

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
55 (6) :739 - 747; 4 June 2015
ISSN 0001 - 6209; CN 11 - 1995/Q
http://journals.im.ac.cn/actamicroen
doi: 10.13343/j.cnki.wsxb.20140552

枯草芽孢杆菌 SS6N-酰基高丝氨酸内酯酶基因的克隆表达及其酶学特性

张盼^{1,4}, 丁贤², 李来好², 陆勇军³, 殷波^{1*}

¹中国科学院南海海洋研究所, 广东 广州 510301

²中国水产科学研究院南海水产研究所农业部水产品加工重点实验室, 广东 广州 510300

³中山大学生命科学院生物防治国家重点实验室, 广东 广州 510275

⁴中国科学院大学, 北京 100049

摘要:【目的】从一株具有细菌群体感应 (Quorum Sensing, QS) 信号分子淬灭活性的枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) SS6 中扩增 *N*-酰基高丝氨酸内酯酶 (*N*-acylhomoserine lactonase, AiiA) 基因 *aiiA*_{SS6} 并异源表达, 研究此信号降解酶的酶学特性。【方法】设计特异性引物, 从 *B. subtilis* SS6 中克隆 *N*-酰基高丝氨酸内酯酶基因 *aiiA*_{SS6}, 测序并进行生物信息学分析; 将此基因克隆到表达载体 pET28 (a), 构建重组菌株并提纯目的蛋白 AiiA_{SS6}; 然后用高效液相色谱 (high performance liquid chromatography, HPLC) 分析目的蛋白 AiiA_{SS6} 降解 QS 信号分子 *N*-(3-Oxoocctanoyl)-L-homoserine lactone (OOHL) 的酶学特性。【结果】克隆得到基因片段, 命名为 *aiiA*_{SS6} (GenBank: KP125494), 其编码一条含有 297 氨基酸残基的多肽, 用 pET28 (a) 成功构建重组质粒 pET28-*aiiA*_{SS6}。生物信息学分析表明, AiiA_{SS6} 的氨基酸序列含有 *N*-酰基高丝氨酸内酯酶典型的“HXHXDH”基序和 194 位的 Tyr 残基。在 *Escherichia coli* BL21 (DE3) 中异源表达 AiiA_{SS6}, 用 Ni 柱纯化后, AiiA_{SS6} 含量达 2.76 mg/mL。HPLC 检测结果表明 AiiA_{SS6} 对 OOHL 具有很强的催化活性及耐热性, K_m 和 V_{max} 分别为 0.998 mmol/L 和 22.3 U/mg, 最适 pH 为 7.6, 最适温度范围为 50 - 90°C; 此酶在 4°C 保存 3 个月后其残余活性仍达到 86%, 表现出较强的稳定性。【结论】从 *B. subtilis* SS6 中获得的 QS 淬灭酶 AiiA_{SS6} 表现出降解 QS 信号分子的高活性, 其酶学特性表明它具有作为微生物制剂防控植物或水产养殖中基于 QS 调控的病原菌毒力的应用潜力。

关键词: 群体感应, *N*-酰基高丝氨酸内酯酶, 酶学特性, 高效液相色谱

中图分类号: Q814 **文章编号:** 0001-6209 (2015) 06-0739-09

群体感应 (Quorum Sensing, QS) 是细菌依赖细胞密度的一种基因调控机制, 它通过一种可溶性化学信号分子来进行细胞间的交流^[1]。随着对群体

感应研究的逐渐深入, 大量的研究表明许多动植物病原菌通过群体感应系统来调控毒力基因的表达, 如嗜水气单胞菌分泌到胞外的毒性蛋白的表达^[2];

基金项目: 广东省教育部产学研结合项目 (2011B090400151); (中国科学院南海水产研究所) 农业部水产品加工重点实验室开放基金 (NYJG201308)

* 通信作者。Tel: +86-20-89023114; E-mail: yinbo@sesio.ac.cn

作者简介: 张盼 (1990 -), 女, 硕士研究生, 专业研究方向为环境微生物。E-mail: feixiangzhangpan@163.com

收稿日期: 2014-11-21; **修回日期:** 2014-12-23

欧文氏菌 *Erwinia carotovora*, *Erwinia chrysanthemi*, *Erwinia stewartii* 毒力基因的诱发^[3-5]; *Pseudomonas aeruginosa* 毒力因子的表达调控^[6]; 替换哈维氏弧菌 QS 的信号分子可以抑制其发光及毒力^[7], 这些研究都表明 QS 系统可以作为不同于传统抗菌治疗的新型靶标^[8]。

细菌的群体感应系统中起决定性作用的是细胞分泌的一种化学小信号分子, 到目前为止, 已经发现了很多类型的群体感应信号分子, 其中, N-乙酰高丝氨酸内酯 (N-acylhomoserine lactones, AHLs) 是许多革兰氏阴性菌产生的一类信号分子^[9]。AHL 信号分子结构的典型特征是含有高丝氨酸内酯环和一个酰胺侧链^[10], 依赖于 AHL 的 QS 系统参与很多种重要的生理功能的调控, 因此许多研究通过降解 AHLs 来干扰细菌 QS 的信号系统, 从而阻断病原菌的毒力及致病性^[11]。AHL-降解酶是抑制群体感应系统最简易的途径^[12-13], AHL-内酯酶通过断裂 AHL 内酯键水解 AHLs, 是目前最具特异性的 AHL-降解酶, 具不同酰胺侧链的 AHLs 都可作为 AHL-内酯酶的底物, 但对其它化合物并没有降解活性^[9,14]。研究发现许多芽孢杆菌 (*Bacillus* sp.) 可以合成 AHL-内酯酶 AiiA^[15], AiiA 对 QS 信号分子 AHLs 的降解活性及其相关的酶学特性研究对发展群体感应淬灭应用是非常必要的。相对于利用报告菌 *Chromobacterium violaceum* CV026 或 *Agrobacterium tumefaciens* 生物测定方法来定性检测 AiiA 酶对信

号分子 AHL 的水解, 高效液相色谱 (high performance liquid chromatography, HPLC) 则可以十分精确地定量分析 AHL-内酯酶的动力学特征, 有利于构建基于 QS 调控的病原微生物防控新策略, 发掘其潜在的应用价值。所以, 研究 AHL-降解酶的酶学特性是必不可少的理论基础。

