

副溶血性弧菌 *vanM* 基因原核表达及酰基高丝氨酸内酯信号分子鉴定研究

吴葵^{1,2,3}, 吴清平², 张菊梅², 徐晓可²

(1. 中国科学院南海海洋研究所, 广东广州 510301) (2. 广东省微生物研究所, 省部共建华南应用微生物国家重点实验室, 广东省菌种保藏与应用重点实验室, 广东广州 510070) (3. 中国科学院大学, 北京 100049)

摘要: 从副溶血性弧菌 ATCC33847 扩增 *vanM* 基因, 连接到 pMD19-T 载体进行克隆测序和序列比对; 将测序正确的 *vanM* 序列经 *NdeI* 和 *EcoRI* 酶切后连接到 pET22b; 以 IPTG 诱导 *vanM* 基因在 BL21 (DE3) 中表达; 利用 acyl-HSL 报告菌株 KYC55 检测 ATCC33847 和带有 *vanM* 基因的大肠杆菌的 acyl-HSL 活性; 萃取 VanM 合成的 acyl-HSL 信号分子, 经 HPLC-MS 测试后与标准品进行对比分析。成功测序了 ATCC33847 *vanM* 基因, 与鳃弧菌 *vanM* 基因序列相似性达到 57%; 并构建了 pET22b-*vanM* 表达质粒, 以 0.6 mmol/L IPTG 诱导 BL21 (DE3) 表达系统时 VanM 融合蛋白表达量最大; 经过 KYC55 检测 ATCC33847 和带有 pET22b-*vanM* 的大肠杆菌能够产生 acyl-HSL 活性; HPLC-MS 分析显示, ATCC33847 和携带 pET22b-*vanM* 的 BL21(DE3) 萃取物中含有 3-Hydroxybutanoyl-HSL (3-OH-C4-HSL) 和 3-Hydroxydecanoyl-HSL (3-OH-C10-HSL) 信号分子。本研究克隆表达了副溶血性弧菌 *vanM*, 首次证明了副溶血性弧菌利用 VanM 信号分子合成酶合成 acyl-HSL 信号分子 3-OH-C4-HSL 和 3-OH-C10-HSL。

关键词: 副溶血性弧菌; *vanM*; 原核表达; 酰基高丝氨酸内酯

文章编号: 1673-9078(2015)6-29-35

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2015.6.006

Research on Prokaryotic Expression of *Vibrio parahaemolyticus vanM* Gene and *N*-acyl-homoserine Lactone Identification

WU Kui^{1,2,3}, WU Qing-ping², ZHANG Ju-mei², XU Xiao-ke²

(1. South China Sea Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510301, China) (2. Guangdong Institute of Microbiology, State Key Laboratory of Applied Microbiology Southern China, Guangdong Provincial Key Laboratory of Microbial Culture Collection and Application, Guangzhou, 510070, China) (3. University of the Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Abstract: The *vanM* sequence was amplified for *V. parahaemolyticus* ATCC33847 genome and inserted into pMD19-T vector for clone sequencing and sequence alignment. The correct *vanM* fragment was double-digested by *NdeI* and *EcoRI* and ligated into the pET22b vector for gene expression. IPTG was used to induce *vanM* prokaryotic expression. An acyl-HSL bio-reporter strain KYC55 was used to detect the acyl-HSL activities of ATCC33847 and *Escherichia coli* carrying the *vanM* gene. HPLC-MS assay was performed to identify *vanM*-associated acyl-HSL molecules in extracts from ATCC33847 and *Escherichia coli*. The ATCC33847 *vanM* sequence was aligned with that of *V. anguillarum vanM*, with the similarity of 57%. The expression vector pET22b-*vanM* was constructed and induced to produce the highest level of VanM protein by induction with 0.6mmol/L IPTG in BL21(DE3). ATCC33847 and BL21(DE3) containing pET22b-*vanM* presented an acyl-HSL activity, which was detected by KYC55. HPLC-MS results indicated that both 3-Hydroxybutanoyl-HSL (3-OH-C4-HSL) and 3-Hydroxydecanoyl-HSL (3-OH-C10-HSL) were detected in extracts from ATCC33847 and BL21(DE3)(pET22b-*vanM*). In this study, the prokaryotic expression of *V. parahaemolyticus vanM* confirmed that *V. parahaemolyticus vanM* was responsible for the synthesis of *V. parahaemolyticus* quorum sensing signals, 3-OH-C4-HSL and 3-OH-C10-HSL.

