

乳酸菌基因组学与基因工程的研究新进展

薛迎迎, 杨汝德

(华南理工大学生物科学与工程学院, 广东 广州 510006)

摘要: 本文对乳酸菌基因组学的研究新进展, 包括乳酸菌基因组测序、基因组的进化和基因转移、乳酸菌重要的功能基因等以及乳酸菌基因工程的研究新进展, 包括乳酸菌食品级表达载体、食品级载体选择标记、活体疫苗载体等方面进行了概述。

关键词: 乳酸菌; 基因组学; 基因工程

中图分类号: Q939.1; 文献标识码: A; 文章编号: 1673-9078(2008)06-0617-04

Advances in Genomics and Genetic Engineering of Lactic Acid Bacteria

XUE Ying-ying, YANG Ru-de

(College of Bioscience and Bioengineering, South China University of Technology, Guangzhou 510006, China)

Abstract: In this paper, research advances in genomics of lactic acid bacteria were reviewed, including genome sequencing, evolution, gene transfer and functional gene. The recent advances in genetic engineering of lactic acid bacteria were also introduced, including food-grade expression vector, selective marker, and live vaccine vector.

Key words: lactic acid bacteria; genomics; genetic engineering

乳酸菌 (*lactic acid bacteria*, LAB), 是一类能利用碳水化合物产生大量乳酸的革兰氏阳性细菌的通称, 广泛存在于自然界中, 被公认为是安全的食品级微生物。目前在自然界已发现的乳酸细菌在细菌分类学上划分为23个属, 包括乳杆菌属、乳球菌属、肠球菌属、双歧杆菌属、片球菌属、链球菌属等。大量事实证明, 乳酸菌具有提高食品营养价值, 调节肠道菌群, 降低胆固醇水平, 缓解乳糖不耐症, 增强免疫, 抗肿瘤, 抗突变等作用^[1]。

随着乳酸菌在食品工业、保健品及医药业的广泛应用, 乳酸菌的分子生物学研究也在不断深入。广大微生物学家、遗传学家和微生物生态学家等, 致力于通过对乳酸菌基因组学的研究及应用基因工程技术, 改良现有的乳酸菌菌种, 从而选育出集多种优势基因的对社会带来更大效益的乳酸菌新菌种。

1 乳酸菌基因组学的研究

1.1 乳酸菌基因组测序

到目前为止, 有 20 种乳酸菌基因组的测序结果已被公布^[2~11]。根据相关文献, 可以看出, 乳酸菌基因组在一个特定的范围内变化, 从 1.8~2.6 Mb 不等, 但是植物乳杆菌 (*Lactobacillus plantarum*) 的基因组相对较大, 为 3.3 Mb。双歧杆菌和乳酸杆菌这两种革

兰阳性菌分别具有较高和较低的 GC 含量, 其中长双歧杆菌 (*Bifidobacterium longum*) 的 GC 含量高达 60.1%, 而乳酸杆菌从 30.9%~50%不等^[12]。目前对于乳酸菌全基因组的研究提示, 由于对丰富的营养环境更易适应, 促进了一些菌种基因组的简化和退化, 因此很多乳酸菌的生物合成能力下降了。

1.2 基因组的进化和基因转移

已报道的 2 株嗜热链球菌 (*Streptococcus thermophilus*) 基因组都发生了显著的基因衰变 (10%的假基因), 尤其是与糖代谢、摄取和发酵相关的基因更证实了基因组的衰退^[13]。大多数链球菌与致病力相关的基因, 在乳品链球菌中都是失活或缺失的, 例如嗜热链球菌的进化主要是通过功能缺失来实现的, 这显著地反映了乳酸菌可大大地引起致病潜力的减弱。

从乳酸乳球菌 (*Lactococcus lactis*) 的一些菌株中, 已获得编码能够在牛奶中生长和竞争的特定功能的质粒 DNA 片段, 这些特定功能包括乳糖代谢、蛋白水解、细菌素产生、表面多糖产生、噬菌体抗性^[14]等。植物乳杆菌中编码糖转运、代谢和表面多糖合成酶的基因, 也是通过基因的水平转移获得的, 这些基因可以增强它们对各种环境的适应性。

