



# 氧化葡萄糖酸杆菌中一种潜在的双组分系统蛋白的功能研究

刘思羽, 马昱澍\*, 魏东芝

华东理工大学 生物反应工程国家重点实验室鲁华生物技术研究所, 上海 200237

刘思羽, 马昱澍, 魏东芝. 氧化葡萄糖酸杆菌中一种潜在的双组分系统蛋白的功能研究[J]. 微生物学报, 2023, 63(8): 3187-3202.

LIU Siyu, MA Yushu, WEI Dongzhi. Function of a potential two-component system protein in *Gluconobacter oxydans*[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2023, 63(8): 3187-3202.

**摘要:** 氧化葡萄糖酸杆菌(*Gluconobacter oxydans*)基因组编码的蛋白质中, 有相当数量的传感器激酶和反应调控蛋白组成了细菌的多个双组分信号转导系统(two-component signal transduction systems, TCSs), 这些系统能够介导细菌对外界环境变化做出反应。但目前对 *G. oxydans* 中潜在的双组分系统成员蛋白质结构和功能缺少必要的研究。【目的】研究菌株 *G. oxydans* 621H 中 *GOX0645* 基因序列所编码蛋白质的自磷酸化活性, 探究其与细菌趋化性运动的关联, 揭示其是否作为一种双组分系统成员蛋白在细胞内发挥作用。【方法】以菌株 *G. oxydans* 621H 基因组中一段可能编码双组分系统蛋白质的基因 *GOX0645* 为基础, 通过生物信息学分析其保守结构域; 采用体外化学发光实验证明其编码蛋白质的自磷酸化活性; 利用基因定点突变筛选出与自磷酸化活性相关的氨基酸位点; 通过差速离心法寻找双组分蛋白的亚细胞定位; 最后运用体内双分子荧光互补和体外生物大分子相互作用实验印证其与下游鞭毛马达蛋白之间的相互作用。【结果】生物信息学分析发现 *GOX0645* 编码蛋白同时具有组氨酸激酶和应答调节子保守结构域, 该蛋白含有能够结合 ATP 并发生磷酸化反应的保守组氨酸和天冬氨酸位点, 且蛋白自磷酸化活性可受 cAMP 浓度调节; 该蛋白主要存在于 *G. oxydans* 细菌细胞质内, 并与鞭毛马达蛋白具有中等强度相互作用力。【结论】本研究发现了菌株 *G. oxydans* 621H 中一种可能参与细胞趋化性调控的 TCS 系统, 为进一步研究 *G. oxydans* 中 TCS 系统的作用机制奠定了基础。

**关键词:** 氧化葡萄糖酸杆菌; 双组分信号转导系统; 自磷酸化活性; 蛋白质相互作用

资助项目: 上海市自然科学基金(21ZR1417200)

This work was supported by the Natural Science Foundation of Shanghai (21ZR1417200).

\*Corresponding author. E-mail: myushu@ecust.edu.cn

Received: 2022-12-03; Accepted: 2023-03-06; Published online: 2023-03-15

# Function of a potential two-component system protein in *Gluconobacter oxydans*

LIU Siyu, MA Yushu\*, WEI Dongzhi

State Key Laboratory of Bioreactor Engineering, Lu Hua New World Institute of Biotechnology, East China University of Science and Technology, Shanghai 200237, China

**Abstract:** The genome of *Gluconobacter oxydans* encodes a large number of sensor kinases and response regulators, potential members of two-component signal transduction systems (TCSs), by which bacteria recognize and respond to a variety of environmental stimuli. However, little is known about the structures and functions of these proteins in *G. oxydans*. **[Objective]** To study the autophosphorylation activity of a potential TCS protein encoded by *GOX0645* in *G. oxydans* 621H, and to reveal the role of this protein in bacterial chemotaxis. **[Methods]** We performed sequence analysis on *GOX0645* from *G. oxydans* 621H that might encode a TCS member, detected the autophosphorylation activity of the encoded protein by *in vitro* luminescent kinase assay, and then identified the amino acid residues critical to the autophosphorylation by site-directed mutagenesis. We employed differential centrifugation to study the subcellular localization of the protein, and BiFC assay and Octet® system to explore the interaction between the protein and a flagellar motor protein of *G. oxydans*. **[Results]** The protein encoded by *GOX0645* contained the conserved domains of both histidine kinases and response regulators, with a conserved Asp and three His residues associated with autophosphorylation activity. Furthermore, the protein, as a hybrid protein, showed the activity of autophosphorylation which was affected by the concentration of cAMP molecule. The protein was localized in the cytoplasm and had a moderate affinity with the flagellar motor protein, which implied its regulatory role in bacterial chemotaxis. **[Conclusion]** This study analyzed a potential TCS that might be involved in the regulation of chemotaxis in *G. oxydans* 621H. This finding contributes to gaining insight into the molecular mechanism of two-component systems in *G. oxydans*.

**Keywords:** *Gluconobacter oxydans*; two-component signal transduction system; autophosphorylation activity; protein-protein interaction

为了适应外界环境的变化,生物体需要迅速感应并对环境信号做出应答。在大部分低等真核生物、原核生物和植物的生命活动中,组氨酸蛋白激酶系统,又称为双组分系统(two-component system, TCS)发挥着重要作用<sup>[1]</sup>。在已完成全基因组测序的 1 087 个细菌中,共含有 63 259 种编码双组分系统蛋白的基因<sup>[2]</sup>。这些双组分系统介

导了细菌体内各类生理过程,如细菌趋化、渗透压调节、孢子形成、营养元素代谢和物质运输等<sup>[3]</sup>。在某些革兰氏阴性致病菌中,双组分蛋白除了参与细菌生存所必需的调控过程外,还与致病菌的毒力、生物膜和群体感应等致病过程相关<sup>[4-5]</sup>。

典型的双组分系统由组氨酸激酶(histidine kinase, HK)和应答调节蛋白(response regulator,

RR)两部分组成, HK 大部分为跨膜蛋白, 而 RR 一般位于胞质内<sup>[6]</sup>。HK 组氨酸残基和 RR 天冬氨酸残基的磷酸化和去磷酸化是整个信号转导过程的关键<sup>[7-8]</sup>。在外界环境信号的刺激下, HK 的 His 位点发生自磷酸化, 然后将其磷酸基团转移至配对 RR 的 Asp 位点上, 引起蛋白构象发生变化。磷酸化 RR 的 DNA 结合能力显著提高, 从而激活或抑制下游靶基因的转录<sup>[9]</sup>。作为双组分系统的终端, RR 的磷酸化水平受到 HK 活性状态的严格控制, 在细胞内维持着磷酸化和脱磷酸化 2 种状态的动态平衡<sup>[10]</sup>。

除了作为转录因子发挥作用的 RR 之外, 信号结构域应答调节蛋白(signal domain response regulators, SD-RRs)通过结合其他蛋白, 如鞭毛马达蛋白、组氨酸激酶或蛋白酶等将信号向下传递<sup>[11-12]</sup>。大肠杆菌(*Escherichia coli*) CheA-CheB/CheY 双组分系统中的趋化蛋白 CheY 是第一个被鉴定的 SD-RR, 该双组分系统可以调控大肠杆菌的趋化性, 其同源蛋白广泛分布于多种细菌中<sup>[13-15]</sup>。

氧化葡萄糖酸杆菌(*Gluconobacter oxydans*) 是醋酸杆菌科(*Acetatebacter*)中的一种专性好氧的革兰氏阴性菌, 由于其不完全氧化糖和醇的能力而广泛应用于食品、饲料和制药等工业生产中<sup>[16]</sup>。通过分子生物学方法对工程菌株进行遗传标记和改良是研究和阐明其在生物催化中的作用, 并进一步优化的重要手段<sup>[17]</sup>。但目前适用于氧化葡萄糖酸杆菌的分子生物学工具有限, 其双组分系统方面的报道不足。

本研究从 *G. oxydans* 621H 菌株的基因组中得到了一段基因, 编号 *GOX0645*, 序列分析推测其翻译产物可能是双组分系统中的组氨酸激酶应答调节子杂合蛋白(HK 蛋白)。体外化学发光实验证明 HK 蛋白能够通过保守的组氨酸位点结合 ATP 发生磷酸化反应, 该自磷酸化活性

可受信号分子 cAMP 浓度的调节。此外本研究表明, HK 蛋白主要存在于 *G. oxydans* 细菌细胞质内, 并与鞭毛马达蛋白具有中等强度相互作用力, 这为进一步研究 *G. oxydans* 中 TCS 系统的作用机制奠定了基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌株和质粒

