

# 乳杆菌表面粘附蛋白的提取、鉴定及粘附特异性的初步研究

陈 营<sup>1,2\*\*</sup>, 王 蕾<sup>1\*\*</sup>, 安利国<sup>1\*</sup>, 李佳忠<sup>1</sup>, 刘 倩<sup>1</sup>

(<sup>1</sup> 山东师范大学生命科学学院 济南 250014)

(<sup>2</sup> 烟台大学化学生物理工学院 烟台 264005)

**摘 要:** 以从健康牙鲆肠道中分离筛选的乳杆菌 L15 (*Lactobacillus* sp. L15) 和嗜酸乳杆菌 ATCC4356 为实验材料, 应用 5mol/L LiCl 提取其表面蛋白, 利用蛋白印迹法鉴定出在 L15 表面蛋白中分子量为 61.8kDa 和 54.6kDa 的蛋白质分别参与对牙鲆和鲤鱼粘液的粘附过程, 为新发现的粘附蛋白种类, 将其命名为 MAPP<sub>po1</sub> 和 MAPP<sub>ec</sub>。ATCC4356 中分子量分别为 43.0kDa 和 63.3kDa 的两个表面蛋白参与对牙鲆粘液的粘附, 而分子量为 43.0kDa 的蛋白参与对鲤鱼粘液的粘附。同时, 蛋白质印迹法显示 L15 和 ATCC4356 在牙鲆和鲤鱼肠粘液中均具有相同的粘附受体, 在牙鲆肠粘液中是分子量为 29.7kDa 和 30.3kDa 的两种蛋白质, 而在鲤鱼肠粘液中只有分子量为 26.2kDa 的蛋白作为受体参与 L15 和 ATCC4356 的粘附过程。结果显示, 乳杆菌对肠粘液的粘附不但具有菌种的特异性, 而且也有宿主的特异性。

**关键词:** 乳杆菌, 表面蛋白, 粘附, 粘液, 蛋白印迹法

中图分类号: Q936 文献标识码: A 文章编号: 1001-6209(2006)03-0397-04

粘附是细菌细胞的表面结构-粘附素与宿主上皮细胞表面受体的相互作用, 是细菌定植的第一步, 是细菌得以在宿主体内生长繁殖并发挥作用的关键。乳酸菌通过粘附素与肠粘膜细胞紧密结合, 在肠粘膜表面定植占位, 对致病菌与潜在致病菌在正常微生物群中的定植和繁殖具竞争排斥作用。在乳酸菌中存在许多不同的介导粘附的表面蛋白, 研究较为清楚的是罗伊氏乳杆菌 (*Lactobacillus reuteri*) 的表面蛋白 Cnb 和一些乳杆菌的 S 层表面蛋白<sup>[1~4]</sup>。在陆生动物和水产动物中, 均已证实乳酸菌的粘附具有菌种的特异性, 而无宿主特异性<sup>[5]</sup>。一些来源人和乳制品的乳酸菌菌株可以粘附鱼的粘液, 并对鱼的病原菌, 如弧菌、气单胞菌和黄杆菌的感染有保护作用<sup>[6]</sup>。

乳杆菌 L15 为一株从牙鲆中分离的乳杆菌 (*Lactobacillus* sp.), 该菌在体外对牙鲆消化道粘液有很强的粘附作用, 并对多种致病菌有竞争抑制作用。在鱼类的苗种培育和养成中应用乳杆菌 L15, 起到了提高成活率, 防病、促生长的作用。本文以乳杆菌 L15 为材料, 提取和鉴定参与细菌粘附的表面蛋白成份, 对阐述乳酸菌在体内粘附和定植的机理和益生菌的应用具有重要的指导意义。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 菌株:** 乳杆菌 (*Lactobacillus* sp.) L15, 分离自健康牙鲆肠道; 嗜酸乳杆菌 (*Lactobacillus acidophilus*) ATCC4356, 来源于人类咽喉, 购自中科院微生物所菌种保藏中心。

