

研究报告

信号分子 AI-2 合成关键基因 *luxS* 对嗜盐喜盐芽孢杆菌盐适应性的影响

王卓*, 王传旭, 杨静, 李云杰, 牛亚洁, 李新*

运城学院 运城盐湖生态保护与资源利用厅市共建山西省重点实验室, 山西 运城 044000

王卓, 王传旭, 杨静, 李云杰, 牛亚洁, 李新. 信号分子 AI-2 合成关键基因 *luxS* 对嗜盐喜盐芽孢杆菌盐适应性的影响[J]. 微生物学通报, 2024, 51(11): 4517-4534.

WANG Zhuo, WANG Chuanxu, YANG Jing, LI Yunjie, NIU Yajie, LI Xin. Effects of the critical gene *luxS* related to synthesis of AI-2 on salt adaptability of *Halobacillus halophilus*[J]. Microbiology China, 2024, 51(11): 4517-4534.

摘要:【背景】群体感应信号分子 AI-2 是由 S-核糖基高半胱氨酸裂解酶(S-ribosylhomocysteinase, LuxS)和 S-腺苷高半胱氨酸核苷酶(S-adenosylhomocysteine nucleosidase, Pfs, 也被称为 MtnN)催化 S-腺苷高半胱氨酸(S-adenosylhomocysteine, SAH)生成的 4,5-二羟基-2,3-戊二酮(4,5-dihydroxy-2,3-pentanedione, DPD)自发环化形成, 在细菌中广泛参与调节多种重要的生理过程, 如趋化、生物发光、生物膜形成等; 然而该信号分子对嗜盐喜盐芽孢杆菌盐适应性的影响尚未报道。【目的】对嗜盐喜盐芽孢杆菌(*Halobacillus halophilus*)群体感应信号分子 AI-2 进行体外合成并揭示 AI-2 对嗜盐喜盐芽孢杆菌盐适应性的影响。【方法】以嗜盐喜盐芽孢杆菌为研究对象, 首先通过实时定量 PCR 分析 *luxS* 转录水平与盐浓度之间的联系; 之后对 LuxS、MtnN-1、MtnN-2、MtnN-3 进行多序列比对分析寻找其关键氨基酸位点并通过异源表达纯化 4 种蛋白进行 AI-2 的体外合成; 最后使用同源重组方法敲除 *luxS* 并通过盐胁迫、胞内相容性溶质含量检测、生物膜形成检测等试验研究 *luxS* 对嗜盐喜盐芽孢杆菌盐适应性的影响。【结果】实时定量分析表明嗜盐喜盐芽孢杆菌中 *luxS* 的转录水平随盐浓度上升而上调, 而且受到 Cl⁻ 离子浓度的正向调控。生长曲线结合生物发光试验表明随着嗜盐喜盐芽孢杆菌的生长, 培养液上清中 AI-2 活性在 15 h 达到最大, 此外随着盐浓度的提高, 其 AI-2 活性也会增强。体外酶促反应试验表明 LuxS 能够与 MtnN-1 或 MtnN-2 共同催化合成 AI-2。利用同源重组技术成功构建了嗜盐喜盐芽孢杆菌 *luxS* 缺失突变体, 在低盐条件下(0.5 mol/L NaCl)野生型、*luxS* 缺失突变体

资助项目: 国家自然科学基金(32300111); 山西省科技创新人才团队项目(202204051001035); 山西省基础研究计划(202303021212258); 运城市基础研究计划(YCKJ-2023030); 博士来晋科研专项(QZX-2023006); 运城学院博士启动基金(YQ-2023005); 运城学院应用研究项目(YY-202302)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (32300111), the Special Fund for Science and Technology Innovation Teams of Shanxi Province (202204051001035), the Fundamental Research Program of Shanxi Province (202303021212258), the Yuncheng Fundamental Research Program (YCKJ-2023030), the Doctoral Scientific Startup Fund of Shanxi Province (QZX-2023006), the Doctoral Scientific Startup Fund of Yuncheng University (YQ-2023005), and the Applied Research Project of Yuncheng University (YY-202302).

*Corresponding authors. E-mail: WANG Zhuo, wangzhuojs@ycu.edu.cn; LI Xin, lixin-eva@163.com

Received: 2024-07-31; Accepted: 2024-09-18; Published online: 2024-09-30

和互补菌株的生长曲线无明显差异,而在高盐条件下(3.5 mol/L NaCl) *luxS* 突变体的生长较为缓慢,互补菌株则能够恢复到与野生型相似的生长状况。此外, *luxS* 的缺失会导致嗜盐喜盐芽孢杆菌在高盐条件下的盐胁迫存活率、胞内相容性溶质含量以及生物膜形成能力的下降,而互补菌株则可以恢复到接近野生型的水平。【结论】嗜盐喜盐芽孢杆菌能够合成信号分子 AI-2,其 *luxS* 受到 Cl⁻ 离子浓度的正向调控并对其盐适应性具有重要的调控作用,为进一步研究嗜盐喜盐芽孢杆菌的盐适应性调节机制提供基础。

关键词:嗜盐喜盐芽孢杆菌; AI-2; LuxS; 盐适应性; 相容性溶质

Effects of the critical gene *luxS* related to synthesis of AI-2 on salt adaptability of *Halobacillus halophilus*

WANG Zhuo^{*}, WANG Chuanxu, YANG Jing, LI Yunjie, NIU Yajie, LI Xin^{*}

Shanxi Key Laboratory of Yuncheng Salt Lake Ecological Protection and Resource Utilization, Yuncheng University, Yuncheng 044000, Shanxi, China

Abstract: [Background] The quorum sensing signal molecule AI-2 is spontaneously cyclized from 4,5-dihydroxy-2,3-pentanedione (DPD), which is derived from S-adenosylhomocysteine (SAH) via catalysis by S-ribosylhomocysteinase (LuxS) and S-adenosylhomocysteine nucleosidase (Pfs, also known as MtnN). AI-2 regulates a variety of physiological processes including chemotaxis, bioluminescence, and biofilm formation of bacteria. However, the effect of AI-2 on the salt adaptability of *Halobacillus halophilus* has not been reported. [Objective] To synthesize AI-2 *in vitro* and reveal its effect on the salt adaptability of *H. halophilus*. [Methods] The relationship between *luxS* transcript level in *H. halophilus* and salt concentration was assessed by real-time quantitative PCR. Then, multiple sequence alignments of LuxS, MtnN-1, MtnN-2, and MtnN-3 were performed to identify the key amino acid sites, and the four proteins were heterologously expressed and purified for the synthesis of AI-2 *in vitro*. Finally, *luxS* was knocked out by homologous recombination, and the effect of *luxS* on the salt adaptability of *H. halophilus* was studied through salt stress assay, intracellular compatible solute content determination, and biofilm formation assay. [Results] The transcript level of *luxS* in *H. halophilus* increased with the elevation in salt concentration and was positively regulated by the Cl⁻ concentration. The growth curve and bioluminescence assay showed that as *H. halophilus* grew, the AI-2 activity in the supernatant of the culture medium reached the maximum at 15 h, and it enhanced with the increase in salt concentration. The *in vitro* enzymatic reaction assay showed that LuxS collaborated with MtnN-1 or MtnN-2 to catalyze the synthesis of AI-2. The *luxS*-deleted mutant of *H. halophilus* was successfully constructed by homologous recombination. Under a low salt concentration (0.5 mol/L NaCl), there were no significant differences in the growth curves between the wild type, *luxS*-deleted mutant, and complementary strain. However, under high salt (3.5 mol/L NaCl), the *luxS*-deleted mutant grew slow, while the complementary strain demonstrated a growth trend similar to that of the wild type. Furthermore, the deletion of *luxS* led to decreases in the survival

rate, intracellular compatible solute content, and biofilm formation of *H. halophilus* under salt stress, whereas the complementary strain could recover to the levels close to those of the wild type. **[Conclusion]** *H. halophilus* can synthesize AI-2, and its *luxS* is positively regulated by the Cl^- concentration and plays an important role in regulating salt adaptability. The findings provide a basis for further research on the regulatory mechanism of salt adaptability in *H. halophilus*.

Keywords: *Halobacillus halophilus*; AI-2; LuxS; salt adaptability; compatible solute

群体感应系统是指微生物在生长中会分泌一些名为自诱导物(autoinducer, AI)的信号分子,随着群体密度增加而不断积累,在达到临界浓度之后,会被微生物的相关受体蛋白识别,进而调节其群体的生理特征^[1-2]。微生物可以分泌多种 AI 信号分子,如酰基高丝氨酸内酯(acyl homoserine lactone, AHL)和 2-庚基-3-羟基-4-喹诺酮等^[3-4]。其中自诱导物 2 (autoinducer-2, AI-2)的合成依赖于 S-核糖基高半胱氨酸裂解酶(S-ribosylhomocysteinase, LuxS)和 S-腺苷高半胱氨酸核糖苷酶(S-adenosylhomocysteine nucleosidase, Pfs, 也被称为 MtnN)^[5], S-腺苷高半胱氨酸(S-adenosylhomocysteine, SAH)在 LuxS 和 Pfs 作用下生成 4,5-二羟基-2,3-戊二酮(4,5-dihydroxy-2,3-pentanedione, DPD),DPD 自发环化形成 AI-2^[6]。由于 LuxS 广泛存在于细菌中,因此 AI-2 也被认为是种间信号分子,参与调节细菌诸多重要的生理过程,如生物膜形成和毒素分泌等^[6-8]。此外,许多研究也表明 LuxS/AI-2 群体感应系统能够调节细菌对各种胁迫环境的适应能力^[9],如抗生素胁迫^[1]、热胁迫和盐胁迫^[10-11]。

嗜盐细菌是一类只有在一定浓度的盐介质中才能正常生长的极端环境微生物,根据其最适生长的盐浓度可分为轻度嗜盐细菌(0.2–0.5 mol/L)、中度嗜盐细菌(0.5–2.0 mol/L)以及极端嗜盐细菌(3.0 mol/L 以上)^[12-13]。由于特殊的高盐生态环境,嗜盐细菌进化出复杂而精巧的盐适应机

