

一种检测革兰氏阴性菌群体感应抑制剂的简便方法

綦国红¹, 董明盛^{2,*}, 王岁楼¹

(1. 中国药科大学药学院, 江苏 南京 210009; 2. 南京农业大学食品科技学院, 江苏 南京 210095)

摘要: 许多革兰氏阴性菌通过产生 N-酰基-高丝氨酸内酯类(AHLs)化合物介导的群体感应(QS)现象来调控特定生理性状的表达。而 AHL 类似物作为群体感应抑制剂(QSI)可使由 QS 所调控的生理特性不表达或表达水平下降。本研究的目的是建立检测 AHL 类似物方法。基于 QS 抑制原理, 建立了平板法及 TLC 方法从微生物中筛选 AHL 类似物。该方法简便有效, 费用低廉, 为筛选群体感应抑制剂提供了一种新方法。

关键词: 群体感应; 群体感应抑制剂; N-酰基-高丝氨酸内酯; 检测

A Simple Method for Detecting Quorum Sensing Inhibitor in Gram-negative Bacteria

QI Guo-hong¹, DONG Ming-sheng^{2,*}, WANG Sui-lou¹

(1. College of Pharmacy, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China;

2. College of Food Science and Technology, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract: Many Gram-negative bacteria regulate the expression of some physiological traits in quorum sensing (QS) mediated by N-acyl-homoserine lactones (AHLs). Quorum sensing inhibitor (QSI) of AHL antagonists can block or attenuate the expression of characteristic associated with QS. Based on the above inhibitory principle, this study developed an agar plate and TLC assay to detect the antagonists for N-acyl-homoserine in microorganism. This new method is simple, inexpensive and easy to application.

Key words: quorum sensing; quorum sensing inhibitor; n-acyl-homoserine lactones; detection

中图分类号: Q938

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2009)04-0142-03

许多海洋细菌聚集在一个很小的微环境中, 并达到很高的密度从而展现出特定的生理性状, 即群体感应现象(quorum sensing, QS)^[1-2]。研究发现革兰氏阴性菌通过产生 N-酰基-高丝氨酸内酯类(n-acyl-homoserine lactones, AHLs)化合物来调控与食品腐败、动植物致病性等有关的许多特定的生理性状的表达, 如蛋白酶活性、致病因子的表达、生物膜的形成等^[3]。

近几年群体感应抑制成为研究的一个热点。通过群体感应抑制剂(quorum sensing inhibitor, QSI)使致病细菌、腐败细菌中由 QS 系统所调控的生理特性不表达或者表达水平下降, 开创新的食品防腐保鲜技术及新药开发途径。其中利用 AHL 类似物是研究群体感应抑制的一个非常重要的方式。发现最早同时也是研究最广泛的是由海洋红藻(*Delissea pulchra*)产生的卤化呋喃酮^[4], 该

化合物能够抑制费氏弧菌(*V. fischeri*) 和哈维氏弧菌(*V. harveyi*)的生物发光、产水沙门氏菌(*S. liquefaciens*)的浮游、白菜软腐病菌(*E. carotovora*)胞外酶的产生以及减弱铜绿假单胞菌的致病力等^[4-6]。

因此, QSI 化合物在医疗、食品防腐等领域都具有非常广泛的应用价值。建立筛选 AHL 类似物的方法对研究群体感应抑制是非常重要的。本实验根据 QSI 化合物能够抑制群体感应现象的原理, 建立一种从微生物中筛选具有 QSI 活性化合物的方法。该方法简单、易得不需要昂贵的硬件设备。

1 材料与方法

1.1 菌株与培养条件

表 1 为本实验的供试菌株及特性。所有菌株均在 LB

收稿日期: 2008-01-15

基金项目: 国家自然科学基金项目(30700627)

作者简介: 綦国红(1972-), 女, 讲师, 博士, 研究方向为食品微生物与生物技术。E-mail: qghbox@163.com

* 通讯作者: 董明盛(1961-), 男, 教授, 研究方向为食品微生物与生物技术。E-mail: dongms@njau.edu.cn

表1 供试菌株
Table 1 Selected strains for experiment in this study

菌株	特性	来源
紫色杆菌 CVO26 (<i>Chromobacterium violaceum</i> CVO26)	不产 AHL, <i>cviI::mini-Tn5</i> 突变体, C ₄ ~C ₈ -HSL 细菌生物感应器, KM 抗性	参考文献[7]制备
铜绿假单胞菌 PAO-1 (<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO-1)	产生 C ₄ -HSL 和 3-oxo-C ₁₂ -HSL, QSI 阳性对照	本实验室保存
大肠杆菌 JM109 (<i>Escherichia coli</i> JM109)	不产 AHL 和 QSI, QSI 阴性对照	本实验室保存
荧光假单胞菌(<i>Pseudomonas fluorescens</i>)	用于 QSI 的筛选	本实验室保存

