

研究报告

## 马奶酒样乳杆菌 ZW3 中 WANG\_1291 基因的表达

康然 王菁蕊 崔月倩 西艳双 王艳萍\*

(天津科技大学食品工程与生物技术学院 食品营养与安全教育部重点实验室 天津 300457)

**摘要:**【目的】马奶酒样乳杆菌 ZW3 含有一段长度为 14.4 kb 的胞外多糖合成基因簇, 包含 17 个与胞外多糖合成相关的基因(WANG\_1283–WANG\_1299), 主要分析 17 个基因在马奶酒样乳杆菌 ZW3 生长过程中不同时间段的表达量, 探究其中一个表达量发生变化的基因对乳酸菌产胞外多糖的影响。【方法】通过半定量 RT-PCR 实验, 对基因簇上各基因的表达量进行分析; 通过构建含有表达量变化基因的重组乳酸乳球菌, 比较重组菌与野生菌的产胞外多糖差异。【结果】经分析, WANG\_1284、WANG\_1286、WANG\_1287、WANG\_1288、WANG\_1290、WANG\_1291、WANG\_1292、WANG\_1294、WANG\_1296、WANG\_1297、WANG\_1298、WANG\_1299 这 12 个基因在菌体生长的 50 h 和 60 h (产糖量上升阶段)表达量最高, 推测这些基因在多糖聚合过程中起作用。从这 12 个基因中选出一个表达量发生明显变化的基因 WANG\_1291 做进一步研究。将 WANG\_1291 插入乳酸菌表达载体 pMG36e 中, 构建了重组表达载体 pMG36e-1291。将构建的重组表达载体转化到乳酸乳球菌 WH-C1 中, 得到重组菌株。测定重组菌与野生菌生长特性, 发现重组菌与野生菌之间的生长速度存在一定差异。然后利用苯酚-硫酸法测得重组乳酸乳球菌的胞外多糖产量是野生菌的 2.1 倍, 胞外多糖产量有了明显的提高。【结论】确定 WANG\_1291 基因是调控马奶酒样乳杆菌 ZW3 产胞外多糖的关键基因之一。

**关键词:** 马奶酒样乳杆菌 ZW3, 胞外多糖, 半定量 RT-PCR, 重组菌株

## Expression of WANG\_1291 gene of *Lactobacillus kefiranofaciens* ZW3

KANG Ran WANG Jing-Rui CUI Yue-Qian XI Yan-Shuang WANG Yan-Ping\*

(College of Food Engineering & Biotechnology, Tianjin University of Science & Technology, Key Laboratory of Food Nutrition and Safety, Ministry of Education, Tianjin 300457, China)

**Abstract:** [Objective] The whole genome sequencing of *Lactobacillus kefiranofaciens* ZW3 is already known, it carries a 14.4 kb EPS (exopolysaccharides) gene cluster (WANG\_1283 to WANG\_1299) containing 17 EPS-related genes. In this study, we analyzed the expression quantity of 17 EPS genes in *Lactobacillus kefiranofaciens* ZW3 growth, and explored one expression quantity changed gene how to influence EPS yield. [Methods] Expression quantity of 17 EPS genes was analyzed by semi-quantitative RT-PCR technique; By constructing a recombinant strain of *Lactococcus lactis* containing an expression quantity changed gene, the EPS yield was compared between mutant strain and the wild strain. [Results] WANG\_1284, WANG\_1286, WANG\_1287, WANG\_1288,

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 31171629)

\*通讯作者: ✉: ypwang40@163.com

收稿日期: 2015-01-10; 接受日期: 2015-03-09; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2015-04-10

WANG\_1290, WANG\_1291, WANG\_1292, WANG\_1294, WANG\_1296, WANG\_1297, WANG\_1298, WANG\_1299 have the highest expression level at 50 h and 60 h when EPS was highly synthesized, suggesting that these genes play a role in the polymerization of polysaccharides. WANG\_1291 was picked out from EPS genes to be further studied. This gene was inserted into plasmid pMG36e for the recombinant expression. The recombinant expression vectors were electroporated into *Lactococcus lactis* WH-C1. Assessing growth curves showed that the mutant strain and the wild strain have some differences. EPS yield of the recombinant was 2.1 times higher than that of the wild strain as analyzed by phenol-sulfuric acid method. **[Conclusion]** We provided evidence to show that WANG\_1291 is a key gene to regulate *Lactobacillus kefiranofaciens* ZW3 EPS yield.

**Keywords:** *Lactobacillus kefiranofaciens* ZW3, Exopolysaccharides, Semi-quantitative RT-PCR, Recombinant strains

乳酸菌(Lactic acid bacterium, LAB)是一类能发酵利用碳水化合物并产生大量乳酸的细菌。乳酸菌胞外多糖(LAB EPS)是这类细菌在生长代谢过程中分泌到细胞壁外的黏多糖或荚膜多糖。多年来研究表明, 乳酸菌胞外多糖有免疫调节<sup>[1-2]</sup>、抗肿瘤<sup>[3-4]</sup>、抗氧化等生物活性<sup>[5-6]</sup>, 也具有改善酸奶的流变特性、增加酸奶黏度、提高酸奶稳定性<sup>[7]</sup>等优良特征, 具有广阔的应用前景。

