

淬灭酶 AiiO-AIO6 酶学性质及 对嗜水气单胞菌毒力因子的表达调控

张美超¹, 曹雅男¹, 姚斌¹, 白东清², 周志刚^{1*}

(1. 中国农业科学院饲料研究所,农业部饲料生物技术重点开放实验室,北京 100081;

2. 天津农学院水产科学系,天津 300384)

摘要: 将 N-乙酰高丝氨酸内酯酶基因 (*aioA*) 插入表达载体 pET28a 构建了原核表达载体 pET28a/*aioA*。转化大肠杆菌后筛选具有活性的重组子并对纯化的目的蛋白 AiiO-AIO6 的酶学性质进行了研究,同时研究了纯化的酶液对嗜水气单胞菌 ATCC7966 溶血素 (Hemolysin, Hem)、细胞肠毒素 (Cytotoxic enterotoxin, Ast)、胞外蛋白酶 (Extracellular protease, Ep)、丝氨酸蛋白酶 (Serine protease, Sp) 及磷脂酶 Pho (Phospholipase A1, Pho) 等 5 个毒力因子表达的影响。结果表明, pET28a/*aioA* 在大肠杆菌中大量表达 N-乙酰高丝氨酸内酯酶,纯化后的 N-乙酰高丝氨酸内酯酶的最适作用条件为 pH 8.0, 30 °C, 在 pH 6.0 ~ 11.0 的范围内能够稳定的存在,在 80 °C 条件下保温 30 min 后酶活力能够维持在 65% 以上;且该酶对多种金属离子、化合物和中性蛋白酶都具有很好的抗性;该酶对多种底物都具有一定的降解作用;以 3-oxo-C8-HSL 为底物时的 K_m 值为 0.015 mmol/L;比活力为 583.33 U/mg。N-乙酰高丝氨酸内酯酶在培养 8 h 及 12 h 时对嗜水气单胞菌 5 个毒力因子的表达量都具有明显的下调趋势 ($P < 0.05$)。本实验通过测定 AiiO-AIO6 的酶学性质及证明 AiiO-AIO6 可以通过降解嗜水气单胞菌产生的信号分子来抑制其毒力因子的表达,从而为将其应用于水产环境及致病性嗜水气单胞菌的生物防治奠定理论基础。

关键词: N-乙酰高丝氨酸内酯酶;原核表达;嗜水气单胞菌;毒力因子测定

中图分类号: Q 786; S 917.1

文献标志码: A

细菌根据特定信号分子的浓度可以检测自身或周围环境中其它细菌的数量变化。当信号分子达到一定的浓度阈值时,能启动菌体中相关基因的表达来适应环境中的变化,这一调控系统被称为细菌的群体感应系统 (quorum sensing, QS)^[1-2],群体感应现象广泛存在于自然界中。N-乙酰高丝氨酸内酯 (AHL) 是一类广泛存在于革兰氏阴性细菌中调控群体感应系统的信号分子^[3]。

目前根据碳链长度和 C₃ 位的取代基不同可将 AHL 信号分子分为 40 多种^[4],但这些信号分子都具有相同的高丝氨酸内酯环和相似的调控机

制,其中信号分子达到特定的浓度是引发病原菌表达致病因子的关键。如果能够降解 AHL,使其无法达到引发致病因子表达的临界浓度,病原菌也就失去了其致病力^[5]。因此将 AHL 信号分子作为细菌病害的新靶标位点,已经成为生物防治细菌病害的一条新途径。

据报道,群体感应调控着水产动物主要病原细菌的毒性基因的表达,如:嗜水气单胞菌及杀鲑气单胞菌的 QS 系统中产生的 C4-HSL (N-butanoyl-L-homoserine lactone) 可调控毒力因子的表达^[6-7]。因此,控制病原细菌群体感应路径成为近年来国际上兴起的鱼类细菌病防治的新手

收稿日期:2011-07-21 修回日期:2011-09-01

资助项目:科技部农业科技成果转化资金项目(2010GB23260591);中国农业科学院饲料研究所所长基金(2009);中国博士后科学基金(20090450472)

通讯作者:周志刚, E-mail: zhou_zg@msn.com

段^[7-8],其中利用可以淬灭信号分子的淬灭酶来淬灭病原细菌群体感应是重要举措之一。N-乙酰高丝氨酸内酯酶是一类研究最为深入、应用最为广泛的淬灭革兰氏阴性细菌产生的 N-乙酰高丝氨酸内酯(AHL)类信号分子的淬灭酶,此类淬灭酶通过水解进入胞内的 AHL 分子的内酯键,降低其浓度,使致病基因不能表达,从而阻止了病原菌对宿主的侵染^[9]。

嗜水气单胞菌是引起人、畜共患病的重要病原菌,也是导致水产养殖暴发性流行病的主要病原菌之一,其毒力因子如溶血素、肠毒素、蛋白酶及脂肪酶等,受群体感应系统中 AHL 信号分子的调控^[10-11]。因此可以尝试利用 N-乙酰高丝氨酸内酯酶降解其信号分子达到抑制嗜水气单胞菌毒力因子表达的目的,最终实现对嗜水气单胞菌所引起各类疾病的生物防治。

本实验在获得苍白杆菌(*Ochrobactrum* sp.) M231 来源 N-乙酰高丝氨酸内酯酶基因(*aiiO-AIO6*)的基础上,尝试对其进行原核表达,并利用实时荧光定量 PCR 技术检测该酶对嗜水气单胞菌毒力因子表达的影响,为全面应用 N-乙酰高丝氨酸内酯酶防治水产养殖细菌性病原菌奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

