



海洋细菌粪产碱菌 J481 中 DMS 趋化受体的鉴定

赵丽君, 谢珂, 杨江科, 雷磊*

武汉轻工大学生命科学与技术学院, 湖北 武汉 430023

赵丽君, 谢珂, 杨江科, 雷磊. 海洋细菌粪产碱菌 J481 中 DMS 趋化受体的鉴定. 微生物学报, 2022, 62(12): 5029–5042.
Zhao Lijun, Xie Ke, Yang Jiangke, Lei Lei. Identification of DMS receptors in the marine *Alcaligenes faecalis* J481. *Acta Microbiologica Sinica*, 2022, 62(12): 5029–5042.

摘要: 【目的】 β -二甲基巯基丙酸(β -dimethylsulfoniopropionate, DMSP)是海洋环境中重要的含硫有机化合物, 会被海洋中的微生物裂解并释放出挥发性气体二甲基硫醚(dimethylsulfide, DMS)。该反应的生物学意义尚不明确, 前人曾有少量研究表明 DMSP 可能是趋化效应物。本研究旨在鉴定 DMSP 趋化作用中的信号分子以及该过程中的趋化受体基因。【方法】挖掘出基因组中含有甲基趋化受体蛋白结构域(methyl-accepting chemotaxis protein, MCP)的全部基因, 并预测趋化受体蛋白的结构特征及功能。通过同源重组构建所有趋化受体的缺失突变株, 并通过软琼脂平板实验观察趋化表型确定 DMS 的趋化受体。【结果】对不同化合物 DMSP、DMS、丙烯酸进行鉴别后, 明确趋化信号分子为 DMS。从粪产碱菌(*Alcaligenes faecalis*) J481 基因组中一共挖掘到 8 个潜在编码趋化受体蛋白的基因, 分别构建对应的缺失突变株, 并通过实验筛选出 *D6I95_17420* 基因为编码识别 DMS 的趋化受体蛋白基因。【结论】*D6I95_17420* 基因为编码 DMS 的趋化受体蛋白的基因, 为之后进一步阐明 DMS 作为信号分子在细胞内的调控作用奠定了基础。

关键词: 粪产碱菌 J481; 基因组挖掘; DMS; 趋化作用; 信号转导

Identification of DMS receptors in the marine *Alcaligenes faecalis* J481

ZHAO Lijun, XIE Ke, YANG Jiangke, LEI Lei*

School of Life Science and Technology, Wuhan Polytechnic University, Wuhan 430023, Hubei, China

Abstract: [Objective] β -dimethylsulfoniopropionate (DMSP), an important sulfur-containing organic

基金项目: 国家自然科学基金(3190010126)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (3190010126)

*Corresponding author. Tel: +86-27-83956793; E-mail: Lei_bc@whpu.edu.cn

Received: 6 April 2022; Revised: 19 May 2022; Published online: 26 July 2022

compound in the marine environment, is the main precursor to the climatically important gas dimethyl sulfide (DMS). DMS is released upon the bacterial catabolism of DMSP. The biological significance of this reaction is still unclear, and studies have shown that DMSP might be a chemoattractant. This study aims to identify the signal molecule in the chemotaxis of *Alcaligenes faecalis* J481 to DMSP and the receptor gene in this process. **[Methods]** All genes encoding methyl-accepting chemotaxis protein (MCP) were explored by genome mining, and the structures and functions of the chemotaxis receptors were predicted. The receptors-deleted mutants were developed by homologous recombination. The chemotactic phenotypes were observed based on the soft agar plate experiment and the chemotaxis receptors of DMS were determined. **[Results]** Through the test of DMSP, DMS, and acrylic acid, it was found that the signal molecule in the chemotaxis was DMS. A total of 8 potential genes encoding chemotaxis receptor proteins were found from the genome of J481, and *D6I95_17420* was identified to encode the receptor protein of DMS. **[Conclusion]** *D6I95_17420* encodes the chemotaxis receptor protein of DMS, which lays a foundation for further exploring the regulatory effect of DMS as a signal molecule in cells.

Keywords: *Alcaligenes faecalis* J481; genome mining; dimethyl sulfide; chemotaxis; signal transduction

二甲基硫醚(dimethylsulfide, DMS)及其前体β-二甲基巯基丙酸(β-dimethylsulfoniopropionate, DMSP)是海洋中最重要硫化物^[1]。DMSP由海洋中的浮游植物合成,每年产生约 10^9 t^[2]。在DMSP裂解酶的催化作用下,DMSP形成挥发性气体二甲基硫醚,DMS的大气氧化产物可形成气溶胶,增加大气云凝结核数量,提高云层对太阳光的反射率,使全球热量收入减少。此外,DMS及其硫化物在高空中的浓度会影响降水量,使得地表气候和温度发生变化。该反应是全球硫元素循环以及气候观测模型中的重要组成部分^[3]。DMSP裂解酶广泛存在于细菌、藻类、甚至珊瑚虫等不同海洋生物中。同时,海洋生物裂解DMSP并且释放DMS这一生物化学反应在地球化学循环以及全球气候监测模型中起着重要的作用,但是对于该反应对于海洋生物的生物功能,目前尚不明朗。Curson等^[4]在海洋细菌中发现,DMSP合成途径的关键基因*dsyB*以及DMSP裂解酶*dddL*基因的表达水平,在一些胁迫条件下有着显著提

高,但是2个基因的缺失突变株与野生型菌株相比较,并未表现出明显的表型差异。这些研究表明,DMSP及其裂解产物DMS的生物功能目前并不明朗,仍然需要进一步的探索。

De Souza等分离出一株来自海洋环境的粪产碱菌J481,能够以DMSP为唯一碳源生长^[5],且含有一个DMSP裂解酶基因*dddY*。*dddY*基因编码的产物定位于细胞周质空间中,是目前为止已知活性最高的DMSP裂解酶^[6]。然而,其缺失突变株仍然可以利用DMSP为唯一碳源生长^[5],这预示着该裂解酶不是DMSP代谢途径的组成部分。Zimmer-Faust等在另一篇工作中指出,粪产碱菌J481能够表现出对DMSP的趋化反应,且该反应依赖DMSP裂解酶基因的表达^[7]。细菌利用趋化作用感应环境中的化学浓度梯度,从而朝有利于自身生长的环境方向运动。趋化受体与信号化合物结合后,会引发MCP发生结构变化,从而引起胞内结构域被甲基化^[8],随后影响下游一系列的变化,最终引起鞭毛挥动。细菌以趋化作用这种方式使得自

身沿着趋化因子的浓度梯度来移动^[8]。

综上所述,粪产碱菌对 DMSP 的趋化作用依赖于 DMSP 裂解酶的诱导表达,这意味着 DMSP 裂解酶及其催化产物 DMS 在趋化作用中有重要作用^[9]。本文探究了 $\Delta dddY$ 在软琼脂趋化平板上的趋化作用表型;何种趋化效应物引发了粪产碱菌 J481 对 DMSP 趋化作用;并对粪产碱菌 J481 进行了全基因组测序以及深度挖掘,从中找出 8 个候选趋化作用受体基因,从这 8 个基因中鉴定出识别 DMS 的趋化受体基因。这为解释海洋细菌对 DMSP 趋化作用过程中, DMS 作为信号分子与受体相互作用奠定了基础,并对以后阐明其分子水平机制提供了理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒

