

doi:10.6041/j.issn.1000-1298.2016.09.033

乳杆菌胞外蛋白提取鉴定与双向电泳图谱建立

赵伟 郭慧媛 任发政 陈尚武

(中国农业大学食品科学与营养工程学院, 北京 100083)

摘要: 采用三氯乙酸(TCA)-丙酮沉淀法提取乳杆菌胞外蛋白并进行了优化,通过 SDS-PAGE 分析了该方法用于 7 株乳杆菌胞外蛋白的提取效果,同时对乳杆菌不同生长期胞外蛋白的分泌特性进行了研究,采用 MALDI-TOF/TOF-MS 鉴定了胞外蛋白,最后通过双向电泳(2-DE)分析了 *L. paracasei* L14 的胞外蛋白组。结果表明:采用终质量分数为 6% 的 TCA 提取乳杆菌胞外蛋白效果最好,并且具有通用性;从乳杆菌稳定期提取出种类较多的胞外蛋白,成功鉴定出 *L. paracasei* SW2 胞外蛋白中 3 个蛋白质;使用半合成培养基培养乳杆菌,可以提取出符合 2-DE 样品纯度要求的胞外蛋白,从 *L. paracasei* L14 胞外蛋白组 2-DE 图谱上检测到 (130 ± 10) 个蛋白质点,约占 *L. paracasei* 预测分泌蛋白组的 46%。

关键词: 乳杆菌; 胞外蛋白; 提取方法; 蛋白质组; 双向电泳图谱

中图分类号: TS252.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-1298(2016)09-0234-07

Extraction and Identification of Extracellular Proteins from Lactobacilli and a Reference Extracellular Proteomic Map of *Lactobacillus paracasei* L14

Zhao Wei Guo Huiyuan Ren Fazheng Chen Shangwu

(College of Food Science and Nutritional Engineering, China Agricultural University, Beijing 100083, China)

Abstract: *Lactobacillus* extracellular proteins are key molecular factors in promoting the probiotic-host crosstalk and signal transduction. Their extractions and identifications could contribute to unravelling the probiotic molecular mechanisms such as adhesion to intestinal surfaces, modulating immune response and enhancing antagonism towards pathogens. A protocol based on trichloroacetic acid (TCA)-acetone precipitation of proteins was presented and optimized. The method was tested on seven *Lactobacillus* strains after sodium dodecyl sulfate - polyacrylamide gel electrophoresis (SDS - PAGE). The extracellular proteins secretion capacity of *L. paracasei* SW2 in different growth phases was studied and some protein bands were selected for identification by tandem MS. The extracellular proteome of *L. paracasei* L14 were analyzed by 2 - D electrophoresis (2 - DE). The results showed that the final concentration of 6% TCA was the most suitable for extracting extracellular proteins from lactobacilli. More extracellular proteins could be extracted in the stationary phase than mid-exponential growth phase. Three of extracellular proteins extracted from *L. paracasei* SW2 were successfully identified. The extracellular samples extracted from semi-defined medium (SDM) could be analyzed by 2 - DE. 130 ± 10 spots, corresponding to about 46% coverage of the predicted secretome of *L. paracasei*, were detected in the 2 - DE map of *L. paracasei* L14 extracellular proteome. In conclusion, this study preliminarily established the extraction method and 2 - DE analysis system of extracellular proteins from lactobacilli and paved the way for a more comprehensive insight into relevant research.

Key words: *Lactobacillus*; extracellular proteins; extraction method; proteome; 2 - D electrophoresis

收稿日期: 2016-03-18 修回日期: 2016-04-11

基金项目: “十二五”国家科技支撑计划项目(2011AA100903)

作者简介: 赵伟(1981—),男,博士生,主要从事乳品科学及加工工程研究,E-mail: wayjow@cau.edu.cn

通信作者: 陈尚武(1958—),男,教授,博士生导师,主要从事乳品科学与代谢工程研究,E-mail: Swchen@cau.edu.cn

引言

乳杆菌(*Lactobacillus*)是一类低G+C含量的革兰氏阳性菌,属于真细菌中梭菌-芽孢杆菌(*Clostridium-Bacillus*)分支中的硬壁菌门(*Firmicutes*)^[1],天然存在于乳制品、肉类、发酵植物食品以及人和动物的口腔、阴道和肠道中^[2],是最为常见的乳酸菌种类之一。乳杆菌传统上作为发酵剂广泛用于食品工业中,具有延长食品保藏期、改善食品风味和质构等功能^[3],随着近年来不断有研究表明乳杆菌具有很多对人体健康有益的生理功能,如今其作为公认的益生菌被广泛研究和开发^[4]。