菌种与载体 苍白杆菌 M231 由中国农业科学院生物技术研究所伍宁丰研究员馈赠;嗜水气单胞菌 ATCC7966 购自中国农业科学院菌种保藏中心(2008);报告菌株 *A. tumefaciens* KYC 55 (pJZ372) (pJZ384) (pJZ410) 由南京农业大学朱军教授馈赠;大肠杆菌 BL 21 购自北京全式金生物公司,质粒 pET-28a 为本实验室保存。

培养基 液体 LB 培养液,用于菌株活化;ATmm 培养基^[12],用于测定 N-乙酰高丝氨酸内酯酶活。

主要试剂与仪器 燕麦木聚糖、胰蛋白酶、 α -糜蛋白酶、蛋白酶 K、枯草芽孢杆菌蛋白酶、胶原蛋白酶、C4-HSL、C6-HSL、C7-HSL、C8-HSL、C10-HSL、C12-HSL、C14-HSL、3-oxo-C6-HSL、3-oxo-C8-HSL、3-oxo-C10-HSL、3-oxo-C12-HSL、3-oxo-C14-HSL、3-hydroxy-C12-HSL 和 3-hydroxy-C14-HSL 均购自 Sigma 公司。rTaq 酶、dNTP、各

种限制性内切酶及 Rever Tra Ace 反转录试剂盒均购自 TaKaRa;pEASY-T3 载体、DNA 产物纯化试剂盒、质粒小提试剂盒、细菌基因组提取试剂盒、DNA 产物胶回收纯化试剂盒、细菌总 RNA 提取试剂盒均购自北京天根生化科技有限公司;SYBR Premix Ex Taq II 购自 TaKaRa 公司;连接酶购自 Invitrogen 公司,镍柱、去糖基化酶 *Endo H* 购自 NEB 公司;其他试剂均系进口分装或国产分析纯。本研究使用的主要仪器有 PCR 仪(Technie 公司);SDS-PAGE 系统(Aamersham pharmacia biotech)。

1.2 *aiiO-AIO6* 基因片段的克隆与融合表达载体的构建

利用 Tall-PCR 的方法从苍白杆菌中扩增得到 *AiiO-AIO6* 编码基因 *aiiO-AIO6*。

设计引物 A6-F:5'-CGGAATTCAAATCCC-ATGAAATCGAGACCAGTC-3';A6-R:5'-TTAAGCGGCCGCTCAGGCCGTGCAGTCG-3'(划横线的部分分别为 *Eco R I* 和 *Not I* 的酶切位点),由上海生工合成。以苍白杆菌 M231 基因组 DNA 为模板,扩增目的片段。PCR 反应条件:95 °C 预变性 5 min;94 °C 30 s,62 °C 30 s,72 °C 1 min,共 30 个循环;72 °C 延伸 10 min。

用 *Not I* 和 *Eco R I* 双酶切目的片段 *aiiO-AIO6*,连接于同样经 *Not I*、*Eco R I* 双酶切的 pET-28a 表达载体上,构建融合表达载体 pET-28a/*aiiO-AIO6*,转化大肠杆菌 BL 21,阳性克隆送北京擎科公司测序。

1.3 *AiiO-AIO6* 目的蛋白的诱导表达及纯化

***AiiO-AIO6* 诱导表达目的蛋白** 挑取阳性重组子接种于 5 mL LB 液体培养基,37 °C 培养过夜。按 2% 的接种量扩培于 200 mL LB 液体培养基,当 OD₆₀₀ 为 0.6 ~ 0.8 时,加入终浓度为 1 mmol/L 的 IPTG 于 20 °C 诱导 12 h 后收集菌体。将收集的菌体用 10 mmol/L 的 PBS 清洗 1 次,液氮冷冻 2 ~ 3 min,超声破碎后离心收集上清即为目的蛋白。

***AiiO-AIO6* 表达水平的检测** 参照文献 [13] 的操作方法进行操作。

***AiiO-AIO6* 目的蛋白的纯化** 将细胞破碎后收集的上清液过镍柱纯化蛋白。选取 20 mmol/L Tris,0.5 mol/L NaCl 缓冲液分别加入 20、40、60、80、100、200、300 mmol/L 不同浓度

的咪唑, pH 调至 7.6, 配成不同浓度梯度的洗脱液 NTA-0、NTA-20、NTA-40、NTA-60、NTA-80、NTA-100、NTA-200 及 NTA-300。等体积梯度洗脱后用 SDS-PAGE 验证为单一条带后送天津生物芯片技术有限公司进行一级质谱分析。

1.4 AiiO-AIO6 酶学性质的测定

参照文献[13]的操作方法进行的操作。

1.5 添加 AiiO-AIO6 对嗜水气单胞菌毒力基因表达量的影响

嗜水气单胞菌毒力因子的扩增及 PCR 验证根据文献查找嗜水气单胞菌的毒力因子, 最终选取 5 个报道过受信号分子调控的毒力因子为研究对象^[10,11,14]。再根据嗜水气单胞菌 ATCC 7966 基因组设计这 5 个毒力因子特异性引物及内参基因 *rpob* 的特异性引物(表 1)。

表 1 嗜水气单胞菌 ATCC 7966 内参基因及毒力因子特异性引物
Tab. 1 The specific primers of *A. hydrophila* ATCC 7966 factor reference and reference gene

