

苏文政,吴家强,马建军,等. 保加利亚乳杆菌 *N*-乙酰胞壁质酶基因的克隆及生物信息学分析[J]. 江苏农业科学,2019,47(15):99-102.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2019.15.023

# 保加利亚乳杆菌 *N*-乙酰胞壁质酶基因的克隆及生物信息学分析

苏文政<sup>1</sup>, 吴家强<sup>1</sup>, 马建军<sup>1</sup>, 黄保华<sup>1</sup>, 蒋 慧<sup>2</sup>, 王 可<sup>1</sup>, 张玉玉<sup>1</sup>

(1. 山东省农业科学院畜牧兽医研究所/山东省畜禽疫病防治与繁育重点实验室, 山东济南 250100;

2. 山东省食品药品检验研究院, 山东济南 250101)

**摘要:**为了研究保加利亚乳杆菌 *N*-乙酰胞壁质酶基因的结构特征及编码蛋白的功能,根据 GenBank 中其基因的 DNA 序列设计引物,以保加利亚乳杆菌 MN 株的基因组为 DNA 模板,利用 PCR 技术扩增 *N*-乙酰胞壁质酶基因,将其克隆到 pMD-19T 载体上,进行测序与生物信息学分析。结果表明,MN 株 *N*-乙酰胞壁质酶基因序列编码 217 个氨基酸,与 GenBank 中公开的 *N*-乙酰胞壁质酶基因核苷酸序列的同源性为 98.8%~100.0%;蛋白质的理论分子质量为 24.55 ku,理论等电点为 9.83;该蛋白属于亲水性蛋白,二级结构以  $\alpha$ -螺旋为主;该蛋白的第 16~38 位氨基酸残基组成跨膜区,第 56~216 位氨基酸残基组成 LYZ2 结构域。研究结果为今后探讨 *N*-乙酰胞壁质酶基因的生物学功能及其功能改造奠定了基础。

**关键词:**保加利亚乳杆菌;*N*-乙酰胞壁质酶;克隆;生物信息学分析

**中图分类号:** S182 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2019)15-0099-04

保加利亚乳杆菌(*Lactobacillus bulgaricus*,简称 LB)是可用于保健食品的益生菌菌种之一,具有维持微生态平衡和胃肠道健康、促进营养物质的消化和吸收、增强免疫功能及抗癌抗肿瘤等重要生理功能<sup>[1]</sup>。*N*-乙酰胞壁质酶(*N*-acetylmuramidase)是 LB 的关键自溶酶,可水解肽聚糖 *N*-乙酰葡萄糖胺和 *N*-乙酰胞壁酸间的  $\beta$ -1,4 糖苷键,从而破坏细胞壁,引起菌体自溶<sup>[2-3]</sup>。

自溶现象是菌体在不利条件下维持生存的一种自我保护行为<sup>[4-5]</sup>。发酵的乳制品不同时,乳酸菌自溶的利弊也不相同<sup>[6-7]</sup>。在干酪生产中,乳酸菌自溶释放的蛋白酶、肽酶和脂肪酶将干酪中的蛋白质、多肽和脂肪水解为游离氨基酸、脂肪酸等风味物质,从而促进干酪的成熟,并赋予干酪良好的风味<sup>[8]</sup>。而在酸奶发酵剂的生产中,乳酸菌自溶制约着菌体的增殖,不利于菌株的高密度培养<sup>[6]</sup>。因此,调控乳酸菌自溶的发生时间和程度,有利于缩短发酵乳制品和发酵剂的生产周期,改善产品风味,从而提高产品质量。

本研究从 LB MN 株中克隆了 *N*-乙酰胞壁质酶基因,并综合应用生物信息学软件预测该基因编码蛋白质的相关数据,分析其基因结构及功能,为今后深入开展 *N*-乙酰胞壁质

酶的功能改造及 LB 自溶活性的调控研究奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验菌株和载体

德氏乳杆菌保加利亚亚种 MN 株,由笔者所在实验室分离、鉴定和保存;pMD19-T 克隆载体,购自宝生物工程(大连)有限公司;大肠杆菌 DH5 $\alpha$  感受态细胞,购自北京全式金生物技术有限公司。

### 1.2 主要试剂

Dream Taq DNA 聚合酶、限制性内切酶 *Nde* I 和 *Hind* III,为美国 Thermo 公司产品;细菌基因组 DNA 提取试剂盒、凝胶回收试剂盒、质粒提取试剂盒,为宝生物工程(大连)有限公司产品。

