

肉类腐败性假单胞菌群体感应信号分子的研究

马晨晨 欧杰* 王婧

(上海海洋大学 食品学院 上海水产品加工及贮藏工程技术研究中心 上海 201306)

摘要: 【目的】研究两株假单胞菌的标准菌株荧光假单胞菌(*Pseudomonas fluorescens*)和铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)在纯培养条件下所释放的 AHLs 类信号分子种类、量和变化规律。【方法】利用乙酸乙酯等有机溶剂萃取菌种纯培养液的 AHLs 类信号分子,检测手段利用 HPLC-MS-MS。【结果】荧光假单胞菌释放信号分子的种类为: C₄-HSL、C₆-HSL、C₈-HSL、3-oxo-C₁₀-HSL、3-oxo-C₁₂-HSL、3-oxo-C₁₄-HSL。铜绿假单胞菌释放信号分子的种类为: C₄-HSL、C₆-HSL、C₈-HSL、C₁₀-SL、C₁₂-HSL、C₁₄-HSL、3-oxo-C₈-HSL、3-oxo-C₁₀-HSL、3-oxo-C₁₂-HSL、3-oxo-C₁₄-HSL。【结论】两株菌所释放各类信号分子的量均随时间变化,当菌落数达到 10⁹–10¹⁰时信号分子的量达到峰值,两株菌所释放各类信号分子含量差异较大。

关键词: 假单胞菌, 群体感应效应, 信号分子, HPLC-MS-MS

Quantitation of quorum sensing signal molecules of *Pseudomonas* spp. isolated from meet

MA Chen-Chen OU Jie* WANG Jing

(Shanghai Engineering Research Center of Aquatic-Product Processing & Preservation, College of Food Science and Technology, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

Abstract: [Objective] Different types, quantities and varying patterns of the AHLs released from pure cultured *Pseudomonas fluorescens* and *Pseudomonas aeruginosa* as the standard strains of *Pseudomonas* spp. were studied in this research. [Methods] AHLs in the pure culture solution were extracted via ethyl acetate and then identified through HPLC-MS-MS. [Results]

基金项目: 上海市科委工程中心建设项目(No. 11DZ2280300); 上海市科委重点科技攻关项目(No. 10391902300)

*通讯作者: Tel: 86-21-61900937; 信箱: jou@shou.edu.cn

收稿日期: 2013-03-13; 接受日期: 2013-06-18

The results showed that C₄-HSL, C₆-HSL, C₈-HSL, 3-oxo-C₁₀-HSL, 3-oxo-C₁₂-HSL, 3-oxo-C₁₄-HSL were the main signaling molecules released from *Pseudomonas fluorescens* while C₄-HSL, C₆-HSL, C₈-HSL, C₁₀-SL, C₁₂-HSL, C₁₄-HSL, 3-oxo-C₈-HSL, 3-oxo-C₁₀-HSL, 3-oxo-C₁₂-HSL, 3-oxo-C₁₄-HSL were the corresponding signaling molecules in *Pseudomonas aeruginosa*. **[Conclusion]** Quantities of signal molecules from the two strains were changing with time, when the number of colonies at 10⁹–10¹⁰, reached the peak of the signal molecule. Also, significant differences of signaling molecules contents released from the 2 strains were found in this research.

Keywords: *Pseudomonas* spp., Quorum sensing, AHLs, HPLC-MS-MS

微生物的作用是导致肉类腐败的首要原因,在很多相关的报道中对肉类贮藏过程中的腐败菌进行菌相分析,并对主要腐败菌进行分离和鉴定,发现假单胞菌(*Pseudomonas* spp.)是主要的腐败优势菌之一^[1],如:恶臭假单胞菌^[2]、荧光假单胞菌等。铜绿假单胞菌虽属于病原微生物之一,但有报道说明在腐败的肉类当中也可分离出此菌^[3-4]。如何抑制微生物的腐败作用一直是国内外相关学者的研究重点,利用理化作用抑制微生物生长已取得诸多成效,自20世纪70年代群体感应效应被发现至今,国内外众多学者提出了利用抑制腐败菌信息交流的方式来干扰腐败菌特殊基因的表达,从而达到食品防腐作用^[5]。群体感应效应(Quorum sensing)是指微生物细胞内通过相应的感应系统感应细胞外的小分子自诱导剂的浓度从而感知菌体密度的大小,当菌体密度达到一定的阈值时启动一系列的目的基因并表达相应特征的方式。“自诱导剂”(Autoinducer)是微生物之间发生群体感应效应的关键物质,微生物通过这种小分子物质的分泌、释放和感应来进行种内及种间相互交流并完成某种特性的表达^[6],如Chugani等的研究发现,绿脓假单胞菌的基因 *antA* 的表达大多受到信号分子 C₁₀-HSL、3-oxo-C₁₂-HSL 和 C₄-HSL 的影响^[7]。经过多年的研究人们发现,细菌之间通过分泌并感应一种小分子物质来判断菌群的密度,并以此小分子物质浓度的某一特定值为

