



研究报告

c-di-GMP 的磷酸二酯酶 PA4781 在抗菌肽 Meroicidin 抑制铜绿假单胞菌生物被膜中的作用

王雅蓉¹ 朱明星² 张帆¹ 杨婷婷¹ 贾琴琴¹ 王秀青^{*3}

1 宁夏医科大学临床医学院检验系 宁夏 银川 750004

2 宁夏医科大学科技中心 宁夏 银川 750004

3 宁夏医科大学总医院外科学研究室 宁夏 银川 750004

摘要: 【背景】抗菌肽 Meroicidin 可抑制临床菌株铜绿假单胞菌 PA03 生物被膜。PA4781 基因是课题组通过生物信息学分析筛选出的差异表达基因, PA4781 作为细菌第二信使分子环二鸟苷酸(cyclic diguanylate, c-di-GMP)的磷酸二酯酶具有降解 c-di-GMP 的作用, 其在抗菌肽 Meroicidin 抑制生物被膜中的作用机制尚不清楚。【目的】研究细菌第二信使分子 c-di-GMP 的磷酸二酯酶 PA4781 基因在抗菌肽 Meroicidin 抑制铜绿假单胞菌生物被膜中的作用。【方法】利用单碱基突变技术敲除 PA4781 基因, Sanger 测序方法检测敲除的正确性。采用结晶紫染色法观察 PA03 菌株、PA4781 过表达菌株、PA4781 敲除菌株 24 h 生物被膜生长情况, 以及在抗菌肽 Meroicidin 24、48、72 $\mu\text{mol/L}$ 作用下各菌株生物被膜的生长情况。采用对羟基联苯溶液显色法检测在抗菌肽 Meroicidin 48、72 $\mu\text{mol/L}$ 作用下, PA03 菌株、PA4781 过表达菌株、PA4781 敲除菌株生物被膜藻酸盐的变化情况。【结果】Sanger 测序结果显示, 用 pnCasPA-BEC 系统成功实现了靶点位置的单碱基突变, 提前终止了 PA4781 的转录; 结晶紫染色结果显示, 培养 24 h 时, 在 24 $\mu\text{mol/L}$ 抗菌肽 Meroicidin 作用下 PA03 菌株、PA4781 过表达菌株、PA4781 敲除菌株生物被膜形成情况无显著性差异($P>0.05$), 在抗菌肽 Meroicidin 48、72 $\mu\text{mol/L}$ 处理下, 过表达株与正常株和敲除株有显著性差异($P<0.05$), 生物被膜明显减少, 敲除株生物被膜厚度高于 PA03 组($P<0.05$)。随着抗菌肽 Meroicidin 浓度升高各组藻酸盐含量下降, 其中过表达菌株在抗菌肽 Meroicidin 作用下藻酸盐生成量抑制率最高, 可达 65%。【结论】抗菌肽 Meroicidin 能够促进细菌第二信使分子磷酸二酯酶 PA4781 的表达, 为抗菌肽 Meroicidin 抑制铜绿假单胞菌生物被膜的作用机制可能通过细菌第二信使分子这一信号途径提供新的研究思路。

关键词: 铜绿假单胞菌, 生物被膜, 抗菌肽 Meroicidin, 环二鸟苷酸, 单碱基突变

Foundation items: National Natural Science Foundation of China (81760661); Natural Science Foundation of Ningxia (NZ16080)

*Corresponding author: E-mail: xiuqingwang1979@163.com

Received: 18-09-2019; Accepted: 10-01-2020; Published online: 14-01-2020

基金项目: 国家自然科学基金(81760661); 宁夏自然科学基金(NZ16080)

*通信作者: E-mail: xiuqingwang1979@163.com

收稿日期: 2019-09-18; 接受日期: 2020-01-10; 网络首发日期: 2020-01-14

The role of c-di-GMP phosphodiesterase PA4781 in the inhibition of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm by the antimicrobial peptide mercedin

WANG Ya-Rong¹ ZHU Ming-Xing² ZHANG Fan¹ YANG Ting-Ting¹ JIA Qin-Qin¹
WANG Xiu-Qing^{*3}

1 Department Clinical Laboratory Medicine, Clinical Medicine College of Ningxia Medical University, Yinchuan, Ningxia 750004, China

2 Science and Technology Center of Ningxia Medical University, Yinchuan, Ningxia 750004, China

3 Department of Surgery, General Hospital of Ningxia Medical University, Yinchuan, Ningxia 750004, China

Abstract: [Background] The antimicrobial peptide mercedin can inhibit the clinical strain *Pseudomonas aeruginosa* PA03 biofilm. The PA4781 gene is a differentially expressed gene selected by bioinformatics analysis. As a phosphodiesterase, PA4781 has function to degrade c-di-GMP, which is a bacterial second messenger molecule. PA4781 plays a role in inhibiting biofilm in the antimicrobial peptide mercedin, while the mechanism of action is still unclear. [Objective] To study the role of the phosphodiesterase PA4781 gene, which degrades the bacterial second messenger molecule c-di-GMP, in the inhibition of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm by the antimicrobial peptide mercedin. [Methods] The PA4781 gene was knocked out by approach of base editing and the sanger sequencing method was used to detect the correctness of knockout. Crystal violet staining was used to observe the growth of biofilm in PA03 strain, PA4781 overexpressing strain, PA4781 knockout strain for 24 hours, and the development of biofilm of each strain under the action of antimicrobial peptide mercedin 24, 48, 72 $\mu\text{mol/L}$. Dihydroxybiphenyl solution chromogenic method was used to detect alginate production under interference from antibacterial peptide mercedin 48, 72 $\mu\text{mol/L}$ to the PA03 strain, PA4781 overexpressing strain and PA4781 knockout strain. Alginate is an exopolysaccharide polymer composed of mannuronic acid and guluronic acid which produced by various bacteria. It is an important component of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm. [Results] The results of sanger sequencing showed that the pnCasPA-BEC system successfully realized the single-base mutation at target position and terminated the transcription of PA4781 in advance. The results of crystal violet staining showed that under the treatment of 24 $\mu\text{mol/L}$ antimicrobial peptide mercedin, there was no significant difference in the formation of biofilm between the three groups ($P>0.05$). Under the treatment of 48 $\mu\text{mol/L}$ and 72 $\mu\text{mol/L}$ antimicrobial peptide mercedin, there was a significant difference between the overexpression group with the normal group with the knockout group ($P<0.05$), the biofilm was significantly reduced, and the biofilm thickness of the knockout group was higher than that of the PA03 group ($P<0.05$). With the increase of the concentration of the antimicrobial peptide mercedin, the alginate content of each group decreased, and the overexpression strain had the highest inhibition rate of alginate production under the action of the antimicrobial peptide mercedin, which reached to 65%. [Conclusion] Antibacterial peptide mercedin can promote the expression of bacterial second messenger molecule c-di-GMP phosphodiesterase PA4781, which may provide a new research idea for the mechanism of antibacterial peptide mercedin inhibiting *Pseudomonas aeruginosa* biofilm through the signaling pathway of bacterial second messenger molecule.

