

## 大菱鲆源荧光假单胞菌群体感应淬灭酶基因的克隆及生物信息学分析

申悦<sup>1</sup>, 崔方超<sup>1\*</sup>, 李婷婷<sup>2\*</sup>, 王当丰<sup>1</sup>, 刘景云<sup>1</sup>, 谭茜倩<sup>1</sup>, 吕欣然<sup>1</sup>, 励建荣<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>渤海大学食品科学与工程学院 生鲜农产品贮藏加工及安全控制技术国家地方联合工程研究中心 辽宁锦州 121013

<sup>2</sup>大连民族大学生命科学院 辽宁大连 116600)

**摘要** 导致水产品腐败变质的微生物之间存在一种信息交流机制,称之为群体感应。革兰氏阴性细菌群体感应系统主要由 *N*-酰基高丝氨酸内酯作为信号分子,在水产品中间接调控一些腐败菌的致病特性。可通过淬灭群体感应来抑制水产品的腐败。作为群体感应抑制剂的群体感应淬灭酶在许多细菌中被鉴定出来。为探究荧光假单胞菌 PF08 的 *pf-1240* 基因表达产物的潜在功能,通过基因克隆和生物信息学分析对其进行研究。结果表明:荧光假单胞菌 PF08 的 *pf-1240* 基因能编码一种群体感应淬灭酶,与铜绿假单胞菌 PAO1 的第 2 个高丝氨酸内酯酰化酶 QuiP 蛋白的相似性为 65.82%。序列分析显示:*pf-1240* 基因共编码 795 个氨基酸,蛋白分子式为 C<sub>3867</sub>H<sub>6010</sub>N<sub>1084</sub>O<sub>1160</sub>S<sub>19</sub>,相对分子质量 86 855.96,理论等电点为 7.81,不稳定系数为 35.29,属于亲水蛋白。由保守结构域分析可知,该蛋白包含一个完整的青霉素酰化酶家族结构域且该家族中有许多酶被证实具有群体感应淬灭酶功能,能够分解长链群体感应信号分子 AHLs。推测该蛋白也具有类似的群体感应淬灭酶功能。本研究借助生物信息学技术对其理化性质、结构等情况进行预测分析,以便深入了解荧光假单胞菌群体感应淬灭酶的性质和功能。

**关键词** 基因克隆; 群体感应; *N*-酰基高丝氨酸内酯酰化酶; 生物信息学分析; 水产品腐败

**文章编号** 1009-7848(2022)07-0064-12 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2022.07.007

群体感应是细菌间进行信息交流的一种方式,通过分泌信号分子来达到交流的目的,从而调控相应功能基因的表达,使细菌表现出一些表型特征,如毒力因子的分泌、生物被膜的形成、细菌运动性和扩散性的增强等<sup>[1]</sup>。这些行为一方面能够增强细菌自身的防御能力,提高生存能力,另一方面会导致一些病原菌毒力因子和致病基因的表达<sup>[2]</sup>。群体感应系统存在于许多水产腐败菌中,能够参与并调控水产品的腐败进程,如胞外蛋白酶的产生、生物被膜的形成、黏液的分泌等,对水产品的品质产生严重的影响。温和气单胞菌是鱼类等水产品低温贮藏过程中常见的腐败菌之一,能够产生 AHLs 来调控其生物被膜的产生,蛋白酶的表达和群集泳动<sup>[3]</sup>。大量化学保鲜剂的使用使细菌出现耐药性,增加了水产品食用的危险。寻找安

全的群体感应抑制剂(Quorum sensing inhibitors, QSIs)来干扰或破坏其参与调控的生物学功能,可在非致死条件下阻断依赖 QS 的细菌侵染,并抑制相关致病因子的分泌,从而为解决细菌耐药性,控制水产品品质变化,延长水产品的货架期提供新的途径<sup>[4]</sup>。

群体感应淬灭(Quorum quenching, QQ)通过抑制信号分子的合成和积累,或对信号分子进行降解和修饰,以此破坏细菌群体感应系统,从而阻断腐败菌或致病菌带来的不利影响<sup>[5]</sup>。群体感应淬灭酶(Quorum quenching enzymes)能利用群体感应中的信号分子 AHLs 作为底物,通过酶促反应使 AHLs 分解<sup>[6]</sup>。根据淬灭酶催化机制的不同,可分为内酯酶、酰化酶和氧化还原酶。内酯酶水解 AHLs 内酯环的酯键,酰化酶水解酰基骨架,氧化还原酶可以催化氧化或还原 AHLs。其中 AHL 酰化酶能以不可逆的方式破坏高丝氨酸内酯部分和酰基链之间的酰胺键,释放出游离高丝氨酸内酯(HSL)和相应的脂肪酸<sup>[7]</sup>。AHL 酰化酶广泛存在于各种细菌中,包括革兰氏阴性菌和革兰氏阳性菌,如铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)、*An-*

收稿日期: 2021-07-11

基金项目: “十三五”国家重点研发计划“蓝色粮仓科技创新”重点专项(2019YFD0901702)

作者简介: 申悦(1996-),女,硕士生

通信作者: 崔方超 E-mail: cfc1031@163.com

李婷婷 E-mail: jwlti@dlmu.edu.cn

*abaena* sp. PCC7120 和青枯菌 (*Ralstonia solanacearum*), 然而其底物特异性因 AHL 的不同酰基链取代而不同。据报道铜绿假单胞菌 PAO1 中存在 2 种酰基转移酶 PvdQ 和 QuiP, 两者都可以编码 AHL 酰化酶, 并降解 3O-oxo-C<sub>12</sub>-HSL<sup>[8]</sup>。Rodrigo 等<sup>[9]</sup>发现薰衣草链霉菌 (*Streptomyces lavendulae*) 产生的 AHL 酰化酶 SIPA, 对含有较长酰基链的 AHLs 催化效率更高。Ivanova 等<sup>[10]</sup>发现酰化酶能够限制铜绿假单胞菌的生物膜形成。在活体动物模型中对该酶进行评估, 结果该酶可将生物膜的形成延迟 7 d。Kusada 等<sup>[11]</sup>从嗜酸菌 MR-S7 中分离并鉴定一种新的 AHL 酰化酶 (MacQ), 该酶具有降解多种 AHLs 的能力, 包括 C<sub>6</sub> 到 C<sub>14</sub> 侧链, 并且内酯环上 3 号碳原子的氧取代不影响该酶的降解能力。

荧光假单胞菌 (*Pseudomonas fluorescens*) 是水产品贮藏过程中常见的嗜冷菌, 属于好氧或兼性厌氧的革兰氏阴性细菌。由于其适应性强, 生长周期短, 胞外酶活性高, 被公认为动物和水产品中的主要腐败菌<sup>[12]</sup>。本实验室从腐败大菱鲆中分离出一株荧光假单胞菌。在该菌株中发现 *pf-1240* 基因编码的蛋白序列与 QuiP 蛋白的氨基酸序列一致性达 65.82%。有文献报道, QuiP 可降解 AHLs, 推测荧光假单胞菌 PF-1240 蛋白可能也具有降解 AHLs 的活性, 可抑制细菌间的群体感应现象, 从而抑制腐败菌的腐败特性, 达到延缓水产品腐败的效果。迄今为止, 还没有关于从荧光假单胞菌中克隆 AHL 降解酶的报道。本研究以荧光假单胞菌为研究对象, 从其全基因组中克隆 *pf-1240* 基因, 并分析其生物信息学特征, 以期为后续揭示该酶淬灭 AHLs, 抑制腐败菌群体感应现象提供理论参考。

