

# 嗜水气单胞菌 AH-1 quorum sensing 负调控Ⅲ型分泌系统的表达\*

周文广 刘广锋 周世宁\*\*

(中山大学生命科学学院, 有害生物控制与资源利用国家重点实验室, 广州 510275)

**摘要** 通过构建嗜水气单胞菌 AH-1 Quorum Sensing (QS) 2 个关键调节基因 *ahyI*, *ahyR* 的突变菌株, 来系统分析嗜水气单胞菌 AH-1 Ⅲ型分泌系统基因, 揭示它们由 QS 系统调控. 在 *ahyI* 突变菌中, TTSS 分泌效应因子(effector) *aexT* 量显著提高. 通过构建 LacZ-TTSS 基因启动子融合表达, 进一步表明 QS 系统负调控编码 TTSS 组分的基因.

**关键词** 嗜水气单胞菌, quorum sensing, Ⅲ型分泌系统, 负调控  
**学科分类号** Q78

嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)是人兽共患病的重要病原菌, 广泛分布于水样环境、食品(包括肉类, 鱼以及蔬菜)和多种动物包括健康人的肠道中. 近年来, 该菌引起感染性腹泻的报告在全世界日益增多, 已受到国内外学者的广泛关注<sup>[1,2]</sup>. 由于该菌对水中的氯和各种抗生素的抵抗力越来越强, 因此世界环保组织已经把它列入污染物候选名单, 并且从 2002 年开始监控美国自来水供应中嗜水气单胞菌的含量<sup>[3]</sup>.

Ⅲ型分泌系统(type Ⅲ secretion system, TTSS)是存在于嗜水气单胞菌 AH-1 中的一种独立的蛋白质分泌系统, 很多革兰氏阴性病原菌都将其产生的致病性蛋白通过Ⅲ型分泌系统送入宿主细胞质而发挥毒性作用<sup>[4~6]</sup>. 因此了解 TTSS 致病机理, 揭示其调控机制, 对有效抑制该病原菌对人和动物的危害将产生积极的作用. Quorum Sensing(QS)系统是指细菌根据特定信号分子的浓度可以检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<sup>[7]</sup>, 其中绿脓杆菌 QS 系统调控很多致病因子的合成和分泌, 在绿脓杆菌感染宿主过程中发挥重要作用<sup>[8]</sup>. 在嗜水气单胞菌 AH-1 中, QS 系统由合成信号分子的酶基因 *ahyI* 和调节基因 *ahyR* 组成, 本研究应用基因组步行 PCR 技术获得了嗜水气单胞菌 AH-1QS 2 个关键调节基因 *ahyI*,

*ahyR* 的两侧序列, 然后利用基因敲除技术构建了缺失 *ahyI*, *ahyR* 的突变菌株, 分析了嗜水气单胞菌 AH-1 胞外蛋白表达情况, 同时, 通过构建 LacZ-TTSS 基因启动子融合表达进一步阐明 QS 与 TTSS 之间的关联, 以期全面、真实地揭示 QS 调控 TTSS 的分子机制.

## 1 材料与方 法

### 1.1 菌株, 质粒和培养条件

本研究所用的菌株及质粒见表 1, 嗜水气单胞菌 AH-1 于 TSB(tryptic soy broth)或者 TSA(tryptic soy agar) 25℃培养, 大肠杆菌于 LB 培养基 37℃培养, 根据需要在培养基中加入以下抗生素: 氨苄青霉素(100 mg/L), 氯霉素(30 mg/L), 四环素(5 mg/L). 大肠杆菌与嗜水气单胞菌 AH-1 之间的质粒结合转移的条件为 30℃, 平板交配 36 h.

### 1.2 方 法

**1.2.1 分子克隆技术及 DNA 印迹.** 基因组 DNA 的纯化采用 Promega 公司的 DNA 分离和纯化试剂盒, 质粒提取采用 Qiagen 质粒提取试剂盒, DNA 酶切、

\*国家自然科学基金资助项目(30370030).

\*\* 通讯联系人. Tel: 020-84110238, E-mail: LSSZS@mail.sysu.edu.cn

收稿日期: 2007-01-11, 接受日期: 2007-04-03

连接和转化均参考分子克隆手册. DNA 印迹采用 Roche 公司的地高辛 DNA 标记试剂盒, 转移 DNA 到尼龙膜、杂交条件和显色反应均参考说明书.

