



大肠杆菌 CusS 的生物信息学分析及对银离子胁迫的响应

安皓月^{1,2,3#}, 谭超^{4#}, 沈舒楚^{1,2,3}, 伍中宝^{1,2,3}, 吴钰煌^{1,2,3}, 邓凯红^{1,2,3}, 邹黎黎^{1,2,3}, 王君^{4*}

1 三峡大学 肿瘤微环境与免疫治疗湖北省重点实验室, 湖北 宜昌 443002

2 三峡大学感染与炎症损伤研究所, 湖北 宜昌 443002

3 三峡大学基础医学院, 湖北 宜昌 443002

4 三峡大学第一临床医学院, 湖北 宜昌 443002

安皓月, 谭超, 沈舒楚, 伍中宝, 吴钰煌, 邓凯红, 邹黎黎, 王君. 大肠杆菌 CusS 的生物信息学分析及对银离子胁迫的响应[J]. 微生物学报, 2024, 64(4): 1187-1202.

AN Haoyue, TAN Chao, SHEN Shuchu, WU Zhongbao, WU Yuhuang, DENG Kaihong, ZOU Lili, WANG Jun. Bioinformatics of CusS in *Escherichia coli* in response to silver ion stress[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2024, 64(4): 1187-1202.

摘要: 【目的】解析大肠杆菌(*Escherichia coli*) K-12 菌株同型二聚体内膜传感器组氨酸激酶(sensor histidine kinase, CusS)蛋白在细菌应答金属银离子胁迫中的调控机制,为该菌的防治提供重要科学依据。【方法】利用 ProtParam、ProtScale、Protein-Sol、TMHMM、SignalP、LocTree3、NetNGlyc-1.0、NetPhosBac-3.0、SOPMA、I-TASSERF、STRING 和 MEGA 分别预测 CusS 的理化性质、亲水性、可溶性、跨膜域、信号肽、亚细胞定位、糖基化位点、磷酸化位点、二级结构、三级结构、蛋白互作的关系网络和蛋白在革兰阴性杆菌中的同源性。采用 Red 同源重组技术构建大肠杆菌 $\Delta cusS$, 在不同培养基中连续监测 $\Delta cusS$ 的生长情况,观察该基因缺失后的细菌生长活性;通过最小抑菌浓度(minimal inhibitory concentration, MIC)试验评价该缺失株对金属铜、银离子和临床常见抗生素的敏感性变化;运用 RT-qPCR 检测 *cusS* 缺失后其下游基因 *cusCFBA* 和 *cusR* 转录水平。【结果】CusS 蛋白由 480 个氨基酸组成,相对分子质量为 53 738.05,原子总数为 7 624,等电点为 6.02,具有稳定性,是一种亲水性、不溶性蛋白;含有跨膜域;不存在信号肽,定位于细胞内膜中;存在 2 个糖基化位点、24 个丝氨酸磷酸化位点、14 个苏氨酸磷酸化位点和 3 个酪

资助项目: 湖北省自然科学基金(2022CFB544)

This work was supported by the Natural Science Foundation of Hubei Province (2022CFB544).

#These authors contributed equally to this work.

*Corresponding author. Tel: +86-717-6397438, E-mail: wangjfox@ctgu.edu.cn

Received: 2023-11-02; Accepted: 2024-02-01; Published online: 2024-02-05

氨酸磷酸化位点; 二级结构中 α -螺旋占比 55.42%, β -折叠占比 11.67%, β -转角占比 3.75%, 无规则卷曲占比 29.17%; *cusS* 在埃希菌属和志贺菌属中的保守性高; 菌落 PCR 和一代测序验证 $\Delta cusS$ 构建成功; 连续检测生长曲线表明 *cusS* 缺失并不影响细菌的生长代谢, 但 CusS 蛋白为大肠杆菌抵御金属银胁迫的关键基因。【结论】*cusS* 作为一个关键基因, 它的缺失并不影响大肠杆菌的生长活性, 但会显著降低细菌抵御银离子胁迫的应答能力。缺失 *cusS* 将使下游基因 *cusCFBA* 和 *cusR* 的 mRNA 表达水平显著下降。对 CusS 蛋白进行生物信息学分析及表型初探, 为深入了解 CusS 在大肠杆菌应答银离子胁迫的调控机制奠定了基础。

关键词: 大肠杆菌; Red 同源重组技术; 银离子; 金属外排系统; 传感器组氨酸激酶(CusS); 生物信息学分析

Bioinformatics of CusS in *Escherichia coli* in response to silver ion stress

AN Haoyue^{1,2,3#}, TAN Chao^{4#}, SHEN Shuchu^{1,2,3}, WU Zhongbao^{1,2,3}, WU Yuhuang^{1,2,3}, DENG Kaihong^{1,2,3}, ZOU Lili^{1,2,3}, WANG Jun^{4*}

1 Hubei Key Laboratory of Tumor Microenvironment and Immunotherapy, China Three Gorges University, Yichang 443002, Hubei, China

2 Institute of Infection and Inflammation, China Three Gorges University, Yichang 443002, Hubei, China

3 College of Basic Medical Sciences, China Three Gorges University, Yichang 443002, Hubei, China

4 The First College of Clinical Medical Science, China Three Gorges University, Yichang 443002, Hubei, China

Abstract: [Objective] To decipher the regulatory mechanism of a sensor histidine kinase (CusS) in *Escherichia coli* K-12 in response to silver ion stress and provide scientific evidence for the prevention and treatment of this bacterium. **[Methods]** ProtParam, ProtScale, Protein-Sol, TMHMM, SignalP, LocTree3, NetNGlyc-1.0, NetPhosBac-3.0, SOPMA, I-TASSERF, STRING, and MEGA were employed to predict the physicochemical properties, hydrophilicity, solubility, transmembrane domain, signal peptides, subcellular localization, glycosylation sites, phosphorylation sites, secondary structure, tertiary structure, protein-protein interaction network of CusS, and the homology of CusS in Gram-negative bacilli, respectively. After that, $\Delta cusS$ was constructed by the Red homologous recombination system, and the growth of $\Delta cusS$ in different media was monitored. In addition, we evaluated the sensitivity of $\Delta cusS$ to silver and copper ions and common antibiotics based on the minimum inhibitory concentration (MIC). RT-qPCR was employed to determine the transcription levels of *cusCFBA* and *cusR* after *cusS* deletion. **[Results]** CusS was composed of 480 amino acid residues, with the relative molecular weight of 53 738.05, the atom number of 7 624, and the isoelectric point of 6.02. It was a hydrophilic and insoluble protein containing transmembrane domain, and no signal peptide, located in the intracellular membrane. CusS had 2 glycosylation sites, 24 serine phosphorylation sites, 14 threonine phosphorylation sites, and 3 tyrosine phosphorylation sites. In the secondary structure, α -helixes, β -sheets, β -turns, and

random coils accounted for 55.42%, 11.67%, 3.75%, and 29.17%, respectively. The gene *cusS* was highly conserved in *Escherichia* and *Shigella*. The colony PCR and first-generation sequencing confirmed the successful construction of $\Delta cusS$. The deletion of *cusS* had no influence on the growth or metabolism of the strain. However, *cusS* was the key gene for *E. coli* in response to the silver ion stress. **[Conclusion]** The deletion of *cusS* did not affect the growth but attenuated the protective response of *E. coli* to silver ion stress. Furthermore, the deletion of *cusS* significantly down-regulated the mRNA levels of the downstream genes *cusCFBA* and *cusR*. The bioinformatics analysis and phenotype characterization of CusS lays a foundation for unveiling the regulatory mechanism of CusS in *E. coli* in response to silver ion stress.

