一种 XRE 家族转录调节因子对干酪乳杆菌适应抗生素环境的影响

赵 薇，曹晨霞，张文羿*

（内蒙古农业大学 乳品生物技术与工程教育部重点实验室/农业农村部 奶制品加工重点实验室，内蒙古 呼和浩特 010018）

摘要：为了深入研究干酪乳杆菌 Zhang（*Lactobacillus casei* Zhang，*L. casei* Zhang）在抗生素环境中适应性进化机制，构建基因敲除体系，并对突变体的耐药表型进行研究。运用 PCR 技术分别扩增 XRE 家族转录调节因子基因的同源臂序列，构建带有内部缺失 LCAZH_0458 基因的敲除载体。采用 Cre/lox 基因重组系统，筛选双交换子 *L. casei* Zhang-G/A-1200/600-0458::*lox*66-P32-*cat*-*lox*71，构建突变株 *L. casei* Zhang-G/A-1200/600_Δ0458。此外，作者通过稀释法研究了野生菌株和突变株的耐药表型。耐药表型结果表明，与野生菌株相比，突变株在庆大霉素质量浓度为 8 μg/mL 和 16 μg/mL 时，浊度提高约 2 倍。在阿莫西林环境下，浊度和活菌数均未发生改变。LCAZH_0458 对干酪乳杆菌适应庆大霉素环境有一定的调节作用 。

关键词：干酪乳杆菌 Zhang；庆大霉素；阿莫西林；基因敲除；耐药性

中图分类号：TS 252.53　**文章编号**：1673-1689(2020)07-0074-09　**DOI**：10.3969/j.issn. 1673-1689.2020.07.011

Effect of An XRE Family Transcriptional Regulator on the Adaptation of *Lactobacillus casei* to Antibiotic Environment

ZHAO Wei，*CAO Chenxia*，*ZHANG Wenyi* *

(Key Laboratory of Dairy Biotechnology and Engineering, Ministry of Education / Key Laboratory of Dairy Products Processing, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot 010018, China)

Abstract: In order to study the adaptive evolution mechanism of *L. casei* Zhang in antibiotic environment, the gene knockout system was constructed and the resistant phenotype of mutants was studied. The homologous arm sequence of the XRE family transcriptional regulator gene was amplified by PCR, and a knockout vector with internal deletion of LCAZH_0458 gene was constructed.Using the Cre/lox gene recombination system, the double-crossing *L. casei* Zhang-G/A-1200/600-0458::*lox*66-P32-*cat*-*lox*71 was screened and the mutant strain *L. casei* Zhang-G/A-1200/600-Δ0458 was constructed. Besides, the antibiotic resistance phenotype of the wild strain and mutants were studied by the dilution method. The drug-resistant phenotypic results showed that the turbidity was increased by a factor of about 2 when the gentamicin concentrations

收稿日期：2019-05-15

基金项目：国家自然科学基金项目(31922071)。

* **通信作者**：张文羿(1981—)，男，博士，研究员，主要从事乳酸菌分子生物学研究。E-mail：zhangwenyizi@163.com

were 8 μg/mL and 16 μg/mL compared to the wild strain. In the amoxicillin environment, there was no change in the turbidity and viable counts. LCAZH_0458 has a certain regulatory effect on the gentamicin environment of *L. casei*.

Keywords: *L. casei* Zhang, gentamicin, amoxicillin, gene knockout, drug resistance

益生菌是通过改善肠道微生物平衡来对宿主产生有益影响的活的微生物添加物[1]。*Lactobacillus (L.) casei* Zhang 是从内蒙古众多的自然发酵酸马奶样品中分离出的一株益生乳酸菌,利用 16S rDNA 同源性对其进行了种属归类分析,发现它和 ATCC 334 标准菌株的同源概率是 100%[2],经实验证明它有一定的耐酸、抗氧化和提高机体免疫力[3]等特性。

益生菌在应用于食品工业等领域时会遭受不同的胁迫环境[4]。这些胁迫环境会影响菌体细胞的生理状态以及它的性质。近年来抗生素的广泛使用使其成了一种新的环境胁迫,对人类健康造成了很大的威胁,对于我们来说,最好的方法是寻找一个可以替代或者辅助的药物从而减少抗生素的使用[5]。目前,益生菌联合抗生素被用于治疗胃肠道疾病,并且在临床上取得一定疗效[6]。益生菌在长期接触抗生素环境中的适应性进化成了主要问题[7],因此,对益生菌在抗生素环境中的适应性机制研究至关重要。基因敲除技术是研究基因功能最有效的方法之一,它是根据同源重组的原理,通过构建带有同源序列的基因敲除载体,将其转入细胞,取代野生型的等位基因,最后通过分析突变体的表型从而确定基因功能[8]。

