

铜绿假单胞菌 PAO1 中 c-di-GMP 代谢相关基因 PA2072 的生物学分析

席那仁¹, 海娥¹, 张小敏², 郭嘉义², 黄卫东^{*1}

1 宁夏医科大学基础医学院生物化学与分子生物学系, 宁夏 银川 750000

2 宁夏医科大学科技中心, 宁夏 银川 750000

席那仁, 海娥, 张小敏, 郭嘉义, 黄卫东. 铜绿假单胞菌 PAO1 中 c-di-GMP 代谢相关基因 PA2072 的生物学分析[J]. 微生物学通报, 2023, 50(5): 2113-2126.

XI Naren, HAI E, ZHANG Xiaomin, GUO Jiayi, HUANG Weidong. Biological characterization of a c-di-GMP metabolism-related gene PA2072 mutant from *Pseudomonas aeruginosa* PAO1[J]. Microbiology China, 2023, 50(5): 2113-2126.

摘要: 【背景】铜绿假单胞菌为革兰氏阴性杆菌, 是医院感染的常见条件致病菌之一。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)对细菌生理生化功能具有重要的调节作用。铜绿假单胞菌 PAO1 中存在参与 c-di-GMP 代谢的基因 PA2072。

【目的】探讨铜绿假单胞菌 PAO1 中 c-di-GMP 代谢相关基因 PA2072 的生物学功能。【方法】运用 PCR 及分子克隆技术构建 PA2072 基因及各结构域的自杀载体, 运用基因敲除方法获取 PA2072 基因的 3 个突变株; 利用泳动性(swimming)、蜂群运动(swarming)、蹭行运动(twitching)和生物膜定量实验对细菌进行初步的表型分析, 进一步通过刚果红染色法对菌株进行分析。【结果】成功构建 PA2072 基因敲除突变菌株及回补菌株; 生物膜定量结果发现基因 PA2072 的敲除会影响细菌生物膜的形成, PA2072 蛋白的不同结构域对生物膜的合成也起到了重要作用; 细菌运动能力检测中发现 PA2072 相关基因的敲除对细菌运动能力也有一定影响。刚果红平板检测结果显示, 与野生型 PAO1 菌株相比, PA2072 敲除菌株菌苔呈红色, 提示其胞内 c-di-GMP 含量升高。【结论】基因 PA2072 的敲除影响了铜绿假单胞菌胞的表型, 可能由于铜绿假单胞菌胞内 c-di-GMP 水平变化引起, 该结果为进一步研究基因 PA2072 的生物学功能奠定了基础。

关键词: 铜绿假单胞菌 PAO1; 环鸟苷二磷酸; PA2072 敲除突变菌株

资助项目: 宁夏回族自治区自然科学基金(NZ17210); 国家自然科学基金(81960365)

This work was supported by the Natural Science Foundation of Ningxia Hui Autonomous Region (NZ17210) and the National Natural Science Foundation of China (81960365).

*Corresponding author. E-mail: weidong1969@hotmail.com

Received: 2022-10-18; Accepted: 2022-11-29; Published online: 2023-02-01

Biological characterization of a c-di-GMP metabolism-related gene PA2072 mutant from *Pseudomonas aeruginosa* PAO1

XI Naren¹, HAI E¹, ZHANG Xiaomin², GUO Jiayi², HUANG Weidong^{*1}

1 Department of Biochemistry and Molecular Biology, School of Basic Medicine, Ningxia Medical University, Yinchuan 750000, Ningxia, China

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

Abstract: [Background] *Pseudomonas aeruginosa*, a Gram-negative bacterium, is a common opportunistic pathogen of nosocomial infection. Cyclic di-guanosine monophosphate (c-di-GMP), a secondary messenger ubiquitous in bacteria, plays a role in regulating the physiological and biochemical functions of bacteria. PA2072 is a gene involved in c-di-GMP metabolism in *P. aeruginosa* PAO1. [Objective] To investigate the biological functions of PA2072 in *P. aeruginosa* PAO1. [Methods] The suicide vectors carrying the full length and different domains of PA2072 were constructed by common molecular cloning technology. Three mutant strains of PA2072 were obtained and studied. The swimming, swarming, and twitching motility, as well as the biofilm formation, of the strains was studied. Congo Red staining was further employed to determine the c-di-GMP levels of the strains. [Results] PA2072 mutant strains and complement strains were successfully constructed. The deletion of PA2072 affected the biofilm formation, and the individual domains of PA2072 also played a role in biofilm formation. The motility tests showed that PA2072 was involved in the regulation of bacterial motility. Compared with the wild-type PAO1 strain, PA2072-deleted strains displayed red lawn, which indicated an increased level of intracellular c-di-GMP. [Conclusion] The deletion of PA2072 affects the phenotypes of *P. aeruginosa*, which might be because of the changes in c-di-GMP level. Our work lays a foundation for further characterization of the biological functions of PA2072.

Keywords: *Pseudomonas aeruginosa* PAO1; c-di-GMP; PA2072-deleted mutant

铜绿假单胞菌是环境中存在的能引起人类感染的条件致病菌之一,可引起呼吸道、泌尿道、烧伤创面和菌血症等严重感染。随着抗生素的广泛使用,铜绿假单胞菌的耐药性越来越普遍,感染检出率呈现上升趋势,严重威胁患者生命安全,为临床抗感染治疗带来巨大挑战^[1]。

目前对铜绿假单胞菌模式菌株 PAO1 基因组序列分析已经完成,并鉴定出部分参与细菌生理、代谢过程调控以及与抗药性相关的基因;然而铜绿假单胞菌毒力和抗性受到多种复杂信

号网络的调控,亟待进一步研究。

环鸟苷二磷酸(cyclic-di-guanosine monophosphate, c-di-GMP)于20世纪80年代被发现,已被证明是一种广泛存在于细菌内的小分子环核苷酸第二信使^[2],对细菌各项生理生化功能具有重要影响。c-di-GMP在胞内的合成及降解机制是目前的研究热点。作为第二信使,在一定信号条件下c-di-GMP的合成和水解受两类酶的调控,胞内的c-di-GMP由二鸟苷酸环化酶(diguanylate cyclase, DGC)合成,并由特异

性的磷酸二酯酶(phosphodiesterase, PDE)降解^[3]。研究发现在细菌中,具有 DGC 活性的蛋白通常含 GGDEF 结构域,而具有 PDE 活性的蛋白通常含有 EAL 结构域^[4]。GGDEF 结构域能够将 2 分子 GTPs 催化合成 1 分子 c-di-GMP,而 EAL 结构域能够将 c-di-GMP 降解为 1 分子 pGpG 和 2 分子 GMP^[5]。