Keywords: *Escherichia coli*; Red homologous recombination technology; silver ions; metal efflux system; sensor histidine kinase (CusS); bioinformatics analysis

银是一种古老的抗菌物质, 常被应用于烫伤患者的细菌感染^[1]、糖尿病引起的伤口溃疡^[2]、牙科治疗^[3]等相关医疗活动中。此外, 银离子还被广泛运用于制作包括外科手术敷料在内的各种医用材料^[4-5]。一方面, 银离子可通过抑制呼吸链^[6], 干扰细胞膜功能^[7], 诱导细菌凋亡样反应^[8], 产生活性氧和自由基诱导细胞毒性和氧化应激^[9]等发挥抗菌活性。另一方面, 细菌也进化出内源性和外源性两种途径来抵御银离子的重金属毒性。内源性途径主要依赖于膜结合、细胞壁结构破坏和外排泵^[10]; 外源性途径则包括外排泵蛋白和质粒等载体蛋白^[11]。值得注意的是, 无论是内源性还是外源性机制, 都主要涉及由一个转运蛋白、一个膜融合蛋白和一个外膜因子组成的细菌耐药结节细胞分化家族(resistance-nodulation-cell division, RND)外排泵^[12], 将各种有毒底物排出至细胞外环境。其中, 在大肠杆菌中主要是通过内源性途径实现对银胁迫的抵御效应。

Randall等^[10]和Li等^[13]在大肠杆菌中发现了内源性抗银的机制, 该机制与 Cus 外排系统和主要外膜蛋白(outer membrane protein, OMPs)的缺失(如 OmpF 或 OmpC)有关。染色体编码的 Cus 系统由 2 个背靠背的操纵子组成, 分别是调

节操纵子 *cusRS* 和结构操纵子 *cusCFBA*, 在阅读框的顺序分别是 *cusS*、*cusR*、*cusC*、*cusF*、*cusB* 和 *cusA* (其功能见表 1 和图 1)。CusCFBA 是一个独立的系统, 由镶嵌在膜上的三元蛋白质复合体 CusCBA 和周质中金属伴侣 CusF 组成^[20]。其中 CusCBA 复合体包括转运蛋白 CusA、周质蛋白 CusB 和外膜蛋白 CusC^[21], 是目前已知的重金属特有的 RND 型外排转运体^[22], 对 Ag^+/Cu^+ 均具有高度特异性。CusRS 双组分系统是 CusCFBA 转运体正调节器, 对 *cusCFBA* 外排泵编码基因的诱导至关重要。当 Ag^+/Cu^+ 在周质中升高时, 大肠杆菌为了适应这种环境, 则会通过双组分系统 CusRS 上调 *cusCFBA* 基因的表达^[23], 将离子排出体外, 维持机体内金属离子的稳态。CusS 是同型二聚体内膜传感器组氨酸激酶, 由周质传感器结构域、 α 螺旋跨膜结构域和胞质激酶结构域组成, 能够与周质中的 Ag^+/Cu^+ 结合, 并将信号传导至其胞质激酶结构域^[24]。CusR 是同源的胞质反应调节因子^[25], 是一种磷酸化反应调节器, CusR 可被 CusS 以外的其他激酶传感器磷酸化^[26-27], 磷酸化的 CusR 介导外排蛋白 CusCBA 的转录^[28]。此外, CusR 还具有与 CusS 相互作用的 N 端结构域和与 DNA 结合的

C 端结构域，从 CusS 向 CusR 的信号转导涉及以下分子活动：首先，CusS 的周质传感器域与底物(Cu^+/Ag^+)结合，随后周质结构域二聚体化，变构信号通过跨膜结构域传递至胞质激酶结构域进行 ATP 水解，在 His (H271) 残基处发生顺式自磷酸化，活化的 CusS 将磷酸基转移到 CusR 的 Asp (D51) 残基上，然后与 DNA 结合以激活 CusRS 和 *cusCFBA* 基因的转录^[23,25,29-30]。

1 材料与方 法

1.1 材料

1.1.1 菌种和质粒

大肠杆菌(*Escherichia coli*) K-12 由三峡大学医学院感染与炎症研究损伤实验室保存, 并进行全基因组测序。pKD4(Kan^r)、pKD46(Amp^r) 均由三峡大学医学院感染与炎症研究损伤实验室保存。

表 1 Cus 系统蛋白在抵御银离子胁迫中的作用

Table 1 Role of Cus system proteins in silver ions resistance

Protein	Explanation	Reference
CusA	Actively absorbs metal ions from cytoplasm and periplasm, relying on methionine residues to bind and export silver ions	[14]
CusB	CusA and CusC are connected to participate in the efflux of silver ions	[15]
CusC	Expel the silver ions from the body	[16]
CusF	It can bind to silver ions in periplasm and transport to CusB	[17]
CusR	Phosphorylated CusR mediates transcription of the efflux protein CusCBA	[18]
CusS	It binds to silver ions in the periplasm and transmits signals to its cytoplasmic kinase domain	[19]

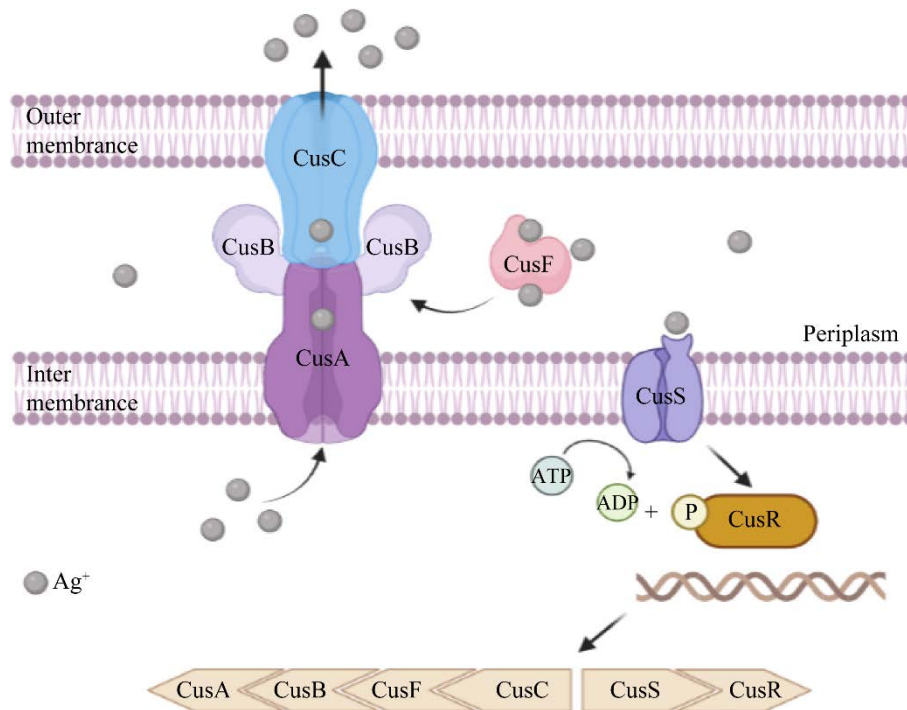


图 1 Cus 抵御银胁迫作用机制示意图

Figure 1 The illustration for the mechanisms of action of Cus against silver treatment.

1.1.2 主要试剂和仪器

AgNO₃, Sigma-Aldrich 公司; 甘油, 武汉赛维尔生物科技有限公司; 氨苄青霉素钠、硫酸卡那霉素、环丙沙星(ciprofloxacin, CIP)、左氧氟沙星(levofloxacin, OFL)、牛脑心浸液肉汤(beef brain heart infusion broth, BHI)、SOC 培养基、胰酪大豆胨液体培养基 TSB, 生工生物工程(上海)股份有限公司; 美罗培南(meropenem, MEM)、四环素(tetracycline, TET), MCE 公司; 蛋白胨、酵母提取物, OXOID 公司; 阿拉伯糖, 上阿拉丁生化科技股份有限公司; 琼脂糖, 上海贝晶生物技术有限公司; 核酸染料, 武汉科瑞生物技术有限公司; TaKaRa Ex Taq DNA Polymerase、PrimeScript™ RT Master Mix, TaKaRa 公司; TRIzol™ Reagent, ThermoFisher Scientific 公司; 胶回收纯化, 南京诺唯赞生物科技股份有限公司; 质粒小提试剂盒, 天根生物科技(北京)有限公司; 氯仿、异丙醇、无水乙醇, 西陇化工股份有限公司。电转仪器, Bio-Rad 公司; 全波长酶标仪, Thermo Scientific Multiskan Spectrum 公司; 台式高速离心机, Eppendorf 公司; PCR, ABI 公司。

1.2 生物信息学研究

利用 ProtParam 软件在线预测 CusS 的分子量、等电点、疏水性、脂溶性系数、消光系数和吸光度等基本理化性质; 利用 ProtScale 软件在线预测 CusS 的亲水性; 使用 Protein-Sol 软件在线预测 CusS 的可溶性; 利用 TMHMM 软件预测 CusS 是否存在跨膜域; 利用 SignalP 软件预测 CusS 是否存在信号肽; 利用 LocTree3 软件预测 CusS 的亚细胞定位; 使用 NetNGlyc-1.0 软件在线预测 CusS 的糖基化位点; 利用 NetPhosBac-3.0 在线预测 CusS 的磷酸化位点; 利用 SOPMA 软件在线预测 CusS 的二级结构; 使用 RCSC PDB 软件构建 CusS 的三级结构模

型; 利用 STRING 数据库对 CusS 蛋白的调控作用关系网络进行分析。

1.3 *cusS* 缺失株构建

1.3.1 引物设计

根据 NCBI 数据库中大肠杆菌 K-12 的全基因组序列和 pKD4 序列, 用 Red 同源重组方法构建大肠杆菌 *cusS* 缺失株^[31]。H1P1 和 H2P2 引物由两部分组成, 分别是 *cusS* 基因两端的同源臂序列和卡那霉素基因两端的序列。鉴定引物选取以 *cusS* 的上游基因为一部分, pKD4 卡那抗性区域为另一部分, 分别是 C1 和 C2。引物序列如表 2 所示。