Key words: *N*-acyl-homoserine lactone; prokaryotic expression; *vanM*; *Vibrio parahaemolyticus*

收稿日期: 2014-05-22

基金项目: 广东省自然科学基金研究团队项目 (S2012030006235); 广州市科技计划项目 (201300000074)

作者简介: 吴葵 (1985-) 男, 博士研究生, 主要从事副溶血性弧菌相关食品安全研究

通讯作者: 吴清平 (1962-), 男, 博士, 研究员, 主要从事微生物安全检测与控制研究

副溶血性弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*)是一种重要而常见的食源性致病菌,广泛分布于海洋和湖泊等盐性环境中,感染包括众多鱼虾贝类等经济动物在内的海洋动物,能够引起鱼类皮肤溃疡、虾红体病等弧菌病,威胁水产养殖业的发展^[1-2]。人们食用其污染的鱼、虾、贝类等水产品,经常导致食物中毒事件的发生,食物中毒病人主要的临床症状有水样腹泻和腹部痉挛性疼痛,严重者可引起败血症^[3]。

为了加强副溶血性弧菌预防控制技术手段,人们正抓紧发掘其危害形成机理和控制理论。群体感应(quorum sensing)作为一种广泛的分子调控机制,指微生物某些基因的表达受到与群体密度相关的信号分子调控的现象,被认为能够调控众多病原菌的生理过程^[4]。用于群体感应调控的信号分子种类繁多,按照来源和分子结构可分成以下几类^[4]:(1)革兰氏阴性细菌的酰基高丝氨酸内酯化合物(N-acyl-homoserine lactone, acyl-HSL)。acyl-HSL具有一个高丝氨酸内酯环头部,不同的acyl-HSL具有不同的酰基侧链尾巴,这也造成了不同细菌在利用acyl-HSL信号分子时的差异。(2)革兰氏阳性细菌的自体诱导肽(autoinducing peptides, AIPs)。(3)自体诱导物-2(autoinducer-2, AI-2)。AI-2为呋喃硼酰二酯,由luxS基因编码的LuxS蛋白负责合成,能够被革兰氏阴性和阳性细菌细菌所识别,被认为是不同种属细菌之间的交流信号。(4)其他信号分子。随着微生物群体感应的研究,越来越多的新型群体感应分子被发现。副溶血性弧菌是一个革兰氏阴性的弧菌属成员,虽然目前关于副溶血性弧菌的群体感应研究少有报道,但从Genbank中已有的副溶血性弧菌基因组数据^[5]推断,副溶血性弧菌至少具有3种群体感应通路系统:VanM/N、LuxS/PQ、CqsA/S,分别对应acyl-HSL、AI-2、和霍乱样自体诱导物1(cholerae autoinducer 1, CAI-1)信号分子通路。本研究原核表达副溶血性弧菌群体感应信号分子合成酶基因vanM,并首次鉴定了vanM负责合成的acyl-HSL信号分子。

1 材料与方法

1.1 菌种和质粒

本实验所用菌株为副溶血性弧菌 ATCC33847,基因克隆用宿主菌为大肠杆菌 DH5 α ,表达用宿主为大肠杆菌 BL21(DE3)。acyl-HSL 报告菌株为根癌农杆菌 KYC55^[6],这是一种广谱的acyl-HSL检测工程菌,能够对多种不同侧链的acyl-HSL进行检出。副溶血性弧菌由本实验室保存,大肠杆菌感受态购自天根生物科

技公司, KYC55 由南京农业大学朱军教授惠赠。pMD19-T 克隆载体试剂盒购自 Takara 公司,表达载体为 pET22b,购自 Novagen 公司。所有菌株培养均采用 luria-bertani(LB)培养基,培养基购自广东环凯微生物科技有限公司。在进行副溶血性弧菌培养时,培养基中 NaCl 终浓度提高到 3%;在大肠杆菌和 KYC55 工程菌培养时分别加入相应浓度的抗生素。大肠杆菌培养时 LB 培养基中加入终浓度为 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的氨苄青霉素, KYC55 培养时 LB 培养基中同时加入 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 四环素、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 庆大霉素、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 壮观霉素。

1.2 试剂和实验仪器

细菌基因组抽提试剂盒、质粒抽提试剂盒、胶回收试剂盒和部分生物化学试剂购自上海生工公司。PCR 试剂盒和限制性内切酶 *NdeI* 和 *EcoRI* 以及 T4 ligase 购自 fermentas 公司。测序工作和引物合成由华大基因公司完成。用乙酸乙酯萃取 acyl-HSL,以异丙基- β -D-硫代吡喃半乳糖苷(Isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside, IPTG)诱导基因表达,以 5-溴-4-氯-3-吲哚- β -D-半乳糖苷(5-Bromo-4-chloro-3-indolyl β -D-galactoside, X-Gal)为 acyl-HSL 的检测底物。乙酸乙酯购自广州化学试剂公司。信号分子检测标准品为 3-Hydroxybutanoyl-HSL (3-OH-C4-HSL)、Octanoyl-HSL (C8-HSL)、3-Oxo-octanoyl-HSL (3-Oxo-C8-HSL)、Decanoyl-HSL (C10-HSL)、3-Oxo-decanoyl-HSL (3-Oxo-C10-HSL)、Dodecanoyl-HSL (C12-HSL)、3-Hydroxydodecanoyl-HSL (3-OH-C12-HSL),共 7 种 acyl-HSL 分子, IPTG、X-Gal 和信号分子标准品均购自 Sigma-Aldrich 公司。蛋白质纯化试剂盒购自 Merck 公司,高效液相色谱采用 Agilent Technologies 公司 Agilent 6430 Triple Quad LC/MS 系统。

