

## 摘要

低聚木糖 (XOS) 由 2-7 个木糖分子通过  $\beta$ -(1,4)糖苷键连接形成。体内外研究表明 XOS 具有益生功能, 但这些研究目前仅限于全局代谢过程, 而转录调控机制尚不清晰。因此, 本论文首先从种水平上分析了不同种双歧杆菌利用 XOS 的差异性, 其次以高效利用 XOS 的 *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* JNFE03 菌株作为研究对象, 通过细胞生理学和转录组学分析了其利用 XOS 的代谢通路, 并阐明了其代谢 XOS 关键的转录因子 XosR 的调控机制。

首先, 根据双歧杆菌中的 XOS 降解酶系系统发育进化关系, 通过体外培养实验分析 *Bifidobacterium adolescentis*、*Bifidobacterium longum* subsp. *long*、*Bifidobacterium pseudocatenulatum*、*Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*、*Bifidobacterium pseudolongum* 和 *Bifidobacterium bifidum* 利用 XOS 的差异性。获得了一株高效利用 XOS 的菌株 *B. animalis* subsp. *lactis* JNFE03, 其在 XOS 碳源体系中发酵培养 24 h 后, 体系 OD 值为 1.01; 木四糖和木三糖含量分别下降了 79.7% 和 59.2%; 细胞膜不饱和脂肪酸含量和细胞膜流动性增加。在 XOS 碳源体系中发酵培养该菌株 36 h 后, 该菌株  $\beta$ -木糖苷酶活性增强至 4.75 U/mL, 短链脂肪酸总含量增加至 1793.51  $\mu$ g/mL。

在此基础上, 通过 RNA-seq 测序对 *B. animalis* subsp. *lactis* JNFE03 在不同碳源培养基上的差异表达基因进行分析。GO 富集分析表明差异表达基因主要集中在 ATP 结合、膜组成和细胞质组成中。KEGG 富集分析表明差异表达基因主要富集在氨基酸代谢、翻译、膜运输等途径。基于生物信息学数据库, 对 *B. animalis* subsp. *lactis* JNFE03 利用 XOS 的途径进行描述。研究发现, *B. animalis* subsp. *lactis* JNFE03 主要通过 ABC 转运系统和 MFS 转运系统摄取 XOS 并通过 OPP 转运系统、DPP 转运系统和 LIV 转运系统摄取蛋白质。

最后, 对转录组学结果中获得的 LacI 家族转录因子 *xosR* 的调控机制进行探究, 该转录因子具有螺旋-转角-螺旋 (HTH) 结构 DNA 结合域。通过启动子荧光强度测定验证了 *xosR* 的启动子 PI, 并且 XosR 转录因子能够在 *E. coli* BL21 (DE3) 中可溶性表达, 分子量约为 44.3 kDa, 在浓度为 20 nmol/L 时可与 BIFANG\_00034 靶点片段结合。通过圆二色谱分析及分子对接模拟进一步发现, XosR 蛋白可以与 XOS 结合且结合后构象发生变化, 不能与原有靶点结合, 促进了结构基因的表达。

**关键词:** 动物双歧杆菌乳亚种; 低聚木糖; 转录组学; XosR 转录因子

## Abstract

Xylo-oligosaccharides (XOS) are formed by xylose molecules with  $\beta$ -(1,4) glycosidic bonds. A large number of in vitro studies and in vivo studies have proved the probiotic function of XOS, but these studies are limited to global studies. The specific metabolic regulation mechanism of bifidobacterium utilizing XOS is still unclear. In this study, we analyzed the XOS utilization ability of different bifidobacteria and then took *B. animalis* subsp. *lactis* JNFE03 strain as the research object. The metabolic pathways of *B. animalis* subsp. *lactis* JNFE03 using XOS were analyzed through cell physiology analysis and transcriptomic analysis. The regulatory mechanism of the key transcription factor XosR was elucidated.

Firstly, based on the phylogenetic evolution analysis of the XOS-degrading enzyme system in bifidobacteria, the in vitro culture experiments were used to analyze the XOS utilization ability of *B. adolescentis*, *B. longum* subsp. *long*, *B. pseudocatenulatum*, *B. animalis* subsp. *lactis*, *B. pseudolongum* and *B. bifidum*. A strain named *B. animalis* subsp. *lactis* JNFE03 that efficiently utilizes XOS was screened. When the strain was fermented and cultured in the XOS carbon source system for 24 hours, the OD value of the system was 1.01, and the contents of xylotetraose and xylotriose decreased by 79.7% and 59.2%, respectively; the content of unsaturated fatty acids in the cell membrane and the fluidity of the cell membrane increased. When the strain was fermented and cultured in the XOS carbon source system for 36 h, the activity of  $\beta$ -xylosidase increased to 4.75 U/mL, and the total content of short-chain fatty acids increased to 1793.51  $\mu$ g/mL.

On this basis, the differentially expressed genes of *B. animalis* subsp. *lactis* JNFE03 on different carbon source mediums were determined by RNA-seq sequencing. Through GO enrichment analysis, the differentially expressed genes were mainly concentrated in ATP binding, membrane composition and cytoplasm. Through KEGG enrichment analysis, differentially expressed genes were mainly enriched in amino acid metabolism, translation and membrane transport. Based on the bioinformatics database, the XOS utilization pathway of *B. animalis* subsp. *lactis* JNFE03 was described. The study found that *B. animalis* subsp. *lactis* JNFE03 mainly uptook XOS through the ABC transport system and MFS transport system and uptook protein through the Opp transport system, DPP transport system and LIV transport system.

Finally, the regulatory mechanism of the LacI family transcription factor *xosR* obtained in transcriptomics results was explored, which has a helix-angle-helix (HTH) structure DNA binding domain. The promoter PI of *xosR* was verified by promoter fluorescence intensity determination, and the XosR transcription factor was solubly expressed in E. Coli BL21 (DE3), with a molecular weight of about 44.3 kDa, which can bind to BIFANG\_00034 target fragments at a concentration of 20 nmol/L. Through circular dichroism analysis and molecular docking simulation, it was found that XosR protein can bind to XOS. After that, the XosR protein cannot bind to the original target, thus promoting the expression of structural genes.

**Keywords:** *B. animalis* subsp. *lactis*; xylooligosaccharides; transcriptomics; XosR transcription factor

## 中英文缩写对照表

缩写	英文名称	中文名称
ABC	ATP binding cassette	ATP 结合盒
DTT	Dithiothreitol	二硫苏糖醇
DPH	Diphenylhexatriene	二苯基-己三烯
EDTA	Ethylene diamine tetraacetic acid	乙二胺四乙酸
HEPES	Hydroxyethyl piperazinyl ethanesulfonicacid	羟乙基哌嗪乙磺酸
IPTG	Isopropyl beta D thiogalactopyranoside	异丙基硫代- $\beta$ -半乳糖苷
KEGG	Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes	日本京都大学生物信息 学中心数据库
XOS	Xylooligosaccharide	低聚木糖

---

目 录

摘 要.....	I
Abstract.....	II
中英文缩写对照表.....	IV
目 录.....	1
1 绪论.....	1
1.1 益生元与低聚木糖.....	1
1.1.1 益生元.....	1
1.1.2 XOS 的结构与应用.....	1
1.1.3 XOS 的生理功能.....	1
1.2 肠道菌群与双歧杆菌.....	3
1.2.1 肠道菌群.....	3
1.2.2 双歧杆菌的功能.....	3
1.2.3 双歧杆菌对碳水化合物的代谢机制.....	4
1.3 双歧杆菌利用 XOS 机制研究进展.....	4
1.3.1 XOS 体外增殖双歧杆菌研究.....	4
1.3.2 XOS 代谢机制研究进展.....	5
1.3.3 XOS 调控机制研究进展.....	5
1.4 立题依据与研究意义.....	6
1.5 本课题主要研究内容.....	6
2 材料与amp;方法.....	7
2.1 材料与设备.....	7
2.1.1 引物.....	7
2.1.2 主要试剂.....	8
2.1.3 主要设备.....	8
2.1.4 培养基及溶液.....	8
2.2 菌株筛选方法.....	8
2.2.1 双歧杆菌中 XOS 降解酶系系统进化分析.....	8
2.2.2 双歧杆菌的分离纯化.....	9
2.2.3 高效利用 XOS 双歧杆菌的筛选.....	9
2.3 细胞生理学研究方法.....	9

---

2.3.1 生长特性曲线测定 .....	9
2.3.2 XOS 含量变化测定 .....	9
2.3.3 细胞膜脂肪酸分析 .....	9
2.3.4 细胞膜流动性分析 .....	10
2.3.5 短链脂肪酸分析 .....	10
2.3.6 $\beta$ -木糖苷酶的活性测定 .....	10
2.4 转录组测序 .....	11
2.4.1 总 RNA 的提取与测序文库构建 .....	11
2.4.2 转录组测序和功能注释 .....	11
2.4.3 差异表达基因富集分析 .....	11
2.4.4 RT-qPCR 验证 .....	11
2.5 XosR 蛋白表达与纯化 .....	12
2.5.1 pET28a-XosR 重组质粒的构建 .....	12
2.5.2 感受态细胞转化 .....	12
2.5.3 XosR 重组蛋白表达与纯化 .....	12
2.5.4 XosR 蛋白纯化 .....	13
2.5.5 Tricine-SDS-PAGE 电泳检测 .....	13
2.6 XosR 结合位点分析 .....	13
2.6.1 XosR 基因簇生物信息学分析 .....	13
2.6.2 PUD19-PROMOTER-EGFP 重组质粒的构建 .....	14
2.6.3 重组质粒 PUD19-PROMOTER-EGFP 启动子荧光强度的测定 .....	14
2.6.4 凝胶迁移 (EMSA) 实验 .....	14
2.6.5 XosR 及其变构体结构测定 .....	15
2.7 数据处理与分析 .....	15
3 结果与讨论 .....	16
3.1 具有代谢 XOS 能力双歧杆菌的筛选 .....	16
3.1.1 双歧杆菌中 XOS 降解酶系系统发育分析 .....	16
3.1.2 不同双歧杆菌体外利用 XOS 生长差异分析 .....	17
3.1.3 <i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i> JNFE03 细胞生理学分析 .....	19
3.2 <i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i> JNFE03 转录组学分析 .....	23
3.2.1 转录组质量评估 .....	23
3.2.2 功能注释分析 .....	24
3.2.3 差异表达基因分析 .....	26