1.3.2 质粒提取以及目的片段获得

将 pKD4 和 pKD46 培养 12 h, 按照质粒小提试剂盒说明书提取, 以 pKD4 为模板, 采用 TaKaRa Ex Taq DNA Polymerase 试剂盒, 用引物 H1P1 和 H2P2 进行 PCR 扩增。PCR 反应体系 (25 μL): TaKaRa Ex Taq (5 U/μL) 0.25 μL, Buffer (20 mmol/L) 2.5 μL, dNTP Mixture (2.5 mmol/L) 2 μL, 模板 (500 ng) 1 μL, 上、下游引物 (1 μmol/L) 各 1 μL, 灭菌水 17.25 μL。PCR 反应条件: 98 °C 10 s; 60 °C 30 s, 72 °C 1 min, 30 个循环。产物经琼脂糖凝胶电泳检测后, 回收目的条带按照南京诺唯赞生物科技股份有限公司胶回收纯化试剂盒说明书进行纯化, 纯化后的产物用分光光度计检测浓度。

1.3.3 电转感受态制备

首先制备大肠杆菌的感受态。按照 1:100 转接至 200 mL LB 中, 培养 OD₆₀₀ 至 0.5–0.7 之间, 4 °C、5 500 r/min 离心 5 min, 除去上清, 使用预冷的丙三醇(10%)重悬菌体, 混匀, 4 °C、5 500 r/min 离心 5 min 除去上清, 重复 3 次, 最后使用 1 mL 预冷的丙三醇(10%)重悬菌体, 以每管 100 μL 分装至无菌的 EP 管中, 并保存于 -80 °C 冰箱。

1.3.4 诱导同源重组酶的表达

取 3 μL 提取好的质粒 pKD46 加入即将融化的野生型大肠杆菌的感受态中，混合均匀，转移至预冷的电击杯，冰上放置 3 min。电转，转移感受态至 1 mL SOC 培养基中，在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、220 r/min 复苏 2 h。取 100 μL 涂布至含氨苄抗性的 LB 固体培养基上，培养 12 h，菌落 PCR 鉴定方法鉴定在氨苄抗性固体培养基生长的单克隆菌落。选取阳性菌落按照 1:100 转接至 200 mL 含有氨苄抗性的液体培养基中，培养 OD_{600} 至 0.2–0.3，加入 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的阿拉伯糖诱导至 OD_{600} 为 0.6 左右，该过程是诱导重组酶的表达。接着按照 1.3.3 步骤制备含有

pKD46 的感受态细胞。

1.3.5 同源重组以及阳性克隆鉴定

取 2 μL 纯化后的含有同源臂的抗性产物加入含有 pKD46 质粒的野生型感受态中，轻柔混匀，冰上静置 5 min，使用 Bio-Rad 电转仪进行电转，在 30 $^{\circ}\text{C}$ 、220 r/min 条件下复苏 2 h，取 100 μL 涂布至含卡那霉素抗性的固体培养基上，培养过夜。在生物安全柜挑取阳性克隆并用引物 C1 和 C2 进行菌落验证，将与预期大小相同的 PCR 扩增片段送至生工生物工程(上海)股份有限公司进行一代测序。将测序正确的对应缺失株过夜培养，并对缺失株进行菌种保存。

表 2 实验所用引物

Table 2 Primers used in the experiments

Primer name	Primer sequence (5'→3')	Sequence (bp)	Purpose
H1P1	<u>CCGAAGCTAATTCAGACCGTGCGCGGCGTGGGTTACAT</u> <u>GCTTGAGGTGCCGGTTGAGCGATTGTGTAGGCTGG</u>	73	Confirmatory deletion
H2P2	<u>GTGACAGCTTTTTACCATTAATAGGTATGACTATTGCGGC</u> <u>ACGTTATTTTTACACTTAACGGCTGACATGGGAA</u>	74	Confirmatory deletion
C1	ATGACCGCTAACGTTATCGCGA	22	Validation of deletion strain
C2	ACCGCTATCAGGACATAGCGTT	22	Validation of deletion strain
rrsA-F	CTCTTGCCATCGGATGTGCCCA	22	Internal reference
rrsA-R	CCAGTGTGGCTGGTCATCCTCTCA	24	Internal reference
cusC-F	CAGTTCTCACTCAGCCAGAACG	22	qPCR
cusC-R	ATGCGCAAATCCCGATTATTAC	23	qPCR
cusF-F	GCAAGTCGCAATGTTTCAGTCT	21	qPCR
cusF-R	ATACCCTTTACCACGCCAGTG	21	qPCR
cusB-F	GATCTGGTGCCGAAATATGCCG	22	qPCR
cusB-R	CTGACATTCGCCGGGAAACT	20	qPCR
cusA-F	GCATAAACGGCTGGAAGAGTGG	22	qPCR
cusA-R	CGACAACGTGATAATCAGCAGACT	24	qPCR
cusR-F	GGTTGCCGATTTGATGGTCGA	21	qPCR
cusR-R	CCTGATGGCGAAGGAAGAACT	21	qPCR

H1P1 和 H2P2 分别是构建 $\Delta cusS$ 的同源臂上、下游引物；C1 和 C2 是用来验证 *cusS* 成功敲出的上、下游引物，C1 位于 *cusS* 上游基因，C2 位于 Kana 基因；*rrsA*-F/R 是内参；*cusC*-F/R、*cusF*-F/R、*cusB*-F/R、*cusA*-F/R 和 *cusR*-F/R 是 qPCR 引物。下划线表示同源臂序列

H1P1 and H2P2 were the upstream and downstream primers of the homologous arm for the construction of $\Delta cusS$, respectively. C1 and C2 were the upstream and downstream primers to verify the successful knock-in of *cusS*. *rrsA*-F/R is the internal control, *cusC*-F/R, *cusF*-F/R, *cusB*-F/R, *cusA*-F/R, and *cusR*-F/R are qPCR primers. The underlined bases are homologous arm sequences.

1.3.6 $\Delta cusS$ 的鉴定

在卡那霉素培养基上挑取阳性克隆, 菌落 PCR 鉴定后, 将与预期大小相同的 PCR 扩增片段送至生工生物工程(上海)股份有限公司进行一代测序验证。将测序正确的菌株接种含有卡那霉素抗性的液体培养基中培养并进行菌种保存。

1.4 $\Delta cusS$ 生长曲线测定

将对数生长期的细菌调至 OD_{600} 为 0.4 后, 用含有卡那霉素的培养基 1:1 000 比例稀释, 充分混匀, 分别于 0、2、4、6、8、10、12、14、16、24 h 监测细菌生长状态。

1.5 $\Delta cusS$ 对 $AgNO_3/CuCl_2/OFL/MEM$ 的敏感性

将对数生长期的细菌调至 OD_{600} 为 0.4, 用培养基按 1:1 000 的比例稀释, 充分混匀后用不同浓度的 $AgNO_3/CuCl_2/OFL/MEM$ 处理, 混匀后接种于 96 孔板中, 每孔 200 μL , 设置 4 个复孔。并将该 96 孔板置于 37 $^{\circ}C$ 恒温培养箱, 分别于 0、2、4、8、16、24 h 监测细菌生长状态。

1.6 $\Delta cusS$ 对下游基因 $cusCFBA$ 以及 $cusR$ 转录水平的影响

1.6.1 RNA 提取和 cDNA 提取

将 DHB4 和 $\Delta cusS$ 两株菌培养至对数生长期, 离心后在沉淀中加入 1 mL TRIzol, 混匀, 冰上放置 5 min, 加入 200 μL 氯仿, 振荡 15 s, 4 $^{\circ}C$ 、12 000 r/min 离心 10 min, 吸取上层水相于新的离心管, 加入等体积异丙醇, 混匀, 4 $^{\circ}C$ 、12 000 r/min 离心 10 min, 弃去上清, 加入 75% 乙醇, 静置 10 min, 4 $^{\circ}C$ 、12 000 r/min 离心 10 min, 弃去上清, 加入 20 μL RNase-free H_2O 水溶解沉淀, 使用分光光度计检测纯度和浓度。使用反转录试剂 PrimeScriptTM Master Mix 进行反转录。将产物保存于 -20 $^{\circ}C$ 。

1.6.2 荧光定量 PCR

以 16S *rrsA* 为内参, 采用 TB Green Premix Ex TaqTM II TaKaRa 荧光定量试剂盒检测 DHB4

和 $\Delta cusS$ 两株菌中 *cusC*、*cusF*、*cusB*、*cusA* 和 *cusR* 基因的表达量。反应体系(25 μL): 上、下游引物(0.4 $\mu mol/L$)各 1 μL , TB Green Premix Ex Taq II 12.5 μL , cDNA (100 ng) 2 μL , 无酶水 8.5 μL 。反应条件: 95 $^{\circ}C$ 30 s; 95 $^{\circ}C$ 30 s, 61 $^{\circ}C$ 30 s, 40 个循环。根据 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 进行数据分析。