作者采用 iTRAQ 蛋白质组学技术研究了抗生素适应性 *L. casei* Zhang 的差异表达蛋白,研究结果发现,在庆大霉素/阿莫西林环境中连续进化的 *L. casei* Zhang 与野生型菌株相比,有差异表达蛋白存在[9-11]。因此,为了进一步分析庆大霉素/阿莫西林适应性 *L. casei* Zhang 的耐药机制,从差异蛋白表达谱中选出可能与耐药性相关的基因 LCAZH_0458,采用 cre/lox基因重组技术将其敲除,成功的构建 *L. casei* Zhang 的突变株,并对突变体的表型进行验证,进一步鉴定该基因在 *L. casei* Zhang 的作用。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 菌株与质粒 试验菌株和质粒见表 1、表 2。

表 1 试验菌株

Table 1 Test strains

菌株	特征	来源
E. coli DH5α	分子克隆宿主菌	[12]
L. casei Zhang	分离自内蒙古牧区自然发酵酸马奶	[13]
L. casei Zhang-G-1200	*L. casei* Zhang 在含 1 ug/mL 庆大霉素的 LSM 培养基中连续传代 6 个月所获得的菌株	[14]
L. casei Zhang-A-600	*L. casei* Zhang 在含 0.5 ug/mL 阿莫西林的 LSM 培养基中连续传代 3 个月所获得的菌株	[14]
L. casei Zhang -G -1200 -0458::*lox*66 -p32-*cat*-*lox*71 (LCZ1)	*L. casei* Zhang -G -1200 中 LCAZH_0458 基因被 *lox*66 -P32 -*cat* -*lox*71 替换后的衍生菌	作者所在实验室
L. casei Zhang-A-600-0458::*lox*66-p32-*cat*-*lox*71(LCZ2)	*L. casei* Zhang-A -600 中 LCAZH_0458 基因被 *lox*66 -P32 -*cat* -*lox*71 替换后的衍生菌	作者所在实验室
L. casei Zhang-G-1200-Δ0458 (LCZ3)	*L. casei* Zhang -G -1200 -0458::*lox*66 -P32 -*cat* -*lox*71 中 *lox*66-P32 -*cat* -*lox*71 被 *lox*72 替换后的衍生菌	作者所在实验室
L. casei Zhang-A-600-Δ0458 (LCZ4)	*L. casei* Zhang -A -600 -0458::*lox*66 -P32 -*cat* -*lox*71 中 *lox*66-P32 -*cat* -*lox*71 被 *lox*72 替换后的衍生菌	作者所在实验室

表 2 试验质粒

Table 2 Test plasmids

质粒	特征	来源
pNZ5319	Cm^rEm^r(具有氯霉素抗性和红霉素抗性);含 *lox*66-P32-*cat*-*lox*71 用于革兰氏阳性菌的多基因替换	[15]
pNZ5319-0458Up-Down	Cm^rEm^r;含 LCAZH_0458 上游和下游同源臂 pNZ5319 衍生质粒	作者所在实验室
pMSPcre	Em^r(具有红霉素抗性);cre 酶的表达	[16]

1.1.2 所用培养基 乳酸菌的增值培养用 MRS 培养基（MRS Broth（OXOID,CM0359),MRS agar（OXOID,CM0361)),根据需要添加氯霉素与红霉素（氯霉素的终质量浓度为 10 μg/mL，红霉素的终质量浓度为 5 μg/mL),使用前需滤菌(0.22 μm 孔径滤膜)。大肠杆菌的增值培养用 LB 培养基:胰蛋白胨(OXOID,LP0042),10 g/L;酵母粉,5 g/L;氯化钠,10 g/L,根据需要添加氯霉素与红霉素(氯霉素的终质量浓度为 10 μg/mL,红霉素的终质量浓度为 250 μg/mL),使用前需滤菌(0.22 μm 孔径滤膜),37 ℃摇床培养。抗生素的溶解和稀释用 LSM 培养基:IST(ISO-SENSITEST Broth OXOID,CM0473),质量分数 90%;MRS Broth(OXOID,CM0359),质量分数 10%[17]。

1.1.3 所用试剂 红霉素(Ery)、氯霉素(Cm)、TBE 电泳缓冲液贮液、阿莫西林(Amoxicillin,Amo)、庆大霉素(Gentamycin,Gen):美国 Sigma 公司产品;高保真 TransStart® FastPfu DNA 聚合酶、Taq Polymerase、10×PCR Buffer、dNTPs、核酸染料、蛋白酶 K:于北京全式金生物工程有限公司产品。

1.1.4 仪器及设备 仪器与设备见表 3。

表 3 仪器与设备

Table 3 Instruments and equipment

仪器设备	类型	公司
电泳仪	DYY-12	北京六一电子仪器厂
UPV 凝胶成像仪	GDS-8000	美国 Uvp 公司
分析天平	Sartorius BT25S	梅特勒公司
冷冻台式离心机	centrifuge 5417R	德国 eppendorf 公司
全自动高压蒸汽灭菌器	HA-300M	日本 Hirayama 公司