大部分胞外多糖在细胞内聚合过程大致为: 糖酵解产生的葡萄糖-6-磷酸在  $\alpha$ -磷酸葡萄糖变位酶作用下生成糖-1-磷酸, 糖-1-磷酸经相关酶转化形成糖核苷酸前体, 糖核苷酸前体在糖基转移酶作用下, 将第一个糖基加载在一种脂质载体上<sup>[8]</sup>, 随后将一系列糖基加载在不断增长的重复单元上最终聚合成胞外多糖<sup>[9-10]</sup>, 通过细胞膜转移分泌到胞外。胞外多糖的合成需要相关基因的参与<sup>[11-13]</sup>, 通常, EPS 基因簇主要分 4 个功能区域, 分别为: 控制基因簇转录的调控基因、糖基转移酶基因、链长决定基因、糖单元聚合输出基因<sup>[14]</sup>。本实验室已对马奶酒样乳杆菌 ZW3 进行了全基因组测序, 测序结果可知染色体上含有一段 14.4 kb 的胞外多糖合成基因簇<sup>[15]</sup>, 含有 17 个多糖编码相关基因 (WANG\_1283-WANG\_1299), 编码蛋白包括: 甘油-3-磷酸胞苷转移酶、EpsIM 假定的糖基转移酶、LPS 生物合成蛋白、EpsN、WchA 糖基转移酶、UDP-N-乙酰氨基葡萄糖、EPS 生物合成蛋白和荚膜多糖合成蛋白等。

本文以马奶酒样乳杆菌 ZW3 为研究对象, 应用半定量 RT-PCR 技术分析 EPS 基因簇中 17 个基因在菌体生长不同时间点的表达量, 通过产物条带亮度预测各基因在多糖合成中的作用, 并从中选取 WANG\_1291 这一关键基因, 构建乳酸乳球菌 WH-C1 的突变株, 初步探究此基因对胞外多糖产量的影响, 为后续研究奠定了基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌株、引物、质粒及培养条件

菌种: 马奶酒样乳杆菌 ZW3 (*Lactobacillus kefiranofaciens* ZW3) 与乳酸乳球菌 WH-C1 (*Lactococcus lactis* WH-C1), 分离自西藏 Kefir 粒, 高产胞外多糖, 本实验室保存。

引物: 本实验所用引物均采用 Primer Premier 5 设计, 由华大基因合成, 见表 1。

质粒: pMG36e<sup>[16]</sup>, 大小为 3 610 bp, 含 P32 启动子, 具有红霉素抗性。

马奶酒样乳杆菌用乳清培养基培养<sup>[17]</sup>; 乳酸乳球菌用 MRS 培养基培养<sup>[18]</sup>。

### 1.2 主要试剂和仪器

2×EasyTaq PCR Mix 和 Trans 2K Plus II DNA marker, 购自北京全式金生物技术有限公司; T4 DNA 连接酶与限制性内切酶, 购自立陶宛 MBI Fermentas 公司; cDNA 第一条链合成试剂盒、DTT 二硫苏糖醇溶液, 购自天根生化科技有限公司。其他试剂均为国产分析纯。PCR 仪, 购自德国

表 1 本实验使用的引物  
Table 1 The primers used in this study

引物名称 Primers	引物序列 Primers sequences (5'→3')
bdInc-up	CTGATGTGAAAGCCCTCG
bdInc-down	TAATCCTGTTGCTACCC
q91-up	GCGAGCTCTGGGGATTATGTATTC
q91-down	CCCAAGCTTTTAATCTATTTTTTTGAT
1283-up	TGCTCTAGATTGATCGTCGCACTTC
1283-down	CGCCAAGCTTCTAAAGTTTCAAATCTCTC
1284-up	CCGAGCTCATGAAGATTGCACTGAT
1284-down	GCGTCGACTTACTTATAAAGTGATAT
1285-up	GCGAGCTCATGCAAAAAAAGTGTATCGAG
1285-down	CCCAAGCTTCTAAAGTTTAAAATCTACGAG
1286-up	GCTCTAGAATGAGCAAAAAATCTTTG
1286-down	GGGCCCAAGCTTCTAAATTTTAT
1287-up	CCGAGCTCATGGTAGATAAAAAGCCGAT
1287-down	GCGTCGACTCATGACTTTCCTTTCT
1288-up	GCGAGCTCATGAAAAGAGCATGTTTATAATTC
1288-down	GGCGTCGACTTATCTACCATTTTTTGTAGT
1289-up	TGCACTGCAGATGAAAATAAGACTTGAGCG
1289-down	CCCAAGCTTTCATTTTAATCCTTCTT
1290-up	CGCTCTAGAATGAGCATAAAAAGACAA
1290-down	GCCTGCAGTCATTTACGTTCCACCAATC
1291-up	GCTCTAGATTGGGGATTATGTATTC
1291-down	CCCAAGCTTTTAATCTATTTTTTTGAT
1292-up	GCCTGCAGATGAATTCATTAGTTTCA
1292-down	CCCGAAGCTTTTAAATAACTTGAACCTTA
1293-up	GCTCTAGAATGATCTTTGTTACAGTAGGGAC
1293-down	CCCAAGCTTTTATTTGCAATCCATC
1294-up	GCGAGCTCATGAAAGTTTGTGTTAGTTGG
1294-down	GCCGCTCTAGATTA AAAAATACTCCCT
1295-up	GCGAGCTCATGGTAATGGAGAACTAAAAG
1295-down	GCGTCGACTTAATACGCTCCATTAGGATG
1296-up	GCGAGCTCATGGTTTTAGTTGATATTCAC
1296-down	GCGTCGACTTAAAAATAGCCAGAATT
1297-up	GGCGAGCTCATGTCACTTTTTAAG
1297-down	GCGTCGACTTACTTTTTCAACCTAG
1298-up	GCGAGCTCATGGAACAAGAACAAAAG
1298-down	GCGTCGACCTATACTCTGCGTCTCTT
1299-up	GCGAGCTCATGGTAGAAAAGAATCAAC
1299-down	CCCAAGCTTTTAATTATGATTCATAACG

Eppendorf 公司; Power PAC3000 电泳仪。全自动凝胶成像仪与电转仪, 购自美国 Bio-Rad 公司; ND2000 超微量核酸蛋白测定仪, 购自美国 Thermo 公司。