细菌胞外蛋白是在核糖体合成后可以跨越细胞膜转运到细胞外存在于细胞表面或者释放到胞外基质中的一类蛋白质^[5-6]。乳杆菌胞外蛋白可以直接接触宿主粘膜细胞如上皮细胞和免疫细胞,在粘附肠道表面、诱导免疫调节等益生功能方面发挥重要作用,是菌体与宿主细胞分子交互感应、进行信号传导的重要分子基础^[7-9]。有效提取和鉴定乳杆菌胞外蛋白,将为深入研究乳杆菌粘附宿主细胞、诱导免疫调节、拮抗病原体等益生作用的分子机制奠定重要基础。BOEKHORST等^[10]对*L. plantarum* WCFS1的分泌蛋白组预测研究表明,至少有12个蛋白直接参与粘附宿主细胞成分如胶原蛋白和粘蛋白。SANCHEZ等^[11]研究了*L. plantarum* BMC12胞外蛋白对肠道内常见病原菌的影响,结果表明胞外蛋白可以显著减弱大肠杆菌(*Escherichia coli*)和沙门氏菌(*Salmonella enterica*)对宿主粘膜表层的粘附;SANCHEZ等^[12]进一步研究发现,来源于*L. plantarum*的一种胞外蛋白可以粘附一些糖基化蛋白,如粘蛋白和存在于上皮细胞表面的蛋白。据YAN等^[13]和BAUERL等^[14]的研究,来源于*L. rhamnosus* GG和*L. casei* BL23的表面抗原p40和p75均可以激活肠上皮细胞(IEC)的蛋白激酶Akt和抑制肿瘤坏死因子(TNF)诱导的IEC凋亡,发挥免疫调节作用。为此,有效提取、分离和鉴定出乳杆菌胞外蛋白,将为深入研究乳杆菌益生作用的分子机制奠定重要基础。但是,目前大部分研究都集中在植物乳杆菌细胞蛋白组的研究,如COHEN等^[15]首次建立了*L. plantarum*的细胞质蛋白组图谱并研究了对数期到稳定期蛋白组的变化情况。SIRAGUSA等^[16]研究了*L. plantarum*为适应食品环境的蛋白质组变化。有关乳杆菌胞外蛋白组的研究很少,仅有ZHU等^[17]分析过*L. plantarum* CMCC-P0002的分泌蛋白组,但是分离出的胞外蛋白数量较少。

本文以乳杆菌为研究材料,优化三氯乙酸(TCA)-丙酮法提取乳杆菌胞外蛋白的方法,通过SDS-PAGE分析检验此方法应用于提取乳杆菌胞外蛋白的通用性,对不同生长期提取乳杆菌胞外蛋白的分泌特性进行研究,采用MALDI-TOF/TOF-MS对提取的胞外蛋白进行鉴定,并对鉴定蛋白进行生物信息学分析。进一步采用双向电泳(2-DE)分析*L. paracasei* L14的胞外蛋白组,确定乳杆菌胞外蛋白组2-D PAGE的体系条件并得到其胞外蛋白组图谱。

1 材料与方 法

1.1 试验材料

(1) 菌株来源

副干酪乳杆菌(*Lactobacillus paracasei*) L14、SW2、Z3-11、C,植物乳杆菌(*L. plantarum*) NL42、PC41,发酵乳杆菌(*L. fermentum*) Z2-11,鼠李糖乳杆菌(*L. rhamnosus*) NL24,均由本实验室分离鉴定保藏^[18]。

(2) 培养基

MRS培养基^[19];半合成培养基:以*L. casei*全合成培养基^[20]为基础加入1% MRS培养基,配制后采用0.22 μm微孔膜过滤器(康宁公司)除菌。

(3) 主要试剂

TCA、DTT、CHAPS、IAA,购自Sigma公司;脱氧胆酸钠(DOC)、APS、尿素、丙烯酰胺、甲叉丙烯酰胺、Tris碱、SDS、考马斯亮蓝G-250,购自Amresco公司;牛血清白蛋白(BSA),购自Takara公司;硫脲、IPG胶条、IPG buffer、Drystrip覆盖液、蛋白酶抑制剂cocktail,购自GE Healthcare公司;其他常规生化试剂为国产分析纯。

(4) 主要仪器与设备

CJ-20型超净工作台,天津市泰斯特仪器有限公司;TGL-20M型低温离心机,长沙平凡仪器仪表有限公司;1-14型台式高速离心机,德国Sigma公司;Sorvall LYNX 4000型高速落地离心机,美国Thermo Scientific公司;Infinite 200 PRO型多功能酶标仪,瑞士Tecan公司;DHP-9082型电热恒温培养箱,上海精宏实验设备有限公司;UV/VIS 2802PC型紫外分光光度计,美国UNICO公司;DYY-6C型电泳仪,北京市六一仪器厂;UF/NVPL5124型超纯水系统,美国Pall公司;Ettan IPGphorII型等电聚焦仪,Ettan DALTsix型垂直电泳仪、Image Scanner II型凝胶扫描仪,GE Healthcare公司。

