

• 生物技术与新方法 •

鉴定 cyclic di-GMP 效应蛋白 :高通量筛选策略与实验验证方法

程寿廷^{1,2}, 王芳芳¹, 钱韦¹

1 中国科学院微生物研究所 植物基因组学国家重点实验室, 北京 100101

2 中国科学院遗传与发育生物学研究所 植物基因组学国家重点实验室, 北京 100101

程寿廷, 王芳芳, 钱韦. 鉴定 cyclic di-GMP 效应蛋白:高通量筛选策略与实验验证方法. 生物工程学报, 2017, 33(9): 1376-1389.

Cheng ST, Wang FF, Qian W. Identification of cyclic di-GMP protein receptors: high-throughput screening strategies and experimental verification. Chin J Biotech, 2017, 33(9): 1376-1389.

摘要: 环二鸟苷单磷酸 (cyclic di-GMP 或 c-di-GMP) 是细菌细胞中广泛存在的第二信使, 调控细菌生物被膜发育、致病力、运动性、胞外多糖产生及细胞周期在内的诸多重要生理表型。c-di-GMP 通过结合多种类型的效应子 (包括核糖开关或效应蛋白) 来发挥调控功能。由于 c-di-GMP 分子在构象上具有多变性, 其结合的效应子同样具有多样性。新型效应蛋白的筛选、鉴定是当前细菌信号转导领域的研究热点和难点, 也是解析 c-di-GMP 调控机制的首要环节。本文在阐述 c-di-GMP 结合不同类型的效应蛋白并调控细菌生物被膜发育的基础上, 综述了目前筛选 c-di-GMP 效应蛋白的方法, 包括遗传筛选、亲和色谱结合质谱鉴定、DRaCALA 系统鉴定以及基于分子对接的预测等。同时, 对验证 c-di-GMP 效应蛋白的技术, 如等温微量热滴定、表面等离子共振、微量热泳动在内的多种验证方法进行了总结, 对比了这些策略和方法在应用上的优、缺点, 为在细菌及其真核宿主基因组水平鉴定 c-di-GMP 效应蛋白的研究提供参考。

关键词: 环二鸟苷酸单磷酸, 二鸟苷酸环化酶, 磷酸二酯酶, 效应蛋白, 生物被膜

Received: April 28, 2017; **Accepted:** June 12, 2017

Supported by: National Natural Science Foundation of China (Nos. 31400071, 31370127).

Corresponding author: Wei Qian. Tel: +86-10-64806063; E-mail: qianw@im.ac.cn

国家自然科学基金 (Nos. 31400071, 31370127) 资助。

网络出版时间: 2017-06-26

网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1998.Q.20170626.1455.005.html>

Identification of cyclic di-GMP protein receptors: high-throughput screening strategies and experimental verification

Shouting Cheng^{1,2}, Fangfang Wang¹, and Wei Qian¹

¹ State Key Laboratory of Plant Genomics, Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China

² State Key Laboratory of Plant Genomics, Institute of Genetics and Developmental Biology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China

Abstract: cyclic di-GMP (c-di-GMP) is a universal second messenger in bacterial cells. It regulates various biological processes such as biofilm development, pathogenicity, motility, exopolysaccharide (EPS) production and cell cycle. The second messenger exerts its function by binding to effectors, such as riboswitches and proteins. However, due to the diverse conformations of c-di-GMP, its effectors are hardly to be predicted by homology search. Identification of c-di-GMP effectors is the initial step to investigate its regulatory function in bacterial signal transduction, however, it remains to be a technically difficult task. Here we reviewed the mechanism of biofilm development controlled by c-di-GMP through binding to various types of protein effectors, and summarized the screening strategies, including genetics analysis, protein pull-down combined with LC/MS/MS identification, DRaCALA systematic screening and molecular docking-based prediction. We also summarized experimental methods for verifying protein-c-di-GMP interaction, including isothermal titration calorimetry, surface plasmon resonance, microscale thermophoresis etc. In addition, we discussed the advantages and disadvantages of these strategies and methods. The present review aims to facilitate the future investigations that are focused on regulatory role of novel c-di-GMP effectors.

Keywords: cyclic di-GMP, diguanylate cyclase, phosphodiesterase, effector, biofilm

1 c-di-GMP 的研究简况及其调控功能

细菌环二鸟苷单磷酸 (c-di-GMP) 的研究始于 1987 年, Benziman 研究组在分析木驹形杆菌 *Komagataeibacter xylinus* (当时称木醋酸杆菌 *Acetobacter xylinum*, 后来称木葡糖酸醋杆菌 *Gluconacetobacter xylinus*) 纤维素的产生机制时, 发现 c-di-GMP 作为一种别构剂, 增强纤维素合成酶的活性^[1-3]。这一发现的重要意义被忽视了近 10 年, 直到后续研究表明 c-di-GMP 是一个广泛分布于各类细菌中、具有重要调控功能的新型第二信使。c-di-GMP 参与调控细菌生物被膜的形成与消解、运动性、胞外多糖的产

生、致病力、细胞形态、细胞周期及细胞分化等许多重要生理过程^[3-4]。近 10 余年来, c-di-GMP 调控功能的研究是细菌信号转导领域的前沿。除 c-di-GMP 以外, 核苷类第二信号分子还包括环二腺苷单磷酸 (c-di-AMP)、环鸟苷腺苷单磷酸 (c-GAMP)、(五) 四磷酸鸟苷[(p)ppGpp] 以及研究历史最悠久的环腺苷单磷酸 (cAMP) 及环鸟苷单磷酸 (cGMP) 等, 其中 c-di-GMP 是研究最为深入的第二信使分子之一^[2]。

2 c-di-GMP 的代谢

细菌胞内 c-di-GMP 的浓度会随着胞内或外界环境信号的刺激而改变, 胞内 c-di-GMP 的浓度变

化由其合成酶——二鸟苷酸环化酶 (Diguanylate cyclases, DGCs) 与降解酶——c-di-GMP 特异性的磷酸二酯酶 (Phosphodiesterases, PDEs) 共同调节。其中, 具有 GGDEF 结构域的 DGCs 能够催化将 2 分子的 GTP 合成 1 分子 c-di-GMP^[5]; 具有 EAL 或 HD-GYP 结构域的 PDEs 催化 c-di-GMP 降解为线性的 5'-pGpG, 之后再降解为 2 分子 GMP^[6-7]。EAL 结构蛋白与 HD-GYP 结构域蛋白酶活性有所不同, 前者具有较低的 5'-pGpG 降解活性, 而后者则可以高效地降解 5'-pGpG。研究表明 EAL 结构域广泛分布于多种细菌细胞中, 而且往往与 GGDEF 结构域串联存在于同一个蛋白中。而 HD-GYP 结构域在细菌中一般分布不多, 有些细菌根本不编码 HD-GYP 结构域蛋白^[3]。由于 EAL 结构域蛋白具有较低的 5'-pGpG 降解活性, 推测在不编码 HD-GYP 结构域蛋白的细菌细胞内, 可能存在催化 5'-pGpG 降解的其他酶。最近研究表明, 寡聚核糖核酸酶 (Oligoribonuclease, Orn) 可以高效地催化 5'-pGpG 降解为 2 分子的 GMP^[8-9]。这一发现解释了在不含 HD-GYP 结构域蛋白的细菌中 5'-pGpG 降解的问题。因此, Orn 间接参与胞内 c-di-GMP 水平的控制。