## 1 材料与方 法

### 1.1 菌株来源

供试菌: 荧光假单胞菌 (*Pseudomonas fluorescens*) PF08 从腐败大菱鲆中分离、鉴定, 保藏于渤海大学食品科学学院水产品贮藏与加工研究所。

### 1.2 主要试剂和仪器

LB 肉汤, 青岛海博生物技术有限公司; 50×

TAE 缓冲液、琼脂糖、DNA 分子量标准 Maker (100~5 000 bp)、DiaSpin 柱式 PCR 产物纯化试剂盒、Gold view 核酸染色剂, 上海生工生物工程有限公司; 异丙基硫代半乳糖苷 (IPTG)、X-Gal、氨苄青霉素 (Amp), 北京索莱宝科技有限公司; PrimeSTAR<sup>®</sup> Max DNA Polymerase, 北京宝生物技术有限公司; Mighty TA-cloning Reagent Set for PrimeSTAR<sup>®</sup> 试剂盒, 大连 Takara 公司。

DL-CJ-2N 超级洁净工作台, 北京市东联哈尔仪器制造有限公司; ABI stepone plus PCR 仪, 德国 Eppendorf 公司; DYY-8C 电泳仪, 北京市六一仪器厂; Quantity One 凝胶成像系统, 美国 Bio-Rad 公司; LDZX-50KB 立式压力蒸汽灭菌器, 上海申安医疗器械厂; PE Victor X3 酶标仪, 美国 Perkin Elmer 公司。

### 1.3 试验方法

1.3.1 基因组 DNA 的提取及目的基因的扩增 将 PF08 从 -80 °C 超低温冰箱中取出, 按 1:100 的体积比接种于新鲜 LB 肉汤液体培养基中, 在 28 °C, 160 r/min 条件下, 过夜培养 12~16 h, 继续用相同的方法对菌株进行传代, 待菌株生长到 OD<sub>595nm</sub> 为 0.6 时备用。

采用加热法快速提取 DNA, 取 1 mL 菌液加入 1.5 mL 离心管中 8 000×g 室温离心 5 min 后, 弃上清, 将菌体溶解于 100 μL 无菌水中, 95 °C 加热 10 min, 再次离心, 所用的 DNA 即溶解于上清中。

根据 NCBI 中报道的该菌株的青霉素酰化酶基因序列 (WP\_017137176.1 AYG06728.1) 利用生工在线工具 (<http://www.sangon.com/newPrimerDesign>) 进行扩增引物的设计, 并送至上海生工生物工程股份有限公司合成。

表 1 荧光假单胞菌 *pf-1240* 基因引物序列

Table 1 The primers of <i>pf-1240</i> gene of <i>Pseudomonas fluorescens</i>	
引物名称	引物序列 5'→3'
PF-1240F	GTTGCCAGTGCCTTGGGC
PF-1240R	TTACTTTCCTCCGGAACCAGGCT

PCR 扩增反应体系为: DNA 模板 1.0 μL, PrimeSTAR<sup>®</sup> Max DNA Polymerase 25 μL, ddH<sub>2</sub>O

22.4  $\mu\text{L}$ , 上游引物 0.8  $\mu\text{L}$ , 下游引物 0.8  $\mu\text{L}$ , 总体积 50  $\mu\text{L}$ 。PCR 扩增反应程序: 95  $^{\circ}\text{C}$ , 预变性 4 min; 98  $^{\circ}\text{C}$ , 变性 10 s; 65  $^{\circ}\text{C}$ , 退火 18 s; 72  $^{\circ}\text{C}$ , 延伸 2 min; 72  $^{\circ}\text{C}$ , 保持 5 min; 循环 25 次, 4  $^{\circ}\text{C}$  保温。

PCR 产物经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳, 观察凝胶成像系统的扩增效果并照相。

**1.3.2 目的基因的纯化及 TA 克隆测序** 利用 DiaSpin 柱式 PCR 产物纯化试剂盒, 对扩增的目的基因进行纯化, 产物经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳。确定纯化成功后, 进行加“A”反应, 反应液立即与 pMD20-T 载体连接, 而后转化到 *E. coli* JM109 感受态细胞中, 在 SOC 培养基中 37  $^{\circ}\text{C}$  培养 1 h 后, 涂布到选择培养基上, 挑选白色菌落进行阳性鉴定, 具体步骤参照梅永超<sup>[13]</sup>的方法, 鉴定成功后, 送去北京天一辉公司进行测序。

#### 1.4 pf-1240 基因序列生物信息学分析

利用纽普生物在线 DNA 序列翻译成氨基酸序列的网站 (<https://www.novopro.cn/tools/translate.html>)。将 pf-1240 基因序列上传到网站中, 选择阅读框 1 为翻译起始位置, 序列顺序为正向, 选用 standard(1) 模式进行翻译, 翻译结果用于下一步分析。将氨基酸序列导入 ProtParam 在线软件 (<https://web.expasy.org/protparam/>) 对 pf-1240 编码的蛋白进行理化性质预测和氨基酸组成分析, 得出该蛋白的分子质量、分子式、等电点、氨基酸组成等理化性质。利用 ProtScale (<https://web.expasy.org/protscale/>) 分析 PF-1240 蛋白亲/疏水性, 打开网址后, 将蛋白序列输入对话框内, 选择 Hphob. / Kyte & Doolittle 即可分析出蛋白的亲/疏水性; 利用 Net NGlyc 1.0 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>) 对蛋白的 N-糖基化位点进行预测, 用 NetPhos 3.1 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/>) 对蛋白的磷酸化位点进行预测; 采用 TMHMM Server v. 2.0 预测蛋白跨膜区域; 用 CDD 工具选择 CD-Search (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/cdd/>) 分析蛋白的结构域<sup>[14]</sup>; 采用 SOPMA ([https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa\\_automat.pl?page=/NPSA/npsa\\_sopma.html](https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=/NPSA/npsa_sopma.html)) 和 COILS server ([https://embnet.vital-it.ch/software/COILS\\_form.html](https://embnet.vital-it.ch/software/COILS_form.html)) 对蛋白二级结构及卷曲螺旋结构进行分析<sup>[15-16]</sup>; 利用 Protcomp 9.0 软件对蛋白的

亚细胞定位进行分析<sup>[17]</sup>; 利用 Discovery Studio (DS) 对 PF-1240 蛋白进行三级结构建模<sup>[18]</sup>。利用 NCBI 在线软件比对功能 (BLAST: Basic Local Alignment Search Tool) 对 PF-1240 蛋白的氨基酸序列进行蛋白质同源性分析。之后选择同源性高的 9 个氨基酸序列在 MEGAX 软件运用最小邻距离法 (Neighbor-Joining, NJ) 并选用自长支持率 (Bootstrap) 1 000 次重复构建系统进化树, 对 PF-1240 蛋白进行同源性分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 荧光假单胞菌 PF08 的 pf-1240 基因 PCR 扩增、克隆

以 PF08 的全基因组 DNA 为模板, PCR 扩增产物的琼脂糖凝胶电泳如图 1a 所示。其中泳道 1 为扩增产物, 可以看出扩增出的条带在 2 000~3 000 bp 之间, 与目的基因的大小相符, 初步确定扩增出了与预期大小一致的片段。将上述 PCR 产物进行纯化, 纯化结果见图 1a 中泳道 2, 能够看出与纯化前的条带大小一致, 可以用于下一步试验。

将转化后的转化子涂布于选择性培养平板上, 长出的菌落如图 1b 所示, 可观察到其分为蓝色和白色, 其中蓝色菌落应为空载体转化子, 而白色菌落应为重组载体转化子即阳性克隆子。随机挑选 10 个阳性克隆子, 进行 PCR 扩增验证, 结果如图 1c 显示。10 个扩增条带大小符合预期且清晰无杂带, 说明挑取的阳性克隆子全部成功导入了目的基因, 下一步即可将阳性克隆子送去测序。

