

酸胁迫对干酪乳杆菌 H^+ -ATP 酶基因表达的影响*

陈霞¹ 孙志宏¹ 张文弈¹ 孟和^{2**} 张和平^{1**}

(内蒙古农业大学乳品生物技术与工程教育部重点实验室 呼和浩特 010018)

(上海交通大学农业与生物学院 上海 200240)

摘要 耐酸性是乳酸菌重要的益生菌性状之一。实验采用半定量 RT-PCR 法分别对在不同酸度条件下培养后的 3 株不同干酪乳杆菌的 H^+ -ATP 酶基因 mRNA 表达水平进行了比较和分析。实验结果显示,随着培养基酸度增加干酪乳杆菌的生长受到抑制,特别在 pH4.0 条件下干酪乳杆菌的生长受到强烈的抑制, H^+ -ATP 酶基因的表达量随着培养基酸度的增加而增加。推测 H^+ -ATP 酶与干酪乳杆菌耐受酸性条件是有了一定的关联的。

关键词 干酪乳杆菌 耐酸性 H^+ -ATP 酶 半定量 RT-PCR

中图分类号:Q786 文献标识码:A 文章编号:0253-2654(2007)03-0479-04

Expression of H^+ -ATPase Gene Associated with Different Acidic Condition in *Lactobacillus casei**

CHEN Xia¹ SUN Zhi-Hong¹ ZHANG Wen-Yi¹ MENG He^{2**} ZHANG He-Ping^{1**}

(Key Laboratory of Dairy Biotechnology and Engineering Ministry of Education, Inner Mongolia Agricultural University, Huhhot 010018)

(College of Agriculture and Biology, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240)

Abstract The ability of acid tolerance is one of the most important properties of lactic acid bacteria. To investigate the gene expression of three stains of *Lactobacillus casei* which incubated in different acidic condition, a semi-quantitative RT-PCR method was used to detect the H^+ -ATPase gene expression in different acidic condition. The result indicated that the growth of *Lactobacillus casei* had been restrained by the acid stress, especially when the incubated condition changed to pH4.0 and the expression of H^+ -ATPase gene was increased along with the increased of incubated condition acidity. We guess it has some relationship between H^+ -ATPase and the growth ability of *Lactobacillus casei* in different acidic condition.

Key words *Lactobacillus casei*, acid tolerance H^+ -ATPase, Semi-quantitative RT-PCR

乳酸菌是人体肠道中正常菌群之一,当达到一定数量时,能够改善调节宿主体内微生物菌群的平衡,对宿主的健康有一定促进作用^[1]。因此能否在人体肠道中的低 pH 值,高胆汁酸中存活是有益菌群面对的首要挑战,同时也是进行益生菌筛选的先决条件。另外,能否在不断降低的酸性环境中保持较高的活性,也是筛选性质优良乳酸菌发酵剂的标准之一。

人们对于乳酸菌耐酸机理进行了许多有益的探索和研究。其中质子原动力透性转移酶系统(PMF)认为, H^+ -ATP 酶作为胞膜结合蛋白酶,其作用为通过消耗胞体内的 ATP,将胞内质子(H^+)泵出

胞外,以保持胞内 pH 值中性。与此同时,产生胞膜质子原动力,因此称其为质子移位膜 ATP 酶(proton translocation ATPase)。 H^+ -ATP 酶水平的提高通过膜上功能单元(F_1F_0 复合体)的增加而获得。pH 值的调节是通过依靠于细胞质 pH 值的 H^+ -ATP 酶的数量和活性的改变而调节。 F_1F_0 复合体具有氧化特性或光磷酸化作用。该系统主要在酸性环境中发生作用的低亲和力系统,转运物为葡萄糖。乳酸菌依靠该系统可将葡萄糖和其它溶质逆浓度梯度通过胞膜上的载体蛋白,即透性酶由胞外转至胞内,同时还伴有氢离子向胞内的转移^[2-7]。

本研究通过检测不同酸度条件下干酪乳杆菌

* 国家自然科学基金项目(No. 30560097), 国家高科技研究发展计划(863 计划)项目(No. 2006AA10Z345)

** 通讯作者 Tel: 0471-4319940, 021-34204538, E-mail: hepingdd@vip.sina.com amenghe@sjtu.edu.cn

收稿日期 2006-08-07, 修回日期 2006-10-09

中 H^+ -ATP 酶基因的表达,旨在了解干酪乳杆菌 H^+ -ATP 酶与耐酸性间的关系,探索乳酸菌耐酸可能的分子机制,为乳酸菌益生菌株的筛选、遗传改造和应用提供基本研究材料。

