

细菌群体感应信号分子——酰基高丝氨酸内酯的检测

宋水山* 黄媛媛

(河北省生物研究所, 石家庄 050051)

摘要 革兰氏阴性菌根据信号分子N-酰基高丝氨酸内酯(AHLs)的浓度可以监测周围环境中自身或其他细菌的数量变化,当信号分子达到一定浓度阈值时,能启动相关基因的表达来适应环境的变化,这一调控系统被称为细菌的群体感应(quorum sensing, QS)系统。快速简便而有效地检测细菌是否以及产生何种信号分子成为深入研究和了解细菌群体感应的重要手段。现对信号分子AHLs敏感的用于检测不同的信号分子AHLs的微生物传感菌进行综述,并对其检测能力进行了讨论。

关键词 N-酰基高丝氨酸内酯;细菌的群体感应系统;微生物传感菌;信号分子

细菌根据特定信号分子的浓度时刻监控着周围环境中自身或其他细菌的数量变化。当细菌的数量积聚增加到一定程度时,细菌会通过信号分子发信号,改变和协调它们之间的行为,共同展示出它们的某些生理特性,从而表现出单个细菌无法从事的某些生理功能和调节机制。这一调控机制被称为细菌的群体感应(quorum sensing, QS)^[1]系统。革兰氏阴性菌中的QS系统主要由信号分子N-酰基高丝氨酸内酯(N-acylhomoserine lactones, AHLs)、AHLs合成酶LuxI族蛋白和AHLs受体LuxR族蛋白组成。研究表明,AHLs介导的细菌QS系统参与许多生物学功能的调控,如根瘤菌与植物共生,病原细菌胞外酶和毒素的产生,生物膜的形成,生物发光,色素产生,抗生素形成和细菌运动^[2-5]等。除此之外,AHLs介导的QS系统可能还具有其他许多未知的生物学功能,如参与细菌-细菌互作和细菌-真核生物互作的信号转导等^[6,7]。进入21世纪后,研究细菌与细菌之间的信息交流已成为微生物学研究的热门领域,人们希望可以针对细菌AHL介导的QS系统进行干扰和促进,从而达到有益于人类的目的。AHLs是细菌QS系统中的关键因子,因此如何快速、准确地测定细菌是否产生AHLs,产生的AHLs的种类以及环境和细胞中AHLs的消长变化成为研究细菌QS系统的重要手段。本文将对目前用于检测细菌信号分子AHLs的微生物传感菌及其检测能力进行简要概述。

虽然目前可以通过质谱、核磁共振和红外光谱来鉴定AHLs的结构和性质,但因其操作复杂,费用昂贵等原因难以成为检测AHLs的常规方法。目前主要采用对扩散性信号分子AHLs敏感的微生物传感菌来检测AHLs的存在和浓度。

微生物传感菌的工作原理基于细菌QS系统的作用机制。这些细菌中产生AHLs的功能基因被人工剔除或其本身就不能产生AHLs,但含有LuxR类功能基因和其相应的靶启动子序列以及与其融合在一起的报告基因(如*luxAB*, *lacZ*, *gfp*等),这些重组细菌就成为AHLs的生物感应器,当遇到外源AHLs时,报告基因的转录表达被启动,通过检测报告基因的活性就可以检测AHLs的存在。

采用微生物传感菌检测AHLs的方法通常有几种:(1)平板划线法。待测菌和传感菌在固体平板培养基上划线培养,二者不接触但成“T”字型。通过两菌交互点附近的菌体表型可推知AHLs的存在及浓度;(2)薄层层析结合生物检测法。提取待测菌对数生长后期上清液中的AHLs,与已知标准品进行薄层层析分离,在分离后的薄层层析板上覆盖一层软琼脂,琼脂内含有微生物传感菌,培养一段时间后比较样本和标准品的迁移特性确定AHLs的种类;(3)定量测定法。根据传感菌报告基因的活性强度定量测定待测AHLs的浓度;(4)体内测定法。将含有以*gfp*

1 检测AHLs的基本原理和方法

由于信号分子的浓度极低,一般手段无法检测出

收稿日期:2007-03-02 接受日期:2007-05-24

国家自然科学基金资助项目(No.30570402)和河北省自然科学基金资助项目(No.C2006000707)

