

乳酸菌食品级筛选标记研究进展

范丽平, 李艾黎, 霍贵成

(东北农业大学 乳品科学教育部重点实验室 黑龙江 哈尔滨 150030)

摘要: 构建食品级载体是开发乳酸菌潜在应用价值的关键。筛选标记是载体的重要组成部分, 也是目前乳酸菌遗传学研究领域的一个热点。本文对国内外已构建的食品级筛选标记系统, 包括抗性筛选标记系统、互补型筛选标记系统进行了综述, 以期对食品级筛选标记系统的进一步研究提供有价值的参考。

关键词: 乳酸菌; 食品级载体; 筛选标记

Development Review on Food Grade Selection Marker in Lactic Acid Bacteria

FAN Li-ping, LI Ai-li, HUO Gui-cheng

(Key Laboratory of Dairy Science, Ministry of Education, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China)

Abstract: Development of food-grade vector is the key point to exploit the potential application of lactic acid bacteria. Selection markers are the important ingredient of the vector, and it is also a hot research spot of the genetics of lactic acid bacteria at present. In the article, the foreign and domestic food-grade selection markers system, including dominant selection markers and complement selection markers were reviewed, in order to provide valuable references for the further study of the food-grade selection markers system.

Key words: lactic acid bacteria; food-grade vector; selection marker

中图分类号: TS201.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2006)09-0264-04

大多数乳酸菌是有着重要经济价值的食品级微生物, 在食品工业和医疗保健领域有着广泛的应用。生物技术的发展进一步开发了乳酸菌的可应用潜能, 提升了其应用价值。在过去的二十多年里欧盟、美国和澳大利亚等国家的一些实验室利用分子生物学实验技术对乳酸菌遗传学进行了广泛和深入的研究, 从而使我们能够更好地认识这一类微生物进而对其进行改造, 其中关键兴趣点就是构建带有价值性状的遗传修饰菌株, 包括: 产风味菌株、产酶菌株、作为细胞工厂生产抑菌素、产高价值蛋白菌株、高产特定初级次级代谢产物菌株以及作为疫苗载体等, 并应用于医疗保健、食品发酵和食品保藏等领域。在将价值性状基因转移到合适的受体细胞构建重组菌株的过程中, 有一关键性需求即载体, 包括两种类型: 整合型载体和复制型载体, 但无论何种类型的载体都必须带有一个有效的筛选标记确保转化子的检出。传统的乳酸菌载体都带有一个或多个编码特定抗生素(如红霉素、氯霉素等)的异源抗性基因, 虽然这为遗传操作时保持一定的选择压力, 对转

化子的选择作用是有效的, 但将抗生素抗性基因投放到环境中或人和动物体内, 由于抗性因子的转移, 将带来生物安全性的严重后果, 在实际生产应用中也是必然被排斥的。为了防止使用抗生素抗性标记所引起的危害, 最有效的办法是用对人体安全的食品级筛选标记替代抗生素抗性标记以构建食品级受体/载体系统。本文拟将乳酸菌食品级筛选标记的研究进展综述如下。

1 乳酸菌抗性筛选标记

1.1 nisin抗性标记

nisin是乳酸乳球菌产生的由34个氨基酸组成的抗菌肽, 是一种高效无毒的食品添加剂, 菌株的产nisin和抗nisin特性通常是共存的。利用nisin抗性基因 niS' 作为筛选标记筛选乳酸乳球菌转化子是研究最早的乳酸菌食品级抗性筛选标记系统。

美国明尼苏达州明尼苏达大学食品与营养学部的McKay等人从乳酸乳球菌双乙酰亚种DRC3分离到一个60kb质粒pNP40。将pNP40通过接合作用转移到nisin

收稿日期: 2005-10-28

基金项目: 国家“863计划”课题资助项目(2002AA248041)

