



波罗的海希瓦氏菌 AI-2/LuxS 对生物被膜和致腐的调控

叶晓锋¹, 严羽萍¹, 唐蓉¹, 朱军莉^{1*}, 高海春²

¹浙江工商大学食品与生物工程学院, 浙江省食品安全重点实验室, 浙江 杭州 310018

²浙江大学生命科学学院, 浙江 杭州 310058

摘要:【目的】波罗的海希瓦氏菌(*Shewanella baltica*)是冷藏海产鱼类的特定腐败菌。研究群体感应信号 AI-2/LuxS 对鱼源 *S. baltica* 生物被膜和致腐的调控作用。【方法】扩增 SB11 分离株的 *luxS* 基因, 用自杀性质粒构建 *luxS* 基因缺失株, 通过结晶紫染色、珠涡流法、显微镜观察和 HPLC, 比较分析野生株与缺失株 $\Delta luxS$ 在 4 °C 和 28 °C 下生物被膜形成、粘附能力、泳动性和致腐产物的差异。【结果】*S. baltica* SB11 中扩增获得 *luxS* 基因, 生物信息学分析显示 LuxS 蛋白由 169 个氨基酸构成, 含有保守的 His-Thr-Leu-Glu-His (HTLEH) 模体和关键氨基酸位点, 蛋白三维空间结构与其他细菌相似。与野生株相比, $\Delta luxS$ 缺失株上清荧光信号散失, 但不影响生长, 生物被膜形成期和成熟期的含量显著低于野生株, 在 4 °C 培养 96 h 和 28 °C 培养 24 h 被膜分别减少 20.1% 和 27.9%。缺失株在不锈钢片的粘附能力明显减弱, 其中在 4 °C 培养 72 h 和 28 °C 培养 24 h 后的粘附量比野生株分别减少 6.48% 和 6.57%。荧光显微镜观察发现, 野生株能快速粘附于玻璃片, 聚集形成大量生物被膜, 而 $\Delta luxS$ 仅形成平坦稀疏的被膜, 粘附细菌降低, CLSM 证实野生株和 $\Delta luxS$ 的成熟被膜厚度分别为 68.95 μm 和 36.44 μm 。并且, $\Delta luxS$ 株在 4 °C 和 28 °C 下泳动性均显著强于野生株。然而, 野生株和 $\Delta luxS$ 株三甲胺和腐胺积累无差异。【结论】鱼源 *S. baltica* 中 LuxS 蛋白保守, AI-2/LuxS 参与被膜、粘附能力及泳动性等多种生物被膜形成相关的调控作用, 然而不是该菌致腐能力的功能性群体感应信号。

关键词: *Shewanella baltica*, 群体感应 AI-2, LuxS, 生物被膜, 致腐性

细菌在生长繁殖过程中会产生自诱导分子 (autoinducer, AI) 并释放到环境中, 当环境中的信号分子浓度达到一定阈值后开启细胞密度依赖的

特定基因表达, 该过程为群体感应 (quorum sensing, QS)。QS 是一种细菌种间和种内信息交流的调控机制, 参与生物被膜的形成、发光、毒力因子的

基金项目: 省协同创新中心(2017SICR105); 国家自然科学基金(31271954); 复旦大学教育部/卫计委医学分子病毒学重点实验室项目(FDMV-2017001)

*通信作者。Tel: +86-571-28008924; E-mail: junlizhu0305@163.com

收稿日期: 2017-11-20; 修回日期: 2018-01-10; 网络出版日期: 2018-01-25

释放、泳动能力、蛋白酶活性等大量基因表达的调控^[1]。迄今为止,十几种群体感应自诱导分子被鉴定报道,包括高丝氨酸内酯(N-acyl-N-homoserine lactone, AHLs)、寡肽(autoinducing peptides, AIP)和吡喃酮酰硼酸二酯(autoinducer-2, AI-2)等^[2]。Bassler 等^[3]首先发现哈维氏弧菌(*Vibrio harveyi*)除 AHLs 信号,还有另一套系统 AI-2 来调控发光。据研究,大量革兰氏阳性及阴性菌中发现 AI-2 活性,认为 AI-2 是一种用于种间 QS 的信号分子^[4]。在多种食品介质和食源性微生物中也报道 AI-2 活性,西红柿、西瓜和胡萝卜等新鲜果蔬^[5]、牛奶^[5]和腐败水产品^[6]中鉴定出 AI-2 类信号分子,在气调保藏的牛肉中分离得到 15 株乳酸菌也检测到 AI-2 活性^[7]。

迄今为止,已发现包括鼠伤寒沙门氏菌(*Salmonella typhimurium*)、幽门螺旋杆菌(*Helicobacter pylori*)、流感嗜血杆菌(*Haemophilus influenzae*)、乳酸菌等在内的许多细菌中报道存在 AI-2 合成的关键 *luxS* 基因。*LuxS* 蛋白在 1999 年才被确认为信号分子,然而 Miller 等^[8]早在 1968 年发现 *LuxS* 是 S-核糖高半胱氨酸(S-ribosylhomocysteine, SRH)的裂解酶。现在细菌体内 AI-2 的生物合成途径已较清楚,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,生成中间产物 S-腺苷高半胱氨酸(S-adenosylhomocysteine, SAH)然后通过甲硫腺苷核苷酸酶作用下生成 SRH, SRH 在 *LuxS* 蛋白作用下分解成等摩尔的 4,5-羟基-2,3-戊二酮(4,5-Dihydroxy-2,3-pentanedione, DPD)和高半胱氨酸,随后 DPD 自发快速环化形成 AI-2^[9]。该过程也是细菌甲基代谢循环(activated methyl cycle, AMC)的一个部分,*LuxS* 蛋白是其中一个重要的代谢酶。研究报道了多种细菌中 *luxS* 基因

功能,表明其参与调控控制发光、毒力、生物被膜形成等表型^[4,9]。然而,不同细菌的 *luxS* 基因对同一表型的影响不完全一致。

波罗的海希瓦氏菌(*Shewanella baltica*)为革兰氏阴性,嗜冷性,具有将氧化三甲胺还原为三甲胺能力,产 H₂S,导致鱼体腐败出现酸臭味等异味,是多种海产品在贮运过程中品质下降的特定腐败菌^[10-11]。前期研究发现,*S. baltica* 能产生 AI-2 活性,而 *LuxS* 蛋白对 *S. baltica* 生物被膜形成和致腐性的影响未见报道。鉴于此,本研究拟扩增分析波罗的海希瓦氏菌 *luxS* 基因,构建 *luxS* 基因缺失株,比较研究在冷藏和室温培养条件下野生株和缺失株对生物被膜形成、泳动性和致腐性的影响。该研究将为探究 AI-2/*LuxS* 系统在 *S. baltica* 中的生物学功能、研究 QS 系统对腐败菌的调控作用奠定良好基础。

1 材料和方法

1.1 主要试剂和仪器

酪胺、腐胺、鸟胺、组胺、尸胺、色胺、亚精胺、精胺等生物胺标准品,异硫氰酸荧光素标记的刀豆球蛋白 A(FITC),购于美国 Sigma 公司;氧化三甲胺(TMAO)、三甲胺盐酸盐(TMA)、丹磺酰氯购自阿拉丁有限公司;LB、胰蛋白胨大豆肉汤(TSB)等购于青岛海博生物有限公司。主要仪器有:酶标仪 VICTOR X,美国 Perkin Elmer 公司;荧光显微镜 LEICA DM4000,德国莱卡公司;PCR 仪,杭州博日科技有限公司;高效液相色谱仪 HPLC 1100,美国安捷伦公司。

