

植物乳杆菌DMDL 9010胞外多糖合成蛋白 cpsB的生物信息学分析

梁婉诗¹, 吴佳敏¹, 林嘉伟¹, 曹凯¹, 宋炜桐¹, 曾新安^{1,2}, 刘冬梅², 黄燕燕^{1*}

(1. 佛山科学技术学院食品科学与工程学院, 佛山科学技术学院广东省食品智能制造重点实验室, 广东佛山 528225) (2. 华南理工大学食品科学与工程学院, 广东广州 510640)

摘要: 为了探讨植物乳杆菌 DMDL 9010 胞外多糖合成蛋白 cpsB 的结构特性, 该文通过生物信息学技术研究了胞外多糖合成蛋白 cpsB 的理化性质、亲/疏水性、跨膜结构、功能位点、磷酸化位点、信号肽、结构域、保守功能域、序列同源性以及空间结构进行预测与分析。结果表明胞外多糖合成蛋白 cpsB 相对分子质量约为 2 920, 等电点 6.86, 含有 191 个氨基酸; 其为疏水蛋白, 具有较高的稳定性; 经过跨膜结构预测, 发现其不存在跨膜结构, 为胞内蛋白; 胞外多糖合成蛋白 cpsB 中含有 15 个磷酸位点; 氨基酸序列中不包含信号肽, 所编码蛋白均为内分泌型蛋白; 保守功能域预测中, 基因中仅发现一段 PHP 结构域, 该基因可能参与调节胞外多糖的基因表达。胞外多糖合成蛋白 cpsB 的二级结构中 α -螺旋占 51.14%, 并不存在 β -折叠和 β -转角结构, 其三级结构比例与二级结构基本相似。该研究对植物乳杆菌 DMDL 9010 的胞外多糖合成蛋白 cpsB 功能机制进行深入研究, 对利用基因工程技术研究其胞外多糖的生物合成具有重要意义。

关键词: 植物乳杆菌; 胞外多糖合成蛋白 cpsB; 生物信息学

文章编号: 1673-9078(2024)03-113-120

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2024.3.0246

Bioinformatics Analysis of Capsular Polysaccharide Synthesis Protein cpsB Prepared by Using *Lactiplantibacillus plantarum* DMDL 9010

LIANG Wanshi¹, WU Jiamin¹, LIN Jiawei¹, CAO Kai¹, SONG Weitong¹, ZENG Xin'an^{1,2}, LIU Dongmei²,
HUANG Yanyan^{1*}

(1. School of Food Science and Engineering, Guangdong Provincial Key Laboratory of Intelligent Food anufacturing, Foshan University of Science and Technology, Foshan 528225, China)

(2. School of Food Science and Engineering, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

Abstract: To investigate the structural characteristics of cpsB, a capsular polysaccharide synthesis protein prepared with the help of *Lactiplantibacillus plantarum* DMDL 9010, the physical and chemical properties, hydrophilic/hydrophobic

引文格式:

梁婉诗, 吴佳敏, 林嘉伟, 等. 植物乳杆菌 DMDL 9010 胞外多糖合成蛋白 cpsB 的生物信息学分析 [J]. 现代食品科技, 2024, 40(3): 113-120.

LIANG Wanshi, WU Jiamin, LIN Jiawei, et al. Bioinformatics analysis of capsular polysaccharide synthesis protein cpsB prepared by using *Lactiplantibacillus plantarum* DMDL 9010 [J]. Modern Food Science and Technology, 2024, 40(3): 113-120.

收稿日期: 2023-03-02

基金项目: 广东省基础与应用基础研究基金项目 (2022A1515110426); 广东省科技创新战略专项资金 (2022B1212010015); 佛山科学技术学院高层次人才经费 (CGZ07001); 企业委托项目 (BKH208034)

作者简介: 梁婉诗 (1999-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 食品中微生物的利用和控制, E-mail: 849140824@qq.com

通讯作者: 黄燕燕 (1992-), 女, 博士, 特聘青年研究员, 研究方向: 食品中微生物的利用和控制, E-mail: huang_yanyan@fosu.edu.cn

properties, transmembrane structure, functional sites, phosphorylation sites, signal peptides, structural domains, conserved functional domains, sequence homology, and spatial structure of *cpsB* were studied and predicted by bioinformatics. The results showed that the relative molecular weight of *cpsB* was 2 920, the isoelectric point was 6.86, and the protein contains 191 amino acids. It was a hydrophobic protein with high stability. The transmembrane structure prediction demonstrated that it has no transmembrane structure and it is an intracellular protein. *CpsB* contains 15 phosphate sites. The amino acid sequence does not contain signal peptides, and the encoded proteins are all endocrine proteins. In conserved functional domain prediction, only one PHP domain was found in the gene, which might be involved in regulating the expression of the exopolysaccharide gene. In the secondary structure of *cpsB*, α -helix accounts for 51.14%, and there are no β -sheets and β -turn structures. The proportion of tertiary structures in *cpsB* was similar to that of secondary structures. In this study, the functional mechanisms of *cpsB*, a capsular polysaccharide synthesis protein produced using *Lactiplantibacillus plantarum* DMDL 9010, were studied in depth. The findings are important to understand its extracellular polysaccharide biosynthesis through genetic engineering.

