

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
55 (9) :1201 – 1207; 4 September 2015
ISSN 0001 – 6209; CN 11 – 1995/Q
<http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>
doi:10.13343/j.cnki.wsxb.20140592

迟缓爱德华菌 *luxS* 基因在不同生长时期表达水平的差异

王敏¹, 李宁求², 闫茂仓³, 常维山¹, 郝金婷¹, 庞晓茹¹, 王雪鹏^{1*}

¹ 山东农业大学动物科技学院, 山东 泰安 271018

² 农业部渔用药物创制重点实验室, 广东 广州 510380

³ 浙江省近岸水域生物资源开发与保护重点实验室, 浙江 温州 325005

摘要:【目的】探索迟缓爱德华菌 LuxS/AI-2 型密度感应系统关键基因 *luxS* 的分布及在不同生长时期的表达特征和生物功能。【方法】克隆迟缓爱德华菌 *luxS* 基因, 利用生物信息学工具和网络数据库分析该基因序列的特征及编码蛋白的基本特征和保守结构; 原核表达 LuxS 蛋白, 纯化后制备抗 LuxS 的抗体, 运用 Western-blot 技术分析 LuxS 在不同毒力、不同来源迟缓爱德华菌中的分布情况及在不同生长时期的表达水平; 利用抗体中和方法, 分析抗 LuxS 抗体对迟缓爱德华菌生长的影响, 探索 LuxS 是否为信号分子 AI-2 的特异依赖模式。【结果】克隆到迟缓爱德华菌 *luxS* 基因, 长度为 516 bp, 序列分析结果表明, 该基因在迟缓爱德华菌属中高度保守; 对多株迟缓爱德华菌 LuxS 蛋白的检测结果表明, 该基因在该菌属中普遍存在; 对不同生长时期 LuxS 蛋白的检测结果表明, LuxS 蛋白的表达量在迟缓期较低, 进入对数生长期逐渐增加, 在对数生长后期最大, 稳定后期逐渐减少; 抗体中和生长试验结果表明, 1% 抗血清 (效价 1:40000) 能延长迟缓爱德华菌生长的平台期, 但对细菌生长无显著影响。【结论】LuxS/AI-2 介导的密度感应系统在迟缓爱德华菌中普遍存在; 关键基因 *luxS* 的序列高度保守, 在不同生长时期表达量不一致, 在对数生长后期达到峰值。

关键词: 迟缓爱德华菌, LuxS/AI-2 密度感应系统, LuxS 蛋白

中图分类号: Q933 **文章编号:** 0001-6209 (2015) 09-1201-07

迟缓爱德华菌 (*Edwardsiella tarda*, *E. t*) 属肠杆菌科的爱德华菌属, 有鞭毛、能运动, 无荚膜, 革兰氏阴性, 兼性厌氧杆菌。该菌是水产动物的重要致病菌, 可感染鳗鲡、牙鲆、罗非鱼、黄颡鱼等二十多种鱼类, 给水产养殖业造成严重经济损失^[1-2]。另外, 还可以感染两栖类、爬行类、鸟类, 也是一种人、鱼共患病原菌, 引起人的胃肠炎、溃疡、败血症等, 直接威胁人类健康, 因此对该菌的研究引起了人们的广泛重视^[3-4]。

群体感应 (Quorum sensing, QS) 首次由 Fuqua^[5] 等提出, 用来描述细菌细胞特定形式的分子通讯, 即细菌产生信号分子并释放到环境中去, 当环境中的信号分子达到一定浓度后诱导细胞密度以依赖的特定基因的表达。QS 系统可以调控细菌的生长特性及多种生理生化功能, 如生物发光^[6]、成群浮游现象、质粒转移^[7] 和生物被膜^[8-9] 的形成等; 通过对信号合成酶突变体的研究发现, QS 系统也可调控病原菌的毒性因子, 如胞外多糖、降解酶、抗生素、含铁细胞、色素以

基金项目: 山东省现代农业产业技术体系贝类创新团队项目 (SDAIT-49); 国家自然科学基金 (31402325); 农业部渔用药物创制重点实验室开放基金 (201302)

* 通信作者。Tel: +86-538-8242593-8107; Fax: +86-538-8241419; E-mail: xpwang@sdau.edu.cn

