

## 研究报告

## 鼠李糖乳杆菌菌毛 SpaA 亚基的表达、抗体制备及其种属特异性研究

魏永峰<sup>1</sup> 杨振泉<sup>1,2\*</sup> 高璐<sup>1</sup> 饶胜其<sup>1</sup> 尹永祺<sup>1</sup> 方维明<sup>1</sup> 顾瑞霞<sup>1,2</sup>

(1. 扬州大学食品科学与工程学院 江苏 扬州 225127)

(2. 扬州大学 江苏省乳品生物技术与安全控制重点实验室 江苏 扬州 225127)

**摘要:**【目的】制备鼠李糖乳杆菌菌毛亚基 SpaA 多克隆抗体, 研究其种属特异性。【方法】应用 PCR 方法从鼠李糖乳杆菌 GG 的基因组扩增出 *spaA*, 并连接到质粒 pET-28α(+) 中。将重组质粒转化大肠杆菌 BL21(DE3), 经 IPTG 诱导表达和镍柱纯化制备重组 SpaA。通过免疫 BALB/c 小鼠获得多克隆抗体, 利用全菌 ELISA、Western 和 Dot-blot 分析了 SpaA 在 18 株乳酸菌(12 个种)中的分布特征。【结果】表达的重组 SpaA 分子量为 36 kD, 与预期大小一致; 获得的 SpaA 抗体效价为 1:12 800。Western 结果显示抗体与天然 SpaA 具有良好的反应性。在测定的 18 株乳酸菌中, 鼠李糖乳杆菌、干酪乳杆菌、副干酪乳杆菌 3 个种属菌株的 *spaA* 基因 PCR 和 RT-PCR 检测均为阳性。但全菌 ELISA 和 Dot-blot 结果显示, 只有 3 株鼠李糖乳杆菌的全菌细胞与 SpaA 抗体呈特异性反应, 而其它种属的菌株没有明显的交叉反应。【结论】尽管 *spaA* 基因在鼠李糖乳杆菌、干酪乳杆菌、副干酪乳杆菌中具有高度同源性, 但 SpaA 蛋白只特异性地呈现在鼠李糖乳杆菌细胞表面。本研究获得的 SpaA 抗体, 为高黏附性鼠李糖乳杆菌的免疫磁珠分离及菌毛功能研究提供了工具。

**关键词:** 鼠李糖乳杆菌 GG, 菌毛, SpaA 亚基, 表达, 抗体

Expression, antibody production and species specificity of SpaA pilin subunit from *Lactobacillus rhamnosus*WEI Yong-Feng<sup>1</sup> YANG Zhen-Quan<sup>1,2\*</sup> GAO Lu<sup>1</sup> RAO Sheng-Qi<sup>1</sup>YIN Yong-Qi<sup>1</sup> FANG Wei-Ming<sup>1</sup> GU Rui-Xia<sup>1,2</sup>

(1. College of Food Science and Engineering, Yangzhou University, Yangzhou, Jiangsu 225127, China)

(2. Jiangsu Key Laboratory of Dairy Biological Technology and Safety Control, Yangzhou University, Yangzhou, Jiangsu 225127, China)

**Abstract:** [Objective] To obtain the polyclonal antibody against SpaA pilin subunit from *Lactobacillus rhamnosus*, and study its species specificity. [Methods] The *spaA* of *Lactobacillus rhamnosus* GG

**Foundation item:** National Natural Science Foundation of China (No. 31371806); College Natural Science Foundation of Jiangsu Province (No. 15KJA550004)

\*Corresponding author: Tel: 86-514-89786037; Fax: 86-514-87313372; E-mail: yangzq@yzu.edu.cn

**Received:** August 14, 2015; **Accepted:** January 08, 2016; **Published online** (www.cnki.net): January 11, 2016

**基金项目:** 国家自然科学基金项目(No. 31371806); 江苏省高校自然科学基金项目(No. 15KJA550004)

\*通讯作者: Tel: 86-514-89786037; Fax: 86-514-87313372; E-mail: yangzq@yzu.edu.cn

**收稿日期:** 2015-08-14; **接受日期:** 2016-01-08; **优先数字出版日期**(www.cnki.net): 2016-01-11

(LGG) was amplified by PCR and cloned into plasmid pET-28α(+). The resultant plasmid was transformed into *Escherichia coli* BL21(DE3), and the recombinant SpaA was expressed by IPTG induction and purified by Ni-NTA column. The purified protein was used to immunize the BALB/c mice for raising polyclonal antibody. The SpaA presence in 18 Lactic acid bacteria (LAB) strains belonging to 12 species was detected by indirect whole-cell ELISA, Western and Dot-blot assays. **[Results]** The recombinant SpaA was obtained with molecular mass of 36 kD as expected. The antibody against SpaA was generated with titer of 1:12 800. Western analysis showed that the antibody can specifically react with the native SpaA. Among 18 LAB strains, all of *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus paracasei* strains showed positive reactions in the *spaA*-PCR and RT-PCR detection, while only 3 strains of *Lactobacillus rhamnosus* showed positive reactions with SpaA antibody in whole-cell ELISA and Dot-blot, and none of the other strains had obvious cross reaction with SpaA antibody. **[Conclusion]** Although SpaA encoding gene was highly homologous among *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus paracasei* species, SpaA protein was uniquely expressed and cell surface-exposed in *Lactobacillus rhamnosus*. The SpaA antibody obtained in this study provide a useful tool for further immunomagnetic separation and pilin function investigation of highly adhesive *Lactobacillus rhamnosus* strains.