### 2.2 测序结果及序列比对

通过 TA 克隆测序, 得到了 2 389 bp 的 *pf-1240* 基因 (WP\_120731947.1) 全长。与 NCBI 数据库中荧光假单胞菌青霉素酰化酶家族基因 (Gene ID: 61637474) 的相似性为 83.90%。

### 2.3 pf-1240 基因的序列分析

蛋白质的理化性质是蛋白质研究的基础。经 ExPaSy PortParam 在线软件预测显示荧光假单胞菌 *pf-1240* 基因共编码 795 个氨基酸, 推测对应的蛋白分子式为  $\text{C}_{3867}\text{H}_{6010}\text{N}_{1084}\text{O}_{1160}\text{S}_{19}$ , 相对分子质量为 86 855.96, 理论等电点 (pI) 为 7.81, 不稳定系数为 35.29, 说明该蛋白质是一个稳定的蛋白 (>40

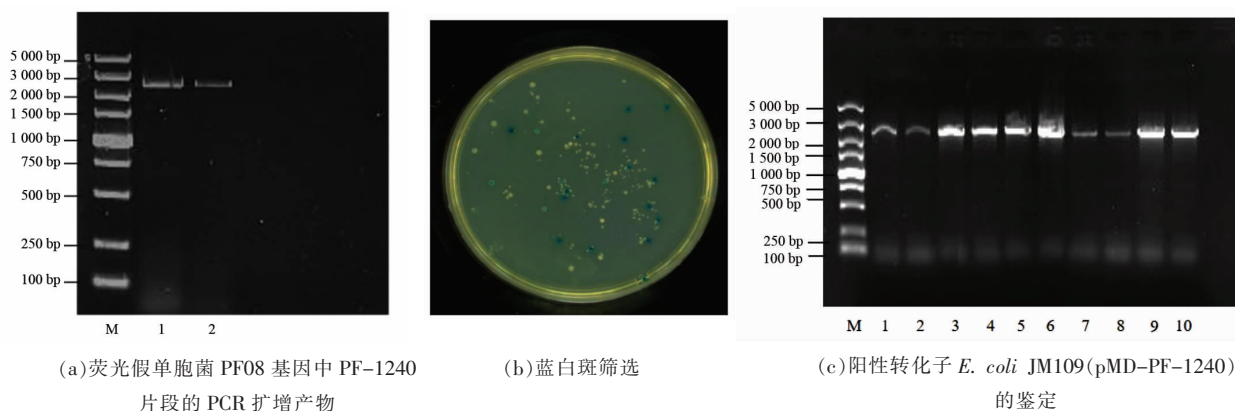


图 1 目的基因的克隆

Fig.1 Cloning of target gene

```

ORIGIN
1      GTGGCCAGTG CCTTGGGCCT GGCCGGTTGC CAGTCACTGA ACAGCCAGGA CACCCGTGCC
61     CCCGTTTCCG GCGTGCAGCC GCTCAAGGGC CTGGCGCAGA ATGTTTCCGT ACGGCGTAAC
121    AGCCAGGGCA TGCCCGTGTG TGAAGCAGT ACCTTCCACG ACGCGCTGTT CACCCCTGGT
181    TATGTGCACG CCAGCGACCG GATCAACCAG ATGGTTATCC TGCGCCTGTT GGCCAGGGC
241    CGACTGGCGG AGATGTCCGG TCCGGACGTG CTGGATGTCG ACCGCTTCAT GCGCGCGTCC
301    AACCTGAAGA AAAGCGCCAG CGAGCTGTAC AACGCCTCGT CGCCGCGCCT CAAGCGCTTC
361    TTTGAAAGTGT ATGCCCGCGG GGTCAACGCC TACCTGTTCG GCTACCCGGA CAAACTGCCG
421    ACGGACCTGG CCCAGACTGG CTACAAGCCC GAGTACTGGA AGCCGGAGGA CTCGGCGCTG
481    TTGTTTGGCC TGCTGAATTT CAGTGAGTCT GCCAACCTGC AGGAAGAGTT GTCGCGCTG
541    GTA CTGGCGC AAAAAGTCCG CGCCGACAAA CTCGCCTGGC TGACCCCAAG CTACCCGGAC
601    GAACCGCTGC STASTGGCGG AGTCCGACAA GCTCAAGGGC GTC AATCTCG GGCAGATTCC
661    CGGCCTTGCC ACGCTCAACA GCATCAACGA ACACCTGGGC AGCCTCAACA CCCTTGGGGT
721    TTCCACCTTC AGCAACTGGG CCATCGCCCC GCAACGCAGC CGCAGTGGTC GCAGCTGTT
781    GGCACAACGA CTGTCTACGC CTATGCAGGC GCGTCCCTG TGGAATTTCC TACAATCCG
841    CGCGCCGAAA TACCAGGCGG TCGGGGTGTC GATTGCGGGG ATTCGACCT TGCTGTCCGG
901    TTTCAACGGC AAGGTGGCCT GGAGCATGAG CCAGGTGTCC GGC GATACCC AGGACCTGTT
961    CCTGGAGAAG GTC AAAACGCC AGGGCAGCGC GCTGTACTAC GAGCACAACG GCA AATGGCT
1021   GCCGACAATC GTGCGTAACG AAACCTTCTT CGCCAAGGGC CAGCGGCCGA TTCGCGAGGC
1081   GGTGTACGAA ACCCGCCACG GACCGTTGCT CAACAGCGCC CAGTCGCTGA CCAGCGATTA
1141   CGGCCTGGCC CTGCAAACCG CCAGTTTCAA GGACGACAAG AGCCTGGATG CGTTTTTCGA
1201   CCTGTCCCGG GCGCAGATG TGGAAAAGC CTCGGACGCC AGCCGCGAGA TTCGGGCCAT
1261   CGCCCTGAAC ATGGTATTTG CCGACGCCAG CAATATCGGC TGGCAGGTCA CCGGGCGTTT
1321   CCCCAACCGC CGCGAAGSTG AAGGCCTGCT GCCCTCGCCG GGCTGGGACG GGCCTTTGA
1381   CTGGGATGGC TACCCCGATG CGATGCTGCA CCCCTATGAC CAGGACCCGC CACAGGGCTG
1441   GGTGCGCACG GCCAACACAG GCACGGTGCC CCACGGCTAC GGCATGCAAC TGTCCAATTC
1501   CTGGGCCGCG CCGGAGCGCA GCGAACGCCT GGC GCAACTG GCGGGCAACG CCAACGACA
1561   CAGCCGCAGC GTGATCGCCA TGCAGTACGA CCAGACCAGC CTGTTCGCGC GCAAACTCAA
1621   AAGCATGTTT CAGGCGCCAG GCATGGCCCA GCCACTGAAG CAGGCGATTG ATGCCCTGCC
1681   TGCCGCAGAG CGGGCCAAAG CCCAGCAGGC CCTGGGCGCG CTGATGGCGT TCGACGGCGG
1741   GCTGGCAGCC ACCTCGGCGG ACGCCCGGAT CTACCAACTG TTCCTGCAGG AAAGCGCCAG
1801   GCAGATTTTC CTCGACGAGC TGGGCCCGGA ATCCAGCGCC ACCTGGAAAG CCTTGTGCTC
1861   CAACGCCAAC CTGTCCCTAC CGGCCAGGC CGACCATCTG CTGGGGCGTG AAGACAGCCC
1921   GTTCTGGGAC GACCTGCACA CCCAGGCAA AGAAGACAAG CCGCGGATTC TCGCCCGCAG
1981   CCTGGCTGCT GCAATCACCG CCGCGCAGC CAGTTGGGC GCAGATCACA AGGCTGGCA
2041   ATGGGGCAAA CTGCACAGCT ACACCTGGAA AAACACCGGT GGGCAGACGA TTCGCGGCC
2101   ATTGGCAGCC GGGCGCGATC ACAGTACGTT GAACGCAGCG CCTACAGTT GGGGGCAGGA
2161   TTTGCGCACG AGCCAAGTCC AGGCCCTGCG CATGATTGTC GATTTCGGCC AGGTGGAACC
2221   AATGATGGGT CAAGGCGGGA TCGGCCAATC CGGCAACCTT GCCAGCCCGA ACTATGCCAA
2281   TGGCATTGAT CCGTGGCTCA AGGCACAATA CCTGAGCTTC CCGATGCAGC CACAGAACCT
2341   TGAAAAGGTG TATGGCAAGA CTCGTCTGAC CCTGGTTCGG GGAAGTAA
    
```

