



# 检测大肠杆菌内 c-di-GMP 水平的双荧光素报告质粒的构建及应用

张贝贝, 胡剑刚, 王欣宇, 郭伟奇, 姚澜, 王芷洋, 王帝, 祁晶晶, 田明星, 鲍衍清, 王少辉\*

中国农业科学院上海兽医研究所, 上海 200241

张贝贝, 胡剑刚, 王欣宇, 郭伟奇, 姚澜, 王芷洋, 王帝, 祁晶晶, 田明星, 鲍衍清, 王少辉. 检测大肠杆菌内 c-di-GMP 水平的双荧光素报告质粒的构建及应用[J]. 微生物学报, 2023, 63(12): 4814-4822.

ZHANG Beibei, HU Jiangang, WANG Xinyu, GUO Weiqi, YAO Lan, WANG Zhiyang, WANG Di, QI Jingjing, TIAN Mingxing, BAO Yanqing, WANG Shaohui. Construction and application of a dual fluorescence reporter plasmid for measuring c-di-GMP levels in *Escherichia coli*[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2023, 63(12): 4814-4822.

**摘要:** 细菌通过调控第二信使环二鸟苷酸(cyclic diguanylate, c-di-GMP)而促进其适应环境、存活及致病。【目的】本研究旨在建立有效的 c-di-GMP 水平检测方法, 为大肠杆菌内 c-di-GMP 水平检测提供便利条件。【方法】根据 c-di-GMP 核糖开关受体的调控方式、荧光报告基因等设计引物, 通过重叠聚合酶链反应(overlap polymerase chain reaction, overlap PCR)和同源重组酶构成基于核糖开关的双荧光素报告质粒 pAmCherry-Vc2EGFP (pACVcE), 然后构建 c-di-GMP 代谢基因过表达菌株和缺失菌株, 利用 pACVcE 检测大肠杆菌内 c-di-GMP 水平。【结果】Overlap PCR 扩增产物与目的靶序列一致, 测序结果证明 pACVcE 序列正确。表达 c-di-GMP 合成酶 DgcZ 的大肠杆菌胞内 c-di-GMP 水平显著升高, 而表达 c-di-GMP 降解酶 PdeK 的大肠杆菌胞内 c-di-GMP 水平显著降低。禽致病性大肠杆菌的胞内 c-di-GMP 水平检测发现 c-di-GMP 降解酶基因 *pdeK* 缺失后胞内的 c-di-GMP 水平显著升高。【结论】本研究构建了基于核糖开关的双荧光素报告质粒, 可方便、快速检测大肠杆菌胞内 c-di-GMP 水平。

**关键词:** 环二鸟苷酸; 核糖开关; 双荧光素报告质粒; 检测

资助项目: 国家自然科学基金(32172856, 31972654); 上海市自然科学基金(22ZR1476100, 23ZR1476600); 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金(2023JB02); 中国农业科学院科技创新工程(SHVRI-ASTIP-2014-8)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (32172856, 31972654), the Natural Science Foundation of Shanghai (22ZR1476100, 23ZR1476600), the Fundamental Research Funds for the Central Institutes by Shanghai Veterinary Research Institute (2023JB02), and the Agricultural Science and Technology Innovation Program of the Chinese Academy of Agricultural Sciences (SHVRI-ASTIP-2014-8).

\*Corresponding author. Tel: +86-21-34293412, E-mail: shwang0827@126.com

Received: 2023-05-04; Accepted: 2023-07-25; Published online: 2023-08-11

# Construction and application of a dual fluorescence reporter plasmid for measuring c-di-GMP levels in *Escherichia coli*

ZHANG Beibei, HU Jianguang, WANG Xinyu, GUO Weiqi, YAO Lan, WANG Zhiyang, WANG Di, QI Jingjing, TIAN Mingxing, BAO Yanqing, WANG Shaohui\*

Shanghai Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Shanghai 200241, China

**Abstract:** Bacteria modulate intracellular concentrations of the second messenger cyclic dimeric guanosine monophosphate (c-di-GMP), which facilitates the adaptation to environments, survival, and infection. **[Objective]** To establish an effective method for measuring the c-di-GMP levels in *Escherichia coli*. **[Methods]** We designed the primers for the dual fluorescence reporter plasmid based on the regulation pattern of the riboswitch receptor by c-di-GMP and the fluorescence reporter genes. The dual fluorescence reporter plasmid pAmCherry-Vc2EGFP (pACVcE) was constructed by overlap polymerase chain reaction (overlap PCR) and homologous recombination. Then, we constructed the mutants overexpressing and lacking the genes involved in c-di-GMP metabolism, and used pACVcE to measure the c-di-GMP levels in *Escherichia coli*. **[Results]** The targeted genes were successfully amplified with correct sequences. The intracellular c-di-GMP levels in *Escherichia coli* expressing the c-di-GMP synthase DgcZ were significantly increased, while the intracellular c-di-GMP levels expressing the c-di-GMP phosphodiesterase PdeK were significantly decreased. The deletion of the *pdeK* gene encoding c-di-GMP phosphodiesterase elevated the level of c-di-GMP in avian pathogenic *Escherichia coli*. **[Conclusion]** We constructed a dual fluorescence reporter plasmid based on riboswitch, which can facilitate the rapid determination of c-di-GMP levels in *Escherichia coli*.

