



铜绿假单胞菌二鸟苷酸环化酶 SiaD 突变体的功能研究

霍卫萍¹, 刘智猛¹, 陈韦¹, 贾佳¹, 王媛媛², 张亚妮¹, 陈谷奎^{1*}

1 西北大学生命科学与医学部, 陕西 西安 710000

2 陕西中医药大学医学技术学院, 陕西 咸阳 712046

霍卫萍, 刘智猛, 陈韦, 贾佳, 王媛媛, 张亚妮, 陈谷奎. 铜绿假单胞菌二鸟苷酸环化酶 SiaD 突变体的功能研究. 微生物学报, 2022, 62(10): 3997–4007.

Huo Weiping, Liu Zhimeng, Chen Wei, Jia Jia, Wang Yuanyuan, Zhang Yani, Chen Gukui. Functions of mutants of diguanylate cyclase SiaD from *Pseudomonas aeruginosa*. Acta Microbiologica Sinica, 2022, 62(10): 3997–4007.

摘要: 【目的】铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)二鸟苷酸环化酶 SiaD 调控着铜绿假单胞菌的生物被膜形成等表型。在研究过表达 *siaD* 对生物被膜的调控作用时发现, 与野生型 *siaD* 基因回补菌株相比, 一株回补菌株的生物被膜产量显著升高。本文的目的即是探究该菌株生物被膜产量升高的原因, 并对该菌株的其他表型进行研究。【方法】通过测序确定突变位点; 利用生物被膜定性和定量实验对发生点突变的菌株表型进行分析; 利用 Western blotting 实验检测 SiaD^{R119M} 蛋白表达水平; 利用 GST-pull down 实验检测 SiaC 蛋白与 SiaD^{R119M} 蛋白在体外的结合能力; 针对 *siaD*^{R119M} 点突变基因进行融合蛋白表达载体的构建, 表达并纯化该蛋白, 利用高效液相色谱检测 SiaD^{R119M} 的酶活; 为了进一步研究 c-di-GMP 与细菌运动能力的关系, 对细菌的运动能力进行检测。【结果】测序比对结果显示, 序列的第 119 个氨基酸发生了突变, 由精氨酸突变成了甲硫氨酸。生物被膜定性和定量实验显示, 与野生型 *siaD* 回补菌株相比, *siaD*^{R119M} 的回补菌株生物被膜产量增加, *siaD*^{R119A} 的回补菌株生物被膜产量低于 *siaD*^{R119M} 的回补菌株, *siaD*^{R201A} 回补菌株生物被膜含量显著增加, *siaD*^{R119M R201A} 双突变回补菌株生物被膜的含量低于 *siaD*^{R201A} 回补菌株。Western blotting 和 GST-pull down 实验证明, 与野生型 SiaD 蛋白相比, SiaD^{R119M} 蛋白表达水平无差别, SiaC 和 SiaD^{R119M} 蛋白之间存在特异的相互作用。高效液相色谱结果显示 SiaD^{R119M} 蛋白酶活降低。运动能力检测实验中, 与 *siaD* 野生型回补菌株相比, *siaD*^{R119M} 回补菌株运动能力

基金项目: 国家自然科学基金(32170178, 31900121)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (32170178, 31900121)

*Corresponding author. E-mail: gukuichen@nwu.edu.cn

Received: 24 February 2022; Revised: 29 April 2022; Published online: 9 June 2022

减弱, *siaD*^{R201A}、*siaD*^{R119M R201A} 回补菌株运动能力无差别。【结论】*siaD*^{R119M} 突变导致生物被膜合成增强, 酶活降低, 运动能力减弱。我们推测突变后表型的变化可能是因为突变在体内会影响 SiaD 蛋白与下游效应蛋白的相互作用, 加强了下游效应蛋白的信号传导能力, 然而具体机制有待进一步探索。

关键词: *siaD*^{R119M} 突变体; 生物被膜; 环二鸟苷酸; 运动性

Functions of mutants of diguanylate cyclase SiaD from *Pseudomonas aeruginosa*

HUO Weiping¹, LIU Zhimeng¹, CHEN Wei¹, JIA Jia¹, WANG Yuanyuan², ZHANG Yani¹, CHEN Gukui^{1*}

¹ College of Life Science and Medicine, Northwest University, Xi'an 710000, Shaanxi, China

² College of Medical Technology, Shaanxi University of Traditional Chinese Medicine, Xianyang 712046, Shaanxi, China

Abstract: [Objective] Diguanylate cyclase SiaD regulates the biofilm formation of *Pseudomonas aeruginosa*. Our previous study about the effect of *siaD* overexpression on biofilm has revealed that the biofilm yield of a complementary strain is significantly higher than that of the strain overexpressing the wild-type *siaD* gene. This study aims to explore the reasons for the increase in biofilm production and to study other phenotypes of this strain. [Methods] The mutation sites of *siaD* were identified by sequencing. The qualitative and quantitative biofilm experiments were carried out to analyze the phenotype of the strain with point mutation. Western blotting was employed to determine the protein level of SiaD^{R119M}, and GST-pull down assay to measure the binding ability of SiaC to SiaD^{R119M} *in vitro*. The fusion expression vector was constructed for the point mutation gene *siaD*^{R119M}, and the protein was expressed and purified. The enzyme activity of SiaD^{R119M} was detected by high performance liquid chromatography (HPLC). Further, we studied the motility of the strain to reveal the relationship between c-di-GMP and bacterial motility. [Results] The sequencing comparison showed that the 119th amino acid was mutated from arginine to methionine (R119M). Compared with that of the wild-type *siaD* complementary strain, the biofilm yield of *siaD*^{R119A} increased, while the biofilm yield of *siaD*^{R119A} was lower than that of *siaD*^{R119M}; the biofilm yield of *siaD*^{R201A} significantly increased and was higher than that of *siaD*^{R119M R201A}. Western blotting showed no difference in the expression level between SiaD^{R119M} and wild-type SiaD, and the GST-pull down assay indicated there was a specific interaction between SiaC and SiaD^{R119M}. The HPLC results showed that the activity of SiaD^{R119M} decreased. Compared with wild-type *siaD* complementary strain, *siaD*^{R119M} showed weakened motility, and *siaD*^{R201A} and *siaD*^{R119M R201A} had no significant difference in motility. [Conclusion] The mutation of R119M in SiaD increased the biofilm yield, decreased the enzyme activity, and reduced the bacterial motility. This mutation may affect the interaction between SiaD and downstream effector to enhance the signal transduction of downstream effector. The underlying mechanism remains to be explored.