阈值来调节细菌的自身状态并表达相应的特性,并且很多细菌中都存在这种类似的机制。研究表明,细菌通过种内或种间的信息交流来表现某种特性并导致食品腐败变质,因而随着进一步的深入研究可尝试通过某种途径干扰或控制食品中微生物间的信息传递以达到防止食品腐败及抑制腐败菌生长的有效途径。

本课题研究的目的在于建立 HPLC-MS-MS 检测 AHLs 类信号分子的方法,并利用此分析检测手段初步研究假单胞菌所释放群体感应信号分子的种类,及随不同的细菌浓度对应信号分子量的变化规律,从而为进一步研究与其致腐性之间的关系,依据所得此类信号分子的种类和数量变化的特征开发快速检测牛肉腐败的新方法,同时为开发腐败性细菌群体感应效应干扰素提供一定的理论基础。

1 材料与方法

1.1 标准菌株

荧光假单胞菌 (*Pseudomonas fluorescens*) AS.1.33, 铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*) ATCC15442, 购于上海市工业微生物研究所。

1.2 主要试剂和仪器

信号分子标准品(表1)均购于Sigma公司;乙酸乙酯(AR),无水甲醇(HPLC)购于国药集团;LB培养基,营养琼脂等购于上海生工。Quattro micro 液相色谱-质谱联用仪, Waters 公司; 250 型旋转蒸

发仪, 上海申生科技有限公司; 高速冷冻离心机 SupRa22K, 上海民仪电子有限公司。

1.3 AHLs 提取方法

制备所取菌种营养琼脂平板, 于 28 °C 恒温培养箱培养 48 h。用接种环挑取单菌落培养于含 50 mL LB 培养基的 250 mL 三角瓶中, 于 28 °C 摇床培养 12 h, 制备种子培养液。待种子培养液培养 12 h 后取 1 mL, 接种于含有 100 mL LB 液体培养基的三角瓶中培养。将上述培养液放于 50 mL 离心管 27 000×g、4 °C 离心 20 min。取上清液(弃沉淀)用等量含 0.1 mL/L 冰乙酸的乙酸乙酯萃取 3 次^[8], 弃水相, 混合有机相。将上述得到的乙酸乙酯抽提液置于旋转蒸发仪内, 进行旋转蒸干^[9]。用 5 mL 无水甲醇分 2 次充分振荡润洗上述蒸干的蒸发瓶, 并收集所得甲醇溶液。将甲醇溶液置于离心管 12 000 r/min、4 °C 冷冻离心, 弃沉淀, 最终将所得甲醇溶液置于

-20°C 冰箱备用。

1.4 HPLC-MS-MS 分析检测条件及定量方法^[10]

色谱条件为: 色谱柱 Sunfire C₁₈ (3.5 μm, 2.1 mm×50 mm); 流动相: 甲醇:水(50:50, V/V) 等梯度洗脱, 流速为 0.2 mL/min, 柱温: 35 °C, 进样量: 10 μL。

质谱条件为: 毛细管电泳: 3.5 kV, 离子源温度: 120 °C, 去溶剂温度: 350 °C, 锥孔气流: 500 L/hr, 去溶剂气流: 50 L/hr, 喷装气体: 氦气, 碰撞压力: 3.25^{e-3} mbar, 扫描方式: 正离子扫描, 定量离子对: 242.10/102.10, 定性离子对: 242.10/141.20, 驻留时间: 0.5 s, 锥孔电压及碰撞能量见表 2。

样品按 1.3 前处理后, 经 C₁₈ 色谱柱分离后进入质谱, 采用电喷雾离子源正离子模式和多反应监测(MRM)模式, 外标法进行定量分析, 分析时间 12 min。

