

## 定向驯化罗伊氏粘液乳杆菌 F22A089 尿酸降解能力研究

刘欣蕾, 甄冬玉, 张家超\*  
(海南大学食品科学与工程学院 海口 570100)

**摘要** 以罗伊氏粘液乳杆菌 F22A089 对核苷降解能力为例,探究增强其核苷降解能力的驯化策略,为获得高降尿酸能力菌株及对益生菌特定功能的定向驯化提供理论依据。采用体外驯化和体内驯化两种方法对益生菌降解核苷的能力进行驯化。结果发现,体外驯化无法快速增强益生菌的核苷降解能力,驯化 3 周后,菌株降解核苷的能力仍无显著变化。而通过饮食驱动小鼠体内的高尿酸肠道环境对益生菌进行体内驯化的研究表明,罗伊氏粘液乳杆菌 F22A089 驯化株增强了对核苷的降解能力,部分菌株对鸟苷的降解率达到原始菌株的 2 倍,说明通过宿主肠道选择压力对益生菌定向驯化具有可行性。对驯化菌株进行全基因组及转录组测序及突变位点分析,共注释到 3 个与降尿酸能力相关的突变基因(*pbuG\_1*, *rihB* 和 *yusV*),这些功能基因的突变与驯化菌株降尿酸能力增强密切相关。本研究率先通过体内驯化的方式定向驯化菌株并提高其对尿酸的降解能力,为通过宿主肠道定向驯化益生菌,增强其益生功效,提供了切实可行的驯化方法。

**关键词** 益生菌; 定向驯化; 体内驯化; 降尿酸; 罗伊氏粘液乳杆菌 F22A089

**文章编号** 1009-7848(2024)04-0009-13 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2024.04.002

益生菌通过定殖在宿主肠道内,发挥多种益生功效,改善宿主健康,预防或缓解疾病。如益生菌可以通过产生胆盐水解酶(Bile salt hydrolase, BSH)在宿主体内降胆固醇<sup>[1]</sup>,含有 *abfA* 簇的微生物可以通过改善肠道运动来改善功能性便秘<sup>[2]</sup>。通过将益生菌某种功能的作用放大可使益生菌的效用大大增加。在酿酒酵母的研究中,通过让菌株在特定的环境中生长繁殖来定向驯化出更优良的酿酒酵母菌株<sup>[3-4]</sup>。通过施加特定的环境条件使菌株朝着特定的方向进化,定向驯化得到的菌株使特定益生功能增强具有可行性。由于益生菌在宿主体内可进行适应性进化,通过宿主选择压力获得新的功能特征,因此可以尝试利用宿主选择压力对菌株进行定向驯化<sup>[5]</sup>。

高尿酸血症判定标准通常为血清中尿酸浓度超过 420  $\mu\text{mol/L}$ <sup>[6]</sup>,近年来发病率逐年升高。高尿酸血症还会诱发许多更严重的疾病,如痛风、高血压、心血管疾病、肾脏疾病等<sup>[7]</sup>。人体中,作为尿酸前体物质的核苷主要有肌苷、鸟苷两种,细胞中的核苷酸在核苷酸酶的作用下水解成核苷,核苷经由嘌呤碱最终变为尿酸(Uric acid, UA),降低宿

主体内的核苷含量,有助于减少尿酸含量<sup>[8]</sup>。常见的降尿酸药物主要有别嘌呤、非布司他和苯溴马隆等<sup>[9]</sup>,然而服用药物可能会导致如严重过敏反应,增加不可预知的心脏相关死亡风险和肝毒性等副作用<sup>[10]</sup>。因此,研究安全、有效的降尿酸方式具有重大意义。有报道益生菌可以通过对核苷的降解,减少宿主对合成尿酸前体物质的吸收,从而降低尿酸水平,实现缓解高尿酸血症的作用<sup>[11]</sup>。Wu 等<sup>[12]</sup>从西北传统发酵食物“浆水”中分离得到的发酵乳酸杆菌 JL-3,具有较好的降尿酸效果。Li 等<sup>[13]</sup>研究发现植物乳杆菌 FS4722 对核苷的降解,可能降低肠上皮细胞对尿酸前体物质的吸收,由此降低尿酸的合成量,表现出降血尿酸作用。Yamada 等<sup>[14]</sup>也发现乳酸杆菌 PA-3 通过利用肌苷减少大鼠对其的吸收。益生菌具有较好的降尿酸效果,通过定向驯化将益生菌降解核苷的作用放大,可使其降尿酸效果大大增加。

本研究首先对具有核苷降解能力的益生菌进行筛选,而后选择降解能力较强的益生菌株,通过体外和体内驯化罗伊氏粘液乳杆菌 F22A089 降解核苷的能力,探究增强其核苷降解能力的驯化方法,并对驯化菌株进行全基因组测序及突变位点分析,甄别其相关突变功能基因,为通过宿主肠道定向驯化益生菌,增强其功能,提供切实可行的驯化策略和理论依据。

收稿日期: 2024-04-15

基金项目: 国家自然科学基金优秀青年基金项目(32222066)

第一作者: 刘欣蕾,女,硕士生

通信作者: 张家超 E-mail: jiachao@hainanu.edu.cn

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

菌株:15株益生菌(见表1)均由海南大学热

带益生菌团队提供,菌种保藏于含25%甘油的冻存管中,于-80℃超低温冰箱保存。

表1 筛选菌株清单

Table 1 List of screened strains

编号	菌种名称	来源
WN01P-9	植物乳植杆菌( <i>Lactiplantibacillus plantarum</i> )	发酵虾酱
HNU082	植物乳植杆菌( <i>Lactiplantibacillus plantarum</i> )	发酵鱼茶
LS02Y-2	发酵乳杆菌( <i>Limosilactobacillus fermentum</i> )	发酵鱼茶
H22B008	副干酪乳酪杆菌( <i>Lacticaseibacillus paracasei</i> )	婴儿粪便
HNU312	副干酪乳酪杆菌( <i>Lacticaseibacillus paracasei</i> )	猪皮酸
H22B173	格氏乳杆菌( <i>Lactobacillus gasseri</i> )	婴儿粪便
F22A089	罗伊氏粘液乳杆菌( <i>Limosilactobacillus reuteri</i> )	发酵酸笋
WN02X-6	罗伊氏粘液乳杆菌( <i>Limosilactobacillus reuteri</i> )	发酵虾酱
LGG	鼠李糖乳酪杆菌( <i>Lacticaseibacillus rhamnosus</i> )	广东省微生物菌种保藏中心
H22B484	动物双歧杆菌乳亚种( <i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>lactis</i> )	婴儿粪便
H22B525	动物双歧杆菌乳亚种( <i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>lactis</i> )	婴儿粪便
H22B656	动物双歧杆菌乳亚种( <i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>lactis</i> )	婴儿粪便
H22B784	动物双歧杆菌乳亚种( <i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>lactis</i> )	婴儿粪便
58F-9	动物双歧杆菌乳亚种( <i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>lactis</i> )	婴儿粪便
H22B748	长双歧杆菌( <i>Bifidobacterium longum</i> subsp. <i>longum</i> )	婴儿粪便

实验动物:7周龄无菌级(Germ free,GF) C57BL/6J 雄性小鼠9只,体质量20g左右,购于净拓(深圳)生物科技有限公司。

饲料:高尿酸模型饲料(在基础饲料的基础上加入15%,30%,45%酵母膏和氧嗉酸钾)、基础饲料,江苏协同医药生物工程有限责任公司。基础饲料原料组成:玉米、小麦,进口鱼粉、鸡肉粉,豆粕、豆油,饲料级氯化钠、石粉、磷酸氢钙、氯化胆碱,蛋氨酸以及微量元素和维生素等。

