两歧双歧杆菌 PRL2010 菌体外表面蛋白的功能分析

朱德全[1],王茗悦[2],栗金柳[2],张跃华[1],张 武[1],卢 伟[3],栾积毅[3],刘向东[3]* (1. 佳木斯大学理学院,黑龙江佳木斯 154007;2. 佳木斯大学生命科学学院,黑龙江佳木斯 154007;3. 佳木斯大学机械工程学院,黑龙江佳木斯 154007)

摘要 [目的]分析两歧双歧杆菌 PRL2010 菌体外表面蛋白的功能。[方法]以两歧双歧杆菌 PRL2010 基因组序列为研究对象,采用 Perry 等人分析革兰氏阳性菌菌体外表面蛋白(PSE 蛋白)的 Inmembrane 方法,同时采用 COG 功能数据库对预测的外表面蛋白进行功能注释和聚类分析。[结果]PRL2010 外表面蛋白包括 28 个细胞壁蛋白、12 个脂蛋白、182 个细胞膜蛋白、38 个分泌蛋白。PRL2010 外表面蛋白的功能分析结果显示,大多数外表面蛋白与细胞壁、细胞膜的生物合成,无机离子转运与代谢,防御机制,碳水化合物转运与代谢,氨基酸转运与代谢等有关。[结论]该研究可为探讨该菌与宿主相互作用的分子机制奠定基础。

关键词 两歧双歧杆菌;基因组;外表面蛋白;功能
中图分类号 S188 **文献标识码** A **文章编号** 0517 - 6611(2017)18 - 0118 - 02

Functional Analysis of the Outer Surface Protein of *Bifidobacterium bifidum* PRL2010

ZHU De-quan[1], WANG Ming-yue[2], LI Jin-liu[2], LIU Xiang-dong[3]* et al (1. College of Science, Jiamusi University, Jiamusi, Heilongjiang 154007;2. College of Life Science, Jiamusi University, Jiamusi, Heilongjiang 154007;3. College of Mechanical Engineering, Jiamusi University, Jiamusi, Heilongjiang 154007)

Abstract [Objective]To analyze the function of the outer surface proteins of *Bifidobacterium bifidum* PRL2010. [Method]The genome sequence of *B. bifidum* PRL2010 was used to study the potentially surface exposed proteins (PSE proteins) by Inmembrane used by Perry et al, to analyze PSE proteins of Gram-positive bacteria. Functional annotation and cluster analysis of predicted surface proteins were performed by using COG (Cluster of Orthologous Groups of proteins) functional database. [Result]The outer surface protein of PRL2010 included 28 cell wall proteins,12 lipoproteins,182 cell membrane proteins,38 secretory proteins. Function analysis of the outer surface proteins showed that most outer surface proteins were involved in amino acid transport and metabolism, carbohydrate transport and metabolism, cell wall or cell membrane formation, defense mechanism, inorganic ion transport and metabolism. [Conclusion]The study provided the basis for studing molecular methanisms of interaction between bacteria and their host.

Key words *Bifidobacterium bifidum*;Genome;Outer surface protein;Function

两歧双歧杆菌 PRL2010 作为一种肠道内的益生菌株,它具有抑制肠道致病菌黏附[1]、降低血清胆固醇[2]、调节宿主免疫[3]、调整肠道菌群等益生作用。双歧杆菌的外表面蛋白在介导菌体与宿主细胞黏附定殖、与外界环境相互作用方面起着非常重要的作用[4-5]。2010 年该菌株完成了全基因组测序和功能注释,共 1 791 个基因,1 706 个编码蛋白[6]。

