

# 乳杆菌表层蛋白对菌株表面特性和益生特性的影响

李佳珣, 张秋香\*, 王瑞, 赵建新

(江南大学食品学院, 江苏无锡 214122)

**摘要:** 为评估乳杆菌表层蛋白对菌株特性的影响, 该研究通过序列比对筛选出含 *slp* 基因的乳杆菌, 之后用十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 对其中部分菌的 *slp* 基因表达情况进行鉴定, 并测定了表层蛋白去除前后菌体生长的吸光度值、自聚集率、自成膜量、与致病菌共聚集率等特性。结果表明, 4 株嗜酸乳杆菌、30 株卷曲乳杆菌、3 株瑞士乳杆菌、30 株鼠李糖乳杆菌都含有 *slp* 基因, 经过 SDS-PAGE 鉴定了四种菌的部分菌株均表达表层蛋白, 且其表层蛋白与菌株的特性密切相关。比如, 在生长方面, 瑞士乳杆菌去除表层蛋白前后生长能力差异很大, 但氯化锂溶液和蛋白酶 K 两种溶液处理的吸光度值差距较小, 差值仅在 0.2 以内; 在与致病菌共聚集方面, 大部分菌株在不同处理过程中没有较大差异, 有趣的是, 本身自聚能力弱的鼠李糖乳杆菌 3-1 表现出来的与致病菌极强的共聚能力, 这株菌的在口腔方面的防龋潜力值得进一步探究。该研究丰富了人们对乳杆菌表层蛋白的了解, 为深入探究表层蛋白的功能和应用奠定理论基础。

**关键词:** 乳杆菌; 表层蛋白; 表面特性; 序列比对; *slp* 基因

文章编号: 1673-9078(2021)11-43-49

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2021.11.0613

## Effects of Surface Proteins on the Surface and Probiotic Properties of *Lactobacillus* Species

LI Jiaxun, ZHANG Qiuxiang\*, WANG Rui, ZHAO Jianxin

(School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

**Abstract:** To evaluate the effects of surface proteins on the properties of *Lactobacillus*, different species containing *slp* gene were selected through sequence comparison. Subsequently, sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) was performed to analyze some of them. The expression of *slp* gene in different *Lactobacillus* species was evaluated, and then the light absorbance, self-aggregation rate, biofilm formation rate, and co-aggregation rate with other pathogenic microorganisms associated with each of these species were assessed before and after the removal of surface proteins. The results revealed that 4 strains of *L. acidophilus*, 30 strains of *L. crispatus*, 3 strains of *L. helveticus*, and 30 strains of *L. rhamnosus* contain *slp* expressed surface proteins that were identified using SDS-PAGE. These surface proteins were found to be closely related to the properties of the strains. For example, the growth of *L. helveticus* before and after the removal of surface proteins was found to be significantly different. However, the light absorbance of the species of interest differed only slightly (within 0.2) after lithium chloride solution and proteinase K solution treatments. Meanwhile, for co-aggregation with other pathogenic microorganisms, most of the strains demonstrated no significant differences after different treatments. Interestingly, *L. rhamnosus* 3-1, which exhibits weak self-aggregation, exhibited strong co-aggregation with other pathogenic microorganisms, and therefore, the anti-caries potential of this strain is worth further exploration. This research would provide more information on the surface proteins of *Lactobacillus* species and lays a theoretical foundation for in-depth exploration of the functions and applications of surface proteins.

**Key words:** *Lactobacillus*; surface protein; surface property; sequence comparison; *slp* gene

引文格式:

李佳珣,张秋香,王瑞,等.乳杆菌表层蛋白对菌株表面特性和益生特性的影响[J].现代食品科技,2021,37(11):43-49,+33

LI Jiaxun, ZHANG Qiuxiang, WANG Rui, et al. Effects of surface proteins on the surface and probiotic properties of *Lactobacillus* species [J]. Modern Food Science and Technology, 2021, 37(11): 43-49, +33

收稿日期: 2021-06-09

基金项目: 国家自然科学基金项目 (32072197)

作者简介: 李佳珣 (1996-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 食品生物技术, E-mail: 857971620@qq.com

通讯作者: 张秋香 (1979-), 女, 博士, 副教授, 研究方向: 食品微生物学, E-mail: zhangqx@jiangnan.edu.cn

表层蛋白是覆盖在菌体外表面的一层分子量为25~71 ku、单分子排列且可在内部自组装形成对称次晶格阵列结构的蛋白或糖蛋白,通常存在于古生菌和一些细菌当中<sup>[1]</sup>。乳杆菌是一类对肠道有重要功能的益生菌,主要通过定殖于宿主肠道、与致病菌竞争黏附位点、调节机体免疫等机制实现其益生功能<sup>[2]</sup>。而表层蛋白可以作为黏附因子帮助乳杆菌定殖于肠道,但并非所有的乳杆菌都含有表层蛋白<sup>[3]</sup>。目前报道的含有表层蛋白的乳杆菌主要集中在嗜酸乳杆菌<sup>[4]</sup>和卷曲乳杆菌<sup>[5]</sup>上,更多的携带表层蛋白的乳杆菌尚待被发掘和研究。

