西安交通大學

本科毕业设计（论文）

大肠杆菌在吲哚诱导下的趋化行为的调控与机制初步研究

学院（部、中心）：　生命科学与技术学院

专　　业：　化生试验班

班　　级：　化生试验班 91

学生姓名：　陈泓宇

学　　号：　2196113481

指导教师：　谭 丹

2023 年 06 月

摘 要

对细菌趋化性的研究是定量生物学与系统生物学领域的一个重要方向。大肠杆菌在吲哚诱导下的趋化反应主要是由 Tsr 与 Tar 两种效应相反的受体所介导的，在合适的条件下，两者的拮抗效应会导致双向趋化反应或趋化性逆转等现象的发生。本论文拟从多角度对此类现象进行观察、定量描述与调控，并借助于数学模型对其发生原因进行探究与分析。

本论文从数学模型的建立与模拟、实验调控与观测两方面对大肠杆菌在吲哚诱导下的双向趋化反应进行研究。本论文基于信号转导动力学与马尔可夫（Markov）随机游走模型，构建了描述大肠杆菌在双受体介导下趋化性的数学模型，并使用计算机程序对该模型下大肠杆菌群体趋化运动进行了模拟和分析。同时，利用 CRISPRi 技术，构建了可诱导的敲低 Tar 受体的系统，实现并验证了诱导敲低效果，并获得了具有不同 Tar 受体表达量（100%、60%和 30%）的可观测菌株。本论文设计并优化了用于浓度梯度产生与趋化性观测的微流控装置，并对其浓度梯度场的生成效果进行了仿真模拟与验证。在以上基础上，使用 Transwell 细菌迁移实验与微流控成像，对吲哚诱导下，不同 Tar 表达量菌株的趋化性进行了观测与分析。

本论文通过对 Tar 受体进行不同程度的可诱导敲低，初步实现了调控细菌趋化运动行为；同时，基于数学模型、模拟结果与实验观测，对趋化运动的特征现象进行了分析与解释。本论文阐释了由 Tsr 受体的适应现象导致的趋化性逆转的发生过程中，Tar 受体具有的关键作用；同时揭示了 Tar-Tsr 受体表达量与效应强度的比例对细菌个体与整体趋化运动中阈值浓度与趋化性逆转现象的影响。

本论文工作对细菌趋化性的定量描述、分析和调控，扩展了趋化行为的定量研究和精确调控手段，为未来利用细菌趋化性进行肠道菌群的人工调节和定向定植、环境污染检测与治理、癌症诊断治疗等应用奠定了基础。

关 键 词：趋化性；吲哚；趋化模型；CRISPRi；微流控；定量生物学

ABSTRACT

Research on bacterial chemotaxis is an important direction in the fields of quantitative biology and systems biology. The chemotactic response of *Escherichia coli* under indole induction is primarily mediated by two receptors, Tsr and Tar, which have opposite effects. Under appropriate conditions, the antagonistic effects of these receptors can lead to bidirectional chemotactic responses or chemotactic inversion. This work aims to observe, quantitatively describe, and regulate such phenomena from multiple perspectives and investigate the underlying reasons using mathematical models.

This work investigates the bidirectional chemotactic response of *E. coli* under indole induction from two aspects: the establishment and simulation of mathematical models and experimental regulation and observation. Based on signal transduction dynamics and Markov random walk models, a mathematical model describing the chemotaxis of *E. coli* under dual-receptor mediation was constructed, and computer programs were used to simulate and analyze the chemotactic motion of the bacteria population in this model. Additionally, the CRISPRi technology was employed to construct an inducible system for downregulating the Tar receptor, and the induced downregulation effect was achieved and verified, resulting in strains with different observable levels of Tar receptor expression (100%, 60%, and 30%). A microfluidic device for generating concentration gradients and observing chemotaxis was designed and optimized, and the effectiveness of the concentration gradient field generation was simulated, analyzed, and validated. Based on these foundations, the chemotactic behavior of strains with different levels of Tar expression under indole induction was observed and analyzed using Transwell bacterial migration experiments and microfluidic imaging.

By inducibly downregulating the Tar receptor to different degrees, this work achieved preliminary regulation of bacterial chemotactic motion. Furthermore, based on mathematical models, simulation results, and experimental observations, the characteristic phenomena of chemotactic motion were analyzed and explained. This work elucidates the crucial role of the Tar receptor in the occurrence of chemotactic inversion caused by the adaptation phenomenon of the Tsr receptor. It also reveals the

influence of the ratio between Tar-Tsr receptor expression levels and the strength of their effects on the threshold concentration and chemotactic inversion phenomenon in both individual and collective bacterial chemotaxis.

The quantitative description, analysis, and regulation of bacterial chemotaxis in this work expand the quantitative research and precise control methods of chemotactic behavior. It lays the foundation for future applications such as artificial regulation and targeted colonization of gut microbiota, environmental pollution detection and remediation, and cancer diagnosis and treatment through the utilization of bacterial chemotaxis.

KEY WORDS: Chemotaxis; Indole; Chemotaxis model; CRISPRi; Microfluidics; Quantitative biology

目 录

摘 要.....I
ABSTRACT.....III
目 录.....V
1 绪论.....1
1.1 细菌趋化性简介.....1
1.2 大肠杆菌趋化性模型及研究现状.....1
1.2.1 大肠杆菌趋化运动调控机制.....1
1.2.2 大肠杆菌趋化运动的数学模型.....3
1.2.3 大肠杆菌对吲哚的双相趋化反应.....3
1.2.4 大肠杆菌趋化性的研究方法.....4
1.3 本论文研究内容.....6
2 实验与材料.....9
2.1 实验材料.....9
2.1.1 菌株及质粒.....9
2.1.2 仪器及试剂.....9
2.2 实验方法.....11
2.2.1 细菌培养.....11
2.2.2 分子克隆与质粒构建.....12
2.2.3 感受态细胞制备与质粒转化.....13
2.2.4 Transwell 细菌迁移与荧光成像检测.....14
2.2.5 微流控芯片预处理与使用.....15
3 大肠杆菌趋化运动的数学描述与模拟.....17
3.1 Markov 随机游走模型对大肠杆菌趋化运动的描述.....17
3.1.1 信号转导动力学模型.....17
3.1.2 随机游走模型.....19
3.2 大肠杆菌群体运动的粒子化模拟与数值解.....20
3.2.1 信号转导动力学模型的模拟结果.....20
3.2.2 随机游走模型的模拟结果.....23
3.3 本章小结.....25
4 大肠杆菌 Tar 趋化受体敲低菌株的构建.....27
4.1 CRISPRi 工作质粒的设计与构建.....27

4.2 趋化受体诱导敲低的验证与分析.....30
4.3 本章小结.....31
5 大肠杆菌对吲哚趋化运动的调控与分析.....33
5.1 吲哚浓度与趋化受体 Tar 表达量对趋化运动的影响.....33
5.2 微流控成像平台的设计与搭建.....35
5.2.1 微流控芯片的设计与优化.....35
5.2.2 微流控平台的搭建与优化.....37
5.2.3 浓度场的仿真预测与实验验证.....38
5.3 浓度场下大肠杆菌趋化运动行为的观察与描述.....40
5.4 本章小结.....41
6 结论与展望.....43
6.1 结论.....43
6.2 展望.....44
致 谢.....45
参考文献.....47
附 录 A 外文原文.....51
附 录 B 外文译文.....59
附 录 C 随机游走模型代码及参数.....71
附 录 D 图像处理与统计代码.....97
附 录 E 毕业设计（论文）任务书.....101
附 录 F 毕业设计（论文）考核评议书.....103
附 录 E 毕业设计（论文）答辩结果.....107

1 绪论

1.1 细菌趋化性简介

细菌趋化性（Chemotaxis），指具有运动能力的细菌对多种化学物质的浓度梯度产生趋向（正趋化性）或离避反应（负趋向性）。细菌个体的趋化现象由 Thomas Engelmann、 Wilhelm Pfeffer 分别于 1881 年、1884 年发现和描述，之后在原核生物、真核单细胞生物、免疫细胞、癌细胞以及部分昆虫等多种生物中均观察到了类似现象。

趋化性的形成对于细菌等微生物的生存具有重要的作用。总体而言，细菌对有利的化学物质，如食物（单糖、氨基酸等分子）产生正趋化性，而对不利条件（如重金属离子、强酸、强碱等）产生负趋向性。即使同种物质，不同的物种也可能表现出相反的趋化性，如苯酚分别可作为大肠杆菌（*E. coli*）与鼠伤寒沙门氏菌（*S. typhimurium*）正向、负向趋化剂[1]。细菌对于趋化性的动态性、多样性不仅可以帮助细菌在变化的环境中获得最佳的生态位，还可以显著影响细菌的致病、共生等生物过程的发生与进行[2-4]。

在细菌中，不同物种可能具有不同的趋化性调控途径，包括多样化的受体、激酶和鞭毛结构，但都能表现出整体上相似的运动行为[5]。对于单个细菌而言，其可以根据外界化学物质的浓度改变鞭毛的运动状态，从而以“有偏差的随机游走”实现趋化运动，这在群体上则表现为对该物质产生的趋向或离避行为[4]。对于趋化性相关机制如分子受体、信号通路、个体行为等方面，均在大肠杆菌中取得了最广泛、最深入的研究。

1.2 大肠杆菌趋化性模型及研究现状

1.2.1 大肠杆菌趋化运动调控机制

大肠杆菌（*Escherichia coli*）作为一种具多鞭毛（约 4~6 根）细菌，其主要通过鞭毛旋转进行运动，亦由调控鞭毛旋转方式实现特定的趋化行为[6]。1960 年，随着 Alder 等人对大肠杆菌趋化性的膜表面受体及胞内信号转导过程进行阐明，对于趋化性的研究从此真正进入到分子层面[7, 8]。

根据 Macnab 等的观察[9]，*E. coli* 的运动分为“前进”与“翻转”两种状态，以何种状态运动则取决于鞭毛的旋转方向。当鞭毛逆时针（CCW）旋转时，鞭毛丝全部绑定成束，故而沿固定方向前进；顺时针（CW）旋转时，

鞭毛丝解束，无法提供稳定持续的推动，使菌体原地翻转，故而运动方向改变。当细菌接收到外界化学物质刺激后，通过一系列信号转导至马达复合体，即可改变鞭毛旋转的方向，从而影响细菌个体的运动状态。

在 *E. coli* 中，参与趋化性响应与调节的信号转导通路主要由跨膜受体复合体、鞭毛-马达复合体、趋化反应调节蛋白（CheY）以及其它调节蛋白如 CheB、CheR、CheZ 等组成。跨膜受体复合体包括甲基趋化受体（MCPs）、组氨酸激酶 CheA 与连接蛋白 CheW。在 *E. coli* 中已鉴定出了五种 MCPs 分子（Tar、Tsr、Trg、Tap、Aer）[10]以分别对不同分子进行响应，其均为同源二聚体，胞内段可与胞质中的 CheW 和 CheA 结合[11]。MCPs 通过连接蛋白 CheW 与调节蛋白 CheY 结合并调节其自磷酸化活性：负向趋化剂结合 MCPs 时激活 CheA 的自磷酸化活性，而正向趋化剂结合时则抑制其自磷酸化活性[12]。磷酸化的 CheA 则可以催化将其磷酸基团转移至 CheY 上[13]，CheY 磷酸化后从受体复合体上脱离、扩散并与鞭毛-马达复合体中的 FliM 蛋白结合，从而使马达旋转方向更易于转化为 CW 状态[14]。

另一方面，CheB 与 CheR 可以对 MCPs 的甲基化程度进行调节。CheA 磷酸化激活后，也可以将磷酸根转移至下游 CheR。磷酸化 CheR 发挥甲基转移酶活性，对 MCPs 进行甲基化修饰，从而使配体结合导致的结构变化无法传递至并效用于 CheW/CheA 复合体，阻断了趋化剂配体的效应并重置受体的信号性，即实现了对趋化剂信号的“适应”；而 CheB 则通过使 MCPs 去甲基化逆转该效应[15]。

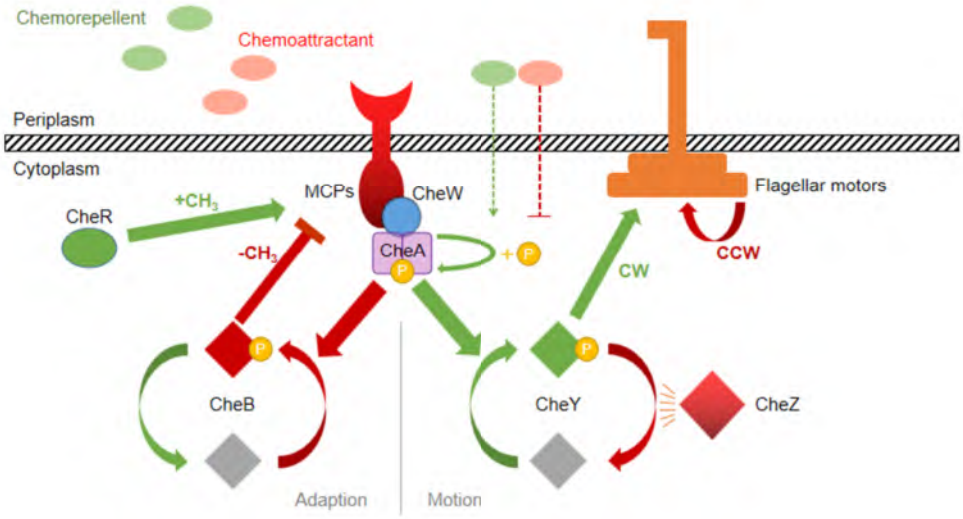


图 1-1 大肠杆菌趋化运动信号转导机制示意图

1.2.2 大肠杆菌趋化运动的数学模型

（1）基于“扩散-感知”模型的描述

为了描述细菌在趋化剂浓度梯度场中的运动规律，Keller 在实验观察的基础上对细菌的群体运动规律进行了推导，首次建立起了群体在趋化剂浓度梯度场中的迁移模型，不仅对细菌的定向移动进行了较好的描述，还成功解释了了迁移过程中“成带”现象的形成机制[16]。该模型认为细菌的运动由“扩散运动”与“定向移动”两部分组成，分别对应(1-1)右式中的第 1、2 项。式中，b, s分别代表细菌群体密度与趋化剂浓度，t, x分别为运动的时间与位移。其中“扩散运动”类比于分子自由扩散，使用μ作为动力学参数代替分子扩散系数D；而“定向移动”则描述细菌对当前位置浓度梯度场的“感知”，趋化系数$\chi(s)$描述细菌的响应强度，并可由式(1-2)决定，其中s_τ代表了细菌能够感受到的最小浓度。故而该模型又被称为“扩散-感知”模型。

$$\frac{\partial b}{\partial t} = \frac{\partial}{\partial x}\left[\mu \frac{\partial b}{\partial x}\right] - \frac{\partial}{\partial x}\left[b\chi(s)\frac{\partial s}{\partial x}\right] \tag{1-1}$$

$$\chi(s) = \delta(s - s_\tau)^{-1} \tag{1-2}$$

尽管此模型具有简洁、易解的优点，且对实验现象能够较好地描述，但其大量依赖于经验参数，使得该模型在不同物种、不同趋化剂间的通用性较差。同时，该模型仅为描述模型，而难以从机制上对细菌趋化性进行解释，如模型认为细菌受体能够对特定位置的浓度梯度而非浓度进行“感知”，而这与蛋白受体的实际工作方式相悖。这些不足使得该模型只能在群体足够大时较好地符合实验，而难以描述个体乃至单个马达蛋白的运动规律。

随着计算机算力的提升，基于粒子随机运动的模拟手段建立起了从个体运动模型到群体统计学规律的桥梁，从而得到易于被实验验证的观测量；另一方面，显微成像与图像处理技术提供的栓菌实验轨迹分析手段实现了对单细胞乃至单马达的运动状态进行监测。在以上基础上，Lili Jiang 等人建立了定量描述大肠杆菌趋化运动的 SPECS 模型[17]，并通过实验与模拟验证了其可靠性与部分参数的敏感性[18]。

1.2.3 大肠杆菌对吲哚的双相趋化反应

吲哚是广泛存在与人体消化道内的一种芳香化合物，为肠道菌群的主要代谢产物之一。Yang 等人发现，宿主消化道中的吲哚浓度可能对不同细菌的定植能力产生影响，而该现象是由于吲哚所介导的双向趋化反应所引发的[19]。一方面，高浓度的吲哚呈现出负向趋化，而低浓度的吲哚则呈现出正向趋化

效应；另一方面，通过对吲哚的预先适应，细菌能够对高浓度的吲哚做出正向反应。

双向趋化反应由两种作用效果相反的甲基趋化受体（MCPs）分子及其下游通路所介导：吲哚对于 Tar 受体为正向趋化剂，即结合后抑制 CheA 自磷酸化活性，从而促进鞭毛 CCW 旋转；对于 Tsr 受体则为负向 趋化剂，结合后抑制 CheA 自磷酸化活性，促进鞭毛 CW 旋转。两种受体相拮抗的功能使得细菌在宏观上表现对吲哚的双向趋化，吲哚浓度阈值则决定于两者的相对数量于活性。同时，由于两种受体发生适应的速率不同，Tar 受体的适应过程缓慢、持久，而 Tsr 受体的适应过程强度高、速度快，这使得细菌在长期暴露于高浓度吲哚后，两种受体的活性比例改变，发生双向趋化反应的阈值浓度增加，即表现为对高浓度吲哚发生正向趋化效应。

通过该机制，吲哚作为趋化分子，帮助肠道微生物群落中的原住民更好定植，并阻止外来细菌定植于黏膜之上，从而构成了抵御致病性微生物侵袭的另一道防线。该研究揭示了肠道环境因素影响肠道微生物定制的可能机制，为人工调节肠道细菌定制能力提供了理论依据。然而，当前对于双相趋化反应的机制仍停留在定性解释阶段，对于受体间拮抗关系对阈值的影响、对双相趋化系统与阈值的人工改造与调控、该机制对于生理状态下肠道菌群定制能力等方面，还需要进一步的研究与讨论。

1.2.4 大肠杆菌趋化性的研究方法

在趋化性研究中，对细菌定向运动能力的观察与测量是研究的主要目的。在趋化性发现初期，对其研究停留在定性阶段，即通过显微观察、半固体培养等方式，观察不同物质对细菌运动状态的影响。随着对趋化性通路的深入了解，以及显微技术等研究手段的进步，如今趋化性不仅能够从群体到分子层面进行观察，更能实现精确的条件控制与定量。

（1）Transwell 迁移实验

Transwell 板由上下两室组成，分别包含不同浓度的培养液，两者以特定孔径的聚碳酸酯薄膜包被，常用于细胞迁移与侵袭实验。Sneha Jani 将该装置与实验方法进行了优化，将其运用到大肠杆菌趋化性的半定量表征[20]。在聚碳酸酯薄膜上覆盖含有趋化物质的琼脂层，从而在下层培养液中产生稳定浓度梯度；在膜的下表面进行聚赖氨酸包被，使其吸附定向移动的细菌个体。在细菌个体表达荧光蛋白下，使用荧光显微镜观察附着的细菌个体数，即可反应细菌趋化运动的方向与强度。

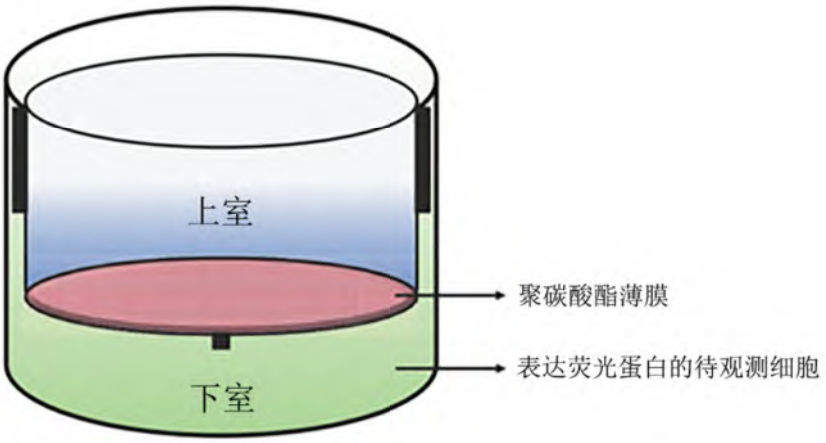


图 1-2 Transwell 细菌趋化装置示意图[20]

（2）微流控装置表征细菌趋化性

微流控装置通过设计可以产生特定浓度梯度的趋化剂分布，同时结合显微成像技术，在小尺度内对细菌群体分布进行精确到个体分辨率的实时监控。由于该技术可以对外界环境（如浓度梯度）进行精确控制，且对群体运动状态进行基于统计的分析的同时反应每个个体的运动轨迹状态，该方法已广泛用于细菌趋化性群体层面的定量分析[21, 22]。以 μFlow[23]装置（图 1-3）为例，其包含输出/输出接口、梯度混合装置与趋化室。含不同浓度趋化剂的运动缓冲液在梯度混合装置中混合后，可以在趋化室内产生特定浓度梯度场；细菌注入后在其中运动，并被成像后进行统计分析。

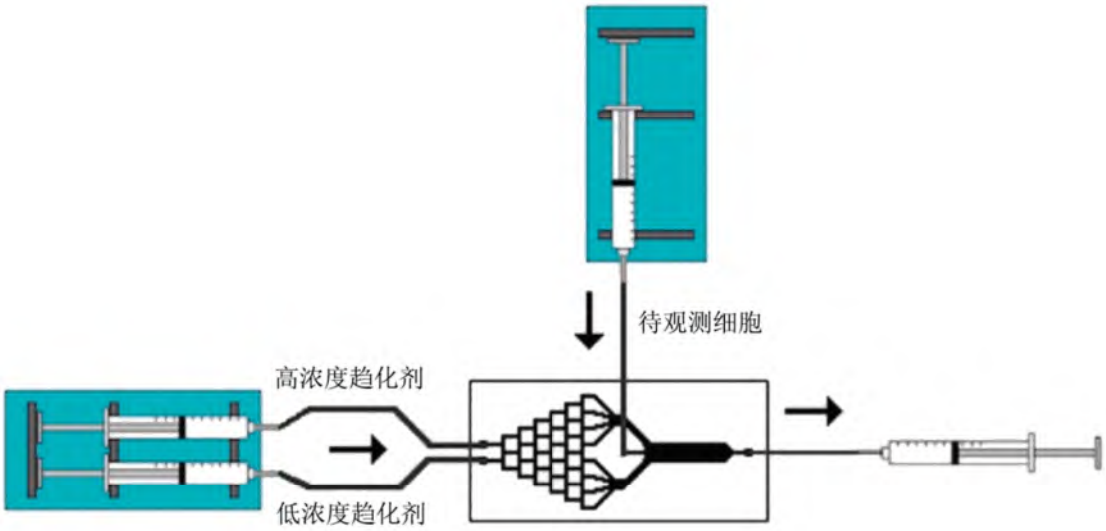


图 1-3 μFlow 装置示意图[23]

（3）栓菌实验

由于细菌鞭毛难以直接在光学显微镜下成像，1974 年，M.Silverman 和 M.simon 通过使用抗体将细菌鞭毛游离端固定在玻片上，观察菌体的旋转方向确定了鞭毛运动的模式，即“栓菌实验”[24]。在此基础上，通过将鞭毛蛋白 FilC 进行突变[25]，引入了疏水氨基酸序列，使鞭毛具有“粘性”。具有粘性鞭毛的细菌在无需鞭毛蛋白抗体的情况下即可自动吸附在疏水化玻璃的表面。如今在显微成像技术与计算机图像处理技术的辅助下，利用栓菌实验可以定量对细菌鞭毛的运动状态进行监测，如计算在不同浓度趋化剂下，一段时间内鞭毛顺/逆时针方向旋转的比例[26]。运用此种方法，可以从个体甚至单分子层面量化马达蛋白对于不同浓度和类型的趋化剂的反应。

1.3 本论文研究内容

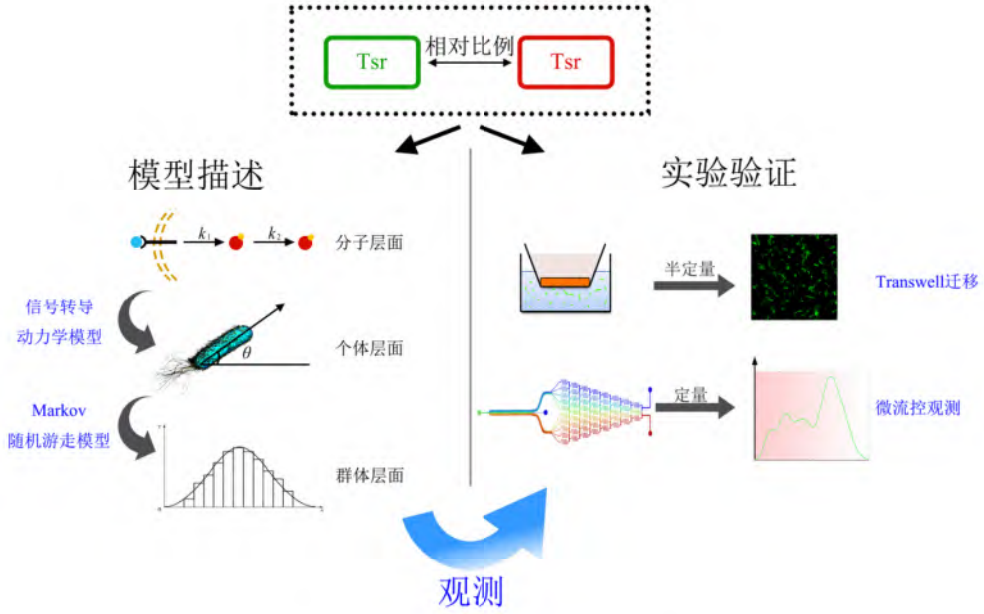


图 1-4 论文研究内容示意图

大肠杆菌趋化性的原理与通路结构已被较清晰地阐明，并在此基础上建立起了包含马尔可夫随机游走模型在内地多种数学模型。然而以上对趋化性地描述与模型大多仅关注了一种特定受体所介导的趋化反应。大肠杆菌已被报道可以对吲哚等物质产生双相趋化反应，并证实了 Tar 与 Tsr 受体间拮抗作用，但目前仍缺乏对双向趋化反应进行描述地数学模型与群体水平上地实验结果。

本研究通过数学建模与实验观测，尝试对大肠杆菌中 Tar-Tsr 受体介导对吲哚地双向趋化反应进行描述。利用 Markov 随机游走模型框架，模拟大肠杆菌在浓度梯度场下的运动，并在两种受体不同作用强度下，从单鞭毛到细菌群体运动状态进行了描述；同时，利用 CRISPRi 技术对 Tar 受体进行不同程度地敲低，结合 Transwell 迁移实验与微流控技术，探究两种受体相对表达比例对细菌趋化运动的影响。

2 实验与材料

2.1 实验材料

2.1.1 菌株及质粒

本研究中所用菌株如表 2-1 所示：

表 2-1 本研究中使用的菌株

名称	特征	来源
E. coli DH5α	F- *lacZΔ lacΔ(lacZYA-argF) U169 deoR recA1 endA1 hsdR17(rK+,mk+) phoA supE44 Y-thi-1 gyrA96 relA1*	北京全式金生物技术有限公司
E. coli RP437	F- *thr-1 araC14 leuB6(Am) fhuA31 lacY1 tsx-78λ- eda-50 hisG4(Oc) rfbC1 rpsL136(strR) xylA5 metF159(Am) mtl-1 thiE1*	[27]
E. coli RP437ΔTar	*E. coli* RP437 基础上敲除 *Tar* 基因	本工作

本研究中所用质粒如表 2-2 所示：

表 2-2 本研究中使用的质粒

名称	特征	来源
pUC19 (*Bsa*I free)	Amp^R, pBR322 origin, 无 *Bsa*I 限制酶位点	北京擎科生物科技股份有限公司
pUC-eGFP	pUC19 衍生质粒，携带 *eGFP*	本工作
pHT43-mRFP	pHT43 衍生质粒，携带 *mRFP*	实验室保存
pdCas9	Cm^R，携带 *dCas9* 基因（四环素诱导）与 sgRNA scaffold（阿拉伯糖诱导），插入 Spacer DNA 后可用于 CRISPRi	[28]
pdCas9-Spacer6	pdCas9 衍生质粒，插入 Spacer6，可表达完整 sgRNA	本工作
pCas9	Cm^R，携带 *Cas9* 基因，用于 CRISPR	实验室保存

2.1.2 仪器及试剂

本研究中所用试剂如表 2-3 所示

表 2-3 本研究中使用的试剂

名称	生产商
工具酶	
*Bsa*I-HFv2	New England Biolabs (Beijing)
*EcoR*I-HF	New England Biolabs (Beijing)
T4 DNA ligase	New England Biolabs (Beijing)
T4 DNA ligase buffer	New England Biolabs (Beijing)
5× Evo M-MLV RT Master Mix	湖南艾科瑞生物工程有限公司
2× Taq Master Mix (Dye Plus)	南京诺唯赞生物科技股份有限公司
Phanta® super-fidelity DNA polymerase	南京诺唯赞生物科技股份有限公司
2× ChemQ SYBR qPCR Master Mix	南京诺唯赞生物科技股份有限公司
试剂盒	
质粒小提试剂盒	天根生化科技（北京）有限公司
总 RNA 提取试剂盒	天根生化科技（北京）有限公司
通用型 DNA 纯化回收试剂盒	天根生化科技（北京）有限公司
细菌基因组提取试剂盒	天根生化科技（北京）有限公司
生化试剂	
GelRed (10000×)核酸染料	西安赫特生物科技有限公司
Gel Loading Dye Purple (6×)	New England Biolabs (Beijing)
氯化钠	国药集团化学试剂
酵母提取物	英国 Oxoid 公司
胰蛋白胨	英国 Oxoid 公司
琼脂	北京索莱宝生物科技有限公司
琼脂糖	西班牙 Biowest 公司
氯霉素	江苏平光制药有限责任公司
氨苄青霉素钠	北京索莱宝生物科技有限公司
硫酸卡那霉素	北京索莱宝生物科技有限公司
硫酸链霉素	上海阿拉丁生化科技股份有限公司
盐酸四环素	上海易恩化学技术有限公司
L-阿拉伯糖	中国医药集团有限公司
聚乙烯吡咯烷酮 K30	上海阿拉丁生化科技股份有限公司
吲哚	上海易恩化学技术有限公司
异丙基-β-D-硫代半乳糖苷	上海阿拉丁生化科技股份有限公司
葡萄糖	国药集团化学试剂
M9 培养基盐	上海尚宝生物科技有限公司
3,1-对磺酸苯基偶氮-2-羟基萘-6-磺酸二钠盐	华璇生物科技有限公司
氯仿	山东富宇化工有限公司
无水乙醇	山东富宇化工有限公司
氢氧化钠	天津永大化学试剂有限公司
聚-L-赖氨酸	默克化工技术(上海)有限公司
50× TAE 缓冲液	陕西普罗安蒂生物科技发展有限公司

本研究中所用仪器如表 2-4 所示：

表 2-4 实验主要使用仪器

名称	厂商
超纯水制备系统	Milipore
凝胶成像系统	Tanon
电转化仪	Bio-Rad
PCR 仪	Bio-Rad
超微量分光光度计	BioDrop
核酸电泳仪电源	君意
恒温振荡摇床	龙跃
电子天平	Sartorius
高速低温离心机	Eppendorf
水浴锅	Crystal
荧光显微镜	Nexcope
-80°C 超低温冰箱	Thermo Fisher
蠕动泵	联合众为科技有限公司

2.2 实验方法

2.2.1 细菌培养

常规细菌培养使用 LB 液体培养基（NaCl：10 g/L，胰蛋白胨：10 g/L、酵母提取物：5 g/L），并加入对应抗性的抗生素（氨苄青霉素：100 mg/L；氯霉素：27 mg/L；卡那霉素：50 mg/L；链霉素：50 mg/L）。需诱导培养时，在细菌生长至 OD=0.6~0.7 时加入对应诱导剂。LB 固体平板在此基础上加入 15 g/L 的琼脂。灭菌采用常规高压蒸汽灭菌（121℃，20 min）。培养条件为 37℃，200 rpm，过夜培养。

转化后细菌复苏培养使用 SOC 液体培养基（NaCl：0.5 g/L、酵母提取物：5 g/L、胰蛋白胨：20 g/L、KCl：18.6 g/L、葡萄糖：3.6 g/L）。

观测细菌趋化性时使用运动缓冲液 MB，其在 M9 基础培养基（Na_2HPO_4：6.78 g/L、KH_2PO_4：3.0 g/L、NaCl：0.5 g/L、NH_4Cl：1.0 g/L、$MgSO_4 \cdot 7H_2O$：0.493 g/L、$CaCl_2$：0.011 g/L、葡萄糖：4 g/L）中添加 2% w/v 聚乙烯吡咯烷酮 K30。

以上成分中，葡萄糖均配制为 180 g/L 的储备液，并单独使用高压蒸汽灭菌。

2.2.2 分子克隆与质粒构建

（1）常规 PCR 反应

本研究中常规 PCR 反应引物设计均通过 SnapGene™ 1.1.3 软件完成，设计溶解温度 T_m=(56±1)℃。引物溶解温度根据邻域热力学算法计算[29]；引物特异性检验中，引物匹配条件满足：引物 3'端匹配≥10 碱基对（允许 1 处单碱基错配）。引物由北京擎科生物科技股份有限公司合成，采用 OPC 方法纯化。

