网络出版时间:2026-04-08 DOI:10.13207/j.jnwafu.2026.10.017

施氏假单胞菌LuxR-0394蛋白的结构与功能

韩云蕾[1],胡琪[2],游佳伟[3],黄丹[2],孟文娇[2],罗蕊[2],卢镜[4],汤科[2]
(1 成都医学院 基础医学院,四川 成都 610500;2 成都医学院 公共卫生学院,四川 成都 610500;
3 成都医学院 生物科学与技术学院,四川 成都 610500;4 成都医学院 药学院,四川 成都 610500)

[摘 要] 【目的】解析施氏假单胞菌(*Pseudomonas stutzeri*)A1501中LuxR-0394蛋白的结构特征及其在群体感应相关表型中的潜在作用,为开发以群体感应为调控靶点的农业微生物应用提供参考。【方法】采用生物信息学方法,分析施氏假单胞菌A1501菌株中LuxR-0394蛋白的理化性质、结构域、亲疏水性、磷酸化位点、亚细胞定位、结合口袋、系统发育关系及蛋白互作网络,构建突变株*LuxR*-0394和回补株C-0394,并分别对其进行生长曲线、生物膜形成及运动能力测定。【结果】LuxR-0394蛋白缺乏典型的AHL结合结构域,保留HTH_LuxR DNA结合结构域,为LuxR solos型调控蛋白。该蛋白由218个氨基酸组成,定位于细胞质,无信号肽和跨膜结构,存在8个磷酸化位点及2个潜在小分子结合口袋。系统发育分析结果显示,LuxR-0394蛋白与*P. stutzeri* RCH2同源蛋白亲缘性较近。蛋白互作分析推测其可能与双组分系统及表面结构装配相关蛋白协同调控。功能测定结果表明,*PST*_0394基因缺失虽不影响施氏假单胞菌A1501生长,但导致其生物膜形成能力下降69.14%,运动能力下降87.70%。【结论】LuxR-0394在施氏假单胞菌A1501生物膜形成和运动能力等与环境适应相关的表型中发挥重要作用,并可能通过与双组分系统及表面结构装配相关蛋白的互作来影响菌株的生态功能。

[关键词] 施氏假单胞菌;生物膜;运动能力;群体感应;孤立型LuxR
[中图分类号] S182;Q939.11^{+}2 [文献标志码] A [文章编号] 1671-9387(2026)10-0161-09

Structural characterization and functional exploration of LuxR-0394 in *Pseudomonas stutzeri*

HAN Yunlei[1], HU Qi[2], YOU Jiawei[3], HUANG Dan[2], MENG Wenjiao[2],
LUO Rui[2], LU Jing[4], TANG Ke[2]
(1 *School of Basic Medical Sciences, Chengdu Medical College, Chengdu, Sichuan* 610500, *China*;
2 *School of Public Health, Chengdu Medical College, Chengdu, Sichuan* 610500, *China*;
3 *College of Bioscience and Technology, Chengdu Medical College, Chengdu, Sichuan* 610500, *China*;
4 *School of Pharmaceutical Sciences, Chengdu Medical College, Chengdu, Sichuan* 610500, *China*)

Abstract: 【Objective】 This study aimed to characterize the structural features and elucidate the potential role of the LuxR solo protein LuxR-0394 in *Pseudomonas stutzeri* A1501, particularly in quorum sensing (QS)-related phenotypes, thus providing a foundation for the development of QS-based regulatory strategies in agricultural microbial applications. 【Method】 Bioinformatics tools were used to analyze physicochemical properties, structural domains, hydropathicity, phosphorylation sites, subcellular localization, binding pockets, phylogenetic relationships, and protein interaction networks of the LuxR-0394 protein in *P. stutzeri* A1501. In addition, *LuxR*-0394 mutant and complemented strains (C-0394) were constructed, and their growth curves, biofilm for-

[收稿日期] 2025-08-31 [修回日期] 2025-11-16
[基金项目] 国家自然科学基金项目(31800070);四川省科技厅自然科学基金项目(2022NSFSC1679);成都医学院科技项目(CYZYB-25-15)
[作者简介] 韩云蕾(1983—),女,河北唐山人,讲师,博士,主要从事固氮菌研究。E-mail:hanyunlei@vip.163.com
[通信作者] 汤科(1982—),男,四川内江人,讲师,博士,主要从事微生物基因功能鉴定研究。E-mail:ke.tang@vip.163.com

mation, and motility were subsequently evaluated.【Result】LuxR-0394 lacks the canonical AHL-binding domain but retains the HTH_LuxR DNA-binding domain, making it a LuxR solo-type regulator protein. This 218-amino-acid protein localizes in the cytoplasm without a signal peptide or transmembrane region, and is predicted to possess eight phosphorylation sites and two potential small-molecule binding pockets. Phylogenetic analysis showed its close relatedness to a homolog in *P. stutzeri* RCH2. Interaction network analysis suggested its cooperation with proteins involved in two-component systems and surface structure assembly. Deletion of *PST*_0394 did not affect bacterial growth but significantly reduced biofilm formation (69.14%, $P<0.05$) and motility (87.70%, $P<0.05$).【Conclusion】LuxR-0394 contributes critically to environmental adaptation-related phenotypes, including biofilm formation and motility, in *P. stutzeri* A1501, and may modulate the strain's ecological functions through interactions with proteins associated with two-component systems and surface structure assembly.