通常筛选携带表层蛋白的乳杆菌的方法是通过分析实验菌株 LiCl 提取物的 SDS-PAGE 凝胶电泳条带,判断在 25~71 ku 的目标分子量范围内是否存在高含量的蛋白条带,以此确定实验菌株是否携带表层蛋白<sup>[6]</sup>。而这种方法通常费时费力。随着生物信息学的发展,微生物的全基因组测序已成为掌握某微生物全部遗传信息的最佳方式<sup>[7]</sup>。通过序列比对寻找携带表层蛋白编码基因的乳杆菌比传统方法更为高效。

此外,表层蛋白不仅作为黏附因子帮助乳杆菌定殖于肠道,其对菌株的本身特性有很多影响,如影响菌体在不良环境中的生长,Yong 等<sup>[8]</sup>利用无菌小鼠模型测定嗜酸乳杆菌 NCFM 在肠道中的空间转录组,发现表层蛋白的基因 *slpA* 是在肠道中表达量最高,*slp* 基因缺失突变的菌株对胆汁攻击、模拟胃液和高渗透压的敏感性增加。因此,了解筛选出来的不同种乳杆菌的表层蛋白对菌株自身特性的影响,也具有重要意义。

本研究利用实验室保藏的乳杆菌资源及已测序的基因组草图,通过生物信息学的方法筛选含有编码表层蛋白 *slp* 基因的不同乳杆菌,并用十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 鉴定,随后分析表层蛋白对菌体自身特性及与致病菌共聚集能力的影响,初步探索不同种乳杆菌的表层蛋白与菌株特性的联系,为继续研究乳杆菌表层蛋白的其它性质和功能提供理论指导和参考借鉴。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌株

嗜酸乳杆菌 NCFM、CCFM720、FFJND7L5、JCM1132,卷曲乳杆菌 FHNFQ 15L11、FHBZX 13M4、FCQJJ 9M2、FGuxi 14M5,瑞士乳杆菌 D-5-A108、D-6-A122、D-9-A28,鼠李糖乳杆菌 FBJCY 2-1、FBJCY 3-1、FAHWH 26-1、FAHWH 30-1 均由江南大学食品生物技术中心保藏。

### 1.2 主要试剂与仪器

LiCl、冰醋酸、考马斯亮蓝购自国药沪试;TEMED 购自湖北佰智昂生物化工有限公司;丙烯酰胺/甲叉双丙烯酰胺 40%溶液 (29:1) 购自生工生物工程(上海)股份有限公司;PageRuler™ Unstained Protein Ladder 购自 ThermoFisher Scientific;蛋白酶 K(B47041-5MG) 购自北京伊诺凯科技有限公司;SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液 (SDS-PAGE Sample Loading buffer)、BCA 蛋白质浓度测定试剂盒购自碧云天生物技术有限公司。

MiniT-C 迷你金属浴,杭州奥盛仪器有限公司;DYY-7C 电泳仪,北京市六一仪器厂;GelDoc EZ 全自动凝胶成像仪,美国伯乐公司 (Bio-Rad)。

### 1.3 方法

#### 1.3.1 乳杆菌的培养

取出-80℃保藏的菌种,以2%的接种量接种于5 mL MRS 液体培养基中,37℃静置培养18 h。活化3代后可用于实验。

#### 1.3.2 含 S 层蛋白的乳杆菌的筛选

从 NCBI 数据库下载已报道的乳杆菌 *slp* 基因序列,建立本地数据库,选取本中心已有的嗜酸乳杆菌 (4 株),瑞士乳杆菌 (44 株),鼠李糖乳杆菌 (81 株),卷曲乳杆菌 (50 株) 四种菌的基因组草图进行 blast 比对,序列匹配度大于 90% 认为有 *slp* 基因,可编码 S 层蛋白。

#### 1.3.3 表层蛋白的去除和提取

参考 Johnson 等<sup>[9]</sup>的方法并做适当改动。培养好的菌液于室温下 6000 g 离心 15 min,收集菌体。向菌体中加入原乳杆菌培养液 1/20 体积的 5 mol/L LiCl 溶液和蛋白酶 K 溶液并置于恒温摇床 (37℃, 220 r/min) 处理 2 h 后,于室温下 12000 ×g 离心 15 min。收集 LiCl 溶液提取的上清液以待后续鉴定,沉淀的菌体即为去除表层蛋白 (LiCl 溶液处理) 和去除所有表面蛋白的乳杆菌 (蛋白酶 K 溶液处理),空白对照组以 PBS 代替。

#### 1.3.4 表层蛋白的鉴定

将 1.3.3 所得的 LiCl 提取的表层蛋白通过 BCA 浓度试剂盒测定浓度,将总蛋白浓度调整至一致,后与 5×loading buffer (4:1, V/V) 的比例混合,于 95℃的干式恒温金属浴中反应 10 min,冷却后向每个凝胶孔加入 20 μL 样品使总蛋白量在 50 μg 左右,进行电泳。其中,浓缩胶浓度为 5%,电泳电压为 80 V;分离胶浓度为 12%,电泳电压 120 V。电泳结束后用考马斯亮蓝染色液染色 30 min,再用脱色液脱色至条带清晰