1.3 副溶血性弧菌 vanM 基因 T 载体克隆和序列分析

设计副溶血性弧菌 vanM 克隆引物,正向引物为 Ex-luxM3F: 5-cacatgatgagctctaagctgtctttgggt-3;反向引物为 Ex-luxM3R: 5-gagaattcaaagcatgttcattcacctgc-3。正向引物带有 *NdeI* 酶切位点(catatg),反向引物带有 *EcoRI* 酶切位点(gaattc)。扩增片段大小约为 1194 bp,包括 vanM 基因 1179 bp 的开放阅读框(Open Reading Frame, ORF)序列。采用 25 μL 扩增体系,各引物终浓度均为 0.4 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 。扩增程序为:95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 4 min,95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 40 s,58 $^{\circ}\text{C}$ 退火 1 min,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1 min,

循环 30 次。PCR 产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳。采用胶回收试剂盒进行切胶回收 PCR 产物。使用 Takara 公司 pMD19-T 载体试剂盒连接回收产物, 构建 pMD19T-vanM 质粒。连接产物转化大肠杆菌 DH5 α , 氨苄青霉素 (ampicillin, Amp) LB 平板 (添加 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 氨苄青霉素) 筛选阳性克隆。利用质粒抽提试剂盒从阳性克隆中抽提 pMD19T-vanM 质粒。取部分 pMD19T-vanM 质粒样品送华大基因公司测序验证, 以 M13 引物测序 (M13F: 5-tgtaaacgacggccagt-3, M13R: 5-caggaacagctatgacc-3)。另取部分 pMD19T-vanM 质粒用于 PCR 验证和 *NdeI* 和 *EcoRI* 双酶切消化。PCR 验证依然使用 M13 引物。限制性内切酶消化产物 1% 琼脂糖凝胶电泳后切胶回收, 用于连接表达载体 pET22b。从 NCBI 网站下载鳗弧菌 (*V. anguillarum*) *vanM* 序列 (序列登录号: AF288163) 和副溶血性弧菌 RIMD2210633 *vanM* 序列 (ID: 1189478), 与测序得到的 ATCC33847 *vanM* 序列进行比对。采用 DNASTAR 软件分析基因序列间的一致性。

1.4 副溶血性弧菌 *vanM* 基因表达载体的构建

将 pMD19T-vanM 和 pET22b 质粒经过 *NdeI* 和 *EcoRI* 双酶切消化, 消化产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳, 利用胶回收试剂盒切胶回收相应片段, 从 pMD19T-vanM 消化产物回收 *vanM* 片段, 从 pET22b 消化产物回收线性化载体。使用 T4 Ligase 将 *vanM* 序列插入 pET22b 载体中, 构建 *vanM* 表达质粒 pET22b-vanM。将连接产物转化常用于原核表达的大肠杆菌 BL21(DE3) 宿主, 通过氨苄青霉素抗生素标记筛选阳性克隆。从阳性克隆菌株中抽提 pET22b-vanM 质粒, 以 Ex-luxM3F/Ex-luxM3R 引物进行 PCR 鉴定, 同时利用 *NdeI* 和 *EcoRI* 进行双酶切鉴定。在表达质粒 pET22b-vanM 中, 由于去除了 *vanM* 基因的终止密码子, 表达得到的 VanM 重组蛋白含有 413 个氨基酸残基, 在 C 端有获得一段来源于 pET22b 序列编码的含有组氨酸标签的尾巴。

1.5 VanM 重组蛋白的原核表达

使用 IPTG 诱导携带 pET22b-vanM 质粒的 BL21(DE3) 表达 VanM 重组蛋白。将带有 pET22b-vanM 质粒和带有 pET22b 质粒的 BL21(DE3) 菌株以 LB 肉汤复壮过夜。复壮过夜的菌体转接到新鲜 LB 肉汤中培养, 取指数生长期的菌液以 1% 体积菌液接种于多支 5 mL LB 肉汤的试管中, 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 下摇床培养 (200 r/min)。当培养液在 600 nm 处光吸收值 (OD_{600}) 达到 0.6~1.0 时, 在各试管中加入 IPTG 溶

液, 使 IPTG 终浓度分别为 0、0.2、0.4、0.6、0.8 mmol/L, 3 继续培养。4 h 后分别从各浓度梯度 IPTG 诱导的培养物中取出 1 mL, 5000 r/min 离心收集菌体。100 μL dH $_2\text{O}$ 重悬菌体, 加入 25 μL 5 \times SDS 上样缓冲液, 95~100 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 10 min。12000 r/min 离心, 取上清直接上样, 以 10% 聚丙烯酰胺胶进行样品总蛋白 SDS-PAGE。电泳完成后, 对 PAGE 胶进行染色脱色, 使用 GE 公司 ImageQuant 350 system 凝胶成像仪照相分析结果。

