

## 不动杆菌属中 *aidE* 基因编码高丝氨酸内酯酶

刘春妍\*, 郭松\*, 艾力·吐热克, 张俊威, 张力群

中国农业大学 植物病理系, 北京 100193

刘春妍, 郭松, 艾力·吐热克, 等. 不动杆菌属中 *aidE* 基因编码高丝氨酸内酯酶. 生物工程学报, 2017, 33(9): 1625-1639.  
Liu CY, Guo S, Turak A, et al. *AidE* encodes an *N*-acyl homoserine lactonase in *Acinetobacter*. Chin J Biotech, 2017, 33(9): 1625-1639.

**摘要:** 群体感应 (Quorum sensing, QS) 是细菌在进化过程中形成的依赖于群体密度的细菌间交流方式。许多革兰氏阴性细菌以 *N*-酰基高丝氨酸内酯 (AHL) 为信号分子, 感应自身群体密度并调控致病基因表达。因此, 淬灭 AHLs 信号分子可防治此类细菌引起的植物病害。本实验室前期已筛选得到了一株具有 AHLs 信号降解能力的不动杆菌菌株 *Acinetobacter* sp. 77, 本研究通过基因组文库筛选, 自菌株 77 中克隆得到具有 AHLs 降解活性的基因 *aidE*。该基因编码 268 个氨基酸。序列一致性比较发现 *aidE* 的氨基酸序列与吉伦伯不动杆菌 *Acinetobacter gyllenbergii* CIP110306 中  $\beta$ -内酰胺酶一致性高达 95%, 但与已知的 AHLs 降解酶序列一致性较低, 最高为缓黄分支杆菌 *Mycobacterium lentiflavum* 中 AHL 内酯酶 AttM/AiiB 家族蛋白 (CQD23908.1), 一致性仅为 33%。通过高压液相色谱 (HPLC) 分析 *AidE* 蛋白处理 *N*-己酰基高丝氨酸内酯 (C6-HSL) 的反应产物, 证明 *aidE* 为 AHL 内酯酶。序列比对研究发现, *aidE* 基因在不动杆菌属中并不保守, 其在菌株 77 基因组中的上下游的基因排列存在菌株水平的特异性, 且 *aidE* 基因下游存在疑似 IS 插入序列, 上述证据表明 *aidE* 基因有可能是通过水平转移进入 *Acinetobacter* sp. 77 基因组中, 或其基因组中的位置发生过重排。表达 *aidE* 的软腐果胶杆菌 Z3-3 中完全检测不到 AHLs 信号产生, 且致病力明显降低。综上所述, *aidE* 为新发现的 AHL 内酯酶。在防治依赖 QS 系统表达致病性的细菌病害中具有应用潜力。

**关键词:** 群体感应, 酰基高丝氨酸内酯, 不动杆菌, *aidE*

## *AidE* encodes an *N*-acyl homoserine lactonase in *Acinetobacter*

Chunyan Liu\*, Song Guo\*, Ali Turak, Junwei Zhang, and Liqun Zhang

Department of Plant Pathology, China Agricultural University, Beijing 100193, China

**Abstract:** Quorum sensing (QS) is a cell-cell communication mechanism that allows bacterial populations to coordinate

**Received:** April 12, 2017; **Accepted:** July 14, 2017

**Supported by:** National Natural Science Foundation of China (Nos. 31272082, 31572045), National Basic Research Program of China (973 Program) (No. 2015CB150605), National Key Research and Development Program (No. 2017YFD0201108).

**Corresponding author:** Liqun Zhang. Tel: +86-10-62731464; E-mail: zhanglq@cau.edu.cn

\*These authors contribute equally to this study.

国家自然科学基金 (Nos. 31272082, 31572045), 国家重点基础研究发展计划 (973 计划) (No. 2015CB150605), 国家重点研发计划重点专项 (No. 2017YFD0201108) 资助。

gene expression in response to cell density. *N*-acylhomoserine lactones (AHL) are used as quorum-sensing signal molecules by many Gram negative bacteria. *Acinetobacter* sp. 77, an AHL-degrading bacterium, was isolated in our previous work. The gene *aidE* for AHL inactivation was cloned in this study by screening a genomic DNA library. The deduced protein AidE is 268 amino acids in length and shares a high identity (95%) with the beta-lactamase family protein in *Acinetobacter gyllenbergii* CIP110306, but low identities with known AHL-degrading enzymes. HPLC analysis of the AidE-degraded C6-HSL products revealed that AidE functioned as an AHL lactonase. Sequences alignment suggested that the *aidE* gene is not conserved in *Acinetobacter* species, flanking sequences of *aidE* and their arrangement are specific in *Acinetobacter* sp. 77 genome, and some IS insertion sequences were found downstream of the *aidE* gene. These evidences indicated that the *aidE* gene might be foreign DNA taken up via horizontal gene transferring or had changed its relative location due to the genome rear-arrangement. Expression of the *aidE* gene in *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* Z3-3 significantly reduced its AHL production as well as the pathogenicity on host plants, indicating that AidE was able to effectively quench quorum sensing-dependent functions in bacteria. In conclusion, *aidE* is a newfound AHL-lactonase with a potential for suppression of bacterial infections.

**Keywords:** quorum sensing (QS), *N*-acylhomoserine lactones (AHL), *Acinetobacter* sp., *aidE*

群体感应(Quorum sensing, QS)是细菌间典型的群体密度依赖型交流方式。具有 QS 系统的细菌能够合成并向胞外分泌小分子信号。信号分子在胞外环境中积累并被细菌识别,用来检测自身群体密度。当细菌的群体密度达到一定阈值时,信号分子和相应受体蛋白结合,启动下游相关基因的表达<sup>[1]</sup>。

QS 系统在革兰氏阴性细菌中广泛存在,植物病原细菌中绝大多数以 *N*-酰基高丝氨酸内酯(AHL) 为信号分子,调控致病性的表达,如:胡萝卜软腐果胶杆菌 *Pectobacterium carotovorum* 中植物细胞壁降解酶等毒力因子的表达<sup>[2]</sup>;根癌土壤杆菌 *Agrobacterium tumefaciens* 中 Ti 质粒的转移<sup>[3]</sup>;西瓜食酸菌 *Acidovorax citrulli* 的游动性和在甜瓜植株及果实上的致病力<sup>[4]</sup>;丁香假单胞菌 *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* 在宿主植物上的定殖及致病性<sup>[5]</sup>等。因此,淬灭 AHL 信号分子以破坏细菌 QS 调控功能是防治此类病害的可行策略。

目前已发现的 AHLs 信号降解酶包括内酯酶(AHL-lactonase)、酰基转移酶(AHL-acylase)

和氧化还原酶(Oxidoreductases)三大类<sup>[6-8]</sup>。AHL 内酯酶通过水解 AHLs 的内酯键产生脂酰高丝氨酸,破坏信号分子结构。已报道的 AHL 内酯酶根据其蛋白结构及金属离子依赖性的差异可分为不同类群,包括以蜡样芽胞杆菌 *Bacillus cereus* 240B1 中 AiiA<sub>240B1</sub> 为代表的金属-β-内酰胺类降解酶<sup>[9]</sup>,苍白杆菌 *Ochrobactrium* sp. T63 中 AidH<sup>[10]</sup>所属的 α/β-水解酶家族降解酶,红串红球菌 *Rhodococcus erythropolis* 中磷酸三脂酶家族的 QsdA<sup>[11]</sup>,根瘤菌 *Rhizobium* sp. strain NGR234 中双烯内酯水解酶家族的 DhIR<sup>[8]</sup>等。近年来利用宏基因组学方法的研究增加了 AHLs 降解酶的多样性。2008 年 Riaz 等从宏基因组文库中筛选到编码 AHL-内酯酶活性的 *qlcA* 基因。2009 年 Schipper 等通过宏基因组学筛选到 4 个 AHL-内酯酶: BpiB01、BpiB04、BpiB07 和 BpiB05,其中 BpiB07 与已知的内酯酶具有一致性,为双烯内酯水解酶家族蛋白, BpiB04 为糖基水解酶家族蛋白,而 BpiB01 和 BpiB05 则与已报道的 AHL-内酯酶没有明显的同源性<sup>[12-13]</sup>。表达 *aiiA* 基因的软腐果胶杆菌 *P. carotovorum*

AHLs 产量明显减少,在马铃薯、白菜、茄子、胡萝卜和芹菜上造成的软腐症状明显减弱<sup>[9]</sup>。表达 AiiA 内酯酶的转基因植物马铃薯、烟草、拟南芥等提高了对软腐病菌的侵染抗性,植物不发病或发病时间延后<sup>[14-17]</sup>。