Keywords: *siaD*^{R119M} mutant; biofilm; c-di-GMP; motility

铜绿假单胞菌是一种常见的人类条件致病菌, 严重危害着人类的健康和生命, 可引起急性感染或慢性感染 2 种状态^[1]。环二鸟苷酸(cyclic diguanylic acid, c-di-GMP)是一种几乎普遍存在的细菌第二信使, 在细菌的急慢性感染转换机制中发挥着重要作用, 介导细菌信号转导系统。它在 1987 年首次被描述为细菌纤维素合酶的变构激活剂^[2-4]。随着对 c-di-GMP 不断深入的研究, 发现 c-di-GMP 对细菌的表型(运动能力和生物膜)、毒力等一系列生理生化过程起到重要作用, 从而影响了细菌的致病性和耐药性^[5-7]。

二鸟苷酸环化酶(diguanylate cyclases, DGC)和磷酸二酯酶(phosphodiesterase, PDE)分别介导了 c-di-GMP 合成与降解。随后研究发现所有含有 GGDEF 结构域的蛋白均具有 DGC 活性, 并且高度保守的 GGDEF 基序是 GTP 分子特异的结合位点。2 分子 GTP 在 DGC 的催化作用下经过 2 步反应生成 c-di-GMP。EAL 结构域和 HD-GYP 结构域均具有 PDE 活性, 催化 c-di-GMP 的水解^[8]。在铜绿假单胞菌模式菌株 PAO1 中, 41 种蛋白具有这 3 种特殊结构域, 其中仅仅含有 GGDEF 结构域和 EAL 结构域的蛋白分别有 17 种和 5 种, 同时具有 GGDEF 结构域和 EAL 结构域的蛋白有 16 种, 含有 HD-GYP 结构域的蛋白有 3 种^[9]。研究者们注意到 GGDEF/EAL 结构域的 N 端大部分都包含如 Per-Arnt-Sim (PAS) 等信号感应结构域以响应环境刺激, 从而调控细菌的毒力因子、表型等生理生化过程^[10]。细菌的泳动能力依赖于鞭毛的泳动、滑行或旋转梭动^[11], 蹭行运动依赖于鞭毛的运动和 IV 型菌毛的伸展和收缩, 蜂群泳动则是一类依赖于 IV 型菌毛的群集运动^[12]。铜绿假单胞菌在感染时会利用各种形式的运动以便达到感染部位, 其中细菌的菌毛可粘附上皮细胞, 从而对铜绿假单胞菌慢

性感染过程中生物被膜的形成起到促进作用。生物被膜的形成使细菌可以抵御宿主免疫防御系统及抗生素的影响, 同时鞭毛促进了细菌的迁移和扩散, 进而促进病原菌与宿主的相互作用^[13]。因此, 铜绿假单胞菌的表型在病原菌感染时起到了重要作用, 研究其表型对未来治疗和预防铜绿假单胞菌感染具有重要意义。

siaD 基因是 *siaABCD* 操纵子的一部分, 它编码了二鸟苷酸环化酶。在之前的文章中我们已经证明 *siaABCD* 操纵子编码一个信号网络, 该网络调节 SiaD 酶的活性, 以控制生物膜和聚集体的形成^[14]。

在研究过表达 *siaD* 对生物被膜的调控作用时, 我们发现, 与野生型 *siaD* 基因过表达菌株相比, 一株过表达菌株的生物被膜产量显著升高。为了探究该菌株生物被膜产量升高的原因, 进行了以下研究: 序列比对确定突变位点; Western blotting 实验检测突变后 SiaD 蛋白的稳定性以及表达水平; 并通过 GST-pull down 实验检测 SiaC 蛋白与 SiaD^{R119M} 蛋白体外结合能力的变化; 通过构建 pET28a-sumo-*siaD*^{R119M} 融合蛋白表达载体, 诱导蛋白表达, 用高效液相色谱检测了 SiaD^{R119M} DGC 的酶活; 为了进一步研究 SiaD^{R119M} 对细菌运动能力的影响, 检测了 *siaD* 点突变过表达菌株的运动能力。

1 材料与方法

1.1 菌株、质粒和培养条件

研究涉及的菌株和质粒见表 1。本研究中所使用的大肠杆菌、铜绿假单胞菌 PAO1 以及构建的各菌株均在 37 °C 条件下培养, 在摇床中振荡培养时, 使用的转速为 220 r/min, 实验中使用的培养基为 LB 培养基(NaCl 10 g/L, yeast extract 5 g/L, tryptone 10 g/L)。