该菌株基因组测序的完成,使得利用基因组学数据进行功能基因组学分析得以实施,如菌体外表面蛋白的分析。目前关于细菌外表面蛋白的基因组分析主要集中在致病菌[7-9]和乳杆菌方面,如 Barinov 等[10]采用 SurfG$^+$ 的方法对革兰氏阳性菌进行了预测,结果显示该方法是一种非常有效的分析革兰氏阳性菌外表面蛋白的方法。同样,2013 年 Perry 等[11]提出更为容易和方便的分析方法:Inmembrane。目前关于双歧杆菌外表面蛋白的基因组预测和功能分析,国内外鲜见报道。以两歧双歧杆菌 PRL2010 全基因组编码蛋白序列为研究对象,采用 Inmembrane 方法分析该菌株外表面蛋白和功能,以期为探讨该菌与宿主相互作用的分子机制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料 美国国立生物技术信息中心(NCBI)GenBank 公布的两歧双歧杆菌 PRL2010 全基因组序列,GenBank 的登录号是 NC_014638.1。

1.2 方法 采用 Perry 等[11]分析革兰氏阳性菌外表面蛋白的 Inmembrane 方法,即采用 SignalP4.0、LipoP、HMM search 2.0 等一系列生物信息学分析软件预测革兰氏阳性菌外表面的蛋白,预测并统计各类外表面蛋白(脂蛋白、细胞壁蛋白、细胞膜蛋白、分泌蛋白),利用 COG 功能数据库对各类蛋白进行注释,同时进行 COG 功能聚类分析。

2 结果与分析

2.1 两歧双歧杆菌 PRL2010 菌体外表面蛋白的种类分析 两歧双歧杆菌 PRL2010 菌体外表面蛋白的种类分析结果见表 1。分析结果显示,两歧双歧杆菌 PRL2010 基因组编码的 1 706 个蛋白中,暴露于菌体外表面蛋白共计 260 个,占基因组蛋白比例为 15.2%。在这些蛋白中,定位于细胞膜的蛋白数目最多,达 182 个,占基因组蛋白比例为 10.7%,这些跨膜螺旋数的膜蛋白分布见图 1。

外表面蛋白的膜蛋白中,具有 1 个跨膜螺旋数的蛋白最多(87 个),其次是具有 2 个和 3 个跨膜螺旋数的蛋白,分别为 23 个和 16 个。

2.2 两歧双歧杆菌 PRL2010 菌体外表面蛋白的功能分析 两歧双歧杆菌 PRL2010 基因组预测的外表面蛋白功能分析结果见图 2。两歧双歧杆菌 PRL2010 菌体外表面蛋白数目为 260 个。从图 2 可以看出,在这些蛋白中,含有较大比例的蛋白没有功能注释(128 个),132 个蛋白具有 COG 功能注释。在有具体功能注释的蛋白中,所占比例较大的是与细胞壁、细胞膜生物合成有关(17个);与无机离子转

基金项目 黑龙江省卫生计生委科研项目(2016 - 325);佳木斯大学科技创新团队项目(cxtd - 2016 - 02)。
作者简介 朱德全(1980—),男,贵州遵义人,讲师,博士,从事微生物生物技术研究。*通讯作者,副教授,博士,硕士生导师,从事生物质收获与综合利用研究。
收稿日期 2017 - 05 - 05

表 1　两歧双歧杆菌 PRL2010 菌体外表面蛋白种类

Table 1　Varieties of the outer surface protein of *Bifidobacterium bifidum* PRL2010

种类 Varieties	在基因组蛋白中所占比例 Percentage in the genome protein//%	蛋白数 Protein number 个	蛋白结构特征 Protein structural feature
细胞壁蛋白 Cell wall proteins	1.6	28	蛋白最短 13 个氨基酸,最长 2 527 个氨基酸;23 个蛋白具有 LPxTG、2 个蛋白具有 LysM、3 个蛋白具有 PG 细胞壁锚定结构基序
脂蛋白 Lipoproteins	0.7	12	蛋白最短 200 个氨基酸,最长 568 个氨基酸;12 个蛋白全部具有脂蛋白信号肽、4 个蛋白具有跨膜结构域
细胞膜蛋白 Cell membrane proteins	10.7	182	蛋白最短 53 个氨基酸,最长 1 941 个氨基酸;全部蛋白具有跨膜结构域,其中跨膜螺旋数在 1 ~ 16
分泌蛋白 Secretory proteins	2.2	38	蛋白最短 64 个氨基酸,最长 867 个氨基酸;全部蛋白具有分泌信号肽,其中 16 个蛋白具有 1 个跨膜螺旋结构域