目前, 多种编码 AiiA 蛋白的基因 *aiaA* 已被克隆, 而海洋环境微生物的信号降解酶基因克隆及其酶学特性研究尚未见有报道。在本研究中, 我们从近海区生态环境样品中分离得到一株具有 QS 淬灭活性的枯草芽孢杆菌 SS6, 从中克隆 AHL-内酯酶基因 *aiaA*_{SS6} 在 *Escherichia coli* 中异源表达 AiiA_{SS6} 蛋白并进行相关生物信息学分析, HPLC 方法研究重组表达产物 AiiA_{SS6} 的酶学特性及其动力学为进一步研究该基因重组表达的特性及其应用奠定基础, 为构建以致病菌 QS 系统为靶点的防控新技术提供参考, 有利于开发海洋微生物资源及功能基因。

1 材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 菌株和质粒: 本研究所涉及的菌株和质粒见表 1, *E. coli* 菌株及枯草芽孢杆菌 SS6 均采用 LB 培养基, 在 37℃ 培养。所用抗生素终浓度: 氨苄霉素 (Amp) 为 100 μg/mL; 卡那霉素 (Kan) 为 100 μg/mL。

表 1. 本研究所用的菌株和质粒

Table 1. Bacterial strains and plasmids used in this study

Strains or Plasmids	Characteristics	Source
Bacteria strains		
<i>Escherichia coli</i> DH5α	Standard cloning host, host of pET28- <i>aiaA</i> _{SS6}	This lab
<i>Escherichia coli</i> BL21 (DE3)	The expression host, host of pET28- <i>aiaA</i> _{SS6}	This lab
<i>Bacillus subtilis</i> SS6	Wild type, AHL-degrading	This lab
Plasmids		
pET28 (a)	Expression vector (T7 promoter, His/Thrombin/T7 tag, Kan ^r , 5369bp)	This lab
pET28- <i>aiaA</i> _{SS6}	pET28 (a) derivative carrying <i>aiaA</i> _{SS6} gene	This study

1.1.2 主要试剂: Bacterial DNA Kit、Gel Extraction Kit、Plasmid Mini Kit、T4 DNA 连接酶购自 OMEGA 公司; 引物合成及 DNA 测序由英韦创津公司完成; 无填料层析柱及各种限制性内切酶购自 NEB 公司; PierceTM BCA Protein Assay KIT 购于 Thermo 公司; 辛酰高丝氨酸内酯 [N-(3-oxooctanoyl)-L-homoserine

lactone, 3-oxo-C8-HSL, OOHSL] 购于 Sigma 公司; HPLC 级甲醇购自德国 CNW; 其他化学试剂均为分析纯。

1.1.3 引物: 表 2 为本研究所用引物, 均由上海英潍捷基公司合成。

表 2. PCR 引物序列

Table 2. Oligonucleotides used as primers

Primers	Primer sequence (5'→3')
<i>aiiA-F</i>	ATG CAGTAAAGAAGCTTTAT
<i>aiiA-R</i>	CTCAACAAGATACTCCTA ATG

1.2 菌株 SS6 中 AHL-内酯酶基因 *aiiA* 的克隆

以 SS6 基因组为模板, PCR 反应体系为: GoTaq DNA 聚合酶 25 μ L, Primer-F 1 μ L, Primer-R 1 μ L, 模板 2 μ L, 补水至 50 μ L; 反应条件: 95 $^{\circ}$ C 2 min, 94 $^{\circ}$ C 30 s, 55 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 2 min, 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 2 min, 4 $^{\circ}$ C 1 h. 胶回收 PCR 扩增产物, 4 $^{\circ}$ C 保存备用。

1.3 菌株 SS6 中 *aiiA* 基因异源表达载体的构建

将所得的目的基因片段 *aiiA* 与载体质粒 pET28 (a) 分别经 *Bam*H I 和 *Hind* III 双酶切后, 经电泳检测, 纯化回收目的片段, 酶连, *E. coli* DH5 α , 获得的阳性克隆子提取质粒后再转入 *E. coli* BL21 (DE3) 中, 挑取阳性克隆子并送测序公司测序, 富集培养后保种备用。

1.4 *aiiA*_{SS6} 基因的核苷酸序列分析及蛋白三级结构预测

将测序得到的核苷酸序列与 NCBI 数据库比对, 分析与其它物种的同源性; 利用软件 primer premier 5.0 对 *aiiA*_{SS6} 基因核苷酸序列进行翻译, 对得到的氨基酸序列进行三级结构预测。通过网站 <http://swissmodel.expasy.org/> 提供的同源建模法, 预测翻译蛋白的晶体结构及保守基序。

1.5 Western blot 检测 *aiiA* 在 *E. coli* BL21 (DE3) 中的表达

将构建好的带有 pET28-*aiiA*_{SS6} 质粒的工程菌在 0.1 mmol/L IPTG 条件下 20 $^{\circ}$ C 过夜诱导, 以未加诱导剂 IPTG 为阴性对照; 富集培养后收集 5 mL 菌液, 菌体加入 20 μ L SDS-PAGE 上样缓冲液在 100 $^{\circ}$ C 煮 10 min, 然后进行 SDS-PAGE 电泳; 电泳结束后进行转膜, 转膜条件为 60 V 转移 2 h; 接下来进行免疫反应, 抗体孵育条件为: 一抗 (6 * His, His-Tag Antibody, Mouse monoclonal), 室温孵育 1 h, 或 4 $^{\circ}$ C 过夜; 二抗 (goat anti-mouse IgG-HRP) 孵育 1 h; 然后将 Chemiluminescent HRP Substrate 与膜在暗室中充分接触, 用化学发光成像系统扫描, 检测目的蛋白。

1.6 重组蛋白 AiiA_{SS6} 的纯化

重组大肠杆菌 BL21 (pET28-*aiiA*_{SS6}) 于 LB 培养基 37 $^{\circ}$ C 培养, 当 *OD*₆₀₀ 达到 0.6 - 0.9 时, 加入终浓

