

研究报告

嗜水气单胞菌群体感应信号分子 AI-2 的细胞外生物合成及活性检测

赵晶¹ 张福蓉¹ 崔一² 许永斌¹ 陈明² 权春善^{1*} 范圣第¹

(1. 大连民族大学生命科学院 国家民委-教育部生物化工重点实验室 辽宁 大连 116600)

(2. 大连工业大学 生物工程学院 辽宁 大连 116034)

摘要:【目的】对嗜水气单胞菌群体感应信号分子 AI-2 进行细胞外生物合成及活性检测。【方法】对 LuxS、MtnN-1、MtnN-2 蛋白进行氨基酸序列分析、表达及纯化。以 S-腺苷同型半胱氨酸(SAH)为底物,利用纯化的 LuxS 分别与 MtnN-1 及 MtnN-2 蛋白共同作用合成 AI-2,并利用哈维氏弧菌报告菌株 BB170 检测 AI-2 活性。【结果】嗜水气单胞菌培养液上清中 AI-2 活性在 8 h 达到空白对照的 16.96 倍。氨基酸序列分析表明,嗜水气单胞菌与水生病原菌哈维氏弧菌和迟钝爱德华氏 LuxS 一致性达到 76%以上, MtnN-1 与 MtnN-2 氨基酸序列一致性为 26.37%,其中 MtnN-2 与哈维氏弧菌和迟钝爱德华氏菌 Pfs 一致性达到 53%以上。成功表达及纯化了 LuxS、MtnN-1 和 MtnN-2 蛋白,细胞外 LuxS 和 MtnN-1 共同作用合成的 AI-2 活性是空白对照的 45.04 倍, LuxS 和 MtnN-2 共同作用合成的 AI-2 活性是空白对照的 63.62 倍。【结论】嗜水气单胞菌能够合成信号分子 AI-2。MtnN-1 和 MtnN-2 氨基酸序列尽管存在较大差异,但两者均能与 LuxS 共同催化 AI-2 的细胞外生物合成。

关键词: 嗜水气单胞菌, 群体感应信号分子 AI-2, 生物合成, LuxS, MtnN

In vitro biosynthesis and activity detection of quorum sensing signal molecule AI-2 of *Aeromonas hydrophila*

ZHAO Jing¹ ZHANG Fu-Rong¹ CUI Yi² XU Yong-Bin¹ CHEN Ming²
QUAN Chun-Shan^{1*} FAN Sheng-Di¹

(1. College of Life Science, Dalian Nationalities University, State Ethnic Affairs Commission-Ministry of Education Key Laboratory of Biochemical Engineering, Dalian Nationalities University, Dalian, Liaoning 116600, China)

(2. School of Biological Engineering, Dalian Polytechnic University, Dalian, Liaoning 116034, China)

Abstract: [Objective] To realize *in vitro* biosynthesis and activity detection of quorum sensing signal molecule autoinducer 2 (AI-2) of *Aeromonas hydrophila*. [Methods] LuxS, MtnN-1, MtnN-2 proteins were analyzed for amino acid sequences, expressed and purified. AI-2 was synthesized from S-adenosylhomocysteine (SAH) with purified LuxS and MtnN-1, or purified LuxS and MtnN-2 separately. The activity of AI-2 was detected by the reporter strain *Vibrio harveyi* BB170. [Results] The

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 21272031); 辽宁省教育厅一般项目(No. L2013508)

*通讯作者: ✉: mikyeken@dlnu.edu.cn

收稿日期: 2014-12-16; 接受日期: 2015-02-05; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2015-03-11

activity of AI-2 in *A. hydrophila* culture supernatant was 16.96-fold of the control at 8 h. As analysis of amino acid sequence alignment indicated, the identity of LuxS of *A. hydrophila* with that of *V. harveyi* and *Edwardsiella tarda* is above 76%. The identity of MtnN-1 with MtnN-2 is 26.37%. MtnN-2 has relatively high homologies with representative Pfs amino acid sequences. The identity of MtnN-2 with that of *V. harveyi* and *E. tarda* is above 53%. LuxS, MtnN-1 and MtnN-2 proteins were successfully expressed and purified. The activity of AI-2 produced with purified LuxS and MtnN-1 *in vitro* was 45.04-fold of the control; the activity of AI-2 produced with purified LuxS and MtnN-2 *in vitro* was 63.62-fold of the control. **[Conclusion]** *A. hydrophila* could secrete AI-2. MtnN-1 and MtnN-2 could both cooperate with LuxS and realize *in vitro* biosynthesis of AI-2, though the amino acid sequences between the two showed relatively big differences.

Keywords: *Aeromonas hydrophila*, Quorum sensing signal molecule AI-2, Biosynthesis, LuxS, MtnN

嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)是一种广泛存在于水体环境中的革兰氏阴性菌,能够导致鱼类的出血性败血症,是水产养殖中最常见的致病菌之一^[1]。嗜水气单胞菌的致病性与其产生的毒力因子及生物膜的形成密切相关^[2]。其病害的有效防治是水产养殖业面临的重要问题。