Key words: *Lactiplantibacillus plantarum*; capsular polysaccharide synthesis protein *cpsB*; bioinformatics

微生物胞外多糖（Exopolysaccharides, EPS）是一些微生物通过碳源同化作用，从而在细胞内产生并分泌到细胞壁外的聚合物，属于微生物的次级代谢产物^[1]。EPS 不仅可以改善食品的质构特性^[2]，还具有抗氧化、抑菌、抗肿瘤和免疫调节等多种生物活性^[3]。随着全基因组测序技术的发展，对乳酸菌产生 EPS 的功能机制研究不断深入^[4]。乳酸菌的 EPS 生物合成是由 *eps* 基因簇调控，其决定 EPS 重复单元的合成、聚合、输出等过程^[5]，不同的 *eps* 基因簇指导具有不同化学结构和生物学活性的 EPS 合成^[6]，因此，探究 *eps* 基因簇的组成和功能，能够更好地解释 EPS 复杂的合成模型，有助于根据 EPS 的合成特性定制多糖和提高多糖产量，如 Boels 等^[7]通过在乳酸乳球菌 NIZO B40 中同源表达完整 *eps* 基因簇，提高 EPS 质粒拷贝数，使得 NIZO B40 的 EPS 生产水平增加近四倍。但由于不同种类乳酸菌产生的 EPS 结构上具有显著差异，测定的过程繁琐且具有一定的随机性，不能完整解释 EPS 合成机理^[4]。因此，本文采用生物信息技术探究 EPS 合成及其分泌相关基因的功能特性具有重要意义。

笔者课题组前期经过大量实验证明植物乳杆菌 DMDL 9010 分泌的胞外多糖在抗氧化、提高机体免疫活性以及缓解抑郁症上具有良好的性能^[8]，但对其胞外多糖的研究仍仅局限在结构表征和基本应用，故继续对植物乳杆菌 DMDL 9010 进行全基因组测序后发现，该菌的酪氨酸蛋白磷酸酶染色体上的基因在功能注释中为胞外多糖合成蛋白 *cpsB*。根据以往研究结果，该胞外多糖合成蛋白 *cpsB* 位于植物乳杆菌 DMDL 9010 *l_eps2* 簇（如图 1 所示），

属于调控基因且与植物乳杆菌 WCFS1 的 *cps4ABC* 基因同源性较高（>98%），因此推测其在胞外多糖的合成过程中起调节作用^[8]。

为了进一步了解该胞外多糖合成蛋白 *cpsB* 的调控作用，本研究以其为研究对象，应用生物信息学工具和方法，对其理化性质、亲 / 疏水性、跨膜结构、功能位点、磷酸化位点、信号肽、结构域、保守功能域、序列同源性以及空间结构进行预测与分析，为开发植物乳杆菌 DMDL 9010 及其 EPS 在食品、医药上的应用提供理论基础，打破我国在植物乳杆菌胞外多糖研究上的局限性。

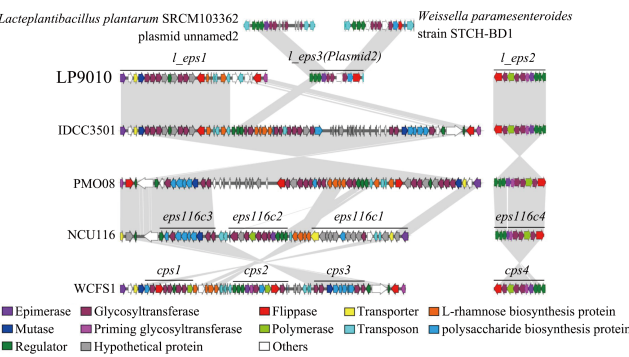


图 1 植物乳杆菌 DMDL 9010 与其他物种胞外多糖生物合成基因簇的比较分析

Fig.1 Comparative analysis of exopolysaccharide biosynthesis gene clusters of *Lactiplantibacillus plantarum* DMDL 9010 and other species

1 材料与方法

1.1 材料来源

植物乳杆菌 DMDL 9010 (*Lactiplanti-bacillus*

plantarum DMDL 9010, 简称 LP9010), 由华南理工大学食品科学与工程学院食品质量与安全系筛选分离并保存^[9]。LP9010 基因组 DNA 由华大基因研究所提取, 采用 Illumina 平台和 PacBio 平台进行 LP9010 的基因组测序。LP9010 的基因组序列已提交至 NCBI, 登录号为 CP063986-CP063988^[8]。

1.2 胞外多糖合成蛋白cpsB的理化性质分析

利用在线预测软件 DNAMAN 9.0 对胞外多糖合成蛋白 cpsB 的相对分子质量、等电点和氨基酸组成等理化性质进行预测。经在线分析软件 NovoPro 分析胞外多糖合成蛋白 cpsB 的亲 / 疏水性。

1.3 蛋白的功能位点分析

利用 Superfamily 在线分析软件分析胞外多糖合成蛋白 cpsB 跨膜结构域。利用 NetPhos 3.1 Server 可分析得出胞外多糖合成蛋白 cpsB 磷酸位点分析。

1.4 蛋白信号肽预测

利用 SIGNALP 5.0 SERVER 在线分析软件对胞外多糖合成蛋白 cpsB 的信号肽进行预测。

1.5 蛋白结构域及保守功能域预测

采用 Superfamily 在线分析工具对蛋白进行结构域预测。

1.6 多序列比对和系统进化树构建

多序列对比采用 Clustal Omega 在线工具对不同物种 cpsB 蛋白进行多重序列比对^[10]。利用 NCBI 在线数据库的 blast 功能, 对不同物种 cpsB 蛋白序列进行分析, 利用 MEGA 11 软件构建系统进化树进入 ClustalW 2.0 软件, 设置 Gap Opening Penalty 为 10.00, Gap Extension Penalty 为 0.20, Delay Divergent Sequence 为 30%, 其他参数默认。