**Keywords:** *Lactobacillus rhamnosus* GG, Pilin, SpaA subunit, Expression, Antibody

乳酸菌(Lactic acid bacteria, LAB)是定殖在人和动物肠道中的优势菌群,在维持宿主肠道微生态平衡、调节免疫应答、抑制致病菌生长中发挥了重要作用<sup>[1-2]</sup>。LAB 是被公认为安全级(Generally regarded as safe, GRAS)的微生物<sup>[3]</sup>,从人体和环境样品中分离功能性 LAB 是目前功能食品及微生态制剂研究中的热点。鼠李糖乳杆菌(*Lactobacillus rhamnosus*, Lr)是目前研究与应用较为深入的 LAB 之一,其中菌株 LGG 具有较高的体内定殖能力和显著的免疫调节功效<sup>[4]</sup>,已被广泛应用于食品补充剂及益生菌产品中。研究显示 LGG 菌株表面分布有菌毛结构<sup>[5]</sup>,该结构与菌株定殖与免疫调节能力密切相关<sup>[6]</sup>。比较基因组学研究显示 LGG 中含有编码菌毛的 *spaCBA* 基因簇,其编码产物形成以 SpaA 亚基为轴心,SpaB 亚基位于底部,SpaC 亚基位于顶端的杂聚体菌毛结构<sup>[7]</sup>。已有研究报道 SpaC 亚基在与细胞的黏附中发挥了重要作用,但对 SpaA 和 SpaB 亚基的功能研究尚不多见<sup>[8]</sup>。另一方面,基因组分析显示 *spaA* 在产菌毛结构的 Lr 菌株间最为保守<sup>[9]</sup>,并且 SpaA 亚基贯穿整个菌毛,因此,可作为鼠李糖乳杆菌免疫检测及磁珠分离的潜在靶抗原;但是最近的研究表明与 Lr 遗传关系相近的其它乳酸菌的基因组中也存在 *spaA* 的高度同源

序列<sup>[10]</sup>,在这些种属的 LAB 中 *spaA* 能否表达,并在菌株表面形成 SpaCBA 菌毛类似结构,目前尚不清楚<sup>[11]</sup>。因此,SpaA 的种属特异性还需要进一步研究。本文拟应用大肠杆菌原核表达重组 SpaA,制备其特异性抗体,并分析了 SpaA 抗体的种属特异性,以期为高黏附性 Lr 的菌毛功能研究及免疫磁珠分离提供合适的抗体工具。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 菌株和质粒:** *Escherichia coli* DH5α、*E. coli* BL21(DE3)、pET-28α(+)质粒均由本实验室保存,乳酸菌菌株来源如表 1 所示。

**1.1.2 主要试剂:**限制性内切酶 *Nco* I、*Xho* I、Protein Marker、SanPrep 柱式质粒 DNA 小量抽提试剂盒、DNA 片段回收与纯化试剂盒、辣根过氧化物酶 DAB 显色试剂盒、卡那霉素、IPTG 均购自上海生物工程股份有限公司;T4 DNA 连接酶、DL 2000 DNA Marker、TaKaRa MiniBEST universal RNA Extraction Kit 均购自 TaKaRa 公司;RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit 购自 Fermentas 公司;辣根过氧化物酶(HRP)标记的羊抗鼠 IgG 购自武汉博士德生物工程有限公司;6 周龄

BALB/c 小鼠购自扬州大学比较医学中心; 其他试剂均为国产或进口分析纯。

**1.1.3 主要仪器:** BILON-92 超声波细胞粉碎机, 上海比朗仪器有限公司; DYY-10C 型电泳仪, 北京市六一仪器厂; 紫外凝胶成像系统, 上海天能科技有限公司; ALPHA 1-2LD PLUS 冷冻干燥机, 德国 Christ 公司; PTC-100 PCR 仪, 美国 MJ 公司; ABI 7500 荧光定量 PCR 仪, 美国 ABI 公司。

