

青海弧菌 Q67 自体诱导物的检测及其对菌体发光的影响

叶姜瑜¹ 陈宇^{2*} 李书钺¹ 翟俊¹ 何强¹ 舒为群³

(1. 重庆大学城市建设与环境工程学院 重庆 400045)

(2. 西南大学生命科学学院 重庆 400715)

(3. 第三军医大学军事预防医学院 重庆 400038)

摘要: 青海弧菌 Q67 是一种我国新近确定的淡水发光细菌, 其发光强度随毒物浓度改变的特性使其可作为水质检测的指示菌株。利用生物检测菌株快速检测、 C_{18} 反相薄层层析和 β -半乳糖苷酶含量测定, 证实了该菌存在 LuxI-LuxR 型群体感应系统, 并产生 N-酰基高丝氨酸内酯类自诱导物。进一步的实验表明, 该信号分子活性随生长阶段有较大变化, 其粗提物不仅能调控菌体的生物发光, 对菌体生长繁殖也产生较大影响。

关键词: 青海弧菌, 群体感应, AHLs 类信号分子, 发光强度

Detection of autoinducer in *Vibrio qinghaiensis* sp. -Q67 and its effect on luminescence

YE Jiang-Yu¹ CHEN Yu^{2*} LI Shu-Yue¹ ZHAI Jun¹ HE Qiang¹ SHU Wei-Qun³

(1. College of City Construction and Environmental Engineering, Chongqing University, Chongqing 400045, China)

(2. College of Life Science, Southwest University, Chongqing 400715, China)

(3. School of Military Preventive Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: *Vibrio qinghaiensis* sp. -Q67 was a newly identified luminescent bacterium in fresh water, its character of luminous intensity changed with toxic pollutant concentrations made it as an strain for water quality monitoring. Through bioassay strain JZA1 test, C_{18} reverse phase thin-layer chromatography and LacZ activity test, it was identified that Q67 had a LuxI-LuxR type Quorum-Sensing and produced N-acyl-homoserine lactone (AHL) as autoinducer. The other test results indicated that the content and activity of the signal molecular in Q67 changed with its growth phases. The crude extract from Q67 affected not only its luminescence but also its growth and reproduction.

Keywords: *Vibrio qinghaiensis* sp. -Q67, Quorum-Sensing, AHLs, Luminous intensity

在环境监测中,利用发光细菌的发光强度检测水质毒性已经越来越广泛,其中应用最广泛的当属海洋发光细菌,如费氏弧菌 *Vibrio fischeri*。*V. fischeri* 产生 3-oxo-C6-HSL 信号分子,当信号分子浓度达到一定的阈值时,能启动菌体中发光系统 *luxCDABE* 基因的表达,发射可见荧光。这一调控系统被称为细菌的群体感应(Quorum-Sensing)系统,即 QS 系统^[1]。*V. fischeri* 的群体感应是 LuxI-LuxR 型 QS 系统^[2],即在低细胞密度时细菌积累 3-oxo-C6-HSL,扩散到胞外,当达到一定浓度时,3-oxo-C6-HSL 与 LuxR 蛋白结合, LuxR 蛋白构象发生改变,能识别 DNA 的 *lux* 框区域,启动发光基因的表达。3-oxo-C6-HSL 属于自诱导物 N-酰基高丝氨酸内酯(N-acyl-homoserine lactone, AHL)类信号分子,目前在很多革兰氏阴性细菌中都发现产生此类信号分子。

海洋发光菌生境中 NaCl 浓度较高,用于检测淡水水质急性毒性时需要添加 2% 的 NaCl,这对毒性测定会造成一定干扰。淡水发光菌则没有此类需求,因此逐渐受到大家的关注。青海弧菌 Q67 (*Vibrio qinghaiensis* sp. -Q67)是我国学者 20 世纪 90 年代才鉴定的淡水发光细菌^[3],可作为水质监测的指示菌^[4-5],并在汶川地震水质检测中得到了应用。不过,青海弧菌的发光机理和 QS 系统的研究等尚未深入报道,所以检测青海弧菌是否产生自诱导物,并对自诱导物的活性变化规律、对菌体发光和生长的影响等方面的研究非常有价值。

1 材料与方 法

1.1 供试菌株及其生长条件

青海弧菌 Q67,购于华东师范大学朱文杰教授,20 °C 培养。培养基配方(g/L):胰胨 5,酵母膏 5,甘油 3, MgCl₂ 3.2, KBr 0.2, CaSO₄ 0.1, NaCl 4, KCl 4, pH 9.0。AHL 检测菌株: *Agrobacterium tumefaciens* JZA1 [KYC55(pJZ372)(pJZ384)(pJZ410)],南京农业大学钟增涛教授、朱军教授惠赠,于 AT 培养基^[6]28 °C 培养,四环素 2 mg/L,壮观霉素 100 mg/L,庆大霉素 100 mg/L。 *Agrobacterium tumefaciens* R10,为 AHL 高表达菌株。

