

## LC-MS/MS 检测水产品源致病菌和 腐败菌群体感应 AHLs 信号分子

黄旭镇, 朱军莉\*, 赵二科, 梁新乐

(浙江工商大学食品与生物工程学院, 浙江 杭州 310018)

**摘要:** 为分析水产品源致病菌和腐败菌中群体感应信号分子 AHLs 的含量和种类, 实验建立液相色谱-串联质谱(LC-MS/MS)同时检测细菌群体感应 11 种 AHLs 类信号分子的技术, 并与生物报告菌法比较。结果显示, 报告菌紫色杆菌 CV026 和根瘤农杆菌 A136 检测发现嗜水气单胞菌和 2 株铜绿假单胞菌是 AHLs 产生菌。建立的 LC-MS/MS 能完全分离和检测 11 种 AHLs, 并发现假单胞菌和嗜水气单胞菌产生的 AHLs 信号分子含量较高, 其中 ATCC 9027 和 ATCC 15692 产生 3-oxo-C<sub>12</sub>-HSL, 嗜水气单胞菌 A2 产生 C<sub>4</sub>-HSL, 而腐败希瓦氏菌 XH4 分泌的 C<sub>4</sub>-HSL 信号分子含量较低, 沙门氏菌 ATCC 14028-3、大肠杆菌 O157:H7 和 3 种弧菌的 AHLs 很低。随着细菌浓度的增加, 铜绿假单胞菌 ATCC 9027 产生的 AHLs 含量逐步增加, 在 12 h 达到最高。研究表明, LC-MS/MS 可用于多种 AHLs 信号分子的定性和定量检测, 具有灵敏性与准确性更高的优点。在 11 株水产品源致病菌和腐败菌中, 假单胞菌和气单胞菌分泌的 AHLs 含量最高。

**关键词:** 群体感应; AHLs; 检测; LC-MS/MS

**中图分类号:** TS 254.7

**文献标志码:** A

我国是水产品生产和消费大国, 水产品总产量已连续 20 多年居世界第 1 位。然而, 水产品消费过程中食源性致病菌, 如沙门氏菌、大肠杆菌 O157:H7、致病性弧菌等仍是威胁食品安全的重要因素<sup>[1]</sup>。同时, 我国生鲜水产品腐烂损失十分严重, 平均损失率在 15% 左右, 而微生物活动仍是引起水产品腐败变质的主要原因。研究表明, 在有氧冷藏条件下水产品特定腐败菌(specific spoilage organism, SSO) 多为希瓦氏菌(*Shewanella putrefaciens*)或假单胞菌属<sup>[2]</sup>。

细菌信息交流成为当前微生物学研究的热点。群体感应(quorum sensing, QS)是一种细菌细胞间信息传递的机制, 即细菌在生长繁殖过程中通过合成、分泌自诱导物(autoinducer, AI)作为信号分子来检测自身细菌浓度。当 AI 浓度随着细菌群体密度达到一定阈值时, 细菌便开启细胞

密度依赖的特定基因表达机制<sup>[3]</sup>。目前, 已发现许多细菌利用该系统调控体内特定的功能, 如生物发光、生物被膜形成、毒素产生、胞外酶合成等。研究表明, 革兰氏阴性细菌中群体感应信号分子(AI-1)主要为高丝氨酸内酯类(N-acyl-L-homoserine lactones, AHLs)<sup>[4]</sup>。该类信号分子含有 1 个高丝氨酸内酯的五环状结构和 1 个酰基侧链, 不同细菌所产生 AHLs 的特异性由酰基侧链的长度及酰基侧链 C-3 位上取代基团的性质决定<sup>[5]</sup>。

如何快速、准确地检测细菌产生群体感应 AHLs 信号分子及其种类, 是研究细菌群体感应与病原菌和腐败菌作用机制的前提和基础。目前, 细菌 AHLs 信号分子的分析方法主要有构建生物报告菌<sup>[6]</sup>、薄层层析<sup>[7]</sup>、 $\beta$ -半乳糖苷酶法<sup>[8]</sup>、GC-MS<sup>[9]</sup>和 HPLC-MC<sup>[10]</sup>等。其中, 生物报告菌

收稿日期:2014-03-07 修回日期:2014-04-29

资助项目:国家自然科学基金(31271954, 31171745); 国家科技支撑计划(2012BAD29B06); 浙江省科技厅项目(2012C22049); 浙江工商大学校级研究生科技创新项目(1110XJ1513125)

通信作者:朱军莉, E-mail: junlizhu0305@163.com

法广泛采用,但敏感性较低,而薄层层析和 $\beta$ -半乳糖苷酶法通过酶活性间接反映 AHLs 水平,操作繁琐,仅用于初步定量,而 LC-MS 法仅用于定性分析 AHLs<sup>[9]</sup>。LC-MS/MS 具有准确、灵敏、高效的优点,可准确定性 AHLs 的种类,并进行精确的定量分析<sup>[10]</sup>。鉴于此,本研究采用 LC-MS/MS 技术分析了水产品中主要致病菌与腐败菌的 AHLs 含量和种类,为研究细菌作用机制及调控奠定良好的基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌株