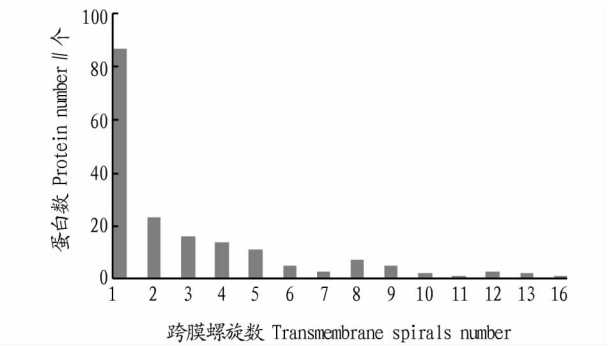

图 1　跨膜螺旋数的膜蛋白分布

Fig. 1　The membrane protein distribution of transmembrane spirals number

运与代谢有关(12 个)、与防御机制有关(12 个)、与碳水化合物转运与代谢有关(11 个)、与氨基酸转运与代谢有关(8 个)等。功能聚类分析结果表明菌体外表面蛋白与这些功能有关。

3　讨论与结论

细菌外表面的数量和种类与微生物的特性和生长环境有着密切的联系,特别是与宿主之间的相互作用,如根癌土壤杆菌,它是一类普遍存在于土壤中的革兰氏阴性菌,植物根的表面依靠由根组织渗透出来的营养物质进行生存[12];再如马铃薯晚疫病菌是引起马铃薯和西红柿晚疫病的病原菌,其生存环境主要是植物体内,分析发现潜在的分泌到细胞外蛋白为 671 个,占基因组蛋白总数的 3%。由于越来越多菌株全基因组测序的完成,采用基因组编码蛋白序列预测

