



低 H⁺-ATPase 活性植物乳杆菌突变菌筛选及基因表达的相对定量分析

张祥¹, 方卉¹, 谢东芳¹, 林越呈¹, 陶颖妍¹, 王宏鹏¹, 龚金炎¹, 葛青¹,
洋国荣¹, 黄俊^{1,3*}, 尤玉如^{1,2*}

¹浙江科技学院 省农产品化学与生物加工技术重点实验室, 浙江 杭州 310023

²贝因美婴童食品股份有限公司, 浙江 杭州 310007

³杭州奥盛仪器有限公司, 浙江 杭州 310030

摘要:【目的】筛选 H⁺-ATPase 活性降低的植物乳杆菌突变菌, 比较其与亲本菌基因表达水平的差异, 进一步探索 H⁺-ATPase 的调控机制。【方法】利用硫酸新霉素诱变、筛选突变菌, 并对亲本菌(ZUST)和突变菌(ZUST-1、ZUST-2)进行生长、产酸能力及 H⁺-ATPase 活性的测定。分别提取亲本菌和突变菌的基因组 DNA, 扩增 H⁺-ATPase 全部编码基因并测序。通过荧光定量 PCR 对 H⁺-ATPase 全部编码基因进行相对定量分析。【结果】突变菌的生长和产酸能力均低于亲本菌, 突变菌 ZUST-1 和 ZUST-2 的 H⁺-ATPase 活性比亲本菌分别降低了 10.1%和 28.8%。突变菌 ZUST-1 和 ZUST-2 的 *atpA* 基因均有 22 个位点发生突变, 而 ZUST-2 的 *atpC* 基因有 6 个位点发生突变。突变菌 ZUST-1 和 ZUST-2 的 *atpA* 在对数期基因表达水平分别比亲本菌 ZUST 下调了 41.1%和 35.7%, 在稳定期分别下调了 43.6%和 14.2%; ZUST-1 的 *atpC* 基因在对数期的表达水平比 ZUST 略高, 在稳定期比 ZUST 上调了 30%, 而 ZUST-2 的 *atpC* 基因未表达。【结论】突变菌 H⁺-ATPase 活性减弱会导致其全部编码基因在稳定期表达水平上调(除 ZUST-2 的 *atpC* 不表达外), 而且 *atpA* 和 *atpC* 基因突变导致的基因表达水平的差异是影响 H⁺-ATPase 活性的主要因素, 此研究结果为进一步研究植物乳杆菌中 H⁺-ATPase 的调控机制奠定了基础。

关键词: 植物乳杆菌, H⁺-ATPase, 突变, 荧光定量 PCR

植物乳杆菌属于乳酸杆菌属, 菌体成对或成链状排列分布, 不产芽孢, 厌氧或兼性厌氧, 革兰氏阳性菌, 最适 pH 为 6.5 左右。作为一种公认的益生菌^[1], 植物乳杆菌与人类的生活关系密切,

基金项目: 国家自然科学基金(31470793, 31240054); 杭州市科技计划(20140432B106); 浙江科技学院研究生创新基金(2015ZUSTJJSKC010)

*通信作者。Tel/Fax: +86-571-85070370; E-mail: 黄俊, hjunlzh@163.com; 尤玉如, youyuru0130@163.com

收稿日期: 2016-07-29; 修回日期: 2016-08-30; 网络出版日期: 2016-09-18

被广泛用于酸奶、火腿、泡菜等发酵制品^[2-6]。该菌株能通过胃并定殖于肠道,维持肠道内菌群平衡,促进营养物质吸收,缓解乳糖不耐症,具有多种重要的保健功能^[7-10]。本课题组前期从黄酒浸米液中筛选出 1 株产 γ -氨基丁酸的菌株,采用生理生化实验、形态学观察及 16S rRNA 鉴定,结果表明该菌株为植物乳杆菌^[11]。

H^+ -ATPase 是乳酸菌产酸代谢的关键酶,既可以利用跨膜质子电化学梯度合成 ATP,也可以利用 ATP 水解产生的能量将胞内 H^+ 排出。当外界 pH 下降时, H^+ 会通过细胞膜进入胞内,对乳酸菌细胞形成酸压力,诱导细胞膜上 H^+ -ATPase 水解 ATP 释放自由能,推动细胞内质子泵出胞外,从而使胞内 pH 维持在中性附近^[12-15]。刘飞等^[16]利用硫酸新霉素成功筛选出 H^+ -ATPase 缺陷的德氏乳杆菌保加利亚亚种突变菌,发现突变菌的 H^+ -ATPase 活力降低,具有较低的生长速率和产酸能力。 H^+ -ATPase 由 8 个蛋白亚基组成,位于细胞质膜上,难以分离纯化。Koponen 等^[17]研究发现,将鼠李糖乳杆菌分别在最佳 pH 5.8 和相对酸性环境 pH 4.8 中进行培养,结果在 pH 4.8 时鼠李糖乳杆菌的 H^+ -ATPase 编码基因在对数期末期表达水平比对数期中期均上调。目前一些乳酸菌 H^+ -ATPase 的操纵子已被鉴定,但关于其具体调控机制仍鲜有报道,对植物乳杆菌的 H^+ -ATPase 调控机制也鲜有报道。本研究以植物乳杆菌 ZUST 作为出发菌,通过硫酸新霉素诱变筛选低 H^+ -ATPase 活性突变菌,使其产酸能力减弱,并从基因表达水平方面对 H^+ -ATPase 编码基因的调控进行研究,期望结合植物乳杆菌的功能性和弱后酸化性,使发酵的产品不仅具有良好的生理功能,而且具有弱后酸化效果,防止产品在短期内酸败,从而延长产品的保质期。

1 材料和方法

1.1 材料和主要仪器试剂

植物乳杆菌 ZUST 为本实验室筛选保存菌株; BacteriaGen DNA Kit, SuperQuick RT MasterMix, UltraSYBR Mixture 均购自北京康为世纪生物科技有限公司; rNAstore Reagent, rNAprep Pure Bacteria Kit 均购自天根生化科技有限公司; 硫酸新霉素、氨苄青霉素均购自上海生工生物工程股份有限公司; ABI StepOne 实时定量 PCR 仪; ABI PCR 扩增仪; MD SpectraMax 190 全波长酶标仪; UV-5500PC 紫外分光光度计; Gel Doc 2000 凝胶成像分析系统; Beckman 超速冷冻离心机; 杭州奥盛 Nano-100 超微量核酸分析仪; Waters 高效液相色谱仪。

