

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
52(9):1167-1172; 4 September 2012
ISSN 0001-6209; CN 11-1995/Q
http://journals.im.ac.cn/actamicrocn

禽致病性大肠杆菌安徽分离株 *luxS* 和 *pfs* 基因的克隆、表达与细胞外合成 AI-2 活性检测

韩先干¹, 白灏^{1,2}, 刘蕾¹, 陈文静¹, 丁铲¹, 胡青海¹, 祁克宗², 于圣青^{1*}

¹ 中国农业科学院上海兽医研究所, 上海 200241

² 安徽农业大学动物科技学院, 合肥 230036

摘要: 【目的】LuxS/AI-2 型密度感应系统存在于革兰氏阴性和阳性菌中, 可产生用于细菌种间交流的通用自诱导信号分子 AI-2 (Autoinducer-2, AI-2), 细菌许多生理功能都受此系统的调节。本研究开展对禽致病性大肠杆菌 (Avian Pathogenic *Escherichia coli*, APEC) 自诱导信号分子 AI-2 的检测和建立体外合成、定量的方法, 为进一步研究 APEC 的 AI-2 调控作用奠定基础。【方法】利用哈维弧菌 BB170 (*Vibrio harveyi* BB170) 开展对 APEC AI-2 的检测; 利用表达、纯化的 LuxS 和 Pfs 在体外催化 S-腺苷同型半胱氨酸 (S-adenosylhomocysteine, SAH), 进行 AI-2 的体外合成。【结果】APEC 能产生自诱导信号分子 AI-2; 成功表达可用于 AI-2 合成的可溶性重组蛋白 LuxS 和 Pfs; 纯化的重组蛋白 LuxS 和 Pfs 与 SAH 同时作用后, 合成了浓度为 300 μmol/L 的 AI-2; 运用哈维弧菌 BB170 对合成的 AI-2 活性检测表明, 其活性是阴性对照的 700 倍。【结论】APEC 存在 LuxS/AI-2 型密度感应系统, APEC 的 LuxS 和 Pfs 可以在体外催化 SAH 生成有活性的 AI-2 分子。本研究为进一步研究 APEC 的 AI-2 的调控作用奠定基础。

关键词: 禽致病性大肠杆菌, 密度感应系统, 信号分子 AI-2, LuxS

中图分类号: Q933 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2012) 09-1167-06

禽致病性大肠杆菌 (Avian Pathogenic *Escherichia coli*, APEC) 可引起禽类的多种疾病, 是目前严重危害养禽业的传染病之一^[1]。因其复杂的血清型, 给该病的防控提出了新的挑战。

细菌通过自身产生的自诱导信号分子 (Autoinducer, AI) 进行交流和协调群体行为的过程称为密度感应 (Quorum Sensing, QS)。存在于革兰氏阴性和阳性菌中的 LuxS/AI-2 型密度感应系统, 可产生用于细菌种间交流的通用信号分子 AI-2。细菌许多生理功能都受此系统的调节, 在病原菌中,

该系统主要通过调控病原菌的毒力基因表达、生物被膜形成 (与生存能力、药物敏感性等有关) 和抗性质粒转移等方式来实现对病原菌的调控。当前, 对细菌密度感应系统及其抑制剂的研究已成为微生物学研究的新热点^[2-4]。

Bassler 等报道了用于合成 AI-2 分子的 *luxS* 基因, 证实该基因在多种革兰氏阳性和阴性细菌中具有同源性, 并且构建了用于信号分子 AI-2 检测的报告菌株哈维弧菌 BB170^[5]。

在细菌体内, AI-2 的产生来源于 S-腺苷甲硫氨

基金项目: 国家自然科学基金 (31001078, 31072161, 30871851)

* 通信作者。Tel: +86-21-34293461; E-mail: yus@shvri.ac.cn

作者简介: 韩先干 (1977-), 男, 安徽肥西人, 副研究员, 博士, 主要从事细菌致病机理研究。E-mail: hanxgan@163.com

收稿日期: 2012-03-16; 修回日期: 2012-04-25

酸(S-adenosylmethionine, SAM)代谢,即SAM的甲基转移至接受甲基的底物后生成S-腺苷同型半胱氨酸(S-adenosylhomocysteine, SAH)。SAH对细菌有毒害作用,细菌通过Pfs迅速降解SAH,产生S-核糖同型半胱氨酸(S-ribosylhomocysteine, SRH)。随后,LuxS催化SRH分解为4,5-羟基-2,3-戊二酮(4,5-dihydroxy-2,3-pentanedione, DPD)和同型半胱氨酸(Homocysteine)两种产物。其中,同型半胱氨酸获得甲基生成SAM再次进入循环,而DPD则可能通过化学重排成为有活性的AI-2分子^[6-7]。

