

研究论文

DOI: 10.12211/2096-8280.2025-036

大肠杆菌中吲哚介导的双向趋化行为的调控与分析

汪昆昆¹, 陈泓宇², 张安栋¹, 卢晓云¹, 谭丹¹

(¹ 西安交通大学生命科学与技术学院, 生物医学信息工程教育部重点实验室, 陕西 西安 710049; ² 清华大学生命科学学院, 北京 100084)

摘要: 细菌趋化性在肠道菌群定植和癌症诊疗等领域发挥着重要作用, 也是定量生物学与合成生物学的研究方向之一。大肠杆菌中吲哚诱导的趋化反应主要由两种效应相反的甲基化趋化受体 Tsr 与 Tar 介导, 两者的拮抗效应可导致双向趋化反应的发生。本文从数学模型的建立与仿真以及实验调控与观测两方面对该双向趋化反应进行研究。基于信号转导动力学与马尔可夫随机游走模型, 分别从个体水平和群体水平构建了大肠杆菌在双受体介导下趋化性的数学模型, 并对不同受体比例下大肠杆菌的趋化响应行为进行了模拟和仿真分析。同时, 利用 CRISPRi 技术对 Tar 受体进行了不同程度的可诱导敲低 (分别敲低 0%、40% 和 70%), 并借助于 Transwell 细菌迁移实验和自主设计优化的微流控观测平台, 对吲哚介导下不同 Tar 表达量菌株的趋化性行为进行了观测与分析。通过两种甲基化趋化受体 Tsr/Tar 相对比例的调节实现了细菌趋化行为的调控, 同时结合数学建模初步揭示了相互拮抗的两种趋化性受体比例对细菌个体和群体趋化运动的影响, 为扩展趋化行为的定量研究和精确调控手段, 以及未来细菌趋化性在肠道菌群人工调节等多领域的应用奠定基础。

关键词: 趋化性; 吲哚; 双向趋化行为; 基于 CRISPR 的基因抑制技术 (CRISPRi); 微流控; 定量生物学

中图分类号: Q819 文献标志码: A

A preliminary study on the regulation and analysis of indole mediated bidirectional chemotaxis behavior of *Escherichia coli*

WANG Kunkun¹, CHEN Hongyu², ZHANG Andong¹, LU Xiaoyun¹, TAN Dan¹

(¹Key Laboratory of Biomedical Information Engineering of Ministry of Education, School of Life Science and Technology, Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710049, Shaanxi, China; ²School of Life Sciences, Tsinghua University, Beijing 100084, China)

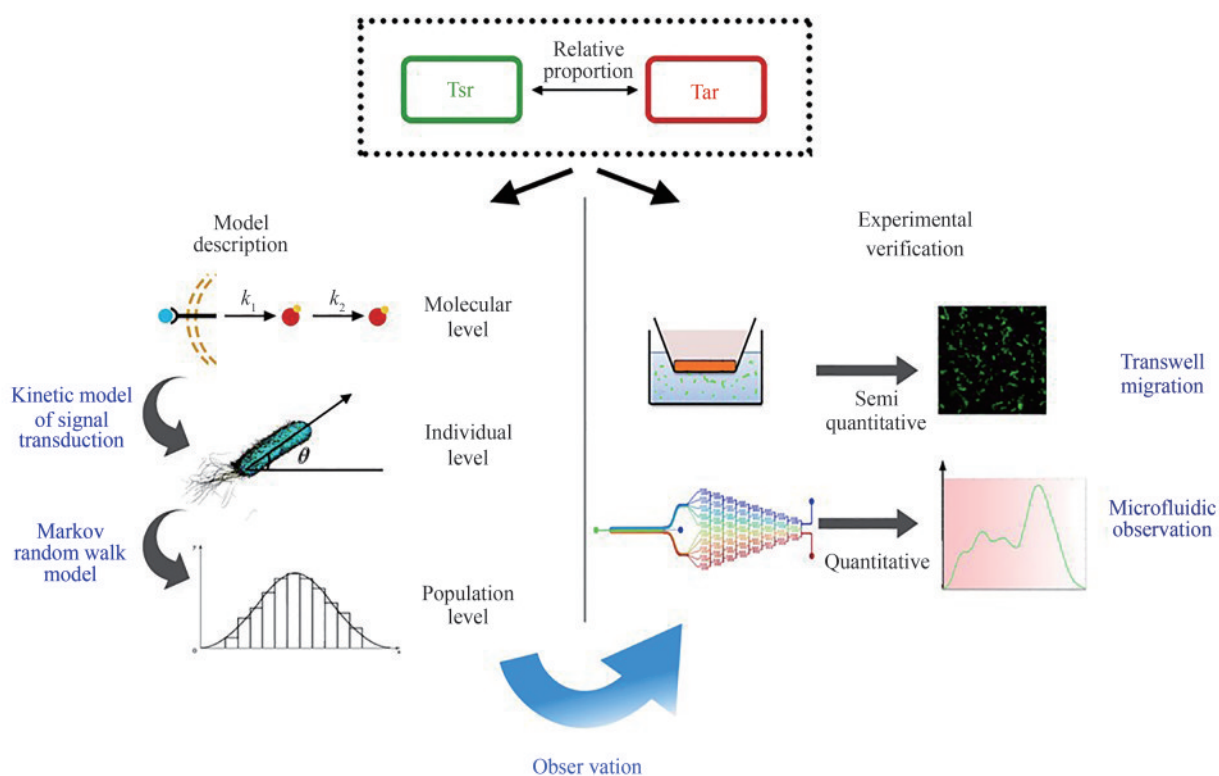
Abstract: Chemotaxis constitutes a fundamental mechanism underlying bacterial behaviors such as microbiota colonization and cancer therapy, while also representing an actively studied area within quantitative and synthetic biology. The indole induced bidirectional chemotaxis in *Escherichia coli* is mainly mediated by two methylation chemoreceptors (MCPs) with antagonistic effects, Tsr and Tar respectively, which was investigated in this study by mathematical model and experimental verification. Based on signal transduction dynamics model and Markov random

收稿日期: 2025-04-29 修回日期: 2025-07-31

引用本文: 汪昆昆, 陈泓宇, 张安栋, 卢晓云, 谭丹. 大肠杆菌中吲哚介导的双向趋化行为的调控与分析[J]. 合成生物学, 2025, 6(6): 1398-1420

Citation: WANG Kunkun, CHEN Hongyu, ZHANG Andong, LU Xiaoyun, TAN Dan. A preliminary study on the regulation and analysis of indole mediated bidirectional chemotaxis behavior of *Escherichia coli*[J]. Synthetic Biology Journal, 2025, 6(6): 1398-1420

walk model, the bidirectional chemotaxis of *E. coli* was described and simulated at both individual and population levels. Meanwhile, one of the MCPs receptors Tar was knockdown by 0%, 40% and 70% respectively via CRISPRi, and the chemotaxis behaviors of knockdown strains with different Tar expression levels under indole induction were observed and analyzed by Transwell migration experiment and self-designed microfluidics platform. The regulation of bacterial chemotaxis behavior was achieved in this study by adjusting the ratio of two antagonistic chemotaxis receptors Tsr and Tar, and together with mathematical model and experimental observation, the influence of Tsr/Tar ratio on the chemotaxis behavior of *E. coli* at individual and population level was preliminarily revealed in our study. This will benefit the quantitative analysis and precise regulation of chemotaxis behavior, as well as the future applications of bacterial chemotaxis in various fields.



Keywords: chemotaxis; indole; bidirectional chemotaxis; CRISPRi; microfluidics; quantitative biology

细菌趋化性是一种定向运动，指具有运动能力的细菌对多种化学物质的浓度梯度产生趋向（正趋化性）或离避反应（负趋化性）^[1]。趋化性能促使细菌感知化学信号并实现趋利避害，对生物生存至关重要。除了细菌，在多种生物中也观察到类似的趋化现象。同种物质在不同物种间可能引发相反的趋化性，如苯酚对大肠杆菌是正向趋化效应，而对鼠伤寒沙门氏菌则是负向趋化效应^[2]。这种动态性和多样性帮助细菌适应环境变

化，影响其致病和共生等生物过程^[3-5]。不同细菌的趋化性整体运动行为相似^[6]，但调控机制多样，主要涉及多样化的受体、激酶和鞭毛结构等协同作用，在群体中表现为趋向或离避行为^[5]。

大肠杆菌作为多鞭毛细菌，通过调控鞭毛旋转实现趋化运动^[4]。Alder等在1960年系统地阐明了大肠杆菌趋化性的膜表面受体及胞内信号转导过程，使研究进入分子层面^[1, 7]。总体上，大肠杆菌接收到环境中的化学信号后，信号转导至鞭毛-

马达复合体, 改变鞭毛旋转方向, 而鞭毛旋转方向直接决定了大肠杆菌的运动状态是“前进”还是“原地翻转”: 当鞭毛收到信号刺激发生逆时针(counterclockwise, CCW)旋转时, 鞭毛丝全部绑成束, 故而沿固定方向前进; 当鞭毛顺时针(clockwise, CW)旋转时, 鞭毛丝解束, 无法提供稳定持续的推动, 使菌体原地翻转^[7-8]。大肠杆菌中趋化性信号转导通路包括跨膜受体复合体、鞭毛-马达复合体、趋化反应调节蛋白CheY及其他调节蛋白(如CheB、CheR、CheZ等)^[9]。跨膜受体复合体由甲基趋化受体(methyl chemotaxis receptor, MCP)、组氨酸激酶CheA和连接蛋白CheW三部分组成, 其中MCP对于刺激响应和趋化行为的调控至关重要。大肠杆菌中已鉴定出五种MCP分子(Tar、Tsr、Trg、Tap、Aer)以响应不同的信号分子, 均为同源二聚体, 胞内段与CheW和CheA结合^[9-10]。如图1所示, 接收到信号后, MCP通过CheW调节CheA的自磷酸化活性: 当负向趋化剂结合MCP时会激活CheA自磷酸化, 正向趋化剂结合MCP时则抑制CheA自磷酸化^[11]。CheA自磷酸化进一步促进CheY的磷酸化, 使其从受体复合体上脱离、扩散并与鞭毛-马达复合体中的FliM蛋白结合, 使马达更易转化为CW状态, 细菌打转频率增加, 通过改变方向从而向趋化剂浓度减小的方向游动^[12-13]。另外, CheB和CheR也能调节MCP甲基化程度: 磷酸化CheR发挥甲基转移酶活性, 修饰MCP, 阻断趋化剂配体效应并

重置信号, 实现对信号的“适应”; CheB则通过去甲基化逆转该效应^[14]。

吡啶是肠道菌群的代谢产物之一, 在宿主消化道中吡啶将介导双向趋化反应, 即高浓度吡啶呈正向趋化, 低浓度呈负向趋化, 可能对不同细菌的定植能力产生影响^[15]。这种双向趋化反应由两种作用效果相反的MCP分子及其下游通路所介导: 高浓度吡啶被Tar受体感知为正向趋化剂, 即抑制CheA自磷酸化活性, 从而促进鞭毛CCW旋转, 细菌前进产生趋向反应; 低浓度吡啶被Tsr受体感知为负向趋化剂, 促进CheA自磷酸化使得鞭毛CW旋转, 细菌打转频率增加产生趋避反应。两种功能上相拮抗的受体使得细菌在宏观上表现为对吡啶的双向趋化, 吡啶浓度阈值则取决于两者的相对数量与活性^[15]。吡啶介导的细菌双向趋化反应能帮助肠道微生物群落中原住民的定植, 抵御致病微生物, 为肠道菌群的人工调节提供了理论依据。

大肠杆菌的趋化性原理和通路结构已被阐明, 并且已经建立了包括“扩散-感知”模型和马尔可夫(Markov)随机游走模型等在内的多种数学模型^[16-19]。但现有描述和模型大多关注单一受体介导的反应, 对于类似吡啶介导的双向趋化反应的数学模型研究比较有限; 同时, 尽管大肠杆菌对吡啶等物质的双向趋化反应已被证实存在受体间拮抗作用, 但双向趋化反应机制仍需深入研究, 特别是受体间拮抗关系对趋化阈值的影响及如何改

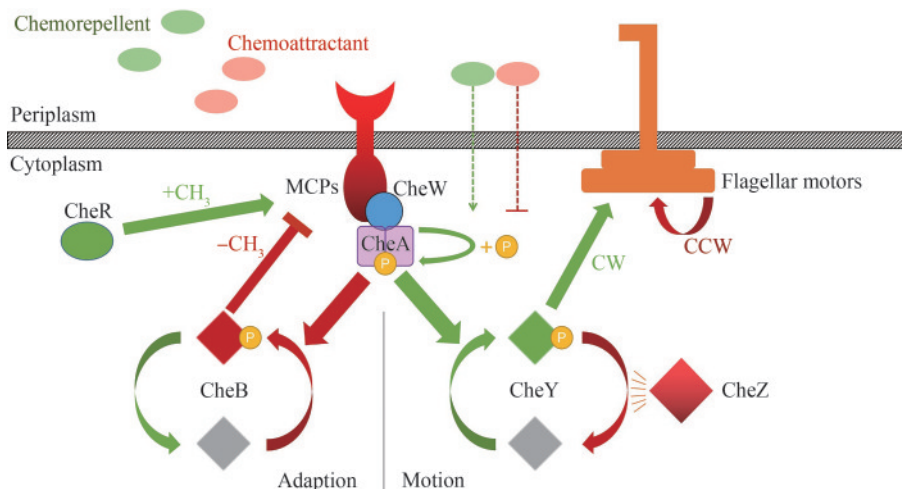


图1 大肠杆菌趋化运动信号转导机制示意图

Fig. 1 The signal transduction mechanism of chemotaxis in *Escherichia coli*

变受体比例以实现趋化性调控等问题还缺乏研究。鉴于此，本研究通过数学建模和实验观测，对大肠杆菌在吡啶诱导下的双向趋化反应进行研究。尝试对大肠杆菌在双受体介导下趋化性现象进行建模模拟和仿真分析；同时利用 CRISPRi 技术对甲基化趋化受体 Tar 进行不同程度的可诱导敲低，初步实现了细菌趋化行为的调控，并结合 Transwell 细菌迁移实验与微流控技术，对吡啶诱导下不同 Tar 表达量菌株的趋化性进行了观测与分析，探究两种趋化受体 Tar-Tsr 相对表达比例对细菌趋化运动的影响。本文工作将扩展趋化行为的定量研究和精确调控手段，为细菌趋化性的广泛应用奠定了基础。

