

密度感应系统对弗氏志贺菌生长竞争能力的影响

徐苹^{1,2}, 杨晶², 陆丽兰², 冯尔玲², 王恒樑^{1,2}, 卢瑛¹, 朱力²

1. 上海海洋大学食品学院, 上海 201306;

2. 军事医学科学院生物工程研究所, 病原微生物生物安全国家重点实验室, 北京 100071

摘要: 密度感应系统调节细菌应答反应的发生, 这些应答反应与细胞密度有关。通过对比大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 和志贺氏菌 (*Shigella* spp.) 的序列发现, 志贺菌属密度感应系统操纵子普遍存在丢失或突变。为研究其密度感应系统的功能, 文章利用哈氏弧菌 (*Vibrio harveyi*) BB170 作为指示菌, 检测弗氏志贺菌 (*Shigella flexneri*) 密度感应系统信号分子 AI-2, 证明其可以分泌有活性的 AI-2; 其次, 采用 Golden Gate 克隆法将大肠杆菌 MG1655 的密度感应系统基因克隆至弗氏志贺菌 301 中, 获得密度感应系统回复株 301。通过菌落计数表明, 在混合培养条件下, 密度感应系统基因回复株 301 比野生株 301 存在生长优势; 通过双向电泳初步比较分析表明, 密度感应系统基因可以在志贺菌中表达, 并鉴定到了其他一些与应激反应相关的差异表达蛋白, 如 Hsp60、GroEL、SodB。

关键词: 弗氏志贺菌; 密度感应系统; 信号分子 AI-2; 比较蛋白质组学

The effect of quorum sensing system for growth competitiveness on *Shigella flexneri*

Ping Xu^{1,2}, Jing Yang², Lilan Lu², Erling Feng², Hengliang Wang^{1,2}, Ying Lu¹, Li Zhu²

1. Food Science and Engineering College, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;

2. State Key Laboratory of Pathogen and Biosecurity, Beijing Institute of Biotechnology, Beijing 100071, China

Abstract: Quorum sensing (QS) regulates the onset of bacterial social responses related to cell density. Comparison between the gene sequences of all components of QS system of *Escherichia coli* and *Shigella* strains, shows that the QS system is generally lost or mutated in *Shigella*. Since AI-2 is produced and processed by the *lsr* operon, we analyzed the potential function of the *lsr* operon. We first detected AI-2 in *Shigella flexneri* 2a strain 301 through the reporter bacteria *Vibrio harveyi* BB170, indicating that *S. flexneri* can produce AI-2. Then, the *lsr* operon of *E. coli* MG1655 was cloned into *S. flexneri* using the Golden Gate method. Colony counting experiments showed that the QS system recovery strain had growth advantage over the wild-type strain when they were mixed and cultured. The preliminary comparative proteomics analysis showed that the *lsr* operon could be expressed and the abundance of stress

收稿日期: 2014-12-31; 修回日期: 2015-01-13

基金项目: 国家自然科学基金项目(编号: 81171531, 81125012, 81373316)和国家重点基础研究发展计划("973"计划)项目(编号: 2011CB504901, 2013CB910804)资助

作者简介: 徐苹, 硕士研究生, 专业方向: 微生物蛋白质组学。E-mail: pingqing@163.com

通讯作者: 朱力, 博士, 副研究员, 研究方向: 微生物学。E-mail: jewly54@126.com

卢瑛, 博士, 副教授, 研究方向: 食品生物技术。E-mail: y-lu@shou.edu.cn

DOI: 10.16288/j.ycz.15-002

网络出版时间: 2015-4-13 9:27:21

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1913.R.20150413.0927.002.html>

response proteins also changed when the QS system was introduced into *S. flexneri*.