1.1.5 所用引物 试验所用引物见表 4。

表 4 本试验所用引物

Table 4 primers used in this study

引物	序列(5′-3′)a	限制性内切酶和参考文献
0458upF	5′-CCGCTCGAGGCAGAAGGACGCATAAGA -3′	*Xho*I
0458upR	5′-AGCTTTGTTTAAACGCCAAGAATAGAAGGGTAA-3′	*Pme*I
0458downF	5′-TCCCCCCGGGGCTTCGCATTTCCATCCC-3′	*Xma*I
0458downR	5′-GGGTTTGAGCTCTTTCGTTAGGCAATCCAG-3′	*Eco*53kI
87F	5′-GCCGACTGTACTTTCGGATCCT-3′	[15]
85R	5′-GTTTTTTTCTAGTCCAAGCTCACA-3′	[15]
CatF	5′-TCAAATACAGCTTTTAGAACTGG-3′	[15]
CatR	5′-ACCATCAAAAATTGTATAAAGTGGC-3′	[15]
EryintF(EryF)	5′-CGATACCGTTTACGAAATTGG-3′	[15]
EryintR(EryR)	5′-CTTGCTCATAAGTAACGGTAC-3′	[15]

注:引物中添加的限制性内切酶序列由下划线标出

1.2 引物设计及同源臂扩增

1.2.1 引物设计 根据 GenBank 报道的中 LCAZH_0458 的基因序列（GenBank accession number CP001084.2),利用 Primer premier 5.0 软件分别设计上、下游同源臂引物(长度约 1 kb,表 4)。由上海桑尼生物科技有限公司完成对引物的合成。

1.2.2 同源臂扩增 以 *L. casei* Zhang 基因组为模板,利用高保真 TransStart® FastPfu DNA Polymerase 扩增出 LCAZH_0458 上下游各约 1 000 bp 的片段。PCR 反应体系为 50 μL:模板 DNA 1.5 μL,上下游引物各 1 μL,2.5 mmol/L dNTPs 4 μL,5TransStart® FastPfu Buffer 10 μL,高保真聚合酶 0.5 μL,双蒸水补足 50 μL。PCR 条件为:95 ℃预变性 5 min;95 ℃变性 1 min,58 ℃退火 1 min,72 ℃延伸 2 min,30 个循环;72 ℃延伸 10 min;4 ℃保存。

1.3 敲除载体 pNZ5319-0458Up-Down 构建

将纯化后的同源臂上、下游片段分别插入到 pNZ5319 质粒的 *Xoh*I、*Pem*I 和 *Eco*53kI、*Bgl*II 酶切位点中。将上述酶切与连接的重组质粒转入大肠杆菌 DH5α 感受态细胞中,在含有氯霉素(10 μg/mL)的 LB 平板上筛选获得阳性克隆子。用引物 0458upF、85R 和 87F、0458downR 进行 PCR 扩增,验证后将 PCR 产物邮寄测序。

1.4 乳杆菌感受态的制备及电转化

1.4.1 感受态制备 将活化 2 代后的乳杆菌接种到 MRS 液体培养基中,37 ℃培养 24 h;体积分数 2%接种量接种到溶液 I(MRS+0.75 mol/L 山梨醇+体积分数 0.1%甘氨酸)中,37 ℃培养至 $A_{600\ nm}$ 0.3~0.6;6 000 r/min,4 ℃离心 5 min,收集菌体细胞;用 1 mL 预冷的溶液 II(1 mol/L 蔗糖+3.5 mmol/L $MgCl_2 \cdot 6H_2O$)洗涤细胞,6 000 r/min,4 ℃离心 5 min,弃掉上清液,反复洗涤 3 次;用 40 μL 冰浴的溶液 II 重悬菌体细胞,用于电转化乳杆菌。

1.4.2 电转化 无菌电转化杯冰上预冷 10 min;向 40 μL 感受态细胞悬液中加入 1 μg 质粒 DNA,吹吸混匀,冰浴 10 min;转移混合液至电转化杯,冰浴 10 min。设置电转参数:电压 1.7 kV,电阻 200 Ω,电容为 25 μF。将电转化杯迅速擦干,进行电击转化;向转化后的电转化杯中加入 960 μL 预冷的复苏液(MRS+0.75 mol/L 山梨醇+10 mmol/L $CaCl_2$+100 mmol/L $MgCl_2$),冰上放置 5 min;将液体移入无菌 Eppendorf 管中,37 ℃培养 2 h,将细胞涂布到含有 5 μg/mL Cm 的 MRS 固体平板上,37 ℃培养 48 h,长出的菌落即为转化子。