本实验室在新疆阿瓦提县植物根围土壤中筛选到了一株具有 AHLs 信号分子降解能力的菌株 77,经 16S rRNA 基因序列分析鉴定为不动杆菌属 *Acinetobacter* 细菌。本文通过基因组文库筛选和亚克隆分析,得到具有 AHL 信号降解功能的基因 *aidE*,明确了 AidE 降解 AHL 信号的机制,并初步研究了其生物学及生物防治功能,为植物病害生防提供新的资源。

## 1 材料与方法

### 1.1 细菌菌株、质粒及生长条件

本实验中所用菌株和质粒分别列于表 1。不动杆菌 77、荧光假单胞菌 2P24 和软腐果胶杆菌 Z3-3 在 LB (Luria-Bertani) 培养基 (蛋白胨 10 g/L, 酵母提取物 5 g/L, NaCl 5 g/L) 中 28 °C 培养;大肠杆菌 DH5 $\alpha$ 、BL21 及其衍生菌株在 LB 培养基中 37 °C 培养;土壤杆菌 NTL4 (pZLR4) 在 ABM 基本培养基 (每 100 mL 中含 20 $\times$ 盐溶液 5 mL、20 $\times$ 缓冲液 5 mL、10% 甘露醇 2 mL 和无菌水 88 mL。其中 20 $\times$ 盐溶液: NH<sub>4</sub>Cl 20 g/L、KCl 3 g/L、MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 6 g/L、CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O 0.2 g/L、FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.06 g/L, 调节 pH 为 7.2; 20 $\times$ 缓冲液: NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 23 g/L、K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 60 g/L, 调节 pH 为 7.0; 储存液分别高压灭菌保存) 中 28 °C 培养。抗生素使用终浓度分别为: 氨苄青霉素 (Ap) 50  $\mu$ g/mL, 卡那霉素 (Km) 50  $\mu$ g/mL, 氯霉素 (Cm) 20  $\mu$ g/mL, 庆大霉素 (Gm) 30  $\mu$ g/mL。

5-溴-4-氯-3-吡啶- $\beta$ -D-半乳糖苷 (X-Gal) 使用终浓度 40  $\mu$ g/mL。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 DNA 试验操作

细菌染色体及质粒 DNA 的提取、限制性内切酶酶切分析和 PCR 参见分子克隆实验技术手册。核苷酸测序由北京三博远志生物技术有限责任公司完成。核苷酸及其编码的氨基酸序列通过 NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) 中的软件分析。

#### 1.2.2 *aidE* 基因的筛选与克隆

*Acinetobacter* sp. 77 基因组文库的构建参照文献[22]。随机挑取菌株 77 基因组文库转化子,接种到 180  $\mu$ L 液体 LB 培养基中,于 28 °C、140 r/min 振荡培养 12 h; 随后加入 15  $\mu$ L (10  $\mu$ mol/L) *N*-3-氧代辛酰基高丝氨酸内酯 (C8-oxo-HSL) 信号分子,混匀后置于摇床上 140 r/min、28 °C 振荡培养 6 h, 分别用信号纯品及纯水作对照; 取 3  $\mu$ L 培养液滴于预先制备的报告菌平板上 (见 1.2.5), 选取阳性克隆并提取质粒, 经过限制性内切酶酶切分析后确定目的片段, 将其连接至质粒 pMD18 并测序 (北京三博远志生物技术有限责任公司)。

#### 1.2.3 *aidE* 基因缺失突变体构建及 AHL 信号降解功能检测

根据 *aidE* 基因及侧翼序列的测序结果, 设计两对引物 77-a、77-b 和 77-c 和 77-d (表 2), 分别以 pQ30 为模板, PCR 扩增得到 *aidE* 基因上下两段侧翼序列。PCR 扩增条件为: 94 °C 变性 5 min; 94 °C 变性 40, 55 °C 复性 40, 72 °C 延伸 1 min, 循环数为 35; 72 °C 充分延伸 10 min。两条 PCR 产物经相应限制性内切酶酶切后连接同一载体 pSR47s, 得到重组自杀载体 pSR47 $\Delta$ *aidE* (图 1)。将 pSR47 $\Delta$ *aidE* 转化 DH5 $\alpha$ ( $\lambda$ -pir),

表 1 菌株和质粒

Table 1 Strains and plasmids

Strains and plasmids	Characteristics	Source or reference
<b>Strains</b>		
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> NTL4 (pZLR4)	Gm <sup>r</sup> ; <i>A. tumefaciens</i> NT1 derivative carrying a <i>traG::lacZ</i> reporter fusion	[18]
<i>Escherichia coli</i> DH5 $\alpha$	$\phi$ 80 <i>lacZ</i> $\Delta$ M15 $\Delta$ ( <i>lacZYA-argF</i> ) U169 <i>hsdR17 recA1 endA1 thi-1</i>	[19]
<i>Pectobacterium carotovorum</i> <i>P. carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i> Z3-3	Wild-type	Laboratory stock
Z3-3 (pBBR1MCS-2)	Km <sup>r</sup> ; strain Z3-3 containing pBBR1MCS-2	This paper
Z3-3 (pB77E)	Km <sup>r</sup> ; strain Z3-3 containing pB77E	This paper
<i>Acinetobacter</i> sp. 77	Wild-type	This paper
<i>Acinetobacter</i> sp. 77 $\Delta$ <i>aidE</i>	Derivative of <i>Acinetobacter</i> sp.77, <i>aidE</i> in-frame deletion	This paper
<b>Plasmids</b>		
pBluescript II SK(+)	Ap <sup>r</sup> , ColE1 origin	Stratagene
pMD18	Ap <sup>r</sup> ; ColE1 origin, cloning vector	Laboratory stock
pQ30	Ap <sup>r</sup> ; pMD18 containing a 8.0-kb fragment with AHL-degrading activity	This paper
pHSG399	Cm <sup>r</sup> ; ColE1 origin	TaKaRa
pCH6	Cm <sup>r</sup> ; pHSG399 containing a 1.2-kb <i>Hind</i> III fragment with <i>aidE</i> gene	This paper
pBBR1MCS-2	Km <sup>r</sup> ; <i>Escherichia-Pseudomonas</i> shuttle vector	[20]
pB77E	Km <sup>r</sup> ; pBBR1MCS-2 containing a 1.2-kb <i>Hind</i> III fragment with <i>aidE</i> gene	This paper
pET-22b(+)	Ap <sup>r</sup> ; expression vector	Novagen
pETAidE	Ap <sup>r</sup> ; pET-22b(+) containing <i>aidE</i> gene	This study
pSR47 $\Delta$ <i>aidE</i>	Km <sup>r</sup> ; Suicide plasmid pSR47s containing deleted <i>aidE</i> gene	This paper
pRK600	Cm <sup>r</sup> ; ColE1 replicon with RK2 transfer region, helper plasmid	[21]

Ap<sup>r</sup>, Km<sup>r</sup>, Gm<sup>r</sup> and Cm<sup>r</sup> indicate resistance to ampicillin, kanamycin, gentamycin and chloromycetin, respectively.

表 2 引物序列

Table 2 Primer sequences

Primer name	Primer sequence (5'-3') <sup>a</sup>	Size (bp)
77-a	<b>TCGAGCTCGTGACGGGGCATGCACC</b>	1 131
77-b	<b>TTGGATCCGCCACATCCTCACCGGG</b>	
77-c	<b>TTGGATCCGGACATGATCCTGAGCAATCG</b>	1 247
77-d	<b>TTGTCGACGCAGCCCGTGTATTGGG</b>	
AidE-F	TAACATATGATGGAAGAAGTTAAATTATATGCC	350
AidE-R	TAACATATGATGGAAGAAGTTAAATTATATGCC	
pQ30-2335	CGCCTTTGTTCTTTATGGAC	1 241
pQ30-3556	CGTGTATTGGGTATTAGTCG	

<sup>a</sup> Bold fonts indicate the recognition sites of the corresponding restriction enzymes.