### 1.3 引物合成

根据 GenBank 中保加利亚乳杆菌 ATCC 11842 (NC\_008054.1)的基因组序列,应用 Primer primer 5.0 设计 *N*-乙酰胞壁质酶基因的特异引物,由铂尚生物技术(上海)有限公司合成。上游引物:5'-GGAGCACCATATGATGGCTGGACACAGAAA-3',下游引物:5'-CGCGGATCCTTAATTATCGTACTTATTCAGGTTG-3'。在上、下游引物的 5'端分别引入 *Nde* I 和 *Bam*H I 2 个酶切位点(分别为 CATATG、GGATCC)。该引物扩增具有完整开放阅读框(ORF)的 *N*-乙酰胞壁质酶基因片段,预计扩增片段长度为 676 bp。

### 1.4 目的基因的扩增与克隆

用细菌基因组 DNA 提取试剂盒提取保加利亚乳杆菌 MN 株的基因组 DNA 作为 PCR 模板。PCR 反应体系:5  $\mu$ L 10 $\times$ buffer,1  $\mu$ L dNTPs (10 mmol/L),各 2  $\mu$ L 上、下游引物 (10  $\mu$ mol/L),3  $\mu$ L 模板 DNA,0.25  $\mu$ L Dream Taq DNA 聚合酶,加无菌水至 50  $\mu$ L。PCR 反应程序:94  $^{\circ}$ C 预变性 5 min;

收稿日期:2018-06-12

基金项目:山东省农业科学院青年科研基金(编号:2015YQN52、2016YQN55);山东省农业重大应用技术创新项目[编号:农指(2014)38号];济南市金种子企业关键产品提升计划(编号:201502069)。

作者简介:苏文政(1984—),男,山东泰安人,硕士,助理研究员,研究方向为微生物与免疫学。E-mail:nkyswz777@163.com。

通信作者:王 可,博士,研究员,研究方向为动物遗传育种,E-mail:sduwangke@163.com;张玉玉,博士,副研究员,研究方向为微生物与免疫学,E-mail:zhyy@126.com。

94 ℃ 变性 45 s,60 ℃ 退火 45 s,72 ℃ 延伸 45 s,34 个循环;72 ℃ 延伸 10 min。PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳后切胶回收,将目的片段与 pMD19-T 载体连接,并转化 DH5 $\alpha$  感受态细胞,挑取单克隆进行培养,提取质粒后进行 PCR 及双酶切鉴定,将阳性质粒送至生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序。所有试验于 2017 年在山东省畜禽疫病防治与繁育重点实验室完成。

1.5 序列比对分析

利用 DNA Star 软件对已经获得的 *N*-乙酰胞壁质酶基因序列片段进行拼接,并推导其氨基酸序列;运用 Megalign 程序对 MN 株及 GenBank 中已发表的 10 株保加利亚乳杆菌的该基因序列进行比对分析,运用 MEGA 4 软件绘制系统进化树。

1.6 Mur 蛋白的生物信息学分析

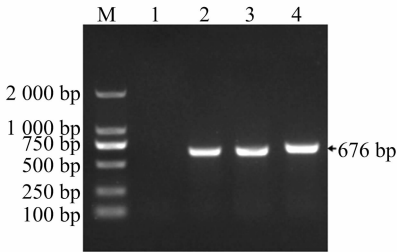
用 ProtParam(<http://web.expasy.org/protparam/>)分析蛋白质氨基酸序列的理化特性;用 TMHMM Server v. 2.0(<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>)预测蛋白质的跨膜区和跨膜方向;用 SignalP 4.1 Server(<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>)分析蛋白质的信号肽;用 ProtScale(<http://web.expasy.org/protscale/>)分析蛋白质的亲疏水性;用 NetPhos 3.1 Server(<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/>)分析蛋白质的磷酸化位点;用 Hopfield HNN([http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa\\_automat.pl?page=/NPSA/npsa\\_hnn.html](http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=/NPSA/npsa_hnn.html))预测蛋白质的二级结构;用 Smart(<http://smart.embl-heidelberg.de/>)分析预测蛋白质氨基酸序列的保守结构域;用 Phyre2(<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/html/page.cgi?id=index>)预测蛋白质的三级结构。