1.2 主要试剂与仪器

X-gal、ONPG (邻硝基苯-β-D-半乳糖苷)、四环素、壮观霉素、庆大霉素为 Sigma 产品;3-oxo-C6-HSL、3-oxo-C8-HSL 为 Fluka 产品;其它试剂均为分析纯;C₁₈ 反相薄层层析板购于 Merck 公司;RS9901 生物发光仪(上海容圣生物电子公司)。

1.3 信号分子的定性检测

1.3.1 上清制备:青海弧菌 Q67 过夜活化,然后转接培养至对数期,取 1 mL 菌液 10 000 r/min 离心 5 min,取上清液-20 °C 保存。

1.3.2 生物显影^[7]:JZA1 过夜活化后,接种至 50 mL AT 培养基中培养 24 h。配制 100 mL 固体培养基(琼脂含量 1.2%),冷却至 46 °C 时,将 50 mL JZA1 培养物倒入,混匀。加入 3 种抗生素和 20 μL X-gal,迅速倒入细菌培养板。A 孔加入 20 μL 青海弧菌 Q67 液体培养基, B 孔加入 20 μL R10 培养上清, C 孔加入 20 μL 青海弧菌 Q67 培养上清,28 °C 培养 12 h。

1.4 C₁₈ 反相薄层层析

1.4.1 AHLs 类信号分子粗提液的制备^[7-8]:青海弧菌 Q67 培养至 OD₆₀₀ 为 1.8-2.0,离心取上清,用等量酸化乙酸乙酯(含 0.5% 甲酸)提取 3 次,取有机相混合,蒸干溶剂,溶于一定量的甲醇中,-20 °C 保存。

1.4.2 TLC 检测^[9]:将 3-oxo-C6-HSL (75 g/L)、3-oxo-C8-HSL (75 g/L)和青海弧菌 Q67 的信号分子粗提液分别点样于 C₁₈ 反相薄层层析板(TLC)上,以 60% 的甲醇为流动相层析 2-3 h,风干后在层析板上铺一层含有 X-gal 和检测菌株 JZA1 的 AT 水琼脂培养基,培养 12 h 后观察层析板的颜色变化。

1.5 β-半乳糖苷酶含量测定^[7]

JZA1 培养至 OD₆₀₀ 0.4-0.6,用 LB 培养基按一定比例稀释,取 1 mL 分装于离心管中,加入 200 μL 青海弧菌 Q67 培养上清,过夜培养。在 5 mL 离心管中依次加入 0.8 mL Z-buffer、200 μL 过夜培养的菌液、1 滴 0.1% SDS、3 滴氯仿,剧烈振荡。然后加入 100 μL 4 g/L 的 ONPG 摇匀,待变黄加入 600 μL Na₂CO₃ (1 mol/L)终止反应,记变色时间。10 000 r/min 离心 5 min。测定上清的 OD₄₂₀ 和 OD₅₅₀,及 JZA1 菌液的 OD₆₀₀。

β -半乳糖苷酶含量计算公式:

$$IU = \frac{1000 \times (OD_{420} - 1.75 \times OD_{550})}{t \times v \times OD_{600}}$$

IU: 酶诱导单位, 1 IU 等于催化 1 μ mol ONPG 所需要的酶量;

t: 反应时间, min;

v: 细菌培养液体积, mL;

OD_{420} : 酶与 ONPG 反应产物的含量;

OD_{550} : 试验溶液中颗粒物含量, 通常接近零值;

OD_{600} : 试验用培养液中细菌含量。

1.6 菌体生长曲线、菌体发光曲线和 AHLs 类信号分子活性变化的测定

-80 °C 保存的青海弧菌 Q67 接种至新鲜培养基, 每 2 h 分别测定其 OD_{600} 、菌体发光值和 AHLs 类信号分子活性。菌体发光值(RLU)用 RS9901 生物发光仪测定, 每次测量取 1 mL 菌液, 10 倍增益。

1.7 信号分子粗提液对菌体生长和发光影响曲线的测定

将培养至对数期的青海弧菌 Q67 加入 150 mL 新鲜培养基中, 加入不同比例的青海弧菌 Q67 信号分子粗提液, 28 °C 摇床培养, 每 2 h 测 1 次 OD_{600} 和发光值(10 倍增益)。