3 c-di-GMP 调控细菌生物被膜形成的分子机制

c-di-GMP 通过结合效应子 (包括 RNA 类的核糖开关和效应蛋白) 来发挥作用。本文主要综述效应蛋白的筛选鉴定方法与研究进展。

鉴于 c-di-GMP 分子自身构象的多样性, 其结合的效应蛋白类型也是多种多样的。c-di-GMP 通过别构效应调控效应蛋白的信号输出功能, 包括酶活性 (如 MshE、CckA)^[10-11],

DNA 结合活性 (如 FleQ、CLP、MrkH)^[12-14], 蛋白质多聚化状态 (如 VpsT)^[15-16], 蛋白质-蛋白质相互作用 (PgaC/D、FimX、YajQ)^[17-19]。不同类型的效应蛋白通过多种不同的信号输出方式来发挥不同的调控功能。以下简要介绍 c-di-GMP 通过效应蛋白介导的生物被膜 (Biofilm) 形成的调控机制。

生物被膜是细菌附着在生物或非生物表面的一种聚集的生活形式, 与细菌的群体感应 (Quorum-sensing)、营养摄取、抗逆能力等密切相关^[20]。生物被膜的形成与消解是一个复杂的过程, 与细菌的运动性、胞外基质的产生等密切相关。c-di-GMP 可以结合多种不同类型的效应蛋白, 进而通过不同的机制调控细菌的生物被膜的形成与消解过程。例如, LapD 是荧光假单胞菌 *Pseudomonas fluorescens* Pf0-1 中 1 个包含退化 EAL 结构域的 c-di-GMP 效应蛋白, 调控 Pf0-1 生物被膜的形成。Newell 等发现在高浓度的 c-di-GMP 条件下, 效应蛋白 LapD 结合并抑制周质蛋白酶 LapG 的活性, 阻止 LapG 对黏附蛋白 LapA N 端的切割, 进而促进了 Pf0-1 生物被膜的产生^[20]。

霍乱弧菌 *Vibrio cholerae* 的浮游状态与生物被膜形成之间的转换受到 c-di-GMP 调控, 其中 c-di-GMP 效应蛋白 VpsT 在这一转换过程中发挥关键作用。c-di-GMP 结合 VpsT 后, 导致该转录因子多聚化, 与启动子区域结合进而调控 *vps* 基因簇的转录。Vps 基因簇通过调控 *V. cholerae* 胞外基质的产生, 来调控其生物被膜的发育^[15-16]。除 VpsT 外, *V. cholerae* 生物被膜的形成还与甘露糖敏感的血球凝聚素 (MshA) 纤毛相关。Roelofs 等发现 c-di-GMP 可以直接结合 ATP 酶 MshE, 提示了 c-di-GMP 可能通过 MshE 来影响

MshA 的合成, 进而影响了 *V. cholerae* 的运动性, 最终调控其生物被膜的发育^[10]。研究者从遗传和生化角度阐明了 c-di-GMP 调控细菌生物被膜发育的新机制。

胞外多糖 (Exopolysaccharide, EPS) 是细菌生物被膜形成所需胞外基质的主要成分之一。大肠杆菌 *Escherichia coli* 中 *pgaABCD* 操纵子与 EPS 的合成与分泌相关, 其中 PgaC 和 PgaD 参与多聚葡糖胺的合成^[21]。Steiner 等发现 c-di-GMP 可以直接结合效应蛋白 PgaC 和 PgaD, 维持 PgaCD 蛋白复合体的稳定性^[17]。高浓度 c-di-GMP 通过稳定 PgaCD 复合体的方式防止了 PgaD 的降解, 同时激活 PgaCD 蛋白复合物糖基转移酶活性, 促进了 *E. coli* 生物被膜的形成。

4 c-di-GMP 效应蛋白鉴定策略

经过多年的研究, 已经发现 c-di-GMP 效应子主要包括效应蛋白以及 RNA 类的核糖开关 (Riboswitch)。效应蛋白又可以分为 PilZ 结构域蛋白, 退化的 GGDEF 或 EAL 结构域蛋白以及转录因子等。近年来陆续鉴定了多个具有 c-di-GMP 结合活性的 ATP 酶类效应蛋白, 如 FleQ、MshE 以及 CckA^[10-12], 表明 ATP 酶类蛋白是一类新的 c-di-GMP 效应蛋白。

新型效应蛋白的筛选鉴定一直是 c-di-GMP 研究中的重点和难点。虽然 PilZ 结构域蛋白和退化的 GGDEF 或 EAL 效应蛋白可以通过基于氨基酸序列的生物信息学方法进行预测。但这一方法对不具有氨基酸序列保守性的效应蛋白并不适用。到目前为止, c-di-GMP 效应蛋白的鉴定筛选主要有以下 4 种策略。

4.1 遗传筛选

c-di-GMP 效应蛋白感应胞内 c-di-GMP 浓度

并调控相关表型。基于这一特性, 研究者设计了遗传学方法筛选 c-di-GMP 效应蛋白。通常采用过表达 DGCs 或缺失 PDEs 的方法, 创建具有高浓度胞内 c-di-GMP 且具有明显表型的起始菌株。然后利用规模化突变方法得到突变表型恢复的突变菌株。对表型恢复菌株的突变基因进行测序鉴定即可得到编码效应蛋白的候选基因, 通过对候选基因的进一步验证即有可能鉴定到新型 c-di-GMP 效应蛋白 (图 1A)。如伯克霍尔德氏菌 *Burkholderia cenocepacia* 中 Bcam1349 即是通过遗传筛选的方式鉴定得到^[22]。

遗传筛选这一策略不依赖效应蛋白的氨基酸序列特征, 因此很有可能筛选到除了 PilZ 结构域蛋白和退化的 GGDEF 或 EAL 结构域蛋白之外的新型效应蛋白。但这一策略存在一定的局限性: 1) 筛选过程依赖于具有明显表型的起始菌株, 在某些细菌中这一起始菌株并不一定可以得到。2) 对于那些 c-di-GMP 抑制效应蛋白的功能所产生的表型, 突变效应蛋白编码基因的策略不可能得到表型恢复菌株, 也就无法进行效应蛋白的鉴定。3) 有可能筛选得到抑制和调控上述突变表型, 但不直接参与 c-di-GMP 结合的蛋白。