在嗜热链球菌 CNRZ 368 的基因组中, 有一个大小为 32.5 kb 的基因位点 (称为 EPS 位点), 包含了 25 个开放阅读框 ORF 和 7 个插入片段, 其中 17 个 ORF 编码的蛋白与多糖的合成有关。在这个位点靠近左端的一个

收稿日期: 2007-12-30

作者简介: 薛迎迎, 女, 硕士研究生。研究方向: 工业微生物

大小为13.6 kb、包含7个插入序列和2个epsORF的片段,与乳酸乳球菌NIZOB40的epsL和orfY基因几乎完全一致。提示这个13.6 kb的片段,有可能是通过水平转移的方式,从乳酸乳球菌中获得的^[15]。有证据显示,基因的水平转移一般发生在复制起始点周围区域,该区域具有较低的GC含量和较高的可变性。

1.3 乳酸菌的重要功能基因

基因组分析显示乳酸杆菌、双歧杆菌、链球菌及乳球菌的基因组中,有很多编码酵解糖类物质的基因,满足了乳酸菌主要靠糖酵解来获取能量的要求。如Kleerebezem等^[16]发现植物乳杆菌具有大量可以编码磷酸烯醇式丙酮酸依赖的磷酸转移酶(PTS)以及其它糖转运系统相关酶类的基因,其中菌株WCFS1基因组中含有5个完整的PTS糖转运系统,编码了所有糖酵解途径和磷酸乙酰醇途径的相关酶系。这一基因组的特点反映了植物乳杆菌可以适应含有各种糖源的生长环境。

TUOMOLA 等^[17]发现在格氏乳杆菌(*Lactobacillus gasseri*)、嗜酸乳杆菌(*Lactobacillus acidophilus*)、约氏乳杆菌(*Lactobacillus johnsonii*)和植物乳杆菌中,都可以找到多拷贝的编码粘膜结合蛋白(Mub)的基因。Mub是最大的细菌表面蛋白之一,主要与菌的粘附性能相关^[18]。目前在许多肠道乳酸菌的基因组中,都已经发现编码这种Mub蛋白的基因,这些蛋白的大小从1000到4300个氨基酸不等,一般代表了基因组中最大的ORF。如在约氏乳杆菌基因组中发现了一个含有编码Mub基因的区域,Mub基因位于含9个基因的操纵子中,这个操纵子包含一个编码与链球菌粘附素同源且丝氨酸富集的蛋白基因。

几乎每种乳酸菌都可以产生细菌素,而且种类多样。这些细菌素无毒副作用,主要对革兰氏阳性菌有抑制作用。乳酸链球菌素Nisin是乳酸乳球菌产生的一种细菌素,例如在乳酸乳球菌6F3中,发现了编码nisin合成酶的完整基因簇,大小为15 kb,包含11个基因:nisA, nisB, nisC, nisT, nisI, nisP, nisR, nisK, nisF, nisE 和nisG。Nisin首先由nisA编码,是包含有57个氨基酸残基的前肽,而后通过nisP编码一个34个氨基酸的前肽,将nisin的前体在一个特定的剪切位点进行切割。一系列的转录后修饰在产生成熟产物中起作用,包括nisB和nisC的作用,而nisin成熟产物的分泌也需要nisT所编码的一个ABC转运子来参与。此外,还有报道nisI, nisF, nisE和nisG编码的产物还参与了乳酸乳球菌的免疫反应。

2 乳酸菌基因工程的研究

早在20世纪90年代,国内外学者就开始致力于乳酸菌分子生物学及作用机制的研究。以乳酸菌作为基因工程受体菌,应用基因工程技术有目的、有选择地表达有价值的酶、抑菌素、次级代谢产物等,以便更好地控制其参与食品加工、医疗保健的过程。其中最具有前景的应用就是将其作为安全的疫苗载体,分泌表达多种治疗性蛋白和免疫抗原,刺激机体的免疫应答。

