

文章编号: 1673-1689(2011)02-0250-05

## 鼠李糖乳杆菌 JAAS8 胞外多糖生物合成基因的克隆和序列分析

戴大海<sup>1,2</sup>, 李盛钰<sup>2</sup>, 周义发<sup>2</sup>, 赵玉娟<sup>2</sup>, 张雪<sup>2</sup>, 曾宪鹏<sup>2</sup>, 杨贞耐<sup>\*2</sup>

(1. 东北师范大学 生命科学学院, 吉林 长春 130024; 2. 吉林省农业科学院 农产品加工研究中心, 吉林 长春 130033)

**摘要:** 根据已报道乳杆菌胞外多糖生物合成基因的同源性, 利用其保守区设计引物, 扩增出鼠李糖乳杆菌 JAAS8 *RmlA* 基因部分序列, 并通过染色体步移法扩增出 *Rml(ACB)* 的序列。获得了鼠李糖乳杆菌 JAAS8 胞外多糖生物合成基因 4.1 kb 序列片段, 编码 4 个可读框。利用 BLAST 和 ClustalX 程序对获得序列进行生物信息学分析, 预测其结构和功能。结果表明: 该序列与已知鼠李糖乳杆菌胞外多糖生物合成基因具有高度同源性, *RmlA*、*RmlC* 和 *RmlB* 基因与 dTDP-L-鼠李糖前体的生物合成密切相关。

**关键词:** 鼠李糖乳杆菌; 胞外多糖; 生物合成; 基因簇

中图分类号: Q 51

文献标识码: A

## Cloning and Sequence Analysis of the Exopolysaccharide Biosynthesis Genes from *Lactobacillus rhamnosus* JAAS8

DAI Dā hai<sup>1,2</sup>, LI Sheng yu<sup>2</sup>, ZHOU Yi fa<sup>2</sup>, ZHAO Yu juan<sup>2</sup>,  
ZHANG Xue<sup>2</sup>, ZENG Xian peng<sup>2</sup>, YANG Zhen nai<sup>\*2</sup>

(1. School of Life Sciences, Northeast Normal University, Changchun 130024, China; 2. Center of Agror food Technology, Jilin Academy of Agricultural Sciences, Changchun 130033, China)

**Abstract:** To clone the *RmlA* gene in *Lactobacillus rhamnosus* JAAS8, degenerate primers were designed from the conserved domain of the exopolysaccharide biosynthetic genes of lactic acid bacteria (LAB). The distinctive PCR products with the expected size were amplified from *L. rhamnosus* JAAS8. The gene sequence (4.1 kb) of *RmlACB* and *Orf1* were cloned by genomic walking method. Nucleotide sequence similarity analyses with GenBank sequences were performed using the BLAST and ClustalX software. GenBank database searching shows that the predicted protein products of the *RmlACB* genes from *L. rhamnosus* JAAS8 have highest similarity with the EPS biosynthetic genes of *Lactobacillus*. The genes *RmlA*, *RmlC* and *RmlB* are closely related to the biosynthesis of dTDP-L-rhamnose precursor.

**Key words:** *Lactobacillus rhamnosus*, exopolysaccharide, biosynthesis, gene clusters

收稿日期: 2010-04-15

基金项目: 国家自然科学基金项目(30670057); 农业部现代农业产业技术体系建设专项资金项目(nycytx-0502)。

\* 通信作者: 杨贞耐(1965-), 男, 江西广丰人, 工学博士, 研究员, 博士研究生导师, 主要从事乳品工艺与生物技术方面的研究。Email: zyang@cjaas.com

乳酸菌(lactic acid bacteria, LAB)胞外多糖(exopolysaccharides, EPS)是乳酸菌在生长代谢过程中分泌到细胞壁外的黏液多糖(slime polysaccharides, SPS)和荚膜多糖(capsular polysaccharides, CPS)的总称<sup>[1]</sup>。乳酸菌胞外多糖对改善发酵乳制品的理化性质至关重要,它被公认为是食用安全性的天然增稠剂,能改善发酵乳制品的粘性、质地和口感等。另外,研究表明,乳酸菌胞外多糖对人体健康也有促进作用<sup>[2-4]</sup>。