4.2 亲和色谱结合 LC/MS/MS 鉴定

随着新型亲和色谱磁珠^[19,23]的出现和带亲和和标签 c-di-GMP 衍生物的合成^[24], 利用亲和色谱结合蛋白质质谱鉴定 c-di-GMP 效应蛋白变得更为便捷。早期研究利用固定有 GTP 的亲和磁珠来捕获 c-di-GMP 效应蛋白。如 Christen 等利用这一方法鉴定到新月柄杆菌 *Caulobacter crescentus* 中 DgrA 是一个新的 c-di-GMP 效应蛋白^[23]。生物素标记的 c-di-GMP (Biotin-c-di-GMP) 含有 biotin 基团和 c-di-GMP 基团, 两个功能基团通

过柔性的 AHC 链连接起来,分别结合链亲合素磁珠 (Biotin 基团) 与 c-di-GMP 效应蛋白 (c-di-GMP 基团) (图 1B)。An 等利用固定链亲合素的磁珠和带生物素标签的 c-di-GMP, 鉴定到野油菜黄单胞菌 *Xanthomonas campestris* 中一个新型的 c-di-GMP 效应蛋白 YajQ^[19]。

近年来发展的 c-di-GMP 捕获复合体 (c-di-GMP capture complex, c-di-GMP-CC)^[24]通过紫外交联的方式将捕获到的 c-di-GMP 结合蛋白固定下来,因此可以特异性地捕获具有 c-di-GMP 结合活性的膜蛋白。Sprecher 等利用 c-di-GMP-CC 鉴定到新月柄杆菌中 HfsK 是一个定位于细胞膜上的新型 c-di-GMP 效应蛋白。c-di-GMP 结合 HfsK 后,影响该蛋白与未知膜组分 (Membrane component X) 的相互作用并控制 HfsK 的亚细胞定位,最终调控了 *C. crescentus* 在固体表面基质的黏着特性^[25]。

相较于遗传筛选策略,亲和色谱是一种垂钓式的分析策略,它不依赖于 c-di-GMP 效应蛋白的调控机制,而是取决于其与 c-di-GMP 的相互作用力。研究表明这一方法更容易得到与 c-di-GMP 具有强亲和力的效应蛋白^[19,23-25],而应用于筛选与 c-di-GMP 具有弱亲和力或者在胞内表达丰度较低的效应蛋白时则有一定的局限性。

4.3 DRaCALA 系统筛选

差异性配体毛细辐射实验 (Differential radial capillary action of ligand assay, DRaCALA)是基于 c-di-GMP 与效应蛋白互作原理的另一种系统化鉴定方法^[26]。利用蛋白质可以被硝酸纤维素膜 (Nitrocellulose membrane, NC 膜) 吸附固定,而小分子配体可以在 NC 膜上自由扩散,将放射性小分子与蛋白质共同孵育后点到硝化纤维膜上,

结合在蛋白质上的小分子会随蛋白固定在 NC 膜上,形成“内圈”;而游离的小分子则在 NC 膜上自由向外周扩散,形成“外圈”(图 1C)。DRaCALA 操作简单快捷,适用于规模化筛选。Roelofs 等利用 Gateway 方法构建了 *V. cholerae* 中 3 812 个蛋白的表达文库,其中 384 蛋白可以在大肠杆菌中异源表达。将蛋白表达菌株的裂解液与放射性的 $[\alpha^{32}\text{P}]$ c-di-GMP 共孵育,利用复制器将样品批量点在硝化纤维素膜上,通过检测放射性信号来筛选 c-di-GMP 结合蛋白。最终鉴定到 ATP 酶 MshE 是一个新型的 c-di-GMP 效应蛋白^[10]。

DRaCALA 在一定程度上克服了亲和色谱实验中低亲和力效应蛋白或低丰度效应蛋白很难被鉴定到的困扰,但它需要单独表达大量蛋白。由于有些蛋白无法异源表达,该策略同样有一定的局限性。

4.4 基于分子对接预测的筛选方法

一般而言,基于氨基酸序列特征的生物信息学方法无法预测除了 PilZ 结构域蛋白和退化的 GGDEF 或 EAL 结构域蛋白之外的 c-di-GMP 效应蛋白。但是,基于蛋白质三维结构的分子对接是鉴定新型 c-di-GMP 效应蛋白的可行方法。该方法基于已知的蛋白结构信息和已知的 c-di-GMP 构象信息,通过反向分子对接的策略筛选与 c-di-GMP 互作的候选蛋白,经过后续的互作验证及功能分析,即可确定新型的 c-di-GMP 效应蛋白 (图 1D)。例如, Li 等利用已知蛋白结构数据库,通过分子对接的生物信息学筛选,鉴定到人源蛋白 LCN2 是 c-di-GMP 的效应蛋白^[27]。LCN2 是继 STING 和 DDX41 之后的又一例人源 c-di-GMP 效应蛋白^[28-29]。这一研究为鉴定 c-di-GMP 效应蛋白的筛选提供了新的思路。