本研究涉及的菌株和质粒见表 1。

### 1.2 主要试剂和仪器

Kinase-Glo 化学发光试剂盒购于 Progenia 公司; PrimeSTAR HS DNA Polymerase 高保真聚合酶购于 TaKaRa 公司; 限制性内切酶、T4 DNA 连接酶购于 Thermo Fisher 公司; 细菌质粒提取试剂盒购于 Axygen 公司; 细菌基因组 DNA 提取试剂盒购于天根生化科技(北京)有限公司; DNA 片段纯化试剂盒和琼脂糖凝胶回收试剂盒购于 Omega 公司; 快速克隆试剂盒(CloneExpress II One Step Cloning Kit)购于 Vazyme 公司; Bradford 蛋白含量检测试剂盒购于碧云天生物技术有限公司; 各类抗生素和异丙基- $\beta$ -D-硫代半乳糖苷(isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactoside, IPTG)诱导剂购于上海前尘生物科技有限公司。本研究中使用的头孢西丁钠、卡那霉素、氨苄青霉素和硫酸庆大霉素的终浓度分别为 25、50、100、25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

IPTG 诱导剂(mol/L): IPTG 0.5; TBS 缓冲液(mol/L): Tris-base 0.02, 调节 pH 值至 7.4; 咪唑溶液(mol/L): Tris-base 0.02, NaCl 0.2, 咪唑 0.5, 调节 pH 值至 7.4; 蛋白透析液(mol/L): Tris-base 0.04,  $\text{MgCl}_2$  0.02, 调节 pH 值至 7.4, 加入 5%–10% 甘油; 洗涤缓冲液 I (mol/L): Tris-base 0.02,  $\text{EDTA}\cdot\text{Na}_2$  0.001, 调节 pH 值至 8.5, 加入 1% Triton X-100; 洗涤缓冲液 II (mol/L): Tris-base 0.02,  $\text{EDTA}\cdot\text{Na}_2$  0.001, 尿素 2, 调节 pH 值至 8.5, 加入 1% Triton X-100;

表 1 研究用菌株和质粒

Table 1 Strains and plasmids used in this study

Strains and plasmids	Genotype and/or description <sup>a</sup>	Source
Strains		
<i>G. oxydans</i> 621H	Wild-type, Cef <sup>r</sup>	Kept by the laboratory
<i>E. coli</i> Trans5a	Host for cloning	TransGen Biotech
<i>E. coli</i> BL21(DE3)	Host for expression vector	TransGen Biotech
<i>E. coli</i> HB101/pRK2013	Helper bacteria in triparental mating; Kan <sup>r</sup>	Kept by the laboratory
Plasmids		
pET21a	Amp <sup>r</sup>	Kept by the laboratory
pET28a	Kan <sup>r</sup>	Kept by the laboratory
pET28a- <i>hk</i>	pET28a expressing HK; Kan <sup>r</sup>	Kept by the laboratory
pBBR1MCS-5	Broad host range vector; Gm <sup>r</sup>	Kept by the laboratory
pET21a- <i>mcherry</i>	pET21a expressing mCherry fluorescent protein; Amp <sup>r</sup>	Kept by the laboratory
pET28a-c2530g_a2531c- <i>hk</i>	pET28a expressing HK-H844A; Kan <sup>r</sup>	This study
pET28a-c2887g_a2888c- <i>hk</i>	pET28a expressing HK-H963A; Kan <sup>r</sup>	This study
pET28a-c3142g_a3143c- <i>hk</i>	pET28a expressing HK-H1048A; Kan <sup>r</sup>	This study
pET28a-a3422c- <i>hk</i>	pET28a expressing HK-D1141A; Kan <sup>r</sup>	This study
pBBR1MCS5- <i>hk-mcherry</i>	pBBR1MCS5 expressing HK-mCherry; Gm <sup>r</sup>	This study
pET28a- <i>mc-hk</i>	pET28a expressing MC-HK; Kan <sup>r</sup>	This study
pET28a- <i>hk-mc</i>	pET28a expressing HK-MC; Kan <sup>r</sup>	This study
pET21a- <i>mn-flim</i>	pER21a expressing MN-FliM; Amp <sup>r</sup>	This study
pET21a- <i>flim-mn</i>	pET21a expressing FliM-MN; Amp <sup>r</sup>	This study
pET28a- <i>flim</i>	pET21a expressing FliM; Kan <sup>r</sup>	This study

Cef: Cefoxitin sodium; Kan: Kanamycin; Amp: Ampicillin; Gm: Gentamicin.

变性缓冲液(mol/L): Tris-base 0.02, EDTA·Na<sub>2</sub> 0.01, 尿素 8, 调节 pH 值至 9.5; 复性缓冲液 I (mol/L): Tris-base 0.02, 尿素 6, 调节 pH 值至 9.5, 加入 20%甘油; 复性缓冲液 II (mol/L): Tris-base 0.02, 尿素 3, 调节 pH 值至 9.0, 加入 15%甘油; 复性缓冲液 III (mol/L): Tris-base 0.02, 尿素 1.5, 调节 pH 值至 8.5, 加入 10%甘油; 复性缓冲液 IV (mol/L): Tris-base 0.02, 尿素 1, 调节 pH 值至 8.0, 加入 5%甘油; 复性缓冲液 V (mol/L): Tris-base 0.02, 调节 pH 值至 7.4; Octet 缓冲液(mol/L): Tris-base 0.04, MgCl<sub>2</sub> 0.02, BSA 0.1 g/100 mL, 调节 pH 值至 7.5, 加入 0.02% Tween-20; Octet ATP 反应液(mol/L): Tris-base 0.4, MgCl<sub>2</sub> 0.2, BSA 1 g/100 mL, ATP 0.002, 调节 pH 值至 7.5, 加入 0.02% Tween-20。

SpectraMax 190 多功能酶标仪(Molecular Devices)、Nikon A1R 激光共聚焦显微镜(Nikon)、OctetQke 分子相互作用技术平台(ForteBio)、LYNX4000 超速离心机(Thermo Fisher)、5804R 低温离心机(Eppendorf)、TC-XP-D PCR 扩增仪(杭州博日科技有限公司)、NanoDrop 2000 核酸定量仪(Thermo Fisher)、SPX-150B-Z 生化培养箱(上海博讯实业有限公司)、DHG-9240A 电热鼓风干燥箱(上海一恒科学仪器有限公司)、BS600 电子天平(上海友声仪器有限公司)。

### 1.3 培养基和培养条件

*E. coli* 培养使用 LB 培养基, 质粒扩增或普通传代培养条件为 37 °C、200 r/min 摇床培养 12 h; 蛋白表达时应先 37 °C、220 r/min 培养至

$OD_{600}$  为 1.0 (约 12–16 h), 然后取 1 mL 菌液加入到 200 mL 新鲜 LB 培养基中, 37 °C、220 r/min 培养至  $OD_{600}$  为 0.6 (约 2 h), 再加入 IPTG 诱导剂至终浓度 0.1 mmol/L, 18 °C、220 r/min 继续培养 20 h。

*G. oxydans* 621H 使用山梨醇培养基进行培养, 基因组扩增培养条件为 30 °C、220 r/min 培养 16–20 h; 取 1 mL 菌液加入到 50 mL 新鲜山梨醇培养基中, 30 °C、220 r/min 培养 12 h, 用于荧光蛋白检测。

山梨醇培养基(g/L): 酵母粉 20, 山梨糖醇 80,  $KH_2PO_4$  1,  $MgSO_4$  0.3, 谷氨酰胺 0.1, (固体培养基补加琼脂 20), 121 °C 灭菌 20 min 后使用。

#### 1.4 *hk* 基因突变菌株的获取

采用重叠延伸 PCR (overlap extension PCR) 法对 *hk* 基因进行改造, 分别将第 1 141 位 Asp 氨基酸残基和保守 HATPase 结构域中 963 位、1 048 位 His 氨基酸残基以及结构域 N 端紧邻的 844 位 His 位点突变为 Ala 残基, 得到 4 种去磷酸化 HK 突变体。

重叠延伸 PCR 由 3 个 PCR 反应组成: 以基

础质粒 pET28a-*hk* 为模板, 正向引物 *hk*-F 和突变引物 H844/H964/H1048/D1141-Rm 进行扩增, 产物为包含突变位点的上游基因片段; 同时也以基础质粒 pET28a-*hk* 为模板, 反向引物 *hk*-R 和突变引物 H844/H964/H1048/D1141-Fm 进行扩增, 产物为包含突变位点的下游基因片段; 最终混合 2 种产物并以正反向引物 F 和 R 进行第 3 轮扩增, 得到引入突变的目标片段。