*通讯作者。Tel: 0311-83999012, E-mail: shuishans@hotmail.com

为报告基因的质粒装载入待测菌细胞,借助于流式细胞仪和激光共聚焦显微镜检测单个细胞内AHLs的动态变化。

不同的细菌产生不同的AHLs。但其都含有相同的高丝氨酸内酯环,主要区别在于酰基侧链的长短,饱和度及3位碳上的取代基。LuxR类蛋白优先结合其相应的LuxI类蛋白产生的AHLs,虽然可以和其他不同长度侧链或含有不同取代基的AHLs结合,但敏感度有所降低。由于每种微生物传感菌只能检测部分AHLs。因此,科学家们构建了多种微生物传感菌用于检测不同种类、不同结构的AHLs。

2 检测不同AHLs的微生物传感菌

2.1 检测中短链AHLs的微生物传感菌

一些基于*luxI/luxR* QS系统的微生物传感菌可以检测含4~8个碳原子酰基侧链的AHLs,其中最常用的是McClellan等^[8]采用转座子插入突变法破坏紫色杆菌(*Chromobacterium violaceum*)AHLs合成酶基因*cviI*和紫色杆菌素合成抑制基因而构建的紫色杆菌突变株CV026。在含有外源的AHLs培养基中培养CV026时,紫色杆菌素可迅速产生。该传感菌对C₆-AHL最敏感,还可以检测C₆-3-oxo-AHL, C₈-AHL(灵敏度比对C₆-AHL低6倍), C₈-3-oxo-AHL(灵敏度比对C₆-AHL低11倍)和C₄-AHL(灵敏度比对C₆-AHL低30倍)。CV026不能用来检测C₄-3-oxo-AHL和酰基侧链长于10个碳原子的AHLs,也不能用来检测3-羟基AHLs。

基于发光杆菌(*Photobacterium luminescens*)的*luxCDABE*构建的微生物传感菌可以以生物发光作为报告系统检测含4~8个碳原子酰基侧链的AHLs。大肠杆菌(pSB401)^[9]和大肠杆菌(pHV200I)^[10]对C₆-3-oxo-AHL最敏感,同时可以检测C₆-AHL、C₈-3-oxo-AHL和C₈-AHL。但不能检测C₄-AHL以及侧链长度大于10个碳原子的AHLs。对C₄-AHL最敏感的传感菌是大肠杆菌(pSB536)^[11]。另外,大肠杆菌(pAL101)对C₄-AHL也很敏感^[12]。由于大肠杆菌中一个配基未知的LuxR族蛋白SdiA可以激活*rhlI*启动子,从而干扰传感菌对C₄-AHL的检测,因此,将质粒pAL101导入大肠杆菌突变株*sdiA*,该重组菌对C₄-AHL的检测效率更高^[12]。

2.2 检测长链AHLs的微生物传感菌

基于铜绿假单胞菌的LasI/R QS系统的微生物传感菌可以用于特异性检测C₁₀-AHL、C₁₂-AHL及

其3-羰基AHLs。大肠杆菌(pSB1075)可以采用生物发光法检测C₁₂-3-oxo-AHL、C₁₀-3-oxo-AHL和C₁₂-AHL。大肠杆菌(pKDT17)可以通过测定β-半乳糖苷酶的活性确定长链AHLs的存在,但不能检测短链AHLs和3-羟基AHLs。铜绿假单胞菌PAO1 M71LZ是*lasI*被剔除的突变株,含有*rsaL*启动子与*LacZ*融合基因。*rsaL*基因直接受LasI/R QS系统调控。以PAO1 M71LZ为报告菌通过测定β-半乳糖苷酶活性可以定量测定C₁₂-3-oxo-AHL和C₁₀-3-oxo-AHL^[13]。

2.3 检测多种AHLs的微生物传感菌

TraI/R QS系统位于根癌农杆菌的Ti-质粒上,其QS系统的信号分子主要为C₈-3-oxo-AHL。根癌农杆菌NT1(pZLR4)是去掉Ti质粒的NT1菌株,携带含有*traR*和*traG::LacZ*融合基因的重组质粒pZLR4^[14]。*traG*的转录受*traI/R* AHL QS系统调控。它可以检测含有3羰基取代基4~12碳原子酰基侧链的AHLs和除C₄-AHL之外的所有3位碳上无取代基的AHLs。另外,该传感菌还可以用来检测3-羟基AHLs,尤其是C₆-3-hydroxy-AHL、C₈-3-hydroxy-AHL和C₁₀-3-hydroxy-AHL。

