

一株降解 N-酰基高丝氨酸内酯酵母菌株的分离鉴定及其降解特性

邱 健,贾振华,马 宏,张 霞,宋水山*

(河北省生物研究所 石家庄 050051)

摘 要 利用 N-酰基高丝氨酸内酯(N-acyl-homoserine lactone,简称 AHL)为唯一碳源和能源,筛选得到一株能够降解 AHL 的菌株 R1。常规鉴定和 18S rDNA 序列分析表明,菌株 R1 属于红冬孢酵母菌(*Rhodospiridium toruloides*),定名为 *R. toruloides* R1。结果显示 *R. toruloides* R1 能利用所测试的 3 种 AHL 作为唯一碳源和能源生长,具有降解 AHL 的能力,其对 AHL 依赖型胡萝卜欧文氏软腐病菌(*Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*)的致病有一定的抑制作用。

关键词: 群体感应; N-酰基高丝氨酸内酯; 18S rDNA; 酵母菌; 系统发育

中图分类号: Q939 **文献标识码**: A **文章编号**: 1001-6209(2007)02-0355-04

近些年的研究发现,单个细菌之间存在着信息交流,并且通过这种不同个体甚至不同种群间的信息交流对外界环境变化进行群体性应答。这种细菌与细菌之间的信息交流称为群体感应(Quorum sensing,简称 QS)^[1]。群体感应在协调细菌群体基因同步表达和细菌生物学功能上起着非常重要的作用。具有群体感应的细菌不仅能够向环境中分泌一种特殊的、可以扩散的化学小分子化学物质(也称为信号分子),而且还可以检测环境中的信号分子,并且以细胞密度依赖型的方式对信号分子的积累进行应答。当环境中的信号分子达到一定的浓度阈值时,它与细菌内的特异受体蛋白结合,诱导一系列靶基因的表达,调控相关的生物学功能^[2-4]。N-酰基高丝氨酸内酯(N-acyl-homoserine lactone,AHL)作为革兰氏阴性细菌的主要信号分子,是调控群体感应的关键因子,降解 AHL 能扰乱和阻断群体感应,阻断病原菌的发病机制,提高植物的抗病性。目前国外已报道的含群体感应猝灭酶的菌种已有 10 多种,其中包括 4 个芽孢杆菌(*Bacillus* species)、根癌农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*)、节杆菌(*Arthrobacter* sp.)、肺炎克雷伯氏菌(*Klebsiella pneumoniae*)、铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)和雷尔氏菌(*Ralstonia* sp.)各一个,它们分别来自于植物、土壤、生物膜和实验室的保藏菌种,其中大多数编码 AHL 降解酶的基因已经被克隆并加以研究^[5]。这些结果表明,编码 AHL 内酯酶的基因可能广泛地存在于许多原核生物中。另外 Greenberg 等在动物细胞中检测到某种能降解 AHL 而使之失活的酶^[6]。但并没有酵母菌的相关报道,实验首次发现一株能降解 AHL 的酵母菌,这一结果丰富了群体感应猝灭酶的来源,并为进一步探究其作用机理、酶学特性等提供了基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 主要试剂和材料: 3 种信号分子 N-butanoyl-DL-homoserine lactone(C4-HSL)、N-hexanoyl-DL-homoserine lactone

(C6-HSL)和 N-octanoyl-DL-homoserine lactone(C8-HSL)均购自 Sigma 公司;PCR 用 *Taq* 酶、dNTPs、T-vector、T4DNA 连接酶购自 Promega 公司;PCR 纯化试剂盒和 DNA 凝胶回收试剂盒购自时代天根公司。

