

响应面法优化信号分子 AI-2 合成蛋白 LuxS 表达条件

李祎, 韩朔, 王玉琪, 秦梦园, 吴晓敏

(河南师范大学 生命科学学院, 河南 新乡 453007)

摘要: 群体感应是一种由自诱导物(autoinducers, AIs)介导的、细菌密度依赖的基因表达调控方式, 已经被证实参与细菌多种生理功能的调控. 信号分子 AI-2 介导的 LuxS/AI-2 型群体感应系统广泛存在于革兰氏阳性和阴性细菌, 并备受关注. AI-2 的合成依赖于 S-核糖同型半胱氨酸酶(LuxS)的催化作用, 而 LuxS 蛋白则是由 *luxS* 基因经过转录、翻译得到的. 为了探索 LuxS 蛋白在表达菌株 *Escherichia coli* BL21(DE3)中的最佳表达条件, 从而获得较高产量且具有一定的生物活性的 LuxS 蛋白. 首先对 LuxS 蛋白结构进行预测, 确定 *E. coli* BL21(DE3)作为表达菌株. 其次, 在单因素优化的基础上, 进一步通过响应面法优化 LuxS 蛋白的表达条件. 在菌液浓度 OD₆₀₀ 为 0.5、诱导温度为 37 °C、IPTG 浓度为 0.5 mmol/L、诱导时间为 31 h 条件下, 获得 LuxS 蛋白的最高表达量. 研究成功优化了 LuxS 蛋白在 *E. coli* BL21(DE3)中的诱导表达条件, 获得了具有生物活性的 LuxS 蛋白, 并在后续的研究中成功合成了具有生物活性的信号分子 AI-2, 为体外合成 AI-2 奠定了基础.

关键词: 群体感应; AI-2; LuxS 蛋白; 原核表达; 条件优化

中图分类号: Q93

文献标志码: A

文章编号: 1000-2367(2025)01-0136-08

群体感应(quorum sensing, QS)是微生物普遍存在的一种细胞与细胞之间进行沟通的重要机制. 其本质是细菌通过监控环境中存在的自身或其他细菌产生的信号分子的浓度来感知其他细菌数量的变化, 当达到一定阈值后, 启动细菌相关的基因表达来适应环境的变化. 细菌之间通过群体感应效应(QS)系统进行通讯, 用于调节生态和医学上的重要性状^[1]. 并且细菌通过群体感应调节自身行为并协调群体活动, 如生物被膜形成和毒力因子表达. 群体感应也在细菌竞争和种间交流中发挥作用. 群体感应领域的研究为控制细菌感染和开发新型病原菌防治策略提供了新的思路. 例如, 群体感应抑制剂已被开发为控制细菌感染的抗生素类潜在替代品^[2]. 总的来说, 群体感应研究是一个重要的研究领域, 对生物、食品、农业、纳米医学和人类健康等领域都有影响.

群体感应发生时大多数细菌会分泌一种化学信号分子, 其被称为自诱导物(autoinducers, AIs). 由于不同细菌的 QS 系统也有区别, 信号分子类型也会随细菌的差异而有所不同. 第一类是存在于革兰氏阴性菌当中的群体感应系统, 依赖于 N-酰基高丝氨酸内酯类(N-acyl homoserine lactones, AHLs)及其衍生物作为信号分子^[3]; 第二类是存在于革兰氏阳性菌当中的群体感应系统, 以寡肽类(autoinducing peptides, AIPs)作为信号分子^[4]; 信号分子 AI-2 在革兰氏阳性和革兰氏阴性菌中都被检测到, 所以将 AI-2 视为种间通用信号分子, 它起着至关重要的信号传递与交流的作用^[5-6].

LuxS/AI-2 群体感应系统是细菌用来调节各种细胞过程的机制, 包括毒力因子、细菌发光和生物膜形成的调节^[7-9]. LuxS 酶在群体感应和细菌生长调节中发挥着关键作用, 催化 AI-2 信号分子的产生^[10]. LuxS/AI-2

收稿日期: 2023-03-29; **修回日期:** 2023-10-31.

基金项目: 国家自然科学基金(32000073).

作者简介(通信作者): 李祎(1988—), 男, 河南安阳人, 河南师范大学副教授, 研究方向为应用与环境微生物, E-mail: liyi@htu.cn.

引用本文: 李祎, 韩朔, 王玉琪, 等. 响应面法优化信号分子 AI-2 合成蛋白 LuxS 表达条件[J]. 河南师范大学学报(自然科学版), 2025, 53(1): 136-144. (Li Yi, Han Shuo, Wang Yuqi, et al. Optimization of expression conditions for signal molecule AI-2 synthetic protein LuxS by response surface methodology[J]. Journal of Henan Normal University (Natural Science Edition), 2025, 53(1): 136-144. DOI: 10.16366/j.cnki.1000-2367.2023.03.29.0001.)