根癌农杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) A136 由浙江农林大学杨梦华副教授馈赠。铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) ATCC 9027、(*P. aeruginosa*) ATCC 15692、副溶血性弧菌 (*Vibrio parahaemolyticus*) ATCC 17802-3、腐败希瓦氏菌 ATCC 8071、沙门氏菌 (*Salmonella typhimurium*) ATCC 14028-3、大肠杆菌 (*Escherichia coli*) O157:H7 均购于美国标准菌库 (ATCC); 创伤弧菌 (*Vibrio vulnificus*) CICC 21615、溶藻弧菌 (*Vibrio alginolyticus*) CICC 21611 购于中国工业微生物菌种保藏管理中心 (CICC); 紫色杆菌 (*Chromobacterium violaceum*) CV026 为本实验室保存,*P. aeruginosa* PH1、腐败希瓦氏菌 (*S. putrefaciens*) XH4、嗜水气单胞菌 (*Aeromonas hydrophila*) A2 均为实验室大黄鱼中的分离株。

### 1.2 主要试剂和培养基

信号分子 C<sub>4</sub>-HSL、C<sub>6</sub>-HSL、C<sub>8</sub>-HSL、C<sub>10</sub>-HSL、C<sub>12</sub>-HSL、C<sub>14</sub>-HSL、3-oxo-C<sub>6</sub>-HSL、3-oxo-C<sub>8</sub>-HSL、3-oxo-C<sub>10</sub>-HSL、3-oxo-C<sub>12</sub>-HSL、3-oxo-C<sub>14</sub>-HSL:Sigma 公司; LB 肉汤:青岛海博生物有限公司。

### 1.3 细菌培养

取 *V. parahaemolyticus* ATCC 17802-3、*V. vulnificus* CICC 21615、*V. alginolyticus* CICC 21611 甘油菌种 100  $\mu$ L 接种于含 3% NaCl 的 LB 肉汤,在 37  $^{\circ}$ C 下活化。其他菌株接种于 LB 中培养,其中 *S. typhimurium* ATCC 14028-3 和 *E. coli* O157:H7 在 37  $^{\circ}$ C 下培养,其余均在 28  $^{\circ}$ C 下培养。

### 1.4 信号分子的提取

参考綦国红等<sup>[10]</sup>的方法,取培养 12 h 的菌

液,离心(10 000 r/min,10 min),将上清液与等体积酸化乙酸乙酯(含 0.01% 冰醋酸)混合,涡旋振荡,静置分层后取有机相。按同法重复 3 次,旋转蒸发至干,用适量甲醇溶解烧瓶内壁上的 AHLs 信号分子,-20  $^{\circ}$ C 保存备用。

### 1.5 生物报告菌检测信号分子

参考 Ravn 等<sup>[11]</sup>的方法并略作修改。报告菌 *C. violaceum* CV026 和 *A. tumefaciens* A136 活化后,取 500  $\mu$ L 加入到 LB 琼脂中,混匀并倒平板。待平板冷却后打孔,在孔中加入 9 种细菌的 AHLs 提取液,对照组添加 C<sub>6</sub>-HSL,28  $^{\circ}$ C 培养,观察颜色变化。

### 1.6 LC-MS/MS 检测信号分子

参考马晨晨等<sup>[12]</sup>方法并稍作修改,采用 Agilent 6410 液质联用仪分析。液相色谱条件为,Agilent XDB-C<sub>18</sub> 色谱柱(1.8  $\mu$ m,4.6 mm  $\times$  50 mm),流速:0.3 mL/min,进样量:10  $\mu$ L,分析时间:30 min,柱温:30  $^{\circ}$ C,流动相分别选择甲醇:水和乙腈:水 2 种体系进行分析。质谱条件为,采用 ESI<sup>+</sup> 离子源电喷雾,MRM 扫描模式,离子源温度为 650  $^{\circ}$ C,脱溶剂温度 300  $^{\circ}$ C,脱溶剂气和锥孔气为 N<sub>2</sub>,碰撞气体为氩气,锥孔气流速 3 L/min,毛细管电压为 4 000 V,驻留时间为 100 ms,MassHunter 软件进行数据处理。

### 1.7 假单胞菌的 AHLs 形成规律

将假单胞菌接种于 LB 培养基,在 28  $^{\circ}$ C 下摇床培养,每隔 3 h 取样,测定细菌 OD<sub>600 nm</sub>,并在 6、12、18 和 24 h 取样,LC-MS/MS 分析 AHLs 信号分子的含量。