PCR 程序采用 Touch-Down PCR 法提高特异性，程序如图 2-1 所示：

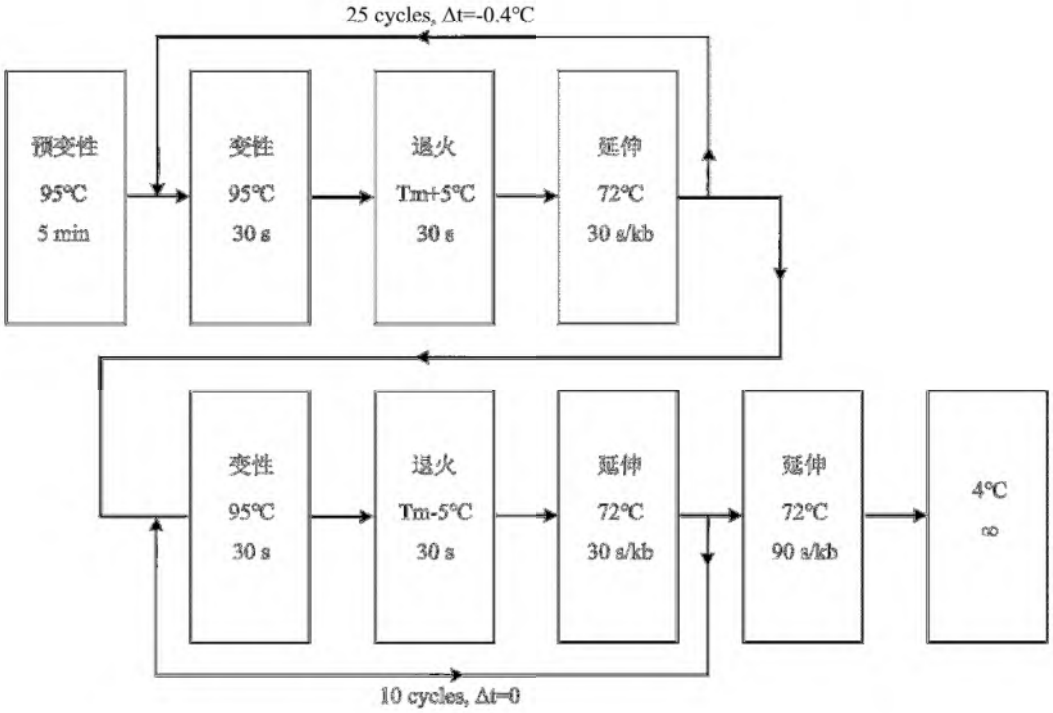


图 2-1 本研究中 Touch-Down PCR 程序示意图

（2）反转录（RT）与实时荧光定量 PCR（qPCR）反应

本研究中，反转录反应加入 500 ng 总 RNA（每 10 μL 体系），其它条件按照 5× Evo M-MLV RT Master Mix 试剂说明确定。实时荧光定量 PCR 反应引物均由北京擎科生物科技股份有限公司合成，采用 PAGE 方法纯化，浓度为 10 mmol/L。引物设计溶解温度 T_m=(56±0.5)℃；引物特异性检验中，引物匹配条件满足：引物 3'端匹配≥10 碱基对（允许 2 处单碱基错配）。qPCR 体系如表 2-5 所示。其它条件与扩增程序按照 2× ChemQ SYBR qPCR Master Mix 试剂说明确定。

表 2-5 qPCR 反应体系

组分	体积
cDNA（反转录产物）10×稀释液	2 μL
上游引物	0.5 μL
下游引物	0.5 μL
2× ChemQ SYBR qPCR Master Mix	5 μL
H_2O	2 μL

利用 RT-qPCR 进行基因表达量测定时，以 16S rRNA 作为内参基因，采用$2^{-\Delta\Delta C_T}$计算基因相对表达量。

（3）Golden Gate Assembly 反应

本研究中 Golden Gate Assembly 反应[30]用于完成重组质粒的构建。通过在引物 5'端设计含有 Type IIs（如 *Bsa*I）酶切位点和合适粘性末端的引物，经 PCR 扩增、酶切、连接后，获得重组质粒产物并用于转化筛选。本研究使用 *Bsa*I-HFv2 进行酶切，反应体系如表 2-6 所示。

表 2-6 Golden Gate Assembly 反应体系与条件

组分	用量
插入片段	0.02 pmol
载体片段	0.04 pmol
*Bsa*I HFv2	1 μL
T4 DNA ligase	1 μL
T4 DNA ligase buffer	2 μL
H_2O	to 20 μL
37℃, 60 min → 15℃, 30 min → 85℃, 10 min	

2.2.3 感受态细胞制备与质粒转化

化学转化使用 *E. coli* Trans5α 感受态细胞（全式金生物科技有限公司），实验操作依照其说明书进行。进行质粒转化时，每 100 μL 感受态细胞加入约 50 ng DNA；进行重组质粒连接产物转化时，每 100 μL 感受态细胞加入约 20 μL 连接产物。转化后使用 1 mL SOC 培养基，37℃，200 rpm 复苏培养 60 min 后，离心收集细菌涂布平板。

电穿孔感受态细胞与转化方法如下：

（1）使用培养约 8 h 的菌株培养液（OD_{600}=0.6-0.8），6000 rpm，5 min，4℃离心收集细菌；

（2）尽量去除上清液，使用与培养液等体积的 4℃ 15%甘油重悬细菌，轻柔混匀，6000 rpm，5 min，4℃离心收集细菌；

（3）重复步骤（2）3~5 次；

（4）去除上清液，使用培养液 0.1 倍体积的 4℃ 15%甘油重悬细菌，轻柔混匀，分装为 100 μL 每管的感受态细胞。分装后迅速保存于-80℃中，并且可以长期存放；

（5）进行电转化时，每 100 μL 感受态细胞中加入质粒 DNA 不超过 50 ng，或加入连接产物不超过 10 μL。加入 DNA 后转移至 4℃预冷的电极杯中，静置 5 min；

（6）使用 12.5~17.5 kV/cm 的电场强度进行电穿孔，电脉冲时间不超过 5 ms；

（7）迅速加入 1 mL SOC 培养基至电极杯中，吹打若干次，转移至离心管中，37℃，200 rpm 复苏培养 60 min 后，离心收集细菌涂布平板。

2.2.4 Transwell 细菌迁移与荧光成像检测

使用 0.4 μm 孔径聚碳酸酯薄膜的 12 孔 Transwell 板进行实验，具体步骤如下：

（1）依次使用双蒸水、75%消毒酒精、无水乙醇润洗并分别浸泡 2 min，置于室温下充分晾干；

（2）在下室中加入 1 mL 0.01%（w/v）聚-L-赖氨酸（分子量 150000-30000）溶液，放入上室以包被聚碳酸酯薄膜下表面。室温下静置 120 min；

（3）取出上室，倒置晾干，回收下室中聚-L-赖氨酸溶液，用双蒸水清洗下室若干次并充分晾干；

（4）在运动缓冲液 MB 中加入 1%（w/v）的琼脂糖，加热融化，加入吲哚至对应浓度并充分溶解；

（5）将上室放入下室中，趁热向上室中加入 1 mL MB-琼脂糖溶液，静置待其凝固，取出上室并倒置，晾干下表面；

（6）使用过夜培养的待测菌株培养液（OD_{600}=1.0~1.2），6000 rpm，5 min 离心收集细菌；

（7）使用 MB 重悬细菌并混匀，6000 rpm，5 min 离心收集细菌，重复该步骤 3~5 次；

（8）使用 MB 重悬细菌至 OD_{600}=0.4；

（9）将 1.5 ml 细菌悬液加入下室，放入上室，室温静置 8 min，并避免振动；

（10）取出上室，立即将下表面浸入干净 MB 中 5 s 后取出，过程中应避免剧烈振动并精确计时。用吸水纸从侧面吸干下表面残留液体，倒置放置于超净台内，室温下晾干（不超过 10 min）；

（11）依次使用蒸馏水、无水乙醇清洁下室，使用擦镜纸擦除内外表面液体，放入上室，使用荧光倒置显微镜观察。

2.2.5 微流控芯片预处理与使用

本研究中微流控芯片为 PDMS 材质，经设计后，由苏州含光微纳科技有限公司进行模板蚀刻与芯片制作。

由于 PDMS 芯片疏水性较大，难以直接灌注水相进入流道，故使用如下方法对芯片进行预处理：

（1）使用无水乙醇冲洗芯片表面及灌注进入流道内，控制压力为 200~300 kPa 范围内，直至流道内所有气泡均被排出；

（2）使用 0.5% w/v 的二烷基磺酸钠（SDS）水溶液进行灌注约 15 min，以降低流道内表面对水的表面张力与对疏水小分子的吸附作用；

（3）使用含 0.5% w/v SDS 的 MB 溶液进行灌洗约 10 min；

（4）使用 MB 缓冲液进行灌洗约 15 min 以除去残留的 SDS；

（5）镜检结束后，使用 1% w/v SDS，75% v/v 乙醇水溶液灌洗 20 min 以上，之后直接将芯片浸泡在无水乙醇中保存。

使用蠕动泵进样（3 滚轮，泵内管内径 0.4 mm），泵头转速为 0.04~0.68 rpm。泵内管使用 BPT 材料；泵外连接管与接头为聚四氟乙烯材料。

3 大肠杆菌趋化运动的数学描述与模拟

利用信号转导动力学模型与随机游走模型，可以对细菌趋化性在分子、个体、群体多个层次进行模拟分析，由于其较为真实地描述了趋化运动的形成原理，故而其具有较高的准确性与可解释性。在已有对大肠杆菌趋化运动进行描述的此类模型之中，大都仅对单一受体的效应进行了描述与分析。为了使用数学模型描述大肠杆菌在吲哚诱导下的趋化运动状态，本论文在已有模型的基础上，建立了能够描述 Tar-Tsr 双受体拮抗作用的模型，编写程序对该模型进行了模拟，并对模拟结果进行了分析，探究了影响细菌双向趋化运动特点的可能因素与作用机制。

3.1 Markov 随机游走模型对大肠杆菌趋化运动的描述

Markov 模型中认为，大肠杆菌运动具有两种状态，即$s = 0, 1$，分别代表细菌做翻转运动（鞭毛 CW 旋转）、向固定方向前进（鞭毛 CCW 旋转）。细菌运动状态取决于鞭毛的旋转状态，而鞭毛旋转状态改变的概率取决于鞭毛当前状态以及上游信号通路的调节。因此，模型分为信号转导动力学模型与游走模型两部分，描述细菌从感知趋化剂分子浓度、胞内信号转导直至运动状态改变的过程。

3.1.1 信号转导动力学模型

该部分模型以 SPECS 模型为基础构建[17]，并采用了部分已知参数[18]。具体如下：

对于受体复合体而言，其激酶活性取决于配体的结合状态与自身甲基化状态。由准平衡近似得式(3-1)，其中，a为激酶活性，N为所有 MCPs 复合体中受体二聚体数量，$N \cdot \varepsilon(m, [L])$为激活/失活状态 MCPs 的自由能差异。此式成立的前提条件为配体结合时长（<1 ms）远小于受体甲基化时长（>>1 s）。$[L]$为所在环境的趋化剂浓度。若趋化剂浓度为随时空间分布的函数，则有$[L](\vec{x}(t))$。

$$a = \frac{1}{1 + e^{N \cdot \varepsilon(m,[L])}} \tag{3-1}$$

$\varepsilon(m,[L])$关系具体可由(3-2)式决定（Monod-Wyman-Changeux 变构模型[31]），其中K_A, K_I分别为受体在活性形式与失活形式下与配体的结合常数。f_m为甲基化程度m相关的自由能差值，常采用已被实验验证的线性模型估计，如式(3-3)，其中α, m_0可由趋化剂的剂量响应曲线实验拟合得出。

$$\varepsilon(m,[L]) = f_m(m) - ln\left(\frac{1+[L]/K_A}{1+[L]/K_I}\right) \tag{3-2}$$

$$f_m(m) = \alpha(m_0 - m) \tag{3-3}$$

甲基化程度m可以由[32]决定，经衰退，此处采用其关于甲基化速率k_R与去甲基化速率k_B的线性近似描述，其中参数b由实验拟合得到：

$$\frac{dm}{dt} \approx k_R(1-b) - k_B b \tag{3-4}$$

在达到平衡时，则认为$k_R = k_B$，且$b = 0.5$，此时可知$\frac{\mathrm{d}m}{\mathrm{d}t} = 0$。

对于每个大肠杆菌个体，其具有两种运动状态$s = 0,1$，其以分别代表“翻转（CW）”与“前进（CCW）”状态。在$t \to t + \mathrm{d}t$时间内，细胞从状态s转换至$(1-s)$状态的概率记为$P_s([Y]) \cdot \mathrm{d}t$。则运动状态转换概率之比可由(3-5)式得出：

$$\frac{P_1([Y])}{P_0([Y])} = \frac{[Y]^H}{[Y]_{0.5}^H} \tag{3-5}$$

其中，$H \approx 10, [Y]_{0.5} \approx 3\ \mu\mathrm{M}$。在模型中近似认为，处于$s = 0$状态的持续时间为常数$\tau_0 \approx 0.2\ \mathrm{s}$，而非关于$[Y]$的函数，故而有：

$$P_s([Y]) = \begin{cases} \tau_0^{-1}, & s = 0 \\ \tau_0^{-1}\dfrac{[Y]^H}{[Y]_{0.5}^H}, & s = 1 \end{cases} \tag{3-6}$$

而$[Y]$认为与激酶活性a成正比关系，即有：

$$[Y] = Y_a \cdot a \tag{3-7}$$

由于模型中，CheY-P 去磷酸化速率τ_z与其空间分布和扩散速率对模型整体表现无明显影响，故在模型中不考虑该因素。

在不存在趋化剂时，测得其平均前进持续时间$\tau_1 \approx 0.8$，且有：

$$a = a_0 = \frac{k_R}{k_R + k_B} \tag{3-8}$$

$$P_1([Y]_0) = \tau_0^{-1} \frac{[Y]_0^H}{[Y]_{0.5}^H} = \tau_1^{-1} \tag{3-9}$$

则可决定Y_a值为：

$$[Y]_0 = Y_a \cdot a_0 = [Y]_{0.5} \cdot \left(\frac{\tau_1^{-1}}{\tau_0^{-1}}\right)^{\frac{1}{H}} \tag{3-10}$$

当存在多种 MCPs 受体R_i时，考虑到受体对下游激酶活性的竞争与稀释效应，采用线性平均法计算激酶总活性，则式(3-1)可改写为(3-11)，其中w_i表示不同受体权重，权重越大，认为其对下游激酶活性的影响越显著。

$$a = \frac{1}{\sum_i w_i} \cdot \sum_i \frac{1}{1 + e^{N_i \cdot \varepsilon_i}} \tag{3-11}$$

其中ε_i根据受体R_i各自的结合常数K_{Ai}, K_{Ii}以及拟合参数α_i, m_{0i}分别得到。考虑到不同受体的甲基化程度均由相同途径调节（即 CheR 与 CheB），故共用相同甲基化/去甲基化速率常数k_R, k_B及平衡参数b。

3.1.2 随机游走模型

当$\Delta t \ll \frac{1}{P_0([Y])}$且$\Delta t \ll \frac{1}{P_1([Y])}$时，认为在$\Delta t$内个体仅发生至多 1 次状态转换，故而可以用离散时间的 Markov 模型描述如下：

对于每个细菌个体A，其任意时刻的状态可以用(x, y, θ, s)描述。其中x, y对应于A所处坐标(x, y)；θ为A在当前时刻运动方向与x轴方向夹角；s代表A所处状态，规定$s = 0,1$。每隔Δt后A进行一次决策，规则如下：

（1）若当前时刻$s = 0$，则$\theta \to \theta + \Delta\theta, \Delta\theta \sim U(-\pi, \pi)$，而$x, y$不改变，即原地“翻转”；若当前时刻$s = 1$，则$\theta$不改变，而$x \to (x + v\Delta t \cdot cos\theta), y \to (y + v\Delta t \cdot sin\theta)$，即朝向$\theta$方向运动$v\Delta t$长度，其中$v$为运动速率；

（2）在$t \to t + \Delta t$时间内，细胞从状态s转换至$(1-s)$状态的概率为$P_s([Y]) \cdot \mathrm{d}t$。由(3-6)式可知，$P_0 = \tau_0^{-1}$为与$[Y]$无关的常数，即可写出如下概率转移矩阵$P$，其中元素$p_{ij}$表示发生$(s_t = i) \to (s_{t+\Delta t} = j-1)$的概率。

$$P = \Delta t \cdot \begin{bmatrix} (1-\tau_0^{-1}) & \tau_0^{-1} \\ P_1([Y]) & 1-P_1([Y]) \end{bmatrix} \tag{3-12}$$

3.2 大肠杆菌群体运动的粒子化模拟与数值解

3.2.1 信号转导动力学模型的模拟结果

该部分模拟主要展示在不同浓度下，个体运动状态发生改变的概率。由于模型中$P_0 = \tau_0^{-1}$为常数，故使用$CW_{bias} = \frac{1/P_0}{1/P_0+1/P_1}$作为描述细菌个体运动的指标，其含义为鞭毛发生 CW 转动的时间比例。CW_{bias}值越高，细菌发生翻转的可能性越大，则更倾向于表现出负向趋化性。根据(3-1)至(3-11)建立对应的模型，并在其中改变 Tar 受体与 Tsr 受体的相对含量，分析个体在不同趋化剂浓度 c 下的响应情况，即$CW_{bias} - c$关系，结果如图 3-1。其中，以 Tar 为生理条件含量作为 1Tar，其余分别对应增高/降低倍数；Tar-only 与 Tsr-only 则分别代表仅包含生理条件含量下的 Tar 受体与 Tsr 受体。

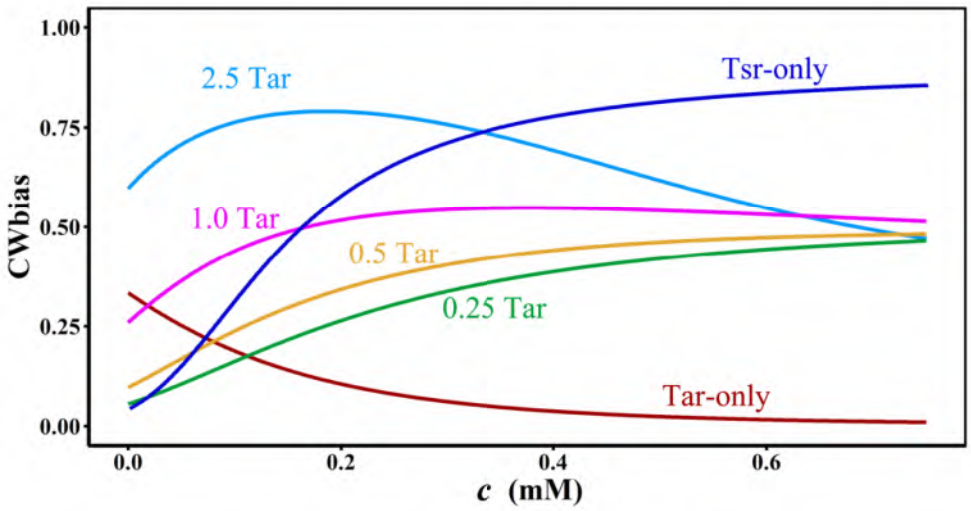


图 3-1 不同受体比例下$CW_{bias} - c$关系

由上图可见，Tar-only 的CW_{bias}随浓度增加而降低，即 Tar 受体效应表现出正向趋化性；而 Tsr-only 则与之相反。需要指明的是，在某处浓度下，

发生趋化方向和强度并非是由CW_{bias}值的大小所决定的，而是由其随着浓度的变化关系，即$\partial CW_{bias}/\partial c$决定的。当$\partial CW_{bias}/\partial c > 0$时，表现为负向趋化，而$\partial CW_{bias}/\partial c < 0$时则为正向趋化，其绝对值决定了正/负向趋化的强度。因此，对于低浓度范围，尽管 Tar-only 的CW_{bias}值大于 Tsr-only，但其CW_{bias}随浓度 c 升高而下降，因此其效应为正向趋化，即朝向浓度较高处运动。

依此角度，可以将细菌趋化效应描述为：细菌在概率期望上总是朝向CW_{bias}下降的浓度方向移动，即$\boldsymbol{v_e} = -k_v \frac{\partial CW_{bias}}{\partial c}$。结合$CW_{bias} - c$，可以认为细菌将“离避”$CW_{bias}$较高处的浓度，而“趋向”$CW_{bias}$较低处的浓度（如图 3-2）。同样地，若在某空间中存在浓度场分布，则细菌在该空间中的运动方向为$\boldsymbol{v_e} = -k_v \nabla CW_{bias}$，其中$\nabla CW_{bias}$为$CW_{bias}$在该空间坐标下的梯度。

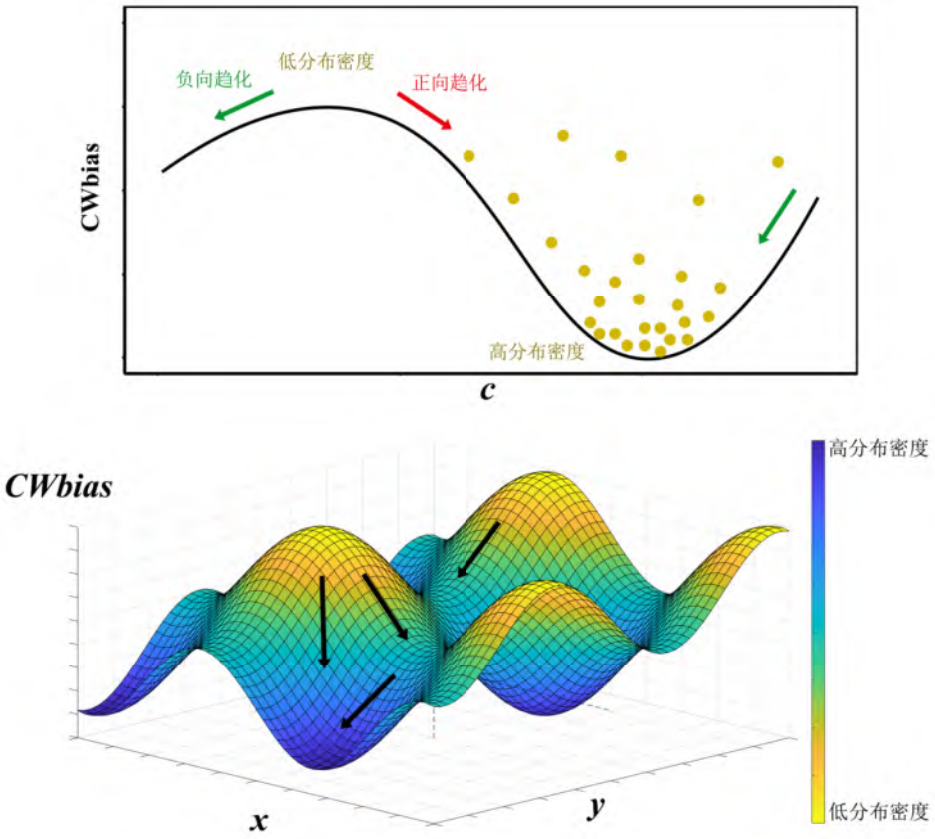


图 3-2 细菌趋化运动方向与CW_{bias}关系示意图

对于同时表达 Tsr 与 Tar 受体的菌株，在两者综合效应下，其$CW_{bias} - t$关系曲线有可能出现极大值；且对于不同 Tar 表达量，其 Tar 比例越高，则该极大值越明显，对应的浓度 c 越小（如图 3-1）。由以上分析可知，细菌具有“离避”极大值的趋势，这表明在较高 Tar/Tsr 表达比例下，细菌对于浓度

的响应具有一个“阈值”：当细菌当前环境浓度低于该阈值，则向浓度较低处运动，而高于该阈值则向浓度较高处运动，从而使其分布“两极分化”，即出现“双向运动状态”；且 Tar/Tsr 表达比例越高，阈值浓度则越低。

同时，为了反映出受体对于吲哚的“适应”过程，对细菌在特定浓度下CW_{bias}随时间变化进行了分析（图 3-3）。由 Tar-only 与 Tsr-only 对比可知，Tsr 受体可以发生十分快速且剧烈的适应行为，其CW_{bias}受高浓度吲哚增加后，短时间内下降至基线水平；而 Tar 受体的适应过程较为缓慢，其CW_{bias}受吲哚诱导下降后基本维持在较低水平。当两种受体共同存在时，可以发现不论是对吲哚的响应还是适应过程，均基本由 Tsr 受体所主导：受吲哚诱导后CW_{bias}增加，而后快速适应下降。其中，Tar 含量越高，受吲哚诱导CW_{bias}增幅越小，适应过程的斜率越小（即适应越慢），但总体效应不显著，仍以 Tsr 效应为主。但值得注意的是，2.5 Tar 组在首次受诱导时表现类似于 Tsr 特征；但经过适应，受到第二次更高浓度吲哚诱导后，CW_{bias}反常降低，表现出了 Tar 受体支配的特征，表明在适应前后 Tsr 与 Tar 受体的支配性发生了“逆转”。另一方面，随着适应的发生，Tsr 效应减弱，Tar/Tsr 效应的相对比例增大，则会导致双相运动浓度阈值不断降低。

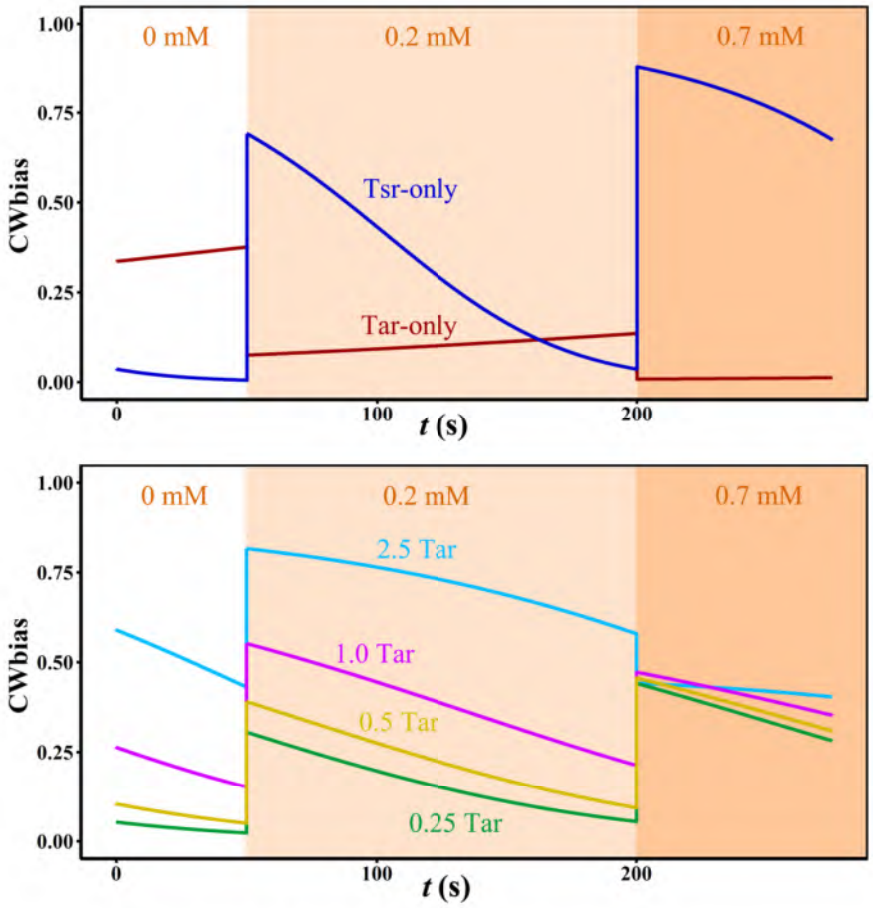


图 3-3 不同受体比例下$CW_{bias}-t$变化关系

3.2.2 随机游走模型的模拟结果

创建具有 x、y 方向的二维容器，其中 x 方向总长 2 mm，y 方向总长 0.75 mm，并设置容器中心位置为坐标原点。容器内随 x 方向设置浓度梯度场，分布如图 3-4；y 轴方向浓度均匀无梯度变化。初始时刻时在原点附近创建独立粒子对象，其分布服从$x \sim N\left(0,\ 0.02\ \text{mm}\right), y \sim N\left(0,\ 0.03\ \text{mm}\right)$。每个粒子对象内储存可更新的位置坐标、运动速度、运动状态及完整的信号转导动力学参数，并由此计算出每时刻对应的转移矩阵。以$\Delta t = 0.002$ s为时间步长，根据式(3-12)模拟粒子运动，各粒子的运动速率在每一时间步长下单独取值，满足$\|v\| \sim N\left(0.03\ \text{mm/s}, 0.005\ \text{mm/s}\right)$，根据当前状态进行游走；并由各粒子当前位置浓度独立更新该粒子中信号转导动力学参数，同时根据转移矩阵进行状态更新。容器边界条件采用反弹模型，即触碰后粒子法线方向速度分量反向。总模拟时长共 300 s，粒子数$N = 500$。

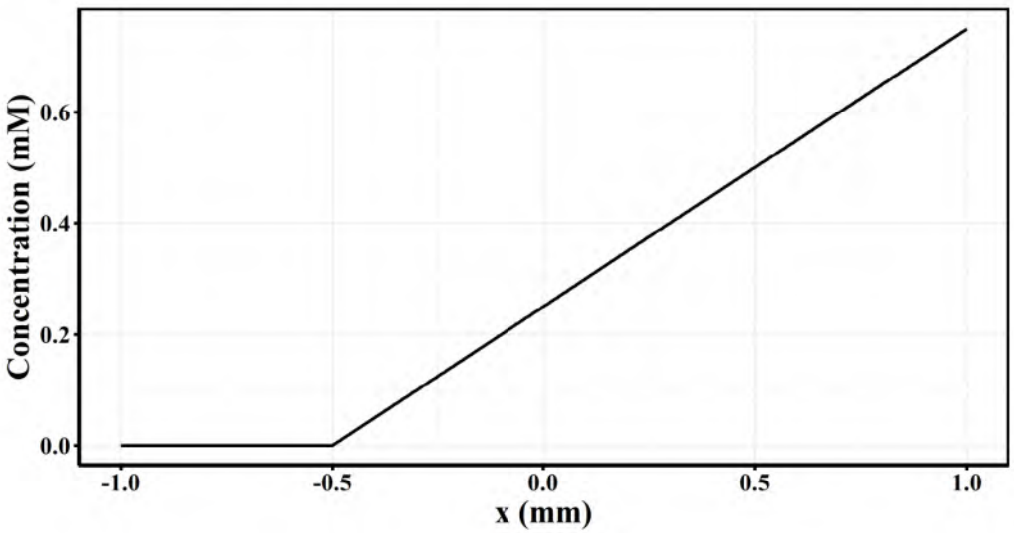


图 3-4 模拟中浓度场在 x 方向上的分布

对模拟后各时间点处粒子的分布状态进行分析，得到粒子在 x 轴方向上的密度分布曲线（如图 3-5）。当仅存在 Tar 受体时，粒子整体朝向高浓度吲哚方向移动；当 Tar 表达比例不断减少时，则总体密度向低浓度吲哚处移动的趋势则越大，该现象可以通过平均中心分布图（图 3-6）更好地观察到。较为有趣的是，对于 2.5 Tar 组与 1.0 Tar 组，尽管其平均中心均不同程度的向低浓度方向移动，但其密度分布的峰值却位于 x 轴正半轴侧（即较高浓度）；在 0.5 Tar、0.25 Tar 与 Tsr 组中，该现象则出现地更加提前，而在此之后在

高浓度处峰消失，粒子集中分布在负半轴侧（低浓度区域）。与之相反的时对于仅表现出正向趋化地 Tar 则在粒子群体迁移向高浓度区域之前，在低浓度区域形成一个类似的密度峰值。这是由于在粒子响应浓度场的初始阶段，具有低CW_{bias}的粒子个体具有更高的“前进”/“翻转”比例，其运动到具有更低CW_{bias}区域的概率更大，因此更加迅速地进入CW_{bias}极小值附近；而类似地，具有高CW_{bias}的粒子用于原地“翻转”的时间增加，且在运动期间不断随机改变方向，因此需要更长的时间才能“寻找”到较低CW_{bias}的区域，因此该部分粒子会在高CW_{bias}区域“滞留”一段时间，表现为在此处形成较高的密度峰值。