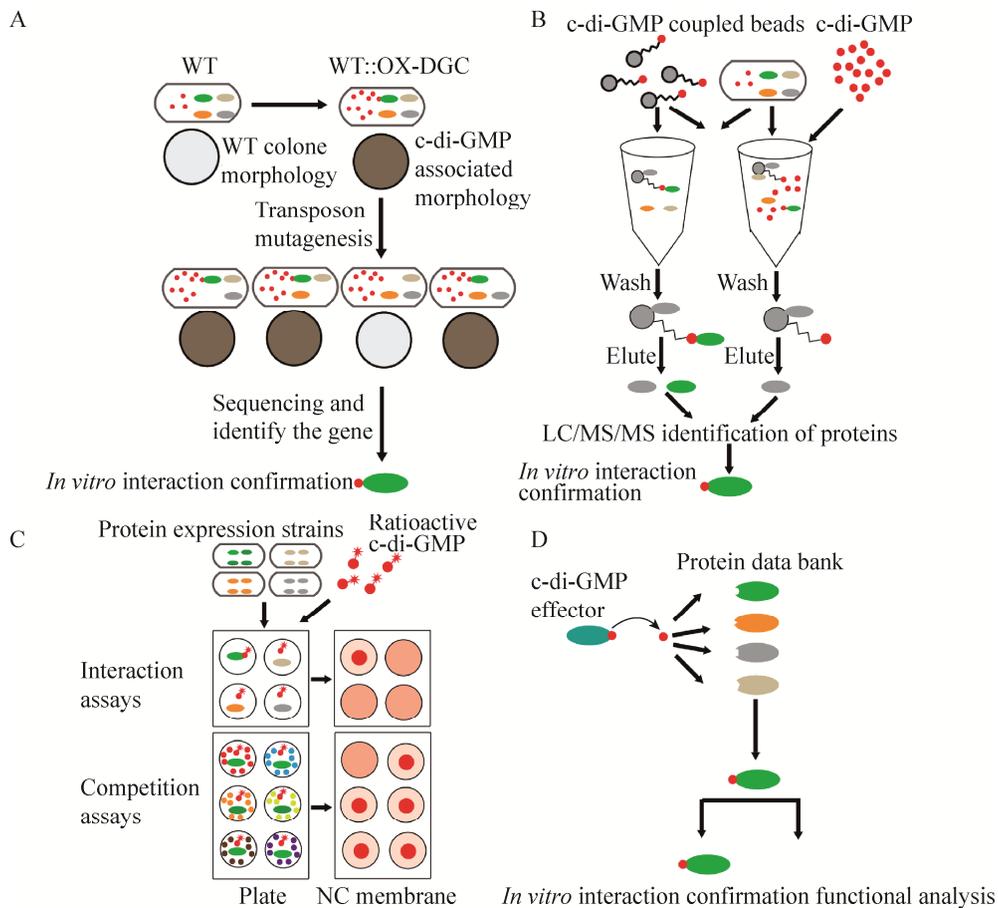


图 1 **c-di-GMP** 效应蛋白筛选策略。图中红色圆点代表 **c-di-GMP** 分子，蓝色、橘色、黄色、褐色、紫色圆点分别代表 **GTP**、**GMP**、**pGpG**、**cGMP**、**c-di-AMP** 等其他类型核苷衍生物。绿色椭圆代表候选的 **c-di-GMP** 效应蛋白，灰色、黄色、浅黄色椭圆代表其他蛋白。(A) 遗传筛选。获得具有胞内高 **c-di-GMP** 浓度，且具有 **c-di-GMP** 相关表型的菌株；规模突变后获得表型回复菌株；测序鉴定候选基因并通过实验方法验证其编码蛋白与 **c-di-GMP** 的互作。(B) 亲和色谱结合 **LC/MS/MS** 鉴定。细胞裂解液与 **biotin-c-di-GMP** 及链亲和素磁珠共孵育，分步洗涤后进行洗脱，**LC/MS/MS** 鉴定。对照组中加入过量 **c-di-GMP** 用于特异性竞争。(C) **DRaCALA** 筛选。首先构建蛋白异源表达的文库，**DRaCALA** 结合实验得到与 **c-di-GMP** 结合的候选蛋白。利用竞争性实验确定蛋白与 **c-di-GMP** 结合的特异性。(D) 分子对接筛选。根据已有 **c-di-GMP** 与效应蛋白结合的结构信息确定 **c-di-GMP** 构象，从蛋白数据库选取已有结构信息的蛋白进行分子对接分析。对得到的候选蛋白进行互作检测，并对该蛋白编码基因的功能进行验证。

Fig. 1 Screening and verification of **c-di-GMP** effectors. Red dots represents **c-di-GMP**; blue, orange, yellow, brown and purple dots represent **GTP**, **GMP**, **pGpG**, **cGMP** and **c-di-AMP** respectively. Green ellipse represents candidate **c-di-GMP** effector; gray, yellow and light yellow represent other proteins. (A) Genetic screening. Elevated cellular **c-di-GMP** concentration mutant was obtained by overexpression a **DGC**, the candidate genes were screened by transposon mutagenesis and phenotypic test. Candidate genes were sequenced and the coding protein interaction with **c-di-GMP** was experimental proved *in vitro*. (B) Pull-down combined **LC/MS/MS**. Cell lysates, **biotin-c-di-GMP** and streptavidin in beads were incubated in the absence or presence of **c-di-GMP**, after several times washing, the eluted proteins were analyzed by **LC-MS/MS**. (C) **DRaCALA** screening. Proteins expression strains were constructed and used for **DRaCALA** assay, the candidate effectors were confirmed by nucleotides competition assays. (D) Molecular docking. **c-di-GMP** conformation information was obtained from previously studied and proteins structure information were obtained for **PDB** data bank, molecular docking was performed, the candidate protein receptors were confirmed by *in vitro* interaction assay and genetic functions of the coding genes were analyzed.

这一筛选策略使研究者的目光不再囿于所研究的细菌自身，还可以关注与细菌存在“跨界”交流的宿主物种中是否存在感应 c-di-GMP 的效应蛋白。当然，基于分子对接的鉴定策略局限性在于：1) 依赖于蛋白质的结构信息，没有结构数据的蛋白则无法纳入筛选范围。2) 用于分子对接筛选的 c-di-GMP 自身构象并不容易确定。

综上所述，不同的 c-di-GMP 效应蛋白的鉴定策略各有其优点，同时也存在一定的固有局限性。对于新型 c-di-GMP 效应蛋白的鉴定，一方面可以依赖于不同策略之间的联合应用；另一方面，在深入理解 c-di-GMP 调控机制的基础上，设计出新的筛选策略。

5 c-di-GMP 与效应蛋白互作的验证方法

经过上述筛选方法获得候选蛋白以后，c-di-GMP 与效应蛋白在体外是否存在直接互作是效应蛋白鉴定过程中的关键实验证据。在 c-di-GMP 效应蛋白的鉴定研究过程中，两者互作的检测方法也得到了长足发展，已有多种生物化学或生物物理学实验技术可以用来检测 c-di-GMP 与效应蛋白的相互作用。在研究过程中发现，由于效应蛋白生化性质的多样性，有些效应蛋白与 c-di-GMP 互作的验证局限于某种特定的技术方法^[30]。全面掌握 c-di-GMP 与效应蛋白相互作用的检测方法是十分必要的。

5.1 等温滴定微量热仪检测 (Isothermal titration calorimetry, ITC)

等温滴定微量热 (ITC) 是检测分子间互作的经典方法，通过检测滴定过程体系的热量变化来确定分子间的相互作用，得到解离常数 (K_d)、反应计量数 (n)、焓 (ΔH) 和熵 (ΔS) 等完整的热力学参数。ITC 实验中样品无需标记和

修饰处理，此外，对于样品的分子大小、结构以及缓冲体系的成分也没有限制。一般而言，由 ITC 法检测得到的效应蛋白与 c-di-GMP 的亲合力范围在纳摩尔 (nmol/L) 到毫摩尔 (mmol/L) 之间，能够涵盖绝大多数 c-di-GMP 与效应蛋白的亲合力范围，已成为检测 c-di-GMP 与效应蛋白互作的常用方法之一^[13,27-28,31-32]。然而，有些效应蛋白与 c-di-GMP 互作的检测上，如 FliI 与 c-di-GMP 的互作验证，ITC 实验并不适用^[30]，推测可能是由于两者互作的热量变化不明显。此外，在 ITC 检测过程中，需要获得大量的纯化蛋白，这是限制该方法应用的主要因素之一。