1.1.2 菌种和质粒: 大肠杆菌(*Escherichia coli*)DH5 α 、SS10(含有 *aiaA* 信号分子水解酶基因)均由实验室保存,根癌农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*)NTL4(pZLR4),群体感应的报告菌株,含有 *traG::lacZ* 融合基因,以及 *traR* 基因,庆大霉素抗性,用量为 30 μ g/mL,本身不产生 AHLs,外源 AHLs 可诱导 *lacZ* 基因大量表达,水解 X-gal 产生明显的颜色变化(由法国 Yauxxs 教授惠赠)。欧文氏胡萝卜软腐病菌(*Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*)由中国农业科学院植保所赵延昌博士惠赠。

1.1.3 培养基: ①无碳源无机培养基:NaCl 1g,KCl 0.5g,MgCl₂·6H₂O 0.4g,NH₄Cl 0.3g,CaCl₂·2H₂O 0.1g,KH₂PO₄ 0.2g,Na₂SO₄ 0.15g,2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid(MES)1g,蒸馏水定容至 1L,pH5.5,121℃ 20min 灭菌。②麦氏培养基(用于酵母菌培养):葡萄糖 1g,KCl 1.8g,酵母浸膏 2.5g,醋酸钠 8.2g,蒸馏水定容至 1L,113℃ 灭菌 20min。③MM 培养基(用于 AHL 检测):K₂HPO₄ 10.5g,KH₂PO₄ 4.5g,Mg₂SO₄·7H₂O 0.2g,FeSO₄ 5mg,CaCl₂ 10mg,MnCl₂ 2mg,(NH₄)₂SO₄ 2.0g,甘露糖醇 2.0g,蒸馏水定容至 1L,121℃ 灭菌 20min,pH7.0。

1.2 菌种富集、分离纯化

试验土样取江西省庐山松树林土、菠菜地土和河北省石家庄、邢台、沧州等地的耕作土、菜园土、荒土和草土等,共 52 个。分别将土壤样品研磨成细小粉末状,以 3% 的接入量接种于富集培养基中(以 C4-HSL 为唯一碳源和能源),加少许玻璃珠,于 30℃、130r/min 摇床上振荡培养 1 周左右,培养基变浑浊后,再按 1% 的接入量转接到新的富集培养基中培养 1 周左右,如此重复 3~5 次,然后将富集物在琼脂平板上涂布,选择不同形态特征的菌落,重新转接至含有 C4-HSL 的富

基金项目:河北省自然科学基金(303610、C2006000707)

* 通讯作者。Tel:86-311-83999012;E-mail:shuishans@hotmail.com

作者简介:邱 健(1978-),男,河北唐山人,实习研究员,硕士,主要从事微生物学研究。E-mail:jianqiu1128@sina.com

收稿日期:2006-07-10,接受日期:2006-08-16,修回日期:2006-11-23

集培养基中,相同条件下培养以验证是否具有对 AHL 的降解能力。将通过富集筛选得到的菌株分离后,得到的斜面培养基内的菌株接入 LB 培养基中 28℃ 振荡(120r/min)培养 24h 后,用接种环取少量菌株样品接入平板固体培养基,采用平板划线分离法对菌株进行纯化,于 28℃ 培养 24h 后得到的单菌落接入斜面培养基。

1.3 所筛得菌株降解 AHL 能力的进一步验证

对筛选到的菌株进行 AHL 降解能力的进一步验证^[7]。

1.4 菌种的鉴定

1.4.1 形态学观察及生理生化特征:取 18h 培养物,离心弃去上清,1.5%戊二醛固定过夜,锇酸固定半小时,30%、50%、70%、80%、100%乙醇梯度脱水,液氮冷冻干燥,进行电镜观察。常规菌种鉴定参照文献[8]进行。