## 目 录

---

3.2.4 RT-qPCR 验证.....	30
3.3 <i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i> 来源 xosR 基因分析.....	31
3.3.1 xosR 基因确定.....	31
3.3.2 xosR 基因启动子分析.....	34
3.3.3 转录因子 XosR 调控机制探究.....	38
主要结论与展望.....	43
主要结论.....	43
展望.....	43
致谢.....	44
参考文献.....	45
附录：作者在攻读硕士学位期间发表的论文.....	52

# 1 绪论

## 1.1 益生元与低聚木糖

### 1.1.1 益生元

益生元通常是一种短链碳水化合物，由于其不能被人体消化酶消化，故被称为不可消化低聚糖<sup>[1]</sup>。益生元主要来源于母乳、菊粉、大豆和雪莲果等不易消化的碳水化合物。这些碳水化合物可以抵抗胃酸水解、促进肠道微生物增殖、提高肠道微生物生存能力<sup>[2]</sup>。肠道中可受益生元调节的微生物主要是双歧杆菌和乳酸杆菌<sup>[3]</sup>。低聚半乳糖、低聚果糖是最常见的益生元。益生元进入人体后会进入结肠并选择性刺激双歧杆菌的生长，从而对宿主产生有益影响。由于益生元在调节血糖、缓解腹泻和促进口腔健康等方面具有功效，因此被广泛应用于食品、医药、农业等领域，具有广阔的市场前景。

### 1.1.2 XOS 的结构与应用

低聚木糖(XOS)是由D-木糖通过 $\beta$ -(1,4)糖苷键连接而成的线性低聚糖，其聚合度在2至12之间<sup>[4]</sup>，分子式为 $C_{5n}H_{8n+2}O_{4n+1}$ 。XOS是一种益生元，天然存在于蜂蜜、水果、蔬菜和麦麸中<sup>[5]</sup>。在理化性质方面，XOS甜度和热量低，在酸性介质中稳定，可用作饮料添加剂<sup>[6]</sup>。在稳定性方面，XOS耐热，不会在胃中降解，可作为稳定剂<sup>[7]</sup>。在生物特性方面，XOS不易被消化，利于双歧杆菌增殖，可作为酶抑制剂和抗癌剂<sup>[8]</sup>。

XOS的生产方式主要有化学法、酶解法和水热法。2014年，XOS产品通过美国FDA GRAS及FDA NDI的官方认可，可作为主方或配方添加到保健品中。2016年，NAD宣布XOS为新型的安全食品。2018年，欧洲食品安全局(EFSA)网站发布《Safety of xylo-oligosaccharides(XOS) as a novel food pursuant to regulation(EU) 2015/2283》，批准XOS为新资源食品。2020年欧盟将XOS食用范围扩大至食品补充剂产品。XOS在食品、化妆品和饲料等行业具有巨大的发展潜力。在食品行业中，XOS被用于牛奶、果冻、蜂蜜等产品；在饲料工业中，XOS被添加至动物饲料中以提高动物免疫力<sup>[9]</sup>；在化妆品行业中，XOS可作为一种具有抗氧化、保湿、减轻刺激等功效的成分被添加至产品中。

### 1.1.3 XOS 的生理功能

#### (1) 调节肠道菌群

XOS能够选择性地刺激后肠中双歧杆菌和乳酸杆菌的生长繁殖，从而抑制有害菌的活性，并降低胃肠道中有害发酵产物的浓度<sup>[10]</sup>。同时，有益菌可代谢产生短链脂肪酸，进而增强肠道屏障功能<sup>[11]</sup>。体外实验表明，杏仁壳来源的XOS可以促进双歧杆菌和乳杆菌的生长<sup>[12]</sup>。动物实验表明，以含500 mg/kg XOS的



基础粮饲喂实验组仔猪，可以增强其盲肠屏障功能和盲肠乳杆菌丰度，调节粘膜细胞因子水平<sup>[13]</sup>。人体实验表明，以 1.4 g XOS/天、2.8 g XOS/天的剂量对人体进行干预 4 周后，体内粪杆菌比例显著高于对照组<sup>[14]</sup>。以 5 g XOS/天的剂量对人体进行干预 4 周后，粪便中双歧杆菌数量和丁酸盐浓度增加， $\alpha$ -葡萄糖苷酶和 $\beta$ -葡萄糖醛酸酶活性增加<sup>[15]</sup>。

### (2) 调节脂质代谢

肠道微生物组成的改变可能引起肥胖，进而导致代谢紊乱<sup>[16]</sup>，其中厚壁菌门和拟杆菌的比例与血糖水平、脂肪含量和体重有关<sup>[17]</sup>。以 0.8 g XOS/天的剂量对 10 周龄肥胖模型大鼠进行干预，大鼠体重增长受到抑制且脂质代谢恢复正常<sup>[18]</sup>。以 5% XOS/天的剂量对高脂大鼠进行干预，结果表明，高脂饲料中添加 XOS 可有效改善大鼠的血糖和血脂水平，降低血清、肝脏和心脏中的丙二醛和谷胱甘肽水平，提高超氧化物歧化酶、过氧化氢酶和谷胱甘肽过氧化物酶活性<sup>[19]</sup>。以 2.7g XOS/天的剂量对年轻女性进行干预后，人体血清胆固醇含量和甘油三酯含量有轻微下降<sup>[20]</sup>。XOS 对于脂质代谢的调节作用可能与肠道菌群发酵产生丙酸，从而抑制肝脏脂肪生成有关<sup>[21]</sup>；也有可能通过结肠中短链脂肪酸含量的增多促进胰岛素合成，从而抑制脂肪的分解<sup>[22]</sup>。

### (3) 提高机体免疫

XOS 被有益菌利用后可作为外来抗原持续刺激机体免疫系统，从而调节宿主免疫力<sup>[23]</sup>。体外细胞实验表明，XOS 可以抑制未被刺激的巨噬细胞 RAW264 中肿瘤坏死因子 TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 和 NO 的产生并诱导 IL-10 的产生<sup>[24]</sup>。每天在 1 日龄肉鸡的饲料中添加 150 mg/kg XOS 可增加血液中过氧化物酶活性<sup>[25]</sup>。健康成人以 8 g/天的剂量随水服用 XOS 3 周后，空腹血浆中高密度脂蛋白浓度显著增加，总胆固醇含量降低<sup>[26]</sup>，高密度脂蛋白浓度的升高可以有效预防冠心病的发生<sup>[27]</sup>。

XOS 被有益菌发酵后产生的短链脂肪酸也可以激活免疫系统。短链脂肪酸具有为结肠上皮细胞提供能量、调节离子转运和调节基因表达等功能<sup>[28]</sup>。志愿者服用含有阿拉伯低聚木糖的面包 21 天后，粪便中丁酸含量显著增加<sup>[29]</sup>。丁酸是肠上皮细胞的主要能量来源，与潜在抗癌活性有关，其可通过刺激恶性细胞凋亡来降低细胞恶性肿瘤出现的概率<sup>[30]</sup>。同时，XOS 被益生菌发酵后产生的乙酸能够促使淋巴细胞增殖，从而提高宿主抵抗病原体的能力<sup>[31]</sup>。

## 1.2 肠道菌群与双歧杆菌

### 1.2.1 肠道菌群

人体肠道中有数亿万微生物，包含着一千多种肠道细菌<sup>[32]</sup>。有益菌可以通过维持肠道菌群平衡来促进宿主机体健康，具有调节免疫系统、保护上皮细胞免受损伤、合成维生素和氨基酸等功能<sup>[33]</sup>。相反，病原体会导致菌群失调，从而引发疾病。人类肠道中的优势菌主要包括拟杆菌属、梭菌属、梭杆菌属、真菌属、瘤胃球菌属、消化球菌属、消化链球菌属和双歧杆菌属<sup>[34]</sup>。双歧杆菌是最常见的益生菌，可被用作有益健康的微生物补充剂<sup>[35]</sup>，常被用于酸奶、奶粉、谷物等食品领域。

### 1.2.2 双歧杆菌的功能

双歧杆菌是一种杆状、不产气的厌氧革兰氏阳性菌，它可以通过产生有机酸和抗菌肽来抑制肠道病原体，是一类公认的安全益生菌<sup>[36]</sup>。双歧杆菌可以利用各种在上消化道中不被降解的膳食纤维，大部分是植物来源的多糖和低聚糖<sup>[37]</sup>，对宿主有许多有益作用。

#### (1) 供给营养

双歧杆菌可以将膳食化合物转化为维生素、共轭亚油酸等生物活性分子。转录组学结果显示，存在于成年受试者粪便样品中的双歧杆菌基因在合成 B 族维生素途径高度表达<sup>[38]</sup>。B 族维生素可以参与各种代谢过程，如 DNA 复制、修复和甲基化。动物研究表明，益生元在大鼠体内可以被代谢产生叶酸，从而降低癌症风险<sup>[39]</sup>。