1.7 蛋白二、三级结构的构建

利用 DNAMAN 9.0 和 Psipred 在线分析软件预测胞外多糖合成蛋白 cpsB 的二级结构, 利用 SWISS-MODEL 构建蛋白的三级结构。

2 结果与分析

2.1 胞外多糖合成蛋白cpsB的理化性质分析

通过 DNAMAN 9.0 对胞外多糖合成蛋白 cpsB 的蛋白质序列的氨基酸组成及含量进行分析, 结果如表 1 所示。胞外多糖合成蛋白 cpsB 相对分子质量约为 2 920, 预测等电点 pI=6.86, 蛋白质中共含有

55 个极性氨基酸 (C、N、Q、S、T、Y), 占比约 20.8%、110 个疏水性氨基酸 (A、F、I、L、V、W), 占比约 41.6%、23 个强碱性氨基酸 (K、R), 占总比约 8.7% 和 26 个强酸性氨基酸 (D、E), 占比约 9.8%。胞外多糖合成蛋白 cpsB 在第 98 位氨基酸和第 195 位氨基酸的疏水性分值最大为 1.8, 第 252 位的氨基酸的亲水性分值最大为 -2.7, 故为疏水性蛋白。

表 1 胞外多糖合成蛋白cpsB的蛋白质组成及含量
Table 1 Protein composition and content of extracellular polysaccharide synthesis protein cpsB

氨基酸组成成分	数量	mol/mol, %	m/m, %
丙氨酸 Ala(A)	19	8.41	5.93
半胱氨酸 Cys(C)	0	0	0
天冬氨酸 Asp(D)	11	4.87	5.13
谷氨酸 Glu(E)	8	3.54	4.13
苯丙氨酸 Phe(F)	4	1.77	2.32
甘氨酸 Gly(G)	16	7.08	4.21
组氨酸 His(H)	4	1.77	2.18
异亮氨酸 Ile(I)	12	5.31	5.52
赖氨酸 Lys(K)	11	4.87	5.64
亮氨酸 Leu(L)	26	11.5	11.59
蛋氨酸 Met(M)	6	2.65	3.14
天冬酰胺 Asn(N)	10	4.42	4.63
脯氨酸 Pro(P)	12	5.31	4.84
谷氨酰胺 Gln(Q)	11	4.87	5.63
精氨酸 Arg(R)	10	4.42	6.11
丝氨酸 Ser(S)	11	4.87	4.05
苏氨酸 Thr(T)	22	9.73	9.18
缬氨酸 Val(V)	25	11.06	10.26
色氨酸 Trp(W)	1	0.44	0.72
酪氨酸 Tyr(Y)	7	3.1	4.45

2.2 胞外多糖合成蛋白cpsB的亲疏水性分析

用在线程序 NovoPro 对胞外多糖合成蛋白 cpsB 进行亲 / 疏水性预测, 确定最大亲水值和最大疏水值及其相对应的位置。蛋白质结构的特征是亲 / 疏水间的平衡, 其结构的稳定在很大程度上有赖于分子内的疏水作用^[11]。亲 / 疏水性氨基酸可以预测跨膜蛋白的位置, 构成疏水的二级结构, 便于蛋白质跨膜, 形成更高级结构。疏水氨基酸的疏水基团不仅可以促使蛋白质二级结构的折叠^[12], 还有利于蛋白形成 α -螺旋, 保证其稳定性。疏水性推动了蛋白质折叠成复杂的高级结构, 并且在此复杂的结构基

础上维系着复杂的生物化学功能^[13]。

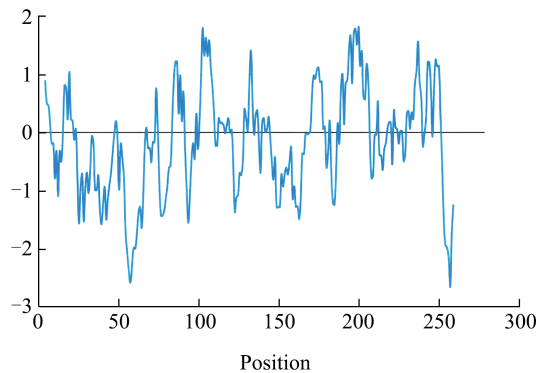


图 2 胞外多糖合成蛋白 cpsB 的亲疏水分析
Fig.2 Hydrophilic and hydrophobic analysis of extracellular polysaccharide synthetic protein cpsB

负值表示亲水性，负值越大表示蛋白亲水性越强；正值代表疏水性，正值越大表示蛋白疏水性越强^[14]。由图 2 研究结果可知，第 8 位的亮氨酸和第 195 位的丙氨酸正值最大为 1.8，胞外多糖合成蛋白 cpsB 疏水性最强的区域在第 96 个氨基酸~第 107 个氨基酸区间和第 183 个氨基酸~第 202 个氨基酸区间；第 252 位的天冬酰胺负值最大为 -2.7，胞外多糖合成蛋白 cpsB 亲水性最强的区域在第 247 个氨基酸~第 264 个氨基酸区间。整体分析结果表明，胞外多糖合成蛋白 cpsB 存在明显的疏水和亲水区域，在不同区域所具有的亲水性 / 疏水性各不相同，具有差异性；胞外多糖合成蛋白 cpsB 疏水区域大于亲水区域，表现为疏水性，是疏水性蛋白。