目前铜绿假单胞菌 PAO1 的全基因组测序^[6]工作表明,其基因组中共具有 18 个 GGDEF、5 个 EAL、16 个 GGDEF/EAL 和 3 个 HD-GYP 蛋白结构域基因,这些蛋白结构域参与了 c-di-GMP 代谢。研究者们注意到这类基因的 C 端结构域往往与环鸟苷二磷酸的代谢有关,主要包括 2 个方面:GGDEF 结构域可以催化 c-di-GMP 合成,而 EAL 结构域则催化其降解;而这类基因的 N 端往往大部分都包含有 PAS 结构域、GAF 结构域和 REC 结构域等信号感应结构域,以感知抗生素、磷酸化反应、金属离子、光和小分子等外界环境刺激,从而调控细菌相应的生理生化过程^[7];但具体到每个基因的生物学功能,仍有很多问题亟待分析。

参与铜绿假单胞菌 c-di-GMP 代谢的未知功能基因 PA2072 引起了广泛关注,研究表明 PA2072 基因 N 端含有可感应外界信号的结构域, C 端含有参与 c-di-GMP 代谢的 GGDEF/EAL 结构域^[8]。由此我们推测 PA2072 可能在感应外界环境信号及调控细菌 c-di-GMP 的水平等方面有着复杂功能,通过对 PA2072 进行表型分析和胞内 c-di-GMP 含量的检测,以期为后续 PA2072 的生物学功能研究奠定基础。

1 材料与amp;方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒

实验所用到的菌株和质粒见表 1。

1.1.2 培养基、主要试剂和仪器

铜绿假单胞菌在 37 °C 的 LB 液体(220 r/min)或固体培养基以及假单胞菌分离琼脂(*Pseudomonas* isolation agar, PIA)培养基^[9]中培养。PIA 培养基:假单胞菌分离琼脂 45 g/L;刚果红培养基^[11]:LB 固体培养基中添加刚果红 Congo Red 0.04 g/L,考马斯亮蓝 G-250 0.02 g/L。

抗生素浓度:大肠杆菌在 LB 培养基中使用 50 μg/mL 庆大霉素(gentamicin, Gm);铜绿假单胞菌在 LB 培养基中使用 100 μg/mL 羧苄青霉素(carbenicillin, Cb),在 PIA 培养基中使用 150 μg/mL 庆大霉素。

细菌基因组 DNA 提取试剂盒、质粒提取试剂盒、琼脂糖凝胶电泳回收试剂盒, Axygen 公司; Q5 DNA Polymerase、限制性内切酶、T4 DNA 连接酶, NEB New England Biolabs 公司;实验所用培养基以及抗生素均购于北京索莱宝科技有限公司。酶标仪, Thermo Fisher 公司; PCR 仪, Gene Company Limited 公司;电转化仪、凝胶成像系统, Bio-Rad 公司。

1.2 方法

1.2.1 铜绿假单胞菌敲除突变菌株的构建

根据生物信息学比对序列筛选 PA2072 不同结构域,设计 PA2072 全长、CHASE4 和 GGDEF-EAL 结构域的 3 组上、下游引物,所用引物见表 2。根据细菌基因组提纯试剂盒使用说明提取铜绿假单胞菌 PAO1 基因组 DNA 作为模板。敲除突变体构建流程如图 1 所示。以 PA2072 为例,以 PAO1 gDNA 为模板,以 PA2072-F1/PA2072-R1 和 PA2072-F2/PA2072-R2 2 组引物对,分别 PCR 扩增 PA2072 全长基因上、下游同源臂 PA2072-1 和 PA2072-2 片段(各 1 000 bp)。PCR 反应体系(50 μL):DNA 模板(150 ng/μL) 2 μL,引物 F、R (10 μmol/L)各 2.5 μL, Q5 DNA polymerase (2 U/μL) 0.5 μL, Q5 reaction buffer 10 μL, Q5

表 1 菌株和质粒

Table 1 Strains and plasmids

材料 Materials	基因型及相关特征 Genotype and relevant characteristics	来源 Source
菌株 Strains		
<i>Escherichia coli</i>		
DH10B	F-mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC)Δ80lacZΔM15 ΔlacX74 recA1 araΔ139	[9]
DH5α	F-φ80 lac ZΔM15Δ(lacZYA-arg F) LAMpir U169 endA1 recA1 hsdr17(rk-, mk+) supE44λ- thi -1 gyrA96 relA1 phoA	[10]
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		
PAO1	Wild type	Lab collection
ΔPA2072	PAO1 knockout mutant PA2072 domain; Gm ^R	This study
ΔCHASE4	PAO1 knockout mutant CHASE4 domain; Gm ^R	This study
ΔGGDEF-EAL	PAO1 knockout mutant GGDEF-EAL domain; Gm ^R	This study
CΔPA2072	(ΔPA2072) complemented strain; Cb ^R Cb ^R	This study
CΔCHASE4	(ΔCHASE4) complemented strain; Cb ^R	This study
CΔGGDEF-EAL	(ΔGGDEF-EAL) complemented strain; Cb ^R	This study
CΔPAO1	PAO1 complemented strain; Cb ^R	This study
PΔPAO1	PAO1 containing the empty vector pUCP20; Cb ^R	This study
PΔPA2072	ΔPA2072 containing the empty vector pUCP20; Cb ^R	This study
质粒 Plasmids		
pRK2013	Broad-host-range helper vector; Kan ^R	Lab collection
pEX18GM	Broad-host-range gene replacement vector; Gm ^R	Lab collection
pUCP 20	<i>E. coli-P. aeruginosa</i> shuttle plasmid; Cb ^R	Lab collection

Kan^R: Kanamycin resistance; Gm^R: Gentamicin resistance; Cb^R: Carbenicillin resistance.

enhancer buffer 10 μL, dNTPs (0.1 mol/L) 1 μL, ddH₂O 21.5 μL。PCR 反应条件: 98 °C 30 s; 98 °C 10 s, 60 °C 30 s, 72 °C 30 s, 30 个循环; 72 °C 2 min。PCR 产物纯化后通过 *Sac* I 与 *Hind* III 双酶切, 连接至同样双酶切的 pEX18GM 中, 连接产物转化至大肠杆菌 DH10B 感受态细胞中, 所得质粒经过酶切及 PCR 验证, 得到质粒 pEX18GM-PA2072。以含有质粒 pEX18GM-PA2072 的大肠杆菌 DH10B 作供体菌, PAO1 作受体菌, 质粒 pRK2013 作协助菌, 进行三亲株杂交。挑取在含 Gm 和 20%

蔗糖的 PIA 平板上生长的单克隆扩大培养, 以 YZ CHASE4-F/YZ PA2072-R 为验证引物进行 PCR 检测。PCR 反应体系(25 μL): DNA 模板(150 ng/μL) 1 μL, 引物 F、R (10 μmol/L)各 0.5 μL, *Taq* DNA polymerase mix 12.5 μL, ddH₂O 10.5 μL。PCR 反应条件: 98 °C 20 s; 98 °C 20 s, 60 °C 30 s, 72 °C 2 min, 30 个循环; 72 °C 5 min。经测序验证后, 获得敲除突变菌株 ΔPA2072, 甘油冻存保种。