1.2 菌种和质粒

波罗的海希瓦氏 *Shewanella baltica* SB11 是大

黄鱼中分离的特定腐败菌, 其 16S rRNA 的 NCBI 登录号为 KT716389, 为本实验室保存。 *V. harveyi* BB170 购于中国普通微生物保藏管理中心, 基因敲除的自杀性质粒 pHGM01 从 Jin 等^[12]处获赠, 宿主菌大肠杆菌 WM3064 为浙江大学微生物实验室保藏。限制性内切酶 *EcoR* I 和 *Hind* III, T4 DNA 连接酶、*Taq* DNA 聚合酶、DNA 纯化试剂盒、质粒提取试剂盒等, 均购自宝生物工程有限公司。

1.3 SB11 菌株 *luxS* 基因扩增和生物信息学分析

用煮沸法提取 *S. baltica* DNA, PCR 体系为: dNTPs Mixture 2 μ L, 10 \times PCR Buffer 2.5 μ L, 上下游引物各 0.5 μ L, DNA 模板 0.5 μ L, *Taq* 酶 0.25 μ L, ddH₂O 18.75 μ L, 共 25 μ L。PCR 扩增程序为: 94 $^{\circ}$ C 5 min; 94 $^{\circ}$ C 40 s, 49 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 5 min, 产物经纯化后测序。菌株 SB11 的 LuxS 蛋白序列提交至 PredictProtein (<https://www.predictprotein.org/>) 分析蛋白空间结构, 并在 SWISS-MODEL (<http://swissmodel.expasy.org/>) 寻找合适的已知该蛋白三维空间结构, 采用 Alignment Mode 建立 LuxS 蛋白模拟的三维空间。

1.4 SB11 菌株 *luxS* 基因缺失株的构建

采用 att-融合 PCR 构建 *S. baltica* SB11 的 *luxS* 基因缺失株, 将缺失的 *luxS* 基因克隆到自杀性质粒 pHGM01, 并转化到大肠杆菌 WM3064, 利用同源重组技术并利用庆大霉素获得 *luxS* 基因缺失株 $\Delta luxS$ ^[10]。本研究构建缺失株 $\Delta luxS$ 的引物见表 1。

1.5 野生株和缺失株 *luxS* 基因扩增及 AI-2 活性检测

将 SB11 野生株和缺变株培养 24 h 后, 提取基因组 DNA, 同 1.3 方法 PCR 扩增 *luxS* 基因。参考 Bodor 等^[13]方法取培养 12 h 的野生株与 $\Delta luxS$ 菌液, 离心(10000 \times g, 3 min)取上清, 过滤后获得

表 1. *luxS* 基因缺失株构建实验中所使用的引物

Table 1. Primers used in this study of *luxS* mutant

Primer name	Sequence (5'→3') description
luxS-5O	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGG CTTCGGTCTACATAAAGTGGCG
luxS-5I	GGTCCGGGTTTCGCTATCTATGAGTATGAT CGACGGTAAAG
luxS-3I	ATAGATAGCGAACCCGGACCGACGAAAT TCTAGGTAATCT
luxS-3O	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGG GTCAACCGCCATATTCGCCATT
luxS-LF	GTCGGTGCTATTCCTGTGAA
luxS-SR	AATTGCGGTGCAGAATAAGG
luxS-SF	ACAGCGTCAACACTAAATGC
luxS-LR	TGGTGCGACAGTTGATACTT

无菌上清液。将过夜活化的 *V. harveyi* BB170 报告菌用 AB 培养基以 1:5000 稀释, 分别将 10 μ L 待测的无菌上清液和 90 μ L 稀释的 BB170 菌液添加至 96 孔酶标板。以大肠杆菌 DH5 α 和哈维氏弧菌 BB120 为阴阳性对照, AB 培养基为空白对照。荧光酶标仪选择 OPS 模式检测, 在 30 $^{\circ}$ C 培养每隔 0.5 h 检测 1 次, 连续测定 6 h。

1.6 生长和生物被膜测定

取 1% 过夜活化的 *S. baltica* SB11 野生株与 $\Delta luxS$ 缺失株分别接种 LB 培养基。在 4 $^{\circ}$ C 静置培养 120 h, 每隔 24 h 取样, 在 28 $^{\circ}$ C 培养 24 h, 每隔 3 h 取样, 分光光度计 600 nm 处测定吸光度。将 SB11 与 $\Delta luxS$ 菌液用 TSB 培养基分别稀释 1000 倍, 添加至 96 孔板, 每孔 200 μ L。菌体在 4 $^{\circ}$ C 和 28 $^{\circ}$ C 分别培养至 144 h 和 48 h, 每隔 12 h 或 24 h 取出。参考 Djordjevic 等^[14]方法用结晶紫法测定样品被膜含量, 最后用酶标仪测量 600 nm 处吸光值。

1.7 细菌的粘附性

将 SB11 野生株与 $\Delta luxS$ 株用于被膜分析的稀释菌液同时接种至 8 孔板中, 加入不锈钢片(1 cm \times

1 cm)和盖玻片(14 mm×14 mm)。菌体分别在 4 °C 和 28 °C 静置培养至 144 h 和 48 h, 每隔 12 h 或 24 h 取出后参考 Nguyen 等^[15]的珠涡流法对粘附在不锈钢片表面的细菌进行计数。用无菌磷酸缓冲液(PBS)洗去不锈钢片表面的浮游菌, 放于含无菌生理盐水的 Falcon 管中, 加入适量玻璃珠, 剧烈涡旋 3 min, 梯度稀释计数。

1.8 荧光和共聚焦显微镜(CLSM)观察

将细菌粘附中 4 °C 培养的野生株与 $\Delta luxS$ 株盖玻片取出, 用无菌 PBS 洗去表面的浮游菌, 在 2.5%戊二醛中固定 12 h, 用 PBS 清洗, 烘箱干燥后, 取 70 μ L 20 μ g/mL FITC 均匀滴加在盖玻片表面, 4 °C 避光孵育 30 min, 取出盖玻片, 漂洗 3 次, 干燥后, 放置荧光显微镜下观察。将野生株与 $\Delta luxS$ 分别接种含 TSB 的共聚焦培养皿, 在 4 °C 培养 120 h 后去菌悬液, 用 SYTO-9 染料处理样品 15 min。采用 Zeiss LSM 710 CLSM 在 63×油镜下观察, 用 ZEN 2012 软件处理三维图像。

1.9 泳动性测定

参考 Packiavathy 等^[16]方法, 泳动培养基(1.5% 胰蛋白胨、0.5%氯化钠、0.3%琼脂)凝固后, 吸取 5 μ L 过夜培养的 SB11 野生株与 $\Delta luxS$ 菌液滴在平板中央, 吸干后分别移至 4 °C 和 28 °C 静置培养观察。

1.10 TMA 和生物胺含量测定

将活化 SB11 野生株与 $\Delta luxS$ 接种于 TMAO-LB 培养基中。经 4 °C 和 28 °C 培养后取上清采用苦味酸法测定 TMA^[18]。同时将 2 个菌株分别接种于 LB 培养基(含 0.50% L-赖氨酸盐酸盐, 0.25% L-鸟氨酸盐酸盐, 含 0.0005%吡哆醛溶剂的 0.25% L-络氨酸二钠盐), 在 4 °C 和 28 °C 培养后, 经衍生后高效液相色谱法测定生物胺^[17]。

1.11 数据处理

每组样品设 3 个重复, 其中生物被膜分析设 5 个重复, 采用 Microsoft Excel 2007 和 Origin 8.5 进行数据处理和作图, 并利用 SPSS 22.0 的 ANOVA 进行方差分析, 采用 Duncan 法进行多重比较, $P < 0.05$ 表示差异显著, $P < 0.01$ 表示差异极显著。