### 1.3 乳酸菌产糖量的测定

使用苯酚-硫酸法测产糖量, 按黄晓钰等<sup>[19]</sup>所述方法制作标准曲线, 将不同浓度的葡萄糖溶液与苯酚、浓硫酸混合后, 测其  $OD_{490}$  值, 以葡萄糖浓度为横坐标,  $OD_{490}$  值为纵坐标绘制标准曲线。然后将待测乳酸菌接种到乳清液体培养基中厌氧培养。每 4 h 取样一次, 将取出的菌液离心除去菌体后, 取一定体积的上清液装入透析袋中, 蒸馏水透析(截流量 6 000–8 000 kD), 直至透析蒸馏水中无单糖检出, 用移液管吸取待测液 1.0 mL, 以蒸馏水补足至 2.0 mL, 测定方法同标准曲线的制作。

### 1.4 RNA 的提取

将 *Lb. kefiranofaciens* ZW3 接种到乳清液体培养基中厌氧培养, 结合其产糖曲线确定取样点。分别在生长 10、30、50、60、72、80 h 这 6 个时间点取菌液 3–5 mL, 离心收集菌体, 加入溶菌酶裂解细胞壁, 再加入 0.5 mL Trizol 与 200  $\mu$ L 氯仿, 剧烈振荡后 4  $^{\circ}$ C 离心 15 min。吸上层水相至另一 EP 管中, 加入异丙醇与冰乙醇使 RNA 沉淀, 最后 4  $^{\circ}$ C、13 000 r/min 离心 10 min, 弃上清, 用 20  $\mu$ L 0.1% 的 DEPC 水溶解 RNA 样品。

### 1.5 cDNA 第一条链的合成

在 DEPC 水泡过的 EP 管中依次加入: 10  $\mu$ mol/L 随机引物 2  $\mu$ L, RNA 样品 20  $\mu$ L, 10 mmol/L dNTPs 2  $\mu$ L, 5 $\times$ 缓冲液 8  $\mu$ L, 0.1 mol/L DTT 4  $\mu$ L, 20 g/L RNase 抑制剂 2  $\mu$ L, 200 U/ $\mu$ L 逆转录酶 M-MLV 2  $\mu$ L, 轻轻吹打混匀, 在 25  $^{\circ}$ C 保温 10 min, 37  $^{\circ}$ C 孵育 50 min, 70  $^{\circ}$ C 15 min 终止反应。

### 1.6 EPS 基因的半定量 RT-PCR

将得到的 6 组 cDNA 作为半定量 RT-PCR 反应的模板。反应体系: 双蒸水(8-x)  $\mu$ L, 2 $\times$ EasyTaq PCR Mix (PCR 扩增预混合溶液) 10  $\mu$ L, bdlnc-up

(10  $\mu$ mol/L) 1.0  $\mu$ L, bdlnc-down (10  $\mu$ mol/L) 1.0  $\mu$ L, cDNA x  $\mu$ L。反应程序: 94  $^{\circ}$ C 5 min; 94  $^{\circ}$ C 30 s, 55  $^{\circ}$ C 30 s, 72  $^{\circ}$ C 30 s, 28 个循环; 72  $^{\circ}$ C 10 min。分别取 3  $\mu$ L 进行琼脂糖凝胶电泳, 用软件 Quantity One 对条带进行相对定量分析, 通过调整 PCR 体系的模板量, 使 6 组样品灰度值基本一致。

再以该模板量扩增 EPS 基因簇各个基因片段, PCR 反应体系与反应程序同上, 但其中的退火温度和延伸时间要根据引物  $T_m$  值和基因片段长短而定, 一般退火温度比引物  $T_m$  值低 3–5  $^{\circ}$ C, 延伸时间按照 1 min 延伸 1 kb 片段长度而设定。

### 1.7 马奶酒样乳杆菌 ZW3 基因组的提取

培养过夜的菌液离心收集后, 加 250  $\mu$ L 的 50 mmol/L Tris (pH 8.0)重悬, 依次加入 0.4 mol/L EDTA 10  $\mu$ L, 20 g/L 溶菌酶 10  $\mu$ L, 20 g/L 蛋白酶 K 1.5  $\mu$ L, 10 % SDS 15  $\mu$ L, 缓慢混匀, 在 50  $^{\circ}$ C 水浴 2 h 至溶液澄清。再加 10 g/L RNase 2  $\mu$ L, 65  $^{\circ}$ C 水浴 30 min 后, 将溶液移到含胶的离心管。按 25:24:1 的比例加入苯酚/氯仿/异戊醇离心 5 min, 上清液转移至另一含胶的离心管, 重复抽提一次。加预冷的无水乙醇沉淀 DNA, 最后溶于 100  $\mu$ L TE 中, 于 -20  $^{\circ}$ C 保存。

### 1.8 重组载体 pMG36e-1291 的构建

以基因组为模板, 加入表 1 中 WANG\_1291 对应引物扩增基因。WANG\_1291 PCR 反应体系: ZW3 基因组 1.0  $\mu$ L, 双蒸水 7.0  $\mu$ L, 2 $\times$ EasyTaq PCR Mix 10  $\mu$ L, 上下引物各 1.0  $\mu$ L。反应条件: 94  $^{\circ}$ C 5 min; 94  $^{\circ}$ C 30 s, 48  $^{\circ}$ C 30 s, 72  $^{\circ}$ C 30 s, 30 个循环; 72  $^{\circ}$ C 10 min。将 WANG\_1291 基因片段和质粒 pMG36e 用 *Sac* I 和 *Hind* III 双酶切, 外源片段与载体按照 9:1–6:1 的浓度比例混合, 用 T4 DNA 连接酶 16  $^{\circ}$ C 连接过夜, 得到重组载体 pMG36e-1291。