研究发现,细菌中存在群体感应(Quorum sensing, QS)现象,细胞密度达到一定阈值后,细菌能够感知自体诱导的信号分子(Autoinducers, AIs)浓度,进而调控毒力相关基因的表达,表现出致病性^[3]。因此,对 QS 系统的研究有助于深入了解细菌的致病机理。目前发现多种水生病原菌中均存在 LuxS/AI-2 QS 系统, LuxS 参与催化 AI-2 信号分子的合成。该 QS 系统能够调控多种毒力基因的表达^[4-9]。嗜水气单胞菌株 ATCC7966 基因组信息表明,其存在着 LuxS 同源蛋白的基因,预测嗜水气单胞菌中可能存在 LuxS/AI-2 QS 系统。

细菌体内 AI-2 的生物合成途径如下:以 S-腺苷甲硫氨酸(S-adenosylmethionine, SAM)作为甲基供体,在甲基转移酶的作用下,产生中间产物 S-腺苷高半胱氨酸(S-adenosylhomocysteine, SAH), SAH 在甲硫腺苷(Methylthioadenosine, MTA)/S-腺苷高半胱氨酸核苷酶(Pfs/MTAN)和 LuxS 蛋白的催化作用下,生成等摩尔的 4,5-羟基-2,3 戊二酮(4,5-Dihydroxy-2,3-pentanedione, DPD)和高半胱氨酸,DPD 通过化学重排生成 AI-2^[10]。

本研究拟对嗜水气单胞菌 AI-2 进行检测,并对

嗜水气单胞菌中 LuxS 和 Pfs 同源蛋白进行表达和纯化,实现 AI-2 的细胞外生物合成及活性检测。该研究有利于嗜水气单胞菌群体感应信号分子 AI-2 纯品的制备,将其结构的解析和 QS 系统对致病性调控作用的研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株及其培养条件:嗜水气单胞菌 ATCC7966,购自中国普通微生物菌种保藏管理中心(CGMCC)。哈维氏弧菌 BB152(野生型哈维氏弧菌 BB120 *luxLM::Tn5*)和哈维氏弧菌 BB170(野生型哈维氏弧菌 BB120 *luxN::Tn5*),由中国农业科学院上海兽医研究所韩先干研究员馈赠。哈维氏弧菌 MM77(野生型哈维氏弧菌 BB120 *luxLM::Tn5*, *luxS::Tn5*)由普林斯顿大学 Bassler B. L.教授馈赠。嗜水气单胞菌于 Luria-Bertani (LB)培养基^[11]中培养。哈维氏弧菌于 AB 培养基^[12]中培养,培养温度均为 28 °C。

1.1.2 主要试剂及仪器:pET-28a(Km^R)和 pPROEX-HTa(Ap^R)载体由本实验室保存;限制性内切酶 *EcoR* I 和 *Hind* III、T4 DNA 连接酶、*ExTaq* DNA 聚合酶、DNA 胶回收试剂盒、DNA 纯化试剂盒、质粒提取试剂盒等,均购自宝生物工程(大连)有限公司;Flx800 荧光发光微孔检测仪,购自美国伯腾(BioTek)仪器有限公司;BioDrop μ Lite 超微量分光光度计,购自英国柏楛(Biochrom)有限公司。

1.2 方法

1.2.1 嗜水气单胞菌 AI-2 的活性检测: 利用哈维氏弧菌报告菌株 BB170 检测 AI-2 的活性, 哈维氏弧菌 BB152 和 MM77 培养至 OD_{600} 为 1.0–1.1 的无菌上清液分别作为阳性对照和阴性对照。哈维氏弧菌 BB170 于 AB 培养基中培养至 OD_{600} 为 1.0–1.1, 用 AB 培养基按照 1:5 000 的比例稀释 BB170 培养液, 分别加入 10% 的嗜水气单胞菌无菌上清液、哈维氏弧菌 BB152、MM77 的无菌上清液和 AB 培养基。28 °C 培养 4 h, 培养液加入 96 孔板中, 用荧光发光微孔检测仪上预存的检测程序读取发光读数, 检测其发光强度。以报告菌株培养液稀释后仅加入 AB 培养基作为空白对照, AI-2 的活性用相对发光强度表示, 即上清液中 AI-2 诱导发光强度相对于空白对照诱导发光强度的倍数。

1.2.2 嗜水气单胞菌 LuxS、MtnN-1、MtnN-2 氨基酸序列分析: 利用美国国家生物技术信息中心 (The National Center for Biotechnology Information, NCBI) 网站信息, 选取具有代表性的 LuxS 和 Pfs 氨基酸序列, 提供序列在 GenBank 中登录号。用软件 ClustalX 1.81 将嗜水气单胞菌 LuxS、MtnN-1、MtnN-2 氨基酸序列与代表性序列进行多重序列比对, 用软件 DNAMAN 6.0 进行序列比对分析及着色处理。

1.2.3 嗜水气单胞菌 luxS、mtnN-1、mtnN-2 克隆及表达载体的构建: 根据嗜水气单胞菌 ATCC7966 基因组测序结果 (GenBank 序列号 CP000462.1) 设