本研究所用供试菌株和质粒见表 1。

1.1.2 主要试剂、试剂盒和感受态

限制性内切酶购自江苏愚公生命公司, PCR 反应相关试剂购自诺唯赞公司, PCR 产物纯化试剂盒、琼脂糖凝胶回收试剂盒购自 Omega, 无缝克隆试剂盒(Seamless Assembly Cloning Kit)购自中美泰和生物, 抗生素培养基相关组分等分子生物学常规药品购自中国国药集团, 使用浓度为庆大霉素 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 利福

平 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。研究所用 PCR 引物由金唯智生物科技有限公司合成。pJQ200SK 使用 *Bam*H I 和 *Not* I 进行双酶切;琼脂购于赛国生物科技(用于软琼脂平板)。

1.1.3 引物

本研究所用引物见表 2。

1.2 培养基和培养条件

大肠杆菌采用 LB 培养基,在 37 °C 培养。筛选 J481 相关缺失突变株时采用含有 5%蔗糖的 LB+Rif 培养基,于 28 °C 培养。

基础软琼脂趋化平板培养基制备: 1 mol/L 液体 M9 培养基,灭菌后于超净台加入以下化合物模拟海水(30 mmol/L Na_2SO_4 , 1 mmol/L CaCl_2 , 100 mmol/L KH_2SO_4 , 1 mmol/L MgSO_4 , pH 8),最后加入 0.08%琼脂,于微波炉加热至琼脂完全溶解后取 15–18 mL 于平板静置至凝固。M9 Minimal Salts 购自北京酷来博科技有限公司。

1.3 软琼脂平板检测

1.3.1 趋化性检测

将相关菌株接种于 LB 培养基中,于 28 °C、200 r/min 振荡培养 10 h。随后 2 000 r/min、4 °C 离心 10 min,弃上清,收集菌体。用新鲜的趋化培养基重悬,2 000 r/min、4 °C 离心 10 min 重复 3 次。在超净台取 5 μL 重悬的菌液接种至软琼脂趋化平板中央。平板于 28 °C 培养 24 h 后观察表型。

表 1 本研究所用菌株和质粒

Table 1 The strains and plasmids in this study

Strains/Plasmids	Characteristic	Source
<i>Alcaligenes faecalis</i> J481	Wild type, Rif ^r	Gift from Andy Johnstone (UEA)
pJQ200SK	Mutant strains construction vector, Gm ^r	This lab
<i>E. coli</i> DH5 α	Host of recombinant plasmids	This lab
$\Delta dddY^*$ <i>mut</i>	DddY deletion mutant	Gift from Andy Johnstone (UEA)
$\Delta cheY^*$ <i>mut</i>	CheY deletion mutant	Gift from Dan Tawfik Lab (WIS)

Rif: rifampicin; Gm: gentamicin; *: $\Delta dddY^*$ *mut* is DMSP lyase gene deletion mutant. $\Delta cheY^*$ *mut* is a chemotaxis regulatory protein deletion mutant.

表 2 供试 PCR 引物

Table 2 PCR primers used in this study

ID of primers	Sequences of primers (5'→3')	Characteristic
01015L-sense	TCCTGCAGCCCGGGGATCCTTATTCGTAG TGGCGGATGT	The forward primer of L-01015 exchange fragment
01015L-anti	TGAGCCTGTTTTAGTCCTGGCGGCCAATA CGTGCCATAG	The reverse primer of L-01015 exchange fragment
01015R-sense	CTATGGCACGTATTGGCCGCCAGGACTAA AAACAGGCTCA	The forward primer of R-01015 exchange fragment
01015R-anti	TCCACCGCGGTGGCGGCCGCTTAGCTTTT ACGTGACGATA	The reverse primer of R-01015 exchange fragment
05705 L-sense	ATCGAATTCCTGCAGGATCCTTAATTACCA AATTGCTTTA	The forward primer of L-05705 exchange fragment
05705L-anti	CCCAAAGCCTGGGGTTCTAATATAGAGCC CTTCCCTTTATCGTTTT	The reverse primer of L-05705 exchange fragment
05705R-sense	AAAACGATAAAGGGAAGGGCTCTATATTA GAACCCAGGCTTTGGG	The forward primer of R-05705 exchange fragment
05705R-anti	TCCACCGCGGTGGCGGCCGCTTAACCGTC GTGGCCTGCAG	The reverse primer of R-05705 exchange fragment
12910 L-sense	ATCGAATTCCTGCAGGATCCATGGAACATG CACGATGCGT	The forward primer of L-12910 exchange fragment
12910 L-anti	ACGCGAGGTGGCACCATTAAATCCCCGA ACAACACTGAA	The reverse primer of L-12910 exchange fragment
12910 R-sense	TTCAGTGTGTTCGGGGAATTAATGGTGC CACCTCGCGT	The forward primer of R-12910 exchange fragment
12910 R-anti	TCCACCGCGGTGGCGGCCGCTACTTCTT GTCCTCGACCG	The reverse primer of R-12910 exchange fragment
17300 L-sense	TCCTGCAGCCCGGGGATCCATGAGCTCC GGCGTAGATCT	The forward primer of L-17300 exchange fragment
17300 L-anti	CCACAGATGTGCTCATATAGTCCTTCAAGG ACCCGGTAAA	The reverse primer of L-17300 exchange fragment
17300 R-sense	TTTACCGGGTCCTTGAAGGACTATATGAGC ACATCTGTGG	The forward primer of R-17300 exchange fragment
17300 R-anti	TCCACCGCGGTGGCGGCCGCTCATAACAG GTGCCAAAAG	The reverse primer of R-17300 exchange fragment
17410 L-sense	TCCTGCAGCCCGGGGATCCATGCGTATTA GTTCTTCTCT	The forward primer of L-17410 exchange fragment
17410 L-anti	GGTTAGTGGGGAACATGACAAGAAGATTC CCGCATGTGGT	The reverse primer of L-17410 exchange fragment
17410 R-sense	ACCACATGCGGGAATCTTCTTGTCATGTTC CCCCTAACC	The forward primer of R-17410 exchange fragment
17410 R-anti	TCCACCGCGGTGGCGGCCGCTTAACGCAA ACGATCGTAAT	The reverse primer of R-17410 exchange fragment
17420 L-sense	TCCTGCAGCCCGGGGATCCATGCTTTTAA AGAATTTGAG	The forward primer of L-17420 exchange fragment
17420 L-anti	GTTTTTCCCCGAAAACGCTTGCTAAATC CAAAGAAAAC	The reverse primer of L-17420 exchange fragment
17420 R-sense	GTTTTCTTTGGATTTAGCAAGCGTTTTGCG GGGAAAAAAC	The forward primer of R-17420 exchange fragment
17420 R-anti	TCCACCGCGGTGGCGGCCGCTCATAAGCG ATACCGAAAAG	The reverse primer of R-17420 exchange fragment
17565 L-sense	TCCTGCAGCCCGGGGATCCATGTCTCCC TCCCCCTCTCG	The forward primer of L-17565 exchange fragment

(待续)

(续表 2)

