



基于 iTRAQ 技术对植物乳杆菌 FS5-5 的耐盐特性分析

王茜茜, 宋雪飞, 郭晶晶, 张颖, 乌日娜*

沈阳农业大学食品学院, 辽宁 沈阳 110866

摘要:【目的】对大酱中耐盐性较好的植物乳杆菌进行蛋白质组学研究, 为植物乳杆菌盐胁迫应激机制的研究提供实验数据。【方法】本研究以筛选自东北传统农家大酱的耐盐性较好的植物乳杆菌 FS5-5 为研究对象, 绘制了其在 0%、6.0%、7.0% 和 8.0% (W/V) NaCl 浓度下的生长曲线, 并利用 iTRAQ 技术研究了其在 0%、6.0%、7.0% 和 8.0% (W/V) NaCl 浓度下的蛋白质表达情况。【结果】植物乳杆菌 FS5-5 在 0%、6.0%、7.0% 和 8.0% (W/V) NaCl 浓度下到达对数生长期中期的时间点分别为 5、10、12 和 12 h; 以差异倍数在 1.2 倍以上且 $P < 0.05$ 为筛选条件对 6.0%、7.0% 和 8.0% (W/V) NaCl 浓度下与 0% 进行差异蛋白质的筛选, 共筛选出 1271 个差异蛋白质。这些差异蛋白质主要参与糖代谢、氨基酸代谢、脂肪酸代谢、核苷酸代谢、应激反应、转运、PTS 系统和核糖体代谢等。【结论】植物乳杆菌在高盐浓度下生长与能量合成蛋白质、应激蛋白质以及相容性溶质转运蛋白质的表达上调有密切关系。

关键词: 植物乳杆菌 FS5-5, 盐胁迫, iTRAQ, 差异蛋白质表达

植物乳杆菌作为一种常见的益生菌, 对人体的健康具有很好的益生作用。它们通常要在产品的生产和储存过程中能够耐受高温、高压、强碱、高盐等外界环境压力的变化^[1], 同时也需要耐受人体的胃肠消化道中低 pH 值、高胆盐等胁迫的变化。以便能够在人体内更好地发挥益生特性。

为了抵抗和适应生产过程中遇到的高温、强碱、高盐, 以及在人体消化过程中遇到的胃酸、胆盐等环境压力的变化, 乳酸菌也逐渐进化出了

大量的适应机理和压力反应。相关报道指出, 对不良环境的适应能力通常与大量基因的诱导、应激蛋白质的生物合成有关^[2-3]。也有报道指出, 这些适应机理是因为生物体面对压力变化时激活了不同的代谢途径, 进而导致其蛋白质图谱发生了改变^[4]。因此, 利用蛋白质组学研究植物乳杆菌面对生理和环境的变化产生的适应机理是一种非常有效的方法。与传统的双向电泳相比, 基于同位素标记与高效液相色谱与质谱联用的 iTRAQ 技术

基金项目: 国家自然科学基金(31471713, 31000805); 中国博士后科学基金(2014M560395); 辽宁省农业领域青年科技创新人才培养计划(2014048); 辽宁省高等学校优秀人才支持计划(LR2015059); 江苏省博士后科研资助计划(1402071C)

*通信作者。Tel/Fax: +86-24-88487161; E-mail: wrn6956@163.com

收稿日期: 2016-12-28; 修回日期: 2017-03-12; 网络出版日期: 2017-03-30

能够更精确地对蛋白质进行定性和定量分析。

大酱是东北地区一种深受大家喜爱的传统发酵食品。盐作为大酱的一种主要调味品,在发酵过程中是必须添加的,盐的添加不仅能够提高大酱的风味,抑制微生物的生长,也能提高大酱的货架期。在大酱发酵过程中主要存在的微生物是乳酸菌和酵母菌,以前对大酱中耐盐乳酸菌的研究主要集中在嗜盐四联球菌,对耐盐植物乳杆菌的研究则较少。

本研究以筛选自东北传统农家大酱并且对 NaCl 环境具有一定耐受性的植物乳杆菌 FS5-5 为研究对象^[5],利用 iTRAQ 技术比较分析了该菌株在 0%、6.0%、7.0% 和 8.0% (W/V) 的盐浓度下生长至对数期中期的蛋白质表达差异情况,通过生物信息学对差异蛋白质功能进行注释,为进一步探究该菌株的耐盐机理提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料

菌种:耐盐植物乳杆菌 *L. plantarum* FS5-5 (中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心 CGMCC10331)。

改良的 MRS 培养基(g/L):葡萄糖 20,蛋白胨 10,牛肉浸膏 8,无水乙酸钠 5,磷酸氢二钾 2,酵母粉 4,柠檬酸钠 2,七水硫酸镁 0.58,四水硫酸锰 0.25,吐温 1。

裂解液 buffer 的配制:8 mol/L 尿素、30 mmol/L HEPES、1 mmol/L PMSF、2 mmol/L EDTA、10 mmol/L DTT。