作者简介: 王敏 (1989-), 女, 山东济宁人, 硕士研究生, 主要从事动物病原分子生物学方面的研究。E-mail: yiren12689@163.com

收稿日期: 2014-12-14; **修回日期:** 2015-01-20

及分泌蛋白等^[10]。因此, QS 系统在病原致病过程中的作用及机制成为研究热点, 尤其是对 LuxS/AI-2 型密度感应系统的研究, 即由 S-核糖基高半胱氨酸酶 (S-ribosylhomocysteinase, LuxS) 参与合成的 AI-2 型信号分子介导的种间群体感应。Bassle 等在 1999 年证实 LuxS 是产生 AI-2 分子所必需的, 在许多革兰氏阴性和阳性菌中都存在高度保守的 LuxS 类似物^[11]。LuxS 参与 S-腺苷甲硫氨酸 (S-adenosylmethionine, SAM) 的再循环, 以 SAM 为底物, 至少经过三步酶促反应而产生 AI-2^[12]。SAM 作为 DNA、RNA 和蛋白质的甲基供体, 在甲基转移酶的作用下生成 S-腺苷 L 高半胱氨酸 [S-(5'-adenosyl)-L-homocysteine, SAH], 是一种有毒的代谢中间产物, 随后在 S-腺苷高半胱氨酸核苷酶 (S-adenosylhomocysteine nucleosidase, Pfs) 的催化下产生腺嘌呤和 S-核苷高半胱氨酸 (S-ribosylhomocysteine, SRH), LuxS 催化 SRH 生成高半胱氨酸和 4,5-二羟基-2,3-戊二酮 (DPD), 高半胱氨酸经过至少三步反应再生成 SAH, 进入下一轮循环。DPD 脱水环化后生成自诱导物 2 (AI-2), AI-2 其实是一类信号分子的总称, 它们均由共同的前体 DPD 转变而来^[12]。同时, LuxS 本身也是活性甲基循环 (Activated methyl cycle, AMC) 的固有组分, 另外, LuxS 除了参与群体感应以外, 还参与细胞生长和毒素调节^[13]。通过干扰 QS 系统, 不仅可以抑制细菌毒力因子的表达, 而且在降低细菌致病力的同时又不使细菌产生耐药性^[14]。近年来, 人们对基于 LuxS 的 QS 系统进行了广泛地研究, 发现 LuxS 的功能更加复杂多样。

目前, 有关 luxS 基因表达调节的研究目前还不够深入, 由于 sRNAs 的功能还未得到充分阐明, 因此研究 luxS 基因表达调节应该在转录或翻译后修饰水平充分揭示该基因的表达调控机制^[12]。本研究通过对 LuxS 蛋白的原核表达, 利用 Western 技术对迟缓爱德华菌不同生长时期 LuxS 蛋白的表达水平进行了检测, 在蛋白水平揭示其随细菌生长的产生规律, 为深入研究上述领域奠定基础。

1 材料和方法

1.1 试验试剂、菌种

琼脂糖、酵母粉、胰蛋白胨、胰蛋白胨大豆肉汤 (TSB)、细菌基因组提取试剂盒、琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒购自上海生工生物技术公司; Taq 酶、

dNTP、DNA Marker、T₄ 连接酶、Trans-T1、PET28a 购自北京全式金有限公司; 限制性内切酶 BamH I 和 Hind III 购自美国 NEB 公司; PMD-18T 载体购自大连宝生物工程 (TaKaRa) 有限公司; 引物由上海生工生物技术公司合成; TMB 显色液购自北京索莱宝科技有限公司; HRP-DAB 显色试剂盒购自天根生化科技有限公司; HRP 标记的山羊抗兔 IgG 及 BCA 蛋白定量试剂盒购自武汉博士德生物工程有限公司; HisTrap™ HP 亲和层析柱购自 GE Healthcare 公司; PCR 扩增仪 (Bio-Rad); 电泳仪 (Bio-Rad); 凝胶成像系统 (Bio-Rad); 生化摇床 (重庆市永生实验仪器厂); 酶标仪 (Bio-tekELx800 USA)。

本实验室保存菌株迟缓爱德华菌 CD 株 (*E. t* CD^[15]) 为强毒株, 分离自真鲷; 迟缓爱德华菌 TANX 株 (*E. t* TANX) 为野生弱毒株, 分离自鲶鱼; 迟缓爱德华菌 X2 株 (*E. t* X2^[16]) 为鸭源分离株; 迟缓爱德华菌 89602 株 (*E. t* 89602^[15-16]) 为人源分离株; 迟缓爱德华菌 QD 株 (*E. t* QD^[15-16]) 分离自牙鲆。大肠杆菌表达菌株 *E. coli* BL21 (DE3) 购自北京全式金有限公司。

