



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

谢来工, 赵文瑾, 张磊*

西北农林科技大学生命科学院, 陕西省杨凌示范区, 陕西 杨凌 712100

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. 微生物学报, 2022, 62(2): 628–639.

Xie Laigong, Zhao Wenjin, Zhang Lei. Autoinducer-2 regulates the chemotaxis and biofilm formation of *Pseudomonas putida* KT2440 by the methyl-accepting chemotaxis protein McpU. *Acta Microbiologica Sinica*, 2022, 62(2): 628–639.

摘要: 【背景】广泛存在于革兰氏阴性菌和革兰氏阳性菌中的自诱导物 autoinducer-2 (AI-2) 能够介导细菌种内和种间通讯, 并调节细菌的多种生理过程。然而恶臭假单胞菌 KT2440 能否感知 AI-2 信号还未见报道。【目的】挖掘介导恶臭假单胞菌 KT2440 对 AI-2 趋化反应的趋化受体, 检测 AI-2 信号通过趋化受体对恶臭假单胞菌 KT2440 生物膜形成的调控作用。【方法】本研究首先检测恶臭假单胞菌 KT2440 对 AI-2 信号的趋化反应, 随后表达纯化了与铜绿假单胞菌 AI-2 受体高度同源的甲基化趋化受体 McpU 的配体结合结构域(ligand-binding domain, LBD), 利用哈维氏弧菌的生物发光实验和等温滴定量热法(ITC)分析 McpU-LBD 与 AI-2 的相互作用; 软琼脂平板法和毛细管定量分析法分析 KT2440 及 *mcpU* 敲除菌株($\Delta mcpU$)对 AI-2 的趋化反应; 结晶紫染色法检测 AI-2 对 KT2440 及 $\Delta mcpU$ 生物膜形成能力的影响。【结果】软琼脂平板法和毛细管定量分析发现 KT2440 对 AI-2 信号表现出明显的正趋向性。哈维氏弧菌的生物发光实验和 ITC 分析发现 AI-2 与 McpU-LBD 具有高亲和力相互作用。进一步研究发现 KT2440 对 AI-2 的趋化反应是通过 McpU 介导的。生物膜测定结果显示, AI-2 能通过其受体 McpU 显著增强 KT2440 的生物膜形成能力($P < 0.05$)。【结论】以上结果表明, 甲基化趋化受体 McpU 介导了恶臭假单胞菌 KT2440 对 AI-2 的趋化作用, 并且 AI-2 通过作用于该受体显著提高恶臭假单胞菌 KT2440 的生物膜形成能力。

关键词: 恶臭假单胞菌; 甲基化趋化受体蛋白; AI-2; 趋化作用; 生物膜

基金项目: 国家重点研发计划(2018YFA0901200)

Supported by the National Key Research and Development Program of China (2018YFA0901200)

*Corresponding author. Tel: +86-29-87092087; E-mail: zhanglei0075@nwsuaf.edu.cn

Received: 12 May 2021; Revised: 3 September 2021; Published online: 12 October 2021

Autoinducer-2 regulates the chemotaxis and biofilm formation of *Pseudomonas putida* KT2440 by the methyl-accepting chemotaxis protein McpU

XIE Laigong, ZHAO Wenjin, ZHANG Lei*

College of Life Sciences, Northwest A&F University, Yangling 712100, Shaanxi, China

Abstract: [Background] Autoinducer-2 (AI-2), ubiquitous in Gram-negative bacteria and Gram-positive bacteria, can mediate intraspecific and interspecific communication and regulate a variety of physiological processes. However, whether *Pseudomonas putida* KT2440 can sense AI-2 signal has not been reported yet. [Objective] To explore the chemotactic receptor mediating the chemotaxis of KT2440 to AI-2, and to detect the regulatory role of AI-2 in the biofilm formation of KT2440. [Methods] Firstly, soft agar plate assay and quantitative capillary assay were employed to detect the chemotactic response of KT2440 to AI-2. Then, the ligand binding domain (LBD) of the methyl-accepting chemotaxis protein McpU which had a high homology with that of the known AI-2 receptor TlpQ in *Pseudomonas aeruginosa* was expressed and purified. *Vibrio harveyi* MM32 bioluminescence and isothermal titration calorimetry (ITC) were adopted to detect the interaction between McpU-LBD and AI-2. Soft agar assay and quantitative capillary assay were carried out to evaluate the chemotaxis of the *mcpU* knockout strain ($\Delta mcpU$) to AI-2. The effect of AI-2 on the biofilm formation of KT2440 and $\Delta mcpU$ was detected by crystal violet staining. [Results] KT2440 exhibited chemotaxis to AI-2. The bioluminescence and ITC assays showed that AI-2 bound to McpU-LBD with high affinity. The chemotaxis of KT2440 to AI-2 was mediated by McpU, and AI-2 significantly enhanced the biofilm formation in KT2440 via its receptor McpU ($P < 0.05$). [Conclusion] McpU mediates the chemotaxis of *P. putida* KT2440 to AI-2, and AI-2 significantly enhances the biofilm formation of *P. putida* KT2440 by engaging McpU.

Keywords: *Pseudomonas putida* KT2440; methyl-accepting chemotaxis protein; autoinducer-2 (AI-2); chemotaxis; biofilm

群体感应(quorum sensing, QS)是依赖细菌群体密度调控细菌生理状态的一种机制,能够介导细胞间的通讯并且在细菌环境适应性中发挥重要作用^[1]。由自诱导物 autoinducer-2 (AI-2)介导的 QS 系统广泛存在于革兰氏阴性菌和革兰氏阳性菌中,能够介导细菌种内和种间通讯,并调节细菌多种生理过程,例如生物膜的形成,毒力和耐药性等^[2-4]。*luxS* 基因编码的 S-核糖基高半胱氨酸酶分解底物后形成 4,5-二羟基-2,3-戊二酮(4,5-dihydroxy-2,3-pentanedione, DPD), DPD 能

够自发环化形成 AI-2^[5]。AI-2 并不是一个单一的信号分子,而是一组由 DPD 迅速转换成的不同衍生物混合物^[6]。细菌通过相应受体感知环境中的 AI-2,当 AI-2 的浓度超过阈值时,就会激活 QS 系统,调控细菌的基因表达和群体行为^[7]。迄今为止已经鉴定出 3 种类型 AI-2 受体:(1) 仅存在于弧菌属中的 LuxP^[8];(2) 在大肠杆菌、沙门氏菌等肠道菌以及根瘤菌科、芽孢杆菌科和梭菌科的少数种中被发现的 LsrB^[9];(3) 本课题组最新鉴定的含 dCACHE 结构域的第三类 AI-2 受体^[10]。