基因 gene	GenBank no. / Locus Tag	引物名称: 引物序列 primer name: primer sequence	片段大小/bp fragment size
<i>rpob</i>	CP000462/AHA_4028(standard)	Aha-RpoB-3429F; AGGGTATCGGCGAGAAGATC Aha-RpoB-3777R; CAGGTGGTTCAACTTCAGCA	350
<i>ast</i>	NC_008570/AHA_0804	Aha-ast-262F; GAGATGGCGCTGAAAATGC Aha-ast-583R; CATAGGTGCGATAGCTGAGC	322
<i>hem</i>	ABK36425/AHA_0438	Aha-hem-295F; TATCCGACCAATCCTGTTACC Aha-hem-615R; GTCAGGGTCCAGTTGTATG	322
<i>sp</i>	YP_857195/AHA_2687	Aha-Sp-276F; AGGGTCAGGGCATCAACGTG Aha-Sp-622R; CCACCAGGCTCATACCGTAG	348
<i>ep</i>	YP_857221/AHA_2713	Aha-Ep-236F; GAGGGGGCCTTGATCAAGC Aha-Ep-482R; ACCCGCTCGTCACTCACCC	248
<i>pho</i>	YP_854631/AHA_0104	Aha-Pho-19F; TACGCCGAGTTGTCAAGT Aha-Pho-253R; GGATAGCCTGGGTCGTGGA	235

注: Hem: 溶血素, Ast: 细胞肠毒素, Ep: 胞外蛋白酶, Sp: 丝氨酸蛋白酶, Pho: 磷脂酶。

Notes: Hem: Hemolysin, Ast: Cytotoxic enterotoxin, Ep: Extracellular protease, Sp: Serine protease, Pho: Phospholipase A1.

嗜水气单胞菌 cDNA 的获得 将嗜水气单胞菌 ATCC 7966 按 1% 接种于 LB 培养基中, 30 °C 培养 8 h 后取 1 mL 于 1.5 mL 离心管中用天根总 RNA 提取试剂盒提取嗜水气单胞菌 ATCC 7966 的总 RNA (操作方法参照试剂盒使用说明书)。然后尽快将提取的总 RNA 用 Rever Tra Ace 反转录试剂盒反转录成 cDNA。反转录成 cDNA 的条件: 30 °C 10 min; 42 °C 20 min; 99 °C 5 min; 4 °C 5 min。用 *rpob* 内参基因验证 cDNA 的反转录效果。

添加 AiiO-AIO6 对嗜水气单胞菌毒力基因表达量的影响 将嗜水气单胞菌 ATCC 7966 接种于 400 mL LB 培养基中混匀后分装 2 瓶(每瓶 190 mL)。然后分别向各瓶中加 10 mL 酶液(AiiO-AIO6)和 10 mL 热灭活的酶液(AiiO-AIO6)。将其放入 30 °C 摇床中培养, 每隔 4 h 取样一次至 24 h 结束。取出的样品分别测定其光吸收值, 同时将取出的样品 12 000 r/min 离心 1 min 后分别收集上清和菌体; 收集的上清用于测

定样品中的淬灭酶剩余活性, 收集的菌体用于嗜水气单胞菌的总 RNA 的提取(每组样品 3 个平行), 而后分别反转录成 cDNA 用(Bio-Rad 的 iQ5) Q-PCR 进行检测。Q-PCR 的检测体系为 20 μL: 10 μL SYBR Premix Ex Taq II; 2 μL 的 cDNA 模板; 1 μL (8 mmol) 的 P1; 1 μL (8 mmol) 的 P2; 6 μL 的 ddH₂O。Q-PCR 的检测条件为步骤 1: 预变性 95 °C 3 min; 步骤 2: 三步法扩增 95 °C 20 s, 52 °C 30 s, 72 °C 30 s 40 个循环; 步骤 3: 熔解曲线从 65 °C ~ 95 °C 每 10 秒上升 0.5 °C。每个反应管均设置 3 个平行, 实验重复两次。将实验所得结果用相对定量法(-ΔΔC_t法)^[15]计算毒力因子表达量的变化。

2 结果

2.1 aiiO-AIO6 目的基因的获得

以苍白杆菌 M231 的基因组 DNA 为模板利用 PCR 技术扩增得到 N-乙酰高丝氨酸内酯酶基因(图 1)。结果显示, 从菌株 M231 基因组 DNA

中扩增得到一个约 800 bp 左右的单一条带为目的片段,命名为 *aiiO-AIO6*。*aiiO-AIO6* 全长为 810 bp,编码由 269 个氨基酸组成的蛋白质,其推导理论分子量为 34.08 ku,等电点为 5.24。所编码的蛋白质命名为 AiiO-AIO6 (GenBank no. JN572045)。

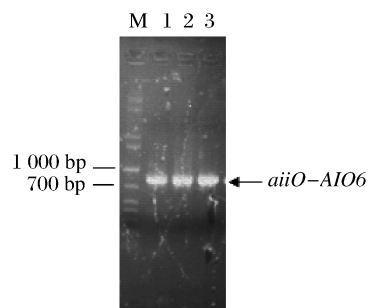


图 1 融合基因电泳图

M. 1 kb plus DNA 标记; 1~3. N-乙酰高丝氨酸内酯酶基因 *aiiO-AIO6*。

Fig. 1 Electrophoresis graph of *aiiO-AIO6*

M. 1 kb plus DNA marker; 1~3. N-acetyl-homoserine lactonase gene *aiiO-AIO6*。

2.2 AiiO-AIO6 的表达和纯化

在体外研究 AiiO-AIO6 的功能和酶学特性,首先将目的片段连接 pET-28a 表达载体在大肠杆菌 (*E. coli*) BL21 中进行表达。SDS-PAGE

检测表明(图 2),由 AiiO-AIO6 编码的蛋白经 IPTG 诱导后在大肠杆菌 BL21 中表达一个 35 ku 左右的蛋白与理论分子量一致。收集诱导后的菌体,经超声破碎后 12 000 r/min 离心 5 min 取上清镍柱纯化后得到单一条带的目的蛋白。将得到的纯酶液置于含 1 × PBS 缓冲液的透析袋中,4 °C 过夜透析,而后用 PEG 8000 浓缩酶液,浓缩后的酶液置于 4 °C 冰箱备用。