2 结果和分析

2.1 *S. baltica* SB11 中 *luxS* 基因扩增及蛋白序列分析

经 PCR 扩增 *S. baltica* SB11 获得约为 550 bp 的编码 AI-2 的 *luxS* 基因。经测序后, 发现该基因由 510 bp 核酸序列组成, NCBI 登录号为 KX192394。经生物信息学分析发现, SB11 LuxS 蛋白共编码 169 个氨基酸, 理论等电点(pI)为 4.77, 分子量为 18831.40 U。蛋白序列比对分析显示, LuxS 蛋白拥有 His-Xaa-Xaa-Glu-His (HXXGH)模体, 由 His-Thr-Leu-Glu-His (HTLEH)氨基酸构成(图 1)。该模体中 3 个保守的氨基酸组氨酸(H₅₄)、组氨酸(H₅₈)和谷氨酸(E₅₇)与保守的半胱氨酸(C₁₂₇)共同结合二价锌离子, 从而组成蛋白催化中心, 催化 DPD 的形成。LuxS 蛋白中对反应催化起关键作用的 C₈₃、E₅₇ 以及对 LuxS 活性起重要作用的 S₆、H₁₁ 和 R₃₉、G₉₃ 无任何改变, 表明 *S. baltica* LuxS 蛋白较为保守。在 SWISS-MODEL 网站模拟 *S. baltica* SB11 LuxS 蛋白的模拟三维空间结构(图 2), 发现 SB11 LuxS 蛋白由 4 个 α 螺旋和 5 个 β 折叠片构成, 在亚基表面有一个锌离子结合位点, 与其他细菌的 LuxS 蛋白相似。

2.2 缺失株 $\Delta luxS$ 基因扩增和活性分析

S. baltica SB11 经自杀性质粒转入和同源重组

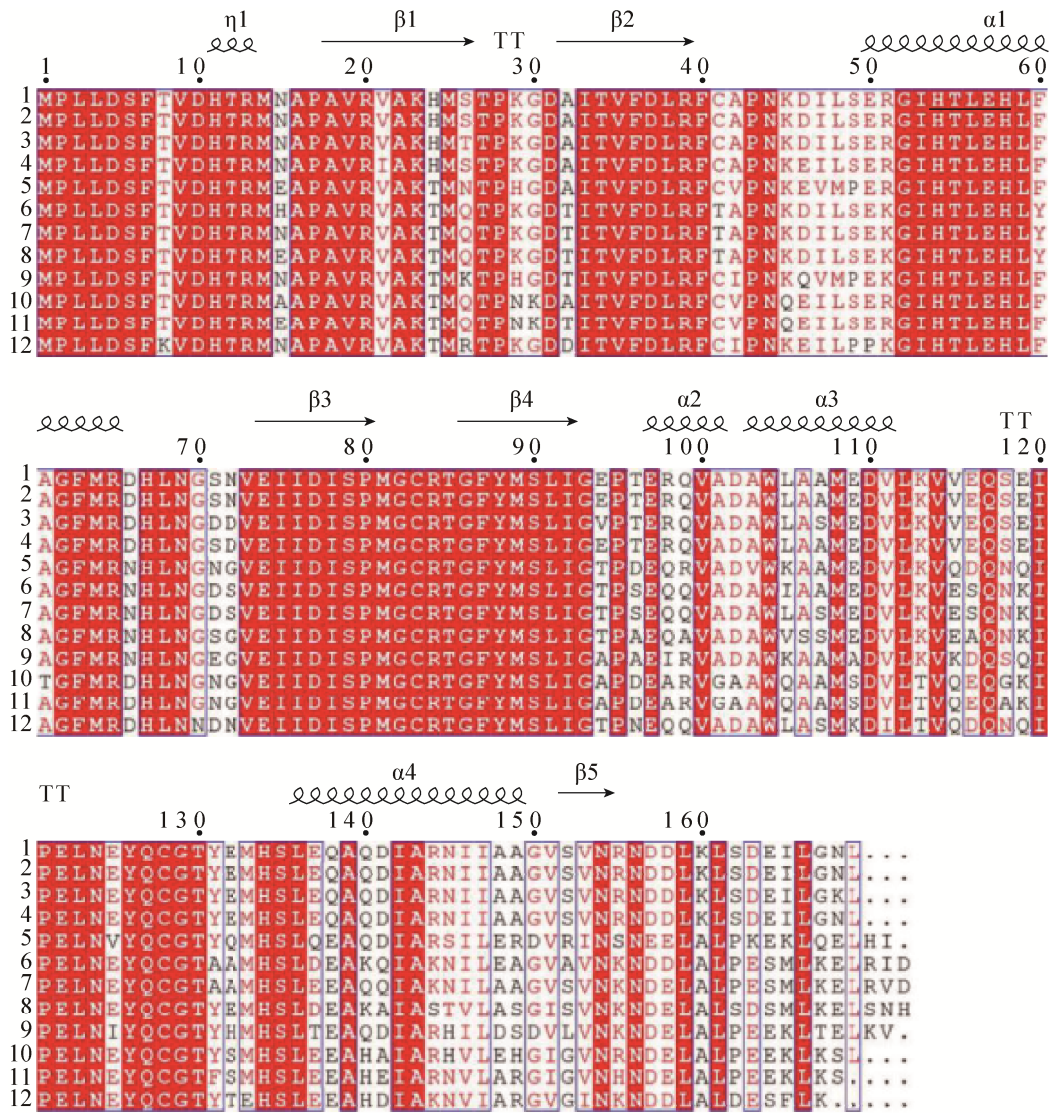


图 1. *S. baltica* SB11 与 11 种不同细菌 LuxS 蛋白氨基酸序列多重序列同源比对

Figure 1. Alignment of LuxS protein among *S. baltica* SB11 and 11 species of bacteria. 1: *S. baltica* SB11 (KX192394); 2: *S. baltica* BA175 (AEG12577.1); 3: *S. oneidensis* (WP_011071345.1); 4: *S. putrefaciens* (WP_028761570.1); 5: *Escherichia coli* O157:H7 (BAB36972.1); 6: *Vibrio harveyi* (WP_050936802.1); 7: *Vibrio parahaemolyticus* (WP_005462534.1); 8: *Vibrio fischeri* (WP_011261308.1); 9: *Photobacterium luminescens* (WP_036814109.1); 10: *Aeromonas hydrophila* (ACD45693.1); 11: *Aeromonas salmonicida* (WP_005313423.1); 12: *Haemophilus influenzae* (WP_005694994.1).

获得 *luxS* 基因缺失株 $\Delta luxS$ 。PCR 扩增野生株与缺失株的 *luxS* 基因,发现野生株扩增出约 550 bp 的产物,与预期相符,而 $\Delta luxS$ 无条带(图 3),表明缺失株中 *luxS* 基因已成功敲除。采用 *V. harveyi* BB170

报告菌检测两株菌的 AI-2 活性,野生株上清液诱导报告菌培养 12 h 的荧光强度达到 78650 RLU,而 $\Delta luxS$ 荧光强度很低($P < 0.01$),表明 $\Delta luxS$ 无 AI-2 活性,提示 *luxS* 基因敲除导致功能丧失。



图 2. *S. baltica* SB11 LuxS 蛋白三维模型
Figure 2. Three-dimensional model of LuxS protein in *S. baltica* SB11.

