

研究报告

## 高产信号分子 AI-2 乳酸菌的筛选及其 *Pfs* 基因的克隆和表达

顾悦 廉雪花 吴荣 田建军 杨军 贺银凤\*

(内蒙古农业大学食品科学与工程学院 内蒙古 呼和浩特 010018)

**摘要:**【目的】从锡盟地区酸马奶酒分离的乳酸菌中筛选出高产信号分子自体诱导物 2 (Autoinducer-2, AI-2)的乳酸菌,通过优化其重组蛋白 *Pfs* 的诱导条件体外合成信号分子 AI-2。【方法】利用生物学发光法对不同乳酸菌产信号分子 AI-2 的产量进行比较,以高产信号分子 AI-2 乳酸菌基因组 DNA 为模板,扩增其 S-腺苷高半胱氨酸核苷酶(S-adenosylhomocysteine nucleosidase, *Pfs*)基因,构建原核表达载体。利用异丙基- $\beta$ -D-硫代吡喃半乳糖苷(IPTG)进行重组蛋白的诱导表达,通过优化培养基、诱导温度、诱导前菌体密度、IPTG 浓度以及诱导时间得到高表达的 *Pfs* 蛋白,使其与底物作用最终体外合成信号分子 AI-2。【结果】10 株乳酸菌均可产信号分子 AI-2,其中屎肠球菌 8-3 分泌信号分子 AI-2 的产量明显高于其他菌株;重组蛋白的最佳诱导条件为:选取 SOC (Super optimal broth with catabolite repression)作为诱导表达培养基,菌液  $OD_{600}$  为 0.5–0.7 时加入终浓度为 0.1 mmol/L 的 IPTG, 37 °C 诱导 12 h; 利用最优诱导条件获得了浓度为 4.08 g/L 的纯化 *Pfs* 蛋白,体外合成了信号分子 AI-2。【结论】酸马奶酒中分离出的 10 株乳酸菌均可产生信号分子 AI-2,且屎肠球菌 8-3 可通过 *Pfs* 基因的作用生成信号分子 AI-2。

**关键词:** 乳酸菌, 信号分子 AI-2, S-腺苷高半胱氨酸核苷酶(*Pfs*), 诱导表达, 重组蛋白

## Screening lactic acid bacteria with high production of AI-2 and cloning and expression of the *Pfs* gene

GU Yue LIAN Xue-Hua WU Rong TIAN Jian-Jun YANG Jun HE Yin-Feng\*

(College of Food Science and Engineering, Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot, Inner Mongolia 010018, China)

**Abstract:** [Objective] The study in order to screen the strain with high yield of autoinducer-2 (AI-2) of lactic acid bacteria strains which isolated from koumiss of Ximeng region in Inner Mongolia, and optimize the condition of recombinant protein to synthesize signal molecule AI-2 *in vitro*. [Methods] Using biological luminescence method to compare the contents of signal molecule AI-2 which produced by different lactic acid bacteria, with high production of signal molecule AI-2 lactic acid bacteria genomic DNA as a template, expanded its S-adenosine homocysteine nucleoside enzyme

**Foundation item:** National Natural Science Foundation of China (No. 31360396); Graduate Research and Innovation Foundation of Inner Mongolia (No. B20151012908Z)

\*Corresponding author: Tel: 86-471-4309231; E-mail: heyinf6468@163.com

Received: June 24, 2016; Accepted: August 30, 2016; Published online (www.cnki.net): September 20, 2016

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 31360396); 内蒙古自治区研究生科研创新项目(No. B20151012908Z)

\*通讯作者: Tel: 86-471-4309231; E-mail: heyinf6468@163.com

收稿日期: 2016-06-24; 接受日期: 2016-08-30; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2016-09-20

(*Pfs*) gene to build the prokaryotic expression vector. Isopropyl  $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) was used to induce expression of recombinant proteins. The culture medium, induction temperature, the density of bacteria, IPTG concentration and inducing time were optimized to get the high expression of *Pfs* protein, and finally synthesized signal molecule AI-2 *in vitro*. [Results] Ten strains of lactic acid bacteria could produce AI-2, and the relative luminescence intensity of AI-2 secreted by *Enterococcus faecium* 8-3 was obviously higher than other strains. The optimal inducing condition of the recombinant protein was as follows: when the  $OD_{600}$  was 0.5–0.7, using SOC medium as the induction medium, the induction were initiated with 0.1 mmol/L IPTG at 37 °C for 12 h; The optimal inducing condition was used to induce the target protein and obtained the purified *Pfs* protein with the concentration of 4.08 g/L, and successfully synthesized AI-2 *in vitro*. [Conclusion] The strains of ten lactic acid bacteria isolated from Koumiss could produce AI-2 and the signal molecule AI-2 of *Enterococcus faecium* 8-3 could be synthesized by *Pfs* gene.

**Keywords:** Lactic acid bacteria, Signal molecules AI-2, S-adenosylhomocysteine nucleosidase (*Pfs*), Induced expression, Recombinant protein

群体感应(Quorum sensing, QS)是细菌通过小分子物质进行信息交流、感知菌体密度,进而调控目的基因表达的一种机制<sup>[1-2]</sup>。群体感应现象可以调控抗生素和胞外酶的产生、生物膜形成、质粒转运、菌体抗药性等过程<sup>[3-4]</sup>。其中, *LuxS*/AI-2 群体感应系统存在于革兰氏阳性菌和阴性菌中,它们分泌的信号分子 AI-2 结构相似,而且具有一定的保守性,是介导种间交流的一类信号分子<sup>[5-8]</sup>。近几年的研究发现,在不同乳酸菌种间以及乳酸菌种内存在着群体感应现象。分离自发酵泡菜中的优势菌种乳酸杆菌、魏斯氏菌和明串珠菌可以产信号分子 AI-2,并且这些菌株在未分离时可以产更多的信号分子 AI-2<sup>[9]</sup>。同时,酸马奶酒分离出的部分乳酸菌也可以产信号分子 AI-2<sup>[10]</sup>,并且乳酸菌在与酵母菌共培养的过程中许多生理性状都受群体感应系统的调控<sup>[11-12]</sup>。在粪肠球菌 V583 培养过程中孵育过量的信号分子 AI-2 对其生长速率无明显影响,但与翻译、代谢、能量产生等 15 个相关蛋白的表达量下降,而且促进了生物膜的形成<sup>[13]</sup>。对植物乳杆菌 KLDS1.0391 添加外源信号分子 AI-2 的研究中也发现,外源信号分子 AI-2 对菌体生长速率无明显影响,但菌体细菌素产量增加,并且不同添加量对细菌素的促进作用也不相同<sup>[14]</sup>。