## 1.2 方法

**1.2.1 表达载体的构建:** 根据 GenBank 中 *spaA* 序列, 利用 Primer Premier 5.0 软件设计引物 P1: 5'-CCGCCATGGGCATGAAAAAGACAATTG-3' (下划线为 *Nco* I 酶切位点), P2: 5'-AATCTCGAGGAAACCATTCGCGCGCT-3' (下划线为 *Xho* I 酶切位点)。采用改良 CTAB 法<sup>[12]</sup>提取菌株 LGG 基因组 DNA 为模板, 进行 *spaA* 的 PCR 扩增。反应体系为: 10×Buffer 2.5  $\mu$ L, 25 mmol/L dNTPs 1  $\mu$ L, 10  $\mu$ mol/L 上下游引物各 0.5  $\mu$ L, DNA 模板 2  $\mu$ L, 5 U/ $\mu$ L *Taq* DNA Polymerase 0.3  $\mu$ L, 加 ddH<sub>2</sub>O 至 25  $\mu$ L。扩增程序为: 94 °C 5 min; 94 °C 50 s, 59 °C 1 min, 72 °C 2 min, 共 30 个循环; 72 °C 10 min。PCR 产物经 DNA 回收试剂盒回收目的片段后, 用 *Nco* I 和 *Xho* I 分别对目的基因和 pET-28 $\alpha$ (+)质粒进行双酶切; 用 T4 DNA 连接酶 16 °C 过夜连接回收片段。采用热激法<sup>[13]</sup>将连接产物转入 *E. coli* DH5 $\alpha$  感受态细胞中, 涂布于 LB 固体培养基<sup>[14]</sup>(含卡那霉素 50 mg/L), 37 °C 培养。挑取单菌落进行菌落 PCR 鉴定, 并提取质粒进行双酶切鉴定, 将鉴定为阳性克隆提取质粒(pET28 $\alpha$ -*spaA*)委托上海生工生物工程股份有限公司进行 *spaA* 测序鉴定。

**1.2.2 重组 SpaA 的诱导表达及纯化:** 表达质粒 pET28 $\alpha$ -*spaA* 转化 *E. coli* BL21(DE3)感受态细胞, 接种到 LB 培养基<sup>[14]</sup>(含卡那霉素 50 mg/L)中, 37 °C、200 r/min 培养过夜。将培养物按 1%接种于 100 mL 新鲜 TB 培养基<sup>[14]</sup>(含卡那霉素 50 mg/L)中, 37 °C、200 r/min 培养至菌液 OD<sub>600</sub> 达到 0.6–0.8, 加入诱导剂 IPTG (终浓度为 0.05 mmol/L), 37 °C、200 r/min

培养 5 h。4 °C、10 000 r/min 离心 10 min 收集细胞, PBS 重悬菌体, 冰浴超声破碎 40 min (超声 2 s, 间歇 4 s, 300 W), 4 °C、10 000 r/min 离心 15 min 收集沉淀包涵体。将包涵体用 6 mol/L 盐酸胍(pH 8.0)溶解, 镍柱纯化操作按 Ni-NTA-Sefinose Column 说明书进行。

**1.2.3 SpaA 抗体制备:** 将纯化的重组 SpaA 与等体积弗氏完全佐剂乳化, 皮下多点注射免疫 BALB/c 小鼠, 免疫剂量为 50  $\mu$ g/只; 首次免疫后分别在 14 d 和 21 d 各加强免疫一次, 重组蛋白与等体积弗氏不完全佐剂乳化, 免疫剂量为 25  $\mu$ g/只。在第 2 次加强免疫 3 d 后, 眼眶采血, 参考文献[15]分离血清, 并测定血清效价, -20 °C 保存备用。

**1.2.4 Western blot 鉴定:** 将 BSA (阴性对照)、纯化的重组 SpaA (阳性对照)以及 LGG 细胞裂解液进行 SDS-PAGE 电泳, 采用电转印法将蛋白转移至硝酸纤维素膜, 5%脱脂乳封闭 1 h; 加小鼠 SpaA 抗血清(1:4 000), 37 °C 孵育 1 h, TBST 洗涤 3 次, 10 min/次; 加 HRP 标记的羊抗鼠 IgG (1:5 000), 37 °C 孵育 1 h, TBST 洗涤; 用辣根过氧化物酶 DAB 显色试剂盒进行 DAB 显色, 程序按说明书进行。

**1.2.5 全菌 ELISA 检测:** 参考文献[16]建立全菌 ELISA 方法测定不同乳酸菌菌株与 SpaA 抗体的反应性。将乳酸菌接种至 MRS 培养基<sup>[17]</sup>, 37 °C, 厌氧罐中静置培养 18–24 h。培养物 4 °C、10 000 r/min 离心 10 min 收集菌体, 用 PBS 将菌体调整至 10<sup>8</sup> 个/mL (OD<sub>600</sub> 约为 0.5)。酶标板每孔加入 100  $\mu$ L 2.5%戊二醛溶液, 37 °C 1 h, 去离子水洗涤 3 次; 加入上述菌体 100  $\mu$ L/孔, 置 37 °C 直至干燥; 用 2.5% BSA 封闭 1 h, PBST 洗涤 3 次; 抗体工作浓度为 1:1 600, 以阴性血清为对照, 37 °C 孵育 1 h, PBST 洗涤; 加入 HRP 标记的羊抗鼠 IgG (1:4 000), 100  $\mu$ L/孔, 37 °C 孵育 1 h, PBST 洗涤; TMB 显色 10 min, 2 mol/L 浓硫酸终止反应, 在 490 nm 波长处读取 OD 值。重复 3 次, 以  $P/N \geq 2.1$  作为阳性判断标准( $P$  为阳性血清 OD<sub>490</sub> 值,  $N$  为阴性对照 OD<sub>490</sub> 值)。