2.3 胞外多糖合成蛋白cpsB的跨膜结构域

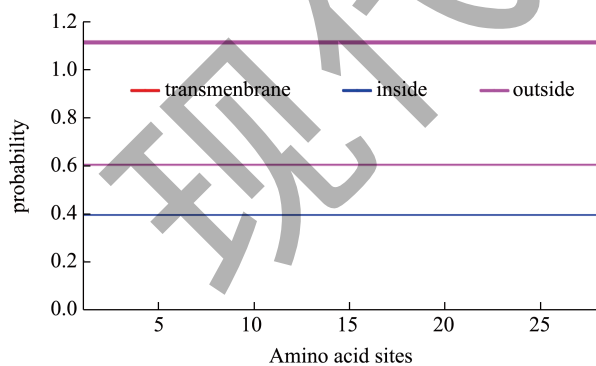


图 3 胞外多糖合成蛋白 cpsB 蛋白跨膜区域预测结果
Fig.3 Prediction of the transmembrane region of extracellular polysaccharide synthesis protein cpsB

采用在线分析工具 TMHMM 2.0 对上述基因进行蛋白进行跨膜区域预测，跨膜区是蛋白质序列中跨越细胞膜的区域，为 α -螺旋结构，约 20~25 个氨基酸残基，构成跨膜区蛋白的氨基酸大部分是疏水

性氨基酸。如图 3 所示，结果表明该胞外多糖合成蛋白 cpsB 的蛋白为胞内蛋白，不存在跨膜结构，为非膜蛋白，即没有介导物质运输及信号转导等功能。

2.4 胞外多糖合成蛋白cpsB的磷酸位点分析

蛋白质翻译后修饰常见的过程有泛素化、磷酸化、糖基化、脂基化、甲基化和乙酰化等^[15]，其中蛋白质的磷酸化是通过酶促反应将磷酸基团转移到蛋白组氨基酸残基上的过程，而蛋白质的糖基化是指在糖基转移酶作用下将糖转移至蛋白质和蛋白质上的氨基酸残基形成糖苷键的过程。糖基化是对蛋白的重要的修饰作用，有调节蛋白质功能作用^[16,17]。糖基化修饰常发生在赖氨酸和精氨酸中，磷酸化修饰位点则常见于酪氨酸、丝氨酸和苏氨酸^[18]。蛋白质的磷酸化是通过酶促反应将磷酸基团转移到蛋白组氨基酸残基上的过程，在生物体内普遍存在，蛋白质的磷酸化与去磷酸化这一可逆过程几乎参与了生命活动的所有过程，与信号传导、细胞周期、生长发育、癌症发生发展等密切相关^[19-21]。利用 NetPhos 3.1 Sever 蛋白的磷酸位点进行分析。结果如图 4 所示，胞外多糖合成蛋白 cpsB 中含有 15 个磷酸位点，其中，Ser 磷酸位点 4 个，Tyr 磷酸位点 4 个，Thr 磷酸位点 7 个。

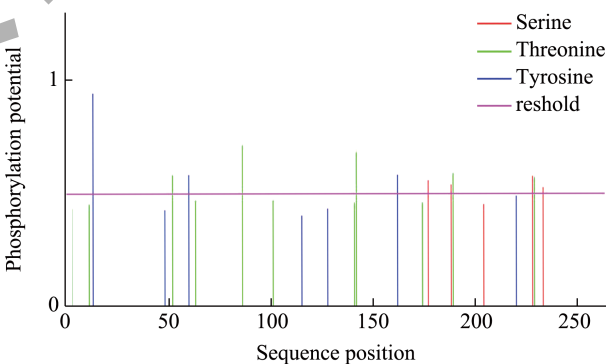


图 4 胞外多糖合成蛋白 cpsB 蛋白磷酸位点分析结果
Fig.4 Analysis results of phosphoric acid locus of extracellular polysaccharide synthesis protein cpsB

2.5 胞外多糖合成蛋白cpsB的信号肽预测分析

利用 Phobius 在线分析工具对胞外多糖合成蛋白 cpsB 蛋白进行信号肽预测。信号肽在引导和转运跨膜蛋白和分泌蛋白方面发挥着重要作用，它本质上是蛋白质序列中起始于 N 端的一段特定氨基酸序列^[22]，具有信号肽表明其为胞外分泌蛋白^[23]，反之则为内分泌蛋白。如付春等^[24]进行信号肽预测和分析发现研究的目的基因存在 C 值最大切割位点以

及分值：而本研究结果如下图 5 所示，与其进行对比发现，并没有出现任一峰值，因此表明该基因并没有信号肽，表明胞外多糖合成蛋白 cpsB 所编码蛋白为内分泌型蛋白。

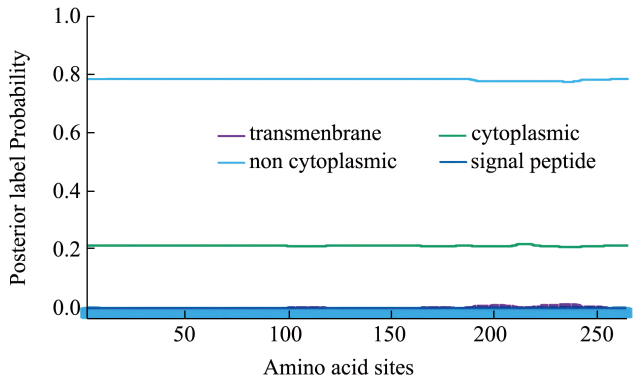


图 5 胞外多糖合成蛋白 cpsB 信号肽预测结果

Fig.5 Prediction of cpsB signal peptide of extracellular polysaccharide synthesis protein cpsB