表 1 菌株和质粒汇总表
Table 1 List of strains and plasmids

Strains and plasmids	Description	Sources
Strains		
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		
PAO1	Wild type	This lab
Δ siaD	siaD deletion mutant of PAO1	This lab
<i>E. coli</i>		
DH5 α	F- ϕ 80lacZ Δ M15 Δ (lacZYA-arg F)U169 recA1 endA1 hsdR17(rk-, mk+)phoA supE44 thi-1 gyrA96 relA1 tonA	Invitrogen
BL21(DE3)	F-ompT hsdSB(rB-mB-) gal dcm (DE3)	Invitrogen
Plasmids		
pUCP20	<i>Escherichia-Pseudomonas</i> shuttle vector	This lab
pUCP20-siaD-flag	pUCP20 derived plasmid expressing siaD-flag; Amp ^r	This study
pUCP20-siaD ^{R119M} -flag	pUCP20 derived plasmid expressing siaD ^{R119M} -flag; Amp ^r	This study
pUCP20-siaD ^{R119A} -flag	pUCP20 derived plasmid expressing siaD ^{R119A} -flag; Amp ^r	This study
pUCP20-siaD ^{R201A} -flag	pUCP20 derived plasmid expressing siaD ^{R201A} -flag; Amp ^r	This study
pUCP20-siaD ^{R119M R201A} -flag	pUCP20 derived plasmid expressing siaD ^{R119M R201A} -flag; Amp ^r	This study
pET28a-Sumo	Plasmid for Sumo expression	This lab
pSumo-siaD ^{R119M}	Plasmid for Sumo-siaD ^{R119M} expression	This study

1.2 主要试剂

实验中所需抗生素如羧苄青霉素(Cb)、卡那霉素(Kan)、四环素(Tc)、甲氧苄啶(Tmp)等均购自生工生物工程(上海)股份有限公司;氯化钠、胰蛋白胨、酵母提取物、琼脂粉、琼脂糖购自生工生物工程(上海)股份有限公司; T4 连接酶以及常用限制性内切酶等购自 Thermo 公司;质粒提取试剂盒、琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒购自北京天根生物科技有限责任公司; PCR 反应 PFU 高保真酶购自全式金生物技术有限公司,实验所用到的引物合成、质粒片段的一代测序均由北京擎科新业生物技术有限公司(西安分公司)提供;异丙基- β -D-硫代半乳糖苷(IPTG)、GST-Beads、蛋白纯化过程中所用到的 His Trap HP、GST Trap HP 购自生工生物工程(上海)股份有限公司; ECL 试剂盒购自武汉塞维尔生物科技有限公司。

1.3 质粒构建

利用引物设计软件 Premier 5, 设计出目的基因的上下游引物,引物详见表 2,用高保真酶 *Pfu* 进行目的基因的扩增;用 T4 ligase 于金属浴连接;将连接产物化学转化入 DH5 α 感受态细胞;用含有相应抗性的抗生素筛选阳性克隆,PCR 验证,双酶切验证和测序。

1.4 电转化感受态细胞 BL21(DE3)的制备

挑取单菌落于 5 mL 试管中,37 °C 培养 8 h,转接后培养至 $OD_{600}=0.3-0.5$, 4 °C 收菌,菌体用无菌水洗 3 次,10%甘油洗 3 次,最后用 10%甘油重悬分装备用。

1.5 生物被膜的形成

挑取单克隆 37 °C 振荡培养过夜,将种子液先稀释 10 倍,再稀释 100 倍后接种于新鲜 1 mL 液体 LB 培养基中,25 °C 静置培养 17 h,将静置培养的菌液吸出,用超纯水轻轻吹洗表

表 2 本研究所用引物

Table 2 Primers used in this study

Primers	Sequences (5'→3')	Usage
<i>siaD</i> ^{R119A} -flag-F1	AGCGGATCCGGACCTGCGCCTGCTGTACCT	For constructing p- <i>siaD</i> ^{R119A} -flag
<i>siaD</i> ^{R119A} -flag-R1	CGTTCGTTCTCCTCCGCGAGGCGCTCCAGCAG	For constructing p- <i>siaD</i> ^{R119A} -flag
<i>siaD</i> ^{R119A} -flag-F2	CTGCTGGAGCGCCTCGCGGAGGAGAACGAACG	For constructing p- <i>siaD</i> ^{R119A} -flag
<i>siaD</i> ^{R119A} -flag-R2	CCCAAGCTTTCACTTGTATCGTCGTCCTTGTAGTCGCGCGC TGGAGCCGGG	For constructing p- <i>siaD</i> ^{R119A} -flag
<i>siaD</i> ^{R201A} -flag-F1	AGCGGATCCGGACCTGCGCCTGCTGTACCT	For constructing p- <i>siaD</i> ^{R201A} -flag
<i>siaD</i> ^{R201A} -flag-R1	ACGCTGTGCGCACCGCCTCGAGTACCGGGCC	For constructing p- <i>siaD</i> ^{R201A} -flag
<i>siaD</i> ^{R201A} -flag-F2	GGCCCGGTACTCGAGGCGGTGCGCGACAGCGT	For constructing p- <i>siaD</i> ^{R201A} -flag
<i>siaD</i> ^{R201A} -flag-R2	CCCAAGCTTTCACTTGTATCGTCGTCCTTGTAGTCGCGCGC TGGAGCCGGG	For constructing p- <i>siaD</i> ^{R201A} -flag
<i>siaD</i> ^{R119M} -F	AGCGGATCCATGAGCCGCGAACGCGAAC	For constructing psumo- <i>siaD</i> ^{R119M}
<i>siaD</i> ^{R119M} -R	CCCAAGCTTTAGCGCGCTGGAGCCGG	For constructing psumo- <i>siaD</i> ^{R119M}

面杂质。用适量 0.1% 的结晶紫对玻璃管壁上形成的生物被膜进行染色, 静置 30 min, 弃去结晶紫, 用清水缓慢将没有着色的染料进行冲洗。放置于 65 °C 烘箱将水分烘干, 观察不同菌株生物被膜形成情况, 并拍照保存数据; 用 2 mL 30% 的乙酸将管壁上的生物被膜洗脱下来, 测量其在 590 nm 处的吸收值。实验重复 3 次。

