

研究报告

Rib 类似蛋白在三种乳酸杆菌中的分布

杨伟伟 王智能 郑露华 丁冯玲 梁小波*

(昆明理工大学云南省食品安全研究院 云南 昆明 650500)

摘要:【目的】阐明罗伊氏乳杆菌中 Rib 蛋白在细菌中的亚细胞定位, 以及其在几种乳酸杆菌中的分布, 探讨 Rib 蛋白潜在的生物学功能。【方法】以罗伊氏乳杆菌 ATCC55730 中 Rib 蛋白的基因为模板, 设计特异性引物, 通过 PCR 获得 Rib 蛋白 N 末端非重复区序列并在大肠杆菌中进行异源表达, 经过亲和层析和分子筛获得纯化的 Rib 蛋白, 制备 Rib 蛋白的小鼠多克隆抗体。通过蛋白质免疫印迹方法对 11 株乳酸杆菌中 Rib 类似蛋白进行检测。【结果】Western blot 结果显示 Rib 蛋白主要分布于罗伊氏乳杆菌的细胞壁上。PCR 和 Western blot 均表明 Rib 类似蛋白在 4 株罗伊氏乳杆菌、6 株植物乳杆菌和 1 株干酪乳杆菌中均可被检测到。【结论】Rib 类似蛋白可能在乳酸杆菌中分布较广泛, 它们主要存在于细菌细胞壁上的现象表明其可能对这些乳杆菌在宿主肠道的定殖具有一定作用。

关键词: Rib 蛋白, 乳酸杆菌, 黏附, 蛋白表达, 免疫印迹

Distribution of Rib like protein in three lactobacilli bacteria

YANG Wei-Wei WANG Zhi-Neng ZHENG Lu-Hua DING Feng-Ling LIANG Xiao-Bo*

(Kunming University of Science and Technology, Yunnan Institute of Food Safety, Kunming, Yunnan 650500, China)

Abstract: [Objective] We studied the distribution and potential function of Rib protein, a large bacterial cell surface protein founded in *Lactobacillus reuteri*, in different lactobacilli strains. [Methods] Primers were designed according to the 5' non-repeat regain sequence of *rib* gene in *L. reuteri* ATCC55730, to PCR *rib* gene and heterologous expression. Truncated Rib protein from *L. reuteri* was expressed in *Escherichia coli*. The recombinant protein was purified and used for polyclonal antibody preparation. Western blot was done in subcellular localization analyses of Rib and Rib like protein detection. [Results] Western blot showed that Rib protein mainly distributed in the *L. reuteri* bacterial cell wall. Both PCR and Western blot analyses showed that Rib like protein was detected in 11 lactobacilli strains with different size. [Conclusion] Rib like protein is a probable widely distributing cell surface protein in lactobacilli strains, and may play a role in the adhesion of these lactobacilli on the host gut.

Keywords: Rib protein, Lactobacilli, Adhesion, Protein expression, Western blot

Foundation item: National Natural Science Foundation of China (No. 31360022); Innovative Training Program for College Students (No. 201310674004)

*Corresponding author: Tel: 86-871-65920216; E-mail: liangxb@kmust.edu.cn

Received: March 20, 2017; Accepted: April 19, 2017; Published online (www.cnki.net): May 09, 2017

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 31360022); 大学生创新训练计划项目(No. 201310674004)

*通讯作者: Tel: 86-871-65920216; E-mail: liangxb@kmust.edu.cn

收稿日期: 2017-03-20; 接受日期: 2017-04-19; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2017-05-09

乳酸杆菌是乳酸菌中最大的一个属,与动物的关系最为紧密,广泛存在于动物和人类的消化道内,其中绝大多数被认为是安全的益生菌^[1]。研究显示乳酸杆菌具有抵抗胃肠道感染、缓解腹泻、改善乳糖代谢、降低胆固醇、改善骨质疏松及免疫调节等作用^[2-4],被广泛应用于食品发酵和生产中^[5],具有广阔的工业和医学前景^[6]。另外,还有研究发现乳酸杆菌能够长期定殖在肠道和泌尿生殖道内,调节机体菌群平衡,改善内源细菌特性,竞争性抑制病原菌黏附和繁殖^[7-10]。罗伊氏乳杆菌作为重要的益生菌之一,广泛存在于哺乳动物及鸟类的肠道内^[11]。近年来的研究表明罗伊氏乳杆菌具有改善人体机能、提高机体免疫力、促进人体健康的作用^[12-14]。

益生菌在胃肠道中的黏附定殖对其发挥益生功效尤为重要,且黏附是定殖的先决条件,也是评价乳酸杆菌益生功能的重要指标之一^[15-16]。研究发现细菌的表面蛋白在乳酸菌对肠道细胞的黏附中发挥重要作用^[17]。乳酸杆菌表层蛋白具有黏附、抑制病原菌及非致病性的特性,因此在口服型活性疫苗中具有潜在的应用价值^[18]。在B类链球菌中,Rib蛋白为细菌的一种表面蛋白,对胰蛋白酶具有相对抗性,可刺激机体产生抗体,起到免疫保护的作用^[19]。

本文在罗伊氏乳杆菌 ATCC55730 基因组的序列分析中发现了编码类似 Rib 蛋白的基因,而且该蛋白可能主要分布在细胞表面,同时存在于其他乳酸杆菌中,并且参与乳杆菌对肠道上皮细胞的黏附与定殖。为证明该推测,本文通过基因扩增、特异性抗体的制备与免疫印迹的方法,检测 Rib 类似蛋白在罗伊氏乳杆菌、植物乳杆菌及干酪乳杆菌中的分布及其在细菌中的亚细胞分布,为进一步研究 Rib 类似蛋白在乳酸杆菌对肠道的黏附机制奠定基础,从而使乳酸杆菌与宿主相互作用及其益生功能的进一步研究具有更广泛的意义。