群体感应系统影响不同细菌菌株的生长特性、生物膜形成、抗生素产生、毒力和代谢^[11]。研究表明,鼠李糖乳杆菌 GG 的 LuxS/AI-2 群体感应系统可以促进无菌斑马鱼生物膜形成并增强对产肠毒素大肠杆菌的抵抗力^[10]。肺炎链球菌的 LuxS/AI-2 群体感应系统是引起疾病并调节中耳感染大鼠模型中毒力和代谢相关基因所必需的^[1]。LuxS/AI-2 群体感应系统还会影响副猪嗜血杆菌的生长特性、生物膜形成和毒力因子的表达^[11]。

作为群体感应中重要的信号传递物质,AI-2 在细菌细胞内的合成途径主要由 3 个阶段的酶促反应完成,由合成途径得知,*luxS* 基因表达出的 LuxS 蛋白在这个过程中发挥重要作用。广泛分布于细菌间的 AI-2 合成酶 LuxS 本质上属于一种小分子金属酶^[12],能够催化底物 S-核糖同型半胱氨酸(S-ribosylhomocysteine, SRH)中稳定的硫醚键的裂解,因此也称为 SRH 裂解酶^[13]。有研究表明,通过对许多细菌的 LuxS 同源氨基酸序列进行比对,发现在比对的 LuxS 蛋白序列中存在一个保守的基序为 His-Xaa-Xaa-Glu-His(HXXGH)。同时,通过电子克隆(in silico)分析哈维氏弧菌的 LuxS 氨基酸序列,发现 LuxS 蛋白中存在 Lys-Ile-Pro-Glu-Leu-Asn-Glu-Tyr 的氨基酸序列,其与酪氨酸激酶磷酸化位点[Lys/Arg]-Xaa2-3-[Asp/Glu]-Xaa2-3-Tyr 完全匹配。对已知的几种革兰氏阴性菌的 LuxS 蛋白的酪氨酸磷酸化位点的基序进行分析,发现该位点的结构十分保守,这些特征都使得克隆 *luxS* 基因并进一步异源表达 LuxS 蛋白成为可能。

本研究旨在提高合成 AI-2 的关键酶 LuxS 的原核表达效率,在前期成功构建重组原核表达载体 pET28a-*luxS* 基础上^[14],通过生物信息学方法预测了 LuxS 蛋白的基本结构,并且获得了具有生物活性的 LuxS 蛋白,采取响应面法对其表达条件进行优化。结果表明,LuxS 蛋白在 *Escherichia coli* BL21(DE3)中成功表达,并且通过优化后大幅度提高了 LuxS 蛋白的表达量,该研究为体外合成群体感应信号分子 AI-2 提供必要条件,并为在各种细菌中对 LuxS/AI-2 群体感应的功能研究奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 实验菌株

E. coli BL21(DE3)和 *E. coli* DH5 α 感受态细胞由功能微生物绿色转化技术河南省工程实验室保藏,并接种于 Luria broth 培养基(LB,胰蛋白胨 10 g/L,酵母粉 5 g/L,NaCl 10 g/L,pH 7.2~7.6)在 37 °C 下培养。重组质粒 pET28a-*luxS* 由本实验室前期构建。

1.2 主要试剂和仪器

异丙基- β -D-硫代半乳糖苷(IPTG)购自上海麦克林生化科技股份有限公司;卡那霉素(kanamycin,Kan)购自北京索莱宝科技有限公司;质粒小量提取 DNA 凝胶回收试剂盒购自北京聚合酶生物科技有限公司;超声波细胞破碎仪(XC-CDH),高速冷冻离心机(fresco17),PCR 仪和凝胶成像系统均购自赛默飞世尔科技(中国)有限公司。

1.3 实验方法

1.3.1 LuxS 蛋白结构分析预测

借助 NCBI 网站(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>),通过 Blastp 对比分析,剔除相同序列,筛选得到 LuxS 蛋白的氨基酸序列。利用 TMHMM Server v2.0 对 LuxS 蛋白进行跨膜区结构预测,利用 SignalIP 3.0 Server 软件对信号肽进行预测。

1.3.2 种子液制备

将含有重组质粒 pET28a-*luxS* 的 *E. coli* BL21(DE3)的菌液按体积分数 1% 的接种量接种到 10 mL 含 Kan 抗性的 LB 培养基中,并置于 37 °C 摇床,180 r/min 培养 12 h。

1.3.3 诱导表达

将种子液按照上述方法分别接种到 20 mL 的 LB 培养基中,于 37 °C,180 r/min 摇床振荡培养至菌液 OD₆₀₀ = 0.5 后按照不同试验条件进行诱导。

1.3.4 单因素试验

为筛选出最佳诱导效果,分别对诱导时重要的几个条件进行不同设置,包括培养温度、IPTG 浓度、培养

时间.除这些条件外,其他条件做相同处理,包括使用同一批次的 LB 培养基,统一摇床转速为 180 r/min.对含有重组质粒的菌液进行培养后破碎细胞取裂解液,随后 12 000 r/min 离心 5 min 后取上清液,加入质量分数 5% Loading Buffer 后进行 SDS-PAGE 检测,电泳条件为:浓缩胶 90 V 电压,分离胶 120 V 电压.

1.3.5 响应面试验

以单因素试验的结果为依据,将单因素试验中所选取的 3 个条件分别作为自变量,用软件 ImageJ 测定蛋白条带灰度值并作为响应值.通过 Design Expert 8.0.6 软件进行 3 因素 3 水平的 Box-Behnken 试验设计.其他条件为:LB 为基础培养基、摇床转速 180 r/min.

