



铜绿假单胞菌 *antABC* 操纵子的生物学效应分析

李治盈[#], 李盼欣[#], 宁婉清, 李兰, 韩嘉仪, 成娟丽*, 林金水*

延安大学 生命科学学院, 陕西省黄土高原资源植物研究与利用省市共建重点实验室, 陕西 延安 716000

李治盈, 李盼欣, 宁婉清, 李兰, 韩嘉仪, 成娟丽, 林金水. 铜绿假单胞菌 *antABC* 操纵子的生物学效应分析[J]. 微生物学报, 2024, 64(11): 4403-4424.

LI Zhiying, LI Panxin, NING Wanqing, LI Lan, HAN Jiayi, CHENG Juanli, LIN Jinshui. Biological effects of *antABC* operon on *Pseudomonas aeruginosa*[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2024, 64(11): 4403-4424.

摘要: 在铜绿假单胞菌中, 色氨酸可通过 KynABU 犬尿氨酸途径被转化邻氨基苯甲酸, 邻氨基苯甲酸进一步作为底物在烷基喹诺酮类化合物(alkyl quinolones, AQs)合成基因簇 *pqsABCDE* 的作用下被转化为 AQs 信号分子, 包括 2-庚基-3-羟基-4-喹诺酮(*Pseudomonas* quinolone signal, PQS)和 2-庚基-4-喹诺酮(2-heptyl-4-hydroxyquinoline, HHQ)。同时, 邻氨基苯甲酸还能在邻氨基苯甲酸双加氧酶复合物 AntABC 的催化下被降解进入三羧酸循环, 但 AntABC 在铜绿假单胞菌中所介导的生物学效应依然不清楚。【目的】构建铜绿假单胞菌 *antABC* 的缺失突变株, 并对该突变株的表型进行分析。【方法】以铜绿假单胞菌 PAO1 为亲本菌株, 通过同源重组的方法构建 *antABC* 缺失突变株, 研究该操纵子对铜绿假单胞菌色氨酸降解、生物被膜形成、绿脓菌素合成、运动性和毒力等的影响。【结果】缺失突变 *antABC* 或 *kynU* 均完全抑制了铜绿假单胞菌以色氨酸为唯一碳源的生长, 而 $\Delta pqsA$ 则无该表型, 说明 *antABC* 是铜绿假单胞菌降解色氨酸所必需的, 并且在本研究指定的培养条件下 KynABU-AntABC 途径是该菌降解色氨酸的唯一途径。除了影响铜绿假单胞菌的色氨酸降解,

资助项目: 国家自然科学基金(32070103, 31860012, 32360015); 陕西省秦创原“科学家+工程师”队伍建设项目(2023KXJ-019); 陕西省“特支计划”区域发展人才项目(2020-44); 陕西省普通高等学校青年杰出人才支持计划(2018-111); 陕西高校青年创新团队项目(2022-943); 陕西省大学生创新创业训练项目(S202210719127, S202310719142); 延安大学科研计划(2023HBZ-001, 2023CGZH-007)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (32070103, 31860012, 32360015), the Qinchuang Yuan “Scientist+Engineer” Team Construction Project of Shaanxi Province (2023KXJ-019), the Regional Development Talent Project of the “Special Support Plan” of Shaanxi Province (2020-44), the Outstanding Young Talent Support Project of the Higher Education Institutions of Shaanxi Province (2018-111), the Youth Innovation Team Project of Shaanxi Universities (2022-943), the Shaanxi University Student Innovation and Entrepreneurship Training Program (S202210719127, S202310719142), and the Research Project of Yan'an University (2023HBZ-001, 2023CGZH-007).

[#]Those authors contributed equally to this work.

*Corresponding authors. E-mail: CHENG Juanli: chengjl-1981@163.com; LIN Jinshui: linjinshui@yau.edu.cn

Received: 2024-06-24; Accepted: 2024-08-27; Published online: 2024-08-30

缺失突变 *antABC* 通过诱导胞外多糖合成操纵子 *pel* 的表达进而促进铜绿假单胞菌生物被膜的形成, 还通过诱导绿脓菌素合成操纵子 *phz1* 和 *phz2* 的表达进而促进铜绿假单胞菌绿脓菌素的合成。缺失突变 *antABC* 还促进了铜绿假单胞菌的集群运动和蹭行运动。另外, 进一步缺失突变 *pqsA* 则完全逆转 $\Delta antABC$ 的这些生理表型。因此, *antABC* 对这些生理表型的调控依赖于 AQS。然而缺失突变 *antABC* 确实使铜绿假单胞菌积累了更多的 HHQ, 但却抑制了 PQS 的合成。说明 *antABC* 对这些生理表型的调控主要依赖于 HHQ。此外, 缺失突变 *antABC* 还增强了铜绿假单胞菌对白菜和大蜡螟幼虫的毒力, 但是进一步缺失突变 *pqsA* 只能部分逆转 $\Delta antABC$ 的这一毒力表型, 同时缺失突变 *antABC* 也使铜绿假单胞菌积累了更多的邻氨基苯甲酸, 因此缺失突变 *antABC* 对铜绿假单胞菌毒力的增强作用应该由 HHQ 和邻氨基苯甲酸共同介导。最后, 生物信息学分析发现超过 90% 的铜绿假单胞菌临床分离株中 *antABC* 操纵子发生了错义突变, 因此 *antABC* 有望作为判断铜绿假单胞菌临床分离株是否具有高毒力的生物标志物。【结论】*AntABC* 在铜绿假单胞菌的色氨酸降解、生物被膜形成、绿脓菌素合成、运动性和毒力等方面都发挥着重要的作用, 这为针对铜绿假单胞菌的临床诊断和抗菌药物开发奠定了基础。

关键词: 铜绿假单胞菌; *AntABC*; 邻氨基苯甲酸; 烷基喹诺酮类化合物; 毒力

Biological effects of *antABC* operon on *Pseudomonas aeruginosa*

LI Zhiying[#], LI Panxin[#], NING Wanqing, LI Lan, HAN Jiayi, CHENG Juanli^{*}, LIN Jinshui^{*}

Shaanxi Key Laboratory of Research and Utilization of Resource Plants on the Loess Plateau, College of Life Sciences, Yan'an University, Yan'an 716000, Shaanxi, China

Abstract: In *Pseudomonas aeruginosa*, tryptophan can be converted into anthranilate via the KynABU pathway, and anthranilate as a substrate is further converted into alkyl quinolones (AQs), including 2-heptyl-3-hydroxy-4-quinolone (PQS) and 2-heptyl-4-quinolone (HHQ), under the action of *pqsABCDE*, a synthetic gene cluster of AQs. At the same time, anthranilate can be degraded into the tricarboxylic acid cycle under the catalysis of the anthranilate dioxygenase complex *AntABC*, while the biological effect of *AntABC* on *P. aeruginosa* remains unclear. **[Objective]** To construct and characterize the phenotype of the *antABC*-deleted mutant of *P. aeruginosa*. **[Methods]** With *P. aeruginosa* PAO1 as the starting strain, we constructed the *antABC*-deleted mutant by homologous recombination to study the effects of the operon on tryptophan degradation, biofilm formation, pyocyanin synthesis, motility, and virulence of *P. aeruginosa*. **[Results]** The deletion of *antABC* or *kynU* completely inhibited the growth of *P. aeruginosa* with tryptophan as the sole carbon source, while $\Delta pqsA$ did not present this phenotype, indicating that *antABC* was essential for the degradation of tryptophan by *P.*

aeruginosa, and KynABU-AntABC pathway was the only way for the degradation of tryptophan by the bacterium under the culture conditions in this study. In addition to affecting tryptophan degradation in *P. aeruginosa*, the deletion of *antABC* promoted the biofilm formation of *P. aeruginosa* by inducing the expression of the extracellular polysaccharide synthesis operon *pel*, and it promoted the synthesis of pyocyanin by inducing the expression of the pyocyanin synthesis operons *phz1* and *phz2*. In addition, the deletion of *antABC* enhanced the swarming motility and twitching motility of *P. aeruginosa*. Interestingly, further deletion of *pqsA* completely reversed the physiological phenotypes of $\Delta antABC$. Therefore, the regulation of *antABC* on these physiological phenotypes depended on AQS. The deletion of *antABC* increased the HHQ accumulation while inhibiting the synthesis of PQS in *P. aeruginosa*. These results indicated that the regulation of these physiological phenotypes by *antABC* mainly depended on HHQ. In addition, the deletion of *antABC* enhanced the virulence of *P. aeruginosa* to Chinese cabbage and *Galleria mellonella* larvae, while further deletion of *pqsA* only partially reversed this virulence phenotype. Moreover, the deletion of *antABC* caused increased accumulation of anthranilate in *P. aeruginosa*. Therefore, the enhancement of *antABC* deletion on the virulence of *P. aeruginosa* was mediated by HHQ and anthranilate together. Finally, bioinformatics analysis revealed that the missense mutations of *antABC* operon occurred in more than 90% of clinical isolates of *P. aeruginosa*. Therefore, *antABC* was expected to be used as a biomarker to determine whether clinical isolates of *P. aeruginosa* were highly virulent. **[Conclusion]** AntABC plays an important role in the tryptophan degradation, biofilm formation, pyocyanin synthesis, motility, and virulence of *P. aeruginosa*. This finding lays a foundation for the clinical diagnosis and antimicrobial development of *P. aeruginosa* infection.

Keywords: *Pseudomonas aeruginosa*; AntABC; anthranilate; alkyl quinolones; virulence

铜绿假单胞菌是一种革兰氏阴性条件致病菌^[1], 它能成功感染免疫力受损或功能低下的患者, 如造成囊性纤维化患者的肺部感染、烧伤感染、泌尿系统感染等, 占院内感染的 10%–20%^[2–3]。铜绿假单胞菌之所以能成功致病, 离不开其自身产生的多种致病相关次级代谢产物, 包括吩嗪类化合物、烷基喹诺酮类化合物、酰基高丝氨酸内酯类化合物和邻氨基苯甲酸等, 这些次级代谢产物在铜绿假单胞菌生长过程中大量分泌和积累, 其合成受到群体感应(quorum sensing, QS)系统的调控^[4–6]。

QS 是微生物在生长过程中, 通过产生并释

放可扩散的信号分子(自诱导剂)来感知群体密度, 当群体密度达到一定阈值时, 聚集的信号分子与相应的转录调节子结合而诱导各种靶基因的转录表达, 从而调控细菌的各种群体行为, 如调控生物被膜的形成、运动性以及毒力因子的产生等^[7–8]。铜绿假单胞菌主要包括 4 种 QS 系统, 分别为 *las*、*rhl*、*iqs* 和 *pqs* 系统。其中 *las*、*rhl* 和 *iqs* 的信号分子分别为 N-3-氧十二烷酰-L-高丝氨酸内酯(3-oxo-C₁₂-HSL)、N-丁酰-L-高丝氨酸内酯(C₄-HSL)和 2-(2-羟基苯基)-噻唑-4-甲醛[2-(2-hydroxyphenyl)-thiazole-4-carbaldehyde, IQS], 它们分别由 LasI、RhII 和 AmbBCDE 合成, 并

分别通过结合相应的调节因子受体 LasR、RhIR 和 IqsR 从而调控下游基因的表达^[9-10]。铜绿假单胞菌 PQS 系统则是以烷基喹诺酮类化合物 (alkyl quinolones, AQs) 为信号分子的 QS 系统^[11]。AQs 主要包括 3 个重要的化合物, 即 2-庚基-3-羟基-4-喹诺酮(2-heptyl-3-hydroxy-4-quinolone, PQS)、2-庚基-4-喹诺酮(2-heptyl-4-quinolone, HHQ) 和 4-羟基-2-庚基喹啉-N-氧化物 (4-hydroxy-2-heptylquinoline-N-oxide, HQNO), 其中 PQS 及其前体 HHQ 是 PQS 系统的信号分子^[11-12]。PQS 与 LysR 型调节子 PqsR 的 C 末端配体结合区相互作用, 导致其构象变化进而激活 *pqsABCDE* 操纵子的表达, 从而调节铜绿假单胞菌的一些毒力表型^[13]。在 *PqsABCDE* 的催化下, 铜绿假单胞菌以邻氨基苯甲酸为底物合成 HHQ, HHQ 则进一步在黄素单加氧酶 PqsH 催化下经羟基化反应产生 PQS^[9] (图 1)。

铜绿假单胞菌中邻氨基苯甲酸有 2 种代谢来源途径: 第一种是降解色氨酸并转化产生邻氨基苯甲酸的犬尿氨酸途径, 该途径依赖 3 种酶, 分别是 *kynA* (PA2579) 基因编码的色氨酸 2,3-双加氧酶、*kynB* (PA2081) 基因编码的犬尿氨酸甲酰胺酶和 *kynU* (PA2080) 基因编码的犬尿氨酸酶, 是存在色氨酸时细胞代谢转化产生邻氨基苯甲酸的主要来源^[14]; 第二种途径是以分支酸为底物, 在邻氨基苯甲酸合酶 PhnAB 的催化下合成邻氨基苯甲酸^[15]。