2.3 *luxS* 缺失对 *S. baltica* 生长和生物被膜的影响

野生株与 $\Delta luxS$ 缺失株在 4 °C 和 28 °C 下的生长和生物被膜如图 4 所示。野生株与 $\Delta luxS$ 在 4 °C 前 24 h 生长缓慢, 之后生长迅速, 96 h 后到达稳定期(图 4-A), 而在 28 °C 培养 18 h 达到稳定期(图 4-B)。野生株与 $\Delta luxS$ 在低温和常温下表现相似的生长($P>0.05$)。同时, 野生株与 $\Delta luxS$ 在静止培养下生物被膜随着时间的延长不断增长, 在 4 °C、96 h 与 28 °C、48 h 到达最大值后开始缓慢下降。野生株和 $\Delta luxS$ 在 4 °C 初期的 12 h 生物被膜量相似, 24 h 后野生株生物被膜形成量明显大于 $\Delta luxS$, 96 h 时 $\Delta luxS$ 生物被膜量减少 20% ($P<0.05$) (图 4-C)。相似地, 野生株在 28 °C 下生物被膜形

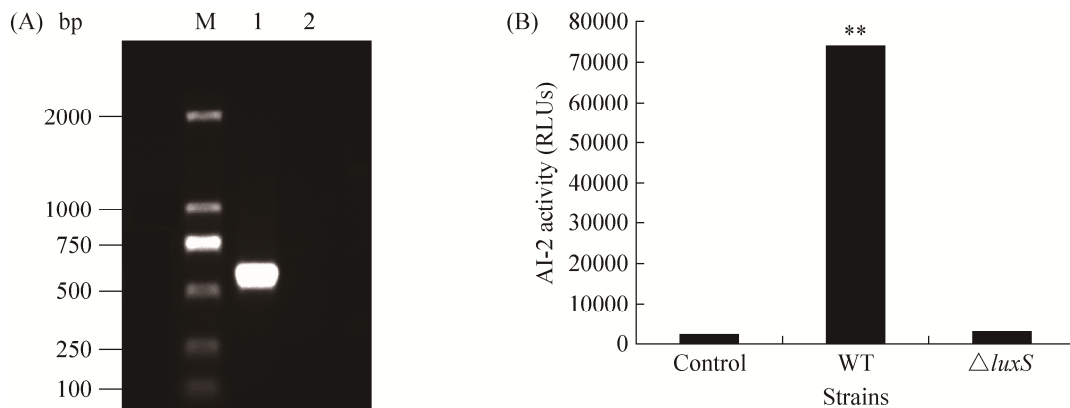


图 3. *S. baltica* SB11 野生株与 $\Delta luxS$ 株 *luxS* 基因扩增(A)和 AI-2 活性(B)

Figure 3. Amplification of *luxS* gene (A) and AI-2 activity (B) between SB11 wild type strain and mutant strain. M: DNA marker DL 2000; 1: SB11 wild type strain; 2: $\Delta luxS$ mutant strain. Data was expressed as means \pm standard deviations ($n=5$, **: $P<0.01$).

成量明显大于 $\Delta luxS$ ($P<0.05$), 在 48 h 时 $\Delta luxS$ 生物被膜减少 19% (图 4-D)。而且在 4 °C 下 SB11 野生株生物被膜生成显著大于 28 °C ($P<0.05$)。结果表明, *luxS* 缺失显著减弱 *S. baltica* 在低温和常温下的生物被膜形成能力。

2.4 *luxS* 缺失对 *S. baltica* 粘附能力的影响

细菌粘附在介质表面为生物被膜形成第一

步, 因此菌体的粘附能力对被膜形成十分重要。分析了野生株与 *luxS* 基因缺失株在不锈钢片上的粘附能力, 如图 5 所示。SB11 野生株与 $\Delta luxS$ 在 4 °C 下粘附速度较为缓慢, 在初期 12 h 两者粘附数量较少, 24 h 后粘附量快速增加, 72 h 达到最大, 分别为 7.25 \log_{10} CFU/cm² 和 6.78 \log_{10} CFU/cm², 之后粘附量开始缓慢减少并趋于稳定。野生株与

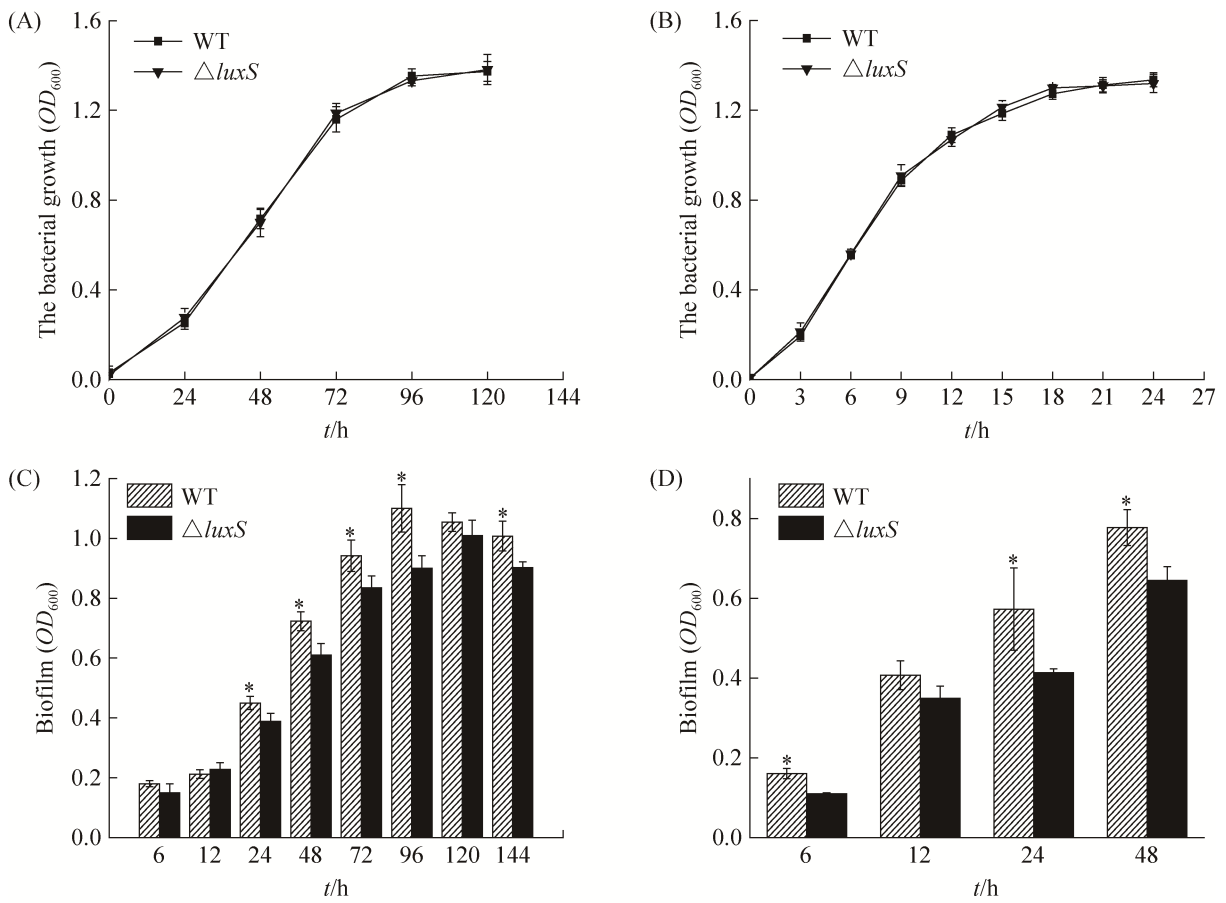


图 4. *S. baltica* SB11 野生株与 $\Delta luxS$ 株在 4 °C 和 28 °C 下的生长和生物被膜形成

Figure 4. Growth and biofilm formation in *S. baltica* wild strain and *luxS* mutant on TSB at 4 °C and 28 °C. A: Growth at 4 °C; B: Growth at 28 °C; C: Biofilm at 4 °C; D: Biofilm at 28 °C. Data was expressed as means± standard deviations (n=5, *: P<0.05).