图 2 *pf-1240* 基因测序结果

Fig.2 Sequencing results of *pf-1240* gene

为不稳定蛋白),脂肪指数为 79.65,总平均亲水性为-0.344,蛋白总平均亲水系数为负值,属于亲水蛋白。氨基酸疏水性是氨基酸的一种基本性质,疏水性氨基酸位于蛋白质内部,由于其疏水性的相互作用,故在保持蛋白质三级结构上起作用。图 3 中的横坐标表示氨基酸位置,纵坐标表示得分,

Score 值小于 0 表示亲水,大于 0 表示疏水。其氨基酸最大疏水性位置为 163 位亮氨酸,最大值为 2.400,第 153 位脯氨酸出现最小值为-2.633。氨基酸组成如表 2 所示,其中含量最高的是丙氨酸(Ala),占 11.84%。

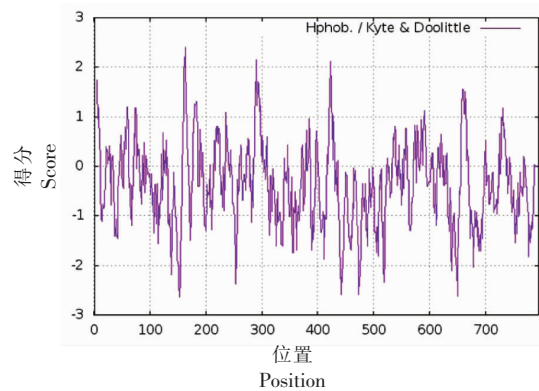


图3 氨基酸亲疏水性分析

Fig.3 Hydrophilic-hydrophobic property analysis of amino acid

表2 荧光假单胞菌 PF-1240 蛋白的氨基酸组成

Table 2 Amino acid composition of *Pseudomonas fluorescens* PF-1240 protein

氨基酸	个数	占比/%	氨基酸	个数	占比/%
Ala (A)	93	11.7	Lys (K)	35	4.4
Arg (R)	42	5.3	Met (M)	17	2.1
Asn (N)	35	4.4	Phe (F)	30	3.8
Asp (D)	45	5.7	Pro (P)	46	5.8
Cys (C)	2	0.3	Ser (S)	68	8.6
Gln (Q)	51	6.4	Thr (T)	34	4.3
Glu (E)	31	3.9	Trp (W)	18	2.3
Gly (G)	64	8.1	Tyr (Y)	24	3.0
His (H)	12	1.5	Val (V)	37	4.7
Ile (I)	23	2.9	Leu (L)	88	11.1

## 2.4 PF-1240 蛋白信号肽和跨膜结构的预测

通过 SignalP-5.0 Server 分析 PF-1240 氨基酸序列预测信号肽。如图 4 所示,其中 SP 表示由 Sec 易位子转运并被信号肽酶 I(Lep)切割的“标准”分泌信号肽;TAT 表示由双精氨酸转 Tat 易位子转运并被信号肽酶 I(Lep)切割的 Tat 信号肽;LIPO 表示由 Sec 易位子转运并被信号肽酶 II (Lsp) 切割的脂蛋白信号肽。预测结果显示 PF-1240 蛋白可能存在脂蛋白信号肽,存在的概率为 0.4521, 裂解位点在第 9 和第 10 个氨基酸之间,这与已有的研究有所不同。已有的研究中表明青霉素酰化酶(Penicillin G acylase,PGA)翻译后利用双精氨酸易位(Tat)机械将前体易位至周质膜,然后进行自催化分子内肽键裂解<sup>[19]</sup>。跨膜结构域是指蛋白质序列中跨越细胞膜的区域,通常为螺旋结构,含 20~25 个氨基酸残基,构成其蛋白质的

氨基酸大多数为疏水性氨基酸,运用 TMHMM Server.v.2.0 对荧光假单胞菌 PF-1240 蛋白跨膜结构进行预测,结果如图 5 所示,整条多肽链均处于细胞膜外,说明该蛋白不存在跨膜结构。这与目前已有研究的鱼腥藻 AiiC 酰化酶相似,该酶是由 2 544 bp 基因编码 847 个氨基酸的蛋白质,N 末端区域存在 1 个信号肽和 1 个假定的跨膜结构域,表明 AiiC 定位在周质中,其酰化酶的活性主要在菌体裂解后的细胞碎片中发挥作用<sup>[20]</sup>。

## 2.5 PF-1240 蛋白翻译后修饰

蛋白质的翻译后修饰 (Post-translational modification,PTM)是指对翻译后的蛋白质进行共价加工的过程,通过在 1 个或多个氨基酸残基加上修饰基团,可以改变蛋白质的理化性质,进而影响蛋白质的空间构象和活性状态、亚细胞定位、折叠及其稳定性以及蛋白质-蛋白质相互作用,是调