LuxP 与 AI-2 结合后,能够调节膜传感器组氨酸激酶 LuxQ 的活性。随后 LuxPQ 共同调控磷酸化信号转导的级联反应,从而通过调控下游基因表达协调细菌群体行为^[11]。由 LsrB 参与组成的 ABC 转运系统与 AI-2 的内化有关^[12]。dCACHE 结构域广泛存在于细菌中,并存在于少量古菌中^[10,13-14]。dCache_1 家族是 dCACHE 家族中最大的子家族,原核生物中许多参与信号转导的蛋白质都具有 dCache_1 结构域,包括甲基化趋化受体蛋白(methyl- accepting chemotaxis proteins, MCPs)、组氨酸激酶(histidine kinases, HKs)、c-di-GMP 合成酶和磷酸二酯酶(c-di-GMP synthases and phosphodiesterases, CSPs)、丝氨酸磷酸酶(serine phosphatases, SPs)、丝氨酸/苏氨酸激酶(serine/threonine kinases, STKs)、腺苷酸或鸟苷酸环化酶(adenylate/guanylate cyclases, ACs/GCs)等^[13]。带有 dCache_1 结构域的诸多蛋白被鉴定为 AI-2 受体,表明 AI-2 是一类原核生物种间对话的通用信号语言^[10]。

在自然环境中,细菌能够向对自身生长有益的物质定向聚集或者主动远离对自身生长有害的物质,这种行为被称为细菌的趋化性。细菌能够利用趋化性向有利于其生长和生存的环境

迁移^[15],以使其能够适应环境的变化,这对细菌是有益的。甲基化趋化受体蛋白是细菌中最常见的化学感受器,在细菌许多生理功能中发挥重要作用,包括外源污染物的降解和胞内第二信使 c-di-GMP 水平调节等^[16-17]。

作为目前遗传背景研究最为清晰、代谢过程研究最为透彻的假单胞菌,恶臭假单胞菌 KT2440 被广泛应用于科学研究和环境治理中,例如生物修复、生物催化、生物排污和代谢工程等方面^[18]。本研究发现恶臭假单胞菌 KT2440 对 AI-2 具有趋化性,通过生物信息学分析发现恶臭假单胞菌 KT2440 的甲基化趋化受体蛋白 McpU 具有 dCache_1 结构域而且其与铜绿假单胞菌已知的 AI-2 受体 TlpQ^[10]具有高度同源性。本研究对恶臭假单胞菌 KT2440 中 McpU 介导的对 AI-2 的趋化作用进行分析,并检测 AI-2 信号通过 McpU 对该菌生物膜形成的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验相关菌株、质粒及引物

实验所用菌株和质粒详见表 1,所用引物详见表 2。

表 1 实验用菌株和质粒

Table 1 Strains and plasmids used in this study

Strains and plasmids	Relevant characteristics	References or sources
Strains		
<i>Pseudomonas putida</i> KT2440	Wild-type; Chl ^r	Laboratory stock
<i>E. coli</i> TG1	Host for cloning	Laboratory stock
<i>E. coli</i> S17-1	F ⁻ <i>thi pro hsdR</i> [RP4-2 Tc::Mu Km::Tn7 (Tp Sm)]	Laboratory stock
<i>E. coli</i> BL21(DE3)	Host for expression vector pET-28a	Laboratory stock
<i>E. coli</i> BL21(DE3) lacking <i>luxS</i>	$\Delta luxS$ deletion mutant in <i>E. coli</i> BL21(DE3)	[10]
<i>V. harveyi</i> MM32 lacking <i>luxN</i> and <i>luxS</i>	<i>luxN::cat luxS::Tn5kan</i>	[19]
Plasmids		
pET-28a	Expression vector with N-terminal hexahistidine affinity tag; Kan ^r	Laboratory stock
pK18 <i>mobsacB</i>	<i>sacB</i> -based gene replacement vector; Kan ^r	Laboratory stock
pBBR1MCS-5	Rep <i>Bordetella</i> , <i>lacZ</i> , Gm ^r	Laboratory stock
pBBR1MCS-5- <i>mcpU</i>	pBBR1MCS-5 expressing <i>mcpU</i>	This study

Kan: kanamycin; Chl: chloramphenicol; Gm: gentamicin.

表 2 实验所用引物

Table 2 Primers used in this study

Primers names	Sequences (5'→3')	Purposes
F	ACTGGTGGACAGCAAATGGGTCGCGGA TCCACCCAGGCCATCGCAGC	Forward primer to clone <i>mcpU-LBD</i> into pET-28a
R	GTGGTGGTGTCTCGAGTGC GGCCGCAAG CTTTCAGTTGGCGTTCTGGTTATGGGCA	Reverse primer to clone <i>mcpU-LBD</i> into pET-28a
UP-F	AGGAAACAGCTATGACATGATTACGAAT TCGACCATCCTGTGCTTCTCGTTCCT	To amplify the upstream homologous arm of <i>mcpU</i> from strain KT2440 for fusion
UP-R	CCTCCACCGAAACCTGCGTGGAGGCGA CGCAGCGGCAT	To amplify the upstream homologous arm of <i>mcpU</i> from strain KT2440 for fusion
Down-F	ATGCCGCTGCGTCGCCTCCACGCAGGTT TCGGTGGAGG	To amplify the downstream homologous arm of <i>mcpU</i> from strain KT2440 for fusion
Down-R	GCATGCCTGCAGGTCGACTCTAGAGGAT CCGACGGCGATGGTCACACAGGT	To amplify the downstream homologous arm of <i>mcpU</i> from strain KT2440 for fusion
C-F	TCACTAAAGGGAACAAAAGCTGGGTAC CGATGCCGCTGCGTCGCCTCT	Forward primer to clone <i>mcpU</i> into pBBR1MCS-5
C-R	GTGGCGGCCGCTCTAGAACTAGTGGATC CCTAGACGCGAAACTGCTCCATCAGC	Reverse primer to clone <i>mcpU</i> into pBBR1MCS-5

1.1.2 主要试剂、仪器及培养基

实验中所使用的 Pfu 高保真酶和限制酶均购买自 TaKaRa 公司；DNA 回收使用的试剂盒和质粒提取使用的质粒小提试剂盒均购买于北京天根生化科技有限公司；实验用的 DPD/AI-2 购买于美国 Omm Scientific 公司；pET-28a 使用 *BamH* I 和 *Hind* III 进行双酶切，pK18*mobSacB* 使用 *EcoR* I 和 *BamH* I 进行双酶切；pBBR1MCS-5 使用 *Kpn* I 和 *BamH* I 进行双酶切；软琼脂平板使用的琼脂是购买于美国 BD 公司的 Bacto agar。