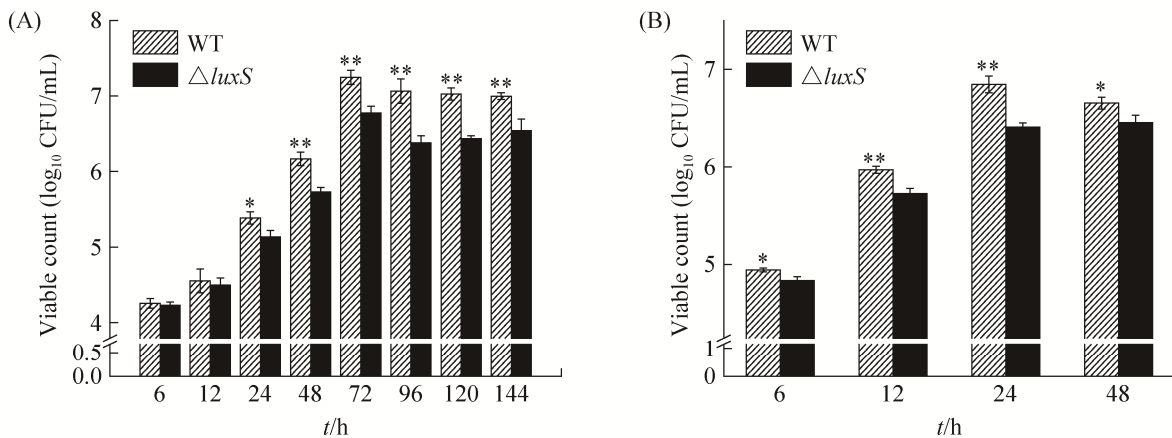


图 5. *S. baltica* SB11 野生株与 $\Delta luxS$ 株在 4 °C (A)和 28 °C (B)下粘附能力

Figure 5. The adherence of *S. baltica* wild strain and *luxS* mutant on TSB at 4 °C (A) and 28 °C (B). Data was expressed as means±standard deviations (n=3, *: P<0.05, **: P<0.01).

$\Delta luxS$ 在 28 °C 培养 24 h 粘附量达到最大,分别为 6.85 \log_{10} CFU/cm² 与 6.40 \log_{10} CFU/cm²。 $\Delta luxS$ 在 4 °C 和 28 °C 下粘附量均显著低于野生株($P < 0.01$),其中最大粘附量时 $\Delta luxS$ 分别减少 6.48%和 6.57%。结果表明, $luxS$ 基因缺失导致 *S. baltica* 粘附能力降低。

运用荧光显微镜观察 *S. baltica* 野生株和 $\Delta luxS$ 株在玻璃片上的粘附,如图 6 所示。在 4 °C 粘附初期细菌分布稀疏,24 h 后 SB11 细菌聚集增多,形成细菌团块,到 72 h 整块玻璃片几乎覆盖

S. baltica 细胞,并有堆积显现,96 h 后逐渐减少。而 $\Delta luxS$ 细菌初期无聚集成团,分布均匀,生物被膜较少且较为平坦。相似地,野生株在 28 °C 粘附量显著高于 $\Delta luxS$,在 24 h 粘附量达到最大值,之后便进入播撒,细菌在玻璃片上的粘附量少于 4 °C (结果未显示)。可见,*S. baltica* 野生株粘附量都大于 $\Delta luxS$,且 $\Delta luxS$ 播撒更快。CLSM 观察也发现 SB11 野生株在 4 °C 粘附 5 d 形成的被膜厚 58.95 μm ,而 $\Delta luxS$ 仅 36.44 μm ,其成熟被膜显著薄于野生株,与荧光显微镜观察一致。

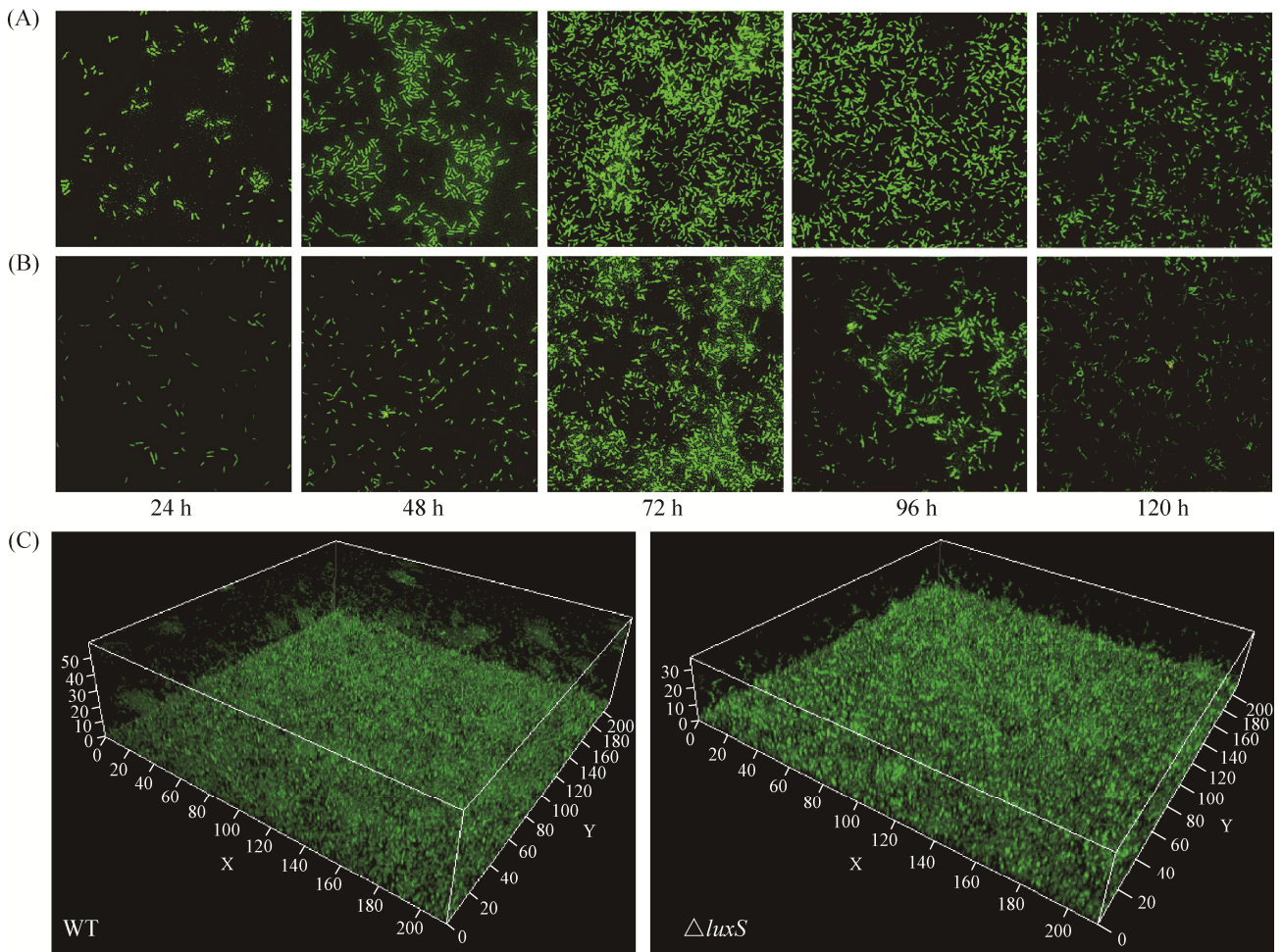


图 6. 荧光显微镜和 CLSM 观察 *S. baltica* SB11 野生株与 $\Delta luxS$ 株在 4 °C 下粘附和被膜结构

Figure 6. Fluorescence microscope and CLSM images showing adherence and biofilm structure of *S. baltica* wild strain and $\Delta luxS$ at 4 °C. A: wild strain; B: $luxS$ mutant (Fluorescence microscope); C: CLSM observation.