以类似方法构建 CHASE4 及 GGDEF-EAL 的敲除突变菌株 ΔCHASE4 和 ΔGGDEF-EAL。

表 2 本研究所用引物序列

Table 2 Sequences of primers used in PCR amplification reactions in this study

引物 Primers	序列 Sequences (5'→3')	产物大小 Product size (bp)
PA2072-F1	TATC <u>GAGCTC</u> CGACCAGGAGAAGATGGGCATCGCCC	1 000
PA2072-R1	TATCCTGCAGCGATTCCGCATCCTTGTGACCGTATA	
PA2072-F2	TATCCTGCAGGCGGGCGTCAGAAGGGCGCACGCGGT	1 001
PA2072-R2	TATCA <u>AAGCTT</u> CGAGGCCAGGAATGCGCCCAGCGACA	
CHASE4-F1	TATC <u>GAGCTC</u> CAAGCCGCAGGTGGCCTATCGCGAGA	1 004
CHASE4-R1	TATCCTGCAGCTTTTCCACGTAGAAATGGCTCTGCT	
CHASE4-F2	TATCCTGCAGGCCGCGGGCGCGGGCGGCGACAAGGA	1 026
CHASE4-R2	TATCA <u>AAGCTT</u> GCCCCGCGGATCGCCGCCGTGCTCCG	
GGDEF-EAL-F1	TATC <u>GAATTC</u> CTACGTCTATCTGGGAAACCGGGTCG	1 000
GGDEF-EAL-R1	TATC <u>GGATCC</u> CGTCCGGTGTGTCGGCCGCCGTGCCGC	
GGDEF-EAL-F2	TATC <u>GGATCC</u> CCTGCGCATCTGCTGGAGCGCGAGGC	1 000
GGDEF-EAL-R2	TATCA <u>AAGCTT</u> CGGCGTTTCGTGCGGCAGGTAGCGGG	
YZ PA2072-R	CAGTCAGGTCAAATAATCAGTTCAGC	601
YZ CHASE4-F	TACTCGATGGAGTTCGTTTCGCT	829
YZ CHASE4-R	TATCGCTATCCAGCAACTCGTC	
YZ GGDEF-EAL-F	TTGCCGCTGCTGGGAATCTTCG	925
YZ GGDEF-EAL-R	GGTGAAGCCGGTGACCATGGTG	
PA2072-C-F	CGAGCTACTCGATGGAGTTCGTTTCGCTATG	3 006
PA2072-C-R	TCAAGGCCGCGCGCAGCATGGCCTTC	

下划线序列: 限制性内切酶识别序列. *Sac* I: GAGCTC; *Pst* I: CTGCAG; *Hind* III: AAGCTT; *Eco*R I: GAATTC; *Bam*H I: GGATCC

Underlined sequences: Restriction endonuclease recognition sequences. *Sac* I: GAGCTC; *Pst* I: CTGCAG; *Hind* III: AAGCTT; *Eco*R I: GAATTC; *Bam*H I: GGATCC.

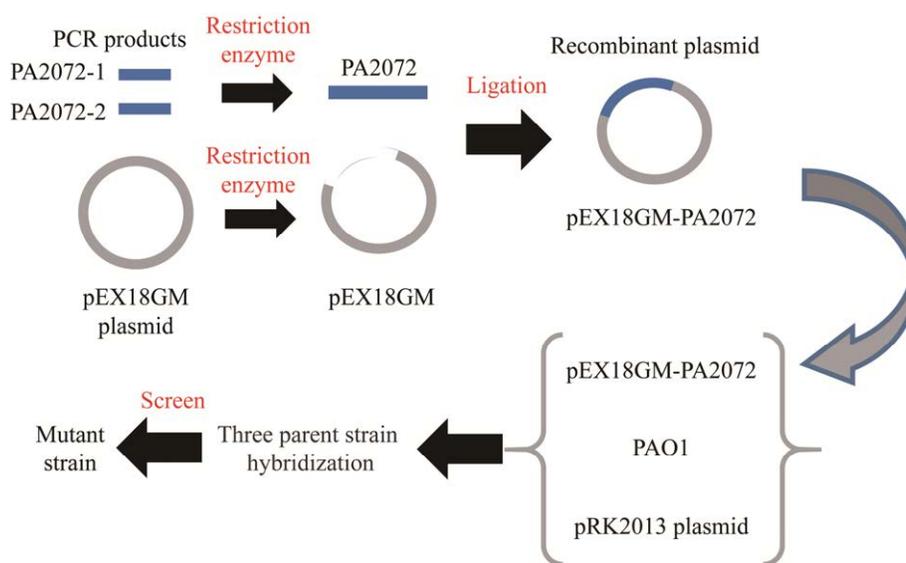


图 1 敲除突变菌株的构建流程

Figure 1 Flowchart of knockout mutant strains construction.

1.2.2 敲除回补菌株的构建

以 PA2072 为例,在铜绿假单胞菌网站上获取 PA2072 基因及上、下游核酸序列,设计回补引物,所用引物见表 1;以野生型 PAO1 gDNA 为模板,以 PA2072-C-F/PA2072-C-R 为引物对,PCR 扩增包括完整的启动子和开放阅读框的目的片段(3 000 bp)。利用 *Sac* I/*Hind* III 与 pUCP 20 连接,获得质粒 pUCP 20-PA2072-C,将其电转入 Δ PA2072,挑取单克隆扩大培养获得 PA2072 敲除回补菌株 C Δ PA2072。

类似方法构建 CHASE4 和 GGDEF-EAL 的敲除回补菌株 C Δ CHASE4 和 C Δ GGDEF-EAL;另将质粒 pUCP 20-PA2072-C 电转至 PAO1 中,获得 PAO1 对照菌株 C Δ PAO1。

1.2.3 细菌生物膜的检测及定量

将空白对照 PAO1,3 个敲除突变菌株 Δ PA2072、 Δ CHASE4 和 Δ GGDEF-EAL,以及 3 个敲除回补菌株 C Δ PA2072、C Δ CHASE4 和 C Δ GGDEF-EAL,于 37 °C、220 r/min 培养过夜,调节 OD_{600} 为 0.6 左右。在聚苯乙烯试管中加入 1 mL 新鲜 LB 液体培养基,分别加入 10 μ L 菌液,每组 3 个重复,于 37 °C、100 r/min 孵育。在 12、18、24、36 和 48 h 取出试管,冲洗晾干后加入 2.5 mL 0.2%结晶紫染色 30 min 后,双蒸水清洗晾干后拍照记录。定量时需加入 5 mL 95%乙醇溶解,常温摇床培养 12 h 后,酶标仪测量 OD_{595} 并进行统计分析。

1.2.4 细菌运动能力的检测

将空载体 pUCP 20 电转至 PAO1 和 Δ PA2072 中,获得敲除突变对照菌株 P Δ PAO1 和 P Δ PA2072 作为条件对照。

将空白对照 PAO1,3 个敲除突变菌株 Δ PA2072、 Δ CHASE4 和 Δ GGDEF-EAL,3 个敲除回补菌株 C Δ PA2072、C Δ CHASE4 和 C Δ GGDEF-EAL,以及对照菌株 P Δ PAO1、P Δ PA2072 和 C Δ PAO1,于 37 °C、220 r/min 条件下培养过夜,