目前发现,所有产生信号分子 AI-2 的细菌都

具有相同的合成信号分子 AI-2 的途径,即 S-腺苷甲硫氨酸(S-adenosylmethionine, SAM)代谢过程。S-腺苷甲硫氨酸作为一种甲基的供体脱去甲基后生成 S-腺苷高半胱氨酸(S-adenosylhomocysteine, SAH)。SAH 经 *Pfs* 蛋白催化生成 S-核糖高半胱氨酸(S-ribosylhomocysteine, SRH)和腺嘌呤, S-核糖高半胱氨酸再经 S-核糖高半胱氨酸裂解酶(S-ribosylhomocysteine lyase, *LuxS*)蛋白催化生成 4,5-二羟基-2,3-戊二酮(4,5-Dihydroxy-2,3-pentanedione, DPD)和高半胱氨酸(Homocysteine, HCY)。DPD 不稳定,可以通过自身的分子重排形成信号分子 AI-2<sup>[15-16]</sup>。目前因为商品化的信号分子 AI-2 在国内比较缺乏,且本身存在易降解的特性,无法从细菌的代谢产物中分离出来,所以利用分子生物学手段表达信号分子 AI-2 合成的相关蛋白对信号分子 AI-2 的前体物质 DPD 进行合成。有研究通过扩增 *Escherichia coli* MG1655 的 *LuxS* 基因和 *Pfs* 基因,并构建原核表达载体表达蛋白最终体外合成了 AI-2<sup>[17-18]</sup>。这说明 *Pfs* 蛋白可以外源表达,并具有其原有的生物活性。

实验选取分离自锡盟地区酸马奶酒中的 10 株乳酸菌,通过生物学手段,利用哈维氏弧菌(*Vibrio harveyi*) BB170 检测具有生物活性的信号分子 AI-2 的产生。同时,对高产信号分子 AI-2 乳酸菌

的 *Pfs* 基因进行克隆,构建原核表达载体,利用大肠杆菌原核表达系统表达 *Pfs* 蛋白并进行诱导条件的优化,最终体外合成信号分子 AI-2,为进一步研究添加外源信号分子 AI-2 对乳酸菌生理功能的调节作用奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌株、主要试剂和仪器

分离自酸马奶酒中的粪肠球菌 1-1、1-3、4-3-2,屎肠球菌 8-3、5-2-1,植物乳杆菌 6-1-1,干酪乳杆菌 5-1-1、10-3-3,嗜酸乳杆菌 9-2-2,发酵乳杆菌 2-1,均为本实验室保藏;*V. harveyi* BB170 购自 ATCC;大肠杆菌 Trans1-T1 和 BL21(DE3)感受态细胞及原核表达载体 pEASY Blunt E1 购自北京全式金生物技术有限公司。

琼脂糖凝胶回收和质粒小提试剂盒, Axygen 公司;蛋白 Marker, 全式金生物技术有限公司;SDS-PAGE 凝胶制备试剂盒, Solarbio 公司;Premix Taq, 宝生物工程有限公司;异丙基硫代半乳糖苷 (Isopropyl  $\beta$ -D-thiogalactopyranoside, IPTG)、氨苄青霉素 (Ampicillin, Amp) 和溶菌酶 (酶活力 > 20 000 U/mg), eBio-top 公司。

THZ-98A 型恒温振荡器, 上海一恒科学仪器有限公司;凝胶成像系统、水平电泳仪和蛋白质电泳仪, 美国 Bio-Rad 公司;T6 新悦可见分光光度计, 北京普析通用仪器有限责任公司;高速冷冻离心机, Eppendorf 公司;Scientific Multiskan FC 酶标仪, 美国 Thermo 公司。

### 1.2 高产信号分子 AI-2 乳酸菌的筛选

**1.2.1 乳酸菌无菌上清液的制备:**将培养至对数期的乳酸菌按 1%接种量接入新鲜的 MRS 培养基<sup>[19]</sup>中, 37 °C、100 r/min 继续培养 19 h, 菌液 6 000 r/min 离心 20 min 弃去菌泥, 上清液用 0.22  $\mu$ m 滤菌器过滤除菌;将 *V. harveyi* BB170 接种于 AB 培养基<sup>[20]</sup>, 30 °C、100 r/min 振荡培养 16 h, 用相同方法收集无菌上清液作为阳性对照;用 0.22  $\mu$ m 滤菌器分别过滤 MRS 培养基和 AB 培养基作为介质对

照和阴性对照。滤液-20 °C 保存。

**1.2.2 生物学方法检测信号分子 AI-2:**将 *V. harveyi* BB170 接种于 AB 培养基, 30 °C、100 r/min 振荡培养至  $OD_{600}$  为 0.7–1.2, 菌液用新鲜 AB 培养基以 1:5 000 比例稀释, 振荡混匀, 将乳酸菌无菌上清液及阳性、阴性、介质对照与稀释后的 *V. harveyi* BB170 菌液按体积比 1:99 进行混合, 30 °C 继续振荡培养。0–6 h 内每 30 min 取 200  $\mu$ L/孔至 96 孔酶标板测定其荧光强度。

0–6 h 内以阴性对照荧光强度达到最小值时的时间点为基准, 计算相对荧光强度, 公式如下<sup>[21]</sup>:

