

研究报告

鸭疫里默氏杆菌 Mtan 对底物 SAH 的催化活性

吴小卡¹ 徐达^{1,2} 荆雅玮¹ 吕小龙¹ 胡剑刚¹ 米荣升¹ 黄燕¹ 王成明^{1,2}
陈兆国^{1*} 韩先干^{1*}

(1. 中国农业科学院上海兽医研究所 上海 200241)

(2. 扬州大学兽医学院 江苏 扬州 225009)

摘要:【目的】分析鸭疫里默氏杆菌(*Riemerella anatipestifer*, RA)不同血清型 *pfs* 基因的序列差异, 并开展其编码蛋白 S-腺苷高半胱氨酸核苷酶(Mtan, 又称 Pfs)的催化活性研究。【方法】PCR 扩增 9 株不同血清型 RA 的 *pfs* 基因, 分析其核苷酸序列的同源性; 构建该基因的重组表达载体 pCold-RA-*pfs*, 表达、纯化 RA 的重组蛋白 Mtan(RA-Mtan); 测定 RA-Mtan 对底物 S-腺苷同型半胱氨酸(S-adenosylhomocysteine, SAH)的催化活性, 运用哈维弧菌报告菌株 BB170 检测催化底物的自诱导物 2 (Autoinducer-2, AI-2)活性。【结果】对 RA 的 *pfs* 序列分析结果表明, 不同血清型 RA 的核苷酸一致性在 93.9%–100%之间; SDS-PAGE 检测结果表明, RA-Mtan 呈可溶性表达; 酶活测定表明 RA-Mtan 和禽致病性大肠杆菌(Avian pathogenic *Escherichia coli*, APEC)的 LuxS 蛋白共同作用于底物时, 可产生浓度为 176.7 $\mu\text{mol/L}$ 的同型半胱氨酸(Homocysteine, HCY); AI-2 活性检测结果表明, 产生的 AI-2 具有生物学活性。【结论】RA 不同血清型的 *pfs* 高度保守, RA *pfs* 基因的编码产物 RA-Mtan 在体外具有催化 SAH 的活性, RA-Mtan 和禽致病性大肠杆菌的 LuxS 蛋白共同作用于底物 SAH 时, 能产生有活性的 AI-2, 为进一步研究 *pfs* 对 RA 的调控作用提供参考。

关键词: 鸭疫里默氏杆菌, S-腺苷高半胱氨酸核苷酶, S-腺苷同型半胱氨酸, 密度感应系统, 自诱导物质 AI-2

Foundation item: National Natural Science Foundation of China (No. 31572546, 31370045); Shanghai Agriculture Applied Technology Development Program (No. G20150109)

***Corresponding authors:** CHEN Zhao-Guo: Tel: 86-21-34293157; E-mail: zhaoguochen@shvri.ac.cn
HAN Xian-Gan: Tel: 86-21-54225517; E-mail: hanxgan@163.com

Received: July 25, 2016; **Accepted:** November 09, 2016; **Published online** (www.cnki.net): December 19, 2016

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 31572546, 31370045); 上海市科技兴农重点攻关项目(No. G20150109)

***通讯作者:** 陈兆国: Tel: 86-21-34293157; E-mail: zhaoguochen@shvri.ac.cn

韩先干: Tel: 86-21-54225517; E-mail: hanxgan@163.com

收稿日期: 2016-07-25; 接受日期: 2016-11-09; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2016-12-19

Catalytic activity of Mtan catalyzing S-adenosylhomocysteine in *Riemerella anatipestifer*

WU Xiao-Ka¹ XU Da^{1,2} JING Ya-Wei¹ LV Xiao-Long¹ HU Jian-Gang¹
MI Rong-Sheng¹ HUANG Yan¹ WANG Cheng-Ming^{1,2}
CHEN Zhao-Guo^{1*} HAN Xian-Gan^{1*}

(1. Shanghai Veterinary Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Shanghai 200241, China)

(2. College of Veterinary Medicine, Yangzhou University, Yangzhou, Jiangsu 225009, China)