Keywords: *Shigella flexneri*; quorum sensing system; autoinducer-2(AI-2); comparative proteomics

志贺氏菌(*Shigella* spp.)在自然界中广泛存在, 俗称痢疾杆菌, 是导致细菌性痢疾的常见病原菌。目前, 微生物群体间的相互作用越来越引起人们的关注, 细菌所表现出的细胞相互作用行为, 如抗生素的产生^[1]、菌体自身的发育及孢子的形成等^[2], 需要高细胞密度共同协作完成。而密度感应系统是细菌间重要的交流系统, 它可以通过群体密度来调控这些协作行为^[3,4]。另外, 病原菌中许多致病因子的表达也由密度感应系统控制, 如铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)^[5]、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)^[6]和沙门氏菌(*Salmonella*)^[7]等, 因此研究细菌的密度感应系统, 不仅可以了解细菌间的相互作用, 同时对细菌的致病机理也有重要的意义。

有研究表明, 通过对已知序列的大肠杆菌(*Escherichia coli*)和志贺氏菌的分析, 在志贺氏菌中缺少密度感应系统操纵子区内的一些基因, 如*lsrK*、*lsrB*、*lsrF*^[8]。在革兰氏阴性菌密度感应系统中, AI(autoinducer)-2 是一个通用信号分子, 可以介导细菌种内以及不同种属间的相互作用。在此系统中, LsrK蛋白有激酶活性, 使AI-2 磷酸化; LsrR是*lsr*操纵子的阻遏蛋白, 阻止*lsr*操纵子的表达; *lsrA*基因编码ATP酶, 为AI-2 的转运提供能量; LsrC、LsrD为AI-2 分子进入细胞的通道蛋白; *lsrB*编码LsrB蛋白, 是AI-2 信号分子进入细胞的通道蛋白; LsrF、LsrG被认为是对AI-2 信号分子的修饰蛋白, 但其具体作用尚不明确^[9]。在大肠杆菌中, AI-2 密度感应系统调控着许多种群的行为, 如生物膜的形成^[10,11], 趋化性和细胞运动性^[12,13]。虽然志贺氏菌与大肠杆菌在基因组水平上有着高度的同源性和相似性, 但是两者在表型和致病性方面却有着显著的差异。

基于这些原因, 本文首先通过生物学方法检测了弗氏志贺菌(*Shigella flexneri*)能否产生和分泌信号分子 AI-2; 其次, 利用 Golden Gate 克隆法将大肠杆菌密度感应系统基因(约 8 kb)克隆至弗氏志贺氏菌 301 野生株, 构建 301 密度感应系统回复株, 并通过菌落计数评估其对 301 菌株的生长优势; 通过双向电泳初步比较, 分析密度感应系统在弗氏志贺菌 301 中的表达情况。研究结果发现, 志贺氏菌能

够产生 AI-2, 但不能将其运入胞内, 无法正确感知其存在; 回补密度感应系统基因能够使 AI-2 顺利进入弗氏志贺菌 301 胞内, 从而为回复株提供一定的生长优势, 并且引起细菌胞内多种蛋白质表达的变化, 暗示这些蛋白功能与密度感应系统的正常运转相关。

1 材料和方法

1.1 菌株和质粒

弗氏 2a 志贺菌 301 野生株(Nal^r)、大肠杆菌 MG1655(Sm^r)均为本实验室保存; 大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞购自全式金公司; 哈氏弧菌(*Vibrio harveyi*)BB170 菌株由中国人民解放军军事医学科学院疾病预防研究所袁静教授惠赠; pET28a 质粒(Kan^r)为本实验保存; pMD18-T 载体购自 TaKaRa 公司。

1.2 培养基和培养条件

哈氏弧菌BB170 采用AB培养基(配制方法见文献^[14]), 弗氏志贺菌 301 及其密度感应系统回复株、大肠杆菌DH5 α 均采用LB培养基。

抗生素所用浓度: 萘啶酮酸(Nal) 50 μ g/mL; 卡那霉素(Kan) 50 μ g/mL; 链霉素(Sm) 50 μ g/mL。

1.3 AI-2 检测

在LB培养基中过夜培养弗氏志贺菌 301 野生株, 用新鲜的LB培养基按 1:1000 稀释菌液, 继续培养 7 h, 此时处于对数期末期(在大肠杆菌体内, AI-2 信号分子在对数期积累量最多, 而进入稳定期后大大下降^[9]), 用 0.22 μ m 的过滤器过滤除去培养基中的 301 野生菌, 收集上清待检; 在AB培养基中过夜培养(约 14 h)BB170, 测定其OD₆₀₀ 值约为 1.0, 稀释 BB170 过夜培养液, 按 1:5000 的比例稀释到新鲜AB培养基中, 作为荧光检测指示剂, 收集剩余的BB170 培养液, 用过滤器过滤收集上清, 用于阳性对照; 然后将待测样品(或对照样品)与BB170 荧光检测剂按照体积比 1:9 混合, 置于 30 $^{\circ}$ C 培养箱中震荡培养, 在 0~5 h 内, 每 1 h 取 200 μ L/孔至 96 孔板中, 用 Spectra-Max M5 微孔板检测系统, 检测其荧光强度

