

食源假单胞菌群体感应信号分子的研究*

綦国红 董明盛** 陈晓红 姜梅

(南京农业大学食品科技学院 南京 210095)

摘要: 从市售鲜鱼中分离的3株革兰氏阴性菌, 经16S rDNA鉴定为假单胞菌属, 该菌是一种导致食品腐败的重要腐败细菌。N-酰基-高丝氨酸内酯(AHLs)是革兰氏阴性菌群体感应(QS)系统中一类重要的信号分子, 以密度依赖的方式调控某些生理性状的表达。利用AHLs检测菌株对3株假单胞菌进行检测发现, 均产生AHLs类信号分子, 且FML05-1和FML05-2至少产生两种AHLs, 主要的信号分子是N-3-氧代-辛酰基-高丝氨酸内酯(N-3-oxo-C₈-HSL)。同时对菌株FML05-2在生长过程中所产生的AHLs的活性变化进行研究, 发现AHLs活性在菌体生长至12h时达到最大。首次对食源假单胞菌所产生的AHLs进行了研究, 为以干扰腐败细菌群体感应为靶点的食品防腐保鲜策略提供研究基础。

关键词: 假单胞菌, N-酰基-高丝氨酸内酯, 群体感应

中图分类号: Q938 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2007) 01-0048-04

Research on Quorum Sensing Signal Molecules of *Pseudomonas* spp. Isolated from Food*

QI Guo-Hong DONG Ming-Sheng** CHEN Xiao-Hong JIANG Mei

(College of Food Science and Technology Nanjing Agriculture University, Nanjing 210095)

Abstract: Three Gram-negative bacteria from commercial fresh fish were identified as *Pseudomonas* sp., an important food spoilage bacteria, on the basis of 16S rDNA sequences. N-acyl-homoserine lactones (AHLs) were the important quorum sensing molecules and regulated the expression of many characteristics in a cell-density-dependent manner in Gram-negative bacteria. The AHL biosensor detection revealed that three isolates produced AHLs molecules and strains FML05-1 and FML05-2 produced two types of AHLs at least and the main signal molecules were N-3-oxo-octanoyl-homoserine lactone (N-3-oxo-C₈-AHL). Also the amount of AHL in FML05-2 reached to the maximum at 12h throughout growth. This was first study of quorum sensing signal molecule AHLs produced by the *pseudomonas* from food and layed the foundation for new strategies of food preservation based on interfering in quorum sensing of spoilage bacteria.

Key words: *Pseudomonas*, N-acyl-homoserine lactones, Quorum sensing

研究发现许多细菌某些生理特性的表达是细胞密度依赖调控的, 即“群体感应 (quorum sensing, QS)”现象。革兰氏阴性菌主要产生 N-酰基-高丝氨酸内酯 (N-acyl-homoserine lactones, AHLs) 类信号分子以密度依赖的方式调控特定基因的表达。许多现象如毒性因子的表达、生物膜的形成、生物发光等都是由 QS 系统调控的^[1-3]。

微生物是导致食品腐败的主要因素, 但只有特定的微生物才会导致特定食品的腐败, 即特定的腐败微生物 (specific spoilage organism (s), SSO)。在鱼类等蛋白含量丰富的食品中碳水化

物含量非常少, 但游离氨基酸含量却非常高。因此, 只有假单胞菌等产蛋白水解酶丰富的微生物, 才能在此类产品中大量生长, 变成优势微生物, 最终导致产品的腐败^[4]。国际上研究表明许多与食品腐败有关的革兰氏阴性菌也产生 AHLs 信号分子, 如变形斑沙雷氏菌 (*Serratia proteamaculans*)、成团肠杆菌 (*Enterobacter agglomerans*)、胡萝卜软腐欧文氏菌, 蜂房哈夫尼菌 (*Hafnia alvei*) 等^[5]。同时还发现在腐败的肉、鱼、豆芽等产品中都能够检测到 AHLs, 而且只有腐败细菌的数量达到一定的密度后才能检测到 AHLs。这说明群体感应现

* 江苏高技术研究发展计划 (No. BG2004322)