1.2 不同盐浓度下植物乳杆菌 FS5-5 生长至对数生长期中期生长点的确定

将活化至第 3 代的植物乳杆菌 FS5-5 供试菌

液以 1% 的接种量接种到 NaCl 含量分别为 0%、6.0%、7.0% 和 8.0% (W/V) 的新鲜配置的改良 MRS 培养基中(pH 用 HCl 调节至 6.5),同时添加 MES、MOPS 缓冲剂。以每管 5 mL 的量分装到灭过菌的试管中,于 37 °C 条件下恒温培养 24 h,在培养过程中,每隔 2 h 进行 1 次取样,振荡均匀后,测定在 600 nm 下的吸光度值,并且根据不同时间的吸光度值绘制植物乳杆菌 FS5-5 在不同盐浓度下的生长曲线^[6]。

1.3 不同盐浓度下植物乳杆菌 FS5-5 生长至对数生长期中期时样品的收集

将活化至第 3 代的 *L. plantarum* FS5-5 的供试菌液以 1% 的接种量分别接种至灭过菌的新鲜配置的含有不同盐浓度的 MRS 培养基中,在 37 °C 条件下恒温培养。待植物乳杆菌 *L. plantarum* FS5-5 在各个盐浓度下培养到对数生长期中期,从恒温培养箱中取出,在 4 °C 条件下,4000×g 离心 10 min,吸出上清液,将菌体转移至 2 mL 离心管中,加入 1.5 mL PBS 缓冲液,振荡,使菌体重悬,在 4 °C 条件下,4000×g 离心 10 min,吸出上清液,重复 3 次;再加入 1.5 mL 灭菌水,振荡,使菌体重悬,在 4 °C 条件下,4000×g 离心 10 min,吸出上清液,重复 3 次,并将菌体表面残留的灭菌水吸干。

不同盐浓度下的菌体样品分别按照上述方法重复 3 次,并且将 3 次分别收集到的菌体样品等量混合,-80 °C 保存备用。

1.4 iTRAQ 试验

收集的菌体样品送北京华大蛋白质研发中心有限公司进行 iTRAQ 试验。

1.4.1 蛋白质的提取:收集不同 NaCl 浓度处理的植物乳杆菌的菌体样品,并采用超声破碎与丙酮沉淀法提取经过不同 NaCl 浓度处理的植物乳杆

菌的蛋白质样品。在 500 μg 植物乳杆菌菌体样品中加入裂解液 1 mL, 超声(超声条件: pulse on 2 s、pulse off 3 s、power 180 W), 离心收集上清, 在上清中加入丙酮沉淀蛋白质, 再加入裂解液复溶。使用 Bradford 法对提取的蛋白质进行定量, 并通过 SDS-PAGE 检测提取的蛋白质质量。

1.4.2 蛋白质的消化、肽段标记以及肽段纯化:

对经过不同 NaCl 浓度处理的植物乳杆菌的蛋白质样品进行胰蛋白酶消化, 用 iTRAQ 试剂盒对肽段进行标记, 标记信息分别为: 0%, 113; 6.0%, 114; 7.0%, 115; 8.0%, 116。之后采用 Phenomenex Luna SCX 100A 对标记后的肽段样品进行预分离, 最后用 Strata-X C_{18} 除盐柱(Phenomenex)对标记后的肽段样品进行纯化。

1.4.3 质谱检测与定性定量分析: 标记后的肽段样品用戴安纳液相色谱系统进行分离。流动相 A 为含有 0.1% 甲酸的水溶液, 流动相 B 为含有 0.1% 甲酸的乙腈溶液, 用 C_{18} 色谱柱(100 mm \times 75 mm, 300 A, 5 μm)进行分离, 流速为 400 nL/min, 洗脱梯度如表 1 所示。洗脱的肽段利用 Thermo fisher Q-Exactive 进行收集并进行质谱检测。Q-Exactive 质谱仪检测肽段信号参数: 离子模式为正离子模式; 一级扫描范围 350–2000 Da; 二级扫描范

表 1. Nano-LC 液相洗脱梯度

Table 1. Elution gradient of nano-LC

t/min	B liquid/%
0	5
10	5
40	30
45	60
48	80
55	80
58	5
65	5
65.01	STOP

围依赖于一级母离子质荷比自动选择; 二级分辨率 17500; 毛细管温度 320 $^{\circ}\text{C}$; 离子源电压 1800 V; 破裂模式 HCD。

将质谱扫描后得到的总离子流图输入到 PD (Proteome Discoverer 1.3, thermo)软件后, 对总离子流图进行筛选。总离子流图筛选参数为: 母离子质量范围 350–6000 Da; 二级总离子流图中最小峰数 10; 信噪比(S/N)域值 1.5。PD 提取后的谱图用 mascot 进行搜索, 搜索结束后, PD 软件根据 mascot 搜索结果和第一步筛选后的谱图进行定量分析。

1.4.4 生物信息学分析: 通过 GO (<http://geneontology.org/>)数据库和 KEGG (<http://www.kegg.jp/>)数据库对得到的差异蛋白质点的功能和代谢通路进行注释。

