



研究报告

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

林才云^{1,2} 江艳华² 姚琳² 李凤铃² 曲梦² 王联珠^{*2} 许加超^{*1}

1 中国海洋大学食品科学与工程学院 山东 青岛 266003

2 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

摘要:【背景】抗菌药的过度使用引起细菌耐药性日益严重,作为重要的食源性致病菌,副溶血性弧菌也表现出一定程度的耐药性。群体感应系统可以调控细菌的耐药性,为研究副溶血性弧菌的耐药机制和控制技术提供新的途径。【目的】探讨群体感应信号分子 AI-2 (autoinducer-2)对海产品中分离的副溶血性弧菌四环素耐药性的调控作用。【方法】通过原核表达制备 AI-2 合成关键酶——S-核糖同型半胱氨酸酶 (S-ribosylhomocysteinase, LuxS) 和 S-腺苷同型半胱氨酸核苷酶 (S-adenosylhomocysteine nucleosidase, Pfs),体外合成 AI-2,通过菌落计数法分析 AI-2 对副溶血性弧菌在四环素亚抑菌浓度下耐受性的影响,采用逆转录实时荧光定量 PCR 法测定不同浓度 AI-2 对副溶血性弧菌四环素耐药基因转录水平的影响。【结果】通过原核表达获得 LuxS 和 Pfs,作用于底物 S-腺苷同型半胱氨酸能合成具有生物活性的 AI-2,其荧光强度约为阳性对照的 6 倍。在四环素亚抑菌浓度下, AI-2 能显著促进副溶血性弧菌的生长, 6、15、30 $\mu\text{mol/L}$ 浓度 AI-2 能不同程度地提高副溶血性弧菌四环素耐药基因的转录水平。【结论】AI-2 能增强副溶血性弧菌对四环素的耐受作用,为解析副溶血性弧菌的耐药机制、研制以 AI-2 为靶点的副溶血性弧菌耐药性控制技术提供基础。

关键词: 副溶血性弧菌, 信号分子 AI-2, S-核糖同型半胱氨酸酶, S-腺苷同型半胱氨酸核苷酶, 四环素耐药性, 四环素耐药基因 *tet*

Foundation items: National Natural Science Foundation of China (31601566); Central Public-interest Scientific Institution Basal Research Fund of Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences (20603022020004); National Key Research and Development Program of China (2017YFC1600703)

***Corresponding authors:** E-mail: WANG Lian-Zhu: wanglz@ysfri.ac.cn; XU Jia-Chao: xujia@ouc.edu.cn

Received: 27-12-2019; **Accepted:** 16-03-2020; **Published online:** 31-03-2020

基金项目: 国家自然科学基金(31601566); 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)

***通信作者:** E-mail: 王联珠: wanglz@ysfri.ac.cn; 许加超: xujia@ouc.edu.cn

收稿日期: 2019-12-27; **接受日期:** 2020-03-16; **网络首发日期:** 2020-03-31

In vitro synthesis of AI-2 and its effect on tetracycline resistance of *Vibrio parahaemolyticus*

LIN Cai-Yun^{1,2} JIANG Yan-Hua² YAO Lin² LI Feng-Ling² QU Meng²
WANG Lian-Zhu^{*2} XU Jia-Chao^{*1}

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

2 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, Shandong 266071, China

Abstract: [Background] Antimicrobial resistance of bacteria has become more and more serious due to the abuse of antimicrobials. As an important foodborne pathogen, *Vibrio parahaemolyticus* also exhibited a certain level of antimicrobial resistance. Quorum sensing system can regulate the antimicrobial resistance of bacteria, which provides a new pathway to study the mechanism and control technique of antimicrobial resistance of *V. parahaemolyticus*. [Objective] To study the effect of signaling molecule autoinducer-2 (AI-2) on tetracycline resistance of *V. parahaemolyticus* strains from seafoods. [Methods] AI-2 was synthesized *in vitro* by a reaction using the critical enzymes, S-ribosylhomocysteinase (LuxS) and S-adenosylhomocysteine nucleosidase (Pfs), which were prepared by prokaryotic expression. The effect of AI-2 on tetracycline resistance of *V. parahaemolyticus* was determined by colonies counting method. The effect of AI-2 at different concentrations on the transcriptional levels of tetracycline resistance genes in *V. parahaemolyticus* was assayed by reverse transcription and real-time quantitative PCR. [Results] LuxS and Pfs enzymes were obtained by prokaryotic expression. The bioactive AI-2 could be synthesized *in vitro* by adding LuxS and Pfs to the substrate S-adenosylhomocysteine (SAH), with the fluorescence intensity of about 6 times as much as positive control. When treating with tetracycline at subinhibitory concentration, AI-2 could significantly promote the growth of *V. parahaemolyticus* strains, and AI-2 at the concentrations of 6, 15 and 30 $\mu\text{mol/L}$ could increase the transcriptional levels of tetracycline resistance genes in *V. parahaemolyticus* strains to a certain extent. [Conclusion] AI-2 could enhance the tetracycline resistance of *V. parahaemolyticus*, which provided a reference for further study on the antimicrobial resistance mechanism of *V. parahaemolyticus* and developing control techniques targeting AI-2 on antimicrobial resistance of *V. parahaemolyticus*.

Keywords: *Vibrio parahaemolyticus*, Signaling molecule AI-2, S-ribosylhomocysteinase, S-adenosylhomocysteine nucleosidase, Tetracycline resistance, Tetracycline resistance gene *tet*

副溶血性弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*)是一种广泛分布于海水、海底沉积物及海产品中的嗜盐性海洋菌,食用未经加工或未煮熟的海产品极易感染副溶血性弧菌,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]。在我国,副溶血性弧菌是引起食源性疾病的最主要微生物病原^[3-5]。海产品是副溶血性弧菌的主要传播载体,海水养殖环境的频繁用药导致副溶血性弧菌耐药性日益严重^[6-8],影响着海产品的质量安全,其耐药菌,尤其是致病性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,开展副溶血性弧菌耐药机制和控制技术研究对于提高海产品质量安全、保障人类健康具有重要意义。

群体感应(quorum sensing, QS)是指细菌在生长过程中产生的低分子量信号分子,通过信号分子来感知种群密度变化,从而调节相关基因表达和群体行为的过程^[9]。不同细菌利用不同类型的信号分子进行交流,其中信号分子 AI-2 (autoinducer-2)广泛分布于革兰氏阳性菌和阴性菌,被认为是种间交流的信号分子^[10]。已有的研