2.6 蛋白结构域及保守功能域预测

采用 Superfamily 在线分析工具对蛋白质进行结构域预测，结构域是根据蛋白质的结构来确定的，但由于蛋白质的序列决定了蛋白质的结构，而且序列数据比结构数据更容易获得，因此选用序列获得结构域^[25]，故本文采用在线分析工具对胞外多糖合成蛋白 cpsB 进行分析预测。结果如图 6 所示，胞外多糖合成蛋白 cpsB 的蛋白序列中只发现一段 PHP 结构域。在过去的十年中，酪氨酸磷酸酶 PHP 家族被认为与分泌 EPS 的合成调控有关^[26]。



图 6 蛋白结构域预测结果

Fig.6 Protein domains predicted results

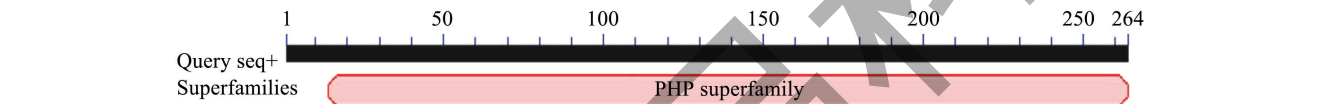


图 7 蛋白质保守功能域预测结果

Fig.7 Predicted results of protein conserved functional domains

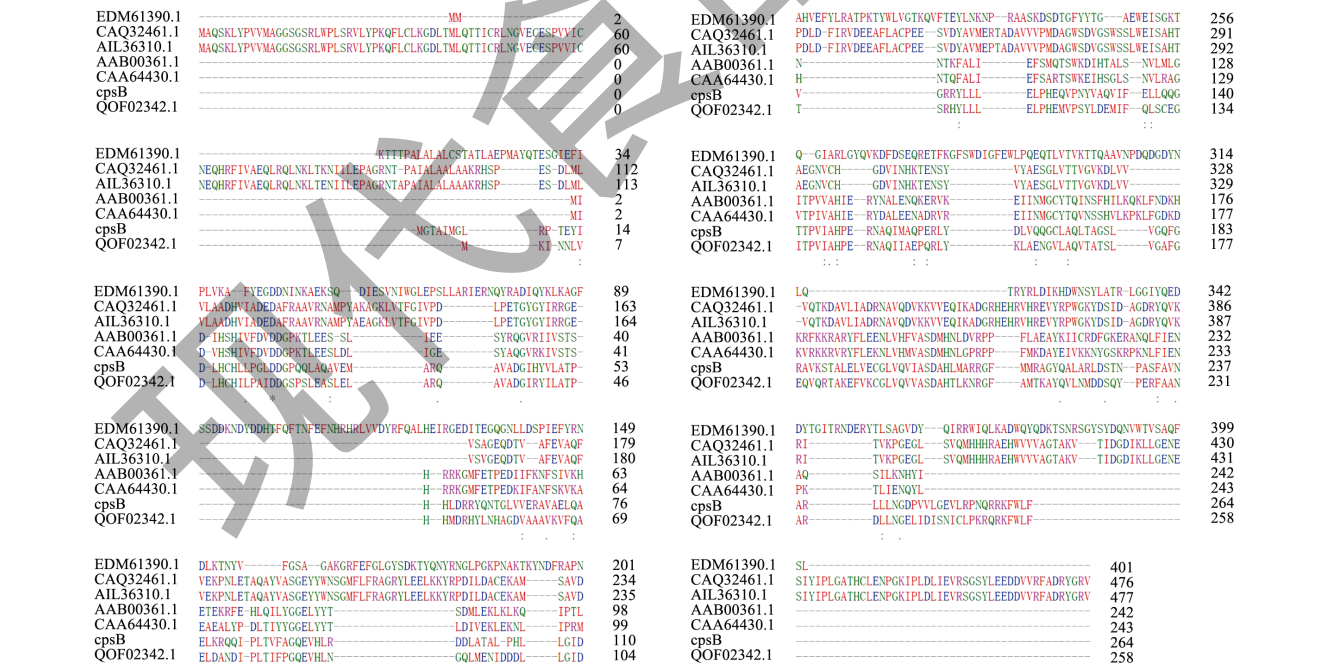


图 8 不同物种 cpsB 蛋白多序列比对分析

Fig.8 Multiple sequence alignment of proteins from different species

注：相似蛋白及菌株：EDM61390.1(副溶血性弧菌 AQ3810, GenBank 序列号: EDM61390.1), CAQ32461.1 (大肠杆菌 BL21(DE3), GenBank 序列号: CAQ32461.1), AIL36310.1 (福氏志贺菌 2003036, GenBank 序列号: AIL36310.1), AAB00361.1 (无乳链球菌 COH1, GenBank 序列号: AAB00361.1), CAA64430.1 (嗜热链球菌 NCBF 2393, GenBank 序列号: CAA64430.1), QOF02342.1 (植物乳杆菌 PM008, GenBank 序列号: QOF02342.1)。

利用 Conserved Domain Search 在线分析工具对其上述基因编码的蛋白质进行保守功能域分析。保守结构域是指在生物进化或一个蛋白家族中拥有不变或一致的结构域,他们一般具有能够利用独立功能的区域,通常包括了酶的活性催化位点在内^[27,28]等重要的功能。结果如图 7 所示,胞外多糖合成蛋白 cpsB 的蛋白质上发现了一个聚合酶和组氨酸磷酸酶结构域,该结构域与编码胞外多糖的序列同源性最强。推测该结构可能参与胞外多糖的聚合;蛋白质分类为酪氨酸蛋白激酶,也再次验证了 blast 中的结果,该基因编码的蛋白在 EPS 的合成过程中起重要作用。

