

文章编号: 1673 1689(2010)05-0777-05

# 嗜酸乳杆菌 $\beta$ 半乳糖苷酶基因的克隆及其作为食品级筛选标记的研究

贺松<sup>1</sup>, 龚芳红<sup>1</sup>, 张德纯<sup>\*1</sup>, 刘明方<sup>1</sup>, 程芳<sup>2</sup>, 郭亚楠<sup>1</sup>

(1. 重庆医科大学 分子医学与肿瘤研究中心, 重庆 400016; 2. 西安交通大学 医学院, 陕西 西安 710061)

**摘要:** 为研究嗜酸乳杆菌  $\beta$  半乳糖苷酶基因 (*lacZ*) 作为食品级筛选标记的活性及筛选稳定性, 作者从嗜酸乳杆菌基因组中克隆  $\beta$  半乳糖苷酶基因并在乳酸乳球菌中表达, 通过 X-gal 显色筛选阳性克隆; 用 X-gal 显色筛选方法将重组乳酸乳球菌传 60 代, 并测定  $\beta$  半乳糖苷酶活和比活力。结果显示: 通过表达有活性的  $\beta$  半乳糖苷酶和 X-gal 显色可成功筛选出阳性克隆菌株; 对借助 X-gal 传 60 代后的重组乳酸乳球菌进行  $\beta$  半乳糖苷酶比活力检测, 与 X-gal 筛选的第二代相比没有显著差异 ( $P=0.592 > 0.05$ ), 与红霉素筛选比较也没有显著差异 ( $P=0.882 > 0.05$ )。由此可见,  $\beta$  半乳糖苷酶基因作为筛选标记具有较好的活性和稳定性, 为以  $\beta$  半乳糖苷酶基因作为筛选标记的食品级载体的研究奠定了基础。

**关键词:**  $\beta$  半乳糖苷酶; 嗜酸乳杆菌; 乳酸乳球菌; 食品级筛选标记

中图分类号: Q 78; Q 939.11

文献标识码: A

## Cloning of $\beta$ Galactosidase Gene from *Lactobacillus acidophilus* and Study of Its Activity as a Food-Grade Selection Marker

HE Song<sup>1</sup>, GONG Fang-hong<sup>1</sup>, ZHANG De-chun<sup>\*1</sup>,  
LIU Ming-fang<sup>1</sup>, CHENG Fang<sup>2</sup>, GUO Ya-nan<sup>1</sup>

(1. Molecular Medicine & Tumor Research Center, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China;  
2. School of Medicine, Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710061, China)

**Abstract:** To study the selective activity and stability of  $\beta$  galactosidase gene (*lacZ*) from *Lactobacillus acidophilus* as a food-grade selection marker, the *lacZ* gene from *L. acidophilus* was cloned and expressed in *L. lactis*. In this study, the selective activity was determined by X-gal-containing medium and the activity and specific activity of  $\beta$  galactosidase by X-gal. The results showed that the positive recombinant strains were selected successfully by  $\beta$  galactosidase activity and X-gal coloration. The  $\beta$  galactosidase specific activity of the recombinant *L. lactis* after a period of 60 generations selected with X-gal was similar to that of the 2nd generation ( $P=0.592 > 0.05$ ), and also similar to the 61st generation selected with Erythromycin ( $P=0.882 > 0.05$ ). These results indicated that the  $\beta$  galactosidase *lacZ* gene had good activity and stability as

收稿日期: 2009-11-01

基金项目: 重庆市教委资助项目 (JK060306)。

\* 通信作者: 张德纯 (1946-), 男, 重庆人, 教授, 博士生导师, 主要从事应用微生物学与微生物生态学方面的研究。

Email: zhangdechun46@163.com

a selection marker, and it could be used as a selection marker for construction of a food grade vector.