究表明, AI-2 能调控很多细菌的重要生理过程, 包括耐药性等^[11-12], 为研究细菌耐药性的产生与扩散机制提供了新的途径。细菌合成 AI-2 的途径极其相似, 主要与 S-核糖同型半胱氨酸酶(S-ribosylhomocysteinase, LuxS)和S-腺苷同型半胱氨酸核苷酶(S-adenosylhomocysteine nucleosidase, Pfs)相关, 通过这两个酶的作用能在体外合成 AI-2^[13-14]。目前 AI-2 对副溶血性弧菌耐药性的调控作用尚不清楚, 因此, 本实验通过体外合成 AI-2, 分析 AI-2 对副溶血性弧菌四环素耐药性的影响作用, 为解析副溶血性弧菌的耐药机制、研制以 AI-2 为靶点的副溶血性弧菌耐药性控制技术提供基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株

副溶血性弧菌 Vp2009027、Vp2011007、Vp2015094, 分离自海产品中, 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 、*E. coli* BL21(DE3)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

细菌总 RNA 提取试剂盒, 天根生化科技(北京)有限公司; *Nde* I、*Hind* III限制性内切酶、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 ExTaqTM II、DL2000 DNA 分子量标准, 宝生物工程(大连)有限公司; 表达载体 pET-30a(+), 安诺伦(北京)生物科技有限公司; 酵母粉、胰蛋白胨, Oxoid 公司; 异丙基硫代- β -D-半乳糖(IPTG)、卡那霉素、酪蛋白氨基酸, 北京索莱宝生物科技有限公司; 四环素、L-精氨酸、咪唑, 生工生物工程(上海)股份有限公司; S-腺苷同型半胱氨酸(S-adenosylhomocysteine, SAH)、同型

半胱氨酸(L-homocystine)、二硫代二硝基苯甲酸(DTNB), Sigma-Aldrich 公司; Ellman's 试剂为 DTNB 溶于含有 100 mmol/L 磷酸钠和 0.1 mmol/L EDTA 的缓冲液(pH 7.2); 蛋白定量测试盒, 南京建成生物工程研究所; 蛋白电泳预制胶 ExpressPlusTM PAGE Gel, 南京金斯瑞生物科技有限公司。

蛋白纯化柱 Ni-NTA Superflow Column, Qiagen 公司; 脱盐柱 ZebaTM Spin Desalting Columns 7K MWCO, 赛默飞世尔科技(中国)有限公司; 荧光定量 PCR 仪, Roche 公司; 温度梯度 PCR 仪, 北京东胜创新生物科技有限公司; 多功能微孔板检测仪, MD 公司; 微量核酸蛋白测定仪, Implen 公司; Class II 生物安全柜, Nuaire 公司。

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 液体培养基中添加约 15 g/L 琼脂; LBS 液体培养基: LB 液体培养基中添加 20 g/L NaCl; 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 \times 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(0.22 μ m 滤膜过滤)、20 mL 50%无菌甘油, 混匀。

1.2 方法

1.2.1 蛋白 LuxS、Pfs 的重组表达及纯化

根据 GenBank 中副溶血性弧菌 ATCC 17802 已公布的 LuxS 和 Pfs 的蛋白序列优化密码子, 上、下游加入 *Nde* I、*Hind* III限制性内切酶酶切位点, 委托金斯瑞生物科技有限公司合成基因序列, 然后接入表达载体 pET-30a(+)中, 连接产物转化 *E. coli* DH5 α 感受态细胞, 于含 50 μ g/mL 卡那霉素的 LB 平板上筛选阳性克隆, 培养并提取质粒, 对质粒进行双酶切和测序鉴定, 阳性重组质粒命名为 pET-30a-luxS、pET-30a-pfs。将重组质粒 pET-30a-luxS、pET-30a-pfs 转化原核表达菌

E. coli BL21(DE3)感受态细胞, 于含 50 $\mu\text{g/mL}$ 卡那霉素的 LB 平板上筛选阳性克隆, 将阳性克隆菌接种入含 50 $\mu\text{g/mL}$ 卡那霉素的 LB 液体培养基中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 、150 r/min 振荡培养 3 h, 加入 IPTG 诱导表达 4 h, 通过 SDS-PAGE 凝胶电泳检测蛋白表达情况, 筛选表达成功的重组菌, 分别命名为 BL21-pET-30a-luxS、BL21-pET-30a-pfs, 以原核表达菌 *E. coli* BL21(DE3)作为对照。将重组菌进行扩大培养、IPTG 诱导表达, 将培养液在 4 $^{\circ}\text{C}$ 、8 000 r/min 离心 10 min, 收集菌体, 采用无菌磷酸盐缓冲液重悬菌体并洗涤 3 次, 菌体沉淀于-20 $^{\circ}\text{C}$ 冻存过夜。用 10 mL NPI-10 (配方参照 Ni-NTA Superflow Column 试剂盒说明书)悬浮菌体, 在 4 $^{\circ}\text{C}$ 下 100 W 超声破碎 25 min。将破碎液在 4 $^{\circ}\text{C}$ 、12 000 r/min 离心 30 min, 分别收集上清与沉淀, 通过 SDS-PAGE 分析重组蛋白的可溶性。上清液采用 Ni-NTA Superflow Column 进行重组蛋白的纯化, 通过脱盐柱进行脱盐处理, 纯化的蛋白采用 SDS-PAGE 电泳检测, 采用蛋白定量测试盒测定浓度。

1.2.2 AI-2 的体外合成

AI-2 的体外合成参考文献[15], 在 10 mmol/L 的磷酸钠缓冲液(pH 7.5)中添加终浓度为 1 mmol/L SAH、0.5 mg/mL 的重组蛋白 LuxS 和 Pfs, 将该体系在 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 1 h, 体外合成 AI-2 信号分子。采用超滤管(截留分子量 10 kD)滤除蛋白, 收集滤液, 滤液用 0.22 μm 滤膜过滤, -80 $^{\circ}\text{C}$ 冻存。参照文献[16]用 *V. harveyi* BB170 报告菌株检测 AI-2 生物活性, 将-80 $^{\circ}\text{C}$ 冻存的 *V. harveyi* BB170 接种于 AB 培养基中, 30 $^{\circ}\text{C}$ 、150 r/min 培养过夜, 将菌液稀释 5 000 倍。取 AI-2 按 10% (体积比)的量加入到稀释菌液, 30 $^{\circ}\text{C}$ 、110 r/min 振荡培养, 每隔 30 min 测定其荧光值, 直至空白对照组荧光值降至最小值。以 *V. harveyi* BB152 的培养上清作为阳性对照, 以 *E. coli* DH5 α 的培养上清作为阴性对照, 以 AB 培养基为空白对照组, 将阳性对照中 AI-2 活性定义为 100%。AI-2 浓度测定参考文献[17], 根据

