

## LiaX 家族表面蛋白 LPL9\_0968 在副干酪乳杆菌 L9 胆盐胁迫 应激中的作用

王艳美, 刘永乐, 邓凯, 玛依热·奥斯曼, 马夏吟\*  
(长沙理工大学食品与生物工程学院 长沙 410114)

**摘要** 副干酪乳杆菌 L9 中假定表面蛋白 LPL9\_0968 在胆盐胁迫下转录水平上调 9.67 倍。经生物信息学分析发现, LPL9\_0968 属于 LiaX 家族的表面蛋白, 与粪肠球菌中 LiaX 蛋白序列相似度高达 61.96%, 且该家族蛋白中存在多个天冬酰胺-甘氨酸(NG)保守位点。本试验构建的 LPL9\_0968 所在操纵子基因插入失活突变体, 在 0.075% 混合牛胆盐胁迫下突变体胆盐耐受能力下降 10 倍, 表明该 LiaX 家族蛋白参与 L9 胆盐胁迫抗性机制。在单一组分胆盐胁迫中突变菌株表现出对甘氨酸脱氧胆盐较强的敏感性, 在 3.0% 牛磺酸胆盐、0.4% 牛磺酸脱氧胆盐、2.0% 甘氨酸胆盐、0.075% 甘氨酸脱氧胆盐胁迫下, 存活率分别降低了 1.95、2.85、2.05 倍和 8.21 倍。Zeta 电位试验和扫描电镜结果表明突变株在胆盐胁迫下细胞膜电位增大, 并出现更为严重的萎缩现象, 而分子对接表明该表面蛋白与胆盐不同组分均存在相互作用, LPL9\_0968 很可能通过感受胆盐信号分子, 调控细胞膜表面蛋白, 维持细胞膜的稳定性, 从而提高菌株胆盐抗性。本试验首次探究乳酸菌中 LiaX 家族表面蛋白的功能, 证明了其在菌株胆盐胁迫抗性中的重要性, 为其抗胆盐机制的深入研究打下理论基础。

**关键词** LiaX 家族表面蛋白; 乳酸菌; 胆盐胁迫; 细胞膜表面稳定性

**文章编号** 1009-7848(2022)12-0104-12 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2022.12.011

副干酪乳杆菌属于干酪乳杆菌群, 是一种在人类和动物肠道内常见的革兰氏阳性益生菌, 被广泛用于乳制品发酵中, 在干酪发酵过程中对风味的形成起关键性作用<sup>[1]</sup>。此外, 副干酪乳杆菌具有增强人体免疫力, 维持肠道微生态平衡等诸多益生特性<sup>[2]</sup>。然而, 益生乳酸菌在进入人体消化道后会遇到各种各样的环境胁迫, 如胃酸、胰消化酶及肠道中的胆盐等<sup>[3]</sup>, 此时益生菌存活率显著降低。副干酪乳杆菌随发酵食品进入人体内并最终定植于肠道系统, 能否耐受一定程度的胆盐胁迫是其发挥益生作用的关键。

胆盐是胆酸形成的不同钠盐或钾盐的混合物, 首先由胆固醇经过一系列反应形成初级胆盐, 后转化为次级胆盐, 最后次级胆盐与甘氨酸或牛磺酸形成结合型胆盐, 人体中甘氨酸结合型胆盐与牛磺酸结合型胆盐的比例约为 3:1<sup>[4]</sup>。结合型胆盐比游离型胆盐的溶解度更高, 两性性更强, 是胆

汁中发挥功能的主要成分。胆盐作为一种具有较强抗菌活性的物质, 可通过破坏微生物细胞膜, 诱导胞内蛋白质错误折叠及引发 DNA 损伤等途径发挥抑菌作用<sup>[5-7]</sup>, 而细胞膜是胆盐攻击细菌的首要靶点, 低浓度胆盐会影响细胞膜上蛋白和酶的活性<sup>[8]</sup>, 同时还会改变菌体的表面性质, 如疏水性和表面电位<sup>[9-10]</sup>; 而高浓度的胆盐会直接溶解微生物细胞膜, 致细胞破裂菌体死亡<sup>[11]</sup>。肠道益生菌在长期胆盐胁迫环境下形成一系列复杂的细胞表面蛋白抗性机制: 一些膜转运蛋白能够将胞内胆盐转运到胞外, 减轻其对菌体的毒性<sup>[12-13]</sup>; 另有一些膜蛋白, 如唾液乳杆菌 OppA 蛋白、艰难梭菌跨膜蛋白激酶 PrkC、丙二酸杆菌 tolC 编码蛋白具有维持细胞膜结构, 减少胆盐进入, 提高细菌耐受能力的功能<sup>[14-16]</sup>。此外, 一些膜蛋白还具有感受胆盐胁迫, 调控胞内胆盐应激机制的功能, 如双歧杆菌中 SenX3-RegX3 双组分调控系统<sup>[17]</sup>。目前大部分关于胆盐胁迫下表面蛋白的研究仅限于组学推测阶段<sup>[18-19]</sup>, 且乳酸菌抵抗胆盐的机制存在菌株特异性, 例如: 在胆盐应激下, 唾液乳杆菌 (*Lacticas-eibacillus salivarius*) FWXBH36M1 中 *LSL\_1568*、*LSL\_1716* 和 *LSL\_1709* 的相对表达与 *LSL\_0951* 相比有显著变化, 这些功能基因在唾液乳杆菌

收稿日期: 2022-06-22

基金项目: 国家自然科学基金青年科学基金项目(32101914);  
湖南省教育厅一般项目(20C0062)

第一作者: 王艳美, 女, 硕士生,

通信作者: 马夏吟 E-mail: 1137977621@qq.com

FJLHD9M1 中的相对表达水平呈相反趋势, 其中 LSL\_0951 表现出比其它基因更高的表达水平<sup>[20]</sup>。探究乳酸菌表面蛋白在胆盐胁迫下的抗性机制, 对于推动乳酸菌肠道适应机制研究具有十分重要的作用。

副干酪乳杆菌 (*Lactocaseibacillus paracasei*) L9 (CGMCC No. 9800) 分离自广西巴马长寿老人肠道<sup>[21]</sup>, 具有维持肠道菌群平衡, 调节免疫系统, 缓解过敏症状等益生作用<sup>[22-23]</sup>。在前期胆盐胁迫研究中, 副干酪乳杆菌 L9 中假定表面蛋白 LPL9\_0968 所在操纵子基因均显著上调 (9.67~23.75 倍), 为所有差异表达基因中上调倍数最高<sup>[24]</sup>。本试验通过生物信息学分析发现, LPL9\_0968 编码一个属于 LiaX 家族的表面蛋白, 目前该家族蛋白仅在粪肠球菌的达托霉素抗性机制中有表述, 研究显示这种表面蛋白可与抗生素结合, 通过调控胞内 LiaFSR 系统引起细胞膜结构变化, 从而提升粪肠球菌的耐药性<sup>[25-26]</sup>。本文通过构建突变体及胆盐胁迫试验, 验证 LPL9\_0968 蛋白在 L9 胆盐胁迫抗性机制中的重要作用, 探究失去该表面蛋白后, 突变菌株对 4 种组分胆盐的敏感性, 以及细胞膜表面产生的电位、形态变化, 通过生物信息学分析及模拟分子对接佐证该表面蛋白与胆盐组分之间结合方式及作用位点。本文首次探究了 LiaX 家族的表面蛋白在乳酸菌中的功能, 对乳酸菌胆盐胁迫机制的研究提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料、试剂与仪器