**1.2.2 基因组步移(genome walking)和 PCR 分析.** Clontech 公司的 Advantage polymerase 2 用于基因组步移和 PCR 分析, 用以下 5 种限制性内切酶来

构建基因组步移文库: *Dra* I, *EcoR* V, *Pvu* II, *Sca* I 和 *Stu* I. 基因组步移的循环参数是: 94°C, 15 s 和 72°C, 4 min, 7 个循环; 94°C, 15 s 和 67°C, 3 min, 32 个循环. 扩增片段克隆进 pGEM-T easy vector(Promega 公司)并转化到大肠杆菌 JM109 中然后测序.

**Table 1 Strains and plasmid in this study**

Strains or plasmid	Relavant property	Source / reference
<i>A. hydrophila</i> strains		
AH-1 (TF7)	O:11, virulent	Fish; UM, Canada; Leung & Stevenson, 1988
AH-3	O:34, virulent	Fish; UB, Spain; Merino <i>et al.</i> , 1999
ATCC7966	O:1, virulent, type strain	Spoil milk ; ATCC, USA; Leung <i>et al.</i> , 1995
Ba5	O:34, virulent	Fish; Mittal <i>et al.</i> , 1980
Xs91/4/1	virulent	Fish; IHB, China
L36	O:36, avirulent	BAU, Indonesia; Leung <i>et al.</i> , 1995
PPD35/85	O:7, avirulent	Fish; AVA, Singapore; Leung <i>et al.</i> , 1995
PPD88/90	O:16, avirulent	Fish; AVA, Singapore; Leung <i>et al.</i> , 1995
JCM3985	O:23, avirulent	JCM, Japan; Zhang <i>et al.</i> , 2002
JCM3996	O:34, avirulent	JCM, Japan; Zhang <i>et al.</i> , 2002
AH-1Δ <i>ahyR</i>	Deleted 320 to 466 <i>ahyR</i> fragment	This study
AH-1 <i>ahyI</i>	Inserted 183bp <i>ahyI</i> fragment	This study
<i>E. coli</i>		
JM109	Km <sup>s</sup> Col <sup>f</sup> Cm <sup>s</sup>	Stored in this lab
MC1061 ( <i>pir</i> )	<i>thi thr-1 leu-6 proA2 his-4 argE2 lacY1 galK2 ara-14 xy15 supE44 pir</i>	[9]
S17-1( <i>pir</i> )	<i>thi pro hsdR hsdM<sup>+</sup> recA</i> [RP42-Tc:: Mu-Km::Tn7 (Tpr Smr)Tra <sub>+</sub> ]	[10]
Plasmid		
pGEMT-Easy	Amp <sup>r</sup>	Promega
pRE112	pGP704suicide plasmid; Cm <sup>r</sup> ; <i>oriT oriV sacB</i>	[11]
pRW50	<i>lacZ</i> reporter vector; Tet <sup>r</sup>	[12]

**1.2.3 构建插入和缺失突变株以及重组质粒.** 嗜水气单胞菌 AH-1 *ahyI* 插入突变株和 *ahyR* 缺失突变株的构建如下: Overlap 延伸 PCR 方法<sup>[13]</sup>被用来构建 *ahyR* 缺失突变株, 即通过 PCR 的方法先扩增 *ahyR* 2 端的片段, 引物 AHYR-1, GAGTACCTG-AGCATTTCACCTTCGG, 和 AHYR-2, GTACT-TGGACATCCAGGCAAGACTGCCCTCTTGCAG, 扩增 *ahyR* 上游序列为 315 bp. 引物 AHYR-3, CCTGGATGTCCAACACTACATCTTCGAGGCGGCG, 和 AHYR-4, GGGGAAGTTGGTGACCACGACC-TGC, 扩增 *ahyR* 下游序列, 为 302 bp. 这 2 段片段在末端有 17 bp 重叠(下划线), 通过 2 次 PCR 的方

