

分类号:

密级:



华中农业大学

HUAZHONG AGRICULTURAL UNIVERSITY

硕士学位论文

MASTER'S DEGREE DISSERTATION

Cyclic di-GMP 激发假单胞菌形成生物膜和调控杀线虫与锰氧化活性的研究

CYCLIC DI-GMP ACTUATES BIOFILM FORMATION IN
PSEUDOMONAS TO MODULATE NEMATICIDAL AND
MN(II)-OXIDIZING ACTIVITY

研究生: 苏雨薇

CANDIDATE: SU YUWEI

学 号: 2017304110026
STUDENT NO.:

专 业: 微生物学
MAJOR: MICROBIOLOGY

导 师: 李 林 教授
SUPERVISOR: PROFESSOR LI LIN

中国 武汉
WUHAN, CHINA

二〇二〇年六月
JUNE, 2020

华中农业大学硕士学位论文

Cyclic di-GMP 激发假单胞菌形成生物膜和调控杀线虫 与锰氧化活性的研究

**Cyclic di-GMP actuates biofilm formation in *Pseudomonas* to
modulate nematicidal and Mn(II)-oxidizing activity**

研 究 生： 苏雨薇

学 号： 2017304110026

指 导 教 师： 李 林 教授

专业：微生物学

研究方向：微生物生物技术

获得学位名称：理学硕士

获得学位时间：2020 年 6 月

华中农业大学生命科学技术学院

二〇二〇年六月

华中农业大学学位论文独创性声明及使用授权书

学位论文 是否保密		如需保密，解密时 间	
<div>独创性声明</div> <p>本人声明所呈交的论文是我个人在导师指导下进行的研究工作及取得的研究成果。尽我所知，除了文中特别加以标注和致谢的地方外，论文中不包含其他人已经发表或撰写过的研究成果，也不包含为获得华中农业大学或其他教育机构的学位或证书而使用过的材料，指导教师对此进行了审定。与我一同工作的同志对本研究所做的任何贡献均已在论文中做了明确的说明，并表示了谢意。</p> <div>研究生签名：时间： 年 月 日</div>			
<div>学位论文使用授权书</div> <p>本人完全了解华中农业大学关于保存、使用学位论文的规定，即学生必须按照学校要求提交学位论文的印刷本和电子版本；学校有权保留提交论文的印刷版和电子版，并提供目录检索和阅览服务，可以采用影印、缩印或扫描等复制手段保存、汇编学位论文。本人同意华中农业大学可以用不同方式在不同媒体上发表、传播学位论文的全部或部分内容，为存在馆际合作关系的兄弟高校用户提供文献传递和交换服务，同时本人保留在其他媒体发表论文的权力。</p> <p>注：保密学位论文（即涉及技术秘密、商业秘密或申请专利等潜在需要提交保密的论文）在解密后适用于本授权书。</p> <div>学位论文作者签名：导师签名： 签名日期：签名日期：</div>			

目录

摘要	i
Abstract.....	iii
缩略语表	v
1 前言	1
1.1 假单胞菌	1
1.2 生物膜	2
1.3 环鸟苷二磷酸 c-di-GMP	4
1.4 秀丽隐杆线虫	5
1.5 锰氧化作用	6
1.6 研究目的及意义	7
2 材料与方法	9
2.1 实验材料	9
2.1.1 菌株和质粒	9
2.1.2 PCR 引物	11
2.1.3 实验所需试剂及配制	12
2.1.3.1 培养基	12
2.1.3.2 质粒抽提、感受态细胞制备与快检	12
2.1.3.3 PCR、重组质粒构建及琼脂糖凝胶电泳	13
2.1.3.4 蛋白质的诱导与纯化	13
2.1.3.5 基因敲除试剂	15
2.1.3.6 EMSA 所需试剂	15
2.1.3.7 以秀丽隐杆线虫为实验对象的生物学测定所需试剂	15
2.1.3.8 锰氧化活性测定所需试剂	16
2.1.3.9 染料去除所需试剂	16
2.1.4 实验仪器	16
2.2 实验方法	17
2.2.1 实验技术路线	17

2.2.2 分子克隆技术	17
2.2.2.1 PCR 扩增	17
2.2.2.2 大肠杆菌质粒的抽提	18
2.2.2.3 大肠杆菌钙转化感受态细胞制备	18
2.2.2.4 DNA 体外重组	19
2.2.2.5 大肠杆菌的钙法转化	19
2.2.2.6 电转化	19
2.2.2.7 阳性克隆的快速筛选	19
2.2.3 重组菌的诱导表达、亲和纯化	19
2.2.3.1 诱导表达	19
2.2.3.2 SDS-PAGE 样品制备及聚丙烯酰胺凝胶电泳	20
2.2.3.3 亲和纯化	20
2.2.3.4 蛋白质透析	20
2.2.3.5 蛋白浓度测定	21
2.2.4 生物信息学分析	21
2.2.5 EMSA	22
2.2.5.1 EMSA 胶的配制（40mL）	22
2.2.5.2 EMSA 反应的结合体系	22
2.2.5.3 电泳分析	22
2.2.6 基因敲除	23
2.2.6.1 基因敲除原理	23
2.2.6.2 基因敲除步骤	23
2.2.7 生物膜形成	24
2.2.7.1 以 96 孔板为介质的生物膜形成及其测定	24
2.2.7.2 以玻璃容器为介质的生物膜形成及其测定	24
2.2.8 以秀丽隐杆线虫为试验对象的生物学测定实验	25
2.2.8.1 秀丽隐杆线虫的饲养	25
2.2.8.2 秀丽隐杆线虫的裂解与同步化	25
2.2.8.3 对秀丽隐杆线虫的生物学活性测定	25

2.2.8.4 MB03 细胞喂食秀丽隐杆线虫的显微分析.....	26
2.2.9 细菌 Mn (II) 氧化活性的测定	26
2.2.9.1 锰氧化物聚集体培养.....	26
2.2.9.2 细菌的 Mn (II) 氧化活性测定.....	27
2.2.9.3 KMnO ₄ 标准曲线的制作方法:	27
2.2.10 细菌锰氧化物对染料的脱色作用	27
2.2.10.1 细菌锰氧化物对多种染料的脱色分析.....	27
2.2.10.2 HPLC (高效液相色谱) 操作流程.....	28
3 结果与分析	29
3.1 c-di-GMP 激发丁香假单胞菌 MB03 形成生物膜和调控杀线虫	29
3.1.1 MB03 细胞喂食秀丽隐杆线虫的显微分析和生物学测定	29
3.1.2 秀丽隐杆线虫对 MB03 胞内 c-di-GMP 水平的影响.....	30
3.1.3 不同生物膜形成能力的菌株对秀丽隐杆线虫毒杀实验	30
3.1.4 c-di-GMP 的效应因子 AAA+结构域的识别、同源建模及分子对接	31
3.1.5 FleQ03 调控生物膜的形成及其杀线虫活性	33
3.1.6 c-di-GMP 与 FleQ03 在生物膜形成中的协同作用	34
3.1.7 FleQ03 调控靶基因的寻找	34
3.2 c-di-GMP 激发假单胞菌 T34 形成生物膜对锰氧化物及染料脱色的影响	37
3.2.1 鸟苷酸环化酶基因 <i>VT47_20995</i> 在 T34 菌株中的表达	37
3.2.3 T35 菌株胞内 c-di-GMP 水平的检测.....	38
3.2.4 T35 菌株胞内 c-di-GMP 水平对菌株生物膜形成的影响.....	39
3.2.5 c-di-GMP 高水平菌株 T35 锰氧化活性的测定.....	39
3.2.5.1 KMnO ₄ 标准曲线的制作	39
3.2.5.2 T35 菌株锰氧化活性的测定	40
3.2.6 磷酸二酯酶基因 <i>T34_00070</i> 的超表达与敲除	41
3.2.7 超表达株 T36 和敲除株 T37 胞内 c-di-GMP、生物膜、锰氧化活性测定	43
3.2.8 不同 c-di-GMP 水平菌株的锰氧化物在荧光显微镜下的观察	44
3.2.9 c-di-GMP 高水平菌株 T37 生物锰氧化物对合成染料脱色作用.....	45
3.2.9.1 T37 生物锰氧化物对直接红 243、活性蓝 220、酸性绿 25 的脱色	46

3.2.9.2 T37 生物锰氧化物对酸性绿 25 的去除	46
4 小结与讨论	48
4.1 小结	48
4.2 讨论	49
参考文献	53
附录	60
致谢	66

摘要

细菌与环境捕食者共同进化的过程中，形成了复杂的防御机制。在细菌对抗线虫的研究中发现，生物膜通常被认为是细菌的一种防御手段，而生物膜主要由胞内 c-di-GMP 的水平进行调节。本研究以一株对模式线虫秀丽隐杆线虫（*Caenorhabditis elegans*）的丁香假单胞菌（*Pseudomonas syringae*）野生菌株 MB03 作为实验对象，调查胞内第二信使 c-di-GMP 对生物膜形成的调控和生物膜对秀丽隐杆线虫的致病性。我们发现，当用 MB03 细胞去喂养线虫时，线虫会刺激细菌胞 c-di-GMP 水平增加导致生物膜在线虫周围逐渐积累，并增加了线虫的致死率。通过分别在丁香假单胞菌 MB03 中导入一种鸟苷酸环化酶编码基因 *VT47_20995* 和一种磷酸二酯酶编码基因 *VT47_05410*，成功构建可分别超表达鸟苷酸环化酶的重组菌株 MB783 和超表达磷酸二酯酶的重组菌株 MB784。对野生株 MB03 及超表达菌株 MB783 和 MB784 胞内 c-di-GMP 水平、生物膜的定量及定性分析发现，重组菌株 MB783 和 MB784 胞内 c-di-GMP 水平相较于野生菌株分别发生了升高和降低，而其生物膜的形成则与 c-di-GMP 水平呈现正相关，即随 c-di-GMP 水平升高而升高、随 c-di-GMP 水平降低而降低；对各菌株对秀丽隐杆线虫杀虫活性的生物学测定结果表明，MB783 对秀丽隐杆线虫的致死率高于野生菌株 MB03，而 MB784 对秀丽隐杆线虫的致死率低于野生菌株 MB03。此外，使用来自铜绿假单胞菌（*Pseudomonas aeruginosa*）PAO1 的 FleQ 为参照序列对 MB03 全基因组搜索发现，共存在 20 个 AAA+域蛋白。通过同源建模和分子对接发现，FleQ03 与 c-di-GMP 的结合活性最高。与野生株 MB03 相比，敲除株 $\Delta fleQ03$ 的胞内 c-di-GMP 水平增加，生物膜产量减少的同时，其杀虫活性显著降低。体外结合实验表明，FleQ03 仅与 *fleQ03* 自身和其它几个侧翼基因结合。因此，我们推测 c-di-GMP 结合 FleQ03 增强细菌生物膜和生物膜依赖的致病性来响应秀丽隐杆线虫的捕食。

某些细菌在外界营养匮乏的情况下能够利用环境中的 Mn^{2+} ，为自身提供生命所需的能量。在实验室先前分离的一株高锰氧化活性的恶臭假单胞菌 T34 的突变文库中发现，胞内调节 c-di-GMP 水平的酶类对细菌锰氧化活性存在影响。为了调查胞内 c-di-GMP 与细菌锰氧化之间的关系，本研究利用之前研究丁香假单胞菌 MB03 中的鸟苷酸环化酶编码基因 *VT47_20995*，构建超表达菌株 T35，经测定其胞内 c-di-GMP 水平、生物膜量和锰氧化活性发现，当胞内 c-di-GMP 水平升高时，生物膜会

增加，锰氧化活性也会提高。通过对 T34 全基因组框架的测定，在 T34 锰氧化活性改变的突变文库中选取了编号为 *T34_00070* 的磷酸二酯酶进行后续研究。以 T34 为出发菌株，*T34_00070* 为目的基因，构建了超表达菌株 T36 以及敲除株 T37。通过对菌株 T34、T36 和 T37 在 24 h 胞内相对荧光水平和生物膜量测定分析发现，T36 胞内 c-di-GMP 水平及生物膜量较 T34 显著降低，而 T37 胞内 c-di-GMP 水平和生物膜量较 T34 显著地提高。由此可知，该菌生物膜的形成会随着胞内 c-di-GMP 水平的升高而升高，这与之前在丁香假单胞菌 MB03 中的结论一致。之后对菌株 T34、T36 和 T37 的锰氧化活性测定发现，T36 的锰氧化活性明显低于 T34，T37 的锰氧化活性较 T34 提高了 20 % 左右。经过对菌株 T34、T36 和 T37 在倒置荧光显微镜下的观察发现细菌聚集的越多，形成的锰氧化物越多分析可得在此菌株中，细菌可能通过胞内的 c-di-GMP 变化调控生物膜形成从而影响其锰氧化活性。

关键词：假单胞菌；c-di-GMP；生物膜；秀丽隐杆线虫；锰氧化

Abstract

As bacteria and environmental predators co-evolved, complex defense mechanisms were developed. Studies of bacteria fighting nematodes have shown that biofilms, which are thought to be a defense of bacteria, are regulated by the levels of c-di-GMP in cells. In this study, a wild-type *Pseudomonas syringae* MB03 and *Caenorhabditis elegans*, that was used to investigate the regulation of intracellular second messenger c-di-GMP on biofilm formation and the pathogenicity of biofilm against *C. elegans*. We show that stimulated increases in the c-di-GMP levels of bacterial cells led to the gradual accumulation of biofilms around the worms and increased worm lethality following the feeding processing of MB03 cells. The recombinant strains MB783 and MB784 were successfully constructed by introducing a diguanylate cyclase encoding gene *VT47_20995* and a phosphodiesterase encoding gene *VT47_05410* into *P. syringae* MB03, respectively. After quantitative and qualitative analysis of the intracellular c-di-GMP levels and biofilm of wild strains MB03 and overexpressed strains MB783 and MB784, it was found that recombinant strains MB783 and MB784 intracellular c-di-GMP levels compared with wild strains, rising and falling respectively. The formation of the biofilm is positively related with c-di-GMP levels, namely with the c-di-GMP levels higher and higher, along with the c-di-GMP levels lower and lower. The results of biological determination of the insecticidal activity of each strain against *C. elegans* showed that the mortality rate of MB783 against *C. elegans* was higher than that of wild MB03, and the mortality rate of MB784 against *C. elegans* was lower than that of wild MB03. In addition, a genome-wide search of MB03 using FleQ from *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 as a reference sequence revealed the presence of 20 AAA+ domain proteins. Through homologous modeling and molecular docking, the binding activity of FleQ03 to c-di-GMP was found to be the highest. Compared with wild strain MB03, the extracellular c-di-GMP levels of knockout strain $\Delta fleQ03$ increased, and its nematocidal activity was significantly reduced while the biofilm yield decreased. In vitro binding experiments showed that FleQ03 only combined with FleQ03 itself and several other flanking genes. Therefore, we hypothesized that c-di-GMP combined with FleQ03 to

enhance bacterial biofilm formation and biofilm-dependent pathogenicity in response to *C. elegans* predation.

Some bacteria are able to use Mn^{2+} in the environment to provide energy for life when nutrients are scarce. It was found in the mutant library of a strain of *Pseudomonas putida* T34 with high manganese oxidation activity, which was previously isolated in our laboratory, that enzymes regulating the levels of c-di-GMP in cells had an effect on the manganese oxidation activity of the bacteria. In order to survey the relationship between the intracellular c-di-GMP and the bacteria manganese oxidation, this study used *P. syringae* MB03 of diguanylate cyclase *VT47_20995* genes before, constructed overexpression strain T35, the determination of the intracellular c-di-GMP levels, quantity of the biofilm and manganese oxide activity, found that when the intracellular c-di-GMP levels rise, the biofilm will increase, manganese oxidation activity will also increase. Through the determination of T34 genome-wide framework, phosphodiesterase encoding gene *T34_00070* was selected from the mutant library of T34 manganese oxidation activity changed for our later study. Taking T34 as the starting strain and *T34_00070* as the target gene, the overexpression strain T36 and knockout strain T37 were constructed. The relative fluorescence level and biofilm content of T34, T36 and T37 in 24 h were measured and analyzed. It was found that the levels of c-di-GMP and biofilm quantity in T36 were significantly lower than T34, while the levels of c-di-GMP and biofilm quantity in T37 were significantly higher than T34. Thus, the formation of the biofilm of the bacteria increased with the increase of intracellular c-di-GMP levels, which was consistent with the previous conclusion in *P. syringae* MB03. After the determination of the manganese oxidation activity of T34, T36 and T37 strains, we found that the manganese oxidation activity of T36 was significantly lower than T34, and the manganese oxidation activity of T37 was about 20 % higher than T34. After observation of strains T34, T36 and T37 under inverted fluorescence microscope, it was found that the more the bacteria gathered, the more the manganese oxide was formed. It was concluded that in this strain, the bacteria could regulate the formation of biofilm through the intracellular c-di-GMP changes, thus affecting the manganese oxidation activity.

Key words: *Pseudomonas*; c-di-GMP; Biofilm; *Caenorhabditis elegans*; Manganese oxidation

缩略语表

Abbreviation

英文缩写	全称	中文名
Amp	Ampicillin	氨苄青霉素
Aps	Ammonium persulfate	过硫酸铵
Cm	Chloroamphenicol	氯霉素
DGC	Diguanylate cyclase	鸟苷酸环化酶
EDTA	Ethylenediamine tetraacetic acid	乙二胺四乙酸
EMSA	Electrophoretic mobility shift assay	聚丙烯酰胺凝胶阻滞
FUdR	5-fluorodeoxyuridine	5-氟尿嘧啶脱氧核苷
GFP	Green fluorescent protein	绿色荧光蛋白
Gm	Gentamicin	庆大霉素
h	Hour	小时
His	Histidine	组氨酸
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid	4-羟乙基哌嗪乙磺酸
HPLC	High performance liquid chromatography	高效液相色谱
IPTG	Isopropylthio- β -D-galactoside	异丙基- β -D-硫代半乳糖苷
kDa	Kilo-Dalton	千道尔顿
Km	Kanamycin	卡那霉素
LBB	Leukoberbelin blue	LBB
min	Minute	分钟
Mn	Manganese	锰元素
NGM	Nematode Growth Medium	线虫培养基
NCBI	National Center for Biotechnology Information	国家生物技术信息中心
OD	Optical density	光密度
PAGE	Polyacrylamide gel electrophoresis	聚丙烯酰胺凝胶电泳

续缩略语表

PBS	Phosphate Buffered Saline	磷酸盐缓冲液
PCR	Polymerase chain reaction	聚合酶链式反应
PDE	Phosphodiesterase	磷酸二酯酶
SDS	Sodium dodecylsulphate	十二烷基磺酸钠
TET	Tetracycline	四环素
TAE	Tris Acetic acid EDTA	Tris 乙酸电泳缓冲液
TBE	Tris Borate Ethylenediamine	Tris 硼酸电泳缓冲液
TEMED	Tetramethyl ethylenediamine	N,N,N',N'-四甲基二乙胺
Tris	3-hydroxymethyl aminomethane	三羟甲基氨基乙烷

1 前言

1.1 假单胞菌

假单胞菌属 (*Pseudomonas*) 为革兰氏阴性菌, 种类繁多, 生长于土壤、淡水和海水等环境中(Silby et al 2011), 包含一群代谢功能多样的生物体。它们占据许多生态位, 存在于许多植物的根际和内层。假单胞菌是植物根际土壤微生物的主要细菌类群, 它们的多样性影响着这些群落的系统发育多样性和异质性。目前, 在假单胞菌的应用研究方面报道众多, 涉及领域包括农业生物防治、植物生长调节、环境保护和医药开发等。特别是在医学、生物防治与环境保护方面的研究最为透彻、应用最为广泛(Nikel et al 2016; Arnold and Preston 2019)。研究广泛的有铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*)、丁香假单胞菌 (*Pseudomonas syringae*) 及恶臭假单胞菌 (*Pseudomonas putida*)。

P. syringae 菌株呈短杆状, 严格好氧, 菌落呈圆形。其分布广泛, 据统计在该物种中已发现了五十多种致病菌变种(Gutiérrez-Barranquero et al 2019), 丁香假单胞菌作为一种植物病原菌, 关于它研究也大多集中在是关于植物致病方面。最近有报道称, 传统的植物致病菌丁香假单胞菌对秀丽隐杆线虫表现出了杀虫活性(Ali et al 2016; Manan et al 2018)。但是, 致病相关的毒力因子尚不清楚。这使得我们对丁香假单胞菌在杀线虫方面的研究产生了浓厚的兴趣。在本研究中使用本室所拥有的丁香假单胞菌亚种 MB03 形成的生物膜及生物膜依赖的杀虫活性展开工作, 也为之后的研究方向奠定了基础。

P. putida 菌落与铜绿假单胞菌相似, 但只产生荧光素(青脓素), 不产生绿脓素, 其陈旧培养物有腥臭味。它从一个土居菌和植物定植菌转变为一个灵活的、代谢工程中的工程菌, 源于对恶劣的环境条件和各种物理化学压力的适应。多年来, 随着对 *P. putida* 基因组的深入分析, 以及基因编辑工具的不断丰富, 这些特性在生物技术得到了充分利用(Nikel and de Lorenzo 2018)。此外, 该细菌对抗生素和有机溶剂等外源性药物表现出高度耐受性, 其次级代谢产物也可作为工业生产上的原料(Loeschcke and Thies 2015)。在 *P. putida* 的众多变种中, 具有锰氧化活性的恶臭假单胞菌吸引了越来越多的关注, 本研究以我室一株高锰氧化活性的恶臭假单胞菌 T34 为实验对象, 旨在将其改造成锰氧化活性更高的菌株, 利用锰氧化物于环境治理。

1.2 生物膜

细菌在液体中游动的生活方式称为浮游细菌；在固体表面聚集的生活方式称为生物膜(Valentini et al 2018)，细菌随着外界环境的改变，在两种生活方式之间切换。当细菌处于不利条件时，经历一系列剧烈的生理、代谢和表型变化，通常会形成非运动性的多细胞聚集物，并通常被细胞外高分子基质（Extracellular polymeric substances, EPS）包裹形成的群落，这就是我们所定义的生物膜。其中，EPS 的主要成分是胞外多糖、细胞外 DNA（eDNA）和蛋白质(Fish et al 2016)。

生物膜形成的经典过程通常被描述为：细菌粘附在表面，通过合成外聚物基质形成微菌落进而发展成熟，最后扩散。细菌在形成可逆的初始黏附后，聚集的细菌便开始生长，向外分泌 EPS，正式进入不可逆黏附阶段，并进而形成微菌落。随着 EPS 的大量分泌使得更多的细胞聚集，形成成熟的生物膜结构(Carniello et al 2018)。如果形成生物膜的条件变得不利，细菌就会降低细胞外基质成分的产生，并产生分解特定基质成分的酶，从而使他们从生物膜中分散，在新的部位形成新的生物膜(Gjermansen et al 2005; Gjermansen et al 2010)。生物膜形成的过程如图 1-1 所示。

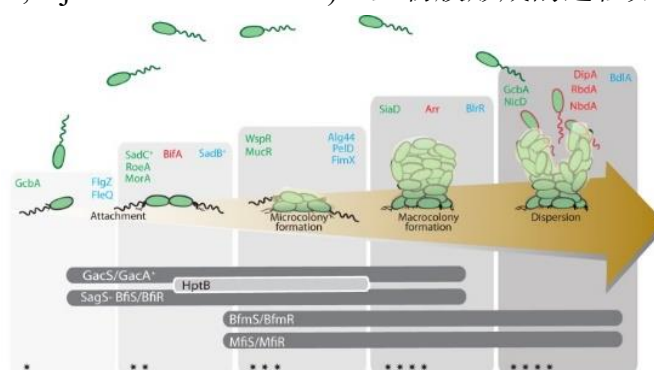


图 1-1 细菌生物膜的形成过程

Fig. 1-1 The formation of bacterial biofilms

与浮游细菌相比，生物膜中细菌的生长和繁殖速度都更慢，但却是自然界中细菌存在的主要形态，因为生物膜更利于微生物的自我保护。如在南极洲，发现了一株名为 *Pseudoalteromonas haloplanktis* TAC125 的菌株，在应对环境变化时采用不同生物膜结构(Ricciardelli et al 2019)。不同的 EPS 赋予了生物膜在不同条件下的灵活性和稳定性，这种特殊的发育形式使其具有极强的持久能力，抵抗吞噬作用、氧化应激、营养/氧限制、代谢废物积累、物种间竞争和传统抗菌剂(Moradali et al 2017)。例如在临床上，由铜绿假单胞菌的感染而形成的囊胞性纤维症(Ryder et al 2007)，由