可见。用全自动凝胶成像仪拍摄凝胶<sup>[10]</sup>。

### 1.3.5 乳杆菌生长情况的测定

将 1.3.3 中 LiCl 溶液处理, 蛋白酶 K 溶液处理和对照组的乳杆菌菌体继续培养 24 h, 将培养后的菌液混匀并在 600 nm 波长下测定的吸光度, 根据吸光值判断乳杆菌经不同处理方式后的生长情况。

### 1.3.6 乳杆菌自聚集能力的测定

取 1.3.5 培养得到的菌液, 调节菌悬液的浓度为  $10^8$  cfu/mL, 将菌悬液涡旋震荡约 10 s, 记录其 OD<sub>600nm</sub> 值为 A<sub>1</sub>, 室温静置 4 h, 上清液的 OD<sub>600nm</sub> 记为 A<sub>2</sub>, 按如下公式计算自聚集率<sup>[11]</sup>。

$$\text{自聚集率} / \% = (1 - \frac{A_2}{A_1}) \times 100\%$$

### 1.3.7 乳杆菌自成膜能力的测定

在 96 孔板中加入 1.3.5 培养得到的菌液 200 μL, 37 °C 静置培养 24 h。阴性对照组以同等体积的 MRS 代替。培养结束后去除培养液, 用 PBS (磷酸盐缓冲液) 小心清洗生物膜 2 遍, 室温静置晾干。向每孔中加入 100 μL 甲醇以固定生物膜, 10 min 后除去甲醇, 自然晾干, 加入 100 μL 质量分数为 0.10% 的结晶紫溶液, 将生物膜染色 30 min。染色结束后用 PBS 清洗 2 遍, 每孔以 100 μL 33% 的冰醋酸溶解, 用酶标仪 OD<sub>600nm</sub> 读取吸光度值<sup>[12]</sup>。

### 1.3.8 乳杆菌与致病菌共聚集能力的测定

参考 Xu 等<sup>[13]</sup>的方法并加以适当修改。取 1 mL 的白色念珠菌和变异链球菌菌液于离心管中, 在 6000 r/min、4 °C 的条件下离心 10 min, 弃上清, 将收集到的菌体用 PBS 缓冲液重悬洗涤两次, 向最后收集到的菌体中加入原始菌液体积的 PBS 缓冲液并混匀。将混匀后的菌悬液静置 4 h, 测定记录此时的吸光值为 A<sub>3</sub>。

取得到的三组乳杆菌悬液与白色念珠菌悬液或变异链球菌悬液等体积混合并混匀, 将混匀后的菌悬液静置 4 h, 测定上清液的 OD<sub>600nm</sub>, 记为 A<sub>4</sub>。乳杆菌和病原菌的共聚集率计算公式如下<sup>[14]</sup>。

$$\text{共聚集率} / \% = (1 - \frac{2A_4}{A_2 + A_3}) \times 100\%$$

### 1.3.9 数据分析

数据分析使用 Graphpad Prism 8.4.3, R studio 4.0.1, SPSS, 使用 Two-way anova 进行方差分析,  $p < 0.05$  表示具有显著性差异, 使用 R 包 ggplot2, corrplot 和 ggsci 等进行数据可视化。

## 2 结果与讨论

### 2.1 携带表层蛋白乳杆菌的筛选与鉴定

随着测序技术的高度发展, 许多乳杆菌的表层蛋白编码基因相继被报道。其中, 有些菌株不仅仅含有一个表层蛋白基因, 如短乳杆菌含有 4 个 *slp* 基因<sup>[15]</sup>, 嗜酸乳杆菌含有 2~3 个 *slp* 基因<sup>[8]</sup>。通常 *slpA* 基因为编码表层蛋白的显性基因, 而其他的 *slp* 基因如 *slpB*, *slpX* 基因在正常状况下不表达<sup>[8]</sup>。本研究将实验室保藏的已测序的基因组草图的部分乳杆菌与建立的本地 *slp* 基因数据库进行 blast 比对, 结果如图 1 所示, 其中, 4 株嗜酸乳杆菌均含有 *slp* 基因, 50 株卷曲乳杆菌中有 30 株菌含有 *slp* 基因, 44 株瑞士乳杆菌中有 3 株菌含有 *slp* 基因, 81 株鼠李糖乳杆菌中有 30 株菌含有 *slp* 基因。