1.7 数据统计与分析

本实验数据统计采用 GraphPad Prism 5.0 进行统计分析, 两组数据间的比较采用 *t* 检验。

2 结果与分析

2.1 基本理化性质分析

ProtParam 软件分析显示 CusS 蛋白由 480 个氨基酸残基组成, 分子式为 $C_{2405}H_{3844}N_{658}O_{699}S_{18}$, 相对分子质量为 53 738.05, 原子总数为 7 624, 等电点为 6.02。亮氨酸(Leu)是含量最多的氨基酸, 占比 10.6%; 甘氨酸(Cys)和色氨酸(Trp)含量最低, 占比 0.4%。带负电荷残基数(天冬氨酸 Asp 和谷氨酸 Glu)为 56, 带正电荷残基数(精氨酸 Arg 和赖氨酸 Lys)为 47。脂溶性系数为 103.98, 亲水性平均值为 0.012。在 280 nm 波长处, 如果所有半胱氨酸残基对形成胱氨酸, 则其消光系数为 24 410, 吸光度为 0.457; 如果所有半胱氨酸残基消失, 则其消光系数为 24 410, 吸光度为 0.454。CusS 的不稳定系数为 30.42, 为稳定蛋白。

2.2 亲水性/疏水性和可溶性分析

利用 ProtScale 软件在线分析 CusS 的亲水性, 亲、疏水性分别用负值、正值表示。结果显示第 439 位氨基酸亲水性最强, 得分为 -2.911; 第 200 位氨基酸疏水性最强, 得分为 4.011 (图 2A)。CusS 的亲水性氨基酸总数多于疏水性氨基酸, 为亲水性蛋白。通过 Protein-Sol 软件在线预测 CusS 的可溶性, CusS 的溶解度为 0.178, 属于不溶性蛋白(图 2B)。

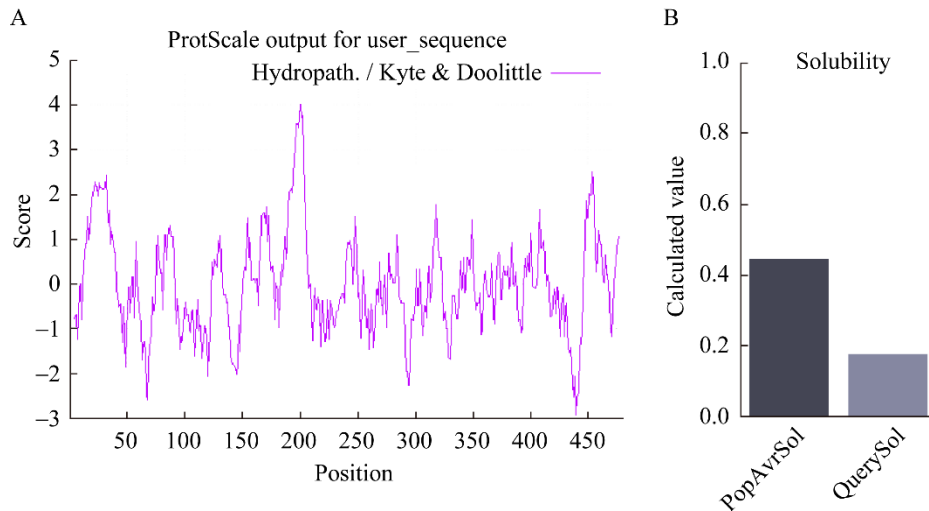


图 2 CusS 亲水性、疏水性分析和可溶性分析 A: CusS 亲水性、疏水性预测. B: CusS 可溶性预测
 Figure 2 Hydrophilicity, hydrophobicity and solubility analysis of CusS. A: The hydrophilicity, hydrophobicity prediction of CusS. B: The solubility prediction of CusS.

2.3 跨膜域、信号肽和亚细胞定位分析

TMHMM 软件预测显示 CusS 有跨膜域(图 3A), 表明 CusS 是一条跨膜蛋白。SignalP 软件显示其不存在信号肽(图 3B), 因此推断 CusS 属于非分泌蛋白。LocTree3 软件分析 CusS 的亚细胞定位, 由图 3C 可见, CusS 位于内膜中, 亚细胞定位分数为 100, 精确度 99%。基于上述预测结果表明, CusS 为非分泌性蛋白, 定位于细胞内膜中, 在细胞内发挥作用。

2.4 CusS 糖基化位点和磷酸化位点分析

利用 NetNGlyc-1.0 程序在线预测 CusS 的糖基化位点, 结果表明, 该蛋白含有糖基化位点 2 个(图 4A)。这可能有助于 CusS 在感受到 Ag^+ 胁迫时, 实现黏附、识别、信号转导等功能。

NetPhosBac-3.0 程序在线预测 CusS 的磷酸化位点, 结果显示其具有 41 个潜在的磷酸化位点(图 4B), 包含 24 个丝氨酸磷酸化位点、14 个苏氨酸磷酸化位点, 3 个酪氨酸磷酸化位点。其中, 丝氨酸磷酸化位点位于第 11、38、55、84、

89、93、101、146、172、192、195、217、255、263、266、289、291、293、303、316、381、437、445 和 467 位, 苏氨酸磷酸化位点位于第 24、68、75、97、111、224、391、396、403、417、462、466、472 和 477 位, 酪氨酸磷酸化位点位于第 99、179、302 位。CusS 具有的多个磷酸化位点, 使 CusS 容易被激活, 这可能有助于其感受胞内 Ag^+ 。另一方面, 多个磷酸化位点也能够协助 CusS 与 CusR 进行信息传递, 激活 CusR, 提高处理 Ag^+ 的效率, 保护胞内蛋白等结构免受伤害。

2.5 CusS 二级和三级结构分析及与银离子结合位点预测

利用 SOPMA 软件在线预测 CusS 的二级结构, 结果显示其具有 α -螺旋(Hh)、 β -折叠(Ee)、 β -转角(Tt)、无规则卷曲(Cc), 分别占比 55.42%、11.67%、3.75%和 29.17%。由 SOPMA 预测结果可知: CusS 二级结构主要由螺旋和卷曲结构构成。

利用 RCSB PDB 软件在线构建 CusS 的三级

结构模型, 预测了 CusS 与银离子的结合位点(图 5A、5B)。CusS 对于金属底物可能具有一定的特异性。在 CusS 形成的 3 个二聚体中, 每个二聚体有 4 个银离子结合位点(参与银离子结合的关键氨基酸残基: H42A/F43I/H176A/M133I/

M135I/H145A、*pcusS-AIA-IIA* 等), 二聚体界面的两个对称结合位点由两个组氨酸和一个苯丙氨酸通过阳离子- π 作用形成^[25]。CusS 对银离子的高结合率, 可能更有益于其高效运输底物, 降低银离子等对细菌的毒性作用。

