

研究报告

信号分子 AI-2 合成关键基因 *luxS* 对副溶血性弧菌生物学特性的影响

江艳华¹, 王婷^{1,2}, 林才云^{1,2}, 王鹏², 李风铃¹, 曲梦¹, 王联珠¹, 谭志军¹, 姚琳^{*1}

1 中国水产科学研究院黄海水产研究所 农业农村部水产品质量安全检测与评价重点实验室, 山东 青岛 266071

2 中国海洋大学食品科学与工程学院, 山东 青岛 266003

江艳华, 王婷, 林才云, 王鹏, 李风铃, 曲梦, 王联珠, 谭志军, 姚琳. 信号分子 AI-2 合成关键基因 *luxS* 对副溶血性弧菌生物学特性的影响[J]. 微生物学通报, 2022, 49(2): 690-701

Jiang Yanhua, Wang Ting, Lin Caiyun, Wang Peng, Li Fengling, Qu Meng, Wang Lianzhu, Tan Zhijun, Yao Lin. Effects of the critical gene *luxS* related to synthesis of AI-2 on biological characteristics of *Vibrio parahaemolyticus*[J]. Microbiology China, 2022, 49(2): 690-701

摘要:【背景】副溶血性弧菌是全球范围重要的食源性病原菌, 能引起急性肠胃炎。群体感应系统 LuxS/AI-2 影响细菌的生物学特性, 为研究副溶血性弧菌的传播机制和控制技术提供了新的途径。【目的】探讨群体感应信号分子 AI-2 合成关键基因 *luxS* 对海产品中分离的副溶血性弧菌 Vp2009027 生物学特性的影响。【方法】利用自杀质粒同源重组技术敲除信号分子 AI-2 合成关键基因 *luxS*, 构建副溶血性弧菌 Vp2009027 的 *luxS* 基因缺失株, 通过比较野生株与 *luxS* 基因缺失株的生长曲线、AI-2 活性、运动能力、生物膜形成能力和耐药性, 分析 LuxS/AI-2 系统对副溶血性弧菌生物学特性的影响。【结果】构建了副溶血性弧菌 Vp2009027 的 *luxS* 基因缺失株, 野生株和 *luxS* 基因缺失株的生长无明显差异, *luxS* 基因的缺失导致 AI-2 合成受阻、运动能力和生物膜形成能力增强、四环素耐药性降低。【结论】*luxS* 基因对副溶血性弧菌的生物学特性具有重要的调控作用, 为进一步研究副溶血性弧菌的传播机制和研发控制技术提供基础。

关键词: 副溶血性弧菌; *luxS* 基因; 信号分子 AI-2; 生物膜; 四环素耐药性

基金项目: 中国水产科学研究院黄海水产研究所基本科研业务费(20603022020004); 国家重点研发计划(2017YFC1600703); 中国水产科学研究院基本科研业务费(2020TD71)

Supported by: Central Public-Interest Scientific Institution Basal Research Fund, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences (20603022020004); National Key Research and Development Program of China (2017YFC1600703); Central Public-Interest Scientific Institution Basal Research Fund, Chinese Academy of Fishery Sciences (2020TD71)

*Corresponding author: E-mail: yaolin@ysfri.ac.cn

Received: 2021-07-11; Accepted: 2021-08-17; Published online: 2021-10-22

Effects of the critical gene *luxS* related to synthesis of AI-2 on biological characteristics of *Vibrio parahaemolyticus*

JIANG Yanhua¹, WANG Ting^{1,2}, LIN Caiyun^{1,2}, WANG Peng², LI Fengling¹, QU Meng¹, WANG Lianzhu¹, TAN Zhijun¹, YAO Lin^{*1}

1 Key Laboratory of Testing and Evaluation for Aquatic Product Safety and Quality, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, Shandong, China

2 College of Food Science and Engineering, Ocean University of China, Qingdao 266003, Shandong, China

Abstract: [Background] *Vibrio parahaemolyticus* is an important foodborne pathogen worldwide, which can cause gastroenteritis. Quorum sensing system LuxS/AI-2 can regulate the biological characteristics of bacteria, which provides a new pathway to study the dissemination mechanism and control techniques of *V. parahaemolyticus*. [Objective] To study the effect of quorum sensing signaling molecule autoinducer-2 (AI-2) on the biological characteristics of *V. parahaemolyticus* Vp2009027 from seafood. [Methods] The critical gene *luxS* related to the synthesis of AI-2 was knocked out, and the *luxS*-knockout mutant of *V. parahaemolyticus* Vp2009027 was constructed by homologous recombination with suicide plasmid. The effect of LuxS/AI-2 on the biological characteristics of *V. parahaemolyticus* was determined by comparing the growth, AI-2 activity, motility, biofilm formation ability, and antibiotic resistance between the wildtype strain and the mutant. [Results] The mutant was constructed successfully, which showed no significant difference in growth compared with the wildtype strain. The deletion of *luxS* led to the failure of AI-2 synthesis, increase in motility and biofilm formation ability, and weakening of tetracycline resistance. [Conclusion] *luxS* gene could regulate the biological characteristics of *V. parahaemolyticus*, which provided a reference for further research on the dissemination mechanism and development of control techniques of *V. parahaemolyticus*.

Keywords: *Vibrio parahaemolyticus*; *luxS* gene; signaling molecule AI-2; biofilm; tetracycline resistance

副溶血性弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*)是一种全球广泛分布的食源性病原菌,能引起急性肠胃炎,出现呕吐、腹泻、腹痛等症状,严重者可发展成为败血症^[1-2]。食用未经加工或未煮熟的海产品极易感染副溶血性弧菌,在我国,副溶血性弧菌是引起食源性疾病最主要的微生物病原^[3]。抗生素的过度使用导致细菌耐药性问题日益严重,海产品中的副溶血性弧菌同样存在耐药性问题^[4],影响海产品的质量安全,其耐药菌通过食物链进入人体会造成常规抗生素失效,给临床治疗带来巨大挑战,进而威胁人类健康。因此,开展副溶血性弧菌的特性和