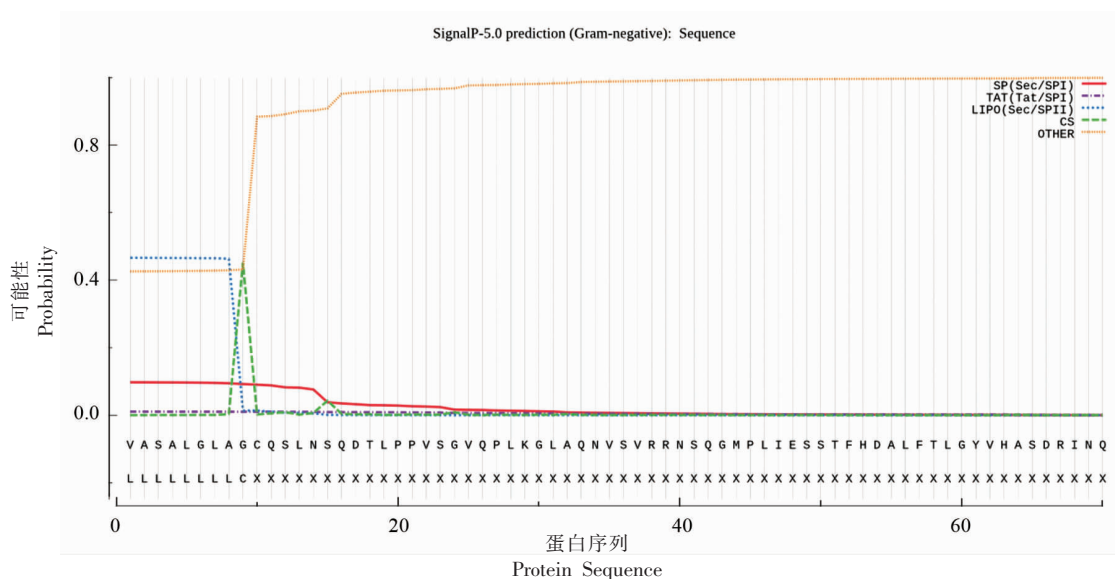


图 4 PF-1240 蛋白信号肽预测

Fig.4 Prediction of signal peptide of PF-1240 protein

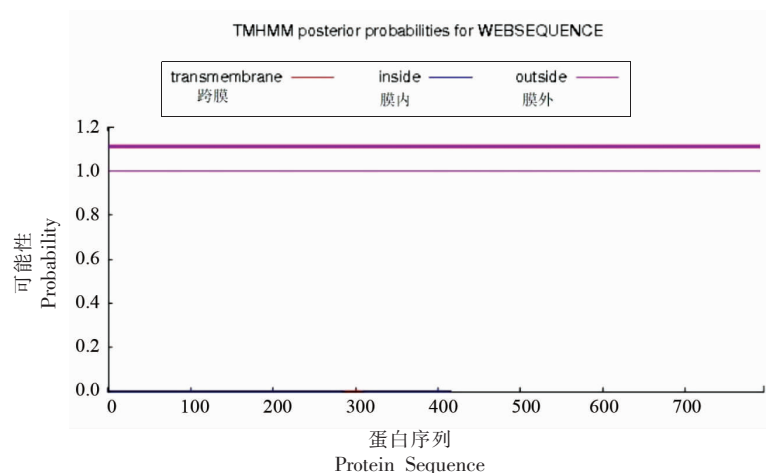


图 5 PF-1240 蛋白跨膜区预测

Fig.5 Prediction of protein transmembrane regions of PF-1240 protein

节蛋白质功能的重要方式<sup>[21]</sup>。蛋白质翻译后修饰使得蛋白具有特定功能,常见的蛋白质翻译后修饰包括泛素化、磷酸化、糖基化、甲基化、乙酰化、酯基化等。糖基化(Glycosylation)是指蛋白质或脂质在酶的作用下被连接上糖链的过程。作为生物体内最为重要的蛋白质翻译后修饰形式之一,糖基化调控了蛋白质在组织和细胞中的定位、功能、活性、寿命和多样性<sup>[22]</sup>。在此,运用 NetNGlyc 1.0 对 PF-1240 蛋白糖基化位点进行分析,结果见图 6。PF-1240 蛋白 N-糖基化位点有 5 个,分别位于第 34,111,166,346,623 位氨基酸。

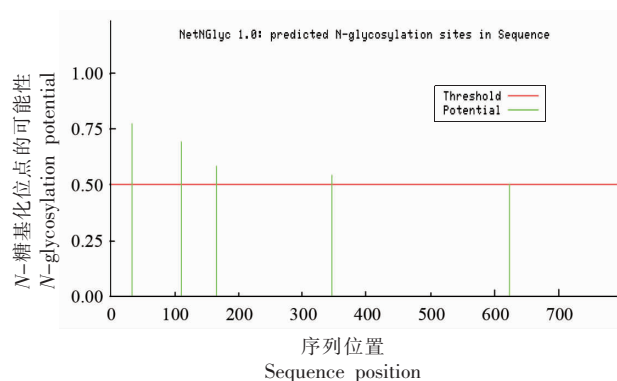


图 6 PF-1240 蛋白糖基化位点分析

Fig.6 Protein glycosylation site analysis of PF-1240 protein

运用 NetPhos 3.1 Server 在线软件预测蛋白磷酸化位点,结果如图 7 所示。该蛋白序列中有 79 个潜在磷酸化位点,其中 50 个丝氨酸磷酸化

位点,19 个苏氨酸磷酸化位点,10 个酪氨酸磷酸化位点。磷酸化是蛋白质最重要的翻译后修饰之一,对蛋白质发挥信号传导作用,具有重要意义<sup>[23]</sup>。

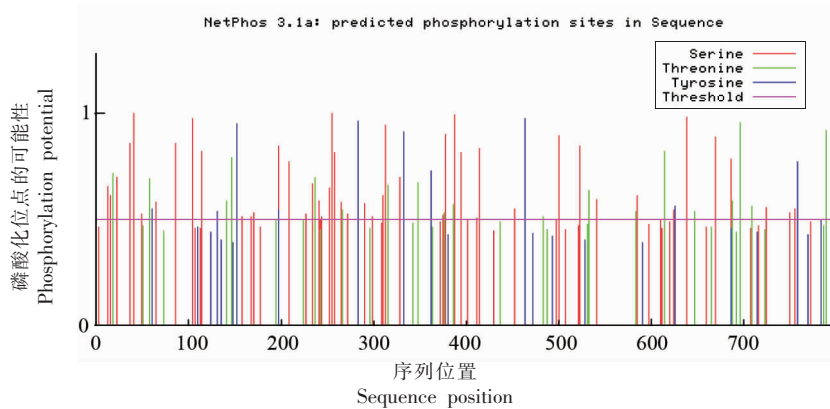


图 7 PF-1240 蛋白磷酸化的分析

Fig.7 Protein phosphorylation site analysis of PF-1240 protein

## 2.6 PF-1240 蛋白亚细胞定位

亚细胞定位是指某种蛋白或表达产物在细胞内的具体存在部位。例如:在核内、胞质内或者细胞膜上存在。亚细胞定位对于蛋白质功能非常重要,蛋白质必须处于合适的亚细胞定位才能行使其功能<sup>[24]</sup>。通过在线软件 PSORTb v.3.0 分析预测 PF-1240 蛋白的亚细胞定位结果如表 3,该蛋白主要分布在细胞周质。因此,该蛋白主要在细胞周质发挥作用。与其它酰化酶类似,通过翻译表达到胞外,与周围环境中的 AHLs 发生作用。

## 2.7 PF-1240 蛋白开放阅读框及保守结构域分析

通过 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/> 在线软件,预测了 PF-1240 蛋白的开放阅读框,如图

表 3 蛋白亚细胞定位预测

Table 3 Predicted of subcellular location of protein

位置	分值
细胞质	0.03
细胞质膜	0.51
周质	8.92
外膜	0.50
细胞外	0.04

8 所示。该开放阅读框由 791 个氨基酸组成,与荧光假单胞 PF01 的 QuiP 序列 (Genebank ID: Q3KH00.1) 的一致性为 100%,证明该蛋白属于群体感应信号分子淬灭酶的一种,与 QuiP 具有类似的功能。

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
RecName: Full=Acyl-homoserine lactone acylase QuiP; Short=AHL acylase QuiP; Short=Acyl-HSL acylase QuiP...Pseudomonas fl...		1315	1315	100%	0.0	78.46%	816	Q3KH00.1

图 8 PF-1240 蛋白开放阅读框预测

Fig.8 Prediction of PF-1240 protein open reading frame

AHL 酰化酶是一种 AHL 降解酶,通过水解酰基侧链和 HSL 部分之间的酰胺键来切割 AHL 分子,其方式与青霉素酰化酶的作用方式非常相似。保守结构域在基因功能中发挥重要作用。NCBI 的结构域预测(图 9)显示该肽链中含有 1 个保守结

构域,氨基酸第 35~779 位为 Penicil\_amidase 结构域,E-value 为 0,证明其结构预测可靠,说明在这段序列中有一个完整的青霉素酰胺酶结构域,在这个结构域中只有 1 个丝氨酸催化中心。通过在线程序 InterPro 对蛋白保守结构域进行分析,有 6

