

## 基于细菌群感效应人工构建分子开关

张志伟<sup>1,2</sup>, 吴胜<sup>1</sup>

1 中国科学院微生物研究所 微生物资源前期开发国家重点实验室, 北京 100101

2 中国科学院大学, 北京 100049

张志伟, 吴胜. 基于细菌群感效应人工构建分子开关. 生物工程学报, 2013, 29(9): 1301-1312.

Zhang ZW, Wu S. Construct a molecular switch based on bacterial quorum sensing. Chin J Biotech, 2013, 29(9): 1301-1312.

**摘要:** 对生物体内已有的或者人工组装的生物合成途径进行优化操作涉及两个重要问题: 代谢途径中关键酶的活性及蛋白表达水平。对于酶表达水平的研究, 传统的做法是采用强启动子控制下的靶蛋白过量表达策略。靶蛋白的过量表达通常会导致细胞内积累大量的无活性包涵体, 从而严重影响细胞的生理状态和相关生物途径的有效运转。针对这一问题, 设计一种分子开关来精确调控生物合成过程中关键酶的表达水平, 对于研究生物合成途径的代谢节律以及促进生物合成途径高效运转都具有重要的实用价值。基于细菌群落中普遍存在群感效应的基本原理并结合酶促催化的动力学特征, 首先在大肠杆菌群落中建立信号分子高丝氨酸内酯 (AHL) 介导的细胞-细胞交流机制, 将靶基因 *egfp* 置入到启动子  $P_{luxI}$  的控制之下。在细胞生长过程中, 产生的 AHL 累积到一定浓度启动靶基因表达。通过在细胞生长的不同阶段启动 AHL 降解酶 *AiiA* 的表达控制环境中信号分子 AHL 的浓度水平, 从而控制靶基因 *egfp* 的转录效率, 最终实现对靶蛋白 EGFP 表达水平的精确控制。通过检测细胞的生长状态、靶基因在 mRNA 水平、蛋白质水平的表达情况证明人工设计的分子开关可以便捷高效地控制靶基因表达水平, 具有时空调节的严谨性。该分子开关有望广泛应用于代谢工程和合成生物学等研究领域。

**关键词:** 细菌群感效应, 高丝氨酸内酯, *aiiA* 基因, 分子开关

**Received:** May 12, 2013; **Accepted:** May 22, 2013

**Supported by:** Supported by: The Key Project of the Chinese Academy of Sciences (No.KSCX2-EW-J-6).

**Corresponding author:** Sheng Wu. Tel: +86-10-62628482; Fax: +86-10-64807429; E-mail: shengwu@im.ac.cn

中科院微生物所基础前沿研究项目 (No. KSCX2-EW-J-6) 资助。

网络出版时间: 2013-07-12

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1998.Q.20130712.1535.001.html>

# Construct a molecular switch based on bacterial quorum sensing

Zhiwei Zhang<sup>1,2</sup>, and Sheng Wu<sup>1</sup>

<sup>1</sup> State Key Laboratory of Microbial Resources, Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China

<sup>2</sup> University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

**Abstract:** Engineering the existing or manual assembling biosynthetic pathways involves two important issues: the activity and expression level of key enzymes in the pathway. Concerning the enzyme expression study, the conventional approach is to use strong promoter to initiate the overexpression of the target protein. The excessive expression of the target protein usually result in the intracellular accumulation of a large number of inactive inclusion bodies, thereby seriously affect the physiological state of the cell and the effective functioning of the relevant biological pathways. To solve this problem, we would like to design a molecular switch to precisely manipulate the expression level of key enzymes in the biosynthetic process, which has important practical value for the study of metabolic rhythm of the biosynthetic pathway and to promote the efficiency of the biosynthetic pathway. Based on the basic principles of quorum sensing existing in the bacterial community and combining the dynamic characteristics of the enzymatic catalysis, we first established cell-cell communication mechanisms mediated by signal molecule homoserine lactone (AHL) in the *E. coli* community and target protein EGFP was expressed under the control of the promoter  $P_{luxI}$ . In the process of cell growth, AHL accumulated to a certain concentration to start the expression of target gene *egfp*. At the different cell growth stages, AHL-degrading enzyme AiiA was induced and resulted in the degradation of AHL molecule in a controlled environment, thereby controlling the transcription efficiency of target gene *egfp* and ultimately achieve the precise control of the level of expression of the target protein EGFP. The detection of cell growth state, the mRNA level and protein expression level of the target gene showed the artificially designed molecular switch can control the level of expression of a target gene in a convenient and efficient manner with a spatial and temporal regulation of rigor. The molecular switch is expected to be widely used in the field of metabolic engineering and synthetic biology research areas.

**Keywords:** quorum-sensing, acyl-homoserine lactone, *aiiA* gene, molecular switch

在生物体内, 一个多步骤的生物合成途径中往往存在一个或几个关键的节点受到多重水平的调节从而精确地控制目标产物的合成<sup>[1-3]</sup>。目前, 对生物合成途径的改造, 常规的做法是增加代谢途径中受调蛋白基因的拷贝数, 过量表达目标蛋白。但这种对代谢途径的改造方法很多时候并不奏效, 原因可能是目标蛋白的过量表达, 往往会带来非常严重的负面效应。主要表现为: 由于常规的蛋白质表达是一种不完善的受控表达, 只能启动, 不能终止, 表达的蛋白质大部分在体

内形成包涵体, 不仅是对生物体内能量和物质的巨大浪费, 而且造成细胞严重的生理负担。针对上述问题, 我们提出基于细菌群感效应的基本原理及酶促反应的动力学设计一种分子开关, 精确调节目标蛋白表达水平, 克服因蛋白过量表达带来的一系列负面效应, 维持细胞正常的生理状态, 用于研究生物合成途径的代谢节律以及促进生物合成途径高效运转。