于生物膜的存在, 对治疗增加了难度。另外, 经多种抗生素治疗后会致 *Clostridium difficile* 感染 (CDI) (Vuotto et al 2018)。除此之外, 细菌生物膜对动植物也存在致病性。例如 *Pseudomonas brassicacearum* DF41 中生物膜对秀丽隐杆线虫 (*Caenorhabditis elegans*) 的毒杀 (Nandi et al 2016), 在 *Ralstonia solanacearum* OE1-1 侵染番茄叶片时, 生物膜也发挥一定的作用 (Mori et al 2016)。

细菌形成生物膜的外界驱动因素可能包括以下三点: (1) 防御; (2) 定植; (3) 物质和信息交换。对于其形成分子机制的研究主要是通过细胞内第二信使 c-di-GMP, 这也是研究最深入的。在许多细菌物种中, 如铜绿假单胞菌、荧光假单胞菌 (*Pseudomonas fluorescens*)、恶臭假单胞菌、霍乱弧菌 (*Vibrio cholerae*)、鼠疫耶尔森氏菌 (*Yersinia pestis*)、大肠杆菌 (*Escherichia coli*)、肠道沙门氏菌 (*Salmonella enterica*)、新洋葱伯克霍尔德菌 (*Burkholderia cenocepacia*)、枯草芽胞杆菌 (*Bacillus subtilis*)、艰难梭菌 (*Clostridium difficile*) 等等, 表明生物膜的形成发生细胞内第二信使 c-di-GMP 水平开始增加之时 (Hall and Mah 2017)。除了 c-di-GMP 介导的调节外, 在许多细菌物种中, 生物膜的形成也通过调节小 RNA (Small regulatory RNAs, sRNA) 进行调节, 此通路在铜绿假单胞菌中研究比较透彻。另外, 群体感应 (QS) 系统对于生物膜的形成和毒力基因的表达等具有关键的调控作用 (Liu et al 2012; Moradali et al 2017)。目前研究表明, c-di-GMP 作为第二信使的系统调节胞外多糖和表面蛋白的生成, 这些胞外蛋白在细菌形成的生物膜中起着细胞外基质成分的作用; sRNAs 的系统似乎可以调节所有这些物种的胞外多糖生物膜基质物质的生产。在假单胞菌中, QS 调控细胞外 DNA、凝集素和生物表面活性剂的生成, 这些都在生物膜的形成中起作用, 如图 1-2 所示 (Fazli et al 2014)。

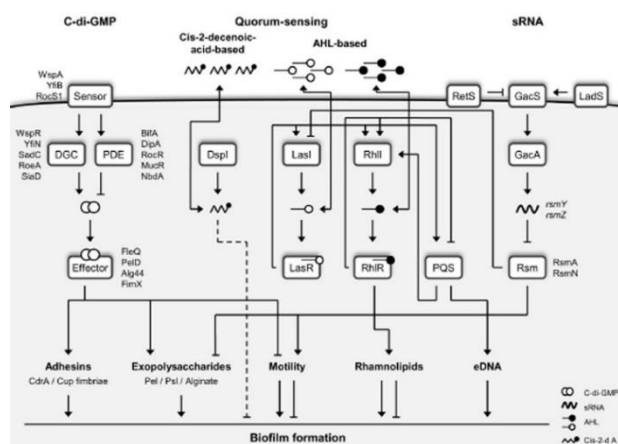


图 1-2 生物膜形成的分子机制

Fig. 1-2 Molecular mechanism of biofilm formation

1.3 环鸟苷二磷酸 c-di-GMP

环状二核苷酸（CDNs）是一种高度通用的信号分子，无论是在原核生物中还是真核生物中，都控制着各种重要的生物学过程。研究最好的例子是环二鸟苷酸（c-di-GMP）（Jenal et al 2017）。自 20 世纪 80 年代末被发现以来，它被认为是一种几乎无处不在的第二信使，协调细菌生长和行为的各个方面，包括活力、毒性、生物膜的形成和细胞周期的进展(Xiang et al 2017)。c-di-GMP 对细胞功能的调节是多层次的，包括：（1）酶活性或蛋白功能的变构调节，（2）通过调节转录因子来调节基因表达，（3）通过直接与非编码 RNA 分子（核糖体）相互作用来调节基因表达。c-di-GMP 构建这些调控连接的分子由一系列不同的 c-di-GMP 结合受体或 c-di GMP 效应或分子组成(全旭 et al 2018)。

环二鸟苷酸（Cyclic diguanylate, c-di-GMP）最早是在在葡糖醋酸杆菌中发现(Ross et al 1987)。该分子是由 GTP 的两个分子通过鸟苷酸环化酶(DGCs)的筷子模型催化合成，如图 1-3 a 所示(Schirmer 2016)，并通过磷酸二酯酶(PDEs)分解成线性 di-GMP，如 5'-pGpG，或被寡核苷酸酶和相关的 RNA 降解酶进一步降解为 GMP(Hall and Lee 2018)。c-di-GMP 的细胞水平由 DGCs 和 PDEs 的拮抗活性决定，以维持细胞内 c-di-GMP 浓度处于一个动态平衡。在一个给定的细菌有机体中，通常含有多种 DGCs 和 PDEs。1987 年，Benziman 等人在从葡糖醋酸杆菌中提取出 PDEs，并证实其可将 c-di-GMP 水解。1995 年，首次在新月杆菌中 PLeD，是第一个被发现的鸟苷酸环化酶。后来利用生物信息学、生化和结构方法，识别和表征了 DGCs 和 PDEs 的催化结构域。前者携带 GGDEF 活化基序，后者携带 EAL 或 HD-GYP 结构域。经过大规模的基因组测序发现，编码 GGDEF、EAL 或 HD-GYP 这些蛋白结构域的基因序列广泛存在于细菌中。此外，GGDEF 和 EAL 既可以单独存在于不同的蛋白中，也可以同时存在于同一蛋白中。在这些所谓“杂交”蛋白中，要么两个域中只有一个具有催化活性，另一个具有调节功能，要么存在第三个调节域，可能会使二者的活性分离(Na and Yang 2012)。

c-di-GMP 在活跃的浮游生物和静止的生物膜的生活方式之间切换时起着关键作用。有研究称，细胞中高浓度的 c-di-GMP 与生物膜的形成或低浓度的 c-di-GMP 与运动的相关性已在几种细菌中得到证实，如大肠杆菌、铜绿假单胞菌和鼠伤寒沙门氏菌(Simm et al 2004)。据估计，在铜绿假单胞菌中每 mg 的总细胞提取物中，生物膜平均含有 75-110 pmol 的 c-di-GMP，而浮游细胞中含量不足 30 pmol(Basu Roy

and Sauer 2014)。胞内 c-di-GMP 浓度越高生物膜形成越多这一概念被广泛接受，但不包括多重 c-di-GMP 传输级联操作生物膜。受 c-di-GMP 调节的生物膜决定因素包括：鞭毛旋转、IV 型菌毛回缩、胞外多糖生成、表面粘附素表达、抗菌素耐药性和其他应激反应、次级代谢产物生成和生物膜分散(Römling et al 2013)。

目前已证实在不同的细菌中存在一系列的 c-di-GMP 效应分子，其中包括：具有 PilZ 结构域的蛋白；具有 GGDEF 结构域和 EAL 结构域的无酶活的蛋白变体；及一些含有特殊结构域的转录调控因子如报道较多的铜绿假单胞菌的转录调控因子 FleQ，如图 1-3 b 所示(Valentini and Filloux 2016)。FleQ 作为一种转录调控因子广泛存在于假单胞菌中，主要负责调控鞭毛基因和胞外多糖的表达(Molina-Henares et al 2017)。在铜绿假单胞菌中，当胞内 c-di-GMP 水平较高时，FleQ 可以使生物膜形成的基因发生去阻遏作用，当胞内 c-di-GMP 水平较低时，FleQ 也可以激活鞭毛基因的转录。因此，FleQ 在调节铜绿假单胞菌浮游生活方式和生物膜生活方式之间的过渡中起着中心作用。另外，FleQ 通过结合 c-di-GMP 将抑制子转化为激活子，从而控制 Pel 胞外多糖生物合成的 *pel* 操纵子的表达(Baraquet and Harwood 2016)。在基因表达调控上，FleQ 是一种细菌增强结合蛋白 (bEBP)，其结构上包含三个典型的结构域：中心的 AAA+ATP 酶及 σ^{54} 相互作用域，C 端螺旋-转角-螺旋 DNA 结合结构域和 N 端 REC 受体域(Matsuyama et al 2016)。

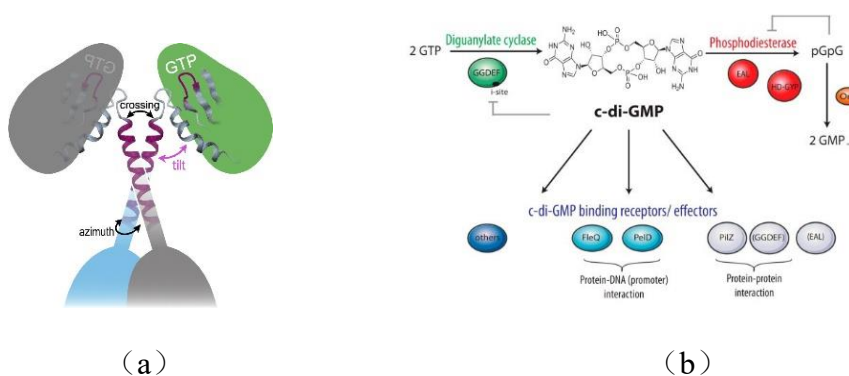


图 1-3 c-di-GMP 的合成及其调控网络

Fig. 1-3 The synthesis of c-di-GMP and its regulation network

1.4 秀丽隐杆线虫

秀丽隐杆线虫 1974 年被 Sydney Brenner 作为一种典型的遗传有机体被推广开 (Sulston and Brenner 1974)，其细胞数量少、组织多样、繁殖快、易操作、不变的体细胞谱系等特点成为了全世界研究秀丽隐杆线虫的基础(Kipreos and van den Heuvel

2019)。后来,秀丽隐杆线虫才被用作研究一种不同分子、生化、微生物和免疫相关机制的模式生物。秀丽隐杆线虫通常是在实验室的琼脂培养基上繁殖的,培养基上有大肠杆菌菌种 OP50。在与环境捕食者共同进化的过程中,一些细菌形成了复杂的防御机制,包括毒素的分泌,或避免溶酶体杀伤和在原生动物体内复制的能力(Hilbi et al 2007)。目前在细菌对抗秀丽隐杆线虫的研究中,探讨最多的是铜绿假单胞菌。铜绿假单胞菌可以通过多种机制杀死秀丽隐杆线虫。例如:“Fast killing”是秀丽隐杆线虫的一种快速中毒,它不依赖于肠道内细菌的积累,甚至不依赖于活菌的存在,主要是由于毒性因子的存在。“Slow killing”是由于活的细菌在秀丽隐杆线虫的肠管腔内积聚而导致的活动性感染。另外在铜绿假单胞菌还存在一种特别的“Liquid killing”是为了高通量筛选抗感染化合物的化学文库而建立的(Kirienko et al 2014)。

除此之外,当环境中的细菌不断受到细菌捕食者的威胁,如自由生活的原生动物和线虫,为了保护自己不受捕食者的侵害,一些细菌形成了不能食用的细丝或生物膜,从而防止自己被吞噬(Matz and Kjelleberg 2005)。通过形成生物膜来杀线虫这条途径并非所有致病菌都具备,有报道称就连臭名昭著的利用形成生物膜来感染致病的铜绿假单胞菌和大肠杆菌也都缺乏这种能力(Kirienko et al 2013)。在 2002 年,有研究者报道称鼠疫杆菌能够利用一种依赖 *hms*-HFRS 操纵子在秀丽隐杆线虫的头部和身体处形成生物膜,抑制线虫进食,最终使线虫饥饿而死(Darby et al 2002)。类似地,在十字花科假单胞菌 DF41 菌株和假结核菌属的部分菌株中也是通过在线虫的头部形成大量的生物膜,堵塞口腔,导致线虫死亡(Joshua et al 2003; Nandi et al 2016)。由此看来,这种抵御策略只适用于仅有的小部分细菌物种。在此基础上展开了本次实验,旨在研究在营养匮乏的培养基中丁香假单胞菌 MB03 是否会通过形成生物膜这种途径来杀线虫,并且进一步地探索这两者之间的关系。

1.5 锰氧化作用

锰(Mn)是人体必需的元素,当摄入过少时会引起多种疾病的发生,当摄入过多时将会导致中毒。锰离子的超标不仅危害人类的身体健康,而且在生活和工业上也会产生各种不良影响。自然界中的许多微生物均可将可溶性的 Mn(II)氧化成为不溶性的锰氧化物,并且在自然状态下,微生物对于高价锰的氧化速率可达到非生物过程的 10 万倍(Tebo et al 2004)。锰氧化物通常以球状、块状或不规则形等形状的聚集体的形式分布于土壤和水体沉积物中(Hansel 2017),在环境中不仅能强烈地吸

附多种重金属、放射性元素和微量元素等,而且研究表明,生物膜形成菌能促进铁、锰氧化菌对生物滤池的固定化,提高地下水中铁、锰离子的去除效率(Li et al 2016),影响或直接决定着它们在环境中的浓度、形态、迁移和转化过程(Wright et al 2016; Estes et al 2017),还可以和环境中的有机物发生反应,催化它们的降解(Singh et al 2003; Furgal et al 2015)。

我们知道能够参与 Mn(II)氧化的细菌种类众多,其中常用作锰氧化机制研究的模式菌株主要有芽孢杆菌 SG-1,恶臭假单胞菌 MnB1/GB-1 和生盘纤发菌 SS-1。在 *P. putida* 中,参与鞭毛合成、蛋白转运、双组分响应调控、细胞色素 c 生物发生、碳代谢等基因均与锰氧化相关(Banh et al 2013)。此外,多铜氧化酶和过氧化物酶已被证明参与细菌的锰氧化过程。在细菌锰氧化酶的研究表明,这些氧化酶在形成颗粒状锰氧化物的过程中产生中间产物 Mn(III),并且能够将 Mn(III)氧化为 Mn(IV)(Wright et al 2018)。由于 Mn(III)在 Mn(II)氧化过程中仅被发现为一种瞬态可溶性中间体,通常不被观察到,这表明 Mn(II)氧化成 Mn(IV)是通过两个连续的单电子氧化反应发生的,而 Mn(II)氧化成 Mn(III)是速率限制步骤(Toyoda and Tebo 2013)。虽然目前对细菌锰氧化形成的分子机制取得了一定的进步,但是其中复杂的调控过程还需要人们深入探究。而细菌氧化并不是在任何条件下都能发生,一般需要在营养物质匮乏的情况下启动。关于细菌 Mn(II)氧化的潜在生理功能或益处已经提出了许多假说,主要包括:(1)通过 Mn(II)氧化过程中产生能量来帮助细菌的生存。(2)锰氧化物可以作为一个保护屏障,抵御外部活性氧(ROS)、紫外线和原生生物和病毒的捕食。(3)锰氧化物也可以作为一种解毒机制来降低 Mn(II)或其他有毒金属的毒性。锰氧化物潜在的好处和生理作用可能因为不同的系统发育谱系而有所不同。

1.6 研究目的及意义

生物膜的研究主要是以铜绿假单胞菌为模式细菌,研究生物膜对一些药物的抗菌性,以及生物膜形成分子机制、消散、信号转导方面的研究,对假单胞菌利用生物膜引起秀丽隐杆线虫致死的研究报道较少。细菌锰氧化也主要集中在研究锰氧化细菌的发掘及锰氧化发生的分子机制等方面。本研究以调查 c-di-GMP 激发假单胞菌形成生物膜和调控杀线虫与锰氧化活性,开展实验。

本研究以实验室自行分离的丁香假单胞菌 MB03 及恶臭假单胞菌 T34 为实验材

料，利用基因超表达、基因敲除等分子生物学技术成功构建了超表达菌株 T35、T36 及敲除菌 T37。本室对丁香假单胞菌 MB03 的研究主要集中在杀线虫机制及植物侵染方面，在这里我们重点研究了 MB03 菌株中 c-di-GMP、FleQ03、生物膜形成和杀线虫活性的整合调控途径。提供了在 MB03 中通过 c-di-GMP 驱动 FleQ03 加强生物膜的形成和生物膜依赖的抵抗秀丽隐杆线虫捕食的策略。而本实验室对于锰氧化假单胞菌 T34 主要研究方向为锰氧化形成的分子机制和采用 CRISPR 技术改造野生株 T34 提高其锰氧化活性。在本研究中利用突变菌株 T35、T36、T37 对胞内 c-di-GMP、生物膜、生物锰氧化之间关系进行了初步探索。

通过本研究为丁香假单胞菌在杀秀丽隐杆线虫的机制提供了新的思路以及防治线虫给农业作物带来的危害提供了一定的参考价值。同时，通过探究锰氧化假单胞菌 T34 的胞内 c-di-GMP、生物膜、生物锰氧化三者的联系，为生物锰氧化物的形成途径提供了新的线索，也能将最终得到锰氧化活性提高的菌株应用于生物降解。

2 材料与方法

2.1 实验材料

2.1.1 菌株和质粒

本研究所用质粒见表 2-1，所用菌株见表 2-2。

表 2-1 实验所用质粒

Table 2-1 Plasmids used in this study		
质粒	特性	用途
Plasmids	Characteristic	Function
pDS3.0	Suicide plasmid	基因敲除
p519ngfp	p519gfp with <i>pnpt2</i> cloned directly in front of <i>gfp</i> ;Kmr	基因超表达
pCdrA::gfp ^C	pUCP22Not-P <i>cdrA</i> -RBSII-gfpmut3-T0-T1;Ap ^r Gm ^r	具有绿色荧光，用于 测量细胞内 c-di-GMP 水平
pMB693	Amp ^r , GFP , M13 fwd , M13 rev	含绿色荧光，于基因超表达
pMB781	1476 bp gene cloned to pET-28a at <i>Bam</i> H I and <i>Hind</i> III	重组质粒（用于纯化蛋白 FleQ03）
pMB782	1476 bp gene cloned to p519ngfp at <i>Nde</i> I and <i>Eco</i> R I	重组质粒（用于超表达基 因 <i>fleQ03</i> ）
pMB783	1656 bp gene cloned to p519ngfp at <i>Nde</i> I and <i>Eco</i> R I	重组质粒（用于超表达 <i>VT47_20995</i> ）
pMB784	2118 bp gene cloned to p519ngfp at <i>Nde</i> I and <i>Eco</i> R I	重组质粒（用于超表达 <i>VT47_05410</i> ）
pT35	1656 bp gene cloned to pMB693 <i>Eco</i> R I and <i>Sac</i> I	重组质粒（用于超表达 <i>VT47_20995</i> ）
pT36	3831 bp gene cloned to pMB693 <i>Eco</i> R I and <i>Sac</i> I	重组质粒（用于超表达 <i>T34_00070</i> ）
pT37	1964 bp target fragment cloned to pDS3.0 at <i>Sac</i> I	重组质粒（用于基因 <i>T34_00070</i> 的敲除）

表 2-2 实验所用菌株

Table 2-2 Strains used in this study

菌株	性质	来源
Strains	Characteristics	Sources
<i>E. coli</i>		
DH5 α	F- $\Phi 80d lacZ\Delta M15 \Delta(lacZYA-argF)U169$ <i>deoR recA1 endA1 hdsR17 (rk- mk+) phoA</i>	本室保存
BL21(DE3)	F-, ompT, hsdS(rBB-mB-), gal, dcm(DE3)	本室保存
S17-1/ λ pir	RK2 traregulon, pir, host for pir-dependent plasmids	本室保存
MB781	pMB781 transformed to <i>E. coli</i> BL21	本室保存
<i>Pseudomonas</i>		
<i>P. syringae</i> MB03	具冰核活性的野生菌株	本室分离保存
MB519	含质粒 p519ngfp 的 MB03 菌株	本室保存
MB782	含质粒 pMB782 的 $\Delta fleQ03$ 突变株	本室保存
MB783	含质粒 pMB783 的 MB03 菌株	本室保存
MB784	含质粒 pMB784 的 MB03 菌株	本室保存
<i>P. putida</i> T34	具有锰氧化活性的野生菌株	本室分离保存
T35	含质粒 pT35 的 T34 菌株	本研究
T36	含质粒 pT36 的 T34 菌株	本研究
T37	含质粒 pT37 的 T34 菌株	本研究

2.1.2 PCR 引物

表 2-3 PCR 中所用引物及序列

Table 2-3 Primers and their sequence

引物名称	序列
Primer	Sequence
<i>T34_00070</i> -UP	F: 5'-CATGCGATATCGAGCTTGAAGTCAGGTTGCAGGGCT-3' R: 5'-CCAATCGCAGGATCAACGCTCAACTCATGGATCTACGC AGC-3'
<i>T34_00070</i> -Down	F: 5'-GCTGCGTAGATCCATGAGTTGAGCGTTGATCCTGCGAT TGG-3'
<i>YZT34_00070</i>	R: 5'-AATTCCTGGGAGAGCT AGCCAAAACCAAGCCCTCTA-3' F: 5'-GGGCTGGTGTAGTTTTCCGA-3' R: 5'-GGGTGTCCGGCCTTATAGTG-3'
<i>Kan</i>	F: 5'-GACTGCGAGATCATAGATATATCAGAAGAACTCGTCAAG AAGG-3' R: 5'-CAGCCGCGTAGTGAGATCATGATTGAACAAGATGGATTG C-3'
<i>YZKan</i>	F: 5'-TGAGGAGATTGATGAGCGCGG-3' R: 5'-AAGTTTGAGCAGCCGCGTAG-3'
<i>ExpVT47_20995</i>	F: 5'-ATTTAAGAAGGAGATGAGCTGATGACCTACCCTGAAGAC CCTAG-3' R: 5'-ATTCATTTCAATATCTGTATAGCCTCAGGCTTCGATTTCG GTCCGC-3'
<i>ExpT34_00070</i>	F: 5'-ATTTAAGAAGGAGATGAGCTGTTGACCAACCTTACTCAT CCGTC-3' R: 5'-ATTCATTTCAATATCTGTATAGCCTCAATGGAACATGAA CAGGGTCTC-3'

2.1.3 实验所需试剂及配制

2.1.3.1 培养基

- 1) LB 培养基：胰蛋白胨 1 % (w/v)；酵母粉 0.5 % (w/v)；NaCl 1 % (w/v)； pH 7.0。
- 2) KB 培养基：蛋白胨 2 % (w/v)；1.6 mmol/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ；甘油 1 % (w/v)；高压蒸汽灭菌，待冷后加入 8.6 mmol/L K_2HPO_4 （过滤除菌）。
- 3) NGM 线虫培养基：2.5 g 蛋白胨，3 g NaCl，定容到 1 L，每 200 mL 分装于 250 mL 三角瓶中，121 °C 灭菌 30 min。倒平板时每 200 mL 培养基中加入 1 mg/mL 胆固醇（酒精溶解）200 μL ，1 mol/L CaCl_2 200 μL ，1 mol/L MgSO_4 200 μL ，1 mol/L 磷酸钾缓冲液（pH 6.0）5 mL，混匀后倾倒即可。
- 4) Lept 培养基：酵母提取物 0.5 g，Casamino Acids 0.5 g，葡萄糖 1 g，10 mmol/L HEPES，pH 7.5，0.48 mmol/L CaCl_2 ，痕量元素溶液 1 mL，蒸馏水溶解定容至 1.0 L。痕量元素溶液（1 L 含有）： $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 10 mg， $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 44 mg， $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 20 mg， $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 13 mg。
- 5) PG 培养基：胰蛋白胨（10 g/L）、葡萄糖（10 g/L）、NaCl（10 g/L），将各组分称量好后，放入烧杯加入蒸馏水震荡溶解。用 5 mol/L NaOH 调节 pH 至 7.0，用去离子水定容至 1 L。
- 6) 固体培养基的配制即在上述培养基中加入 1.5 %的琼脂粉。
- 7) 选择培养基：在 LB 培养基中加入相应抗生素，适用于筛选转化子。
- 8) 实验所需抗生素终浓度如下：氨苄青霉素（Amp）：100 $\mu\text{g/mL}$ ，卡那霉素（Km）：50 $\mu\text{g/mL}$ ，庆大霉素（Gm）：10 $\mu\text{g/mL}$ ，四环素（Tet）：12.5 $\mu\text{g/mL}$ 。