计引物 (表 1), 引物由宝生物工程 (大连) 有限公司合成。以嗜水气单胞菌基因组为模板, 利用表 1 中引物分别 PCR 扩增 luxS (510 bp)、mtnN-1 (774 bp) 和 mtnN-2 (693 bp) 基因, luxS PCR 扩增条件: 95 °C 5 min; 94 °C 30 s, 58 °C 30 s, 72 °C 1 min, 30 个循环; 72 °C 10 min。mtnN-1 和 mtnN-2 PCR 扩增条件: 95 °C 5 min; 94 °C 30 s, 67 °C 30 s, 72 °C 1 min, 30 个循环; 72 °C 10 min。PCR 产物利用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测并利用胶回收试剂盒回收。用 EcoR I 和 Hind III 酶切 PCR 产物和 pET-28a、pPROEX HTa 载体, 酶切产物用 DNA 纯化试剂盒纯化后连接。连接产物转化 *E. coli* DH5 α 感受态细胞。于抗性平板上筛选阳性克隆, 培养并提取质粒, 用 EcoR I 和 Hind III 双酶切鉴定并送至宝生物工程 (大连) 有限公司测序。测序正确的质粒分别命名为 pPROEX-HTa-luxS、pPROEX-HTa-mtnN-1 和 pET-28a-mtnN-2。

1.2.4 LuxS、MtnN-1、MtnN-2 蛋白的表达及纯化: 将 1.2.2 中质粒分别转化 *E. coli* BL21(DE3) 感受态细胞。将重组菌接种于含有相应抗生素 (100 mg/L) 的 LB 液体培养基, 37 °C、180 r/min 振荡培养至 OD_{600} 为 0.8–1.2 时加入 0.5 mmol/L 的 IPTG, 30 °C 诱导表达 7–8 h。将重组菌于 4 °C 离心 (6 000 r/min, 5 min), 收集菌体沉淀, 用 Tris-HCl 缓冲液重悬后, 超声破碎。破碎后混合液于 4 °C 离心 (13 000 r/min, 30 min), 分别收集上清液和沉淀。上清液中的目的蛋白用亲和层析柱 (Ni²⁺-NTA agarose) 纯化, 根据载

表 1 本研究中所用引物
Table 1 Oligonucleotide primers used in this study

引物 Primer	序列 Sequence (5'→3')	酶切位点 Restriction site
luxS-F	CCGGAATTCATGCCGTTATTGGAC	EcoR I
luxS-R	CCCAAGCTTTCAGAGGCTTTTCAG	Hind III
mtnN-1-F	CCGGAATTCATGGCGGCAAGCCG	EcoR I
mtnN-1-R	CCCAAGCTTTCAGGCTTTGTTGAAGCCGT	Hind III
mtnN-2-F	CCGGAATTCATGAAAGTAGGTATTATCGGCGC	EcoR I
mtnN-2-R	CCCAAGCTTTCACAGCTTGCCGAGCAT	Hind III

体分别用 Tev 蛋白酶和凝血酶切除组氨酸标签,并用凝胶过滤层析纯化目的蛋白。利用 SDS-PAGE 检测重组蛋白的表达情况。利用 BioDrop μ Lite 超微量分光光度计中预存程序测定蛋白浓度。

1.2.5 嗜水气单胞菌 AI-2 细胞外生物合成及活性检测: AI-2 的体外合成按照文献[10]的方法进行,10 mmol/L 磷酸钠缓冲液(pH 7.5)中加入终浓度为 1 mmol/L 的 SAH、1 g/L 纯化的 LuxS、MtnN-1 蛋白或 LuxS、MtnN-2 蛋白,37 °C 反应 1 h,反应液用 Millipore 超滤离心管(截留分子量 10 kD)超滤去除反应液中蛋白。活性检测按照 1.2.1 方法进行。

2 结果与分析

2.1 嗜水气单胞菌 AI-2 的活性检测

利用哈维氏弧菌报告菌株 BB170 检测 AI-2 的活性,结果表明,嗜水气单胞菌菌株 ATCC7966 培养不同时间后制备的无菌上清液均能诱导 BB170 发光(图 1),证明嗜水气单胞菌能够合成信号分子 AI-2。发光强度表明, AI-2 在嗜水气单胞菌培养前 12 h 呈先增加后降低的趋势,其活性在 8 h 达到空白对照的 16.96 倍(OD_{600} 为 1.4)。在 12–24 h 内, AI-2 的活性先降低后增加,24 h 略有下降。其活性在 20 h 达到空白对照的 17.2 倍。

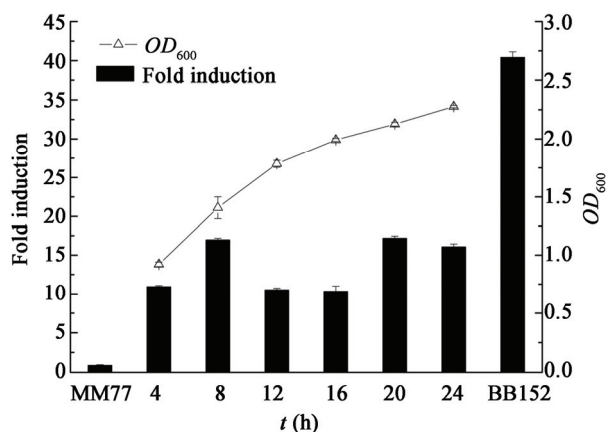


图 1 嗜水气单胞菌生长过程中 AI-2 活性检测

Figure 1 Detection of AI-2 activity in *Aeromonas hydrophila* culture

注: OD_{600} 为嗜水气单胞菌培养液吸光值。

Note: OD_{600} corresponding to absorbance of *Aeromonas hydrophila* culture.