利用三亲交配将 pSR47 $\Delta$ *aidE* 转入 *Acinetobacter* sp. 77, 筛选二次重组突变体, 并用检测引物 AidE-F、AidE-R (表 2) 进行 PCR 验证, 最终得到 *aidE* 基因缺失菌株。为检测相关菌株 AHL 信号降解功能, 利用 *Agrobacterium tumefaciens* NTL4 (pZLR4) 信号检测系统, 在野生型 *Acinetobacter* sp. 77 和 *aidE* 基因缺失突变体 *Acinetobacter* sp. 77  $\Delta$ *aidE* 发酵液中分别加入 4  $\mu$ L 100  $\mu$ mol/L 的 C8-oxo-HSL 信号分子纯品共培养 4 h, 设置 dd H<sub>2</sub>O 处理的信号纯品作对照。

#### 1.2.4 生长曲线的测定

软腐果胶杆菌 Z3-3 及其相应衍生菌接种于 5 mL 的 LB 培养液中, 28  $^{\circ}$ C、140 r/min 水浴摇培至稳定生长期; 按 1 : 1 000 (V : V) 的比例接于 50 mL 的 LB 培养液中, 28  $^{\circ}$ C、130 r/min 气浴摇培培养; 培养 8 h 后开始取样, 测定其在 600 nm 处的吸光值 ( $OD_{600}$ ), 每 3 h 取样 1 次, 重复 3 次。

#### 1.2.5 AHLs 信号检测

AHL 信号检测平板的制备: 将报告菌根瘤土壤杆菌 *Agrobacterium tumefaciens* NTL4 (pZLR4) 接种于含有 30  $\mu$ g/mL 庆大霉素 (Gm) 的液体 ABM 培养基中, 28  $^{\circ}$ C 培养 16–24 h 后待用; 100 mL 的 ABM 基本培养基冷却至 50  $^{\circ}$ C 左右, 加入 5 mL *A. tumefaciens* NTL4 培养液、终浓度为 30  $\mu$ g/mL 的 Gm 和 40  $\mu$ g/mL 的 X-Gal,

混匀后制备报告菌平板<sup>[18]</sup>。

AHL 信号分子测定: 取 0.5 mL 软腐果胶杆菌 Z3-3 及其衍生菌培养液, 加入等体积的乙酸乙酯充分混匀萃取信号分子, 12 000 r/min 离心 15 min, 吸取上清液, 萃取 3 次。循环水式真空泵真空抽干, 加入 100  $\mu$ L 甲醇溶解; 取 2  $\mu$ L 上述所得信号提取液, 加入 400  $\mu$ L *A. tumefaciens* NTL4 (pZLR4) 培养液 ( $OD_{600}$ =0.8), 28  $^{\circ}$ C、130 r/min 培养 4 h; 12 000 r/min 离心 1 min, 弃上清, 加 100  $\mu$ L dd H<sub>2</sub>O 悬浮细胞; 检测 *A. tumefaciens* NTL4 (pZLR4) 中  $\beta$ -半乳糖苷酶活性<sup>[10]</sup>, 以酶活强弱表示 AHLs 信号分子浓度高低。

#### 1.2.6 致病性的检测

将软腐果胶杆菌 Z3-3 及其衍生菌接种于 LB 培养基, 在 28  $^{\circ}$ C 条件下 130 r/min 培养至  $OD_{600}$ =1.0; 萝卜和马铃薯清水洗净后晾干, 用 70% 的酒精对表面进行消毒处理后切成厚度一致的组织切块。在培养皿中铺一层灭菌吸水纸保湿, 喷洒无菌水后将组织切块置于中央, 组织切块中央针刺接种 5  $\mu$ L 细菌培养液, 28  $^{\circ}$ C 培养箱培养; 大白菜去掉外层叶片, 将内层大小一致的健康叶片置于塑料培养盒中 (盒底部铺两层灭菌纱布), 表面消毒后针刺接种 5  $\mu$ L 细菌培养液于叶柄中央, 盒子四角放置吸水棉球, 28  $^{\circ}$ C 培养箱密封培养。方差分析应用 DPS 分析软件, 95% 置信区间。

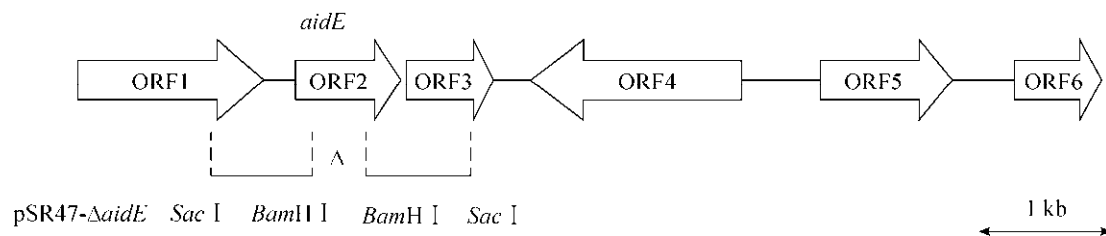


图 1 质粒 pQ30 (ORF2 为 *aidE*) 功能片段的物理图谱及 *aidE* 基因的缺失结构

Fig. 1 Physical map of the functional fragment in pQ30 (the ORF2 represents for *aidE*) and the structure of *aidE* gene deletion mutant.

### 1.2.7 AidE 降解机制分析

通过 Ni-NTA 亲和层析和 AKTA-Purifier (GE Healthcare)层析系统得到精细纯化的 AidE 蛋白。200  $\mu\text{L}$  精细纯化的 AidE 蛋白溶液 (0.3 mg/mL) 与 30  $\mu\text{L}$  (0.05 mol/L) 信号分子 C6-HSL 在 1 mL 反应缓冲液 (50 mmol/L Tris-Cl, 400 mmol/L NaCl, pH 7.0) 中于 37  $^{\circ}\text{C}$  反应 2 h; 200  $\mu\text{L}$  二甲基亚砜 (DMSO) 和 200  $\mu\text{L}$  1 mol/L NaOH 混合, 加入 30  $\mu\text{L}$  (0.05 mol/L) 信号分子 C6-HSL, 37  $^{\circ}\text{C}$  反应 30 min, 利用 NaOH 溶液破坏 AHLs 信号分子的内酯环结构形成降解产物 *N*-酰基高丝氨酸, 作为产物对照; 设不加信号分子的蛋白溶液及未处理的 C6-HSL 信号纯品作空白对照; 上述反应溶液分别用等体积的乙酸乙酯萃取 3 次, 取上清, 真空抽干后用 100  $\mu\text{L}$  甲醇溶解; 用高压液相色谱 (HPLC) 分析反应产物。HPLC 使用 C18 反向色谱柱 (4.6 mm $\times$ 150 mm; Agilent TC-18), 扫描波长 210 nm; 进样体积 5  $\mu\text{L}$ ; 流动相为: 甲醇: 水 (V/V)=40: 60, 0.1% 磷酸; 流量: 0.25 mL/min。

### 1.2.8 aidE 基因序列在不动杆菌中特异性分析

pQ30 中 *aidE* 上下游基因位置关系与已知不动杆菌中基因的排列均不相同。为检测上述特异性基因排列关系是否是由于建库过程中 *Sau3A* I 酶切后的片段拼接错误, 设计引物 pQ30-2335、pQ30-3556 (表 2) 分别以 pQ30、菌株 77 基因组和单菌落为模板进行 PCR 反应。PCR 扩增条件为: 94  $^{\circ}\text{C}$  变性 5 min; 94  $^{\circ}\text{C}$  变性 40 s, 55  $^{\circ}\text{C}$  复性 40 s, 72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 1 min, 循环数为 30; 72  $^{\circ}\text{C}$  充分延伸 10 min。

## 2 结果与分析

### 2.1 aidE 基因的克隆与序列分析

*Acinetobacter* sp. 77 分离自新疆阿瓦提县的

植物根围土壤, 能够降解 AHLs 信号分子。利用 *Agrobacterium tumefaciens* NTL4 (pZLR4) 信号检测系统, 通过对 *Acinetobacter* sp. 77 基因组文库的筛选, 从 2 000 个转化子中筛选到 1 个具有 AHL 信号降解功能的粘粒克隆 pF38。对 pF38 进一步的 *EcoR* I 亚克隆筛选得到具有 AHLs 信号降解功能的阳性克隆 pQ30, 该质粒克隆了约 8 kb 的外源片段, 该序列已提交至 GenBank (登录号为 MF074213)。

测序分析表明 8 kb 片段 (图 1) 编码 6 个开放阅读框 (ORF)。ORF1 为编码 490 个氨基酸的琥珀酸半醛脱氢酶 (Succinate-semialdehyde dehydrogenase); ORF2 为编码 268 个氨基酸的内酰胺酶家族蛋白 (Beta-lactamase); ORF3 编码一个含有 191 个氨基酸的假定蛋白; ORF4、ORF5、ORF6 编码的分别为含有 575 个氨基酸的转录调控因子 (Transcriptional regulator)、含有 331 个氨基酸的苯酚羟化酶 (Phenol hydroxylase) P1 蛋白和酚-2-单氧酶 (Phenol-2-monooxygenase) 的部分序列, 三者同为酚合成基因簇的组成部分。

