



## 异源表达德氏乳杆菌保加利亚亚种 TCS1 调控酸适应基因提高乳酸乳球菌 NZ9000 耐酸性

王超<sup>1</sup>, 崔艳华<sup>1\*</sup>, 曲晓军<sup>2</sup>

<sup>1</sup> 哈尔滨工业大学化工与化学学院, 黑龙江 哈尔滨 150090

<sup>2</sup> 黑龙江省科学院微生物研究所, 黑龙江 哈尔滨 150010

**摘要:** 【目的】在乳酸乳球菌 NZ9000 中异源表达德氏乳杆菌保加利亚亚种中由双组分系统 TCS1 (JN675228/JN675229) 调控的与酸适应相关基因, 进而探究德氏乳杆菌保加利亚亚种应对酸胁迫的机制。【方法】通过逆转录聚合酶链式反应和十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳验证由德氏乳杆菌保加利亚亚种 TCS1 调控的与酸适应相关基因中腺嘌呤磷酸核糖转移酶(*aprt*)、D-丙氨酸-D-丙氨酸连接酶(*ddl*)、寡肽 ABC 转运蛋白(*oppDII*)和延伸因子 Ts(*tsf*) 在乳酸乳球菌 NZ9000 中的表达情况。酸处理实验验证基因表达对宿主菌酸胁迫耐受能力的影响。并采用酵母双杂交验证双组分系统 TCS1 与表达的酸适应相关基因之间的互作关系及具体的互作部位。【结果】结果表明, 乳酸乳球菌 NZ9000 中成功表达了 *aprt*、*ddl*、*oppDII* 和 *tsf*。*aprt*、*ddl* 基因使重组菌对酸胁迫的抗性分别提高了 75 倍和 114 倍。*oppDII* 和 *tsf* 基因的表达对重组菌株的耐酸能力没有明显影响。酵母双杂交实验表明 TCS1 中的组氨酸蛋白激酶 HPK1 与 Ddl 之间存在相互作用, 且 HPK1-C 结构域是二者相互作用的关键区域。【结论】*aprt* 和 *ddl* 过表达菌株酸刺激的适应能力显著高于对照菌株, 该研究结果可为德氏乳杆菌保加利亚亚种及类似菌株耐酸性特性的获得策略提供参考。

**关键词:** 德氏乳杆菌保加利亚亚种, 腺嘌呤磷酸核糖转移酶, D-丙氨酸-D-丙氨酸连接酶, 耐酸性, 酵母双杂交

德氏乳杆菌保加利亚亚种 (*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Lb. bulgaricus*) 广泛应用于食品和医药行业<sup>[1]</sup>。*Lb. bulgaricus* 是一种乳酸菌, 在其自身生长和应用过程中经常遇到各

种酸性环境<sup>[2]</sup>。低 pH 环境产生酸胁迫, 对细胞生理产生不利影响, 包括膜损伤、抑制酶活性和运输系统等<sup>[3]</sup>。因此, 保持对酸胁迫的耐受性对于这类菌株的生存和工业应用至关重要。

基金项目: 国家自然科学基金(31371827, 31471712)

\*通信作者。Tel: +86-451-86282902; Fax: +86-451-86282906; E-mail: yhcui@hit.edu.cn

收稿日期: 2020-02-11; 修回日期: 2020-05-19; 网络出版日期: 2020-07-02

乳酸菌(lactic acid bacteria, LAB)中发现了多种耐酸机制,包括中和过程、质子泵、高分子保护、预适应和交叉保护作用等<sup>[4]</sup>。然而,通过对 *Lb. bulgaricus* 基因组序列的生物信息学分析表明,参与菌株调节 pH 稳定性的基因相对较少,探索菌株通过何种调节机制来维持自身在酸性环境的耐受性显得尤为重要<sup>[5]</sup>。

细菌中参与基因调节的双组分系统(two-component system, TCS)由组氨酸蛋白激酶(histidine protein kinase, HPK)和应答调节蛋白(response regulator protein, RR)组成<sup>[6]</sup>。本课题组前期研究表明, TCS1 调节了由于突然暴露在酸性环境引起的酸耐受反应(acid tolerance reaction, ATR),参与了菌株的耐酸性和生长性能的调节<sup>[7]</sup>。分别构建了 HPK1 突变体 CH3-H 和 RR1 突变体 CH3-R,并通过 2-DE 和 RT-qPCR 鉴定出了一些与耐酸相关的差异表达基因<sup>[8]</sup>。其中,腺嘌呤磷酸核糖转移酶(adenine phosphoribosyltransferase, Aprt)在嘌呤核苷酸补救合成途径中将激活的 5-磷酸核糖-1-焦磷酸(5-phosphoribosyl 1-pyrophosphate, PRPP)添加到腺嘌呤上产生单磷酸腺苷(adenosine monophosphate, AMP),除了影响嘌呤核苷酸代谢外,还可能对能量代谢产生影响; D-丙氨酸-D-丙氨酸连接酶(D-alanine-D-alanine ligase, Ddl)参与了 D-丙氨酸代谢和细胞壁中肽聚糖的生物合成过程,对细胞壁合成产生影响;寡肽 ABC 转运蛋白(oligopeptide ABC transporter, OppDII)影响代谢分泌物质的吸收过程;延伸因子 Ts (elongation factor Ts, Tsf)有助于在蛋白质合成的延伸阶段将各种氨基酸加入到延伸的多肽链中,加快胞内蛋白的合成速率。

德氏乳杆菌保加利亚亚种缺乏有效的电转化策略和用于基因突变的分子手段,严重制约了对

其基因功能的直接评价<sup>[9]</sup>。因此,本研究将 Aprt、Ddl、OppDII 和 Tsf 在乳酸乳球菌 NZ9000 中进行异源表达,探讨这 4 个关键差异基因的表达对宿主耐酸性的影响,并探讨 TCS1 调控的这 4 个关键差异基因在菌株 ATR 过程中的作用。翟远征发现,构建 *Lb. bulgaricus* CAUH1 电转化平台存在技术难点,采用 *Lc. lactis* NZ9000 表达可能参与 *Lb. bulgaricus* CAUH1 耐酸反应的丙酮酸激酶(pyruvate kinase, Pyk)和假定的转录因子(hypothetical transcription factors, Ldb0677),发现宿主菌的耐酸能力得到了明显提高<sup>[9]</sup>。类似地,干酪乳杆菌中的 DNA 修复蛋白 *recO* (DNA repair protein, *recO*)基因在 *Lc. lactis* NZ9000 中表达,使得重组菌株在低 pH 环境下的耐酸性显著改善<sup>[10]</sup>。

本研究通过克隆关键耐酸调控相关基因 *aprt*、*ddl*、*oppDII* 和 *tsf*,并在 *Lc. lactis* NZ9000 中进行异源表达,进一步确定这些差异表达基因是否参与了菌株的耐酸调控过程,并对这些基因的功能进行了验证和评价。利用酵母双杂交技术(yeast two hybrid, Y2H)研究了双组分系统中 HPK1、RR1 与耐酸调控蛋白 Aprt、Ddl 之间潜在的物理相互作用。本研究结果为 *aprt* 和 *ddl* 基因在酸适应中的功能研究及其在提高菌株耐酸性中的应用提供了依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 菌株、质粒、引物、培养条件

本研究所用菌株、质粒和引物见表 1 和表 2。本实验中所用的菌株为大肠杆菌 DH5 $\alpha$ 、*Lb. bulgaricus* CH3、*Lc. lactis* NZ9000 和酿酒酵母 Y2HGold。实验中用到的质粒有大肠杆菌-乳酸乳球菌穿梭载体 pMG36c<sup>[7]</sup>以及 pGBKT7 DNA-BD、pGADT7 AD、pGBKT7-53、pGBKT7-Lam 和

pGADT7-T 等用于酵母双杂交实验的质粒。实验中所用的引物用于扩增 *aprt*、*ddl*、*oppDII* 和 *tsf* 基因全长构建表达载体以及用于构建全长酵母双杂交载体和截短型酵母双杂交载体等(表 2)。

用于培养大肠杆菌 DH5 $\alpha$  的培养基是 LB 培养基。用于培养 *Lb. bulgaricus* CH3 的培养基是 MRS 培养基。*Lc. lactis* NZ9000 在 GM17 培养基(添加 0.5% 葡萄糖的 M17 培养基)中进行培养。酵母菌株在 YPDA 培养基或 SD 培养基(Synthetic Drop-out Medium, SD 培养基)中培养。

*Lb. bulgaricus* CH3 在 37 °C 静置培养。*Lc. lactis* NZ9000 在 30 °C 厌氧培养。GM17 培养基和 LB 培养基中分别加入 5  $\mu$ g/mL 和 10  $\mu$ g/mL 氯霉素, 筛选 pMG36c 阳性克隆。将 Y2H 重组质粒转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$ , 用含氨苄青霉素(100  $\mu$ g/mL)或卡那霉素(50  $\mu$ g/mL)的 LB 平板筛选阳性克隆。YPDA 培养基、SD 培养基购自 TaKaRa BIO INC. 公司。氯霉素、氨苄青霉素、卡那霉素、葡萄糖购自美国 Sigma-Aldrich 公司。配制 LB 培养基、M17 培养基所用到的各种药品购自天津市百世化工有限公司。