AI-2 合成体系, 可以生成等摩尔的 AI-2 前体物质 DPD (4,5-dihydroxy-2,3-pentanedione)和同型半胱氨酸。含巯基的同型半胱氨酸可将无色的 Ellman's 试剂中的 DTNB 转变成黄色的 5-巯基-2-硝基苯甲酸, 5-巯基-2-硝基苯甲酸在 412 nm 处具有最大吸收。取 200 μL 不同浓度(0、10、20、40、60、80、100 $\mu\text{mol/L}$)的同型半胱氨酸, 加入 100 μL 5 mmol/L Ellman's 试剂, 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 作用 15 min, 在 412 nm 波长下测定吸光值, 绘制标准曲线。同时以 AI-2 替代同型半胱氨酸, 根据标准曲线计算浓度。

1.2.3 AI-2 对副溶血性弧菌四环素耐药性的影响

(1) 四环素亚抑菌浓度下 AI-2 对副溶血性弧菌生长的影响: 将副溶血性弧菌菌株 Vp2009027、Vp2011007、Vp2015094 接种到 LBS 液体培养基中, 36 $^{\circ}\text{C}$ 、150 r/min 振荡培养过夜, 将菌液浓度稀释至约 10^5 – 10^6 CFU/mL。200 μL 体系中加入亚抑菌浓度的四环素(Vp2009027、Vp2011007、Vp2015094 对应浓度分别为 30、60、60 $\mu\text{g/mL}$)、副溶血性弧菌稀释液和 10% (体积比)终浓度为 30 $\mu\text{mol/L}$ 的 AI-2, 以 10 mmol/L 的磷酸钠缓冲液(pH 7.5)作为对照, 36 $^{\circ}\text{C}$ 静置培养 24 h, 将培养菌液稀释至 3×10^2 – 3×10^3 CFU/mL 后取 100 μL 涂布 LBS 平板, 36 $^{\circ}\text{C}$ 培养 24 h, 计算菌落总数。

(2) 四环素亚抑菌浓度下 AI-2 对副溶血性弧菌耐药基因转录水平的影响: 将副溶血性弧菌菌株接种到 LBS 液体培养基中, 36 $^{\circ}\text{C}$ 、150 r/min 振荡培养过夜, 将菌液浓度稀释至约 10^5 – 10^6 CFU/mL。1 mL 体系中加入亚抑菌浓度的四环素(Vp2009027、Vp2011007、Vp2015094 对应浓度分别为 30、60、60 $\mu\text{g/mL}$)、副溶血性弧菌稀释液和 10% (体积比)终浓度分别为 6、15 和 30 $\mu\text{mol/L}$ 的 AI-2, 以 10 mmol/L 的磷酸钠缓冲液(pH 7.5)作为对照, 36 $^{\circ}\text{C}$ 静置培养 12 h 和 24 h。培养液采用细菌总 RNA 提取试剂盒提取副溶血性弧菌的 RNA, 采用 PrimeScriptTM RT Reagent Kit with gDNA Eraser 试剂盒进行逆转录获得 cDNA, 以副溶血

性弧菌 16S rRNA 基因为内参基因, 采用 TB Green™ Premix ExTaq™ II 试剂盒进行实时荧光定量 PCR, 检测副溶血性弧菌四环素耐药基因 *tetB* 和 *tetM* 的转录水平。荧光定量 PCR 反应体系 (20 μL): 2×预混液 10 μL, 正、反向引物 (10 μmol/L)各 0.8 μL, cDNA 50 ng, 无菌水补足 20 μL。荧光定量 PCR 反应条件: 95 °C 30 s; 95 °C 5 s, 60 °C 30 s, 40 个循环; 溶解曲线反应条件为 95 °C 5 s, 60 °C 60 s。所用引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成, 引物序列见表 1。

(3) 数据分析: 试验结果以平均值±标准偏差表示。采用 *t* 检验对数据的差异性进行统计分析,

表 1 本研究所用引物序列
Table 1 Sequences of primers used in this study

名称	序列	目标基因
Name	Sequences (5'→3')	Target gene
16S-F	cagctcgtgtcgtgagatgt	16S rRNA
16S-R	cgttaaggccatgatgactt	
tetB-F	ggcgcacgcgtcgattacttattg	<i>tetB</i>
tetB-R	cgttgagaagctgaggtggtatcg	
tetM-F	atggaagtgacttgtgctctgctg	<i>tetM</i>
tetM-R	gcggtgctacagatagaccaatgg	

$P<0.05$ 表示差异性显著, $P<0.01$ 表示差异性极其显著。

2 结果与分析

2.1 蛋白 LuxS 和 Pfs 的重组表达和纯化

LuxS 和 Pfs 的理论分子量为 19.9 kD 和 25.6 kD, 如图 1 所示, 出现了预期大小一致的蛋白表达条带, 表明蛋白 LuxS 和 Pfs 通过原核表达成功。对重组蛋白的可溶性进行分析, 结果表明重组 LuxS 和 Pfs 大部分以可溶性方式表达。通过超声破碎和 Ni 柱纯化之后, 获得单一条带的目的蛋白(图 2)。

2.2 体外合成 AI-2 的活性和浓度

测定了 0、10、20、40、60、80、100 μmol/L 浓度的同型半胱氨酸分别与 Ellman’s 试剂反应后的吸光值, 绘制了用于计算 AI-2 浓度的标准曲线(图 3)。纯化的 LuxS 和 Pfs 蛋白作用于 SAH 底物的反应液经超滤后, 测得浓度约为 330 μmol/L, 用 *V. harveyi* BB170 检测到反应液的活性约为阳性对照的 6 倍, 表明合成了具有生物学活性的 AI-2 (图 4)。