1.2 *E. t* CD luxS 基因的克隆及分析

根据 NCBI 上公布的 *E. t* 不同分离株的 LuxS 基因序列保守区设计了一对 PCR 引物, 上游引物 L1: 5'-AATGTAGGCTGGAGCTGCTTC-3', 下游引物 L2: 5'-CCATATGAATATCCTCCTTAG-3', 目的片段 516 bp, 送上海生工生物技术公司测序, 分析不同分离株的同源性。

1.3 LuxS 蛋白的表达和鉴定

上游引物 L3: 5'-GCGGATCCATGCCGTTACTGGATAGCTTCACTG-3' (引入了 BamH I 酶切位点); 下游引物 L4: 5'-GCAAGCTTCTAGGGGTGCAGACGGGCCAGTTGG-3' (引入了 Hind III 酶切位点), 以 *E. t* CD 基因组为模板, PCR 扩增目的片段, 构建重组质粒 PET28a-luxS, 测序鉴定正确后转化 *E. coli* BL21 (DE3), 鉴定正确后保存备用。以 1:100 的比例接种于新鲜的 LB 培养基中, 37 °C 振荡培养至 OD₆₀₀ 达到 0.6-0.8, 加 IPTG 诱导表达。最佳诱导条件下采用 HisTrap TMHP (GE Healthcare) 亲和层析柱纯化重组蛋白, BCA 蛋白定量试剂盒测定蛋白浓度。

将纯化的重组蛋白皮下多点注射免疫 6 周龄新西兰兔, 剂量为 0.5 mg/只, 每隔 2 周免疫 1 次, 共免

疫 3 次。末次加强免疫 1 周后心脏采血，分离血清保存备用。以纯化的重组蛋白为抗原，一抗为制备的上述兔抗血清，二抗为 HRP 标记的山羊抗兔 IgG，ELISA 法测定效价，Western-blot 分析兔抗血清的免疫原性^[17]。

1.4 *E. t* CD 不同生长时期 LuxS 蛋白检测

将 *E. t* CD 按 1:100 接种于 TSB 中，220 r/min、28 ℃ 培养。接种后 1、3、5、5、13、19、25、28、31、36、40、45 h 取样，PBS 洗 3 次，调至 OD_{600} 为 1，取 100 μL 菌液与上样 Buffer 等量混匀，加热煮沸 15 – 20 min，制备的上述兔抗血清为一抗，HRP 标记的山羊抗兔 IgG 为二抗 Western-blot 进行免疫印迹检测。

1.5 不同 *E. t* 分离株的 LuxS 蛋白检测

将分离的其它 4 株 *E. t* (*E. t* TANX、*E. t* QD、*E. t* 89602、*E. t* X2) 按 1:100 接种于 TSB 中，28 ℃、220 r/min，培养 25 h 取样，PBS 洗 3 次，调至 OD_{600} 为 1，取 100 μL 菌液与上清样 Buffer 等量混匀，加热煮沸 15 – 20 min，制备的上述兔抗血清为一抗，HRP 标记的山羊抗兔 IgG 为二抗 Western-blot 进行免疫印迹检测。

1.6 兔抗 LuxS 血清对迟缓爱德华菌生长的影响

将 *E. t* CD 按 1:100 接种于 TSB 中，平均分成 3 管，分别加入 0.5%，1.0%，2.0% 的兔抗 LuxS 血清，于 28 ℃、220 r/min 培养，每隔 3 h 取样测定波长 600 nm 的吸光值 (OD_{600})。

2 结果

2.1 *luxS* 基因的克隆及同源性分析

用引物 L1/L2 对 *E. t* CD 进行 PCR 扩增，测序结果表明，该基因含有一个 516 bp 的开放阅读框 (ORF)，编码 171 个氨基酸，预测分子量约 19.00 kDa，PI 为 5.993。对 *E. t* CD 的 *luxS* 基因与 NCBI 已登录的迟缓爱德华菌异源株 DNA 序列进行同源性比较 (表 1)，结果显示 *E. t* CD 的 *luxS* 基因序列与 *E. t* 080813 株的同源性为 99.8%，与鲶鱼爱德华菌、鲨鱼爱德华菌的同源性也都在 95% 以上；氨基酸序列分析结果显示，*E. t* CD 株的 LuxS 与 NCBI 上登录的 *E. t* 080813 株的同源性为 100%，与鲶鱼爱德华菌、杀鱼爱德华菌的同源性均在 94.8% 以上。

