

植物乳杆菌降胆固醇 Lp10 菌株的 *rhaD* 基因敲除株的构建

郭天芬¹, 林俊芳^{1,2}, 郭丽琼^{1,2}, 叶志伟^{1,2}, 魏韬^{1,2}, 许之恒¹

(1. 华南农业大学食品学院生物工程系, 食品生物技术研究, 广东广州 510642)

(2. 广东省微生物生态制剂工程技术研究中心, 广东广州 510642)

摘要: 以转录组数据为依据推测植物乳杆菌 (*Lactobacillus plantarum*) 中 *rhaD* 基因参与胞外多糖 (exopolysaccharide, EPS) 合成代谢中的鼠李糖代谢过程, 从而通过调节胞外多糖合成并利用其吸附作用达到降胆固醇效果。为了进一步验证 *rhaD* 基因的功能, 本研究利用同源重组技术, 构建 *rhaD* 基因敲除载体, 采用电击转化方法将构建的敲除载体导入植物乳杆菌 Lp10 菌株感受态细胞, 并在抗性平板上筛选转化子, 以转化子的基因组 DNA 为模板进行 PCR 及测序鉴定, 再利用邻苯二甲醛法测定突变株与初始菌株的降胆固醇能力。结果表明, 敲除载体 pNZ5319-*rhaD* 被成功构建, 测序结果显示 *rhaD* 基因被成功敲除; 敲除菌株的降胆固醇能力略有上升。本研究结果不仅为植物乳杆菌基因敲除载体的构建提供了实验技术支持, 同时为植物乳杆菌降胆固醇相关功能基因的验证分析奠定了理论依据。

关键词: 植物乳杆菌; *rhaD* 基因; 同源重组; 基因敲除

文章编号: 1673-9078(2018)11-28-34

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2018.11.005

Construction of an *rhaD* Gene Knockout Mutant of Cholesterol-lowering *Lactobacillus plantarum* Lp10

GUO Tian-Fen¹, LIN Jun-Fang^{1,2}, GUO Li-Qiong^{1,2}, YE Zhi-Wei^{1,2}, WEI Tao^{1,2}, XU Zhi-Heng¹

(1. College of Food Science, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China) (2. Research Center for Micro-Ecological Agent Engineering and Technology of Guangdong Province, Guangzhou 510642, China)

Abstract: Based on the analysis of transcriptome data, it was speculated that *rhaD* gene in *Lactobacillus plantarum* was involved in metabolism of rhamnose metabolism responsible for the biosynthesis of exopolysaccharide (EPS). As a result, the cholesterol-lowering effect of *L. plantarum* is realized by the adsorption of EPS whose biosynthesis was regulated by the expression of *rhaD* gene. In order to verify the function of *rhaD* gene, *rhaD* gene knockout vector of *L. plantarum* Lp10 was constructed by homologous recombination technology, the knockout vector pNZ5319-*rhaD* was transformed into *L. plantarum* Lp10 competent cells by the method of electroporation. Resistance plate was used to screen the transformants followed by the performances of PCR identification and DNA sequencing using the genome DNA as template. Results showed that the knockout vector pNZ5319-*rhaD* was constructed successfully, and the DNA sequencing results indicated that *rhaD* gene was successfully knocked out, and the cholesterol lowering ability of knockout strain increased slightly. This research not only provides technical support for the construction of *L. plantarum* gene knockout vectors, but also lays the theoretical foundation for the subsequent functional verification of genes related to the cholesterol-lowering effects of *L. plantarum*.

Key words: *Lactobacillus plantarum*; *rhaD* gene; homologous recombination; gene knockout

血清中高浓度的胆固醇是诱发高血压、冠心病

收稿日期: 2018-05-21

基金项目: 广东省自然科学基金博士启动项目(2015A030310225); 广东省自然科学基金项目(2015A030313425)

作者简介: 郭天芬(1993-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 微生物学

通讯作者: 郭丽琼(1963-), 女, 博士, 教授, 研究方向: 天然产物与微生物工程; 叶志伟(1984-), 男, 博士, 助理研究员, 研究方向: 天然产物与微生物工程

等众多心血管疾病的重要因素^[1], 控制血清胆固醇水平已经受到越来越广泛的关注。传统药物治疗存在药费昂贵, 毒副作用较大、治疗效果不明显等缺陷^[2]。Mathara 等^[3]从传统发酵乳中分离出了 23 株乳酸菌, 分析显示部分乳杆菌具有降胆固醇的能力。益生菌对降胆固醇的治疗效果明显, 对高血脂的防治有积极作用, 并有望替代药物治疗法成为了更安全、更有效的降胆固醇方法^[4,5]。