调节 OD_{600} 为 0.6 左右。吸取 0.6 μ L 菌液分别插入泳动性(swimming)、蜂群运动(swarming)和蹭行运动(twitching)的平板^[12]中,封口正置培养,在 16 h 后密切观察各菌株生长情况,拍照并测量菌落直径,每个菌落测量 3 次取平均值,并进行统计学分析。

1.2.5 刚果红平板检测胞内 c-di-GMP 含量

将空白对照 PAO1,3 个敲除突变菌株 Δ PA2072、 Δ CHASE4 和 Δ GGDEF-EAL,3 个敲除回补菌株 C Δ PA2072、C Δ CHASE4 和 C Δ GGDEF-EAL,于 37 °C、220 r/min 条件下培养过夜,调节 OD_{600} 为 0.6 左右。吸取 1 μ L 菌液分别滴加在刚果红平板表面,点样结束后,开盖晾 5 min 左右至液体挥发,封口倒置于 37 °C 温箱培养 48 h 以上,观察菌苔颜色并拍照记录。

2 结果与分析

2.1 铜绿假单胞菌敲除突变菌株及敲除回补菌株的构建

依据 PA2072 基因的不同结构域序列设计引物,以 PAO1 gDNA 为模板,利用高保真 DNA 聚合酶扩增 PA2072 全长、CHASE4 和 GGDEF-EAL 结构域的 3 组上游及下游片段,克隆至 pEX18GM 中,得到 3 个重组质粒 pEX18GM-PA2072、pEX18GM-CHASE4 和 pEX18GM-GGDEF-EAL。将这 3 个重组质粒转化至大肠杆菌 DH10B 中作为供体菌,供体菌与受体菌野生型 PAO1 混合培养后,利用庆大霉素及蔗糖进行筛选,获得 3 个敲除突变菌株。以野生型 PAO1 为阴性对照,验证引物进行 PCR 检测及 DNA 测序,证实铜绿假单胞菌 PAO1 基因 PA2072 的 3 个敲除突变菌株,即 Δ PA2072、 Δ CHASE4 和 Δ GGDEF-EAL 构建成功。各菌株 gDNA 的 PA2072 扩增结果如图 2 所示,敲除菌株扩增片段明显小于野生型菌株 PAO1。

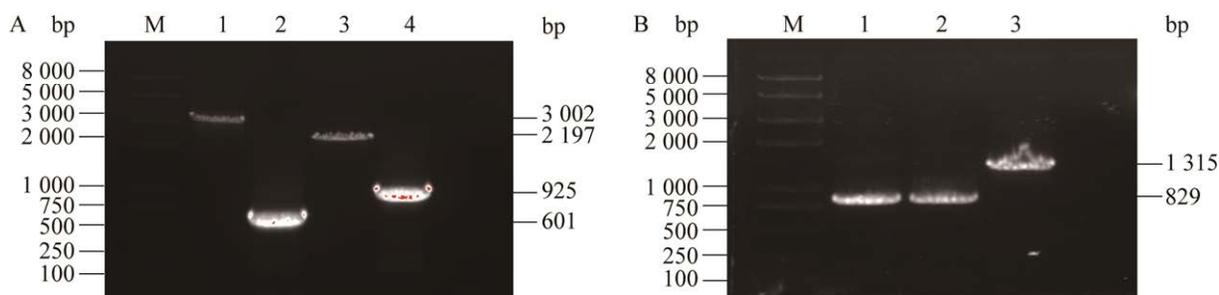


图 2 PA2072 敲除突变菌株的 PCR 验证 M: Trans2K Plus II DNA Marker. A: Δ PA2072 和 Δ GGDEF-EAL 敲除菌株的 PCR 验证, 1 和 3: 野生型 PAO1; 2: Δ PA2072; 4: Δ GGDEF-EAL. B: Δ CHASE4 敲除菌株的 PCR 验证, 1-2: Δ CHASE4; 3: 野生型 PAO1

Figure 2 PCR validation of PA2072 knockout mutant strains. M: Trans2K Plus II DNA Marker. A: PCR validation of Δ PA2072 and Δ GGDEF-EAL knockout strains; Wild-type PAO1 in lane 1 and lane 3; Δ PA2072 in lane 2; Δ GGDEF-EAL in lane 4. B: PCR validation of Δ CHASE4 knockout strain; Δ CHASE4 in lanes 1-2; Wild-type PAO1 in lane 1.

由 PAO1 基因组 DNA 扩增获得 PA2072 编码区及上游约 1 000 bp 的完整序列, 克隆至载体 pUCP 20 中, 获得回补载体 pUCP 20-PA2072, 将其电转入 3 个敲除突变菌株, 即获得 3 个敲除回补菌株 $C\Delta$ PA2072、 $C\Delta$ CHASE4 和 $C\Delta$ GGDEF-EAL。

2.2 细菌生物膜合成分析研究

为了探究基因 PA2072 的生物学功能, 首先进行了生物膜分析实验。当细菌附着于惰性或活性实体表面, 为了适应生存环境, 繁殖、分化所分泌 pel 和 psl 型胞外多糖、海藻酸钠等包裹菌体群落所形成的细菌聚集体膜状物结构称为生物膜^[10]。生物膜经结晶紫染色后会在聚苯乙烯试管底部形成紫色的环状结构, 经 95% 乙醇溶解并通过 OD_{595} 定量。其结果如图 3 所示, 与野生型 PAO1 菌株相比, 3 个敲除突变菌株在培养 12 h 后, 生物膜含量均比野生型低; 培养 18 h 时, Δ PA2072 和 Δ CHASE4 含量比野生型低, Δ GGDEF-EAL 与 PAO1 无明显差异; 培养 24 h, 3 个敲除突变菌株均高于野生型水平。培养 36-48 h 后, Δ PA2072 趋于平稳期, Δ CHASE4

处于缓慢上升趋势, 而 Δ GGDEF-EAL 呈下降趋势, 但各敲除突变菌株仍高于野生型水平。

将回补质粒转入敲除突变菌株后, 与野生型 PAO1 菌株相比, 培养 12-48 h 回补的 3 个基因的生物膜形成均已基本恢复至野生型水平。因此, 基因 PA2072 的敲除对细菌生物膜的形成有一定影响, 经回补后可得到部分弥补。

2.3 细菌运动能力的检测结果

为了进一步探究基因 PA2072 的生物学功能, 对各菌株的运动能力进行了检测。野生型 PAO1、PA2072 基因的 3 个敲除突变菌株, 以及 3 个敲除回补菌株的泳动能力、蜂群运动能力和蹭动运动能力如图 4 所示, 测量菌落直径并统计分析后发现, 与野生型 PAO1 菌株相比, Δ PA2072 菌株的蜂群运动能力及泳动能力增强 ($P < 0.05$), 而蹭行运动能力减弱 ($P < 0.05$); 将空载体 pUCP 20 转入 PAO1 及 Δ PA2072 后, 发现其对 PAO1 及 Δ PA2072 的泳动能力、蜂群运动能力及蹭行运动能力均无明显影响; 而将 PA2072 回补载体转入 PAO1 及 Δ PA2072 菌株后, 发现 $C\Delta$ PAO1 蜂群运动能力增强, 泳动能