阳性对照相对荧光强度=阳性对照的荧光强度值/阴性对照的荧光强度值;

待测样品相对荧光强度=待测样品的荧光强度值/介质对照的荧光强度值。

### 1.3 高产信号分子 AI-2 乳酸菌 *Pfs* 基因的克隆与表达

**1.3.1 原核表达载体的构建:**以屎肠球菌 8-3 的基因组 DNA 为模板, 进行 *Pfs* 基因的 PCR 扩增, 引物序列为 F 5'-ATGAAAATCGGTATTATCGGC-3'; R: 5'-TTATACGAGATGTTTGACAAATTCG-3'。PCR 反应体系(25  $\mu$ L)为: Premix Taq 12.5  $\mu$ L, ddH<sub>2</sub>O 8.5  $\mu$ L, 上、下游引物(10  $\mu$ mol/L)各 1  $\mu$ L, 模板 2  $\mu$ L。PCR 反应条件: 95 °C 4 min; 95 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 1 min, 30 个循环; 72 °C 7 min。PCR 产物经 1%琼脂糖凝胶电泳检测, 采用琼脂糖凝胶回收 DNA 试剂盒回收纯化目的片段。将得到的 *Pfs* 基因片段与表达载体 pEASY Blunt E1 进行连接后转化入 Trans1-T1 感受态细胞, 在含有 100 mg/L Amp 的 LB 固体培养基<sup>[22]</sup>上 37 °C 培养过夜, 挑取阳性克隆菌落进行菌落 PCR 鉴定。将鉴定正确的阳性克隆菌液送至生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序。

取测序成功的菌液进行质粒的提取, 将构建到原核表达载体 pEASY-Blunt E1 的 *Pfs* 基因的重组质粒转化入表达感受态细胞中, 在含有 100 mg/L Amp 的 LB 固体培养基上挑取阳性克隆菌落, 于含

有 100 mg/L Amp 的 LB 液体培养基中 37 °C、200 r/min 培养 6 h 后甘油保存。

**1.3.2 最佳诱导条件的确定:** (1) 诱导培养基的确定。含有重组质粒 pEASY Blunt E1-Pfs 的 BL21(DE3)菌液分别接种于 LB、2YT、SOC、SOB、TB、M9 培养基<sup>[22]</sup>(含 100 mg/L Amp)中培养至  $OD_{600}$  为 0.5–0.7, 加入终浓度为 1 mmol/L 的 IPTG 进行重组蛋白的诱导表达, 200 r/min 诱导 6 h, 菌体漂洗重悬后进行 SDS-PAGE 分析。

(2) 诱导温度的确定。将 BL21(DE3)菌液接种于 SOC 培养基(含 100 mg/L Amp)中培养至  $OD_{600}$  为 0.5–0.7, 加入终浓度为 1 mmol/L 的 IPTG 进行重组蛋白的诱导表达, 分别置于 25、30、37 °C 诱导。

(3) 诱导前菌体密度的确定。将 BL21(DE3)菌液接种于 SOC 培养基(含 100 mg/L Amp)中培养至  $OD_{600}$  分别为 0.3、0.5、0.7、0.9、1.1, 加入终浓度为 1 mmol/L 的 IPTG 进行重组蛋白的诱导。

(4) 诱导剂 IPTG 浓度的确定。将 BL21(DE3)菌液接种于 SOC 培养基(含 100 mg/L Amp)中培养至  $OD_{600}$  为 0.5–0.7, 加入终浓度分别为 0、0.10、0.25、0.50、0.75、1.00 mmol/L 的 IPTG 进行重组蛋白的诱导表达。

(5) 诱导时间的确定。将 BL21(DE3)菌液接种于 SOC 培养基(含 100 mg/L Amp)培养至  $OD_{600}$  为 0.5–0.7, 加入终浓度为 0.1 mmol/L 的 IPTG 进行重组蛋白的诱导表达, 37 °C、200 r/min 分别诱导 4、6、8、10、12 h, 菌体漂洗重悬后进行 SDS-PAGE 分析。

**1.3.3 重组蛋白存在形式的检测:** 在最优诱导条件下对重组质粒进行诱导, 6 000 r/min 离心 10 min 收集菌体, 用 PBS 缓冲液<sup>[23]</sup>漂洗菌体 2 次, 将菌体重悬于 PBS 中, 加入溶菌酶(终浓度为 1 g/L)和苯甲基磺酰氟(Phenylmethanesulfonyl fluoride, PMSF, 终浓度为 1 mmol/L), 冰上超声波破碎细胞, 4 °C、12 000 r/min 离心 20 min, 分别收集上清和沉淀, 沉淀用 PBS 缓冲液漂洗 2 次后重悬于

PBS 中, 将上清和沉淀进行 SDS-PAGE 分析。

**1.3.4 体外合成信号分子 AI-2:** 采用 Ni 柱对优化诱导的重组蛋白 Pfs 进行纯化, 利用超滤管对蛋白进行浓缩, 浓缩蛋白采用 BCA 试剂盒测定其浓度。同时, 按上述方法得到纯化的 LuxS 蛋白。将 1 g/L 的 Pfs 蛋白和 LuxS 蛋白与 1 mmol/L SAH 在 10 mmol/L 的磷酸钠缓冲液(pH 7.5)中 37 °C 作用 1 h, 反应液用超滤管去除未反应的蛋白。埃尔曼试剂法测定其浓度, 生物学方法检测其荧光强度<sup>[14]</sup>。

## 2 结果与分析

### 2.1 高产信号分子 AI-2 乳酸菌的筛选

信号分子 AI-2 活性实验是基于它的保守性, 不同细菌产生的信号分子 AI-2 都能被报告菌株 *V. harvey* BB170 识别, 诱导其荧光酶基因的表达, 从而产生发光反应<sup>[24–26]</sup>。由图 1 可知, 在 0–3 h 内, 阳性对照、阴性对照、介质对照的荧光强度均随着时间的延长而不断下降; 随后, 介质对照和阴性对照荧光强度值继续下降, 并且阴性对照在 4 h 时荧光强度达到最低, 之后开始升高, 由于阴性对照中只有稀释后的指示菌 *V. harveyi* BB170, 表明当培养时间达到 4 h 时, 指示菌产生的信号分子 AI-2 浓度达到诱导其发光的时间阈值。因此, 以 4 h 时的荧光强度值为基准计算相对荧光强度, 表示信号分子 AI-2 活性。