Keywords: *Pseudomonas aeruginosa*, Biofilm, Antimicrobial peptide mercedin, c-di-GMP, Single-base mutation

铜绿假单胞菌是院内获得性感染发病率很高的革兰氏阴性杆菌。铜绿假单胞菌感染后通常会伴有生物被膜的产生,生物被膜是由细菌及自身

产生的蛋白质、多糖等成分包绕而成,很容易附着在生物材料或者黏膜表面^[1],由于生物被膜的产生使其对常规抗生素产生抵抗力,并且生物被膜的

保护使得细菌逃避宿主免疫系统的攻击。如铜绿假单胞菌生物被膜胞外多聚基质中的藻酸盐能够保持生物被膜结构的稳定性^[2]，增强细菌黏附性，提高对于附着物的附着能力，增强细菌耐药性，因而消除生物被膜一直是人们在积极探索的内容。

抗菌肽是先天免疫效应分子，本研究使用的抗菌肽为 Merocecin (或命名为 17BIPHE2)，氨基酸序列为 GBKRLVQRLKDBLRNLV，是抗菌肽 LL-37 的衍生肽。其中 L 为 D 型氨基酸，B 为联苯丙氨酸，分子量为 2 561.866^[3]。Merocecin 相比 LL-37 溶血活性和对人体毒性更低，而抗菌活性有所提高^[4-5]。我们前期研究表明，Merocecin 具有抗肿瘤的作用^[6]，并且能够抑制金黄色葡萄球菌以及铜绿假单胞菌生物被膜^[7]。

本研究就抗菌肽 Merocecin 对铜绿假单胞菌生物被膜作用机制进一步探究。在 Merocecin 抑制铜绿假单胞菌生物被膜的基础上，对经过抗菌肽处理的生物被膜原核转录组进行测序分析，测序分析结果显示抗菌肽作用后与对照组相比 PA4781 基因表达量明显上调。Real-time PCR 实验也验证了这一结果的正确性。

PA4781 是 c-di-GMP 的磷酸二酯酶。c-di-GMP 作为细菌的第二信使分子，与相应的受体分子结合接受信号传导，进而影响下游靶点的功能^[8]。c-di-GMP 主要调控细菌的运动性、生物膜的形成等生理过程^[9]。c-di-GMP 由含 GGDEF 蛋白质结构域的环化酶合成，而含有 EAL 和 HD-GYP 结构域的磷酸二酯酶参与其水解^[10-11]。c-di-GMP 是一个可以介导细菌由生物被膜生长模式向游离运动状态转变的关键分子^[11]。c-di-GMP 水平升高，生物被膜形成增强，c-di-GMP 水平下降致使生物被膜形成缺陷^[12]。PA4781 和 PA4108 在铜绿假单胞菌中能够编码含有 HD-GYP 结构域的蛋白^[13]。

因 PA4781 在抗菌肽 Merocecin 作用下表达上调，因而猜想抗菌肽 Merocecin 可能会通过影响 PA4781 表达进而影响细菌第二信使分子 c-di-GMP

相关调控系统使得生物被膜的产生受到抑制。因而将 PA4781 过表达以及敲除，并在不同浓度的抗菌肽 Merocecin 的作用下观察其生物学功能变化情况，如生物被膜厚度、生物被膜重要组分胞外多糖藻酸盐的变化情况等，以期探索抗菌肽 Merocecin 对铜绿假单胞菌生物被膜的抑制机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒

铜绿假单胞菌 PA03 为临床分离株，由宁夏医科大学总医院实验中心提供，成膜能力较强，PA4781 过表达株 pMP2444-PA4781 由实验室保存。实验所用菌株及质粒详见表 1。

1.1.2 抗菌肽 Merocecin

氨基酸序列为 GBKRLVQRLKDBLRNLV，由吉尔生化(上海)有限公司合成，纯度达 95%以上，灭菌 ddH₂O 作为其溶剂。

1.1.3 主要试剂和仪器及培养基

庆大霉素、氨苄青霉素，北京 Solarbio 公司；Prime STAR HS (Premix)、T4 PNK，TaKaRa 公司；限制性内切酶 *Bsa* I、高效连接酶 T4 DNA Ligase，NEB 公司；藻酸盐标准品，Sigma 公司；DNA 回收试剂盒、质粒提取试剂盒、DNA marker，北京天根生化科技有限公司。

Multiskan GO 全波长酶标仪，Thermo Fisher Scientific 公司；双光束紫外可见光光度计，北京普析通用仪器有限责任公司；生物电泳图像分析系统，复日科技有限公司；电转化仪，Bio-Rad 公司。

表 1 本实验所用菌株和质粒

Table 1 Strains and plasmids used in this study

菌株和质粒	来源
Strains and plasmids	Source
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (PA03)	Laboratory stock (Clinical isolates)
PA4781 overexpression strain (pMP2444-PA4781)	Laboratory stock
pnCasPA-BEC	Addgene
DH10B competent Cells	Thermo Fisher Scientific

SOC (super optimal broth with catabolite repression)培养基: 在 950 mL 纯水中加入蛋白胨 20.0 g, 酵母粉 5.0 g, 氯化钠 0.5 g, 再加入 10 mL 250 mmol/L 氯化钾, 定容至 1 L, 1×10^5 Pa 灭菌 30 min, 冷却至室温后加入 20 mL 1 mol/L 葡萄糖, 溶液使用前加入 5 mL 灭菌的 2 mol/L 氯化镁。

TSB (tryptic soy broth)培养基(g/L): 胰蛋白胨 17.0, 大豆蛋白胨 3.0, 氯化钠 5.0, 磷酸氢二钾 2.5, 葡萄糖 2.5, pH 7.2。TSA (tryptic soy agar)即在 TSB 中添加琼脂(20 g/L)。

1.1.4 PCR 引物

根据靶基因 PA4781 序列和 CasOT 软件筛选 sgRNA 靶序列, 得到了 3 个 sgRNA 序列, 并设计每个 sgRNA 的退火引物对; 敲除质粒筛选时菌检下游引物为 PA-BEC-R。根据 NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov)网站提供的铜绿假单胞菌 PA4781 基因序列, 设计引物对 pari1-F 和 pair1-R, 用来扩增 PA4781 基因片段, 详见表 2。引物合成由生工生物工程(上海)股份有限公司完成, 基因测序由金唯智生物科技(天津)有限公司完成。

1.2 PA4781 敲除载体构建

PA4781 基因的敲除选择 pnCasPA-BEC 系统, 该系统由胞苷脱氨酶 APOBEC1 和 Cas9 蛋白融合而成, 是一种单碱基基因编辑系统, 该系统通过脱氨反应将靶基因中特定氨基酸密码子如 CAA、

CAG 中的 C 碱基突变为 T, 其互补链上相应的 G 突变为 A, 通过突变提前产生终止密码子 TAA、TAG, 从而提前将靶基因的转录翻译过程终止, 达到敲除基因的效果^[14]。