培养基中 28℃ 摇床培养。紫色杆菌 CVO26 培养时在培养基中添加卡那霉素(KM)至 20 μg/ml。

1.2 试剂与设备

卡那霉素、C10-HSL、C6-HSL 美国 Sigma 公司; RP-C₁₈ F_{254s} 反相薄层板 德国 Merck 公司。

1.3 AHLs 的粗提液制备

待测菌培养至一定的密度, 离心, 取上清液, 用等量酸化乙酸乙酯(含 0.5% 的甲酸)提取三次, 取有机相混合, 旋转蒸发器蒸干溶剂, 溶于一定量的甲醇中, -20℃ 保存备用。

1.4 平板法检测 QSI 活性

1.4.1 双层平板法

被检测菌株在 LB 平板的中央划条, 无菌风吹干后, 过夜培养, 按文献[7]的方法制备含有紫色杆菌 CVO26 的琼脂, 并添加 C₆-HSL 至 2 × 10⁻⁶mol/L, 迅速覆盖在平板的上面, 继续过夜培养。铜绿假单胞菌 PAO-1 用作 QSI 的阳性对照。大肠杆菌 JM109 不产生 AHL, 也不产生 QSI, 用作阴性对照。

1.4.2 平行划条法

在含有 0.8% 琼脂的 LB 中加入 C₆-HSL 至 2 × 10⁻⁶ mol/L, 倾注平板, 凝固后, 待检测菌划条, 无菌风吹, 过夜培养后, 将活化好的紫色杆菌 CVO26 与待检测菌平行划条, 无菌风吹干, 继续过夜培养。菌株铜绿假单胞菌 PAO-1 用作 QSI 的阳性对照, 大肠杆菌 JM109 作阴性对照。

1.5 TLC 法检测 QSI 活性

根据文献[7], 乙酸乙酯提取物 2~5 μl 点样于 C₁₈ 反相薄层板上, 甲醇/水(60:40, V/V)充分展开后, 按双层平板法中制备上层琼脂的方法制备含有 2 × 10⁻⁶mol/L 的 C₆-HSL 及紫色杆菌 CVO26 的上层琼脂, 立即铺于 TLC 板上, 无菌风吹干, 凝固后, 置于消毒的密闭容器中 28℃ 培养 48h。

2 结果与分析

2.1 平板法检测 QSI 活性

紫色杆菌 CVO26 为野生菌株紫色杆菌 ATCC 31532 的 *mini-Tn5* 突变体, 本身不产生 AHLs, 也不产生紫色,

当外源 AHLs 存在时, 产生特征性的紫色。利用该细菌生物感应器是否产生紫色来检测 AHLs, 非常直观, 不需要借助仪器, 也不需要再另外添加底物, 就可以直接对结果进行观察。该生物感应器对酰基侧链长度为 C₄~C₈ 的 AHLs 具有不同程度的敏感^[7], 但是 QSI 化合物能够与 AHL 受体蛋白 CviR 竞争结合, 抑制 QS 系统, 使之不表达紫色这种性状, 但并不抑制紫色杆菌 CVO26 的生长。菌株铜绿假单胞菌 PAO-1 同时产生 3-oxo-C₁₂-HSL 和 C₄-HSL 两种 AHL 分子, 长链的信号分子 3-oxo-C₁₂-HSL 是紫色杆菌 CVO26 的 QSI, 在 C₆-HSL 存在的条件下, 抑制其紫色的产生。首先, 利用双层平板法进行检测, 从图 1 看出, 在菌株铜绿假单胞菌 PAO-1 的周围形成一个不产紫色的晕圈。通过该法对荧光假单胞菌的 QSI 产生情况进行检测, 发现在菌株荧光假单胞菌的周围也形成不产紫色的晕圈。接下来, 又利用平行划条法对 QSI 活性进行检测。QSI 产生菌株所产生 QSI 化合物通过琼脂扩散至细菌生物感应器 CVO26, 在 C₆-HSL 存在时, 抑制其紫色的产生。由图 2 可知, 菌株荧光假单胞菌能抑制 CVO26 紫色的产生。根据上述结果初步判断荧光假单胞菌产生 QSI 类化合物。