1 材料和方法

1.1 菌株、质粒与 DNA 序列信息

本研究中所用菌株、质粒与 DNA 序列信息如表 1 所示。

1.2 培养基及试剂

LB 培养基：NaCl 10 g/L，胰蛋白胨 10 g/L、酵母提取物 5 g/L。

SOC 培养基：0.5 g/L NaCl，20 g/L 胰蛋白胨，5 g/L 酵母提取物，3.6 g/L 葡萄糖，18.6 g/L KCl。

观测细菌趋化性的运动缓冲液 MB^[21]：在 M9

表1 本研究所涉及的菌株、质粒与 DNA 序列信息

Table 1 Strains, plasmids and oligomers used in this study

Name	Description	Source
Strains		
<i>E. coli</i> DH5 α	F- <i>lacZA lacA(lacZYA-argF) U169 deoR recA1 endA1 hsdR17(rK+,mk+) phoA supE44 Y-thi-1 gyrA96 relA1</i>	TransGen Biotech
<i>E. coli</i> RP437	F- <i>thr-1 araC14 leuB6(Am) fhuA31 lacY1 tsx-78λ- eda-50 hisG4(Oc) rfbC1 rpsL136(strR) xylA5 metF159 (Am) mtl-1 thiE1</i>	[20-21]
<i>E. coli</i> RP437 Δ Tar	<i>E. coli</i> RP437 mutant with <i>tar</i> gene knockdown	This study
Plasmids		
pUC19 (<i>Bsa</i> I free)	Amp ^R , pBR322 origin, no <i>Bsa</i> I restriction enzyme site	Tsingke
pUC-eGFP	pUC19-derived plasmid carrying <i>eGFP</i> , for cell visualization in Transwell and microfluidics experiment	This study
pdCas9	Cm ^R , backbone plasmid for CRISPRi, carrying <i>dCas9</i> gene (tetracycline-induced) with sgRNA scaffold (arabinose-induced), and mRFP expression cassette	[22]
pdCas9-Spacer 1~6	pdCas9-derived plasmid inserted with Spacer 1~6 for <i>tar</i> gene knockdown	This study
Oligomers		
Spacer-F1	TTCAGCCATACTTTTCATACTCCC	
Spacer-R1	GAAGCGGAATATATCCCTAGGTAT	
Spacer-extend-F1	GCAAGGCGATTAAGTTGGGTAA	
Spacer-extend-R1	TGAGTTAGTCACTCATTAGGCAC	
Spacer-extend-F2	CGTAAGGAGAAAATACCGCATCAG	
Spacer-extend-R2	ACAGGAAACAGCTATGACCAGAATT	
GFP-F- <i>EcoR</i> I	CCCAATCCGGAATTCGCAATTAATGTGAGTTAGCTCAC	
GFP-R- <i>EcoR</i> I	CCCGGACACGAATTCGATCCGGATATAGTTCTCCTTTC	
GFP-R- <i>Spe</i> I	CCCGGACACACTAGTGATCCGGATATAGTTCTCCT	
Spacer-1	CCAGGGAATGCAAAATGCAA	
Spacer-2	CCAGCACGGCGGCAAAGTGG	
Spacer-3	CGCACGCGCGGCTTCAACCG	
Spacer-4	TGCTCACTGGCAGGACGGGA	
Spacer-5	CGATAGCGCCAGGAAAACAT	
Spacer-6	TTCAGTACGGGAGGAAAGAT	

基础培养基 (Na₂HPO₄ 6.78 g/L、KH₂PO₄ 3.0 g/L、NaCl 0.5 g/L、NH₄Cl 1.0 g/L、MgSO₄·7H₂O 0.493 g/L、CaCl₂ 0.011 g/L、葡萄糖 4 g/L) 中添加 20 g/L 聚乙烯吡咯烷酮 K30。

抗生素终浓度: 氨苄青霉素 100 μg/mL, 氯霉素 25 μg/mL, 卡那霉素 50 μg/mL, 链霉素 50 μg/mL。

诱导剂: 5 g/L 阿拉伯糖, 0.5 μg/mL 盐酸四环素, 在细菌生长至 OD₆₀₀ 为 0.6~0.7 时加入。

NaCl、葡萄糖和 KCl 购自国药集团化学试剂有限公司; 胰蛋白胨和酵母提取物购自英国 Oxoid 公司; 2×Taq Master Mix (Dye Plus)、Phanta® super-fidelity DNA polymerase 和 2×ChemQ SYBR qPCR Master Mix 购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司; Bsa I-HFv2、EcoR I-HF、T4 DNA ligase 和 T4 DNA ligase buffer 购自美国 NEB 公司; 质粒小提试剂盒、总 RNA 提取试剂盒、通用型 DNA 纯化回收试剂盒和细菌基因组提取试剂盒购自北京天根生化科技有限公司。所有引物/Spacer 序列合成自北京擎科生物技术公司。

1.3 大肠杆菌趋化运动的数学建模

本文将大肠杆菌运动分为两种状态, 即 $s=0$ 和 1, 分别代表细菌做翻转运动 (鞭毛 CW 旋转)、向固定方向前进 (鞭毛 CCW 旋转)。细菌运动状态取决于鞭毛的旋转状态, 而鞭毛旋转状态改变的概率取决于鞭毛当前状态以及上游信号通路的调节^[18]。因此, 本文模型分为信号转导动力学模型与游走模型两部分, 描述细菌从感知趋化剂分子浓度、胞内信号转导直至运动状态改变的过程。

1.3.1 信号转导动力学模型

该部分模型以 SPECS 模型为基础构建^[17], 并采用了部分已知参数^[16]。具体如下:

对于受体复合体而言, 其激酶活性取决于配体的结合状态与自身甲基化状态。由准平衡近似得式 (1):

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

式中, a 为激酶活性, N 为所有 MCP 复合体中受体二聚体数量, $N \cdot \varepsilon(m, [L])$ 为激活/失活状态 MCP 的自由能差异。此式成立的前提条件为配体结合时长 (<1 ms) 远小于受体甲基化时长 ($\gg 1$ s)。

[L] 为所在环境的趋化剂浓度。若趋化剂浓度为随时间分布的函数, 则有 $[L](\vec{x}(t))$ 。

$\varepsilon(m, [L])$ 关系具体可由式 (2) 决定 (Monod-Wyman-Changeux 变构模型):

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

式中, K_A , K_I 分别为受体在活性形式与失活形式下与配体的结合常数。 f_m 为甲基化程度 m 相关的自由能差值, 常采用已被实验验证的线性模型估计, 如式 (3):

$$f_m(m) = \alpha(m_0 - m) \quad (3)$$

式中, α 、 m_0 可由趋化剂的剂量响应曲线实验拟合得出。

甲基化程度 m 可以由 Michaelis-Menten 动力学方程决定, 经过简化, 此处采用其关于甲基化速率 k_R 与去甲基化速率 k_B 的线性近似描述, 其中参数 b 由实验拟合得到式 (4):

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

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

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

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

式中, $H \approx 10$, $[Y]_{0.5} \approx 3 \mu\text{mol/L}$ 。在模型中近似认为, 处于 $s = 0$ 状态的持续时间为常数 $\tau_0 \approx 0.2$ s, 而非关于 $[Y]$ 的函数, 故而有式 (6):

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

而 $[Y]$ 认为与激酶活性 a 成正比关系, 即有式 (7):

$$[Y] = Y_a a \quad (7)$$

由于模型中, CheY-P 去磷酸化速率 τ_z 与其空间分布和扩散速率对模型整体表现无明显影响,

故在模型中不考虑该因素。

在不存在趋化剂时，测得其平均前进持续时间 $\tau_1 \approx 0.8$ ，且有式 (8) 和式 (9)：

$$a = a_0 = \frac{k_R}{k_R + k_B} \quad (8)$$

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

则可决定 Y_a 值如式 (10)：

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

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

$$a = \frac{1}{\sum_i w_i} \cdot \sum_i \frac{1}{1 + e^{N_i \varepsilon_i}} \quad (11)$$

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

1.3.2 随机游走模型

当 $\Delta t \ll \frac{1}{P_0([Y])}$ 且 $\Delta t \ll \frac{1}{P_1([Y])}$ 时，认为在 Δt 内个体仅发生至多 1 次状态转换，故而可以用离散时间的马尔可夫模型^[19]描述如下：

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

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

(2) 在 $t \rightarrow t + \Delta t$ 时间内，细胞从状态 s 转换至 $(1-s)$ 状态的概率为 $P_i([Y]) \cdot dt$ 。由式 (3) ~ 式 (6) 可知， $P_0 = \tau_0^{-1}$ 为与 $[Y]$ 无关的常数，即可

写出如下概率转移矩阵 P [式(12)]，其中元素 p_{ij} 表示发生 $(s_t = i) \rightarrow (s_{t+\Delta t} = j - 1)$ 的概率。

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

1.4 利用 CRISPRi 构建大肠杆菌 Tar 受体不同程度敲低菌株

1.4.1 CRISPRi 敲低质粒的构建

本研究利用 pdCas9 质粒^[22]构建了 CRISPRi 敲低 Tar 受体的工作质粒。pdCas9 质粒中含有 dCas9 与 sgRNA scaffold 编码序列，并分别由 P_{tet} 启动子（四环素诱导）与 P_{araBAD} 启动子（阿拉伯糖诱导）起始转录。其中 dCas9 为第 10 位氨基酸由天冬氨酸突变为丙氨酸的 Cas9 蛋白突变体，即 Cas9 (D10A)。sgRNA scaffold 包含除 Spacer 序列外的 sgRNA 结构，通过插入不同 Spacer 序列，可以实现对靶标基因的特异性抑制。Spacer 序列负责对靶点进行识别，在网站 <http://crispr.dfci.harvard.edu/SSC/> 进行在线设计，尽量选择位于 *tar* 基因中央的序列，且该序列在大肠杆菌 *E. coli* RP437 基因组上特异性高，不易形成二级结构。选择评分较高的前 6 个送北京擎科生物科技股份有限公司合成（表 1）。

利用 PCR 扩增包含复制起始位点、 P_{tet} 启动子和 P_{araBAD} 启动子及其对应调控蛋白、终止子、筛选标记、dCas9 与 sgRNA scaffold 编码序列的 pdCas9 骨架，得到线性化的质粒载体。与合成的上述 6 条序列按照特定比例混合后进行 Golden gate 连接，并转化大肠杆菌 *E. coli* DH5 α ，构建 pdCas9-Spacer 敲低质粒。对重组质粒转化使用含 25 $\mu\text{g/mL}$ 氯霉素的 LB 固体培养基进行筛选。在 pdCas9-Spacer 1~6 各筛选平板上分别挑取 2 个白色菌落，使用检验引物 Spacer-F/R 进行菌落 PCR 验证，通过 PCR 条带长度判断 Spacer 序列是否成功插入。

1.4.2 大肠杆菌 *E. coli* RP437 的电转化和 *tar* 基因的敲低

将以上 6 个验证正确的重组质粒分别电转化入 *E. coli* RP437 菌株，具体为：OD₆₀₀ 0.6~0.8 的 *E. coli* RP437 菌株培养液，6000 r/min，5 min，4 $^{\circ}\text{C}$ 离心收集细菌。尽量去除上清液，等体积预冷

15% 甘油重悬细菌，轻柔混匀并离心收集细菌。重复 3~5 次，最终使用 0.1 倍体积的预冷 15% 甘油重悬细菌，即得电转化感受态细胞。每 100 μL 感受态细胞中加入重组质粒 DNA 50 ng，并转移至 4 $^{\circ}\text{C}$ 预冷的电极杯中，静置 5 min。使用 18 kV/cm 的电场强度进行电穿孔，电脉冲时间不超过 5 ms。迅速加入 1 mL SOC 培养基至电极杯中重悬菌体后，37 $^{\circ}\text{C}$ ，200 r/min 复苏培养 1 h，涂布含 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 氯霉素的 LB 固体培养基。

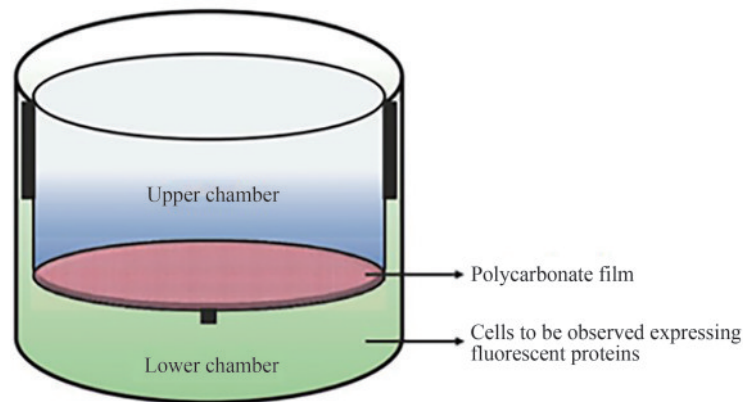
1.4.3 *tar* 基因不同程度敲低菌株的实时荧光定量 PCR (RT-qPCR) 验证

从大肠杆菌 *E. coli* RP437 的 6 个电转化筛选平板上各挑取 2 个单克隆，使用液体 LB 培养基过夜活化后，加入 5 g/L 阿拉伯糖和 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 盐酸四环素诱导，利用 RT-qPCR 检测 *tar* 基因的相对 mRNA 水平，以此衡量 CRISPRi 质粒的抑制效果。总 RNA 提取和反转录等过程参照 5 \times Evo M-MLV RT Master Mix 及 2 \times ChemQ SYBR qPCR Master Mix 试