1.2 亲本菌株诱变及低 H^+ -ATPase 活性突变株筛选

1.2.1 菌种活化: 将 $-80\text{ }^\circ\text{C}$ 保存的植物乳杆菌接种于 MRS 液体培养基中, $37\text{ }^\circ\text{C}$ 培养 12 h 后, 在 MRS 液体培养基中传代 2-3 次。

1.2.2 生长曲线的测定: 将活化的菌株按 2% 的接种量接种于 MRS 液体培养基, $37\text{ }^\circ\text{C}$ 培养 24 h, 每 2 h 测定 OD_{660} 值, 建立菌株生长曲线。

1.2.3 硫酸新霉素诱变: 将活化后的植物乳杆菌接种于 MRS 液体培养基中, $37\text{ }^\circ\text{C}$ 培养 8 h, 使用硫酸缓冲液 (PBS) (pH 7.2, 10 mmol/L) 稀释后, 取 100 μL 涂布于含有硫酸新霉素的 MRS 平板上, 硫酸新霉素的质量浓度分别为 100, 200, 300, 400 和 500 mg/L。

1.2.4 突变菌的筛选: 硫酸新霉素平板在 $37\text{ }^\circ\text{C}$ 培养 24 h 后, 挑选单个菌落接种于 MRS 液体培养基, 继续培养 24 h, 每隔 2 h 测定 OD_{660} 和 pH 值, 挑选生长产酸弱的菌株保存。

1.3 H^+ -ATPase 活性的测定

1.3.1 建立磷浓度标准曲线: 参考 Ongol 等^[18]报

道的方法建立了磷浓度标准曲线。

1.3.2 建立蛋白含量标准曲线：使用改良型 Bradford 法蛋白浓度测定试剂盒(上海生工)建立蛋白含量标准曲线。

1.3.3 H⁺-ATPase 活性的测定：参考 Jaichumjai 等^[4]报道的方法稍作修改，将亲本菌及突变菌接种于 MRS 液体培养基中，37 °C 培养至对数期，收集菌体(8000×g 5 min)。首先加入 1 mL 浓度为 75 mmol/L 的 Tris-HCl 缓冲液(含 10 mmol/L 的 MgSO₄ pH 7.0)重悬菌体，然后加入 60 μL 甲苯和丙酮(1:9)混合物，剧烈震荡 5 min，得到粗酶液。向粗酶液中加入 1 mL 浓度为 50 mmol/L 的 Tris-maleate 缓冲液(含 10 mmol/L 的 MgSO₄ pH 6.0)混合均匀，37 °C 水浴 5 min，加入 50 μL 浓度为 0.1 mol/L 的 ATP，37 °C 水浴 15 min 然后加入 600 μL 浓度为 0.1 mol/L 的 HCl 终止反应，迅速放在冰上冷却，分别测定磷浓度和蛋白含量。H⁺-ATPase 的活性用 μmol/(mg·min) 来表示，其中每个活力单位定义为 1 mg H⁺-ATPase 的粗提取物在 1 min 内分解 ATP 形成 1 μmol 的无机磷酸盐。

1.4 乳酸含量的测定

色谱分离柱：WonCract ODS-2 C₁₈ 柱；检测器：UV 206 nm；流动相 A：0.1 mol/L KH₂PO₄，流动相 B：甲醇，A:B=95:5；流速：0.8 mL/min；进样量：10 μL。将发酵液在 10000×g 条件下离心 10 min，取上清液经 0.22 μm 滤膜过滤后经适当稀释后进行色谱分析测定乳酸含量，乳酸单位用 g/L 来表示。

1.5 H⁺-ATPase 编码基因的 PCR

1.5.1 基因组 DNA 的提取及鉴定：用基因组提取试剂盒(康为世纪)提取细菌基因组 DNA，实验步骤参照说明书进行。用质量分数为 1%的琼脂糖凝胶进行凝胶电泳，紫外下观察基因组条带的纯度和完整性。

1.5.2 H⁺-ATPase 编码基因的 PCR 扩增：查找 GenBank 中植物乳杆菌的基因组信息，发现 H⁺-ATPase 共有 8 个亚基，对应的编码基因分别为 *atpA*、*atpB*、*atpC*、*atpD*、*atpE*、*atpF*、*atpG*、*atpH*，设计 8 对引物进行全酶扩增(表 1)。使用 Primer Premier 5.0 设计扩增引物，由通用生物系统有限公司合成。

表 1. 用于扩增 H⁺-ATPase 编码基因的 PCR 引物

Table 1. PCR primers for amplifying different H⁺-ATPase encoding genes

Gene name	Forward primer	Reverse primer
<i>atpA</i>	ATGAGCATTAATCTGAAGAAATCA	CTACTTCGCAGCGGTTGGC
<i>atpB</i>	GTGGGTGATCCAGTTCCTACAGTC	TTATTCTCGTCGTTAACCTTCTGA
<i>atpC</i>	ATGGCTGACAATGCAAAATCAT	TAAATGCCGAGCAACATTCAA
<i>atpD</i>	ATGAGTACAGGTAAAGTTGTACAAGTTA	CTAATCAGTTACCATCGATTTTCG
<i>atpE</i>	ATGGGAGCAATTGCTGCAGGT	TACTTGTTCATAACCATCAAAGCA
<i>atpF</i>	ATGCTCTCGCATTAAATATATCGGT	TCAAGACTCATGCTTTCCCAACC
<i>atpG</i>	ATGGCAGAATCATTAAATGGATGTC	TTATTCTTGC GCAACCAAACC
<i>atpH</i>	ATGAGTCTTGATAATCTTACAATTGC	CTAATTGTTGATGAGTGCTCGTC

PCR 反应体系：灭菌 ddH₂O，22 μL；基因组 DNA，1 μL；正向引物，1 μL；反向引物，1 μL；Prime STAR Max Premix，25 μL。

PCR 反应条件：98 °C 2 min；98 °C 10 s；55 °C

30 s，72 °C 30 s，共 35 个循环；72 °C 10 min。

1.5.3 PCR 产物胶回收、TA 克隆及测序：采用琼脂糖凝胶纯化试剂盒(上海生工)对目的条带进行回收纯化，并电泳鉴定。用平端 DNA 片段添

dA 试剂盒(上海生工)在回收产物末端添加单个碱基 A, 采用 T-载体 PCR 产物克隆试剂盒(上海生工)对其克隆, 通过蓝白斑筛选挑出白色阳性克隆, 接种至含有氨苄青霉素的 LB 试管中, 培养过夜, 取新鲜菌液送至通用生物系统有限公司测序。