1.4.2 18S rDNA PCR 扩增和序列分析:采用菌落 PCR 扩增方法,将得到的细胞裂解液做为模板,直接用于 PCR 扩增。用于酵母菌 18S rDNA 扩增的 PCR 反应的引物为一对真菌通用引物^[9],正向引物 NS1:5'-GTAGTCATATGCTTGTGTC-3',反向引物 NS8:5'-TCCGCAGGTTACCTACGGA-3'。PCR 反应条件为 95℃ 4min 95℃ 1min 55℃ 1min 72℃ 1min 30 个循环;72℃ 10min。PCR 产物的检测、回收、连接、转化、阳性克隆参见文献[10]。测序由上海生工生物公司完成。将菌株 R1 的 18S rDNA 序列与 GenBank 核酸序列数据库中的序列进行比对,采用 CLUSTALX 软件进行同源性分析,建系统发育树。

1.5 *R. toruloides* R1 的生长和降解特性

1.5.1 *R. toruloides* R1 的生长曲线测定:分别取菌株 R1 的 20h 培养物,以 10%的接种量接种于 2mL 以 C4-HSL、C6-HSL、C8-HSL 为唯一碳源和能源的培养基中,28℃,120r/min,培养 24h。每 2h 取样 50μL,并用血小板计数法,测定菌体个数^[11]。以培养时间为横轴,菌体个数为纵轴绘制生长曲线。

1.5.2 *R. toruloides* R1 对信号分子的降解特性:①信号分子标准曲线的测定:实验方法见文献[12]。②*R. toruloides* R1 对信号分子降解曲线的测定:取 *R. toruloides* R1 的 20h 培养物,以 10%的接种量接种于 1mL 以终浓度为 500μg/mL 的信号分子 C4-HSL、C6-HSL、C8-HSL 为唯一碳源和能源的培养基中,28℃,120r/min,培养 24h。每小时取样 50μL,离心取上清,分别点样在含终浓度为 40μg/mL X-gal 的 MM 固体条状培养基,用灭菌牙签沾取农杆菌 NTLA(pZLR4)菌液($OD_{600} \approx 0.4$),间隔均匀地接种于上清点样点以下的固体培养基的条带上,28℃培养 15~19h,观察现象。根据蓝斑条长度,对照标准曲线,得到信号分子浓度,以培养时间为横轴,浓度为纵轴,绘制信号分子降解曲线。

1.5.3 *R. toruloides* R1 粗酶液酶活的测定:*R. toruloides* R1 接入 LB 培养基中,于 28℃,120r/min 摇床过夜培养。培养液 4℃ 6000r/min 离心 15min,弃上清,沉淀用 0.9% NaCl 洗一遍,离心,沉淀用液氮冷冻 2~3min 后,加 40mL PBS 裂解液,混匀后 4℃ 静置 30min,然后超声破碎(超声条件:功率 400W,5s,间隔 5s,重复 99 次),然后裂解液低温 10000r/min 离心 30min,弃去沉淀,取出上清过 0.45μm 微孔滤膜,-20℃低温储存备用。粗酶液酶活测定同 1.5.2 中的②。

1.5.4 *R. toruloides* R1 对欧文氏软腐病菌的抑制:将胡萝卜欧文氏软腐病菌以 1%的接种量接种于 20mL LB 液体培养基,30℃ 120r/min 培养至 OD_{600} 值约为 0.8 左右,用灭菌水稀

释 103 倍,再分别与 *R. toruloides* R1 菌液(28℃过夜培养)按 1:1 比例混合,28℃静置 2h 备用。将土豆用自来水洗干净,用 70%乙醇进行表面消毒后,用灭过菌的小刀将土豆切成厚度约 1cm 的土豆块,放置于铺有滤纸的平板上,在土豆的中央挖一个深约 0.1cm 的小坑,分别将 *R. toruloides* R1 与致病菌的混合液接种在土豆小坑中,接种量为 5μL,用移液枪滴加 1mL 的无菌水于滤纸上(使土豆保持一定湿度),放置于培养箱内 30℃培养 28h 后观察土豆的腐烂现象^[13]。