邻氨基苯甲酸除了能转化为 PQS 之外, 还能通过 AntABC 降解途径被降解。邻氨基苯甲酸被降解的第一步是转化为儿茶酚^[16], 该反应由邻氨基苯甲酸双加氧酶复合物 AntABC 介导, AntABC 由 AntA、AntB 和 AntC 三个亚基组成, 它们分别是属于同一操纵子的 *antA* (PA2512)、*antB* (PA2513) 和 *antC* (PA2514) 的基因产物。其中 *antA* 编码邻氨基苯甲酸双加氧酶大亚基、*antB*

编码邻氨基苯甲酸双加氧酶小亚基、*antC* 编码邻氨基苯甲酸双加氧酶还原酶^[16-17]。形成的儿茶酚则进一步经儿茶酚降解途径 CatABC 的降解而进入三羧酸循环(TCA 循环)。

虽然 AntABC 是负责邻氨基苯甲酸降解的已知关键酶, 但是其在铜绿假单胞菌中所介导的生物学效应依然不清楚。因此, 为了解决这一问题, 本研究在铜绿假单胞菌 PAO1 中缺失突变了 *antABC* 操纵子, 并基于该突变株阐述了 *antABC* 操纵子的生物学效应。结果显示, *antABC* 操纵子在铜绿假单胞菌 PAO1 的色氨酸降解、生物被膜形成、绿脓菌素合成、运动性和毒力等方面都发挥着重要的作用。

1 材料与方法

1.1 引物信息

本研究使用的引物信息详见表 1。

1.2 菌株和质粒

本研究使用的菌株及质粒信息详见表 2。

1.3 培养条件及培养基

本研究中使用的大肠杆菌、铜绿假单胞菌 PAO1 及其突变株均在 37 °C 培养, 液体振荡使用的转速为 220 r/min。

TSB 液体培养基(g/L): Tryptone Soya Broth 30.0, pH 7.0。

LB 液体培养基(g/L): 酵母提取物 5.0, NaCl 10.0, 胰蛋白胨 10.0, pH 7.0。

TSB 固体培养基(g/L): Tryptone Soya Broth 30.0, 琼脂粉 15.0, pH 7.0。

LB 固体培养基(g/L): 酵母提取物 5.0, NaCl 10.0, 胰蛋白胨 10.0, 琼脂粉 15.0, pH 7.0。

MMP 基础培养基(mg/L): Na₂HPO₄ 4 258.8, KH₂PO₄ 1 905.2, FeSO₄ 0.6, MgSO₄ 120.0, (NH₄)₂SO₄ 2 642.8, pH 7.0, 使用时添加适量的碳源^[23]。

表 1 引物信息表

Table 1 List of primers used in this study

Primers name	Sequences (5'→3')
<i>antABC</i> up F	ATCGGAATTCATCTCCTCGCTGATGTGC
<i>antABC</i> up R	AGAGGTCGAAGTAGATCCAGTTCTTTTC
<i>antABC</i> low F	CTGGATCTACTTCGACCTCTACCTGTGC
<i>antABC</i> low R	ATCGAAGCTTAGGAGATTCCCATGAACG
<i>pqsA</i> up F	AGCTGAATTCAAAATATTCCCGCAACTG
<i>pqsA</i> up R	TCGGCCAGGTATCGAAATCGAGGCGGAAC
<i>pqsA</i> low F	CGATTTTCGATACCTGGCCGACACCCTTTATCAC
<i>pqsA</i> low R	ATCGAAGCTTGATCGCTGCCAGTTTGAC
<i>kynU</i> up F	AGCTGGATCCACATGGACGATGGCTTC
<i>kynU</i> up R	TGGAGGATTTTCGTTGCCGTCGAGGTAGATC
<i>kynU</i> low F	CGACGGCAACGAAATCCTCCAGAGCGAAG
<i>kynU</i> low R	AGCTAAGCTTGCCAGGGTCAGCAGGTAG
<i>antABC</i> F (pME6032)	AGCTGAATTCATGAACGCTACCCGCAGAAG
<i>antABC</i> R (pME6032)	AGTCAGATCTGCCTCCGACGAGGCGTCC
<i>antABC</i> F (pUCP24)	AGCTGAATTCATGAACGCTACCCGCAGA
<i>antABC</i> R (pUCP24)	AGTCGGTACCCAGCATCGACGAGCAGGT
<i>phz1</i> F	AGCTGGTACCAAGTTTCTCCGGCATAAC
<i>phz1</i> R	AGCTAAGCTTAGTGGGAATACCGTCACG
<i>phz2</i> F	AGCTGGTACCATGGATGCCAGTCGATTC
<i>phz2</i> R	AGCTAAGCTTGGTGGGAATACCGTCACG
<i>pqsA</i> F	AGCTCTCGAGTCCGGATGCATATCGCTG
<i>pqsA</i> R	GTCAGGATCCAACATGCCCCGTTCCCTCCG
<i>pqsH</i> F	CTGACTCGAGATGTCCGGAGGCGTGATG
<i>pqsH</i> R	GTCAGGATCCACCAGCAGCCAGTCGATG
<i>antR</i> F	AGCTCTCGAGGTCGACTGGTTGCCCTTG
<i>antR</i> R	AGCTGGATCCCTCAGGCTGTAGGCGTTG

*: The underlined bases are the restriction sites.

MMP 基础培养基中补加的碳源: 2 g/L 的葡萄糖或 10 mmol/L 的氨基酸(异亮氨酸, Ile; 半胱氨酸, Cys; 苯丙氨酸, Phe; 亮氨酸, Leu; 色氨酸, Trp; 丝氨酸, Ser; 甘氨酸, Gly; 甲硫氨酸, Met; 脯氨酸, Pro; 苏氨酸, Thr; 谷氨酰胺, Gln; 天冬酰胺, Asn; 缬氨酸, Val; 丙氨酸, Ala; 精氨酸, Arg; 组氨酸, His; 酪氨酸, Tyr; 谷氨酸, Glu; 赖氨酸, Lys; 天冬氨酸, Asp; 这些氨基酸中的一种)。

PB 培养基(g/L): NaCl 1.4, K₂SO₄ 10.0, 胰蛋白胨 20.0, pH 7.0^[1]。

集群运动(swarming motility)培养基(g/L):

营养肉汤 8.0, 葡萄糖 5.0, 琼脂糖 5.0, pH 7.0^[24]。

泳动运动(swimming motility)培养基(g/L): 蛋白胨 10.0, NaCl 5.0, 琼脂糖 3.0, pH 7.0^[24]。

蹭行运动(twitching motility)培养基(g/L): 蛋白胨 10.0, 酵母提取物 5.0, NaCl 5.0, 琼脂糖 10.0, pH 7.0^[24]。

抗生素使用情况如下: 铜绿假单胞菌(硫酸卡那霉素 30 µg/mL, 氯霉素 30 µg/mL, 庆大霉素 100 µg/mL, 四环素 200 µg/mL), 大肠杆菌(硫酸卡那霉素 30 µg/mL, 氯霉素 30 µg/mL, 四环素 20 µg/mL, 庆大霉素 10 µg/mL)。

表 2 菌株和质粒信息表

Table 2 List of strains and plasmids used in this study

Strains and plasmids	Related features	Source
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		
PAO1 (ATCC 15692)	Wild-type	Laboratory collection
$\Delta antABC$	Mutant of knockout <i>antABC</i> in PAO1	This study
$\Delta pqsA$	Mutant of knockout <i>pqsA</i> in PAO1	This study
$\Delta kynU$	Mutant of knockout <i>kynU</i> in PAO1	This study
$\Delta antABC\Delta pqsA$	<i>antABC/pqsA</i> double deletion mutant in PAO1	This study
<i>Escherichia coli</i>		
TG1	F' [traD36 proAB ⁺ lac I ^q lacZ Δ M15], supE, thi-1, Δ (lac-proAB), Δ (mcrB-hsdSM)5, (rK ⁻ mK ⁻)	Laboratory collection
S17-1	RP4-2 (Km::Tn7, Tc::Mu-1), pro-82, LAMpir, recA1, endA1, thiE1, hsdR17, creC510	Laboratory collection
Plasmids		
pK18mobsacB	Km ^r ; sacB-based gene replacement vector	[18]
p34s-Gm	Amp ^r ; Gm resistant cassette carrying vector	[19]
pME6032	Broad-host-range vector, Tc ^r	[20]
pME6032- <i>antABC</i>	<i>antABC</i> was cloned into pME6032	This study
pUCP24	Broad-host-range vector, Gm ^r	[21]
pUCP24- <i>antABC</i>	<i>antABC</i> was cloned into pUCP24	This study
pMini-CTX::lacZ	Ω -FRT- <i>attP</i> -MCS, <i>ori</i> , <i>int</i> , <i>oriT</i> , Tc ^r	[22]
pMini-CTX-P _{pelF} ::lacZ	P _{pelF} promoter was cloned into pMini-CTX::lacZ	Laboratory collection
pMini-CTX-P _{pslA} ::lacZ	P _{pslA} promoter was cloned into pMini-CTX::lacZ	Laboratory collection
pMini-CTX-P _{phz1} ::lacZ	P _{phz1} promoter was cloned into pMini-CTX::lacZ	Laboratory collection
pMini-CTX-P _{phz2} ::lacZ	P _{phz2} promoter was cloned into pMini-CTX::lacZ	Laboratory collection
pMini-CTX-P _{pqsA} ::lacZ	P _{pqsA} promoter was cloned into pMini-CTX::lacZ	Laboratory collection
pMini-CTX-P _{pqsH} ::lacZ	P _{pqsH} promoter was cloned into pMini-CTX::lacZ	Laboratory collection
pMini-CTX-P _{antR} ::lacZ	P _{antR} promoter was cloned into pMini-CTX::lacZ	Laboratory collection

Tc: Tetracycline; Gm: Gentamicin; Km: Kanamycin; Amp: Ampicillin.

1.4 主要试剂

琼脂糖、胰蛋白胨、酵母提取物、Tryptone Soya Broth 培养基, OXOID 公司; DNA 纯化回收试剂盒、质粒小提试剂盒, 天根生化科技(北京)有限公司; DNA 聚合酶, 北京全式金生物技术有限公司; 限制性内切酶, TaKaRa 公司; T4 DNA 连接酶, NEB 公司; o-硝基苯基- β -D-半乳糖苷(o-nitrophenyl- β -D-galactoside, ONPG), 西格玛奥德里奇(上海)贸易有限公司; 琼脂粉, Gentamicin、Kanamycin monosulfate、Chloramphenicol、Tetracycline 和 20 种氨基酸等,

北京索莱宝科技有限公司。其他常规试剂均使用国产分析纯。

1.5 突变株及互补菌株的构建

突变株及互补菌株的构建按照文献[25]报道的方法执行。

1.5.1 突变株的构建

本研究中突变株的构建主要采用同源重组的方法。以构建 $\Delta antABC$ 为例, 首先, 以铜绿假单胞菌 PAO1 的总 DNA 为模板, 用设计的两对引物 *antABC* up F/*antABC* up R 和 *antABC* low F/*antABC* low R 分别扩增了该基因的上游

antABC up 片段和下游 *antABC* low 片段, 再使用 *antABC* up F/*antABC* low R 引物以 *antABC* up 片段和 *antABC* low 片段为模板, 通过重叠延伸 PCR 构建基因敲除盒 $\Delta antABC$ 。将获得的敲除盒与自杀载体 pK18mobsacB 同时酶切(*Bam*H I/*Hind* III)后进行连接, 然后转化至大肠杆菌 TG1, 筛选阳性克隆并获得重组载体 pK18mobsacB- $\Delta antABC$ 连接庆大霉素抗性基因(Gm)后转化进大肠杆菌 S17-1 得到重组供体菌株 S17-1 (pK18mobsacB- $\Delta antABC$ -Gm)。随后, 将得到的供体菌与受体菌(铜绿假单胞菌 PAO1)通过接合的手段将重组载体导入铜绿假单胞菌 PAO1 中。随后, 将接合后的菌苔使用 LB 悬浮稀释后涂布于含有庆大霉素(100 μ g/mL)和氯霉素(30 μ g/mL)的 LB 双抗平板。长出的菌落经 PCR 验证后得到单交换体。获得的单交换体再通过 LB 无抗性摇菌, 稀释后涂布于含有卡那霉素(30 μ g/mL)和 12%蔗糖的 LB 平板上, 对长出的单菌落经 PCR 检测、抗性验证和测序后, 即获得 *antABC* 的缺失突变株。