试剂:尿酸试剂盒,南京建成生物工程研究所;肌苷和鸟苷(色谱级,纯度 $\geq 98\%$ ),上海源叶生物科技有限公司。

### 1.2 仪器与设备

高效液相色谱仪,日立科学仪器(北京)有限公司;Infinite 200 Pro 全波长微孔扫描仪,瑞士帝肯;OptiClean 130 双人洁净工作台,力康精密科技(上海)有限公司;LRH-250-HSE 恒温恒湿培养箱,广东泰宏君科学仪器有限公司;DW-HL528 超低温冰箱,中科美菱低温科技股份有限公司;3-18KS 台式高速冷冻离心机,SIGMA;KZ-III-F 研

磨仪,武汉赛维尔生物科技有限公司。

### 1.3 实验方法

#### 1.3.1 降尿酸菌株的筛选

1.3.1.1 核苷降解率的测定 标准曲线绘制,将肌苷和鸟苷配制成质量浓度分别为100,150,200,250,300,350,400  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的标准溶液,用0.22  $\mu\text{m}$  水系滤膜过滤,采用液相色谱检测其出峰时间及峰面积,每组3个平行样品。分别以肌苷、鸟苷的质量浓度为横坐标,峰面积为纵坐标,绘制标准曲线,并计算回归方程<sup>[15]</sup>。

将活化后的15株菌株按照2%接种量重新接种于5 mL 灭菌 MRS 或 TPY 液体培养基中,37℃培养24 h后,取1 mL 培养液(OD值应保持一致)于4℃,5 000 $\times$ g 离心5 min,将菌体混悬于1 mL 灭菌生理盐水中,清洗3次,离心得到菌体,随后重悬于750  $\mu\text{L}$  肌苷-鸟苷-0.1 mol/L 磷酸钾溶液(pH=7.0,肌苷和鸟苷的终浓度均为1.26 mmol/L)中,以未加菌的肌苷-鸟苷-0.1 mol/L 磷酸钾溶液为对照,于摇床(120 r/min)37℃培养60 min,迅速取出,将反应液置沸水浴中5 min,终止反应并冷

却至室温(25 ℃),以 10 000×g 离心 2 min,收集上清液。过 0.22 μm 滤膜后用液相色谱测定肌苷、鸟苷浓度。降解率计算公式为:

$$\text{降解率}(\%) = (C_0 - C_1) / C_0 \times 100 \quad (1)$$

式中,  $C_0$ ——标准溶液的原始浓度(未加菌的肌苷-鸟苷-0.1 mol/L 磷酸钾溶液浓度), mmol/L;  $C_1$ ——反应后溶液的剩余浓度, mmol/L。

采用高效液相色谱(HPLC)测定溶液浓度,色谱条件:色谱柱:Agilent ZORBAX SB-Aq 色谱柱(250 nm × 4.6 nm × 5 μm);流速 1.0 mL/min;柱温 30 ℃;流动相:甲醇和水;检测波长 254 nm;进样量 10 μL。色谱程序见表 2。

1.3.1.2 生长曲线的测定 活化罗伊氏粘液乳杆菌 F22A089 菌株,划线纯化,于 37 ℃培养箱中过夜培养。挑取单菌落接种至 5 mL MRS 液体培养基中,混匀,37 ℃培养 24 h。吸取 2% 罗伊氏粘液乳杆菌 F22A089 培养液到 MRS 液体培养基中,37 ℃摇床(120 r/min)培养 24 h,并从 0 h 开始,每隔 2 h 将培养液振荡混匀,于波长 600 nm 处测量培养液吸光度,每次 3 个平行,根据  $OD_{600nm}$  值绘制生长曲线。

1.3.1.3 耐酸、耐胆盐特性试验 耐酸特性试验:所用的 MRS 液体培养基用 6 mol/L 盐酸分别调节 pH 值为 3.0 和 2.5,用 0.22 μm 水系滤膜过滤。分别吸取 100 μL 培养 24 h 的罗伊氏粘液乳杆菌 F22A089 溶液接种至 pH 值为 3.0 和 2.5 的 MRS 液体培养基中,混合均匀,立刻进行梯度稀释,涂布于 MRS 固体培养基,并进行平板计数(记为初始活菌数)。将菌株于 37 ℃培养 3 h 后,再次取培养液进行梯度稀释,涂布于 MRS 固体培养基,并

表 2 液相色谱方法

时间/min	水/%	甲醇/%
0	98	2
5	98	2
10	88	12
12	85	15
20	85	15
20.2	98	2
24	98	2

进行平板计数(记为终止活菌数)。

耐胆盐特性试验:使用牛胆盐配制质量分数分别为 0.25% 和 0.3% 的 MRS 液体培养基。分别吸取 100 μL 培养 24 h 的罗伊氏粘液乳杆菌 F22A089 溶液接种至牛胆盐质量分数为 0.25% 和 0.3% 的 MRS 液体培养基中,混合均匀,立刻进行梯度稀释,涂布于 MRS 固体培养基,并进行平板计数(记为初始活菌数)。将菌株于 37 ℃培养 3 h 后,再次取培养液进行梯度稀释,涂布于 MRS 固体培养基,并进行平板计数(记为终止活菌数)。

$$\text{存活率}(\%) = \text{终止活菌数} \div \text{初始活菌数} \times 100 \quad (2)$$

1.3.2 罗伊氏粘液乳杆菌 F22A089 体外驯化试验 参照以往研究<sup>[3-4]</sup>中的驯化菌株方法,设计在试管中驯化罗伊氏粘液乳杆菌 F22A089 的方法(图 1)。罗伊氏粘液乳杆菌 F22A089 菌株划线纯化后,接种至溶解有肌苷、鸟苷各 0.5 mg/mL 的 MRS 液体培养基中,每日传代,分别于第 1,2,3 周结束后,取样、分菌。方法如下:取培养液在 MRS 固体培养基上划线培养,37 ℃培养箱培养 1

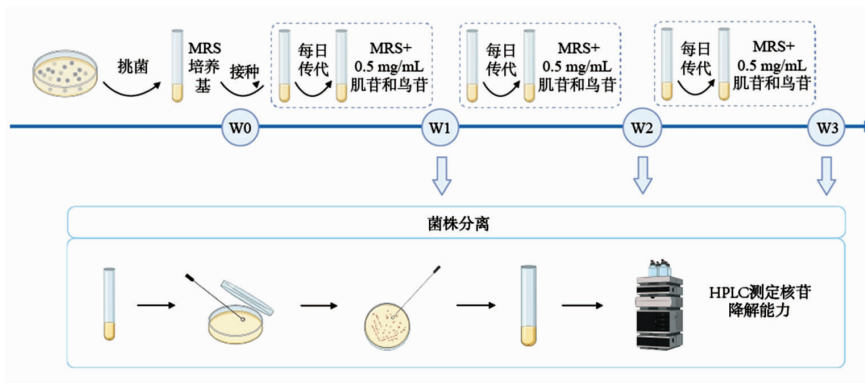


图 1 体外驯化试验流程图

Fig.1 Flow chart of *in vitro* acclimation experiment

d后,从培养皿中挑取10个单菌落到普通MRS液体培养基中,37℃培养箱恒温培养1d,划线纯化后,测定降解核苷能力,操作参照1.3.1.1节,HPLC条件不变。

### 1.3.3 罗伊氏粘液乳杆菌 F22A089 体内驯化实验

**1.3.3.1 实验设计** 通过高尿酸饮食,在小鼠肠道中制造高尿酸环境,而后对菌株进行驯化。体内驯化实验用小鼠为GF级小鼠,其肠道的无菌环境可使罗伊氏粘液乳杆菌 F22A089 菌株在1次灌胃后,长期定殖在小鼠肠道,从而保证粪便所有分离菌株均来自于该原始菌株<sup>[5]</sup>。