1.3.6 数据分析

此实验中的作图是通过 Graphpad Prism 8.0 软件完成;蛋白电泳条带通过 Image J 处理与分析;响应面法通过 Design Experts 8.0 软件完成.采用最终得到的相对灰度值来反映蛋白的表达量,其计算方法为:所得处理组的蛋白条带除以内参条带的灰度值.

2 结果与分析

2.1 LuxS 蛋白结构预测分析与验证

2.1.1 LuxS 蛋白结构预测

通过在线网站 SingalIP 与 TMHMM Server v2.0 对 LuxS 蛋白进行分析,结果显示 LuxS 蛋白由 164 个氨基酸组成,其中丙氨酸和亮氨酸为含量最高的两种氨基酸,均为疏水性氨基酸,其次是酸性氨基酸天冬氨酸.二级结构预测显示,占比最高的结构形式为 α -折叠(39.35%),其次是无规则卷曲(34.19%), β 折叠占比最少(3.87%).通过信号肽预测发现,该蛋白预测分值均在标准线(0.5)之下,不包括信号肽结构(图 1).跨膜区域预测结果显示,该蛋白膜外分泌概率接近 100%.根据预测结果,选择 *E. coli* BL21(DE3)作为表达菌株进行蛋白 LuxS 的表达.

2.1.2 结构预测验证

本试验的研究结果如图 1(f)所示,经过不同条件诱导的重组质粒 pET28a-luxS 表达出的 LuxS 蛋白大小约为 23 kDa.另外,通过 SDS-PAGE 分析相同体积下的细菌全细胞裂解液中的蛋白表达量以及上清液中的蛋白表达量发现,两组都有蛋白表达,表明 LuxS 蛋白主要以可溶性形式存在.该结果基本符合蛋白结构预测结果,以胞外分泌表达形式为主.

2.2 LuxS 蛋白诱导表达条件单因素试验结果

2.2.1 诱导剂浓度

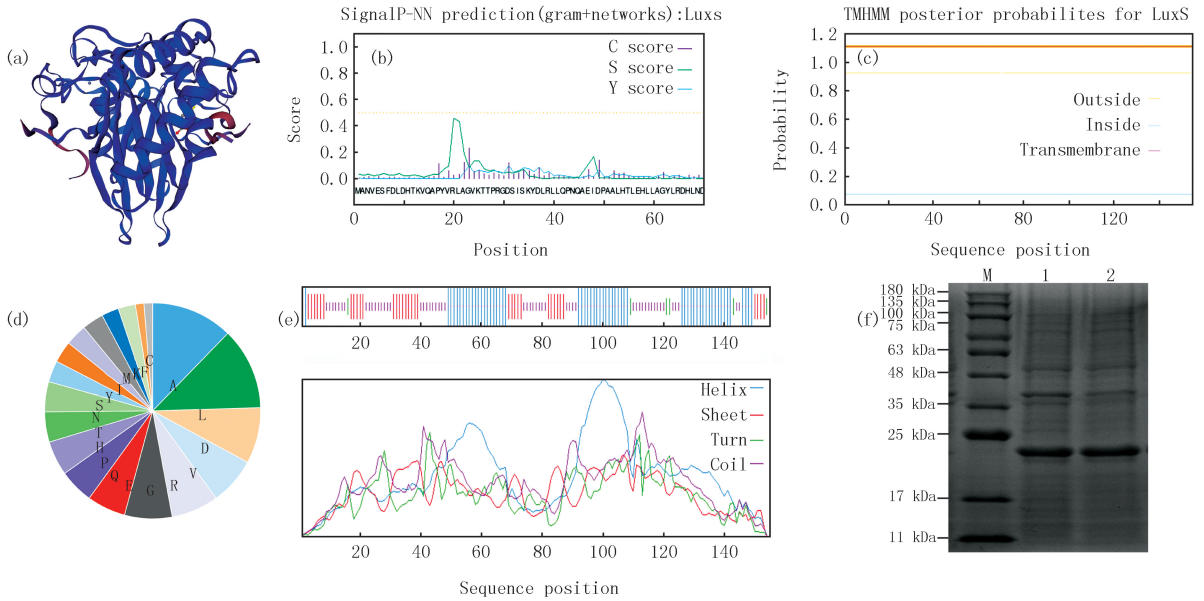
由图 2(a)和(d)可知,在不同浓度 IPTG 条件下 LuxS 蛋白均可诱导表达,随着诱导浓度的增加,蛋白表达量也呈上升趋势.其中,在加入 0.5 mmol/L 的 IPTG 时,蛋白表达量比较高,其相对灰度值约为 600%.然而,随着 IPTG 浓度的继续增加,蛋白表达量与之前相比并没有显著差异,所以将 0.3~0.7 mmol/L 确定为 IPTG 的最佳诱导浓度.

2.2.2 诱导时间

由图 2(b)和(e)可知,当诱导时间为 12 h、24 h、48 h 时均可以使 LuxS 蛋白表达,随着诱导时间的延长蛋白表达量也显著性的上升.在诱导 12 h 后,上清液和全细胞裂解液的蛋白含量基本一致.当时间延长至 24 h 后,全细胞裂解液和上清液的蛋白灰度值分别上升至 639% 和 652% 依旧保持基本一致.当诱导时间达到 48 h 后,全细胞裂解液和上清液中的蛋白含量继续上升,但上清液中蛋白含量提高幅度大于全细胞裂解液,此时上清液中的蛋白含量略高于全细胞裂解液,达到 11.18 倍.