2.1.3.2 质粒抽提、感受态细胞制备与快检

- 1) 溶液 I：50 mmol/L 葡萄糖，25 mmol/L $\text{Tris} \cdot \text{HCl}$ （pH 8.0），10 mmol/L EDTA（pH 8.0）；
- 2) 溶液 II：0.4 mol/L NaOH，1 % SDS。
- 3) 溶液 III：每 100 mL 的溶液中包含 5 mol/L CH_3COOK 60 mL，5 mmol/L CH_3COOH 11.5 mL， H_2O 28.5 mL。

- 4) 感受态细胞: 0.1 mol/L CaCl_2 -MgCl 溶液; 混有 10 %甘油的 0.1 mol/L CaCl_2 溶液。
- 5) 快检液 I: 0.3 mol/L 蔗糖, 25 mol/L Tris·HCl (pH 8.0), 25 mmol/L EDTA, 0.02 %溴钾酚蓝 (w/v)。
- 6) 快检液 II: 0.4 mol/L NaOH, 10 % SDS (w/v)。
- 7) 25/24/1 的苯酚/氯仿/异戊醇。

2.1.3.3 PCR、重组质粒构建及琼脂糖凝胶电泳

- 1) Taq DNA 聚合酶、dNTP、限制性核酸内切酶 (*Bam*H I、*Eco*R I、*Sac* I、*Bgl* II) 购于 Takara 生物公司, DNA Marker (2 K、5 K)、T4 DNA 连接酶购于 Thermo 生物公司, 胶回收试剂盒购于擎科生物技术有限公司, PCR 引物由天一辉远生物科技有限公司合成。
- 2) 琼脂糖凝胶电泳试剂:

TAE Buffer: 1 mmol/L EDTA, 40 mmol/L Tris-乙酸 pH 8.0;

溴酚蓝: 0.25 % (w/v) 溴酚蓝, 40 % (w/v) 蔗糖;

EB (溴化乙锭): 称取 0.2 g 溶于 20 mL 去离子水中, 混匀后避光保存;

琼脂糖: 0.8 %或 1.5 %的琼脂糖凝胶。

2.1.3.4 蛋白质的诱导与纯化

- 1) 1 mol/L IPTG: 称取 2 g IPTG 固体, 溶于 10 mL 去离子水中, 0.22 μm 微孔滤膜过滤除菌后分装成小份于 -20 °C 保存。
- 2) SDS-PAGE 所用试剂:
 - a) 10 % SDS (w/v): 称量 SDS 1 g, 加入 8 mL 双蒸水搅拌溶解, 加 HCl 调节 pH 值到 7.2, 加双蒸水定容至 10 mL 于室温保存;
 - b) 1.5 mol/L Tris-HCl (pH 8.8): Tris 181.7 g, 先加 800 mL 双蒸水, 搅拌溶解后加浓 HCl 调节 pH 至 8.8, 定容至 1 L 于 4 °C 保存;
 - c) 1.0 mol/L Tris-HCl (pH 6.8): 称量 Tris-HCl 121.1 g, 先加约 800 mL 的双蒸水, 搅拌溶解后加浓 HCl 调 pH 至 6.8, 加双蒸水定容至 1 L, 4 °C 保存;
 - d) 10 % (w/v) 过硫酸铵: 称量 0.1 g 过硫酸铵, 溶于 1 mL 双蒸水;

- e) TEMED: 购于公司直接可用;
- f) 30 % 丙烯酰胺混合液: 丙烯酰胺 290 g, 甲叉双丙烯酰胺 10 g, 先加 800 mL 双蒸水, 搅拌定容至 1 L。用滤纸过滤除去杂质, 移入棕色瓶中 4 °C 保存;
- g) Tris-甘氨酸缓冲液: 25 mmol/L Tris-HCl、25 mmol/L 甘氨酸、0.1 % SDS (w/v);
- h) 2 × SDS 凝胶加样缓冲液: 100 mmol/L Tris-HCl (pH 6.8)、4 % SDS (w/v)、0.2 % (w/v) 溴酚蓝、20 % (v/v) 甘油、200 mmol/L 二硫苏糖醇;
- i) 染色液: 45 % (v/v) 甲醇、10 % (v/v) 冰乙酸、0.25 % (w/v) 考马斯亮蓝 R-250, 用滤纸过滤后使用;
- j) 脱色液: 30 % (v/v) 甲醇 300 mL、10 % (v/v) 冰乙酸 100 mL, 定容至 1 L。

3) 蛋白亲和纯化所用试剂:

纯化镍柱购买自北京韦氏博慧色谱科技有限公司。

- a) 缓冲液 I: 0.5 mmol/L H_2PO_4 19 mL、0.5 mmol/L Na_2HPO_4 81 mL、NaCl 29.3 g, 加水溶解后定容至 1 L, pH 7.0~7.4;
- b) 缓冲液 II: 0.5 mmol/L NaH_2PO_4 19 mL、0.5 mmol/L Na_2HPO_4 81 mL、NaCl 29.3 g 及咪唑 34 g, 加水溶解后定容至 1 L;
- c) 缓冲液 III: 不同浓度咪唑溶液。 配制方法如下:

表 2-4 不同咪唑浓度的配置

Table 2-4 Configuration of different imidazole concentrations

咪唑浓度	缓冲液 I 量	缓冲液 II 量
10 mmol/L	98 mL	2 mL
20 mmol/L	96 mL	4 mL
50 mmol/L	90 mL	10 mL
100 mmol/L	80 mL	20 mL
200 mmol/L	60 mL	40 mL
300 mmol/L	40 mL	60 mL
400 mmol/L	20 mL	80 mL

4) 蛋白浓度测定所用试剂:

Bradford 浓染液的配制：将 100 mg 考马斯亮蓝 G-250 溶于 50 mL 95 %乙醇，加入 100 mL 85 %的磷酸，然后用蒸馏水补充至 1 L。

2.1.3.5 基因敲除试剂

- 1) VBMM：以柠檬酸盐作为碳源的培养基，假单胞菌可以生长，大肠杆菌无法生长。
- 2) 10 × VBMM：100 g K_2HPO_4 或 131 g $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ ，2 g $MgSO_4$ 或 4 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ，35 g $NaNH_4HPO_4 \cdot 4H_2O$ ，20 g 柠檬酸，加水定容到 1 L，调节 pH 至 7.0 后，121 °C 灭菌 30 min。
- 3) VBMM + 15 % 蔗糖：30 g 蔗糖溶于 90 mL ddH₂O 中，3 g Agar 溶于 90 mL ddH₂O 中，二者分别灭菌后再混匀，最后再加入 20 mL 10 × VBMM。
- 4) VBMM + Gm₁₀：1.5 g Agar 溶于 90 mL ddH₂O，10 mL 10 × VBMM，分别灭菌后降至 50 °C 左右后混匀并按 1 : 1000 加入 10 mg/mL 的庆大霉素至终浓度为 10 µg/mL。

2.1.3.6 EMSA 所需试剂

- 1) 10 % (w/v) 过硫酸铵 (APS)：称量 0.1 g 过硫酸铵，溶于 1 mL 双蒸水。
- 2) 30 % 丙烯酰胺混合液：丙烯酰胺 290 g，甲叉双丙烯酰胺 10 g，先加 800 mL 双蒸水，搅拌定容至 1 L。用滤纸过滤除去杂质，移入棕色瓶中 4 °C 保存。
- 3) TEMED：购于公司直接可用。
- 4) TBE：Tris-base 54 g，Na₂EDTA·2H₂O 3.72 g，硼酸 27.5 g，定容至 1 L，pH 8.0，过滤，121 °C，20 min 湿热灭菌，4 °C 保存。
- 5) H × buffer：购于公司直接可用。

2.1.3.7 以秀丽隐杆线虫为实验对象的生物学测定所需试剂

- 1) M9 Buffer：MgSO₄ 0.12 g，NaCl 5 g，Na₂HPO₄ 6 g，KH₂PO₄ 3 g，蒸馏水定容到 1 L。
- 2) S basal：0.1 mol/L NaCl，0.05 mol/L K₂HPO₄，pH 6.0。
- 3) S medium buffer：S Basal 1 L，1 mol/L 柠檬酸盐缓冲液 (pH 6.0)，trace metals 10 mL，1 mol/L CaCl₂ 3 mL，1 mol/L MgSO₄ 3 mL，5 mg/mL 胆固醇 1 mL。

- 4) Trace metals: EDTA 二钠 1.86 g, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.69 g, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.2 g, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.29 g, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.025 g, 蒸馏水定容至 1 L。
- 5) 线虫同步化试剂: 5 % NaClO , 5 mol/L NaOH , 双蒸水。
- 6) 8 mg/mL 5-氟-2'-脱氧尿苷。

2.1.3.8 锰氧化活性测定所需试剂

- 1) 10 mmol/L HEPES 缓冲液: 其分子式为 $\text{C}_8\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_4\text{S}$, 是一种强缓冲剂, 对菌体无毒性作用, 能长时间维持体系 pH 值在恒定范围内。本实验采用 HEPES 缓冲液在培养基中的终浓度为 1 mmol/L, pH 调节至 7.5 左右。
- 2) 0.04 % LBB(用 0.25 % HAC 溶解): 以 0.25 % 的乙酸溶液为溶剂, 配制浓度为 0.04 % 的 LBB 溶液, 于 4 °C 条件下避光静置 24 h 至溶解。

2.1.3.9 染料去除所需试剂

- 1) 染料: 直接红 243、活性蓝 220、酸性绿 25 直接购于厂家。
- 2) HPLC 试剂: 甲醇, 哇哈哈水。

2.1.4 实验仪器

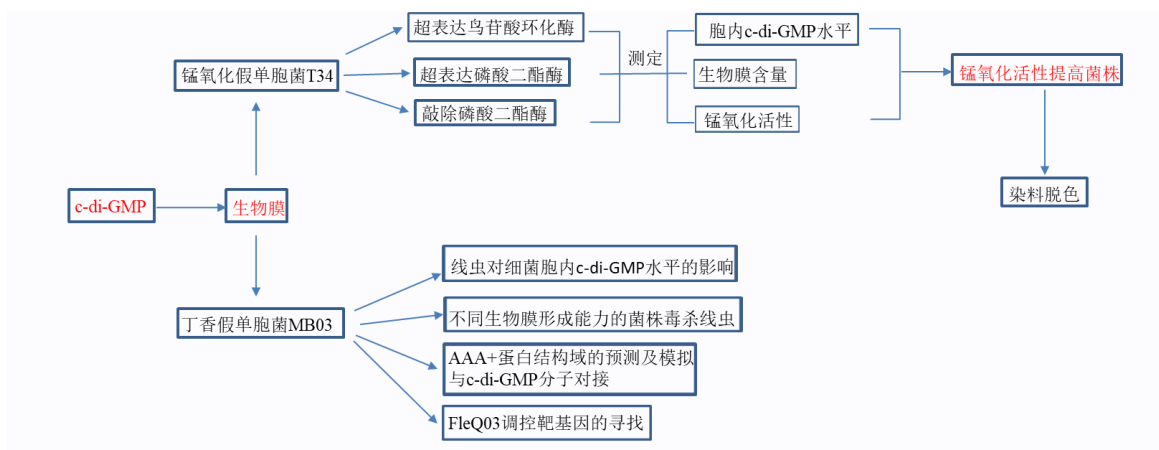
表 2-5 实验仪器

Table 2-5 Experimental apparatus

仪器名称	生产厂家及型号
超速离心机	Beckman Optima LE-80K
PCR 仪	Applied Biosystems Thermal Cycler 2720
超声波破碎仪	Sonics VibraCell Vcx130
压力破碎仪	Thermo, USA French Pressure Cell
电脉冲转化仪	Bio-Rad GenePulserTM
荧光分光光度计	SHIMADZU RF-5301PC
紫外-可见分光光度计	Beckman Coulter DU800 nucleic acid/protein Analyzer
磷屏成像系统	FUJIFILM FLA-5100
倒置荧光显微镜	Nikon Ti-U
液相色谱仪	Shimadu LC20-AT

2.2 实验方法

2.2.1 实验技术路线



2.2.2 分子克隆技术

2.2.2.1 PCR 扩增

实验采用常规的 PCR 方法进行相关基因的扩增。所用的引物见表 2-3，PCR 反应过程中所用模板为丁香假单胞菌 MB03 的总 DNA。反应体系如下（50 μL 体系）：

表 2-6 PCR 反应体系

Table 2-6 PCR reaction system

试剂	体积
Taq DNA polymerase	1 μL
10 \times PCR easy buffer	5 μL
dNTP(10 mM)	4 μL
模板	1 μL
上游引物	1 μL
下游引物	1 μL
ddH ₂ O	37 μL

10 \times PCR easy buffer 中含有 Mg^{2+} ，无需再另外添加。

PCR 一般反应程序为：预变性温度 94 °C，10 min，变性温度 94 °C，45 s，退火温度据引物的 T_m 值而定，通常设定为 $(T_m - 5) ^\circ\text{C}$ ，延伸温度 72 °C，时间由扩增基因片段的长度决定，进行 25 个循环即可。

2.2.2.2 大肠杆菌质粒的抽提

- 1) 将菌株接种于相应的培养基中，37 °C 过夜培养。
- 2) 加入 100 μL 溶液 I，在快速混匀器上使菌体均匀悬浮。
- 3) 加入 200 μL 溶液 II，轻柔颠倒混匀，放置于冰上不超过 5 min。
- 4) 加入 150 μL 溶液 III，颠倒混匀，冰上放置 10 min。
- 5) 12000 r/min 离心 5 min，吸取上清移至另一离心管内，加入 400 μL 苯酚氯仿异戊醇（若离心管内蛋白质很少，可以省略此步），震荡混匀，12000 r/min 离心 5 min。
- 6) 取上清液移至另一离心管内，加入两倍体积的无水乙醇，混匀，冰上放置 30 min。
- 7) 12000 r/min 离心 5 min，弃上清，将离心管内酒精吸干，自然晾干。
- 8) 加入 50 μL TE 或去离子水，放置于 -20 °C 冰箱备用。

2.2.2.3 大肠杆菌钙转化感受态细胞制备

- 1) 挑单菌落（DH5a）于 LB 液体培养基中 7 °C 振荡培养过夜，将该菌悬液以 1 : 100 – 1 : 50 转接于 200 mL LB 液体培养基中，37 °C 振荡培养约 2 h 后至对数生长期。
- 2) 将活化后的细菌从摇床中拿出，放置在冰上冷却 20 - 30 min。等菌液完全冷却后，在超净台中将菌液分装到 50 mL 的离心管中，于 4 °C，4000 r/min 离心 10 min（从这一步开始，所有操作均在冰上进行，速度尽量快而稳）。
- 3) 倒入 50 mL 的离心管中，配平，在冷冻离心机中于 4000 r/min，4 °C 离心 10 min。
- 4) 弃上清，先加 1 mL 预冷的 0.1 mol/L 的 CaCl_2 混匀菌体，然后加至 15 mL，使菌体充分悬浮，冰上放置 30 min。
- 5) 于 4 °C，4000 r/min 离心 10 min。

- 6) 弃上清, 每 50 mL 初培养物加 2 mL 预冷的 0.1 mol/L 的甘油 (10%) CaCl_2 , 重悬菌体, 分装每管 100 μL , $-80\text{ }^\circ\text{C}$ 保存。

2.2.2.4 DNA 体外重组

DNA 的酶切、酶连, 回收及纯化等相关实验操作均按照《分子克隆实验指南 (第三版)》(萨姆布鲁克等 2002) 和所用酶的说明书来进行。

2.2.2.5 大肠杆菌的钙法转化

实验中所用的大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞及 BL21 感受态细胞均根据《分子克隆实验指南 (第三版)》(萨姆布鲁克等 2002) 采用氯化钙法制备及转化。

2.2.2.6 电转化

电转化中感受态细胞的制备, 电泳冲参数的设置及相关实验操作均按照《分子克隆实验指南 (第三版)》(萨姆布鲁克等 2002) 进行。

2.2.2.7 阳性克隆的快速筛选

- 1) 用牙签挑选转化子, 先将转化子点在新的相应抗性的平板上, 然后将牙签浸在加入 1 mL 相应抗性培养基的 1.5 mL 离心管中, 做好标记, 平板和离心管均 $37\text{ }^\circ\text{C}$ 培养, 离心管中的菌体大约培养 6 h 左右。
- 2) 收集菌体, 加入 25 μL 快检液 I, 振荡混匀后在冰上放置片刻。
- 3) 加入 25 μL 快检液 II, 充分混匀, 置于 $70\text{ }^\circ\text{C}$ 水浴锅中 15 min。
- 4) 冷却后加入 50 μL 溶液 III (苯酚氯仿异戊醇), 充分振荡混匀, 12000 r/min 离心 5 min。
- 5) 取 10 μL 上清液进行琼脂糖凝胶电泳检测。

2.2.3 重组菌的诱导表达、亲和纯化

2.2.3.1 诱导表达

- 1) MB781 重组菌培养过夜, 按 1% 的接种量进行转接。
- 2) 待菌株培养至薄雾状 (2 h 左右), 然后加入 IPTG, 终浓度为 0.3 mmol/L。

- 3) 置于 20 °C，150 r/min 培养 8 h。

2.2.3.2 SDS-PAGE 样品制备及聚丙烯酰胺凝胶电泳

- 1) 12000 r/min 离心 1 min 收集菌体。
- 2) 用 PBS (pH 7.4) 缓冲液洗涤两到三次，重悬菌体。
- 3) 加入等体积的 2 × SDS-PAGE Buffer。
- 4) 沸水浴煮沸 5-15 min，冷却到室温后 12000 r/min 离心 5 min。
- 5) 通常取 10 μL 上清点样跑胶。参照萨姆布鲁克（2002）的方法，根据表达蛋白的分子量大小选择合适的分离胶浓度。

2.2.3.3 亲和纯化

- 1) 收集诱导好的菌体于 50 mL 离心管中。
- 2) 使用超声波破碎仪或压力破碎仪，冰上破碎细胞。
- 3) 4 °C，12000 r/min 离心 15 - 20 min。
- 4) 吸取镍柱 1 mL，用缓冲液 I 过柱洗涤 2 - 3 遍。
- 5) 细胞破碎上清全部加入到镍柱中，4 °C 结合 3 h 左右。
- 6) 结合完后，将液体全部转入层析柱，用 10 mmol/L 咪唑洗脱液洗涤 3 遍，以除去杂蛋白。
- 7) 按咪唑浓度 50 mmol/L、100 mmol/L、150 mmol/L、200 mmol/L、250 mmol/L、300 mmol/L 摸索最佳洗脱目的蛋白浓度。分别 2 - 4 mL 过柱，收集洗脱液并跑 SDS-PAGE 胶验证纯化结果。

2.2.3.4 蛋白质透析

旨在除去纯化蛋白时收集的洗脱液中的咪唑和镍离子，以最大限度减小对后续实验的干扰。

- 1) 将透析袋剪成合适的大小。
- 2) 在 2 % (m/v) 碳酸氢钠和 1 mmol/L EDTA (pH 8.0) 中将透析袋煮沸 10 min。
- 3) 将煮过的透析袋内外用蒸馏水彻底漂洗干净（从此步起用透析袋时一定要戴手套操作）。
- 4) 将待透析液加入到冲洗干净的透析袋中，两端夹紧，中间不要有气泡产生。

- 5) 使用预冷的 50 mmol/L Tris-HCl 缓冲液 4 °C 透析过夜，缓冲液的 pH 调整为目的蛋白的最适 pH。

2.2.3.5 蛋白浓度测定

使用考马斯蓝染色法（Bradford 法）测定目的蛋白浓度。

2.2.4 生物信息学分析

- 1) 以铜绿假单胞菌 PAO1 的 FleQ 蛋白的 AAA+结构域(S145~D394)作参考，利用 BioEdit 7.0 对 MB03 基因组数据进行本地 BLASTp 搜索，预测其中含有 AAA+域的蛋白。
- 2) 利用 ExPASy 分析蛋白分子质量和等电点。
- 3) 利用 NCBI 的在线工具“保守域搜索”分析了候选蛋白的保守域结构。
- 4) 利用 ClustalX 软件将氨基酸序列与 PDB（Protein Data Bank）数据库中发现的某些同源蛋白进行多序列比对。
- 5) 利用 Discovery Studio 2018 软件进行同源建模和分子对接。
 - a) 使用“创建同源模型”选项生成同源建模，使用“BLASTp 搜索”选项搜索模板；
 - b) 使用“MODELER”选项进一步优化了总共 20 个模型的最小 DOPE 评分模型；
 - c) 采用“柔性对接”方法对 AAA+的蛋白与 c-di-GMP(来源于“PubChem”)进行分子对接；
 - d) 结合位点由受体空腔确定，结合槽中的氨基酸选择为柔性残基；
 - e) 将 cDock- Energy 值最低的模型定义为最佳结合构象。
- 6) 使用“PyMol”软件（DeLano Scientific LLC）生成的对接模型有两种：演示腔结构的立体图像和演示表面结构的立体图像。

2.2.5 EMSA

2.2.5.1 EMSA 胶的配制（40mL）

表 2-7 EMSA 胶配置体系

Table 2-7 EMSA gel system

试剂	体积
ddH ₂ O	25.65mL
30 % Acrylamid	10mL
5 × TBE	4mL
APS	300μL
TEMED	50μL

室温放置 30 min 左右，等胶凝之后，用蒸馏水冲上样槽。

2.2.5.2 EMSA 反应的结合体系

表 2-8 EMSA 反应体系

Table2-8 EMSA raction system

试剂	体积			
	1	2	3	4
H × Buffer	2μL	2μL	2μL	2μL
DNA	2μL	2μL	2μL	2μL
PBS + 甘油	16μL	10μL	6μL	2μL
protein	0μL	6μL	10μL	14μL

冰上孵育 30 min

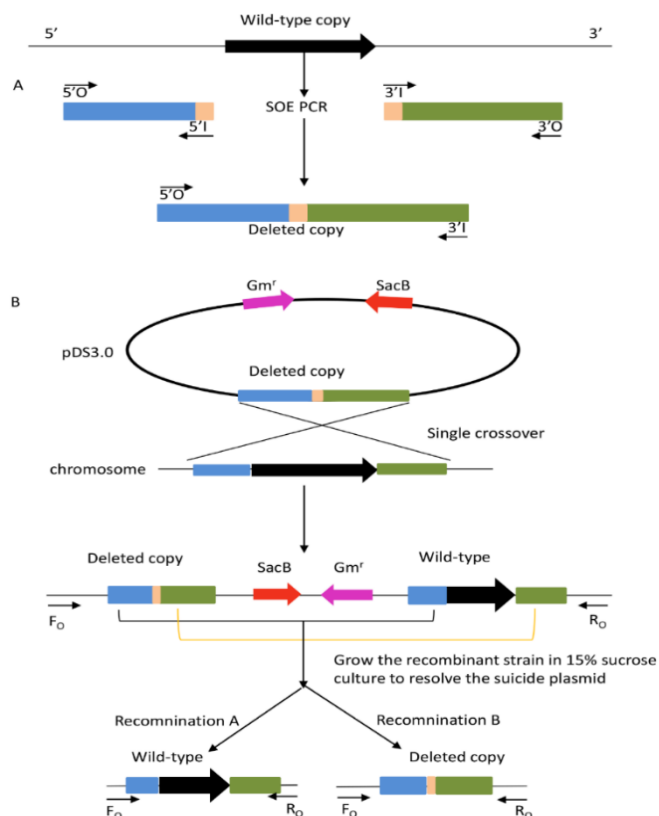
2.2.5.3 电泳分析

- 1) 用 0.5 × TBE 作为电泳液，按照 10 V/cm 的电压预电泳 10 min。
- 2) 把样品加入到上样孔内。
- 3) 电压 120 V，2 h 30 min，可以根据条件适当改变。
- 4) 电泳完之后，用 EB 染色 10 min 左右，用照胶成像系统仪器照胶检测。