表 1. *E. t* CD LuxS 同源性比较
Table 1. *E. t* CD LuxS homology comparison

Description	GenBank number	Gene homology / %	Protein homology / %
<i>Edwardsiella tarda</i> 080813	CP006664	99.8	100
<i>Edwardsiella tarda</i> EIB210	FJ968732	95.2	96.5
<i>Edwardsiella tarda</i> FL6-60	CP002154	95.2	96.5
<i>Edwardsiella tarda</i> strain TX1	EU070919	95.2	96.5
<i>Edwardsiella ictaluri</i> 93-146	CP001600	95.3	95.9
<i>Edwardsiella ictaluri</i> J901	JQ272177	95.0	94.8
<i>Edwardsiella piscicida</i> C07-087	CP004141	95.0	96.5

2.2 LuxS 蛋白的表达和鉴定

SDS-PAGE 凝胶电泳显示，IPTG 诱导后，重组质粒 pET28a-luxS 在 22 kDa 的位置出现一条着色较深的条带，与预期表达产物大小相符。重组表达的蛋白经 HisTrap™ HP 亲和层析柱纯化，得到高纯度的 LuxS 重组蛋白 (图 1-A)，用 BCA 法进行蛋白定量，浓度为 1.5 μg/μL。ELISA 检测结果显示，所制备的兔抗 LuxS 血清的抗体效价在 1:40000 以上。用此血清对纯化的重组蛋白进行 Western-blot 检测，结果在 SDS-PAGE 相同位置 (22 kDa) 出现特异反应 (图 1-B)。

2.3 不同生长时期 *E. t* CD 的 LuxS 蛋白的表达检测

根据 *E. t* CD 的生长曲线，选取不同生长点进行 Western-blot 检测，结果显示，发现 LuxS 蛋白在迟缓期 (接种后培养前 5 h) 表达量最低，检测不到蛋白存在；进入对数生长期 (培养 6 – 21 h) 开始增加，可以检测到少量蛋白；在对数后期 (培养 22 – 25 h) 表达量达到最大，可检测到明显蛋白印迹；稳定后期 (培养 26 – 31 h) 依然存在，仍有蛋白印迹；衰退期 (培养 32 h 后) 未检测到 LuxS 蛋白 (图 2)。

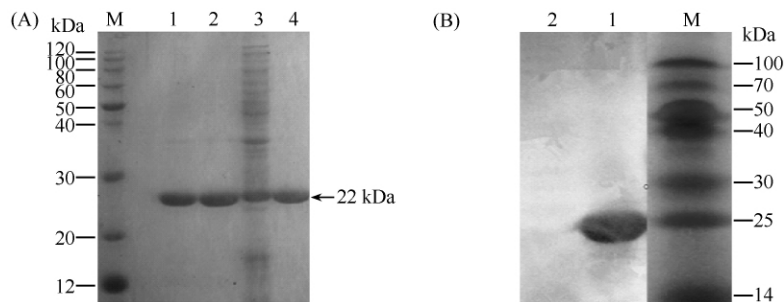


图 1. 重组蛋白 LuxS 纯化及鉴定

Figure 1. The purification and identification of LuxS protein. A: M, Marker; lane 1: 200 mmol/L imidazole purified expression product of LuxS; lane 2: 400 mmol/L imidazole purified expression product of LuxS; lane 3: the recombination protein of LuxS; lane 4: 500 mmol/L imidazole purified expression product of LuxS. B: M, Marker; lane 1: the recombination protein of LuxS; lane 2: negative control.

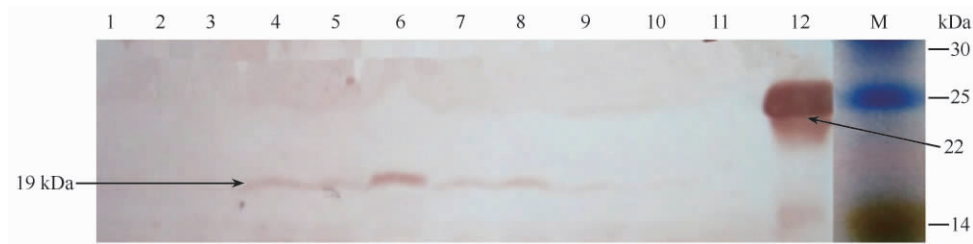


图 2. Western 检测 *E. t* CD 不同培养时期 LuxS 蛋白的表达量

Figure 2. Western detection *E. t* CD LuxS protein expression of different training period. M: Marker; lane1: Culture of *E. t* CD in 1 h; lane 2: Culture of *E. t* CD in 3.5 h; lane 3: Culture of *E. t* CD in 5 h; lane 4: Culture of *E. t* CD in 13 h; lane 5: Culture of *E. t* CD in 19 h; lane 6: Culture of *E. t* CD in 25 h; lane 7: Culture of *E. t* CD in 28 h; lane 8: Culture of *E. t* CD in 31 h; lane 9: Culture of *E. t* CD in 36 h; lane 10: Culture of *E. t* CD in 40 h; lane 11: Culture of *E. t* CD in 45 h; lane 12: recombination protein of LuxS. LuxS protein reached the highest level after cultured 25 h.