1 材料与方法

1.1 菌株、质粒和培养基

大肠杆菌 *E. coli* BL21(DE3) (乳糖诱导表达菌株)及 pET27b 质粒购自 Novagen 公司;BL21(DE3)/L2

为本实验室构建的 Rib 蛋白表达的重组菌株;罗伊氏乳杆菌 *L. reuteri* ATCC55730、*L. reuteri* CGMCC1.2838、*L. reuteri* CGMCC1.3222、*L. reuteri* CGMCC1.3264、植物乳杆菌 *L. plantarum* CGMCC 1.1856、*L. plantarum* CGMCC1.2437、*L. plantarum* CGMCC1.3252、*L. plantarum* CGMCC1.6971、干酪乳杆菌 *L. casei* 均购自中国微生物菌种保藏管理中心;*L. plantarum* ZN02、*L. plantarum* ZN07 由本实验室分离并鉴定^[20-21]。

LB 液体培养基(g/L):胰蛋白胨 10.0,酵母膏 5.0,氯化钠 10.0,添加卡那霉素终浓度为 50.0 mg/L。MRS 液体培养基(g/L):细菌蛋白胨 10.0,酵母膏 5.0,牛肉膏 10.0,柠檬酸三铵 2.15,乙酸钠 5.0,葡萄糖 20.0,七水硫酸镁 0.58,磷酸氢二钾 2.0,一水硫酸锰 0.19,吐温-80 1.0 mL,pH 调节为 6.2-6.4。

1.2 主要试剂和仪器

1.2.1 主要试剂:限制性内切酶购自 Thermo 公司;PCR 体系试剂购自 TaKaRa 公司;Rib 蛋白抗血清由中国科学院遗传与发育研究所完成;HRP 标记的羊抗鼠购自 Biosharp 公司;蛋白预染 Marker、BCA 试剂盒、ECL 试剂盒购自 Thermo 公司;DNA marker 购自 Life Science 公司;引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成;生化试剂为 Sigma 或 Biosharp 公司产品,其他为国产分析纯。

缓冲液配方:PBS 缓冲液(g/L):磷酸二氢钾 0.2,磷酸氢二钠 2.9,氯化钠 8.0,氯化钾 0.2;TEP 缓冲液:10 mmol/L Tris,1 mmol/L EDTA,1% PMSF,pH 8.0;原生质体缓冲液:10 mmol/L Tris-HCl,2 mmol/L MgCl₂,26%棉籽糖,1 mmol/L PMSF,pH 8.0。

1.2.2 主要仪器:PCR 仪 T100、蛋白电泳仪、蛋白转膜系统、蛋白纯化系统 NGC,美国 Bio-Rad 公司;核酸电泳仪 DYY-6C,北京市六一仪器厂;紫外可见光光度计 UV-1800PC,上海美普达仪器有限公司;摇床 TS-200B,上海天呈实验仪器制造有限公司。

1.3 实验方法

1.3.1 表达载体的构建:以罗伊氏乳杆菌 ATCC 55730 基因组 DNA 为模板,使用 Vector NTI 软件

对 Rib 蛋白非重复区(N 末端)基因序列设计引物并进行 PCR 扩增,引物为 F (5'-GGAATTCATATGAGAGGAATGAATAAGGAA-3', 下划线表示的是 *Nde* I 酶切位点), R (5'-CCGCTCGAGTTTATCAGCATCAAGTTCTG-3', 下划线表示的是 *Xho* I 酶切位点)。PCR 反应体系(50 μ L): dNTP mix 4 μ L, 10 \times Buffer 5 μ L, *Taq* 酶 0.25 μ L, 引物 F (5 μ mol/L) 2.5 μ L, 引物 R (5 μ mol/L) 2.5 μ L, DNA 1 μ L, ddH₂O 补充至 50 μ L。PCR 反应条件: 95 $^{\circ}$ C 5 min; 95 $^{\circ}$ C 30 s, 54 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 2 min, 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10 min。

将 *Nde* I 和 *Xho* I 双酶切后的 pET27b 质粒和 PCR 产物纯化回收,连接过夜。连接产物转化大肠杆菌 BL21(DE3)感受态细胞,筛选出具有卡那霉素抗性并 PCR 验证为阳性的克隆。对阳性克隆的质粒进行酶切和测序验证,测序由生工生物工程(上海)股份有限公司完成。将验证正确的菌株命名为 BL21(DE3)/L2。

1.3.2 Rib 蛋白诱导表达的初步优化与蛋白纯化: 接种 BL21(DE3)/L2 单菌落于 5 mL LB 液体培养基中, 37 $^{\circ}$ C、250 r/min 振荡培养过夜, 1:100 稀释到新的 LB 培养基中, 相同条件培养至对数期进行目标蛋白的诱导表达。实验中对不同 IPTG 终浓度 (0.02、0.05、0.10、0.40、1.00 mmol/L) 在诱导温度 25、37 $^{\circ}$ C 下进行优化, 诱导时间为 12 h, 摇床转速为 120 r/min。通过 SDS-PAGE 对表达产物进行分析评价, 诱导条件重复 3 次。Rib 蛋白的纯化使用 Bio-Rad NGCTM Scout 10 Plus 系统, 使用 Histrap HP 层析柱(GE)采用线性洗脱方式进行亲和层析; 使用 HiLoad Superdex 16/600 75pg 预装柱(GE)进行凝胶过滤; 使用超滤管进行超滤浓缩得到纯化的蛋白, 经 SDS-PAGE 凝胶电泳分析达到单一蛋白条带, 经 BCA 蛋白定量试剂盒测定蛋白浓度。