法获得缺失一段从 320 bp 到 466 bp 的 *ahyR* 基因, PCR 产物克隆到 pGEMT-Easy 载体并测序验证序列是否正确, 然后 *ahyR* 片段用 *Kpn* I 和 *Sac* I 双酶切并连接到自杀质粒 pRE112 (Cmr), 获得的质粒再转化到大肠杆菌 S17-1, 插入突变通过与嗜水气单胞菌 AH-1 结合转移获得, 缺失突变通过在含 10%蔗糖的 TSA 平板上筛选获得. *AhyI* 插入突变株采用以下方法获得, 先采用 PCR 方法以 *AhyI*-1, CGCGGTACCGTCAGCTCCCACACGTCGTT 和 *AhyI*-2, CGCGAGCTCTGTGGAATCCCACCGT-GGT, 为引物扩增 *AhyI* 中间一段 183 bp 的片段, 然后连接到自杀质粒 pRE112 (Cmr), 获得的质粒

再转化到大肠杆菌 S17-1, 插入突变通过与嗜水气单胞菌 AH-1 结合转移并进行单交换获得, 最后用 PCR 方法验证.

构建 LacZ 报道质粒, 即使用表 2 所列引物采用 PCR 的方法扩增嗜水气单胞菌 AH-1TTSS 基因启动子区域并亚克隆到 *Hind* III 和 *Eco*R I 酶切的质

粒 pRW50 上, 再通过结合转移的方法转化到嗜水气单胞菌 AH-1 野生型及突变型菌株中.

**1.2.4  $\beta$ -Galactosidase 检测.** 菌株在 DMEM 或者 TSB 培养基培养, 每隔 30 min 取一次样品,  $\beta$ -galactosidase 活力测定方法参照 Miller 方法<sup>[14]</sup>.

**Table 2 Oligonucleotides used in this study**

Name	Sequence (5 to 3)
AexT pro F	ATGAATTC GATCTGCAGGCTGGTGACGCTCTCT
AexT pro R	ATAAGCTT TTTGCGTTTCACTGCGGCTG
aopN proF	ATGAATTC GATAGACCGGATACCAAG
aopN proR	ATAAGCTT CCAAAATCAGCCGTGAAT
aopB proF	ATGAATTCGCGGTTATTGAAGCGCTCAATCGTTTATCC
aopB proR	ATAAGCTT AGAGAGGGCGTTCCTACTGC
aopD proF	ATGAATTC GGTCTGGCTTCCAAAATC
aopD proR	ATAAGCTT CCCTGTCAAACCCTCTTT

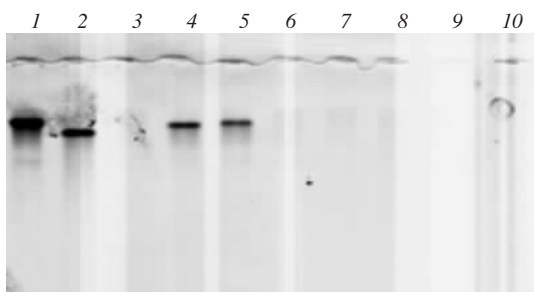
**1.2.5 双向电泳(2-DE).** 双向等电聚焦用 the Ettan™ IPGphor™ 等电聚焦系统(Amersham 公司), 蛋白质样品加在负极的小杯上, 分离用 pH 值范围在 3~10, 18 cm 长的 Immobiline DryStrip (Amersham) 上 32 kV·h<sup>-1</sup>, 蛋白质胶用银染法显色, 最后用 Bio-Rad 公司的 PDQUEST software package 扫描和分析.

**1.2.6 DNA 测序及序列分析.** DNA 测序采用应用生物系统 PRISM 3100 基因分析仪及 BigDye 终止循环测序试剂盒(Applied Biosystems). 序列分析采用 Vector NTI 7.0 DNA 分析软件(InforMax).