**1.2.6 菌株 *spaA*-PCR 检测:** 将乳酸菌接种至 MRS 培养基, 37 °C 厌氧罐中静置培养 18–24 h。采用改良 CTAB 法<sup>[12]</sup>提取基因组 DNA, 应用引物 P1 和 P2 进行 PCR 扩增, 检测方法参见 1.2.1。

**1.2.7 Dot-blot 检测:** 取 SpaA 阳性乳酸菌作为待测菌株, 接种至 MRS 培养基, 37 °C 厌氧罐中静置培养 18–24 h。培养物 4 °C、10 000 r/min 离心 10 min 收集菌体, 用 PBS 调整菌体浓度至  $10^8$  个/mL ( $OD_{600}$  约为 0.5)。冰浴超声破碎 30 min (超声 2 s, 间歇 4 s, 300 W), 4 °C、4 000 r/min 离心 5 min 收集上清。取 10  $\mu$ L 乳酸菌细胞悬液和细胞裂解上清分别点在硝酸纤维素膜上, 37 °C 干燥 15 min, 用 5% 脱脂乳封闭 1 h 后, 抗体的孵育、洗膜、显色方法参见 1.2.4。

**1.2.8 菌株 *spaA* 基因反转录荧光定量 PCR (Real time RT-PCR)检测:** 将乳酸菌接种至 MRS 培养基, 37 °C 厌氧罐中静置培养 18–24 h。培养物 4 °C、10 000 r/min 离心 10 min 收集菌体, 用 PBS 调整菌体至  $10^8$  个/mL ( $OD_{600}$  约为 0.5)。用 TaKaRa MiniBEST universal RNA Extraction Kit 试剂盒提取总 RNA, 程序按说明书进行; 总 RNA 反转录获得 cDNA 程序按 RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit 试剂盒说明书进行。荧光定量 PCR 操作参考文献[18]进行, 反应程序为: 94 °C 10 min; 94 °C 20 s, 58 °C 15 s, 72 °C 20 s, 共 40 次循环。根据反转录荧光定量 PCR 扩增曲线比较 *spaA*<sup>+</sup> 菌株中的 *spaA* 转录体拷贝数。

## 2 结果与分析

### 2.1 鼠李糖乳杆菌 SpaA 多克隆抗体的获得及其反应性

应用大肠杆菌表达系统表达了 SpaA 重组蛋白, 分子量大小为 36 kD, 与预期大小一致。将纯化的重组 SpaA 免疫 BALB/c 小鼠, 成功获得了 SpaA 抗体(anti-SpaA), 经 ELISA 测定效价为 1:12 800。以重组 SpaA 为阳性对照、BSA 为阴性对照, 通过 Western blot 检测 SpaA 抗体与鼠李糖乳杆菌(LGG)细胞裂解液的反应性。结果如图 1 所示, 抗体与重组 SpaA (2)和 LGG 细胞裂解液(3)均能发

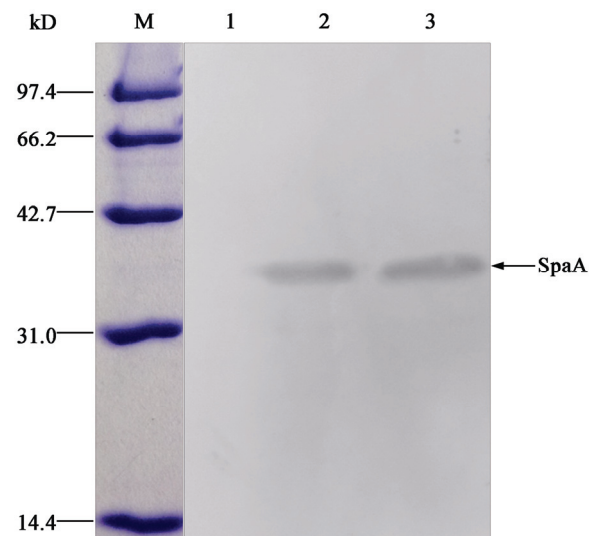


图 1 重组 SpaA 抗体的 Western blot 分析

Figure 1 Western blot analysis of polyclonal antibody against recombinant SpaA

注: M: 蛋白分子量标记; 1: BSA (阴性对照); 2: 重组 SpaA (阳性对照); 3: LGG 细胞裂解液。

Note: M: Standard protein molecular weight marker; 1: BSA (negative control); 2: The recombinant SpaA (positive control); 3: The cell lysate solution of LGG.