MRS (Man-Rogosa-Sharpe) 培养基、LB (Luria-Bertani) 培养基, 广东环凯生物科技有限公司; 红霉素、氨苄西林、FastPure<sup>®</sup> bacterium DNA 试剂盒、FastPure<sup>®</sup> EndoFree Plasmid 试剂盒、T4 DNA 连接试剂盒, 南京诺唯赞生物科技股份有限公司; 混合牛胆盐, 上海麦克林生化科技有限公司; 牛磺酸胆盐、牛磺酸脱氧胆盐、甘氨酸胆盐、甘氨酸脱氧胆盐, 美国 Sigma 公司; *E. coli* DH5 $\alpha$ , 北京擎科生物科技有限公司; 限制性内切酶, 赛默飞世尔科技公司。

电穿孔仪, 美国 BIO-RAD; 纳米粒度分析仪, NanoBrook 90plus, 美国 Bookhaven; 场发射扫描电子显微镜 (SU8220), 日本 JEOL。

### 1.2 菌株和载体

本研究用菌株和质粒列于表 1 中。将副干酪乳杆菌 L9 在 MRS 培养基中 37 °C 厌氧培养, 大肠杆菌 DH5 $\alpha$  在 LB 培养基中 37 °C、200 r/min 振荡培养。在培养基中添加 10  $\mu$ g/mL 红霉素用于筛选副干酪乳杆菌 L9 突变株, 添加 100  $\mu$ g/mL 氨苄西林用于大肠杆菌 DH5 $\alpha$  重组菌株筛选。加入不同浓度的牛混合胆盐 (Ox-bile) 和单一组分胆盐——牛磺酸胆盐 (TCA)、牛磺酸脱氧胆盐 (TDCA)、甘氨酸胆盐 (GCA)、甘氨酸脱氧胆盐 (GDCA)。

表 1 本试验所用菌株和质粒

Table 1 Strains and plasmids used in this study

菌株和质粒	特性	来源或引用文献
菌株		
副干酪乳杆菌 L9	宿主菌株	[22]
<i>E.coli</i> DH5 $\alpha$	大肠杆菌感受态	擎科生物
LPL9_0968 <sup>-</sup>	副干酪乳杆菌 L9 的 <i>LPL9_0968</i> 基因失活	本次试验构建
LPL9_melA <sup>-</sup>	副干酪乳杆菌的 L9 的 <i>LPL9_melA</i> 基因失活	[24]
质粒		
pUC19EM	自杀载体质粒携带抗性基因即 <i>pUC19 Amp<sup>R</sup>, Em<sup>R</sup></i>	[27]
pUC19E0968	pUC19EM 含有基因序列 <i>LPL9_0968</i>	本次试验构建
pUC19EmelA	pUC19EM 含有基因序列 <i>mleA</i>	[24]

### 1.3 DNA 操作技术

试验所用引物均为软件 primer 5 设计 (表 2)。采用 FastPure<sup>®</sup> bacterium DNA 试剂盒提取副

干酪乳杆菌 L9 的基因组; 采用 FastPure<sup>®</sup> EndoFree Plasmid 试剂盒提取大肠杆菌的质粒; 采用 Green Taq Mix DNA 聚合酶扩增 DNA 片段; 采用

限制性内切酶进行 DNA 酶切;用 T4 DNA 连接试剂盒进行载体和片段的连接。采用热休克转化法将重组质粒引入大肠杆菌 DH5 $\alpha$ <sup>[28]</sup>,采用电穿孔法

将重组质粒引入副干酪乳杆菌 L9<sup>[29]</sup>。所有重组菌株均通过 DNA 测序(生工生物工程),并用 DNA-MAN 软件对测序结果进行比对分析。

表 2 引物序列

Table 2 Sequences of oligonucleotide primers

基因	PCR 引物 (5'→3')	限制性内切酶 s	长度/bp
LPL9_0968-F	CTAGTCTAGACAAGCGAAGAGGCGCTGG	<i>Xba</i> I	28
LPL9_0968-R	CCGGAATTCTCAGAGACTCAATTTGGCC	<i>EcoR</i> I	28
LPL9_2172-F	CTAGTCTAGAGACCTCATTACGCTGACCGG	<i>Xba</i> I	30
LPL9_2172-R	CCGGAATTCGGACGAACAATTTTCGAT	<i>EcoR</i> I	27
<i>Em</i> -F	CATCAGAGTATGGACAGTTGCGATG		25
LPL9_0968D-R	AGAAGAGCCACACAGCTAAGATGAT		25

#### 1.4 突变体菌株构建

利用同源重组单交换的方法构建 LPL9\_0968 基因并插入失活突变体。首先用引物 LPL9\_0968-F 和 LPL9\_0968-R 扩增 LPL9\_0968 基因内部长度为 400 bp(50~450 bp)的片段作为同源臂,该同源臂片段两侧包含 *Xba* I 和 *EcoR* I 限制性内切酶位点。然后,将所得同源臂片段和质粒 pUC19E 均用 *Xba* I 和 *EcoR* I 酶切连接,并将连接产物热激转化入大肠杆菌 DH5 $\alpha$  中,通过氨苄霉素筛选获得重组菌株,将提取获得的重组质粒命名为 pUC19E0968。最后,利用电穿孔法将重组质粒 pUC19E0968 电转入副干酪乳杆菌 L9 中,自杀载体 pUC19E0968 在乳酸菌中无法复制,在红霉素的筛选压下只能通过同源重组插入 LPL9\_0968 基因内部,导致该基因失活,产生的突变体被命名为 LPL9\_0968<sup>-</sup>。在红霉素耐药基因内部及 LPL9\_0968 基因组序列下游设计引物(总长 2 396 bp),PCR 扩增后测序验证突变株 LPL9\_0968<sup>-</sup> 是否构建成功。

同时,为了消除培养中红霉素对突变株菌株后续胆盐胁迫试验产生的影响,选择构建副干酪乳杆菌 L9 菌株  $\alpha$ -半乳糖苷酶基因(*mela*, LPL9\_2172)突变株作为对照菌株(LPL9\_melA<sup>-</sup>)。

#### 1.5 胆盐胁迫试验

将活化 3 代后的 LPL9\_melA<sup>-</sup>和 LPL9\_0968<sup>-</sup>接种于含红霉素的 MRS 液体培养基中培养至 OD<sub>600nm</sub>=0.6,于常温下 8 000×g 离心 4 min,收集菌体,弃培养基后将菌体重悬于同体积新鲜 MRS 液

体培养基中,添加不同浓度的胆盐。继续培养 2 h,通过梯度稀释法进行菌落计数,以不添加胆盐组为对照,计算胆盐胁迫下菌株的存活率。本试验中添加的胆盐组分及含量为:混合牛胆盐(Ox-bile;0%,0.025%,0.05%,0.075%)、牛磺酸胆盐(TCA;0%,1.0%,2.0%,3.0%)、牛磺酸脱氧胆盐(TDCA;0%,0.2%,0.4%,0.6%)、甘氨酸胆盐(GCA;1.0%,2.0%,3.0%)和甘氨酸脱氧胆盐(GDCA;0%,0.025%,0.05%,0.075%)。所有试验至少进行 3 个生物学重复,每个生物学重复均做 3 份技术平行试验,用单因素方差分析(ANOVA)来评估数据。