制,是研究微生物抗盐胁迫机制的重要素材,尤其是中度嗜盐细菌能够应对如此宽泛的盐度变化,因而吸引了众多研究学者对其进行研究。

通常情况下,中度嗜盐细菌可以通过合成一些小分子相容性溶质来应对高盐环境^[14],例如在嗜盐喜盐芽孢杆菌(*Halobacillus halophilus*)中可以通过合成积累甘氨酸、甜菜碱、谷氨酸、谷氨酰胺、脯氨酸和四氢嘧啶等来缓解高盐环境对细胞的胁迫^[15-17]。此外, Sewald 等^[18]发现嗜盐喜盐芽孢杆菌 *luxS* 的表达水平严格依赖于培养基中的盐浓度,随盐浓度的上升而上调。然而,嗜盐喜盐芽孢杆菌是否能够合成有活性的 AI-2 信号分子,以及 AI-2 对嗜盐喜盐芽孢杆菌盐适应性的影响仍然未知。因此,本研究对嗜盐喜盐芽孢杆菌的 AI-2 信号分子进行检测,同时通过异源表达纯化其 LuxS 和 Pfs 同源蛋白,并通过体外酶促反应实现 AI-2 的体外合成和活性检测;之后构建嗜盐喜盐芽孢杆菌的 *luxS* 缺失突变体,并通过盐胁迫、胞内相容性溶质含量检测及生物膜形成能力检测等试验探究 AI-2 对嗜盐喜盐芽孢杆菌盐适应性的影响,旨在为嗜盐喜盐芽孢杆菌的开发利用和盐适应性机制的深入研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 菌株、质粒及引物

本研究所使用的菌株和质粒信息详见表 1,引物信息详见表 2。

表 1 本研究所用菌株和质粒

Table 1 Strains and plasmids used in this work

Strain and plasmid	Relevant characteristic	Source
<i>Escherichia coli</i>		
TG1	Host for cloning	Laboratory collection
BL21(DE3)	F ⁻ <i>ompT hsdS</i> (r _B ⁻ , m _B ⁻) <i>gal dcm</i> (DE3)	Laboratory collection
<i>Halobacillus halophilus</i>		
<i>H. halophilus</i> DSM 2266 (ATCC 35676)	Wild-type	[18]
$\Delta luxS$	<i>luxS</i> deletion mutant derived from <i>H. halophilus</i>	This study
<i>Vibrio harveyi</i>		
<i>V. harveyi</i> MM32	<i>luxN::cat luxS::Tn5kan</i>	[19]
Plasmids		
pET-28a	Expression vector with N-terminal His ₆ affinity tag; Kan ^r	Laboratory collection
pET-28a- <i>luxS</i>	pET-28a expressing <i>luxS</i>	This study
pET-28a- <i>mtnN-1</i>	pET-28a expressing <i>mtnN-1</i>	This study
pET-28a- <i>mtnN-2</i>	pET-28a expressing <i>mtnN-2</i>	This study
pET-28a- <i>mtnN-3</i>	pET-28a expressing <i>mtnN-3</i>	This study
pHH Δpro	pTOPO derivative for generation of deletion mutants; Chl ^r	[20]
pHH- $\Delta luxS$	Containing <i>luxS</i> knockout fragment	This study
pHT01	IPTG inducible expression vector; Amp ^r ; Chl ^r	Laboratory collection
pHT01- <i>luxS</i>	<i>luxS</i> was cloned into pHT01	This study

Kan: Kanamycin; Chl: Chloramphenicol; Amp: Ampicillin.

表 2 本研究所使用的引物

Table 2 primers used in this work

Primer	Sequence (5'→3')	Purpose
UP-F	TACG CCAAGCTTGGTACCGAGCTCGGATCCGAATCTAAATCAGAACCACC	To generate pHH- $\Delta luxS$
UP-R	CCTTCGTTTAAAATCATTCTCCTTTTTTTTG	
DOWN-F	AGAATGATTTTAAACGAAGGGTGAGAGTGC	To generate pET-28a- <i>luxS</i>
DOWN-R	CTCA CTATAGGGCGAATTGGGCCCTCTAGAGAAAGACCGTTACAATTCT	
<i>luxS</i> -F	AACA ATTCCCAATTAAAGGAGGAAGGATCCATGACACAGATGAACGTAGA	To generate pET-28a- <i>luxS</i>
<i>luxS</i> -R	GCGG GCTGCCCCGGGGACGTCGACTCTAGATTAATAAACTTCCGTCCATT	
<i>luxS</i> -HF	ACTG GTGGACAGCAAAATGGGTGCGGGATCCATGACACAGATGAACGTAGA	To generate pET-28a- <i>mtnN-1</i>
<i>luxS</i> -HR	GTGG TGGTGCTCGAGTGC GGCCGCAAGCTTTTAAAAAACTTCCGTCCATT	
<i>mtnN-1</i> -HF	ACTG GTGGACAGCAAAATGGGTGCGGGATCCATGGCAATTGGTATTATCGGA	To generate pET-28a- <i>mtnN-1</i>
<i>mtnN-1</i> -HR	GTGG TGGTGCTCGAGTGC GGCCGCAAGCTTCTATTTCATAATGAGTAACCAT	
<i>mtnN-2</i> -HF	ACTG GTGGACAGCAAAATGGGTGCGGGATCCATGAATTTTAAACAAAGTGTC	To generate pET-28a- <i>mtnN-2</i>
<i>mtnN-2</i> -HR	GTGG TGGTGCTCGAGTGC GGCCGCAAGCTTCTAAATACCTTTTAACATTTC	
<i>mtnN-3</i> -HF	ACTG GTGGACAGCAAAATGGGTGCGGGATCCATGAAAAAATACGCTTCACTC	To generate pET-28a- <i>mtnN-3</i>
<i>mtnN-3</i> -HR	GTGG TGGTGCTCGAGTGC GGCCGCAAGCTTTTATTTCGCCTGTTTGGGTAGT	
<i>luxS</i> -RT-F	AACCGAAGGAGATAAAGG	RT-qPCR
<i>luxS</i> -RT-R	CATCAGGTGTTCAAGGGA	
16S-RT-F	AAGGCTGAAACTCAAAGGA	
16S-RT-R	AACCCAACATCTCACGACAC	

粗体序列为无缝克隆同源臂

Letters in boldface denote overlap fragment added for Seamless Cloning.

1.2 培养基和主要试剂、仪器

LB 培养基(g/L): 蛋白胨 10.0, 酵母提取物 5.0, NaCl 10.0; AB 培养基(g/L): 酸水解酪蛋白 2.0, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 12.3, NaCl 17.5, 灭菌后补加 1%丙三醇, 1 mmol/L L-精氨酸, 10 mmol/L 磷酸钾缓冲液(pH 7.0); Marine Broth 2216, BD 公司; 固体培养基额外加入 1.5%琼脂。

DNA 聚合酶和限制性快切酶, 北京宝日生物技术有限公司; 无缝克隆试剂盒, 上海碧云天生物技术公司; AI-2 信号分子, 上海赛可锐生物科技有限公司; DNA 胶回收试剂盒、质粒小提试剂盒、细菌基因组 DNA 提取试剂盒、细菌总 RNA 提取试剂盒、反转录试剂盒、实时荧光定量 PCR 试剂盒, 北京天根生化科技有限公司。

蛋白胨、酵母提取物, OXOID 公司; 过硫酸铵、硫酸镁、氯化镁、氯化钙、氯化钠、葡萄糖、冰乙酸、无水乙醇、磷酸二氢钾、磷酸氢二钾等常规试剂均为分析纯, 广东光华科技有限公司; SAH、5,5'-二硫代双-(2-硝基苯甲酸) [5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid), DTNB]、四氢嘧啶以及脯氨酸, Sigma 公司; 十二烷基磺酸钠、IPTG、三羟甲基氨基甲烷(Tris)、结晶紫、琼脂糖、抗生素等, 北京索莱宝科技有限公司。

电子天平和核酸电泳仪, 上海天能科技有限公司; 超净工作台、PCR 仪、凝胶成像仪、恒温水浴锅、氨基酸分析仪、多功能酶标仪, PerkinElmer; 高速离心机和超微量分光光度计, ThermoFisher Scientific 公司; 荧光定量 PCR 仪, Roche 公司。

1.3 培养条件

大肠杆菌以及在此基础上构建的克隆菌株和表达菌株等均在 37 °C、220 r/min 条件下培养, 培养时使用的抗生素终浓度为: 氨苄青霉素

100 µg/mL、卡那霉素 50 µg/mL、氯霉素 20 µg/mL; 嗜盐喜盐芽孢杆菌以及在此基础上构建的突变体菌株等均在 30 °C、220 r/min 条件下培养, 抗生素使用终浓度为: 氯霉素 25 µg/mL。

1.4 嗜盐喜盐芽孢杆菌 AI-2 的活性检测

嗜盐喜盐芽孢杆菌 AI-2 的活性检测参考文献[7]并加以修改。在生长曲线测定过程中, 每隔 3 h 取 200 µL 嗜盐喜盐芽孢杆菌菌液, 通过 8 000 r/min 离心 5 min 除去菌体, 经 0.22 µm 除菌滤膜过滤后保留无细胞上清, 置于-20 °C 保存备用; 挑取哈维氏弧菌(*Vibrio harveyi*) MM32 单菌落接种于 AB 培养基^[19]中培养过夜; 将培养过夜的 MM32 菌液用 AB 培养基稀释 5 000 倍后, 取 90 µL 加入黑色 96 孔板中; 各取 10 µL 样品、阳性对照(AI-2 标准品)和阴性对照(新鲜无菌培养基)分别加入到相应的孔中, 30 °C、100 r/min 低速振荡培养 4 h 后, 将 96 孔板放入多功能酶标仪进行发光强度检测并记录数据, AI-2 活性用相对发光强度表示。