2.7 多序列比对和系统进化树构建分析

利用 NCBI 数据库收集副溶血性弧菌 AQ3810、大肠杆菌 BL21 (DE3)、福氏志贺菌 2003036、无乳链球菌 COH1、嗜热链球菌 NCBF 2393 和植物乳杆菌 PM008 的 cpsB 蛋白完整序列。将获得的 6 条 cpsB 蛋白序列与胞外多糖合成蛋白 cpsB 进行多序列比对构建系统进化树。结果如图 8 所示,通过多序列比对发现,胞外多糖合成蛋白 cpsB 序列与植物乳杆菌 PM008 的 cpsB 蛋白 (GenBank 序列号 QOF02342.1) 100% 同源。

根据胞外多糖合成蛋白 cpsB 的氨基酸序列同源性分析结果,使用 MEGA 11.0 软件并通过邻位归并法构建包含在胞外多糖合成蛋白 cpsB 内 7 种蛋白的系统进化树。结果如图 9 所示胞外多糖合成蛋白 cpsB 与来源于植物乳酸菌 PM008 (GenBank 序列号 QOF02342.1) 中 cpsB 蛋白位于同一进化分支,其置信度为 100。

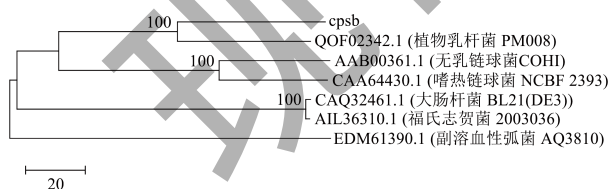


图 9 胞外多糖合成蛋白 cpsB 系统进化树分析

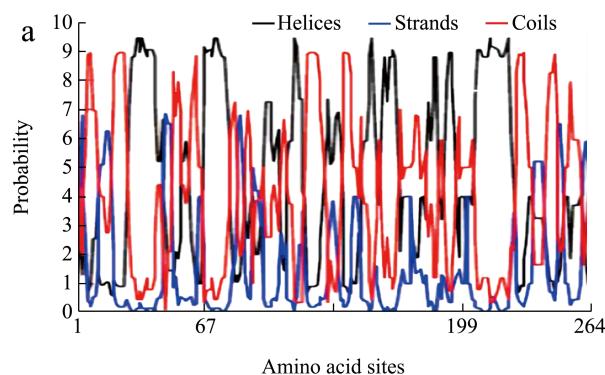
Fig.9 Phylogenetic tree analysis of extracellular polysaccharide synthetic protein cpsB

这表明在序列相似性基础上,胞外多糖合成蛋白 cpsB 的氨基酸序列在相同物种中具有较高的保守性,亲缘关系较近,这表明在同一物种中存在着共同的起源或者进化模式,这种保守性的存在,为研究物种内部的进化关系提供了重要线索。而不同

物种之间的 cpsB 蛋白序列相似性差异显著,亲缘关系较远,这为物种间的分类提供了重要的信息。这些差异可以揭示不同物种之间的亲缘关系,因此,胞外多糖合成蛋白 cpsB 在 cps 蛋白中中既有物种之内的保守性,又具有物种之间相对变异性,较真实地反映了不同物种间的自然演化进程,这为研究物种进化和分类提供了重要的线索和参考,同时 cpsB 蛋白还可以作为分子标记,为物种鉴定和分类提供一定的参考^[29]。

2.8 胞外多糖合成蛋白 cpsB 二级结构

本实验利用 DNAMAN 9.0 和 Psipred 在线工具以及 NPS@HNN 在线分析工具对胞外多糖合成蛋白 cpsB 蛋白质二级结构进行预测。胞外多糖合成蛋白 cpsB 中含有 α -螺旋、无规则卷曲和延伸链等三种结构。如图 10 结果所预测,胞外多糖合成蛋白 cpsB 蛋白质二级结构中 α -螺旋占 51.14%,无规则卷曲占 33.71%,无 β -折叠和 β -转角结构。蛋白质的功能作用主要取决于其空间结构,其中 α -螺旋可以稳定蛋白质骨架,起到跨膜传递的作用^[29]。而且由于模体序列表现较为保守, α -螺旋占比高的蛋白多为保守蛋白^[30]。无规则卷曲则是蛋白质重要的功能区域^[31],可使空间结构中的自由能达到最大而促进蛋白质结构稳定^[30],胞外多糖合成蛋白 cpsB 无规则卷曲占据 33.71%,推测其空间结构较小,受到侧链间相互作用较大的影响。蛋白质中 α -螺旋结构占比超过 50%,无 β -折叠和 β -转角结构,属于 α 类蛋白质。与其他蛋白酪氨酸磷酸酶,如何王伟等^[32]研究的家蚕蛋白酪氨酸磷酸酶基因 BmPTP-h 和王叶菁^[33]研究的嗜热菌 HB27 的蛋白酪氨酸磷酸酶基因 PTPase 对比发现,两种胞外多糖合成蛋白 cpsB 的结构排列方式上较为相似,中间均为多段 α -螺旋为主,两端均由一段无规则卷曲包裹一段其他结构构成。