等温滴定量热仪，TA 仪器公司；多功能酶标仪 Victor X3，PerkinElmer 公司。电转化仪，凝胶图像分析系统，核酸电泳及蛋白电泳系统，上海 Tanon 公司。超微量分光光度计，DeNovix 公司。

Tris-HCl 缓冲液: 25 mmol/L Tris, 150 mmol/L NaCl, pH 7.5。透析缓冲液: 含 10% 甘油的 Tris-HCl 缓冲液。PBS 缓冲液: 137 mmol/L NaCl, 2.7 mmol/L KCl, 10 mmol/L Na₂HPO₄, 2 mmol/L KH₂PO₄, pH 7.5。

抗生素购买自北京索莱宝科技有限公司, 使用浓度为卡那霉素 50 μg/mL, 氯霉素 20 μg/mL,

庆大霉素 10 μg/mL。

1.1.3 培养基与生长条件

LB 液体培养基(g/L): NaCl 10.0, 胰蛋白胍 10.0, 酵母浸出物 5.0。LB 固体培养基(g/L): NaCl 10.0, 胰蛋白胍 10.0, 酵母浸出物 5.0, 琼脂粉 15.0。趋化培养基(g/L): Na₂HPO₄·12H₂O 17.9, KH₂PO₄ 3.0, NH₄Cl 1.0, NaCl 0.5; 使用前需补加 0.1 mmol/L CaCl₂、2 mmol/L MgSO₄ 和 2.5 mmol/L 葡萄糖。

AB 培养基参照 Bassler 等^[5]的方法配制。

恶臭假单胞菌 KT2440 及其相关菌株使用 LB 培养基于 30 °C 培养，大肠杆菌使用 LB 培养基于 37 °C 培养，哈氏弧菌 MM32 使用 AB 培养基于 30 °C 培养。

1.2 *mcpU* 敲除菌株的获取

mcpU 基因的敲除基于同源重组的方式进行，本研究使用 pK18*mobSacB* 自杀载体^[20]。以恶臭假单胞菌 KT2440 为模板，利用引物对 UP-F 和 UP-R 以及 Down-F 和 Down-R 分别扩增出 *mcpU* 的上游和下游同源交换臂。通过重叠 PCR 连接上下游 PCR 片段，并将其克隆到线性化载体 pK18*mobSacB*，然后将连接产物热

激转化 *E. coli* S17-1, 获得转化子。通过携带重组质粒的 *E. coli* S17-1 和恶臭假单胞菌 KT2440 两亲本接合转移, 按照 1:100 稀释, 涂布在含有卡那霉素和氯霉素抗性的 LB 固体培养基上。30 °C 培养 24 h 后, 通过 PCR 筛选出发生同源单交换的克隆。将发生单交换的菌株涂布在含有 20% (W/V) 蔗糖的 LB 固体培养基上, 利用 *sacB* 基因的编码产物能将蔗糖分解成有毒物质使细菌致死这一特性^[21-22], 实现重组质粒的消除, 并使用 PCR 筛选出消除重组质粒的 *mcpU* 缺失菌株。

1.3 *mcpU* 回补菌株的构建

实验采用质粒回补方式, 将 *mcpU* 的基因片段克隆到 pBBR1MCS-5, 得到重组载体。并将重组载体通过电穿孔的方式转化 $\Delta mcpU$, 经 PCR 验证, 构建回补菌株 $\Delta mcpU(mcpU)$ 。在野生型菌株和 $\Delta mcpU$ 菌株中也转入了 pBBR1MCS-5 质粒, 分别记为 KT2440 (vector) 和 $\Delta mcpU$ (vector), 用于野生、突变及回补菌株的表型比较。

1.4 哈氏弧菌生物发光实验

参考文献[10]表达纯化 McpU-LBD。将携带 *mcpU-LBD* 片段的 pET-28a 表达载体热激转化 *E. coli* BL21(DE3) 和缺失了 *luxS* 基因的 *E. coli* BL21(DE3) 中。使用 LB 培养基将所得 2 种菌株于 37 °C、220 r/min, 培养至 OD_{600} 为 0.8, 然后转移至 23 °C、150 r/min, 并使用 0.25 mmol/L IPTG 诱导 7 h。4 °C 离心收集菌体并使用 PBS 缓冲液洗涤 1 次菌体。随后按 1:5 的质量体积比, 使用 PBS 缓冲液重悬菌体, 超声破碎, 4 °C、8 000 r/min 离心 60 min, 取上清, 使用镍离子亲和树脂(Ni^{2+} -NTA)进行蛋白纯化。使用含 25 mmol/L 咪唑的 PBS 缓冲液洗去杂蛋白, 再用含 250 mmol/L 咪唑的 PBS 缓冲液洗脱目标蛋白, 得到 McpU-LBD。使用 50 mmol/L NaH_2PO_4 (pH 8.0), 300 mmol/L NaCl 和 1 mmol/L

dithiothreitol (DTT) 将纯化的 McpU-LBD 经 Sephadex-G25 葡聚糖进行脱盐处理, 然后将 McpU-LBD 浓缩至 10 mg/mL 左右, 70 °C 加热 10 min 使其变性, 以释放结合的配体, 离心收集上清液。

在 AB 培养基中过夜培养哈维氏菌 MM32 至 OD_{600} 达到 0.8, 然后按照 1:5 000 将其稀释到新鲜的 AB 培养基中, 并以每孔 90 μ L 将稀释后的菌液添加到 96 孔微量滴定板中。随后, 取 10 μ L 上清液添加到孔中, 以等体积的 PBS 缓冲液和 1 μ mol/L DPD/AI-2 分别作为阴性和阳性对照。30 °C、170 r/min。振荡培养 10 h 后使用多功能酶标仪测量生物发光量(每秒计数)。AI-2 活性以蛋白变性上清液诱导发光值与不加上清液空白对照发光值的比值表示。