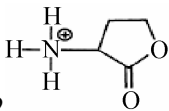
表 1 AHLs 信号分子名称、结构、简称及分子量 Table 1 Names, structures, abbreviations and molecular weights of the AHLs			
化学名称 Names	结构 Structures	简称 Abbreviations	分子量 MW
N-butyryl-DL-homoserine lactone		C ₄ -HSL	171.19
N-caproyl-DL-homoserine lactone		C ₆ -HSL	199.25
N-octanoyl-DL-homoserine lactone		C ₈ -HSL	227.30
N-decanoyl-DL-homoserine lactone		C ₁₀ -SL	255.35
N-lauroyl-DL-homoserine lactone		C ₁₂ -HSL	283.41
N-myristoyl-DL-homoserine lactone		C ₁₄ -HSL	311.46
N-(β-ketocaproyl)-L-homoserine lactone		3-oxo-C ₆ -HSL	213.23
N-(β-ketooctanoyl)-L-homoserine		3-oxo-C ₈ -HSL	241.28
N-(3-oxodecanoyl)-L-homoserine lactone		3-oxo-C ₁₀ -HSL	269.34
N-(3-oxo-dodecanoyl)-L-homoserine lactone		3-oxo-C ₁₂ -HSL	297.39
N-(3-oxo-tetradecanoyl)-L-homoserine lactone		3-oxo-C ₁₄ -HSL	325.44

表 2 HPLC-MS-MS 检测 AHLs 类信号分子质谱条件表 Table 2 MS conditions of determine AHLs by HPLC-MS-MS					
化合物 Compound	母离子 Parent ion (<i>m/z</i>)	子离子 Daughtern ion (<i>m/z</i>)	保留时间 Retention time (min)	锥孔电压 Cone (V)	碰撞能量 Collision energy (eV)
C ₄ -HSL	172	102、71	1.09	15、15	10、10
C ₆ -HSL	200	102、99	1.80	15、15	10、10
C ₈ -HSL	228	102、127	5.47	15、15	10、10
C ₁₀ -HSL	256	102、155	8.70	20、20	10、10
C ₁₂ -HSL	284	102、183	9.64	20、20	10、10
C ₁₄ -HSL	312	102、211	10.24	20、20	10、10
3-oxo-C ₆ -HSL	214	102、113	1.15	15、15	10、10
3-oxo-C ₈ -HSL	242	102、141	2.04	20、20	10、15
3-oxo-C ₁₀ -HSL	270	102、169	6.54	20、20	15、15
3-oxo-C ₁₂ -HSL	298	102、197	8.90	25、25	15、15
3-oxo-C ₁₄ -HSL	326	102、225	9.73	25、25	15、20

2 结果与分析

2.1 HPLC-MS-MS 检测 AHLs 标准品

HPLC-MS-MS 在上述条件下分别对 11 种信号分子标准品进行检测, 见图 1。由于结构及分子量的不同, 在上述检测条件下各类信号分子标准品在高效液相色谱中均有不同的保留时间并呈现一定规律性, 其在质谱分析过程中 AHLs 信号分子主要打碎成固定碎片 *m/z*

102  , 还有 *m/z* 71、*m/z* 99、*m/z* 127、*m/z*155、*m/z* 183、*m/z* 211 等特征碎片, 这些碎片相差 *m/z* 28 递增。见表 2 及图 2。

2.2 铜绿假单胞菌释放 AHLs 的检测

如图 3 所示, 铜绿假单胞菌所产生信号分子的种类为: C₄-HSL、C₆-HSL、C₈-HSL、C₁₀-HSL、C₁₂-HSL、C₁₄-HSL、3-oxo-C₈-HSL、3-oxo-C₁₀-HSL、3-oxo-C₁₂-HSL、3-oxo-C₁₄-HSL, 各类信号分子的量见表 3, 并且随细菌浓度的

变化在 7.6×10⁹ 和 1.6×10¹⁰ 时达到峰值, 见图 4。

2.3 荧光假单胞菌释放 AHLs 的检测

如图 5 所示, 荧光假单胞菌所产生信号分子的种类为: C₄-HSL、C₆-HSL、C₈-HSL、3-oxo-C₁₀-HSL、3-oxo-C₁₂-HSL、3-oxo-C₁₄-HSL, 各类信号分子的量见表 4, 并且随细菌浓度的变化在 1.1×10⁹时达到峰值, 见图 6。