细菌的群体感应现象最初是在海洋细菌费氏弧菌 *Vibrio fischeri* 中发现的<sup>[4]</sup>。夏威夷短尾鱿

鱼等鱼类的特定器官中特殊共生体 *V. fischeri* 的细胞密度很高, 达到  $10^{10} \sim 10^{11}/\text{mL}$ , 导致该器官发出荧光; 而在海水中游离的 *V. fischeri*, 由于密度低于  $10^2/\text{mL}$ , 不能发出荧光<sup>[5-6]</sup>。这种细菌能够感知其数量的变化, 当其密度达到一定阈值时才能发生的感应现象称为群感应<sup>[7]</sup>。后来的研究发现这种由细菌的细胞与细胞之间的信息交流而引发的群体效应, 是由特殊的、微小的、可扩散的化学分子介导的, 这些分子被称为自动诱导物或信号分子。细菌正是通过产生、扩散、检测、感应这种化学信号分子从而传递了信息, 改变了它们之间的行为, 显示出单个细菌所不具有的生理功能和生态特征, 包括弧菌调节生物发光、成群浮游形成生物膜现象、抗生素的生物合成等<sup>[8-10]</sup>。群体感应同时也调控着动植物致病菌的毒性因子的产生, 而毒性因子的产生与这些细菌的致病性密切相关<sup>[11-12]</sup>。

革兰氏阴性细菌 *V. fischeri* 的群感应是以 LuxI-LuxR 组成的系统进行运作的。LuxR 是一种转录调节蛋白, LuxI 是信号分子合成酶, 其中 LuxI 能够自动维持低水平地合成可以溶解的小分子信号分子 OHHL (N-3-oxohexanoyl-L-homoserinelactone)<sup>[13-14]</sup>。当环境中细胞密度较低时, 产生的少量信号分子不足以和 LuxR 结合, 因而不能引发依赖 LuxR 的包含 *luxI* 基因在内的荧光操纵子的大量转录。当环境中细胞密度足够大, 信号分子浓度达到阈值时, OHHL 就进入到细胞内和 LuxR 结合形成 LuxR-OHHL 复合物, 此复合物结合到  $P_{luxI}$  启动子上, 使包括 *luxI* 基因在内的荧光操纵子得到大量表达, 生物体发光。同时, LuxI 的增多进一步促进 OHHL 的合成,

形成一个正反馈调节机制, 使荧光功能性基因不断地得到表达, *V. fischeri* 就会发出明显的荧光。此外, 科学家也阐明了存在于铜绿假单胞菌和革兰氏阳性细菌的群感应分子机制<sup>[15-19]</sup>。

由于群感应与细胞的致病性密切相关, 因此寻找能够抑制细菌群感应的方法 (即细菌群感猝灭) 对于防病治病具有重要的意义<sup>[20-22]</sup>。Zhang 等首先从芽胞杆菌 240B1 中分离出了能够降解 AHL 的酶 AiiA, 它是由 *aiiA* 基因编码的 250 个氨基酸组成, 结构中含有一个保守的 HXHXDH 锌指结构<sup>[23]</sup>。2002 年 Dong 等和 Lee 等相继报道了在苏云金芽胞杆菌的不同亚种中广泛存在着 *aiiA* 基因, 可能原因是苏云金芽胞杆菌在自然生态系统中与革兰氏阴性菌存在竞争关系<sup>[24-25]</sup>。通过对产物进行化学结构分析发现, 该信号分子的内酯环已被打开, 由此可知 AiiA 是一种 AHL 内酯酶 (AHL lactonase)<sup>[26-27]</sup>。

群感应分子机制的阐明及相关元件的发现为人工设计微生物群落奠定了基础<sup>[28-29]</sup>。Arnold 等利用群感应设立了一个微生物生物系统, 该系统通过调节性自杀效应可以使细胞浓度处于特定的水平<sup>[30]</sup>。Hasty 等设计了一种同步遗传振荡器, 利用细菌通过振荡输出信号的方式来构建宏观的生物感应器, 为进一步为研究自然界发生的多细胞协调行为的机制提供了一个具体的模型系统<sup>[31]</sup>。本实验基于细菌群落中普遍存在的群感应的基本原理并结合酶催化的动力学特征, 首先在大肠杆菌群落中建立信号分子高丝氨酸内酯 (AHL) 介导的细胞-细胞交流机制, 进而通过控制环境中信号分子 AHL 的浓度水平精确控制细胞中靶蛋白的表达水平, 实现靶蛋白

的定时定量表达,为研究生物合成途径的代谢节律以及促进生物合成途径高效运转提供一种分子工具。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 工具酶与试剂

限制性内切酶、ExTaq DNA 聚合酶和 T4 DNA 连接酶购于宝生物工程(大连)有限公司;基因组 DNA 提取试剂盒、质粒提取试剂盒、细胞细菌总 RNA 提取试剂盒、Quant cDNA 第一链合成试剂盒购于天根生化科技(北京)有限公司;KOD Taq DNA 聚合酶、SYBR Green Realtime PCR Master Mix 购于日本 TOYOBO 公司;DNA 凝胶回收试剂盒购于德国 QIAGEN 公司;阿拉伯糖购于北京赛百盛基因技术有限公司;蛋白胨、酵母膏、氯化钠均为国产分析纯试剂;N-(3-oxohexanoyl)-L-homoserine lactone 购于 TCR 试剂公司;海洋肉汤 2216 购自美国 BD 公司。