**Key words:**  $\beta$ galactosidase, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactococcus lactis*, food grade selection marker

乳酸菌是食品安全性微生物,利用乳酸菌表达重要的医药功能蛋白以赋予乳酸菌新的生理功能,是开发乳酸菌应用的新领域<sup>[1]</sup>。但是目前构建的重组乳酸菌多经过了遗传修饰,带有抗生素抗性标记,这些抗生素抗性基因若投放到环境中或人和动物体内,由于抗性因子的转移,会存在严重的生物安全隐患,因此在应用中也受到限制。食品级载体系统的研究为重组乳酸菌的潜在应用提供了可能。目前国内外已有许多关于食品级筛选标记研究的报道,包括细菌素抗性<sup>[2-3]</sup>、重金属抗性标记<sup>[4]</sup>、噬菌体抗性标记<sup>[5]</sup>、营养缺陷互补标记<sup>[6-8]</sup>和糖类利用筛选标记<sup>[9]</sup>等。作者借鉴蓝白筛选转化子的思路,从嗜酸乳杆菌中克隆 $\beta$ 半乳糖苷酶(*lacZ*)基因,利用 X-gal 显色筛选大肠杆菌和乳酸乳球菌中的阳性克隆子,并观察以 *lacZ* 基因作为食品级筛选标记的筛选效果和稳定性。

## 1 材料与方 法

### 1.1 实验材料

**1.1.1 菌种和质粒** 嗜酸乳杆菌(*L. acidophilus* ATCC4356):购自中国科学院微生物所菌种保藏中心;乳酸乳球菌(*L. lactis* MG1363)和质粒 pMG36e:由荷兰 Groningen University J. Kok 博士惠赠;大肠杆菌(*E. coli* DH5 $\alpha$ ):作者所在实验室保存菌株。

**1.1.2 主要试剂** M17 培养基及 LB 培养基购自 Oxoid 公司;DNA 回收试剂盒:购自 Omega 公司;基因组提取试剂盒,质粒抽提试剂盒,限制性核酸内切酶 *Xba*I 和 *Pst*I:均为 Promega 公司产品;PCR 及连接相关试剂:均购自 Takara 公司;X-gal 和 ONPG:Sigma 公司产品。

### 1.2 方法

**1.2.1 含有 *lacZ* 基因重组体的构建** 根据 GenBank 公布的嗜酸乳杆菌 ATCC4356  $\beta$ 半乳糖苷酶(*lacZ*)基因序列(2 017 bp,编号:EU 590652)设计

一对特异性引物。

LacZ-P1: 5-GCTCTAGA TAGAGG AAATAAAATG ACACAATTATCACG-3  
XbaI RBS 起始子

LacZ-P2: 5-AAAACTGCAG CTA ATTCTCAATACTTGAACATCC-3  
PstI 终止子

以嗜酸乳杆菌 ATCC4356 染色体 DNA 为模板,进行 PCR 扩增获得 *lacZ* 基因。反应条件为:94  $^{\circ}$ C 预变性 5 min;94  $^{\circ}$ C 变性 40 s,55  $^{\circ}$ C 退火 30 s,72  $^{\circ}$ C 延伸 130 s,共 26 个循环;最后 72  $^{\circ}$ C 延伸 10 min。将 PCR 产物切胶回收,回收产物与质粒 pMG36e 同步进行 *Xba*I 和 *Pst*I 双酶切回收处理。之后两者在 T4 DNA 连接酶作用下连接,构建的重组质粒名为 pMG36e-*lacZ*。重组质粒转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$  感受态细胞,转化菌涂布于 LB-Ery-X-gal 平板(含 200  $\mu$ g/mL 红霉素,临用前 2 小时吸取 X-gal DM F 溶液 50  $\mu$ L 涂布平板)表面,37  $^{\circ}$ C 培养 18~24 h,挑取蓝色菌落(命名为 DH5 $\alpha$ /pMG36e-*lacZ*)进行传代培养,并对重组质粒进行 PCR、酶切和测序鉴定(由 Invitrogen 公司进行)。