2 结果分析

2.1 信号分子的检测结果

采用的一株针对 AHLs 类信号分子有高敏感性的检测菌株 JZA1, 为自体诱导物合成酶 *traI* 基因缺陷的根癌农杆菌, 其自身不能产生自体诱导物, 它的 *P_{traI}-lacZ* 完全依赖于外源自体诱导物诱导表达。LacZ 与显色底物 X-gal 反应变蓝, 通过对 LacZ 酶活的测定反映外源 AHL 活性的高低。

加入青海弧菌 Q67 培养上清的 JZA1 水琼脂培养物过夜培养后显蓝色(图 1), 说明青海弧菌 Q67 在培养过程中产生了 AHLs 类群体感应信号分子。

AHL 分子的典型特征是含有高丝氨酸内酯环和一个酰胺链, 酰胺链中的碳原子数(从 4 到 18 个, 多为偶数, 奇数只有 7)和第 3 位上取代基(氢、羟基和羰基)决定了该类信号分子对细菌的不同调控功能^[10]。结构不同的 AHLs 类信号分子在以 60%甲醇

为流动相的 C_{18} 反相薄层层析板上的迁移率不同, 迁移率主要取决于酰胺链中碳原子的多少。碳原子数越多, 迁移率越小; 碳原子数越少, 迁移率越大。TLC 结果如图 2 所示, 1 和 2 分别为标准品 3-oxo-C6-HSL 和 3-oxo-C8-HSL, 3 为青海弧菌 Q67 的 AHLs 信号分子粗提液。可以看出青海弧菌 Q67 层析出现两团比较集中的显色斑。说明可能合成 2 种不同的 AHLs 类信号分子。迁移率较大的活性较强, 迁移率与标准品 3-oxo-C6-HSL 几乎相同, 说明其酰胺链中可能含有 6 个碳原子。



图 1 AT 水琼脂固体生物显色

Fig. 1 AT medium agar bioassay

Note: A: Medium of Q67 (Negative control); B: R10 (Positive control); C: Q67.



图 2 不同 AHLs 的 TLC 层析分析

Fig. 2 TLC analysis of AHLs

Note: 1: 3-oxo-C6-HSL; 2: 3-oxo-C8-HSL; 3: Q67.

2.2 信号分子含量与细菌生长和发光的关系

由于 β -半乳糖苷酶含量可以间接反映外源 AHLs 类信号分子活性的高低, 所以结合图 3 和图 4 可以看出, AHLs 类信号分子慢慢积累, 8 h 以后开始启动发光系统。随着细菌密度的增大, AHLs 活性增大, 20 h 后 AHLs 活性达到最大值, 22 h 以后细菌生长达到稳定期, 并在稳定期时 AHLs 活性开始下降, 衰亡期检测不到 AHLs 活性(图中未显示)。