细菌耐药性的出现迫切需要采用新的方式来进行APEC的防控,干扰或者阻断APEC的细菌密度感应系统,尤其是抑制LuxS/AI-2型密度感应系统,可以成为防控APEC的新途径。目前国内尚未开展对APEC的AI-2的检测以及用于AI-2合成的相关基因的克隆、表达。因此开展APEC的LuxS/AI-2型密度感应系统,有助于进一步研究该系统对APEC的调控作用。

因目前国内缺乏商品化的信号分子AI-2供应,限制了对AI-2调控作用的研究。本研究开展禽致病性大肠杆菌的信号分子AI-2的检测和建立体外合成、定量的方法,为进一步研究AI-2的调控作用奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 载体、菌株及其培养:禽致病性大肠杆菌DE12株(DE12)、DE17株(DE17)、DE54株(DE54)、CE56株(CE54)和CE66株(CE66),均为本实验室2008年分离自安徽巢湖,其中DE12,DE17和DE54分离自患病鸭,CE54,CE66分离自患病鸡^[1]。大肠埃希氏菌DH5a, BL21(DE3),本室保存。哈维弧菌BB170,哈维弧菌BB152(*Vibrio harveyi* BB152),购自美国模式培养物集存库(American Type Culture Collection, ATCC)。AB培养基的配置方法参照文献[2]进行。

报告菌BB170的培养:200 μ L BB170菌液接种5mL AB培养基中,28 $^{\circ}$ C培养过夜,至对数生长期。

1.1.2 主要试剂和仪器:pMD-18T载体,购自TaKaRa公司(日本)。限制性内切酶EcoRI, HindIII, DNA Tag聚合酶、T4 DNA连接酶、DNA快

速纯化回收试剂盒、质粒提取试剂盒等均为大连TaKaRa有限公司产品,原核表达载体pET28a购自Novagen公司;蛋白质低分子量标准为Fermentas公司产品。其它化学纯试剂均购自美国Sigma公司。

1.2 自诱导信号分子AI-2的制备

AI-2的制备参照文献[3]进行,阳性对照BB152培养上清的制备:5 mL AB培养基+加200 μ L预培养BB152菌液,28 $^{\circ}$ C培养过夜。12000 \times g, 4 $^{\circ}$ C离心10 min,上清用0.22 μ m的滤器过滤(Millipore),-80 $^{\circ}$ C冻存,用于作为检测AI-2活性的阳性对照;

参照文献[5]的方法,以大肠杆菌DH5 α 培养上清为阴性对照。阴性对照DH5 α 培养上清制备:5 mL LB培养基加200 μ L预培养DH5 α 菌液,28 $^{\circ}$ C培养过夜。12000 \times g, 4 $^{\circ}$ C离心10 min,上清用0.22 μ m的滤器过滤(Millipore),-80 $^{\circ}$ C冻存,用于作为检测AI-2活性的阴性对照;

禽致病性大肠杆菌培养上清制备:分别接种禽致病性大肠杆菌不同分离株到LB中,37 $^{\circ}$ C培养至对数期,分别取适量各分离株培养物,12000 \times g, 4 $^{\circ}$ C离心10 min,上清用0.22 μ m的滤器过滤(Millipore),-80 $^{\circ}$ C冻存,用于检测AI-2活性。

1.3 禽致病性大肠杆菌AI-2的活性检测

接种哈维弧菌BB170到新配制的AB培养基中,28 $^{\circ}$ C培养过夜,用新配制的AB培养基以1:5000稀释BB170培养物,分别加入10%按1.2方法制备的禽致病性大肠杆菌培养上清,同时以BB152培养上清为阳性对照、DH5 α 培养上清阴性对照,30 $^{\circ}$ C培养,用多功能酶标仪的生物发光模式,在4到6 h内检测培养物发光。每组重复3次。