度为 0.1 mmol/L 的 IPTG, 20 $^{\circ}$ C 过夜诱导, 4 $^{\circ}$ C 收集菌体 (6000 \times g, 10 min), 用 25 mmol/L 咪唑缓冲液 (25 mmol/L Tris, 25 mmol/L 咪唑, 500 mmol/L NaCl, 浓 HCl 调 pH 至 7.8) 裂解细胞, 超声破碎, 4 $^{\circ}$ C 离心 (10000 \times g, 10 min), 收集上清过装有 His 标签填料的亲和层析柱, 50 mmol/L 咪唑缓冲液洗涤, 350 mmol/L 咪唑缓冲液洗脱目的蛋白, 洗脱的蛋白再用 10 kDa 的超滤管进行浓缩, 用不含咪唑的置换缓冲液洗 2 次, 收集超滤液, 4 $^{\circ}$ C 保存备用。

1.7 BCA 法蛋白浓度测定

根据 PierceTM BCA Protein Assay KIT 操作说明书测出标准蛋白的标准曲线, 重组蛋白样品做 3 个重复, 取平均值作为蛋白最终浓度。在本研究中, 1 个酶活单位定义为 1 min 内水解 1 μ mol 的底物 OOHl 所需的酶的量。

1.8 HPLC 法测定 pH 和温度对重组蛋白 AiiA_{SS6} 酶活的影响

HPLC 法测定的流动相为甲醇和水 (体积比 60:40), 柱温 30 $^{\circ}$ C, 流速为 1 mL/min, 检测波长为 201 nm, 进校量 100 μ L, 实际用量为 10 μ L, 所有检测的样品在上样前都用 0.45 μ m 膜过滤。

在 30 $^{\circ}$ C 的磷酸缓冲体系中, 改变缓冲体系的酸碱度, 测定 pH 对 AiiA_{SS6} 酶活性的影响, pH 梯度设置为: 5.0、5.8、6.4、7.0、7.6、8.0。具体实验方案为取纯化的 AiiA_{SS6} 蛋白 5 μ L 与 20 μ L 底物 OOHl 在不同的 pH 的磷酸缓冲液中, 反应体积为 400 μ L, 30 $^{\circ}$ C 水浴反应 10 min, 然后用 SDS 终止反应。

在 pH 8.0 的磷酸缓冲液体系中, 改变反应体系的温度, 测定温度的变化对 AiiA_{SS6} 酶活性的影响。取纯化的 AiiA_{SS6} 蛋白 5 μ L 与 20 μ L 底物 OOHl 进行反应, 反应体积为 400 μ L, 温度梯度设置为: 15、20、25、30、40、50、60、70、80、90 $^{\circ}$ C, 水浴反应 10 min 后, 用 SDS 终止反应, 通过底物 OOHl 的减少量来测定 AiiA_{SS6} 酶的活性大小, 从而确定该酶反应的最适温度。

1.9 HPLC 法测定反应时间和底物浓度对重组蛋白 AiiA_{SS6} 酶活的影响

取纯化的 AiiA_{SS6} 蛋白 5 μ L, 以 OOHl (终浓度为 0.04 g/L) 为底物, 30 $^{\circ}$ C、pH 值为 8.0 的磷酸缓冲体系下, 反应体系为 400 μ L, 分别在反应时间 5、10、20、30、40、60、90、120 min 时, 用 SDS (终浓度为 2%) 终止反应。

取纯化的 AiiA_{SS6} 蛋白 5 μL, 以 OOHl 为底物, 30℃、pH 值为 8.0 的磷酸缓冲体系下, 反应体系为 400 μL, 反应 10 min 后用 SDS 终止反应分别测定不同底物浓度时的酶活, 底物终浓度分别为 0.02、0.04、0.06、0.08、0.10、0.12 g/L。

2 结果

2.1 AHL-内酯酶基因 *aia*_{SS6} 的 PCR 扩增与克隆

从近海区生态环境样品中筛选得到的枯草芽孢杆菌 SS6 具细菌 QS AHLs 降解活性, 表明 SS6 可能拥有 AHL-降解酶基因, AHL-降解酶主要分为 AHL-内酯酶和 AHL-酰化酶两类。根据芽孢杆菌中 AHL-降解酶基因中保守性, 本研究参考文献设计了 AHL-内酯酶基因和 AHL-酰化酶基因的特异 PCR 引物, 以 SS6 基因组为模板从中 PCR 扩增 AHL-降解酶基因。最终以 AiiA 同源基因 (GenBank 登录号: AF350929) 设计的引物从 SS6 基因组中扩增出一个约 900 bp 大小的单一条带 (图 1-A), 并将扩增的产物命名为 *aia*_{SS6}; 将目的基因 *aia*_{SS6} 构建克隆载体并测序 (GenBank 登录号: KP125494) (图 1-B), 核苷酸序列大小为 891 bp。

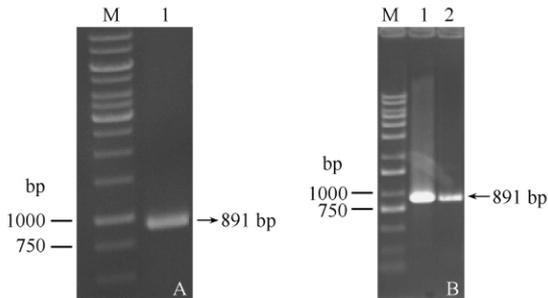


图 1. SS6 菌株中 *aia* 基因和 pET28-*aia*_{SS6} 阳性克隆子 PCR 扩增电泳图

Figure 1. PCR amplification for *aia* gene from SS6 strain and pET28-*aia*_{SS6} positive clone. A: M, Marker; lane 1, *aia* gene. B: M, Marker; lane 1, positive control; lane 2, pET28-*aia*_{SS6} positive clone.