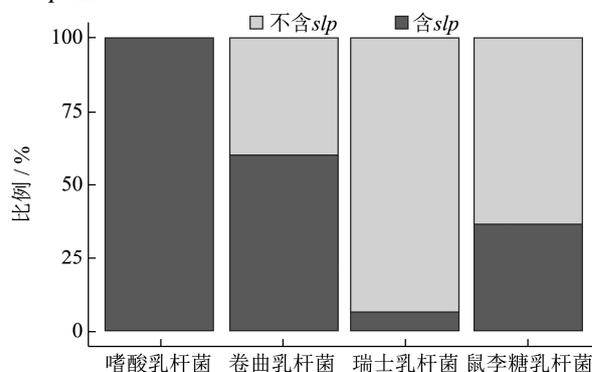


图 1 含有 *slp* 基因的乳杆菌占比

Fig.1 The proportion of *Lactobacillus* containing *slp* gene

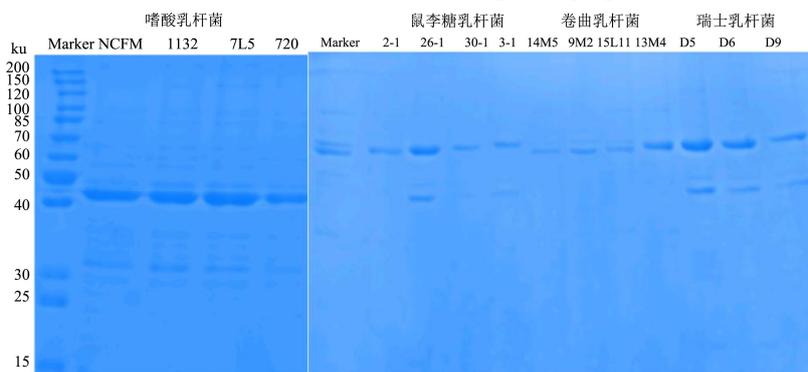


图 2 乳杆菌 LiCl 提取物的 SDS-PAGE 鉴定

Fig.2 SDS-PAGE identification of *Lactobacillus* LiCl extract

之后随机选取了含表层蛋白编码基因的 3 株瑞士乳杆菌, 4 株嗜酸乳杆菌, 4 株卷曲乳杆菌, 4 株鼠李糖乳杆菌, 用 LiCl 进行提取, 并用 SDS-PAGE 鉴定, 结果如图 2 所示。研究表明, 大部分乳杆菌表层蛋白的分子量集中于 40~50 ku 之间<sup>[16]</sup>, 如嗜酸乳杆菌 NCFM 表层蛋白的相对分子质量大约为 46 ku, 卷曲乳杆菌 K243 的表层蛋白分子量为 43 ku, 干酪乳杆菌 zhang 的表层蛋白分子量为 43 ku。本研究中乳杆菌表层蛋白的条带也在 40~50 ku 之间, 四种菌均可以观察到明显的蛋白条带, 其中, 与表层蛋白阳性对照菌株嗜酸乳杆菌 NCFM 相似, 嗜酸乳杆菌 1132、7L5、CCFM720, 瑞士乳杆菌 D5 和 D6, 卷曲乳杆菌 13M4 在 43~46 ku 附近都存在一条明显的高浓度蛋白条带, 而其他菌株的蛋白条带亮度则稍弱, 表明表层蛋白在菌体中存在但含量较低。这表明携带 *slp* 基因的菌株可以编码表层蛋白, 但不同菌种、不同菌株之间表层蛋白表达量是不同的。

## 2.2 表层蛋白对乳杆菌菌株特性的影响

表层蛋白对菌体本身具有重要的意义, 它不仅能控制菌体细胞与外界的联系以适应环境的威胁(溶菌酶、高渗透压、低温等), 还会影响菌群的生长状态<sup>[17]</sup>。本研究将从生长、自聚集率、自成膜量、与致病菌共聚集率探讨去除表层蛋白对乳杆菌菌体的影响。

### 2.2.1 表层蛋白对乳杆菌生长的影响

研究表明, 嗜酸乳杆菌 ATCC4356 经 5 mol/L 氯化锂溶液去除表层蛋白后菌会死亡约 1 个对数级, 瑞士乳杆菌 ATCC12046 经氯化锂处理后也会引起 1 个 log 以内的损伤<sup>[18]</sup>。本研究通过测定 5 mol/L 的氯化锂溶液和终浓度 0.5 mg/mL 蛋白酶溶液处理后乳杆菌的生长状况, 研究表层蛋白的存在与否对乳杆菌生长是否存在影响, 结果如图 3a 所示。4 种乳杆菌去除表层蛋白后, 菌的生长情况受到了一定程度的影响, 且经蛋白酶 K 处理的菌生长能力比经氯化锂处理的菌弱。这可能由于蛋白酶 K 是广谱的蛋白质去除剂, 去除表层蛋白的同时也去除了其他表面蛋白, 故生长过程中需要重新合成大量蛋白质, 而氨基酸合成会竞争生长所需要的能量<sup>[19]</sup>, 且经蛋白酶 K 处理的表层蛋白不能重新恢复, 故显著影响了乳杆菌的生长。而氯化锂的针对表层蛋白的专一提取剂, 经氯化锂处理的表层蛋白在菌体生长的 8 h 左右会重新恢复<sup>[20]</sup>, 仅在重新合成表层蛋白时竞争生长的能量。

瑞士乳杆菌去除表层蛋白前后生长能力差异很大, 但氯化锂溶液和蛋白酶 K 两种溶液处理的差异吸光度值差距较小, 差值仅在 0.20 以内, 推测瑞士乳杆菌的表

面蛋白主要成分是表层蛋白, 因此两种处理方式下, 均去除了表层蛋白, 但可能由于瑞士乳杆菌表层蛋白重新合成的速度缓慢, 竞争了生长的能量<sup>[19]</sup>, 因而生长情况均低于对照组。而嗜酸乳杆菌经氯化锂和蛋白酶 K 两种溶液处理后生长情况差异较大, 吸光度差值高达 0.90, 这表明嗜酸乳杆菌经氯化锂处理后表层蛋白在菌体生长过程中快速恢复, 而蛋白酶 K 处理组不能恢复, 故生长较为缓慢。而卷曲乳杆菌和鼠李糖乳杆菌经两种处理情况后生长情况差异较小, 这可能由于这两种菌有较强的抗逆性, 其生长不容易受到影响。因此不论表面是否有表面蛋白类成分的保护, 均能生长。