生特异性反应, 产生的印迹条带大小一致, 而与 BSA 对照(1)不发生反应, 表明用重组 SpaA 免疫获得的多克隆抗体能够特异性识别 LGG 菌体中的天然 SpaA。

### 2.2 SpaA 抗体的种属特异性

应用 SpaA 抗体建立了全菌 ELISA, 并对 18 个供试菌株(12 个种)菌体细胞的反应性进行测定, 同时通过 PCR 测定了不同菌株中的 *spaA* 基因分布, 结果如表 1 所示。*spaA*-PCR 结果显示 3 株鼠李糖乳杆菌(LGG, LV108, Lr hsnY)、2 株干酪乳杆菌(FS13, F20-5-3)和副干酪乳杆菌 YZU27 基因组中均存在 *spaA* 基因, 其他菌株的 *spaA* 扩增均为阴性。但是全菌 ELISA 测定结果显示, SpaA 抗体只与 3 株鼠李糖乳杆菌(LGG、LV108 和 Lr hsnY)呈现阳性反应( $P>0.2$ ,  $P/N\geq 2.1$ ), 而与其他种属的 15 个菌株均呈阴性反应( $P/N<2.1$ )。结果表明 SpaA 只在鼠李糖乳杆菌中能够有效的表达并转运到菌体表面形成特异性表面抗原, 而干酪乳杆菌和副干酪乳杆

表 1 SpaA 抗体特异性测定结果  
Table 1 The determination of specificity of SpaA antibody

菌株 Strains	种属 Species	菌株来源 Source of strains	spaA 扩增 spaA amplification	P 值 P value	N 值 N value	P/N 值 P/N value	判定结果 Determine results
LGG	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	本实验室保存	+	0.700	0.142	4.94	+
LV108	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	动物肠道	+	0.588	0.141	4.17	+
Lr hsny	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	动物肠道	+	0.608	0.138	4.40	+
FS13	<i>Lactobacillus casei</i>	发酵卤水	+	0.247	0.147	1.68	-
F20-5-3	<i>Lactobacillus casei</i>	发酵豆制品	+	0.233	0.152	1.53	-
YZU27	<i>Lactobacillus paracasei</i>	泡菜	+	0.232	0.160	1.45	-
P2	<i>Lactobacillus plantarum</i>	泡菜	-	0.152	0.150	1.01	-
HP12	<i>Lactobacillus plantarum</i>	泡菜	-	0.197	0.177	1.11	-
F4-5-11	<i>Lactobacillus oryzae</i>	臭豆干	-	0.255	0.148	1.72	-
F28-8	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	臭豆干	-	0.318	0.179	1.78	-
H10	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	腐乳	-	0.257	0.173	1.47	-
H13	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	腐乳	-	0.245	0.163	1.51	-
F7	<i>Lactobacillus fermentum</i>	臭豆干	-	0.160	0.141	1.13	-
YZU.12	<i>Lactobacillus brevis</i>	泡菜	-	0.236	0.183	1.29	-
YZU.13	<i>Bifidobacterium</i> sp.	发酵乳	-	0.235	0.174	1.35	-
YZU.32	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	泡菜	-	0.137	0.130	1.05	-
FS14	<i>Lactobacillus buchneri</i>	发酵卤水	-	0.292	0.205	1.42	-
Y38	<i>Lactobacillus confusus</i>	发酵豆腐	-	0.179	0.151	1.18	-

注: +: 阳性; -: 阴性。

Note: +: Positive; -: Negative.