3 讨论

在上述色谱及质谱条件下对 11 种 AHLs 类信号分子的检测表明, 在此条件下 11 种信号分子在高效液相色谱中都能很好的被分离, 各自具备不同的出峰时间, 质谱分析表明: 各类信号分子随分子质量的变化均具备 172+14*n*, 并呈现以 14 的递增规律, 另外 AHLs 类信号分子所具备的高丝氨酸内酯环在质谱鉴定过程中均没有被破坏, 并且总具有一个 *m/z* 为 102 的特征碎片, 这与 MCLEAN R.^[11]和 Bruhn J. B.等^[12]的结果是一致的, 见图 7。

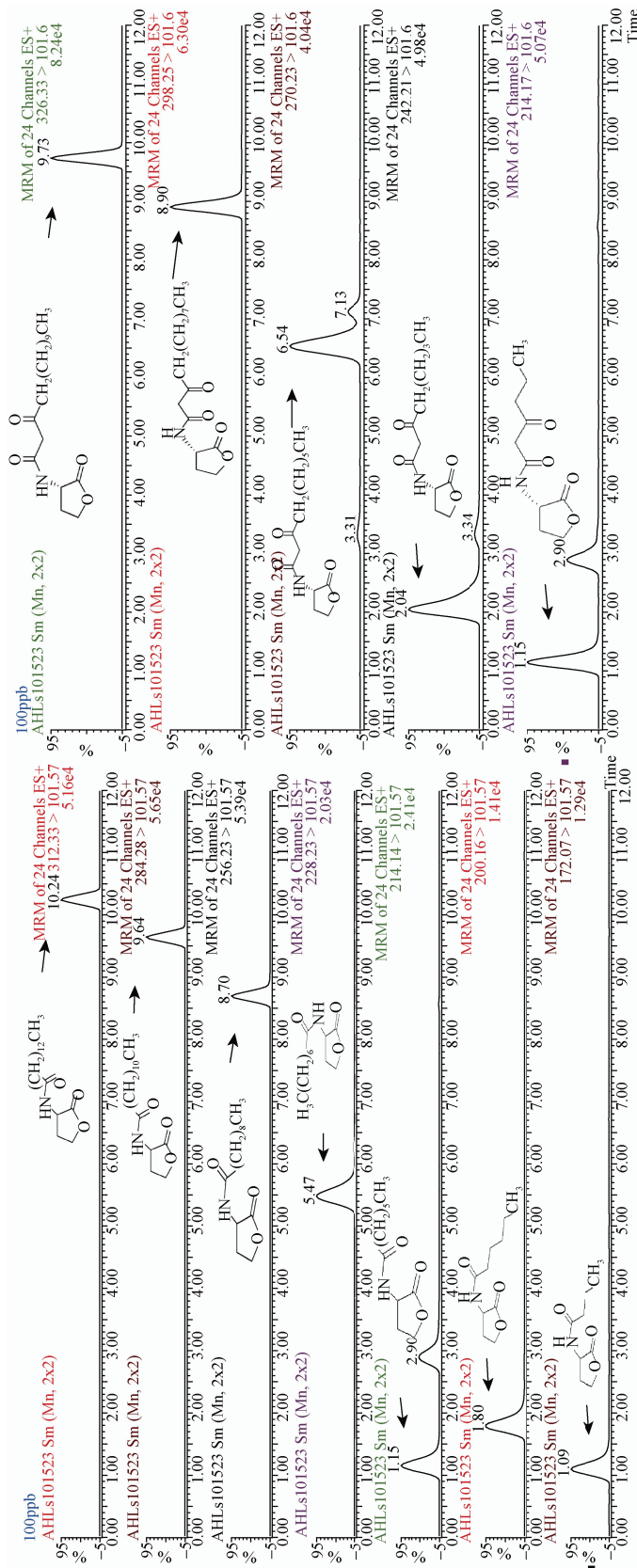


图 1 AHLs 信号分子标准品色谱图
Fig.1 HPLC chromatogram of AHLs standard

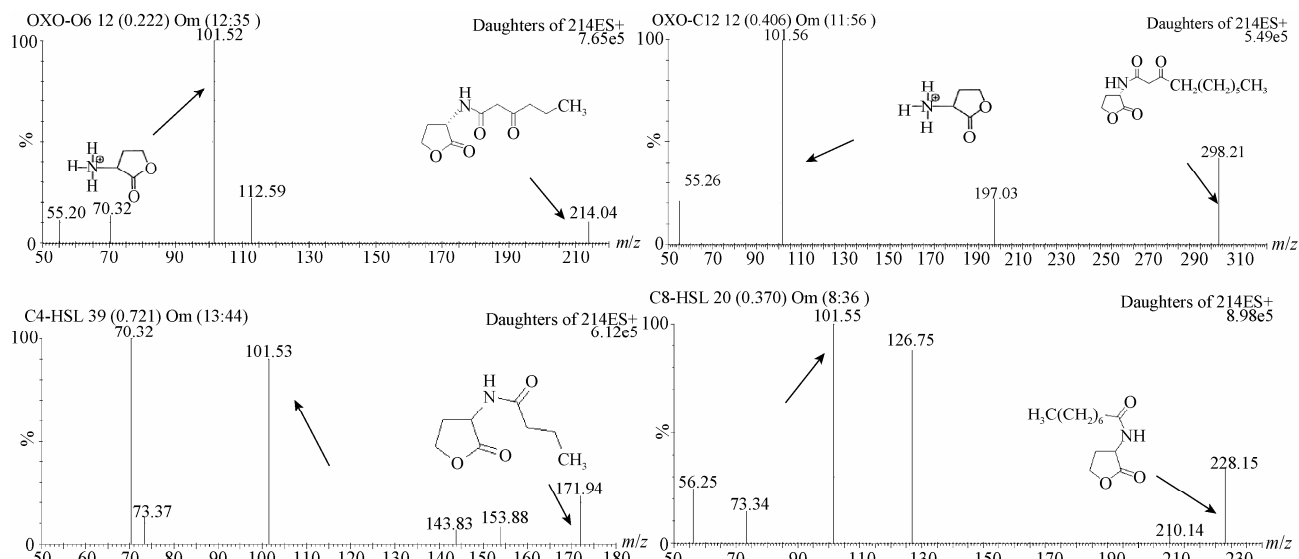


图 2 4 种 AHLs (3-oxo-C₆-HSL、3-oxo-C₁₀-HSL、C₄-HSL 和 C₈-HSL) 二级质谱碎片
Fig. 2 MS/MS fragments of 4 AHLs (3-oxo-C₆-HSL, 3-oxo-C₁₀-HSL, C₄-HSL and C₈-HSL)

表 3 铜绿假单胞菌释放 10 种 AHLs 的量							