1.2 方 法

(1) 菌种活化与培养条件:按照1%接种量将

保藏菌种接种至新鲜 MRS 液体培养基中活化,37℃ 静置培养,至对数生长后期转接菌种扩大培养。

(2) TCA-丙酮沉淀法提取胞外蛋白:参照 SANCHEZ 等^[11,21]的方法,改进如下:将活化菌种接种至 50 mL MRS 培养液于 37℃ 静置培养至对数生长中期或稳定期,3 500 g 离心 10 min 收集上清液,0.22 μm 微孔膜过滤上清液,加入百分之一体积质量分数为 2% DOC 混合均匀后于 4℃ 静置 30 min,边搅拌边加入终质量分数为 6%、10% 和 15% 的 TCA 于 4℃ 沉淀蛋白 4 h,13 000 g 离心悬浊液 15 min 收集沉淀,用 4 倍体积冰丙酮(-20℃ 保存)充分洗涤沉淀 3 次(用超声波清洗器助洗),13 000 g 离心 15 min 收集沉淀后室温下自然风干丙酮,将蛋白样品保存在-80℃ 冰箱中备用。2-DE 样品通过接种至 1 000 mL 半合成培养基提取胞外蛋白,其他步骤同上。

(3) 乳杆菌胞外蛋白的 SDS-PAGE:将上述制得样品充分溶解于 100 μL 1 × Laemmli buffer^[22] 中。电泳上样前将样品 15 000 g 离心 10 min,收集上清。在 12% 分离胶中进行 SDS-PAGE,上样量 20 μL。

(4) 蛋白质鉴定:将 SDS-PAGE 电泳条带脱色后,手工切取蛋白条带,按照 ROSENFELD 等^[23]的方法进行胶内酶解,按照 LIHONG 等^[24]的方法采用 MALDI-TOF/TOF-MS 进行蛋白质鉴定,将得到的肽段指纹图谱用 MASCOT 软件在 NCBI 数据库中检索。

(5) 蛋白质数据生物信息学分析:利用 UniProtKB 数据库对鉴定蛋白进行序列比对和功能注释。利用在线分析软件 PSORTb version 3.0.2 (<http://www.psort.org/psortb/index.html>) 对鉴定蛋白进行亚细胞定位预测。参照 PETERSEN 等^[25]的方法,通过在线预测工具 SignalP 4.1 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP>) 预测是否含有蛋白质分泌信号肽。

(6) 乳杆菌胞外蛋白的双向聚丙烯酰胺凝胶电泳(2-DE)体系建立:将前述 TCA-丙酮沉淀法制得的蛋白样品溶于 150 μL 样品制备溶液(7 mol/L 尿素,2 mol/L 硫脲,4% CHAPS,2% IPG Buffer pH 4~7,40 mmol/L DTT 和蛋白酶抑制剂 Cocktail),超声波助溶后,15 000 g 离心 15 min 取上清液,采用 Bradford 法^[26]测定蛋白质含量。2-DE 实验参照 GORG 等^[27]的方法优化改进,详细过程如下:取 600 μg 蛋白质样品用再水化液(7 mol/L 尿素,2 mol/L 硫脲,2% CHAPS,0.5% IPG Buffer pH 值 4~7,20 mM DTT 和 0.002% 考马斯亮蓝)稀释至

450 μL,充分混匀后加入水化盘,使用 IPG 胶条(24 cm,pH 值 4~7,GE Healthcare)覆盖到再水化液上水化过夜;水化完成后将 IPG 胶条转移至 Ettan IPGphorII 进行第一向等电聚焦电泳,电泳程序设定为:总聚焦 97 kV·h,温度 20℃,最大电流 50 μA;等电聚焦结束后,参照 GORG 等^[28]的方法将 IPG 胶条放入平衡管进行平衡;采用 Ettan DALT six 进行第二向 SDS-PAGE,连续凝胶质量分数为 12%,电泳程序设定为:温度 25℃,初始功率为 2 W/胶条,胶条中的蛋白质样品迁移至 SDS-PAGE 连续凝胶中后功率转换为 17 W/胶条,直至溴酚蓝条带前沿接近凝胶底端时停止电泳;采用 Blue silver 染色法^[29]对 2-DE 胶进行染色和脱色。

(7) 2-DE 图谱分析:用 Image Scanner III 扫描仪扫描脱色后的凝胶块,采用透射模式,分辨率 300 dpi,以 ImageMaster 和 TIFF 格式输出文件。采用 ImageMaster 2D Platinum 7.0 (GE Healthcare) 分析 2-DE 凝胶成像图,对胶上的蛋白点识别并进行相对丰度分析。