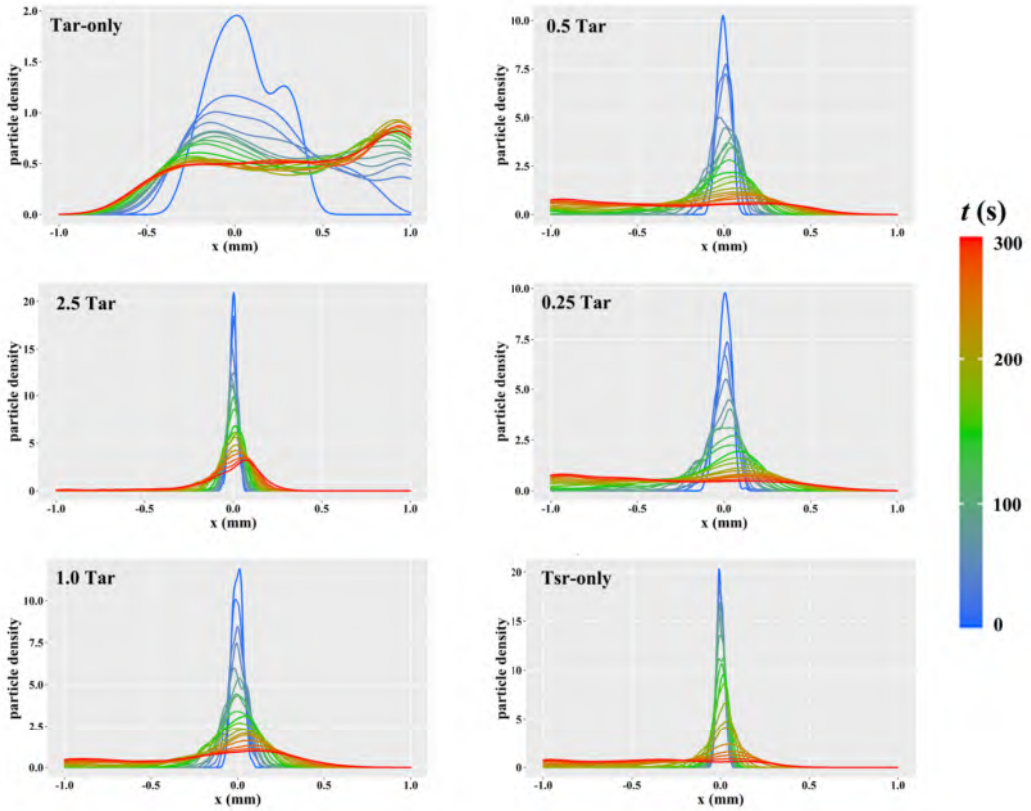


图 3-5 模拟运动中粒子的密度分布曲线

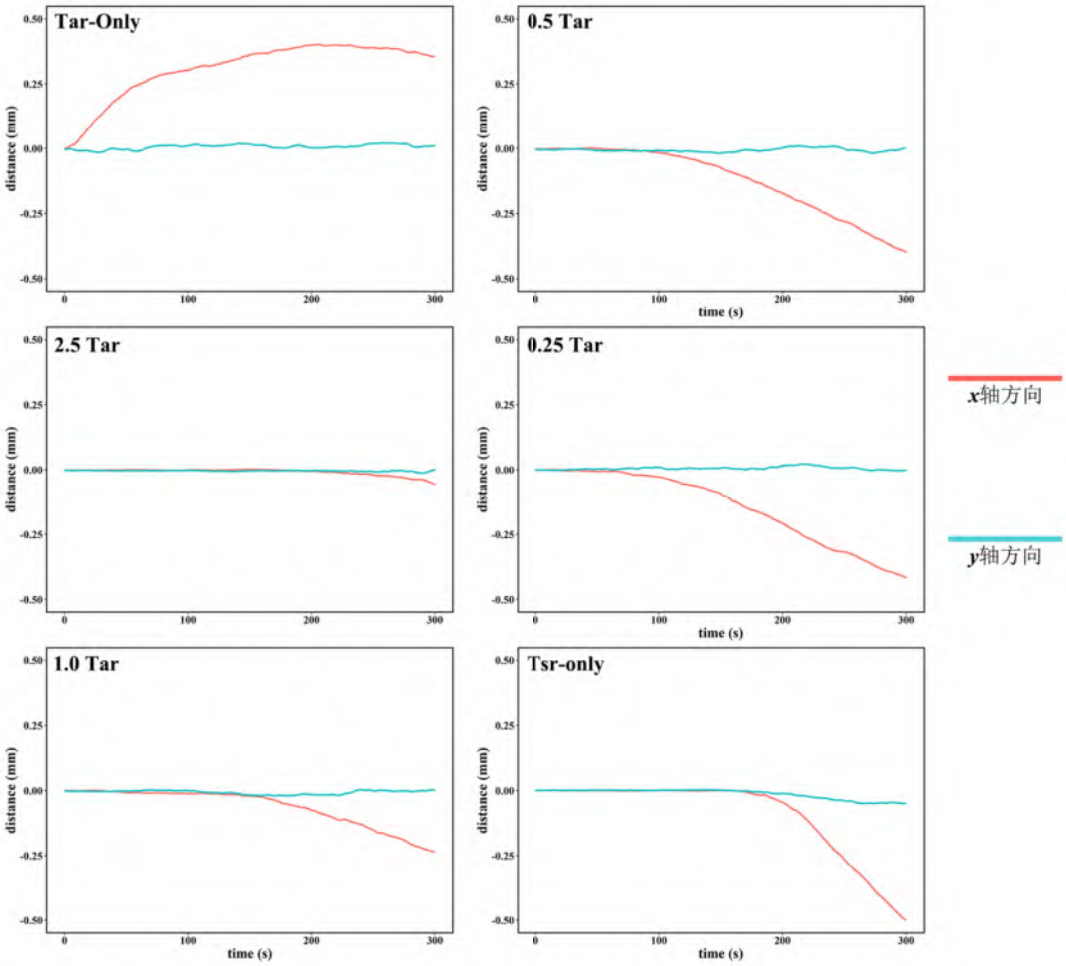


图 3-6 模拟运动中粒子平均中心位置的变化

3.3 本章小结

该部分工作基于信号转导动力学与 Markov 随机游走模型，对 *E. coli* 从分子到个体再到群体的趋化行为进行了模型建立与数学描述，并编写程序对上述模型进行了实现与模拟，从而分析了趋化性发生过程中的部分现象与机制。

通过将CW_{bias}作为指标，分析不同受体表达比例下，在浓度场与坐标空间中CW_{bias}的变化情况，归纳得出了趋化行为与CW_{bias}相关联的一般规律。基于此结论，分析了细菌双向趋化性中浓度“阈值”与“两极分化”行为的产生原因与影响因素。对模拟后粒子分布密度与平均中心进行了统计与分析，描述了在该模型中不同受体表达比例下粒子运动的行为特征。

4 大肠杆菌 Tar 趋化受体敲低菌株的构建

为了探究趋化受体的效应，已有工作对 Tar、Tsr 等受体基因进行了敲除，通过观察敲除前后趋化运动的变化，分析得到该受体对于在趋化运动中的作用及受体效应特征。然而，该种“全或无”的敲除方式不能反映出两种不同受体间的互作关系。该部分工作利用 CRISPRi 技术，对 Tar 受体进行了敲低，且敲低水平可受诱导强度调节，从而构建了具有不同 Tar 受体表达量（100%、30%和 60%）的可观测菌株，为后续观察 Tsr-Tar 间的拮抗作用模式奠定了基础。

4.1 CRISPRi 工作质粒的设计与构建

本论文利用 pdCas9 质粒构建了用于 CRISPRi（CRISPR 干扰，CRISPR interference）敲低 Tar 受体基因表达的工作质粒。pdCas9 质粒中含有 dCas9 与 sgRNA scaffold 编码序列，并分别由 tetA 启动子（四环素诱导）与 araBAD 启动子（阿拉伯糖诱导）起始转录。其中，dCas9 为第 10 位氨基酸由天冬氨酸突变为丙氨酸的 Cas9 蛋白突变体，即 Cas9(D10A)，其可以在 sgRNA 的协助下正常特异性识别并结合目标 DNA 序列；而 D10A 位点突变位于 N 端 RuvC-I 结构域[33]，使其失去对非靶标 DNA 单链的内切酶活性[34, 35]。因此，当 pdCas9 识别并结合于靶基因处后，不会对基因组 DNA 序列造成改变，但其产生的空间位阻阻止 RNA 聚合酶与 DNA 的结合及前进，从而达到抑制转录的目的[36]。由于 dCas9 无法切割 DNA，其会与 DNA 形成较为稳定的 DNA-dCas9-sgRNA 三元复合物，从而保证了转录抑制的效率；另一方面，由于基因组 DNA 序列不发生改变，并考虑到复合物的解离平衡与 dCas9 蛋白、sgRNA 的降解平衡，相较于 CRISPR 敲除，CRISPRi 的抑制作用保留了高特异性的优势，并同时具有可逆、可控的特点[37, 38]。

pdCas9 质粒中 sgRNA scaffold 包含除 Spacer 序列外的 sgRNA 结构，通过插入不同 Spacer 序列，可以实现对对应靶标基因的特异性抑制。在 Spacer 插入位点处含有完整的 *mRFP* 转录单元，可以组成型表达 mRFP 作为筛选标记；当 Spacer 序列成功插入后，*mRFP* 转录单元将被替换使菌落失去荧光蛋白表达，从而方便重组质粒转化后的初步筛选（图 4-1）。

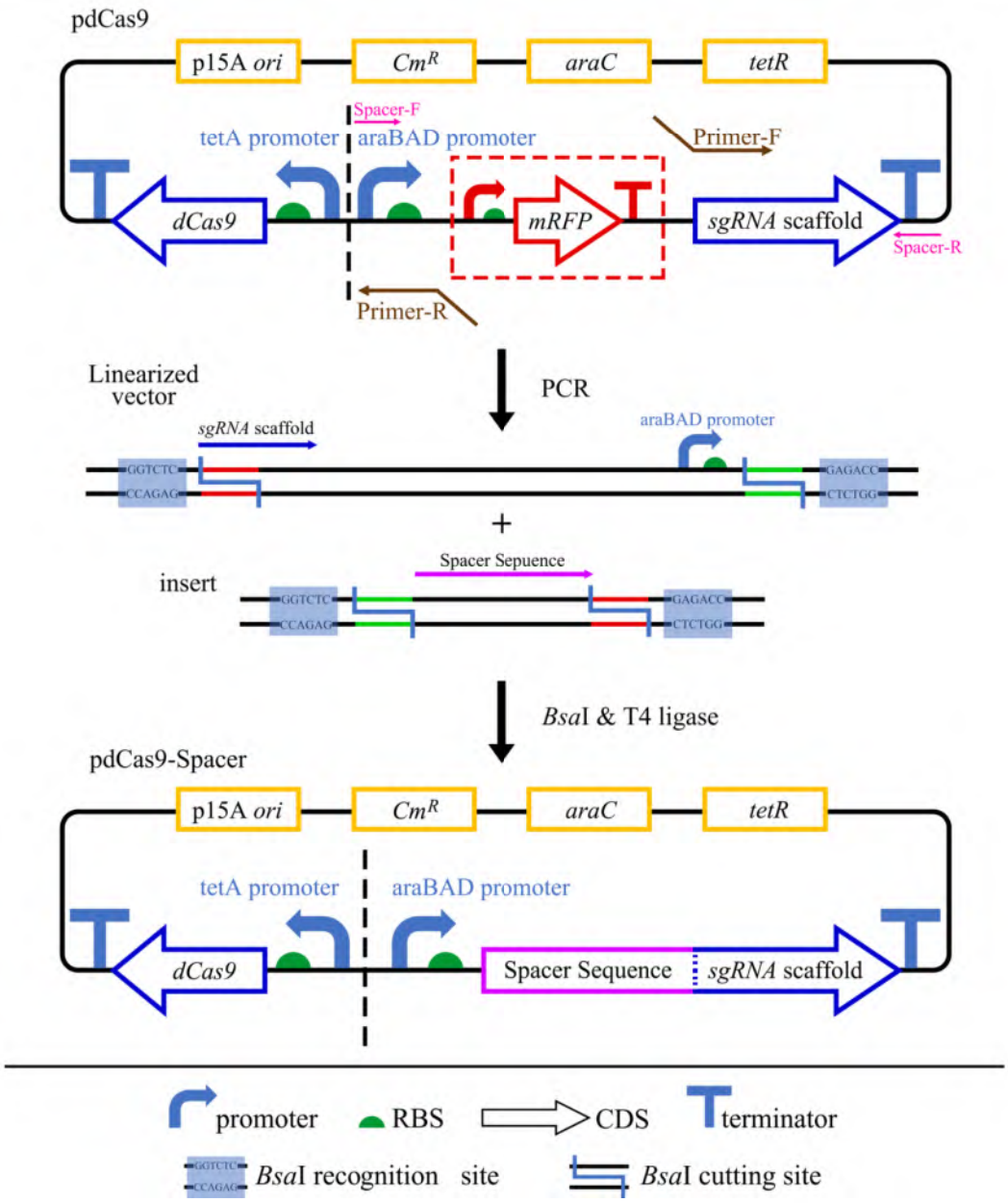


图 4-1 pdCas9 质粒结构与 Spacer 序列插入示意图

其中，Spacer 序列负责对靶点进行识别，因此需设计合适的序列，保证其不会形成自身二级结构并结合于目标序列合适位置，从而获得较好的抑制效果；同时确保其特异性，防止脱靶发生。本研究中使用 Qi 等人[38]开发的 CRISPR-guide RNA 设计工具寻找 *tar* 基因中的可能 Spacer 结合位点，选取评分较高者域 *E.coli* RP437 基因组比对验证其特异性（除靶点外匹配<15 nt）。选取 6 条评分较高且满足特异性要求的 Spacer 序列（含前后缀）进行合成验证（表 4-1）。序列合成由北京擎科生物科技股份有限公司完成。

表 4-1 本研究中使用的候选 Spacer 序列

名称	序列	评分
Spacer 1	GACAGGTCTCACCAT**CCAGGGAATGCAAAATGCAA**GTTTTGAGACCTGTC	1943
Spacer 2	GACAGGTCTCACCAT**CCAGCACGGCGGCAAAGTGG**GTTTTGAGACCTGTC	2065
Spacer 3	GACAGGTCTCACCAT**CGCACGCGCGGCTTCAACCG**GTTTTGAGACCTGTC	1764
Spacer 4	GACAGGTCTCACCAT**TGCTCACTGGCAGGACGGGA**GTTTTGAGACCTGTC	1761
Spacer 5	GACAGGTCTCACCAT**CGATAGCGCCAGGAAAACAT**GTTTTGAGACCTGTC	1935
Spacer 6	GACAGGTCTCACCAT**TTCAGTACGGGAGGAAAGAT**GTTTTGAGACCTGTC	2732

注：序列中仅展示序列中编码链部分。*Bsa*I 识别位点与切割位点分别使用下划线与波浪线示意。Spacer 序列部分**加粗**表示，共 20 bp，其余部分为用于酶切及黏性末端链接的前后缀。

分别将以上 6 条序列插入至 pdCas9 质粒中，构建 pdCas9-Spacer 工作质粒。重组质粒的构建工作使用 *E. coli* DH5α 作为宿主菌。对重组质粒转化后菌落使用氯霉素平板进行筛选（如图 4-2 所示），可观察到成功转化后菌落失去 mRFP 表达，红色荧光消失；以不含质粒的宿主菌株作为阴性对照，对各筛选平板上分别挑取 2 个菌落，使用检验引物 Spacer-F/R，进行菌落 PCR 验证，结果如图 4-3 所示。其中，若未插入 Spacer 序列，则 PCR 产物应为 1642 bp；若插入 Spacer 序列则 PCR 产物应为 579 bp。由以上结果可初步判断 Spacer 序列插入成功。使用检验引物 Spacer-F/R 对所有重组质粒中 sgRNA 部分进行测序验证并确认无误，pdCas9-Spacer 工作质粒构建完成。

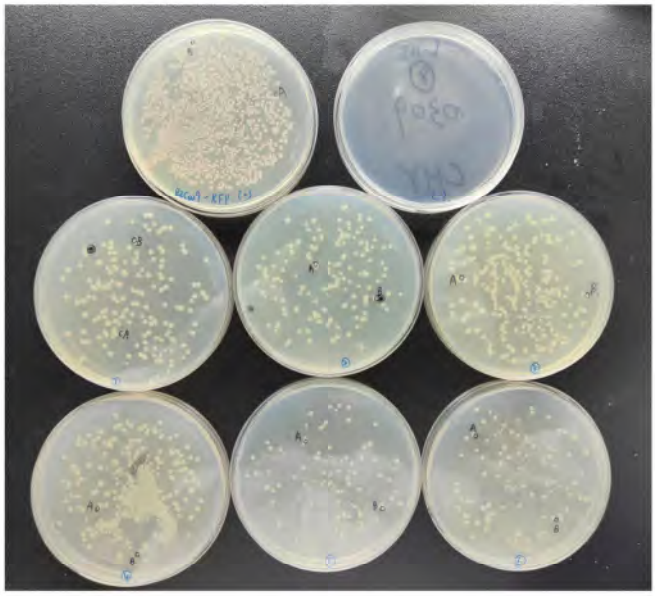


图 4-2 重组质粒转化筛选结果

（从上至下、从左至右依次为 pdCas9、阴性对照、Spacer 1~6 重组质粒转化结果）

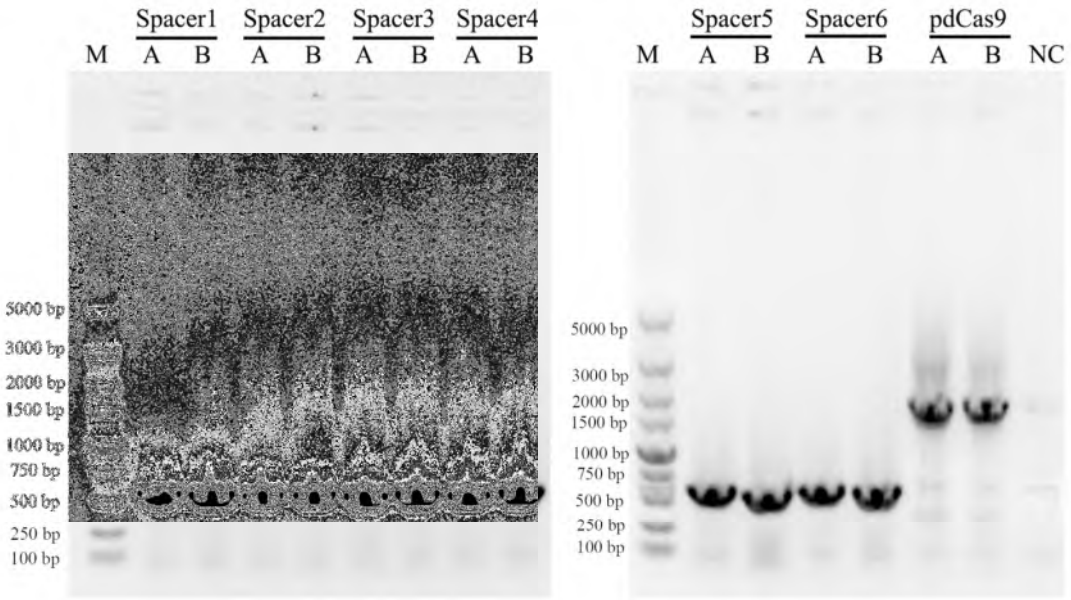


图 4-3 重组质粒转化后菌落 PCR 检验结果

（M：DL5000 DNA Marker；Spacer 1~6：含对应 Spacer 序列的重组质粒转化菌落；A、B：各筛选平板上平行单菌落；NC：阴性对照，即无质粒 *E.coli* DH5α）

将以上重组质粒分别电转化进入 *E.coli* RP437 菌株后，使用 0.5 % (w/v) 阿拉伯糖+0.5 mg/L 盐酸四环素诱导后，RT-qPCR 验证其抑制效果，其中 Spacer 6 具有最佳的抑制效果，故使用其完成后续实验。

4.2 趋化受体诱导敲低的验证与分析

根据 CRISPRi 可逆抑制的特点，通过改变 sgRNA 表达量，可以实现对目的基因不同程度的敲低。该部分工作验证了阿拉伯糖诱导浓度-sgRNA 表达量-Tar 表达敲低水平间的关系。

使用含 pdCas9-Spacer 6 的 *E. coli* RP437 菌株，使用不同浓度阿拉伯糖进行诱导 8 h 后，分别对各样本中 sgRNA 与 *tar* 基因进行 RT-qPCR 定量验证，并分析诱导浓度-sgRNA 表达量-Tar 表达敲低水平关系，如图 4-4 所示。其中 Tar 表达量为相对于野生型 RP437 菌株的表达量。可见，当阿拉伯糖浓度达到 2 g/L 时，诱导敲除效果基本达到饱和，此时 Tar 受体表达量约为未诱导状态下的 30%。当阿拉伯糖浓度为 1 g/L 时，Tar 受体相对表达量约为 60%。因此，后续实验使用 1 g/L、2 g/L 分别进行诱导，以分别获得 Tar 敲低水平约为 40%、70%的菌株，并分别记作 *E. coli* RP437$\Delta_{tar}^{0.4}$、*E. coli* RP437$\Delta_{tar}^{0.7}$。

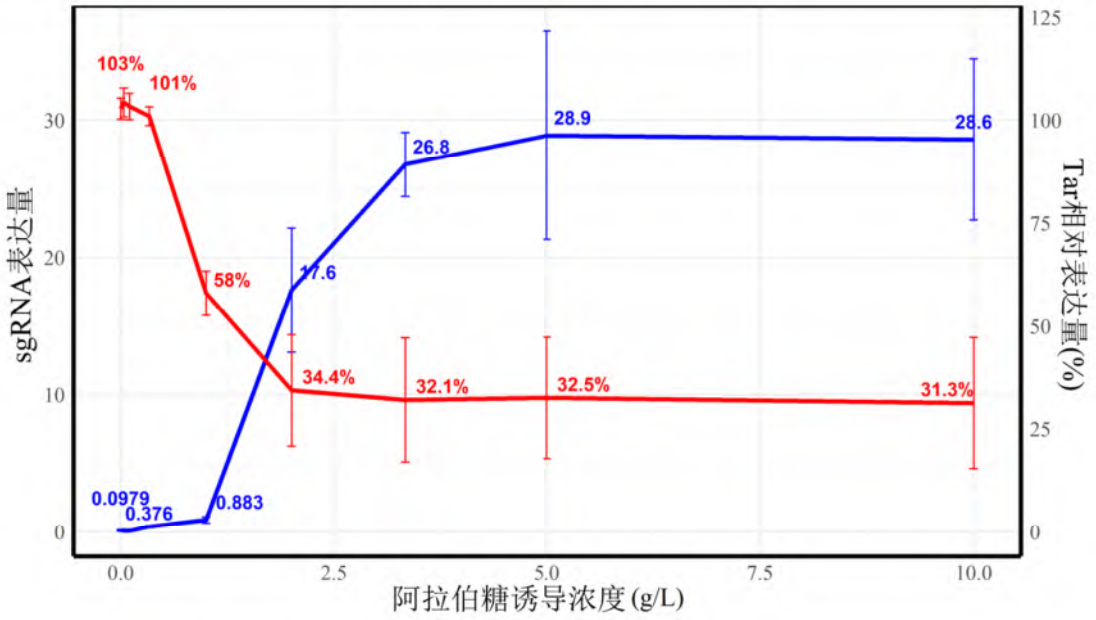


图 4-4 不同阿拉伯糖诱导浓度下 gRNA 与 Tar 表达水平

此外，在本部分工作中，我们构建了由 IPTG 可诱导表达绿色荧光蛋白（eGFP）的质粒 pUC-eGFP，并将其分别转化入野生型、$\Delta_{tar}^{0.4}$、$\Delta_{tar}^{0.7}$的 *E. coli* RP437 的菌株中，从而方便对细菌趋化运动状态进行成像观察。

4.3 本章小结

本章使用 CRISPRi 技术构建大肠杆菌 Tar 趋化受体敲低菌株并对诱导敲低效果进行了表征。首先，使用 CRISPR-guide RNA 设计工具寻找 tar 基因中的合适 Spacer 序列，并插入进 pdCas9 质粒，构建了用于 CRISPRi 敲低 Tar 受体基因表达的工作质粒。该质粒包含了 dCas9 与包含 Spacer 序列的 sgRNA 的编码序列，并分别由 *tetA* 启动子与 *araBAD* 启动子驱动可诱导转录。。通过筛选转化菌落并进行 PCR 验证，确认了 Spacer 序列的插入成功。

在此基础上，筛选出了具有最佳敲低效果的 Spacer 6 序列，对并 pdCas9-Spacer 6 的诱导效果进行实验验证。通过改变阿拉伯糖诱导浓度，调节 sgRNA 表达量，观察 Tar 基因的敲低效果。根据 RT-qPCR 结果，确定了两个最佳诱导浓度，并对应获得 Tar 敲低水平约为 40%和 70%的菌株。

本章通过 CRISPRi 技术成功构建了大肠杆菌 Tar 趋化受体敲低菌株，并验证了阿拉伯糖诱导浓度与 sgRNA 表达量对 Tar 基因敲低水平的影响关系，为后续章节的实验研究奠定了基础。

5 大肠杆菌对吲哚趋化运动的调控与分析

在该部分工作中，使用 Transwell 细菌迁移实验与微流控装置对细菌趋化运动进行了观察与分析。通过仿真模拟优化与实验观测，实现并验证了微流控芯片的浓度梯度场生成；利用图像处理与分析，对 Transwell 与微流控成像结果进行统计，在群体层面验证了改变受体表达比例对趋化运动的调控效果，并在时间与空间尺度上分析了两种受体拮抗作用的效应特点。

5.1 吲哚浓度与趋化受体 Tar 表达量对趋化运动的影响

利用 Transwell 细菌迁移技术，该部分研究对细菌趋化运动进行初步测量与分析，并探究了吲哚浓度及 Tar 受体表达量对细菌趋化运动的影响，验证了通过改变受体表达调控趋化运动的效果，并探究了不同因素下趋化运动的特征。。

在 Transwell 实验中，通过改变上室琼脂糖凝胶中吲哚的浓度，探究细菌对不同浓度吲哚的趋化运动强度。用不同浓度阿拉伯糖诱导，得到 Tar 受体不同程度敲减后的 *E. coli* RP437 作为待测菌进行测试。对 Transwell 后聚碳酸酯膜下表面使用倒置荧光显微镜进行成像拍照，并进行图像处理与统计（如图 5-1）。从视野中细菌分布较均匀的 100 μm×100 μm 区域进行分析；将分析区域按比例缩放至固定像素，使用 MATLAB 软件对图像进行二值化处理并统计像素数（代码见附录），以此反映图像中绿色荧光强度，并用于衡量细菌相对密度的高低。若细菌密度越高，则代表细菌朝向上室方向（高浓度吲哚）运动正向趋化性越强；反之则代表细菌对该浓度吲哚具有负向趋化性。

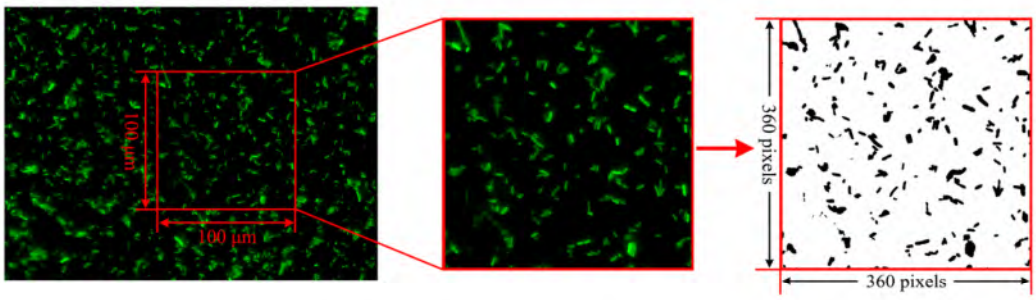


图 5-1 Transwell 荧光成像图像处理流程

分别使用野生型（wt）、Tar 受体敲减 40%（$\Delta_{tar}^{0.4}$）、、Tar 受体敲减 70%（$\Delta_{tar}^{0.7}$）的菌株，在上室使用 0 mM、0.5 mM 与 2 mM 浓度的吲哚进行诱导。在预适应组中，最后一次收集细胞前在缓冲液中加入 2 mM 浓度吲哚，预适应 5 min。各组成像结果与细菌密度统计分别如图 5-2、图 5-3 所示。

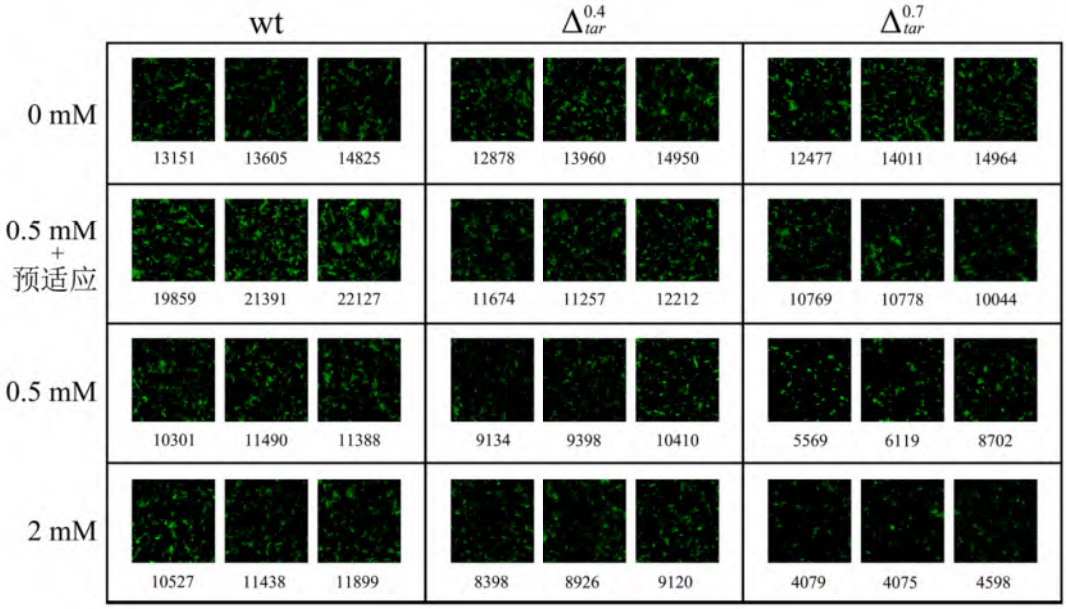


图 5-2 Transwell 成像结果

（图片下的数值代表该图片二值化处理后的荧光像素数）

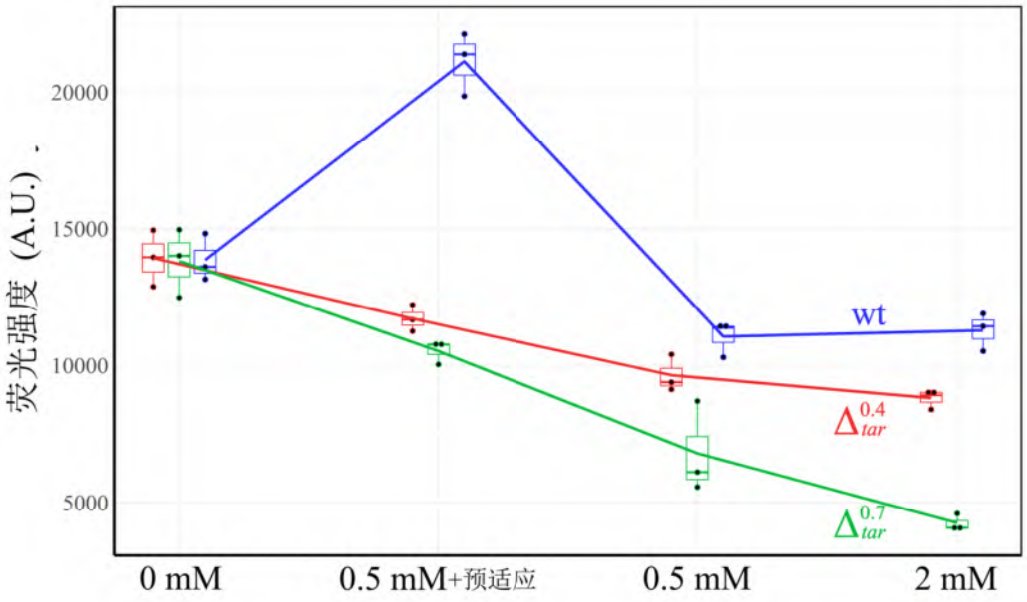


图 5-3 Transwell 实验中不同菌株对吲哚浓度的响应结果

由上图可见，野生型对于吲哚浓度的增加整体成负向趋化反应，这是由于 Tsr 受体活性较 Tar 更高；另一方面，在进行预适应之后，野生型菌株对于低浓度吲哚则表现为强烈的趋向性，表明 Tsr 发生了快速且大幅度的适应，而 Tar 适应过程相对缓慢，从而使 Tar 受体的效应占主导。敲低 Tar 表达后，则预适应的效用大幅下降，进一步证明 Tar 对于大肠杆菌对吲哚发生适应后转为正向趋化运动的重要性。同时，Tar 的敲除也促进了细菌对于低浓度或高浓度吲哚的负向趋化，且程度随 Tar 受体表达水平的降低而增加，证明即使在未发生适应情况下，Tar 受体即存在对 Tsr 受体的拮抗作用。由于 Transwell 实验中，细菌受吲哚诱导时间较长（8 min），因此当高浓度吲哚（2 mM）诱导下，Tsr 受体即有可能发生一定程度的适应，而 Tar 受体活性进一步增加。因此在野生型细菌中观察到 2 mM 吲哚诱导相较于 0.5 mM 吲哚诱导下，细菌负向趋化强度基本持平甚至略有减少，侧面说明了吲哚浓度越高，Tsr 的适应效果越显著。

5.2 微流控成像平台的设计与搭建

5.2.1 微流控芯片的设计与优化

微流控芯片设计以 μFlow 装置[23]作为参考，使用 AutoCAD 软件完成平面设计与三维建模。芯片包含梯度生成模块与趋化观测模块，设置有 3 个进入通道与 1 个流出通道。芯片具体参数如图 5-4 中标注。

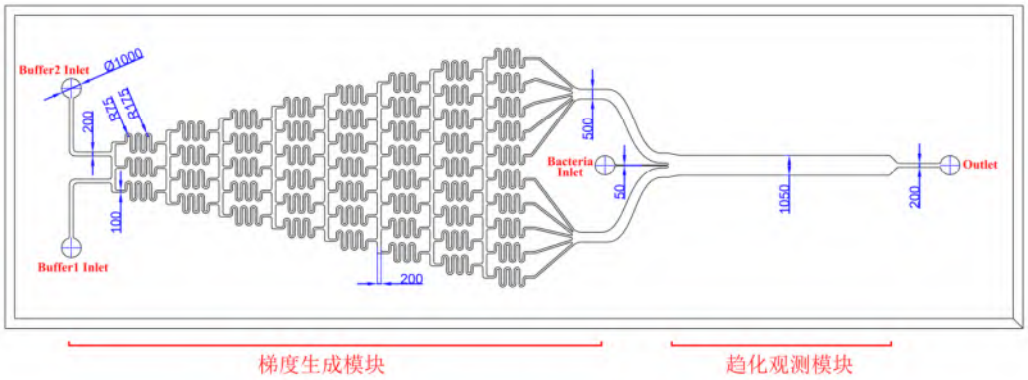


图 5-4 微流控芯片设计图（标注单位为 μm）

为了达到实验目的，该芯片设计的核心是在趋化观测模块中实现稳定且均匀的浓度场分布，故而需对局部流道形状进行优化，从而最大程度避免湍流的发生。本研究使用 Ansys CFX 流体仿真模拟对芯片内流体性质与表现