表 1. 本研究中使用的菌株和质粒

Table 1. Strains and plasmids used in this study

Strains or plasmids	Characteristics	Sources
<b>Strains</b>		
<i>Lb. bulgaricus</i> CH3	Isolation and identification from traditional fermented milk in Chinese pastoral areas	Preserved in our laboratory
<i>Lc. lactis</i> NZ9000	Host bacteria of the expression system of <i>Lc. lactis</i>	Preserved in our laboratory
<i>Lc. lactis</i> NZCK	<i>Lc. lactis</i> NZ9000 carrying pMG36c plasmid	This study
<i>Lc. lactis</i> NZAprt	<i>Lc. lactis</i> NZ9000 carrying pMG-aprt plasmid	This study
<i>Lc. lactis</i> NZDdl	<i>Lc. lactis</i> NZ9000 carrying pMG-ddl plasmid	This study
<i>Lc. lactis</i> NZOppDII	<i>Lc. lactis</i> NZ9000 carrying pMG-oppDII plasmid	This study
<i>Lc. lactis</i> NZTsf	<i>Lc. lactis</i> NZ9000 carrying pMG-tsf plasmid	This study
<i>E. coli</i> DH5 $\alpha$	Plasmid cloning host	Preserved in our laboratory
Y2HGold	Yeast two-hybrid expression strain	TaKaRa BIO INC.
<b>Plasmids</b>		
pMG36c	Chloramphenicol resistance, expression system carrier	Preserved in our laboratory
pMG-aprt	pMG36c plasmid carrying <i>aprt</i> gene	This study
pMG-ddl	pMG36c plasmid carrying <i>ddl</i> gene	This study
pMG-oppDII	pMG36c plasmid carrying <i>oppDII</i> gene	This study
pMG-tsf	pMG36c plasmid carrying <i>tsf</i> gene	This study
pGBKT7 DNA-BD	Kanamycin resistance, bait plasmid for Y2H, BD	TaKaRa BIO INC.
pGADT7 AD	Ampicillin resistance, prey plasmid for Y2H, AD	TaKaRa BIO INC.
pGBKT7-53	Recombinant plasmid as positive control for Y2H, BD-53	TaKaRa BIO INC.
pGBKT7-Lam	Recombinant plasmid as negative control for Y2H, BD-Lam	TaKaRa BIO INC.
pGADT7-T	Recombinant plasmid as control for Y2H, AD-T	TaKaRa BIO INC.
pGBKT7- <i>aprt</i>	pGBKT7 carrying <i>aprt</i> gene, BD-APRT	This work
pGBKT7- <i>ddl</i>	pGBKT7 carrying <i>ddl</i> gene, BD-Ddl	This work
pGADT7- <i>hpk1</i>	pGADT7 carrying <i>hpk1</i> gene, AD-HPK1	This work
pGADT7- <i>rr1</i>	pGADT7 carrying <i>rr1</i> gene, AD-RR1	This work
pGADT7-A	pGADT7 carrying the A domain of <i>hpk1</i> gene, AD-A	This work
pGADT7-B	pGADT7 carrying the B domain of <i>hpk1</i> gene, AD-B	This work
pGADT7-C	pGADT7 carrying the C domain of <i>hpk1</i> gene, AD-C	This work

表 2. 本研究中使用的引物  
Table 2. Primers used in this study

Primers	Sequences (5'→3')	Restriction sites	Targets
Aprt-F	TTCGAGCTCGCATGGAGGATTACAAAATGTCAATTG	<i>Sac</i> I	Full length of <i>aprt</i> for expression
Aprt-R	GACTCTAGATTAAGCGCCGGTGTATTGAAC	<i>Xba</i> I	
Ddl-F	TTCGAGCTCGCATGACGAAAAAACACAAGTTGG	<i>Sac</i> I	Full length of <i>ddl</i> for expression
Ddl-R	GACTCTAGATTAGTCGTGCTTGTGCAGGATG	<i>Xba</i> I	
oppDII-F	TTCGAGCTCGCATGGCAAATAGAATTTTAGACGTTAAAAAC	<i>Sac</i> I	Full length of <i>oppDII</i> for expression
oppDII-R	GACTCTAGATTAATCCTCGTCAGCTGCTTG	<i>Xba</i> I	
Tsf-F	TTCGAGCTCGCATGGCAAACACTACTGCTAAGC	<i>Sac</i> I	Full length of <i>tsf</i> for expression
Tsf-R	GACTCTAGATTAGTTCTTCATTTGTGCAGCAAC	<i>Xba</i> I	
HPK1-EF	CCGGAATTCATGATCAACAGCCTGTTCAA	<i>Eco</i> R I	Full length of <i>hpk1</i> for Y2H
HPK1-BR	CGCGGATCCCTATCCCTTCTGAATAACTA	<i>Bam</i> H I	
RR1-BF	CGCGGATCCATGCTAGCCATCATCATTTT	<i>Bam</i> H I	Full length of <i>rr1</i> for Y2H
RR1-PR	GCCCTGCAGTTAAACAAGGTCATTTTTTG	<i>Pst</i> I	
RR1-XR	CCGCTCGAGTTAAACAAGGTCATTTTTTG	<i>Xho</i> I	
Aprt-EF	CCGGAATTCATGGAGGATTACAAAATGTC	<i>Eco</i> R I	Full length of <i>aprt</i> for Y2H
Aprt-BR	CGGATCCCTTAAGCGCCGGTGTATTGAA	<i>Bam</i> H I	
Ddl-BF	CGCGGATCCATGACGAAAAAACACA	<i>Bam</i> H I	Full length of <i>ddl</i> for Y2H
Ddl-XR	CCTCGAGTTAGTCGTGCTTGTGCAGGA	<i>Xho</i> I	
Ddl-SR	GCGTCGACTTAGTCGTGCTTGTGCAGGA	<i>Sal</i> I	
A-EF	CCGGAATTCCTGTTCAACAATCTAGCTTT	<i>Eco</i> R I	Truncated <i>hpk 1</i> ( <i>hpk1-A</i> ) for Y2H
A-BR	CGGATCCCTTATTCCTGGTTTTTTTGAATCG	<i>Bam</i> H I	
B-EF	CCGGAATTCATTATGGCCACACGGATTCA	<i>Eco</i> R I	Truncated <i>hpk 1</i> ( <i>hpk1-B</i> ) for Y2H
B-BR	CGCGGATCCCTTAGTTGATCTCAACCTTGGTCT	<i>Bam</i> H I	
C-EF	GGAATTC AAGCCAATTGCTACTCTGCC	<i>Eco</i> R I	Truncated <i>hpk 1</i> ( <i>hpk1-C</i> ) for Y2H
C-BR	CGCGGATCCCTTACTTCTGAATAACTAATCAA	<i>Bam</i> H I	

## 1.2 重组菌株的构建

根据细菌 DNA 提取试剂盒(OMEGA bio tek, 美国)说明书提取 *Lb. bulgaricus* CH3 基因组 DNA。根据 *Lb. bulgaricus* ATCC 11842 全基因组 (GenBank 登录号 CR954253.1)中 *aprt*、*ddl*、*oppDII* 和 *tsf* 基因序列设计引物<sup>[5]</sup>。以基因组 DNA 为模板, 在上游引物加入 *Sac* I 位点, 下游引物加入 *Xba* I 位点, 用 PCR 方法扩增 *aprt*、*ddl*、*oppDII* 和 *tsf* 基因片段。纯化后的 PCR 产物分别与 *Sac* I-*Xba* I 酶切后的 pMG36c 连接, 获得重组质粒 pMG-*aprt*、pMG-*ddl*、pMG-*oppDII* 和 pMG-*tsf*。将重组质粒 pMG-*aprt*、pMG-*ddl*、pMG-*oppDII* 和

pMG-*tsf* 分别在 2000 V、200 Ω 和 25 μF 下电转化到 *Lc. lactis* NZ9000 感受态细胞中, 构建重组菌株 *Lc. lactis* NZAprt、*Lc. lactis* NZDdl、*Lc. lactis* NZOppDII 和 *Lc. lactis* NZTsf。将 pMG36c 转化到 *Lc. lactis* NZ9000 构建 *Lc. lactis* NZCK 对照菌株。

## 1.3 RT-PCR 检测重组蛋白表达

采用逆转录 PCR(reverse transcription PCR, RT-PCR)在转录水平确认差异基因的表达情况<sup>[11]</sup>。重组菌株 *Lc. lactis* NZAprt、*Lc. lactis* NZDdl、*Lc. lactis* NZOppDII 和 *Lc. lactis* NZTsf 以及对照菌株 *Lc. lactis* NZCK 在含有 5 μg/mL 氯霉素的 GM17 中, 30 °C 下培养直到  $OD_{600}=0.8$ 。采用 Trizol 试

剂提取细菌总 RNA, 去除基因组 DNA<sup>[7]</sup>。采用 TaKaRa BIO INC 公司的 PrimeScript™II 第一链 cDNA 合成试剂盒合成 cDNA, 然后以 cDNA 为模板, 用相应的引物分别扩增 *aprt*、*ddl*、*oppDII* 和 *tsf* 基因。

#### 1.4 SDS-PAGE 检测蛋白表达

菌株的培养方法与 RT-PCR 检测基因表达实验相同。细胞在 4 °C 下离心(8000 r/min) 5 min, 用预冷的 PBS 缓冲液洗涤 2 次, 然后重新悬浮, 冰上超声破碎 30 min (75 W, 工作 10 s, 间隔 10 s)。4 °C 下离心(12000 r/min) 5 min 去除细胞碎片, 获得细胞提取液。将细胞提取液与 2× SDS-PAGE 上样缓冲液混合, 煮沸 5 min, 用 5% (W/V) 浓缩胶和 12% (W/V) 分离胶对每个样品进行电泳, 并用考马斯亮蓝(Coomassie brilliant blue, CBB) R-250 染色。