**Keywords:** cyclic dimeric guanosine monophosphate (c-di-GMP); riboswitch; dual fluorescence reporter plasmid; determination

环二鸟苷酸 (cyclic dimeric guanosine monophosphate, c-di-GMP) 是细菌中普遍存在的核苷类第二信使, 参与调控细菌生长和分化、群体感应、生物被膜形成、运动性和毒力等生理功能<sup>[1]</sup>。研究表明细菌胞内不同水平 c-di-GMP 影响不同生物学进程, 细菌胞内 c-di-GMP 水平较高时细菌表面附着能力增强, 有利于生物被膜的形成, 而低 c-di-GMP 水平与单细胞、运动性和毒力有关。细菌胞内 c-di-GMP 由二鸟苷酸环化酶(diguanylate cyclase, DGC)合成, 由磷酸二酯酶(phosphodiesterase, PDE)降

解。DGC 催化两分子三磷酸鸟苷(guanosine triphosphate, GTP)成 c-di-GMP, 同时产生两分子的焦磷酸; 而 PDE 分解 c-di-GMP 中的磷酸二酯键, 产生 5'-O-磷酸基鸟苷酰-(3'-5')-鸟苷 [5'-O-phosphorylguanylyl-(3'-5')-guanosine, pGpG], 进而降解为一磷酸鸟苷(guanosine monophosphate, GMP)<sup>[2]</sup>。其中, DgcZ 是 c-di-GMP 合成酶(含有 GGDEF 结构域), 能够高效合成 c-di-GMP<sup>[3-4]</sup>; PdeK 可能为 c-di-GMP 降解酶, 同时含有 GGDEF 和 EAL 结构域。PdeK 是一种活性的 PDE, 其退化的 GGDEF 结构域不影响其活性

(至少在没有胞外质结构域的情况下), 该蛋白质的核心集合高度保守<sup>[5]</sup>。在 c-di-GMP 信号途径中, DGC 或 PDE 可感应来自细胞内外的环境信号, 影响 c-di-GMP 代谢酶活性, 进而影响胞内 c-di-GMP 水平。c-di-GMP 通过结合下游信号受体, 进而调节细菌的生理生化功能。目前已经鉴定的信号受体包括转录调控因子、核糖开关、蛋白激酶等<sup>[6]</sup>, 其中核糖开关调控下游基因是最直接的受体介导的调控方式。

核糖开关(riboswitch)是一类非编码 RNA, 作为 c-di-GMP 非蛋白类受体在细菌中普遍存在, 结合特定小分子时调节下游基因表达<sup>[7]</sup>。一个典型的核糖开关通常包含 2 个结构域, 一个是进化保守的适配体结构域, 用于结合目标代谢物; 另一个是表达平台, 通过配体依赖的构象转换来调节下游基因的表达<sup>[8]</sup>。当 c-di-GMP 水平较高时, 与核糖开关适配体结合引起下游的表达平台区发生构象变化, 进而实现对下游基因的调节<sup>[9]</sup>。迄今为止, 各种核糖开关已被鉴定为能感知多种配体, 包括阴离子、金属离子、氨基酸、糖类、辅酶、核苷酸及其衍生物(如 c-di-GMP)<sup>[10]</sup>。目前已经发现来自于霍乱弧菌(*Vibrio cholerae*)的 I 类 c-di-GMP 核糖开关(c-di-GMP-I)和来自艰难梭菌(*Clostridium difficile*)的 II 类 c-di-GMP 核糖开关(c-di-GMP-II)<sup>[11]</sup>。c-di-GMP-I 核糖开关分布广泛, 霍乱弧菌 N16961 株的 Vc2 核糖开关在高浓度 c-di-GMP 时呈现“开启”状态, 促进下游基因的表达<sup>[11]</sup>。

c-di-GMP 参与细菌多种生物学功能的调控, 准确检测和比较细菌胞内 c-di-GMP 水平十分重要。为了建立更有效的 c-di-GMP 水平检测方法, 本研究根据 c-di-GMP 对核糖开关受体的调控方式、荧光报告基因等设计引物, 通过重叠聚合酶链反应(overlap polymerase chain reaction, overlap PCR)和同源重组构成基于核糖

开关的双荧光素报告质粒 pAmCherry-Vc2EGFP (pACVcE), 然后构建 c-di-GMP 代谢基因过表达菌株和缺失菌株, 进而利用 pACVcE 检测大肠杆菌胞内 c-di-GMP 水平。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌株

本试验所用大肠杆菌(*Escherichia coli*) DH5 $\alpha$ 、BL21(DE3)感受态细胞购自天根生化科技(北京)有限公司; 质粒 pUC19、pET28a、pACYC184、pBBR1MCS2-Tac-mCherry、pEGFP-N1 和霍乱弧菌基因组由本实验室保存; 禽致病性大肠杆菌分离株 APCE50 由本实验室保存。