植物乳杆菌 (*Lactobacillus plantarum*) 是具有降胆固醇^[6]、改善免疫功能^[7]，维持肠道菌群平衡^[8]，抑制肿瘤细胞的形成^[9]等益生功能的革兰氏阳性细菌。目前，植物乳杆菌降胆固醇的作用机理主要有以下几种观点：(1) 细胞直接吸收胆固醇；(2) 胆盐水解酶 (bile salt hydrolase, BSH) 作用；(3) 胞外多糖 (exopolysaccharide, EPS) 的吸附作用；(4) 鉴于植物乳杆菌降低胆固醇效果受多种因素的影响，还存在一些其他理论^[10]。

植物乳杆菌的次级代谢产物EPS种类繁多，其组分包括果糖、葡萄糖、甘露糖、半乳糖和鼠李糖等。L-鼠李糖-1-磷酸醛缩酶 (L-rhamnulose-1-phosphate aldolase, RhaD) 按照供体专一性进行分类，属于磷酸二羟基丙酮 (DHAP) 依赖性醛缩酶，在植物乳杆菌中参与L-鼠李糖的代谢。首先，L-鼠李糖在L-鼠李糖异构酶的催化下生成L-鼠李糖，然后经过L-鼠李糖激酶的作用生成L-鼠李糖-1-磷酸，最后经RhaD裂解为L-乳醛和磷酸甘油酮，进入糖酵解循环^[11,12]。研究组前期的转录组分析结果表明，在植物乳杆菌Lp10菌株降胆固醇过程中*rhaD*基因表现为转录水平下调，推测植物乳杆菌在添加胆固醇环境下主要是通过产生EPS对胆固醇进行吸附，而此过程中植物乳杆菌为提高EPS的合成量以下调*rhaD*基因的表达量来抑制了L-鼠李糖的代谢。为了深入分析*rhaD*基因与植物乳杆菌Lp10菌株降胆固醇功能的关系，本研究利用同源重组原理敲除*rhaD*基因，并比较初始菌株与突变菌株的降胆固醇能力。同源重组技术在乳酸菌中已经应用广泛，例如李娅妮等^[13]在pUC18敲除载体的基础上成功构建了基因敲除载体pUC18Δ*lai*并实现对植物乳杆菌的亚油酸异构酶 (Linoleic isomerase, *lai*) 基因的敲除；岳云春等^[14]利用同源重组法构建质粒pKLKRT，并电转化于副干酪乳杆菌 (*Lactobacillus paracasei*) 感受态细胞，

成功构建组氨酸蛋白激酶基因缺失突变株。

植物乳杆菌Lp10菌株是本研究组前期从海带中分离出来的一株具有高降胆固醇能力的乳酸菌^[15]。本实验选用pNZ5319作为敲除质粒，构建*rhaD*基因敲除载体的构建及转化体系，为植物乳杆菌降胆固醇机制及其功能基因的分析研究奠定实验基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株与质粒

植物乳杆菌 (*Lactobacillus plantarum*) Lp10菌株由本研究组从海带中分离纯化并保存；大肠杆菌 (*Escherichia coli*) DH5α购买于大连TaKaRa公司；质粒pNZ5319由南开大学乔明强教授惠赠。

1.1.2 主要试剂和培养基

细菌基因组 DNA 提取试剂盒购买于 TIANGEN 公司；琼脂糖凝胶 DNA 纯化回收试剂盒、质粒小提试剂盒购买于 MAGEN 公司；Ex Taq 酶购买于大连 Takara 公司；限制性内切酶 *Xho*I、*Pme* I、*Sac* I、*Bgl* II 购买于 Thermo Fisher Scientific 公司；氯霉素 (chloramphenicol, *cm*) 购于 Solarbio 公司；其余试剂均为分析纯。

MRS 培养基 (1 L)：蛋白胨 10 g、葡萄糖 20 g、牛肉膏 10 g、酵母粉 5 g、磷酸氢二钾 2 g、乙酸钠 5 g、柠檬酸氢二铵 2 g、吐温-80 1 mL、硫酸镁 0.58 g、硫酸锰 0.25 g、pH 6.8、琼脂 20 g (固体培养基添加)。

LB 培养基 (1 L)：胰蛋白胨 10 g、酵母提取物 5 g、NaCl 10 g、pH 7.0、琼脂粉 20 g (固体培养基添加)。

恢复培养基：含 0.3 mol/L 蔗糖、20 mmol/L MgCl₂、2 mmol/L CaCl₂ 的 MRS 培养基。

表 1 基因扩增的引物序列

Table 1 DNA sequences of primers for gene amplification

名称	序列 (5'-3')	目的片段
<i>rhaD</i> -up-F	GGACCGATAACGCGCTCGAGCTGCAGCACTATTCGAATCTG	上游同源臂 <i>rhaD</i> -up (1200 bp)
<i>rhaD</i> -up-R	GTAGATTTAAATTGTTTAAACGTTTGGCTGAGAAGAGGGTTATCATG	
<i>rhaD</i> -down-F	GTACAGCCCGGGCATGAGCTCTGCCAACCTTTTCTTGTTAATTTTTG	下游同源臂 <i>rhaD</i> -down (1200 bp)
<i>rhaD</i> -down-R	CCCGTCAGCTTTAGAGATCTTCGGGTGATTACCCAGGTATGCGC	
<i>cm</i> -F	ATGAACTTTAATAAAATTGATTTAGACAATTG	<i>cm</i> 基因 (651 bp)
<i>cm</i> -R	TTATAAAAGCCAGTCATTAGGCCTATC	
<i>rhaD</i> -F	ATGATTATGACAGACTTTATTGATTACAC	<i>rhaD</i> 基因 (852 bp)
<i>rhaD</i> -R	TTAGTCAACCGTTGCTCCG	