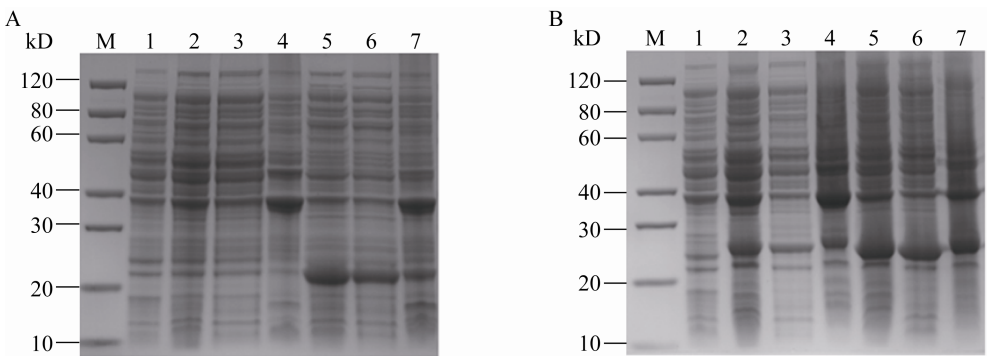


图 1 重组 LuxS 和 Pfs 的表达形式
Figure 1 Expression form of recombinant LuxS and Pfs

注: A: 重组 LuxS 的表达形式; B: 重组 Pfs 的表达形式。M: 蛋白质标准分子量; 1: BL21 全细胞裂解液; 2: 未诱导的重组菌全细胞裂解液; 3: 未诱导的重组菌细胞裂解液上清; 4: 未诱导的重组菌细胞裂解液沉淀; 5: 诱导的重组菌全细胞裂解液; 6: 诱导的重组菌细胞裂解液上清; 7: 诱导的重组菌细胞裂解液沉淀。

Note: A: Expression form of recombinant LuxS; B: Expression form of recombinant Pfs. M: Protein molecular weight marker; 1: BL21 whole cell lysate; 2: Uninduced whole cell lysate of recombinant strain; 3: Uninduced cell lysate’s supernatant of recombinant strain; 4: Uninduced cell lysate’s debris of recombinant strain; 5: Induced whole cell lysate of recombinant strain; 6: Induced cell lysate’s supernatant of recombinant strain; 7: Induced cell lysate’s debris of recombinant strain.

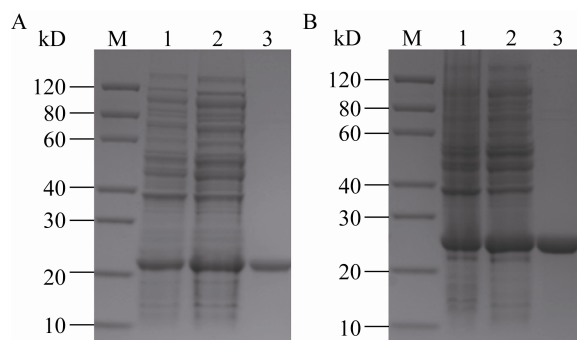


图2 重组LuxS和Pfs的纯化

Figure 2 Purification of recombinant LuxS and Pfs

注: A: 重组LuxS的纯化; B: 重组Pfs的纯化. M: 蛋白质标准分子量; 1: 诱导的重组菌全细胞裂解液; 2: 纯化前的重组菌细胞裂解液上清; 3: 纯化后的重组菌细胞裂解液上清.

Note: A: Purification of recombinant LuxS; B: Purification of recombinant Pfs. M: Protein molecular weight marker; 1: Induced whole cell lysate of recombinant strain; 2: Cell lysate's supernatant of recombinant strain before purification; 3: Purified cell lysate's supernatant of recombinant strain.

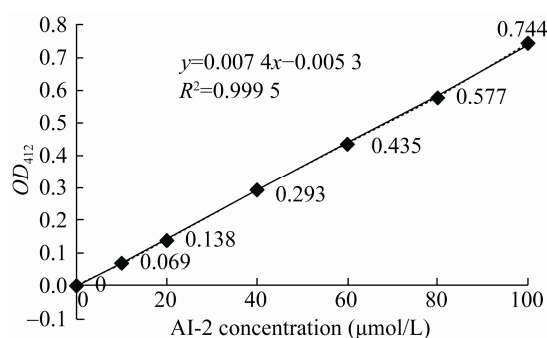


图3 同型半胱氨酸标准曲线

Figure 3 Standard curve of L-homocysteine

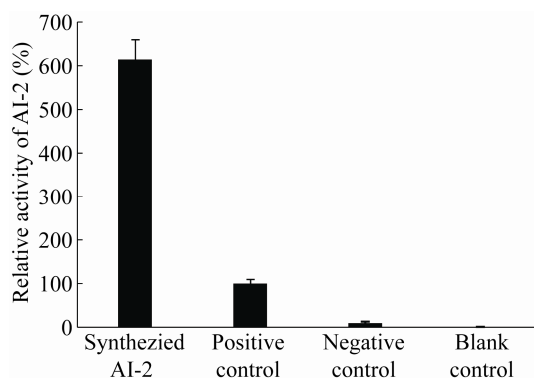


图4 体外合成AI-2的活性

Figure 4 Activity of AI-2 synthesized in vitro

2.3 AI-2对副溶血性弧菌四环素耐药性的影响

2.3.1 四环素亚抑菌浓度下AI-2对副溶血性弧菌生长的影响

通过菌落计数法测定四环素亚抑菌浓度下AI-2对副溶血性弧菌生长的影响,结果如图5所示,在测定的亚抑菌浓度下,四环素对副溶血性弧菌有显著的抑制作用,能使菌数降低67%–78%。当向体系添加终浓度为30 μmol/L的AI-2后,与添加四环素未添加AI-2的对照组菌数相比,Vp2009027和Vp2011007的菌数极显著增加($P<0.01$),Vp2015094的菌数显著增加($P<0.05$),表明AI-2能显著增强这3株菌对四环素的耐受性。而在没有四环素压力下,AI-2并没有显著促进菌株的生长。