(样品和对照均取复孔)^[14]。

实验分为以下 4 组，每组实验都要一式两份，包括对照实验：待测样品组(301 培养上清)；空白对照组 AB 培养基；空白对照 LB 培养基；阳性对照组(BB170 培养上清)。

1.4 密度感应系统基因重组质粒 pET28a-lsrKG 的构建及电转弗氏 2a 志贺菌 301 野生株

本文采用的克隆方法为Golden Gate法^[15]，其操

作流程如图 1 所示，扩增引物序列见表 1。

首先将 *lacZ* 基因与 pET28a 质粒连接，构成 pET28a-*lacZ* 质粒作为受体质粒。根据大肠杆菌 MG1655 完整的密度感应系统基因(图 2 所示 约 8 kb)^[8]，将其分为 3 段，分别为 *lsrK-R*、*lsrA-D*、*lsrB-G*，分别连接至 T 载体中作为供体质粒。将供体质粒和受体质粒放在一个体系中，利用 *Bsa* I 酶(购自 New England Biolabs 公司)的活性，将密度感应系统基因完整的克隆至 pET28a 质粒中，构成重组质粒 pET28a-*lsrKG*。

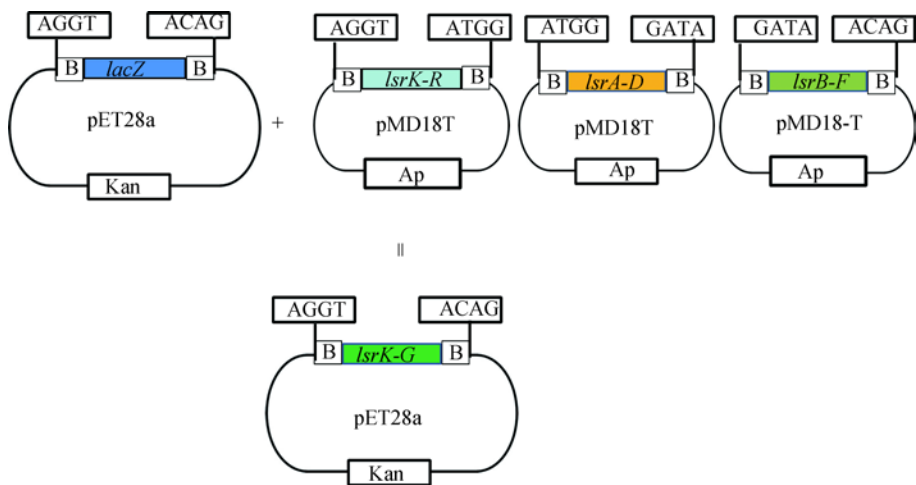


图 1 Golden Gate 克隆法流程图

表 1 Golden Gate 克隆法使用的引物信息

引物名称	引物序列(5' 3')	备注
LsrK-R_F	TTTggtctcaAGGTATACTCAAAACTAACAGCCACGGT	扩增 LsrK-R 片段
LsrK-R_R	TTTggtctcaCCATCACAGATATAATGAGCAAGA	扩增 LsrK-R 片段
LsrA-D_F	TTTggtctcaATGGATACATTTGTTCAAACTCACCTG	扩增 LsrA-D 片段
LsrA-D_R	TTTggtctcaTATCCTTTATGGCATGGGTA	扩增 LsrA-D 片段
LsrB-G_F	TTTggtctcaGATACTTCATGACACTTCATCGCTTTAAG	扩增 LsrB-G 片段
LsrB-G_R	TTTggtctcaTGTCGAGGGGTTCCAGTCAGACATT	扩增 LsrB-G 片段
LacZ_F	CGGGATCCAGGTagagaccGTCTAGTTAATGTGTAACG	扩增 LacZ 片段
LacZ_R	GCGTCGACTGTGcagagaccTAGCATATTATGTTGCCAAC	扩增 LacZ 片段
LsrB-F_F	CGGGATCCCTTCATGACACTTCCGCTTTAAG	验证回复株