Abstract: [Objective] The sequences of *pfs* gene (encoding the Mtan protein, also known as Pfs) from different serotypes of *Riemerella anatipestifer* (RA) were analyzed, and catalytic activity of Mtan was studied. [Methods] The different serotypes of RA *pfs* gene were amplified by PCR and then the homology of nucleotide sequences was analyzed. The recombinant plasmid, pCold-RA-*pfs* was constructed, and then expressed in BL21 and the recombinant protein RA-Mtan was purified. Furthermore, the activity of RA-Mtan catalyze S-adenosylhomocysteine (SAH) to produce Homocysteine (HCY) was evaluated by Ellman's assay, and the activity of AI-2 was detected by *Vibrio harveyi* reporter strain BB170. [Results] The sequence analysis of *pfs* indicated that the homology of different serotypes varied from 93.9% to 100%. The SDS-PAGE showed that RA-Mtan was soluble expression in BL21. Moreover, the result suggested that RA-Mtan and recombinant protein LuxS (from Avian pathogenic *Escherichia coli*) could catalyze SAH to produce 176.7 $\mu\text{mol/L}$ HCY. The reaction products were able to induce luminescence of *Vibrio harveyi* BB170, demonstrating that recombinant RA-Mtan and LuxS synthesize AI-2 *in vitro* from SAH. [Conclusion] The RA *pfs* genes from different serotypes were highly conserved. The RA-Mtan can catalyze SAH to produce HCY, and produce AI-2 with biological activity as well. This study will contribute to further study of the roles of *pfs* in RA.

Keywords: *Riemerella anatipestifer*, Pfs, S-adenosylhomocysteine, Quorum sensing system, AI-2

鸭疫里默氏杆菌病是由鸭疫里默氏杆菌 (*Riemerella anatipestifer*, RA)引起的鸭的主要细菌性传染病,研究 RA 的致病机制对开展该病的防控具有重要意义。RA 对宿主的致病性受其毒力因子、生物被膜和密度感应系统的调控。广泛存在于革兰氏阴性和阳性菌中的 LuxS/AI-2 型密度感应系统能产生通用信号分子 AI-2, AI-2 由 LuxS 和 Pfs 催化底物 S-adenosylhomocysteine (SAH)产生, SAH 在 Pfs 作用下,产生 S-核糖同型半胱氨酸(S-ribosylhomocysteine, SRH), SRH 在 LuxS 作用下产生等量的同型半胱氨酸(Homocysteine, HCY)和 AI-2, AI-2 参与调控细菌众多的生理功能^[1]。

在大肠杆菌中 *pfs* 基因的编码产物 Pfs 不但参与 AI-2 的合成,同时也是细菌甲硫氨酸循环中的重要组分,其对于有毒代谢产物 SAH 的清除也是必需的^[2]。研究表明, *pfs* 在细菌的感染过程中发挥重

要作用,参与调控包括细菌的毒力、生物被膜形成等功能^[3]。

本实验室的前期研究表明,在 RA 中不存在 *luxS* 基因,不产生 AI-2,但存在编码 Mtan 蛋白的 *pfs*^[3]。由于 RA 血清型众多,不同血清型的 *pfs* 是否存在差异, *pfs* 的编码产物 Mtan 蛋白是否在体外具有催化 SAH 的能力,目前尚未见相关研究。

在宿主的消化道、泌尿生殖道、呼吸道和皮肤等病原菌入侵部位存在微生物菌群(Microbiota),并且微生物菌群中的细菌可以产生 AI-2,由于 AI-2 不具有种属特异性,是一种通用的信号分子,因此不产生该类信号分子的细菌,可以利用环境中其他细菌产生的 AI-2 来调节其生物学特性,如苜蓿中华根瘤菌(*Sinorhizobium meliloti*)自身不产生 AI-2,但可以利用其他细菌产生的 AI-2 来调控自身的行为^[4]。RA 在感染过程中,是否存在类似的作用,目

前仍未见相关报道。

本研究通过对 RA 不同血清型 *pfs* 的序列分析, 进一步研究其重组表达产物 RA-Mtan 的催化活性, 为研究 *pfs* 对 RA 的调控作用提供参考。