2.4 不同 *E. t* 分离株 LuxS 蛋白的检测

对其它 4 株 *E. t* (*E. t* TANX、*E. t* QD、*E. t* 89602、*E. t* X2) 的 LuxS 蛋白检测结果显示,均检测到 LuxS 蛋白的表达,天然 LuxS 蛋白为 19 kDa,重组蛋白为 22 kDa (图 3)。

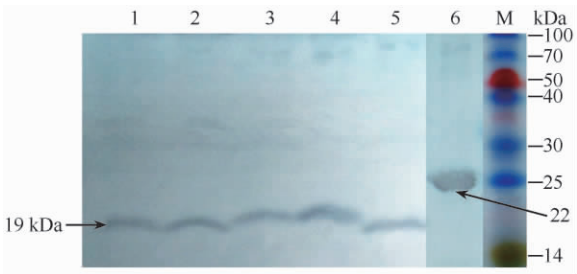


图 3. 免疫印迹检测 LuxS 蛋白在迟缓爱德华菌不同分离株中的存在

Figure 3. Western blot test LuxS protein in *E. t* from different isolates. M: Marker; lane 1: *E. t* CD; lane 2: *E. t* 89602; lane 3: *E. t* QD; lane 4: *E. t* TANX; lane 5: *E. t* X2; lane 6: the recombination protein of LuxS.

2.5 兔抗 LuxS 血清对迟缓爱德华菌生长的影响

通过对不同终浓度 (0.5% 1.0% 2.0% 效价为 1:40000) 的兔抗 PET28a-LuxS 血清对 *E. t* CD 的生长曲线检测,发现终浓度为 1% 以上 (1%, 2%) 的兔抗 LuxS 血清能显著延长 *E. t* CD 的生长平台期,推后衰退期 (图 4)。

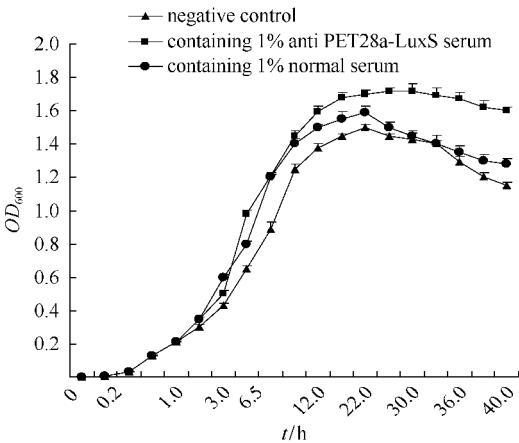


图 4. 兔抗 LuxS 血清对 *E. t* CD 生长的影响

Figure 4. Effect of rabbit anti LuxS serum on the growth of *E. t* CD.

3 讨论

至今已发现 50 多种革兰氏阴性和阳性菌^[18] 都存在 *luxS* 基因, 而且该基因的同源性很高, 分泌的 AI-2 信号分子结构相似, 从而使其成为种间信息交流的通用信号分子^[19]。Morohoshi T 等研究发现, 迟缓爱德华菌中存在 LuxI/R 介导的种内信息交流系统, 并认为迟缓爱德华菌的 AHL 可能参与调控毒力因子的表达^[20]。张敏等发现迟缓爱德华菌产生胞外 AI-2 信号分子, 证实迟缓爱德华菌存在 LuxS/AI-2 型密度感应系统。我们检测了其它不同毒力、不同来源迟缓爱德华菌分离株的 LuxS 蛋白, 均能检测到 LuxS 蛋白的表达, 证实 LuxS/AI-2 型密度感应系统在迟缓爱德华菌中普遍存在。通过克隆 *E. t* CD 的 *luxS* 基因, 发现 *luxS* 基因与其它已知迟缓爱德华菌的同源性高达 95% 以上, 高度保守。通过与其它多种细菌的同源比对, 发现 LuxS 蛋白含有共有的保守区域 His-Xaa-Glu-His^[21] 以及络氨酸激酶磷酸化位点 [Lys/Arg]-Xaa2-3-[Asp/Glu]-Xaa2-3-Tyr^[22]。