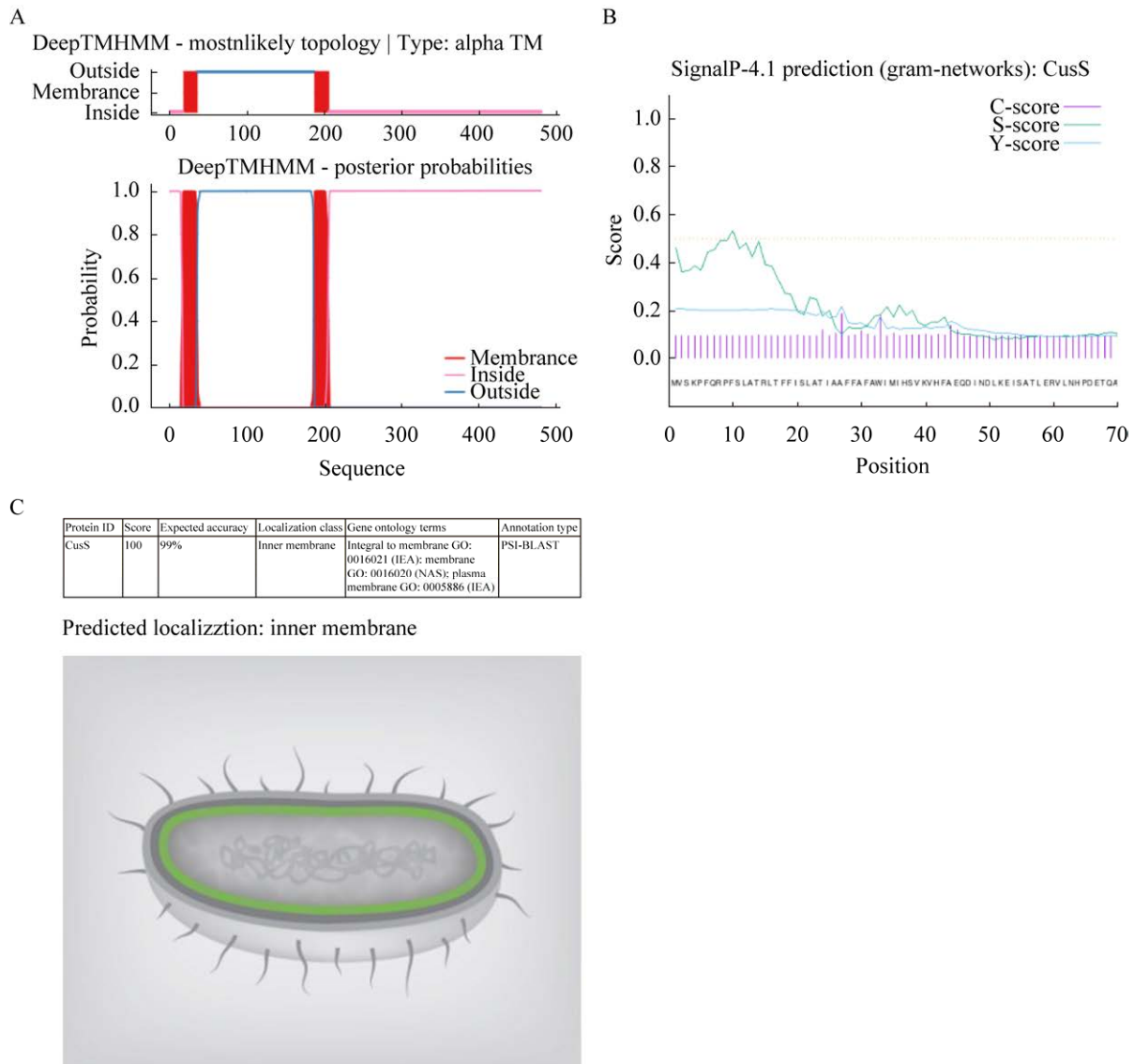


图 3 CusS 跨膜域、信号肽和亚细胞定位分析 A: CusS 蛋白跨膜域预测. B: CusS 蛋白信号肽预测. C: CusS 亚细胞定位预测

Figure 3 Transmembrane domain, signal peptide, and subcellular localization analysis of CusS. A: Protein transmembrane domain prediction of CusS. B: Protein signal peptide prediction of CusS. C: Subcellular localization prediction of CusS.

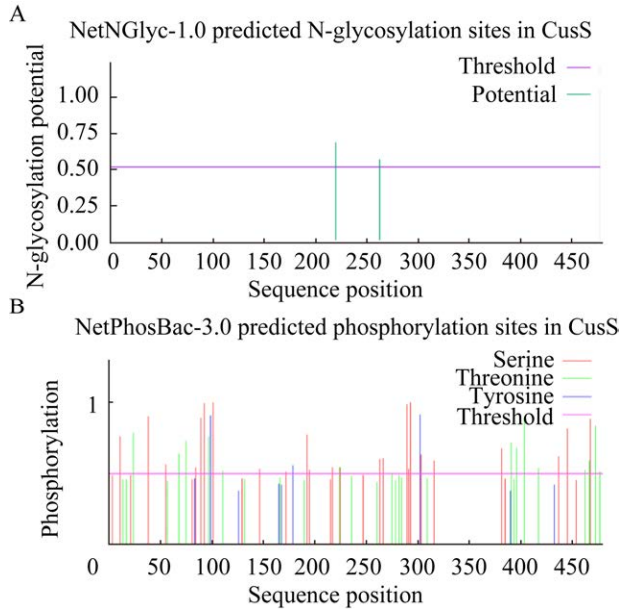


图 4 CusS 糖基化位点和磷酸化位点分析 A: CusS 糖基化位点预测. B: CusS 磷酸化位点预测

Figure 4 Analyses of glycosylation and phosphorylation sites of CusS. A: Prediction of glycosylation site of CusS. B: Prediction of phosphorylation site of CusS.

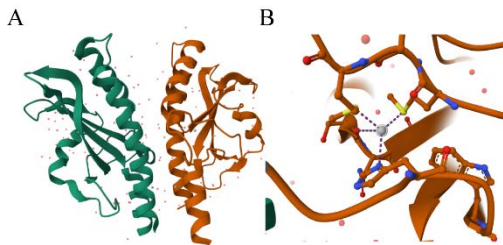


图 5 CusS 三级结构分析及与银离子结合位点预测 A: CusS 三维结构预测. B: CusS 与银离子结合位点预测

Figure 5 Prediction of tertiary structure and silver ion binding site of CusS. A: Tertiary structure prediction of CusS. B: Silver ion binding site prediction of CusS.

2.6 *cusS* 与其他基因的关系网络分析

通过 STRING 构建了 *cusS* 基因相互作用网络(图 6), 基因之间有更多的关联, 意味着它们之间的关联更紧密。发现 CusS 不仅与 Cus 其他

成员组成 CusCFBARS 内源性外排系统, 还与双组分系统 BaeS、渗透调节相关的 RnvZ-OmpR 以及 YedvW 中的 DNA 结合转录激活因子 BaeR, DNA 结合转录双调节因子 OmpR、YedW 存在相互作用。此外, CusS 与金属铜离子转运因子 CueR 和 CueO 相关联。CusS 对于调控 CusCFBA 的表达及银离子的外排具有重要作用。

2.7 *cusS* 遗传进化关系分析

用 MEGA 软件构建系统进化树(图 7), 结果展示了 *cusS* 在革兰阴性杆菌中的同源性。表明 *cusS* 在埃希菌属和志贺菌属中的保守性高。

2.8 $\Delta cusS$ 的构建验证

为了验证 *cusS* 基因对大肠杆菌抵御银离子胁迫的重要性, 利用 Red 同源重组构建 $\Delta cusS$ 菌株。在含有卡那霉素抗性的平板上共挑选 10 个阳性克隆进行菌落 PCR 验证。验证引物 C1 和 C2 在 *E. coli* K-12 无条带, 在 $\Delta cusS$ 扩增出的目的条带是 627 bp, 其中第 10 泳道扩增出目的条带, 将克隆 10 送一代测序, 用软件 Clustal Omega 比对, 显示 *cusS* 基因敲除菌株构建成功(图 8)。

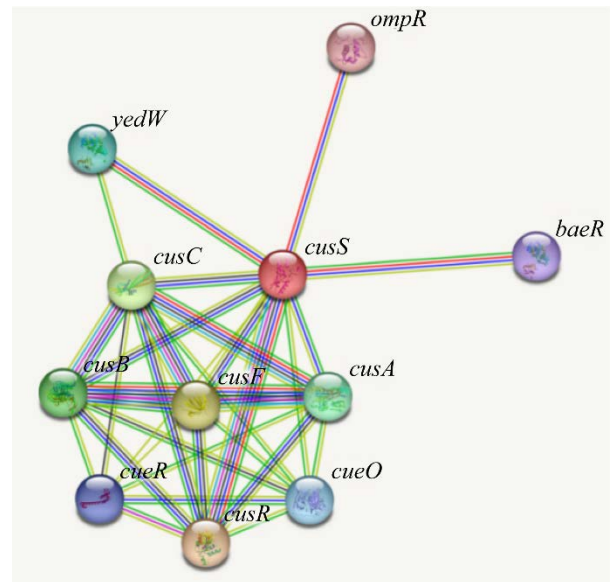


图 6 *cusS* 与其他基因的相互作用网络

Figure 6 The interaction network of *cusS* with other genes.

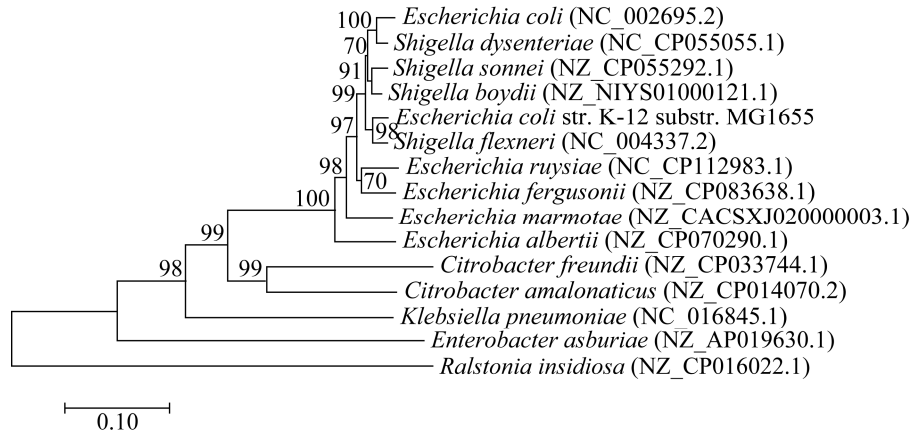


图 7 *cusS* 在革兰阴性杆菌中的遗传发育树

Figure 7 Phylogenetic tree of *cusS* in Gram-negative bacillus. The number at the branch point indicates how many percent of the trees have this branch after the step size test; 0.10 represents the genetic distance, and the length of the branches can accurately represent the genetic distance.