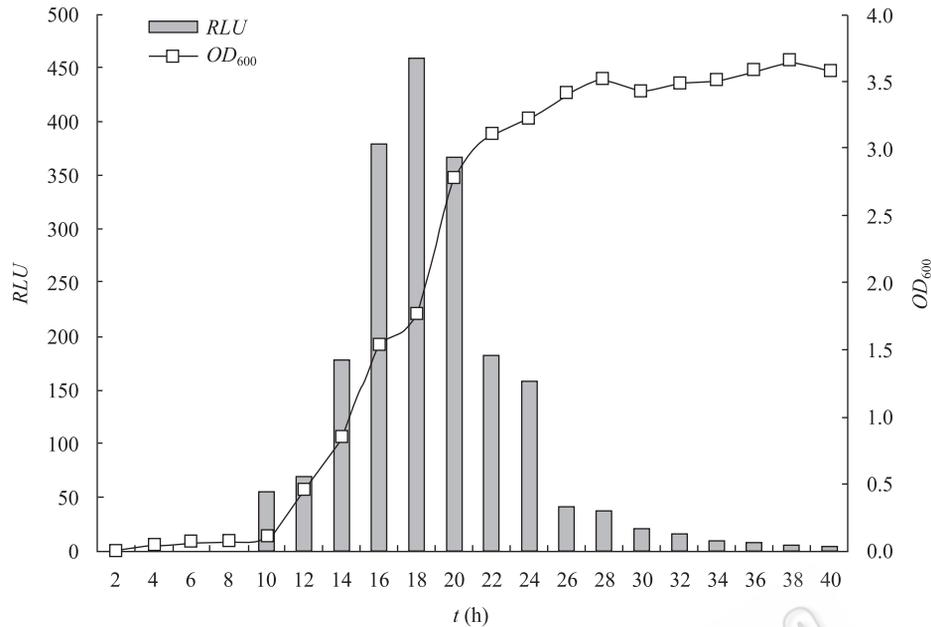


图3 青海弧菌 Q67 的生长曲线和发光变化曲线

Fig. 3 Growth curve and Q67 suspension luminescence vs. time

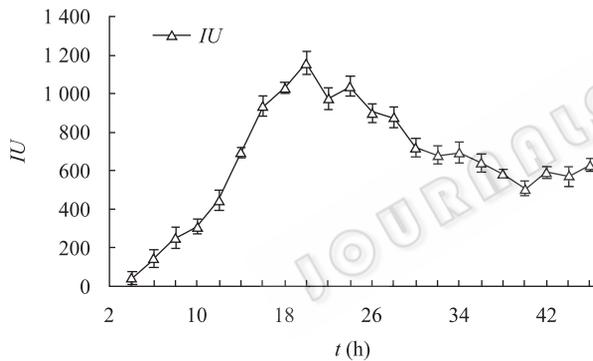


图4 青海弧菌 Q67 上清液中 AHL 的活性变化

Fig. 4 AHL activity curve of Q67

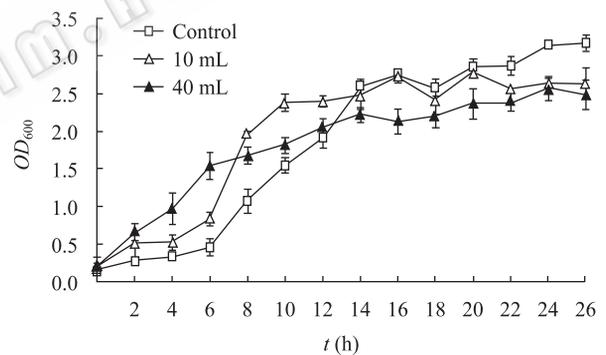


图5 AHLs 提取液对青海弧菌 Q67 生长的影响

Fig. 5 Effect of AHLs from Q67 on Growth

2.3 信号分子粗提液对菌体生长的影响

对照组不加青海弧菌 Q67 的 AHLs 粗提液, A 组加入从 10 mL 青海弧菌菌液中提取的 AHLs, B 组加入从 40 mL 青海弧菌菌液中提取的 AHLs。如图 5 所示, 添加 AHLs 提取液后青海弧菌 Q67 的生长速度加快, 提前进入对数生长期, 并且 AHLs 的浓度越大, 生长也越快, 到达生长稳定期时细菌的密度没有对照组密度大。原因可能是由于外加的信号分子被细菌误认为是自己产生的, 信号分子浓度达到一定值后, 细菌通过某种感知系统确定周围的细菌

密度已经很大, 食物竞争压力变大等, 从而对自身生长代谢进行调控, 抑制自身生长繁殖。

2.4 信号分子粗提液对菌体发光的影响

如图 6 所示, 3 组的发光曲线跟生长曲线类似, 在前几个小时, 加入青海弧菌 Q67 的 AHLs 粗提液的青海弧菌 Q67 培养液发光迅速增强, 但是在达不到正常菌液发光值最高点时就已经开始减弱。说明青海弧菌 Q67 的群体感应 AHLs 类信号分子调控该菌的发光起始和最大发光强度, 但是不能解释发光为什么会迅速减弱, 是否跟 AHLs 的调控有关有待进一步探究。