将小鼠分为3组,分别是对照组(3只)、模型组(3只)以及灌菌组(3只),共饲养5周。实验动物饲养于无菌小鼠饲养系统中,饲养温度(23±1)℃,相对湿度(50±5)%,昼夜12h交替。所有动

物实验严格遵守道德伦理标准,经海南大学伦理委员会批准(批准号 HNUAUCC-2023-00190)。

小鼠经适应性饲养1周后,以 $10^{10}$  CFU/d的高浓度菌液对灌菌组小鼠进行一次性灌胃,而后不断提高饲料中酵母膏+氧嗉酸钾浓度,逐步增加小鼠尿酸含量,创造小鼠高尿酸环境<sup>[16]</sup>。第1周将模型组与灌菌组饲料替换为15%酵母膏+氧嗉酸钾造模饲料。分别于第3周开始前和第5周开始前,将饲料依次更换为30%酵母膏+氧嗉酸钾造模饲料以及45%酵母膏+氧嗉酸钾造模饲料。分别于1,3,4,5周结束后,取灌菌组粪便进行菌株分离。第5周结束时,所有小鼠禁食、不禁水12h,对小鼠取血后,将血液样本静置20min,4℃,3000 r/min离心20min,取上层血清,严格按照试剂盒说明书测量小鼠的UA水平(图2)。

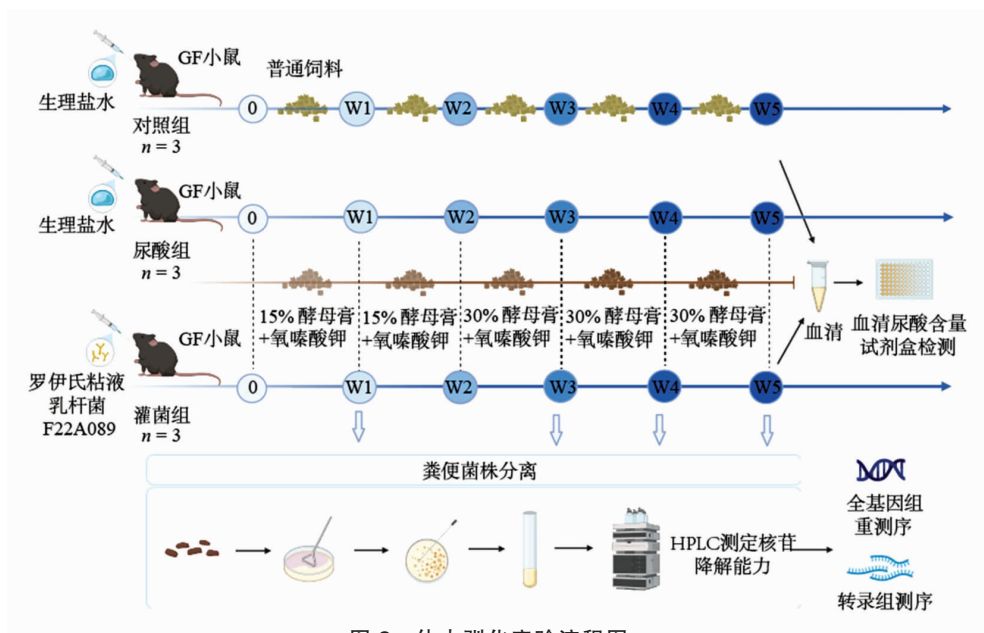


图2 体内驯化实验流程图

Fig.2 Flow chart of *in vivo* acclimation experiment

**1.3.3.2 粪便样本中罗伊氏 F22A089 驯化菌株的分离** 收集灌菌组小鼠新鲜粪便0.1g,加入1.5mL生理盐水后,用研磨仪研磨均匀,而后以 $10^{-3}$ , $10^{-4}$ , $10^{-5}$ 梯度稀释,涂布至MRS固体培养基上,37℃培养箱培养48h,从培养皿中挑取10~15个单菌落到MRS液体培养基中,划线纯化后保藏冻存,并测量其降解核苷能力,操作参照1.3.1.1节。

**1.3.4 全基因组重测序和原核转录组测序** 将纯

化的罗伊氏粘液乳杆菌原始菌株按2%的接种量接种至35mL MRS培养基中,37℃富集培养24h,6000×g离心10min,弃上清,得到菌泥,送至北京诺禾致源科技股份有限公司进行Nanopore三代测序。

将纯化的驯化菌株按上述步骤得到菌泥,一部分于-80℃保藏,并将菌泥送至北京诺禾致源科技股份有限公司进行全基因组重测序。另一部分

通过 1.3.1.1 节中描述的肌苷-鸟苷-0.1 mol/L 磷酸钾溶液重悬菌泥, 37 °C 孵育 1 h 后, 再次 6 000×g 离心 10 min 取得菌泥, 将菌泥送至北京诺禾致源科技股份有限公司进行原核转录组测序。

#### 1.4 数据处理及统计分析

**1.4.1 基因组草图拼接** 通过 Filtlong 软件将罗伊氏粘液乳杆菌 F22A089 原始菌株 Nanopore 三代测序结果进行质控<sup>[17]</sup>, 去除低质量序列后用 Flye 软件拼接<sup>[18]</sup>, 再用 Racon 软件和 Minimap2 软件联用进行 3 次纠错<sup>[19-20]</sup>, 得到罗伊氏粘液乳杆菌 F22A089 原始菌株的完整基因组。

**1.4.2 驯化菌株单核苷酸突变位点 (Single nucleotide variations, SNVs) 注释以及驯化菌株系统发育树构建** 用原始菌株的完整基因组序列作为参考基因组, 使用 Bowtie2 软件建立参考数据库<sup>[21]</sup>, 并用此参考基因组与各个驯化菌株的测序 reads 进行比对, 得到的 sam 文件用 SAMtools 软件排序转换格式后, 得到各个驯化菌株的 bam 文件<sup>[22]</sup>。以 bam 文件为输入文件, 通过 InStrain 软件对 9 株驯化菌株单核苷酸突变位点 (SNVs) 进行注释<sup>[23]</sup>。罗伊氏粘液乳杆菌 F22A089 基因组的功能注释用 Prokka 软件实现<sup>[24]</sup>。

**1.4.3 菌株转录组分析** 通过 Fastp 软件对罗伊氏粘液乳杆菌 F22A089 原始菌株和驯化菌株转录组测序结果进行质控<sup>[25]</sup>, 用 Trinity 软件拼接<sup>[26]</sup>, 得到罗伊氏粘液乳杆菌 F22A089 的完整转录本。通过 Prokka 软件对拼接结果进行自动注释<sup>[24]</sup>, 以 Salmon 软件构建 index 作为定量参考基因组<sup>[27]</sup>, 所得结果的处理使用 NumReads 列以 R 软件内的

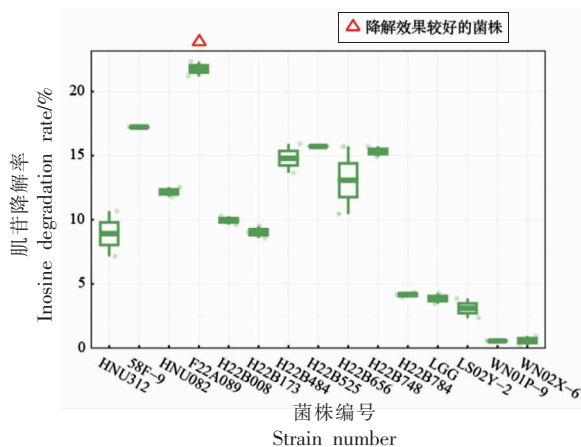
“DESeq2”包进行标准化和表达量差异分析<sup>[28]</sup>。

**1.4.4 生信统计分析** 统计分析使用 GraphPad Prism 及 R 软件。柱状图用 GraphPad Prism 软件绘制。箱型图的绘制使用 R 软件的 “ggplot2” “ggsignif” “ggpubr” 包<sup>[29-31]</sup>。拟合曲线和绘制使用 R 软件的 “ggplot2” 包。转录组表达量的可视化用 R 软件的 “ggplot2” 包实现, 组间差异用 Kruskal-Wallis 检验, 组间两两比较使用邓肯检验 (Duncan’s test), 系统发育树使用 MEGA-X 和 iTOL 软件构建。