1.1.3 仪器

SPX-158L 生化培养箱宁波新芝生物科技股份有限公司；

FRESC21 微量台式冷冻离心机 Thermo Fisher Scientific 公司；YXQ50 蒸汽灭菌锅西安太康生物科技

公司; BIO-RADC1000 梯度 PCR 仪和 Gel DocTMXR+ 凝胶成像系统 BIO-RAD 公司; SKJH-1109 超净工作台上海苏坤实业公司; EPS-300 电泳仪上海天能公司。

1.1.4 引物

本文所用引物如表 1 所示。

1.2 实验方法

1.2.1 *rhaD* 基因同源臂的克隆及纯化

根据 GenBank 中已登录的植物乳杆菌 *rhaD* 基因两侧序列, 设计引物 *rhaD*-up-F/*rhaD*-up-R、*rhaD*-down-F/*rhaD*-down-R 分别扩增长约为 1200 bp 的 *rhaD* 基因上游同源臂 (*rhaD*-up) 和下游同源臂 (*rhaD*-down), 并在 *rhaD*-up 片段引入限制性酶切位点 *Xho* I 和 *Pme* I, *rhaD*-down 片段引入限制性酶切位点 *Sac* I、*Bgl* II。植物乳杆菌 Lp10 菌株基因组 DNA 按照 TIANGEN 细菌基因组 DNA 提取试剂盒说明书步骤提取。PCR 反应体系 (50 μ L): 模板 DNA (25 ng/ μ L) 2 μ L, 10 \times Ex Taq buffer (20 mM) 5 μ L, dNTPs (2.5 mM) 4 μ L, 上下游引物 (20 μ M) 各 1 μ L, Ex Taq 酶 (5 U/ μ L) 0.5 μ L, ddH₂O 补足 50 μ L。PCR 条件为: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 65 $^{\circ}$ C (*rhaD*-up) 或 68 $^{\circ}$ C (*rhaD*-down) 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 72 s, 34 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min, 4 $^{\circ}$ C 保存。PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳后, 切下目的条带并使用琼脂糖凝胶 DNA 纯化回收试剂盒回收目的片段并进行测序比对分析。

1.2.2 *rhaD* 基因敲除质粒的构建

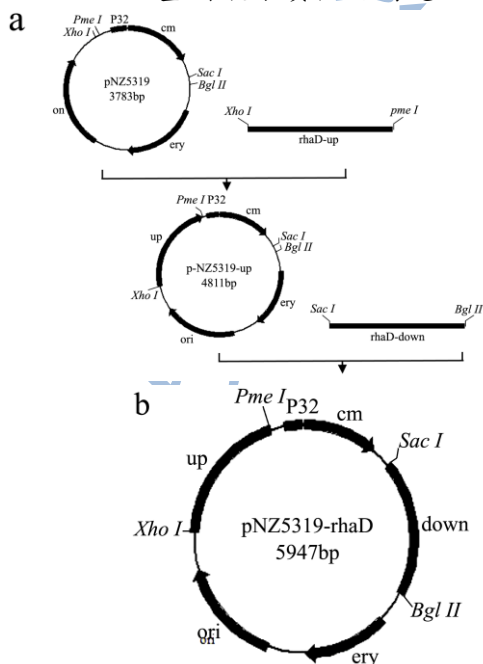


图 1 敲除载体 pNZ5319-rhaD 构建路线

Fig.1 Structure route of knockout vector pNZ5319-rhaD

植物乳杆菌 *rhaD* 基因的 pNZ5319-*rhaD* 敲除质粒的构建路线如图 1 所示。利用限制性内切酶 *Xho* I 和 *Pme* I 分别对 pNZ5319 质粒和 *rhaD*-up 进行双酶切并进行琼脂糖电泳回收, 利用 abm 必克隆试剂盒将双酶切处理后的 pNZ5319 质粒和 *rhaD*-up 片段进行连接处理, 转化 DH5 α 感受态细胞并于终浓度为 15 μ L/mL 氯霉素的 LB 固体培养基过夜培养。