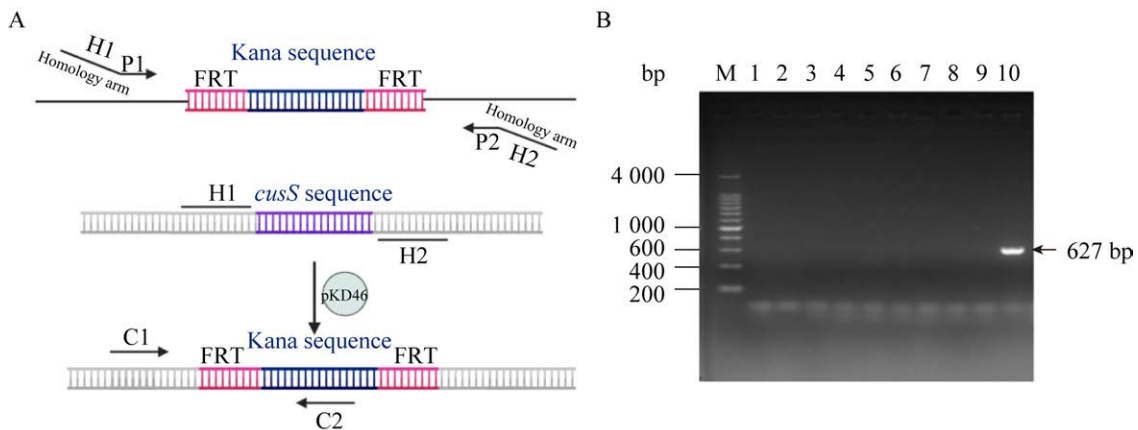


图 8 菌落 PCR 验证 *cusS* 敲除成功

A: 敲除株构建示意图. B: PCR 产物 DNA 电泳图

Figure 8 The verification of *cusS* deletion by colony PCR. A: The demonstrating figure of deletion *cusS*. B: DNA gel for PCR product (validation primers C1 and C2 had no band in *E. coli* K-12, and the target band amplified at $\Delta cusS$ was 627 bp, including the 10th target band).

2.9 *cusS* 缺失不影响大肠杆菌正常生长

为了排除 *cusS* 基因是 *E. coli* 基础代谢所必需的, 首先验证 *cusS* 基因的缺失是否影响 *E. coli* K-12 的生长活性。将 *E. coli* K-12 和 $\Delta cusS$ 菌株分别在常见培养基(LB、SOC、BHI 和 TSB)进行生长培养。结果如图 9 所示, *E. coli* K-12 和 $\Delta cusS$ 菌株在不同培养基中的复制生长

曲线无显著差异($P>0.05$), 表明 *cusS* 基因的缺失并不影响该细菌的生长活性。

2.10 *cusS* 缺失影响大肠杆菌抵御银和铜离子的能力

$AgNO_3$ 作用下, 6 $\mu g/mL$ 的 $AgNO_3$ 显著抑制 WT 的生长活性, 4 $\mu g/mL$ 的 $AgNO_3$ 抑制缺失株 *cusS* 的生长活性($P<0.0001$), $CuCl_2$ 作用下

WT 与缺失株 *cusS* 的生长活性无显著差异(图 10), 表明 *cusS* 基因缺失对硝酸银的抗性明显

减弱, 由此说明 *CusS* 参与调控细菌对银离子的抗性。

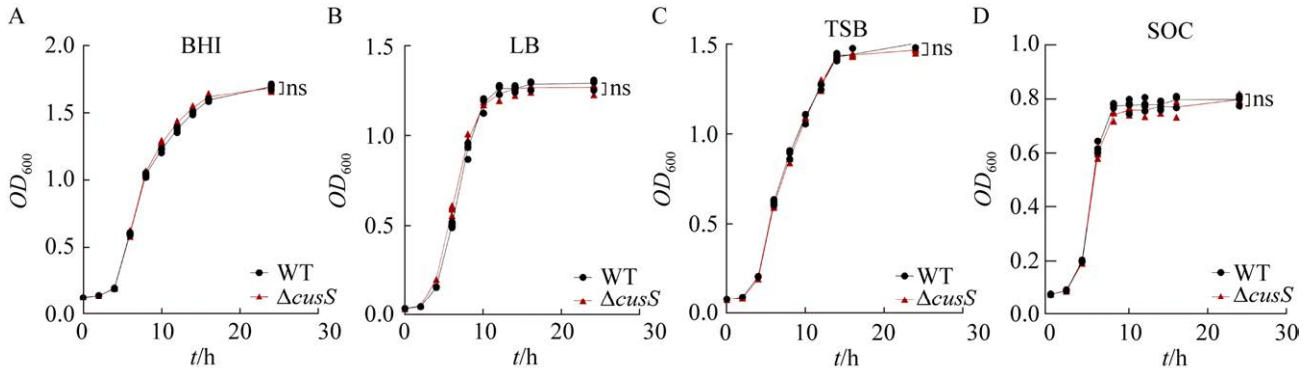


图 9 大肠杆菌 K-12 与大肠杆菌 $\Delta cusS$ 菌株的生长曲线

Figure 9 The growth curves of *Escherichia coli* K-12 and $\Delta cusS$. A: BHI. B: LB. C: TSB. D: SOC. $P > 0.05$, Student's *t* test. ns: No significance.

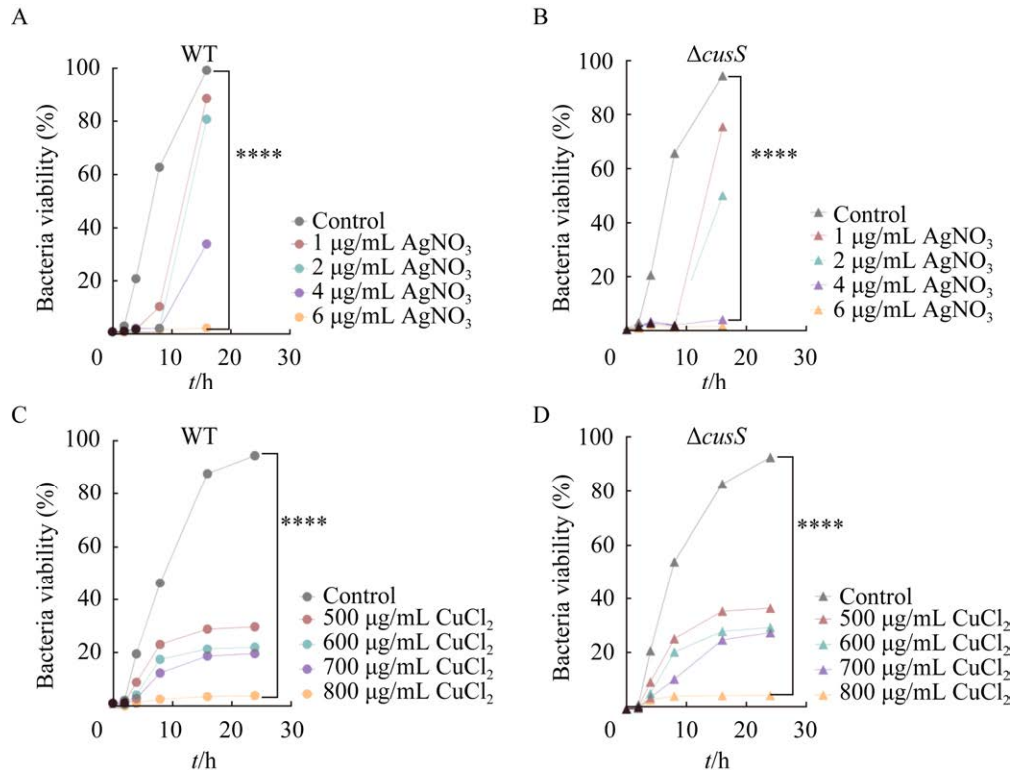


图 10 $AgNO_3$ 、 $CuCl_2$ 对 *Escherichia coli* K-12 和 $\Delta cusS$ 的抗菌活性

Figure 10 The antimicrobial activity of $AgNO_3$, $CuCl_2$ against *Escherichia coli* K-12 and $\Delta cusS$. A, B: $AgNO_3$. C, D: $CuCl_2$. A, C: *E. coli* K-12. B, D: $\Delta cusS$. ****: $P < 0.0001$, Student's *t* test.