## 2 结果与分析

### 2.1 生物报告菌检测 AHLs 信号分子

采用 2 种报告菌分析水产品源致病菌与腐败菌 AHLs 信号分子的分泌情况。结果发现,仅 *A. hydrophila* A2 能诱导 *C. violaceum* CV026 产生紫色,而 *P. aeruginosa* ATCC 9027、*P. aeruginosa* ATCC 15692 能够诱导 *A. tumefaciens* A136 呈现出蓝色(表 1)。McLean 等<sup>[13]</sup>研究表明,生物报告菌对不同酰基侧链长度的 AHLs 敏感性不同,其中 *C. violaceum* CV026 主要对短链 C-3 没有取代基的 C-4 ~ C-8 AHLs 较敏感,而 *A. tumefaciens* A136 对酰基侧链 C-3 羰基取代的 C-6 ~ C-14 AHLs 敏感性最强。

表 1 报告菌法检测 11 株致病菌和腐败菌的 AHLs

Tab.1 AHLs assays for 11 kinds of pathogens and spoilage bacteria by biosensor

| 菌株<br>strains                          | 报告菌 biosensor |      | 菌株<br>strains                    | 报告菌 biosensor |      |
|--|---------------|------|----------------------------------|---------------|------|
|  | CV026         | A136 |                                  | CV026         | A136 |
| <i>V. parahemolyticus</i> ATCC 17802-3 | -             | -    | <i>P. aeruginosa</i> ATCC 9027   | -             | +    |
| <i>V. vulnificus</i> CICC 21615        | -             | -    | <i>P. aeruginosa</i> ATCC 15692  | -             | +    |
| <i>V. alginolyticus</i> CICC 21611     | -             | -    | <i>S. putrefaciens</i> ATCC 8071 | -             | -    |
| <i>Salmonella</i> ATCC 14028-3         | -             | -    | <i>S. putrefaciens</i> XH4       | -             | -    |
| <i>E. coli</i> O157:H7                 | -             | -    | <i>A. hydrophila</i> A2          | +             | -    |
| <i>P. aeruginosa</i> PH1               | -             | -    | control                          | +             | +    |

注：“+”有颜色变化，“-”无变化；“CV026”紫色杆菌 CV026；“A136”根瘤农杆菌 A136

Notes：“+”coloured；“-”no change；“CV026”*C. violaceum* CV026；“A136”*A. tumefaciens* A136

## 2.2 LC-MS/MS 条件优化

研究分别选择甲醇：水和乙腈：水作为流动相，经过比较分析，发现乙腈：水作为流动相对 AHLs 信号分子分离效果更好。同时，流动相加入 0.1% 甲酸，可以提高离子化效率，提高灵敏度，降低检测限及检出限。混合标准品的色谱图中，11 种 AHLs 根据相对分子质量大小出峰，得到完全分离，表明 AHLs 在该色谱条件下分离效果良好（图 1）。

在 ESI<sup>+</sup> 离子源条件下对 11 种 AHLs 信号分子的母离子、子离子及碰撞能等参数进行优化。结果表明，AHLs 在质谱鉴定时均会产生  $m/z$  102 的碎片离子以及相应的酰基侧链  $[M + H - 101]^+$  的碎片，并且其分子量具有  $172 + 14n$  的特征，即分子量递增的规律（表 2）。该结果与 Ortori

等<sup>[14]</sup>报道一致。

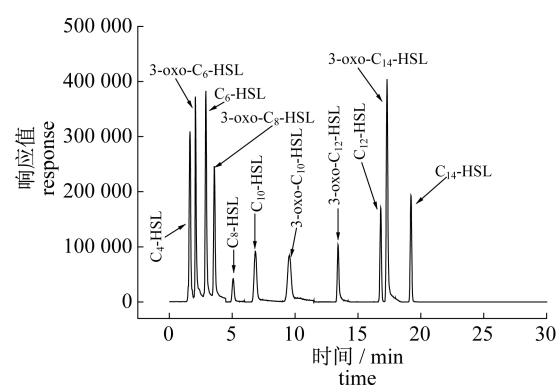


图 1 11 种 AHLs 信号分子混合标准品色谱图

Fig.1 Chromatograms of 11 kinds of AHLs mixed standards

表 2 MRM 模式下 AHLs 信号分子优化后的质谱条件

Tab.2 Mass spectrometer parameters used for AHLs analyses in MRM condition optimized

| 高丝氨酸内酯<br>AHL              | 保留时间/min<br>retention time | 母离子/(m/z)<br>precursor ion | 子离子/(m/z)<br>product ion | 碎裂电压/V<br>fragmentor | 碰撞能/V<br>collision energy |
|----------------------------|----------------------------|----------------------------|--------------------------|----------------------|---------------------------|
| C <sub>4</sub> -HSL        | 1.649                      | 172.1                      | 102.1                    | 135                  | 15                        |
| C <sub>6</sub> -HSL        | 2.913                      | 200.1                      | 102.1                    | 135                  | 14                        |
| C <sub>8</sub> -HSL        | 5.077                      | 228.1                      | 102.1                    | 135                  | 15                        |
| C <sub>10</sub> -HSL       | 6.842                      | 256.1                      | 102.1                    | 135                  | 17                        |
| C <sub>12</sub> -HSL       | 16.812                     | 284.1                      | 102.1                    | 135                  | 18                        |
| C <sub>14</sub> -HSL       | 19.214                     | 312.1                      | 102.1                    | 135                  | 16                        |
| 3-oxo-C <sub>6</sub> -HSL  | 2.084                      | 214.1                      | 102.1                    | 135                  | 15                        |
| 3-oxo-C <sub>8</sub> -HSL  | 3.576                      | 242.1                      | 102.1                    | 135                  | 17                        |
| 3-oxo-C <sub>10</sub> -HSL | 9.572                      | 270.1                      | 102.1                    | 135                  | 18                        |
| 3-oxo-C <sub>12</sub> -HSL | 13.420                     | 298.1                      | 102.1                    | 135                  | 18                        |
| 3-oxo-C <sub>14</sub> -HSL | 17.309                     | 326.1                      | 102.1                    | 135                  | 21                        |