剂说明书，其中以 16S rRNA 作为内参基因，采用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 计算 *tar* 基因的相对 mRNA 水平^[23]。使用 Snap Gene 软件设计质粒及所需引物，常规 PCR 以及菌落 PCR 引物长度设置在 18~25 bp， T_m 值控制在 60 $^{\circ}\text{C}$ 左右，GC 含量尽量保持在 40%~60%。荧光定量 PCR 引物使用 NCBI 中的 Primer blast 功能，长度设置在 20 bp，产物大小控制在 150~200 bp。

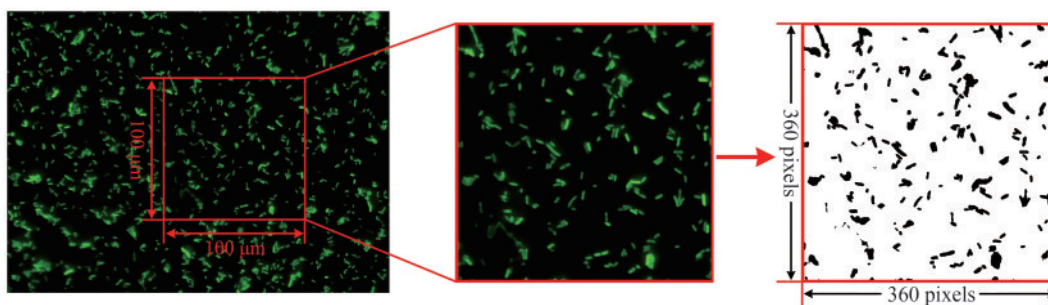
1.5 Transwell 细菌迁移实验与荧光成像检测

按照文献报道，使用 0.4 μm 孔径聚碳酸酯薄膜的 12 孔 Transwell 板进行细菌迁移实验^[24-25] [图 2 (a)]。依次用双蒸水、75% 酒精、无水乙醇润洗并分别浸泡 2 min，置于室温下充分晾干。在下室中加入 1 mL 0.1 g/L 聚 L-赖氨酸溶液（分子质量 15~30 kDa），放入上室以包被聚碳酸酯薄膜下表面，室温下静置 2 h。取出上室，倒置晾干，回收下室中聚-L-赖氨酸溶液，用双蒸水清洗下室若干次并



(a) Transwell 细菌迁移装置示意图^[24]

(a) The Transwell bacterial migration device^[24]



(b) Transwell 荧光成像图像处理流程

(b) Transwell fluorescence image processing procedure

图 2 Transwell 迁移实验装置和图像处理流程

Fig. 2 Transwell migration experiment and image processing procedure

充分晾干。在运动缓冲液 MB 中加入 10 g/L 的琼脂糖，加热融化，加入吡啶至终浓度分别为 0 mmol/L、0.5 mmol/L、2 mmol/L 并充分溶解。将上室放入下室中，趁热向上室中加入 1 mL MB-琼脂糖溶液，静置待其凝固，取出上室并倒置，晾干下表面。过夜培养的含绿色荧光蛋白的重组 *E. coli* RP437 菌株培养液 (OD_{600} 1.0~1.2) 于 6000 r/min, 5 min 离心收集细菌，并用 MB 重悬后再离心，重复该步骤 3~5 次，最终用 MB 重悬细菌至 OD_{600} 约为 0.4。将 1.5 mL 细菌悬液加入下室，放入上室，室温静置 8 min，并避免振动。取出上室，立即将下表面浸入干净 MB 中 5 s 后取出，过程中应避免剧烈振动并精确计时，用吸水纸从侧面吸干下表面残留液体，倒置于超净台内，室温下晾干（不超过 10 min）。依次使用蒸馏水、无水乙醇清洁下室，使用擦镜纸擦除内外表面液体，放入上室，使用荧光倒置显微镜观察。在 0.5 mmol/L 预适应组中，最后一次收集细胞前在缓冲液 MB 中加入 2 mmol/L 吡啶，预适应 5 min 后，观察在 0.5 mmol/L 吡啶浓度下的 Transwell 细菌迁移情况。

荧光显微镜视野中细胞密度统计方法 [图 2 (b)]: 从荧光图像的视野中选取细菌分布较均匀的 $100\ \mu\text{m}\times 100\ \mu\text{m}$ 区域进行分析；将分析区域按比例缩放至固定像素 360 pixels \times 360 pixels，使用 MATLAB 软件对图像进行二值化处理并统计像素数，以此反映图像中绿色荧光强度，并用于统计细菌相对密度。

为了便于观察，构建表达绿色荧光蛋白的重组 *E. coli* RP437 菌株：将 *eGFP* 基因连接入 pUC19 质粒中，得到的 pUC19-eGFP 质粒转化 *E. coli* RP437，得到可用于 Transwell 和微流控实验中直观观测的重组菌株 *E. coli* RP437 (pUC19-eGFP)。

1.6 微流控芯片设计、优化和预处理

微流控芯片设计以 μ Flow 装置作为参考，包含梯度生成模块与趋化观测模块，设置有 3 个进入通道与 1 个流出通道 [图 3(c)]^[26-27]。含不同浓度吡啶的运动缓冲液在梯度混合装置中混合后，可以在趋化模块内产生特定浓度梯度场；细菌注入后在其中运动，并被成像后进行统计分析。使用

AutoCAD 软件完成微流控芯片的平面设计与三维建模，材质为 PDMS 材质。经设计后，由苏州含光微纳科技有限公司进行模板蚀刻与芯片制作。

由于 PDMS 芯片疏水性较大，难以直接灌注水相进入流道，故需要对芯片进行预处理。使用无水乙醇冲洗芯片表面及灌注进入流道内，控制压力为 200~300 kPa 范围内，直至流道内所有气泡均被排出。使用 5 g/L 的二烷基磺酸钠 (SDS) 水溶液进行灌注约 15 min，以降低流道内表面对水的表面张力与对疏水小分子的吸附作用。使用含 5 g/L SDS 的 MB 溶液进行灌注约 10 min。使用 MB 缓冲液进行灌注约 15 min 以除去残留的 SDS。镜检结束后，使用 10 g/L SDS、75% (体积分数) 乙醇水溶液灌注 20 min 以上，之后直接将芯片浸泡在无水乙醇中保存。

整个微流控观测平台主要由微流控芯片、观测装置与进样系统组成 [图 3(b)]。其中进样系统包含三个进样口，可分别加入含两种不同吡啶浓度的 MB 缓冲液 (Butter 1 inlet 和 Butter 2 inlet) 以及待观测细菌 (Bacterial inlet)。为保证微流控芯片正常稳定工作，需要 Inlet 1 和 2 中 MB 缓冲液以基本相同的流速进样以产生预期的浓度梯度场。为此本研究中使用蠕动泵进样，且为保证压力和流速的均一性，设计和优化了如图 3(a) 所示的进样系统：通过调节球阀 A 和 C，可对进样口处流速进行初步调节；平衡瓶则对系统压强起到缓冲作用，同时也防止因流速过大造成进样口压强过大；当 D 开启后两个平衡瓶相通，两者压强达到平衡，使两进样口处缓冲液流速基本相同。若系统压强超过芯片额定压强 (500 kPa) 则泄压阀 F 开启，防止芯片损坏。微流控平台采用 3 滚轮蠕动泵，泵内管内径 0.4 mm，泵头转速为 0.04~0.68 r/min。泵内使用聚氨酯 (BPT) 软管，泵外连接管与接头为聚四氟乙烯材料。通过泵头转速及上述进样系统的设置，控制 Butter 1 inlet 和 Butter 2 inlet 两种 MB 缓冲液的流速基本相同，维持在 5~10 $\mu\text{L}/\text{min}$ 。

1.7 微流控芯片浓度场的仿真预测和实验验证

芯片设计的核心是在趋化观测模块中实现稳定且均匀的浓度场分布，故需对局部流道形状进

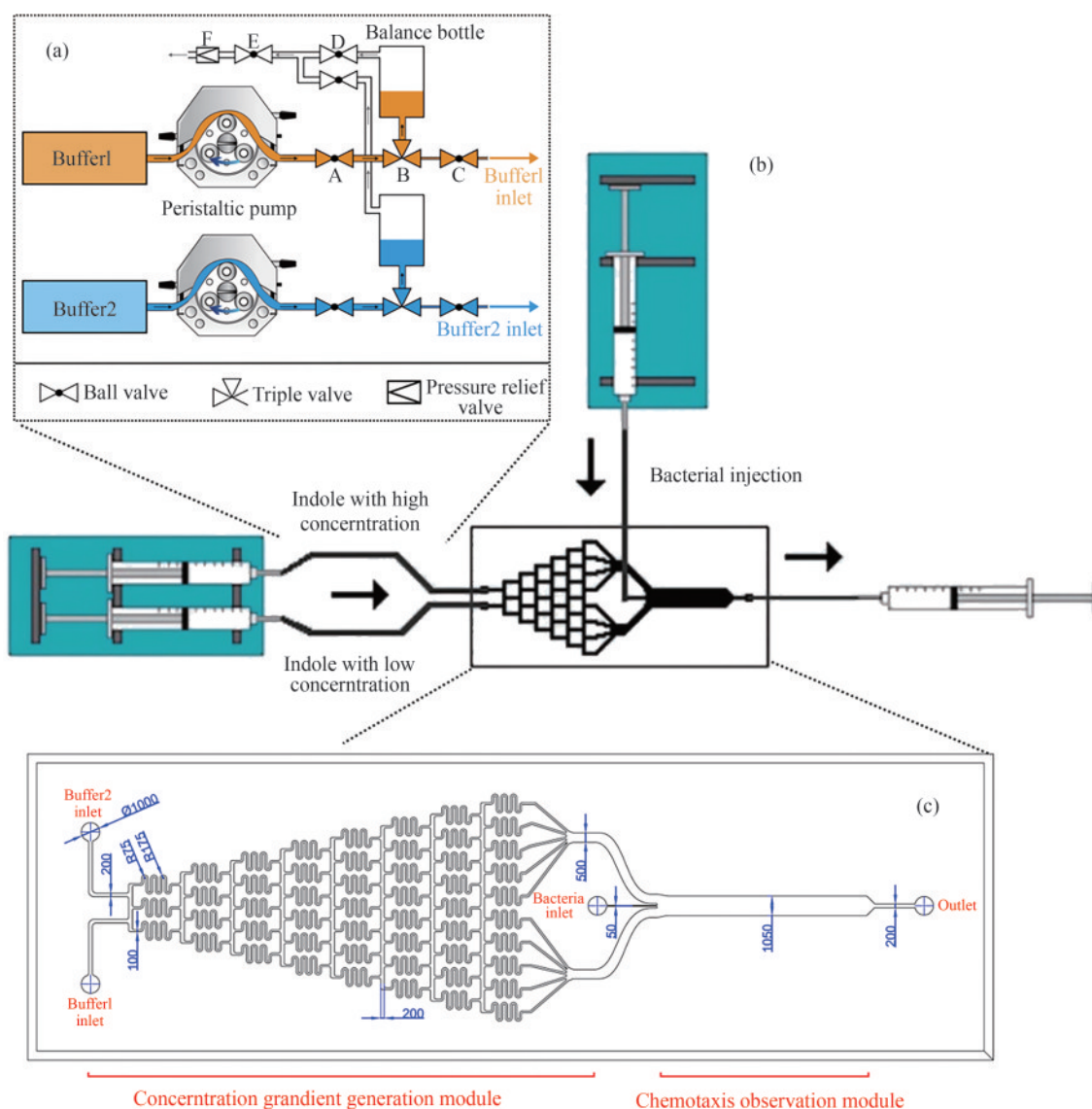


图3 微流控设计和优化示意图

(a) 微流控进样系统示意图; (b) μ Flow装置示意图^[27]; (c) 微流控芯片设计图(标注单位为 μm)

Fig. 3 The design and optimization of microfluidics

(a) The injection system of microfluidics; (b) μ Flow design of microfluidics^[27]; (c) The detail of microfluidics

行优化,从而最大程度避免湍流的发生。本研究使用Ansys CFX流体仿真模拟软件及Fikentscher黏度公式^[28],对芯片内流体性质与表现进行预测与优化。通过仿真过程中调整汇入流道的转角形状、弧度,减小流体汇入角度从而降低两侧流体进入流道后的法向速度,消除了局部不均匀性,使得两侧流体汇入后能够更好地保持层流状态,保证趋化观测模块内具有更稳定且均匀的浓度梯度分布。以细菌注入口(bacteria inlet)为原点,在仿

真中统计液体沿着 y 方向流动过程中,两种注入液在 x 方向上的混合程度和分布情况。

另外,以1-对磺酸苯基偶氮-2-羟基萘-6-磺酸二钠盐(日落黄)作为染色剂,进一步在实验实际条件下验证该芯片产生的浓度场,具体为:分别在Buffer 1 inlet和Buffer 2 inlet通入无色MB与加入日落黄后的MB缓冲液,在细菌注入口加入无色MB缓冲液;待流速稳定后,在显微镜下明场下 $y=5\text{ mm}$ 处(细菌注入口为 $y=0$)观察流道内颜色分

布并成像。成像结果使用 MATLAB 程序进行统计，分析染料浓度随 x 方向的分布情况。

1.8 利用微流控芯片对大肠杆菌中吡啶介导的趋化行为的观测和分析

可荧光观测的重组菌株 *E. coli* RP437 (pUC19-eGFP) 或其 *tar* 基因敲低菌株培养至 OD_{600} 1.0~1.2, 于 6000 r/min 离心 5 min 收集细菌, 用 MB 缓冲液清洗 3~5 次后离心, 用 MB 重悬细菌至 OD_{600} 约为 1.0。分别从微流控芯片的 Butter 1 inlet 和 Butter 2 inlet 通道通入吡啶浓度为 1 mmol/L、0 mmol/L 的 MB 运动缓冲液, 二者混合后将在微流控观测模块流道内形成稳定的浓度梯度。待浓度梯度场建立后, 自 Bacteria Inlet 通道通入上述处理的待观察细菌。分别在通入细菌后的 180 s、390 s、600 s 和 780 s, 于芯片 $y=5$ mm 处 (细菌注入口为 $y=0$) 用激光扫描共聚焦显微镜进行成像观察 (曝光时间 5 ms、帧率 100 fps)。将成像结果使用 MATLAB 程序进行统计分析, 并绘制出细菌密度分布图。