2.1 乳酸菌食品级表达载体

利用乳酸菌作为表达系统最吸引人的是:乳酸菌安全、不含内毒素,表达的外源蛋白无需经过纯化,可以直接连同菌体一起服用。由于乳酸菌应用的特殊性,这就要求其载体系统必须具有十分安全的特性。大部分乳酸菌含有丰富的质粒,科学工作者已开发出乳酸菌自身质粒,作为基因表达和蛋白分泌的载体,乳酸菌的各种食品级表达体系不断被组建。

相关的研究表明,乳酸菌(LAB)对启动子的要求比大肠杆菌(*E.coli*)要严格得多,故在LAB表达系统中,很少使用外源启动子。目前已成功用于表达外源蛋白的启动子有lacA, lacR, lacF, T7, xylA, lacS, nisA/nisZ, nisF, usp等,这些启动子的诱导物都是食品级的,如乳糖、木糖和Nisin等,易于组成食品级乳酸菌表达系统,提高转基因LAB工程菌株的安全性。

在LAB表达系统中,表达载体上的复制子大多为repB,该基因广泛存在于乳酸菌的多种质粒上,全长1206 bp,编码一个柠檬酸复制子复制蛋白。repB的3'末端可加入多个酶切位点,用于外源基因插入到载体上。孙强正等^[19]构建了乳酸乳球菌食品级载体pSH91,该载体包括3个部分:乳酸乳球菌MG1363的thyA基因选择标记、乳酸乳球菌亚种cremoris Wg2隐性质粒pWV01的复制子(RepA、ORFC和ori⁺)、来自pUC18质粒的全部多克隆位点,并利用其表达了锰超氧化物歧化酶。

2.2 乳酸菌食品级载体选择标记

传统的表达载体都以抗生素抗性基因作为选择标记,但是作为食品级载体,这是不允许的。非抗生素抗性选择标记,是乳酸菌基因工程菌株构建中必不可少的重要组成部分,也是目前乳酸菌基因工程研究的前沿和热点。这类选择标记主要有:

2.2.1 显性选择标记

在乳酸菌基因工程技术中,主要涉及细菌素类、重金属抗性、热激蛋白三大类显性选择标记。在众多

细菌素中,来源于乳酸乳球菌的nisin抗性标记(nis^r)是第一种细菌素抗性选择标记,是研究得最深入的一种。含有nisin抗性基因nis^r或免疫性基因nisI的菌株,能在一定浓度的nisin基质上生长。Takala等^[20]以nisI作为选择性标记构建质粒pLEB590,并在nisI之前插入组成型启动子P₄₅来控制nisI的表达。在nisin的选择压力下,pLEB590可以在乳酸乳球菌MG1614中稳定存在。Liu等将编码镉抗性的乳酸乳球菌质粒pND302和乳链菌肽抗性基因组成表达载体用于*Lactococcus lactis*中,同时pND302本身也可直接用作乳球菌的食品级克隆载体。

2.2.2 互补型选择标记

互补选择标记是利用质粒选择标记补充宿主染色体中的缺失突变,从而恢复宿主原来的某种特性,并根据这一特性进行选择。与乳糖代谢相关的*lacF*及*lacG*均可作为选择标记,配合相应的缺陷型菌株应用。Takala等^[21]利用此选择标记构建了用于干酪乳杆菌(*Lactobacillus casei*)的非抗生素抗性克隆载体pLEB600,此载体含有来源于乳酸乳球菌的复制子和来源于干酪乳杆菌的*lacG*基因,并在*lacG*前加入组成型启动子*pepR*控制表达。与此同时,使宿主菌的*lacG*基因中141bp的区段缺失,突变为*Lac*⁻型,转入互补质粒pLEB600的转化子能够利用乳糖生长繁殖,从而达到筛选的目的,并实现了外源基因在干酪乳杆菌中的表达。

2.2.3 双质粒选择标记

双质粒选择标记系统构建的筛选过程新颖独特,为整个选择标记系统的发展开辟了新的途径及思路。Emond等^[22]成功地构建了双质粒选择标记系统,首先将带有目的基因的*RepB*⁺型质粒载体pVEC1上的抗生素抗性标记删除,同时另一*RepB*⁻型辅助型质粒pCOM1仍带有红霉素抗性选择标记。将两种质粒共转化一株菌中,通过红霉素琼脂培养基筛选。然后再以无抗生素的培养基培养,使带有红霉素抗性基因的pCOM1质粒丢失,从而使整个系统中的基因元件仍保持非抗生素抗性标准。

