



研究报告

铜绿假单胞菌 PAO1 中 c-di-GMP 代谢相关基因 PA0575 对表型的影响

詹学良¹ 姚严翔¹ 芦晓红¹ 郭嘉义² 黄卫东^{*1}

1 宁夏医科大学基础医学院 宁夏 银川 750000

2 宁夏医科大学科技中心 宁夏 银川 750000

摘要:【背景】铜绿假单胞菌 PAO1 中存在与环鸟苷二磷酸(cyclic-di-guanosine monophosphate, c-di-GMP)代谢相关基因 PA0575。【目的】探讨铜绿假单胞菌 PAO1 中环鸟苷二磷酸代谢相关基因 PA0575 对运动能力及生物膜的影响。【方法】通过 PCR 对菌株遗传背景进行确认; 利用刚果红结合实验及电转 P_{cdrA} -gfp 质粒间接测量胞内 c-di-GMP 水平; 利用泳动性(swimming)、蜂群泳动(swarming)、蹭行运动(twitching)和生物膜定量实验对细菌进行表型分析, 并在运动培养基中添加抗生素研究其对运动能力的影响; 针对 PA0575 基因进行融合蛋白表达载体的构建, 并对蛋白进行原核诱导表达。【结果】3 株突变体菌株的转座子插入突变位点不一致, 胞内 c-di-GMP 水平检测结果显示, PA0575-1 菌株的 c-di-GMP 含量高于野生型 PAO1 菌株($P<0.05$), PA0575-2、PA0575-3 菌株胞内 c-di-GMP 水平与野生型 PAO1 菌株无差异($P>0.05$)。运动能力检测实验中, 与野生型 PAO1 菌株相比, PA0575-1 菌株泳动性增强($P<0.05$); PA0575-2、PA0575-3 菌株的泳动性、蜂群运动均增强($P<0.05$); 该基因不同位点的突变均导致氯霉素对菌株的运动能力产生抑制作用。生物膜定量结果显示, 与野生型 PAO1 菌株相比, 细菌培养 18 h 后 PA0575-1 的生物膜含量降低($P<0.05$), PA0575-2、PA0575-3 菌株的生物膜含量升高。最后成功构建了 PA0575 基因不同结构域的 8 个表达载体, 并获得了异源表达蛋白。【结论】PA0575 基因降低铜绿假单胞菌胞内 c-di-GMP 的水平, 影响表型的同时也抑制了氯霉素抗性基因的表达。以上研究为 PA0575 基因对表型的影响奠定了基础。

关键词: GGDEF/EAL 结构域, PA0575 转座子突变体, 铜绿假单胞菌 PAO1, 环鸟苷二磷酸

Foundation items: National Natural Science Foundation of China (31560042, 81960365); University Level Scientific Research Fund of Ningxia Medical University (XM2011003)

***Corresponding author:** Tel: 86-951-6980113; E-mail: weidong1969@hotmail.com

Received: 10-10-2019; **Accepted:** 30-12-2019; **Published online:** 21-04-2020

基金项目: 国家自然科学基金(31560042, 81960365); 宁夏医科大学校级科研项目(XM2011003)

***通信作者:** Tel: 0951-6980113; E-mail: weidong1969@hotmail.com

收稿日期: 2019-10-10; **接受日期:** 2019-12-30; **网络首发日期:** 2020-04-21

Effect of c-di-GMP metabolism related gene PA0575 on phenotype in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1

ZHAN Xue-Liang¹ YAO Yan-Xiang¹ LU Xiao-Hong¹ GUO Jia-Yi²
HUANG Wei-Dong^{*1}

1 School of Basic Medical Science, Ningxia Medical University, Yinchuan, Ningxia 750000, China

2 Science and Technology Center, Ningxia Medical University, Yinchuan, Ningxia 750000, China

Abstract: [Background] There is a gene PA0575 related to cyclic-di-guanosine monophosphate (c-di-GMP) metabolism in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. [Objective] To investigate the effect of c-di-GMP metabolism related gene PA0575 on phenotype of PAO1. [Methods] Identification of genetic background of strains by PCR method. Swimming, swarming, twitching and biofilm were used to analyze the phenotype of transposon mutant strain and wild type PAO1, and antibiotics were added to motility medium to study the effect of antibiotics on motility. The fusion protein expression vector of PA0575 gene was constructed and the prokaryotic expression of the protein was induced. [Results] Inconsistency of transposon insertion mutation sites among three mutant strains, and the mutation sites are inconsistent. The results of intracellular c-di-GMP level test showed that: The c-di-GMP content of PA0575-1 strain was higher than that of wild type PAO1 strain ($P<0.05$). In the motility test, compared with the wild type PAO1 strain, enhanced Swimming of strain PA0575-1 ($P<0.05$). The swimming motility and swarming motility of PA0575-2 and PA0575-3 were enhanced ($P<0.05$). The effect of adding four antibiotics to motility media showed that three different insertion sites led to the inhibition of chloramphenicol on exercise ability. The results of biofilm detection showed that after 18 hours of bacterial culture, the biofilm content of PA0575-1 was significantly lower than that of wild type PAO1 ($P<0.05$). Eight expression vectors of PA0575 gene were successfully constructed and induced. SDS-PAGE results showed that the expression vector was induced by IPTG to obtain heterologous expression protein. [Conclusion] PA0575 gene decreased the level of intracellular c-di-GMP of *Pseudomonas aeruginosa*, affected the phenotype and inhibited the expression of chloramphenicol resistance genes. The above studies laid the foundation for the effect of PA0575 gene on phenotype.