挑取转化子并扩大培养后, 提取质粒进行 *Xho* I 和 *Pme* I 双酶切鉴定和测序鉴定, 将正确的重组质粒命名为 pNZ5319-up。

分别将 pNZ5319-up 质粒和下游同源臂 *rhaD*-down 片段进行 *Sac* I 和 *Bgl* II 双酶切和回收处理。将双酶切后的 pNZ5319-up 质粒和 *rhaD*-down 片段连接并转化 *E. coli* DH5 α 感受态细胞。对重组质粒进行酶切鉴定和测序鉴定 (参照 1.2.2.1), 将正确的重组质粒命名为 pNZ5319-*rhaD*。

1.2.3 植物乳杆菌感受态细胞的制备

植物乳杆菌 Lp10 菌株按 1% 接种量接种于 100 mL 含 1% 甘氨酸的 MRS 培养基, 37 $^{\circ}$ C, 静置培养至 OD₆₀₀ 约 0.8 (6~7 h); 冰浴 15 min, 使菌停止生长; 于 4 $^{\circ}$ C, 8000 g 下离心 5 min 后收集菌体; 用 100 mL 冰浴的 30% PEG4000 洗涤 3 次, 离心条件同上; 用 1 mL 冰浴的 30% PEG4000 重悬菌体, 分装每管 100 μ L, -80 $^{\circ}$ C 保存。

1.2.4 电转化

将 20 μ L 重组质粒 (浓度 537.8 ng/ μ L) 与 100 μ L 植物乳杆菌 Lp10 菌株感受态细胞在冰浴条件下混匀, 转移至电转杯中, 冰浴 10 min。在电阻 200 Ω , 电容值 25 μ F, 电压 2.5 kV 条件下进行电击, 电击后迅速加入 800 μ L 恢复培养基, 混合均匀后 37 $^{\circ}$ C 静置培养 3 h 并涂布于含终浓度为 5 μ g/mg 氯霉素的 MRS 培养基, 于 37 $^{\circ}$ C 培养 24~48 h。

1.2.5 植物乳杆菌 Lp10 *rhaD* 基因敲除突变株的鉴定

利用 TIANGEN 细菌基因组 DNA 提取试剂盒 (离心柱) 提取植物乳杆菌 Lp10 初始菌株和重组转化子的基因组 DNA。以重组转化子和初始菌株基因组 DNA 为模板, 分别扩增上游同源臂 *rhaD*-up、下游同源臂 *rhaD*-down、*cm* 基因和 *rhaD* 基因等 DNA 片段。

1.2.6 植物乳杆菌 Lp10 *rhaD* 基因敲除突变株的生长分析

将植物乳杆菌突变株与初始菌株按接种量 1% 接种于 MRS 液体培养基中, 37 $^{\circ}$ C 静置培养, 以 0 h 为起点, 每隔 2 h 取一次样并测定 OD₆₀₀, 测定到 24 h, 通过软件 Origin 绘制生长曲线, 观察两株菌的生长情

况。

1.2.7 植物乳杆菌 Lp10 *rhaD* 基因敲除突变株的降胆固醇能力测定

将植物乳杆菌突变株与初始菌株分别接种于加有 1%胆固醇溶液的 MRS 培养基中, 37 °C 培养 20 h。

按照邻苯二甲醛法^[15]对初始菌株和突变菌株进行降胆固醇能力的测定, 每个样品进行 3 次重复进行试验。

1.2.8 数据统计分析

实验中每个数据重复三次, 结果表示为平均数±标准差。采用 Origin 8.5 软件作图, SPSS 17.0 进行显著性分析。

2 结果与分析

2.1 *rhaD* 基因同源臂的克隆及纯化

以植物乳杆菌 Lp10 菌株基因组 DNA 为模板, 分别扩增 *rhaD* 基因上下游同源臂, 将 PCR 产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳, 发现在 1200 bp 处都有明显的单一条带, 与预计大小一致 (图 2)。目的条带的测序鉴定表明 *rhaD* 基因上下游同源臂被成功克隆。

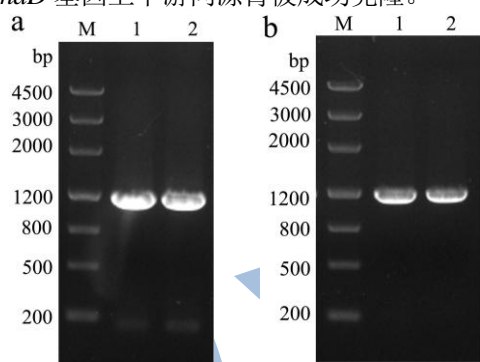


图 2 *rhaD* 基因同源臂的 PCR 扩增

Fig.2 PCR amplification for homologous arms of *rhaD* gene

注: (a) 上游同源臂 *rhaD*-up 的 PCR 扩增 (M: DNA marker; 1 和 2: 上游同源臂 *rhaD*-up 的 PCR 扩增电泳结果); (b) 下游同源臂 *rhaD*-down 的 PCR 扩增 (M: DNA marker; 1 和 2: 下游同源臂 *rhaD*-down 的 PCR 扩增电泳结果)。

