

食品中细菌生物膜信号分子AHLs的HPLC-MS研究初探

廖 吕¹,方祥聪²,冯志强^{1*}

(1.西藏自治区农畜产品质量安全检验检测中心,西藏 拉萨 850000,2.中国民用航空西藏自治区管理局,西藏 拉萨 850000)

摘要:通过对细菌群不同时间产生的生物膜信号分子N-酰基-高丝氨酸内酯类化合物(N-acyl-L-homoserine lactones, AHLs)进行测定,得出细菌群在生长过程中信号分子的含量与其生长繁殖的时间关系,对微生物导致食品腐败的风险评估具有一定的指导意义。利用高效液相色谱-串联质谱(HPLC-MS)MRM模式,使用色谱柱为2.1 mm×50 mm(3 μm, 4 μm),采用电喷雾离子源正离子模式,分析时间为1.5~7 min,建立细菌群体感应信号分子AHLs类标准信号分子的测定方法,将大肠杆菌所分泌的信号分子通过乙酸乙酯萃取处理之后,加入甲醇进样分析,同标准信号分子进行对比。成功建立了6种标准信号分子的快速测定条件,利用该测定条件对大肠杆菌所分泌的信号分子的种类和数量变化进行检测,得到了大肠杆菌不同时间的信号分子随时间变化的增长图,可在未来对食品的货架期进行预测,大大缩短食品货架期试验时间。

关键词:群体感应; AHLs; HPLC-MS

中图分类号:TS207.4 **文献标志码:**A

Preliminary Study on Food Bacterial Biofilm Signal molecules AHLs by HPLC-MS

LIAO Lyu¹, FANG Xiangcong², FENG Zhiqiang^{1*}

(1. Agricultural and Livestock Products Quality and Safety Inspection Center of Tibet Autonomous Region, Tibet Lhasa 850000, China; 2. China Civil Aviation Administration of Tibet Autonomous Region, Tibet Lhasa 850000, China)

Abstract: By measuring the biofilm signal molecules (N-acyl-L-homoserine lactones, AHLs) produced by bacterial communities at different times, the relationship between the content of signal molecules and the time of growth and reproduction of bacterial communities was obtained, which has certain guiding significance to the risk assessment of food spoilage caused by microorganism. The MRM mode of high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (hplc-ms) was used. The chromatographic column was 2.1 mm×50 mm(3 μm, 4 μm), and the analytical time was 1.5~7 min. A method for the determination of bacterial quorum sensing signal molecules AHLs standard signal molecules was established. The signal molecules secreted by Escherichia coli were extracted by ethyl acetate and then injected with methanol for sample analysis and compared with standard signal molecules. Successfully established rapid determination conditions of six standard signal molecules. The amount and type of signal molecular secreted by Escherichia coli were determined by this determination conditions, and the growth graphs of signal molecules of the E. coli at different time were obtained, which can forecast the shelf life of food, and greatly shorten the shelf life of food experiment time in the future.

Key Words: Quorum sensing; AHLs; HPLC-MS

群体感应是指细菌细胞之间通过特定的分子来进行通讯的行为现象,在一个特定的环境之中,细胞会产生一种信号分子,并且这种信号分子的浓度会随着细胞密度的增加而增加,当这种信号分子

的浓度达到一定的阈值,就会激活细胞的特定基因,从而引起特定的基因表达,如发光、产毒、成群等。AHLs类化合物是革兰氏阴性菌群体感应系统中最典型的一类信号分子。细菌细胞可以通过产生AHLs进行同种或异种菌之间的信息交流,从而来调控某些特定基因产物的表达。在食源性病菌中有60%的基因都是由AHLs调控的,其相互之间可以通过信号分子来进行信息交流,通过群体感应调节系统分泌信息素和完成整个特性的表达,从而

收稿日期:2021-12-12

作者简介:廖吕(1994-),女,助理农艺师,主要从事食品安全、农畜产品检验检测有关工作,E-mail:lulu420138@sina.cn; *为通讯作者:冯志强(1990-),男,助理兽医师,主要从事农产品质量安全及检验检测相关工作。