### 1.2 主要试剂及仪器

异丙基- $\beta$ -D-硫代半乳糖苷(isopropyl- $\beta$ -D-galactothioglycoside, IPTG)购自天根生化科技(北京)有限公司; 抗生素购自生工生物工程(上海)股份有限公司; 胶回收试剂盒购自赛默飞世尔科技(上海)有限公司; 2 $\times$ PrimerSTAR Mix、限制性内切酶购自 TaKaRa 公司; PCR 仪购自 ABI 公司; 荧光显微镜购自 Nikon 公司; 酶标仪购自 BioTeK 公司; 恒温摇床、恒温培养箱购自北京创新思成科技有限公司。

### 1.3 引物设计及合成

设计下列扩增引物(表1), 分别以pACYC184、pUC19、pBBR1MCS2-Tac-mCherry、pEGFP-N1 质粒和霍乱弧菌基因组为模板进行 PCR 扩增; 根据 APCE50 株 *dgcZ*、*pdeK* 基因序列设计引物, 扩增的 *dgcZ*、*pdeK* 基因用于原核表达载体构建。引物由上海睿勉生物科技有限公司合成。

### 1.4 双荧光素报告质粒 pACVcE 的构建

分别从 pACYC184、pUC19、pBBR1MCS2-Tac-mCherry、pEGFP-N1 和霍乱弧菌基因组中扩增 *Cm*、*p15Aori*、*Tet*、*P<sub>bla</sub>*、*mCherry*、T7 终止子、*EGFP* 和 *Vc2* 核糖开关基因片段, 反

表 1 本研究使用的引物  
Table 1 Primers used in this study

Primers	Sequences (5'→3')	Annealing temperature (°C)	Target gene	Product size (bp)
pACYC-Vc2 riboswitch-F	TAATACTCGCACTACATATGACCCTGCCCTGAACCGA CGAC	62	<i>Cm, p15Aori, Tet</i>	2 084
pACYC- <i>P<sub>bla</sub></i> -R	GTATTTAGAAAAATAAACAAATGCTGGAGATGGCGG ACGCGA			
<i>P<sub>bla</sub></i> -pACYC-F	GCCATCTCCAGCATTGTTTATTTTCTAAAT	56	<i>P<sub>bla</sub></i>	126
<i>P<sub>bla</sub></i> - <i>mCherry</i> -R	CTCCTCGCCCTTGCTCACCATACTCTTCCTTTTCAATA			
<i>mCherry</i> - <i>P<sub>bla</sub></i> -F	TATTGAAAAAGGAAGAGTATGGTGAGCAAGGGCGAG GAG	65	<i>mCherry, T7 terminator</i>	875
<i>mCherry</i> -EGFP-R	ACACCTCCCCCTGAACCTGGGATCCGATGTGTGACCGTG			
EGFP- <i>mCherry</i> -F	CACGGTCACACATCGGATCCAGGTTTCAGGGGGAGG TGT	65	EGFP	852
EGFP-Vc2 riboswitch-R	AATACTCCGAGACTAACAGCATGGTGAGCAAGGGCG AGG			
Vc2 riboswitch-EGFP-F	TCCTCGCCCTTGCTCACCATGCTGTTAGTCTCGGAGTATT	50	Vc2	320
Vc2 riboswitch-pACYC-R	CATATGTAGTGCGAGTATTAT			
<i>dgcZ</i> -F	CGCGGATCCATGATCAAGAAGACAACGG	45	<i>dgcZ</i>	891
<i>dgcZ</i> -R	CCCAAGCTTTTAAACTCGGTTAATCAC			
<i>pdeK</i> -F	CGCGGATCCTTGCGCGTAAGTCGCTCGTT	50	<i>pdeK</i>	1 989
<i>pdeK</i> -R	CCCAAGCTTCTACTTTTCTTCCAGGTAACCT			

应程序参考表 1 内容。通过 overlap PCR 连接, 再与同源重组酶连接, 构建成基于核糖开关的双荧光素报告质粒 pAmCherry-Vc2EGFP (pACVcE), 经 PCR 鉴定后送公司进行测序。

### 1.5 双荧光素报告质粒 pACVcE 的验证

用 pACVcE 质粒转化 BL21 感受态细胞, 然后在含氯霉素(chloramphenicol, Cm)的 LB 固体培养基上培养, 将质粒转化体接种至液体培养基并将其制备成感受态细胞。分别构建 pET28a-dgcZ 和 pET28a-pdeK 重组质粒, 电转化至大肠杆菌 BL21-pACVcE 感受态, 涂布 LB 含卡那霉素(kanamycin, Kan)和 Cm 固体培养基, 得到 pACVcE&pET28a-dgcZ、pACVcE&pET28a-pdeK 转化菌株。取诱导前后的上述菌液, 磷酸缓冲盐溶液(phosphate buffered saline, PBS)洗涤和重悬后作为检测样品。首先用荧光显微镜

观察表达 DgcZ 和 PdeK 细菌胞内的荧光颜色变化, 再用酶标仪检测细菌胞内的吸光值变化, 每个样品 3 个重复, 用增强绿色荧光蛋白 (enhanced green fluorescent protein, EGFP)/单体樱桃红荧光蛋白(monomeric cherry red fluorescent protein, mCherry)表示菌株胞内的 c-di-GMP 水平。