进行预测与优化，模拟中所使用的主要参数如表 5-1 所示。其中，流体黏度根据聚乙烯吡咯烷酮（PVP）-K30 的浓度决定，采用 Fikentscher 黏度公式[39]进行计算（式 5-1）：

$$\frac{ln\,\eta}{2.303C}=\frac{75K_0^2}{1+1.5CK_0}+K_0 \tag{5-1}$$

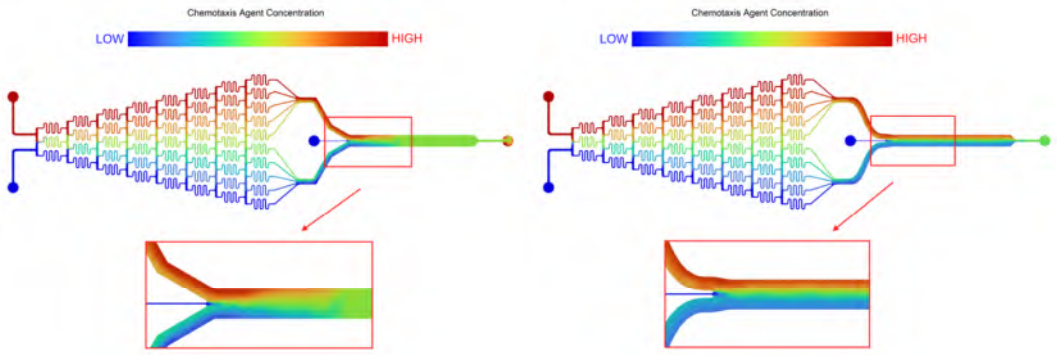
其中，η为 PVP 溶液对于水的相对黏度，C为 PVP 浓度（g/100 ml），$K=1000K_0$为 Fikentscher 常数。

表 5-1 流体模拟仿真中的主要参数

参数	值
粘性模型	标准k－ϵ模型+增强壁面函数
C_μ	0.09
$C_{\epsilon 1}$	1.44
$C_{\epsilon 2}$	1.92
组分运输	
密度	1015 kg/m^3
黏度	1.535 mPa·s
分子量	18 g/mol
入口	
Buffer1 Inlet 与 Buffer2 Inlet	压力入口-抑制回流
表压（与边界法向）	250 kPa
Bacteria Inlet	压力入口-抑制回流
表压（与边界法向）	150 kPa
出口	流出边界
计算设置	
时间步长	0.01 s
总时长	10 s
每步最大迭代次数	5
初始化压力	101 kPa

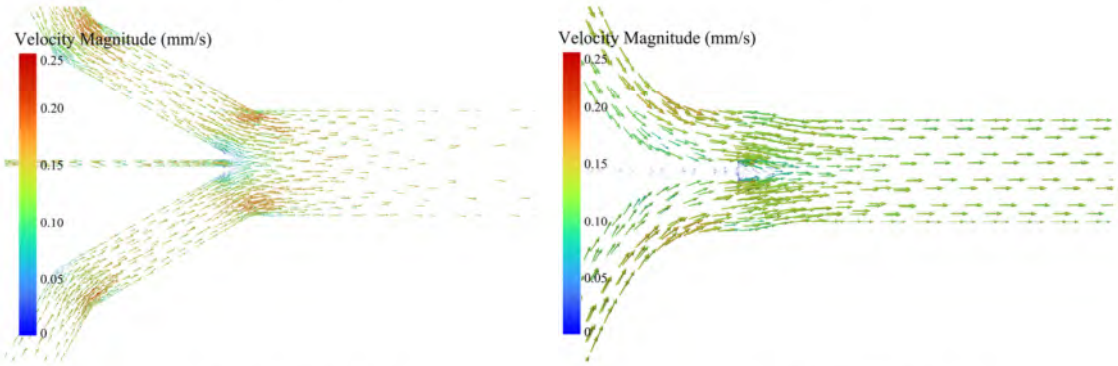
对比优化前后结果（图 5-5）可见，在进行流道优化前，两侧流体交汇后由于具有较大的法向速度分量，导致其过早融合。同时转角处导致局部流速增加，同样破坏了层流的稳定性，导致远端流体速度与径向形成夹角；（图

5-6）。通过调整汇入流道的转角形状、弧度，减小流体汇入角度从而降低两侧流体进入流道后的法向速度，消除了局部不均匀性，使得两侧流体汇入后能够更好地保持层流状态，保证趋化观测模块内具有更稳定且均匀的浓度梯度分布。



(a) 流道优化前浓度场分布　　(b) 流道优化后浓度场分布

图 5-5 微流控芯片流道优化前后浓度场分布仿真



(a) 流道优化前速度分布　　(b) 流道优化后速度分布

图 5-6 微流控芯片流道优化前后速度分布仿真

5.2.2 微流控平台的搭建与优化

微流控平台主要由微流控芯片、观测装置与进样系统组成。为了保证微流控芯片正常、稳定工作，同时满足其设计的预期功能，需要对进样系统进行设计与优化，从而获得合适的进样压力。该芯片中，共有三个进样口，分别对应两种不同趋化剂浓度的 MB 缓冲液与待观测细菌。其中为了产生预期的浓度梯度场，需要两处 MB 缓冲液以基本相同的流速进样。

本研究中使用蠕动泵（3 头）对 MB 缓冲液进行进样，但由于蠕动泵精度相对较低、流量分度值大、易产生压力脉冲，直接连接微流控芯片难以保

证两处进样口的均一性；同时由于该芯片流道容积小、长度长，缓冲液黏度大，运动过程中粘滞阻力较大，流速较慢，若蠕动泵流速过高，极可能造成进样口附近局部压力过大，导致芯片结构损坏。基于以上考虑，对进样系统进行如图 5-7 的优化。通过调节球阀 A、C，可以对进样口处流速进行初步调节；平衡瓶则对系统压强起到缓冲作用，消除蠕动泵造成的压力脉冲，同时也防止了因流速过大造成进样口压强超出芯片承受范围；当 D 开启后两个平衡瓶相通，两者压强达到平衡，从而使两处进样口处缓冲液具有基本相同的流速。若系统压强超过芯片额定压强（500 kPa）则泄压阀 F 开启，防止芯片损坏。

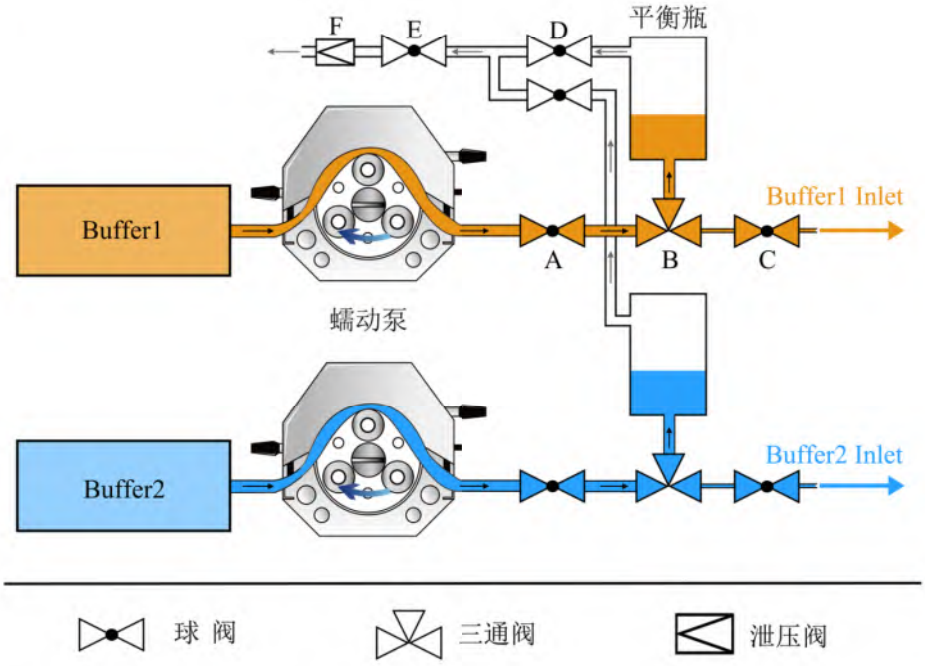


图 5-7 微流控进样系统示意图

5.2.3 浓度场的仿真预测与实验验证

根据 Jeon 等人[40]对该类型梯度产生装置的设计与验证，该装置可以在趋化观测模块产生接近于线性且稳定分布的浓度梯度。为了验证本研究中所用装置的合理性，分别从仿真结果与实际成像结果对芯片内浓度场分布进行验证。

在仿真结果中，以细菌注入口为原点，统计随液体在 y 方向流动中，两种注入液在 x 方向上的混合程度（如图 5-8）。在注入口附近时，由于注入流体自身的影响，使局部摩尔比例出现扰动；但随着流动距离的增加，在流道全场范围内，均能形成较稳定的浓度梯度，且近似为线性分布，与设计预期结果相符。

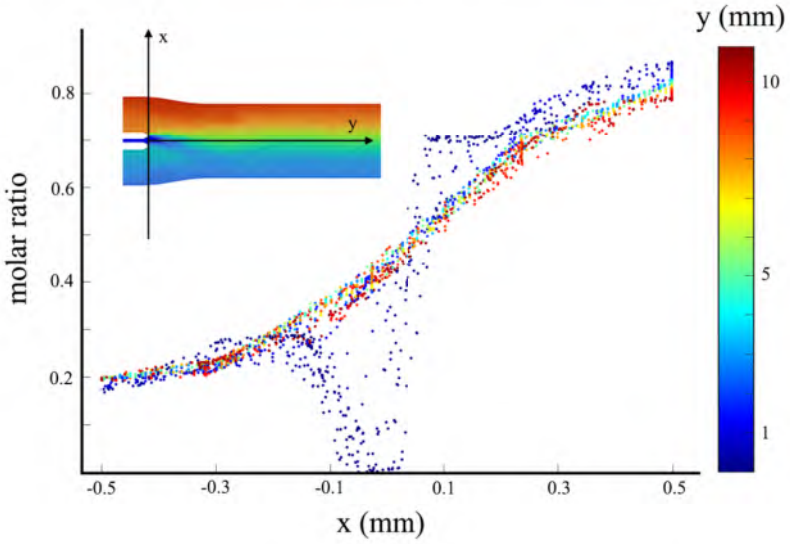


图 5-8 仿真结果中浓度场在各方向上分布

通过显微成像，本研究为了进一步验证该芯片在实际实验条件下所产生的浓度场。分别在 Inlet 2、Inlet 1 通入无色 MB 与加入 3,1-对磺酸苯基偶氮-2-羟基萘-6-磺酸二钠盐（日落黄）染色后的 MB 缓冲液；Bacteria Inlet 加入无色 MB 缓冲液。待流速稳定后，在明场下 y=5 mm 处观察流道内颜色分布并成像。成像结果使用 MATLAB 编写程序（见附录），分析染料浓度随 x 分布情况，结果如图 5-9 所示。可见，在统计范围内，染料浓度接近于线性分布，与设计及仿真预测结果基本相符，验证了该装置在实验使用条件下产生浓度场的可靠性与可预测性。

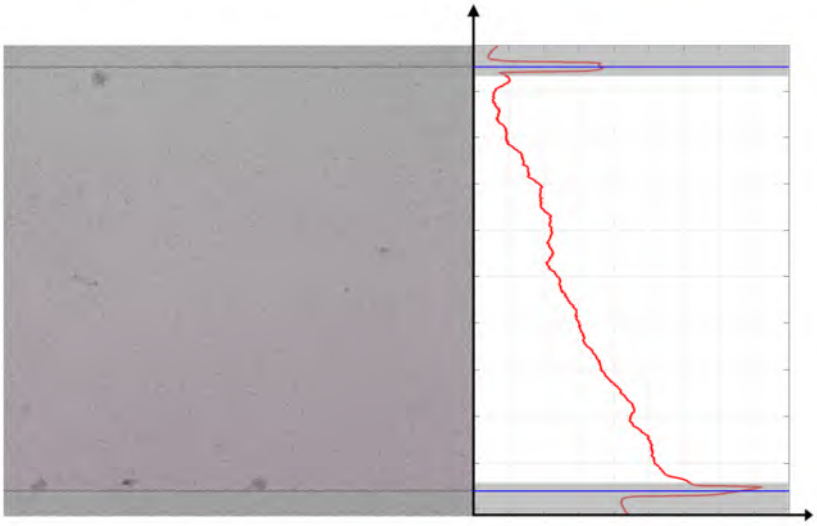


图 5-9 微流控装置浓度场分布的实验验证

5.3 浓度场下大肠杆菌趋化运动行为的观察与描述

Tranwell 结果展示了不同 Tar 表达量的细菌对不同浓度场的响应，但其仅能反映出趋化运动的相对强度和趋势，而不能对细菌在浓度场中的分布特征进行描述。因此，该研究使用微流控装置对细菌在浓度场中趋化运动的表现进行了观察与分析。

分别从 Inlet 1、Inlet 2 通道通入吲哚浓度为 1 mM、0 mM 的 MB 运动缓冲液，使微流控观测模块流道内形成稳定的浓度梯度。待浓度梯度场建立后，自 Bacteria Inlet 通道通入待观察细菌，并置于激光扫描共聚焦显微镜下成像观察，观察区域为 y=5 mm 处。将成像结果使用 MATLAB 程序进行分析（代码见附录），并绘制出细菌密度分布图。

图 5-10 展示了野生型 *E. coli* RP437 菌株分布状态随时间变化情况，其中，密度曲线图中背景颜色深浅示意吲哚浓度分布情况，颜色越深代表此处对应的吲哚浓度越大。运动至 180 s 时，细菌密度在吲哚浓度较低处形成较高峰值，表明此时细菌整体表现负向趋化性，Tsr 受体占主导地位；随着时间推移，低浓度吲哚处峰值逐渐下降，而高浓度处细菌逐渐增多，细菌分布更加平均化。该现象印证了 Tsr 受体快速而强烈的适应过程：当细菌长期受到吲哚诱导后，Tsr 快速适应导致其负向趋化效应减弱；而 Tar 受体虽然具有较弱的正向趋化作用，但其效应更加稳定持久，因此随着适应的发生，Tar 相对于 Tsr 的效应强度快速增加，最终使细菌对于吲哚的负向趋化效应逐渐减弱，直至逆转为正向趋化。

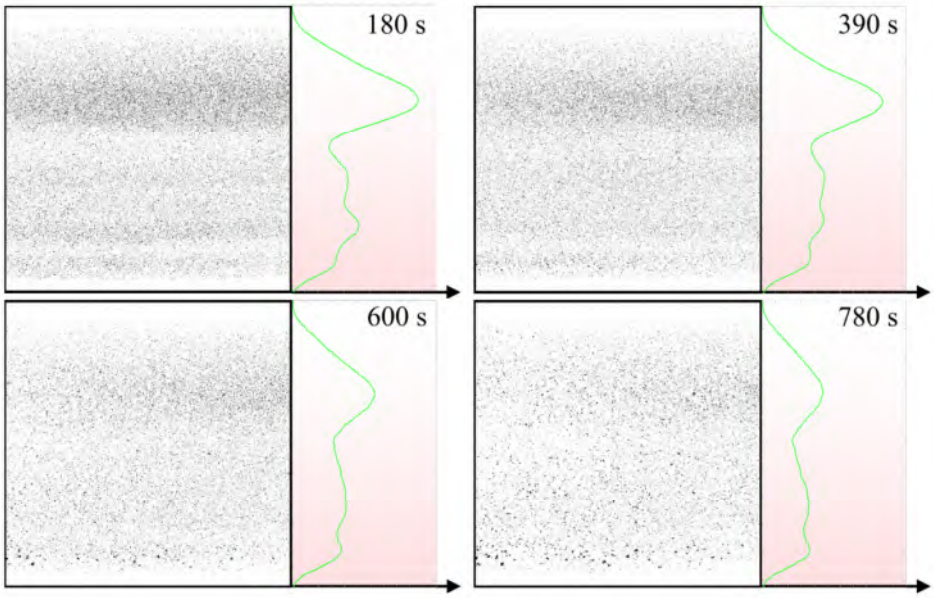


图 5-10 野生型菌株分布状态随时间变化情况

图 5-11 展示了具有不同 Tar 表达量的菌株在相同时间时的分布情况。可以发现，Tar 受体表达量越低，则细菌在 780 s 时在低浓度处的分布密度越高。这表明，当 Tar 受体的效应被削弱后，尽管 Tsr 受体发生了快速的适应，但由于缺乏 Tar 的正向趋化作用与之抗衡，细菌群体体仍旧表现出负向趋化效应，只是强度有所下降。以上结果进一步表明 Tsr 快速的适应过程并不足以单独逆转细菌的负向趋化效应，同时还需要 Tar 稳定且持续的拮抗作用，才能使群体水平上的运动表现出“适应”行为，而两种受体的相对表达量决定了发生适应后细菌对于特定浓度吲哚的趋化状态与强度。

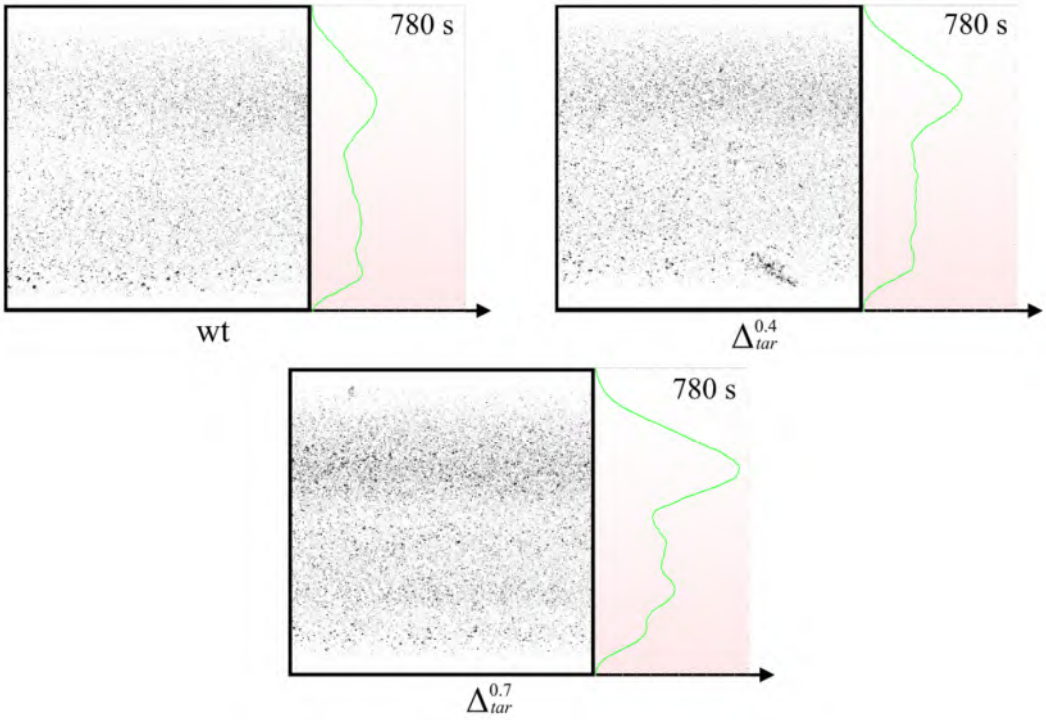


图 5-11 不同 Tar 受体表达量的菌株的分布状态

5.4 本章小结

本章分别使用 Transwell 迁移实验与微流控装置，对不同 Tar 受体表达量的 *E. coli* RP437 对于不同浓度吲哚的趋化性进行了表征与分析。

通过 Transwell 实验，初步观察到了 Tar/Tsr 受体表达相对含量对吲哚趋化性的影响。Tsr 对吲哚具有强烈的负向效应，在不发生适应的情况下该种负向效应超过 Tar 的正向效应，因此细菌整体表现出对吲哚的离避反应；发生适应后，Tsr 效应迅速下降，而 Tar 发生适应较为缓慢，因此细菌逐渐对

吲哚转变为正向趋化。当减少 Tar 表达量后，由于 Tar 对 Tsr 拮抗作用下降，因此细菌更难完成从负向趋化性向正向趋化性的转变。

本部分工作还完成了对微流控芯片的设计、优化与验证。利用 CFX 仿真，模拟了工作状态下芯片内的浓度场分布，并基于模拟结果对芯片流道结构进行优化，实现了工作区域内浓度场的均匀与稳定分布。同时利用显微成像对实际工作状态下浓度场分布进行了验证，其结果与设计预期及模拟结果基本一致，证明了该芯片设计与工作条件的合理性。

基于此芯片，该部分工作进一步研究了 Tar 受体表达量改变对细菌在浓度场内空间分布的影响。一方面，在时间尺度上，野生型细菌先集中于低浓度区域，而后逐渐平均化，体现了由于 Tsr 受体的快速适应而导致负向趋化效应随时间减弱甚至逆转；另一方面，Tar 表达量的降低削弱了负向趋化效应的衰减过程，表明 Tar 对负向趋化的拮抗作用对于群体运动层面的适应发生是不可或缺的。

6 结论与展望

6.1 结论

对细菌趋化性的研究是定量生物学与系统生物学领域的一个重要方向。目前对 *E.coli* 趋化性的描述已发展出了丰富的数学模型，其中随机游走模型具有预测准确、可解释性强的优点，但该模型目前主要局限于对一种受体分子的效应进行描述，而缺乏对两种具有拮抗作用的受体介导的双向趋化性的描述。本论文将 Tar-Tsr 受体表达量相对比例作为变量，从新的维度对趋化性的行为特点与影响因素进行分析；同时使用微流控技术，对双向趋化运动进行了空间维度与时间维度相结合的分析。

本论文中从数学模型模拟与实验观测两方面，对 *E. coli* 在吲哚诱导下的趋化反应进行了预测、验证与分析。具体研究内容如下：

（1）建立了信号转导动力学模型，对 Tar-Tsr 双受体作用下鞭毛的行为进行了分析。根据CW_{bias}对趋化运动的影响机制，分析了细菌双向趋化性中浓度“阈值”与“两极分化”行为的产生原因与影响因素，并对不同 Tar/Tsr 比例下的趋化响应与适应过程进行了描述；使用 Markov 随机游走模型对群体的趋化性表现进行模拟与统计，描述了群体尺度下的运动、分布特征与影响因素；

（2）使用 CRISPRi 技术构建了靶向 Tar 受体的可诱导基因敲低系统，并验证了不同诱导剂浓度下对 Tar 受体的敲低程度，并分别获得了 40%、70% Tar 敲低的菌株用于后续实验；

（3）设计与改进了用于进行细菌趋化性观测与分析的微流控芯片，并对其工作状态进行了仿真预测与实验验证。利用梯度生成模块，在观测流道内形成趋化剂浓度梯度，并通过对原始流道参数进行优化，提高了观测区域内浓度梯度的均匀性、稳定性。分别从模拟结果与实验观测出发，验证了芯片流道内的浓度分布与设计目标相符；

（4）通过改变 Tar 表达量，对大肠杆菌在吲哚诱导下的趋化行为进行了调控；利用 Transwell 细菌迁移实验与微流控成像技术，对不同 Tar-Tsr 受体表达量下 *E. coli* 在吲哚诱导下的趋化行为进行了观测，并对其特征进行了归纳与分析：

• 在野生型 *E. coli* 中，Tsr 受体的负向趋化效应占主导地位，细菌整体表现出对吲哚的强烈离避反应；

• 在高浓度吲哚下，Tsr 受体发生快速而剧烈的适应，其负向趋化效应快速降低，Tar 受体则发生相对缓慢的适应。因此随着适应的发生，细菌的负向趋化性将减弱并可以“逆转”为正向趋化性；

• 在适应过程中，Tar 受体是“逆转”负向趋化效应所不可或缺的，Tar 表达比例越低，“逆转”作用越弱。

6.2 展望

本论文工作中，尚存在需要进一步研究与完善之处，如微流控成像结果与模型预测结果未能完全吻合、模型参数与实验条件尚待优化；对 Tar 表达比例的调节尚为粗糙，且未实现对 Tsr 受体的诱导敲低；缺乏对单分子马达行为的直接观测等。因此本论文工作还可在以下方面进行进一步优化：

（1）寻找合适 Spacers 序列，分别实现对 Tar 与 Tsr 受体的 CRISPRi 敲低、CRISPRa 增强与 CRISPR 敲除，优化诱导调节，实现对两种受体表达量的更精细调控；

（2）借助栓菌实验与荧光蛋白鞭毛嵌入技术，从单分子马达的尺度观察趋化行为，并获得CW_{bias}的实际变化情况；

（3）使用群体与单分子水平的实验观测数据，对模型中参数进行修正，改善模型对实验现象的洽合程度；通过生化实验或动力学预测，对模型中尚未明确的酶活性相关常数进行确定；

（4）在完善模型的基础上，预测浓度“阈值”和受体表达量间的对应关系，并以此为指导设计并构建出具有特定浓度“阈值”或特定趋化行为的工程细菌；

（5）实现细菌在吲哚诱导下趋化性的调控可以为开发具有更强、可诱导定植能力的益生菌提供研究基础；同时细菌趋化性的研究还具有多方面的应用前景，可以将对趋化性行为特点的深入研究与应用结合起来，例如利用细菌的趋化性实现生物传感器、微生物运载系统或者智能药物释放系统等方面的应用，为生物医学和生物工程领域的发展做出贡献。

致 谢

首先对西安交通大学生命学院谭丹副教授表示诚挚的感谢。作为从科研训练、科研创新比赛，到 iGEM 竞赛，以及本次毕业论文的指导老师，谭丹老师作为我在大学本科期间科研学习实践的引路人，给予了我在实验资源、科研方法、专业知识等各方面的指导与支持，陪伴并见证了我在这四年来的成长。

同时，感谢卢晓云教授对我始终的教导、帮助与关心。每当我因挫折感到自卑、迷茫，在压力当前不知所措时，卢晓云老师总会以她丰富而深刻的智慧，帮助我重新认识自己、认识事物、认识世界与人生。她所教会我的，不仅仅只是科研本身，亦是做人处事。

感谢卢晓云教授课题组与谭丹副教授课题组中师兄师姐一直以来的陪伴；感谢赵季平师姐、张玉燕师姐、常越师姐、张琦师姐、尚森师姐、汪昆昆师兄、王丹颖师姐，以及课题组中与我一起进行实验工作的张安栋（生物 91）、高一航（化生 91）对我实验过程中提供的各种帮助与支持；感谢李佳宝（化生 71）学长在我初次接触科研与实验设计时的帮助。

感谢西安交通大学物理学院杨志伟副教授对我在分子动力学方面学习的鼓励与指导，帮助我建立起了一条连通宏观世界与微观世界的桥梁，让我对生命科学有了新的认识与观察方向，为我在科研中带来了更多的机遇与思考。

感谢父母自始至终对我最无私的付出与陪伴，这是我在面对任何困难，身处任何逆境下最坚实的后盾和支持。

此外，对以下同学、老师对我在毕业论文完成期间在以下方面提供的帮助表示感谢：

易啸 教授	中科院深圳先进技术研究院合成生物学研究所	RP437 菌株的提供；趋化性实验方法指导
董晟渤	西安交通大学统计 91	马尔可夫模型与随机过程
高王江	西安交通大学化工 91	流体仿真方法与软件使用
谢阳	西安交通大学自动化 002	图像处理分析；流体系统控制
王澄瑶 助理研究员	西安交通大学第一附属医院	微流控芯片设计
余佩隆	北京大学基础医学院 2020 级	R 语言编程与绘图

参考文献

[1] Imae Y., Oosawa K., Mizuno T., et al. Phenol - a Complex Chemoeffector in Bacterial Chemotaxis [J]. Journal of Bacteriology, 1987, 169(1): 371-379.

[2] Ramos H. C., Rumbo M., Sirard J. C. Bacterial flagellins: mediators of pathogenicity and host immune responses in mucosa [J]. Trends Microbiol, 2004, 12(11): 509-517.

[3] Aihara E., Closson C., Matthis A. L., et al. Motility and Chemotaxis Mediate the Preferential Colonization of Gastric Injury Sites by Helicobacter pylori [J]. Plos Pathog, 2014, 10(7): e1004275.

[4] Wadhams G. H., Armitage J. P. Making sense of it all: Bacterial chemotaxis [J]. Nat Rev Mol Cell Bio, 2004, 5(12): 1024-1037.

[5] Hoch J. A. Two-component and phosphorelay signal transduction [J]. Curr Opin Microbiol, 2000, 3(2): 165-170.

[6] C B. H. E. coli in Motion [M]. Springer Science & Business Media, 2008.

[7] Adler J. Chemotaxis in Bacteria [J]. Science, 1966, 153(3737): 708-&.

[8] Adler J. Chemotaxis in Bacteria [J]. Annu Rev Biochem, 1975, 44: 341-356.

[9] Macnab R. M. Examination of bacterial flagellation by dark-field microscopy [J]. J Clin Microbiol, 1976, 4(3): 258-265.

[10] Grebe T. W., Stock J. Bacterial chemotaxis: The five sensors of a bacterium [J]. Curr Biol, 1998, 8(5): R154-+.

[11] Zhulin I. B. The superfamily of chemotaxis transducers: From physiology to genomics and back [J]. Adv Microb Physiol, 2001, 45: 157-198.

[12] Ninfa E. G., Stock A., Mowbray S., et al. Reconstitution of the bacterial chemotaxis signal transduction system from purified components [J]. J Biol Chem, 1991, 266(15): 9764-9770.

[13] Bourret R. B., Borkovich K. A., Simon M. I. Signal transduction pathways involving protein phosphorylation in prokaryotes [J]. Annu Rev Biochem, 1991, 60: 401-441.

[14] Mcevoy M. M., Bren A., Eisenbach M., et al. Identification of the binding interfaces on CheY for two of its targets, the phosphatase CheZ and the flagellar switch protein fliM [J]. J Mol Biol, 1999, 289(5): 1423-1433.

[15] Djordjevic S., Stock A. M. Crystal structure of the chemotaxis receptor methyltransferase CheR suggests a conserved structural motif for binding S-adenosylmethionine [J]. Structure, 1997, 5(4): 545-558.

[16] Keller E. F., Segel L. A. Traveling bands of chemotactic bacteria: a theoretical analysis [J]. J Theor Biol, 1971, 30(2): 235-248.

[17] Jiang L., Ouyang Q., Tu Y. Quantitative modeling of Escherichia coli chemotactic motion in environments varying in space and time [J]. PLoS Comput Biol, 2010, 6(4): e1000735.

[18] Norris N., Alcolombri U., Keegstra J. M., et al. Bacterial chemotaxis to saccharides is governed by a trade-off between sensing and uptake [J]. Biophys J, 2022, 121(11): 2046-2059.

[19] Yang J., Chawla R., Rhee K. Y., et al. Biphasic chemotaxis of Escherichia coli to the microbiota metabolite indole [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2020, 117(11): 6114-6120.

[20] Jani S. Visualizing Chemoattraction of Planktonic Cells to a Biofilm [J]. Methods Mol Biol, 2018, 1729: 61-69.

[21] Zang Xiao-Qian L. Z.-Y., Zhang Xiao-Yan, Jiang Lei, Ren Nan-Qi, Sun Kai. Advance in Bacteria Chemotaxis on Microfluidic Devices [J]. Chinese Journal of Analytical Chemistry, 2017, 45(11): 1734-1744.

[22] Byungjin Lee H.-H. J., Kyoung-Ku Kang, Chang-Soo Lee, Sang-Ho Lee. Improvement of a diffusion-based microfluidic chemotaxis assay through stable formation of a chemical gradient [J]. Chemical Engineering Science, 2019, 202: 130-137.

[23] Englert D. L., Manson M. D., Jayaraman A. Investigation of bacterial chemotaxis in flow-based microfluidic devices [J]. Nat Protoc, 2010, 5(5): 864-872.

[24] Silverman M., Simon M. Flagellar rotation and the mechanism of bacterial motility [J]. Nature, 1974, 249(452): 73-74.

[25] Kuwajima G. Construction of a minimum-size functional flagellin of Escherichia coli [J]. J Bacteriol, 1988, 170(7): 3305-3309.

[26] Katie M. Ford R. C., Pushkar P. Lele. Biophysical Characterization of Flagellar Motor Functions [J]. J Vis Exp, 2017, 119: e55240.

[27] Parkinson J. S. Complementation Analysis and Deletion Mapping of Escherichia-Coli Mutants Defective in Chemotaxis [J]. Journal of Bacteriology, 1978, 135(1): 45-53.

[28] Bradley R. W. An easy-to-use CRISPRi plasmid tool for inducible knockdown in E. coli [J]. Biotechnology Reports, 2021, 32: e00680.

[29] Santalucia J., Hicks D. The thermodynamics of DNA structural motifs [J]. Annu Rev Bioph Biom, 2004, 33: 415-440.

[30] Engler C., Kandzia R., Marillonnet S. A One Pot, One Step, Precision Cloning Method with High Throughput Capability [J]. Plos One, 2008, 3(11): e3647.

[31] Ferrell J. E. Systems Biology of Cell Signaling: Recurring Themes and Quantitative Models [M]. CRC, 2021.

[32] Lehninger A. L., Nelson D. L., Cox M. M. Lehninger principles of biochemistry [M]. 6th ed. New York: W.H. Freeman, 2013.

[33] Anders C., Niewoehner O., Duerst A., et al. Structural basis of PAM-dependent target DNA recognition by the Cas9 endonuclease [J]. Nature, 2014, 513(7519): 569-+.

[34] Zuo Z. C., Liu J. Cas9-catalyzed DNA Cleavage Generates Staggered Ends: Evidence from Molecular Dynamics Simulations [J]. Sci Rep-Uk, 2016, 6: 37584.

[35] Nishimasu H., Ran F. A., Hsu P. D., et al. Crystal Structure of Cas9 in Complex with Guide RNA and Target DNA [J]. Cell, 2014, 156(5): 935-949.

[36] Qi L. S., Larson M. H., Gilbert L. A., et al. Repurposing CRISPR as an RNA-Guided Platform for Sequence-Specific Control of Gene Expression [J]. Cell, 2013, 152(5): 1173-1183.

[37] Bikard D., Jiang W. Y., Samai P., et al. Programmable repression and activation of bacterial gene expression using an engineered CRISPR-Cas system [J]. Nucleic Acids Res, 2013, 41(15): 7429-7437.

[38] Dominguez A. A., Lim W. A., Qi L. S. Beyond editing: repurposing CRISPR-Cas9 for precision genome regulation and interrogation [J]. Nat Rev Mol Cell Bio, 2016, 17(1): 5-15.

[39] Awasthi R., Manchanda S., Das P., et al. 9 - Poly(vinylpyrrolidone) [M]//PARAMBATH A. Engineering of Biomaterials for Drug Delivery Systems. Woodhead Publishing. 2018: 255-272.