## 2.3 LC-MS/MS 检测致病菌和腐败菌群体感应的 AHLs

采用 LC-MS/MS 分析了水产品源 11 株致病菌和腐败菌群体感应的 AHLs 信号分子，如表 3

和图 2 所示。结果发现，不同属细菌产生的 AHLs 信号分子存在较大差异，其中铜绿假单胞菌和嗜水气单胞菌产生的 AHLs 含量较高，*P. aeruginosa* ATCC 9027 和 *P. aeruginosa* ATCC 15692 均产生

3-oxo-C<sub>12</sub>-HSL, 含量为 771.02 和 551.11 μg/L, *A. hydrophila* A2 主要产生 C<sub>4</sub>-HSL, 含量为 924.45 μg/L。而 *S. putrefaciens* ATCC 8071 和 *S. putrefaciens* XH4 产生的 AHLs 含量较低, 其中 *S. putrefaciens* XH4 产生的 AHLs 以 C<sub>4</sub>-HSL 为

主, 含量为 204.75 μg/L, 而 *S. putrefaciens* ATCC 8071 的 AHLs 总含量很低, 约为 63.16 μg/L。 *V. parahemolyticus* ATCC 17802-3、*V. vulnificus* CICC 21615、*V. alginolyticus* CICC 21611、*Salmonella* ATCC 14028-3、*E. coli* O157:H7 仅检测到极微量

表 3 LC-MS/MS 分析 11 株细菌的 AHLs 含量

Tab.3 The concentrations of AHLs in eleven strains measured by LC-MS/MS

| 菌株<br>strains                          | 高丝氨酸内酯浓度/(μg/L) AHLs concentration |                         |                         |                          |                          |                          |                               |                               |                                |                                |                                |
|--|------------------------------------|-------------------------|-------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|-------------------------------|-------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|
|  | C <sub>4</sub> -<br>HSL            | C <sub>6</sub> -<br>HSL | C <sub>8</sub> -<br>HSL | C <sub>10</sub> -<br>HSL | C <sub>12</sub> -<br>HSL | C <sub>14</sub> -<br>HSL | 3-oxo-<br>C <sub>6</sub> -HSL | 3-oxo-<br>C <sub>8</sub> -HSL | 3-oxo-<br>C <sub>10</sub> -HSL | 3-oxo-<br>C <sub>12</sub> -HSL | 3-oxo-<br>C <sub>14</sub> -HSL |
| <i>V. parahemolyticus</i> ATCC 17802-3 | 10.32                              | 17.26                   | 1.61                    | 4.65                     | 1.46                     | 4.21                     | 4.98                          | 1.07                          | 1.43                           | 0.35                           | 0.15                           |
| <i>V. vulnificus</i> CICC21615         | 0.39                               | 6.95                    | 0.32                    | 0.52                     | 0.64                     | 0.28                     | 0.18                          | /                             | 0.10                           | 0.08                           | 0.06                           |
| <i>V. alginolyticus</i> CICC21611      | 2.40                               | 15.73                   | 0.16                    | 0.47                     | 0.09                     | 0.01                     | 0.11                          | 0.07                          | 0.07                           | 0.04                           | /                              |
| <i>Salmonella</i> 14028-3              | 2.79                               | 5.53                    | 0.35                    | 0.36                     | 0.12                     | 0.02                     | 0.08                          | 0.11                          | 0.07                           | 0.02                           | 0.01                           |
| <i>E. coli</i> O157:H7                 | 1.26                               | 13.56                   | 0.33                    | 0.53                     | 0.16                     | 0.01                     | 0.20                          | 0.12                          | 0.06                           | 0.19                           | 0.00                           |
| <i>P. aeruginosa</i> ATCC 9027         | 138.11                             | 8.08                    | 13.74                   | 127.43                   | 21.92                    | /                        | 10.58                         | 2.20                          | 1.68                           | 771.02                         | 18.26                          |
| <i>P. aeruginosa</i> ATCC 15692        | 33.25                              | 14.99                   | 55.49                   | 51.22                    | 3.26                     | /                        | 0.34                          | 0.29                          | 7.68                           | 551.11                         | 5.45                           |
| <i>P. aeruginosa</i> PH1               | 2.28                               | /                       | 3.83                    | /                        | /                        | /                        | 0.69                          | /                             | 0.54                           | 0.13                           | 0.10                           |
| <i>S. putrefaciens</i> ATCC 8071       | 34.92                              | 5.71                    | 0.66                    | 0.10                     | 3.49                     | /                        | 8.47                          | 1.68                          | /                              | 1.09                           | 7.06                           |
| <i>S. putrefaciens</i> XH4             | 204.75                             | 32.89                   | 0.94                    | 7.00                     | 3.14                     | /                        | 11.66                         | 0.32                          | /                              | /                              | 11.68                          |
| <i>A. hydrophila</i> A2                | 924.45                             | 53.24                   | 12.45                   | 5.23                     | 6.35                     | /                        | 19.35                         | /                             | /                              | /                              | /                              |

