



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

谢晓荣, 尚道涵, 沈锡辉, 张磊*

西北农林科技大学生命科学院, 陕西 杨凌 712100

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. 微生物学报, 2022, 62(7): 2808–2823.

Xie Xiaorong, Shang Daohan, Shen Xihui, Zhang Lei. AI-2 affects biofilm formation and motility of *Plesiomonas shigelloides* by regulating the c-di-GMP-metabolizing enzyme DosC. *Acta Microbiologica Sinica*, 2022, 62(7): 2808–2823.

摘要: 细菌中广泛分布的群体感应信号分子 autoinducer-2 (AI-2) 会影响细菌的生物膜形成及运动性等生理过程, 然而该信号对类志贺邻单胞菌相关表型的调控作用及其分子机制尚未有所报道。【目的】揭示 AI-2 通过影响胞内环二鸟苷单磷酸(c-di-GMP)水平调控类志贺邻单胞菌生物膜形成及运动性的内在机制, 为类志贺邻单胞菌感染的防治提供新思路。【方法】首先利用同源重组方法构建 *luxS* 基因敲除菌株($\Delta luxS$), 通过软琼脂平板法和结晶紫染色法分别检测其与野生型泳动能力和生物膜形成水平的差异; 之后通过序列比对找到 AI-2 的潜在受体蛋白 DosC (SAMEA2665130_2180), 利用哈维氏弧菌生物发光实验及等温滴定量热实验(ITC)研究 DosC 的配体结合结构域(ligand-binding domain, LBD)与 AI-2 的结合能力; 通过体外酶活实验、胞内 c-di-GMP 定量分析研究 AI-2 对 DosC 受体活性的影响; 最后参照前述方法构建受体 DosC 编码基因敲除菌株($\Delta dosC$)并检测其与野生型相比泳动能力和生物膜形成水平的变化。【结果】AI-2 与 DosC-LBD 显示出高亲和作用力; 通过高效液相色谱分析发现 AI-2 会增强受体蛋白 DosC 的磷酸二酯酶活性, 促进 c-di-GMP 的降解。与野生型相比, $\Delta luxS$ 和 $\Delta dosC$ 菌株胞内 c-di-GMP 水平显著升高, 泳动与生物膜形成能力均显著降低。【结论】受体蛋白 DosC 通过响应群体感应信号分子 AI-2, 增强自身磷酸二酯酶活性, 促进 c-di-GMP 的降解, 影响胞内 c-di-GMP 的含量,

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. E-mail: zhanglei0075@nwsuaf.edu.cn

Received: 25 November 2021; Revised: 7 February 2022; Published online: 11 March 2022

进而调控细菌的生物膜形成和泳动能力等表型。

关键词: 类志贺邻单胞菌; LuxS/AI-2; 受体; c-di-GMP; 生物膜; 泳动

AI-2 affects biofilm formation and motility of *Plesiomonas shigelloides* by regulating the c-di-GMP-metabolizing enzyme DosC

XIE Xiaorong, SHANG Daohan, SHEN Xihui, ZHANG Lei*

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

Abstract: Autoinducer-2 (AI-2), a quorum sensing signal molecule ubiquitous in bacteria, influences a variety of bacterial physiological processes including biofilm formation and motility. However, the role of AI-2 in regulation of these phenotypes and the underlying mechanism have not been reported for *Plesiomonas shigelloides*. **[Objective]** To reveal the mechanism through which AI-2 regulates biofilm formation and motility of *P. shigelloides* by regulating the intracellular cyclodiguanosine monophosphate (c-di-GMP) level, and provide a new idea for the prophylaxis and treatment of *P. shigelloides* infections. **[Methods]** Firstly, we constructed the *luxS* gene knockout strain ($\Delta luxS$) by homologous recombination method. Soft agar plate assays and crystal violet staining assays were employed to compare the swimming motility and biofilm formation between $\Delta luxS$ and the wild type. Then, we identified the potential receptor protein DosC (SAMEA2665130_2180) of AI-2 by sequence alignment. *Vibrio harveyi* MM32 bioluminescence and isothermal titration calorimetry (ITC) were employed to test the binding affinity of the ligand-binding domain of DosC (DosC-LBD) to AI-2. Afterwards, we studied the effect of AI-2 on DosC activity by *in vitro* enzyme activity assay and intracellular c-di-GMP quantitative assay. Finally, we constructed the *dosC* knockout strain ($\Delta dosC$) according to the above method and compared its swimming motility and biofilm formation with those of the wild type. **[Results]** AI-2 bound to DosC-LBD with high affinity. Compared with the wild type, $\Delta luxS$ and $\Delta dosC$ showed significantly weakened swimming motility and biofilm formation and dramatically increased intracellular c-di-GMP level. HPLC demonstrated that AI-2 enhanced the phosphodiesterase (PDE) activity of DosC. **[Conclusion]** The c-di-GMP-metabolizing enzyme DosC enhances its PDE activity in response to AI-2, thus affecting the intracellular c-di-GMP level and regulating the biofilm formation and swimming motility of *P. shigelloides*.

Keywords: *Plesiomonas shigelloides*; LuxS/AI-2; receptor; c-di-GMP; biofilm; swimming

群体感应(quorum sensing, QS)是一种细菌通过分泌可溶性信号分子来监测群体密度并协调细菌生物功能的信息交流机制^[1-3], 它可影响细菌的多种生命活动^[4-5]。广泛存在于革兰氏阴

性和革兰氏阳性菌中的 autoinducer-2 (AI-2)是目前所知的唯一一种既能进行细菌种内交流又能进行种间交流的化学信号分子^[6-7]。它一般由 S-核糖同型半胱氨酸酶(S-ribosylhomocysteinase,

LuxS) 催化合成的 4,5-二羟基-2,3-戊二酮(4,5-dihydroxy-2,3-pentanedione, DPD) 自发衍生形成, 与受体结合后可介导细菌的多种信号转导途径^[4-5]。早前研究已发现两种 AI-2 分子的经典受体, 分别是仅存在于弧菌中的 LuxP 蛋白与主要存在于鼠伤寒沙门氏菌、鼠疫耶尔森氏菌等肠道菌中的 LsrB 蛋白^[8-10]。此外, 本课题组最近发现胞外传感 dCACHE (double calcium channels and chemotaxis receptors) 结构域家族中 dCache_1 亚家族的部分保守结构域也是 AI-2 分子的特异性受体, 这些感知 AI-2 信号的 dCache_1 结构域存在于包括甲基化趋化受体、组氨酸激酶、c-di-GMP 合成与水解酶、丝氨酸磷酸酶、丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶、腺苷酸/鸟苷酸环化酶等几乎所有主要类型的原核生物跨膜信号转导蛋白中^[11], 这为 AI-2 介导的群体感应调控机制提供了更广阔的研究思路。

类志贺邻单胞菌(*Plesiomonas shigelloides*) 是一种革兰氏阴性、兼性厌氧的运动性病原菌, 是肠杆菌科邻单胞菌属内唯一的种。其常见于淡水生态系统、河口等水生环境, 可感染野生及家养动物, 造成养殖业的巨大经济损失, 同时也会导致人类感染性腹泻和食物中毒, 是世界部分地区散发性和流行性传染性腹泻及食物中毒的潜在病因之一, 还可能引发免疫力低下的民众患肠道外感染, 例如菌血症、败血症、脑膜炎、肺炎和骨髓炎等^[12-13]。近些年来, 研究表明细菌生物膜和运动性与细菌的毒力及耐药性密切相关^[14]。生物膜的形成能够增强细菌的耐受性, 是细菌产生耐药性的主要原因。据统计, 有 65% 的细菌感染可能涉及生物膜^[14-15]。此外, 相关研究已证实广泛存在于细菌胞内的第二信使分子 c-di-GMP 是影响细菌生物膜形成和运动性的关键因子^[16], 其在细菌鞭毛的功

能发挥及粘附素和胞外多糖的生物合成中均发挥着重要作用^[17-20]。c-di-GMP 在细菌胞内的合成与降解分别受到含 GGDEF 结构域的二鸟苷酸环化酶(diguanylate cyclase, DGC) 和含 EAL 或 HD-GYP 结构域的磷酸二酯酶(phosphodiesterase, PDE) 催化。本研究发现 AI-2 对类志贺邻单胞菌生物膜的形成、泳动能力等表型有显著影响。之后我们通过生物信息学分析找到了类志贺邻单胞菌中一个含 dCache_1 结构域的 AI-2 潜在受体蛋白 DosC, 其含有控制 c-di-GMP 代谢的 GGDEF 与 EAL 结构域。我们进一步对 c-di-GMP 代谢酶 DosC 响应 AI-2 信号调控胞内 c-di-GMP 水平, 进而调控类志贺邻单胞菌生物膜形成及运动性的机制进行研究, 以期为类志贺邻单胞菌感染的防治提供新思路。