[40] Jeon N. L., Baskaran H., Dertinger S. K. W., et al. Neutrophil chemotaxis in linear and complex gradients of interleukin-8 formed in a microfabricated device [J]. Nat Biotechnol, 2002, 20(8): 826-830.

[41] Ginestet C. ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis [J]. J Roy Stat Soc A, 2011, 174: 245-245.

附 录A 外文原文

Biphasic chemotaxis of *Escherichia coli* to the microbiota metabolite indole

Jingyun Yang[a,1], Ravi Chawla[a,1], Kathy Y. Rhee[a], Rachit Gupta[a], Michael D. Manson[b], Arul Jayaraman[a,c,2], and Pushkar P. Lele[a,2]

[a]Artie McFerrin Department of Chemical Engineering, Texas A&M University, College Station, TX 77843; [b]Department of Biology, Texas A&M University, College Station, TX 77843; and [c]Department of Molecular Pathogenesis and Immunology, Texas A&M Health Science Center, Bryan, TX 77807

Edited by John S. Parkinson, University of Utah, Salt Lake City, UT, and accepted by Editorial Board Member Thomas J. Silhavy January 22, 2020 (received for review October 1, 2019)

Bacterial chemotaxis to prominent microbiota metabolites such as indole is important in the formation of microbial communities in the gastrointestinal (GI) tract. However, the basis of chemotaxis to indole is poorly understood. Here, we exposed *Escherichia coli* to a range of indole concentrations and measured the dynamic responses of individual flagellar motors to determine the chemotaxis response. Below 1 mM indole, a repellent-only response was observed. At 1 mM indole and higher, a time-dependent inversion from a repellent to an attractant response was observed. The repellent and attractant responses were mediated by the Tsr and Tar chemoreceptors, respectively. Also, the flagellar motor itself mediated a repellent response independent of the receptors. Chemotaxis assays revealed that receptor-mediated adaptation to indole caused a bipartite response—wild-type cells were attracted to regions of high indole concentration if they had previously adapted to indole but were otherwise repelled. We propose that indole spatially segregates cells based on their state of adaptation to repel invaders while recruiting beneficial resident bacteria to growing microbial communities within the GI tract.

metabolite | flagella | switching | adaptation | chemoreceptors

Chemotaxis toward environmental cues regulates the formation of bacterial communities and attachment to host cells (1–4). The environmental cues in response to which motile bacteria migrate include nutrients such as amino acids and sugars, oxygen, pH, and temperature gradients (5–11). Bacteria also respond to neurotransmitters and hormones (12) and to metabolites that regulate bacterial physiology and shape the formation of microbial communities (13–15).

The binding of chemoeffector molecules to the chemoreceptors of *Escherichia coli* modulates the activity of the receptor-associated kinase CheA. *E. coli* carry five types of chemoreceptors: Tar, Tsr, Trg, Aer, and Tap, out of which Tar and Tsr are dominant. The activated CheA autophosphorylates using ATP and in turn phosphorylates the chemotaxis response regulator CheY. CheY-P binds to a switch in the flagellar motor to promote clockwise (CW) rotation in an otherwise counterclockwise (CCW)-rotating flagellum. Such motor reversals mediate alternating runs and tumbles, which enable the cell to steer its direction of swimming in response to a chemical gradient (16).

To continue migrating up a chemical gradient (positive chemotaxis) or down a chemical gradient (negative chemotaxis), cells must constantly reset the activity of CheA. This resetting, known as adaptation, involves the covalent modification of the receptors by two enzymes—CheR and CheB. When an attractant binds and CheA activity falls, the slow constitutive activity of a methyltransferase, CheR, leads to higher methylation of the receptor. Methylation increases the activity of CheA until it reaches prestimulus levels. The cells adapt and are ready to respond to higher concentrations of the attractant. When a repellent binds and CheA activity increases, a methylesterase, CheB, becomes phosphorylated. CheB-P rapidly demethylates the receptor to decrease the activity of CheA back to its prestimulus levels. Once again, the cell adapts and is ready to respond to higher concentrations of the repellent.

Among the important metabolites that control chemotactic behavior (17, 18), indole has received wide attention for its role in regulating a broad range of bacterial phenotypes in the gastrointestinal (GI) tract, including motility, stress responses, biofilm formation, antibiotic resistance, and virulence (15, 19–22). Indole is a product of tryptophan and is produced by several species that inhabit the GI tract, especially those belonging to the phyla *Bacteroidetes*, *Firmicutes*, *Proteobacteria*, and *Actinobacteria* (23). Indole promotes homeostasis in the microbial community of the GI tract by inhibiting virulence and colonization of host cells by several pathogens, including enterohemorrhagic *E. coli* (24, 25), *Salmonella enterica* (22, 26), and *Vibrio cholerae* (27). Indole also promotes phenotypes linked to virulence and colonization in other pathogens such as *Pseudomonas aeruginosa* and *Clostridium difficile* (23, 28, 29). These varying effects of indole probably depend on its concentrations, which can fluctuate over a wide range (0.2 to 6.5 mM) in the GI tract (30).

Previous reports suggest that indole induces a chemorepellent response in *S. enterica* and *E. coli* (17, 18) and that the response is mediated by the one of the two major chemoreceptors, Tsr (31–33). Yet, strains of *E. coli* lacking all major chemotaxis genes other than *cheY* also exhibit a repellent response to indole (34). Other

Significance

Chemotaxis to microbial metabolites in the GI tract plays a key role in regulating bacterial colonization and pathogenesis. Chemotaxis to indole, one of the prominent GI-tract metabolites, remains poorly understood. In this work, we describe how two major chemoreceptors, Tar and Tsr, mediate opposite responses to indole. The difference in the kinetics of these responses causes an inversion from a repellent to an attractant response over time. Cells migrated toward regions of high indole concentration only if they had previously adapted to indole. Otherwise, they were repelled. Thus, indole has the potential to segregate cells based on their state of adaptation. This bipartite response to indole may shape the development of microbial communities in the GI tract.

Author contributions: M.D.M., A.J., and P.P.L. designed research; J.Y., R.C., K.Y.R., and R.G. performed research; P.P.L. developed experimental setups; J.Y., R.C., and K.Y.R. contributed new reagents/analytic tools; J.Y., R.C., K.Y.R., and R.G. analyzed data; and J.Y., R.C., M.D.M., A.J., and P.P.L. wrote the paper.

The authors declare no competing interest.

This article is a PNAS Direct Submission. J.S.P. is a guest editor invited by the Editorial Board.

Published under the PNAS license.

[1]J.Y. and R.C. contributed equally to this work.

[2]To whom correspondence may be addressed. Email: arulj@tamu.edu or plele@tamu.edu.

This article contains supporting information online at https://www.pnas.org/lookup/suppl/doi:10.1073/pnas.1916974117/-/DCSupplemental.

First published March 2, 2020.

Downloaded from https://www.pnas.org by 111.20.225.132 on October 10, 2022 from IP address 111.20.225.132.

studies suggest that indole induces attractant responses instead (32, 35). Thus, the mechanisms underlying these diverse chemotaxis responses to indole remain poorly understood.

In this work, we explored the mechanisms underlying chemotaxis to indole and observed selective partitioning of *E. coli* on the basis of their memory of exposure to indole. Our results suggest that indole produced by microbial communities retains resident indole-responsive commensals while preventing invading indole-responsive bacteria from joining the community.

Results

Chemotaxis Response to a Low Concentration of Indole. We measured the chemotactic response of individual cells by tracking the motor CW_{bias}, namely the fraction of the time that it rotates CW, using tethered-cell assays. Perfusion chambers were employed to stimulate tethered cells with indole. An increase in CW_{bias} upon stimulation is indicative of a chemorepellent response, whereas a decrease in CW_{bias} is indicative of a chemoattractant response (36). A strong and reproducible CW repellent response was observed immediately after stimulating wild-type cells with 20 μM indole. The response precisely adapted to the original value within 30 to 50 s (Fig. 1*A*). When indole was replaced with motility buffer, it had the opposite effect; the CW_{bias} decreased initially and subsequently adapted to its prestimulus value (*SI Appendix*, Fig. S1).

Addition of 20 μM indole to isogenic mutant cells lacking the Tar receptor, which we refer to as Tsr-only because Tsr is their only high-abundance receptor, induced a similar but shorter CW repellent response of only ~25 s (Fig. 1*A*). Addition of 20 μM indole to isogenic mutant cells lacking the Tsr receptor, which we refer to as Tar-only, did not evoke either a detectable repellent or attractant response. This result demonstrates that Tsr mediates a repellent response to 20 μM indole and adapts rapidly, presumably through demethylation of Tsr by CheB-P.

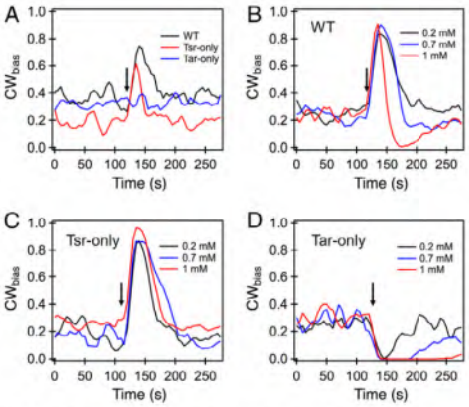


Fig. 1. (*A*) Averaged response of tethered cells to 20 μM indole. The arrow indicates the approximate time of exposure to indole. The wild type (black curve) and the *tar* knockout (red curve) both exhibited a brief increase in CW_{bias}, indicating a repellent response. The response precisely adapted such that the pre- and poststimulus CW_{bias} was similar. The *tsr* knockout showed no response to the stimulation. (*B*) The short-time CW repellent response of wild-type cells was evident over the entire range of concentrations tested, as indicated by the increase in CW_{bias} ~20 to 50 s following stimulation. At longer times (>50 s), an attractant response was evident when cells were treated with 1 mM indole. A similar inversion was observed upon treatment with 2 mM indole (*SI Appendix*, Fig. S1). (*C*) A strong repellent response was observed in the case of the Tsr-only mutant over the entire range of indole concentrations tested. The adaptation was precise in each case. (*D*) Attractant responses were observed in the Tar-only mutant over the 0.2 to 1 mM concentration range. The delay in adaptation to the response increased with indole concentration. All response curves represent an average over n = 1[illegible] to 21 cells. The average error was 0.01.

Chemotaxis Responses to Higher Concentrations of Indole. At higher concentrations of indole (200 to 700 μM), wild-type cells continued to exhibit a repellent response that adapted precisely. However, when the cells were treated with 1 mM indole, the repellent response inverted to an attractant response after about 50 s (Fig. 1*B*). A similar time-dependent inversion was observed at 2 mM indole (*SI Appendix*, Fig. S1*A*).

The Tsr-only strain exhibited CW repellent-only responses that adapted precisely to the prestimulus levels with 200 μM to 1 mM indole (Fig. 1*C*). Again, adaptation presumably occurs via CheB-P–mediated demethylation. The increase in the CW_{bias} was relatively insensitive to indole concentrations. The absence of an inverted response after addition of indole, even at 2 mM (*SI Appendix*, Fig. S1*B*), suggested that Tar mediates the delayed attractant response that was observed with the wild type. The Tar-only strain exhibited a strong CCW attractant response to 200 μM to 1 mM indole (Fig. 1*D*), and also to 2 mM indole (*SI Appendix*, Fig. S1*C*). The absence of the repellent response was consistent with the notion that Tsr mediates the initial repellent response that was observed in the wild type. Adaptation in the Tar-only mutant was slower and presumably occurs via CheR-mediated methylation. The adaptation occurred with increasing delays as the concentration of indole increased, likely because the deviation of CheA activity from its basal value increased with indole levels. This suggests that the attractant response does not saturate even at 1 mM indole.

Overall, the biphasic response of wild-type cells to higher concentrations of indole seems to occur due to the combination of a strong but rapidly adapting repellent response mediated by Tsr and a prolonged, slowly adapting attractant response mediated by Tar. The repellent response masks the attractant response until the cells have adapted via demethylation of Tsr.

Responses to the Removal of Indole. The replacement of indole with motility buffer (MB) had different effects on the wild-type, Tar-only, and Tsr-only cells. The wild type exhibited attractant-like CCW responses when indole at 20 or 200 μM was replaced with MB (*SI Appendix*, Fig. S1*A*). Removal of 700 μM or higher indole induced rapid repellent responses followed by extended attractant responses that did not adapt over 100 s.

The Tsr-only mutant generally exhibited extended attractant responses upon the removal of indole, with adaptation slow because it requires methylation of Tsr. The removal of 2 mM indole induced a biphasic response, with a brief repellent response followed by a strong attractant response that did not adapt over 100 s. We do not know the cause of this brief repellent response. However, it is unlikely to arise due to demethylation-mediated inversion in Tsr's repellent response to indole since no attractant response was ever observed in the Tsr-only strain when indole was added.

The Tar-only mutant exhibited repellent responses that adapted to baseline within 50 to 75 s, presumably via CheB-P–mediated demethylation, when ≥200 μM indole was removed. The Tar-only cells did not give a detectable response to the removal of 20 μM indole, just as they gave no detectable response to addition of 20 μM indole. All of these data are consistent with the notion that indole is sensed by Tsr as a repellent and by Tar as an attractant.

Indole Responses Are Not Mediated by Changes in Cytoplasmic pH. Previous work showed that Tar mediates an attractant response when the intracellular pH is decreased, whereas Tsr mediates a

MICROBIOLOGY

Downloaded from https://www.pnas.org by 111.20.225.132 on October 10, 2022 from IP address 111.20.225.132.

repellent response (37). As indole at high concentrations reportedly permeates the membrane and decreases the cytoplasmic pH (38, 39), we tested whether the biphasic response to indole occurs through the known pH-mediated signaling mechanism. To do this, we expressed a pH-sensitive fluorescent protein in the wild-type strain (*Materials and Methods*). Cells attached to a glass surface in a perfusion chamber were treated with a mix of 40 mM benzoate and buffer (at pH 6.0), following previous approaches (40, 41), and illuminated at an appropriate excitation wavelength. Benzoate in its protonated form permeates the membrane and equalizes the cytoplasmic and extracellular pH. A strong change in emission intensities was observed when pH 7.0 MB was exchanged with a buffer containing 40 mM benzoate at pH 6.0 (Fig. 2, *Left*). Yet, repeated cycles of exposure to 2 mM indole failed to elicit a measurable change in emission intensity (Fig. 2, *Right*). This result suggests that, even upon exposure to the highest indole concentration employed in this work, no change occurred in the cytoplasmic pH, at least within the detection limits of our experimental setup.

Response to Step Increments in Indole Concentrations. Because the repellent response adapted much more quickly than the attractant response (Fig. 1), we hypothesized that wild-type cells previously adapted to indole would exhibit an attractant-only response upon further stimulation. To test this hypothesis, we repeatedly stimulated the same population of wild-type tethered cells with increasing concentrations of indole (Fig. 3*A*). Each time the cells were stimulated with indole at ≤700 μM, an immediate repellent response that adapted precisely was observed. Once adapted to 700 μM indole, however, the cells exhibited attractant-only responses when exposed to higher concentrations of indole. The brief Tsr-mediated repellent response that was observed in nonadapted cells (Fig. 1*A*) was absent in these adapted cells.

Effect of Adaptation to a Threshold Concentration of Indole on Chemotaxis to Indole-Containing Surfaces. Because high indole levels (1 mM and above) induced an attractant response in cells that had previously adapted to the threshold level (~700 μM), we hypothesized that such adapted (primed) cells should respond to indole as an attractant and migrate toward indole-rich substrates. To test this idea, we employed an inverted transwell assay previously developed in our laboratory (42, 43), depicted in *SI Appendix*, Fig. S2. Agar pads presoaked in 2 mM indole were brought into contact with wild-type cells swimming in a 2-mL reservoir of MB. Agar contact with the reservoir fluid rapidly established an indole gradient in the reservoir. The cells in the reservoir that responded to the gradient either migrated away (negative chemotaxis) or toward (positive chemotaxis) the indole-rich agar pads. The number of cells attached to the poly-L-lysine–coated agar pads was quantitatively determined following 5 min of exposure (*Materials and Methods*). In the primed case, the 2-mL MB reservoir contained ~700 μM indole, and the cells were allowed to adapt to it for 30 min prior to being placed in contact with agar. In the unprimed case, the 2-mL MB reservoir contained no indole during the 30-min incubation. The basal attachment expected due to chance encounters of motile cells with the agar surface over 5 min was determined in separate measurements in which no indole was added to the agar or the reservoir. To rule out the possibility that the primed cells attached in greater numbers because of non–chemotaxis-related effects of indole, an additional gradient-less control was included in which primed cells were exposed to agar that contained the same concentration of indole (700 μM).

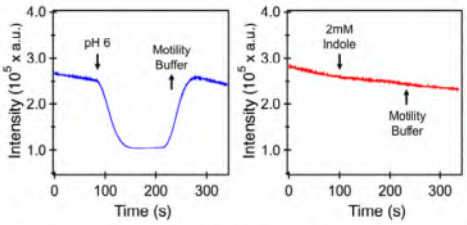


Fig. 2. (*Left*) Emission intensities of a pH-sensitive fluorophore that was expressed in the wild-type strain are indicated. The cells were initially exposed to a neutral buffer solution (MB, pH 7.0). At ~90 s, the buffer was exchanged with an acidic medium (MB, pH 6.0 plus 40 mM benzoate). The acidification of the intracellular environment reduced the emission intensities. The intensities were restored to the prestimulus values when the medium was replaced with MB (pH 7.0) at ~210 s. (*Right*) Cells were stimulated with 2 mM indole at ~90 s. No measurable change in the emission intensities was observed. Removal of indole also did not cause a significant change in intensities. Signals were obtained from ~100 to 200 cells. a.u., arbitrary units.

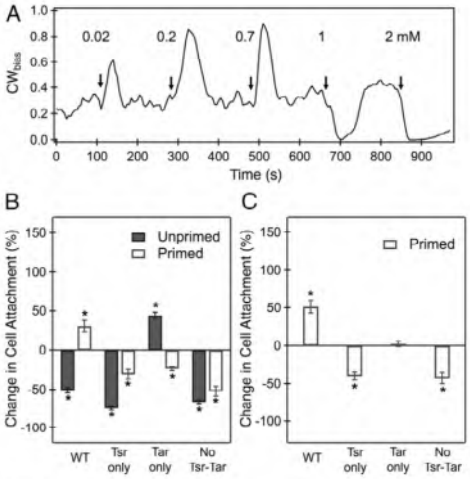


Fig. 3. (*A*) Wild-type cells were stimulated with step increments in the concentration of indole at the times indicated by the arrows. Upon adaptation to 0.7 mM indole, attractant-only responses were observed at higher stimulation levels. The average error was 0.07 (n = 11 motors). (*B* and *C*) The nature and magnitude of the chemotaxis response in the transwell-based chemotaxis assay are indicated for several strains. The ordinate in *B* reflects the percentage difference in cell attachment to the agar source containing 2 mM indole relative to the basal attachment. The basal attachment is determined from the number of unprimed cells adhered to agar pads that contain no indole (agar pads and reservoir contain MB only). The basal value depends on chance encounters and attachment of the cells with the polylysine-coated agar surface in the absence of chemical signals, and it has been normalized to 0 for each strain. Positive (negative) attachment values indicate positive (negative) chemotaxis. A +100% value indicates that recruitment to the agar surface is twice that seen through random chance. The ordinate in *C* reflects the percentage difference in the attachment of primed cells to the agar source containing 2 mM indole relative to the attachment of primed cells in the gradient-less control. The gradient-less control includes agar pads soaked in the same concentration of indole as the cell reservoir (700 μM). Two biological and three technical replicates were carried out for each condition. The mean attachment values were calculated over 4,000 to 10,000 cells. *P < 0.05.

Downloaded from https://www.pnas.org by 111.20.225.132 on October 10, 2022 from IP address 111.20.225.132.

As shown in Fig. 3*B*, primed wild-type cells that were exposed to agar pads containing 2 mM indole (positive gradient) attached in higher numbers relative to the basal value (in the absence of indole), indicating an attractant response. Primed wild-type cells exposed to a positive gradient of indole also attached in higher numbers relative to primed wild-type cells that were exposed to uniform indole concentrations (gradient-less control; Fig. 3*C*). This result confirmed that the increased attachment of the primed cells was due to positive chemotaxis (chemoattraction) toward the indole source. In contrast, the unprimed wild-type cells attached in lower numbers than the basal value, indicating a repellent response to indole. The raw data are shown in *SI Appendix*, Fig. S3.

The chemotaxis assays were repeated with mutants lacking Tsr, Tar, or both Tsr and Tar. With the Tsr-only mutant, unprimed as well as primed cells exhibited negative chemotaxis (repellent response), consistent with the results with tethered cells (Fig. 3*B*). As shown in Fig. 3*C*, the primed Tsr-only cells exhibited negative chemotaxis relative to the gradient-less control. In the Tar-only mutant, unprimed cells exhibited an attractant response (Fig. 3*B*), as in the tethered-cell assay. The primed cells appeared to exhibit a weak repellent response, but the result was not significant relative to the corresponding gradient-less control (Fig. 3*C*). A repellent response was clearly seen in the Δ*tar* Δ*tsr* double mutant, whether the cells were primed or unprimed (Fig. 3*B*). The response was significant even when compared with the gradient-less control (Fig. 3*C*). These repellent responses occurred despite the absence of either high-abundance receptor. As will become apparent later, we believe that a part of the repellent response arises from a receptor-independent mechanism rather than a response mediated by the low-abundance receptors Trg, Tap, and Aer.

Is There a Receptor-Independent Response to Indole? To determine the reason for the repellent response in the Δ*tsr* Δ*tar* strain, we stimulated tethered cells of the double mutant with indole. These cells exhibited a strong repellent response that showed little adaptation over 200 s (Fig. 4*A*). The small and slow adaptation suggested that kinase (CheA) activity itself was not perturbed significantly and that the majority of the observed repellent response might be receptor-independent.

The flagellar switch consists of the FliM and FliN complexes, to which CheY-P binds, and the FliG ring, which forms the track on which the stators act to rotate the motor (44). We hypothesized that indole permeates the membrane and interacts with the flagellar switch, either directly or indirectly, to promote CW rotation. To test the hypothesis, we generated a Δ*cheY* strain in which the motors are still capable of switching. Although motors usually rotate only CCW in a Δ*cheY* strain, they are able to switch in the presence of a few mutant $FliG_{CW}$ subunits in an otherwise wild-type FliG ring (45). These mutant subunits are locked in the CW conformation (46), and they destabilize the FliG ring to allow switching to occur through cooperative interactions when they are present in the right proportion relative to wild-type FliG subunits (45). Mixed FliG motors were generated by expressing the mutant subunits from an IPTG (isopropyl β-D-thiogalactoside)-inducible vector (induced with 5 μM IPTG), while the native FliG subunits were expressed from the genomic locus. The Δ*cheY* cells with mixed FliG motors rotated predominantly CCW, but when stimulated with 2 mM indole they exhibited a strong repellent response that did not adapt over 250 s (Fig. 4*B*). Tethered cells belonging to a Δ*cheY* strain that carried wild-type FliG subunits continued to rotate CCW only following the addition of 2 mM indole. Because the absence of CheY cuts all communication between the receptor patch and the flagellar motor, this observation is consistent with the hypothesis that part of the repellent response to high concentrations of indole is receptor-independent.

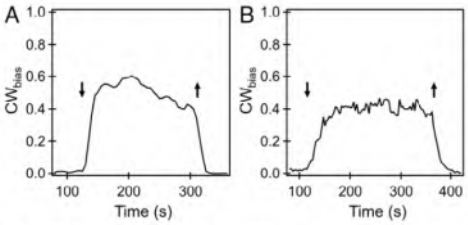


Fig. 4. (*A*) Averaged response of a Δ*tar* Δ*tsr* double mutant to 1 mM indole. The entry and exit of indole from the flow cell are indicated by the downward and upward arrows, respectively. A repellent-only response was observed with minimal adaptation. Response curves were averaged over $n = 22$ cells, and the mean error was 0.01. (*B*) The averaged CW_{bias} of the CheY-less $FliG^{CW}$-$FliG^{WT}$ motors that switch is indicated. Stimulation with 2 mM indole at ~110 s increased the CW_{bias}, and removal of indole restored the bias to prestimulus levels. The curve was averaged over $n = 9$ cells, and the average error in bias measurements was 0.05.

Discussion

Our experiments quantified the Tsr-mediated repellent response to indole. This is most easily observed in the Tsr-only strain (Fig. 1 *A* and *C*). Cells responded strongly to the addition of 20 μM indole (Fig. 1*A*), and the strength of the response did not increase significantly at concentrations above 200 μM (Fig. 1*C* and *SI Appendix*, Fig. S1*B*). The adaptation times, presumably controlled by CheB-P–mediated Tsr demethylation, were relatively short and similar over the range of indole concentrations tested (~30 to 50 s).

We also demonstrated that Tar mediates an attractant response to indole, but only at high concentrations. This is best seen in the Tar-only strain that exhibited strong attractant responses to indole at ≥200 μM or higher (Fig. 1*D*). The time required for adaptation, presumably influenced by the slow Tar methylation by CheR, increased with indole concentration. The CW_{bias} is very sensitive to CheY-P levels (47–49), and it drops to 0 even for small reductions in CheY-P levels. It takes longer for CheY-P levels, and consequently the CW_{bias}, to recover to the basal value when the reduction in CheY-P is more significant. Therefore, the increasing delays in adaptation in Fig. 1*D* suggest that higher indole levels cause greater reductions in CheY-P levels in the Tar-only strain. Based on this, we conclude that the attractant response to indole requires concentrations of at least 1 mM, and probably higher, to saturate. We also conclude that Tsr has a higher affinity for indole than Tar.

The response of wild-type cells to indole is a combination of the repellent response mediated by Tsr and the attractant response mediated by Tar. At 20 and 200 μM, the wild-type cells sense indole as a repellent through Tsr, and the response adapts quickly (Fig. 1*A*). At indole concentrations of ≥1 mM (Fig. 1*B*), the Tsr-mediated repellent response initially masks the Tar-mediated attractant response until the rapid receptor demethylation by CheB-P deactivates CheA adequately for the attractant response to be revealed. The attractant response then adapts slowly due to CheR-mediated methylation of the receptors. Thus, the binding affinities of Tsr and Tar for indole and the asymmetric kinetics of methylation and demethylation play a key role in the biphasic wild-type response.

Tsr-mediated repellent and Tar-mediated attractant responses are known to occur when the cytoplasmic pH decreases. However, experiments with a pH-sensitive fluorescent protein revealed that even at the highest concentration tested (2 mM), indole did not produce a measurable change in cytoplasmic pH (Fig. 2). Thus, sensing of changes in cytoplasmic pH in our study

MICROBIOLOGY

Downloaded from https://www.pnas.org by 111.20.225.132 on October 10, 2022 from IP address 111.20.225.132.

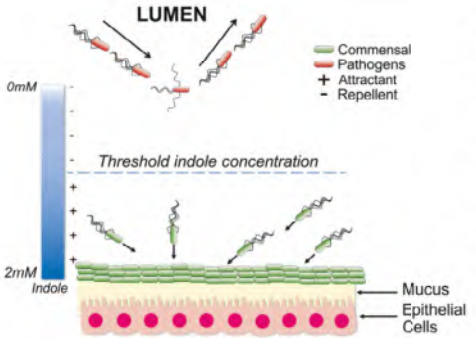


Fig. 5. Distributional sorting by indole in the GI tract. The indole levels near the mucosal layers are shown as being above the threshold concentration. Primed cells will be attracted to the source, leading to retention of commensal bacteria in existing microbial communities. Away from the source, indole concentrations are shown as being lower than the threshold. Low indole concentrations prevent cells from becoming primed, inducing a repellent response. Unprimed cells will be induced to migrate toward the lumen.

is not involved in the receptor responses to indole. The following two questions remain: How does indole interact with the two receptors, and do the indole-binding sites localize to the same region of the proteins in Tsr and Tar? A previous study reported that *E. coli* cells devoid of periplasm continued to exhibit repellent responses to indole, which suggests that the soluble periplasmic protein is not involved, at least in repellent sensing by Tsr (50). However, the interpretation is not straightforward, due to the observed motor-mediated effects (Fig. 4*B*). Another confounding factor is that the strength of the allosteric coupling interactions within the signaling complex arrays in the wild type are unlikely to be preserved in the Tsr-only or Tar-only strains, where one or the other major receptor is lacking (51). Thus, the wild-type response may not be a simple summation of the Tsr-only and Tar-only responses. The mechanisms of indole sensing are the subjects of ongoing investigations.

An important consequence of the rapid adaptation of the repellent response at intermediate indole concentrations and the slow dynamics of the attractant response is that cells preadapted to a threshold concentration of indole exhibit an attractant-only response at higher concentrations. Tethered wild-type cells previously adapted to ~700 μM indole sense it as an attractant at 1 mM and higher concentrations; the brief repellent responses seen at these concentrations in nonadapted cells (Fig. 1*B*) are not seen in adapted cells (Fig. 3*A*). Cells previously adapted to 200 μM or lower concentrations of indole continue to sense it as a repellent. These data suggest that a threshold indole concentration of ~700 μM bifurcates the cell response depending on its recent exposure to the molecule.

The above argument also suggests that wild-type swimming cells adapted to the threshold indole level (~700 μM) will be attracted to sources of higher indole concentrations, whereas those not adapted to ~700 μM indole will be repelled from those sources. This was confirmed by our in vitro attachment assay (Fig. 3 *B* and *C*). Wild-type cells not previously exposed to the threshold level (unprimed cells) actively avoided agar plugs soaked in 2 mM indole. However, cells adapted to the threshold level (primed cells) were attracted to those agar plugs. This attraction depended on the presence of the Tar receptor, as primed and unprimed Tsr-only cells actively avoided the plugs. The unprimed Tsr-only cells avoided the plugs more than the primed Tsr-only cells, presumably because they had a larger proportion of indole-free, nonadapted Tsr receptors. The unprimed Tar-only cells were attracted to the indole-soaked agar plugs, but the primed Tar-only cells were not. In the case of the strains lacking both Tar and Tsr, the primed as well as the unprimed cells avoided the indole-soaked agar plugs, and tethered cells of this strain exhibited strong, nonadapting repellent responses to indole (Fig. 4*A*).

To determine if the repellent response seen in the Δ*tar* Δ*tsr* double mutants was independent of input from chemoreceptors, we measured the responses of tethered cells belonging to a strain that lacked the chemotaxis response regulator CheY and carried a mix of wild-type and CW-locked FliG subunits in its C ring (46, 52). Motors in strains lacking CheY rotate CCW only because the large free energy difference between the CW and CCW conformations of the flagellar switch makes it unlikely that the motor will rotate CW, even for a short time (53). Motors containing both types of FliG subunits exist in a metastable state that can switch, as the CW-locked FliG subunits lower the energy difference between the two rotational states (45). We hypothesized that indole acts on the motor, directly or indirectly, to further reduce the difference in free energy between the two conformations of the switch, thereby increasing the CW_{bias} in a receptor-independent manner. Indeed, upon addition of 2 mM indole to such cells, a strong and nonadapting repellent response was observed (Fig. 4*B*). It is unclear whether indole interacts directly with the switch complex or through another molecule. However, this finding suggests that

Table 1. Bacterial strains and plasmids used in this study

	Relevant genotype	Source
Strains		
PL15	HCB33 (RP437), sticky *fliC* allele	(63)
PL221	PL15 Δ*tsr* (Δnt 16–1644) Δ*tar* (Δnt 16–1638)	This work
PL225	PL15 Δ*tsr* (Δnt 16–1644)	This work
PL278	PL15 Δ*tar* (Δnt 16–1638)	This work
PL14	PL4 (Δ*cheY, sticky fliC*) with *pTrc99A-fliG*^{CW}	(45)
CV1	*thr-1*(Am) *leuB6 his-4 metF159*(Am) *rpsL136* [*thi-1 ara-14 lacY1 mtl-1 xyl-5 eda tonA31 tsx-78*] with pCM18	(30)
CV4	CV1 Δ*tar*	(64)
CV5	CV1 Δ*tsr thr*$^+$	(64)
CV11	Δ*tar* Δ*tsr*	M.D.M. laboratory
Plasmids		
pPL1	*pTrc99A-fliG*^{CW}	(35)
pCM18	pTRKL2-PCP25RBSII-gfpmut3*-T0–T1	(65)

Downloaded from https://www.pnas.org by 111.20.225.132 on October 10, 2022 from IP address 111.20.225.132.

indole may act as a chemorepellent even to flagellated bacteria that lack a specific chemoreceptor for sensing it.

The *E. coli* Tsr and Tar receptors mediate opposite responses to several types of signals, including temperature, pH, leucine, and certain neurotransmitters (9, 11, 12, 30, 45, 54, 55). In the cases of temperature and pH, the result is to bring cells to optimal environments of neutral pH and physiological temperatures. It is intriguing that the different responses to indole may have exactly the opposite effect, partitioning cells into "extreme" environments. Cells that have adapted to the threshold level (~700 μM) will be attracted to still higher concentrations of the metabolite. In unadapted cells, such as those encountering an indole gradient for the first time, the repellent response will cause cells to swim away from indole-rich regions.

A direct consequence of the above mechanism is that bacteria that produce indole have a higher likelihood of adapting to it, and therefore will be attracted to indole-rich microbial communities. These niches are likely to be those inhabited by other indole-producing bacteria as well. As bacterial species that lack the tryptophanase-encoding *tnaA* gene do not produce indole, their receptors are unlikely to have adapted to the molecule, and therefore will likely be repelled by indole-rich regions. Bacteria lacking a specific chemoreceptor for indole may also be repelled through a receptor-independent repellent response.

The interplay of repellent and attractant responses to indole may help guide the development of microbial niches in regions such as the GI tract. Indole-producing commensal microbes thrive in proximity to the mucosal interface in the GI tract; the concentrations of indole at these sites of production are expected to be much higher than the threshold level, considering that the diluted bulk concentrations in fecal samples can be as high as 6.5 mM (56). Commensal bacteria adapted to the threshold indole level will likely be retained in existing microbial communities because of attractant chemotaxis—although the precise number of motile species in the gut is unknown, several members of the phyla *Firmicutes* and *Proteobacteria* produce flagella (57). Away from the mucosal interface and toward the lumen of the GI tract, where indole levels are lower than the threshold (25), motile bacteria will be repelled by negative chemotaxis (Fig. 5). Thus, foreign ingested bacteria, including invading pathogens such as *E. coli* O157:H7 and *S. enterica*, are likely to be prevented by indole from gaining a foothold in the mucosa.