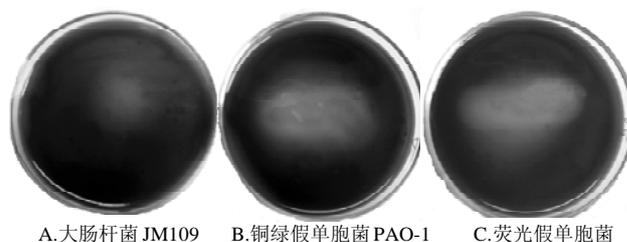


图1 双层平板法检测 QSI 活性
Fig.1 Detection results of QSI activity by double-plate method

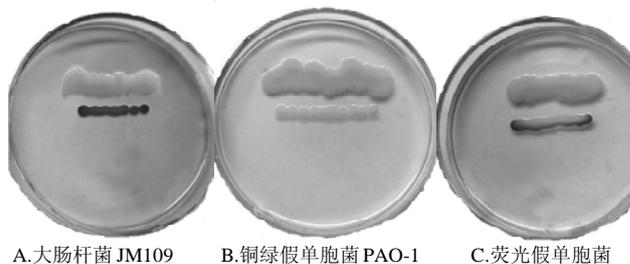
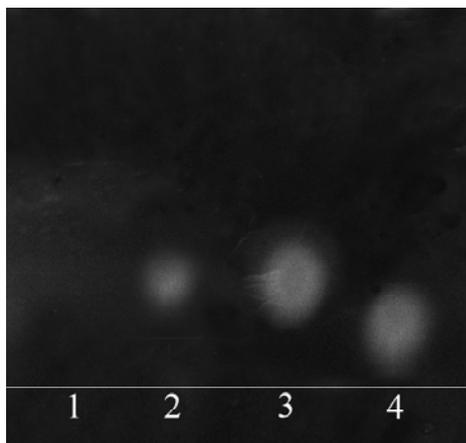


图2 平行划条法检测 QSI 活性
Fig.2 Detection results of QSI activity by parallel streak method

2.2 TLC法检测 QSI

为进一步检测 QSI 产生菌所产生的 QSI, 把文献[7]中检测 AHL 信号分子的 TLC 方法用于检测 QSI。待检测菌的乙酸乙酯提取物经薄层层析展开后, 在外源 AHL 存在的条件下, 有 QSI 的区域, 细菌生物感应器的 QS 系统受到抑制, 使之所调控的特性不表达, 并呈现颜色变化的斑点。图 3 是利用 TLC 与紫色杆菌 CVO26 相接合的方法对 AHL 类似物进行检测结果。由图 3 可知, 有 QSI 化合物存在的区域, 在紫色背景中呈现白色的斑点。利用该方法对荧光假单胞菌进一步检测, 根据所产生斑点的 R_f 值初步推测该 QSI 化合物为 C_{12} -HSL 或 3-oxo- C_{14} -HSL。其中 C_{10} -HSL 也具有微弱的 QSI 的活性。但作为紫色杆菌天然的信号分子 C_6 -HSL 不具有 QSI 活性。同样铜绿假单胞菌 PAO-1 所产生的 C_4 -HSL 也不具有 QSI 活性。



1. C_6 -HSL; 2. C_{10} -HSL; 3. 铜绿假单胞菌 PAO-1; 4. 荧光假单胞菌

图 3 TLC 方法分析 QSI 活性
Fig.3 TLC analysis of QSI activity

3 讨论

本实验基于群体感应干扰抑制细菌生物感应器紫色

杆菌 CVO26 产生紫色的原理, 建立了平板法以及 TLC 法检测 AHL 类似物的方法, 双层平板法和平行划条法可用于可能产生 QSI 化合物的微生物, 甚至是植物样品的初步筛选, 对筛选到的目标样品, 通过 TLC 方法进一步确证。由于很多微生物及植物都产生抗菌物质, 利用平板法进行检测时, 对 CVO26 的生长产生抑制作用, 导致假阳性结果。但经 TLC 分离后, 避免了由于产生抗菌物质所至的假阳性结果, 使检测结果得到进一步确证。还可以获取该化合物的一些初步信息。对于具有 QSI 活性的样品可进一步用于生物功能的干扰试验。然后再通过 HPLC、GC-MS 等方法进一步确定 QSI 化合物的结构及定量等信息。通过上述方法对荧光假单胞菌的 QSI 活性进行了检测, 发现其产生 QSI 化合物。

参考文献:

- [1] 蔡国红, 董明盛. 细菌胞间的分子通讯与食品保藏新策略[J]. 广西农业生物科学, 2005, 24(3): 259-263.
- [2] FUQUA W C, WINANS S C, GREENBERG E P. Quorum sensing in bacteria: the LuxR-LuxI family of cell density-responsive transcriptional regulators[J]. Journal of Bacteriology, 1994, 176(2): 269-275.
- [3] WHITEHEAD N A, BARNARD A M L, SLATER H, et al. Quorum-sensing in Gram-negative bacteria[J]. FEMS Microbiology Reviews, 2001, 25: 364-404.
- [4] MANEFIELD M, NYS R, KUMAR N, et al. Evidence that halogenated furanones from *Delisea pulchra* inhibit acylated homoserine lactone (AHL)-mediated gene expression by displacing the AHL signal from its receptor protein[J]. Microbiology, 1999, 145, 283-291.
- [5] MAMEFIELD M, WELCH M, GIVSKOV M. Halogenated furanones from the red alga, *Delisea pulchra*, inhibit carbapenem antibiotic synthesis and exoenzyme virulence factor production in the phytopathogen *Erwinia carotovora*[J]. FEMS Microbiology Letters, 2001, 205(1): 131-138.
- [6] HENTZER M, WU H, ANDERSEN J B. Attenuation of *Pseudomonas aeruginosa* virulence by quorum sensing inhibitors[J]. The EMBO Journal, 2003, 22(15): 3803-3815.
- [7] 蔡国红, 董明盛, 陈晓红, 等. 鱼源假单胞菌群体感应信号分子与腐败特性相关关系的研究[J]. 中国农业科学, 2007, 40(7): 1486-1491.