1 材料与方法

1.1 菌株、质粒和引物

本实验涉及菌株、质粒和引物分别见表 1、表 2。

1.2 主要试剂和仪器

DNA 回收试剂盒与质粒提取试剂盒购自北京天根生化科技有限公司; 泳动培养基使用的琼脂粉, 蛋白胨购自 BD 公司; *Pfu* 高保真酶和限制性核酸内切酶购自 TaKaRa 公司; DPD/AI-2 购自 Omm Scientific 公司; GTP, pGpG, c-di-GMP 标准品均购自 Sigma 公司; 抗生素购自北京索莱宝科技有限公司, 卡那霉素, 氯霉素, 庆大霉素使用终浓度分别为 50、20、10 $\mu\text{g/mL}$ 。

PBS 缓冲液(g/L): 称取 NaCl 8.0, KCl 0.2, Na_2HPO_4 1.42, KH_2PO_4 0.27 溶于 800 mL 去离子水中, 用浓盐酸调 pH 7.4, 最后定容至 1 L。

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>Plesiomonas shigelloides</i> NCTC 10360	Wild-type; Gm ^r	CGMCC
<i>E. coli</i> TG1	Host for cloning	Laboratory stock
<i>E. coli</i> S17-1 λ pir	λ -pir lysogen of S17-1, F ⁻ <i>thi pro hsdR hsdM</i> ⁺ [RP4-2 Tc::Mu Km::Tn7]	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>	Δ <i>luxS</i> deletion mutant in <i>E. coli</i> BL21(DE3)	Laboratory stock
<i>V. harveyi</i> MM32 lacking <i>luxN</i> and <i>luxS</i>	<i>luxN::cat luxS::Tn5kan</i>	[21]
Plasmids		
pET-28a	Expression vector with N-terminal hexahistidine affinity tag; Kan ^r	Laboratory stock
pDM4	Suicide vector, <i>sacB</i> , <i>moobRK2</i> , <i>oriR6K</i> , <i>pir</i> ; Chl ^r	Laboratory stock
pBAD33	Expression vector; Chl ^r	Laboratory stock
pBAD33- <i>luxS</i>	pBAD33 expressing <i>luxS</i> ; Chl ^r	This study
pBAD33- <i>dosC</i>	pBAD33 expressing <i>dosC</i> ; Chl ^r	This study
pBAD33- <i>STM0385</i>	pBAD33 expressing DGC; Chl ^r	This study

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

Tris-HCl 缓冲液(g/L): 称取 6.05 g Tris、8.775 g NaCl 溶于 800 mL 去离子水中, 用浓盐酸调 pH 7.5, 最后定容至 1 L。

透析缓冲液: 含终浓度为 10% (V/V) 甘油的 Tris-HCl 缓冲液。

c-di-GMP 提取液(mL/L): 乙腈 400, 甲醇 400, 水 200。

多功能酶标仪 Victor X3, PerkinElmer 公司; 等温滴定量热仪, TA 仪器公司; 超微量分光光度计, DeNovix 公司。核酸电泳及蛋白电泳系统, 凝胶图像分析系统, 电转化仪, Tanon 公司。超高速冷冻离心机 Optima XPN-100, Beckman Coulter 公司。全自动高效液相色谱仪分析型 1525+2424, Waters 公司。Symmetry C₁₈ 高效液相色谱柱购自 Waters 公司。

1.3 培养基与菌株培养条件

LB 培养基(g/L): 分别称取 10.0 g NaCl,

10.0 g 蛋白胨, 5.0 g 酵母浸出物溶于去离子水中, 固体培养基补加琼脂粉 15.0 g。

TSB 液体培养基(g/L): 胰酪大豆胨液体培养基(TSB) 30.0。

泳动培养基(g/L): NaCl 5.0, 胰蛋白胨 10.0, 琼脂粉 3.0。

M9 培养基(g/L): 称取 Na₂HPO₄·12H₂O 17.9 g, KH₂PO₄ 3.0 g, NH₄Cl 1.0 g, NaCl 0.5 g 溶于去离子水中; 使用时补加终浓度 CaCl₂ 为 0.1 mmol/L, MgSO₄ 为 2 mmol/L, 葡萄糖为 2.0 mmol/L。

AB 培养基参照文献[22]的方法配置。

将类志贺邻单胞菌 NCTC 10360 野生型菌株、相关突变体及回补菌株接种于新鲜的 TSB 液体培养基, 于 37 °C 振荡培养, 大肠杆菌接种于新鲜 LB 液体培养基, 在 37 °C 振荡培养, 哈维氏弧菌 MM32 接种于新鲜的 AB 液体培养基, 在 30 °C 振荡培养。所有菌株均可在 LB 固体培养基培养。

表 2 实验所用引物

Table 2 Primers used in this study

Primers name	Sequences (5'→3')	Purpose
<i>dosC</i> -F	CCGGAATCCGGCCAACCTCTGCGGTCTT	Forward primer to clone <i>dosC</i> into pET-28a
<i>dosC</i> -R	CCCAAGCTTGGGTAAACGGCAACTTTCCAATT	Reverse primer to clone <i>dosC</i> into pET-28a
<i>dosC-LBD</i> -F	CCGGAATCCGGATGTCCTTGTCTGCAAAGCTGT	Forward primer to clone <i>dosC-LBD</i> into pET-28a
<i>dosC-LBD</i> -R	CCCAAGCTTGGGTATTAGCTATTCGGCAGGATGT ATAG	Reverse primer to clone <i>dosC-LBD</i> into pET-28a
<i>CluxS</i> -F	TTTTGGGCTAGCGAATTCGAGCTCGGTACCATGCC ATTACTTGATAGTTTTACCG	Forward primer to clone <i>luxS</i> into pBAD33
<i>CluxS</i> -R	AAGCTTGCATGCCTGCAGGTCGACTCTAGATTAGC CCAACAGCGATGGA	Reverse primer to clone <i>luxS</i> into pBAD33
<i>CdosC</i> -F	TTTTGGGCTAGCGAATTCGAGCTCGGTACCATGTC CTTGTCTGCAAAGC	Forward primer to clone <i>dosC</i> into pBAD33
<i>CdosC</i> -R	AAGCTTGCATGCCTGCAGGTCGACTCTAGATTAGC TATTCGGCAGGATG	Reverse primer to clone <i>dosC</i> into pBAD33
<i>STM0385</i> -F	TTTTGGGCTAGCGAATTCGAGCTCGGTACCATGTT CCCAAAAATAATGAATGAT	Forward primer to clone <i>STM0385</i> into pBAD33
<i>STM0385</i> -R	AAGCTTGCATGCCTGCAGGTCGACTCTAGATCATG CCGCCACTTCG	Reverse primer to clone <i>STM0385</i> into pBAD33
$\Delta luxS$ -up-F	CAGGTTACCCGCATGCAAGATCTATCTAGAAGCGA AGGTGAGTTGCTGTG	To amplify the upstream homologous arm of <i>luxS</i> from strain NCTC 10360 for fusion
$\Delta luxS$ -up-R	ACGGGTATGATCGACGGTAA	To amplify the upstream homologous arm of <i>luxS</i> from strain NCTC 10360 for fusion
$\Delta luxS$ -down-F	TTACCGTCGATCATAACCGTATGACGAGCTGGCAC TGGAT	To amplify the downstream homologous arm of <i>luxS</i> from strain NCTC 10360 for fusion
$\Delta luxS$ -down-R	GTGTATATCAAGCTTATCGATACCGTCGACCTGTAC CGCGACAATTTGGA	To amplify the downstream homologous arm of <i>luxS</i> from strain NCTC 10360 for fusion
$\Delta dosC$ -up-F	CAGGTTACCCGCATGCAAGATCTATCTAGAAGCTG AGGGCGTAACCAAT	To amplify the upstream homologous arm of <i>dosC</i> from strain NCTC 10360 for fusion
$\Delta dosC$ -up-R	GCCCACGTTGACGCAATAC	To amplify the upstream homologous arm of <i>dosC</i> from strain NCTC 10360 for fusion
$\Delta dosC$ -down-F	GTATTGCGTCAACGTGGGCTTTCAGTCGCCAGTT CCTC	To amplify the downstream homologous arm of <i>dosC</i> from strain NCTC 10360 for fusion
$\Delta dosC$ -down-R	GAGAGCTCAGGTTACCCGCATGCAAGATCTGGTG TACTACCGTTGGCTCGA	To amplify the downstream homologous arm of <i>dosC</i> from strain NCTC 10360 for fusion