乳酸菌胞外多糖通常由 3~8 个单糖组成的重复单元聚合而成,其相对分子质量在  $1 \times 10^4 \sim 6 \times 10^6$ 。自 1990 年首次报道了 *Streptococcus thermophilus*<sup>[5]</sup> 胞外杂多糖重复单元的结构以来,国内外学者对乳酸菌胞外多糖的结构做了大量的研究<sup>[6-8]</sup>。到目前为止,已有 50 多株乳酸菌的胞外多糖结构被鉴定。由于组成胞外多糖的单糖种类、连接方式和多糖相对分子质量不同,使多糖的结构复杂多样<sup>[1]</sup>。乳酸菌胞外多糖结构的多样性是由参与其生物合成的基因簇,尤其是糖基转移酶基因的特异性决定的。因此,了解胞外多糖生物合成基因簇的结构和功能,对进一步调控多糖的生物合成和探讨多糖结构与功能的关系具有重要意义<sup>[9]</sup>。

乳酸菌胞外多糖的合成是从活化的核苷酸糖复合物开始的,UDP-葡萄糖、UDP-半乳糖和 dTDP-鼠李糖是胞外多糖重复单元合成最常见的供体。近年来,一些乳酸菌胞外多糖生物合成基因簇已经被克隆和测序<sup>[10-12]</sup>,对胞外多糖生物合成基因簇的结构和功能已经有了一定的了解,但是这些基因调控胞外多糖生物合成的机制仍不清楚。为了进一步理解乳杆菌胞外多糖的生物合成及其调控机制,作者以课题组自主分离的一株同时产荚膜多糖和黏液多糖的鼠李糖乳杆菌 JAAS8 为研究对象,对其参与胞外多糖生物合成的 dTDP-L-鼠李糖前体的生物合成基因进行了克隆、鉴定和生物信息学分析。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌株和培养基

鼠李糖乳杆菌 JAAS8 为作者所在实验室保藏菌株,分离自东北传统发酵酸菜,经 API 50 CHL 和 16s rDNA 鉴定为鼠李糖乳杆菌(*L. rhamnosus*)。其 16S rDNA 基因部分序列已向 GenBank 提交,登录号为:GQ461595。菌株在含体积分数为 20% 甘油的 MRS<sup>[13]</sup> 培养基中 -80 °C 冻存。使用前接种于 MRS 液体培养基,37 °C 连续活化 2 次。

### 1.2 主要试剂和仪器

凝胶成像分析系统:Alpha Innotech 公司制造;电泳仪:北京六一公司制造;PCR 仪:Eppendorf 公司制造;溶菌酶:Genview 公司产品;蛋白酶 K:TaKaRa 公司产品;EXtaq 酶:TaKaRa 公司产品;染色体步移试剂盒:购自 Clontech Laboratories 公司;DNA 胶回收试剂盒、DNA Marker:购自加拿大 BIO BASIC INC 公司;引物合成与序列测定:由北京华大基因公司完成;其它试剂均为分析纯。

### 1.3 菌株培养及基因组 DNA 的提取

鼠李糖乳杆菌 JAAS8 接种于 MRS 液体培养基中,37 °C 培养 18 h 后,4 °C、6 000 r/min 离心 10 min。沉淀用 PBS(pH 7.0)洗涤 2 次,离心。基因组 DNA 提取参照文献[14]进行。

### 1.4 胞外多糖生物合成基因的扩增和测序

根据 Genebank 中已报道鼠李糖乳杆菌基因 *RmlA* 的保守序列设计特异引物或简并引物,见表 1。以鼠李糖乳杆菌 JAAS8 基因组 DNA 为模板,PCR 扩增目的基因序列。PCR 扩增条件:94 °C 预变性 8 min,94 °C 变性 1 min,55 °C 退火 1.5 min,72 °C 延伸 1.5 min,35 个循环,72 °C 延伸 8 min。PCR 产物纯化采用 DNA 胶回收试剂盒纯化,连入 PMD-18T 载体测序。