5.2 表面等离子共振 (Surface plasmon resonance, SPR)

表面等离子共振 (SPR) 是一种光学现象，通过检测共振角度的动态变化即可确定流动相与固定相中的分子是否存在互作，可以得到配体分子与样品结合的亲和力、动力学、选择性、浓度以及热力学等一系列信息。SPR 检测分子间互作的亲和力范围在纳摩尔 (nmol/L) 和亚毫摩尔 (sub mmol/L) 之间，广泛应用于蛋白质、核酸、多肽、小分子化合物等生物分子的相互作用，同样可用于 c-di-GMP 与效应蛋白的互作分析。如铜绿假单胞菌 *Pseudomonas aeruginosa* 中的 PelD 与 c-di-GMP 互作的证明^[33]。SPR 实验具有实时、非标记、动态分析分子间互作等优势。但会受限于缓冲体系的选择、流动相分子与芯片基质的非特异性互作等。此外，SPR 使用芯片的成本较高，不适用于规模化的鉴定。

5.3 微量热泳动 (Microscale thermophoresis, MST)

微量热泳动 (MST) 是近几年发展的检测生物分子相互作用的新技术^[34]。其原理是分子在

温度梯度的溶液环境下迁移速率会发生显著的改变, 对该变化过程进行监控即可确定分子间相互作用, 测定分子间的亲和力、化学计量数等指标。MST 对互作分子间的亲和力检测范围在皮摩尔 (pmol/L) 到毫摩尔 (mmol/L) 之间。对待测蛋白分子进行荧光标记后, 即可用于 MST 实验。Rotem 等利用 MST 技术检测了蛭弧菌 *Bdellovibrio bacteriovorus* 中 PilZ 结构域的蛋白 Bd2717、Bd2402、Bd2924 与 c-di-GMP 的相互作用^[35]。MST 具有灵敏性高、实验样品消耗少、可用溶质多样化、实验准备快速操作简单等优点。此外, MST 可用于检测包被在脂质双分子层中的全长膜蛋白与 c-di-GMP 相互作用关系, 这是其他方法很难达到的重要优势, 预计该方法在未来鉴定与 c-di-GMP 互作的膜蛋白时将得到广泛应用。

5.4 生物膜干涉技术 (Biolayer interferometry, BLI)

生物膜干涉技术 (BLI) 是基于光干涉现象的非标记生物分子互作检测技术^[36]。其基本原理是特定频率的反射光能够与入射光产生相长干涉和相消干涉, 从而形成具有一定特征的干涉光谱。因此, 当生物分子结合到传感器表面时, 会导致传感器表面厚度发生变化, 进而引起干涉光谱位移。光谱仪通过检测干涉光谱的位移即可实时地监控分子间的结合过程。BLI 能够检测分子之间的亲和力 (K_D)、结合速率 (K_a)、解离速率 (K_d) 等多种数据, 具有实时、非标记以及高通量等诸多优点^[37]。该技术已广泛应用于药物筛选、蛋白结构靶点分析、天然产物分析及信号转导等多个研究领域。鉴于 BLI 在生物分子互作检测中的强大功能, 可以预见

其能够在 c-di-GMP 与效应蛋白的互作检测中发挥重要作用。

5.5 核磁共振 (Nuclear magnetic resonance, NMR)

核磁共振 (NMR) 是指原子在强磁场作用下产生的电子自旋的改变, 是广泛应用的解析分子结构的实验手段。分子间的互作会对原子周边的化学环境产生影响, 在核磁共振实验中表现为局部的核磁共振谱的迁移。这一特性可用于分子间相互作用的检测。Jenal 研究组利用 NMR 方法鉴定了 DgrA、CckA 等效应蛋白与 c-di-GMP 的相互作用, 并解析了关键的互作位点^[6,11]。NMR 实验需要准备同位素 (^{15}N , ^{13}C , ^1H) 标记的蛋白, 此外, 数据的收集和分析都需要较长的时间。

5.6 基于放射性同位素的互作检测方法

随着 DGC 研究的深入, 已开发出包括 PleD、Slr1143、WspR、YdeH 以及 tDGC 在内的多个高催化效率和转化效率的 DGCs 用于 c-di-GMP 的体外合成^[6,26,38-40]。利用放射性标记的 ^{32}P -GTP 合成 ^{32}P -c-di-GMP, 可以用于 c-di-GMP 与效应蛋白的互作检测^[6,11,25]。基于放射性标记的 c-di-GMP 与效应蛋白的检测方法主要有以下 3 种。

5.6.1 紫外交联 (UV-crosslinking)

紫外交联实验是利用核苷类分子与蛋白在紫外光处理下发生共价交联、形成稳定的复合物这一特性来进行二者间互作的检测。放射性标记的 c-di-GMP 与待测蛋白进行紫外交联处理后, 经电泳分离, 通过放射自显影分析蛋白条带所带有的放射性信号, 即可分析二者是否存在互作^[11,22,26]。

5.6.2 DraCALA 实验

DRaCALA 可以用于 c-di-GMP 效应蛋白的高通量筛选 (详见 4.3), 也可以用于 c-di-GMP 与效应蛋白的互作分析, 如 GIL、HsbD 等效应蛋白与 c-di-GMP 相互作用的证明^[41-42]。

5.6.3 c-di-GMP-蛋白共纯化实验

此外, 还可以通过检测结合在蛋白质上的放射性标记 c-di-GMP 的量来确定两者间的相互作用。将效应蛋白与放射性 c-di-GMP 共孵育, 然后利用结合特定抗体的磁珠收集蛋白, 经漂洗后, 通过分析磁珠上结合的放射性同位素来判定 c-di-GMP 与蛋白的互作。对同位素信号的定量分析, 既可利用液闪计数器直接检测^[22], 也可以利用薄层层析分离 c-di-GMP 后通过放射自显影来检测^[43]。

5.7 基于荧光标记 c-di-GMP 的互作检测方法

近年来, 具有荧光基团标签的 c-di-GMP 产品的开发 (如 2'-Fluo-AHC-c-diGMP, Biology, German) 为研究提供了便利。基于荧光标记的 c-di-GMP (F-c-di-GMP), 有多种方法可用于 c-di-GMP 与效应蛋白的相互作用的检测。

荧光偏振 (Fluorescence polarization, FP) 是一种定量分析技术, 其基本原理是溶液中的荧光物质经入射偏振光照射后, 产生激发偏振荧光, 偏振荧光的强弱程度与荧光分子的分子量大小呈正相关, 蛋白与荧光分子的结合会导致激发的偏振荧光增强。Schumachera 等利用 F-c-di-GMP, 通过 FP 实验检测了 MrkH 与 c-di-GMP 的相互作用^[44]。