** 通讯作者 Tel: 025-84396989, E-mail: dongms@njau.edu.cn

收稿日期: 2006-03-14, 修回日期: 2006-05-16

象可能与食品腐败密切相关,在食品腐败过程中发挥重要的作用。因此 AHLs 介导的群体感应现象如何影响食品的品质成为食品防腐保鲜领域的一个新的研究热点。

本文旨在对食源假单胞菌所产生的 AHLs 分子进行研究,为干扰腐败细菌群体感应为靶点的食品防腐保鲜策略提供研究基础。

1 材料与方法

1.1 菌株,质粒与培养条件

菌株 FMO5-1, FMO5-2, FMO5-3, 从市售鲜鱼中分离,本实验室保存。根癌农杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) A136 (pCF218/pCF372), AHLs 检测的报告菌株,壮观霉素和四环素抗性,用量分别为 50 μ g/mL 和 4.5 μ g/mL。根癌农杆菌 KYC6 (pCF218) 过量表达 N-3-oxo-C₈-HSL 信号分子,四环素抗性,用量为 4.5 μ g/mL。紫色杆菌 (*Chromobacterium violaceum*) CVO26 AHLs 检测的报告菌株,卡那霉素抗性,用量为 20 μ g/mL,均由美国德克萨斯州立大学 Robert J. C. McLean 教授惠赠。所有菌株均在 LB 培养基中 28 $^{\circ}$ C 摇床培养。

1.2 试剂与器材

抗生素, C₁₀-HSL, C₆-HSL 购自 Sigma 公司, RP-C18 F₂₅₄ 反相薄层板购自 Merck 公司, Bio-Rad 热启动 PCR 仪。

1.3 总 DNA 的提取, PCR 扩增、测序与系统发育树的构建

总 DNA 的提取参考文献[6], 16S rDNA 的扩增采用细菌的通用引物 16SF5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'; 16SR5'-GGCTACCTGTTACCGACT-3'。PCR 产物送上海生工公司测序, 序列提交 GenBank, 序列号分别为 DQ084459, DQ084460, DQ084461。通过 Blast 的方法搜索相似序列, 获取代表菌株的 16S rDNA 序列, 利用 phylip 软件, 采用 neighbour-joining 方法网上构建系统发育树。

1.4 AHLs 提取

待测菌培养至一定的密度, 离心, 取上清, 用等量乙酸乙酯提取 3 次, 得有机相, 合并提取液, 旋转蒸发仪蒸干溶剂, 溶于一定量的水或甲醇中, -20 $^{\circ}$ C 保存备用。

1.5 平行划线法与报告平板法检测 AHLs

根据文献[7]被检测菌与报告菌 CVO26 或 A136 在 LB 平板上平行划线, 无菌风吹干, 28 $^{\circ}$ C 过夜培养。报告平板检测即 25mL 报告菌培养液与 50mL 含有 0.8% 琼脂的 LB 混合, 倒平板, 凝固后, 打孔, 加入乙酸乙酯提取物, 28 $^{\circ}$ C 过夜培养。用 A136 检测时, 在平板表面涂布适量的 X-gal。

1.6 薄层层析检测

根据文献[8]AHL 提取物 2~5 μ L 点样于 C₁₈ 反相薄层板上, 甲醇/水 (60:40, v/v) 展开后, 按制备报告平板的方法制备含 A136 菌的上层琼脂, 铺于 TLC 板上, 凝固后, 涂布适量的 X-gal, 置于密闭容器中 28 $^{\circ}$ C 培养 48h。

1.7 生长曲线的制作及 AHL 浓度的变化检测

待测菌接种新鲜 LB, 每 2h 取样, 测 OD₆₀₀ 及 pH 值, 同时取一定量上清, 乙酸乙酯提取、浓缩后, 利用报告平板法检测 AHLs 浓度变化。

2 结果与分析

2.1 菌株 16S rDNA 鉴定与系统发育树的构建

所获得的 3 株菌的 16S rDNA 序列与 GenBank 数据库中已有的序列进行 Blast 搜索, 发现与假单胞菌 16S rDNA 序列的相似性高达 99%, 因此把这 3 株菌鉴定为假单胞菌属。由于假单胞菌种之间的遗传距离比较近, 16S rDNA 只能鉴定到属。图 1 显示了 3 株假单胞菌与其它具有类似来源或类似性状的假单胞菌之间的系统发育关系。

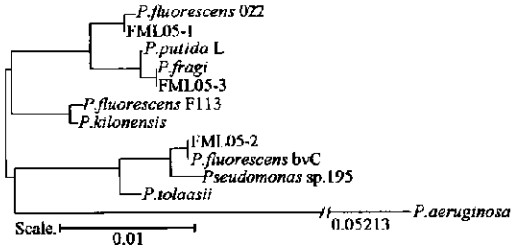


图 1 3 株假单胞菌与其它假单胞菌之间的系统发育关系
Pseudomonas sp. 195 来源于牛奶, *P. putida* L. 来源于鱼, *P. fluorescens* F113 是生防菌产生 AHLs

2.2 AHLs 的初步检测

利用待检测菌与报告菌平行划线的方法初步检测, 发现只有 FMO5-2 能够诱导 CVO26 产生紫色 (图 2A), 但三者都能够诱导 A136 在含有 X-gal