1.5.2 互补菌株的构建

以构建 $\Delta antABC$ 的互补菌株为例, 首先使用引物 *antABC* F/*antABC* R, 扩增 *antABC* 操纵子基因片段。将成功扩增的 *antABC* 操纵子基因片段和互补载体 pME6032 同时酶切(*Eco*R I/*Bgl* II)后进行连接, 然后转化至大肠杆菌 TG1 中, 筛选阳性克隆并获得重组互补载体 pME6032-*antABC*。随后, 通过电击转化的方法将重组载体电转至 $\Delta antABC$ 突变株中, 经抗性筛选获得遗传互补菌株。使用同样的方法得到铜绿假单胞菌其他突变株的互补菌株。

1.6 生长曲线的测定

将待测菌株接种于 5 mL 液体 TSB 培养基中, 37 $^{\circ}$ C、220 r/min 培养 12 h 后按 1%转接至新鲜的 5 mL 液体 TSB 培养基中, 培养至稳定期

后分别各取 1 mL 的待测菌液, 4 500 r/min 离心 5 min 收集菌体, 再用 1 mL MMP 培养基悬浮清洗 2 次使各样品间 OD_{600} 测定的数值相等, 然后转接到新鲜的 5 mL 液体 MMP 培养基(设置不同碳源处理, 如以葡萄糖或不同的氨基酸为碳源), 调节起始 OD_{600} 为 0.05, 37 $^{\circ}$ C、220 r/min 振荡培养, 根据不同菌株的生长情况, 选择合适的时间间隔测定 OD_{600} , 绘制生长曲线。培养基中可根据实验需要添加适量浓度的抗生素及诱导剂 IPTG 等。

1.7 薄层色谱(thin-layer chromatography, TLC)实验

AQs 的提取方法主要参考文献[26]并加以修改。将待测菌株接种于 5 mL 的液体 LB 中, 37 $^{\circ}$ C、220 r/min 培养 12 h。将培养后的菌液按 1%转接至 5 mL 的液体 LB 中, 37 $^{\circ}$ C、220 r/min 培养至稳定期后 10 000 r/min 离心 10 min, 收集上清并用 0.22 μ m 的微孔过滤器过滤。将滤液用 3 倍体积的酸化乙酸乙酯(乙酸乙酯中加入 0.01%的冰醋酸)萃取 2 次。收集萃取液并旋转蒸发浓缩。浓缩提取物用甲醇溶解, 取 3 μ L 溶解液点 GF254 TLC 板。吹干后, 以二氯甲烷: 甲醇(95:5)为流动相进行层析。层析后使用紫外分析仪在 312 nm 波长下进行可视化观察并采集图片。

1.8 生物被膜的形成实验

生物被膜的形成方法主要参考文献[25]并加以修改, 首先将待测菌株接种于新鲜的 5 mL 液体 LB 培养基中, 待细菌培养至 OD_{600} 为 2.50 时, 取培养后的菌液按 1%稀释到新鲜 LB 培养基中, 混匀后取 100 μ L 稀释后菌液加入 96 孔 PVC 板中, 每个处理设置 8 个重复, 在 37 $^{\circ}$ C 培养箱中培养 24 h 后吸去菌液, 并在每个孔中加入 200 μ L 的磷酸盐缓冲液(PBS)清洗 2 次以除去非黏附细胞和培养基。室温干燥后, 向每孔里加

入 100 μL 0.1% 结晶紫染液对已形成的生物被膜染色 10 min, 再用 PBS 清洗 2 次。最后用适量的 95% 乙醇洗提附着在生物被膜上的结晶紫, 然后使用酶标仪测定乙醇洗涤液的 OD_{570} 对生物被膜进行定量。通过 8 个重复数据计算平均值和标准偏差。

1.9 绿脓菌素的含量测定

绿脓菌素含量测定方法主要参考文献[1]。将待测菌株接种于 5 mL 液体 TSB 培养基, 37 $^{\circ}\text{C}$ 、220 r/min 培养至 OD_{600} 为 2.50, 按 1% 转接至 5 mL 新鲜的液体 PB 培养基中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 、220 r/min 培养 24 h 后, 将培养物以 8 000 r/min 离心 5 min 收集上清液, 在 5 mL 上清液中加入 3 mL 氯仿, 剧烈颠倒混匀 2 min 后, 以 8 000 r/min 的速度离心 10 min。然后, 将氯仿相转移至新的离心管中并加入 1 mL 0.2 mol/L 的 HCl 进行反萃取, 再次离心后, 取出 HCl 溶液, 测定 OD_{520} , 绿脓菌素含量 = $OD_{520} \times 17.072$ ($\mu\text{g/mL}$)。绿脓菌素含量的测定结果再用菌液的 OD_{600} 值做均一化处理。

1.10 运动性实验

集群运动、游泳运动和蹭行运动实验参考文献[27]的方法。3 种运动性实验分别在集群运动平板, 游泳运动平板和蹭行运动平板上进行。对于集群运动和游泳运动运动性实验, 将待测菌株接种于 5 mL 液体 LB 中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 、220 r/min 培养至 OD_{600} 为 0.80 后取 3 μL 菌液接种于各自平板中心, 30 $^{\circ}\text{C}$ 正置培养 20–24 h, 观察菌苔的扩散情况, 使用 ImageJ 软件以培养皿直径为标定长度测量菌苔面积。对于蹭行运动运动性实验, 用牙签挑取菌落穿刺接种于蹭行运动平板的底部, 37 $^{\circ}\text{C}$ 倒置培养 24 h, 然后用染色液(0.05% 考马斯亮蓝 R250, 40% 甲醇, 10% 乙酸)染色 3 h 后, 使用工业酒精脱洗至蹭行运动平板底部的细菌运动扩散圈清晰可见, 使用 ImageJ 软件以培养

皿直径为标定长度测量扩散圈面积。

1.11 β -半乳糖苷酶活性的检测

本研究测定 β -半乳糖苷酶活性的方法参考文献[28]并加以修改。吸取 200 μL 待测菌液, 检测 OD_{600} 后从中吸取 50 μL 菌液, 依次加入 420 μL 的 Z buffer、20 μL 氯仿和 10 μL 0.1% 十二烷基硫酸钠(SDS)。混合均匀后 30 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h。之后向混合液中加入 100 μL 浓度为 4 mg/mL 的 α -硝基苯基- β -D-半乳糖苷(ONPG)开始反应, 反应液变色后加入 250 μL 的 1 mol/L Na_2CO_3 终止反应, 并记录反应时间。12 000 r/min 离心 3 min, 检测反应后上清液的 OD_{420} 和 OD_{550} , 然后根据公式(1)计算 β -半乳糖苷酶活性, 以米勒单位(Miller units, MU)表示。

$$\text{MU} = 1\,000 \times (OD_{420} - 1.75 \times OD_{550}) / [OD_{600} \times \text{体积}(\text{mL}) \times \text{反应时间}(\text{min})] \quad (1)$$

Z buffer 配方(g/L): Na_2HPO_4 0.85, NaH_2PO_4 4.79, KCl 0.47, MgSO_4 0.12, pH 7.0, 最后加入 0.2% β -巯基乙醇。

1.12 白菜感染实验

白菜感染实验主要参考文献[24]的方法。将待测菌株接种于 5 mL 液体 LB 培养基, 37 $^{\circ}\text{C}$ 、220 r/min 培养至稳定期, 取 1 mL 菌液以 5 500 r/min 离心 5 min 收集菌体, 用 10 mmol/L 的 MgSO_4 悬浮并清洗菌体 2 次后, 调至 OD_{600} 为 2.00, 备用。选择新鲜且生长状况一致的白菜叶片, 表面经 0.1% H_2O_2 消毒后, 使用微量注射器接种 10 μL 预处理的菌液于白菜背面, 30 $^{\circ}\text{C}$ 保湿培养 6 d 后观察分析大白菜接种处感染情况, 最后使用 Image J 软件测量接种处感染面积。

1.13 大蜡螟幼虫感染实验

大蜡螟幼虫感染实验方法参考文献[29]并加以修改。将各待测菌株接种于液体 TSB 培养基培养至稳定期后, 转接至新鲜的液体 TSB 培

培养基中, 37 °C、220 r/min 培养至 OD_{600} 为 0.70, 吸取 1 mL 菌液, 以 5 000 r/min 离心 5 min 收集菌体, 使用无菌的 0.85% NaCl 清洗 2 次后, 重新悬浮菌体并稀释成 2×10^7 CFU/mL 的菌悬液, 备用。随后, 将生长状况一致的大蜡螟幼虫置于冰上 5–10 min。待大蜡螟幼虫麻醉后用微量注射器在大蜡螟幼虫尾部第 3 节处注射 5 μ L 菌悬液, 以注射 0.85% 的 NaCl 溶液为对照。每个处理注射 60 只大蜡螟幼虫, 室温下黑暗培养, 每 12 h 记录 1 次大蜡螟幼虫存活数, 采用 Kaplan-Meier 法绘制生存曲线, 并用 Mantel-Cox 对数秩检验对结果进行统计分析。

1.14 统计分析

本研究的每个处理都至少设定 3 个生物学重复, 实验结果以平均值 \pm 标准偏差的形式体现。采用 Student *t* (双尾非配对) 检验进行显著性分析。用 GraphPad Prism version 10.00 软件对结果进行统计学分析并作图, $P < 0.05$ 代表差异显著。

2 结果与分析

2.1 AntABC 是铜绿假单胞菌降解 Trp 所必需的

犬尿氨酸途径(KynuABU)是动物以及一些真菌和细菌体内色氨酸(Trp)分解代谢的主要途径^[30]。在铜绿假单胞菌中, Trp 的分解代谢是先通过 KynABU 途径将 Trp 转化成邻氨基苯甲酸, 邻氨基苯甲酸进一步在邻氨基苯甲酸双加氧酶复合物 AntABC 的催化下被降解并进入 TCA 循环(图 1)。

为了验证 KynABU-AntABC 途径是否只能降解 Trp, 比较分析了铜绿假单胞菌野生菌 PAO1 和 $\Delta antABC$ 突变株的生长表型差异情况。结果显示, 在基础培养基 MMP 中分别以 20 种不同的氨基酸为唯一碳源培养时, 相比于 PAO1, $\Delta antABC$ 只在以 Trp 为唯一碳源的情况下才出现明显的生长缺陷表型。这表明, 在测试的 20 种氨基酸中, 只有 Trp 的降解依赖于 AntABC 途径(图 2A–2D)。

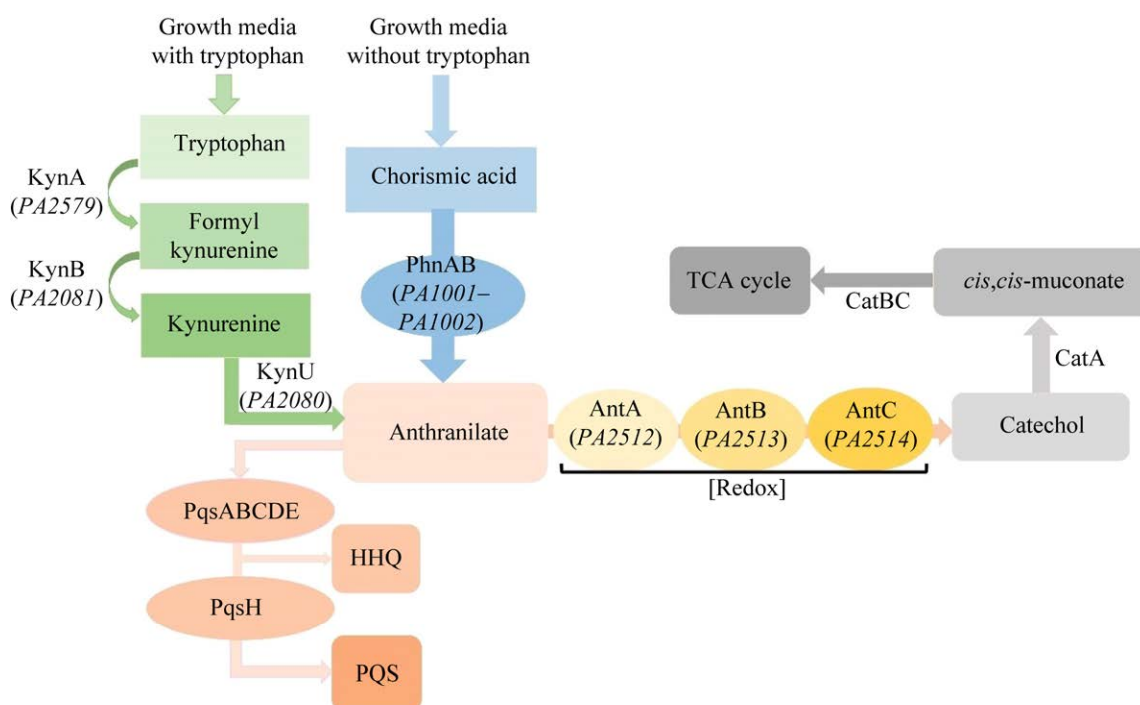


图 1 铜绿假单胞菌中邻氨基苯甲酸的生物合成、转化与降解示意图

Figure 1 Biosynthesis, transformation and degradation of anthranilate in *Pseudomonas aeruginosa*.