作者简介: 范丽平(1979-), 女, 博士研究生, 主要从事食品微生物与生物技术方面的研究。

敏感菌株中,接合子获得 *nisin* 抗性,进而证实质粒 pNP40 编码 *nisin* 抗性^[1]。进一步的酶切、连接及转化实验后获得一个独立复制子 pFM011,该复制子带有质粒 pNP40 的复制起始区、多克隆位点和 *nisin* 抗性决定子,可作为乳酸乳球菌的克隆载体^[2]。乳球菌 LM0230 是乳酸乳球菌乳酸亚种 C2 质粒消除获得的空菌,是 *nisin* 敏感性菌株,可作为以 *nis^r* 为筛选标记载体的受体菌株。利用 pFM011 作为克隆载体在乳酸乳球菌 LM0230 成功地表达了 6.3kb 的外源片段,该片段编码 Rbs⁺ 表型,同时设计了一种特定的 *nisin* 抗性转化子筛选培养基 M17-GNTN 可有效的筛选阳性转化子。酶切分析将 *nisin* 抗性基因定位在 1.06kb 的片段上^[3]。

芬兰和丹麦合作研究于 90 年构建了以 *nis^r* 为筛选标记的食品级受体/载体系统。载体为 pVS40(7.8kb),带有乳酸乳球菌双乙酰亚种 SSD207 一个 28kb 的隐蔽型质粒的复制子,该复制子被定位在 2.5kb 的 *EcoRI*-*ClaI* 限制性片段上,乳酸乳球菌乳酸亚种 10.084 的一个 40kb 的质粒 pSF01 上的 *nisin* 抗性基因,及链球菌质粒载体 pGB301 的克隆位点。受体菌株为 *nisin* 敏感菌株 MG1614^[4]。

我国中科院微生物研究所分离并鉴定了一个含有 *nisin* 抗性基因的乳酸乳球菌质粒 pTS50(47kb),通过 PCR 及杂交技术将 *nis^r* 基因定位在 1.9kb 的 *EcoRI* 小片段上^[5]。

nisin 抗性基因是个相对较小的有效的抗性筛选标记,但很多工业菌株都具有 *nisin* 抗性限制了它的应用范围。

1.2 免疫性标记

美国卡罗莱纳州立大学食品科学与微生物学部的 Allison 等人利用约氏乳杆菌 VPI 11088 的 *LafI* 作为标记基因成功应用于多种乳杆菌。*LafI* 是 Lactacin F 系统的免疫因子^[6]。Lactacin F 是由约氏乳杆菌 VPI 11088 产生的一种细菌素,该细菌素是由 *LafA* 和 *LafX* 两种肽构成的双成分细菌素^[7]。Lactacin F 对多种乳杆菌、歧异肉食杆菌和粪肠球菌都有抑制作用,其作用原理是基于两个肽分子可在敏感细胞的细胞膜上形成一个中空的孔道使细胞内的离子释放到细胞外导致细胞死亡^[8]。*Laf* 操纵子由 *LafA*、*LafX* 和 *ORFZ* (*LafI*) 三部分组成,定位在约氏乳杆菌 VPI 11088 染色体上 2.3kb *EcoRI* 酶切片段上。NCK64 是 VPI 11088 的移码突变菌株 (*LafA⁻*, *LafX⁺*),利用温度敏感型复制子 pSA3 通过同源重组获得 *ORFZ* 失活菌株 NCK800 (*LafA⁻*, *LafX⁺*, *ORFZ⁻*),该菌株表现 Lactacin F 敏感性。重组质粒 pTRK434 克隆有 *ORFZ* 基因,转化 NCK800 和其他 Lactacin F 敏感菌株,转化子表现为对 Lactacin F 的免疫性。利用 pTRK434 转化发酵乳杆菌 NCD01750,转化子对 Lactacin F 敏感性比非转化子细胞下降了 64 倍,表明了 *LafI* 作为筛选标记基因的有效性。另外,实验显示瑞士乳杆菌、德氏乳杆菌、嗜酸乳杆