17565 L-anti	GTCTTTAACAGGGCCAGATCTAAAAAATA GTGGGGGCAAA	The reverse primer of L-17565 exchange fragment
17565 R-sense	TTTGCCCCACTATTTTTAGATCTGGCCC TGTTAAAGAC	The forward primer of R-17565 exchange fragment
17565 R-anti	TCCACCGCGGTGGCGGCCGCATGCGTAAG AATTTCCCCAT	The reverse primer of R-17565 exchange fragment
17570 L-sense	TCCTGCAGCCCCGGGGATCCTCAGGCCGC TTTCAGCAGGG	The forward primer of L-17570 exchange fragment
17570 L-anti	GTTCTCCTCAGGATGATGAACCATAAAAT CAGGCTCGGTGGCCC	The reverse primer of L-17570 exchange fragment
17570 R-sense	GGCCACCGAGCCTGATTTTATGGTTCATC ATCCTGGAGGAGAAC	The forward primer of R-17570 exchange fragment
17570 R-anti	TCCACCGCGGTGGCGGCCGCTTAGCGCGC TTGTTTGCCA	The reverse primer of R-17570 exchange fragment
<i>dddY</i> F	TTACGGCTTCCAGTCGCGCA	The verification primer of J481
<i>dddY</i> R	ATGCAAAAACGAATGTTGGGGG	The verification primer of J481
<i>cheY</i> F	AGCCCAGATTGGCCAGCAAATCG	The verification primer of J481
<i>cheY</i> R	TCTTTGGCATGCCCGTGAA	The verification primer of J481
01015 F	AGCACATGCACCACGTTTTTC	The verification primer of <i>D6I95_01015 mut</i>
01015 R	CACCGAAATCCTGCCTGACT	The verification primer of <i>D6I95_01015 mut</i>
05705 F	GTGGATCTGAACCTGCCCAA	The verification primer of <i>D6I95_05705 mut</i>
05705R	GACGATGCCGAGACTACAGG	The verification primer of <i>D6I95_05705 mut</i>
12910 F	ATGGAACATGCACGATGCGT	The verification primer of <i>D6I95_12910 mut</i>
12910 R	GGCGTCGATAATCTGGAGCA	The verification primer of <i>D6I95_12910 mut</i>
17300 F	TTTTGAATTTGCGCGACCGT	The verification primer of <i>D6I95_17300 mut</i>
17300 R	ACGAAATCCTGCCACTCCTG	The verification primer of <i>D6I95_17300 mut</i>
17410 F	TCTTCCTTATCGGGGGCAGA	The verification primer of <i>D6I95_17410 mut</i>
17410 R	GCCATCGAGCTGTGCATACA	The verification primer of <i>D6I95_17410 mut</i>
17420 F	TCGACAGGAAGTGTGGCTTC	The verification primer of <i>D6I95_17420 mut</i>
17420 R	TTTGCCCTTGCGCAACAATG	The verification primer of <i>D6I95_17420 mut</i>
17565 F	CATACGCTTTAACGGCACGG	The verification primer of <i>D6I95_17565 mut</i>
17565 R	CAACTGAGCAAGGCAACCAC	The verification primer of <i>D6I95_17565 mut</i>
17570 F	CGTACCGAGGCATAGCCATT	The verification primer of <i>D6I95_17570 mut</i>
17570 R	CTGACAGCCACCAAAACAGC	The verification primer of <i>D6I95_17570 mut</i>

1.3.2 趋化平板分析

将菌液接种于添加不同碳源的软琼脂趋化平板中央, 于 28 °C 静置培养 24 h, 观察趋化表型并扫描拍照。

1.4 毛细管定量分析法分析

将待测菌株菌液吸取 200 μL 分装在聚苯乙烯 96 孔板中, 使用酒精灯火焰将毛细管一端热封后, 将开口端插入 DMS 溶液中。然后将开口端浸入聚苯乙烯 96 孔板细菌悬液中, 静置

30 min, 取出毛细管, 用无菌水清洗毛细管外壁残留液体, 然后将毛细管内部细胞吹入趋化培养基中, 梯度稀释, 取 100 μL 涂布于 LB 平板, 于 28 °C 恒温培养 24 h 后, 进行计数, 重复实验 3 次。

1.5 MCP 编码基因的全基因组挖掘

通过 HMMer 包^[10]的 HMMsearch 使用基于隐马尔可夫模型搜索 MCP。简而言之, MCP 的 HMM 模型 PF16867^[11]用于搜索粪产碱菌

J481 基因组(accession No.: CP032521)。

1.6 质粒的构建

基于同源重组的方法,将粪产碱菌 J481 基因组中的 *D6I95_01015*、*D6I95_05705*、*D6I95_12910*、*D6I95_17300*、*D6I95_17410*、*D6I95_17420*、*D6I95_17565* 和 *D6I95_17570* 基因序列,从其开放阅读框(open reading frame, ORF)中选取目标基因的上下游交换臂片段作为交换片段。PCR 反应体系(50 μ L): ddH₂O 18 μ L, 2 \times Phanta Max Buffer 25 μ L, dNTPs 1 μ L, Phanta polymerase (1 U/ μ L) 1 μ L, 上游引物(10 μ mol) 2 μ L, 下游引物(10 μ mol) 2 μ L, J481 总 DNA 1 μ L。反应条件:95 $^{\circ}$ C 3 min;95 $^{\circ}$ C 15 s, 56 $^{\circ}$ C 15 s, 72 $^{\circ}$ C 6 min, 34 个循环;72 $^{\circ}$ C 5 min。

将目标基因的上下游扩增产物(上述产物)与载体 pJQ200SK 使用无缝克隆连接。无缝克隆体系(10 μ L): DNA 片段和线性载体 4 μ L, 2 \times Seamless Master Mix 5 μ L, ddH₂O 1 μ L。50 $^{\circ}$ C 反应 30 min 后置冰上。

粪产碱菌 J481 总 DNA 的抽提和质粒提取、酶切、热激转化等实验方法参照《分子克隆实验指南》进行。

1.7 缺失突变株的筛选及纯化

单交换突变株筛选:以含有质粒 pJQ200SK-目的基因片段的大肠杆菌 DH-5 α 为供体菌,野生型 J481 粪产碱菌为受体菌进行电穿孔转化。将重组质粒 pJQ200SK-目的基因导入菌株 J481,基因通过同源交换重组将质粒整合到染色体上,使目标基因被敲除,质粒随染色体的复制使细菌产生 Gm 抗性,用含 Gm+Rif 的 LB 选择性平板筛选单交换突变体。

双交换突变株筛选:将单交换突变株稀释涂布接种至含有蔗糖和 Rif 的 LB 选择培养基上筛选出双交换突变株并消除质粒。最后,甘油

管保存于-80 $^{\circ}$ C。

1.8 DMSP 裂解酶的诱导及酶活检测

菌株培养及诱导:待测菌株于 4 mL LB+Rif 培养基中培养,28 $^{\circ}$ C,摇床 150 r/min。6 h 后将细胞悬液离心、重悬于 M9 液体培养基中,重复 3 次,洗净 LB,后将菌体于含有 5 mmol/L 的丙烯酸溶液(pH 8)的 M9 培养基中 28 $^{\circ}$ C 诱导 12-18 h^[9]。该过程中,丙烯酸诱导裂解酶的表达。