2 结果

2.1 样品的富集培养和菌种分离纯化

取自江西庐山土样经过 4 次富集培养后,得到的混合微生物的培养物,它可以在含 500μg/mL 的 C4-HSL 的合成培养基中生长。上述混合培养物在 C4-HSL 的平板上进行涂布,挑取单菌落,经过复筛、纯化后得到一株能以 C4-HSL 为唯一碳源和能源的酵母菌菌株 R1 和两株细菌(结果未列出)。

2.2 所筛得菌株降解 AHL 能力的进一步验证

进一步验证菌株 R1 的 AHL 降解能力,发现该菌具有降解 AHL 的能力(图 1)。因为在单个细菌之间的群体感应信号分子的浓度从 2~15μmol/L 不等,所以选择信号分子 C4-HSL 终浓度为 15μmol/L。如图 1 所示,经过 4h 混合培养,阳性对照出现 3 个蓝斑,而 *R. toruloides* R1 和阴性对照均无蓝斑出现。说明 *R. toruloides* R1 与信号分子的混合培养液中,信号分子被利用,浓度减小,而且它显示很强的降解代谢能力,它可以将信号分子完全降解。

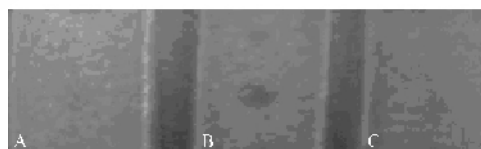


图 1 菌株 R1 对 AHL 降解情况

Fig.1 Degradation of AHL by strain R1. A: Strain R1; B: C4-HSL; C: Strain SS10.

2.3 菌种的鉴定

2.3.1 形态学观察及生理生化特征:观察在麦氏平板固体培养基上培养 24h 的菌株 R1 的菌落,其特征为粉红色,圆形,隆起,不透明,表面光滑,湿润,边缘整齐。菌体大小为 $4.25 \sim 7.37 \mu\text{m} \times 4.46 \sim 7.25 \mu\text{m}$,细胞为圆或椭圆形(图 2),出芽生殖,无假菌丝生成。能利用葡萄糖和蔗糖进行发酵,可以利用蔗糖、棉籽糖、柠檬酸等作为碳源。在无维生素培养基中生长。

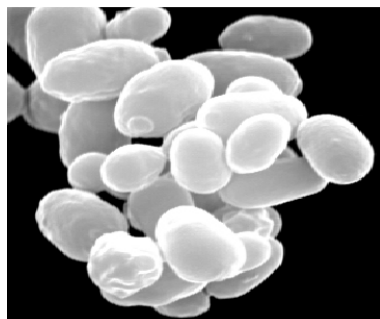


图 2 菌株 R1 的细胞形态(12000×)

Fig.2 The cellular morphology of strain R1(12000×).

2.3.2 18S rDNA PCR 扩增和序列测定、比对、系统发育分析 扩增菌株 R1 的 18S rDNA 基因,长度为 1851bp,在 GenBank 中的登录号为 DQ647614。将菌株 R1 的 18S rDNA 序列与 GenBank 数据库中的序列进行同源性比较,发现菌株 R1 与红冬孢酵母菌属的 18S rDNA 自然类聚。在最相近的 21 个序列中,菌株 R1 与他们的同源性为 98% ~ 99%。从 21 个序列中挑选 10 个菌株的 18S rDNA 序列与菌株 R1 构建的系统发育树如图 3 所示。从图中可以看出菌株 R1 与 *Rhodospiridium toruloides* 聚为一群,表明菌株 R1 与 *Rhodospiridium toruloides* 的亲缘关系最近。

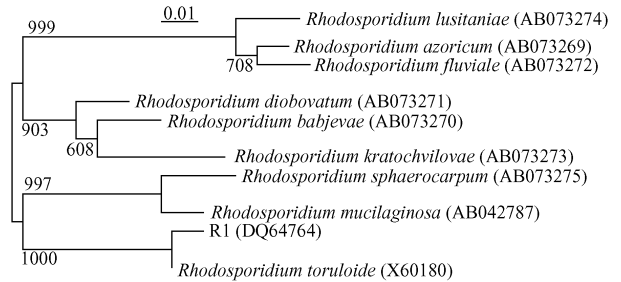


图 3 以 18S rDNA 为基础的酵母菌系统发育树

Fig.3 Phylogenetic tree of isolated R1 and other yeast strains based on 18S rDNA sequences. Numbers in parentheses represent the sequences accession number in GenBank. The number at each branch points is the percentage supported by bootstrap. Bar, 1% sequence divergence.