1.4 AI-2的浓度测定

AI-2的浓度测定方法,参照文献[6]的方法进行。在以SAH为底物,进行AI-2的合成实验中,可以生成等量的DPD和高半胱氨酸,通过DTNB对高半胱氨酸浓度的检测,可以测定AI-2的浓度。DTNB为Ellman试剂,易溶于水,可用于比色法测定生物样品中巯基。在巯基化合物的存在下,无色的DTNB将被转变成黄色的5-巯基-2-硝基苯甲酸,5-巯基-2-硝基苯甲酸在412 nm处具有最大吸收。

取200 μ L不同浓度的同型半胱氨酸(Homocysteine)(用10 mmol/L pH 7.5磷酸钠缓冲液稀释到1 μ mol/L-100 μ mol/L),加入100 μ L的

5 mmol/L Ellman's 试剂 (DTNB, 溶于 100 mmol/L 磷酸钠, 0.1 mmol/L EDTA, pH 7.2 缓冲液), 37°C 作用 15 min, 在 412 nm 的波长下测光吸收值。

1.5 *LuxS* 和 *pfs* 的克隆、表达

依据 APEC 的 *luxS* 和 *pfs* 的基因序列, 利用 Primer (Version 5.0) 基因分析软件, 设计 2 对引物分别扩增 *luxS* 和 *pfs* 全基因, 跨幅分别为 516 bp 和 690 bp, 两端分别包含 *EcoRI* 及 *HindIII* 酶切位点, 序列见表 1。

表 1 本研究中所用引物

Table 1 Primers used in this study

Primers	Sequence (5'→3')	Restriction site	Size / bp
luxS-F	CCGGAATTCATGCCGTTGTTAGATAGC	<i>EcoRI</i>	
luxS-R	CCCAAGCTTCTAGATGTGCAGTTCCTGC	<i>HindIII</i>	516
pfs-F	CCGGAATTCATGAAAATCGGCATCATT	<i>EcoRI</i>	
pfs-R	CCCAAGCTTTTAGCCATGTGCAAGTTT	<i>HindIII</i>	690

PCR 扩增条件为: 94°C 4 min; 94°C 40 s, 52°C 40 s, 72°C 1 min 30 s, 30 个循环; 72°C 延伸 10 min。PCR 产物经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测扩增结果。PCR 扩增产物用 TaKaRa 公司 DNA 纯化试剂盒回收。

用 *EcoRI* 和 *HindIII* 酶切 PCR 产物和 pET28a 载体, 电泳、回收目的片段, 连接转化 BL21 (DE3) 感受态细胞。测序鉴定阳性的质粒分别命名为 pET28a-*luxS* 和 pET28a-*pfs*。

将筛选出的阳性重组菌接种于 LB 液体培养基 (Kan 100 μg/mL) 中, 在 37°C 震荡至 OD₆₀₀ 值达到 0.6–1.0 时加入 0.1 mmol/L 的 IPTG 诱导表达 5 h, SDS-PAGE 检测重组融合蛋白的表达。

1.6 重组蛋白 *LuxS*、*Pfs* 的纯化及可溶性分析

将诱导表达 *LuxS* 和 *Pfs* 的重组菌 4°C 离心, 收集菌体沉淀, PBS 重悬后, 进行超声裂解, 裂解产物 4°C 离心后, 分别收集上清与沉淀, 进行 SDS-PAGE, 用于重组蛋白的可溶性分析。重组蛋白的纯化按照 Merk 公司的 His-Bind Kits 纯化步骤进行。

1.7 AI-2 的体外合成及活性检测

AI-2 的体外合成参照文献 [3, 6] 建立的方法进行, 1 mg/mL 纯化的 *Pfs* 和 *LuxS* 蛋白与 1 mmol/L SAH 在 10 mmol/L 磷酸钠 (sodium phosphate buffer, pH 7.5) 缓冲液中, 37°C 作用 1 h, 反应液用 Millipore (10,000 Da cutoff) 的超滤膜, 进行超滤, 去除反应液

中的蛋白。滤液冻存于 -80°C。

体外合成的 AI-2 活性检测参照 1.3 方法进行。

2 结果

2.1 禽致病性大肠杆菌 AI-2 的活性检测

以 DH5α 培养上清为阴性对照, 用哈维弧菌 BB170 检测禽致病性大肠杆菌的 AI-2 活性, 结果表明, 检测的禽致病性大肠杆菌分离株培养上清均能诱导 BB170 发光 (图 1)。检测结果表明禽致病性大肠杆菌能产生 AI-2 样信号分子, 存在合成 AI-2 信号分子的 *LuxS*/AI-2 型密度感应系统。