#### (2) 改善过敏性疾病

过敏性疾病与 Th1/Th2 细胞因子平衡向 Th2 反应的转变有关，可以导致 Th2 细胞因子的激活和白细胞介素 4、免疫球蛋白 E 的释放<sup>[40]</sup>。转录组结果表明，两歧双歧杆菌可以在刺激免疫系统反应的同时下调趋化因子以减弱促炎反应<sup>[41]</sup>。动物实验结果表明，短双歧杆菌可以通过抑制 Th2 细胞免疫反应，增强 (CD)4-CD25-T 细胞活性，从而起到抗敏作用<sup>[42]</sup>。ZHANG 等<sup>[43]</sup>研究发现，卵清蛋白致敏小鼠被喂养双歧杆菌后调节性 T 细胞数量和抗炎细胞因子白介素 IL-10 数量增加，肠上皮屏障功能增强。

#### (3) 缓解腹泻

许多研究表明双歧杆菌已被用于治疗各种胃肠疾病。临床研究发现，口服双歧杆菌可以预防婴幼儿腹泻，添加益生菌的配方奶可显著降低患儿由抗生素引起的腹泻频率<sup>[44]</sup>。同时，包含短双歧杆菌和婴儿双歧杆菌的商业益生菌混合物可降低腹泻发生频率<sup>[45]</sup>。动物研究表明，经过含乳杆菌饮食治疗后，动物的粪便样品

中含有较高的 IgA、IgG 和 IgM 含量，可以提高动物细胞免疫水平，从而缓解轮状病毒或大肠杆菌引起的腹泻<sup>[46]</sup>。

### 1.2.3 双歧杆菌对碳水化合物的代谢机制

宿主摄入的一部分碳水化合物可以不被消化到达结肠，是潜在的益生元。膳食淀粉、XOS 和低聚半乳糖已被证明具有益生元功能。

淀粉分为直链淀粉和支链淀粉两种。直链淀粉是葡萄糖通过  $\alpha$ -(1,4)糖苷键连接而成的多糖链。支链淀粉是葡萄糖通过  $\alpha$ -(1,4)糖苷键和  $\alpha$ -(1,6)糖苷键连接而成的线性聚合物<sup>[47]</sup>。基因组研究表明，青春双歧杆菌 22L 可以利用淀粉，其基因组中包含不存在于其它双歧杆菌中的糖苷水解酶基因位点<sup>[48]</sup>。短双歧杆菌 UCC2003 的基因组结果显示，*apuB* 基因含有编码胞外支链淀粉酶的基因。ApuB 蛋白由含  $\alpha$ -淀粉酶结构域的 N 端和含普鲁兰酶结构域的 C 端组成，前者水解淀粉和相关多糖中的  $\alpha$ -(1,4)糖苷键，后者水解淀粉中的  $\alpha$ -(1,6)糖苷键<sup>[49]</sup>。因此，双歧杆菌具有代谢淀粉的能力。

阿拉伯半乳聚糖是一种来源于果胶的多糖，由  $\beta$ -(1,4)半乳糖苷键或  $\beta$ -(1,6)半乳糖苷键组成。Crocian 等<sup>[50]</sup>发现，长双歧杆菌可以在含 D-氨基半乳糖的培养基上生长。Scheel 等<sup>[51]</sup>通过基因组测序从长双歧杆菌株 NCC2705 中发现了半乳糖苷酶基因。Mary 等<sup>[52]</sup>发现短双歧杆菌 UCC2003 利用半乳聚糖的过程主要包括 *galA* 编码的胞外半乳聚糖内切酶将半乳聚糖降解为半乳三糖、ABC 转运系统将半乳三糖转运至细胞内和 *glaG* 编码的  $\beta$ -半乳糖苷酶将半乳三糖水解为半乳糖三个步骤。因此，双歧杆菌具有代谢阿拉伯半乳聚糖的能力。

低聚半乳糖由半乳糖或葡萄糖分子上连接半乳糖基构成，其通常通过  $\beta$ -半乳糖苷酶或  $\beta$ -葡萄糖苷酶的酶促转糖基作用产生。Waston 等<sup>[53]</sup>对 39 株双歧杆菌利用低聚半乳糖的能力进行探究。研究结果显示，长双歧杆菌和假小链双歧杆菌对低聚半乳糖有较高的利用效率。Fujitk 等<sup>[54]</sup>通过转录组学分析，发现长双歧杆菌中存在可水解低聚半乳糖的半乳聚糖酶。Shigehisa 等<sup>[55]</sup>对短双歧杆菌中的低聚半乳糖进行鉴定。研究结果显示，溶质结合编码蛋白 BbrY\_0420 和  $\beta$ -半乳糖苷酶编码蛋白 BbrY\_0422 显著上调。其中，BbrY\_0422 表达蛋白可水解 4'-半乳糖基乳糖，但不能水解 3'-半乳糖基乳糖和 6'-半乳糖基乳糖，具有特异性。因此，双歧杆菌具有代谢低聚半乳糖的能力。

## 1.3 双歧杆菌利用 XOS 机制研究进展

### 1.3.1 XOS 体外增殖双歧杆菌研究

双歧杆菌在 XOS 培养基中利用碳源的能力可以通过生长曲线进行初步判定。Mäkeläinen 等<sup>[56]</sup>对双歧杆菌和乳杆菌在 XOS、木聚糖和低聚半乳糖等唯一碳源

培养基上的生长特性进行测定。结果表明,乳双歧杆菌 HN019、乳双歧杆菌 BB12 等能够利用不同聚合度的 XOS,而短双歧杆菌 Bb-03、长双歧杆菌 KC-1 和婴儿双歧杆菌 DSM20088 等双歧杆菌不能有效利用 XOS。Palframa 等<sup>[57]</sup>对不同双歧杆菌碳水化合物偏好性进行了探究,研究结果表明,两歧双歧杆菌能在 XOS 唯一碳源培养基中生长且生长趋势优于其在木糖唯一碳源培养基的生长趋势,这种生长优势与体内发酵途径及特殊的寡糖转运机制有关。

### 1.3.2 XOS 代谢机制研究进展

XOS 在机体内代谢时需要多种酶的共同作用。XOS 在  $\beta$ -木糖苷酶、木聚糖酶和木糖异构酶等木聚糖酶解系统的作用下释放出木糖,随后被肠道微生物发酵产生短链脂肪酸。体外消化研究表明,XOS 在经过唾液至小肠粘膜后的残留率可达到 99.6%,可以充分被肠道内的细菌消化利用。肠道细菌代谢 XOS 过程一般为先发酵生成乙酸和乳酸,然后再生成丙酸和丁酸;随着发酵 XOS 过程的进行,短链脂肪酸和乳酸的浓度增加,并且分支 XOS 代谢后产生的丁酸含量更高,有利于机体健康。

低聚糖可通过转运系统进入双歧杆菌。这些系统主要包括 ATP 结合盒式蛋白转运系统(ABC 转运系统)、磷酸烯醇式丙酮酸-糖磷酸转移酶系统(PEP-PTS 转运系统)和主要协同转运系统(MFS 转运系统)。

ABC 转运系统主要包括糖特异性溶质结合蛋白、渗透酶和 ATP 酶<sup>[58]</sup>。Yang 等<sup>[59]</sup>通过转录组学分析发现,XOS 可以促进青春双歧杆菌 15703 ABC 转运蛋白的表达。Parche 等<sup>[60]</sup>发现了长双歧杆菌 NCC2705 中 13 个参与寡糖转运的 ABC 转运蛋白、3 个内化葡萄糖的 MFS 转运蛋白和 1 个转运葡萄糖的 PEP-PTS 转运蛋白。与长双歧杆菌 NCC2705 相比,乳双歧杆菌 BI-04 只有两个编码碳水化合物特异性结合蛋白的基因<sup>[61]</sup>,这两个基因均为 ABC 转运体系的一部分。

MFS 转运系统主要通过质子动力进行转运<sup>[62]</sup>。ABC 转运体系中每个转运过程需要消耗 2 个 ATP 分子,而对于 MFS 转运体而言,仅需要消耗一个 ATP 分子。因此,MFS 转运系统耗能较少,可促使 XOS 转运至细胞内。魏斯氏菌 XU1 可通过 MFS 转运蛋白和糖苷水解酶转运并水解 XOS<sup>[63]</sup>。同时,魏斯氏菌在利用 XOS 时,其糖酵解途径和戊糖磷酸途径相关基因表达上调。

### 1.3.3 XOS 调控机制研究进展

人类和动物来源的双歧杆菌基因组结果显示,双歧杆菌中有大量参与低聚糖代谢的基因。目前已有关于双歧杆菌利用 XOS 基因簇的研究,该基因簇中包括  $\beta$ -(1,4)木糖苷酶、转运系统和 LacI 转录调节因子<sup>[64]</sup>。在大多数情况下,编码转运蛋白和相关碳水化合物分解代谢酶的基因聚集在保守模块中,并作为单个操纵子共同调节聚合度、成分相似低聚糖的利用过程。Ravindra 等<sup>[65]</sup>提出了 XOS 的代

谢模型，该模型主要为 XOS 通过  $\beta$ -木糖苷酶水解为木糖，随后编码木糖异构酶的基因(*xyIF*)将木糖转化为木酮糖并由木酮糖激酶编码基因 (*xyIG*) 将其转化为木酮糖-5-磷酸，最终进入戊糖磷酸途径并生成短链脂肪酸。在这一模型中，*xyIR* 调控因子与 *xyIF*、*xyIG* 共同构成 XOS 代谢相关的基因簇，调控 XOS 的代谢过程。而这些基因簇的描述，仅限于基因组理论研究，需要通过实验进一步验证。