2.3.2 四环素亚抑菌浓度下AI-2对副溶血性弧菌耐药基因转录水平的影响

菌株Vp2009027含有四环素耐药基因*tetB*,在四环素亚抑菌浓度30 μg/mL下,6、15和30 μmol/L

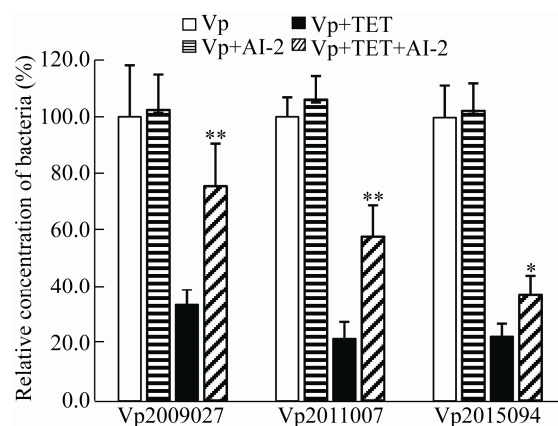


图5 AI-2对副溶血性弧菌生长的影响

Figure 5 Effect of AI-2 on the growth of *Vibrio parahaemolyticus*

注: *: 四环素亚抑菌浓度下添加AI-2组(Vp+TET+AI-2)与未添加AI-2组(Vp+TET)比较 $P<0.05$; **: 四环素亚抑菌浓度下添加AI-2组(Vp+TET+AI-2)与未添加AI-2组(Vp+TET)比较 $P<0.01$.

Note: *: At subinhibitory concentration of tetracycline, the group treating with AI-2 (Vp+TET+AI-2) was compared with control group without AI-2 (Vp+TET) $P<0.05$; **: At subinhibitory concentration of tetracycline, the group treating with AI-2 (Vp+TET+AI-2) was compared with control group without AI-2 (Vp+TET) $P<0.01$.

的 AI-2 均能促进 *tetB* 的转录水平, 在培养 12 h 时, 不同浓度 AI-2 均能显著提高 *tetB* 的转录水平 ($P<0.05$), 为对照组的 1.50–1.56 倍, 但 3 个浓度之间没有显著差异; 在培养 24 h 时, 不同浓度 AI-2 均能提高 *tetB* 的转录水平, 与对照组相比没有显著差异 ($P>0.05$), 3 种浓度之间也没有显著差异(图 6)。

菌株 Vp2011007 含有 *tetB* 和 *tetM* 两个四环素耐药基因, 在培养 12 h 时, 6 $\mu\text{mol/L}$ AI-2 能显著提高 *tetM* 的转录水平 ($P<0.05$), 为对照组的 1.39 倍, 30 $\mu\text{mol/L}$ 的 AI-2 能显著提高 *tetB* 和 *tetM* 的转录水平, 分别为对照组的 1.56 倍 ($P<0.05$) 和 1.64 倍 ($P<0.01$); 在培养 24 h 时, 6 $\mu\text{mol/L}$ 的 AI-2 能显著提高 *tetB* 和 *tetM* 的转录水平, 分别为对照组的 1.35 倍 ($P<0.05$) 和 1.67 倍 ($P<0.01$), 而 15 $\mu\text{mol/L}$ 和 30 $\mu\text{mol/L}$ 的 AI-2 却抑制 *tetM* 的转录水平(图 7)。

菌株 Vp2015094 同样含有两个四环素耐药基因 *tetB* 和 *tetM*, 在四环素亚抑菌浓度 60 $\mu\text{g/mL}$ 下, 培养 12 h 时, 30 $\mu\text{mol/L}$ 的 AI-2 能显著提高 *tetM* 的转录水平 ($P<0.05$), 为对照组的 1.50 倍; 培养 24 h 时, 15 $\mu\text{mol/L}$ 和 30 $\mu\text{mol/L}$ 的 AI-2 能极显著提高 *tetB* 和 *tetM* 的转录水平 ($P<0.01$), 为对照组的 1.65–1.78 倍(图 8)。

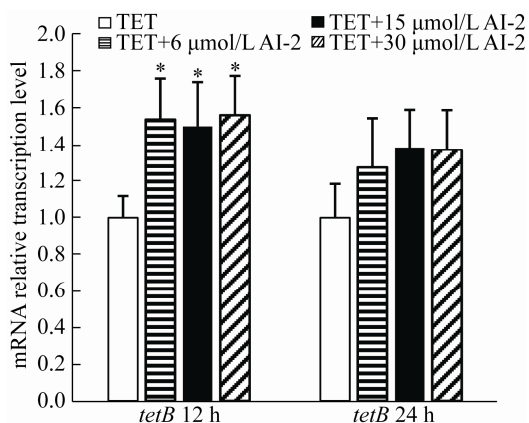


图 6 AI-2 对 Vp2009027 四环素耐药基因转录的影响
Figure 6 Effect of AI-2 on the transcription of tetracycline resistance gene in Vp2009027

注: *: 同一培养时间下, 添加 AI-2 组与未添加 AI-2 对照组比较 $P<0.05$ 。

Note: *: At the same culture time, the group treating with AI-2 was compared with control group without AI-2 $P<0.05$.

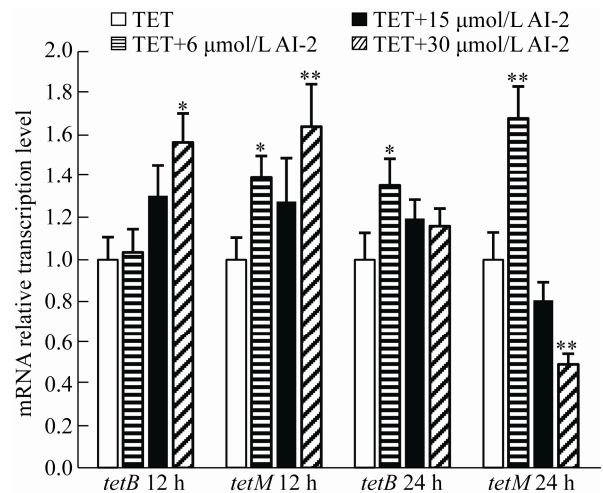


图 7 AI-2 对 Vp2011007 四环素耐药基因转录的影响
Figure 7 Effect of AI-2 on the transcription of tetracycline resistance genes in Vp2011007

注: *: 同一培养时间下, 添加 AI-2 组与未添加 AI-2 对照组比较 $P<0.05$; **: 同一培养时间下, 添加 AI-2 组与未添加 AI-2 对照组比较 $P<0.01$ 。

Note: *: At the same culture time, the group treating with AI-2 was compared with control group without AI-2 $P<0.05$; **: At the same culture time, the group treating with AI-2 was compared with control group without AI-2 $P<0.01$.