菌、格氏乳杆菌、鸡乳杆菌、约氏乳杆菌及罗伊氏乳杆菌等敏感菌株均可作为受体菌株,这意味着以 *LafI* 作为筛选标记基因在乳杆菌中将有广泛应用性^[6]。

芬兰赫尔辛基大学应用化学与微生物学部构建的载体 pLEB 590 是完全以乳酸乳球菌 DNA 构建的, pSH 71 复制子,组成型启动子 P45,并以 *nisin* 免疫基因 *nisI* 为标记基因。利用该载体成功地转化了乳酸乳球菌 MG 1614 及其它带有隐蔽质粒的工业菌株^[9]。爱尔兰微生物与国家食品生物技术中心获得 60.2kb 乳球菌质粒 pMRC01,该质粒编码的 lantibiotic lactacin 3147 有免疫作用,进一步研究将其定位在 12.6kb 含有十个基因的基因簇上,通过删除试验及在乳酸乳球菌 MG1363 中的表达实验,确定了起免疫作用的基因为 *ltnI*,该基因编码 116 个氨基酸的蛋白,同其他细菌素免疫蛋白无同源性。通过对 *ltnI* 和抗性基因筛选效果的比较性实验证明 *ltnI* 可作为一个有效的食品级筛选标记^[10]。

免疫性标记基因大都只有几百个碱基,而且免疫性菌株和敏感菌株界限分明,这为它的应用带来了许多方便,更为主要的是 *LafI* 可应用于多种乳杆菌。开发乳杆菌筛选标记,构建乳杆菌载体应用于一些肠道乳杆菌及益生菌是很有意义的。

1.3 金属抗性

pND302 是由乳酸乳球菌乳酸亚种 M71 中分离出来的一个 8.8kb 的质粒,该质粒编码铜抗性^[11]。铜抗性决定子定位在 2.9kb 的区域,由 *cadA* 和 *cadC* 两部分组成。*cadA* 编码 P 型铜特异性流出 ATP 酶,可以使铜离子由细胞内释放到细胞外避免细胞内积累高浓度铜离子而致死,*cadC* 编码转录调节蛋白^[12]。澳大利亚 Wing Yee Wong 等将此抗性基因转连到嗜热链球菌复制子载体 pND913,去除非食品级 DNA 片段得以铜抗性为筛选标记的食品级克隆载体 pND919,并成功应用于嗜热链球菌 ST3-1 和 ST4-1 中,其中 ST4-1 为工业菌株, pND919 也是第一个应用于嗜热链球菌工业菌株的食品级载体^[13]。

pND306 是由乳酸乳球菌乳酸亚种 1252D 中分离出来的一个 5.4kb 的质粒,该质粒编码铜抗性,抗性决定子 10.6kb。联合使用 *Cu^R* 和 *Ni^{S^r}* 构建了双标记克隆载体 pND968 成功应用于乳球菌菌株。pND968 的两个标记基因都有单一的限制性内切酶酶切位点,插入外源片段后可失活其中的一个标记基因,减少假阳性转化子更便于实验操作^[14]。

澳大利亚 C-Q Liu 等利用两个质粒复制子和三个标记基因构建了五个食品级载体 pND632、pND648、pND969、pND965D J、pND965RS,抗性标记为 *nisin*、铜和铜,标记或单独使用或联合使用。这五个载体完全由乳酸乳球菌 DNA 组成并且不含有任何抗生素抗性基因,符合食品级标准。所有这些载体都成功转化了乳

酸乳球菌 LM0230, 并在 40 代以内稳定存在。pND648 和 pND965RS 亦成功转化了乳酸乳球菌工业菌株并在工业菌株中成功表达了噬菌体抗性基因, 表征了其应用潜力^[15]。

1.4 热应激蛋白

Geis 从嗜热链球菌菌株 St4 中分离到一个 3.2kb 的质粒, 该质粒带有两个开放阅读框: *repA* 和 *shsp*。 *shsp* 的基因产物同一些嗜热链球菌产生的小的热应激蛋白具有高度同源性^[16]。德国乳品研究中心的 Hassan 等人进一步研究发现消除该质粒的嗜热链球菌菌株对热和酸的抵抗能力明显降低, 另外将该基因克隆转化嗜热链球菌 St11, 该菌株获得了 60 和 pH3.5 条件下的生长能力, 证实了该基因确实编码小的热应激蛋白。利用 *shsp* 和 *Em^r* 作为标记基因构建重组质粒, 转化后对转化子进行比较分析得出 *shsp* 作为标记基因和 *Em^r* 作为标记基因有同样高的筛选效率^[17]。此外该基因只有 480bp 带给载体的压力下, 且在嗜热链球菌和乳酸乳球菌中都可应用。