It is likely that the GI-tract microbial communities complement the natural defense mechanisms of the host. They might do so by tuning the production of indole and exploiting the biphasic chemotaxis response to retain resident commensal bacteria and to prevent colonization by invading motile pathogens. If the receptor-independent repellent response is a general property of flagellar motors across bacterial species, motile bacteria lacking indole-specific chemoreceptors may also be discouraged from colonizing the intestinal mucosa. However, there exists a spatially varying mix of different microbial and host metabolite signals within the GI tract, some of which are potent chemoattractants (15, 58). The integrated chemotaxis response to a combination of different GI-tract signals may ultimately determine the efficacy of this defense strategy. Combinatorial studies on integrated signaling and chemotaxis response to a combination of metabolites and metabolic derivatives are needed to provide further insights.

Materials and Methods

Strains and Plasmids. All strains were derivatives of *E. coli* RP437 (59) and are listed in Table 1. The two-step λ-red-mediated homologous recombination technique (60) was used to generate scarless, in-frame deletions. The deletions were confirmed via sequencing.

Cell Culture. Overnight cultures were grown at 33 °C in tryptone broth (TB) followed by 1:100 dilution in 25 mL fresh TB for day cultures. The cultures were allowed to grow at 33 °C to an OD_{600} of 0.5. Antibiotics (100 μg/mL erythromycin and 25 μg/mL chloramphenicol) were added to the cultures where appropriate. Arabinose was added to the day cultures in the range of 0.001 to 0.1% (wt/vol) and IPTG was added to a concentration of 100 μM, where appropriate.

Tethered-Cell Assays. The day cultures were harvested by pelleting cells by centrifugation (1,500 × *g*, 5 min). Cells were washed 2× in motility buffer (10 mM potassium phosphate buffer, 67 mM NaCl, 0.1 mM EDTA, 1 μM methionine, 10 mM sodium lactate, pH 7.0). The final pellet was resuspended in 1 mL MB. Cells were then sheared to truncate flagellar filaments to stubs following previous approaches, and subsequently tethered to coverslips in perfusion chambers with the aid of sticky FliC filaments (61, 62). Cell rotation was recorded on a Nikon microscope (Optiphot 2) with a 20× phase objective at 60 fps and a digital camera (UI-3240LE-M-GL; IDS Imaging Development Systems). Videos of the rotation of the tethered cells were analyzed with custom-written codes in MATLAB (63). The rotation speeds were determined from Gaussian fits to the speed distributions. The CW_{bias} (fraction of the time that the motor rotates CW) was determined as a function of time by employing a moving filter that averaged over 1.5 cell rotations, as done previously (47).

A three-directional valve (Hamilton) was employed to exchange the fluid in the perfusion chambers with MB or MB containing indole. The flow rate (260 μL/min) was controlled by a syringe pump (Fusion 200; Chemyx). Separate calibration experiments were performed with a colored fluid to estimate the average time of entry of chemoeffectors into the perfusion chamber after the initiation of flow.

pH Measurements. A plasmid encoding a pH-sensitive green fluorescent protein (GFP-mut3*) was introduced into the wild-type RP437 strain. The expression level of GFP was controlled with IPTG (100 μM). An LED illumination source (SOLA SE II 365 light engine; Lumencor) and a standard Nikon GFP cube were employed to excite the fluorophores and to filter the emission. One hundred to 200 cells were excited in the field of view with a 60× water-immersion objective (Nikon Instruments). The emission was collected by a sensitive photomultiplier (H7421-40 SEL; Hamamatsu) after passing through a band-pass emission filter (FF01-542/27; AVR Optics). Custom-written LabVIEW codes were employed to record the photon count over time. For calibration purposes, the emission from the cells was measured for 100 s in MB. Then, the medium was exchanged for one containing 40 mM benzoate/MB at pH 6.

During measurements of the effect of indole on internal pH, the emission from the cells was measured for the first 100 s in MB. Then, MB was replaced with MB containing 2 mM indole while continuing the intensity measurements. The cells were allowed to equilibrate for 3 min before switching back to MB.

In Vitro Chemotaxis and Attachment Assay. A thin agar layer was poured into individual transwell inserts (Nunc cell-culture inserts) and then soaked overnight in motility buffer or in motility buffer containing 2 mM indole. The agar surface was coated with poly-L-lysine to facilitate stable attachment of the cells. The inserts were then carefully transferred to individual wells in a 24-well plate (Carrier Plate Systems; Thermo Fisher Scientific; 141002) carrying a suspension of GFP-expressing *E. coli* (*SI Appendix*, Fig. S2). Cells that respond to time-varying chemical gradients established in these reservoirs either migrate toward and attach to the agar pads or are repelled (42, 43). In the primed case, the cell suspension contained 700 μM indole. In the unprimed case, the cell suspension contained no indole. After 5 min, the inserts were carefully removed, gently washed with MB to remove unstuck cells, and then imaged via confocal microscopy. Custom-written MATLAB codes were then employed to count the number of cells adhered to the surface.

Statistical Analysis. All statistical analyses were performed with the Student's *t* test. Results with $P < 0.05$ were considered statistically significant.

Data Availability. All data discussed in this paper are available in the main text and *SI Appendix*.

ACKNOWLEDGMENTS. We thank Victor Sourjik for discussions. P.P.L. acknowledges support from the National Institute of General Medical Sciences United States (R01-GM123085) and the US Department of Defense Army Research Development and Engineering Command Army Research Laboratory (W911NF1810353). Partial support from the Nesbitt Chair endowment to A.J. is also acknowledged.

MICROBIOLOGY

Downloaded from https://www.pnas.org by 111.20.225.132 on October 10, 2022 from IP address 111.20.225.132.

1. I. Chet, R. Mitchell, Ecological aspects of microbial chemotactic behavior. *Annu. Rev. Microbiol.* **30**, 221–239 (1976).
2. J. J. Falke, R. B. Bass, S. L. Butler, S. A. Chervitz, M. A. Danielson, The two-component signaling pathway of bacterial chemotaxis: A molecular view of signal transduction by receptors, kinases, and adaptation enzymes. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **13**, 457–512 (1997).
3. G. H. Wadhams, J. P. Armitage, Making sense of it all: Bacterial chemotaxis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **5**, 1024–1037 (2004).
4. M. A. Matilla, T. Krell, The effect of bacterial chemotaxis on host infection and pathogenicity. *FEMS Microbiol. Rev.* **42**, fux052 (2018).
5. J. Adler, B. Templeton, The effect of environmental conditions on the motility of *Escherichia coli*. *J. Gen. Microbiol.* **46**, 175–184 (1967).
6. R. Mesibov, J. Adler, Chemotaxis toward amino acids in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **112**, 315–326 (1972).
7. J. Shioi, C. V. Dang, B. L. Taylor, Oxygen as attractant and repellent in bacterial chemotaxis. *J. Bacteriol.* **169**, 3116–3123 (1987).
8. M. Kihara, R. M. Macnab, Cytoplasmic pH mediates pH taxis and weak-acid repellent taxis of bacteria. *J. Bacteriol.* **145**, 1209–1221 (1981).
9. Y. Yang, V. Sourjik, Opposite responses by different chemoreceptors set a tunable preference point in *Escherichia coli* pH taxis. *Mol. Microbiol.* **86**, 1482–1489 (2012).
10. K. Maeda, Y. Imae, J.-I. Shioi, F. Oosawa, Effect of temperature on motility and chemotaxis of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **127**, 1039–1046 (1976).
11. A. Paulick *et al.*, Mechanism of bidirectional thermotaxis in *Escherichia coli*. *eLife* **6**, e26607 (2017).
12. J. G. Lopes, V. Sourjik, Chemotaxis of *Escherichia coli* to major hormones and polyamines present in human gut. *ISME J.* **12**, 2736–2747 (2018).
13. K. M. Keeney, B. B. Finlay, Enteric pathogen exploitation of the microbiota-generated nutrient environment of the gut. *Curr. Opin. Microbiol.* **14**, 92–98 (2011).
14. K. Makki, E. C. Deehan, J. Walter, F. Bäckhed, The impact of dietary fiber on gut microbiota in host health and disease. *Cell Host Microbe* **23**, 705–715 (2018).
15. T. Bansal *et al.*, Differential effects of epinephrine, norepinephrine, and indole on *Escherichia coli* O157:H7 chemotaxis, colonization, and gene expression. *Infect. Immun.* **75**, 4597–4607 (2007).
16. S. H. Larsen, R. W. Reader, E. N. Kort, W. W. Tso, J. Adler, Change in direction of flagellar rotation is the basis of the chemotactic response in *Escherichia coli*. *Nature* **249**, 74–77 (1974).
17. N. Tsang, R. Macnab, D. E. Koshland, Jr, Common mechanism for repellents and attractants in bacterial chemotaxis. *Science* **181**, 60–63 (1973).
18. W. W. Tso, J. Adler, Negative chemotaxis in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **118**, 560–576 (1974).
19. J. Domka, J. Lee, T. K. Wood, YliH (BssR) and YceP (BssS) regulate *Escherichia coli* K-12 biofilm formation by influencing cell signaling. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**, 2449–2459 (2006).
20. J. Lee, T. Bansal, A. Jayaraman, W. E. Bentley, T. K. Wood, Enterohemorrhagic *Escherichia coli* biofilms are inhibited by 7-hydroxyindole and stimulated by isatin. *Appl. Environ. Microbiol.* **73**, 4100–4109 (2007).
21. J. Lee, C. Attila, S. L. Cirillo, J. D. Cirillo, T. K. Wood, Indole and 7-hydroxyindole diminish *Pseudomonas aeruginosa* virulence. *Microb. Biotechnol.* **2**, 75–90 (2009).
22. E. Nikaido *et al.*, Effects of indole on drug resistance and virulence of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium revealed by genome-wide analyses. *Gut Pathog.* **4**, 5 (2012).
23. J. H. Lee, J. Lee, Indole as an intercellular signal in microbial communities. *FEMS Microbiol. Rev.* **34**, 426–444 (2010).
24. G. V. Sridharan *et al.*, Prediction and quantification of bioactive microbiota metabolites in the mouse gut. *Nat. Commun.* **5**, 5492 (2014).
25. A. Kumar, V. Sperandio, Indole signaling at the host-microbiota-pathogen interface. *MBio* **10**, e01031-19 (2019).
26. N. Kohli *et al.*, The microbiota metabolite indole inhibits *Salmonella* virulence: Involvement of the PhoPQ two-component system. *PLoS One* **13**, e0190613 (2018).
27. M. F. Howard, X. R. Bina, J. E. Bina, Indole inhibits ToxR regulon expression in *Vibrio cholerae*. *Infect. Immun.* **87**, e00776-18 (2019).
28. S.-K. Kim, H.-Y. Park, J.-H. Lee, Anthranilate deteriorates the structure of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms and antagonizes the biofilm-enhancing indole effect. *Appl. Environ. Microbiol.* **81**, 2328–2338 (2015).
29. C. Derkoh, K. Plants-Paris, D. Bishoff, H. L. DuPont, *Clostridium difficile* modulates the gut microbiota by inducing the production of indole, an interkingdom signaling and antimicrobial molecule. *mSystems* **4**, e00246-18 (2019).
30. H. Mao, P. S. Cremer, M. D. Manson, A sensitive, versatile microfluidic assay for bacterial chemotaxis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **100**, 5449–5454 (2003).
31. M. S. Springer, M. F. Goy, J. Adler, Sensory transduction in *Escherichia coli*: Two complementary pathways of information processing that involve methylated proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **74**, 3312–3316 (1977).
32. M. A. Muskavitch, E. N. Kort, M. S. Springer, W. F. Goy, J. Adler, Attraction by repellents: An error in sensory information processing by bacterial mutants. *Science* **201**, 63–65 (1978).
33. J. S. Parkinson, P. T. Revello, Sensory adaptation mutants of *E. coli*. *Cell* **15**, 1221–1230 (1978).
34. M. Montrone, D. Oesterhelt, W. Marwan, Phosphorylation-independent bacterial chemoresponses correlate with changes in the cytoplasmic level of fumarate. *J. Bacteriol.* **178**, 6882–6887 (1996).
35. R. W. Reader, W.-W. Tso, M. S. Springer, M. F. Goy, J. Adler, Pleiotropic aspartate taxis and serine taxis mutants of *Escherichia coli*. *J. Gen. Microbiol.* **111**, 363–374 (1979).
36. I. E. Segall, S. M. Block, H. C. Berg, Temporal comparisons in bacterial chemotaxis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **83**, 8987–8991 (1986).
37. A. Krikos, M. P. Conley, A. Boyd, H. C. Berg, M. I. Simon, Chimeric chemosensory transducers of *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **82**, 1326–1330 (1985).
38. C. Chimerel, C. M. Field, S. Piñero-Fernandez, U. F. Keyser, D. K. Summers, Indole prevents *Escherichia coli* cell division by modulating membrane potential. *Biochim. Biophys. Acta* **1818**, 1590–1594 (2012).
39. A. Zarkan *et al.*, Indole pulse signalling regulates the cytoplasmic pH of *E. coli* in a memory-like manner. *Sci. Rep.* **9**, 3868 (2019).
40. I. C. Wilks, J. L. Slonczewski, pH of the cytoplasm and periplasm of *Escherichia coli*: Rapid measurement by green fluorescent protein fluorimetry. *J. Bacteriol.* **189**, 5601–5607 (2007).
41. K. A. Martinez, II *et al.*, Cytoplasmic pH response to acid stress in individual cells of *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis* observed by fluorescence ratio imaging microscopy. *Appl. Environ. Microbiol.* **78**, 3706–3714 (2012).
42. S. Jani, A. L. Seely, G. L. Peabody V, A. Jayaraman, M. D. Manson, Chemotaxis to self-generated AI-2 promotes biofilm formation in *Escherichia coli*. *Microbiology* **163**, 1778–1790 (2017).
43. S. Jani, "Visualizing chemoattraction of planktonic cells to a biofilm" in *Bacterial Chemosensing*, M. Manson, Ed. (Methods in Molecular Biology, Humana Press, New York, NY, 2018), vol. 1729, pp. 61–69.
44. H. C. Berg, The rotary motor of bacterial flagella. *Annu. Rev. Biochem.* **72**, 19–54 (2003).
45. P. P. Lele, H. C. Berg, Switching of bacterial flagellar motors [corrected] triggered by mutant FliG. *Biophys. J.* **108**, 1273–1280 (2015).
46. T. Minamino *et al.*, Structural insight into the rotational switching mechanism of the bacterial flagellar motor. *PLoS Biol.* **9**, e1000616 (2011).
47. P. P. Lele, A. Shrivastava, T. Roland, H. C. Berg, Response thresholds in bacterial chemotaxis. *Sci. Adv.* **1**, e1500289 (2015).
48. P. Cluzel, M. Surette, S. Leibler, An ultrasensitive bacterial motor revealed by monitoring signaling proteins in single cells. *Science* **287**, 1652–1655 (2000).
49. J. Yuan, R. W. Branch, B. G. Hosu, H. C. Berg, Adaptation at the output of the chemotaxis signalling pathway. *Nature* **484**, 233–236 (2012).
50. M. Eisenbach, C. Constentinou, H. Aloni, M. Shinitzky, Repellants for *Escherichia coli* operate neither by changing membrane fluidity nor by being sensed by periplasmic receptors during chemotaxis. *J. Bacteriol.* **172**, 5218–5224 (1990).
51. R. Z. Lai *et al.*, Cooperative signaling among bacterial chemoreceptors. *Biochemistry* **44**, 14298–14307 (2005).
52. F. Togashi, S. Yamaguchi, M. Kihara, S. I. Aizawa, R. M. Macnab, An extreme clockwise switch bias mutation in *fliG* of *Salmonella typhimurium* and its suppression by slow motile mutations in *motA* and *motB*. *J. Bacteriol.* **178**, 2994–3003 (1997).
53. S. Khan, R. M. Macnab, Proton chemical potential, proton electrical potential and bacterial motility. *J. Mol. Biol.* **138**, 599–614 (1980).
54. S. Khan, J. L. Spudich, J. A. McCray, D. R. Trentham, Chemotactic signal integration in bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **92**, 9757–9761 (1995).
55. S. Khan, D. R. Trentham, Biphasic excitation by leucine in *Escherichia coli* chemotaxis. *J. Bacteriol.* **186**, 588–592 (2004).
56. C. Derkoh, C. Chappell, C. Gonzales, P. Olchuyser, A rapid and specific method for the detection of indole in complex biological samples. *Appl. Environ. Microbiol.* **81**, 8093–8097 (2015).
57. C. Lozupone *et al.*, Identifying genomic and metabolic features that can underlie early successional and opportunistic lifestyles of human gut symbionts. *Genome Res.* **22**, 1974–1984 (2012).
58. C. G. Moreira *et al.*, Bacterial adrenergic sensors regulate virulence of enteric pathogens in the gut. *MBio* **7**, e00826-16 (2016).
59. J. S. Parkinson, S. E. Houts, Isolation and behavior of *Escherichia coli* deletion mutants lacking chemotaxis functions. *J. Bacteriol.* **151**, 106–113 (1982).
60. K. A. Datsenko, B. L. Wanner, One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **97**, 6640–6645 (2000).
61. B. E. Scharf, K. A. Fahrner, L. Turner, H. C. Berg, Control of direction of flagellar rotation in bacterial chemotaxis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **95**, 201–206 (1998).
62. K. M. Ford, R. Chawla, P. P. Lele, Biophysical characterization of flagellar motor functions. *J. Vis. Exp.* (119), e55240 (2017).
63. P. P. Lele, R. W. Branch, V. S. Nathan, H. C. Berg, Mechanism for adaptive remodeling of the bacterial flagellar switch. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **109**, 20018–20022 (2012).
64. M. Hegde *et al.*, Chemotaxis to the quorum-sensing signal AI-2 requires the Tsr chemoreceptor and the periplasmic LsrB AI-2-binding protein. *J. Bacteriol.* **193**, 768–773 (2011).
65. M. C. Hansen, R. J. Palmer, Jr, C. Udsen, D. C. White, S. Molin, Assessment of GFP fluorescence in cells of *Streptococcus gordonii* under conditions of low pH and low oxygen concentration. *Microbiology* **147**, 1383–1391 (2001).

Downloaded from https://www.pnas.org by 111.20.225.132 on October 10, 2022 from IP address 111.20.225.132.

附　录B 外文译文

大肠杆菌（*Escherichia coli*）在菌群代谢物吲哚诱导下的双相趋化性

意义

在消化道中，由微生物群落代谢物所诱导的趋化作用在调节细菌定植能力与致病性中发挥了重要作用。吲哚是一种重要的消化道代谢物，但其趋化作用尚不明确。在本研究中，我们描述了两种主要的化学受体 Tar 和 Tsr 如何介导对吲哚的相反反应。随着时间的推移，这些反应的动力学差异导致了运动从排斥（负趋向）到吸引（正趋向）的转变。只有当细胞已经适应了吲哚时，它们才会向高吲哚浓度的区域迁移，否则，他们远离该区域。因此，吲哚具有根据细胞适应状态分离细胞的潜力。这种对吲哚的两方面反应可能塑造了胃肠道微生物群落的形成过程。

摘要

细菌对一些重要的微生物代谢产物（如吲哚）的趋化作用在胃肠道微生物群落的形成中非常重要（1-4）。然而，其对于吲哚趋化性的基础尚不清楚。本研究中，我们将大肠杆菌暴露于一定浓度的吲哚中，并测量单个鞭毛马达的动态响应，以衡量细菌的趋化性。当吲哚浓度低于 1 mM 时，只观察到了“排斥”，即负趋向效应。当吲哚浓度等于或高于 1 mM 时，观察到从“排斥”到“吸引”（正趋向）反应随时间发生逆转。“排斥”和“吸引”效应分别由 Tsr 和 Tar 化学受体介导。此外，鞭毛运动本身也介导了一种独立于受体的“排斥”反应。趋化性分析显示，受体介导的对吲哚的适应引起了一种双相反应——野生型细胞如果此前已经适应了吲哚，则会被吸引到高吲哚浓度的区域，否则就会被排斥。我们提出，吲哚可以根据细胞的适应状态在空间上分离细胞，以抵御入侵微生物，同时招募有益的细菌定植到胃肠道的微生物群落中。

细菌对环境中特定因子的趋化作用可以调节群落的形成和对宿主细胞的附着。影响细菌运动的环境因子包括营养素（如氨基酸和糖）、氧、pH 值和温度梯度（5-11）。此外，细菌还对神经递质和激素（12）以及调节细菌生理过程和形成微生物群落的代谢物（13-15）有响应。

大肠杆菌的趋化效应分子与趋化受体结合后可以调节受体相关激酶 CheA 的活性。大肠杆菌携带 5 种趋化受体:Tar， Tsr， Trg， Aer 和 Tap，其中 Tar 和 Tsr 占主导地位。激活的 CheA 使用 ATP 进行自磷酸化，并磷酸化下游趋化调节蛋白 CheY。CheY-

P 与鞭毛马达中的开关结合，促进鞭毛逆时针（CCW）旋转；反之则进行顺时针（CW）旋转。这样的运动逆转引起了交替的前行和翻滚，使细胞能够根据化学梯度控制游动的方向（16）。

为了持续向化学梯度正向（正向趋化性）或化学梯度负向（负向趋化性）进行迁移，细胞必须不断重置 CheA 的活性。这种重置被称为适应，涉及到两种酶——CheR 和 CheB 对受体的共价修饰。当正向趋化剂结合，但 CheA 活性下降时，甲基转移酶（CheR）的缓慢本底活性会导致受体的更高甲基化。甲基化增加 CheA 的活性，直到它达到刺激前水平，细胞适应并准备对高浓度的趋化作出反应。当负向趋化剂结合，CheA 活性增加时，甲基酯酶 CheB 就会被磷酸化。CheB-P 使受体迅速去甲基化，使 CheA 的活性降低到刺激前水平。细胞再一次适应并准备对高浓度的负向趋化剂做出反应。

在控制趋化行为的重要代谢物中（17，18），吲哚因能够对胃肠道（GI）中众多细菌表型具有调节作用而受到广泛关注，包括运动性、应激反应、生物膜形成、抗生素耐药性和毒性（15，19 - 22）。吲哚是色氨酸代谢的产物，由定居在胃肠道的几种物种产生，特别是部分属于拟杆菌门、厚壁菌门、变形菌门和放线菌门的物种（23）。吲哚通过抑制多种病原体（包括肠出血性大肠杆菌（24，25）、肠道沙门氏菌（22，26）和霍乱弧菌（27））对宿主细胞的毒力和定植过程，促进胃肠道微生物群落的内稳态。吲哚还促进与其他病原体（如铜绿假单胞菌和艰难梭菌）的毒性和定植有关的表型（23，28，29）。吲哚的这些不同作用效果可能取决于其浓度，且其在胃肠道中可在很大范围内波动（0.2 至 6.5 mM）（30）。

先前的报道表明，吲哚诱导肠道沙门氏菌和大肠杆菌产生负向趋化反应（17，18），该反应是由两种主要化学受体之一 Tsr 介导的（31-33）。然而，缺乏除 CheY 外的所有主要趋化基因的大肠杆菌菌株也对吲哚表现出负向趋化反应（34）。其他研究表明，吲哚反而诱导了正向趋化反应（32，35）。因此，吲哚的这些不同趋化反应背后的机制仍然知之甚少。

在本文中，我们探索了吲哚诱导趋化的潜在机制，并观察了大肠杆菌在接触吲哚后产生的记忆性基础上发生的选择性的运动分区。我们的结果表明，对于能够响应吲哚的细菌而言，微生物群落产生的吲哚可以保留已形成定居群落的细菌，同时阻止新入侵细菌加入群落。

结果

对低浓度吲哚的趋化反应

利用栓菌法，通过监测鞭毛马达顺时针旋转（CW）的比例（CWbias），我们测量出了单个细胞的趋化反应。在灌注室中，使用吲哚刺激被栓定的细胞，刺激后 CWbias 的增加表明了负向趋化反应，而减少则表明了正向趋化反应（36）。用 20 μM 吲哚刺激

野生型细胞后，其立即产生强烈的、可重复的负向趋化反应，且在 30 至 50 s 内精确地恢复到初始值(图 1A)。用运动缓冲液代替吲哚后则产生反效果：CWbias 最初下降，随后逐渐适应并恢复至原始值（附录，图 S1）。

将 20 μM 吲哚添加到缺少 Tar 受体的突变细胞（我们称之为 Tsr-only，因为 Tsr 是唯一的高丰度受体）中，可诱导类似但较短的 CW 负向趋化反应，仅为约 25 s(图 1A)。将 20 μM 吲哚添加到缺乏 Tsr 受体的同基因型突变细胞（我们称之为 Tar-only）中，既没有引起可检测到的负向趋化反应，也没有引起可检测到的正向趋化反应。这一结果表明，Tsr 对 20 μM 吲哚产生负向趋化反应并迅速适应，着可能是通过 CheB-P 对 Tsr 的去甲基化实现的。

图 1 拴系细胞对 20 μM 吲哚的平均响应。箭头表示暴露于吲哚的大致时间。野生型（黑色曲线）和仅含 Tar（红色曲线）均表现出短暂的 CWbias 增加，表明有负向趋化反应。这种反应具有精确的适应性，刺激前后的 CWbias 是一致的。仅含 Tsr 菌株对刺激无反应。(B) 在整个测试浓度范围内，野生型细胞的短时间 CW 负向趋化反应是明显的，正如刺激后 CWbias 在 20～50 s 的增加所表明的那样。在较长的时间内（50 s），当用 1 mM 吲哚处理细胞时，正向反应是明显的。在用 2 mM 吲哚处理时也观察到类似的逆转 （SI 附录，图 S1）。(C) 在测试的整个吲哚浓度范围内，仅在仅含 Tsr 的菌株中观察到强烈的负向趋化反应。每种情况下的都能精确适应到原先水平。(D) 在 0.2～1 mM 浓度范围内，仅在仅含 Tar 的菌株中观察到正向反应。随着吲哚浓度的增加，对反应的适应延迟增加。所有响应曲线代表 n = 11 到 21 个细胞的平均值。平均误差为 0.01。

对高浓度吲哚的趋化性反应

在更高浓度的吲哚（200～700 μM）下，野生型细胞继续表现出精确适应的负向趋化反应。然而，当细胞被 1 mM 吲哚处理时，大约 50 s 后，负向转变为正向趋化反应（图 1B）。在 2 mM 吲哚下，观察到类似的时间依赖性反转（附录，图 S1A）。

仅含有 Tsr 的菌株只表现出负向趋化，并能在 200 μM 至 1 mM 吲哚水平下精确适应到初始值。同样，适应可能是通过 CheB-P 介导的去甲基化发生的。CWbias 的增加对吲哚浓度相对不敏感。添加吲哚后，即使在 2 mM 浓度也没有出现负向反应（附录，图 S1B），表明 Tar 介导了野生型中观察到的延迟正向反应。仅含有 Tar 的菌株对 200 μM 到 1 mM 吲哚表现出强烈的 CCW 正向反应（图 1D），对 2 mM 吲哚也表现出强烈的 CCW 正向反应（附录，图 S1C）。负向反应的缺失与在野生型中观察到的 Tsr 介导起始负向反应的概念一致。Tar-only 突变体的适应较慢，可能是通过 CheR 介导的甲基化发生的。随着吲哚浓度的增加，适应性发生的时间越来越晚，这可能是因为随着吲哚浓度的增加，CheA 活性偏离其基础值的幅度越来越大。这表明正向趋化反应即使在 1 mM 吲哚也尚未达到饱和。总的来说，野生型细胞对高浓度吲哚的双相反应似乎是由

于 Tsr 介导的强而快速适应的负向反应和 Tar 介导的长而缓慢适应的正向反应的结合。负向反应掩盖了正向反应，直到细胞通过 Tsr 的去甲基化完成适应。

对去除吲哚的反应

用运动缓冲液（MB）替代吲哚对野生型、仅含 Tar 型和仅含 Tsr 型细胞有不同的影响。当 20 或 200 μM 的吲哚被 MB 取代时，野生型表现出类似正趋化剂的 CCW 反应（SI 附录，图 S1A）。去除 700 μM 或更高的吲哚后，迅速产生负向趋化反应，随后是在超过 100 s 后都不发生适应的正向趋化反应。

只有 Tsr 的突变体在去除吲哚后通常表现出延长的正向反应，由于需要 Tsr 的甲基化，适应较慢。去除 2 mM 吲哚诱导双相反应，先是短暂的负向反应，然后是是在超过 100 s 后都不发生适应的强烈正向反应。我们不知道这种短暂的负向反应的原因。然而，它不太可能由于去甲基化介导的 Tsr 对吲哚的负向反应反转而产生，因为在添加吲哚时，在仅含有 Tsr 菌株中从未观察到正向反应。

当去除≥ 200 μM 的吲哚时，仅含有 Tar 的突变体表现出负向反应，并在 50 ~ 75 s 内适应基线，可能是通过 CheB-P 介导的去甲基化。仅含 Tar 的细胞对去除 20 μM 吲哚没有可检测到的反应，就像它们对添加 20 μM 吲哚没有可检测到的反应一样。所有这些数据都与吲哚对于 Tsr 是负向趋化剂而对于 Tar 是正向剂的概念一致。

对吲哚的反应不是由细胞质 pH 值的变化介导的

先前的研究表明，当细胞内 pH 值降低时，Tar 介导了一种正向趋化反应，而 Tsr 介导了一种负向趋化反应（37）。据报道，高浓度的吲哚渗透细胞膜并降低细胞质 pH 值（38，39），我们测试了吲哚的双相反应是否通过已知的 pH 介导的信号机制发生。为此，我们在野生型菌株中表达了一种 pH 敏感荧光蛋白（见材料和方法）。细胞附着在灌注室的玻璃表面上，按照已报道的方法（40，41），用 40 mM 苯甲酸酯和缓冲液（pH 值为 6.0）的混合物处理，并在适当的激发波长下进行照射。苯甲酸酯以质子化的形式渗透细胞膜，使细胞质和细胞外 pH 平衡。当 pH 7.0 的 MB 与 pH 6.0 含有 40 mM 苯甲酸酯的缓冲液交换时，可以观察到发射强度的强烈变化（图 2，左）。然而，反复暴露于 2 mM 吲哚中未能引起可测量的发射强度变化（图 2，右）。这一结果表明，即使暴露于本工作中使用的最高浓度的吲哚，细胞质 pH 值也没有发生变化，至少在我们的实验设置的检测范围内。

对吲哚浓度梯度增量的响应

因为负向趋化反应比正向趋化反应的适应速度要快得多（图 1），我们假设先前适应吲哚的野生型细胞在进一步刺激后会表现出只对正向趋化剂的反应。为了验证这一假设，我们用不断增加的吲哚浓度反复刺激相同的野生型被拴定细胞（图 3A）。每次用≤700 μM 的吲哚刺激细胞时，都能立即观察到与之相适应的负向反应。然而，一旦适应了 700 μM 的吲哚，当暴露于更高浓度的吲哚时，细胞表现出仅正向反应。在非适应细胞中观察到的短暂 Tsr 介导的负向反应（图 1A）在这些适应细胞中则没有观察到。

吲哚阈值浓度的适应对在含吲哚表面上趋化性的影响

由于高的吲哚水平（1 mM 及以上）在已经适应阈值水平（~700 μM）的细胞中诱导了正向反应，我们假设这种适应的（启动的）细胞应该对吲哚作为正向趋化剂做出反应，并迁移到富含吲哚的基质上。为了验证这一想法，我们采用了我们实验室之前开发的倒置 transwell 分析方法（42，43），见 SI 附录，图 S2。将浸泡在 2 mM 吲哚中的琼脂垫与游动在 2 ml MB 储液池中的野生型细胞接触。琼脂与储液池流体接触后，在储液池中迅速建立了吲哚梯度。对梯度有反应的细胞要么远离（负趋化性），要么向（正趋化性）富含吲哚的琼脂垫迁移。暴露 5 分钟后定量测定附着在聚 L-赖氨酸包被琼脂垫上的细胞数量（见材料和方法）。在接触后，2 ml MB 的储存库含有约 700 μM 的吲哚，细胞在与琼脂接触前让其适应 30 分钟。在接触的情况下，在 30 分钟的孵育过程中，2 ml MB 储液不含吲哚。在不向琼脂或储液器中添加吲哚的情况下，通过单独的测量确定了由于运动细胞与琼脂表面偶然接触超分钟而预期的基底附着。为了排除由于吲哚的非趋化相关效应导致细胞大量附着的可能性，我们加入了一个额外的无梯度对照，将适应后细胞暴露于含有相同浓度吲哚（700 μM）的琼脂中。

如图 3B 所示，暴露在含有 2 mM 吲哚（正梯度）的琼脂垫中的适应后野生型细胞，其附着数量高于基础值（在没有吲哚的情况下），表明有正向趋化反应。暴露于吲哚正梯度的适应后野生型细胞，其附着数量也高于暴露于均匀吲哚浓度的适应后野生型细胞（无梯度对照；图 3C）。这一结果证实了细胞的附着增加是由于对吲哚源的正向趋化）。相比之下，未适应的野生型细胞附着的数量低于基础值，表明对吲哚有排斥反应。原始数据见附录，图 S3。

在缺乏 Tsr、Tar 或 Tsr 与 Tar 均缺乏的突变体中重复趋化试验。对于仅含 Tsr 突变体，未预适应和预适应细胞均表现出负向的趋化性，这与栓系细胞的结果一致（图 3B）。如图 3C 所示，相对于无梯度对照，预适应的仅含 Tsr 细胞表现出负的趋化性。在只有 Tar 的突变体中，未适应的细胞表现出正向反应（图 3B），与拴系细胞试验一样。预适应细胞表现出微弱的负向反应，但与相应的无梯度对照相比，结果并不显著（图 3C）。在 Δtar Δtsr 双突变体中，无论细胞是否预适应，都能显著地观察都负向反应（图 3B）。即使与无梯度对照相比，该反应也很显著（图 3C）。尽管没有高丰度受体，这些负向反应还是发生了。之后将会说明，我们认为负向趋化反应的一部分来自于不依赖受体的机制，而不是由低丰度受体 Trg、Tap 和 Aer 介导的反应。

图 2 （左）显示了在野生型菌株中表达的 pH 敏感荧光团的发射强度。细胞最初暴露于中性缓冲溶液（MB， pH 7.0）。在~90 s 时，缓冲液与酸性介质（MB， pH 6.0 + 40 mM 苯甲酸盐）交换。胞内环境的酸化降低了辐射强度。约 210 秒后，用 MB （pH 7.0）替代培养基，强度恢复到刺激前值。（右） 细胞在约 90 秒后用 2 mM 吲哚刺激。没有观察到发射强度的可测量变化。除去吲哚也没有引起强度的显著变化。从~100~200 个细胞中获得信号。a.u 为任意单位。

图 3 野生型细胞按箭头所示时间用吲哚浓度逐级递增刺激。在适应 0.7 mM 吲哚后，在更高的刺激水平下观察到仅正向的反应。平均误差为 0.07 （n = 11 个马达）。（B 和 C） 在基于 transwell 的趋化性试验中，几种菌株的趋化性反应的性质和大小被指出。B 中的纵坐标反映了含有 2 mM 吲哚的琼脂源相对于无趋化剂时本底附着的细胞附着的百分比差异。本底附着由粘附在不含吲哚的琼脂垫上的未预适应细胞数量决定（琼脂垫和培养基仅含有 MB）。本底值取决于细胞在没有化学信号的情况下与聚赖氨酸包裹的琼脂表面的偶遇和附着情况，每个菌株的本底值都归一化为 0。正（负）附着值表明正向（负向）趋化性。+100%表示琼脂表面的附着量是随机情况下的两倍。C 中的纵坐标反映了在含有 2 mM 吲哚的琼脂源上，相对于无梯度对照中，引物细胞附着的百分比差异。无梯度对照包括在与培养基相同浓度的吲哚中浸泡的琼脂垫（700 μM）。每种条件分别进行 2 组生物学重复和 3 组技术重复。在 4000 到 10000 个细胞中计算平均附着值。*代表 P 小于 0.05.