1 材料与方 法

1.1 主要的菌体、相关试剂和仪器

不同血清型的 9 株 RA 分离自樱桃谷鸭, 由本实验室分离、保存; 哈维弧菌 BB170、哈维弧菌 BB152 由本实验室保存; RA 的 *pfs* 重组表达质粒 pCold-RA-*pfs*、禽致病性大肠杆菌(APEC)的 *pfs* 和 *luxS* 原重组表达质粒 pET28a-APEC-*pfs* 和 pET28a-APEC-*luxS* 均由本实验室前期构建、保存^[5]。

DNA Marker DL5000、DL2000, 2×PrimeSTAR Max DNA Polymerase 高保真酶购自宝生物工程(大连)有限公司; 2×Taq PCR Master Mix 购自北京康为世纪有限公司; 蛋白超滤管购自 Millipore 公司; 自动高压灭菌锅购自日本 TOMY 公司; 恒温培养箱购自上海新苗公司; 多功能酶标仪购自美国 BIOTEK 公司。

1.2 RA 的 *pfs* 基因扩增及序列分析

以不同血清型的 9 株鸭疫里默氏杆菌 CH3 (血清 1 型)、WJ4 (血清 1 型)、YXB12 (血清 1 型)、TH4 (血清 2 型)、YB2 (血清 2 型)、YXB1 (血清 2 型)^[6]、YXL1 (血清 10)、XYB1 (血清 10)、HXB2 (血清 10 型) 基因组为模板^[6], 以 RA-*pfs*-F (5'-CCGGAATTCA TGAAAATAGTCGTTATTGGAGC-3', 划线部分为 *EcoR* I 酶切位点)和 RA-*pfs*-R (5'-CCCAAGCTTC TATAAACTTTTAATTAATC-3', 划线部分为 *Hind* III 酶切位点)为引物, PCR 扩增 *pfs* 基因, PCR 扩增体系为: 25.0 μL PCR Mix, 上下游引物(10.0 μmol/L) 各 1.0 μL, 基因组 DNA (100 mg/L) 1.0 μL, 双蒸水补充至 50.0 μL; PCR 扩增条件为: 98 °C 40 s, 98 °C 15 s, 56 °C 15 s, 72 °C 30 s, 35 个循环; 72 °C 10 min。产物回收后连接 T 载体, 送华津生物科技公司测序。利用 DNASTar 软件中的 MegAlign 进行核苷酸序列的同源性分析。

1.3 重组蛋白的表达、纯化

将本实验室前期构建的分别表达 APEC 的 *luxS* 和 *pfs* 重组表达质粒 pET28a-APEC-*luxS* 和 pET28a-APEC-*pfs*^[5]和本实验构建的表达 RA 的 *pfs* 重组表达质粒 pCold-RA-*pfs* 分别转化大肠杆菌 BL21(DE3)菌株, 37 °C 培养至 OD_{600} 约为 0.6–0.8, 经 IPTG 诱导表达后, 收集菌体, 用超声细胞裂解仪 130 Hz 工作 90 s, 间歇 90 s, 超声破碎裂解菌体, 4 °C、12 000 r/min 离心 10 min, 分别收集上清和沉淀并进行 SDS-PAGE 分析, 以检测基因表达情况。将上述表达的重组蛋白分别命名为 APEC-LuxS、APEC-Pfs 和 RA-Mtan。

重组蛋白的纯化用美国 Bio-Rad 公司的高效亲和纯化层析仪进行。将收集的洗脱蛋白进行 SDS-PAGE 鉴定蛋白纯度, 并采用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒测定样品蛋白的浓度。

1.4 HCY 标准曲线的建立

通过测定重组蛋白 APEC-LuxS、APEC-Pfs 和 RA-Mtan 催化底物 SAH 后形成 HCY 的量, 评价蛋白的酶活。参照文献[7]方法并进行适当修改, 建立 HCY 标准曲线, 具体方法如下: 将 100 μL 不同浓度的同型半胱氨酸(用 10 mmol/L pH 7.5 磷酸钠缓冲液, 将 HCY 稀释到 1–200 μmol/L)与 50 μL 5 mmol/L 的 Ellman's 试剂混匀后, 避光置于 37 °C 培养箱孵育 30 min, 用酶标仪测量不同浓度的 HCY 在 412 nm 的吸收峰值, 建立 HCY 标准曲线。