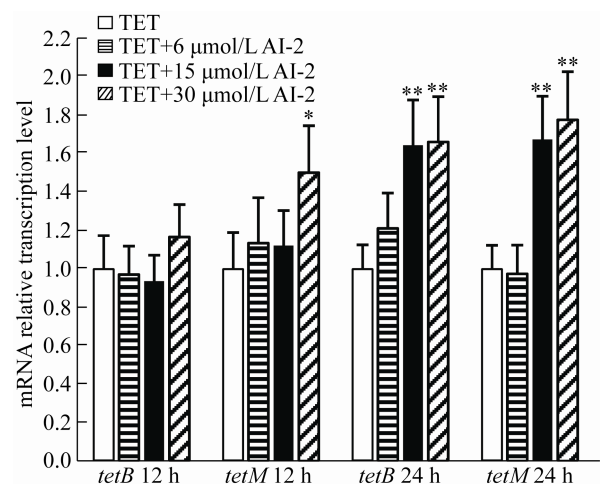


图 8 AI-2 对 Vp2015094 四环素耐药基因转录的影响
Figure 8 Effect of AI-2 on the transcription of tetracycline resistance genes in Vp2015094

注: *: 同一培养时间下, 添加 AI-2 组与未添加 AI-2 对照组比较 $P<0.05$; **: 同一培养时间下, 添加 AI-2 组与未添加 AI-2 对照组比较 $P<0.01$ 。

Note: *: At the same culture time, the group treating with AI-2 was compared with control group without AI-2 $P<0.05$; **: At the same culture time, the group treating with AI-2 was compared with control group without AI-2 $P<0.01$.

3 讨论

信号分子 AI-2 介导的群体感应系统广泛存在于革兰氏阳性菌和阴性菌,能调控细菌的许多重要生理功能,包括耐药性^[11-12,18-19]。近年来随着群体感应现象的深入研究,发现细菌耐药性与细菌群体现象相关,因此细菌的群体感应系统对细菌耐药性的调控作用成为研究新热点。研究 AI-2 对细菌耐药性的调控作用,其中一种方式是通过外源添加信号分子 AI-2 研究菌株耐药性或耐药基因转录水平的变化情况。目前国内缺乏商品化的信号分子 AI-2,因此 AI-2 的来源主要分为两种,一是以能产生 AI-2 野生株的无细胞培养上清作为 AI-2 的来源,二是通过重组表达制备合成关键酶 LuxS 和 Pfs 进而在体外合成 AI-2。由于野生株的无细胞培养上清成分复杂,对试验的干扰因素多,因此多采用体外合成 AI-2 的方式来获得该信号分子。目前已成功在体外合成禽致病性大肠埃希氏菌、变异链球菌、嗜水气单胞菌、植物乳杆菌、猪链球菌等细菌的 AI-2^[20-24]。其中对禽致病性大肠埃希氏菌的 *luxS* 和 *pfs* 进行原核表达,获得浓度分别为 2 mg/mL 和 1.5 mg/mL 的 LuxS 和 Pfs,体外合成的 AI-2 分子活性为阴性对照的 700 倍, AI-2 浓度为 300 $\mu\text{mol/L}$ ^[20],本实验制备的 AI-2 浓度与之相近,活性约为阳性对照的 6 倍,表明成功在体外合成了活性较高的 AI-2。

本实验从海产品中分离的副溶血性弧菌 Vp2009027、Vp2011007 和 Vp2015094 对四环素耐受,为了便于计数和比较,选择在四环素亚抑菌浓度环境下进行实验,由于合成的 AI-2 浓度接近 300 $\mu\text{mol/L}$,因此选择 300 $\mu\text{mol/L}$ 作为最高使用浓度(即终浓度为 30 $\mu\text{mol/L}$), 1/2 该浓度和 1/5 该浓度作为中浓度和低浓度进行实验。添加 AI-2 的副溶血性弧菌生长密度高于未添加 AI-2 的对照组,表明 AI-2 能促进副溶血性弧菌对四环素的耐受性,提高细胞存活率。推测 AI-2 在副溶血性弧菌的生长过程中激活副溶血性弧菌相关受体,进而

调控菌群行为,增强其对环境适应性,从而增强对抗菌药的耐药性。通过菌落计数可以显著表证出 AI-2 对细菌耐药性的调控作用,进一步利用实时荧光定量 PCR 从基因水平探究 AI-2 对细菌耐药性的调控作用,结果发现在四环素亚抑菌浓度下, AI-2 能在一定程度上提高副溶血性弧菌 Vp2009027、Vp2011007 和 Vp2015094 四环素耐药基因的转录水平,表明 AI-2 通过调控菌株耐药基因的转录水平来提高耐药性。已有报道,对 3 株禽源大肠埃希氏菌 APEC32、APEC28 和 APEC35 添加外源 AI-2 后, APEC28 与 APEC32 对金霉素的耐药性增强而 APEC35 的耐药性减弱,通过实时荧光定量 PCR 测定进一步证实 AI-2 促进 APEC32 和 APEC28 耐药基因 *tetA* 转录水平的提高,而 APEC35 的 *tetA* 转录水平则有所降低^[25]。表明 AI-2 对细菌四环素耐药基因的转录水平与耐药性的影响作用呈正相关,此外,这种相关性在细菌对其他抗菌药物的耐药调控作用上也得到证实。奶牛中分离的大肠埃希氏菌 ECDCM1 在氨苄西林、苯唑西林和青霉素的亚抑菌浓度下添加 AI-2 后耐药性得到了增强,相应地,添加 AI-2 后会导致 *tem* 基因的转录水平分别提高 2.1、2.4 和 2.4 倍^[26];大肠埃希氏菌 APEC32、APEC28 和 APEC56 对卡那霉素的耐药性则随着 AI-2 的添加呈下降趋势,相应地,外源 AI-2 导致卡那霉素耐药基因 *aadA* 转录水平下调^[27]。这些结果均表明, AI-2 通过调控细菌耐药基因的转录水平来增强或降低其耐药性。

在本实验中, AI-2 对副溶血性弧菌的四环素耐药性总体呈正调节的作用,而报道的不同大肠埃希氏菌菌株对不同抗菌药呈现正调节和负调节的作用,这可能与 AI-2 在体内的受体和调控途径不同相关。在弧菌中, AI-2 一般为硼酸酯类的信号分子,在菌体细胞周质空间被可溶性蛋白识别,胞内的效应蛋白接收到信号并启动磷酸化级联反应,从而对目的基因的转录进行调控,而大