**1.1.2 培养基:** MRS 培养基见参考文献 [7]。

**1.1.3 主要试剂和仪器:** 酯化生物素 (B-NHS, Sigma 公司), HRP 标记亲和素 (HRP-Avidin, 北京欣经科生物科技有限公司), DAB 浓缩显色液 (华美生物科技有限公司), 湿式电转仪 (Bio-Rad 公司)。

### 1.2 L15 和 ATCC4356 表面蛋白的提取

参考 Toba 等<sup>[3]</sup>方法改动后提取 L15 的表面蛋白。取  $OD_{600}$  为 1.0 的菌悬液以 1% 接种到 MRS 培养基中, 37℃ 培养 16h 后, 6000r/min 在 4℃ 下离心 10min 收集菌体; 收集的菌体用 10mmol/L PBS (pH7.4) 洗涤两次, 离心收集菌体, 冻干; 每 0.1g 冻干菌体加入 20mL 5mol/L 中性 LiCl 后在 37℃ 下振荡 3h, 4℃ 下 10000r/min 离心 10min 收集上清, 上清液对 PBS 充分透析后于 4℃ 下用 PEG 浓缩并冻存备用。

\* 通讯作者。Tel: 86-531-86180143; Fax: 86-531-86180107; E-mail: anlg@sdu.edu.cn

\*\* 作者简介: 两位作者对本文有同等贡献。陈 营 (1964 - ) 男, 辽宁锦州人, 在站博士后, 主要从事动物微生态学和乳酸菌分子生物学研究, E-mail: chen728@yahoo.com.cn; 王 蕾 (1979 - ) 女, 山东潍坊人, 硕士研究生, 主要从事分子微生物学和细胞免疫学研究, E-mail: panda-95@163.com

收稿日期: 2005-08-22; 接受日期: 2005-10-20; 修回日期: 2006-02-22

参考 Turner 等<sup>[8]</sup>方法改动后提取 ATCC 4356 的表面蛋白。取适量  $OD_{600}$  达到 1.0 的细菌培养物, 6000r/min 在 4℃ 下离心 10min 收集菌体; 菌体用 10mmol/L PBS (pH7.4) 洗涤两次, 再加入 0.5mL 5mol/L LiCl (pH2.0), 冰水混合液中作用 15min, 离心收集上清, 上清对 PBS 充分透析, 4℃ 下用 PEG 浓缩后冻存备用。

### 1.3 L15 和 ATCC 4356 菌体全蛋白的制备

利用超声波破碎法进行。菌体培养同上, 收集菌体后加入适量 PBS 缓冲液重悬, 超声波间隔破碎 1h, 10000r/min 离心 10min 收集上清, 冻存备用。

### 1.4 肠粘液的制备

**1.4.1 牙鲆肠粘液的制备** 无菌条件下将牙鲆肠道取出, 用含氯化钠 1.76% 的 10mmol/L 碳酸盐缓冲液 (pH9.5) 冲洗后轻轻刮取粘液, 刮取物于 4℃ 搅拌 3h, 10000r/min 离心 10min 收集上清, 上清过滤后标定蛋白含量为 500 $\mu$ g/mL, 冻存备用。

**1.4.2 鲤鱼肠粘液的制备** 除改用 PBS 冲洗鲤鱼肠道并用 PBS 溶解鲤鱼肠粘液外, 其余操作同牙鲆肠粘液的制备。

### 1.5 肠粘液和菌体全蛋白的酯化生物素化处理

根据冯涛等的方法改动<sup>[9]</sup>。1mg 酯化生物素溶解到 1mL 二甲基亚酰胺中, 充分溶解后加入到 10mL 蛋白含量为 1mg/mL 的处理液中, 室温轻轻搅拌 3h, 4℃ 下充分透析后冻存备用。

### 1.6 蛋白印迹法鉴定参与粘附的特异蛋白成份

**1.6.1 L15 和 ATCC 4356 表面蛋白 (或粘液蛋白) 的 SDS-PAGE** 菌体表面蛋白或者粘液蛋白加入 2 $\times$  样品处理液煮沸 10min, 上样 20 $\mu$ L 进行常规 SDS-PAGE<sup>[10]</sup>。分离胶浓度为 12.5%, 电泳条件为浓缩胶 60V, 分离胶 80V。

