究蛋白质与配体结合过程的金标准技术^[25]，并且已有多篇文献报道 TSA 技术容易产生假阳性结果，所以我们在细菌趋化实验中只测定了根癌农杆菌对丙酮酸和丙酸的趋化响应。

毛细管法是定量测定细菌趋化响应的可靠方法^[26]。利用该方法证明，MCP₁₉₁₂ 介导根癌农杆菌对丙酮酸的吸引趋化响应和对丙酸的躲避趋化响应。MCP₁₉₁₂ 的缺失完全消除了根癌农杆菌对这两种物质的趋化响应，这说明根癌农杆菌中没有其他 MCP 可以替代 MCP₁₉₁₂ 识别这两种物质并参与介导根癌农杆菌对这两种物质的趋化响应。 Δ MCP₁₉₁₂C 的功能恢复，进一步支持了这一结论。通过测定丙酮酸和丙酸对根癌农杆菌生长的影响，证明根癌农杆菌可以利用丙酮酸作为唯一碳源，而丙酸不但不能被根癌农杆菌利用，而且还能抑制根癌农杆菌在丰富培养基 MG/L 中的生长，这与根癌农杆菌能被丙酮酸吸引，而躲避丙酸的现象完全相符。用 ITC 所测得的丙酮酸和 LBD₁₉₁₂ 结合所形成的复合物的解离常数 $[K_D=(17.0\pm 0.9) \mu\text{mol/L}]$ ，明显小于丙酸和 LBD₁₉₁₂ 结合所形成的复合物的解离常数 $[K_D=(31.5\pm 5.4) \mu\text{mol/L}]$ ，说明 LBD₁₉₁₂ 对丙酮酸的亲和力比对丙酸的亲和力强。该结果也与用毛细管法测得的这两种物质能引起根癌农杆菌产生趋化响应的最适浓度一致。本文所取得的这些结果不仅对进一步认识根癌农杆菌识别环境信号和适应环境的机理有一定的理论意义，而且对如何利用丙酮酸和丙酸调控根癌农杆菌的生长、防控植物冠瘿瘤病或提高根癌农杆菌的转基因效率也有潜在的实践指导作用。

尽管从离体的蛋白质和活体的细菌都证明 MCP₁₉₁₂ 是介导根癌农杆菌趋化响应丙酮酸和

丙酸的唯一化学受体，但是，根据 MCP₁₉₁₂ 的配体结合结构域 LBD₁₉₁₂ 与两种化合物结合时的热量变化明显相反，而且所介导的对两种物质的趋化响应也相反，说明 MCP₁₉₁₂ 利用不同的作用力甚至可能是不同的结合位点结合这两种物质。因此，有关 MCP₁₉₁₂ 识别和结合这两种物质的位点和机理值得进一步探讨。

参考文献

- [1] Armitage JP. Bacterial tactic responses. *Advances in Microbial Physiology*. Amsterdam: Elsevier, 1999: 229–289.
- [2] Szurmant H, Ordal GW. Diversity in chemotaxis mechanisms among the bacteria and archaea. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2004, 68(2): 301–319.
- [3] Bi SY, Lai LH. Bacterial chemoreceptors and chemoeffectors. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2015, 72(4): 691–708.
- [4] Huang ZW, Pan XY, Xu N, Guo ML. Bacterial chemotaxis coupling protein: structure, function and diversity. *Microbiological Research*, 2019, 219: 40–48.
- [5] Huang Z, Wang YH, Zhu HZ, Andrianova EP, Jiang CY, Li DF, Ma LY, Feng J, Liu ZP, Xiang H, Zhulin IB, Liu SJ. Cross talk between chemosensory pathways that modulate chemotaxis and biofilm formation. *mBio*, 2019, 10(1): e02876–e02818.
- [6] Black WP, Yang ZM. *Myxococcus xanthus* chemotaxis homologs DifD and DifG negatively regulate fibril polysaccharide production. *Journal of Bacteriology*, 2004, 186(4): 1001–1008.
- [7] Harkey CW, Everiss KD, Peterson KM. The *Vibrio cholerae* toxin-coregulated-pilus gene *tcpI* encodes a homolog of methyl-accepting chemotaxis proteins. *Infection and Immunity*, 1994, 62(7): 2669–2678.
- [8] Berleman JE, Bauer CE. Involvement of a Che-like signal transduction cascade in regulating cyst cell development in *Rhodospirillum centenum*. *Molecular Microbiology*, 2005, 56(6): 1457–1466.
- [9] Sun Y, Xie ZH, Sui F, Liu XL, Cheng WZ. Identification of Cbp1, a c-di-GMP binding chemoreceptor in *Azorhizobium caulinodans* ORS571 involved in chemotaxis and nodulation of the host plant. *Frontiers in Microbiology*, 2019, 10: 638.