实验中所用的上下游引物均通过软件 Primer 5.0 设计完成, 定点突变引物由 Agilent 公司 QuikChange Primer Design 网站在线设计, 并由上海捷瑞生物工程有限公司合成, 引物汇总表 2。

使用 *Bam*H I 和 *Sal* I 分别对纯化后的 PCR 产物和 pET28a 空载质粒进行双酶切, T4 DNA 连接酶连接后获得 pET28a-c2530g\_a2531c-*hk*、pET28a-c2887g\_a2888c-*hk*、pET28a-c3142g\_a3143c-*hk* 和 pET28a-a3422c-*hk* 4 种诱导性表达重组质粒。分别转化到 *E. coli* Trans5 $\alpha$  中扩增质粒, 菌落 PCR 筛选阳性克隆子, 测序进一步验证后提取质粒, 转化到 *E. coli* BL21(DE3) 中进行蛋白表达。

表 2 重叠延伸 PCR 引物

Table 2 Primers used for overlap extension PCR

Primers	Sequences <sup>b</sup> (5'→3')	Description
<i>hk</i> -F	ATAGGATCCATGTATCTTGTGGAGGGCACTGAAGAGG	Digested with <i>Bam</i> H I; forward primer to clone mutants of <i>hk</i> into pET-28a
<i>hk</i> -R	ATAGTCGACTCAGTCCCCTTTCAGCAGAACAGC	Digested with <i>Sal</i> I; reverse primer to clone mutants of <i>hk</i> into pET-28a
H844-Fm	GTTGTTGAAATCAG <u>CC</u> GCCAGACCACCCG	To introduce HK-H844A mutant encoding gene
H844-Rm	CGGGTGGTCTGGCGGCTGATTTCAACAAC	Same as above
H963-Fm	ACGCCATGGCTGACCGCG	To introduce HK-H963A mutant encoding gene
H963-Rm	CGCGGTCA <u>GC</u> CATGGCGT	Same as above
H1048-Fm	GTGGAGATCGCCTCCACGCG	To introduce HK-H1048A mutant encoding gene
H1048-Rm	CGCGTGGAGGCGATCTCCAC	Same as above
D1141-Fm	CCGGCATCCCGATAG <u>C</u> ACTAATAAGAACCGCAG	To introduce HK-D1141A mutant encoding gene
D1141-Rm	CTGCGGTTCTTATTAGTGC <u>T</u> ATCGGGATGCCGG	Same as above

<sup>b</sup>: Restriction sites are in bold and mutant bases are underlined.

## 1.5 蛋白表达和纯化

将 5 种含有 pET28a 重组载体(pET28a-*hk*、pET28a-c2530g\_a2531c-*hk*、pET28a-c2887g\_a2888c-*hk*、pET28a-c3142g\_a3143c-*hk* 和 pET28a-a3422c-*hk*) 的 *E. coli* BL21(DE3)接种到 LB 培养基中,并在低温条件下使用 IPTG 诱导表达 HK 蛋白及其突变体。

诱导结束后离心菌液(4 °C, 8 000 r/min, 10 min),使用 TBS 缓冲液清洗菌体沉淀后重悬,然后在冰水浴条件下进行超声破碎(工作参数:300 W, 5/5 s),直至溶液清澈透明。超声后的溶液离心(4 °C, 8 000 r/min, 30 min)取上清,0.45 μm 滤器过滤后使上清液在低温条件下缓慢流过镍离子亲和树脂(Ni<sup>2+</sup>-NTA)纯化蛋白(流速 2 mL/min)。用 500 mmol/L 咪唑洗脱目标蛋白后透析至咪唑浓度<0.01 mmol/L,得到纯化后的目标蛋白 HK 及其突变体 HK-H844A、HK-H963A、HK-H1048A 和 HK-D1141A。置于-20 °C 冰箱中冻存 1-2 周或直接用于检测。

## 1.6 HK 蛋白自磷酸化活性测定

将 HK 蛋白及 4 种突变体与 ATP 孵育,然后使通过化学发光试剂盒法确定蛋白结合 ATP 发生自磷酸化反应的活性。

固定反应体系中 ATP 终浓度分别为 0、2、4、6、8、10 μmol/L,恒温孵育(37 °C, 30 min)后加入与反应体系等体积的 Kinase-Glo 化学发光试剂,继续孵育 10 min 后,用酶标仪检测化学发光信号,作 ATP 含量/化学发光值曲线,选择斜率最大即最灵敏点为最佳 ATP 浓度。

将纯化后的 HK 蛋白超滤浓缩至约 5 mg/mL (4 °C, 3 600 r/min),分别按照 0、1、2、3、4 和 5 μL 梯度加至含有最佳 ATP 浓度的反应体系中,使用化学发光试剂盒在酶标仪下检测反应体系中剩余 ATP 的量,以确定蛋白自磷酸化活性;固定 HK 蛋白和 ATP 的浓度,将 cAMP 小分子

以 0、60、120、180、240、300、350、400 μmol/L 浓度梯度加至反应体系中,测定剩余 ATP 的量,以确定 cAMP 小分子对 HK 蛋白自磷酸化活性的影响。

将 HK 蛋白的 4 种突变体 HK-H844A、HK-H963A、HK-H1048A 和 HK-D1141A 同样超滤浓缩至约 5 mg/mL (4 °C, 3 600 r/min),并以浓度梯度加至含有最佳 ATP 浓度的反应体系中,使用化学发光试剂盒在酶标仪下检测反应体系中剩余 ATP 的量,以确定蛋白发生自磷酸化反应的氨基酸位点。

## 1.7 HK 蛋白亚细胞定位

以 mCherry 红色荧光蛋白作为标记以确定 HK 蛋白在 *G. oxydans* 621H 菌株中的定位。首先在 *G. oxydans* 621H 菌株中表达 *hk-mcherry* 重组基因,然后通过差速离心法分离细胞质和细胞膜组分,并在酶标仪下检测荧光值(激发光波长 587 nm,发射光波长 610 nm),以确定 HK 蛋白的位置。

以 pBBR1MCS-5 广宿主质粒作为克隆载体,首先使用 pET28a-*hk* 模板和 *hk*-F/R 引物对将 *hk* 基因插入 pBBR1MCS-5 质粒中,然后以 pET21a-*mcherry* 为模板,通过 *mcherry*-F/R 引物对将荧光蛋白基因 *mcherry* 连接到 *hk* 基因 3'端,构建出 pBBR1MCS5-*hk-mcherry* 重组质粒。考虑到 pBBR1MCS-5 质粒连接外源基因的效率较低,选择快速克隆(ClonExpress)代替连接过程。使用的引物也相应需在 5'端增加 15-20 个 pBBR1MCS-5 质粒插入位点的同源碱基。所用引物如表 3 所示。

PCR 产物和质粒酶切后转入快速克隆体系,37 °C 反应 30 min,转化到 *E. coli* Trans5α 中扩增质粒,筛选阳性克隆子并测序验证质粒序列正确,用于后续三亲本结合转化(triparental mating)。

表 3 快速克隆引物

Table 3 Primers collection for ClonExpress

Primers	Sequences <sup>c</sup> (5'→3')	Description
<i>hk</i> -F	<u>CAGAAAGATCTAGAACTAGTGGATCC</u> ATGTATCTTGTGGAGGGCAC	Digested with <i>Bam</i> H I; forward primer to clone <i>hk</i> into pBBR1MCS-5
<i>hk</i> -R	<u>AATTCCTGCAGCCCGGG</u> GGATCCGTCCCCTTTCAGCAGAACA	Digested with <i>Bam</i> H I; reverse primer to clone <i>hk</i> into pBBR1MCS-5
<i>mcherry</i> -F	GGCTGCAGGAATTCGATATCAAGCTT <u>GGAGGTGGCGGGAGTGGAGGTGGCGGGAGT</u> ATGGTGAGCAAGGGC	Digested with <i>Hind</i> III; forward primer to clone <i>mcherry</i> into pBBR1MCS5- <i>hk</i>
<i>mcherry</i> -R	AGGTCGACGGTATCGATAAGCTT TCACTTGACAGCTCGT	Digested with <i>Hind</i> III; reverse primer to clone <i>mcherry</i> into pBBR1MCS5- <i>hk</i>

<sup>c</sup>: Restriction sites are in bold and homologous sequences are underlined.