**1.6.2 湿式转移电泳<sup>[10]</sup>** 将 SDS-PAGE 后的聚丙烯酰胺凝胶进行转移电泳。

**1.6.3 特异蛋白成份的鉴定** 转印后的硝酸纤维素膜先用 10% 小牛血清和 0.05% Tween-20 进行封闭, 室温下振摇 2h; PBS 洗涤 3 次, 每次 5min; 加入酯化生物素化处理的肠粘液 (或者菌体全蛋白), 室温下振摇 3h; PBS 洗涤 3 次, 每次 5min; 加入 1:1000 HRP-Avidin, 室温下振摇 30min; PBS 洗涤 3 次, 每次 5min; 加入 DAB 显色, 显色完毕后三蒸水冲洗, 干燥保存。

## 2 结果

### 2.1 L15 和 ATCC4356 的表面蛋白

对提取的 L15 和 ATCC4356 的表面蛋白进行

SDS-PAGE 后, 考马斯亮蓝染色结果显示, 两菌体表面蛋白的种类和数量都有较大的差异。结果显示 (图 1) L15 表面蛋白质提取物中含有多种成分, 但是没有明显的主蛋白条带; ATCC4356 的提取物中蛋白质成分的种类也有很多, 但是分子量为 43.0kDa 的 S 层蛋白质含量最多, 是表面蛋白质中的主要成分。

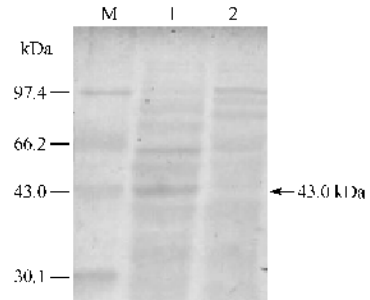


图 1 表面蛋白的 SDS-PAGE 分析

Fig. 1 SDS-PAGE analysis of the surface proteins. M. Marker; 1. Surface proteins of ATCC4356; 2. Surface proteins of L15.

### 2.2 L15 和 ATCC4356 中参与粘液粘附的蛋白质的鉴定

经 Western blot 分析, L15 表面蛋白质中只特异性显示一种蛋白质, 分子量为 61.8kDa (图 2-A 中第 1 泳道) 此种蛋白质并非表面蛋白的主要成分 (图 1 中第 2 泳道), L15 表面蛋白中其它几种含量较高的成分均未显示。ATCC4356 表面蛋白质中有多种成分存在, 如图 1 中第 1 泳道所示, 经 Western blot 分析, 有两种蛋白质特异显示, 分子量分别为 43.0kDa 和 63.3kDa (图 2-A 中第 2 泳道), 此两种蛋白质为表面蛋白质中的主要成分。

提取的 L15 和 ATCC4356 表面蛋白经与鲤鱼肠粘液粘附作用, 在 L15 表面蛋白中只有一种蛋白质显示, 分子量为 54.6kDa, 如图 2-B 中第 1~3 泳道所示, 此种成分在 L15 表面蛋白质 (图 1 中第 2 泳道) 中含量比较少, 不是主要蛋白种类。ATCC4356 中只有分子量为 43.0kDa 的蛋白质特异显示 (图 2-B 中第 4 泳道), 该蛋白质在其表面蛋白质中 (图 1 中第 1 泳道) 的含量较高, 为主要的蛋白种类。

### 2.3 肠粘液中参与 L15 和 ATCC4356 全蛋白粘附的蛋白质的鉴定

用酯化生物素化的 L15 全蛋白和酯化生物素化的 ATCC4356 全蛋白分别与牙鲆肠粘液作用, 均有两种分子量接近的蛋白质特异显示, 分子量分别为 29.7kDa 和 30.3kDa, 此两种蛋白质属于牙鲆肠粘液中的主要蛋白质, 但是粘液中其它的主要蛋白质在实验中均没有特异性的显示 (图 3)。