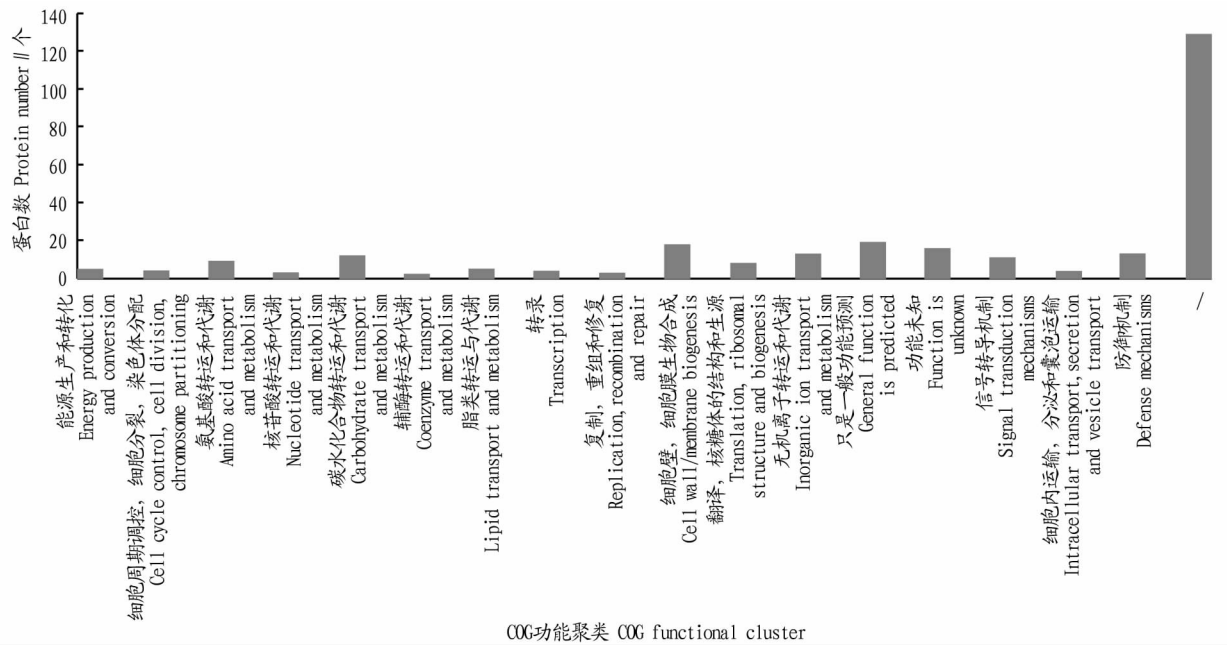

图 2　两歧双歧杆菌 PRL2010 菌体外表面蛋白功能聚类

Fig. 2　Functional cluster of the outer surface protein of *Bifidobacterium bifidum* PRL2010

细菌外表面蛋白成为可能。最早预测革兰氏阳性菌外表面蛋白的方法是 SurfG$^+$,但该方法里面的一些程序网上不一定能随时获得,另外它主要用于预测革兰氏阳性菌。Perry 等[11]于 2013 年提出了 Inmembrane 的分析方法,该方法对 SurfG$^+$方法进行了完善和补充,程序很容易网上在线获取,并且可以对革兰氏阴性菌进行预测分析。

该研究预测分析得到的两歧双歧杆菌 PRL2010 260 个外表面蛋白中,132 个蛋白没有功能注释,这部分蛋白还需要进行进一步的功能研究和注释。在有功能注释的蛋白中,所占比例较大的是与细胞壁、细胞膜生物合成有关;与无机离子转运与代谢有关;与防御机制有关;与碳水化合物转运与

(下转第 166 页)

土地使用权出让合同。

至于规划为城市建设用地的海域,若由政府组织实施围海造陆工程,围海造地工程所需资金由政府筹集,则不存在海域使用权出让的问题,可通过招投标等方式将施工任务确定给具体单位和个人承担,待围海造地工程完成后再进行国有土地使用权出让。

3 结语

《海域使用管理法》和《物权法》明确了海域使用权是一项物权,把海域变成土地并在其上开展建设活动,是"海变地"海域使用权的前后相继、不可分割的两项权能。"海变地"海域使用权变换登记是一种特殊类型的物权变更登记。当事人的权益不会因为新的登记换证行为而增加或者减少。海域使用权和土地使用权虽同属国土资源部职能管理范围,但地方上的管理分属海洋和国土两个部门,在换证过程中还存在很多需要协调的内容,在立法上亟须制定《海域使用管理法实施条例》,对海域使用权转化为土地使用权的转化途径、方式、程序、限制等方面予以明确规定[6]。新出台的《不动产登记暂行条例》,海域使用权和林权、建设用地使用权等都将登记在不动产登记簿上,海域使用权和土地使用权都将由国土部门统一登记,未来"海变地"海域使用权的转化将会更加明晰化和可操作化。

参考文献

[1] 海野. 世界沿海国家的填海造地[J]. 港口经济,2010(10):63.
[2] 范晓婷. 我国海岸线现状及其保护建议[J]. 地质调查与研究,2008,31(1):29-32.
[3] 国家海洋局. 中国海域使用管理公报[R]. 北京:国家海洋局,2003-2012.
[4] 张惠荣,施星平,高中义. 海域使用权与土地使用权相互转化中的法律问题探讨[J]. 海洋开发与管理,2008(12):49-53.
[5] 宁德. 关于海域使用权变更为土地使用权若干问题的研究[J]. 南方国土资源,2008(1):21-24.
[6] 杨华. 海域使用权变更为土地使用权:实践及规制[J]. 法商研究,2011(3):77-83.