1.5 RA 的 Mtan 对 SAH 的催化活性检测

将纯化蛋白超滤后, 在 3 管终浓度为 1 mmol/L SAH 的磷酸钠(10 mmol/L, pH 7.5)缓冲液中, 分别加入终浓度为 0.5 mg/mL 的 APEC-LuxS+APEC-Pfs (阳性对照)、APEC-LuxS+RA-Mtan 和 RA-Mtan (阴性对照), 37 °C 孵育 1 h。将反应液用 10 kD 蛋白超滤管进行超滤, 去除反应液中的蛋白后, 取出 100 μL 滤液与 50 μL 5 mmol/L 的 Ellman's 试剂混匀后避光置于 37 °C 孵育 30 min。用酶标仪测量每组在 412 nm 处的吸收峰值, 参照 1.4 HCY 标准曲线, 测定每组生成同型半胱氨酸的浓度。

1.6 生成 AI-2 活性检测

将哈维弧菌 BB170 在 28 °C 培养过夜, 培养至 OD_{600} 为 3.0, 用新配制的 AB 培养基^[1]以 1:5 000 稀释 BB170 培养物。将 1.5 中反应产物超滤液在无菌条件下用 0.22 μm 的滤器过滤后, 用于 AI-2 活性检测。具体方法参照文献[1], 并做适当修改。具体方法如下: 900 μL 的 AB 培养基, 加入无菌的各蛋白滤液 100 μL , 28 °C 培养 3 h 后用多功能酶标仪测定生物发光。同时以哈维弧菌 BB152 培养上清为阳性对照、DH5 α 培养上清为阴性对照, 每组重复 3 次。

2 结果与分析

2.1 不同血清型鸭疫里默氏杆菌 *pfs* 基因的 PCR 扩增结果及序列分析

PCR 检测结果表明, 不同血清型的 RA 菌株均可以扩增到大小约为 688 bp 的 *pfs* 基因(图 1)。对扩增的序列测序后, 运用 DNASTar 软件进行序列分析, 结果表明该基因在不同血清型间的核苷酸一致在 93.9%–100%之间(图 2)。

2.2 鸭疫里默氏杆菌 Mtan 蛋白的表达、纯化

将包含重组表达质粒 pCold-RA-*pfs* 的 BL21 重组菌经 IPTG 诱导后, 用 SDS-PAGE 检测, 结果表明, 获得以可溶性方式表达的 RA 的重组 Mtan 蛋白, 大小约为 85 kD, 与预期大小一致(图 3)。

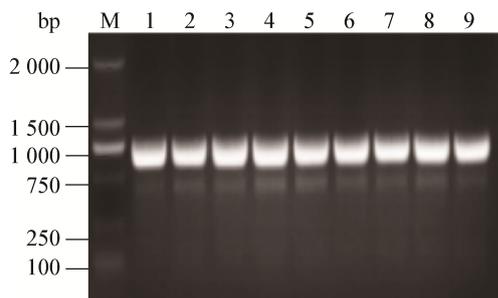


图 1 9 株不同血清型鸭疫里默氏杆菌 *pfs* 基因 PCR 检测
Figure 1 The *pfs* gene was amplified from 9 isolation strains of *Riemerella anatipestifer* from different serotypes
注: M: DL2000 DNA 分子标准; 1–9: RA 9 株不同血清型的 *pfs* 基因 PCR 扩增条带。

Note: M: DL2000 DNA marker; 1–9: The *pfs* from different serotypes in RA.

		Percent identity										
		1	2	3	4	5	6	7	8	9		
Divergence	1	■	94.0	100.0	94.0	94.0	100.0	98.7	94.0	93.9	1	CH3
	2	6.3	■	94.0	100.0	100.0	94.0	94.8	100.0	99.9	2	YXB12
	3	0.0	6.3	■	94.0	94.0	100.0	98.7	94.0	93.9	3	WJ4
	4	6.3	0.0	6.3	■	100.0	94.0	94.8	100.0	99.9	4	TH4
	5	6.3	0.0	6.3	0.0	■	94.0	94.8	100.0	99.9	5	YB2
	6	0.0	6.3	0.0	6.3	6.3	■	98.7	94.0	93.9	6	YXB1
	7	1.3	5.5	1.3	5.5	5.5	1.3	■	94.8	94.6	7	HXB2
	8	6.3	0.0	6.3	0.0	0.0	6.3	5.5	■	99.9	8	YXL1
	9	6.5	0.1	6.5	0.1	0.1	6.5	5.7	0.1	■	9	XYB1
		1	2	3	4	5	6	7	8	9		