### 1.6 利用 pACVcE 检测大肠杆菌胞内 c-di-GMP 水平

通过 Red 同源重组构建 APCE50 菌株的 c-di-GMP 代谢基因 *pdeK* 缺失株, 然后分别制备野生株和  $\Delta pdeK$  缺失株感受态细胞, 用 pACVcE 电转化后涂布于 LB (含 Cm) 固体培养基, 培养后挑取单菌落接种液体培养基。取培养至对数生长期的上述菌液, PBS 洗涤和重悬后作为检测样品, 分别用荧光显微镜和酶标仪对 APCE50 和  $\Delta pdeK$  菌株的 c-di-GMP 水平进行测定。

## 2 结果与分析

### 2.1 双荧光素报告质粒的构建策略

利用 overlap PCR 构建双荧光素报告质粒的策略如图 1 所示, 其中报告基因 *mCherry* (红色荧光蛋白基因) 用于测定报告质粒本底表达量, 核糖体开关的适配体结构域特异结合的细胞内 c-di-GMP 调控报告基因 *EGFP* (绿色荧光蛋白基因) 表达, 高水平 c-di-GMP 时 *EGFP* 表达量上升, 低水平 c-di-GMP 时 *EGFP* 表达量下降。

### 2.2 目的基因扩增与重组质粒构建

分别从 pACYC184、pUC19、pBBR1MCS2-Tac-*mCherry*、pEGFP-N1 和霍乱弧菌基因组扩增得 *Cm*, *p15Aori*, *Tet* (3 468 bp)、*P<sub>bla</sub>* (126 bp)、*mCherry*, T7 terminator (875 bp)、*EGFP* (852 bp)

和 *Vc2* riboswitch (320 bp) 基因片段, 扩增产物大小均与预期一致。通过 overlap PCR 和同源重组酶连接获得 pACVcE 质粒, 用 pACYC-*Vc2* riboswitch-F 和 pACYC-*P<sub>bla</sub>*-R 引物扩增目的片段为预期的 4 257 bp, 经测序证明 pACVcE 构建正确(图 2)。

### 2.3 利用 pACVcE 检测 *DgcZ* 表达细胞内的 c-di-GMP 水平

荧光显微镜观察显示, 0.5 mmol/L IPTG 诱导后的 pACVcE 和 pET28a-*dgcZ* 共转化 BL21 菌株内的绿色荧光强度高于未诱导的菌株(图 3A); 酶标仪检测结果显示, 诱导后 pACVcE 和 pET28a-*dgcZ* 转化菌株的相对 c-di-GMP 水平是未诱导菌株的 1.59 倍( $P < 0.001$ , 图 3B)。这些结果表明 c-di-GMP 合成酶 *DgcZ* 表达细胞内的 c-di-GMP 水平升高。

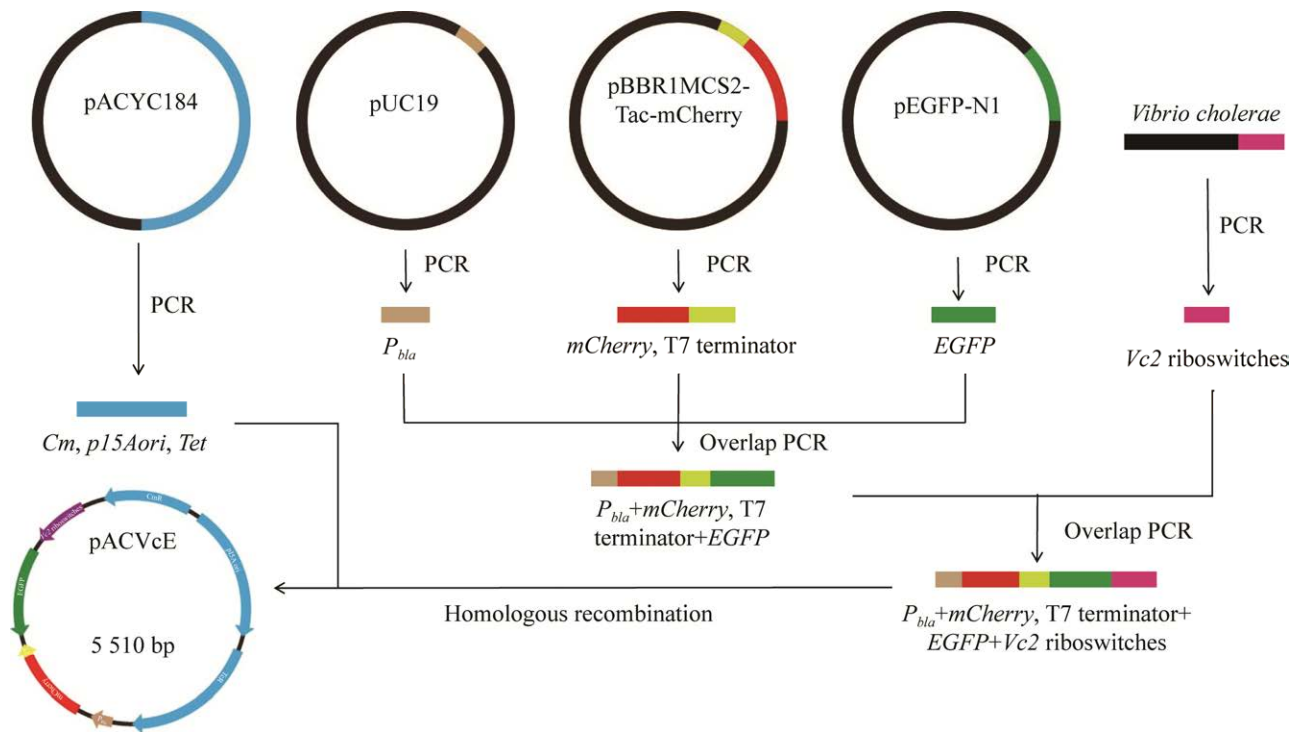


图 1 pACVcE 的构建策略

Figure 1 The strategy for construction of pACVcE.