Keywords: GGDEF/EAL domain, PA0575 transposon mutant, *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, c-di-GMP

铜绿假单胞菌是一种条件致病菌,研究者对野生型铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*) PAO1已完成全基因组测序。作为一种广泛研究的模式菌,野生型铜绿假单胞菌PAO1菌株常被用于细菌表型及生理生化功能的研究^[1-2]。近年来发现的一种广泛存在于细菌中的第二信使分子环鸟苷二磷酸(cyclic-di-guanosine monophosphate, c-di-GMP)^[3],对细菌的表型(运动能力和生物膜)、毒力等一系列生理生化过程起到重要作用,从而影响了细菌的致病性和耐药性^[4-6]。

胞内 c-di-GMP 分别由二鸟苷酸环化酶(diguanylate cyclase, DGC)合成,并由磷酸二酯酶(phosphodiesterase, PDE)降解。在细菌中具有 DGC

活性的蛋白通常含 GGDEF 结构域,具有 PDE 活性的蛋白通常含有 EAL 结构域^[7]。野生型铜绿假单胞菌 PAO1 基因组具有 17 个 GGDEF、5 个 EAL、16 个 GGDEF/EAL 结构域基因,这些结构域可能参与了 c-di-GMP 代谢,近年来部分蛋白的生物学功能已经得到了深入研究,如 FimX、PleD、WspR、BlrP1、RocR、LapD 等^[8]。研究者们注意到 GGDEF/EAL 结构域的 N 端大部分都包含如 Per-Arnt-Sim (PAS)等信号感应结构域以响应环境刺激,从而调控细菌的毒力因子、表型等生理生化过程^[9]。然而诸多细菌表型中,运动能力尤为重要,运动能力增加侵袭力的同时,对生物膜的定殖也起到了一定的作用;生物膜的形成使得细菌可以抵御

外界不利因素的影响, 导致患者在短时间内感染该病原菌并且难以治愈^[10]。因此, 铜绿假单胞菌的表型在病原菌感染时起到了重要作用, 研究其表型对未来治疗和预防铜绿假单胞菌感染具有重要意义。

PAO1 基因组中, PA0575 基因编码的蛋白由 1 个跨膜结构域、4 个 PAS 结构域、1 个 GGDEF 结构域及 1 个 EAL 结构域构成, 目前关于 PA0575 基因 GGDEF/EAL 串联结构域的研究表明该结构域的 PDE 活性依赖于 GGDEF 结构域, 与 PA0575 基因高度同源的 PA14_07500 基因的研究表明该基因缺失后会导致泳动能力的下降^[11], 但是 PA0575 基因的 GGDEF 结构域及其信号感应结构域与细菌表型的关系至今鲜有报道。

我们对 PAO1 中与 c-di-GMP 代谢相关的基因 PA0575 进行研究, 利用刚果红结合实验及电转 P_{cdrA} -gfp 质粒间接检测胞内 c-di-GMP 水平; 使用转座子插入突变体菌株进行了运动能力的检测, 以此来分析 PA0575 蛋白结构域对细菌表型(运动能力和生物膜)的影响, 并探讨 4 种抗生素对铜绿假单胞菌转座子突变体菌株运动能力的影响; 为了更进一步研究该基因的功能, 针对 PA0575 催化结构域和信号感应结构域设计构建了 8 种融合蛋白的表达载体, 并诱导蛋白的表达, 以期为后续 PA0575 的生物学功能及机制研究奠定基础。

1 材料与方 法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒

野生型铜绿假单胞菌菌株 PAO1 及其转座子插入突变体菌株 PA0575-1、PA0575-2、PA0575-3 和 P_{cdrA} -gfp 质粒由美国 Manoil 实验室惠赠。

1.1.2 主要试剂和仪器及培养基

Congo Red、氨苄青霉素(ampicillin, AMP)、硫酸卡那霉素(kanamycin sulfate, KAN)、氯霉素(chloramphenicol, CHL)、盐酸四环素(tetracycline hydrochloride, TET)、G-250 均购于 Solarbio 公司。