#### 1.5 菌株生长能力

将重组菌株 *Lc. lactis* NZA<sub>aprt</sub>、*Lc. lactis* NZD<sub>ddl</sub>、*Lc. lactis* NZO<sub>oppDII</sub>、*Lc. lactis* NZT<sub>tsf</sub> 和对照菌株 *Lc. lactis* NZCK 接种(2%, V/V)在 GM17 培养基中, 并在 30 °C 下培养。使用紫外分光光度计(UV-2100, Unicol Shanghai Co. LTD.)在 600 nm 处每隔 2 h 监测菌株的  $OD_{600}$ , 采用精密酸度计 [PB-10, 赛多利斯科学仪器(北京)有限公司]测定胞外 pH (extracellular pH, pH<sub>ex</sub>)。

#### 1.6 菌株耐胁迫能力分析

所有菌株在 30 °C 下培养于添加 5 μg/mL 氯霉素的 GM17 中。在  $OD_{600}=0.8$  时收集细胞, 将细胞平均分成 2 份, 用 PBS 洗涤, 一份重悬在含有 5 μg/mL 氯霉素的等体积 GM17 液体培养基(pH 2.5)中酸处理 1 h, 一份不做任何处理作为对照。将处理前后的细胞涂布于 GM17 平板上, 30 °C 培养 24–48 h

后, 对酸处理前后的细胞进行计数, 存活率等于酸处理前后活细胞数的比值。在鉴定了异源表达基因对菌株耐酸性的影响后, 评价了这些基因对菌株耐其他胁迫能力的影响, 包括胆盐胁迫(1.25%牛胆汁, 20 min)、热胁迫(50 °C, 30 min)、冷胁迫(10 °C, 12 h)和氧化胁迫(15 mmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 30 min)<sup>[12]</sup>。菌株耐其他胁迫实验中, 菌株培养方法与耐酸性实验相同, 仅处理方法按照此条件进行即可。

#### 1.7 Y2H 质粒构建

为确定双组分系统 TCS1 中的组氨酸蛋白激酶(HPK1)、应答调节蛋白(RR1)与耐酸调控差异蛋白 Aprt、Ddl 的相互作用及作用关键区域, 进行了全长和截短型酵母双杂交试验。pGADT7(AD)、pGBKT7(BD)和其他对照质粒从 TaKaRa BIO INC. 购买。表 1 所列用于 Y2H 分析的重组质粒是通过双酶切将需插入的 DNA 连接到穿梭载体上构建而成。用于构建融合蛋白的全长或截短部分是通过使用表 2 中相应的引物从 *Lb. bulgaricus* CH3 的基因组 DNA 中进行 PCR 扩增获得。

#### 1.8 酵母转化与斑点检测

利用醋酸锂(lithium acetate, LiAc)介导的方法, 将编码杂交蛋白的 AD 和 BD 重组质粒共转化到 Y2HGold 菌株感受态细胞中<sup>[13]</sup>。在 SD/-Trp-Leu 培养基(SD 培养基中缺少色氨酸、亮氨酸)上 30 °C 孵育 3 d 后, 选择带有诱饵质粒和猎物质粒的转化子, 将适量的菌落转移到无菌水中, 调节  $OD_{600}$  约为 1.0。将 5 μL 不同梯度稀释液(1:10、1:100 和 1:1000)用移液枪点到 SD/-Trp-Leu-His-Ade 选择性培养基(SD 培养基中缺少色氨酸、亮氨酸、组氨酸和腺嘌呤)上, 30 °C 静置培养 2 d。

## 2 结果和分析

### 2.1 重组菌株验证

为了在 *Lc. lactis* NZ9000 中表达 *Lb. bulgaricus* CH3 中与菌株耐酸能力相关的 Aprt、Ddl、OppDII 和 Tsf 蛋白, 分别扩增了 *aprt*、*ddl*、*oppDII* 和 *tsf* 基因片段, 片段大小分别约为 543 bp、1089 bp、1044 bp 和 1029 bp, 分别连接到表达载体 pMG36c 上(图 1), 经菌落 PCR、双酶切鉴定和测序验证的阳性转化子分别命名为 pMG-*aprt*、pMG-*ddl*、pMG-*oppDII* 和 pMG-*tsf* (数据未显示)。

为研究 *aprt*、*ddl*、*oppDII* 和 *tsf* 在耐酸调节中的作用, 将含有 *aprt*、*ddl*、*oppDII* 和 *tsf* 的质粒分

别转化到 *Lc. lactis* NZ9000 感受态细胞中。重组质粒 pMG-*aprt*、pMG-*ddl*、pMG-*oppDII* 和 pMG-*tsf* 及对照质粒 pMG36c 经电穿孔分别转化到 *Lc. lactis* NZ9000 中, 通过质粒提取并进行双酶切验证(图 2)。

从图 2 中可以看出, 各个重组质粒条带大小均大于 pMG36c 空载体, 出现不同程度的滞后现象。经 *Xba* I 单酶切后各个重组质粒条带大小明显大于酶切后线性的 pMG36c 空载体, 条带滞后现象更加明显; 经 *Sac* I 和 *Xba* I 双酶切后, 有与酶切后线性的 pMG36c 空载体大小相同的条带以及外源连接的耐酸调控差异基因片段 PCR 产物大小一致的条带产生。说明重组质粒 pMG-*aprt*、

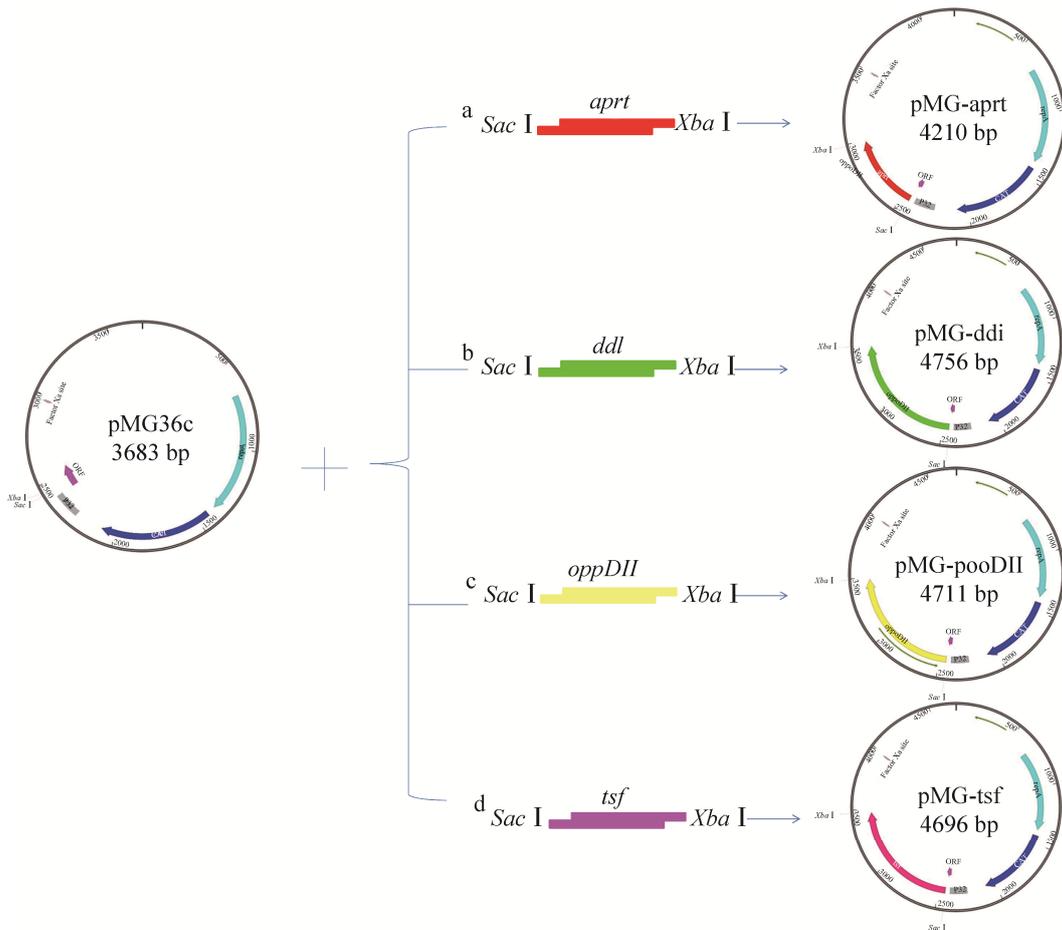


图 1. 表达质粒的构建

Figure 1. Construction of the expression plasmids. a: pMG-*aprt*; b: pMG-*ddl*; c: pMG-*oppDII*; d: pMG-*tsf*.