1.6 基因表达水平的测定

1.6.1 RNA 的提取及鉴定: 将亲本菌和突变菌以 2% 接种量接种于 MRS 液体培养基中, 在 37 °C 下培养, 分别收集对数期(亲本菌 ZUST 及突变菌 ZUST-1 为 8 h; 突变菌 ZUST-2 为 10 h)和稳定期(亲本菌 ZUST 及突变菌 ZUST-1 为 12 h; 突变菌

ZUST-2 为 16 h)的菌体, 用细菌总 RNA 提取试剂盒(天根)提取细胞中的总 RNA, 实验步骤参照说明书进行。对提取的总 RNA 进行 1% 琼脂糖凝胶电泳检测。

1.6.2 cDNA 的合成: 按照 SuperQuick RT MasterMix 试剂盒(康为世纪)进行逆转录, 步骤参照说明书。反应完毕后, -20 °C 条件下保存。

1.6.3 荧光定量 PCR 测定基因转录情况: 采用 SubGreen 法测定目的基因的转录情况。根据植物乳杆菌的全部编码基因和 16S rRNA 基因设计荧光定量引物, 其中 16S rRNA 基因是内参基因, 引物序列如表 2。

表 2. *qRT-PCR* 反应中所用引物
Table 2. PCR primers used in *qRT-PCR*

Gene name	Forward primer	Reverse primer
<i>atpA</i>	TCGACAACGCCTTACAAGGTGAATTA	CAAAATCCCCTAAAACAACGATACCAA
<i>atpB</i>	TATGAAGCCCAAGGGTGGACAAA	TACTGCCCCGACCTGAACGTGAAT
<i>atpC</i>	ATGACGAAATTGCCGTTAATGGTG	TTGGGCATTTTGAATCCGTGTTT
<i>atpD</i>	ACTTTACGGGCCAACCTG	CGGAATGCGTCTTCTGGT
<i>atpE</i>	TCTAAGATGCTTGAAGGGATGGC	CAACAACGAAGGAAATGATAGGC
<i>atpF</i>	CAACAACGAAGGAAATGATAGGC	AATGCCTGTTGGCCTTCC
<i>atpG</i>	CGTAAAGCCAAGGATAGCCGGGTAGA	GTTGACGACGAAGCATGTTTCAGCAGT
<i>atpH</i>	ATTGGCGGTGTAATTGTGAA	TTGTTGATGAGTGCTCGTCTT
16S rRNA	ACATCTCACGACACGAGCTG	TGAGTGCTAAGTGTGGAGG

用 UltraSYBR Mixture 试剂盒(康为世纪)测定目的基因的转录水平, 按说明书操作。Real-time RT PCR 反应条件: 95 °C 10 min; 95 °C 15 s, 60 °C 1 min (40 个循环); 熔解曲线分析: 95 °C 15 s; 60 °C 1 min; 95 °C 15 s。

每个样品重复 3 次。以 16S rRNA 作为内参基因, 根据 $-C_t$ 法测定全部编码基因在不同时期的相对表达量。按照公式(1)、(2)和(3)计算^[19]。

C_t 目的基因 = C_t (目的基因) - C_t (同一样本的内参基因) 公式(1)

C_t 目的基因 = 实验组 C_t 目的基因 - 参照组 C_t 目的基因 公式(2)

相对倍数(实验组/对照组) = 2^{-C_t} 公式(3)

其中 C_t 为循环阈值(cycle threshold value), 代表 PCR 扩增过程中扩增产物的荧光信号达到设定的荧光阈值所经过的循环数。 2^{-C_t} 代表目标基因表达量的变化倍数。

2 结果和分析

2.1 低 H⁺-ATPase 活性突变株的筛选

从每个含硫酸新霉素的 MRS 平板中随机挑取 5 个单菌落, 分别接种于 MRS 液体培养基中, 37 °C 培养 24 h, 通过测定 OD_{660} 和 pH 值, 挑选

出 1 株突变菌, 命名为 ZUST-1。再对 ZUST-1 进行诱变, 挑选出另一株突变菌 ZUST-2。

各菌株生长曲线和 pH (图 1-A) 测定实验表明: 亲本菌 ZUST 和突变菌 ZUST-1 均在 4 h 进入对数期, 在 12 h 达到稳定期, 而突变菌 ZUST-2 在 8 h 进入对数期, 16 h 达到稳定期。突变菌 ZUST-1 和 ZUST-2 生长能力均低于亲本菌 ZUST, ZUST-1 在进入稳定期后与 ZUST 基本相近, 而 ZUST-2 的差异最显著; pH 测定结果与生长能力成对应的

关系, 突变菌 ZUST-1 在对数期与亲本菌 ZUST 的 pH 差异很小, 进入稳定期后几乎相同, 在 24 h 时 pH 为 3.7, 而突变菌 ZUST-2 的产酸能力最弱, 在 24 h 时 pH 为 4.0。发酵液乳酸含量(图 1-B)测定结果表明: 亲本菌 ZUST 和突变菌 ZUST-1 在对数期和稳定期发酵液中乳酸含量差异很小, 趋于一致。突变菌 ZUST-2 在对数期和稳定期发酵液中乳酸含量均低于亲本菌 ZUST 和突变菌 ZUST-1, 且在稳定期差异比对数期小。这与 pH 测定结果一致,