2 结果和分析

2.1 不同盐浓度下植物乳杆菌 FS5-5 的生长

植物乳杆菌 FS5-5 在 NaCl 浓度分别为 0%、6.0%、7.0% 和 8.0% (W/V)的改良 MRS 培养基中能够生长, 其生长曲线如图 1 所示。植物乳杆菌

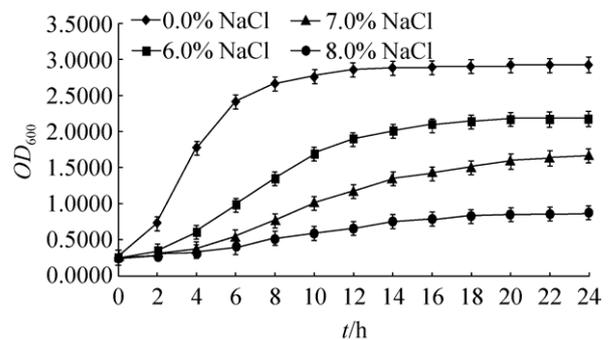


图 1. 植物乳杆菌 *L. plantarum* FS5-5 在不同 NaCl 浓度条件下的生长曲线

Figure 1. The growth of *L. plantarum* FS5-5 cultured in MRS medium at different NaCl concentrations.

FS5-5 在 0% 盐浓度下 5 h 到达对数生长期中期, 在 6.0% 盐浓度下 10 h 到达对数生长期中期, 在 7.0% 盐浓度下 12 h 到达对数生长期中期, 在 8.0% 盐浓度下 12 h 到达对数生长期中期。

2.2 植物乳杆菌 FS5-5 的 iTRAQ 结果分析

2.2.1 蛋白质定量与质谱鉴定结果:通过 Bradford 法对提取的蛋白质样品进行定量, 蛋白质浓度分别为 1.55、1.07、1.25 和 1.32 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 。凝胶电泳图谱如图 2 所示, 由凝胶电泳图可以看出, 4 个样品条带清晰, 各个条带之间相对平行, 可以进行后续 iTRAQ 试验。

通过质谱扫描后的总离子流图如图 3 所示, 通过 Mascot 软件进行搜索, 在 1578_UNI_Lactobac 库(建库日期: 2015.08.07; Number of sequences: 461115)中鉴定到的总蛋白质为 2056 个, 其中全部的谱图数为 343524 个, 匹配上的谱图数为 85516

个, 肽段种类数为 11215 个, 匹配上的蛋白质数为 2056 个。

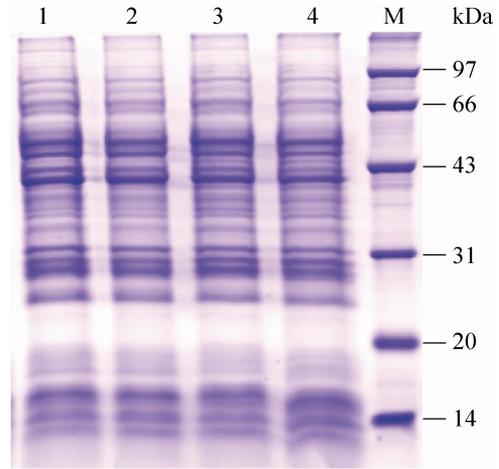


图 2. 植物乳杆菌 *L. plantarum* FS5-5 在不同 NaCl 浓度条件下的 SDS-PAGE 分析

Figure 2. SDS-PAGE analysis of *L. plantarum* FS5-5 cultured in MRS medium at different NaCl concentrations. Lane 1: 0%; lane 2: 6.0%; lane 3: 7.0%; lane 4: 8.0%; M: marker.