防控技术的研究对提高海产品质量安全、保障人类健康具有重要意义。

细菌的群体感应(quorum sensing)是指细菌通过产生和交换可扩散的自诱导信号分子进行细菌之间交流的过程^[5]。不同细菌利用不同类型的信号分子进行交流,其中 LuxS/AI-2 群体感应系统是目前唯一确认的细菌种间交流的群体感应系统,广泛分布于革兰氏阳性菌和阴性菌^[6]。已有研究表明, LuxS/AI-2 能调控细菌的很多重要生理过程,包括发光、运动性、生物膜形成和耐药性等^[7-9]。信号分子 AI-2 的合成主要与 S-核糖同型半胱氨酸酶

(S-ribosylhomocysteinase, LuxS)相关, 该酶由 *luxS* 基因编码^[10]。本实验通过敲除 *luxS* 基因阻断 AI-2 的合成, 探究 LuxS/AI-2 对副溶血性弧菌生物学特性的影响作用, 以期为副溶血性弧菌的预防控制提供基础。

1 材料与方 法

1.1 材料

1.1.1 菌株

副溶血性弧菌 Vp2009027, 分离自养殖海参, 保存于农业农村部水产品质量安全检测与评价重点实验室。大肠埃希氏菌(*Escherichia coli*) DH5 α λ pir、*E. coli* β 2155, 购自 BioVector NTCC 典型培养物保藏中心; *E. coli* DH5 α , 购自天根生化科技(北京)有限公司; 哈维氏弧菌(*V. harveyi*) BB152、*V. harveyi* BB170, 由中国海洋大学张晓华教授和曾名湧教授惠赠。

1.1.2 主要试剂和仪器及培养基

细菌基因组 DNA 提取试剂盒、细菌总

RNA 提取试剂盒, 天根生化科技(北京)有限公司; 逆转录试剂盒 PrimeScriptTM RT Reagent Kit with gDNA Eraser、实时荧光定量 PCR 试剂盒 TB GreenTM Premix Ex TaqTM II、高保真 DNA 聚合酶 PrimeSTAR Max DNA Polymerase、DNA 分子量标准 DL2000, 宝生物工程(大连)有限公司; 10 \times Tango Buffer、内切酶 *Sma* I (10 U/ μ L)、T4 连接酶(5 U/ μ L), MBI 公司; pKD3 质粒、自杀质粒 pCVD442、DNA 分子量标准 Marker Q、四环素, 生工生物工程(上海)股份有限公司; 酵母粉、胰蛋白胨, Oxoid 公司。

所用引物序列见表 1, 由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

荧光定量 PCR 仪, Roche 公司; PCR 仪, 北京东胜创新生物科技有限公司; 多功能微孔检测仪, MD 公司; 电转仪, Bio-Rad 公司; 微量核酸蛋白测定仪, Implen 公司; Class II 生物安全柜, Nuair 公司。

表 1 本研究使用的引物

Table 1 Primers used in this study

项目 Item	名称 Name	引物序列 Primers sequence (5'→3')
上游同源臂引物	luxS-5F	CTGGCTCACGGTTACCAACATTAC
Primers of upstream homologous arm	luxS-5R	GAGTAAAGGCATTACATCTCTCCTGATTG
下游同源臂引物	luxS-3F	CTGCGCGTAGACTAAGTTCTTTTGG
Primers of downstream homologous arm	luxS-3R	GAAGAGTTACGCACGGTCGTAAATG
氯霉素抗性基因扩增引物	luxS-CmF	CAATCAGGAGAGATGTAATGCCTTTACTCCatagatcatcctcttagtctctatc
Primers of chloramphenicol resistance gene	luxS-CmR	CCAAAAGAACTTAGTCTACGCGCAGgagctgcttgaagtctcta
外侧鉴定引物	luxS-outF	GATTGATAACCCTGAACTGACGATTTCTG
Primers of outer fragment	luxS-outR	CTAATGGTTTCATTCGTTTGCTTGGTG
内侧鉴定引物	luxS-inF	GCATTCATACACTAGAGCACTTGTACG
Primers of inner fragment	luxS-inR	CCACACTGGTACTCAITTAGCTCAG
<i>tetB</i> 荧光定量 PCR 引物	tetB-F	GGCGCATCGCTGGATTACTTATTG
Primers of <i>tetB</i> for real-time PCR	tetB-R	CGTTGAGAAGCTGAGGTGGTATCG
16S rRNA 荧光定量 PCR 引物	16S-F	CAGCTCGTGTGTGAAATGT
Primers of 16S rRNA for real-time PCR	16S-R	CGTAAGGGCCATGATGACTT

LB 液体培养基(g/L): 酵母粉 5.0, 胰蛋白胨 10.0, NaCl 10.0。LB 固体培养基: LB 液体培养基中添加 15–20 g/L 琼脂。LBS 液体培养基: LB 液体培养基中添加 20 g/L NaCl。LBS 固体培养基: LBS 液体培养基中添加 15–20 g/L 琼脂。AB 培养基(g/L): MgSO₄·7H₂O 12.6, NaCl 17.5, 酪蛋白(不含维生素) 2.0, 加蒸馏水 900 mL 溶解, 用 10 mol/L NaOH 调 pH 至 7.0, 补足蒸馏水至 960 mL, 1×10⁵ Pa 灭菌 15 min, 冷却后加入 10 mL 无菌 1 mol/L 磷酸钾缓冲液(pH 7.0)、10 mL 0.1 mol/L L-精氨酸(0.2 μm 滤膜过滤)、20 mL 50%无菌甘油, 混匀。

1.2 方法

1.2.1 *luxS* 基因的敲除与鉴定

菌株 Vp2009027 在 LBS 液体培养基中 36 °C、150 r/min 振荡培养过夜, 采用细菌基因组 DNA 提取试剂盒提取基因组 DNA。根据副溶血性弧菌 Vp2009027 的基因序列, 获得 *luxS* 基因的上、下游同源臂。采用高保真 DNA 聚合酶和引物 *luxS*-5F/*luxS*-5R 和 *luxS*-3F/*luxS*-3R 扩增 *luxS* 基因的上、下游同源臂。采用引物 *luxS*-CmF/*luxS*-CmR 从 pKD3 质粒上扩增氯霉素(Cm)抗性基因。将 *luxS* 基因上、下游同源臂与 Cm 抗性基因通过融合 PCR 连接, 得到上游同源臂-Cm-下游同源臂的融合 PCR 产物。自杀质粒 pCVD442 经 *Sma* I 酶切后纯化, 再将融合 PCR 产物与自杀质粒 pCVD442 通过 T4 连接酶进行连接, 然后电转化入 *E. coli* DH5α λpir 中, 涂布 LB 平板(含氨苄青霉素 50 μg/mL、氯霉素 17 μg/mL), 36 °C 培养 18–24 h, 获得阳性克隆后通过质粒提取试剂盒提取质粒, 获得重组质粒。将重组质粒电转化入 *E. coli* β2155 中, 采用 LB 平板(含 100 μg/mL 氨苄青霉素、0.5 mmol/L 二氨基庚二酸)筛选获得供体菌。将供体菌与副