2.11 *cusS* 缺失对抗生素 OFL/MEM 的敏感性测定

在 OFL 和 MEM 作用下, 结果(图 11)显示 *cusS* 缺失后细菌对 OFL 和 MEM 的敏感性不变, 其最小抑菌浓度均为 60 ng/mL。结合图 10, 表

明 *cusS* 对银离子的感受性具有较高的特异性。

2.12 *cusS* 缺失对 *cusCFBA* 以及 *cusR* 转录水平影响

cusS 的缺失能够明显下调 *cusCFBA* 和 *cusR* mRNA 的表达水平(图 12), 表明 *cusS* 的缺失可

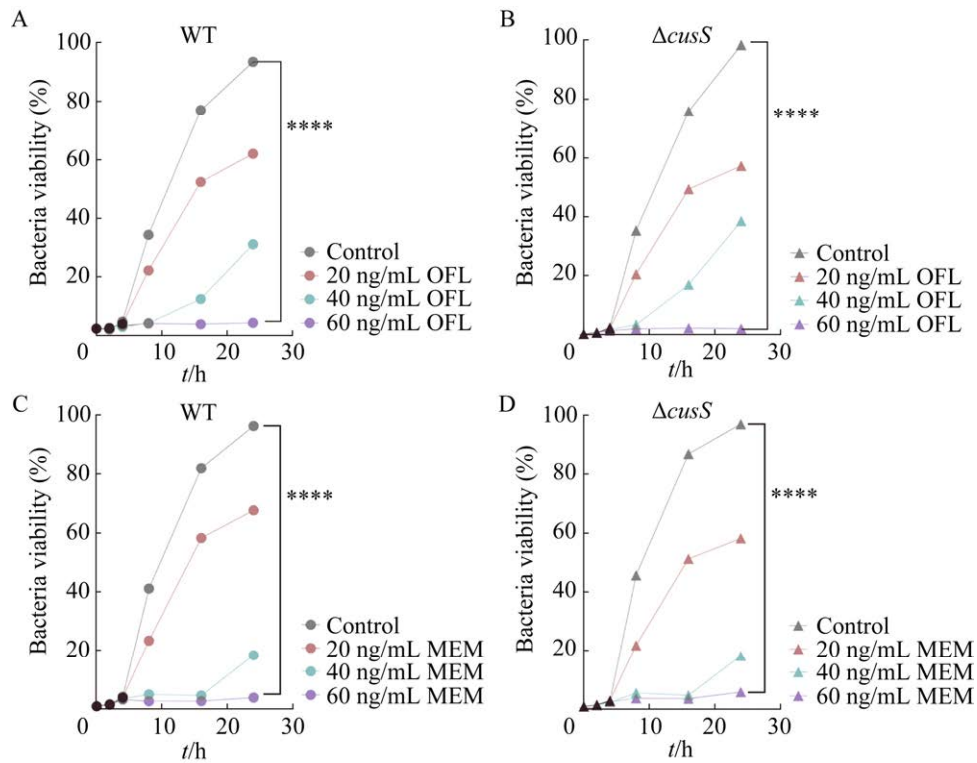


图 11 OFL/MEM 对 *Escherichia coli* K-12 和 $\Delta cusS$ 的抗菌活性

Figure 11 The antimicrobial activity of OFL/MEM against *Escherichia coli* K-12 and $\Delta cusS$. A, B: OFL. C, D: MEM. A, C: *E. coli* K-12. B, D: $\Delta cusS$. ****: $P < 0.0001$, Student's *t* test.

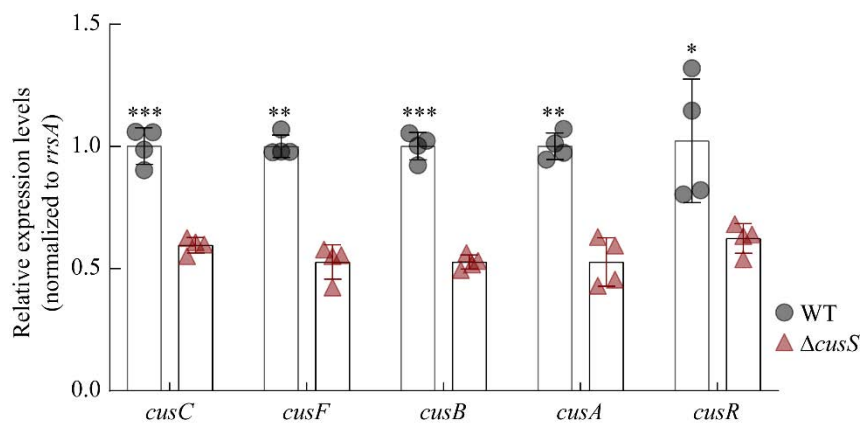


图 12 *cusS* 缺失对 *cusCFBA* 以及 *cusR* 表达的影响

Figure 12 Effect of *cusS* deletion on the expression of *cusCFBA* and *cusR*. $P < 0.001$, Student's *t* test. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

能使 CusR 无法被磷酸化, 继而 CusR 无法呈递信号给下游的 CusCFBA, 使得 CusCFBA 外排银离子的能力受损。

3 讨论与结论

CusRS 双组分系统对于细菌感知、响应和适应不断变化的环境十分重要。该双组分系统由控制跨包膜外排系统基因表达, 参与感知外周质的金属阳离子^[32], 为细菌应对金属离子等的胁迫提供了识别感应与信号传导的基础。CusS 是其中的关键蛋白, 兼具感应环境信号和结合底物的双重作用。已有研究发现, *cusS* 的突变可能促进 CusS 功能的获得, 导致 CusCFBA 表达升高, 增加银离子外排能力^[33]。因此, CusS 的底物识别、信号传递与 CusR 被激活介导及 CusCFBA 表达, 整个系统一系列蛋白之间的互作, 是大肠杆菌抵御阳离子胁迫的重要保障。在这一过程中, CusS 的底物识别以及信号传递是关键步骤, CusR 的激活介导是实现这一过程的主要步骤, CusCFBA 则是实现这一过程的主要蛋白^[34]。一系列蛋白之间的相互作用发挥着至关重要的作用, 它们共同组成了一张完整的调控网络, 从而确保了大肠杆菌能够抵御阳离子胁迫。由此认为, *cusS* 上调是细菌应对周质银离子水平升高的重要手段之一。值得注意的是, 因 CusS 在不同情况下的不同特殊表达, 有必要进一步对其生物结构进行探索, 以帮助研究者理解其细胞质结构域在活性与非活性状态下的不同构象^[23], 以及整个系统可能潜在的其他外排金属阳离子机制。随着 CusS 生物结构的深入探索, 研究者们将更好地了解它的功能, 并为研究它在不同情况下的特殊表达提供更多线索。

本文成功利用同源重组技术构建了大肠杆

菌 *cusS* 单基因缺失株。结果显示, *cusS* 的缺失显著提高了大肠杆菌 K-12 对银离子的敏感性。CusS 作为大肠杆菌应对银离子胁迫的重要外排泵, 可通过调控下游基因 *cusCFBA* 及 *cusR* 的表达水平执行功能, 因此认为 CusS 对于大肠杆菌响应银离子胁迫至关重要。CusS 功能的缺失可降低 CusR 磷酸化水平, 最终导致 CusRS 系统失灵, 显著下调大肠杆菌抵御银离子胁迫的能力。本文进一步利用各种数据库和在线工具检索 CusS 蛋白的关键信息, 如氨基酸组成、蛋白质结构、功能域等。以帮助我们了解 CusS 相关信息, 便于设计下一步实验, 用于深入阐述 CusS 蛋白在抵御银离子胁迫中的具体作用机制。根据上述实验与生物信息学分析, 我们能够较好地了解 CusS 蛋白的结构、功能和作用机制, 对深入研究 Cus 系统调控银离子的功能和机制提供帮助, 并为解决细菌耐金属提供新靶点信息。

现如今, 含银化合物产品被广泛应用于医疗、纺织品、环境净化等领域, 大大地改善了人民的生活质量^[35]。病原菌中抗生素耐药性的增加正在危及抗生素的疗效, 而越来越多的研究不仅证实含银化合物可有效对抗耐药菌, 还有研究发现银离子可有效提高多种抗生素的治疗效率, 使得含银化合物的使用越来越广泛^[36]。随着含银化合物的广泛使用, 细菌则通过 CusRS 等重要双组分系统来调节对银离子的耐受能力^[23]。因此, 深入了解银离子对病原微生物的影响及微生物双组份系统响应银离子胁迫的机制, 对于设计更有效的具有选择性毒性的含银化合物, 防止耐药性的发展至关重要。在未来, 对于多药耐药病原体, 应更谨慎地使用含银化合物或含银材料, 以消除产生银耐受的可能性, 并防止相关耐药基因的进一步传播。