## 2 结 果

### 2.1 TTSS 对嗜水气单胞菌 AH-1 的致病性是必需的

TTSS 一般通过分泌毒性蛋白因子到宿主细胞产生作用, 其中一种叫效应因子(effector)的蛋白质



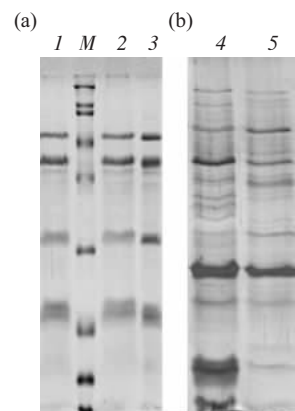
**Fig. 1 Distribution of *aexT* among 10 virulent and avirulent *A. hydrophila* strains by Southern blot**

Lane 1~10 are genomic DNA from AH-1, AH3, ATCC7966, Ba5, Xs91-4-1, L36, PPD35/85, PPD88/90 and JCM3985, respectively.

因子能通过 TTSS 进入宿主细胞的细胞质, 通过破坏宿主细胞的免疫调节功能、毁坏上皮细胞、抑制伤愈过程来产生致病性<sup>[15,16]</sup>. 进行 DNA 印迹实验来研究嗜水气单胞菌 AH-1 效应因子 *aexT* 在各种环境及鱼类分离菌中的分布发现(图 1), 它只分布在致病株中, 而不存在于非致病株中, 说明 TTSS 对嗜水气单胞菌 AH-1 的致病性是必需的.

### 2.2 QS 突变株对嗜水气单胞菌 AH-1 分泌胞外蛋白的影响

先了解在 TTSS 诱导条件下 *ahyI*, *ahyR* 基因表达情况, 根据实验结果, *ahyI*, *ahyR* 基因表达水平未改变(数据未显示), 接着分别检测 *ahyI*, *ahyR*



**Fig. 2 SDS-PAGE analysis of ECPs of *A. hydrophila* AH-1**

(a) Coomassie blue staining analysis of ECPs of *A. hydrophila* AH-1. (b) Silver staining analysis of ECPs of *A. hydrophila* AH-1. 1,4: Wild type; 2: *ahyR* mutant (without induced); 3: *ahyR* mutant (induced with 5 mmol/L EGTA); 5: *ahyI* mutant.

基因突变株中分泌蛋白的表达情况, SDS-PAGE 发现, *ahyR* 基因突变株与野生型分泌蛋白的表达无明显差异(图 2-2,3), 为了进一步验证, 用双向电泳来精确了解分泌蛋白的数量及分布, 结果如图 3 所示. 从图 3 中可以看出, *ahyR* 基因突变株与野生型也无明显差异(见图 3a, b 对应数字). 同时, 比较了 *ahyI*, 基因突变株与野生型菌株, 可以看出突

变株的分泌蛋白明显小于野生型(图 2-4, 5 所示), 暗示在嗜水气单胞菌 AH-1 中, QS 调节基因 *ahyI* 起着更为重要的作用, 此结果与本实验室用鱼的上皮细胞作宿主显示 *ahyI* 突变株侵染宿主能力明显降低, 而 *ahyR* 突变株侵染宿主能力与野生型相比并无明显差异结果一致(另文发表).

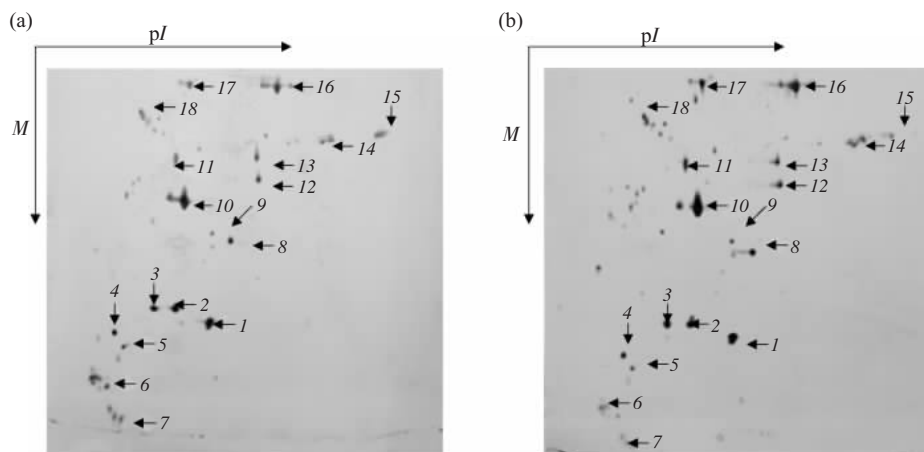


Fig. 3 Comparative extracellular proteome analysis of *A. hydrophila* AH-1 wild type (a) and *ahyR* mutant (b)

The proteins were separated by 2-D gel using IPG at pH 3 to 10.