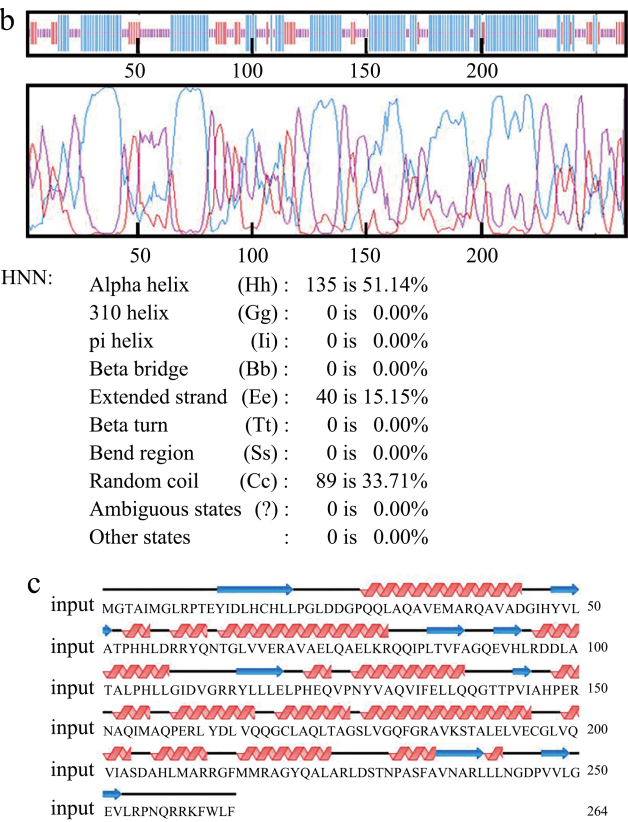


图 10 胞外多糖合成蛋白 cpsB 的二级结构预测分析

Fig.10 Secondary structure prediction analysis of extracellular polysaccharide synthesis protein cpsB

注：(a) 胞外多糖合成蛋白 cpsB 二级结构；(b) 胞外多糖合成蛋白 cpsBNPS@HNN 二级结构预测结果；(c) 胞外多糖合成蛋白 cpsB 蛋白 Psired 二级结构预测结果。

2.9 胞外多糖合成蛋白cpsB三级结构预测分析

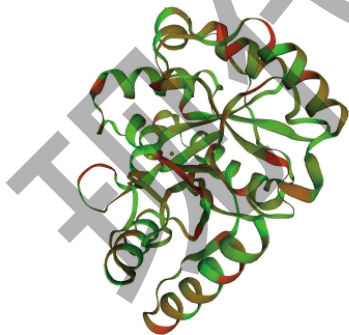


图 11 胞外多糖合成蛋白 cpsB 三级结构预测结果

Fig.11 Results of tertiary structure prediction of extracellular polysaccharide synthesis protein cpsB

本实验利用 SWISS-MODEL 在线分析工具，以胞外多糖合成蛋白 cpsB 的蛋白序列为基础进行三级结构建模预测。结果如图 11 所示，胞外多糖合成蛋白 cpsB 三级结构中包含 8 段 α -螺旋和多段无规则卷曲。预测结果与二级结构的预测结果比例较

为相似，预测结果的相似度较低为 40.16%，但与基因同源性比对及功能注释的结果一致，与同类蛋白的结构大致相同。

3 结论

本文从植物乳杆菌 DMDL 9010 编码胞外多糖合成蛋白 cpsB 序列出发，运用多种在线生物信息学软件进行分析，全面了解其性质和功能。结果表明胞外多糖合成蛋白 cpsB 相对分子质量约为 2 920，等电点 6.86，含有 191 个氨基酸；其为疏水蛋白，具有较高的稳定性；经过跨膜结构预测，发现其不存在跨膜结构，为胞内蛋白；胞外多糖合成蛋白 cpsB 中含有 15 个磷酸位点；氨基酸序列中不包含信号肽，所编码蛋白均为内分泌型蛋白；保守功能域预测中，基因中仅发现一段 PHP 结构域，该基因可能参与调节胞外多糖的基因表达。胞外多糖合成蛋白 cpsB 的二级结构中 α -螺旋占 51.14%，无规则卷曲占 33.71%，无 β -折叠和 β -转角结构，其三级结构具有极大相似性。经多系列比对和系统进化树构建分析结果表明，该序列与已报道的植物乳杆菌氨基酸序列具有高度的同源性。关于 cpsB 作用的信息尤其有限，因为其独特的序列和其乳杆菌菌同源物的酶学数据甚少。因此本研究对胞外多糖合成蛋白 cpsB 功能及其调控机制进行全面深入研究，将有助于更好地了解植物乳杆菌 DMDL 9010 的胞外多糖的合成与分泌，进一步了解其生物合成基因簇的结构和功能，这对利用基因工程技术研究胞外多糖的生物合成具有重要意义。

参考文献

[1] 李春雨,屈建航,周佳.微生物胞外多糖及其结构与活性研究进展[J].食品研究与开发,2023,44(18):198-204.

[2] 朱桂兰.结冷胶的发酵过程优化及其在食品中的应用研究[D].无锡:江南大学,2015.

[3] RAJOKA M S R, MEHWISH H M, HAYAT H F, et al. Characterization, the antioxidant and antimicrobial activity of exopolysaccharide isolated from poultry origin *Lactobacilli* [J]. Probiotics and Antimicrobial Proteins, 2019, 11: 1132-1142.

[4] JIANG Y, YANG Z. A functional and genetic overview of exopolysaccharides produced by *Lactobacillus plantarum* [J]. Journal of Functional Foods, 2018, 47: 229-240.

[5] 田佳乐,刘洋,李嘉雯,等.产胞外多糖嗜热链球菌*eps*基因簇的表达及生物信息学分析[J].中国食品学报,2021, 21(11):244-251.