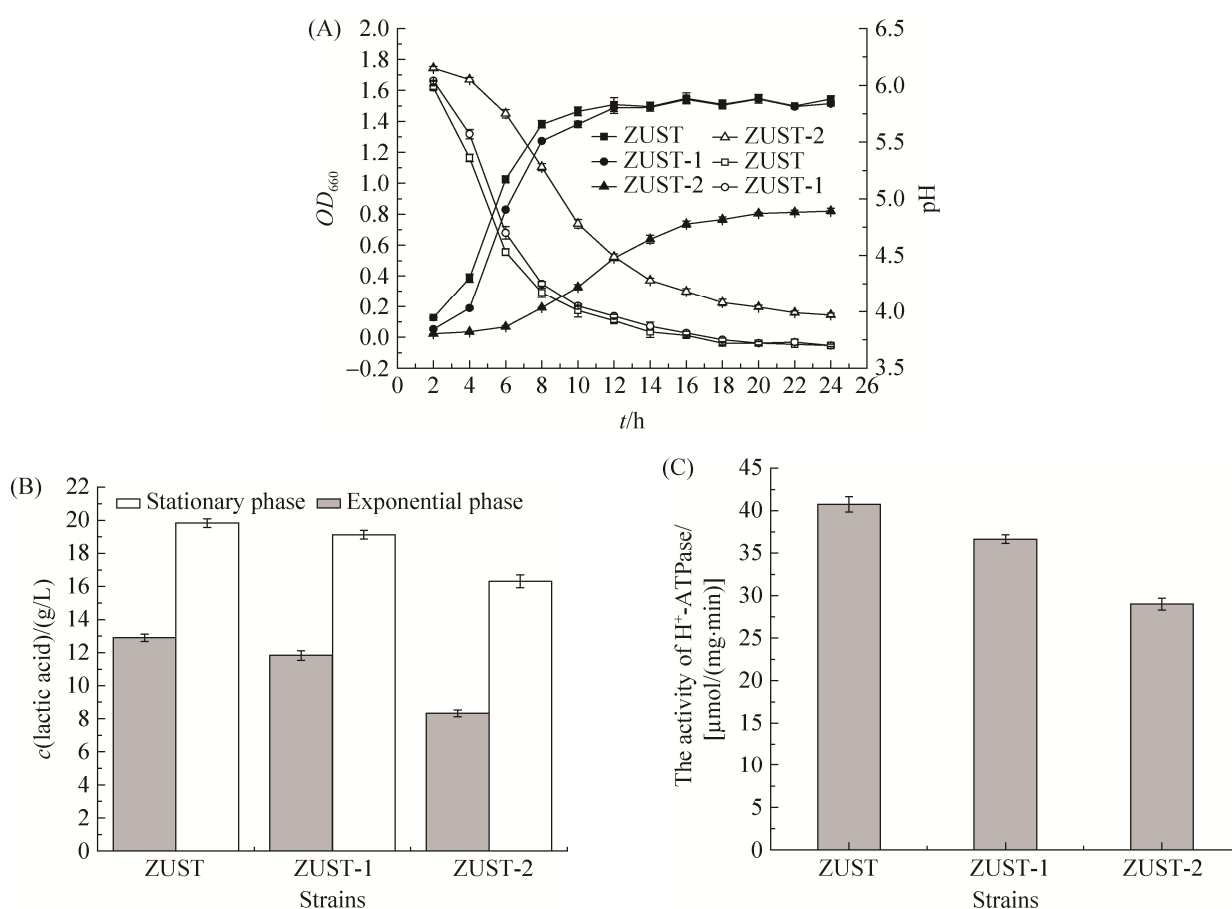


图 1. 生长曲线和产酸能力、乳酸含量和酶活力分析

Figure 1. The growth curve, acid production ability, the concentration of lactic acid and H^+ -ATPase activity assay. A: growth curve of wild-type stain ZUST (\blacksquare) and mutants ZUST-1(\bullet), ZUST-2(\blacktriangle), respectively. The acid production ability of wild-type stain ZUST (\square) and mutants ZUST-1(\circ), ZUST-2(\triangle), respectively. The black and white symbols represent OD_{660} and pH, respectively. B: the lactic acid concentration of wild-type stain ZUST and mutants ZUST-1, ZUST-2 in exponential phase (\blacksquare) and stationary phase (\square), respectively. C: the H^+ -ATPase activity of wild-type stain ZUST and mutants ZUST-1, ZUST-2, respectively. All the symbols represent means \pm standard deviation (error bars) obtained from three independent experiments.

突变菌 ZUST-2 的 pH 均高于亲本菌 ZUST 和突变菌 ZUST-1, 但在稳定期的差异比对数期小。H⁺-ATPase 活力(图 1-C)测定结果表明:突变菌 ZUST-1 和 ZUST-2 酶活力比亲本菌 ZUST 分别下降了 10.1%和 28.8%, 说明由于 H⁺-ATPase 活力的下降, 导致 ZUST-1 和 ZUST-2 的生长代谢能力减弱, 使突变菌 OD₆₆₀ 均低于亲本菌, pH 均高于亲本菌, 发酵液中乳酸含量均低于亲本菌, 同时 ZUST-2 的酶活力比 ZUST-1 更低, 所以 ZUST-2 生长产酸能力最弱。

2.2 突变位点分析

2.2.1 基因组 DNA 的提取:基因组 DNA 电泳结果(图 2)均得到单一清晰的条带, OD₂₆₀/OD₂₈₀ 为 1.8, 表明提取的 DNA 较完整, 没有 RNA、蛋白的污染, 可直接用于 PCR 扩增 H⁺-ATPase 的编码基因。

2.2.2 H⁺-ATPase 全部编码基因的扩增:H⁺-ATPase 全部编码基因扩增结果表明, 亲本菌 ZUST (图 3-A), 突变菌 ZUST-1 (图 3-B), 突变菌 ZUST-2 (图 3-C)均已全部成功扩增, 但有杂

带, 经胶回收纯化后, 亲本菌 ZUST (图 4-A), 突变菌 ZUST-1 (图 4-B), 突变菌 ZUST-2 (图 4-C)都得到只含目的片段的单一条带, 可以继续后续实验。

2.2.3 测序结果分析:用 DNAMAN 对测序结果进行比对, 结果如表 3 所示。突变菌 ZUST-1 的 *atpA* 基因上有 22 个突变位点, 其它编码基因均无突变。突变菌 ZUST-2 的 *atpA* 基因上有 22 个位点发生突变, 而且 *atpC* 基因上有 6 个位点发生突变, 其中有 2 个发生移码突变。为确保测序结果准确性, 每个编码基因均送测 3 次。

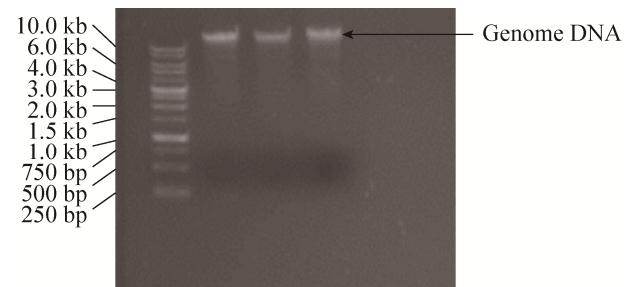


图 2. 基因组 DNA 琼脂糖凝胶电泳检测图
Figure 2. Agarose gel electrophoresis of genomic DNA.