2.2.3 诱导温度

由图 2(c)和(f)可知,在诱导温度由 16 °C 提高到 28 °C 时,LuxS 蛋白的表达量在全细胞裂解液与上清液中均出现了显著的提高,相对灰度值分别由 16 °C 的 305%、378% 提高到 572%、869%.但是当诱导温度由 28 °C 提高至 37 °C 时,全细胞裂解液中的蛋白表达量继续出现了显著性上升,但是上清液中的蛋白含量反而出现下降,灰度值从 869% 下降到 639%.

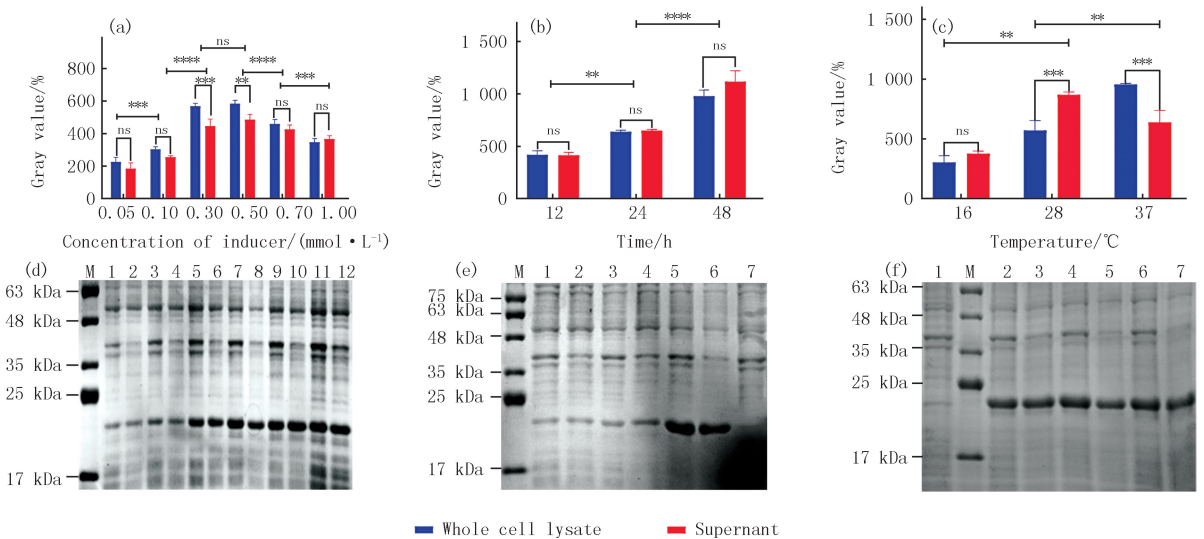


注:图1(f)中M为Marker;泳道1为蛋白在上清中的表达水平;泳道2为全细胞裂解液中蛋白表达水平。

(a)三级结构;(b)信号肽;(c)跨膜结构域;(d)氨基酸构成;(e)二级结构;(f)SDS-PAGE验证蛋白分泌表达情况。

图1 LuxS蛋白结构预测

Fig.1 The prediction of LuxS protein structure



注:ns代表无显著差异;**代表 $P < 0.01$;***代表 $P < 0.001$;****代表 $P < 0.0001$ 。图2(d)中M为Marker;泳道1,3,5,7,9,11为诱导剂浓度为0.05~1.0 mmol/L时,蛋白在上清中的表达水平;泳道2,4,6,8,10,12为诱导剂浓度为0.05~1.0 mmol/L时,蛋白在全细胞裂解液中的表达水平。图2(e)中M为Marker;泳道1,3,5为诱导12 h、24 h、48 h后,蛋白在上清中的表达水平;泳道2,4,6诱导为12 h、24 h和48 h,蛋白在全细胞裂解液中的表达水平;泳道7为阴性对照。图2(f)中M为Marker;泳道1为阴性对照;泳道2,4,6为在16 °C、28 °C和37 °C的诱导温度下,蛋白在上清中的表达水平;泳道3,5,7为在16 °C、28 °C和37 °C诱导温度下,蛋白在全细胞裂解液中的表达水平。

(a) 诱导剂浓度;(b) 诱导时间;(c) 诱导温度;(d) 不同诱导剂浓度对蛋白表达量的影响;(e) 不同诱导时间对蛋白表达量的影响;(f) 不同诱导温度对蛋白表达量的影响。

图2 LuxS蛋白诱导条件单因素优化。

Fig.2 Single factor optimization of induction conditions for LuxS protein

2.3 回归模型建立与分析

2.3.1 响应面优化结果

基于单因素试验结果,采用 Box-Behnken 进行 3 因素(A = 诱导温度/°C, B = 诱导时间/h, C = 诱导剂浓

度/(mmol · L⁻¹))³ 水平的试验设计,LuxS 蛋白条带相对灰度值的响应面试验设计与结果见表 1 和图 3.