1.5 双交换子 *L. casei* Zhang-G/A-1200/600-0458::*lox*66-P32-*cat*-*lox*71 的筛选

挑取单菌落活化于添加 10 μg/mL 氯霉素的 MRS 培养基中,24 h 后分别接种于含 10 μg/mL 氯霉素和 5 μg/mL 红霉素的 MRS 培养基中,筛选有氯霉素抗性无红霉素抗性的重组子,同时将野生菌株 *L. casei* Zhang-G/A-1200/600 分别接种于含氯霉素和红霉素的 MRS 培养基中作为对照。将筛选到的双交换子和野生菌株分别用 5 对引物(0458upF/0458downR、eryintF/eryintR、CatF/CatR、0458upF/CatR 和 CatF/0458downR)进行 PCR 扩增,将有正确电泳条带 PCR 产物寄样测序。

1.6 抗性基因消除

将 pMSPcre 电转入以上筛选到的双交换子中。涂布于含红霉素的 MRS 平板上,37 ℃培养 48~72 h。筛选出具红霉素抗性无氯霉素抗性的菌株。将以上筛选的菌株在无抗生素 MRS 中 37 ℃连续传 10 代使 pMSPcre 丢失。用引物 eryintF/eryintR、CatF/CatR 和 0458upF/0458downR,以传代之前菌为对照进行 PCR 验证。同时将筛选到的突变株再次用同源臂引物进行 PCR 扩增,寄样测序。

1.7 突变株 *L. casei* Zhang-G/A-1200/600-Δ0458 耐药表型分析

利用稀释法[18]测定突变株 *L. casei* Zhang-G/A-1200/600-Δ0458 对庆大霉素/阿莫西林的最小抑制浓度以及在不同浓度的抗生素环境下,突变株的活菌数,浊度和 pH 值。以野生菌株为对照,分析突变株与野生型生长特性的差异。

2 结果与分析

2.1 敲除载体 pNZ5319-0458Up-Down 的构建

将在含有氯霉素(10 μg/mL)的 LB 平板上筛选的阳性克隆体进行 PCR 验证。泳道 1,2 分别用引物 0458upF、0458upR 和 0458upF、85R 扩增;泳道 3、4 分别用引物 0458downF、0458downR 和 87F、0458downR 扩增。电泳结果与预期一致(见图 1),说明前后臂已经成功插入 pNZ5319 质粒。且测序结果说明各序列均正确。载体 pNZ5319-0458Up-Down 成功构建。

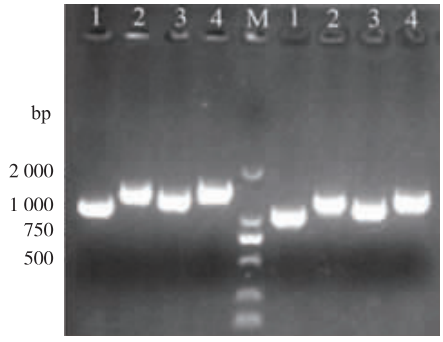


图 1 敲除载体 PCR 方法验证

Fig. 1 Gene-specific mutagenesis vectors PCR method verification

2.2 基因敲除载体的电转化

将筛选出的含氯霉素抗性无红霉素抗性的 LCZ1/LCZ2,用引物 0458upF、0458downR 进行验证。分别挑取 5 个双交换子进行 PCR 验证,并进行琼脂糖凝胶电泳分析,每条泳道对应的 PCR 产物由表 5 所示。由图 2 可以看出,*L. casei* Zhang-G/A-1200/600 没有红霉素抗性和氯霉素抗性,所以泳道 1、8、15、22 均无条带;泳道 9-14 为氯霉素引物下的 pNZ5319-0458Up-Down 和 LCZ1/LCZ2,应该都出现条带,可能由于特异性不好导致没有扩增出来,但不影响后续分析。因质粒本身携带有抗氯霉素与红霉素基因,因此在泳道 2、16 和 23 均有条带出现;

本试验筛选阳性转化子，此过程红霉素抗性消失，因此表现为泳道 2 有条带，而泳道 3–7 无条带；由于在 pNZ5319–0458Up–Down 与 LCZ1/LCZ2 中氯霉素抗性基因片段小于 *L. casei* Zhang–G/A–1200/600，因此 pNZ5319–0458Up–Down 与 LCZ1/LCZ2 中的全长片段要小于 *L. casei* Zhang– G/A–1200/600，如泳道 29–35 所示。在 pNZ5319–0458Up–Down 与 LCZ1/LCZ2 中用 upF，CatR 及 CatF 和 downR 引物扩增均出现条带，如泳道 16–21 和 23–28 所示，说明 Cat 基因片段已连入目的基因的前后臂中。结果与预期的一致，并且测序结果显示各序列均正确。成功的筛选到 LCZ1/LCZ2。