1.6 蛋白表达纯化

将构建的 pET28a-sumo-*siaD*^{R119M} 的蛋白表达载体, 转入 BL21 细胞中。少量表达检测该蛋白的表达量以及可溶性。然后用 IPTG 16 °C 进行大量诱导, 收集菌体并破碎、离心, 上清液与镍柱结合, 用含有 5×10⁻¹ mol/L 咪唑的 Buffer B 进行梯度洗脱, 将收集到的蛋白通过 SDS-PAGE 跑胶检测蛋白大小及纯度; 纯度较好的蛋白收集在一起, 用蛋白 UlpI 进行特异位点的识别, 将 SumO 蛋白酶切, 回收得到没有任何标记的 *SiaD* 蛋白。

1.7 二鸟苷酸环化酶活性检测方法

利用纯化蛋白 *SiaC*、*SiaD* 和 *SiaD*^{R119M} 进行体外酶活反应, 以 GTP 为底物合成 c-di-GMP; 再通过高效液相色谱(HPLC)检测所合成 c-di-GMP 的浓度, 反应对应样品的酶活性。体外酶

活反应体系为 5×10⁻² mol/L Tris-HCl (pH 7.5), 1.5×10⁻¹ mol/L NaCl 和 5×10⁻³ mol/L MgCl₂; *SiaD* 及 *SiaD*^{R119M} 终浓度为 7×10⁻⁷ mol/L, *SiaC* 蛋白为 1.4×10⁻⁶ mol/L。反应体系于室温孵育 15 min 后, 加入 5×10⁻⁵ mol/L GTP 并混匀, 转入 37 °C, 反应开始, 此时计为 0 min。在特定时间取出样品, 加入 2×10⁻³ mol/L EDTA 终止反应, 100 °C 金属浴加热 5 min 以失活蛋白; 12 000×g 离心 5 min, 用 0.22 μmol/L 滤膜过滤并收集上清, 制成 HPLC 样品, 备用。

HPLC 检测, 利用 Symmetry C₁₈ Column 柱在波长 245 nm 处检测 GTP 与 c-di-GMP, 实验每组 3 个重复。流动相 A 为 1×10⁻² mol/L 醋酸铵(水溶解), 流动相 B 为 1×10⁻² mol/L 醋酸铵(甲醇溶解), 洗脱程序为: 0–9 min, 1% 流动相 B; 9–14 min, 15% 流动相 B; 14–19 min, 25% 流动相 B; 19–35 min, 1% 流动相 B。

1.8 蛋白质免疫印迹实验

挑取单克隆培养过夜, 转接后于 37 °C 摇床中培养至 OD₆₀₀ 约 1.0。取 800 μL 培养好的菌液离心弃去上清后, 在菌体沉淀中加入 50 μL 1×SDS 载样缓冲液吹吸混匀, 100 °C 金属浴加热 10 min。用 12% SDS-PAGE 胶进行跑胶分离

后,电转至 PVDF 膜,在室温下用 5%脱脂牛奶封闭 1 h,随后用相应的一抗于 4 °C 孵育过夜, TBST 洗膜 3 次,加入相应二抗于室温孵育 1 h,再次洗膜 3 次。ECL 显影、曝光成像,分析实验结果。实验重复 3 次。

1.9 泳动(swimming)实验

在 swimming 平板(10 g/L 胰蛋白胨, 5 g/L NaCl, 0.3%琼脂)滴加 2 μ L 菌液 37 °C 培养过夜,将平板置于 30 °C 培养过夜后测量菌落直径并拍照。实验重复 3 次。

1.10 GST-pull down 实验

根据上述表达载体构建方法构建 pUCP20-*siaD*^{R119M}-flag 载体,挑取单克隆 37 °C 振荡培养过夜;转接培养,收集菌体、破碎、离心后取上清备用;将 Aglutathione magnetic Beads 洗好后平均分装至 2 个 1.5 mL EP 管中,一个管中加入实验组 100 ng GST-SiaC 蛋白,另一管中加入 50 ng 谷胱甘肽巯基转移酶(glutathione S-transferase, GST)蛋白作为负对照,在旋转混匀器上反应 2 h,使蛋白与 Beads 结合。用 Binding Buffer 洗去未结合的蛋白。将事先准备好的 pUCP20-*siaD*^{R119M}-flag 蛋白上清分别加入到结合了 GST-SiaC 蛋白和 GST 蛋白的 Beads 中,于 4 °C 旋转混匀器上反应过夜。制备 Input 样品和 Pulldown 样品;制备好的 Input 样品和 Pulldown 样品点 SDS-PAGE 胶,通过 Western blotting 的方法检测 SiaD^{R119M} 蛋白与 SiaC 蛋白在体外的相互作用。实验重复 3 次。

2 结果与分析

2.1 突变位点分析

siaD 与 *siaABC* 共同转录,*siaD* 基因已被注释为一个 708 bp 长的基因,以 GTG 密码子开头(<https://www.pseudomonas.com/>),然而,在之前的研究中我们分析了 *siaC* 和 *siaD* 之间

125 bp 的基因间隔区,发现了 ATG 起始密码子。因此,我们推测 *siaD* 的编码序列始于先前注释的 GTG 密码子上游的这个 ATG 密码子。经生物被膜实验证实,以 ATG 为起始密码子的 *siaD* 序列为该蛋白在体内的功能形式^[15]。因此,今后我们构建与 *siaD* 有关的质粒都是以 ATG 为起始密码子的序列。我们推测生物被膜增加可能是由于 *siaD* 序列发生了突变,于是将生物被膜增加的突变菌株提取质粒并测序。测序比对结果显示,该序列的第 119 个氨基酸发生了突变,由精氨酸突变成了甲硫氨酸。