用 *Hind* III 对 pQ30 进一步亚克隆, 得到包含约 1.2 kb 有信号降解功能片段的阳性克隆 pCH6, 序列分析表明, pCH6 中仅含有一个完整的开放阅读框, 即上述 ORF2。据此确定 *orf 2* 即为编码 AHL 信号降解酶的基因, 命名为 *aidE* (Autoinducers degrading)。

*aidE* 基因共 807 bp, 编码 268 个氨基酸, 推测分子量为 29.48 kDa。序列一致性比较发现, *aidE* 的氨基酸序列与已知的 AHLs 降解酶的氨基酸序列一致性较低, 最高为 *AttM/AiiB* 家族蛋白 (*Mycobacterium lentiflavum*, CQD23908.1), 一致性仅为 33%。然而该蛋白与  $\beta$ -内酰胺酶类

家族蛋白高度一致,与 *Acinetobacter gyllenbergii* CIP110306 中的  $\beta$ -内酰胺酶类家族蛋白 (EPF70788.1) 一致性高达 95%,与恶臭假单胞菌 *Pseudomonas putida* 中的  $\beta$ -内酰胺酶类家族蛋白 (KEX94407.1) 一致性为 93%,与海单胞菌 *Marinomonas* sp. MWYL1 中的  $\beta$ -内酰胺酶类结构

域蛋白 (ABR69113.1) 一致性为 90%。*AidE* 中具有  $\beta$ -内酰胺酶类蛋白的特征序列 105-HLHFDHAG-112 以及与金属水解酶特征序列一致的 177-HTPGHOSL-184。将 *AidE* 与已报道的 AHL 内酯酶进行氨基酸序列比对 (图 2), *AidE* 与  $\beta$ -内酰胺酶蛋白家族类的 AHL 内酯酶一致性较高。

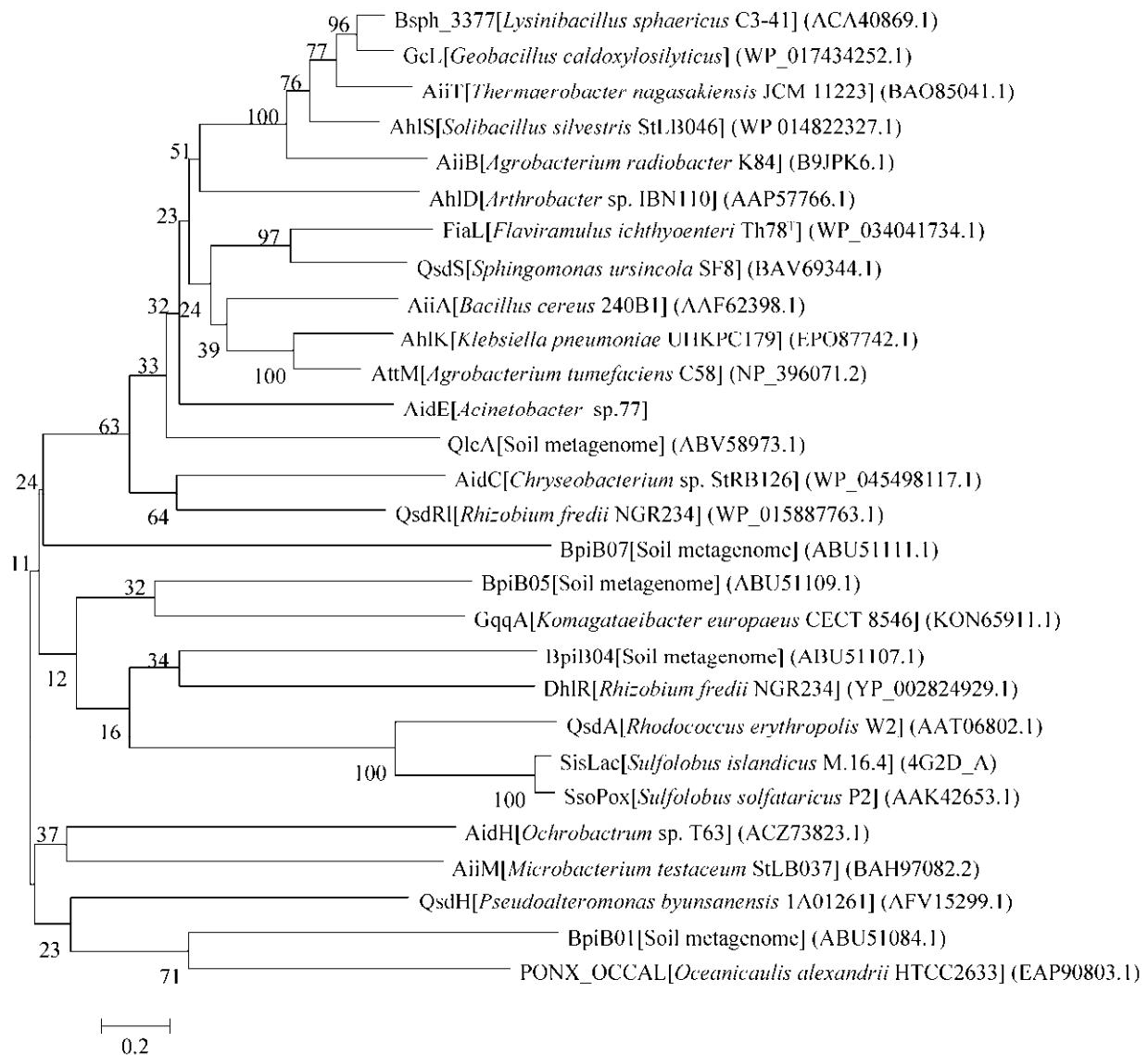


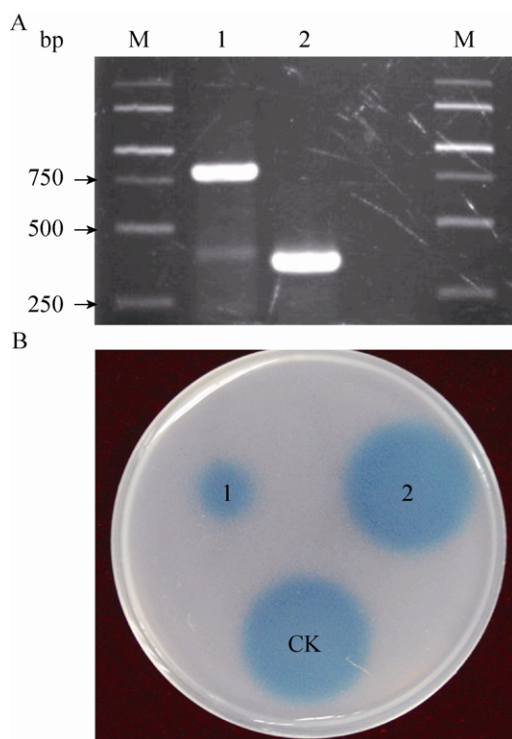
图 2 *aidE* 与已发表 AHL 内酯酶氨基酸序列的系统进化分析

Fig. 2 Phylogenetic analysis of the *aidE* and other published AHL-lactonases. The dendrogram was constructed after ClustalW alignment using Neighbor-Joining and Kimura two-parameter methods subjected to 1 000 bootstrap trials with MEGA 5.05. [9-11,12,13,22-40].

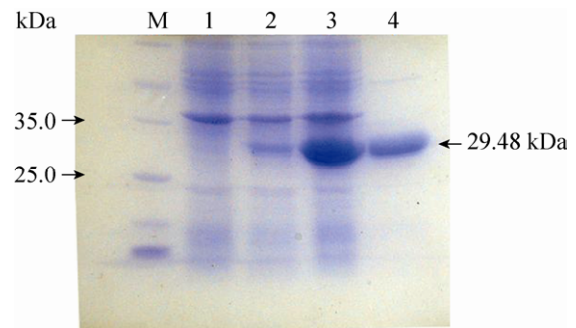
为进一步验证 *aidE* 基因是否为菌株 77 中唯一发挥信号降解功能的基因, 本实验构建了 *aidE* 基因缺失 471 bp 片段的突变体 (图 3 A)。实验结果发现, *aidE* 基因缺失后, 菌株 77 失去信号降解功能 (图 3 B)。由此可见, *aidE* 基因的正常表达是菌株 77 具有信号降解能力的决定性因素。

## 2.2 *aidE* 蛋白降解机制解析

利用表达载体 pETAidE 表达并精细纯化得到融合的 AidE-His<sub>6</sub> 蛋白 (图 4), 分子量与预测结果相同, 约 30 kDa。用精细纯化的 AidE 蛋白



**图 3** *aidE* 基因缺失突变体的构建及其功能验证  
Fig. 3 In-frame deletion of the *aidE* gene (A) and determining the AHL-inactivating function (B) of wild-type *Acinetobacter* sp. 77 (1) and the *aidE* gene deletion mutant *Acinetobacter* sp. 77  $\Delta$ *aidE* (2). M: marker; dd H<sub>2</sub>O as negative control (CK).