1.2.1 sgRNA 的设计及相关引物合成

根据目的基因 PA4781 序列和 CasOT 软件筛选出候选 sgRNA 靶序列, 同时希望预期产生的突变位于 sgRNA 靶序列第 2-8 个碱基处, 靶序列上需有氨基酸 Q 或 W 的 sgRNA 靶位点^[14], 设计的具体序列见表 2。

1.2.2 sgRNA 载体构建、转化及转化筛选

sgRNA 载体构建: (1) sgRNA 引物对的退火连接: PA4781-sgRNA-F (100 μ mol/L) 1 μ L, PA4781-sgRNA-R (100 μ mol/L) 1 μ L, $10 \times$ T4 Ligation Buffer 1 μ L, T4 PNK (10 U/ μ L) 0.5 μ L, ddH₂O 6.5 μ L, 总体积 10 μ L。PCR 反应条件: 37 $^{\circ}$ C 30 min, 95 $^{\circ}$ C 5 min 之后取出放于室内自然降温至 25 $^{\circ}$ C, 产物于 -20 $^{\circ}$ C 中保存。(2) pnCasPA-BEC 质粒载体与 sgRNA 退火产物做连接反应, 首先用限制性内切酶 *Bsa* I 对 pnCasPA-BEC 质粒上的 *Bsa* I 酶切位点进行特异性的切割, 形成与 sgRNA 两端互补的黏性末端, 酶切体系(50 μ L): $10 \times$ Buffer 5 μ L, pnCasPA-BEC 15 μ L, *Bsa* I 1 μ L, ddH₂O 29 μ L。37 $^{\circ}$ C 反应 3 h 之后置于 65 $^{\circ}$ C 15 min 灭活内切酶。(3) 将酶切后的质粒纯化回收, 回收后

表 2 本实验所用引物

Table 2 Primers used in this study

引物名称	序列	用途
Primers name	Sequence (5'→3')	Usage
pari1-F	CTCCAGCGTCTTCAATACGGA	PA4781 amplification
pair1-R	GGCAAACGCCGTGCCGAGCACA	PA4781 amplification
sgRNA-1	GCCCGAGCAGGAACCTCGTGCTGG	Target sequence 1
sgRNA-2	GAGCAACAGGGCCTGGCCCTGG	Target sequence 2
sgRNA-3	GCGCCAGCTGCAACAGTTGCAGG	Target sequence 3
PA4781-sgRNA-F1	GTGGGCCCCGAGCAGGAACCTCGTGTC	Annealing primer 1
PA4781-sgRNA-R1	AAACGCACGAGTTCCTGCTCGGGC	
PA4781-sgRNA-F2	GTGGGAGCAACAGGGCCTGGCCCT	Annealing primer 2
PA4781-sgRNA-R2	AAACAGGGCCAGGCCCTGTTGCTC	
PA4781-sgRNA-F3	GTGGGCGCCAGCTGCAACAGTTGC	Annealing primer 3
PA4781-sgRNA-R3	AAACGCAACTGTTGCAGCTGGCGC	
PA-BEC-R	CTCGTGCGGTTCAATGCGA	Colony PCR primer

的质粒与 sgRNA 退火产物进行连接, 连接体系 (20 μL): 10 \times T4 DNA Ligase Buffer 2 μL , 退火后的 sgRNA 4 μL , 酶切后的质粒 pnCasPA-BEC 2 μL , T4 DNA Ligase 1 μL , ddH₂O 11 μL 。25 $^{\circ}\text{C}$ 连接反应 3 h, 获得连接产物。

连接产物的转化: 将上述获得的连接产物转化至 DH10B 感受态细胞中。从-80 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中取出 100 μL DH10B 感受态细胞, 将其置于冰上缓慢融化, 加入连接产物 6 μL , 轻轻吹打混匀, 冰浴 30 min; 冰浴结束之后将菌液放入 42 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中热激 45 s, 立即放入冰浴中 2 min; 加入提前预热于 37 $^{\circ}\text{C}$ 的 SOC 培养基 900 μL , 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温摇床 150 r/min 振荡 45 min, 将菌液于室温下 5 000 r/min 离心 5 min 弃尽上清; 取 100 μL 新鲜 LB 培养基将菌体打散, 均匀涂布于含有庆大霉素抗性的平板表面; 平板可先正向 37 $^{\circ}\text{C}$ 放置 0.5 h, 待液体吸收完毕, 再倒置 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养过夜。

转化筛选: 挑选过夜培养转化平板上的单克隆菌落于含 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 庆大霉素的 LB 液体培养基中在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、220 r/min 条件下培养过夜。之后进行菌落 PCR 验证。将退火后的 sgRNA 双链引物对定向亚克隆到 pnCasPA-BEC 载体上, PCR 筛选的引物为以 3 个 sgRNA 正向引物和 PABEC IDR, 对克隆进行 PCR 筛选, PCR 所用模板为煮沸法制得: 取 20 μL 菌液, 加入 100 μL ddH₂O, 低火煮沸 10 min, 4 $^{\circ}\text{C}$ 、12 000 $\times g$ 离心 10 min, 取上清作为模板。菌落 PCR 体系 (50 μL): 模板 2 μL , PA4781F (10 $\mu\text{mol}/\text{L}$) 1 μL , PA-BEC-R (10 $\mu\text{mol}/\text{L}$) 1 μL , Prime STAR HS (Premix) 25 μL , ddH₂O 21 μL 。PCR 反应条件: 98 $^{\circ}\text{C}$ 30 s; 98 $^{\circ}\text{C}$ 10 s, 62 $^{\circ}\text{C}$ 5 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 10 s, 30 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 7 min。对菌检结果为阳性的菌株提取重组质粒 DNA, 按照质粒小提试剂盒的使用说明操作, 送金唯智生物科技(天津)有限公司进行测序分析, 结果测序正确的命名为 PA4781 sgRNA-F1、PA4781 sgRNA-F2、PA4781 sgRNA-F3, 重组质粒 -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

1.2.3 PA03 菌株电转感受态制备^[15]

复苏 PA03 菌株于无抗性的 LB 固体平板上, 37 $^{\circ}\text{C}$ 倒置培养约 16 h。挑取单个菌落于 5 mL 新鲜的 LB 液体培养基中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 、180 r/min 培养过夜 (12-14 h)。将培养过夜的菌液按照 1:100 的比例接入 100 mL 新鲜的 LB 培养基中, 放大培养至 OD_{600} 为 0.6-0.8 之间, 此时细菌处于对数生长期。将菌液放于冰上预冷约 0.5 h, 并不间断摇晃菌液。离心机 4 $^{\circ}\text{C}$ 预冷, 将预冷的菌液倒入离心管中, 利用天平两两配平, 4 $^{\circ}\text{C}$ 、5 000 r/min 离心 12 min, 弃上清, 首先加入预冷的双蒸水充分悬浮洗涤, 4 $^{\circ}\text{C}$ 、5 000 r/min 离心 12 min, 弃上清, 再用 10% 甘油重复上述步骤清洗 2 次。根据最后一次离心后剩余的菌体加入 10% 预冷的甘油 (大约 1 mL), 吹打混匀之后分装感受态细胞, 100 μL 每管直接进行转化实验或者放入-80 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存。