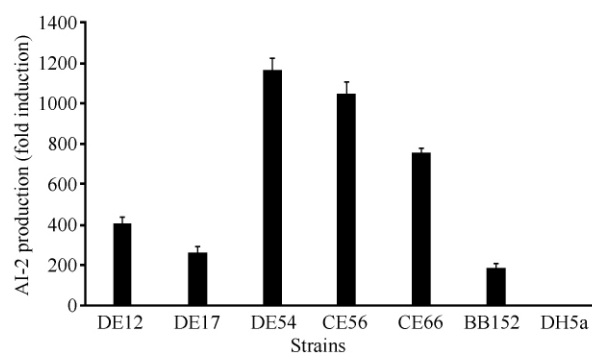


图 1 哈维氏弧菌 BB170 对禽致病性大肠杆菌的 AI-2 的检测

Fig. 1 AI-2 activity in the supernatant of culture was measured using the *V. harveyi* bioluminescence assay.

2.2 AI-2 浓度测定标准曲线

不同浓度的同型半胱氨酸 (Homocysteine) 与 5 mmol/L Ellman's 试剂, 37°C 作用 15 min 后, 分别测定 412 nm 的波长下的光吸收值。依据测定的数据, 绘制了用于 AI-2 浓度测定的标准曲线 (图 2)。

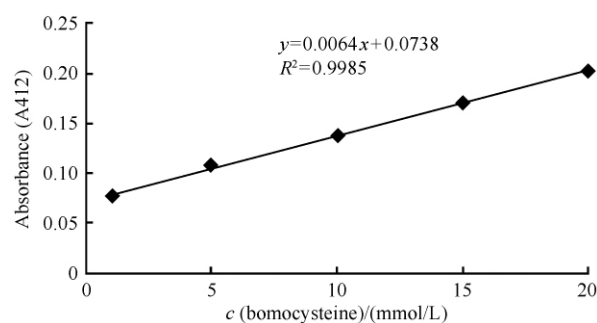


图 2 AI-2 浓度测定标准曲线

Fig. 2 The standard curve of AI-2 concentration.

2.3 *luxS* 和 *pfs* 的克隆以及表达载体的构建

用特异性引物 *LuxS*-F/*LuxS*-R 和 *pfs*-F/*pfs*-R 对

禽致病性大肠杆菌 DE17 株进行 PCR 扩增,电泳结果表明成功扩增出 2 条与预期大小一致的 DNA 片段。

对重组质粒双酶切、电泳,均出现预期 DNA 片段,测序结果表明重组质粒 pET28a-luxS 和 pET28a-pfs 中分别包含完整的 *luxS* 和 *pfs* 阅读框。

2.4 LuxS 和 Pfs 的表达、纯化及可溶性分析

SDS-PAGE 分析显示:经 IPTG 诱导后,重组质粒 pET28a-luxS 和 pET28a-pfs 在预期位置出现了预期大小的蛋白表达条带,表明目的片段在大肠杆菌 BL21 中得到了表达(图 3)。对重组蛋白的可溶性进行分析,结果表明两种重组蛋白都主要以可溶性方式在上清表达。对表达的上清蛋白经 HisTrap 纯化、采用 Bradford 方法测定 LuxS 和 Pfs 蛋白浓度分别为 2 和 1.5 mg/mL。

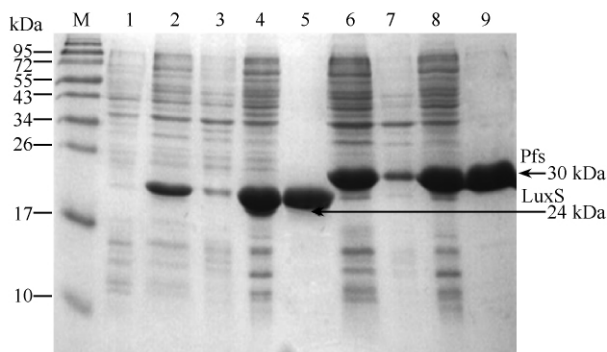


图 3 重组 LuxS 与 Pfs 的表达、纯化

Fig. 3 SDS-PAGE analysis of the expression and purification of LuxS and Pfs. M. Protein molecular weight marker; 1. Negative control; 2. Total cellular proteins of *E. coli* BL21 transformed with pET28a-luxS; 3. The inclusion body expression of LuxS; 4. The soluble expression of LuxS; 5. Purified expression product of LuxS; 6. Total cellular proteins of *E. coli* BL21 transformed with pET28a-pfs; 7. The inclusion body expression of Pfs; 8. The soluble expression of Pfs; 9. Purified expression product of Pfs.