2 结果与分析

2.1 目的基因的克隆与鉴定

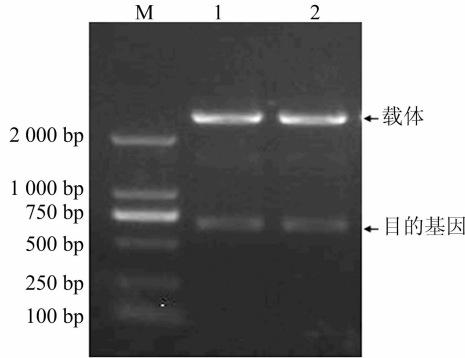
以保加利亚乳杆菌 MN 株基因组 DNA 为模板,PCR 扩增 *N*-乙酰胞壁质酶基因。由图 1 可以看出,电泳检测可见 676 bp 大小的条带,与预期目的基因的片段大小相符。将该基因片段与 pMD19-T 载体连接并转化到 DH5 $\alpha$  感受态细胞

中后,提取重组质粒 pMD19-T-mur,PCR 能扩增出 676 bp 大小的目的基因片段,双酶切重组质粒可切出 663 bp 大小的目的片段和 2 692 bp 大小的载体片段(图 2),表明克隆的 *N*-乙酰胞壁质酶基因已成功插入 pMD19-T 载体中。



M—DNA marker; 1—阴性对照; 2—4—PCR 扩增产物

图1 *N*-乙酰胞壁质酶基因的 PCR 扩增结果



M—DNA marker; 1~2—pMD19-T-mur 质粒双酶切片段

图2 pMD19-T-mur 重组质粒的双酶切鉴定结果

2.2 基因序列分析

测序得到的 MN 株 *N*-乙酰胞壁质酶基因的核苷酸序列见图 3,将该序列与 GenBank 中 10 株保加利亚乳杆菌的相应基因序列进行比对分析,结果表明,核苷酸同源性达到 98.8%~100%。用 MEGA 4 绘制系统进化树,由图 4 可以看出,MN 株与 CNCM I-1519 株、LBVIB27 株之间的亲缘关系最近。

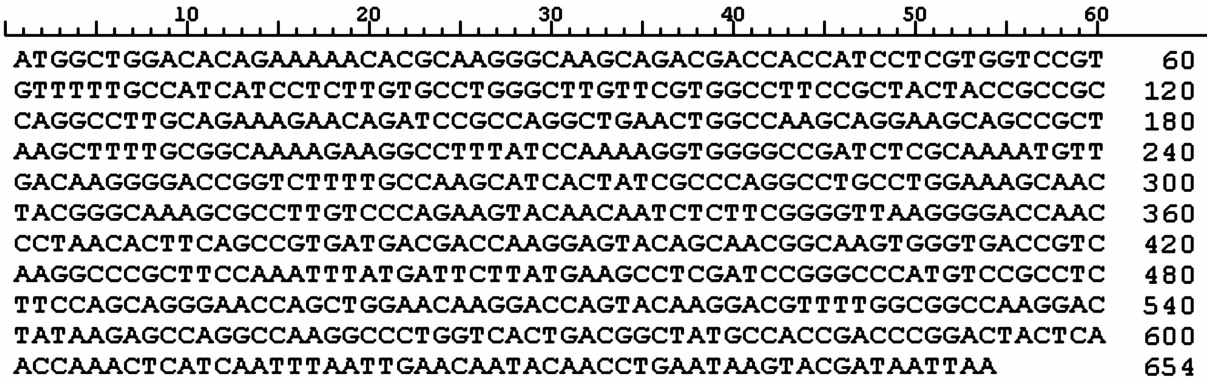
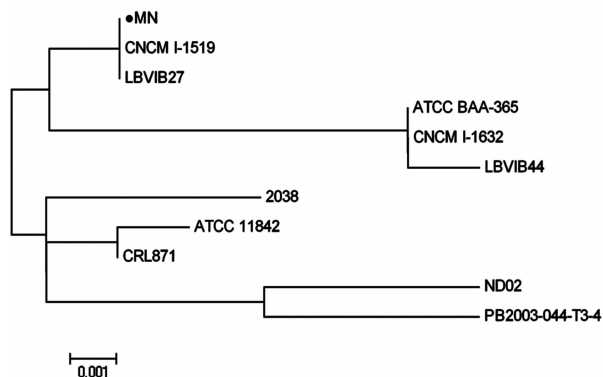