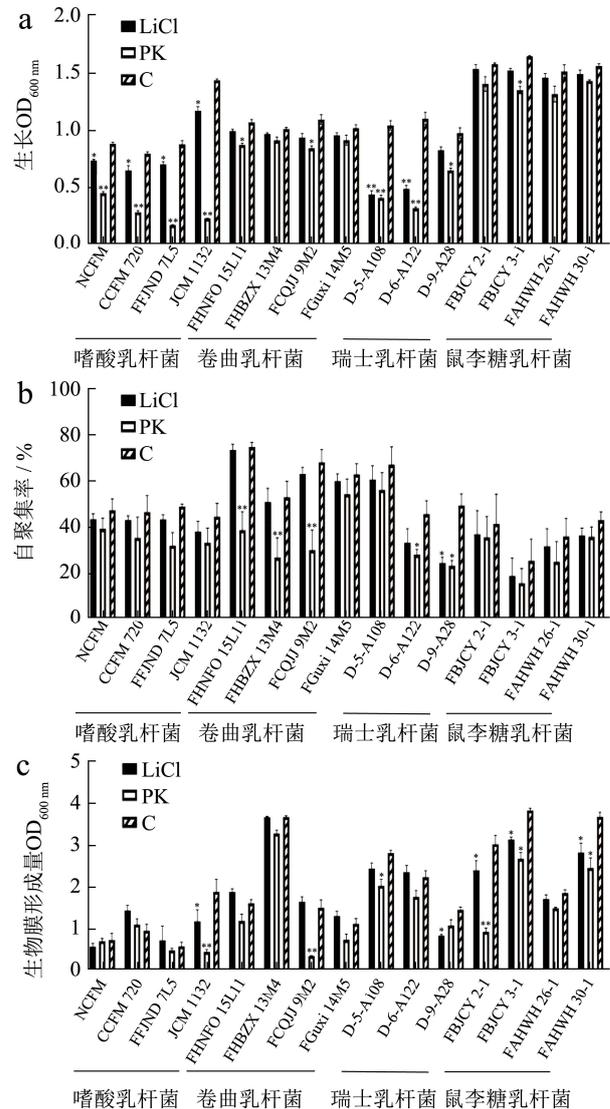


图 3 表层蛋白对乳杆菌自身特性的影响

Fig.3 The effect of surface layer protein on the characteristics of *Lactobacillus*

注: 图 a: 生长; 图 b: 自聚集率; 图 c: 自成膜量。图中 C 表示对照组; LiCl 表示 LiCl 溶液去除表层蛋白组; PK 表示蛋白酶 K 溶液去除表层蛋白组; \*表示具有显著差异 ( $p < 0.05$ ); \*\*表示具有极显著差异 ( $p < 0.01$ )。

### 2.2.2 表层蛋白对乳杆菌自聚集的影响

菌体在生长繁殖过程中出现的大量菌体自发聚集成团的现象被称为自聚集。乳杆菌的自聚集能力与其黏附性息息相关，通常自聚集能力强的菌株也具有强黏附性，而表层蛋白会影响乳杆菌的自聚集能力和黏附能力<sup>[21]</sup>。Chen 等<sup>[22]</sup>的研究表明卷曲乳杆菌 ZJ001 去除表层蛋白后其自聚集能力和对细胞的黏附能力有所下降，Yong 等<sup>[8]</sup>在无菌小鼠体内进行嗜酸乳杆菌 NCFM 的体内转录组分析表明，*slpA* 是无菌小鼠体内表达最高的基因，且辅助表达表层蛋白功能的 *slpX* 也是肠道转运过程中转录较高的基因，说明代谢活跃的细胞表层在菌株 NCFM 黏附定植肠道过程中的重要作用。图 3b 为氯化锂溶液和蛋白酶 K 溶液去除表层蛋白的乳杆菌的自聚集率变化。4 种乳杆菌本身具有不同的自聚集能力，其中，鼠李糖乳杆菌的自聚集能力相对较低，为 36%，卷曲乳杆菌的自聚集能力相对较高，为 64.50%。去除表层蛋白后，菌的自聚集能力显著降低，且蛋白酶 K 处理后菌的自聚集能力下降程度更大，其中，瑞士乳杆菌去除表层蛋白前后菌体自聚集率差异高达 25%，但两种溶液处理的差异仅为 5%，这也与菌株生长特性的趋势相吻合。而卷曲乳杆菌、鼠李糖乳杆菌、嗜酸乳杆菌经氯化锂溶液去除表层蛋白后自聚集率有 10% 左右的下降，但不如瑞士乳杆菌明显，而蛋白酶 K 溶液去除表面蛋白时自聚集能力有显著下降，我们推测，乳杆菌表面其他蛋白质在自聚集过程中也起到了重要作用。