1.5 转录水平的检测

嗜盐喜盐芽孢杆菌培养过夜至稳定期后分别转接至含有 0.5、1.0 和 2.0 mol/L NaCl 的 Marine Broth 2216 液体培养基, 30 °C、220 r/min 培养至 OD_{600} 为 2.6。将待测试菌液 OD_{600} 值调整一致后, 各取 1 mL 菌液利用细菌总 RNA 提取试剂盒提取 RNA, 将提取后的 RNA 浓度调节一致后利用反转录试剂盒反转录成 cDNA, 以嗜盐喜盐芽孢杆菌 16S rRNA 基因(引物: 16S-RT-F/16S-RT-R)为内参基因, 采用实时荧光定量 PCR 试剂盒进行实时荧光定量 PCR, 检测不同样品 *luxS* (引物: *luxS*-RT-F/*luxS*-RT-R)的转录水平。荧光定量 PCR 反应体系: 2×RealUniversal PreMix 10 µL, 正、反向引物(10 µmol/L)各 1 µL, cDNA 80 ng, 超纯水补足 20 µL。荧光定量 PCR 反应条件: 95 °C 15 min; 95 °C 10 s, 60 °C 30 s,

40个循环;熔解曲线分析按仪器默认程序进行。

1.6 氨基酸多序列比对分析

从KEGG数据库中(<https://www.kegg.jp/>)分别选取具有代表性的LuxS和MtnN氨基酸序列,使用ClustalX 2.1软件进行氨基酸序列的比对分析,结果通过在线工具ESPrict2进行美化导出。

1.7 蛋白的异源表达和纯化

使用细菌基因组DNA提取试剂盒提取嗜盐喜盐芽孢杆菌基因组。使用引物*luxS*-HF/*luxS*-HR以基因组为模板扩增*luxS*全长片段,目的片段胶回收后通过无缝克隆连接至表达载体pET-28a上得到LuxS重组蛋白的表达质粒pET-28a-*luxS*并将其转入大肠杆菌BL21(DE3)中。构建好的表达菌株培养过夜后,转接于含有500 mL LB液体培养基锥形瓶中扩大培养,37℃、180 r/min振荡培养至 OD_{600} 为0.6左右,加入诱导剂IPTG(终浓度为0.3 mmol/L)后摇床参数调整为22℃、140 r/min诱导10 h。8 000 r/min离心5 min,收集菌体后用150 mL His蛋白结合缓冲液重悬菌体,重悬菌液经超声破碎(200 W,15 min,工作5 s,间隔5 s)后于4℃、8 500 r/min离心1 h收集上清。上清通过Ni²⁺-NTA亲和层析柱材后,使用His蛋白洗涤缓冲液和His蛋白洗脱缓冲液进行纯化洗脱,得到的His₆-LuxS重组蛋白经透析、蛋白质浓度测定和SDS-PAGE凝胶电泳检测后保存在-80℃超低温冰箱待用。MtnN-1、MtnN-2、MtnN-3重组蛋白采用类似的方法纯化得到。

1.8 AI-2 体外合成

AI-2体外合成参考文献[21]并加以修改。25 mmol/L pH 7.5的Tris Buffer中加入1 mmol/L SAH、1 mg/mL纯化的LuxS和MtnN-1蛋白(或MtnN-2、MtnN-3蛋白),30℃反应1 h后通过截留分子量3 kDa的超滤离心管(Millipore)去除

反应液中的蛋白。AI-2的浓度采用DTNB试剂进行检测^[22]。

1.9 突变体和互补菌株的构建

嗜盐喜盐芽孢杆菌突变体的构建方法参考文献[20]并加以修改。使用细菌基因组DNA提取试剂盒提取嗜盐喜盐芽孢杆菌基因组。以基因组作为模板,分别使用2对引物(UP-F/UP-R和DOWN-F/DOWN-R)通过PCR扩增出待敲除基因*luxS*的上游和下游同源臂。PCR反应体系:2×Buffer 25 μL, dNTPs (2.5 mmol/L) 8 μL, 基因组模板 800 ng, 正、反向引物(10 μmol/L)各2 μL, DNA聚合酶 0.5 μL, 超纯水补足 50 μL。PCR反应条件:94℃ 5 min; 94℃ 30 s, 52℃ 30 s, 72℃ 1 kb/min, 30个循环; 16℃ 30 min。通过重叠PCR将*luxS*-UP和*luxS*-DOWN连接起来得到敲除片段 $\Delta luxS$,再通过无缝克隆的方式将敲除片段连接至pHH载体,获得敲除质粒pHH- $\Delta luxS$ 。构建好的敲除质粒pHH- $\Delta luxS$ 通过原生质体转化^[20]转入嗜盐喜盐芽孢杆菌中,涂布于含有25 μg/mL氯霉素的Marine Broth 2216固体培养基上,30℃倒置培养。挑取长出的单菌落,经PCR验证后即为单交换菌株。验证正确后将其接种于不添加任何抗生素的Marine Broth 2216液体培养基中培养过夜,培养物适当稀释后涂布于Marine Broth 2216固体培养基,30℃倒置培养。挑取长出的单菌落经氯霉素抗性检测、PCR验证和测序后即得到*luxS*的单基因缺失突变体。以基因组作为模板,使用引物*luxS*-F和*luxS*-R通过PCR扩增出*luxS*。PCR反应体系:2×Buffer 25 μL, dNTPs (2.5 mmol/L) 8 μL, 基因组模板 800 ng, 正、反向引物(10 μmol/L)各2 μL, DNA聚合酶 0.5 μL, 超纯水补足 50 μL。PCR反应条件:94℃ 5 min; 94℃ 30 s, 52℃ 30 s, 72℃ 1 kb/min, 30个循环; 16℃ 30 min。通过无缝克隆将PCR产物连

接至 pHT01 载体, 获得互补质粒 pHT01-*luxS*, 再通过电转将其转入 *luxS* 缺失突变体中, 涂布于含有 25 $\mu\text{g/mL}$ 氯霉素的 Marine Broth 2216 固体培养基上, 30 $^{\circ}\text{C}$ 倒置培养。挑取长出的单菌落, 经 PCR 验证和测序后即得到互补菌株。

1.10 生长曲线的测定

将测试菌株嗜盐喜盐芽孢杆菌接种于 Marine Broth 2216 液体培养基中, 30 $^{\circ}\text{C}$ 、220 r/min 振荡培养过夜至稳定期后分别转接于 5 mL 不同盐浓度(0.5、1.0 和 2.0 mol/L NaCl)的 Marine Broth 2216 液体培养基中, 30 $^{\circ}\text{C}$ 、220 r/min 振荡培养, 每 3 h 间隔取样测 OD_{600} , 整理数据绘制生长曲线。

1.11 盐胁迫存活率的检测

挑取单菌落于 Marine Broth 2216 液体培养基中培养至对数后期, 取 1 mL 菌液于 5 000 r/min 离心 5 min, 弃上清, 保留菌体, 用 1 mL PBS 缓冲液(NaCl 浓度调整至 0.5 mol/L)重悬并清洗菌体, 取 50 μL 重悬后的菌液, 加入 2 mL 含有 5 mol/L NaCl 的 PBS 缓冲液中, 30 $^{\circ}\text{C}$ 、100 r/min 处理 1 h, 之后稀释涂布于 Marine Broth 2216 固体培养基, 30 $^{\circ}\text{C}$ 倒置培养, 根据平板上的菌落数计算存活率。

1.12 生物膜形成能力的检测

采用结晶紫染色法测定生物膜形成能力。测试菌株培养过夜至稳定期后分别转接于含有 3 mL Marine Broth 2216 液体培养基的试管中, 试管竖直插入摇床中。30 $^{\circ}\text{C}$ 、145 r/min 培养 3 d 后倒掉菌液, 无菌水清洗试管 3 次, 加入 5 mL 0.1% 结晶紫染液染色 15 min 后倒掉染液, 并用无菌水清洗试管 3 次。自然风干后拍照记录生物膜形成结果, 之后加入 3 mL 95% 乙醇溶解结合在生物膜上的结晶紫染料, 并检测其 OD_{595} 。

1.13 胞内相容性溶质含量的测定^[23]

测试菌株生长至对数后期($OD_{600}=2.7$)后,

5 000 r/min 离心 5 min 收集菌体放入真空冷冻干燥机进行干燥处理。干燥后取 10 mg 菌体进行破壁提取, 使用氨基酸分析仪检测脯氨酸含量; 另取 10 mg 菌体参照文献[16]提取四氢嘧啶, 采用高效液相色谱检测四氢嘧啶含量。胞内相容性溶质含量的测定结果以菌体总蛋白浓度计算。

1.14 数据统计分析

每组试验均设 3 个生物学重复, 试验数据以平均值 \pm 标准偏差(standard deviation, SD)表示, 采用 Student's *t*-test (双尾非配对)进行显著性分析, 使用 GraphPad Prism 8 软件分析结果并绘图。

2 结果与分析

2.1 盐浓度对嗜盐喜盐芽孢杆菌 *luxS* 转录水平的影响

群体感应信号分子 AI-2 的关键合成基因 *luxS* 在细菌中广泛存在, 参与调节了细菌许多重要的生理过程。为了探究信号分子 AI-2 对嗜盐喜盐芽孢杆菌盐适应性的影响, 本研究检测了在不同盐浓度下生长(0.5、1.0 和 2.0 mol/L NaCl 的 Marine Broth 2216 液体培养基)的嗜盐喜盐芽孢杆菌中 *luxS* 的转录水平。首先通过梯度稀释 cDNA 样本作为模板进行荧光定量 PCR, 扩增后绘制 16S rRNA 内参基因(图 1A)和 *luxS* (图 1B)的标准曲线, 计算得出扩增效率分别为 103%和 104%; 同时分析其熔解曲线(图 1C、1D)也只出现单一的信号, 说明没有非特异性条带产生, 符合实时荧光定量 PCR 的要求。如图 1E 所示, 随着培养基中盐浓度的增加, *luxS* 的转录水平呈现出显著上升的趋势($P<0.01$)。为了探究 *luxS* 的上调是否是由渗透压引起的, 本研究设置了在相同渗透压下(盐浓度为 2 mol/L)含有不同盐成分的培养基, 测定

luxS 的转录水平后发现,在渗透压一致的情况下,*luxS* 的转录水平随着氯离子浓度升高而明显上调($P<0.001$) (图 1F)。为了检测硝酸根离子对 *luxS* 的影响,本研究检测了在不同浓度 NaNO_3 下生长的嗜盐喜盐芽孢杆菌 *luxS* 的转录水平,结果如图 1G 所示,*luxS* 的转录水平无明显差异。此外,在相同盐度(1.0 mol/L)下,NaCl 条件下培养的嗜盐喜盐芽孢杆菌 *luxS* 的转录水平明显高于 NaNO_3 (图 1H)。这些结果表明在嗜盐喜盐芽孢杆菌中,*luxS* 的转录水平与培养基中的盐浓度有着紧密的联系,而且受到氯离子浓度的正向调控。