此外, 在 DRaCALA 实验中, F-c-di-GMP 可以替代放射性的 c-di-GMP, 避免了繁琐的合成与纯化过程^[41]。F-c-di-GMP 也可以用于 MST

实验中 c-di-GMP 与蛋白间互作的检测^[45], 该方法避免了荧光标记过程可能对蛋白活性产生的影响。

5.8 基于 biotin-c-di-GMP 的互作检测方法

Biotin-c-di-GMP 和 c-di-GMP-CC 除了可用于 c-di-GMP 效应蛋白的筛选鉴定 (详见 4.2), 还可以用于 c-di-GMP-效应蛋白互作的分析, 其中 c-di-GMP-CC 可以检测 c-di-GMP 与膜蛋白的相互作用^[17,25,28]。由于蛋白纯化上所受的限, 常规的互作验证方法对于膜蛋白并不适用。因此, 基于 c-di-GMP-CC 的亲合色谱结合 Western blotting 实验是鉴定 c-di-GMP 与膜蛋白相互作用的有效方法。

此外, SPR 实验中, biotin-c-di-GMP 还可以作为固定相结合在链亲合素芯片 (SA 芯片) 上, 进行 c-di-GMP 与效应蛋白的互作分析^[30]。BLI 实验中也可以采用类似的策略, 利用 SA 芯片和 biotin-c-di-GMP 来进行检测。参照 Li 等的实验方法^[46], 本实验室发展了基于 biotin-c-di-GMP 和链亲合素抗体的酶联免疫吸附实验 (Enzyme linked immunosorbent assay, ELISA), 检测 c-di-GMP 与效应蛋白的相互作用 (数据未发表)。

5.9 基于蛋白构象变化的互作检测

作为变构剂, c-di-GMP 与效应蛋白结合通常会引起蛋白构象发生变化, 基于这一特性, 可以利用蛋白热迁移实验 (Thermal shift assay, TSA) 和蛋白酶部分水解实验 (Limited proteolysis) 来检测 c-di-GMP 与效应蛋白的互作。

5.9.1 蛋白热迁移实验 (TSA)

广泛应用于靶向蛋白受体的小分子药物筛选, 也常见于蛋白结晶实验前期实验缓冲液的优化^[47-48]。当蛋白质因自身不稳定或在热处理

时发生构象变化时,疏水性残基大量暴露出来,可以被疏水性荧光染料标记,从而产生可检测的荧光信号。该技术可以提供分子间发生相互作用的间接证明,因此可以用于检测 c-di-GMP 与效应蛋白的互作^[49-50]。该方法简便快捷,可以实现高通量的检测。

此外,近年来发展的非标记差式扫描荧光实验(Nano differential scanning fluorimetry, NanoDSF)的基本原理与 Thermal shift 实验类似,NanoDSF 实验无需使用荧光染料标记蛋白,避免了染料对蛋白质活性的影响。

5.9.2 蛋白酶部分水解实验(Limited proteolysis)

蛋白酶部分水解实验是常用的检测蛋白结构组成、折叠特性以及配体结合的生物化学方法^[51-52]。c-di-GMP 与效应蛋白的结合会造成蛋白构象的变化,进而引发蛋白酶酶切位点的暴露或者隐藏,经过适当条件的酶切处理,通过 SDS-PAGE 分离酶切产物,对比差异条带即可鉴定 c-di-GMP 与蛋白之间的互作。结合质谱分析还可以进一步确定发生变构的位置。例如 FleQ 与 c-di-GMP 互作研究中就采用了该方法^[32]。

6 讨论与展望

6.1 新 c-di-GMP 效应蛋白筛选策略的设计

c-di-GMP 效应蛋白的筛选和鉴定是解析 c-di-GMP 调控机制的重要步骤,尽管已有多种策略用于新型 c-di-GMP 的效应蛋白的筛选,但现有的策略均存在其固有的局限性。除了不同筛选策略联合使用之外,新型筛选策略的设计是这一研究方向的另一突破口。

新型筛选策略的设计需依赖于扎实的研究基础,以及深入和缜密的研究分析。例如,新月柄杆菌中新型 c-di-GMP 效应蛋白 CckA 的鉴

定过程可以在这一方面给我们带来启示^[11]。

新月柄杆菌是研究原核生物细胞周期调控机制的模式细菌,其中 c-di-GMP 在细菌的命运决定过程中发挥重要作用。前期的研究表明组氨酸激酶(Histidine kinase, HK) DivK 与 DivL 通过蛋白-蛋白互作的方式负调控 HK CckA 的磷酸化水平,进而影响与其配对的反应调节蛋白(Response regulator, RR) CtrA 的磷酸化水平。此外,研究还表明 c-di-GMP 通过效应蛋白 PopA 控制 CtrA 的降解。

以 cdG0 (删除了所有的 DGC,完全不含有 c-di-GMP 的突变菌株)为出发菌株进行遗传筛选和表型分析。Lori 等^[11]发现 c-di-GMP 和 DivK 共同调控细菌的细胞周期,且两者存在功能冗余现象,即只有同时突变 *popA* 和 *divK* 才会导致细菌停滞在 G1 期。因而推测 c-di-GMP 在通过 PopA 调控 CtrA 的稳定性的同时,还通过未知途径调控 CtrA 的磷酸化状态。

考虑到 HK CckA 可以通过磷酸基团转移蛋白 ChpT 来调控 CtrA 的磷酸化状态。研究人员猜测 c-di-GMP 可能是通过调控 CckA 的磷酸化状态进而调控 CtrA 的磷酸化水平。体外紫外交联实验和磷酸化实验表明 c-di-GMP 可以直接结合 CckA,抑制其激酶活性并激活其磷酸酶活性,最终调控了 CtrA 的磷酸化状态。值得注意的是,这一工作首次发现受体组氨酸激酶也是 c-di-GMP 效应蛋白之一。

6.2 真核生物中 c-di-GMP 效应蛋白的鉴定

作为细菌第二信使,c-di-GMP 主要在原核生物细菌中发挥调控功能,但近年来的研究发现,c-di-GMP 可以通过多种方式在真核生物中发挥调控作用。例如在盘基网柄菌 *Dictyostelium discoideum* 中,c-di-GMP 能够调控柄状细胞的