Key words: *Pseudomonas stutzeri*; biofilm; motility; quorum sensing; LuxR solo

近年来,全球农业面临土壤退化、化肥和农药过量施用、作物病害频发及多重耐药病原菌扩散等多重挑战,这些问题相互交织,严重威胁粮食安全与生态可持续性[1-2]。在这一背景之下,基于微生物群体调控机制的绿色农业技术逐渐成为研究热点。群体感应(quorum sensing,QS)是一种广泛存在于革兰氏阴性细菌中,基于群体密度的信号传导与调控机制。群体感应系统通过信号分子的产生、释放、积累与感知,调控微生物群体在营养资源争夺[3]、表面附着[4]、生物膜形成[5]、抗生素合成及毒力表达[6-7]等方面的群体行为,从而提高微生物对环境的适应能力和生态竞争力[6,8]。

在已知的群体感应类型中,LuxI/LuxR型系统是研究最为深入的经典模式。其中LuxI蛋白催化合成N-酰基高丝氨酸内酯类(N-acyl-L-homoserine lactones,AHLs)信号分子,而LuxR受体蛋白识别特异的AHL信号,并进一步结合靶基因启动子区域,调控转录活性[9-10]。LuxR蛋白是群体感应系统的核心转录因子,由252个氨基酸残基组成,包含2个典型结构域,分别为N端的诱导子结合结构域(inducer-binding domain,IBD)和C端的DNA结合结构域(helix-turn-helix,HTH)[9-10]。基因组学研究发现,在多种革兰氏阴性菌尤其是假单胞菌属中存在一类不与*LuxI*基因共存的孤立型LuxR类蛋白,统称为LuxR solos或LuxR orphans[11]。LuxR solos不依赖经典AHL途径,但可识别内源性或外源性的小分子信号(如植物次生代谢物、酚类化合物或其他微生物产物),从而实现种内、种间乃至跨界的信号传递[12]。然而,现有研究中LuxR solos的信号识别谱、下游调控网络及其生态功能仍缺乏系统解析。

施氏假单胞菌(*Pseudomonas stutzeri*)A1501是一株从中国南方水稻根际土壤中分离得到的微好氧型联合固氮菌,隶属于γ-变形菌亚纲。该菌株具备固氮、合成植物生长素(如IAA)、调节根际pH、耐受重金属与盐胁迫等益生特性[13],因而作为微生物肥料的候选菌株得到广泛关注。基因组注释结果显示,该菌株含有多个LuxR家族调控因子,包括未配对的LuxR solo候选基因*PST*_0394,但其生物学功能尚不明确。因此,本研究以LuxR solo编码基因*PST*_0394为研究对象,结合生物信息学分析与功能验证试验,系统评估其编码蛋白的理化性质、保守结构域、潜在结合口袋、系统发育关系及蛋白互作网络,并通过构建突变株和回补株,开展生长曲线、运动能力和生物膜形成试验,探讨其在群体感应相关表型调控中的潜在作用,初步揭示LuxR solos在环境适应与植物互作中的分子机制,为开发以群体感应调控为靶点的农业微生物应用提供参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验所用施氏假单胞菌A1501菌株,载体pLAFR3,均由中国农业科学院生物技术研究所林敏课题组惠赠。

施氏假单胞菌A1501及其衍生菌株培养采用LB培养基,生长曲线测定采用K培养基[14],培养条件为30 ℃、220 r/min。

泳动培养基:胰蛋白胨10.0 g/L,酵母提取物5.0 g/L,NaCl 5.0 g/L,琼脂3.5 g/L。

试验试剂:非连接酶依赖型的多片段一步法克隆试剂盒(ClonExpress MultiS One Step Cloning

Kit），购自诺唯赞公司；限制性内切酶、T4 DNA 连接酶，购自 TaKaRa 公司；PCR 纯化试剂盒、胶回收试剂盒，购自 Omega；其余试剂均为国产分析纯。

试验仪器：微生物生长曲线分析仪（Scientz-WSQ），购自新芝生物科技；紫外可见分光光度计（U3010 Hitachi），购自日立高新技术公司；PCR 仪（9700），购自 Bio-Rad 公司；小型离心机（5424），购自 Eppendorf 公司；酶标仪（Biotek PowerWave XS2），购自伯腾仪器有限公司。

1.2　LuxR-0394 蛋白的生物信息学分析

施氏假单胞菌 A1501 菌株的 LuxR 家族调控蛋白序列来自 NCBI，序列编码为 ABP78100.1（DNA-binding response regulator CorR［*Pseudomonas stutzeri* A1501］）。利用 NCBI CDD、InterPro 和 SMART 数据库分析 LuxR-0394 蛋白的功能结构域，利用 ProtParam 分析其理化性质，利用 ProtScale 分析其亲水性/疏水性，利用 PSORTb v3.0.3 进行亚细胞定位，利用 SignalP 6.0 分析信号肽，利用 TMHMM 2.0 分析跨膜结构域，利用 NetPhosBac 1.0 分析蛋白质的磷酸化位点，利用 SOPMA 分析蛋白质的二级结构，利用 SWISS-MODEL 预测蛋白质的三级结构，利用 DoGSiteScorer 预测蛋白潜在的结合口袋，利用 MEGA-11 软件分析系统发育，利用 STRING 数据库分析蛋白互作网络。

1.3　*LuxR*-0394 缺失突变株和回补株的构建

利用同源双交换的方法构建 *LuxR*-0394 缺失突变株，利用 pLAFR3 载体构建功能回补株 C-0394，具体步骤参照 ZHAN 等[15]的方法，构建过程中涉及的引物信息详见表 1。