制备电转感受态细胞所有物品均用双蒸水洗涤并高压蒸汽灭菌, 使用前预冷。所有步骤均应在冰上进行。

1.2.4 敲除质粒的电转化及验证

将 PA4781 sgRNA (F1、F2、F3) 重组质粒分别电转入铜绿假单胞菌 PA03 感受态细胞, 将 PA4781 基因扩增出来通过 Sanger 测序观察靶点位置碱基突变情况。在含庆大霉素 (60 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 的 LB 平板上培养过夜后, 挑取平板上单克隆菌落于含庆大霉素 (60 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 的 LB 培养基中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 、180 r/min 振荡培养 12 h, 煮沸法提取菌液 DNA 作为模板。PCR 反应体系 (25 μL): 模板 1 μL , pair1-F (10 $\mu\text{mol}/\text{L}$) 0.5 μL , pair1-R (10 $\mu\text{mol}/\text{L}$) 0.5 μL , ddH₂O 10.5 μL , Prime STAR HS (Premix) 12.5 μL 。PCR 反应条件: 98 $^{\circ}\text{C}$ 30 s; 98 $^{\circ}\text{C}$ 10 s, 61 $^{\circ}\text{C}$ 5 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 10 s, 26 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 7 min。先取 2.5 μL 进行 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测。选择 PCR 产物大小符合 PA4781 基因 1 182 bp 的、并且条带单一的 PCR 产物进行测序。将成功进行敲除的菌株命名为 pnCasPA-BEC- Δ PA4781。

1.3 结晶紫法定量检测 Mercedin 在不同浓度作用下正常株、过表达株、敲除株生物被膜的变化情况

复苏 PA03 株、过表达株 pMP2444-PA4781、敲除株 pncasPA-BEC- Δ PA4781 于 TSA 培养基 37 °C 倒置培养, 15 h 后挑取单个菌落, 在 TSB 培养基中 37 °C、180 r/min 振荡过夜, pMP2444-PA4781、pncasPA-BEC- Δ PA4781 为维持质粒稳定需在培养基中添加抗生素。培养过夜后, 取 1% 菌液放大培养约 2.5 h, 调整菌液浓度至 0.5 麦氏浊度, 用 TSB 继续稀释菌液 100 倍后, 每孔 200 μ L 接种至 96 孔培养板中, 以空白 TSB 培养基作为空白对照, 以不加药的 PA03 株、过表达株 pMP2444-PA4781、敲除株 pncasPA-BEC- Δ PA4781 为阴性对照。

Mercedin 药物稀释: 抗菌肽保存于 -20 °C 冰箱中, 取出后室温平衡 5 min, 进行称量, 称取 1 mg 抗菌肽加入 100 μ L 灭菌 ddH₂O, 此时抗菌肽 Mercedin 为 3 900 μ mol/L, 取该溶液进行稀释, 最终使得加入的孔内菌液药物浓度分别为 24、48、72 μ mol/L。

培养 24 h 之后轻轻吸去培养基, 用 PBS 冲洗 2 次, 动作轻柔以防生物被膜洗去, 晾干之后每孔加入甲醇 200 μ L 固定 15 min。固定结束后弃去甲醇晾干, 加入 0.1% 结晶紫 200 μ L 染色 5 min, 结束后弃去结晶紫, 流水下冲洗多余染料, 自然晾干。每孔加入 33% 冰乙酸, 酶标仪高速振荡 15 min 后测波长 595 nm 处的光密度, 培养基空白孔做以上同样的处理。实验重复 3 次。

1.4 不同浓度抗菌肽 Mercedin 作用下受试菌生物被膜藻酸盐产生量变化情况

生物被膜中藻酸盐含量采用对羟基联苯溶液显色法^[16-17], 首先根据藻酸盐标准品制得藻酸盐标准曲线方程: $y=0.0007x-0.0031$, $R^2=0.9805$ 。用上述方法获得 0.5 麦氏浊度的 PA03 株、过表达株 pMP2444-PA4781、敲除株 pncasPA-BEC- Δ PA4781 菌液, 并将其稀释 100 倍, 作为工作浓度。实验设空白培养基组、不含药阴性对照组、抗菌肽 Mercedin 48、72 μ mol/L 处理组, 每组 4 个复孔。

无菌细胞爬片置于 24 孔板, 加入稀释好的工作浓度菌液 1 mL, 抗菌肽处理组在加入菌液后并加入不同浓度的抗菌肽溶液使其终浓度为 48、72 μ mol/L, 37 °C 培养 24 h 后取出爬片, 用 4 °C PBS 轻柔洗去爬片上的浮游菌, 将爬片弄碎放入试管, 加入 2.4 mL 硫酸和硼酸钠的混合物(于冰水混合物中操作), 混匀后 100 °C 煮沸 5 min, 4 °C 放置, 之后加入 40 μ L 1% 对羟基联苯溶液进行显色, 混匀后检测 520 nm 处吸光度值, 减去空白对照, 以藻酸盐标准品的标准曲线所得公式计算出黏附在爬片上各组生物被膜藻酸盐含量。以各菌株阴性对照组藻酸盐产生量为 100%, 计算不同浓度抗菌肽作用后各菌株藻酸盐产生的百分率。实验重复 3 次。

1.5 数据处理

采用 SPSS 22.0 统计软件进行统计分析。数据采用均数 \pm 标准差表示, 采用单因素方差分析(one-way ANOVA), $P<0.05$ 认为差异有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 敲除载体构建

2.1.1 sgRNA 设计

依据软件 CasOT^[18]设计靶向 PA4781 基因的 sgRNA 序列。在 CasOT 里面遵循降低脱靶几率的原则, 原核生物基因组一般较小, 脱靶率相对较低, 位于 CDS 区 5' 端的靶点是选择的重点。之后利用单碱基基因编辑系统的原理, 在靶点处进行分析, 靶位点中有氨基酸为 Q (密码子为 CAG、CAA) 者, 这样的靶点更具有意义, 能够使得预期产生的突变密码子处于所构建靶点的第 2-8 个碱基。本实验构建的 3 个靶基因所处的位置如图 1 所示。

2.1.2 sgRNA 载体构建

因 pncasPA-BEC 载体中不含靶点 sgRNA 引物, 因此阴性质粒不能够 PCR 出产物。阳性克隆菌的 PCR 产物大小为 350 bp, 复核预期的 PCR 产物大小。如图 2A 所示, 3 个靶点分别挑取 3 个单克隆菌落进行筛选, 获得 1 个 sgRNA-1 阳性菌落, sgRNA-2、sgRNA-3 各 2 个阳性菌落, 送检测序正



图 1 sgRNA 靶基因在基因组中的位置

Figure 1 Genome location of PA4781 sgRNA target

注: Primer 7: sgRNA-1 靶点; Primer 8: sgRNA-2 靶点; Primer 12: sgRNA-3 靶点; 红色部分为预期突变子产生的位置。

Note: Primer 7 is sgRNA-1, Primer 8 is sgRNA-2, and Primer 12 is sgRNA-3. The red part is the position where the expected mutant is produced.