### 1.2.2 重组体电转乳酸乳球菌 MG1363

1) 重组质粒的提取:大肠杆菌阳性转化子 DH5 $\alpha$ /pMG36e-*lacZ* 接种于 LB-Ery-X-gal 平板(红霉素终质量浓度增加为 250  $\mu$ g/mL,其他同前),挑取蓝色菌落接种于 LB 液体培养基(红霉素终质量浓度为 250  $\mu$ g/mL),37  $^{\circ}$ C 振荡培养过夜,并用质粒抽提试剂盒提取重组质粒 pMG36e-*lacZ*。

2) 乳酸乳球菌 MG1363 感受态细胞制备:接种 MG1363 于 M17 肉汤培养基,30  $^{\circ}$ C 培养至 OD<sub>600</sub> 为 0.5~0.8,在结束培养之前 1 小时加入氨苄青霉素至终质量浓度为 20  $\mu$ g/mL。培养结束后将细菌培养物冰浴 5 min,离心收集菌体,用冰冷的甘油缓冲液(100 mg/mL 甘油,0.5 mmol/L 蔗糖)洗涤菌体 5 次,然后用 1:100 的甘油缓冲液重悬菌体。

3) 电穿孔转化 MG1363:参见文献[10]。电穿孔条件:电压为 2 kV,时间为 5 ms。电转化后的菌液涂布于 M17-LSCaMg-Ery-X-gal 平板(含 0.5 g/dL 乳糖、0.3 mol/L 蔗糖、20 mmol/L MgCl<sub>2</sub>、2 mmol/L CaCl<sub>2</sub>、5 mg/L 红霉素,临用前 2 小时吸取 X-gal DM F 溶液 50  $\mu$ L 涂布平板),30  $^{\circ}$ C 培养 48~

72 h, 筛选蓝色菌落即为阳性重组菌, 记为 MG1363/pMG36e-*lacZ*。

**1.2.3 重组菌 $\beta$ 半乳糖苷酶的表达** 将重组乳酸乳球菌 MG1363/pMG36e-*lacZ* 接种于 10 mL LM17-Ery 肉汤培养基(含 0.5 g/dL 乳糖、5 mg/L 红霉素), 在 30 °C、220 r/min 振荡培养 24 h。取 5 mL 细菌培养液, 离心收集菌体用 500  $\mu$ L 双蒸水充分重悬菌体, 在冰上超声破碎菌体, 然后离心收集上清液。超声沉淀用少量水重悬后与超声上清液、菌液一并做 10 g/dL SDS-PAGE 和 native PAGE 电泳分析。其中 SDS-PAGE 电泳后的凝胶经考马斯亮蓝 R-250 染色; native PAGE 电泳后的凝胶铺在涂有 100  $\mu$ L 浓度为 2 g/dL 的 X-gal 溶液的 M17 平板上, 30 °C 孵育 2 h, 蓝色条带显示 $\beta$ 半乳糖苷酶的存在。

**1.2.4 *lacZ* 基因作为筛选标记的活性及稳定性检测** 重组乳酸乳球菌 MG1363/pMG36e-*lacZ* 分别在 LM17-X-gal 平板(含 0.5 g/dL 乳糖, 临用前 2 h 吸取 X-gal DM F 溶液 50  $\mu$ L 涂布平板)和 M17-Ery 平板(5 mg/L 红霉素)上传 60 代。分别将两种平板上第 1 代和第 60 代的细菌接种于 LM17 肉汤(含 0.5 g/dL 乳糖), 30 °C、220 r/min 振荡培养 24 h。离心浓缩菌液并用培养菌液重悬菌体, 在冰上超声破碎菌体, 离心收集超声上清液, 采用邻硝基苯- $\beta$ -D-半乳糖吡喃糖苷(ONPG)法<sup>[11]</sup>测定 $\beta$ 半乳糖苷酶活性, 结合 Bradford 法<sup>[12]</sup>计算 $\beta$ 半乳糖苷酶比活力, 并对在 LM17-X-gal 平板传 60 代的 MG1363/pMG36e-*lacZ* 提质粒鉴定。