LuxS 蛋白对 AI-2 的合成起重要的催化作用, 可以体外合成信号分子 AI-2。韩先干等克隆了猪链球菌的 *luxS* 基因和 *Pfs* 基因, 并成功表达了 LuxS 蛋白和 *Pfs* 蛋白, 催化 SAH 产生高活性的 AI-2 分子^[23]。其实 AI-2 是一类信号分子的总称, 它们均由共同的前体 DPD 转变而来。自从发现 LuxS 蛋白与 AI-2 之间的关系后, 人们研究 LuxS 的表达往往通过检测胞外 AI-2 的水平来间接证实影响 LuxS 表达。Neil Doherty 等发现金黄色葡萄球菌的 AI-2 水平在指数期达到峰值, 进入稳定期后 2 h 会降低到峰值的 60%^[24]。张敏等研究发现, *E. t* 的 AI-2 也是在对数生长期达到高峰^[14]。然而研究表明, 细菌生长过程中的 LuxS 表达与培养物上清中 AI-2 的积累并不一致^[12], 因此, 最理性的方法应该是直接检测 LuxS 蛋白的表达量。我们通过制备抗 LuxS 蛋白的特异抗血清, 检测了不同生长时期 *E. t* 的 LuxS 蛋白表达情况, 发现 LuxS 蛋白在迟缓期表达量最低, 进入对数生长期后开始增加, 在对数后期表达量达到最大, 稳定后期依然存在, 衰退期后检测不到 LuxS 蛋白。细菌胞外 AI-2 的活性在对数生长期的中后期最高, 进入稳定期则明显下降^[12]。而 LuxS 蛋白直到稳定期的后期依然存在, 此时胞外 AI-2 的水平

已经急剧下降, 分析原因很可能是由于其底物 SRH 大量缺乏, 导致 LuxS 并不能发挥催化作用生成 AI-2^[12]。

LuxS 蛋白体外催化反应, 可以产生多种副产物, 有些同样具有信号分子的作用; 研究发现在 DPD 自发环化所形成的呋喃酮类衍生物中, 4-羟基-5-甲基-3 [2H]-呋喃酮 (MHF) 具有诱导哈氏弧菌生物发光能力的功能^[12]。MHF 在体内可由 D-5-磷酸核酮糖 (Ru1-5-P) 转变而来, 这种由 Ru1-5-P 向 MHF 的自发转变为 AI-2 的产生提供了一种 LuxS 非依赖的模式, 这一模式很可能是体内 AI-2 产生的另一条替代途径^[25]。大肠杆菌 LuxS 突变菌株培养在富含葡萄糖的介质中仍然能检测到 AI-2 样的活性, 则进一步支持了这个观点。我们通过在迟缓爱德华菌培养基中加入抗 LuxS 蛋白抗体中和 LuxS 的活性, 发现加入抗 LuxS 血清能够导致 *E. t* 的平台期延长, 衰退期推后, 但是生长曲线整体趋势并未产生很大变化, 迟缓爱德华菌 AI-2 的产生是否具有替代途径还需进一步研究。

本研究通过 Western 技术对不同生长时期 LuxS 蛋白的检测, 发现 LuxS 蛋白随迟缓爱德华菌生长的表达产生规律, 为转录或翻译后水平揭示该基因的表达调控机制, 深入研究该蛋白在细菌生长、生物膜的形成及毒力领域的作用机制, 阐明信息交流细菌与细菌之间、细菌与宿主之间的本质^[12] 奠定基础。在细菌感染机体过程中 LuxS 蛋白在病原菌与机体相互作用中有重要作用, 大肠杆菌 *luxS* 基因缺失株的生物被膜形成能力降低, 却能增加大肠杆菌 K12 鞭毛的泳动力^[26], 胸膜肺炎放线杆菌 LuxS 在生物膜形成, 附着力及铁代谢有重要作用^[27]; 在蛋白水平深入研究 LuxS 蛋白在上述领域的作用机制, 不仅为迟缓爱德华菌感染的预防奠定理论基础, 而且为开发新型信号传导型抗菌药物提供可能。

参考文献

- [1] Cheng S, Hu YH, Zhang M, Sun L. Analysis of the vaccine potential of a natural a virulent *Edwardsiella tarda* isolate. *Vaccine*, 2014, 28 (15): 2716-2721.
- [2] Xu TT, Zhang XH. *Edwardsiella tarda*: an intriguing problem in aquaculture. *Aquaculture*, 2014, 431: 129-135.
- [3] Liu XH, Chang XY, Wu HZ, Xiao JF, Gao Y, Zhang YX. Role of intestinal inflammation in predisposition of