图3 MN 株 *N*-乙酰胞壁质酶基因的核苷酸序列

2.3 MN 株 *N*-乙酰胞壁质酶的生物信息学分析

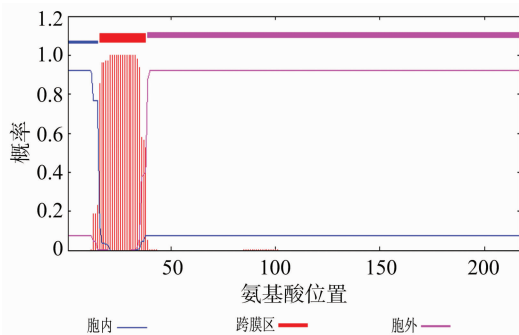
2.3.1 蛋白质的理化特性 用 ProtParam 针对蛋白质的基本理化特性进行分析,结果显示,MN 株 *N*-乙酰胞壁质酶含有 217 个氨基酸,分子质量为 24 546.17 u,理论等电点(pI 值)

为 9.83;该蛋白质由 20 种氨基酸组成,其中丙氨酸(Ala)和赖氨酸(Lys)含量最丰富,均达到 10.1%;总带正电荷残基、带负电荷残基数分别是 33、16 个;不稳定指数为 33.04,被分类为稳定蛋白质;脂肪族系数为 85.02;其总平均疏水指数为

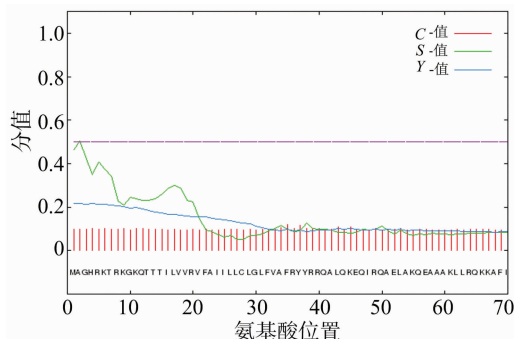
图4 *N*-乙酰胞壁质酶基因核苷酸序列的系统进化树

-0.461, 为亲水性蛋白。

2.3.2 蛋白质的跨膜结构分析 用 TMHMM 2.0 软件预测 *N*-乙酰胞壁质酶的跨膜结构, 结果显示, 该蛋白质由内向外存在 1 个可能的跨膜螺旋区域 (16~38 aa), *N* 端的 1~15 aa 区域为胞内区, *C* 端的 39~217 aa 区域为胞外区 (图 5)。

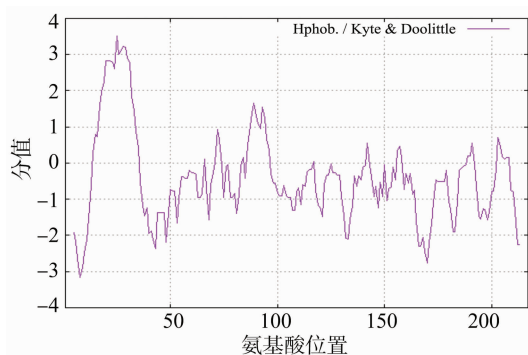
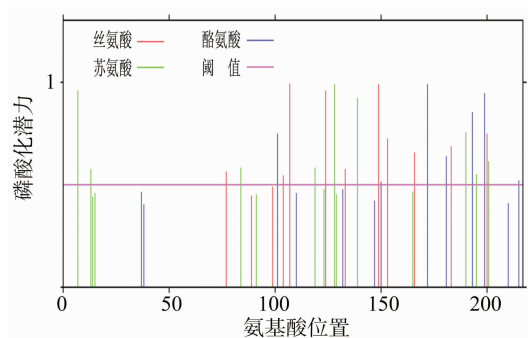
图5 *N*-乙酰胞壁质酶的跨膜结构分析结果

2.3.3 蛋白质的信号肽预测 用 SignalP 4.1 进行 *N*-乙酰胞壁质酶的信号肽预测分析, 由图 6 可以看出, 该蛋白质不包含信号肽。

图6 *N*-乙酰胞壁质酶的信号肽预测分析结果

2.3.4 蛋白质的亲疏水性分析 用 ProtScale 分析 *N*-乙酰胞壁质酶的亲疏水性, 如图 7 所示, 该蛋白质氨基酸序列绝大多数为亲水性残基 (正值表示疏水, 负值表示亲水), 具有多个高亲水性区域, 表明该蛋白质为水溶性蛋白。