是否存在不依赖受体的对吲哚的趋化反应？

为了确定 ΔTsr ΔTar 株产生负向反应的原因，我们用吲哚刺激双突变株的栓系细胞。这些细胞表现出强烈的负向反应，在 200 秒内几乎没有适应（图 4A）。这种小而慢的适应表明，激酶（CheA）活性本身并没有受到显著的干扰，而且观察到的大多数负向反应可能是不依赖于受体的。

鞭毛开关由 CheY-P 结合的 FliM 与 FliN 复合物和 FliG 环组成，FliG 环形成轨道，定子在其上作用以旋转马达（44）。我们假设吲哚可渗透细胞膜，并与鞭毛开关直接或间接相互作用，以促进 CW 旋转。为了验证这个假设，我们构造了一个 ΔCheY 突变，其中马达仍然能够切换方向。虽然马达在 ΔCheY 株通常只 CCW 旋转，但在野生型 FliG 环中含有少量突变体 FliGCW 亚基时仍能够改变方向（45）。这些突变亚基被锁定在 CW 构象中（46），当它们以相对于野生型 FliG 亚基的适当比例出现时，它们使 FliG 环不稳定，从而允许通过协同作用发生转换（45）。通过 IPTG（异丙基 β- D -巯基半乳糖苷）诱导载体（5 μM IPTG 诱导）表达突变亚基生成混合 FliG 马达，而此时基因组表达生成野生型亚基。含有混合 FliG 马达的 ΔCheY 细胞主要以 CCW 旋转，但当受到 2 mM 吲哚刺激时，它们表现出强烈的负向反应，且在 250 s 内不发生适应（图 4B）。仅在添加 2 mM 吲哚后，带有野生型 FliG 亚基的 ΔCheY 菌株的栓系细胞才持续以 CCW 旋转。由于 CheY 的缺失切断了受体和鞭毛运动之间的所有通信，这一观察结果与对高浓度吲哚的部分排斥反应不依赖受体的假设相一致。

图 4 Δtar Δtsr 双突变体对 1 mM 吲哚的平均响应。吲哚从灌注池的流入口和流出分别由向下和向上的箭头表示。观察到了仅发生极小适应的仅负向趋化反应。对 n = 22 个细胞的响应曲线进行平均，平均误差为 0.01。（B）表示切换中无 CheY 的 FliGCW-FliGWT 电机的平均 CWbias。在约 110 秒的时间内使用 2 mM 吲哚刺激可增加 CWbias，

去除吲哚可使 CWbias 恢复到刺激前水平。曲线在 n = 9 个细胞上取平均值，测量的平均误差为 0.05。

讨论

我们的实验量化了 Tsr 介导的对吲哚的负向趋化反应。这在仅含有 Tsr 菌株中最容易观察到（图 1A 和 C）。细胞对添加 20 μM 吲哚有强烈反应（图 1A），而在浓度超过 200 μM 时，反应强度没有显著增加（图 1C 和附录，图 S1B）。适应时间可能由 CheB-P 介导的 Tsr 去甲基化控制，在测试的吲哚浓度范围内（~ 30 ~ 50 s）相对较短且表现相似。

我们还证明了 Tar 介导对吲哚的正向趋化反应，但只有在高浓度才发生。这在仅含 Tar 的菌株中表现得最好，该菌株对≥200 μM 或更高的吲哚表现出强烈的正向趋化反应（图 1D）。适应所需的时间，可能是受 CheR 对 Tar 的缓慢甲基化的影响，随着吲哚浓度的增加而增加。CWbias 对 CheY-P 水平非常敏感（47-49），即使 CheY-P 水平轻微下降，CWbias 也会下降到 0。当 CheY-P 的减少更显著时，CheY-P 水平和 CWbias 需要更长的时间才能恢复到基础值。因此，图 1D 中逐渐增加的适应延迟表明，较高的吲哚水平导致仅 Tar 菌株中 CheY-P 水平的降低。基于此，我们得出结论，吲哚的正向趋化反应需要至少 1 mM 的浓度，甚至可能更高，才能达到饱和。我们还得出结论，Tsr 对吲哚的亲和力高于 Tar。

野生型细胞对吲哚的反应是 Tsr 介导的负向趋化反应和 Tar 介导的正向趋化反应的结合。在 20 和 200 μM 时，野生型细胞通过 Tsr 感知吲哚作为负向趋化剂，并迅速适应（图 1A）。在吲哚浓度≥1 mM 时（图 1B），Tsr 介导的负向趋化反应掩盖了 Tar 介导的引诱反应，直到 CheB-P 的使受体的快速去甲基化使 CheA 充分失去活性，正向趋化反应才显露出来。随后，由于 CheR 介导的受体甲基化，正向趋化反应缓慢适应。因此，Tsr 和 Tar 对吲哚的结合亲和力以及甲基化和去甲基化的不对称动力学在野生型菌株双相趋化反应中起着关键作用。

Tsr 介导的负向趋化反应和 Tar 介导的正向趋化反应在细胞质 pH 值降低时发生。然而，pH 敏感荧光蛋白的实验表明，即使在测试的最高浓度（2 mM）下，吲哚也不会产生可测量的细胞质 pH 值变化（图 2）。因此，在我们的研究中，吲哚的受体反应不涉及对细胞质 pH 值的感知。以下两个问题仍然存在:吲哚是如何与两个受体相互作用的？ 吲哚结合位点是否定位于 Tsr 和 Tar 中蛋白质的同一区域？之前的一项研究报道，缺乏周质的大肠杆菌细胞对吲哚持续表现出负向趋化反应，这表明可溶性的周质蛋白不参与此过程，至少在 Tsr 的负向趋化感应中如此（50）。然而，根据观察到的运动介导效应，此解释并不能直接阐明此效应（图 4B）。另一个尚不明晰的地方是野生型信号复合体中的变构耦合相互作用强度不太可能在仅含 Tsr 或仅含 Tar 的菌株中保留，因为其中一个或另一个主要受体缺失（51）。因此，野生型响应可能不是仅发生 Tsr 响应和仅发生 Tar 响应的简单总和。吲哚的传感机制仍是尚处于研究之中的课题。

中等吲哚浓度下负向趋化反应的快速适应和正向趋化反应的缓慢变化所导致的一个重要结果是，预先适应阈值吲哚浓度的细胞在较高浓度下只表现出正向趋化反应。先前适应于约 700 μM 吲哚的拴系野生型细胞在 1 mM 及更高浓度时将其视为正向趋化剂；在此浓度下，在非适应细胞（图 1B）中所见的短暂负向趋化反应在适应细胞（图 3A）中是不存在的。预适应 200 μM 或更低浓度吲哚的细胞持续将其作为负向趋化剂。这些数据表明，阈值为 700 μM 的吲哚浓度会使细胞反应发生反转，这取决于细胞最近暴露在何种浓度的分子中。

上述论证还表明，适应了阈值吲哚水平（~ 700 μM）的野生型运动细胞将被更高浓度的吲哚源所吸引，而那些不适应~ 700 μM 吲哚的细胞将远离。我们的体外附着试验证实了这一点（图 3B 和 C）。之前未暴露于阈值水平的野生型细胞（未预适应细胞）主动远离浸泡在 2mm 吲哚中的琼脂。然而，适应阈值水平的细胞（预适应细胞）被这些琼脂吸引，且依赖于 Tar 受体的存在，因为不论是否预适应，仅含有 Tsr 的细胞都会主动远离。未预适应的仅含 Tsr 细胞比预适应细胞表现出更强的负向反应，可能是因为它们有更大比例的无吲哚结合、非适应性 Tsr 受体。未预适应的仅含 Tar 细胞被吲哚浸泡的琼脂栓所吸引，而预适应细胞则不被吸引。在同时缺乏 Tar 和 Tsr 的菌株中，不论预适应与否的细胞都远离了吲哚浸泡后的琼脂栓，该菌株的栓系细胞对吲哚表现出强烈的、非适应性的负向趋化反应（图 4A）。

为了确定在 Δtar Δtsr 双突变体中看到的负向趋化反应是否不依赖于受体的信号，我们测量了缺乏趋化性反应调节蛋白 CheY，且在 C 环中混合携带野生型亚基和仅能发生 CW 的突变 FliG 亚基的栓系细胞的反应（46，52）。由于 CCW 与 CW 构象间大的自由能差异，缺乏 CheY 的菌株中马达仅能进行 CCW 旋转，这也使得即使在很短时间内马达也难以发生 CW 旋转 （53）。包含两种类型 FliG 亚基的马达处于一个可以切换旋转状态的亚稳态中，因为仅允许 CW 的突变 FliG 亚基降低了两种旋转状态之间的能量差（45）。我们假设，吲哚直接或间接作用于马达，以进一步减少两种构象之间的自由能差，从而以一种与不依赖于受体的方式增加 CWbias。事实上，在这些细胞中加入 2 mM 吲哚后，观察到强烈的非适应性负向趋化反应（图 4B）。目前尚不清楚吲哚是直接与转换复合物相互作用还是通过另一分子相互作用。然而，这一发现表明，对于缺乏趋化受体的鞭毛菌吲哚仍可能作为一种负向趋化剂来影响其运动。

大肠杆菌 Tsr 和 Tar 受体介导对多种类型信号的相反反应，包括温度、pH 值、亮氨酸和某些神经递质（9，11，12，30，45，54，55）。在考虑温度和 pH 值的情况下，其结果是将细胞带到中性 pH 值和生理温度的最佳环境中。有趣的是，对吲哚的不同反应可能会产生相反的效果，将细胞划分到更为“极端”环境中。已经适应阈值水平（~ 700 μM）的细胞将被更高浓度的代谢物所吸引。在未适应的细胞中，例如那些第一次接触吲哚梯度的细胞，负向趋化反应将导致细胞远离富含吲哚的区域。

图 5 胃肠道中菌群的分布收到吲哚的选择性影响。粘膜层附近的吲哚水平显著高于阈值浓度。预适应细胞将被吸引到此，导致共生细菌保留在现有的微生物群落中。在远离吲哚源的地方，吲哚浓度显著低于阈值。低吲哚浓度阻止细胞发生适应，诱导负向趋化反应。未适应的细胞将被诱导向肠腔内迁移。

上述机制的一个直接后果是，自身产生吲哚的细菌更有可能适应它，因此会被富含吲哚的微生物群落所吸引。这些生态位很可能也居住着其他产生吲哚的细菌。由于缺乏色氨酸酶编码基因 tnaA 的细菌不产生吲哚，它们的受体不太可能已经适应这种分子，因此很可能会被富含吲哚的区域排斥。缺乏吲哚特异性化学受体的细菌也可能通过不依赖于受体的负向趋化反应被排斥。

吲哚的负向和正向趋化反应的相互作用可能有助于引导胃肠道等区域的微生物生态位的建立。产生吲哚的共生微生物在胃肠道粘膜界面附近繁盛；考虑到粪便样品中即使被稀释后吲哚浓度可高达 6.5 mM（56），这些生产场所的吲哚浓度预计将远远高于阈值水平。适应了吲哚阈值水平的共生细菌可能会因为正向趋化作用而保留在定植的微生物群落中——尽管肠道中可运动微生物物种的精确数量尚不清楚，但已知的是厚壁菌门和变形菌门中的部分物种具有鞭毛（57）。当远离粘膜界面和向胃肠道管腔方向，吲哚水平低于阈值（25），运动细菌会因负向趋化运动而排斥（图 5）。因此，吲哚很可能阻止外来摄入的细菌，包括入侵的病原体，如大肠杆菌 O157:H7 和肠道沙门氏菌，在消化道黏膜中立足。

消化道中微生物群落很可能与宿主的自然防御机制形成互补。他们可能通过调节吲哚的生产，利用双相趋化反应来保留已定植的共生细菌并防止入侵的可运动病原体的定植。如果不依赖受体的负向趋向反应是所有细菌鞭毛马达的一般特性，缺乏吲哚特异性化学受体的运动细菌也可能被阻止定植于肠粘膜。然而，胃肠道内存在着不同微生物和宿主代谢产物信号的空间变化组合，其中一些是有效的正向趋化剂（15，58）。对不同消化道中信号组合的综合趋化反应可能最终决定这种防御策略的效用。这需要我们对代谢产物和代谢衍生物组合的综合信号和趋化反应进行组合研究，以进行更深层次的阐释。

材料与方法

菌株与质粒

所有菌株均为大肠杆菌 RP437（59）的衍生物，列于表 1。两步 λ-red 介导的同源重组技术（60）用于生成无缝的框内缺失。这些缺失突变通过测序得到确认。

表 1 本研究中使用的菌株与质粒

细胞培养

在 33°C 的色氨酸肉汤培养基（TB）中培养过夜，然后在 25 mL 新鲜 TB 中以 1:100 稀释接种，培养一日。培养物在 33°C 下生长至 OD600 为 0.5。在培养基中适当加入抗生素（100 μg/mL 红霉素和 25 μg/mL 氯霉素）。将阿拉伯糖以 0.001 ~ 0.1% （wt/vol）的浓度添加到日培养物中，IPTG 以 100 μM 的适量浓度添加。

栓菌实验

通过离心（1500×g， 5 分钟）收集细胞。细胞在运动缓冲液（10 mM 磷酸钾缓冲液，67 mM NaCl， 0.1 mM EDTA， 1μM 蛋氨酸，10 mM 乳酸钠，pH 7.0）中洗涤 2 次。最后的颗粒在 1ml MB 中重悬。然后按照之前的方法将细胞剪短以截断鞭毛细丝，随后在灌注室中用粘性 FliC 将细胞拴在盖玻片上（61，62）。细胞旋转轨迹使用尼康显微镜（Optiphot 2）记录，20×相位物镜，60 帧/秒，数码相机（UI-3240LE-M-GL；IDS 成像开发系统）。用 MATLAB 中自编写的代码分析栓系细胞旋转的视频（63）。转速由高斯拟合到速度分布确定。CWbias（马达旋转 CW 的时间的比例）是通过使用一个平均值超过 1.5 单元旋转的移动滤波器来确定的时间函数，如前所述（47）。

使用三向阀（Hamilton）与 MB 或含吲哚的 MB 交换灌注室中的液体。以流量（260 μL/min）由注射泵（Fusion 200；Chemyx）灌注流入。用着色液体进行单独的校准实验，以估计化学效应剂在开始流动后进入灌注室的平均时间。

pH 测量

将编码 pH 敏感性绿色荧光蛋白（GFP-mut3*）的质粒导入野生型 RP437 菌株。用 IPTG （100 μM）控制 GFP 的表达量。LED 照明源（SOLA SE II 365 光引擎；Lumencor）和标准尼康 GFP 滤光立方体用于激发荧光团并过滤发射光。用 60 倍水浸物镜在视场中激发 100 到 200 个细胞。发射光由灵敏的光电倍增管（H7421-40 SEL；Hamamatsu）通过带通发射滤波器（FF01-542/27；AVR 光学）收集。自编写的 LabVIEW 代码被用来记录随时间变化的光子计数。为了校准目的，在 MB 中测量细胞的发射光 100 秒。然后，将介质交换为含有 40mm 苯甲酸盐/MB 的培养基，pH 值为 6。

在测量吲哚对细胞内部 pH 值的影响时，在 MB 中测量细胞前 100 秒的发射量。然后，将 MB 替换为含有 2mm 吲哚的 MB，同时继续进行强度测量。让细胞平衡 3 分钟，然后切换回 MB。

体外趋化性和附着试验

将薄琼脂层倒入单个 transwell 衬垫（Nunc 细胞培养衬垫）中，然后在运动缓冲液或含有 2 mM 吲哚的运动缓冲液中浸泡一夜。在琼脂表面涂覆聚 l -赖氨酸，以促进细

胞稳定附着。然后将插入物小心地转移到24孔板中的各个孔中（载体板系统；赛默飞世尔科技公司；141002），其中为表达GFP的大肠杆菌悬液（SI附录，图S2）。对这些孔中建立的随时间变化的化学梯度，有反应的细胞要么向琼脂垫迁移并附着在琼脂垫上，要么被排斥（42，43）。在被预处理情况下，细胞悬液中含有700 μM吲哚。在未预处理的情况下，细胞悬液中不含吲哚。5分钟后，小心地取出衬垫，用MB轻轻清洗以去除未粘附的细胞，然后通过共聚焦显微镜成像。然后使用定制编写的MATLAB代码来计数附着在表面的细胞数量。