2.2 *aia*_{SS6} 基因的生物信息学分析

根据基因 *aia*_{SS6} 核苷酸序列推测其编码由 297 个氨基酸组成的多肽链, 命名为 AiiA_{SS6}, 利用 ProtParam 推导其分子量为 33 kDa, 等电点为 5.31。利用 BLAST 将 *aia*_{SS6} 与已报道的 AHL-内酯酶基因进行比对, 结果显示 *aia*_{SS6} 与苏云金芽孢杆菌

Bacillus thuringiensis Bt407 (NC_018877.1) 同源性达到 96%; 与 *Bacillus cereus* NC7401 (NC_016771.1) 同源性达到 90%。由此可推测本研究获得的基因 *aia*_{SS6} 编码一种 AHL-内酯酶。

利用软件 primer premier 5.0 对 *aia*_{SS6} 基因核苷酸序列进行翻译, 对得到的氨基酸序列进行三级结构预测。通过网站 <http://swissmodel.expasy.org/> 提供的同源建模法, 得到一个同源性为 96% 的蛋白质结构数据, 模板 PDB ID 为 2A7M, 网址为 <http://rcsb.org/>。建模结果如图 2, 图中卷曲结构代表 α 螺旋, 可见 AHL-内酯酶 AiiA_{SS6} 的外部被亲水性的 α 螺旋所包围; 利用 NCBI 数据库和 Clustal Omega 对 AiiA_{SS6} 和来自于其它物种的 AHL-内酯酶进行多序列比对, 结果显示了氨基酸序列中的保守基序 “HXHXDH” 及 194 位的 Tyr 残基 (图 3)^[16]; 根据 Thomas 等推测的在所有 AHL-内酯酶中存在的保守锌结合残基模型^[17], 在 AiiA_{SS6} 的氨基酸序列中也可看到金属-1 位点的残基 His104、His 106、His 169 及金属-1 位点的残基 Asp 108、His 109、His 235。对 AiiA_{SS6} 蛋白结构的预测为研究 AHL-内酯酶与底物相互作用的机制提供了基础。

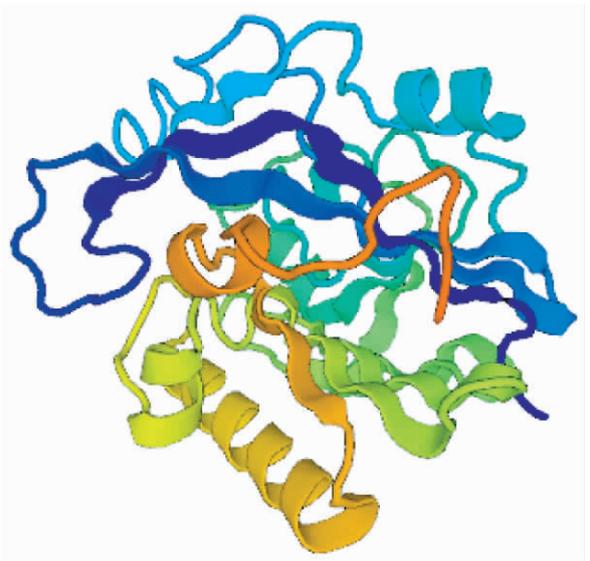


图 2. AiiA_{SS6} 蛋白三级结构预测模型

Figure 2. Prediction of crystal structure of AiiA_{SS6}.

2.3 AiiA_{SS6} 的异源表达、纯化及蛋白浓度测定

本实验以 pET28 (a) 为载体构建 pET28-*aia*_{SS6} 重组质粒, 并转入 *E. coli* BL21 (DE3) 进行异源表达。重组工程菌经 IPTG 诱导后, Western blot (WB)

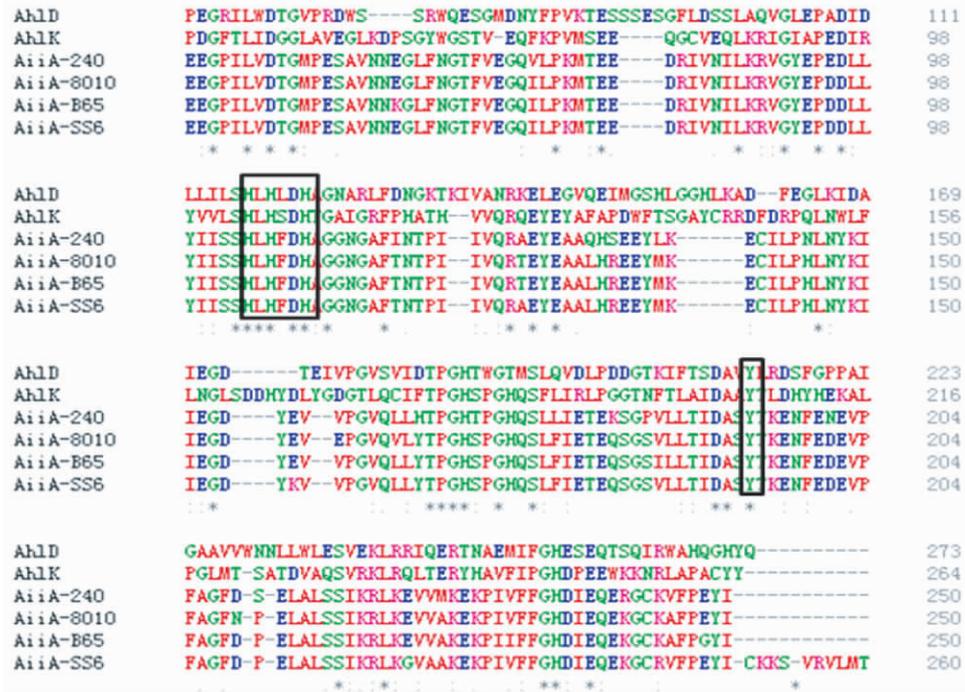


图 3. *aiiA*_{SS6} 基因的氨基酸序列与 AHL-内酯酶氨基酸序列的同源性比较

Figure 3. Multiple alignment of amino acid sequence *AiiA*_{SS6} (*AiiA*-SS6) with other known sequences. *AiiA*_{SS6} (*AiiA*-SS6) was aligned with *Arthrobacter* sp. IBN110 (AhlD, accession number: AF525800.1), *Klebsiella pneumoniae* (AhlK, accession number: AY222324.1), *Bacillus* sp. 240B1 (*AiiA* 240, accession number: AF196486.1), *Bacillus thuringiensis* serovar *kurstaki* strain 8010 (*AiiA* 8010, accession number: AY943832.1), *Bacillus weihenstephanensis* strain B65 (*AiiA* B65, accession number: KC823046.1). Clustal Omega was used for alignment of sequences and identical residue was colored with green. "DXHXDH" motif and Tyr (194) were boxed with black frame.