1.5 等温滴定量热法(ITC)分析

使用重组烟草花叶病毒蛋白酶(rTEV)切除目标蛋白 N 端的六聚组氨酸标签, 经镍柱亲和层析, 得到纯化的 McpU-LBD, 使用透析缓冲液透析无标签蛋白。ITC 实验在 20 °C 下进行, 上样前需要对样品进行脱气处理, 然后将 1 mL 蛋白质(70 μ mol/L)和 250 μ L DPD/AI-2 溶液(700 μ mol/L)分别添加到样品池和注射器中。等温滴定量热仪搅拌速度为 200 r/min, 每针滴定 25 次, 间隔 300 s。每个样本进行 3 个独立的实验。在对照实验中, 将 DPD/AI-2 溶液(700 μ mol/L)滴定到样品池的缓冲液中, 以获得稀释热。最后每组实验数据减去稀释热, 得到反应热数据, 使用 NanoAnalyze 3.4 版本, 对 ITC 数据进行分析并拟合曲线。

1.6 趋化性检测

将相关菌株接种在趋化培养基中, 于 30 °C、220 r/min 振荡培养至 OD_{600} 为 0.4。4 500 r/min 室温离心 3 min, 弃上清, 收集菌体, 然后用新鲜趋化培养基重悬, 4 500 r/min 室温离心 3 min, 如此

操作 2 遍, 最后将菌体重悬于趋化培养基中。

1.6.1 毛细管定量分析法分析

参照先前报道的方法进行^[23]。分别吸取 230 μL 上述菌液分装在聚苯乙烯 96 孔板中。利用火焰将毛细管一端热封, 将开口端插入 DPD/AI-2 溶液中。然后将开口端浸入聚苯乙烯 96 孔板细菌悬液中, 静置 30 min, 取出毛细管, 用无菌水清洗毛细管外壁, 然后将毛细管内部细胞吹入培养基中, 梯度稀释, 取 100 μL 涂布平板, 于 30 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养 24 h 后, 进行 CFU 计数。

1.6.2 软琼脂平板法分析

在趋化培养基(含有 0.18% 的纯化琼脂粉)中心接种 10 μL 1 mmol/L DPD/AI-2 溶液, 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜静置, 使 DPD/AI-2 向周围充分扩散以形成浓度梯度。在中心点两侧距离中心点 1.5 cm 处分别接种 2 μL 菌液, 30 $^{\circ}\text{C}$ 培养 16–20 h, 培养结束后, 测定菌液接种点距离 DPD/AI-2 接种点最近(D1)和最远(D2)菌落边缘的距离, 并计算趋化响应指数 RI (response index) 值: $\text{RI}=\text{D1}/(\text{D1}+\text{D2})$, RI 值大于 0.52 的菌落被认为具有趋化性^[24]。

1.7 生物膜形成能力分析

将 KT2440 和 ΔmcpU 突变体的过夜培养物按 1:100 的比例转接至含有 2 mL LB 液体培养基的玻璃试管中, 初始 OD_{600} 为 0.06, 向培养基中加入终浓度为 10 $\mu\text{mol/L}$ DPD/AI-2 溶液, 30 $^{\circ}\text{C}$ 、120 r/min 孵育 36 h。除去菌液, 并用 PBS 缓冲液洗涤试管 2 次。自然晾干后, 使用 0.1% 结晶紫染液染色 20 min, 然后用 PBS 洗去游离的结晶紫。自然晾干后, 使用 3 mL 的 95% 乙醇溶解固定的结晶紫, 并记录 OD_{595} 值。

1.8 生长曲线的测定

为分析 AI-2 是否影响 KT2440 和 ΔmcpU 的生长, 将 2 种菌株在 LB 固体培养基上活化,

并挑取单菌落接种于 LB 液体培养基中, 30 $^{\circ}\text{C}$ 、200 r/min 培养至 OD_{600} 为 0.6。取适量菌液再次转接至新鲜 LB 液体培养基中, 使初始 OD_{600} 为 0.05, 并在 30 $^{\circ}\text{C}$ 、200 r/min 培养。每隔 2 h, 取样测定 OD_{600} 值, 并绘制生长曲线。

2 结果与分析

2.1 恶臭假单胞菌 KT2440 对 AI-2 具有趋化性

首先利用毛细管定量分析法检测恶臭假单胞菌 KT2440 对不同浓度 DPD/AI-2 的趋化性, 以确定 KT2440 对 DPD/AI-2 最适趋化浓度。结果显示, KT2440 对 1 mmol/L 的 DPD/AI-2 具有最显著的趋化性($P<0.001$)(图 1A)。软琼脂平板法分析结果也表明 KT2440 对 DPD/AI-2 表现出明显的正趋化性($\text{RI}=0.62$)(图 1B)。

2.2 McpU 蛋白序列分析

为了挖掘介导恶臭假单胞菌 KT2440 对 AI-2 趋化反应的趋化受体, 本实验基于铜绿假单胞菌中已知 AI-2 受体 TlpQ 的氨基酸序列在恶臭假单胞菌 KT2440 基因组中进行 BlastP 搜索, 检索到与其同源性最高的甲基化趋化受体蛋白 McpU。使用 Clustalx 软件对 McpU 和 TlpQ 进行序列比对, 结果显示, McpU 与 TlpQ 同源性为 62.13%。利用 HMMER (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/hmmer/>)和 SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de/>)在线软件预测 McpU 的结构域, 结果如图 2A 所示, McpU 除具有胞内典型的 MA (methyl-accepting domain)结构域和 HAMP 结构域外, 还具有 2 个跨膜螺旋以及位于周质空间的 dCache_1 结构域(图 2A)。更为重要的是, 该结构域还含有对应与 TlpQ 的 dCache_1 结构域中结合 AI-2 的关键位点 W192、Y208、D210 和 D239^[10]的保守位点(图 2B), 所以推测该 dCache_1 结构域是 McpU 与 AI-2 的结合