1 材料与方法

1.1 菌株

本实验所用的干酪乳杆菌(*Lactobacillus casei*) *L. casei* ZL3-1, *L. casei* ZL3-2, *L. casei* Zhang 由内蒙古农业大学乳品生物技术与工程教育部重点实验室分离保存。这3株干酪乳杆菌均能在 pH3.5 的 MRS(Man Rogosa Sharpe broth)液体培养基中生长。

1.2 PCR 引物设计与合成

PCR 引物根据 GenBank 提供的相关序列(Accession No: NZ_AAGR01000077)采用 Primer Primer 5.0 设计,由上海桑尼生物科技有限公司合成。 H^+ -ATP 酶基因 PCR 引物:

F1 5'-ATGGTCCGATGGATTAT-3';

R1 5'-AACACGGGAAACAGAAG-3'

GAPDH 基因 PCR 引物:

F2 5'-CTTCCCTGGTGAAGTTAG-3';

R2 5'-GTTTCAGGAAGTAAGCCATT-3'。

1.3 干酪乳杆菌生长曲线的确定

将干酪乳杆菌在液体 MRS 培养基 37℃ 培养过夜后 3000g 离心 10min,弃去上清液,灭菌生理盐水(0.8%)洗涤菌体,3000g 离心 10min,重复3次,收集菌体,每管加入生理盐水将菌体稀释到适当浊度($OD_{600nm} = 0.8 \sim 0.9$)。将供试菌液以2%的量加入不同酸度条件的三角瓶中,以每管5mL的量分装试管。置于37℃恒温培养箱中培养29h。每隔1h取出3支试管用分光光度计测量其600nm处的吸光值,以不含菌液的空白培养基管为空白,平行实验重复3次,取平均值。以吸光度为纵坐标,培养时间为横坐标,绘制生长曲线。

1.4 总 RNA 提取

将 *L. casei* ZL3-1, *L. casei* ZL3-2, *L. casei* Zhang 分别同时培养在 pH4.0、pH5.0、pH6.5 的 MRS 培养基中,在37℃培养到其对数生长期。取处于对数生长期的乳酸菌在2%溶菌酶中作用20min后,收取约50mg菌体沉淀。总RNA提取采用Trizol法(Invitrogen, USA),具体操作按照Trizol试剂盒说明

书进行。在生物分光光度计(Biophotometer, Eppendorf)上测OD值,调整各样总RNA浓度至100ng/ μ L。备用总RNA于-70℃保存。

1.5 RT-PCR 扩增

按反转录试剂盒 TaKaRa RNA PCR Kit(AMV) Ver3.0 要求进行反转录。反转录反应体系组成:1 μ L 10 \times RT Buffer, 2 μ L 25mmol/L MgCl₂, 1 μ L dNTP Mixture 0.25 μ L RNase Inhibitor(40U/ μ L) 0.5 μ L AMV Reverse Transcriptase XL(5U/ μ L), 0.5 μ L Oligo dT-Adaptor Primer(2.5pmol/ μ L), 3 μ L RNA 模板, 1.75 μ L RNase Free dH₂O, 总体系为10 μ L。反转录反应条件:30℃ 10min, 42℃ 30min, 99℃ 5min, 5℃ 5min。PCR 扩增条件:97℃ 变性 5min, 95℃ 30s \rightarrow 55℃ 30s \rightarrow 72℃ 1min, 如此进行30次循环,72℃延伸10min, 4℃保存。

1.6 琼脂糖凝胶电泳检测

取每个样品的目的基因 RT-PCR 产物5 μ L, 对照 GAPDH 基因 RT-PCR 产物2 μ L, 同1 μ L 上样缓冲液混合均匀,分别点样于琼脂糖凝胶孔中,在另一孔中加入5 μ L DL2000 Marker, 5V/cm 电压下电泳30min。电泳结束后,在凝胶成像系统 GDS-8000 System(UVP Biomaging Systems)上留取照片。应用系统软件(Gelpro Analyzer)进行吸光值比较分析,确定目的基因在组织样品中表达量的相对值。

2 结果与分析

2.1 干酪乳杆菌生长曲线

为了了解干酪乳杆菌在不同酸度条件下的生长情况,并以此来确定检测 H^+ -ATP 酶基因表达的时间,实验测定了干酪乳杆菌分别在 pH4.0、5.0 和 6.5 条件下不同时间的吸光值,并绘制了生长曲线。如图1所示,干酪乳杆菌在 pH5.0 和 pH6.5 条件下于3h时进入对数生长期,在10h时进入平台期;在 pH4.0 条件下于3h进入一个迟滞期后,在6h左右进入对数生长期,在17h左右进入平台期。测定结果显示,随着培养基酸度增加,干酪乳杆菌的生长受到抑制, pH5.0 和 pH6.5 条件下已表现这种趋势,到 pH4.0 条件时,干酪乳杆菌的生长受到强烈的抑制。