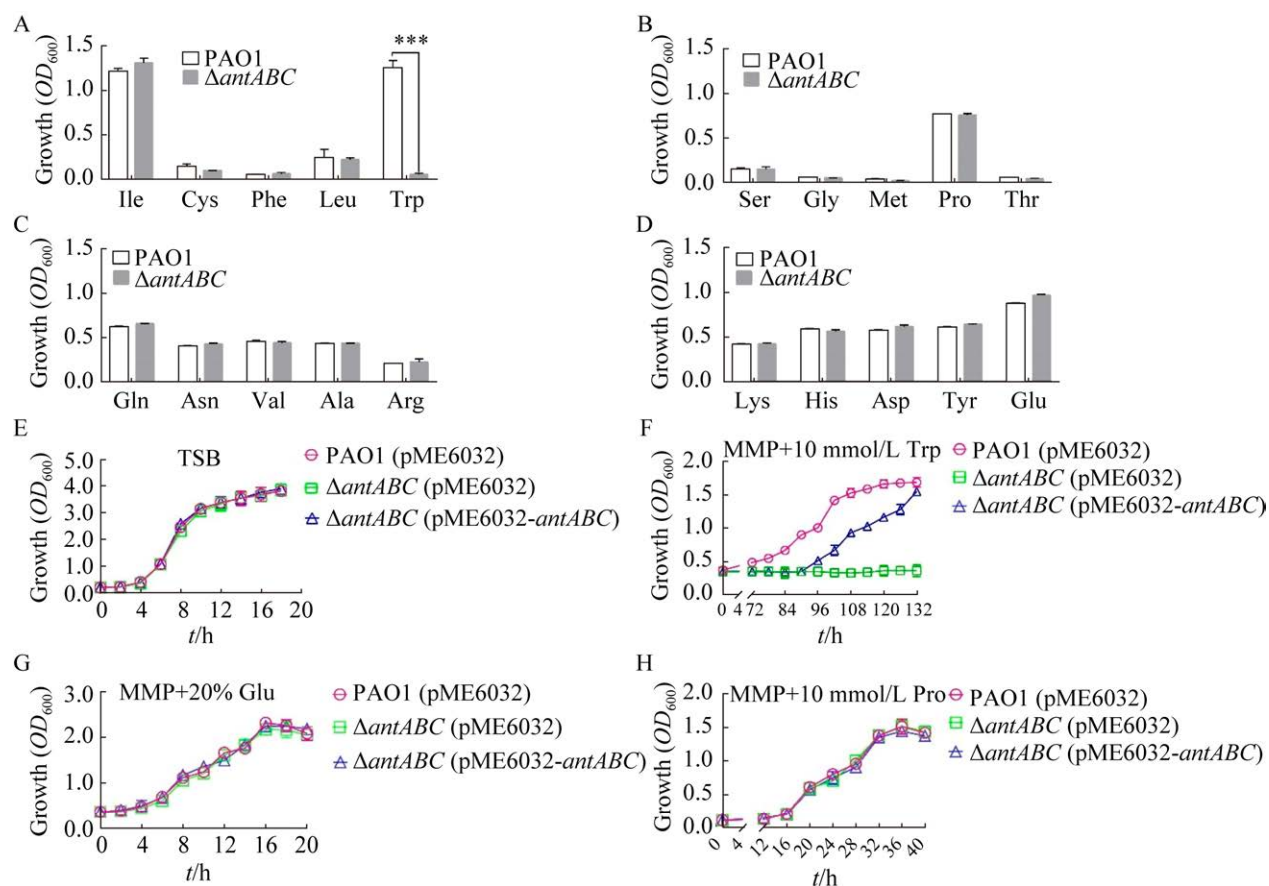


图2 铜绿假单胞菌各菌株在不同碳源培养基中的生长情况

Figure 2 The growth of *Pseudomonas aeruginosa* strains in different carbon source media. A–D: The growth of PAO1 and $\Delta antABC$ in MMP minimal salts medium with one of 20 amino acids as the sole carbon source. E–H: The growth curves of PAO1, $\Delta antABC$ and its complementary strain in liquid medium TSB, MMP minimal salts+10 mmol/L tryptophan (Trp), MMP minimal salts+20% glucose (Glu) and MMP minimal salts+10 mmol/L proline (Pro). All data represent at least three independent experiments. The error line represents the standard deviation. ***: $P < 0.001$.

遗传互补的结果显示, 在 TSB 培养基中缺失突变 *antABC* 对铜绿假单胞菌生长无显著影响 (图 2E), 而在 MMP 基础培养基中以 Trp 为唯一碳源培养时, $\Delta antABC$ 丧失了生长能力, 互补 *antABC* 后则恢复 $\Delta antABC$ 的生长, 接近 PAO1 的水平 (图 2F), 并且以葡萄糖 (Glu) 或脯氨酸 (Pro) 为唯一碳源培养时, PAO1、 $\Delta antABC$ 及其互补菌株之间的生长情况无显著差异 (图 2G、2H)。综上所述, *antABC* 途径对于铜绿假单胞菌降解 Trp 是必需的。

2.2 KynABU-AntABC 是铜绿假单胞菌在 MMP 培养基中降解色氨酸的唯一途径

上述结果表明铜绿假单胞菌的 *antABC* 是其降解 Trp 所必需的, 在 20 种氨基酸中只有 Trp 的降解依赖于 AntABC 途径。为了判断在铜绿假单胞菌中 KynABU-AntABC 途径是否为降解 Trp 的唯一途径, 构建了铜绿假单胞菌 *kynU* 缺失突变株, 生长表型分析显示在 MMP 基础培养基中以 Trp 为唯一碳源培养时, 相比于野生型 PAO1, $\Delta kynU$ 和 $\Delta antABC$ 均丧失了生长能力 (图 3A),

并且以葡萄糖(Glu)为唯一碳源培养时, PAO1、 $\Delta antABC$ 和 $\Delta kynU$ 菌株之间的生长无显著差异(图 3B), 说明 KynABU-AntABC 途径是铜绿假单胞菌降解 Trp 所必需的。然而铜绿假单胞菌中 Trp 经 KynABU 催化转化为邻氨基苯甲酸后, 除了通过 AntABC 被降解进入 TCA 循环外, 还能通过 PqsABCDE 代谢途径用于合成 AQS (图 1)。如果合成的 AQS 能被再降解, Trp 也能通过 KynABU-PqsABCDE 途径被代谢。为了验证这一假设, 本研究构建了 $\Delta pqsA$ 和 $\Delta antABC\Delta pqsA$ 突变株, 同样在以 Trp 为唯一碳源的 MMP 培养基中进行生长测定, 结果显示缺失突变 $pqsA$ 不影响铜绿假单胞菌在以 Trp 为唯一碳源的 MMP 培养基中的生长, 但相比 PAO1 和 $\Delta pqsA$, $\Delta antABC$ 和 $\Delta antABC\Delta pqsA$ 在该培养条件下均丧失了生长能力(图 3C), 而以葡萄糖(Glu)为唯一碳源培养时, PAO1、 $\Delta pqsA$ 、 $\Delta antABC$ 和

$\Delta antABC\Delta pqsA$ 菌株之间的生长无显著差异(图 3D)。综上所述, 在 MMP 培养基中, 铜绿假单胞菌的 KynABU-AntABC 途径是其降解 Trp 的唯一途径, 其合成的 AQS 不能被重新降解再利用。

2.3 缺失突变 *antABC* 促进了铜绿假单胞菌生物被膜的形成

上述结果表明缺失突变 *antABC* 影响了铜绿假单胞菌 AQS 的合成, 同时有研究报道 AQS 影响铜绿假单胞菌生物被膜的形成^[10]。为了探讨 *antABC* 操纵子对是否影响铜绿假单胞菌生物被膜的形成, 本研究对各菌株生物被膜的形成情况进行了分析比较。结果显示 $\Delta antABC$ 在 PVC 96 孔板上的生物被膜形成量显著高于其回补菌株和野生菌 PAO1, 说明缺失突变 *antABC* 显著增强了铜绿假单胞菌生物被膜的形成(图 4A)。当在 $\Delta antABC$ 的基础上进一步缺失 AQS 的合成基

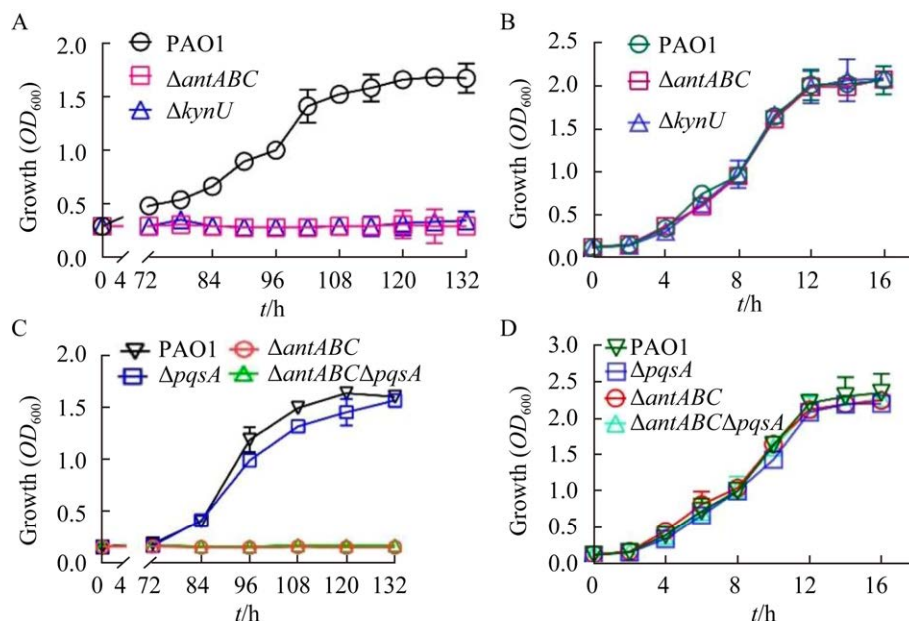


图 3 KynABU-AntABC 是铜绿假单胞菌在 MMP 培养基中降解色氨酸的唯一途径

Figure 3 KynABU-AntABC pathway is the only way for *Pseudomonas aeruginosa* to degrade tryptophan in MMP medium. A: The growth curves of PAO1, $\Delta antABC$, and $\Delta kynU$ in MMP minimal salts+10 mmol/L tryptophan. B: The growth curves of PAO1, $\Delta antABC$, and $\Delta kynU$ in MMP minimal salts+20% glucose. C: The growth curves of PAO1, $\Delta pqsA$, $\Delta antABC$, and $\Delta antABC\Delta pqsA$ in MMP minimal salts+10 mmol/L tryptophan. D: The growth curves of PAO1, $\Delta pqsA$, $\Delta antABC$, and $\Delta antABC\Delta pqsA$ in MMP minimal salts+20% glucose. All data represent at least three independent experiments. The error line represents the standard deviation.