#### 1.1.2 菌株与质粒

苏云金芽胞杆菌 *Bacillus thuringiensis* CGMCC1.792 购于中国普通微生物菌种保藏管理中心; *V. fischeri* ES114 购于美国菌种保藏中心; pACYC-Duet-1 购于 Invitrogen 公司; *E. coli* DH5 $\alpha$ 、*E. coli* Top10 以及质粒 pBAD/Myc-HisA、pET30-Egfp 均为本实验室保存。

#### 1.1.3 培养基

BT 培养基:蛋白胨 10 g,牛肉提取物 3 g, NaCl 5 g,蒸馏水定容 1 L, pH 调为 7.0, 121 °C 高压蒸汽灭菌 20 min, 固体培养时加 1.5% 琼脂。  
VF 培养基: 37.4 g 海洋肉汤 2216 溶于蒸馏水,定容至 1 L, 121 °C 高压蒸汽灭菌 20 min。

## 1.2 方法

### 1.2.1 培养方法

*B. thuringiensis* 接种到 BT 培养基中, 37 °C、200 r/min 培养 16 h。 *V. fischeri* 接种到 VF 培养基中, 26 °C、200 r/min 培养 16 h。

### 1.2.2 重组质粒的构建

菌株 *V. fischeri* ES114 和 *B. thuringiensis* CGMCC1.792 的基因组 DNA 的提取按照细菌基因组 DNA 提取试剂盒说明书的方法操作。实验中所用的引物见表 1, 下划线所示为限制性内切酶的酶切位点。

根据 NCBI 数据库中 *V. fischeri* ES114 中 lux 系统基因序列 (GenBank Accession No. AY292966) 设计引物 *lux for* 和 *lux rev*。PCR 反应条件为: 95 °C 预变性 5 min; 95 °C 1 min, 53 °C 1 min, 72 °C 2 min, 进行 30 个循环; 72 °C 10 min。PCR 产物经 *Bam*H I / *Hind* III 双酶切后连接到质粒 pACYC-Duet-1 的对应位点, 构建质粒 pLux。根据启动子  $P_{luxI}$ 、rbs 序列和绿色荧光蛋白基因 *egfp* 序列设计一组引物, 通过叠加延伸 PCR 进行 DNA 片段拼接, 获得  $P_{luxI}$ -rbs-*egfp* 的拼接片段。以 pET30-Egfp 为模板, 以 *egfp for* 和 *egfp rev* 为引物进行第一轮扩增; 以所得基因片段为模板, 以 *egfp for2* 和 *egfp rev* 为引物进行第二轮扩增; 再以所得基因片段为模板, 以 *egfp for3* 和 *egfp rev* 为引物进行第三轮扩增, 最终得到  $P_{luxI}$ -rbs-*egfp* 基因片段。该片段经 *Nde* I / *Hind* III 双酶切后连接到重组质粒 pLux 的对应位点, 构建重组质粒 pLPE (图 1)。该质粒中包含用于靶基因 *egfp* 启动表达的全部元件。

以 *Bacillus thuringiensis* CGMCC1.792 基因组 DNA 为模板, 简并引物 *aiiA for* 和 *aiiA rev* 进行

表 1 文中所用 PCR 引物

Table 1 PCR primers used in this study

Primer name	Primer sequence (5'-3')
Primers used for cloning	
<i>lux</i> for	CGGGATCCGAAATGTATGAG
<i>lux</i> rev	CGAAGCTTATTATGTTCGAG
<i>aiiA</i> for	GCCATATGACAGTAAAG
<i>aiiA</i> rev	CGCTCGAGTATATABTCWGGGAAC
<i>egfp</i> rev	CCCTCGAGTACTTGTACAGC
<i>egfp</i> for	ACTAGAGAAAGAGGAGAAATACTAGAT CCTCACGAAGGGC
<i>egfp</i> for2	GCAAGAACCTGGTTTGTATAGTCGAAT AAATACTAGAGAAAGAGG
<i>egfp</i> for3	GCAAGCTTACCTGTAGGATCGTACAGGTTTACGCAAGAAAATGGTTT
Primers used for RT-qPCR	
<i>egfp</i> for1	TTGATGCCGTTCTTCTGCTTGTCG
<i>egfp</i> rev1	CGCAGCAGGATCTGGTTAATCTCTTC
<i>rrsA</i> for	GCAGGCAGATGTGGTGGTCTACGA
<i>rrsA</i> rev	CTTCTTCATACACGCGGCATGGC

The restriction sites for cloning are underlined.

PCR 扩增; PCR 反应条件为: 95 °C 5 min; 95 °C 1 min, 53 °C 1 min, 72 °C 1 min, 进行 30 个循环; 72 °C 10 min。PCR 产物切胶回收后, 用 *Nde* I/*Xho* I 双酶切, 连接到经同样酶切处理的表达载体 pBAD/Myc-HisA, 构建重组质粒 pAIIA (图 1)。该质粒中包含用于终止靶基因 *egfp* 表达的全部元件。

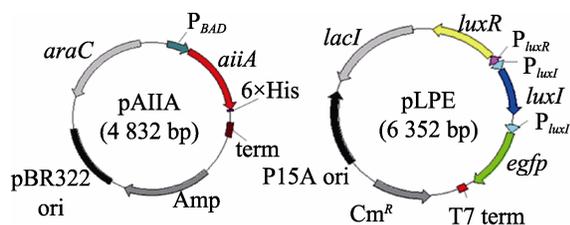


图 1 质粒 pAIIA 和 pLPE 图谱

Fig. 1 Map of plasmid pAIIA and pLPE.