1.9 数据分析方法

实验均设置三个平行对照, 结果以平均值 \pm 标准误差展示, 数据以 Graphpad prism 软件作图。使用 t 检验分析显著性。 $p>0.05$ 时表明无显著差异, 标记为 “ns”。当 $p<0.05$ 时标记为 “*”, $p<0.01$ 标记为 “**”, $p<0.001$ 标记为 “***”, 以上三种标记代表数据间存在显著差异。

2 结果和分析

2.1 大肠杆菌中吡啶介导的趋化运动的数学模拟

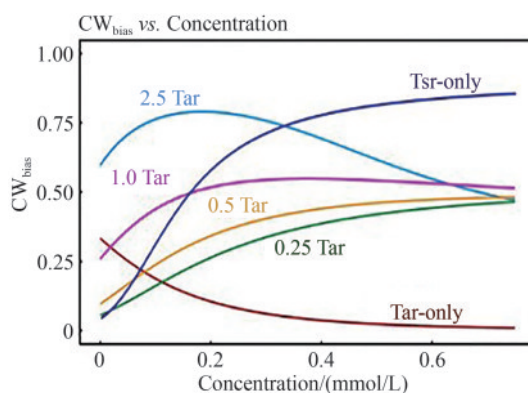
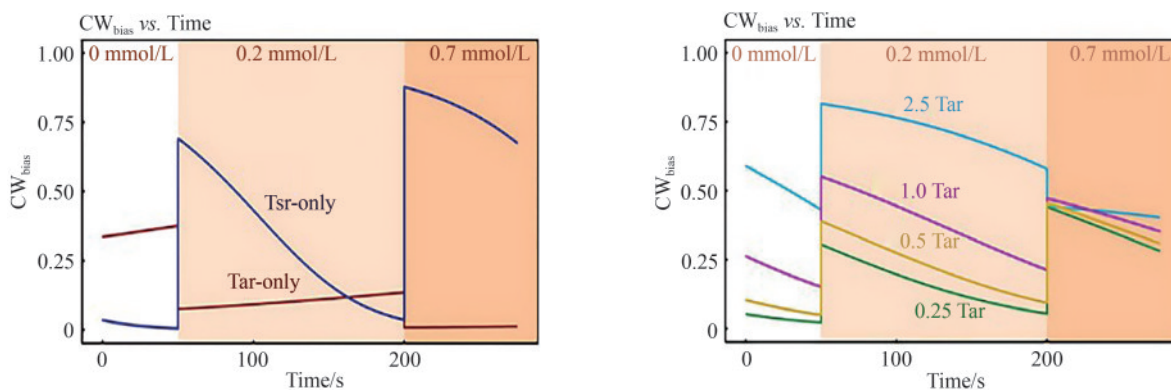
2.1.1 信号转导动力学模型的模拟结果

信号转导动力学模型可对细菌趋化性在个体层面进行模拟分析。该部分模拟以已有的 SPECS 模型^[17]为基础, 主要展示在不同浓度下个体运动状态发生改变的概率。由于模型中 $P_0 = \tau_0^{-1}$ 为常数, 故使用 $CW_{bias} = \frac{1/P_0}{1/P_0 + 1/P_1}$ 作为描述细菌个体运动的指标, 其含义为鞭毛发生顺时针转动

(CW) 的时间比例。 CW_{bias} 值越高, 细菌发生翻转的可能性越大, 则更倾向于表现出负向趋化性。根据已有的模型, 并改变 Tar 受体与 Tsr 受体的相对含量, 分析个体在不同浓度下的响应情况, 即 $CW_{bias} - c$ 关系, 结果如图 4(a)。其中, 以 Tar 生理条件含量作为 1Tar, 其余分别对应增高/降低倍数; Tar-only 与 Tsr-only 则分别代表仅包含生理条件含量下的 Tar 受体与 Tsr 受体。

由图 4(a) 可知, Tar-only 的 CW_{bias} 随浓度增加而降低, 即 Tar 受体效应表现出正向趋化性; 而 Tsr-only 则与之相反。对于同时表达 Tsr 与 Tar 受体的菌株, 二者的相对比例会影响细菌趋化行为, 其 $CW_{bias} - c$ 关系曲线有可能出现极大值; 且对于不同 Tar 表达量, 其 Tar 比例越高, 则该极大值越明显, 对应的浓度 c 越小。由以上分析可知, 细菌具有 “离避” 极大值的趋势, 这表明在较高 Tar/Tsr 表达比例下, 细菌对于浓度的响应具有一个 “阈值”: 当细菌当前环境浓度低于该阈值, 则向浓度较低处运动, 而高于该阈值则向浓度较高处运动, 从而使其分布 “两极分化”, 即出现 “双向运动状态”; 且 Tar/Tsr 表达比例越高, 阈值浓度则越低。需要指明的是, 在某处浓度下, 发生趋化方向和强度并非是由 CW_{bias} 值的大小所决定的, 而是由其随着浓度的变化关系, 即 $\partial CW_{bias}/\partial c$ 决定的。当 $\partial CW_{bias}/\partial c > 0$ 时, 表现为负向趋化, 而 $\partial CW_{bias}/\partial c < 0$ 时则为正向趋化, 其绝对值决定了正/负向趋化的强度。因此, 对于低浓度范围, 尽管 Tar-only 的 CW_{bias} 值大于 Tsr-only, 但其 CW_{bias} 随浓度 c 升高而下降, 因此其效应为正向趋化, 即朝向浓度较高处运动。

同时, 为了反映出受体对于吡啶的 “适应” 过程 (即受体甲基化过程), 对细菌在特定浓度下随时间变化进行了分析, 如图 4(b)。由 Tar-only 与 Tsr-only 对比可知, Tsr 受体甲基化速度较快, 可发生十分快速且剧烈的适应行为, 其受高浓度吡啶增加后, 短时间内下降至基线水平; 而 Tar 受体甲基化过程相对慢, 导致其适应过程较为缓慢, 其受吡啶诱导下降后基本维持在较低水平。当两种受体共同存在时, 可以发现不论是对吡啶的响应还是适应过程, 均基本由 Tsr 受体所主导: 受吡啶诱导后增加, 而后快速适应下降。其中, Tar 含量

(a) 不同吲哚浓度和不同 Tsr/Tar 受体比例下 $CW_{bias} - c$ 关系(a) $CW_{bias} - c$ relationship at different Tsr/Tar receptor ratios and different indole concentrations(b) 不同吲哚浓度下不同 Tsr/Tar 受体比例下 $CW_{bias} - t$ 变化关系

[左图表示仅包含生理条件含量下的 Tar 受体与 Tsr 受体的 $CW_{bias} - t$ 变化关系,右图表示不同含量 Tar(分别为 2.5 倍、1 倍、0.5 倍、0.25 倍生理条件含量的 Tar)条件下 $CW_{bias} - t$ 变化关系。其中, Tar-only 与 Tsr-only 分别代表仅包含生理条件含量下的 Tar 受体与 Tsr 受体。Tar 前的倍数代表以生理条件含量作为 1 Tar, 分别对应增高/降低倍数。]

(b) $CW_{bias} - t$ relationship at different Tsr/Tar receptor ratios and different indole concentrations

(Tar-only and Tsr-only mean physiological concentration of Tar receptors and Tsr receptors. The number before Tar represents the corresponding increase/decrease fold when the physiological concentration of Tar served as 1 Tar.)

图4 信号转导动力学模型的模拟结果

Fig. 4 Simulation results of signal transduction kinetic model

越高, 受吲哚诱导增幅越小, 适应过程的斜率越小(即适应越慢), 但总体效应不显著, 仍以 Tsr 效应为主。但值得注意的是, 2.5 Tar 组在首次受诱导时表现类似于 Tsr 特征; 但经过适应, 受到第二次更高浓度吲哚诱导后, 反常降低, 表现出了 Tar 受体支配的特征, 表明在适应前后 Tsr 与 Tar 受体的支配性发生了“逆转”。另外, 随着适应的发生, Tsr 效应减弱, Tar/Tsr 效应的相对比例增大, 则会导致双相运动浓度阈值不断降低。

2.1.2 随机游走模型的模拟结果

随机游走模型描述了不同受体表达比例下粒子运动的行为特征, 从群体层面模拟并分析了细菌感知变化后运动状态改变过程。对模拟后各时

间点处粒子的分布状态进行分析, 得到粒子在 x 方向上的密度分布曲线(图5)。当仅存在 Tar 受体时, 粒子整体朝向高浓度吲哚方向移动; 当 Tar 表达比例不断减少时, 则总体密度向低浓度吲哚处移动的趋势越大。较为有趣的是, 对于 2.5 Tar 组与 1.0 Tar 组, 尽管其平均中心均不同程度地向低浓度方向移动, 但其密度分布的峰值却位于 x 轴正半轴侧(即较高浓度); 在 0.5 Tar、0.25 Tar 与 Tsr-only 组中, 该现象则提前出现, 而在此之后在高浓度处峰消失, 粒子集中分布在负半轴侧(低浓度区域)。与之相反的是, 对于仅表现出正向趋化的 Tar, 则在粒子群体迁移向高浓度区域之前, 在低浓度区域形成一个类似的密度峰值。这是由于在

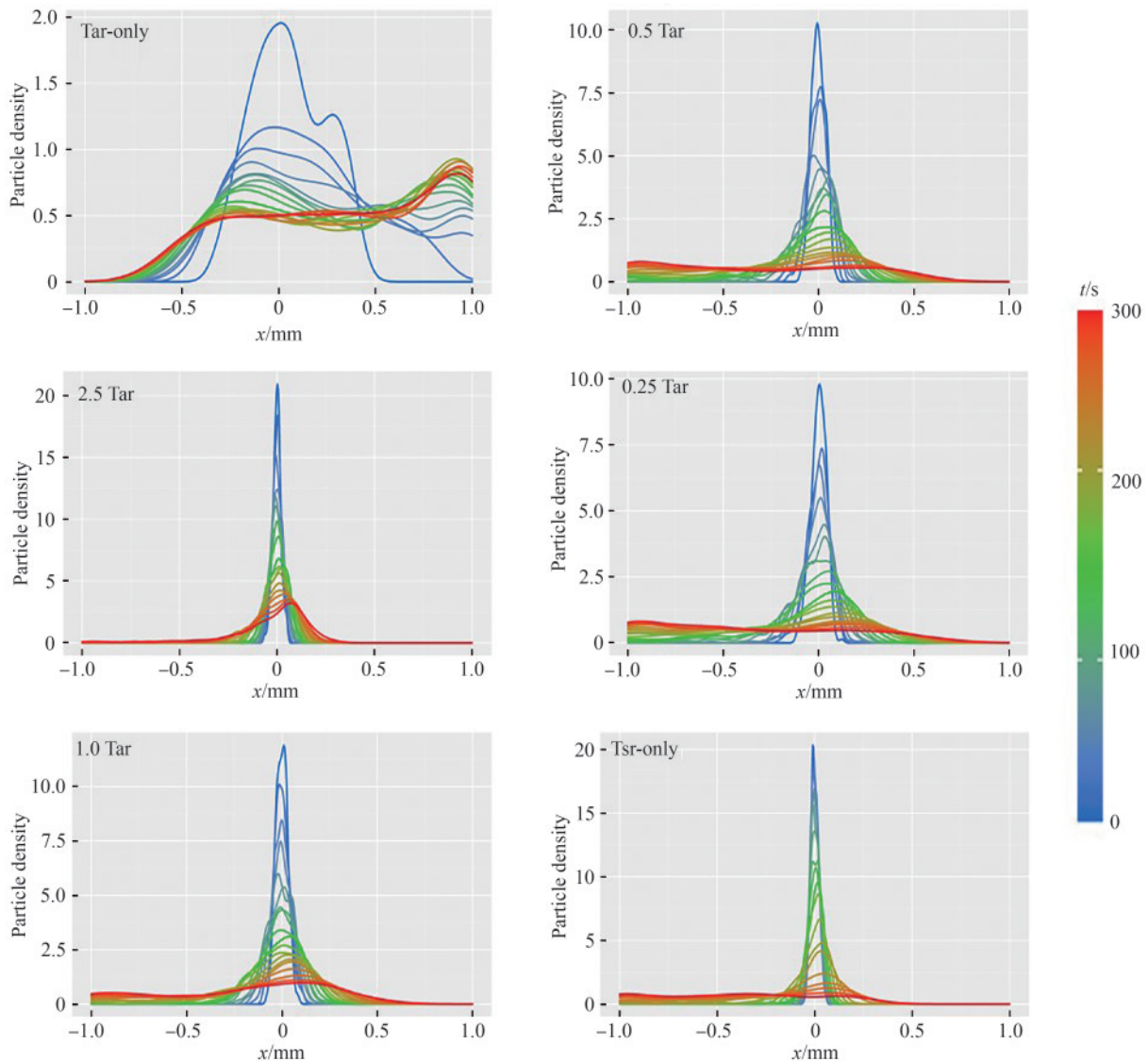


图5 随机游走模型模拟运动中粒子的密度分布曲线

(其中, Tar-only 与 Tsr-only 分别代表仅包含生理条件含量下的 Tar 受体与 Tsr 受体。2.5 Tar、1 Tar、0.5 Tar、0.25 Tar 分别表示 2.5 倍、1 倍、0.5 倍、0.25 倍生理条件含量的 Tar)

Fig. 5 Density distribution curves of particles in simulated motion of random walk model

(Tar-only and Tsr-only mean physiological concentration of Tar receptors and Tsr receptors. The number before Tar represents the corresponding increase/decrease fold when the physiological concentration of Tar served as 1 Tar.)