Zhu等^[15]将3个相容质粒pJZ384、pJZ410和pJZ372导入缺失Ti质粒的农杆菌KYC55中。pJZ384、pJZ410和pJZ372分别含有噬菌体T7启动子控制的*traR*基因、T7 RNA聚合酶基因和*traI-lacZ*融合基因。农杆菌KYC55(pJZ384)(pJZ410)(pJZ372)能够检测的AHLs种类非常多,而且检测极限很低^[15]。

2.4 检测3-羟基AHLs的微生物传感菌

Khan等^[16]基于荧光假单胞菌2-79的*phzI/R* AHL QS系统构建微生物传感菌用于3-羟基AHLs的检测。荧光假单胞菌2-79 *phzI/R* AHL QS系统中的信号分子主要为C₆-3-hydroxy-AHL、C₈-3-hydroxy-AHL和C₁₀-3-hydroxy-AHL。质粒pSF105和pSF107分别携带*trc*启动子控制的*phzR*基因和*phzA::uidA*、*phzA::lacZ*融合基因。荧光假单胞菌(pSF105)(pSF107)可以通过检测β-葡萄糖醛酸酶和β-半乳糖苷酶的活性检测外源AHLs的存在。该报告菌对C₆-3-hydroxy-AHL的敏感性最高,对C₈-3-hydroxy-AHL的检测灵敏度仅为对C₆-3-hydroxy-AHL的1/10^[16]。

2.5 检测稀有AHL的微生物传感菌

据报道,某些细菌包括脱氮副球菌(*Paracoccus denitrificans*)、荚膜红细菌(*Rhodobacter capsulatus*)、豌豆根瘤菌(*Rhizobium leguminosarum*)和苜蓿根瘤菌(*Sinorhizobium meliloti*)可以产生酰基侧链长于12个

碳原子的稀有 AHLs, 用上述介绍的微生物传感菌难以检测这些 AHLs^[17]。Llamas 等^[17]基于 *S. meliloti* 的 SinI/R 系统构建可以特异性检测长链包括 C₁₂-AHL、C₁₄-3-oxo-AHL、C_{16:1}-3-oxo-AHL、C₁₆-AHL、C_{16:1}-AHL 和 C₁₈-AHL 的微生物传感菌 *S. meliloti* (*sinI::lacZ*)。该传感菌对 C₁₄-AHL 的检测效果较差, 并且不能检测 C₁₈-AHL。若将 *sinR* 置于阿拉伯糖诱导启动子的控制下, 传感菌 *S. meliloti sinI::lacZ* (pJNSinR) 的检测灵敏度可以提高两倍, 但检测范围无变化。这些传感菌均不能检测侧链短于 14 个碳原子的 AHLs。

2.6 体内检测 AHLs 的微生物传感菌

在 1999 年以前, 人们对细菌 AHL 介导的 QS 系统的理解主要是基于体外实验的结果。为了实时和在单个细胞水平检测 AHLs 的体内动态变化, Andersen 等^[18]采用稳定型和非稳定型 GFP 为报告基因基于费氏弧菌的 QS 系统分别构建了质粒 pJBA130 和

pJBA132。这两种质粒可以导入多种革兰氏阴性菌, 包括大肠杆菌、沙雷氏菌(*Serratia liquefaciens*)、致黄假单胞菌(*Pseudomonas aureofaciens*)和铜绿假单胞菌, 这些重组菌可以检测以 AHLs 为语言的细菌胞间通讯。它们对 C₆-3-oxo-AHL 最敏感, 其次依次为 C₈-AHL、C₁₀-3-oxo-AHL、C₁₂-3-oxo-AHL 和 C₈-AHL。

Riedel 等^[19]基于铜绿假单胞菌 *lasI/R* QS 系统和洋葱伯克霍尔德菌(*Burkholderia cepacia*) *ceplI/R* QS 系统, 以非稳定型绿色荧光蛋白 *gfp* (ASV) 为报告基因构建质粒 pKR-C12 和 pAS-C8, 这两种质粒属于广谱寄主型, 可导入各种不同的不产 AHLs 的突变菌株中。*S. liquefaciens* MG44 (pKR-C12) 对 C₁₂-3-oxo-AHL 最敏感, 其次是 C₁₀-3-oxo-AHL、C₁₀-AHL 和 C₁₂-AHL。*S. liquefaciens* MG44 (pAS-C8) 对 C₈-AHL 最敏感, 也可以检测 C₁₀-AHL、C₁₀-3-oxo-AHL、C₆-AHL、C₁₂-AHL 和 C₁₂-3-oxo-AHL。上述两种传感菌可以用于研究 *P. aeruginosa* 和 *B. cepacia* 两种病原