### 1.9 重组载体电转化乳酸菌

首先制备乳酸乳球菌 WH-C1 感受态, 过程如下: 用 1/10 体积冰冷的洗涤液洗涤离心收集菌体后, 再次离心收集, 该步骤重复一次。接着用 1/100

体积冰冷的电击液重悬菌液,冰上放置约 10 min 后,成功制备乳酸菌感受态,在 $-80^{\circ}\text{C}$ 保存备用。取 1  $\mu\text{L}$  重组载体与 50  $\mu\text{L}$  感受态细胞混匀后转入电转杯,电击条件: 1.25 kV, 25  $\mu\text{F}$ , 400  $\Omega$ , 以空载体 pMG36e 作为对照。电击后的乳酸菌在 MRS 培养基中复苏后,将菌液涂布于含 5 mg/L 红霉素的 MRS 固体培养基上,  $30^{\circ}\text{C}$  厌氧倒置培养,同时将野生菌株涂布于抗性平板,作为阴性对照。7 d 后挑取转化子进行验证。

### 1.10 重组菌株 WH-C1/pMG36e-1291 的表达蛋白验证

重组乳酸乳球菌 WH-C1/pMG36e-1291 与对照菌乳酸乳球菌 WH-C1/pMG36e 活化培养两代,按 1% 接种于 50 mL MRS 培养基中,  $37^{\circ}\text{C}$  培养至对数中期( $OD_{600}$  值约为 1.5–2.0), 收集菌体作蛋白质表达的 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳检查<sup>[20-21]</sup>。

### 1.11 重组菌株 WH-C1/pMG36e-1291 及野生株生长曲线与胞外多糖产量的测定

按董群等<sup>[22]</sup>的方法,以 3% 的接种量将两株转化子种子液接种到含 5 mg/L 红霉素抗性的 MRS 液体培养基中,利用 Bioscreen 全自动生长曲线分析仪测定两种菌生长曲线。按方法 1.3 测定乳酸乳球菌 WH-C1/pMG36e-1291 及 WH-C1/pMG36e 的产糖量。

## 2 结果与分析

### 2.1 *Lb. kefiranofaciens* ZW3 产糖曲线测定

将 *Lb. kefiranofaciens* ZW3 培养 88 h, 用苯酚-硫酸法测定其产糖曲线, 结果如图 1 所示。

由图 1 可以看出, 大约从 30 h 开始, 多糖量开始显著增加, 72 h 达到最高点之后产量有所下降。

### 2.2 半定量 RT-PCR 结果

半定量反转录-聚合酶链反应(Semi-quantitative reverse transcription and polymerase chain reaction) 是近年来常用的一种简捷、特异 RNA 定量的方法。半定量 RT-PCR 是通过将 mRNA 反转录合成 cDNA, 用特异性引物进行 PCR 扩增, 通过琼脂糖凝胶电泳比较等量的 PCR 产物条带的亮度, 从而推

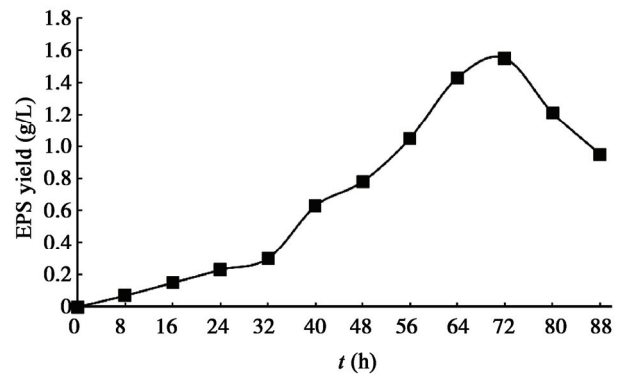


图 1 马奶酒样乳杆菌 ZW3 产糖曲线

Figure 1 EPS production curve of *Lb. kefiranofaciens* ZW3 with different time

测样品中 mRNA 的含量<sup>[23-27]</sup>。

通过测  $OD_{260}$  值, 得到 6 组样品 cDNA 浓度分别为 1 668、1 737、1 781、1 639、1 774、1 486  $\mu\text{g/L}$ 。通过不断调整 PCR 体系模板量, 进行 16S rRNA 内参基因 PCR 反应, 当 6 组样品的模板量分别为 0.6、0.8、1.5、1.8、1.0、1.2  $\mu\text{L}$ , 电泳上样量为 3  $\mu\text{L}$  时, 6 组样品呈现较为接近的电泳条带, 电泳结果见图 2。

电泳条带用软件 Quantity One 的等高线定量法进行分析, 它通过半自动描绘电泳条带的等高线边缘来得到等高线区域内部面积, 再将该面积乘以区域内平均光密度值得到条带内部总信号量, 再将各个样品的信号量进行相对定量比较。通过分析, 6 组样品扩增内参总信号接近, 分析结果见表 2, 各组信号比值基本一致, 认为模板量已经调平, 可以进行 EPS 基因的扩增。

6 组样品的模板量分别为 0.6、0.8、1.5、1.8、1.0、1.2  $\mu\text{L}$ , 以此模板量对 EPS 基因簇 17 个基因



图 2 马奶酒样乳杆菌 ZW3 16S rRNA 基因的半定量 RT-PCR 结果

Figure 2 Semi-quantitative RT-PCR of 16S rRNA gene of *Lb. kefiranofaciens* ZW3

表 2 马奶酒样乳杆菌 ZW3 16S rRNA 基因的半定量 RT-PCR 结果  
Table 2 Semi-quantitative RT-PCR of 16S rRNA gene of *Lb. kefiranofaciens* ZW3

时间 Time (h)	10	30	50	60	72	80
信号相对比值 Signal relative value	16.77	16.78	16.68	16.64	16.70	16.72

进行半定量 RT-PCR。扩增 EPS 基因簇 17 个基因的半定量 RT-PCR 结果见图 3。

由图 3 可以直观地看到 EPS 基因簇各基因在菌体生长过程中的表达情况, 用软件 Quantity One 分析了各组条带的信号比值, 结果见表 3, 每个基因在 6 个时间点的信号值是一个相对比值, 可以看出该基因在菌体生长过程中表达量的变化。