2.2 嗜水气单胞菌 LuxS、MtnN-1、MtnN-2 氨基酸序列分析

NCBI 中提供的嗜水气单胞菌 ATCC7966 基因组信息显示,嗜水气单胞菌中含有 LuxS 和 Pfs 蛋白编码基因。与其他微生物不同的是,嗜水气单胞菌中含有两种 Pfs 蛋白编码基因 *mtnN-1* 和 *mtnN-2*。在 AI-2 生物合成中, MtnN-1 与 MtnN-2 是否均具有催化活性仍有待研究。

选取几种具有代表性的 LuxS 氨基酸序列与嗜水气单胞菌菌株 ATCC7966 LuxS 氨基酸序列进行比对(图 2),结果表明,嗜水气单胞菌 LuxS 与革兰氏阴性菌 LuxS 有较高同源性,如大肠埃希氏菌(一致性 79.29%),以及水生病原菌哈维氏弧菌(一致性 76.33%)和迟钝爱德华氏菌(一致性 78.70%);与革兰氏阳性菌 LuxS 同源性较低,如肺炎链球菌(一致性 33.12%)和解淀粉芽孢杆菌(一致性 35.90%)。据报道,几个高度保守的氨基酸(H54–H58–C128)是金属离子结合位点,组成 LuxS 蛋白的催化中心^[13],保守的 C83/E57 氨基酸位点也在 LuxS 催化活性中起重要作用^[14];此外,保守的 G93 也被证实为产生 AI-2 所必需的氨基酸^[15]。在嗜水气单胞菌 LuxS 氨基酸序列中可见以上保守氨基酸位点,表明其很可能具有 LuxS 家族成员蛋白的功能。

选取几种具有代表性的 Pfs 氨基酸序列与嗜水气单胞菌 ATCC7966 Pfs 氨基酸序列进行比对(图 3),结果表明,嗜水气单胞菌 Pfs 与革兰氏阳性菌及阴性菌 Pfs 同源性差别不大。与 MtnN-1 相比, MtnN-2 与代表性蛋白同源性较高,如大肠埃希氏菌(一致性 53.71%),以及水生病原菌哈维氏弧菌(一致性 53.48%)和迟钝爱德华氏菌(一致性 55.46%);如肺炎链球菌(一致性 46.72%)和解淀粉芽孢杆菌(一致性 50.87%)。MtnN-1 与代表性蛋白同源性较低,如大肠埃希氏菌(一致性 22.33%)、哈维氏弧菌(一致性 20.35%)和迟钝爱德华氏菌(一致性 21.65%);如肺炎链球菌(一致性 23.37%),解淀粉芽孢杆菌(一致性 23.38%)。

MtnN-1 与 MtnN-2 氨基酸序列一致性为 26.37%,虽然同为 MTA/SAH 核苷酶,两者序列仍存在较大差异。据报道, E175 和 R194 是 Pfs 蛋白中的保守氨基酸^[16], D198、D209 氨基酸位点在 Pfs

1	MP...LLDSETVDHTRMNAAPAVRVAKTMQTPKGDITTVEDLRFETAPNKDILSEKGIHTLE	57
2	MP...LLDSETVDHTRMAAPAVRVAKTMQTPNKDITTVEDLRFVCPNQEILSERGIHTLE	57
3	MP...LLDSETVDHTRMAAPAVRVAKMTTPHGDQITVEDLRFVCPNKAILPERGIHTLE	57
4	MP...LLDSETVDHTRMEAPAVRVAKTMNTPHGDALITVEDLRFVCPNKEVMPERGIHTLE	57
5	MSKEVIVSEFELDHTIVKAPYVRLIGEETGPKGDIISNYDIRLVQPNEDSIPTAGLHTIE	60
6	ME...SVESEFELDHNAVWVAPYVRHCGVHKVGTGVDVWVKEDIRFCQPNKQAMKPDTHHTLE	57
1	HLVYAGFMRNHLNG.DSVEIIDIISPMGCRGTGFYMSLIGTPEEQVADAWIAAMEDVLKVEN	116
2	HLEFAGFMRDHLNG.NGVEIIDIISPMGCRGTGFYMSLIGAPDEARVGAAWQAAMSDVLTVQE	116
3	HLEFAGFMRDHLNG.DGVEIIDIISPMGCRGTGFYMSLIGTPDEARVAAAATAAMEDVLQVQD	116
4	HLEFAGFMRNHLNG.NGVEIIDIISPMGCRGTGFYMSLIGTPDEQRVADAWKAAMEDVLKVQD	116
5	HLLAKLIRTRIDG.....MIDCSPEFGCRGTGFHMIMWGRHTSAKIAAVIKDSLKEIAETTT	115
6	HLLAFTIRTHSEKYDHFIDIISPMGCQTGYLWVSGEPTAEIIVDILLDATLKEAIDIT.	116
1	QNKIPELNEYQCGTAAMHSLDEAKQIAKNILEVGVAVNKNDLALPESMLRELRID	172
2	QGKIPELNEYQCGTYSMHSLEEAAHAIARHVLERGIGVNRNDELALPEEKLKSL...	169
3	QHHTPELNEFQCGTCNMHSLTEAQQIARDILASGIGINHNDDLALSAEQQLARLHP.	171
4	QNQIPELNVYQCGTYQMHSLOEAQDIARSI LERDVIRINSNEELALPEEKLOELHI.	171
5	WEDVPGTTIESCGNYKDHS LFSAKEWAKLILEQGISDDAFERHVI.....	160
6	..EIPAAANEKQCGQAKLHDLLEGAKRLMRFWLSQDK.EDLLKVEG.....	157