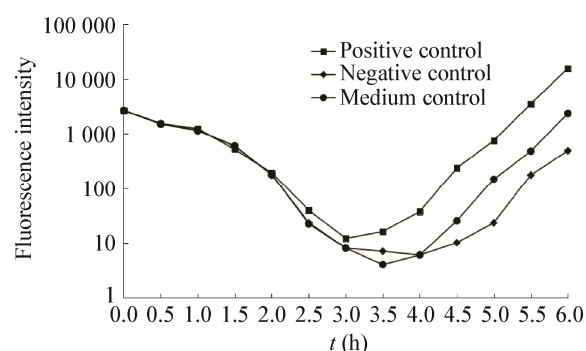


图 1 各样品不同培养时间的荧光强度  
Figure 1 The fluorescence of different incubation time of samples

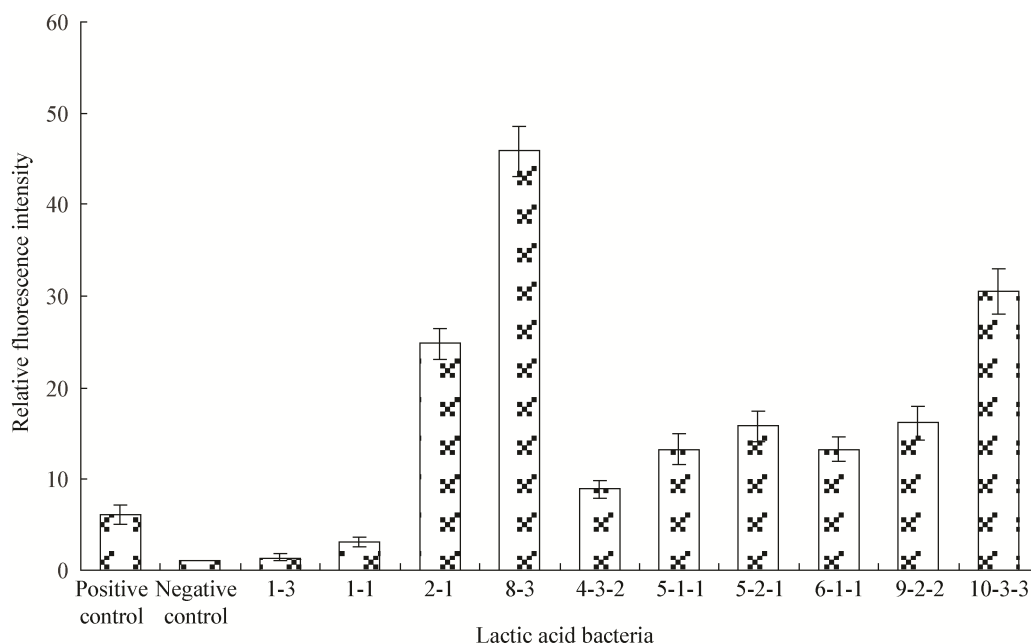


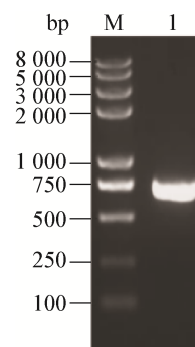
图2 乳酸菌培养 19 h 上清液相对荧光强度

Figure 2 Relative fluorescence intensity of different lactic acid bacteria cell free supernatant in culture 19 h

研究显示,乳酸菌产信号分子 AI-2 都在对数末期或者稳定期初期,因此实验中选择培养 19 h 时测定不同乳酸菌产信号分子 AI-2 的荧光强度<sup>[27-28]</sup>。由图 2 可知,10 株乳酸菌的相对荧光强度均大于阴性对照,说明 10 株乳酸菌全部可以产信号分子 AI-2,其中屎肠球菌 8-3 的相对荧光强度明显高于其它几株,因此选取菌株 8-3 用于后续实验。

## 2.2 *Pfs* 基因的克隆

为了进一步研究乳酸菌群体感应系统,对屎肠球菌 8-3 的 *Pfs* 基因进行克隆,PCR 扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳,扩增的基因片段大小约为 750 bp,见图 3。构建重组质粒 pEASY Blunt E1-*Pfs*,经含有 100 mg/L Amp 的 LB 抗性平板筛选,挑取阳性克隆菌落进行菌落 PCR 验证,克隆鉴定结果见图 4。选取 PCR 鉴定正确的阳性克隆进行测序,测序结果显示连接后阳性率比较高,且经氨基酸序列比对分析,屎肠球菌 8-3 的 *Pfs* 蛋白氨基酸序列与屎肠球菌 AUS0085 中 *Pfs* 蛋白氨基酸序列的相似性高达 100%,进而说明重组质粒构建正确。

图3 *Pfs* 基因的 PCR 扩增结果Figure 3 PCR production of *Pfs* gene

注: M: Marker; 1: *Pfs* 基因扩增产物。

Note: M: Marker; 1: PCR products of *Pfs* gene.

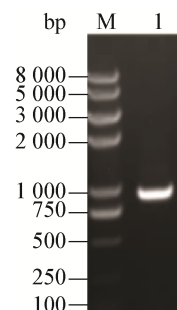


图4 菌落 PCR 鉴定阳性克隆

Figure 4 Colony PCR identification of positive clones

注: M: Marker; 1: 阳性克隆 PCR 结果。

Note: M: Marker; 1: PCR products of positive clones.