2.3.2 方差分析

利用 Design Experts 8.0 软件对响应面试验结果多元回归拟合分析,得到回归方程:

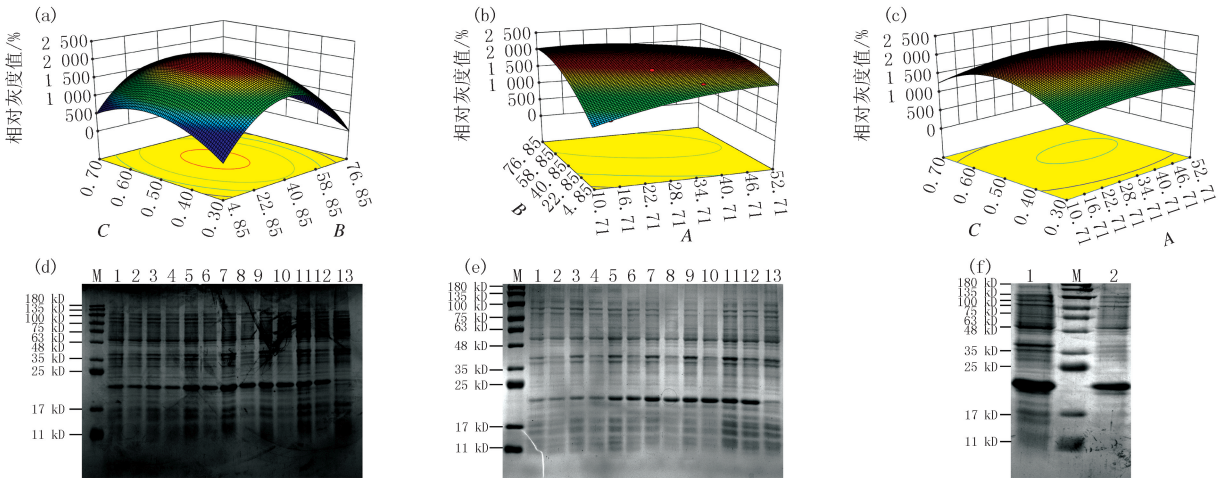
$$Y = 2\,043.80 + 92.45A + 326.27B + 111.38C - 262.78AB + 32.26AC - 45.34BC - 167.71A^2 - 336.09B^2 - 607.49C^2.$$

回归模型分析得到的响应面参数见附录表 S1,回归模型显著模型的相关系数 $R^2 = 0.997\,7 (> 0.75)$,说明该模型准确性较高.3 个因素的改变引起的响应值变化达 99.08%,从而说明模型有着较高的拟合度,可以用来分析和预测 LuxS 蛋白诱导表达条件的优化.同时,结果表明 A、B、AB、A²、B²、C² 对蛋白相对灰度值的影响达到显著,由模型分析可得在试验范围内对蛋白相对灰度值的影响因素为 $B > C > A$.

表 1 Box-Behnken 试验设计与结果

Tab. 1 The design and results of Box-Behnken

序号	A	B	C	相对灰度值/%	序号	A	B	C	相对灰度值/%
1	28.00	12.00	0.70	960	8	37.00	24.00	0.30	1 130
2	28.00	12.00	0.30	640	9	37.00	12.00	0.50	1 610
3	16.00	24.00	0.70	1 050	10	37.00	48.00	0.50	1 680
4	16.00	12.00	0.50	860	11	37.00	24.00	0.70	1 450
5	28.00	48.00	0.30	1 350	12	16.00	24.00	0.30	860
6	28.00	24.00	0.50	1 920	13	28.00	48.00	0.70	1 490
7	16.00	48.00	0.50	2 010					



注:图3(d)中M为Marker;泳道1~12为蛋白在上清中的表达水平;泳道13为阴性对照.图3(e)中M为Marker;泳道1~12为蛋白在全细胞裂解液中的表达水平;泳道13为阴性对照.图3(f)中M为Marker;泳道1为最佳条件下,蛋白在上清中的表达水平;泳道2为最佳条件下,蛋白在全细胞裂解液中的表达水平.

(a) 诱导剂浓度与诱导时间交互;(b) 诱导时间与诱导温度交互;(c) 诱导剂浓度与诱导温度交互;(d) 上清液蛋白电泳图;(e) 全细胞裂解液蛋白电泳图;(f) SDS-PAGE验证优化条件.

图3 LuxS蛋白的响应面优化及验证

Fig. 3 Response surface optimization and verification of LuxS protein

2.3.3 响应面分析及优化

为了更直观地展现两两因素之间的交互作用,通过 Design expert 软件生成了三维坐标图,通过响应面轮廓岭脊、等高线密集程度、形状及拟合公式分析预测,当在 37 °C 条件下用 0.52 mmol/L 的 IPTG 诱导 31.56 h时,蛋白表达的效果最佳.在此条件下,模型预测蛋白相对灰度值为 1 980%(图 3).

2.4 诱导条件验证试验

考虑到操作方便的因素,本实验将实际诱导条件修正为:在 37 °C 条件下用 0.5 mmol/L 的 IPTG 诱导培

养 30 h,从而使蛋白获得较高表达量.依据上述参数进行 3 组平行试验,结果如图 3(f),得到蛋白相对灰度值为 2 237.