2.3 基因工程活体疫苗载体

利用一些乳酸菌在胃肠道、粘膜部位粘附存活且无病原性的特点,开展活菌口服疫苗的研究,受到了广泛的重视。多个研究表明乳酸菌是良好的口服疫苗载体,可有效地引起机体的免疫应答和免疫耐受。Norton等研究发现,给小鼠口服免疫表达破伤风毒素片段C(TTFC)的重组乳酸球菌后,IgG和IgA水平显著提高,证实了乳酸球菌可有效提高黏膜免疫系统提

呈抗原及诱导特异性免疫反应的能力。MICHAEL等^[23]将疟原虫Glurp-Msp3杂合蛋白在乳酸球菌中进行了有效表达。RAHAAR等^[24]将Acma蛋白中一段255 bp的具有膜结合特性的区域与肠病毒EV71的VP1蛋白A1和A3区域在乳酸球菌中进行融合表达,结果表明外源蛋白在宿主细胞膜上能准确稳定表达。在乳酸球菌中表达外源抗原的工具和条件已经相对成熟,为进一步开发食品级的新型活黏膜疫苗提供了基础。

3 展望

乳酸菌表达系统的组建和完善,对于深入了解乳酸菌的基因功能和表达调控的规律提供了良好的材料。乳酸菌是肠道中的正常益生菌,通过改造乳酸菌使其更适合人体的需要,再制成微生态制剂和活菌疫苗等保健品或药品,将为人类健康做出更大贡献。今后以转基因乳酸菌菌株作为活疫苗,是乳酸菌分子生物学研究的一个重要方向,而对于控制抗原基因表达的有效性和持久性方法也需要进一步发展。可以预期,食品级的乳酸菌工程菌在食品行业、生物制药等领域,具有潜在的巨大应用前景和商业价值。

参考文献

- [1] 栾金水.乳酸菌的研究应用进展[J].江苏调味副食品.2004,21(1):8-11
- [2] Altermann, E. et al. Complete genome sequence of the probiotic lactic acid bacterium *Lactobacillus acidophilus* NCFM[J]. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 2005,102:3906-3912
- [3] Bolotin, A. et al. Complete sequence and comparative genome analysis of the dairy bacterium *Streptococcus thermophilus*[J]. Nat. Biotechnol. 2004,22: 1554-1558
- [4] Bolotin, A. et al. The complete genome sequence of the lactic acid bacterium *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* IL1403 [J]. Genome Res. 2001,11: 731-753
- [5] Chaillou, S. et al. The complete genome sequence of the meatborne lactic acid bacterium *Lactobacillus sakei* 23K[J]. Nat. Biotechnol. 2005,23: 1527-1533
- [6] Claesson, M.J. et al. Multireplicon genome architecture of *Lactobacillus salivarius*[J]. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 2006, 103: 6718-6723
- [7] Kleerebezem, M. et al. Complete genome sequence of *Lactobacillus plantarum* WCFS1[J]. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 2003, 100:1990-1995
- [8] Makarova, K. et al. Comparative genomics of the lactic acid