表 1　本研究所用引物信息

Table 1　Primers used in this study

引物名称 Primer name	引物序列（5′→3′）Primer sequence（5′→3′）	用途 Application
LuxR-0394-U-F(E)	GGAATTCTAGCGATTGCTGCGGGTTT	扩增上游同源臂 Amplify upstream homology arms
LuxR-0394-U-R(H)	CAAGCTTGCGTTATCCAGGCGGACTTT	
LuxR-0394-D-F(B)	CGGATCCAGATGGCGAACGGGCACT	扩增下游同源臂 Amplify downstream homology arms
LuxR-0394-D-R(P)	AAAACTGCAGGCAGCGTATAGGCGGGAAT	
LuxR-0394-F(B)	CGCCCTAGGGAATGCCGCCTGCTC	功能回补株构建 Construction of functional complementation strain
LuxR-0394-R(H)	CAAGCTTACTGCTTGGCTTGTTCT	
Cm 验证引物 R Cm verification primer R	CTCACCGTCTTTCATTGCCATAC	重组质粒验证引物 Recombinant plasmid verification primer

1.4　测定指标及方法

1.4.1　生长曲线的测定　挑取野生型施氏假单胞菌 A1501、*LuxR*-0394 突变株和回补株 C-0394 的单菌落分别接种到 LB 液体培养基中，30 ℃、220 r/min 振荡培养 12 h，转接至 10 mL 新鲜培养基 K 中，每个菌株重复 3 个，使初始 OD_{600} 为 0.1，30 ℃、220 r/min 振荡培养，采用微生物生长曲线分析仪测定不同菌株的生长曲线。

1.4.2　生物膜形成能力的测定　参考 SHANG 等[16]的研究，将 150 μL 菌液添加到 96 孔培养皿中，每个处理 3 个重复，静置培养 48 h；弃去菌液，蒸馏水冲洗干净；再加入 160 μL 0.1% 的结晶紫，室温染色 10 min，然后用清水冲洗 96 孔培养皿至无色；再加入 200 μL 30% 乙酸溶液，静置 10 min，于 560 nm 下测吸光值。以 LB 培养基为空白对照，以吸光值大小反映菌株生物膜形成能力的强弱。

1.4.3　运动能力测定　运动能力的测定参考尚立国[17]的研究，将 *P. stutzeri* A1501 菌株、*LuxR*-0394 突变株和回补株 C-0394 在 LB 液体培养基中 30 ℃培养过夜，取菌液 1.5 mL，4 000 r/min 离心 5 min，去上清收集菌体，用生理盐水洗涤 2 次，再加 0.2 mL 洗涤介质悬浮菌体，得到菌浓度为 1 000 CFU/mL。配制泳动培养基半固体平板，在半固体平板中央吸取 40 μL 培养基，再加入 10 μL 悬浮菌体在半固体平板中央小孔中，30 ℃培养 48 h，测量向外泳动形成的泳动环直径，探究 *P. stutzeri* A1501 菌株、突变菌株和回补株运动能力的差异。

1.5　数据统计与分析

所有试验均进行 3 次独立重复，结果以“平均值±标准差”表示。采用 SPSS 29.0 软件进行统计分析，采用独立样本 *t* 检验评估组间差异，以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2　结果与分析

2.1　LuxR-0394 蛋白的鉴定及其结构域

在施氏假单胞菌 A1501 基因组中鉴定到编码 LuxR 家族转录调控蛋白的基因 *PST*_0394，其编码蛋白 LuxR-0394 氨基端（N 末端）缺乏典型 AHL 信

号分子结合区的6个保守氨基酸位点,而羧基端(C末端)保留HTH区3个保守氨基酸残基(表2)。

表 2 LuxR-0394蛋白氨基端及羧基端保守氨基酸位点比较

Table 2 Comparison of conserved amino acid residues in the N-terminal and C-terminal domains of LuxR-0394 protein

结构域 Domain	LuxR蛋白 LuxR protein	LuxR-0394蛋白 LuxR-0394 protein	结构域 Domain	LuxR蛋白 LuxR protein	LuxR-0394蛋白 LuxR-0394 protein
自诱导物结合结构域 Autoinducer-binding domain	W_{57}	F_{57}	DNA结合结构域 DNA-binding domain	G_{113}	G_{113}
	Y_{61}	Q_{61}		E_{178}	E_{178}
	D_{70}	D_{70}		L_{182}	L_{182}
	P_{71}	A_{71}		G_{188}	G_{188}
	W_{85}	Q_{85}			

经NCBI CDD、InterPro和SMART数据库比对,LuxR-0394蛋白具有LuxR家族特有的HTH_LuxR DNA结合结构域,功能域覆盖全长且无双组分系统相关结构域。结合PRK10100超家族的全长覆盖结果(表3),确认LuxR-0394为LuxR solo型调控蛋白,推测其具有DNA结合功能,参与群体感应信号感知及下游基因调控,可能涉及毒力因子、生物膜形成等过程。

表 3 LuxR-0394蛋白的结构域分析

Table 3 Domain analysis of LuxR-0394 protein

结构域名称 Domain name	数据库 Database	起止位置 Start and end position	*E*值 *E* value	功能说明 Function description
LuxR型HTH结构域 HTH_LuxR	SMART	151—203	2.48e—21	LuxR家族特有Helix-Turn-Helix DNA结合结构域,用于启动子结合和调控转录 The unique Helix-Turn-Helix DNA binding domain of the LuxR family is used for promoter binding and regulation of transcription
CsgD类转录调控因子 CsgD-like transcription regulator	InterPro	13—210	—	属于LuxR/CsgD类调控蛋白超家族,参与生物膜形成、毒力调控等 Belongs to the LuxR/CsgD regulatory protein superfamily and is often involved in biofilm formation, virulence regulation, etc
PRK10100蛋白超家族(cl32463) PRK10100 superfamily (cl32463)	NCBI CDD	13—210	9.74e—17	LuxR结构相关超家族,覆盖蛋白全长,具备调控功能 The LuxR structurally related superfamily covers the entire length of the protein and has regulatory functions