#### 1.6 Zeta 电位试验

Zeta 电位依照 Giaouris 等<sup>[30]</sup>的方法进行测定:将 LPL9\_melA<sup>-</sup>和 LPL9\_0968<sup>-</sup>在含有红霉素的 MRS 中培养 12 h,收集菌体(6 000×g,10 min,4 ℃),用 1.5 mmol/L 的 NaCl 清洗菌体两遍并重悬至 OD<sub>400nm</sub>=0.3。用纳米粒度分析仪测量其 Zeta 电位数值。所有试验至少进行 3 个生物学重复,每个生物学重复均进行 3 份技术平行试验,使用单因素方差分析(ANOVA)来评估数据。

#### 1.7 扫描电镜

将 LPL9\_melA<sup>-</sup>和 LPL9\_0968<sup>-</sup>培养至 OD<sub>600nm</sub>=0.6,收集菌体,用 0.85%的生理盐水洗涤 2 次后,重悬于含胆盐(0.4% TDCA)的 MRS 培养基中培养 2 h。离心收集菌体,用 4%戊二醛在 4 ℃下过夜固定。用双蒸水洗涤 3 次,然后,依次用 30%,50%,70%,85%,95%,100%的乙醇浸泡 13 min,

6 000×g 离心 5 min, 弃上清, 再用 100%乙醇重复上述操作 3 次, 使用冷冻干燥机(宁波新芝 SCI-ENTZ-10N)冻干成粉, 用场发射扫描电子显微镜进行 13 万倍和 30 万倍放大成像。

### 1.8 生物信息学分析

通过 GenBank 及 KEGG 等数据库对 LPL9\_0968 基因进行原位分析; 用 TMHMM server v.2.0 工具分析相关蛋白中的跨膜区; 用 NCBI 中的 Blast 工具进行蛋白同源序列的分析, 并使用 MEGA 软件, 采用邻位相接法设置各分支的置信度, 构建 N-J 系统进化树。利用 ClustalX 软件对 LPL9\_0968 相似蛋白序列进行比对, 分析其保守位点。

### 1.9 分子对接

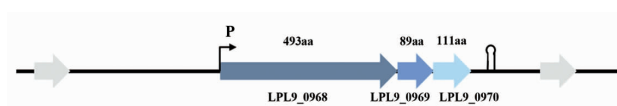
利用 I-TASSER (<https://zhanggroup.org/I-TASSER/>) 服务器对 LPL9\_0968 进行蛋白三维结构建模, 在 PubChem 数据库中下载各胆盐组分的结构文件。以 LPL9\_0968 编码蛋白为受体, 各胆盐组分分子为配体, 运用 Discovery Studio(DS)软件中 CDOCKER 模块进行分子对接。在分子对接开始前使用 DS 中 Preparation Protein 对蛋白进行优化, Prepare Ligands 对配体进行优化, 执行诸如删除重复、枚举异构体和互变异构体以及生成 3D 构象等任务。准备结束后使用 CDOCKER 模块进行对接, 设置 Pose Cluster Radius 为 0.5 以确保对接构象尽可能具有多样性, 其余参数默认。最终数据以 -CDOCKER ENERGY 为主, 以 -CDOCKER INTERACTION ENERGY 为辅, 以 Binding Ener-

gy、Ligand Energy 等数据为参考进行结果分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 生物信息学分析结果

根据 GenBank 和 KEGG 等数据库的分析结果, 副干酪乳杆菌 L9 中 LPL9\_0968 基因所在操纵子的结构如图 1 所示: LPL9\_0968、LPL9\_0969 和 LPL9\_0970 3 个基因构成一个功能未知的操纵子。利用在线工具 TMHMM server v.2.0 进行跨膜区域分析, 结果(图 2), LPL9\_0969 和 LPL9\_0970 分别编码两个 89AA 和 111AA 大小的跨膜区域蛋白, LPL9\_0968 编码的 493AA 蛋白则完全位于细胞外侧。通过 Blast 进行蛋白序列比对, 发现 LPL9\_0968 编码的蛋白属于 LiaX 家族的膜蛋白, 用 MEGA 7.0 中的 Neighborjoining 算法构建进化树, 系统发育关系分析如图 3 所示。LiaX 家族蛋白多存在于肠球菌属和乳酸菌干酪乳杆菌群中(干酪乳杆菌、副干酪乳杆菌、鼠李糖乳酪杆菌), 在乳酸菌中该蛋白间相似度高达 93.59%, 而与粪



注: 基因用宽箭头表示, 启动子用黑色箭头表示, 终止子用黑色圆条表示。

图 1 LPL9\_0968 基因所在操纵子结构图

Fig.1 The structure of the operon where the LPL9\_0968 gene is located.

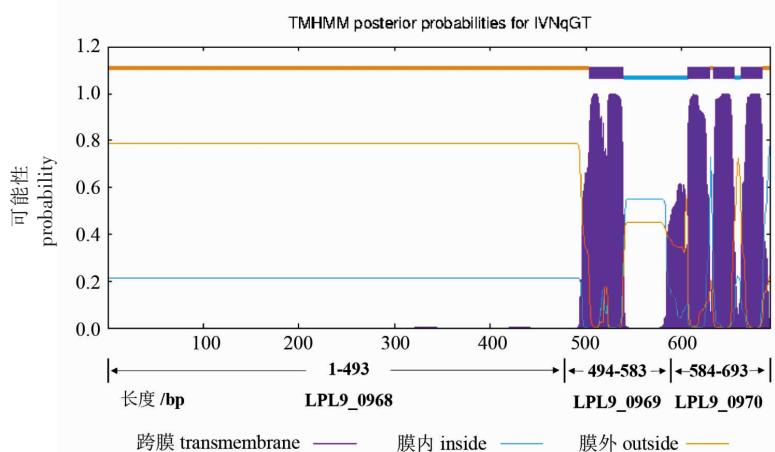
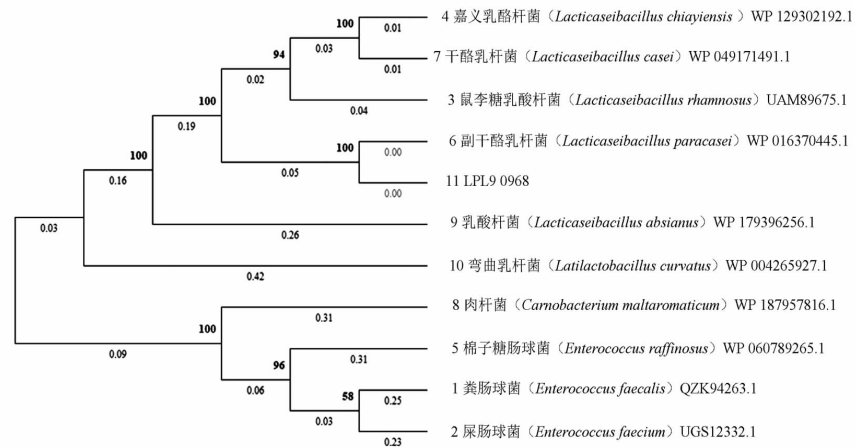