2.5 *luxS* 缺失对 *S. baltica* 泳动性的影响

细菌泳动是一种由鞭毛控制的细菌运动现象,与细菌粘附、被膜形成、播撒关系密切^[16]。如图 7 所示,*S. baltica* 野生株与缺失株 $\Delta luxS$ 在 4 °C 泳动缓慢,培养 72 h 后 $\Delta luxS$ 泳动的扩散直径明显大于野生株,其扩散直径分别达到 32.3 mm

和 25.9 mm,而在 120 h 后,野生株扩散直径仅为 $\Delta luxS$ 的 80%。在 28 °C 培养 12 h 后泳动的扩散直径快速增大,野生株与缺失株泳动差距也随之增大,培养 48 h 后分别为 53.1 mm 和 71.5 mm。可见, $\Delta luxS$ 在 4 °C 和 28 °C 下泳动性均强于野生株($P < 0.01$),暗示 *luxS* 基因对 *S. baltica* 泳动性有反调控作用。

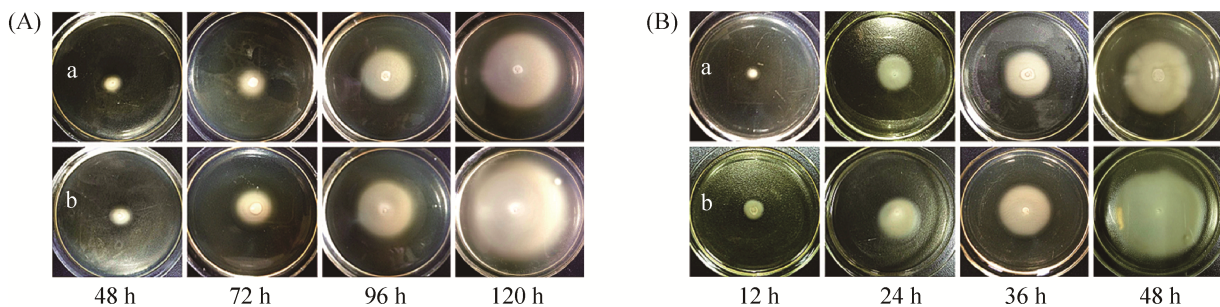


图 7. *S. baltica* SB11 野生株与 $\Delta luxS$ 株在 4 °C (A)和 28 °C (B)下的泳动

Figure 7. Swimming motility of *S. baltica* wild strain and $\Delta luxS$ at 4 °C (A) and 28 °C (B). a: Wild strain; b: *luxS* mutant.

2.6 *luxS* 基因缺失对 *S. baltica* 三甲胺和腐胺形成的影响

TMA 和腐胺是水产品中特征性的腐败物质,分析 *luxS* 基因缺失对 *S. baltica* 的 TMA 和腐胺生成影响。如图 8 所示,野生株与 $\Delta luxS$ 在 4 °C 培养 24 h 后 TMA 逐渐增加,在 72 h 后达到最大值,分别为 3.38 mg/L 与 3.29 mg/L (图 8-A)。野生株与 $\Delta luxS$ 在 28 °C TMA 形成量也无明显差异,其中在 24 h 含量为 3.10–3.20 mg/L,趋于稳定。*S. baltica*在 4 °C 生长初期腐胺形成缓慢,在 72 h 后含量稳定在 900 mg/L 左右(图 8-C),在 28 °C 下腐胺形成快速,12 h 后便达到最大值(图 8-D),野生株与 $\Delta luxS$ 的腐胺含量均无差异。结果表明,*luxS* 基因缺失对 *S. baltica* 三甲胺和腐胺形成能力无显著影响($P > 0.05$)。

3 讨论

革兰氏阴性菌和阳性菌中广泛存在 AI-2/LuxS 系统,在 *E. coli*、*S. Typhimurium*、*V. harveyi*、*V. cholerae* 等多种细菌中均已报道^[9]。希瓦氏菌属中 *luxS* 基因最早由 Bodor 等^[13]报道,在 165 株海洋菌中有 9 株希瓦氏菌检测到 *luxS* 基因和 AI-2 活性,发现所有希瓦氏菌均存在 *luxS* 基因,并拥有不同活性的 AI-2。课题组也发现不同致病性 *S. baltica* 的 AI-2 活性存在差异^[6],进一步探究 AI-2/LuxS 对 *S. baltica* 生物被膜形成和致病性的调控作用。研究在 *S. baltica* SB11 中扩增出预期的 *luxS* 基因,生物信息学分析表明,LuxS 蛋白中存在多种保守氨基酸,如模体 HTLEH 中的 H₅₄、H₅₈ 和 E₅₇,与其他菌种的 LuxS 蛋白相似。蛋白三级结构模拟发现 LuxS 折叠方式和空间结构与已研究的嗜血流感菌和幽