2.2 LuxR-0394蛋白的氨基酸组成及理化性质

利用ProtParam对LuxR-0394蛋白的理化性质进行分析,结果(图1)表明,LuxR-0394蛋白由218个氨基酸组成,其中亮氨酸(Leu)、谷氨酸(Glu)、丙氨酸(Ala)和丝氨酸(Ser)占比较高,分别为16.51%,8.72%,7.34%和7.34%。LuxR-0394蛋白相对分子质量为24.35 ku,理论等电点为5.75,呈弱酸性;带负电荷氨基酸残基数(Asp+Glu)多于带正电荷氨基酸残基数(Arg+Lys);不稳定指数为40.61,为不稳定蛋白;脂肪族氨基酸指数为108.26,表明该蛋白的热稳定性较高。

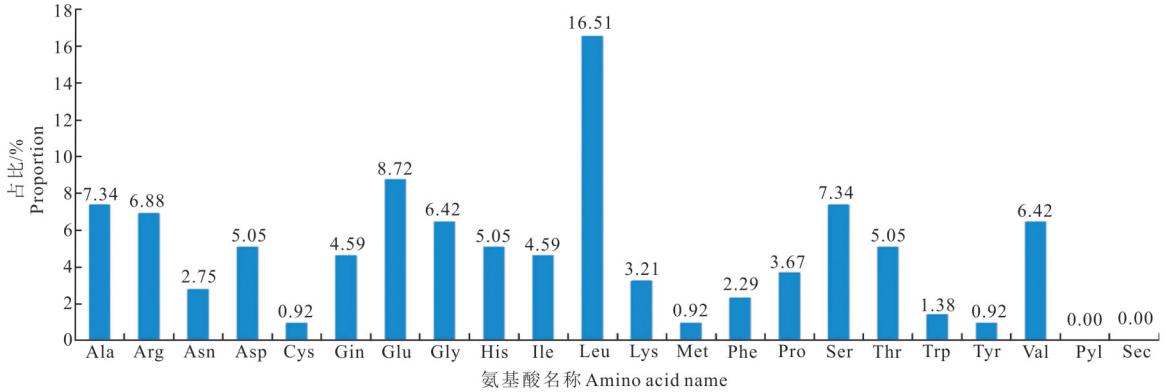


图1 LuxR-0394蛋白的氨基酸组成

Fig. 1 Amino acid composition of LuxR-0394 protein

亲水/疏水性分析结果(图2)表明,LuxR-0394蛋白的平均亲水性值(grand average of hydropathi-

city，GRAVY）为－0.197，属于亲水蛋白；该蛋白第48位谷氨酸（Glu）的亲水性最强，得分为－2.456；第81位丙氨酸（Ala）疏水性最强，得分为1.878。

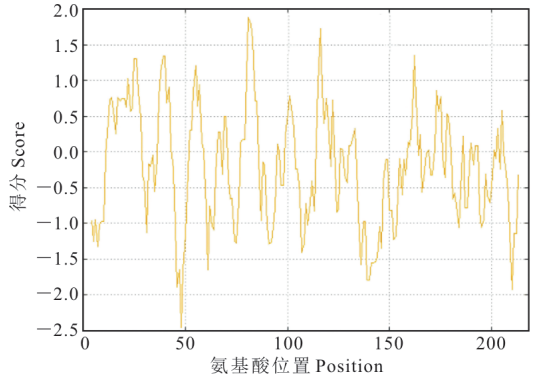


图2　LuxR-0394蛋白的亲水/疏水性预测

Fig. 2　Hydrophilicity/hydrophobicity prediction of LuxR-0394 protein

2.3　LuxR-0394蛋白的信号肽与跨膜结构域预测

使用SignalP 6.0预测LuxR-0394蛋白的信号肽，结果表明LuxR-0394蛋白不含信号肽，属于非分泌型蛋白。利用TMHMM 2.0预测该蛋白的跨膜结构域，结果表明LuxR-0394蛋白无跨膜结构域，说明其定位于细胞内。

2.4　LuxR-0394蛋白的亚细胞定位

采用PSORTb v3.0.3对LuxR-0394蛋白进行亚细胞定位分析，结果显示，LuxR-0394蛋白定位于细胞质中，得分为9.97，显著高于可信阈值7.5，说明可信度极高。这与其作为转录调控因子在胞质中结合DNA的功能一致。

2.5　LuxR-0394蛋白的磷酸化位点预测

采用NetPhosBac 1.0对LuxR-0394蛋白的潜在磷酸化位点进行预测，结果（图3）显示，该蛋白有8个潜在磷酸化位点，包括7个丝氨酸（Ser）磷酸化位点和1个苏氨酸（Thr）磷酸化位点，磷酸化潜能均高于0.5，推测上述8个潜在磷酸化位点可能参与LuxR-0394蛋白活性调节。

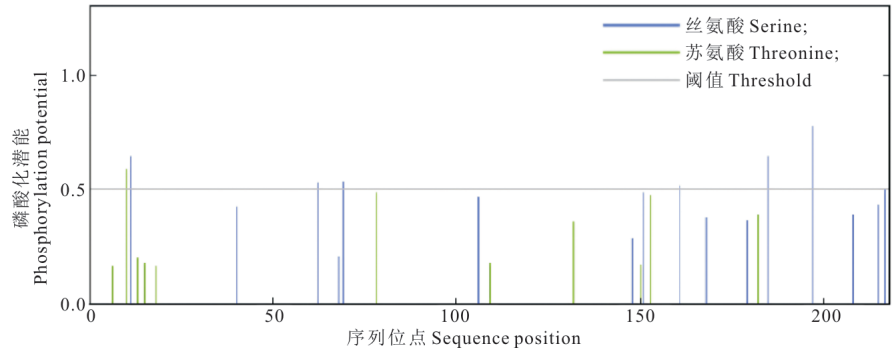


图3　LuxR-0394蛋白的磷酸化位点分析结果

Fig. 3　Analysis results of phosphorylation sites in the LuxR-0394 protein

2.6　LuxR-0394蛋白的二级及三级结构

利用SOPMA工具对LuxR-0394蛋白进行二级结构预测分析，结果（图4）表明，LuxR-0394蛋白的二级结构主要由α-螺旋、无规则卷曲、延伸链和β-转角组成，占比分别为50.00%，33.49%，11.93%和4.59%，其中α-螺旋和无规则卷曲占比较高，有助于维持该蛋白的结构稳定。