[6] SUN X, ZHANG J. Bacterial exopolysaccharides:

- Chemical structures, gene clusters and genetic engineering [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2021, 173: 481-490.
- [7] BOELS I C, KRANENBURG R V, KANNING M W, et al. Increased exopolysaccharide production in *Lactococcus lactis* due to increased levels of expression of the NIZO B40 eps gene cluster [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2003, 69(8): 5029-5031.
- [8] 黄燕燕.植物乳杆菌DMDL9010基因组学、降解NO₂-特性及其胞外多糖缓解抑郁症的研究[D].广州:华南理工大学,2021.
- [9] 黄燕燕,刘冬梅,邝嘉华,等.植物乳杆菌DMDL 9010降解亚硝酸盐特性及其相关基因挖掘[J].现代食品科技, 2021,37(11):14-24,184.
- [10] 林燕玲,蔡雨晨,李利君,等.基于序列比对分析木聚糖1,4- β -木糖苷酶结构差异和分子进化规律[J].现代食品科技, 2022,38(8):138-147.
- [11] HAN Y, JIN J, CUI J, et al. Effect of hydrophilicity of end-grafted polymers on protein adsorption behavior: A Monte Carlo study [J]. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2016, 142: 38-45.
- [12] HOUSMANS J A J, WU G, SCHYMKOWITZ J, et al. A guide to studying protein aggregation [J]. The FEBS Journal, 2023, 290(3): 554-583.
- [13] BALDWIN R L, ROSE G D. How the hydrophobic factor drives protein folding [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2016, 113(44): 12462-12466.
- [14] GUO K, ZHANG X, ZHAO D, et al. Identification and characterization of sericin5 reveals non-cocoon silk sericin components with high β -sheet content and adhesive strength [J]. Acta Biomaterialia, 2022, 150: 96-110.
- [15] SCHJOLDAGER K T, NARIMATSU Y, JOSHI H J, et al. Global view of human protein glycosylation pathways and functions [J]. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2020, 21(12): 729-749.
- [16] SCHJOLDAGER K T, NARIMATSU Y, JOSHI H J, et al. Global view of human protein glycosylation pathways and functions [J]. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2020, 21(12): 729-749.
- [17] OUADHI S, LÓPEZ D M V, MOHIDEEN F I, et al. Engineering the enzyme toolbox to tailor glycosylation in small molecule natural products and protein biologics [J]. Protein Engineering, Design and Selection, 2023, 36: 1-7.
- [18] RAMAZI S, ALLAHVERDI A, ZAHIRI J. Evaluation of post-translational modifications in histone proteins: a review on histone modification defects in developmental and neurological disorders [J]. Journal of Biosciences, 2020, 45: 1-29.
- [19] ARDITO F, GIULIANI M, PERRONE D, et al. The crucial role of protein phosphorylation in cell signaling and its use as targeted therapy [J]. International Journal of Molecular Medicine, 2017, 40(2): 271-280.
- [20] YAMAZAKI H, KOSAKO H, YOSHIMURA S H. Quantitative proteomics indicate a strong correlation of mitotic phospho-/dephosphorylation with non-structured regions of substrates [J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics, 2020, 1868(1): 140295.
- [21] GAO J, SHAO K, CHEN X, et al. The involvement of post-translational modifications in cardiovascular pathologies: Focus on SUMOylation, neddylation, succinylation, and prenylation [J]. Journal of Molecular and Cellular Cardiology, 2020, 138: 49-58.
- [22] 张维洵.基于领域规则与混合深度模型的蛋白质信号肽预测研究[D].上海:上海交通大学,2020.
- [23] 谢纯良,龚文兵,严理,等.全基因组预测糙皮侧耳经典胞外分泌蛋白[J].生命科学研究,2017,21(6):501-506.
- [24] 付春,刘晓伟,王玲,等.阿拉伯岩芥AP2基因家族的生物信息学分析[J].安徽农业学,2020,48(8):114-123.
- [25] COPLEY R R, DOERKS T, LETUNIC I, et al. Protein domain analysis in the era of complete genomes [J]. FEBS letters, 2002, 513(1): 129-134.
- [26] STANDISH A J, MORONA R. The role of bacterial protein tyrosine phosphatases in the regulation of the biosynthesis of secreted polysaccharides [J]. Antioxidants & Redox Signaling, 2014, 20(14): 2274-2289.
- [27] 李芬,孙大庆,张丽萍.植物乳杆菌LY-78乳酸脱氢酶基因的生物信息学分析[J].食品科学,2017,38(8):102-106.
- [28] 任敬敬.龙眼体胚发生过程中谷胱甘肽代谢相关基因的克隆及其表达分析[D].福州:福建农林大学,2013.
- [29] SYKES J, HOLLAND B R, CHARLESTON M A. A review of visualisations of protein fold networks and their relationship with sequence and function [J]. Biological Reviews, 2023, 98(1): 243-262.
- [30] YANG Z, SUN J, CHEN Y, et al. Genome-wide identification, structural and gene expression analysis of the bZIP transcription factor family in sweet potato wild relative *Ipomoea trifida* [J]. BMC genetics, 2019, 20(1): 1-18.
- [31] SUN F, LIANG Y, JIN L, et al. Weak interaction-tailored catalytic interface of ultrasmall gold nanoclusters as enzyme mimics for enhanced colorimetric biosensing [J]. ACS Applied Materials and Interfaces, 2021, 13(48): 58209-58219.
- [32] 何华伟,王叶菁,宋凯,等.家蚕蛋白酪氨酸磷酸酶基因克隆、表达纯化与结构分析[J].生物工程学报,2017, 33(11):1827-1839.
- [33] 王叶菁.嗜热菌HB27的蛋白酪氨酸磷酸酶的折叠研究[D].兰州:兰州大学,2009.