## 1.4 立题依据与研究意义

人体肠道含有一百万亿微生物，这些微生物共同构成人体肠道微生物群，对人体的生理功能有着重要的作用。XOS 作为一种可刺激肠道有益菌增长的益生元，在食品、化妆品和医药等行业具有巨大的发展潜力。XOS 相关的动物实验和人体实验已经证明了 XOS 具有调节血糖、降低胆固醇、缓解慢性腹泻等功能，但这些研究仅局限于效果和表征。

随着转录组学及基因组学的普及，多数研究着眼于双歧杆菌利用 XOS 的运输和代谢模型，尚未有文献描述双歧杆菌利用 XOS 的完整通路。为扩展 XOS 的应用范围，有必要对双歧杆菌利用 XOS 的通路进行描述并探究其调控机制。本课题通过改良 MRS 培养基筛选获得可高效利用 XOS 的双歧杆菌，并阐述 XOS 增殖双歧杆菌的机制，有助于补充 XOS 益生功能研究的空缺，对益生菌、益生元与合生元产品的开发具有一定的借鉴意义。

## 1.5 本课题主要研究内容

本研究通过菌株筛选获得可高效利用 XOS 的 *B. animalis* subsp. *lactis* JNFE03 菌

株，依托细胞生理学、转录组学、分子生物学三方面的研究，对 *B. animalis* subsp. *lactis* JNFE03 利用 XOS 的详细通路及调控机制进行描述，主要研究内容如下：

1. 以 *B. animalis* subsp. *lactis* JNFE03 为研究对象，分析了 XOS 跨膜运输过程中的细胞膜脂肪酸、细胞膜流动性变化；XOS 水解过程中的木糖苷酶酶活、XOS 含量变化以及 XOS 代谢过程中的短链脂肪酸含量变化，多方面论证其高效利用原因。

2. 基于转录组结果，对转录组差异表达基因进行功能注释，并从转运、水解、代谢三个方面描述 *B. animalis* subsp. *lactis* JNFE03 利用 XOS 的代谢途径。通过 RT-qPCR 实验结果验证 RNA-Seq 实验的准确性。

3. 通过生物信息学网站预测，对 *xosR* 调控因子的启动子序列、靶结合位点、效应物结合位点进行确定。将 XosR 重组蛋白在 *E. coli* BL21 (DE3) 中可溶性表达，通过启动子荧光强度测定、体外 EMSA 实验及圆二色谱分析验证预测结果。

## 2 材料与方法

### 2.1 材料与设备

#### 2.1.1 引物

本研究用于基因片段扩增的引物列于表 2-1 中。

表 2-1 本研究涉及的引物

Table 2-1 Primers involved in study

目的片段	序列(5'-3')
16srRNA-F	TGTGAAAGTCCATCGCTTAACGG
16srRNA-R	GGTATCTAATCCTGTTCGCTCCC
<i>xynB</i> -F	TGTTGCCGAGCCCGCTGAACC
<i>xynB</i> -R	CACGGGCCACGGATGTCCTC
<i>xylA</i> -F	GCTCAACCTCGAAGGCAACCAC
<i>xylA</i> -R	CGAGCACTTCCCACATCACGGAG
<i>ldh</i> -F	ATCGTGCTGGAAGACATCGCAA
<i>ldh</i> -R	TCGGCGTCACGGCAGATCTCC
<i>pta</i> -F	ACGTCCGCGACTTTATCCAG
<i>pta</i> -R	ACAGCCAGGTAATTGTCGTCCA
<i>ackA</i> -F	AAGCTCTTCGTTTCGTCGGGACA
<i>ackA</i> -R	CGTTCGGCGTCAAGCTCGACA
<i>xosR</i> -F	TGCGGCCGCAAGCTT
<i>xosR</i> -R	ATGGGTCGCGGATCC
PI-F	CTCACTCATTAGGCA
PI-R	CTCACTCATTAGGCA
PII-F	CTCACTCATTAGGCA
PII-R	TGGCGTAATCATGGT
PIII-F	CTCACTCATTAGGCA
PIII-R	TGGCGTAATCATGGT
BIFANG_00034-F	CGATGGCTGCGCGGGCTTCG
BIFANG_00034-R	GTGTGTTTTTCGGCGTTTCGCGCAC
BIFANG_00034_1-F	GTGCGCGAAACGCCGAAAACACAC
BIFANG_00034_1-R	CGGCCAGTGTCGCTGCTGCA
BAD_0424-F	GCGCACGAAGGAGATGTGGCGCA
BAD_0424-R	AGCTCGAGGCGCACGCGATCG

### 2.1.2 主要试剂

XOS 粉剂 (XOS-99P), 河南益常青生物科技有限公司; MRS 培养基, 北京陆桥技术股份有限公司; 甲醇钠、正己烷、乙酸 (色谱级)、丙酸 (色谱级)、丁酸 (色谱级)、异丁酸 (色谱级), 麦克林生化科技有限公司; DPH, 翌圣生物科技有限公司; 对硝基苯酚- $\beta$ -D-木糖苷、*E.coli* DH5 $\alpha$  感受态细胞、IPTG, 生工生物工程有限公司; 溶菌酶、反转录试剂盒, 翌圣生物科技有限公司; Real time PCR 试剂盒, Takara 公司; 基因组提取试剂盒、DNA 纯化回收试剂盒, 天根生化科技有限公司; 重组酶、SDS-PAGE 凝胶制备试剂盒, 诺维赞生物科技有限公司。

### 2.1.3 主要设备

AW200SG 厌氧工作站, 英国 ELECTROTEK 公司; LDZX-50KBS 立式压力蒸汽灭菌器, 上海申安医疗器械厂; 酶标仪, 南京拜尔沃克公司; 高压离子色谱, 美国赛默飞世尔科技公司; HITACHI H-7000FA 透射电子显微镜、F-7000 荧光光谱仪, 日本日立公司; QP2010Ultra 气相色谱质谱联用仪、GC-2010PLUS 气相色谱仪日本岛津公司, 日本岛津公司; LightCycler 480 II 全自动荧光定量 PCR 系统, 美国罗氏公司; AKTA avant 25 蛋白纯化系统, 美国通用电气公司。

### 2.1.4 培养基及溶液

#### 2.1.4.1 培养基

MRS 培养基 (1L 体系): 半胱氨酸盐酸盐 0.5 g, 蛋白胨 10 g, 酵母提取物 5 g, 乙酸钠 5 g, 磷酸氢二钾 2 g, 柠檬酸二铵 2 g, 七水硫酸镁 0.1 g, 一水硫酸锰 0.05 g, 牛肉膏 10 g, 吐温 80 1mL, 葡萄糖 20 g。

改良 MRS 培养基 (1L 体系): 半胱氨酸盐酸盐 0.5 g, 蛋白胨 10 g, 酵母提取物 5 g, 乙酸钠 5 g, 磷酸氢二钾 2 g, 柠檬酸二铵 2 g, 七水硫酸镁 0.1 g, 一水硫酸锰 0.05 g, 牛肉膏 10 g, 吐温 80 1mL, XOS 20 g。

#### 2.1.4.2 溶液

Buffer A: 20 mmol/L Tris/HCl, 500 mmol/L NaCl (pH=8.0)。

结合缓冲液: 50 mmol/L HEPES, 750 mmol/L 氯化钠, 5 mmol/L EDTA, 5 mmol/L DTT。

上样缓冲液: 36% 甘油, 120 mmol/L Tris/HCl (pH=8.0)。

## 2.2 菌株筛选方法

### 2.2.1 双歧杆菌中 XOS 降解酶系系统进化分析

通过 NCBI 数据库查询来自双歧杆菌属的  $\beta$ -木糖苷酶 (EC 3.2.1.37) 和木糖异构酶 (EC 5.3.1.5) 的氨基酸序列并对其进行 blast 比对和同源性分析。采用

MEGAX 软件进行多序列比对，并使用 Neighbor-Joining 算法构建进化树，最后使用 Evolview 对系统进化树进行美化。进化树中除去了描述性序列，仅保留了菌株代表性序列。

### 2.2.2 双歧杆菌的分离纯化

收集 2-6 月龄婴儿粪便，称取 1 g 婴儿粪便样品，转移至 9 mL 的无菌生理盐水中，用移液枪吹打混匀并进行梯度稀释。分别吸取 200  $\mu\text{L}$  稀释梯度为  $10^{-6}$ 、 $10^{-7}$  和  $10^{-8}$  的稀释液，涂布于改良 MRS 培养基上并倒置于厌氧工作站进行发酵培养。37  $^{\circ}\text{C}$  恒温培养 48 h 后，挑取与双歧杆菌菌落相似的单菌落纯化后送公司进行菌种鉴定。

### 2.2.3 高效利用 XOS 双歧杆菌的筛选

将筛得菌株活化后以 2% 的接种量接种于改良 MRS 培养基中，并将其置于 37  $^{\circ}\text{C}$  厌氧工作站进行恒温培养。测定不同培养时间段菌株的 OD 值和 pH 值<sup>[37]</sup>。阴性对照和阳性对照分别为无碳源 MRS 液体培养基和普通 MRS 液体培养基，以此分析不同菌株利用 XOS 的差异性。