个蛋白条目与目的蛋白匹配成功(图 10)。其中匹配最成功的条目是 IPR002692:Penicillin/GL-7-ACA/AHL/aculeacin-A acylase。数据库定义这些家族中的蛋白代表了一些酰化酶,它们都属于 MEROPS 肽酶家族 S45,是 PGA 前体和头孢菌素酰化酶前体,也是一类自发形成成熟酰化酶异二聚体的自裂解蛋白质。该家族包括 AHL 酰化酶 PvdQ 和 QuiP,以及已证明具有青霉素酰化酶活性的 ACULACIN-A 酰化酶<sup>[25]</sup>。目的蛋白从第 5 个到 792 个氨基酸与 IPR002692 蛋白相一致,第 31 个

到 788 个氨基酸与 IPR029055 (N 端亲核氨基水解酶)同源超家族蛋白序列相匹配,该家族中的蛋白利用氨基末端残基的侧链,结合在  $\beta$  折叠上,作为亲核分子在羰基碳上的催化攻击。这一家族的一个重要成员嗜黄菌的 PGA 被证明能够降解链长为 6~8 个碳的 AHLs<sup>[26]</sup>。通过详细的结构研究,已经证实 AHL 酰化酶与所有其它青霉素酰化酶属于同一个 Ntn 水解酶超家族<sup>[27]</sup>,根据保守结构域的分析结果,可以推测出 PF-1240 蛋白属于 PGA,具有酰化酶的功能。

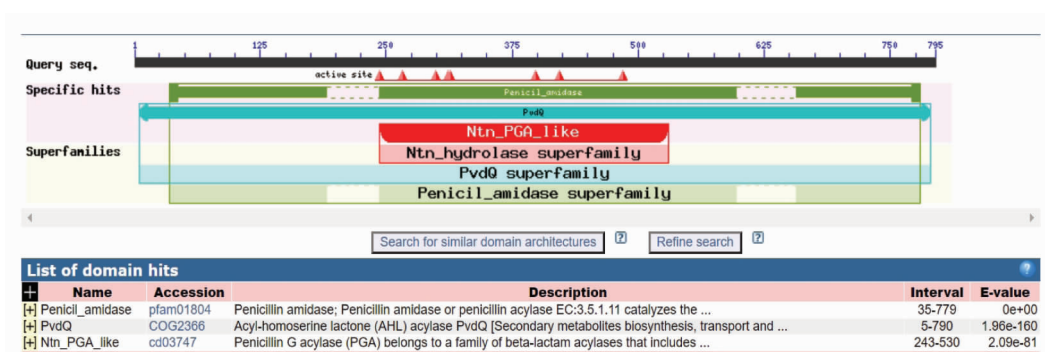


图 9 PF-1240 蛋白的结构域预测

Fig.9 Structural domain prediction of PF-1240 protein

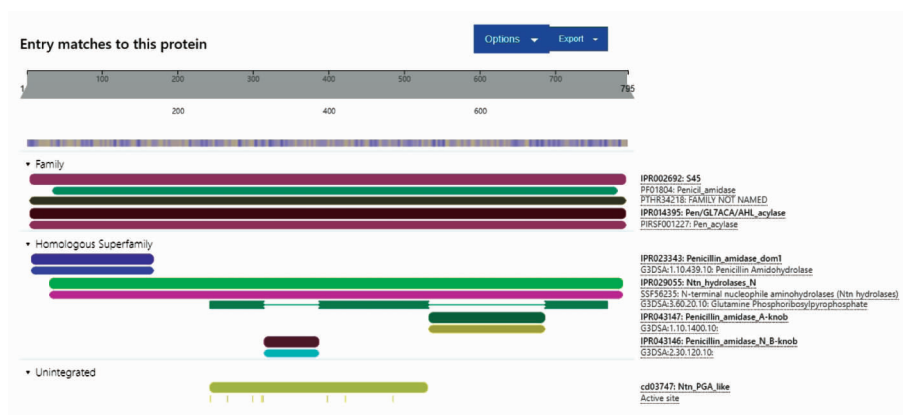


图 10 PF-1240 蛋白保守结构域匹配序列

Fig.10 PF-1240 Protein conserved domain matching sequence

## 2.8 PF-1240 蛋白二级结构特征

通过 SOPM 程序预测蛋白的二级结构,如图 11 所示。其中  $\alpha$ -螺旋区域有 344 个氨基酸,占 42.01%, $\beta$  折叠有 70 个氨基酸,占 8.81%,无规则卷曲有 290 个氨基酸,占 36.48%,延伸链区有 101 个氨基酸,占 12.7%。从蛋白质的整体结构来看,无规则卷曲和  $\alpha$ -螺旋是 PF-1240 蛋白的主要结

构元件,分散于整条多肽链;而延伸链和  $\beta$ -折叠相对较少,其中 2 个明显的  $\alpha$ -螺旋分别位于两端。使用 COILS server 预测了蛋白的卷曲螺旋结构,结果如图 12,显示了在 3 种窗口宽度下的检测值均较低,表明蛋白中可能不存在卷曲螺旋结构。



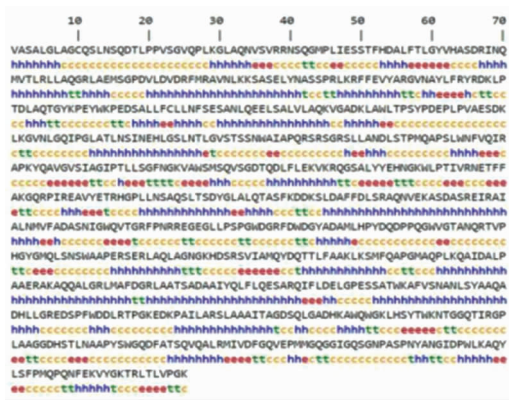


图 11 PF-1240 蛋白二级结构预测  
Fig.11 Prediction of PF-1240 protein secondary structure

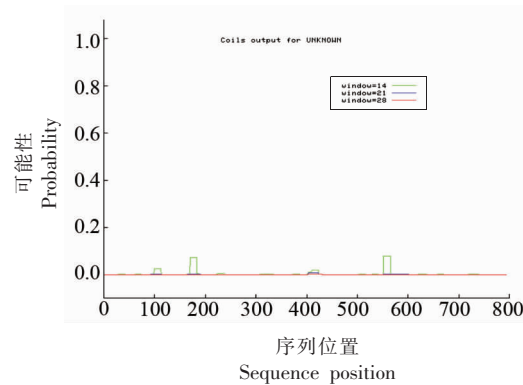


图 12 PF-1240 蛋白卷曲螺旋结构预测  
Fig.12 Prediction of PF-1240 protein coil structure

### 2.9 PF-1240 蛋白的生物进化分析

依据 PF08 的 pf-1240 基因编码的蛋白序列以及对其潜在功能的预测,在 NCBI 中进行 Blast 同源性检索,获取多个菌株的 PF-1240 同源蛋白序列进行多序列比对,包括链霉菌(*Streptomyces* sp.)的 AhlM、铜绿假单胞菌的 PvdQ、PA0305 和 QuiP、丁香假单胞菌 (*Pseudomonas syringae*)的 Psyr\_1971 和 Psyr\_4858、希瓦氏菌 (*Shewanella* sp.)的 Aac,苍白杆菌(*Bacillus pallidus*)A44 编码 aiiO 的 AHL 酰化酶,*R. alstonia* sp. XJ12B 的 ai-iD,并用 MEGA-X 软件邻位相连法 (Neighbor-joining)构建系统进化树,结果证明荧光假单胞菌 PF-1240 蛋白与铜绿假单胞菌的 QuiP 氨基酸序列同源性较高,为 65.82%,进化关系最为接近,且