3 讨 论

群体感应系统是指细菌通过产生和交换可扩散的自诱导信号分子进行细菌间交流的过程^[14].LuxS/AI-2 群体感应系统广泛存在于各类革兰氏阳性菌和阴性菌中,被认为是种间群体感应系统.LuxS/AI-2 群体感应系统能够调控细菌很多重要的生理过程,包括生物发光^[15]、生物膜形成^[16]、运动性^[17]及抗药性^[18]等.LuxS 蛋白在同种细菌中高度保守且同源性高,并且可以催化底物 S-核糖同型半胱氨酸合成信号分子 AI-2.因此,LuxS 蛋白对于 LuxS/AI-2 群体感应系统具有重要意义^[19].

目前,国内并未普及商品化且高纯度的信号分子 AI-2,严重制约了关于 LuxS/AI-2 群体感应系统的研究工作.获取 AI-2 的方法主要是从能够产生 AI-2 的无菌上清中获取或通过关键酶 S-腺苷高半胱氨酸核苷酶(Pfs)和 S-核糖高半胱氨酸裂解酶(LuxS)在体外合成 AI-2.第一种方法成本高、得率低、上清中成分复杂,因此一般采用体外合成的方法来获取 AI-2^[20].在细菌体内,AI-2 的产生以 S-腺苷同型半胱氨酸(S-adenosylhomocysteine,SAH)为底物,经 Pfs 酶迅速降解产生 S-核糖同型半胱氨酸(S-ribosylhomocysteine,SRH).随后,SRH 经 LuxS 蛋白催化分解成为 4,5-羟基-2,3-戊二酮(4,5-dihydroxy-2,3-pentanedione,DPD)和同型半胱氨酸两种产物.其中同型半胱氨酸获得甲基生成 S-腺苷甲硫氨酸(S-adenosylmethionine,SAM)再次进入循环,而 DPD 通过分子重排的方式形成 AI-2^[21].在这一过程中 LuxS 蛋白成为关键,并且此前已有研究表明,经过动态光散射测量表明 LuxS 蛋白在溶液中以二聚体形式存在,其亚基通过晶体对称相关.二聚体界面的中心部分是由单体薄片组成的结构,并且二聚体的结构与一般的同源二聚物结构类似,平均表面积达到 1 685^[22].这种稳定的二聚体结构能够充分保证在异源表达的过程中 LuxS 蛋白不会产生结构变性,能够直接作为 AI-2 合成的催化酶.因此目前获得 LuxS 蛋白主要通过异源表达系统获得.体外合成的过程中如何提高重组蛋白的表达量,获得大批量、高纯度、有活性的 LuxS 酶成为急需解决的问题.

信号肽假说是美国学者 Gunter Blobel 于 20 世纪 70 年代提出的假说,在蛋白的异源表达中信号肽能够引导外源蛋白定位并分泌到特定区间,提高可溶性,避免形成包涵体而无法发挥蛋白活性^[23-24].因此,在进行重组蛋白的异源表达前必须进行合理的分析预测,对于无信号肽结构的蛋白应选择能够表达信号肽结构的载体或者宿主以帮助蛋白的活性表达.本研究中,通过在线预测工具对 LuxS 蛋白的基本结构进行预测,除基本结构和跨膜结构外,发现该蛋白无信号肽结构.在后续的表达中选择了大肠杆菌 *E. coli* BL21(DE3)进行后续试验.因为该菌株具有高效的转录和翻译能力,能够在胞内表达出大量的目的蛋白,并且研究表明该菌株表达蛋白比使用其他宿主菌的效果好且可溶性更高^[25].

重组蛋白的表达效率受到诱导条件的影响.因此,LuxS 蛋白表达量的提高需要对蛋白的诱导条件进行优化,寻找最佳的组合.响应面优化法在优化研究中应用广泛,能降低优化成本、提高优化效率且能够综合多因素之间的交互作用.因此,响应面法被广泛地应用于农业、食品、生物、化学等不同领域的优化工作^[26-27].本研究首先采取单因素优化确定了合适的诱导时间、诱导温度及诱导剂浓度范围,结果表明该蛋白在诱导条件为 37 °C 时蛋白表达量较高,因为此温度是大肠杆菌的最适生长温度,使得蛋白能够有较高水平的表达量.但是诱导表达温度也会影响可溶性重组蛋白的影响,从结果可以看出 37 °C 条件下表达的蛋白多为不可溶性蛋白,可能是因为在在此温度下菌体生长旺盛,蛋白表达量较高,导致错误折叠形成包涵体结构.彭方毅等^[28]构建了 pEGX-KG-HPV16L 重组质粒,并利用 *E. coli* BL21(DE3)作为表达菌株,在 37 °C 以包涵体形式成功表达出 HPV16L 蛋白.

用 0.5 mmol/L 的诱导剂 IPTG 诱导时发现,LuxS 蛋白有较高水平的表达量.但是,随着诱导剂浓度增加,蛋白表达量逐渐出现平缓趋势,并且这一趋势随着诱导剂浓度的提高而逐渐明显.诱导时间为 48 h 蛋白表达量较高,且为可溶性表达.通过响应面模型分析发现 3 个因素对蛋白表达产量的影响程度由大到小依次为:诱导时间、诱导剂浓度、诱导温度.