## 2.3 细胞生理学研究方法

### 2.3.1 生长特性曲线测定

将活化的种子液以 2% 接种量转接至 10 mL 液体培养基，37  $^{\circ}\text{C}$  恒温厌氧培养。每 3 h 测定 OD 值和 pH 值。实验组以 XOS 为碳源，阳性对照组以葡萄糖为碳源。绘制发酵时间与 OD 值、pH 值的关系曲线。

### 2.3.2 XOS 含量变化测定

表 2-2 梯度洗脱条件

Table 2-2 Gradient elution condition

时间 (min)	洗脱液 A	洗脱液 B	A (%)	B (%)
0.00	1 mol/L NaOH	250 mol/L NaOH	100	0
30.00	1 mol/L NaOH	250 mol/L NaOH	0	100
30.00	1 mol/L NaOH	250 mol/L NaOH	100	0
40.00	1 mol/L NaOH	250 mol/L NaOH	100	0

采用 ICS-5000 型高压离子色谱对发酵液中 XOS 含量进行分析。色谱柱型号为 Dionex™ CarboPac™ PA200 IC<sup>[66]</sup>。测试条件如下：进样体积 10  $\mu\text{L}$ ，柱温 30  $^{\circ}\text{C}$ ，流速 1.000  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ <sup>[67]</sup>。梯度洗脱条件见表 2-2。

### 2.3.3 细胞膜脂肪酸分析

参考 Fatemeh 等<sup>[68]</sup>的方法，并进行一定的调整。将菌株在 37  $^{\circ}\text{C}$  条件下厌氧发酵 24 h、36 h 和 48 h。发酵后将发酵液以 4000  $\text{r}/\text{min}$ ，4  $^{\circ}\text{C}$  条件离心



20 min。弃上清，加入无菌生理盐水洗涤三次。称取 0.5 g 菌泥，加入 1.5 mL 1 mol/L 的甲醇钠振荡 2 min。10000 r/min，4 °C 离心 10 min。加入 1 mL 正己烷振荡 30 s，3000 r/min 离心 5 min。收集上清液进行分析。

采用 GC-MS 测定细胞膜脂肪酸含量。气相条件为：毛细管柱（0.25 mm×30 m×

0.25 μm），载气为高纯氦气，1 μL 进样体积。进样口温度和检测器温度为 230 °C。升温程序起始温度为 170 °C，以 5 °C/min 的升温速率至 210 °C 后以 2 °C/min 的升温速率升至 190 °C，并在此温度保持 5 min。通过各脂肪酸分布计算不饱和度。

### 2.3.4 细胞膜流动性分析

参考 Aricha 等<sup>[69]</sup>的方法，并进行一定的调整。将发酵液离心后弃除上清液，收集菌体细胞。加入 0.25% 的甲醛溶液于 37 °C 固定 1 h，随后用 PBS 溶液洗涤。缓慢加入 DPH 试剂并吹打混匀。37 °C 温浴 1 h 后 4,000 r/min 离心去除上清，加入 PBS 缓冲液。在荧光分光光度计上安装偏振装置后测定荧光强度。测定条件如下：发射波长为 430 nm，激发波长为 360 nm，狭缝为 5 nm。采用公式计算各向异性值（r 值）：

$$r = [I_{VV} - I_{VH}(I_{HV}/I_{HH})] / [I_{VV} + 2I_{VH}(I_{HV}/I_{HH})] \quad (2-1)$$

其中：

$I_{VV}$ ：荧光强度由垂直方向起偏器和垂直方向检偏器测得；

$I_{VH}$ ：荧光强度由垂直方向起偏器和水平方向检偏器测得；

$I_{HV}$ ：荧光强度由水平方向起偏器和垂直方向检偏器测得；

$I_{HH}$ ：荧光强度由水平方向起偏器和水平方向检偏器测得。

### 2.3.5 短链脂肪酸分析

取 500 μL 发酵液置于离心管中，加入 40 μL 10% (v/v) H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 震荡 30 s 提取发酵液中的短链脂肪酸。随后加入 1 mL 乙醚，震荡 30 s 并在 4 °C 条件下 3,000 r/min 离心 5 min。向样品中加入 0.25 g 无水 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>，静置 15 min 后取 200 μL 上清液用于气相色谱分析<sup>[70]</sup>。

GC 条件：DB-Wax 柱（30 m×0.25 mm×0.25 μm）用于分离检测，进样体积为 1 μL，分流比为 10:1。初始柱温为 100 °C，分别以 7.5 °C/min、10 °C/min 的升温速率至 140 °C 和 200 °C 并在此温度保持 3 min。

### 2.3.6 β-木糖苷酶的活性测定

胞内粗酶提取物的制备：称取 1 g 菌泥，加入 110 μL 缓冲液和 70 μL 50 mg/mL 的溶菌酶，37 °C 水浴 30 min，获得粗酶提取物。

对硝基苯酚标准曲线绘制<sup>[71]</sup>: 配制浓度为 1 mmol/L 的对硝基苯酚, 用水稀释制备系列浓度梯度的标准溶液。在总体积为 200  $\mu$ L 的标准溶液中加入 600  $\mu$ L 1 mol/L 的  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  以终止显色, 在 405 nm 处测定吸光值。以  $A_{405}$  为纵坐标, 对硝基苯酚浓度为横坐标, 绘制标准曲线。

菌体胞内  $\beta$ -木糖苷酶的活性测定: 反应体系包含 10  $\mu$ L 20 mmol/L 的对硝基苯酚- $\beta$ -D-木糖苷、185  $\mu$ L 100 mmol/L 的邻苯二甲酸氢钾和 5  $\mu$ L 粗酶提取物。将混合物在 65  $^{\circ}\text{C}$  中水浴 5 min 并加入 600  $\mu$ L 1 mol/L 的  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  以终止反应。测定 405nm 处的吸光度值以计算对硝基苯酚的产量。一个酶活单位定义为在该反应条件下, 1 min 内催化产生 1  $\mu$ mol/L 的对硝基苯酚所需要的酶量。

## 2.4 转录组测序

### 2.4.1 总 RNA 的提取与测序文库构建

选取以葡萄糖为碳源的对照组和以 XOS 为碳源的实验组进行转录组数据测定。将 *B. animalis* subsp. *lactis* JNFE03 活化后以 2% 接种量分别接种于含葡萄糖和 XOS 的 MRS 培养基, 每组设置三个平行。37 $^{\circ}\text{C}$  厌氧条件下培养 18 h 后在 4 $^{\circ}\text{C}$  条件下以 8,000 r/min 离心 10 min 收集细胞。收集沉淀并使用 Axygen<sup>TM</sup> 总 mRNA 提取试剂盒提取总细菌 mRNA。使用 Illumina HiSeq 平台进行测序。

### 2.4.2 转录组测序和功能注释

通过 Illumina HiSeq 平台进行测序。使用 DESeq2 软件对 raw counts 进行统计分析, 基于  $\text{Fold change} \geq 2$  且  $p < 0.05$  的条件筛选比较组间表达差异的基因<sup>[72]</sup>。将差异表达基因映射到 GO 数据库和 KEGG 数据库以分析其功能和途径。

### 2.4.3 差异表达基因富集分析

通过 Goatools 软件对差异表达基因进行 GO 富集分析, 方法采用 Fisher 检验。当 P 值经校正 ( $\text{P}_{\text{adjust}} < 0.05$ ) 时, 表示该 GO 功能显著富集。通过 R 脚本对差异表达基因进行 KEGG 富集分析, 当 P 值经校正 ( $\text{P}_{\text{adjust}} < 0.05$ ) 时, 表示该 KEGG 功能显著富集。

### 2.4.4 RT-qPCR 验证

基于转录组学结果, 对关键差异表达基因进行验证。采用 oligo 软件设计引物, 引物序列如表 2-1 所示。采用反转录试剂盒进行 cDNA 合成并用于 RT-qPCR 验证。将 iTaq<sup>TM</sup> Universal SYBR<sup>®</sup> Green Supermix, cDNA 和

引物按照表 2-3 混匀制备反应液。通过 LightCycler 480 II 系统进行 RT-qPCR 验证。依据  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  法计算基因相对表达量。

表 2-3 RT-qPCR 反应体系

Table 2-3 Quantitative real-time PCR reaction system

试剂	体积 ( $\mu\text{L}$ )
iTaqTM Universal SYBR® Green Supermix (2x)	10
Forward and reverse primers (500 nmol/L)	1
DNA template (100 ng)	2
Nuclease-free H <sub>2</sub> O	7
Total	20

## 2.5 XosR 蛋白表达与纯化

### 2.5.1 pET28a-XosR 重组质粒的构建

采用基因组提取试剂盒提取 *B. animalis* subsp. *lactis* JNFE03 基因组。以基因组为模板 PCR 扩增获得 *xosR* 基因。PCR 所用引物见表 2-1。PCR 产物采用纯化回收试剂盒回收 DNA 片段。提取 pET28a 质粒并将其线性化。通过同源重组获得重组质粒 pET28a-XosR。

### 2.5.2 感受态细胞转化

吸取 10  $\mu\text{L}$  重组产物转化至 *E. coli* BL21 (DE3) 感受态细胞中。于冰上静置 30 min 后热激 45 s 并立刻放置于冰上冷却 3 min。加入 900  $\mu\text{L}$  LB 液体培养基，以 200 r/min、37°C 条件培养 1 h。以 5,000 r/min 条件离心 5 min 后弃上清。重悬菌体并将其涂布在含抗性平板上，挑取转化子进行菌落 PCR 并将阳性转化子送公司测序。

### 2.5.3 XosR 重组蛋白表达与纯化

挑取阳性转化子在 KANA 抗性 LB 平板上活化，挑取单菌落转接至 KANA 抗性 LB 液体培养基，以 200 r/min、37°C 条件培养至对数生长期。加入 1 mol/L IPTG 诱导蛋白表达，以 200 r/min、16°C 低温培养 24 h。