2.2 嗜盐喜盐芽孢杆菌 AI-2 的活性检测

嗜盐喜盐芽孢杆菌中 *luxS* 的转录水平随着培养基中盐浓度的上升而上调,然而生长曲线检测结果表明在不同盐浓度下嗜盐喜盐芽孢杆菌的生长情况无明显差异(图 2A),这也暗示着 *luxS* 有可能在嗜盐喜盐芽孢杆菌适应不同盐浓度的生长环境过程中发挥了重要的作用。通过哈维氏弧菌生物发光试验发现,在不同盐浓度下生长的嗜盐喜盐芽孢杆菌菌液制备成的无细胞上清液均能够诱导哈维氏弧菌 MM32 菌株发光,整体呈现出先上升后下降的趋势,其 AI-2 活性在 15 h 左右达到最高(图 2B)。此外,随着盐浓度的上升, AI-2 活性也有明显的增强,其中在 15 h 时, 2 mol/L NaCl 条件下嗜盐喜盐芽孢杆菌的 AI-2 活性是 0.5 mol/L NaCl 条件下的 3.8 倍(图 2B),这也进一步证明 *luxS* 对嗜盐喜盐芽孢杆菌的盐适应性有着非常重要的影响。

2.3 嗜盐喜盐芽孢杆菌 LuxS、MtnN-1、MtnN-2 和 MtnN-3 氨基酸多序列比对分析结果

根据 KEGG 数据库提供的嗜盐喜盐芽孢杆菌的基因组信息显示,编码 LuxS 蛋白的基因号为 *HBHAL_2021*,而与 Pfs 同源的 MtnN 蛋白共

有 3 个,基因号分别为 *HBHAL_3605* (*mtnN-1*)、*HBHAL_2454* (*mtnN-2*)和 *HBHAL_5109* (*mtnN-3*)。这 3 个 MtnN 蛋白是否都能够与 LuxS 蛋白共同催化合成 AI-2 信号分子仍是未知的。

在 KEGG 数据库中选取几条具有代表性的 LuxS 和 MtnN 蛋白的氨基酸序列与嗜盐喜盐芽孢杆菌进行多序列比对。结果表明,嗜盐喜盐芽孢杆菌 LuxS 与维尔兹芽孢杆菌(*Bacillus velezensis*) LuxS 的一致性为 45.95%,与坎氏弧菌(*Vibrio campbellii*)的一致性为 38.64%,与大肠杆菌(*Escherichia coli*)的一致性为 36.99%,与鼠伤寒沙门氏菌(*Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium str.) SL1344 的一致性为 36.30%。进一步分析可知, LuxS 蛋白的高度保守性氨基酸,对应嗜盐喜盐芽孢杆菌 LuxS 的 56 位组氨酸、60 位组氨酸和 123 位半胱氨酸在嗜盐喜盐芽孢杆菌中被保留了下来,这 3 个保守性氨基酸位点被认为是金属离子结合的关键位点,构成了 LuxS 蛋白的催化中心^[24] (图 3A);此外,嗜盐喜盐芽孢杆菌 LuxS 的 59 位谷氨酸、81 位半胱氨酸^[25]以及 84 位甘氨酸^[26],这 3 个在 LuxS 催化活性中起着重要作用的氨基酸位点也未发生变化(图 3A),这也暗示其具备催化合成 AI-2 的能力。

MtnN 蛋白的氨基酸多序列比对结果显示嗜盐喜盐芽孢杆菌 MtnN-1 与维尔兹芽孢杆菌 MtnN 的一致性最高(54.19%),其次是坎氏弧菌(一致性 51.09%)、大肠杆菌(一致性 46.46%)和鼠伤寒沙门氏菌 SL1344 (46.46%)。MtnN-2 与代表性蛋白的一致性在 38%–42%之间,而 MtnN-3 与代表性蛋白的一致性均在 30%以下。根据已有的研究报道,对应嗜盐喜盐芽孢杆菌 MtnN-1 蛋白的 12 位和 174 位谷氨酸、193 位精氨酸、197 位天冬氨酸和 208 位的天冬氨酸或谷氨酸在催化过程中发挥着关键作用^[27-28]。以

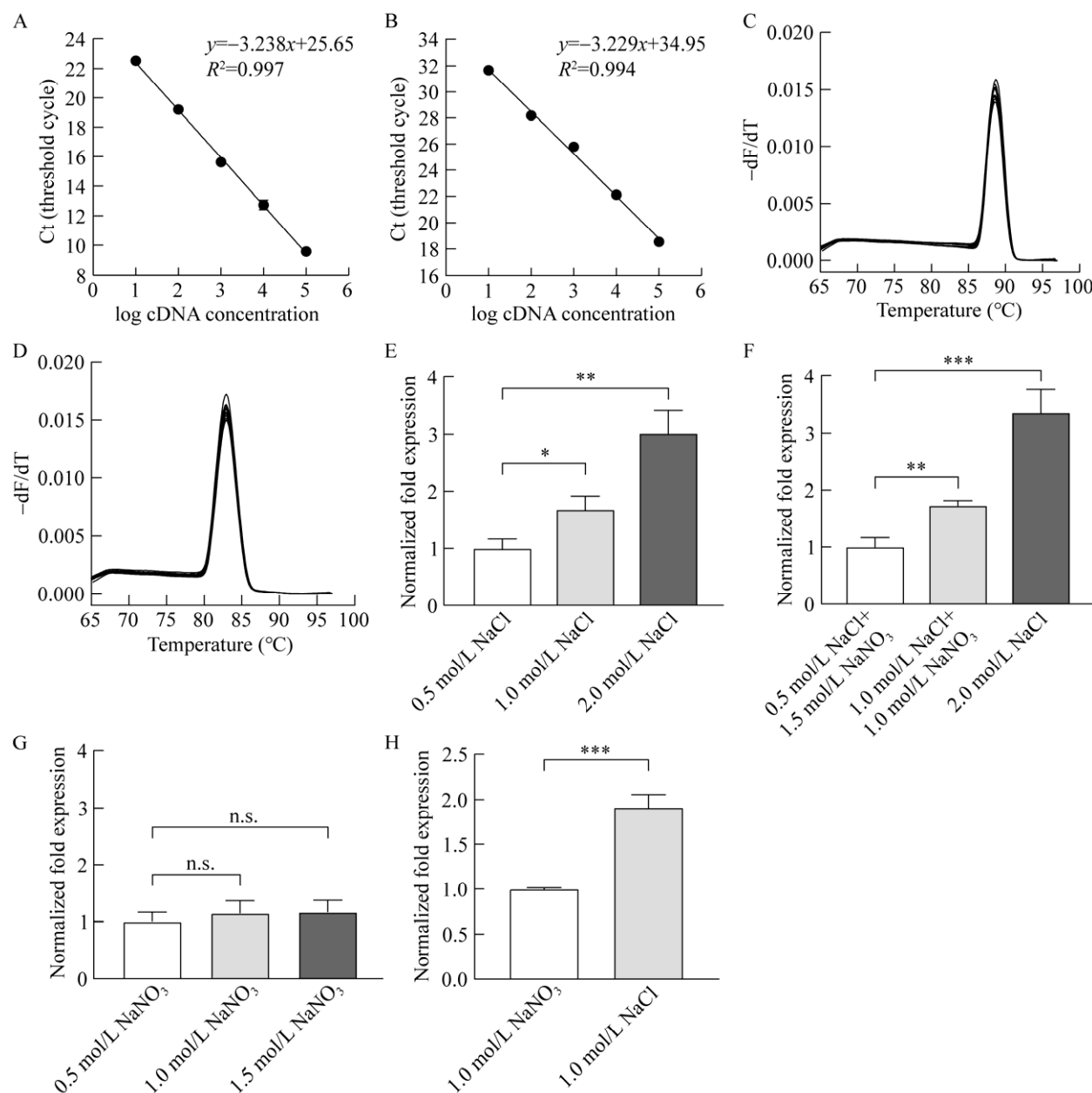


图 1 嗜盐喜盐芽孢杆菌 *luxS* 的荧光定量 PCR 标准曲线、熔解曲线及转录水平 A 和 B: 16S rRNA 内参基因(A)和 *luxS* (B)荧光定量 PCR 标准曲线. C 和 D: 16S rRNA 内参基因(C)和 *luxS* (D)荧光定量 PCR 熔解曲线. E-H: 不同盐度条件下培养嗜盐喜盐芽孢杆菌, 并通过实时荧光定量 PCR 检测 *luxS* 的转录水平. *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$; n.s.: 差异不显著

Figure 1 Quantitative PCR standard curve, melting curve, and transcription level of *luxS* in *Halobacillus halophilus*. A and B: 16S rRNA (A) and *luxS* (B) quantitative PCR standard curves. C and D: 16S rRNA (C) and *luxS* (D) quantitative PCR melting curves. E-H: *H. halophilus* cells were cultivated under different salinity conditions, and the transcription level of *luxS* was determined by quantitative real time PCR. *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$; n.s.: Not significant.