的平板上产生蓝色 (图 2B)。为了进一步分析 3 株菌所产生的 AHL, 其培养上清用乙酸乙酯提取浓缩后, 利用报告平板法进行检测, 同样只有 FML05-2 的提取物能够诱导 CVO26 产生紫色, 但三者的提取物都能够诱导 A136 产生蓝色, 且蓝色圈的大小也表明了 AHL 相对浓度的高低, 其中 FML05-2 的 AHL 活性最强, FML05-3 的 AHL 活性均低于 FML05-2 与 FML05-1。

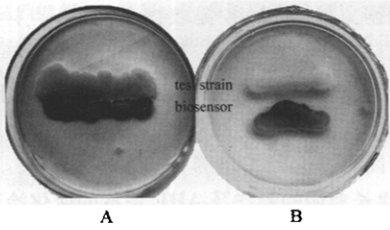


图 2 报告菌 CVO26 (A) 和 A136 (B) 平行划线检测

2.3 TLC 分析

为进一步分析所产生的 AHLs 的种类, 以 A136 为检测菌株对 FML05-1 和 FML05-2 的 AHL 提取物进行薄层分析。侧链不同的 AHLs 经薄层层析展开后, 有 AHLs 存在的区域, 上层的报告菌感受到, 并在 X-gal 存在的情况下, 呈现蓝色斑点。根据斑点的 R_f 值, 形状, 大小可以确定 AHLs 的相对含量及种类^[8]。图 3 显示, FML05-1 和 FML05-2 至少产生两种 AHL 分子, 且二者所产生的 AHL 种类相同。根据被检测菌 AHLs 斑点的 R_f 值, 形状, 可断定由 FML05-1 和 FML05-2 所产生的主要 AHL 分子是 N-3-oxo-C₈-HSL, 且 FML05-2 的浓度高于 FML05-1。

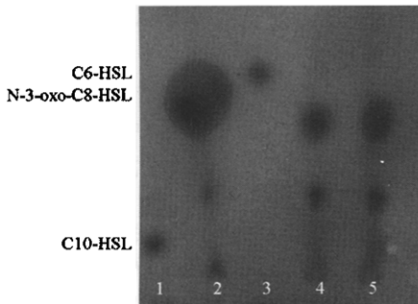


图 3 FML05-1, FML05-2 反相薄层层析

1 C₁₀-HSL, 2 KYC6, 3 C₆-HSL, 4 FML05-1, 5 FML05-2

2.4 AHLs 浓度变化规律

以 AHLs 产生量最高的菌株 FML05-2 为研究对

象, 进一步研究了菌体生长过程中所产生的 AHLs 的浓度变化规律, 图 4 图 5 显示随着细胞的生长, AHLs 的浓度也随之增加, 当细胞生长至对数末期 (12h) 时 AHLs 的浓度达最大。接下来随着细胞的生长 AHLs 的浓度呈现下降趋势。我们对培养液中的 pH 检测发现, 随着细胞的生长 pH 由初始的 6.73 升高至 8.42 (图 5)。AHL 分子是由一个酰基侧链与一个高丝氨酸内酯环相连, 该结构在酸性条件下稳定, 强碱会导致高丝氨酸内酯环开环, 从而破坏其结构, 失去信号分子的作用^[9]。因此细胞生长进入稳定期时, AHLs 浓度的下降与环境中的 pH 的升高密不可分。

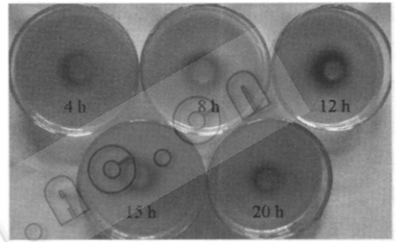


图 4 FML05-2 在生长过程中 AHLs 的活性变化

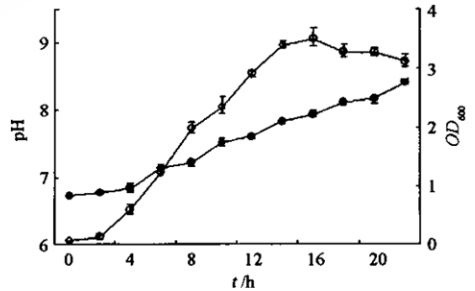


图 5 FML05-2 的生长 (○) 与 pH (●) 变化

3 讨论

本文通过目前常用的两种报告菌紫色杆菌 CVO26 和根癌农杆菌 A136 对鱼源假单胞菌群体感应信号分子进行检测, 利用 CVO26 检测时 FML05-1、FML05-3 呈现阴性结果, 而 A136 能够检测到二者所产生的 AHL, 由此可见, 报告菌 A136 的检测范围高于 CVO26, 与国外文献报道的结果相印证。