图 2 LPL9\_0968、LPL9\_0969、LPL9\_0970 基因蛋白跨膜区域分析

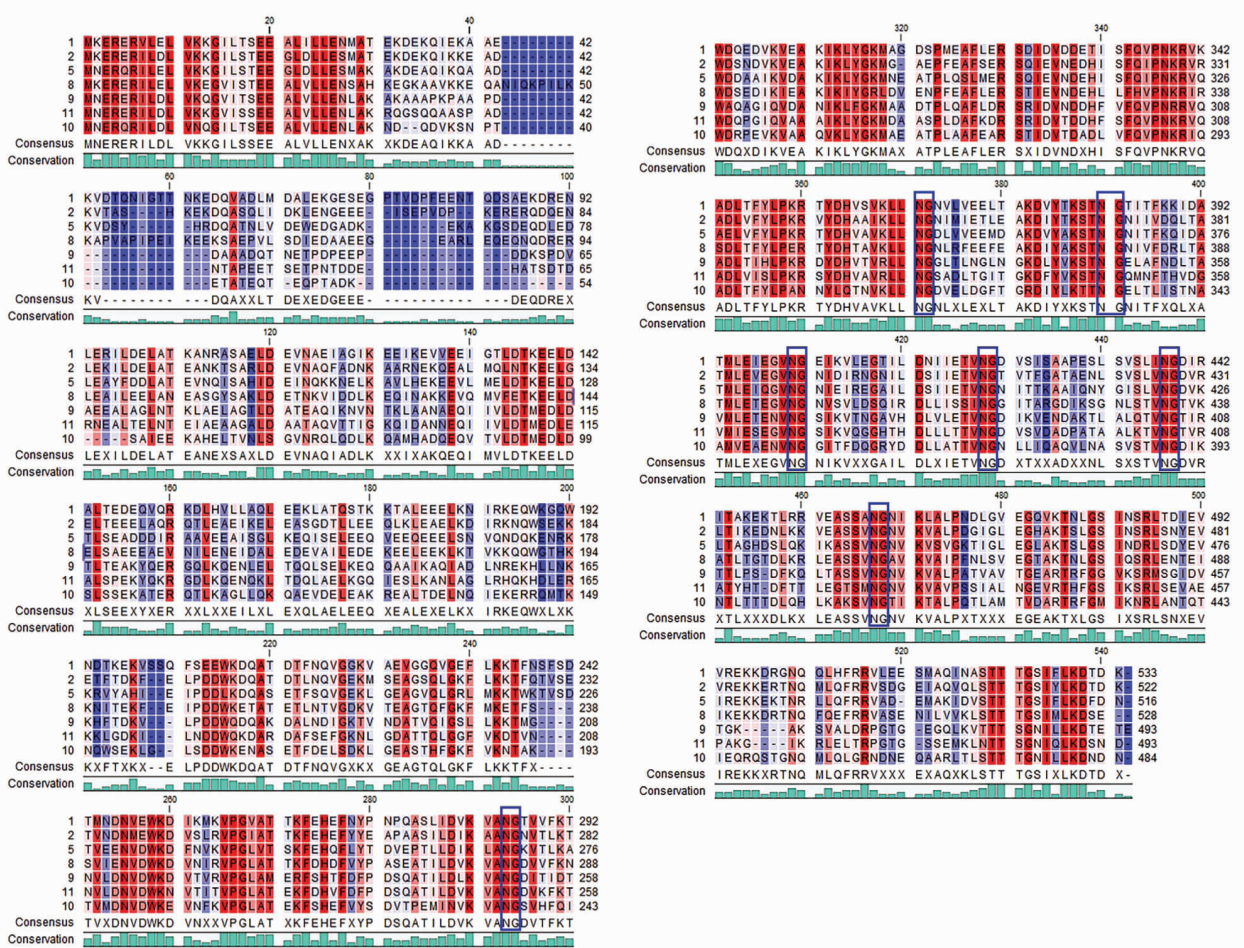
Fig.2 Analysis of the transmembrane domain in LPL9\_0968, LPL9\_0969 and LPL9\_0970 proteins



注:0.00~0.42 代表遗传距离,值越小,序列相似度越高;58~100 表示置信度,大于 70 的值表示结果更可靠。

图 3 Neighbourjoining 法构建 LiaX 家族蛋白系统进化树

Fig.3 Phylogenetic tree of LiaX proteins constructed by Neighbourjoining method



注:1.粪肠球菌;2.尿肠球菌;5.棉子糖肠球菌;8.肉杆菌;9.乳酸杆菌;10.弯曲乳杆菌;11.LPL9\_0968。

图 4 假定表面蛋白 LPL9\_0968 与其它乳酸菌和肠球菌中 LiaX 蛋白氨基酸序列的多重比对分析

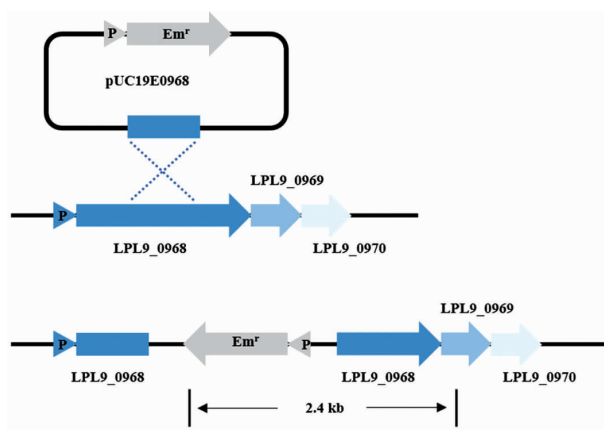
Fig.4 Multiple alignment of LPL9\_0968 with LiaX proteins from other Lacticaseibacillus and Enterococcus.

肠球菌中的 LiaX 蛋白从进化上看明显分为两个亚组,副干酪乳杆菌 L9 中 LPL9\_0968 蛋白与粪肠球菌中的 LiaX 蛋白序列相似度高达 61.96%。通过 ClustalX 序列比对结果发现(图 4),LiaX 家族蛋白具有一些明显的保守区域,蛋白 N 端 1~30 序列处存在多个保守氨基酸位点。此外,蛋白 200~500 序列处也属于保守氨基酸较多的部分,其中包含多个天冬酰胺和甘氨酸(ng)保守位点。

目前该家族蛋白仅在粪肠球菌中被报道参与达托霉素抗药性机制<sup>[31]</sup>。研究发现,LiaX 膜蛋白存在胞外游离态和细胞膜结合态两种状态,能够根据环境中的达托霉素信号改变与细胞膜上蛋白的结合状态,从而激活菌体的达托霉素抗性相关基因<sup>[25]</sup>。推测 LPL9\_0968、LPL9\_0969 和 LPL9\_0970 3 个基因表达的蛋白可能共同构成一个细胞膜表面蛋白,其中 LPL9\_0969 和 LPL9\_0970 表达的蛋白构成跨膜锚定区域,LPL9\_0968 通过与跨膜锚定区域蛋白相连而位于细胞膜表面。有研究表明,副干酪乳杆菌 L9 在胆盐胁迫下,该操纵子中的 3 个基因转录水平分别上调 9.67,10.33 倍和 23.75 倍<sup>[24]</sup>,表明该表面蛋白很有可能参与副干酪乳杆菌 L9 胆盐胁迫抗性机制。