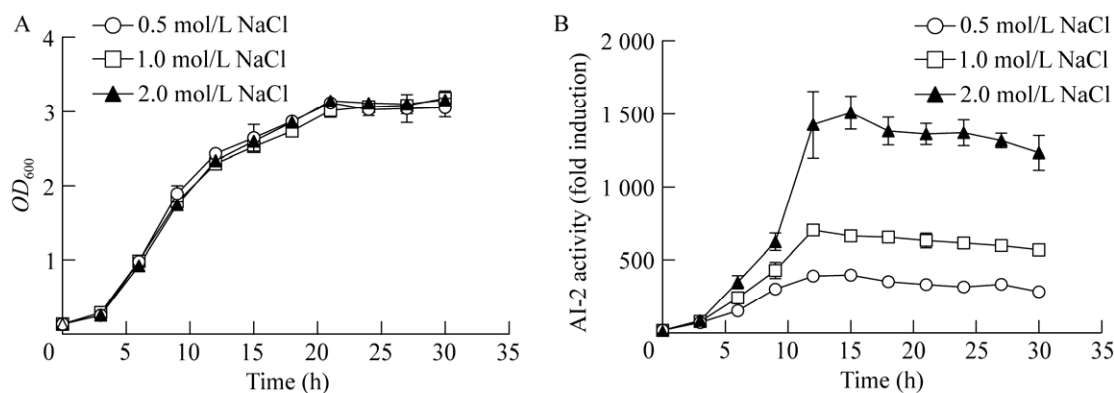


图2 嗜盐喜盐芽孢杆菌的生长曲线(A)和胞外 AI-2 活性(B)

Figure 2 Growth curves (A) and extracellular AI-2 activities (B) of *H. halophilus*.

上关键氨基酸位点在嗜盐喜盐芽孢杆菌 MtnN-2 蛋白中也可以比对到(图 3B), 表明其可能具有参与催化合成 AI-2 的能力, 而在 MtnN-3 中有 2 个发生了变化(图 3B), 暗示其可能不具备催化能力。

2.4 AI-2 体外合成及活性检测结果

为探究 MtnN-1、MtnN-2 和 MtnN-3 是否都会与 LuxS 共同作用催化生成 AI-2 信号分子, 本研究通过异源表达分别纯化了 LuxS 和 MtnN 相关重组蛋白。LuxS 与 MtnN 共同催化 SAH 反应生成 AI-2 过程中, 还会生成等摩尔的高半胱氨酸, 所以可以用 DTNB 试剂与高半胱氨酸的反应来检测 AI-2 的浓度。如图 4A 所示, LuxS 与 MtnN-1 或者 MtnN-2 混合在一起均可以催化 SAH 反应生成 AI-2, 而且反应物能够诱导哈维氏弧菌 MM32 菌株发光(图 4B), 而与 MtnN-3 混合在一起则无 AI-2 生成, 也不会引起 MM32 菌株发光(图 4B)。以上结果表明 LuxS 能够与 MtnN-1 或者 MtnN-2 共同催化合成有生物活性的 AI-2 信号分子, 而 MtnN-3 则不参与 AI-2 信号分子的生成。

2.5 嗜盐喜盐芽孢杆菌 *luxS* 缺失突变体构建结果

为进一步探讨 *luxS* 对嗜盐喜盐芽孢杆菌盐适

应性的影响, 本研究构建了 *luxS* 的缺失突变体。图 5 为分别用引物 UP-F/DOWN-R 和 *luxS*-F/*luxS*-R 对野生型嗜盐喜盐芽孢杆菌和 $\Delta luxS$ 的 PCR 鉴定结果, 并经过测序验证确认获得了嗜盐喜盐芽孢杆菌的 *luxS* 缺失突变体。AI-2 活性检测也证实 *luxS* 的缺失阻断了 AI-2 信号分子的合成(图 5C)。

2.6 *luxS* 缺失对嗜盐喜盐芽孢杆菌盐适应性的影响

首先对 *luxS* 缺失突变体的生长曲线进行了测定分析, 如图 6A 所示, 在低盐(0.5 mol/L NaCl)条件下, 嗜盐喜盐芽孢杆菌的野生型、*luxS* 缺失突变体和互补菌株的生长情况是一致的, 无明显的差异。然而, 在高盐(3.5 mol/L NaCl)条件下, *luxS* 缺失突变体的生长相比于野生型较为缓慢, 而互补菌株则可以恢复到接近野生型的水平(图 6A)。接着, 本研究进一步分析了在极端高盐条件下(5.0 mol/L NaCl), 缺失 *luxS* 对嗜盐喜盐芽孢杆菌存活率的影响。结果如图 6B 所示, 相较于野生型, $\Delta luxS$ 的存活率显著下降 ($P < 0.05$)。嗜盐微生物在面临高盐环境时, 可以通过合成和积累一些小分子的胞内相容性溶质来缓解高盐环境对自身的胁迫^[14,29]。本研究检测了嗜盐喜盐芽孢杆菌在不同盐浓度下两种典

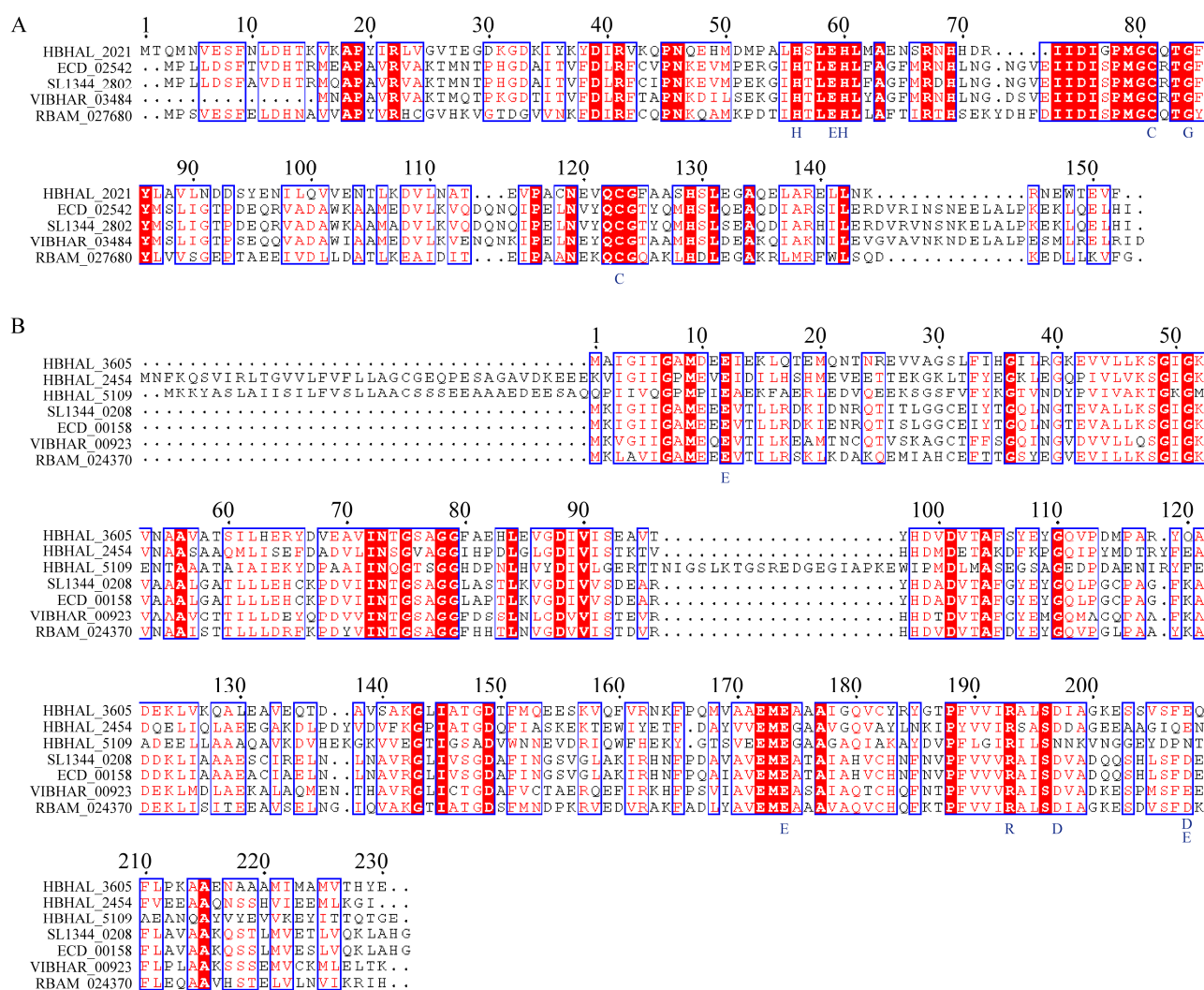


图 3 *LuxS*、*MtnN-1*、*MtnN-2* 和 *MtnN-3* 氨基酸多序列比对分析 A: *LuxS* 序列比对, 用于序列比对的 *LuxS* 蛋白如下: 嗜盐喜盐芽孢杆菌(HBHAL_2021, *LuxS*); 大肠杆菌(ECD_02542); 鼠伤寒沙门氏菌 SL1344 (SL1344_2802); 坎氏弧菌(VIBHAR_03484); 维尔兹芽孢杆菌(RBAM_027680). B: *MtnN-1*、*MtnN-2* 和 *MtnN-3* 序列比对, 用于序列比对的 *MtnN* 蛋白如下: 嗜盐喜盐芽孢杆菌(HBHAL_3605, *MtnN-1*; HBHAL_2454, *MtnN-2*; HBHAL_5109, *MtnN-3*); 鼠伤寒沙门氏菌 SL1344 (SL1344_0208); 大肠杆菌 (ECD_00158); 坎氏弧菌(VIBHAR_00923); 维尔兹芽孢杆菌(RBAM_024370). 重要的酶活性位点用蓝色表示

Figure 3 *LuxS*, *MtnN-1*, *MtnN-2*, and *MtnN-3* amino acid multiple sequence alignment. A: *LuxS* sequence alignment. *LuxS* proteins used in the sequence alignment are as follows: *H. halophilus* (HBHAL_2021, *LuxS*); *Escherichia coli* (ECD_02542); *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium str. SL1344 (SL1344_2802); *Vibrio campbellii* (VIBHAR_03484); *Bacillus velezensis* (RBAM_027680). B: *MtnN-1*, *MtnN-2*, and *MtnN-3* sequence alignment. *MtnN* proteins used in the sequence alignment are as follows: *H. halophilus* (HBHAL_3605, *MtnN-1*; HBHAL_2454, *MtnN-2*; HBHAL_5109, *MtnN-3*); *S. Typhimurium* SL1344 (SL1344_0208); *E. coli* (ECD_00158); *V. campbellii* (VIBHAR_00923); *B. velezensis* (RBAM_024370). The important enzyme active sites are shown in blue.