2.4 *R. toruloides* R1 的生长曲线和信号分子降解曲线

2.4.1 *R. toruloides* R1 的生长曲线和信号分子降解曲线:信号分子 C4-HSL 浓度与蓝斑距离函数为 $Y = 0.6128\ln(X) - 2.1695$ ($R^2 = 0.9887$)。 *R. toruloides* R1 在以 C4-HSL 为唯一碳源和能源的培养基中的生长曲线和信号分子降解曲线绘制如图 4 显示。

R. toruloides R1 能利用 C4-HSL 作为唯一碳源和能源进行生长,随着菌体数的增加,信号分子 C4-HSL 也逐渐的被消耗,在经过 20 多个小时的培养后,菌株生长进入衰亡期,C4-HSL 也停止消耗。另外菌株 R1 也可利用其他信号分子 C6-HSL、C8-HSL 进行生长(图 4-B、图 4-C),说明它的底物谱较宽。

2.4.2 粗酶液酶活的检验:粗酶液与 C8-HSL 等体积混合反应 12h 后,蓝斑实验结果显示(图 5),经过 12h 的催化反应,信号分子 C8-HSL 能完全被 *R. toruloides* R1 的粗酶降解,说

明该菌株中确实存在能降解 N-酰基高丝氨酸内酯的酶。

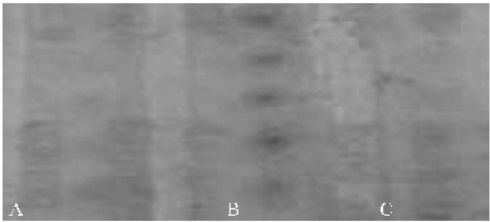


图 5 粗酶液与 C8-HSL 反应后蓝斑实验

Fig.5 Degradation of C8-HSL by the crude cell extracts of strain R1. A: The crude cell extracts of strain R1; B: H₂O; C: The crude cell extract of strain SS10.

2.5 菌株 R1 对欧文氏软腐病菌的抑制

经过 28h 培养后观察土豆的腐烂现象,结果显示(图 6),未接种筛选菌株混合培养的欧文氏胡萝卜软腐病菌,经过一段时间的培养,在土豆表面能引起大面积的组织松软腐烂,而菌株 R1 与欧文氏胡萝卜软腐病菌混合培养后,能较明显的抑制土豆表面的腐烂。上述现象说明,菌株 R1 中存在的某类物质,阻断或者部分阻断了 *E. carotovora* subsp. *carotovora* 个体之间的群体感应,抑制病害的发生。

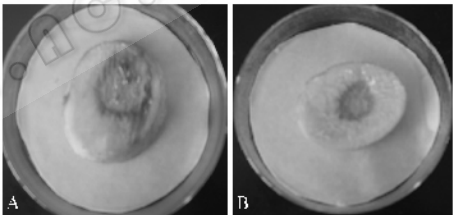


图 6 菌株 R1 在土豆表面对软腐病菌的抑制

Fig.6 Control of soft rot disease by strain R1 on potato. A: 1000 times dilution of the culture broth of *E. carotovora* subsp. *carotovora*; B: Coculture of strain R1 and *E. carotovora* subsp. *carotovora*.