区域即 McpU 的配体结合结构域(McpU-LBD)。结合以上信息, 推测 McpU 是 AI-2 的潜在受

体并介导恶臭假单胞菌 KT2440 对 AI-2 的趋化反应。

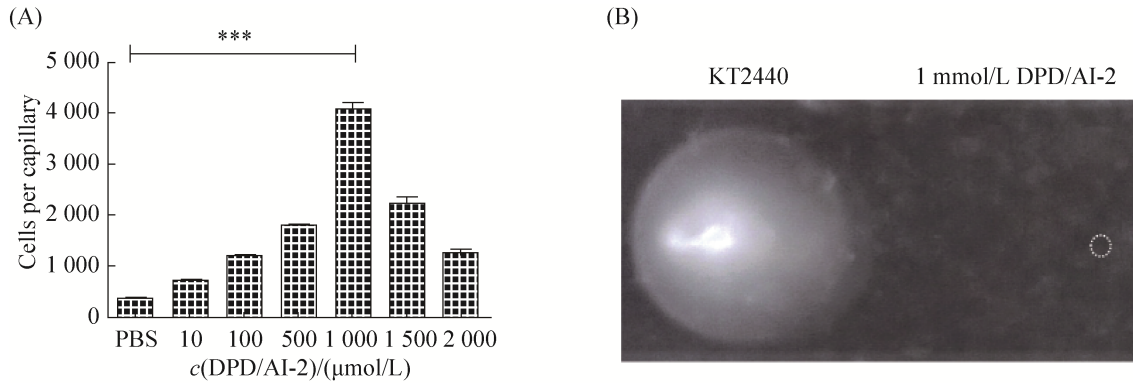


图 1 恶臭假单胞菌 KT2440 对 AI-2 具有趋化性

Figure 1 KT2440 exhibits obvious chemotaxis to AI-2. A: the chemotaxis of *Pseudomonas putida* KT2440 to different concentrations of DPD/AI-2. B: the chemotaxis of KT2440 strain to AI-2 is detected by soft agar plate gradient assays. The white imaginary circle indicates the DPD/AI-2 inoculation point. Data were shown as mean±SEM. The error bars represent the standard deviations of three independent experiments. Statistical significance was evaluated using the two-tailed unpaired Student's *t*-test. $P < 0.05$ was considered to indicate a statistically significant difference. ***: $P < 0.0001$.

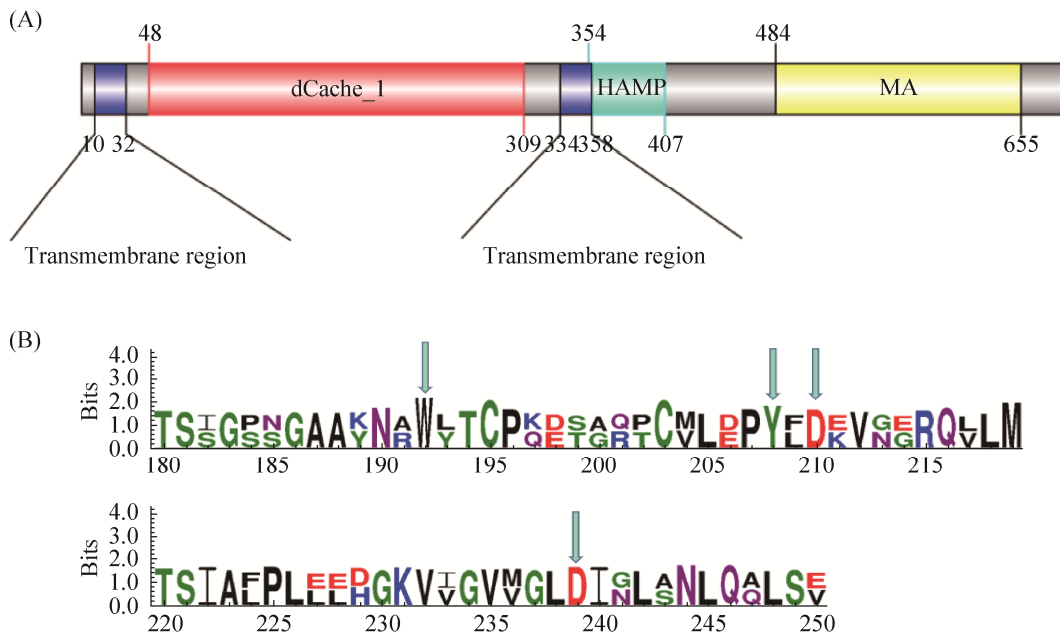


图 2 McpU 的生物信息学分析

Figure 2 Bioinformatics analysis of McpU. A: domain architectures of the chemoreceptor McpU. B: analysis of conserved sites of dCache_1 domains in McpU and TlpQ. Multiple alignment analysis of dCache_1 domains in McpU and TlpQ was performed with ClustalW embedded in MEGA7.

2.3 恶臭假单胞菌 KT2440 对 AI-2 的趋化反应依赖甲基化趋化受体 McpU

为了检测 McpU 能否介导恶臭假单胞菌 KT2440 对 AI-2 的趋化反应, 本研究利用软琼脂平板法和毛细管定量分析法检测了 KT2440 (vector)、 $\Delta mcpU$ (vector)和 $\Delta mcpU(mcpU)$ 对 AI-2 的趋化反应。软琼脂平板检测结果表明, KT2440(vector)(RI=0.61)和 $\Delta mcpU(mcpU)$ (RI=0.58)对 AI-2 具有趋化反应, 而 $\Delta mcpU$ (vector)(RI=0.49)对 AI-2 未表现出趋化反应(图 3A)。毛细管定量分析结果(图 3B)也表明,KT2440 (vector)对 AI-2 具有趋化性, 而 $\Delta mcpU$ 突变株对 AI-2 未显示出趋化反应, 但是在 $\Delta mcpU$ 中回补 *mcpU*, 能使 $\Delta mcpU$ 菌株恢复对 AI-2 的趋化性。以上结果说明 McpU 介导了恶臭假单胞菌 KT2440 对 AI-2 的趋化反应。

2.4 McpU-LBD 与 AI-2 具有高亲和力的相互作用

为了检测 McpU-LBD 是否能与 AI-2 结合,

将 McpU-LBD 纯化浓缩后热变性, 并将上清液添加到哈氏弧菌的培养基中, 通过检测哈氏弧菌的发光能力来确定 McpU-LBD 能否与 AI-2 结合。如图 4A 所示, 与从缺失 *luxS* 基因的 *E. coli* BL21(DE3)纯化 McpU-LBD 后的变性上清液相比, 从 *E. coli* BL21(DE3)中纯化 McpU-LBD 的变性上清液能使哈氏弧菌显著发光($P<0.01$)。这说明 McpU-LBD 能够结合 AI-2, 热变性后 McpU-LBD 结合的 AI-2 被释放到上清液中, 所以当 McpU-LBD 的热变性上清液加入到哈氏弧菌的培养基中能够使哈氏菌显著发光。在通过弧菌生物发光实验间接证明了 McpU-LBD 与 AI-2 的结合之后, 进一步利用 ITC 实验验证 McpU-LBD 与 AI-2 的直接相互作用。ITC 滴定结果表明, McpU-LBD 对 AI-2 显示出热量变化趋势(图 4B), 并且 McpU-LBD 与 AI-2 的结合常数达到了 $0.28 \mu\text{mol/L}$, 充分证明了 McpU-LBD 对 AI-2 存在高亲和力的直接相互作用。