图4　LuxR-0394蛋白序列与模板序列比对

Fig. 4　Alignment of the LuxR-0394 protein sequence with the template sequence

使用SWISS-MODEL对LuxR-0394蛋白的三级结构进行同源建模，获得17个预测模型，其中以AlphaFold DB中ID为A0A7Y9Q398.1.A模板的预测模型质量最高，序列相似性达92.17%（图4），GMQE值为0.83，模型预测可信度高。LuxR-0394蛋白的三维结构模型如图5所示，整体结构中富含α-螺旋和无规则卷曲等二级结构单元，推测这些结构在维持LuxR-0394蛋白的空间构象稳定性及其

生物学功能发挥中具有重要作用。

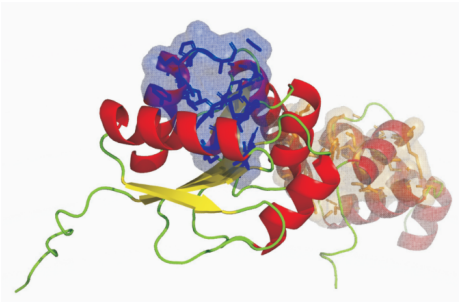


图 5 LuxR-0394蛋白的三级结构及小分子结合口袋预测结果

Fig. 5 Prediction results of tertiary structure and small molecule binding pocket of LuxR-0394 protein

由图5可知,LuxR-0394蛋白的三维模型中可见其C端HTH结构域,结合DoGSiteScorer预测发现,LuxR-0394蛋白有2个高潜力结合口袋,其中蓝色口袋可能与特定信号分子(如群体感应信号分子)结合,触发蛋白质构象变化,调节下游基因的转录,从而实现群体感应和信号转导;橙色口袋可能通过与辅因子、金属离子或其他小分子结合,调节蛋白质构象,从而影响其功能域之间的协同作用及转录活性。2个高潜力结合口袋的协同作用使LuxR-0394蛋白能够精确感知环境信号,调节基因表达及细胞行为,从而在群体感应和信号传导中发挥重要作用。

2.7 LuxR-0394蛋白的系统发育

利用MEGA-11软件中的Clustal W对LuxR-0394蛋白进行多序列比对,用Neighbor-joining法进行系统发育分析,Bootstrap值设置为1 000。由图6可知,LuxR-0394与 *P. stutzeri* RCH2中AGA88353.1蛋白聚为一支,表明相应系统的亲缘关系接近,可能来源于同一个祖先。

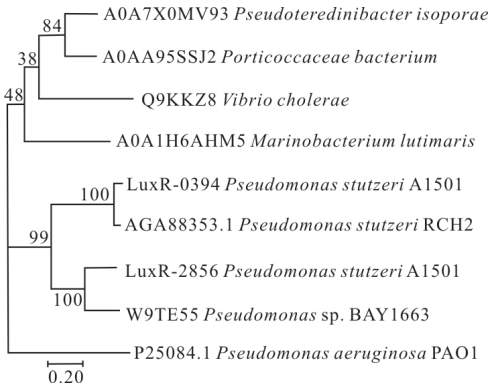
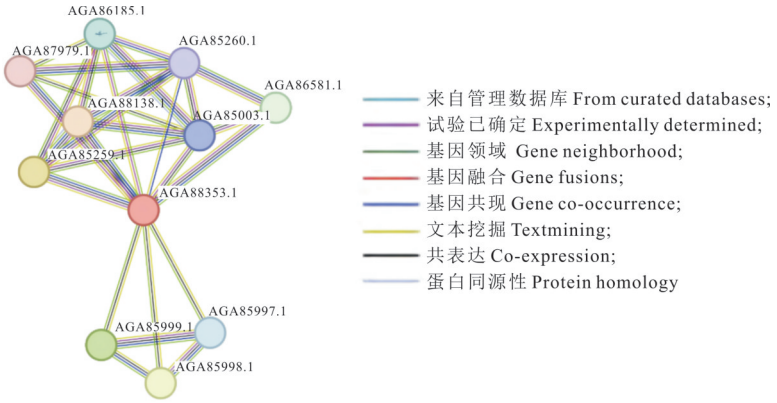


图 6 LuxR-0394蛋白的系统发育树

Fig. 6 Phylogenetic tree of the LuxR-0394 protein

2.8 LuxR-0394蛋白的互作网络

通过STRING数据库构建LuxR-0394蛋白的互作网络,结果(图7)显示,其同源蛋白AGA88353.1与多种信号转导组氨酸激酶(如AGA88138.1、AGA85259.1)存在互作关系,提示LuxR-0394蛋白可能是双组分系统下游的响应调控因子。同时,LuxR-0394蛋白与curli纤维形成相关蛋白(CsgE、CsgF、CsgG)互作密切,推测其可能参与细菌黏附和生物膜形成的调控。



AGA88353.1. LuxR家族的细菌调控蛋白;AGA88138.1. 多传感器信号转导组氨酸激酶;AGA85259.1. 含PAS域组氨酸激酶;AGA85998.1. CsgF,Curli纤维组装/转运蛋白;AGA85999.1. CsgE,Curli组装蛋白;AGA86581.1. HAMP域组氨酸激酶;AGA86185.1. 包含多信号转导相关结构域;AGA85997.1. CsgG,Curli聚合相关未注释蛋白;AGA85003.1. 含CHASE3等多个感应结构域;AGA85260.1. LuxR家族响应调节蛋白;AGA87979.1. 硝酸/亚硝酸相关组氨酸激酶。