2.2 H^+ -ATP 酶基因表达的半定量 PCR 检测

2.2.1 RT-PCR 反应循环次数确定:为了准确反映

不同酸度条件下 H^+ -ATP 酶基因表达, 在进行半定量 PCR 时, 要求 PCR 扩增不进入平台期。实验取同一样本 cDNA 分别用 H^+ -ATP 酶和 GAPDH 的 PCR 扩增引物进行了 22、25、28、31 和 34 个循环扩增(见图 2)。实验结果显示, 当 H^+ -ATP 酶基因和 GAPDH 基因达到 31 循环时条带的吸光值基本达到恒定。因此 30 循环被共同 RT-PCR 扩增所采用。

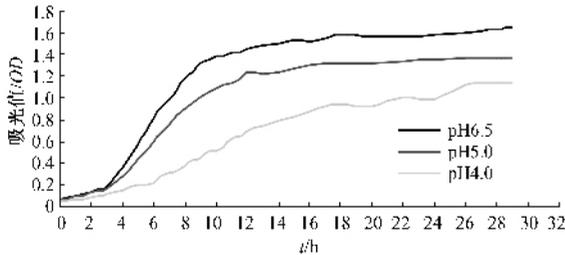


图 1 干酪乳杆菌在不同酸度条件下生长曲线图(*L. casei* Zhang)

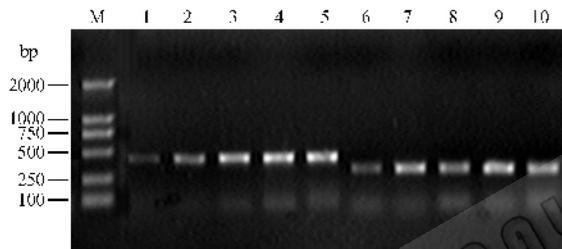


图 2 干酪乳杆菌不同循环次数扩增 H^+ -ATP 酶、GAPDH 产物电泳

M DL2000 marker, 1 H^+ -ATP 酶 22 循环, 2 H^+ -ATP 酶 25 循环, 3 H^+ -ATP 酶 28 循环, 4 H^+ -ATP 酶 31 循环, 5 H^+ -ATP 酶 34 循环, 6 GAPDH 基因 22 循环, 7 GAPDH 基因 25 循环, 8 GAPDH 基因 28 循环, 9 GAPDH 基因 31 循环, 10 GAPDH 基因 34 循环

2.2.2 不同酸度条件下 H^+ -ATP 酶基因的表达: 为了确保 PCR 扩增产物的特异性, 实验将 PCR 产物回收后进行了克隆测序, 其中目的基因 H^+ -ATP 酶 481bp, 参比基因 GAPDH 335bp(图 3)。测序结果表明 PCR 扩增产物确为 H^+ -ATP 酶基因片段。

根据干酪乳杆菌生长曲线, 实验确定在菌体进入对数生长期, 即在培养 8h 时回收菌体并提取总 RNA。参照 RT-PCR 反应循环次数确定实验结果, 实验分别对 pH4.0、5.0 和 6.5 条件下 H^+ -ATP 酶的表达进行了半定量 RT-PCR 检测(图 3)。

根据图 3 所示电泳条带的吸光值比较, 绘制柱状图, 如图 4 所示。由图可见, 随着干酪乳杆菌培养基酸度的增加, H^+ -ATP 酶的表达呈上升趋势, 其中 pH5.0 和 pH4.0 时的表达量分别是 pH6.5 时的

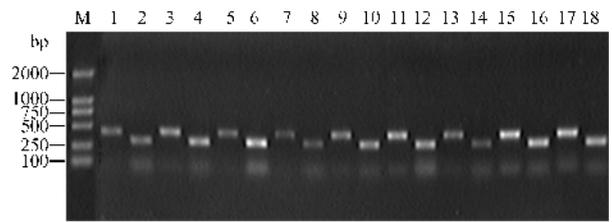


图 3 不同酸度条件下干酪乳杆菌 H^+ -ATP 酶 RT-PCR 电泳

M DL2000 marker, 1~6 *L. casei* ZL 3-1, 7~12 *L. casei* ZL 3-2, 13~18 *L. casei* Zhang, 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17 H^+ -ATP 酶, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18 GAPDH 基因, 1, 2, 7, 8, 13, 14 pH4.0, 3, 4, 9, 10, 15, 16 pH5.0, 5, 6, 11, 12, 17, 18 pH6.5

2.8 倍和 3.3 倍。实验结果在一定程度上反映了干酪乳杆菌 H^+ -ATP 酶同菌细胞酸调节间的相互关系。

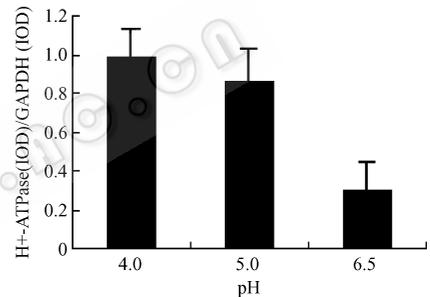


图 4 不同酸度条件下干酪乳杆菌 H^+ -ATP 酶表达($n=3$)