PCR 仪、电泳仪、凝胶成像仪, Bio-Rad 公司; 恒温培养箱, 上海一恒科技有限公司; 恒温气浴摇床, 上海博迅实业有限公司。

刚果红培养基: LB 固体培养基中添加 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Congo red 和 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ G-250。在运动能力培养基中添加氨苄青霉素(50 $\mu\text{g}/\text{mL}$)、卡那霉素(25 $\mu\text{g}/\text{mL}$)、四环素(25 $\mu\text{g}/\text{mL}$)、氯霉素(25 $\mu\text{g}/\text{mL}$)^[12]。

1.2 方法

1.2.1 c-di-GMP 水平检测

将 P_{cdrA} -gfp 质粒电转到 PAO1、PA0575-1、PA0575-2、PA0575-3 中并培养至 OD_{600} 为 1.0, 100 μL 菌液加入到 1.9 mL 5% LB 液体培养基(使用 PBS 稀释), 37 $^{\circ}\text{C}$ 、200 r/min 培养 6 h, 测量 OD_{600} 及荧光值(激发波长 485 nm, 发射波长 520 nm); 刚果红培养基上滴加菌液 37 $^{\circ}\text{C}$ 正置培养 24 h, 拍照记录。

1.2.2 生物膜定量实验及运动能力的表型分析

PAO1、PA0575-1、PA0575-2、PA0575-3 菌株于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、200 r/min 条件下培养过夜至 OD_{600} 为 0.5, 聚苯乙烯试管中加入 1 mL LB 液体培养基及 10 μL 菌液, 37 $^{\circ}\text{C}$ 、100 r/min 孵育, 在 12、18、24 h 分别取出试管, 0.2% 结晶紫染色, 定量时需加入 95% 酒精 5 mL 溶解, 测量 OD_{595} 并统计结果。运动能力检测: 培养 14 h 后拍照并测量菌斑的直径, 每个菌斑测量 3 次取平均值, 并进行统计分析。

1.2.3 表达载体的构建与蛋白诱导表达

根据 PA0575 基因结构域设计相关引物:

4PASPAC-R: 5'-TAGCAAGCTTGAGGGTGGAGATATCGGGCGAAG-3';

PASPAC1-F: 5'-AGAGGATCCCAGCACTACCGGGGACTGGTGG-3';

PASPAC1-Rev: 5'-TAGCAAGCTTGGCCTCGGTGATGTCGATCATC-3';

PBPB-Rev: 5'-TAGCAAGCTTCAGGCCGCCGACCCAGGGGGC-3';

PBPB-Rev: 5'-AGAGGATCCAGCATCGCGGTGGCATGGACACC-3';

GGDEF-Rev: 5'-TAGCAAGCTTGTAGTACTC

GATGCGGCTGCGG-3'.

通过 PCR 扩增目的片段^[13], 双酶切后连接于载体 pET-32a(+), 将测序结果无误的质粒分别热激转化到大肠杆菌 BL21 中, 1 mmol/L IPTG 诱导蛋白表达, SDS-PAGE 检测。

1.2.4 统计学方法

采用 SPSS 11.5 统计软件分析数据, 计量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm SD$)表示, 多组间比较用方差分析, 组间两两比较采用 SNK 检验方法, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 PCR 转座子突变验证

以野生型 PAO1 和 PA0575 的 3 个转座子突变体菌株的 DNA 为模板, 以基因特异性引物和转座子引物 Hah munus 138 分别组合对它们进行转座子插入突变验证(图 1), 由第 1、2、3、4 泳道证明野生型菌株不含转座子; 其余泳道条带显示 PA0575-1、PA0575-2、PA0575-3 基因组存在转座子插入突变且突变位点不同。测序结果显示 PA0575-3、PA0575-2 的转座子插入位点位于



图 1 PA0575 基因转座子插入突变失活验证琼脂糖凝胶电泳图

Figure 1 Verification of PA0575 gene transposon insertion mutation inactivation by agarose gel electrophoresis

注: M: Trans2K Plus DNA Marker; PCR 引物组合为: F1+R1、F2+R2、Hah138+R1、Hah138+R2。1-4: PAO1 为 DNA 模板; 5-8: PA0575-1 为 DNA 模板; 9-12: PA0575-2 为模板; 13-16: PA0575-3 为 DNA 模板。

Note: M: Trans2K Plus DNA Marker; The combination of PCR primers are: F1+R1, F2+R2, Hah138+R1, Hah138+R2. 1-4: PAO1 as DNA template; 5-8: PA0575-1 as DNA template; 9-12: PA0575-2 as template; 13-16: PA0575-3 as DNA template.