AGA88353.1. Bacterial regulatory proteins of LuxR family;AGA88138.1. Multi-sensor signal transduction histidine kinase;AGA85259.1. PAS domain S-box,Histidine kinase;AGA85998.1. Curli production assembly/transport component CsgF;AGA85999.1. Curli assembly protein CsgE;AGA86581.1. Histidine kinase,HAMP domain;AGA86185.1. Harboring multiple sensory domains;AGA85997.1. Uncharacterized protein involved in formation of curli polymers;AGA85003.1. Harboring multiple sensory domains including CHASE3;AGA85260.1. Bacterial regulatory proteins of LuxR family;AGA87979.1. Signal transduction histidine kinase,nitrate/nitrite-specific.

图 7 LuxR-0394蛋白(AGA88353.1)的互作网络

Fig. 7 Interaction network of LuxR-0394 protein (AGA88353.1)

2.9　LuxR-0394对施氏假单胞菌A1501菌株生长的影响

本研究构建了*LuxR*-0394突变株，并通过生长曲线测定探究*P. stutzeri* A1501中*PST*_0394基因突变对菌体生长的影响。结果（图8）表明，*PST*_0394基因缺失突变株与*P. stutzeri* A1501的生长状况无明显差异，表明*PST*_0394基因缺失对菌株的生长无明显影响。

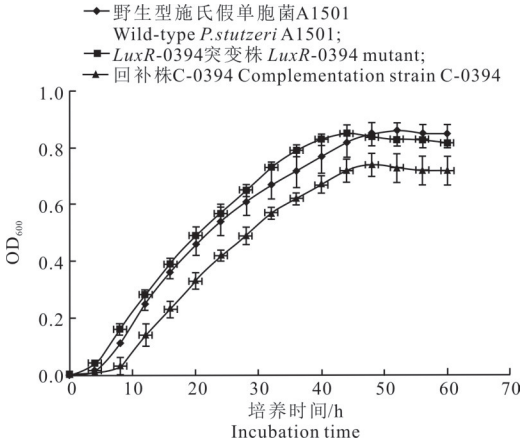


图8　LuxR-0394对施氏假单胞菌A1501生长的影响

Fig. 8　Effects of LuxR-0394 on growth of *Pseudomonas stutzeri* A1501

2.10　LuxR-0394对施氏假单胞菌A1501生物膜形成的影响

在菌株生长期间，微生物会在固体表面聚集、生长，以适应生存需要。生物膜是细菌聚集、定植和增殖的一种方式。结晶紫染色结果（表4）表明，与野生型施氏假单胞菌A1501菌株相比，*LuxR*-0394突变株的生物膜形成能力显著降低69.14%（$P<0.05$），回补株C-0394的生物膜形成能力较*LuxR*-0394突变株明显恢复，且与野生型无显著差异（$P>0.05$）。表明*PST*_0394基因在施氏假单胞菌A1501的生物膜形成过程中发挥重要作用。

2.11　LuxR-0394对施氏假单胞菌A1501运动能力的影响

运动能力检测结果（表4和图9）表明，与野生型菌株相比，*LuxR*-0394突变株的泳动环直径显著缩小87.70%（$P<0.05$）；与*LuxR*-0394突变株相比，回补株C-0394的泳动环直径显著增加，且回补株C-0394的泳动环直径与野生型菌株无显著差异（$P>0.05$），表明回补株C-0394的运动能力明显恢复。由此可见，*PST*_0394基因缺失显著降低了突变株的运动能力。

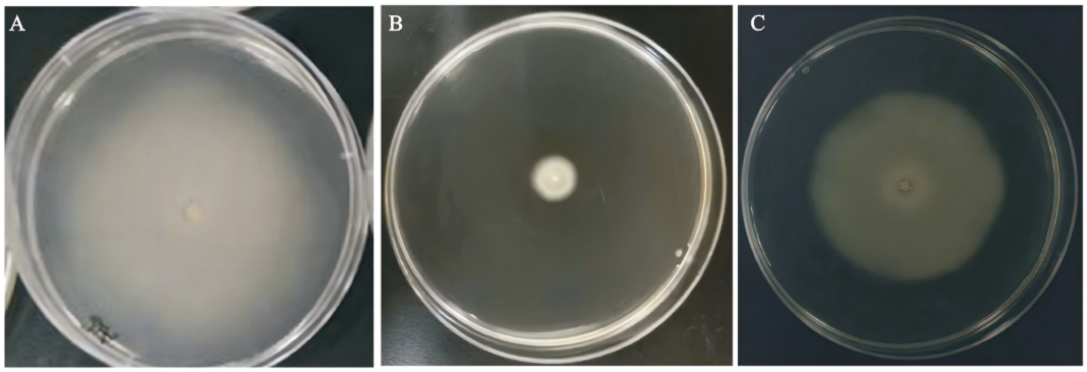
表4　LuxR-0394对施氏假单胞菌A1501生物膜形成和运动能力的影响

Table 4　Effects of LuxR-0394 on biofilm formation and motility of *Pseudomonas stutzeri* A1501

菌株 Strains	OD_{560}	泳动环直径/cm Swimming diameter
野生型施氏假单胞菌A1501 Wild-type *Pseudomonas stutzeri* A1501	1.62±0.19 a	6.75±0.51 a
LuxR-0394突变株 *LuxR*-0394 mutant	0.50±0.02 b	0.83±0.21 b
回补株C-0394 Complementation strain C-0394	1.47±0.12 a	5.43±0.42 a

注：同列数据后标不同小写字母表示不同菌株间差异显著（$P<0.05$）。

Note：Different lowercase letters after data in the same column indicate significant differences among strains ($P<0.05$).