### 1.2.3 AiiA 蛋白质表达以及活性检测

将重组质粒 pAIIA 转入到大肠杆菌 Top10 中, 重组菌接种到 LB 液体培养基中, 加入终浓度为 100 μg/mL 的氨苄青霉素, 37 °C、200 r/min 培养至  $OD_{600}$  等于 0.6 左右时, 加入诱导剂 L-阿拉伯糖, 终浓度为 1%, 继续诱导培养 10 h。离心除去上清液, 细胞经洗涤后超声破碎, 低温离心后, 取上清液用于 SDS-PAGE 检测蛋白的表达情况。

将 1 mL *E. coli* Top10 (pAIIA) 菌体用生理盐水洗涤 3 次后用 495 μL 反应缓冲液和 5 μL AHL 母液混合, AHL 终浓度为 2 mmol/L, 37 °C 反应 10 min, 反应液经高速冷冻离心和微孔滤膜过滤处理, HPLC 分析色谱柱为 Waters C18 反向

色谱柱,柱温为 25 °C。流动相 A 液为 ddH<sub>2</sub>O (其中添加终浓度为 0.1% 乙酸),流动相 B 液为色谱级乙腈。A 液和 B 液的比例为 32 : 68。高丝氨酸内酯及其产物保留时间分别为 4.9 min 和 3.9 min。酶的活力定义为每分钟水解 1 μmol AHL 所需的菌液。

#### 1.2.4 荧光的镜检

取 1 mL 过夜培养的重组菌株 *E. coli* Top10 (pLPE) 菌液,以 *E. coli* Top10 菌液作对照,取 2 μL 菌液滴在干净的载玻片上,用镊子将盖玻片放在样品上,用吸水纸吸去多余的菌液,放于荧光显微镜下观察,选用 100×物镜,10×目镜,先在可见光投射下调出视野,观察细胞形态及密度,拍照后关闭可见光,改换荧光,绿色荧光激发波长为 485 nm,拍照保存。

#### 1.2.5 荧光强度的测定

取不同实验条件下的重组菌株 *E. coli* Top10 (pLPE/pAIIA) 细胞培养液 200 μL 置于 96 孔板,以 *E. coli* Top10 菌液作对照,测定样品在 485 nm 下的吸光值,相同体积测定 3 次取平均值。定义相对荧光强度 = (重组菌荧光强度 - 对照菌荧光强度) / 对照菌荧光强度。

#### 1.2.6 总 RNA 的提取及其反转录

不同实验条件下的重组菌株 *E. coli* Top10 (pLPE/pAIIA) 的总 RNA 提取按细胞细菌总 RNA 提取试剂盒说明书进行。以经过 DNase I 处理过的 RNA 为模板,选取 *egfp* for1 与 *egfp* rev1、*rrsA* for 与 *rrsA* rev 2 对引物进一步验证总 RNA 中是否有 DNA 污染。经验证后以无 DNA 污染的总 RNA 进行反转录反应。按照 Quant cDNA 第一链合成试剂盒说明书进行 RT-PCR,反应体系为: 10×RT Mix 2 μL, Super Pure dNTPs

(2.5 mmol/L each) 2 μL, Oligo(dT)<sub>15</sub> 2 μL, 逆转录酶 1 μL, RNase-Free ddH<sub>2</sub>O 12 μL, 模板 RNA 1 μL, 总体积 20 μL, 反应条件为: 37 °C 孵育 60 min。

#### 1.2.7 RT-qPCR

以 *E. coli* Top10 中 *rrsA* 基因为内标<sup>[32]</sup>, 检测基因片段大小均为 90 bp 左右。按照 SYBR Green Realtime PCR Master Mix 试剂盒说明书进行 RT-qPCR。反应体系为: 2×SYBR mix 12.5 μL, cDNA 模板 1 μL, 上下游引物各 0.25 μL, ddH<sub>2</sub>O 11 μL, 总体积 25 μL。反应条件为: 95 °C 60 s; 95 °C 15 s, 55 °C 15 s, 72 °C 30 s, 循环 40 次。熔解曲线分析 20 min, 验证是否产生非特异性双链 DNA。每个样品重复 3 次, RT-qPCR 结果采用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  方法对各个基因的 Ct 值进行定量分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 分子开关的设计理念及工作原理

与常规的靶蛋白过表达策略不同,分子开关的设计旨在精确控制细胞内靶基因的蛋白表达水平,实现定量表达的目的,从而有助于研究生物合成途径中关键酶不同的表达水平对该途径代谢节律的影响,也可用于在细胞生长的特定阶段关闭靶基因的表达,从而关闭靶基因所处的代谢通路。为此利用 *V. fischeri* ES114 中参与群感效应的 Lux 系统以及信号分子 AHL 降解酶等生物学元件设计一个可以操控靶基因蛋白表达水平的分子开关。图 2 显示了构成分子开关的基本元件,工作原理如下:在细胞生长过程中,AHL 合成酶编码基因 *luxI* 转录,翻译合成蛋白 LuxI,后者合成信号分子 AHL。AHL 可以自由出入细胞膜,在细胞内和细胞间扩散,当 AHL 达到一

定浓度时,与 LuxR 调控蛋白结合形成复合物 LuxR-AHL,该复合物可以上调  $P_{luxI}$  启动子控制下的基因转录,靶蛋白 E 合成速度加快,此时分子开关处于“on”状态。当需要终止目标蛋白表达时,加入诱导物,启动 *aiaA* 转录,翻译合成蛋白质 AHL 内酯酶,分解 AHL,降低环境内 AHL 的浓度,进而导致 LuxR-AHL 复合物分离,解除上调效应,此时分子开关处于“off”状态。通过

分子开关“on”和“off”状态的切换,可以精确控制靶蛋白的表达水平。为了便于检测分子开关的控制效果,我们选择绿色荧光蛋白 EGFP 作为靶基因进行验证。此外,考虑到应用的便捷性,我们设计将用于关闭靶基因的元件 *aiaA* 和 Lux 系统置于同一细胞或不同细胞,并在转录和翻译水平检验分子开关对靶基因表达的实际控制效果。