2.3.5 蛋白质潜在的磷酸化位点分析 用 NetPhos 进行磷酸化位点分析, 由图 8 可以看出, *N*-乙酰胞壁质酶有 10 个丝氨酸 (Ser)、9 个苏氨酸 (Thr)、7 个酪氨酸 (Tyr) 位点, 可能成为蛋白激酶的磷酸化位点。

图7 *N*-乙酰胞壁质酶的亲疏水性分析结果图8 *N*-乙酰胞壁质酶的磷酸化位点分析结果

2.3.6 蛋白质的二级结构预测 用 Hopfield HNN 预测 *N*-乙酰胞壁质酶的二级结构, 由图 9 可以看出, 该蛋白质含有的  $\alpha$ -螺旋 (用 h 表示) 占 55.76%, 无规则卷曲 (用 c 表示) 占 32.72%, 延伸链 (用 e 表示) 占 11.52%。

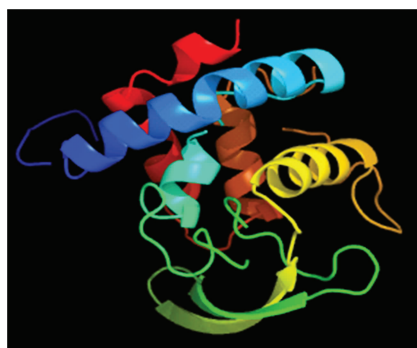
2.3.7 蛋白质的保守结构域分析 Smart 软件分析结果显示, *N*-乙酰胞壁质酶蛋白质的 16~38 位氨基酸残基是跨膜区, 56~216 位氨基酸残基是 LY22 结构域 (图 10)。

2.3.8 蛋白质的三级结构预测 用 Phyre2 软件在线预测 *N*-乙酰胞壁质酶的三级结构, 图 11 结果显示, 其序列与 c5t1qB 模板的同源性最高, 基于该模板预测的 168 个残基 (77% 的序列) 已被建模, 可信度达到 100%。

### 3 讨论

乳酸菌的自溶现象普遍存在, 大量研究表明, 肽聚糖水解酶在菌体自溶中发挥着重要作用<sup>[4,9]</sup>。不同乳酸菌所含关键肽聚糖水解酶的种类存在差异, 植物乳杆菌 WCFS1 和干酪乳杆菌 ATCC 27092 的关键肽聚糖水解酶是 *N*-乙酰氨基葡萄糖苷酶<sup>[10-11]</sup>, 而保加利亚乳杆菌 LJJ 的关键肽聚糖水解酶是 *N*-乙酰胞壁质酶<sup>[2]</sup>, 这 2 种酶均是细菌中普遍存在的肽聚糖水解酶<sup>[12]</sup>。

*N*-乙酰胞壁质酶俗称溶菌酶, 是一种无毒、无害、安全性很高的盐基水解蛋白酶, 已被广泛应用于食品、饲料、医药等行业<sup>[13-15]</sup>。该酶专一性地作用于肽聚糖的 *N*-乙酰胞壁酸与 *N*-乙酰葡萄糖胺之间的  $\beta$ -1,4 糖苷键, 使细胞溶解死亡。目前, 已被证实能够水解肽聚糖的溶菌酶有 4 类: 鸡蛋白溶菌酶、鹅蛋白溶菌酶、噬菌体 T4 溶菌酶和拟内串生孢霉 (*Chalaropsis*) 溶菌酶, 尽管这 4 类酶的基因序列差异很大, 但它们的三维结构显示出一些有趣的相似性<sup>[12]</sup>。