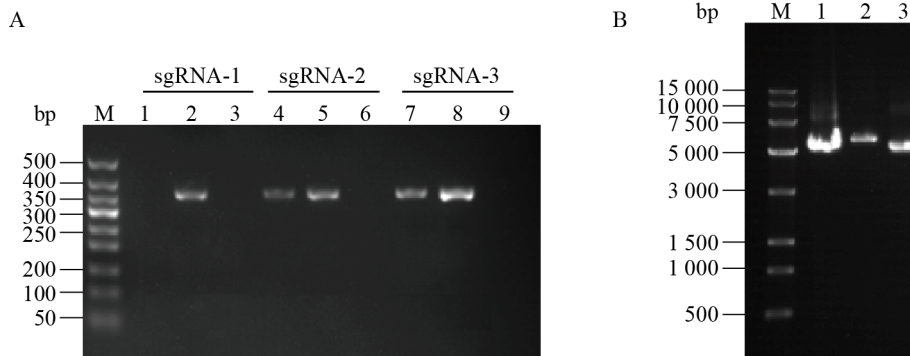


图 2 sgRNA 载体菌检 PCR 筛选(A)和 sgRNA 质粒纯化(B)

Figure 2 PCR screening for positive sgRNA plasmid subclone (A) and purification of sgRNA expressing plasmid (B)

注: A: DNA 分子量标准 500 bp. B: DNA 分子量标准 15 000 bp; 1: PA4781 sgRNA-F1 质粒; 2: PA4781 sgRNA-F2 质粒; 3: PA4781 sgRNA-F3 质粒。

Note: A: The DNA molecular weight standard is 500 bp. B: DNA molecular weight standard of 15 000 bp; 1: PA4781 sgRNA-F1 plasmid; 2: PA4781 sgRNA-F2 plasmid; 3: PA4781 sgRNA-F3 plasmid.

确的 3 个靶点质粒分别命名为 PA4781 sgRNA-F1、PA4781 sgRNA-F2、PA4781 sgRNA-F3。图 2B 为 PA4781 sgRNA-F1、PA4781 sgRNA-F2、PA4781 sgRNA-F3 3 个靶点的质粒提取图。

2.1.3 敲除质粒转化并筛选

将 3 个重组质粒电转化入铜绿假单胞菌 PA03

感受态细胞中, 筛选转化平板上面的单个转化克隆, 扩增目的片段 PA4781, 并用 1.5%凝胶电泳鉴定, 如图 3 所示, 条带单一, 符合目的片段大小 (1 182 bp), 单碱基突变在琼脂糖电泳上面看不出变化, 因此将剩余的 PCR 产物送去金唯智生物科技(天津)有限公司进行 Sanger 测序鉴定。

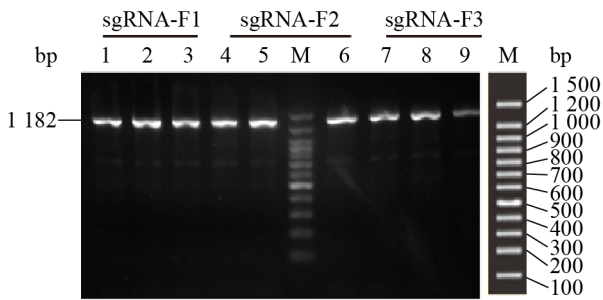


图3 铜绿假单胞菌单克隆菌 PCR 扩增 PA4781

Figure 3 PCR amplification of *Pseudomonas aeruginosa* monoclonal strain PA4781

注: M: DNA 分子量标准 1 500 bp; 1、2、3 源于 PA4781 sgRNA-F1 质粒转化克隆; 4、5、6 源于 PA4781 sgRNA-F2 质粒转化克隆; 7、8、9 源于 PA4781 sgRNA-F3 质粒转化克隆。

Note: M: The DNA molecular weight standard is 1 500 bp; 1, 2, 3 are derived from the PA4781 sgRNA-F1 transformant; 4, 5, 6 are derived from the PA4781 sgRNA-F2 transformant; 7, 8, and 9 are derived from the PA4781 sgRNA-F3 transformant.

Sanger 测序分析发现, PA4781 sgRNA-F1、PA4781 sgRNA-F2 电转后, 转化平板上面的菌落均未发现靶点附近有任何单碱基突变。这可能跟靶点序列位置的二级结构以及其位于基因组中的空间位置有关, 导致该靶点位置无法进行有效的基因编辑。PA4781 sgRNA-F3 转化平板上挑取的菌落, 3 株均发现在 sgRNA 靶点位置出现预期突变, 如图 4 所示, 在进行序列比对时发现 PA4781 sgRNA-F3 靶点位置出现了一个碱基突变即 C→T, 其相应的密码子由原来的 CAG 转变为终止密码子 TAG, 符合图 1 中所设计的 PA4781 sgRNA-F3 靶点位置的预期突变, 提前终止 PA4781 的转录翻译过程, 达到 PA4781 敲除的目的, 将该株菌命名为 pnCasPA-BEC-ΔPA4781。图 4 对比如下: PA03 中标记为红色的碱基 C, 在突变体中转变为 T。

2.2 不同浓度抗菌肽 Mercidlin 作用下正常株、过表达株、敲除株生物被膜形成情况

结晶紫是一种碱性染料, 能够结合生物被膜表面带负电荷的分子和胞外基质多糖组分, 通过测定吸光度来用于生物被膜形成能力的鉴定。PA03、

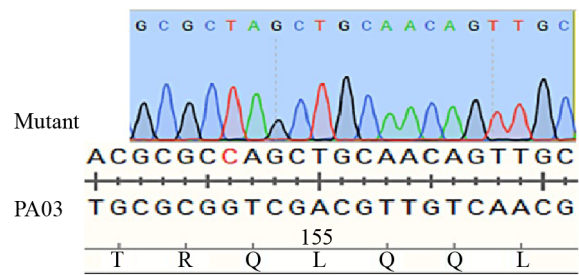


图4 单碱基基因编辑系统 pnCasPA-BEC 编辑基因组 C 突变为 T

Figure 4 The base editor pnCasPA-BEC enabled highly efficient C/T conversion

注: PA03 菌株中 PA4781 基因被 pnCasPA-BEC system 系统有效突变。PA03 中标红的碱基, 在突变体中突变为 T。

Note: The PA4781 gene of the *P. aeruginosa* PA03 strain was effectively inactivated by the pnCasPA-BEC system. The base C of the red color in PA03 was mutated to T in the mutant.