2.2.6 基因敲除

2.2.6.1 基因敲除原理

基因敲除使用双交换的原理，具体如图 2-2 所示：



2.2.6.2 基因敲除步骤

- 1) 目的基因上、下游序列及其重叠片段的获得：通过 SeqBuilder 软件，找到待敲除的基因，通过 PCR 扩增出该基因的上游片段和下游片段（各 1000 bp 左右）作为同源臂。
- 2) SOE PCR：将上下游片段通过融合 PCR 扩增成 1 个长片段。
- 3) 酶连及转化：将融合片段约 2000 bp 连接到 pDS3.0 质粒上，转化到辅助菌 S17-1 中，并通过 PCR 验证。
- 4) 结合转移：受体菌株和供体菌过夜培养后，转接液体 LB 培养至对数期，取受体菌株:供体菌株=1:3 的比例收菌，中间用 ddH₂O 或者 10 mmol/L MgSO₄ 洗涤和重悬，最终将重悬后的混合菌液用移液器滴加到灭菌后的滤纸条上。28 °C 培养 24 h（结合 12 - 24 h 均可，24 h 的结合效率更高）。

- 5) 收菌：使用灭菌的镊子将滤纸取出到有装有 LB 培养基的 PA 瓶中，在振荡器上震荡混匀，收集 2-3 mL 菌液，用 ddH₂O 洗涤，重悬后涂布到平板上。在 28 °C 恒温箱中培养 1.5 - 2 d。
- 6) 挑取结合子：
 - a) 按顺序点于 VBMM (Gm^R) 和 VBMM + 15 % 蔗糖平板。培养约 12 h 。
 - b) 挑选 VBMM (Gm^R) 上生长良好但蔗糖平板上不生长或长势弱的菌接种到 5 mL 的 LB 培养基，过夜培养。
- 7) 基因敲除菌的筛选：将上一步骤中过夜培养的菌收集后，用 ddH₂O 洗涤后并重悬，按 10⁻¹ 至 10⁻³ 梯度稀释到 VBMM + 15 % 蔗糖培养基中，28 °C 培养 1.5 - 2 d 后，挑选单菌落，点于 VBMM + 15 % 蔗糖和 VBMM (Gm^R) 平板上，28 °C 培养 12 h。
- 8) 基因敲除验证：挑选 VBMM + 15 % 蔗糖生长且 VBMM (Gm^R) 平板上不生长的菌作为待验证的模板，通过菌落 PCR 验证的方法进行验证。如果敲除成功，则通过 PCR 扩增出来的条带是要比未敲除菌株的条带要小，差距则是所敲除目的基因的大小。

2.2.7 生物膜形成

2.2.7.1 以 96 孔板为介质的生物膜形成及其测定

- 1) 菌株过夜培养，收集菌体，调节 OD₆₀₀ = 1.0；
- 2) 按菌株:培养基 = 1 : 10 比例，将培养基和菌株加入 96 孔板中，置于 22 °C 静止培养 24 h；
- 3) 生物膜形成后，倒掉内含物，动作轻柔；
- 4) 双蒸水清洗 3 遍，80 °C 固定 20 min；
- 5) 1 % 结晶紫染液室温染色 15 min；
- 6) 双蒸水清洗 3 遍；
- 7) 加入适量的 95 % 乙醇溶解，2 h 后即可测定 OD₅₉₅。

2.2.7.2 以玻璃容器为介质的生物膜形成及其测定

- 1) 菌株过夜培养，收集菌体，调节 OD₆₀₀ = 1.0；

- 2) 按菌株:培养基= 1 : 100 比例, 将培养基和菌株加入玻璃容器中, 置于 28 °C 摇床 100 r/min 培养 16 h;
- 3) 生物膜形成后, 倒掉内含物, 动作轻柔;
- 4) 双蒸水清洗 3 遍, 80 °C 固定 20 min;
- 5) 1 %结晶紫染液室温染色 15 min;
- 6) 双蒸水清洗 3 遍;
- 7) 加入适量的 95 %乙醇溶解, 2 h 后即可测定 OD₅₉₅。

2.2.8 以秀丽隐杆线虫为试验对象的生物学测定实验

2.2.8.1 秀丽隐杆线虫的饲养

秀丽隐杆线虫一般培养在涂布有大肠杆菌 OP50 的 NGM 固体平板上, 平板应足够厚以维持培养基一定的湿度。转移线虫时可使用无菌镊子切割一块带有足够多线虫的琼脂块并置于新的涂布有大肠杆菌 OP50 的 NGM 平板上, 也可以直接将带有线虫的液体滴在平板上进行转接培养。

2.2.8.2 秀丽隐杆线虫的裂解与同步化

- 1) 用 3 mL 无菌水冲洗一个拥有大量受孕成虫的 NGM 平板两次, 然后 800 r/min 离心 1 min。
- 2) 弃上清, 加入 5 mL 水并摇匀, 再次 800 r/min 离心 1 min。吸去上清, 加入 1 mL 预先配制好的裂解液 (裂解液成分: 4 mL ddH₂O, 0.5 mL 5 mol/L NaOH 和 0.5 mL 4 % - 6 % NaClO) 并混匀。显微镜下观察线虫的裂解状态, 当线虫虫体完全溶解 (一般需 4 - 8 min), 虫卵全部释放出来后, 加入 5 mL 无菌水, 2000 r/min 离心 1 min, 弃上清, 再用无菌水洗一次, 然后用 M9 Buffer 洗两次, 最后加入 1 mL M9 Buffer 重悬虫卵, 旋转摇床室温孵育过夜。
- 3) 孵育结束后, 取 5 μ L 于载玻片上, 显微镜下检测线虫的生长状况。
- 4) 将 L1 期的线虫涂布于长有大肠杆菌 OP50 的 NGM 平板上, 直至长成 L4 期。

2.2.8.3 对秀丽隐杆线虫的生物学活性测定

- 1) 第一天, 将成虫进行裂解和同步化, 得到的虫卵室温孵育一晚。

- 2) 第二天,孵化的 L1 期线虫涂布在涂有大肠杆菌 OP50 的 NGM 平板上, 22 °C 培养 44 - 48 h。
- 3) 第三天, 大肠杆菌 OP50 挑取单菌落接种于 5 mL 的 LB 培养基中, 培养过夜, 同时将实验组菌株涂布在 PG (含有终浓度为 8 mmol/L 的 FUdR) 平板上生长 24 h 左右。
- 4) 第四天, 先将实验菌株和大肠杆菌 OP50 离心收集菌体, 并用 M9 Buffer 洗两次, 再用 M9 Buffer 重悬菌体并调节其 OD₆₀₀ 至 0.7; 然后, 用 M9 Buffer 将长至 L4 期的线虫从平板上冲洗下来, 800 r/min 离心 1 min, 再用 M9 Buffer 洗两次, 重悬虫体, 并调整虫子数量使得每 5 μ L 约含有 30 - 50 头成虫。固体杀虫: 将线虫打至培养好的含有实验菌株的 PG 平板上, 22 °C 培养 5 d, 每天按时计数; 液体杀虫: 将 96 孔板消毒处理后, 每个孔中加入 50 μ L 的线虫溶液 (包括 5 μ L 的线虫虫液, 5 μ L FUdR, 0.6 μ L 的氯霉素和 40 μ L M9 Buffer) 和 150 μ L 的待测样品。每个菌株设置 3 个重复, 将 96 孔板用封口膜封口放入 22 °C、 3 - 5 d, 定期统计线虫的死亡数。

2.2.8.4 MB03 细胞喂食秀丽隐杆线虫的显微分析

- 1) 将含有 GFP 的 MB03 菌株涂布在 PG 平板上生长 24 h 左右。
- 2) 然后将同步化的线虫放在含有 GFP 的 MB03 菌株的 PG 平板上共培养 3 d 左右。
- 3) 之后用 ddH₂O 轻轻将浮游的细菌洗下来。
- 4) 最后用倒置荧光显微镜进行观察。

2.2.9 细菌 Mn (II) 氧化活性的测定

2.2.9.1 锰氧化物聚集体培养

以假单胞菌野生型 T34 和改造后的 T34 菌株, 在含终浓度为 1 mmol/L Mn²⁺的 Lept 培养基中连续培养 5 d。

2.2.9.2 细菌的 Mn (II) 氧化活性测定

- 1) 挑取细菌单菌落于培养基中, 按照 0.5 % - 1 % 的接种量转接到含锰的培养基中进行培养 5 d。
- 2) 收集 1 mL 菌体(12000 r/min, 30 s), 弃上清, 加入 50 μ L HEPES(10 mmol/L), 混匀。
- 3) 按 1 : 5 (V : V) 入 0.04 % LBB 溶液, 避光反应约 30 min。
- 4) 反应后, 离心 (2000 r/min, 30 s) 取上清测定吸光值 (620 nm)。
- 5) 根据高锰酸钾标准曲线计算锰氧化物浓度。

2.2.9.3 KMnO₄ 标准曲线的制作方法:

- 1) 精确称取 KMnO₄, 制备 0.01 mol/L 的 KMnO₄, 煮沸 30 min, 静置一周后, 用草酸钠反滴定, 记录其终浓度。
- 2) 根据制备的 KMnO₄ 的浓度, 稀释至 100, 150, 200, 250, 300, 350 μ mol/L。取这六个浓度的 KMnO₄ 溶液各 50 μ L, 再分别加入 0.04 % LBB 溶液 250 μ L (1 : 5, V : V) 于暗处常温反应约 30 min。
- 3) 用分光光度计测各反应液在波长为 620 nm 下的吸光值, 以 KMnO₄ 的浓度为横坐标, 以吸光值为纵坐标, 绘制标准曲线, 以 LBB 作为空白对照。

2.2.10 细菌锰氧化物对染料的脱色作用

2.2.10.1 细菌锰氧化物对多种染料的脱色分析

- 1) 用分析天平称取染料各 0.1 g。
- 2) 溶于 10 mL ddH₂O 中搅拌均匀乃至染料全部溶解。
- 3) 收集培养 5 d 的生物锰氧化物, 清洗 2 - 3 次。
- 4) 重悬生物锰氧化物恢复至收集之前的体积, 然后按比例加入染料, 使其终浓度为 100 mg/L。
- 5) 放置在 28 °C 摇床培养 12 h。
- 6) 测定不同染料最后的吸光度值。

2.2.10.2 HPLC（高效液相色谱）操作流程

上机前准备：样品用 0.45 μm 滤膜过滤，然后超声脱气 5 - 10 min，用来排除 O_2 ， N_2 。

- 1) 接通电源，依次开启稳压电源、A 泵、B 泵、柱温箱、自动进样器、检测器、系统控制器，待自检通过。
- 2) 打开计算机电源。
- 3) 排空操作：打开 LC-20AT 泵排空阀（逆时针 90°以上），按 Purge 键，泵开始排空运行（三分钟自动停止）。然后关紧排空阀（顺时针旋紧）或者开机之前，直接打开排空阀，听到滴声之后，关紧排空阀。
- 4) 把吸滤头放入流动相瓶中，打开排液阀，按 purge 键排液 2 - 3 min，purge 完毕后关闭排液阀启动泵送液（流速开始不宜太高应为正常分析流速的 50% - 80%），此时可以同时进行自动进样器的 purge 操作（时间为 15 - 25 min）自动进样器清洗液一般使用与流动相比比例接近的不含缓冲盐的试剂也可以用甲醇:水 = 70 : 30 或甲醇:水 = 1 : 1 代替，观察检测器基线平稳后即可做样。
（注意：a 如果使用前色谱柱中保存的流动相为纯甲醇或纯乙腈，而新流动相中含有缓冲盐时，应先用纯水冲洗色谱柱十分钟左右再使用流动相，以免盐析出损坏系统。b 如系统为正相和反相交换使用，应先将所有管路用异丙醇清洗后再更换新流动相使用）。
- 5) 数据的采集及分析参照仪器说明书进行操作。
- 6) 然后，更换洗液清洗流路系统（如用缓冲液，先用水清洗 1 h，再用有机溶剂清洗 30 min 以上），最后用有机溶剂封存。
- 7) 清洗结束后，停止系统运行，在 LC SOLUTION 工作站中，按 Instrument on/off 键即停止所有单元工作。
- 8) 关主机 SPD-M20A（或 RF-10AXL）检测器，LC-20AT 泵，CTO-10ASvp 柱箱电源开关。

3 结果与分析

3.1 c-di-GMP 激发丁香假单胞菌 MB03 形成生物膜和调控杀线虫

3.1.1 MB03 细胞喂食秀丽隐杆线虫的显微分析和生物学测定

在本实验室之前的研究工作中发现丁香假单胞菌 MB03 具有全细胞杀线虫活性。我们为了更直观的了解细菌在线虫体内、体外的分布，将本室保存的带有 GFP 标记的质粒导入至 MB03 得到的重组菌株 MB519 涂布在 PG 平板上，然后将同步化之后的线虫放置在上面培养 3 - 5 d，轻轻润洗，洗掉浮游的细菌，最后在倒置荧光显微镜下观察。结果如图 3-2 A 所示，上面一行表示在明场下的拍摄，下面一行表示在荧光场下的拍摄。在菌株 MB519 喂食线虫的过程中，并不是立即将线虫杀死，而是从体表到体腔内逐渐积累的细菌菌体，直至蠕虫头部均清晰可见。此外如图 3-2 B 所示，随着 MB519 形成的生物膜增加，线虫的存活率越低。由此看来，MB519 的杀线虫活性与生物膜形成的数量明显相关。

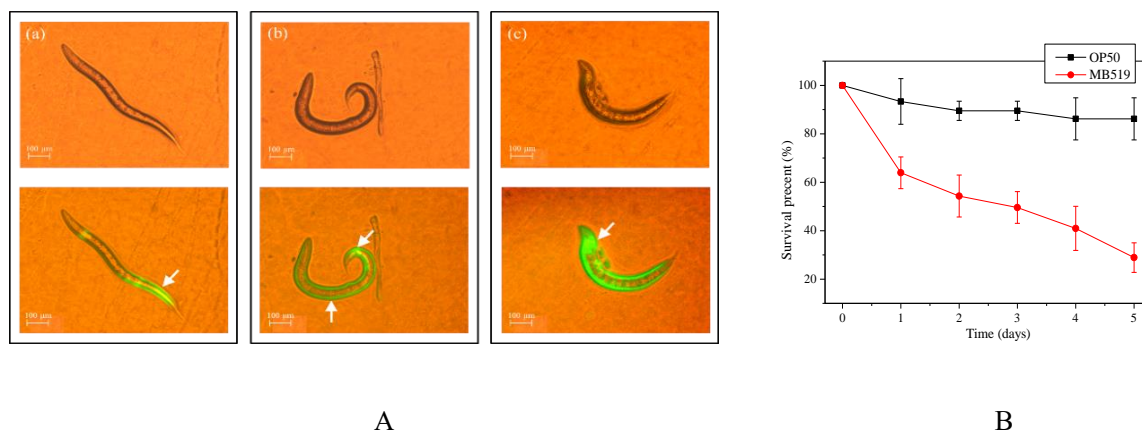


图 3-1 MB03 细胞喂食秀丽隐杆线虫的显微分析和生物学测定

Fig. 3-1 Microanalysis and biological determination of *C. elegans* feeding by MB03 cells

A: 表示 MB03 细胞喂食秀丽隐杆线虫的显微分析。

B: 表示 MB03 细胞喂食秀丽隐杆线虫的生物学测定。

3.1.2 秀丽隐杆线虫对 MB03 胞内 c-di-GMP 水平的影响

本研究中使用的是改造后的荧光报告载体 $pCdrA::gfp^C$ ，此质粒用于检测菌株胞内 c-di-GMP 的水平。研究表明，该载体适用于大多数假单胞菌，它是基于转录水平在编码绿色荧光蛋白的基因上游融合了一个 c-di-GMP 应答元件 *cdrA* 启动子。在铜绿假单胞菌中，*cdrA* 启动子的转录水平是由胞内 c-di-GMP 的水平所调控的。通过测定 $OD_{600\text{ nm}}$ 及在 EX 485 nm 和 EM 520 nm 处测定荧光值，然后间接得到胞内 c-di-GMP 水平(Borlee et al 2010; Rybtke et al 2012)。

将过夜培养的含有 $pCdrA$ 质粒的 MB03 收集、清洗、调 OD_{600} 至 0.7 左右，然后用液体杀虫的实验方法与同步化之后的线虫混合培养 3 d 左右，收菌测定其胞内 c-di-GMP 水平。结果如图 3-1 所示，经显著性分析， P 值小于 0.05。表明由秀丽隐杆线虫存在所引起的外部条件的改变能提高 MB03 胞内的 c-di-GMP 水平。

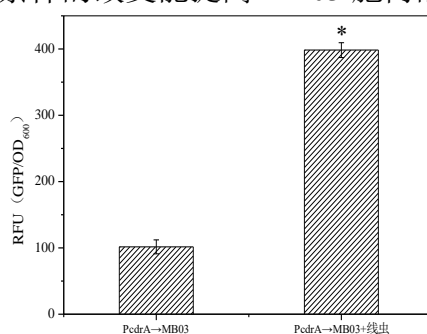


图 3-2 MB03 胞内 c-di-GMP 水平的检测

Fig. 3-2 Detection the level of c-di-GMP in MB03

3.1.3 不同生物膜形成能力的菌株对秀丽隐杆线虫毒杀实验

经上述实验结果可知，线虫会引起野生株 MB03 胞内的 c-di-GMP 水平的变化。所以，这里使用了不同 c-di-GMP 水平的菌株。基于本实验室的现有研究成果，已构建好超表达鸟苷酸环化酶菌株 MB783，及超表达磷酸二酯酶菌株 MB784，并且前期实验表明 MB783 的胞内 c-di-GMP 水平及生物膜的量都高于野生型 MB03；MB783 的胞内 c-di-GMP 水平及生物膜的量都低于野生型 MB03。由此可知在丁香假单胞菌 MB03 中，随着胞内 c-di-GMP 水平升高生物膜形成增加。随后采用 2.2.7.3 中固体杀虫的方式，对线虫 1 - 5 d 在 MB03、MB783、MB784 三株菌株中的存活率进行统计。结果如图 3-3 所示，线虫在 MB783 中存活率最低，第 5 d 仅存活 10 %左右，而线虫

在 MB784 存活率在第 5 d 时较 MB03 高出 40 %左右。结果表明，在丁香假单胞菌 MB03 中，生物膜形成能力更强的菌株对线虫的毒杀作用更强。

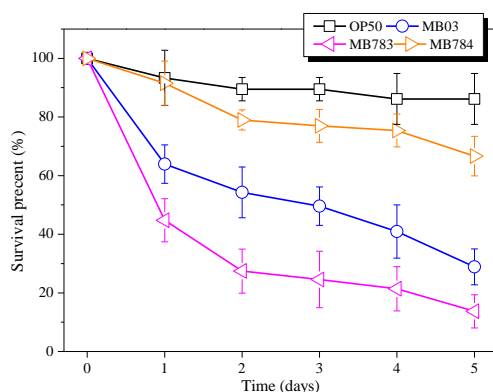


图 3-3 秀丽隐杆线虫在不同菌株的存活率分析





















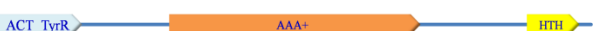
Fig. 3-3 Survival assay of different strains with *C. elegans*

3.1.4 c-di-GMP 的效应因子 AAA+结构域的识别、同源建模及分子对接

c-di-GMP 主要作用于假单胞菌多种 AAA+含域效应蛋白，其中包括在铜绿假单胞菌中其主要效应因子的转录调控因子 FleQ。我们根据铜绿假单胞菌 PAO1 的 FleQ 的氨基酸序列，使用 Bioedit 软件对丁香假单胞菌 MB03 全基因组进行搜索，发现了共存在 20 个包含 AAA+结构域的蛋白，这些蛋白被认为是能够通过 AAA+结构域与 c-di-GMP 结合的候选蛋白。我们利用生物信息学的方法从这些候选蛋白中选择与 c-di-GMP 分子最优对接的蛋白。首先通过 NCBI 分析这些蛋白的保守结构域，如表 3-1 所示，然后在 PDB 数据库中找出与这些蛋白的同源的蛋白模型（如附录 3 所示），小分子配体 c-di-GMP (CID: 6323195) 从 PubChem 获得，最后利用 Discovery Studio 2018 进行同源建模和柔性对接方式，模拟对这些蛋白与 c-di-GMP 结合的三维模型。我们发现这些候选蛋白中 FleQ03 与 c-di-GMP 结合能量值最低，结合活性最高。图 3-4 A 为 FleQ03 的保守结构域，中间 AAA+结构域为 c-di-GMP 结合部位，图 3-4 B 显示了 FleQ03 的同源建模以及与 c-di-GMP 的分子对接。

表 3-1 参照铜绿假单胞菌 PA01 FleQ 氨基酸序列预测 MB03 中 AAA+ 包含域的转录因子

Table 3-1 Predicted AAA+ Domain containing transcription factors of MB03 after searching with *Pseudomonas aeruginosa* PA01 FleQ

Protein name	Identify	AAA+ Domain	Conserved domain
PA01 FleQ	100 %	S145 ~ D394	
VT47_16350	94 %	S145 ~ D394	
VT47_15180	56 %	V24 ~ D262	
VT47_13090	55 %	R271 ~ R489	
VT47_23760	53 %	R151 ~ N374	
VT47_04100	51 %	I149 ~ E381	
VT47_19080	51 %	L144 ~ L373	
VT47_01335	50 %	L147 ~ E384	
VT47_01640	50 %	P34 ~ R265	
VT47_11275	50 %	L199 ~ V451	
VT47_13440	50 %	G349 ~ R594	
VT47_03620	49 %	D132 ~ I371	
VT47_23205	48 %	E140 ~ G374	
VT47_00305	47 %	L140 ~ R383	
VT47_05425	47 %	L193 ~ E426	
VT47_13970	47 %	F98 ~ E375	
VT47_05860	44 %	A4 ~ L214	
VT47_05865	44 %	V22 ~ L237	
VT47_16340	44 %	I131 ~ L374	
VT47_08180	42 %	D331 ~ A557	
VT47_16935	38 %	R151 ~ N374	

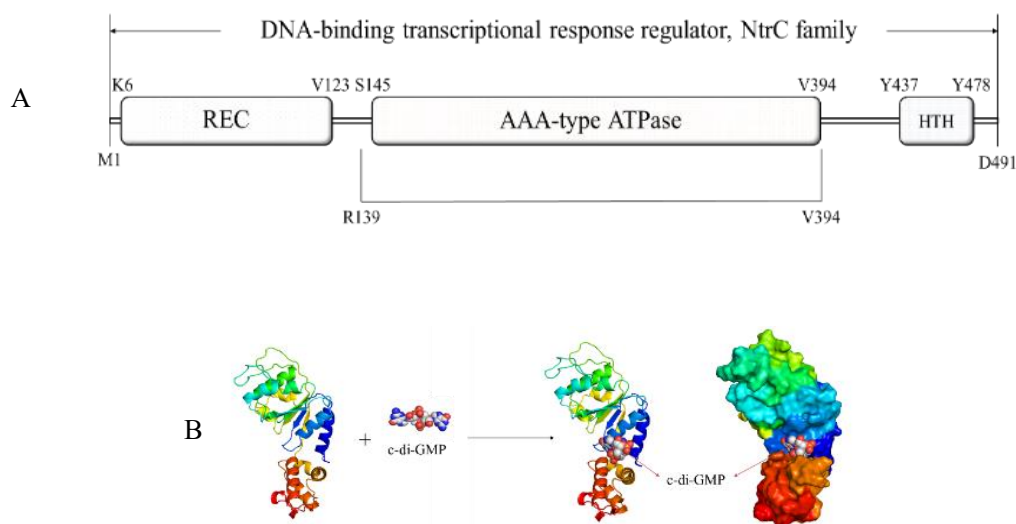


图 3-4 FleQ03_{139 ~ 394} 同源建模及与 c-di-GMP 分子对接

Fig. 3-4 Schematic illustration of FleQ03_{139 ~ 394} homology modeling and molecular docking of FleQ03 with c-di-GMP