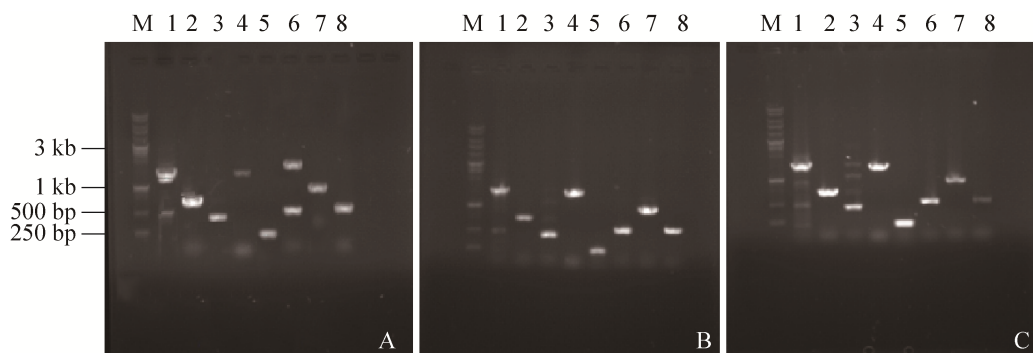


图 3. 目的基因 PCR 扩增琼脂糖电泳检测图

Figure 3. Agarose gel electrophoresis of PCR amplification for the target genes. A: PCR amplification for H⁺-ATPase of wild-type strain ZUST. B: PCR amplification for H⁺-ATPase of mutant ZUST-1. C: PCR amplification for H⁺-ATPase of mutant ZUST-2. Lane 1: *atpA*, 1515 bp; Lane 2: *atpB*, 714 bp; Lane 3: *atpC*, 429 bp; Lane 4: *atpD*, 1404 bp; Lane 5: *atpE*, 213 bp; Lane 6: *atpF*, 516 bp; Lane 7: *atpG*, 945 bp; Lane 8: *atpH*, 546 bp. M: DNA marker.

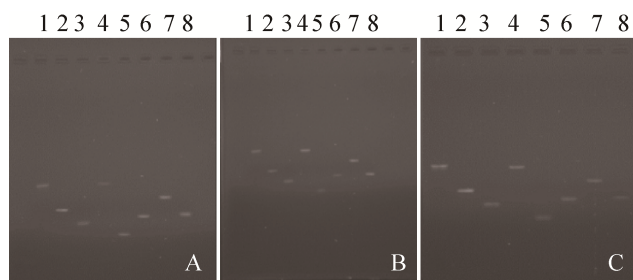


图 4. 目的基因 PCR 产物胶回收电泳图

Figure 4. Gel extraction of PCR products for the target genes. A: gel extraction for H^+ -ATPase of wild-type stain ZUST. B: gel extraction for H^+ -ATPase of mutant ZUST-1. C: gel extraction for H^+ -ATPase of mutant ZUST-2. Lane 1-8: *atpA*, *atpB*, *atpC*, *atpD*, *atpE*, *atpF*, *atpG* and *atpH*, respectively.

表 3. 基因序列分析结果

Table 3. The results of the gene sequence similarity

Gene name	Sequence size	Numbers of mutations	
		ZUST-1	ZUST-2
<i>atpA</i>	1515 bp	22	22
<i>atpB</i>	714 bp	0	0
<i>atpC</i>	429 bp	0	6(2)
<i>atpD</i>	1404 bp	0	0
<i>atpE</i>	213 bp	0	0
<i>atpF</i>	516 bp	0	0
<i>atpG</i>	945 bp	0	0
<i>atpH</i>	546 bp	0	0

2.3 亲本和突变菌 H^+ -ATPase 表达量的相对定量分析

2.3.1 总 RNA 非变性琼脂糖凝胶电泳结果: 总 RNA 电泳结果(图 5)得到两条清晰条带, 分别为 23S rRNA 和 16S rRNA, 而且 OD_{260}/OD_{280} 为 2.0, 表明 RNA 提取完整, 无污染, 可以用于后续实验。

2.3.2 荧光定量 PCR 检测 H^+ -ATPase 的表达: H^+ -ATPase (图 6-A)由 8 个编码基因组成, 分别编码 8 个蛋白亚基。其中 *atpB*、*atpE*、*atpF* 编码的 a、c、b 亚单位共同组成膜质子通道 F_0 , 其它 5 个亚单位组成编码复合体 F_1 , 负责对质子通道的装配及调控^[20]。

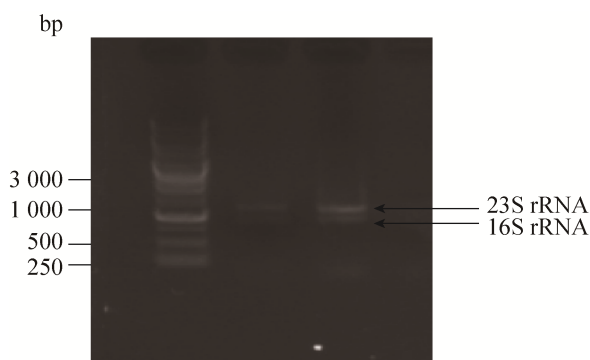


图 5. 总 RNA 电泳检测图

Figure 5. The gel electrophoresis of total RNA.

各菌株编码基因表达水平实验结果(图 6-B)表明:所有菌株的 *atpA* 和 *atpC* 基因在稳定期的表达水平均比对数期高(除 ZUST-2 的 *atpC* 不表达外), 而亲本菌 ZUST 的其它 6 个基因在稳定期的表达水平均比对数期低, 突变菌 ZUST-1 和 ZUST-2 的其它 6 个基因在稳定期的表达水平均比对数期高。分析认为, 突变菌 ZUST-1 和 ZUST-2 由于发生基因突变, 酶活力减弱, 在进入稳定期后, 酸胁迫环境愈加严峻, 菌株为保证自身存活, 产生一系列应激反应, 从而导致其它 6 个编码基因的表达水平上调。亲本菌和突变菌 *atpA* 和 *atpC* 基因表达水平在稳定期均高于对数期(除 ZUST-2 的 *atpC* 不表达外), 具有一致性, 在稳定期为应对酸胁迫环境, 基因表达水平均上调, 说明 *atpA* 和 *atpC* 是调控 H^+ -ATPase 活力的主要基因。突变菌 ZUST-1 的 *atpA* 在对数期和稳定期的基因表达水平分别比亲本菌 ZUST 下调了 41.1%和 43.6%, 突变菌 ZUST-2 在对数期和稳定期的基因表达水平分别比亲本菌下调了 35.7%和 14.2%。突变菌 ZUST-1 的 *atpC* 基因在对数期表达水平比亲本菌 ZUST 略高, 在稳定期的表达水平上调了 30%, 而突变菌 ZUST-2 在对数期和稳定期均未表达。