1.6 酰基高丝氨酸内酯分子活性验证

为了验证了副溶血性弧菌的 acyl-HSL 活性, 我们将 ATCC33847 和 acyl-HSL 报告菌株置于同一平板内共同培养, 但是由于两种菌株的培养条件并不一致, 本研究采用了双层培养基的策略, 具体操作简述如下。首先将复壮的 ATCC33847 划一直线接种于含有 3% NaCl 的无抗生素 LB 琼脂上, 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 24 h; 取出平板, 于培养基上再倾注一层含有 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 四环素、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 庆大霉素、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 壮观霉素和 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ X-Gal 的 LB 琼脂, 待凝固后于上层琼脂划线接种复壮的 KYC55, 为了方便观察, KYC55 垂直于副溶血性弧菌划线; 平板置于 28 $^{\circ}\text{C}$ 培养 48 h, 取出观察结果。

为了验证副溶血性弧菌的 acyl-HSL 活性与 *vanM* 基因相关, 我们分析了带有 pET22b-vanM 和 pET22b 的 BL21(DE3) 衍生菌株 BL21(DE3)(pET22b-vanM) 和 BL21(DE3)(pET22b) 发酵液的 acyl-HSL 活性。按照 1.5 中诱导 *vanM* 基因原核表达的方法, 各取 100 mL 经过 0.6 mmol/L IPTG 诱导 4 h 的发酵液, 离心取上清。使用等体积的乙酸乙酯于磁力搅拌器上常温搅拌萃取 15 min, 分层后收集有机相, 再重复 2 次, 将有机相合并, 常温真空旋转蒸发后, 以 1 mL 甲醇溶解。同样将 C8-HSL 标准品以甲醇溶解。取 5 mL 含有 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ X-Gal 的 KYC55 指数期培养液, 分别向其中加入 10 μL 浓度为 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 C8-HSL 溶液和两种发酵液萃取物。28 $^{\circ}\text{C}$ 继续培养 6 h, 取出观察结果。

1.7 *vanM* 相关高丝氨酸内酯分子的 LC-MS 鉴定

将所有 acyl-HSL 分子标准品以甲醇溶解, 并稀释成 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。以 1.6 的方法萃取 ATCC33847 培养物上清, 将 BL21(DE3)(pET22b-vanM) 和 BL21(DE3)(pET22b) 萃取物以及 ATCC33847 萃取物和 7 种 acyl-HSL 标准品上样进行 LC-MS 分析。所有样品上样前经 0.45 μm 有机滤膜过滤, 上样量为 10

μL。色谱柱为用 Venusil MP C18 柱，规格为 2.1×100 mm，5 μm。以甲醇:水=80:20 恒梯度洗脱，洗脱速度为 0.3 mL/min，柱温 30 °C。acyl-HSL 的分子量呈现规律：当侧链未发生取代或者发生氧取代时，质子化的 acyl-HSL 分子量 (M+H⁺) 为 172+14n；当侧链发生羟基取代时质子化的分子量为 174+14n。Acyl-HSL 质谱时产生分子量大小为 102 的高丝氨酸内酯环碎片。因此设置扫描要求为：1 级质谱分子量大小为 172、186、188、200、214、216、228、242、244、256、270、272、284、298、300，且对应 2 级质谱中存在 102 大小碎片，对 HPLC 样品进行选择扫描。如果 HPLC 谱图出现分子量相符、且与标准品保留时间吻合的物质，就可以判断是何种 acyl-HSL 信号分子。

构建了 pMD19T-vanM 质粒。PCR 结果显示 (图 1)，以 M13 引物扩增 pMD19T-vanM 得到大小约 1300 bp 的目标片段，表明 T 克隆成功。pMD19T-vanM 质粒经过 M13 引物测序，得到了 ATCC33847 的 vanM 基因 ORF 全序列。