LsrB-F_R	GCGTCGACGTGACGTGCATAATTCTCCT	验证回复株
LsrK_F	CCCTCGAGAACTAACAGCCACA	验证回复株
LsrK_R	CCCAAGCTTCGGTTATATCAACG	验证回复株
交叉引物 1_F	GATCTCGCTCTGGGTCAGCCCCG	接口处验证
交叉引物 1_R	GGCGTGGACCTCCCCCTGATGCAAC	接口处验证
交叉引物 2_R	ACCGTACCTTATGTGCGCTCTATGC	接口处验证
交叉引物 2_R	CTCCGGTTTAGTATCAGAGTCCCAG	接口处验证

注：下划线小写字母为 *Bsa* I 酶切位点；下划线大写字母为接头处碱基。

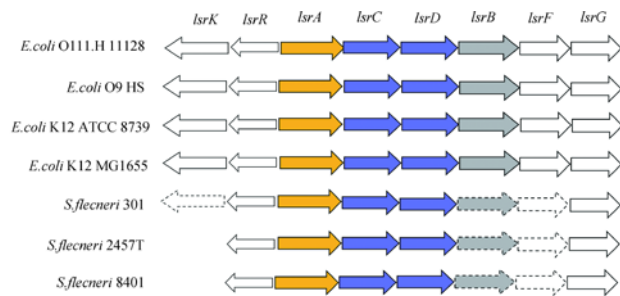


图 2 密度感应系统基因分布图^[8]

将重组成功的质粒 pET28a-lsrKG 电转入 301 感受态细胞中, 获得密度感应系统回复株 301/pET28a-lsrKG。

1.5 密度感应系统回复株 301/pET28a-lsrKG 与 301 野生株的生长竞争能力比较

将 301 野生株(Nal 抗性)、301/pET28a-lsrKG 菌株(Kan 抗性)分别接种于含 50 mg/L 抗生素的 LB 培养基中, 30℃ 过夜培养; 将 301、301/pET28a-lsrKG 菌液等比例混合后, 取 100 μL 接种于新鲜 LB 培养基中, 30℃ 混合培养 10 h; 同时取 100 μL 的混合培养液做梯度稀释(一般稀释到 10^{-6}), 将稀释后的混合菌液涂布于无抗 LB 培养基上, 30℃ 倒置培养, 作为混合培养 0 h 时的生长情况; 取混合培养 10 h 后的菌液 100 μL, 进行梯度稀释后将稀释菌液涂布于无抗 LB 培养基上, 置于 30℃; 次日在混合培养 0 h 和 10 h 培养基上随机挑取若干单克隆, 分别接种 Kan 抗性和无抗平板, 后将平板置于 37℃。次日平板上菌落计数, 并计算两种菌在混合培养前后的生长比例(实验重复 3 次)。

$$\text{生长比例} = \frac{R_{10}/W_{10}}{R_0/W_0}$$

其中, R_{10} 指培养 10 h 后回复株 301/pET28a-lsrKG 的菌落数; W_{10} 指培养 10 h 后野生株 301 的菌落数; R_0 指培养 0 h 时回复株 301/pET28a-lsrKG 的菌落数; W_0 指培养 0 h 时野生株 301 的菌落数。