1.4 相关基因敲除菌株的获取

参照文献[13]的方法,利用同源重组的原理获得相关敲除菌株,本实验使用 pDM4 自杀载体。以类志贺邻单胞菌 NCTC 10360 为模板,利用相关敲除引物扩增出基因的上、下游片段。利用重叠 PCR 将上下游片段连接,并通过无缝克隆连至线性化载体 pDM4,然后将连接产物

热激转化至 *E. coli* S17-1 λ pir 感受态细胞中,PCR 验证得到带有符合预期连接产物的菌株。将携带重组质粒的 *E. coli* S17-1 λ pir 和类志贺邻单胞菌 NCTC 10360 野生型菌株以 3:1 的比例进行接合转移,48 h 后将 2 种菌体混合物稀释并涂布在庆大霉素、氯霉素双重抗性的 LB 固体培养基上。37 °C 培养箱培养至长出单菌落,

挑取单菌落 PCR 验证正确后, 得到发生同源单交换的菌株。将筛选到的单交换菌株液体培养后涂布在含有 20% (W/V) 蔗糖的 LB 固体培养基上, 利用 *sacB* 基因的蔗糖致死效应筛选消除掉质粒的菌株, 并通过 PCR 筛选出发生双交换的基因缺失突变株。

1.5 基因回补菌株的构建

本实验使用 pBAD33 质粒进行外源回补。以类志贺邻单胞菌 NCTC 10360 为模板, 分别扩增 *luxS*、*dosC* 基因片段, 并连接于载体 pBAD33, 连接产物热激转化至 *E. coli* TG1 感受态细胞中, 得到转化子。PCR 验证正确后, 接菌提取相应质粒, 并将质粒电转化至相应突变体中。同时将空质粒电转至野生型及各突变体中, 用作对照。

1.6 生物膜形成能力检测

参照文献[23], 采用结晶紫染色法在玻璃试管中进行生物膜形成能力的检测。将类志贺邻单胞菌 NCTC 10360 野生型、相关突变体及回补菌株接种至 TSB 液体培养基中, 37 °C 过夜培养至 OD_{600} 为 0.9 左右, 然后以 1:100 比例转接至含有 2 mL M9 液体培养基的玻璃试管中。37 °C 静置培养 36 h 后, 轻柔地除去菌液, 并用 37 °C 预热的去离子水洗涤试管 3 次。自然风干后, 使用 0.05% 结晶紫染液染色 15 min, 然后用去离子水洗去未结合的多余结晶紫染液。待试管自然晾干后, 使用 3 mL 无水乙醇溶解结合的结晶紫, 并测定相应 OD_{595} 值。进行 3 次独立重复实验。

1.7 泳动能力的测定

将类志贺邻单胞菌 NCTC 10360 野生型、相关突变体及回补菌株接种至 TSB 液体培养基中, 37 °C 过夜培养至 OD_{600} 为 0.9 左右。取适量菌液, 4 500 r/min 离心 3 min, 收集菌体。用新鲜 M9 培养基洗菌 3 次后, 用等量新鲜 M9

培养基重悬, 取 2.5 μ L 菌液垂直接种于泳动培养基中央内部。30 °C 培养箱过夜培养后, 记录各菌株泳动圈大小。

1.8 生长曲线的测定

将类志贺邻单胞菌 NCTC 10360 野生型、相关突变体及回补菌株在 LB 固体培养基上划线培养, 接单菌落于新鲜的 TSB 液体培养基中, 37 °C、200 r/min 培养至稳定期。再转接至新鲜 TSB 液体培养基中, 于 37 °C、200 r/min 振荡培养。每次间隔 2 h, 取 200 μ L 菌液测定 OD_{600} 值, 并用 GraphPad Prism 6 处理数据得到生长曲线。

1.9 AI-2 潜在受体蛋白的查找与鉴定

从 NCBI 数据库(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)中下载得到类志贺邻单胞菌 NCTC 10360 蛋白编码序列, 利用 HMMER 网站中 hmmscan 程序 (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/hmmer/search/hmmscan>)对各蛋白编码序列进行结构域注释, 找到了含 dCache_1 结构域的蛋白 DosC。然后通过 MEGA 7 软件中的 ClustalW 程序将该蛋白的 dCache_1 结构域与已知 AI-2 受体 PctA 的 dCache_1 结构域进行序列比对, 进一步探究二者的同源关系。

1.10 哈氏弧菌生物发光实验

参考文献[11]表达纯化 DosC-LBD。将构建好的含有 DosC-LBD 基因片段的表达载体 pET-28a 热激转化至 *E. coli* BL21(DE3), 同时将该表达载体电转至缺失了 *luxS* 基因的 *E. coli* BL21(DE3)中。将所得两种菌株接种于 LB 液体培养基中, 37 °C 培养至对数前期, 然后加入 0.3 mmol/L IPTG, 20 °C、150 r/min 条件下诱导培养 8 h。4 °C 离心收集菌体, 并用 PBS 缓冲液重悬菌体, 用超声破碎仪破碎菌体, 然后用低温离心机 4 °C、8 000 r/min 离心 60 min 后, 去沉淀, 留上清。使上清液在 4 °C 温度条件下

缓慢流过镍离子亲和树脂(Ni²⁺-NTA)纯化蛋白。用含 300 mmol/L 咪唑的 PBS 缓冲液洗脱得到目标蛋白后,再用 Sephadex-G25 葡聚糖凝胶层析将其转移至含 50 mmol/L NaH₂PO₄ (pH 8.0), 300 mmol/L NaCl 和 1 mmol/L 二巯苏糖醇(DTT)的溶液体系中。经 SDS-PAGE 检测后将蛋白超滤至 10 mg/mL 左右,70 °C 水浴 10 min 使结合的配体释放到上清中。最后离心收取上清,用以检测 AI-2 的含量。

将哈维氏弧菌 MM32 接种至 AB 培养基中振荡过夜培养至 OD₆₀₀ 为 0.8 左右,然后按 1:500 的比例稀释至无菌 AB 培养基中,并将稀释好的菌液以每孔 90 μL 加到 96 孔板中。再分别取 10 μL 变性蛋白上清液、PBS 缓冲液(阴性对照)、0.1 μmol/L DPD/AI-2 溶液(阳性对照)加入至相应位置。避光,30 °C、170 r/min 振荡培养 10 h,使用多功能酶标仪 Victor X3 检测生物发光值(每秒计数)。以变性蛋白上清液诱导的发光值与 PBS 缓冲液对照诱导的发光值的比值表示 AI-2 的相对含量。

1.11 等温滴定热实验(ITC)

诱导表达并纯化 DosC 的周质 LBD 结构域,利用重组烟草花叶病毒蛋白酶(TEV)去除其 N 端的 His 标签,得到无标签 DosC-LBD。SDS-PAGE 检测纯度后,将其用透析液透析,并用此透析液分别对蛋白样品以及 DPD/AI-2 标准品母液进行稀释。ITC 实验进行前,先对样品进行脱气处理,然后分别将稀释好的 1 mL 蛋白质(50 μmol/L)和 250 μL DPD/AI-2 溶液(250 μmol/L)加入到样品池和滴定针中。设定滴定温度 20 °C,转速 200 r/min,滴定次数 25,滴定间隔时间 300 s。进行 3 次独立重复实验。同时,将用相同浓度的 DPD/AI-2 溶液(250 μmol/L)滴定透析缓冲液,作为阴性对照。获得的实验数据使用 NanoAnalyze 3.4 软件进行分析和拟

合。数据分析需扣除阴性对照。

1.12 DosC 全长蛋白的表达纯化

参考文献[24]进行膜蛋白的提取。将 *dosC* 基因克隆到 pET-28a 载体上,并电转入 *E. coli* BL21(DE3)的 $\Delta luxS$ 突变体中表达。将该表达菌株接种于 LB 培养基中 37 °C 培养至 OD₆₀₀ 为 0.8,然后加入终浓度为 0.3 mmol/L 的 IPTG,20 °C、150 r/min 条件下诱导培养 12 h。收菌后,菌体重悬于高盐缓冲液(20 mmol/L Na₃PO₄, pH 7.0; 2 mol/L KCl; 10%甘油; 5 mmol/L EDTA; 5 mmol/L DTT; 1 mmol/L PMSF),再通过超声破碎细胞,8 000 r/min 离心 60 min,取上清。将包含全长蛋白的上清用超高速低温离心机 4 °C、200 000×g 离心 60 min,收集沉淀并将含有膜组分的沉淀重悬于高盐缓冲液中,4 °C 旋转过夜使其充分溶解。再次使用超高速离心机 4 °C、200 000×g 离心 60 min,收集上清,通过 Ni²⁺-NTA 亲和层析进一步纯化。纯化的膜蛋白用透析液透析,存于-80 °C 冰箱待用。