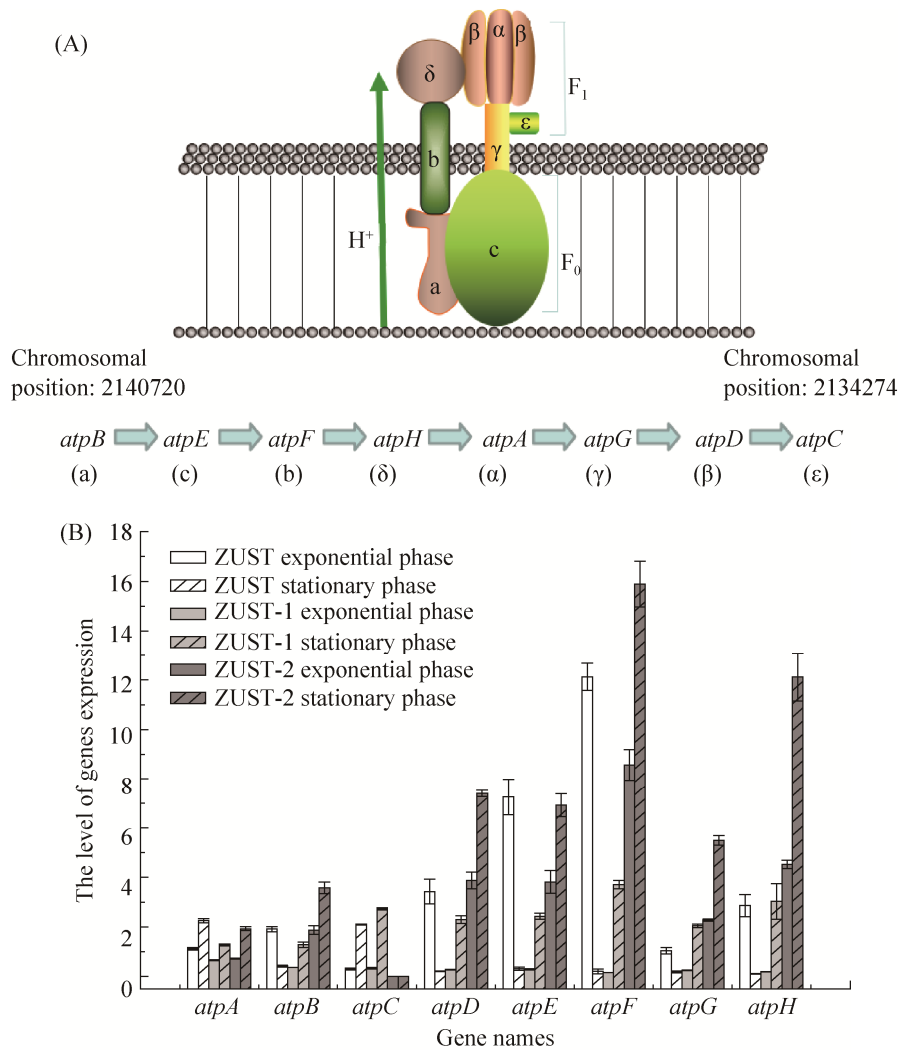


图 6. H^+ -ATPase 结构以及 H^+ -ATPase 全部编码基因表达水平

Figure 6. The H^+ -ATPase structure and its gene expression. A: organization of the H^+ -ATPase in lactic acid bacteria. B: the gene expression of wild-type strain ZUST and mutants ZUST-1, ZUST-2 in exponential phase and stationary phase, respectively. The white, light gray and dark gray symbols represent wild-type strain ZUST, mutants ZUST-1 and ZUST-2, respectively. The symbols with pure color and fill slash represent exponential phase and stationary phase, respectively. The symbols represent means±standard deviation (error bars) obtained from three independent experiments.

3 讨论

植物乳杆菌是食品工业上常用的发酵剂，硫酸新霉素能够使乳酸菌 H^+ -ATPase 的某个亚基发生突变，从而使乳酸菌的生长代谢能力减弱，关于利用硫酸新霉素选育弱后酸化的乳酸菌的研究多有报道^[21-23]。本研究通过利用硫酸新霉素成功

诱变、筛选出 2 株突变菌，发现突变菌生长产酸能力均低于亲本菌。通过对 H^+ -ATPase 的酶活力进行测定，结果表明突变菌的酶活力均低于亲本菌。研究表明， H^+ -ATPase 是控制乳酸菌生长代谢的关键酶，在正常生长条件下能够维持乳酸菌的胞内 pH 在中性附近，从而提高乳酸菌的耐酸性^[24]。由于 H^+ -ATPase 的酶活力减弱，从而使突

变菌的生长产酸能力下降,这一结果与报道内容一致。

目前关于弱后酸化乳酸菌的选育研究虽然有很多,但对弱后酸化机理的研究却鲜有报道,即使有限的报道也是观点与机理不一。崔兰^[25]对弱后酸化保加利亚乳杆菌的研究发现,突变菌的 *atpG* 表达水平在对数期和稳定期分别比亲本菌下调了 76%和 67%。刘飞等^[26]通过对弱后酸化保加利亚乳杆菌突变株和亲本菌株的 H^+ -ATPase 基因相似性进行研究,发现突变菌和亲本菌的 H^+ -ATPase 编码基因相似性为 100%,认为突变株和亲本菌之间的 H^+ -ATPase 活力的差异并不是由于编码基因发生了突变,可能是转录水平的降低导致 H^+ -ATPase 蛋白的表达量降低,进而影响酶活力。本研究为进一步阐述突变菌的弱后酸化机理及 H^+ -ATPase 的调控机制,分别对亲本菌和突变菌 H^+ -ATPase 的全部编码基因进行测序,结果发现突变菌 ZUST-1 和 ZUST-2 的 *atpA* 编码基因上均有 22 个位点发生突变,而且 ZUST-2 的 *atpC* 编码基因上有 6 个位点发生突变,包括两个移码突变位点。对亲本菌和突变菌全部编码基因表达水平的测定,结果发现突变菌所有编码基因表达水平在稳定期均高于对数期,亲本菌和突变菌 *atpA* 及 *atpC* 基因表达水平在稳定期均高于对数期(除 ZUST-2 的 *atpC* 不表达外),具有一致性,而其它 6 个基因则恰好相反,亲本菌 ZUST 在稳定期表达水平均低于对数期,突变菌 ZUST-1 及 ZUST-2 在稳定期表达水平均高于对数期。突变菌 ZUST-1 和 ZUST-2 的 *atpA* 基因的表达水平均比亲本菌低,而 ZUST-2 的 *atpC* 不表达,综合分析认为 *atpA* 和 *atpC* 这两个编码基因对 H^+ -ATPase 的功能均有影响,而 *atpC* 的影响可能起主导作用。虽然突变菌 ZUST-2 *atpA* 基因的表达水平在稳定期