### 2.2.3 表层蛋白对乳杆菌自成膜的影响

乳杆菌形成生物膜，不仅能够定植于宿主肠道表面，还能阻挡致病菌的入侵，从而更好的发挥乳杆菌的益生特性<sup>[23]</sup>。浦明珠<sup>[24]</sup>研究对比了游离细胞和生物膜菌体的在低酸、高盐、存在蛋白酶等情况下的活性和存活率，结果表明生物膜状态的菌体的耐受性更高，Kubota 等<sup>[25]</sup>的研究也表明与浮游状态相比形成生物膜的植物乳杆菌 JCM1149 更加耐受有机酸，乙醇和次氯酸钠。而不同菌株的成膜能力会有巨大的差异，比如植物乳杆菌 M610 成膜能力很强，而植物乳杆菌 S061 成膜能力却很弱<sup>[26]</sup>。本研究通过结晶紫染色法来判断不同菌株的成膜能力和表层蛋白对菌成膜能力的影响，结果见图 3c。当乳杆菌经氯化锂和蛋白酶 K 处理而失去表层蛋白后，菌的成膜能力大多显示出下降的趋势，尤其是蛋白酶 K 处理后的菌株。其中，嗜酸乳杆菌 JCM1132，鼠李糖乳杆菌 2-1 经氯化锂去除表层蛋白后出现了极显著的下降趋势，结晶紫染色的吸光度分别下降了 0.80 和 0.60，而其他菌株则不明显。

### 2.2.4 表层蛋白对乳杆菌与致病菌共聚集的影响

目前，有关表层蛋白拮抗病原菌的研究主要集中在肠道致病菌方向，而表层蛋白在拮抗口腔致病菌方面益生功能的作用研究尚不多见。早期研究表明口腔中不同种类的细菌会出现共聚集的现象，如干酪乳杆菌和变异链球菌的在口腔中的共聚集能有效阻止病原菌的结合或定植，从而降低病原菌的危害性，维护口腔健康<sup>[27]</sup>。为了探究表层蛋白对乳杆菌与致病菌共聚集能力的影响，本研究选取致病性强的变异链球菌和白色念珠菌，测定 4 种乳杆菌在有无表层蛋白的情况下与致病菌的共聚集能力，从而探究表层蛋白对乳杆菌与病原菌共聚集的影响，结果如图 4 所示。

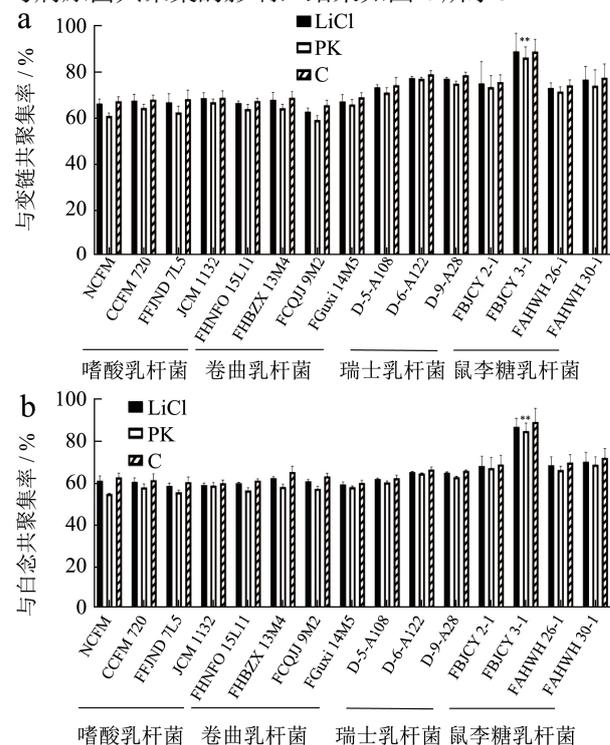


图 4 表层蛋白对乳杆菌与致病菌共聚集的影响

Fig.4 The effect of surface layer protein on *Lactobacillus*

#### Co-aggregation with pathogenic organisms

注：图 a：与变异链球菌共聚集率；图 b：与白色念珠菌共聚集率。图中 C 表示对照组；LiCl 表示 LiCl 溶液去除表层蛋白组；PK 表示蛋白酶 K 溶液去除表层蛋白组；\*\*表示具有极显著差异 ( $p < 0.01$ )。

4 种乳杆菌在氯化锂和蛋白酶 K 剥除表层蛋白前与变异链球菌和白色念珠菌混合后都会产生共聚集现象，有研究表明发酵乳杆菌 421 失去表层蛋白前后与鼠伤寒沙门氏菌的共聚集率相差 48.27%<sup>[14]</sup>，开菲尔乳杆菌失去表层蛋白后与沙门氏菌的共聚集能力也有显著的降低<sup>[28]</sup>。本研究结果显示（图 4），经氯化锂和蛋白酶 K 处理以去除表层蛋白后，乳杆菌与致病菌的共聚集能力都有了小幅度的下降，且蛋白酶处理比氯化锂处理所造成的降幅更大，但几种菌的种间和种内