A: 表示 FleQ03 蛋白结构域示意图。 B: 表示模拟 FleQ03 与 c-di-GMP 的结合。

3.1.5 FleQ03 调控生物膜的形成及其杀线虫活性

关于 FleQ03 调控生物膜形成相关实验, 在本实验室肖帆的工作中已展示。结果证实, FleQ03 数量的不同, 形成的生物膜数量也因此不同。生物膜随着 FleQ03 数量的增多而增多, 降低而降低。我们将野生株 MB03, 敲除株 $\Delta fleQ03$, 互补表达株 MB782 也使用固体杀虫方式测定它们的杀线虫活性, 结果如图 3-5 所示。MB782 表现出最高的杀线虫活性, $\Delta fleQ03$ 显示了非常有限的杀线虫活性。结果表明, FleQ03 蛋白是调节生物膜形成的重要因子, 生物膜在秀丽隐杆线虫的死亡中起着重要作用。

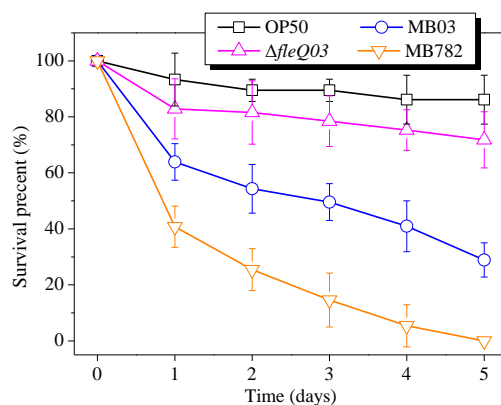


图 3-5 秀丽隐杆线虫在不同菌株的存活率分析

Fig. 3-5 Survival assay of different strains with *C. elegans*

3.1.6 c-di-GMP 与 FleQ03 在生物膜形成中的协同作用

为了探究 c-di-GMP 是否还存在其他监管生物膜形成的因子, 本研究中将含有鸟苷酸环化酶基因 *VT47_20995* 和含有磷酸二酯酶基因 *VT47_05410* 的重组质粒 pMB783 和 pMB784 分别导入至 $\Delta fleQ03$ 得到重组菌 MB786 和 MB787, 测定 72 h 细胞内 c-di-GMP 和生物膜数量, 结果如 3-6 所示。图 A 中 MB786 胞内 c-di-GMP 水平大约高出 $\Delta fleQ03$ 的 42 %; 然而, MB786 胞内 c-di-GMP 水平较 $\Delta fleQ03$ 没有明显的减少 (数据没有显示)。图 B 中观察到 MB786 的生物膜数量较 $\Delta fleQ03$ 增加了约 1.7 倍, 表明 c-di-GMP 肯定暗示其他监管途径而不是 FleQ03 通路。鉴于互补表达株 MB782 的生物膜量大约高出重组株 MB786 的 3 倍, 可知 FleQ03 蛋白使 MB03 中控制生物膜的形成的主要效应因子。对图中所有实验数据进行显著性分析后, P 值小于 0.05。

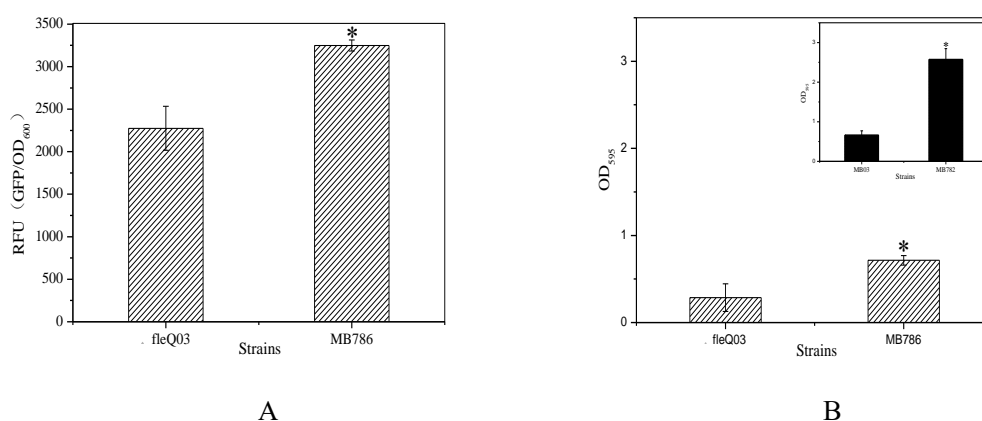


图 3-6 不同菌株中胞内 c-di-GMP 水平和生物膜测定

Fig. 3-6 Determination of c-di-GMP levels and biofilms in different strains

A: 表示 MB786 胞内 c-di-GMP 水平。

B: 表示 MB786 的生物膜测定, 右上角小图表示 MB782 的生物膜测定。

3.1.7 FleQ03 调控靶基因的寻找

在铜绿假单胞菌和恶臭假单胞菌中, 对 c-di-GMP 和 FleQ 之间的相互作用研究较多。本实验室前期实验也已发现在丁香假单胞菌中 c-di-GMP 能与 FleQ03 蛋白结合调控其活性, 从而影响丁香假单胞菌 MB03 生物膜的形成。为了探索 MB03 中 FleQ03 调控生物膜形成的靶基因, 采用了 EMSA 对其调控的下游基因进行寻找。经查阅文献, 参照铜绿假单胞菌中 FleQ 调控的下游基因以及可能结合的保守序列, 在

MB03 基因组中进行比对选取了如表 3-2 所示的基因。之后利用 Promoter 2.0 和 BPROM 两个启动子预测网站对这些基因的启动子进行预测。

通过 NCBI 网站设计引物, PCR 扩增启动子片段之后用醋酸钠方法回收纯化, 准备好的 DNA 片段可以保存在-20℃备用。FleQ03 蛋白的纯化是利用大肠杆菌表达系统, 此表达系统中需要添加一定浓度的诱导剂异丙基硫代半乳糖苷 (IPTG) 来增加目的蛋白的表达, 另一方面利用这套表达体系而获得的目的蛋白, 其 N 端会带上 His-tag 的标签, 之后便可以用镍柱对该蛋白进行亲和纯化。在不同温度、不同 IPTG 终浓度、不同诱导时长下比较目的蛋白的表达量, FleQ03 蛋白在 IPTG 终浓度为 0.3 mmol/L、20℃、诱导过夜时表达量最高。经探索, 洗脱条件在咪唑浓度为 300 mmol/L, 2 ml 最佳。为了防止咪唑及镍离子影响 DNA 和 FleQ03 蛋白结合, 参照 2.2.3.4 对 FleQ03 蛋白进行透析。

表 3-2 丁香假单胞菌 MB03 中 FleQ03 可能调控的靶基因

Table 3-2 Possible targets of FleQ03 regulation in *Pseudomonas syringae* MB03

基因名称	编码基因编号
<i>flagellar hook-length control protein</i>	VT47_16290
<i>fleR</i>	VT47_16340
<i>fleS</i>	VT47_16345
<i>fleQ</i>	VT47_16350
<i>fliTSD</i>	VT47_16355 VT47_16360 VT47_16365
<i>flagellin</i>	VT47_16375
<i>beta-ketoacyl-ACP synthase</i>	VT47_16380
<i>glycosyl transferase</i>	VT47_16385
<i>flgF</i>	VT47_16425
<i>dgc</i>	VT47_20995
<i>pde</i>	VT47_05410

PCR 扩增出表 3-2 中的基因启动子片段, 大小都在 200 bp 左右以及将 FleQ03 蛋白诱导表达后, 用镍柱对该蛋白进行亲和纯。结果如图 3-7 所示。

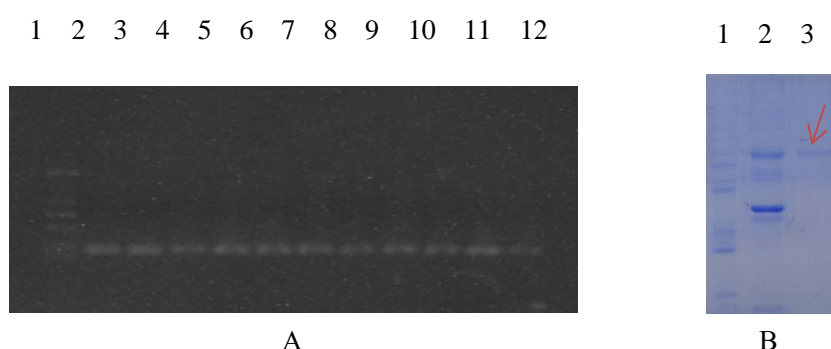


图 3-7 启动子片段和 FleQ 蛋白的纯化

Fig. 3-7 Purification of promoter fragments and FleQ protein

A: 泳道 1 表示 2K Marker, 泳道 2-12 分别表示: *flgF*, *glycosyl transferase*, *beta-ketoacyl-ACP synthase*, *fliTSD*, *fleQ03*, *fleS*, *fleR*, *flagellin*, *flagellar hook-length control protein*, *VT47_20995*, *VT47_05410*, 大小均为 200bp。

B: 泳道 1 表示蛋白 Marker, 泳道 2 表示 IPTG 诱导后未纯化之前的 BL21 总蛋白, 泳道 3 表示纯化的 FleQ03 蛋白, 大小为 54.12 kDa。

待 DNA 和 FleQ03 蛋白都准备完成之后, 就可进行 EMSA 实验。经查阅文献中使用的实验条件(Jyot et al 2002; Nie et al 2017), 摸索得到 EMSA 的最佳条件为 DNA 终浓度为 30 ng/ μ l, 蛋白终浓度为 50 - 100 μ g/ml, 设置不同的蛋白梯度, 冰上孵育 30 min, 在体系中加入终浓度为 10 μ M 的 ATP, 能够促进两者结合。得到的阳性结果如图 3-7 所示。FleQ03 对一个组氨酸激酶基因 *fleS*、一个 Fis 家族转录调节基因 *fleR* 和 *fleQ03* 自身具有结合活性。此外, FleQ03 也绑定到 *dgc*, 但不绑定到 *pde*。这些结果初步表明, FleQ03 是一种全局性的调控因子, 可能参与了丁香假单胞菌 MB03 的多种代谢途径, 并在一定条件下与 c-di-GMP 协同作用, 如线虫捕食所带来的应激反应。

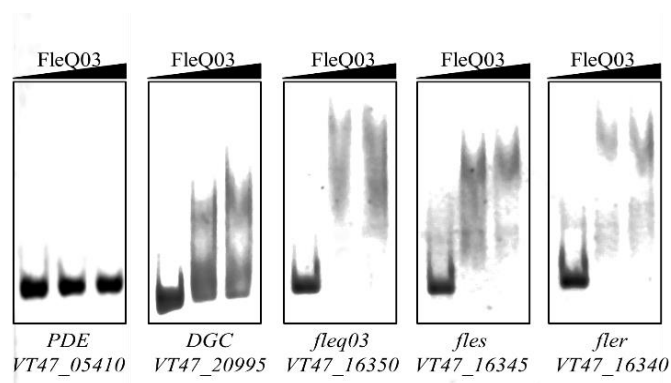


图 3-8 EMSA 验证 FleQ03 与 DNA 探针的结合作用

Fig. 3-8 Identification of the binding between FleQ03 and DNA prob

3.2 c-di-GMP 激发假单胞菌 T34 形成生物膜对锰氧化物及染料脱色的影响

3.2.1 鸟苷酸环化酶基因 *VT47_20995* 在 T34 菌株中的表达

通过对 T34 转座突变文库的分析,发现胞内 c-di-GMP 合成或降解相关的酶与野生株 T34 的锰氧化活性相关,故选用了本研究丁香假单胞菌中的鸟苷酸环化酶基因 *VT47_20995* 做初步探索。以 MB03 基因组 DNA 为模板扩增 *VT47_20995* 基因片段,将得到的目的基因片段回收后与已用 *EcoR* I 和 *Sac* I 双酶切后回收的 pMB693 载体片段酶连,转化至大肠杆菌 DH5 α ,最后利用卡那霉素抗性平板进行筛选,挑取转化子进行 PCR 验证即可,构建的重组质粒 pT35 如图 3-9。然后,抽提构建成功的 pT35 质粒电转至野生株 T34 即可得到相应的 T35 菌株,验证结果如图 3-10 所示。

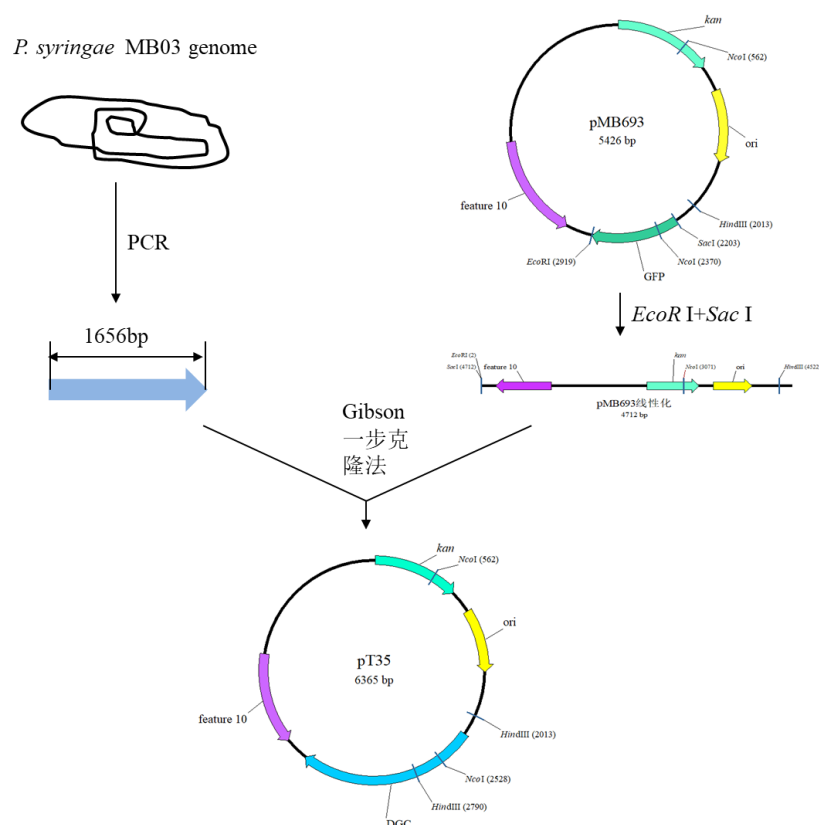


图 3-9 重组质粒 pT35 的构建过程

Fig. 3-9 Construction of plasmid pT35

构建突变菌株 T35 的过程及验证如下：

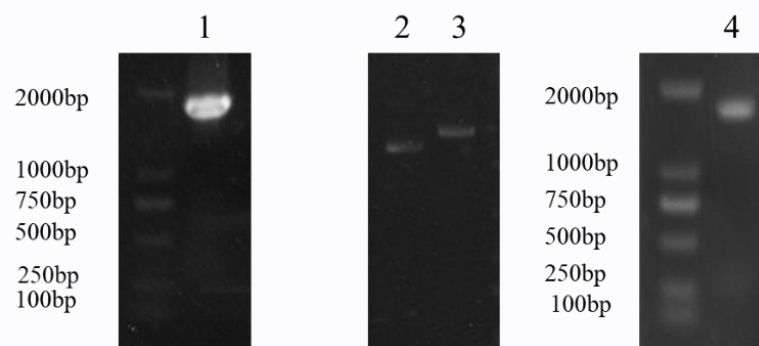


图 3-10 T35 菌株的构建过程及验证

Fig. 3-10 Construction and verification of T35 strain

泳道 1 表示以 MB03 基因组 DNA 为模板扩增的目的基因 *VT47_20995* 的 PCR 条带，大小为 1656 bp；泳道 2、3 表示以 pMB693 质粒为对照和重组质粒 pT35 的质粒抽提图；泳道 4 表示将重组质粒 pT35 电转到野生型菌株 T34 构建突变株 T35 的 PCR 验证图，测序经序列比对后正确，说明增效表达菌株 T35 构建成功。

3.2.3 T35 菌株胞内 c-di-GMP 水平的检测

实验过程中，将 pCdrA::*gfp*^C 电转至野生型 T34 菌株后，发现庆大霉素平板并不能起到筛选作用，故只能对其抗性基因进行替换，考虑到卡那基因已经作为筛选基因用于构建菌株 T35，故替换为四环素基因。将 pCdrA::*gfp*^C 用 *Bgl* II 线性化，纯化的质粒片段与四环素基因用 Gibson 酶连方法连接后转化至大肠杆菌 DH5 α ，挑取转化子验证即可。后期实验中，由 T34 菌株基础之上进行改造得到的菌株均使用抗性基因为四环素的 pCdrA::*gfp*^C 质粒。超表达菌株 T35 在 24 h 胞内 c-di-GMP 的水平检测结果如图 3-11 所示，表明超表达基因 *VT47_20995* 可以显著提高 T34 菌株胞内 c-di-GMP 的水平。对实验数据进行显著性分析后，*P* 值小于 0.05。

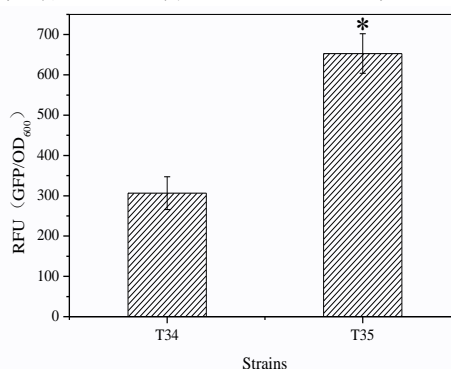


图 3-11 超表达菌株胞内 c-di-GMP 水平的检测

Fig. 3-11 Detection the level of c-di-GMP in gene-overexpression strains

3.2.4 T35 菌株胞内 c-di-GMP 水平对菌株生物膜形成的影响

对超表达菌株 T35 进行生物膜的定量测定，检测胞内 c-di-GMP 水平对菌株生物膜形成的影响。本研究中将培养过夜的菌株转接培养至 OD₆₀₀ 为 1.0 左右，然后转移至 96 孔板，22 °C 静置培养 24 h，使用结晶紫染色对形成的生物膜进行染色，最后测定其在波长 595 nm 处的 OD 值。对于菌株生物膜的定性分析，是将 OD₆₀₀ 为 1.0 左右菌液转接至 PA 瓶中，其他操作步骤与定量分析一样。最后，染色完之后冲洗干净即可。

不同菌株形成的生物膜定量测定结果如图 3-12 所示，实验数据经显著性分析，P 值小于 0.05。对于菌株培养 24 h 形成的生物膜量，突变株 T35 高于野生株 T34，说明在该培养时间段内，胞内 c-di-GMP 水平会影响菌株生物膜的形成，并且形成的生物膜量会随着胞内 c-di-GMP 水平的升高而升高。

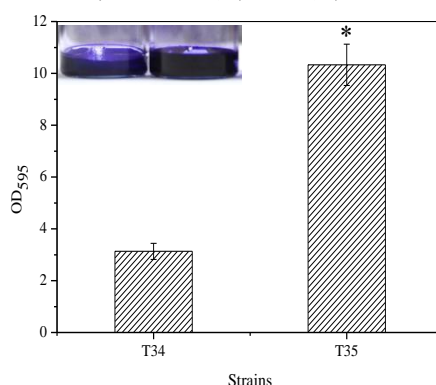


图 3-12 c-di-GMP 水平对菌株生物膜形成的影响

Fig. 3-12 The influence of the levels of c-di-GMP to biofilm formation

3.2.5 c-di-GMP 高水平菌株 T35 锰氧化活性的测定

3.2.5.1 KMnO₄ 标准曲线的制作

首先用草酸钠反滴定 KMnO₄，然后根据公式 $5\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4 + 2\text{KMnO}_4 + 8\text{H}_2\text{SO}_4 = 2\text{MnSO}_4 + 5\text{Na}_2\text{SO}_4 + \text{K}_2\text{SO}_4 + 10\text{CO}_2 \uparrow + 8\text{H}_2\text{O}$ 精确计算溶液中 Mn²⁺ 的浓度。当 LBB 与不同浓度 KMnO₄ 反应后，通过分光光度计测定溶液在波长 626 nm 处的 OD 值。以 KMnO₄ 溶液浓度为横坐标，OD 值为纵坐标绘制 KMnO₄ 的标准曲线。结果如图

3-13 所示，与 KMnO_4 标准曲线对照后按 $1 \mu\text{mol/L MnO}_2$ 等于 $0.4 \mu\text{mol/L KMnO}_4$ 的量，计算各菌株在培养一定时期后生成的二氧化锰的量，即得到其锰氧化活性。

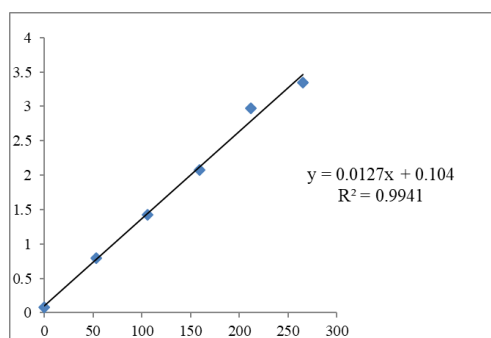


图 3-13 KMnO_4 标准曲线

Fig. 3-13 KMnO_4 standard curve

3.2.5.2 T35 菌株锰氧化活性的测定

LBB (Leukoberbelin blue) 为一种淡蓝色氧化还原指示剂，是测定细菌锰氧化活性的常用方法。它能和 Mn (III) 、 Mn (IV) 、 Mn (VII) 等高价态锰反应，溶液由无色变成蓝色。当 LBB 加入到含有 MnO_2 的溶液时，其化学反应可以消耗 MnO_2 ，所以可以用 LBB 反应来逐渐去除锰氧化细菌外层细胞上的 MnO_2 。将实验菌株接种至含 Lept 培养基的 PA 瓶中 28°C 培养过夜然后以 1 % 的接种量转接至 50 mL 摇瓶中连续培养 5 d，测定各个菌株的锰氧化活性。结果如图 3-14 所示，其中所有数据经显著性分析，P 值小于 0.05。T35 菌株较野生株 T34 的锰氧化活性提高了 15 % 左右。

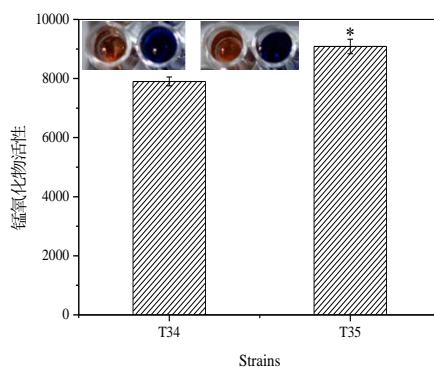


图 3-14 T35 菌株锰氧化活性测定

Fig. 3-14 The manganese oxidation activity of T35 strain

T34 对应左上方图的左边，T35 对应左上方图的右边。棕色溶液未加 LBB，蓝色溶液添加 LBB。

3.2.6 磷酸二酯酶基因 *T34_00070* 的超表达与敲除

研究表明，鸟苷酸环化酶和磷酸二酯酶的基因普遍存在于真核生物和原核生物中，并且数量众多，它们主要参与胞内“第二信使”c-di-GMP 分子的代谢过程(Chao et al 2013)。本研究以锰氧化假单胞菌 T34 为实验材料，主要是为了对其进行改造，得到锰氧化活性更强的菌株，作为工程菌应用于环境修复或生物降解等方面。我们通过上一实验结果可知在 T34 菌株中，当胞内 c-di-GMP 水平升高时，生物膜形成会增加，锰氧化活性也会提高。猜想如果将 T34 菌株自身的磷酸二酯酶基因敲除来改变其胞内 c-di-GMP 水平，那是不是也会增加它的锰氧化活性？故从 T34 锰氧化活性改变的突变文库中，选取了磷酸二酯酶编码基因 *T34_00070*。通过对其结构域的分析发现，基因 *T34_00070* 含有两个保守结构域，其中 PRK10060 超家族是属于编码磷酸二酯酶的特定位点。