1.13 体外蛋白酶活的测定

参考文献[25]方法,采用高效液相色谱法测定 DosC 的酶活性。向含有 50 mmol/L Tris-HCl (pH 7.5),5 mmol/L MgCl₂,0 或 300 μmol/L DPD/AI-2 的 200 μL 反应体系中加入 70 mg DosC 蛋白,并在两种反应体系中分别添加 20 μmol/L c-di-GMP 或 50 μmol/L GTP。30 °C 反应 0、60 min 后,于相应时间点取 100 μL 等量溶液,100 °C 加热 10 min,离心除去变性蛋白,上清经 0.22 μm 滤膜过滤。过滤后样品经高效液相色谱(Agilent 1260 infinity II)系统注入,用 98%的 A 溶液(150 mmol/L Na₂HPO₄, pH 5.2)和 2%的 B 溶液(乙腈)在 30 min 内以 1 mL/min 的流速等温洗脱各组份,在 252 nm 波长下检测。以 GTP、pGpG 和 c-di-GMP 作为标准品对照。

1.14 胞内 c-di-GMP 的提取及含量测定

参照文献[26]方法,提取野生型及各突变体菌株胞内 c-di-GMP。培养细菌至对数末期,收取 15 mL 菌液,4 °C、5 000×g 离心 20 min,弃上清。再用 1.5 mL 新鲜培养基重悬菌体并转移至 2 mL EP 管中,4 °C、5 000×g 离心 20 min,弃上清。加入 300 μL 提取液重悬,冰浴 15 min,95 °C 加热 10 min,冰浴 15 min。4 °C、20 800×g 离心 10 min,收取上清。再向沉淀中加入 200 μL 提取液,重复提取 2 次(无需加热)。将 3 次提取上清液混合,4 °C、20 800×g 离心 10 min,收取上清,干燥处理后保存于-80 °C 冰箱备用。含量测定采用液质联用的方法,测定前先加入 200 μL 高效液相色谱级水溶解样品,并经 0.22 μm 滤膜过滤。以 c-di-GMP 标准品作为对照。样品中 c-di-GMP 的浓度由已知浓度的 c-di-GMP 标准品溶液建立的标准曲线确定。

2 结果与分析

2.1 群体感应信号 AI-2 调控类志贺邻单胞菌的生物膜形成及泳动能力

luxS 是群体感应信号分子 AI-2 合成的关键基因,在细菌中广泛存在且高度保守^[27]。为探究 AI-2 对类志贺邻单胞菌生物膜形成水平和泳动能力的影响,我们构建了 *luxS* 基因缺失的突变体菌株 $\Delta luxS$ (vector) 以及回补菌株 $\Delta luxS$ (*luxS*), 并对 WT (vector)、 $\Delta luxS$ (vector) 及 $\Delta luxS$ (*luxS*) 菌株进行了生物膜形成水平和泳动能力的检测。发现与野生型相比, $\Delta luxS$ (vector) 菌株的生物膜形成水平及泳动能力均有极显著的下降 ($P < 0.001$), $\Delta luxS$ (*luxS*) 菌株基本恢复至野生型水平(图 1A–B)。为分析生物膜形成及泳动能力差异是否是由于野生株与突变菌株生长状态的不同引起,我们测定了各菌株的生长曲线,

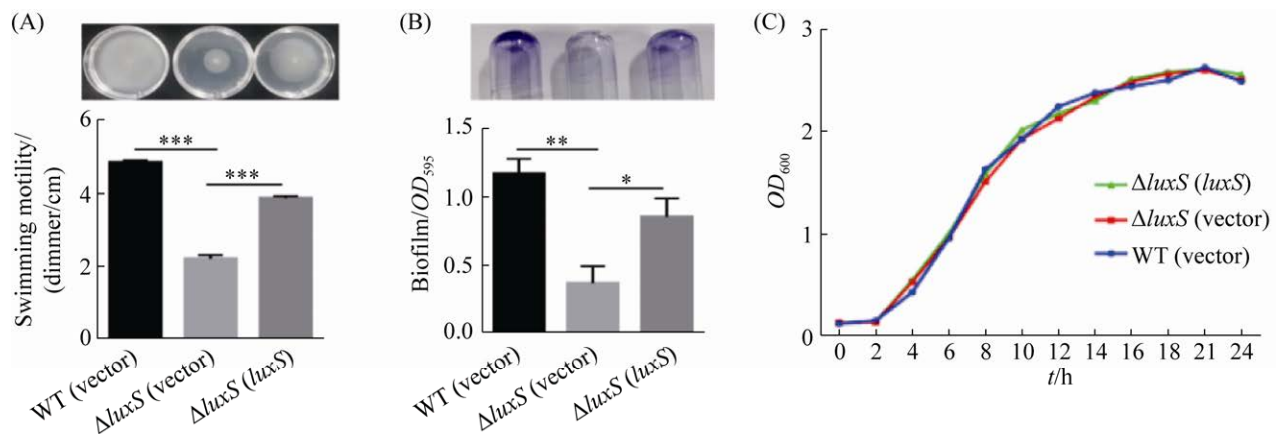


图 1 群体感应信号 AI-2 调控类志贺邻单胞菌 NCTC 10360 的生物膜形成及泳动能力

Figure 1 Quorum-sensing signal AI-2 regulates biofilm formation and swimming ability of *Plesiomonas shigelloides* NCTC 10360. A: crystal violet quantification of biofilm formation by the wild-type (WT) *Plesiomonas shigelloides* NCTC 10360 (vector), $\Delta luxS$ (vector) and $\Delta luxS$ (*luxS*) strains. B: quantification of swimming ability by *Plesiomonas shigelloides* NCTC 10360 WT (vector), $\Delta luxS$ (vector) and $\Delta luxS$ (*luxS*) strains. The measured data were the diffusion diameters of each strain. C: growth curves of *Plesiomonas shigelloides* NCTC 10360 WT (vector), $\Delta luxS$ (vector) and $\Delta luxS$ (*luxS*) strains. Data are mean s.e.m. 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. ***: $P < 0.001$.

发现 3 种菌株生长曲线基本一致(图 1C), 说明生物膜及泳动表型的差异并不是由于菌株生长状态的不同引起。此结果表明, 群体感应信号分子 AI-2 正调控类志贺邻单胞菌的生物膜形成水平及泳动能力。

2.2 DosC 是类志贺邻单胞菌 NCTC 10360 中 AI-2 的受体

为探究 AI-2 调控类志贺邻单胞菌生物膜形成水平与泳动能力的具体机制, 我们对类志贺邻单胞菌 NCTC 10360 中的 AI-2 受体进行了挖掘。通过对类志贺邻单胞菌 NCTC 10360 蛋白编码序列注释发现, 该菌中并不存在 AI-2 的经典受体 LuxP/LsrB, 但存在一个含 dCache_1 结构域的 c-di-GMP 代谢酶 DosC, 通过序列比对发现该蛋白的 dCache_1 结构域与铜绿假单胞菌中已知 AI-2 受体 PctA 的 dCache_1 结构域同源性较高, 两者同源性为 42.4%。DosC 是类志贺邻单胞菌 NCTC 10360 中一个含有多结构域的跨膜蛋白, 其在周质空间具有一 dCACHE 家族的配体结合结构域(LBD) dCache_1, 在胞内还有两个与 c-di-GMP 代谢相关的 GGDEF 与 EAL 结构域(图 2A)。序列比对还发现 PctA 的 dCache_1 结构域中结合 AI-2 的 5 个关键位点^[11], 在 DosC 的 dCache_1 结构域中均保守存在(图 2B), 故推测 DosC 的配体结合结构域(DosC-LBD) dCache_1 能与 AI-2 结合。

为检测 DosC-LBD 与 AI-2 的结合能力, 进行了哈维氏弧菌生物发光实验及等温滴定量热实验(ITC)。哈维氏弧菌生物发光实验显示, 从能够产生 AI-2 的大肠杆菌菌株中纯化出的 DosC-LBD 经热变性处理后释放的配体可以诱导哈维氏弧菌 MM32 菌株发光, 其水平与 100 nmol/L DPD/AI-2 标准品诱导的发光水平相当; 而同时从 *luxS* 基因缺失不能产生 AI-2 的大肠杆菌菌株中纯化出的 DosC-LBD 无法释放出