图2 LuxS 氨基酸序列比对

Figure 2 LuxS amino acid sequence alignment

注: 1: 哈维氏弧菌 BB120 (登录号 AAD17292); 2: 嗜水气单胞菌 ATCC7966 (登录号 ABK38869); 3: 迟钝爱德华氏菌 ATCC 23685 (登录号 EFE24408); 4: 大肠埃希氏菌 O104:H4 C227-11 (登录号 EGT69648); 5: 肺炎链球菌 Kor74 (登录号 AFC91868); 6: 解淀粉芽孢杆菌 FZB42 (登录号 ABS75126)。

Note: 1: *Vibrio harveyi* BB120 (accession No. AAD17292); 2: *Aeromonas hydrophila* ATCC7966 (accession No. ABK38869); 3: *Edwardsiella tarda* ATCC 23685 (accession No. EFE24408); 4: *Escherichia coli* O104:H4 C227-11 (accession No. EGT69648); 5: *Streptococcus pneumoniae* Kor74 (accession No. AFC91868); 6: *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 (accession No. ABS75126)。

蛋白催化活性中起重要作用^[17]。在嗜水气单胞菌 MtnN-2 氨基酸序列中可见以上氨基酸位点, MtnN-1 氨基酸序列中同样含有上述保守氨基酸位点, 但对应位置发生变化(E200/R219)。表明 MtnN-1 与 MtnN-2 可能均具有 Pfs/MTAN 家族成员蛋白的功能。

2.3 嗜水气单胞菌 *luxS*、*mtnN-1*、*mtnN-2* 克隆及表达载体的构建

与其他微生物不同的是, 嗜水气单胞菌 ATCC7966 基因组信息显示含有两种 Pfs 蛋白编码基因 *mtnN-1* 和 *mtnN-2*。以嗜水气单胞菌 ATCC7966 基因组为模板 PCR 分别扩增 *luxS*、*mtnN-1*、*mtnN-2*, 电泳结果表明成功扩增出 3 条大小与预期相符的条带(图 4)。重组质粒双酶切后电泳检测均发现与预期相符的条带, 测序结果表明重组质粒

pPROEX-HTa-*luxS*、pPROEX-HTa-*mtnN-1* 和 pET-28a-*mtnN-2* 构建成功。

2.4 嗜水气单胞菌 *LuxS*、*MtnN-1*、*MtnN-2* 蛋白的表达及纯化

SDS-PAGE 电泳结果(图 5)表明, 重组蛋白 *LuxS*、*MtnN-1*、*MtnN-2* 均得以表达, 三者均为细胞内可溶性蛋白。对细胞破碎并离心后的上清液进行亲和层析纯化、组氨酸标签切除及凝胶过滤层析纯化得到单一条带的目的蛋白, 蛋白大小符合预期。

2.5 细胞外生物合成 AI-2 的活性检测

细胞外合成 AI-2 的体系中, SAH 终浓度为 1 mmol/L, 每种酶终浓度均为 1 g/L。AI-2 的活性检测结果(表 2)表明, *LuxS* 能够分别与 *MtnN-1*、*MtnN-2* 催化合成具有活性的 AI-2。证明 *MtnN-1*、

1MKVGIICAMEQEVITLREAMTNCCTVNRKAGCTFFSGQINDVDVWLLCSGIGKV	53
2	MAAKPASAPILIQCAMDVEVETLVAALKDKCELTVGSWTYWCGLTSGYPWVSRTEVGLA	60
3MKVGIICAMEQEVALLRSCMSNPITLQLGCEFYCGTLAGKEVILTRSGIGKV	53
4MKVGIICAMEQEVITLRERIENCCTTLTAGCEIYTGRLHGVEVALLKSGIGKV	53
5MKIGIICAMEEEVITLBDRIENRCTISLGCCEIYTGQLNGTEVALLKSGIGKV	53
6MKIGIILAMPEELAYLVQHLNNTQCECVVLGNTYHTGTIASHEVWLVESGIGKV	53
7MKLAVICAMEEEVITLRSKLDKAKQEMIAHCEFTTGSYEGVEVILLKSGIGKV	53
1	AAAVGTTILLDEYCPDVIINTGSGGFDSSINLGDVWISTEVR.....	96
2	NAAAATTILAMERFCRLVINCGTAGGHDPALHFGDIWIGIKSFNMGAYRSDLTPAEQGV	120
3	AAAVATSLLLLEKFAFDVINTGSGGFAQDLHIGDVIASEMR.....	96
4	AAAVGTTILLDHCQPDVIINTGSGGLASTLRVGDIVWSDEV.....	96
5	AAALGATILLLEHCRPDVIINTGSGGLAPTLLKVGDIWWSDEAR.....	96
6	MSAVSVAAILADHFCVDALINTGSGGVAEGIAVGDVVIADKLA.....	96
7	NAAISTILLDRFRPDVINTGSGGFHHTLNVGDVWISTDVR.....	96
1	...HEDADVTAFGYEMGOMAGQPAAFKADKELMDLAEKALACMENTHAVRGLICTGDAFV	153
2	PSKWEINFEVITMRLRDNCKLVEH.SSFAQDPELVGRALGMADRYRHGFVVPGLIGTADEN	179
3	...FEDVDVTAFGYEMGOMAGQPAAFPCDETLIAVAQDCIAEQGRHCTKVGLICTGQDFM	153
4	...YEDADVTAFGYQPGOMAGCPAAFSADAALIALAERCIGALQ.LNAVRGLICSQDAFI	152
5	...YEDADVTAFGYEQPLGCPAGFKADDKLIAAAEACIAELN.LNAVRGLIIVSGDAFI	152
6	...YEDVDVTAFGYAYGOMAGQPLYESDKTFVACIQESLSCLD.QNWHLGLIATGDSFV	152
7	...HEDVDVTAFDVEYQVPLPAAFKADKELISITEEAVSELNGICVARGTIATGDSFM	153
1	CTAEROEFIRKHFPSVIAVENEASLIACTCHOFNTPFVWVRAISDVADKESPMSEDFLP	213
2	RQVARINWLHQTY.QTAAEEMETSSAALVAEAYKVPFVGIKRVLSNTDLHG....EBDFP	233
3	CKPDAIAKARADFPQMLAVEMEGAAIGCVCHMFKVPLVVRAMSDIIGKEQVESDFDIE	213
4	NGAEPALARIRHTFPQVAVEMEAALIGHVCHAFATPFVWVRAISDVADHVSHLSDFDLK	212
5	NGSGLAKIRHNFPOAVAVEMETAIAHVCHNFVFPVWVRAISDVADQCSHLSDFDLA	212
6	AGNDRIEAIAKSHFPEVLAVEMEGAAIAQAHTLNLPLVLRAMSDNANHEANIFFDFEII	212
7	NDPKFVEDVRAKFAADLYAVEMEAALVAVCVCHQFKTFVWVIRALSIDIGKESDVSEDFLE	213
1	LAAKSSSEMVFKML.ELTK....	231
2	QTAIHCCQFVIDYAKALINGFNKA	257
3	VAGKHSAEVVIKMLGKL.....	230
4	VAAECSTLMVEAMLRELACQ....	232
5	VAAKCSLMVESLVQRLAHG....	232
6	EAGRBSAQVLLAFLKALD.....	230
7	QAAVHSTELVLNVIKRIH.....	231