(上接第 119 页)

代谢有关、与氨基酸转运与代谢有关。功能分析结果表明菌体外表面蛋白在营养物质交换、环境适应、细胞稳定性方面发挥重要作用。该研究获得的结果将对今后研究两歧双歧杆菌 PRL2010 与宿主作用的分子机制提供标靶,同时,也为益生菌领域的研究发展及应用分析提供数据基础。

参考文献

[1] SERAFINI F,STRATI F,RUAS-MADIEDO P,et al. Evaluation of adhesion properties and antibacterial activities of the infant gut commensal *Bifidobacterium bifidum* PRL2010 [J]. Anaerobe,2013,21:9-17.
[2] ZANOTTI I,TURRONI F,PIEMONTESE A,et al. Evidence for cholesterol-lowering activity by *Bifidobacterium bifidum* PRL2010 through gut microbiota modulation[J]. Appl Microbiol Biotechnol,2015,99(16):6813-6829.
[3] TURRONI F,TAVERNITI V,RUAS-MADIEDO P,et al. *Bifidobacterium bifidum* PRL2010 modulates the host innate immune response[J]. Applied and environmental microbiology,2014,80(2):730-740.
[4] LIU C,ZHANG Z Y,DONG K,et al. Adhesion and immunomodulatory effects of *Bifidobacterium lactis* HN019 on intestinal epithelial cells INT-407[J]. World journal of gastroenterology,2010,16(18):2283-2290.
[5] 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.
[6] TURRONI F,BOTTACINI F,FORONI E,et al. Genome analysis of *Bifidobacterium bifidum* PRL2010 reveals metabolic pathways for host-derived glycan foraging[J]. Proceedings of the national academy of sciences of the united states of america,2010,107(45):19514-19519.
[7] 赵文杰,曾嘉,柳建设,等. 嗜酸氧化亚铁硫杆菌基因组分泌蛋白的初步分析[J]. 现代生物医学进展,2008,8(1):22-26.
[8] 周晓罡,侯思名,陈铎文,等. 马铃薯晚疫病菌全基因组分泌蛋白的初步分析[J]. 遗传,2011,33(7):785-793.
[9] 周晓罡,李成云,赵之伟,等. 粗糙脉孢菌基因组分泌蛋白的初步分析[J]. 遗传,2006,28(2):200-207.
[10] BARINOV A,LOUX V,HAMMANI A,et al. Prediction of surface exposed proteins in Streptococcus pyogenes,with a potential application to other Gram-positive bacteria[J]. Proteomics,2009,9(1):61-73.
[11] PERRY A J,HO B K. Inmembrane,a bioinformatic workflow for annotation of bacterial cell-surface proteomes[J]. Source code for biology and medicine,2013,8(1):9.
[12] 范成明,李成云,赵明富,等. 根癌土壤杆菌 C58 Cereon 中分泌蛋白信号肽分析[J]. 微生物学报,2005,45(4):561-566.

科技论文写作规范——缩略语

采用国际上惯用的缩略语。如名词术语 DNA(脱氧核糖核酸)、RNA(核糖核酸)、ATP(三磷酸腺苷)、ABA(脱落酸)、ADP(二磷酸腺苷)、CK(对照)、CV(变异系数)、CMS(细胞质雄性不育性)、IAA(吲哚乙酸)、LD(致死剂量)、NAR(净同化率)、PMC(花粉母细胞)、LAI(叶面积指数)、LSD(最小显著差)、RGR(相对生长率),单位名缩略语 IRRI(国际水稻研究所)、FAO(联合国粮农组织)等。对于文中有些需要临时写成缩写的词(如表及图中由于篇幅关系以及文中经常出现的词而写起来又很长时),则可取各主要词首字母写成缩写,但需在第一次出现处写出全称,表及图中则用注解形式在下方注明,以便读者理解。