酶活检测:将菌液重悬于 500 μ L 的 Tris-HCl (pH 8)的缓冲液中。置于冰上进行超声波破碎,400 W、4 s,重复 2 次。最后加入 10 mmol/L 的 DMSP,静置 0.5 h,检测 DMSP 裂解酶活性。

2 结果与分析

2.1 鉴定引发趋化作用的信号分子

根据前人的报道,DMSP 依赖 DMSP 裂解酶 DddY 才能引发趋化作用。DMSP 会通过 DMSP 裂解酶生成 DMS、丙烯酸和氢离子。为了验证是何种物质引发该趋化作用过程,本研究进行了一系列的软琼脂趋化平板实验。软琼脂趋化平板初步筛选了 DMSP、DMS、丙烯酸这 3 种信号分子。

在软琼脂趋化平板实验中,观察了以下 3 种菌株:DMSP 裂解酶缺失突变株 Δ dddY、作为负对照的趋化作用调节蛋白缺失突变株 Δ cheY 和野生型 WT。

结果显示,野生型 WT 对 DMS 和丙烯酸都无趋化响应,而对作为趋化效应物正对照的天冬氨酸和 DMSP 都有趋化响应(图 1,表 3); Δ dddY 仍然拥有对天冬氨酸的趋化作用响应,而对 DMSP 和丙烯酸都不响应(图 1,表 3);作为负对照的趋化作用调节蛋白缺失突变株 Δ cheY 对 3 种信号分子都无响应。

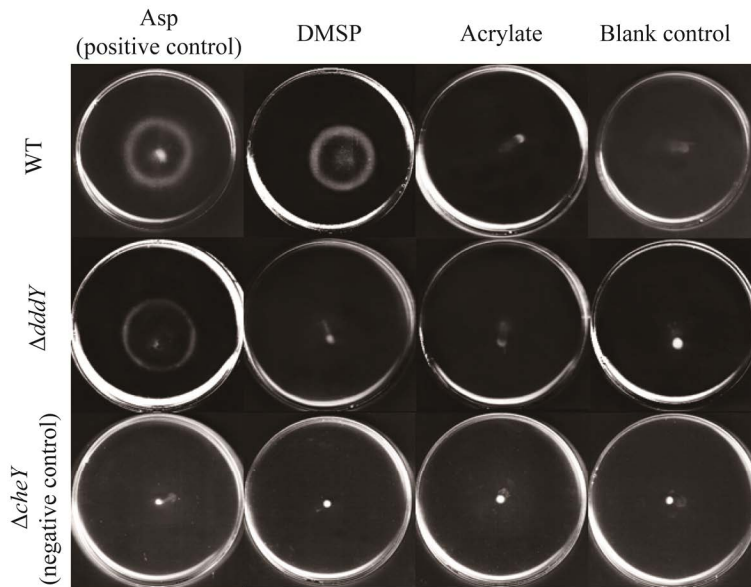


图 1 WT、 $\Delta dddY$ 突变株和 $\Delta cheY$ 突变株对不同信号分子的趋化表型

Figure 1 Chemotaxis phenotype of WT, $\Delta dddY$, $\Delta cheY$ tested on soft agar chemotaxis plates to different signaling molecules. Top to bottom: WT, $\Delta dddY$, $\Delta cheY$. From left to right are chemotactic effector with Asp, DMSP, acrylate, blank.

表 3 趋化作用表型比较小结

Table 3 Chemotactic phenotype comparison summary

Strains	Asp*	DMSP*	Acrylate*	Blank control
J481(WT)	+	+	-	-
$\Delta dddY$	+	-	-	-
$\Delta cheY$	-	-	-	-

Asp*: positive control (1 mmol/L); DMSP*: 1 mmol/L; Acrylate*: 1 mmol/L.

以上结果表明, $\Delta dddY$ 并没有失去响应趋化作用的基本能力(对天冬氨酸仍有响应), 只是不再响应 DMSP。值得注意的是, 在软琼脂趋化平板上并未观测到野生型或 $\Delta dddY$ 缺失突变株对 DMS 的趋化作用, 造成这一现象的可能原因是 DMS 这一挥发性物质的挥发速率太快。为此, 使用毛细管定量分析实验进一步验证 WT 和 $\Delta dddY$ 的趋化作用(图 2)。野生型菌株对于 DMSP 以及 DMS 都显示出了明确的趋化作用响应; $\Delta dddY$ 对于 DMSP 没有任何响应, 而对 DMS 表现出了和野生型菌株同样的趋化作用

响应。该结果证实了在海洋细菌粪产碱菌 J481 对 DMSP 的趋化作用过程中, DMSP 裂解酶将 DMSP 裂解并释放 DMS, 而 DMS 作为信号分子和细菌的趋化作用受体相结合并引发细菌的趋化作用。

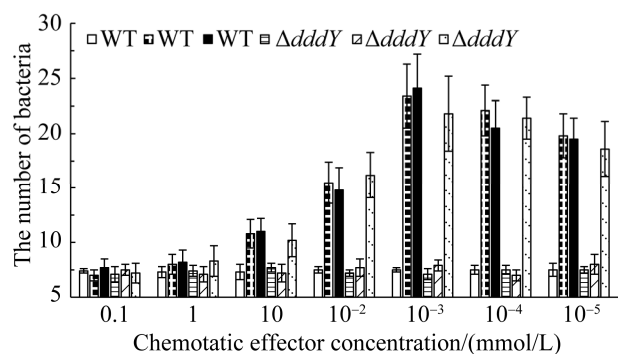


图 2 毛细管定量分析实验检测粪产碱菌和 $\Delta dddY$ 对 DMSP 及 DMS 的趋化作用响应

Figure 2 Quantitative capillary assay to detect the chemotactic responses of *Alcaligenes faecalis* and $\Delta dddY$ to DMSP and DMS. The error bars represent the standard deviations of three independent experiments.

2.2 MCP 编码基因的全基因组挖掘

目前为止, 所有已报道的细菌趋化作用, 均依赖 MCP 信号转导结构域的受体蛋白^[12]。因此, 本研究通过 HMMer 软件^[13](基于隐马尔科夫模型的方案), 对已经完成测序粪产碱菌 J481 完整基因组进行深度挖掘, 找到基因组中含有 MCP 结构域的全部基因, 最终得到了 8 个候选为编码趋化作用受体的基因(表 4)。根据这 8 个基因的蛋白保守结构域分析, 发现这 8 个蛋白都属于识别趋化效应物的受体蛋白, 其功

能是识别趋化信号分子导致蛋白结构变化, 影响下游组氨酸激酶 CheA 的磷酸化水平, 因此推断这 8 个基因与粪产碱菌的趋化响应有关。

通过 InterPro Scan 检索得到这 8 个受体蛋白的不同配体结合结构域(LBD), 预示着其识别的信号各有不同: CHASE3 是一种细胞外的感觉结构域(图 3), 它存在于各种类型的跨膜受体中, 组氨酸激酶、腺苷酸环化酶、甲基接受趋化蛋白和预测二甘氨酸环化酶/磷酸二酯酶^[14], 但是它所能识别的刺激尚不清楚^[15]; DUF948