表 5　PCR 反应所用菌株及引物

Table 5　Strains and primers used in PCR reactions

泳道	菌株	引物	泳道	菌株	引物
1	*L. casei* Zhang–G/A–1200/600	EryF, EryR	19	LCZ1/LCZ2 3	UpF, CatR
2	pNZ5319–0458Up–Down	EryF, EryR	20	LCZ1/LCZ2 4	UpF, CatR
3	LCZ1/LCZ2 1	EryF, EryR	21	LCZ1/LCZ2 5	UpF, CatR
4	LCZ1/LCZ2 2	EryF, EryR	22	*L. casei* Zhang–G/A–1200/600	UpF, CatR
5	LCZ1/LCZ2 3	EryF, EryR	23	pNZ5319–0458Up–Down	CatF, DownR
6	LCZ1/LCZ2 4	EryF, EryR	24	LCZ1/LCZ2 1	CatF, DownR
7	LCZ1/LCZ2 5	EryF, EryR	25	LCZ1/LCZ2 2	CatF, DownR
8	*L. casei* Zhang–G/A–1200/600	CatF, CatR	26	LCZ1/LCZ2 3	CatF, DownR
9	pNZ5319–0458Up–Down	CatF, CatR	27	LCZ1/LCZ2 4	CatF, DownR
10	LCZ1/LCZ2 1	CatF, CatR	28	LCZ1/LCZ2 5	CatF, DownR
11	LCZ1/LCZ2 2	CatF, CatR	29	*L. casei* Zhang–G/A–1200/600	UpF, DownR
12	LCZ1/LCZ2 3	CatF, CatR	30	pNZ5319–0458Up–Down	UpF, DownR
13	LCZ1/LCZ2 4	CatF, CatR	31	LCZ1/LCZ2 1	UpF, DownR
14	LCZ1/LCZ2 5	CatF, CatR	32	LCZ1/LCZ2 2	UpF, DownR
15	*L. casei* Zhang–G/A–1200/600	UpF, CatR	33	LCZ1/LCZ2 3	UpF, DownR
16	pNZ5319–0458Up–Down	UpF, CatR	34	LCZ1/LCZ2 4	UpF, DownR
17	LCZ1/LCZ2 1	UpF, CatR	35	LCZ1/LCZ2 5	UpF, DownR
18	LCZ1/LCZ2 2	UpF, CatR			

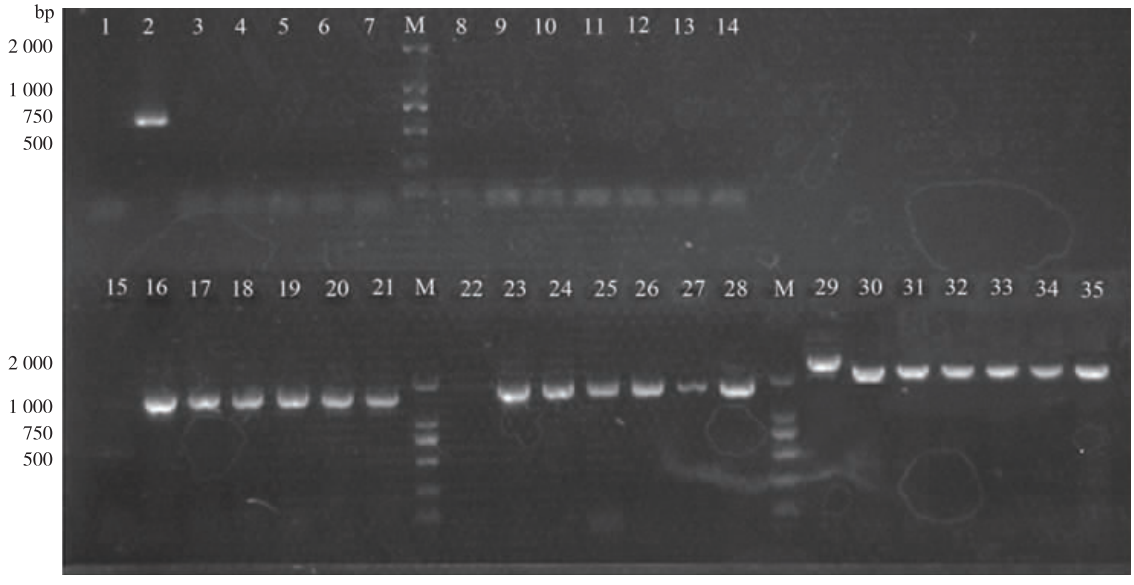


图 2　挑取阳性转化子单菌落重复 PCR 方法验证

Fig. 2　Single positive colony repeat PCR method for picking positive transformants

2.3 突变株 *L. casei* Zhang –G/A –1200/600 –Δ0458 的构建

将 pMSPcre 质粒电转入上述的双交换子中，涂布含红霉素的 MRS 平板上，筛选出具有红霉素抗性没有氯霉素抗性的菌株。并在无抗生素的培养基中连续传 10 代使 pMSPcre 质粒丢失。用引物 eryintF/eryintR、CatF/CatR 和 0458upF、0458downR 验证，*L. casei* Zhang–G/A–1200/600 为对照。验证结果如表 6 和图 3 所示。在 *L. casei* Zhang–G/A–1200/600 和 LCZ3/ LCZ4 中都没有红霉素和氯霉素基因，并且 *L. casei* Zhang–G/A–1200/600 比 LCZ3/ LCZ4 要长，说明成功构建突变株。