我们通过二代测序知道了 T34 菌株的全基因组框架图，然后以 T34 基因组 DNA 为模板扩增磷酸二酯酶基因 *T34_00070* 片段。以 *T34_00070* 为目的基因，pMB693 为载体构建重组质粒 pT36。构建的过程与 pT35 类似，以 pT35 重组质粒为参考。

对磷酸二酯酶基因 *T34_00070* 的敲除实验，本研究采用的是带有蔗糖致死基因 *sacB* 的自杀型质粒 pDS3.0。首先，以 T34 基因组 DNA 为模板分别扩增出 *T34_00070* 的上游和下游同源片段，片段纯化回收后利用融合 PCR 将两者融合成打靶片段，将扩增得到的打靶片段回收后与已用 *Sac* I 线性化的 pDS3.0 载体酶连，得到重组质粒 pT37，构建流程如图 3-15，然后转化大肠杆菌 S17-1，利用庆大霉素抗性平板进行筛选阳性克隆即可。因前期实验证明野生型 T34 菌株对庆大霉素不敏感，故庆大霉素不能用作筛选，故将 pDS3.0 的抗性基因替换成了卡那霉素。抗性替换成功后，参照 2.2.6.2 的步骤完成基因敲除。最后对挑选的转化子进行 PCR 验证即完成敲除菌株 T37 的构建，验证结果如图 3-16 所示。

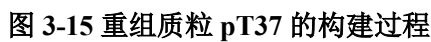


Fig. 3-15 Construction of plasmid pT37

构建超表达菌株 T36 以及敲除菌株 T37 的过程及验证如下：



B

续图 3-16

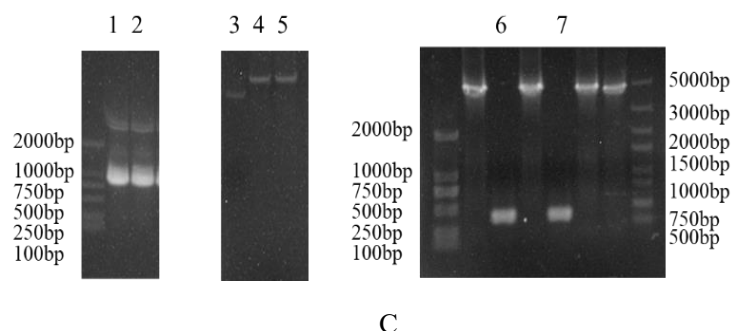


图 3-16 超表达菌株 T36 以及敲除菌株 T37 的构建及验证

Fig. 3-16 Construction and verification of overexpression strain T36 and knockout strain T37

A: 泳道 1 表示以 T34 基因组 DNA 为模板扩增的目的基因 *T34_00070* 的 PCR 条带, 大小为 3831 bp; 泳道 2、3 表示以 pMB693 质粒为对照和重组质粒 pT36 的质粒抽提图; 泳道 4 表示将重组质粒 pT36 电转到野生型菌株 T34 构建突变株 T36 的 PCR 验证图, 经测序结果显示基因序列正确, 说明超表达菌株 T36 构建成功。

B: 泳道 1、2 表示以 T34 基因组 DNA 为模板扩增的 *T34_00070* 上游和下游同源片段, 大小分别为 996 bp 和 968 bp; 泳道 3 表示 pDS3.0 对照质粒; 泳道 4 - 6 表示 *Sac I* 线性化的 pDS3.0 质粒; 泳道 7 表示成功扩增出 *T34_00070* 的上下游同源片段, 经测序结果显示基因序列正确, 说明打靶片段成功构建至 pDS3.0 载体上。

C: 泳道 1、2 表示以 pMB693 的 DNA 为模板扩增的 *kan* 基因全长图, 大小为 795 bp; 泳道 3 表示表示 pDS3.0(已含 *T34_00070* 的上下游同源片段)重组对照质粒; 泳道 4、5 表示 *Bgl*II 线性化的 pDS3.0(已含 *T34_00070* 的上下游同源片段)重组质粒; 泳道 6、7 表示基因敲除完成之后对筛选到的阳性转化子进行 PCR 验证, 说明 *T34_00070* 已成功敲除, T37 菌株构建成功。

3.2.7 超表达株 T36 和敲除株 T37 胞内 c-di-GMP、生物膜、锰氧化活性测定

为了证实我们的猜想, 用与之前测定鸟苷酸环化酶增效表达菌株 T35 相同的实验方法与实验条件, 对磷酸二酯酶基因 *T34_00070* 的超表达菌株 T36 和敲除菌株 T37 胞内 c-di-GMP、生物膜、锰氧化活性的进行测定。结果如图 3-17 所示, 所有数据经显著性分析, P 值小于 0.05。在超表达菌株 T36 中, 由于增加了磷酸二酯酶的表达, 使得其胞内 c-di-GMP 较野生株 T34 降低, 生物膜和锰氧化活性也都较野生株 T34 降低。在敲除株 T37 中, 由于降低了磷酸二酯酶的表达, 使得其胞内 c-di-GMP 较野生株 T34 增加, 生物膜和锰氧化活性也都较野生株 T34 增加。说明在锰

氧化假单胞菌 T34 中胞内 c-di-GMP 越高、生物膜及其锰氧化活性也会提高，磷酸二酯酶 T34_00070 对 T34 细胞内 c-di-GMP、生物膜、锰氧化活性产生了较大影响。

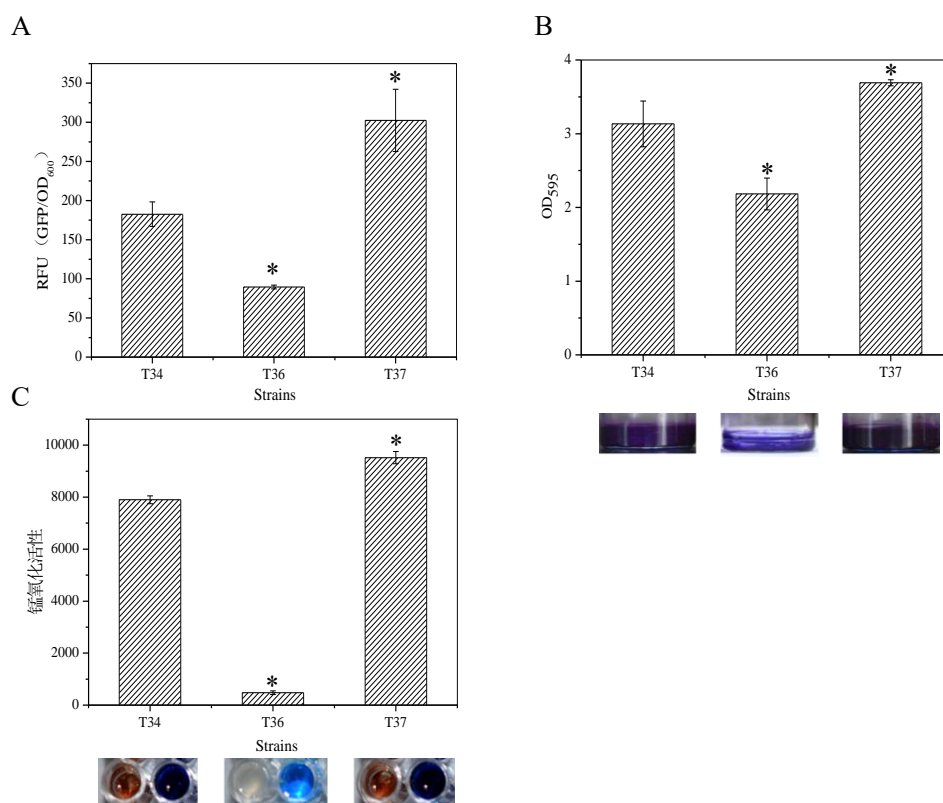


图 3-17 不同菌株胞内 c-di-GMP、生物膜、锰氧化活性测定

Fig. 3-17 Determination of c-di-GMP, biofilm, manganese oxidation activity in different strains

A: 表示不同菌株胞内 c-di-GMP 水平。

B: 表示不同菌株形成的生物膜定量，下方分别对应不同菌株的生物膜定性。

C: 表示不同菌株的锰氧化活性，下方分别对应不同菌株与 LBB 反应前和反应后。

3.2.8 不同 c-di-GMP 水平菌株的锰氧化物在荧光显微镜下的观察

野生株 T34 在含 Mn^{2+} 的 Lept 培养基中，形成的锰氧化物是肉眼可见的棕褐色颗粒，锰氧化物通常包裹在细菌周围。将带有 GFP 的质粒转入菌株时，可以在荧光显微镜下观察到细胞呈绿色。本实验将带有 pCdrA::gfp^C 质粒的菌株 T34、T36、T37 放在含 Mn^{2+} 的 Lept 培养基中摇瓶培养 5 d，每隔 24 h 取一次样，共取 5 次。这里使用的放大倍数为 100×，单个细胞在此放大倍数不可见，故只有当细胞聚集至一定程度才在视野下可见。由于第 5 d 与第 4 d 结果一致，故只展示到第 4 d。我们在荧光显微镜下观察到的结果如图 3-18 所示，当细胞聚集的越多，相对地锰氧化物形成越

多。与野生株 T34 相比，超表达磷酸二酯酶基因 *T34_00070* 的菌株 T36 在培养初期细胞聚集很微弱，后面随着培养时间的延长才出现了零星的聚集体并且在明场下观察到的锰氧化物也显著减少。然而，敲除了磷酸二酯酶基因 *T34_00070* 的菌株 T37 在培养初期较野生株 T34 聚集的更快，形成的锰氧化物也相对增多。由于，这里所用的荧光质粒 *pCdrA::gfp^C* 与胞内的 c-di-GMP 有关，故不同的菌株呈现得绿色荧光的强弱不同。根据结果显示，也再一次证明了菌株 T36 胞内 c-di-GMP 低于野生株 T34，菌株 T37 胞内 c-di-GMP 高于野生株 T34。

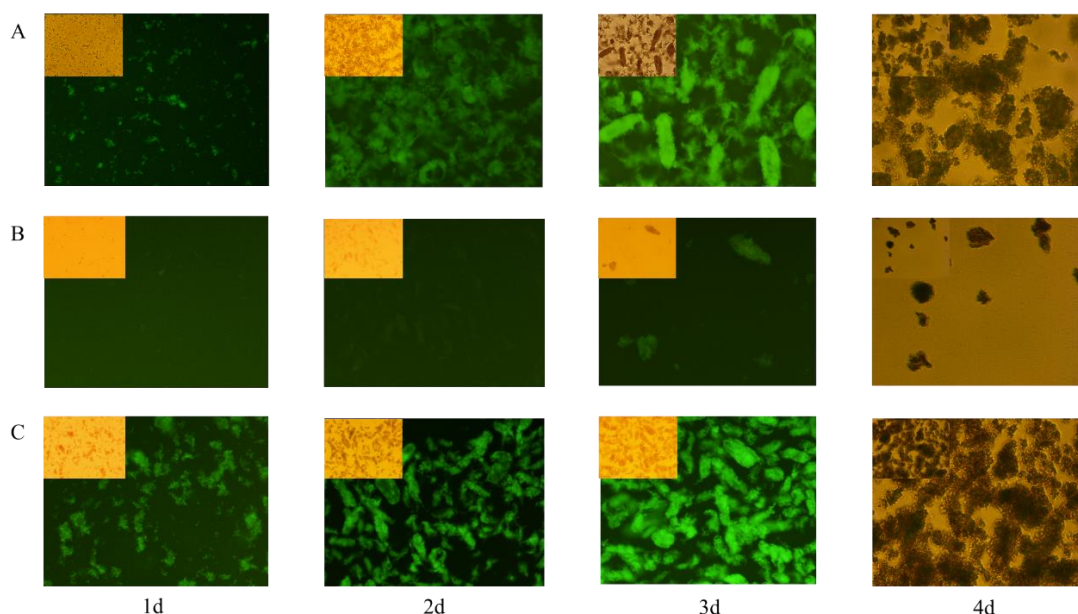


图 3-18 不同 c-di-GMP 水平菌株的锰氧化物在荧光显微镜下的观察

Fig. 3-18 Observation of manganese oxides in different c-di-GMP level strains
under fluorescence microscope

A 表示 T34。B 表示 T36。C 表示 T37。左上角为明场下的锰氧化物，大图为荧光场下的细菌聚集体。从左到右为 1 - 4 d，在第 4 d 时，细菌周围形成的锰氧化物将其包裹，荧光场下很难观察到绿色荧光。

3.2.9 c-di-GMP 高水平菌株 T37 生物锰氧化物对合成染料脱色作用

染料广泛应用于纺织、造纸、印刷、皮革和油漆等行业。据统计，现有各类纺织染料 10000 多种，年生产能力 7×10^5 吨以上。这些有机染料大多被过度使用，10 % - 20 % 直接作为废水排放到不同的水体中。这样不仅会导致水体的富营养化，也会造成美观污染和水生生物系统失衡，还会对人和动物产生慢性毒性、致癌性和神经毒性(Dassanayake et al 2019)。去除有机染料废水的处理我们可以大致分为三种：物理

处理法、化学处理法和生化处理法三种(姜佩 2012)。然而, 这些方法中很多都存在着各种各样的限制, 如污泥生成、吸附剂再生、膜污染、运行成本高、运行时间长、完全去除多环芳香族化合物无效等。近年来, 新的氧化过程作为处理工业废水的替代技术引起了人们的兴趣。 Mn (III/IV) 氧化物以其独特的结构和物理化学性质, 成为去除有机染料污染物的研究热点。细菌源性锰氧化物由于其高表面积和氧化能力, 能有效地将生物上难以降解的有机分子降解为低分子量化合物(Spiro et al 2010)。许多研究报告了各种 Mn (III/IV) 氧化物通过催化降解和吸附去除染料。锰氧化物的晶体结构和溶液的 pH 值对染料的去除有很大的影响(Cui et al 2015)。

3.2.9.1 T37 生物锰氧化物对直接红 243、活性蓝 220、酸性绿 25 的脱色

本研究选取了三种初始染料, 使用相同量的生物锰氧化物对它们的脱色效率进行了比较。结果如图 3-19 所示, 在染料的终浓度都为 100 mg/L, 摇床转速为 150 r/min, 温度 28 °C 过夜脱色的情况下, 生物锰氧化物对酸性绿 25 的去除效果最好, 去除率高达 92 % 左右。所以, 选取了酸性绿 25 展开下一步实验。

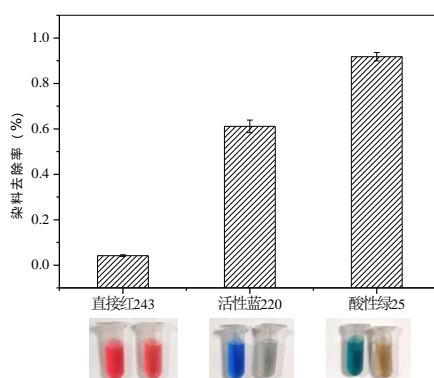


图 3-19 T37 生物锰氧化物对不同染料的去除率

Fig. 3-19 Removal rate of T37 biological manganese oxide to different dyes

3.2.9.2 T37 生物锰氧化物对酸性绿 25 的去除

酸性绿 25 ($\text{C}_{28}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{Na}_2\text{O}_8\text{S}_2$) 属于蒽醌类染料的一种, 由于其分子结构中含有共轭结构以及磺酸基 (如图 3-20 B 所示), 所以它具有性质稳定, 水溶性强的特点。蒽醌类染料由于它们具有稠化的芳香环结构, 导致出现了生物累积性和耐降解性。根据 2.2.9.1 所配的酸性绿 25 的贮备液, 用超纯水稀释至 100 mg/L 的水溶液, 在波长为 200 nm - 800 nm 处进行紫外-可见全波长扫描, 结果如图 3-20 A 所示。酸性绿 25 在可见光区有三个峰, 最高吸收峰在波长 640 nm 处。

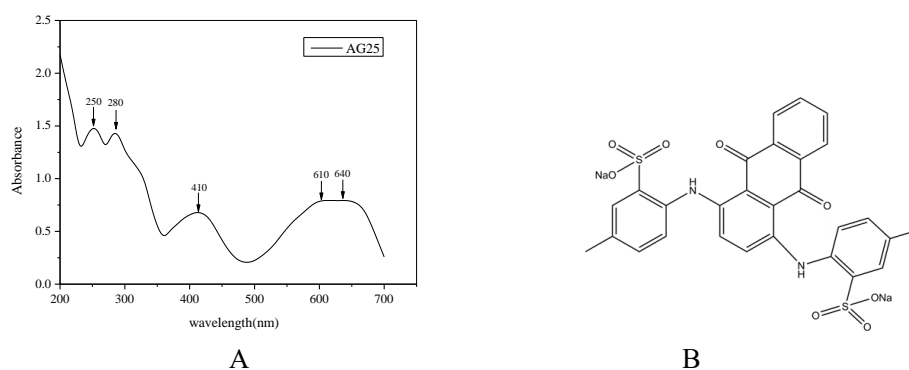


图 3-20 酸性绿 25

Fig. 3-20 Acid green 25

A: 酸性绿 25 的紫外吸收光谱。B: 酸性绿 25 的分子结构式。

通过进一步的探究,生物锰氧化对酸性绿 25 的去除效率在 4 h 内就可以到达顶峰,经醋酸钠解析附之后,并无绿色析出,表明此过程并不是简单的吸附作用。之后采用高效液相色谱法鉴定是否有新的物质生成,具体的实验方法见 2.2.9.2。经摸索,当检测波长为 250 nm,流动相用 10 % - 90 % 的甲醇,1 mL/min 梯度洗脱时效果最佳。结果如图 3-21 A 所示,结果显示原本酸性绿 25 的吸收峰消失了,出现了新的峰,推测了生物锰氧化物将酸性绿 25 降解成了其他化学物质。后将 T37 与 100 mg/L 的酸性绿 25 在含有终浓度为 1 mmol/L Mn^{2+} 的 Lept 培养基中混合培养 3 d,对照组中未添加 Mn^{2+} ,在与之前实验条件相同的情况下,经 HPLC,结果如图 3-21 B 所示,溶液中的酸性绿 25 的吸收峰消失,出现的新峰与之前单纯用生物锰氧化物处理酸性绿 25 时一致,但峰强度大幅度降低。

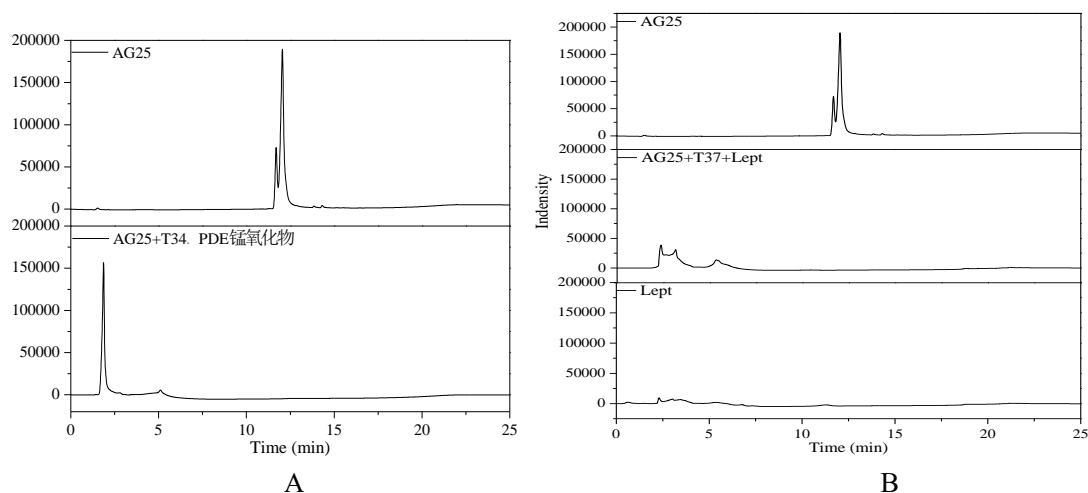


图 3-21 HPLC 对酸性绿 25 的分析

Fig. 3-21 Analysis of acid green 25 by HPLC

A: 菌株 T37 的锰氧化物处理酸性绿 25。B: 菌株 T37 和其锰氧化物共同处理酸性绿 25。

4 小结与讨论

4.1 小结

本研究以丁香假单胞菌 MB03 和锰氧化假单胞菌 T34 为实验对象，旨在探索在 MB03 中通过 c-di-GMP 驱动 FleQ03 加强生物膜的形成和生物膜依赖的抵抗秀丽隐杆线虫捕食的策略。对于在 T34 菌株的研究，在前人研究的结果中发现锰氧化物的结构中包含生物膜的存在，受到了前一部分实验的启发及查阅文献，此部分主要是研究胞内 c-di-GMP 对生物膜进行调控时，T34 菌株的锰氧化活性是否会因此受到影响。以此为目的，本研究分为以下几个部分进行：

（1）通过观察带有 GFP 标记的 MB03 菌株与秀丽隐杆线虫共培养之后在线虫周围的分布情况，发现在线虫的头部、尾部、体内均存在生物膜。并且随着生物膜的增多，线虫死亡越多。

（2）在丁香假单胞菌 MB03 中，通过超表达鸟苷酸环化酶菌株 MB783 和超表达磷酸二酯酶菌株 MB784，对野生株 MB03，超表达菌株 MB783 和 MB784 使用固体杀虫的方法测定秀丽隐杆线虫的存活率。分析发现线虫在 MB783 中存活率最低，在 MB784 存活率最高。从而证实生物膜形成能力更强的菌株对线虫的毒杀作用更强。

（3）以 PAO1 中 FleQ 序列为参照序列，在 MB03 基因组中寻找到了 20 个同源蛋白，并利用同源建模和分子对接找到了结合活性最高的蛋白 FleQ03。

（4）构建了分别含有鸟苷酸环化酶基因的重组质粒 pMB783 和含有磷酸二酯酶基因的重组质粒 pMB784 分别导入至 $\Delta fleQ03$ 的重组菌 MB786 和 MB787。研究证实 FleQ03 是 c-di-GMP 调控生物膜形成的主要效应因子。

（5）通过 EMSA 实验，在 MB03 菌株中成功筛选到了四个 FleQ03 调控的下游基因，提供了 FleQ03 作为一种全局转录因子调控 c-di-GMP、FleQ03 和其他蛋白的可能性。

（6）成功构建鸟苷酸环化酶增效菌株 T35 和制作了 KMnO_4 的标准曲线，并测定菌株胞内 c-di-GMP 水平和生物膜含量以及锰氧化活性。成功，确定超表达基因 VT47_20995 可以显著提高 T34 菌株胞内 c-di-GMP 的水平，增加生物膜含量和提高锰氧化活性。

(7) 成功构建了磷酸二酯酶基因 *T34_00070* 的超表达株 T36 以及敲除株 T37。将野生株 T34, 超表达株 T36 和敲除株 T37 胞内 c-di-GMP、生物膜、锰氧化活性进行定量分析发现, 超表达株 T36 胞内 c-di-GMP 水平、生物膜含量和锰氧化活性较野生株 T34 显著降低; 而敲除株 T37 以上三个方面的数据均高于野生株 T34。

(8) 利用倒置荧光显微镜对野生株 T34, 单敲株 T37 以及超表达菌株 T36 在含有 Mn^{2+} 的 Lept 培养基中培养 1 - 5 d 的现象定性分析发现, 菌株 T37 中生物膜和锰氧化物的量相较于野生株 T34 更多, 而菌株 T36 中生物膜和锰氧化物的量相较于野生株 T34 少的多。

(9) 经染料初筛发现, T37 生物锰氧化物对酸性绿 25 的效果最佳。通过 HPLC 实验发现 T37 生物锰氧化物对酸性绿 25 进行处理的时候发生了氧化还原反应, 将其降解成了其他化学物质。

(10) 将 T37 菌株与终浓度为 100 mg/L 的酸性绿 25 一起接种于含有 Mn^{2+} 的 Lept 培养基中培养 5 d, 通过 HPLC 实验发现 T37 菌株参与了对酸性绿 25 的降解。