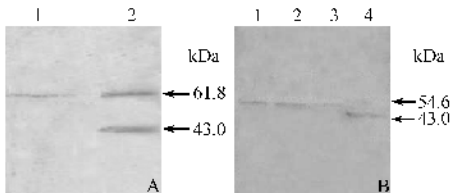


图2 L15 和 ATCC 4356 中参与牙鲮与鲤鱼肠粘液粘附的表面蛋白

Fig.2 Surface proteins of L15 and ATCC4356 participated in adhesion to the intestinal mucus of *Paralichthys olivaceus* (A) and *Common carp* (B). A: 1. Specific proteins of L15; 2. Specific proteins of ATCC4356. B: 1~3. Specific proteins of L15; 4. Specific proteins of ATCC4356.

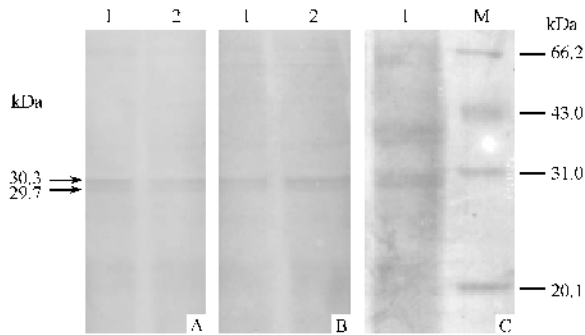


图3 牙鲮肠粘液中参与粘附的蛋白质

Fig.3 Proteins in intestinal mucus of *Paralichthys olivaceus* participated in adhesion. A: Protein identified by B-NHS marked whole proteins of ATCC4356; B: Protein identified by B-NHS marked whole proteins of L15; C: M. Marker; 1. The whole proteins in intestinal mucus of *Paralichthys olivaceus*.

经酯化生物素处理的 L15 全蛋白和 ATCC4356 全蛋白与鲤鱼肠粘液作用后,均只有一种蛋白质成分特异显示,分子量为 26.2kDa,此种蛋白质成分虽然在鲤鱼肠粘液中的含量也较高,也属于主要蛋白质成分,粘液中其它的主要蛋白质在 Western blot 后均没有特异性的显示(图 4)。

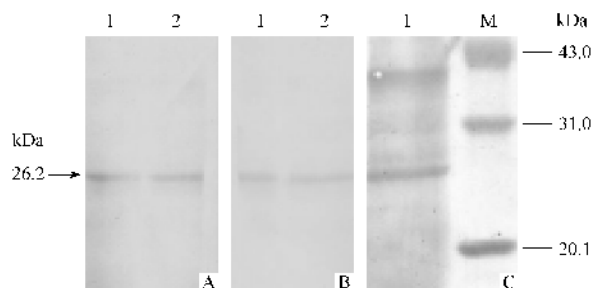


图4 鲤鱼肠粘液中参与粘附的蛋白质

Fig.4 Proteins in intestinal mucus of *Common carp* participated in adhesion. A: Protein identified by B-NHS marked whole proteins of ATCC4356; B: Protein identified by B-NHS marked whole proteins of L15; C: M. Marker; 1. The whole proteins in intestinal mucus of *Common carp*.

### 3 讨论

细菌与上皮细胞或者粘液通过生物化学作用产生的特异性的粘连称为粘附,根据细菌作用的底物将粘附分为两种:细胞粘附和粘液粘附。就益生菌表面粘附蛋白的研究而言,由于粘液成分的复杂性和不稳定性,粘液粘附在乳酸菌表面粘附蛋白的研究过程中不受研究者的青睐,目前研究中应用的大都是细胞模型。但是对肠道内的益生菌来讲,肠粘液是其生活的直接环境,也是其定植过程中首先接触的成分,菌体与肠粘液粘附能力的高低会直接影响到菌体在肠道中的存留,而且生活环境相似的同一种物种的肠粘液中,其蛋白质成分可能会有一定的差异,但是主蛋白的种类相似,所以粘液模型的构建具有可行性。2002 年 Rojas 等人以发酵乳杆菌 104R 为实验材料,分离纯化了参与猪小肠粘液以及胃粘液素粘附的表面蛋白质<sup>[11]</sup>。本文在实验中采用粘液粘附的模型,对乳杆菌 L15 以及 ATCC4356 中参与牙鲮和鲤鱼肠粘液粘附的表面蛋白质进行了研究。