分化过程^[53]。c-di-GMP 还可以通过结合真核生物中不同类型的效应蛋白来发挥功能,如 STING、CDX41 以及 LCN2 等^[27-29]。

在病原细菌与真核生物宿主的侵染与防御的较量过程中,识别对方致病或免疫过程中必需的组分是长期进化的必然结果。c-di-GMP 作为细菌中最为重要的第二信使,在病原菌与真核宿主互作过程中发挥作用并不在人们的意料之外。如人源的 STING 蛋白可以识别细菌中 c-di-GMP,进而激活 I 型干扰素的合成,启动自身的免疫反应^[28,50]。与之相对,细菌同样可以利用 c-di-GMP 来达到抑制宿主免疫反应的目的。如细菌利用 c-di-GMP 靶向结合亚铁血红素结合蛋白 LCN2,进而抑制宿主的免疫应答^[27]。

因此,利用现有的 c-di-GMP 效应蛋白的筛选策略,对真核宿主生物中可能存在的效应蛋白进行筛选鉴定,对于细菌 c-di-GMP 调控机制的解析和宿主免疫机制的阐明均具有重大的理论和实际意义。

REFERENCES

- [1] Ross P, Weinhouse H, Aloni Y, et al. Regulation of cellulose synthesis in *Acetobacter xylinum* by cyclic diguanylic acid. *Nature*, 1987, 325(6101): 279–281.
- [2] Jenal U, Reinders A, Lori C. Cyclic di-GMP: second messenger extraordinaire. *Nat Rev Microbiol*, 2017, 15(5): 271–284.
- [3] Römling U, Galperin MY, Gomelsky M. Cyclic di-GMP: the first 25 years of a universal bacterial second messenger. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2013, 7(1): 1–52.
- [4] Hengge R. Principles of c-di-GMP signalling in bacteria. *Nat Rev Microbiol*, 2009, 7(4): 263–273.
- [5] Chan C, Paul R, Samoray D, et al. Structural basis of activity and allosteric control of diguanylate cyclase. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101(49): 17084–17089.
- [6] Christen M, Christen B, Folcher M, et al. Identification and characterization of a cyclic di-GMP-specific phosphodiesterase and its allosteric control by GTP. *J Biol Chem*, 2005, 280(35): 30829–30837.
- [7] Ryan RP, Fouhy Y, Lucey JF, et al. Cell-cell signaling in *Xanthomonas campestris* involves an HD-GYP domain protein that functions in cyclic di-GMP turnover. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103(17): 6712–6717.
- [8] Cohen D, Mechold U, Nevenzal H, et al. Oligoribonuclease is a central feature of cyclic diguanylate signaling in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2015, 112(36): 11359–11364.
- [9] Orr MW, Donaldson GP, Severin GB. Oligoribonuclease is the primary degradative enzyme for pGpG in *Pseudomonas aeruginosa* that is required for cyclic-di-GMP turnover. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2015, 112(36): E5048–E5057.
- [10] Roelofs KG, Jones CJ, Helman SR, et al. Systematic identification of cyclic-di-GMP binding proteins in *Vibrio cholerae* reveals a novel class of cyclic-di-GMP-binding ATPases associated with type II secretion systems. *PLoS Pathog*, 2015, 11(10): e1005232.
- [11] Lori C, Ozaki S, Steiner S, et al. Cyclic di-GMP acts as a cell cycle oscillator to drive chromosome replication. *Nature*, 2015, 523(7559): 236–239.
- [12] Baraquet C, Murakami K, Parsek MR, et al. The FleQ protein from *Pseudomonas aeruginosa* functions as both a repressor and an activator to control gene expression from the *pel* operon promoter in response to c-di-GMP. *Nucleic Acids Res*, 2012, 40(15): 7207–7218.
- [13] Tao F, He Y W, Wu DH, et al. The cyclic

- nucleotide monophosphate domain of *Xanthomonas campestris* global regulator CLP defines a new class of cyclic di-GMP effectors. *J Bacteriol*, 2010, 192(4): 1020–1029.
- [14] Wilksch JJ, Yang J, Clements A, et al. MrkH, a novel c-di-GMP-dependent transcriptional activator, controls *Klebsiella pneumoniae* biofilm formation by regulating type 3 fimbriae expression. *PLoS Pathog*, 2011, 7(8): e1002204.
- [15] Krasteva PV, Fong JCN, Shikuma NJ, et al. *Vibrio cholerae* VpsT regulates matrix production and motility by directly sensing cyclic di-GMP. *Science*, 2010, 327(5967): 866–868.
- [16] Shikuma NJ, Fong JCN, Yildiz FH. Cellular levels and binding of c-di-GMP control subcellular localization and activity of the *Vibrio cholerae* transcriptional regulator VpsT. *PLoS Pathog*, 2012, 8(5): e1002719.
- [17] Steiner S, Lori C, Boehm A, et al. Allosteric activation of exopolysaccharide synthesis through cyclic di-GMP-stimulated protein-protein interaction. *EMBO J*, 2013, 32(3): 354–368.
- [18] Chin KH, Kuo WT, Yu YJ, et al. Structural polymorphism of c-di-GMP bound to an EAL domain and in complex with a type II PilZ-domain protein. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 2012, 68: 1380–1392.
- [19] An SQ, Caly DL, McCarthy Y, et al. Novel cyclic di-GMP effectors of the YajQ protein family control bacterial virulence. *PLoS Pathog*, 2014, 10(10): e1004429.
- [20] Newell PD, Boyd CD, Sondermann H, et al. A c-di-GMP effector system controls cell adhesion by inside-out signaling and surface protein cleavage. *PLoS Biol*, 2011, 9(2): e1000587.
- [21] Wang X, Preston III JF, Romeo T. The *pgaABCD* locus of *Escherichia coli* promotes the synthesis of a polysaccharide adhesin required for biofilm formation. *J Bacteriol*, 2004, 186(9): 2724–2734.
- [22] Fazli M, O'Connell A, Nilsson M, et al. The CRP/FNR family protein Bcam1349 is a c-di-GMP effector that regulates biofilm formation in the respiratory pathogen *Burkholderia cenocepacia*. *Mol Microbiol*, 2011, 82(2): 327–341.
- [23] Christen M, Christen B, Allan MG, et al. DgrA is a member of a new family of cyclic diguanosine monophosphate receptors and controls flagellar motor function in *Caulobacter crescentus*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104(10): 4112–4117.
- [24] Nesper J, Reinders A, Glatter T, et al. A novel capture compound for the identification and analysis of cyclic di-GMP binding proteins. *J Proteomics*, 2012, 75(15): 4874–4878.
- [25] Sprecher KS, Hug I, Nesper J, et al. Cohesive properties of the *Caulobacter crescentus* holdfast adhesin are regulated by a novel c-di-GMP effector protein. *mBio*, 2017, 8(2): 00294–17.
- [26] Roelofs KG, Wang JX, Sintim HO, et al. Differential radial capillary action of ligand assay for high-throughput detection of protein-metabolite interactions. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011, 108(37): 15528–15533.
- [27] Li WH, Cui T, Hu LH, et al. Cyclic diguanylate monophosphate directly binds to human siderocalin and inhibits its antibacterial activity. *Nat Commun*, 2015, 6: 8330.
- [28] Burdette DL, Monroe KM, Sotelo-Troha K, et al. STING is a direct innate immune sensor of cyclic di-GMP. *Nature*, 2011, 478(7370): 515–518.
- [29] Parvatiyar K, Zhang ZQ, Teles RM, et al. The helicase DDX41 recognizes the bacterial secondary messengers cyclic di-GMP and cyclic di-AMP to activate a type I interferon immune response. *Nat Immunol*, 2012, 13(12): 1155–1161.
- [30] Trampari E, Stevenson CEM, Little RH, et al. Bacterial rotary export ATPases are allosterically regulated by the nucleotide second messenger cyclic-di-GMP. *J Biol Chem*, 2015, 290(40):