肠埃希氏菌的 AI-2 分子结构不同, 无法启动磷酸化级联反应, 而是被 LsrB 蛋白捕捉后通过 ABC 转运蛋白运送到细胞内, 再对基因进行调控^[28]。在本实验中, AI-2 对不同菌株、不同 *tet* 基因转录水平的影响程度不同。对于菌株 Vp2015094, AI-2 对 *tet* 基因的调节与时间和浓度基本成正相关, 培养 24 h 时较高浓度(30 $\mu\text{mol/L}$ 和 15 $\mu\text{mol/L}$)的 AI-2 对菌株 *tet* 基因转录水平的促进作用更强; 对于菌株 Vp2009027, 不同浓度 AI-2 对 *tetB* 转录水平的正调节作用没有显著性差异, 可能是 AI-2 在该菌体中达到一定阈值后, 对基因的调控作用就不再增加; 而对于菌株 Vp2011007, 培养 24 h 时低浓度(6 $\mu\text{mol/L}$)的 AI-2 对四环素耐药基因转录水平的促进作用更强, 30 $\mu\text{mol/L}$ 的 AI-2 对 *tetB* 转录水平的促进作用降低, 甚至抑制 *tetM* 的转录水平, 可能是培养时间较长, 该菌株自身也合成了较高浓度的 AI-2, 推测胞外 AI-2 的浓度过高, 导致 AI-2 与受体结合后启动了对耐药基因不同程度的调控作用, 但由于双基因起作用, 总体上菌株表现的耐药性仍为增强。由于细菌的基因调控是一个复杂的过程, 目前没有 AI-2 对细菌耐药基因调控作用与其浓度相关性的报道, 也没有 AI-2 调控细菌耐药基因表达相关通路的报道, 因此本实验中呈现的耐药基因转录水平的多样性也无法明确解释。后续将通过转录组测序技术分析并挖掘 AI-2 对副溶血性弧菌四环素耐药性的调控通路, 从而进一步解析 AI-2 对 *tet* 基因转录水平的调控机制。

本实验通过外源添加的方式研究 AI-2 对副溶血性弧菌的调控作用, 研究表明 AI-2 参与调控细菌的耐药性。另一种研究 AI-2 功能的方式是敲除 AI-2 合成关键酶的基因, 从内部阻断 AI-2 的来源, 分析基因缺失株生理机能的变化。研究表明, 肠炎沙门氏菌 *luxS* 基因缺失株对氟喹诺酮类药物敏感性提高 128–256 倍, 对氨苄西林、四环素、多西环素、氯霉素和氟苯尼考类等的药物敏

感性提高了 8 倍^[12], 而 *luxS* 基因的缺失导致禽致病性大肠埃希氏菌 APEC 优势血清型 APEC01 对头孢吡肟和丁胺卡那由耐药变为高度敏感, 对氯霉素由高度敏感变为耐药, 使优势血清型 E940 对氯霉素由高度敏感变为耐药^[29]。基于此, 后续将通过敲除副溶血性弧菌 AI-2 合成关键基因, 比较耐药基因转录水平的差异, 进一步深入研究 AI-2 对副溶血性弧菌耐药性的调控机制, 并基于干扰 AI-2 的合成通路或降解 AI-2 的思路构建副溶血弧菌耐药性的控制技术。

4 结论

本研究以影响海产品质量安全的副溶血性弧菌为对象, 通过原核表达, 获得副溶血性弧菌信号分子 AI-2 的合成关键酶 LuxS 和 Pfs, 并在体外合成具有生物活性的 AI-2, 其荧光强度约为阳性对照的 6 倍。在四环素亚抑菌浓度下, 30 $\mu\text{mol/L}$ 浓度的 AI-2 能促进副溶血性弧菌 Vp2009027、Vp2011007 和 Vp2015094 的生长, 增强菌株的耐药性; 6、15、30 $\mu\text{mol/L}$ 浓度的 AI-2 能不同程度地提高副溶血性弧菌四环素耐药基因的转录水平, 提示 AI-2 通过调控菌株耐药基因的转录水平来提高耐药性。本文为解析副溶血性弧菌的耐药机制、研制以 AI-2 为靶点的副溶血性弧菌耐药性控制技术提供基础。

REFERENCES

- [1] Fujino T, Okuno Y, Nakada D, et al. On the bacteriological examination of Shirasu-food poisoning[J]. Medical Journal of Osaka University, 1953, 4: 299-304
- [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] Li WW, Wang ST, Liang JJ, et al. Analysis of foodborne disease outbreaks in China mainland in 2013[J]. Chinese Journal of Food Hygiene, 2018, 30(3): 293-298 (in Chinese)
李薇薇, 王三桃, 梁进军, 等. 2013 年中国大陆食源性疾病暴发监测资料分析[J]. 中国食品卫生杂志, 2018, 30(3): 293-298