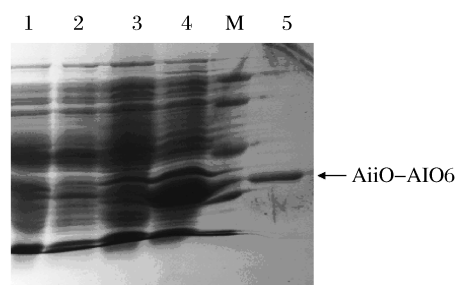


图 2 AiiO-AIO6 在大肠杆菌中表达

1. pET-28a 空载体未加入 IPTG 表达; 2. pET-28a 空载体加入 IPTG 诱导表达; 3. pET-28a-*aiiO-AIO6* 载体未加入 IPTG 表达; 4. pET-28a-*aiiO-AIO6* 加入 IPTG 诱导表达。

Fig. 2 Expression of AiiO-AIO6 in *E. coli*

1. The vacant pET-28a without expression; 2. The pET-28a induced by IPTG; 3. The pET-28a-*aiiO-AIO6* without expression; 4. The pET-28a-*aiiO-AIO6* induced by IPTG.

质谱分析结果如下:

```

1 KSHEIETSHG RIAIRESRGN GTPLLMIHGN SSAGAIFAPQ LEGEIGRNWR
51 VIAPDLPGHG QSGNALDPDR SYSMEGYADV MTEVLAKLGI SDAVVFGWSL
101 GGHIGIEMIS RFPGMRGLMI TGTPPVAREE VGQGFRSGPD MALAGQEAFS
151 DRDVESYARS TCGEPFEEQL LEIVAR TDGR ARRIMFEKFA AGTGGNQRDI
201 VAEAR LPIAV VNGRDEPFVE LDFVSKVRFGLNWEGR THVI DGAGHAPFRE
251 TPAIFDDYLQ RFMRDCTA

```

图 3 大肠杆菌表达的 N-乙酰高丝氨酸内酯酶质谱分析

Fig. 3 LC-ESI-MS/MS analysis of recombinant AiiO-AIO6 expressed in *E. coli*

2.3 AiiO-AIO6 酶学性质的测定

温度与 pH 值 *aiiO-AIO6* 编码的蛋白质 AiiO-AIO6 在 pH 6.0 ~ 10.0 范围内具有活性,其中 pH 8.0 的条件下酶活最高,即 pH 8.0 为 AiiO-AIO6 的最适 pH(图 4-a); AiiO-AIO6 在 pH 范围为 pH 6.0 ~ 12.0 间都很稳定,可以保持 80% 以上的酶活(图 4-b); AiiO-AIO6 在 0 ~ 70 °C 范围内有酶活,其中 30 °C 为最适作用温度,温度高于 60 °C 时酶活仍保持在 30% 左右(图 4-c); AiiO-AIO6 在 80 °C 保温 30 min 后剩余酶活力为 67.71% (图

4-d)。

金属离子及相关化学试剂的抗性 测定结果表明,除 SDS 外其余离子或化学试剂对酶活没有显著影响(表 2)。

中性蛋白酶抗性 N-乙酰高丝氨酸内酯酶 AiiO-AIO6 对胰蛋白酶、 α -糜蛋白酶、枯草芽孢杆菌蛋白酶 A、胶原蛋白酶具有极强的抗性,测定结果表明,与上述中性蛋白酶混合处理 1 h 后其剩余酶活力都为 99.90%; 但与蛋白酶 K 混合处理 1 h 后其剩余酶活力都为 50.19% (图 5)。

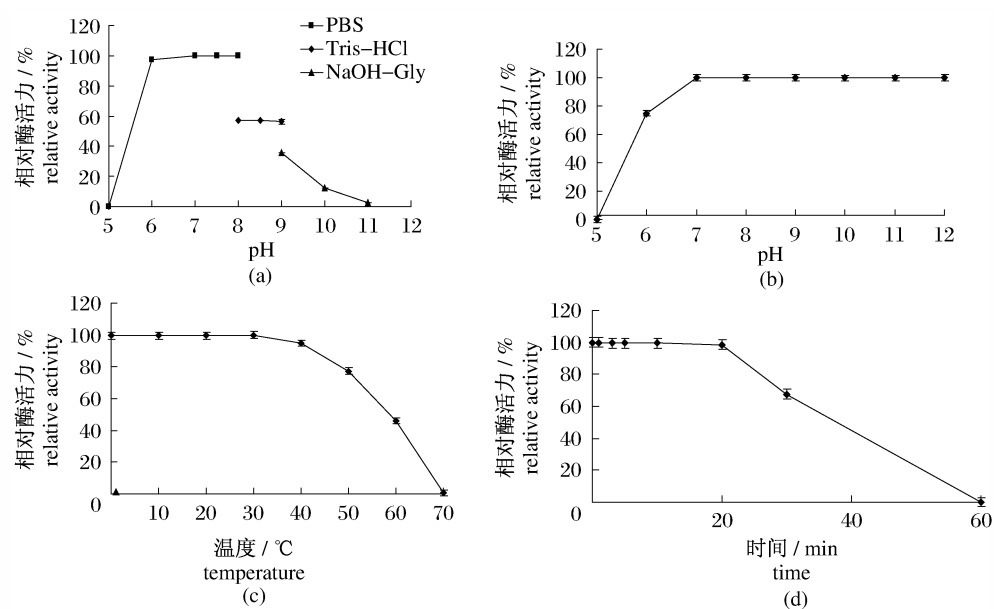


图4 AiiO-AIO6 N-乙酰高丝氨酸内酯酶性质

a, b, c, d 分别为 N-乙酰高丝氨酸内酯酶的最适 pH、pH 稳定性、最适温度及温度稳定性。

Fig. 4 The enzymatic characteristic of N-acyl-homoserine lactonase AiiO-AIO6

a, b, c and d represent the optimum pH value, the pH stability, the optimum temperature and the temperature stability of N-acyl-homoserine lactonase, respectively.