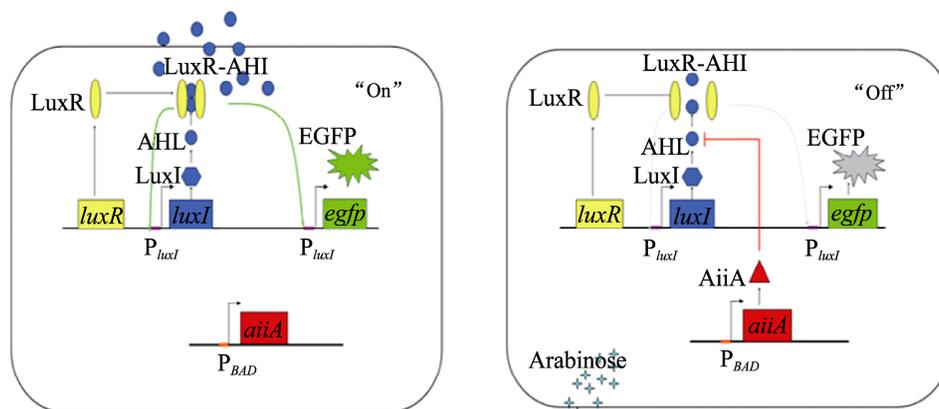


图2 “On”元件、“Off”元件置于同一细胞作用原理示意图

Fig. 2 Schematic diagram of molecular switch mechanism.

## 2.2 分子开关中“Off”元件的构建

### 2.2.1 *aiaA* 基因的克隆

将文献报道一组功能确认的 *aiaA* 基因序列进行同源比对,发现苏云金芽胞杆菌的不同亚种中广泛存在着 *aiaA* 基因。根据同源比对结果设计简并引物 *aiaA* for 和 *aiaA* rev,以 *B. thuringiensis* CGMCC1.792 基因组 DNA 为模板进行扩增,得到了一条 753 bp 的基因片段,该片段具有完整的开放阅读框。将翻译的蛋白质序列进行同源比对,发现与芽胞杆菌 240B1 中分离到的 AiiA 氨基酸序列的同源性为 90%。

### 2.2.2 *aiaA* 基因在 *E. coli* 中表达及酶活性检测

按照方法 1.2.1 描述成功构建了质粒 pAIIA,将质粒转入到 *E. coli* Top10,加入 L-阿拉伯糖进行诱导表达,收集全细胞,进行 SDS-PAGE 凝胶电泳检测。与未诱导细胞相比,诱导后的细胞明显多出一个条带,大小为 28 kDa 左右,与目的蛋白理论计算值相符,说明 *aiaA* 基因可以在 *E. coli* 中表达(图 3)。

按照方法 1.2.2 所示的方法检测诱导后 *E. coli* Top10 (pAIIA) 菌体的活性,反应 10 min,高速低温离心除去细胞沉淀,上清液经 0.22  $\mu\text{m}$

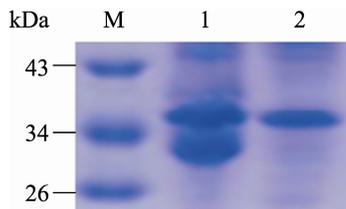


图3 *aiiA* 基因在 *E. coli* 中表达的 SDS-PAGE 图

Fig. 3 SDS-PAGE analysis of *aiiA* gene expression in *E. coli*. M: protein marker; 1: induced *E. coli* BL21 (pAIIA); 2: uninduced *E. coli* BL21 (pAIIA).

膜过滤后, 进行 HPLC 检测。底物 AHL 保留时间为 4.9 min, 细胞与底物反应生成的产物的保留时间为 3.9 min, 检测表明反应液中底物全部耗尽。将产物进行液质分析, 确定保留时间为 3.9 min 的物质为底物 AHL 内酯环水解后的产物(图 4)。上述结果表明诱导生成的 AiiA 蛋白具有催化活性, 全细胞表现出的催化能力为 200  $\mu\text{mol}/(\text{min}\cdot\text{mL})$  菌液。

### 2.3 分子开关中“On”元件的构建

为了便于检测, 本实验选择绿色荧光蛋白 EGFP 为靶蛋白, 将靶基因 *egfp* 置于启动子  $P_{\text{lux1}}$  的控制之下, 同时插入核糖体结合序列 *rbs*。详细的构建过程参见 1.2.1。将重组质粒 pLPE 转入 *E. coli* Top10 感受态细胞, 挑取单菌落在 LB 液体培养基中过夜培养, 离心肉眼可见菌体呈现亮绿色(图 5A), 通过荧光显微镜可看到细胞发出的绿色荧光(图 5B)。

### 2.4 蛋白水平检验分子开关对靶基因表达控制

将分子开关“On”和“Off”元件设计在同一细胞中, 也即将两种质粒 pLPE 和 pAIIA 转入到同一个细胞, 构建重组菌 *E. coli* Top10 (pLPE/pAIIA)。将分子开关“On”和“Off”元件设计在不同细胞中, 也即将两种质粒 pLPE 和

pAIIA 分别转入到大肠杆菌 Top10, 混合培养 *E. coli* Top10 (pLPE) 和 *E. coli* Top10 (pAIIA)。*E. coli* Top10 (pLPE/pAIIA) 以及混菌分别接种