A. 野生型施氏假单胞菌A1501；B. *LuxR*-0394突变株；C. 回补株C-0394。

A. Wild-type *P. stutzeri* A1501; B. *LuxR*-0394 mutant; C. Complemented strain C-0394.

图9　LuxR-0394对施氏假单胞菌A1501运动能力的影响

Fig. 9　Effects of LuxR-0394 on motility of *Pseudomonas stutzeri* A1501

3 讨 论

施氏假单胞菌A1501是一株重要的植物根际联合固氮菌,具备固氮、合成植物激素、抗逆及降解苯甲酸等多种功能,广泛应用于农业微生物肥料研发[14,18]。A1501基因组中存在未与LuxI配对的LuxR solo蛋白,推测其能够感知非AHL类信号分子,从而参与种间信号识别或植物-微生物互作。已有研究发现,部分LuxR solo可通过调控毒力、抗性及运动等表型来响应宿主信号[11-12]。

3.1 LuxR-0394蛋白的结构及功能预测

本研究发现,施氏假单胞菌A1501基因组中鉴定到编码LuxR家族转录调控蛋白的基因*PST_0394*,其编码LuxR-0394蛋白缺乏典型LuxR蛋白N端的AHL结合结构域及6个保守氨基酸残基,表明其不依赖内源性AHL信号实现功能[19];但其C末端保留了高度保守的HTH-LuxR DNA结合结构域,并呈现PRK10100超家族和CsgD-like结构域特征,符合LuxR solo的典型结构特征[20-21]。LuxR-0394蛋白为亲水性蛋白,具有高脂肪族氨基酸指数,有助于其在复杂土壤环境中保持功能活性。LuxR-0394定位于细胞质内,且无信号肽和跨膜结构域,这与其在细胞质内感知信号并调控转录的功能一致。

二级与三级结构预测进一步证实LuxR-0394富含α-螺旋,并构成典型的HTH DNA结合结构域,这一结构常见于细菌转录调控因子。NetPhosBac分析结果显示,LuxR-0394蛋白具有多个潜在磷酸化位点,尤其Ser197位点得分最高。综合DoGSiteScorer预测结果,推测LuxR-0394蛋白可能作为蛋白激酶的底物,通过磷酸化修饰参与细胞内信号级联调控,从而实现对靶基因表达的精细调节。系统发育分析结果表明,LuxR-0394与*P. stutzeri* RCH2等菌株LuxR蛋白的亲缘关系较近,表明其在进化上均来源于假单胞属LuxR家族,可能保留了假单胞菌属的保守生态功能调控特性[22]。

STRING蛋白互作网络结果表明,LuxR-0394(同源蛋白AGA88353.1)可能作为典型双组分信号调控系统的下游响应因子,与上游含有PAS和HAMP结构域的组氨酸激酶(AGA88138.1)协同完成信号感知与转导。此外,LuxR-0394蛋白与Curli结构蛋白的互作关系提示其可能整合多种信号输入,协同调控细菌的信号转导、表面结构装配及群体感应等过程,对环境适应具有潜在意义。

3.2 LuxR-0394蛋白对施氏假单胞菌A1501生物膜形成与运动能力的影响

已有研究表明,LuxR solo在铜绿假单胞菌(*P. aeruginosa*)中可调控抗生素耐药性和生物膜相关基因的表达[23],而在褶鳍假单胞菌(*P. plecoglossicida*) NB2011中则显著影响菌体运动能力与感染能力[22]。本研究发现,*PST*-0394基因缺失虽不影响菌株生长,但生物膜形成能力降低69.14%,运动能力降低87.70%。生物膜形成和运动能力是细菌环境适应的重要表型,其中生物膜形成能力与表面附着、群体协作与抗逆性密切相关,运动能力则涉及鞭毛运动系统和资源探索能力[24-25]。表明LuxR-0394在环境响应、定植与生态适应中具有重要作用。

目前,对LuxR solo的相关研究多局限于基因鉴定或信号识别,而本研究采用结构分析、遗传操作及表型评估等多种策略,综合验证了LuxR-0394在群体感应相关行为中的调控作用。该研究不仅扩展了群体感应系统调控网络的研究范式,也为识别非典型群体感应信号受体的鉴别及其功能解析提供了新思路。

尽管本研究较为全面地揭示了LuxR-0394蛋白的结构特征与调控作用,但仍存在信号分子类型未确定、靶基因调控机制未解析以及缺乏环境条件依赖性评估等不足。未来可通过代谢组学结合LC-MS/MS鉴定潜在信号分子,利用RNA-seq和ChIP-seq明确其全基因组调控网络,并在模拟根际和胁迫条件下验证其生态功能,以全面揭示LuxR-0394的作用机制。

4 结 论

本研究系统解析了施氏假单胞菌A1501中LuxR-0394蛋白的结构特征、潜在信号感知机制及其在群体感应相关行为中的调控作用,发现LuxR-0394蛋白在细菌生物膜形成和运动能力等与环境适应相关的表型中发挥重要作用,并可能通过与双组分系统及表面结构装配相关蛋白的互作影响菌株的生态功能。该研究不仅深化了对LuxR solo在根际细菌中的功能认知,也为优化农业微生物肥料、提升菌株定植效率提供参考。

[参考文献]

[1] LI R, HU W Y, JIA Z J, et al. Soil degradation: a global threat to sustainable use of black soils[J]. Pedosphere, 2025, 35(1):

264-279.

[2] SHEN W S, HU M C, QIAN D, et al. Microbial deterioration and restoration in greenhouse-based intensive vegetable production systems [J]. Plant and Soil, 2021, 463(1): 1-18.