- [10] Lacal J, García-Fontana C, Muñoz-Martínez F, Ramos JL, Krell T. Sensing of environmental signals: classification of chemoreceptors according to the size of their ligand binding regions. *Environmental Microbiology*, 2010, 12(11): 2873–2884.
- [11] Ortega Á, Zhulin IB, Krell T. Sensory repertoire of bacterial chemoreceptors. *Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR*, 2017, 81(4): e00033–e00017.
- [12] Fernández M, Ortega Á, Rico-Jiménez M, Martín-Mora D, Daddaoua A, Matilla MA, Krell T. High-throughput screening to identify chemoreceptor ligands. *Methods in Molecular Biology*, 2018, 1729: 291–301.
- [13] Boyeldieu A, Ali Chaouche A, Méjean V, Jourlin-Castelli C. Combining two optimized and affordable methods to assign chemoreceptors to a specific signal. *Analytical Biochemistry*, 2021, 620: 114139.
- [14] Shaw CH. Swimming against the tide: chemotaxis in *Agrobacterium*. *BioEssays*, 1991, 13(1): 25–29.
- [15] Xu N, Wang MQ, Yang XJ, Xu YJ, Guo ML. *In silico* analysis of the chemotactic system of *Agrobacterium tumefaciens*. *Microbial Genomics*, 2020, 6(11): 10.1099/mgen.0.000460.
- [16] Gao DW, Zong RJ, Huang ZW, Ye JY, Wang H, Xu N, Guo ML. The divergent key residues of two *Agrobacterium fabrum* (*tumefaciens*) CheY paralogs play a key role in distinguishing their functions. *Microorganisms*, 2021, 9(6): 1134.
- [17] Ye JY, Gao MM, Zhou QX, Wang H, Xu N, Guo ML. The only chemoreceptor encoded by *che* operon affects the chemotactic response of *Agrobacterium* to various chemoeffectors. *Microorganisms*, 2021, 9(9): 1923.
- [18] Thomashow MF, Nutter R, Montoya AL, Gordon MP, Nester EW. Integration and organization of Ti plasmid sequences in crown gall tumors. *Cell*, 1980, 19(3): 729–739.
- [19] Knauf VC, Nester EW. Wide host range cloning vectors: a cosmid clone bank of an *Agrobacterium* Ti plasmid. *Plasmid*, 1982, 8(1): 45–54.
- [20] Guo ML, Zhu Q, Gao DK. Development and optimization of method for generating unmarked *A. tumefaciens* mutants. *Progress in Biochemistry and Biophysics*, 2009, 36(5): 556–565.
- [21] Huang ZW, Zhou QX, Sun P, Yang J, Guo ML. Two *Agrobacterium tumefaciens* CheW proteins are incorporated into one chemosensory pathway with different efficiencies. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2018, 31(4): 460–470.
- [22] Guo ML, Hou QM, Hew CL, Pan SQ. *Agrobacterium* VirD2-binding protein is involved in tumorigenesis and redundantly encoded in conjugative transfer gene clusters. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2007, 20(10): 1201–1212.
- [23] Upadhyay AA, Fleetwood AD, Adebali O, Finn RD, Zhulin IB. Cache domains that are homologous to, but different from PAS domains comprise the largest superfamily of extracellular sensors in prokaryotes. *PLoS Computational Biology*, 2016, 12(4): e1004862.
- [24] Wuichet K, Zhulin IB. Origins and diversification of a complex signal transduction system in prokaryotes. *Science Signaling*, 2010, 3(128): ra50.
- [25] Matilla MA, Martín-Mora D, Krell T. The use of isothermal titration calorimetry to unravel chemotactic signalling mechanisms. *Environmental Microbiology*, 2020, 22(8): 3005–3019.
- [26] Adler J. A method for measuring chemotaxis and use of the method to determine optimum conditions for chemotaxis by *Escherichia coli*. *Journal of General Microbiology*, 1973, 74(1): 77–91.

(本文责编 张晓丽)