图 2 核苷酸序列比对分析图

Figure 2 Nucleotide sequence analysis

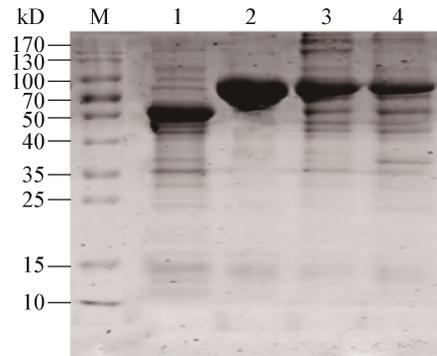


图 3 RA-Mtan 的表达、纯化

Figure 3 Expression and purification of RA-Mtan

注: M: 蛋白质分子质量 Marker; 1: 转化空质粒 pColdTF 的 BL21 (阴性对照); 2: 纯化的 RA-Mtan; 3: 转化 pCold-RA-*pfs* 的 BL21 重组菌; 4: 转化 pCold-RA-*pfs* 的 BL21 重组菌超声上清。

Note: M: Protein marker; 1: The total cellular proteins from *E. coli* BL21 containing pColdTF (serve as negative control); 2: The purification of RA-Mtan; 3: The total cellular proteins containing expression plasmids pCold-RA-*pfs*; 4: The supernatant of total cellular proteins containing expression plasmids pCold-RA-*pfs*.

APEC-LuxS 和 APEC-Pfs 的纯化、表达参照本实验室前期建立的方法。RA-Mtan、APEC-LuxS 和 APEC-Pfs 通过 His-Binding-Resin 进行亲和层析纯化后经 BCA 法测定的浓度分别为 0.67、1.30 和 2.30 g/L。

2.3 建立 HCY 标准曲线及测定 RA-Mtan 的酶活

将不同浓度 (0–200 $\mu\text{mol/L}$) 的同型半胱氨酸 (HCY) 分别与 5 mmol/L Ellman's 试剂混匀, 37 °C 作用 30 min 后, 测定其在 412 nm 波长下的光吸收值。依据得到的数据建立 HCY 浓度测定标准曲线(图 4)。

当 200 μL 0.5 g/L 的 APEC-LuxS 与 APEC-Pfs 酶蛋白组合共同作用于 200 μL 1 mmol/L 的底物 SAH 时, 可以生成 306.6 $\mu\text{mol/L}$ 的 HCY, 当 APEC-LuxS

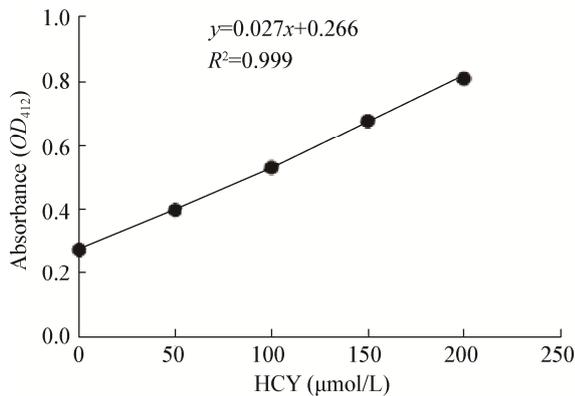


图4 HCY 浓度测定标准曲线

Figure 4 Standard curve to determine HCY concentration

和 RA-Mtan 酶蛋白组合共同作用于相同浓度的 SAH 时,生成 HCY 的浓度为 176.7 $\mu\text{mol/L}$,而当 RA-Mtan 单独作用于底物 SAH 时,不能产生 HCY。

2.4 Mtan 催化 SAH 生成 AI-2 活性

AI-2 活性检测结果表明,当 APEC-LuxS 和 APEC-Pfs 共同作用于 SAH 时,能产生有活性的 AI-2 分子;同样地,当 APEC-LuxS 和 RA-Mtan 共同作用于 SAH 时,也能产生有活性的 AI-2。但当 RA-Mtan 单独作用于 SAH 时,不能产生 AI-2,表明鸭疫里默氏杆菌中 Mtan 与大肠杆菌的 Pfs 功能相似,参与 AI-2 的合成(图 5)。