粒子响应浓度场的初始阶段, 具有低比例 Tar 的粒子个体具有更高的“前进”/“翻转”比例, 其运动到具有更低区域的概率更大, 因此更加迅速地进入极小值附近; 而类似地, 具有高比例 Tar 的粒子用于原地“翻转”的时间增加, 且在运动期间不断随机改变方向, 因此需要更长的时间才能“寻找”到较低的区域, 因此该部分粒子会在高区域“滞留”一段时间, 表现为在此处形成较高的密度峰值。

本部分利用信号动力学模型和随机游走模型,

从个体和群体层面模拟和分析了 Tar-Tsr 双受体作用下细菌双向趋化行为, 并描述了不同 Tsr/Tar 比例下的趋化响应与适应过程, 为后续趋化行为的实验验证提供了理论基础。

2.2 大肠杆菌 *E. coli* RP437 中 Tar 趋化受体不同程度敲低菌株的构建和验证

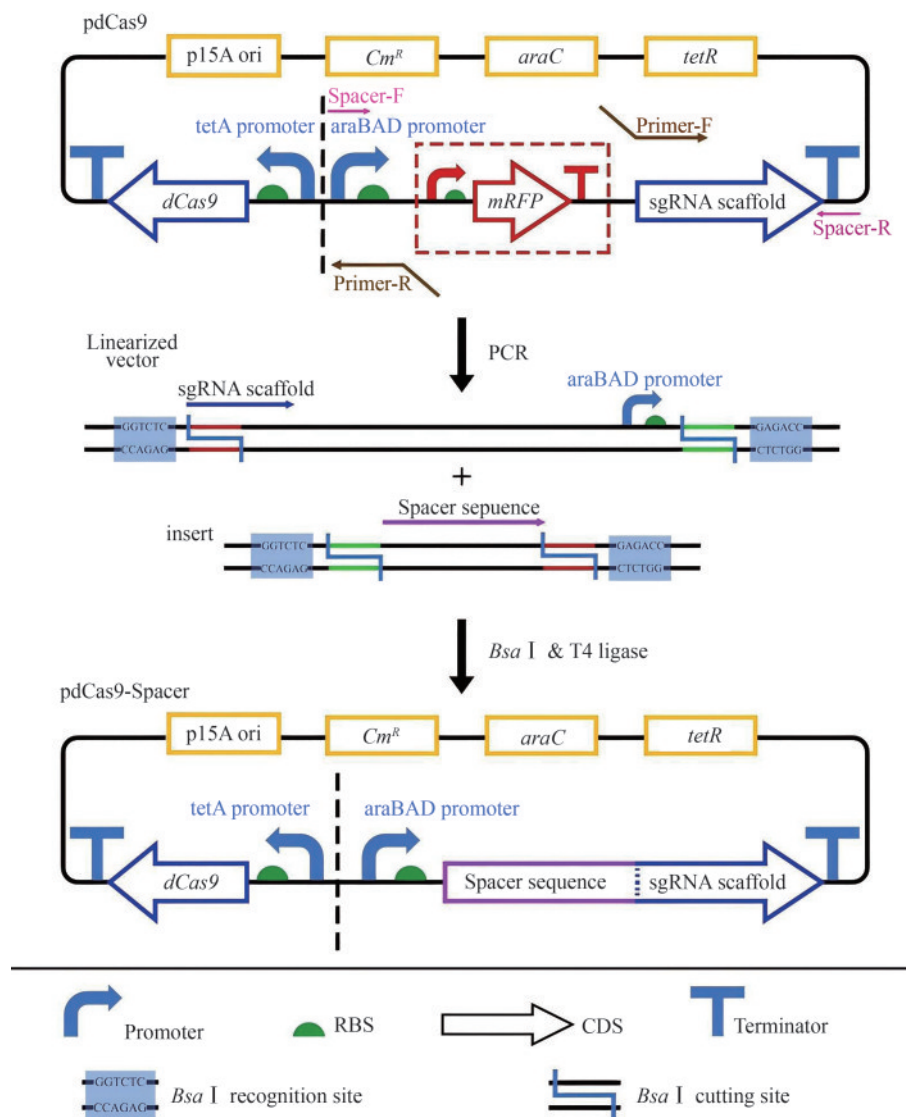
2.2.1 CRISPRi 敲低质粒的设计与构建

本论文以 pdCas9 质粒为基础构建了可诱导敲

低 Tar 受体的 CRISPRi 工作质粒。pdCas9 质粒中含有的 dCas9 为 Cas9 (D10A) 突变体, D10A 位点突变位于 N 端 RuvC 结构域^[29], 失去了对靶标 DNA 单链的内切酶活性; 但 dCas9 仍可在 sgRNA 的协助下特异性识别并结合目标 DNA 序列, 形成的 DNA-dCas9-sgRNA 三元复合物产生的空间位阻阻止 RNA 聚合酶与 DNA 的结合及前进, 从而达到抑制转录的目的^[30-32]。相较于 CRISPR 敲除, CRISPRi 的抑制作用保留了高特异性的优势, 同时具有可逆可控的特点。pdCas9 质粒还含有 sgRNA scaffold 编码序列, 通过插入不同 Spacer 序列可以实现对应靶标基因的特异性抑制。本论文在线设计

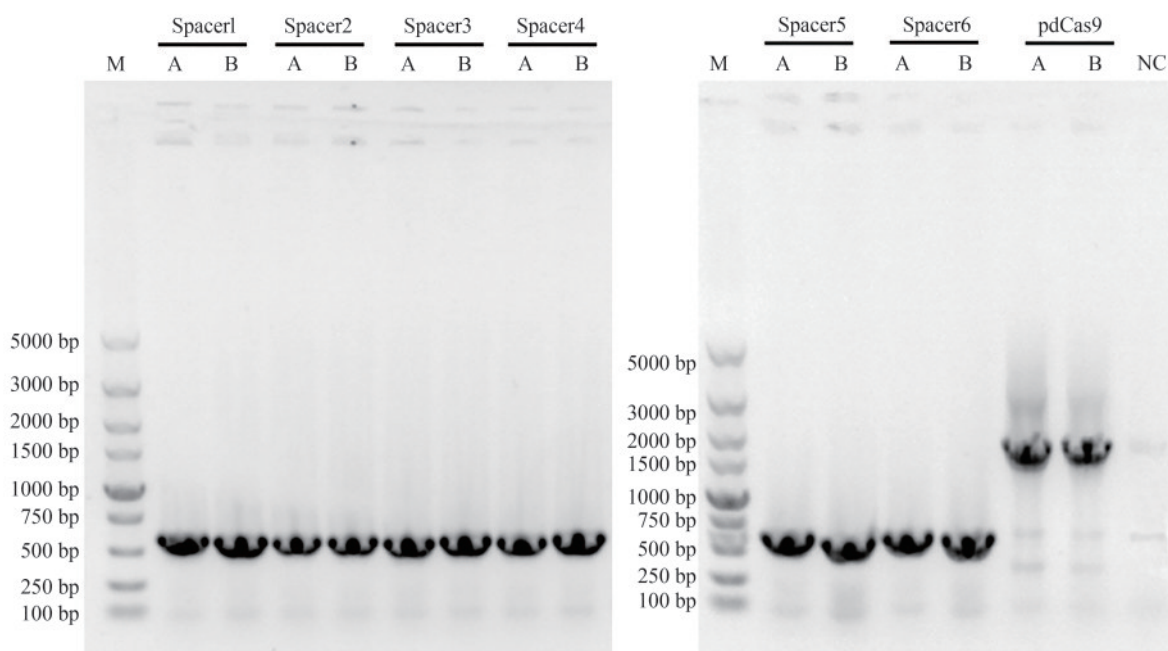
了评分较高、特异性较好的 6 条 Spacer 序列 (表 1)。pdCas9 质粒在 Spacer 插入位点处含有完整的红色荧光蛋白 mRFP 的表达单元, 当 Spacer 序列成功插入后, mRFP 被插入失活, 菌落无法表达荧光蛋白而呈现白色, 有利于简化重组质粒转化后的筛选步骤 [图 6(a)]。

分别将 6 条 Spacer 序列与 pdCas9 线性化载体进行 Golden gate 连接并转化 *E. coli* DH5 α , 挑取固体平板上的白色克隆进行菌落 PCR 验证, 结果如图 6(b) 所示 (以不含质粒的宿主菌株作为阴性对照, 验证引物为 Spacer-F/R)。若未插入 Spacer 序列, PCR 产物应为 1642 bp; 若插入 Spacer 序列则



(a) CRISPRi 敲低质粒的设计与构建: Spacer 序列与 pdCas9 线性化载体进行 Golden gate 连接

(a) Design of CRISPRi plasmid and its construction via Golden gate of pdCas9 linear vector and spacer sequence



(b) pdCas9-Spacer导入大肠杆菌 *E. coli* DH5 α 的菌落PCR验证结果

(左图为含pdCas9-Spacer 1~4的重组菌菌落PCR验证结果, 右图为含pdCas9-Spacer 5~6的重组菌菌落PCR验证结果, 阳性结果条带应为579 bp; M表示DL5000 DNA Marker; A、B分别表示各筛选平板上的两个平行单菌落; pdCas9孔道为只含有pdCas9空质粒的菌落PCR结果, 条带应为1642 bp; NC表示阴性对照, 即无质粒的野生型 *E. coli* DH5 α)

(b) Results of colony PCR after transformation

(M:DL5000 DNA Marker;Spacer 1~6:Colony PCR results of recombinant strains with pdCas9-Spacer 1~6 plasmids;A, B:Two parallel single colonies on each screening plate;NC:negative control, that is, *E. coli* DH5 α wild type without any plasmid)

图6 CRISPRi工作质粒的设计、构建和验证

Fig. 6 Design, construction and verification of CRISPRi plasmids

PCR产物应为579 bp。由图6(b)可知, pdCas9-Spacer 1~6均获得了579 bp的阳性条带, Spacer序列插入成功。使用检验引物对所有重组质粒中sgRNA部分进行测序验证并确认无误。

2.2.2 趋化受体Tar可诱导敲低的验证与分析

将以上6个验证正确的重组质粒分别电转化入 *E. coli* RP437菌株, 加入5 g/L阿拉伯糖和0.5 μ g/mL四环素诱导, 利用RT-qPCR检测 *tar*基因的相对mRNA水平。发现含pdCas9-Spacer 6的 *E. coli* RP437菌株中CRISPRi质粒的抑制效果最佳最稳定(数据未展示), 因此后续实验均采用含pdCas9-Spacer 6的质粒进行 *tar*基因的可诱导敲低。根据CRISPRi可逆抑制的特点, 可通过改变诱导剂浓度来调整sgRNA表达量, 实现对 *tar*不同程度的敲低, 并验证阿拉伯糖诱导浓度-sgRNA表达量-Tar表达敲低水平间的关系。

含pdCas9-Spacer 6的 *E. coli* RP437菌株使用不同浓度阿拉伯糖进行诱导8 h后, 分别对各样本中

sgRNA与 *tar*基因进行RT-qPCR定量验证, 结果如图7所示。其中 *tar*相对转录量为相对于野生型RP437菌株的相对mRNA水平。随着阿拉伯糖浓度逐渐上升, sgRNA转录水平逐渐提升(蓝色曲线), *tar*相对转录量逐渐下降(红色曲线); 当阿拉伯糖浓度达到约2 g/L时, sgRNA和 *tar*转录水平基本达到饱和, 此时 *tar*相对转录水平约为未诱导状态下的30%。当阿拉伯糖浓度为1 g/L时, *tar*相对转录水平约为未诱导的60%。因此, 后续实验分别使用1 g/L、2 g/L阿拉伯糖进行诱导, 获得Tar敲低水平约为40%、70%的菌株, 并分别记作 $\Delta_{tar}^{0.4}$ 、 $\Delta_{tar}^{0.7}$ 。

本研究工作利用CRISPRi技术对大肠杆菌Tar趋化受体进行了可诱导敲低, 验证了阿拉伯糖诱导浓度-sgRNA表达量-Tar敲低水平三者间的关系, 获得了具有不同Tar受体表达量(100%、30%和60%)的 *E. coli* RP437菌株可观测菌株。

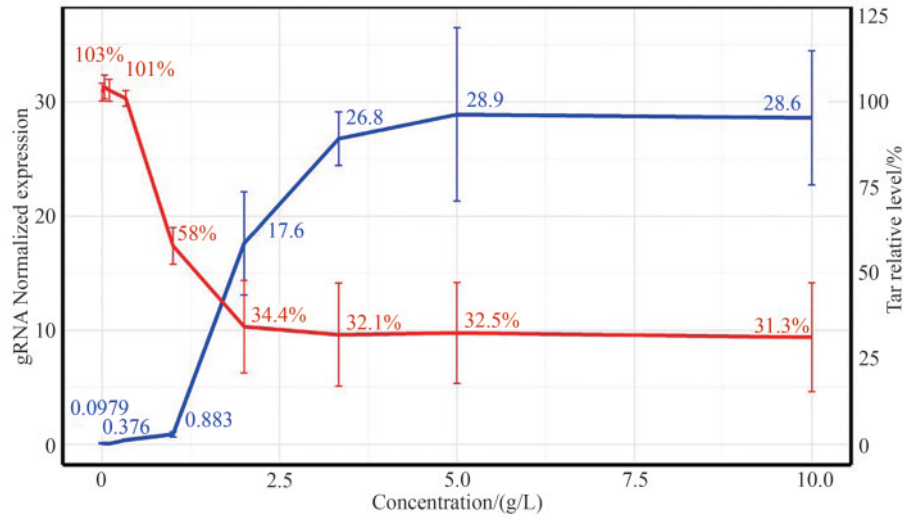


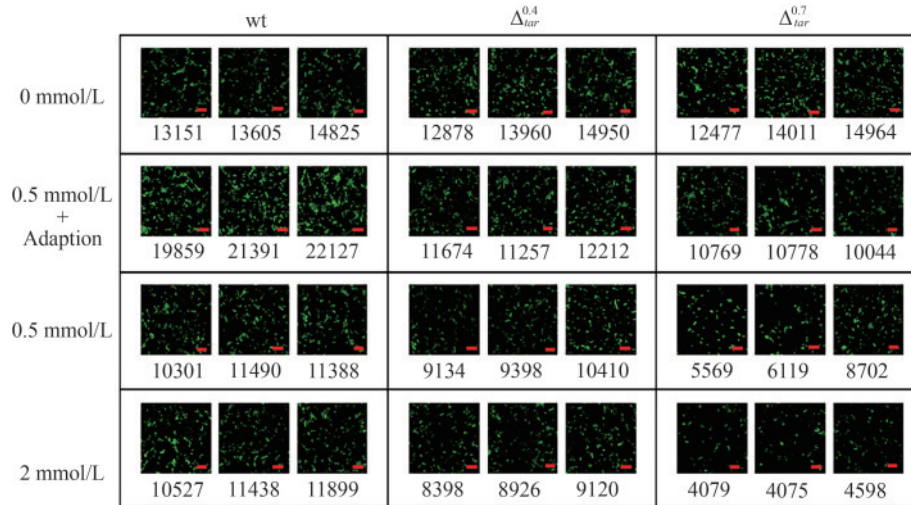
图7 不同阿拉伯糖诱导浓度下sgRNA转录水平(蓝色曲线)与tar相对转录水平(红色曲线)