统计学分析

所有结果均使用Student's t检验进行分析。$P < 0.05$时认为在统计上具有显著差异。

数据可及性

本文涉及的所有数据均可在正文和附录中查阅。

附　录 C 随机游走模型代码及参数

```
#注：该部分程序使用 R 4.1.2 完成编写。其中使用程辑包 ggplot2 3.3.5[41]。
rm(list=ls())
gc()
windowsFonts(Times=windowsFont("Times New Roman"))
library("ggplot2")
color_global<-"#009933"
options(warn=-1)

HOME_PATH<-"I:/CHY/Rscript/"
setwd(HOME_PATH)
prog_dir_name<-"./Tsr+1Tar"
unlink(prog_dir_name,recursive = T)
dir.create(prog_dir_name,mode="7777")
setwd(prog_dir_name)
unlink("./n_t",recursive = T)
dir.create("./n_t",mode="7777")
#########################
#Environment Settings
#########################
ntwx=10 #save n_t each 10s in simulations
#时间
dt=0.002
t_max=300
#对象个数
n_num=500
# swimming velocity 0.03 +- 0.01 mm/s
v_mean<-0.03*0.001
v_sd<-0.005*0.001
v_range=c(0,v_mean+4*v_sd)
#  容器大小
x_scale=2e-3
y_scale=0.75e-3
x_min<- -0.5*x_scale
x_max<- 0.5*x_scale
y_min<- -0.5*y_scale
y_max<- 0.5*y_scale
#允许的概率
```

```
p_max <- 1
p_min <- 0

#初始分布
x_range=c(0-0.08*(x_max-x_min),0+0.08*(x_max-x_min))
y_range=c(0-0.25*(y_max-y_min),0+0.25*(y_max-y_min))
x_mean=0
y_mean=0
x_sd=0.01*(x_max-x_min)
y_sd=0.04*(y_max-y_min)

#####
#<Constant> (SI)
#####

###
#determined by other researches
#NOTE: Some could be determined arbitrarily as the relative relation is satisfied
H <- 10 # √
tau0 <- 0.2 # √
tau1 <- 0.8 # √
Yhalf <- 3e-6 # √
Y0 <- Yhalf*(((tau1^(-1))/(tau0^(-1)))^(1/H)) # √

#determined by fitting other researches results

tar_weight<-0.465 #tsr 占主导地位
N_tar<-5.30 #MCP 受体二聚体数量相对表达量
N_tsr<-2.65

KA_tar <- 10e-4 #受体活性形式与配体结合常数 (>0)
KI_tar <- 5e-4 #受体失活形式与配体结合常数 (>0) (L 为 attractant 时 KI>KA)

KA_tsr <- 3e-4
KI_tsr <- 12e-4

alpha_tar <- 0.155 #甲基化自由能差的线性系数(拟合) (-1,1) (绝对值值越接近 1，适应越快)
alpha_tsr <- -0.8255 #tsr 适应快

m0_tar <- 0.575 #甲基化自由能差的线性系数(拟合) (0,1)
m0_tsr <- 2.531
```

```
kR <-3.5e-3 #CheR 活性（甲基化） (>0)
kB0 <-3.969e-3 #CheB 本底活性（去甲基化）(>0)
b <- 0.25 #甲基化动力方程的平衡速率(0,1)

#####
#<Constant>
#####

#==========================================================================
========================#
###!o-o!###!o-o!###!o-o!###!o-o!###!o-o!###!o-o!###!o-o!###!o-o!###!o-o!###!o-
o!###!o-o!###!o-o!
#==========================================================================
========================#

#####
#<function>
#####

VariableInitialization <- function(ligand_concentration=0.25e-4) #generate variable_list
{

  a<-0.6535 #由预平衡条件得到
  L <- ligand_concentration #配体浓度
  kB <- kB0 #(为迭代变量)
  m <- 0.5 #甲基化程度，为迭代变量，即 m=m+(kR*(1-b)-kB*b)*dt，先于 a 改变
  fm_tar <- alpha_tar*(m0_tar-m) #甲基化自由能差
  fm_tsr <- alpha_tsr*(m0_tsr-m)

  epsilon_tar<-fm_tar-log((1+L/KA_tar)/(1+L/KI_tar),base=exp(1))
  epsilon_tsr<-fm_tsr-log((1+L/KA_tsr)/(1+L/KI_tsr),base=exp(1))

  a<-weighted.mean(c(
    1/(1+exp(N_tsr*epsilon_tsr)),
    1/(1+exp(N_tar*epsilon_tar))
    ),
    c(1,tar_weight))

  P0 <- tau0^(-1) #从翻转 0 到前进 1 的概率
  Y <- Y0/(kR/(kR+kB))*a
  P1 <- tau1^(-1)*(Y^H)/(Yhalf^H) #从前进 1 到翻转 0 的概率
```

```
  variable_list <-
list(L=L,a=a,epsilon_tar=epsilon_tar,epsilon_tsr=epsilon_tsr,fm_tar=fm_tar,fm_tsr=fm_tsr,m=
m,kB=kB,Y=Y,P0=P0,P1=P1,CWbias=0)
  return(variable_list)
}

UpdateVariable <- function(c,variable_list,dt)
{
  ###
  #输入 c(concentration), variable_list，输出更新后 variable_list
  # variable_list={L,a,epsilon,fm,m,kB,Y,P0,P1}
  ###
  temp_list<-variable_list

  L <- c
  kB <- temp_list$kB
  m <- temp_list$m
  fm_tar <- temp_list$fm_tar
  fm_tsr <- temp_list$fm_tsr
  a <- temp_list$a
  Y <- temp_list$Y

  temp_list$L <- c #配体浓度
  kB<- temp_list$kB <- kB0*a
  m<- temp_list$m <- m+(kR*(1-b)-kB*b)*dt #甲基化程度

  fm_tar<- temp_list$fm_tar <- alpha_tar*(m0_tar-m)
  fm_tsr<- temp_list$fm_tsr <- alpha_tsr*(m0_tsr-m)#甲基化自由能差

  epsilon_tar<-temp_list$epsilon_tar<-fm_tar-log((1+L/KA_tar)/(1+L/KI_tar),base=exp(1))
  epsilon_tsr<-temp_list$epsilon_tsr<-fm_tsr-log((1+L/KA_tsr)/(1+L/KI_tsr),base=exp(1))

  a<-temp_list$a<-weighted.mean(c(
    1/(1+exp(N_tsr*epsilon_tsr)),
    1/(1+exp(N_tar*epsilon_tar))
  ),
  c(1,tar_weight))

  P0<-temp_list$P0 <- tau0^(-1)*dt #从翻转到前进的概率
  Y<-temp_list$Y <- Y0/(kR/(kR+kB))*a
  P1<- temp_list$P1 <- tau1^(-1)*(Y^H)/(Yhalf^H)*dt #从前进到翻转的概率
```

```
  t_CW<-1/P0 #翻转 CW 平均时长=1/P(CWtoCCW)
  t_CCW<-1/P1

  temp_list$CWbias <- t_CW/(t_CW+t_CCW)

  return(temp_list)
}

############################
#The contents below can be copied to other receptors
############################

InRange <- function(x,range)#将 x 限制在 range 范围内
{
  if(x>range[2])
  {
    x=range[2]
  }
  else if(x<range[1])
  {
    x=range[1]
  }
  else
  {
    x=x
  }
  return(x)
}

concentration<-function(x)#浓度决定式
{
  temp<- 0.5*x+0.25e-3
  if(temp<0)
  {
    temp<-0
  }
  else
  {

  }
  return(temp)
}
```

```
plotconcentration <- function()
{
  c<-vector()
  x<- seq(from=x_min,by=(x_max-x_min)/1000,to=x_max)
  for(i in x)
  {
    c<-c(c,concentration(i))
  }

  p<-ggplot(data=data.frame(x=x*1000,c=c*1000))+
    geom_line(aes(x=x,y=c),size=1)+
    labs(title="Concentration vs. x") +
    theme_bw()+
    xlab("x (mm)")+
    ylab("Concentration (mM)")+
    theme(legend.text = element_text(colour = 'black', size =
20,family="Times",face="bold"),
          title = element_text(colour = 'black', size = 20,family="Times",face="bold"),
          axis.title.x = element_text(colour = 'black', size = 20,family="Times",face="bold"),
          axis.title.y = element_text(colour = 'black', size = 20,family="Times",face="bold"),
          axis.text.x = element_text(colour = 'black', size =
15 ,family="Times",face="bold"),
          axis.text.y = element_text(colour = 'black', size =
15 ,family="Times",face="bold"),
          axis.line.x=element_line(linetype=1,color="black",size=1),
          axis.line.y=element_line(linetype=1,color="black",size=1),
          axis.ticks.x=element_line(color="black",size=1),
          axis.ticks.y=element_line(color="black",size=1),
          panel.border = element_rect(color="black",size=1.5))

  return(list(p))
}

UpdateState <- function(variable_list, state, dt)#根据输入变量列表 variable_list 与当前状态
state 决定改变后状态
  #0=翻转，1=前进
{
  if(state==0)
  {
    if(runif(1,min=0,max=1)<=variable_list$P0)
    {
```

```
        state=1
      }
      else
      {
        state=0
      }
    }
    else if(state==1)
    {
      if(runif(1,min=0,max=1)<=variable_list$P1)
      {
        state=0
      }
      else
      {
        state=1
      }
    }
    else
    {
      state=0
    }

    return(state)
}

PlotPossibility <- function(xmax,xmin,dt) #only 从前进到翻转的概率
{
    p<-vector()
    variable_list_temp <- VariableInitialization()
    x<- seq(from=x_min,by=(x_max-x_min)/1000,to=x_max)
    for(i in x)
    {
      p<-c(p,UpdateVariable(concentration(i),variable_list_temp,dt)$P1)
    }

    p1<-ggplot(data=data.frame(x=x*1000,p=p))+
      geom_line(aes(x=x,y=p),size=1,color=color_global)+
      labs(title="Possibility vs. x") +
      theme_bw()+
      xlab("x (mm)")+
      ylab("Possibility")+
```

```
    theme(legend.text = element_text(colour = 'black', size =
20,family="Times",face="bold"),
            title = element_text(colour = 'black', size = 20,family="Times",face="bold"),
            axis.title.x = element_text(colour = 'black', size = 20,family="Times",face="bold"),
            axis.title.y = element_text(colour = 'black', size = 20,family="Times",face="bold"),
            axis.text.x = element_text(colour = 'black', size =
15 ,family="Times",face="bold"),
            axis.text.y = element_text(colour = 'black', size =
15 ,family="Times",face="bold"),
            axis.line.x=element_line(linetype=1,color="black",size=1),
            axis.line.y=element_line(linetype=1,color="black",size=1),
            axis.ticks.x=element_line(color="black",size=1),
            axis.ticks.y=element_line(color="black",size=1),
            panel.border = element_rect(color="black",size=1.5))

  c<-vector()
  for(i in x)
  {
    c<-c(c,concentration(i))
  }

  p2<-ggplot(data=data.frame(c=c*1000,p=p))+
    geom_line(aes(x=c,y=p),size=1,color=color_global)+
    labs(title="Possibility vs. concentration") +
    theme_bw()+
    xlab("Concentration (mM)")+
    ylab("Possibility")+
    theme(legend.text = element_text(colour = 'black', size =
20,family="Times",face="bold"),
            title = element_text(colour = 'black', size = 20,family="Times",face="bold"),
            axis.title.x = element_text(colour = 'black', size = 20,family="Times",face="bold"),
            axis.title.y = element_text(colour = 'black', size = 20,family="Times",face="bold"),
            axis.text.x = element_text(colour = 'black', size =
15 ,family="Times",face="bold"),
            axis.text.y = element_text(colour = 'black', size =
15 ,family="Times",face="bold"),
            axis.line.x=element_line(linetype=1,color="black",size=1),
            axis.line.y=element_line(linetype=1,color="black",size=1),
            axis.ticks.x=element_line(color="black",size=1),
            axis.ticks.y=element_line(color="black",size=1),
            panel.border = element_rect(color="black",size=1.5))
```

```
  return(list(p1,p2))
}

PlotCWbias <- function(xmax,xmin,dt)
{
  CWbias<-vector()
  variable_list_temp <- VariableInitialization(0.02e-4)

  i_temp<-1
  while(i_temp<1000)
  {
    variable_list_temp<-UpdateVariable(0.02e-4,variable_list_temp,1)
    i_temp<-i_temp+1
  }

  x<- seq(from=x_min,by=(x_max-x_min)/1000,to=x_max)
  for(i in x)
  {
    CWbias<-c(CWbias,UpdateVariable(concentration(i),variable_list_temp,dt)$CWbias)
  }

  p1<-ggplot(data=data.frame(x=x*1000,CWbias=CWbias))+
    geom_line(aes(x=x,y=CWbias),size=1.2,color=color_global)+
    labs(title="CWbias vs. x") +
    theme_bw()+
    xlab("x (mm)")+
    ylab("CWbias")+
    theme(legend.text = element_text(colour = 'black', size =
20,family="Times",face="bold"),
          title = element_text(colour = 'black', size = 20,family="Times",face="bold"),
          axis.title.x = element_text(colour = 'black', size = 20,family="Times",face="bold"),
          axis.title.y = element_text(colour = 'black', size = 20,family="Times",face="bold"),
          axis.text.x = element_text(colour = 'black', size =
15 ,family="Times",face="bold"),
          axis.text.y = element_text(colour = 'black', size =
15 ,family="Times",face="bold"),
          axis.line.x=element_line(linetype=1,color="black",size=1),
          axis.line.y=element_line(linetype=1,color="black",size=1),
          axis.ticks.x=element_line(color="black",size=1),
          axis.ticks.y=element_line(color="black",size=1),
          panel.border = element_rect(color="black",size=1.5))+
```

```
    ylim(0,1)


  c<-vector()
  for(i in x)
  {
    c<-c(c,concentration(i))
  }

  p2<-ggplot(data=data.frame(c=c*1000,CWbias=CWbias))+
    geom_line(aes(x=c,y=CWbias),size=1.2,color=color_global)+
    labs(title="CWbias vs. Concentration") +
    theme_bw()+
    xlab("Concentration (mM)")+
    ylab("CWbias")+
    theme(legend.text = element_text(colour = 'black', size =
20,family="Times",face="bold"),
          title = element_text(colour = 'black', size = 20,family="Times",face="bold"),
          axis.title.x = element_text(colour = 'black', size = 20,family="Times",face="bold"),
          axis.title.y = element_text(colour = 'black', size = 20,family="Times",face="bold"),
          axis.text.x = element_text(colour = 'black', size =
15 ,family="Times",face="bold"),
          axis.text.y = element_text(colour = 'black', size =
15 ,family="Times",face="bold"),
          axis.line.x=element_line(linetype=1,color="black",size=1),
          axis.line.y=element_line(linetype=1,color="black",size=1),
          axis.ticks.x=element_line(color="black",size=1),
          axis.ticks.y=element_line(color="black",size=1),
          panel.border = element_rect(color="black",size=1.5))+
    ylim(0,1)

  return(list(p1,p2))
}

findframe <- function(t) #返回 t 时刻对应的分布状态
{
  if (t>t_max)
  {
    print("Input time out of range:")
    print(t_max)
    t<-t_max
  }
```

```
  ####load n_t###
  rm(n_t)
  n_t_file_index<-1
  load(paste("./n_t/",n_t_file_index,".RData",sep=""))
  while(t>(n_t[[length(n_t)]]$time+0.5*dt))
  {
    rm(n_t)
    n_t_file_index<-n_t_file_index+1
    load(paste("./n_t/",n_t_file_index,".RData",sep=""))
  }
  ####load n_t###
  for (frame in n_t)
  {
    if(frame$time<(t-0.5*dt)){   }

    else if(frame$time>(t-0.5*dt)&frame$time<(t+0.5*dt))
    {
      print("Success.")
      return(frame$particle)
    }
    else if(frame$time>(t+0.5*dt)){   }
    else if (frame$time>t_max)
    {
      print("ERROR:time>t_max")
      return(NULL)
    }
    else
    {
      print("Can't found thought searching to the last one:")
      print(frame$time)
      return(NULL)
    }
  }
  print("Nothing Found    TAT")
  return(NULL)
}

plotframe <-function(t)#绘制 t 时刻的所有对象,参数为所有对象集合、当前时间
{
  n=findframe(t)
  all_x=vector()
  all_y=vector()
```

```
  for (particle in n)
  {
    all_x=c(all_x,as.numeric(particle$x))
    all_y=c(all_y,as.numeric(particle$y))
  }
  data=data.frame(x=all_x,y=all_y)
  title=paste("The distribution of particles at time ",t," s",sep="")
  p=ggplot(data, aes(x=x*1000, y=y*1000)) +
    labs(title=title) +
    theme_bw()+
    scale_x_continuous(limits = c(x_min*1000,x_max*1000))+
    scale_y_continuous(limits = c(y_min*1000,y_max*1000))+
    xlab("x (mm)")+
    ylab("y (mm)")+
    geom_point(size=0.25)+
    theme(legend.text = element_text(colour = 'black', size =
20,family="Times",face="bold"),
          title = element_text(colour = 'black', size = 20,family="Times",face="bold"),
          axis.title.x = element_text(colour = 'black', size = 20,family="Times",face="bold"),
          axis.title.y = element_text(colour = 'black', size = 20,family="Times",face="bold"),
          axis.text.x = element_text(colour = 'black', size =
15 ,family="Times",face="bold"),
          axis.text.y = element_text(colour = 'black', size =
15 ,family="Times",face="bold"),
          axis.line.x=element_line(linetype=1,color="black",size=1),
          axis.line.y=element_line(linetype=1,color="black",size=1),
          axis.ticks.x=element_line(color="black",size=1),
          axis.ticks.y=element_line(color="black",size=1),
          panel.border = element_rect(color="black",size=1.5))
  return(list(p))
}

gettraj <-function(p) #p 粒子的运动轨迹
{
  traj_x=vector()
  traj_y=vector()
  traj_t=vector()
  traj_theta=vector()
  traj_v=vector()
  for(file_i in seq(from=1,to=n_t_file_index_max,by=1))
  {
    rm(n_t)
```

```
    load(paste("./n_t/",file_i,".RData",sep=""))
    for (n in n_t)
    {
      traj_t=c(traj_t,n$time)
      traj_x=c(traj_x,n$particle[[p]]$x)
      traj_y=c(traj_y,n$particle[[p]]$y)
      traj_theta=c(traj_theta,n$particle[[p]]$theta)
      traj_v=c(traj_v,n$particle[[p]]$v)
    }
  }
  return(data.frame(x=traj_x,y=traj_y,t=traj_t,theta_in_deg=traj_theta/2/pi*360,v=traj_v))
}

plottraj <-function(particle_index) #particle_index 绘制第几个粒子轨迹；depth：绘制的最大时间
{
  data=gettraj(particle_index)
  title_str=paste("The trajectory of the particle ",particle_index,"/",n_num,sep="")
  p=ggplot(data) +
    geom_path(aes(x=x*1000,y=y*1000,color=t),size=1.2,linetype=1)+
    labs(title=title_str,
         x="x (mm)",y="y (mm)") +
    scale_color_gradient(name="Time (s)",low="red",high="green")+
    theme_bw()+
    xlim(c(x_min*1000,x_max*1000))+
    ylim(c(y_min*1000,y_max*1000))+
    theme(legend.text = element_text(colour = 'black', size =
15,family="Times",face="bold"),
          title = element_text(colour = 'black', size = 20,family="Times",face="bold"),
          axis.title.x = element_text(colour = 'black', size = 20,family="Times",face="bold"),
          axis.title.y = element_text(colour = 'black', size = 20,family="Times",face="bold"),
          axis.text.x = element_text(colour = 'black', size =
15 ,family="Times",face="bold"),
          axis.text.y = element_text(colour = 'black', size =
15 ,family="Times",face="bold"),
          axis.line.x=element_line(linetype=1,color="black",size=1),
          axis.line.y=element_line(linetype=1,color="black",size=1),
          axis.ticks.x=element_line(color="black",size=1),
          axis.ticks.y=element_line(color="black",size=1),
          panel.border = element_rect(color="black",size=1.5))
  return(list(p))
}
```

```
getstate<- function()
{
  state_data<-data.frame(NULL)
  time_temp<-NULL
  for(n_t_file_index in seq(from=1,to=n_t_file_index_max,by=1))
  {
    rm(n_t)
    load(paste("./n_t/",n_t_file_index,".RData",sep=""))
    for(n_i in n_t)
    {
      state_data_per_frame<-NULL
      time_temp<-c(time_temp,n_i$time)
      n_i_temp<-n_i$particle
      particle_name<-NULL
      particle_index<-1
      for(i in n_i_temp)
      {
        state_data_per_frame<-c(state_data_per_frame,i$state)
        particle_name<-c(particle_name,paste("particle",particle_index,sep = ""))
        particle_index<-particle_index+1
      }
      state_data<-rbind(state_data,state_data_per_frame)
    }
  }

  row.names(state_data)<-time_temp
  return(state_data)
}


average <- function()
{
  avg=data.frame(x=NULL,y=NULL,theta=NULL,t=NULL,state=NULL)
  for(n_t_file_index in seq(from=1,to=n_t_file_index_max,by=1))
  {
    rm(n_t)
    load(paste("./n_t/",n_t_file_index,".RData",sep=""))
    for(n_i in n_t)
    {
      i=0
      x_sum=0
```

```
        y_sum=0
        theta_sum=0
        state_sum=0
        for(p_i in n_i$particle)
        {
          theta_sum=theta_sum+p_i$theta
          x_sum=x_sum+p_i$x
          y_sum=y_sum+p_i$y
          state_sum=state_sum+p_i$state
          i=i+1
        }

data=data.frame(x=x_sum/i,y=y_sum/i,theta=theta_sum/i,t=n_i$time,state=state_sum/i)
        avg=rbind(avg,data)
      }
    }

    return(avg)
}


plotdensity<-function(t,start_time=0)
{
    p<-ggplot()
    for(t_i in t)
    {
      n=findframe(t_i)
      all_x=vector()
      all_y=vector()
      all_theta=vector()
      for(p_i in n)
      {
        all_x=c(all_x,p_i$x)
        all_y=c(all_y,p_i$y)
        all_theta=c(all_theta,p_i$theta)
      }
      data=data.frame(x=all_x,y=all_y,theta=all_theta,t=t_i)
      subtitle_str=paste("frame:",t_i,"s; total:",t_max,"s",sep="")
      if(t_i>=start_time)
      {
        p<-p+
          geom_density(data=data,aes(x=x*1000,color=t),size=1.0)
```

```
    }
  }
  time_tatio<-t_i/t_max
  color_t<-rgb(time_tatio,1-time_tatio,1-(1-time_tatio^2)^2)
  p<-p+
    labs(title="Density distribution",
         x="x (mm)",
         y="particle density")+
    xlim(c(x_min*1000,x_max*1000))+
    scale_colour_gradient2(high = "#ff0000",mid="#00cc00" ,low = "#0066ff",midpoint =
0.5*t_max)+
    theme(legend.text = element_text(colour = 'black', size =
15,family="Times",face="bold"),
          title = element_text(colour = 'black', size = 20,family="Times",face="bold"),
          axis.title.x = element_text(colour = 'black', size = 20,family="Times",face="bold"),
          axis.title.y = element_text(colour = 'black', size = 20,family="Times",face="bold"),
          axis.text.x = element_text(colour = 'black', size =
15 ,family="Times",face="bold"),
          axis.text.y = element_text(colour = 'black', size =
15 ,family="Times",face="bold"))
  return(list(p))
}


plotave<-function(data)
{
  p=ggplot(data)+
    geom_line(aes(x=t,y=x*1000,color="x"),size = 1.2)+
    geom_line(aes(x=t,y=y*1000,color="y"),size = 1.2)+
    labs(title="The movement of distribution center by time")+
    xlim(c(0,t_max))+
    ylim(c(x_min*0.5*1000,x_max*0.5*1000))+
    xlab("time (s)")+
    ylab("distance (mm)")+
    theme_bw()+
    theme(legend.text = element_text(colour = 'black', size =
12,family="Times",face="bold"),
          legend.title = element_text(colour = 'black', size =
15,family="Times",face="bold"),
          title = element_text(colour = 'black', size = 20,family="Times",face="bold"),
          axis.title.x = element_text(colour = 'black', size = 20,family="Times",face="bold"),
          axis.title.y = element_text(colour = 'black', size = 20,family="Times",face="bold"),
```

```
            axis.text.x = element_text(colour = 'black', size =
15 ,family="Times",face="bold"),
            axis.text.y = element_text(colour = 'black', size =
15 ,family="Times",face="bold"),
            panel.border = element_rect(color="black",size=1.5),
            panel.grid.major = element_blank(),
            panel.grid.minor = element_blank())+
    scale_color_discrete(name="direction",
                         breaks=c("y","x"),
                         labels=c("y (no chemoattractant gradient)","x
(chemoattractant gradient)"))+
    theme(legend.position = c(0.5,0.4),#plot 内位置
            legend.justification = c("left", "top"),#固定右上角
            legend.key = element_blank(),#图标背景色 element_rect(colour="black")
            legend.box.background = element_rect(fill="white",color="black",linetype =
1,size=1),#（删除 fill=NA）
            legend.background = element_blank())#图例背景色，避免与
legend.box.background 冲突
  return(list(p))
}


PlotCWbias_t<-function(dt,concentration,timelast) #总时长，分步时长，每一阶段的配体浓
度，每一阶段持续时间
{
  step_temp<-data.frame(concentration=concentration,timelast=timelast)
  t_temp<-c()
  CWbias_temp<-c()
  c_temp<-c()
  current_time<-0

  t_temp<-c(t_temp,current_time)
  variable_temp<-VariableInitialization(concentration[1])
  while(current_time<=1000)
  {
    variable_temp<-UpdateVariable(concentration[1],variable_temp,1)
    current_time<-current_time+1
  }
  current_time<-0
  CWbias_temp<-c(CWbias_temp,variable_temp$CWbias)
  c_temp<-c(c_temp,concentration[1])
  current_time<-current_time+dt
```

```
  step_index<-1
  while(step_index<=nrow(step_temp))
  {
    step_concentration<-step_temp$concentration[step_index]
    step_timelast<-step_temp$timelast[step_index]
    finished_time<-current_time+step_timelast
    while(current_time<finished_time)
    {
      t_temp<-c(t_temp,current_time)
      variable_temp<-UpdateVariable(step_concentration,variable_temp,dt)
      CWbias_temp<-c(CWbias_temp,variable_temp$CWbias)
      c_temp<-c(c_temp,step_concentration)
      current_time<-current_time+dt
    }
    step_index<-step_index+1
  }

  CWbias_t_data<-data.frame(t=t_temp,CWbias=CWbias_temp,c<-c_temp)

  p<-ggplot(data=CWbias_t_data) +
    geom_line(aes(x=t, y=CWbias),size=1.2,color=color_global) +
    labs(title="CWbias vs. Time") +
    theme_bw()+
    xlab("Time (s)")+
    ylab("CWbias ")+
    theme(legend.text = element_text(colour = 'black', size =
20,family="Times",face="bold"),
          title = element_text(colour = 'black', size = 20,family="Times",face="bold"),
          axis.title.x = element_text(colour = 'black', size = 20,family="Times",face="bold"),
          axis.title.y = element_text(colour = 'black', size = 20,family="Times",face="bold"),
          axis.text.x = element_text(colour = 'black', size =
15 ,family="Times",face="bold"),
          axis.text.y = element_text(colour = 'black', size =
15 ,family="Times",face="bold"),
          axis.line.x=element_line(linetype=1,color="black",size=1),
          axis.line.y=element_line(linetype=1,color="black",size=1),
          axis.ticks.x=element_line(color="black",size=1),
          axis.ticks.y=element_line(color="black",size=1),
          panel.border = element_rect(color="black",size=1.5))+
    ylim(0,1)
```

```
  return(list(p))
}

#####
#<function/>
#####

#==========================================================================
=========================#
###!o-o!###!o-o!###!o-o!###!o-o!###!o-o!###!o-o!###!o-o!###!o-o!###!o-o!###!o-
o!###!o-o!###!o-o!
#==========================================================================
=========================#

p_possibility<-PlotPossibility(x_max,x_min,0.002)
for(i in p_possibility)
{
  print(i)
}
p_CWbias<-PlotCWbias(x_max,x_min,0.002)
for(i in p_CWbias)
{
  print(i)
}
p_concentration_x<-plotconcentration()
for(i in p_concentration_x)
{
  print(i)
}

#绘制 CWbias-t 关系图
p_CWbias_t<-PlotCWbias_t(dt*5,c(0.002e-4,2e-4,7e-4),c(50,150,75))
for(i in p_CWbias_t)
{
  print(i)
}

#==========================================================================
=========================#
###!o-o!###!o-o!###!o-o!###!o-o!###!o-o!###!o-o!###!o-o!###!o-o!###!o-o!###!o-
o!###!o-o!###!o-o!
```

```
#=========================================================================
========================#

#########################
#run
#########################
run_start_time <- Sys.time()
n_t<-list()

#创建初始对象
t=0
n<-list()#所有粒子的集合
index<-1
while (index<=n_num)
{
  #一个粒子每一时刻包含属性:
  #x 横坐标
  #y 纵坐标
  #v 运动速度
  #theta 运动方向
  #chemical 列表，包含各种酶活性与 P0（0 到 1）,P1（1 到 0）
  #s 状态，分别为 0 翻转、1 前进
  temp<-list(x=rnorm(1,mean=x_mean,sd=x_sd),
             y=rnorm(1,mean=y_mean,sd=y_sd),
             v=rnorm(1,mean=v_mean,sd=v_sd),
             theta=runif(1,min=-1*pi,max=1*pi),
             chemical=VariableInitialization(),
             state=sample(c(0,1),size=1,prob = c(0.5,0.5)))
  temp$x<-InRange(temp$x,x_range)
  temp$y<-InRange(temp$y,y_range)
  temp$v<-InRange(temp$v,v_range)
  i_temp<-1
  while(i_temp<=1000)
  {
    temp$chemical<-UpdateVariable(concentration(temp$x),temp$chemical,1)
    i_temp<-i_temp+1
  }
  temp$chemical<-UpdateVariable(concentration(temp$x),temp$chemical,dt)
  n[[index]]<-temp
  index<-index+1
}
n_t[[length(n_t)+1]]<-list(particle=n,time=t)
```

```
#时间迭代
#由于 n_t 变量大小较大，无法直接储存在内存中，故将其分批写入外存，并进行分批读写
t=t+dt
n_t_file_index=1 #存储分块文件的编号
t_unsaved<-0 #未保存的时间总长
pb<-txtProgressBar(style=3,min=0,max=t_max,initial=0)
while(t<=t_max)
{
  index=1
  n_min<-list()
  for (i in n) #更新每个粒子的状态
    #n 中储存全部状态信息，仅保留至下一循环即被覆盖
    #为了释放内存，仅保留 x,y,theta,s 进入列表，记为 n_min
  {
    #更新速度
    i$v=InRange(rnorm(1,mean=v_mean,sd=v_sd),v_range)

    #根据当前状态更新角度/坐标
    if(i$state==0)#翻转
    {
      i$theta<-runif(1,min=-1*pi,max=1*pi)
    }
    else if(i$state==1)#运动
    {
      #更新坐标
      delta_x=i$v*cos(i$theta)*dt
      delta_y=i$v*sin(i$theta)*dt
      #若粒子触碰左右壁则角度 x 轴分量"反弹"
      if(i$x+delta_x>x_max)
      {
        i$x=i$x-2*delta_x
        i$theta=pi*2-i$theta
      }
      else if(i$x+delta_x<x_min)
      {
        i$x-2*delta_x
        i$theta=pi*2-i$theta
      }
      else
      {
        i$x=i$x+delta_x
```

```
    }
    #若粒子触碰上下壁则角度 y 轴分量"反弹"
    if(i$y+delta_y>y_max)
    {
      i$y=i$y-2*delta_y
      i$theta=pi-i$theta
    }
    else if(i$y+delta_y<y_min)
    {
      i$y=i$y-2*delta_y
      i$theta=pi-i$theta
    }
    else
    {
      i$y=i$y+delta_y
    }
  }
  else
  {
    print("ERROR, the state should be either 0 or 1!")
  }
  #更新运动状态
  if(i$state==0)
  {
    #有 P0 概率改变为 1
    P0_temp<-i$chemical$P0
    i$state<-sample(c(0,1),size=1,prob=c(1-P0_temp,P0_temp))
  }
  else if(i$state==1)
  {
    #有 P1 概率改变为 0
    P1_temp<-i$chemical$P1
    i$state<-sample(c(0,1),size=1,prob=c(P1_temp,1-P1_temp))
  }
  else
  {
    print("ERROR, the state should be either 0 or 1!")
  }
  #更新细胞 chemical 列表状态
  i$chemical<-UpdateVariable(concentration(i$x),i$chemical,dt)

  #将 i 重新赋值给原始列表 n
```

```
      n[[index]]<-i
      #赋值给 n_min
      i_min<-list(x=i$x,y=i$y,theta=i$theta,state=i$state)
      n_min[[index]]<-i_min
      index=index+1
    }

    n_t[[length(n_t)+1]]<-list(particle=n_min,time=t)
    setTxtProgressBar(pb,t)
    if(t_unsaved>ntwx) #当时间到达阈值后，保存并删除除最后一个元素外的所有元素
    {
      n_t_last<-n_t[length(n_t)]
      n_t<-n_t[-length(n_t)]
      save(n_t,file=paste("./n_t/",n_t_file_index,".RData",sep=""))
      rm(n_t)
      n_t<-n_t_last
      t_unsaved<-0
      n_t_file_index<-n_t_file_index+1
    }
    t<-t+dt
    t_unsaved<-t_unsaved+dt
}
close(pb)
save(n_t,file=paste("./n_t/",n_t_file_index,".RData",sep=""))
rm(n_t)
n_t_file_index_max<-n_t_file_index
n_t_file_index<-1
#########################
#run finished
#########################
run_end_time <- Sys.time()
runtime<-difftime(run_end_time, run_start_time, units = "sec")
#######################
#plotting
#########################
p_frame<-c()
p_frame<-c(
    plotframe(0),
    plotframe(t_max*0.25),
    plotframe(t_max*0.5),
    plotframe(t_max*0.75),
    plotframe(t_max-1)
```

```
)
for(i in p_frame)
{
  print(i)
}

p_traj<-c()
p_traj<-c(
  plottraj(ceiling(n_num*0.01))
)
for(i in p_traj)
{
  print(i)
}

ave=average()

p_average<-plotave(ave)
for(i in p_average)
{
  print(i)
}

density_show_time<-t_max*seq(from=0,to=0.99,by=0.05)
p_density<-c(plotdensity(density_show_time,start_time = 0.02))
for(i in p_density)
{
  print(i)
}

#########################
#plotting Done
#########################

cat(paste("\n\n\nRun started at:\n",run_start_time,"\n\nFinished
at:\n",run_end_time,"\n\nTime Elapsed:\n",runtime[[1]],"\n\n\n",sep=""))
cat(paste("Simulated ",n_num," particles in ",t_max," seconds,\n","\nAverage Time Elapse
per particle per step:\n",runtime[[1]]/(n_num*(t_max/dt+1))*1e6," μs",sep=""))

#########################
#save plottings
#########################
```

```
all_plot_list<-list(
  p_concentration_x=p_concentration_x,
  p_CWbias=p_CWbias,
  p_CWbias_t=p_CWbias_t,
  p_possibility=p_possibility,
  p_frame=p_frame,
  p_traj=p_traj,
  p_density=p_density,
  p_average=p_average
)

dir_names<-
c("p_concentration_x","p_CWbias","p_CWbias_t","p_possibility","p_frame","p_traj","p_density
","p_average")
dir_index<-1
for(plot_i1 in all_plot_list)
{
  dir_name<-dir_names[dir_index]
  unlink(dir_name,recursive = T)
  dir.create(dir_name,mode="7777")
  img_index<-1
  {
    for(plot_i2 in plot_i1)
    {
      img_name<-paste(dir_name,"/","img",img_index,".png",sep="")
      png(filename = img_name,height=2000,width=3500,res=400)
      print(plot_i2)
      dev.off()
      Sys.sleep(1)
      img_index<-img_index+1
    }
  }
  dir_index<-dir_index+1
}
#####################################################
```

附　录 D 图像处理与统计代码

注：该部分程序使用 MATLAB R2021a 完成编写

（1）Transwell 成像结果二值化与像素统计

```
path="";
cd(path);
status=rmdir("..\binary","s");
mkdir("..\binary");
status=rmdir("..\combine","s");
mkdir("..\combine");
cells=ls();
cellname=["wt","i","d"];
px_data=[];

for i1=3:5
    cd(path);
    cell_group=cells(i1,:);
    concentrations=ls(cell_group);
    mkdir(strcat("..\binary\",cell_group));
    concentration_px=[];

    for i2=3:6
        cd(path)
        con_group=concentrations(i2,:);
        imgs=ls(strcat(cell_group,"\",con_group));
        mkdir(strcat("..\binary\",cell_group,"\",con_group));
        px_count_temp="";
        for i3=3:5
            filename=imgs(i3,:);
            file_path=strcat(path,"\",cell_group,"\",con_group);
            cd(file_path);

            img = imread(filename);
            img_gray = rgb2gray(img);
            T=graythresh(img_gray);
            result=imbinarize(img_gray,T);%0=black=bg,1=white=cell
            %calculate pixel counts
            pixel_counts=num2str(sum(result(:)));
            result=~result;%0=black=cell,1=white=bg
```

```
px_count_temp=strcat(px_count_temp,"&",pixel_counts,"(",filename,
")");

            cd(path);


filesaved1=strcat("..\binary\",cell_group,"\",con_group,"\",pixel
_counts,"_pixels_",filename);
            imwrite(result,filesaved1,"png")



filesaved2=strcat("..\binary\",pixel_counts,"_pixels_",filename);
            imwrite(result,filesaved2,"png")

            mkdir(strcat("..\combine\px", pixel_counts))
            filesaved3=strcat("..\combine\px",
pixel_counts,"\",filename);
            imwrite(result,filesaved3,"png")

            filesaved4=strcat("..\combine\px",
pixel_counts,"\origin_",filename);
            imwrite(img,filesaved4,"png")
        end

concentration_px=cat(1,concentration_px,strcat("concentration=",c
on_group,"cell=",cell_group,":",px_count_temp));
    end
    px_data=cat(2,px_data,concentration_px);
end
```

（2）浓度梯度场分布统计

```
%read RGB image
%for the white background, invert the image
rgb_image=255-imread('1.png');
image_size = size(rgb_image);
density = zeros(image_size(1), 3);
% calc the value of RGB density at each y
for y = 1:image_size(1)
    y_range = round((y-
0.01*image_size(1)):1:(y+0.01*image_size(1)));
```

```
    y_range = max(1, min(y_range, image_size(1)));
    for channel = 1:3
        channel_pixels = rgb_image(y_range, :, channel);
        channel_density = sum(channel_pixels(:)) /
numel(channel_pixels);
        density(y, channel) = channel_density;
    end
end

density_red=density(:,3)+density(:,2);
plot(1:image_size(1), density_red, 'r', 'LineWidth', 2)

xlim([1, image_size(1)]);
set(gcf, 'PaperUnits', 'centimeters');
set(gcf, 'PaperSize', [25, 15]);
set(gcf, 'PaperPosition', [0, 0, 25, 15]);
grid on;

dlmwrite('density_Red.txt', density(:, 1));
print(gcf, 'density_Red.png','-dpng', ['-r', num2str(600)]);
```

（3）细菌分布统计

```
clear all;clc;

cd("")
folder_name1="txt_data";
folder_name2="img_data";

if exist(folder_name1, 'dir')
    rmdir(folder_name1, 's');
end
mkdir(folder_name1);
if exist(folder_name2, 'dir')
    rmdir(folder_name2, 's');
end
mkdir(folder_name2);

file_list=ls();
for i=3:(length(file_list)-2)
    file_name=file_list(i,:);
    [image, colormap] = imread(file_name);
    rgb_image = ind2rgb(image, colormap);
```

```
    %rgb_image=imread('1.png');

    image_size = size(rgb_image);
    density = zeros(image_size(1), 3);
    for y = 1:(image_size(1))
        y_range = round((y-
0.05*image_size(1)):1:(y+0.05*image_size(1)));
        y_range = max(1, min(y_range, image_size(1)));
        for channel = 1:3
            channel_pixels = rgb_image(y_range, :, channel);
            channel_density = sum(channel_pixels(:)) /
numel(channel_pixels);
            density(y, channel) = channel_density;
        end
    end

    dlmwrite(strcat(folder_name1,"\",file_name,".txt"), density(:,
2));
    plot(1:image_size(1), density(:, 2), 'g', 'LineWidth', 2);

    xlim([1, image_size(1)]);
    ylim([0, 0.055]);
    set(gcf, 'PaperUnits', 'centimeters');
    set(gcf, 'PaperSize', [25, 15]);
    set(gcf, 'PaperPosition', [0, 0, 25, 15]);

    print(gcf, strcat(folder_name2,"\",file_name,".png"),'-dpng',
['-r', num2str(300)]);

end

cd("..\")
```

附　录 E 毕业设计（论文）任务书

西 安 交 通 大 学

系 (专业) 1223 理科试验班（化学生物 H）
系 (专业) 主任 张建保
批 准 日 期 2022 年 11 月 15 日

毕业设计(论文)任务书

生命科学与技术学院　1223 理科试验班（化学生物 H）专业　化生试验班 91 班

学生 陈泓宇

毕业设计(论文)课题 大肠杆菌在吲哚诱导下的趋化行为的调控与机制初步研究

毕业设计(论文)工作自 2022 年 9 月 26 日起至 2023 年 6 月 14 日止

课题的背景、意义及培养目标

化学趋化性是按化学物质浓度梯度进行定向运动的细胞行为。利用细菌的趋化性可以控制其定向迁移和靶向杀伤。本课题将利用 CRISPR 技术（CRISPR knockout 和 CRISPRi）对大肠杆菌的趋化受体（如 Tar 和 Tsr 等）进行编辑和调控，从而多样化调控大肠杆菌对肠道吲哚分子或特定肿瘤微环境因子的趋化性，为开发定向定植的肠道工程菌，以及靶向治疗癌症的细菌疗法奠定基础，具有重要的应用前景。通过本课题的训练，旨在培养学生基本的科研思路和方法，磨练学生分析和解决问题的能力，并掌握 CRISPR 基因编辑技术、工程菌构建技术、趋化性检测等技术，让学生对最新的生物工程技术和学科交叉有更深入的认识。

设计(论文)的原始数据与资料

1.前期已有很多大肠杆菌趋化性和趋化受体的报道，为本课题奠定了坚实基础。2. CRISPR 等基因编辑技术手段非常成熟，相关载体工具已经获得。3.合作课题组具备成熟的微流控装置制备技术，为本课题奠定了重要基础。4.实验过程中同时将参考商业化的设备或者试剂盒的使用说明书。

课题的主要任务

1.针对特定化学物质（如肠道吲哚分子、肿瘤微环境因子等）的大肠杆菌趋化受体的筛选和研究。2.利用 CRISPR 技术敲除相关受体，获得大肠杆菌工程菌。3.利用微流控装置检测工程菌对特定化学物质（如吲哚等）的趋化性。4.CRISPRi 技术敲低相关受体，实现趋化性的多样化调控，检测工程菌的趋化性变化。

课题的基本要求(工程设计类题应有技术经济分析要求)

1.调研和筛选 1-2 种大肠杆菌中吲哚分子的趋化性受体；2.利用 CRISPR 技术敲除和敲低相关受体，获得大肠杆菌工程菌；3.用微流控装置检测趋化受体缺失或敲低的大肠杆菌对吲哚分子趋向性的改变；4.完成毕业论文的撰写和外文文献的翻译。

完成任务后提交的书面材料要求(图纸规格、数量，论文字数，外文翻译字数等)

1.论文 1 篇：完成完整的毕业论文 1 篇，包括中英文摘要，目录，正文（含实验方法、实验结果及结论），致谢，参考文献，附录（如测序结果等）。论文字数不少于 15000 字。2.外文文献翻译 1 篇。

主要参考文献

1.Yang J, Chawla R, Rhee KY, Gupta R, Manson MD, Jayaraman A, Lele PP. Biphasic chemotaxis of Escherichia coli to the microbiotametabolite indole. Proc Natl Acad Sci USA. 2020,17;117(11):6114-6120.（外文翻译文献）

2.Song J, Zhang Y, Zhang C, Du X, Guo Z, Kuang Y, Wang Y, Wu P, Zou K, Zou L, Lv J, Wang Q. A microfluidic device for studying chemotaxis mechanism of bacterial cancer targeting. Sci Rep. 2018,23;8(1):6394.

指导教师 谭丹

接受设计(论文)任务日期 2022 年 11 月 15 日

（注：由指导教师填写） 学生签名 陈泓宇

附　录 F 毕业设计（论文）考核评议书

西　安　交　通　大　学

毕业设计(论文)考核评议书

生命科学与技术学院 学院 1223 理科试验班（化学生物 H） 专业 化生试验班 91 班

指导教师对学生 陈泓宇 所完成的课题为 大肠杆菌在吲哚诱导下的趋化行为的调控与机制初步研究 的毕业设计(论文)进行的情况，完成的质量及评分的意见：

细菌趋化性在肠道菌群定植和癌症诊断治疗等领域发挥着重要作用。目前对细菌趋化性的研究大部分集中于定性描述，需要更多定量化的研究以实现对细菌趋化性的调控。基于此，本论文对大肠杆菌在吲哚诱导下的双向趋化反应进行了观察、描述与调控，并借助数学模型的建立与模拟、实验调控与观测两方面探究其发生机制。论文利用 CRISPRi 技术，构建了可诱导的敲低趋化性受体 Tar 的系统，获得了具有不同 Tar 受体表达量和趋化行为的菌株；进一步利用 Transwell 细菌迁移实验与微流控成像，对吲哚诱导下不同 Tar 表达量菌株的趋化性进行了观测与分析，初步揭示了 Tar-Tsr 受体表达量与效应强度的比例对细菌个体与群体趋化行为的影响机制。本论文工作扩展了趋化行为的定量研究和精确调控手段，为细菌趋化性的广泛应用奠定了基础。

本论文工作量非常饱满，创新性很高，陈泓宇同学以很高的科研素养和科研能力完成了论文工作。论文内容详实，逻辑清晰，模型合理，写作流畅，数据图表规范，达到了西安交通大学本科毕业论文的要求，同意其参加本科毕业答辩。

指导教师建议成绩：　A+

指导教师　谭丹

2023 年 06 月 06 日

西 安 交 通 大 学
毕业设计(论文)评审意见书（一）

评审意见：大肠杆菌趋化和调控，包括干实验部分-数学模型的建立与模拟和湿实验部分-趋化行为的调控与观测。利用 CRISPRi 技术成功构建了具有不同趋化性受体表达量和趋化行为的菌株，并进一步利用 Transwell 细菌迁移实验与微流控成像技术对其趋化行为进行了观测和分析，初步揭示了大肠杆菌在吲哚诱导下的双向趋化反应的发生机理。本论文工作扩展了趋化行为的定量研究和精确调控手段，为利用细菌趋化性进行肠道菌群的人工调节和定向定植、环境污染检测与治理、癌症诊断治疗等应用奠定了基础。

本论文工作量饱满，创造性很强，逻辑清晰，假设合理，行文流畅，图表数据规范，达到了西安交通大学本科毕业论文的要求，同意其参加本科毕业答辩。

评阅结论：同意答辩　　评阅人建议成绩：A+

评阅人 张雅利 职称 教授

2023 年 06 月 08 日

西 安 交 通 大 学
毕业设计(论文)评审意见书（二）

评审意见：细菌趋化性已广泛应用于肠道菌群定植和癌症诊断治疗等领域。本论文从数学模型的建立与模拟、实验调控与观测两方面对大肠杆菌在吲哚诱导下的双向趋化反应进行了定量研究，以指导对趋化性的调控和应用。论文涉及了丰富的个体和群体趋化模型的计算机建模仿真，也利用 CRISPRi 技术构建了具有不同趋化性受体表达量和趋化行为的菌株，并进一步利用 Transwell 细菌迁移实验与微流控成像技术对其趋化行为进行了观测和分析，初步揭示了大肠杆菌在吲哚诱导下的双向趋化反应的发生机理。本论文工作为细菌趋化行为的定量化研究和精确控制奠定了基础。

本论文工作量大，创新性强，条理清晰，行文流畅，数据图表规范，达到了西安

交通大学本科毕业论文的要求，同意其参加本科毕业答辩。

建议成绩：A+

评阅结论：同意答辩　　评阅人建议成绩：A+

评阅人　卢晓云　职称　教授

2023 年 06 月 08 日

附　录E 毕业设计（论文）答辩结果

毕业设计(论文)答辩结果

生命科学与技术学院

1223 理科试验班（化学生物 H）专业

毕业设计(论文)答辩组对学生 陈泓宇 所完成的课题为 大肠杆菌在吲哚诱导下的趋化行为的调控与机制初步研究 的毕业设计(论文)经过答辩,其意见为 陈泓宇同学在答辩过程中，讲述清楚，能准确回答问题。论文书写规范，结构合理，实验方案设计思路清晰，数据充分、可信，结论正确。论文从数学模型建立与模拟、实验调控与观测两方面对大肠杆菌在吲哚诱导下的趋化行为进行了定量调控和研究，为细菌趋化性的精确调控和广泛应用奠定了基础。出色地完成了本科毕业设计的相关任务，达到了本科毕设的要求。

经答辩组讨论，同意通过其论文答辩。

并确定成绩为 93.6 分

毕业设计(论文)答辩组负责人　　许丹

答辩组成员　　谭丹　　龙建纲

董楠　　彭韵桦

2023 年 06 月 13 日