2.5 信号分子 AI-2 的体外合成及活性检测

AI-2 体外合成的结果表明,当纯化的重组蛋白 LuxS 和 Pfs 与 SAH 同时作用后,其反应液经过滤后,运用 BB170 可检测其 AI-2 活性是阴性对照(DH5a)的 700 倍(表 1),表明合成了具有生物学活性的 AI-2。在 AI-2 的体外合成实验中,仅 LuxS 或 Pfs 单独作用于底物 SAH 时,其反应产物没有检测到明显的 AI-2 活性(表 1),表明 AI-2 的体外合成需要 LuxS 和 Pfs 的同时参与。

表 2 重组蛋白 LuxS 和 Pfs 的功能分析^a

Table 2 Functional analyses of recombinant luxS and

In vitro reaction combination		pfs enzymes ^a	
Substrate	Enzyme	AI-2 activity (fold induction)	Concentration of homocysteine ($\mu\text{mol/L}$)
SAH	-	1	0
SAH	Pf	1	0
SAH	LuxS	1	0
SAH	LuxS + Pfs	700	300

^aNote that the catalyzed reactions produce equimolar concentrations of both DPD and homocysteine.

3 讨论

LuxS 介导合成的 AI-2 参与众多细菌的毒力调控: Sperandio 等^[8] 利用基因芯片技术研究出血性大肠杆菌中受 AI-2 调节的基因; Han 等^[4] 报道在猪链球菌 2 型中, AI-2 调节与细菌毒力有关的基因表达。Chung 等^[9] 报道在牙龈卟啉假单胞菌 (*Porphyromonas gingivalis*) 中, AI-2 调节与卟啉摄取和凝血作用相关基因的表达^[10]; 在产气荚膜杆菌 (*Clostridium perfringens*) 中, *luxS* 基因突变导致多种毒素,如 α 、 κ 、 θ 等毒素合成量降低^[11]。除调节毒力基因表达外, AI-2 可能与细菌生物被膜形成相关。Merritt 等^[12] 首次报道 *luxS* 突变影响变异链球菌生物被膜形态, McNab 等报道戈氏链球菌 (*Streptococcus gordonii*) *luxS* 基因突变可影响该细菌与 *luxS* 缺陷的牙龈卟啉单胞菌形成混合生物被膜的能力。

利用哈维弧菌发光的特性, Bassler 等通过 Tn5 转座子构建了检测细菌 AI-2 的报告菌株哈维弧菌 BB170, AI-2 可诱导其荧光素酶启动子的表达,通过诱导报告菌株 BB170 的发光来证实检测菌中存在用于 AI-2 合成的 *luxS* 基因^[13], 大肠杆菌 DH5 α 因其编码 LuxS 酶的基因发生移码突变,而不能产生 AI-2 信号分子,可被用来作为 *luxS* 基因互补实验的工程菌或是作为 AI-2 检测时的阴性对照^[5]。在本实验中不同禽致病性大肠杆菌分离株上清诱导 BB170 发光的倍数显著高于阴性对照,表明禽致病性大肠杆菌株产生 AI-2 样信号分子,存在合成 AI-2 的 LuxS/AI-2 型密度感应系统,对不同 APEC 分离株的 AI-2 检测表明,不同菌株产生 AI-2 的水平差异很大,推测可能是不同菌株的 AI-2 合成、转运及内化差异所致,其机制仍有待进一步的研究。

除了共生生物和寄生虫,所有的生物体都有 SAH 循环途径,或者通过酶 Pfs 和 LuxS 进行酶促反应产生腺嘌呤、同型半胱氨酸和 DPD,DPD 经环化及重排,生成了 S-DHMF 及 R-DHMF,再经水化后,分别生成了 S-THMF 及 R-THMF(大肠杆菌及沙门氏菌中等细菌的 AI-2),S-THMF 进一步与硼酸反应生成了 S-THMF-硼酸盐,即哈维弧菌的 AI-2;或者通过 SAH 水解酶(SAH hydrolase, SahH)一步进行转化。通过 SAH 水解酶这一途径没有 AI-2 产生,真核生物、古生菌(Archaea)、 α -蛋白菌(α -proteobacteria)、放线菌(Actinobacteria)和蓝细菌(Cyanobacteria)中普遍存在该途径^[14-16]。在本实验中,通过体外实验证实利用禽致病性大肠杆菌的 LuxS 和 Pfs 可以在体外催化 SAH 生成有活性的 AI-2 分子,证明在 APEC 中,SAH 循环是通过酶 Pfs 和 LuxS 进行酶促反应产生腺嘌呤、同型半胱氨酸和 DPD,DPD 再通过重排形成 AI-2。