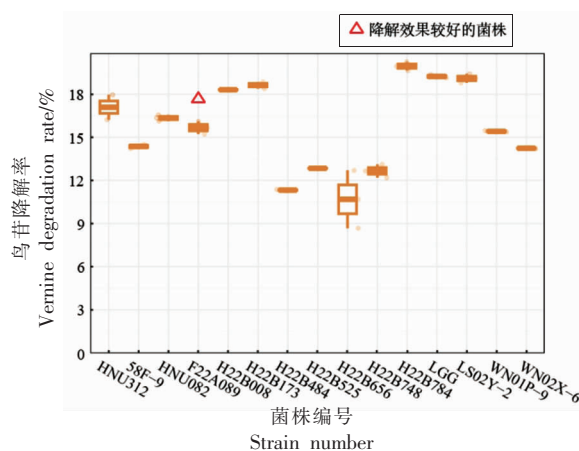
## 2 结果与分析

### 2.1 降尿酸菌株筛选结果

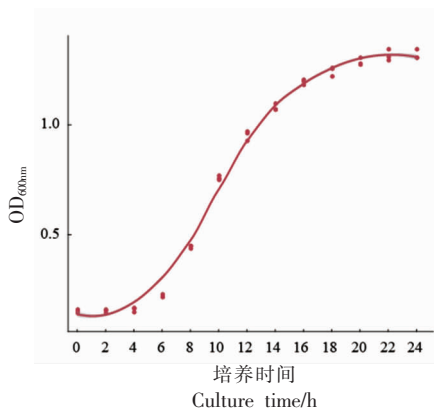
将 15 株菌活化后进行核苷降解试验, 得到各菌株对肌苷和鸟苷的降解率, 结果表明, 罗伊氏粘液乳杆菌 F22A089 的肌苷降解能力是所有菌株中最高的 (图 1a), 动物双歧杆菌 H22B784 菌株对鸟苷的降解能力最高 (图 1b)。罗伊氏粘液乳杆菌 F22A089 的鸟苷降解能力同样较好, 而 H22B784 等菌株的肌苷降解能力非常差。综合 2 个指标后, 罗伊氏粘液乳杆菌 F22A089 是对肌苷和鸟苷降解效果均较好的菌株, 用于后续降解尿酸驯化实验, 并测定其生长曲线和耐受性。根据菌株在波长 600 nm 处的吸光度, 绘制罗伊氏粘液乳杆菌 F22A089 在 37 °C 下培养 24 h 的生长曲线 (图 1c)。耐受性试验结果表明, 罗伊氏粘液乳杆菌 F22A089 在 pH 3.0 条件下的培养基中的存活率为 2%, 在 0.25% 胆盐条件下存活率最高达到 0.025% (图 1d)。



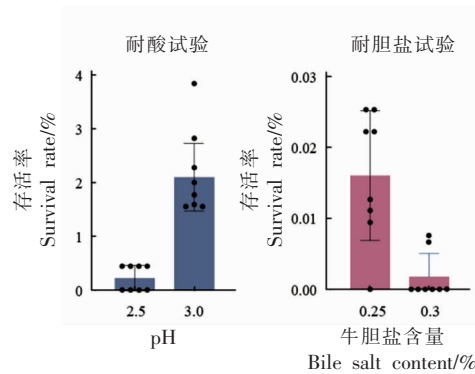
(a) 15 株菌的肌苷降解率



(b) 15 株菌的鸟苷降解率



(c) 罗伊氏粘液乳杆菌 F22A089 生长曲线



(d) F22A089 耐酸、耐胆盐试验结果

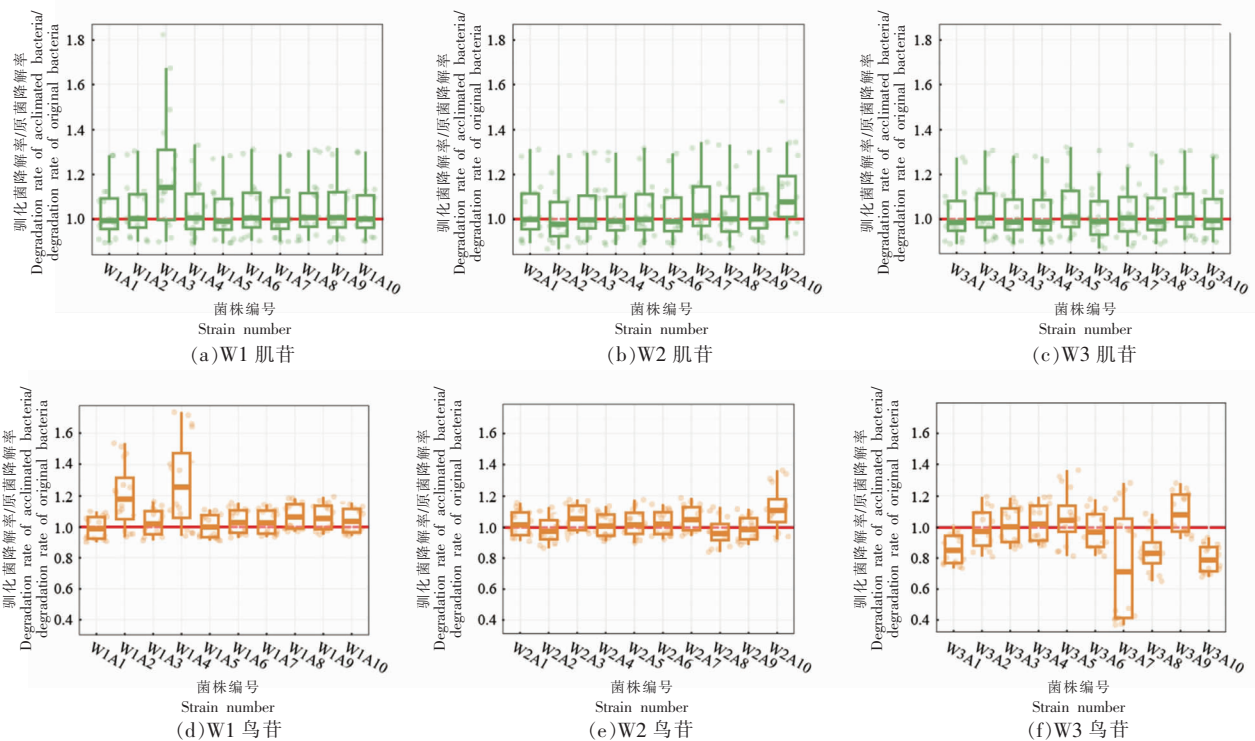
图 3 菌株筛选结果

Fig.3 Strain screening result

### 2.2 罗伊氏粘液乳杆菌 F22A089 体外驯化结果

分离出第 1,2,3 周的驯化菌株各 10 株,编号 WnAn, W1、W2、W3 表示分别从 1,2,3 周分离出的菌株, A1~A10 表示每周分离出的 10 株菌的序号。对获得的 30 株体外驯化菌株与罗伊氏粘液乳杆菌 F22A089 原始菌株的核苷降解能力进行测