2.2 生物被膜的检测

为了进一步检测突变位点对生物被膜合成的影响,我们进行了生物膜定性和定量实验。将 PAOI、 Δ *siaD* 以及回补菌株于 25 °C 恒温培养箱中静置培养 17 h。培养结束后,用结晶紫对生物被膜进行染色,定性观察表型特征;然后用 30%的乙酸将结晶紫洗脱下来,在波长 590 nm 处检测结晶紫溶液的吸光值,进行定量分析。野生型菌株和 Δ *siaD* 作为对照,如图 1 所示,野生型 *siaD* 回补菌株生物被膜表型能够恢复到野生型 PAOI 的状态,与报道的结果一致^[14]。*siaD*^{R119M} 的回补菌株相比较野生型 *siaD* 回补菌株生物被膜产量增加。为了排除生物被膜产量增加与突变的甲硫氨酸有关,我们构建了 p-*siaD*^{R119A}-flag 载体,把质粒电转化至 Δ *siaD* 菌株中。生物被膜实验结果显示,与野生型 *siaD* 回补菌株相比生物被膜产量虽然增加,但是低于 *siaD*^{R119M} 的回补菌株的生物膜产量。之前的研究报道发现,绝大多数 c-di-GMP 受体利用它们的 Arg 和 Asp/Glu 残基与 c-di-GMP 单体、鸟嘌呤碱基堆积而成的 c-di-GMP 二聚体或四聚体相结合^[16], R201 是二鸟苷酸环化酶 SiaD c-di-GMP 反馈抑制结合位点,该位点发生突变后,反馈抑制被解除,细胞内 c-di-GMP 的水平

增加, 进而影响生物被膜的形成。我们把构建好的 p-*siaD*^{R201A}-flag 质粒电转化至 Δ *siaD* 菌株中, 生物被膜实验结果显示, 与野生型 *siaD* 回补菌株相比, *siaD*^{R201A} 回补菌株生物被膜含量显著增加, 与报道结果一致^[15]。我们推测 *siaD* 基因的第 119 个氨基酸发生突变后生物膜表型的变化可能与 c-di-GMP 的反馈抑制有关, 为了验证我们的猜测, 构建了 *siaD*^{R119M R201A} 双突变回补菌株, 生物被膜实验结果显示, 生物被膜的含量与 *siaD*^{R201A} 回补菌株相比没有升高, 反而降低了。

2.3 蛋白表达水平的检测

鉴于上述各种点突变回补菌株的生物被膜表型的显著差异, 我们推测与蛋白的表达水平有

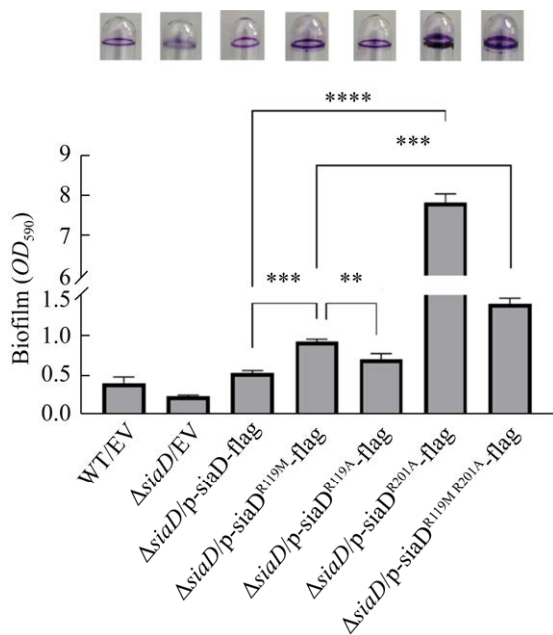


图 1 生物被膜染色和定量统计结果

Figure 1 Biofilm staining and quantitative statistical results. The upper figure indicates the formation of biofilm by crystal violet staining, while the lower figure shows quantitative analysis of biofilm by optical density. **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$; ****: $P < 0.0001$. Standard deviation represents the deviation of the values of three samples in each group.

关, 为了验证这一猜测, 按照上述实验方法, 将野生型、 Δ *siaD* 以及各种点突变回补菌株制样, 经 Western blotting 检测 SiaD 蛋白的表达量。如图 2 所示, 与野生型 *siaD* 回补菌株蛋白表达水平相比, SiaD^{R119M}、突变为丙氨酸的 SiaD^{R119A}、反馈抑制结合位点的突变 SiaD^{R201A} 以及双突变 SiaD^{R119M R201A} 蛋白的表达水平没有显著差异。以上实验结果证明, 各种点突变回补菌株的生物被膜表型的显著差异与蛋白的表达水平无关。

2.4 R119M 突变未影响 SiaC-SiaD 之间的相互作用

我们之前的研究证明 SiaC 与 SiaD 蛋白之间存在相互作用, 而且 SiaC 蛋白去磷酸化后可以激活 SiaD DGC 蛋白的活性, 促进 c-di-GMP 的产生, 进而调节生物被膜的形成^[14]。我们猜测 R119M 突变可能影响了 SiaD 蛋白与 SiaC 的结合能力, 继而影响其功能。为了验证这一猜测, 我们进行了 GST-pull down 实验, 通过 Western blotting 检测蛋白间的相互作用。为了避免非特异性相互作用, 将 GST 蛋白设置为阴性对照。如图 3 所示, SiaC 和 SiaD^{R119M} 蛋白之间存在特异的相互作用。这表明 R119M 突变并未影响 SiaC-SiaD 蛋白间的相互作用。

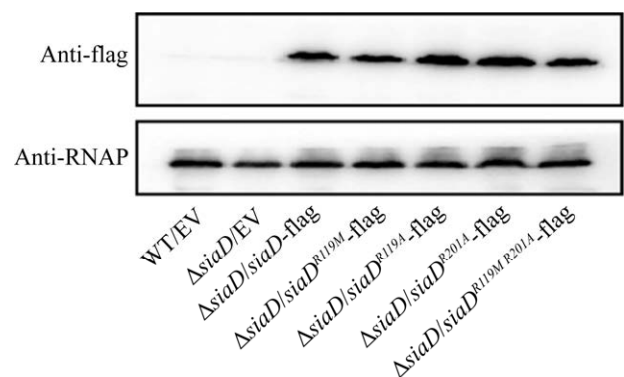


图 2 Western blotting 实验结果

Figure 2 Western blotting results.