表 6 PCR 反应所用菌株及引物

Table 6 Strains and primers used in PCR reactions

泳道	菌株	引物	泳道	菌株	引物
1	*L. casei* Zhang–G/A–1200/600	EryF, EryR	12	LCZ3/ LCZ4 3	CatF, CatR
2	pNZ5319–0458Up–Down	EryF, EryR	13	LCZ3/ LCZ4 4	CatF, CatR
3	LCZ3/ LCZ4 1	EryF, EryR	14	LCZ3/ LCZ4 5	CatF, CatR
4	LCZ3/ LCZ4 2	EryF, EryR	15	*L. casei* Zhang–G/A–1200/600	UpF, DownR
5	LCZ3/ LCZ4 3	EryF, EryR	16	pNZ5319–0458Up–Down	UpF, DownR
6	LCZ3/ LCZ4 4	EryF, EryR	17	LCZ3/ LCZ4 1	UpF, DownR
7	LCZ3/ LCZ4 5	EryF, EryR	18	LCZ3/ LCZ4 2	UpF, DownR
8	*L. casei* Zhang–G/A–1200/600	CatF, CatR	19	LCZ3/ LCZ4 3	UpF, DownR
9	pNZ5319–0458Up–Down	CatF, CatR	20	LCZ3/ LCZ4 4	UpF, DownR
10	LCZ3/ LCZ4 1	CatF, CatR	21	LCZ3/ LCZ4 5	UpF, DownR
11	LCZ3/ LCZ4 2	CatF, CatR			

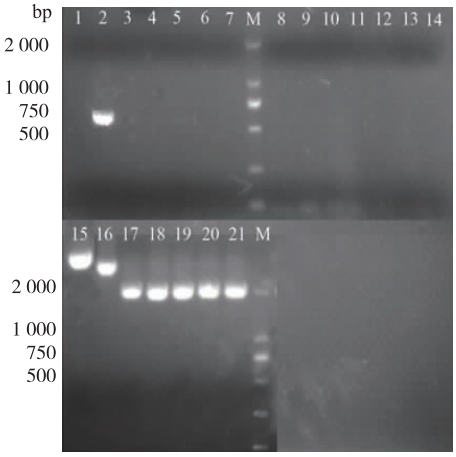


图 3 突变株 PCR 方法验证

Fig. 3 Mutant strain PCR method validation

2.4 突变株的耐药表型验证

2.4.1 突变株 *L. casei* Zhang–G–1200–Δ0458 的耐药表型验证 对突变株 LCZ3 进行庆大霉素耐药性分析，并且对其在庆大霉素不同质量浓度中的生长特性进行检测，以野生型菌株（*L. casei* Zhang–G–1200）为对照。结果如图 4–6 所示，突变株 LCZ3 在正常培养基中生长时，和 *L. casei* Zhang–G–1200 活菌数、吸光度和 pH 值都没有差异，在庆大霉素质量浓度为 8 μg/mL 和 16 μg/mL 时，突变株的 $A_{600\ nm}$ 值是 *L. casei* Zhang–G–1200 的 2 倍左右，在庆大霉素质量浓度为 16 μg/mL 时，*L. casei* Zhang–G–1200 比突变株的活菌数较低。pH 值也在庆大霉素质量浓度为 8 μg/mL 和 16 μg/mL 时有所不同。

可见敲除 LCAZH_0458 后菌株对庆大霉素的敏感性降低，LCAZH_Δ0458 对庆大霉素的耐药表型发生了显著的变化。该结果证明 LCAZH_0458 与庆大霉素的耐药性有一定的相关性。

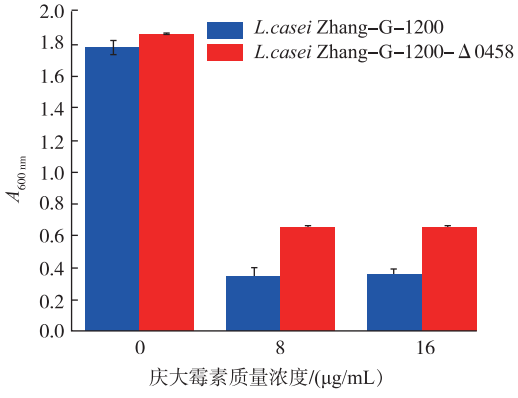


图 4 野生型菌株与突变株在添加不同质量浓度庆大霉素的 LSM 培养基中吸光度的变化

Fig. 4 Changes of $A_{600\ nm}$ values of wild and mutant plants in LSM medium supplemented with different concentrations of gentamicin