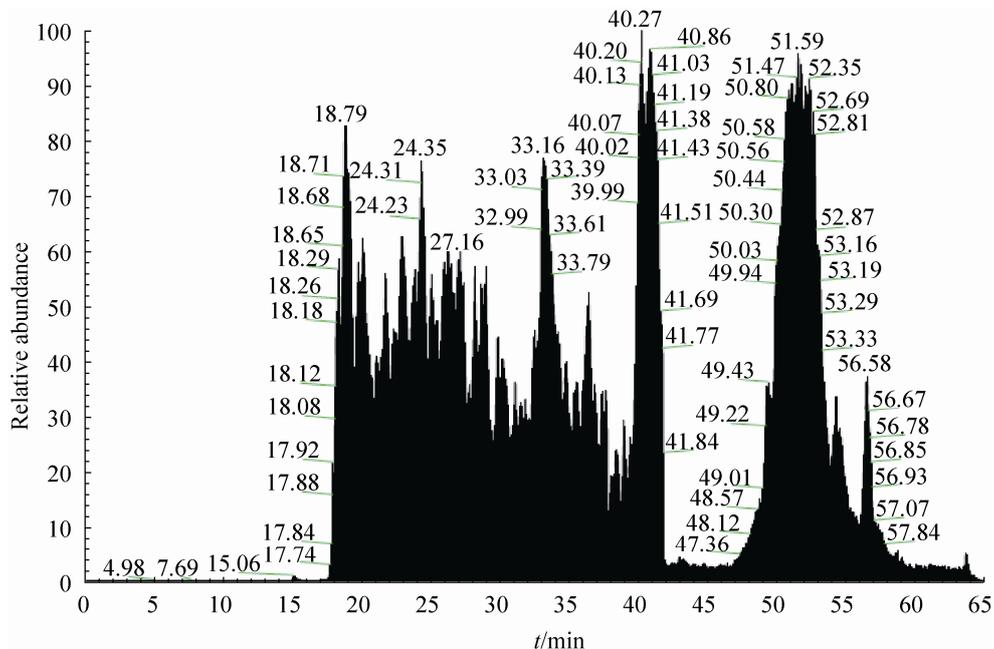


图 3. Q-Exacte 质谱检测总离子流图

Figure 3. Schematic diagram of Q-Exacte. Abscissa: elution time; ordinate: signal strength.

2.2.2 差异蛋白质分析:以差异倍数在 1.2 倍以上且 $P < 0.05$ 为筛选条件,对 6.0%、7.0%和 8.0% (W/V) NaCl 浓度下出现的蛋白质与 0% (W/V) NaCl 浓度下出现的蛋白质进行差异蛋白质的筛选,共筛选出 1271 个差异蛋白质。其中 6.0% (W/V) NaCl 浓度下出现的蛋白质与 0% (W/V) NaCl 浓度下出现的蛋白质相比,共有 372 个差异蛋白质点,其中有 200 个蛋白质表达上调,有 172 个蛋白质表达下调;7.0% (W/V) NaCl 浓度下出现的蛋白质与 0% (W/V) NaCl 浓度下出现的蛋白质相比,共有 440 个差异蛋白质点,其中有 222 个蛋白质表达上调,有 218 个蛋白质表达下调;8.0% (W/V) NaCl 浓度下出现的蛋白质与 0% (W/V) NaCl 浓度下出现的蛋白质相比,共有 459 个差异蛋白质点,其中有 245 个蛋白质表达上调,有 214 个蛋白质表达下调。

而与 0% (W/V) NaCl 浓度下出现的蛋白质相比,6.0%、7.0%和 8.0% (W/V) NaCl 浓度下蛋白质点均发生差异变化的共有 255 个,其中有 140 个蛋白质表达上调,有 115 个蛋白质表达下调。

2.2.3 差异蛋白质生物信息学分析:通过 GO 数据库和 KEGG 数据库对这些差异表达的蛋白质的功能和代谢通路进行分析,这些差异蛋白质主要参与糖代谢、氨基酸代谢、脂肪酸代谢、核苷酸代谢、应激反应、ABC 转运、PTS 系统和核糖体代谢、DNA 复制重组与修复蛋白质等。在 6.0%、7.0%和 8.0% (W/V) NaCl 浓度下蛋白质点均发生差异变化的部分蛋白质信息如表 2 所示。

在本实验中,与糖酵解相关的蛋白质主要有磷酸甘油酸酯变位酶和乙醇脱氢酶。与 NaCl 浓度为 0%相比,在 NaCl 浓度为 6.0%、7.0%和 8.0% (W/V)时,这两种酶的表达是上调的,这说明在盐胁迫条件下,可能需要产生更多的能量来抵抗

不利环境。与磷酸戊糖途径相关的蛋白质主要有 6-磷酸葡萄糖脱氢酶(Gpd)和 6-磷酸葡萄糖酸脱羧酶(Gnd),与 NaCl 浓度为 0%相比,在 NaCl 浓度为 6.0%、7.0%和 8.0% (W/V)时,这两种酶的表达是上调的,这也说明在盐胁迫条件下,菌体可能启动多种反应相互协调相互配合来抵抗不利环境,同时也需要产生更多的能量来维持自身细胞的生长繁殖。

与 NaCl 浓度为 0%相比,NaCl 浓度为 6.0%、7.0%和 8.0% (W/V)时的 AccB、AccC、FabZ2、FabG2、FabD 蛋白质均发生了明显的变化,并且表达均是下调的,这说明 NaCl 的加入可能抑制了菌体细胞的生长,导致细胞生长繁殖过程中脂肪酸生物合成中的相关酶活性减弱。Heunis 等^[7]发现植物乳杆菌 423 在酸胁迫时 FabD 的蛋白质表达也是下降的,这可能是其在不良环境下通过减少脂肪酸的生物合成来减少自身的生长^[8]。