2 结果与分析

2.1 副溶血性弧菌 vanM 基因序列分析

我们将 ATCC33847 的 vanM 基因克隆到 pMD19T

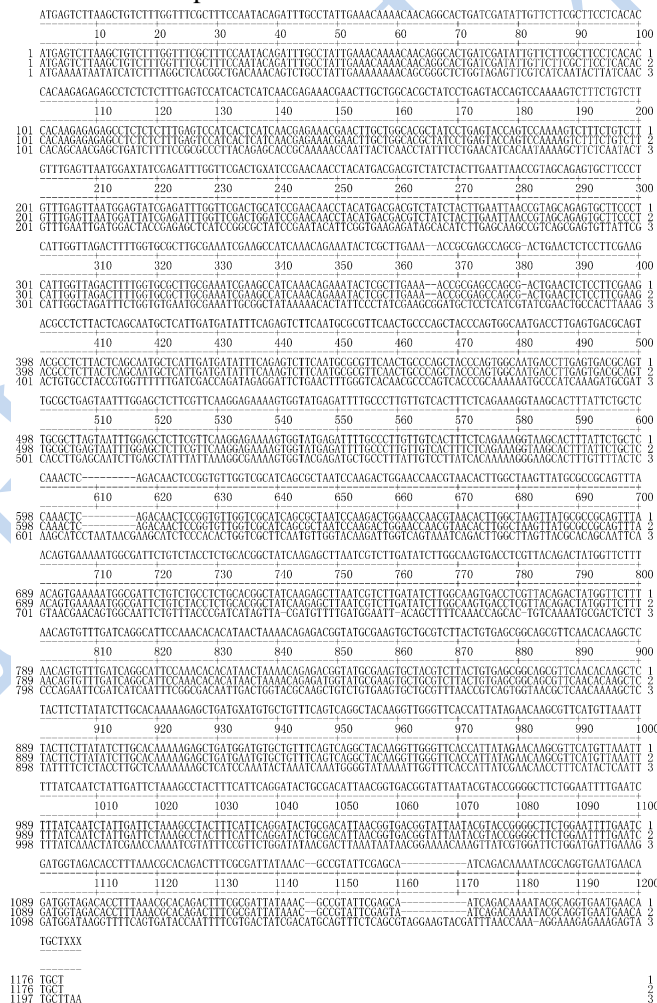


图 2 不同 vanM 序列比对

Fig.2 DNA sequence alignment of different vanM

注：序列来源：1、V. parahaemolyticus ATCC33847；2、V. parahaemolyticus RIMD2210633；3、V. anguillarum。

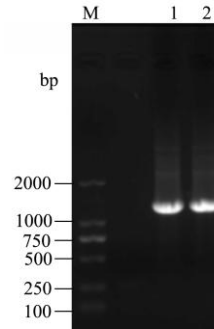


图 1 pMD19T-vanM 的 PCR 鉴定

Fig.1 PCR analysis of pMD19T-vanM using Ex-luxM3F/Ex-luxM3R primers

注：M：DL2000；1、2：pMD19T-vanM 扩增条带。

将来源于副溶血性弧菌 ATCC33847、副溶血性弧菌 RIMD2210633 和鳗弧菌的 *vanM* 基因 ORF 进行序列比对。在 DNASTar 软件 MegAlign 中运行 Clustal W 比对程序, 结果如图 2 所示。ATCC33847 的 *vanM* 序列与 RIMD2210633 高度相似, 在开放读码框中只有 10 处碱基不同, DNA 序列一致性达到 99%, 而且将两段序列翻译成蛋白质后, 氨基酸序列几乎完全一致。这说明成功获得了副溶血性弧菌 *vanM* 基因 ORF 序列。两段副溶血性弧菌 *vanM* 序列与鳗弧菌 *vanM* 序列一致性达到 57%。鳗弧菌 *vanM* 基因负责信号分子 Hexanoyl-HSL(C6-HSL) 和 3-Hydroxyhexanoyl-HSL(3-OH-C6-HSL)合成^[7]。从 DNA 序列相似性的角度出发, 我们推断副溶血性弧菌 *vanM* 基因同样具有负责某些 acyl-HSL 分子合成的功能。

2.2 *vanM* 基因的大肠杆菌表达分析

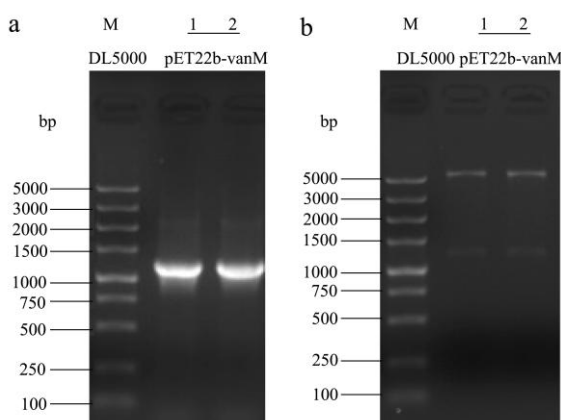


图 3 pET22b-vanM 鉴定

Fig.3 Identification of pET22b-vanM plasmid

注: A: Ex-luxM3F/Ex-luxM3R 引物 PCR 鉴定; B: pMD19T-vanM 的 *NdeI* 和 *EcoRI* 双酶切鉴定。

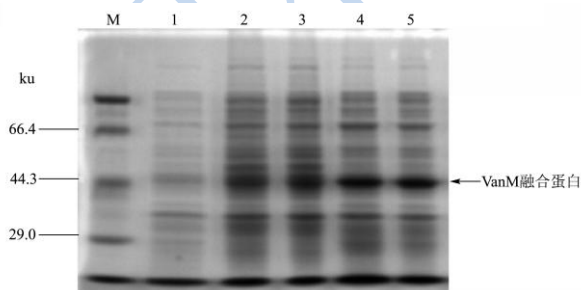


图 4 BL21 (pET22b-vanM) 总蛋白 SDS-PAGE

Fig.4 SDS-PAGE analysis of BL21(pET22b-vanM) total proteins

注: M: S530 蛋白 marker; 1~5: 0、0.2、0.4、0.6、0.8mmol/L IPTG。

本研究构建了 pET22b-vanM 表达质粒, 并进行了

PCR 和酶切鉴定验证。图 3A 为 pET22b-vanM 经 Ex-luxM3F/Ex-luxM3R 引物扩增结果, 得到大小约 1240 bp 的扩增片段。图 3B 显示 pET22b-vanM 经 *NdeI* 和 *EcoRI* 双酶切后得到一段大小约为 5500 bp 的 pET22b 线性化片段和一段约 1200 bp 包含 *vanM* ORF 序列的片段。两个结果显示 pET22b-vanM 构建成功。