**图 4** *aidE* 蛋白的表达与纯化

Fig. 4 Expression and purification of *aidE*. 1: *E. coli* BL21 (pET-22b)(+); 2: *E. coli* BL21 (pETAidE) without induction; 3: *E. coli* BL21 (pETAidE) after induction by IPTG for 4 h in 37 °C; 4: purified AidE protein; M: marker.

处理信号分子 C6-HSL, 以 NaOH 处理 C6-HSL 作为对照<sup>[41]</sup>, 通过高压液相色谱 (HPLC) 对反应产物进行检测分析。结果显示, 在本实验条件下, 信号分子 C6-HSL 的保留时间 (Retention time) 为 26.0 min (图 5 A), C6-HSL 经 NaOH 处理的降解产物 *N*-己酰基-高丝氨酸 (C6-HS) 保留时间为 21.9 min (图 5 C)。用纯化的 AidE 蛋白与 C6-HSL 信号分子反应后, 出现保留时间为 22.0 min 和 25.9 min 的两种化合物 (图 5 D)。比对分析可知二者分别为 AidE 蛋白作用于 C6-HSL 的降解产物 C6-HS (图 5 D), 与未反应的 C6-HSL 信号分子 (图 5 D)。通过降解产物分析可知, AidE 为 AHL-内酯酶。AidE 蛋白作用于 AHLs 信号分子的内酯键, 形成降解产物 C6-HS。

除 C6-HSL 信号外, AidE 对 C10-HSL、*N*-3-氧代己酰基高丝氨酸内酯 (3-oxo-C6-HSL)、3-oxo-C8-HSL 和提取自荧光假单胞 2-79 的 *N*-羟基高丝氨酸内酯类信号分子混合物具有降解活性, 表明其 AHL 降解活性没有明显的底物特异性 (数据未显示)。



### 2.3 *aidE* 基因表达对软腐果胶杆菌 Z3-3 生物学性状及致病性影响

胡萝卜软腐欧文氏菌 Z3-3 能够引起胡萝卜、白菜、马铃薯等多种作物的软腐病。其毒力因子植物细胞壁降解酶等的合成受到 QS 系统严格调控<sup>[42]</sup>。将携带有 *aidE* 基因的载体 pB77E 导入菌株 Z3-3 中,检测其生长趋势、AHLs 信号的产生以及对致病性的影响。

结果显示,表达 *aidE* 基因的菌株 Z3-3 (pB77E)的生长趋势与野生型菌株 Z3-3 及空载体对照菌株 Z3-3 (pBBR1MCS-2)在各个阶段均无明显差异(图 6 A),说明 *aidE* 基因的表达对菌株 Z3-3 的生长没有影响。菌株 Z3-3 和 Z3-3

(pBBR1MCS-2)在培养前期信号产量较大,培养 18–21 h 时信号产量达到最大值,而后随着培养时间的增加信号产量逐步降低,而在菌株 Z3-3 (pB77E) 中始终未检测到信号产生(图 6 B)。说明 *aidE* 基因的表达能够完全降解菌株 Z3-3 合成的信号分子。以上菌株针刺接种白萝卜、马铃薯和大白菜,结果显示接种菌株 Z3-3 和 Z3-3 (pBBR1MCS-2) 后能够在上述植物组织上形成明显的软腐症状,而 *aidE* 基因的表达能显著降低病原菌 Z3-3 的致病能力(图 6 C,表 3)。综上,*aidE* 基因能够通过降解细菌产生的 AHLs 信号分子影响其群体感应系统,从而抑制群体感应系统调控的致病性。

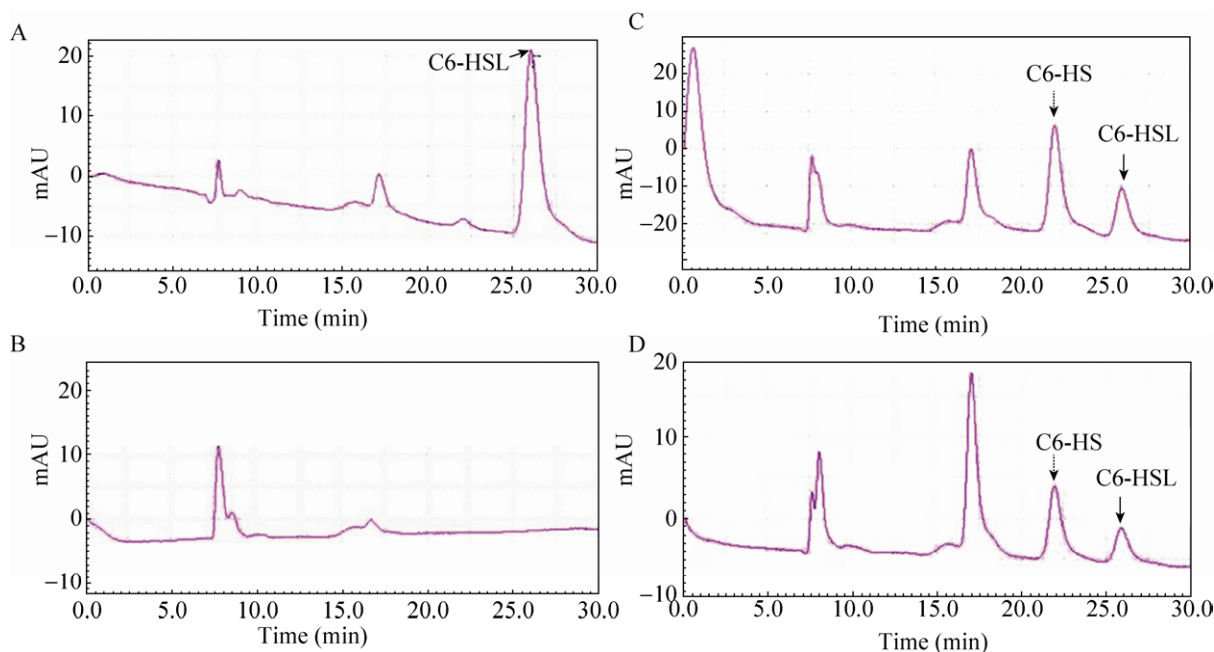


图 5 HPLC 分析 AidE 降解 C6-HSL 机制

Fig. 5 HPLC analysis of the AidE-degraded product of *N*-hexanoyl-L-homoserine lactone (C6-HSL). (A) Reaction buffer containing C6-HSL. (B) Reaction buffer containing pure AidE protein. (C) C6-HSL degraded by NaOH. (D) C6-HSL degraded by AidE, the solid and dotted arrows represent for C6-HSL and its degraded product *N*-hexanoyl-L-homoserine(C6-HS), respectively.