可诱导哈维氏弧菌 MM32 菌株发光的配体(图 2C)。ITC 实验进一步验证了 AI-2 与 DosC-LBD 的结合亲和性, 其 K_d 值为 $2.83 \pm 0.17 \mu\text{mol/L}$ 。综合以上结果, 充分说明 DosC 是类志贺邻单胞菌 NCTC 10360 中的一个 AI-2 受体蛋白, 其与 AI-2 具有较高的亲和作用力。

2.3 DosC 响应 AI-2 促进 c-di-GMP 的降解

DosC 蛋白除了上游结合 AI-2 的 dCache_1 结构域, 下游还具有与 c-di-GMP 代谢相关的 GGDEF 和 EAL 结构域^[28]。为探究 AI-2 的结合对 DosC 的活性的影响, 我们纯化了 DosC 全长跨膜蛋白, 在添加或不添加 AI-2 情况下进行了 c-di-GMP 体外合成与水解实验, 并通过高效液相色谱检测反应产物。结果显示, DosC 能将 c-di-GMP 水解为 pGpG, 且 AI-2 可增强其磷酸二酯酶活性(图 3A), 而在添加或不添加 AI-2 情况下该蛋白均无双鸟苷酸环化酶活性(图 3B)。以上结果说明, DosC 具有磷酸二酯酶活性, 且 AI-2 通过与 DosC 结合增强了其磷酸二酯酶活性, 促进了 c-di-GMP 降解。

2.4 DosC 通过调控胞内 c-di-GMP 水平影响类志贺邻单胞菌的生物膜形成及泳动能力

为探究 DosC 响应 AI-2 酶活性变化对类志贺邻单胞菌胞内 c-di-GMP 水平及相关表型的影响, 我们利用液质联用的方法测定了类志贺邻单胞菌野生型、 $\Delta luxS$ 、 $\Delta dosC$ 菌株的胞内 c-di-GMP 含量, 发现与野生型相比, $\Delta luxS$ 和 $\Delta dosC$ 菌株的胞内 c-di-GMP 水平均有显著提高(图 4A)。同时, 对 WT (vector)、 $\Delta dosC$ (vector) 及 $\Delta dosC$ (*dosC*) 菌株进行了生物膜形成水平和泳动能力的检测, 发现与野生型相比, $\Delta dosC$ (vector) 菌株的生物膜形成水平及泳动能力均有显著下降, 而 $\Delta dosC$ (*dosC*) 菌株恢复至野生型水平(图 4B-C)。生长曲线的测定显示, 生物膜形成及泳动能力差异并不是由于菌株生长状态

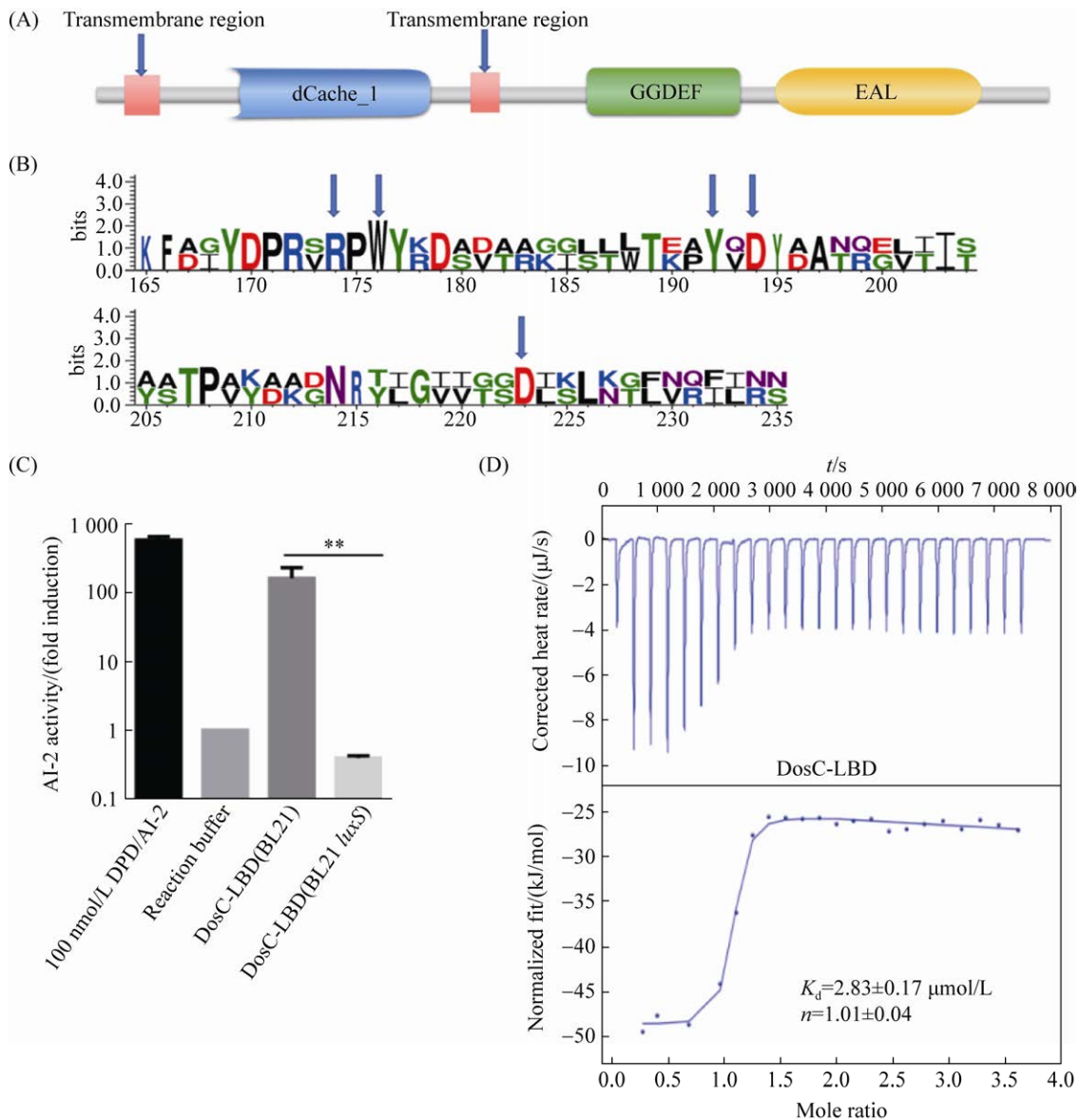


图 2 DosC-LBD 是类志贺邻单胞菌 NCTC 10360 中 AI-2 的受体

Figure 2 DosC is the chemoreceptor of AI-2 in *Plesiomonas shigelloides* NCTC 10360. A: schematic view of secondary protein structure of DosC. B: analysis of conserved sites of dCache_1 domains in DosC and PctA. Multiple alignment analysis of dCache_1 domains in DosC and PctA was performed with ClustalW embedded in MEGA 7. Blue arrows denote the five highly conserved positions corresponding to R174, W176, Y192, D194, and D223 of DosC. C: DosC-LBD is capable of retaining AI-2. Proteins were expressed in a BL21 or BL21/*luxS*⁻ *E. coli* strain. Light production by the AI-2 reporter *Vibrio 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. 100 nmol/L DPD/AI-2 standard solution was used as a positive control. AI-2 activity was reported as fold induction of bioluminescence over background obtained in the buffer control alone. D: the binding affinity between AI-2 and DosC-LBD was evaluated using ITC analysis. Data are mean±s.e.m. of three independent experiments. 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.