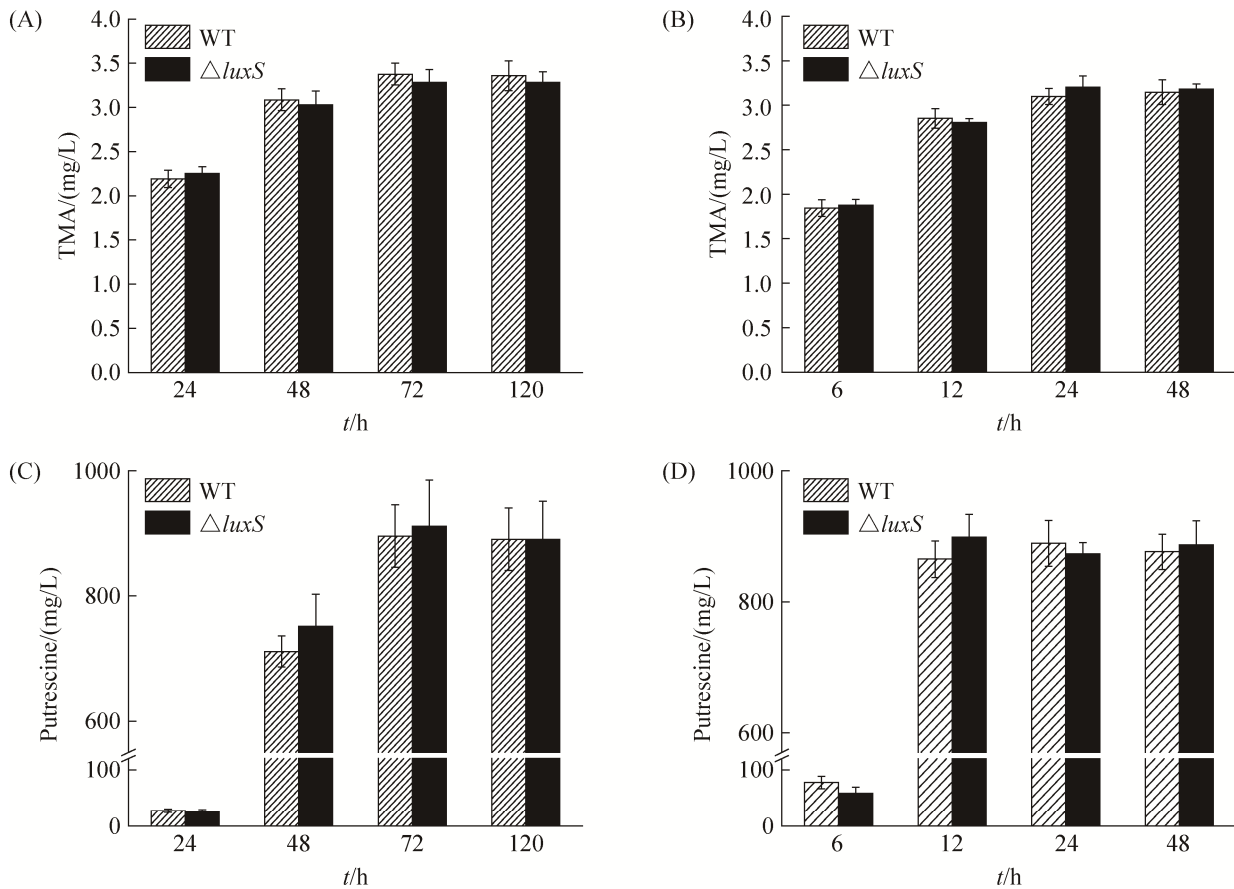


图 8. *S. baltica* SB11 野生株与 $\Delta luxS$ 株在 4 °C 和 28 °C 下三甲胺和腐胺的形成

Figure 8. Production of TMA and putrescine in *S. baltica* wild strain and $\Delta luxS$ at 4 °C and 28 °C. A: TMA level at 4 °C; B: TMA level at 28 °C; C: Putrescine level at 4 °C; D: Putrescine level at 28 °C. Data was expressed as means \pm standard deviations ($n=3$).

门螺旋杆菌 X 射线衍射图的空间结构较为相似，其中与嗜血流感菌最为接近，为 LuxS 功能蛋白。

研究构建了缺失株 $\Delta luxS$ ，显示 *luxS* 缺失导致 *S. baltica* 上清液散失诱导 BB170 产生荧光信号。Learman 等^[18]构建 *S. oneidensis* 的 *luxS* 基因缺失株和回补株，发现野生株与回补株在对数末期有高强度的荧光值，而缺失株荧光值很低。研究发现 *luxS* 基因缺失不影响 *S. baltica* 细菌在 4 °C 和 28 °C 的生长，Bodor 等^[19]构建 *S. oneidensis* 的 *luxS* 缺失株与野生株生长无差异。通过结晶紫分析和粘附计数，发现 *luxS* 基因缺失在常温和低温

下显著减少 *S. baltica* 生物被膜形成，减弱在不锈钢片上的粘附能力。也相似地发现 *S. oneidensis* 的 *luxS* 基因缺失株在第 1 天生物被膜量比野生株只低 10%左右，而培养 3 d 后却低 40%^[18]。利用荧光显微镜和 CLSM 观察 *S. baltica* 野生株在 4 °C 和 28 °C 下粘附的细菌量明显多于 $\Delta luxS$ 株，且野生株容易聚集成团， $\Delta luxS$ 菌难以形成大块生物被膜，成熟被膜菌变薄。Bodor 等^[19]利用荧光显微镜观察 *S. oneidensis* 野生株形成紧密、圆形的生物被膜，而 *luxS* 缺失株的生物被膜疏松地覆盖在表面。Niu 等^[20]利用 CLSM 发现 *E. coli luxS* 基因

回补株与野生株的生物被膜更加容易聚集,且更厚实,而 *luxS* 缺失株生物被膜范围更广,分布均匀。然而,也有报道 *luxS* 缺失导致 *Enterococcus faecalis* 生物被膜形成加速^[21]。该现象表明 *luxS* 基因参与细菌生物被膜形成的调控作用,但在不同种属细菌中存在差异。

已表明 LuxS 蛋白是细菌活性甲基代谢循环中重要的组成部分,这一循环显著影响含硫氨基酸的代谢,如 S-腺苷甲硫氨酸的合成^[9]。*luxS* 基因在 AI-2 的合成和细菌甲基代谢中有重要作用,因此推测 $\Delta luxS$ 缺失株生物被膜减少可能是由于 *S. baltica* 丧失 AI-2 合成能力,也可能与甲基代谢循环通路破坏有关。细菌粘附和泳动与生物被膜形成密切相关,与野生株相比, $\Delta luxS$ 细菌粘附性显著减弱,而泳动性却明显增大,可能是 *luxS* 缺失同时导致 *S. baltica* 生物被膜和鞭毛相关基因表达改变。Ling 等^[22]发现 *E. coli* K12 敲除 *luxS* 基因后能显著地促进泳动及鞭毛合成,该现象与 *flhDC* 转录水平的提升或 c-di-GMP 浓度减少有关。由此推测, $\Delta luxS$ 株的粘附能力降低及泳动性增强可能导致生物被膜中菌体聚集量减少,厚度变薄。

S. baltica 能产生高含量的 TMA 和生物胺等致腐产物,为冷藏海产鱼类的特定腐败菌。前期研究表明,群体感应与食品微生物腐败密切关联^[23],发现二酮哌嗪分子正调控 *S. baltica* 腐败菌蛋白酶和胺类产物的形成^[10-11],然而 AI-2/LuxS 系统对其致腐性的影响仍未见明确的报道。本研究表明, $\Delta luxS$ 与野生株的三甲胺和腐胺形成无差异,前期研究^[10-11]也发现添加 AI-2 前体物质 DPD 至 *S. baltica* 中对胺类产物形成无显著影响。因此,推测 AI-2 在希瓦氏菌中只是 AMC 代谢循环的副产物,可能不是一种参与调控致腐性的种间交流的

信号分子。

由此可见, *S. baltica* SB11 含有保守的 LuxS,为细菌 LuxS 家族功能蛋白。通过比较研究野生株和 $\Delta luxS$ 缺失株的生物被膜形成和致腐代谢产物,阐明 AI-2/LuxS 参与调控 *S. baltica* 生物被膜,但并不是致腐性的功能性信号。

参 考 文 献

- [1] Fuqua C, Greenberg EP. Signalling: Listening in on bacteria: acyl-homoserine lactone signalling. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2002, 3(9): 685–695.
- [2] Parker CT, Sperandio V. Cell-to-cell signalling during pathogenesis. *Cellular Microbiology*, 2009, 11(3): 363–369.
- [3] Bassler BL, Wright M, Silverman MR. Multiple signalling 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.
- [4] Vendeville A, Winzer K, Heurlier K, Tang CM, Hardie KR. Making ‘sense’ of metabolism: autoinducer-2, LUXS and pathogenic bacteria. *Nature Reviews Microbiology*, 2005, 3(5): 383–396.
- [5] Liu M, Gray JM, Griffiths MW. Occurrence of proteolytic activity and N-acyl-homoserine lactone signals in the spoilage of aerobically chill-stored proteinaceous raw foods. *Journal of Food Protection*, 2006, 69(11): 2729–2737.
- [6] Zhu JL, Zhao EK, Sun LX, Huang XZ, Li JR, Tian DY. Dynamic variation rule of spoilage bacterial and quorum sensing signal molecules in the refrigerated large yellow croaker. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 2015, 15(4): 175–182. (in Chinese)
朱军莉, 赵二科, 孙丽霞, 黄旭镇, 励建荣, 田迪英. 冷藏大黄鱼腐败菌群和群体感应信号分子的动态变化规律. *中国食品学报*, 2015, 15(4): 175–182.
- [7] Blana VA, Doulgeraki AI, Nychas GJE. Autoinducer-2-like activity in lactic acid bacteria isolated from minced beef packaged under modified atmospheres. *Journal of Food Protection*, 2011, 74(4): 631–635.
- [8] Miller CH, Duerre JA. S-ribosylhomocysteine cleavage enzyme from *Escherichia coli*. *The Journal of Biological*