低温诱导后以 8,000 r/min、4°C 条件离心 10 min 收集菌体。加入 Tris 缓冲液洗涤后重悬于 40 mL 缓冲液。将重悬液置于冰上进行超声破碎。破碎条件为：功率 200 W；破碎 1.5 s，停 3 s；破碎时间 30 min。

破碎液以 8,000 r/min 条件离心 15 min，吸取上清后过 0.22  $\mu\text{m}$  膜用于纯化。

### 2.5.4 XosR 蛋白纯化

采用镍柱亲和层析法纯化重组蛋白。纯化条件如表 2-4 所示。

表 2-4 亲和层析纯化方法

Table 2-4 Affinity chromatography purification method

程序	溶液	柱体积 (CV)	流速 (mL/min)
平衡	蒸馏水	10	1
平衡	含 20 mmol/L 咪唑 BufferA	10	1
上样	破碎液	样品体积	0.5
洗脱	含 20 mmol/L 咪唑 BufferA	5	1
洗脱	含 50 mmol/L 咪唑 BufferA	5	1
洗脱	含 100 mmol/L 咪唑 BufferA	5	1
洗脱	含 200 mmol/L 咪唑 BufferA	5	1
洗脱	含 300 mmol/L 咪唑 BufferA	5	1
冲柱	蒸馏水	10	1
封柱	20% 乙醇	10	1

### 2.5.5 Tricine-SDS-PAGE 电泳检测

按照试剂盒制备 16.5% Tricine-SDS-PAGE 胶。加入 1 mol/L (pH=0.8) Tric/HCl 缓冲液。将蛋白样品煮沸后按比例加入 loading buffer。100 V 电压电泳 4 h 后置于染色液中染色 1 h。随后将凝胶放入脱色液中脱色过夜，用凝胶成像仪观察结果。

## 2.6 XosR 结合位点分析

### 2.6.1 XosR 基因簇生物信息学分析

XosR 基因簇生物信息学分析所用到的网站及软件如下：

- (1) Jalview 序列比对软件用于 XosR 同源蛋白氨基酸序列比对。
- (2) MEGAX 软件用于 XosR 同源蛋白进化树分析。
- (3) Softberry 在线预测网站用于 *xosR* 基因启动子预测。
- (4) ProtScale 在线分析网站用于 XosR 蛋白性质分析。
- (5) RegPrecise 在线预测网站用于 XosR 蛋白靶点分析。
- (6) AlphaFold 在线预测网站用于 XosR 蛋白构象分析。
- (7) AutoDock 软件用于 XosR 蛋白效应因子结合位点分析。

### 2.6.2 PUD19-PROMOTER-EGFP 重组质粒的构建

采用基因组提取试剂盒对 *B. animalis* subsp. *lactis* JNFE03 的基因组进行提取。以 *B. animalis* subsp. *lactis* JNFE03 基因组为模板 PCR 扩增获得启动子片段，引物序列见表 2-1。PCR 产物采用纯化回收试剂盒回收 DNA 片段。将 PUD19-EGFP 质粒线性化并通过同源重组获得重组质粒 PUD19-PROMOTER-EGFP。

### 2.6.3 重组质粒 PUD19-PROMOTER-EGFP 启动子荧光强度的测定

参考 2.5.2 的实验方法将重组质粒 PUD19-PROMOTER-EGFP 转化至 *E. coli* DH5 $\alpha$  感受态细胞中。以 200 r/min, 37 °C 条件培养 16 h。吸取 200  $\mu$ L 菌液至 96 黑孔板中，用酶标仪测定荧光吸收值，每组设置三个平行。同时吸取 200  $\mu$ L 菌液至 96 孔透明板中，用酶标仪测定 OD<sub>600</sub> 值，每组设置三个平行。采用公式计算荧光强度：

$$\text{荧光强度} = \frac{\text{荧光吸收值}}{\text{OD}_{600} \text{ 值}} \quad (2-2)$$

### 2.6.4 凝胶迁移 (EMSA) 实验

采用基因组提取试剂盒对 *B. animalis* subsp. *lactis* JNFE03 的基因组进行提取。以 *B. animalis* subsp. *lactis* JNFE03 基因组为模板 PCR 扩增获得靶点片段，引物序列见表 2-1。

根据试剂盒说明书制备 6% Native-PAGE 胶，成分列表如下：

表 2-5 6%Native-PAGE 胶成分表

Table 2-5 Composition of 6% Native-PAGE

成分	体积 (mL)
5×TBE	1
30% 丙烯酰胺	2
甘油	0.5
蒸馏水	6.39
TEMED	0.01
10%APS	0.1

按照表 2-6 配制反应体系。

表 2-6 反应体系  
Table 2-6 Reaction system

成分	体积 ( $\mu\text{L}$ )
结合缓冲液	3
蛋白纯化样品	X
靶点片段	Y
蒸馏水	补充至 15

将反应体系置于室温反应 30 min 后加入 3  $\mu\text{L}$  上样缓冲液，用移液枪轻微吹打后缓慢上样。上样前先使用 0.5 $\times$ TBE 缓冲液以 120 V 条件预电泳 1 h，上样后更换电泳液以 110 V 条件正式电泳 2 h。电泳结束后，使用 YeaRed 核酸染料染色 1 h 后用凝胶成像仪观察结果。

### 2.6.5 XosR 及其变构体结构测定

采用圆二色谱光谱仪对 XosR 及其变构体进行二级结构测定。

## 2.7 数据处理与分析

实验数据采用平均值 $\pm$ 标准差 ( $\bar{X} \pm S$ ) 的形式表示，设置生物学重复以及三个技术重复。对组间荧光各项异性值、木糖苷酶酶活、启动子荧光强度等数据的差异进行单因素方差分析，统计分析及作图均使用 GraphPad Prism 8.0 ( $P < 0.05$  标注“\*”， $P < 0.01$  标注“\*\*”， $P < 0.001$  标注“\*\*\*”， $P < 0.0001$  标注“\*\*\*\*”)。

### 3 结果与讨论

#### 3.1 具有代谢 XOS 能力双歧杆菌的筛选

##### 3.1.1 双歧杆菌中 XOS 降解酶系系统发育分析

$\beta$ -木糖苷酶和木糖异构酶在 XOS 降解过程中起主要作用。为了明确这两种酶在双歧杆菌中的分布,对青春双歧杆菌 (*B. adolescentis*)、长双歧杆菌长亚种 (*B. longum* subsp. *longum*)、假小链双歧杆菌 (*B. pseudocatenulatum*)、动物双歧杆菌乳亚种 (*B. animalis* subsp. *lactis*)、假长双歧杆菌 (*B. pseudolongum*)、两歧双歧杆菌 (*B. bifidum*) 的  $\beta$ -木糖苷酶 (EC 3.2.1.37) 氨基酸序列和木糖异构酶 (EC 5.3.1.5) 氨基酸序列进行系统进化分析。

进化树结果如图 3-1 所示。 $\beta$ -木糖苷酶是一种胞内酶,主要水解两个或多个碳水化合物分子和非碳水化合物分子之间的糖苷键<sup>[73]</sup>。双歧杆菌中的  $\beta$ -木糖苷酶主要分布在 *B. adolescentis*、*B. longum* subsp. *longum*、*B. pseudocatenulatum* 和 *B. animalis* subsp. *lactis* 中。其中, *B. longum* subsp. *longum* 和 *B. pseudocatenulatum* 各为单独的一簇, *B. adolescentis* 和 *B. longum* subsp. *longum* 中的  $\beta$ -木糖苷酶具有比较近的亲缘关系。木糖异构酶可以催化 D-木糖异构化生成木酮糖,这是微生物代谢木糖的第一步<sup>[74]</sup>。其主要分布在 *B. adolescentis*、*B. longum* subsp. *longum*、*B. pseudocatenulatum*、*B. animalis* subsp. *lactis*、*B. pseudolongum* 和 *B. bifidum* 中。其中 *B. adolescentis* 和 *B. pseudolongum* 中的木糖异构酶为单独的一簇, *B. pseudolongum*、*B. bifidum* 和 *B. animalis* subsp. *lactis* 中的木糖异构酶呈分散分布。

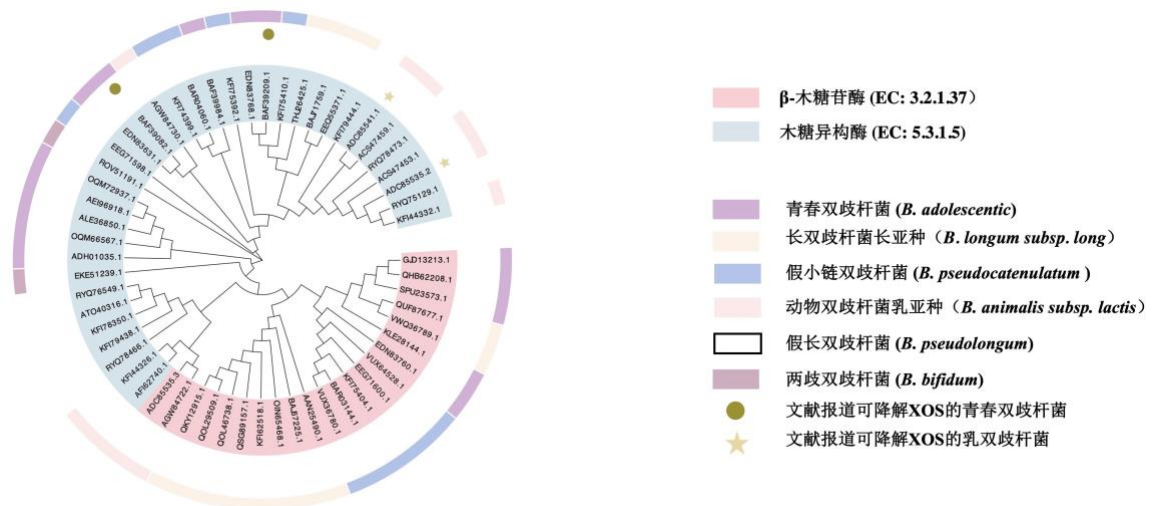


图 3-1 双歧杆菌中  $\beta$ -木糖苷酶和木糖异构酶系统进化分析

Fig. 3-1 Phylogenetic analysis of  $\beta$ -xylosidase and xylose isomerase in bifidobacteria