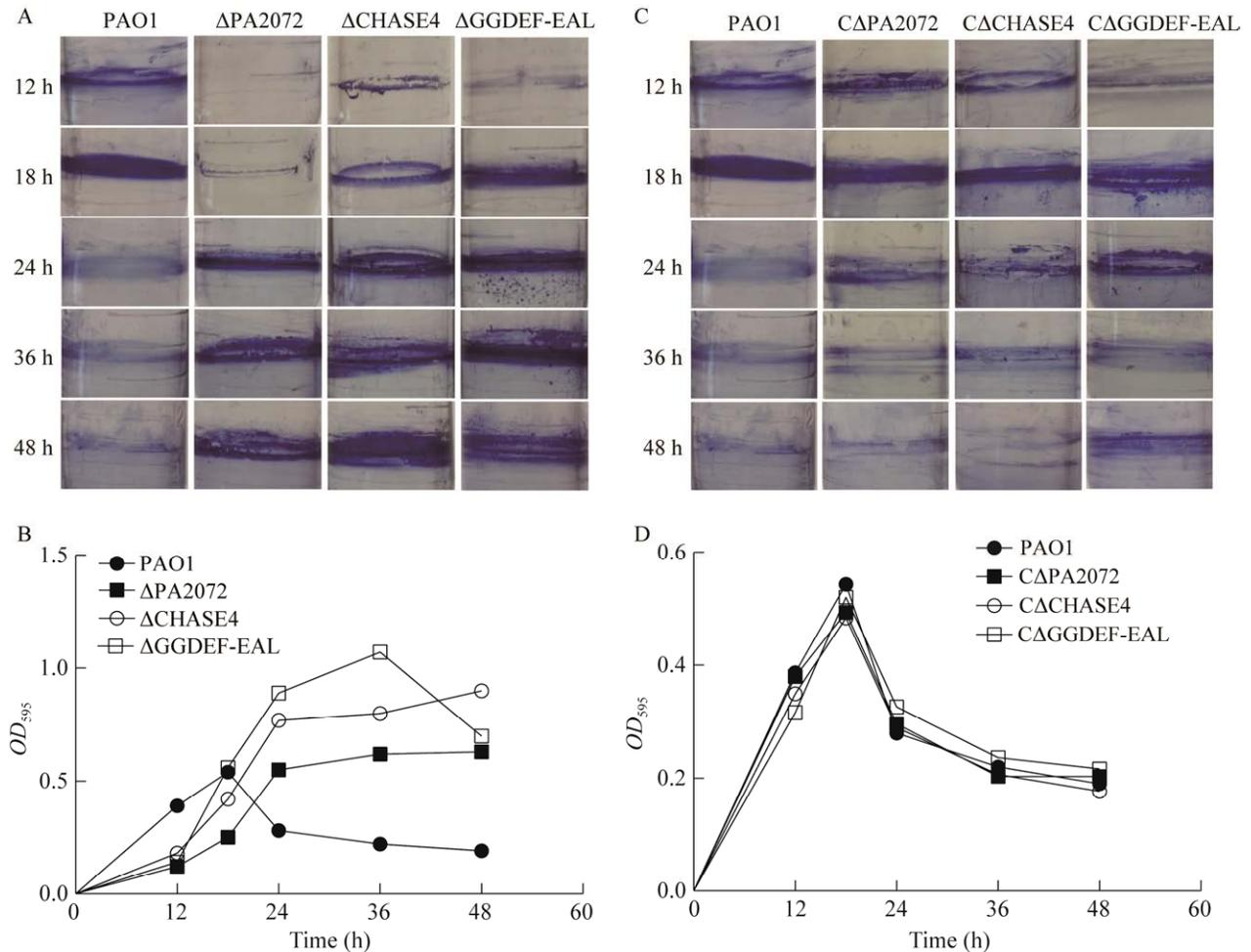


图3 生物膜结晶紫染色和定量统计分析 A和B: 敲除菌株生物膜结晶紫染色以及定量统计分析. C和D: 回补菌株的生物膜结晶紫染色以及定量统计分析

Figure 3 Crystal violet staining and statistical analysis of biofilm. A and B show biofilm crystal violet staining and quantitative statistical analysis of knockout strain biofilm. C and D show biofilm crystal violet staining and quantitative statistical analysis of complement strains.

力及蹭行运动能力与野生型相比无明显差异, 而 $C\Delta PA2072$ 泳动能力、蜂群运动能力以及蹭行运动能力均基本恢复至野生型水平(图 4A、4B)。以 $\Delta PA2072$ 作为对照, 与 $\Delta CHASE4$ 以及 $\Delta GGDEF-EAL$ 对比发现, $\Delta PA2072$ 的泳动能力强于 $\Delta CHASE4$ 及 $\Delta GGDEF-EAL$, 而蜂群运动低于 $\Delta CHASE4$ 及 $\Delta GGDEF-EAL$; $\Delta CHASE4$ 的泳动能力及蜂群运动能力均高于

$\Delta GGDEF-EAL$, 而 $\Delta PA2072$ 、 $\Delta CHASE4$ 及 $\Delta GGDEF-EAL$ 的蹭行运动能力无明显差别(图 4C、4D); 将回补载体转入 $\Delta CHASE4$ 及 $\Delta GGDEF-EAL$ 后, 发现 3 个回补菌株间的泳动能力、蜂群运动能力以及蹭行运动能力无明显差别, 基本恢复至野生型水平(图 4C、4D)。由此可见, 基因 $PA2072$ 的敲除也影响细菌的运动能力, 但此种作用较为复杂。