注:“/”不可定量

Notes:“/”not quantifiable

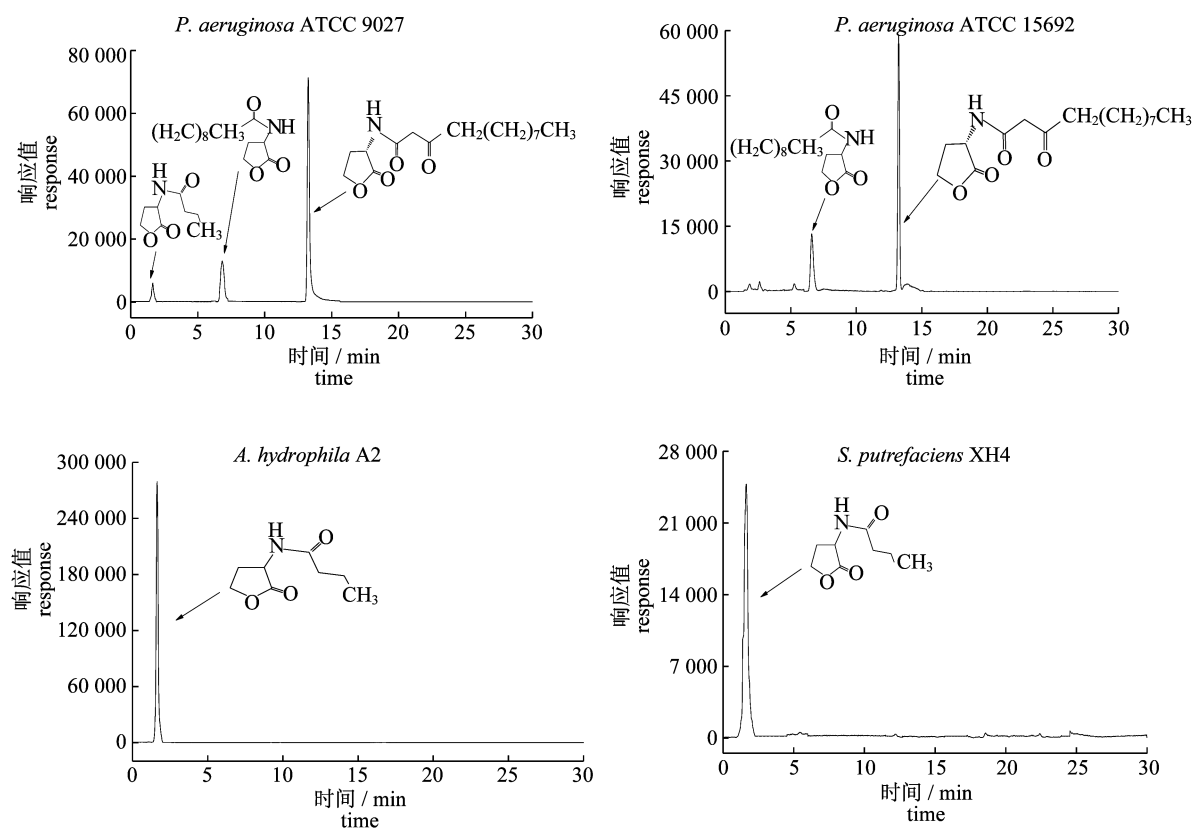


图 2 4 种细菌 AHLs 提取物的 LC-MS/MS 色谱图

Fig.2 Chromatograms of AHLs produced from four kinds of strains

的 AHLs。同一属细菌不同分离株产生的 AHLs 信号分子存在差别, *P. aeruginosa* ATCC 9027 分泌的信号分子除 3-oxo-C<sub>12</sub>-HSL, 还检测到 C<sub>4</sub>-HSL 和 C<sub>10</sub>-HSL, 浓度分别为 138.11 和 127.43 μg/L, 而 *P. aeruginosa* ATCC 15692 提取液中主要为 3-oxo-C<sub>12</sub>-HSL, 其他信号分子含量较低, 分离株 *P. aeruginosa* PH1 产生 AHLs 含量均极低。 *S. putrefaciens* ATCC 8071 和 *S. putrefaciens* XH4 产生的 AHLs 浓度也有明显的差别。