表2 N-乙酰高丝氨酸内酯酶对相关化学试剂的抗性

Tab. 2 Effect of relevant chemical ions and reagents to N-acyl-homoserine lactonase

化学试剂 reagent	相对酶活力 / % relative activity		化学试剂 reagent	相对酶活力 / % relative activity	
	1 mmol/L	10 mmol/L		1 mmol/L	10 mmol/L
CK	100.00	100.00	NiSO ₄	99.87	99.60
NaCl	99.10	99.10	ZnSO ₄	100	99.76
KCl	100.11	99.60	PbAc	100	99.76
LiCl	98.10	98.10	FeCl ₃	99.87	99.60
CaCl ₂	99.71	99.76	MnSO ₄	99.71	99.76
MgSO ₄	98.87	99.41	AgNO ₃	99.31	99.19
CoCl ₂	99.71	99.76	SDS	82.49	70.20
CrCl ₃	99.31	99.41	β-mercaptoethanol	99.71	99.41
CuSO ₄	100.28	99.89	EDTA	99.71	100
CK	100.00	100.00	CK	100.00	100.00

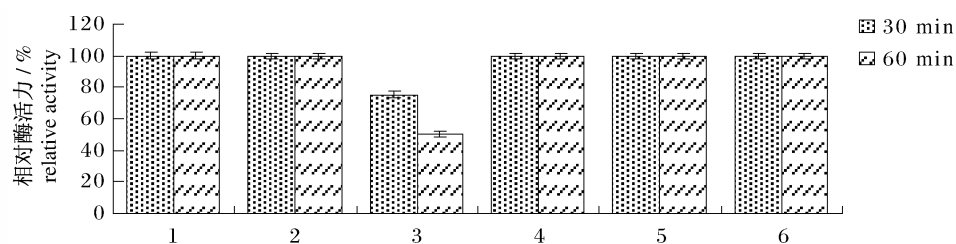


图5 N-乙酰高丝氨酸内酯酶中性蛋白酶抗性

1. 对照, 2. α-糜蛋白酶, 3. 蛋白酶 K, 4. 胰蛋白酶 K, 5. 枯草芽孢杆菌蛋白酶, 6. 胶原蛋白酶。

Fig. 5 The resistance of the N-acyl-homoserine lactonase to proteases

1. CK, 2. α-chymotrypsin, 3. proteinase K, 4. trypsin, 5. subtilisin, 6. collagenase.

底物多样性 N-乙酰高丝氨酸内酯酶 AiiO-AIO6 对不同底物酶活力测定结果分别为 C7-HSL (316.14 U/mL)、C8-HSL (126.10 U/mL)、C10-HSL (287.74 U/mL)、3-oxo-C8-HSL (877.04 U/mL)、3-oxo-C10-HSL (232.17 U/mL)、3-oxo-C12-HSL (172.94 U/mL)、3-oxo-C14-HSL (29.46 U/mL)、3-hydroxy-C12-HSL (28.20 U/mL)、3-oxo-C6-HSL (0.92 U/mL);同时对 C4-HSL、C6-HSL 也具有一定的降解作用,但对 C12-HSL、3-hydroxy-C14-HSL、C14-HSL 降解作用不明显。

动力学测定 N-乙酰高丝氨酸内酯酶 AiiO-AIO6 的动力学测定结果为 $V_{\max} = 121.95 \text{ nmol}/(\text{mg} \cdot \text{min})$, $K_m = 0.015 \text{ mmol/L}$ 。

比活力测定 N-乙酰高丝氨酸内酯酶 AiiO-AIO6 的比活力为 583.33 U/mg。

2.4 添加 AiiO-AIO6 对嗜水气单胞菌毒力基因表达量的影响

以嗜水气单胞菌 ATCC 7966 的基因组 DNA 为模板利用 PCR 技术分别扩增得到 *hem*、*ast*、*ep*、*sp*、*pho* 等 5 个毒力因子的基因片段及内参基因 *ropB* 的基因片段。

提取嗜水气单胞菌 ATCC 7966 的总 RNA,而后迅速用反转录试剂盒将提取的 RNA 反转录成 cDNA,再以 cDNA 为模板用 *ropB* 基因引物验证 cDNA 的反转录质量(图略)。结果表明在 350 bp 处得到单一条带。

嗜水气单胞菌生长曲线的绘制,分别测定添加 AiiO-AIO6 及等量灭活 AiiO-AIO6 为对照培养了 4、8、12、24 h 的嗜水气单胞菌菌液的光密度值(图 6),结果表明,在分别添加 AiiO-AIO6 与等量灭活 AiiO-AIO6 为对照培养 0~24 h,菌液的光密度值没有明显差异($P > 0.05$)。