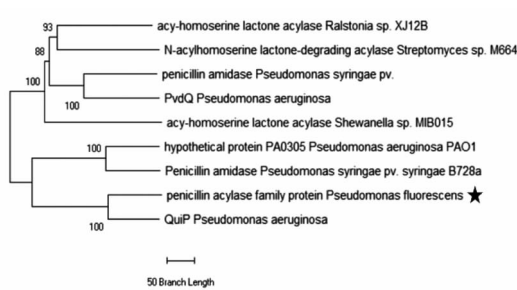


图 13 PF-1240 蛋白系统进化树  
Fig.13 Phylogenetic tree of PF-1240 protein

在其它物种中也具有很高的保守性。

### 2.10 PF-1240 蛋白的三级结构预测建模

通过 Discovery Studio (DS) 的 Homology Modeling 方法自动预测蛋白质的三级结构,选用 4e56(间隔区缩短型头孢菌素酰化酶突变体)为模板,通过 DS 序列的比对,对序列进行适当修改,构建出 PF-1240 蛋白的三级结构,如图 14 所示。青霉素酰化酶家族蛋白的前体包含了信号肽、中间肽、 $\alpha$  亚基和  $\beta$  亚基。成熟的蛋白是由  $\alpha$  亚基和  $\beta$  亚基组成的二聚体, $\beta$  亚基的第 1 个氨基酸丝氨酸是 1 个保守的活性位点。从图中可看出 PF-1240 是由 2 个不同大小的亚基组成,黄色部分为保守的丝氨酸活性位点。

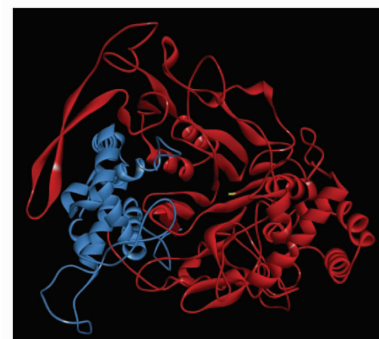


图 14 PF-1240 蛋白三级结构  
Fig.14 The tertiary structure of PF-1240 protein

## 3 结论

本研究从 1 株大菱鲜源荧光假单胞菌中成功

克隆得到全长 2 235 bp 的 pf-1240 基因,又通过生物信息学分析进一步确定了该蛋白的理化性

质。PF-1240 蛋白序列包含 795 个氨基酸,预测氨基酸相对分子质量为 86 855.96,理论等电点 pI 为 7.81, $\alpha$ -螺旋占 42.01%, $\beta$ -折叠占 8.81%。第 35 个氨基酸到 779 个为 Penicil\_amidase 结构域,说明该蛋白属于青霉素酰化酶家族蛋白,具有水解酰胺键的活性,能够催化 N-酰基高丝氨酸内酯和酰基链之间的酰胺键断裂。铜绿假单胞菌产生的 QuiP 是铜绿假单胞菌基因 PA1032 的产物,作为第 2 个 AHL 酰化酶,能够灭活铜绿假单胞菌的群体信号分子<sup>[28]</sup>,与 PF-1240 蛋白的相似性为 65.82%。Huang 等<sup>[29]</sup>发现 QuiP 在铜绿假单胞菌 PAO1 中的表达后,导致菌株 PAO1 中 3-O-C<sub>12</sub>-HSL 信号分子的积累减少,表明该酶对长链 AHL 具有活性。

由于群体感应是存在于微生物中独特的调控机制,从而使其成为人为调控微生物行为的潜在靶点,能够在食品保鲜、生物发酵等领域显现出应用潜力。随着细菌群体感应现象研究的不断深入,大量的群体感应淬灭酶被发现,越来越多的淬灭酶结构和功能被解析出来。通过 DS 同源建模,能够对蛋白三维空间有初步了解,为后续的试验研究提供指导性意见。AHL 酰化酶通过降解革兰氏阴性菌群体感应 AHL,从而调控毒力因子的形成。通过不断的对其进行深入研究和分析,对人为控制细菌群体感应造成的水产品腐败具有非常诱人的应用前景。

### 参 考 文 献

- [1] 励建荣,李婷婷,王当丰.微生物群体感应系统及其在现代食品工业中应用的研究进展[J].食品科学技术学报,2020,38(1):1-11.  
LI J R, LI T T, WANG D F. Research progress on microbial quorum sensing system and its application in modern food industry[J]. Journal of Food Science and Technology, 2020, 38(1): 1-11.
- [2] 常晶,史国萃,曾名湧,等.细菌群体感应淬灭酶及其应用研究进展[J].生物加工过程,2019,17(3):244-250.  
CHANG J, SHI G C, ZENG M Y, et al. Quorum quenching enzymes—a review[J]. Chin J Bioprocess Eng, 2019, 17(3): 244-250.
- [3] 梅永超,李婷婷,刘楠,等.绿薄荷精油对温和气单胞菌群体感应现象及其腐败特性的抑制作用[J].食品科学,2018,39(15):17-23.  
MEI Y C, LI T T, LIU N, et al. Effect of spearmint oil on quorum sensing and spoilage characteristics of *Aeromonas sobria* [J]. Food Science, 2018, 39(15): 17-23.
- [4] 丁婷,李婷婷,王当丰,等.水产品腐败菌群体感应系统及群体感应抑制剂研究进展[J].生物加工过程,2019,17(3):227-235.  
DING T, LI T T, WANG D F, et al. Research progress in quorum sensing of spoilage organisms of aquatic products[J]. Chin J Bioprocess Eng, 2019, 17(3): 227-235.
- [5] GRANDCLÉMENT C, TANNIÈRES M, MORÉRA S, et al. Quorum quenching: Role in nature and applied developments[J]. Expert Review of Anti-infective Therapy, 2016, 40(1): 86-116.
- [6] 邢启凡,柳鹏福,史吉平,等.细菌群体感应信号分子淬灭酶的研究进展[J].生物技术通报,2015,31(10):48-55.  
XING Q F, LIU P F, SHI J P, et al. Research progress on bacterial quorum quenching enzyme [J]. Biotechnology Bulletin, 2015, 31(10): 48-55.
- [7] SIKDAR R, ELIAS M. Quorum quenching enzymes and their effects on virulence, biofilm, and microbiomes: A review of recent advances[J]. Expert Review of Anti-infective Therapy, 2020, 18(12): 11-13.
- [8] 谭安娜,黄崇艳.铜绿假单胞菌 *quiP* 基因实时荧光定量 PCR 标准质粒的构建[J].临床血液学杂志(输血与检验版),2011,24(2):204-206.  
TAN A N, HUANG C Y. Construction of standard plasmid for detecting *Pseudomonas aeruginosa quiP* gene with real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction[J]. Journal of Clinical Hematology, 2011, 24(2): 204-206.
- [9] RODRIGO V, DANIEL H, JESÚS F, et al. Penicillin acylase from *Streptomyces lavendulae* and aculeacin A acylase from *Actinoplanes utahensis*: Two versatile enzymes as useful tools for quorum quenching processes[J]. Catalysts, 2020, 10(7): 730.
- [10] IVANOVA K, FERNANDES M M, FRANCESKO A, et al. Quorum-quenching and matrix-degrading enzymes in multilayer coatings synergistically prevent