## 2 实验结果

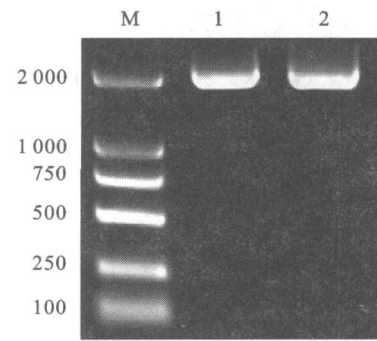
### 2.1 重组质粒的鉴定

首先对重组质粒 pMG36e-*lacZ* 进行 PCR 鉴定, 1 g/dL 琼脂糖凝胶电泳显示在约 2 000 bp 处有一明显条带(图 1a)。再对重组质粒分别进行 *Xba*I、*Pst*I 单酶切和双酶切鉴定(图 1b), 鉴定结果与预期目标一致。测序结果表明, pMG36e-*lacZ* 中的 *lacZ* 基因序列与 GenBank 中公布的序列符合率达 97%。由此可见, 重组质粒构建成功。

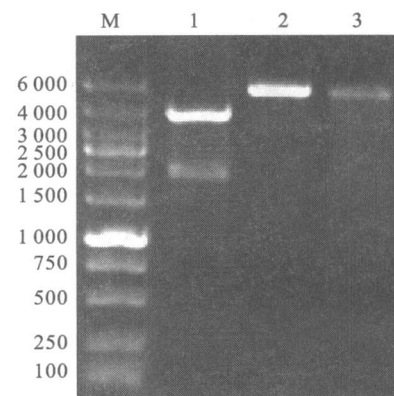
### 2.2 $\beta$ 半乳糖苷酶的表达

重组菌株 DH5 $\alpha$ /pMG36e-*lacZ* 和 MG1363/pMG36e-*lacZ* 在筛选平板上长出了蓝色菌落, 初步说明能表达有活性的 $\beta$ 半乳糖苷酶。SDS-PAGE 分析见图 2。重组菌株在约 70 000 处可见一明显的表达条带, 与天然 *lacZ* 的理论相对分子质量 76 583

相近。Native PAGE 分析结果见图 3。菌液、超声上清液和超声菌体都具有 $\beta$ 半乳糖苷酶活性。



(a)

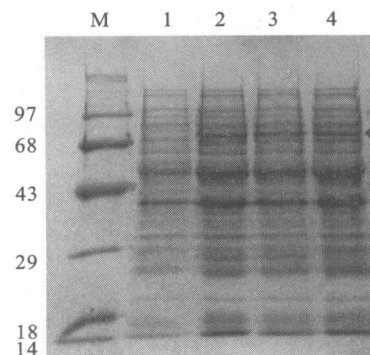


(b)

(a) 重组质粒的 PCR 鉴定。M: DNA marker; 1, 2: PCR 扩增产物。(b) 限制性核酸内切酶酶切鉴定。M: DNA marker; 1: *Xba*I 和 *Pst*I 双酶切鉴定; 2, 3: *Xba*I 和 *Pst*I 分别单酶切鉴定

图 1 重组质粒 pMG36e-*lacZ* 鉴定 1

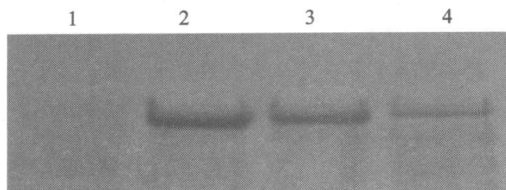
Fig. 1 Identification of recombinant plasmid (1)



M: 蛋白质 marker; 1: 重组 MG1363/pMG36e 蛋白质电泳; 2~4: 重组 MG1363/pMG36e-*lacZ* 蛋白质电泳(2: 超声上清液; 3: 超声菌体; 4: 细菌培养液)