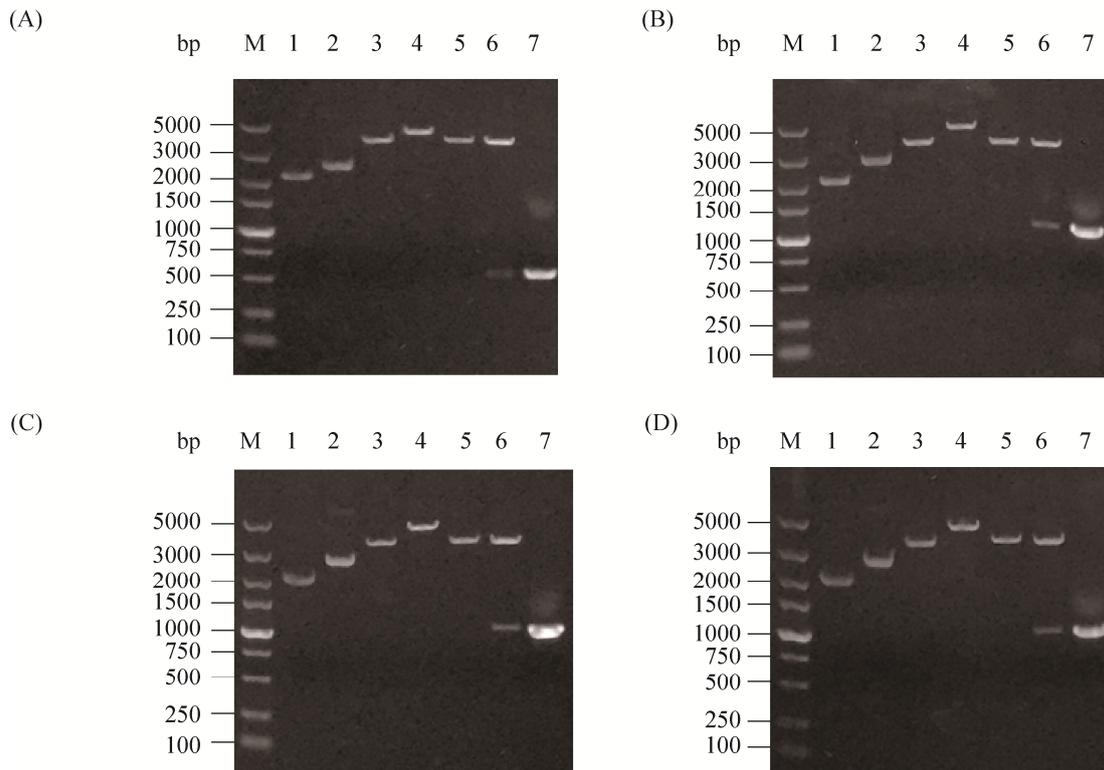


图 2. 重组质粒酶切验证电泳图

Figure 2. Agarose electrophoresis of the recombinant plasmids verified by single and double enzyme digestion. M: DNA marker DL5000; 1: pMG36c; 2: recombinant plasmids; 3, 5: single enzyme digestion of pMG36c; 4, 6: single and double enzyme digestion of recombinant plasmids; 7: exogenous PCR products. A: pMG-aprt; B: pMG-ddl; C: pMG-oppDII; D: pMG-tsf.

pMG-ddl、pMG-oppDII 和 pMG-tsf 及对照质粒 pMG36c 经电穿孔成功转化到 *Lc. lactis* NZ9000 中, 分别命名为乳酸乳球菌 NZAprt、NZDdl、NZOppDII、NZTsf 和 NZCK。

## 2.2 RT-PCR 和 SDS-PAGE 检测重组菌株表达情况

为了检测 *Lb. bulgaricus* CH3 中由双组分系统 TCS1 调控的与菌株耐酸能力相关差异蛋白 Aprt、Ddl、OppDII 和 Tsf 在 *Lc. lactis* NZ9000 中的表达情况, 采用 RT-PCR 技术检测了这些基因在转录水平上的表达情况。以乳酸乳球菌 NZAprt、NZDdl、NZOppDII、NZTsf 和 NZCK 提取的总 RNA 反转录合成的单链 cDNA 为模板, 用相应的引物

进行 RT-PCR, 分别扩增 *aprt*、*ddl*、*oppDII* 和 *tsf* 基因, 结果如图 3 所示。

乳酸乳球菌 NZ9000 中也存在双组分信号转导系统 TCSs, 但经过将德氏乳杆菌保加利亚亚种中的 TCS1 与乳酸乳球菌 NZ9000 中的双组分信号转导系统 TCSs 进行比对发现同源性很低。且通过 PCR 扩增发现(图 3), 乳酸乳球菌 NZ9000 中不含有本实验中异源表达的德氏乳杆菌保加利亚亚种的 *aprt*、*ddl*、*oppDII* 和 *tsf* 基因。因此, 理论上乳酸乳球菌 NZ9000 中的双组分信号转导系统 TCSs 对异源表达的德氏乳杆菌保加利亚亚种这 4 个基因不存在调控作用。

从图 3 中可以看出, *Lb. bulgaricus* CH3 中由

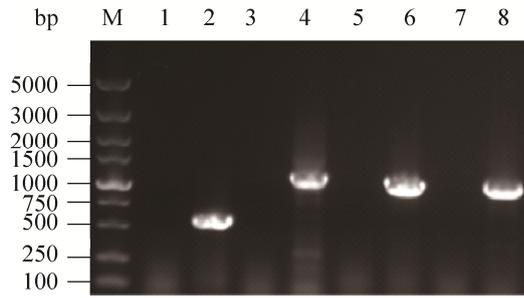


图 3. 耐酸调控相关基因 RT-PCR 产物的电泳图

Figure 3. Agarose electrophoresis of RT-PCR product of acid-related genes. M: DNA marker DL5000; lane 1, 3, 5, 7: Negative control (NZCK); lane 2: *aprt* (NZAprt); lane 4: *ddl* (NZDdl); lane 6: *oppDII* (NZOppDII); lane 8: *tsf* (NZTsf).

TCS1 调控的耐酸性相关基因 *aprt*、*ddl*、*oppDII* 和 *tsf* 均可以从 *Lc. lactis* NZ9000 中扩增得到。在重组菌株中观察到相应条带，而在对照菌株 NZCK 中没有观察到条带。结果表明，与耐酸相关基因 *aprt*、*ddl*、*oppDII* 和 *tsf* 均在 *Lc. lactis* NZ9000 中成功表达。

采用 SDS-PAGE 检测乳酸乳球菌 NZAprt、NZDdl、NZOppDII、NZTsf 和 NZCK 的总蛋白表达情况。结果表明，*Lb. bulgaricus* CH3 中的 *aprt*、*ddl*、*oppDII* 和 *tsf* 基因成功在 *Lc. lactis* NZ9000 中异源表达，但重组菌株表达重组蛋白后与对照菌株在总蛋白表达水平上无显著差异(图 4)。

### 2.3 重组乳酸乳球菌 NZ9000 生长性能研究

在相同条件下，对乳酸乳球菌 NZCK 和重组乳酸乳球菌 NZAprt、NZDdl、NZOppDII 和 NZTsf 的生长性能进行了研究。重组菌株乳酸乳球菌 NZAprt、NZDdl、NZOppDII 和 NZTsf 的生长曲线与对照菌株乳酸乳球菌 NZCK 几乎没有差异(图 5-A)。所有菌株的延滞期大概持续 2 h，2–10 h 菌株处于指数生长期，之后所有菌株开始进入稳

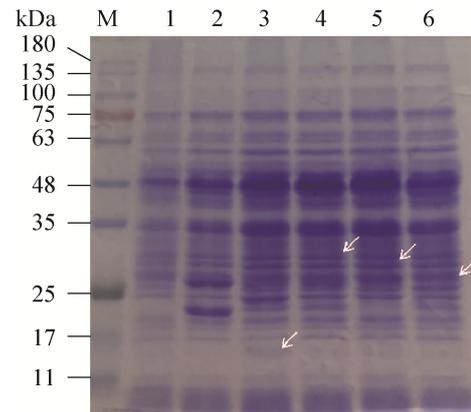


图 4. SDS-PAGE 检测酸胁迫差异基因在 *Lc. lactis* NZ9000 中的表达情况

Figure 4. The expression of acid-related genes in *Lc. lactis* NZ9000 determined by SDS-PAGE. 1: NZ9000; 2: NZCK; 3: NZAprt; 4: NZDdl; 5: NZOppDII; 6: NZTsf.

定期。在正常生长条件下检测了携带 *aprt*、*ddl*、*oppDII* 和 *tsf* 的乳酸乳球菌的胞外 pH (图 5-B)。虽然重组菌株的  $OD_{600}$  略有增加，胞外 pH 略有下降，但综合来看，表达外源蛋白对菌株生长和胞外 pH 没有显著差异，表明异源表达 *aprt*、*ddl*、*oppDII* 和 *tsf* 基因对细胞生长和细胞外 pH 没有显著影响，研究人员对其他基因的异源表达也得到了相似的结果<sup>[14]</sup>。

### 2.4 重组乳酸乳球菌 NZ9000 耐酸性评价

为了阐明 Aprt、Ddl、OppDII 和 Tsf 的表达是否影响了 *Lc. lactis* NZ9000 的耐酸性，对乳酸乳球菌 NZAprt、NZDdl、NZOppDII、NZTsf 和 NZCK 在 pH 2.5 的 GM17 液体培养基中 30 °C 静置培养 1 h 前后的活细胞进行了计数(图 6)。对照菌株乳酸乳球菌 NZCK 与重组菌株乳酸乳球菌 NZAprt、NZDdl、NZOppDII 和 NZTsf 在酸胁迫下的存活率有着明显的差异。对照菌株乳酸乳球菌 NZCK 和重组菌株乳酸乳球菌 NZAprt、NZDdl、NZOppDII 和 NZTsf 的存活率分别为  $5.0 \times 10^{-6}$ 、 $3.8 \times 10^{-4}$ 、 $5.7 \times 10^{-4}$ 、 $3.2 \times 10^{-6}$  和  $5.4 \times 10^{-6}$ 。