图 3 Pfs 氨基酸序列比对

Figure 3 Pfs amino acid sequence alignment

注: 1: 哈维氏弧菌 CAIM 1792 (登录号 EMR37082); 2: 嗜水气单胞菌 ATCC7966 MtnN-1 (登录号 ABK36761); 3: 嗜水气单胞菌 MtnN-2 (登录号 ABK39195); 4: 迟钝爱德华氏菌 ATCC 15947 (登录号 GAC64529); 5: 大肠埃希氏菌 O104:H4 C227-11 (登录号 EHF20296); 6: 肺炎链球菌 R6 (登录号 AAK99698); 7: 解淀粉芽孢杆菌 UASWS BA1 (登录号 ERK82321).

Note: 1: *Vibrio harveyi* CAIM 1792 (accession No. EMR37082); 2: *Aeromonas hydrophila* ATCC7966 MtnN-1 (accession No. ABK36761); 3: *Aeromonas hydrophila* ATCC7966 MtnN-2 (accession No. ABK39195); 4: *Edwardsiella tarda* ATCC 15947 (accession No. GAC64529); 5: *Escherichia coli* O104:H4 C227-11 (accession No. EHF20296); 6: *Streptococcus pneumoniae* R6 (accession No. AAK99698); 7: *Bacillus amyloliquefaciens* UASWS BA1 (accession No. ERK82321).

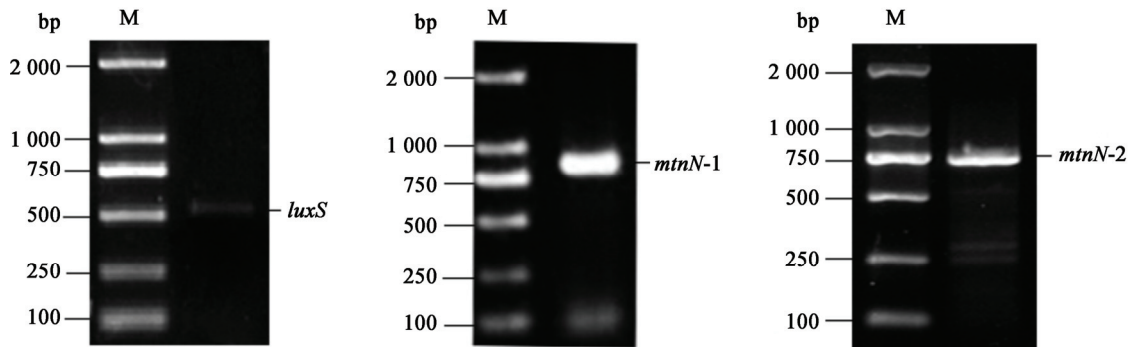


图4 *luxS*、*mtnN-1* 和 *mtnN-2* 基因扩增
Figure 4 Gene amplification of *luxS*, *mtnN-1* and *mtnN-2*