差异均不明显,这可能是由于变异链球菌和白色念珠菌本身较强的自聚能力所引起的。有趣的是,鼠李糖乳杆菌 3-1 与变异链球菌和白色念珠菌的共聚集能力是所有菌中最强的,接近 90%,且与其他所有菌株都具有显著性差异(图 4),而其本身的自聚能力仅为 36%(图 3b),这表明鼠李糖乳杆菌 3-1 具有较强的和口腔中的致病菌共聚集能力,有望成为具有防龋潜力的益生菌株。

### 2.2.5 表层蛋白与菌株特性的热图分析

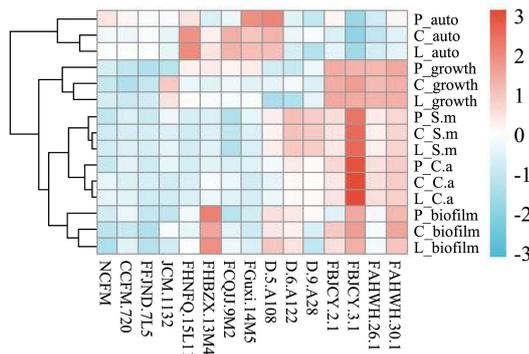


图 5 对照组,氯化锂处理组和蛋白酶 K 处理组的乳杆菌菌株特性热图

Fig.5 The heatmap of the characteristics of *Lactobacillus* strains in the control group, the lithium chloride group and the protease K group

注: C 表示对照组; L 表示 LiCl 处理组; P 表示蛋白酶 K 处理组。

为了从总体上探究不同菌株特性与表层蛋白的联系,对 4 种乳杆菌在对照组,氯化锂处理组和蛋白酶 K 处理组三种状态下的菌株特性进行了总结,绘制了热图。颜色越接近红色,表明菌株该特性越强,颜色越接近蓝色,表明菌株该特性越弱。结果表明,4 种乳杆菌本身的菌株特性存在明显差异,嗜酸乳杆菌生长能力较弱,鼠李糖乳杆菌生长能力较强,鼠李糖乳杆菌 3-1 自聚能力很弱,但是与致病菌共聚能力很强。LiCl 处理会使大部分菌株的生长,自成膜,自聚集能力下降,蛋白酶 K 处理降幅更大,这表明在去除表层蛋白后对菌株的特性产生了一定影响,但影响不如去除细胞表面相关蛋白明显。

### 3 结论

本研究通过本地 blast 对实验室已有基因草图的菌种进行筛选,找到了 4 株嗜酸乳杆菌、30 株卷曲乳杆菌、3 株瑞士乳杆菌、30 株鼠李糖乳杆菌中均含有 *slp* 基因。之后随机挑选了四种菌的不同菌株用氯化锂溶液提取其表层蛋白,用 SDS-PAGE 鉴定,4 种乳杆菌均含有表层蛋白,但含量不同。随后分析表层蛋白

的存在对菌体生长,自聚集能力,自成膜能力及与致病菌共聚集能力都有不同程度的影响。本研究初步探究了不同种乳杆菌及同种不同菌株的乳杆菌表层蛋白与菌株特性的联系,这为将来继续研究其他乳杆菌表层蛋白的性质及深入分析表层蛋白的其他性质和功能提供了一定的理论参考。

### 参考文献

- [1] Hynonen U, Palva A. *Lactobacillus* surface layer proteins: structure, function and applications [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2013, 97(12): 5225-5243
- [2] Wang H F, Zhang L, Li Q P, et al. Surface-layer protein produced by *Lactobacillus crispatus* JCM 2009 ameliorates lipopolysaccharide-induced inflammation through autophagy cross-talk with the NF-kappa B signaling pathway [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2021, 166: 633-640
- [3] Zhang Y C, Xiang X L, Lu Q H, et al. Adhesions of extracellular surface-layer associated proteins in *Lactobacillus* M5-L and Q8-L [J]. Journal of Dairy Science, 2016, 99(2): 1011-1018
- [4] Konstantinov S R, Smidt H, De Vos W M, et al. S layer protein A of *Lactobacillus acidophilus* NCFM regulates immature dendritic cell and T cell functions [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2008, 105(49): 19474-19479
- [5] Abramov V M, Kosarev I V, Pripitnevich T V, et al. S-layer protein 2 of *Lactobacillus crispatus* 2029, its structural and immunomodulatory characteristics and roles in protective potential of the whole bacteria against foodborne pathogens [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2020, 150: 400-412
- [6] 高树明. 乳杆菌表层蛋白对菌株益生特性的影响[D]: 无锡: 江南大学, 2015  
GAO Shuming. Influence of surface protein on the probiotic functions of *Lactobacillus* [D]. Wuxi: Jiangnan University, 2015
- [7] Oniciuc E A, Likotrafiti E, Alvarez-molina A, et al. The present and future of whole genome sequencing (WGS) and whole metagenome sequencing (WMS) for surveillance of antimicrobial resistant microorganisms and antimicrobial resistance genes across the food chain [J]. Genes, 2018, 9(5): 268
- [8] Goh Y J, Barrangou R, Klaenhammer T R. *In vivo* transcriptome of *Lactobacillus acidophilus* and colonization