溶血性弧菌受体菌进行接合实验, 在含氯霉素(17 μg/mL)的 LB 平板上筛选获得氯霉素抗性的克隆, 随机挑选 10 个克隆混合培养, 用含 10% 蔗糖和氯霉素(17 μg/mL)的 LB 平板进行二次筛选。随机挑取 20 个单克隆进行纯培养, 采用内侧鉴定引物扩增菌株的基因组 DNA, 确定是否含有目的片段。将不含目的片段的阳性克隆纯培养后涂布在含 10%蔗糖和氯霉素(17 μg/mL)的 LB 平板上, 36 °C 培养至单菌落形成。单菌落纯培养后通过内侧鉴定引物 *luxS*-inF/*luxS*-inR 进行 PCR 扩增、外侧鉴定引物 *luxS*-outF/*luxS*-outR 进行 PCR 扩增和测序, 进一步确证 *luxS* 基因是否被敲除。

1.2.2 *luxS* 缺失对副溶血性弧菌生长的影响

分别将副溶血性弧菌 Vp2009027 野生株与 *luxS* 缺失株接种至 LBS 液体培养基中 36 °C、150 r/min 活化, 调整为相同浓度的菌液(麦氏浓度约 0.5), 分别取 1 mL 菌液加入 100 mL LBS 中, 36 °C、150 r/min 振荡培养, 每 2 h 取菌液于 600 nm 下测定吸光值(*OD*₆₀₀), 绘制生长曲线, 比较缺失株与野生株生长能力的差异。

1.2.3 *luxS* 缺失对副溶血性弧菌 AI-2 活性的影响

分别于 0、2、4、6、8、12、16、24、30、36 h 取 1.2.2 中 Vp2009027 野生株与 *luxS* 缺失株的培养液, 12 000 r/min 离心 10 min, 上清液经 0.2 μm 滤膜过滤后, 参照文献[11]的方法, 用报告菌株 *V. harveyi* BB170 检测 AI-2 的活性。将-80 °C 冻存的报告菌株 *V. harveyi* BB170 接种到 AB 培养基中, 于 30 °C、150 r/min 振荡培养 12 h, 用新鲜的 AB 培养基按 1:5 000 比例(体积比)稀释菌液。在 96 孔白色平底微孔板中加入 20 μL 含 AI-2 的待测无菌上清液和 180 μL *V. harveyi* BB170 稀释液, 30 °C、110 r/min 振荡培养, 每隔 30 min 用多功能酶标仪测定其

荧光值,直至空白对照组荧光值降至最小值。将 *V. harveyi* BB152 和 *E. coli* DH5 α 分别接种到 LBS 培养基和 LB 培养基中,分别于 30 °C 和 36 °C 下 150 r/min 振荡培养 12 h。以 *V. harveyi* BB152 的无菌上清液作为阳性对照、*E. coli* DH5 α 的无菌上清液作为阴性对照及 AB 培养基为空白对照组,将阳性对照的 AI-2 活性定义为 100%。

1.2.4 *luxS* 缺失对副溶血性弧菌运动性的影响

将 Vp2009027 野生株与 *luxS* 缺失株分别接种于 LBS 液体培养基中,36 °C、150 r/min 振荡培养过夜,将菌液稀释至麦氏浓度 0.5,再稀释 10 倍,取 1 μ L 接种于新鲜配制的运动性培养基(分别含 0.3%琼脂的 LBS、含 0.5%琼脂的 LBS)中,以含 2.0%琼脂的 LBS 作为对照,36 °C 培养,每 2 h 测量菌苔直径^[12]。

1.2.5 *luxS* 缺失对副溶血性弧菌生物膜形成的影响

将 Vp2009027 野生株与 *luxS* 缺失株分别接种于 LBS 液体培养基中,36 °C、150 r/min 振荡培养过夜,将菌液稀释至麦氏浓度 0.5,再稀释 10 倍,取 200 μ L 加入无菌 96 孔板中,置于 36 °C 培养 24 h,取出后倾去培养基,用无菌水清洗 3 次后 60 °C 干燥固定 30 min,采用 200 μ L 0.1%结晶紫染色 5 min,弃去染液,用无菌水清洗 3 次后晾干,用 200 μ L 95%乙醇溶解,在波长 590 nm 下测量吸光值(OD_{590})。

1.2.6 *luxS* 缺失对副溶血性弧菌四环素耐药性的影响

将 Vp2009027 野生株与 *luxS* 缺失株分别接种于 LBS 液体培养基中,36 °C、150 r/min 振荡培养过夜,将菌液浓度稀释到约 10^5 – 10^6 CFU/mL。采用微量肉汤稀释法测定 Vp2009027 野生株与 *luxS* 缺失株对四环素的最小抑菌浓度(minimal inhibitory concentration, MIC),配制四环素溶液(浓度分别为 20、30、40、50、60、70、80、

90、100、110、120 μ g/mL),取稀释菌液与对应各浓度的四环素等量混匀,36 °C 培养 24 h,测定菌液吸光值(OD_{600}),以菌株不生长的最低浓度为四环素的 MIC。

选择在四环素亚抑菌浓度(15 μ g/mL)体系下,按照上述操作对野生株和缺失株进行培养,通过测定 600 nm 下的吸光值确定菌液浓度,同时采用细菌总 RNA 提取试剂盒提取菌株的 RNA。采用 PrimeScriptTM RT Reagent Kit with gDNA Eraser 试剂盒进行逆转录获得 cDNA,以 16S rRNA 基因为内参基因,采用 TB GreenTM Premix Ex TaqTM II 试剂盒进行实时荧光定量 PCR,检测四环素耐药基因 *tetB* 的转录水平^[13-14]。荧光定量 PCR 反应体系(20 μ L): 2 \times 预混液 10 μ L,正、反向引物(10 μ mol/L)各 0.8 μ L, cDNA (约 50 ng) 2 μ L, 无菌水 6.4 μ L。PCR 反应条件为: 95 °C 30 s; 95 °C 5 s, 60 °C 30 s, 进行 40 个循环;溶解曲线反应条件为 95 °C 5 s, 60 °C 60 s。