图 2 SDS PAGE 图显示重组菌株 MG1363/pMG36e-*lacZ* 分泌 $\beta$ 半乳糖苷酶

Fig. 2 The SDS PAGE analysis of  $\beta$  galactosidase secreted by recombinant strain MG1363/pMG36e-*lacZ*



1: 重组 MG1363/pMG36e 蛋白质电泳; 2~ 4: 重组 MG1363/pMG36e *lacZ* 蛋白质电泳(2. 细菌培养液; 3. 超声上清液; 4. 超声菌体)

图3 重组菌株 MG1363/pMG36e *lacZ* native PAGE X-gal 染色图

Fig. 3 The native PAGE figure of recombinant strain MG1363/pMG36e *lacZ* stained with X-gal

### 2.3 *lacZ* 基因作为筛选标记的活性及稳定性检测

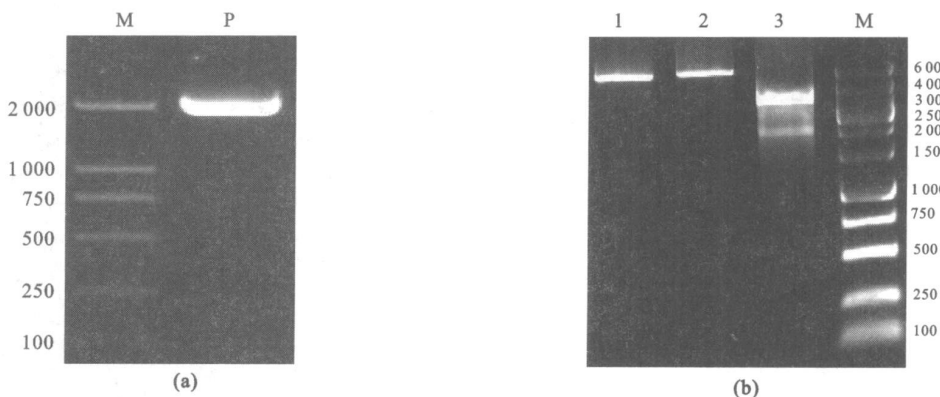
分别对红霉素和 X-gal 两种筛选方法筛选的第 2 代和第 61 代重组菌株 MG1363/pMG36e *lacZ* 进行酶活和比活力测定, 结果见表 1。结果显示, 在利用 X-gal 筛选 60 代后的重组菌株  $\beta$ -半乳糖苷酶比活力与第 2 代相比没有显著差异 ( $P = 0.592 > 0.05$ ); 与利用红霉素筛选 60 代后的重组菌株  $\beta$ -半乳糖苷酶比活力相比也没有显著差异 ( $P = 0.882 > 0.05$ ), 表明 *lacZ* 基因作为筛选标记具有较好的活性和稳定性。对 X-gal 筛选第 60 代的重组菌株提质粒进行 PCR 和酶切鉴定结果也表明该基因具有较好的稳定性, 见图 4。

表 1 第 2 代和第 61 代重组菌株进行酶活和比活力测定

Tab. 1  $\beta$  galactosidase activity and specific activity of MG1363/pMG36e *lacZ* at the 2nd generation and the 61st generation respectively

| 筛选方法         | 第 2 代                  |                             | 第 61 代                 |                             |
|--------------|------------------------|-----------------------------|------------------------|-----------------------------|
|              | $\beta$ 半乳糖苷酶酶活/(U/mL) | $\beta$ 半乳糖苷酶比活力/(U/mg pro) | $\beta$ 半乳糖苷酶酶活/(U/mL) | $\beta$ 半乳糖苷酶比活力/(U/mg pro) |
| Erythromycin | 9.80 ± 2.28            | 4.92 ± 1.14                 | 10.25 ± 2.58           | 5.15 ± 1.30                 |
| X-gal        | 9.50 ± 1.80            | 4.77 ± 0.91                 | 10.09 ± 2.03           | 5.07 ± 1.02 <sup>△</sup>    |