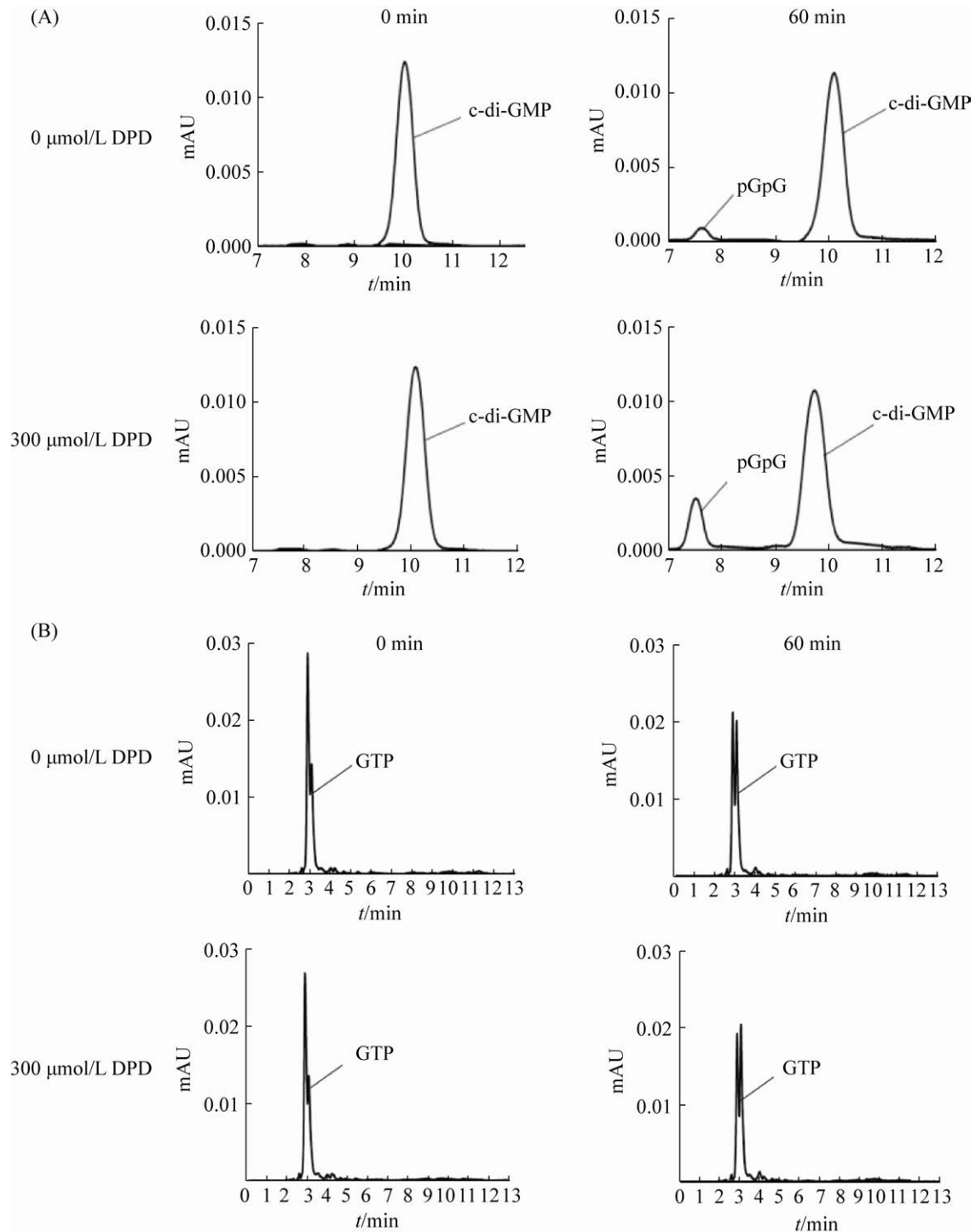


图 3 DosC 响应 AI-2 促进 c-di-GMP 的降解

Figure 3 AI-2 enhances the PDE activity of DosC and promotes the degradation of intracellular c-di-GMP. A: membrane fractions containing DosC were incubated with c-di-GMP in the presence or absence of DPD/AI-2 at 30 °C for 0 and 60 min and the product was analyzed by HPLC. B: membrane fractions containing DosC were incubated with GTP in the presence or absence of DPD/AI-2 at 30 °C for 0 and 60 min and the product was analyzed by HPLC.

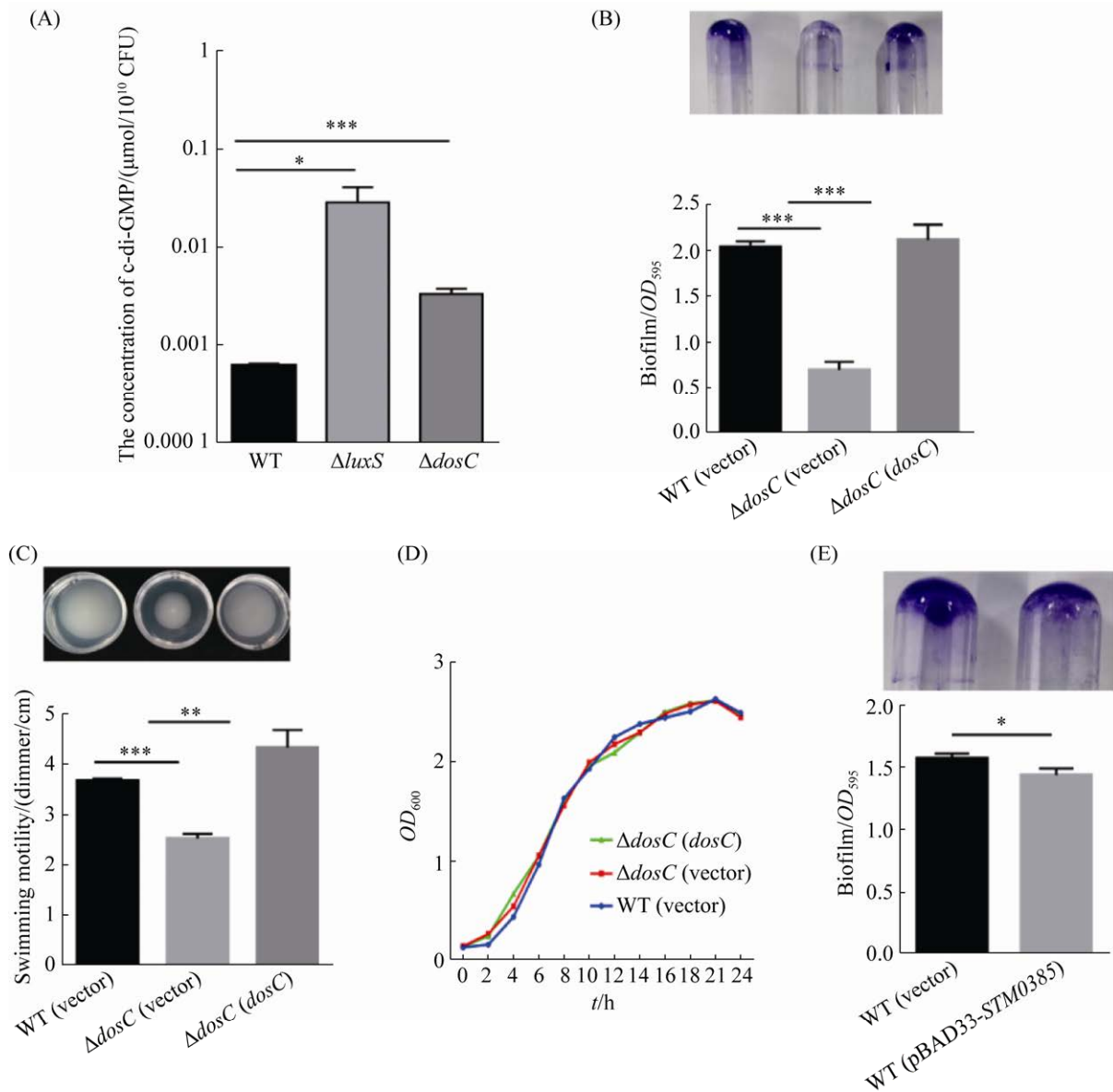


图 4 *DosC* 通过调控胞内 c-di-GMP 水平影响类志贺邻单胞菌 NCTC 10360 的生物膜形成及泳动能力
 Figure 4 *DosC* affects the biofilm formation and swimming ability of *Plesiomonas shigelloides* NCTC 10360 by regulating the level of intracellular c-di-GMP. A: quantification of intracellular c-di-GMP levels of *Plesiomonas shigelloides* NCTC 10360, $\Delta luxS$ and $\Delta dosC$ strains by LC-MS/MS. B: crystal violet quantification of biofilm formation by *Plesiomonas shigelloides* NCTC 10360 WT (vector), $\Delta dosC$ (vector) and $\Delta dosC$ ($dosC$) strains. C: quantification of swimming ability by *Plesiomonas shigelloides* NCTC 10360 WT (vector), $\Delta dosC$ (vector) and $\Delta dosC$ ($dosC$) strains. The measured data were the diffusion diameters of each strain. D: growth curves of *Plesiomonas shigelloides* NCTC 10360 WT (vector), $\Delta dosC$ (vector) and $\Delta dosC$ ($dosC$) strains. E: crystal violet quantification of biofilm formation by *Plesiomonas shigelloides* NCTC 10360 WT (vector) and WT (pBAD33-STM0385) strains. Data are mean \pm s.e.m. 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*<0.05, **: *P*<0.01, ***: *P*<0.001.