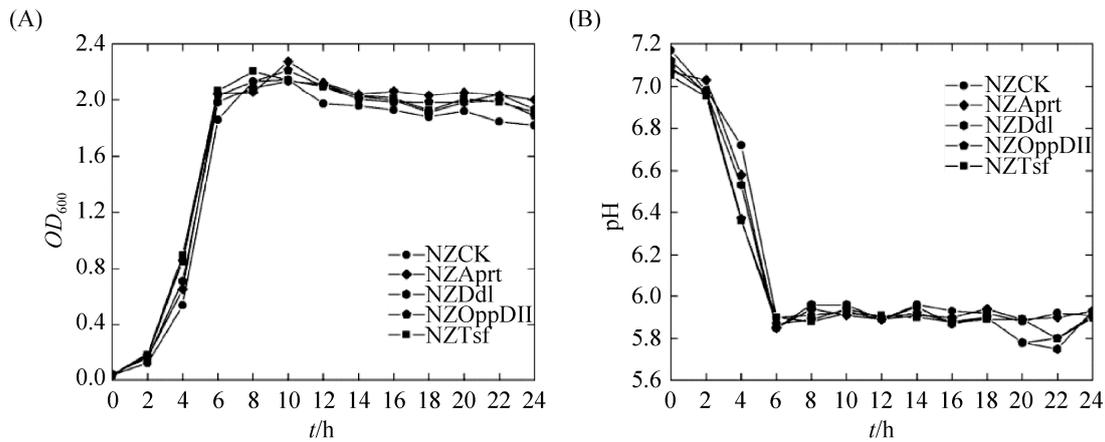


图 5. 正常条件下 NZCK、NZAprt、NZDdl、NZOppDII 和 NZTsf 的生长曲线(A)和 pH<sub>ex</sub>(B)  
 Figure 5. The growth curves (A) and pH<sub>ex</sub> (B) of NZCK, NZAprt, NZDdl, NZOppDII and NZTsf under normal condition.

结果表明, 乳酸乳球菌 NZAprt 菌株的存活率是对照菌株 NZCK 的 75 倍, 乳酸乳球菌 NZDdl 菌株的存活率是对照菌株 NZCK 的 114 倍。与对照菌株相比, 乳酸乳球菌 NZOppDII 和 NZTsf 菌株的耐酸性没有显著提高。这些数据表明, NZAprt 和 NZDdl 菌株在应对酸性环境时赋予了宿主菌更高的耐受能力, 使宿主菌在各种酸性环境下可能表现更好。

2.5 Aprt 和 Ddl 重组菌株对其他胁迫的耐受性

菌株在不同环境胁迫下的适应反应通常是相互联系的, 不同的环境刺激, 如冷、热、氧和胆盐, 会产生相似的反应<sup>[15]</sup>。Aprt 和 Ddl 在 *Lc. lactis* NZ9000 中的表达增强了菌株对酸胁迫的抗性, 那么对酸胁迫以外的其他胁迫是否也具有抵抗力则需要进一步探讨。因此, 本研究探讨了可能由 *Lb. bulgaricus* CH3 中 TCS1 调控的与菌株耐酸能力相关的 Aprt 和 Ddl 对宿主菌 *Lc. lactis* NZ9000 在其他胁迫下的影响, 包括胆盐胁迫、低温胁迫、氧化胁迫和高温胁迫。

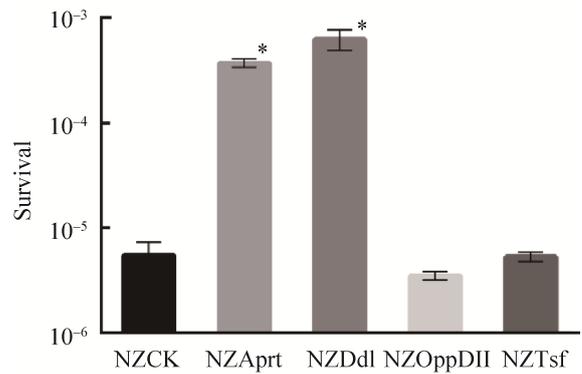


图 6. 酸刺激后重组乳酸乳球菌 NZ9000 的存活情况  
 Figure 6. The survival of *Lc. lactis* NZ9000 derivatives after acid challenge. The survival rate was calculated equal to the number of living cells before and after the acid treatment. \*:  $P < 0.05$ .

研究结果(图 7)显示, 在不同的环境胁迫下, 对照菌株乳酸乳球菌 NZCK 和重组菌株乳酸乳球菌 NZAprt 和 NZDdl 的存活率是不同的。Aprt 的表达可使重组菌株 NZAprt 的胆盐耐受力比对照菌株高 5 倍, 但对其他 3 种胁迫与对照菌株差异不显著。Ddl 蛋白的表达可使 NZDdl 在胆盐胁迫下的耐受力比对照菌株高 12 倍, 在低温胁迫下的

耐受力比对照菌株高 8 倍, 但对其他两种胁迫均无显著影响。结果表明, 异源表达 Aprt 和 Ddl 为 *Lc. lactis* NZ9000 提供了对多种胁迫的耐受性。

## 2.6 Y2H 分析

本课题组前期研究发现, 自然发酵条件下, *Lb. bulgaricus* CH3 菌株的组氨酸蛋白激酶 HPK1 突变体 CH3-H 和应答调节蛋白 RR1 突变体 CH3-R 中, Aprt 分别提高 2.87 倍和下降 2.01 倍; 酸适应条件下, D-丙氨酸-D-丙氨酸连接酶(D-alanine-D-alanine ligase, Ddl)在 CH3-H 和 CH3-R 中分别比 CH3 下降 2.53 倍和 3.79 倍。Aprt 和 Ddl 的表达与野生型 CH3 相比有显著变化, 且本研究显示 Aprt 和 Ddl 在 *Lc. lactis* NZ9000 中异源表达显著提高了

宿主菌的酸耐受能力。为进一步确定双组分系统中的 HPK1、RR1 与 Aprt、Ddl 的潜在相互作用, 验证二者之间是否存在蛋白质-蛋白质相互作用, 构建了 Y2H 技术的诱饵质粒和猎物质粒(图 8)。

本研究中, 分别构建了含有转录激活蛋白 GAL4 (galactose utilization enzyme, GAL4) 激活域和 GAL4-DNA 结合域的融合表达载体(图 8), 并通过 DNA 测序进行了验证。实验中选择 BD-53 和 AD-T 作为阳性对照, BD-Lam 与 AD、BD 与 AD-HPK1、BD-APRT 与 AD、BD-Ddl 与 AD、BD 与 AD-RR1 作为阴性对照。BD 空载体和猎物质粒 AD-HPK1 共转化子、AD 空载体和诱饵质粒 BD-Ddl 共转化子均可以在营养缺陷型培养基

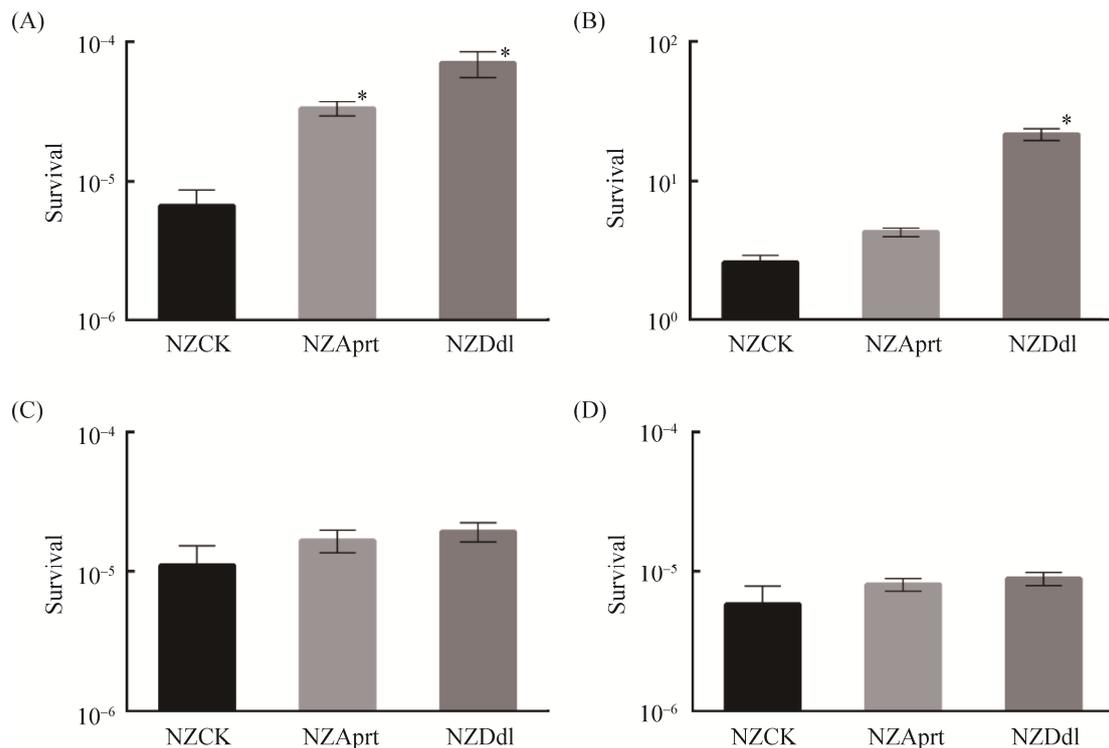


图 7. 多种胁迫下重组菌株的存活情况

Figure 7. The survival of recombinant strains after various stresses. A: Bile salt stress: 1.25% W/V Ox-bile, 20 min; B: Cold stress: 10 °C, 12 h; C: H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> stress: 15 mmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 30 min; D: Heat stress: 50 °C, 30 min. The survival rate was calculated equal to the number of living cells before and after the acid treatment. \*: P < 0.05.