检测结果如图 4, 结果表明在 IPTG 的诱导下 *aiiA*_{SS6} 基因在宿主 BL21 (DE3) 进行了特异性的表达。

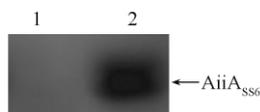


图 4. 目的蛋白 *AiiA* 的 Western blot 检测结果

Figure 4. Western blot of *AiiA*_{SS6}. Lane 1: IPTG-free; lane 2: Induce by IPTG.

基于 WB 的结果, 利用镍离子对诱导表达带有 His 标签融合蛋白的亲合作用来结合目的蛋白, 优化了 *AiiA*_{SS6} 蛋白表达的条件, 在 350 mmol/L 咪唑洗脱缓冲液的作用下, 超滤浓缩后纯化得到大量的分子量约为 33 kDa 的目的蛋白 (图 5), 这与根据氨基酸序列推导出的 *AiiA*_{SS6} 蛋白分子量一致。用 BCA Protein Assay 测定不同浓度的标准蛋白通过双缩脲反应后在 561 nm 对应的吸光值, 根据蛋白浓度的标准曲线, 计算出纯化的目的蛋白浓度为 2.76 mg/mL。

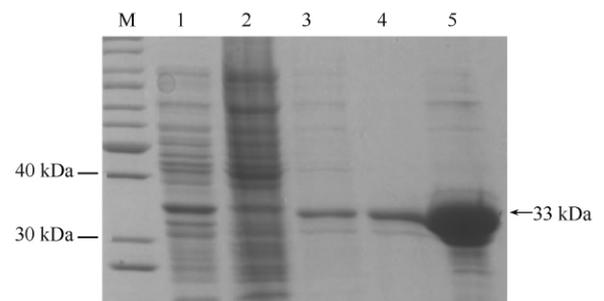


图 5. 镍离子亲和层析柱纯化的 *AiiA*_{SS6} SDS-PAGE 分析

Figure 5. SDS-PAGE analysis of *AiiA*_{SS6} purified with Ni²⁺-NTA affinity chromatography. M: molecular marker; lane 1: IPTG-free; lane 2: Washed with binding buffer; lane 3: Washed with 50 mmol/L imidazole; lane 4: Eluted with 350 mmol/L imidazole; lane 5: ultrafiltration concentration of *AiiA*_{SS6}.

2.4 AHL-内酯酶 *AiiA*_{SS6} 的动力学特性及其稳定性

在米氏动力学中, 米氏常数 K_m 可以反应底物和酶结合的紧密程度, V_{max} 可以反映酶催化反应的速度。在本研究中, 通过测定不同底物浓度下的酶促

反应来计算 AiiA_{SS6} 的动力学参数, 定量研究 AiiA_{SS6} 对 OOHL 的催化活性。根据 Lineweaver-Burk 由 $1/V$ 、 $1/S$ 双倒数作图 (图 6), 通过计算得出米氏常数 K_m 为 0.998 mmol/L, 酶的最大反应速度 V_{max} 值为 22.3 U/mg, 数据表明 AiiA_{SS6} 和底物 OOHL 有较高的亲和力和较大的反应初速度。此外将酶在 4°C 贮存 3 个月后, 测定酶的最大反应速度为 19.34 U/mg, 残余酶活仍可达到 86%, 这表明 AHL-内酯酶 AiiA_{SS6} 的稳定性也很高。

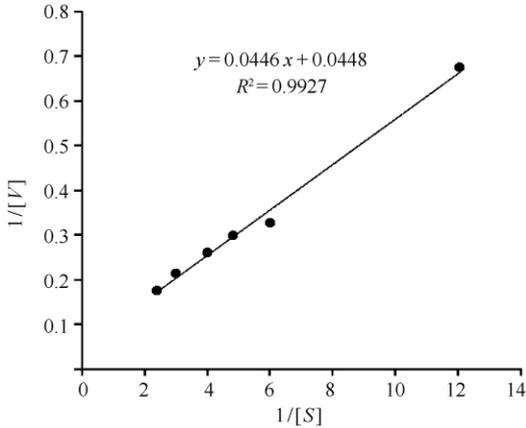


图 6. Lineweaver-Burk 法绘制双倒数曲线

Figure 6. Curve of Michaelis Menten equation operated by Lineweaver-Burk.

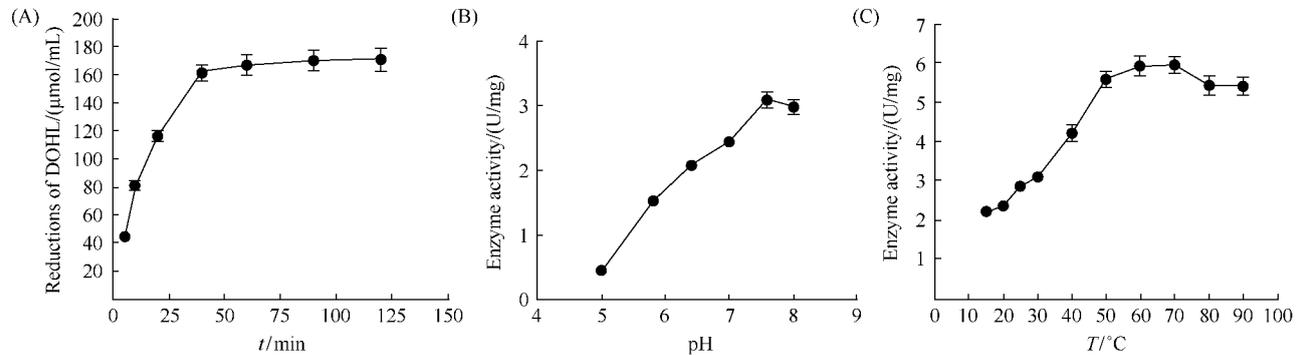


图 7. 反应时间、温度及 pH 对 AiiA_{SS6} 酶活性的影响

Figure 7. The effect of reaction time, temperature and pH on enzymatic activity. A: reaction time; B: pH; C: temperature.