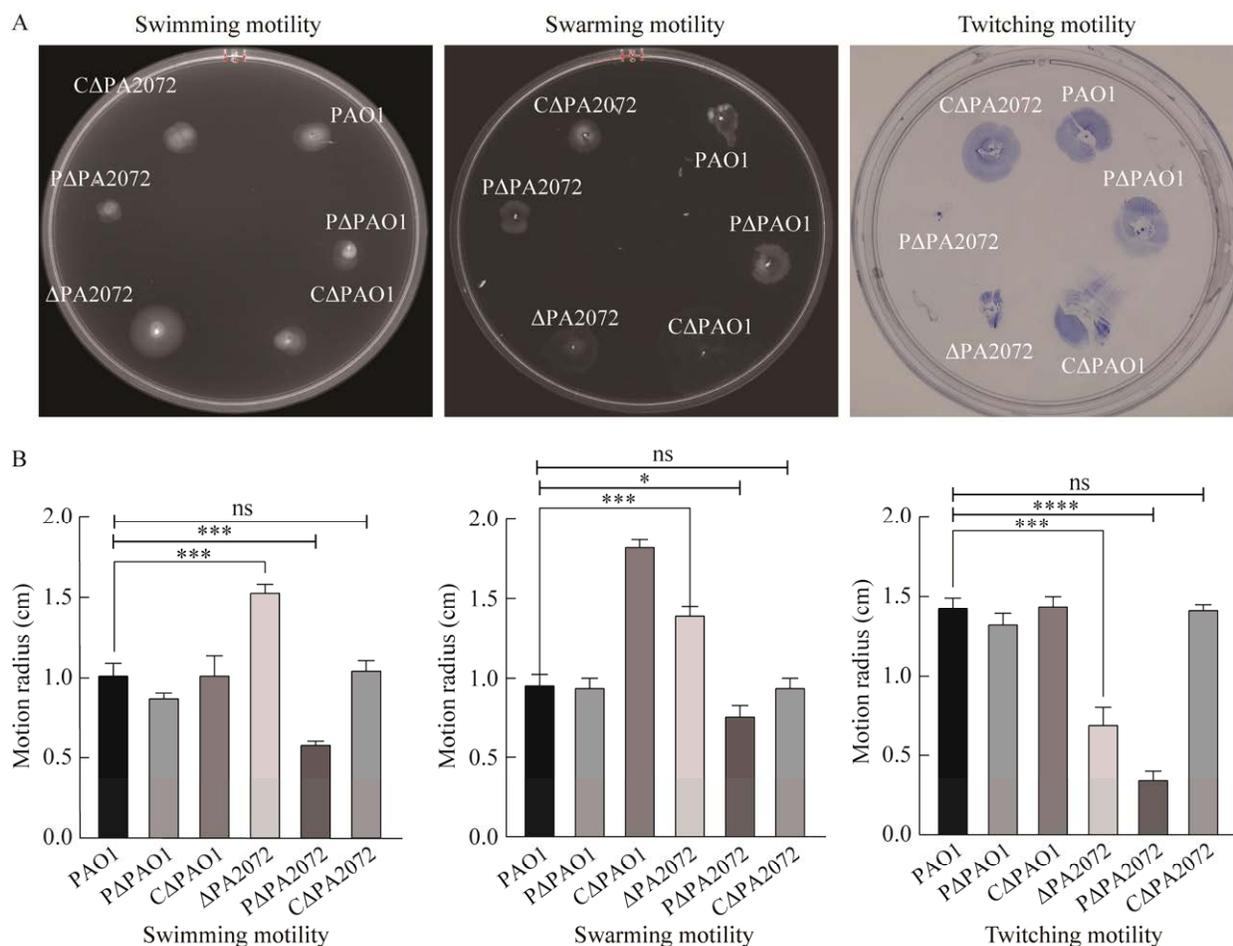
2.4 刚果红平板检测胞内 c-di-GMP 含量结果

由于基因 PA2072 的 C 端存在 GGDEF 及 EAL 结构域, 提示 c-di-GMP 的合成和降解可能对其发挥生物学功能具有影响。刚果红平板染色法^[11]可以粗略反映胞内 c-di-GMP 水平: c-di-GMP 能够促进纤维素的合成, 当 c-di-GMP 含量偏高时, 纤维素和刚果红结合后为红色或棕色。因此, 我们对 3 个敲除突变菌株以及 3 个回补菌株进行了刚果红染色分析。如图 5 所示, 与野生型 PAO1 菌株相比, Δ PA2072、 Δ CHASE4 及 Δ GGDEF-EAL 菌苔均呈红色, 表明其 c-di-GMP 含量升高, 此结果提示尽管具有 GGDEF 及 EAL 2 个结构域, PA2072 总体呈现出 PDE 活性, 此结果与 Valentini 等的观察一致^[8]; 将回补质粒

转入敲除突变菌株后, 刚果红平板结果显示, $C\Delta$ PA2072、 $C\Delta$ CHASE4 及 $C\Delta$ GGDEF-EAL 菌苔较敲除突变菌株均相应变浅, 提示回补后的 3 个菌株胞内 c-di-GMP 的水平降低, 部分恢复至野生型水平。

3 讨论与结论

铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)是一种常见的革兰氏阴性菌, 当患者患有基础疾病或长期住院免疫力低下时易发生铜绿假单胞菌感染^[13]。近年来发现的小分子环核苷酸第二信使环鸟甘二磷酸(c-di-GMP)调控细菌的生长及行为, 包括运动性、毒性、生物膜形成和细胞周期等, 也影响了细菌的致病性和耐药



性^[14-15]。PA2072 作为一个潜在的 c-di-GMP 代谢基因, 可能通过其所含结构域感应外界环境信号, 调控胞内环鸟苷二磷酸水平以发挥生物学作用。

本研究根据基因 PA2072 所含结构域设计引物, 通过基因敲除的方法构建了铜绿假单胞菌 PAO1 中基因 PA2072 的 3 个缺失突变菌株 Δ PA2072、 Δ CHASE4 及 Δ GGDEF-EAL, 并对其展开初步的生物学功能分析。首先, 生物膜是嵌入在细胞外聚合物中的微生物群落, 是慢性和持续性感染的主要原因^[16]。生物膜的形成能够使细菌抵御宿主免疫防御系统及抗生素的影响, 其往往与细菌鞭毛所促进的迁移和扩散协同作用, 因此有助于病原菌与宿主的相互作用^[17]。铜绿假单胞菌在感染人体后会迅速生成生物膜, 从而具有更强的耐药性和免疫逃逸能力, 增加了临床治疗难度^[18]。c-di-GMP 在生物膜形成过程中起着重要作用, 当 c-di-GMP 升高时会刺激黏着素和胞外多糖的生物合成, 以增强生物膜的形成; c-di-GMP 降低时则与活性和毒性的增加有关^[19]。

本研究的结果显示, 野生型 PAO1 菌株在培养 0-18 h 后进入生物膜合成的快速生长期并达到饱和, 随后进入衰退期; 而各敲除菌株的生物膜合成在培养 0-12 h 上升缓慢, 培养 12-24 h 进入快速生长期, 而在培养至 36 h 后, Δ PA2072 的生物膜趋于平稳, Δ CHASE4 处于缓慢上升趋势, Δ GGDEF-EAL 则出现下降, 但各突变菌株生物膜水平均高于野生型(图 3A、3B)。以此我们推测, 基因 PA2072 在删除特定的结构域后, 可能通过第二信使的层层级联反应使生物膜的形成相较于野生型出现了迟滞。铜绿假单胞菌的 c-di-GMP 信号分子是一种环核苷酸, 在细菌的胞质中以自由扩散的方式运动, 而不同的 DGC 和 PDE 在一个复杂的网络中发挥着不同

的作用^[20]。在这种情况下, 所有的 DGC 和 PDE 都可能在整个胞质中影响 c-di-GMP 的浓度^[17]; 因此, c-di-GMP 对不同效应子的结合亲和力不同, 从而影响不同的表型。PA2072 的缺失导致生物膜形成增加, 这是 EAL 基因在 *P. aeruginosa* 中的典型特征, 显示了 PDE 活性, 这与 Wei 等对 PA0285 和 PA4367 中的观察^[19]一致。将回补质粒转入 3 个敲除突变菌株后, 其生物膜形成能力基本接近野生型。由此可以推断, 铜绿假单胞菌 PAO1 的基因 PA2072 参与调节细菌生物膜的形成。