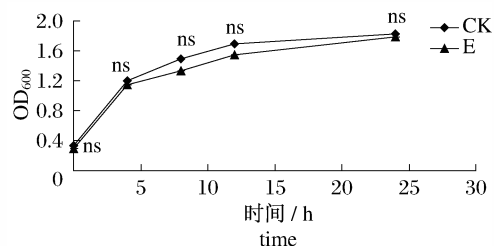


图 6 嗜水气单胞菌 ATCC 7966 生长曲线

ns: 无显著性差异

Fig. 6 Growth curve of *A. hydrophila* ATCC 7966

ns: no significant difference

将分别添加 AiiO-AIO6 及等量灭活 AiiO-AIO6 为对照培养了 0、4、8、12、24 h 的嗜水气单胞菌离心取上清分别测定其剩余 AiiO-AIO6 酶活力(图 7)。结果表明,其剩余酶活力分别为 1.68、1.64、1.22、0.87、0.61 U/mL;同时收集各时间点的菌体分别提取嗜水气单胞菌 ATCC 7966 总 RNA,用琼脂糖凝胶电泳验证结果表明分别在 900 和 1500 bp 处有两条目的片段即 16S RNA 和 23S RNA,而后迅速用反转录试剂盒将提取的 RNA 反转录成 cDNA,再以这些 cDNA 为模板用实时定量 PCR 的方法检测嗜水气单胞菌 5 个毒力因子表达量的变化,结果表明,在添加淬灭酶培养 4 h 时 *Hem*、*Ast*、*Sp* 这三个毒力因子表达量没有明显的变化,毒力因子 *Pho* 的表达量显著性下调($P < 0.05$),因子 *Ep* 的表达量呈现明显的上调($P < 0.05$);但培养 8、12 h 时 5 个毒力因子表达量均呈现显著性下调($P < 0.05$);在培养 24 h 时 *Hem*、*Ast* 这两个毒力因子的表达量仍然呈显著性下调($P < 0.05$),但 *Ep*、*Sp*、*Pho* 这三个毒力因子的表达量调控呈明显上调($P < 0.05$)。从得到的结果看,N-乙酰高丝氨酸内酯酶 AiiO-AIO6 起到了抑制该原菌毒力因子表达量的作用。24 h 时可能是由于添加 N-乙酰高丝氨酸内酯酶的活力有所降低使得调控毒力因子的能力有所减弱,从而导致部分毒力因子的表达量上调。

3 讨论

本研究报道的 N-乙酰高丝氨酸内酯酶与其他已报道的芽孢杆菌来源的 N-乙酰高丝氨酸内酯酶基因的相似性只有 12% 左右。通过酶学性质研究表明,该酶的最适 pH 为 pH 8.0,最适温度为 30 °C,与已报道的 N-乙酰高丝氨酸内酯酶的最适 pH 及温度一致^[16-17],但本实验报道的 N-乙酰高丝氨酸内酯酶具有更好的热稳定性,在 80 °C 处理 30 min 后酶活剩余 67.70% 左右,比张美超等^[13]报道的 N-乙酰高丝氨酸内酯酶的比活力高百倍以上,因此具有较高的实际应用价值。

目前,将 N-乙酰高丝氨酸内酯酶应用于植物病原菌的生物防治中已取得一定的进展。DONG 等^[18-19]研究表明芽孢杆菌来源的 *aiiA* 基因表达的 N-乙酰高丝氨酸内酯酶 AiiA 可以使 *Pectobacterium carotovorum* SCG1 分泌的胞外酶显著降低;将 *aiiA* 基因转入烟草和马铃薯结果表

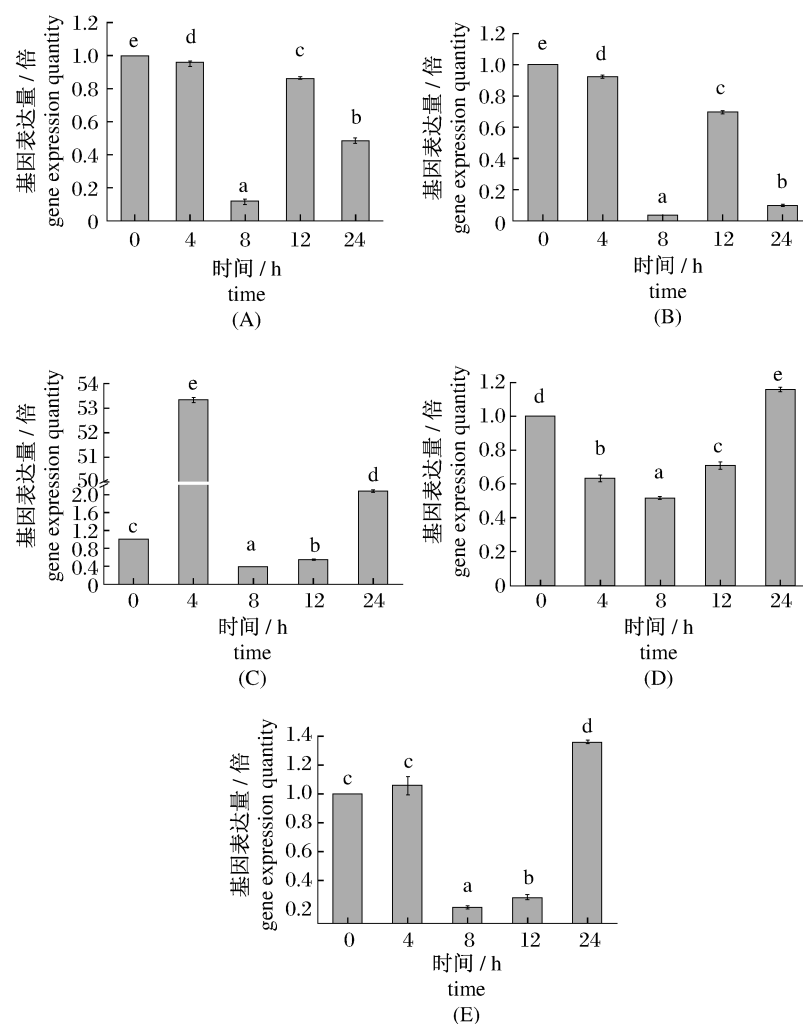


图7 添加 AiiO-AIO6 对嗜水气单胞菌 ATCC7966 5 个毒力基因表达量的影响

a,b,c,d,e 代表存在显著性差异,字母相同差异不显著,字母不相同差异显著。A. Hem, B. Ast, C. EP, D. Sp, E. Pho。

Fig. 7 Effects of AiiO-AIO6 on the gene expression of virulence factors in *A. hydrophila* ATCC7966

a,b,c,d,e mean significant differences. The same letter represent no significant difference.