1.3.3 多克隆抗体的制备: 多克隆抗体制备参照 Harlow E 和 Lane D 的方法^[22], 由中国科学院遗传与发育研究所实验动物中心协助完成。利用 ELISA 方法^[23]对抗体效价进行测定, 测定结果为 1:2 000。

1.3.4 Rib 蛋白亚细胞定位: 根据文献[24]报道的方

法对罗伊氏乳杆菌 ATCC55730 菌液进行处理, 以分别获得细菌细胞壁、细胞质和上清液组分。具体如下: 5 mL 菌液培养至对数期, 5 000 r/min 离心 5 min, 分别取上清液和菌体。对于上清液, 加入 2 倍体积无水乙醇, -80 $^{\circ}$ C 沉淀 30 min。13 000 r/min 离心 10 min 后, 70%乙醇洗涤一次, ddH₂O 溶解沉淀。对于菌体, PBS 缓冲液洗涤一次, 再用 TEP 缓冲液洗涤两次, 然后用 100 μ L 原生质体缓冲液重悬菌体, 加入 60 U 溶菌酶, 37 $^{\circ}$ C 保温 30 min。13 000 r/min 离心 10 min 后取上清液作为细胞壁组分。沉淀用 100 μ L 原生质体缓冲液重悬作为细胞质组分。对不同组分的蛋白经过 SDS-PAGE 电泳后通过免疫印迹(Western blot)确定 Rib 蛋白在不同细胞组分中的分布。

1.3.5 Western blot: 为检测 Rib 蛋白在乳杆菌中的分布情况, 选取 11 株不同乳杆菌进行免疫印迹。以罗伊氏乳杆菌 ATCC55730 为阳性对照进行 SDS-PAGE 以及免疫印迹。接种乳酸菌单菌落于 5 mL MRS 液体培养基中, 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 静置培养过夜。用新鲜 MRS 培养基调节细菌浓度使其一致后, 取 1 mL 培养液于 5 000 r/min 离心 5 min 收集菌体, PBS 洗涤一次, 80 μ L TEP 缓冲液重悬, 加入 60 U 溶菌酶, 37 $^{\circ}$ C 保温 30 min。加入 20 μ L 5 \times Loading buffer, 煮沸 10 min, 离心取上清进行 SDS-PAGE 以及免疫印迹检测与 Rib 抗体特异性作用的蛋白。

2 结果与分析

2.1 Rib 类似蛋白基因序列分析

使用 NCBI 在线软件 Protein BLAST 对 *L. reuteri* ATCC55730 的 Rib 蛋白氨基酸序列进行同源性检索。结果显示与该 Rib 蛋白具有一定同源性的蛋白在多种来源的罗伊氏乳杆菌、巴氏乳酸菌、卷曲乳杆菌、植物乳杆菌、动物乳杆菌、鼠李糖乳杆菌等乳杆菌中都被发现, 在肺炎链球菌、酿脓链球菌、无乳链球菌、轻型链球菌、粪肠球菌、铜绿假单胞菌等病原菌中也被发现。这表明 Rib 类似蛋白在肠道微生物中普遍存在(结果未展示)。

2.2 Rib 类似蛋白基因 PCR 检测

在罗伊氏乳杆菌 ATCC55730 中 Rib 蛋白 N 端

为一非重复的未知功能区,中间部分为 8 个重复的结构域, C 末端含有一个保守的 LPXTG 转肽酶信号序列(图 1)。

为检测 Rib 类似蛋白的基因是否在多种来源的乳酸杆菌中存在,以相对保守的 Rib 蛋白 C 端重复区和 N 端非重复区基因序列为模板分别设计引物,以 11 株乳酸杆菌基因组 DNA 为模板进行 PCR 扩增。C 端引物序列如下: F-C (5'-GCTATTTCGGCAGCCAAAAG-3'); R-C (5'-CCCGGTTGTTT

CTTCCTAA-3')。PCR 条件为: 95 °C 30 s, 48-58 °C 30 s, 72 °C 3 min, 30 个循环。N 端引物序列: F-N (5'-CGGGTGTATAATGAACTA-3'); R-N (5'-TCTGTCGTCATAACCGTC-3')。PCR 条件为: 95 °C 30 s, 40-58 °C 30 s, 72 °C 1 min, 30 个循环。

PCR 结果(图 2)显示两对引物均可以从 11 株乳酸杆菌基因组中扩增出类似的基因片段,不同的是 C 末端重复区(图 2A)的 PCR 扩增片段大小和扩增

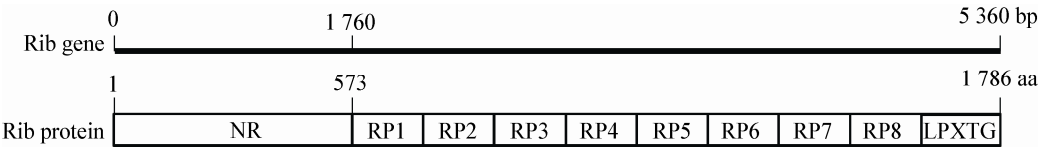


图 1 罗伊氏乳杆菌 ATCC55730 Rib 蛋白结构示意图

Figure 1 The structural diagram of Rib protein from *L. reuteri* ATCC55730

注: NR: 非重复区; RP: 重复区。

Note: NR: Non repeat region; RP: Repeat region.