表 4 粪产碱菌 J481 中的所有趋化作用受体蛋白

Table 4 All chemotaxis receptor proteins in *Alcaligenes faecalis*

ID of gene	Target name	Full sequence		
		E-value	score	Description of target
D6I95_17410	WP_123051509.1	1.5e-56	188.6	HAMP domain-containing protein [<i>Alcaligenes faecalis</i>]
D6I95_17300	WP_123051492.1	2.2e-53	178.2	Tar ligand binding domain-containing protein [<i>Alcaligenes faecalis</i>]
D6I95_12910	WP_123051511.1	1.6e-52	175.5	Tar ligand binding domain-containing protein [<i>Alcaligenes faecalis</i>]
D6I95_17565	WP_123051535.1	7.2e-51	170.1	PAS domain-containing protein [<i>Alcaligenes faecalis</i>]
D6I95_17570	WP_123051536.1	1.6e-50	169.0	PAS domain-containing methyl-accepting chemotaxis protein [<i>Alcaligenes faecalis</i>]
D6I95_17420	WP_123050843.1	1.9e-45	152.4	Methyl-accepting chemotaxis protein [<i>Alcaligenes faecalis</i>]
D6I95_05705	WP_123049767.1	3.2e-42	141.9	PAS domain-containing protein [<i>Alcaligenes faecalis</i>]
D6I95_01015	WP_123051578.1	2.7e-36	122.6	HAMP domain-containing protein [<i>Alcaligenes faecalis</i>]

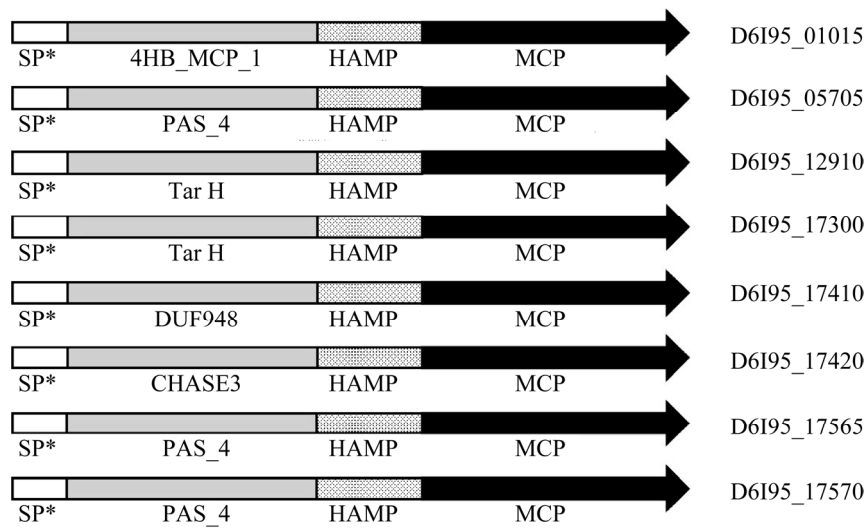


图 3 8 个趋化受体蛋白的结构域展示

Figure 3 Domain display of 8 chemotactic receptor proteins. SP*: signal peptide

是一种功能未知的结构域蛋白,由细菌序列组成,部分被认为是应激蛋白,可能与多种细菌的代谢活动有关; Tar H 和 4HB 是最为常见的信号识别结构域。Tar H 常作为信号结构域模型被研究,在二聚体界面有 2 个位点可以结合配体,具有很强的负协同性^[16]。4HB 结构域由 4 个螺旋束组成^[17],是自然界中最广泛的 LBD 之一,占有化学感受器的三分之一;而 PAS 结构域常被认为是感知光、氧气、氧化还原电位和小配体的结构域^[18]。PAS 结构域是蛋白质-蛋白质相互作用的位点,会在涉

及转录激活的几种信号转导途径中形成同源和异源二聚体^[19]。

总之,这 8 个基因编码的受体蛋白都有可能介导了细菌对特定信号的趋化作用。

2.3 基因的突变体构建与鉴定

重组质粒的构建如图 4 所示。重组质粒电转后使用含 Rif+Gm 的 LB 平板筛选单交换的克隆。由于 pJQ200SK 质粒上含有蔗糖敏感基因 *SacB*,在含有蔗糖的平板中不会生长。将单交换重组子稀释涂布于含 Rif 的蔗糖平板消除质粒,筛选出双交换突变株。

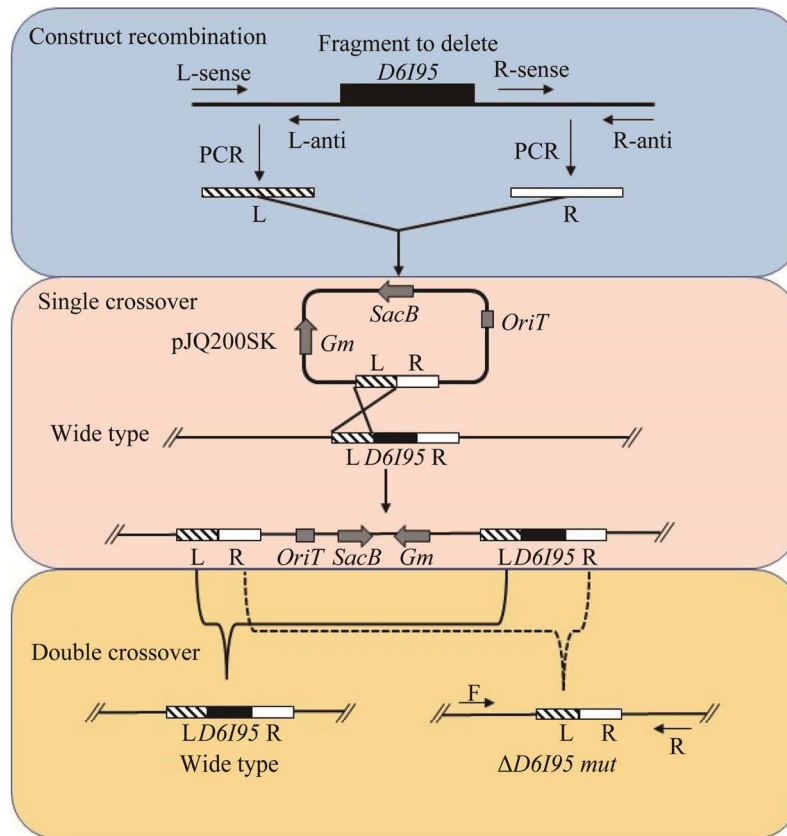


图 4 粪产碱菌 J481 的 8 个趋化蛋白受体候选基因的敲除策略

Figure 4 The diagram of strategy for *D6I95* knockout, DNA flanks upstream and downstream of the target gene are amplified by PCR using primer pair L-sense/L-anti and R-sense/R-anti, and then the PCR product was connected into the pJQ200SK vector using seamless cloning. The recombination was mobilized into the host strain J481 (wide type).