使食物腐败变质。日常中微生物是导致食品腐败的重要原因,并且只有当腐败微生物的数量达到一定程度时,才会导致食品的腐败,所以通过对微生物的AHLs的检测来研究食品防腐保鲜具有非常重要的意义。

2 材料与方法

2.1 试剂及主要设备

2.1.1 试剂

试验用试剂主要有:AHLs类信号分子标准品(C4-HSL, C6-HSL, C8-HSL, C10-HSL, C12-HSL, C14-HSL,纯度 $\geq 98\%$),甲醇(HPLC级),乙酸乙酯(分析级),乙酸铵,牛肉膏,蛋白胨,NaCl。

2.1.2 主要设备

液相色谱-质谱联用仪,旋转蒸发仪,冷冻离心机,摇床培养箱,pH计。

2.2 试验前处理

2.2.1 标准原液的制备

分别称取5 mg的C4-HSL, C6-HSL, C8-HSL, C10-HSL, C12-HSL, C14-HSL,用20 mL的甲醇进行溶解,然后移液至50 mL的容量瓶中,用甲醇定容至50 mL,即100 mg/L的标准原液,放在 $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下存储备用。

2.2.2 大肠杆菌种子培养液的培养

准确称取牛肉膏3 g,蛋白胨10 g,NaCl 5 g,放入到1 000 mL烧杯中,加入1 000 mL蒸馏水加热溶解,溶解后,待其冷却后,用pH计调溶液的pH值至7.0~7.4。取250 mL三角瓶,量取50 mL的液体培养基,用棉塞塞住瓶口,放入高压灭菌锅中,灭菌30 min后取出。待其冷却后,从冰箱中取出,在无菌操作台上用接种环接种少许大肠杆菌到三角瓶中。将接种好的三角瓶放在摇床上, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养12 h,12 h后取出三角瓶,放入冰箱中备用。

2.2.3 大肠杆菌样品制备

按照2.2.2配置1 000 mL的液体培养基,取5个500 mL三角瓶,分别加入100 mL的液体培养基,放入高压灭菌锅中灭菌,同时将6根移液管包好同时灭菌30 min,30 min后取出培养基,待其冷却。同时取出2.2.2中的种子培养液,分别取1 mL种子培养液至5个三角瓶中,用棉塞塞好,放在摇床上培养,分别培养4 h,6 h,8 h,10 h,12 h后取出。取

出后立即将三角瓶中的培养液倒在离心管中,在 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 以13 000 g离心30 min,取上清液,用等量含0.02 mol/L冰乙酸的乙酸乙酯萃取3次,弃水相,混合有机相。将得到的乙酸乙酯抽提液置于旋转蒸发仪内, $75\text{ }^{\circ}\text{C}$ 进行旋转蒸发,待蒸发瓶中液体被蒸发干后,停止旋转加热,关闭旋转蒸发仪,用2 mL的无水甲醇倒入蒸发瓶中,溶解蒸干的蒸发瓶,而后倒入5 mL的容量瓶,定容至5 mL。将5个样品处理好后,放在 $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下保存备用。

2.3 标准品的测定

从冰箱中取出2.2.1中配置好的6种标准原液,待其恢复室温。配甲醇-水流动相,量取500 mL的超纯水,称取77 mg的乙酸铵,溶于1 mL水中,用0.2 μm 滤膜过滤,注入超纯水中,再加入0.5 mL的甲酸。对HPLC-MS进行排空和平衡压力。汲取1 mL C4-HSL的标准原液,用0.2 μm 滤膜过滤到棕色小瓶中,放入到HPLC中,把C4-HSL标准原液样品泵入HPLC-MS仪器,在锥孔电压的测定的一级质谱图中,选择特定的母离子来进行监测,其横坐标是荷质比,纵坐标是通过质谱锥孔的离子的量,其通过的量越多,锥孔电压越合适。在碰撞能量的测定过程中,选择特定的特征子离子来进行监测,横坐标是荷质比,纵坐标是特征离子的含量,含量越高,碰撞效果越好。通过测定,可找到C4-HSL的测定条件,同法可找到其余5个标准样品的测定条件,即建立6个标准样品的测定方法。