Fig. 7 Relative transcriptional levels of gRNA (blue) and tar gene (red) under the induction of different arabinose concentrations

2.3 利用 Transwell 迁移实验观测和分析大肠杆菌中吡啶介导双向趋化反应

使用 Transwell 细菌迁移实验对细菌趋化运动进行观测与分析^[24], 分别使用野生型 (wt)、Tar 受体敲低 40% ($\Delta_{tar}^{0.4}$)、Tar 受体敲低 70% ($\Delta_{tar}^{0.7}$) 的菌株 (含荧光蛋白 GFP 的可观测菌株), 在 Transwell 装置上室使用 0 mmol/L、0.5 mmol/L 与 2 mmol/L 吡啶进行诱导。在 0.5 mmol/L 预适应组

中, 最后一次收集细胞前在缓冲液 MB 中加入 2 mmol/L 吡啶, 预适应 5 min 后采用 0.5 mmol/L 进行诱导。对 Transwell 迁移实验后聚碳酸酯膜下表面使用倒置荧光显微镜进行成像拍照, 并进行图像处理与统计, 方法如图 2(b) 所示。各组成像结果与细菌密度统计分别如图 8(a) 和 (b) 所示。其中图 8(a) 展示了荧光显微镜中细菌分布较均匀的 100 μm \times 100 μm 的分析区域, 下方数字表示经过处理统计后的视野中的绿色荧光强度, 并用于统计

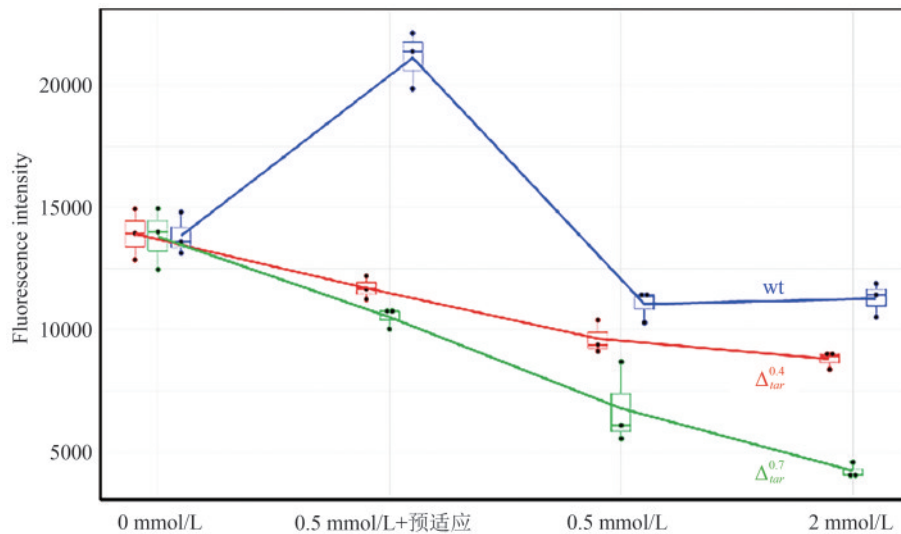


(a) 不同 Tar 表达量突变株在不同吡啶浓度条件下的 Transwell 成像结果

(吡啶处理浓度分别为 0 mmol/L、0.5 mmol/L、0.5 mmol/L+预适应、2 mmol/L, 每组含细菌分布较均匀的 100 μm \times 100 μm 的三个平行视野, 红色标尺为 2 μm 。下方数字表示经过处理统计后的视野中的绿色荧光强度, 并用于衡量细菌相对密度)

(a) Transwell imaging results of tar knockdown mutants under different indole concentrations

(Indole concentrations were 0 mmol/L, 0.5 mmol/L, 0.5 mmol/L+adoption and 2 mmol/L. Each group contains three parallel view fields with dimension of 100 μm \times 100 μm . Number below each image means the fluorescence intensity in the view field after statistical processing. Bar is 2 μm .)



(b) Transwell 实验中不同菌株对吡喹浓度的响应的定量趋势统计

(ns 表示 $p > 0.05$, 无显著差异; *表示 $p < 0.05$, **表示 $p < 0.01$, ***表示 $p < 0.001$, 以上三种代表存在显著性差异)(b) Quantitative trend of the response of different *tar* knockdown mutants to indole concentration in Transwell experiments('ns' indicates $p > 0.05$, with no significant difference; '*' indicates $p < 0.05$, '**' indicates $p < 0.01$, and '***' indicates $p < 0.001$.)

The above three represent significant differences.)

图 8 利用 Transwell 细菌迁移实验观测吡喹介导的趋化性结果**Fig. 8** Results of Transwell migration experiments

细菌相对密度, 每组三个平行视野。图 8(b) 则对图 8(a) 进行了定量化展示 (使用 t 检验分析显著性)。若荧光强度越高, 细菌密度越高, 则代表细菌朝向上室方向 (高浓度吡喹) 运动的正向趋化性越强; 反之则代表细菌对该浓度吡喹具有负向趋化性。

由图 8 可见, 随着吡喹浓度的增加, 视野中野生型大肠杆菌的荧光强度和细菌密度整体上呈逐渐下降的趋势, 表明野生型对吡喹整体为负向趋化反应, 主要由于野生型中 Tsr 受体数量和活性较 Tar 更高 (此时野生型中 Tsr/Tar 比例大约为 1.88, 表 2); 但在经历预适应后, 上室中野生型菌株的细胞密度显著性上升, 表明预适应后的细胞对吡喹表现出了强烈的正向趋向性, 推测由于预适应过程中 Tar 和 Tsr 去甲基化速度不同等因素, 当前 Tar 受体的效应占主导, 细胞表现出正向趋化。敲

低 Tar 受体后 ($\Delta_{tar}^{0.4}$ 和 $\Delta_{tar}^{0.7}$ 菌株), 由于胞内 Tar 表达量降低, $\Delta_{tar}^{0.4}$ 和 $\Delta_{tar}^{0.7}$ 中 Tsr/Tar 比例进一步升高 (分别为约 3.16 和 5.66, 表 2), 因此细菌整体上也呈现比野生型更为明显的负向趋化反应, 且 Tar 表达量越低, 细菌的负向趋化越明显, 充分证实了 Tar 的敲除促进了细菌对于吡喹的负向趋化, 且程度随 Tar 受体表达水平的降低而增加。然而两种敲低菌株在预适应后, 并没有出现类似野生型的对吡喹的正向趋化, 预适应的作用大幅下降, 进一步证明 Tar 受体对大肠杆菌对吡喹发生适应后转为正向趋化运动的重要性。

2.4 微流控观测平台的设计、优化与验证

Tranwell 结果展示了不同 Tar 表达量的细菌对不同浓度场的响应, 但其仅能反映出趋化运动的相对

表 2 Transwell 迁移实验的细菌中 *tar* 和 *tsr* 的相对转录水平 (RT-qPCR 测定)**Table 2** The relative transcriptional level of Tar and Tsr in *E. coli* used in Transwell experiment tested by RT-qPCR

菌株类型	Tar 相对转录水平	Tsr 相对转录水平	Tsr/Tar
<i>E. coli</i> RP437 野生型	7.80±0.10	14.66±0.03	1.88±0.06
Tar 受体敲低菌株 $\Delta_{tar}^{0.4}$	4.68±0.08	14.81±0.02	3.16±0.05
Tar 受体敲低菌株 $\Delta_{tar}^{0.7}$	2.53±0.02	14.31±0.11	5.66±0.03

强度和趋势，而不能对细菌在浓度场中的分布特征进行描述。因此本论文使用微流控装置进一步对细菌在浓度场中趋化运动的表现进行了观察与分析。

微流控装置通过设计可产生特定浓度梯度的趋化剂分布，同时结合显微成像技术，在小尺度内对细菌群体分布进行精确实时监控。由于该技术可对外界环境（如浓度梯度）进行精确控制，且对群体运动状态进行统计分析的同时反映每个个体的运动轨迹状态，该方法已广泛用于细菌趋化性群体层面的定量分析^[33]。本研究以 μ Flow^[27]装置作为参考设计了微流控芯片，其包含梯度生成模块与趋化观测模块，含有3个进入通道（Butter 1 inlet, Butter 2 inlet, Bacterial inlet）与1个流出通道（Outlet）。除此以外，观察平台还包含进样系统和观测装置。通过蠕动泵头转速及多阀进样系统的设置，Inlet 1和2两种MB缓冲液的流速基本相同，以保证能形成稳定均一的浓度梯度场。

根据Jeon等^[34]对该类型梯度产生装置的设计与验证，该装置可以在趋化观测模块产生接近于线性且稳定分布的浓度梯度。为了验证本研究中所用微流控装置的合理性，分别从仿真预测与以染色剂为观测对象的实际成像结果对芯片内浓度场分布进行验证。

使用Ansys CFX流体仿真模拟软件及Fikentscher黏度公式^[28]对芯片内流体性质和浓度分布进行预测。以细菌注入入口为原点，统计液体在沿 y 方向流动过程中，两种注入液在 x 方向上的混合程度和分布情况。如图9(a)所示，在注入入口附近时，由于注入流体自身影响，使局部摩尔比例出现扰动；但随着流动距离的增加，在流道全场范围内，能形成较稳定的浓度梯度，且近似为线性分布，与设计预期结果相符。

为了进一步验证该芯片在实际实验条件下所产生的浓度场，分别从微流控芯片的Butter 1 inlet、Butter 2 inlet通道通入无色MB与日落黄染色后的MB缓冲液；通过蠕动泵头转速及多阀进样系统的设置，Inlet 1和2两种MB缓冲液的流速基本相同，以保证能形成稳定均一的浓度梯度场。待流速稳定后，在明场下 $y=5\text{ mm}$ 处观察流道内颜色分布并成像。结果如图9(b)所示，显示了染料的显微成像结果（左）以及MATLAB统计分析后的日落黄浓度随 x 方向的分布情况（右）。除去最接近0点和远离0点处的浓度波动外，在统计范围内染料浓度接近于线性分布，与设计及仿真预测结果相一致，验证了本研究所搭建的微流控平台在实验条件下产生浓度场的可靠性、可预测性和稳定性。

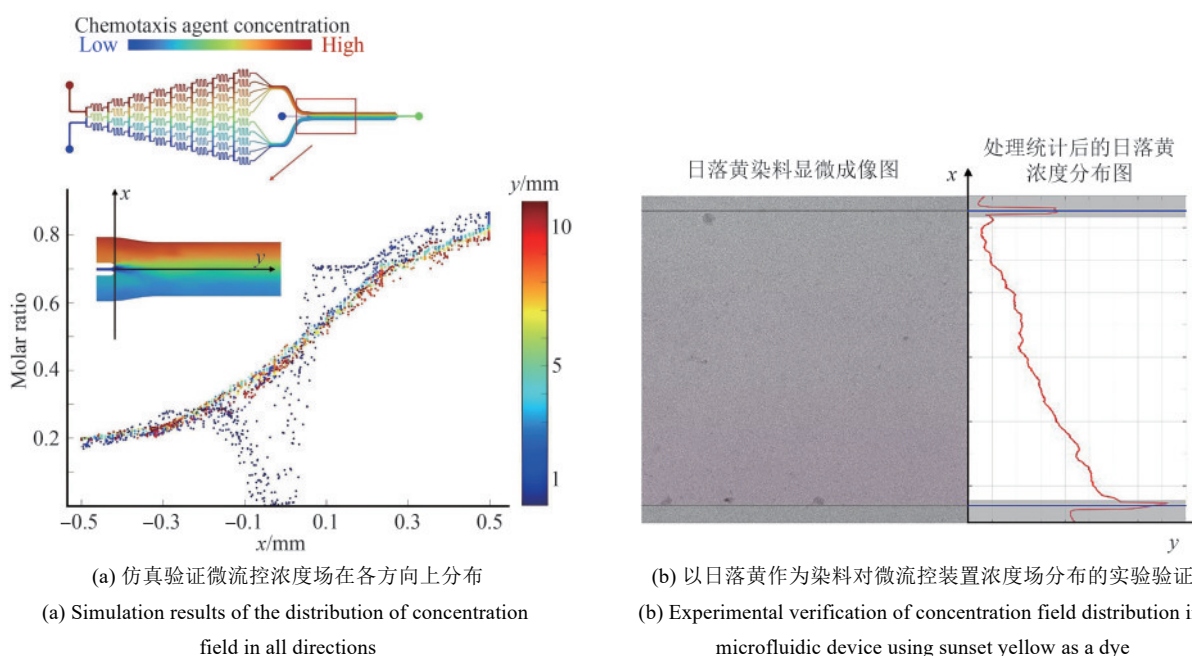


图9 微流控装置浓度场的仿真实验和实验验证结果

Fig. 9 Simulation and experimental verification results of concentration field in microfluidic devices