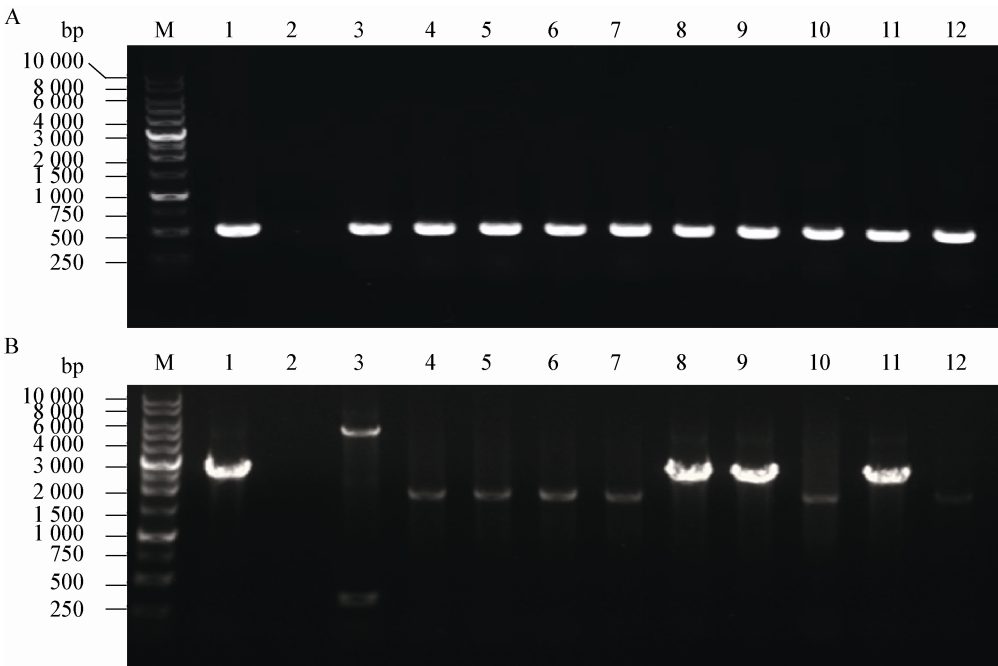


图 2 乳酸杆菌中 Rib 类似蛋白的 PCR 分析

Figure 2 PCR analyses of Rib like protein in different *Lactobacillus* strains

注: A: 重复区; B: 非重复区。M: DNA 分子量标品; 1: 罗伊氏乳杆菌 ATCC55730; 2: 阴性对照; 3: 干酪乳杆菌 *L. casei*; 4: 植物乳杆菌 ZN02; 5: 植物乳杆菌 ZN07; 6: 植物乳杆菌 CGMCC1.1856; 7: 植物乳杆菌 CGMCC1.2437; 8: 罗伊氏乳杆菌 CGMCC1.2838; 9: 罗伊氏乳杆菌 CGMCC1.3222; 10: 植物乳杆菌 CGMCC1.3252; 11: 罗伊氏乳杆菌 CGMCC1.3264; 12: 植物乳杆菌 CGMCC1.6971。

Note: A: Repeat region; B: Non repeat region. M: DNA ladder; 1: *L. reuteri* ATCC55730; 2: Negative control; 3: *L. casei*; 4: *L. plantarum* ZN02; 5: *L. plantarum* ZN07; 6: *L. plantarum* CGMCC1.1856; 7: *L. plantarum* CGMCC1.2437; 8: *L. reuteri* CGMCC1.2838; 9: *L. reuteri* CGMCC1.3222; 10: *L. plantarum* CGMCC1.3252; 11: *L. reuteri* CGMCC1.3264; 12: *L. plantarum* CGMCC1.6971.

条带亮度均比较一致,而 N 末端非重复区(图 2B)的 PCR 扩增片段则大小不同,扩增效率也有差异。4 株罗伊氏乳杆菌均扩增获得约 3.0 kb 大小的片段,而 6 株植物乳杆菌获得 2.0 kb 左右大小片段,干酪乳杆菌中则获得约 6.0 kb 和 0.3 kb 大小的两个片段。PCR 检测结果表明 11 株乳杆菌中均含有类似 Rib 蛋白的基因,且基因的大小不同。要确认 Rib 类似蛋白是否存在,需要通过免疫印迹的方法直接对蛋白质进行检测。

2.3 Rib 蛋白在大肠杆菌中的诱导表达与蛋白纯化

为制备 Rib 蛋白特异性抗体,通过基因重组表达的方法,构建了含有部分 Rib 基因的重组大肠杆菌 BL21(DE3)/L2。该工程菌中含有乳糖启动子引导的 Rib 蛋白 N 末端非重复区基因,在 IPTG 的诱导下可表达相应蛋白。首先对不同温度下的表达量进行初步实验,发现 37 °C 条件下诱导 12 h 时表达的蛋白多为不溶性包涵体,而在较低温度 25 °C 下为可溶性蛋白(结果未展示)。在此基础上对 IPTG 浓度进行优化,分别选取 IPTG 浓度为 0.02、0.05、0.10、0.40 和 1.00 mmol/L。结果如图 3 所示,当 IPTG 浓度为 0.02 mmol/L 时,目标蛋白的表达量较低,当 IPTG 浓度大于 0.05 mmol/L 时,目标蛋白的表达量变化不大。因而研究中采用 25 °C、0.05 mmol/L IPTG 诱导 12 h 表达的条件,依次经过了 His 亲和层析和凝胶过滤的方法进行纯化后,经 BCA 蛋白定量试剂盒测定浓度为 1.06 g/L,纯化的蛋白用于 Rib 蛋白特异性抗体制备。