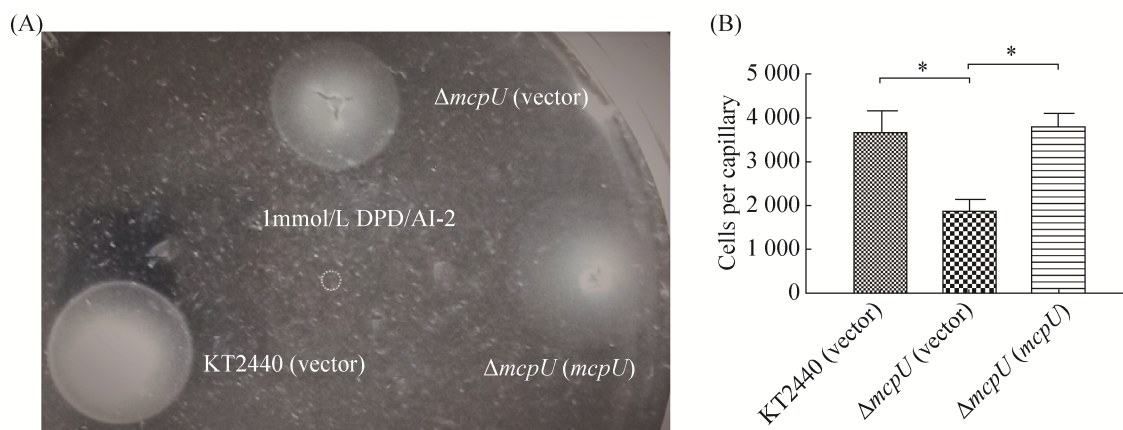


图 3 McpU 介导 KT2440 对 AI-2 的趋化反应

Figure 3 McpU is required for chemotaxis induced by AI-2. A: The chemotaxis of KT2440(vector), $\Delta mcpU$ (vector) and $\Delta mcpU(mcpU)$ to AI-2 is detected by soft agar plate gradient assays. The white imaginary circle indicates the DPD/AI-2 inoculation point. B: The chemotaxis of KT2440 (vector), $\Delta mcpU$ (vector) and $\Delta mcpU(mcpU)$ to 1 mmol/L DPD/AI-2 by quantitative capillary assay. Data were presented as mean \pm SEM. The error bars represent the standard deviations of three independent experiments. *P* values were determined using the two-tailed unpaired Student's *t*-test. $P<0.05$ was considered to indicate a statistically significant difference. *: $P<0.05$.

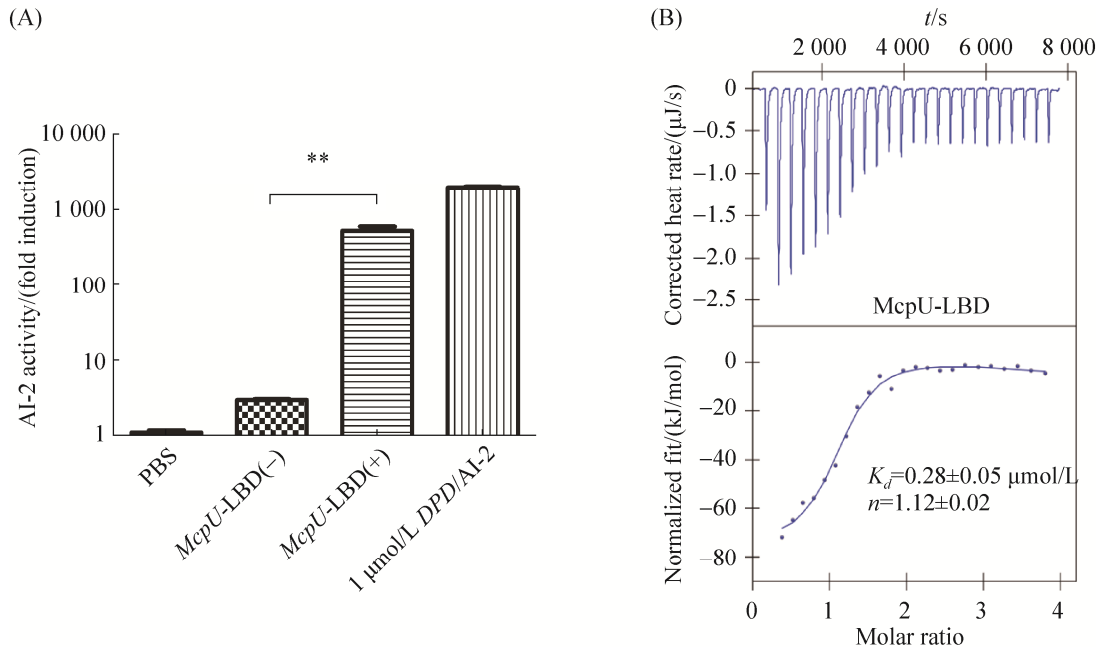


图 4 McpU 与 AI-2 具有高亲和力的相互作用

Figure 4 High affinity interaction between McpU and AI-2. A: McpU-LBD is capable of retaining AI-2. McpU-LBD(+) was expressed in wild type of *E. coli* BL21(DE3). On the contrary, McpU-LBD(-) was expressed in *E. coli* BL21(DE3) lacking *luxS*. Light production by the AI-2 reporter *V. harveyi* strain MM32 lacking *luxN* and *luxS* was measured following the addition of a buffer control or ligands released from the purified proteins upon denaturing by heating and AI-2 activity was reported as fold induction of bioluminescence over background obtained in the buffer control alone^[11]. B: The binding affinity between McpU-LBD and AI-2 is evaluated using ITC analysis. Data were expressed as mean±SEM. The error bars represent the standard deviations of three independent experiments. Statistical significance was estimated via two-tailed unpaired Student's *t*-test. $P < 0.05$ was considered to indicate a statistically significant difference. **: $P < 0.01$.