2.5 利用微流控装置观测和分析大肠杆菌中吲哚介导的双向趋化反应

为利用微流控探究大肠杆菌 *E. coli* RP437 及其 *tar* 基因敲低菌株在吲哚介导下的趋化行为随时间的变化情况，在微流控芯片的 Butter 1 inlet、Butter 2 inlet 通道分别通入吲哚浓度为 1 mmol/L、0 mmol/L 的 MB 运动缓冲液并建立稳定的浓度场后，将可荧光观测的重组菌株 *E. coli* RP437 (pUC19-eGFP) ($OD_{600}=1.0\sim 1.2$) 自 Bacteria Inlet 通道加入微流控体系。通入细菌后的 180 s、390 s、600 s 和 780 s 于芯片 $y=5$ mm 处进行激光扫描共聚焦显微镜观察并绘制出细菌密度分布图。如图 10 所示，左侧表示激光共聚焦显微镜下带绿色荧光的大肠杆菌 *E. coli* RP437 细菌成像结果（统一将视野中的绿色细菌处理成黑色以便于统计分析），右侧为经过 MATLAB 程序进行分析后的细菌密度情况，且右侧背景的颜色深浅示意吲哚浓度分布情况，颜色越深代表此处对应的吲哚浓度越大。由

图 10 可知，在观测的时间范围内，细胞整体表现出负向趋化性，即在吲哚浓度较低处细菌密度较高，在吲哚浓度较高处细菌密度低。180 s 时，细胞的负向趋化性最明显，细菌密度在低吲哚处出现高数值，表明此时细菌中 Tsr 受体占主导地位；随着时间推移，低浓度吲哚处的密度峰值逐渐下降，而高浓度吲哚处细菌密度逐渐增大，细菌分布更加平均化。在 Tsr/Tar 受体表达比例不变的条件下，该现象印证了当细菌受到吲哚刺激后，Tsr 和 Tar 受体的“适应”过程对细菌趋化行为的影响：Tsr 受体快速甲基化导致的“适应”会使其负向趋化效应减弱；而 Tar 受体虽也会发生适应过程，但速度相对较慢，即 Tar 介导的正向趋化效应更稳定持久；因此随着吲哚适应的发生，Tar 相对于 Tsr 的效应强度快速增加，最终使细菌对于吲哚的负向趋化效应逐渐减弱。

为了进一步探究 *tar* 基因敲低后对于大肠杆菌趋化行为的影响，利用微流控芯片通入三种不同 Tar 受体表达量的 *E. coli* RP437 菌株，于 780 s 时进

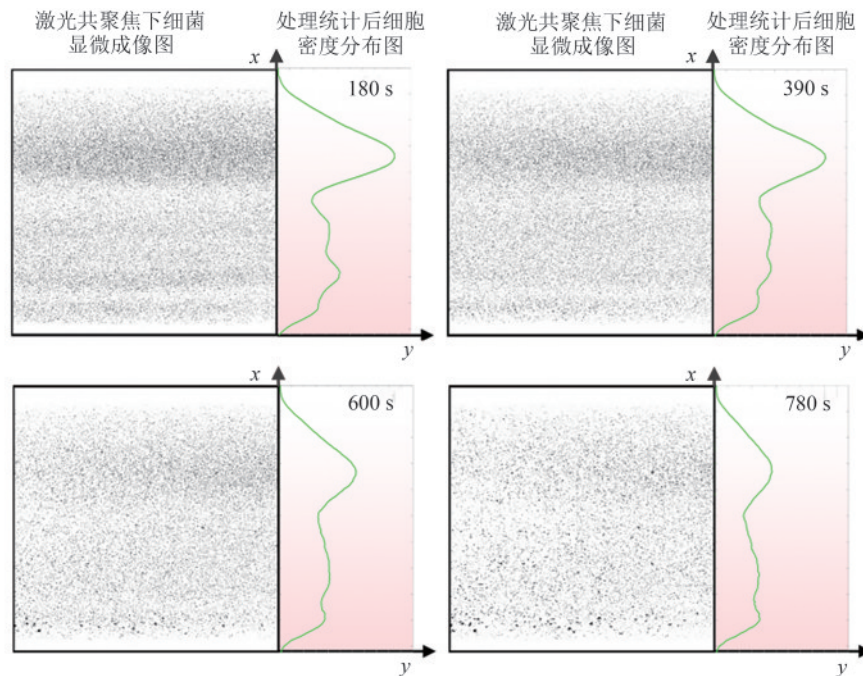


图 10 微流控通道中大肠杆菌野生菌的密度分布随时间变化情况

[左侧表示激光共聚焦显微镜下细菌成像结果（统一将视野中的绿色细菌处理成黑色以便于统计分析），右侧为统计分析后的细菌密度情况，且右侧背景的颜色深浅表示吲哚浓度高低，颜色越深代表此处对应的吲哚浓度越大。]

Fig. 10 Density distribution over time of *Escherichia coli* wild-type in microfluidic channel

(The left part of each image represents the bacterial imaging results under confocal microscopy, and the right part represents the bacterial density after statistical analysis. The color of the background in right part indicates the concentration of indole, and the darker color means the higher indole concentration.)

行激光扫描共聚焦显微镜观察并绘制出细菌密度分布图,结果如图11所示。可以发现,由于三种细菌中Tsr受体表达量均较Tar受体高,因此细菌整体表现出负向趋化特性。细菌中Tar受体表达量越低,其在低浓度吡啶处的分布密度越高,说明其负向趋化程度越明显;主要是由于当Tar受体被敲低后,细胞内Tsr/Tar比例上升,导致Tsr受体介导的负向趋化作用越明显,这与上述Transwell的结果是一致的。另外,780 s的时间范围内,Tsr受体也发生了快速的适应,但由于缺乏Tar的正向趋化作用与之抗衡,细菌群体体仍旧表现出负向趋化效应。以上结果进一步证实了Tsr的负向趋化作用,并且其快速的甲基化和适应过程并不足以单独逆转细菌的负向趋化效应,同时还需要Tar受体表达量的增加和拮抗作用,才有可能使群体水平上的趋化行为逆转。

本部分利用Transwell细菌迁移实验以及自主

设计搭建的微流控观测平台,深入分析了不同Tar受体表达量(100%,60%,30%)的*E. coli* RP437对不同浓度吡啶的趋化行为。在群体层面验证了改变受体表达比例对趋化运动的调控效果,并在时间与空间尺度上分析了两种受体拮抗作用的效应特点。

本文的初步研究揭示了Tsr/Tar受体对吡啶介导的大肠杆菌趋化行为的复杂精细调控过程,主要依赖两方面的因素:Tsr/Tar受体表达量相对比例,以及两种受体甲基化和去甲基化的程度和速度。Tsr/Tar受体比例受到基因拷贝数或表达水平(如过表达或者敲除/敲低)的影响。同时二者比例也随着细胞生长状态而改变:细胞生长初期,Tsr表达比例比较高;随着细胞密度的增加,Tar表达量提升^[35]。在本研究中,采用 $OD_{600}=1.0\sim 1.2$ 的大肠杆菌,此时细胞中Tsr/Tar相对比例约1.88(相对转录水平比较,表2),从Transwell和微流控实

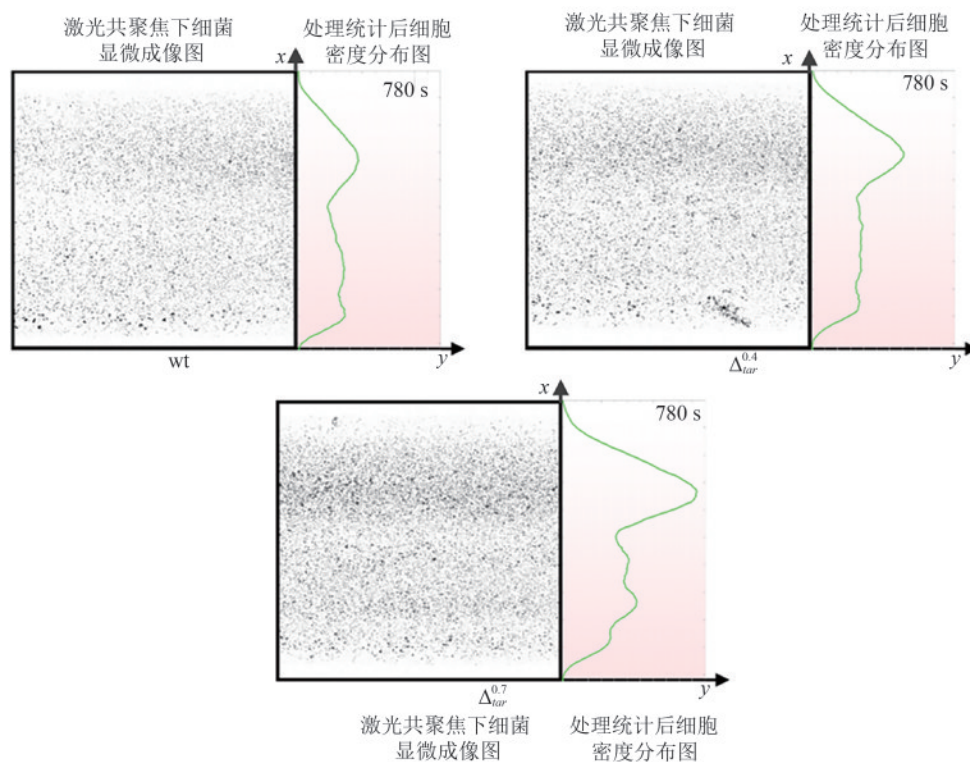


图11 微流控流道中不同Tar受体表达量菌株在同一时间的密度分布情况

[左侧表示激光共聚焦显微镜下细菌成像结果(统一将视野中的绿色细菌处理成黑色以便于统计分析),右侧为统计分析后的细菌密度情况,且右侧背景的颜色深浅表示吡啶浓度高低,颜色越深代表此处对应的吡啶浓度越大]

Fig. 11 Density distribution of strains with different Tar receptor expression levels in microfluidic channels at the same time (The left part of each image represents the bacterial imaging results under confocal microscopy, and the right part represents the bacterial density after statistical analysis. The color of the background in right part indicates the concentration of indole, and the darker color means the higher indole concentration.)

验结果可知该时期的细菌具备较好的运动能力，能观测到明显的细菌对吡啶的趋化性。文献报道37 °C LB培养基中 $OD_{600}=1.0\sim 1.2$ 的大肠杆菌平均泳动速度约为 $15\sim 25\ \mu\text{m/s}$ [36]，略低于对数早期($OD_{600}=0.2\sim 0.6$)的泳动速度约 $30\ \mu\text{m/s}$ [18]。

Tsr/Tar受体的相对比例对趋化性的调控，对于细菌在生存环境中的“趋利避害”有重要意义。Tsr/Tar受体的相对比例也会影响细菌对其他环境因素如pH的响应 [37]。低pH值和中性pH值下Tsr受体占主导，因此Tsr/Tar相对比例高，细菌负向趋化（离避反应）明显；高pH值下Tar受体占主导，细菌正向趋化。这种响应与受体甲基化程度也有关：酸性pH值下Tsr具有较少的甲基化谷氨酰胺残基，对pH变化有更高的敏感性，此时Tsr受体主导反应并导致细胞向更高pH值迁移；而碱性pH值下Tar甲基化程度较低，Tar主导趋化反应导致细胞向较低pH值游动，这种奇妙的推拉机制使大肠杆菌细胞能在最佳pH值下积累 [37-39]。同时，细菌对温度的响应也受到Tsr/Tar相对水平的影响 [40]。当处于低水平趋化剂（如氨基酸、吡啶等）下，Tar和Tsr受体的趋热性增强，导致整体出现趋热反应，但这种反应在过高温下会减弱，主要由于两种受体甲基化水平增加导致其嗜热性降低；当处于中等水平趋化剂时，Tar和Tsr受体的甲基化状态使细胞对温度不敏感；当处于高水平趋化剂时，两种受体及细胞整体都出现趋冷反应。细菌对温度的响应依赖于趋化剂浓度以及细胞对两种受体Tar和Tsr的对称调节，两种受体的甲基化程度也会影响其温度响应性和敏感度。细菌对温度的趋化性会使得细菌发生嗜热趋化从而促进细胞生长 [40-41]。

本文从数学模型模拟与实验观测两方面，对*E. coli*在吡啶诱导下的趋化反应进行了预测、分析和验证。将Tsr/Tar受体相对比例作为变量，从新的维度对趋化性的行为特点与影响因素进行建模分析；并利用Transwell迁移实验和微流控技术，对不同Tsr/Tar受体比例下的双向趋化运动进行了空间维度与时间维度的验证分析，实现了数据建模和实验验证的统一。在建模部分，利用信号转导动力学模型对不同Tar/Tsr比例下的细菌个体的趋化响应与适应过程进行了描述，利用随机游走

模型描述了群体尺度下的运动、分布特征与影响因素。建模发现Tar主导正向趋化，而Tsr主导负向趋化；Tsr/Tar受体的相对比例也会决定趋化行为，高Tsr/Tar受体以负向趋化为主，反之亦然 [图4(a)和图5]。这些模拟结果在Transwell迁移实验和微流控观察实验中也得到了充分验证：图8中野生型和敲低菌中的负向趋化均是由高Tsr/Tar受体比例决定的，且Tsr/Tar受体比例越高，负向趋化越明显（敲低株 $\Delta_{tar}^{0.4}$ 和 $\Delta_{tar}^{0.7}$ ）；图10、图11中野生菌和敲低株整体呈现负向趋化，也是由于Tsr/Tar受体比例高，Tsr受体占主导地位导致。与此同时，对于受体甲基化过程及其带来的趋化适应行为也进行了建模分析 [图4(b)]，表明Tsr甲基化和适应速度快，而Tar适应更为缓慢。这一分析结果在后续的实验中也得到证实：图8(b)中预适应后的野生型细菌对吡啶表现出了强烈的正向趋化性，可能由于Tar的缓慢甲基化导致当前Tar受体的效应占主导，细胞表现出正向趋化。同时，信号转导动力学模型还将 CW_{bias} 作为指标，模拟分析了不同受体表达比例下细菌双向趋化性中浓度“阈值”与“两极分化”行为的产生，弥补了湿实验中尚未观测到的浓度阈值下的趋化行为的逆转等现象。后续可进一步优化和统一建模和湿实验中Tsr/Tar受体比例，提高模型的准确性，使其更好地拟合实验观测数据。