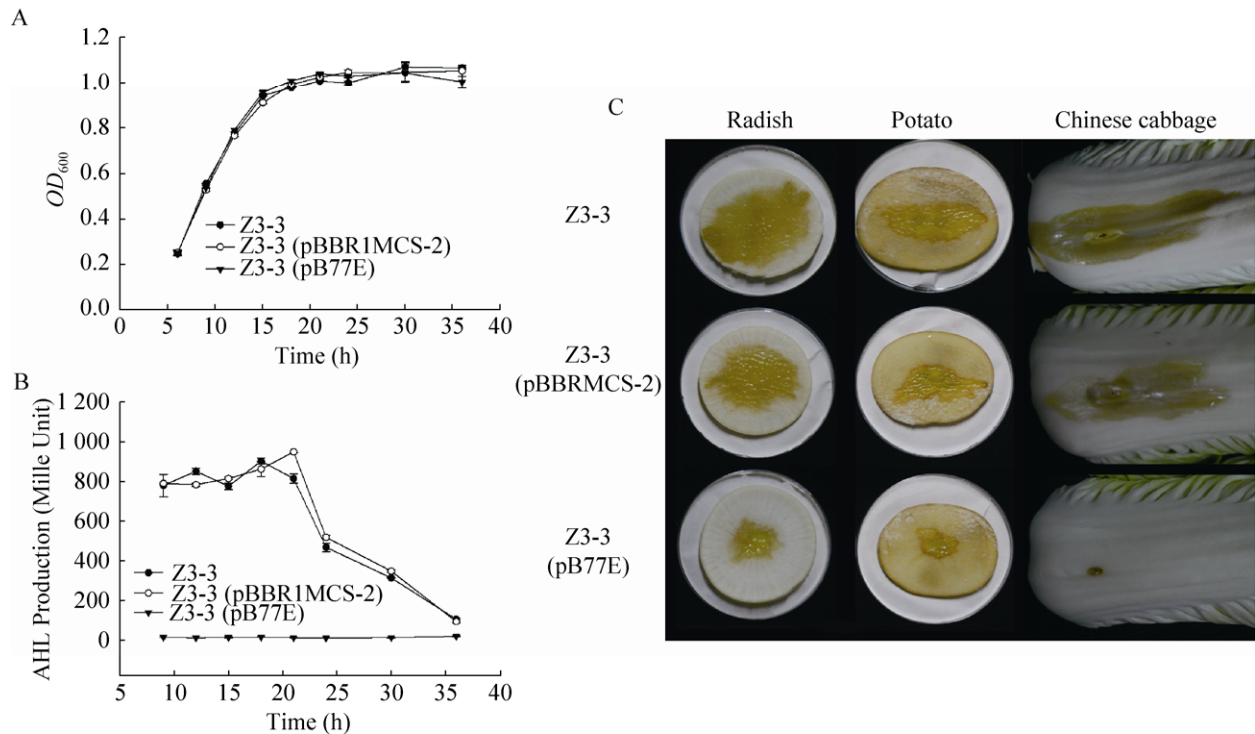


图 6 *aidE* 对软腐果胶杆菌 Z3-3 生长、AHL 产量和致病性的影响

Fig. 6 Effect of *aidE* on bacterial growth (A), extracellular AHLs accumulation (B) and pathogenicity (C) in *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* Z3-3.

表 3 果胶杆菌对植物组织致病性分析

Table 3 Pathogenicity assay of *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* strains on plant tissues

Plant	Tissue	Maceration area (cm <sup>2</sup> )		
		Z3-3	Z3-3 (pBBR1MCS-2)	Z3-3 (pB77E)
Radish	Root	28.68±7.35 a	20.17±2.20 a	6.13±0.31 b
Potato	Tuber	8.43±1.13 a	6.83±1.00 a	3.89±0.49 b
Chinese cabbage	Leaf	7.64±4.76 a	6.44±0.42 a	0.27±0.04 b

All experiments were performed in triplicate, and the mean  $\bar{x} \pm s$  are indicated; a,b indicate statistically significant differences ( $P < 0.05$ ).

#### 2.4 *aidE* 基因序列在不动杆菌中特异性分析

通过对 *AidE* 氨基酸序列一致性比对发现, *aidE* 基因在不动杆菌属中并不保守。在已知不动杆菌基因组中, 仅在 *Acinetobacter gyllenbergii* 和鲍氏不动杆菌 *A. baumannii* 144107 中找到一

致性较高的编码基因。与其他属细菌对比发现, *P. putida* 与 *Marinomonas* sp. MWYL1 中也含有一致性较高的 *aidE* 同源基因。

对 pQ30 中 *aidE* 上下游基因结构进行一致性比对分析发现, 上游琥珀酸半醛脱氢酶 (ORF1)

基因在不动杆菌属中不保守,虽然在 *A. gyllenbergii* 中发现该基因的存在,但不动杆菌其他种中并未发现该基因。下游假定蛋白 (ORF3) 基因在不动杆菌属中不保守,只在 *A. baumannii* 144107 和 *A. gyllenbergii* 种的一些菌株中发现该基因。下游转录调控因子 (ORF4)、苯酚羟化 P1 蛋白(ORF5) 和酚-2-单氧酶 (ORF6) 组成的酚合成基因簇在不动杆菌中却是保守存在的。虽然在 *A. gyllenbergii* 和 *A. baumannii* 144107 中未发现酚合成基因簇相关基因,但在不动杆菌其他种中,酚合成基因簇下游基因高度保守,上游基因在种间存在差异,但均未发现 *AidE* 一致性高的

蛋白及其他  $\beta$ -内酰胺酶类蛋白。

pQ30 中 *AidE* 上下游基因位置关系与已知不动杆菌中基因的排列均不相同。为了检测上述特异性基因排列关系是否是由于文库构建过程中 *Sau3A I* 酶切后拼接错误,利用引物 pQ30-2335 和 pQ30-3556 分别以 pQ30、菌株 77 基因组和单菌落为模板进行 PCR 反应。结果显示, pQ30、菌株 77 基因组和单菌落中均能扩增出相同条带(图 7B),说明 *aidE* 基因在菌株 77 基因组中的上下游的基因排列与 pQ30 中的亚克隆片段分析结果相同,菌株 77 基因组中存在一段与其他已知不动杆菌不同的特异性序列。

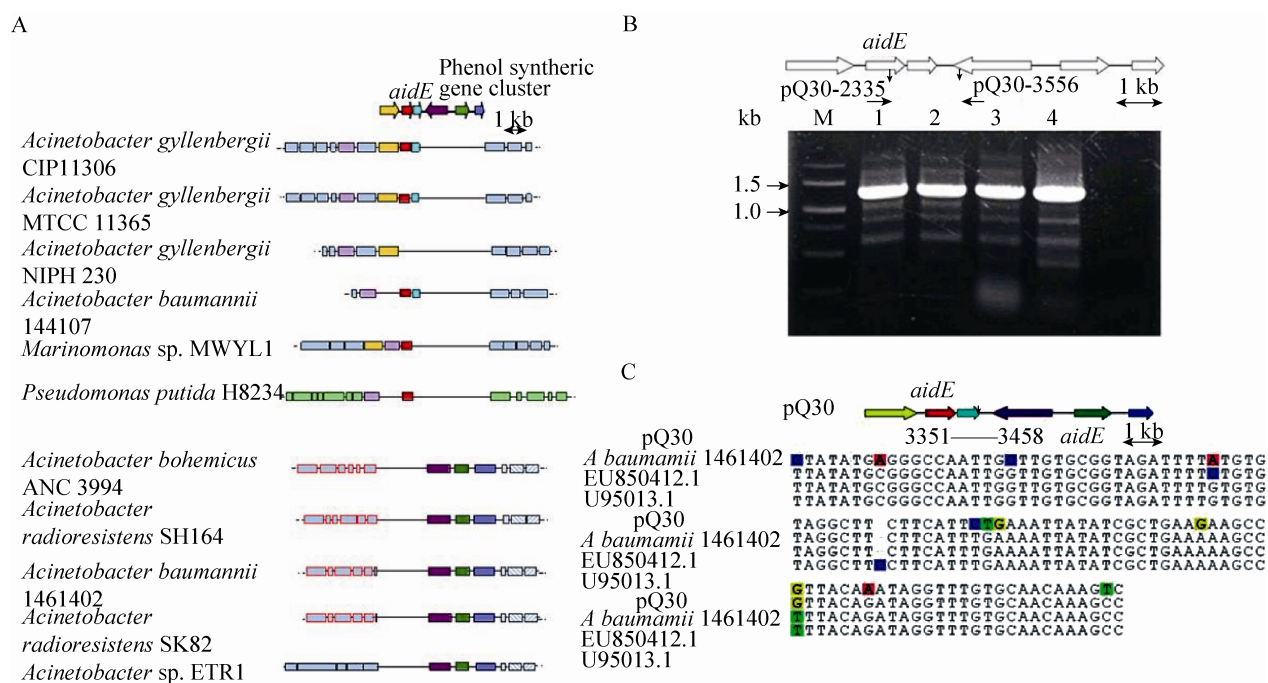


图 7 *aidE* 基因的特异性分析

Fig. 7 The specificity analysis of the *aidE* gene. A: Localization of the *aidE* and its neighboring genes in genomes of different bacterial species. B: The specificity detection of the fragment which has the function of AHL signal degradation in pQ30. C: Nucleotide consistency of the suspected IS sequence in pQ30 with its homologous in *A. baumannii* 1461402, insertion sequence IS17 TnpA (*tnpA*) gene (EU850412.1) in *A. baumannii* and insertion sequence IS17 putative transposase gene (U95013.1) in *A. haemolyticus*.