2.5 AI-2 通过 McpU 增强 KT2440 的生物膜形成能力

为了探究 AI-2 对恶臭假单胞菌 KT2440 生物膜形成的影响,进行了生物膜定量检测实验。图 5A 显示了 KT2440 及 $\Delta mcpU$ 在 30 °C、150 r/min 培养 36 h 后产生的生物膜经结晶紫染色及定量后的结果。在 AI-2 的作用下,KT2440 菌株的生物膜形成量显著提高($P < 0.05$),而 AI-2 对 $\Delta mcpU$ 菌株的生物膜的形成能力没有显著影响($P > 0.05$)。为了检测 AI-2 对 KT2440 与 $\Delta mcpU$ 生物膜形成能力的影响是否是该信号影响了菌株的生长速度所致,本研究在 LB 液体

培养基中测定了 AI-2 对 KT2440 和 $\Delta mcpU$ 生长的影响。结果表明,无论是否存在 AI-2, $\Delta mcpU$ 与 KT2440 的生长曲线几乎一致(图 5B),说明 AI-2 的添加不影响菌株的生长能力。综合以上结果,可以说明 AI-2 通过作用于其受体 McpU 增强了恶臭假单胞菌 KT2440 的生物膜形成能力。

3 讨论与结论

化学感应通路是细菌中一种重要的信号转导系统^[25],其核心是由化学感受器即甲基化趋化受体蛋白、组氨酸激酶 CheA 和偶联蛋白

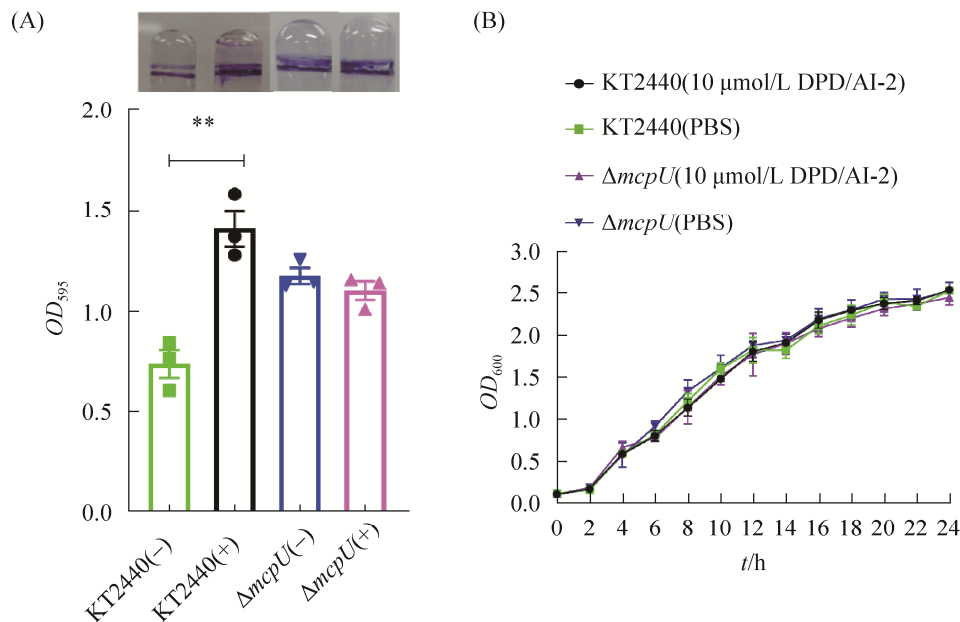


图5 McpU 介导 AI-2 对恶臭假单胞菌 KT2440 生物膜形成的作用

Figure 5 AI-2 regulates *Pseudomonas putida* KT2440 biofilm formation via McpU. A: AI-2 promotes biofilm formation of *Pseudomonas putida* KT2440. -: No DPD/AI-2; +: 10 $\mu\text{mol/L}$ DPD/AI-2. B: effect of 10 $\mu\text{mol/L}$ DPD/AI-2 on the growth of KT2440 strain and $\Delta mcpU$ strain. Data were represented by mean \pm SEM. The error bars represent the standard deviations of three independent experiments. P values were calculated by two-tailed unpaired student's t -test. $P < 0.05$ was considered to indicate a statistically significant difference. **: $P < 0.01$.

CheW 组成的三元复合物。化学感受器的配体结合域能够识别并结合信号分子进而调节 CheA 自磷酸化, 磷酸化的 CheA 进一步调节调控蛋白 CheY 磷酸化, 磷酸化的 CheY 与鞭毛马达相互作用, 最终导致细菌表现趋化性^[26]。恶臭假单胞菌 KT2440 共有 27 个化学感受器, 已被注释的配体主要为有机酸、嘌呤、氨基酸和 γ -氨基丁酸^[27]。据现有报道, 恶臭假单胞菌 KT2440 中还未发现 AI-2 受体。先前的研究证明 McpU 能够特异性结合多胺类化合物^[28]。本研究利用哈维氏弧菌生物发光实验和 ITC 证明 McpU 与 AI-2 具有高亲和力相互作用, 这不仅扩大了 McpU 配体结合能力, 同时也表明在环境中恶臭假单胞菌 KT2440 并不是孤立地存在, 而是能够通过识别群体感应信号分子 AI-2, 参与种间信息交流, 这为研究恶臭假单胞菌

KT2440 在环境中与其他微生物群落成员之间的相互作用奠定了基础。

研究证明, 化学感应通路除了能够介导细菌趋化性之外, 还具有其他生理功能。例如, 通过调控胞内 c-di-GMP 的水平进而调控细菌生物膜的形成^[17]。细菌生物膜是细菌为了适应生存环境而自发产生的一种积极的、保护性的生存方式, 赋予细菌许多抗性, 使细菌免受环境压力的影响。生物膜的形成是一个复杂的过程, 可以概括为 3 个阶段, 首先是细菌的粘附, 然后细菌不断地增殖生长形成微菌落, 并产生细胞外基质, 最终形成结构完整、能够行使功能的生物膜结构, 最后就是生物膜的离散^[29]。生物膜的形成是群体协同行为, 离不开细胞之间的通讯联系, 因此常常受到群体感应信号的调控。KT2440 作为一种工业微生物, 常被用作

工业宿主进行生物生产。因此,提高KT2440环境生存的耐受性使其能够承受工业生产压力尤为重要。本研究通过结晶紫染色法检测了AI-2对KT2440及 $\Delta mcpU$ 生物膜形成能力的影响。结果表明, AI-2刺激恶臭假单胞菌KT2440生物膜形成,且这一刺激效应依赖于McpU。这表明恶臭假单胞菌KT2440本身虽不能产生AI-2,但是其对AI-2的感知可能会使其在与产AI-2细菌伴生时,能够通过促进生物膜形成增强其环境适应能力。例如,大肠杆菌与产AI-2粪肠球菌共培养时,能够增强大肠杆菌的聚集和生物膜形成能力,并提高了大肠杆菌的抗逆性^[30]。因此通过调控恶臭假单胞菌KT2440对AI-2的感知来提高KT2440的环境生存耐受性可以作为一种新的策略,这为阐明恶臭假单胞菌KT2440的环境适应机制提供了新的思路。