### 2.3 QS 负调控 TTSS 基因

构建一系列的 TTSS 启动子融合质粒, 转化到野生型或 *ahyI*, *ahyR* 突变型菌株中.  $\beta$ -galactosidase 活力检测结果显示, 在 *ahyR* 突变型菌株中, pro-aopN, pro-aopB, pro-aopD 的表达水平与野生型无明显表达差异, 见图 4a, 而在 *ahyI* 突变型菌株中, 每个启动子融合的表达水平都比野生型高, 见图 4b, 说明 QS 负调控 TTSS 基因.

### 2.4 *ahyI* 突变株对 TTSS 分泌效应因子 (effector) *aexT* 的影响

为了研究 *ahyI* 突变株对 TTSS 分泌效应因子 (effector) 的影响, 构建了 pro-*aexT*-lacZ 融合质粒, 从图 4c 可以看出, *ahyI* 突变株的效应因子 (effector) *aexT* 表达水平明显高于野生型菌株, 有趣的是, 从总体上来讲, 其表达水平呈下降趋势.

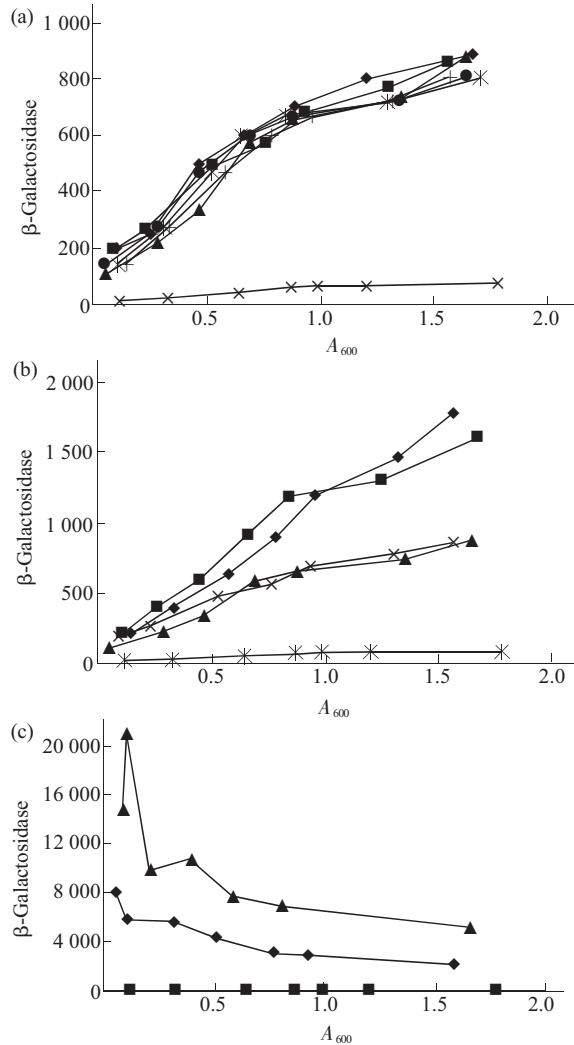
## 3 讨 论

主要寄生在水样环境中的嗜水气单胞菌是各种水生、陆生及哺乳动物包括人在内的机会型致病菌, 它能引起鱼类疾病, 导致水产业重大损失, 也

能引起人类腹泻等疾病, 因此研究其致病基因, 了解其致病机理成为国内外学者研究的热点.

很多革兰氏阴性致病菌如耶尔森氏菌属 (*Yersinia* spp.)、沙门氏菌 (*Salmonella* spp.)、福氏志贺氏菌 (*Shigella flexneri*) 等都通过 III 型分泌系统 (type III secretion system, TTSS) 专一性地将蛋白质 (主要为毒力因子) 从细菌胞浆注入到宿主细胞质中, 从而导致许多疾病<sup>[7]</sup>. 鉴于此, 很多科学家们都致力于 III 型分泌系统的研究, 希望找出其中的奥妙, 进而研制出针对 TTSS 靶点的抗革兰氏阴性致病菌的新药.