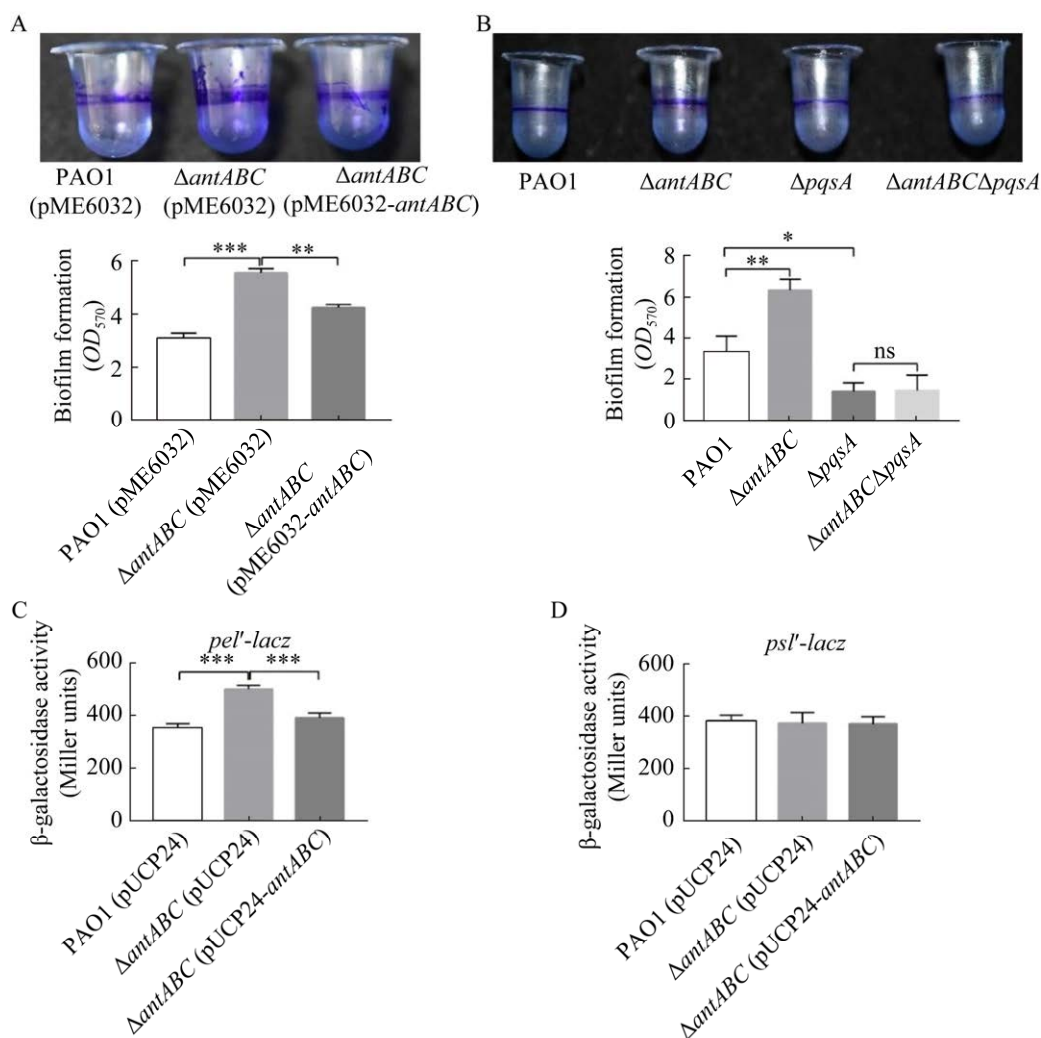


图 4 缺失突变 *antABC* 对铜绿假单胞菌生物被膜形成的影响

Figure 4 Effect of deletion mutation *antABC* on biofilm formation of *Pseudomonas aeruginosa*. A, B: Biofilm formation and quantitative analysis of different strains on 96-well plates. C, D: The expression levels of biofilm-related genes in PAO1, $\Delta antABC$ and its complementary strain were detected by *pel'*-*lacZ* and *psl'*-*lacZ* transcription fusion. All data represent at least three independent experiments. The error line represents the standard deviation. *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$; ns: No significant difference.

因 *pqsA* 时, 相比于 $\Delta antABC$, $\Delta antABC\Delta pqsA$ 的生物被膜形成能力显著降低, 且 $\Delta antABC\Delta pqsA$ 的生物被膜形成能力与 $\Delta pqsA$ 相似, 也均低于 PAO1 野生菌(图 4B), 说明缺失 Aqs 抑制了 $\Delta antABC$ 生物被膜形成增强的表型。综上所述, 缺失突变 *antABC* 以 Aqs 依赖的方式促进了铜绿

假单胞菌生物被膜的形成。

胞外多糖 Pel 和 Psl 是铜绿假单胞菌生物被膜基质的关键结构成分, 操纵子 *pelABCDEFGHIJKL* (简称 *pel*) 和 *pslABCDEFGHIJKLMNO* (简称 *psl*) 分别是负责胞外多糖 Pel 和 Psl 的生物合成^[31]。本研究进一步通过 *lacZ* 转录融合的手段, 分析

了缺失突变 *antABC* 对铜绿假单胞菌胞外多糖合成操纵子 *pel* 和 *psl* 表达的影响。结果显示 $\Delta antABC$ (pUCP24) 中胞外多糖合成操纵子 *pel* 的表达量相比野生菌 PAO1 (pUCP24) 和 $\Delta antABC$ (pUCP24-*antABC*) 互补菌株均有显著提升(图 4C), 而 *psl* 操纵子的表达量在这 3 个菌株之间则无显著差异(图 4D)。因此, 缺失突变 *antABC* 以 Aqs 依赖的方式促进了铜绿假单胞菌生物被膜的形成, 主要通过增强胞外多糖合成操纵子 *pel* 的表达实现的。

2.4 缺失突变 *antABC* 促进了铜绿假单胞菌绿脓菌素的合成

已有研究报道铜绿假单胞菌 PQS 系统正调控其绿脓菌素的合成^[32-33]。为了研究缺失突变 *antABC* 对铜绿假单胞菌绿脓菌素合成的影响, 本研究对各菌株绿脓菌素的合成情况进行了分析比较。结果显示 $\Delta antABC$ 菌株绿脓菌素的合成量显著高于其回补菌株和野生菌 PAO1, 说明缺失突变 *antABC* 显著增强了铜绿假单胞菌绿脓菌素的合成(图 5A)。此外, 相比于大量合成绿脓菌素的 PAO1 和 $\Delta antABC$ 菌株, $\Delta antABC\Delta pqsA$ 和 $\Delta pqsA$ 均几乎不合成绿脓菌素(图 5B), 说明缺失 Aqs 抑制了 $\Delta antABC$ 绿脓菌素合成增加的表型。综上所述, 缺失突变 *antABC* 以 Aqs 依赖的方式增强了铜绿假单胞菌绿脓菌素的合成。

由于铜绿假单胞菌绿脓菌素的合成由 *phzA1B1C1D2E1F1G1* (简称 *phz1*) 和 *phzA2B2C2D2E2F2G2* (简称 *phz2*) 这 2 个操纵子负责^[32]。因此, 我们检测了 *antABC* 对 *phz1* 和 *phz2* 表达的影响。结果显示相比于野生型 PAO1, *antABC* 缺失突变均显著增加了 *phz1* 和 *phz2* 的表达, 回补 *antABC* 又可恢复 *phz1* 和 *phz2* 的表达至野生型水平(图 5C、5D)。综上所述, 缺失突变 *antABC* 以 Aqs 依赖的方式增强了铜绿假单胞菌绿脓菌素的合成, 主要通过增强 *phz1* 和 *phz2* 的表达实现的。

2.5 缺失突变 *antABC* 促进了铜绿假单胞菌的集群运动和蹭行运动

铜绿假单胞菌主要有 3 种运动方式, 分别为集群运动、游泳运动和蹭行运动^[34]。已有研究报道铜绿假单胞菌 PQS 系统正调控铜绿假单胞菌的集群运动和蹭行运动^[35-36]。为了研究缺失突变 *antABC* 对铜绿假单胞菌运动性的影响, 本研究分析比较了各菌株的运动能力。结果显示, 相比于野生菌 PAO1, *antABC* 缺失突变显著增强了铜绿假单胞菌的集群运动和蹭行运动(图 6A、6E), 但不影响铜绿假单胞菌的游泳运动(图 6C、6D)。然而, 相比于 PAO1 野生菌, $\Delta pqsA$ 和 $\Delta antABC\Delta pqsA$ 的集群运动和蹭行运动能力却显著降低(图 6B、6F), 说明缺失 Aqs 抑制了 $\Delta antABC$ 集群运动和蹭行运动增强的表型。综上所述, 缺失突变 *antABC* 以 Aqs 依赖的方式增强了铜绿假单胞菌的集群运动和蹭行运动。

2.6 缺失突变 *antABC* 增强了铜绿假单胞菌的毒力

为了分析 *antABC* 对铜绿假单胞菌毒力的影响, 分别以白菜和大蜡螟幼虫为感染模型, 比较了各菌株的致病能力。结果显示, 相比于 PAO1 野生菌, 缺失突变 *antABC* 显著增加了铜绿假单胞菌对白菜和大蜡螟幼虫的毒力, 而互补 *antABC* 后可使 $\Delta antABC$ 的毒力表型恢复至野生菌水平(图 7A、7C)。然而, 在 $\Delta antABC$ 基础上进一步缺失 *pqsA* 则使铜绿假单胞菌对白菜和大蜡螟幼虫的毒力显著降低。说明缺失 Aqs 抑制了 $\Delta antABC$ 毒力增强的表型。由于 $\Delta antABC\Delta pqsA$ 对白菜和大蜡螟幼虫的毒力依然还显著高于 $\Delta pqsA$, 暗示 $\Delta antABC$ 毒力增强的表型不完全依赖于 Aqs (图 7B、7D)。综上所述, 缺失突变 *antABC* 增强了铜绿假单胞菌的毒力, 而且这种表型仅部分依赖于 Aqs。

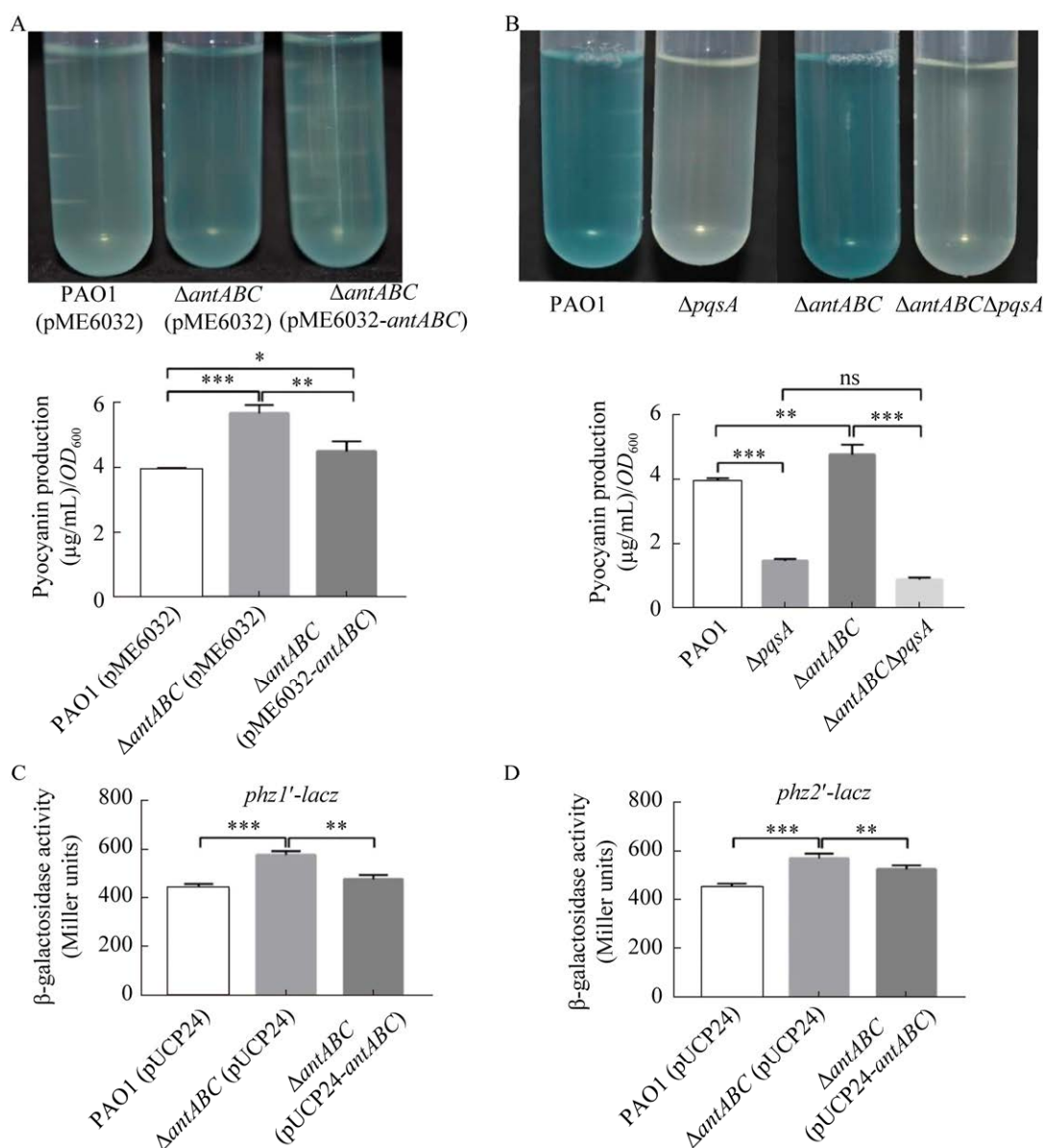


图5 缺失突变 *antABC* 对铜绿假单胞菌绿脓菌素合成的影响

Figure 5 Effect of deletion mutation *antABC* on pyocyanin biosynthesis of *Pseudomonas aeruginosa*. A, B: Synthesis and quantitative analysis of pyocyanin from different strains in PB medium. C, D: The expression levels of pyocyanin synthesis-related genes in PAO1, $\Delta antABC$ and its complementary strain were detected by *phz1'-lacZ* and *phz2'-lacZ* transcription fusion. All data represent at least three independent experiments. The error line represents the standard deviation. *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$; ns: No significant difference.