参考文献

- [1] RAI M, YADAV A, GADE A. Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials[J]. *Biotechnology Advances*, 2009, 27(1): 76-83.
- [2] CHOUDHURY H, PANDEY M, LIM YQ, LOW CY, LEE CT, MARILYN TCL, LOH HS, LIM YP, LEE CF, BHATTAMISHRA SK, KESHARWANI P, GORAIN B. Silver nanoparticles: advanced and promising technology in diabetic wound therapy[J]. *Materials Science and Engineering: C*, 2020, 112: 110925.
- [3] WANG QY, ZHANG Y, LI Q, CHEN L, LIU H, DING M, DONG H, MOU YB. Therapeutic applications of antimicrobial silver-based biomaterials in dentistry[J]. *International Journal of Nanomedicine*, 2022, 17: 443-462.
- [4] YUAN JH, CAO JL, YU F, MA J, ZHANG D, TANG YJ, ZHENG J. Microbial biomanufacture of metal/metallic nanomaterials and metabolic engineering: design strategies, fundamental mechanisms, and future opportunities[J]. *Journal of Materials Chemistry B*, 2021, 9(33): 6491-6506.
- [5] ALHOMAIDI E, JASIM SA, AMIN HIM, NOBRE MAL, KHATAMI M, JALIL AT, DILFY SH. Biosynthesis of silver nanoparticles using *Lawsonia inermis* and their biomedical application[J]. *IET Nanobiotechnology*, 2022, 16(7/8): 284-294.
- [6] PARK HJ, KIM JY, KIM J, LEE JH, HAHN JS, GU MB, YOON J. Silver-ion-mediated reactive oxygen species generation affecting bactericidal activity[J]. *Water Research*, 2009, 43(4): 1027-1032.
- [7] YAN XT, HE B, LIU LH, QU GB, SHI JB, HU LG, JIANG GB. Antibacterial mechanism of silver nanoparticles in *Pseudomonas aeruginosa*: proteomics approach[J]. *Metallomics*, 2018, 10(4): 557-564.
- [8] LEE W, KIM KJ, LEE DG. A novel mechanism for the antibacterial effect of silver nanoparticles on *Escherichia coli*[J]. *BioMetals*, 2014, 27(6): 1191-1201.
- [9] LONG YM, HU LG, YAN XT, ZHAO XC, ZHOU QF, CAI Y, JIANG GB. Surface ligand controls silver ion release of nanosilver and its antibacterial activity against *Escherichia coli*[J]. *International Journal of Nanomedicine*, 2017, 12: 3193-3206.
- [10] RANDALL CP, GUPTA A, JACKSON N, BUSSE D, O'NEILL AJ. Silver resistance in Gram-negative bacteria: a dissection of endogenous and exogenous mechanisms[J]. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2015, 70(4): 1037-1046.
- [11] SILVER S. Bacterial silver resistance: molecular biology and uses and misuses of silver compounds[J]. *FEMS Microbiology Reviews*, 2003, 27(2/3): 341-353.
- [12] KIM EH, NIES DH, McEVOY MM, RENSING C. Switch or funnel: how RND-type transport systems control periplasmic metal homeostasis[J]. *Journal of Bacteriology*, 2011, 193(10): 2381-2387.
- [13] LI XZ, NIKAIDO H, WILLIAMS KE. Silver-resistant mutants of *Escherichia coli* display active efflux of Ag⁺ and are deficient in porins[J]. *Journal of Bacteriology*, 1997, 179(19): 6127-6132.
- [14] MOSENG MA, LYU MN, PIPATPOLKAI T, GLAZA P, EMERSON CC, STEWART PL, STANSFELD PJ, YU EW, GILMORE MS. Cryo-EM structures of CusA reveal a mechanism of metal-ion export[J]. *mBio*, 2021, 12(2): e00452-21.
- [15] KĘDZIORA A, SPERUDA M, KRZYŻEWSKA E, RYBKA J, ŁUKOWIAK A, BUGLA-PŁOSKOŃSKA G. Similarities and differences between silver ions and silver in nanoforms as antibacterial agents[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2018, 19(2): 444.
- [16] LEI HT, BOLLA JR, BISHOP NR, SU CC, YU EW. Crystal structures of CusC reveal conformational changes accompanying folding and transmembrane channel formation[J]. *Journal of Molecular Biology*, 2014, 426(2): 403-411.
- [17] KITTLESON JT, LOFTIN IR, HAUSRATH AC, ENGELHARDT KP, RENSING C, McEVOY MM. Periplasmic metal-resistance protein CusF exhibits high affinity and specificity for both CuI and AgI[J]. *Biochemistry*, 2006, 45(37): 11096-11102.
- [18] FU B, SENGUPTA K, GENOVA LA, SANTIAGO AG, JUNG W, KRZEMIŃSKI Ł, CHAKRABORTY UK, ZHANG WY, CHEN P. Metal-induced sensor mobilization turns on affinity to activate regulator for metal detoxification in live bacteria[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2020, 117(24): 13248-13255.
- [19] FUNG DKC, MA YZ, XIA TY, LUK JCH, YAN AX. Signaling by the heavy-metal sensor CusS involves rearranged helical interactions in specific transmembrane regions[J]. *Molecular Microbiology*, 2016, 100(5): 774-787.
- [20] FRANKE S, GRASS G, RENSING C, NIES DH. Molecular analysis of the copper-transporting efflux system CusCFBA of *Escherichia coli*[J]. *Journal of Bacteriology*, 2003, 185(13): 3804-3812.

- [21] LONG F, SU CC, ZIMMERMANN MT, BOYKEN SE, RAJASHANKAR KR, JERNIGAN RL, YU EW. Crystal structures of the CusA efflux pump suggest methionine-mediated metal transport[J]. *Nature*, 2010, 467: 484-488.
- [22] DELMAR JA, SU CC, YU EW. Bacterial multidrug efflux transporters[J]. *Annual Review of Biophysics*, 2014, 43: 93-117.
- [23] AFFANDI T, McEVOY MM. Mechanism of metal ion-induced activation of a two-component sensor kinase[J]. *Biochemical Journal*, 2019, 476(1): 115-135.
- [24] HOBMAN JL, CROSSMAN LC. Bacterial antimicrobial metal ion resistance[J]. *Journal of Medical Microbiology*, 2015, 64(Pt 5): 471-497.
- [25] AFFANDI T, ISSAIAN AV, McEVOY MM. The structure of the periplasmic sensor domain of the histidine kinase CusS shows unusual metal ion coordination at the dimeric interface[J]. *Biochemistry*, 2016, 55(37): 5296-5306.
- [26] SINGH K, SENADHEERA DB, CVITKOVITCH DG. An intimate link: two-component signal transduction systems and metal transport systems in bacteria[J]. *Future Microbiology*, 2014, 9(11): 1283-1293.
- [27] URANO H, YOSHIDA M, OGAWA A, YAMAMOTO K, ISHIHAMA A, OGASAWARA H. Cross-regulation between two common ancestral response regulators, HprR and CusR, in *Escherichia coli*[J]. *Microbiology*, 2017, 163(2): 243-252.
- [28] COCIUROVSCAIA A, BUJACZ G, PIETRZYK-BRZEZINSKA AJ. Crystal structure of the *Escherichia coli* CusS kinase core[J]. *Journal of Structural Biology*, 2022, 214(3): 107883.
- [29] GUDIPATY SA, McEVOY MM. The histidine kinase CusS senses silver ions through direct binding by its sensor domain[J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2014, 1844(9): 1656-1661.
- [30] YAMAMOTO K, ISHIHAMA A. Transcriptional response of *Escherichia coli* to external zinc[J]. *Journal of Bacteriology*, 2005, 187(18): 6333-6340.
- [31] DATSENKO KA, WANNER BL. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2000, 97(12): 6640-6645.
- [32] RIMONDO J, GROßE C, NIES DH. The sensory histidine kinase CusS of *Escherichia coli* senses periplasmic copper ions[J]. *Microbiology Spectrum*, 2023, 11(2): e0029123.
- [33] STOCK AM, ROBINSON VL, GOUDREAU PN. Two-component signal transduction[J]. *Annual Review of Biochemistry*, 2000, 69: 183-215.
- [34] GUDIPATY SA, LARSEN AS, RENSING C, McEVOY MM. Regulation of Cu(I)/Ag(I) efflux genes in *Escherichia coli* by the sensor kinase CusS[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2012, 330(1): 30-37.
- [35] BRUNA T, MALDONADO-BRAVO F, JARA P, CARO N. Silver nanoparticles and their antibacterial applications[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2021, 22(13): 7202.
- [36] DENG H, McSHAN D, ZHANG Y, SINHA SS, ARSLAN Z, RAY PC, YU HT. Mechanistic study of the synergistic antibacterial activity of combined silver nanoparticles and common antibiotics[J]. *Environmental Science & Technology*, 2016, 50(16): 8840-8848.