参考文献

- [1] Xu GM. Relationships between the regulatory systems of quorum sensing and multidrug resistance. *Frontiers in Microbiology*, 2016, 7: 958.
- [2] Ma YP, Hao L, Ke H, Liang ZL, Ma JY, Liu ZX, Li YG. *luxS/AI-2* in *Streptococcus agalactiae* reveals a key role in acid tolerance and virulence. *Research in Veterinary Science*, 2017, 115: 501–507.
- [3] Ma RH, Qiu SW, Jiang Q, Sun HP, Xue T, Cai G, Sun BL. AI-2 quorum sensing negatively regulates *rbf* expression and biofilm formation in *Staphylococcus aureus*. *International Journal of Medical Microbiology*, 2017, 307(4/5): 257–267.
- [4] Ma YP, Ke H, Hao L, Liu ZX, Liang ZL, Ma JY, Yang HC, Li YG. *luxS/AI-2* quorum sensing is involved in antimicrobial susceptibility in *Streptococcus agalactiae*. *Fish Pathology*, 2015, 50(1): 8–15.
- [5] Bassler BL, Wright M, Showalter RE, Silverman MR. Intercellular signalling in *Vibrio harveyi*: sequence and function of genes regulating expression of luminescence. *Molecular Microbiology*, 1993, 9(4): 773–786.
- [6] 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. *Molecular Cell*, 2004, 15(5): 677–687.
- [7] Wang Y, Liu B, Grenier D, Yi L. Regulatory mechanisms of the *luxS/AI-2* system and bacterial resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2019, 63(10): e01186–19.
- [8] Chen X, Schauder S, Potier N, Van Dorselaer A, Pelczar I, Bassler BL, Hughson FM. Structural identification of a bacterial quorum-sensing signal containing boron. *Nature*, 2002, 415(6871): 545–549.
- [9] Taga ME, Semmelhack JL, Bassler BL. The LuxS-dependent autoinducer AI-2 controls the expression of an ABC transporter that functions in AI-2 uptake in *Salmonella typhimurium*. *Molecular Microbiology*, 2001, 42(3): 777–793.
- [10] 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. *Nature Communications*, 2020, 11: 5371.
- [11] Jung SA, Chapman CA, Ng WL. Quadruple quorum-sensing inputs control *Vibrio cholerae* virulence and maintain system robustness. *PLoS Pathogens*, 2015, 11(4): e1004837.
- [12] Taga ME, Miller ST, Bassler BL. Lsr-mediated transport and processing of AI-2 in *Salmonella typhimurium*. *Molecular Microbiology*, 2003, 50(4): 1411–1427.
- [13] 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.
- [14] Day CJ, King RM, Shewell LK, Tram G, Najnin T, Hartley-Tassell LE, Wilson JC, Fleetwood AD, Zhulin IB, Korolik V. A direct-sensing galactose chemoreceptor recently evolved in invasive strains of *Campylobacter jejuni*. *Nature Communications*, 2016, 7: 13206.
- [15] Bi SY, Sourjik V. Stimulus sensing and signal processing in bacterial chemotaxis. *Current Opinion in Microbiology*, 2018, 45: 22–29.
- [16] Luu RA, Kootstra JD, Nesteryuk V, Brunton CN, Parales JV, Ditty JL, Parales RE. Integration of chemotaxis, transport and catabolism in *Pseudomonas putida* and identification of the aromatic acid chemoreceptor PcaY. *Molecular Microbiology*, 2015, 96(1): 134–147.

- [17] Morgan R, Kohn S, Hwang SH, Hassett DJ, Sauer K. BdlA, a chemotaxis regulator essential for biofilm dispersion in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology*, 2006, 188(21): 7335–7343.
- [18] Timmis KN. *Pseudomonas putida*: a cosmopolitan opportunist par excellence. *Environmental microbiology*, 2002, 4(12): 779–781.
- [19] Pereira CS, McAuley JR, Taga ME, Xavier KB, Miller ST. *Sinorhizobium meliloti*, a bacterium lacking the autoinducer-2 (AI-2) synthase, responds to AI-2 supplied by other bacteria. *Molecular microbiology*, 2008, 70(5): 1223–1235.
- [20] Lin JS, Zhang WP, Cheng JL, Yang X, Zhu KX, Wang Y, Wei GH, Qian PY, Luo ZQ, Shen XH. A *Pseudomonas* T6SS effector recruits PQS-containing outer membrane vesicles for iron acquisition. *Nature Communications*, 2017, 8: 14888.
- [21] Quénee 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.
- [22] Irani VR, Lee SH, Eckstein TM, Inamine JM, Belisle JT, Maslow JN. Utilization of a *ts-sacB* selection system for the generation of a *Mycobacterium avium* serovar-8 specific glycopeptidolipid allelic exchange mutant. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 2004, 3: 18.
- [23] Reyes-Darias J, García V, Rico-Jiménez M, Corral-Lugo A, Krell T. Identification and characterization of bacterial chemoreceptors using quantitative capillary and gradient plate chemotaxis assays. *BIO-PROTOCOL*, 2016, 6(8): e1789.
- [24] Pham HT, Parkinson JS. Phenol sensing by *Escherichia coli* chemoreceptors: a nonclassical mechanism. *Journal of Bacteriology*, 2011, 193(23): 6597–6604.
- [25] Wuichet K, Zhulin IB. Origins and diversification of a complex signal transduction system in prokaryotes. *Science Signaling*, 2010, 3(128): ra50.
- [26] Hazelbauer GL, Falke JJ, Parkinson JS. Bacterial chemoreceptors: high-performance signaling in networked arrays. *Trends in Biochemical Sciences*, 2008, 33(1): 9–19.
- [27] Corral-Lugo A, Matilla MA, Martín-Mora D, Silva Jiménez H, Mesa Torres N, Kato J, Hida A, Oku S, Conejero-Muriel M, Gavira JA, Krell T. High-affinity chemotaxis to histamine mediated by the TlpQ chemoreceptor of the human pathogen *Pseudomonas aeruginosa*. *mBio*, 2018, 9(6): e01894–18.
- [28] Corral-Lugo A, de la Torre J, Matilla MA, Fernández M, Morel B, Espinosa-Urgel M, Krell T. Assessment of the contribution of chemoreceptor-based signalling to biofilm formation. *Environmental Microbiology*, 2016, 18(10): 3355–3372.
- [29] O'Toole G, Kaplan HB, Kolter R. Biofilm formation as microbial development. *Annual Review of Microbiology*, 2000, 54: 49–79.
- [30] Laganenka L, Sourjik V. Autoinducer 2-dependent *Escherichia coli* biofilm formation is enhanced in a dual-species coculture. *Applied and Environmental Microbiology*, 2018, 84(5): e02638–17.

(本文责编 张晓丽)