Table 3 Amount of 10 AHLs by <i>P. aeruginosa</i> release (μg/L)							
AHLs	菌数 Colony numbers (CFU/mL)						
	1.40×10 ⁷	2.30×10 ⁹	3.30×10 ⁹	7.60×10 ⁹	1.60×10 ¹⁰	1.80×10 ¹⁰	2.40×10 ¹⁰
C ₄ -HSL	32	20	73	921	1 606	1 590	429
C ₆ -HSL	15	11	23	237	396	301	42
C ₈ -SL	12	11	14	81	116	82	11
C ₁₀ -HSL	2	2	2	6	6	2	2
C ₁₂ -HSL	3	2	2	3	2	2	2
C ₁₄ -HSL	2	2	2	5	2	3	2
3-oxo-C ₈ -HSL	1	1	2	3	2	3	0
3-oxo-C ₁₀ -HSL	18	22	118	309	212	136	2
3-oxo-C ₁₂ -HSL	186	216	850	1 390	697	277	55
3-oxo-C ₁₄ -HSL	16	18	6	17	11	10	3

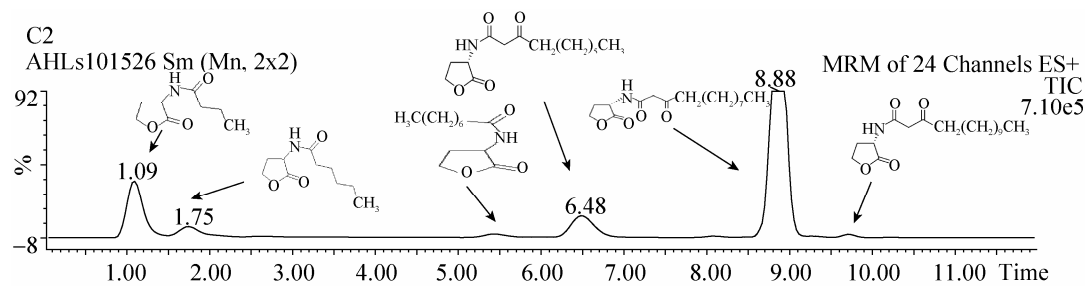


图 3 铜绿假单胞菌释放 10 种 AHLs 选择离子流图
Fig. 3 Chromatograms of 10 AHLs by *P. aeruginosa* release