尽管有超过 55 种细菌有 LuxS 的类似物存在,但只有哈维弧菌和鼠伤寒沙门氏菌 2 种 AI-2 分子的结构被研究:在哈维弧菌中,Chen 等对哈维弧菌的 LuxP-AI-2 复合体进行了结晶和 X-射线衍射分析。三维结构分析显示,AI-2 为结合硼离子的呋喃硼酸二酯(S-THMF-硼酸盐)^[17];而在鼠伤寒沙门氏菌中 AI-2 是缺少硼离子的 R-THMF^[16]。因不同的细菌可以产生不同结构的 AI-2 分子,其他细菌的 AI-2 分子结构如何呢?推测可能是 R-THMF 或者 S-THMF-硼酸盐,或者至少是相似的分子。目前对 APEC 产生的 AI-2 结构尚不清楚。此外,由于国内尚没有商品化的 APEC 的 AI-2 供应,在一定程度上也限制了对其结构的研究,本研究利用重组表达的 APEC 的 LuxS 与 Pfs 催化底物 SAH,建立了 AI-2 体外合成的方法。此外,为将来进一步研究 AI-2 对 APEC 的调控作用,需要建立 AI-2 的定量方法,但由于对 APEC 的 AI-2 结构不清楚,目前不能对 AI-2 进行直接定量,因此在本研究中,利用 LuxS 与 Pfs 在催化底物 SAH 时,可以生成等量的 DPD 和高半胱氨酸,通过 DTNB 对高半胱氨酸浓度的检测,可以测定 DPD 浓度,进而测定 AI-2 的浓度。在本实验中,依据建立的用于 AI-2 浓度测定的标准曲线,在体外合成 300 $\mu\text{mol/L}$ 具有生物学活性的 AI-2,为进一步开展 APEC 的 AI-2 结构研究以及 AI-2 对 APEC 的调控作用奠定基础。

本研究通过建立 AI-2 检测、体外合成和定量的方法,为进一步研究 AI-2 对禽致病性大肠杆菌的调

控、AI-2 的结构研究以及 AI-2 拮抗剂的研制奠定了基础,同时也为通过干扰或者阻断 LuxS/AI-2 型密度感应系统,来进行禽致病性大肠杆菌防控提供新思路。

参考文献

- [1] 陈文静,韩先干,何亮,胡青海,于圣青. 鸭致病性大肠杆菌的分离鉴定及其生物学特性分析. 中国动物传染病学报(*Chinese Journal of Animal Infectious Diseases*), 2010, 18 (2) :34-40.
- [2] Han XG, Lu CP. Detection of autoinducer-2 and analysis of profile of *luxS* and *pfs* transcription in *Streptococcus suis* serotype 2. *Current microbiology*, 2009, 58 (2) : 146-152.
- [3] Han XG, Lu CP. *In vitro* biosynthesis of autoinducer 2 of *Streptococcus suis* serotype 2 using recombinant LuxS and Pfs. *Enzyme and Microbial Technology*, 2009, 44 (1) : 40-45.
- [4] Han XG, Lu CP. Biological activity and identification of a peptide inhibitor of LuxS from *Streptococcus suis* serotype 2. *FEMS Microbiology letters*, 2009, 294 (1) :16-23.
- [5] Surette MG, Miller MB, Bassler BL. Quorum sensing in *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, and *Vibrio harveyi*: a new family of genes responsible for autoinducer production. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96 (4) : 1639-1644.
- [6] Schauder S, Shokat K, Surette MG, Bassler BL. The LuxS family of bacterial autoinducers: biosynthesis of a novel quorum-sensing signal molecule. *Molecular Microbiology*, 2001, 41 (2) :463-476.
- [7] Winzer K, Hardie KR, Burgess N, Doherty N, Kirke D, Holden MT, Linforth R, Cornell KA, Taylor AJ, Hill PJ, Williams P. LuxS: its role in central metabolism and the *in vitro* synthesis of 4-hydroxy-5-methyl-3 (2H) -furanone. *Microbiology*, 2002, 148 (4) :909-922.
- [8] Sperandio V, Torres AG, Giron JA, Kaper JB. Quorum sensing is a global regulatory mechanism in enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Journal Bacteriology*, 2001, 183 (17) :5187-5197.
- [9] Chung WO, Park Y, Lamont RJ, McNab R, Barbieri B, Demuth DR. Signaling system in *Porphyromonas gingivalis* based on a LuxS protein. *Journal Bacteriology*, 2001, 183 (17) :3903-3909.
- [10] Lyon WR, Madden JC, Levin JC, Stein JL, Caparon MG. Mutation of *luxS* affects growth and virulence factor