- impact on murine host intestinal gene expression [J]. *Mbio*, 2021, 12(1): e03399-20
- [9] Johnson B, Selle K, O'flaherty S, et al. Identification of extracellular surface-layer associated proteins in *Lactobacillus acidophilus* NCFM [J]. *Microbiology-Sgm*, 2013, 159: 2269-2282
- [10] Meng J, Zhu X, Gao S M, et al. Characterization of surface layer proteins and its role in probiotic properties of three *Lactobacillus* strains [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2014, 65: 110-114
- [11] Chen X Y, Xu J J, Shuai J B, et al. The S-layer proteins of *Lactobacillus crispatus* strain ZJ001 is responsible for competitive exclusion against *Escherichia coli* O157: H7 and *Salmonella typhimurium* [J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2007, 115(3): 307-312
- [12] 徐晚晴,张秋香,郑彦懿,等.治疗牙周炎的乳杆菌筛选及口腔益生特性评价[J].食品与发酵工业,2021,47(15):70-76  
XU Wanqing, ZHANG Qiuxiang, ZHENG Yanyi, et al. Screening of lactobacilli for treating periodontitis and evaluation of oral probiotic properties [J]. *Food and Fermentation Industries*, 2021, 47(15): 70-76
- [13] Xu H, Jeong H S, Lee H Y, et al. Assessment of cell surface properties and adhesion potential of selected probiotic strains [J]. *Letters in Applied Microbiology*, 2009, 49(4): 434-442
- [14] 牛钰涵.表层蛋白对乳杆菌益生性质的影响及其抑菌功能[D].无锡:江南大学,2019  
NIU Yuhan. Effect of surface layer proteins from lactobacillus on the strains' probiotic properties and their antibacterial function [D]. Wuxi: Jiangnan University, 2019
- [15] Jakava-viljanen M, Avall-jaaskelainen S, Messner P, et al. Isolation of three new surface layer protein genes (slp) from *Lactobacillus brevis* ATCC 14869 and characterization of the change in their expression under aerated and anaerobic conditions [J]. *Journal of Bacteriology*, 2002, 184(24): 6786-6795
- [16] 孟珺,王艳阳,康媛媛,等.乳杆菌表层蛋白理化性质与生物功能的研究进展[J].河南工业大学学报(自然科学版),2020, 41(4):129-138  
MENG Jun, WANG Yanyang, KANG Yuanyuan, et al. Advances in research on physicochemical properties and biological functions of *Lactobacillus* surface layer proteins [J]. *Journal of Henan University of Technology (Natural Science Edition)*, 2020, 41(4): 129-138
- [17] Li P N, Herrmann J, Tolar B B, et al. Nutrient transport suggests an evolutionary basis for charged archaeal surface layer proteins [J]. *Isme Journal*, 2018, 12(10): 2389-2402
- [18] Lortal S, Vanheijenoort J, Gruber K, et al. S-layer of *Lactobacillus-Helveticus* Atcc-12046 - isolation, chemical characterization and Re-formation after extraction with lithium-chloride [J]. *Journal of General Microbiology*, 1992, 138: 611-618
- [19] 程新,赵延胜,董英,等.Mn<sup>2+</sup>对植物乳杆菌影响的代谢组学分析[J].中国食品学报,2019,19(2):258-265  
CHENG Xin, ZHAO Yansheng, DONG Ying, et al. Metabolomics analysis of the effect of Mn<sup>2+</sup> on *Lactobacillus plantarum* [J]. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 2019, 19(2): 258-265
- [20] 胡斌,田丰伟,赵建新,等.嗜酸乳杆菌 NCFM 表层蛋白的提取及其与菌体酸和胆盐耐受及粘附性能的关系[J].食品工业科技,2014,35(5):118-121  
HU Bin, TIAN Fengwei, ZHAO Jianxin, et al. Extraction of surface layer protein from *Lactobacillus acidophilus* NCFM and the relationship among SLP and strain acid, bile resistance and cell adhesion [J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2014, 35(5): 118-121
- [21] Alp D, Kuleasan H, Altintas A K. The importance of the S-layer on the adhesion and aggregation ability of lactic acid bacteria [J]. *Molecular Biology Reports*, 2020, 47(5): 3449-3457
- [22] Chen X Y, Chen Y, Li X L, et al. Characterization of surface layer proteins in *Lactobacillus crispatus* isolate ZJ001 [J]. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2009, 19(10): 1176-1183
- [23] Terraf M C L, Mendoza L M, Tomas M S J, et al. Phenotypic surface properties (aggregation, adhesion and biofilm formation) and presence of related genes in beneficial vaginal lactobacilli [J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2014, 117(6): 1761-1772
- [24] 浦明珠.椰果表面乳酸菌生物膜的特性及其冻干保护效果研究[D].南京:南京农业大学,2014  
PU Mingzhu. Study on the characteristics of *Lactobacillus* biofilm on coconut fruit surface and its protective effect of freeze-drying [D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2014
- [25] Kubota H, Senda S, Tokuda H, et al. Stress resistance of biofilm and planktonic *Lactobacillus plantarum* subsp *plantarum* JCM 1149 [J]. *Food Microbiology*, 2009, 26(6): 592-597

(下转第 33 页)