利用不同浓度 IPTG 诱导带有 pET22b-vanM 质粒的大肠杆菌 BL21(DE3), 通过灰度分析发现, SDS-PAGE 图中, 分子量 44 ku 附近有蛋白随着 IPTG 浓度升高而增多, 当 IPTG 浓度为 0.6 mmol/L 时达到最大。VanM 重组蛋白含有 413 个氨基酸残基, 大小约为 45 ku, 与 SDS-PAGE 图中被诱导的蛋白大小一致, 说明 VanM 被 IPTG 诱导表达, 当 IPTG 浓度达到 0.6 mmol/L, VanM 表达水平不再随着 IPTG 浓度升高而增高。

2.3 酰基高丝氨酸内酯分子生物活性分析

根据 Zhu 的描述^[6]利用 T7 表达系统过表达 acyl-HSL 受体蛋白 TraR, KYC55 能够非常敏感的检测至少 29 种类不同侧链 acyl-HSL。当培养基中存在 acyl-HSL 时, acyl-HSL 与 TraR 结合, 使得 KYC55 中的 *traI-lacZ* 融合基因表达, 如果培养基中存在 X-gal 底物, 那么 KYC55 将显蓝色。由于 KYC55 和 ATCC33847 培养条件不同, 采用双层平板划线检测 ATCC33847 的 acyl-HSL 活性, 结果如图 5 所示。白色菌线为 ATCC33847, 位于底层琼脂上, 在覆盖顶层琼脂时已经于 37 °C 培养 24 h 以确保 AHL 产生。另一条菌线为 KYC55, 28 °C 培养 48 h 后, 可以明显观察到 KYC55 菌线呈蓝色, 而且蓝色从中间向上下两边逐渐变淡。说明 ATCC33847 产生了 acyl-HSL 分子, 并且 acyl-HSL 分子从底层琼脂扩散到顶层琼脂, 越靠近 ATCC33847 菌线, acyl-HSL 分子浓度越高, KYC55 的蓝色越深。



图 5 ATCC847 的 acyl-HSL 活性验证

Fig.5 ATCC33847 acyl-HSL activity detection

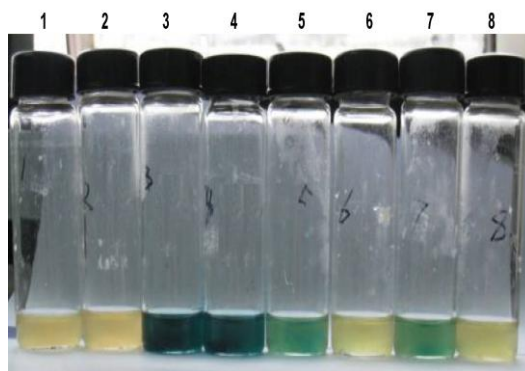


图6 *vanM*相关 acyl-HSL 活性验证

Fig.6 Detection of the *vanM*-associated acyl-HSL activity

注：含有 X-Gal 的 KYC55 培养物利用不同萃取物或 acyl-HSL 处理，1、2: H₂O; 3、4: C8-HSL; 5、7: BL21(DE3) (pET22b-*vanM*) 萃取物; 6、8: BL21(DE3) (pET22b) 萃取物。

在确定 ATCC33847 的 acyl-HSL 活性后，我们进一步分析了 *vanM* 基因与该活性的相关性。将 pET22b-*vanM* 转化 BL21(DE3)后，大肠杆菌发酵液萃取物能够使带有 X-Gal 的 KYC55 培养物变蓝。而带有 pET22b 空载体的 BL21(DE3)发酵液萃取物并不能使得带有 X-Gal 的 KYC55 培养物变蓝（图 6）。这说明副溶血性弧菌 *vanM* 基因在大肠杆菌中表达，使得 BL21(DE3)获得了 acyl-HSL 活性。副溶血性弧菌 *vanM* 负责某种 AHL 分子在大肠杆菌中合成。

2.4 *vanM* 基因对应酰基高丝氨酸内酯分子

LC-MS 鉴定

在 C18 反相 HPLC 分析时，分子量越小，亲水性越强的 acyl-HSL 分子保留时间越短。根据本研究的色谱条件，7 种标准品分子按照保留时间由小到大顺序为 3-OH-C4-HSL、3-Oxo-C8-HSL、C8-HSL、3-Oxo-C10-HSL、C10-HSL、3-OH-C12-HSL、C12-HSL、保留时间分别为 1 min、1.5 min、1.8 min、1.9 min、2.6 min、2.8 min、4.3 min。