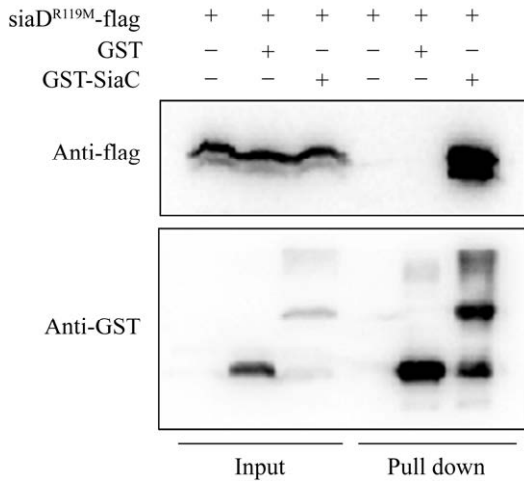


图3 GST-pull down 实验结果

Figure 3 GST-pull down experimental results.

2.5 重组蛋白 *SiaD*^{R119M} 的诱导表达及纯化

为了检测 R119M 突变对 *SiaD* 体外酶活性的影响，我们将测序正确的 pET28a-sumo-*siaD*^{R119M} 重组质粒电转化至 BL21(DE3) 感受态细胞中，经 IPTG 诱导，重组蛋白获得较高水平表达，经纯化蛋白，得到目的蛋白 *SiaD*^{R119M}。如图 4 所示，在约 40 kDa 处出现特异性条带，与 Sumo-*SiaD*^{R119M} 重组蛋白理论值相符。经 UlpI 蛋白酶酶切后，在约 25 kDa 处出现特异性条带，与无标签的 *SiaD*^{R119M} 蛋白理论值相符。

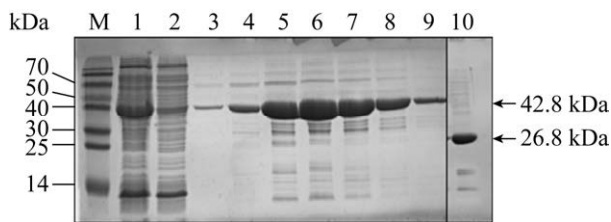


图4 *SiaD*^{R119M} 蛋白纯化

Figure 4 *SiaD*^{R119M} protein purification. M: blue PlusII Protein Marker; 1: supernatant of thallus fragmentation; 2: after hanging the nickel column, the flow through liquid; 3-9: *SiaD*^{R119M} protein with sumo label collected, with a size of 42.8 kDa; 10: cut the target protein of sumo label, the size is 26.8 kDa.

2.6 酶活的测定

我们将得到的 *SiaD*^{R119M} 蛋白采用高效液相色谱 (high performance liquid chromatography, HPLC) 技术检测体外酶活性的变化。如图 5 所示，*SiaC* 和野生型 *SiaD* 蛋白混合物与 GTP 孵育后，生成 c-di-GMP；但是 *SiaC* 和 *SiaD*^{R119M} 蛋白混合物与 GTP 孵育后，生成大量的 c-di-GMP 含量明显低于野生型 *SiaD* 蛋白。这一结果表明，与野生型 *SiaD* 蛋白酶活相比，*SiaD*^{R119M} 酶活降低了。

2.7 突变株运动能力的检测

研究证实，胞内高浓度的 c-di-GMP 与其生物被膜的形成密切相关；而低浓度的 c-di-GMP 与其运动性密切相关^[17]。以上研究结果显示，虽然 *siaD*^{R119M} 回补菌株生物被膜产量增多，但是 *SiaD*^{R119M} 蛋白酶活反而减弱。为了进一步研究 *SiaD* 与细菌运动能力的关系，我们对突变菌株的运动能力进行了检测。如图 6 所示，测量菌苔直径并统计分析后发现，与 *siaD* 野生型回补菌株相比，*siaD*^{R119M} 回补菌株运动能力减弱，*siaD*^{R201A}、*siaD*^{R119M R201A} 回补菌株运动能力无差别。我们也做了其他 2 种蹭动和蜂群泳动实验，结果显示，*siaD*^{R119M}、*siaD*^{R201A}、*siaD*^{R119M R201A}

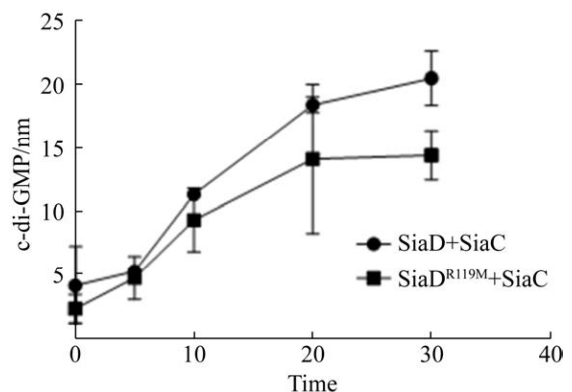


图5 高效液相色谱检测 c-di-GMP 的产量

Figure 5 Production of c-di-GMP by HPLC. Standard deviation represents the deviation of the values of three samples in each group.