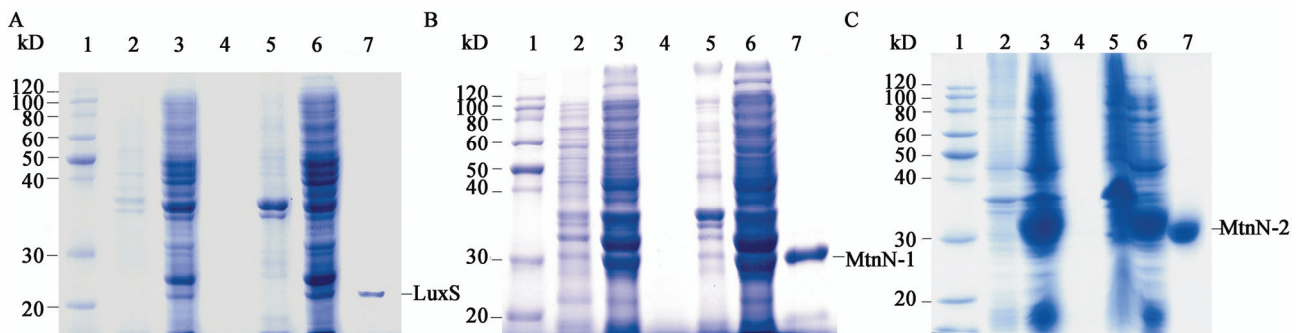


图5 *LuxS*、*MtnN-1*、*MtnN-2* 蛋白表达及纯化

Figure 5 Expression and purification of *LuxS*, *MtnN-1* and *MtnN-2* proteins

注：A：*LuxS* 蛋白表达及纯化；B：*MtnN-1* 蛋白表达及纯化；C：*MtnN-2* 蛋白表达及纯化。1：蛋白分子量标准，ProteinRuler II；2：未诱导的全蛋白；3：诱导后全蛋白；4：诱导后离心上清液；5：诱导破碎离心后沉淀；6：诱导破碎离心后上清；7：纯化后蛋白。
Note: A: Expression and purification of *LuxS*; B: Expression and purification of *MtnN-1*; C: Expression and purification of *MtnN-2*. 1: Marker, ProteinRuler II; 2: Negative control; 3: Total cellular proteins of *E. coli* BL21(DE3) harboring constructed plasmid with IPTG induction; 4: Supernatant of *E. coli* BL21(DE3) harboring constructed plasmid with IPTG induction; 5: Precipitation of *E. coli* BL21(DE3) harboring constructed plasmid with IPTG induction and cell disruption; 6: Supernatant of *E. coli* BL21(DE3) harboring constructed plasmid with IPTG induction and cell disruption; 7: Purified protein.

MtnN-2 虽然氨基酸序列具有较大差异，但均能够发挥 Pfs/MTAN 家族蛋白的功能。反应体系 1 和 2 中，AI-2 对报告菌株哈维氏弧菌 BB170 的诱导发光分别为空白对照诱导发光的 45.04 倍和 63.62 倍。

表 2 细胞外生物合成 AI-2 的活性检测

Table 2 Detection of the activity of *in vitro* biosynthesized AI-2

反应体系 Reaction system	底物 Substrate	酶 Enzyme	AI-2 活性 AI-2 activity (fold induction)
1	SAH	<i>LuxS</i> + <i>MtnN-1</i>	45.04±0.47
2	SAH	<i>LuxS</i> + <i>MtnN-2</i>	63.62±0.57

3 讨论

目前已发现 *LuxS*/AI-2 群体感应系统参与调控多种病原菌的毒力基因表达。在大肠埃希氏菌 (*Escherichia coli* O156:H7) 中鉴定出 5 个致病相关蛋白表达受到 AI-2 的浓度调节^[18]。除此之外，在多种水产养殖的常见病原菌中也发现了相似现象。Kozlova 等^[19]研究表明，嗜水气单胞菌 *luxS* 基因突变能够影响其生物被膜形态、运动性和毒力。哈维氏弧菌中 AI-2 能够调节细胞外毒素、III-型分泌系统相关蛋白、溶血素等合成。创伤弧菌中 *LuxS*/AI-2 群体感应系统能够调节蛋白酶(VvpE)和溶血素(VvhA)等毒力蛋白的表达。溶藻弧菌 *luxS* 基因突变

能够影响其生物被膜形态及运动性。迟钝爱德华氏菌 *luxS* 基因突变能够影响其 III-型分泌系统、生物被膜及丝氨酸蛋白酶的表达^[20]。然而,除哈维氏弧菌外,其他水生病原菌中的 AI-2 信号分子的结构尚未揭晓, AI-2 的生理学功能有待进一步研究。因此,体外合成嗜水气单胞菌 AI-2 有助于揭示其结构信息及研究其对毒力相关基因的调控机制。

本研究表明,嗜水气单胞菌能够产生信号分子 AI-2, AI-2 活性在对数生长期早期就接近最高值,意味着 AI-2 信号分子可能较早地发挥其生理学功能,调控相关毒力因子的表达,该结论与 Han 等^[9]的研究相符。然而,在菌株培养后期仍检测到较高活性的 AI-2 信号分子,其合成机制仍有待研究。

嗜水气单胞菌基因组中存在着编码 LuxS 酶的基因 *luxS* 和编码 MTA/SAH 核苷酶的基因 *mtnN-1* 和 *mtnN-2*。氨基酸序列比对分析表明,嗜水气单胞菌与革兰氏阴性菌 LuxS 有较高同源性,与水生病原菌哈维氏弧菌和迟钝爱德华氏菌一致性达到 76%以上。值得注意的是,与其他微生物不同,嗜水气单胞菌能够合成 Pfs/MTAN 家族蛋白中的两种蛋白 MtnN-1 和 MtnN-2。MtnN-1 与 MtnN-2 氨基酸序列一致性为 26.37%,两者存在较大差异,其中 MtnN-2 与几种代表性 Pfs 氨基酸序列同源性较高,与水生病原菌哈维氏弧菌、迟钝爱德华氏菌 Pfs 一致性达到 53%以上。本研究通过细胞外生物合成,证明嗜水气单胞菌的 LuxS 可以分别与 MtnN-1、MtnN-2 共同催化合成具有活性的 AI-2。合成的 AI-2 对报告菌株哈维氏弧菌 BB170 的诱导发光强度分别为空白对照诱导发光的 45.04 倍和 63.62 倍。推测 MtnN-2 可能比 MtnN-1 蛋白具有更强的催化活性。