2 乳酸菌互补型筛选标记

2.1 氨基酸营养缺陷型互补

丙氨酸是革兰氏阳性菌细胞壁的结构成分。丙氨酸消旋酶, 催化 D- 丙氨酸和 L- 丙氨酸的转化。丙氨酸消旋酶由 *alr* 编码, *alr* 基因缺失的菌株在缺乏 D- 丙氨酸的培养基上不能生长^[18]。乳酸乳球菌和植物乳杆菌染色体上有单拷贝的 *alr* 基因, 菌株 NCIMB8826、MD007 和 PH3960 均为 *alr* 失活菌株。比利时和荷兰合作研究构建了以 *alr* 为标记基因的克隆载体。载体 pGIP011 和 pGIP012 上克隆有乳酸乳球菌菌株 MG1363 染色体上的 *alr* 基因, 分别利用这两个载体成功转化了植物乳杆菌菌株 NCIMB8826 和 MD007, 构建了以 *alr* 为标记基因的异源标记载体系统。克隆有植物乳杆菌 *alr* 基因 pGIP013 被成功转入乳酸乳球菌菌株 PH3960 也实现了异源标记^[19]。

hom-thrB 操纵子编码高丝氨酸脱氢酶和高丝氨酸激酶, 是由精氨酸到苏氨酸这一途径的关键酶, 它们的缺失导致苏氨酸营养缺陷。SØREN 和 Jacob 利用整合载体 pSMA507 通过双交换先后构建了乳酸乳球菌营养缺陷型菌株 MG1614 *thr* 和 MG1363 *thr*。Jacob 等人亦构建以 *hom-thrB* 为标记基因的载体 pJAG5, 并以该载体为基础构建了衍生载体 pJAG8, 在人肾纤维原细胞中成功的表达了绿色荧光蛋白, 这为疫苗载体的开发奠定了基础^[20, 21]。

2.2 胸苷酸营养缺陷型互补

中国农业大学的王春风等以胸苷酸合成酶基因取代了穿梭质粒(大肠杆菌和乳酸菌)pW425e 上的红霉素抗性基因, 获得了重组载体, 同时筛选了 *thyA* 缺陷的嗜酸乳杆菌 D0MLaS107 作为受体菌株, 构建了以 *thyA* 为筛

选标记的嗜酸乳杆菌食品级载体 / 受体系统^[22, 23]。

日本功能性食品研究院的 Yasuko Sasaki 通过在添加 TMP(甲氧苄氨嘧啶)的培养基上连续传代 50~100 代获得了嗜热链球菌胸苷缺陷突变株, 同时克隆了嗜热链球菌和保加利亚乳杆菌的胸苷酸合成酶基因 *thyA*, 以其作为筛选标记构建了克隆载体 pBSt1 和 pBLb1, 成功转化了突变株 TM1-1。另外, 此人还以保加利亚乳杆菌的 *thyA* 为标记基因构建了嗜热链球菌的整合系统并将淀粉酶基因 *amyA* 整合到嗜热链球菌的染色体上^[24]。

2.3 糖类利用筛选标记

荷兰的 Posno 等把可发酵木糖的戊糖乳杆菌 MD353 染色体上的 *xyl* 基因簇克隆到大肠杆菌和乳杆菌穿梭载体 pLP3537 得到重组质粒 pLP3537-*xyl*, 在将其转入不能利用木糖的干酪乳杆菌 ACTT393 和植物乳杆菌 NCD01193 中, 结果转化子获得了利用木糖的能力, 实现了载体的食品级标记^[25]。