- 24470–24483.
- [31] Benach J, Swaminathan SS, Tamayo R, et al. The structural basis of cyclic diguanylate signal transduction by PilZ domains. *EMBO J*, 2007, 26(24): 5153–5166.
- [32] Baraquet C, Harwood CS. Cyclic diguanosine monophosphate represses bacterial flagella synthesis by interacting with the Walker a motif of the enhancer-binding protein FleQ. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2013, 110(46): 18478–18483.
- [33] Lee VT, Matewish JM, Kessler JL, et al. A cyclic-di-GMP receptor required for bacterial exopolysaccharide production. *Mol Microbiol*, 2007, 65(6): 1474–1484.
- [34] Wienken CJ, Baaske P, Rothbauer U, et al. Protein-binding assays in biological liquids using microscale thermophoresis. *Nat Commun*, 2010, 1: 100.
- [35] Rotem O, Nesper J, Borovok I, et al. An extended cyclic di-GMP network in the predatory bacterium *Bdellovibrio bacteriovorus*. *J Bacteriol*, 2016, 198(1): 127–137.
- [36] Rich RL, Myszka DG. Higher-throughput, label-free, real-time molecular interaction analysis. *Anal Biochem*, 2007, 361(1): 1–6.
- [37] Wallner J, Lhota G, Schosserer M, et al. An approach for liposome immobilization using sterically stabilized micelles (SSMs) as a precursor for bio-layer interferometry-based interaction studies. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2017, 154: 186–194.
- [38] Zähringer F, Massa C, Schirmer T. Efficient enzymatic production of the bacterial second messenger c-di-GMP by the diguanylate cyclase YdeH from *E. coli*. *Appl Biochem Biotechnol*, 2016, 163(1): 71–79.
- [39] Rao F, Pasunooti S, Ng Y, et al. Enzymatic synthesis of c-di-GMP using a thermophilic diguanylate cyclase. *Anal Biochem*, 2009, 389(2): 138–142.
- [40] Hickman JW, Tifrea DF, Harwood CS. A chemosensory system that regulates biofilm formation through modulation of cyclic diguanylate levels. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102(40): 14422–14427.
- [41] Fang X, Ahmad I, Blanka A, et al. GIL, a new c-di-GMP-binding protein domain involved in regulation of cellulose synthesis in enterobacteria. *Mol Microbiol*, 2014, 93(3): 439–452.
- [42] Valentini M, Laventie BJ, Moscoso JA, et al. The diguanylate cyclase HsbD intersects with the HptB regulatory cascade to control *Pseudomonas aeruginosa* biofilm and motility. *PLoS Genet*, 2016, 12(11): e1006473.
- [43] Newell PD, Monds RD, O'Toole GA. LapD is a bis-(3',5')-cyclic dimeric GMP-binding protein that regulates surface attachment by *Pseudomonas fluorescens* Pf0-1. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, 106(9): 3461–3466.
- [44] Schumacher MA, Zeng WJ. Structures of the activator of *K. pneumonia* biofilm formation, MrkH, indicates PilZ domains involved in c-di-GMP and DNA binding. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2016, 113(36): 10067–10072.
- [45] Sundriyal A, Massa C, Samoray D, et al. Inherent regulation of EAL domain-catalyzed hydrolysis of second messenger cyclic di-GMP. *J Biol Chem*, 2014, 289(10): 6978–6990.
- [46] Li L, Wang QY, Zhang H, et al. Sensor histidine kinase is a β -lactam receptor and induces resistance to β -lactam antibiotics. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2016, 113(6): 1648–1653.
- [47] Molina DM, Jafari R, Ignatushchenko M, et al. Monitoring drug target engagement in cells and tissues using the cellular thermal shift assay. *Science*, 2013, 341(6141): 84–87.
- [48] Huynh K, Partch CL. Analysis of protein stability and ligand interactions by thermal shift assay.

- Curr Protoc Protein Sci, 2015, 79: 28.9.1–28.9.14.
- [49] Jones CJ, Utada A, Davis KR, et al. C-di-GMP regulates motile to sessile transition by modulating MshA Pili biogenesis and near-surface motility behavior in *Vibrio cholerae*. PLoS Pathog, 2015, 11(10): e1005068.
- [50] Ouyang S, Song XQ, Wang YY, et al. Structural analysis of the STING adaptor protein reveals a hydrophobic dimer interface and mode of cyclic di-GMP binding. Immunity, 2012, 36(6): 1073–1086.
- [51] Chang AL, McKeague M, Liang JC, et al. Kinetic and equilibrium binding characterization of aptamers to small molecules using a label-free, sensitive, and scalable platform. Anal Chem, 2014, 86(7): 3273–3278.
- [52] Dokudovskaya S, Williams R, Devos D, et al. Protease accessibility laddering: a proteomic tool for probing protein structure. Structure, 2006, 14(4): 653–660.
- [53] Chen ZH, Schaap P. The prokaryote messenger c-di-GMP triggers stalk cell differentiation in *Dictyostelium*. Nature, 2012, 488(7413): 680–683.

(本文责编 陈宏宇)

钱韦 博士，中国科学院微生物研究所研究员。植物基因组学国家重点实验室副主任。从事病原细菌致病机理和感知寄主与环境信号的分子机制研究。作为主要完成人，完成国内首个植物病原细菌全基因组测序和功能基因组学分析；完成黄单胞菌双组分信号转导系统的遗传与功能研究；发现细菌识别金属离子、群体感应信号和植物激素等信号分子的生物化学机制。主要研究成果发表在 *PLoS Pathogens*、*Genome Research*、*Environmental Microbiology*、*Genetics*、*Molecular Plant-Microbe Interaction* 等期刊上。担任植物病理学会理事、植物生理与分子生物学会植物-微生物互作专业委员会副主任、《植物病理学报》编委和 *Frontiers in Plant-Microbe Interactions* 的 Review Editor 等学术职务。