本论文对细菌在吡啶诱导下趋化性调控的初步研究，可为开发具有更强、可诱导定植能力的益生菌提供研究基础。吡啶是肠道微生物代谢的重要产物之一，且吡啶在肠道中分布呈现梯度性。肠道黏膜附近高水平的吡啶会吸引细胞在现有微生物群落中滞留，而离黏膜较远处吡啶浓度低于阈值，细胞产生离避反应。因此细菌对吡啶的双向趋化，有助于建立基于吡啶浓度阈值的空间隔离，以排斥有害菌募集有益菌 [15]。但吡啶浓度对不同肠道菌的趋化行为影响不一致，可能会导致外来病原菌如铜绿假单胞菌、沙门氏菌等滞留于肠道上皮并形成耐药生物膜，导致抗生素耐药性，也会一定程度上威胁人类健康 [3, 42]。因此需要深入理解吡啶介导的趋化性调控机制，才能更好地利用吡啶浓度梯度调节共生菌群结构和状态，帮助维持肠道微生物稳态，维护肠道共生菌群与人

体健康间的有机联系。与此同时,细菌趋化性的研究还具有多方面的应用场景,可利用细菌的趋化性实现生物传感器的开发、微生物运载系统或者智能药物释放系统等方面的应用,在生物医学和生物工程领域具有广泛的应用前景^[43]。

3 结 论

对细菌趋化性的研究是定量生物学与系统生物学领域的一个重要方向。目前对 *E. coli* 趋化性的描述已发展出了丰富的数学模型,但目前模型主要局限于对单一受体分子的效应进行描述,而缺乏对两种具有拮抗作用的受体介导的双向趋化性的描述和分析。同时,双向趋化行为的实验调控、观测和分析也亟待深入研究。本论文将两种效应相反的甲基化趋化受体 Tar-Tsr 的表达量相对比例作为变量,从数学模型模拟与实验观测两方面,对大肠杆菌中吡啶介导的双向趋化反应进行了预测、分析、调控与验证:利用信号动力学模型和随机游走模型从双受体角度对趋化性的行为特点与影响因素进行模拟分析,同时使用 Transwell 迁移实验和自主设计搭建的微流控装置,对不同 Tsr/Tar 受体比例下趋化行为进行了空间维度与时间维度相结合的观测和分析。

首先,利用信号动力学模型和随机游走模型,从个体和群体层面分析了 Tar-Tsr 双受体作用下鞭毛行为与细菌双向趋化性中浓度“阈值”和“两极分化”行为的产生原因及影响因素,并描述了不同 Tar-Tsr 比例下的趋化响应与适应过程。

其次,利用 CRISPRi 技术构建了靶向 Tar 受体的可诱导基因敲低系统,验证了不同诱导剂浓度下的敲低程度,成功获得了 40%、70% Tar 受体敲低的可观测菌株,初步实现了细菌趋化行为的调控。

最后,自主设计和优化了用于细菌趋化性观测的微流控芯片及其观测平台。通过仿真预测和实验验证,证实了微流控的浓度梯度场分布与设计一致。利用 Transwell 迁移实验和微流控成像技术,观察并分析上述不同 Tsr/Tar 受体比例下大肠杆菌的趋化行为。研究发现野生型和敲低株中 Tsr 的负向效应占主导,导致细菌对吡啶的负向趋化;

细胞中 Tsr/Tar 受体的相对比例也会决定趋化行为,高 Tsr/Tar 受体以负向趋化为主,反之亦然。与此同时,两种受体甲基化过程及其带来的适应行为也影响趋化性,Tsr 受体甲基化和适应速度快,而 Tar 受体适应更为缓慢,导致了适应后的野生型细菌对吡啶表现出了负向趋化向正向趋化的逆转。同时发现 Tar 在逆转过程中不可或缺,其表达比例越低,逆转作用越弱。

本文工作较为初步揭示了 Tsr/Tar 受体对吡啶介导的大肠杆菌趋化行为的复杂精细调控过程两个主要因素:Tsr/Tar 受体表达量相对比例以及两种受体甲基化的程度和速度。以上研究结果为深入理解细菌双向趋化行为机制提供了重要依据,扩展了趋化行为的定量研究和调控手段,也为细菌趋化性的广泛应用奠定了基础。

参 考 文 献

- [1] ADLER J. Chemotaxis in bacteria: motile *Escherichia coli* migrate in bands that are influenced by oxygen and organic nutrients [J]. *Science*, 1966, 153(3737): 708-716.
- [2] IMAE Y, OOSAWA K, MIZUNO T, et al. Phenol: a complex chemoeffector in bacterial chemotaxis[J]. *Journal of Bacteriology*, 1987, 169(1): 371-379.
- [3] AIHARA E, CLOSSON C, MATTHIS A L, et al. Motility and chemotaxis mediate the preferential colonization of gastric injury sites by *Helicobacter pylori*[J]. *PLoS Pathogens*, 2014, 10(7): e1004275.
- [4] RAMOS H C, RUMBO M, SIRARD J C. Bacterial flagellins: mediators of pathogenicity and host immune responses in mucosa[J]. *Trends in Microbiology*, 2004, 12(11): 509-517.
- [5] WADHAMS G H, ARMITAGE J P. Making sense of it all: bacterial chemotaxis[J]. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2004, 5(12): 1024-1037.
- [6] HOCH J A. Two-component and phosphorelay signal transduction [J]. *Current Opinion in Microbiology*, 2000, 3(2): 165-170.
- [7] ADLER J. Chemotaxis in bacteria[J]. *Annual Review of Biochemistry*, 1975, 44: 341-356.
- [8] MACNAB R M. Examination of bacterial flagellation by dark-field microscopy[J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 1976, 4 (3): 258-265.
- [9] GREBE T W, STOCK J. Bacterial chemotaxis: the five sensors of a bacterium[J]. *Current Biology*, 1998, 8(5): R154-R157.
- [10] ZHULIN I B. The superfamily of chemotaxis transducers: from physiology to genomics and back[J]. *Advances in Microbial Physiology*, 2001, 45: 157-198.

- [11] NINFA E G, STOCK A, MOWBRAY S, et al. Reconstitution of the bacterial chemotaxis signal transduction system from purified components[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1991, 266(15): 9764-9770.
- [12] BOURRET R B, BORKOVICH K A, SIMON M I. Signal transduction pathways involving protein phosphorylation in prokaryotes[J]. *Annual Review of Biochemistry*, 1991, 60: 401-441.
- [13] MCEVOY M M, BREN A, EISENBACH M, et al. Identification of the binding interfaces on CheY for two of its targets, the phosphatase CheZ and the flagellar switch protein flhM [J]. *Journal of Molecular Biology*, 1999, 289(5): 1423-1433.
- [14] DJORDJEVIC S, STOCK A M. Crystal structure of the chemotaxis receptor methyltransferase CheR suggests a conserved structural motif for binding *S*-adenosylmethionine [J]. *Structure*, 1997, 5(4): 545-558.
- [15] YANG J Y, CHAWLA R, RHEE K Y, et al. Biphasic chemotaxis of *Escherichia coli* to the microbiota metabolite indole[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2020, 117(11): 6114-6120.
- [16] NORRIS N, ALCOLOMBRI U, KEEGSTRA J M, et al. Bacterial chemotaxis to saccharides is governed by a trade-off between sensing and uptake[J]. *Biophysical Journal*, 2022, 121(11): 2046-2059.
- [17] JIANG L L, OUYANG Q, TU Y H. Quantitative modeling of *Escherichia coli* chemotactic motion in environments varying in space and time[J]. *PLoS Computational Biology*, 2010, 6(4): e1000735.
- [18] KELLER E F, SEGEL L A. Traveling bands of chemotactic bacteria: a theoretical analysis[J]. *Journal of Theoretical Biology*, 1971, 30(2): 235-248.
- [19] ZHU B Q, LI H Y, ZHANG L, et al. A Markov random field model-based approach for differentially expressed gene detection from single-cell RNA-seq data[J]. *Briefings in Bioinformatics*, 2022, 23(5): bbac166.
- [20] PARKINSON J S. Complementation analysis and deletion mapping of *Escherichia coli* mutants defective in chemotaxis [J]. *Journal of Bacteriology*, 1978, 135(1): 45-53.
- [21] BAI Y, HE C Y, CHU P, et al. Spatial modulation of individual behaviors enables an ordered structure of diverse phenotypes during bacterial group migration[J]. *eLife*, 2021, 10: e67316.
- [22] BRADLEY R W. An easy-to-use CRISPRi plasmid tool for inducible knockdown in *E. coli*[J]. *Biotechnology Reports*, 2021, 32: e00680.
- [23] ROCHA D J P G, CASTRO T L P, AGUIAR E R G R, et al. Gene expression analysis in bacteria by RT-qPCR[M/OL]// *Methods in molecular biology: quantitative real-time PCR*. New York: Humana Press, 2020, 2065: 119-137. (2019-10-02) [2025-02-01]. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9833-3_10.
- [24] JANI S. Visualizing chemoattraction of planktonic cells to a biofilm [M/OL]// *Methods in molecular biology: bacterial chemosensing*. New York: Humana Press, 2018, 1729: 61-69. (2018-02-11) [2025-02-01]. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7577-8_6.
- [25] JUSTUS C R, MARIE M A, SANDERLIN E J, et al. Transwell *in vitro* cell migration and invasion assays[M/OL]// *Methods in molecular biology: cell viability assays*. New York: Humana Press, 2023, 2644: 349-359. (2013-05-05) [2025-02-01]. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7577-8_6.
- [26] ZANG X Q, LI Z Y, ZHANG X Y, et al. Advance in bacteria chemotaxis on microfluidic devices[J]. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 2017, 45(11): 1734-1744.
- [27] ENGLERT D L, MANSON M D, JAYARAMAN A. Investigation of bacterial chemotaxis in flow-based microfluidic devices[J]. *Nature Protocols*, 2010, 5(5): 864-872.
- [28] HINKAMP P E. A table of Fikentscher *K* values versus relative viscosities for a concentration of 1.0[J]. *Polymer*, 1967, 8: 381-384.
- [29] ANDERS C, NIEWOEHNER O, DUERST A, et al. Structural basis of PAM-dependent target DNA recognition by the Cas9 endonuclease[J]. *Nature*, 2014, 513(7519): 569-573.
- [30] QI L S, LARSON M H, GILBERT L A, et al. Repurposing CRISPR as an RNA-guided platform for sequence-specific control of gene expression[J]. *Cell*, 2021, 184(3): 844
- [31] NISHIMASU H, RAN F A, HSU P D, et al. Crystal structure of Cas9 in complex with guide RNA and target DNA[J]. *Cell*, 2014, 156(5): 935-949.
- [32] DOMINGUEZ A A, LIM W A, QI L S. Beyond editing: repurposing CRISPR-Cas9 for precision genome regulation and interrogation[J]. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2016, 17(1): 5-15.
- [33] LEE B J, JEONG H H, KANG K K, et al. Improvement of a diffusion-based microfluidic chemotaxis assay through stable formation of a chemical gradient[J]. *Chemical Engineering Science*, 2019, 202: 130-137.
- [34] JEON N L, BASKARAN H, DERTINGER S K W, et al. Neutrophil chemotaxis in linear and complex gradients of interleukin-8 formed in a microfabricated device[J]. *Nature Biotechnology*, 2002, 20(8): 826-830.
- [35] DARNTON N C, TURNER L, ROJEVSKY S, et al. On torque and tumbling in swimming *Escherichia coli*[J]. *Journal of Bacteriology*, 2007, 189(5): 1756-1764.
- [36] PING L Y. Cell orientation of swimming bacteria: from theoretical simulation to experimental evaluation[J]. *Science China Life Sciences*, 2012, 55(3): 202-209.
- [37] YANG Y L, SOURJIK V. Opposite responses by different chemoreceptors set a tunable preference point in *Escherichia coli* pH taxis[J]. *Molecular Microbiology*, 2012, 86(6): 1482-1489.
- [38] HU B, TU Y H. Precision sensing by two opposing gradient sensors: how does *Escherichia coli* find its preferred pH level?

- [J]. Biophysical Journal, 2013, 105(1): 276-285.
- [39] KHAN S, SPUDICH J L, MCCRAY J A, et al. Chemotactic signal integration in bacteria[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1995, 92(21): 9757-9761.
- [40] SALMAN H, LIBCHABER A. A concentration-dependent switch in the bacterial response to temperature[J]. Nature Cell Biology, 2007, 9(9): 1098-1100.
- [41] PAULICK A, JAKOVLJEVIC V, ZHANG S M, et al. Mechanism of bidirectional thermotaxis in *Escherichia coli*[J]. eLife, 2017, 6: e26607.
- [42] LAGANENKA L, LEE J W, MALFERTHEINER L, et al. Chemotaxis and autoinducer-2 signalling mediate colonization and contribute to co-existence of *Escherichia coli* strains in the murine gut[J]. Nature Microbiology, 2023, 8(2): 204-217.
- [43] SONG J, ZHANG Y, ZHANG C Q, et al. A microfluidic device for studying chemotaxis mechanism of bacterial cancer targeting[J]. Scientific Reports, 2018, 8: 6394.



通讯作者: 谭丹(1986—),女,博士,副教授,硕士生导师。研究方向为基于嗜盐微生物的合成生物学与定量生物学、新活性天然产物的生物合成及关键酶挖掘与研究等。

E-mail: tandan@mail.xjtu.edu.cn



第一作者: 汪昆(1999—),男,硕士研究生。研究方向为基于嗜盐微生物的合成生物学。

E-mail: 3122113016@stu.xjtu.edu.cn