乳糖是所有乳酸菌都能利用的糖类, 乳酸菌乳糖操纵子的研究也很深入。MacCormick 将完整的乳糖操纵子整合到不含质粒的乳酸乳球菌 MG5276 的染色体上, 通过双交换使 *LacF* 基因失活, 产生 Lac⁻ 表型。当克隆有 *LacF* 基因的质粒导入 *LacF* 缺陷株时就恢复了 Lac⁺ 表型。以乳糖为唯一碳源, *LacF* 基因就可起到筛选标记的作用^[26]。另外有报道以磷酸化 - 半乳糖苷酶基因为标记基因构建了干酪乳杆菌、乳酸乳球菌和瑞士乳杆菌克隆载体。

3 结 语

互补型筛选标记需要有相应的基因缺陷型菌株作为受体, 研究有一定的难度, 使用中也有一定的局限性, 而食品级抗性筛选标记不需要对受体菌株进行特别的处理, 相对来说有一定的优势。此外, 作为载体带有一个筛选标记是必须的, 如果同时具有一个插入失活筛选标记是比较理想的, 因为这可以大大减少假阳性转化子, 减少后期工作量。由前述可知国外自 90 年代已研究使用了很多食品级筛选标记, 但大多为单标记, 只有澳大利亚的 C-Q Liu 等构建的载体使用了双标记。国内目前只有中国农业大学的王春风构建了以 *thyA* 为筛选标记的食品级标记的受体 / 载体系统。因此在国内开展食品级筛选标记系统的研究包括单标记和双标记是很有意义的。随着乳酸菌食品级载体 / 受体系统的逐步研究和完善也必将促进乳酸菌在更广泛领域的应用。

参考文献:

- [1] Larry L McKay, Kathleen A Baldwin. Conjugalive 40-megadalton plasmid in *Streptococcus lactis* subsp. *Diacetylactis* DR3 is associated with resistance to nisin and bacteriophage[J]. Applied and Environmental