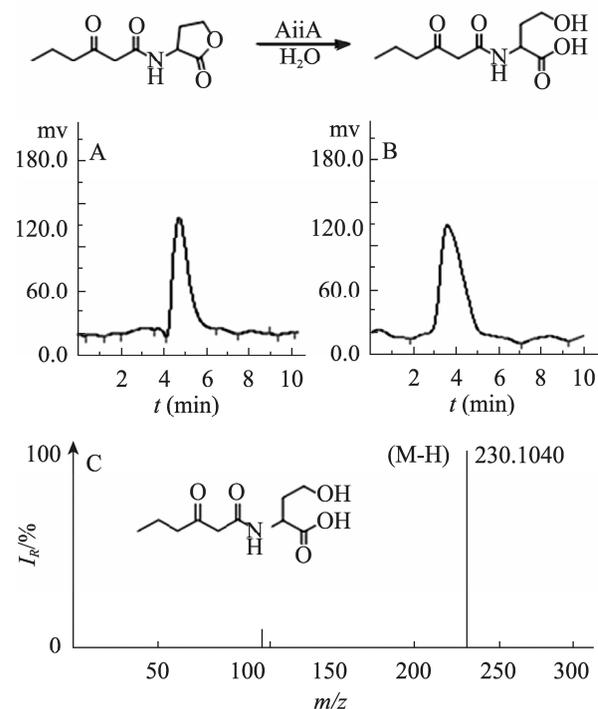


图4 AiiA 蛋白催化活力分析

Fig. 4 Analysis of AiiA protein catalytic activity. (A) HPLC analysis of AHL. (B) HPLC analysis of reaction product. (C) LC-MS analysis of reaction product.

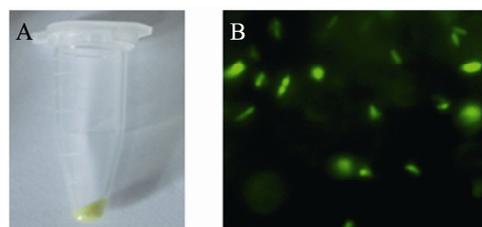


图5 重组菌株 *E. coli* Top10 (pLPE) 荧光检测

Fig. 5 Fluorescence detection of recombinant strain *E. coli* Top10 (pLPE). (A) Image of the centrifugal cells. (B) Image of the cells observed by fluorescence microscope.

到含有 30  $\mu\text{g/mL}$  氯霉素和 100  $\mu\text{g/mL}$  氨苄青霉素的 LB 液体培养基中, 过夜培养后, 按 0.2% 接种量加入到新鲜的 100 mL 含抗生素的 LB 培养基中。为了检验分子开关控制 EGFP 表达效果, 分别选择培养初期 (0 h)、对数生长中期 (5 h) 加入 1% L-阿拉伯糖诱导物启动 AHL 降解酶 AiiA 的表达, 以不添加任何诱导物的培养物为对照。定时取样, 测定细胞密度 ( $OD_{600}$ ), 绘制生长曲线。为准确比较细胞内靶蛋白 EGFP 的蛋白表达水平, 将每份样品都稀释到  $OD_{600}=0.2$ , 用多功能酶标仪测定荧光强度。每个样品测 3 组平

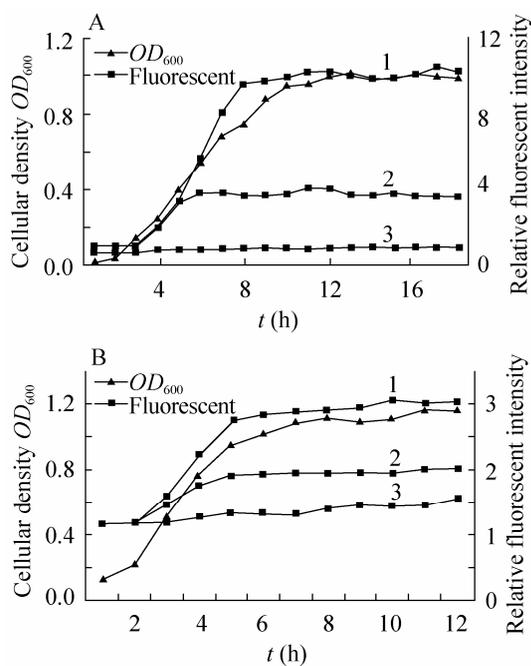


图 6 重组菌株在不同培养条件下的生长曲线及 EGFP 表达检测

Fig. 6 Growth curve and expressed EGFP fluorescence intensity testing of *E. coli* Top10 (pLPE/pAIIA) (A) and mixture culture of *E. coli* Top10 (pLPE) and *E. coli* Top10 (pAIIA) (B) under the different experimental conditions. 1: uninduced; 2: induced at 5 h; 3: induced at 0 h.

行, 计算平均值。图 6A 和图 6B 显示的分别是重组菌 *E. coli* Top10 (pLPE/pAIIA) 和混菌 (*E. coli* Top10 (pLPE) 和 *E. coli* Top10 (pAIIA)) 的细胞生长情况以及分子开关对 EGFP 表达的控制效果。

从图 6A 中可见, *E. coli* Top10 (pLPE/pAIIA) 培养过程中, 如果不添加诱导剂阿拉伯糖时, 分子开关一直处于“On”状态, EGFP 的蛋白表达水平与细胞的生产曲线呈正相关性。在细胞处于对数生长期时, EGFP 的表达也呈现快速增加, 细胞生长进入稳定期后, EGFP 的相对荧光强度不再增加, 维持在 10.5 左右。如果在细胞生长初期就加入诱导剂, 由于 AHL 降解酶 AiiA 的表达导致细胞在生长过程中合成的信号分子 AHL 被快速分解, EGFP 的表达在整个生长周期中处于非常低的水平, 此时分子开关处于“Off”状态。在细胞生长 5 h 后加入诱导物, 可以看到前 5 h, EGFP 的表达与细胞生产曲线呈正相关性, 此后尽管细胞继续生长进入对数生长后期以及稳定期, 但 EGFP 的相对荧光强度基本维持不变。由此可见靶基因的表达的开启与细胞的生长周期密切相关, 受群感应控制, 而一旦加入诱导物, 可以迅速灵敏地终止靶基因表达。