3 讨论

已有许多研究报道了细菌的群体感应系统与病原菌毒力、生物膜形成、抗生素产生等许多重要的生理功能有关, 因此破坏细菌的群体感应可以成为控制病原菌感染的有效手段^[23]。以 QS 信号分子 AHLs 为靶点, 第一个 AHL-降解酶分离自芽孢杆

2.5 AHL-内酯酶 AiiA_{SS6} 的酶学特性

以 N-(3-oxooctanoyl)-L-homoserine lactone (3-oxo-C8-HSL, OOHL) 作为 AiiA_{SS6} 的底物, 通过 HPLC 来检测酶促反应后底物 OOHL 的剩余量以研究 AiiA_{SS6} 的酶学特性和动力学特征。图 7A 所示是在不同的反应时间下, AiiA_{SS6} 水解底物 OOHL 的量, 由图可知 OOHL 在 40 min 内完全被降解, 在这段时间内, 底物的减少量基本上与时间成正比。pH 对 AiiA_{SS6} 的催化活性影响也比较明显 (图 7-B), 在 pH 值为 5.0 时酶的活性几乎丧失, 说明在 AiiA_{SS6} 在酸性环境中结构被破坏, 使其酶活丧失; 随着 pH 的上升 AiiA_{SS6} 酶的活性逐渐增强, 在 pH 7.6 时酶的活性达到最高 (3.1 U), 其后 pH 升高, 酶的活性开始下降; AiiA_{SS6} 酶的最适 pH 在 7.6 左右, 这与许多研究报道的 AHL-内酯酶的最适 pH 相近^[20]。

酶活性也会受到温度的影响, 从图 7C 中可以看出 AiiA_{SS6} 酶从最低温度 15°C 一直到 70°C, 酶活一起处于上升阶段, 酶活最高值达到 5.9 U; 当温度升高达到 90°C, 酶活也没有急剧下降, 活力值还可达到 5.49 U。相较于已报道的 AHL-内酯酶的最适温度 (30 - 40°C 之间) 及耐热性^[21-22], AiiA_{SS6} 酶在较宽的温度范围内 (50 - 90°C) 都显示出较高的活性。

菌^[24], 由 *aia* 基因编码, 它是一个内酯酶; 随后从其它芽孢杆菌中也发现了类似的 *aia* 基因, 如 *Bacillus thuringiensis*、*Bacillus cereus*、*Bacillus mycoides*^[15]、炭疽芽孢杆菌 *Bacillus anthracis*^[25]、韦氏芽孢杆菌 *Bacillus weihenstephanensis*^[16]。本研究从芽孢杆菌 SS6 中克隆得到编码 AHL-内酯酶的 *aia* 基因, 命名为 *aia*_{SS6}, 其大小为 891 bp, 经 BLAST 发现它与其它芽孢杆菌的 *aia* 基因的同源性最高可达到 96%; 序列分析表明该基因编码一条由 297 个氨基酸残基组

成的多肽链, 分子量为 33 kDa, 等电点为 5.31。通过氨基酸序列对 *aiiA_{SS6}* 编码的蛋白预测三级结构 (图 2), 预测结果显示氨基酸序列中含有所有 AHL-内酯酶所具有的“HXHXDH”保守基序及锌指结构及 194 位的 Tyr 残基, 这些结构特征对 AHL-内酯酶的催化活性是必需的^[26], 这些生物信息学的分析都表明 *aiiA* 编码的蛋白可能具有 AHL-内酯酶活性。

为了研究 AHL-内酯酶的特性, 本研究将获得的 *aiiA_{SS6}* 基因构建了 pET28-*aiiA_{SS6}* 重组质粒, 并在 *E. coli* BL21 (DE3) 中诱导表达, 得到大量纯化蛋白 AiiA_{SS6}。在已有的研究中, 从有些物种中获得的 AHL-降解酶基因在原核表达系统中并不能很好的表达, 这会阻碍其作为微生物制剂的实际实用。在本研究中, 对重组蛋白的 SDS-PAGE 分析及 Western blot 检测 (图 4) 都显示 AHL-内酯酶 AiiA_{SS6} 具有很好的特异性; 提纯后得到了含杂质较少的重组蛋白 (图 5), 测得蛋白浓度为 2.75 mg/mL, 其最大比活力可达到 22.3 U/mg, AiiA_{SS6} 的高含量和高纯度为研究其酶学特征提供了充分的条件, 初步显示出实际应用的潜力。

基于获得的较高纯度重组蛋白 AiiA_{SS6}, 本研究对 AHL-内酯酶降解 AHLs 分子的活性进行了深入的研究。由于 AHLs 分子为小分子物质, 且细菌产生的 AHLs 浓度极低, 试验所用的 AHL 底物用量也很低, 因此需要以特定的手段来测定 AHL-降解酶的酶活特性。以报告菌 *Chromobacterium violaceum* CV026 或 *Agrobacterium tumefaciens* 为指示菌的生物测定法应用较多^[21, 27-29], 但是这种定量检测的方法不能很精确地测定 AHL-内酯酶的动力学参数。在本研究中, 我们以信号分子 OOHL 为底物, 利用 HPLC 技术研究 AiiA_{SS6} 的相关特性。由于 AHL 含量低而 HPLC 所需的样品只需 10 μ L - 20 μ L, 用 HPLC 可以有效检测 AHL-降解酶作用于 AHL 后底物的剩余量, 由此定量测定酶的活性。实验结果表明, AiiA_{SS6} 的最适 pH 在 7.6 左右, 这与许多已经报道的 AHL-内酯酶相似。此外 AiiA SS6 的最适温度 (50 - 90 $^{\circ}$ C) 相对较高, 范围也较大, 相比已有报道中野生型 AiiA 蛋白的最适温度高出许多, 如杨梅等^[30] 研究中的野生型 AiiA 蛋白最适温度仅为 28 $^{\circ}$ C, 且 5 d 后丧失降解底物的活性; 邱健等^[31] 的研究结果也表明野生型 AiiA 蛋白对温度敏感、稳定性差。相比之下, 本研究中实验测得 AiiA_{SS6} 的 K_m 和 V_{max} 分别为 0.998 mmol/L 和 22.3 U/mg, 与其它文