PAS2、PAS3 结构域, PA0575-1 的突变位点位于 GGDEF 结构域。

2.2 细菌中 c-di-GMP 水平的检测

为了研究各结构域在 c-di-GMP 代谢过程中发挥的作用, 对野生型 PAO1 以及 PA0575 的 3 个转座子突变体菌株胞内 c-di-GMP 水平进行检测。利用刚果红结合实验初步分析胞内 c-di-GMP 水平, 结果如图 2A 所示, c-di-GMP 促进纤维素的合成, 纤维素和刚果红结合后会呈现紫色, 当 c-di-GMP 含量偏低时为粉色或者棕色; 而 PA0575-1 菌苔呈紫色, 表明其 c-di-GMP 含量偏高。随后在突变体菌株中电转 P_{cdrA} -gfp 质粒(将 c-di-gmp 响应的 $cdra$ 启动子融合到编码绿色荧光蛋白基因上, 用以评估铜绿假单胞菌中 c-di-gmp 的胞内水平, 该结果以荧光值(激发光波长 485 nm, 发射光波长 520 nm)与 OD_{600} 比值表示, 测量结果与刚果红结合实验结果一致, 表明 PA0575-1 菌株中 c-di-GMP 含量明显高于野生型 PAO1 菌株($P < 0.05$), 如图 2B 所示。

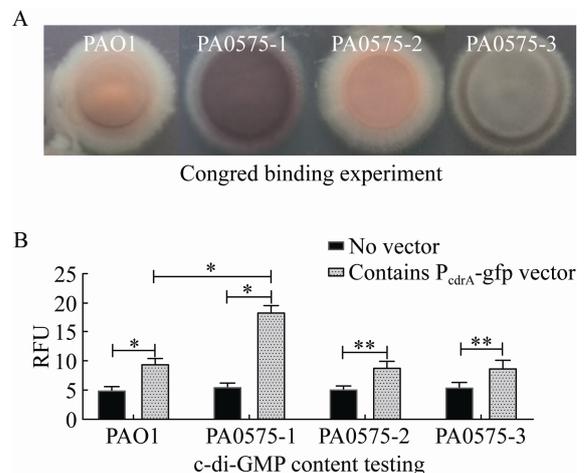


图 2 c-di-GMP 含量检测

Figure 2 c-di-GMP content detection

注: A: 刚果红结合实验; B: 将 P_{cdrA} -gfp 质粒电转移到铜绿假单胞菌中测得的相对荧光值以反映胞内 c-di-GMP 的水平。与对照相比: *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$ 。

Note: A: Congo red binding experiment; B: Relative fluorescence value measured by electrotransfer of P_{cdrA} -gfp plasmid into Pa. The plasmid can reflect the intracellular level of c-di-GMP. Compared with the control group: *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$.

2.3 细菌运动能力检测及抗生素对运动能力的影响

鉴于不同结构域对 c-di-GMP 水平的调控存在差异, 为了进一步研究各结构域、c-di-GMP 及细菌运动能力的关系, 对运动能力进行了检测。野生型 PAO1 以及 PA0575 基因的 3 个转座子突变体菌

株泳动能力、蜂群运动能力和蹭动运动能力如图 3 所示, 测量菌苔直径并统计分析后发现: 3 个转座子突变体菌株的泳动能力明显加强 ($P < 0.05$), PA0575-2 和 PA0575-3 的蜂群运动能力增加 ($P < 0.05$), 但是 PA0575-1 菌株的蜂群泳动能力与野生型无差别 ($P > 0.05$)。