取培养好的受体菌(*G. oxydans* 621H)、供体菌(*E. coli*/pBBR-*hk-mcherry*)和辅助菌(*E. coli* HB101/pRK2013)各 1 mL, 室温下分别离心(6 000 r/min, 1 min)后弃上清, 使用无菌水洗涤 2 次菌体并加入 1 mL 无菌水重悬菌体, 然后将 3 种菌液混合, 室温下离心(6 000 r/min, 1 min), 留 200  $\mu$ L 左右上清重悬菌体, 涂布于无抗山梨醇固体平板上, 30  $^{\circ}$ C 培养至平板表面长出一层均匀的菌膜(约 8–10 h)。在超净工作台中使用 1 mL 无菌水冲洗平板, 吸取 50–200  $\mu$ L 洗液涂布在含 Cef 和 Gm 双抗性的山梨醇固体平板上, 30  $^{\circ}$ C 培养 22 h 后筛选阳性克隆子, 得到 *G. oxydans*/pBBR-*hk-mcherry* 重组菌株。

培养 *G. oxydans*/pBBR-*hk-mcherry* 重组菌株至  $OD_{600}$  为 0.6–1.0 后离心菌液(4  $^{\circ}$ C, 8 000 r/min, 10 min), 使用 TBS 缓冲液清洗菌体沉淀后重悬, 然后在冰水浴条件下进行超声破碎(工作参数: 300 W, 5/5 s), 直至溶液清澈透明。超声后的溶液离心(4  $^{\circ}$ C, 12 000 r/min, 40 min)取上清, 然后在超速离心机中离心(4  $^{\circ}$ C, 40 000 r/min, 90 min)分离上清液和沉淀, 其中上清液为细胞质溶液, 沉淀为细胞膜及其结合蛋白。

使用与上清液等体积的 TBS 缓冲液重悬沉淀, 将各个步骤所得溶液留样进行 SDS-PAGE

电泳分析, 并用 Bradford 蛋白含量检测试剂盒测定浓度, 最后酶标仪检测 mCherry 红色荧光蛋白(587/610 nm)的主要分布位置, 从而确定 HK 蛋白的亚细胞定位。

### 1.8 蛋白相互作用体内检测

采用基于 MN159-MC160 的 mCherry 双分子荧光互补系统确认 HK 蛋白和 *G. oxydans* 621H 中鞭毛马达上的 FliM 蛋白之间的相互作用: 将 mCherry 蛋白分子从第 159 和 160 位氨基酸之间切开, 命名为 MN 和 MC 片段, 并分别通过柔性接头(linker)连接在 FliM 和 HK 单体的 N 端或 C 端, 以 pET21a 和 pET28a 为表达载体, 构建质粒如图 1 所示, 将质粒两两组合在 *E. coli* 中表达融合蛋白。通过酶标仪检测融合蛋白共表达产生的荧光, 并使用激光共聚焦显微镜观察细胞的荧光水平, 可以直观判断目标蛋白是否具有相互作用。

构建双分子质粒所需引物如表 4 所示。使用 *mn1*-F/R 和 *mn2*-F/R 引物对在 pET21a-*mcherry* 模板上克隆出分别在 N 端和 C 端带有柔性蛋白 linker 序列的 *mn* 片段, 连接至 pET21a 空载质粒, 得到 pET21a-linker-*mn* 和 pET21a-*mn*-linker 重组质粒, 分别转化到 *E. coli* Trans5 $\alpha$  中进行扩增, 筛选阳性克隆子并测序验证质粒序列。

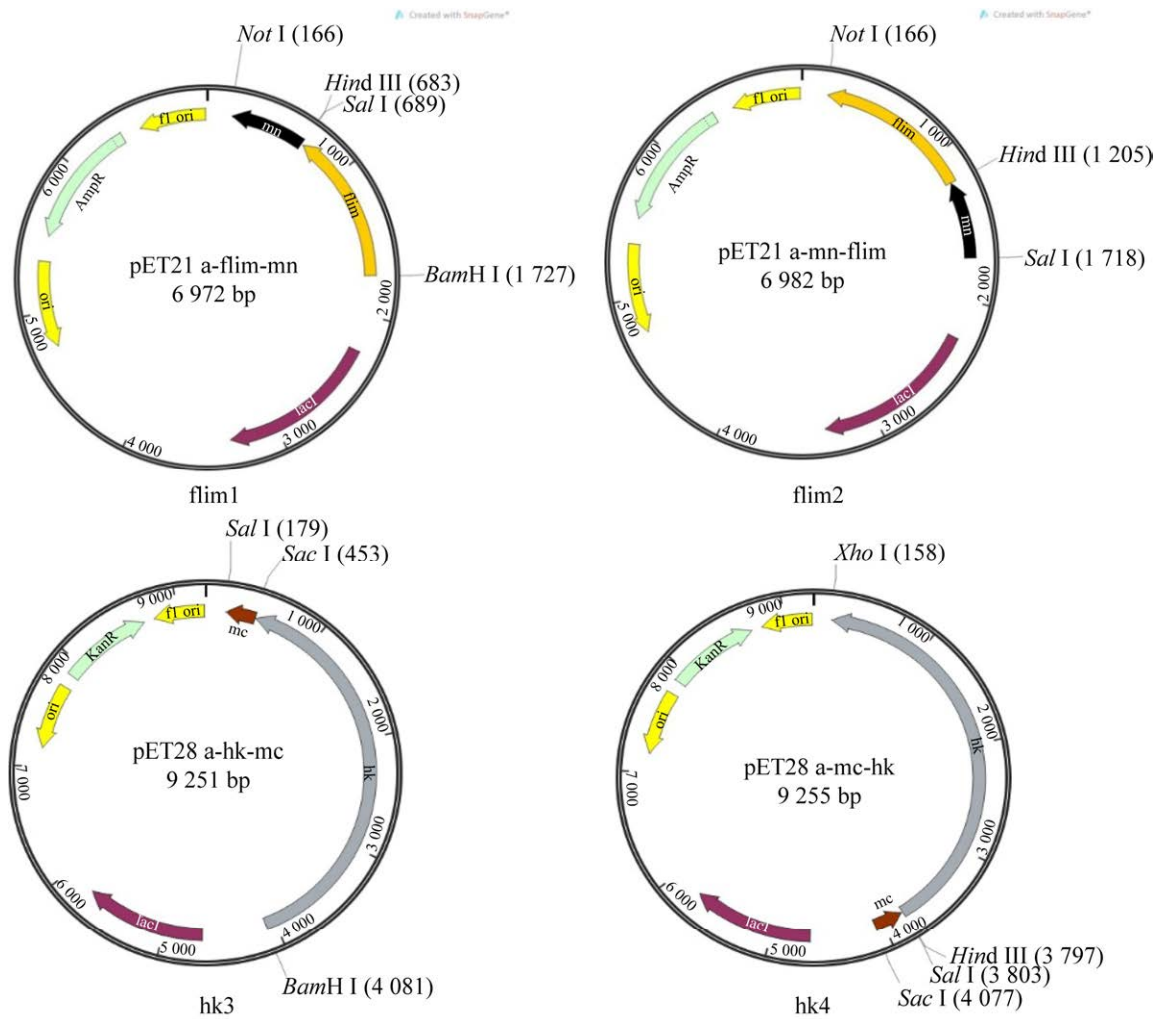


图 1 双分子荧光质粒图

Figure 1 Four plasmids created for BiFC assay. flim1: *mn* segment ligated on C-terminus of *flim*; flim2: *mn* segment ligated on N-terminus of *flim*; hk3: *mc* segment ligated on C-terminus of *hk*; hk4: *mc* segment ligated on N-terminus of *hk*.