与 NaCl 浓度为 0%相比,NaCl 浓度为 6.0%、7.0%、8.0% (W/V)时的 GuaC、PurH、PurA 和 PurB 的蛋白质均发生了明显的变化,并且表达均是下调的,这说明 NaCl 的加入可能抑制了菌体细胞的生长,导致细胞生长繁殖过程中嘌呤代谢中相关酶的活性减弱。Pang 等^[9]研究表明,PurA 含量的减少,可以增加核苷酸代谢中次黄嘌呤的浓度,进而合成 RNA 和 DNA。Sun 等^[10]发表的论文中也有类似的结果,*Escherichia coli* 在酸胁迫条件下的差异蛋白质中,Adk、PurA 的表达也是下调的。与 NaCl 浓度为 0%相比,NaCl 浓度为 6.0%、7.0%和 8.0% (W/V)时的 CarA、PyrB、PyrC、PyrD、PyrE、PyrF 和 PyrG 的蛋白质均发生了明显的变化,并且表达均是下调的,这说明 NaCl 的加入可能抑制了菌体细胞的生长,导致细胞生长繁殖过程中嘌呤代谢相关酶的活性减弱。

表 2. 差异表达的部分蛋白质信息列表
Table 2. The information list of changed expression proteins

Accession number	Protein name	Gene name	M_w /kDa	pI	Differential expression		
					6/1	7/1	8/1
M4KKC5	Glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase	<i>gpd</i>	56.7	5.49	1.24	1.27	1.47
A0A023MCE4	Phosphoglycerate mutase	<i>pgm</i>	24.9	7.15	1.51	1.51	1.51
D7V8V6	6-phosphogluconate dehydrogenase, decarboxylating	<i>gnd</i>	52.9	5.30	1.48	1.41	1.83
A0A023MFR5	Alcohol dehydrogenase, zinc-containing	<i>I526_2330</i>	36.7	5.59	2.22	2.90	3.44
D7V979	FabA-like domain protein	<i>fabZ2</i>	15.1	7.46	0.70	0.54	0.67
V7Z5W3	3-ketoacyl-ACP reductase	<i>fabG2</i>	23.2	7.56	0.72	0.55	0.62
A0A023MB83	Malonyl CoA-acyl carrier protein transacylase	<i>fabD</i>	33.2	5.44	0.73	0.58	0.55
D7V978	Putative acetyl-CoA carboxylase, biotin carboxyl carrier protein	<i>accB</i>	16.3	4.55	0.76	0.54	0.57
A0A023MC38	Acetyl-CoA carboxylase, biotin carboxylase subunit	<i>accC</i>	48.2	7.18	1.31	1.31	1.21
V7Z294	Orotate phosphoribosyltransferase	<i>pyrE</i>	22.4	6.09	0.22	0.25	0.31
A0A023MFH5	Carbamoyl-phosphate synthase small chain	<i>carA</i>	40.0	6.09	0.24	0.26	0.27
D7VCT9	Dihydroorotate dehydrogenase	<i>pyrD</i>	31.2	6.64	0.27	0.27	0.42
Q88SV6	Adenylosuccinate synthetase	<i>purA</i>	47.2	5.64	0.29	0.34	0.48
P77883	Aspartate carbamoyltransferase	<i>pyrB</i>	34.7	6.54	0.31	0.53	0.51
A0A023MEY2	Bifunctional purine biosynthesis protein PurH	<i>purH</i>	55.3	6.33	0.37	0.39	0.48
Q88SV5	GMP reductase	<i>guaC</i>	35.4	6.87	0.38	0.47	0.52
M4KK14	Dihydroorotase	<i>pyrC</i>	45.4	6.18	0.38	0.42	0.44
P77888	Orotidine 5'-phosphate decarboxylase	<i>pyrF</i>	24.9	7.59	0.45	0.40	0.39
A0A023MGM5	Adenylosuccinate lyase	<i>purB</i>	49.0	5.97	0.48	0.62	0.71
Q88Z76	CTP synthase	<i>pyrG</i>	59.7	5.69	0.63	0.59	0.57
U2HMA7	Universal stress protein	<i>uspA</i>	17.6	9.92	1.71	1.87	1.92
A0A023M9S1	Small heat shock protein	<i>hsp</i>	16.0	4.70	1.82	2.22	2.06
A0A023MBA8	Alkaline shock protein	<i>asp</i>	16.1	4.94	2.36	1.95	1.92
A0A023M8Y1	ABC transporter, ATP-binding protein	<i>I526_0147</i>	33.8	8.50	0.33	0.42	0.37
A0A023MB03	Maltose/maltodextrin ABC transporter, substrate binding protein	<i>malE</i>	45.6	9.69	0.50	0.70	0.66
A0A023MCW7	Oligopeptide ABC transporter, permease protein	<i>I526_1074</i>	37.6	9.31	0.62	0.57	0.54
U2HNB3	Peptide ABC transporter substrate-binding protein	<i>N876_09685</i>	36.6	6.02	0.74	0.66	0.59
A0A023MAZ6	Lipoprotein, peptide binding protein OppA-like protein	<i>I526_0648</i>	59.9	9.61	0.74	0.57	0.62
A0A023MDM8	ABC-type dipeptide/oligopeptide/nickel transport system, ATPase component	<i>I526_1075</i>	39.7	5.87	0.81	0.55	0.65
A0A023ME81	Glycine betaine/carnitine/choline ABC transporter, substrate binding protein	<i>I526_1355</i>	34.8	9.36	1.26	1.29	1.28
A0A023MDL1	Glycine betaine/carnitine/choline ABC transporter, permease protein	<i>I526_1354</i>	22.4	8.40	1.37	1.47	1.56
F9UNY1	Glycine betaine/carnitine/choline ABC transporter, ATP-binding protein	<i>opuA</i>	44.4	5.16	1.43	1.39	1.43
R9X8D2	Glycine/betaine/carnitine ABC transporter, ATP-binding subunit(ProV)	<i>Lp16_F055</i>	43.9	6.06	1.54	1.82	1.99