表 1 引物列表

Tab. 1 List of primers

引物	序列(5' — 3')	目的基因
<i>RmlAF</i>	GGTATATTTTAGCCGGTGG	扩增 <i>RmlA</i> 基因部分序列
<i>RmlAR</i>	GCAGTTCGCGTAATTGATC	扩增 <i>RmlA</i> 基因部分序列
<i>RmlCF</i>	TGGCCTGCATTATCAAATCA	染色体步移,获得 <i>RmlC</i> 部分基因序列并扩增
<i>RmlCBF</i>	GCGCAGCCACTTAAGAAGAA	染色体步移,获得 <i>RmlCB</i> 部分基因序列并扩增
<i>RmlBF</i>	CGGCTCAAACCTTGTCCATT	染色体步移,获得 <i>RmlB</i> 部分基因序列并扩增

### 1.5 染色体步移

按照 GenomeWalker<sup>MT</sup> Universal Kit 说明书进行操作。试验所用步移引物见表 1。PCR 反应体系: dNTP 0.4 μL, Ex taqE Buffer 2.5 μL (含 Mg<sup>2+</sup>), 引物各 2.5 μL (1 μmol/L), Ex Taq 酶 0.25 μL, 模板 DNA 2 μL, 去离子水补至 25 μL。步移 PCR 扩增条件: 95 °C 预变性 1 min, 95 °C 变性 30 s, 68 °C 延伸 3 min, 35 个循环, 68 °C 延伸 3 min。

### 1.6 生物信息学比对和分析

核酸序列分析和翻译采用 BioEdit software version 7.0.5.2 软件进行。相似性比较采用 NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) BLAST 软件在线分析。多序列比对采用 ClustalW 程序在线分析 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw/>)。

## 2 结果与分析

### 2.1 dTDP-葡萄糖焦磷酸化酶(RmlA)基因的克隆

以鼠李糖乳杆菌 JAAS8 基因组 DNA 为模板, 用设计的引物 RmlAF 和 RmlAR 进行扩增。PCR 产物经 1 g/dL 琼脂糖凝胶电泳检测, 发现在大于 750 bp 处有一扩增条带, 见图 1, 与目的片段长度相符。将片段纯化并测序。测序结果显示, 扩增出的片段长度为 771 bp, 编码 256 个氨基酸。预测蛋白质与已报道的鼠李糖乳杆菌 dTDP-葡萄糖焦磷酸化酶(RmlA)的同源性很高, 推测该基因片段可能为鼠李糖乳杆菌 JAAS8 胞外多糖生物合成基因簇的部分序列, 见图 2。

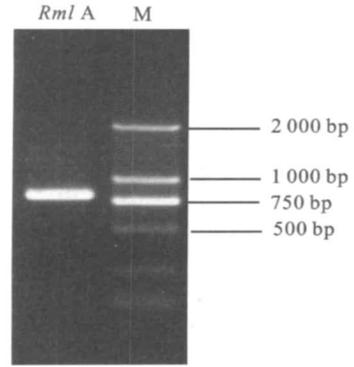


图 1 RmlA 基因的电泳图谱

Fig. 1 Electrophoretogram of RmlA

### 2.2 染色体步移和生物信息学分析

利用已获得的鼠李糖乳杆菌 JAAS8 的部分基因序列, 设计正反向特异性引物, 与 GenomeWalker<sup>MT</sup> UniversalKit 提供的接头引物 AP1 进行 PCR 反应, 扩增基因的上下游序列。回收 PCR 产物测序, 并与 Genbank 中的相关序列进行比对, 然后根据获得的序列信息再次设计引物, 如此反复, 获得鼠李糖乳杆菌 JAAS8 胞外多糖合成基因簇中的部分基因序列。经过多次步移、PCR、测序和拼接, 共获得 4.1 kb 胞外多糖合成基因, 见表 2。

RmlA 的大小为 801 bp, 编码 265-aa 的蛋白质。此蛋白质与葡萄糖-1-磷酸胸苷转移酶有很高的同源性: 与鼠李糖乳杆菌 LGG 的 RmlA (GenBank 序列号: CAR87894) 100% 同源; 与鼠李糖乳