比突变菌 ZUST-1 要高,但由于 *atpC* 基因不表达,导致 ZUST-2 的 H^+ -ATPase 活力比 ZUST-1 更低,具体表现为 ZUST-2 的生长产酸能力最弱,发酵液乳酸含量最低。突变菌 ZUST-1 的 *atpA* 基因表达水平与亲本菌 ZUST 相比下调幅度较大,但是其 *atpC* 基因的表达水平在对数期比 ZUST 略高,稳定期与 ZUST 差异更大。所以,最终表现为突变菌 ZUST-1 与亲本菌 ZUST 的生长产酸能力差异不大,在稳定期比对数期的差异更小,与图 1 实验结果相符。

本研究通过实时荧光定量 PCR 分析了亲本菌和突变菌的基因表达水平,结果表明突变菌 H^+ -ATPase 活力下降是由于其编码基因发生突变,进而引起该编码基因的表达水平下调或不表达,最终导致酶活力下降,具体表现为菌体生长产酸能力减弱,从而达到弱后酸化的效果。通过对两株突变菌的测序结果分析,发现 *atpA* 上发生突变的位点相同,推测 H^+ -ATPase 活性降低的植物乳杆菌突变菌的突变位点可能存在一定的规律性,而突变菌 ZUST-2 上的 *atpC* 发生突变是导致 ZUST-2 与突变菌 ZUST-1 差异的主要原因,说明 *atpC* 基因对该酶活力的影响更大,可能是调控 H^+ -ATPase 功能的关键基因。本研究为进一步阐述 H^+ -ATPase 在植物乳杆菌中的调控机制奠定了基础,但关于 H^+ -ATPase 中的每个编码基因的作用及其编码的蛋白亚基对 H^+ -ATPase 的单独调控作用及其协同作用有待进一步深入的研究。

参考文献

- [1] Wassenaar TM, Klein G. Safety aspects and implications of regulation of probiotic bacteria in food and food supplements. *Journal of Food Protection*, 2008, 71(8): 1734-1741.
- [2] Yu ZH, Zhang X, Li SY, Hou JM, Wang J, Li D, Yang ZN. Study on probiotic yoghurt. *China Dairy Industry*, 2013, 41(7): 27-30. (in Chinese)
于志会, 张雪, 李盛钰, 侯聚敏, 王辑, 李达, 杨贞耐. 植物乳杆菌 C88 在酸奶中的应用. *中国乳品工业*, 2013, 41(7): 27-30.

- [3] Zhang Y, Meng XC. Isolation, identification and genetic diversity analysis of *Lactobacilli* from naturally fermented northeast sauerkraut. *China Dairy Industry*, 2009, 37(2): 19-22. (in Chinese)
张杨, 孟祥晨. 自然发酵酸菜发酵液中乳杆菌的分离鉴定与多态性分析. *中国乳品工业*, 2009, 37(2): 19-22.
- [4] Jaichumjai P, Valyasevi R, Assavanig A, Kurdi P. Isolation and characterization of acid-sensitive *Lactobacillus plantarum* with application as starter culture for Nham production. *Food Microbiology*, 2010, 27(6): 741-748.
- [5] Hammes WP, Bantleon A, Min S. Lactic acid bacteria in meat fermentation. *FEMS Microbiology Letters*, 1990, 87(1/2): 165-173.
- [6] Ho N, Prasad V. Probiotics, prebiotics, synbiotics and naturally fermented foods: why more may be more. *Annals of Gastroenterology*, 2013, 26(3): 277-278.
- [7] Tannock GW, Dashkevich MP, Feighner SD. *Lactobacilli* and bile salt hydrolase in the murine intestinal tract. *Applied and Environmental Microbiology*, 1989, 55(7): 1848-1851.
- [8] Caramia G. Gastroenteric pathology and probiotics: from myth to scientific evidence. Current aspects. *Minerva Gastroenterologica Dietologica*, 2009, 55(3): 237-272.
- [9] Pieper R, Janczyk P, Urubschurov V, Hou ZP, Korn U, Pieper B, Souffrant WB. Effect of *Lactobacillus plantarum*, on intestinal microbial community composition and response to enterotoxigenic *Escherichia coli* challenge in weaning piglets. *Livestock Science*, 2010, 133(1/3): 98-100.
- [10] Rašić JL, Vujičić IF, Škrinjar M, Vulić M. Assimilation of cholesterol by some cultures of lactic acid bacteria and *Bifidobacteria*. *Biotechnology Letters*, 1992, 14(1): 39-44.
- [11] Gong JY, Xie T, Lou J, Hu S, Mei LH, Xie DF, Huang J. Screening and identification of lactic acid bacteria for biosynthesis of γ -aminobutyric acid from the leaching solution of Chinese rice wine. *Industrial Microbiology*, 2015, 45(6): 26-31. (in Chinese)
龚金炎, 谢湑, 楼坚, 胡升, 梅乐和, 谢东芳, 黄俊. 黄酒浸米液中产 γ -氨基丁酸乳酸菌的筛选和鉴定. *工业微生物*, 2015, 45(6): 26-31.
- [12] Kobayashi H, Suzuki T, Unemoto T. *Streptococcal* cytoplasmic pH is regulated by changes in amount and activity of a proton-translocating ATPase. *The Journal of Biological Chemistry*, 1986, 261(2): 627-630.
- [13] Yokota A, Amachi S, Ishii S, Tomita F. Acid sensitivity of a mutant of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* C2 with reduced membrane-bound ATPase activity. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 1995, 59(10): 2004-2007.
- [14] Yamamoto N, Masujima Y, Takano T. Reduction of membrane-bound ATPase activity in a *Lactobacillus helveticus* strain with slower growth at low pH. *FEMS Microbiology Letters*, 1996, 138(2/3): 179-184.
- [15] Senouci-Rezkallah K, Jobin MP, Schmitt P. Adaptive responses of *Bacillus cereus* ATCC14579 cells upon exposure to acid conditions involve ATPase activity to maintain their internal pH. *Microbiology Open*, 2015, 4(2): 313-322.
- [16] Liu F, Du P, Wang YT, Liu F, Huo GC. Screening of H⁺-ATPase deficient mutant of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. *Acta Microbiologica Sinica*, 2009, 49(1): 38-43. (in Chinese)
刘飞, 杜鹃, 王玉堂, 刘芳, 霍贵成. 保加利亚乳杆菌 H⁺-ATPase 缺陷型菌株的筛选. *微生物学报*, 2009, 49(1): 38-43.
- [17] Koponen J, Laakso K, Koskeniemi K, Kankainen M, Savijoki K, Nyman T, de Vos WM, Tynkkynen S, Kalkkinen N, Varmanen P. Effect of acid stress on protein expression and phosphorylation in *Lactobacillus rhamnosus* GG. *Journal of Proteomics*, 2012, 75(4): 1357-1374.
- [18] Ongol MP, Sawatari Y, Ebina Y, Sone T, Tanaka M, Tomita F, Yokota A, Asano K. Yoghurt fermented by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* H⁺-ATPase-defective mutants exhibits enhanced viability of *Bifidobacterium breve* during storage. *International Journal of Food Microbiology*, 2007, 116(3): 358-366.
- [19] Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{- $\Delta\Delta C_t$} method. *Methods*, 2001, 25(4): 402-408.
- [20] 孙懿琳. 弱后酸化保加利亚乳杆菌菌株的筛选及其后酸化机理. 东北农业大学硕士学位论文, 2013.
- [21] Wang XN, Chen M, Sun CL, Wurentuya, Dan T, Bao QH, Zhang HP, Menghebilige. Mutation breeding of H⁺-ATPase deficient mutant of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. *China Dairy Industry*, 2013, 41(8): 8-11, 28. (in Chinese)
王雪妮, 陈明, 孙春玲, 乌仁图雅, 丹彤, 包秋华, 张和平, 孟和毕力格. 保加利亚乳杆菌 H⁺-ATPase 弱化菌株的诱变选育. *中国乳品工业*, 2013, 41(8): 8-11, 28.
- [22] Wang XH, Ren HY, Liu DY, Wang B, Zhu WY, Wang W. H⁺-ATPase-defective variants of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* contribute to inhibition of postacidification of yogurt during chilled storage. *Journal of Food Science*, 2013, 41(8): 8-11, 28. (in Chinese).
- [23] Jia BH, Zhong XT, Yuan CH, Li K, Lin K, Zhang Q, Che ZM, Chen G, Xiang WL. Screening of *Lactobacillus plantarum* LPM21 with F₁F₀-ATPase β -subunit mutation used as probiotics adjunct in Sichuan pickle. *Food Science and Technology Research*, 2013, 19(6): 1045-1050.
- [24] Nyanga-Koumou AP, Ouoba LII, Kobawila SC, Louembe D. Response mechanisms of lactic acid bacteria to alkaline environments: a review. *Critical Reviews in Microbiology*, 2012, 38(3): 185-190.
- [25] 崔兰. 弱后酸化保加利亚乳杆菌的应激性及其遗传稳定性研究. 哈尔滨: 东北农业大学硕士学位论文, 2012.
- [26] Liu F, Jiao YH, Guo WK, Yu W, Gu CT, Huo GC. Comparison of similarity of H⁺-ATPase coding gene between wild strain and mutant strain with low post-acidification of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. *Science and Technology of Food Industry*, 2013, 34(15): 127-130, 135. (in Chinese)
刘飞, 焦月华, 郭文奎, 于微, 谷春涛, 霍贵成. 弱后酸化保加利亚乳杆菌突变株与亲本菌株 H⁺-ATPase 基因的相似性比较. *食品工业科技*, 2013, 34(15): 127-130, 135.