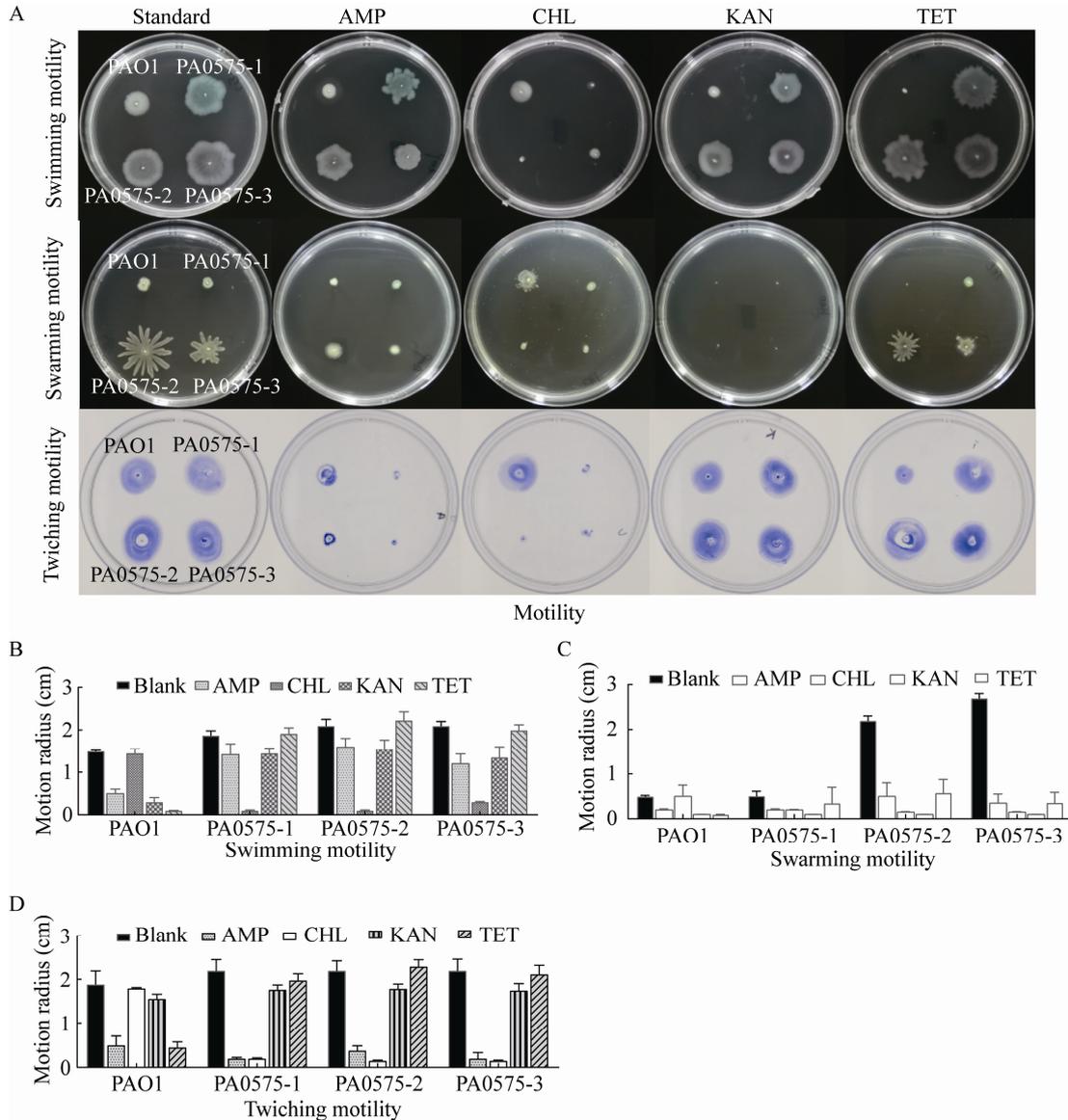


图 3 PA0575 基因转座子突变体菌株运动能力

Figure 3 Movement ability of PA0575 gene transposon mutant strain

注: 平板法检测细菌的运动能力(A)以及细菌泳动能力(B)、蜂群运动(C)、蹭行运动(D)柱状统计图。每组测量细菌直径 3 次, 计算平均值。

Note: Detection of motility of bacteria by plate method (A) and the bar statistical chart of swimming motility (B), swarming motility (C) and twitching motility (D) of bacteria after adding antibiotics were detected by plate method. Measure the diameter of bacteria three times per group, calculate the average value.

为了更进一步了解 PA0575 在抗生素存在条件下影响突变体菌株运动能力的作用,在运动培养基中分别添加 4 种抗生素,氨苄青霉素和卡那霉素对野生型菌株以及突变体菌株的运动能力都有抑制作用;氯霉素对野生型 PAO1 菌株的运动能力无影响($P>0.05$),但是所有的转座子突变体菌株的全部运动表型都被氯霉素抑制($P<0.05$);四环素对野生型 PAO1 菌株的运动能力起到了抑制作用($P<0.05$),因为转座子中含有四环素抗性,导致转座子突变体菌株的泳动能力和蹭动能力不受影响($P>0.05$),但是蜂群运动能力受到了抑制作用。

2.4 生物膜检测

为了探究 PA0575 基因对生物膜合成的影响,进行了生物膜定量实验。生物膜经结晶紫染色后会形成紫色环状物,无水乙醇溶解后测量 OD_{595} 所得实验结果见图 4A,统计分析结果见图 4B。培养 18 h 后 PA0575-2 菌株及 PA0575-3 菌株的生物膜含量比野生型高($P<0.05$),24 h 时含量比野生型低($P<0.05$);PA0575-1 菌株在 12、18、24 h 生物膜

含量比野生型低($P<0.05$),因此,PA0575 蛋白的不同结构域对生物膜的合成也起到了重要作用。

2.5 PA0575 基因的 8 个异源表达载体的构建及诱导表达

为了对 PA0575 蛋白结构域生化功能进行深入研究,进一步重组表达了 PA0575 基因的 8 个结构域蛋白(图 5A)。重组质粒经 *Bam*H I 和 *Hind* III 双酶切后的琼脂糖凝胶电泳结果如图 5B 所示。构建完成的 8 个表达载体经 IPTG 诱导后均可得到表达的产物,SDS-PAGE 结果如图 5C 所示。