2.2 同源臂与 pNZ5319 载体的连接及转化

对上游同源臂 *rhaD*-up 片段与敲除载体 pNZ5319 连接所得的 pNZ5319-up 转化子进行菌液 PCR 鉴定及 *Xho* I 和 *Pme* I 双酶切鉴定。PCR 凝胶电泳结果显示在 1200 bp 处有一清晰条带, 与目的片段 *rhaD*-up 大小相符 (图 3a); 双酶切 pNZ5319-up 质粒, 得到 2 个片段, 大小与 pNZ5319 质粒和 *rhaD*-up 相符 (图 3b)。同理, 得到的 pNZ5319-*rhaD* 转化子进行菌液 PCR 鉴定及

Sac I 和 *Bgl* II 双酶切鉴定 (图 3c 和 3d)。DNA 测序结果进一步验证敲除载体 pNZ5319-*rhaD* 被成功构建。

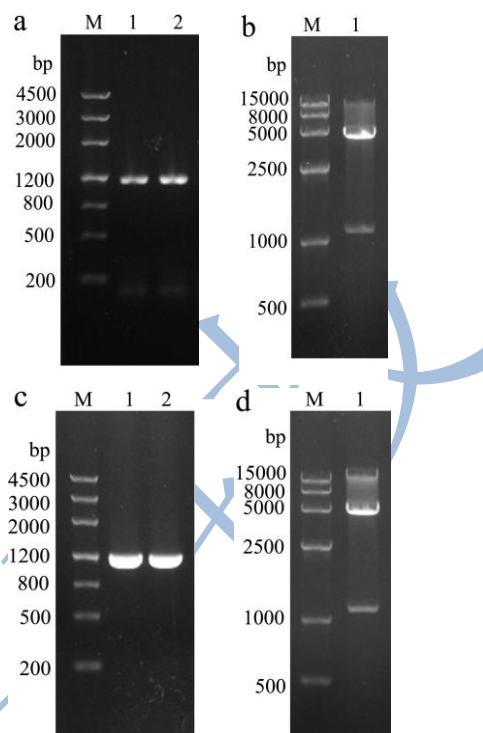


图 3 敲除载体转化子的鉴定

Fig.3 Identification of transformants with knockout vector

注: (a) 菌液 PCR 鉴定上游同源臂 *rhaD*-up (M: DNA marker; 1 和 2: 上游同源臂 *rhaD*-up 的 PCR 扩增电泳结果); (b) pNZ5319-up 质粒双酶切鉴定 (M: DNA marker; 1: pNZ5319-up 质粒双酶切电泳结果); (c) 菌液 PCR 鉴定下游同源臂 *rhaD*-down (M: DNA marker; 1 和 2: 下游同源臂 *rhaD*-down 的 PCR 扩增电泳结果); (d) pNZ5319-*rhaD* 质粒双酶切鉴定 (M: DNA marker; 1: pNZ5319-*rhaD* 质粒双酶切电泳结果)。

2.3 重组转化子的鉴定

利用引物 *rhaD*-up/*rhaD*-down、*cm*-up/*cm*-down 对植物乳杆菌初始菌株和重组转化株进行 PCR 鉴定。实验结果显示, 从植物乳杆菌 Lp10 初始菌株基因组 DNA 中能扩增到与目的基因 *rhaD* (852 bp) 大小相同的片段, 而不能从重组转化株的基因组 DNA 和 ddH₂O (阴性对照) 中扩增出相同的片段 (图 4b); 从重组转化株基因组 DNA 中能扩增出与目的基因 *cm* (651 bp) 大小相同的片段, 而不能从初始菌株基因组 DNA 和 ddH₂O 中扩增出相同片段 (图 4c)。分别将以上扩增所得的两个片段进行回收和测序鉴定, 表明两者分别为 *rhaD* 和 *cm* 基因。因此, 重组转化株的 *rhaD* 基因被成功敲除。