1.2.7 数据分析

实验结果以平均值 \pm 标准差(Mean \pm SD)表示。采用 *t* 检验对数据的差异性进行统计分析, $P < 0.01$ 表示差异性极显著。

2 结果与分析

2.1 *luxS* 缺失株的构建

经过融合 PCR 获得 $\Delta luxS::Cm$ 片段,电泳图如图 1 所示,片段大小为 2 704 bp。将融合 PCR 片段通过连接和转化后,获得重组质粒 pCVD442- $\Delta luxS::Cm$,将其转入 *E. coli* β 2155 后获得供体菌 β 2155/pCVD442- $\Delta luxS::Cm$ 。将 β 2155/pCVD442- $\Delta luxS::Cm$ 与受体菌副溶血性弧菌进行接合,对抗性平板筛选的接合子采用内侧鉴定引物进行 PCR 扩增,如图 2 所示,部分菌株没有扩增出 *luxS* 片段,表明菌株中不含

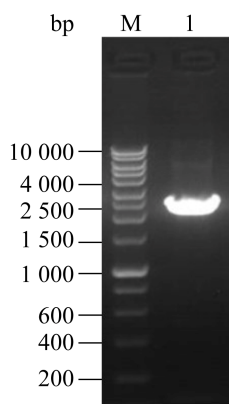


图 1 融合 PCR 构建的 $\Delta luxS::Cm$ 片段 M: DNA 分子量标准 Marker Q; 1: $\Delta luxS::Cm$ 片段
Figure 1 Fragment of $\Delta luxS::Cm$ constructed by fusion PCR. M: DNA Marker Q; 1: Fragment of $\Delta luxS::Cm$.

luxS。将 *luxS* 阴性的菌株进行纯培养后, 再次用内侧鉴定引物进行 PCR 扩增, 未扩增出 *luxS* (图 3)。采用外侧鉴定引物进行 PCR 扩增, 扩增片段大小与预期相符(2 881 bp), 通过测序验证结果显示序列与设计的一致, 进一步证明 *luxS* 基因敲除成功, 将 *luxS* 基因缺失株命名为 Vp2009027 $\Delta luxS$ 。

2.2 *luxS* 缺失对副溶血性弧菌生长的影响

生长曲线(图 4)可以看出, 从最初的 0–2 h 内, 副溶血性弧菌 Vp2009027 野生株与缺失株

生长速率大致相同; 从培养 2 h 开始, 野生株菌浓度要稍高于缺失株, 表明野生株的生长速度比突变株稍快, 到达稳定期后, 野生株的菌浓度仍然高于缺失株, 但无显著差异($P>0.05$)。

2.3 *luxS* 缺失对副溶血性弧菌 AI-2 活性的影响

在培养对数后期和稳定期中, Vp2009027 野生株表现出较高的 AI-2 活性, 而缺失株在所有测定时间内的 AI-2 的活性均显著低于野生株($P<0.01$), 接近于阴性对照, 表明 *luxS* 基因的缺失阻断了 AI-2 的合成(图 5)。

2.4 *luxS* 缺失对副溶血性弧菌运动性和生物膜形成的影响

如图 6 所示, 在 0.3% 琼脂培养基和 0.5% 琼脂培养基上培养 2 h, Vp2009027 野生株和 *luxS* 缺失株的菌苔直径没有明显差异, 培养 4 h 后, 二者的菌苔直径差异性显著($P<0.01$), *luxS* 缺失株的运动能力均显著强于野生株。如图 7 所示, Vp2009027*luxS* 缺失株的生物膜形成能力显著高于野生株($P<0.01$), 约为野生株的 1.58 倍。

2.5 *luxS* 缺失对副溶血性弧菌四环素耐药性的影响

Vp2009027 野生株的 MIC 值约为 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 而 *luxS* 缺失株的 MIC 值约为 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 即 *luxS*

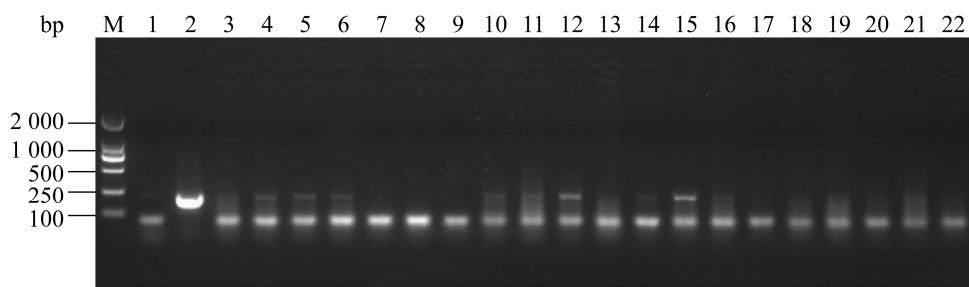


图 2 接合子的筛选 M: DNA 分子量标准 DL2000; 1: 无模板阴性对照的扩增结果; 2: 野生株的扩增结果; 3–22: 第 1–20 号克隆的扩增结果

Figure 2 Screening of conjugants. M: DNA Marker DL2000; 1: Amplification of negative control; 2: Amplification of wildtype strain; 3–22: Amplifications of colonies of No.1 to No. 20.

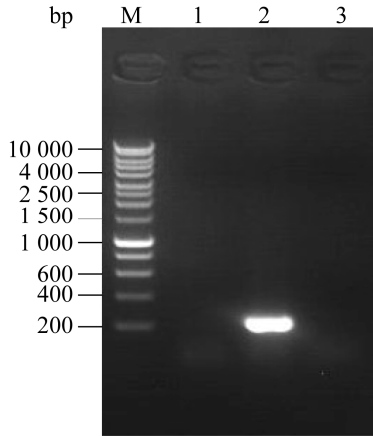


图3 *luxS* 内侧鉴定引物 PCR 扩增片段 M: DNA 分子量标准 Marker Q; 1: 阳性接合子的扩增结果; 2: 野生株的扩增结果; 3: 无模板阴性对照的扩增结果

Figure 3 Fragment of PCR by *luxS* inner primers. M: DNA Marker Q; 1: Amplification of positive conjugons; 2: Amplification of wildtype strain; 3: Amplification of negative control.