过表达株 pMP2444-PA4781、敲除株 pnCasPA-BEC-ΔPA4781, 分别被 24、48、72 μmol/L 的 Mercidlin 处理, 24 h 后结晶紫染色定量生物被膜生成量。24 μmol/L 处理组 3 组无明显差异, 48 μmol/L 和 72 μmol/L 处理组过表达菌株 pMP2444-PA4781 生物被膜明显低于正常株和敲除株, 说明抗菌肽 Mercidlin 作用下 PA4781 作用更加明显, 敲除株 pnCasPA-BEC-ΔPA4781 在高药物浓度下生物被膜还是会减少, 说明高浓度的 Mercidlin 能够刺激 PA4781 发挥部分作用。图 5A 为 OD₅₉₅ 值, 结晶紫染色如图 5B 所示。

2.3 不同浓度抗菌肽 Mercidlin 作用下受试菌藻酸盐产生量变化情况

PA03、过表达株 pMP2444-PA4781、敲除株 pnCasPA-BEC-ΔPA4781 被 48、72 μmol/L 的 Mercidlin 处理, 24 h 为初期黏附阶段, 24 h 后通过对羟基联苯法测定藻酸盐变化情况。如图 6 所示, 显示随着抗菌肽 Mercidlin 浓度升高受试菌藻酸盐含量下降, 过表达 pMP2444-PA4781 组在抗菌肽 Mercidlin 作用下藻酸盐产生量明显低于 PA03 与敲除株 pnCasPA-BEC-ΔPA4781, 抗菌肽 Mercidlin 在 72 μmol/L 作用下抑制率可达 65%。

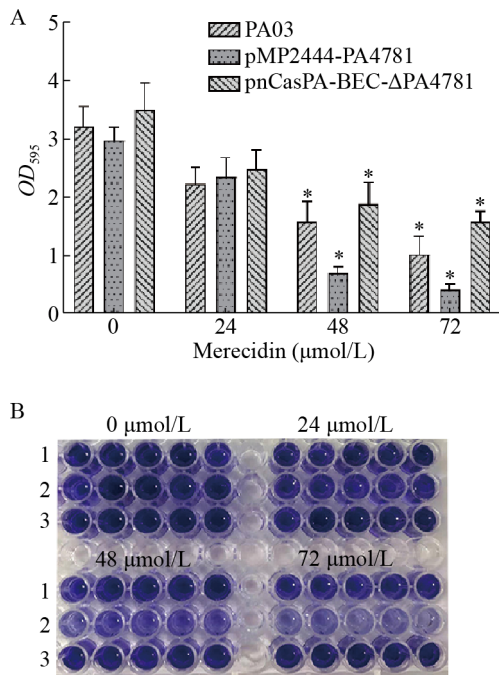


图5 结晶紫染色定量受试菌生物被膜形成能力
Figure 5 Crystal violet staining identify the ability of biofilm formation

注: A: 结晶紫定量染色检测生物被膜, *: $P < 0.05$ 。B: 结晶紫染色观察生物被膜, 1: PA03; 2: pMP2444-PA4781; 3: pnCasPA-BEC-ΔPA4781。

Note: A: Quantitative detection of biofilm by crystal violet staining, *: $P < 0.05$ 。B: Observation of biofilm by crystal violet staining, 1: PA03; 2: pMP2444-PA4781; 3: pnCasPA-BEC-ΔPA4781。

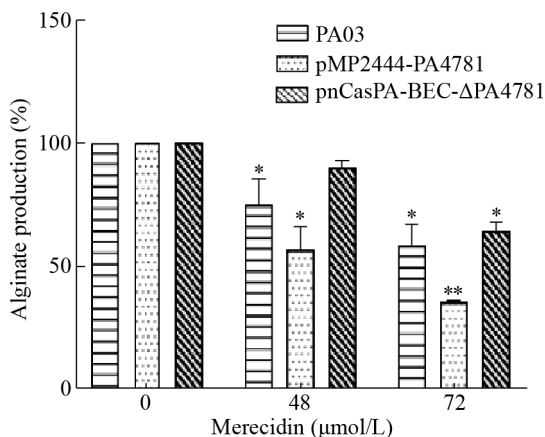


图6 Mercedin 对受试菌生物被膜藻酸盐产生的影响
Figure 6 Effect of mercedin on *Pseudomonas aeruginosa* biofilm alginate

注: *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$ 。

Note: *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$ 。

3 讨论与结论

铜绿假单胞菌广泛分布于自然环境中, 作为条件致病菌, 是免疫力低下患者以及重症患者院内感染的主力军^[19]。因铜绿假单胞菌容易形成多重耐药以及生物被膜, 造成铜绿假单胞菌感染后病情总是反复, 迁延不愈^[20]。生物被膜的形成大致分三步: 初期黏附, 逐渐成熟, 后期扩散。生物被膜具有自身的生物结构特征, 形成过程中细菌产生各种基质作为保护屏障, 比如多糖藻酸盐、Psl、Pel、蛋白质等, 增强细菌适应环境的能力、抗生素抗性, 逃避宿主免疫监视^[21-22]。生物被膜的形成一直是研究的热点, 研究者们希望能够找到抑制生物被膜的手段。

c-di-GMP 信号系统调节细菌毒力、生物被膜等生物学性状^[23-24]。最近还有学者发现 c-di-GMP 的免疫刺激和免疫调节特性, 支持其作为疫苗佐剂的潜在应用^[25]。c-di-GMP 通过与转录调节因子比如 FleQ 等的相互作用, 调节基因表达影响生物被膜多糖组分的 Pel 的转录, 从而对生物被膜的形成产生影响^[8]。高水平的 c-di-GMP 促进无梗细胞生长, 而低水平与浮游生物的存在相关^[8,26]。越来越多的证据表明, c-di-GMP 通过与效应蛋白等受体分子结合, 从而调控细菌胞外多糖、鞭毛生物合成及毒力的产生^[26-27]。生物被膜的组分中含有胞外多糖, 其中藻酸盐、Psl、Pel 是最主要的^[28]。研究表明, 藻酸盐的生物合成受到细菌第二信使分子 c-di-GMP 的调控^[29], c-di-GMP 结合 Alg44 这一藻酸盐合成重要的蛋白, 这是藻酸盐合成的重要途径^[30]。细胞内 c-di-GMP 水平升高导致 Psl 多糖以及其它生物被膜组分升高^[31]。FleQ 除了影响鞭毛基因的表达, 其作为铜绿假单胞菌的转录调节因子, 还能够抑制 Pel 基因的转录, 而这种抑制作用会被高浓度的 c-di-GMP 解除^[8]。