- tal Microbiology, 1984, 47: 68-74.
- [2] Barrie R Froseth, Richard E Herman, Larry L McKay. Cloning of nisin resistance determinant and replication origin on 7.6-kilobase *EcoRI* fragment of pNP40 from *Streptococcus lactis* subsp. *Diacetylactis* DRC3[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1988, 54: 2136-2139.
- [3] Barrie R Froseth, Larry L McKay. Development and application of pFM011 as a possible feed-grade cloning vector[J]. Journal of Dairy Science, 1991, 74: 1445-1453.
- [4] Atte Von Wright, Stephen Wessels, Soile Tynkkynen, et al. Isolation of a replication region of a large *Lactococcus* plasmid and use in cloning of a nisin resistance determinant[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1990, 56: 2029-2035.
- [5] 汤莎, 陈秀珠, 杨巍, 等. 一个含有乳链菌肽抗性基因的乳酸乳球菌质粒pTS50的鉴定[J]. 微生物学报, 2001, 41: 536-541.
- [6] GE Allison, TR Klaenhammer. Functional analysis of the gene encoding immunity to Lactacin F, Iafl, and its use as a *Lactobacillus*-specific, food-grade genetic marker[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1996, 62: 4450-4460.
- [7] GE Allison, C Fremaux, TR Klaenhammer. Expansion of bacteriocin activity and host range upon complementation of two peptides encoded within the Lactacin F operon[J]. Journal of Bacteriology, 1994, 176: 2235-2241.
- [8] Abee T, TR Klaenhammer, L Letelier. Kinetic studies of the action of Lactacin F, a bacteriocin produced by *Lactobacillus johnsonii* that forms poration complexes in the cytoplasmic membrane[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1994, 60: 1006-1013.
- [9] TM Takala, PE Sari. A food-grade cloning vector for lactic acid bacteria based on the nisin immunity gene nisl[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2002, 59: 467-471.
- [10] Olivia McAuliffe, Colin Hill, R Paul Ross. Identification and overexpression of *tnl*, a novel gene which confers immunity to the two-component antibiotic lactacin 3147[J]. Microbiology, 2000, 146: 129-138.
- [11] Chun-Qiang Liu, Vi chien Leelawatcharamas, Melissa L Harvey, et al. Cloning vectors for lactococci based on a plasmid encoding resistance to cadmium[J]. Current Microbiology, 1996, 33: 35-39.
- [12] Chun-Qiang Liu, Nongpanga Khunajakr, Lian G Chia, et al. Genetic analysis of regions involved in replication and cadmium resistance of the plasmid pND302 from *Lactococcus lactis*[J]. Plasmid, 1997, 38: 79-90.
- [13] Wing Yee Wong, Ping Su, Gwen E Allison, et al. A potential food-grade cloning vector for *Streptococcus thermophilus* that uses cadmium resistance as the selectable marker[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2003, 69: 5767-5771.
- [14] Vi chien Leelawatcharamas, Lian G Chia, Pi Laiwan Charoenchai, et al. Plasmid-encoded copper resistance in *Lactococcus lactis*[J]. Biotechnol -ogy Letter, 1997, 19: 639-643.
- [15] C-Q Liu, P Su N Khunajakr, Y-M Deng, et al. Development of food-grade cloning and expression vectors for *Lactococcus lactis*[J]. Journal of Applied Microbiology, 2005, 98: 127-135.
- [16] Geis A, AM El Demerdash, K J Heller. Sequence analysis and characterization of plasmids from *Streptococcus thermophilus*[J]. Plasmid, 2003, 50: 53-69.
- [17] Hassan AM, El Demerdash, Knut J Heller, et al. Application of the shsp gene, encoding a small heat shock protein, as a food-grade selection marker for lactic acid bacteria[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2003, 69: 4408-4412.
- [18] P hols, C Defrenne, T Ferain, et al. The alanine racemase gene is essential for growth of *Lactobacillus plantarum*[J]. Journal of Bacteriology, 1997, 179: 3804-3807.
- [19] Peter A Bron, Marcos G Benchi mol, Jolanda Lambert, et al. Use of the *alr* gene as a food-grade selection marker in lactic acid bacteria[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2002, 68: 5663-5770.
- [20] SØREN M Madsen, Bjarne Albrechtsen, Egon B Hansen, et al. Cloning and transcriptional analysis of two threonine biosynthetic genes from *Lactococcus lactis* MG1614[J]. Journal of Bacteriology, 1996, 178: 3689-3694.
- [21] Jacob Glenting, Søren M Madsen, Astrid Vrang, et al. A plasmid selection system in *Lactococcus lactis* and its use for gene expression in *L. lactis* and human kidney fibroblasts[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2002, 68: 5051-5056.
- [22] Xiaoli Fu, Jian-Guo Xu. Development of a chromosome-plasmid balanced lethal system for *Lactobacillus acidophilus* with *thyA* gene as selective marker[J]. Microbiology Immunology, 2000, 44: 551-556.
- [23] 王春风, 秦泽荣, 孙哲, 等. 以 *thyA* 为选择压力非抗性载体的构建[J]. 微生物学通报, 2001, 28: 42-46.
- [24] Yasuko Sasaki, Yoshiyuki Ito, Takashi Sasaki. *thyA* as a selection marker in construction of food-grade host-vector and integration systems for *Streptococcus thermophilus*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2004, 70: 1858-1864.
- [25] M Posno, P T Heuvelmans, M J van Giezen, et al. Complementation of the inability of *Lactobacillus* strains to utilize D-xyl ose with D-xyl ose catabolism-encoding genes of *Lactobacillus pentosus*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1991, 57: 2764-2766.
- [26] Carol ine A, McCormick, Hugh G Griffin, et al. Construction of a food-grade host/vector system for *Lactococcus lactis* based on the lactose operon[J]. FEMS Microbiology Letters, 1995, 127: 105-109.

信息

转基因羊乳抵御肠道有害细菌

美国科学家的一项新研究显示,一种成分与人类母乳相似的转基因羊乳能大幅减少幼猪大肠内有害细菌的数量。这种羊乳含有母乳中帮助婴儿抵御大肠杆菌的蛋白质,科学家希望它能够改善发展中国家儿童的健康水平。

1999年,科学家就培育出转基因山羊,使其乳腺细胞中含有较多的溶菌酶等蛋白质。此后在培养皿中进行的研究发现,通过这种手段得到的转基因羊乳能够抑制生物组织中细菌的生长。但它在活的动物体内是否有同样效果,还需要进一步验证。