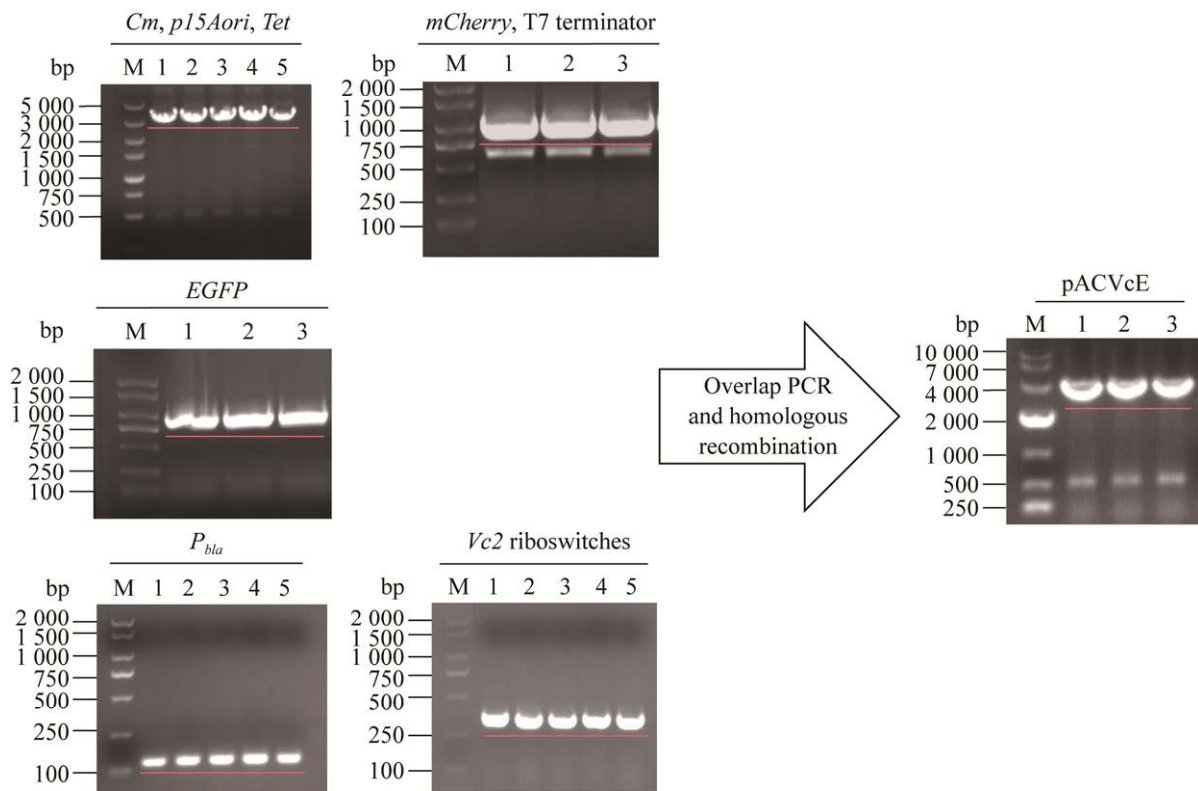


图 2 目的基因扩增和重组质粒构建

Figure 2 Amplification of target genes for vector construction. M: DNA marker; 1–5: Amplified target gene bands.