2.4 Rib 蛋白亚细胞定位

由于通过 Rib 蛋白的结构表明其 N 末端具有典型的信号肽序列, C 末端序列为具有典型的细胞壁锚定结构 LPXTG 及一段富含疏水氨基酸的尾巴。结构表明 Rib 蛋白可能是一个细胞表面蛋白,通过锚定酶分布在细菌细胞壁上。为证明该蛋白的亚细胞分布,将细胞培养后的培养基上清液、细胞壁和细胞质分离后再通过 SDS-PAGE 和免疫印迹进行检测(图 4)。结果显示在细胞壁蛋白部分能检测到约

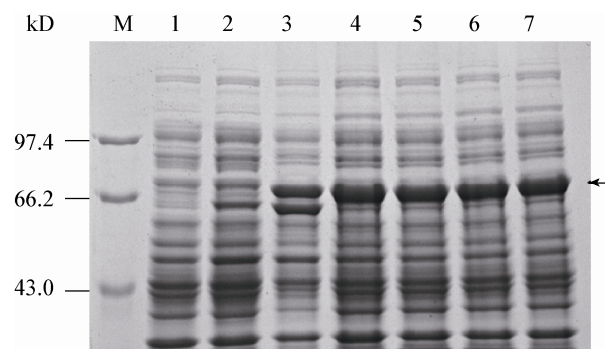


图 3 IPTG 浓度对 Rib 蛋白表达的影响

Figure 3 Effect of IPTG concentrations on the expression of Rib protein in *E. coli*

注: M: 蛋白质分子量标准品; 1: 大肠杆菌 BL21(DE3); 2: 未诱导大肠杆菌 BL21(DE3)/L2; 3: 大肠杆菌 BL21(DE3)/L2 (0.02 mmol/L IPTG); 4: 大肠杆菌 BL21(DE3)/L2 (0.05 mmol/L IPTG); 5: 大肠杆菌 BL21(DE3)/L2 (0.10 mmol/L IPTG); 6: 大肠杆菌 BL21(DE3)/L2 (0.40 mmol/L IPTG); 7: 大肠杆菌 BL21(DE3)/L2 (1.00 mmol/L IPTG).

Note: M: Protein molecular weight ladder; 1: *E. coli* BL21(DE3); 2: Uninduced *E. coli* BL21(DE3)/L2; 3: *E. coli* BL21(DE3)/L2 (0.02 mmol/L IPTG); 4: *E. coli* BL21(DE3)/L2 (0.05 mmol/L IPTG); 5: *E. coli* BL21(DE3)/L2 (0.10 mmol/L IPTG); 6: *E. coli* BL21(DE3)/L2 (0.40 mmol/L IPTG); 7: *E. coli* BL21(DE3)/L2 (1.00 mmol/L IPTG).

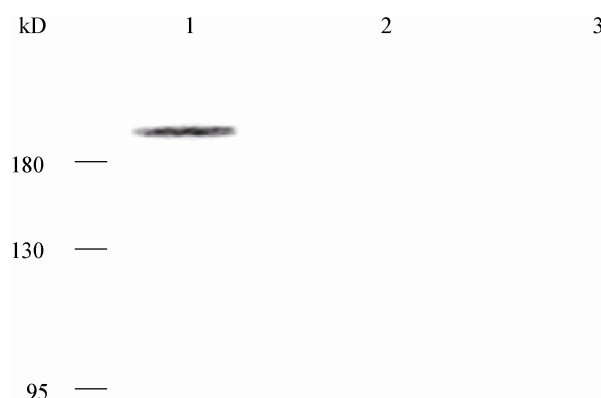


图 4 Rib 蛋白在罗伊氏乳杆菌不同细胞组分中的分布

Figure 4 Subcellular distribution of Rib in *L. reuteri*

注: 1: 细胞壁; 2: 细胞质; 3: 培养基上清液。

Note: 1: Cell wall; 2: Cytoplasm; 3: Cultural supernatant.

190 kD 大小的特异蛋白条带,而在细胞质和培养基上清液中未能检测到相应条带,这表明 Rib 蛋白分布在细菌细胞的细胞壁上。

2.5 Rib 类似蛋白在不同乳酸杆菌中的检测

为检测不同乳酸杆菌中 Rib 类似蛋白的存在,11 株不同的菌株培养至对数期的细胞总蛋白经过 SDS-PAGE 和 Western blot 检测(图 5)。SDS-PAGE 结果表明经过处理后的细胞总蛋白量比较一致,但罗伊氏乳杆菌(图 5A,泳道 1-4)与植物乳杆菌(图 5A,泳道 5-10)的蛋白谱有较大的差异,干酪乳杆菌(图 5A,泳道 11)的蛋白谱接近于植物乳杆菌。而 Western blot 结果表明所有乳酸杆菌中均能够检测到特异杂交条带。4 株罗伊氏乳杆菌中所检测到的蛋白(图 5B,泳道 1-4)大小相似,约为 190 kD,而 6 株植物乳杆菌中所检测到的蛋白(图 5B,泳道 1-4)大小也相似,约为 100 kD,而干酪乳杆菌中的蛋白条带则与前两类不同,约为 130 kD (图 5B,泳道 11)。