通过半定量 RT-PCR 实验对 EPS 基因簇各基因的表达量进行分析, 得出以下结果: WANG\_1283、WANG\_1285、WANG\_1293 这 3 个基因在选取的 6 个时间点表达量变化不大; WANG\_1284、

WANG\_1286、WANG\_1287、WANG\_1288、WANG\_1290、WANG\_1291、WANG\_1292、WANG\_1294、WANG\_1296、WANG\_1297、WANG\_1298、WANG\_1299 这 12 个基因在菌体生长的 50 h 和 60 h 即产糖量上升阶段表达量最高, 推测这些基因在多糖聚合过程中起作用; 基因 WANG\_1289 随着菌体生长时间表达量持续升高, 在菌体生长的 80 h 即产糖后期表达量最高, 推测其在胞外多糖合成后期起作用; 基因 WANG\_1295 在开始 10 h 即有大量表达, 30 h 有所下降, 到了 50–72 h 表达量维持在较高水平, 到 80 h 又有所下降, 呈现出表达量的高低变化。

### 2.3 重组菌株 WH-C1/pMG36e-1291 转化子的验证

按方法 1.8 得到重组质粒 pMG36e-1291, 对其质粒进行 PCR 验证, 得到能 PCR 出相应大小目的条带的转化子质粒, 再将 pMG36e 同时进行 *EcoR* I 单酶切验证, 见图 4, 显示泳道 2 重组载体单酶切

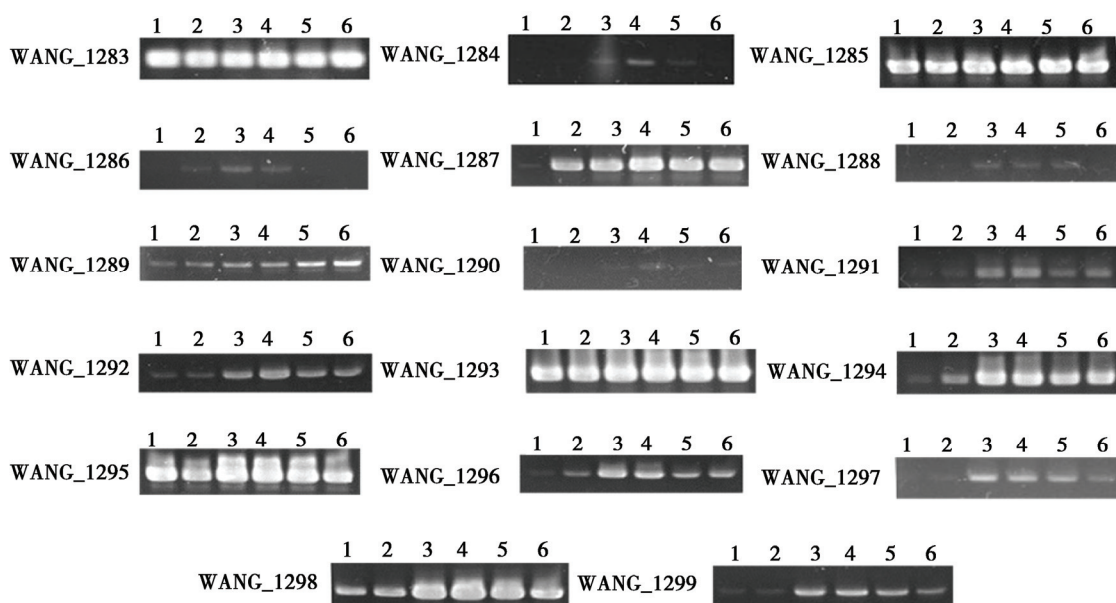


图 3 马奶酒样乳杆菌 ZW3 产胞外多糖基因的半定量 RT-PCR 结果  
Figure 3 Semi-quantitative RT-PCR of *Lb. kefiranofaciens* ZW3 EPS genes

注: 1–6: 依次为菌体生长 10、30、50、60、72、80 h 菌体样品。

Note: 1–6: *Lb. kefiranofaciens* ZW3 in 10, 30, 50, 60, 72, 80 h.



表3 马奶酒样乳杆菌 ZW3 产胞外多糖基因的半定量 RT-PCR 信号值

Table 3 Signal relative value semi-quantitative RT-PCR of *Lb. kefiranofaciens* ZW3 EPS genes

基因 Gene	10 h	30 h	50 h	60 h	72 h	80 h
WANG_1283	16.84	16.56	16.89	16.91	16.34	16.25
WANG_1284	12.56	13.72	18.18	23.29	16.83	15.43
WANG_1285	17.25	16.00	17.13	16.29	16.24	17.09
WANG_1286	11.85	12.45	16.77	23.33	22.00	13.61
WANG_1287	3.43	16.45	16.94	23.56	20.50	19.12
WANG_1288	11.04	11.32	22.68	21.11	21.84	12.00
WANG_1289	11.56	14.62	15.01	15.67	21.10	22.05
WANG_1290	13.35	14.64	18.93	21.19	16.16	15.73
WANG_1291	9.60	10.40	23.00	23.67	16.54	16.79
WANG_1292	9.34	9.05	20.49	25.50	18.00	17.63
WANG_1293	16.46	16.77	16.72	16.88	16.79	16.38
WANG_1294	6.89	10.27	23.64	22.41	18.28	18.51
WANG_1295	18.22	14.24	20.35	17.51	16.48	13.20
WANG_1296	8.42	11.30	26.68	22.84	15.45	15.32
WANG_1297	10.47	10.82	24.34	22.43	18.32	13.60
WANG_1298	9.60	11.07	20.52	22.11	18.88	17.81
WANG_1299	6.55	7.82	26.53	25.14	20.37	13.60