#### 2.4 假单胞菌 AHLs 的形成规律

实验进一步分析了培养时间对假单胞菌细菌浓度和 AHLs 信号分子形成的影响。结果表明, *P. aeruginosa* ATCC 9027 在 LB 培养基中生长迅速, 15 h 达到稳定期。随着假单胞菌的生长, 培养上清液中的 AHLs 逐步增加, 在细菌对数后期 12 h 时 AHLs 的含量最高, 之后逐步下降, 其中在 18 h 下降约 34%, 24 h 下降约 60% (图 3)。假单胞菌分泌的 AHLs 总含量在生长稳定期逐步下降, 可能是由于稳定期培养液 pH 值升高, 在碱性条件下 AHLs 不稳定, 发生水解而失去信号分子导致, 该现象与綦国红等<sup>[10]</sup>报道一致。

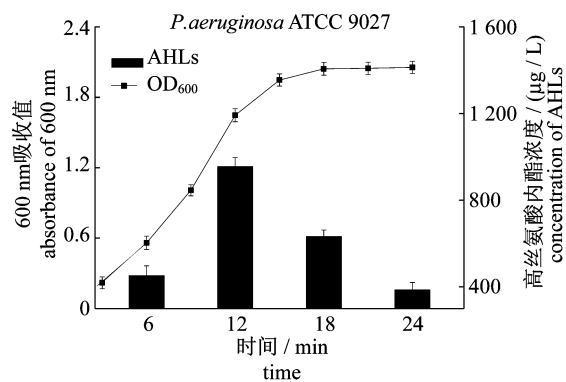


图 3 假单胞菌 ATCC 9027 生长曲线和 AHLs 含量的变化

Fig. 3 Changes in growth curve and AHLs content of *P. aeruginosa* ATCC 9027

### 3 讨论

群体感应是细菌之间交流的“语言”。在革兰氏阴性菌中 QS 主要的信号分子是 AHLs, 由 LuxI 型合成酶和周质中的 LuxR 型受体来调节产生量, 迄今为止已发现 70 余种 LuxR/I 系统。采用基因工程手段构建的报告菌检测群体感应 AHLs 信号分子是目前广泛使用的方法, 其中 *C.*

*violaceum* CV026 和 *A. tumefaciens* A136 是最常用的报告菌。然而, 2 种细菌对不同酰基侧链长度以及不同取代基 AHL 信号分子敏感性不同, 已发现 *C. violaceum* CV026 的 AHL 受体蛋白 CviR 主要对短链 C-3 位无取代基的 AHL 比较敏感<sup>[13,15]</sup>。Fuqua 等<sup>[16]</sup>报道 *A. tumefaciens* A136 的 AHL 受体蛋白 TraR 对无取代基, C-3 位取代基为羰基、羟基、酰基, 侧链 C-3 位为羰基取代的 AHL 敏感性较强。生物报告菌法检测还与样品中信号分子提取量和浓度有关, 仅用于 AHLs 初步分析。而 Ortori 等<sup>[14]</sup>采用 LC-MS/MS 在铜绿假单胞菌 PA1 中检测出 4 种 AHL 及喹诺酮类信号分子。马晨晨等<sup>[12]</sup>报道用 HPLC-MS/MS 方法发现铜绿假单胞菌 AS1.2620 能分泌 3 种 AHL 信号分子。本实验比较研究了 LC-MS/MS 和报告菌法检测 11 株水产品源致病菌和腐败菌的群体感应 AHLs 信号分子, 分析结果较一致, 都发现铜绿假单胞菌和气单胞菌为 AHLs 生成菌, LC-MS/MS 还确定了 2 种细菌的 AHLs 信号分子的种类和含量, 并发现希瓦氏菌仅分泌低含量的 AHLs。可见, 生物报告菌法检测 AHLs 操作简便, 但只能定性, 且灵敏度低, 适用于初筛, 而 LC-MS/MS 可用于多种 AHLs 信号分子的同时定性和定量检测, 具有灵敏性与准确性更高的优点。

本研究发现 *P. aeruginosa* ATCC 9027 和 *P. aeruginosa* ATCC 15692 均产生高浓度的 AHLs, 并且以 3-oxo-C<sub>12</sub>-HSL 为主。铜绿假单胞菌是群体感应研究最广泛和较深入的革兰氏阴性菌, 报道其有 3 套已知的 QS 系统, 其中 2 套是 AHL-依赖的 QS 系统, 分别诱导合成 3-oxo-C<sub>12</sub>-HSL 和 C<sub>4</sub>-HSL 调控目标基因的表达。Smith 等<sup>[17]</sup>发现假单胞菌 AHLs 缺陷株生长和毒力因子的表达下降, 表明 AHLs 对胞外酶和绿脓素等表型的表达有一定的调节作用。假单胞菌通过 AHLs 启动腐败因子的表达引起牛奶变质<sup>[18]</sup>。腐败希瓦氏菌仅检测到一定量的 C<sub>4</sub>-HSL。Tait 等<sup>[19]</sup>报道部分希瓦氏菌分离株会产生 AHLs, 并且发现生物膜形成早期检测到长链 AHL 存在, 而在末期则更多的是短链 AHL。假单胞菌和腐败希瓦氏菌是生鲜水产品贮藏过程中特定腐败菌, 腐败菌产生 AHLs 可能参与食品腐败变质过程的调控。