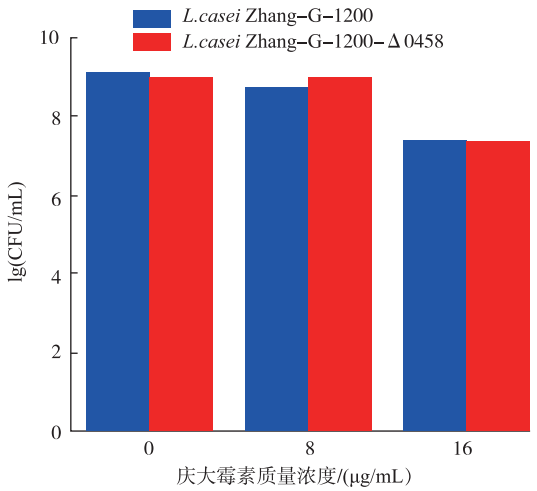


图 5 野生型菌株与突变株在添加不同质量浓度庆大霉素的 LSM 培养基中活菌数的变化

Fig. 5 Changes of the number of live bacteria of wild and mutant plants in LSM medium supplemented with different concentrations of gentamicin

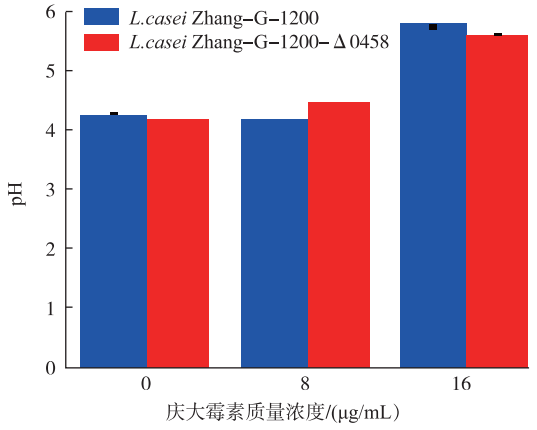


图 6 野生型菌株与突变株在添加不同质量浓度庆大霉素的 LSM 培养基中 pH 值的变化

Fig. 6 Changes of pH of wild and mutant plants in LSM medium supplemented with different concentrations of gentamicin

2.4.2 突变株 *L. casei* Zhang-A-600-Δ0458 的耐药表型验证 对突变株 LCZ4 进行阿莫西林耐药性分析,并且对其在不同阿莫西林质量浓度中的生长特性进行检测,以野生型菌株(*L. casei* Zhang-A-600)为对照。结果如图 7-9 所示,发现突变株 LCZ4 和 *L. casei* Zhang-A-600 活菌数、吸光度和 pH 值在阿莫西林质量浓度为 0、8、16 μg/mL 时几乎都没有差异,并且突变株的 MIC 值与 *L. casei* Zhang-A-600 (MIC=8 μg/mL)的值相一致,说明该基因与阿莫西林环境下菌株耐药性不相关。

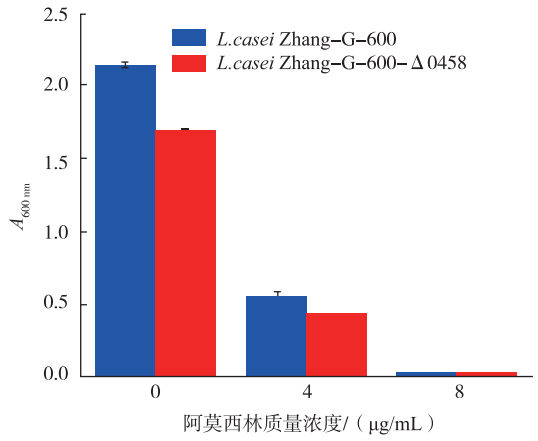


图 7 野生型菌株与突变株在添加不同质量浓度阿莫西林的 LSM 培养基中吸光度的变化

Fig. 7 Changes of $A_{600\ nm}$ values of wild and mutant plants in LSM medium supplemented with different concentrations of amoxicillin

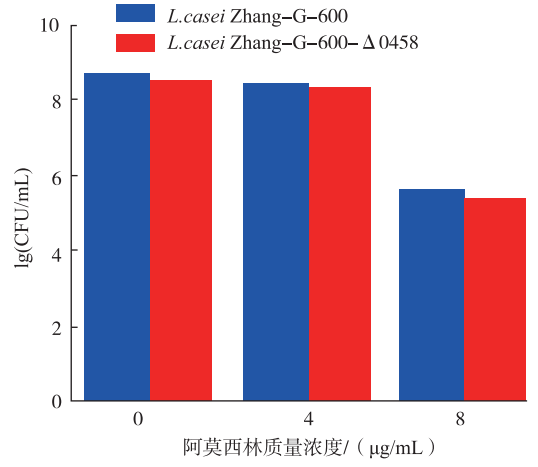


图 8 野生型菌株与突变株在添加不同质量浓度阿莫西林的 LSM 培养基中活菌数的变化

Fig. 8 Changes of the number of live bacteria of wild and mutant plants in LSM medium supplemented with different concentrations of amoxicillin