本研究对嗜水气单胞菌 AI-2 信号分子进行了细胞外生物合成及活性检测,为嗜水气单胞菌 AI-2 的结构解析以及 AI-2 对嗜水气单胞菌致病性的调控作用研究奠定了基础。同时,为进一步开发针对嗜水气单胞菌的群体感应抑制剂明确了目标。

参 考 文 献

[1] Austin B, Adams C. Fish pathogens[A]//Altwegg M, Gosling PJ, Joseph S. The Genus *Aeromonas*[M]. Chichester: John Wiley & Sons, 1996: 197-243
 [2] Zhu DL, Li AH, Qian D, et al. Advances in studies on virulence genes of *Aeromonas hydrophila*[J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2004, 28(1): 80-84 (in Chinese)

朱大玲, 李爱华, 钱冬, 等. 嗜水气单胞菌毒力基因的研究进展[J]. 水生生物学报, 2004, 28(1): 80-84
 [3] Jayaraman A, Wood TK. Bacterial quorum sensing: signals, circuits, and implications for biofilms and disease[J]. Annual Review of Biomedical Engineering, 2008, 10: 145-167
 [4] Croxatto A, Pride J, Hardman A, et al. A distinctive dual-channel quorum-sensing system operates in *Vibrio anguillarum*[J]. Molecular Microbiology, 2004, 52(6): 1677-1689
 [5] Henke JM, Bassler BL. Three parallel quorum-sensing systems regulate gene expression in *Vibrio harveyi*[J]. Journal of Bacteriology, 2004, 186(20): 6902-6914
 [6] Kim SY, Lee SE, Kim YR, et al. Regulation of *Vibrio vulnificus* virulence by the LuxS quorum-sensing system[J]. Molecular Microbiology, 2003, 48(6): 1647-1664
 [7] Zhang M, Sun K, Sun L. Regulation of autoinducer 2 production and luxS expression in a pathogenic *Edwardsiella tarda* strain[J]. Microbiology, 2008, 154(7): 2060-2069
 [8] Li X, Han Y, Yang Q, et al. Detection of quorum sensing signal molecules and mutation of luxS gene in *Vibrio ichthyenteri*[J]. Research in Microbiology, 2010, 161(1): 51-57
 [9] Han Y, Li X, Qi Z, et al. Detection of different quorum-sensing signal molecules in a virulent *Edwardsiella tarda* strain LTB-4[J]. Journal of Applied Microbiology, 2010, 108(1): 139-147
 [10] Schauder S, Shokat K, Surette MG, et al. The LuxS family of bacterial autoinducers: biosynthesis of a novel quorum-sensing signal molecule[J]. Molecular Microbiology, 2001, 41(2): 463-476
 [11] Miller JH. Experiments in Molecular Genetics[M]. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1972
 [12] Greenberg EP, Hastings JW, Ulitzur S. Induction of luciferase synthesis in *Beneckeia harveyi* by other marine bacteria[J]. Archives of Microbiology, 1979, 120(2): 87-91
 [13] Hilgers MT, Ludwig ML. Crystal structure of the quorum sensing protein LuxS reveals a catalytic metal site[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2001, 98(20): 11169-11174
 [14] Pei D, Zhu J. Mechanism of action of S-ribosylhomocysteinase (LuxS)[J]. Current Opinion in Chemical Biology, 2004, 8(5): 492-497
 [15] Plummer P, Zhu J, Akiba M, et al. Identification of a key amino acid of LuxS involved in AI-2 production in *Campylobacter jejuni*[J]. PLoS One, 2011, 6(1): e15876
 [16] Ronning DR, Iacopelli NM, Mishra V. Enzyme-ligand interactions that drive active site rearrangements in the *Helicobacter pylori* 5'-methylthioadenosine/S-adenosylhomocysteine nucleosidase[J]. Protein Science, 2010, 19(12): 2498-2510
 [17] Mishra V, Ronning DR. Crystal structures of the *Helicobacter pylori* MTAN enzyme reveal specific interactions between S-adenosylhomocysteine and the 5'-alkylthio binding subsite[J]. Biochemistry, 2012, 51(48): 9763-9772
 [18] Cagno RD, de Angelis M, Calasso M, et al. Proteomics of the bacterial cross-talk by quorum sensing[J]. Journal of Proteomics, 2011, 74(1): 19-34
 [19] Kozlova EV, Popov VL, Sha J, et al. Mutation in the S-ribosylhomocysteinase (*luxS*) gene involved in quorum sensing affects biofilm formation and virulence in a clinical isolate of *Aeromonas hydrophila*[J]. Microbial pathogenesis, 2008, 45(5/6): 343-354
 [20] Zhao J, Chen M, Quan CS, et al. Mechanisms of quorum sensing and strategies for quorum sensing disruption in aquaculture pathogens[J]. Journal of Fish Diseases, 2015, 38(9): 771-786