以 *G. oxydans* 621H 基因组为模板, 分别使用 *flim1*-F/R 和 *flim2*-F/R 引物对克隆 *flim* 基因片段, 酶切连接在构建好的 pET21a-linker-*mn* 或 pET21a-*mn*-linker 质粒上, 重新转化至 *E. coli* Trans5 $\alpha$  中得到 flim1 (pET21a-*flim*-*mn*) 和 flim2 (pET21a-*mn*-*flim*) 质粒。

同样地, 使用 *mc1*-F/R 和 *mc2*-F/R 引物对克隆出 2 种带有柔性 linker 的 *mc* 片段, 连接至 pET28a 空载质粒上, 进而使用 *hk1*-F/R 和 *hk2*-F/R 引物对

克隆 *hk* 基因, 酶切、连接、转化后最终得到 hk3 (pET28a-*hk*-*mc*) 和 hk4 (pET28a-*mc*-*hk*) 质粒。

将 flim1/2 和 hk3/4 四种质粒两两组合, 分别转化至 *E. coli* BL21(DE3) 感受态细胞中, 涂布在双抗平板上, 挑取单菌落培养并进行菌落 PCR 验证, 其中条带大小全部正确的菌落即为双质粒系统。

为了消除基底荧光对实验结果的影响, 单独构建几组阴性对照组, 包括 flim1+*mc* (pET28a-*mc* 质粒)、hk3+*mn* (pET21a-*mn* 质粒) 和 *mn*+*mc* 双质粒系统。



表 4 双分子荧光引物汇总表

Table 4 Primers for BiFC assay

Primers	Sequence <sup>d</sup> (5'→3')	Description
<i>mn1</i> -F	<u>CCCAAGCTTGGAGGTGGCGGGAGTGGAGGTGGCGG</u> <u>GAGTATGGTGAGCAAG GGCGAGG</u>	Digested with <i>Hind</i> III; forward primer to construct pET21a-linker- <i>mn</i>
<i>mn1</i> -R	TATGCGGCCGCTCAGTCCTCGGGGTACATCCG	Digested with <i>Not</i> I; reverse primer to construct pET21a-linker- <i>mn</i>
<i>flim1</i> -F	CGCGGATCCATGGCAGGGCTGGGCCAT	Digested with <i>Bam</i> H I; forward primer to construct pET21a- <i>flim</i> - <i>mn</i>
<i>flim1</i> -R	CGCGTCGACGCTATAGGATGTGGCACGATCCG	Digested with <i>Sal</i> I; reverse primer to construct pET21a- <i>flim</i> - <i>mn</i>
<i>mn2</i> -F	ATAGTCGACATGGTGAGCAAGGGCGAGG	Digested with <i>Sal</i> I; forward primer to construct pET21a- <i>mn</i> -linker
<i>mn2</i> -R	<u>ATAAAGCTTACTCCCGCCACCTCCACTCCCGCCAC</u> <u>CTCCGTCCTCGGGGTACATCCGCT</u>	Digested with <i>Hind</i> III; reverse primer to construct pET21a- <i>mn</i> -linker
<i>flim2</i> -F	<u>CCCAAGCTTATGGCAGGGCTGGGCCAT</u>	Digested with <i>Hind</i> III; forward primer to construct pET21a- <i>mn</i> - <i>flim</i>
<i>flim2</i> -R	TATGCGGCCGCTCAGCTATAGGATGTGGCACGATC	Digested with <i>Not</i> I; reverse primer to construct pET21a- <i>mn</i> - <i>flim</i>
<i>mc3</i> -F	<u>ATAAAGCTTGGAGGTGGCGGGAGTGGAGGTGGCGG</u> <u>GGAGTGGCGCCCTGAAGGGCG</u>	Digested with <i>Hind</i> III; forward primer to construct pET28a-linker- <i>mc</i>
<i>mc3</i> -R	ATACTCGAGTCACTTGTACAGCTCGTCCATGC	Digested with <i>Xho</i> I; reverse primer to construct pET28a-linker- <i>mc</i>
<i>hk3</i> -F	ATAGGATCCATGTATCTTGTGGAGGGCA	Digested with <i>Bam</i> H I; forward primer to construct pET28a- <i>hk</i> - <i>mc</i>
<i>hk3</i> -R	ATAGTCGACGTCCCCTTTCAGCAGAAC	Digested with <i>Sal</i> I; reverse primer to construct pET28a- <i>hk</i> - <i>mc</i>
<i>mc4</i> -F	ATAGGATCCATGGGCGCCCTGAAGGG	Digested with <i>Bam</i> H I; forward primer to construct pET28a- <i>mc</i> -linker
<i>mc4</i> -R	<u>ATAGTCGACACTCCCGCCACCTCCACTCCCGCCAC</u> <u>CTCCCTTGTACAGCTCGTCCATGCCG</u>	Digested with <i>Sal</i> I; reverse primer to construct pET28a- <i>mc</i> -linker
<i>hk4</i> -F	<u>ATAAAGCTTATGTATCTTGTGGAGGGCACTG</u>	Digested with <i>Hind</i> III; forward primer to construct pET28a- <i>mc</i> - <i>hk</i>
<i>hk4</i> -R	ATACTCGAGTCAGTCCCCTTTCAGCAG	Digested with <i>Xho</i> I; reverse primer to construct pET28a- <i>mc</i> - <i>hk</i>

<sup>d</sup>: Restriction sites are in bold and linker sequences are underlined.

将 4 种双质粒系统(*flim1*+*hk3*、*flim1*+*hk4*、*flim2*+*hk3* 和 *flim2*+*hk4*)和阴性对照组分别在双抗培养基中培养并使用 IPTG 诱导 2 种融合蛋白共表达。

取 1 mL 诱导结束的菌液室温下离心 (8 000 r/min, 2 min)后用 TBS 缓冲液洗涤菌体沉淀 2 次, 然后加入 250  $\mu$ L TBS 缓冲液重悬菌体, 取 200  $\mu$ L 至黑色 96 孔板中, 使用酶标仪测定其

荧光值(激发光波长 587 nm, 发射光波长 610 nm); 另外取 5 mL 菌液, 以新鲜 LB 液体培养基作为参比, 测定其  $OD_{600}$  值。

最后取培养结束的菌液 10–30  $\mu$ L 滴在干净的载玻片上, 盖好盖玻片后用吹风机小心吹干, 通过激光共聚焦显微镜观察并记录细胞影像。

## 1.9 蛋白相互作用体外检测

Octet 生物分子相互作用仪用于快速精确检

测蛋白浓度、小分子或配体筛选及亲和力检测等各个方面,本研究采用能够特异性识别并结合 His 标签的 Anti-Penta-HIS 探针,以 His-FliM 融合蛋白作为抗原, HK 蛋白作为抗体,检测二者之间的相互作用。

以 *G. oxydans* 621H 基因组为模板,使用 flim-F/R 引物对(表 5)对 *flim* 基因进行扩增,然后酶切连接至 pET28a 质粒上并转入 *E. coli* Trans BL21(DE3)感受态细胞中表达,由于 FliM 蛋白在大肠杆菌中无法正确折叠而是以包涵体的形式存在,因此采用包涵体变复性的方式对其进行纯化。

将诱导培养的菌液经超声破碎后离心(4 °C, 8 000 r/min, 30 min)收集沉淀,使用 30 mL 洗涤缓冲液 I 重悬并清洗沉淀,离心(4 °C, 1 000 r/min, 15 min)后使用 30 mL 洗涤缓冲液 III 重悬并清洗沉淀 3 次,再次离心(4 °C, 1 000 r/min, 15 min)。加入 25 mL 变性缓冲液充分溶解包涵体,装入透析袋中,分别使用 1 L 复性缓冲液 I、II、III、IV、V 作为透析液进行透析,在 4 °C 条件下每种溶液透析 3 h,透析结束后将蛋白溶液取出,离心(4 °C, 1 000 r/min, 15 min)取上清即为带 His 标签的 FliM 蛋白溶液。

分别检测发生自磷酸化之前和之后的 HK 与 FliM 蛋白的亲和力,以解析其磷酸化水平的变化对蛋白质相互作用所产生的影响。使用 Octet Buffer 将纯化好的 2 种蛋白重新透析一次,

以防止蛋白缓冲液对实验结果的影响,透析结束后超滤至蛋白浓度约为 0.1–0.5 mg/mL,然后按照检测仪说明书进行检测。

## 2 结果与分析

### 2.1 化学发光法测定 HK 蛋白及其突变体自磷酸化活性

以 ATP 未降解组为对照,化学发光值随 HK 蛋白浓度变化趋势如图 2A 所示。可以发现,随着体系中蛋白含量升高,化学发光值逐渐降低。该结果证实,随着 HK 蛋白含量的上升,ATP 消耗量逐渐增加,剩余 ATP 减少,从而导致化学发光逐渐减弱,表明 HK 蛋白具有结合并消耗 ATP 的自磷酸化活性。