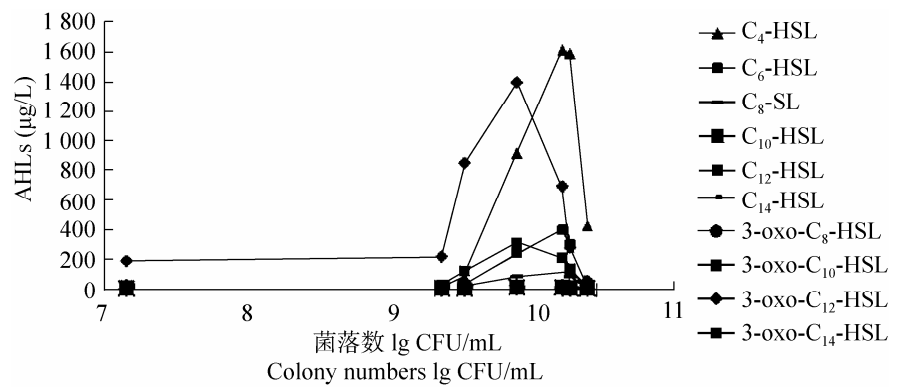


图 4 铜绿假单胞菌释放 10 种 AHLs 的变化趋势
Fig. 4 Trends of 10 AHLs by *P. aeruginosa* release

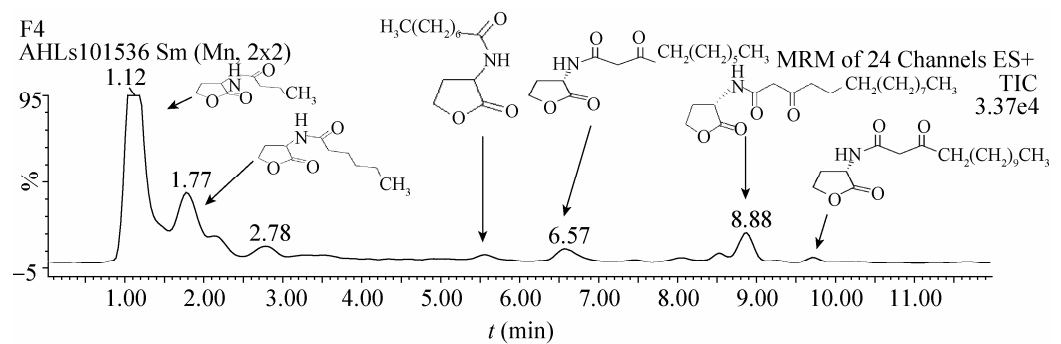


图 5 荧光假单胞菌释放 6 种 AHLs 选择离子流图
Fig. 5 Chromatograms of 6 AHLs by *P. fluorescens* release

表 4 荧光假单胞菌释放 6 种 AHLs 的量 Table 4 Amount of 6 AHLs by <i>P. fluorescens</i> release (μg/L)								
AHLs	菌数 Colony numbers (CFU/mL)							
	1.1×10 ⁷	4.7×10 ⁷	2.2×10 ⁸	5.4×10 ⁸	7.6×10 ⁸	9.0×10 ⁸	1.1×10 ⁹	1.2×10 ⁹
C ₄ -HSL	0	0	0	4	7	11	138	44
C ₆ -HSL	0	0	0	0	0	0	66	21
C ₈ -HSL	0	0	0	0	0	0	14	6
3-oxo-C ₁₀ -HSL	0	0	0	0	0	0	9	2
3-oxo-C ₁₂ -HSL	0	2	2	2	1	3	6	2
3-oxo-C ₁₄ -HSL	0	0	0	0	0	0	2	1