条带比泳道 1 单酶切条带大, 表明目的基因已正确克隆至 pMG36e 载体中。

为了进一步证明乳酸乳球菌 WH-C1/pMG36e-1291 转化子的构建成功, 取培养好的转化子进行 SDS-PAGE 电泳。WANG\_1291 蛋白含有 104 个氨基酸残基, 理论分子量约为 12.97 kD。图 5 显示, 乳酸乳球菌转化子 WH-C1/pMG36e-1291 大约在 14 kD 处可看到一条蛋白条带, 分子量与预计相符, 而在对照株乳酸乳球菌 WH-C1 相同位置无蛋白条带, 说明 WANG\_1291 基因所编码的蛋白在乳酸乳球菌 WH-C1 中进行了表达。

#### 2.4 乳酸乳球菌 WH-C1/pMG36e-1291 的生长曲线及产多糖量

将验证成功的乳酸乳球菌 WH-C1/pMG36e-1291 转化子与乳酸乳球菌 WH-C1/pMG36e 转化子按 1.11 中方法测得其二者的生长曲线(图 6)。

如图 6 所示, 乳酸乳球菌 WH-C1/pMG36e 从接种后, 到第 12 h 进入稳定期, 此期间细胞新生长

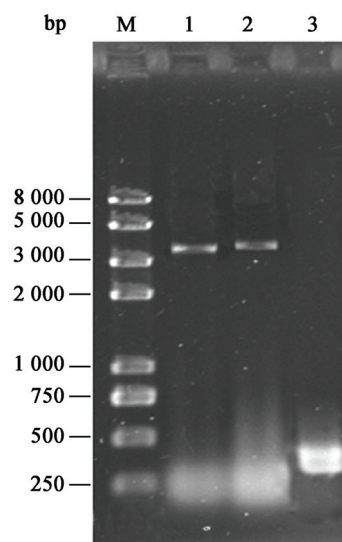


图4 重组质粒 pMG36e-1291 酶切验证

Figure 4 Restriction enzyme analysis of plasmid pMG36e-1291

注: M: Trans 2K Plus II DNA marker; 1: pMG36e/EcoR I 单酶切; 2: pMG36e-1291/EcoR I 单酶切; 3: 重组质粒 pMG36e-1291 PCR 扩增条带。

Note: M: Trans 2K Plus II DNA marker; 1: pMG36e/EcoR I; 2: pMG36e-1291/EcoR I; 3: Product of PCR from pMG36e-1291.

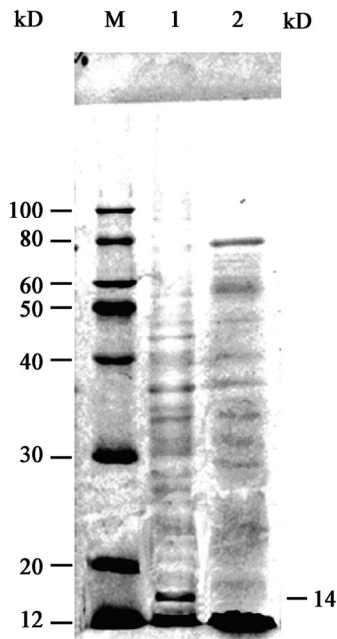


图 5 SDS-PAGE 分析转化子 WH-C1/pMG36-1291 的蛋白表达情况

Figure 5 SDS-PAGE analysis of the protein expressed in *L. lactis* WH-C1/pMG36-1291

注: M: Protein ruler II protein marker; 1: 乳酸乳球菌 WH-C1/pMG36e-1291 转化子; 2: 乳酸乳球菌 WH-C1/pMG36e 转化子。

Note: M: Protein ruler II protein marker; 1: *L. lactis* WH-C1/pMG36e-1291 supernatant from whole-cell lysate; 2: *L. lactis* WH-C1/pMG36e supernatant from whole-cell lysate.

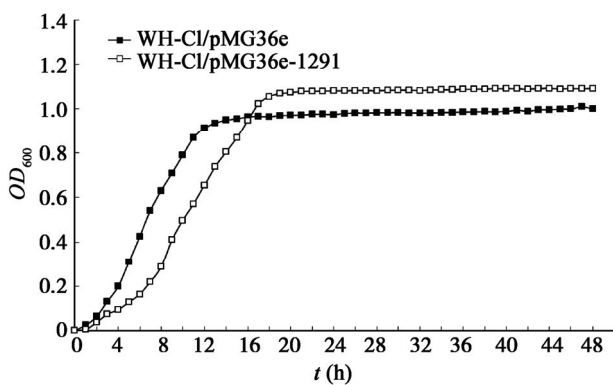


图 6 乳酸乳球菌 WH-C1/pMG36e 及乳酸乳球菌 WH-C1/pMG36e-1291 的生长曲线

Figure 6 The growth curve of strain *L. lactis* WH-C1/pMG36e and *L. lactis* WH-C1/pMG36e-1291

的数目与死亡的细胞数目基本处于稳定平衡状态。相比来说乳酸乳球菌 WH-C1/pMG36e-1291 进入稳定期的时间比较晚, 在第 18 h 才进入稳定期。从总的生物量来看, 转化子与野生菌的差别不是很大。根据实验室前期优化的最佳培养条件进行培养, 乳酸乳球菌 WH-C1/pMG36e 以 3% 的接种量, 在 WHEY 培养基中 30 °C 厌氧条件下静置培养(图 7)。在第 24 h 其 EPS 的产糖量达到最高值为 351.7 mg/L, 乳酸乳球菌 WH-C1/pMG36e-1291 在相同条件下, EPS 产量达到 737.2 mg/L, 是对照菌的 2.1 倍。结果表明, 重组菌株 WH-C1/pMG36e-1291 的 EPS 产量出现明显的提高, 说明 WANG-1291 基因在乳酸菌胞外多糖生物合成过程中起到很大的促进作用。