菌中尽管存在 *spaA* 序列,但不能在菌体表面形成成熟的菌毛结构,因此,SpaA 抗体对鼠李糖乳杆菌的全菌细胞具有特异性。

### 2.3 SpaA 在 *spaA*<sup>+</sup>菌株中的表达及亚细胞定位

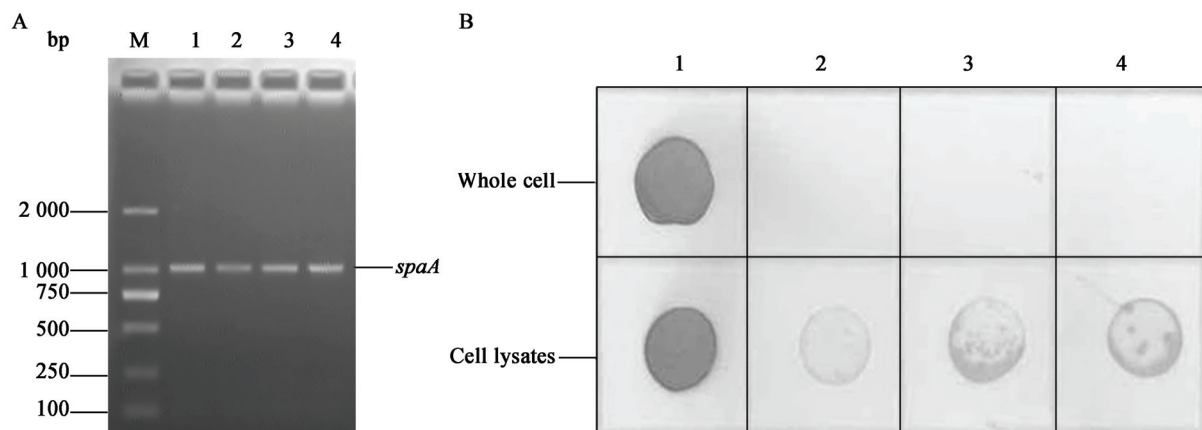
应用 Dot-blot 方法测定了 *spaA*<sup>+</sup>菌株细胞裂解液和全菌细胞的反应性,对 SpaA 的表达及亚细胞定位进行分析,结果如图 2 所示。图 2A 显示菌株 LGG、*L. casei* FS13、*L. casei* F20-5-3 和 *L. paracasei* YZU27 中均能扩增出 *spaA* 基因。图 2B 显示菌株 LGG、*L. casei* FS13、*L. casei* F20-5-3 和 *L. paracasei* YZU27 细胞裂解液均与 anti-SpaA 呈阳性反应,但 LGG 细胞裂解液反应信号最强。在这 4 个菌株的全菌细胞反应性测试中,只有 LGG 与 anti-SpaA 呈阳性,其它 3 株无明显反应。结果证实 SpaA 在 *L. casei* FS13、*L. casei* F20-5-3 和 *L. paracasei* YZU27 胞内

能够少量表达,但不能跨膜转运到菌体表面形成表面抗原,而在 LGG 中 SpaA 大量呈现在细胞表面,可能形成了成熟的菌毛结构。因此基于 SpaA 抗体的全菌 Dot-blot 分析可以快速鉴定样品中 *spaA*<sup>+</sup>的鼠李糖乳杆菌菌株。

### 2.4 *spaA* 的 Real time RT-PCR 分析结果

应用 Real time RT-PCR 分析了 *spaA* 在不同菌株中的转录差异,扩增曲线如图 3 所示。结果表明在 5 株 *spaA*<sup>+</sup>菌株(LGG, LV108, FS13, F20-5-3 和 YZU27)中均存在 *spaA* 转录体,但在鼠李糖乳杆菌 LGG 和 LV108 中 mRNA 拷贝数较高,而在干酪乳杆菌 FS13、F20-5-3 和副干酪乳杆菌 YZU27 中拷贝数较少,测定结果与 Dot-blot 结果相一致,表明 *spaA* 基因在鼠李糖乳杆菌中表达相对活跃,这可能与参与菌毛组装相关的分选酶基因活性有关<sup>[19]</sup>。



图2 SpaA 在 *spaA* 基因阳性菌株中的表达及亚细胞定位分析Figure 2 The expression and subcellular location of SpaA in *spaA* gene positive strains

注: A: 菌株 *spaA* 基因扩增结果; B: Dot-blot 结果. M: DL2000 DNA 分子量标记; 1: 鼠李糖乳杆菌 GG; 2: 干酪乳杆菌 FS13; 3: 干酪乳杆菌 F20-5-3; 4: 副干酪乳杆菌 YZU27.

Note: A: The *spaA* gene amplification results; B: The Dot-blot results. M: DL2000 DNA Marker; 1: *Lactobacillus rhamnosus* GG; 2: *Lactobacillus casei* FS13; 3: *Lactobacillus casei* F20-5-3; 4: *Lactobacillus paracasei* YZU27.

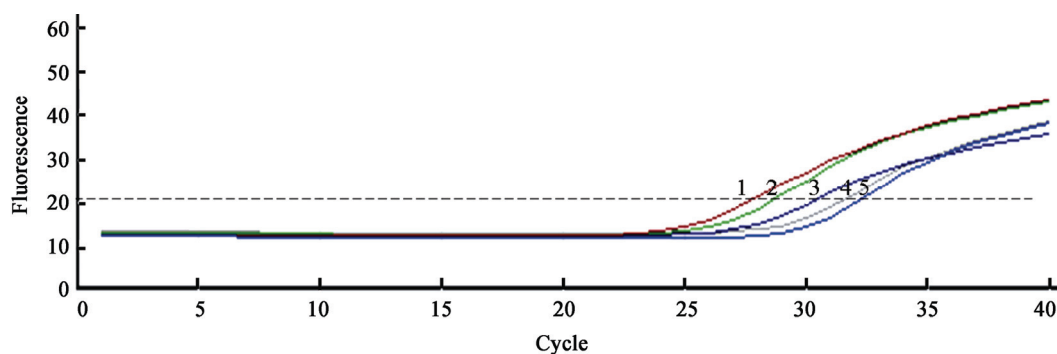


图3 菌株中 SpaA mRNA 实时荧光定量 PCR 扩增曲线

Figure 3 Real time RT-PCR amplification curve of SpaA mRNA in *spaA*<sup>+</sup> strains

注: 1: 鼠李糖乳杆菌 GG; 2: 鼠李糖乳杆菌 LV108; 3: 干酪乳杆菌 FS13; 4: 干酪乳杆菌 F20-5-3; 5: 副干酪乳杆菌 YZU27.