4.2 讨论

丁香假单胞菌是目前研究最多的植物病原菌之一, 也是用来了解细菌致病性、植物与微生物相互作用的分子机制以及微生物生态学和流行病学的模式菌株(Xin et al 2018), 而在丁香假单胞菌对动物致病性方面的研究相对较少。以本室分离的丁香假单胞菌 MB03 为对象, 探究了其对秀丽隐杆线虫的致死情况, 挖掘了丁香假单胞菌作为一种植物致病菌的另外一面, 也可以为农业上防治线虫提供一些的参考。恶臭假单胞菌也是常见的假单胞菌之一, 由于它对环境压力强大的适应能力, 多用于生物降解、生物防治、工业生产等方面。本室的一株锰氧化活性假单胞菌 T34 经序列分析隶属于恶臭假单胞菌, 并具有极强的抗逆性。研究如何提高该菌的锰氧化活性, 有助于充分吸收利用环境中的 Mn^{2+} , 形成的锰氧化物也可应用于多个方面。如: 去除有机物(Jiang et al 2018; Zhai et al 2018), 吸附重金属离子(Tani et al 2004), 电池材料(Jiang et al 2015)等等。

生物膜是细菌主要的生活方式, 主要是为了适应新的生存环境而存在。主要具有以下几个特点: (1) 由于生物膜具有天然的屏障作用, 滤过抗生素, 使得其耐药性极强。(2) 生物膜中包裹细菌的黏性基质可以逃避机体的免疫系统。(3) 可以通过各种复杂的机制牢固地黏附在宿主细胞上或其他固体表面(Chen and Zhang 2004)。

另外，细菌生物膜分布广泛，并以积极和消极的方式极大的影响着我们的生活。其中一些生物膜对工业、农业和环境生物技术具有重要意义。例如，基于 Lux 型聚量传感系统的生物膜调控技术，促进胞外聚合物（EPS）和可溶性微生物产物（SMP）的产生，提高了生物膜的产率，最终提高生物膜处理废水的效率(Zhao et al 2017)。而另一些则在医疗和工业环境中造成了巨大的问题。例如，在许多慢性疾病中生物膜会导致破坏性炎症的发展，使得我们的免疫系统无法有效地应对它们。工业应用中，造纸和卫生食品包装工业生产机械中的生物膜也危害着人们的健康 (Yang and Givskov 2015; Zarnowski et al 2018)。

目前研究表明，参与生物膜形成过程的主要因子有：第二信使 c-di-GMP，群体感应系统以及 sRNA。在过去的几年里，人们对 c-di-GMP 翻转的机制、鸟苷酸环化酶（DGCs）对其合成以及磷酸二酯酶（PDEs）对其的降解进行了深入的研究(Chou and Galperin 2016)。目前的研究重点主要转移到：（1）c-di-GMP 上游的识别细胞信号调节，（2）c-di-GMP 下游效应因子应对变化引起某些细胞行为的变化和代谢。尽管在识别潜在的 c-di-GMP 结合蛋白方面做了大量的工作，但后一领域的进展一直很缓慢(Jenal and Malone 2006; Cotter and Stibitz 2007)。据报道，多种蛋白质和 RNA 的效应因子响应 c-di-GMP 的调节，从而在转录、翻译以及翻译后水平发挥控制作用(Krasteva et al 2012; Sondermann et al 2012)。以铜绿假单胞菌为例，在宿主组织定植过程中依靠细胞内 c-di-GMP 形成坚固的多细胞生物膜。其中转录调节因子 FleQ 直接与 c-di-GMP 作用，而 FleQ 又反过来调节鞭毛运动和胞外多糖的分泌，以确保浮游生物向无柄生命形式过度(Matsuyama et al 2016)。fleS 和 fleR 在假单胞菌中普遍存在，并证实铜绿假单胞菌中转录调控因子 FleQ 对它们具有直接的调控作用(Jyot et al 2002)。另外，在恶臭假单胞菌中发现 FleQ 与 gcbA 启动子 DNA 结合，并被 c-di-GMP 抑制。揭示了通过 FleQ 调控 GcbA 表达的 c-di-GMP 的自我调节功能(Xiao et al 2016)。令人惊喜的是，在 MB03 中发现 FleQ03 对自身存在调控作用，但是对于 FleQ03 在生物膜形成过程中是如何协调这些基因我们还需作进一步的探究。

无论是生物膜带来的利或弊，都需要我们深入了解生物膜的形成机制，从而充分发挥优势、降低或避免危害。本研究从细胞内 c-di-GMP 入手，初步探究其对丁香假单胞菌 MB03 及锰氧化假单胞菌 T34 中生物膜的调控，从而更好地发挥 MB03 生物膜对线虫的毒杀作用和 T34 中生物膜对锰氧化产生的正面影响。

在本研究中经相关实验结果显示，我们最初观察到在菌株 MB519 喂食线虫的过程中，并不是立即将线虫杀死，而是从体表到体腔内细菌菌体逐渐积累，直至线虫

头部。此外，随着 MB519 形成的生物膜增加，线虫的存活率越低。通过测定丁香假单胞菌 MB03 在秀丽隐杆线虫存在的环境下的胞内 c-di-GMP 水平，发现线虫可以刺激 MB03 胞内 c-di-GMP 水平升高。后经过超表达鸟苷酸环化酶和磷酸二酯酶调节 MB03 胞内 c-di-GMP 水平，比较不同菌株的杀虫活性发现超表达鸟苷酸环化酶的菌株 MB783 对线虫的致死率最高。我们推测线虫肛门排出的某些代谢物可能作为趋化物质吸引细菌细胞，导致细菌在线虫的肛门内逐渐积累，并进入线虫的各个部位。然后这些细菌逐渐积累在线虫的头部，由于充足的氧气供应，它们在那里繁殖，形成大量的生物膜。如图 4-1 所示，我们提出了以下主要的逐步信号通路来研究秀丽隐杆线虫生物膜依赖的杀线虫活性。(1) 线虫-细菌接触 (图 4-1 Aa)。MB03 细胞对来自秀丽隐杆线虫的信号分子产生应答，激活 DGC 表达导致 c-di-GMP 水平升高。随后，c-di-GMP 是绑定到效应器 FleQ03，它激活 *fleQ03* 侧翼鞭毛和多糖合成基因的功能以及细胞运动性，导致细胞开始在线虫的肛门处聚集，逐渐形成一定程度的细胞群。(2) 线虫尾部表面形成生物膜，细菌细胞通过肛门进入线虫体内 (图 4-1 Ab)。(3) 生物膜的形成从尾部逐渐向头部延伸，导致在蠕虫周围堆积 (图 4-1 Ac)。FleQ03 可能会结合一些其他调节蛋白，如 FleS 和 FleR 来调节多糖的合成、细胞运动和粘附，从而显著增加生物膜的合成。(4) 生物膜依赖的杀线虫行为。大量生物膜积累阻塞在线虫头部，阻止线虫进食，最终杀死线虫。

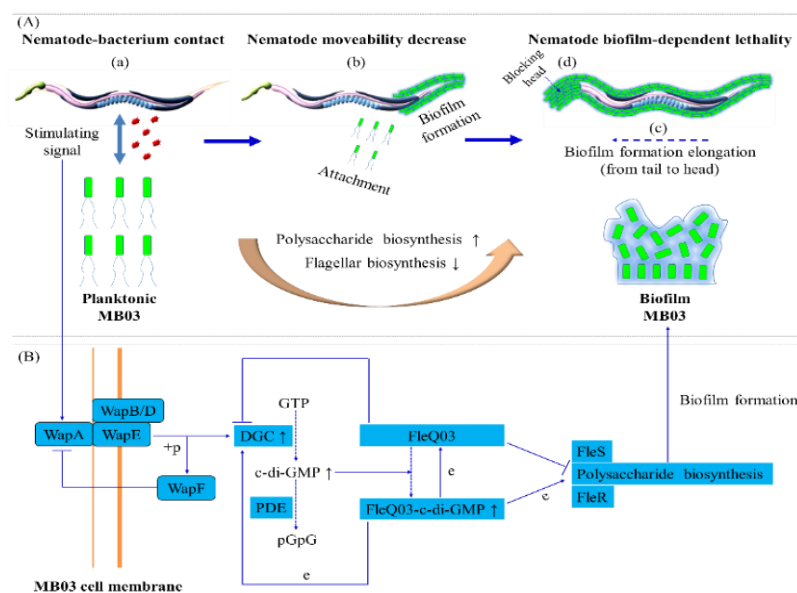


图 4-1 由 c-di-GMP 协同 FleQ03 调控 MB03 的生物膜依赖性致病性示意图

Fig. 4-1 Schematic diagram of the biofilm-dependent pathogenicity of MB03 that were regulated by c-di-GMP-incorporated FleQ03

另外, c-di-GMP 在锰氧化假单胞菌 T34 显示与锰氧化相关。通过在 T34 菌株中表达鸟苷酸环化酶基因 *VT47_20995* 发现, 当提高 T34 胞内 c-di-GMP 水平时, 生物膜的形成和锰氧化活性也会随之增加。然后, 我们在 T34 锰氧化活性改变的突变文库中选择了磷酸二酯酶基因 *T34_00070* 作为后续的研究对象。通过对其进行基因超表达和敲除分别得到菌株 T36 和菌株 T37。与野生株 T34 相比发现, 超表达菌株 T36 胞内 c-di-GMP、生物膜及锰氧化活性显著降低; 相反地, 敲除株 T37 胞内 c-di-GMP、生物膜及锰氧化活性都相对增加。后来在荧光显微镜下观察了菌株 T34、T36、T37 在不同时间下的聚集程度和形成的锰氧化物, 发现敲除株 T37 较野生株 T34 在培养初期聚集的更快, 观察到的锰氧化物也相对增多, 而在超表达株 T36 中的现象恰恰相反。据报道, 生物膜聚合物中存在正电荷和负电荷位点, 这些位点与周围水中离子可能通过吸引静电相互作用和离子交换机制促进离子对生物膜的吸附, 从而使得生物膜中的微生物可以很容易地利用这些离子作为营养离子(Kurniawan et al 2012)。另外有研究表明在 *P. putida* 中, 细胞中转运 Mn^{2+} 的转运蛋白 *mntABC* 在生物膜中的表达量高于浮游细胞(Zheng et al 2018)。我们推测由于菌株 T34 胞内 c-di-GMP 水平的提高, 使得细胞聚集加快生物膜增多, 然后生物膜的形成加快了 Mn^{2+} 的吸收和转运, 导致了锰氧化物形成增多。虽然, 在这里我们强调了由 T34 细胞内 c-di-GMP 水平变化引起的生物膜数量的改变会影响其锰氧化活性, 但对于二者之间相关联的分子机制还需进一步探究。最后, 我们将得到的锰氧化活性提高的菌株 T37 形成的生物锰氧化物应用于酸性绿 25 的去除, 其高效环保的优点为解决染料废水带来的环境问题提供了新的途径。

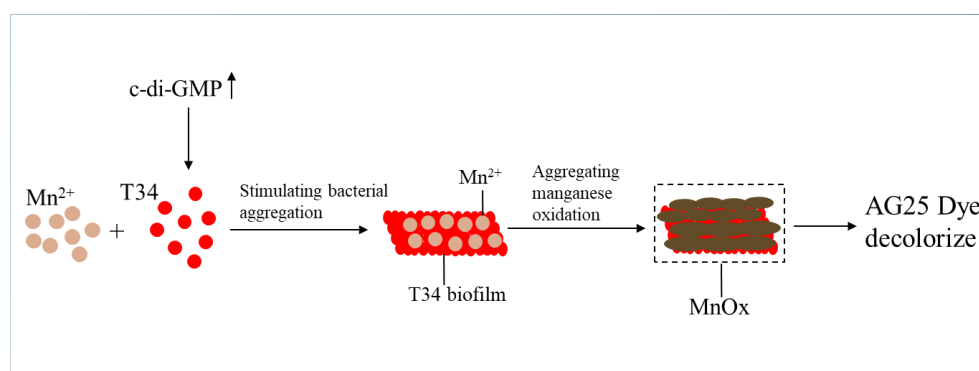


图 4-2 T34 菌株生物膜对锰氧化影响的示意图

Fig. 4-2 Schematic diagram of the effect of biofilm on manganese oxidation in T34 strain

参考文献

1. 姜佩. 染料废水处理技术研究. 中国海洋大学, 2012
2. 全旭, 王鹤龄, 张慧彦, 许彤彤, 王春阳, 崔云霞, 孟维艳. c-di-GMP 及其对细菌生物膜调控作用的研究进展. 现代口腔医学杂志, 2018, 32:352-356
3. Ali M, Sun Y, Xie L, Yu HF, Bashir A, Li L. The pathogenicity of *Pseudomonas syringae* MB03 against *Caenorhabditis elegans* and the transcriptional response of nematicidal genes upon different nutritional conditions. *Front Microbiol*, 2016, 7: 12
4. Arnold DL, Preston GM. *Pseudomonas syringae*: enterprising epiphyte and stealthy parasite. *Microbiology (Reading, England)*, 2019, 165: 251-253
5. Banh A, Chavez V, Doi J, Nguyen A, Hernandez S, Ha V, Jimenez P, Espinoza F, Johnson HA. Manganese(Mn) oxidation increases intracellular Mn in *Pseudomonas putida* GB-1. *PLoS One*, 2013, 8: e77835
6. Baraquet C, Harwood CS. FleQ DNA binding consensus sequence revealed by studies of FleQ-dependent regulation of biofilm gene expression in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol*, 2016, 198: 178-186
7. Basu Roy A, Sauer K. Diguanilate cyclase NicD-based signalling mechanism of nutrient-induced dispersion by *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Microbiol*, 2014, 94: 771-793
8. Borlee BR, Goldman AD, Murakami K, Samudrala R, Wozniak DJ, Parsek MR. *Pseudomonas aeruginosa* uses a cyclic-di-GMP-regulated adhesin to reinforce the biofilm extracellular matrix. *Mol microbiol*, 2010, 75: 827-842
9. Carniello V, Peterson BW, van der Mei HC, Busscher HJ. Physico-chemistry from initial bacterial adhesion to surface-programmed biofilm growth. *Adv Colloid Interface Sci*, 2018, 261: 1-14
10. Chao L, Rakshe S, Leff M, Spormann AM. PdeB, a cyclic di-GMP-specific phosphodiesterase that regulates *Shewanella oneidensis* MR-1 motility and biofilm formation. *J Bacteriol*, 2013, 195: 3827-3833
11. Chen W, Zhang L. New progress in bacterium biofilm. *J Microbiol*, 2004, 24: 46-48
12. Chou SH, Galperin MY. Diversity of cyclic di-GMP-binding proteins and mechanisms. *J Bacteriol*, 2016, 198: 32-46

13. Cotter PA, Stibitz S. C-di-GMP-mediated regulation of virulence and biofilm formation. *Curr Opin Microbiol*, 2007, 10: 17-23
14. Cui HJ, Huang HZ, Yuan BL, Fu ML. Decolorization of RhB dye by manganese oxides: effect of crystal type and solution pH. *Geochemical Trans*, 2015, 16: 8
15. Darby C, Hsu JW, Ghori N, Falkow S. *Caenorhabditis elegans*: plague bacteria biofilm blocks food intake. *Nature*, 2002, 417: 243-244
16. Dassanayake RS, Rajakaruna E, Abidi N. Borax-cross-linked guar gum-manganese dioxide composites for oxidative decolorization of Methylene Blue. *J Nanomater*, 2019: 11
17. Estes ER, Andeer PF, Nordlund D, Wankel SD, Hansel CM. Biogenic manganese oxides as reservoirs of organic carbon and proteins in terrestrial and marine environments. *Geobiology*, 2017, 15: 158-172
18. Fazli M, Almblad H, Rybtke ML, Givskov M, Eberl L, Tolker-Nielsen T. Regulation of biofilm formation in *Pseudomonas* and *Burkholderia* species. *Environ microbiol*, 2014, 16: 1961-1981
19. Fish KE, Osborn AM, Boxall J. Characterising and understanding the impact of microbial biofilms and the Extracellular polymeric substance (EPS) matrix in drinking water distribution systems. *Environ Sci-Wat Res*, 2016, 2: 614-630
20. Furgal KM, Meyer RL, Bester K. Removing selected steroid hormones, biocides and pharmaceuticals from water by means of biogenic manganese oxide nanoparticles in situ at ppb levels. *Chemosphere*, 2015, 136: 321-326
21. Gjermansen M, Nilsson M, Yang L, Tolker-Nielsen T. Characterization of starvation-induced dispersion in *Pseudomonas putida* biofilms: genetic elements and molecular mechanisms. *Mol Microbiol*, 2010, 75: 815-826
22. Gjermansen M, Ragas P, Sternberg C, Molin S, Tolker-Nielsen T. Characterization of starvation-induced dispersion in *Pseudomonas putida* biofilms. *Environ Microbiol*, 2005, 7: 894-906
23. Gutiérrez-Barranquero JA, Cazorla FM, de Vicente A. *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* associated with mango trees, a particular pathogen within the "Hodgepodge" of the *Pseudomonas syringae* complex. *Front Plant Sci*, 2019, 10: 570
24. Hall CL, Lee VT. Cyclic-di-GMP regulation of virulence in bacterial pathogens. *Wiley Interdiscip Rev RNA*, 2018, 9
25. Hall CW, Mah T-F. Molecular mechanisms of biofilm-based antibiotic resistance and tolerance in pathogenic bacteria. *FEMS microbiol Rev*, 2017, 41: 276-301

26. Hansel CM. Manganese in marine microbiology. *Adv Microb Physiol*, 2017, 70: 37-83
27. Hilbi H, Weber SS, Ragaz C, Nyfeler Y, Urwyler S. Environmental predators as models for bacterial pathogenesis. *Environ Microbiol*, 2007, 9: 563-575
28. Jenal U, Malone J. Mechanisms of cyclic-di-GMP signaling in bacteria. *Annu Rev Genet*, 2006, 40: 385-407
29. Jenal U, Reinders A, Lori C. Cyclic di-GMP: second messenger extraordinaire. *Nat Rev Microbiol*, 2017, 15: 271-284
30. Jiang CC, Guo ZY, Zhu Y, Liu H, Wan MX, Jiang L. *Shewanella*-mediated biosynthesis of manganese oxide micro-/nanocubes as efficient electrocatalysts for the oxygen reduction reaction. *Chemsuschem*, 2015, 8: 158-163
31. Jian ZY, Chang YY, Wang LX, Liang JS, Bai YH. Removal of organic matter from water by chemical preoxidation coupled with biogenic manganese oxidation. *Huan Jing Ke Xue*, 2018, 39: 1188-1194
32. Joshua GWP, Karlyshev AV, Smith MP, Isherwood KE, Titball RW, Wren BW. A *Caenorhabditis elegans* model of *Yersinia* infection: biofilm formation on a biotic surface. *Microbiology*, 2003, 149: 3221-3229
33. Jyot J, Dasgupta N, Ramphal R. FleQ, the major flagellar gene regulator in *Pseudomonas aeruginosa*, binds to enhancer sites located either upstream or atypically downstream of the RpoN binding site. *J Bacteriol*, 2002, 184: 5251-5260
34. Kipreos ET, van den Heuvel S. Developmental control of the cell cycle: insights from *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*, 2019, 211: 797-829
35. Kirienko NV, Cezairliyan BO, Ausubel FM, Powell JR. *Pseudomonas aeruginosa* PA14 pathogenesis in *Caenorhabditis elegans*. *Methods Mol Biol*, 2014, 1149: 653-669
36. Kirienko NV, Kirienko DR, Larkins-Ford J, Wählby C, Ruvkun G, Ausubel FM. *Pseudomonas aeruginosa* disrupts *Caenorhabditis elegans* iron homeostasis, causing a hypoxic response and death. *Cell Host Microbe*, 2013, 13: 406-416
37. Krasteva PV, Giglio KM, Sondermann H. Sensing the messenger: the diverse ways that bacteria signal through c-di-GMP. *Protein Sci*, 2012, 21: 929-948
38. Kurniawan A, Yamamoto T, Tsuchiya Y, Morisaki H. Analysis of the ion adsorption-desorption characteristics of biofilm matrices. *Microbes Environ*, 2012, 27: 399-406
39. Li C, Wang S, Du X, Cheng X, Fu M, Hou N, Li D. Immobilization of iron- and manganese-

- oxidizing bacteria with a biofilm-forming bacterium for the effective removal of iron and manganese from groundwater. *Bioresour Technol*, 2016, 220: 76-84
40. Liu L, Tan X, Jia A. Relationship between bacterial quorum sensing and biofilm formation--a review. *Wei Sheng Wu Xue Bao*, 2012, 52: 271-278
41. Loeschcke A, Thies S. *Pseudomonas putida*-a versatile host for the production of natural products. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2015, 99: 6197-6214
42. Manan A, Bazai ZA, Fan J, Yu H, Li L. The Nif3-family protein YqfO03 from *Pseudomonas syringae* MB03 has multiple nematocidal activities against *Caenorhabditis elegans* and *Meloidogyne incognita*. *Int J Mol Sci*, 2018, 19
43. Matsuyama BY, Krasteva PV, Baraquet C, Harwood CS, Sondermann H, Navarro MV. Mechanistic insights into c-di-GMP-dependent control of the biofilm regulator FleQ from *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2016, 113: E209-218
44. Matz C, Kjelleberg S. Off the hook--how bacteria survive protozoan grazing. *Trends Microbiol*, 2005, 13: 302-307
45. Molina-Henares MA, Ramos-González MI, Daddaoua A, Fernández-Escamilla AM, Espinosa-Urgel M. FleQ of *Pseudomonas putida* KT2440 is a multimeric cyclic diguanylate binding protein that differentially regulates expression of biofilm matrix components. *Res Microbiol*, 2017, 168: 36-45
46. Moradali MF, Ghods S, Rehm BHA. *Pseudomonas aeruginosa* lifestyle: a paradigm for adaptation, survival, and persistence. *Front Cell Infect Microbiol*, 2017, 7: 39-39
47. Mori Y, Inoue K, Ikeda K, Nakayashiki H, Higashimoto C, Ohnishi K, Kiba A, Hikichi Y. The vascular plant-pathogenic bacterium *Ralstonia solanacearum* produces biofilms required for its virulence on the surfaces of tomato cells adjacent to intercellular spaces. *Mol Plant Pathol*, 2016, 17: 890-902
48. Na LX, Yang ZJ. Activity of cyclic diguanylate (c-di-GMP) in bacteria and the study of its derivatives. *Yao Xue Xue Bao*, 2012, 47: 307-312
49. Nandi M, Berry C, Brassinga AKC, Belmonte MF, Fernando WGD, Loewen PC, de Kievit TR. *Pseudomonas brassicacearum* strain DF41 kills *Caenorhabditis elegans* through biofilm-dependent and biofilm-independent mechanisms. *Appl Environ Microbiol*, 2016, 82: 6889-6898
50. Nie H, Xiao Y, Liu H, He J, Chen W, Huang Q. FleN and FleQ play a synergistic role in regulating *lapA* and *bcs* operons in *Pseudomonas putida* KT2440. *Environ Microbiol Rep*, 2017,