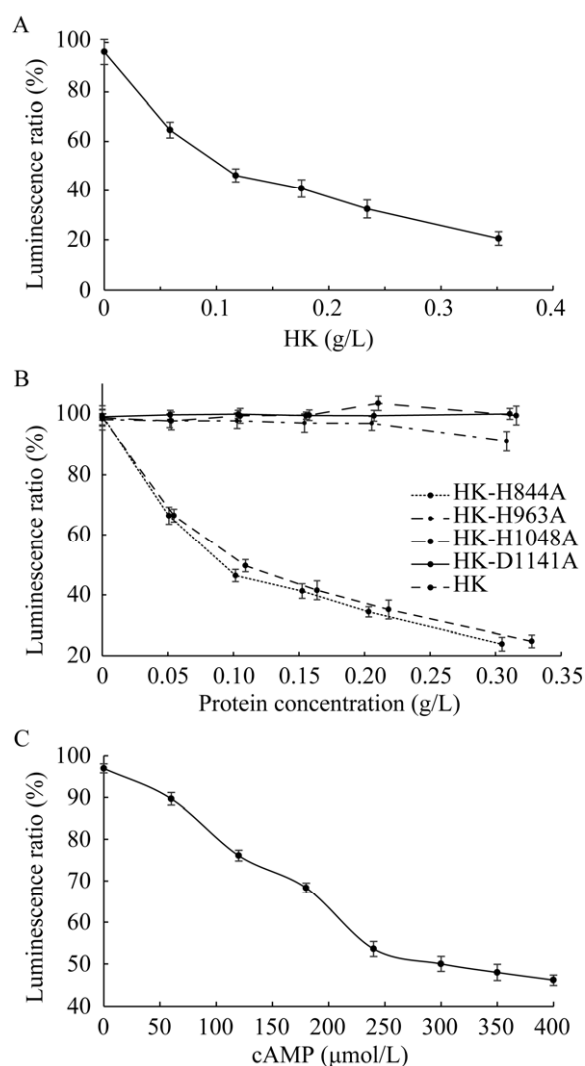
NCBI Blast 在线分析结果显示, HK 蛋白中存在多个保守结构域。蛋白 C 端第 1 141 位氨基酸 Asp 残基为一个保守的磷酸化位点,推测其用于磷酸基团传递;序列分析结果未显示能够被磷酸化的 His 位点,但 Asp 残基附近有保守的 HATPase 结构域(类似于其他组氨酸激酶中的 CA 结构域),该结构域中共有 2 个 His (963 位和 1 048 位),推测可能为能够被磷酸化的 His 残基;另外 HATPase 结构域的 N 端紧邻一个 His 位点(844 位),同样可能参与磷酸基团的接受和传递。根据上述分析结果,分别构建并表达突变体 HK-D1141A、HK-H963A、HK-H1048A 和 HK-H844A,用于自磷酸化活性验证。

表 5 flim 引物汇总表

Table 5 Primers for flim

Primers	Sequences <sup>c</sup> (5'→3')	Description
flim-F	CGCGGATCCATGGCAGGGCTGGGCCAT	Digested with <i>Bam</i> H I; forward primer to construct pET28a- <i>flim</i>
flim-R	CGCGTCGACTCAGCTATAGGATGTGGCACGATC	Digested with <i>Sal</i> I; reverse primer to construct pET28a- <i>flim</i>

<sup>c</sup>: Restriction sites are in bold.



**图 2 HK 蛋白及其 4 种突变体磷酸化活性测定**  
 Figure 2 Autophosphorylation activity of HK and four mutants. A: The phosphorylation reaction of HK kinase consumed ATP, resulting in decrease of luminescence. B: Autophosphorylation of HK mutants. HK-H963A, HK-H1048A and HK-D1141A lost the autophosphorylation activity, while the activity in HK-H844A remained unchanged. C: Influence of cAMP on HK autophosphorylation activity. cAMP improved HK autophosphorylation activity in a quantity-dependent manner. Error bars indicate *SD* ( $n=3$ ).

四种 HK 突变体自磷酸化活性检测结果如图 2B 所示, HK-H844A 蛋白曲线变化趋势与野生型相同, 即 844 位 His 残基的突变并未影响到

HK 蛋白的活性; 而 HK-H963A、HK-H1048A 和 HK-D1141A 自磷酸化实验结果显示, 无论体系中蛋白浓度如何变化, 化学发光值基本保持恒定, 说明未发生 ATP 的消耗。这一结果显示, 963 位和 1 048 位 His 残基, 以及 1 141 位 Asp 残基的突变都会使 HK 蛋白失去自磷酸化活性, 因此这 3 个位点对于 HK 蛋白的信号传递过程起到了至关重要的作用。

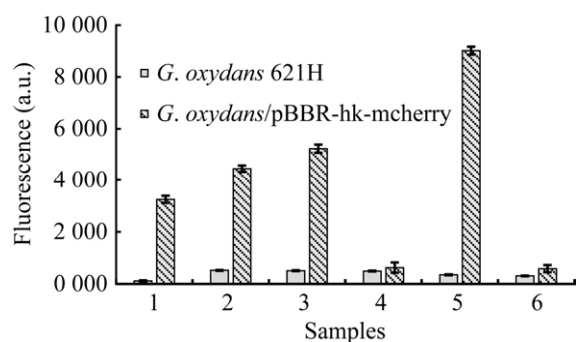
由于 HK 蛋白 N 端含有多个传感器结构域, 能够感应细胞内外多种小分子物质(如 cAMP、cGMP 等), 并对自身活性产生影响<sup>[18]</sup>。因此以 HK 蛋白为研究对象, 验证 cAMP 对其自磷酸化活性的影响。图 2A 中 HK 自磷酸化检测结果显示, 当体系中蛋白浓度在 0.05 g/L 左右时斜率最大, 即此时检测灵敏度最高, 因此固定体系中 HK 浓度 0.05 g/L, ATP 浓度 5  $\mu\text{mol/L}$ , 观察 cAMP 对 HK 蛋白自磷酸化活性的影响。以未加入 cAMP 组为对照, 计算化学发光值的衰减, 结果如图 2C 所示。随着 cAMP 浓度的升高, HK 蛋白明显提高了消耗 ATP 的能力, 但当 cAMP 浓度达到 240  $\mu\text{mol/L}$  时, 曲线趋于平缓, 推测体系中 ATP 已基本耗尽。这一结果显示, cAMP 对 HK 蛋白自磷酸化活性具有促进作用。

## 2.2 HK 蛋白定位

将 mCherry 红色荧光蛋白编码基因连接至 *hk* 基因并转入 *G. oxydans* 621H 中, 通过检测分离后的细胞膜组分和细胞质组分中的红色荧光强度, 对 HK 蛋白进行细胞内定位。

*G. oxydans* 621H 原始菌株及 *G. oxydans/pBBR-hk-mcherry* 重组菌株各组分的 SDS-PAGE 结果显示, pBBR 质粒的导入对 *G. oxydans* 细菌本身蛋白表达无明显影响。

分别对原始菌和重组菌的样品在 587/610 nm 参数下进行荧光值检测, 结果如图 3 所示。在全细胞样品、超声破碎后悬浊液中均有明显的红色



**图3** *Gluconobacter oxydans* 621H 原始菌株及重组菌株不同样品中 mCherry 红色荧光蛋白信号检测

Figure 3 Fluorescence in various samples from *Gluconobacter oxydans* 621H and the recombinant strain with pBBR-*hk-mcherry* of samples. Sample 1: Cells before sonication; Sample 2: Cells after sonication; Sample 3: Supernatant after low-speed centrifugation; Sample 4: Pellet after low-speed centrifugation; Sample 5: Supernatant after ultracentrifugation; Sample 6: Pellet after ultracentrifugation. Error bars indicate *SD* ( $n=3$ ).

荧光信号, 而悬浊液离心后, 红色荧光出现在上清液中, 表明 HK-mCherry 蛋白在 *G. oxydans* 621H 中可溶性表达。对超速离心后分离的细胞质组分样品(5号样品)和细胞膜组分样品(6号样品)的检测显示, 荧光信号主要来自于细胞质组分, 即 HK 蛋白主要存在于 *G. oxydans* 621H 细菌的细胞质中, 其定位与其他典型双组分系统的组氨酸激酶不同。

### 2.3 HK 与 FliM 鞭毛马达蛋白相互作用

根据 NCBI Blast 结果, HK 蛋白 C 端 REC (signal receiver domain) 中存在 CheY 结构域, 且 *G. oxydans* 621H 基因组中存在鞭毛马达蛋白 FliM 的同源基因(S=120)。为分析 HK 蛋白与 FliM 蛋白之间是否存在相互作用的可能, 分别采用基于 mCherry 的双分子荧光互补系统和 Octet 生物分子相互作用仪进行研究。

将图 1 中的质粒两两组合转化至 *E. coli* 中表达融合蛋白, 并使用酶标仪测得 4 种双质粒系统单位细胞荧光量如图 4A 所示。与其他实验组和阴性对照组相比, flim2+hk3 组和 flim2+hk4 组的荧光值较高, 表明在 FliM 蛋白和 HK 蛋白的引导下, MN 和 MC 片段相互结合并重新构成了具有活性的红色荧光蛋白, 该结果显示 HK 和 FliM 两种蛋白之间确实存在相互作用; 与之相比, flim1+hk3 和 flim1+hk4 组荧光量几乎为零。在大肠杆菌中, FliM 蛋白是通过其 N 端直接与 CheY 相互作用的<sup>[19]</sup>, 因此将 MN 连接在 FliM 蛋白的 C 末端, 可能使其与 MC 片段的距离较远, 而无法完成红色荧光蛋白的功能重构。另外, MN 片段与 FliM 蛋白 C 端的连接也可能会影响的空间结构, 使其无法正常折叠, 从而导致双质粒系统无荧光信号。