定(图 4), 结果为各驯化菌株与原始菌株对核苷降解率的比值。驯化后菌株与原始菌株的肌苷降解率比值均接近 1, 表明其降解能力未出现显著提高。驯化 3 周后降解能力未显著提高, 这表明依靠体外驯化, 不能快速驯化出降尿酸效果更好的菌株。



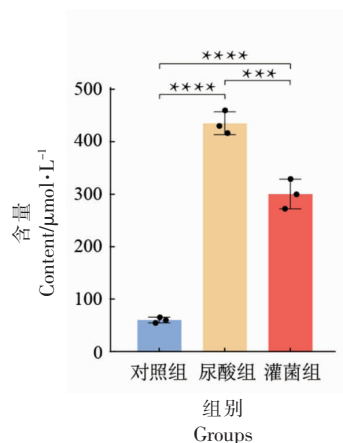
注: 比值 > 1 表示升高, < 1 表示降低。

图 4 3 个时间点分离的驯化菌株肌苷/鸟苷降解率与原始菌株的比值

Fig.4 The ratio of degradation rate of inosine and guanosine of acclimated strains isolated from the three time points to the original bacteria

### 2.3 罗伊氏粘液乳杆菌 F22A089 体内驯化结果

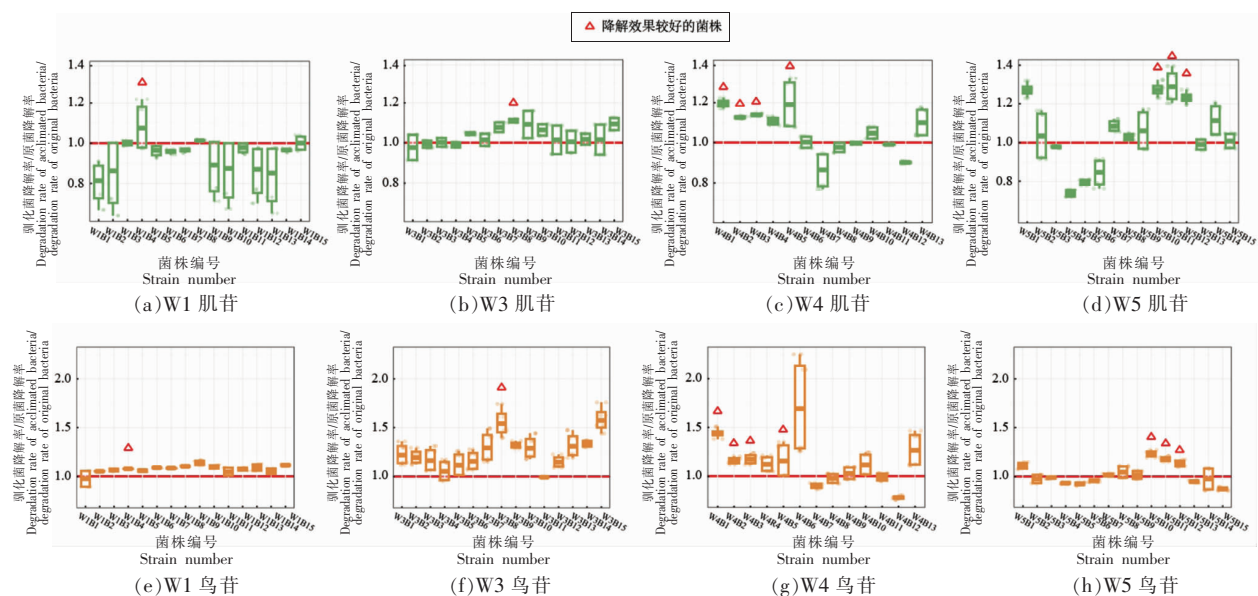
在第 5 周处死小鼠, 测量 3 组小鼠血清尿酸含量(图 5)。结果表明尿酸组血清尿酸含量与对照组相比显著升高, 说明高尿酸饮食干预后小鼠血清尿酸含量显著升高, 造模成功。同时, 灌菌组小鼠血清尿酸含量相比尿酸组显著降低, 表明罗伊氏粘液乳杆菌 F22A089 具有显著的降尿酸作用。在实验第 1, 3, 4, 5 周分离驯化菌株, 分别与原始菌株进行核苷降解率比较(图 6), 研究发现从第 3 周开始, 大部分的驯化菌株对两种核苷的降解率均明显升高。相比于第 3 周分离的驯化菌株, 第 4 周驯化菌株核苷最大降解率升高, W4B6 对鸟苷降解率达到原始菌株的 2 倍, 而第 5 周驯化菌株对核苷的降解能力相比于第 4 周驯化菌株无显著提升。表明通过宿主肠道驯化菌株增强了其降尿酸能力, 可能具有驯化终点, 且驯化菌株对鸟苷的降解率均高于对肌苷的降解率。



注:\*\*\*.  $P < 0.001$ , \*\*\*\*.  $P < 0.0001$ 。

图 5 小鼠体内血清尿酸含量

Fig.5 Serum uric acid content in mice



注: 比值 > 1 表示升高, < 1 表示降低。

图 6 4 个时间点分离的驯化菌株肌苷/鸟苷降解率与原始菌株的比值

Fig.6 The ratio of degradation rate of inosine and guanosine of acclimated strains isolated from the four time points to the original bacteria

综合比较所有驯化菌株降解核苷能力, 选择对肌苷和鸟苷核苷降解能力均较高的 9 株菌株 (W1B4、W3B8、W4B1、W4B2、W4B3、W4B5、W5B10、W5B11、W5B12) 进行全基因组测序, 用于后续对菌株 SNVs 注释甄别。

### 2.4 驯化菌株 SNVs 突变位点甄别及基因功能注释

以罗伊氏粘液乳杆菌 F22A089 原始菌株为参考菌株, 注释 9 株驯化菌株发生的 SNVs。对各驯化菌株发生的 SNVs 统计分析后, 构建罗伊氏粘液

乳杆菌 F22A089 原始菌株与 9 株驯化菌株的系统发育树(图 7a)。结果表明,与其它驯化菌株相比,W5B11 和 W4B5 菌株位于与原始菌株进化距离最远的进化分支。对各驯化菌株的 SNVs 数量进行比较,发现 9 株降解核苷能力增强的驯化菌株均发生大量突变,SNVs 数量均超过 300 个(图 7b)。有趣的是,发生较多 SNVs 的菌株(W5B11, W4B5 和 W1B4)均增强了肌苷降解能力,其中,分离自第 5 周的 W5B11 菌株发生了 876 个 SNVs,在所有驯化菌株中 SNVs 数量最多,并与原始菌

株相比,肌苷降解率升高最多,表明驯化菌株上发生的突变可能是其肌苷降解率增强的原因。本研究统计了 9 株驯化菌株中均发生突变的基因,共甄别到 18 个功能基因(表 3)。通过对这 18 个基因的功能注释,发现基因 *yusV*(*OPHIPLBI\_00171*)编码了铁载体运输系统 ATP 结合蛋白 YusV,而铁离子的蓄积与高尿酸血症和痛风疾病存在密切联系<sup>[32]</sup>。在此基因上的突变很可能是驯化菌株增强其降尿酸能力的原因。通过进一步比较分析发现这 9 株驯化菌株均在该基因的同一点