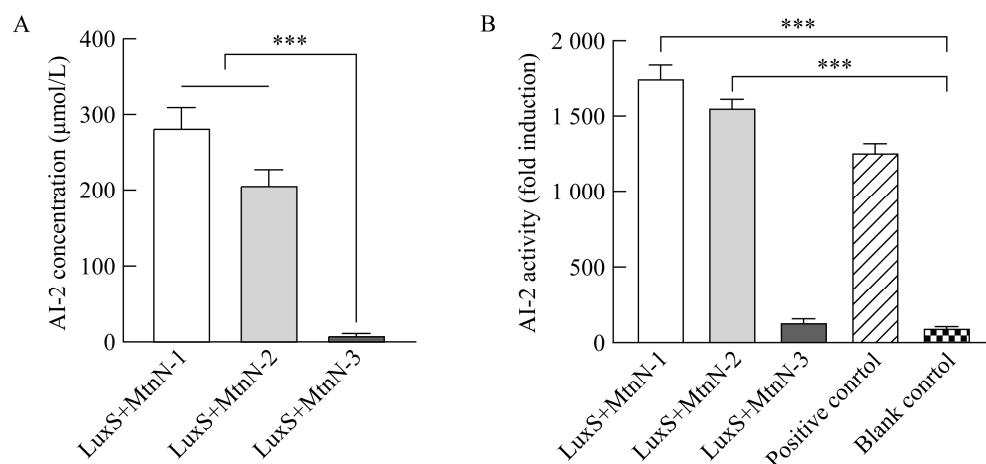


图4 AI-2 体外合成及活性检测 A: AI-2 浓度检测. B: AI-2 活性检测. ***: $P<0.001$

Figure 4 Synthesis and activity detection of AI-2 *in vitro*. A: AI-2 concentration detection. B: AI-2 activity detection. ***: $P<0.001$.

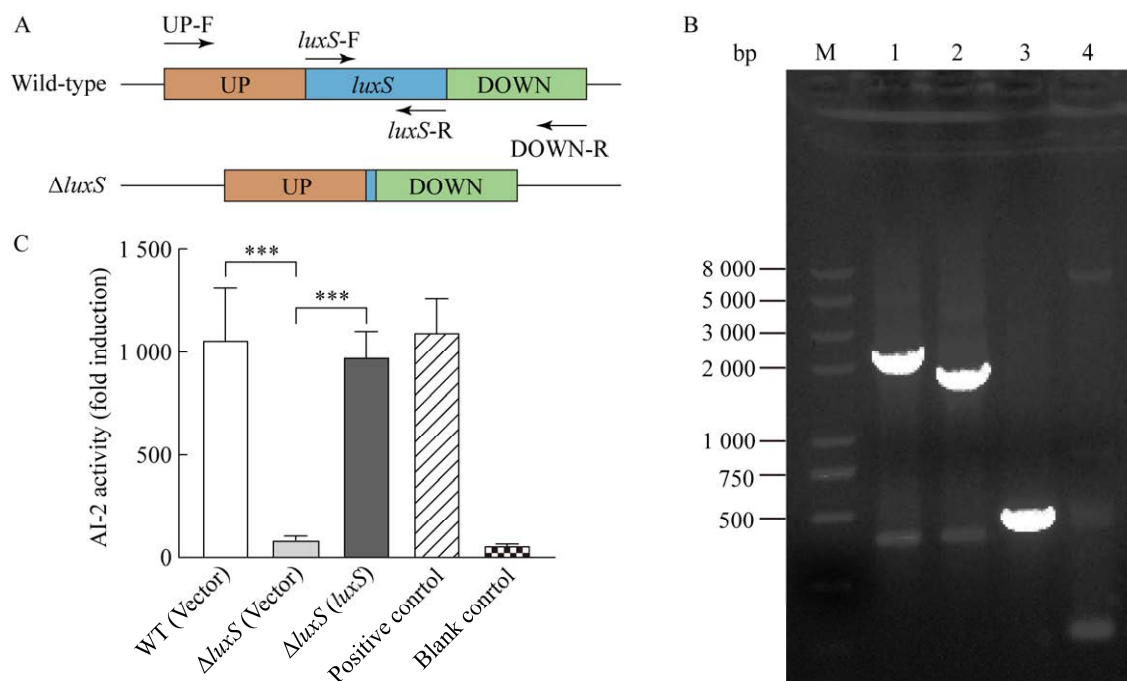


图5 $\Delta luxS$ 突变体构建和 AI-2 活性检测 A: 野生型嗜盐喜盐芽孢杆菌和 $\Delta luxS$ 突变体的上下游分布图. B: 野生型和 $\Delta luxS$ 突变体的 PCR 分析结果. M: DNA 分子量标准 Marker; 泳道 1、3 代表野生型; 泳道 2、4 代表 $\Delta luxS$ 突变体. C: 野生型和 $\Delta luxS$ 突变体的 AI-2 活性检测. ***: $P<0.001$

Figure 5 Construction of $\Delta luxS$ mutant and detection of AI-2 activity. A: The map of upstream and downstream regions of wild type *H. halophilus* and $\Delta luxS$ mutant. B: The PCR analysis result of wild-type and $\Delta luxS$ mutant. M: DNA marker; Lane 1 and lane 3 represent wild-type *H. halophilus*; Lane 2 and lane 4 represent $\Delta luxS$ mutant. C: AI-2 activity detection of wild-type and $\Delta luxS$ mutant. ***: $P<0.001$.

型的胞内相容性溶质(脯氨酸和四氢嘧啶)的含量。结果如图 6C 所示,在面临高盐环境时,*luxS* 缺失突变体胞内相容性溶质的含量显著低于野生型和互补菌株($P<0.001$)。以上结果说明 *luxS* 的缺失减弱了嗜盐喜盐芽孢杆菌在高盐环境下的适应能力。

2.7 *luxS* 缺失对嗜盐喜盐芽孢杆菌生物膜形成的影响

细菌在面临不利环境时往往还会通过促进生物膜的形成来抵御不良环境的影响^[13]。因此,本研究检测了 *luxS* 的缺失对嗜盐喜盐芽孢杆菌生物膜形成的影响。图 7 显示了野生型、 $\Delta luxS$

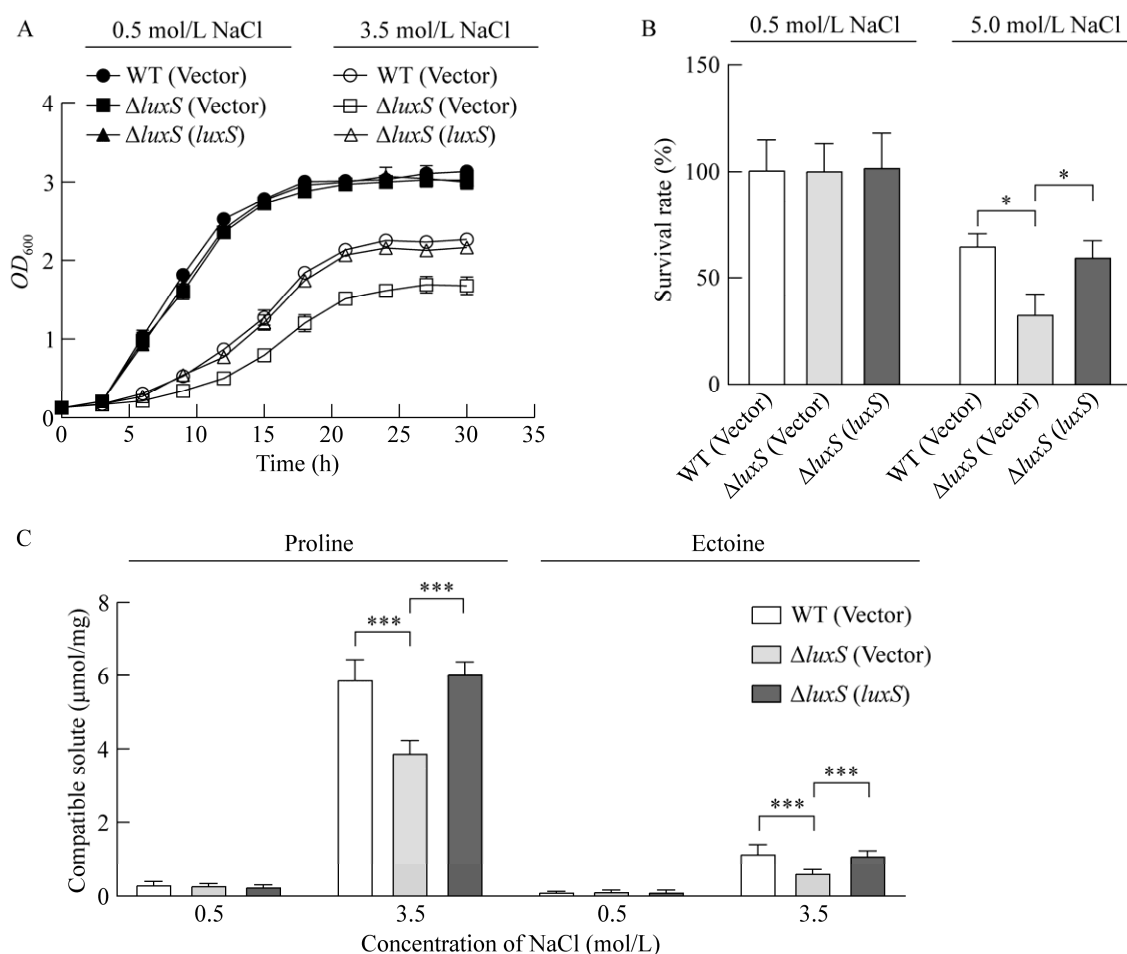


图 6 *luxS* 缺失影响嗜盐喜盐芽孢杆菌盐适应性 A: 野生型嗜盐喜盐芽孢杆菌、 $\Delta luxS$ 突变体和互补菌株 $\Delta luxS$ (*luxS*) 在 0.5、3.5 mol/L NaCl 条件下的生长曲线。B: 5 mol/L NaCl 处理后相关嗜盐喜盐芽孢杆菌菌株的存活率。C: 相容性溶质脯氨酸和四氢嘧啶在相关嗜盐喜盐芽孢杆菌菌株中的积累。*: $P<0.05$; **: $P<0.01$; ***: $P<0.001$

Figure 6 Deletion of *luxS* affects the salt adaptability of *H. halophilus*. A: Growth curves of *H. halophilus* wild-type, $\Delta luxS$ mutant, and its complementary strain $\Delta luxS$ (*luxS*) in the presence of 0.5 mol/L or 3.5 mol/L NaCl. B: Survival rate of indicated *H. halophilus* strains were determined after treatment with 5 mol/L NaCl. C: Accumulation of compatible solutes proline and ectoine in indicated *H. halophilus* strains. *: $P<0.05$; **: $P<0.01$; ***: $P<0.001$.