由于 *antABC* 缺失突变可导致铜绿假单胞菌的毒力增强,那么铜绿假单胞菌的临床分离株中是否会发生 *antABC* 突变以增强毒力的现象? 为探讨这一问题,本研究以铜绿假单胞菌 PAO1 的

AntABC 蛋白序列为模板,通过 Protein BLAST 比对分析从铜绿假单胞菌基因组数据库 (<https://www.pseudomonas.com>)中鉴定到 712 株临床分离的铜绿假单胞菌,其中有 392 株的

AntA 蛋白发生了错义突变, 突变率为 55.06%, 有 663 株的 AntB 蛋白发生了错义突变, 突变率为 93.12%, 有 662 株的 AntC 蛋白发生了错义突变, 突变率为 92.98% (具体的比对结果已上传至国家

微生物科学数据中心, 编号 NMDCX0000257)。说明 *antABC* 在铜绿假单胞菌的临床分离株中存在广泛的错义突变, 这些突变有可能使 AntABC 失活而增强铜绿假单胞菌的毒力。

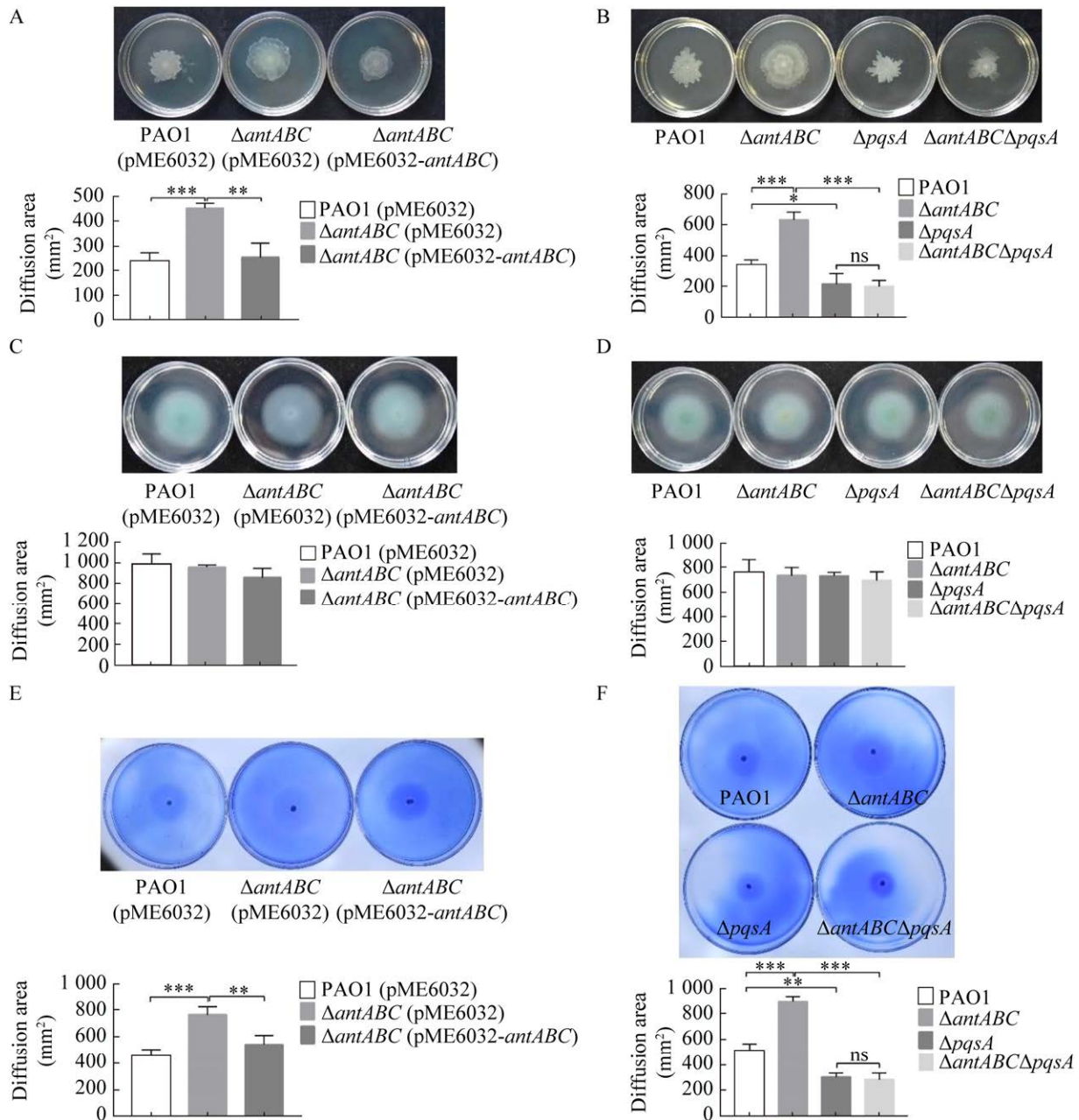


图 6 缺失突变 *antABC* 对铜绿假单胞菌集群运动和蹭行运动的影响

Figure 6 Effect of deletion mutation *antABC* on the swarming motility and twitching motility of *Pseudomonas aeruginosa*. A, B: Determination of swarming motility of *P. aeruginosa* different strains. C, D: Determination of swimming motility of *P. aeruginosa* different strains. E, F: Determination of twitching motility of *P. aeruginosa* different strains. All data represent at least three independent experiments. The error line represents the standard deviation. **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$; ns: No significant difference.

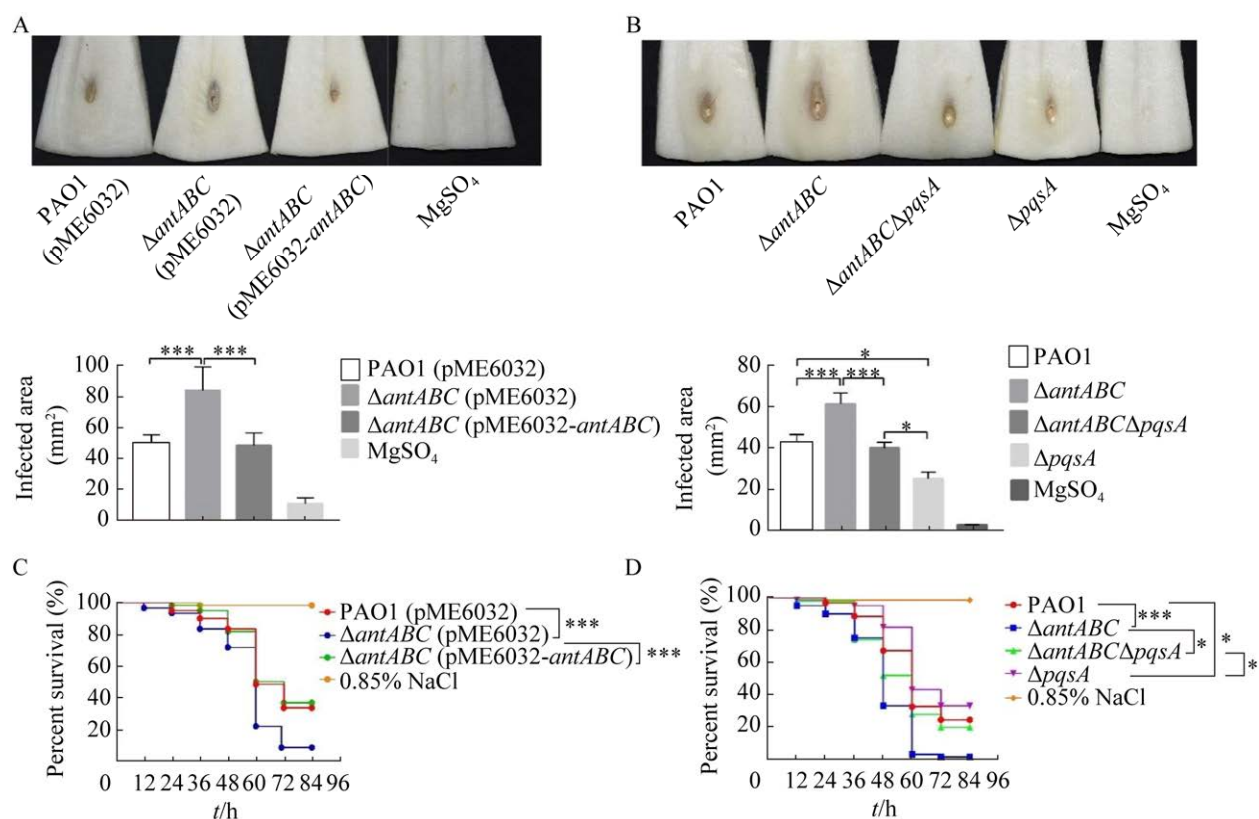


图 7 缺失突变 *antABC* 对铜绿假单胞菌毒力的影响

Figure 7 Effect of deletion mutation *antABC* on virulence of *Pseudomonas aeruginosa*. A, B: Determination of the lesion area of Chinese cabbage treated with different *P. aeruginosa* strains. C, D: Survival curves of the *Galleria mellonella* larvae treated with different *P. aeruginosa* strains. All data represent at least three independent experiments. The error line represents the standard deviation. *: $P<0.05$; ***: $P<0.001$.

2.7 缺失突变 *antABC* 对铜绿假单胞菌 AQs 和邻氨基苯甲酸含量的影响

为了研究缺失突变 *antABC* 对铜绿假单胞菌 AQs 和邻氨基苯甲酸含量的影响。一方面，本研究通过转录融合的手段检测了野生型 PAO1、 $\Delta antABC$ 及其互补菌株中 *pqsA* 和 *pqsH* 的表达水平。结果如图 8 所示， $\Delta antABC$ 中 *pqsA* 的表达水平显著高于野生菌 PAO1 (图 8A)，而同样条件下 $\Delta antABC$ 中 *pqsH* 的表达水平却显著低于野生菌 PAO1 (图 8B)，且回补 *antABC* 均可恢复 $\Delta antABC$ 的这些表型至 PAO1 水平。此外，通过薄层色谱(TLC)测定了稳定生长期的 PAO1、

$\Delta antABC$ 及其互补菌株中 AQs 的含量，并以 PQS 标准品和 HHQ 标准品作为阳性对照， $\Delta pqsA$ (不合成 AQs) 作为阴性对照。结果显示 $\Delta antABC$ 中 HHQ 的含量明显高于 PAO1，且回补 *antABC* 又能使 $\Delta antABC$ 的 HHQ 含量显著降低；相反，相比 PAO1 和互补菌株中明显的 PQS 信号，用 TLC 无法检测到 $\Delta antABC$ 中的 PQS 信号(图 8C)。另一方面，由于 *antR* 的表达量与铜绿假单胞菌中邻氨基苯甲酸的含量呈正相关，可用于评价胞内邻氨基苯甲酸的含量水平^[6]，通过转录融合的手段检测了野生型 PAO1、 $\Delta antABC$ 及其互补菌株中 *antR* 的表达水平以探究 *antABC* 缺失突变是否