为了进一步探究基因 PA2072 的生物学功能, 我们进行了细菌运动能力的检测, 包括蜂群运动(swarming)、泳动(swimming)以及蹭行运动(twitching)。其中, 细菌的泳动能力依赖于鞭毛的泳动及旋转梭动以克服表面斥力^[17]; 蹭行运动则是指个体在IV型菌毛的伸展和收缩作用下产生的运动; 而蜂群泳动是以群体细胞为基础, 依赖鞭毛、IV型菌毛以及鼠李糖脂等的复杂协调^[20]进行的表面协同运动^[21]。

本研究中, 与野生型 PAO1 菌株相比, 3 个敲除菌株 Δ PA2072、 Δ CHASE4 及 Δ GGDEF-EAL 的蜂群运动能力及泳动能力均增强; 其中, Δ PA2072 的泳动能力增强较为明显, Δ CHASE4 的蜂群运动能力也有一定的增强, 对二者运动能力所产生的差异可能由于蜂群运动能力还受到胞外多糖和鼠李糖脂组分的影响, 这些组分的改变可能抵消了鞭毛功能变化的影响^[20]; 3 个敲除菌株的蹭行运动能力无明显差别, 与野生型相比均有所降低(图 4C、4D)。一般认为, 当 c-di-GMP 的浓度升高时有利于生物膜的形成, 而不利于细菌的运动; 当 c-di-GMP 的浓度降低时则有利于细菌的运动, 不利于生物膜的形成^[18], 这一概念已被广泛接受。从现有结果来看, 高水平 c-di-GMP 条件下, 3 个敲除突变菌株的生

物膜形成能力增强, 蹭行运动能力减弱, 符合此逻辑; 而 3 个敲除突变菌株的泳动能力及蜂群运动能力的增强, 则说明 c-di-GMP 的信号转导作用可能具有多样性; 正如 Massie 等对霍乱弧菌中 c-di-GMP 信号的系统分析指出, 高特异性信号预示体内总 c-di-GMP 水平与 DGCs 的下游表型调节之间几乎不存在相关性, 因为个别 DGCs 有助于形成分离的 c-di-GMP 微域, 这表明 DGC 编码基因在假单胞菌中的分布及作用是高度可变的^[22]。当 c-di-GMP 的浓度升高时不仅有利于生物膜形成, 也可能有利于细菌的运动^[23-24], 不同的 *P. aeruginosa* 菌株存在调控差异, 其调控程度可能并不完全相同^[25]。将空载体 pUCP 20 转入 Δ PA2072 后, 发现 P Δ PA2072 泳动能力、蜂群运动能力及蹭行运动能力未能达至野生型水平, 这与 Feng 等的观察^[25]一致; 而将回补载体转入 Δ PA2072 菌株后, 发现 C Δ PA2072 的泳动能力、蜂群运动能力和蹭行运动能力均恢复至野生型水平; 将回补载体转入 Δ CHASE4 及 Δ GGDEF-EAL 菌株后, 其泳动能力、蜂群运动能力和蹭行运动能力也恢复至野生型水平。由此可见, 基因 PA2072 的功能也涉及对细菌运动能力的调控。

PA2072 基因影响生物膜合成及运动性的具体机制尚不清楚, 但其结构中具有调控 c-di-GMP 代谢的 GGDEF-EAL 结构域, 很可能影响胞内 c-di-GMP 的水平, 从而影响表型, 最终实现其功能。本项实验中刚果红结合实验显示野生型 PAO1 菌株菌苔呈白色, 而 Δ PA2072、 Δ CHASE4 及 Δ GGDEF-EAL 菌苔均呈红色 (图 5A), 表明 PA2072 的 3 个基因敲除突变菌株 c-di-GMP 含量均高于野生型, 提示 PA2072 可能具有 PDE 催化活性, 这与生物膜实验所得结果一致。将回补质粒转入敲除突变菌株后, 刚果红平板结果显示, 回补后的 3 个菌株菌苔

颜色均部分恢复至野生型水平, 提示 PA2072 呈现 PDE 活性, 能够降解 c-di-GMP, 由此建立 PA2072 敲除突变株与 c-di-GMP 之间的联系。至于运动性变化较为复杂, 仍有待进一步分析。

本研究通过构建基因 PA2072 的敲除及回补实验, 对其生物学功能及可能的机制进行初步探讨, PA2072 引致的表型变化可能由胞内 c-di-GMP 水平波动所致, 但是 PA2072 基因是一个多结构域多功能的复杂基因, 其具体信号转导作用仍需进一步深入研究。

REFERENCES

- [1] 郭俏. 铜绿假单胞菌致病因子抑制剂及喹诺酮信号分子介导的调节途径研究[D]. 西安: 西北大学博士学位论文, 2013.
GUO Q. Study on *Pseudomonas aeruginosa* pathogenic factor inhibitor and quinolone signal molecule mediated regulation pathway[D]. Xi'an: Doctoral Dissertation of Northwest University, 2013 (in Chinese).
- [2] STOVER CK, PHAM XQ, ERWIN AL, MIZOGUCHI SD, WARRENER P, HICKEY MJ, BRINKMAN FS, HUFNAGLE WO, KOWALIK DJ, LAGROU M, GARBER RL, GOLTRY L, TOLENTINO E, WESTBROCK-WADMAN S, YUAN Y, BRODY LL, COULTER SN, FOLGER KR, KAS A, LARBIG K, et al. Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen[J]. Nature, 2000, 406(6799): 959-964.
- [3] 贾宾, 张维, 郭豫杰, 孔江南, 杨雪宸, 庞博文, 杨国宇, 郑悦亭. 大肠杆菌二核苷酸环化酶催化 c-di-GMP 生物合成[J]. 农业生物技术学报, 2019, 27(7): 1275-1281.
JIA B, ZHANG W, GUO YJ, KONG JN, YANG XC, PANG BW, YANG GY, ZHENG YT. The biosynthesis of c-di-GMP catalyzed by *Escherichia coli* dinucleotide cyclase[J]. Journal of Agricultural Biotechnology, 2019, 27(7): 1275-1281 (in Chinese).
- [4] SARENKO O, KLAUCK G, WILKE FM, PFIFFER V, RICHTER AM, HERBST S, KAEVER V, HENGGE R. 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-e01617.