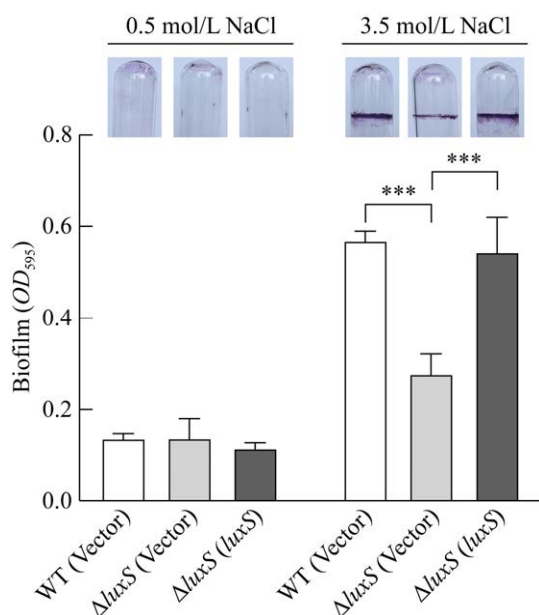


图 7 *luxS* 缺失影响嗜盐喜盐芽孢杆菌生物膜的形成

Figure 7 Deletion of *luxS* affects the biofilm formation of *H. halophilus*. Data shown are mean \pm SD from three independent experiments. ***: $P < 0.001$.

及互补菌株在不同盐浓度条件下的生物膜形成情况。在 0.5 mol/L NaCl 的条件下,嗜盐喜盐芽孢杆菌形成的生物膜量很少,在 3.5 mol/L NaCl 的条件下有明显的生物膜形成,然而 *luxS* 缺失突变体的生物膜形成量显著低于野生型和互补菌株($P < 0.001$),说明 *luxS* 在嗜盐喜盐芽孢杆菌面临高盐环境促进自身形成生物膜的过程中发挥了重要作用。

3 讨论

LuxS/AI-2 型群体感应系统因其广泛存在于细菌中而备受研究学者的关注,研究表明 AI-2 调节了细菌诸多重要的生理功能,如生物发光、抗生素合成、生物膜形成等^[1,2,30]。对 LuxS/AI-2 型群体感应系统进行深入研究有助于我们揭示其作用机制,以更好地应用于微生

物资源的开发和利用。嗜盐微生物作为极端环境微生物的代表,能够在高盐环境中正常生长繁殖,因其所生活的独特高盐生态环境,使其具有独特的代谢机制和丰富的次级代谢产物,因此具有重要的开发利用价值。然而,在嗜盐微生物领域,尚无 LuxS/AI-2 型群体感应系统的深入报道。

前人的研究表明,嗜盐喜盐芽孢杆菌的胞内 LuxS 蛋白水平会随着盐浓度的增加而上升,还发现这种上升受到氯离子浓度的正向调控^[18,31],这与本研究采用实时定量检测 *luxS* 转录水平的结果一致。此外,本研究通过生长曲线测定发现虽然嗜盐喜盐芽孢杆菌在 0.5、1.0 和 2.0 mol/L NaCl 条件下的生长状况没有明显差异,但是生物发光试验的结果表明随着盐浓度的上升,嗜盐喜盐芽孢杆菌的 AI-2 活性有显著的提升。这些结果表明 LuxS/AI-2 型群体感应系统在嗜盐喜盐芽孢杆菌适应不同盐浓度的环境中发挥了关键的作用。

在本研究所选定的代表性 LuxS 蛋白序列中,嗜盐喜盐芽孢杆菌 LuxS 与维尔兹芽孢杆菌 LuxS 的一致性最高,与其他选定微生物的 LuxS 同源性则在 30%左右。进一步分析发现, LuxS 蛋白的保守性氨基酸位点在嗜盐喜盐芽孢杆菌 LuxS 中均可以找到。在 AI-2 的合成途径中,除了 LuxS 之外,还需要 Pfs 蛋白(也被称为 MtnN)的参与^[32]。大多数微生物仅有一个 Pfs 蛋白,例如大肠杆菌和鼠伤寒沙门氏菌 SL1344 等^[21],而在嗜盐喜盐芽孢杆菌中一共找到 3 个 MtnN 蛋白。然而, MtnN 相关蛋白的氨基酸序列比对分析发现,仅在 MtnN-1 和 MtnN-2 中可以找到 MtnN 发挥功能的关键氨基酸。AI-2 的体外合成试验和生物发光试验也表明只有 MtnN-1 和 MtnN-2 蛋白能够参与 AI-2 信号分子的合成。

为了进一步探究 LuxS/AI-2 型群体感应系统对嗜盐喜盐芽孢杆菌盐适应性的影响,本研究构建了嗜盐喜盐芽孢杆菌的 *luxS* 缺失突变体。在低盐条件下, *luxS* 的缺失并不影响嗜盐喜盐芽孢杆菌的生长,这与鼠伤寒沙门氏菌 SL1344、副溶血性弧菌以及大肠杆菌等细菌的研究结果^[33-34]是一致的。然而在高盐条件下, *luxS* 缺失突变体的生长较野生型则有明显的滞后。进一步的研究也表明, *luxS* 的缺失降低了嗜盐喜盐芽孢杆菌在极端高盐条件下的存活率。中度嗜盐菌在面临高盐环境时往往会通过在胞内积累小分子相容性溶质来抵抗高盐胁迫保护自身^[14,29],而 *luxS* 的缺失减弱了嗜盐喜盐芽孢杆菌在高盐环境下的胞内相容性溶质含量,这也可以解释为什么高盐条件下 *luxS* 缺失突变体的生长要慢于野生型。此外,研究表明在许多细菌中 *luxS* 的缺失还会减弱细菌生物膜的形成^[34-35],而本研究发现嗜盐喜盐芽孢杆菌的 *luxS* 缺失突变体在高盐条件下形成的生物膜也有明显的降低。生物膜是微生物在生长过程中分泌一些胞外多糖、蛋白质、胞外脂质等将自身聚集起来的细胞多聚体,也是微生物在面临不利环境时一道非常重要的屏障^[36-37],因此生物膜的减弱也有可能影响了嗜盐喜盐芽孢杆菌 *luxS* 缺失突变体在高盐条件下的适应能力。

作为群体感应信号分子 AI-2 合成的关键基因, *luxS* 在微生物的环境适应性方面发挥了重要的作用。在类植物乳杆菌 (*Lactobacillus paraplantarum*) 中过表达 *luxS* 能够促进其对热和胆盐的抵抗能力,同时增强其生物膜形成能力^[38]。在腐败希瓦菌 (*Shewanella putrefaciens*) 中, *luxS* 的缺失降低了菌株的生长、生物膜形成及 H₂S 的生成,腐败能力也有明显下降^[39]。本研究的结果也表明在嗜盐喜盐芽孢杆菌中, *luxS*

的缺失降低了菌株在高盐条件下的适应能力。AI-2 作为信号分子,需要通过细菌细胞膜上的受体蛋白来调节细菌的生理行为。目前鉴定的 AI-2 受体有四类,分别为 LuxP、LsrB、具 dCACHE 结构域蛋白以及 YeaJ^[34-35]。LuxP 结合 AI-2 后负责调节弧菌的生物发光, LsrB 结合 AI-2 后激活转运系统将其转运至胞内降解^[40]; dCACHE 结构域可以与多种信号转导结构域如环二鸟苷酸 (c-di-GMP) 代谢结构域串联在一起,感受胞外 AI-2 浓度并别构调节邻近的信号转导结构域活性,进而调节下游基因的表达^[35],例如在鼠伤寒沙门氏菌 SL1344 中, LuxS/AI-2 群体感应系统可以通过 YeaJ 蛋白 (c-di-GMP 合成酶) 来调节鼠伤寒沙门氏菌 SL1344 胞内 c-di-GMP 水平,从而影响其生物膜形成和毒力^[34];在类志贺邻单胞菌 (*Plesiomonas shigelloides*) 中, AI-2 通过 DosC (c-di-GMP 降解酶) 影响类志贺邻单胞菌的胞内 c-di-GMP 水平,进而调节其生物膜形成^[41]。这些研究表明 AI-2 和胞内第二信使 c-di-GMP 之间有着紧密的联系,这也是将来解析 *luxS* 对嗜盐喜盐芽孢杆菌盐适应性影响的一个方向。此外,由于细菌群体感应系统的调节过程非常复杂,可能涉及多种下游基因的协作,后续也将通过转录组测序对嗜盐喜盐芽孢杆菌野生型和 *luxS* 缺失突变体的基因表达水平进行差异研究,以进一步阐述 *luxS* 调节嗜盐喜盐芽孢杆菌盐适应性的分子机制。

4 结论

本研究以嗜盐喜盐芽孢杆菌为研究对象,通过实时定量 PCR、生长曲线和生物发光试验发现 LuxS/AI-2 型群体感应系统与嗜盐喜盐芽孢杆菌的盐适应性有着紧密的联系。之后通过氨基酸序列比对和 AI-2 体外合成等试验证明嗜

盐喜盐芽孢杆菌的 LuxS 能够与 MtnN-1 或 MtnN-2 催化合成 AI-2 信号分子。最后构建了嗜盐喜盐芽孢杆菌的 *luxS* 缺失突变体, 并通过盐胁迫、胞内相容性溶质含量检测及生物膜形成能力检测等试验分析探究 *luxS* 的缺失对嗜盐喜盐芽孢杆菌盐适应性的影响, 以期嗜盐喜盐芽孢杆菌的开发利用和盐适应性机制的深入研究奠定基础。