激光共聚焦显微镜进行直接观察的结果如图 4B 所示, 与酶标仪测量值相符, flim1+hk3 和 flim1+hk4 组几乎观察不到荧光, 而 flim2+hk3 组和 flim2+hk4 组的荧光量较强, 进一步证实 FliM 与 HK 蛋白在 *E. coli* 中的相互作用。

为进一步确定 2 种蛋白之间的相互作用力, 并分析 HK 蛋白磷酸化状态对这一相互作用力的影响, 在 *E. coli* 中分别表达纯化了 HK 和 FliM 蛋白, 并按照之前的实验条件将部分 HK 蛋白与 ATP 孵育, 制备磷酸化 HK 蛋白, 与未磷酸化的 HK 蛋白分别用于与 FliM 蛋白的 Octet 亲和力测定。根据结合解离曲线, 可以分别计算出 2 种蛋白质之间的结合速率常数  $K_{on}$  和解离速率常数  $K_{off}$ , 并根据蛋白分子量和浓度计算用于表征两者亲和力强弱的平衡解离常数  $K_D$  (表 6)。其中,  $K_{on}$  和  $K_{off}$  误差值分别比其计算值小一个数量级, 表明计算结果可靠。

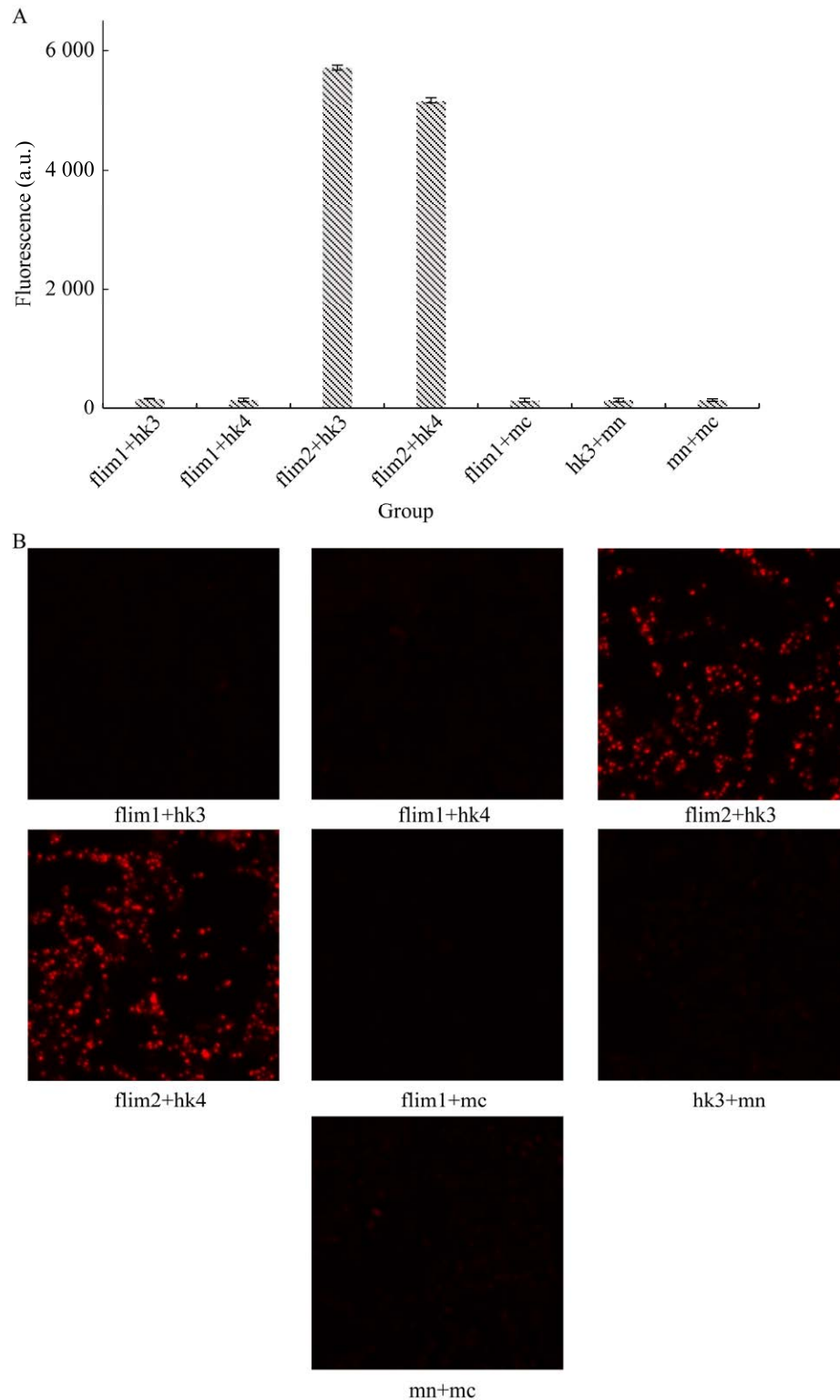


图 4 双分子荧光确认 HK 和 FlIM 蛋白的相互作用

Figure 4 Interaction between HK and FlIM analyzed by BiFC assay. A: Fluorescence in bacteria with different dual plasmid system. B: Cells images by LSCM. flim1: pET21a-*flim-mn*; flim2: pET21a-*mn-flim*; hk3: pET28a-*hk-mc*; hk4: pET28a-*mc-hk*; mn: pET21a-*mn*; mc: pET28a-*mc*. Error bars indicate *SD* ( $n=3$ ).

表 6 HK 与 FliM 蛋白结合亲和力

Table 6 Affinity between HK and FliM

	$K_D$ (mol/L)	$K_{on}$ (L/(mol·s))	$K_{on}$ error	$K_{off}$ ( $s^{-1}$ )	$K_{off}$ error
FliM+HK	$2.296 \times 10^{-7}$	6 511	507.5	$1.495 \times 10^{-3}$	$1.118 \times 10^{-4}$
FliM+(HK+ATP)	$2.196 \times 10^{-7}$	4 487	330.4	$9.835 \times 10^{-4}$	$8.664 \times 10^{-5}$

数据分析结果表明, HK 和 FliM 蛋白相互作用的平衡解离常数位于  $10^{-4}$  mol/L 和  $10^{-8}$  mol/L 区间内, 两者的相互作用具有中等强度的亲和力, 但 HK 的磷酸化状态对相互作用的影响较小。

### 3 讨论与结论

双组分信号转导系统(two-component signal transduction system, TCS)在原核生物应对环境变化, 感应  $O_2$  分子、cAMP 小分子, 调节渗透压等生命活动中发挥着重要作用<sup>[20]</sup>。TCS 系统信号传递从组氨酸激酶(HK)中的保守组氨酸(His)位点自磷酸化开始, HK 蛋白的 CA (催化与 ATP 结合)结构域高度保守, 可以将 ATP 分子固定在 ATP 盖子结构(lid)和中心螺旋之间<sup>[21]</sup>, ATP 分子  $\gamma$  位磷酸基团暴露在外, 迅速被 DHP (二聚体化及磷酸转移)结构域上的组氨酸位点捕捉<sup>[22]</sup>。因此 CA 催化域的空间位置总是靠近磷酸化的 His 位点。HK 蛋白自磷酸化后, 通过与应答调节子(RR)蛋白结合的方式传递磷酸基团。磷酸化的 RR 蛋白会发生构型改变, REC (信号响应)结构域  $\beta 3$ - $\alpha 3$  环、 $\beta 4$ - $\alpha 4$  环和部分  $\alpha 4$  螺旋结构均受其影响<sup>[23]</sup>。据此, 胞外信号以磷酸基团的形式逐级传递, 最终作用到相应位点<sup>[24]</sup>。

在 *E. coli* BL21 中表达来源于 *G. oxydans* 621H 菌株的组氨酸激酶应答调节子杂合蛋白 HK, 发现其具有蛋白激酶活性, 能够自磷酸化。这与双组分信号转导系统蛋白质的组氨酸激酶活性特征相符<sup>[25]</sup>。而 HK 突变体的磷酸化结果表