2 结果与分析

2.1 不同质量分数 TCA 提取乳杆菌胞外蛋白结果

分别采用终质量分数为 6%、10% 和 15% 的 TCA 对 2 株乳杆菌菌株 SW2 和 Z3-11 提取胞外蛋白,通过 SDS-PAGE 分析蛋白样品,结果如图 1 所示。图中 1 为菌株 SW2 全细胞蛋白;2 为菌株 SW2 胞外蛋白;3 为菌株 Z3-11 全细胞蛋白;4 为菌株 Z3-11 胞外蛋白;M 为蛋白质相对分子量 Marker。由 15% TCA 提取的胞外蛋白条带(见图 1c)颜色最深,表明沉淀蛋白含量最高,但是条带背景较深,难以明显辨别蛋白条带数量,这是由于 MRS 培养基本身成分复杂,含有多种有机提取物成分,会影响 TCA 沉淀蛋白效果,高浓度的 TCA 沉淀出了更多的 MRS 培养基中的杂质导致。由 6% 和 10% TCA 质量分数提取出的胞外蛋白(分别见图 1a 和 1b)通过 SDS-PAGE 均可见清晰的蛋白条带,但是 10% TCA 提取的胞外蛋白 SDS-PAGE 图谱仍有部分区域背景较深,蛋白条带难以区分。6% TCA 提取胞外蛋白所有条带均清晰可见,背景干净,易于后续鉴定及分析,而且相较 10% TCA 提取的蛋白条带数量并未减少,而是有更多颜色较浅的蛋白条带得以分离。因此,确定后续实验采用终质量分数为 6% 的 TCA 提取乳杆菌胞外蛋白。

为了检验采用终质量分数为 6% 的 TCA 提取乳杆菌胞外蛋白是否具有通用性,采用此方法对本实验室保藏的 7 株乳杆菌菌株的胞外蛋白进行提取实

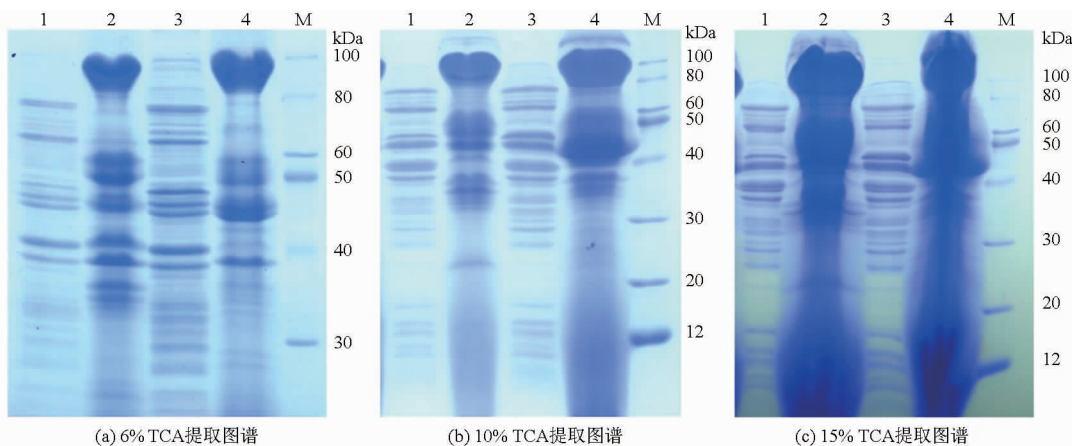


图1 3种不同质量分数TCA提取乳杆菌胞外蛋白SDS-PAGE图谱对比

Fig.1 Representative SDS-PAGE gels showing *Lactobacillus* extracellular proteins extracted with three TCA concentrations

验,通过SDS-PAGE分析蛋白样品,结果如图2所示。图中0为MRS培养基提取物;1为菌株Z2-11;2为菌株C;3为菌株PC41;4为菌株NL42;5为菌株NL24;6为菌株Z3-11;7为菌株SW2;M为蛋白质相对分子量Marker。由图可见,仅有4号菌株NL42蛋白样品条带模糊,难以明显区分蛋白条带,这可能与其胞外蛋白组成有一定特异性有关,一种或几种分子量较为接近的胞外蛋白含量较高,或者是胞外蛋白发生了化学修饰,又同时或因蛋白质浓度过高而导致在SDS-PAGE图谱上高分子量区域连成一片,而不是单独的蛋白条带。另外6株菌株均可分离得到清晰可见的蛋白条带。因此,采用6% TCA-丙酮沉淀法可以作为提取乳杆菌胞外蛋白的有效方法,但是为了得到最佳的提取效果,可以此方法为基础结合特定乳杆菌菌株及其胞外蛋白特性作适当调整。

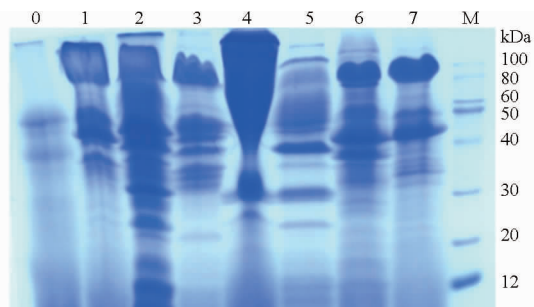
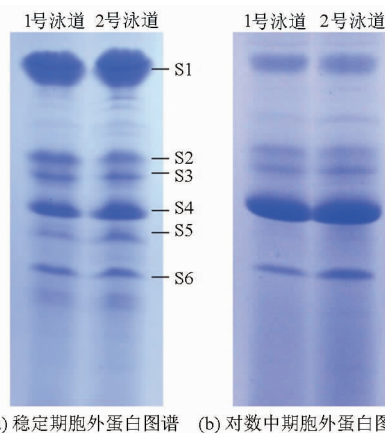