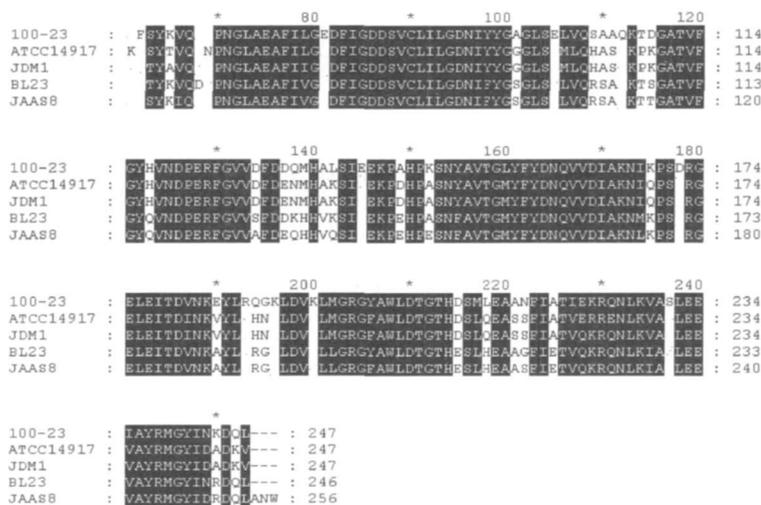


图 2 鼠李糖乳杆菌 JAAS8 RmlA 基因预测蛋白多序列比对

Fig 2 Sequence alignment of the predicted RmlA protein from L rhamnosus JAAS8

相似蛋白及菌株: 100-23(罗伊乳杆菌 100-23, GenBank 序列号: EDX42752), ATCC 14917(植物乳杆菌 ATCC 14917, GenBank 序列号: EEJ65645), JDM1(植物乳杆菌 JDM 1, GenBank 序列号: ACT61919), BL23(干酪乳杆菌 BL23, GenBank 序列号: CAQ67290)

杆菌 Lc 705 的 *RmlA* (GenBank 序列号: CAR90897) 同源性达 97%; 与来自干酪乳杆菌 TCC 334 的 *RmlA* (GenBank 序列号 ABJ70770) 94% 同源。

Orf1 的大小为 1 416 bp, 编码 498-aa 的蛋白质。此蛋白质与转座酶有很高的同源性: 与鼠李糖乳杆菌 HN001 的 Orf1 (GenBank 序列号: EDY97542) 100% 同源; 与来自干酪乳杆菌干酪亚种 ATCC 25302 的 Orf1 (GenBank 序列号: EEI68379) 63% 同源。

*RmlC* 的大小为 600 bp, 编码 199 aa 的蛋白质。此蛋白质与 dTDP-4 脱氢鼠李糖 3, 5-表异构酶有很高的同源性: 与来自鼠李糖乳杆菌 Lc 705 的 *RmlC* (GenBank 序列号 CAR90878) 98% 同源; 与来自干酪乳杆菌 ATCC 334 的 *RmlC* (GenBank 序列号: ABJ70769) 89% 同源。

*RmlB* 的大小为 1 206 bp, 编码 341-aa 的蛋白质。此蛋白质与 dTDP-4, 6-葡萄糖脱水酶有很高的同源性。例如与鼠李糖乳杆菌 Lc 705 的 *RmlB* (GenBank 序列号 CAR90877) 98% 同源; 与来自干酪乳杆菌 ATCC 334 的 *RfbB* (GenBank 序列号: ABJ70768) 93% 同源; 与来自干酪乳杆菌 BL23 的 *RmlB* (GenBank 序列号: CAQ67247) 92% 同源。

*RmlACB* 3 个阅读框预测蛋白参与胞外生物合成过程中 dTDP-L-鼠李糖供体合成。鼠李糖乳杆菌 JAAS8 *RmlACB* 基因与已报道鼠李糖乳杆菌荚膜多糖生物合成基因具有高度同源性和保守性。但在鼠李糖乳杆菌 JAAS8 胞外多糖合成基因簇中未发现 *RmlD* 基因, 该基因在鼠李糖乳杆菌 ATCC 9595 胞外多糖生物合成基因簇中编码活性 dTDP-鼠李糖合成酶<sup>[15]</sup>。

表 2 JAAS8 胞外多糖合成基因簇部分基因功能预测

Tab. 2 Profiles of predicted OFRs of the EPS biosynthesis gene locus of *L. rhamnosus* JAAS8

OFR	G+ C 含量/ %	编码蛋白	相似蛋白质	蛋白质功能	相关菌株	同源性/ %
<i>RmlA</i>	45	265	<i>RmlA</i>	葡萄糖-1-磷酸胸苷转移酶	<i>L. rhamnosus</i> Lc 705	98
Orf1	49	498	Orf1	转座酶	<i>L. rhamnosus</i> HN001	100
<i>RmlC</i>	44	199	<i>RmlC</i>	dTDP-4 脱氢鼠李糖 3, 5-表异构酶	<i>L. casei</i> ATCC334	89
<i>RmlB</i>	45	341	<i>RmlB</i>	dTDP-4, 6 葡萄糖脱水酶	<i>L. casei</i> BL23	92