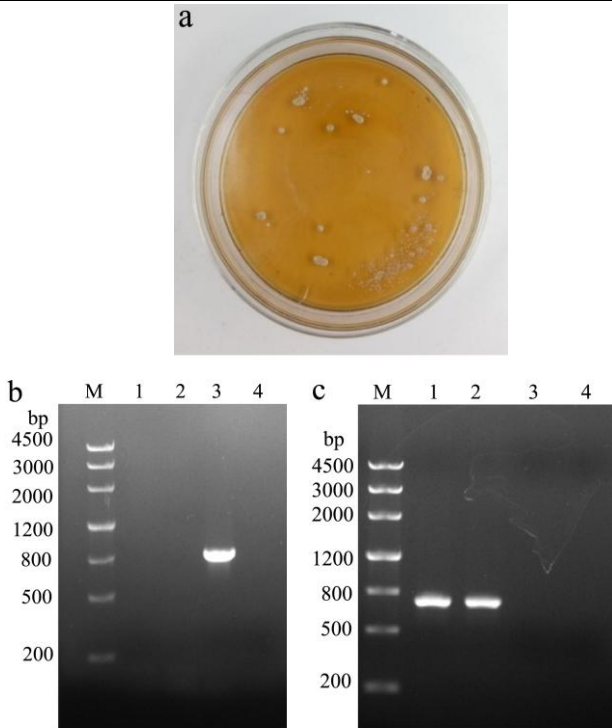


图4 植物乳杆菌 Lp10 重组转化株的鉴定

Fig.4 Identification of recombinant transformation of *L. plantarum*Lp10

注: (a) 植物乳杆菌 Lp10 重组转化株的菌落; (b) 菌株的 *rhaD* 基因的 PCR 鉴定 (M: DNA marker; 1 和 2: 植物乳杆菌 Lp10 重组转化株 *rhaD* 基因的 PCR 扩增电泳结果; 3: 植物乳杆菌 Lp10 初始菌株 *rhaD* 基因的 PCR 扩增电泳结果; ddH₂O 阴性对照的 *rhaD* 基因 PCR 扩增电泳结果); (c) 菌株的 *cm* 基因的 PCR 鉴定 (M: DNA marker; 1 和 2: 植物乳杆菌 Lp10 重组转化株 *cm* 基因的 PCR 扩增电泳结果; 3: 植物乳杆菌 Lp10 初始菌株 *cm* 基因的 PCR 扩增电泳结果; ddH₂O 阴性对照的 *cm* 基因 PCR 扩增电泳结果)。

2.4 植物乳杆菌 Lp10 *rhaD* 基因敲除突变株的生长曲线

生长曲线

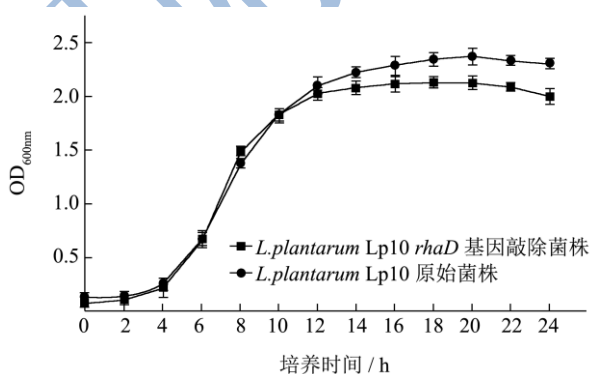


图5 突变菌株和初始菌株的生长曲线

Fig.5 growth curve of mutant strain and original strain

植物乳杆菌 Lp10 *rhaD* 基因敲除突变株与初始菌株在 MRS 培养基中的生长曲线如图 5, 两株菌都符合典型的生长曲线趋势, 在 4 h 进入对数生长期, 14 h 后进入稳定生长期, 但突变株进入稳定生长期后相比于初始菌株生长稍缓慢。

2.5 植物乳杆菌 Lp10 *rhaD* 基因敲除突变株的降胆固醇能力

降胆固醇能力

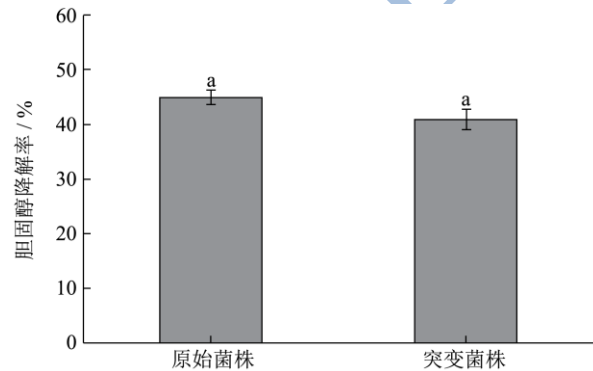


图6 胆固醇能力的测定

Fig.6 Determination of cholesterol lowering ability

注: 不同字母表示差异显著 ($p < 0.05$), 相同字母表示差异不显著 ($p > 0.05$)。

根据邻苯二甲醛法测定胆固醇降解率, 据图 6 可知, 初始菌株的胆固醇降解率为 45%, 突变菌株的胆固醇降解率为 41%, 两株菌株的 OD₆₀₀ 分别为 2.373 和 2.133, 即初始菌株的胆固醇降解率为 18.96%/OD₆₀₀, 敲除菌株的胆固醇降解率为 19.22%/OD₆₀₀, 结果表明基因 *rhaD* 敲除后, 植物乳杆菌 Lp10 的降胆固醇能力略有上升, 但差异不显著 ($p > 0.05$)。