### 2.3 诱导条件的优化

为了进一步提高重组蛋白 *Pfs* 的表达量,实验从诱导培养基、诱导温度、诱导前菌体密度、诱导剂 IPTG 浓度以及诱导时间 5 个方面进行优化。

**2.3.1 重组蛋白诱导培养基的确定:** 将含有重组质粒的菌液分别接入不同培养基中,SDS-PAGE 分析结果如图 5 所示,重组蛋白在 SOC 培养基中诱导时有明显的诱导条带,重组蛋白大小约为 26 kD,在 30 kD 左右处有明显条带,其余 5 种培养基未见明显的诱导条带,可能是由于 SOC 中含有的少量葡萄糖提高了重组蛋白的表达量。所以,实验选取 SOC 培养基作为诱导培养基。

**2.3.2 重组蛋白诱导温度的确定:** 对重组蛋白进行不同温度下的诱导,结果如图 6 所示,重组蛋白在 25、30、37 °C 下均有表达,其中 37 °C 条件下诱导表达量明显高于 25 °C 和 30 °C,这可能是因为 37 °C 是大肠杆菌的最适生长温度,因此选择 37 °C 作为诱导温度。

**2.3.3 重组蛋白诱导前菌体密度的确定:** 选取不同菌体密度进行 IPTG 的诱导,结果如图 7 所示,诱导前菌体量对重组蛋白 *Pfs* 的表达略有影响。 $OD_{600}$

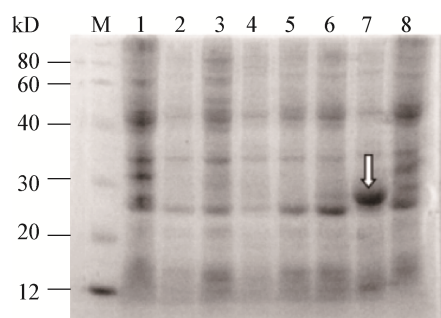


图 5 培养基对重组蛋白 *Pfs* 表达的影响

**Figure 5 Effect of culture medium on the expression of recombinant protein *Pfs***

注: M: Marker; 1、8: 未诱导的全菌体蛋白; 2-7: 分别为 LB、2YT、TB、M9、SOB、SOC 培养基诱导后的全菌体蛋白; 箭头所示为重组蛋白。

Note: M: Marker; 1, 8: Not induced recombinant protein; 2-7: The culture medium of LB, 2YT, TB, M9, SOB and SOC induced recombinant protein; Indicated by the arrows is recombinant protein.

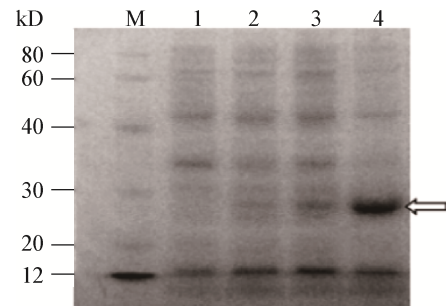


图 6 诱导温度对重组蛋白 *Pfs* 表达的影响

**Figure 6 Effect of induction temperature on the expression of recombinant protein *Pfs***

注: M: Marker; 1: 未诱导的全菌体蛋白; 2-4: 诱导温度分别为 25、30、37 °C; 箭头所示为重组蛋白。

Note: M: Marker; 1: Not induced recombinant protein; 2-4: Recombinant protein was induced when temperatures was 25, 30 and 37 °C; Indicated by the arrows is recombinant protein.

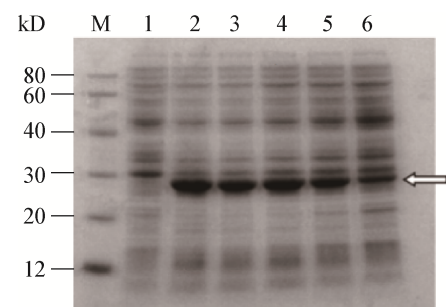


图 7 诱导前菌体密度对重组蛋白 *Pfs* 表达的影响

**Figure 7 Effect of biomass before induction on the expression of recombinant protein *Pfs***

注: M: Marker; 1: 未诱导的全菌体蛋白; 2-6: 诱导前菌液  $OD_{600}$  分别为 0.3、0.5、0.7、0.9、1.1; 箭头所示为重组蛋白。

Note: M: Marker; 1: Not induced recombinant protein; 2-6: Recombinant protein was induced when  $OD_{600}$  was 0.3, 0.5, 0.7, 0.9 and 1.1; Indicated by the arrows is recombinant protein.

在 0.3-0.7 之间时重组蛋白的表达量相对较高,随着菌体密度的不断增大,诱导的重组蛋白表达量反而降低,可能是在菌体生长过程中随着重组蛋白表达量的增加,一些蛋白酶的表达也同时增加,进而加速了重组蛋白的分解。因此选择  $OD_{600}$  为 0.5-0.7 的代谢相对旺盛的对数期菌体以进行诱导表达。

**2.3.4 重组蛋白诱导剂 IPTG 浓度的确定:** 选取不同浓度的 IPTG 进行诱导,结果如图 8 所示, IPTG



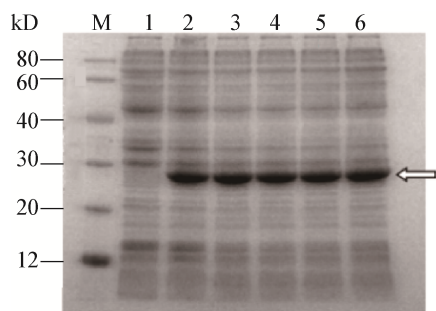


图 8 IPTG 浓度对重组蛋白 Pfs 表达的影响

**Figure 8 Effect of IPTG concentration on the expression of recombinant protein Pfs**

注：M: Marker；1-7: IPTG 浓度分别为 0、0.10、0.25、0.50、0.75、1.00 mmol/L；箭头所示为重组蛋白。

Note: M: Marker; 1-7: Recombinant protein was induced when IPTG concentration was 0, 0.10, 0.25, 0.50, 0.75 and 1.00 mmol/L; Indicated by the arrows is recombinant protein.