3 讨论

Rib 蛋白是罗伊氏乳杆菌细胞表面的大分子蛋白,可能与细菌的黏附与定殖有关。Rib 蛋白最先被报道是在 III 型 B 类链球菌中^[25],对其蛋白的氨基酸序列分析表明该蛋白 N-末端区域具有 174 个残基的非重复区, C 端为 12 个重复区域且含有一个保守的 LPXTG 转肽酶信号序列^[26]。进一步研究发现 Rib 蛋白的抗体可以保护小鼠免受 B 类链球菌的侵染^[25]。本研究分析罗伊氏乳杆菌基因组序列后发现了这个类似 Rib 蛋白的大分子蛋白,其结构与 B 类链球菌 Rib 蛋白相似。通过基因克隆与免疫印迹的方法分别在 DNA 和蛋白质水平检测到了 Rib 蛋白在罗伊氏乳杆菌中的存在,并且发现该蛋白分布在细菌的细胞壁上,为进一步研究其在细菌黏附与定殖中的功能奠定了基础。这是首次在乳酸杆菌中对 Rib 类似蛋白的研究。

Rib 类似蛋白可能存在于多种乳酸杆菌中。应用罗伊氏乳杆菌 Rib 蛋白特异性抗体的免疫印迹结果显示, Rib 类似蛋白不仅在罗伊氏乳杆菌中存在,而且

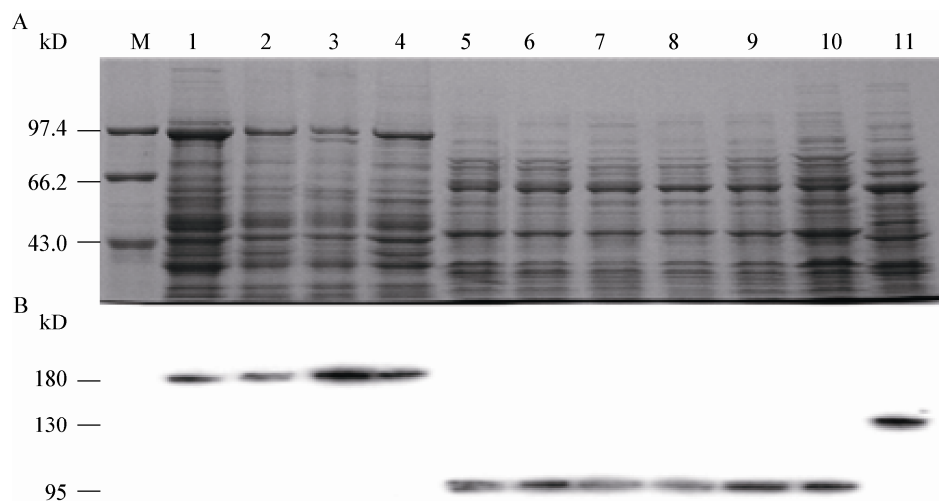


图 5 Rib 蛋白在不同乳酸杆菌中的检测

Figure 5 Detection of Rib protein in different *Lactobacilli* strains

注: A: 总蛋白的 SDS-PAGE; B: Rib 抗体的免疫印迹分析. M: 蛋白质分子量标品; 1: 罗伊氏乳杆菌 ATCC55730; 2: 罗伊氏乳杆菌 CGMCC1.2838; 3: 罗伊氏乳杆菌 CGMCC1.3222; 4: 罗伊氏乳杆菌 CGMCC1.3264; 5: 植物乳杆菌 ZN02; 6: 植物乳杆菌 ZN07; 7: 植物乳杆菌 CGMCC1.1856; 8: 植物乳杆菌 CGMCC1.2437; 9: 植物乳杆菌 CGMCC1.3252; 10: 植物乳杆菌 CGMCC1.6971; 11: 干酪乳杆菌 *L. casei*.

Note: A: SDS-PAGE of the total protein; B: Western blot analyses against Rib antibody. M: Protein marker; 1: *L. reuteri* ATCC55730; 2: *L. reuteri* CGMCC1.2838; 3: *L. reuteri* CGMCC1.3222; 4: *L. reuteri* CGMCC1.3264; 5: *L. plantarum* ZN02; 6: *L. plantarum* ZN07; 7: *L. plantarum* CGMCC1.1856; 8: *L. plantarum* CGMCC1.2437; 9: *L. plantarum* CGMCC1.3252; 10: *L. plantarum* CGMCC1.6971; 11: *L. casei*.

在植物乳杆菌以及干酪乳杆菌中也可被检测到,并且其大小在同一种内相同,种间表现差异。在植物乳杆菌 AY01 基因组分析中也可发现相应大小类似结构的蛋白^[27]。更多对类似蛋白的研究在肺炎双球菌、无乳链球菌、霍乱弧菌等常见致病菌中较为常见,并且对此类蛋白的免疫特性、基因、结构、功能等进行了大量研究,结果表明 Rib 类似蛋白参与了病原细菌与其宿主相互作用从而发挥其致病性的过程^[19,28-32]。在益生菌的研究中,大量研究表明细菌表面蛋白在益生菌的黏附与定殖中起着重要作用,如乳杆菌的 S 层蛋白 Slp^[33]和 SlpA^[34]、双歧杆菌的 DnaK 蛋白^[35]、双歧杆菌中的 BopA 蛋白^[36]、植物乳杆菌 His-N2 蛋白^[37]。另外的研究发现细胞表面蛋白不仅参与了细胞的黏附,也与免疫细胞的激活相关^[38-39]。罗伊氏乳杆菌是在肠道定殖力最强的乳酸菌之一,而对于其 Rib 类似蛋白功能的研究尚未见报道,本文的初步研究发现这种蛋白在不同的乳酸杆菌中广泛存在,因而对其功能的研究不仅有助于对罗伊氏乳杆菌肠道黏附机制的阐明,也会对更多具有 Rib 类似蛋白的乳酸杆菌的研究与应用提供有力的参考。