的不同引起(图 4D)。为进一步证明类志贺邻单胞菌的胞内 c-di-GMP 含量对生物膜形成的影响,我们在类志贺邻单胞菌野生型菌株内表达了一个已知的鼠伤寒沙门氏菌的 c-di-GMP 合成酶 AdrA (STM0385)^[29],通过生物膜表型实验发现表达有 AdrA 的菌株生物膜形成量低于类志贺邻单胞菌野生型菌株(图 4E)。以上结果说明, DosC 通过影响胞内 c-di-GMP 水平调控类志贺邻单胞菌的生物膜形成及泳动能力。

3 讨论与结论

AI-2 作为目前唯一一种广泛存在于革兰氏阳性细菌与革兰氏阴性细菌中的群体感应信号分子,在细菌种内、种间交流过程中发挥着重要作用,甚至被称为“细菌的世界语”。LuxS/AI-2 系统在大肠杆菌(*E. coli*)、鼠伤寒沙门氏菌(*S. typhimurium*)、哈维氏弧菌(*V. harveyi*)、霍乱弧菌(*V. cholerae*)、枯草芽孢杆菌(*B. subtilis*)等多种细菌中已有详尽报道^[6]。然而,许多细菌对 AI-2 的感受和响应机制仍不明确,这主要是因为关于其受体的信息还相对缺乏^[30-31]。本研究通过序列比对及体外结合实验发现了类志贺邻单胞菌中一个具有 dCache_1 结构域的 AI-2 新受体 DosC,其胞内功能域含有与 c-di-GMP 代谢相关的 GGDEF 与 EAL 结构域。通过胞内 c-di-GMP 定量、体外酶活实验及相关表型实验发现, AI-2 可增强该受体 EAL 结构域的磷酸二酯酶活性,促进体内 c-di-GMP 的降解,进而调控细菌的生物膜形成及泳动能力。

c-di-GMP 作为细菌内普遍存在的第二信使分子,介导多种信号转导通路,广泛参与调控细菌生物膜的形成、运动性、毒力、细胞周期循环和细胞的分化等重要生理生化途径,在细菌响应外界环境刺激方面起着重要作用^[32-33]。

细菌内往往存在多个 c-di-GMP 代谢途径,会对信号刺激产生不同的响应,构成一个复杂的调控网络,以对局部和整体的 c-di-GMP 水平及细菌的多种生命活动进行调控,从而使细菌适应环境的变化^[34-35],例如类志贺邻单胞菌 NCTC 10360 基因组编码 12 个具 GGDEF 结构域蛋白,8 个具 EAL 结构域蛋白以及 6 个含 GGDEF/EAL 双结构域蛋白(图 5)。除 DosC 外,类志贺邻单胞菌其他 c-di-GMP 代谢酶的功能及调节机制仍有待阐明。

多数情况下,细菌胞内 c-di-GMP 含量的升高会促进细菌与生物或非生物组织接触表面的黏附,进而促进生物膜的形成,抑制鞭毛介导的运动^[18,36]。本研究中发现,在类志贺邻单胞菌中,细胞内高浓度的 c-di-GMP 生物膜的形成量下降。此种现象已在 *Xylella fastidiosa*、*Burkholderia cenocepacia* 等少数细菌中有所报道^[25,37-38]。c-di-GMP 水平的动态变化是由不同的信号识别和接受结构域完成的,这些结构域整合了不同的环境线索,用于环境适应性调控。c-di-GMP 可与多种效应因子作用,发挥其不同的调节作用。同时 c-di-GMP 分子的结构灵活性增加了多重相互作用的可能性^[39]。因此不同的表型调控可能是某些细菌适应环境变化的机制,其具体的分子机理还有待进一步研究探讨。

类志贺邻单胞菌作为一种水生环境中常见的致病菌,可对人类健康构成严重威胁,并会对经济活动,尤其是对养殖业的生产带来极大的风险^[40-41]。对类志贺邻单胞菌 LuxS/AI-2 群体感应系统介导的 c-di-GMP 信号通路及其调控机制的研究将为相关药物的筛选、设计和优化奠定基础,可以为该菌引起的感染性疾病的防治提供新的策略。

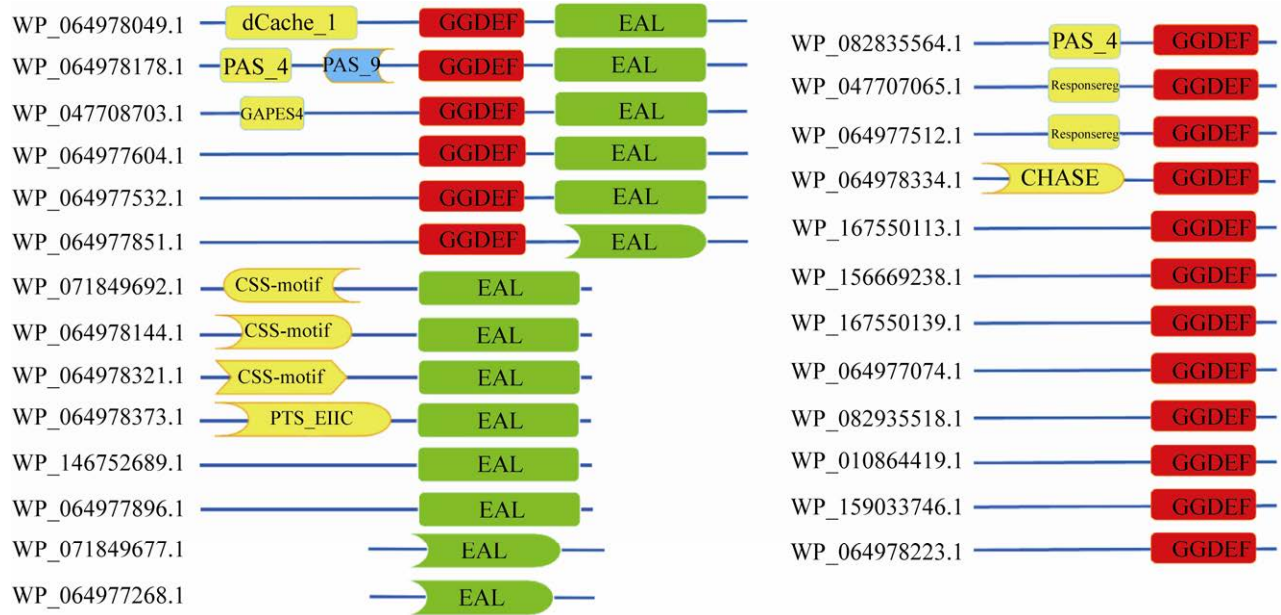


图 5 类志贺邻单胞菌 NCTC 10360 中 DGCs 和 PDEs 的结构域

Figure 5 Domain organization of the DGCs and PDEs present in *Plesiomonas shigelloides* NCTC 10360. GGDEF is the synthesis domain of c-di-GMP and exerts diguanylate cyclase (DGC) activity. EAL and HD-GYP are c-di-GMP hydrolytic domains and exert phosphodiesterase (PDE) activity. Domains identified in yellow and blue are associated to signalling systems and works as a signal sensor domain.