3 讨论

群体感应现象广泛的存在于原核和真核生物中。尽管不同物种中群体感应信号分子的结构不尽相同,但在协调种群内的生物学功能和不同种群间的相互作用中都起到重要作用。真核生物如白色念珠菌、酿酒酵母等产生的金合欢醇

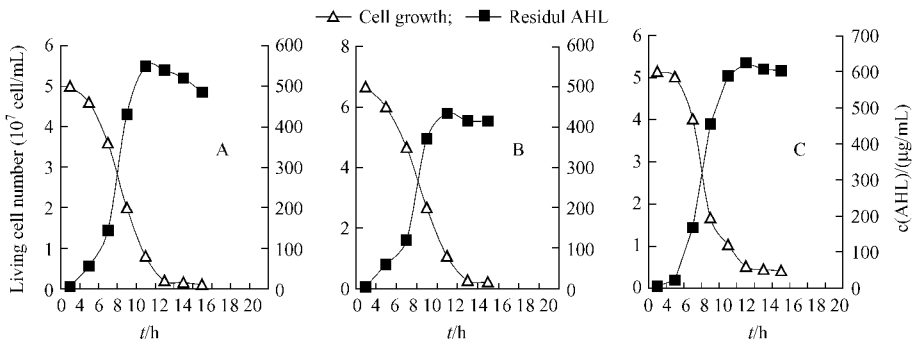


图 4 菌株 R1 在含不同 AHLs 培养基的生长及对不同 AHLs 的降解

Fig.4 Growth and degradation of AHLs for strain R1. Strain R1 was grown in mineral medium containing C4-HSL (A), C6-HSL (B), C8-HSL (C) as sole carbon and energy source, respectively.

和色氨酸等信号分子调控自身从菌丝体到酵母细胞两种形态的转换,也影响着生物膜的形成。在种群间的相互作用中,不同物种可以利用自身的群体感应来抑制对手或在相互竞争中占得先机。比如铜绿假单胞菌和黄单胞菌产生的信号分子可以抑制白色念珠菌菌丝体的发育^[14,15],白色念珠菌产生的金合欢醇可诱导巢曲霉细胞凋亡^[16],说明金合欢醇可能在白色念珠菌与其它真菌的竞争中发挥作用。至今已经报道的真核生物中产生的 AHL 猝灭酶只有 3 种,来自猪肝脏和动物细胞^[17]。这些发现都预示着,当真核宿主不断遭遇病原微生物的侵染时,真核生物会逐渐形成或利用已有的机制破坏细菌群体感应信号系统,抵御病原菌入侵。尽管未比较酵母菌 R1 中猝灭酶的能力和已报道细菌中猝灭酶的能力孰强孰弱,但是在与构建水解酶基因表达载体 SS10 的比较中,*R. toruloides* R1 显示了很强的降解能力。对于该降解能力是否存在于 *R. toruloides* R1 同源性较高的不同种的酵母菌中,将进一步进行研究。尽管在细菌和真菌中都发现了群体感应现象,但是不同种群所利用的信号分子并不相同,可以推测酵母菌在自然环境中与细菌的相互竞争中不仅通过自身的群体感应获得优势,而且通过破坏细菌群体感应信号分子来阻断群体感应的发生。