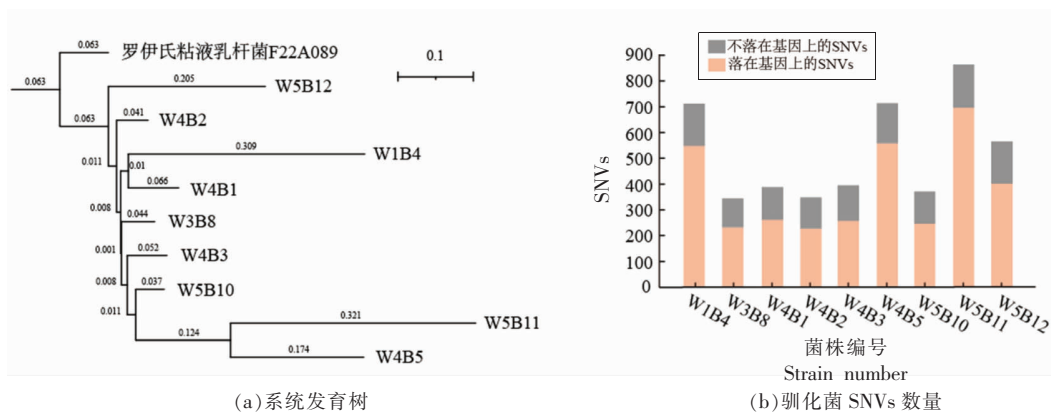


图 7 系统发育树(a)以及驯化菌株 SNVs 数量(b)

Fig.7 The number of SNVs in phylogenetic trees (a) and domesticated strains (b)

表 3 在驯化菌株中都发生突变的基因注释信息

Table 3 Annotated information on genes that are mutated in domesticated bacteria

起始位点至终止位点	基因	基因编码物质
146784~146897	<i>OPHIPLBI_00156</i>	假定蛋白
164931~165626	<i>OPHIPLBI_00171</i>	铁载体运输系统 ATP 结合蛋白 YusV
458949~460199	<i>OPHIPLBI_00442</i>	假定蛋白
460977~461960	<i>OPHIPLBI_00444</i>	假定蛋白
707715~708638	<i>OPHIPLBI_00686</i>	IS30 家族转座酶 IS1070
708650~709027	<i>OPHIPLBI_00687</i>	假定蛋白
732516~733439	<i>OPHIPLBI_00736</i>	IS30 家族转座酶 IS1070
733457~734221	<i>OPHIPLBI_00737</i>	假定蛋白
824632~825057	<i>OPHIPLBI_00825</i>	细胞形状决定蛋白 MreC
983728~985029	<i>OPHIPLBI_01002</i>	假定蛋白
985013~985936	<i>OPHIPLBI_01003</i>	IS30 家族转座酶 IS1070
1856871~1858031	<i>OPHIPLBI_01842</i>	NAD-依赖性苹果酸酶
2263484~2264002	<i>OPHIPLBI_02234</i>	PTS 系统甘露糖特异性 EIIAB 组件
2330992~2331183	<i>OPHIPLBI_02299</i>	假定蛋白
2579291~2579923	<i>OPHIPLBI_02561</i>	假定蛋白
2580975~2581778	<i>OPHIPLBI_02562</i>	假定蛋白
2667662~2668039	<i>OPHIPLBI_02647</i>	假定蛋白
2884645~2885067	<i>OPHIPLBI_02855</i>	假定蛋白



(165004)发生突变,且该突变为非同义突变。该位点原有碱基为鸟嘌呤(G),在驯化菌株中突变为胞嘧啶(C),所编码的氨基酸由亮氨酸(Leu)变为缬氨酸(Val),这可能对该基因表达的蛋白结构及功能产生影响,进而增强菌株的降尿酸能力。

此外,W5B11 菌株发生了最多的 SNVs,并在肌苷降解能力上增强最多,因此进一步分析该菌株发生的所有 SNVs,结果发现该菌株还发生了与核苷代谢密切相关的 2 个基因 (*pbuG\_1* 和 *rihB*) 的突变(图 8)。*rihB* 基因位于菌株的第 613 755~

614 711 个碱基之间,编码的核糖核苷水解酶可以降解宿主体内的核苷,降解产物为嘌呤(鸟嘌呤和次黄嘌呤)。而 *pbuG\_1* 基因位于 511593~512876 位点之间,编码的渗透酶 *PbuG* 可以吸收一定的外源鸟嘌呤和次黄嘌呤<sup>[8]</sup>,这可能是该菌株相较于其它驯化菌株可增强核苷降解能力的原因。发生在 *pbuG\_1* 和 *rihB* 基因上的 SNVs 信息分别见表 4 和表 5。3 个基因及发生突变的位点在罗伊氏粘液乳杆菌 F22A089 基因组中的位置标注在图 8 中。

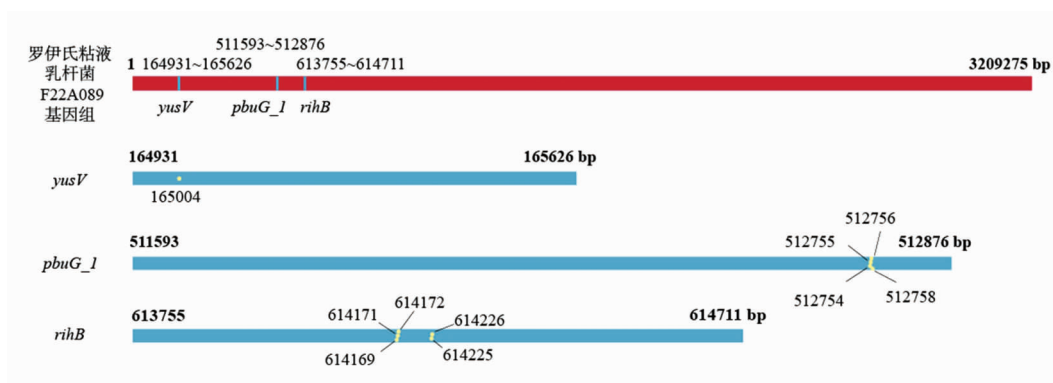


图 8 3 个基因及其上的突变在罗伊氏粘液乳杆菌 F22A089 基因组中的位置

Fig.8 Location of three genes and their mutations in the *Limosilactobacillus reuteri* F22A089 gene

表 4 *pbuG\_1* 基因上的 SNVs 注释信息

位点	突变类型	碱基突变情况	编码氨基酸
512753	同义突变	G-A	-
512754	非同义突变	G-T	Thr-Asn
512755	非同义突变	T-A	Thr-Ser
512757	非同义突变	T-G	Lys-Thr

表 5 *rihB* 基因上的 SNVs 注释信息

位点	突变类型	碱基突变情况	编码氨基酸
614168	同义突变	G-A	-
614170	非同义突变	T-A	Asn-Tyr
614171	同义突变	G-C	-

## 2.5 驯化菌株在核苷环境下转录变化

用罗伊氏粘液乳杆菌 F22A089 原始菌株的基因组作参考,对罗伊氏粘液乳杆菌 F22A089 原始菌株和 9 株驯化菌株在核苷环境下的基因转录组进行测序、比对、注释。根据各基因表达量绘制火山图,甄别差异基因。 $P < 0.05$  且  $\log_2$  Fold Change  $< -1$  的基因为显著下调基因, $P < 0.05$  且  $\log_2$  Fold Change  $> 1$  的值为显著上调基因,其余为无显著差异表达基因(图 9)。对罗伊氏粘液乳杆菌 F22A089 原始菌株和 W5B11 菌株差异表达基

因的比较发现,*dnaK\_6* 与 *rpsL\_4* 等基因表达量上调,*nsrR\_2*、*sufT\_5* 与 *ldh\_3* 等基因表达量下调(表 6)。

## 3 结论与讨论

本研究通过体外驯化和体内驯化两种方式驯化罗伊氏粘液乳杆菌 F22A089 降解核苷的能力。结果表明,体外驯化无法快速增强罗伊氏粘液乳杆菌 F22A089 的核苷降解能力,驯化 3 周后菌株降解核苷的能力仍无显著变化。可能由于体外培