4 结 论

本研究利用生物信息学方法预测了 LuxS 蛋白的基本结构,并通过单因素与响应面法优化了 LuxS 蛋白的表达条件.结果表明,LuxS 蛋白在 37 °C,31 h,IPTG 0.5 mmol/L 的条件下蛋白表达量达到最大.本研究实现了 LuxS 蛋白表达水平的最高水平的优化,显著提高了 LuxS 的表达量,并在后续的研究中成功合成了具有生物活性的信号分子 AI-2^[14],为体外合成信号分子 AI-2 奠定了基础,并为 LuxS/AI-2 群体感应系统的研究提供了科学支持.

附录见电子版(DOI:10.16366/j.cnki.1000-2367.2023.03.29.0001).

参 考 文 献

- [1] YADAV M K, VIDAL J E, GO Y Y, et al. The LuxS/AI-2 quorum-sensing system of *Streptococcus pneumoniae* is required to cause disease, and to regulate virulence- and metabolism-related genes in a rat model of middle ear infection[J]. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2018, 8: 138.
- [2] WHITELEY M, DIGGLE S P, GREENBERG E P. Progress in and promise of bacterial quorum sensing research[J]. *Nature*, 2017, 551(7680): 313-320.
- [3] GE S M, ZHAO Y Z, LIU D, et al. Characterization of an N-acylhomoserine lactonase from *Serratia* sp. and its biofouling mitigation in a membrane bioreactor[J]. *Microbiological Research*, 2022, 264: 127175.
- [4] GORDON C P, OLSON S D, LISTER J L, et al. Truncated autoinducing peptides as antagonists of *Staphylococcus lugdunensis* quorum sensing[J]. *Journal of Medicinal Chemistry*, 2016, 59(19): 8879-8888.
- [5] BASSLER B L, WRIGHT M, SILVERMAN M R. Multiple signalling systems controlling expression of luminescence in *Vibrio harveyi*: sequence and function of genes encoding a second sensory pathway[J]. *Molecular Microbiology*, 1994, 13(2): 273-286.
- [6] SUN J B, DANIEL R, WAGNER-DÖBLER I, et al. Is autoinducer-2 a universal signal for interspecies communication; a comparative genomic and phylogenetic analysis of the synthesis and signal transduction pathways[J]. *BMC Evolutionary Biology*, 2004, 4: 36.
- [7] YU D, ZHAO L P, XUE T, et al. *Staphylococcus aureus* autoinducer-2 quorum sensing decreases biofilm formation in an icaR-dependent manner[J]. *BMC Microbiology*, 2012, 12: 288.
- [8] VENDEVILLE A, WINZER K, HEURLIER K, et al. Making 'sense' of metabolism; autoinducer-2, LuxS and pathogenic bacteria[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2005, 3(5): 383-396.
- [9] WANG Y, LIU B B, GRENIER D, et al. Regulatory mechanisms of the LuxS/AI-2 system and bacterial resistance[J]. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2019, 63(10): e01186.
- [10] DENG Z X, HOU K W, VALENCAK T G, et al. AI-2/LuxS quorum sensing system promotes biofilm formation of *Lactobacillus rhamnosus* GG and enhances the resistance to enterotoxigenic *Escherichia coli* in germ-free zebrafish[J]. *Microbiology Spectrum*, 2022, 10(4): e0061022.
- [11] ZHANG B Z, KU X G, ZHANG X Q, et al. The AI-2/luxS quorum sensing system affects the growth characteristics, biofilm formation, and virulence of *Haemophilus parasuis*[J]. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2019, 9: 62.
- [12] RAJAN R, ZHU J G, HU X B, et al. Crystal structure of S-ribosylhomocysteinase(LuxS) in complex with a catalytic 2-ketone intermediate[J]. *Biochemistry*, 2005, 44(10): 3745-3753.
- [13] ZHU J G, DIZIN E, HU X B, et al. S-Ribosylhomocysteinase(LuxS) is a mononuclear iron protein[J]. *Biochemistry*, 2003, 42(16): 4717-4726.
- [14] HAN S, LU C J, QIN M Y, et al. Alleviation effect of *Deinococcus* sp. Y35 together with autoinducer 2 on the physiological stress caused by *Microcystis aeruginosa* to zebrafish intestines[J]. *Aquaculture*, 2023, 576: 739880.
- [15] WATERS C M, BASSLER B L. Quorum sensing: cell-to-cell communication in bacteria[J]. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 2005, 21: 319-346.
- [16] ANETZBERGER C, PIRCH T, JUNG K. Heterogeneity in quorum sensing-regulated bioluminescence of *Vibrio harveyi*[J]. *Molecular Microbiology*, 2009, 73(2): 267-277.
- [17] XIONG Q, LIU D, ZHANG H H, et al. Quorum sensing signal autoinducer-2 promotes root colonization of *Bacillus velezensis* SQR9 by affecting biofilm formation and motility[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2020, 104(16): 7177-7185.
- [18] YU T, MA M Y, SUN Y X, et al. The effect of sublethal concentrations of benzalkonium chloride on the LuxS/AI-2 quorum sensing system, biofilm formation and motility of *Escherichia coli*[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2021, 353: 109313.
- [19] WANG Y, WANG Y X, SUN L Y, et al. The LuxS/AI-2 system of *Streptococcus suis*[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2018, 102(17): 7231-7238.
- [20] PEREIRA C S, THOMPSON J A, XAVIER K B. AI-2-mediated signalling in bacteria[J]. *FEMS Microbiology Reviews*, 2013, 37(2): 156-181.