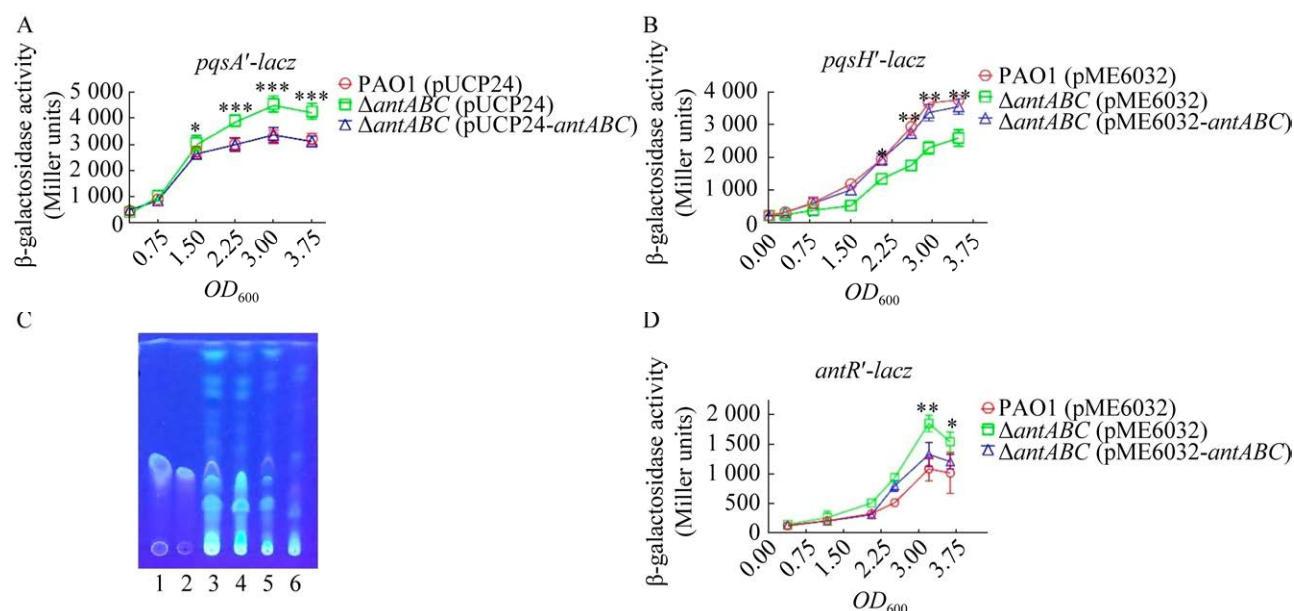


图 8 缺失突变 *antABC* 对铜绿假单胞菌 AQs 产生的影响

Figure 8 Effect of deletion mutation *antABC* on AQs production of *Pseudomonas aeruginosa*. A: The expression levels of *pqsABCDE* operon in PAO1, $\Delta antABC$ and its complementary strain were detected by *pqsA'-lacZ* transcription fusion. B: The expression levels of *pqsH* gene in PAO1, $\Delta antABC$ and its complementary strain were detected by *pqsH'-lacZ* transcription fusion. C: TLC analysis the AQs production of PAO1, $\Delta antABC$ and its complementary strain. Lane 1: 20 mmol/L PQS standard; Lane 2: 20 mmol/L HHQ standard; Lane 3: AQs extract of PAO1 (pME6032); Lane 4: AQs extract of $\Delta antABC$ (pME6032); Lane 5: AQs extract of $\Delta antABC$ (pME6032-*antABC*); Lane 6: AQs extract of $\Delta pqsA$ (pME6032). D: The expression levels of *antR* gene in PAO1, $\Delta antABC$ and its complementary strain were detected by *antR'-lacZ* transcription fusion. All data represent at least three independent experiments. The error line represents the standard deviation. *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$.

影响铜绿假单胞菌邻氨基苯甲酸的含量,结果如图 8D 所示, $\Delta antABC$ 中 *antR* 的表达水平显著高于野生菌 PAO1, 且回补 *antABC* 能恢复 $\Delta antABC$ 的表型至 PAO1 水平。综上所述, *antABC* 缺失突变使铜绿假单胞菌邻氨基苯甲酸的含量显著提升并且差异影响了铜绿假单胞菌 *pqsABCDE* 和 *pqsH* 的表达,通过增强 *pqsABCDE* 的表达和抑制 *pqsH* 的表达,显著促进 HHQ 的合成积累,同时降低 PQS 的形成。

3 讨论与结论

在铜绿假单胞菌中,邻氨基苯甲酸作为色氨酸(Trp)通过犬尿氨酸途径(KynABU)的转化产

物,既能用于合成烷基喹诺酮信号分子(AQs)又能被邻氨基苯甲酸双加氧酶复合体(AntABC)降解形成儿茶酚从而进入 TCA 循环(图 1)^[16]。铜绿假单胞菌 AntABC 除了介导邻氨基苯甲酸的降解外,其他的生物学效应是未知的。本研究构建了 *antABC* 的缺失突变株,并对其生理和毒力表型进行了分析。结果显示:(1) 铜绿假单胞菌 *antABC* 只能介导 Trp 的降解,并且在本研究指定的培养条件下 KynABU-AntABC 是该菌降解 Trp 的唯一途径;(2) 缺失突变 *antABC* 以 AQs 依赖的方式促进了铜绿假单胞菌的生物被膜形成、绿脓菌素合成、集群运动和蹭行运动,以及增强了铜绿假单胞菌对白菜和大蜡螟幼虫的毒

力; (3) 缺失突变 *antABC* 使铜绿假单胞菌积累了更多的邻氨基苯甲酸和 HHQ, 但却抑制了 PQS 的合成。

在 MMP 培养基中, 铜绿假单胞菌 *antABC* 只能介导 Trp 的降解, 并且 KynABU-AntABC 是该菌降解 Trp 的唯一途径, 即 Trp 转化为邻氨基苯甲酸后无法经 Aqs 进一步被降解。由于在以 Trp 为唯一碳源的 MMP 培养基中, 铜绿假单胞菌可以正常合成 Aqs (数据未展示), 说明铜绿假单胞菌合成的 Aqs 在该培养条件下是会被降解的。微生物在群体感应后期往往通过以下 2 种分子机制退出群体感应状态: (1) 微生物在群体感应后期迅速表达特异的降解酶, 降解群体感应信号分子; (2) 微生物在群体感应后期降低信号分子合成酶基因的表达, 从而降低群体感应信号分子的生物合成^[37]。因此, 铜绿假单胞菌退出 PQS 群体感应生理状态应该采取上述的第二种机制, 而不是直接降解信号分子。另外, 在铜绿假单胞菌中不能排除还存在其他色氨酸降解路径的可能性, 因为这种路径可能在本研究的培养条件下不表达。

本研究分析了缺失突变 *antABC* 对铜绿假单胞菌运动性的影响, 结果发现缺失突变 *antABC* 只增强了铜绿假单胞菌的集群运动和蹭行运动, 而对游泳运动无显著影响。由于铜绿假单胞菌的集群运动主要依赖于鞭毛和鼠李糖脂, 蹭行运动则依赖于菌毛, 而游泳运动依赖于鞭毛^[38-40]。因此, 缺失突变 *antABC* 显然不会影响铜绿假单胞菌鞭毛的合成和功能, 其对铜绿假单胞菌运动性的影响主要通过影响鼠李糖脂和菌毛的合成或功能实现的。

本研究的结果显示缺失突变 *antABC* 以 Aqs 依赖的方式促进了铜绿假单胞菌的生物被膜形成、绿脓菌素合成、集群运动和蹭行运动。缺失突变 *antABC* 使铜绿假单胞菌积累了更多的邻氨基苯甲酸和 HHQ, 却抑制了 PQS 的合成。研究

报道, 胞内的 PQS 信号分子能促进铜绿假单胞菌的生物被膜形成、绿脓菌素合成和集群运动, 而不影响它的蹭行运动^[9,41]。综上所述, 缺失突变 *antABC* 促进铜绿假单胞菌的生物被膜形成、绿脓菌素合成、集群运动和蹭行运动等的表型变化, 非 PQS 介导, 而是由胞内积累的 HHQ 所致。尽管有文献报道, 外源添加邻氨基苯甲酸能显著抑制铜绿假单胞菌的生物被膜形成^[42-43], 但是在 $\Delta antABC$ 遗传背景下, 进一步缺失突变 *pqsA* 完全逆转了 $\Delta antABC$ 生物被膜增强的表型, 这说明缺失突变 *antABC* 积累的邻氨基苯甲酸并未影响铜绿假单胞菌生物被膜的形成, 我们推测 *antABC* 突变积累的邻氨基苯甲酸的量并不足以抑制铜绿假单胞菌生物被膜的形成。综上所述, 缺失突变 *antABC* 以 HHQ 依赖的方式促进铜绿假单胞菌的生物被膜形成、绿脓菌素合成、集群运动和蹭行运动。

本研究发现缺失突变 *antABC* 增强了铜绿假单胞菌对白菜和大蜡螟幼虫的毒力, 且这种表型仅部分依赖于 Aqs, 因为在 $\Delta antABC$ 遗传背景下进一步缺失突变 *pqsA* 只能部分逆转 $\Delta antABC$ 的毒力表型。另外, 缺失突变 *antABC* 使铜绿假单胞菌积累了更多的邻氨基苯甲酸和 HHQ, 但却抑制了 PQS 的合成。在不同的感染模型中 PQS 信号分子在铜绿假单胞菌的毒力方面发挥着不同的作用^[9]。在小鼠烧伤感染模型中, 缺失 PQS 信号分子不影响铜绿假单胞菌的毒力^[44], 但在线虫感染模型中, PQS 信号分子却是铜绿假单胞菌的毒力所必需的^[45]。因此, 缺失突变 *antABC* 产生的毒力增强表型显然不是 PQS 所介导的。此外, 有文献报道铜绿假单胞菌培养物中的邻氨基苯甲酸含量水平在稳定生长期迅速增加, 然后再次下降, 形成一个邻氨基苯甲酸峰, 而铜绿假单胞菌的毒力会在邻氨基苯甲酸峰值前后发生显著改变, 显示邻氨基苯甲酸是调节铜绿假单胞

菌致病性相关表型的关键因素之一^[5,46]。因此缺失突变 *antABC* 对铜绿假单胞菌毒力的增强作用应该由 HHQ 和邻氨基苯甲酸共同介导。转录组分析结果显示, 信号分子 HHQ 在铜绿假单胞菌胞中通过其转录调节受体 PqsR 仅对自身的生物合成操纵子 *pqsABCDE* 有调控作用^[11]。*pqsABCDE* 合成操纵子最后一个基因编码的 PqsE 蛋白, 能与 *rhl* 群体感应系统的调节因子受体 RhlR 直接互作而调节 RhlR 的功能, 进而调控包括生物被膜形成、绿脓菌素合成、运动性和毒力在内的多种铜绿假单胞菌的致病表型^[11,47-49]。因此, 缺失突变 *antABC* 对铜绿假单胞菌相关致病表型的影响, 可能通过促进 HHQ 的合成积累, 进而增强 *pqsE* 的表达实现的。

总之, 本研究揭示了铜绿假单胞菌 *antABC* 的重要生物学效应, 它不仅能够负责铜绿假单胞菌色氨酸的降解, 而且在铜绿假单胞菌生物被膜形成、绿脓菌素合成、运动性及毒力等方面都发挥着十分重要的作用。此外, 通过生物信息学分析发现 *antABC* 在铜绿假单胞菌的临床分离株中存在广泛的错义突变, 这些突变有可能使 *AntABC* 失活而增强铜绿假单胞菌的毒力。因此 *antABC* 有望作为一种生物标志物来判断铜绿假单胞菌的临床分离株是否具有高毒力, 为针对铜绿假单胞菌的临床诊断和抗菌药物开发奠定了基础。

参考文献

- [1] ESSAR DW, EBERLY L, HADERO A, CRAWFORD IP. Identification and characterization of genes for a second anthranilate synthase in *Pseudomonas aeruginosa*: interchangeability of the two anthranilate synthases and evolutionary implications[J]. Journal of Bacteriology, 1990, 172(2): 884-900.
- [2] WHEATLEY RM, CABALLERO JD, van der SCHALK TE, de WINTER FHR, SHAW LP, KAPEL N, RECANATINI C, TIMBERMONT L, KLUYTMANS J, ESSER M, LACOMA A, PRAT-AYMERICH C, OLIVER A, KUMAR-SINGH S, MALHOTRA- KUMAR S, CRAIG MACLEAN R. Gut to lung translocation and antibiotic mediated selection shape the dynamics of *Pseudomonas aeruginosa* in an ICU patient[J]. Nature Communications, 2022, 13(1): 6523.
- [3] GHANEM SM, ABD EL-BAKY RM, ABOUREHAB MAS, FADL GFM, GAMIL NGFM. Prevalence of quorum sensing and virulence factor genes among *Pseudomonas aeruginosa* isolated from patients suffering from different infections and their association with antimicrobial resistance[J]. Infection and Drug Resistance, 2023, 16: 2371-2385.
- [4] CHATTERJEE P, SASS G, SWIETNICKI W, STEVENS DA. Review of potential *Pseudomonas* weaponry, relevant to the *Pseudomonas-Aspergillus* interplay, for the mycology community[J]. Journal of Fungi, 2020, 6(2): 81.
- [5] HWANG HJ, LI XH, KIM SK, LEE JH. Anthranilate acts as a signal to modulate biofilm formation, virulence, and antibiotic tolerance of *Pseudomonas aeruginosa* and surrounding bacteria[J]. Microbiology Spectrum, 2022, 10(1): e0146321.
- [6] KIM SK, IM SJ, YEOM DH, LEE JH. AntR-mediated bidirectional activation of *antA* and *antR*, anthranilate degradative genes in *Pseudomonas aeruginosa*[J]. Gene, 2012, 505(1): 146-152.
- [7] NEALSON KH, PLATT T, HASTINGS JW. Cellular control of the synthesis and activity of the bacterial luminescent system[J]. Journal of Bacteriology, 1970, 104(1): 313-322.
- [8] MARKUS V, PAUL AA, TERALI K, ÖZER N, MARKS RS, GOLBERG K, KUSHMARO A. Conversations in the gut: the role of quorum sensing in normobiosis[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2023, 24(4): 3722.
- [9] LIN JS, CHENG JL, WANG Y, SHEN XH. The *Pseudomonas* quinolone signal (PQS): not just for quorum sensing anymore[J]. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, 2018, 8: 230.
- [10] 李盼欣, 成娟丽, 张恒, 林金水. 铜绿假单胞菌群体感应信号分子 PQS 的功能多样性研究进展[J]. 微生物学报, 2023, 63(9): 3500-3519.
- LI PX, CHENG JL, ZHANG H, LIN JS. Research