### 3 结论

本文应用半定量 RT-PCR 技术, 分析了马奶酒样乳杆菌 ZW3 胞外多糖合成基因簇 17 个基因在菌体生长过程中的表达量变化。在马奶酒样乳杆菌 ZW3 生长的 10、30、50、60、72、80 h 6 个时间点取样, 反转录生成 cDNA, 通过半定量 RT-PCR 实验对 EPS 基因簇各基因的表达量进行分析, 得出: WANG\_1283、WANG\_1285、WANG\_1293 这 3 个基因在选取的 6 个时间点表达量变化不大;

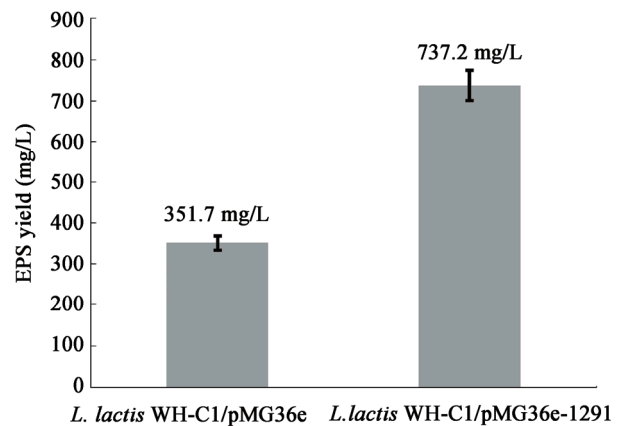


图 7 乳酸乳球菌 WH-C1/pMG36e 及乳酸乳球菌 WH-C1/pMG36e-1291 的胞外多糖产量

Figure 7 EPS yields of strain *L. lactis* WH-C1/pMG36e and *L. lactis* WH-C1/pMG36e-1291



WANG\_1284、WANG\_1286、WANG\_1287、WANG\_1288、WANG\_1290、WANG\_1291、WANG\_1292、WANG\_1294、WANG\_1296、WANG\_1297、WANG\_1298、WANG\_1299 这 12 个基因在菌体生长的 50 h 和 60 h, 即产糖量上升阶段表达量最高, 推测这些基因在多糖聚合过程中起作用; 基因 WANG\_1289 随着菌体生长时间表达量持续升高, 在菌体生长的 80 h 即产糖后期表达量最高, 推测其在胞外多糖合成后期起作用; 基因 WANG\_1295 在开始 10 h 即有大量表达, 30 h 有所下降, 到了 50-72 h 表达量维持在较高水平, 到 80 h 又有所下降, 呈现出表达量的高低变化。在实验结果的基础上, 对 EPS 基因簇上 17 个基因进行深入研究, 从而对马奶酒样乳杆菌 ZW3 高产胞外多糖有更清晰的认识。同时, 成功构建重组乳酸菌表达载体 pMG36e-1291, 酶切验证成功, 获得转化子 WH-C1/pMG36e-1291, 然后利用苯酚-硫酸法测得重组乳酸乳球菌 WH-C1/pMG36e-1291 的胞外多糖产量是对照菌的 2.1 倍, 胞外多糖产量有了明显的提高, 证实 WANG\_1291 基因对提升胞外多糖产量起较大促进作用。