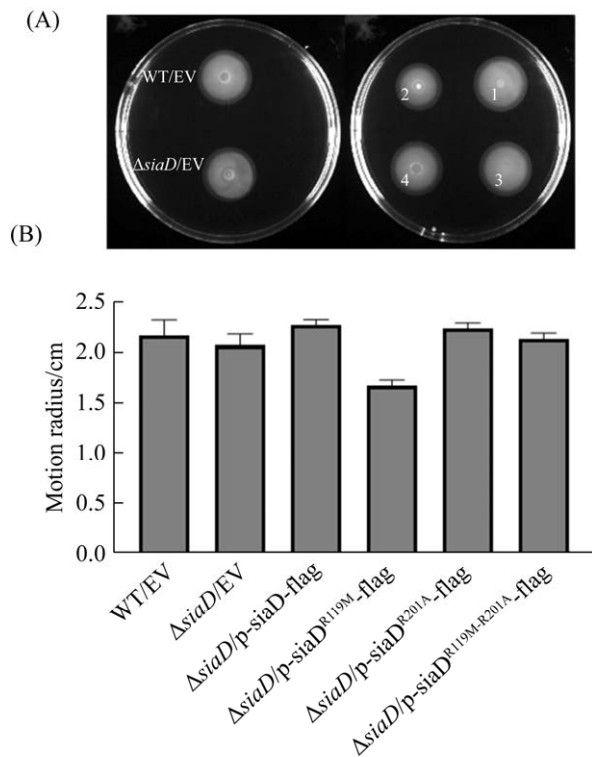


图 6 突变株运动能力的检测

Figure 6 Detection of movement ability of mutant strains. A: the image above is captured after incubation at 30 °C for 12 h. 1: Δ siaD/p-siaD-flag; 2: Δ siaD/p-siaD^{R119M}-flag; 3: Δ siaD/p-siaD^{R201A}-flag; 4: Δ siaD/p-siaD^{R119M-R201A}-flag; B: the upper figure shows the measurement and analysis of the mossy diameter. Standard deviation represents the deviation of the values of three samples in each group.

回补菌株与 *siaD* 野生型回补菌株运动能力无差别(数据未显示)。

3 讨论

铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)是一种可以引发人体严重感染的条件致病菌。近年来铜绿假单胞菌的多重耐药性在急剧增强,并被世界卫生组织列为对人类健康最严重的威胁之一^[18]。研究证实, c-di-GMP 信号通路与细菌群体感应系统和双组分调控系统存在紧密联

系,它们组成了复杂的信号传递网络^[19-20]。通常情况下,细菌胞内的 c-di-GMP 浓度较低时,运动性及急性感染相关毒性因子基因表达水平高;反之,胞内 c-di-GMP 水平升高时,慢性相关基因表达水平升高,细菌将从运动状态向固着状态转变,促进生物被膜的形成及慢性感染的确立^[21]。生物被膜对抗生素、消毒剂以及人体免疫系统均有极高的抗性,无法被传统抗菌剂根除。因此生物被膜相关感染的发病率和死亡率均较高,且日益严重,已成为临床亟待解决的一大难题^[22-23]。

在本研究中,我们首先提取出生物被膜增加菌株的质粒,经测序比对发现该质粒的 *siaD* 序列第 119 个氨基酸序列由精氨酸突变成了甲硫氨酸。进一步研究表明,与野生型 *siaD* 基因回补菌株相比, *siaD*^{R119M} 回补菌株的生物被膜产量显著升高。因此,我们推测 R119 氨基酸位点可能参与了 c-di-GMP 水平的调控。Western blotting 实验结果显示,与野生型 *siaD* 回补菌株蛋白表达水平相比, *SiaD*^{R119M}、*SiaD*^{R119A}、*SiaD*^{R201A}、*SiaD*^{R119M R201A} 蛋白的表达水平没有显著差异,该结果证明生物被膜表型的变化与蛋白表达水平无关。之前的研究表明, *SiaC* 的磷酸化状态对其与 *SiaD* 的相互作用至关重要, *SiaC* 的磷酸化状态将开启或关闭 *SiaD* 的 DGC 活性,并调节 c-di-GMP 水平和随后的毒力表型^[14]。因此我们通过亲和沉降(pull-down)实验研究了 *SiaC* 与 *SiaD*^{R119M} 蛋白的相互作用,结果表明 R119M 突变并未影响 *SiaC* 与 *SiaD* 之间的相互作用。我们进一步使用高效液相色谱技术检测了 R119M 对 *SiaD* DGC 蛋白的酶活性的影响,结果显示,点突变后的 *SiaD* DGC 的酶活降低。为了进一步研究 R119M 突变后对其他表型的影响,我们检测了突变菌株的运动能力,结果表明, R119M 突变对由鞭毛控制的泳

动有影响, 突变后该菌株的泳动能力变弱。

综上所述, *siaD^{R119M}* 突变导致生物被膜合成增强, 体外酶活性降低, 运动能力下降。我们推测突变后表型的变化是由于突变影响了体内 SiaD 蛋白与下游效应蛋白的相互作用, 加强了下游效应蛋白的信号传导能力。c-di-GMP 信号系统下游是一个多层次的复杂调控网络, 它可通过调控鞭毛相关基因的转录、翻译及翻译后修饰等一系列过程, 调控鞭毛的运动性^[24]。总之, *siaD^{R119M}* 突变后表型变化的原因有待进一步研究。