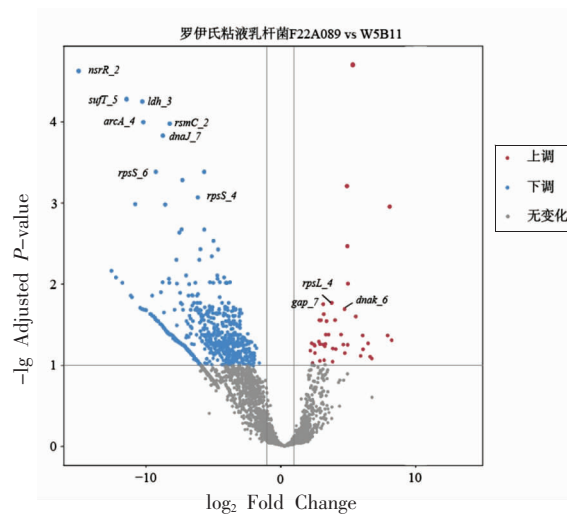


图9 W5B11与罗伊氏粘液乳杆菌F22A089原菌相比基因表达量的变化

Fig.9 Changes of gene expression in W5B11 compared with *Limosilactobacillus reuteri* F22A089

表6 表达量变化的基因注释信息

Table 6 Annotated information on genes with changed expression levels

基因	起始位点至终止位点	上调/下调	功能
<i>nsrR_2</i>	1932822~1933346	下调	HTH型转录抑制因子NsrR
<i>sufT_5</i>	3203537~3203848	下调	Fe-S蛋白成熟辅助因子SufT
<i>ldh_3</i>	2383637~2384599	下调	L-乳酸脱氢酶
<i>arcA_4</i>	2387902~2388924	下调	鸟氨酸氨基甲酰转移酶
<i>rsmC_2</i>	2225323~2225931	下调	核糖体RNA小亚基甲基转移酶C
<i>dnaJ_7</i>	1092434~1093576	下调	伴侣蛋白DnaJ
<i>rpsS</i>	1903812~1904087	下调	30S核糖体蛋白S19
<i>rpsL_4</i>	1910580~1910993	上调	30S核糖体蛋白S12
<i>gap_7</i>	2133074~2134096	上调	甘油醛-3-磷酸脱氢酶
<i>dnaK_6</i>	1090464~1092332	上调	伴侣蛋白DnaK

培养基环境对罗伊氏粘液乳杆菌 F22A089 产生的选择压力较小,无法产生显著驱动作用。而通过饮食驱动小鼠体内的高尿酸肠道环境对益生菌株进行体内驯化研究表明,罗伊氏粘液乳杆菌 F22A089 驯化菌株增强了对核苷的降解能力,部分菌株对鸟苷降解率达到原始菌株的2倍,由此证明在宿主肠道对益生菌株驯化的可行性。

对驯化菌株中 SNVs 位点和基因表达量的分析表明,W5B11 菌株具有最高的突变数量,且发生了 *pbuG\_1* 和 *rihB* 基因的突变,表达的 RihB 为3种同工的核糖核苷水解酶 RihA-C 之一,三者能够快速协同催化核苷水解成核碱基,即催化肌苷、鸟苷转化为嘌呤(鸟嘌呤和次黄嘌呤)<sup>[8]</sup>,说明发生

在 *rihB* 上的突变很可能增强了驯化菌株对核苷的降解。此外,驯化菌株上发生突变的 *pbuG\_1* 基因,还可以通过鸟嘌呤/次黄嘌呤渗透酶 PbuG 摄取一定量的核碱基。这2个基因上的突变可能对 W5B11 菌株对降解核苷的能力增强具有重要意义。其次,所有驯化菌株上均发生了 *yusV* 基因突变,该基因编码了铁载体运输系统 ATP 结合蛋白。铁对于维持代谢稳态的关键生物和生理过程有重要影响<sup>[33]</sup>,而宿主体内铁的缺乏和蓄积都会影响宿主的代谢稳态。Mayneris-Perxachs 等<sup>[34]</sup>发现铁蛋白可以通过肠道微生物组影响肥胖患者非酒精性脂肪性肝疾病。杜康等<sup>[35]</sup>阐述了铁蓄积与高尿酸血症和痛风的相关性。驯化菌株在与铁载

体代谢运输系统相关基因上的突变,可能改变了宿主体内的铁水平,从而实现对高尿酸血症的缓解作用。

本研究创新地通过体内驯化的方式来定向驯化菌株,提高其对尿酸的降解能力,为通过宿主肠道定向驯化益生菌功能提供了切实可行的驯化方法,也为后续更多益生菌的有益功能的增强提供了理论依据。本研究为初步探索,对驯化菌株降尿酸的能力验证仅通过体外核苷降解率来判断,后续研究工作将围绕以下3个方面:1)在高尿酸模型小鼠体内进行表型验证。2)厘清驯化菌株降尿酸能力增强与具体基因功能发挥的作用机制。3)探寻有针对性增强益生菌株驯化的普适性方法。

### 参 考 文 献

- [1] 李权威, 张开屏, 赵艳红, 等. 乳酸菌调控胆固醇代谢关键因子的研究进展[J]. 中国食品学报, 2021, 21(1): 341-350.  
LI Q W, ZHANG K P, ZHAO Y H, et al. Research progress of regulatory key factors involved in cholesterol metabolism by lactic acid bacteria [J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2021, 21(1): 341-350.
- [2] ZHANG C C, YU L L, MA C C, et al. A key genetic factor governing arabinan utilization in the gut microbiome alleviates constipation[J]. Cell Host & Microbe, 2023, 31(12): 1989-2006.
- [3] 张秀丽, 唐晓达, 刘进文, 等. 高浓度双乙酰定向驯化获得优良啤酒酵母菌株的研究[J]. 食品工业科技, 2003, 24(8): 42-43.  
ZHANG X L, TANG X D, LIU J W, et al. Study on the high concentration of diacetyl directed acclimation to obtain excellent strains of beer yeast[J]. Science and Technology of Food Industry, 2003, 24(8): 42-43.
- [4] 黄庆, 苏圆媛, 左勇, 等. 耐受高浓度乙醇酿酒酵母的定向驯化及其在桑葚果酒中的应用初探[J]. 食品与发酵工业, 2023, 49(12): 166-173.  
HUANG Q, SU Y Y, ZUO Y, et al. Directional domestication of *Saccharomyces cerevisiae* tolerant to high concentration ethanol and its application in mulberry wine brewing[J]. Food and Fermentation Industries, 2023, 49(12): 166-173.
- [5] JIANG S M, ZHANG C C, HAN Z, et al. Native microbiome dominates over host factors in shaping the probiotic genetic evolution in the gut [J]. npj Biofilms and Microbiomes, 2023, 9(1): 80.
- [6] 姜泉, 韩曼, 唐晓颇, 等. 痛风和高尿酸血症病证结合诊疗指南[J]. 中医杂志, 2021, 62(14): 1276-1288.  
JIANG Q, HAN M, TANG X P, et al. Guidelines for diagnosis and treatment of gout combined with hyperuricemia [J]. J Tradit Chin Med, 2021, 62(14): 1276-1288.
- [7] BORGHI C, AGABITI-ROSEI E, JOHNSON R J, et al. Hyperuricaemia and gout in cardiovascular, metabolic and kidney disease[J]. European Journal of Internal Medicine, 2020, 80: 1-11.
- [8] WANG M H, WU J M, JIA H C, et al. Enterocyte synthesizes and secretes uric acid as antioxidant to protect against oxidative stress via the involvement of Nrf pathway[J]. Free Radical Biology and Medicine, 2022, 179: 95-108.
- [9] HAO A J, ZHANG C L, SONG H Y. Natural products improving hyperuricemia with hepatorenal dual effects[J]. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 2016, 2016: 7390504.
- [10] PASCART T, RICHELTE P. Investigational drugs for hyperuricemia, an update on recent developments[J]. Expert Opinion on Investigational Drugs, 2018, 27(5): 437-444.
- [11] WANG J, CHEN Y, ZHONG H, et al. The gut microbiota as a target to control hyperuricemia pathogenesis: Potential mechanisms and therapeutic strategies[J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2022, 62(14): 3979-3989.
- [12] WU Y, YE Z, FENG P Y, et al. *Limosilactobacillus fermentum* JL-3 isolated from 'Jiangshui' ameliorates hyperuricemia by degrading uric acid[J]. Gut Microbes, 2021, 13(1): 1897211.
- [13] LI M F, WU X L, GUO Z W, et al. *Lactiplantibacillus plantarum* enables blood urate control in mice through degradation of nucleosides in gastrointestinal tract[J]. Microbiome, 2023, 11(1): 153.
- [14] YAMADA N, SAITO-IWAMOTO C, NAKAMURA M, et al. *Lactobacillus gasseri* PA-3 uses the purines IMP, inosine and hypoxanthine and reduces their absorption in rats[J]. Microorganisms, 2017, 5(1): 10.