- [21] 林才云,江艳华,姚琳,等.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 C Y,JIANG Y H,YAO L,et al.*In vitro* synthesis of AI-2 and its effect on tetracycline resistance of *Vibrio parahaemolyticus*[J].*Microbiology China*,2020,47(5):1321-1331.
- [22] SCHAUDER S,SHOKAT K,SURETTE M G,et al.The LuxS family of bacterial autoinducers;biosynthesis of a novel quorum-sensing signal molecule[J].*Molecular Microbiology*,2001,41(2):463-476.
- [23] HILGERS M T,LUDWIG M L.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.
- [24] 韦雪芳,王冬梅,刘思,等.信号肽及其在蛋白质表达中的应用[J].生物技术通报,2006,22(6):38-42.
WEI X F,WANG D M,LIU S,et al.Signal sequence and its application to protein expression[J].*Biotechnology Bulletin*,2006,22(6):38-42.
- [25] 张真,汪燕,马振刚.提高大肠杆菌重组蛋白可溶性表达方法研究进展[J].广东蚕业,2019,53(7):37-40.
ZHANG Z,WANG Y,MA Z G.Advances in improving the soluble expression of *Escherichia coli* recombinant protein[J].*Guangdong Sericulture*,2019,53(7):37-40.
- [26] 张宇萌,童梅,陆小冬,等.提高大肠杆菌可溶性重组蛋白表达产率的研究进展[J].中国生物工程杂志,2016,36(5):118-124.
ZHANG Y M,TONG M,LU X D,et al.Advances in promoting soluble expression of recombinant protein in *Escherichia coli*[J].*China Biotechnology*,2016,36(5):118-124.
- [27] OCKULY R A,WEESE M L,SMUCKER B J,et al.Response surface experiments;a meta-analysis[J].*Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*,2017,164:64-75.
- [28] 彭方毅,姜海蓉,陈远翔,等.HPV 16L1 基因的原核表达及表达条件的优化[J].浙江大学学报(医学版),2010,39(4):395-398.
PENG F Y,JIANG H R,CHEN Y X,et al.Prokaryotic expression of HPV 16L1 and optimization of expression conditions[J].*Journal of Zhejiang University(Medical Sciences)*,2010,39(4):395-398.

Optimization of expression conditions for signal molecule AI-2 synthetic protein LuxS by response surface methodology

Li Yi, Han Shuo, Wang Yuqi, Qin Mengyuan, Wu Xiaomin

(College of Life Sciences, Henan Normal University, Xinxiang 453007, China)

Abstract: Quorum sensing is a density-dependent gene expression regulation method mediated by autoinducers(AIs) in bacteria, which has been proven to participate in the regulation of multiple physiological functions of bacteria. The LuxS/AI-2 type quorum sensing system mediated by signal molecule AI-2 is widely present in Gram positive bacteria and negative bacteria, which has received considerable attentions. The synthesis of AI-2 depends on the catalytic action of S-ribosylhomocysteinase (LuxS), and the LuxS protein is obtained through transcription and translation of the *luxS* gene. The purpose of this study is to explore the optimal expression conditions of LuxS protein in the expression strain *Escherichia coli* BL21(DE3), thereby obtaining a high yield of LuxS protein with certain biological activity. This study first predicted the structure of LuxS protein and determined that *E. coli* BL21(DE3) was used as the expression strain. Secondly, response surface methodology was further used to optimize the expression conditions of LuxS protein based on single factor optimization. The highest expression condition of LuxS protein was obtained under the conditions of bacterial concentration with OD₆₀₀ of 0.5, induction temperature of 37 °C, IPTG concentration of 0.5 mmol/L, and induction time of 31 h. This study successfully optimized the expression conditions of LuxS protein in *E. coli* BL21(DE3), and obtained high yield of LuxS protein with biological activity, laying a foundation for the synthesis of AI-2 in vitro.

Keywords: quorum sensing; AI-2; LuxS protein; prokaryotic expression; optimization of conditions

[责任编辑 刘洋 赵晓华]

附录

表 S1 模型方差分析
Tab. S1 Model variance analysis

来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值	显著性
Model	221.39	9	24.60	144.82	0.000 8	* *
A	6.50	1	6.50	38.26	0.008 5	* *
B	84.35	1	84.35	496.61	0.000 2	* *
C	9.33	1	9.33	54.92	0.005 1	* *
AB	29.44	1	29.44	173.31	0.000 9	* *
AC	0.42	1	0.42	2.49	0.212 7	ns
BC	0.87	1	0.87	5.11	0.109 0	ns
A ²	6.13	1	6.13	36.11	0.009 2	* *
B ²	19.77	1	19.77	116.41	0.001 7	* *
C ²	84.33	1	84.33	496.46	0.000 2	* *
Residual	0.51	3	0.17			
Cor Total	221.90	12				

$R^2 = 0.997 7$
 $R_{adj} = 0.990 8$

注：* * 代表有显著性；ns 代表无显著性。