Table 1 AHL biosensors, plasmids, the reporter systems and their detecting competence

Strain/Plasmid sensor	Host	Based on QS system	Reporter system	Best responds to	Good detection
<i>C. violaceum</i> CV026	<i>C. violaceum</i>	CviI/R (<i>C. violaceum</i>)	Violacein pigment	C ₆ -AHL	C ₆ -3-oxo-AHL C ₈ -AHL C ₈ -3-oxo-AHL C ₄ -AHL
pSB403	Broad host range	LuxI/R (<i>V. fischeri</i>)	<i>luxCDABE</i>	C ₆ -3-oxo-AHL	C ₆ -AHL C ₈ -3-oxo-AHL C ₈ -AHL
pSB536	<i>E. coli</i>	AhyI/R (<i>A. hydrophyla</i>)	<i>luxCDABE</i>	C ₄ -AHL	
pAL101	<i>E. coli</i> (sdiA mutant)	RhlI/R (<i>P. aeruginosa</i>)	<i>luxCDABE</i>	C ₄ -AHL	
pSB1075	<i>E. coli</i>	LasI/R (<i>P. aeruginosa</i>)	<i>luxCDABE</i>	C ₁₂ -3-oxo-AHL	C ₁₀ -3-oxo-AHL C ₁₂ -AHL
pKDT17	<i>E. coli</i>	LasI/R (<i>P. aeruginosa</i>)	β-galactosidase	C ₁₂ -3-oxo-AHL	C ₁₂ -AHL C ₁₀ -AHL C ₁₀ -3-oxo-AHL
M71LZ	<i>P. aeruginosa lasI</i>	LasI/R (<i>P. aeruginosa</i>)	β-galactosidase	C ₁₂ -3-oxo-AHL	C ₁₀ -3-oxo-AHL
pZLR4	<i>A. tumefaciens</i> NT1	TralI/R (<i>A. tumefaciens</i>)	β-galactosidase	C ₈ -3-oxo-AHL	All 3-oxo-AHLs C ₆ -AHL~C ₁₄ -AHL C ₆ -3-hydroxy-AHL C ₈ -3-hydroxy-AHL C ₁₀ -3-hydroxy-AHL
pSF105 + pSF107	<i>P. fluorescens</i> 1855	PhzI/R (<i>P. fluorescens</i> 2-79)	β glucuronidase β-galactosidase	C ₆ -3-hydroxy-AHL	C ₈ -3-hydroxy-AHL
<i>S. meliloti sinI::lacZ</i>	<i>S. meliloti sinI::lacZ</i>	SinI/R (<i>S. meliloti</i>)	β-galactosidase	C ₁₄ -3-oxo-AHL	C ₁₆ :1-3-oxo-AHL C ₁₆ -AHL C ₁₆ :1-AHL C ₁₄ -AHL
pAS-C8	Broad host range	CepI/R (<i>B. cepacia</i>)	<i>gfp</i>	C ₈ -AHL	C ₁₀ -AHL
pKR-C12	Broad host range	LasI/R (<i>P. aeruginosa</i>)	<i>gfp</i>	C ₁₂ -3-oxo-AHL	C ₁₀ -3-oxo-AHL
pJBA-132	Broad host range	LuxI/R (<i>V. fischeri</i>)	<i>gfp</i>	C ₆ -3-oxo-AHL	C ₆ -AHL C ₈ -AHL C ₁₀ -AHL

菌共感染人类肺囊时的种间通讯^[19]。研究表明,基于GFP的微生物传感菌还可以用于揭示番茄根际不同细菌种群间的信息交流和分析不同菌株对AHLs的降解能力^[20]。