Note: 1: *Lactobacillus rhamnosus* GG; 2: *Lactobacillus rhamnosus* LV108; 3: *Lactobacillus casei* FS13; 4: *Lactobacillus casei* F20-5-3; 5: *Lactobacillus paracasei* YZU27.

### 3 讨论

鼠李糖乳杆菌 GG 最初从健康人肠道中分离得到, 目前主要应用于酸奶、奶酪等产品中, 已成为应用与研究最为广泛的益生菌菌株之一<sup>[20]</sup>。目前, 有研究表明鼠李糖乳杆菌 GG 中 SpaCBA 菌毛蛋白是其黏附到肠黏液和肠上皮细胞, 并定殖在肠道中成为肠道菌群重要组成部分的关键因素。Douillard 等研究显示 Lr 菌株 SpaCBA 菌毛与其对肠黏液黏附能力呈正相关<sup>[9]</sup>。SpaA 是 SpaCBA 菌毛的主要结

构蛋白, 贯穿整个菌毛, 可作为高黏附性 Lr 菌株免疫磁珠分离的理想靶抗原。本研究在构建 SpaA 表达菌株和获得纯化的重组 SpaA 的基础上, 制备了重组 SpaA 的多克隆抗体, 并进行 Western blot 验证, 表明该抗体能够识别天然 SpaA, 为进一步探究 Lr 菌株菌毛的功能特性及免疫分离检测提供了抗体工具。

鼠李糖乳杆菌 GG 菌毛 SpaA 亚基蛋白结构类似于表面黏液黏附因子(MBF)蛋白, 含有 LPXTG

锚定基序和跨膜结构域<sup>[18]</sup>,是在菌体表面形成菌毛结构的关键蛋白。*spaA* 分布于大多数高黏附的 Lr 菌株中,并且序列高度保守(>98%),但是结构基因或启动子序列的微小变化会导致菌毛缺失<sup>[9]</sup>。von Ossowski 等研究表明 *spaA* 序列在 *L. casei* 和 *L. paracasei* 中也存在同源序列,并且在 mRNA 水平上均能检测到表达,但并没有在蛋白质水平上予以证实<sup>[21]</sup>。本室前期分析中也显示 *spaA* 在 Lr、*L. casei* 和 *L. paracasei* 中的序列相似性≥98%,但在 *L. casei* 和 *L. paracasei* 菌株表面是否存在 Lr 菌毛类似的结构尚不清楚。本研究应用中 SpaA 抗体建立了全菌 ELISA,并测定了 18 株乳酸菌表面 SpaA 的分布,结果显示只有 3 株 Lr 菌株与 SpaA 抗体呈阳性反应,而 *L. casei* 和 *L. paracasei* 菌株中尽管 *spaA*-PCR 为阳性,但与 SpaA 抗体没有交叉反应,进一步由 Dot-blot 和 Real time RT-PCR 证实,*spaA* 基因在不同菌株中具有表达差异性,*L. casei* 和 *L. paracasei* 菌株中的 *spaA* 基因同源序列不能高效表达并在菌体表面形成 SpaCBA 菌毛结构,这可能是导致 Lr 菌株与 *L. casei*、*L. paracasei* 的黏附能力差异<sup>[21]</sup>的重要原因,因此,相比 *spaA* 基因序列及其转录体检测,SpaA 抗体反应作为黏附性菌株筛选依据更为可靠。本研究为高黏附性 Lr 菌株的免疫磁珠分离筛选提供了抗体工具。