的浓度对重组蛋白 Pfs 的诱导表达无明显影响，由于高浓度的 IPTG 对菌株有一定的毒害作用，所以选择诱导剂 IPTG 的终浓度为 0.1 mmol/L。IPTG 是一种强诱导剂，在细菌的代谢过程中不会被利用，可以持续性地发挥作用，所以低浓度的 IPTG 就可以起到良好的诱导效果。采用低浓度的 IPTG 可以适当降低转录的速率，有利于蛋白的可溶性表达<sup>[29]</sup>。

**2.3.5 重组蛋白诱导时间的确定：**对重组蛋白 Pfs 诱导不同的时间，结果如图 9 所示，重组蛋白 Pfs 在不同诱导时间下均有表达，其中在 12 h 时表达量较高，因此选择诱导 12 h 为重组蛋白 Pfs 的诱导时间。

**2.3.6 重组蛋白存在形式的检测：**对诱导后的全菌体蛋白、上清和沉淀分别进行 SDS-PAGE 分析，结果如图 10 所示，经 IPTG 诱导后全菌体蛋白中含有重组蛋白 Pfs，且上清中重组蛋白 Pfs 的含量明显高于沉淀中，说明重组蛋白 Pfs 以可溶性蛋白的形式存在，而沉淀中含有的重组蛋白可能是由于裂解细胞不充分所导致的。

**2.3.7 体外合成信号分子 AI-2：**通过对重组蛋白 Pfs 诱导条件的优化，使得重组蛋白被大量诱导，经 Ni 柱纯化、超滤管离心浓缩后获得重组蛋白 Pfs

的质量浓度为 4.08 g/L。在相同诱导条件及纯化方法下得到重组蛋白 LuxS 的质量浓度为 8.13 g/L。以 SAH 为底物，利用 LuxS 和 Pfs 蛋白合成信号分子 AI-2，采用埃尔曼试剂法测得信号分子 AI-2 的摩尔浓度为 203  $\mu\text{mol/L}$ ，生物学发光法测得体外合成的摩尔浓度为 203  $\mu\text{mol/L}$  的信号分子 AI-2 的荧光强度可达阳性对照的 184 倍(图 11)。

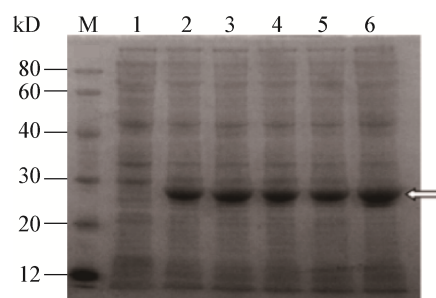


图 9 诱导时间对重组蛋白 Pfs 表达的影响

**Figure 9 Effect of induction time on the expression of recombinant protein Pfs**

注：M: Marker；1: 诱导前全菌体蛋白；2-6: 诱导时间分别为 4、6、8、10、12 h；箭头所示为重组蛋白。

Note: M: Marker; 1: Not induced recombinant protein; 2-6: Recombinant protein was induced when induction time was 4, 6, 8, 10 and 12 h; Indicated by the arrows is recombinant protein.

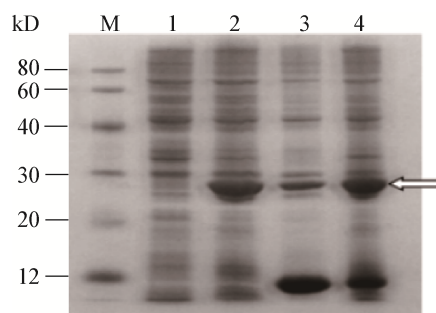


图 10 重组蛋白 Pfs 的存在形式

**Figure 10 Detection of the form of recombinant protein Pfs**

注：M: Marker；1: 诱导前全菌体蛋白；2: 诱导后全菌体蛋白；3: 诱导后裂解菌体的沉淀；4: 诱导后裂解菌体的上清；箭头所示为重组蛋白。

Note: M: Marker; 1: Not induced recombinant protein; 2: Induced whole cell protein; 3: The precipitation of induced lysed cell; 4: The supernatant of induced lysed cell; Indicated by the arrows is recombinant protein.

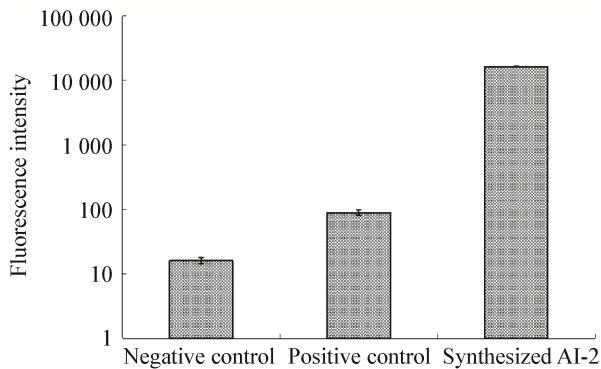


图 11 体外合成 AI-2 的活性

Figure 11 The activity of *in vitro* synthesis of AI-2

### 3 讨论

信号分子 AI-2 介导的群体感应现象广泛存在于革兰氏阳性菌和阴性菌中,并且其介导的群体感应系统参与多种细菌的代谢过程。Silva 等<sup>[30]</sup>研究发现 *Vibrio cholerae* 的生物膜形成与 AI-2 有关。Arnold 等<sup>[31]</sup>研究发现 LuxS/AI-2 系统在 *Borrelia burgdorferi* 感染哺乳动物的过程中起到了重要作用。Lyon 等<sup>[32]</sup>研究发现 *Streptococcus pyogenes* 中的 LuxS/AI-2 系统对毒素和毒性起到调节作用。但是这些研究大多集中在致病菌方面,关于乳酸菌信号分子 AI-2 的报道相对较少。为研究食品中乳酸菌产信号分子 AI-2 的情况,本研究先利用生物学发光法对酸马奶酒中分离出的乳酸菌产信号分子 AI-2 进行检测,发现分离自酸马奶酒中的 10 株乳酸菌均可以产信号分子 AI-2,其中屎肠球菌 8-3 产信号分子 AI-2 的产量明显高于其他几株。同时,为进一步研究信号分子 AI-2 对乳酸菌生理功能的影响,本研究根据屎肠球菌 *Pfs* 基因全序列设计引物,成功扩增出屎肠球菌 *Pfs* 基因。