献报道的 K_m 值 (8.87 mmol/L)^[21] 相比较, AiiA_{SS6} 和底物 OOHL 的亲和能力远远大于已有报道。将 AiiA_{SS6} 蛋白 4 $^{\circ}$ C 保存 3 个月后其仍保有 86% 的活性, 表现出相对较高的稳定性。AiiA_{SS6} 所表现的高活力、耐热性及稳定性是后续研究应用到实际中必不可少的特质。

有些研究针对 AHL-降解酶在控制病原菌感染中的潜在应用效果进行了试验, 例如直接将 AHL-降解酶基因导入植物病原菌胡萝卜软腐欧文氏菌中并表达, 可以大幅度地减少 AHL 信号分子水平, 从而降低了由 AHL 调控的蛋白质水解, 使 *E. carotovora* 在植物中的病原性减弱^[24]; 甚至将可以降解 AHL 的芽孢杆菌菌群作为“益生菌”应用于水产养殖中, 也达到了减少感染的效果^[11]。所有这些报道为本研究所获得的重组表达产物的进一步研究提供了思路, 在后续的研究中, 可以将重组表达的蛋白与病原菌相互作用, 检测 AHL-内酯酶间接调控致病细菌毒力表达的作用, 从分子水平进一步探讨 AHL-内酯酶作为新型抗菌制剂的潜在应用价值。

参考文献

- [1] Fuqua WC, Winans SC, Greenberg EP. Quorum sensing in bacteria: the LuxR-LuxI family of cell density-responsive transcriptional regulators. *Journal of Bacteriology*, 1994, 176 (2): 269-275.
- [2] Swift S, Lynch MJ, Fish L, Kirke DF, Tomas JM, Stewart GS, Williams P. Quorum sensing-dependent regulation and blockade of exoprotease production in *Aeromonas hydrophila*. *Infection and Immunity*, 1999, 67 (10): 5192-5199.
- [3] Beck von Bodman S, Farrand SK. Capsular polysaccharide biosynthesis and pathogenicity in *Erwinia stewartii* require induction by an N-acylhomoserine lactone autoinducer. *Journal of Bacteriology*, 1995, 177 (17): 5000-5008.
- [4] Costa JM, Loper JE. EcbI and EcbR: homologs of LuxI and LuxR affecting antibiotic and exoenzyme production by *Erwinia carotovora* subsp. *betavasculorum*. *Canadian Journal of Microbiology*, 1997, 43 (12): 1164-1171.
- [5] Nasser W, Bouillant ML, Salmond G, Reverchon S. Characterization of the *Erwinia chrysanthemi* *expI-expR* locus directing the synthesis of two N-acyl-homoserine lactone signal molecules. *Molecular Microbiology*, 1998, 29 (6): 1391-1405.
- [6] Pearson JP, Gray KM, Passador L, Tucker KD, Eberhard

- A, Iglewski BH, Greenberg EP. Structure of the autoinducer required for expression of *Pseudomonas aeruginosa* virulence genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1994, 91 (1) : 197-201.
- [7] Manefield M, Harris L, Rice SA, de Nys R, Kjelleberg S. Inhibition of luminescence and virulence in the black tiger prawn (*Penaeus monodon*) pathogen *Vibrio harveyi* by intercellular signal antagonists. *Applied and Environmental Microbiology*, 2000, 66 (5) : 2079-2084.
- [8] Zhu J, Kaufmann GF. Quo vadis quorum quenching? *Current Opinion in Pharmacology*, 2013, 13 (5) : 688-698.
- [9] Wang LH, Weng LX, Dong YH, Zhang LH. Specificity and enzyme kinetics of the quorum-quenching N-Acyl homoserine lactone lactonase (AHL-lactonase). *The Journal of Biological Chemistry*, 2004, 279 (14) : 13645-13651.
- [10] Waters CM, Bassler BL. Quorum sensing: cell-to-cell communication in bacteria. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 2005, 21 : 319-346.
- [11] Zokaeifar H, Babaei N, Saad CR, Kamarudin MS, Sijam K, Balcazar JL. Administration of *Bacillus subtilis* strains in the rearing water enhances the water quality, growth performance, immune response, and resistance against *Vibrio harveyi* infection in juvenile white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Fish & Shellfish Immunology*, 2014, 36 (1) : 68-74.
- [12] Czajkowski R, Jafra S. Quenching of acyl-homoserine lactone-dependent quorum sensing by enzymatic disruption of signal molecules. *Acta Biochimica Polonica*, 2009, 56 (1) : 1-16.
- [13] Geske GD, O'Neill JC, Blackwell HE. Expanding dialogues: from natural autoinducers to non-natural analogues that modulate quorum sensing in Gram-negative bacteria. *Chemical Society Reviews*, 2008, 37 (7) : 1432-1447.
- [14] Dong YH, Wang LY, Zhang LH. Quorum-quenching microbial infections: mechanisms and implications. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 2007, 362 (1483) : 1201-1211.
- [15] Dong YH, Gusti AR, Zhang Q, Xu JL, Zhang LH. Identification of quorum-quenching N-acyl homoserine lactonases from *Bacillus* species. *Applied and Environmental Microbiology*, 2002, 68 (4) : 1754-1759.
- [16] Sakr MM, Aboshanab KM, Aboulwafa MM, Hassouna NA. Characterization and complete sequence of lactonase enzyme from *Bacillus weihenstephanensis* isolate P65 with potential activity against acyl homoserine lactone signal molecules. *BioMed Research International*, 2013, 2013 : 192589.
- [17] Thomas PW, Stone EM, Costello AL, Tierney DL, Fast W. The quorum-quenching lactonase from *Bacillus thuringiensis* is a metalloprotein. *Biochemistry*, 2005, 44 (20) : 7559-7569.
- [18] Miller MB, Bassler BL. Quorum sensing in bacteria. *Annual Review of Microbiology*, 2001, 55 : 165-199.
- [19] Chen F, Gao Y, Chen X, Yu Z, Li X. Quorum quenching enzymes and their application in degrading signal molecules to block quorum sensing-dependent infection. *International Journal of Molecular Sciences*, 2013, 14 (9) : 17477-17500.
- [20] Fan XJ, Liu XL, Liu YH. The cloning and characterization of one novel metagenome-derived thermostable esterase acting on N-acylhomoserine lactones. *Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic*, 2012, 83 : 29-37.
- [21] Cao Y, He S, Zhou Z, Zhang M, Mao W, Zhang H, Yao B. Orally administered thermostable N-acyl homoserine lactonase from *Bacillus* sp. strain AI96 attenuates *Aeromonas hydrophila* infection in zebrafish. *Applied and Environmental Microbiology*, 2012, 78 (6) : 1899-1908.
- [22] Chen R, Zhou Z, Cao Y, Bai Y, Yao B. High yield expression of an AHL-lactonase from *Bacillus* sp. B546 in *Pichia pastoris* and its application to reduce *Aeromonas hydrophila* mortality in aquaculture. *Microbial Cell Factories*, 2010, 9 : 39.
- [23] Dong YH, Zhang LH. Quorum sensing and quorum-quenching enzymes. *Journal of Microbiology*, 2005, 43 Spec No : 101-109.
- [24] Dong YH, Xu JL, Li XZ, Zhang LH. AiiA, an enzyme that inactivates the acylhomoserine lactone quorum-sensing signal and attenuates the virulence of *Erwinia carotovora*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2000, 97 (7) : 3526-3531.
- [25] Ulrich RL. Quorum quenching: enzymatic disruption of N-acylhomoserine lactone-mediated bacterial communication in *Burkholderia thailandensis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 2004, 70 (10) : 6173-6180.
- [26] Kim MH, Choi WC, Kang HO, Lee JS, Kang BS, Kim KJ, Derewenda ZS, Oh TK, Lee CH, Lee JK. The molecular structure and catalytic mechanism of a quorum-quenching N-acyl-L-homoserine lactone hydrolase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the*