3 结论

3.1 近年来, 利用组学研究挖掘差异基因已经成为趋势, 例如基因组、转录组以及蛋白组学等, 了解差异基因的功能已成为研究的热点和核心内容。研究基因功能的一个重要方法, 就是对该基因进行敲除, 获得突变株, 然后根据突变株的变化来推测基因产物的功能^[17]。本研究基于植物乳杆菌 Lp10 降胆固醇过程的转录组数据, 通过 GO 数据库和 KEGG 代谢通路数据分析, 选择 *rhaD* 基因为研究对象。利用同源重组原理, 成功获得植物乳杆菌 Lp10 *rhaD* 基因敲除突变株。对初始菌株与敲除菌株进行生长曲线及降胆固醇能力测定, 结果表明, 敲除菌株的生长较初始菌株更缓慢, 初始菌株的胆固醇降解率为 18.96%/OD₆₀₀, 敲除菌株的胆固醇降解率为 19.22%/OD₆₀₀, 表明基因 *rhaD* 基

因经敲除后,植物乳杆菌 Lp10 的降胆固醇能力略有上升,但差异不显著,推测可能原因是敲除载体 pNZ5319-*rhaD* 在植物乳杆菌 Lp10 发生同源重组时,*cm* 抗性基因与 *rhaD* 基因发生互换,*cm* 基因整合到基因组上,对植物乳杆菌 Lp10 生长、生理活动等产生负影响,后续研究可将 Cre-*loxP* 系统^[14]转化至突变株中,对抗性筛选标记 *cm* 基因进行敲除,此外,*rhaD* 基因的敲除对菌体生长也有所影响,该基因参与鼠李糖在生物体内的代谢,且鼠李糖属于细胞初级代谢产物,*rhaD* 基因的敲除影响菌体细胞正常的初级代谢,从而导致菌体生长减缓,菌体量下降。

3.2 本研究构建 pNZ5319-*rhaD* 敲除载体时,考虑同源重组效率与同源臂长度有一定的关系,在 0.3~1.2 kb 范围内,随着同源臂长度的增加,同源重组效率呈对数增加^[14],*rhaD* 基因的上下游同源臂 *rhaD*-up/*rhaD*-down 长度都约为 1200 bp,有利于目标基因与抗性筛选基因发生同源重组。本研究选用的载体 pNZ5319 是植物乳杆菌-大肠杆菌穿梭载体,氯霉素抗性筛选标记在植物乳杆菌和大肠杆菌中都能发挥作用,无需其他抗性基因的引入,简化了实验操作。

3.3 近年来,随着分子生物学的大力发展,基因敲除技术成为了热点。同源重组技术已成功应用于乳酸菌中,但存在效率低、工作量大等缺点,通过合理设计同源臂、选择合适的敲除载体、优化电击条件均可以提高同源重组效率。除了传统的同源重组技术,CRISPR/Cas 技术已日渐成熟^[18,19]。Jiang 等^[20]利用 CRISPR/Cas 系统成功实现了原核生物基因的定向修饰。后续研究可尝试利用 CRISPR/Cas 技术建立和完善的植物乳杆菌基因操作系统。

3.4 植物乳杆菌敲除系统可以用于降胆固醇功能性植物乳杆菌的开发,应用于酸奶、乳酸菌饮料及益生菌制剂等方面达到降胆固醇的目的,弥补药物治疗引发的肝肾受损、戒断反应和复发等副作用,减少心脑血管发病率,并且食品级敲除菌株包括独特风味,成本低,效率高等优点,具有一定的市场前景。

3.5 本研究成功建立了一套完整的植物乳杆菌敲除体系及电转化体系,这不仅为植物乳杆菌基因敲除载体的构建提供了一定的实验经验,也为后续 *rhaD* 基因的功能验证奠定了基础。为了进一步深入验证 *rhaD* 基因与 EPS 吸附作用降胆固醇机制的关系,后续研究将对敲除前后菌体表面的 EPS 含量及种类进行分析鉴定,为高效降胆固醇乳酸菌制剂的研究和开发利用提供实验基础和理论依据。