### 3 讨 论

乳酸菌胞外多糖的合成是从活化的核苷酸糖复合物开始的。UDP-葡萄糖、UDP-半乳糖和 dTDP-鼠李糖是胞外多糖生物合成最重要的前体化合物。dTDP-鼠李糖是从葡萄糖-1-磷酸开始经过 4 个反应合成的<sup>[16]</sup>。葡萄糖-1-磷酸胸苷转移酶, dTDP-4, 6-葡萄糖脱水酶, dTDP-4 脱氢鼠李糖 3, 5-表异构酶和 dTDP-鼠李糖合酶参与了 dTDP-鼠李糖的合成, 这 4 个酶分别由基因 *RmlA*, *RmlB*, *RmlC*, 和 *RmlD* 编码<sup>[14]</sup>。这 4 个基因是连续的, 位于胞外多糖生物合成基因簇内部<sup>[17-18]</sup>。这 4 个基因广泛存在于革兰氏阳性和阴性菌中, 尽管不同菌种之间操纵子的序列结构不同, 这 4 个基因还是显示出高度的同源性<sup>[17, 19]</sup>。

*RmlACB* 编码蛋白质是乳酸菌胞外多糖生物合成途径中的关键酶。该酶负责将葡萄糖-1-磷酸转化成 dTDP-鼠李糖, 是含鼠李糖胞外多糖生物合成的必需酶。一些研究结果证实了 *RmlA* 基因的功能。Levander 过量表达嗜热链球菌 LY03 *pgmA*

基因(磷酸葡萄糖变位酶)和 *galU* 基因(UDP-葡萄糖焦磷酸化酶), 使胞外多糖产量提高。从胞外多糖生物合成, 糖核苷酸生物合成和戊糖磷酸途径可以看出,  $\alpha$ -葡萄糖磷酸变位酶, UDP-半乳糖 4-表异构酶, UDP-葡萄糖焦磷酸与胞外多糖的产量有直接的关系。Mozzi 研究发现: 干酪乳杆菌 CRL87 以半乳糖为碳源, UDP-葡萄糖焦磷酸化酶、dTDP-葡萄糖焦磷酸化酶、dTDP-鼠李糖合成酶的活性及胞外多糖的产量明显高于以葡萄糖为碳源。另外, 异源过量表达乳酸乳球菌 *RfbAC* 蛋白质能够显著提高 dTDP-rhamnose 供体的产量, 说明 *RfbAC* 表达水平调控 dTDP-rhamnose 的合成<sup>[18]</sup>。

### 4 结 语

作者采用 PCR 扩增和染色体步移技术获得了鼠李糖乳杆菌 JAAS8 胞外多糖生物合成关键酶基因(4.1 kb)的保守序列。使用生物信息学方法鉴定了该序列与已报道乳酸菌胞外多糖生物合成基因具高度同源性和保守性, 并对基因的结构和功能进行了预测分析。*RmlACB* 3 个基因预测编码蛋白质