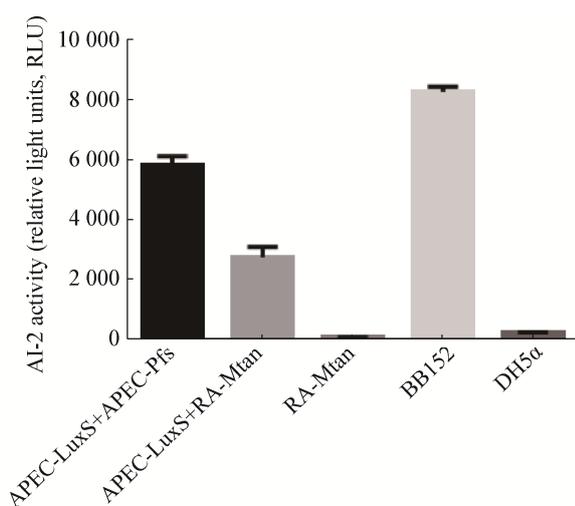


图5 AI-2 活性检测

Figure 5 AI-2 bioassay

3 结论与讨论

pfs 基因编码 Pfs (又称为 Mtan),是细菌甲硫氨酸循环的关键酶,主要参与多聚胺的生物合成、密度感应系统调控、嘌呤和蛋氨酸的合成与代谢等过程^[8]。不同的细菌采用不同的甲硫氨酸代谢通路,在布鲁氏菌和铜绿假单胞菌中,甲硫氨酸与 ATP 反应生成 S-腺苷甲硫氨酸(S-Adenosylmethionine, SAM),SAM 去甲基后生成 SAH,SAH 在 SahH 作用下生成 HCY,HCY 重新生成甲硫氨酸,此过程不产生 AI-2^[9-11]。但在大肠杆菌和沙门氏菌中,甲硫氨酸代谢需要 Pfs 和 LuxS 的参与,通过催化底物 SAH 和 SRH 产生 AI-2^[12]。

近年的研究表明 *pfs* 在细菌代谢过程中具有重要作用,参与调控细菌的众多生理过程。在金黄色葡萄球菌中 *pfs* 基因缺失,可降低金黄色葡萄球菌的自溶能力和影响其生物被膜的形成能力^[13],在肺炎链球菌中 *pfs* 编码 Mtan 蛋白,参与对其密度感应系统的调控^[2,14]。本实验室前期研究表明 RA 不产生 AI-2^[3],但存在 *pfs*。RA 的致病性研究结果表明,RA 主要的致病血清型是 1、2 和 10 型,其 *pfs* 序列是否存在差异?在体外 RA 的 *pfs* 基因编码产物 Mtan 蛋白是否能催化 SAH 产生具有活性的 AI-2 分子?目前尚未见相关研究报道。本研究对 9 株 RA 的 1、2 和 10 型的 *pfs* 序列进行克隆、测序,序列分析表明,*pfs* 在 3 种血清型中的一致性高,表明该基因保守性高,与血清型的相关性不大。

AI-2 分子的产生需要 LuxS 和 Pfs 的参与^[1],虽然 RA 中存在 *pfs*,但其编码产物 Mtan 是否能催化 SAH 产生 AI-2 分子仍不明确。因此本研究利用禽致病性大肠杆菌的 LuxS 和 RA 的 Mtan 共同作用于 SAH 验证其催化活性,结果表明在体外 Mtan 可以催化 SAH 生成 AI-2。由于 RA 不产生 AI-2,而 SAH 在胞内蓄积对细菌是有毒性的,推测在 RA 中,存在类似于布鲁氏菌和铜绿假单胞菌的甲硫氨酸代谢通路,即 RA 中的 SAH 是在 SahH 作用下生成 HCY,HCY 重新生成甲硫氨酸,相关研究仍有待深入。本研究为进一步研究 *pfs* 对 RA 的调控作用