2 结果与分析

2.1 弗氏 2a 志贺菌 301 野生株培养上清中的 AI-2 检测

本文通过生物学检测方法, 采用哈氏弧菌 BB170 作为检测信号分子 AI-2 活性的指示菌, 对弗氏志贺菌 301 是否产生并分泌 AI-2 进行了研究。

将志贺菌 301 培养 7 h, 检测其上清中 AI-2 的表达, 结果如图 3 所示。前 1 h, 4 组的荧光强度基

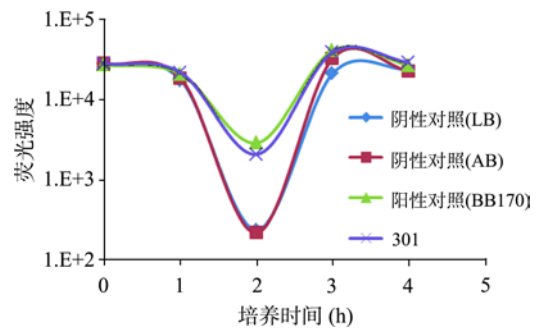


图 3 不同孵育时间各样品的荧光强度

本维持不变, 因指示剂中 BB170 的菌量(起始生长缓慢)没有引起足够的变化, 而原有的信号分子足以发挥作用; 第 2 h, 各组的荧光强度均下降明显, 其中阴性对照 LB 和 AB 的荧光强度下降幅度巨大, 而弗氏志贺菌 301 和阳性对照降低趋势相对平缓, 原因是随着指示剂中 BB170 细菌的较快生长, 外界提供的信号分子量不足以激发荧光, 故表现为荧光强度的下降, 尤以两个阴性对照为重; 第 3 h, 随着指示剂中细菌密度的上升, BB170 自身合成信号分子加快, 从而导致荧光强度的快速上升, 并在 3 个多小时后各组基本同时达到顶峰, 因为其实外源添加的信号分子与内源合成的相比已不起影响; 第 4 h 前后, 各组的荧光强度均有下降, 这完全是由指示菌 BB170 的生长状态所决定的。

这些数据说明, 弗氏志贺菌 301 野生株可以向胞外释放信号分子 AI-2, 并使哈氏弧菌 BB170 产生荧光。

2.2 密度感应系统基因回复株 301/pET28a-lsrKG 的构建及鉴定

利用 Golden Gate 克隆法, 将大肠杆菌 MG1655 基因组上完整的密度感应系统基因克隆到 pET28a 载体上, 构建含有密度感应系统基因的 pET28a-lsrKG 重组质粒, 后将该质粒导入志贺氏菌 301 中。由于 *lsrK*、*lsrB-F* 位于密度感应系统中的两个不同基因区域(图 2 所示), 其在志贺氏菌 301 中是缺失的, 在大肠杆菌 MG1655 中是存在的, 验证结果表明质粒已转入志贺菌 301。为验证 3 段基因是否按顺序连接, 设计了接口处的交叉引物 1、2, 结果表明其连接正确, 表明密度感应系统基因已被克隆入 301 菌株中(验证结果图略)。

2.3 301 野生株与密度感应系统基因回复株 301/pET28a-lsrKG 的生长竞争能力比较

将混合培养 0 h 和 10 h 的菌液进行菌落计数, 计

算 10 h 后的菌落比例变化, 数据如表 2 所示。结果表明, 密度感应系统克隆到野生株 301 中后, 在共同培养 10 h 后, 其生长占有一定优势, 说明密度感应系统基因对其生长有一定的优势影响。

2.4 301 野生株与密度感应系统基因回复株 301/pET28a-lsrKG 的双向电泳初步分析比较

本文制备了 301 与 301/pET28a-lsrKG 在 37 °C 培养 10 h 条件下的全菌蛋白, 并用纯化试剂盒将其纯化, 按双向凝胶电泳的操作进行一向等电聚焦和二向 SDS-PAGE, 得到两株菌在 pH4~7 范围内的蛋白表达图谱(图 4)。

通过对比两株菌的蛋白图谱, 发现密度感应系统基因的导入引起了菌体内蛋白表达谱的变化, 差异点如图 4 所示, 差异蛋白鉴定结果见表 3。与野生株相比, 鉴定到的蛋白差异点有 22 个, 对应的差异蛋白为 19 个, 其中表达上调蛋白点有 10 个, 表达下调的蛋白点有 12 个。

在大肠杆菌相关报道中, 密度感应系统与其体内的甘油代谢有关^[16], 而本文在鉴定到的蛋白中, 有许多与代谢相关的酶, 如*icdA* 编码的异柠檬酸脱氢酶、*sdhA*编码的琥珀酸脱氢酶, 以及与电子传递链相关的还原酶, 如*fabI*编码的NADH还原型辅酶、*nuoI*编码的NADH脱氢酶,表明密度感应系统基因的