3 讨论与结论

铜绿假单胞菌是引起医院获得性感染的主要病原菌之一^[13]。*c-di-GMP* 作为一种广泛存在于细菌中的第二信使,对细菌的运动、生物膜等有重要的影响^[14]。细菌的泳动能力依赖于鞭毛的泳动、滑行或旋转梭动^[15],蹭行运动依赖于鞭毛的运动和 IV 型菌毛的伸展和收缩,蜂群泳动则是一类依赖于 IV 型菌毛的群集运动^[16]。铜绿假单胞菌在感染时会利用各种形式的运动以便达到感染部位,其中细菌的菌毛可粘附上皮细胞,从而对铜绿假单胞菌慢性感染过程中生物膜的形成起到促进作用,生物膜的形成使细菌可以抵御宿主免疫防御系统及抗生素的影响,同时鞭毛促进了细菌的迁移和扩散,进而促进病原菌与宿主的相互作用^[17]。越来越多的患者因耐药铜绿假单胞菌的感染而死亡,因此,针对铜绿假单胞菌运动表型的相关研究十分急迫。

野生型铜绿假单胞菌 PAO1 中 PA0575 蛋白显示 PDE 催化活性,其具有调控 *c-di-GMP* 代谢的 GGDEF-EAL 结构域^[11],以及与胞外信号传递相关的 PAS 结构域。

本研究利用 PCR 技术和基因测序对 3 株 PA0575 转座子插入突变体菌株的遗传背景进行了验证,突变体 PA0575-1 菌株的转座子插入位点位于 GGDEF 结构域,PA0575-2、PA0575-3 菌株转座子插入位点分别位于 PAS3、PAS2 结构域;研究发现 PA0575-1 菌株的 *c-di-GMP* 水平高于 PAO1,

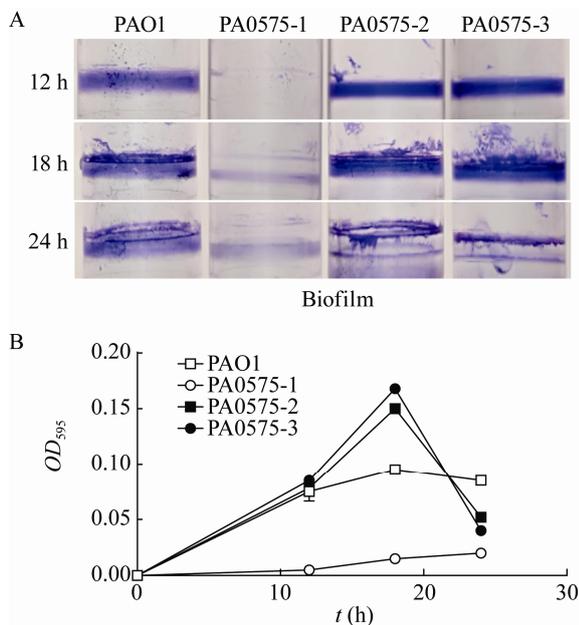


图 4 生物膜染色结果(A)和定量统计结果(B)
Figure 4 Staining results (A) and quantitative results (B) of biofilm