## 参 考 文 献

- [1] Murofushi M, Mizuguchi J, Aibara K, et al. Immunopotentiative effect of polysaccharide from kefir grain, KGF-C, administered orally in mice[J]. Immunopharmacology, 1986, 12(86): 29-35
- [2] Gu XM, Wang FS, Kong J, et al. Effect of EPS I produced by *Lactobacillus* strain, Z<sub>222</sub> on cellular immunity[J]. Chinese Journal of Microbiology and Immunology, 2003, 23(6): 442-445 (in Chinese)  
顾笑梅, 王富生, 孔健, 等. 乳酸菌 Z<sub>222</sub>产胞外多糖(EPS I)对免疫细胞功能的影响[J]. 中华微生物学和免疫学杂志, 2003, 23(6): 442-445
- [3] Wang K, Li W, Rui X, et al. Characterization of a novel exopolysaccharide with antitumor activity from *Lactobacillus plantarum* 70810[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2014, 63: 133-139
- [4] Liu Y. Mechanism for apoptosis of human gastric carcinoma cell due to exopolysaccharides produced by *Lactobacillus bulgaricus*[D]. Harbin: Master's Thesis of Northeast Agricultural University, 2007 (in Chinese)  
刘宇. 保加利亚乳杆菌胞外多糖诱导人胃癌细胞凋亡的作用与机制[D]. 哈尔滨: 东北农业大学硕士学位论文, 2007
- [5] Pan DD, Mei XM. Antioxidant activity of an exopolysaccharide purified from *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* 12[J]. Carbohydrate Polymers, 2010, 80(3): 908-914
- [6] Guo YX, Pan DD, Sun YY, et al. Antioxidant activity of phosphorylated exopolysaccharide produced by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*[J]. Carbohydrate Polymers, 2013, 97(2): 849-854
- [7] Fan LP, Liu F, Huo GC. Structure biosynthesis and genetic regulation of exopolysaccharide production in *Streptococcus thermophilus*[J]. China Dairy Industry, 2005, 33(11): 42-45 (in Chinese)  
范丽平, 刘飞, 霍贵成. 嗜热链球菌胞外多糖的结构生物合成与遗传调控[J]. 中国乳品工业, 2005, 33(11): 42-45
- [8] Zhao SW, Ren J, Wang YY, et al. Research advance of biosynthetic and genetic regulation of exopolysaccharides from lactic acid bacteria[J]. Journal of Shanxi Agricultural Sciences, 2010, 38(12): 94-99 (in Chinese)  
赵时玮, 任静, 王荫榆, 等. 乳酸菌胞外多糖生物合成与遗传调控研究进展[J]. 山西农业科学, 2010, 38(12): 94-99
- [9] Welman AD, Maddox IS. Exopolysaccharides from lactic acid bacteria: perspectives and challenges[J]. Trends in Biotechnology, 2003, 21(6): 269-274
- [10] de Vuyst L, Degeest B. Heteropolysaccharides from lactic acid bacteria[J]. FEMS Microbiology Reviews, 1999, 23(2): 153-177
- [11] de Vuyst L, de Vin F, Vaningelgem F, et al. Recent developments in the biosynthesis and applications of heteropolysaccharides from lactic acid bacteria[J]. International Dairy Journal, 2001, 11(9): 687-707
- [12] Forde A, Fitzgerald GF. Molecular organization of exopolysaccharide (EPS) encoding genes on the lactococcal bacteriophage adsorption blocking plasmid, pCI658[J]. Plasmid, 2003, 49(2): 130-142
- [13] Huang JZ, Schell M. Molecular characterization of the EPS gene cluster of *Pseudomonas solanacearum* and its transcriptional regulation at a single promoter[J]. Molecular Microbiology, 1995, 16(5): 977-989
- [14] Laws A, Gu YC, Marshall V. Biosynthesis, characterisation, and design of bacterial exopolysaccharides from lactic acid bacteria[J]. Biotechnology Advances, 2001, 19(8): 597-625
- [15] Wang YP, Wang JR, Ahmed Z, et al. Complete genome sequence of *Lactobacillus kefiranofaciens* ZW3[J]. Journal of Bacteriology, 2011, 193(16): 4280-4281
- [16] van de Guchte M, van der Vossen JM, Kok J, et al. Construction of a lactococcal expression vector: expression of hen egg white lysozyme in *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1989, 55(1): 224-228
- [17] Wang YP, Zaheer A, Feng W, et al. Physicochemical properties of exopolysaccharide produced by *Lactobacillus kefiranofaciens* ZW3 isolated from Tibet kefir[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2008, 43(3): 283-288
- [18] Yang JH, Kang R, Li H, et al. Fermentation process of burdock kimchi by *Lactobacillus*[J]. Food Research and Development, 2014, 35(18): 46-50 (in Chinese)  
杨加怀, 康然, 李慧, 等. 乳酸菌发酵牛蒡泡菜的工艺研究[J]. 食品研究与开发, 2014, 35(18): 46-50
- [19] Huang XY, Liu LW. Food Chemistry and Analysis of Comprehensive Experiment[M]. Beijing: China Agricultural University Press, 2009: 305 (in Chinese)  
黄晓钰, 刘邻渭. 食品化学与分析综合实验[M]. 北京: 中国农业大学出版社, 2009: 305
- [20] Ding YY, Zuo FL, Lu XM, et al. Cloning and overexpression of 6-phosphate sorbitol dehydrogenase (*gutF*) from *Lactobacillus paracasei*[J]. China Dairy Cattle, 2010(8): 52-55 (in Chinese)  
丁寅寅, 左芳雷, 卢晓明, 等. 副干酪乳杆菌6-磷酸山梨醇脱氢酶(*gutF*)基因的克隆和超表达[J]. 中国奶牛, 2010(8): 52-55
- [21] Xiao W, Zhang YZ. Construction and identification of *Lactobacillus casei* food-graded system[J]. Chinese Journal of Applied & Environmental Biology, 2008, 14(4): 566-570 (in Chinese)

- 肖薇, 张义正. 乳酸杆菌食品级表达系统的构建与鉴定[J]. 应用与环境生物学报, 2008, 14(4): 566-570
- [22] Dong Q, Zheng LY, Fang JN. Modified phenol-sulfuric acid method for determination of the content of oligo- and polysaccharides[J]. Chinese Pharmaceutical Journal, 1996, 31(9): 550-553 (in Chinese)
- 董群, 郑丽伊, 方积年. 改良的苯酚-硫酸法测定多糖和寡糖含量的研究[J]. 中国药学杂志, 1996, 31(9): 550-553
- [23] Favre N, Bordmann G, Rudin W. Comparison of cytokine measurements using ELISA, ELISPOT and Semi-quantitative RT-PCR[J]. Journal of Immunological Methods, 1997, 204(1): 57-66
- [24] Shi YL, Guo XP, Wang FS, et al. Analysis for HA synthase mRNA content in *Streptococcus zooepidemicus*[J]. Food and Drug, 2005, 7(2): 22-24 (in Chinese)
- 石艳丽, 郭学平, 王凤山, 等. 半定量 RT-PCR 法测定链球菌透明质酸合酶 mRNA 的水平[J]. 食品与药品, 2005, 7(2): 22-24
- [25] Ma YY, Zou SL, Zhang K, et al. Research on exogenous gene mRNA levels in *Zymomonas mobilis* by semi-quantitative RT-PCR[J]. Microbiology China, 2009, 36(6): 831-836 (in Chinese)
- 马媛媛, 邹少兰, 张鲲, 等. 半定量 RT-PCR 检测运动发酵单胞菌中外源基因转录水平的研究[J]. 微生物学通报, 2009, 36(6): 831-836
- [26] Liu TW. Quantitative PCR technology[J]. Foreign Medical Sciences (Section of Clinical Biochemistry and Laboratory Medicine), 1998, 19(1): 15-17 (in Chinese)
- 刘陶文. 定量 PCR 技术[J]. 国外医学(临床生物化学与检验学分册), 1998, 19(1): 15-17
- [27] Mi GQ. Expression of earthworm fibrinolytic enzyme encoding gene in tomato fruit[D]. Baoding: Master's Thesis of Hebei University, 2009 (in Chinese)
- 米国桥. 蚯蚓纤溶酶基因在番茄中的表达研究[D]. 保定: 河北大学硕士学位论文, 2009