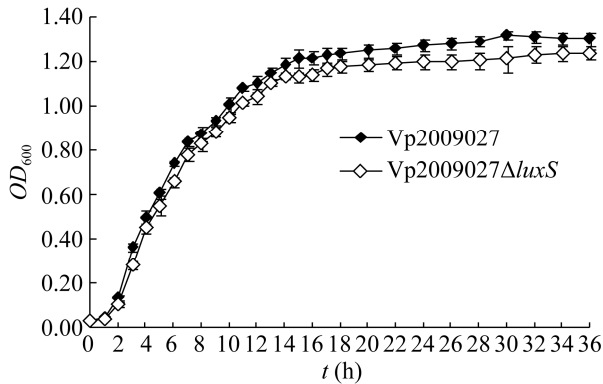


图4 Vp2009027 野生株与 *luxS* 缺失株的生长曲线
Figure 4 Growth curve of Vp2009027 wildtype strain and *luxS* mutant strain.

缺失造成菌株耐药性降低。在四环素亚抑菌浓度(15 $\mu\text{g}/\text{mL}$)下, 缺失株的生长量约为野生株的 60%, 四环素耐药基因 *tetB* 的表达量为野生株的 41%, 表明 *luxS* 的缺失降低了耐药基因的表达量, 相应地也显著降低菌株对四环素的耐药性(图 8)。

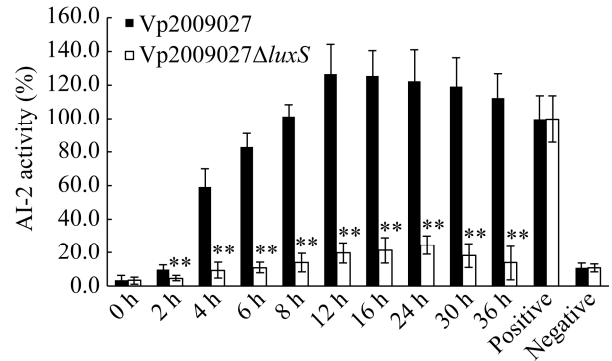


图5 Vp2009027 野生株与 *luxS* 缺失株的 AI-2 活性
**: $P < 0.01$ 表示与野生株相比差异极显著

Figure 5 AI-2 activities of Vp2009027 wildtype strain and *luxS* mutant strain. **: $P < 0.01$ means very significant difference compared to wildtype strain.

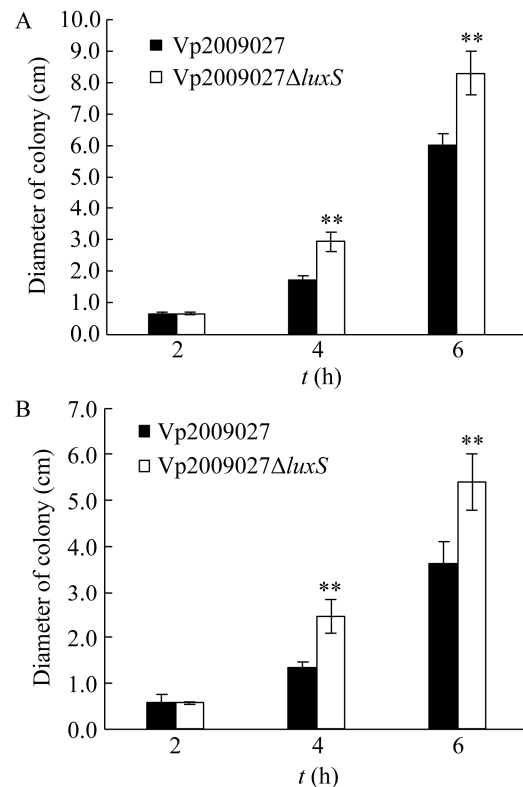


图6 Vp2009027 野生株与 *luxS* 缺失株的运动能力
A: 0.3%琼脂培养基; B: 0.5%琼脂培养基。**: $P < 0.01$ 表示与野生株相比差异极显著

Figure 6 Mobility of Vp2009027 wildtype strain and *luxS* mutant strain. A: 0.3% agar; B: 0.5% agar. **: $P < 0.01$ means very significant difference compared to wildtype strain.

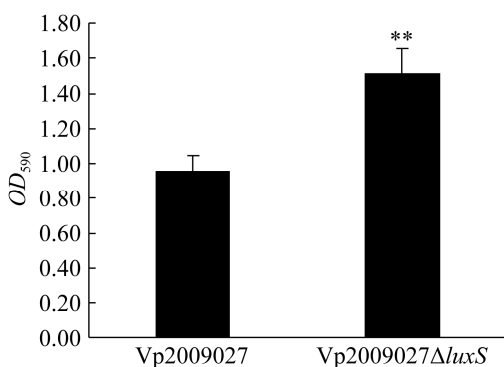


图 7 Vp2009027 野生株与 *luxS* 缺失株的生物膜形成能力 **: $P < 0.01$ 表示与野生株相比差异极显著

Figure 7 Biofilm formation ability of Vp2009027 wildtype strain and *luxS* mutant strain. **: $P < 0.01$ means very significant difference compared to wildtype strain.

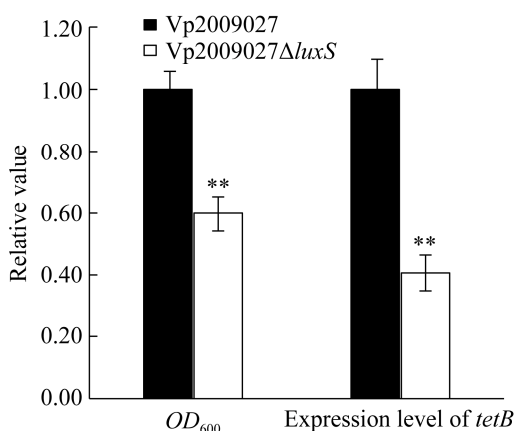


图 8 Vp2009027 野生株与 *luxS* 缺失株对四环素耐受性及耐药基因表达水平 **: $P < 0.01$ 表示与野生株相比差异极显著

Figure 8 Tetracycline resistance and resistance gene's expression of Vp2009027 wildtype strain and *luxS* mutant strain. **: $P < 0.01$ means very significant difference compared to wildtype strain.