(待续)

(续表 2)

R9XAV7	Glycine/betaine/carnitine ABC transporter, substrate binding lipoprotein	<i>Lp16_F053</i>	33.5	10.04	1.64	1.74	1.55
Q88XZ0	30S ribosomal protein S12	<i>rpsL</i>	15.2	11.25	0.57	0.42	0.35
Q88WN3	50S ribosomal protein L27	<i>rpmA</i>	10.1	10.95	0.62	0.61	0.58
Q88WU7	50S ribosomal protein L35	<i>rpmI</i>	7.4	12.04	0.64	0.23	0.21
Q88VD4	30S ribosomal protein S20	<i>rpsT</i>	9.1	10.52	0.67	0.58	0.61
Q88WK6	50S ribosomal protein L28	<i>rpmB</i>	7.0	11.91	0.71	0.43	0.44
Q88XY2	30S ribosomal protein S19	<i>rpsS</i>	10.3	9.82	0.74	0.58	0.82
U2I5Q9	50S ribosomal protein L30	<i>N876_10145</i>	4.4	8.69	0.77	0.67	0.82
Q88XY3	50S ribosomal protein L2	<i>rplB</i>	30.2	10.55	0.77	0.62	0.63
Q88YW7	50S ribosomal protein L7/L12	<i>rplL</i>	12.6	4.48	0.79	0.70	0.79
Q88XW7	50S ribosomal protein L15	<i>rplO</i>	15.3	10.64	0.82	0.79	0.78
A0A023MFT5	Ribonuclease H	<i>I526_2100</i>	32.6	9.85	1.20	1.27	1.21
Q88UZ4	Protein RecA	<i>recA</i>	40.6	5.72	1.26	1.71	2.05
A0A023MA12	DNA ligase	<i>ligA</i>	74.4	5.24	1.34	1.36	1.58
U2WPA2	Single-stranded DNA-binding protein	<i>N644_0531</i>	20.9	5.12	1.42	1.82	2.13
Q88YI8	UvrABC system protein B	<i>uvrB</i>	76.1	5.20	1.44	1.91	2.39

在本实验中, 出现大量的核糖体蛋白质, 如 30S 核糖体蛋白质 S12、50S 核糖体蛋白质 L27、50S 核糖体蛋白质 L35、30S 核糖体蛋白质 S20、50S 核糖体蛋白质 L28、30S 核糖体蛋白质 S19、50S 核糖体蛋白质 L30、50S 核糖体蛋白质 L2 等等, 但核糖体蛋白质的表达量大多是下调的, 这说明在盐胁迫环境下, 可能减少了菌体细胞自身的生长, 所需蛋白质的量减少, 核糖体蛋白质的表达量随之减少。在本实验中出现的通用应激蛋白质、小热休克蛋白质、碱性休克蛋白质的表达均是增强的, 在 NaCl 浓度 6.0%、7.0% 和 8.0% (W/V) 的环境下, 增强倍数均达到了 1.7 倍以上。应激蛋白质对蛋白质和 DNA 的维护和修复作用也是乳酸菌适应胁迫环境的机制之一^[11]。以前的一些关于双向电泳的研究中, 热休克蛋白质如 GroES、GroEL 和 DnaK 经常在胁迫环境下被诱导表达出来。ABC 转运蛋白质在转运磷酸腺苷蛋白质、麦芽糖、麦芽多糖、多肽、寡肽、谷氨酰胺、脂蛋白质相关的蛋白质时的差异表达下调, 而与此同

时, ABC 转运蛋白质在转运甘氨酸甜菜碱、肉碱、胆碱等相关蛋白质时的差异表达上调。

3 讨论

NaCl 的添加会影响植物乳杆菌自身的生长繁殖, 同时也会刺激植物乳杆菌调控自身的耐盐机制来抵抗 NaCl 的胁迫作用, 以便维持自身细胞的稳定性。曾经提出的耐盐机制主要包括“相容性溶质”策略、应激蛋白质的表达、代谢途径的调控等方面。本实验中出现的差异蛋白质主要有糖代谢、氨基酸代谢、脂肪酸代谢、核苷酸代谢、应激蛋白质、ABC 转运蛋白质、PTS 系统、核糖体蛋白质、DNA 复制重组与修复蛋白质等。

在糖代谢过程中最主要的方式是糖酵解, 在厌氧条件下, 乳酸菌几乎完全依靠糖酵解途径来提供能量供应^[12]。磷酸戊糖途径也是糖代谢中的主要代谢途径之一, 在磷酸戊糖途径中, 6-磷酸葡萄糖脱氢酶催化 6-磷酸葡萄糖生成磷酸葡萄糖