大肠杆菌 O157:H7、沙门氏菌和嗜水气单胞菌是水产品常见的致病菌, 其中在 *A. hydrophila*

A2 中发现了含量较高的 C<sub>4</sub>-HSL。Defoirdt 等<sup>[20]</sup>发现水产品致病菌嗜水气单胞菌和杀蛙气单胞菌 (*A. salmonicida*) 通过 AHLs 的群体感应信号分子调节毒力因子的表达。而沙门氏菌和大肠杆菌 O157:H7 几乎不含 AHL 信号分子,可能是由于这 2 种细菌编码 LuxR 家族的信号受体-SdiA,但不含 LuxL 类似物,不产生 AHLs<sup>[21-22]</sup>。并且大肠杆菌和肠炎沙门氏菌有第 2 套系统,即 LuxS 系统,能产生 AI-2,该信号分子对肠道致病菌尤为重要<sup>[23]</sup>。在创伤弧菌、副溶血性弧菌和溶藻弧菌中都未检出 QS 的 AHLs 信号分子,可能与弧菌科存在特有的 CAI-1 和 AI-2 信号分子有关<sup>[24]</sup>。可见,细菌中的信号分子种类是十分丰富的。

#### 参考文献:

- [ 1 ] Yano Y, Hamano K, Satomi M, *et al.* Prevalence and antimicrobial susceptibility of *Vibrio* species related to food safety isolated from shrimp cultured at inland ponds in Thailand [ J ]. *Food Control*, 2014, 38: 30 - 36.
- [ 2 ] Gram L, Ravn L, Rasch M, *et al.* Food spoilage-interactions between food spoilage bacteria [ J ]. *International Journal of Food Microbiology*, 2002, 78: 79 - 97.
- [ 3 ] Bassler B L, Greenberg E P, Stevens A M. Cross-species induction of luminescence in the quorum-sensing bacterium *Vibrio harveyi* [ J ]. *Journal of Bacteriology*, 1997, 179(12): 4043 - 4045.
- [ 4 ] Whitehead N A, Barnard A M, Slater H, *et al.* Quorum-sensing in gram-negative bacteria [ J ]. *FEMS Microbiology Reviews*, 2001, 25(4): 365 - 404.
- [ 5 ] Miller M B, Bassler B L. Quorum sensing in bacteria [ J ]. *Annual Reviews in Microbiology*, 2001, 55(1): 165 - 199.
- [ 6 ] Holden M T, McGowan S J, Bycroft B W, *et al.* Cryptic carbapenem antibiotic production genes are widespread in *Erwinia carotovora*: facile trans activation by the carR transcriptional regulator [ J ]. *Microbiology*, 1998, 144(6): 1495 - 1508.
- [ 7 ] Martinez M S, Uyttendaele M, Demolder V, *et al.* Effect of temperature and glucose connection on the N-butanoyl-L-homoserine lactone production by *Aeromonas hydrophila* [ J ]. *Food Microbiology*, 2005, 12: 145 - 149
- [ 8 ] Swift S, Karlyshev A V, Fish L, *et al.* Quorum sensing in *Aeromonas hydrophila* and *Aeromonas salmonicida*: identification of the LuxRI homologs AhyRI and AsaRI and their cognate N-acyl homoserine lactone signal molecules [ J ]. *Journal of Bacteriology*, 1997, 179(17): 5271 - 5281.
- [ 9 ] Kai K, Tani A, Hayashi H. Facile preparation of deuterium-labeled N-acyl homoserine lactones as internal standards for isotope dilution mass spectrometry [ J ]. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 2010, 18(11): 3776 - 3782.
- [ 10 ] Qi G H, Dong M S, Wu S M, *et al.* Determination of signal molecules N-acyl-homoserine lactones by HPLC-MS [ J ]. *Journal of Instrumental Analysis*, 2007, 26(3): 417 - 419. [ 綦国红,董明盛,吴胜明,等. HPLC-MS 法检测 N-酰基 - 高丝氨酸内酯类信号分子. *分析测试学报*, 2007, 26(3): 417 - 419. ]
- [ 11 ] Ravn L, Christensen A B, Molin S, *et al.* Methods for detecting acylated homoserine lactones produced by Gram-negative bacteria and their application in studies of AHL-production kinetics [ J ]. *Journal of Microbiological Methods*, 2001, 44(3): 239 - 251.
- [ 12 ] Ma C C, Li B L, Ou J, *et al.* Detection of N-acyl-homoserine lactones class signal molecules of quorum sensing secreted by bacteria using high performance liquid chromatography-mass spectrometry/mass spectrometry [ J ]. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 2010, 38(10): 1428 - 1432. [ 马晨晨,李柏林,欧杰,等. 高效液相色谱 - 串联质谱法同时测定细菌群体感应效应的 11 种 AHLs 类信号分子. *分析化学*, 2010, 38(10): 1428 - 1432. ]
- [ 13 ] McLean R J C, Pierson L S III, Fuqua C. A simple screening protocol for the identification of quorum signal antagonists [ J ]. *Journal of Microbiological Methods*, 2004, 58(3): 351 - 360.
- [ 14 ] Ortori C A, Dubern J F, Chhabra S R, *et al.* Simultaneous quantitative profiling of N-acyl-L-homoserine lactone and 2-alkyl-4(1H)-quinolone families of quorum-sensing signaling molecules using LC-MS/MS [ J ]. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2011, 399(2): 839 - 850.
- [ 15 ] McClean K H, Winson M K, Fish L, *et al.* Quorum sensing and *Chromobacterium violaceum*: exploitation of violacein production and inhibition for the detection of N-acylhomoserine lactones [ J ]. *Microbiology*, 1997, 143(12): 3703 - 3711.
- [ 16 ] Fuqua C, Burbea M, Stephen C W. Activity of the *Agrobacterium* Ti plasmid conjugal transfer regulator TraR is inhibited by the product of the traM gene [ J ]. *Journal of Bacteriology*, 1995, 177(5):