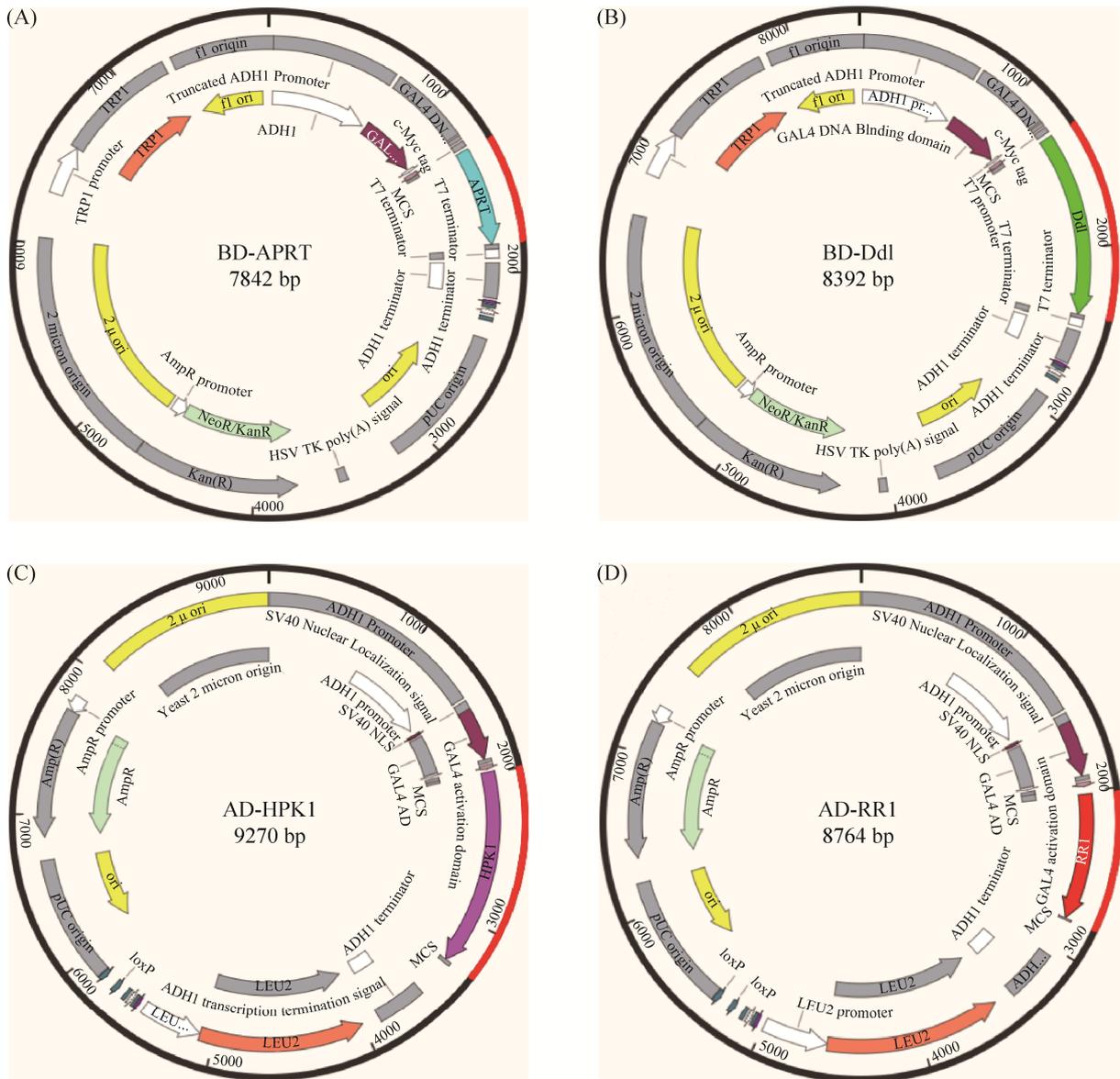


图 8. 酵母双杂交实验中诱饵质粒和猎物质粒的图谱示意图

Figure 8. Sketch maps of bait plasmids and prey plasmids in yeast two hybrid experiments. A: BD-APRT; B: BD-Ddl; C: AD-HPK1; D: AD-RR1. A and B are bait plasmids, C and D are prey plasmids.

SD/-Leu-Trp 上生长，但均不能在营养缺陷型培养基 SD/-Leu-Trp-Ade-His 上生长，这些结果表明，单独的 HPK1 和 Ddl 本身均不能激活下游报告基因的表达。而诱饵质粒 BD-Ddl 和猎物质粒 AD-HPK1 共转化子可以在营养缺陷型培养基 SD/-Leu-Trp-Ade-His 上生长，说明诱饵质粒

BD-Ddl 和猎物质粒 AD-HPK1 在酵母 Y2HGold 中共同表达可以激活下游报告基因的表达，从而使酵母 Y2HGold 可以在不同的营养缺陷型培养基上正常生长，说明在酵母 Y2HGold 中 HPK1 可以与 Ddl 发生互作。同理，诱饵质粒 BD-APRT 和猎物质粒 AD-HPK1 共转化子无法在营养缺陷

型培养基 SD/-Leu-Trp-Ade-His 上生长, 说明在酵母 Y2HGold 中 HPK1 无法与 APRT 发生互作。以上 Y2H 实验结果表明, 参与耐酸调节的蛋白质与由 HPK1 和 Ddl 组成的多聚体复合物有关(图 9)。

## 2.7 激活域分析

Y2H 实验确定组氨酸蛋白激酶 HPK1 与 D-丙氨酸-D-丙氨酸连接酶 Ddl 之间存在相互作用。根

据 HPK1 蛋白的结构域构建 Y2H 截短型表达载体, 确定 Ddl 与 HPK1 相互作用的关键结构域。通过 SMART 数据库(<http://smart.embl.de/>)对 HPK1 蛋白序列进行结构域预测, 发现 HPK1 蛋白具有 3 类保守的结构域, 如图 10 所示。从图 10 中可以看出, HPK1 蛋白有 6 个跨膜区域(HPK1-A), 一个螺旋区域(HPK1-B)和一个组氨酸激酶核心区域(HATPase\_c, HPK1-C)。

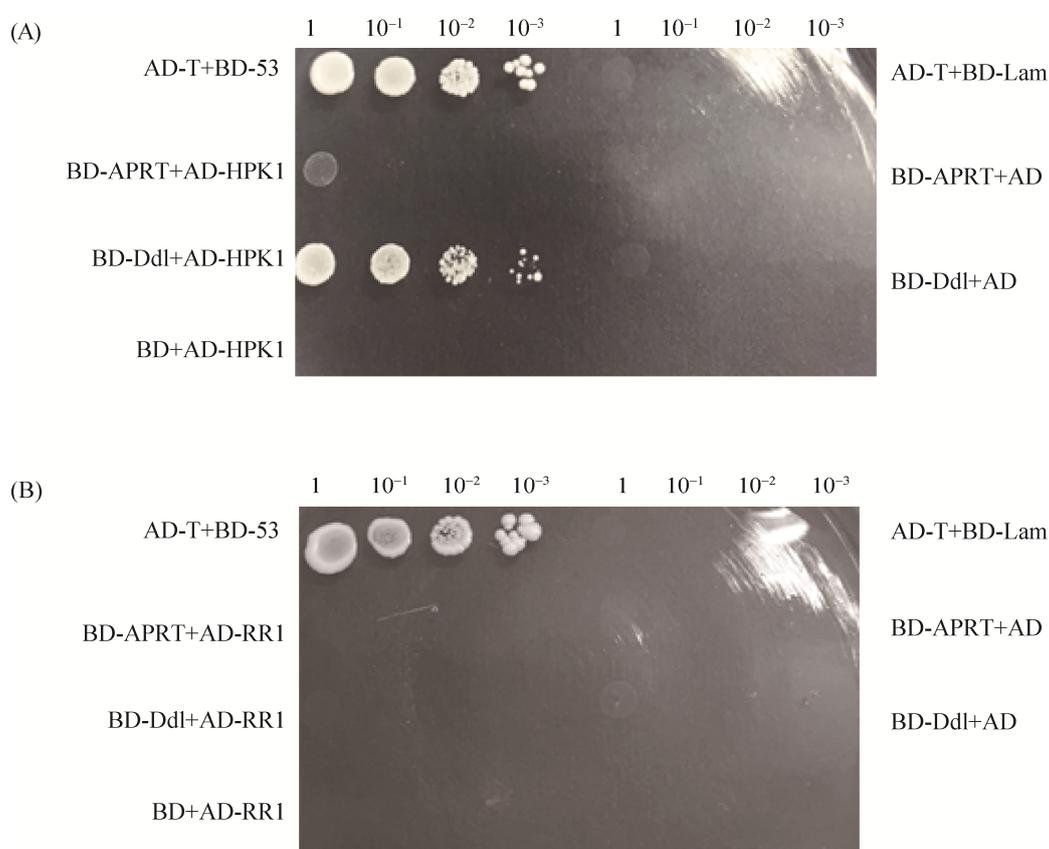


图 9. 酵母 Y2HGold 中诱饵质粒与猎物质粒相互作用检测

Figure 9. Detection of interactions between bait plasmids and prey plasmids in yeast Y2HGold. A: AD-HPK1; B: AD-RR1. AD: pGADT7 AD cloning vector; AD-T: pGADT7-T; BD: pGBKT7 DNA-BD cloning vector; BD-53: pGBKT7-53; BD-Lam: pGBKT7-Lam; AD-T+BD-53: positive control; AD-T+BD-Lam, BD+AD-HPK1, BD-APRT+AD, BD-Ddl+AD, BD+AD-RR1: negative control; BD-APRT+AD-HPK1, BD-Ddl+AD-HPK1, BD-APRT+AD-RR1, BD-Ddl+AD-RR1: experimental groups to be verified.