## 2.2 突变体的构建及胆盐胁迫

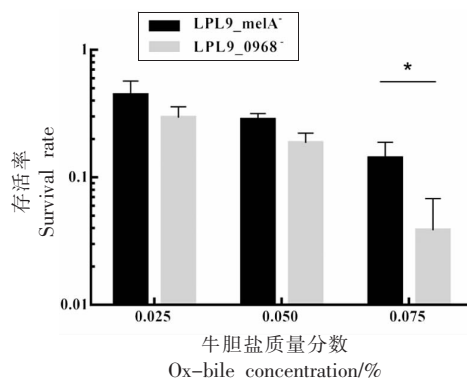
为了研究 LPL9\_0968 相关基因在副干酪乳杆菌 L9 胆盐胁迫中的作用,利用同源重组单交换的方法构建 LPL9\_0968 基因,插入失活突变株 LPL9\_0968<sup>-</sup>,试验原理见图 5。PCR 扩增及测序结果表明(数据未显示),自杀载体 pUC19E0968 已成功插入副干酪乳杆菌 L9 基因组 LPL9\_0968 基因内部,整个操纵子均已失活。同理,本试验成功构建了  $\alpha$ -半乳糖苷酶基因 *mela* 突变株 LPL9\_melA<sup>-</sup>作为对照菌株。对突变株 LPL9\_melA<sup>-</sup>和 LPL9\_0968<sup>-</sup>进行混合牛胆盐胁迫试验,结果如图 6 所示:在质量分数 0.025%,0.050%和 0.075%混合牛胆盐含量下,LPL9\_0968 基因突变株的胆盐耐受能力均低于对照组,其中质量分数 0.075%下 LPL9\_0968<sup>-</sup>存活率为 4.2%,与对照组相比降低 10.17 倍,存在显著性差异( $P < 0.05$ )。这表明 LPL9\_0968 及其相关基因所构成的表面蛋白在副干酪乳杆菌 L9 胆盐抗性机制中具有重要作用。



注:基因用宽箭头表示,启动子用三角形表示。染色体 DNA 由黑线表示,质粒 DNA 由蓝线表示,黑色箭头表示使用正向引物 Em<sup>r</sup>-F 和反向引物扩增的 PCR 产物 LPL9\_0968D-R。

图 5 基于同源重组单交换原理构建 LPL9\_0968 基因突变菌株

Fig.5 Construction of *L. paracasei* mutant strain LPL9\_0968<sup>-</sup> based on homologous recombination single crossover



注:所有结果均来自至少 3 次独立试验。误差线对应于标准误差 (SD)。使用独立的样本 *t* 检验来评估数据,\* $P < 0.05$ 。

图 6 LPL9\_melA<sup>-</sup> and LPL9\_0968<sup>-</sup> 在牛混合胆盐胁迫下的存活率

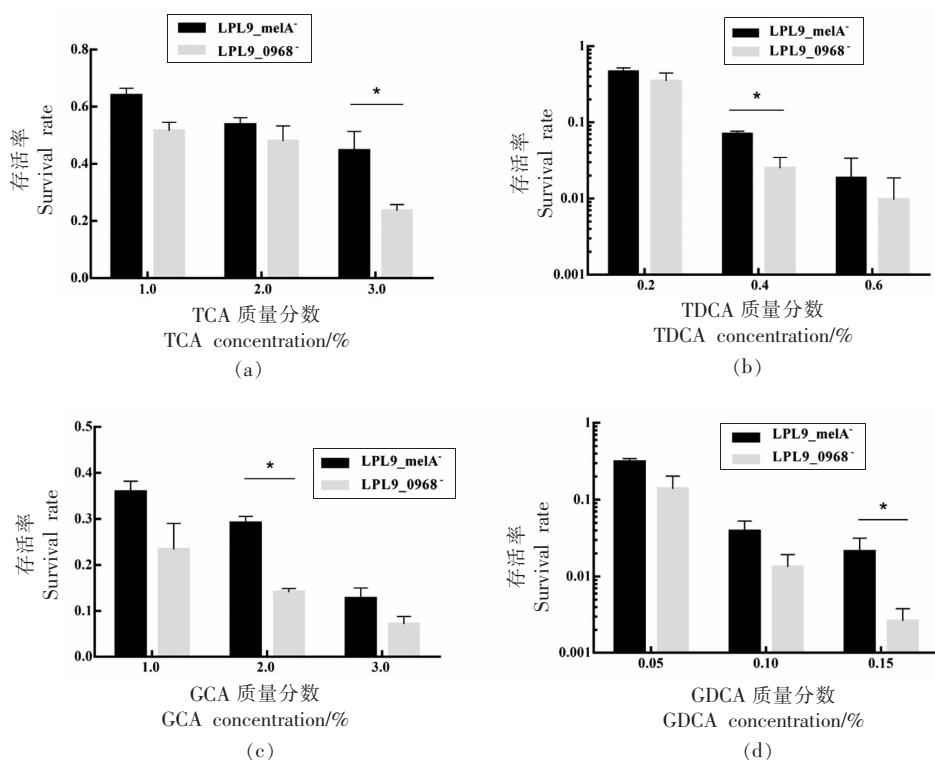
Fig.6 Survival rate of recombination strain LPL9\_melA<sup>-</sup> and LPL9\_0968<sup>-</sup> under Ox-bile stress

## 2.3 单一组分胆盐胁迫试验

为了研究该表面蛋白在胆盐胁迫抗性机制中是否对不同胆盐组分具有特异性,采用 4 种单一胆盐组分(TCA、TDCA、GCA、GDC)来评估突变株 LPL9\_melA<sup>-</sup>和 LPL9\_0968<sup>-</sup>的胆盐耐受能力,结果见图 7。在 4 种单一胆盐胁迫下,LPL9\_0968<sup>-</sup>存活

率与 LPL9\_melA<sup>-</sup>相比均出现不同程度的下降,在质量分数 3.0%的 TCA 中,LPL9\_0968<sup>-</sup>存活率显著下降 1.95 倍( $P<0.05$ );在质量分数 0.4%的 TDCA 中,LPL9\_0968<sup>-</sup>存活率显著下降 2.85 倍( $P<0.05$ );在质量分数 2.0%的 GCA 中,LPL9\_0968<sup>-</sup>存活率显著下降 2.05 倍( $P<0.05$ );在质量分数 0.15%的 GDCA 中,LPL9\_0968<sup>-</sup>存活率显著下降 8.21 倍

( $P<0.05$ ),下降程度最高。以上结果表明,试验菌株和对照菌株对 TDCA 和 GDCA 的耐受能力明显低于 TCA 和 GCA,这与脱氧结合型胆盐有更强的毒性有关<sup>[32]</sup>。此外,在 4 种结合型胆盐中,突变株对甘氨酸脱氧胆盐更为敏感,表明 LPL9\_0968 表面蛋白在菌株胆盐抗性中对甘氨酸脱氧胆盐具有特异性。



注:所有结果均来自至少 3 次独立试验。误差线对应于标准误差 (SD)。使用独立的样本  $t$  检验来评估数据,\* $P<0.05$ 。

图 7 LPL9\_melA<sup>-</sup> and LPL9\_0968<sup>-</sup>在单组分胆盐胁迫下的存活率

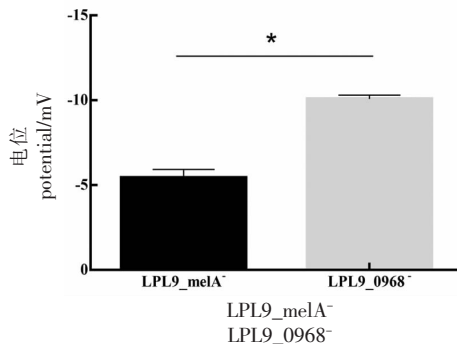
Fig.7 Survival rate of mutant strains LPL9\_melA<sup>-</sup> and LPL9\_0968<sup>-</sup> under different kind of bile salt stress

## 2.4 Zeta 电位

为了进一步探究 LPL9\_0968 假定表面蛋白在副干酪乳杆菌 L9 胆盐抗性中的作用机制。通过 Zeta 电位考察突变菌株表面所带电荷量的变化,结果见图 8。LPL9\_0968<sup>-</sup>的表面电位显著低于 LPL9\_melA<sup>-</sup>( $P<0.05$ ),负值增大。这表明 LPL9\_0968 膜蛋白缺失后,菌体的双电层吸附层的负电荷增加,从而反映菌体表面所带的正电荷增加,这可能导致膜电位的紊乱,细胞膜稳定性降低,菌株的胆盐耐受能力降低。