### 3.1.2 不同双歧杆菌体外利用 XOS 生长差异分析

采用普通 MRS 培养基筛选获得 34 株双歧杆菌。其中, 包含 7 株 *B. adolescentis*、10 株 *B. longum* subsp. *longum*、6 株 *B. pseudocatenulatum*、3 株 *B. animalis* subsp. *lactis*、6 株 *B. pseudolongum* 和 2 株 *B. bifidum*。通过测定其在 XOS 碳源 MRS 培养基中生长 0 h、12 h、24 h 的 pH 值和 OD 值, 对菌株利用 XOS 的能力进行评估 (表 3-1)。结果表明, 在筛得的菌株中, *B. bifidum* 几乎不能利用 XOS, *B. adolescentis*、*B. longum* subsp. *longum*、*B. pseudocatenulatum*、*B. animalis* subsp. *lactis* 和 *B. pseudolongum* 具有一定的利用 XOS 的能力。*B. bifidum* 中不存在木糖苷酶且仅有少部分具有木糖异构酶, 因此其利用 XOS 能力较差。Mäkeläinen 等<sup>[56]</sup>对双歧杆菌和乳杆菌在 XOS、木聚糖、低聚半乳糖等唯一碳源培养基上的生长特性进行测定。结果表明, *B. animalis* subsp. *lactis* HN019、*B. animalis* subsp. *lactis* BB12 能够利用不同聚合度的 XOS 而 *B. breve* Bb-03、*B. longum* subsp. *longum* KC-1、*B. infantis* DSM20088 等双歧杆菌不能有效利用 XOS。Bowen 等<sup>[75]</sup>研究发现, XOS 对 *B. adolescentis* 和 *L. acidophilus* 有良好的增殖能力, 与本研究结果一致。

表 3-1 双歧杆菌对 XOS 的利用能力情况

Table 3-1 Utilization ability of XOS by bifidobacterium

菌种名称	碳源 (XOS)	碳源 (葡萄糖)	无碳源
<i>B. adolescentis</i>	2/7	7/7	0/7
<i>B. longum</i> subsp. <i>longum</i>	9/10	10/10	0/10
<i>B. pseudocatenulatum</i>	2/6	6/6	0/6
<i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i>	3/3	3/3	0/3
<i>B. pseudolongum</i>	4/6	6/6	0/6
<i>B. bifidum</i>	0/2	2/2	0/2

注: 表中分子表示可以利用 XOS 的菌株数量, 分母表示筛得的菌株数量

选取 *B. longum* subsp. *longum* JNFE02、*B. animalis* subsp. *lactis* JNFE03 和 *B. pseudolongum* JNFE06 作为研究对象, 探究不同浓度 XOS 对其生长差异性的影响 (图 3-2)。

*B. longum* subsp. *longum* JNFE02 在不同浓度的 XOS 培养条件下的生长趋势不同。在以 2% XOS 和 3% XOS 为碳源的培养基上生长 24 h 时, OD 值约为 0.71, 显著低于葡萄糖培养体系的 OD 值 (图 3-2a1)。然而在培养 24 h 时, 2% XOS 培养体系和 3% XOS 培养体系与葡萄糖培养体系 pH 值接近, 为 4.61 (图 3-2a2)。因此在 2% XOS 和 3% XOS 的培养体系中, *B. longum* subsp. *longum* JNFE02 具有较强的产酸能力。

*B. animalis* subsp. *lactis* JNFE03 在 3% XOS 培养体系中生长良好。在以 3% XOS 为碳源的培养基上生长 36 h 时, OD 值与葡萄糖培养体系 OD 值几乎一致, 为



1.04 (图 3-2b1)。在培养初期至培养末期, XOS 培养体系 pH 值低于葡萄糖培养体系 pH 值 (图 3-b2)。因此 *B. animalis* subsp. *lactis* JNFE03 在 XOS 体系中, 有很强的产酸能力, 且优于葡萄糖培养体系。

*B. pseudolongum* JNFE06 生长 OD 值存在 XOS 浓度依赖性, 其在 3% XOS 碳源培养基上生长 24 h 时, OD 值为 0.35, 高于 1% XOS 和 2% XOS 培养体系的 OD 值。与以葡萄糖为碳源培养时相比较, OD 值相差 0.15 (图 3-2c1)。然而其在不同浓度的 XOS 培养体系中发酵时, pH 值接近。在培养 24 h 时, 体系 pH 值为 4.84, 并且与葡萄糖为碳源时的 pH 值接近 (图 3-2c2)。因此在含 1% XOS 的培养体系中, *B. pseudolongum* JNFE06 产酸能力强。

基于上述现象, *B. longum* subsp. *longum* JNFE02、*B. animalis* subsp. *lactis* JNFE03、*B. pseudolongum* JNFE06 均能较好地利用 XOS 且 *B. animalis* subsp. *animalis* JNFE03 利用能力最强。

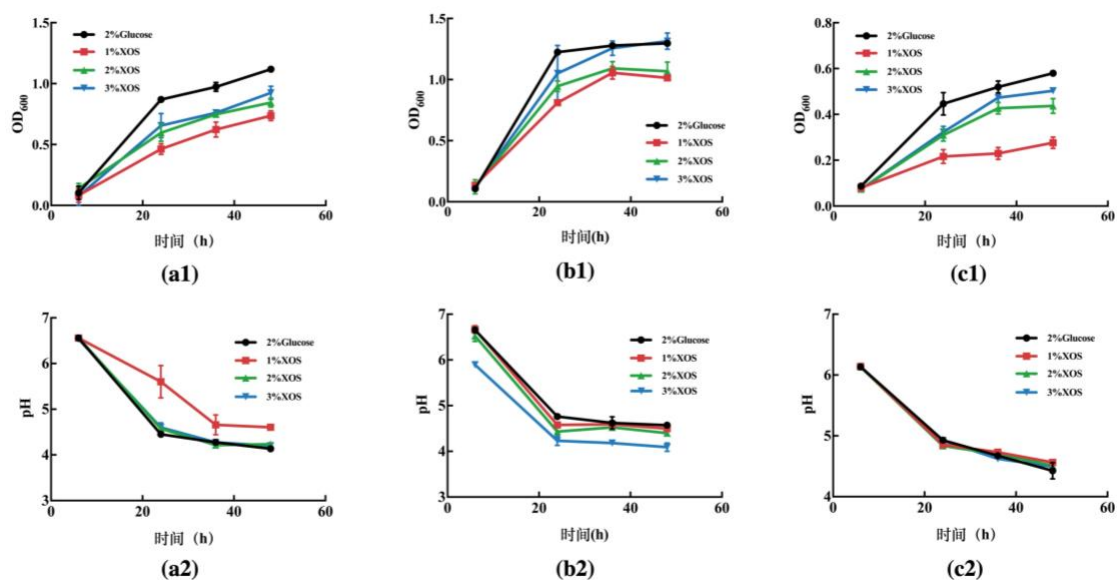


图 3-2 双歧杆菌 OD 值和 pH 值变化

(a1) *B. longum* subsp. *longum* JNFE02 生长 OD 值变化 (a2) *B. longum* subsp. *longum* JNFE02 生长 pH 值变化 (b1) *B. animalis* subsp. *lactis* JNFE03 生长 OD 值变化 (b2) *B. animalis* subsp. *lactis* JNFE03 生长 pH 值变化 (c1) *B. pseudolongum* JNFE06 生长 OD 值变化 (c2) *B. pseudolongum* JNFE06 生长 pH 值变化

Fig. 3-2 OD value change and pH value change of bifidobacterium (a1) OD value change of *B. longum* subsp. *longum* JNFE02 (a2) pH value change of *B. longum* subsp. *longum* JNFE02 (b1) OD value change of of *B. animalis* subsp. *lactis* JNFE03 (b2) pH value change of of *B. animalis* subsp. *lactis* JNFE03 (c1) OD value change of *B. pseudolongum* JNFE06 (c2) pH value change of *B. pseudolongum* JNFE06

### 3.1.3 *B. animalis* subsp. *lactis* JNFE03 细胞生理学分析

#### 3.1.3.1 生长动力学分析

为了进一步探究 *B. animalis* subsp. *lactis* JNFE03 菌株利用 XOS 的能力, 分析了该菌株的生长动力学。将菌株 *B. animalis* subsp. *lactis* JNFE03 在 2% 葡萄糖和 2% XOS 培养条件下分别培养 60 h 后, 采用 Logistic 动力学模型拟合得到其生长曲线 (图 3-3a)。拟合值与测得的实验值基本保持一致, 两者都存在延滞期, 随后进入指数生长期, 最后到达稳定期。菌体在发酵培养 24 h 时达到生长稳定期, 其在不同碳源培养体系中的 OD 值分别为 1.22 和 1.01。同时对体系 pH 值变化进行非线性拟合 (图 3-3b)。拟合值与测得的实验值趋势相同。随着发酵时间的延长, pH 值不断下降且在 40 h 时趋于稳定。因此, *B. animalis* subsp. *lactis* JNFE03 菌株对 XOS 有较强的代谢能力, 在 2% XOS 的碳源条件下可以正常生长。