图2 7株乳杆菌胞外蛋白SDS-PAGE图谱
Fig.2 Representative SDS-PAGE gel showing extracellular proteins of seven *Lactobacillus* stains

2.2 不同生长期提取乳杆菌胞外蛋白结果

为了研究不同生长期乳杆菌分泌胞外蛋白生理特性,对 *L. paracasei* SW2 在对数生长中期 ($OD_{600\text{nm}}$ 约为 0.8) 和稳定期 ($OD_{600\text{nm}}$ 约为 1.8) 的 MRS 培养液中胞外蛋白分别进行了提取,通过 SDS-PAGE 分析蛋白样品,结果如图3所示,图中1号泳道培养基初始 pH 值为 5.5;2号泳

道培养基初始 pH 值为 6.8。由图可知,从稳定期(图3a)培养液中提取的胞外蛋白样品通过 SDS-PAGE 分离出约 14 条蛋白条带,而对数生长中期(图3b)仅分离出约 8 条蛋白条带,表明乳杆菌在对数期还没有将全部胞外蛋白分泌到胞外,从对数期到稳定期胞外蛋白在持续分泌。而稳定后期至衰亡期,微生物细胞逐渐老化并出现自溶现象,会将胞内蛋白释放到培养液中,干扰胞外蛋白的提取。因此,为了能提取出更多种类的乳杆菌胞外蛋白,稳定期为提取的最佳生长时期。另外,经对 *L. paracasei* SW2 生长在不同初始 pH 值的培养液中的胞外蛋白进行提取,SDS-PAGE 分析蛋白样品,发现无论是在稳定期还是对数生长中期,初始 pH 值分别为 5.5 (见图3中1号泳道)和 6.8 (见图3中2号泳道)的培养液中提取的胞外蛋白条带并无明显差异。这可能是由于乳杆菌本身代谢产酸,对较低浓度的酸环境有较好的耐受性,并未影响到其蛋白分泌生理功能所致。



(a) 稳定期胞外蛋白图谱 (b) 对数中期胞外蛋白图谱

图3 副干酪乳杆菌菌株 SW2 不同生长期提取胞外蛋白 SDS-PAGE 图谱

Fig.3 Representative SDS-PAGE gels showing extracellular proteins of the *L. paracasei* strain SW2 in different growth phases

2.3 蛋白质谱鉴定及生物信息学分析结果

采用 MALDI-TOF/TOF-MS 对 *L. paracasei* SW2 稳定期提取的胞外蛋白进行鉴定,选取图 3a 中较为清晰的 6 条蛋白条带(S1~S6)进行鉴定,成功鉴定出 3 个蛋白质(见表 1),通过 NCBI 数据库搜索 3 个蛋白质的基本生物信息表明:3 个蛋白质的基因注释均来源于副干酪乳杆菌菌株,与本实验菌株是相同种属;其中,条带 S1 和 S6 均为细胞壁水解酶,为常见乳杆菌胞外蛋白,主要功能为分解培养基营养成分供给菌体^[10];条带 S5 为表面抗原,与

*L. rhamnosus*GG 表面抗原 p40 具有 86% 同源性。通过 PSORTb 分析鉴定蛋白的亚细胞定位表明:条带 S1 和 S5 均为胞外蛋白,条带 S6 未知。进一步通过 SignalP 分析鉴定蛋白序列是否含有蛋白质分泌信号肽,结果表明:条带 S1 和 S5 均具有信号肽,并预测出 S1 的信号肽剪切位点在 32 和 33 位之间,S1 的信号肽剪切位点在 28 与 29 位之间;S6 蛋白序列没有信号肽,经分析,S6 蛋白分子较小,可能是通过非典型的分泌途径转运到胞外。由此可以验证,本实验方法提取的确为乳杆菌胞外蛋白。

表 1 *L. paracasei* SW2 胞外蛋白质谱鉴定结果

Tab. 1 Identification of extracellular proteins of *L. paracasei* SW2

| 条带编号 ^a | 蛋白名称 ^b | 来源 ^c | 登录号 ^d | 分子量 ^e | pI ^f | 得分 ^g | PSORTb ^h | SignalP ⁱ |
|-------------------|--------------------------------|--------------------------------|------------------|------------------|-----------------|-----------------|---------------------|----------------------|
| S1 | cell wall-associated hydrolase | <i>L. paracasei</i> ATCC 25302 | gi1227533092 | 49804.5 | 4.99 | 132 | Extracellular | 有 |
| S5 | surface antigen | <i>L. paracasei</i> ATCC 334 | gi116493594 | 40777.4 | 6.97 | 96 | Extracellular | 有 |
| S6 | cell wall-associated hydrolase | <i>L. paracasei</i> ATCC 334 | gi116493820 | 23013.3 | 4.86 | 202 | Unknown | 无 |

注:a,条带编号对应图 3 中的蛋白质条带编号;b、c、d、e、f 依次为 NCBI 数据库中检索得到的蛋白质名称、物种来源、登录号、分子量、等电点;g 为基于质谱峰图利用 MASCOT 软件搜索得到的蛋白质得分;h 为通过 PSORTb 分析得到的蛋白质亚细胞定位;i 为通过 SignalP 分析是否含有蛋白分泌信号肽。