酸酯,同时生成 NADPH;6-磷酸葡萄糖酸脱羧酶催化 6-磷酸葡萄糖生成 D-核酮糖-5-磷酸,同时生成 NADPH,再进一步形成核糖-5-磷酸。在该途径中生成的 NADPH 可以用来还原谷胱甘肽,以及参与还原性生物分子的合成;中间产物 D-核酮糖-5-磷酸是核苷酸及其重要辅酶的主要组成成分之一。6-磷酸葡萄糖脱氢酶是一种速率限制酶,由于其具有的不可逆性也赋予该酶一种特殊的信号作用,即表征盐胁迫下细胞生长所处的较合适的氧化还原状态^[13]。

核糖体蛋白质的功能除了促进蛋白质的生物合成外,还可以感受环境的变化,如热、冷、酸、渗透压等的变化^[14]。核糖体蛋白质的产生是细胞代谢的主要支出,细胞需要的翻译机制的量与细胞生长率有关,在不同的环境条件下,核糖体与蛋白质合成之间保持着合适的水平^[15]。当乳酸菌处在胁迫环境(如酸胁迫、胆盐胁迫等)下时,应激蛋白质通常被诱导表达,应激蛋白质在基因和蛋白质的表达和修复过程中起着至关重要的作用,常见的应激蛋白质主要包括热休克蛋白质、冷休克蛋白质和通用应激蛋白质^[16]。

ABC 转运蛋白质可以转运甘氨酸甜菜碱、多肽、腺苷、多糖、脂蛋白质到细胞内,但在转运的过程中需要消耗 ATP。ABC 转运蛋白质在转运磷酸腺苷蛋白质、麦芽糖、麦芽多糖、多肽、寡肽、谷氨酰胺、脂蛋白质相关的蛋白质时的差异表达下调,这说明了 NaCl 的加入抑制了菌体细胞的生长,使菌体细胞自身生长繁殖代谢相关的代谢途径减弱,需要的前提物质减少,也使得转运前体物质的转运蛋白质的含量减少,所以与 NaCl 浓度为 0%相比,蛋白质表达下调。而与此同时,ABC 转运蛋白质在转运甘氨酸甜菜碱、肉碱、胆

碱等相关蛋白质时的差异表达上调,菌体细胞在 NaCl 浓度较高的溶液中,溶液的水势随着 NaCl 浓度的增加而逐渐降低,同时细胞内的自由水会从细胞内的高水势流向细胞外的低水势,从而造成细胞脱水,在此情况下,通常利用“相容性溶质”来维持菌体细胞内可以维持细胞内的低水势^[17],进而保护菌体细胞内的渗透压平衡,而甘氨酸甜菜碱、肉碱、胆碱等就属于相容性溶质,所以在 NaCl 环境下,与转运相容性溶质相关蛋白质的 ABC 转运蛋白质的表达上调了。

本文利用 iTRAQ 技术比较分析了筛选自东北传统农家大酱的植物乳杆菌 FS5-5 在 0%、6.0%、7.0%和 8.0% (W/V)的盐浓度下,生长至对数期中期的蛋白质表达差异情况,在本项研究中,随着盐浓度的不断提高,与供能相关的糖代谢、应激蛋白质、以及与相容性溶质转运相关的蛋白质表达上调;而与生长相关的核苷酸代谢以及脂肪酸代谢等相关的蛋白质表达下调。

参考文献

- [1] Champagne CP, Ross RP, Saarela M, Hansen KF, Charalampopoulos D. Recommendations for the viability assessment of probiotics as concentrated cultures and in food matrices. *International Journal of Food Microbiology*, 2011, 149(3): 185–193.
- [2] Goulhen F, Grenier D, Mayrand D. Stress response in *Actinobacillus actinomycetemcomitans*: induction of general and specific stress proteins. *Research in Microbiology*, 2003, 154(1): 43–48.
- [3] Mills S, Stanton C, Fitzgerald GF, Ross RP. Enhancing the stress responses of probiotics for a lifestyle from gut to product and back again. *Microbial Cell Factories*, 2011, 10(S1): S19.
- [4] Heim S, Del Mar Lleo M, Bonato B, Guzman CA, Canepari P. The viable but nonculturable state and starvation are different stress responses of *Enterococcus faecalis*, as determined by proteome analysis. *Journal of Bacteriology*, 2002, 184(23):