本文运用了蛋白印迹的方法来鉴定菌体中参与粘附的蛋白质种类。该方法基于酯化生物素和亲和素的生物学性质。酯化生物素(也称 N-羟基琥珀酰亚胺生物素酯, B-NHS)可与位于蛋白 N 端和赖氨酸残基侧链初级氨基基团反应,所以几乎可以标记所有的蛋白质,而且一般不会影响被标记蛋白的结构和功能<sup>[12]</sup>。亲和素亦称抗生物素蛋白,其与生物素的结合具有极强的亲和力,一般认为此种结合是不可逆的,也正是由于两者之间极强的特异性结合,目前生物素-亲和素技术在生命科学的诸多领域中都有着广泛的应用。

L15 作为从牙鲮肠道中分离纯化的一株乳杆菌,目前国内外尚没有对该菌表面粘附蛋白的研究报导。利用 Western blot 的方法证明,在 L15 中分子量为 61.8kDa 和 54.6kDa 的两种蛋白分别可在牙鲮肠粘液和鲤鱼肠粘液粘附中起作用,分别将其命名为 MAPPo1 和 MAPPoc。ATCC4356 是从人类咽喉中分离纯化的乳杆菌,Boot 等在 1993 年就发现了该菌表面存在着能够在体外实验中介导粘附的表层蛋白(S-layer protein),分子量为 43.0kDa<sup>[1]</sup>。本文的实验证明此 43.0kDa 的蛋白质可能参与了与牙鲮肠粘液和鲤鱼肠粘液粘附的过程,属于表面粘附蛋白的种类,同时实验也证明该菌表面存在着另外一种可能介导粘附的蛋白质,分子量为 63.3kDa,这在国内外属首次报导,将此 63.3kDa 的蛋白质命名为 MAPPn2。

由于在鉴定粘液中参与粘附的蛋白质中, L15 表面蛋白的需要量较大, 而且 L15 表面蛋白在提取后容易形成不溶性的沉淀, 所以实验过程中采用 L15 菌体全蛋白来进行粘液中特异蛋白质的鉴定。实验结果显示, 在牙鲆和鲤鱼肠粘液中, 参与菌体粘附的蛋白质的种类并不会随着乳杆菌种类的变化而改变, 这个结果与 Rinkinen 等的结论相似<sup>[5]</sup>。牙鲆肠粘液中粘附蛋白的分子量分别为 29.7 和 30.3kDa, 在鲤鱼肠粘液中粘附蛋白的分子量为 26.2kDa。肠粘液中参与粘附的蛋白质种类不随着乳杆菌种类的改变而改变, 但是相应的细菌表面参与粘附的蛋白质会随着肠粘液种类的变化而有所不同。结果说明, L15 和 ATCC4356 表面蛋白和肠粘液的结合不但具有菌种的特异性, 而且可能也具有宿主特异性, 在不同的宿主中参与粘附的蛋白质种类有所差异, 这与细菌的粘附具有宿主特异性的特征相吻合。

### 参 考 文 献

- [ 1 ] Boot HJ, Kolen CP, van Noort JM, *et al.* S-layer protein of *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356: purification, expression in *Escherichia coli*, and Nucleotide Sequence of the Corresponding Genet. *Journal of Bacteriology*, 1993, **175**(19): 6089 – 6096.
- [ 2 ] Ventura M, Jankovic I, Walker DC, *et al.* Identification and characterization of novel surface proteins in *Lactobacillus johnsonii* and *Lactobacillus gasseri*. *Applied and Environmental Microbiology*, 2002, **68**(12): 6172 – 6181.