## 2.5 扫描电镜结果

为了验证 LPL9\_0968 蛋白缺失引起的菌体



注:所有结果均来自至少 3 次独立试验。采用单向方差分析(方差分析)检验对数据进行评价,\* $P<0.05$ 。

图 8 LPL9\_melA<sup>-</sup>和 LPL9\_0968<sup>-</sup> Zeta 电位

Fig.8 Zeta potential of LPL9\_melA<sup>-</sup> and LPL9\_0968<sup>-</sup>

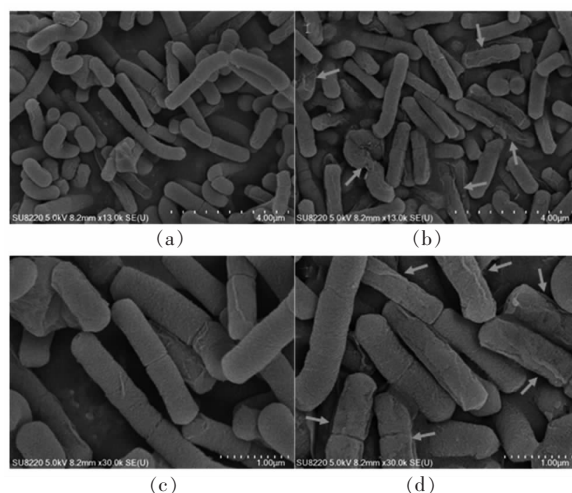
Zeta 电位下降会导致突变株更易受胆盐的攻击,用场发射扫描电子显微镜观察胆盐胁迫下 LPL9\_melA<sup>-</sup>和 LPL9\_0968<sup>-</sup>细胞表面的形态结构。结果如图 9 所示,经 2 h,0.4% TDC 的胁迫后,LPL9\_0968<sup>-</sup>菌体表面形态的完整性明显差于对照组 LPL9\_melA<sup>-</sup>,出现较多的粗糙和萎缩现象(绿色箭头处)。这表明 LPL9\_0968<sup>-</sup>在相同浓度胆盐胁迫下,细胞膜受损和细胞内含物泄露更为严重。

### 3 讨论

细胞膜是胆盐攻击细菌的首要目标,而表面蛋白作为第 1 道防线,通过多种机制抵抗胆盐胁迫,以提高细菌的生存能力<sup>[5]</sup>。LPL9\_0968, LPL9\_0969 和 LPL9\_0970 是副干酪乳杆菌 L9 基因组中一组功能未知的假定膜蛋白,在前期胆盐胁迫相关研究中,该组基因在胆盐胁迫下转录水平上调倍数为全基因组中最高。通过构建插入失活突变体及胆盐胁迫试验,成功证明 LPL9\_0968 相关的假定膜蛋白参与副干酪乳杆菌 L9 的胆盐抗性机制。然而,通过分析可知 LPL9\_0968 假定蛋白为膜表面蛋白,并不具有膜内部分及跨膜转运通道,因此不具有转运胆盐的能力。

经分析比对,LPL9\_0968 基因编码的蛋白属于 LiaX 家族表面蛋白,与粪肠球菌中的 LiaX 蛋白具有很高的相似性。LiaX 蛋白在粪肠球菌中是细菌抵抗达托霉素的表面响应蛋白,它能够感受胞外抗达托霉素分子,通过与细胞表面 LiaFSR 调节蛋白结合,激活细胞膜表面的多种蛋白响应机制来修复因外界胁迫而导致的细胞膜完整性受损<sup>[25,31,33]</sup>。推测副干酪乳杆菌 L9 中的 LPL9\_0968 蛋白很可能也通过感受胆盐信号,调控相关膜蛋白基因的表达,从而在胆盐胁迫下维持细胞膜的平衡,抵抗胆盐胁迫。Zeta 电位结果反映突变体表面正电荷量增加,而结合型胆盐在溶液中会解离成为带负电的分子,菌体表面正电荷增加可能导致胆盐分子吸附增多,细胞膜受到更为严重的破坏。通过扫描电镜观察胆盐胁迫下的菌体表面,证实了这一结果,表明 LPL9\_0968 参与了维持细胞表面电荷稳定与细胞膜完整性的过程。

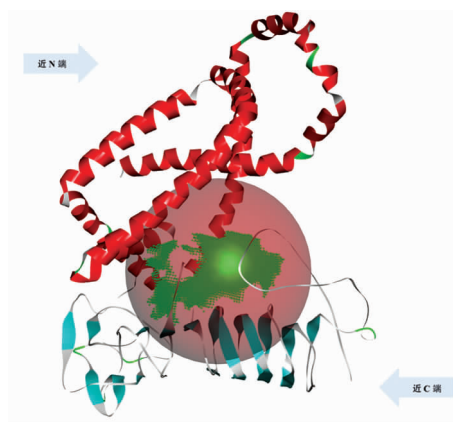
为了进一步探讨 LPL9\_0968 蛋白是否能感受胆盐分子信号,通过分子对接来考察假定表面蛋



注:左列(a,c)是来自 LPL9\_melA<sup>-</sup>的细菌,右列(b,d)来自 LPL9\_0968<sup>-</sup>。

图 9 场发射扫描电子显微镜观察 LPL9\_melA<sup>-</sup>和 LPL9\_0968<sup>-</sup>胆盐胁迫下菌体形态  
Fig.9 The morphology of LPL9\_melA<sup>-</sup> and LPL9\_0968<sup>-</sup> under bile stress by FESEM.

白与胆盐组分的相互作用。通过 I-TASSER 网站建立 LPL9\_0968 蛋白模型(图 10),利用 DS 将蛋白与 4 种单一胆盐组分对接,结果表明:蛋白与胆盐组分之间存在以氢键为主的相互作用(图 11)。4 种胆盐与 LPL9\_0968 蛋白对接所产生的结合能均为负值,说明二者间发生结合的可能性很大,且发生结合后的状态相对稳定。LPL9\_0968 与 GD-CA 间还存在电荷之间的吸引力,并且胆盐分子与