研究中选择 pEASY Blunt E1 为载体与目的基因 *Pfs* 进行连接,构建了重组表达载体。外源蛋白质在宿主中进行表达时多会以包涵体的形式存在<sup>[33]</sup>,而在本研究中重组蛋白 Pfs 则以可溶性蛋白的形式存在,这可能与结合了 His 标签有关。当外源的融合蛋白与特定的标签结合以后,可以增加重组蛋白的表达量,并且可以增加重组蛋白的可溶性<sup>[34]</sup>。

在信号分子 AI-2 的合成过程中, Pfs 和 LuxS 蛋白是以 SAH 为底物合成 AI-2 的关键酶。Han 等<sup>[35]</sup>单独使用 Pfs 或 LuxS 蛋白与底物 SAH 进行作用均未能产生信号分子 AI-2,而本研究利用纯化后的重组蛋白与底物相互作用生成了具有生物活性的信号分子 AI-2,说明本研究中的重组蛋白 Pfs 也具有生物活性。重组蛋白的诱导表达为体外合成信号分子 AI-2 奠定了基础,同时为进一步研究信号分子 AI-2 对屎肠球菌生理功能的调节提供了支持。

### 4 结论

(1) 分离自酸马奶酒中的 10 株乳酸菌均可以产信号分子 AI-2,其中屎肠球菌 8-3 信号分子 AI-2 的产量明显高于其他几株。

(2) 利用屎肠球菌 8-3 基因组 DNA 构建了重组质粒,并优化了重组蛋白 Pfs 的诱导表达条件,最佳诱导表达条件为:以 SOC 培养基作为表达培养基,菌液  $OD_{600}$  为 0.5–0.7,诱导剂 IPTG 浓度为 0.1 mmol/L, 37 °C 诱导 12 h。

(3) 最佳诱导表达条件下重组蛋白有可溶性表达;通过对重组蛋白 Pfs 进行诱导及纯化,得到 4.08 g/L 的具有生物活性的 Pfs 蛋白,同 LuxS 蛋白与底物 SAH 作用后体外合成了 203  $\mu$ mol/L 的信号分子 AI-2,其荧光强度可达阳性对照的 184 倍,说明屎肠球菌 8-3 可通过 *Pfs* 基因的作用生成信号分子 AI-2。

### 参考文献

- [1] Camilli A, Bassler BL. Bacterial small-molecule signaling pathways[J]. Science, 2006, 311(5764): 1113-1116
- [2] Tsao CY, Wang L, Hashimoto Y, et al. LuxS coexpression enhances yields of recombinant proteins in *Escherichia coli* in part through posttranscriptional control of GroEL[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2011, 77(6): 2141-2152
- [3] Ding YC, Feng HJ, Huang WK, et al. The effect of quorum sensing on anaerobic granular sludge in different pH conditions[J]. Biochemical Engineering Journal, 2015, 103: 270-276
- [4] Mizan MFR, Jahid IK, Kim M, et al. Variability in biofilm formation correlates with hydrophobicity and quorum sensing among *Vibrio parahaemolyticus* isolates from food contact surfaces and the distribution of the genes involved in biofilm formation[J]. Biofouling, 2016, 32(4): 497-509
- [5] Reading NC, Sperandio V. Quorum sensing: the many languages of bacteria[J]. FEMS Microbiology Letters, 2006,