明,在转入 *aiiA* 基因的烟草叶片和马铃薯块茎上接种病原菌,不出现病斑或显著推迟病斑的出现;将 *aiiA* 基因转化 *Acidovorax citrulli* 后显著降低了菌株信号分子的产生和致病性^[20];近几年,将 N-乙酰高丝氨酸内酯酶应用于水产病原菌的防治中也有一些报道。如将 N-乙酰高丝氨酸内酯酶基因与木聚糖酶基因融合后进行表达的融合蛋白 SL2B 中的 N-乙酰高丝氨酸内酯酶对锦鲤鱼肠液具有一定的抗性^[13];CHEN 等^[17] 研究发现芽孢杆菌来源的 N-乙酰高丝氨酸内酯酶 AiiA-B546 可延缓嗜水气单胞菌 ATCC 7966 对锦鲤的侵染。因此,将 N-乙酰高丝氨酸内酯酶应用于水产养殖病原菌的生物防治中具有较强的实际意义。

利用 N-乙酰高丝氨酸内酯酶降解信号分子来

达到生物防治致病性嗜水气单胞菌成为我们研究的目的。本实验选取的嗜水气单胞菌 ATCC7966 为全基因组测序的菌株,其遗传背景清楚^[21],其基因组中具有 LuxI/R 同源蛋白^[22],而 LuxI 是合成 N-乙酰高丝氨酸内酯类信号分子的合成酶, LuxR 是 N-乙酰高丝氨酸内酯类信号分子的受体蛋白^[22-23],用检测菌株 KYC55 检测其产信号分子的产生实验中证明了上述结论^[24];同时,嗜水气单胞菌 ATCC 7966 具有产生溶血性、肠毒性和细胞毒性等生物学活性因子的溶血素基因、胞外蛋白酶基因、细胞肠毒素基因,具有直接致病性或活化其他致病因子的丝氨酸蛋白酶基因^[11],以及具有细胞毒性及微弱溶血性的磷脂酶等^[25-27] 毒力因子。

综上所述,本研究选取嗜水气单胞菌

ATCC7966 的 5 个毒力因子为研究对象,利用实时定量 PCR 技术检测添加 N-乙酰高丝氨酸内酯酶对毒力因子表达量的影响。N-乙酰高丝氨酸内酯酶对嗜水气单胞菌致病基因具有一定的下调作用,可以降低其致病性毒力因子的表达量以达到生物防治致病性嗜水气单胞菌对其宿主的侵染及毒害,同时该研究也为将其应用于对致病性嗜水气单胞菌的生物防治奠定理论基础。

此外,本研究分离、纯化得到的 N-乙酰高丝氨酸内酯酶可应用水产养殖环境,利用实时定量 PCR 技术检测证明,该酶对嗜水气单胞菌的致病因子具有下调作用,因此,将该酶应用于水产养殖中致病性嗜水气单胞菌的生物防治具有潜在的应用前景。

参考文献:

- [1] WITHERS H, SWIFT S, WILLIAMS P. Quorum sensing as an integral component of gene regulatory networks in gram-negative bacteria [J]. *Current Opinion in Microbiol*, 2001, 4(2) : 186 - 193.
- [2] CVITKOVITCH D G, LIU Y H, ELLEN R P. Quorum sensing and biofilm formation in Streptococcal infection [J]. *J Clin Invest*, 2003, 112 : 1626 - 1632.
- [3] 黄琪炎. 水产动物疾病学 [M]. 上海:上海科学出版社, 1993 : 123 - 129.
- [4] WILLIAMS P, WINZER K, CHAN W C, *et al.* Look who's talking: communication and quorum sensing in the bacterial world [J]. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London, Series B*, 2007, 362 (1483) : 1119 - 1341.
- [5] SCHMITTGEN T D. Real-time quantitative PCR [J]. *Methods*, 2001, 25(4) : 383 - 385.
- [6] CASCON A, FREGENEDA J, ALLER M, *et al.* Cloning, characterization, and insertional inactivation of a major extracellular serine protease gene with elastolytic activity from *Aeromonas hydrophila* [J]. *Journal of Fish Diseases*, 2000, 23(1) : 49 - 59.
- [7] SCHWENTEIT J, GRAML, NIELSEN K, *et al.* Quorum sensing in *Aeromonas salmonicida* subsp. *achromogenes* and the effect of the autoinducer synthase *AsaI* on bacterial virulence [J]. *Veterinary Microbiology*, 2011, 147 : 389 - 397.
- [8] RASCH M, BUCH C, AUSTIN B, *et al.* An inhibitor of bacterial quorum sensing reduces mortalities caused by vibriosis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) [J]. *Systematic and Applied Microbiology*, 2004, 27(3) : 350 - 359.
- [9] 吴怀光,叶伟星,喻子牛,等. 在苏云金芽胞杆菌中高效和稳定表达 AiiA 蛋白 [J]. *中国农业科学*, 2007, 40(10) : 2221 - 2226.
- [10] BI Z X, LIU Y J, LU C P. Contribution of *AhyR* to virulence of *Aeromonas hydrophila* J-1 [J]. *Research in Veterinary Science*, 2007, 83(2) : 150 - 156.
- [11] KHAJANCHI B K, SHA J, KOZLOVA E V, *et al.* N-Acylhomoserine lactones involved in quorum sensing control the type IV secretion system, biofilm formation, protease production, and *in vivo* virulence in a clinical isolate of *Aeromonas hydrophila* [J]. *Microbiology*, 2009, 155 : 3518 - 3531.
- [12] TEMPE J, PETIT A, HOLSTERS M, *et al.* Thermosensitiveness associated with transfer of the Ti plasmid during conjugation; possible relation to transformation in crown gall [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1977, 74 : 2848 - 2849.
- [13] 张美超,曹雅男,姚斌,等. 高效表达 N-乙酰高丝氨酸内酯酶-木聚糖酶融合蛋白及其酶学性质 [J]. *微生物学报*, 2011, 51(8) : 54 - 64.
- [14] 吴倩,闫芳,刘风波. 嗜水气单胞菌的研究进展 [J]. *兽医研究*, 2010, 2 : 28 - 31
- [15] LIVAK K J, SCHMITTGEN T D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2-CT Method [J]. *Methods*, 2001, 25(4) : 402 - 408.
- [16] 邱健,李承光,贾振华,等. 酰基高丝氨酸内酯酶 SS10 的酶学特性及其抗软腐病功能的初探 [J]. *植物病理学报*, 2007, 37(6) : 629 - 636.
- [17] CHEN R D, ZHOU Z G, CAO Y N, *et al.* Research High yield expression of an AHL-lactonase from *Bacillus* sp. B546 in *Pichia pastoris* and its application to reduce *Aeromonas hydrophila* mortality in aquaculture [J]. *Microbiol Cell Factories*, 2010, 9 : 2 - 10.
- [18] DONG Y H, XU J L, LI X Z, *et al.* AiiA, an enzyme that inactivates the acylhomoserine lactone quorum-sensing signal and attenuates the virulence of *Erwinia carotovora* [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2000, 97(7) : 3526 - 3531.
- [19] DONG Y H, WANG L H, XU J L. Quenching quorum-sensing-dependent bacterial infection by an N-acyl homoserine lactonase [J]. *Nature*, 2001, 411 : 813 - 817.
- [20] 钱国良,杨小丽. 瓜类细菌性果斑病菌群体感应信号分子的检测及其对致病性的影响 [J]. *农业生物技术学报*, 2008, 16(4) : 653 - 657.
- [21] SESHADRI R, JOSEPH S W, CHOPRA A K, *et al.*