参考文献

- [1] Driscoll JA, Brody SL, Kollef MH. The epidemiology, pathogenesis and treatment of *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Drugs*, 2007, 67(3): 351–368.
- [2] Römling U, Galperin MY, Gomelsky M. Cyclic di-GMP: the first 25 years of a universal bacterial second messenger. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2013, 77(1): 1–52.
- [3] Ross P, Weinhouse H, Aloni Y, Michaeli D, Weinberger-Ohana P, Mayer R, Braun S, De VE, Van Der Marel GA, Van Boom JH. Regulation of cellulose synthesis in *Acetobacter xylinum* by cyclic diguanylic acid. *Nature*, 1987, 325(6101): 279–281.
- [4] Jenal U, Reinders A, Lori C. Cyclic di-GMP: second messenger extraordinaire. *Nature Reviews Microbiology*, 2017, 15(5): 271–284.
- [5] Moreira RN, Dressaire C, Barahona S, Galego L, Kaever V, Jenal U, Arraiano CM. BolA is required for the accurate regulation of c-di-GMP, a central player in biofilm formation. *MBio*, 2017, 8(5): e00443-17.
- [6] Yang Y, Li Y, Gao T, Zhang Y, Wang Q. C-di-GMP turnover influences motility and biofilm formation in *Bacillus amyloliquefaciens* PG12. *Research in Microbiology*, 2018, 169(4/5): 205–213.
- [7] Ryu MH, Fomicheva A, Moskvina OV, Gomelsky M. Optogenetic module for dichromatic control of c-di-GMP signaling. *Journal of Bacteriology*, 2017, 199(18): e00014-17.
- [8] Sarenko O, Klauck G, Wilke FM, Pfiffer V, Richter AM, Herbst S, Kaever 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): e01639-17.
- [9] Kulesekara H, Lee V, Brencic A, Liberati N, Urbach J, Miyata S, Lee DG, Neely AN, Hyodo M, Hayakawa Y. Analysis of *Pseudomonas aeruginosa* diguanylate cyclases and phosphodiesterases reveals a role for bis-(3'-5')-cyclic-GMP in virulence. *PNAS*, 2006, 103(8): 2839–2844.
- [10] Borselli D, Lieutaud A, Theffenne H, Garnotel E, Pagès JM, Brunel JM, Bolla JM. Polyamino-isoprenic derivatives block intrinsic resistance of *P. aeruginosa* to doxycycline and chloramphenicol *in vitro*. *PLoS One*, 2016, 11(5): e0154490.
- [11] Robert-Paganin J, Nonin-Lecomte S, Réty S. Crystal structure of an EAL domain in complex with reaction product 5'-pGpG. *PLoS One*, 2012, 7(12): e52424.
- [12] Buensuceso RN, Daniel-Ivrad M, Kilmury SL, Leighton TL, Harvey H, Howell PL, Burrows LL. Cyclic AMP-independent control of twitching motility in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology*, 2017, 199(16): e00188-17.
- [13] Ha DG, O'Toole GA. C-di-GMP and its effects on biofilm formation and dispersion: a *Pseudomonas aeruginosa* review. *Microbiology Spectrum*, 2015, 3(2): 3.2.27.
- [14] Chen GK, Gan JH, Yang C, Zuo YL, Peng J, Li M, Huo WP, Xie YP, Zhang YN, Wang TT, Deng X, Liang HH. The SiaA/B/C/D signaling network regulates biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa*. *The EMBO Journal*, 2020, 39(6): e103412.
- [15] Chen G, Zhou J, Zuo YL, Huo WP, Peng J, Li M, Zhang YN, Wang TT, Zhang L, Zhang L. Structural basis for diguanylate cyclase activation by its binding partner in *Pseudomonas aeruginosa*. *Elife*, 2021, 10: e67289.
- [16] Zhang HN, Xu ZW, Jiang HW, Wu FL, He X, Liu Y, Guo SJ, Li Y, Bi LJ, Deng JY, Zhang XN, Tao SC. Cyclic di-GMP regulates *Mycobacterium tuberculosis* resistance to ethionamide. *Scientific Reports*, 2017, 7(1): 5860.
- [17] Simm R, Morr M, Kader A, Nimtz M, Römling U. GGDEF and EAL domains inversely regulate cyclic di-GMP levels and transition from sessility to motility. *Molecular Microbiology*, 2004, 53(4): 1123–1134.
- [18] 陈相好, 张嵘嵘, 刘芳, 陈嵘宏, 洪伟, 綦廷娜, 谷俊莹, 崔古贞. L1.LtrB 内含子编码蛋白反转录结构域关键催化位点分析及功能验证. *微生物学报*, 2019, 59(12): 2357–2366.

- Chen XH, Zhang ZR, Liu F, Chen ZH, Hong W, Qi TN, Gu JY, Cui GZ. Key catalytic sites in the reverse transcription domain of L1.LtrB intron encoded protein. *Acta Microbiologica Sinica*, 2019, 59(12): 2357–2366. (in Chinese)
- [19] Guła G, Dorotkiewicz-Jach A, Korzekwa K, Valvano MA, Drulis-Kawa Z. Complex signaling networks controlling dynamic molecular changes in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm. *Current Medicinal Chemistry*, 2019, 26(11): 1979–1993.
- [20] Yu X, Chen M, Jiang Z, Hu Y, Xie ZX. The two-component regulators GacS and GacA positively regulate a nonfluorescent siderophore through the Gac/Rsm signaling cascade in high-siderophore-yielding *Pseudomonas* sp. strain HYS. *Journal of Bacteriology*, 2014, 196(18): 3259–3270.
- [21] Kalia D, Meray G, Nakayama S, Zheng Y, Zhou J, Luo YL, Guo M, Roembke BT, Sintim HO. Nucleotide, c-di-GMP, c-di-AMP, cGMP, cAMP, (p)ppGpp signaling in bacteria and implications in pathogenesis. *Chemical Society Reviews*, 2013, 42(1): 305–341.
- [22] Moormeier DE, Bayles KW. *Staphylococcus aureus* biofilm: a complex developmental organism. *Molecular Microbiology*, 2017, 104(3): 365–376.
- [23] Tsui C, Kong EF, Jabra-Rizk MA. Pathogenesis of *Candida albicans* biofilm. *Pathogens and Disease*, 2016, 74(4): ftw018.
- [24] 胡继宏, 朱翠明. 环二鸟苷酸调控细菌生物膜形成的研究进展. 中南医学科学杂志, 2017, 45(3): 318–320.
- Hu JH, Zhu CM. Research progress in the regulation of cyclodiguanosine on bacterial biofilm formation. *Medical Science Journal of Central South China*, 2017, 45(3): 318–320. (in Chinese)