将筛选获得的缺失突变株采用菌落 PCR 的方法，以检测引物进行 PCR 扩增验证，同时用野生型粪产碱菌 J481 总 DNA 作为负对照以及构建的重组质粒作为正对照。对扩增产物进行 DNA 凝胶电泳检测，从电泳凝胶图可以看出 01015 F 和 R 引物扩增的 *D6I95_01015 mut* 产物约为 749 bp，05705 F 和 R 引物扩增的 *D6I95_05705mut* 产物约为 749 bp，12910 F 和 R 引物扩增的 *D6I95_12910 mut* 产物约为 901 bp，17300 F 和 R 引物扩增的 *D6I95_17300 mut* 产物

约为 534 bp，17410 F 和 R 引物扩增的 *D6I95_17410 mut* 产物约为 860 bp，17420 F 和 R 引物扩增的 *D6I95_01015 mut* 产物约为 540 bp，17565 F 和 R 引物扩增的 *D6I95_17565mut* 产物约为 637 bp，17570 F 和 R 引物扩增的 *D6I95_17570 mut* 产物约为 1 091 bp (图 5)，扩增片段大小与预期一致，负对照野生型 J481 对照组比缺失突变株片段大，且正对照质粒扩增片段与缺失突变株扩增片段大小一致。这个结果说明，8 个基因对应的缺失突变株已正确构建。

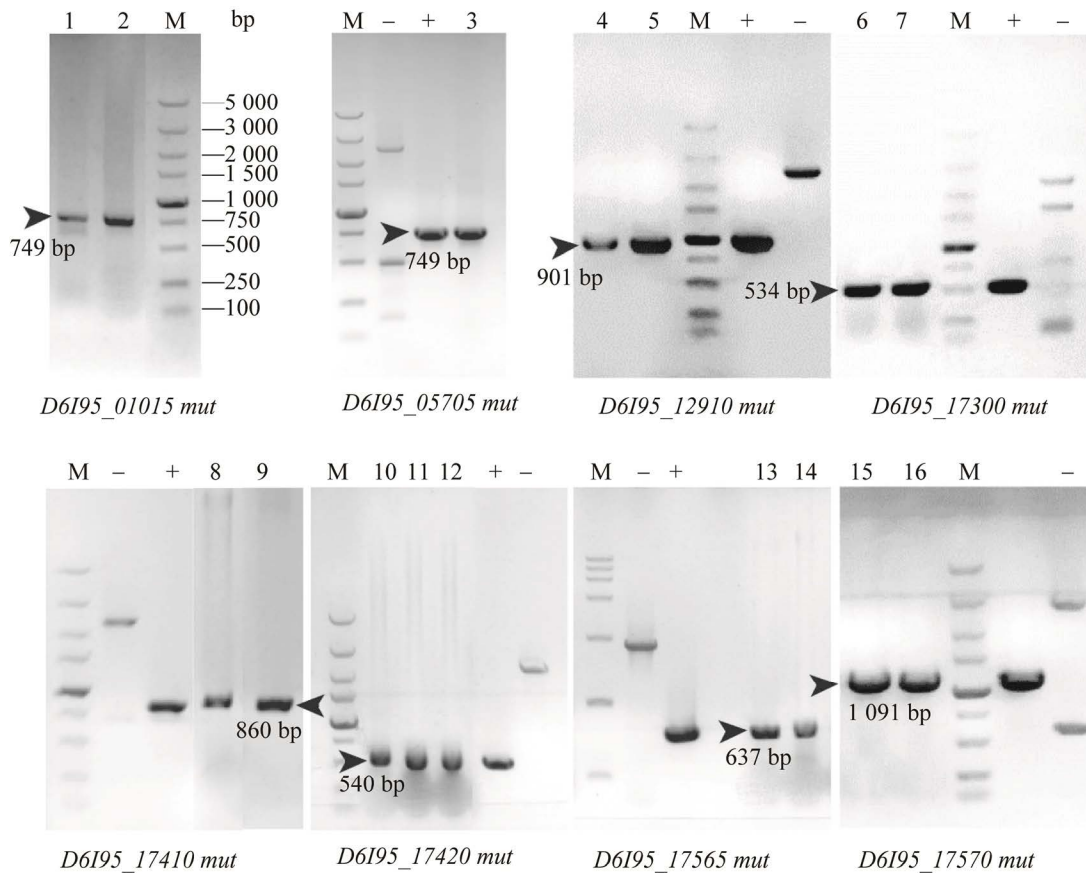


图 5 8 个缺失突变体的菌落 PCR 验证

Figure 5 Identification of the mutants by colony PCR. M: DL5000 DNA marker; -: PCR products of wild-type J481 genomic DNA; +: PCR products of recombinant plasmid *E. coli* genomic DNA; Lane 1-16: PCR product of mutant genomic DNA.

2.4 DMS 趋化受体蛋白的趋化平板表型验证

通过软琼脂趋化平板实验, 检测各个候选趋化基因的缺失突变株表型, 并使用 *AcheY* 菌株作为负对照菌株, 野生型菌株作为正对照, 筛选发现 $\Delta D6195_17420\ mut$ 仍然能够对天冬氨酸这一正对照趋化因子有趋化作用响应, 但是对 DMSP 失去趋化作用(图 6), 而其他 7 个缺失突变株对 DMSP 及天冬氨酸都有趋化响应。以上, 我们初步判定 *D6195_17420* 为编码识别 DMS 趋化受体蛋白的基因。

与此同时, 结果观察到 $\Delta dddY$ 与

$\Delta D6195_17420$ 的平板表型一致, 为确认该突变体是否失去了对 DMSP 的裂解能力。本研究通过在培养基中加入丙烯酸诱导 DddY 裂解酶的产生, 检测出 $\Delta D6195_17420\ mut$ 以及其他缺失突变株和 WT(J481)的 DMS 释放能力(表 5), 发现 $\Delta D6195_17420\ mut$ 并未失去裂解 DMSP 的能力。说明敲除的 *D6195_17420* 基因即为编码 DMS 受体蛋白的基因。

除该结论外, 我们并没有发现对天冬氨酸失去趋化响应的缺失突变株, 因此天冬氨酸的趋化受体可能不止一个基因参与。

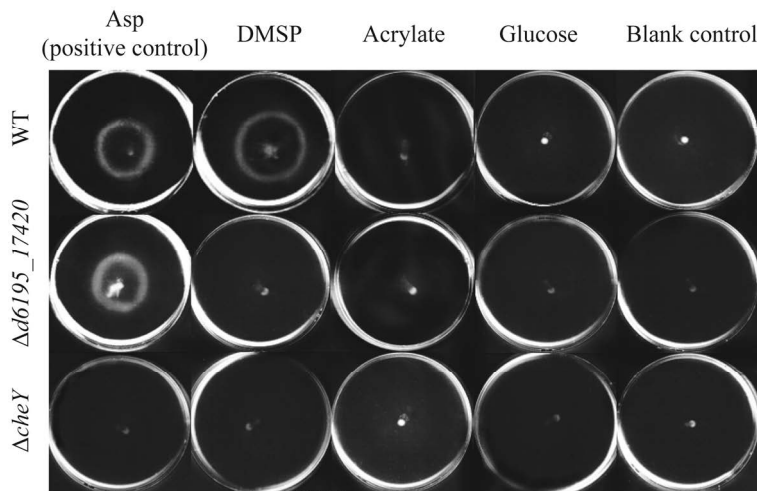


图 6 *D6195_17420* 基因缺失对于粪产碱菌 J481 趋化作用的影响

Figure 6 Effects of *D6195_17420 mut* on the chemotaxis of *Alcaligenes faecalis* J481.