- Genome sequence of *Aeromonas hydrophila* ATCC 7966T: jack of all trades [J]. *Journal of Bacteriology*, 2006, 188: 8272–8282.
- [22] JANGID K, KONG R, PATOLE M S, *et al.* luxRI homologs are universally present in the genus *Aeromonas* [J]. *BMC Microbiology*, 2007, 7: 93.
- [23] FUQUA C, GREENBERG E P. Self perception in bacteria. Quorum sensing with acylated homoserine lactones [J]. *Current Opinion of Microbiology*, 1998, 1: 183–189.
- [24] 陈瑞东. N-酰基高丝氨酸内酯酶基因克隆、表达、性质研究与水产养殖应用 [D]. 北京: 中国农业科学院, 2010.
- [25] MERINO S, AGUILAR A, NOGUERAS M M, *et al.* Cloning, sequencing, and role in virulence of two phospholipases (A1 and C) from mesophilic *Aeromonas* sp. Serogroup O: 34 [J]. *Infection and Immunity*, 1999, 67(8): 4008–4013.
- [26] SWIFT S, LYNCH M J, FISH L, *et al.* Quorum sensing-dependent regulation and blockade of exoprotease production in *Aeromonas hydrophila* [J]. *Infection and Immunity*, 1999, 67: 5192–5199.
- [27] SHA J, PILLAI L, FADL A A, *et al.* The type III secretion system and cytotoxic enterotoxin alter the virulence of *Aeromonas hydrophila* [J]. *Infection and Immunity*, 2005, 73: 644–6457.

Characteristics of quenching enzyme AiiO-AIO6 and its effect on *Aeromonas hydrophila* virulence factors expression

ZHANG Mei-chao¹, CAO Ya-nan¹, YAO Bin¹, BAI Dong-qing², ZHOU Zhi-gang^{1*}

(1. Key Laboratory for Feed Biotechnology of the Ministry of Agriculture, Feed Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China;

2. Department of Fisheries Science, Tianjin Agricultural College, Tianjin 300384, China)

Abstract: The prokaryotic expression vector pET28a/*aiiO-AIO6* was constructed by inserting the *aiiO-AIO6* gene into expression vector pET28a and transformed into *E. coli*. Subsequently, the recombinants with activity of N-acyl homoserine lactonase were investigated. After purification with nickel column, enzymatic characteristic of the target protein was researched. Moreover, the effects of purified enzyme solution on the expression of *Hemolysin*, *Cytotoxic enterotoxin*, Extracellular protease, Serine protease, *Phospholipase A1*, *ea* and *tl* five virulence factors from *Aeromonas hydrophila* ATCC7966 were detected by real-time quantitative PCR. The purified AiiO-AIO6 showed that the N-acyl-homoserine lactonase had optimal pH and temperature at pH 8.0 and 30 °C, respectively. The enzyme was stable between pH 6.0 and 11.0, retained over 65% enzyme activity at 80 °C for 30 min. It resisted various neutral proteases and chemical reagents. The fusion protein can hydrolyze many N-acyl homoserine lactones substrates. With N-(3-oxo-octanoyl)-L-homoserine lactone as substrate, the Km value of AiiO-AIO6 was 0.015 mmol/L and specific activity was 583.33 U/mg. The expression amount of five virulence factors of *A. hydrophila* had down-regulated trend obviously ($P < 0.05$) at 8 h and 12 h. with adding the purified enzyme liquid for the expression amount of five virulence factors. In this study the optimal pH and temperature of AiiO-AIO6 were obtained by detecting enzymatic property, and AiiO-AIO6 could inhibit *A. hydrophila* virulence factors expression indirectly by degrading signal molecules, which established a theoretical foundation for the application in aquaculture environment and biological control of pathogenic *A. hydrophila*.

Key words: N-acylhomoserine lactonase; prokaryotic expression; *Aeromonas hydrophila*; virulence factors determination

Corresponding author: ZHOU Zhi-gang. E-mail: zhou_zg@msn.com