从图 6B 中可见, *E. coli* Top10 (pLPE) 和 *E. coli* Top10 (pAIIA) 混合培养时, 尽管 AiiA 的表达与靶基因的表达不在处于同一细胞, 然而只要启动 AiiA 的表达也可以快速关闭靶基因的表达, 这与信号分子 AHL 可以在细胞间自由扩散直接相关。

由此可见, 无论将分子开关中“On”元件、“Off”元件置于同一细胞亦或是不同细胞中, 只需通过控制加入诱导剂的时间, 可以实现线性

定量控制靶蛋白的表达水平。该分子开关具有便捷、灵敏、高效的特点。

## 2.5 mRNA 水平检验分子开关控制效果

以上结果是从蛋白质水平上评估分子开关调控目标蛋白表达的效果,为进一步研究该分子开关的调控效果,通过 RT-qPCR 技术检测分子开关中靶基因 *egfp* 的转录水平。

*E. coli* Top10 (pLPE/pAIIA) 在培养过程中,分别在 0 h 和 3 h 加入诱导物,以不加诱导物作为对照。在细胞培养过程的不同时间点 (2 h、3 h、3.2 h、3.4 h、3.6 h、4 h 和 10 h) 取样,稀释至相同浓度 ( $OD_{600}=0.1$ ) 后,提取 mRNA,检验无 DNA 污染后,通过 RT-qPCR 检查 *egfp* 基因的转录水平,选定大肠杆菌的 *rrsA* 基因为内参基因。图 7 显示的是 *egfp* 基因分别在不添加诱导物,以及 0 h 和 3 h 时添加诱导物后实时检测其 mRNA 水平的实验结果。由图可见,在细胞培养过程不诱导情况下,*egfp* 基因的相对转录水平在 2 h 到 4 h 之间不断提高,此时细胞处于对数生长期,合成代谢较旺盛,基因转录水平较高。10 h 时细胞处于生长稳定期,合成代谢降低,基因转录水平也相应降低。细胞生长初期 (0 h) 时加入诱导物, AiiA 开始表达,致使 AHL 信号分子浓度达不到与调控蛋白 LuxR 结合所需的阈值,所以 *egfp* 基因的相对转录水平维持在较低的本底水平。细胞培养 3 h 后诱导的情况下, *egfp* 基因的相对转录水平在 3.2 h 比在 3 h 有所提高,之后逐渐下降。因为刚加入诱导剂, AiiA 蛋白的表达需要经过转录和翻译过程,且此时合成的 AiiA 蛋白较少, AHL 信号分子的合成速度大于降解速度,所以加入诱导剂初期 *egfp* 基因的相对转录

水平依旧会有所提高。当细胞合成较多的 AiiA 蛋白,细胞中信号分子浓度降低,解除上调效应, *egfp* 基因的相对转录水平降低。上述实验结果表明分子开关对靶基因蛋白表达水平的控制是通过间接控制细胞中靶基因 mRNA 水平实现的。

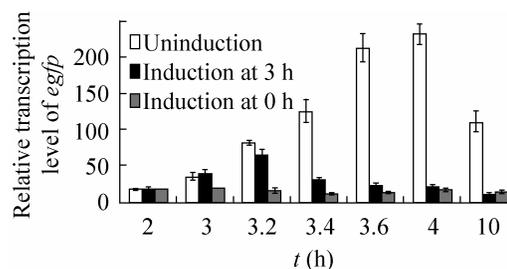


图 7 不同培养条件下 *egfp* 基因转录水平的检测

Fig. 7 Analysis of the transcriptional level of *egfp* under the different culture conditions.

## 3 结论

本实验基于细菌群落中普遍存在的群感效应的基本原理并结合酶催化的动力学特征构建了一种分子开关,并对该分子开关调控目的蛋白表达的效果进行了评估。通过细菌的群感效应启动靶基因表达,通过降解信号分子 AHL 的群感淬灭效应终止靶基因表达。不论将构成分子开关的“On”元件和“Off”元件设计在同一个细胞内,还是设计在独立的细胞中,分子开关都可以有效地调控目标蛋白的表达。只需通过控制加入诱导剂的时间,就可以实现线性定量控制靶蛋白的表达水平。该分子开关具有便捷、灵敏、高效的特点。本实验设计的分子开关有助于研究生物合成途径中关键酶不同的表达水平对该途径代谢节律,也可用于在细胞生长的特定阶段关闭靶基因的表达,从而关闭靶基因所处的代谢通路。