参 考 文 献

- [1] Miller MB, Bassler BL. Quorum sensing in bacteria. *Annu Rev Microbiol*, 2001, **55**: 165–199.
- [2] Williams P. Quorum sensing: an emerging target for antibacterial chemotherapy? *Expert Opin Ther Targets* 2002, **6**: 257–274.
- [3] 宋水山,贾振华,高振贤,等. 植物伴生细菌数量应答系统的研究进展. *微生物学通报* 2004, **31**(2): 117–120.
- [4] 吴红,宋志军, H øiby N. 细菌与细菌之间的信息交流——革兰氏阴性细菌的 Quorum-Sensing 系统. *自然科学进展*, 2003, **13**(7): 679–687.
- [5] Dong YH, Zhang LH. Quorum sensing and Quorum-Quenching Enzymes. *J Microbiol*, 2005, **43**: 101–109.
- [6] Chun CK, Ozer EA, Greenberg EP, *et al.* Inactivation of a *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing signal by human airway epithelia. *Proc Natl Acad Sci*, 2004, **101**: 3587–3590.
- [7] Flagan S, Ching WK, Leadbetter JR. *Arthrobacter* strain VAI-A utilize acyl-homoserine lactone inactivation products and stimulates quorum signal biodegradation by *Varionorax paradoxus*. *Appl Environ Microbiol*, 2003, **69**: 909–916.
- [8] Barnett JA. 酵母菌的特征与鉴定手册. 胡瑞卿,译. 青岛: 海洋大学出版社, 1991.
- [9] 杭晓敏,杨虹, Come W. 垃圾填埋场中厌氧真菌 18S rDNA 的 PCR 扩增及鉴定. *生物工程学报*, 2001, **17**: 515–519.
- [10] Sambrook J, Russell DW. 分子克隆实验指南. 黄培堂,等译. 第三版. 北京: 科学出版社, 2002.
- [11] 沈萍,范秀容,李光武. 微生物学实验. 第三版. 北京: 高等教育出版社, 2000.
- [12] Dong YH, Xu JL, Li XZ, *et al.* AiiA, an enzyme that inactivates the acylhomoserine lactone quorum-sensing signal and attenuates the virulence of *Erwinia carotovora*. *Proc Natl Acad Sci*, 2000, **97**(7): 3526–3531.
- [13] Lin YH, Xu JL, Hu Y, *et al.* Acyl-homoserine lactone acylase from *Ralstonia* strain XJ12B represents a novel and potent class of quorum-quenching enzymes. *Mol Microbiol*, 2003, **47**(3): 849–860.
- [14] Hogan DA, Vik A, Kolter R. A *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing molecule influences *Candida albicans* morphology. *Mol Microbiol*, 2004, **54**: 1212–1223.
- [15] Inoue Y, Shiraishi A, Hada T, *et al.* The antibacterial effect of terpene alcohols on *Staphylococcus aureus* and their mode of action. *FEMS Microbiol Lett*, 2004, **237**: 325–331.
- [16] Brehm SB, Johnson EA. Sensitization of *Staphylococcus aureus* and *Escheichia coli* to antibiotics by the sesquiterpenoids nerolidol farnesol bisabolol and apritone. *Anti microb Agents Chemother*, 2003, **47**: 3357–3360.
- [17] Xu F, Byun T, Deussen HJ, *et al.* Degradation of N-acylhomoserine lactones, the bacterial quorum-sensing molecules, by acylase. *J Biotechnol*, 2003, **101**: 89–96.

Isolation and identification of *Rhodospiridium toruloides* R1 degrading N-acyl homoserine lactone

QIU Jian, JIA Zhen-hua, MA Hong, ZHANG Xia, SONG Shui-shan*

(Hebei Institute of Biology, Shijiazhuang 050051, China)

Abstract In the present study, a AHL-utilizing strain R1 was isolated and identified as the genus *Rhodospiridium toruloides* R1 by physi-biochemical approaches and 18S rDNA sequence analysis, and this strain was designated as *R. toruloides* R1. Results showed that *R. toruloides* R1 exhibited the ability to utilize and degrade the all N-acyl homoserine lactones tested in this study. Coculture of *R. toruloides* R1 with *Erwinia carotovora* subsp. *Carotovora* effectively inhibit the soft rot disease of potato caused by *E. carotovora*. To the best of our knowledge, this is the first report on AHL-degradation of yeast cells.

Keywords: quorum-sensing; N-acyl-homoserine lactone; 18S rDNA; yeast strain; phylogenetic relationship

Foundation item: Natural Science Foundation of Hebei Province of China (303610; C2006000707)

* Corresponding author. Tel: 86-311-83999012; E-mail: shuishans@hotmail.com

Received: 10 July 2006/ Accepted: 16 August 2006/ Revised: 23 November 2006