2.4 大肠杆菌的测定

根据6种标准信号分子的测定结果和测定条件,将准备好的培养不同时间的大肠杆菌甲醇提取液取出,恢复室温,分别汲取0.5 mL提取液,用0.2 μm 的滤膜过滤2次,再加入0.5 mL的超纯水,将两者充分混匀,进样测定。

3 结果与分析

3.1 标准品试验结果

3.1.1 标准品一级质谱

6种标准品一级质谱图横坐标为时间,从左往右,时间逐渐增加,纵坐标表示峰高,可以用峰高表示物质的含量。C4-HSL的出峰时间为0.45 min,其峰高为 6.7×10^6 ;C6-HSL的出峰时间为0.5 min,峰高为 4.5×10^7 ;C8-HSL的出峰时间为0.95 min,峰

高为 1×10^7 ; C10-HSL的出峰时间为1.9 min, 峰高为 1.4×10^7 ; C12-HSL的出峰时间为1.25 min, 峰高为 1.3×10^7 ; C14-HSL的出峰时间为2 min, 峰高为 6×10^7 。

3.1.2 标准品碎片特征离子质谱

C4-HSL的信号分子轰击碎后, 得到许多的特征离子碎片。其中峰值最大, 即含量最多的为其母离子, 其余的为特征碎片离子; 母离子的荷质比为172.0, 其碎片离子有4个, 荷质比分别为71.0, 102.1, 144.1, 154.1; 其中71.0和102.1的离子获得效果最好, 将这两个离子碎片作为C4-HSL的特征离子碎片。C6-HSL的信号分子轰击碎后得到4个离子碎片, 其母离子的荷质比为200.0, 4个离子碎片为99.1, 102.1, 172.1, 182.0, 其中99.1和102.1这2个离子碎片的获得效果最好, 选取这2个离子碎片作为C6-HSL特征离子。C8-HSL的信号分子轰击碎后得到6个离子碎片, 其母离子的荷质比为228.1, 6个离子碎片为57.2, 70.4, 102.1, 127.1, 200.1, 210.0, 其中127.1和102.1这2个离子碎片的获得效果最好, 选取这2个离子碎片作为C8-HSL特征离子。C10-HSL的信号分子轰击碎后得到4个离子碎片, 其母离子的荷质比为256.1, 4个离子碎片为74.1, 102.1, 155.1, 238.1, 其中155.1和102.1这两个离子碎片的获得效果最好, 选取这两个离子碎片作为C10-HSL特征离子。C12-HSL的信号分子轰击碎后得到4个离子碎片, 其母离子的荷质比为284.0, 4个离子碎片为74.0, 102.1, 183.1, 266.2, 其中183.1和102.1这两个离子碎片的获得效果最好, 选取这2个离子碎片作为C12-HSL特征离子。C14-HSL的信号分子轰击碎后得到3个离子碎片, 其母离子的荷质比为256.2, 3个离子碎片为155.0, 102.1, 211.0, 其中211.0和102.1这两个离子碎片的获得效果最好, 选取这两个离子碎片作为C14-HSL特征离子。

3.1.3 标准样品的测定条件

针对适宜锥孔电压的试验, 设置从20~100 V的梯度电压, 根据一级质谱图, 可以设定C4-HSL的母离子为172.1, C6-HSL的母离子200.2, C8-HSL的母离子228.2, C10-HSL的母离子256.2, C12-HSL的母离子284.1, C14-HSL的母离子312.0。经测定, C4-HSL的母离子在50 V的时候通

过量最大, C6-HSL, C8-HSL, C12-HSL的母离子在80 V的时候通过量最大, C10-HSL和C14-HSL在100 V的时候通过量最大。

寻找各个分子的适宜碰撞能量, 选取某一特征离子碎片为测定对象, 设置从2~10 eV的梯度能量, 经测定得到, C4-HSL, C6-HSL, C8-HSL, C10-HSL, 14-HSL的适宜碰撞能量为5 eV, C12-HSL的适宜碰撞能量为8 eV。