参考文献

- [1] Grill J, Schneider F, Crociani J, et al. Purification and characterization of conjugated bile salt hydrolase from *Bifidobacterium longum* BB536 [J]. Applied and Environmental Microbiology, 1995, 61(7): 2577-2582
- [2] Ashen M D, Blumenthal R S. Low HDL cholesterol levels [J]. New England Journal of Medicine, 2005, 353(12): 1252-1260
- [3] Mathara J M, Schillinger U, Guigas C, et al. Functional characteristics of *Lactobacillus* spp. from traditional Maasai fermented milk products in Kenya [J]. International Journal of Food Microbiology, 2008, 126(1): 57-64
- [4] Pereira DIA, Gibson G R. Effects of consumption of probiotics and prebiotics on serum lipid levels in humans [J]. Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology, 2002, 37(4): 259-281
- [5] 王玉文,王延祥,李平兰,等.胆盐水解酶的分离纯化与部分特性研究[J].中国食品学报,2007,7(5):35-41
WANG Yu-wen, WANG Yan-xiang, LI Ping-lan, et al. Studies on the isolation, purification and partial characteristics of bile salt hydrolase [J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2007, 7(5): 35-41
- [6] Choi E A, Chang H C. Cholesterol-lowering effects of a putative probiotic strain *Lactobacillus plantarum* EM isolated from kimchi [J]. LWT - Food Science and Technology, 2015, 62(1): 210-217
- [7] Hirose Y, Murosaki S, Yamamoto Y, et al. Daily intake of heat-killed *Lactobacillus plantarum* L-137 augments acquired immunity in healthy adults [J]. Journal of Nutrition, 2006, 136(12): 3069-3073
- [8] Falaye A, Emikpe B O, Ogundipe E T. Effects of dietary supplementation of *Lactobacillus plantarum* probiotics from corn slurry on growth performance, gut morphometry and profile of the intestinal microbial flora of *Clarias gariepinus* fingerlings [J]. International Journal of Infectious Diseases, 2016, 45: 336
- [9] Dhanani A S, Bagchi T. *Lactobacillus plantarum* CS24.2 prevents *Escherichia coli* adhesion to HT-29 cells and also down-regulates enteropathogen-induced tumor necrosis factor- α and interleukin-8 expression [J]. Microbiology and Immunology, 2013, 57(4): 309-315
- [10] 赵佳锐,杨虹.益生菌降解胆固醇的作用及机理研究进展[J].微生物学报,2005,45(2):315-319
ZHAO Jia-rui, YANG Hong. Research progress on the mechanism and effect of probiotics on cholesterol degradation [J]. Acta Microbiologica Sinica, 2005, 45(2): 315-319

- [11] Sugiyama M, Hong Z, Greenberg W A, et al. *In vivo* selection for the directed evolution of L-rhamnulose aldolase from L-rhamnulose-1-phosphate aldolase (RhaD) [J]. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 2007, 15(17): 5905-5911
- [12] Oroz I, Sánchez-Moreno I, Mena M. Cloning and expression of a putative rhamnulose-1-phosphate aldolase from the hyperthermophilic eubacterium *Thermotoga maritime* [J]. *New Biotechnology*, 2009, 25: 84
- [13] 张和平,李娅妮,赵国芬,等.植物乳杆菌*lai*基因同源重组敲除载体的构建与鉴定[J].农产品加工,2014,(6):51-53
ZHANG He-ping, LI Ya-ni, ZHAO Guo-fen, et al. Construction and identification of *Lactobacillus Plantarum lai* gene homologous recombination knockout vector [J]. *Academic Periodical of Farm Products Processing*, 2014, 6: 51-53
- [14] 岳元春,王洋,由田,等.同源重组法构建副干酪乳杆菌组氨酸蛋白激酶基因缺失突变株[J].食品科学,2017,38(12):15-20
YUE Yuan-chun, WANG Yang, YOU Tian, et al. Construction of *prcK* gene deletion mutant of *Lactobacillus paracasei* by homologous recombination [J]. *Food Science*, 2017, 38(12): 15-20
- [15] 储炫,郭丽琼,叶志伟,等.海带源降亚硝酸盐和胆固醇益生乳酸菌的筛选与鉴定[J].食品工业科技,2015,36(3):163-167
CHU Xuan, GUO Li-qiong, YE Zhi-wei, et al. Screening and identification of lactic acid bacteria with degrading nitrite and cholesterol from *Laminaria japonica* [J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2015, 36(3): 163-167
- [16] 田建军,张开屏,靳焯.高效降胆固醇乳酸菌的筛选[J].食品科技,2011,11:21-25
TIAN Jian-jun, ZHANG Kai-ping, JIN Ye. Screening of *Lactobacillus* for efficient cholesterol-degrading [J]. *Food Science and Technology*, 2011, 11: 21-25
- [17] 王景,穆媛媛,黎庶,等.革兰阴性菌基因敲除载体的构建及其应用[J].第三军医大学学报,2009,31(23):2299-2301
WANG Jing, MU Yuan-yuan, LI Shu, et al. Construction and application of a vector for gene deletion in gram-negative bacteria [J]. *Acta Academiae Medicinae Militaris Tertiae*, 2009 31(23): 2299-2301
- [18] Heler R, Marraffini L A, Bikard D. Adapting to new threats: the generation of memory by CRISPR-Cas immune systems [J]. *Molecular Microbiology*, 2014, 93(1): 1-9
- [19] 吴彩云,罗秉轮,孙玉强.基因组编辑新技术:CRISPR/Cas系统在生物基因组学中的研究进展[J].植物生理学报,2015,12: 2063-2069
WU Cai-yun, LUO Bin-lun, SUN Yu-qiang. A new genome edited technology: CRISPR/Cas system and its research progress in biological genomics [J]. *Plant Physiology Journal*, 2015, 12: 2063-2069
- [20] Jiang W, Bikard D, Cox D, et al. RNA-guided editing of bacterial genomes using CRISPR-Cas systems [J]. *Nature Biotechnology*, 2013, 31(3): 233-239