- 254(1): 1-11
- [6] Fuqua C, Parsek MR, Greenberg EP. Regulation of gene expression by cell-to-cell communication: acyl-homoserine lactone quorum sensing[J]. Annual Review of Genetics, 2001, 35: 439-468
  - [7] Kleerebezem M, Quadri LEN, Kuipers OP, et al. Quorum sensing by peptide pheromones and two-component signal-transduction systems in Gram-positive bacteria[J]. Molecular Microbiology, 1997, 24(5): 895-904
  - [8] Schauder S, Bassler BL. The languages of bacteria[J]. Genes & Development, 2001, 15(12): 1468-1480
  - [9] Park H, Shin H, Lee K, et al. Autoinducer-2 properties of kimchi are associated with lactic acid bacteria involved in its fermentation[J]. International Journal of Food Microbiology, 2016, 225: 38-42
  - [10] Li B, Gu Y, Yan CL, et al. Screening and identification of AI-2 high-producing lactic acid bacteria[J]. Science and Technology of Food Industry, 2016, 37(2): 185-188 (in Chinese)  
李博, 顾悦, 燕彩玲, 等. 高产信号分子 AI-2 乳酸菌的筛选及鉴定[J]. 食品工业科技, 2016, 37(2): 185-188
  - [11] Zhang T, Tian JJ, Li ZY, et al. Research of the relationship between AI-2/LuxS quorum sensing system and biofilm formation in *Lactobacillus plantarum* HE-1[J]. Science and Technology of Food Industry, 2014, 35(5): 130-132, 136 (in Chinese)  
张腾, 田建军, 李梓媛, 等. 植物乳杆菌 HE-1 由 AI-2/LuxS 介导的群体感应与生物膜形成关系的研究[J]. 食品工业科技, 2014, 35(5): 130-132, 136
  - [12] Guo QR, He YF. Screening on the symbiotic lactic acid bacteria and yeasts[J]. Science and Technology of Food Industry, 2015, 36(2): 203-206, 211 (in Chinese)  
郭倩茹, 贺银凤. 具有共生关系的乳酸菌和酵母菌的筛选[J]. 食品工业科技, 2015, 36(2): 203-206, 211
  - [13] Shao CL. Functional analysis of LuxS/AI-2 type quorum sensing system in *Enterococcus faecalis* V583[D]. Wuxi: Master's Thesis of Jiangnan University, 2012 (in Chinese)  
邵长林. 粪肠球菌 V583 株 LuxS/AI-2 型群体感应系统的研究[D]. 无锡: 江南大学硕士学位论文, 2012
  - [14] Yang J. Synthesis of AI-2 *in vitro* and effect of AI-2 on bacteriocin synthesis of *Lactobacillus plantarum*[D]. Harbin: Master's Thesis of Northeast Agricultural University, 2015 (in Chinese)  
杨杰. AI-2 的体外合成及其对植物乳杆菌细菌素合成的影响[D]. 哈尔滨: 东北农业大学硕士学位论文, 2015
  - [15] Federle MJ, Bassler BL. Interspecies communication in bacteria[J]. The Journal of Clinical Investigation, 2003, 112(9): 1291-1299
  - [16] Han XG, Bai H, Liu L, et al. Cloning and expression of *luxS* and *pfs* and *in vitro* biosynthesis autoinducer 2 of avian pathogenic *Escherichia coli* from Anhui Province[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2012, 52(9): 1167-1172 (in Chinese)  
韩先干, 白灏, 刘蕾, 等. 禽致病性大肠杆菌安徽分离株 *luxS* 和 *pfs* 基因的克隆、表达与细胞外合成 AI-2 活性检测[J]. 微生物学报, 2012, 52(9): 1167-1172
  - [17] Schauder S, Shokat K, Surette MG, et al. The LuxS family of bacterial autoinducers: biosynthesis of a novel quorum-sensing signal molecule[J]. Molecular Microbiology, 2001, 41(2): 463-476
  - [18] Sperandio V, Torres AG, Jarvis B, et al. Bacteria-host communication: the language of hormones[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2003, 100(15): 8951-8956
  - [19] Yang JB, Ling DW, Guo XH, et al. Lactic Acid Bacteria-Biological Basis and Application[M]. Beijing: China Light Industry Press, 1996: 139-145 (in Chinese)  
杨洁彬, 凌代文, 郭兴华, 等. 乳酸菌-生物学基础及应用[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1996: 139-145
  - [20] Greenberg EP, Hastings JW, Ulitzur S. Induction of luciferase synthesis in *Beneckea harveyi* by other marine bacteria[J]. Archives of Microbiology, 1979, 120(2): 87-91
  - [21] Surette MG, Bassler BL. Quorum sensing in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1998, 95(12): 7046-7050
  - [22] Peng LT, Li Q, Liu HS, et al. Expression in *E. coli* of fusion protein GST-PSK- $\alpha$  a polypeptide hormone in plants[J]. Journal of Huazhong Agricultural University, 2007, 26(6): 865-870 (in Chinese)  
彭丽桃, 李琼, 刘合生, 等. 重组植物硫化激素 PSK- $\alpha$  融合蛋白诱导表达条件的优化[J]. 华中农业大学学报, 2007, 26(6): 865-870
  - [23] Sambrook J, Russell DW. Molecular Cloning: A Laboratory Manual[M]. Huang PT, trans. Beijing: Science Press, 2002: 1570 (in Chinese)  
萨姆布鲁克, 拉塞尔. 分子克隆实验指南[M]. 黄培堂, 译. 北京: 高等教育出版社, 2002: 1570
  - [24] Buck BL, Azcarate-Peril MA, Klaenhammer TR. Role of autoinducer-2 on the adhesion ability of *Lactobacillus acidophilus*[J]. Journal of Applied Microbiology, 2009, 107(1): 269-279
  - [25] Lebeer S, Claes IJJ, Verhoeven TLA, et al. Impact of *luxS* and suppressor mutations on the gastrointestinal transit of *Lactobacillus rhamnosus* GG[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2008, 74(15): 4711-4718
  - [26] Park H, Yeo S, Ji Y, et al. Autoinducer-2 associated inhibition by *Lactobacillus sakei* NR28 reduces virulence of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7[J]. Food Control, 2014, 45: 62-69
  - [27] Gori K, Moslehi-Jenabian S, Purrotti M, et al. Autoinducer-2 activity produced by bacteria found in smear of surface ripened cheeses[J]. International Dairy Journal, 2011, 21(1): 48-53
  - [28] Moslehi-Jenabian S, Gori K, Jespersen L. AI-2 signalling is induced by acidic shock in probiotic strains of *Lactobacillus* spp.[J]. International Journal of Food Microbiology, 2009, 135(3): 295-302
  - [29] Turner P, Holst O, Karlsson EN. Optimized expression of soluble cyclomaltodextrinase of thermophilic origin in *Escherichia coli* by using a soluble fusion-tag and by tuning of inducer concentration[J]. Protein Expression and Purification, 2005, 39(1): 54-60
  - [30] Silva AJ, Parker WB, Allan PW, et al. Role of methylthioadenosine/S-adenosylhomocysteine nucleosidase in *Vibrio cholerae* cellular communication and biofilm development[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2015, 461(1): 65-69
  - [31] Arnold WK, Savage CR, Antonicello AD, et al. Apparent role for *Borrelia burgdorferi* LuxS during mammalian infection[J]. Infection and Immunity, 2015, 83(4): 1347-1353
  - [32] Lyon WR, Madden JC, Levin JC, et al. Mutation of LuxS affects growth and virulence factor expression in *Streptococcus pyogenes*[J]. Molecular Microbiology, 2001, 42(1): 145-157
  - [33] Chayen NE. Turning protein crystallisation from an art into a science[J]. Current Opinion in Structural Biology, 2004, 14(5): 577-583
  - [34] Korf U, Kohl T, van der Zandt H, et al. Large-scale protein expression for proteome research[J]. Proteomics, 2005, 5(14): 3571-3580
  - [35] Han XG, Lu CP. *In vitro* biosynthesis of autoinducer 2 of *Streptococcus suis* serotype 2 using recombinant LuxS and Pfs[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2009, 44(1): 40-45