[3] SANOW S, KUANG W Q, SCHAAF G, et al. Molecular mechanisms of *Pseudomonas*-assisted plant nitrogen uptake: opportunities for modern agriculture [J]. Molecular Plant-Microbe Interactions, 2023, 36(9): 536-548.

[4] MEHMOOD N, SAEED M, ZAFARULLAH S, et al. Multifaceted impacts of plant-beneficial *Pseudomonas* spp. in managing various plant diseases and crop yield improvement [J]. ACS Omega, 2023, 8(25): 22296-22315.

[5] TANG R, ZHU J L, FENG L F, et al. Characterization of LuxI/LuxR and their regulation involved in biofilm formation and stress resistance in fish spoilers *Pseudomonas fluorescens* [J]. International Journal of Food Microbiology, 2019, 297: 60-71.

[6] MCCLEAN K H, WINSON M K, FISH L, et al. Quorum sensing and *Chromobacterium violaceum*: exploitation of violacein production and inhibition for the detection of N-acylhomoserine lactones [J]. Microbiology, 1997, 143(12): 3703-3711.

[7] MCGOWAN S, SEBAIHIA M, JONES S, et al. Carbapenem antibiotic production in *Erwinia carotovora* is regulated by CarR, a homologue of the LuxR transcriptional activator [J]. Microbiology, 1995, 141(3): 541-550.

[8] DE LA FUENTE I, MANZANO-MORALES S, SANZ D, et al. Quorum sensing in bacteria: in silico protein analysis, ecophysiology, and reconstruction of their evolutionary history [J]. BMC Genomics, 2024, 25(1): 441.

[9] CAI Y Y, ZHANG X H. The atypical organization of the *luxI/R* family genes in AHL-driven quorum-sensing circuits [J]. Journal of Bacteriology, 2024, 206(2): e00430- e00452.

[10] JEONG Y, MOON S. Evolution of proteobacterial quorum sensing focusing on *LuxI/R*-system and AHL signals [J]. Microbiology, 2025, 94(4): 524-531.

[11] BEZ C, COVACEUSZACH S, BERTANI I, et al. LuxR solos from environmental fluorescent pseudomonads [J]. mSphere, 2021, 6(2): e01322-e01342.

[12] BEZ C, GELLER A M, LEVY A, et al. Cell-cell signaling proteobacterial LuxR solos: a treasure trove of subgroups having different origins, ligands, and ecological roles [J]. mSystems, 2023, 8(2): e01039-e01060.

[13] 林敏，尤崇杓. 水稻根分泌物及其与粪产碱菌的相互作用 [J]. 中国农业科学，1989，22(6)：6-12.
LIN M, YOU C B. Root exudates of rice (*Oryza sativa* L.) and its interaction with *Alcaligenes fa*ecalis [J]. Scientia Agricultura Sinica, 1989, 22(6): 6-12.

[14] HAN Y L, WANG R, YANG Z R, et al. 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase from *Pseudomonas stutzer*i A1501 facilitates the growth of rice in the presence of salt or heavy metals [J]. Journal of Microbiology and Biotechnology, 2015, 25(7): 1119-1128.

[15] ZHAN Y H, DENG Z P, YAN Y L, et al. NfiR, a new regulatory noncoding RNA (ncRNA), is required in concert with the NfiS ncRNA for optimal expression of nitrogenase genes in *Pseudomonas stutzeri* A1501 [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2019, 85(14): e00762-19.

[16] SHANG L G, YAN Y L, ZHAN Y H, et al. A regulatory network involving Rpo, Gac and Rsm for nitrogen-fixing biofilm formation by *Pseudomonas stutzeri* [J]. NPJ Biofilms and Microbiomes, 2021, 7(1): 54.

[17] 尚立国. 施氏假单胞菌固氮生物膜形成的网络调控机制 [D]. 北京：中国农业科学院，2018.
SHANG L G. Regulatory networks underlying nitrogen-fixing biofilm formation in *Pseudomonas stutzeri* A1501 [D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2018.

[18] YAN Y L, YANG J, DOU Y T, et al. Nitrogen fixation island and rhizosphere competence traits in the genome of root-associated *Pseudomonas stutzeri* A1501 [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2008, 105(21): 7564-7569.

[19] LU S N, WANG J Y, CHITSAZ F, et al. CDD/SPARCLE: the conserved domain database in 2020 [J]. Nucleic Acids Research, 2020, 48(D1): D265-D268.

[20] OGASAWARA H, ISHIZUKA T, HOTTA S, et al. Novel regulators of the *csgD* gene encoding the master regulator of biofilm formation in *Escherichia coli* K-12 [J]. Microbiology, 2020, 166(9): 880-890.

[21] BRAMEYER S, HEERMANN R. Specificity of signal-binding *via* non-AHL LuxR-type receptors [J]. PLoS ONE, 2015, 10(4): e0124093.

[22] LI S S, JIA T T, CHI Y, et al. Identification and characterization of LuxR solo homolog PplR in pathogenic *Pseudomonas plecoglossicida* NB2011 [J]. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, 2024, 14: 1458976.

[23] SMITH E, MATTHEWS A, WESTRA E R, et al. Disruption of *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing influences biofilm formation without affecting antibiotic tolerance [J]. Microbiology, 2025, 171(4): 001557.

[24] XU Q, ALI S, AFZAL M, et al. Advancements in bacterial chemotaxis: utilizing the navigational intelligence of bacteria and its practical applications [J]. Science of the Total Environment, 2024, 931: 172967.

[25] SEYMOUR J R, BRUMLEY D R, STOCKER R, et al. Swimming towards each other: the role of chemotaxis in bacterial interactions [J]. Trends in Microbiology, 2024, 32(7): 640-649.

（责任编辑：陈丽）