- bacteria[J]. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 2006, 103: 15611–15616
- [9] Pridmore, R.D. et al. The genome sequence of the probiotic-intestinal bacterium *Lactobacillus johnsonii* NCC 533[J]. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 2004, 101: 2512–2517
- [10] van de Guchte, M. et al. The complete genome sequence of *Lactobacillus bulgaricus* reveals extensive and ongoing reductive evolution[J]. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 2006, 103: 9274–9279
- [11] Wegmann, U. et al. Complete genome sequence of the prototype lactic acid bacterium *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* MG1363. [J]. Bacteriol., 2007, 189: 3256–3270
- [12] TODD KLAENHAMMERL. Discovering lactic acid bacteria by genomics[J]. Antonie van Leeuwenhoek, 2002, 82: 29–58
- [13] BOLOTIN A. Complete sequence and comparative genome analysis of the dairy bacterium *Streptococcus thermophilus* [J]. Nat Biotechnol, 2004, 22(12): 1554–1558
- [14] KOK J. Comparative and functional genomics of lactococci[J]. FEMS Microbiol Rev, 2005, 29(3): 411–433
- [15] NGA B H. Genome analysis of lactic acid bacteria in food fermentations and biotechnological applications[J]. Curr Opin Microbiol, 2005, 8(3): 307–312
- [16] Kleerebezem M, Boekhorst J, Van KR.. Complete genome sequence of *Lactobacillus plantarum* WCFS1[J]. Proc Natl Acad Sci. 2003, 100(4): 1990–1995
- [17] TUOMOLA E M. Chemical, physical and enzymatic pretreatments of probiotic lactobacilli alter their adhesion to human intestinal mucus glycoproteins[J]. Int J Food Microbiol. 2000, 60(1): 75–81
- [18] ROOS S. A high-molecular-mass cell-surface Drotein from *Lactobacillus reuteri* 1063 adheres to mucus components[J]. Microbiology, 2002, 148: 433–442
- [19] 孙强正,等. 乳酸乳球菌食品级载体的构建及Mn-SOD基因的克隆和表达[J]. 中国人兽共患病学报. 2006, 22(6): 498–501
- [20] Takala T M, Saris P E. A food2grade cloning vector for lactic acid bacteria based on the nisin immunity gene *nisI* [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2002, 59: 467–471
- [21] Takala T M, Saris P E, Tynkkynen S S. Food-grade hostPvector expression system for *Lactobacillus casei* based on complementation of plasmid-associated phosphor- β -galactosidase gene *lacG*[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2003, 60(5): 564–570
- [22] Emond E, Lavallee R, Drolet G, et al. Molecular characterization of a theta replication plasmid and its use for development of a two-component food-grade cloning system for *Lactococcus lactis*[J]. Appl Environ Microbiol, 2001, 67(4): 1700–1709
- [23] MICHAEL THEISEN, et al. A plasmodium falciparum GLURP-MSP3 chimeric protein; expression in *Lactococcus lactis*, immunogenicity and induction of biologically active antibodies[J]. Vaccine, 2004, 22(9–10): 1188–1198
- [24] RAHAAR, VARMANR, YUSOFFK, et al. Cell display system for *Lactococcus lactis*: a novel development for oral vaccine [J]. Appl. Microbiol Biotechnol, 2005, (6): 1

益生菌可提高猪肉制品的安全性

英国的研究者日前称, 益生菌可以降低猪感染沙门氏菌的风险, 这样有可能会使人们获得更为安全的猪肉产品, 尤其是在目前欧盟已经颁布法令禁止给牲畜使用抗生素的情况下。

益生菌一直被称为“好细菌”, 它天然存在与人和某些动物的肠道中, 它能够增强肌体的免疫力, 能够抑制某些“坏”细菌的作用, 防治患病。在食品工业中, 当前人们对益生菌的利用主要是将其添加到食品中(尤其是乳制品)。主要目的是, 通过食用含有益生菌的食品, 并采用相关的保护措施使益生菌安全抵达肠道, 提高肠道中的好的细菌的数量。

然而, 最近的研究通过给猪食用益生菌, 降低了沙门氏菌的感染率, 这样不仅为益生菌的供应商提供了新的销售方向, 同时也增强了猪肉的安全性, 也降低了使消费者因此受沙门氏菌感染的风险。而同时, 欧盟已经颁布法令, 禁止给牲畜食用抗生素, 降低相关牲畜制品的抗生素水平, 此项研究将为牲畜养殖和加工者提供帮助。

位于 Weybridge 的英国兽医实验局的研究者日前公布了这个消息。研究者通过一个猪肠道的 3D 模型, 进行此项实验。本研究中采用了美国太空总署的一项技术, 能够使研究者在 3D 模型中培育猪肠道的片段, 这个 3D 模型能够完全模拟猪肠道内部的真实环境。

(新闻来源: 中国食品科技学会)