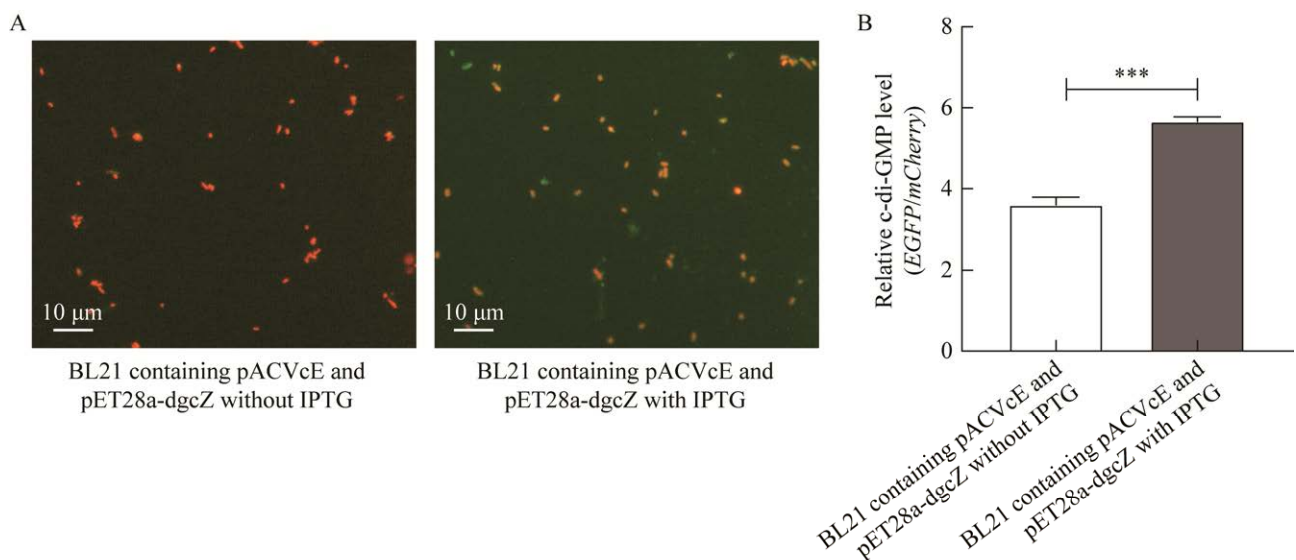


图 3 DgcZ 表达菌株内的 c-di-GMP 水平变化

Figure 3 Changes of intracellular c-di-GMP levels after DgcZ expression. A: Fluorescence microscopy. B: Determination by microplate reader. \*\*\*:  $P < 0.001$ .

## 2.4 利用 pACVcE 检测 PdeK 表达细胞内的 c-di-GMP 水平

荧光显微镜观察显示, 经 0.5 mmol/L IPTG 诱导后, pACVcE 和 pET28a-pdeK 共转化 BL21 菌株的绿色荧光强度低于未诱导的菌株(图 4A); 酶标仪检测结果显示, 未诱导 pACVcE 和 pET28a-pdeK 转化菌株的相对 c-di-GMP 水平是诱导菌株的 3.15 倍( $P < 0.0001$ ) (图 4B), 以上结

果表明 c-di-GMP 降解酶 PdeK 表达可导致 c-di-GMP 水平降低。

## 2.5 双荧光素报告质粒检测 c-di-GMP 水平中的应用

荧光显微镜观察结果显示, 缺失株  $\Delta pdeK$  的绿色荧光强度高于野生株 APCE50 (图 5A); 酶标仪检测结果显示, 缺失株的相对 c-di-GMP 水平是野生株的 1.91 倍( $P < 0.001$ ) (图 5B), 与预

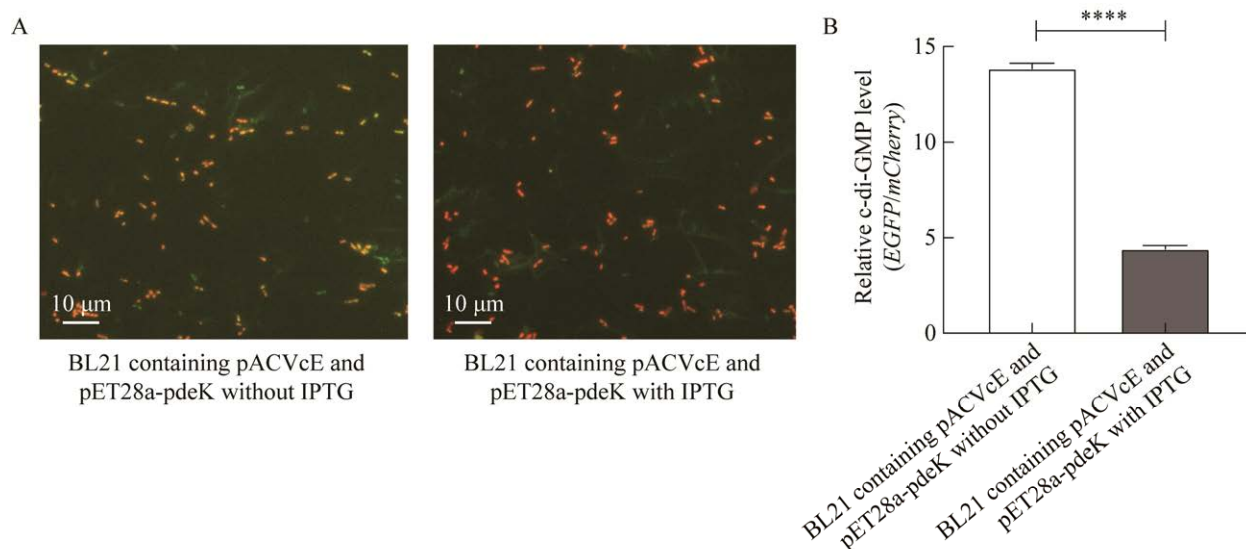


图 4 PdeK 表达菌株内的 c-di-GMP 水平检测

Figure 4 Changes of intracellular c-di-GMP levels after PdeK expression. A: Observation by fluorescence microscopy. B: Determination by microplate reader. \*\*\*\*:  $P < 0.0001$ .