3 讨论

LuxS/AI-2 群体感应系统广泛存在于革兰氏阴性菌和阳性菌中, 被认为是细菌种间群体感应系统。*luxS* 基因在同种细菌中高度保守且同

源性高, 是 LuxS/AI-2 群体感应系统的关键基因, 该基因编码的蛋白作用于 S-核糖同型半胱氨酸进而合成信号分子 AI-2^[10,15-16]。因此构建 *luxS* 基因缺失株成了研究 LuxS/AI-2 群体感应系统对细菌生理功能调节机制的重要方法, 已有研究发现敲除 *luxS* 基因后对细菌的生物学特性有显著影响^[17-20]。在副溶血性弧菌中也检出 LuxS/AI-2 群体感应系统, 但是目前针对 LuxS/AI-2 群体感应调控副溶血性弧菌生物学特性的研究还较少^[20-21]。本实验通过自杀质粒同源重组技术敲除了副溶血性弧菌 Vp2009027 的 *luxS* 基因, 成功构建了 *luxS* 基因缺失株, 通过比较野生株和 *luxS* 缺失株的生长曲线、AI-2 活性、运动能力、生物膜形成能力和四环素耐药性等差异, 探究了 LuxS/AI-2 群体感应系统对副溶血性弧菌生物学特性的调控作用。

细菌的群体感应与菌体密度相关, 菌密度能调控信号分子的合成与分泌, 反之, 不断分泌的信号分子又能调控细菌的生长^[7]。本实验中通过比较副溶血性弧菌 Vp2009027 野生株和 *luxS* 基因缺失株的生长曲线发现, *luxS* 基因缺失株的生长曲线略滞后于野生株, 但其差异不显著, 可以视为无影响, 这与已有报道的鼠伤寒沙门氏菌、禽致病性大肠埃希氏菌、金黄色葡萄球菌和肺炎链球菌等细菌的研究结果基本一致^[17-18,22-23]。*luxS* 基因在参与活化甲基循环、不同细菌硫代谢和糖类代谢等方面有着重要的作用^[24], 能造成缺失株与野生株生长有差异, 但差异不明显。除了 LuxS/AI-2 群体感应系统, 细菌还含有其他群体感应系统^[25], 可能是造成 *luxS* 基因缺失对副溶血性弧菌生长无明显影响的原因。

本实验测定了 Vp2009027 野生株和 *luxS* 基因缺失株在 36 h 内分泌 AI-2 的变化规律, 缺失

株的 AI-2 活性远低于野生株, 与阴性对照的活性接近, 表明 *luxS* 的缺失阻断了 AI-2 的合成。*luxS* 是 AI-2 合成路径中的关键基因, *luxS* 基因编码的 LuxS 蛋白酶作用于 S-核糖同型半胱氨酸生成 AI-2 前体^[10], 说明 *luxS* 在 AI-2 合成途径中起着至关重要的作用, 本实验也进一步验证了敲除 *luxS* 基因后, 从内部切断了 AI-2 的合成。*luxS* 的缺失可能直接或间接影响副溶血性弧菌中受 AI-2 信号分子调控的受体和下游受体, 进而改变细菌的群体行为, 例如与细菌生存能力和致病性相关的运动性和生物膜等。细菌的运动性包括浮泳运动(*swim motility*)和群集运动(*swarm motility*)这 2 种方式。本实验采用 0.3%琼脂培养基反映菌株的浮泳运动情况, 采用 0.5%琼脂培养基反映菌株的群集运动情况, *luxS* 基因缺失引起菌株 Vp2009027 的运动能力增强。以往的研究显示, 对于不同的菌株, *luxS* 基因对运动能力的调控作用不同, 例如 *luxS* 基因缺失导致伤寒沙门氏菌运动能力显著增强^[17], 而导致禽致病性大肠杆菌 APEC01 和 DE17 运动能力显著降低^[18]。影响细菌运动能力的因素较多, 其中最主要的为鞭毛。研究表明, *luxS* 的缺失能引起与运动性相关的鞭毛基因的表达上调或下调, 与运动能力的变化并不一定呈正相关性^[18], 因此, *luxS* 对细菌运动能力的调控可能存在多种机制。细菌生物膜是区别于浮游态的一种生长方式, 其形成和发展受到群体感应系统的调控, 包括正调控和负调控^[26-27]。本实验中, *luxS* 的缺失会造成副溶血性弧菌 Vp2009027 的生物膜增加, 与报道的肠炎沙门氏菌和金黄色葡萄球菌的结果一致, 可能因为 *luxS* 基因缺失后产生的葡糖基转移酶清除大量可发酵碳水化合物并生成非水溶性葡聚糖所导致^[19,28]。

前期的研究表明, 外源添加信号分子 AI-2 能增强副溶血性弧菌对四环素的耐药性, 同时对相关四环素耐药基因的表达水平有正调节作用^[21]。本实验通过敲除 *luxS* 基因阻断 AI-2 的合成, 进一步验证 LuxS/AI-2 对副溶血性弧菌耐药性的调控作用。通过测定 Vp2009027 野生株与 *luxS* 基因缺失株的 MIC 发现, *luxS* 缺失后菌株的 MIC 明显降低, 即菌株的耐药性显著下降。在四环素亚抑菌浓度胁迫下, *luxS* 基因缺失致使菌浓度显著降低, 进一步证实 *luxS* 基因缺失导致 Vp2009027 耐药性降低。同时利用实时荧光定量 PCR 从基因水平探究该基因对菌株耐药性的调控作用, 结果发现 *luxS* 的缺失导致菌株对四环素耐药基因的转录水平显著降低, 与外源添加 AI-2 对菌株耐药性和耐药基因转录水平的正调控作用一致。LuxS/AI-2 群体感应系统对细菌耐药性的调控可能与外排泵相关^[29]。AI-2 分子可通过 ABC 类型转运蛋白进入细胞内, 群体感应系统与外排泵系统两者在调控基因表达和信号转运过程中形成紧密联系, 如猪链球菌外排泵过量表达, AI-2 分子向胞外积累, 能造成菌体对 β -内酰胺类和喹诺酮类的高度耐药^[30]。同样, 四环素耐药基因调控系统是外排泵系统, 包含四环素阻遏蛋白和四环素操纵子, 对细菌四环素耐药性起重要调节作用^[31]。*luxS* 基因缺失导致 AI-2 合成途径受阻, AI-2 分泌到胞外的含量大大降低, 可能影响了四环素阻遏蛋白和四环素操纵子的调控作用, 从而直接或间接调控四环素耐药基因 *tetB* 的转录, 造成耐药性的降低。