铜绿假单胞菌 PAO1 基因组编码两种具有 HD-GYP 结构域的蛋白(PA4108, PA4781)和第 3 种含有关键残基变异结构域(YN-GYP)的蛋白

(PA2572)^[13], PA4108、PA4781 和 PA2572 的突变对铜绿假单胞菌的生物膜形成和结构有明显的影响。HD-GYP 是参与细菌第二信使分子 c-di-GMP 水解的蛋白质结构域^[32]。在霍乱弧菌 (*Vibrio cholerae*) El Tor 体内 HD-GYP 蛋白的过表达降低了 c-di-GMP 的细胞内浓度, 减少了胞外多糖的产生和生物膜形成^[33]。Ueda 等^[34]研究酪氨酸磷酸酶 TpbA 与胞外 DNA 关系时表明, 突变铜绿假单胞菌酪氨酸磷酸酶 TpbA 后 c-di-GMP 的浓度上升, 诱导生物膜形成大量增加, 胞外 DNA 与 c-di-GMP 浓度呈相反的趋势, 突变 PA4781 后胞外 DNA 下降。课题组前期已经发现抗菌肽 Mercedin 作用后能够抑制铜绿假单胞菌生物被膜^[7], 本实验通过抗菌肽 Mercedin 作用前后铜绿假单胞菌转录组的测序分析, 得到若干个差异表达基因, 其相关的信号通路都可能与抗菌肽 Mercedin 抑制铜绿假单胞菌生物被膜有关。其中 PA4781 作为细菌第二信使分子的磷酸二酯酶, 编码的蛋白具有 HD-GYP 结构域, 参与 c-di-GMP 的降解, 并且在抗菌肽 Mercedin 作用下高表达, 我们猜想抗菌肽 Mercedin 可能通过上调 PA4781 基因进而影响细菌第二信使分子 c-di-GMP 信号系统来抑制生物被膜。

细菌对抗生素越来越多耐药性的出现, 希望找到其它对抗细菌的手段。抗菌肽广泛存在于自然界生物体内, 从昆虫到哺乳动物体内均可分离, 不仅具有抗菌作用, 还能够作为先天免疫系统的一部分调节宿主细胞功能^[35]。实验所用抗菌肽 Mercedin 为抗菌肽 Cathelicidin 家族肽中的唯一成员 LL-37 的截短肽, 它更加稳定、有效、毒性更低^[36]。Mercedin 单独使用和与抗生素联用研究均显示出很好的抗细菌生物被膜的作用^[37-38]。

实验通过高表达、敲除 PA4781, 同时加上抗菌肽的作用来验证我们的猜想。为敲除该基因, 实验使用的是由 CRISPR RNA 引导的胞嘧啶单碱基基因编辑系统 pnCasPA-BEC^[14], 由失活的 Cas9

蛋白与胞苷脱氨酶 APOBEC1 形成融合蛋白复合物, 可以通过 Cas9/sgRNA 复合物将脱氨酶导向任何基因组基因座, sgRNA 与目的基因互补配对, 在不产生双链 DNA 断裂、不降低菌落转化效率的情况下, 在靶位点进行碱基 C-T 的单碱基编辑。利用该系统靶向编辑 PA4781 基因, PA4781 转录提前终止, PA4781 失活。该系统已在金葡等细菌中得到很好地验证^[39]。

本研究用抗菌肽 Mercedin 24、48、72 $\mu\text{mol/L}$ 处理 PA03 菌株、PA4781 过表达株和 PA4781 敲除株后, 用结晶紫染色法测定细菌生物被膜形成能力, 对羟基联苯法测定生物被膜藻酸盐含量, 发现抗菌肽 Mercedin 作用下, 过表达株效果最为明显, 生物被膜以及生物被膜中的藻酸盐过表达菌株明显低于 PA03 菌株以及 PA4781 敲除株, 表明抗菌肽 Mercedin 存在下, 细菌体内过量表达的 PA4781 继续发挥其功能降解 c-di-GMP, 减少生物被膜形成; 敲除株发现产生生物被膜以及藻酸盐的能力弱于正常株, 表明利用 pnCasPA-BEC 单碱基编辑系统使 PA4781 基因失活后, 在抗菌肽作用下还是有部分 PA4781 基因功能被激活, 从而继续行使其功能。

本研究主要是根据前期试验结果对抗菌肽 Mercedin 抑制铜绿假单胞菌生物被膜机制的研究做一个铺垫, 发现 PA4781 基因在抗菌肽 Mercedin 作用下表达上调, 降解细菌第二信使分子 c-di-GMP 从而产生抑制生物被膜的作用, 因而下一步将会进行抗菌肽作用后细菌第二信使分子相关其他功能的检测, 继续探究抗菌肽 Mercedin 抑制生物被膜和细菌第二信使分子之间的联系。

REFERENCES

- [1] Stewart PS, Costerton JW. Antibiotic resistance of bacteria in biofilms[J]. *The Lancet*, 2001, 358(9276): 135-138
- [2] Xu BJ, Soukup RJ, Jones CJ, et al. *Pseudomonas aeruginosa* AmrZ binds to four sites in the *algD* promoter, inducing DNA-AmrZ complex formation and transcriptional activation[J]. *Journal of Bacteriology*, 2016, 198(19): 2673-2681