- [ 3 ] Toba T, Virkola R, Westerlund B, *et al.* A collagen-binding S-layer protein in *Lactobacillus crispatus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 1995, **61**(7): 2467 – 2471.
- [ 4 ] Garrote GL, Delfederico L, Bibiloni R, *et al.* Lactobacilli isolated from kefir grains: evidence of the presence of S-layer proteins. *The Journal of Dairy Research*, 2004, **71**(2): 222 – 230.
- [ 5 ] Rinkinen M, Westermarck E, Salminen S, *et al.* Absence of host specificity for in vitro adhesion of probiotic lactic acid bacteria to intestinal mucus. *Veterinary Microbiology*, 2003, **97**: 55 – 61.
- [ 6 ] Nikoskelainen S, Salminen S, Bylund G, *et al.* Characterization of the properties of human- and dairy-derived probiotics for prevention of infectious diseases in fish. *Applied and Environmental Microbiology*, 2001, **67**(6): 2430 – 2435.
- [ 7 ] 凌代文, 东秀珠. 乳酸细菌分类鉴定及实验方法. 北京: 中国轻工业出版社, 1999.
- [ 8 ] Turner MS, Timms P, Hafner LM, *et al.* Identification and characterization of a basic cell surface-located protein from *Lactobacillus fermentum* BR11. *Journal of Bacteriology*, 1997, **179**(10): 3310 – 3316.
- [ 9 ] 冯涛, 林其燧, 宋耀虹. 地高辛的生物素-链霉素和素免疫法测定方法的建立. *基础医学与临床*, 1998, **18**(6): 464 – 467.
- [ 10 ] Ausubel FM, Kingston RE, Seidman JG, *et al.* 精编分子生物学实验指南. 颜子颖, 王海林, 译. 北京: 科学出版社, 1998.
- [ 11 ] Rojas M, Ascencio F, Conway PL. Purification and characterization of a surface protein from *Lactobacillus fermentum* 104R that binds to porcine small intestinal mucus and gastric mucin. *Applied and Environmental Microbiology*, 2002, **68**(5): 2330 – 2336.
- [ 12 ] 沈关心, 周汝麟. 现代免疫学实验技术. 武汉: 湖北科学技术出版社, 1998.

## Extraction, identification and primary investigation of adhesion specificity of *Lactobacillus* sp.

CHEN Ying<sup>1, 2</sup>, WANG Lei<sup>1</sup>, AN Li-guo<sup>1</sup>, LI Jia-zhong<sup>1</sup>, LIU Qian<sup>1</sup>

(<sup>1</sup> College of Life Science, Shandong Normal University, Jinan 250014, China)

(<sup>2</sup> College of Chemistry & Biology, Yantai University, Yantai 264005, China)

**Abstract:** *Lactobacillus* L15, a strain of *Lactobacillus* sp. isolated from the intestinal tract of healthy *Paralichthys olivaceus*, and *Lactobacillus acidophilus* ATCC4356 were used to investigate their specific adhesions. It was shown that cell surface proteins of two strains could be extracted by 5mol/L lithium chloride (LiCl). Two surface proteins with molecular weights of 61.8kDa and 54.6kDa were identified to mediate the adhesion to intestinal mucus of *Paralichthys olivaceus* and Common carp respectively by the method of Western blotting, and the two novel proteins were named as MAPPpo1 and MAPPcc. In *Lactobacillus acidophilus* ATCC4356, two proteins of 43.0kDa and 63.3kDa were identified to mediate the adhesion to intestinal mucus of *Paralichthys olivaceus*. Nevertheless, only 43.0kDa protein was identified to mediate the adhesion to intestinal mucus of Common carp. Furthermore, the mucus proteins which participated the adhesion as the bacteria receptors were identified by the same method and it was found that L15 and ATCC4356 had the same receptors. There were 29.7kDa and 30.3kDa proteins in the intestinal mucus of *Paralichthys olivaceus* and only the 26.2kDa protein was testified in the intestinal mucus of Common carp. It is demonstrated that the adhesion of *Lactobacillus* to mucus is dependent on the strain specificity, as well as host specificity.

**Keywords:** *Lactobacillus*; surface protein; adhesion; mucus; Western blot

\* Corresponding author. Tel: 86-531-86180143; Fax: 86-531-86180107; E-mail: anlg@sndu.edu.cn