- 6739–6745.
- [5] Xu X, Wang QQ, Wang XR, Xue YT, Wu RN. Isolation and identification of salt-resistant lactic acid bacteria in farmers' soybean paste. *Food and Fermentation Industries*, 2014, 40(11): 33–40. (in Chinese)
徐鑫, 王茜茜, 王晓蕊, 薛亚婷, 乌日娜. 传统农家大酱中耐盐性乳酸菌的分离与鉴定. *食品与发酵工业*, 2014, 40(11): 33–40.
- [6] Wu RN, Wang QQ, Tang XY, Zhang Y, Zou TT, Wu JR. Proteomics research on salt response of *L. plantarum* FS5-5 grown at different NaCl concentrations using two-dimensional gel electrophoresis. *Journal of Food Science and Biotechnology*, 2016, 35(2): 123–128. (in Chinese)
乌日娜, 王茜茜, 唐筱扬, 张颖, 邹婷婷, 武俊瑞. 植物乳杆菌 *L. plantarum* FS5-5 在盐胁迫下的蛋白质组学. *食品与生物技术学报*, 2016, 35(2): 123–128.
- [7] Heunis T, Deane S, Smit S, Dicks LMT. Proteomic profiling of the acid stress response in *Lactobacillus plantarum* 423. *Journal of Proteome Research*, 2014, 13(9): 4028–4039.
- [8] Bore E, Langsrud S, Langsrud Ø, Rode TM, Holck A. Acid-shock responses in *Staphylococcus aureus* investigated by global gene expression analysis. *Microbiology*, 2007, 153(7): 2289–2303.
- [9] Pang B, McFaline JL, Burgis NE, Dong M, Taghizadeh K, Sullivan MR, Elmquist CE, Cunningham RP, Dedon PC. Defects in purine nucleotide metabolism lead to substantial incorporation of xanthine and hypoxanthine into DNA and RNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2012, 109(7): 2319–2324.
- [10] Sun YR, Fukamachi T, Saito H, Kobayashi H. ATP requirement for acidic resistance in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 2011, 193(12): 3072–3077.
- [11] Wu RN, Zhang WY, Sun TS, Wu JR, Yue XQ, Meng H, Zhang HP. Proteomic analysis of responses of a new probiotic bacterium *Lactobacillus casei* Zhang to low acid stress. *International Journal of Food Microbiology*, 2011, 147(3): 181–187.
- [12] Veith N, Feldman-Salit A, Cojocaru V, Henrich S, Kummer U, Wade RC. Organism-adapted specificity of the allosteric regulation of pyruvate kinase in lactic acid bacteria. *PLoS Computational Biology*, 2013, 9(7): e1003159.
- [13] Lee K, Lee HG, Pi K, Choi YJ. The effect of low pH on protein expression by the probiotic bacterium *Lactobacillus reuteri*. *Proteomics*, 2008, 8(8): 1624–1630.
- [14] Jones PG, Mitta M, Kim Y, Jiang W, Inouye M. Cold shock induces a major ribosomal-associated protein that unwinds double-stranded RNA in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1996, 93(1): 76–80.
- [15] Paul BJ, Ross W, Gaal T, Gourse RL. rRNA transcription in *Escherichia coli*. *Annual Review of Genetics*, 2004, 38: 749–770.
- [16] Chen W, Zhao SS, Zhang QX. The mechanism of LAB to salt stress. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 2013, 13(10): 1–7. (in Chinese)
陈卫, 赵山山, 张秋香. 乳酸菌的耐盐机制. *中国食品学报*, 2013, 13(10): 1–7.
- [17] Sleator RD, Hill C. Bacterial osmoadaptation: the role of osmolytes in bacterial stress and virulence. *FEMS Microbiology Reviews*, 2002, 26(1): 49–71.

Analysis of salt tolerance of *Lactobacillus plantarum* FS5-5 based on iTRAQ technology

Qianqian Wang, Xuefei Song, Jingjing Guo, Ying Zhang, Rina Wu*

College of Food Sciences, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110866, Liaoning Province, China

Abstract: [Objective] Proteomic analysis of *Lactobacillus plantarum* to salt stress could provide a theoretical basis for salt-tolerant mechanism involved in lactic acid bacteria. [Methods] *Lactobacillus plantarum* FS5-5 was originally isolated from traditional home-made fermented soybean paste from Northeast China. Growth was observed under 0%, 6.0%, 7.0% and 8.0% (W/V) NaCl, and protein expression was analyzed using iTRAQ technology. [Results] We collected bacteria at 5, 10, 12 and 12 h of the mid-logarithmic growth phase for proteomic analysis. Based on iTRAQ results, a total of 1271 differently expressed proteins were identified under different salt stress. They were involved in carbohydrate metabolism, amino acid metabolism, lipid metabolism, nucleotide metabolism, stress proteins, transporters, phosphotransferase system, ribosome, and so on. [Conclusion] The ability of *L. plantarum* FS5-5 to grow in high concentration of NaCl is connected with energy synthesis proteins, stress proteins and compatible solutes transporters.

Keywords: *Lactobacillus plantarum* FS5-5, salt stress, iTRAQ, differential protein expression

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (31471713, 31000805), by the China Postdoctoral Science Foundation Funded Project (2014M560395), by the Cultivation Plan for Youth Agricultural Science and Technology Innovative Talents of Liaoning Province (2014048), by the Program for Liaoning Excellent Talents in University (LR2015059) and by the Jiangsu Province Postdoctoral Science Foundation Funded Project (1402071C)

*Corresponding author. Tel/Fax: +86-24-88487161; E-mail: wrn6956@163.com

Received: 28 December 2016; Revised: 12 March 2017; Published online: 30 March 2017