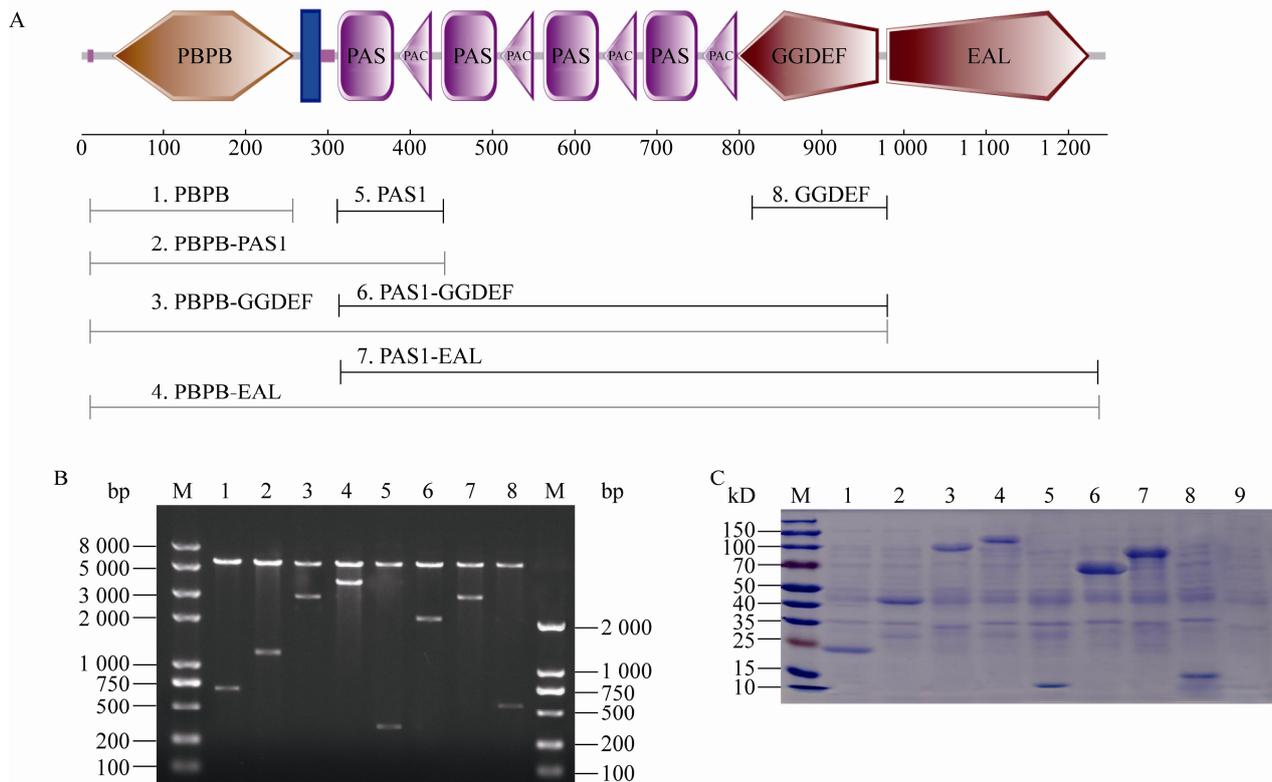


图 5 PA0575 基因结构域示意图(A)、双酶切琼脂糖凝胶电泳(B)和 SDS-PAGE 结果(C)

Figure 5 PA0575 gene domain diagram (A), double enzyme digestion result (B) and SDS-PAGE result (C)

注: 图 A、B、C 中编号 1-8 分别为 PBPB、PBPB-PAS1、PBPB-GGDEF、PBPB-EAL、PAS1、PAS1-GGDEF、PAS-EAL、GGDEF 结构域基因; 图 C 中 9 泳道为对照组. M: Marker.

Note: 1-8 in figure A, B and C are PBPB, PBPB-PAS1, PBPB-GGDEF, PBPB-EAL, PAS1, PAS1-GGDEF, PAS-EAL and GGDEF domain genes, and lane 9 in figure 5C is the control group. M: Marker.

而 PA0575-2、PA0575-3 菌株的 c-di-GMP 水平改变不显著, 据此推断 PA0575 基因可能参与调控胞内 c-di-GMP 的水平, 且 GGDEF 结构域的插入突变可能与 c-di-GMP 含量升高有关, 此项观察与 PA0575 蛋白具有 PDE 活性, 具有 GGDEF 影响 PDE 活性的结果^[11]一致。为了比较转座子插入突变后各菌株表型的变化, 我们进行了表型分析: PA0575 基因 GGDEF 结构域的突变引起泳动能力增强, 生物膜合成能力降低; 然而两个不同的 PAS 结构域突变后可引起泳动、蜂群运动能力增高的同时引起生物膜含量增高, 这表明生物膜的含量不仅与 c-di-GMP 的水平可能相关, 还可能受到 PAS 结构域的影响; 当 PAS 结构域突变时 c-di-GMP 水平无变化但运动能力明显增强, 表明泳动能力、蜂群运

动能力可能受 PAS 结构域的影响。为了进一步研究各结构域在响应胞外抗生素信号对运动能力抑制时发挥的作用, 在运动培养基中添加抗生素后发现: 氨苄青霉素和卡那霉素对野生型菌株和突变体菌株的运动能力都有抑制作用; 转座子中含有四环素抗性基因, 由此转座子突变体菌株的泳动能力和蹭动能力变化不显著, 但是蜂群运动能力受到了抑制作用, 该现象可能与蜂群运动能力易受外界环境因素的影响有关, 在卡那霉素实验组发现细菌的泳动能力和蹭动能力被抑制显著, 而蜂群运动能力完全丧失, 抑制作用十分显著; 同时我们还发现 PA0575 基因 PAS 或 GGDEF 结构域的突变使得氯霉素对细菌 3 种运动能力都产生抑制作用, 表明 PAS 及 GGDEF 结构域可能参与了氯霉素对细菌运