另外 3 条条带未鉴定出结果,可能是由于数据库中未搜索到与其相匹配的同源序列,还有可能是受限于 SDS-PAGE 分离蛋白的分辨率,一条蛋白条带可能混杂有 1 种以上蛋白质,而质谱只能鉴定单一组分蛋白质,不能鉴定蛋白混合物而导致难以得出确切结果。因此,为了能够更为全面、深入地研究乳杆菌胞外蛋白信息,有必要对其进行 2-DE 分析。

2.4 乳杆菌胞外蛋白含量测定结果

采用 Bradford 法测定培养于半合成培养基的 *L. paracasei* 菌株 L14 胞外蛋白含量,以 BSA 为蛋白标准品制作标准曲线见图 4,得到回归方程: $y = 0.018x + 0.014$, $R^2 = 0.988$ 。将提取的胞外蛋白样品作适当稀释,使其 595 nm 吸光度落在标准曲线线性范围内。根据回归方程,将所检测样品的吸光度换算得到菌株 L14 胞外蛋白含量为 0.896 g/L。可见,相较芽孢杆菌 (*Bacillus*) 蛋白分泌量(大于等于 20 g/L)^[30],乳杆菌蛋白分泌能力处于较低水平。

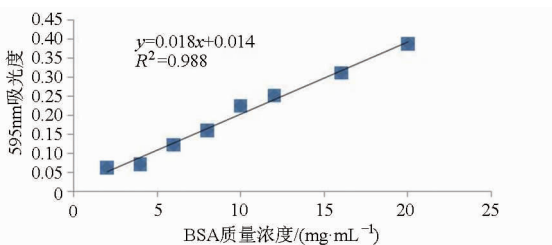


图 4 蛋白含量测定标准曲线

Fig. 4 Standard curve of protein quantitation

2.5 乳杆菌胞外蛋白 2-DE 结果

鉴于乳杆菌蛋白分泌能力不足,培养液中胞外蛋白浓度较低,为了能够提取足够的蛋白量以达到 2-DE 对样品上样量的要求,本实验首先将 *L. paracasei* 菌株 L14 培养于 1 000 mL MRS 培养液中提取胞外蛋白。但是,采用 TCA-丙酮沉淀法在大体量 MRS 培养液中提取胞外蛋白时,同时将培养液中含有的多肽、有机提取物以及色素等复杂组分大量沉淀下来,严重降低了胞外蛋白纯度,导致提取的蛋白样品纯度难以达到 2-DE 对样品纯度的要求,不能顺利进行等电聚焦。

参考 SAVIJOKI 等^[31]的研究,结合乳杆菌自身的营养需求特点,将 *L. paracasei* L14 培养于含有 1% MRS 的半合成培养基中,结果表明:菌株 L14 在

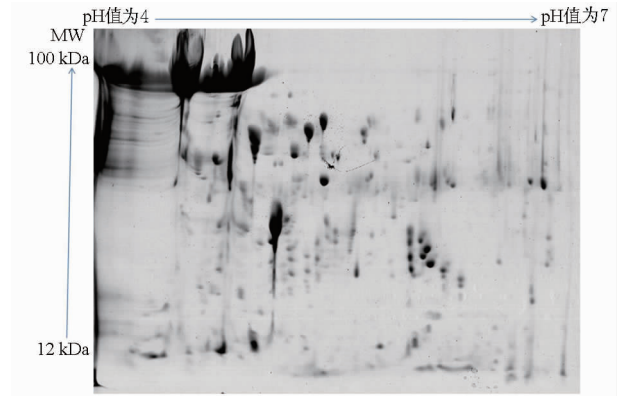


图 5 *L. paracasei* L14 胞外蛋白组 2-DE 图谱

Fig. 5 Representative 2-DE image showing extracellular proteome of *L. paracasei* L14

半合成培养基中生长良好,从中提取的胞外蛋白样品纯度可以达到 2-DE 要求,L14 胞外蛋白组 2-DE 图谱见图 5。经过软件分析,检测到图谱中有 (130 ± 10) 个蛋白质点。考虑到部分蛋白质分子会进行翻译后改造,引起蛋白质周转 (Protein turnover)^[32] 而导致蛋白质的分子量和等电点发生改变,2-DE 胶上部分不同的蛋白点可能会属于同一种蛋白质。参考 GILAD 等^[33] 对 *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12 胞外蛋白组的 2-DE 分析,鉴定成功的 96 个蛋白点可归为 76 种蛋白质,推算本实验检测到蛋白点约为 100 种蛋白质。根据 ZHOU 等^[34] 的研究,通过比较基因组学预测 *L. paracasei* ATCC 334 分泌蛋白组共有 219 个蛋白质。经计算,本实验检测到的蛋白质约占 *L. paracasei* 所有分泌蛋白的 46%。另外,相较 ZHU 等^[17] 通过 2-DE 分析 *L. plantarum* CMCC-P0002 的分泌蛋白仅检测到 28 个蛋白质点,本研究所检测到的蛋白数量为其 4 倍之多。这可能是由于提取方法不同导致,ZHU 等单独采用冰丙酮沉淀分泌蛋白,虽然提取样品不受 TCA 沉淀 MRS 中杂质的干扰,但是蛋白沉淀效率下降,同时由于乳杆菌本身蛋白分泌水平较低,可能导致很多低丰度的分泌蛋白难以通过 2-DE 检测到。由上可见,本研究采用 TCA-丙酮沉淀法在半合成培养液中提取乳杆菌胞外蛋白用于 2-DE 分析,效果更好,比较理想。