3 讨论

细菌可以在一定范围的 pH 条件下生存, 是因为细菌的细胞质中的 pH 保持在几乎中性的水平^[8]。在细菌中, H^+ -ATP 酶位于细胞膜, 在细胞膜上催化 ATP 和横跨膜的质子梯度的互相交换。依靠特定生物体在生长的条件下, 该酶直接作用于 ATP 的合成和水解^[9]。在含有呼吸链的有机体中, 例如埃希氏菌属大肠杆菌, 该酶的作用为在这些有机体由电子受体支持时, 通过由呼吸产生的质子梯度产生的驱动力合成 ATP。在缺乏呼吸链或是缺乏电子受体的有机体中, 这个酶可以产生横跨细胞膜的质子梯度, 该过程由随后的 ATP 水解所启动。作为厌氧菌的乳酸菌同样含有 F1F0-ATP 复合体。这种细菌缺乏呼吸链, 这里的酶涉及到由 ATP 水解驱动质子的排出, 从而产生必需的溶质传送的驱动力来保持适宜的胞内 pH 值^[8]。在这些厌氧微生物中其 F1F0-ATP 酶的活性可通过低 pH 值加强^[10, 11]。另外, Kobayashi (1986) 在粪链球菌

(*Streptococcus faecalis*) 中发现, H^+ -ATP 酶的活性被提高是通过限制 K^+ 水平的条件下, 并使其在酸性媒介下生长, 因此其真实的启动器是细胞质的质子浓度。在这个过程中该复合体的 α β γ 亚单元的量有所增加^[5]。

本实验对不同酸度条件下干酪乳杆菌 H^+ -ATP 酶基因表达的研究显示, 干酪乳杆菌中 H^+ -ATP 酶的表达水平随着 H^+ 浓度的增加呈上升趋势。说明在干酪乳杆菌中, 其 F1FO-ATP 酶的活性是随着培养条件 pH 值的降低而加强的, 从而暗示了 H^+ -ATP 酶的存在有利于干酪乳杆菌在酸性条件下的生长。目前在国际上还没有人对 H^+ -ATP 酶和干酪乳杆菌耐酸性能之间的关系进行较为深入的研究, 但是该实验结果与以上前人在其他类型微生物上所做研究的实验结果是相吻合的^[5,10,11]。可以推测, 在干酪乳杆菌中 H^+ -ATP 酶与其耐受酸性条件是有一定关联的。

半定量 RT-PCR 是基于基因转录 mRNA 水平对基因表达的检测, 加之影响 PCR 的因素较多, 会一定程度影响实验结果的准确性和可靠性, 因此, 在此实验的基础上, 我们计划在以后的实验中采用基因敲除、RNA 干扰等技术。本实验为进一步确定

H^+ -ATP 酶与干酪乳杆菌耐酸性能之间的关系, 深入阐明干酪乳杆菌在低 pH 条件下存活可能的分子机理, 为乳酸菌益生菌株的筛选、遗传改造和应用提供基础研究数据。

参考文献

- [1] Alm L. The therapeutic effects of various cultures-an overview. Robinson R. K. Therapeutic Properties of Fermented Milks. Elsevier Applied Science, New York, 1991, pp. 45 ~ 64.
- [2] Harold F. M., Van Brunt J. Science, 1977, **197**: 372 ~ 373.
- [3] Harold F. M. Annu Rev Microbiol, 1977, **31**: 181 ~ 203.
- [4] Kobayashi H., Murakami N. J Biol Chem, 1982, **257**(22): 13246 ~ 13252.
- [5] Kobayashi H., Suzuki T., Unemoto T. J Biol Chem, 1986, **261**(2): 627 ~ 630.
- [6] Fillingame R. H. Annu Rev Biochem, 1980, **49**: 1079 ~ 1113.
- [7] Koebmann B. J., Nilsson D., Kuipers O. P., et al. J Bacteriol, 2000, **182**(17): 4738 ~ 4743.
- [8] Kobayashi H. The Journal of Biological Chemistry, 1985, **260**(1): 72 ~ 76.
- [9] Futai M., Kanazawa H. Microbiol Rev, 1983, **47**(3): 285 ~ 312.
- [10] Abrams A., Jensen C. Biochem Biophys Res Commun, 1984, **122**(1): 151 ~ 157.
- [11] Kobayashi H., Suzuki T., Kinoshita N., et al. J Bacteriol, 1984, **158**(3): 1157 ~ 1160.