表 5 粪产碱菌 J481 各基因的缺失突变株的趋化作用表型比较

Table 5 Comparison of chemotactic phenotypes of deletion mutants of *Alcaligenes faecalis*

Strains	Asp*	DMSP*	Glucose*	Blank	The ability of lysis DMSP
J481(WT)	+	+	-	-	+
$\Delta 01015$	+	+	-	-	+
$\Delta 05705$	+	+	-	-	+
$\Delta 12910$	+	+	-	-	+
$\Delta 17300$	+	+	-	-	+
$\Delta 17410$	+	+	-	-	+
$\Delta 17420$	+	-	-	-	+
$\Delta 17565$	+	+	-	-	+
$\Delta 17570$	+	+	-	-	+

Asp*: positive control (1 mmol/L); DMSP*: 1 mmol/L; Glucose*: negative control (1 mmol/L).

2.5 基因 *D6I95_17420* 的生物信息学分析

为了研究 *D6I95_17420* 基因的可能相关的生物学途径, 本研究对该基因进行了更加深入的生物信息学分析。通过对该基因所在的基因簇进行分析发现, 其所在的基因组附近, 包含了大量与细菌鞭毛合成以及组装相关的基因(图 7)。该图中一共列举了 *D6I95_17420* 基因上下游的共 31 个基因。其中包括 *D6I95_17420* 基因在内, 一共有 2 个趋化受体基因, 其余的共 26 个基因均显示出和细菌鞭毛相关。其中 *FliA* 会代替 sigma 因子与 *FlgM* 直接相互作用影响鞭毛的合成, 调控细菌运动^[20]。*FliG* 等基因为鞭

毛马达开关。该结果, 明确显示了 *D6I95_17420* 基因的功能与细菌鞭毛有一定相关性, 很可能和细菌的游动相关。

经 BLASTp 检索, 发现 *D6I95_17420* 的同源蛋白几乎只存在于产碱菌属(*Alcaligenes*), 且相似度较高(>90%)。同时, 该基因的同源蛋白在非产碱菌中也有存在, 但相似性<68%, 如: *Pusillimonas soli* 和 *Achromobacter ruhlandii* 等。这些同源蛋白都含有甲基趋化受体蛋白结构域。系统进化树结果显示(图 8), *D6I95_17420* 在产碱菌中保守性较高, 且与 *Alcaligenes faecalis* (AYR21958.1) 亲缘关系最近。

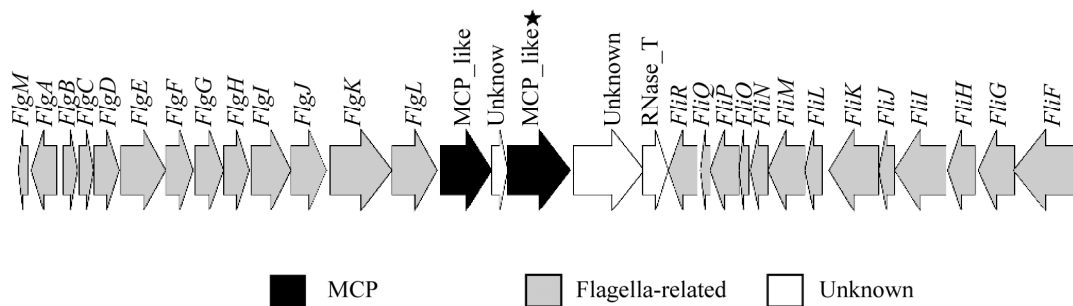


图 7 *D6I95_17420* 基因上下游显示其功能与细菌鞭毛合成相关

Figure 7 The genomic context of *D6I95_17420* indicates a function related to flagellar biosynthesis. *D6I95_17420* is highlight with a black star.

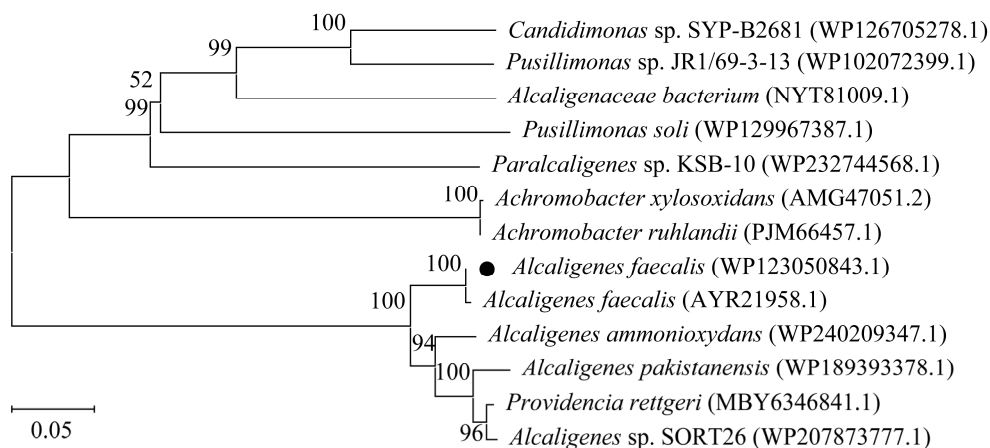


图 8 *D6I95_17420* 基因系统发育树

Figure 8 Neighbour-joining phylogenetic tree of *D6I95_17420* gene homologue proteins. Numbers in bracket represent the sequences accession number in GenBank. The number at each branch points is the percentage supported by bootstrap. Bar: 0.05 sequence divergence.

3 讨论与结论

细菌以趋化作用这种方式使得自身沿着趋化因子浓度梯度来移动。细菌的趋化作用和细菌的生物膜形成^[21]、病原菌的致病性以及和植物的共生关系建立都有着密切的联系^[22]。由于海洋中的 DMSP 主要是由藻类这些自养生物合成, 因此海洋中异养微生物通过裂解 DMSP 产生 DMS 而引发的趋化作用, 在帮助细菌寻找到适合生长的环境起着非常重要的作用。

粪产碱菌中 *dddY* 基因是活性最高的 DMSP 裂解酶基因, 然而在此之前, 并未检测到其缺失突变株的表型^[9]。本研究通过趋化平板以及毛细管实验, 确定了 *DddY* 是粪产碱菌 J481 对 DMSP 趋化作用过程中的重要组成部分, 且其催化产物 DMS 是真正的效应因子。在此基础上, 本研究进一步通过全基因组挖掘, 找出了粪产碱菌 J481 全基因组中的全部趋化受体基因, 共 8 个。分别分析了这 8 个蛋白结构域的功能, 通过同源重组的手段, 构建了 8 个缺失突变株, 进行软琼脂趋化平板实验验证。最终鉴定 *D6195_17420* 是编码 DMS 趋化受体蛋白的基因, 且该蛋白是海洋细菌对 DMSP 趋化作用中的关键受体。而该基因所在的基因簇, 则大量含有和细菌鞭毛相关的基因, 则更进一步的暗示了该基因可能和细菌的游动有关, 且对于粪产碱菌 J481 在海洋环境中寻找合适的生活环境方面, 有着重要的作用。