菌株 FML05-1、FML05-2 产生两种 AHL 分子, 主要的信号分子为 N-3-oxo-C₈-HSL, 据文献报道荧光假单胞菌 2-79 产生五种 AHL 分子, 其中三种被

鉴定为 N-3-OH-C₆-HSL, N-3-OH-C₈-HSL, N-3-OH-C₁₀-HSL^[8], 荧光假单胞菌 F113 产生 N-3-OH-C₁₄-HSL, C₁₀-HSL, C₆-HSL 三种信号分子^[10], 而荧光假单胞菌 NCIMB10586 产生长链的 AHL 分子, 铜绿假单胞菌则产生 N-3-oxo-C₁₂-HSL 与 C₄-HSL 两种 AHL 分子。虽然都属于假单胞菌属, 但所产生的 AHL 种类却差异很大。由此, 我们推测假单胞菌所产生的 AHLs 种类可能与其来源的生境有关。

对群体感应的研究已经有十几年的历史, AHLs 作为一种细菌交流的“语言”, 在微生物世界里调控某些特定生理性状的表达, 日益受到人们的关注。近年来对人类和植物致病菌的研究显示与食品腐败有关特性的表达是由群体感应现象调控的。由于食品腐败细菌主要以 AHLs 为通讯工具, 虽然不同细菌所合成的 AHLs 有所不同, 但所有的 AHLs 都含有保守的高丝氨酸内酯环, 因此, 通过酶类降解 AHLs 或者是使用 AHLs 的类似物来干扰腐败细菌的 QS 系统, 使之所调控的腐败特性不表达, 从而达到防腐保藏的目的, 为食品的防腐保鲜开辟了新途径。

参考文献

- [1] Whitehead N A, Barnard A M. *FEMS Microbiology*, 2001, 25 (7): 364 ~ 404.
- [2] 董国红, 董明盛. *广西农业生物科学*, 2005, 24 (3): 259 ~ 261.
- [3] 谷峻, 陈文峰, 陈强, 等. *微生物学通报*, 2004, 31 (6): 110 ~ 114.
- [4] Gram L, Ravn L, Rasch M, et al. *Inter J Food Microbiol*, 2002, 78 (9): 79 ~ 97.
- [5] Bruhn J B, Christensen A B, Ravn L, et al. *Applied and Environmental Microbiology*, 2004, 70 (7): 4293 ~ 4302.
- [6] Giraffa G, Rossetti L, Neviani E. *Journal of Microbiological Methods*, 2000, 42 (10): 175 ~ 184.
- [7] Ravn L, Christensen A B, Molin S, et al. *Journal of Microbiological Methods*, 2001, 44 (4): 239 ~ 251.
- [8] Shaw P D, Ping G, Daly S, et al. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, 94 (12): 6036 ~ 6041.
- [9] Byers J T, Lucas C, Salmond G P C, et al. *Journal of Bacteriology*, 2002, 184 (4): 1163 ~ 1171.
- [10] Iauë B E, Jiang Y, Chhabra S R, et al. *Microbiology*, 2000, 146 (12): 2469 ~ 2480.

• 产业化信息 •

继1999年和2002年, 淄博广通公司和上海凯赛公司先后转让中国科学院微生物研究所的长链二元酸生物合成技术, 在山东淄博龙泉地区和济宁地区建成两座千吨级规模生物合成工厂之后, 2006年3月, 第3座千吨级规模的长链二元酸生物合成新工厂耸立在我国江苏省淮安市开发区大地上, 中国科学院微生物研究所技术发明人陈远童教授等带着新研制的第三代生物合成新技术下厂指导试生产。新技术在50吨规模的发酵罐中一次试车成功, 十二碳和十三碳二元酸的发酵产酸水平分别达到210g/L和175g/L的国内外最高水平, 年生产能力为2,000吨。该项目属国家高技术产业化示范工程项目, 经测试, 试生产中达到的技术指标均超过示范工程项目规定的各项指标。同年9月, 第4座千吨级规模的长链二元酸生物合成生产工厂, 在江苏省南通市开发区拔地而起, 中科院微生物所的混合长链二元酸专有技术落户于南通圣诺鑫生物高科技公司, 为其关联公司——南通振益热熔胶厂提供生产热熔胶所需的二元酸原料。到2006年底, 4座千吨级规模的长链二元酸生物合成工厂总生产能力超过1万吨/年, 形成一个我国独有的、原创性的、环保型的民族新产业, 使我国成为当今国际上唯一能够应用生物合成技术实现长链二元酸大规模工业化生产的国家, 产品远销欧美和日本。

成功