提供参考。

参考文献

- [1] Bao H. The regulation of quorum sensing of LuxS/AI-2 in avian pathogenic *Escherichia coli*[D]. Hefei: Master's Thesis of Anhui Agricultural University, 2013 (in Chinese)
白灏. LuxS/AI-2 型密度感应系统对禽致病性大肠杆菌的调控研究[D]. 合肥: 安徽农业大学硕士学位论文, 2013
- [2] Thomas K, Cameron SA, Almo SC, et al. Active site and remote contributions to catalysis in methylthioadenosine nucleosidases[J]. *Biochemistry*, 2015, 54(15): 2520-2529
- [3] Fan GB. Function of the *pfs* gene in *Riemerella anatipestifer*[D]. Beijing: Master's Thesis of Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2015 (in Chinese)
范国博. 鸭疫里默氏杆菌 *pfs* 基因的功能研究[D]. 北京: 中国农业科学院硕士学位论文, 2015
- [4] Pereira CS, McAuley JR, Taga ME, et al. *Sinorhizobium meliloti*, a bacterium lacking the autoinducer-2 (AI-2) synthase, responds to AI-2 supplied by other bacteria[J]. *Molecular Microbiology*, 2008, 70(5): 1223-1235
- [5] Fan GB, Han XG, Zhang YX, et al. Preparation of monoclonal antibodies to *pfs* of *Riemerella anatipestifer*[J]. *Chinese Journal of Animal Infectious Diseases*, 2015, 23(5): 41-45 (in Chinese)
范国博, 韩先干, 张宇曦, 等. 鸭疫里默氏杆菌 *pfs* 基因的克隆表达及单克隆抗体制备[J]. *中国动物传染病学报*, 2015, 23(5): 41-45
- [6] Hu QH, Han XG, Zhou XJ, et al. Characterization of biofilm formation by *Riemerella anatipestifer*[J]. *Veterinary Microbiology*, 2010, 144(3/4): 429-436
- [7] Sperandio V, Mellies JL, Nguyen W, et al. Quorum sensing controls expression of the type III secretion gene transcription and protein secretion in enterohemorrhagic and enteropathogenic *Escherichia coli*[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1999, 96(26): 15196-15201
- [8] Kim Y, Lew CM, Gralla JD. *Escherichia coli pfs* transcription: regulation and proposed roles in autoinducer-2 synthesis and purine excretion[J]. *Journal of Bacteriology*, 2006, 188(21): 7457-7463
- [9] Redanz S, Standar K, Podbielski A, et al. Heterologous expression of *sahH* reveals that biofilm formation is autoinducer-2-independent in *Streptococcus sanguinis* but is associated with an intact activated methionine cycle[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2012, 287(43): 36111-36122
- [10] Sun JB, Daniel R, Wagner-Döbler I, et al. Is autoinducer-2 a universal signal for interspecies communication: a comparative genomic and phylogenetic analysis of the synthesis and signal transduction pathways[J]. *BMC Evolutionary Biology*, 2004, 4(1): 36
- [11] Halliday NM, Hardie KR, Williams P, et al. Quantitative liquid chromatography-tandem mass spectrometry profiling of activated methyl cycle metabolites involved in LuxS-dependent quorum sensing in *Escherichia coli*[J]. *Analytical Biochemistry*, 2010, 403(1/2): 20-29
- [12] Liu L. Regulation of AI-2 on biological functions of *Riemerella anatipestifer*[D]. Beijing: Master's Thesis of Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2013 (in Chinese)
刘蕾. AI-2 对鸭疫里默氏杆菌生物学功能调控的研究[D]. 北京: 中国农业科学院硕士学位论文, 2013
- [13] Bao Y. Functional research of *pfs* and target treatment of infection of *Staphylococcus aureus*[D]. Hefei: Doctoral Dissertation of University of Science and Technology of China, 2012 (in Chinese)
鲍燕. 金黄色葡萄球菌 *pfs* 的功能性研究及金葡萄感染的靶向性治疗[D]. 合肥: 中国科学技术大学博士学位论文, 2012
- [14] Parveen N, Cornell KA. Methylthioadenosine/S-adenosylhomocysteine nucleosidase, a critical enzyme for bacterial metabolism[J]. *Molecular Microbiology*, 2011, 79(1): 7-20