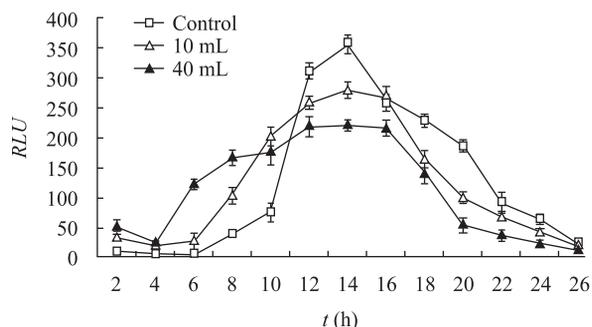


图 6 AHL 提取液对菌体发光的影响

Fig. 6 Effect of AHL from Q67 supernatant on luminescence

3 讨论

青海弧菌 Q67 是淡水发光菌一新种, 对其研究还比较少。首次证明了青海弧菌 Q67 产生了 AHLs 类信号分子, 说明其可能拥有 LuxI-LuxR 型 QS 系统。对其发光机制的深入了解可为如何提高发光强度、延长发光稳定期等提供理论依据和支撑, 充分发挥青海弧菌 Q67 在检测水质毒性方面的应用潜能。近年来, 细菌群体感应系统调节细菌的多种功能被研究, 如根瘤菌与植物共生、蓝细菌中异形胞的分化、芽胞杆菌中感受态与芽胞的形成、根癌农杆菌中 Ti 质粒融合转移、病原细菌胞外酶与毒素产生、生物膜形成、菌体发光、色素产生、抗生素形成、细菌运动等^[11-15]。信号分子可以调节类球红细菌饥饿状态下对碳源的利用, 使细菌增长出现小峰值^[16], 但是还未有报道过群体感应系统调节碳源充足时细菌的生长繁殖。信号分子粗提液可以影响青海弧菌 Q67 的生长繁殖和发光, 其群体感应系统启动了青海弧菌 Q67 的发光系统。实验所用的青海弧菌 Q67 的 AHLs 提取液为粗提物, 除了 AHLs 类信号分子外还可能存在着其它物质影响该菌的生长和生物发光, 需要进一步研究。如提纯信号分子, 或者用分子生物学的方法敲除信号分子合成酶基因等等。另外, 该菌后期发光值减小、信号分子活性减少甚至完全消失的机理有待探讨, 这些对研究青海弧菌 Q67 生物发光和生长衰亡都有一定价值。

参考文献

[1] Waters CM, Bassler BL. Quorum sensing: cell-to-cell

communication in bacteria[J]. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2005 (21): 319-346.

[2] Fuqua WC, Winans SC, Greenberg EP. Quorum sensing in bacteria: the LuxR-LuxI family of cell density-responsive transcriptional regulators[J]. *J Bacteriol*, 1994, 176(2): 269-275.

[3] 朱文杰, 汪杰, 陈晓耘, 等. 发光细菌一新种—青海弧菌[J]. *海洋与湖沼*, 1994, 25(3): 273-279.

[4] 刘清, 马梅, 童中华. Cu, Zn, Cd, Hg 对青海弧菌(Q67 菌株)联合毒性作用的研究[J]. 1997, 17(4): 301-303.

[5] 周世明, 赵清, 舒为群. 青海弧菌 Q67 新鲜培养菌液测试水中砷铬铅镉汞的急性毒性[J]. *预防医学情报杂志*, 2008, 24(6): 403-406.

[6] Ravn L, Christensen AB, Molin S, et al. Methods for detecting acylated homoserine lactones produced by gram-negative bacteria and their application in studies of AHL-production kinetics[J]. *Journal of Microbiological Methods*, 2001, 44(3): 239-251.

[7] Zhu J, Chai Y R, Zhong Z T, et al. Agrobacterium bioassay strain for ultrasensitive detection of N-acylhomoserine lactone-type quorum-sensing molecules: detection of autoinducers in *Mesorhizobium huakuii*[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2003, 69(11): 6949-6953.

[8] 钟增涛, 周晶, 李路, 等. 利用高效检测菌株对中慢生根瘤菌及红壤中自体诱导物的检测[J]. *土壤*, 2005, 37(1): 62-64.

[9] Shaw PD, Ping G, Daly SL, et al. Detecting and characterizing N-acyl-homoserine lactone signal molecules by thin-layer chromatography[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, 94(12): 6036-6041.

[10] Miller MB, Bassler BL. Quorum sensing in bacteria[J]. *Annu Rev Microbiol*, 2001, 55: 165-199.

[11] Milton DL. Quorum sensing in vibrios: complexity for diversification[J]. *International Journal of Medical Microbiology*, 2006, 296(2/3): 61-71.

[12] Smith RS, Iglewski BH. *P. aeruginosa* quorum-sensing systems and virulence[J]. *Current Opinion in Microbiology*, 2003, 6(1): 56-60.

[13] Spoering AL, Gilmore MS. Quorum sensing and DNA release in bacterial biofilms[J]. *Current Opinion in Microbiology*, 2006, 9(2): 133-137.

[14] Parent ME, Snyder C, Kopp ND, et al. Localized quorum sensing in *Vibrio fischeri*[J]. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2008, 62(2): 180-187.

[15] Daniels R, Vanderleyden J, Michiels J. Quorum sensing and swarming migration in bacteria[J]. *FEMS Microbiology Reviews*, 2004, 28(3): 261-289.

[16] 叶姜瑜, 李文娟, 张英, 等. 信号分子对类球红细菌 (*Rhodobacter sphaeroides*) 碳源利用的影响[J]. *生态环境*, 2008, 17(5): 1991-1995.