- Edwardsiella tarda* infection in zebrafish. *Fish & Shellfish Immunology*, 2014, 41 (2) : 271-278.
- [4] Jong EY, Young Y, Kyoung HC, Jaeho C, Inseok K, Ho YK. Identification of antigenic *Edwardsiella tarda* surface proteins and their role in pathogenesis. *Fish & Shellfish Immunology*, 2013, 34 (2) : 673-682.
- [5] Fuqua C, Winans SC, Greenberg EP. Census and consensus in bacterial ecosystems: the LuxR-LuxI family of quorum-sensing transcriptional regulators. *Annual Review of Microbiology*, 1996, 50: 727-751.
- [6] Davies DG, Parsek MR, Pearson JP, Iglewski BH, Costerton JW, Greenberg EP. The involvement of cell-to-cell signals in the development of bacterial biofilm. *Science*, 1998, 280: 295-298.
- [7] Engebrecht J, Neilson K, Silverman M. Bacterial bioluminescence: isolation and genetic analysis of functions from *Vibrio fischeri*. *Cell Press*, 1983, 32: 773-781.
- [8] Engebrecht J, Silverman M. Identification of genes and gene products necessary for bacterial bioluminescence. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1984, 81: 4154-4158.
- [9] Wang Y, Zhang W, Wu ZF, Zhu XL, Lu CP. Functional analysis of LuxS in *Streptococcus suis* reveals a key role in biofilm formation and virulence. *Veterinary Microbiology*, 2011, 152 (1/2) : 151-160.
- [10] Marouni MJ, Sela S. The *luxS* gene of *Streptococcus pyogenes* regulates expression of genes that affect internalization by epithelial cells. *Infection and Immunity*, 2003, 71 (10) : 5633-5639.
- [11] Bassler BL, Wright M, Silverman MR. Multiple signaling systems controlling expression of luminescence in *Vibrio harveyi*: sequence and function of genes encoding a second sensory pathway. *Molecular Microbiology*, 1994, 13 (2) : 273-286.
- [12] Chen W. Current status on function of bacterial LuxS in quorum sensing system-A. *Chinese Journal of Veterinary Science*. 2011, 31 (7) : 1083-1087. (in Chinese)
陈伟. 细菌 QS 系统 LuxS 功能研究进展. 中国兽医学报. 2011, 31 (7) : 1083-1087.
- [13] Walters M, Sperandio V. Quorum sensing in *Escherichia coli* and *Salmonella*. *International Journal Medical Microbiology*, 2006, 296 (2/3) : 125-131.
- [14] Zhang M, Sun K, Sun L. Regulation of autoinducer 2 production and LuxS expression in a pathogenic *Edwardsiella tarda* strain. *Microbiology*, 2008, 154 (7) : 2060-2069.
- [15] Wang XP, Lu CP. Mice orally vaccinated with *Edwardsiella tarda* ghosts are significantly protected against infection. *Vaccine*, 2009, 27 (10) : 1571-1578.
- [16] Wang XP, Yan MC, Wang QS. Identification of *Edwardsiella tarda* isolated from duck and virulence genes detection. *African Journal of Marine Science*, 2012, 6 (23) : 4970-4975.
- [17] Cui N, Su S, Li JQ, Zhao P, Li YP, Ding JB, Cui ZZ. Preparation and identification of polyclonal antibody to serotype I Marker's disease virus *sorf 2* protein. *Acta Microbiologica Sinica*, 2013, 53 (3) : 284-292. (in Chinese)
崔宁, 苏帅, 李久庆, 赵鹏, 李延鹏, 丁家波, 崔治中. 抗 I 型马立克氏病毒 *sorf2* 蛋白的多克隆抗体制备及其特异性鉴定. 微生物学报, 2013, 53 (3) : 284-292.
- [18] Federle MJ, Bassler BL. Interspecies communication in bacteria. *Journal of Clinical Investigation*, 2003, 112 (9) : 1291-1299.
- [19] Schauder S, Bassler BL. The languages of bacteria. *Genes & Development*, 2001, 15 (12) : 1468-1480.
- [20] Morohoshi T, Inaba T, Kato N, Kanai K, Ikeda T. Identification of quorum-sensing signal molecules and the LuxRI homologs in fish pathogen *Edwardsiella tarda*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2004, 98 (4) : 274-281.
- [21] De Keersmaecker SC, Sonck K, Vanderleyden J. Let LuxS speak up in AI-2 signaling. *Trends in Microbiology*, 2006, 14 (3) : 114-119.
- [22] Cozzzone AJ. Protein phosphorylation on tyrosine in bacteria. *Archives of Microbiology*, 2004, 181: 171-181.
- [23] Han XG, Bai H, Liu L, Chen WJ, Ding C, Hu QH, Qi KZ, Yu SQ. Cloning and expression of *luxS* and *pfs* and *in vitro* biosynthesis autoinducer 2 of avian pathogenic *Escherichia coli* from Anhui Province. *Acta Microbiologica Sinica*, 2012, 52 (9) : 1167-1172. (in Chinese)
韩先干, 白灏, 刘蕾, 陈文静, 丁铲, 胡青海, 祁克宗, 于圣青. 禽致病性大肠杆菌安徽分离株 *luxS* 和 *pfs* 基因的克隆、表达与细菌外合成 AI-2 活性检测. 微生物学报, 2012, 52 (9) : 1167-1172.
- [24] Doherty N, Holden MTG, Qazi SN, Williams P, Winzer K. Functional analysis of *luxS* in *Staphylococcus aureus* reveals a role in metabolism but not quorum sensing. *Journal of Bacteriology*, 2006, 188 (8) : 2885-2897.
- [25] Tavender TJ, Halliday NM, Hardie KR, Winzer K. LuxS-independent formation of AI-2 from ribulose-5-