QS 是目前已知的细菌间通讯的主要方式之一, 随着对细菌数量 QS 系统的深入研究和认识, 发现其 QS 系统与许多致病性因素有关. 因此, 越来越多的人正试图通过干扰细菌 QS 系统, 来达到控制感染的目的. 在革兰染色阴性的致病菌中, 发现该菌的 QS 系统参与许多生物行为, 其中最重要的是生物膜的形成、细菌耐药和毒力因子的产生. 为此作者探讨了 QS 与 TTSS 之间的关联以期深入了解它们之间相互作用机理. 本文主要是通过构建嗜水



**Fig. 4** Expression of the transcriptional fusions pro-AexT-lacZ, pro-AopB-lacZ, pro-AopD-lacZ and pro-AopN-lacZ in AH-1 wild type and *ahvI*, *ahvR* mutant

(a) Comparison of lacZ-TTSS promoter in *ahvR* mutant and wild type. ◆—◆: *ahvR* pro-aopB; ■—■: *ahvR* pro-aopD; ▲—▲: *ahvR* pro-aopN; \*—\*: AH1 pro-aopB; ●—●: AH1 pro-aopD; +—+: AH1 pro-aopN; x—x: AH1 pRW50. (b) Comparison of lacZ-TTSS promoter in *ahvI* mutant and wild type. ◆—◆: *ahvI* pro-aopN; ■—■: *ahvI* pro-aopD; ▲—▲: AH1 pro-aopN; x—x: AH1 pro-aopD; \*—\*: AH1 pRW50. (c) Comparison of lacZ-AexT promoter in *ahvI* mutant and wild type. ◆—◆: AH1 Pro-aexT; ▲—▲: *ahvI* pro-aexT; ■—■: AH1 pRW50.

气单胞菌 AH-1 QS 2 个关键调节基因 *ahvI*, *ahvR* 的突变菌株来系统分析嗜水气单胞菌 AH-1 TTSS 基因, 在研究 QS 与 TTSS 之间的关系之前, 先了解在 TTSS 诱导条件下 TTSS 启动子的激活情况, 实验结果表明, 在 TTSS 诱导条件下 QS 2 个关键调节基因 *ahvI*, *ahvR* 表达未改变, 同时通过进行双向电泳深入研究发现, *ahvR* 突变菌株 TTSS 基因启动子的表达水平与野生型完全一致, 推测存在

其他的 QS 调节基因调控 TTSS 的表达. 对 *ahvI* 突变菌研究发现, 与野生型相比, 其 TTSS 分泌效应因子(effector)aexT 量显著提高, 暗示 QS 系统关键调节基因中, *ahvI* 很显著影响编码 TTSS 基因的表达. 通过构建 LacZ-TTSS 基因启动子融合进一步表明了编码 TTSS 组分基因由合成信号分子基因 *ahvI* 控制, 验证了 QS 负调控 TTSS 基因.

以前在大肠杆菌中报道过, QS 与 TTSS 之间的关系, 在该菌中 TTSS 对大肠杆菌吸附和侵染上皮细胞是必需的. 然而在此菌中 QS 激活 TTSS 基因的表达, 起着正调控的作用, 与本研究结果相反<sup>[18,19]</sup>.