如表 1 所示，通过 LC-MS 选择性扫描，在 ATCC33847 萃取液中，我们发现了质子化后(M+H⁺)分子量为 (m/z) 为 188 和 272 的物质；在 BL21(DE3)(pET22b-*vanM*)萃取液中，我们同样发现分子量为 188 和 272，以及少量分子量为 172 的物质。分析这些物质的 2 级质谱，发现均含有分子量大小为 102 的 2 级质谱碎片。而在 BL21(DE3)(pET22b)萃取液中未发现任何符合扫描要求的物质。ATCC33847 萃取液和 BL21(DE3)(pET22b-*vanM*)萃取液中，(M+H⁺)分子量为 188 的物质 HPLC 保留时间为 1.0 min，与标

准品 3-OH-C4-HSL 保留时间一致，说明该物质为 3-OH-C4-HSL。(M+H⁺) 分子量为 272 的物质 HPLC 保留时间为 1.9 min，与标准品 3-O-C10-HSL 保留时间一致。由于在 acyl-HSL 侧链相同位置发生羟基取代和氧取代，两种分子极性相似，HPLC 保留时间非常接近^[8]，因此推测该 HPLC 保留时间为 1.9 min、质谱分子量大小为 272、2 级质谱包含 102 大小碎片的物质为 3-Hydroxydecanoyl-HSL (3-OH-C10-HSL)。在 BL21(DE3)(pET22b-*vanM*) 萃取液样本中监测到的质谱分子量大小为 172 的物质，保留时间为 1.1 min，比 3-OH-C4-HSL 分子保留时间略大，推断为 Butanoyl-HSL (C4-HSL)。根据以上结果我们初步推断，副溶血性弧菌产生 2 种主要的 AHL 信号分子，为 3-OH-C4-HSL 和 3-OH-C10-HSL，它们均由 VanM 蛋白合成。acyl-HSL 合成酶的功能是将酰基载体蛋白 (acyl carrier protein, ACP) 上结合的酰基转移到 S-腺苷甲硫氨酸 (S-adenosylmethionine, SAM) 上，本质上是一种酰基转移酶。不同的 acyl-HSL 合成酶对酰基底物表现出不同的偏好性^[13]，因而每种合成酶仅负责一种信号分子或者 2 种大小结构相近信号分子的合成。然而本研究发现副溶血性弧菌 VanM 酶负责合成的两种信号分子分子量相差明显：3-OH-C4-HSL (分子量 187) 和 3-OH-C10-HSL (分子量 271)。推测副溶血性弧菌 VanM 在合成信号分子时存在某种尚未证实的规则。

表 1 萃取物中 acyl-HSL 的 HPLC 检测

Table 1 Detection of acyl-HSL in different extracts

扫描分子量 (M+H ⁺)	保留时间/min			acyl-HSL 类型
	ATCC33847	BL21(DE3) (pET22b- <i>vanM</i>)	BL21(DE3) (pET22b)	
172	-	1.1	-	C4-HSL
186	-	-	-	
188	1.0	1.0	-	3-OH-C4-HSL
200	-	-	-	
214	-	-	-	
216	-	-	-	
228	-	-	-	
242	-	-	-	
244	-	-	-	
256	-	-	-	
270	-	-	-	
272	1.9	1.9	-	3-OH-C10-HSL
284	-	-	-	
298	-	-	-	
300	-	-	-	

3 结论

acyl-HSL 分子是一类较为常见的群体感应信号分子, 在各类革兰氏阴性细菌中均有报道。根系微生物产生 acyl-HSL 调节生物固氮等功能^[9], 食品腐败相关的一些微生物也能够产生 acyl-HSL 分子^[10], 在多种海洋弧菌中, 不同种类 acyl-HSL 分子调节生物发光^[11]。食源性致病菌耶尔森氏菌 (*Yersinia* spp.) 通过 acyl-HSL 调节自身基因表达^[12]。国内外弧菌群体感应研究表明^[11], 费氏弧菌 (*V. fisheri*) 产生 3-oxohexanoyl-HSL(3-O-C6-HSL)和 C8-HSL 调节生物发光; 而哈氏弧菌利用 3-OH-C4-HSL 调节生物发光和 III 型分泌系统基因的表达; 鳗弧菌拥有 3 种 acyl-HSL 信号分子: C6-HSL、3-OH-C6-HSL 和 3-O-C10-HSL, 调节它的生物膜形成; 而霍乱弧菌(*V. cholerae*)则不具有 acyl-HSL 介导的群体感应通路。作为一种重要的食源性致病菌, 在其它弧菌属多个成员 acyl-HSL 群体感应通路被阐明的背景下, 副溶血性弧菌弧菌群体感应研究亟需深入开展, 为预防和控制副溶血性弧菌危害提供理论基础。一般来说, 鉴定群体感应信号分子往往是从细菌本身直接提取。然而考虑到副溶血性弧菌中可能存在的复杂调控体系, 我们不确定副溶血性弧菌是否大量合成 acyl-HSL 信号分子, 而在大肠杆菌体系中我们可以保证产生充足的信号分子合成酶, 能够提高发酵液中信号分子的浓度, 从而减少了信号分子的制备工作; 另外, 为了研究副溶血性弧菌信号分子合成酶基因 *vanM* 是否负责相应信号分子的合成, 需要将 *vanM* 基因在非副溶血性弧菌体系中表达, 分析 *vanM* 的存在带来了哪些信号分子。事实上, 在大肠杆菌体系中异源表达特定的信号分子合成酶基因鉴定相应信号分子这一策略得到了一些文献的支持: Higgs^[14]将霍乱弧菌信号分子合成酶基因 *cqsA* 克隆到大肠杆菌中, 用于鉴定相应的信号分子 CAI-1; Spirig^[15]采用相同的策略鉴定了嗜肺军团菌 LAI-1 信号分子。本文克隆表达了副溶血性弧菌 acyl-HSL 合成酶基因 *vanM*, 通过生物报告菌株和 HPLC-MS 方法我们首次证明了副溶血性弧菌利用 *vanM* 基因负责信号分子 3-OH-C4-HSL 和 3-OH-C10-HSL 的合成。