- Chemistry*, 1968, 243(1): 92–97.
- [9] Pereira CS, Thompson JA, Xavier KB. AI-2-mediated signalling in bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, 2013, 37(2): 156–181.
- [10] Zhu JL, Zhao AF, Feng LF, Gao HC. Quorum sensing signals affect spoilage of refrigerated large yellow croaker (*Pseudosciaena crocea*) by *Shewanella baltica*. *International Journal of Food Microbiology*, 2016, 217: 146–155.
- [11] Zhu SQ, Wu HH, Zeng MY, Liu ZY, Wang Y. The involvement of bacterial quorum sensing in the spoilage of refrigerated *Litopenaeus vannamei*. *International Journal of Food Microbiology*, 2015, 192: 26–33.
- [12] Jin M, Jiang YM, Sun LL, Yin JH, Fu HH, Wu GF, Gao HC. Unique organizational and functional features of the cytochrome c maturation system in *Shewanella oneidensis*. *PLoS One*, 2013, 8(9): e75610.
- [13] Bodor A, Elxnat B, Thiel V, Schulz S, Wagner-Döbler I. Potential for *luxS* related signalling in marine bacteria and production of autoinducer-2 in the genus *Shewanella*. *BMC Microbiology*, 2008, 8(1): 13.
- [14] Djordjevic D, Wiedmann M, McLandsborough L A. Microtiter plate assay for assessment of *Listeria monocytogenes* biofilm formation. *Applied & Environmental Microbiology*, 2002, 68(6): 2950–2958.
- [15] Nguyen HDN, Yang YS, Yuk HG. Biofilm formation of *Salmonella typhimurium* on stainless steel and acrylic surfaces as affected by temperature and pH level. *LWT-Food Science and Technology*, 2014, 55(1): 383–388.
- [16] Packiavathy IASV, Sasikumar P, Pandian SK, Ravi AV. Prevention of quorum-sensing-mediated biofilm development and virulence factors production in *Vibrio* spp. by curcumin. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2013, 97(23): 10177–10187.
- [17] Zhao EK, Zhu JL, Feng LF, Shi YQ, Li JR. Preliminary mechanism of different spoilage potential of specific spoilage organism, *Shewanella*, in refrigerated *Larimichthys crocea*. *Journal of Fisheries of China*, 2015, 39(2): 256–264. (in Chinese)
赵二科, 朱军莉, 冯立芳, 施永清, 励建荣. 冷藏大黄鱼 SSO 希瓦氏菌致腐能力差异机制初探. *水产学报*, 2015, 39(2): 256–264.
- [18] Learman DR, Yi H, Brown SD, Martin SL, Geesey GG, Stevens AM, Hochella MF. Involvement of *Shewanella oneidensis* MR-1 LuxS in biofilm development and sulfur metabolism. *Applied & Environmental Microbiology*, 2009, 75(5): 1301–1307.
- [19] Bodor AM, Jansch L, Wissing J, Waqner-Döbler I. The *luxS* mutation causes loosely-bound biofilms in *Shewanella oneidensis*. *BMC Research Notes*, 2011, 4(1): 180.
- [20] Niu C, Robbins CM, Pittman KJ, Osborn JL, Stubblefield BA, Simmons RB, Gillbert ES. LuxS influences *Escherichia coli* biofilm formation through autoinducer-2-dependent and autoinducer-2-independent modalities. *FEMS Microbiology Ecology*, 2013, 83(3): 778–791.
- [21] He ZY, Liang JP, Zhou W, Xie Q, Tang ZS, Ma R, Huang ZW. Effect of the quorum-sensing *luxS* gene on biofilm formation by *Enterococcus faecalis*. *European Journal of Oral Sciences*, 2016, 124(3): 234–240.
- [22] 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 & Biophysical Research Communications*, 2010, 401(4): 521–526.
- [23] Zhu JL, Feng LF, Wang YB, Li JR. Spoilage mechanism of fresh food based on bacterial quorum sensing. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 2017, 17(3): 225–234. (in Chinese)
朱军莉, 冯立芳, 王彦波, 励建荣. 基于细菌群体感应的生鲜食品腐败机制. *中国食品学报*, 2017, 17(3): 225–234.

Regulation of AI-2/LuxS gene on biofilm formation and spoilage of *Shewanella baltica*

Xiaofeng Ye¹, Yuping Yan¹, Rong Tang¹, Junli Zhu^{1*}, Haichun Gao²

¹ College of Food Science & Biotechnology Engineering of Zhejiang Gongshang University, Hangzhou 310018, Zhejiang Province, China

² College of Life Science, Zhejiang University, Hangzhou 310058, Zhejiang Province, China

Abstract: [Objective] *Shewanella baltica* is a specific spoilage bacterium in marine fish during refrigerated storage. In the present study regulation of quorum sensing AI-2/LuxS on the biofilm formation and spoilage of *S. baltica* was elucidated. [Methods] *LuxS* gene in SB11 strain was amplified and knocked out by suicide plasmid. Biofilm formation, adhesion, swimming and amine metabolites between wild strain and $\Delta luxS$ mutant at 4 °C and 28 °C were comparatively measured by using crystal violet staining, bead vortexing, microscopy and HPLC, respectively. [Results] *S. baltica* SB11 *luxS* gene was amplified, and bioinformatics analysis revealed that deduced LuxS protein with 169 aa contained conserve His-Thr-Leu-Glu-His (HTLEH) motif and key amino acid functional sites. Three-dimensional structure of LuxS protein was similar to that from various bacteria. Compared with wild strain, supernatant of $\Delta luxS$ mutant lost bioluminance activity, although their growth was the same. $\Delta luxS$ exhibited lower biofilm development and maturation than the wild strain, and decreased by 20.1% and 27.9% at 4 °C for 96 h and at 28 °C for 24 h, respectively. Compared with the wild strain, $\Delta luxS$ reduced adherent cell by 6.48% at 4 °C for 72 h, and 6.57% at 28 °C for 24 h, indicating that the adherence of mutant on steel slide was significantly weak. The observation by fluorescence microscopy showed that the wild strain rapidly adhered to the coverslip and formed a large number of biofilm, whereas, $\Delta luxS$ mutant only seemed to form a flat sparse biofilm and failed to aggregate into clusters. Confocal Laser Scanning Microscope (CLSM) revealed that the thickness of maturing biofilm in the wild and mutant strains was 68.95 μm and 36.44 μm , respectively. Furthermore, the absence of *luxS* gene significantly promoted the bacterial swimming at 4 and 28 °C. However, the production of trimethylamine and putrescine between the wild and mutant strain was similar. [Conclusion] LuxS protein in *S. baltica* SB11 was conserve, and AI-2/LuxS was involved in biofilm formation, adhesion, swimming, but not a functional signal in the regulation of spoilage potential.

Keywords: *Shewanella baltica*, quorum sensing AI-2, LuxS, biofilm, spoilage potential

(本文责编: 李磊)

Supported by the Collaborative Innovation Central Program of Zhejiang Province (2017SICR105), by the National Natural Science Foundation of China (31271954) and by the Key Laboratory of Medical Molecular Virology of the Ministry of Education/Health Planning of Fudan University (FDMV-2017001)

*Corresponding author. Tel: +86-571-28008924; E-mail: junlizhu0305@163.com

Received: 20 November 2017; Revised: 10 January 2018; Published online: 25 January 2018