明, 1 141 位 Asp 位点是蛋白 RR 结构域中用于接收磷酸基团的保守位点; 但发生自磷酸化的 His 位点依然不能确定, 原因是 963 位和 1 048 位 His 残基位于 HATPase 结构域中, 它们在自磷酸化反应中很可能起到催化而非接收磷酸基团的作用。此外, cAMP 在一定浓度范围内促进 HK 蛋白自磷酸化活性的结果提示了传感器结构域的存在, 也进一步提示了 HK 蛋白作为双组分信号转导系统的成员, 可能具备感应外界刺激并调节自身活性的能力。

在细菌生长过程中, 胞内 cAMP 合成受到培养基成分尤其是培养基中葡萄糖浓度的影响: 葡萄糖浓度较高会导致胞内 cAMP 水平下降<sup>[26]</sup>; 而当葡萄糖耗尽时胞内腺苷酸环化酶激活, cAMP 浓度上升。由此推测, *G. oxydans* 621H 中 HK 蛋白可能通过 cAMP 感知外界环境中葡萄糖浓度变化。

HK 蛋白定位结果显示, 红色荧光主要分布在 621H 菌株的细胞质中, 证明 HK 蛋白的亚细胞定位是细胞质结构。目前文献报道的大部分双组分系统的组氨酸激酶与细胞膜结合<sup>[27]</sup>, 只有小部分定位于细胞质中, 用于自身生命活动的调节<sup>[28]</sup>。结合 HK 蛋白能够感应细胞内 cAMP 浓度的变化结果, 可以推断 HK 蛋白不同于大部分双组分系统的组氨酸激酶, 它主要存在于细胞质中, 用于感应胞内信号。

与大肠杆菌 CheA-CheB/CheY 双组分系统相同, HK 蛋白具有 CheY 保守结构域, 提示其可能与鞭毛马达蛋白 FliM 蛋白相互作用, 从而

对细菌的运动状态和趋化性产生影响。双分子荧光实验及 Octet 分子相互作用实验均证实了这一猜想。

本研究涉及了 *G. oxydans* 621H 菌株中一个双组分信号转导系统的信号输入、HK 自磷酸化、磷酸基团传递和信号输出整个信号转导途径, 研究结果提示了 *G. oxydans* 趋化性运动的一种可能调节方式, 有助于更加深入了解细菌的双组分系统和 *G. oxydans* 中信号传递的分子机理。

## 参考文献

- [1] CHANG CR, STEWART RC. The two-component system 1[J]. *Plant Physiology*, 1998, 117(3): 723-731.
- [2] ULRICH LE, ZHULIN IB. The MiST2 database: a comprehensive genomics resource on microbial signal transduction[J]. *Nucleic Acids Research*, 2010, 38(suppl\_1): D401-D407.
- [3] GALPERIN MY. Diversity of structure and function of response regulator output domains[J]. *Current Opinion in Microbiology*, 2010, 13(2): 150-159.
- [4] BRETEL DJ, DEMETRIADOU C, ZAHRT TC. Adaptation to environmental stimuli within the host: two-component signal transduction systems of *Mycobacterium tuberculosis*[J]. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2011, 75(4): 566-582.
- [5] DOW JM, FOUHY Y, LUCEY JF, RYAN RP. The HD-GYP domain, cyclic di-GMP signaling, and bacterial virulence to plants[J]. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2006, 19(12): 1378-1384.
- [6] GAO R, STOCK AM. Biological insights from structures of two-component proteins[J]. *Annual Review of Microbiology*, 2009, 63: 133-154.
- [7] STEWART RC. Protein histidine kinases: assembly of active sites and their regulation in signaling pathways[J]. *Current Opinion in Microbiology*, 2010, 13(2): 133-141.
- [8] WURGLER-MURPHY S. Two-component signal transducers and MAPK cascades[J]. *Trends in Biochemical Sciences*, 1997, 22(5): 172-176.
- [9] CASINO P, RUBIO V, MARINA A. The mechanism of signal transduction by two-component systems[J]. *Current Opinion in Structural Biology*, 2010, 20(6): 763-771.
- [10] LOOMIS WF, KUSPA A, SHAULSKY G. Two-component signal transduction systems in eukaryotic microorganisms[J]. *Current Opinion in Microbiology*, 1998, 1(6): 643-648.
- [11] HOCH JA. Two-component and phosphorelay signal transduction[J]. *Current Opinion in Microbiology*, 2000, 3(2): 165-170.
- [12] JENAL U, GALPERIN YM. Single domain response regulators: molecular switches with emerging roles in cell organization and dynamics[J]. *Current Opinion in Microbiology*, 2009, 12(2): 152-160.
- [13] PORTER SL, WADHAMS GH, MARTIN AC, BYLES ED, LANCASTER DE, ARMITAGE JP. The CheYs of *Rhodobacter sphaeroides*[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2006, 281(43): 32694-32704.
- [14] FOYNES S, DORRELL N, WARD SJ, STABLER RA, McCOLM AA, RYCROFT AN, WREN BW. *Helicobacter pylori* possesses two CheY response regulators and a histidine kinase sensor, CheA, which are essential for chemotaxis and colonization of the gastric mucosa[J]. *Infection and Immunity*, 2000, 68(4): 2016-2023.
- [15] SOURJIK V, SCHMITT R. Phosphotransfer between CheA, CheY1, and CheY2 in the chemotaxis signal transduction chain of *Rhizobium meliloti*[J]. *Biochemistry*, 1998, 37(8): 2327-2335.
- [16] DEPPENMEIER U, HOFFMEISTER M, PRUST C. Biochemistry and biotechnological applications of *Gluconobacter* strains[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2002, 60(3): 233-242.
- [17] de MUYNCK C, PEREIRA C, NAESSENS M, PARMENTIER S, SOETAERT W, VANDAMME E. The genus *Gluconobacter oxydans*: comprehensive overview of biochemistry and biotechnological applications[J]. *Critical Reviews in Biotechnology*, 2007, 27(3): 147-171.
- [18] ZSCHIEDRICH CP, KEIDEL V, SZURMANT H. Molecular mechanisms of two-component signal transduction[J]. *Journal of Molecular Biology*, 2016, 428(19): 3752-3775.
- [19] BREN A, EISENBACH M. The N terminus of the flagellar switch protein, FliM, is the binding domain for the chemotactic response regulator, CheY<sup>1</sup>[J]. *Journal of Molecular Biology*, 1998, 278(3): 507-514.
- [20] SUZUKI T, SAKURAI K, IMAMURA A, NAKAMURA A, UEGUCHI C, MIZUNO T. Compilation and characterization of histidine-containing phosphotransmitters implicated in his-to-asp phosphorelay in plants: AHP signal

- transducers of *Arabidopsis thaliana*[J]. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 2000, 64(11): 2486-2489.
- [21] DUTTA R, INOUE M. GHKL, an emergent ATPase/kinase superfamily[J]. *Trends in Biochemical Sciences*, 2000, 25(1): 24-28.
- [22] DEPARDIEU F, COURVALIN P, MSADEK T. A six amino acid deletion, partially overlapping the VanS<sub>B</sub>G2 ATP-binding motif, leads to constitutive glycopeptide resistance in VanB-type *Enterococcus faecium*[J]. *Molecular Microbiology*, 2003, 50(3): 1069-1083.
- [23] ZHAO XD, COPELAND DM, SOARES AS, WEST AH. Crystal structure of a complex between the phosphorelay protein YPD1 and the response regulator domain of SLN<sub>1</sub> bound to a phosphoryl analog[J]. *Journal of Molecular Biology*, 2008, 375(4): 1141-1151.
- [24] NINFA AJ. Use of two-component signal transduction systems in the construction of synthetic genetic networks[J]. *Current Opinion in Microbiology*, 2010, 13(2): 240-245.
- [25] ROBINSON VL, BUCKLER DR, STOCK AM. A tale of two components: a novel kinase and a regulatory switch[J]. *Nature Structural Biology*, 2000, 7(8): 626-633.
- [26] 谷伟, 战崙华, 邓志平, 陆伟. 假单胞菌中影响碳代谢的三种途径及其调控机制[J]. *生物技术进展*, 2014, 4(2): 96-101.  
GU W, ZHAN YH, DENG ZP, LU W. The regulation mechanism of three pathways on carbon catabolite repression in *Pseudomonas*[J]. *Current Biotechnology*, 2014, 4(2): 96-101 (in Chinese).
- [27] MARTÍN M, ALBANESI D, ALZARI MP, MENDOZA de D. Functional *in vitro* assembly of the integral membrane bacterial thermosensor DesK[J]. *Protein Expression and Purification*, 2009, 66(1): 39-45.
- [28] AYERS RA, MOFFAT K. Changes in quaternary structure in the signaling mechanisms of PAS domains[J]. *Biochemistry*, 2008, 47(46): 12078-12086.