## REFERENCES

- [1] Liu G, Chater KF, Chandra G, et al. Molecular regulation of antibiotic biosynthesis in *Streptomyces*. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2013, 77(1): 112–143.
- [2] Handke P, Lynch SA, Gill RT. Application and engineering of fatty acid biosynthesis in *Escherichia coli* for advanced fuels and chemicals. *Metab Eng*, 2011, 13(1): 28–37.
- [3] Gosset G. Production of aromatic compounds in bacteria. *Curr Opin Biotechnol*, 2009, 20(6): 651–658.
- [4] Cho KW, Colepicolo P, Hastings JW. Autoinduction and aldehyde chain-length effects on the bioluminescent emission from the yellow protein associated with luciferase in *Vibrio fischeri* strain-Y-1B. *Photochem Photobiol*, 1989, 50(5): 671–677.
- [5] Lyell NL, Stabb EV. Symbiotic characterization of *Vibrio fischeri* ES114 mutants that display enhanced luminescence in culture. *Appl Environ Microbiol*, 2013, 79(7): 2480–2483.
- [6] Visick KL, Quirke KP, Mcewen SM. Arabinose induces pellicle formation by *Vibrio fischeri*. *Appl Environ Microbiol*, 2013, 79(6): 2069–2080.
- [7] Fuqua WC, Winans SC, Greenberg EP. Quorum sensing in bacteria: the LuxR-LuxI family of cell density-responsive transcriptional regulators. *J Bacteriol*, 1994, 176: 269–275.
- [8] Nealson KH, Hastings JW. Bacterial bioluminescence: its control and ecological significance. *Microbiol Rev*, 1979, 43: 496–518.
- [9] Eberl L, Winson MK, Sternberg C, et al. Involvement of N-acyl-L-homoserine lactone autoinducers in controlling the multicellular behaviour of *Serratia liquefaciens*. *Mol Microbiol*, 1996, 20: 127–136.
- [10] Pierson LS, Keppenne VD, Wood DW. Phenazine antibiotic biosynthesis in *Pseudomonas aureofaciens* 30-84 is regulated by PhzR in response to cell density. *J Bacteriol*, 1994, 176: 3966–3974.
- [11] Winzer K, Williams P. Quorum sensing and the regulation of virulence gene expression in pathogenic bacteria. *Int J Med Microbiol*, 2001, 291: 131–143.
- [12] Majerczyk C, Kinman L, Han T, et al. Virulence of *Burkholderia mallei* quorum-sensing mutants. *Infect Immun*, 2013, 81(5): 1471–1478.
- [13] Engebrecht J, Nealson K, Silverman M. Bacterial bioluminescence: isolation and genetic analysis of functions from *Vibrio fischeri*. *Cell*, 1983, 32: 773–781.
- [14] Engebrecht J, Silverman M. Identification of genes and gene products necessary for bacterial bioluminescence. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1984, 81: 4154–4158.
- [15] Jimenez PN, Koch G, Thompson JA, et al. The multiple signaling systems regulating virulence in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2012, 76(1): 46–65.
- [16] Dusane DH, Zinjarde SS, Venugopalan VP, et al. Quorum sensing: implications on rhamnolipid biosurfactant production. *Biotechnol Genet Eng Rev*, 2010, 27: 159–184.
- [17] Thoendel M, Horswill AR. Biosynthesis of peptide signals in gram-positive bacteria. *Adv Appl Microbiol*, 2010, 71: 91–112.
- [18] Novick RP, Geisinger E. Quorum sensing in *Staphylococci*. *Annu Rev Genet*, 2008, 42: 541–564.
- [19] George EA, Muir TW. Molecular mechanisms of agr quorum sensing in virulent *Staphylococci*. *Chembiochem*, 2007, 8(8): 847–855.
- [20] Tello E, Castellanos L, Duque C. Synthesis of cembranoid analogues and evaluation of their potential as quorum sensing inhibitors. *Bioorg Med Chem*, 2013, 21(1): 242–256.
- [21] Zhu P, Peng H, Ni N, et al. Novel AI-2 quorum sensing inhibitors in *Vibrio harveyi* identified through structure-based virtual screening. *Bioorg Med Chem Lett*, 2012, 22(20): 6413–6417.
- [22] Galloway WR, Hodgkinson JT, Bowden S, et al. Applications of small molecule activators and

- inhibitors of quorum sensing in Gram-negative bacteria. *Trends Microbiol*, 2012, 20(9): 449–458.
- [23] Dong YH, Xu JL, Li XZ, et al. AiiA, an enzyme that inactivates the acylhomoserine lactone quorum-sensing signal and attenuates the virulence of *Erwinia carotovora*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97: 3526–3531.
- [24] Dong YH, Gusti AR, Zhang Q, et al. Identification of quorum-quenching N-acyl homoserine lactonases from *Bacillus* species. *Appl Environ Microbiol*, 2002, 68(4): 1754–1759.
- [25] Sang JL, Park SY, Lee JJ, et al. Genes encoding the N-acyl homoserine thuringiensis lactone-degrading enzyme are widespread in many subspecies of *Bacillus thuringiensis*. *Appl Environ Microbiol*, 2002, 68(8): 3919–3924.
- [26] Amara N, Krom BP, Kaufmann GF, et al. Macromolecular inhibition of quorum sensing: enzymes, antibodies, and beyond. *Chem Rev*, 2011, 111(1): 195–208.
- [27] Ulrich RL. Quorum quenching: enzymatic disruption of N-acylhomoserine lactone-mediated bacterial communication in *Burkholderia thailandensis*. *Appl Environ Microbiol*, 2004, 70(10): 6173–6180.
- [28] Varga ZG, Szabó MA, Kerényi M, et al. Interference in quorum sensing signal transmission amongst microbial species. *Acta Microbiol Immunol Hung*, 2012, 59(4): 475–484.
- [29] Chen L, Yang L, Duan KM. Bacterial quorum sensing in an evolutionary perspective. *Here ditas*, 2012, 34(1): 33–40 (in Chinese).  
陈林, 杨亮, 段康民. 从进化谈细菌细胞间的群体感应信号传递. *遗传*, 2012, 34(1): 33–40.
- [30] You L, Cox RS, Weiss R, et al. Programmed population control by cell–cell communication and regulated killing. *Nature*, 2004, 428: 868–871.
- [31] Danino T, Palomino OM, Tsimring L, et al. A synchronized quorum of genetic clocks. *Nature*, 2009, 463: 326–330.
- [32] Zhou K, Zhou LH, Qing EL, et al. Novel reference genes for quantifying transcriptional responses of *Escherichia coli* to protein overexpression by quantitative PCR. *BMC Mol Biol*, 2011, 12: 18.

(本文责编 陈宏宇)