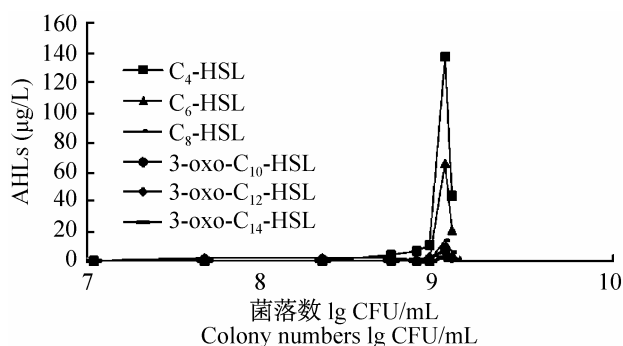


图 6 荧光假单胞菌释放 6 种 AHLs 的变化趋势

Fig. 6 Trends of 6 AHLs by *P. fluorescens* release

在此条件下 HPLC-MS-MS 对信号分子的检测具备较低的检测下限, 为 1 µg/L 左右。研究两种假单胞菌在不同培养时间, 即菌数不同所释放 AHLs 的量的检测表明: 铜绿假单胞菌能产生两类结构不同的信号分子为 OdDHL [N-(3-oxododecanoyl)-homoserine lactone] 和 BHL [N-(butyryl)-homoserine lactone], 这是因为铜绿假单胞菌具有较复杂的群体感应系统即 LasI/LasR-RhlI/RhlR 系统^[13], 这与 Danièle Morin 等^[14]的实验结果有一定的相似, 其中以 C₄-HSL、C₆-HSL、C₈-HSL、3-oxo-C₈-HSL、

3-oxo-C₁₀-HSL 的含量最高, 此 5 类 AHLs 可能与其某种特性表达有关。荧光假单胞菌也能产生的信号分子为 BHL 和 OdDHL 两类信号分子, 因此荧光假单胞菌可能也具有与铜绿假单胞菌类似的群体感应系统, 还有待进一步研究。其中以 C₄-HSL、C₆-HSL 的含量最高, 可能与其某种重要特性表达有关。另外两种菌随着培养时间的不同及活菌数的变化, 各类 AHLs 信号分子在菌落数为 10⁹-10¹⁰ 时达到峰值, 这说明细菌在繁殖过程中只有在一定的时间才释放信号分子, 而此类信号分子并不是一直存在的, 当其作用于细菌某类特殊基因后将消失。另外据报道信号分子的产生与细菌所生长的温度及营养环境有很大的关系^[15]。在此两种假单胞菌所产生 AHLs 中 OdDHL 类 (3-oxo-C₈-HSL、3-oxo-C₁₀-HSL、3-oxo-C₁₂-HSL、3-oxo-C₁₄-HSL 等)、BHL 和 HHL 类 (如 C₄-HSL、C₆-HSL、C₈-HSL、C₁₀-HSL、C₁₂-HSL、C₁₄-HSL 等) 与弹性蛋白酶、绿脓菌素、鼠李糖脂、凝集素、碱性磷酸酶、几丁质酶、凝集素、溶血素等有关^[6,16]。