由于细菌的基因调控是一个复杂的过程, *luxS* 基因可能调控其他众多的基因, 后续将通过转录组学技术开展副溶血性弧菌野生株与 *luxS* 缺失株基因表达水平的差异研究, 获取

luxS 缺失后的差异表达基因及调控通路, 进一步解析 *luxS* 基因对副溶血性弧菌生物学特性的调控机制。

4 结论

本研究以海产品中分离的副溶血性弧菌 Vp2009027 为对象, 通过自杀质粒同源重组技术成功构建了副溶血性弧菌 *luxS* 基因缺失株, *luxS* 的缺失对 Vp2009027 生长无显著影响, 阻断了 AI-2 的合成, 显著提高了菌株的运动能力和生物膜的形成能力; *luxS* 基因缺失株的 MIC 降低至野生株的 50%; 在四环素亚抑菌浓度下, *luxS* 基因缺失导致菌密度和四环素耐药基因转录水平显著降低, 提示 *luxS* 基因缺失导致四环素耐药性降低。结果表明, *luxS* 基因对副溶血性弧菌 Vp2009027 的生物学特性有调控作用, 为开展副溶血性弧菌的防控技术研究提供基础。

REFERENCES

- [1] Joseph SW, Colwell RR, Kaper JB. *Vibrio parahaemolyticus* and related halophilic vibrios[J]. CRC Critical Reviews in Microbiology, 1982, 10(1): 77-124
- [2] FAO/WHO. Risk assessment of *Vibrio parahaemolyticus* in seafood: interpretative summary and technical report. Microbiological risk assessment series No. 16[R]. Rome: FAO/WHO, 2011
- [3] 付萍, 王连森, 陈江, 白光大, 徐粒子, 王帅, 郭云昌. 2015 年中国大陆食源性疾病暴发事件监测资料分析[J]. 中国食品卫生杂志, 2019, 31(1): 64-70
Fu P, Wang LS, Chen J, Bai GD, Xu LZ, Wang S, Guo YC. Analysis of foodborne disease outbreaks in China mainland in 2015[J]. Chinese Journal of Food Hygiene, 2019, 31(1): 64-70 (in Chinese)
- [4] 张德福, 安慧, 张健, 赵禹宗, 张明, 郭佳佳, 冯娇, 刘雪飞, 李春, 白凤翎, 等. 副溶血弧菌耐药及其机制的研究进展[J]. 食品工业科技, 2018, 39(9): 311-317, 324
Zhang DF, An H, Zhang J, Zhao YZ, Zhang M, Guo JJ, Feng J, Liu XF, Li C, Bai FL, et al. Research progress of the drug-resistance and its mechanism of *Vibrio parahaemolyticus*[J]. Science and Technology of Food Industry, 2018, 39(9): 311-317, 324 (in Chinese)
- [5] Waters CM, Bassler BL. Quorum sensing: cell-to-cell communication in bacteria[J]. Annual Review of Cell and Developmental Biology, 2005, 21: 319-346
- [6] Sun JB, Daniel R, Wagner-Dobler I, Zeng AP. Is autoinducer-2 a universal signal for interspecies communication: a comparative genomic and phylogenetic analysis of the synthesis and signal transduction pathways[J]. BMC Evolutionary Biology, 2004, 4(1): 36
- [7] Quan YF, Meng FK, Ma XY, Song XH, Liu X, Gao WX, Dang YL, Meng Y, Cao MF, Song CJ. Regulation of bacteria population behaviors by AI-2 “consumer cells” and “supplier cells”[J]. BMC Microbiology, 2017, 17(1): 198
- [8] Wang Y, Liu BB, Grenier D, Yi L. Regulatory mechanisms of the LuxS/AI-2 system and bacterial resistance[J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2019, 63(10): e01186-19
- [9] 林才云, 姚琳, 李凤铃, 曲梦, 许加超, 江艳华, 王联珠. LuxS/AI-2 群体感应系统及其对细菌致病性和耐药性的调控[J]. 食品安全质量检测学报, 2019, 10(18): 5983-5991
Lin CY, Yao L, Li FL, Qu M, Xu JC, Jiang YH, Wang LZ. LuxS/AI-2 quorum sensing of bacteria and its regulation on pathogenicity and antimicrobial resistance[J]. Journal of Food Safety & Quality, 2019, 10(18): 5983-5991 (in Chinese)
- [10] Schauder S, Shokat K, Surette MG, Bassler BL. The LuxS family of bacterial autoinducers: biosynthesis of a novel quorum-sensing signal molecule[J]. Molecular Microbiology, 2001, 41(2): 463-476
- [11] Taga ME, Xavier KB. Methods for analysis of bacterial autoinducer-2 production[J]. Current Protocols in Microbiology, 2011, Chapter 1: Unit1C.1
- [12] Liu JM, Zhai LG, Lu WJ, Lu ZX, Bie XM. Amino acid decarboxylase-dependent acid tolerance, selected phenotypic, and virulence gene expression responses of *Salmonella enterica* serovar Heidelberg[J]. Food Research International, 2017, 92: 33-39