参考文献

- [1] Neiditch MB, Federle MJ, Miller ST, Bassler BL, Hughson FM. Regulation of LuxPQ receptor activity by the quorum-sensing signal autoinducer-2. *Molecular Cell*, 2005, 18(5): 507–518.
- [2] Pappenfort K, Bassler BL. Quorum sensing signal-response systems in Gram-negative bacteria. *Nature Reviews Microbiology*, 2016, 14(9): 576–588.
- [3] Xiong Q, Liu D, Zhang HH, Dong XY, Zhang GS, Liu YP, Zhang RF. Quorum sensing signal autoinducer-2 promotes root colonization of *Bacillus velezensis* SQR9 by affecting biofilm formation and motility. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2020, 104(16): 7177–7185.
- [4] Li H, Li X, Song C, Zhang Y, Wang Z, Liu Z, Wei H, Yu J. Autoinducer-2 facilitates *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 pathogenicity *in vitro* and *in vivo*. *Frontiers in Microbiology*, 2017, 8: 1944.
- [5] Li HD, Li XY, Wang ZL, Fu YK, Ai Q, Dong Y, Yu JL. Autoinducer-2 regulates *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 biofilm formation and virulence production in a dose-dependent manner. *BMC Microbiology*, 2015, 15: 192.
- [6] Pereira CS, Thompson JA, Xavier KB. AI-2-mediated signalling in bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, 2013, 37(2): 156–181.
- [7] Xavier KB, Bassler BL. Interference with AI-2-mediated bacterial cell-cell communication. *Nature*, 2005, 437(7059): 750–753.
- [8] Chen X, Schauder S, Potier N, Van Dorsselaer A, Pelczar I, Bassler BL, Hughson FM. Structural identification of a bacterial quorum-sensing signal containing boron. *Nature*, 2002, 415(6871): 545–549.
- [9] 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.
- [10] Kavanaugh JS, Gakhar L, Horswill AR. The structure of LsrB from *Yersinia pestis* complexed with autoinducer-2. *Acta Crystallographica Section F, Structural Biology and Crystallization Communications*, 2011, 67(Pt 12): 1501–1505.
- [11] Zhang L, Li S, Liu X, Wang Z, Jiang M, Wang R, Xie L, Liu Q, Xie X, Shang D, Li M, Wei Z, Wang Y, Fan

- C, Luo ZQ, Shen X. Sensing of autoinducer-2 by functionally distinct receptors in prokaryotes. *Nature Communications*, 2020, 11: 5371.
- [12] Ozdemir O, Sari SN, Terzioglu S, Zenciroglu A. *Plesiomonas shigelloides* sepsis and meningoencephalitis in a surviving neonate. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*, 2010, 43(4): 344–346.
- [13] Xi DY, Jing FY, Liu Q, Cao BY. *Plesiomonas shigelloides sipD* mutant, generated by an efficient gene transfer system, is less invasive. *Journal of Microbiological Methods*, 2019, 159: 75–80.
- [14] Samrot AV, Mohamed AA, Faradjeva E, Jie L, Sze CH, Arif A, Sean TC, Michael EN, Mun CY, Qi NX, Mok PL, Kumar SS. Mechanisms and impact of biofilms and targeting of biofilms using bioactive compounds—a review. *Medicina: Kaunas, Lithuania*, 2021, 57(8): 839.
- [15] Thi MTT, Wibowo D, Rehm BHA. *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *International Journal of Molecular Sciences*, 2020, 21(22): 8671.
- [16] Rasmussen TB, Skindersoe ME, Bjarnsholt T, Phipps RK, Christensen KB, Jensen PO, Andersen JB, Koch B, Larsen TO, Hentzer M, Eberl L, Hoiby N, Givskov M. Identity and effects of quorum-sensing inhibitors produced by *Penicillium* species. *Microbiology: Reading, England*, 2005, 151(Pt 5): 1325–1340.
- [17] Dasgupta N, Ramphal R. Interaction of the antiactivator FleN with the transcriptional activator FleQ regulates flagellar number in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology*, 2001, 183(22): 6636–6644.
- [18] Baraquet C, Murakami K, Parsek MR, Harwood CS. The FleQ protein from *Pseudomonas aeruginosa* functions as both a repressor and an activator to control gene expression from the *pel* operon promoter in response to c-di-GMP. *Nucleic Acids Research*, 2012, 40(15): 7207–7218.
- [19] Römling U. Characterization of the rdar morphotype, a multicellular behaviour in *Enterobacteriaceae*. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS*, 2005, 62(11): 1234–1246.
- [20] Römling U, Gomelsky M, Galperin MY. C-di-GMP: the dawning of a novel bacterial signalling system. *Molecular Microbiology*, 2005, 57(3): 629–639.
- [21] 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.
- [22] 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.
- [23] Ficarra FA, Grandellis C, Galván EM, Ielpi L, Feil R, Lunn JE, Gottig N, Ottado J. *Xanthomonas citri* ssp. *citri* requires the outer membrane porin OprB for maximal virulence and biofilm formation. *Molecular Plant Pathology*, 2017, 18(5): 720–733.
- [24] Le Moual H, Quang T, Koshland DE Jr. Conformational changes in the cytoplasmic domain of the *Escherichia coli* aspartate receptor upon adaptive methylation. *Biochemistry*, 1998, 37(42): 14852–14859.
- [25] Deng YY, Schmid N, Wang C, Wang JH, Pessi G, Wu DH, Lee J, Aguilar C, Ahrens CH, Chang CQ, Song HW, Eberl L, Zhang LH. Cis-2-dodecenoic acid receptor RpfR links quorum-sensing signal perception with regulation of virulence through cyclic dimeric guanosine monophosphate turnover. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2012, 109(38): 15479–15484.
- [26] Bähre H, Kaefer V. Identification and quantification of cyclic di-guanosine monophosphate and its linear metabolites by reversed-phase LC-MS/MS. *Methods in Molecular Biology: Clifton, N J*, 2017, 1657: 45–58.
- [27] Garner AL, Park J, Zakhari JS, Lowery CA, Struss AK, Sawada D, Kaufmann GF, Janda KD. A multivalent probe for AI-2 quorum-sensing receptors. *Journal of the American Chemical Society*, 2011, 133(40): 15934–15937.
- [28] Valentini M, Filloux A. Multiple roles of c-di-GMP signaling in bacterial pathogenesis. *Annual Review of Microbiology*, 2019, 73: 387–406.
- [29] Ahmad I, Lamprokostopoulou A, Le Guyon S, Streck E, Barthel M, Peters V, Hardt WD, Römling U. Complex c-di-GMP signaling networks mediate transition between virulence properties and biofilm formation in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *PLoS One*, 2011, 6(12): e28351.
- [30] Whiteley M, Diggle SP, Greenberg EP. Progress in and promise of bacterial quorum sensing research. *Nature*, 2017, 551(7680): 313–320.
- [31] Whiteley M, Diggle S, Greenberg E. Corrigendum: progress in and promise of bacterial quorum sensing research. *Nature*, 2018, 555: 126.

- [32] Wang RJ, Wang FB, He R, Zhang RJ, Yuan JH. The second messenger c-di-GMP adjusts motility and promotes surface aggregation of bacteria. *Biophysical Journal*, 2018, 115(11): 2242–2249.
- [33] Banerjee P, Sahoo PK, Sheenu, Adhikary A, Ruhel R, Jain D. Molecular and structural facets of c-di-GMP signalling associated with biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa*. *Molecular Aspects of Medicine*, 2021, 81: 101001.
- [34] Sarenko O, Klauck G, Wilke FM, Pfiffer V, Richter AM, Herbst S, Kaefer V, Hengge R. More than enzymes that make or break cyclic di-GMP-local signaling in the interactome of GGDEF/EAL domain proteins of *Escherichia coli*. *mBio*, 2017, 8(5): e01639–e01617.
- [35] Hengge R. Linking bacterial growth, survival, and multicellularity-small signaling molecules as triggers and drivers. *Current Opinion in Microbiology*, 2020, 55: 57–66.
- [36] Borlee BR, Goldman AD, Murakami K, Samudrala R, Wozniak DJ, Parsek MR. *Pseudomonas aeruginosa* uses a cyclic-di-GMP-regulated adhesin to reinforce the biofilm extracellular matrix. *Molecular Microbiology*, 2010, 75(4): 827–842.
- [37] Castiblanco LF, Sundin GW. New insights on molecular regulation of biofilm formation in plant-associated bacteria. *Journal of Integrative Plant Biology*, 2016, 58(4): 362–372.
- [38] De Souza AA, Ionescu M, Baccari C, Da Silva AM, Lindow SE. Phenotype overlap in *Xylella fastidiosa* is controlled by the cyclic di-GMP phosphodiesterase Eal in response to antibiotic exposure and diffusible signal factor-mediated cell-cell signaling. *Applied and Environmental Microbiology*, 2013, 79(11): 3444–3454.
- [39] Kakkar A, Verma RK, Samal B, Chatterjee S. Interplay between the cyclic di-GMP network and the cell-cell signalling components coordinates virulence-associated functions in *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. *Environmental Microbiology*, 2021, 23(9): 5433–5462.
- [40] Maciejewska A, Bednarczyk B, Lugowski C, Lukasiewicz J. Structural studies of the lipopolysaccharide isolated from *Plesiomonas shigelloides* O22:H3 (CNCTC 90/89). *International Journal of Molecular Sciences*, 2020, 21(18): 6788.
- [41] De Jesús Cortés-Sánchez A, Espinosa-Chaurand LD, Díaz-Ramírez M, Torres-Ochoa E. *Plesiomonas*: a review on food safety, fish-borne diseases, and tilapia. *The Scientific World Journal*, 2021, 2021: 3119958.

(本文责编 张晓丽)