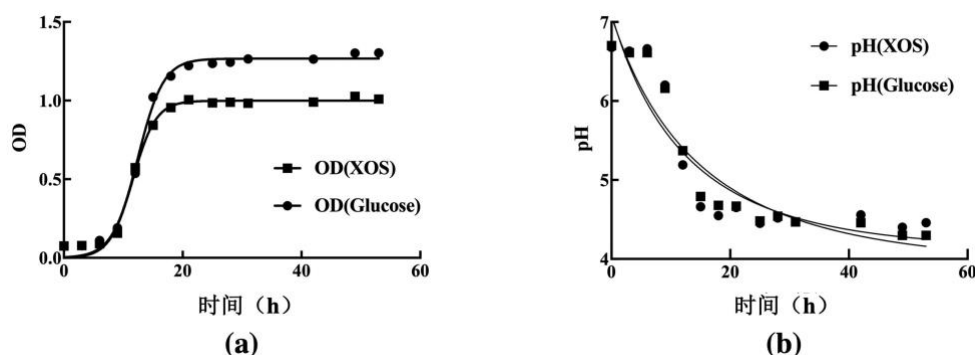


图 3-3 *B. animalis* subsp. *lactis* JNFE03 生长动力学分析 (a) OD 值变化 (b) pH 值变化

Fig. 3-3 Growth kinetics analysis of *B. animalis* subsp. *lactis* JNFE03 (a) OD value (b) pH value

#### 3.1.3.2 发酵液中 XOS 含量变化分析

将 *B. animalis* subsp. *lactis* JNFE03 接种于 2% XOS 碳源培养基中发酵 0 h、12 h、24 h、36 h, 采用离子色谱分析上清液中 XOS 的变化, 结果如图 3-4 所示。发酵前, 培养基中木糖含量为 2.1 g/L, 木二糖含量为 6.4 g/L, 木三糖含量为 5.6 g/L, 木四糖含量为 3.1 g/L, 木五糖含量为 1.6 g/L, 木六糖含量为 0.7 g/L, 木七糖含量为 0.4 g/L。发酵 24 h 时, 发酵液中木五糖、木四糖、木三糖、木二糖分别下降 12.2%, 79.7%, 59.2%, 11.8%; 随着木二糖、木三糖的水解, 木糖含量上升了 64.1%。以上结果表明, *B. animalis* subsp. *lactis* JNFE03 优先利用聚合度较低的 XOS。Ejby 等<sup>[76]</sup>证明, *B. lactis* BIL04 可以通过 ABC 转运蛋白底物结合蛋白结合 XOS, 且该蛋白优先识别聚合度为三或四聚合度的 XOS, 与本研究结果一致。

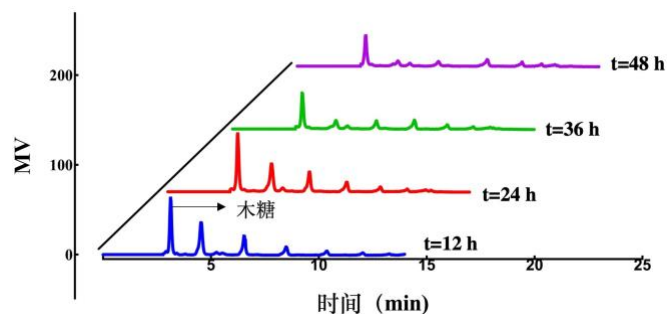


图 3-4 不同发酵时间上清液中 XOS 含量变化分析

Fig. 3-4 Analysis of XOS content in the supernatant of different fermentation time

### 3.1.3.3 细胞膜不饱和脂肪酸分析

细胞膜脂肪酸组成与细胞膜的质子渗透性有关<sup>[77]</sup>。双歧杆菌细胞膜脂肪酸组成的变化与其对环境的适应能力相关<sup>[78]</sup>。由图 3-5 可以看出,在不同碳源培养条件下,细胞膜脂肪酸的主要成分是棕榈酸(C16:0)、十七烷酸(C17:0)和硬脂酸(C18:0)。在 XOS 和葡萄糖碳源培养体系中,随着培养时间的延长,发生变化的主要脂肪酸为十七烷酸(C17:0)、硬脂酸(C18:0)、油酸(C18:1)和亚麻酸(C18:3)。随着发酵时间的增加,细胞膜脂肪酸不饱和度逐渐升高,在发酵 24 h 时达到峰值(表 3-2)。XOS 组由 0.03 上升至 0.24,不饱和度提高了 7.72 倍;葡萄糖组由 0.03 上升至 0.17,不饱和度提高了 5.05 倍。细胞膜脂肪酸不饱和度的提高能够增强菌株的生存能力,包括耐冷、耐酸能力<sup>[79]</sup>。

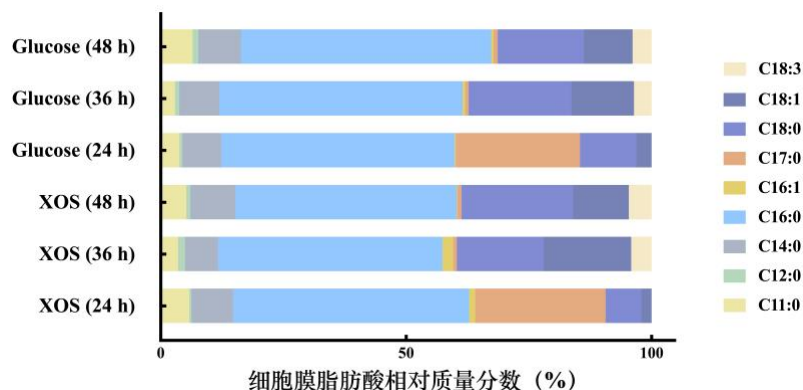


图 3-5 细胞膜脂肪酸组成

Fig. 3-5 Cell membrane fatty acid composition

表 3-2 细胞膜脂肪酸不饱和度

Table 3-2 Unsaturation of cell membrane fatty acid

	XOS (24h)	XOS (36 h)	XOS (48h)	Glucose (24h)	Glucose (36 h)	Glucose (48 h)
不饱 和度	0.03 ± 0.02	0.24 ± 0.03	0.16 ± 0.02	0.03 ± 0.04	0.17 ± 0.03	0.14 ± 0.02

为了进一步探究 *B. animalis* subsp. *lactis* JNFE03 在代谢利用 XOS 过程中细胞膜特性的变化, 以 DPH 为探针, 对 *B. animalis* subsp. *lactis* JNFE03 在不同碳源条件下膜流动性变化进行分析。DPH 是一种较为灵敏的荧光探针, 可进入到细胞膜脂质区域形成荧光物质<sup>[80]</sup>。DPH 分子从吸收到发送过程中可随着脂肪酸分子的活动而有不同程度的倾斜。当细胞膜流动性增加时, 发射的荧光偏振度减小, 各向异性(r 值)减少。与葡萄糖碳源相比较, 当 *B. animalis* subsp. *lactis* JNFE03 在以 XOS 为碳源的培养基中发酵时, 其不同发酵时间段的 r 值均呈减少趋势(图 3-6)。在以葡萄糖和 XOS 为碳源发酵 48 h 时, 细胞膜的 r 值分别为 0.0172 和 0.0094, 表明 XOS 组有更高的细胞膜流动性<sup>[81]</sup>。

细胞膜脂肪酸的改变将对膜流动性产生影响。葡萄糖主要通过自由扩散和协助扩散的方式进入细胞内, 而 XOS 由于具有较大的分子量, 主要通过转运蛋白进入细胞内, 因此更高的细胞膜流动性有利于 XOS 的转运。

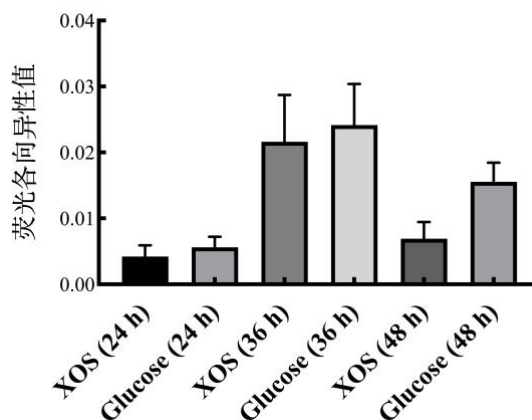


图 3-6 不同碳源对荧光各向异性值的影响

Fig. 3-6 Effect of different carbon sources on the fluorescence anisotropy value

### 3.1.3.4 短链脂肪酸分析

短链脂肪酸是脂肪酸的一种, 通常在肠道微生物发酵不可消化多糖的过程中产生。常见的短链脂肪酸有乙酸、丁酸、异丁酸、丙酸和戊酸<sup>[82]</sup>。乙酸、丙酸和丁酸是肠道微生物发酵不可消化膳食碳水化合物、单糖、糖醇和蛋白质产生的主要终端代谢产物<sup>[83]</sup>。益生菌可以通过发酵益生元产生短链脂肪酸<sup>[84]</sup>。*B. animalis*

以上内容仅为本文档的试下载部分，为可阅读页数的一半内容。如要下载或阅读全文，请访问：<https://d.book118.com/097033163026006046>