导入引起了菌体内代谢活动的变化。此外, 一些与应激反应相关的蛋白表达也发生了变化, 如Hsp60、GroEL、SodB等。

表 2 混合培养前后成长比例的统计分析

实验次数	单克隆数目/个				生长比例
	W ₀	R ₀	W ₁₀	R ₁₀	
1	62	54	44	72	1.88
2	59	57	40	60	1.55
3	64	42	44	62	2.15

3 讨 论

研究结果表明, 弗氏志贺菌 301 野生株的滤过上清和阳性对照相同, 都含有足够剂量的 AI-2, 从而使哈氏弧菌 BB170在自身 AI-2 诱导产生前激发荧光, 证明弗氏志贺菌可以产生并分泌有活性的 AI-2 信号分子, 为进一步研究弗氏志贺菌的 AI-2 密度感应系统的功能奠定了基础。

由于密度感应系统是与群体密度相关的, 因此本文通过生长优势实验来探讨密度感应系统基因的功能。菌落计数结果表明, 密度感应系统的回复提高了志贺氏菌的生存竞争能力。从进化角度讲, 密度感应系统基因的部分丢失暗示其对志贺氏菌的生命周期可能存在某些不利影响: 例如, Diggle等^[17]

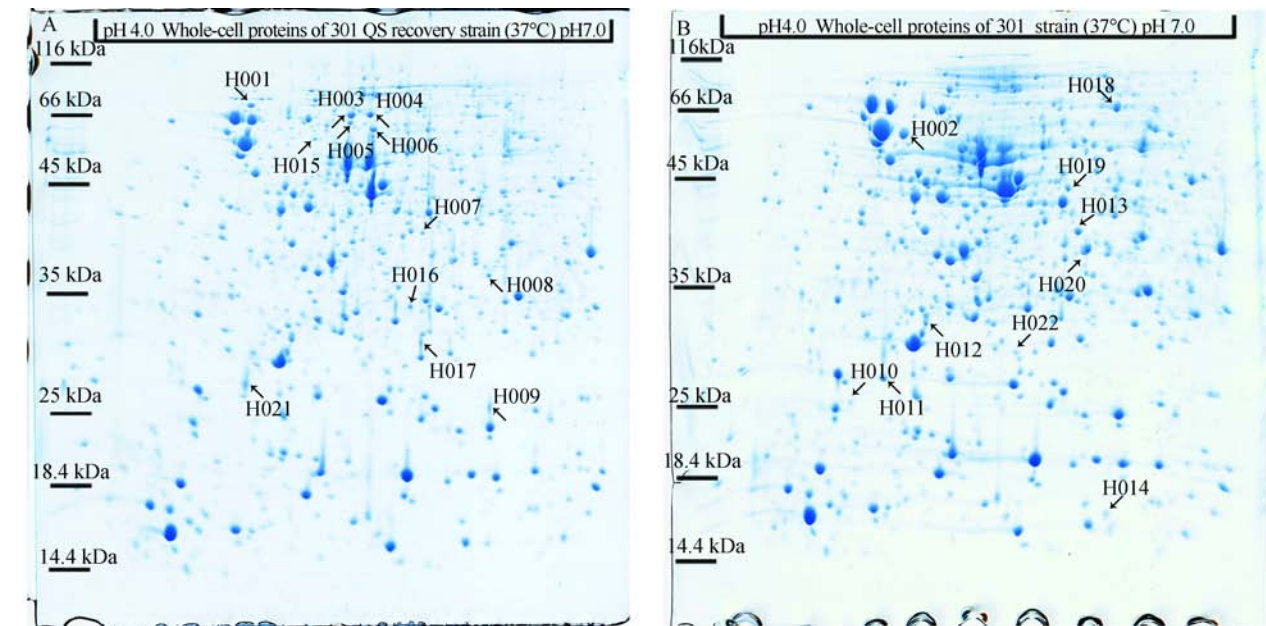


图 4 志贺氏菌 301 野生株(A)与 301 密度感应系统回复株(B)在 pH 4~7 范围内的双向电泳差异点。

表 3 鉴定到的差异表达蛋白列表

编号	分值	表达模式	GenBank 登录号	基因	蛋白功能
表达下调的蛋白					
H001	1380	↓	gi 24054822	<i>mopA</i>	分子伴侣 Hsp60, 肽依赖的 ATP 酶, 热休克蛋白
H003	983	↓	gi 56383927	<i>gadA</i>	谷氨酸脱羧酶同工酶
H004	960	↓	gi 56383506	<i>gadB</i>	谷氨酸脱羧酶同工酶
H005	488	↓	gi 24051450	<i>icdA</i>	异柠檬酸脱氢酶
H006	1010	↓	gi 56383864	<i>tufA</i>	蛋白链延伸因子 EF-Tu
H007	194	↓	gi 24052016	<i>sodB</i>	超氧化物歧化酶
H008	661	↓	gi 56383283	<i>dps</i>	全局调控蛋白 Dps
H009	666				
H010	208	↓	gi 24053411	—	保守的假想蛋白
H011	1090	↓	gi 24051640	<i>tpx</i>	巯基过氧化物酶
H021	836				
H016	774	↓	gi 24052078	<i>osmC</i>	渗透压诱导蛋白
表达上调的蛋白					
H002	1600	↑	gi 24053408	—	外膜蛋白
H017	346	↑	gi 24052016	<i>sodB</i>	超氧化物歧化酶
H012	508	↑	gi 24053853	<i>rpe</i>	5-磷酸-D-核酮糖-3-差向异构酶