- [15] ZHAO H Y, CHEN X Y, ZHANG L, et al. *Lactocaseibacillus rhamnosus* Fmb14 prevents purine induced hyperuricemia and alleviate renal fibrosis through gut-kidney axis [J]. *Pharmacological Research*, 2022, 182: 106350.
- [16] 王琳, 沈嘉艳, 谢招虎, 等. 高尿酸血症动物模型研究进展[J]. *中国实验动物学报*, 2023, 31(1): 112-119.
- WANG L, SHEN J Y, XIE Z H, et al. Research progress of hyperuricemia animal model [J]. *Acta Laboratorium Animalis Scientia Sinica*, 2023, 31(1): 112-119.
- [17] STEINIG E, COIN L. Nanoq: Ultra-fast quality control for nanopore reads[J]. *Journal of Open Source Software*, 2022, 7(69): 2991.
- [18] WANG L, YAN Y C, TANG D, et al. Improving the energy conversion efficiency of a laser-driven flyer by an in situ-fabricated nano-absorption layer [J]. *Nanoscale Research Letters*, 2020, 15: 1-8.
- [19] ZIMIN A V, SALZBERG S L. The genome polishing tool POLCA makes fast and accurate corrections in genome assemblies[J]. *PLoS Computational Biology*, 2020, 16(6): e1007981.
- [20] LI H. Minimap2: Pairwise alignment for nucleotide sequences[J]. *Bioinformatics*, 2018, 34(18): 3094-3100.
- [21] LANGDON W B. Performance of genetic programming optimised Bowtie2 on genome comparison and analytic testing (GCAT) benchmarks [J]. *BioData Mining*, 2015, 8(1): 1-7.
- [22] LI H, HANDSAKER B, WYSOKER A, et al. The sequence alignment/map format and SAMtools [J]. *Bioinformatics*, 2009, 25(16): 2078-2079.
- [23] OLM M R, CRITS-CHRISTOPH A, BOUMA-GREGSON K, et al. inStrain profiles population microdiversity from metagenomic data and sensitively detects shared microbial strains[J]. *Nature Biotechnology*, 2021, 39(6): 727-736.
- [24] SEEMANN T. Prokka: Rapid prokaryotic genome annotation[J]. *Bioinformatics*, 2014, 30(14): 2068-2069.
- [25] CEHN S F, ZHOU Y Q, CEHN Y R, et al. fastp: an ultra-fast all-in-one FASTQ preprocessor [J]. *Bioinformatics*, 2018, 34(17): i884-i890.
- [26] HAAS B J, PAPANICOLAOU A, YASSOUR M, et al. De novo transcript sequence reconstruction from RNA-seq using the Trinity platform for reference generation and analysis[J]. *Nature Protocols*, 2013, 8(8): 1494-1512.
- [27] PATRO R, DUGGAL G, LOVE M I, et al. Salmon provides fast and bias-aware quantification of transcript expression[J]. *Nature methods*, 2017, 14(4): 417-419.
- [28] LOVE M, ANDERS S, HUBER W. Differential analysis of count data-the DESeq2 package [J]. *Genome Biol*, 2014, 15(550): 1-54.
- [29] WILKINSON L. Ggplot2: Elegant graphics for data analysis[J]. *Biometrics*, 2011, 67(2): 678-679.
- [30] AHLMANN-ELTZE C, PATIL I. Ggsignif: R package for displaying significance brackets for 'ggplot2' [J/OL]. *PsyArxiv*: 1-3. (2021-03-31)[2024-04-15] <https://api.semanticscholar.org/CorpusID:236654790>.
- [31] KASSAMBARA A. Ggpubr: 'ggplot2' based publication ready plots[J/OL]. *R Package Version*: 2. (2023-02-10)[2024-04-15] <https://rpkgs.datanovia.com/ggpubr/>.
- [32] LI H X, ZHANG X Y, GU L L, et al. Anti-gout effects of the medicinal fungus *Phellinus igniarius* in hyperuricaemia and acute gouty arthritis rat models [J]. *Front Pharmacol*, 2021, 12(8): 801-910.
- [33] MAYNERIS-PERXACHS J, MORENO-NAVARRETE J M, FERNÁNDEZ-REAL J M. The role of iron in host-microbiota crosstalk and its effects on systemic glucose metabolism [J]. *Nature Reviews Endocrinology*, 2022, 18(11): 683-698.
- [34] MAYNERIS-PERXACHS J, CARDELLINI M, HOYLES L, et al. Iron status influences non-alcoholic fatty liver disease in obesity through the gut microbiome[J]. *Microbiome*, 2021, 9(1): 104
- [35] 杜康, 王子文, 韩彬, 等. 铁蓄积与高尿酸血症和痛风的研究进展[J]. *中华风湿病学杂志*, 2022, 26(12): 859-862.
- DU K, WANG Z W, HAN B, et al. Research progress of iron accumulation and hyperuricemia and gout[J]. *Chinese Journal of Rheumatology*, 2022, 26(12): 859-862.

## Studies on the Targeted Domestication of *Limosilactobacillus reuteri* F22A089 for Uric Acid Degradation Ability

Liu Xinlei, Zhen Dongyu, Zhang Jiachao\*

(School of Food Science and Engineering, Hainan University, Haikou 570100)

**Abstract** This study took *Limosilactobacillus reuteri* F22A089 as an example to explore domestication strategies to enhance its nucleoside degradation ability, which provided theoretical basis for obtaining strains with high uric acid lowering ability and targeted domestication of specific functions of probiotics. Two methods of *in vitro* and *in vivo* domestication were used to domesticate the ability of probiotics to degrade nucleosides. The results showed that the *in vitro* domestication method could not rapidly improve the nucleoside degradation ability of probiotics strains, and the nucleoside degradation ability of probiotics strains remained unchanged after 3 weeks of domestication. The study on *in vivo* domestication of probiotic strains by high-uric acid intestinal environment in mice driven by diet found that the domestication of *Limosilactobacillus reuteri* F22A089 increased the degradation ability of nucleoside, and the degradation rate of guanosine in some strains reached twice that of the original strain, indicating that it is feasible to target domestication of probiotic strains by host intestinal selection pressure. Whole genome and transcriptome sequencing and mutation site analysis were performed in domesticated strains. Three mutant genes (*pbuG\_I*, *rihB* and *yusV*) related to uric acid lowering ability were noted. The mutations of these functional genes were closely related to the enhancement of uric acid lowering ability in domesticated strains. This study was the first to domesticate strains *in vivo* and improve their ability to degrade uric acid, providing a feasible domestication method for domesticating probiotics through the host gut and enhancing their probiotic efficacy.

**Keywords** probiotics; targeted domestication; *in vivo* domestication; uric acid degradation; *Limosilactobacillus reuteri* F22A089