综上测定可以得到, AHLs信号分子可被打成多种特征碎片, 并且各类分子中均还有102.1 m/z这种碎片, 这就证明了AHLs信号分子的一部分结构相同, 含有相同的高丝氨酸内酯环, 并在高丝氨酸内酯环的基础上结合了不同的酰基侧链而形成的。得到的标准样品测定结果为: ①C4-HSL的监测模式为母离子为172.1, 特征子离子为102.1, 71.1, 适宜锥孔电压50 V, 适宜碰撞能量为5 V。②C6-HSL的监测模式为母离子为200.2, 特征子离子为102.1, 99.1, 适宜锥孔电压80 V, 适宜碰撞能量为5 V。③C8-HSL的监测模式为母离子为228.2, 特征子离子为102.1, 127.1, 适宜锥孔电压80 V, 适宜碰撞能量为5 V。④C10-HSL的监测模式为母离子为256.2, 特征子离子为102.1, 155.1, 适宜锥孔电压100 V, 适宜碰撞能量为5 V。⑤C12-HSL的监测模式为母离子为284.1, 特征子离子为102.1, 183.1, 适宜锥孔电压80 V, 适宜碰撞能量为8 V。⑥C14-HSL的监测模式为母离子为312.0, 特征子离子为102.1, 211.0, 适宜锥孔电压100 V, 适宜碰撞能量为5 V(表1)。

表1 6种标准品特征离子及测定条件

化合物	母离子/ $m \cdot z^{-1}$	子离子/ $m \cdot z^{-1}$	锥孔电压/V	碰撞能量/ eV
C4-HSL	172.1	102.1/71.1	50	5
C6-HSL	200.2	102.1/99.1	80	5
C8-HSL	228.2	102.1/127.1	80	5
C10-HSL	256.2	102.1/155.1	100	5
C12-HSL	284.1	102.1/183.1	80	8
C14-HSL	312.0	102.1/211.0	100	5

3.2 大肠杆菌试验

根据标准品的测定条件, 将大肠杆菌样品测定条件定为80 V, 5 eV。大肠杆菌提取液样品0.4 min开始出峰, 4~5 min仍然有峰出现, 将2个峰的分

量相加可得到其信号分子的总量。为了判断该提取液中是否含有6种标准信号分子,可对各个信号分子的母离子和子离子进行提取,可得到提取液样品中某一信号分子的母离子和子离子的含量。由试验结果可知,在大肠杆菌培养过程中,

C4-HSL, C12-HSL在4~10 h的时候随着细菌数量的增长,分子量增加,10 h后逐渐减少; C6-HSL, C8-HSL, C10-HSL和C14-HSL在4~8 h随着大肠杆菌的生长,其信号分子也随之增长,8 h后信号分子含量逐渐减少(表2)。

表2 大肠杆菌培养不同时间的信号分子含量

培养时间/h	C4-HSL	C6-HSL	C8-HSL	C10-HSL	C12-HSL	C14-HSL
4	6.1×10^5	2.5×10^5	4.2×10^5	6×10^5	2.82×10^5	3.9×10^6
6	7.0×10^5	3.28×10^5	4.43×10^5	8.0×10^5	3.0×10^5	4.2×10^6
8	8.0×10^5	4.62×10^5	5.0×10^5	9.5×10^5	6.9×10^5	3.9×10^6
10	9.1×10^5	5.6×10^5	4.52×10^5	9.0×10^5	8.2×10^5	4×10^6
12	5.88×10^5	5.1×10^5	4.23×10^5	7.8×10^5	7.4×10^5	2.8×10^6

4 结论

在HPLC-MS测定前,对C4-HSL, C6-HSL, C8-HSL, C10-HSL, C12-HSL, C14-HSL等6个AHLs标准样品进行了单独的HPLC测定,发现HPLC只能将物质进行简单分离,6个标准样品所出现的峰形和出峰时间相似,无法准确区分标准样品的特征峰。同时将大肠杆菌样品用HPLC进行测定,其出现的峰无法与标准样品的峰准确对应并找到,即采用单独的HPLC无法判断样品中是否含有某信号分子。

通过对AHLs的HPLC-MS的研究初探,成功建立了6种标准信号分子的快速测定条件,并且采用标准信号分子的测定条件对培养不同时间的大肠杆菌进行测定,得到了随时间变化的信号分子含量,表明通过HPLC-MS可以测定细菌微生物的AHLs含量。在未来可以通过对信号分子的测定来对食品的货架期进行预测,为人们的生活提供更好的帮助。