- phosphste. British Medical Council Microbiolgy*, 2008, (8) : 98.
- [26] Ling H, Kang A, Tan MH, Qi XB, Chang MW. The absence of the *luxS* gene increases swimming motility and flagella synthesis in *Escherichia coli* K12. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2010, 401 (4) : 521-526.
- [27] Li L, Xu ZF, Zhou Y, Li TT, Sun LL, Chen HC, Zhou R. Analysis on *Actinobacillus pleuropneumoniae* LuxS regulated genes reveals pleiotropic roles of LuxS/AI-2 on biofilm formation, adhesion ability and iron metabolism. *Microbial Pathogenesis*, 2011, 50 (6) : 293-302.

Expression of *Edwardsiella tarda luxS* gene at different growth stage

Min Wang¹, Ningqiu Li², Maocang Yan³, Weishan Chang¹, Jinting Hao¹, Xiaoru Pang¹, Xuepeng Wang^{1*}

¹College of Science and Veterinary Medicine, Shandong Agricultural University, Tai'an 271018, Shandong Province, China

²Key Laboratory of Fishery Drug Development, Ministry of Agriculture, Guangzhou 510380, Guangdong Province, China

³Zhejiang Key Laboratory of Exploitation and Preservation of Coastal Bio-Resource, Wenzhou 325005, Zhejiang Province, China

Abstract: [Objective] Purpose of this work was to explore the distribution of LuxS/AI-2 quorum sensing system in *Edwardsiella*, and analyze expression characteristics and biological function of the key gene *luxS* accompanying the growth of *Edwardsiella*. [Methods] The full-length of AI-2/LuxS of *Edwardsiella tarda* was cloned by PCR based on the sequence on NCBI, then characteristics and conservative structure of this protein-coding gene were analyzed using web database and bioinformatics tools. The anti-rabbits serum was prepared after this protein was purified through prokaryotic expression. The expression level of *luxS* gene was analyzed during different growth stages using Western blot and further the distribution of *luxS* gene in *Edwardsiella tarda* was studied by this technique. To explore whether the specific LuxS is AI-2 dependent we used the method of antibody neutralization to analyze the effect of the anti-rabbits serum on the growth of *Edwardsiella tarda*. [Results] The *luxS* gene was obtained by PCR, its length was 516 bp, and the sequence was highly conserved in *Edwardsiella tarda*. Results of Western blot analysis showed that LuxS expression level was the lowest in the lag phase and began increasing when entered index phase. It reached the peak in the late index phase and decreased in decline phase. Moreover, Antibody neutralization results showed that, it can elongate the growth plateau phase, but it has no significant effect on bacterial growth. [Conclusion] The key gene of *luxS* was highly conserved, and LuxS/AI-2 was widely distributed among *Edwardsiella tarda*. The expression level of *luxS* gene was different during every growth period, expression of LuxS protein reached the highest level in the late index phase.

Keywords: *Edwardsiella tarda*, LuxS/AI-2 quorum sensing system, LuxS protein

(本文责编:张晓丽)

Supported by the earmarked fund for the Modern Agro-industry Technology Research System in Shandong Province (SDAIT-19), by the National Natural Science Foundation of China (31402325) and by the Key Laboratory of Fishery Drug Development, Ministry of Agriculture (201302)

* Corresponding author. Tel: +86-538-8242593-8107; Fax: +86-538-8241419; E-mail: xpwang@sda.u.edu.cn

Received: 14 December 2014/Revised: 20 January 2015