9: 571-580

51. Nikel PI, de Lorenzo V. *Pseudomonas putida* as a functional chassis for industrial biocatalysis: From native biochemistry to trans-metabolism. *Metab Eng*, 2018, 50: 142-155
52. Nikel PI, Chavarría M, Danchin A, de Lorenzo V. From dirt to industrial applications: *Pseudomonas putida* as a Synthetic Biology chassis for hosting harsh biochemical reactions. *Curr Opin Chem Biol*, 2016, 34: 20-29
53. Ricciardelli A, Casillo A, Vergara A, Balasco N, Corsaro MM, Tutino ML, Parrilli E. Environmental conditions shape the biofilm of the Antarctic bacterium *Pseudoalteromonas haloplanktis* TAC125. *Microbiol Res*, 2019, 218: 66-75
54. Römling U, Galperin MY, Gomelsky M. Cyclic di-GMP: the first 25 years of a universal bacterial second messenger. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2013, 77: 1-52
55. Ross P, Weinhouse H, Aloni Y, Michaeli D, Weinberger-Ohana P, Mayer R, Braun S, de Vroom E, van der Marel GA, van Boom JH, Benziman M. Regulation of cellulose synthesis in *Acetobacter xylinum* by cyclic diguanylic acid. *Nature*, 1987, 325: 279-281
56. Rybtke MT, Borlee BR, Murakami K, Irie Y, Hentzer M, Nielsen TE, Givskov M, Parsek MR, Tolker-Nielsen T. Fluorescence-based reporter for gauging cyclic di-GMP levels in *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl Environ Microbiol*, 2012, 78: 5060-5069
57. Ryder C, Byrd M, Wozniak DJ. Role of polysaccharides in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Curr Opin Microbiol*, 2007, 10: 644-648
58. Schirmer T. C-di-GMP synthesis: structural aspects of evolution, catalysis and regulation. *J Mol Biol*, 2016, 428: 3683-3701
59. Silby MW, Winstanley C, Godfrey SA, Levy SB, Jackson RW. *Pseudomonas* genomes: diverse and adaptable. *FEMS Microbiol Rev*, 2011, 35: 652-680
60. Simm R, Morr M, Kader A, Nimtz M, Römling U. GGDEF and EAL domains inversely regulate cyclic di-GMP levels and transition from sessility to motility. *Mol Microbiol*, 2004, 53: 1123-1134
61. Singh BK, Walker A, Morgan JA, Wright DJ. Effects of soil pH on the biodegradation of chlorpyrifos and isolation of a chlorpyrifos-degrading bacterium. *Appl Environ Microbiol*, 2003, 69: 5198-5206
62. Sondermann H, Shikuma NJ, Yildiz FH. You've come a long way: c-di-GMP signaling. *Curr Opin Microbiol*, 2012, 15: 140-146

63. Spiro TG, Bargar JR, Sposito G, Tebo BM. Bacteriogenic manganese oxides. *Acc Chem Res*, 2010, 43: 2-9
64. Sulston JE, Brenner S. The DNA of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*, 1974, 77: 95-104
65. Tani Y, Miyata N, Ohashi M, Ohnuki T, Seyama H, Iwahori K, Soma M. Interaction of inorganic arsenic with biogenic manganese oxide produced by a Mn-oxidizing fungus, strain KR21-2. *Environ Sci Technol*, 2004, 38: 6618-6624
66. Tebo BM, Bargar JR, Clement BG, Dick GJ, Murray KJ, Parker D, Verity R, Webb SM. Biogenic manganese oxides: properties and mechanisms of formation. *Annu Rev Earth Pl Sc*, 2004, 32: 287-328
67. Toyoda K, Tebo BM. The effect of Ca^{2+} ions and ionic strength on Mn(II) oxidation by spores of the marine *Bacillus* sp. SG-1. *Geochim Cosmochim Acta*, 2013, 101: 1-11
68. Valentini M, Filloux A. Biofilms and cyclic di-GMP (c-di-GMP) signaling: Lessons from *Pseudomonas aeruginosa* and other bacteria. *J Biol Chem*, 2016, 291: 12547-12555
69. Valentini M, Gonzalez D, Mavridou DA, Filloux A. Lifestyle transitions and adaptive pathogenesis of *Pseudomonas aeruginosa*. *Curr Opinion Microbiol*, 2018, 41: 15-20
70. Vuotto C, Donelli G, Buckley A, Chilton C. *Clostridium difficile* biofilm. *Adv Exp Med Biol*, 2018, 1050: 97-115
71. Wright MH, Farooqui SM, White AR, Greene AC. Production of manganese oxide nanoparticles by *Shewanella* Species. *Appl Environ Microbiol*, 2016, 82: 5402-5409
72. Wright MH, Geszvain K, Oldham VE, Luther GW, 3rd, Tebo BM. Oxidative formation and removal of complexed Mn(III) by *Pseudomonas* Species. *Front Microbiol*, 2018, 9: 560
73. Xiang X, Liu X, Tao H, Cui Z, Zhang L. Progress in c-di-GMP inhibitors. *Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao*, 2017, 33: 1466-1477
74. Xiao Y, Nie H, Liu H, Chen W, Huang Q. Expression of the diguanylate cyclase GcbA is regulated by FleQ in response to cyclic di-GMP in *Pseudomonas putida* KT2440. *Environ Microbiol Rep*, 2016, 8: 993-1002
75. Xin XF, Kvitko B, He SY. *Pseudomonas syringae*: what it takes to be a pathogen. *Nat Rev Microbiol*, 2018, 16: 316-328
76. Yang L, Givskov M. Chemical Biology Strategies for biofilm control. *Microbiol Spectr*, 2015, 3
77. Zarnowski R, Sanchez H, Covelli AS, Dominguez E, Jaromin A, Bernhardt J, Mitchell KF,

- Heiss C, Azadi P, Mitchell A, Andes DR. *Candida albicans* biofilm-induced vesicles confer drug resistance through matrix biogenesis. *PLoS biology*, 2018, 16: e2006872-e2006872
78. Zhai J, Tian Y, Chen J, Zhang K. Enrichment of autotrophic manganese oxide bacteria and diclofenac degradation by biological manganese oxide. *CN Wat Wastewat*, 2018, 34: 11-15
79. Zhao C, Wang N, Wang W, Xu Q. Wastewater treatment based on biofilm regulation by Lux type quorum sensing system--a review. *Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao*, 2017, 33: 1596-1610
80. Zheng Y, Li Y, Long H, Zhao X, Jia K, Li J, Wang L, Wang R, Lu X, Zhang D. *bifA* regulates biofilm development of *Pseudomonas putida* MnB1 as a primary response to H₂O₂ and Mn²⁺. *Front Microbiol*, 2018, 9: 1490

附录

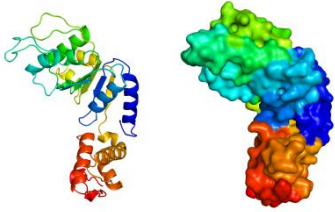
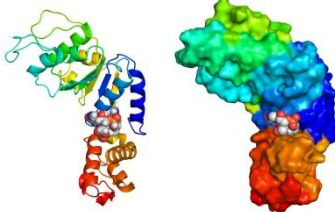
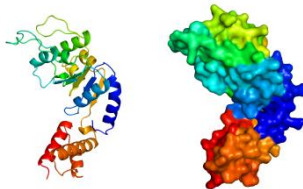
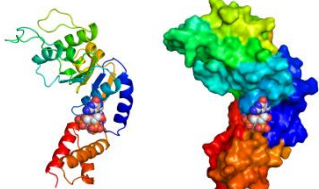
附表 1:

EMSA 所用引物	
引物名称	序列
Primer	Sequence
<i>flagellar hook-length control protein</i>	F: 5'-CGATTCGCGGGCTGTTCAAT-3' R: 5'-AGAGGTTGTGGCCTGAAGAAG-3'
<i>fleS</i>	F: 5'-CGTCGTACCACGCTGGTC-3' R: 5'-GGCCTGGGACATGATTCAT-3'
<i>fleR</i>	F: 5'-GATCTGTTTTATCGCCTGTCGG-3' R: 5'-TTATCCAGCTCCCGCACATT-3'
<i>fleQ</i>	F: 5'-AAGAGCGCGACGAAGGTAT-3' R: 5'-CCCTAGTCAACTCAATGCCCA-3'
<i>fliTSD</i>	F: 5'-GAAGCGATGAACGCGCAGAA-3' R: 5'-GAGCCGATCTTCTGATACTGCC-3'
<i>flgG</i>	F: 5'-TGCCATCCGCAGTACTGAAAC-3' R: 5'-ATCAGCAGGCTTGTCAACCGA-3'
<i>flagellin</i>	F: 5'-TTTGGTGTGGGACTTTCCTGG-3' R: 5'-ACACGACGAAAAAGAGAGGAA-3'
<i>beta-ketoacyl-ACP synthase</i>	F: 5'-CCGGCAAGCATCAAGTGCAT-3' R: 5'-TCCCGACGAAATCGGGGC-3'
<i>glycosyl transferase</i>	F: 5'-CCGATCCGTTTGAACACGCAC-3' R: 5'-CAAGAAGTCTGGCTGGTCCCT-3'
<i>flgF</i>	F: 5'-CTATTGGCTGGCGCTCTGT-3' R: 5'-GTTTTTCGGATGCACCGCTC-3'
<i>dgc</i>	F: 5'-TGGTAGGGTCCTTTCGATCTTG-3' R: 5'-ACAGAACAGCGTCGTAAGTCA-3'
<i>pde</i>	F: 5'-GCTCAGGTAATGGGCTGTTG-3' R: 5'-TCGCTGTTGAAGAAAGACGC-3'

附表 2:

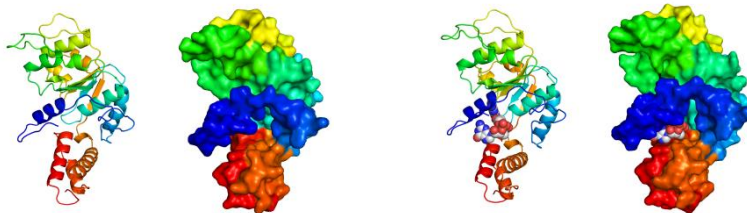
使用的网址	
网址	链接
NCBI	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/
PDB	http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do
BioEdit 7.0	http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html
PubChem	http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/
ExPASy	http://web.expasy.org/compute_pi/
Promoter 2.0	http://www.cbs.dtu.dk/services/Promoter/
BPROM	http://www.softberry.com/berry.phtml?topic=bprom&group=programs&subgroup=gfindb

附表 3:

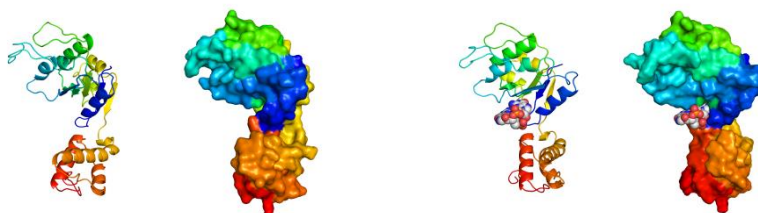
预测的 c-di-GMP 结合转录因子与 c-di-GMP 之间的分子对接		
Predicted c-di-GMP binding transcriptional factors in MB03 (AAA+ Domain) (Ranked by cDock- Energy)	Homologous modeling (Optimum configuration after Modeller)	Flexible docking (Optimum docking configuration)
VT47_16350 (S145 ~ D394) cDock- Energy = - 41.36 kJ/mol		
VT47_05425 (L193 ~ E426) cDock- Energy = - 40.30 kJ/mol		

续附表 3

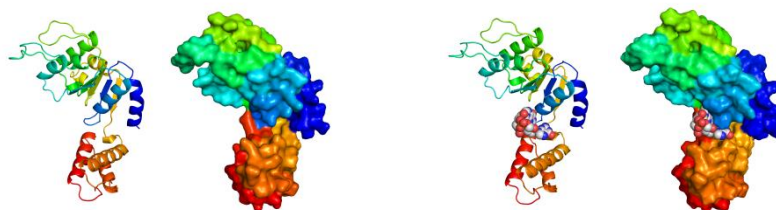
VT47_13970
(F98 ~ E375)
cDocker-Energy =
- 39.98 kJ/mol



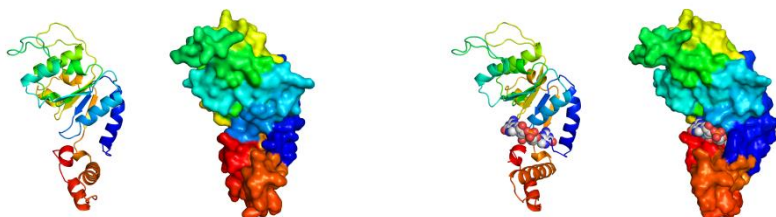
VT47_23760
(R151 ~ N374)
cDocker-Energy =
- 38.82 kJ/mol



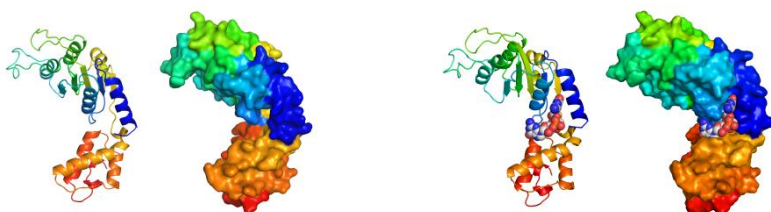
VT47_01640
(P34 ~ R265)
cDocker-Energy =
- 35.59 kJ/mol



VT47_16935
(R151 ~ N374)
cDocker-Energy =
- 35.32 kJ/mol

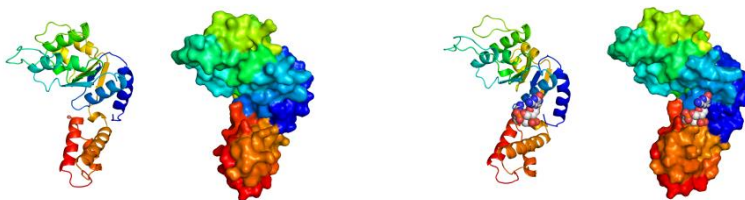


VT47_13440
(G349 ~ R594)
cDocker-Energy =
- 33.53 kJ/mol

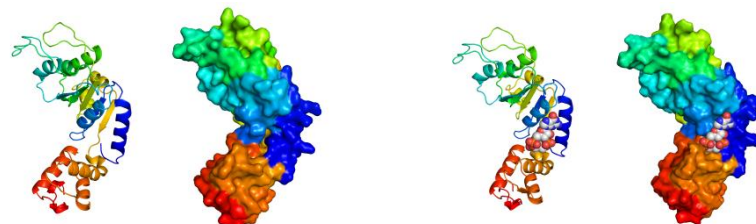


续附表 3

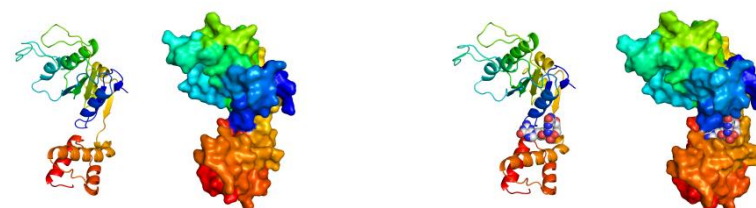
VT47_01335
(L147 ~ E384)
cDock-er-Energy =
- 33.48 kJ/mol



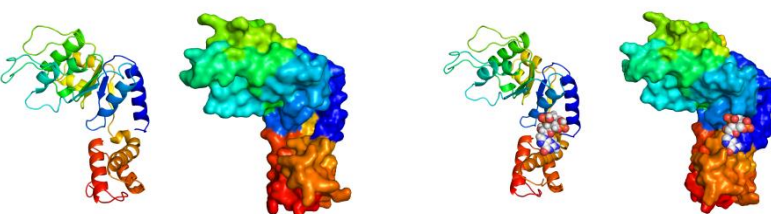
VT47_00305
(L140 ~ R383)
cDock-er-Energy =
- 32.44 kJ/mol



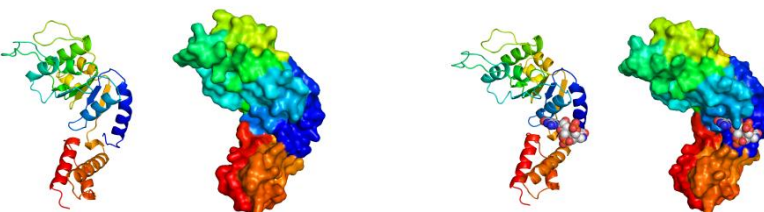
VT47_13090
(R271 ~ R489)
cDock-er-Energy =
- 32.08 kJ/mol



VT47_16340
(I131 ~ L374)
cDock-er-Energy =
- 31.87 kJ/mol

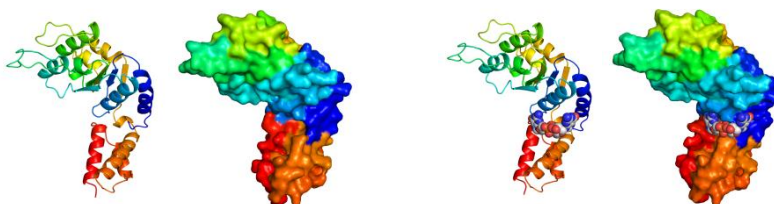


VT47_23205
(E140 ~ G374)
cDock-er-Energy =
- 28.79 kJ/mol

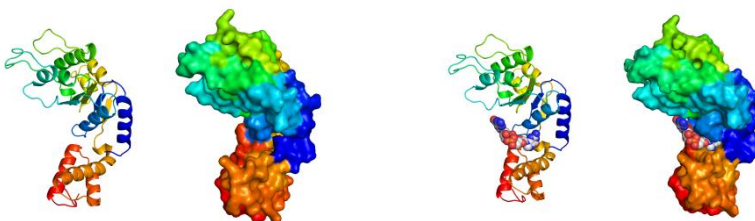


续附表 3

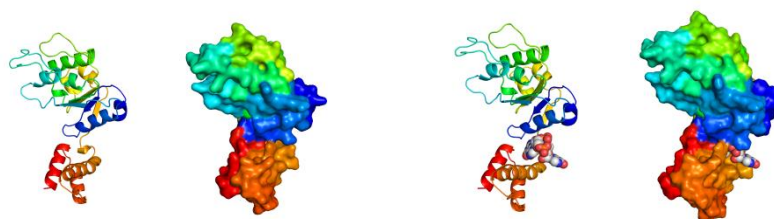
VT47_04100
(I149 ~ E381)
cDock-er-Energy =
- 28.74 kJ/mol



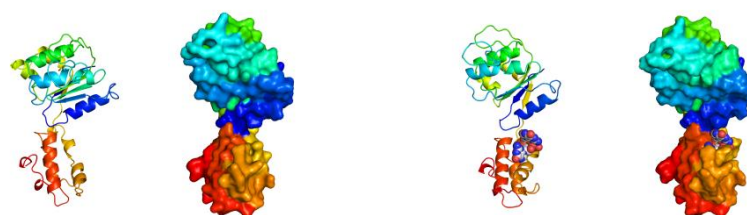
VT47_15180
(V24 ~ D262)
cDock-er-Energy =
- 27.82 kJ/mol



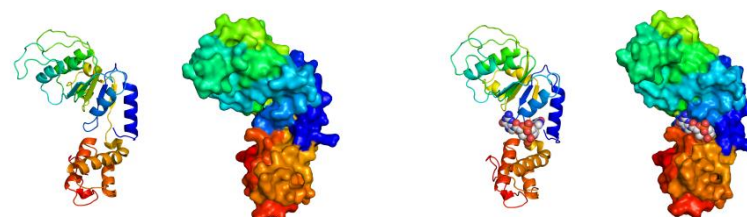
VT47_05865
(V22 ~ L237)
cDock-er-Energy =
- 27.08 kJ/mol



VT47_08180
(D331 ~ A557)
cDock-er-Energy =
- 25.83 kJ/mol

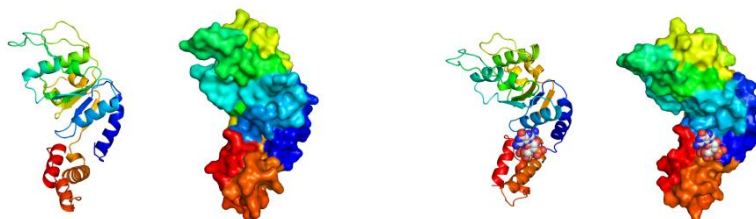


VT47_11275
(L199 ~ V451)
cDock-er-Energy =
- 25.54 kJ/mol

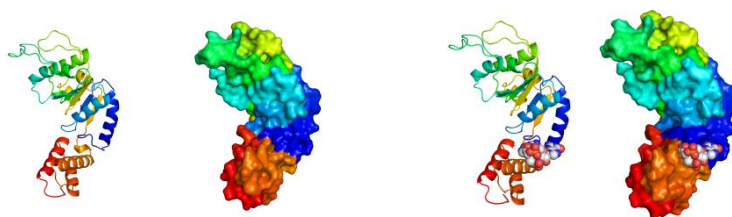


续附表 3

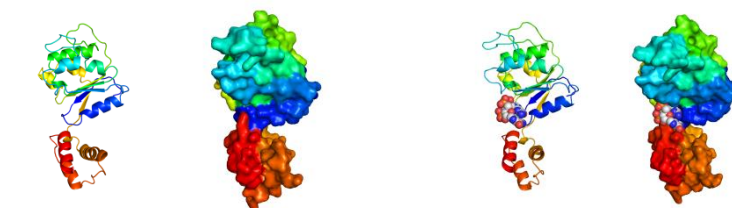
VT47_19080
(L144 ~ L373)
cDock-*Energy* =
- 25.07 kJ/mol



VT47_03620
(D132 ~ I371)
cDock-*Energy* =
- 22.18 kJ/mol



VT47_05860
(A4 ~ L214)
cDock-*Energy* =
- 18.52 kJ/mol



致谢

随着论文答辩的谢幕，毕业已然来临。论文的写作，过程曲折漫长，有抓耳挠腮，也有快意欣慰，只有当论文付梓之时，才感受到这是一种享受。

三年前，我满怀憧憬的开始了我的研究生生涯，过上了三点一线的生活。回首往昔，一幕幕犹如发生在昨日。曾经我们哭着笑着送走了师兄师姐，转眼间我的硕士生涯已经接近尾声。这几年的时光即漫长又短暂，其中充满了酸甜苦辣，但更多的是收获和成长。如今，我也提笔写下这三年来的实验成果。本人的学位论文是在我的恩师李林教授的殷切关怀和耐心指导下进行并完成，衷心感谢我的恩师对我的敦敦教诲和悉心关怀。从课题的选择、实验设计，直到论文的最终完成，李老师都始终给予我耐心的指导和支持。李老师开阔的视野，严谨的学术态度，精益求精的工作作风，诲人不倦的高尚师德，严以律己、宽以待人的崇高风范，深深地感染和激励着我。不仅使我树立了远大的学术目标、掌握了基本的研究方法，最重要的是用科学严谨的思维去发现问题、解决问题，更是我在科研道路上从懵懂走向成熟和专业的领路人。无论是在学习上，还是生活中，李老师都给与了无私的帮助，也教会了我为人处世的方式。

感谢 MMBL 实验室的小伙伴们，感谢有你们的陪伴，感谢肖帆师兄和代海燕师姐在我刚进入实验室时教会我实验室的基本操作，并在实验技术上给予我的耐心指导和帮助。感谢丁美娟师姐在我还小心翼翼和大家相处时，帮助我快速融入到了 MMBL 这个大家庭中。感谢孙孝文师兄给我提供的实验思路，以及在实验设计、数据分析上的帮助。感谢张润三年来形影不离的陪伴，帮我度过了一个又一个的坎。实验之余，追寻美食、美景总能一拍即合说走就走，无论什么时候都能欢声笑语，给我的研究生生活中增添了一抹绚丽的色彩。感谢万能的刘永轩师弟，是一个实验上的好帮手，生活中的开心果。

当然实验的顺利进行离不开实验室全体同学的关心和帮助，感谢顾桐、余勋、王志勇、曹志平、何梦莹、田甜、孟翠、Asmaa、Anum 等师兄师姐对我一点一滴的帮助。感谢一同入学的宋荣辉、谢晋、谭晓晨和师弟张敬民、师妹张雪的陪伴和鼓励。三年来，让我感受到和你们一起学习生活的多姿多彩，我会将和你们一起经历的那些难忘的点点滴滴永远记录记录在我的心里。相聚即是有缘，我们的相遇会留给我以后的一生留下深深的记忆。祝我们在各自的城市更好的生活和工作，我相信

我们会彼此牵挂，我们在以后的道路上会继续相互扶持，相互鼓励。

感谢我的家人和陪伴了我七年青春的男孩，是你们的支持和关爱，支持我的每一个决定，让我学习和生活没有后顾之忧，你们是我坚强的后盾，愿你们平安健康!

最后，感谢答辩委员会的各位老师，您们辛苦了！谢谢大家，感谢所有支持、理解、帮助我的老师、家人和朋友!

苏雨薇

2020 年 6 月