对 pQ30 中的亚克隆片段核苷酸序列进一步分析发现, 在 *aidE* 基因 (pQ30: 1624-2431) 下游 919 bp (pQ30-3350) 处存在一段 107 bp 的疑似 IS 插入序列 (图 7C), 与 *A. baumannii* 中的 IS 插入序列基因 ISAba9 TnpA (*tnpA*)、IS17 TnpA (*tnpA*) (EU850412.1) 和溶血不动杆菌 (*A. haemolyticus*) 中的 IS 插入序列 IS17 假定转座酶基因 (U95013.1) 一致性高达 97%。在 *A. baumannii* 1461402 中, 在酚合成基因簇下游同样发现了两段与 pQ30 中疑似 IS 插入序列一致性高达 97% 的同向重复序列, 二者间隔约 20 kb, 且一致性高的片段附近基因编码转座酶家族蛋白增变 (Mutator) 家族转座酶蛋白 (EXB34237.1) 等。而 *P. putida* H8234 中 *AidE* 一致性较高蛋白上下游存在多个转座酶基因, 推测在 *P. putida* H8234 基因组中此位置可能来源于基因的水平转移。*aidE* 基因在不动杆菌属中的不保守存在, 可能是水平转移或基因组重排的结果。

### 3 讨论

病原细菌的群体感应系统调控多种与致病性密切相关的生物学功能。应用 AHL 信号降解酶防治植物细菌病害的策略主要包括两个方面: 1) 构建转基因植物, 降解病原菌的 AHL, 从而抑制病原菌侵染<sup>[43]</sup>; 2) 以 AHL 降解细菌为生防菌防治植物病害<sup>[8,44]</sup>。

序列相似性比较发现, *aidE* 的氨基酸序列与已知 AHLs 降解酶的氨基酸序列相似性较低(小于 33%), 但与金属依赖性水解酶 ( $\beta$ -内酰胺类家族蛋白) 相似度高达 95%, 并具有  $\beta$ -内酰胺类蛋白的特征序列 105-HLHFDHAG-112 以及与金属水解酶特征序列相似的 177-HTPGHTPGH- 185<sup>[45]</sup>。

2004 年 Wang 等研究表明, *AiiA* 为典型的  $Zn^{2+}$  依赖型降解酶, 能够降解 10 种不同侧链长度和 C3 取代基不同的信号分子<sup>[46]</sup>。*AidH* 是本实验室前期研究得到的具有 AHLs 降解活性的  $Mn^{2+}$  依赖性内酯酶, 对多种类型的 AHLs 信号分子具有降解活性; 与之相比, *AidE* 对于金属离子的依赖性较低, 外源添加  $Zn^{2+}$  和  $Mg^{2+}$ , 其降解活性增强幅度较小(数据未显示)。然而, 表达 *aidE* 基因的胡萝卜软腐欧文氏菌株 Z3-3 的致病性明显下降, 表明利用 *AidE* 降解信号分子进而降低病原菌致病性具有潜在的应用价值。

*aidE* 基因不是不动杆菌属中的保守基因, *aidE* 基因的上下游的基因排列与已测序不动杆菌均不相同。*aidE* 基因下游保守的酚合成基因簇序列比对表明, 在波西米亚不动杆菌 *Acinetobacter bohemicus*、抗辐射不动杆菌 *A. radioresistens* 和 *A. baumannii* 中该基因簇上游基因在不动杆菌中保守性较低, 可能在进化过程中较为活跃, 在不同属细菌间水平转移概率较大。此外在 *P. putida* H8234 中与 *aidE* 一致性高的蛋白编码基因上下游存在多个转座酶基因, 也说明基因有可能是通过水平转移的方式进入 *P. putida* H8234 中的。与此同时, 在 *aidE* 基因下游 919 bp (pQ30-3350) 处发现的一段 107 bp 的 IS 插入序列, 虽然在其基因附近未发现明确的转座酶基因, 但不排除该区域基因发生过水平转移的可能性。信号降解酶基因通过基因水平转移的方式进入细菌基因组并非无迹可寻, 在 *Acinetobacter* sp. Ooi2 中发现的 AHL 酰基转移酶 *AmiE* 上游存在转座酶家族蛋白, 表明该基因可能通过水平转移而来<sup>[47]</sup>。综上, *aidE* 基因可能是通过水平转移进入菌株 77 基因组中, 或是

*aidE* 基因在基因组中的位置发生过重排。菌株 77 自身并未检测到 AHL 信号产生, 外源获得具有信号降解功能的基因可能有利于增强其在环境中的生存优势。

针对群体感应系统的植物细菌性病害防治是近些年的研究热点。对群体感应淬灭的研究近年来更倾向于小分子抑制物的筛选和利用, 但 AHLs 信号降解酶仍具有开发和应用潜力。*AidE* 的发现丰富了信号降解酶的来源和种类, 为生物防治提供了新资源。

## REFERENCES

- [1] Fuqua WC, Winans SC. A LuxR-LuxI type regulatory system activates *Agrobacterium* Ti plasmid conjugal transfer in the presence of a plant tumor metabolite. *J Bacteriol*, 1994, 176(10): 2796–2806.
- [2] Bainton NJ, Stead P, Chhabra SR, et al. *N*-(3-oxohexanoyl)-L-homoserine lactone regulates carbapenem antibiotic production in *Erwinia carotovora*. *Biochem J*, 1992, 288(3): 997–1004.
- [3] Blankschien MD, Potrykus K, Grace E, et al. TraR, a homolog of a RNAP secondary channel interactor, modulates transcription. *PLoS Genet*, 2009, 5(1): e1000345.
- [4] Ren ZG, Lin M, Jiang WJ, et al. Influence of quorum-sensing system on the virulence of *Acidovorax citrulli* MH21 on melon seedlings. *Acta Phytopathol Sin*, 2012, 42(6): 608–619 (in Chinese). 任争光, 林敏, 姜文君, 等. 群体感应系统对甜瓜果斑病菌 MH21 致病力的影响. *植物病理学报*, 2012, 42(6): 608–619.
- [5] Dumenyo CK, Mukherjee A, Chun W, et al. Genetic and physiological evidence for the production of *N*-acyl homoserine lactones by *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* and other fluorescent plant pathogenic *Pseudomonas* species. *Eur J Plant Pathol*, 1998, 104(6): 569–582.
- [6] Waters CM, Bassler BL. Quorum sensing: cell-to-cell communication in bacteria. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2005, 21: 319–346.
- [7] Dong YH, Zhang LH. Quorum sensing and quorum-quenching enzymes. *J Microbiol*, 2005, 43: 101–109.
- [8] Krysciak D, Schmeisser C, Preuß S, et al. Involvement of multiple loci in quorum quenching of autoinducer I molecules in the nitrogen-fixing symbiont *Rhizobium (Sinorhizobium)* sp. strain NGR234. *Appl Environ Microbiol*, 2011, 77(15): 5089–5099.
- [9] Dong YH, Xu JL, Li XZ, et al. AiiA, an enzyme that inactivates the acylhomoserine lactone quorum-sensing signal and attenuates the virulence of *Erwinia carotovora*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97(7): 3526–3531.
- [10] Mei GY, Yan XX, Turak A, et al. AidH, an alpha/beta-hydrolase fold family member from an *Ochrobactrum* sp. strain, is a novel *N*-acylhomoserine lactonase. *Appl Environ Microbiol*, 2010, 76(15): 4933–4942.
- [11] Uroz S, Oger PM, Chapelle E, et al. A *Rhodococcus* *qsA*-encoded enzyme defines a novel class of large-spectrum quorum-quenching lactonases. *Appl Environ Microbiol*, 2008, 74(5): 1357–1366.
- [12] Riaz K, Elmerich C, Raffoux A, et al. Metagenomics revealed a quorum quenching lactonase QlcA from yet unculturable soil bacteria. *Commun Agric Appl Biol Sci*, 2008, 73(2): 3–6.
- [13] Schipper C, Hornung C, Bijtenhoorn P, et al. Metagenome-derived clones encoding two novel lactonase family proteins involved in biofilm inhibition in *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl Environ Microbiol*, 2009, 75(1): 224–233.
- [14] Dong YH, Wang LH, Xu JL, et al. Quenching quorum-sensing-dependent bacterial infection by an *N*-acyl homoserine lactonase. *Nature*, 2001, 411(6839): 813–817.
- [15] Ban HF, Chai XL, Lin YJ, et al. Transgenic *Amorphophallus konjac* expressing synthesized acyl-homoserine lactonase (*aiiA*) gene exhibit enhanced resistance to soft rot disease. *Plant Cell Rep*, 2009, 28(12): 1847–1855.