通过软件对 2-DE 图谱上蛋白点进行了丰度

分析,发现位于 pH 值 4~5 与分子量 80~100 kDa 之间区域存在有丰度极高的蛋白片,其相对丰度占到整个图谱所有蛋白点的 62%。可见,*L. paracasei* L14 胞外蛋白中含有显著的高丰度蛋白,这些高丰度蛋白的存在会严重干扰低丰度蛋白检测。因此,在以后的研究中,可以采用分子筛先去除这些大分子量的高丰度蛋白再进行 2-DE 分析,将有助于更好地检测、鉴定其他蛋白。

3 结束语

TCA-丙酮沉淀法是提取乳杆菌胞外蛋白的有效方法,采用终质量分数为 6% 的 TCA 提取效果最为理想,可以作为提取乳杆菌胞外蛋白的基本方法。从稳定期提取出的乳杆菌胞外蛋白种类更为丰富,是提取乳杆菌胞外蛋白的最佳生长期。通过鉴定胞外蛋白表明:水解酶和表面抗原为乳杆菌常见胞外蛋白。乳杆菌蛋白分泌能力较弱,胞外蛋白分泌量不足 1 g/L。将乳杆菌培养于半合成培养基中,生长良好且可以提取出符合 2-DE 样品要求的胞外蛋白,通过乳杆菌胞外蛋白组 2-DE 图谱分析,所检出胞外蛋白数量约占预测分泌蛋白数量的近一半,大大提高了乳杆菌胞外蛋白的实验检出率。本文初步建立了乳杆菌胞外蛋白的提取、分离及 2-DE 分析体系,为深入开展乳杆菌胞外蛋白相关研究奠定了基础。

参 考 文 献

- POT B, LUDWIG W, KERSTERS K, et al. Taxonomy of lactic acid bacteria [M]//VUYST L D, VANDAMME E J. Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria: Microbiology, Genetics and Applications. Boston, MA; Springer US, 1994: 13-90.
- VAUGHAN E E, DE VRIES M C, ZOETENDAL E G, et al. The intestinal LABs [J]. *Antonie van Leeuwenhoek*, 2002, 82(1-4): 341-352.
- LINDGREN S E, DOBROGOSZ W J. Antagonistic activities of lactic-acid bacteria in food and feed fermentations [J]. *FEMS Microbiology Letters*, 1990, 87(1-2): 149-163.
- NAGPAL R, KUMAR A, KUMAR M, et al. Probiotics, their health benefits and applications for developing healthier foods; a review [J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2012, 334(1): 1-15.
- SCHNEEWIND O, MISSIAKAS D M. Protein secretion and surface display in gram-positive bacteria [J]. *Philosophical Transactions of the Royal Society B-Biological Sciences*, 2012, 367(1592): 1123-1139.
- SANCHEZ B, BRESSOLLIER P, URDACI M C. Exported proteins in probiotic bacteria: adhesion to intestinal surfaces, host immunomodulation and molecular cross-talking with the host [J]. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 2008, 54(1): 1-17.
- SICILIANO R A, MAZZEO M F. Molecular mechanisms of probiotic action: a proteomic perspective [J]. *Current Opinion in Microbiology*, 2012, 15(3): 390-396.
- KLEEREBEZEMM, HOLS P, BERNARD E, et al. The extracellular biology of the lactobacilli [J]. *FEMS Microbiology Reviews*, 2010, 34(2): 199-230.
- RUIZ L, HEVIA A, BERNARDO D, et al. Extracellular molecular effectors mediating probiotic attributes [J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2014, 359(1): 1-11.
- BOEKHORST J, WELS M, KLEEREBEZEM M, et al. The predicted secretome of *Lactobacillus plantarum* WCFS1 sheds light on interactions with its environment [J]. *Microbiology*, 2006, 152(11): 3175-3183.
- SANCHEZ B, URDACI M C. Extracellular proteins from *Lactobacillus plantarum* BMC12 prevent adhesion of enteropathogens to