注:由 I-Tasser 创建的 LPL9\_0968 编码蛋白质的 3D 模型。

图 10 同源建模  
Fig.10 Homology modeling



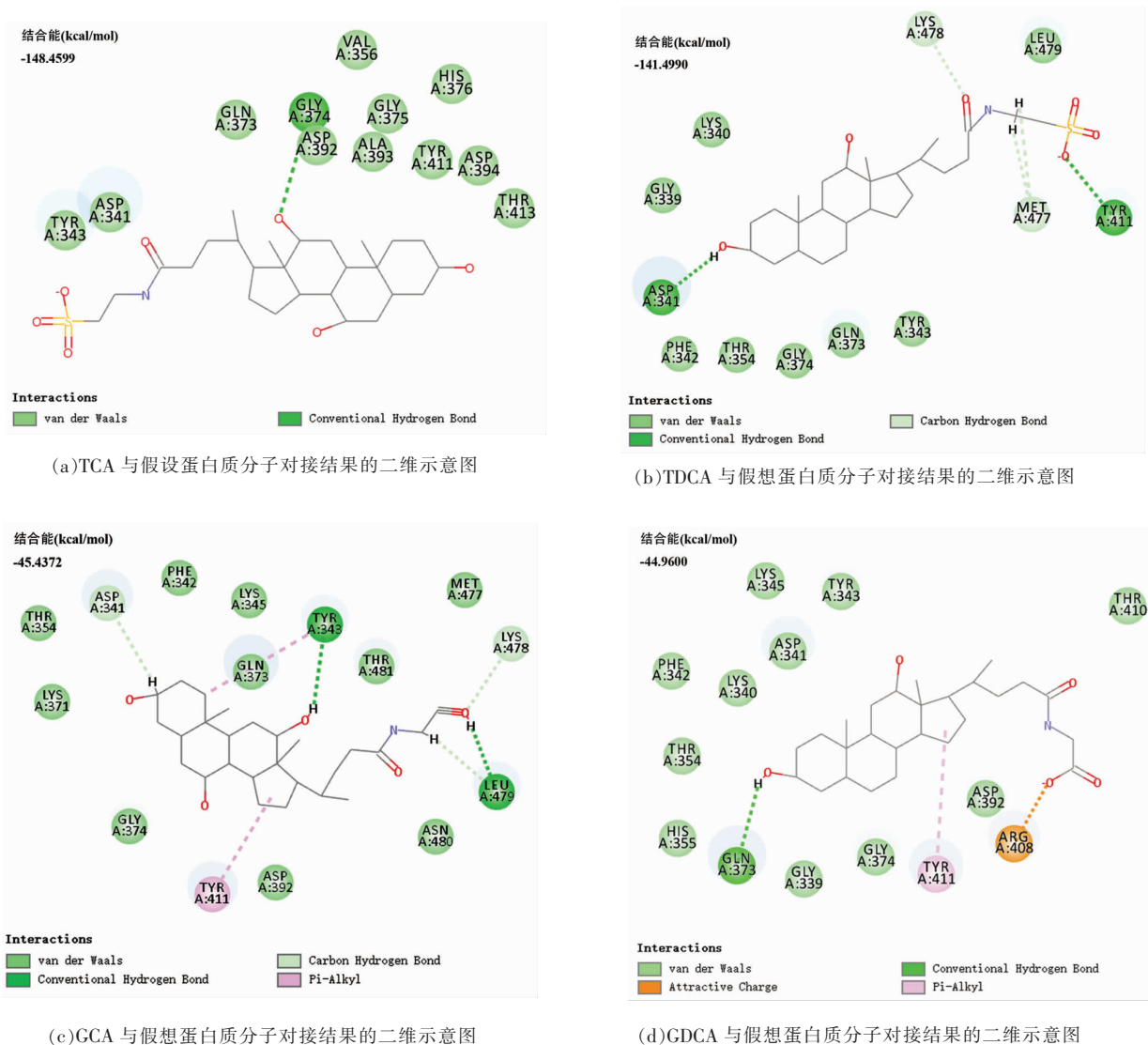


图 11 假定表面蛋白与 4 种胆盐组分模拟分子对接的结合能及对接结果 2D 示意图

Fig.11 2D schematic diagram of binding energy and docking results between hypothetical surface protein and four simulated bile salt components

LPL9\_0968 相互作用的区域是 LiaX 家族蛋白序列 300~500 部分氨基酸保守度较高的区域, 该区域可能与感受环境信号分子相关, 同时也可能控制 LiaX 与膜上蛋白结合或分离。通过比对发现, LPL9\_0969 和 LPL9\_0970 与粪肠球菌中 LiaFSR 蛋白相似度并不高, 且未在副干酪乳杆菌 L9 中找到与之相似的同源蛋白, 因此 LPL9\_0968 感受胆盐胁迫参与调控机制尚待探究。

#### 4 结论

本研究首次报道乳酸菌中的 LiaX 家族表面

蛋白 LPL9\_0968, 采用生物信息学分析对其基因结构、蛋白序列保守性及其与肠球菌中 LiaX 家族蛋白的关系进行初步分析, 同时探究了 LPL9\_0968 的功能, 确定其参与副干酪乳杆菌 L9 胆盐胁迫抗性机制。该蛋白可能通过维持细胞膜的平衡及完整性来提高菌株的胆盐耐受能力。通过分子对接推测该表面蛋白可能与胆盐组分存在相互作用, 可作为胆盐胁迫的表面响应蛋白, 参与胞内未知的调控。

## 致谢

感谢长沙理工大学创新项目：假定表面蛋白 LPL9\_0968 在副干酪乳杆菌 L9 胆盐胁迫应激中的作用对本试验给予的经费支持。

## 参 考 文 献

- [1] BANCALARI E, MONTANARI C, LEVANTE A, et al. *Lactobacillus paracasei* 4341 as adjunct culture to enhance flavor in short ripened Caciotta -type cheese[J]. Food Research International, 2020, 135: 109284.
- [2] SEONG G, LEE S, YANG W M, et al. Effect of a synbiotic containing *Lactobacillus paracasei* and *Opuntia humifusa* on a murine model of irritable bowel syndrome[J]. Nutrients, 2020, 12(10): 3205.
- [3] 胡敏. 胆盐对植物乳杆菌 NCU116 应激基因和关键生理指标的影响[D]. 南昌: 南昌大学, 2019.
- HU M. Influences of bile salts on stress genes and key physiological indexes of *Lactobacillus plantarum* NCU116[D]. Nanchang: Nanchang University, 2019.
- [4] WAHLSTRÖM A, SAYIN S I, MARSCHALL H U, et al. Intestinal crosstalk between bile acids and microbiota and its impact on host metabolism[J]. Cell Metabolism, 2016, 24(1): 41-50.
- [5] MÁIRE B, GAHAN C G M, COLIN H. The interaction between bacteria and bile[J]. Fems Microbiology Reviews, 2010(4): 625-651.
- [6] CREMERS C M, KNOEFLER D, VITVITSKY V, et al. Bile salts act as effective protein-unfolding agents and instigators of disulfide stress *in vivo*[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2014, 111(16): E1610-E1619.
- [7] BERNSTEIN C, BERNSTEIN H, PAYNE C M, et al. Bile salt activation of stress response promoters in *Escherichia coli*[J]. Current Microbiology, 1999, 39(2): 68-72.
- [8] FUJISAWA T, MORI M. Influence of bile salts on  $\beta$ -glucuronidase activity of intestinal bacteria[J]. Letters in Applied Microbiology, 1996, 22(4): 271-274.
- [9] GÓMEZ ZAVAGLIA A, KOCIUBINSKI G, PÉREZ P, et al. Effect of bile on the lipid composition and surface properties of bifidobacteria[J]. Journal of Applied Microbiology, 2010, 93(5): 794-799.
- [10] WAAR K, VAN DER MEI H C, HARMSSEN H J M, et al. Adhesion to bile drain materials and physicochemical surface properties of *Enterococcus faecalis* strains grown in the presence of bile[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2002, 68(8): 3855-8.
- [11] HEUMAN D M, BAJAJ R S, LIN Q. Adsorption of mixtures of bile salt taurine conjugates to lecithin-cholesterol membranes: implications for bile salt toxicity and cytoprotection[J]. Journal of Lipid Research, 1996, 37(3): 562-573.
- [12] XU Q, ZHAI Z, AN H, et al. The MarR family regulator BmrR is involved in bile tolerance of *Bifidobacterium longum* BBMN68 via controlling the expression of an ABC transporter[J]. American Society for Microbiology, 2019, 85(3): e02453-18
- [13] PFEILER E A, KLAENHAMMER T R. Role of transporter proteins in bile tolerance of *Lactobacillus acidophilus*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2009, 75(18): 6013-6016.
- [14] LIU Y, AN H, ZHANG J, et al. Functional role of tlyC1 encoding a hemolysin-like protein from *Bifidobacterium longum* BBMN68 in bile tolerance[J]. FEMS Microbiology Letters, 2014, 360(2): 167-173.
- [15] WANG G, LI D, MA X, et al. Functional role of oppA encoding an oligopeptide-binding protein from *Lactobacillus salivarius* Ren in bile tolerance[J]. J Ind Microbiol Biotechnol, 2015, 42(8): 1167-1174.
- [16] WANG X, WANG Y, LING N, et al. Effects of tolC on tolerance to bile salts and biofilm formation in *Cronobacter malonaticus*[J]. Journal of Dairy Science, 2021, 104(9): 9521-9531.
- [17] AN H, DOUILLARD F P, WANG G, et al. Integrated transcriptomic and proteomic analysis of the bile stress response in a centenarian-originated probiotic *Bifidobacterium longum* BBMN68[J]. Molecular & Cellular Proteomics, 2014, 13(10): 2558-2572.
- [18] LV LX, YAN R, SHI HY, et al. Integrated transcriptomic and proteomic analysis of the bile stress response in probiotic *Lactobacillus salivarius* LI01[J]. Journal of Proteomics, 2017, 150: 216-229.
- [19] PAN Q, SHEN X, YU L, et al. Comparative genomic analysis determines the functional genes related to bile salt resistance in *Lactobacillus salivarius*