- [3] Wang GS, Hanke ML, Mishra B, et al. Transformation of human cathelicidin LL-37 into selective, stable, and potent antimicrobial compounds[J]. ACS Chemical Biology, 2014, 9(9): 1997-2002
- [4] Mishra B, Wang G. Individual and combined effects of engineered peptides and antibiotics on *Pseudomonas aeruginosa* biofilms[J]. Pharmaceuticals, 2017, 10(3): E58
- [5] Wang XQ, Mishra B, Lushnikova T, et al. Amino acid composition determines peptide activity spectrum and hot-spot-based design of mercedin[J]. Advanced Biosystems, 2018, 2(5): 1700259
- [6] Zhan SS, Li J, Yang TT, et al. Antimicrobial peptide mercedin induces apoptosis in human lung adenocarcinoma cell line A549[J]. Basic & Clinical Medicine, 2019, 39(4): 473-477 (in Chinese)
战仕胜, 李军, 杨婷婷, 等. 抗菌肽 mercedin 诱导人肺癌细胞系 A549 凋亡[J]. 基础医学与临床, 2019, 39(4): 473-477
- [7] Hui LY. The Inhibition of *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* biofilms by antimicrobial peptide 17BIPHE2[D]. Yinchuan: Master's Thesis of Ningxia Medical University, 2017 (in Chinese)
回丽媛. 抗菌肽 17BIPHE2 抑制金黄色葡萄球菌及铜绿假单胞菌生物被膜作用的研究[D]. 银川: 宁夏医科大学硕士学位论文, 2017
- [8] Hickman JW, Harwood CS. Identification of FleQ from *Pseudomonas aeruginosa* as a c-di-GMP-responsive transcription factor[J]. Molecular Microbiology, 2008, 69(2): 376-389
- [9] Jung H I, Kim Y J, Lee Y J, et al. Mutation of the cyclic di-GMP phosphodiesterase gene in *Burkholderia lata* SK875 attenuates virulence and enhances biofilm formation[J]. Journal of Microbiology, 2017, 55(10): 800-808
- [10] Christen M, Christen B, Folcher M, et al. Identification and characterization of a cyclic di-GMP-specific phosphodiesterase and its allosteric control by GTP[J]. Journal of Biological Chemistry, 2005, 280(35): 30829-30837
- [11] Simm R, Morr M, Kader A, et al. GGDEF and EAL domains inversely regulate cyclic di-GMP levels and transition from sessility to motility[J]. Molecular Microbiology, 2004, 53(4): 1123-1134
- [12] Hickman JW, Tifrea DF, Harwood CS. A chemosensory system that regulates biofilm formation through modulation of cyclic diguanylate levels[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2005, 102(40): 14422-14427
- [13] Ryan RP, Lucey J, O'Donovan K, et al. HD-GYP domain proteins regulate biofilm formation and virulence in *Pseudomonas aeruginosa*[J]. Environmental Microbiology, 2009, 11(5): 1126-1136
- [14] Chen WZ, Zhang Y, Zhang YF, et al. CRISPR/Cas9-based genome editing in *Pseudomonas aeruginosa* and cytidine deaminase-mediated base editing in *Pseudomonas species*[J]. iScience, 2018, 6: 222-231
- [15] Dorella FA, Estevam EM, Cardoso PG, et al. An improved protocol for electrotransformation of *Corynebacterium pseudotuberculosis*[J]. Veterinary Microbiology, 2006, 114(3/4): 298-303
- [16] Cheng HJ, Zhang CF, Wang CZ, et al. Effect of houttuynonate sodium on alginate synthesis of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms[J]. Chinese Traditional Patent Medicine, 2013, 35(3): 455-460 (in Chinese)
程惠娟, 张昌峰, 汪长中, 等. 鱼腥草素钠对铜绿假单胞菌生物被膜藻酸盐合成的影响[J]. 中成药, 2013, 35(3): 455-460
- [17] Cui DQ. Biofilm production of *Pseudomonas aeruginosa* under different levels of environmental oxygen[D]. Beijing: Doctoral Dissertation of Chinese Academy of Medical Science & Peking Union Medical College, 2009 (in Chinese)
崔冬清. 氧浓度变化对铜绿假单胞菌生物被膜生成的影响[D]. 北京: 中国医学科学院博士学位论文, 2009
- [18] Xiao A, Cheng ZC, Kong L, et al. CasOT: a genome-wide Cas9/gRNA off-target searching tool[J]. Bioinformatics, 2014, 30(8): 1180-1182
- [19] Savoia D. New perspectives in the management of *Pseudomonas aeruginosa* infections[J]. Future Microbiology, 2014, 9(7): 917-928
- [20] Ovortrup K, Hultqvist LD, Nilsson M, et al. Small molecule anti-biofilm agents developed on the basis of mechanistic understanding of biofilm formation[J]. Frontiers in chemistry, 2019, 7: 742
- [21] Franklin MJ, Nivens DE, Weadge JT, et al. Biosynthesis of the *Pseudomonas aeruginosa* extracellular polysaccharides, alginate, Pel, and Psl[J]. Frontiers in Microbiology, 2011, 2: 167
- [22] Mulcahy LR, Isabella VM, Lewis K. *Pseudomonas aeruginosa* biofilms in disease[J]. Microbial Ecology, 2014, 68(1): 1-12
- [23] Yang FH, Xue DR, Tian F, et al. Identification of c-di-GMP signaling components in *Xanthomonas oryzae* and their orthologs in Xanthomonads involved in regulation of bacterial virulence expression[J]. Frontiers in microbiology, 2019, 10: 1402
- [24] Wei Q, Zhang ZQ, Luo J, et al. Insulin treatment enhances *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation by increasing intracellular cyclic di-GMP levels, leading to chronic wound infection and delayed wound healing[J]. American journal

- of translational research, 2019, 11(6): 3261-3279
- [25] Karaolis DKR, Means TK, Yang D, et al. Bacterial c-di-GMP is an immunostimulatory molecule[J]. *The Journal of Immunology*, 2007, 178(4): 2171-2181
- [26] Lee VT, Matewish JM, Kessler JL, et al. A cyclic-di-GMP receptor required for bacterial exopolysaccharide production[J]. *Molecular Microbiology*, 2007, 65(6): 1474-1484
- [27] Liang ZX. The expanding roles of c-di-GMP in the biosynthesis of exopolysaccharides and secondary metabolites[J]. *Natural Product Reports*, 2015, 32(5): 663-683
- [28] Goltermann L, Tolker-Nielsen T. Importance of the exopolysaccharide matrix in antimicrobial tolerance of *Pseudomonas aeruginosa* aggregates[J]. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 2017, 61(4): e02696-16
- [29] Zhou E, Seminara AB, Kim SK, et al. Thiol-benzo-triazolo-quinazolinone inhibits Alg44 binding to c-di-GMP and reduces alginate production by *Pseudomonas aeruginosa*[J]. *ACS Chemical Biology*, 2017, 12(12): 3076-3085
- [30] Merighi M, Lee VT, Hyodo M, et al. The second messenger bis-(3'-5')-cyclic-GMP and its PilZ domain-containing receptor Alg44 are required for alginate biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa*[J]. *Molecular Microbiology*, 2007, 65(4): 876-895
- [31] Irie Y, Borlee BR, O'Connor JR, et al. Self-produced exopolysaccharide is a signal that stimulates biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa*[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2012, 109(50): 20632-20636
- [32] Zheng Y, Tsuji G, Opoku-Temeng C, et al. Inhibition of *P. aeruginosa* c-di-GMP phosphodiesterase RocR and swarming motility by a benzoisothiazolinone derivative[J]. *Chemical science*, 2016, 7(9): 6238-6244
- [33] Hammer BK, Bassler BL. Distinct sensory pathways in *Vibrio cholerae* El Tor and classical biotypes modulate cyclic dimeric GMP levels to control biofilm formation[J]. *Journal of Bacteriology*, 2009, 191(1): 169-177
- [34] Ueda A, Wood TK. Tyrosine phosphatase TpbA of *Pseudomonas aeruginosa* controls extracellular DNA via cyclic diguanylic acid concentrations[J]. *Environmental Microbiology Reports*, 2010, 2(3): 449-455
- [35] Lee MW, Lee EY, Ferguson AL, et al. Machine learning antimicrobial peptide sequences: Some surprising variations on the theme of amphiphilic assembly[J]. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 2018, 38: 204-213
- [36] Wang GS, Narayana JL, Mishra B, et al. Design of antimicrobial peptides: Progress made with human cathelicidin LL-37[A]//*Antimicrobial Peptides*[M]. Singapore: Springer, 2019: 215-240
- [37] Su YJ, Wang HJ, Mishra B, et al. Nanofiber dressings topically delivering molecularly engineered human cathelicidin peptides for the treatment of biofilms in chronic wounds[J]. *Molecular Pharmaceutics*, 2019, 16(5): 2011-2020
- [38] Mishra B, Golla RM, Lau K, et al. Anti-staphylococcal biofilm effects of human cathelicidin peptides[J]. *ACS Medicinal Chemistry Letters*, 2016, 7(1): 117-121
- [39] Gu TN, Zhao SQ, Pi YS, et al. Highly efficient base editing in *Staphylococcus aureus* using an engineered CRISPR RNA-guided cytidine deaminase[J]. *Chemical Science*, 2018, 9(12): 3248-3253