- [5] 丛晓燕, 时建立, 孙文博, 李俊, 杜以军, 吴家强, 陈蕾, 陈智, 王金宝. 环二鸟苷酸(c-di-GMP)作为潜在免疫佐剂的研究进展[J]. 中国兽药杂志, 2014, 48(2): 59-62.
CONG XY, SHI JL, SUN WB, LI J, DU YJ, WU JQ, CHEN L, CHEN Z, WANG JB. The potential of cyclic diguanylate (c-di-GMP) as an immunologic adjuvant[J]. Chinese Journal of Veterinary Drug, 2014, 48(2): 59-62 (in Chinese).
- [6] NEWMAN JW, FLOYD RV, FOTHERGILL JL. The contribution of *Pseudomonas aeruginosa* virulence factors and host factors in the establishment of urinary tract infections[J]. FEMS Microbiology Letters, 2017, 364(15): fnx124.
- [7] BORSELLI D, LIEUTAUD A, THEFENNE H, GARNOTEL E, PAGES JM, BRUNEL JM, BOLLA JM. Polyamino-isoprenic derivatives block intrinsic resistance of *P. aeruginosa* to doxycycline and chloramphenicol *in vitro*[J]. PLoS One, 2016, 11(5): e0154490.
- [8] VALENTINI M, FILLOUX A. Biofilms and cyclic di-GMP (c-di-GMP) signaling: lessons from *Pseudomonas aeruginosa* and other bacteria[J]. The Journal of Biological Chemistry, 2016, 291(24): 12547-12555.
- [9] 张悦, 梁文, 祁婧, 宁唤唤, 郭俏, 陈林, 段康民, 沈立新. 铜绿假单胞菌对碳青霉烯类抗生素耐药相关基因的筛选[J]. 中国科学: 生命科学, 2014, 44(11): 1159-1167.
ZHANG Y, LIANG W, QI J, NING HH, GUO Q, CHEN L, DUAN KM, SHEN L. Determination of genes involved in the resistance of *Pseudomonas aeruginosa* to carbapenems[J]. Scientia Sinica (Vitae), 2014, 44(11): 1159-1167 (in Chinese).
- [10] 张玲莉, 王建峰, 魏华, 于纪棉, 费红军, 岑叶平. 铜绿假单胞菌 PAO1 *ku* 基因缺失菌株的构建及其对生物被膜耐药性的影响[J]. 微生物学通报, 2020, 47(12): 4219-4228.
ZHANG LL, WANG JF, WEI H, YU JM, FEI HJ, CEN YP. Construction of *Pseudomonas aeruginosa ku* gene deletion mutant and its effects on antibiotic resistance of biofilm[J]. Microbiology China, 2020, 47(12): 4219-4228 (in Chinese).
- [11] CIMDINS A, SIMM R. Semiquantitative analysis of the red, dry, and rough colony morphology of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium and *Escherichia coli* using Congo Red[J]. Methods in Molecular Biology (Clifton, N J), 2017, 1657: 225-241.
- [12] 姚宏明, 张璐, 单志英, 李迎丽, 徐海津, 乔明强. 铜绿假单胞菌 PA1550 基因对泳动及蹭动的影响[J]. 微生物学报, 2008, 48(7): 959-962.
YAO MH, ZHANG L, SHAN ZY, LI YL, XU HJ, QIAO MQ. Effects of PA1550 gene of *Pseudomonas aeruginosa* on swimming and musing[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2008, 48(7): 959-962 (in Chinese).
- [13] 张明月, 胡福泉, 黄广涛. 铜绿假单胞菌必需基因的研究进展[J]. 微生物学通报, 2021, 48(6): 2143-2154.
ZHANG MY, HU FQ, HUANG GT. Progress of essential genes in *Pseudomonas aeruginosa*[J]. Microbiology China, 2021, 48(6): 2143-2154 (in Chinese).
- [14] MOREIRA RN, DRESSAIRE C, BARAHONA S, GALEGO L, KAEVER V, JENAL U, ARRAIANO CM. BOLA is required for the accurate regulation of c-di-GMP, a central player in biofilm formation[J]. mBio, 2017, 8(5): e00443-e00417.
- [15] 詹学良, 姚严翔, 芦晓红, 郭嘉义, 黄卫东. 铜绿假单胞菌 PAO1 中 c-di-GMP 代谢相关基因 PA0575 对表型的影响[J]. 微生物学通报, 2020, 47(6): 1927-1934.
ZHAN XL, YAO YX, LU XH, GUO JY, HUANG WD. Effect of c-di-GMP metabolism related gene PA0575 on phenotype in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1[J]. Microbiology China, 2020, 47(6): 1927-1934 (in Chinese).
- [16] LYCZAK JB, CANNON CL, PIER GB. Lung infections associated with cystic fibrosis[J]. Clinical Microbiology Reviews, 2002, 15(2): 194-222.
- [17] HA DG, O'TOOLE GA. C-di-GMP and its effects on biofilm formation and dispersion: a *Pseudomonas aeruginosa* review[J]. Microbiology Spectrum, 2015, 3(2): MB-0003-2014.
- [18] 谷维璇. c-di-GMP 对铜绿假单胞菌生物被膜调控的研究进展[J]. 中国细胞生物学学报, 2020, 42(12): 2289-2296.
GU WX. Research progress on regulation of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm by c-di-GMP[J]. Chinese Journal of Cell Biology, 2020, 42(12): 2289-2296 (in Chinese).
- [19] WEI Q, LECLERCQ S, BHASME P, XU AM, ZHU B, ZHANG YH, ZHANG MK, WANG SW, MA LZ. Diguanylate cyclases and phosphodiesterases required for basal-level c-di-GMP in *Pseudomonas aeruginosa* as revealed by systematic phylogenetic and transcriptomic analyses[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2019, 85(21): e01194-e01119.

- [20] CAI YM, YU KW, LIU JH, CAI Z, ZHOU ZH, LIU Y, WANG TF, YANG L. The c-di-GMP phosphodiesterase PipA (PA0285) regulates autoaggregation and Pf4 bacteriophage production in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2022, 88(12): e00039-22.
- [21] MADUKOMA CS, LIANG PX, DIMKOVIKJ A, CHEN JX, LEE SW, CHEN DZ, SHROUT JD. Single cells exhibit differing behavioral phases during early stages of *Pseudomonas aeruginosa* swarming[J]. Journal of Bacteriology, 2019, 201(19): e00184-e00119.
- [22] MASSIE JP, REYNOLDS EL, KOESTLER BJ, AGOSTONI M, WATERS CM. Quantification of high-specificity cyclic diguanylate signaling[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2012, 109(31): 12746-12751.
- [23] SPERLING L, MULERO ALEGRA MD, KAEVER V, CURTIS PD. Analysis of *Brevundimonas subvibrioides* developmental signaling systems reveals inconsistencies between phenotypes and c-di-GMP levels[J]. Journal of Bacteriology, 2019, 201(20): e00447-e00419.
- [24] MORINAGA K, YOSHIDA K, TAKAHASHI K, NOMURA N, TOYOFUKU M. Peculiarities of biofilm formation by *Paracoccus denitrificans*[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2020, 104(6): 2427-2433.
- [25] FENG QS, AHATOR SD, ZHOU T, LIU ZQ, LIN QQ, LIU Y, HUANG JH, ZHOU JN, ZHANG LH. Regulation of exopolysaccharide production by ProE, a cyclic-di-GMP phosphodiesterase in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1[J]. Frontiers in Microbiology, 2020, 11: 1226.