- [J]. *Microorganisms*, 2021, 9(10): 2038.
- [20] KOSKENNIEMI K, LAAKSO K, KOPONEN J, et al. Proteomics and transcriptomics characterization of bile stress response in probiotic *Lactobacillus rhamnosus* GG[J]. *Molecular & Cellular Proteomics*, 2011, 10(2): M110.002741.
- [21] HAMON E, HORVATOVICH P, BISCH M, et al. Investigation of biomarkers of bile tolerance in *Lactobacillus casei* using comparative proteomics[J]. *Journal of Proteome Research*, 2012, 11(1): 109–118.
- [22] YANG J, REN F, ZHANG H, et al. Induction of regulatory dendritic cells by *Lactobacillus paracasei* L9 prevents allergic sensitization to bovine  $\beta$ -lactoglobulin in mice[J]. *Journal of Microbiology & Biotechnology*, 2015, 25(10): 1687–1696.
- [23] ZHU Y, ZHU J, ZHAO L, et al. Effect of oral administration of *Lactobacillus paracasei* L9 on mouse systemic immunity and the immune response in the intestine[J]. *Archives of Biological Sciences*, 2016, 68(2): 311–318.
- [24] MA X Y, WANG G H, ZHAI Z Y, et al. Global transcriptomic analysis and function identification of malolactic enzyme pathway of *Lactobacillus paracasei* L9 in response to bile stress[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2020, 10: 3029.
- [25] KHAN A, DAVLIEVA M, PANESSO D, et al. Antimicrobial sensing coupled with cell membrane remodeling mediates antibiotic resistance and virulence in *Enterococcus faecalis*[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2019, 116(52): 26925–26932.
- [26] SUNTHARALINGAM P, SENADHEERA M D, MAIR R W, et al. The LiaFSR system regulates the cell envelope stress response in *Streptococcus* mutants[J]. *Journal of Bacteriology*, 2009, 191(9): 2973–2984.
- [27] YANG Y, YIN J, LIU J, et al. The copper homeostasis transcription factor CopR is involved in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> stress in *Lactobacillus plantarum* CAUH2[J]. *Front Microbiol*, 2017, 8: 2015.
- [28] 谢翎, 陈红梅, 尹翀, 等. 大肠杆菌 DH5 $\alpha$  菌株感受态制备及转化率变化研究[J]. *生物学杂志*, 2011, 28(4): 4–6.
- XIE L, CHEN H M, YIN C, et al. Study on variation of transformation rate of *E. coli* DH5 $\alpha$  competent cells[J]. *Journal of Biology*, 2011, 28(4): 4–6.
- [29] Aukrust TW, Brurberg MB, Nes IF. Transformation of *Lactobacillus* by electroporation. *Methods Mol Biol*. 1995; 47: 201–208.
- [30] GIAOURIS E, CHAPOT-CHARTIER M P, BRIANDET R. Surface physicochemical analysis of natural *Lactococcus lactis* strains reveals the existence of hydrophobic and low charged strains with altered adhesive properties[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2009, 131(1): 2–9.
- [31] OTA Y, FURUHASHI K, HAYASHI W, et al. Daptomycin resistant *Enterococcus faecalis* has a mutation in liaX, which encodes a surface protein that inhibits the LiaFSR systems and cell membrane remodeling[J]. *Journal of Infection and Chemotherapy*, 2021, 27(1): 90–93.
- [32] JORDAN S, JUNKER A, HELMANN J D, et al. Regulation of LiaRS-dependent gene expression in *Bacillus subtilis*: identification of inhibitor proteins, regulator binding sites, and target genes of a conserved cell envelope stress-sensing two-component system[J]. *Journal of Bacteriology*, 2006, 188(14): 5153–5166.
- [33] 牟一平. 胆汁酸细胞毒作用研究进展[J]. *国外医学(生理、病理科学与临床分册)*, 1995(3): 163–165.
- MU Y P. Research progress of bile acid cytotoxicity[J]. *Foreign Medical Sciences (Pathophysiology and Clinical Medicine)*, 1995(3): 163–165.

### Role of LiaX Family Surface Protein LPL9\_0968 in Bile Salt Stress Resistance in *Lactocaseibacillus paracasei* L9

Wang Yanmei, Liu Yongle, Deng Kai, Mahira·Osman, Ma Xiayin\*

(Changsha University of Science & Technology, School of Food and Bioengineering, Changsha 410114)

**Abstract** The hypothetical surface protein LPL9\_0968 in *Lactocaseibacillus paracasei* L9 was transcriptionally up-regulat-

ed 9.67-fold under bile salt stress. Through bioinformatics analysis, it was found that LPL9\_0968 belongs to the surface protein of LiaX family, and the sequence similarity with LiaX protein in *Enterococcus faecalis* is as high as 61.96%, and there are multiple asparagine-glycine (NG) conserved sites in this family protein. Therefore, in this experiment, an inactivation mutant of the LPL9\_0968 operon gene was constructed. Under 0.075% Ox-bile stress, the bile salt tolerance of the mutant was reduced by 10 times, indicating that the LiaX family protein is involved in the L9 bile salt stress resistance mechanism. Subsequently, the mutant strain exhibited strong sensitivity to glycine deoxycholate under single-component bile salt stress. Under the stress of 3.0% taurocholic acid, 0.4% taurodeoxycholic acid, 2.0% glycocholic acid, 0.075% glycodeoxycholic acid, the survival rate decreased by 1.95, 2.85, 2.05 times and 8.21 times, respectively. Furthermore, the results of Zeta potential experiment and scanning electron microscope showed that the cell membrane potential of the mutant strain increased under bile salt stress, and more severe atrophy appeared. Molecular docking showed that the surface protein interacted with different components of bile salt. Therefore, LPL9\_0968 is likely to sense bile salt signaling molecules, regulate cell membrane surface proteins, and maintain the stability of cell membranes to improve the bile salt resistance of strains. This experiment explored the function of the surface proteins of the LiaX family in lactic acid bacteria for the first time, proved its importance in the bile salt stress resistance of the strain, and laid a theoretical foundation for the in-depth study of its anti-bile salt mechanism.

**Keywords** LiaX family surface proteins; lactic acid bacteria; bile salt stress; cell membrane surface stability