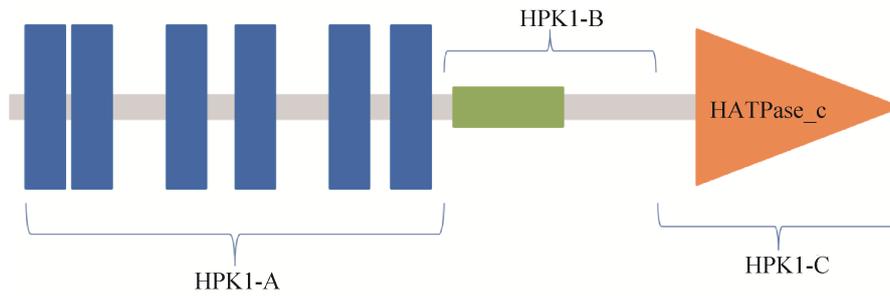


图 10. HPK1 蛋白结构域分析  
Figure 10. Domain analysis of HPK1.

在进一步的实验中,将HPK1蛋白分为HPK1-A、HPK1-B和HPK1-C,并分别与GAL4转录激活结构域融合,分析这些结构域与Ddl的交互作用。诱饵质粒BD-Ddl和猎物质粒AD-A和AD-B在Y2HGold细胞中的共表达不能激活下游报告基因his3、ade2和mel1的表达,表明Ddl和HPK1-A、HPK1-B在Y2HGold细胞中不存在明显的互作作用。Ddl只能与HPK1蛋白的HPK1-C区域发生相互作用,导致酵母可以在选择培养基上生长,说明HPK1-C是与Ddl发生相互作用所必需的(图11)。Y2H结果表明,HPK1与Ddl之间存在相互作用,即HPK1-C与Ddl发生相互作用。

### 3 讨论

德氏乳杆菌保加利亚亚种在食品工业中有着广泛的应用前景,研究者试图研究其耐酸机理以提高菌株活性和稳定性。本课题组前期研究发现,2-DE和RT-qPCR筛选出了自然发酵条件下和酸适应条件下*Lb. bulgaricus* CH3中大量由双组分系统TCS1调控的差异表达基因,其中组氨酸蛋白激酶HPK1突变体CH3-H和应答调节蛋白RR1突变体CH3-R中的腺嘌呤磷酸核糖转移酶(Aprt)、D-丙氨酸-D-丙氨酸连接酶(Ddl)、寡肽ABC转运蛋白(OppDII)和延伸因子Ts(Tsf)的表达水平与野

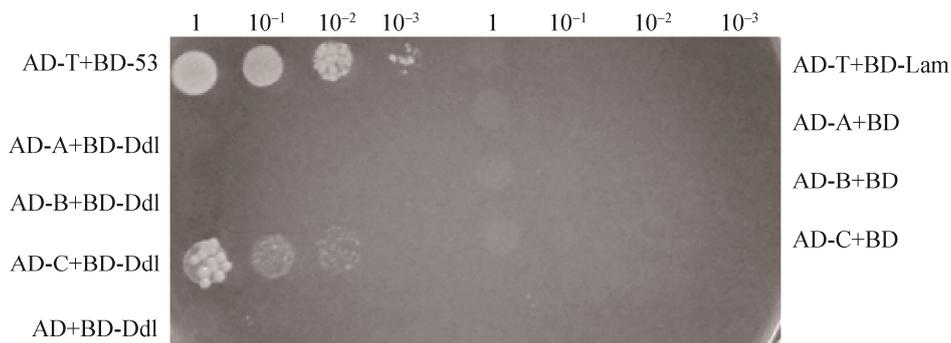


图 11. 截短型诱饵质粒与猎物质粒相互作用检测

Figure 11. Detection of interactions between truncated bait plasmids and prey plasmids. AD: pGADT7 AD cloning vector; AD-T: pGADT7-T; BD: pGBKT7 DNA-BD cloning vector; BD-53: pGBKT7-53; BD-Lam: pGBKT7-Lam; AD-T+BD-53: Positive control; AD-T+BD-Lam, AD+BD-Ddl, AD-A+BD, AD-B+BD, AD-C+BD: Negative control; AD-A+BD-Ddl, AD-B+BD-Ddl, AD-C+BD-Ddl: experimental groups to be verified.

生型 CH3 相比有显著变化。这些蛋白主要参与了嘌呤核苷酸代谢、细胞壁肽聚糖生物合成、氨基酸转运和蛋白质生物合成等过程<sup>[8]</sup>。

但是, 仅仅通过双向电泳和实时定量 PCR 的结果并不能得出差异表达基因参与菌株耐酸反应的结论, 因为并不是所有的差异表达基因都直接参与了菌体的酸耐受反应。因此, 需要通过传统分子生物学手段(如基因突变或超量表达)来验证这些差异基因是否在菌体的酸耐受反应中直接发挥作用。由于 *Lb. bulgaricus* 的电转化方法不够成熟并且缺少基因突变或同源表达的载体系统, 无法进行差异基因的功能分析, 因此采用 *Lc. lactis* NZ9000 进行异源表达。本实验中, 尽管 *Lc. lactis* NZ9000 菌株表达了 Aprt、Ddl、OppDII 和 Tsf, 但实验方案仍有待改进。在没有抗生素压力的情况下, 自由复制的质粒可能是不稳定的。最后, 表达系统的蛋白表达水平相对较低。

本研究通过表达 Aprt 和 Ddl, 观察到宿主菌耐酸能力的改善, 表明了 Aprt 和 Ddl 对耐酸反应的贡献。由此可见, Aprt 和 Ddl 是导致菌株在酸性环境中耐受性提高的原因之一, 同时, 菌株中的耐酸调控过程是涉及多种代谢途径的复杂调控过程, 各种代谢过程协同发挥作用进而实现菌株的自我保护。表达 Aprt、Ddl 也能提高宿主菌的其他抗性能力, 如表达 Aprt 能提高抗胆盐能力, 表达 Ddl 还能提高宿主菌的抗低温能力。说明 Aprt 和 Ddl 在宿主菌中的表达在增强菌株抗多种胁迫中起重要作用。

腺嘌呤磷酸核糖转移酶(Aprt)由 180 个氨基酸组成, 是一种在嘌呤补救合成途径中催化腺嘌呤与 5-磷酸核糖-1-焦磷酸(PRPP)发生 Mg 依赖性缩合反应生成一磷酸腺苷(AMP)的酶, 可以提高嘌

呤碱的利用率, 维持嘌呤碱在最佳水平。同时, AMP 经过二磷酸腺苷(adenosine diphosphate, ADP)最终形成三磷酸腺苷(adenosine triphosphate, ATP), 对菌体内的能量代谢过程产生影响。Aprt 在乳酸菌中的具体功能研究较少, 需要进一步的研究来阐明其在乳酸菌耐酸调节中的作用。

D-丙氨酸-D-丙氨酸连接酶(Ddl)由 362 个氨基酸组成, 是一种参与细菌细胞壁肽聚糖生物合成过程的 ATP 依赖酶<sup>[16]</sup>。Ddl 的结构与谷胱甘肽合酶相似, 可能通过调节氨基酸代谢来调节菌株的耐酸性。大肠杆菌中, 这两种酶可将 ATP 转化为 ADP, 并在反应过程中释放肽类物质<sup>[17]</sup>。酵母中谷胱甘肽合酶活性降低, 会导致细胞内甘氨酸转运能力以及谷胱甘肽水平降低<sup>[18]</sup>。因此, 推测该酶不仅参与了细胞壁肽聚糖的合成过程, 而且还可能影响了菌株在酸性环境中的能量代谢过程及氨基酸代谢, 进而影响了菌株的耐酸能力。

Ddl 广泛的底物特异性可能是影响菌株耐酸能力的另一个原因。研究者研究了大肠杆菌 K12、伊平屋桥大洋芽孢杆菌 JCM 11309、蓝细菌 PCC 6803 和海栖热袍菌 ATCC 43589 中 Ddl 的底物特异性。伊平屋桥大洋芽孢杆菌 JCM 11309 中的 Ddl 对 D-丙氨酸有很强的底物特异性, 而其他 3 种菌中的 Ddl 具有广泛的底物特异性。除 D-丙氨酸外, 还可以使用 D-丝氨酸、D-苏氨酸、D-半胱氨酸和甘氨酸作为底物<sup>[19]</sup>。海栖热袍菌 ATCC 43589 中 Ddl 热稳定性高, 最适温度高达 90 °C, 对 15 种 D-氨基酸, 特别是 D-丙氨酸、D-半胱氨酸和 D-丝氨酸具有底物特异性<sup>[20]</sup>。Ddl 广泛的底物特异性导致菌株即使在酸性环境下, 也能保持利用氨基酸高效合成细胞壁肽聚糖的能力, 有助于保持细胞壁的物理屏障作用。

一般来说, 菌株中的双组分系统可以感知周围环境的各种变化, 并将这些信号传递给目标基因, 以诱导代谢、生理和/或行为的适应性变化。本课题组前期研究发现, 双组分系统 TCS1 中的 HPK1 或 RR1 突变导致菌株耐酸能力下降, Aprt、Ddl 等表达量发生改变。本研究进一步研究证实, Aprt 和 Ddl 表达的确提高了宿主的耐酸性, 但 HPK1、RR1 和 Aprt、Ddl 之间经过怎样的信号转导过程来提高菌株的耐酸性尚有待进一步探讨。