- [16] Vanjildorj E, Song SY, Yang ZH, et al. Enhancement of tolerance to soft rot disease in the transgenic Chinese cabbage (*Brassica rapa* L. ssp. *pekinensis*) inbred line, Kenshin. *Plant Cell Rep*, 2009, 28(10): 1581–1591.
- [17] Chai XL, Zhou Y, Lin YJ, et al. Regeneration of transgenic *Amorphophallus konjac* expressing synthesized acyl-homoserine lactonase (*aiiA*) gene from *Bacillus thuringiensis*. *Mol Plant Breed*, 2007, 5(5): 613–618 (in Chinese).  
柴鑫莉, 周盈, 林拥军, 等. 苏云金芽胞杆菌抗软腐病 *aiiA* 基因转花魔芋研究. *分子植物育种*, 2007, 5(5): 613–618.
- [18] Cha C, Gao P, Chen YC, et al. Production of acyl-homoserine lactone quorum-sensing signals by gram-negative plant-associated bacteria. *Mol Plant Microbe Interact*, 1998, 11(11): 1119–1129.
- [19] Hanahan D. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol*, 1983, 166(4): 557–580.
- [20] Kovach ME, Elzer PH, Hill DS, et al. Four new derivatives of the broad-host-range cloning vector pBRR1MCS, carrying different antibiotic-resistance cassettes. *Gene*, 1995, 166(1): 175–176.
- [21] Kessler B, de Lorenzo V, Timmis KN. A general system to integrate *lacZ* fusions into the chromosomes of gram-negative eubacteria: regulation of the *Pm* promoter of the *TOL* plasmid studied with all controlling elements in monocopy. *Mol Gen Genet*, 1992, 233(1/2): 293–301.
- [22] Keen NT, Tamaki S, Kobayashi D, et al. Improved broad-host-range plasmids for DNA cloning in gram-negative bacteria. *Gene*, 1988, 70(1): 191–197.
- [23] Haudecoeur E, Tannières M, Cirou A, et al. Different regulation and roles of lactonases AiiB and AttM in *Agrobacterium tumefaciens* C58. *Mol Plant Microbe Interact*, 2009, 22(5): 529–537.
- [24] Khan SR, Farrand SK. The BlcC (AttM) lactonase of *Agrobacterium tumefaciens* does not quench the quorum-sensing system that regulates Ti plasmid conjugative transfer. *J Bacteriol*, 2009, 191(4): 1320–1329.
- [25] Zhang HB, Wang LH, Zhang LH. Genetic control of quorum-sensing signal turnover in *Agrobacterium tumefaciens*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99(7): 4638–4643.
- [26] Carrier A, Uroz S, Smadja B, et al. The Ti plasmid of *Agrobacterium tumefaciens* harbors an *attM*-paralogous gene, *aiiB*, also encoding *N*-acyl homoserine lactonase activity. *Appl Environ Microbiol*, 2003, 69(8): 4989–4993.
- [27] Park SY, Lee SJ, Oh TK, et al. AhlD, an *N*-acylhomoserine lactonase in *Arthrobacter* sp., and predicted homologues in other bacteria. *Microbiology*, 2003, 149(6): 1541–1550.
- [28] Wang WZ, Morohoshi T, Someya N, et al. AidC, a novel *N*-acylhomoserine lactonase from the potato root-associated *Cytophaga-Flavobacteria-Bacteroides* (CFB) group bacterium *Chryseobacterium* sp. strain StRB126. *Appl Environ Microbiol*, 2012, 78(22): 7985–7992.
- [29] Wang WZ, Morohoshi T, Ikenoya M, et al. AiiM, a novel class of *N*-acylhomoserine lactonase from the leaf-associated bacterium *Microbacterium testaceum*. *Appl Environ Microbiol*, 2010, 76(8): 2524–2530.
- [30] Huang W, Lin YJ, Yi SY, et al. QsdH, a novel AHL lactonase in the RND-Type inner membrane of marine *Pseudoalteromonas byunsanensis* strain 1A01261. *PLoS ONE*, 2012, 7(10): e46587.
- [31] Bijtenhoorn P, Schipper C, Hornung C, et al. BpiB05, a novel metagenome-derived hydrolase acting on *N*-acylhomoserine lactones. *J Biotechnol*, 2011, 155(1): 86–94.
- [32] Bar-Rogovsky H, Hugenmatter A, Tawfik DS. The evolutionary origins of detoxifying enzymes: the mammalian serum paraoxonases (PONs) relate to bacterial homoserine lactonases. *J Biol Chem*, 2013, 288(33): 23914–23927.
- [33] Bergonzi C, Schwab M, Elias M. The quorum-quenching lactonase from *Geobacillus caldxylosilyticus*: purification, characterization, crystallization and crystallographic analysis. *Acta Crystallogr F Struct Biol Commun*, 2016, 72(9): 681–686.

- [34] Garge SS, Nerurkar AS. Attenuation of quorum sensing regulated virulence of *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* through an AHL lactonase produced by *Lysinibacillus* sp. Gs50. PLoS ONE, 2016, 11(12): e0167344.
- [35] Hiblot J, Gotthard G, Chabriere E, et al. Structural and enzymatic characterization of the lactonase *SisLac* from *Sulfolobus islandicus*. PLoS ONE, 2012, 7(10): e47028.
- [36] Hiblot J, Gotthard G, Elias M, et al. Differential active site loop conformations mediate promiscuous activities in the lactonase *SsoPox*. PLoS ONE, 2013, 8(9): e75272.
- [37] Valera MJ, Mas A, Streit WR, et al. GqqA, a novel protein in *Komagataeibacter europaeus* involved in bacterial quorum quenching and cellulose formation. Microb Cell Fact, 2016, 15(1): 88.
- [38] Morohoshi T, Sato N, Iizumi T, et al. Identification and characterization of a novel *N*-acyl-homoserine lactonase gene in *Sphingomonas ursincola* isolated from industrial cooling water systems. J Biosci Bioeng, 2017, 123(5): 569–575.
- [39] Morohoshi T, Tominaga Y, Someya N, et al. Complete genome sequence and characterization of the *N*-acylhomoserine lactone-degrading gene of the potato leaf-associated *Solibacillus silvestris*. J Biosci Bioeng, 2012, 113(1): 20–25.
- [40] Zhang YH, Liu JW, Tang KH, et al. Genome analysis of *Flaviramulus ichthyenteri* Th78<sup>T</sup> in the family *Flavobacteriaceae*: insights into its quorum quenching property and potential roles in fish intestine. BMC Genomics, 2015, 16(1): 38.
- [41] Yates EA, Philipp B, Buckley C, et al. *N*-acylhomoserine lactones undergo lactonolysis in a pH-, temperature-, and acyl chain length-dependent manner during growth of *Yersinia pseudotuberculosis* and *Pseudomonas aeruginosa*. Infect Immun, 2002, 70(10): 5635–5646.
- [42] Abbott DW, Boraston AB. Structural biology of pectin degradation by *Enterobacteriaceae*. Microbiol Mol Biol Rev, 2008, 72(2): 301–316.
- [43] Toth IK, Bell KS, Holeva MC, et al. Soft rot erwiniae: from genes to genomes. Mol Plant Pathol, 2003, 4(1): 17–30.
- [44] Jafra S, Jalink H, van der Schoor R, et al. *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* strains show diversity in production of and response to *N*-acyl homoserine lactones. J Phytopathol, 2006, 154(11/12): 729–739.
- [45] Holmquist M. Alpha/Beta-hydrolase fold enzymes: structures, functions and mechanisms. Curr Protein Pept Sci, 2000, 1(2): 209–235.
- [46] Wang LH, Weng LX, Dong YH, et al. Specificity and enzyme kinetics of the quorum-quenching *N*-acyl homoserine lactone lactonase (AHL-lactonase). J Biol Chem, 2004, 279(14): 13645–13651.
- [47] Ochiai S, Yasumoto S, Morohoshi T, et al. AmiE, a novel *N*-acylhomoserine Lactone acylase belonging to the amidase family, from the activated-sludge isolate *Acinetobacter* sp. strain Ooi24. Appl Environ Microbiol, 2014, 80(22): 6919–6925.

(本文责编 郝丽芳)

**张力群** 2001年毕业于日本神户大学，获得博士学位。现任中国农业大学植物保护学院植物病理系教授，博士生导师。主要研究方向为植物病害生物防治和植物相关细菌分子遗传，主要研究领域包括假单胞菌 *Pseudomonas* 抗生素的合成与调控、抗逆信号传导和病害生物防治机制；植物病原细菌Ⅲ型分泌系统和群体感应系统抑制剂的筛选和抑制机制。主持国家自然科学基金课题 7 项，发表 SCI 论文 20 余篇。