表中数据为检测 8 次所得的均值 ± 标准差。\* X-gal 筛选 60 代后的重组菌株  $\beta$ -半乳糖苷酶比活力与第 2 代相比,  $P > 0.05$ 。△ X-gal 筛选 60 代后的重组菌株  $\beta$ -半乳糖苷酶比活力与红霉素筛选 60 代后的重组菌株相比,  $P > 0.05$ 。



(a) 重组质粒的 PCR 鉴定。M: DNA marker; P: PCR 扩增产物; (b) 限制性核酸内切酶酶切鉴定(M: DNA marker; 1, 2: *Xba*I 和 *Pst*I 分别单酶切鉴定; 3: *Xba*I 和 *Pst*I 双酶切鉴定)。

图 4 重组质粒 pMG36e *lacZ* 鉴定 2

Fig. 4 Identification of recombinant plasmid (2)

## 3 结 语

$\beta$ -半乳糖苷酶的主要功能是降解乳糖和合成低聚半乳糖, 对生物无害, 而且在生物利用碳水化合物营养中起着重要作用。它可以水解底物 X-gal, 呈现出蓝色, 易于检测和观察, 若将此基因作为筛选标记, 通过检测蓝色菌落的形成即可成功筛选出阳性克隆子<sup>[13]</sup>。最为成功的应用就以 pUC 系列克隆载体为基础的蓝-白筛选系统, 这一筛选系统利

用了  $\beta$ -半乳糖苷酶基因的负性筛选特性。事实上, 同样可以应用  $\beta$ -半乳糖苷酶基因编码产物的阳性筛选方法也同样可以获得阳性克隆子。嗜酸乳杆菌是我们所熟悉的重要的益生菌, 主要存在于酸奶等乳制品和人胃肠道中, 对维持人体健康有益, 甚至对一些消化道疾病有治疗作用<sup>[14]</sup>。最近嗜酸乳杆菌基因组被测序 (GenBank No: CP000033)<sup>[15]</sup>, 发现基因组上有一个不同于大肠杆菌乳糖操纵子的 *lac* 基因簇。特别是该基因簇除拥有一个 GHF-2

$\beta$ 半乳糖苷酶编码基因 lacLM 外, 还拥有一个 GHF-42  $\beta$ 半乳糖苷酶基因 lacZ。目前实验所用的筛选标记主要是还有红霉素抗性基因的, 作者基于食品级载体的要求, 从嗜酸乳杆菌 ATCC4356 中克隆 lacZ 基因, 并观察其作为食品级筛选标记的活性和筛选稳定性。

作者借助载体 pMG36e 上的 P32 启动子和嗜酸乳杆菌 ATCC4356 lacZ 基因的 RBS 序列 (TAGAGG), 在乳酸乳球菌 MG1363 中成功表达

了  $\beta$ 半乳糖苷酶, 并通过该酶活性成功筛选出了阳性克隆子。通过对分别采用 X-gal 筛选和红霉素筛选两种方法传 60 代后的酶活分析表明, 以  $\beta$ 半乳糖苷酶 (lacZ) 基因作为筛选标记, 能够使载体在宿主菌中稳定遗传。因此, 嗜酸乳杆菌 ATCC4356 lacZ 基因可以作为一个新的食品级筛选标记应用于食品级表达系统。若将此食品级载体基因导入乳酸乳球菌, 这种重组基因工程菌将是集菌体本身和有益基因于一体, 制成活菌制剂被人利用则是安全方便的。