H013	556	↑	gi 693172501	<i>lsrB</i>	AI-2 结合蛋白, 转运蛋白
H014	292	↑	gi 24051901	—	保守的假想蛋白
H015	551	↑	gi 56383758	<i>pgk</i>	磷酸甘油酸激酶
H018	1110	↑	gi 56383243	<i>sdhA</i>	琥珀酸脱氢酶黄素蛋白亚基
H019	878	↑	gi 24051201	<i>aspC</i>	天冬氨酸转氨酶
H020	728	↑	gi 24051603	<i>fabI</i>	烯酰-酰基载体蛋白还原酶(NADH)
H022	223	↑	gi 24052717	<i>nuoI</i>	NADH 脱氢酶链 I

注：表达模式指密度感应系统回复株相对于 301 野生株，“↑”表示上调，“↓”表示下调。

认为,密度感应系统突变可能是一种‘social cheater’行为,突变菌株能够强迫其邻近的其他细菌进入合作行为(Cooperative behaviors)模式,但其自身由于丧失感应系统而不受影响,这样就可以从其他细菌中获益。由于肠道菌群是一个复杂的多种细菌共生环境,本研究仅对两种细菌进行分析,具有一定的局限性,因此,密度感应系统在志贺氏菌中的作用还需要进一步深入研究。

本文对志贺菌 301 野生株及密度感应系统回复株 301/pET28a-lsrKG进行了双向电泳初步分析,通过对比蛋白表达图谱,发现了 22 个差异蛋白点,对应 19 个差异蛋白。由于密度感应系统基因的导入而引起了差异蛋白的表达,如*lsrB*基因的表达,使胞外的 AI-2 信号分子可以被转运至胞内;与应激反应相关蛋白的表达,如Hsp60、GroEL、SodB等;与代谢

相关酶的表达,如*icdA*、*sdhA*、*fabI*、*nuoI*等。Winzer 等^[18]认为,虽然 AI-2 信号分子的具体功能在大肠杆菌中尚不明确,但它可能作为某种代谢物,在细菌生长早期被排出胞外,随后在对数期被转运至胞内,并在其生长晚期在被代谢,为细菌生长晚期提供能量,因此使其在后期竞争占优势。事实上,这种假设与本研究中发现的代谢相关酶类的差异表达结果吻合。

参考文献

- [1] El-Sayed AK, Hotherall J, Thomas CM. Quorum-sensing-dependent regulation of biosynthesis of the polyketide antibiotic mupirocin in *Pseudomonas fluorescens* NCIMB 10586. *Microbiology*, 2001, 147(8): 2127–2139. [DOI](#)
- [2] Diggle SP, Crusz SA, Cámara M. Quorum sensing. *Curr Bio*, 2007, 17(21): R907–R910. [DOI](#)