- United States of America*, 2005, 102 (49) : 17606-17611.
- [27] Rajesh PS, Rai VR. Molecular identification of *aiiA* homologous gene from endophytic *Enterobacter* species and in silico analysis of putative tertiary structure of AHL-lactonase. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2014, 443 (1) : 290-295.
- [28] Ravn L, Christensen AB, Molin S, Givskov M, Gram L. Methods for detecting acylated homoserine lactones produced by Gram-negative bacteria and their application in studies of AHL-production kinetics. *Journal of Microbiological Methods*, 2001, 44 (3) : 239-251.
- [29] Tang K, Zhang Y, Yu M, Shi X, Coenye T, Bossier P, Zhang XH. Evaluation of a new high-throughput method for identifying quorum quenching bacteria. *Scientific Reports*, 2013, 3: 2935.
- [30] Yang M, Xie P, Jian S, Lin L, Yang C, Song S. Enhancement of enzyme activity and thermostability of *N*-acylhomoserine lactonase by site-directed mutagenesis. *Acta Microbiologica Sinica*, 2014, 54 (8) : 905-912. (in Chinese)
- 杨梅, 谢盼盼, 简思美, 林丽玉, 杨彩云. 定点突变提高 *N*-酰基高丝氨酸内酯酶酶活和温度稳定性. *微生物学报*, 2014, 54 (8) : 905-912.
- [31] Qiu J, Li C, Jia Z, Zhang X, Ma H, Song S. Enzymatic characterization and function of *N*-acylhomoserine lactonase SS10. *Acta Phytopathol Sinica*, 2007, 37 (6) : 629-636. (in Chinese)
- 邱健, 李承光, 贾振华, 张霞, 马宏, 宋水山. 酰基高丝氨酸内酯酶 SS10 的酶学特性及其抗软腐病功能的初探. *植物病理学报*, 2007, 37 (6) : 629-636.

Gene cloning, expression and characterization of *N*-acylhomoserine lactonase from *Bacillus subtilis* SS6

Pan Zhang^{1,4}, Xian Ding², Laihao Li², Yongjun Lu³, Bo Yin^{1*}

¹South China Sea Institute of Oceanology, Chinese Academy of Science, Guangzhou 510301, Guangdong Province, China

²Key Laboratory of Aquatic Product Processing, Ministry of Agriculture, China, South China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou 510300, Guangdong Province, China

³State Key Laboratory for Biocontrol, School of Life Sciences, Zhongshan (Sun Yat-sen) University, Guangzhou 510275, Guangdong Province, China

⁴University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

Abstract: [Objective] This study was aimed to obtain a quorum quenching *N*-acylhomoserine lactonase gene from *Bacillus subtilis* SS6 and to characterize the enzyme. [Methods] We amplified *N*-acylhomoserine lactonase gene from *B. subtilis* SS6 by PCR methods. Gene *aiiA*_{SS6} was cloned into the expression vector of pET28 (a) and transformed into *Escherichia coli* BL21. The activity of AiiA_{SS6} on signal *N*-(3-Oxooctanoyl)-L-homoserine lactone was characterized by high performance liquid chromatography (HPLC). [Results] We successfully cloned an *N*-acylhomoserine lactonase gene from *B. subtilis* SS6 strain, namely *aiiA*_{SS6} (GenBank: KP125494). The sequencing result showed that the length of *aiiA*_{SS6} was 891 bp and the gene contained an Open Reading Frame encoding 297 amino acids. HPLC results showed that AiiA_{SS6} was very active between 50 and 90°C and the optimal pH was 7.6. Lineweaver-Burk treatment of the data yielded apparent K_m and the V_{max} was 0.998 mmol/L and 22.3 U/mg, respectively. Moreover, the relative activity of the enzyme remained 86% after storing at 4°C for 3 months. [Conclusion] Our findings will be helpful for further studies.

Keywords: Quorum sensing, *N*-acylhomoserine lactonase, enzymatic characteristics, high performance liquid chromatography

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the Cooperation Project in Industry, Education and Research of Guangdong Province and Ministry of Education of China (2011B090400151) and by the Key Laboratory of Aquatic Product Processing, Ministry of Agriculture, China (NYJG201308)

* Corresponding authors. Tel: +86-20-89023114; E-mail: yinbo@sesio.ac.cn

Received: 21 November 2014 / Revised: 23 December 2014