3 小结与展望

目前所用的检测细菌AHLs微生物传感菌及其检测能力总结于表1。由于不同细菌*luxI*和*luxR*同源基因的核苷酸序列相似性较差,不能应用DNA杂交和PCR扩增技术分离和鉴定新的AHL介导的QS系统,因此,微生物传感技术成为快速分离和研究细菌QS系统的强有力的手段。本研究室从芽胞杆菌中克隆出能降解AHLs的内酯酶基因^[21],利用微生物传感菌研究分析了重组蛋白质体外降解AHLs的特性,分析了携带该基因的重组荧光假单胞菌降解病原菌AHLs和提高其抑制病原菌致病的能力^[22]。另外,采用根癌农杆菌NT1(pZLR4)和紫色杆菌突变株CV026为报告系统成功地从土壤中分离到一株能降解多种细菌AHLs的酵母菌^[23],为通过干扰细菌AHL介导的QS系统提高植物抗病性打下了基础。但是,采用微生物传感菌检测细菌AHLs也有其自身局限性,在解析检测结果时应相当谨慎。因为细菌提取物中有可能含有非AHLs化合物,但其可能干扰和激活微生物传感菌的报告系统从而给出假阳性结果。同样,得到阴性结果也不能完全排除待测菌不产生AHLs,因为有可能待测菌在实验条件下产生的AHLs的浓度太低,不足以激活微生物传感菌的报告系统,或者采用的微生物传感菌不适合检测该特异的AHLs。

因此,采用微生物传感菌检测细菌AHL时,应严格控制试验条件,同时应采用多个传感菌交叉检测待测菌是否产生AHLs以及产生的AHLs的种类和浓度。总之,细菌AHL介导的QS系统可能在细菌与真核生物互作及其信号转导,细菌种间和属间信息交流过程中发挥重要作用,因此研究和开发AHL生物传感技术具有重要的实践意义和应用前景。

参考文献(References)

- [1] Fuqua WC *et al.* *J Bacteriol*, 1994, **176**: 269
- [2] Miller MB *et al.* *Annu Rev Microbiol*, 2001, **55**: 165
- [3] Fuqua C *et al.* *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2002, **3**: 685
- [4] Zhu J *et al.* *Dev Cell*, 2003, **5**: 647
- [5] Waters CM *et al.* *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2005, **21**: 319
- [6] 宋水山. *自然科学进展*, 2006, **16**: 933
- [7] 宋水山. *细胞生物学杂志*, 2005, **27**: 427
- [8] McClean KH *et al.* *Microbiogyl*, 1997, **143**: 3703
- [9] Winson MK *et al.* *FEMS Microbiol Lett*, 1998, **163**: 185
- [10] Pearson JP *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, **91**: 197
- [11] Swift S *et al.* *J Bacteriol*, 1997, **179**: 5271
- [12] Lindsay A *et al.* *J Bacteriol*, 2005, **187**: 5054
- [13] Dong YH *et al.* *Mol Microbiol*, 2005, **56**: 1287
- [14] Farrand SK *et al.* *Methods Enzymol*, 2002, **358**: 452
- [15] Zhu J *et al.* *Appl Environ Microbiol*, 2003, **69**: 6949
- [16] Khan SR *et al.* *J Bacteriol*, 2005, **187**: 6517
- [17] Llamas I *et al.* *Appl Environ Microbiol*, 2004, **70**: 3715
- [18] Andersen JB *et al.* *Appl Environ Microbiol*, 1998, **64**: 2240
- [19] Riedel K *et al.* *Microbiology*, 2001, **147**: 3249
- [20] Jafra S *et al.* *J Microbiol Methods*, 2004, **57**: 415
- [21] 宋水山等. *生物技术*, 2005, **15**: 7
- [22] 张霞等. *华北农学报*, 2006, **21**: 1
- [22] 邱建等. *微生物学报*, 2007, **47**: 355

Detection of Quorum Sensing N-acylhomoserine lactones Signal Molecules

Shui-Shan Song*, Yuan-Yuan Huang

(Biology Institute of Hebei, Shijiazhuang 050051, China)

Abstract Many Gram-negative bacteria use N-acylhomoserine lactones (AHLs) as quorum sensing (QS) signal molecules to communicate with each other, synchronize related gene expression and response collectively to a changing environment. Bacterial quorum sensing plays essential roles in controlling and coordinating a variety of bacterial behavior. Simple and effective protocols for detecting and analyzing various signal molecules are of importance for identifying and understanding bacterial quorum sensing. The present article introduces and discusses the currently available microbial sensor strains used in detecting different kinds of AHLs.

Key words N-acylhomoserine lactones; bacterial quorum sensing; microbial sensor; signal molecules

Received: March 2, 2007 Accepted: May 24, 2007

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No.30570402) and the Natural Science Foundation of Hebei Province (No. C2006000707)

*Corresponding author. Tel: 86-311-83999012, E-mail: shuishans@hotmail.com