REFERENCES

- [1] 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.
- [2] BASSLER BL, LOSICK R. Bacterially speaking[J]. Cell, 2006, 125(2): 237-246.
- [3] SPACAPAN M, BEZ C, VENTURI V. Quorum sensing going wild[J]. iScience, 2023, 26(10): 108000.
- [4] LIN JS, CHENG JL, WANG Y, SHEN XH. The *Pseudomonas* quinolone signal (PQS): not just for quorum sensing anymore[J]. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, 2018, 8: 230.
- [5] 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.
- [6] PEREIRA CS, THOMPSON JA, XAVIER KB. AI-2-mediated signalling in bacteria[J]. FEMS Microbiology Reviews, 2013, 37(2): 156-181.
- [7] LIU XZ, LIU QM, SUN SH, SUN HX, WANG Y, SHEN XH, ZHANG L. Exploring AI-2-mediated interspecies communications within rumen microbial communities[J]. Microbiome, 2022, 10(1): 167.
- [8] MONTGOMERY K, CHARLESWORTH JC, LEBARD R, VISSCHER PT, BURNS BP. Quorum sensing in extreme environments[J]. Life, 2013, 3(1): 131-148.
- [9] KAUR A, CAPALASH N, SHARMA P. Communication mechanisms in extremophiles: Exploring their existence and industrial applications[J]. Microbiological Research, 2019, 221: 15-27.
- [10] LIU L, WU RY, ZHANG JL, LI PL. Overexpression of *luxS* promotes stress resistance and biofilm formation of *Lactobacillus paraplantarum* L-ZS9 by regulating the expression of multiple genes[J]. Frontiers in Microbiology, 2018, 9: 2628.
- [11] PARK H, LEE K, YEO S, SHIN H, HOLZAPFEL WH. Autoinducer-2 quorum sensing influences viability of *Escherichia coli* O157: H7 under osmotic and *in vitro* gastrointestinal stress conditions[J]. Frontiers in Microbiology, 2017, 8: 1077.
- [12] SHU WS, HUANG LN. Microbial diversity in extreme environments[J]. Nature Reviews Microbiology, 2022, 20(4): 219-235.
- [13] 王伟伟, 唐鸿志, 许平. 嗜盐菌耐盐机制相关基因的研究进展[J]. 微生物学通报, 2015, 42(3): 550-558.
- WANG WW, TANG HZ, XU P. Salt-tolerance related genes in halophilic bacteria and archaea[J]. Microbiology China, 2015, 42(3): 550-558 (in Chinese).
- [14] GUNDE-CIMERMAN N, PLEMENITAŠ A, OREN A. Strategies of adaptation of microorganisms of the three domains of life to high salt concentrations[J]. FEMS Microbiology Reviews, 2018, 42(3): 353-375.
- [15] HOBMEIER K, CANTONE M, NGUYEN QA, PFLÜGER-GRAU K, KREMLING A, KUNTE HJ, PFEIFFER F, MARIN-SANGUINO A. Adaptation to varying salinity in *Halomonas elongata*: much more than ectoine accumulation[J]. Frontiers in Microbiology, 2022, 13: 846677.
- [16] SAUM SH, MÜLLER V. Growth phase-dependent switch in osmolyte strategy in a moderate halophile: ectoine is a minor osmolyte but major stationary phase solute in *Halobacillus halophilus*[J]. Environmental Microbiology, 2008, 10(3): 716-726.
- [17] SHIYAN AN, THOMPSON M, KÖCHER S, TAUSENDSCHÖN M, SANTOS H, HÄNELT I, MÜLLER V. Glutamine synthetase 2 is not essential for biosynthesis of compatible solutes in *Halobacillus halophilus*[J]. Frontiers in Microbiology, 2014, 5: 168.
- [18] SEWALD X, SAUM SH, PALM P, PFEIFFER F, OESTERHELT D, MÜLLER V. Autoinducer-2-producing protein LuxS, a novel salt- and chloride-induced protein in the moderately halophilic bacterium *Halobacillus halophilus*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2007, 73(2): 371-379.
- [19] BASSLER BL, WRIGHT M, SHOWALTER RE,

- SILVERMAN MR. Intercellular signalling in *Vibrio harveyi*: sequence and function of genes regulating expression of luminescence[J]. Molecular Microbiology, 1993, 9(4): 773-786.
- [20] KÖCHER S, AVERHOFF B, MÜLLER V. Development of a genetic system for the moderately halophilic bacterium *Halobacillus halophilus*: generation and characterization of mutants defect in the production of the compatible solute proline[J]. Environmental Microbiology, 2011, 13(8): 2122-2131.
- [21] 赵晶, 张福蓉, 崔一, 许永斌, 陈明, 权春善, 范圣第. 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.
- ZHAO J, ZHANG FR, CUI Y, XU YB, CHEN M, QUAN CS, FAN SD. *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).
- [22] 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).
- [23] 苗朝华. 中度嗜盐新种黄河盐单胞菌盐胁迫的适应机制研究[D]. 北京: 中国农业大学博士学位论文, 2016.
- MIAO ZH. Study on adaptive mechanism of a new moderately halophilic species *Halomonas Huanghe* under salt stress[D]. Beijing: Doctoral Dissertation of China Agricultural University, 2016 (in Chinese).
- [24] HILGERS MT, LUDWIG ML. Crystal structure of the quorum-sensing protein LuxS reveals a catalytic metal site[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2001, 98(20): 11169-11174.
- [25] PEI DH, ZHU JG. Mechanism of action of S-ribosylhomocysteinase (LuxS)[J]. Current Opinion in Chemical Biology, 2004, 8(5): 492-497.
- [26] PLUMMER P, ZHU JG, AKIBA M, PEI DH, ZHANG QJ. Identification of a key amino acid of LuxS involved in AI-2 production in *Campylobacter jejuni*[J]. PLoS One, 2011, 6(1): e15876.
- [27] MISHRA V, RONNING DR. Crystal structures of the *Helicobacter pylori* MTAN enzyme reveal specific interactions between S-adenosylhomocysteine and the 5'-alkylthio binding subsite[J]. Biochemistry, 2012, 51(48): 9763-9772.
- [28] RONNING DR, IACOPELLI NM, MISHRA V. Enzyme-ligand interactions that drive active site rearrangements in the *Helicobacter pylori* 5'-methylthioadenosine/S-adenosylhomocysteine nucleosidase[J]. Protein Science, 2010, 19(12): 2498-2510.
- [29] CZECH L, HERMANN L, STÖVEKEN N, RICHTER AA, HÖPPNER A, SMITS SHJ, HEIDER J, BREMER E. Role of the extremolytes ectoine and hydroxyectoine as stress protectants and nutrients: genetics, phylogenomics, biochemistry, and structural analysis[J]. Genes, 2018, 9(4): 177.
- [30] BRAMEYER S, BODE HB, HEERMANN R. Languages and dialects: bacterial communication beyond homoserine lactones[J]. Trends in Microbiology, 2015, 23(9): 521-523.
- [31] SAUM SH, MÜLLER V. Regulation of osmoadaptation in the moderate halophile *Halobacillus halophilus*: chloride, glutamate and switching osmolyte strategies[J]. Saline Systems, 2008, 4: 4.
- [32] WANG Y, WANG YX, SUN LY, GRENIER D, YI L. The LuxS/AI-2 system of *Streptococcus suis*[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2018, 102(17): 7231-7238.
- [33] 江艳华, 王婷, 林才云, 王鹏, 李凤铃, 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 YH, WANG T, LIN CY, WANG P, LI FL, QU M, WANG LZ, TAN ZJ, YAO L. 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 (in Chinese).
- [34] LI SY, SUN HX, LI JH, ZHAO YJ, WANG RY, XU L, DUAN CY, LI JL, WANG Z, LIU QM, WANG Y, OUYANG SY, SHEN XH, ZHANG L. Autoinducer-2 and bile salts induce c-di-GMP synthesis to repress the T3SS via a T3SS chaperone[J]. Nature Communications, 2022, 13(1): 6684.

- [35] ZHANG L, LI SY, LIU XZ, WANG Z, JIANG M, WANG RY, XIE LG, LIU QM, XIE XR, SHANG DH, LI MY, WEI ZY, WANG Y, FAN CP, LUO ZQ, SHEN XH. Sensing of autoinducer-2 by functionally distinct receptors in prokaryotes[J]. *Nature Communications*, 2020, 11(1): 5371.
- [36] LIU XB, CAO B, YANG L, GU JD. Biofilm control by interfering with c-di-GMP metabolism and signaling[J]. *Biotechnology Advances*, 2022, 56: 107915.
- [37] WANG Z, SONG L, LIU XZ, SHEN XH, LI X. Bacterial second messenger c-di-GMP: Emerging functions in stress resistance[J]. *Microbiological Research*, 2023, 268: 127302.
- [38] CAO LY, LIU CG, YANG SH, BAI FW. Regulation of biofilm formation in *Zymomonas mobilis* to enhance stress tolerance by heterologous expression of *pfs* and *luxS*[J]. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 2023, 11: 1130405.
- [39] HU ZH, CHIN Y, YUAN CH, GE YL, HANG YY, WANG DX, YAO Q, HU YQ. The *luxS* deletion reduces the spoilage ability of *Shewanella putrefaciens*: an analysis focusing on quorum sensing and activated methyl cycle[J]. *Food Microbiology*, 2024, 120: 104467.
- [40] PAPENFORT K, BASSLER BL. Quorum sensing signal-response systems in Gram-negative bacteria[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2016, 14(9): 576-588.
- [41] 谢晓荣, 尚道涵, 沈锡辉, 张磊. AI-2 通过调节 c-di-GMP 代谢酶 DosC 影响类志贺邻单胞菌生物膜形成及运动性 [J]. *微生物学报*, 2022, 62(7): 2808-2823.
- XIE XR, SHANG DH, SHEN XH, ZHANG L. AI-2 affects biofilm formation and motility of *Plesiomonas shigelloides* by regulating the c-di-GMP-metabolizing enzyme DosC[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2022, 62(7): 2808-2823 (in Chinese).