参 考 文 献

- [1] Michon C, Langella P, Eijsink VGH, et al. Display of recombinant proteins at the surface of lactic acid bacteria: strategies and applications[J]. Microbial Cell Factories, 2016, 15(1): 70
- [2] Hevia A, Delgado S, Sánchez B, et al. Molecular players involved in the interaction between beneficial bacteria and the immune system[J]. Frontiers in Microbiology, 2015, 6: 1285
- [3] McCabe L, Britton RA, Parameswaran N. Prebiotic and probiotic regulation of bone health: role of the intestine and its microbiome[J]. Current Osteoporosis Reports, 2015, 13(6): 363-371
- [4] Thomas LV, Suzuki K, Zhao J. Probiotics: a proactive approach to health. A symposium report[J]. British Journal of Nutrition, 2015, 114(S1): S1-S15
- [5] McKay LL, Baldwin KA. Applications for biotechnology: present and future improvements in lactic acid bacteria[J]. FEMS Microbiology Letters, 1990, 87(1/2): 3-14
- [6] Wei MQ, Rush CM, Norman JM, et al. An improved method for the transformation of *Lactobacillus* strains using electroporation[J]. Journal of Microbiological Methods, 1995, 21(1): 97-109
- [7] Redondo-Lopez V, Cook RL, Sobel JD. Emerging role of lactobacilli in the control and maintenance of the vaginal bacterial microflora[J]. Reviews of Infectious Diseases, 1990, 12(5): 856-872
- [8] Wang B, Wei H, Yuan J, et al. Identification of a surface protein from *Lactobacillus reuteri* JCM1081 that adheres to porcine gastric mucin and human enterocyte-like HT-29 cells[J]. Current Microbiology, 2008, 57(1): 33-38
- [9] Chan RC, Reid G, Irvin RT, et al. Competitive exclusion of uropathogens from human uroepithelial cells by *Lactobacillus* whole cells and cell wall fragments[J]. Infection and Immunity, 1985, 47(1): 84-89
- [10] Tihole F. Possible treatment of AIDS patients with live lactobacteria[J]. Medical Hypotheses, 1988, 26(1): 85-88
- [11] Liu CJ, Bian X, Zhao SJ. Screening of *Lactobacillus reuteri* inhibiting spoilage organisms and its application to yoghurt production[J]. Food Science, 2016, 37(7): 157-162 (in Chinese)
刘春娟, 边鑫, 赵士举. 具有抑制腐败菌能力的罗伊氏乳杆菌筛选及在酸乳生产中的应用[J]. 食品科学, 2016, 37(7): 157-162
- [12] Liu YY, Fatheree NY, Dingle BM, et al. *Lactobacillus reuteri* DSM 17938 changes the frequency of Foxp3⁺ regulatory T cells in the intestine and mesenteric lymph node in experimental necrotizing enterocolitis[J]. PLoS One, 2013, 8(2): e56547
- [13] Thomas CM, Hong T, van Pijkeren JP, et al. Histamine derived from probiotic *Lactobacillus reuteri* suppresses TNF via modulation of PKA and ERK signaling[J]. PLoS One, 2012, 7(2): e31951
- [14] Dong HL, Rowland I, Yaqoob P. Comparative effects of six probiotic strains on immune function *in vitro*[J]. British Journal of Nutrition, 2012, 108(3): 459-470
- [15] Liu L, Wu RY, Li J, et al. Adhesion ability of *Lactobacillus paraplantarum* L-ZS9 and influencing factors of its biofilm formation[J]. Food Science, 2016, 37(15): 136-143 (in Chinese)
刘蕾, 武瑞赞, 李军, 等. 类植物乳杆菌 L-ZS9 生物被膜态的黏附能力及形成影响因素[J]. 食品科学, 2016, 37(15): 136-143
- [16] Zhang YC, Xiang XL, Zhang LW, et al. A review on the structure and immune regulation function of *Lactobacillus* S-layer protein[J]. Food Science, 2016, 37(3): 229-234 (in Chinese)
张英春, 向鑫玲, 张兰威, 等. 乳酸杆菌 S-层蛋白的结构及免疫调控功能研究进展[J]. 食品科学, 2016, 37(3): 229-234
- [17] Pang RP. Advances in *Lactobacilli* adhesion to human intestinal epithelium[J]. China Dairy Cattle, 2014(15): 46-48 (in Chinese)
庞瑞鹏. 乳酸杆菌黏附人肠道上皮功能的研究进展[J]. 中国奶牛, 2014(15): 46-48
- [18] Hynönen U, Palva A. *Lactobacillus* surface layer proteins: structure, function and applications[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2013, 97(12): 5225-5243
- [19] Lindahl G, Ståhlhammar-Carlén M, Areschoug T. Surface proteins of *Streptococcus agalactiae* and related proteins in other bacterial pathogens[J]. Clinical Microbiology Reviews, 2005, 18(1): 102-127
- [20] Saeedi M, Shahidi F, Mortazavi SA, et al. Isolation and identification of lactic acid bacteria in winter salad (local