- expression in *Streptococcus pyogenes*. *Molecular Microbiology*, 2001, 42 (1) :145-157.
- [11] Ohtani K, Hayashi H, Shimizu T. The luxS gene is involved in cell-cell signalling for toxin production in *Clostridium perfringens*. *Molecular Microbiology*, 2002, 44 (1) :171-179.
- [12] Merritt J, Qi FX, Goodman SD, Anderson MH, Shi W. Mutation of luxS Affects biofilm formation in *Streptococcus mutants*. *Infection and Immunity*, 2003, 71 (4) :1972-1979
- [13] Bassler BL, Wright M, Showalter RE, Silverman MR. Intercellular signalling in *Vibrio harveyi*: sequence and function of genes regulating expression of luminescence. *Molecular Microbiology*, 1993, 9 (4) :773-786.
- [14] Winzer K, Hardie KR, Williams P. LuxS and autoinducer-2: their contribution to quorum sensing and metabolism in bacteria. *Advances in Applied Microbiology*, 2003, 53 :291-396.
- [15] Sun J, Daniel R, Wagner-Döbler I, Zeng AP. Is autoinducer-2 a universal signal for interspecies communication: a comparative genomic and phylogenetic analysis of the synthesis and signal transduction pathways. *BMC Evolutionary Biology*, 2004, 4: 36.
- [16] De Keersmaecker SC, Sonck K, Vanderleyden J. Let LuxS speak up in AI-2 signaling. *Trends in Microbiology*, 2006, 14 (3) :114-9.
- [17] Chen X, Schauder S, Potier N, Van Dorsselaer A, Pelczar I, Bassler BL, Hughson FM. Structural identification of a bacterial quorum-sensing signal containing boron. *Nature*, 2002, 415 (6871) :545-549.

Cloning and expression of *luxS* and *pfs* and *in vitro* biosynthesis autoinducer 2 of avian pathogenic *Escherichia coli* from Anhui Province

Xiangan Han¹, Hao Bai^{1, 2}, Lei Liu¹, Wenjing Chen¹, Chan Ding¹, Qinghai Hu¹, Kezong Qi², Shengqing Yu^{1*}

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

² College of Animal Science and Technology, Anhui Agricultural University, Hefei 230036, China

Abstract: [Objective] The LuxS/AI-2 quorum sensing (QS) system shared by Gram-positive and Gram-negative bacteria involves the production of autoinducer-2 (AI-2). In this study, the method of biosynthesis of AI-2 was established using recombinant LuxS and Pfs of avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC), which will be benefit for future study of the role of AI-2 in APEC. [Methods] We investigated AI-2 production in APEC by *vibrio harveyi* BB170 (BB170). Furthermore, APEC LuxS and Pfs were expressed, purified and used to investigate the production of AI-2 *in vitro*. LuxS and Pfs were incubated with S-ribosylhomocysteine (SAH), the reaction was detected for the production of luminescence of BB170. [Results] APEC can produce AI-2 by BB170 bioassay. Purified LuxS and Pfs enzymes incubated with SAH and produced 300 μ mol/L AI-2 in the reaction products. [Conclusion] The results demonstrated that recombinant Pfs and LuxS synthesize AI-2 *in vitro* from SAH. These findings will be of benefit to future studies of the role of AI-2 in APEC.

Keywords: Avian Pathogenic *Escherichia coli*, quorum sensing, autoinduce-2, LuxS

(本文责编:王晋芳)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (31001078,31072161,30871851)

* Corresponding author. Tel: +86-21-34293461; E-mail: yus@shvri.ac.cn

Received: 16 March 2012/ Revised: 25 April 2012