## 参考文献 (References):

- [1] Bermúdez Humarán L G. *Lactococcus lactis* as a live vector for mucosal delivery of therapeutic proteins [J]. **Hum Vaccin**, 2009, 5(4): 264–267.
- [2] Takala T M, Saris P E. A food grade cloning vector for lactic acid bacteria based on the nisin immunity gene nisl [J]. **Appl Microbiol Biotechnol**, 2002, 59(45): 467–471.
- [3] Brede D A, Lothe S, Salehian Z, et al. Identification of the propionicin F bacteriocin immunity gene (pcfI) and development of a food grade cloning system for *Propionibacterium freudenreichii* [J]. **Appl Environ Microbiol**, 2007, 73(23): 7542–7547.
- [4] Liu C Q, Su P, Khunajakr N, et al. Development of food grade cloning and expression vectors for *Lactococcus lactis* [J]. **J Appl Microbiol**, 2005, 98(1): 127–135.
- [5] O'Sullivan D, Ross R P, Twomey D P, et al. Naturally occurring lactococcal plasmid pAH90 links bacteriophage resistance and mobility functions to a food grade selectable marker [J]. **Appl Environ Microbiol**, 2001, 67(2): 929–937.
- [6] Defoor E, Kryger M B, Martinussen J. The orotate transporter encoded by *oroP* from *Lactococcus lactis* is required for orotate utilization and has utility as a food grade selectable marker [J]. **Microbiology**, 2007, 153(11): 3645–3659.
- [7] Bron P A, Benchimol M G, Lambert J, et al. Use of the *alr* gene as a food grade selection marker in lactic acid bacteria [J]. **Appl Environ Microbiol**, 2002, 68(11): 5663–5670.
- [8] 孙强正, 熊衍文, 叶长芸, 等. 食品级分泌表达载体的构建及报告蛋白在乳酸乳球菌中的表达 [J]. **微生物学报**, 2008, 48(3): 293–298.  
SU N Qiang zheng, XIONG Yarr wen, YE Chang yun, et al. Construction of a food grade secretion expression vector and use it for reporter protein expression in *Lactococcus lactis* [J]. **Acta Microbiologica Sinica**, 2008, 48(3): 293–298. (in Chinese)
- [9] Jeong D W, Lee J H, Kim K H, et al. A food grade expression/secretion vector for *Lactococcus lactis* that uses an alpha galactosidase gene as a selection marker [J]. **Food Microbiol**, 2006, 23(5): 468–475.
- [10] 汪川, 刘衡川, 裴晓方, 等. 非融合表达  $\beta$ 半乳糖苷酶的重组乳酸乳球菌的构建和性能研究 [J]. **四川大学学报: 医学版**, 2009, 40(1): 29–32.  
WANG Cuan, LIU Heng chuan, PEI Xiaofang, et al. Construction and property study of recombinant *Lactococcus lactis* with non fusion expressing of  $\beta$  galactosidase [J]. **J Sichuan Univ: Med Sci Edi**, 2009, 40(1): 29–32. (in Chinese)
- [11] Nguyen T H, Splechna B, Yamabhai M, et al. Cloning and expression of the beta galactosidase genes from *Lactobacillus reuteri* in *Escherichia coli* [J]. **J Biotechnol**, 2007, 129(4): 581–591.
- [12] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding [J]. **Anal Biochem**, 1976, 72(1-2): 248–254.
- [13] 钟义华, 唐蕾, 吴亢, 等. 具有  $\beta$ 半乳糖苷酶转苷能力的菌株筛选及鉴定 [J]. **食品与生物技术学报**, 2008, 27(5): 83–85.  
ZHONG Yi hua, TANG Lei, WU Kang, et al. Screening and identification of  $\beta$  galactosidase producing microorganism with transgalactosylation activity [J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2008, 27(5): 83–85. (in Chinese)
- [14] Borthakur A, Gill R K, Tyagi S, et al. The probiotic *Lactobacillus acidophilus* stimulates chloride/hydroxyl exchange activity in human intestinal epithelial cells [J]. **J Nutr**, 2008, 138(7): 1355–1359.
- [15] Altermann E, Russell W M, Azcarate Peril M A, et al. Complete genome sequence of the probiotic lactic acid bacterium *Lactobacillus acidophilus* NCFM [J]. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 2005, 102(11): 3906–3912.

(责任编辑: 李春丽)