- bacterial biofilm formation on urinary catheters [J]. ACS Appl Mater Interfaces, 2015, 7(49): 27066–27077.
- [11] KUSADA H, TAMAKI H, KAMAGATA Y, et al. A novel quorum-quenching *N*-acylhomoserine lactone acylase from *Acidovorax* sp. strain MR-S7 mediates antibiotic resistance [J]. Appl Environ Microbiol, 2017, 83(13): 0099–2240.
- [12] WANG Y Y, HONG X L, LIU J C, et al. Interactions between fish isolates *Pseudomonas fluorescens* and *Staphylococcus aureus* in dual-species biofilms and sensitivity to carvacrol[J]. Food Microbiol, 2020, 91: 103506.
- [13] 梅永超. 大菱鲆源蜂房哈夫尼亚菌群体感应基因 hall/R 的克隆、表达及功能初析[D]. 锦州: 渤海大学, 2019.
- MEI Y C. Cloning, expression and function analysis of quorum sensing genes hall/R of *Hafnia alvei*[D]. Jinzhou: Bohai University, 2019.
- [14] YAO Y F, SHI L, YU J K, et al. Distribution of killer-cell immunoglobulin-like receptor genes and combinations of their human leucocyte antigen ligands in 11 ethnic populations in China[J]. Cells, 2019, 8(7): 711.
- [15] MARCHLER-BAUER A, BO Y, HAN L Y, et al. CDD/SPARCLE: Functional classification of proteins via subfamily domain architectures[J]. Nucleic Acids Research, 2017, 45(D1): D200–D203.
- [16] KIM T S, ZHANG L, IL AHN J I, et al. Molecular architecture of a cylindrical self-assembly at human centrosomes[J]. Nature Communications, 2019, 10(1): 1151.
- [17] KASHANI-AMIN E, TABATABAEI-MALAZY O, SAKHTEMAN A, et al. A systematic review on popularity, application and characteristics of protein secondary structure prediction tools[J]. Current Drug Discovery Technologies, 2019, 16(2): 159–172.
- [18] FAN H Y, WANG L Y, WEN H S, et al. Genome-wide identification and characterization of toll-like receptor genes in spotted sea bass (*Lateolabrax maculatus*) and their involvement in the host immune response to *Vibrio harveyi* infection[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2019, 92: 782–791.
- [19] IGNATOVA Z, HÖRNLE C, NURK A, et al. Unusual signal peptide directs penicillin amidase from *Escherichia coli* to the tat translocation machinery[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2002, 291(1): 146–149.
- [20] ROMERO M, DIGGLE S P, HEEB S, et al. Quorum quenching activity in *Anabaena* sp. PCC 7120: Identification of AiiC, a novel AHL-acylase [J]. FEMS Microbiol Lett, 2008, 280(1): 73–80.
- [21] WATERHOUSE A, BERTONI M, BIENERT S, et al. SWISS-MODEL: Homology modelling of protein structures and complexes[J]. Nucleic Acids Research, 2018, 46(W1): W296–W303.
- [22] 马骏骏, 王旭初, 聂小军. 生物信息学在蛋白质组学研究中的应用进展[J]. 生物信息学, 2021, 19(2): 85–91.
- MA J J, WANG X C, NEI X J. Advances in the application of bioinformatics in proteomics research [J]. Chinese Journal of Bioinformatics, 2021, 19(2): 85–91.
- [23] 周蕾, 顾建新. *N*-糖基化位点鉴定方法和非经典 *N*-糖基化序列[J]. 生命科学, 2011, 23(6): 605–611.
- ZHOU L, GU J X. *N*-glycosylation sites analysis and nonconsensus *N*-glycosylated sequences[J]. Chinese Bulletin of Life Sciences, 2011, 23(6): 605–611.
- [24] 白海艳, 吕军, 张颖, 等. 蛋白质磷酸化位点的识别[J]. 内蒙古工业大学学报(自然科学版), 2011, 30(2): 108–115.
- BAI H Y, LÜ J, ZHANG Y, et al. Recognition of protein phosphorylation site[J]. Journal of Inner Mongolia University of Technology (Natural Science Edition), 2011, 30(2): 108–115.
- [25] 李凤敏, 李学忠. 蛋白质亚细胞定位的识别[J]. 生物物理学报, 2004(4): 297–306.
- LI F M, LI X Z. Recognition of protein subcellular localization [J]. Acta Biophysica Sinica, 2004(4): 297–306.
- [26] TORRES-BACETE J, HORMIGO D, STUART M, et al. Newly discovered penicillin acylase activity of aculeacin A acylase from *Actinoplanes utahensis* [J]. Appl Environ Microbiol, 2007, 73(16): 5378–5381.
- [27] MUKHERJI R, VARSHNEY N K, PANIGRAHI P, et al. A new role for penicillin acylases: Degradation of acyl homoserine lactone quorum sensing signals by *Kluyvera citrophila* penicillin G acylase [J]. Enzyme Microb Technol, 2014, 56: 1–7.
- [28] CZAJKOWSKI R, JAFRA S. Quenching of acyl-homoserine lactone-dependent quorum sensing by en-

- zymatic disruption of signal molecules[J]. Acta Biochim Pol, 2009, 56(1): 1-16.
- [29] HUANG J J, PETERSEN A, WHITELEY M, et al. Identification of QuiP, the product of gene *PAI032*, as the second acyl-homoserine lactone acylase of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1[J]. Appl Environ Microbiol, 2006, 72(2): 1190-1197.

### Cloning and Bioinformatics Analysis of Quorum Sensing Quenching Enzyme Gene from *Pseudomonas fluorescens* Isolated from Turbot

Shen Yue<sup>1</sup>, Cui Fangchao<sup>1\*</sup>, Li Tingting<sup>2\*</sup>, Wang Dangfen<sup>1</sup>, Lui Jingyun<sup>1</sup>, Tan Xiqian<sup>1</sup>, Lü Xinran<sup>1</sup>, Li Jianrong<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>National and Local Joint Engineering Research Center for Storage, Processing and Safety Control Technology of Fresh Agricultural Products, College of Food Science & Project Engineering, Bohai University, Jinzhou 121013, Liaoning

<sup>2</sup>College of Life Sciences, Dalian Minzu University, Dalian 116600 Liaoning)

**Abstract** There is an information exchange mechanism among microorganisms that lead to the deterioration of aquatic products, called "quorum sensing"(QS). The quorum sensing system of Gram-negative bacteria mainly uses *N*-acyl homoserine lactone as a signal molecule to indirectly regulate the spoilage characteristics of some spoilage bacteria in aquatic products. Therefore, the spoilage of aquatic products can be inhibited by quenching quorum sensing. As a quorum sensing inhibitor, quorum sensing quenching enzyme has been identified in many bacteria. In order to explore the potential function of *pf-1240* gene expression product of *Pseudomonas fluorescens* (PF08), gene cloning and bioinformatics analysis were used to study it. The results showed that the *pf-1240* gene of *Pseudomonas fluorescens* PF08 might express a quorum sensing quenching enzyme, which was 65.82% similar to the second homoserine lactone acylase QuiP protein of *Pseudomonas aeruginosa*. Sequence analysis showed that *pf-1240* gene encoded 795 amino acids. The protein molecular formula was C<sub>3867</sub>H<sub>6010</sub>N<sub>1084</sub>O<sub>1160</sub>S<sub>19</sub>, the relative molecular weight was 86 855.96, the theoretical isoelectric point (pI) was 7.81, and the instability coefficient was 35.29. According to the conserved domain analysis, the protein contains a complete domain of penicillin acylase family, and many enzymes in this family have been proved to have quorum sensing quenching enzyme function, which can decompose quorum sensing signal molecule *N*-acyl homoserine lactone (AHL). It is speculated that the protein also has similar function. In this study, the physical and chemical properties and structure of the protein were predicted by bioinformatics technology, so as to understand the properties and functions of quorum sensing quenching enzyme of *Pseudomonas fluorescens*.

**Keywords** gene cloning; quorum sensing; *N*-acylhomoserine lactone acylase; bioinformatics analysis; aquatic product corruption