动能力的抑制途径。

综上所述,我们初步认为:GGDEF 结构域参与了 c-di-GMP 水平的调控;细菌的表型不完全由 c-di-GMP 直接调控,同时受 PAS 结构域的影响;PA0575 基因的 PAS、GGDEF 结构域与氯霉素对细菌运动能力抑制过程相关。为了进一步阐明不同结构域、功能、表型的关联,我们构建了 PA0575 各结构域表达载体,为进一步研究该蛋白的生理生化功能奠定了基础。PA0575 基因编码一个多结构域复杂蛋白,对该基因的研究可能对未来抗菌药物的研发、控制细菌感染和扩散起到重要的影响,但是 PA0575 基因不同结构域的生化功能仍有待进一步探讨。

REFERENCES

- [1] Chevalier S, Bouffartigues E, Bodilis J, et al. Structure, function and regulation of *Pseudomonas aeruginosa* porins[J]. FEMS Microbiology Reviews, 2017, 41(5): 698-722
- [2] Doberenz S, Eckweiler D, Reichert O, et al. Identification of a *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 DNA Methyltransferase, Its Targets, and Physiological Roles[J]. mBio, 2017, 8(1): e02312-16
- [3] Navarro MVAS, de N, Bae N, et al. Structural Analysis of the GGDEF-EAL Domain-Containing c-di-GMP Receptor FimX[J]. Structure. 2009, 17(8): 1104-1116
- [4] Moreira RN, Dressaire C, Barahona S, et al. BolA is required for the accurate regulation of c-di-GMP, a central player in biofilm formation[J]. mBio, 2017, 8(5): e00443-17
- [5] Yang Y, Li Y, Gao TT, et al. C-di-GMP turnover influences motility and biofilm formation in *Bacillus amyloliquefaciens* PG12[J]. Research in Microbiology, 2018, 169(4/5): 205-213
- [6] Ryu MH, Fomicheva A, Moskvina OV, et al. Optogenetic module for dichromatic control of c-di-GMP signaling[J]. Journal of Bacteriology, 2017, 199(18): e00014-17
- [7] Sarenko O, Klauck G, Wilke FM, et al. More than enzymes that make or break cyclic Di-GMP-local signaling in the interactome of GGDEF/EAL domain proteins of *Escherichia coli*[J]. mBio, 2017, 8(5): e01639-17
- [8] Romling U, Galperin MY, Gomelsky M. Cyclic di-GMP: the first 25 years of a universal bacterial second messenger[J]. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 2013, 77(1): 1-52
- [9] Borselli D, Lieutaud A, Theffenne H, et al. Polyamino-isoprenic derivatives block intrinsic resistance of *p. aeruginosa* to doxycycline and chloramphenicol *in vitro*[J]. PLoS One, 2016, 11(5): e154490
- [10] Subedi D, Vijay AK, Willcox M. Overview of mechanisms of antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: an ocular perspective[J]. Clin Exp Optom, 2018, 101(2): 162-171
- [11] Mantoni F, Paiardini A, Brunotti P, et al. Insights into the GTP-dependent allosteric control of c-di-GMP hydrolysis from the crystal structure of PA0575 protein from *Pseudomonas aeruginosa*[J]. The FEBS Journal, 2018, 285(20): 3815-3834
- [12] Opoku-Temeng C, Sintim HO. Targeting c-di-GMP Signaling, Biofilm Formation, and Bacterial Motility with Small Molecules[A]//Sauer K. c-di-GMP Signaling[M]. New York, NY: Humana Press, 2017, 1657: 419-430
- [13] Chen XH, Zhang ZR, Liu F, et al. Key catalytic sites in the reverse transcription domain of L1. LtrB intron encoded protein[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2019, 59(12): 2357-2366 (in Chinese)
陈相好, 张峥嵘, 刘芳, 等. L1. LtrB 内含子编码蛋白反转录结构域关键催化位点分析及功能验证[J]. 微生物学报, 2019, 59(12): 2357-2366
- [14] Stover CK, Pham XQ, Erwin A L, et al. Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen[J]. Nature, 2000, 406(6799): 959-964
- [15] Robert-Paganin J, Nonin-Lecomte S, Réty S. Crystal structure of an EAL domain in complex with reaction product 5'-pGpG[J]. PLoS One, 2012, 7(12): e52424
- [16] Buensuceso R, Daniel-Ivad M, Kilmury S, et al. Cyclic AMP-Independent Control of Twitching Motility in *Pseudomonas aeruginosa*[J]. Journal of Bacteriology, 2017, 199(16): e00188-17
- [17] Ha DG, O'Toole GA. c-di-GMP and its effects on biofilm formation and dispersion: a *Pseudomonas aeruginosa* review[J]. Microbiol Spectr, 2015, 3(2): MB-0003-2014
- [18] Zingg W, Hopkins S, Gayet-Ageron A, et al. Health-care-associated infections in neonates, children, and adolescents: an analysis of paediatric data from the European centre for disease prevention and control point-prevalence survey[J]. Lancet Infect Dis, 2017, 17(4): 381-389