分别为葡萄糖-1-磷酸胸苷转移酶、dTDP-葡萄糖-4,6-脱氢酶和dTDP-4-脱氢鼠李糖-3,5-差向异构酶。为参与胞外多糖生物合成过程中dTDP-鼠李糖前

体生物合成的基因,位于胞外多糖生物合成相关基因簇的中心区。

## 参考文献(References):

- [1] De Vuyst L, Degheest B. Heteropolysaccharides from lactic acid bacteria[J]. **FEMS Microbiol Rev**, 1999, 23(2): 153-177.
- [2] Hosono A, Lee J, Ametani A, et al. Characterization of a water soluble polysaccharide fraction with immunopotentiating activity from *Bifidobacterium adolescentis* M10F-4[J]. **Biosci Biotech Biochem**, 1997, 61(2): 312-316.
- [3] Kitazawa H, Harata T, Uemura J, et al. Phosphate group requirement for mitogenic activation of lymphocytes by an extracellular phosphopolysaccharide from *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *Bulgaricus*[J]. **Int J Food Microbiol**, 1998, 40(3): 169-175.
- [4] Blum S, Reniero R, Schiffrin E J, et al. Adhesion studies for probiotics: need for validation and refinement[J]. **Trends Food Sci Technol**, 1999, 10(12): 405-410.
- [5] Doço T, Wieruszkeski J M, Fournet B, et al. Structure of an exocellular polysaccharide produced by *Streptococcus thermophilus*[J]. **Carbohydr Res**, 1990, 198(2): 313-321.
- [6] Staaf M, Yang Z, Huttunen E, et al. Structural elucidation of a viscous exopolysaccharide produced by *Lactobacillus helveticus* Lb161[J]. **Carbohydr Res**, 2000, 326(2): 113-119.
- [7] Górskaa S, Jachymeka W, Rybkaa J, et al. Structural and immunochemical studies of neutral exopolysaccharide produced by *Lactobacillus johnsonii* 142[J]. **Carbohydr Res**, 2010, 345(1): 108-114.
- [8] Rodríguez Carvajala M A, Sánchezz J I, Campelob A B, et al. Structure of the high molecular weight exopolysaccharide isolated from *Lactobacillus pentosus* LPS26[J]. **Carbohydr Res**, 2008, 343(18): 3066-3070.
- [9] 李盛钰, 曾宪鹏, 杨贞耐. 提高乳酸菌胞外多糖产量的途径[J]. 食品与生物技术学报, 2009, 28(3): 289-293.  
LI Sheng-yu, Zeng Xiang-peng, YANG Zhen-nai. Strategies for increasing of exopolysaccharide production in lactic acid bacteria[J]. **J Food Sci Biotechnol**, 2009, 28(3): 289-293. (in Chinese)
- [10] Jolly L, Newell J, Porcelli I, et al. *Lactobacillus helveticus* glycosyltransferases: from genes to carbohydrate synthesis[J]. **Glycobiology**, 2002, 12(5): 319-327.
- [11] Jolly L, Stingle F. Molecular organization and functionality of exopolysaccharide gene clusters[J]. **Int Dairy J**, 2001, 11(9): 733-745.
- [12] Vankranenburg R, Marugg J D, Vanswam I I, et al. Molecular characterization of the plasmid encoded eps gene cluster essential for exopolysaccharide biosynthesis in *Lactococcus lactis*[J]. **Mol Microbiol**, 1997, 24(2): 387-397.
- [13] De Man J C, Rogosa M, Sharpe M E. A medium for the cultivation of *lactobacilli*[J]. **J Appl Microbiol**, 1960, 23(1): 130-135.
- [14] Bouazzaoui K, LaPointe G. Use of antisense RNA to modulate glycosyltransferase gene expression and exopolysaccharide molecular mass in *Lactobacillus rhamnosus*[J]. **J Microbio Methods**, 2006, 65(2): 216-225.
- [15] Boels I C, Beerthuyzen M M, Kusters M H W, et al. Identification and functional characterization of the *Lactococcus lactis* rfb operon, required for dTDP rhamnose biosynthesis[J]. **J Bacteriol**, 2004, 186(5): 1239-1248.
- [16] Köplin R G, Wang B, Hötte U B, et al. A 3.9 kb DNA region of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* that is necessary for lipopolysaccharide production encodes a set of enzymes involved in the synthesis of dTDP rhamnose[J]. **J Bacteriol**, 1993, 175(24): 7786-7792.
- [17] Li Q, Hobbs M, Reeves P R. The variation of dTDP rhamnose pathway genes in *Vibrio cholerae*[J]. **Microbiology**, 2003, 149(9): 2463-2474.
- [18] Sá-Correia I, Fialho A M, Videira P, et al. Gellan gum biosynthesis in *Sphingomonas paucimobilis* ATCC 31461: genes, enzymes and exopolysaccharide production engineering[J]. **J Ind Microbiol Biotechnol**, 2002, 29(4): 170-176.
- [19] Mitchison M, Bulach D M, Vinh T, et al. Identification and characterization of the dTDP rhamnose biosynthesis and transfer genes of the lipopolysaccharide related rfb locus in *Leptospira interrogans* serovar Copenhageni[J]. **J Bacteriol**, 1997, 179(4): 1262-1267.