Isolation, characterization and real-time RT-PCR for relative quantification of gene expression in H⁺-ATPase-defective mutants from *Lactobacillus plantarum*

Xiang Zhang¹, Hui Fang¹, Dongfang Xie¹, Yuecheng Lin¹, Yingyan Tao¹, Hongpeng Wang¹, Jinyan Gong¹, Qing Ge¹, Guorong Pan¹, Jun Huang^{1,3*}, Yuru You^{1,2*}

¹ Key Laboratory of Agricultural Products Chemical and Biological Processing Technology, Zhejiang University of Science and Technology, Hangzhou 310023, Zhejiang Province, China

² Beingmate Baby & Child Food Co., Ltd., Hangzhou 310007, Zhejiang Province, China

³ Hangzhou Allsheng Instruments Co., Ltd, Hangzhou 310030, Zhejiang Province, China

Abstract: [Objective] The aim of this study was to isolate *Lactobacillus plantarum* acid-sensitive mutants with lower H⁺-ATPase activity, and to study the mechanism of H⁺-ATPase regulation in *Lactobacillus plantarum*. [Methods] We used neomycin to isolate acid-sensitive mutants of *L. plantarum*, and measured H⁺-ATPase activity and lactic acid production of wild-type and mutants. Genomic DNA was extracted from the wild-type ZUST and two mutants (ZUST-1, ZUST-2), and used as PCR templates. H⁺-ATPase genes of the strain were amplified, and the PCR products were sequenced. Sequence similarity of H⁺-ATPase was analyzed. Real-time RT-PCR was used to evaluate the relative quantification of the H⁺-ATPase genes expression. [Results] The growth of the mutants was characterized in MRS broth, which revealed that their cell biomass and acid production were lower than that of the wild-type. H⁺-ATPase activity of the mutants ZUST-1 and ZUST-2 was 10.1% and 28.8% lower than that of the wild-type. Results showed that *atpA* gene of the mutants ZUST-1 and ZUST-2 existed 22 mutations by alignment of the wild-type sequence, and *atpC* gene of ZUST-2 existed 6 mutations. Mutants ZUST-1 and ZUST-2 *atpA* gene expression were 41.1% and 35.7% lower than that of the wild-type in exponential phase, 43.6% and 14.2% in stationary phase, respectively. The *atpC* gene expression of ZUST-1 was similar to that of the wild-type in exponential phase, and was 30% higher than that of the wild-type in stationary phase, and ZUST-2 *atpC* gene was not expressed. [Conclusion] The mutants with lower H⁺-ATPase activity were found to up-regulate the expression of H⁺-ATPase genes in stationary phase, except ZUST-2 *atpC* gene was not expressed. H⁺-ATPase activity has an important connection with the difference in gene expression of *atpA* and *atpC*. The results of this study will pave the way for gaining further insights into the mechanism of the H⁺-ATPase-defective mutants.

Keywords: *Lactobacillus plantarum*, H⁺-ATPase, mutant, real-time RT-PCR

(本文责编：张晓丽)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (31470793, 31240054); Hangzhou Science and Technology Project of China (20140432B106); Graduate Innovation Project of Zhejiang University of Science and Technology (2015ZUSTJSKC010)

*Corresponding author. Tel/Fax: +86-571-85070370; E-mail: Jun Huang, hjunlzh@163.com; Yuru You, youyuru0130@163.com

Received: 29 July 2016; Revised: 30 August 2016; Published online: 18 September 2016