- [13] Xue T, Yu LM, Shang F, Li WC, Zhang M, Ni JT, Chen XL. Short communication: The role of autoinducer 2 (AI-2) on antibiotic resistance regulation in an *Escherichia coli* strain isolated from a dairy cow with mastitis[J]. Journal of Dairy Science, 2016, 99(6): 4693-4698
- [14] Guo X, Zhu L, Zhong H, Li P, Zhang CJ, Wei D. Response of antibiotic and heavy metal resistance genes to tetracyclines and copper in substrate-free hydroponic microcosms with *Myriophyllum aquaticum*[J]. Journal of Hazardous Materials, 2021, 413: 125444
- [15] Rajan R, Zhu JG, Hu XB, Pei DH, Bell CE. Crystal structure of S-ribosylhomocysteinase (LuxS) in complex with a catalytic 2-ketone intermediate[J]. Biochemistry, 2005, 44(10): 3745-3753
- [16] Pereira CS, Thompson JA, Xavier KB. AI-2-mediated signalling in bacteria[J]. FEMS Microbiology Reviews, 2013, 37(2): 156-181
- [17] 杨登辉, 汪洋, 王少辉, 刘新, 许漩, 王栋, 韩先干, 丁铲, 程相朝, 于圣青. 密度感应系统 *luxS* 基因对鼠伤寒沙门菌生物学特性及毒力的影响[J]. 中国兽医科学, 2016, 46(5): 537-543
- Yang DH, Wang Y, Wang SH, Liu X, Xu X, Wang D, Han XG, Ding C, Cheng XC, Yu SQ. Effects of quorum sensing system *luxS* gene on the biological characteristics and virulence of *Salmonella typhimurium*[J]. Chinese Veterinary Science, 2016, 46(5): 537-543 (in Chinese)
- [18] 吕小龙, 胡剑刚, 陈兆国, 荆雅玮, 米荣升, 黄燕, 王少辉, 韩先干, 祁克宗. *luxS* 基因缺失对禽致病性大肠杆菌 O₁、O₂ 和 O₇₈ 三种血清型分离株的生物学特性影响[J]. 微生物学报, 2018, 58(2): 238-246
- Lü XL, Hu JG, Chen ZG, Jing YW, Mi RS, Huang Y, Wang SH, Han XG, Qi KZ. Inactive *luxS* influence on biological characteristics of O₁, O₂ and O₇₈ serotypes isolates in avian pathogenicity *Escherichia coli*[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2018, 58(2): 238-246 (in Chinese)
- [19] 于艳超, 王莉莉, 潘巧, 辛九庆, 王秀梅. 肠炎沙门菌 *luxS* 缺失株的构建及其生物学特性研究[J]. 畜牧兽医学报, 2018, 49(6): 1291-1298
- Yu YC, Wang LL, Pan Q, Xin JQ, Wang XM. Construction and biological characteristics of *Salmonella enterica* serovar enteritidis *luxS* mutant[J]. Chinese Journal of Animal and Veterinary Sciences, 2018, 49(6): 1291-1298 (in Chinese)
- [20] Guo MH, Fang ZJ, Sun LJ, Dongfang S, Wang YL, Li C, Wang RD, Liu Y, Hu HQ, Liu Y, et al. Regulation of thermostable direct hemolysin and biofilm formation of *Vibrio parahaemolyticus* by quorum-sensing genes *luxM* and *luxS*[J]. Current Microbiology, 2018, 75(9): 1190-1197
- [21] 林才云, 江艳华, 姚琳, 李凤铃, 曲梦, 王联珠, 许加超. 信号分子 AI-2 的体外合成及其对副溶血性弧菌四环素耐药性的调控作用[J]. 微生物学通报, 2020, 47(5): 1321-1331
- Lin CY, Jiang YH, Yao L, Li FL, Qu M, Wang LZ, Xu JC. *In vitro* synthesis of AI-2 and its effect on tetracycline resistance of *Vibrio parahaemolyticus*[J]. Microbiology China, 2020, 47(5): 1321-1331 (in Chinese)
- [22] 李穗霞. 食源性金黄色葡萄球菌 *luxS* 基因缺失对环境耐受性及致病性的影响[D]. 杨凌: 西北农林科技大学硕士学位论文, 2018
- Li SX. Effect of *luxS* gene on environmental tolerance and pathogenicity from food-borne *Staphylococcus aureus*[D]. Yangling: Master's Thesis of Northwest A&F University, 2018 (in Chinese)
- [23] Yadav MK, Vidal JE, Go YY, Kim SH, Chae SW, Song JJ. The LuxS/AI-2 quorum-sensing system of *Streptococcus pneumoniae* is required to cause disease, and to regulate virulence- and metabolism-related genes in a rat model of middle ear infection[J]. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, 2018, 8: 138
- [24] 任志明, 于丹妮. *luxS* 基因在细菌代谢组学中的相关功能研究进展[J]. 国际口腔医学杂志, 2010, 37(6): 664-667
- Ren ZM, Yu DN. Research progress of *luxS* gene related function on the bacterial metabonomics[J]. International Journal of Stomatology, 2010, 37(6): 664-667 (in Chinese)
- [25] 汪映, 朱素芹, 张彩丽, 曾名湧. 罗氏沼虾中副溶血弧菌群体感应的检测[J]. 生物技术通报, 2014(3): 146-150
- Wang Y, Zhu SQ, Zhang CL, Zeng MY. Detection of quorum sensing in *Vibrio parahaemolyticus* isolated from *Macrobrachium rosenbergii*[J]. Biotechnology Bulletin, 2014(3): 146-150 (in Chinese)
- [26] Blackledge MS, Worthington RJ, Melander C. Biologically inspired strategies for combating bacterial biofilms[J]. Current Opinion in Pharmacology, 2013,

- 13(5): 699-706
- [27] 刘蕾, 桂萌, 武瑞赟, 李平兰. LuxS/AI-2 型群体感应系统调控细菌生物被膜形成研究进展[J]. 食品科学, 2016, 37(19): 254-262
- Liu L, Gui M, Wu RY, Li PL. Progress in research on biofilm formation regulated by LuxS/AI-2 quorum sensing[J]. Food Science, 2016, 37(19): 254-262 (in Chinese)
- [28] Ma RH, Qiu SW, Jiang Q, Sun HP, Xue T, Cai G, Sun BL. AI-2 quorum sensing negatively regulates rbf expression and biofilm formation in *Staphylococcus aureus*[J]. International Journal of Medical Microbiology, 2017, 307(4/5): 257-267
- [29] Xu GM. Relationships between the regulatory systems of quorum sensing and multidrug resistance[J]. Frontiers in Microbiology, 2016, 7: 958
- [30] Wang Y, Liu BB, Li JP, Gong SL, Dong X, Mao CL, Yi L. LuxS/AI-2 system is involved in fluoroquinolones susceptibility in *Streptococcus suis* through overexpression of efflux pump SatAB[J]. Veterinary Microbiology, 2019, 233: 154-158
- [31] 宫秀群, 马敏敏, 徐格林. 四环素基因调控系统的研究进展[J]. 基础医学与临床, 2012, 32(2): 233-236
- Gong XQ, Ma MM, Xu GL. New strategies in tetracycline-regulatable system[J]. Basic & Clinical Medicine, 2012, 32(2): 233-236 (in Chinese)