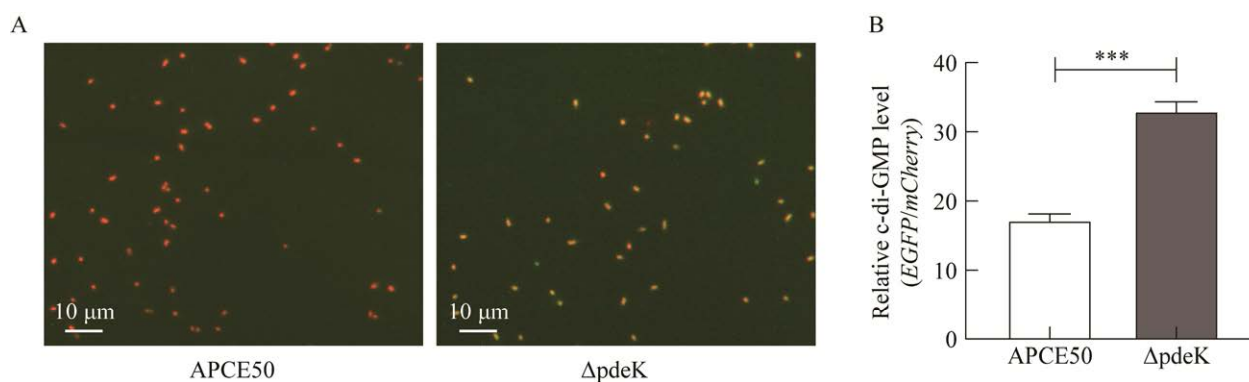


图 5 APCE50 和 *pdeK* 基因缺失菌株的 c-di-GMP 水平测定

Figure 5 Detection of c-di-GMP levels in APCE50 and its *pdeK* gene mutant strains. A: Observation by fluorescence microscopy. B: Determination by microplate reader. \*\*\*:  $P < 0.001$ .

期结果一致, 表明 *pdeK* 基因缺失的 APCE50 菌株胞内 c-di-GMP 水平显著升高, PdeK 具有降解酶的作用。

### 3 讨论与结论

c-di-GMP 是细菌普遍存在的第二信使分子, 参与细菌多种生理活性和生物被膜形成的调控, 能促进生物被膜中粘附素和胞外多糖基质的生物合成, 并能抑制细菌运动。此外, c-di-GMP 还参与动植物病原体的毒力调控, 不同 c-di-GMP 水平对霍乱弧菌毒力的影响不同, 低 c-di-GMP 水平可促进霍乱毒素的表达, 而 c-di-GMP 水平升高可减弱霍乱弧菌对幼鼠模型的毒性<sup>[12]</sup>。c-di-GMP 信号受体类型多样, 接收信号后可以在转录、翻译以及翻译后水平调控下游靶基因表达, 从而影响细菌的毒性、运动性、生物被膜形成等生理生化过程, 其中, 核糖开关是一种特殊的 RNA 类受体。

在核糖开关介导的受体调控中, c-di-GMP 核糖开关的下游调控基因种类繁多, 李新风等发现 c-di-GMP 可直接通过核糖开关调控细菌间的信息交流、运动、趋化等相关过程, 运动性和趋化性等相关过程也会影响细菌的胞外基质合成、生物被膜形成和致病力<sup>[11]</sup>。c-di-GMP-I 核糖开关通过其适配体中 5 个特定碱基的氢键或碱基堆叠与 c-di-GMP 的 2 个鸟苷结合, 从而导致与 c-di-GMP 功能相关的下游基因的转录变化<sup>[13]</sup>。Smith 等<sup>[14]</sup>对来自霍乱弧菌的核糖开关 Vc2 进行了晶体结构解析, 晶体结构清晰地展示了核糖开关 Vc2 的 2 个发夹结构 P2 和 P3 之间的相互联系以及 c-di-GMP 与 Vc2 之间的相互作用。本研究构建的基于核糖开关的双荧光素报告质粒能够根据 c-di-GMP 对 Vc2 核糖开关的调控来响应第二信使 c-di-GMP 浓度的变化。

目前检测 c-di-GMP 的常用方法是高效液相色谱, 需要预先提取菌液的 c-di-GMP, 然后检测 c-di-GMP 水平<sup>[15]</sup>, 存在抽提过程复杂、使用有毒化学试剂、分析成本高等缺点。使用单报告基因质粒检测 c-di-GMP 水平省时省力, 但检测 c-di-GMP 水平的误差较大<sup>[16]</sup>。用双报告基因检测细菌胞内 c-di-GMP 含量时, 由于 mCherry 与 EGFP 比值过小, 不能很好显示 c-di-GMP 水平的变化<sup>[9]</sup>。在此基础上, 本研究基于 Vc2 核糖开关和荧光素报告基因构建了用于检测 c-di-GMP 水平的双荧光素报告质粒, 2 个报告基因分别受启动子和核糖开关控制, mCherry 用于测定质粒本底表达量, 核糖开关的适配体结构域特异性结合细胞内的 c-di-GMP 可调控报告基因 EGFP 表达, 高水平 c-di-GMP 上调 EGFP 表达, 而低水平 c-di-GMP 可下调 EGFP 表达。本研究构建的报告质粒能对细菌中的 c-di-GMP 水平进行快速检测, 降低质粒拷贝数及表达异质性可影响检测结果。通过质粒表达 c-di-GMP 合成酶 DgcZ 后, 大肠杆菌内的 c-di-GMP 水平显著升高, 而表达 c-di-GMP 降解酶 PdeK 后的 c-di-GMP 水平显著降低, 结果验证了 pACVcE 检测细菌内 c-di-GMP 水平的可靠性。大肠杆菌病是家禽的主要病原菌<sup>[16]</sup>, c-di-GMP 在其致病过程中发挥重要作用<sup>[17]</sup>。将 pACVcE 用于禽致病性大肠杆菌内 c-di-GMP 水平检测, 结果表明缺失 *pdeK* 基因后的禽致病性大肠杆菌 APCE50 菌株的 c-di-GMP 水平含量显著上升, 进一步验证 PdeK 为 c-di-GMP 降解酶, 也为研究 c-di-GMP 水平影响细菌表型打下基础。