### 参考文献

- Hanninen M L, Siitonen A. Distribution of *Aeromonas* phenospecies and genospecies among strains from water, food or from clinical samples. *Epidemiol Infect*, 1995, **115** (1): 39~50
- Janda J M. *Aeromonas* and *Plesiomonas*. In: Sussman M. *Molecular Medical Microbiology*. San Diego, Calif: Academic Press, 2001. 1237~1270
- Borchardt M A, Stemper M E, Standridge J H. 2003. *Aeromonas* isolates from human diarrheic stool and groundwater compared by pulsed-field gel electrophoresis. *Emerg Infect Dis*, 2003, **9** (2): 224~228
- Yu H B, Rao, P S, Tomas J M, *et al*. A type III secretion system is required for *Aeromonas hydrophila* AH1 pathogenesis. *Infect Immun*, 2004, **72** (3):1248~1256
- Burr S E, Stuber K, Frey J. The ADP-ribosylating toxin, AexT, from *Aeromonas salmonicida* subsp. *Salmonicida* is translocated via a type III secretion pathway. *J Bacteriol*, 2003, **185** (22): 6583~6591
- Sha J, Pillai L, Fadl A A, *et al*. The type III secretion system and cytotoxic enterotoxin alter the virulence of *Aeromonas hydrophila*. *Infect Immun*, 2005, **73** (10): 6446~6457
- Fuque W C. Quorum sensing in bacteria: The LuxR-LuxI family of cell density-responsive transcriptional regulators. *J Bacteriol*, 1994, **176** (2): 269~273
- Rumbaugh K P, Griswold J A, Hamood A N. The role of quorum sensing in the *in vivo* virulence of *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbes Infect*, 2000, **2** (14): 1721~1731
- Rubire's X, Saigi F, Pique N, *et al*. A gene (*wbbL*) from *Serratia marcescens* N28b (O4) complements the *rfb-50* mutation of *Escherichia coli* K-12 derivatives. *J.Bacteriol*. 1997, **179** (23): 7581~7586
- Simon R U, Prieferand, Puhler A. A broad host range mobilization system for *in vivo* genetic engineering: transposon mutagenesis in gram negative bacteria. *Bio/Technology*, 1983, **1**: 784~791
- Edwards R A, Keller L H, Schifferli D M. Improved allelic exchange vectors and their use to analyze 987P fimbria gene expression. *Gene*, 1998, **207** (2): 149~157
- Lodge J, Fear J, Busby S, *et al*. Broad host range plasmids carrying

- the *Escherichia coli* lactose and galactose operons. FEMS Microbiol Lett, 1992, **95** (2): 271~276
- 13 Ho S N, Hunt H D, Horton R M, *et al.* Pease site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction. Gene, 1989, **77**: 51~59
- 14 Miller J H. Experiments in Molecular Genetics. New York: Cold Spring Harbor, 1972. 129~133
- 15 Ganesan A K, Vincent T S, Olson J C, *et al.* *Pseudomonas aeruginosa* exoenzyme S disrupts Ras-mediated signal transduction by inhibiting guanine nucleotide exchange factor-catalyzed nucleotide exchange. J Biol Chem, 1999, **274** (31): 21823~21829
- 16 Kaufman M R, Jia J, Zeng L, *et al.* *Pseudomonas aeruginosa* mediated apoptosis requires the ADP-ribosylating activity of *exoS*. Microbiology, 2001, **146** (10): 2531~2541
- 17 Cornelis G R. The *yersinia* ysc-yop “type III” weaponry. Nature Review, 2002, **3** (10): 742~752
- 18 Sircili M P, Walters L R, Trabulsi *et al.* Modulation of enteropathogenic *Escherichia coli* virulence by quorum sensing. Infect Immun, 2004, **72** (4): 2329~2337
- 19 Sperandio V A, Torres B, Jarvis J, *et al.* Bacteria-host communication: the language of hormones. Proc Natl Acad Sci USA, 2003, **100** (15): 8951~8956

## Quorum Sensing Negatively Controls Type III Secretion Expression in *Aeromonas hydrophila* AH-1\*

ZHOU Wen-Guang, LIU Guang-Feng, ZHOU Shi-Ning\*\*

(<sup>1</sup>State Key Laboratory for Biocontrol, College of Life Sciences, Guangzhou 510275, China)

**Abstract** A systematic analysis of the type III secretion genes of *Aeromonas hydrophila* strain AH-1 by constructing *ahyR* and *ahyI* mutant revealed that they are under quorum-sensing control. This observation was supported by the down-regulation of the TTSS genes in the presence of lacZ-TTSS gene promoter and the corresponding advanced secretion of AexT in *ahyI* mutant.

**Key words** *Aeromonas hydrophila*, Quorum Sensing, type III secretion system (TTSS), negatively control

\*This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China (30370030).

\*\*Corresponding author. Tel: 86-20-84110238, E-mail: lsszsl@mail.sysu.edu.cn

Received: January 11, 2007 Accepted: April 3, 2007