- 1367 – 1373.
- [17] Smith R S, Iglewski B H. *P. aeruginosa* quorum-sensing systems and virulence [J]. *Current Opinion in Microbiology*, 2003, 6(1):56 – 60.
- [18] Shobharani P, Agrawal R. Interception of quorum sensing signal molecule by furanone to enhance shelf life of fermented milk [J]. *Food Control*, 2010, 21(1):61 – 69.
- [19] Tait K, Williamson H, Atkinson S, *et al.* Turnover of quorum sensing signal molecules modulates cross-kingdom signaling [J]. *Environmental Microbiology*, 2009, 11(7):1792 – 1802.
- [20] Defoirdt T, Boon N, Bossier P, *et al.* Disruption of bacterial quorum sensing: an unexplored strategy to fight infections in aquaculture [J]. *Aquaculture*, 2004, 240(1):69 – 88.
- [21] Michael B, Smith J N, Swift S, *et al.* SdiA of *Salmonella enterica* is a LuxR homolog that detects mixed microbial communities [J]. *Journal of Bacteriology*, 2001, 183(19):5733 – 5742.
- [22] Kanamaru K, Kanamaru K, Tatsuno I, *et al.* SdiA, an *Escherichia coli* homologue of quorum-sensing regulators, controls the expression of virulence factors in enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 [J]. *Molecular Microbiology*, 2000, 38(4):805 – 816.
- [23] Surette M G, Miller M B, Bassler B L. Quorum sensing in *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, and *Vibrio harveyi*; a new family of genes responsible for autoinducer production [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1999, 96(4):1639 – 1644.
- [24] Zhu J, Mekalanos J J. Quorum-sensing-dependent biofilms enhance colonization in *Vibrio cholerae* [J]. *Developmental Cell*, 2003, 5(4):647 – 656.

## Detection of N-acylated-L-homoserine lactones of quorum sensing secreted by pathogen and spoilage bacteria from aquatic product using liquid chromatography-mass spectrometry/mass spectrometry

HUANG Xuzhen, ZHU Junli\*, ZHAO Erke, LIANG Xinle

(College of Food Science & Biotechnology Engineering of Zhejiang Gongshang University, Hangzhou 310018, China)

**Abstract:** To evaluate the N-acylated-L-homoserine lactones (AHLs) profiling of quorum sensing signal molecules of pathogen and spoilage bacteria from aquatic product, the technique of LC-MS/MS detecting simultaneously the AHLs was developed, compared with biosensor method. The results showed that *Aeromonas hydrophila* A2 and two strains of *Pseudomonas aeruginosa* secreted AHLs by biosensors *Chromobacterium violaceum* CV026 and *Agrobacterium tumefaciens* A136. The LC-MS/MS technique could be applied to qualitative and quantitative analysis of 11 kinds of AHLs. High levels of AHLs with 3-oxo-C<sub>12</sub>-HSL and C<sub>4</sub>-HSL being the most prominent were produced by *P. aeruginosa* and *A. hydrophila*, respectively. Low content of AHLs with C<sub>4</sub>-HSL was secreted by *S. putrefaciens* XH4, whereas no AHLs were detected in *Salmonella* ATCC 14028-3, *Escherichia. coli* O157:H7 and three species of *Vibro*. The production of AHLs of *P. aeruginosa* ATCC 9027 increased with the growth of bacteria, and the highest level of AHLs was observed after 12 h culture. Thus, the LC-MS/MS methodology can provide comprehensive profiles and concentration of AHLs in single sample, with high accuracy and sensitivity. Furthermore, *P. aeruginosa* and *A. hydrophila* produced the higher level of AHLs of quorum sensing signal molecules among 11 strains of pathogen and spoilage bacteria from aquatic product, which will provide the good foundation to explore the mechanism and control of these bacteria.

**Key words:** quorum sensing; AHLs; detection; LC-MS/MS

**Corresponding author:** ZHU Junli. E-mail: junlizhu0305@163.com