- progress in functional diversity of quorum sensing signaling molecule PQS in *Pseudomonas aeruginosa*[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2023, 63(9): 3500-3519 (in Chinese).
- [11] RAMPIONI G, FALCONE M, HEEB S, FRANGIPANI E, FLETCHER MP, DUBERN JF, VISCA P, LEONI L, CÁMARA M, WILLIAMS P. Unravelling the genome-wide contributions of specific 2-alkyl-4-quinolones and PqsE to quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*[J]. PLoS Pathogens, 2016, 12(11): e1006029.
- [12] LEE J, ZHANG LH. The hierarchy quorum sensing network in *Pseudomonas aeruginosa*[J]. Protein & Cell, 2015, 6(1): 26-41.
- [13] SOUKARIEH F, MASHABI A, RICHARDSON W, OTON EV, ROMERO M, ROBERSTON SN, GROSSMAN S, SOU T, LIU RL, HALLIDAY N, KUKAVICA-IBRULJ I, LEVESQUE RC, BERGSTROM CAS, KELLAM B, EMSLEY J, HEEB S, WILLIAMS P, STOCKS MJ, CÁMARA M. Design and evaluation of new quinazolin-4(3H)-one derived PqsR antagonists as quorum sensing quenchers in *Pseudomonas aeruginosa*[J]. ACS Infectious Diseases, 2021, 7(9): 2666-2685.
- [14] KURNASOV O, JABLONSKI L, POLANUYER B, DORRESTEIN P, BEGLEY T, OSTERMAN A. Aerobic tryptophan degradation pathway in bacteria: novel kynurenine formamidase[J]. FEMS Microbiology Letters, 2003, 227(2): 219-227.
- [15] KNOTEN CA, WELLS G, COLEMAN JP, PESCI EC. A conserved suppressor mutation in a tryptophan auxotroph results in dysregulation of *Pseudomonas quinolone* signal synthesis[J]. Journal of Bacteriology, 2014, 196(13): 2413-2422.
- [16] COSTAGLIOLI P, BARTHE C, CLAVEROL S, BRÖZEL VS, PERROT M, CROUZET M, BONNEU M, GARBAY B, VILAIN S. Evidence for the involvement of the anthranilate degradation pathway in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation[J]. MicrobiologyOpen, 2012, 1(3): 326-339.
- [17] DJAPGNE L, PANJA S, BREWER LK, GANS JH, KANE MA, WOODSON SA, OGLESBY-SHERROUSE AG. The *Pseudomonas aeruginosa* PrrF1 and PrrF2 small regulatory RNAs promote 2-alkyl-4-quinolone production through redundant regulation of the *antR* mRNA[J]. Journal of Bacteriology, 2018, 200(10): e00704-17.
- [18] SCHÄFER A, TAUCH A, JÄGER W, KALINOWSKI J, THIERBACH G, PÜHLER A. Small mobilizable multi-purpose cloning vectors derived from the *Escherichia coli* plasmids pK18 and pK19: selection of defined deletions in the chromosome of *Corynebacterium glutamicum*[J]. Gene, 1994, 145(1): 69-73.
- [19] DENNIS JJ, ZYLSTRA GJ. Plasmids: modular self-cloning minitransposon derivatives for rapid genetic analysis of Gram-negative bacterial genomes[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1998, 64(7): 2710-2715.
- [20] HEEB S, BLUMER C, HAAS D. Regulatory RNA as mediator in GacA/RsmA-dependent global control of exoproduct formation in *Pseudomonas fluorescens* CHA0[J]. Journal of Bacteriology, 2002, 184(4): 1046-1056.
- [21] SCHWEIZER HP. *Escherichia-Pseudomonas* shuttle vectors derived from pUC18/19[J]. Gene, 1991, 97(1): 109-112.
- [22] BECHER A, SCHWEIZER HP. Integration-proficient *Pseudomonas aeruginosa* vectors for isolation of single-copy chromosomal *lacZ* and *lux* gene fusions[J]. BioTechniques, 2000, 29(5): 948-950, 952.
- [23] KWON DH, LU CD. Polyamines induce resistance to cationic peptide, aminoglycoside, and quinolone antibiotics in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1[J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2006, 50(5): 1615-1622.
- [24] WANG SW, FENG YQ, HAN XF, CAI XY, YANG L, LIU CL, SHEN LX. Inhibition of virulence factors and biofilm formation by wogonin attenuates pathogenicity of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 via targeting *pqs* quorum-sensing system[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2021, 22(23): 12699.
- [25] LIN JS, CHENG JL, CHEN KQ, GUO CH, ZHANG WP, YANG X, DING W, MA L, WANG Y, SHEN XH. The *icmF3* locus is involved in multiple adaptation- and virulence-related characteristics in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1[J]. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, 2015, 5: 70.
- [26] FLETCHER MP, DIGGLE SP, CÁMARA M, WILLIAMS P. Biosensor-based assays for PQS, HHQ and related 2-alkyl-4-quinolone quorum sensing signal molecules[J]. Nature Protocols, 2007, 2(5): 1254-1262.

- [27] RASHID MH, KORNBERG A. Inorganic polyphosphate is needed for swimming, swarming, and twitching motilities of *Pseudomonas aeruginosa*[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2000, 97(9): 4885-4890.
- [28] LIN JS, YANG JS, CHENG JL, ZHANG WP, YANG X, DING W, ZHANG H, WANG Y, SHEN XH. *Pseudomonas aeruginosa* H3-T6SS combats H₂O₂ stress by diminishing the amount of intracellular unincorporated iron in a dps-dependent manner and inhibiting the synthesis of PQS[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2023, 24(2): 1614.
- [29] LIN JS, ZHANG WP, CHENG JL, YANG X, ZHU KX, WANG Y, WEI GH, QIAN PY, LUO ZQ, SHEN XH. A *Pseudomonas* T6SS effector recruits PQS-containing outer membrane vesicles for iron acquisition[J]. Nature Communications, 2017, 8: 14888.
- [30] PHILLIPS RS. Structure, mechanism, and substrate specificity of kynureninase[J]. Biochimica et Biophysica Acta, 2011, 1814(11): 1481-1488.
- [31] 王帅涛, 高倩倩, 成娟丽, 林金水. 铜绿假单胞菌生物被膜组成及其受群体感应系统和 c-di-GMP 调控的研究进展[J]. 微生物学报, 2021, 61(5): 1106-1122.
- WANG ST, GAO QQ, CHENG JL, LIN JS. Regulation of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms by quorum sensing systems and c-di-GMP[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2021, 61(5): 1106-1122 (in Chinese).
- [32] RECINOS DA, SEKEDAT MD, HERNANDEZ A, COHEN TS, SAKHTAH H, PRINCE AS, PRICE-WHELAN A, DIETRICH LEP. Redundant phenazine operons in *Pseudomonas aeruginosa* exhibit environment-dependent expression and differential roles in pathogenicity[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2012, 109(47): 19420-19425.
- [33] GARCÍA-REYES S, SOBERÓN-CHÁVEZ G, COCOTL-YANEZ M. The third quorum-sensing system of *Pseudomonas aeruginosa*: *Pseudomonas* quinolone signal and the enigmatic PqsE protein[J]. Journal of Medical Microbiology, 2020, 69(1): 25-34.
- [34] KHAN F, PHAM DTN, OLOKETUYI SF, KIM YM. Regulation and controlling the motility properties of *Pseudomonas aeruginosa*[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2020, 104(1): 33-49.
- [35] BRU JL, RAWSON B, TRINH C, WHITESON K, HØYLAND-KROGHSSBO NM, SIRYAPORN A. PQS produced by the *Pseudomonas aeruginosa* stress response repels swarms away from bacteriophage and antibiotics[J]. Journal of Bacteriology, 2019, 201(23): e00383-19.
- [36] REEN FJ, MOOIJ MJ, HOLCOMBE LJ, McSWEENEY CM, McGLACKEN GP, MORRISSEY JP, O'GARA F. The *Pseudomonas* quinolone signal (PQS), and its precursor HHQ, modulate interspecies and interkingdom behaviour[J]. FEMS Microbiology Ecology, 2011, 77(2): 413-428.
- [37] 宋凯, 郭晓春, 陈博, 何亚文. 植物病原黄单胞菌退出群体感应生理状态的分子机制和生物学意义[J]. 微生物学报, 2021, 61(1): 68-76.
- SONG K, GUO XC, CHEN B, HE YW. Molecular mechanisms and biological significance of the naturally occurring turnover of DSF-family quorum sensing signal in the phytopathogen *Xanthomonas*[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2021, 61(1): 68-76 (in Chinese).
- [38] DÉZIEL E, LÉPINE F, MILOT S, VILLEMUR R. rhlA is required for the production of a novel biosurfactant promoting swarming motility in *Pseudomonas aeruginosa*: 3-(3-hydroxyalkanoyloxy) alkanolic acids (HAAs), the precursors of rhamnolipids[J]. Microbiology, 2003, 149(Pt 8): 2005-2013.
- [39] CONRAD JC, GIBIANSKY ML, JIN F, GORDON VD, MOTTO DA, MATHEWSON MA, STOPKA WG, ZELASKO DC, SHROUT JD, WONG GCL. Flagella and pili-mediated near-surface single-cell motility mechanisms in *P. aeruginosa*[J]. Biophysical Journal, 2011, 100(7): 1608-1616.
- [40] KÜHN MJ, TALÀ L, INCLAN YF, PATINO R, PIERRAT X, VOS I, AL-MAYYAH Z, MACMILLAN H, NEGRETE J Jr, ENGEL JN, PERSAT A. Mechanotaxis directs *Pseudomonas aeruginosa* twitching motility[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2021, 118(30): e2101759118.
- [41] GUO Q, KONG WN, JIN S, CHEN L, XU YY, DUAN KM. PqsR-dependent and PqsR-independent regulation of motility and biofilm formation by PQS in

- Pseudomonas aeruginosa* PAO1[J]. Journal of Basic Microbiology, 2014, 54(7): 633-643.
- [42] LI XH, KIM SK, LEE JH. Anti-biofilm effects of anthranilate on a broad range of bacteria[J]. Scientific Reports, 2017, 7(1): 8604.
- [43] KIM SK, PARK HY, LEE JH. Anthranilate deteriorates the structure of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms and antagonizes the biofilm-enhancing indole effect[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2015, 81(7): 2328-2338.
- [44] XIAO GP, DÉZIEL E, HE JX, LÉPINE F, LESIC B, CASTONGUAY MH, MILOT S, TAMPAKAKI AP, STACHEL SE, RAHME LG. MvfR, a key *Pseudomonas aeruginosa* pathogenicity LTTR-class regulatory protein, has dual ligands[J]. Molecular Microbiology, 2006, 62(6): 1689-1699.
- [45] GALLAGHER LA, McKNIGHT SL, KUZNETSOVA MS, PESCI EC, MANOIL C. Functions required for extracellular quinolone signaling by *Pseudomonas aeruginosa*[J]. Journal of Bacteriology, 2002, 184(23): 6472-6480.
- [46] PERKOVIĆ I, POLJAK T, SAVIJOKI K, VARMANEN P, MARAVIĆ-VLAHOVIČEK G, BEUS M, KUČEVIĆ A, DŽAJIĆ I, RAJIĆ Z. Synthesis and biological evaluation of new quinoline and anthranilic acid derivatives as potential quorum sensing inhibitors[J]. Molecules, 2023, 28(15): 5866.
- [47] RAMPIONI G, PUSTELNY C, FLETCHER MP, WRIGHT VJ, BRUCE M, RUMBAUGH KP, HEEB S, CÁMARA M, WILLIAMS P. Transcriptomic analysis reveals a global alkyl-quinolone-independent regulatory role for PqsE in facilitating the environmental adaptation of *Pseudomonas aeruginosa* to plant and animal hosts[J]. Environmental Microbiology, 2010, 12(6): 1659-1673.
- [48] SIMANEK KA, TAYLOR IR, RICHAEK EK, LASEK-NESSELQUIST E, BASSLER BL, PACZKOWSKI JE. The PqsE-RhlR interaction regulates RhlR DNA binding to control virulence factor production in *Pseudomonas aeruginosa*[J]. Microbiology Spectrum, 2022, 10(1): e0210821.
- [49] TAYLOR IR, PACZKOWSKI JE, JEFFREY PD, HENKE BR, SMITH CD, BASSLER BL. Inhibitor mimetic mutations in the *Pseudomonas aeruginosa* PqsE enzyme reveal a protein-protein interaction with the quorum-sensing receptor RhlR that is vital for virulence factor production[J]. ACS Chemical Biology, 2021, 16(4): 740-752.