- pickle) during fermentation using 16S rRNA gene sequence analysis[J]. *Journal of Food Safety*, 2015, 35(3): 287-294
- [21] Guo LD, Liu Q, Jiang LQ, et al. Isolation and properties of *Lactococcus lactis* strain from kefir grains[J]. *Modern Food Science and Technology*, 2014, 30(9): 121-125 (in Chinese)
国立东, 刘倩, 江柳青, 等. 开菲尔粒中一株乳酸乳球菌的分离及性能研究[J]. *现代食品科技*, 2014, 30(9): 121-125
- [22] Wright K. Antibodies: a laboratory manual, by E Harlow and D Lane. pp 726. Cold Spring Harbor Laboratory, 1988. \$50, ISBN 0-87969-314-2[J]. *Biochemical Education*, 1989, 17(4): 220
- [23] Pappas MG, Hajkowski R, Hockmeyer WT. Standardization of the dot enzyme-linked immunosorbent assay (Dot-ELISA) for human visceral leishmaniasis[J]. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 1984, 33(6): 1105-1111
- [24] Liang XB, Chen YYM, Ruiz T, et al. New cell surface protein involved in biofilm formation by *Streptococcus parasanguinis*[J]. *Infection and Immunity*, 2011, 79(8): 3239-3248
- [25] Ståhlhammar-Carlemalm M, Stenberg L, Lindahl G. Protein rib: a novel group B streptococcal cell surface protein that confers protective immunity and is expressed by most strains causing invasive infections[J]. *The Journal of Experimental Medicine*, 1993, 177(6): 1593-1603
- [26] Wästfelt M, Ståhlhammar-Carlemalm M, Delisse AM, et al. Identification of a family of streptococcal surface proteins with extremely repetitive structure[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1996, 271(31): 18892-18897
- [27] Li XR, Gong FM, Zheng HJ, et al. Draft genome sequence of *Lactobacillus plantarum* strain AY01, isolated from the raw material of fermented goat milk cheese[J]. *Genome Announcements*, 2013, 1(5): e00737-13
- [28] Maeland JA, Afset JE, Lyng RV, et al. Survey of immunological features of the alpha-like proteins of *Streptococcus agalactiae*[J]. *Clinical and Vaccine Immunology*, 2015, 22(2): 153-159
- [29] Deng YQ, Wang KY, Wang J, et al. Cloning, identification and molecular characteristics analysis of α protein gene of *Streptococcus agalactiae* from Tilapia[J]. *Sichuan Journal of Zoology*, 2014, 33(5): 700-707 (in Chinese)
邓永强, 汪开毓, 王均, 等. 罗非鱼无乳链球菌 α 蛋白基因的克隆、鉴定及分子特性分析[J]. *四川动物*, 2014, 33(5): 700-707
- [30] Almeida A, Villain A, Joubrel C, et al. Whole-genome comparison uncovers genomic mutations between group B streptococci sampled from infected newborns and their mothers[J]. *Journal of Bacteriology*, 2015, 197(20): 3354-3366
- [31] Dangor Z, Kwatra G, Izu A, et al. HIV-1 is associated with lower Group B *Streptococcus* capsular and surface-protein IgG antibody levels and reduced transplacental antibody transfer in pregnant women[J]. *Journal of Infectious Diseases*, 2015, 212(3): 453-462
- [32] Kristian SA, Ota T, Bubeck SS, et al. Generation and improvement of effector function of a novel broadly reactive and protective monoclonal antibody against pneumococcal surface protein A of *Streptococcus pneumoniae*[J]. *PLoS One*, 2016, 11(5): e0154616
- [33] Johnson-Henry KC, Hagen KE, Gordonpour M, et al. Surface-layer protein extracts from *Lactobacillus helveticus* inhibit enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 adhesion to epithelial cells[J]. *Cellular Microbiology*, 2007, 9(2): 356-367
- [34] Buck BL, Altermann E, Svingerud T, et al. Functional analysis of putative adhesion factors in *Lactobacillus acidophilus* NCFM[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2005, 71(12): 8344-8351
- [35] Candela M, Turroni S, Centanni M, et al. Relevance of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* plasminogen binding activity in the human gastrointestinal microenvironment[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2011, 77(19): 7072-7076
- [36] Gleinser M, Grimm V, Zhurina D, et al. Improved adhesive properties of recombinant bifidobacteria expressing the *Bifidobacterium bifidum*-specific lipoprotein BopA[J]. *Microbial Cell Factories*, 2012, 11(1): 80
- [37] Du LH, Zhang H, Shi RH, et al. *In vitro* exclusive inhibition of *E. coli* DH5 α adhesion to porcine intestinal mucus by His-N2 protein[J]. *Food Science*, 2014, 35(11): 95-99 (in Chinese)
都立辉, 张虹, 施荣华, 等. His-N2 蛋白体外排除抑制大肠杆菌 DH5 α 黏附猪肠黏液蛋白的研究[J]. *食品科学*, 2014, 35(11): 95-99
- [38] Li Q, Liu XL, Wang Y, et al. Surface properties and adhesion to Caco-2 cells of *Lactobacillus plantarum* strains[J]. *Food Science*, 2015, 36(9): 97-101 (in Chinese)
李清, 刘小莉, 王英, 等. 植物乳杆菌表面性质及对 Caco-2 细胞的黏附[J]. *食品科学*, 2015, 36(9): 97-101
- [39] Li HH, Yang ZQ, Wang XL, et al. Surface proteins of lactic acid bacteria induce the proliferation and inhibit the adherence of immunocytes[J]. *Chinese Journal of Microecology*, 2016, 28(1): 15-20 (in Chinese)
李海红, 杨振泉, 王晓霖, 等. 乳酸菌表面蛋白对免疫细胞的诱导增殖及粘附抑制效应[J]. *中国微生态学杂志*, 2016, 28(1): 15-20