本研究首次明确报道了 DMSP 裂解酶是 DMSP 趋化作用中的重要组成部分, 并且成功克隆到识别信号分子 DMS 的趋化受体基因。但该受体蛋白与 DMS 之间相互作用的分子机制尚待进一步研究。后续将使用体外重组表达蛋白、蛋白结构的测定、等温滴定量热法 (isothermal titration calorimetry, ITC) 等方法检

测 DMS 与其受体蛋白的相互作用的分子水平机制。本研究为人们了解 DMS/DMSP 在海洋生态环境中与藻类微生物之间相互作用方式的分子生物学机制提供了新的理解, 也为未来阐述 DMS/DMSP 在生物体内所行使功能提供了基础。

参考文献

- [1] Curson AR, Todd JD, Sullivan MJ, Johnston AW. Catabolism of dimethylsulphoniopropionate: microorganisms, enzymes and genes. *Nature Reviews Microbiology*, 2011, 9(12): 849–859.
- [2] Stefels J, Steinke M, Turner S, Malin G, Belviso S. Environmental constraints on the production and removal of the climatically active gas dimethylsulphide (DMS) and implications for ecosystem modelling. *Biogeochemistry*, 2007, 83(1/2/3): 245–275.
- [3] Charlson RJ, Lovelock JE, Andreae MO, Warren SG. Oceanic phytoplankton, atmospheric sulphur, cloud albedo and climate. *Nature*, 1987, 326(6114): 655–661.
- [4] Curson A, Liu J, Bermejo Martinez A, Green R, Chan Y, Carrion O, Williams B, Zhang SH, Yang GP, Bulman Page P, Zhang XH, Todd J. Dimethylsulphoniopropionate biosynthesis in marine bacteria and identification of the key gene in this process. *Nature Microbiology*, 2017, 2: 17009.
- [5] De Souza MP, Yoch DC. Comparative physiology of dimethyl sulfide production by dimethylsulphoniopropionate lyase in *Pseudomonas doudehoffii* and *Alcaligenes* sp. strain M3A. *Applied and Environmental Microbiology*, 1995, 61(11): 3986–3991.
- [6] Li CY, Zhang D, Chen XL, Wang P, Shi WL, Li PY, Zhang XY, Qin QL, Todd JD, Zhang YZ. Mechanistic insights into dimethylsulphoniopropionate lyase *DddY*, a new member of the cupin superfamily. *Journal of Molecular Biology*, 2017, 429(24): 3850–3862.
- [7] Zimmer-Faust RK, De Souza MP, Yoch DC. Bacterial chemotaxis and its potential role in marine dimethylsulphide production and biogeochemical sulfur cycling. *Limnology and Oceanography*, 1996, 41(6): 1330–1334.
- [8] Wadhams G, Armitage J, Wadhams GH, Armitage JP. Making sense of it all: bacterial chemotaxis. *Nature reviews. Molecular Cell Biology*, 2005, 5: 1024–1037.

- [9] De Souza MP, Yoch DC. Purification and characterization of dimethylsulfoniopropionate lyase from an *Alcaligenes*-like dimethyl sulfide-producing marine isolate. *Applied and Environmental Microbiology*, 1995, 61(1): 21–26.
- [10] Potter SC, Luciani A, Eddy SR, Park Y, Lopez R, Finn RD. HMMER web server: 2018 update. *Nucleic Acids Research*, 2018, 46(W1): W200–W204.
- [11] Sunagawa S, Coelho LP, Chaffron S, Kultima JR, Labadie K, Salazar G, Djahanschiri B, Zeller G, Mende DR, Alberti A, Cornejo-Castillo FM, Costea PI, Cruaud C, d'Ovidio F, Engelen S, Ferrera I, Gasol JM, Guidi L, Hildebrand F, Kokoszka F, Lepoivre C, Lima-Mendez G, Poulain J, Poulos BT, Royo-Llonch M, Sarmiento H, Vieira-Silva S, Dimier C, Picheral M, Searson S, Kandels-Lewis S, Bowler C, De Vargas C, Gorsky G, Grimsley N, Hingamp P, Iudicone D, Jaillon O, Not F, Ogata H, Pesant S, Speich S, Stemann L, Sullivan MB, Weissenbach J, Wincker P, Karsenti E, Raes J, Acinas SG, Bork P. Ocean plankton. Structure and function of the global ocean microbiome. *Science*, 2015, 348(6237): 1261359.
- [12] Parkinson JS, Hazelbauer GL, Falke JJ. Signaling and sensory adaptation in *Escherichia coli* chemoreceptors: 2015 update. *Trends in Microbiology*, 2015, 23(5): 257–266.
- [13] Eddy SR. Accelerated profile HMM searches. *Viruses*, 2011, 7(10): e1002195.
- [14] Zhulin IB, Nikolskaya AN, Galperin MY. Common extracellular sensory domains in transmembrane receptors for diverse signal transduction pathways in bacteria and archaea. *Journal of Bacteriology*, 2003, 185(1): 285–294.
- [15] Hsiao YM, Song WL, Liao CT, Lin IH, Pan MY, Lin CF. Transcriptional analysis and functional characterization of *XCC1294* gene encoding a GGDEF domain protein in *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *Archives of Microbiology*, 2012, 194(4): 293–304.
- [16] Gavira JA, Matilla MA, Fernández M, Krell T. The structural basis for signal promiscuity in a bacterial chemoreceptor. *FEBS Journal*, 2021, 288(7): 2294–2310.
- [17] Yeh JI, Biemann HP, Privé GG, Pandit J, Koshland DE, Kim SH. High-resolution structures of the ligand binding domain of the wild-type bacterial aspartate receptor. *Frontiers in Immunology*, 1996, 262(2): 186–201.
- [18] Anantharaman V, Koonin EV, Aravind L. Regulatory potential, phyletic distribution and evolution of ancient, intracellular small-molecule-binding domains. *Journal of Molecular Biology*, 2001, 307(5): 1271–1292.
- [19] Iyer LM, Aravind L, Bork P, Hofmann K, Mushegian AR, Zhulin IB, Koonin EV. Quod erat demonstrandum? The mystery of experimental validation of apparently erroneous computational analyses of protein sequences. *Genome Biology*, 2001, 2(12): RESEARCH0051.
- [20] Ding L, Wang Y, Hu Y, Atkinson S, Williams P, Chen S. Functional characterization of FlgM in the regulation of flagellar synthesis and motility in *Yersinia pseudotuberculosis*. *Microbiology (Reading)*, 2009, 155(Pt 6): 1890–1900.
- [21] Yaryura PM, Conforte VP, Malamud F, Roeschlin R, De Pino V, Castagnaro AP, McCarthy Y, Dow JM, Marano MR, Vojnov AA. XbmR, a new transcription factor involved in the regulation of chemotaxis, biofilm formation and virulence in *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. *Environmental Microbiology*, 2015, 17(11): 4164–4176.
- [22] Greer-Phillips SE, Stephens BB, Alexandre G. An energy taxis transducer promotes root colonization by *Azospirillum brasilense*. *Journal of Bacteriology*, 2004, 186(19): 6595–6604.