- mucin [J]. *Current Microbiology*, 2012, 64(6): 592 – 596.
- 12 SANCHEZ B, GONZALEZ-TEJEDO C, RUAS-MADIEDO P, et al. *Lactobacillus plantarum* extracellular chitin-binding protein and its role in the interaction between chitin, Caco-2 Cells, and Mucin [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2011, 77(3): 1123 – 1126.
- 13 YAN F, CAO H W, COVER T L, et al. Soluble proteins produced by probiotic bacteria regulate intestinal epithelial cell survival and growth [J]. *Gastroenterology*, 2007, 132(2): 562 – 575.
- 14 BAUERL C, PEREZ-MARTINEZ G, YAN F, et al. Functional analysis of the p40 and p75 proteins from *Lactobacillus casei* BL23 [J]. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 2010, 19(4): 231 – 241.
- 15 COHEN D P A, RENES J, BOUWMAN F G, et al. Proteomic analysis of log to stationary growth phase *Lactobacillus plantarum* cells and a 2-DE database [J]. *Proteomics*, 2006, 6(24): 6485 – 6493.
- 16 SIRAGUSA S, DE ANGELIS M, CALASSO M, et al. Fermentation and proteome profiles of *Lactobacillus plantarum* strains during growth under food-like conditions [J]. *Journal of Proteomics*, 2014, 96:366 – 380.
- 17 ZHU L, HU W, LIU D, et al. A reference proteomic database of *Lactobacillus plantarum* CMCC – P0002 [J]. *PLOS ONE*, 2011, 6(10): e25596.
- 18 冯秀娟, 左芳雷, 陈丽丽, 等. 乳酸菌耐酸耐胆盐分析与胆盐水解酶研究 [J]. *中国食品学报*, 2013, 13(11): 139 – 147.
FENG Xiujuan, ZUO Fanglei, CHEN Lili, et al. Analysis of acid and bile salt tolerance and study on bile salt hydrolase in lactic acid bacteria [J]. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 2013, 13(11): 139 – 147. (in Chinese)
- 19 DE MAN J C, ROGOSA M, SHARPE M E. A medium for the cultivation of lactobacilli [J]. *Journal of Applied Bacteriology*, 1960, 23(1): 130 – 135.
- 20 MORISHITA T, FUKADA T, SHIROTA M, et al. Genetic basis of nutritional requirements in *Lactobacillus casei* [J]. *Journal of Bacteriology*, 1974, 120(3): 1078 – 1084.
- 21 SANCHEZ B, CHAIGNEPAIN S, SCHMITTER J M, et al. A method for the identification of proteins secreted by lactic acid bacteria grown in complex media [J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2009, 295(2): 226 – 229.
- 22 LAEMMLI U K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 [J]. *Nature*, 1970, 227(5259):680 – 685.
- 23 ROSENFELD J, CAPDEVIELLE J, GUILLEMOT J C, et al. In-gel digestion of proteins for internal sequence-analysis after one or two-dimensional gelelectrophoresis [J]. *Analytical Biochemistry*, 1992, 203(1): 173 – 179.
- 24 LIHONG H, LINLIN G, YIPING G, et al. Proteomics approaches for identification of tumor relevant protein targets in pulmonary squamous cell carcinoma by 2D-DIGE-MS [J]. *PLOS ONE*, 2014, 9(4): e95121.
- 25 PETERSEN T N, BRUNAK S, VON HEIJNE G, et al. SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions [J]. *Nature Methods*, 2011, 8(10): 785 – 786.
- 26 BRADFORD M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding [J]. *Analytical Biochemistry*, 1976, 72(1 – 2): 248 – 254.
- 27 GORG A, WEISS W, DUNN M J. Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics [J]. *Proteomics*, 2004, 4(12): 3665 – 3685.
- 28 GORG A, POSTEL W, GUNTHER S. The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients [J]. *Electrophoresis*, 1988, 9(9): 531 – 546.
- 29 CANDIANO G, BRUSCHI M, MUSANTE L, et al. Blue silver: a very sensitive colloidal Coomassie G – 250 staining for proteome analysis [J]. *Electrophoresis*, 2004, 25(9): 1327 – 1333.
- 30 HARWOOD C R, CRANENBURGH R. *Bacillus* protein secretion: an unfolding story [J]. *Trends in Microbiology*, 2008, 16(2):73 – 79.
- 31 SAVIJOKI K, SUOKKO A, PALVA A, et al. Effect of heat-shock and bile salts on protein synthesis of *Bifidobacterium longum* revealed by [35S]methionine labelling and two-dimensional gel electrophoresis [J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2005, 248(2): 207 – 215.
- 32 YUAN J, ZHU L, LIU X K, et al. A proteome reference map and proteomic analysis of *Bifidobacterium longum* NCC2705 [J]. *Mol Cell Proteomics*, 2006, 5(6): 1105 – 1118.
- 33 GILAD O, SVENSSON B, VIBORG A H, et al. The extracellular proteome of *Bifidobacterium animalis* subsp. lactis BB – 12 reveals proteins with putative roles in probiotic effects [J]. *Proteomics*, 2011, 11(12): 2503 – 2514.
- 34 ZHOU M, THEUNISSEN D, WELS M, et al. LAB-Secretome: a genome-scale comparative analysis of the predicted extracellular and surface-associated proteins of lactic acid bacteria [J]. *BMC Genomics*, 2010, 11:651.