Y2H 是研究蛋白质相互作用的有效方法, 具有时效性、通用性和适应性等特点。当一个蛋白融合到 GAL4 激活区, 另一个蛋白融合到 GAL4-DNA 结合区时, GAL4 基因的功能可以通过蛋白质的物理相互作用来重建。结构域是生物大分子的一种特殊结构和独立功能区, 是蛋白质生理功能的结构基础, 与蛋白质的功能密切相关。因此, 根据本实验中酵母双杂交实验结果, 我们认为 HPK1 通过 HPK1-C 和 Ddl 形成了介导菌株耐酸反应的复合物, 来调控其他与耐酸相关基因的表达。本研究为 HPK1 和 Ddl 功能相互作用的深入研究奠定了基础, 为研究 HPK1/RR1 双组分系统在耐酸调节中的作用提供了理论依据。

本研究克隆了德氏乳杆菌保加利亚亚种 CH3 的 *aprt*、*ddl*、*oppDII* 和 *tsf* 基因, 并成功地将其导入到乳酸乳球菌 NZ9000 中。采用多种方法分析了重组菌株的特性。*aprt* 和 *ddl* 基因在乳酸乳球菌 NZ9000 中的表达提高了其耐酸性, 并改善了其耐胆盐和/或耐低温能力。因此, 本研究所采用的方法是可行的, 可以通过外源表达来提高耐酸性, 为耐酸调控机制和菌株改良的研究提供了一条潜在的途径。进一步的实验仍需继续进行, 表达其他与耐酸调节相关的基因, 以评估它们在菌株耐酸调节中的特殊作用。此外, 还应开展 Aprt 和 Ddl

在德氏乳杆菌保加利亚亚种 CH3 耐酸性调节中作用相关的研究。

## 参考文献

- [1] Makino S, Hemmi J, Kano H, Kashiwagi M, Hojo K, Asami Y. Anti-fatigue effects of yogurt fermented with *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* OLL1073R-1 in healthy people suffering from summer heat fatigue: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Nutrients*, 2018, 10(7): 798.
- [2] Ai ZW, Lv XP, Huang S, Liu GF, Sun XM, Chen HY, Sun JH, Feng Z. The effect of controlled and uncontrolled pH cultures on the growth of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. *LWT*, 2017, 77: 269–275.
- [3] Liang SX, Gao DC, Liu HH, Wang C, Wen JP. Metabolomic and proteomic analysis of D-lactate-producing *Lactobacillus delbrueckii* under various fermentation conditions. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 2018, 45(8): 681–696.
- [4] Wang C, Cui YH, Qu XJ. Mechanisms and improvement of acid resistance in lactic acid bacteria. *Archives of Microbiology*, 2018, 200(2): 195–201.
- [5] Van De Guchte M, Penaud S, Grimaldi C, Barbe V, Bryson K, Nicolas P, Robert C, Oztas S, Mangenot S, Couloux A, Loux V, Dervyn R, Bossy R, Bolotin A, Batto JM, Walunas T, Gibrat JF, Bessières P, Weissenbach J, Ehrlich SD, Maguin E. The complete genome sequence of *Lactobacillus bulgaricus* reveals extensive and ongoing reductive evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2006, 103(24): 9274–9279.
- [6] Pang XY, Zhang SW, Lu J, Liu L, Ma CL, Yang Y, Ti PP, Gao WH, Lv JP. Identification and functional validation of autolysis—associated genes in *Lactobacillus bulgaricus* ATCC BAA-365. *Frontiers in Microbiology*, 2017, 8: 1367.
- [7] Cui YH, Liu W, Qu XJ, Chen ZT, Zhang X, Liu T, Zhang LW. A two component system is involved in acid adaptation of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. *Microbiological Research*, 2012, 167(5): 253–261.
- [8] Wang C, Cui YH, Qu XJ. Identification of proteins regulated by acid adaptation related two component system HPK1/RR1 in *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. *Archives of Microbiology*, 2018, 200(9): 1381–1393.

- [9] 翟征远. 德氏乳杆菌保加利亚亚种 CAUH1 酸耐受机制的蛋白组学研究及抗酸胁迫基因 *Ldb0677* 和 *pyk* 的功能分析. 中国农业大学博士学位论文, 2014.
- [10] Wu CD, Zhang J, Du GC, Chen J. Heterologous expression of *Lactobacillus casei* RecO improved the multiple-stress tolerance and lactic acid production in *Lactococcus lactis* NZ9000 during salt stress. *Bioresource Technology*, 2013, 143: 238–241.
- [11] Huang JF, Cheng LL, Li N, Si LF, Luo LX. Food-grade expression of  $\beta$ -glucosidase from *Aspergillus aculeatus* in *Lactococcus lactis*. *Modern Food Science and Technology*, 2014, 30(5): 33–37, 11. (in Chinese)  
黄建飞, 成丽丽, 李娜, 司丽芳, 罗立新. 棘孢曲霉  $\beta$ -葡萄糖苷酶的乳酸乳球菌表达. 现代食品科技, 2014, 30(5): 33–37, 11.
- [12] Zhai ZY, Douillard FP, An HR, Wang GH, Guo XH, Luo YB, Hao YL. Proteomic characterization of the acid tolerance response in *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CAUH1 and functional identification of a novel acid stress-related transcriptional regulator *Ldb0677*. *Environmental Microbiology*, 2014, 16(6): 1524–1537.
- [13] Tovpeko Y, Morrison DA. Competence for genetic transformation in *Streptococcus pneumoniae*: mutations in  $\sigma^A$  Bypass the *comW* requirement. *Journal of Bacteriology*, 2014, 196(21): 3724–3734.
- [14] Tian HT, Tan JX, Zhang LF, Gu XX, Xu WT, Guo XH, Luo YB. Increase of stress resistance in *Lactococcus lactis* via a novel food-grade vector expressing a *shsp* gene from *Streptococcus thermophilus*. *Brazilian Journal of Microbiology*, 2012, 43(3): 1157–1164.
- [15] Wang YH, Li Y, Pei XL, Yu L, Feng Y. Genome-shuffling improved acid tolerance and L-lactic acid volumetric productivity in *Lactobacillus rhamnosus*. *Journal of Biotechnology*, 2007, 129(3): 510–515.
- [16] Zhang SW, Oh JH, M Alexander LM, Özçam M, Van Pijkeren JP. D-Alanyl-D-Alanine ligase as a broad-host-range counterselection marker in vancomycin-resistant lactic acid bacteria. *Journal of Bacteriology*, 2018, 200(13): e00607–17.
- [17] Fan C, Moews PC, Shi Y, Walsh CT, Knox JR. A common fold for peptide synthetases cleaving ATP to ADP: glutathione synthetase and D-alanine:d-alanine ligase of *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1995, 92(4): 1172–1176.
- [18] Mooz ED. Association of glutathione synthetase deficiency and diminished amino acid transport in yeast. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1979, 90(4): 1221–1228.
- [19] Sato M, Kirimura K, Kino K. D-amino acid dipeptide production utilizing D-alanine-D-alanine ligases with novel substrate specificity. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2005, 99(6): 623–628.
- [20] Sato M, Kirimura K, Kino K. Substrate specificity of thermostable D-alanine-D-alanine ligase from *Thermotoga maritima* ATCC 43589. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 2006, 70(11): 2790–2792.

# Expression of genes regulated by acid adaptation related TCS1 of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* improved acid tolerance of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* NZ9000

Chao Wang<sup>1</sup>, Yanhua Cui<sup>1\*</sup>, Xiaojun Qu<sup>2</sup>

<sup>1</sup> School of Chemistry and Chemical Engineering, Harbin Institute of Technology, Harbin 150090, Heilongjiang Province, China

<sup>2</sup> Institute of Microbiology, Heilongjiang Academy of Sciences, Harbin 150010, Heilongjiang Province, China

**Abstract:** [Objective] We investigated the acid tolerance mechanisms of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* by heterologous expression of genes related to acid adaptation regulated by two-component system TCS1 (JN675228/JN675229) of *Lb. bulgaricus* in *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* NZ9000. [Methods] We used reverse transcription polymerase chain reaction and sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis to verify the expression of acid adaptation related genes, such as adenine phosphoribosyltransferase (*aprt*), D-alanine-D-alanine ligase (*ddl*), oligopeptide ABC transporter (*oppDII*) and elongation factor Ts (*tsf*), regulated by TCS1 of *Lb. bulgaricus*, in *Lc. lactis* NZ9000. We validated acid treatment experiment to verify the effect of gene expression on acid stress tolerance of host bacteria. We confirmed the interactions between TCS1 and the expressed genes related to acid adaptation by yeast two hybrid. [Results] Our results show that *aprt*, *ddl*, *oppDII* and *tsf* were successfully expressed in *Lc. lactis* NZ9000. The expression of *aprt* and *ddl* genes increased the resistance of recombinant strains to acid stress by 75 and 114 times. The expression of *oppDII* and *tsf* genes had no significant effect on the acid resistance of the recombinant strains. Yeast two hybrid system showed that there was interaction between histidine protein kinase (HPK1) of TCS1 and Ddl, and HPK1-C domain was the key region of the interaction. [Conclusion] The acid tolerance of strains expressing *Aprt* and *Ddl* was significantly higher than that of the control strain. The results of this study can provide references for the strategies of obtaining acid resistance of *Lb. bulgaricus* and other similar strains.

**Keywords:** *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, adenine phosphoribosyltransferase, D-alanine-D-alanine ligase, acid tolerance, yeast two-hybrid

(本文责编: 李磊)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (31371827, 31471712)

\*Corresponding author. Tel: +86-451-86282902; Fax: +86-451-86282906; E-mail: yhcui@hit.edu.cn.

Received: 11 February 2020; Revised: 19 May 2020; Published online: 2 July 2020