参考文献

[1] Suffredini E, Mioni R, Mazzette R, et al. Detection and quantification of *Vibrio parahaemolyticus* in shellfish from Italian production areas [J]. International Journal of Food Microbiology, 2014, published online: <http://dx.doi.org/>

10.1016/j.ijfoodmicro.2014.04.016

[2] Wang D, Zhang D, Chen W, et al. Retention of *Vibrio parahaemolyticus* in oyster tissues after chlorine dioxide treatment [J]. International Journal of Food Microbiology, 2010, 137(1): 76-80

[3] Su Y C, Liu C C. *Vibrio parahaemolyticus*: a concern of seafood safety [J]. Food Microbiology, 2007, 24: 549-558

[4] 吴清平, 吴葵, 叶应旺, 等. 群体感应及其在动物病原菌致病中的作用[J]. 微生物学报, 2009, 49(7): 853-858

WU Qing-ping, WU Kui, YE Ying-wang, et al. Quorum sensing and its roles in pathogenesis among animal-associated pathogens - a review [J]. Acta Microbiologica Sinica, 2009, 49(7): 853-858

[5] Makino K, Oshima K, Kurokawa K, et al. Genome sequence of *Vibrio parahaemolyticus*: a pathogenic mechanism distinct from that of *V. cholerae* [J]. Lancet, 2003, 361: 743-749

[6] Zhu J, Chai Y, Zhong Z, et al. Agrobacterium bioassay strain for ultrasensitive detection of N-acylhomoserine lactone-type quorum-sensing molecules: detection of autoinducers in *Mesorhizobium huakuii* [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2003, 69(11): 6949-6953

[7] Milton D L, Chalker V J, Kirke D, et al. The *LuxM* homologue *VanM* from *Vibrio anguillarum* directs the synthesis of N-(3-hydroxyhexanoyl)homoserine lactone and N-hexanoylhomoserine lactone [J]. Journal of Bacteriology, 2001, 183(12): 3537-3547

[8] Ortori C A, Dubern J F, Chhabra S R, et al. Simultaneous quantitative profiling of N-acyl-L-homoserine lactone and 2-alkyl-4(1H)-quinolone families of quorum-sensing signaling molecules using LC-MS/MS [J]. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2011, 399: 839-850

[9] Krysciak D, Schmeisser C, Preuss S et al. Involvement of multiple loci in quorum quenching of autoinducer I molecules in the nitrogen-fixing symbiont *Rhizobium* (*Sinorhizobium*) sp. strain NGR234 [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2011, 77(15): 5089-5099

[10] Pinto U M, Viana E S, Martins M L, et al. Detection of acylated homoserine lactones in gram-negative proteolytic psychrotrophic bacteria isolated from cooled raw milk [J]. Food Control, 2007, 18(10): 1322-1327

[11] Milton D L. Quorum sensing in vibrios: complexity for diversification [J]. International Journal of Medical Microbiology, 2006, 296: 61-71

[12] LaRock C N, Yu J, Horswill A R, et al. Transcriptome analysis of acetyl-homoserine lactone-based quorum sensing

- regulation in *Yersinia pestis* [J]. PLoS ONE, 2013, 8(4): e62337
- [13] Parsek M R, Val D L, Hanzelka B L, et al. Acyl homoserine-lactone quorum-sensing signal generation [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1999, 96(8): 4360-4365
- [14] Higgins D A, Pomianek M E, Kraml C M, et al. The major *Vibrio cholerae* autoinducer and its role in virulence factor production [J]. Nature, 2007, 450(6): 883-886
- [15] Spirig T, Tiaden A, Kiefer P, et al. The *Legionella* autoinducer synthase *LqsA* produces an α -hydroxyketone signaling molecule. The Journal of Biological Chemistry, 2008, 283(26): 18113-18123

现代食品科技