微生物是导致食品腐败的主要因素, 但只

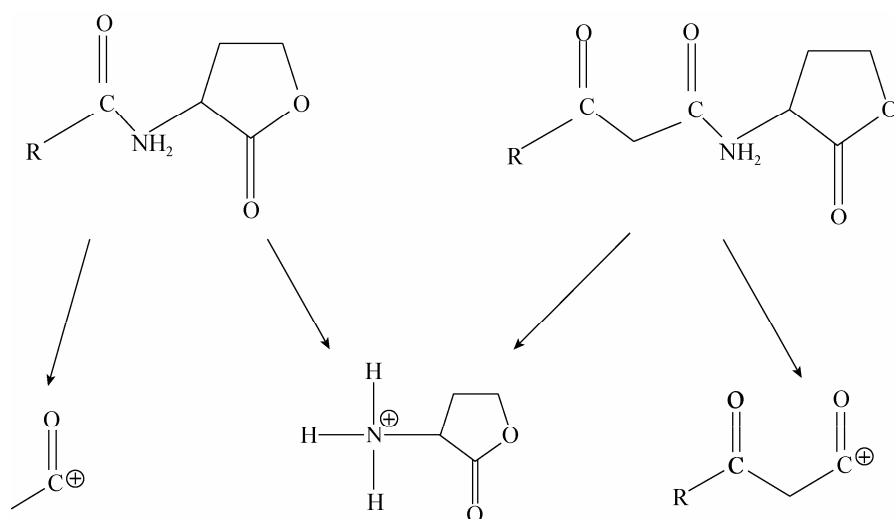


图 7 AHLs 类信号分子的分子离子的碎片规律

Fig. 7 Fragmentation of molecular ion $[M+H]^+$ of AHLs

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,因而可对其在作用过程中产生的信息素加以利用,例如切除铜绿假单胞菌中信息素的合成酶后对其导致的症状有减轻作用,因而利用自诱导剂为靶点开发新型抗菌药物将会成为一种抗菌新型途径。随着对某种食源性细菌调节系统的进一步研究和对其自诱导剂结构的逐步掌握,人工合成此细菌的自诱导剂类化合物将可为干扰其腐败特性或增加其代谢产物的产量(如卡巴酚的产量提高)起到重要的作用^[11]。但目前国内外对假单胞菌属所分泌某个特定的 AHLs 类信号分子与肉类腐败特定指标之间的关系还有待进一步研究。另外食品中微生物的腐败特性只有在信号分子被释放并达到一定的量后才能被表达,因此对信号分子的检测可以相对预示食品中腐败性微生物的量,可以对食品质量安全的评估起一定的参考作用。

参 考 文 献

- [1] 李苗云, 周光宏, 徐幸莲. 应用 PCR-DGGE 研究冷却猪肉贮藏过程中的优势菌[J]. 西北农林科技大学学报, 2008, 36(9): 185–189.
- [2] 李正堂, 李柏林, 欧杰, 等. 市售冷却牛肉中主要细菌的常规分离与鉴定[J]. 微生物学通报, 2009, 36(2): 198–204.
- [3] 戴奕杰, 李宗军, 王远亮. 冷却肉中假单胞菌生长动力学模型的建立[J]. 肉类研究, 2011, 25(4): 17–21.
- [4] 杨宪时, 郭全友, 许钟. 罗非鱼冷藏过程细菌种群的变化[J]. 中国水产科学, 2008, 15(6): 1050–1055.
- [5] Gram L, Ravn L, Rasch M, et al. Food spoilage—interactions between food spoilage bacteria[J]. International Journal of Food Microbiology, 2002, 78: 79–97.
- [6] Gobetti M, de Angelis M, di Cagno R, et al. Cell-cell communication in food related bacteria[J]. International Journal of Food Microbiology, 2007, 120: 34–45.
- [7] Chugani S, Greenberg EP. LuxR homolog-independent gene regulation by acyl-homoserine lactones in *Pseudomonas aeruginosa*[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2010, 107(23): 10673–10678.
- [8] Buchholtz C, Nielsen KF, Milton DL, et al. Profiling of acylated homoserine lactones of *Vibrio anguillarum* *in vitro* and *in vivo*: Influence of growth conditions and serotype[J]. Systematic and Applied Microbiology, 2006, 29: 433–449.
- [9] Blosser RS, Gray KM. Extraction of violacein from *Chromobacterium violaceum* provides a new quantitative bioassay for *N*-acyl homoserine lactone autoinducers[J]. Journal of Microbiological Methods, 2000, 40: 47–55.
- [10] 马晨晨, 李柏林, 欧杰, 等. 高效液相色谱-串联质谱法同时测定细菌群感效应11种 AHLs 类信号分子[J]. 分析化学, 2010, 38(10): 1428–1432.
- [11] Mclean R, Pierson LS, Fuqua C. A simple screening protocol for the identification of quorum signal antagonists[J]. Journal of Microbiological Methods, 2004, 58: 351–360.
- [12] Bruhn JB, Christensen AB, Ravn L, et al. Presence of acylated homoserine lactones (AHLs) and AHL-producing bacteria in meat and potential role of AHL in spoilage of meat[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2004, 70(7): 4293–4302.
- [13] 马晨晨, 李柏林, 欧杰. 食源性细菌的群体感应效应[J]. 食品科学, 2008, 29(9): 643–647.
- [14] Morin D, Grasland B, Vallée-Réhel K, et al. On-line high-performance liquid chromatography-mass spectrometric detection and quantification of *N*-acylhomoserine lactones, quorum sensing signal molecules, in the presence of biological matrices[J]. Journal of Chromatography, 2003, 1002: 79–92.
- [15] 张素琴. 微生物分子生态学[M]. 北京: 科学出版社, 2005: 102–118.
- [16] Medina-Martínez MS, Uyttendaele M, Demolder V, et al. Effect of temperature and glucose concentration on the *N*-butanoyl-L-homoserine lactone production by *Aeromonas hydrophila*[J]. Food Microbiology, 2006, 23: 534–540.