总之, 本研究构建了基于核糖开关的双荧光素报告质粒 pACVcE, 验证了 pACVcE 实际应用的可靠性, 为大肠杆菌内 c-di-GMP 水平检测提供了快速检测方法。



## 参考文献

- [1] BAEK J, YOON H. Cyclic di-GMP modulates a metabolic flux for carbon utilization in *Salmonella enterica* serovar typhimurium[J]. *Microbiology Spectrum*, 2023, 11(2): e0368522.
- [2] JENAL U, REINDERS A, LORI C. Cyclic di-GMP: second messenger extraordinaire[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2017, 15(5): 271-284.
- [3] LACANNA E, BIGOSCH C, KAEVER V, BOEHM A, BECKER A. Evidence for *Escherichia coli* diguanylate cyclase DgcZ interlinking surface sensing and adhesion via multiple regulatory routes[J]. *Journal of Bacteriology*, 2016, 198(18): 2524-2535.
- [4] ZÄHRINGER F, MASSA C, SCHIRMER T. Efficient enzymatic production of the bacterial second messenger c-di-GMP by the diguanylate cyclase YdeH from *E. coli*[J]. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2011, 163(1): 71-79.
- [5] RICHTER AM, POSSLING A, MALYSHEVA N, YOUSEF KP, HERBST S, von KLEIST M, HENGGE R. Local c-di-GMP signaling in the control of synthesis of the *E. coli* biofilm exopolysaccharide pEtN-cellulose[J]. *Journal of Molecular Biology*, 2020, 432(16): 4576-4595.
- [6] RÖMLING U, GALPERIN MY, GOMELSKY M. Cyclic di-GMP: the first 25 years of a universal bacterial second messenger[J]. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2013, 77(1): 1-52.
- [7] SERGANOV A, NUDLER E. A decade of riboswitches[J]. *Cell*, 2013, 152(1/2): 17-24.
- [8] BARRICK JE, BREAKER RR. The distributions, mechanisms, and structures of metabolite-binding riboswitches[J]. *Genome Biology*, 2007, 8(11): R239.
- [9] ZHOU H, ZHENG C, SU JM, CHEN B, FU Y, XIE YQ, TANG Q, CHOU SH, HE J. Characterization of a natural triple-tandem c-di-GMP riboswitch and application of the riboswitch-based dual-fluorescence reporter[J]. *Scientific Reports*, 2016, 6: 20871.
- [10] BREAKER RR. Prospects for riboswitch discovery and analysis[J]. *Molecular Cell*, 2011, 43(6): 867-879.
- [11] 李新风, 陈芳, 肖金凤, 何进. 环二鸟苷单磷酸核糖开关的结构与功能[J]. *生物工程学报*, 2017, 33(9): 1357-1368.
- [12] LI XF, CHEN F, XIAO JF, HE J. Structure and function of c-di-GMP riboswitches[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2017, 33(9): 1357-1368 (in Chinese).
- [13] TISCHLER AD, CAMILLI A. Cyclic diguanylate regulates *Vibrio cholerae* virulence gene expression[J]. *Infection and Immunity*, 2005, 73(9): 5873-5882.
- [14] SUDARSAN N, LEE ER, WEINBERG Z, MOY RH, KIM JN, LINK KH, BREAKER RR. Riboswitches in eubacteria sense the second messenger cyclic di-GMP[J]. *Science*, 2008, 321(5887): 411-413.
- [15] SMITH KD, LIPCHOCK SV, AMES TD, WANG JM, BREAKER RR, STROBEL SA. Structural basis of ligand binding by a c-di-GMP riboswitch[J]. *Nature Structural & Molecular Biology*, 2009, 16(12): 1218-1223.
- [16] BENSE S, WITTE J, PREUßE M, KOSKA M, PEZOLDT L, DRÖGE A, HARTMANN O, MÜSKEN M, SCHULZE J, FIEBIG T, BÄHRE H, FELGNER S, PICH A, HÄUSSLER S. *Pseudomonas aeruginosa* post-translational responses to elevated c-di-GMP levels[J]. *Molecular Microbiology*, 2022, 117(5): 1213-1226.
- [17] CHRISTENSEN H, BACHMEIER J, BISGAARD M. New strategies to prevent and control avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC)[J]. *Avian Pathology*, 2021, 50(5): 370-381.
- [18] KATHAYAT D, LOKESH D, RANJIT S, RAJASHEKARA G. Avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC): an overview of virulence and pathogenesis factors, zoonotic potential, and control strategies[J]. *Pathogens (Basel, Switzerland)*, 2021, 10(4): 467.