图9 *N*-乙酰胞壁质酶的二级结构预测结果图10 *N*-乙酰胞壁质酶的结构域预测图11 *N*-乙酰胞壁质酶的三级结构预测结果

保加利亚乳杆菌 *N*-乙酰胞壁质酶的基因序列与上述酶的基因序列不同。本研究成功克隆了保加利亚乳杆菌 MN 株的 *N*-乙酰胞壁质酶基因序列,该基因全长 654 bp,与其他保加利亚乳杆菌菌株的核苷酸同源性达到 98.8%~100.0%。系统进化树分析结果表明,其与 CNCM I-1519 株、LBVIB27 株之间的亲缘关系最近。该基因编码 217 个氨基酸,应用生物信息学软件分析其基因的结构特征及编码蛋白的功能发现,该蛋白的分子质量为 24 546.17 u,理论等电点为 9.83;该基因编码蛋白不包含信号肽,但由内向外存在 1 个可能的跨膜螺旋区域(16~38 aa);该基因编码蛋白具有多个高亲水性区域,为水溶性蛋白;该基因编码蛋白可能存在 10 个丝氨酸、9 个苏氨酸和 7 个酪氨酸磷酸化位点;蛋白的二级结构以  $\alpha$ -螺旋为主,且保守域 56~216 位氨基酸残基是 LYZ2 结构域;Phyre2 软件成功模拟出了该蛋白的三级结构,为探索该蛋白的结构和功能奠定了基础。本研究结果为开展 *N*-乙酰胞壁质酶基因的功能改造和保加利亚乳杆菌自溶活性的改造提供了理论依据。

#### 参考文献:

- [1] 白卫东,赵文红,梁桂凤,等. 保加利亚乳杆菌的特性及其应用[J]. 中国酿造,2009,209(8):10-14.
- [2] Pang X Y, Cui W M, Liu L, et al. Gene knockout and overexpression analysis revealed the role of *N*-acetylmuramidase in autolysis of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* Lj - 6 [J]. PLoS One, 2014, 9(8): e104829.
- [3] Fridrich E, Gaynor E C. Peptidoglycan hydrolases, bacterial shape, and pathogenesis [J]. Current Opinion in Microbiology, 2013, 16(6): 767-778.
- [4] Rice K C, Bayles K W. Molecular control of bacterial death and lysis [J]. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 2008, 72(1): 85-109.
- [5] 崔文明,刘 鹭,张书文,等. 保加利亚乳杆菌 LJJ 自溶的影响因素分析[J]. 食品与发酵工业,2013,39(7):6-12.
- [6] 李艾黎,邓凯波,霍贵成. 环境因素对酸奶菌株自溶的影响[J]. 微生物学通报,2008,35(8):1262-1267.
- [7] Lortal S, Chapot - Chartier M P. Role, mechanisms and control of lactic acid bacteria lysis in cheese [J]. International Dairy Journal, 2005, 15(6/8/7/9): 857-871.
- [8] Hickey D K, Kilcawley K N, Beresford T P, et al. Starter strain related effects on the biochemical and sensory properties of Cheddar cheese [J]. The Journal of Dairy Research, 2007, 74(1): 9-17.
- [9] Ostlie H M, Vegarud G, Langsrud T. Autolysis of propionibacteria: detection of autolytic enzymes by renaturing SDS - PAGE and additional buffer studies [J]. International Journal of Food Microbiology, 2007, 117(2): 167-174.
- [10] Rolain T, Bernard E, Courtin P, et al. Identification of key peptidoglycan hydrolases for morphogenesis, autolysis, and peptidoglycan composition of *Lactobacillus plantarum* WCFS1 [J]. Microbial Cell Factories, 2012, 11(1): 137.
- [11] Senba M, Kashige N, Nakashima Y, et al. Cloning of the gene of beta - *N*-acetylglucosaminidase from *Lactobacillus casei* ATCC 27092 and characterization of the enzyme expressed in *Escherichia coli* [J]. Biological & Pharmaceutical Bulletin, 2000, 23(5): 527-531.
- [12] Vollmer W, Joris B, Charlier P, et al. Bacterial peptidoglycan (murein) hydrolases [J]. FEMS Microbiology Reviews, 2008, 32(2): 259-286.
- [13] 杨 兵,李晓凤,夏先林. 牛膝多糖对断奶仔猪氧化应激和免疫功能的影响[J]. 江苏农业学报,2017,33(3):618-623.
- [14] 陈珊珊,丁 健,李 鑫,等. 整体优化的信号肽和人溶菌酶基因在毕赤酵母的高效表达[J]. 江苏农业学报,2018,34(1):20-28.
- [15] 何金花,刘 誉,刘冠杰,等. 溶菌酶在医药中的应用及其研究进展[J]. 今日药学,2008,18(2):16-19.

[1] 白卫东,赵文红,梁桂凤,等. 保加利亚乳杆菌的特性及其应用