- [4] Fu P, Liu ZT, Liang JH, et al. Analysis of foodborne disease outbreaks in mainland China in 2014[J]. Chinese Journal of Food Hygiene, 2018, 30(6): 628-634 (in Chinese)
付萍, 刘志涛, 梁骏华, 等. 2014 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, 2018, 30(6): 628-634
- [5] Fu P, Wang LS, Chen J, et al. Analysis of foodborne disease outbreaks in China mainland in 2015[J]. Chinese Journal of Food Hygiene, 2019, 31(1): 64-70 (in Chinese)
付萍, 王连森, 陈江, 等. 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
- [6] Elmahdi S, DaSilva LV, Parveen S. Antibiotic resistance of *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio vulnificus* in various countries: a review[J]. Food Microbiology, 2016, 57: 128-134
- [7] Jiang YH, Yao L, Li FL, et al. Research progress on antibiotic resistance of *Vibrio parahaemolyticus* and its mechanism[J]. Chinese Fishery Quality and Standards, 2013, 3(4): 96-102 (in Chinese)
江艳华, 姚琳, 李凤铃, 等. 副溶血性弧菌的耐药状况及耐药机制研究进展[J]. 中国渔业质量与标准, 2013, 3(4): 96-102
- [8] Zhang DF, An H, Zhang J, 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)
张德福, 安慧, 张健, 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
- [9] Waters CM, Bassler BL. Quorum sensing: cell-to-cell communication in bacteria[J]. Annual Review of Cell and Developmental Biology, 2005, 21: 319-346
- [10] Bassler BL, Wright M, Silverman MR. Multiple signalling systems controlling expression of luminescence in *Vibrio harveyi*: sequence and function of genes encoding a second sensory pathway[J]. Molecular Microbiology, 1994, 13(2): 273-286
- [11] Ahmed NAAM, Petersen FC, Scheie AA. AI-2 quorum sensing affects antibiotic susceptibility in *Streptococcus anginosus*[J]. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2007, 60(1): 49-53
- [12] Yu YC, Wang LL, Pan Q, et al. 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)
于艳超, 王莉莉, 潘巧, 等. 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
- [13] Rajan R, Zhu JG, Hu XB, et al. Crystal structure of S-ribosylhomocysteine (LuxS) in complex with a catalytic 2-ketone intermediate[J]. Biochemistry, 2005, 44(10): 3745-3753
- [14] Beeston AL, Surette MG. Pfs-Dependent regulation of autoinducer 2 production in *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium[J]. Journal of Bacteriology, 2002, 184(13): 3450-3456
- [15] 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
- [16] Taga ME, Xavier KB. Methods for analysis of bacterial autoinducer-2 production[J]. Current Protocols in Microbiology, 2011, 23(1): 1C.1.1-1C.1.15
- [17] 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
- [18] Federle MJ, Bassler BL. Interspecies communication in bacteria[J]. Journal of Clinical Investigation, 2003, 112(9): 1291-1299
- [19] Guo MH, Fang ZJ, Sun LJ, 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
- [20] 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
- [21] Zhang Y, Li MY, Huo L, et al. Biosynthesis of autoinducer-2 and determination of its bioactivity *in vitro*[J]. International Journal of Stomatology, 2016, 43(5): 519-523 (in Chinese)
张鹰, 李明勇, 霍丽, 等. 变异链球菌自诱导物 2 信号分子的体外合成与活性检测[J]. 国际口腔医学杂志, 2016, 43(5): 519-523
- [22] Zhao J, Zhang FR, Cui Y, et al. *In vitro* biosynthesis and activity detection of quorum sensing signal molecule AI-2 of *Aeromonas hydrophila*[J]. Microbiology China, 2015, 42(10): 1858-1865 (in Chinese)
赵晶, 张福蓉, 崔一, 等. 嗜水气单胞菌群体感应信号分子 AI-2 的细胞外生物合成及活性检测[J]. 微生物学通报, 2015, 42(10): 1858-1865
- [23] 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
- [24] Wang Y, Wang YX, Sun LY, et al. The LuxS/AI-2 system of *Streptococcus suis*[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2018, 102(17): 7231-7238
- [25] Liu ZC. The regulatory mechanism of AI-2 quorum sensing of avian pathogenic *Escherichia coli* chlortetracycline drug resistance[D]. Hefei: Master's Thesis of Anhui Agricultural University, 2018 (in Chinese)
- 刘志超. AI-2 群体感应对禽致病大肠杆菌金霉素耐药性的调控机制[D]. 合肥: 安徽农业大学硕士学位论文, 2018
- [26] Xue T, Yu LM, Shang F, et al. 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
- [27] Li WC. Regulatory mechanism of AI-2 quorum sensing on antibiotic resistance in avian pathogenic *Escherichia coli*[D]. Hefei: Master's Thesis of Anhui Agricultural University, 2017 (in Chinese)
- 李文昌. AI-2 群体感应系统对禽致病大肠杆菌耐药性的调控机制研究[D]. 合肥: 安徽农业大学硕士学位论文, 2017
- [28] Pereira CS, Thompson JA, Xavier KB. AI-2-mediated signalling in bacteria[J]. *FEMS Microbiology Reviews*, 2013, 37(2): 156-181
- [29] Lü XL, Hu JG, Chen ZG, et al. 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)
- 吕小龙, 胡剑刚, 陈兆国, 等. *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

征 稿 简 则

1 刊物简介与刊登内容

《微生物学通报》是由中国科学院微生物研究所和中国微生物学会主办, 以微生物学应用基础研究及技术创新与应用为主的综合性学术期刊。本刊为月刊, 中文核心期刊, 中国科技核心期刊, CSCD 核心期刊, 曾获国家优秀科技期刊三等奖, 中国科学院优秀科技期刊三等奖, 并在新闻出版署设立的“中国期刊方阵”中被列为“双效”期刊。从 2012 年至今, 本刊以国内“微生物、病毒学类期刊”综合评价总分第一而蝉联“百种中国杰出学术期刊奖”, 并入选 300 种“中国精品科技期刊”, 成为“中国精品科技期刊顶尖学术论文(F5000)”项目来源期刊。

本刊刊登内容包括: 工业、海洋、环境、基础、农业、食品、兽医、水生、药物、医学微生物学和微生物蛋白质组学、功能基因组、工程与药物等领域的最新研究成果、产业化新技术和新进展, 以及微生物学教学研究改革等。设置的栏目有: 研究报告、专论与综述、生物实验室、高校教改纵横、专栏等。

2 投稿方式

投稿时请登录我刊主页 <http://journals.im.ac.cn/wwxtbcn>, 点击作者投稿区, 第一次投稿请先注册, 获得用户名和密码, 然后依照提示提交稿件, 详见主页“投稿须知”。

3 写作要求

3.1 来稿要求论点明确, 数据可靠, 简明通顺, 重点突出。

3.2 英文摘要写作注意事项: (1) 建议使用第一人称, 以此可区分研究结果是引用文献还是作者所得; (2) 建议用主动语态, 被动语态表达拖拉模糊, 尽量不用, 这样可以避免长句, 以求简单清晰; (3) 建议使用过去时态, 要求语法正确, 句子通顺; (4) 英文摘要的内容应与中文摘要一致, 但可比中文摘要更详尽, 写完后务必请英文较好且专业知识强的专家审阅定稿后再投稿; (5) 摘要中不要使用缩写语, 除非是人人皆知的, 如: DNA、ATP 等; (6) 在英文摘要中不要使用中文字体标点符号。

3.3 关键词: 应明确、具体, 一些模糊、笼统的词语最好不用, 如“基因”“表达”等。

3.4 脚注(正文首页下方):

Foundation items:

*Corresponding author: Tel: 86-; E-mail:

Received: 01-01-20xx; Accepted: 01-03-20xx; Published online: 31-03-20xx

基金项目: 基金项目(编号)

*通信作者: Tel: ; E-mail:

收稿日期: 20xx-01-01; 接受日期: 20xx-03-01; 网络首发日期: 20xx-03-31

(下转 p.1365)