- [3] Williams P, Winzer K, Chan WC, Cámara M. Look who's talking: communication and quorum sensing in the bacterial world. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 2007, 362(1483): 1119–1134. [\[DOI\]](#)
- [4] Miller MB, Bassler BL. Quorum sensing in bacteria. *Annu Rev Microbiol*, 2001, 55: 165–199. [\[DOI\]](#)
- [5] Erickson DL, Endersby R, Kirkham A, Stuber K, Vollman DD, Rabin HR, Mitchell I, Storey DG. *Pseudomonas aeruginosa* a quorum-sensing systems may control virulence factor expression in the lungs of patients with cystic fibrosis. *Infect Immun*, 2002, 70(4): 1783–1790. [\[DOI\]](#)
- [6] Queck SY, Jameson-Lee M, Villaruz AE, Bach THL, Khan BA, Sturdevant DE, Ricklefs SM, Li M, Otto M. RNAIII-independent target gene control by the *agr* quorum-sensing system: insight into the evolution of virulence regulation in *Staphylococcus aureus*. *Mol Cell*, 2008, 32(1): 150–158. [\[DOI\]](#)
- [7] Choi J, Shin D, Ryu S. Implication of quorum sensing in *Salmonella enterica* serovar typhimurium virulence: the *luxS* gene is necessary for expression of genes in pathogenicity island. *Infect Immun*, 2007, 75(10): 4885–4890. [\[DOI\]](#)
- [8] Brito PH, Rocha EPC, Xavier KB, Gordo I. Natural genome diversity of AI-2 quorum sensing in *Escherichia coli*: conserved signal production but labile signal reception. *Genome Biol Evol*, 2013, 5(1): 16–30. [\[DOI\]](#)
- [9] Xue T, Zhao LP, Sun HP, Zhou XX, Sun BL. LsrR-binding site recognition and regulatory characteristics in *Escherichia coli* AI-2 quorum sensing. *Cell Res*, 2009, 19(11): 1258–1268. [\[DOI\]](#)
- [10] González Barrios AF, Zuo RJ, Hashimoto Y, Yang L, Bentley WE, Wood TK. Autoinducer 2 controls biofilm formation in *Escherichia coli* through a novel motility quorum-sensing regulator (MqsR, B3022). *J Bacteriol*, 2006, 188(1): 305–316. [\[DOI\]](#)
- [11] Herzberg M, Kaye IK, Peti W, Wood TK. YdgG (TqsA) controls biofilm formation in *Escherichia coli* K-12 through autoinducer 2 transport. *J Bacteriol*, 2006, 188(2): 587–598. [\[DOI\]](#)
- [12] Bansal T, Jesudhasan P, Pillai S, Wood TK, Jayaraman A. Temporal regulation of enterohemorrhagic *Escherichia coli* virulence mediated by autoinducer-2. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2008, 78(5): 811–819. [\[DOI\]](#)
- [13] Hegde M, Englert DL, Schrock S, Cohn WB, Vogt C, Wood TK, Manson MD, Jayaraman A. Chemotaxis to the quorum-sensing signal AI-2 requires the Tsr chemoreceptor and the periplasmic LsrB AI-2-binding protein. *J Bacteriol*, 2011, 193(3): 768–773. [\[DOI\]](#)
- [14] Taga M E, Xavier KB. Methods for analysis of bacterial autoinducer-2 production. *Curr Protoc Microbiol*, 2005, Chapter 1: Unit1C.1. [\[DOI\]](#)
- [15] Engler C, Kandzia R, Marillonnet S. A one pot, one step, precision cloning method with high throughput capability. *PLoS One*, 2008, 3(11): e3647. [\[DOI\]](#)
- [16] Xavier KB, Bassler BL. Regulation of uptake and processing of the quorum-sensing autoinducer-2 in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, 2005, 187(1): 238–248. [\[DOI\]](#)
- [17] Diggle SP, Gardner A, West SA, Griffin AS. Evolutionary theory of bacterial quorum sensing: when is a signal not a signal? *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 2007, 362(1483): 1241–1249. [\[DOI\]](#)
- [18] Winzer K, Hardie KR, Williams P. Bacterial cell-to-cell communication: sorry, can't talk now—gone to lunch! *Curr Opin Microbiol*, 2002, 5(2): 216–222. [\[DOI\]](#)

(责任编辑: 刘钢)