## 参 考 文 献

- [1] García CEV, Petrova M, Claes IJJ, et al. Piliation of *Lactobacillus rhamnosus* GG promotes adhesion, phagocytosis, and cytokine modulation in macrophages[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2015, 81(6): 2050-2062
- [2] Yoda K, Miyazawa K, Hosoda M, et al. *Lactobacillus* GG-fermented milk prevents DSS-induced colitis and regulates intestinal epithelial homeostasis through activation of epidermal growth factor receptor[J]. European Journal of Nutrition, 2014, 53(1): 105-115
- [3] Ren DY, Li C, Qin YQ, et al. *In vitro* evaluation of the probiotic and functional potential of *Lactobacillus* strains isolated from fermented food and human intestine[J]. Anaerobe, 2014, 30: 1-10
- [4] Nermes M, Kantele JM, Atosuo TJ, et al. Interaction of orally administered *Lactobacillus rhamnosus* GG with skin and gut microbiota and humoral immunity in infants with atopic dermatitis[J]. Clinical & Experimental Allergy, 2011, 41(3): 370-377
- [5] Kankainen M, Paulin L, Tynkynen S, et al. Comparative genomic analysis of *Lactobacillus rhamnosus* GG reveals pili containing a human-mucus binding protein[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2009, 106(40): 17193-17198
- [6] Lebeer S, Claes I, Tytgat HLP, et al. Functional analysis of *Lactobacillus rhamnosus* GG pili in relation to adhesion and immunomodulatory interactions with intestinal epithelial cells[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2012, 78(1): 185-193
- [7] Morita H, Toh H, Oshima K, et al. Complete genome sequence of the probiotic *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 53103[J]. Journal of Bacteriology, 2009, 191(24): 7630-7631
- [8] Reunanen J, von Ossowski I, Hendrickx APA, et al. Characterization of the SpaCBA pilus fibers in the probiotic *Lactobacillus rhamnosus* GG[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2012, 78(7): 2337-2344
- [9] Douillard FP, Ribbera A, Kant R, et al. Comparative genomic and functional analysis of 100 *Lactobacillus rhamnosus* strains and their comparison with strain GG[J]. PLoS Genetics, 2013, 9(8): e1003683
- [10] Toh H, Oshima K, Nakano A, et al. Genomic adaptation of the *Lactobacillus casei* group[J]. PLoS One, 2013, 8(10): e75073
- [11] Tripathi P, Beaussart A, Alsteens D, et al. Adhesion and nanomechanics of pili from the probiotic *Lactobacillus rhamnosus* GG[J]. ACS Nano, 2013, 7(4): 3685-3697
- [12] Jin CJ. Isolation and characterization of highly adhesive lactic acid bacteria strains and their hydrophobic properties[D]. Yangzhou: Master's Thesis of Yangzhou University, 2013 (in Chinese)
- [13] 靳彩娟. 高粘附性乳酸菌的筛选、鉴定及其表面疏水特性研究[D]. 扬州: 扬州大学硕士学位论文, 2013
- [13] Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, et al. Short Protocols in Molecular Biology[M]. Translated by Yan ZY and Wang HL. 3rd Edition. Beijing: Science Press, 1998: 22-23 (in Chinese)
- [13] 奥斯伯, 布伦特, 金斯顿, 等. 精编分子生物学实验指南[M]. 颜子颖, 王海林, 译. 第3版. 北京: 科学出版社, 1998: 22-23
- [14] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual[M]. Translated by Jin DY and Li MF. 2nd Edition. Beijing: Science Press, 1992: 908-909 (in Chinese)
- [14] 萨姆布鲁克, 弗里奇, 曼尼阿蒂斯. 分子克隆实验指南[M]. 金冬雁, 黎孟枫, 等译. 第2版. 北京: 科学出版社, 1992: 908-909
- [15] Cao XT, Yu YZ, Sun WM, et al. Immunology Technology and Its Application[M]. Beijing: Science Press, 2010: 198-191 (in Chinese)
- [15] 曹雪涛, 于益芝, 孙卫民, 等. 免疫学技术及其应用[M]. 北京: 科学出版社, 2010: 198-191
- [16] Xu B, Gao MY, Gong JS, et al. Whole cell dry-coating in ELISA for detecting serum antibody against fowl cholera[J]. China Poultry, 2009, 31(5): 30-33 (in Chinese)
- [16] 徐步, 高明燕, 龚建森, 等. 采用全菌抗原干燥包被法 ELISA 检测禽霍乱血清抗体的研究[J]. 中国家禽, 2009, 31(5): 30-33
- [17] Gu RX, Yang ZQ, Li ZH, et al. Probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from stool samples of longevous people in regions of Hotan, Xinjiang and Bama, Guangxi, China[J]. Anaerobe, 2008, 14(6): 313-317
- [18] Markowicz C, Olejnik-Schmidt A, Borkowska M, et al. *SpaCBA* sequence instability and its relationship to the adhesion efficiency of *Lactobacillus casei* group isolates to Caco-2 cells[J]. Acta Biochimica Polonica, 2014, 61(2): 341-347
- [19] Douillard FP, Rasinkangas P, von Ossowski I, et al. Functional identification of conserved residues involved in *Lactobacillus rhamnosus* strain GG sortase specificity and pilus biogenesis[J]. The Journal of Biological Chemistry, 2014, 289(22): 15764-15775
- [20] Doron S, Snyderman DR, Gorbach SL. *Lactobacillus* GG: bacteriology and clinical applications[J]. Gastroenterology Clinics of North America, 2005, 34(3): 483-498
- [21] von Ossowski I, Satokari R, Reunanen J, et al. Functional characterization of a mucus-specific LPXTG surface adhesin from probiotic *Lactobacillus rhamnosus* GG[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2011, 77(13): 4465-4472