3 讨 论

转录调节因子对细菌适应应激环境有重要作用[19]。XRE 家族转录调节因子的蛋白质大多为假定蛋白,而其具体的功能却不是很清晰。李等利用转录组学对嗜热链球菌的耐酸相关基因进行研究发现,XRE 家族转录调节因子 YIU-C1466 上调 1.9 倍,XRE 家族转录调节因子 YIU-C1466 下调 0.46 倍,这表明 XRE 调节因子可能与嗜热链球菌的耐酸性相关[20]。Liu 等利用转录组学对耐辐射球菌进行

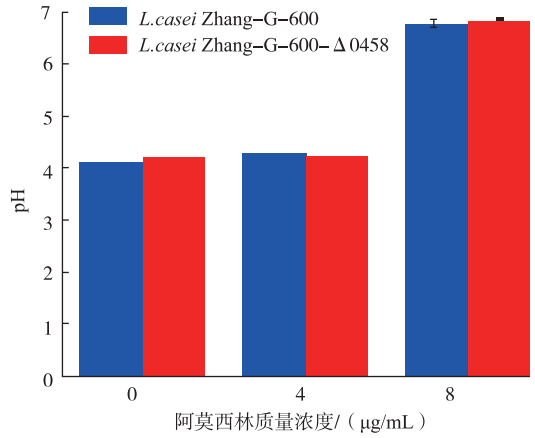


图 9　野生型菌株与突变株在添加不同质量浓度阿莫西林的 LSM 培养基中 pH 值的变化

Fig. 9　Changes of pH of wild and mutant plants in LSM medium supplemented with different concentrations of amoxicillin

了 DNA 辐射研究，结果发现 XRE 转录调节因子 DR2574 表达上调，表明它可能与 DNA 修复有关[21]。MA 等通过使基因缺失来研究嗜酸乳杆菌的耐酸性机制，结果发现突变株比野生株在酸环境下的存活率降低。由 La867 编码的 XRE 转录调节因子的失活对嗜酸乳杆菌对数期细胞的耐酸性有显著影响，表明其可能对嗜酸乳杆菌耐酸性调节有重要作用[22]。Borden 等通过对丙醇丁酮梭杆菌对有机溶剂的耐受基因的研究发现，含有 CAC1869 转录因子的亚克隆质粒的菌株耐受性增高了 81%，而 CAC1869 与 XRE 家族转录调节因子具有同源性[23]。前期实验室研究发现，在庆大霉素中连续培养 1 200 代的 *L. casei* Zhang 与原始菌株的差异蛋白，其中 XRE 发生上调[10]，所以作者进行了 XRE 对庆大霉素耐药性相关性的研究，结果显示突变株对庆大霉素耐药性与野生株比下降，表明 XRE 存在可能抑制菌株对庆大霉素耐药性。氨基糖苷类抗生素和 β-内酰胺类抗生素的耐药机制有抗生素主动向外排出、结合位点的改变、酶水解钝化及菌体细胞的内部代谢重排，乳酸菌细胞壁上有氨基糖苷类抗生素和 β-内酰胺类抗生素等的结合蛋白，比如说青霉素结合蛋白，这种结合蛋白可以影响抗生素耐药性[24]。早在 1996 年发现乳酸乳杆菌中的 ABC 转运蛋白 LmrA 与多重耐药性有关[25]。除此之外，乌日娜用蛋白质组学方法对 *L. casei* Zhang 进行了分析，结果表明在质量分数为 1.5% 的胆盐胁迫下应激蛋白 DnaK 和 GroEL 发生了上调控[26]。所以，可能存在其他相关基因编码的蛋白使 *L. casei* Zhang 有对阿莫西林的耐药性。而对于 XRE 家族转录调节因子的具体功能还需要进一步的研究。

4　结　语

在实验室前期的研究的基础上，采用蛋白质组学技术，分析了在庆大霉素/阿莫西林中连续培养的干酪乳杆菌与野生菌株的差异蛋白。为了进一步确认蛋白表达谱中基因的功能，作者采用Cre-lox 基因敲除方法将 LCAZH_0458 基因敲除，并对突变体的表型进行验证。研究结果显示：在庆大霉素质量浓度为 8、16 μg/mL 时，与野生型菌株相比浊度上升，显示 XRE 家族转录调节因子 LCAZH_0458 与 *L. casei* Zhang 对庆大霉素的适应性相关。在阿莫西林质量浓度为 0、8、16 μg/mL 时，与野生型菌株相比突变株的活菌数、浊度和 pH 值几乎都不变，显示 LCAZH_0458 与 *L. casei* Zhang 对阿莫西林的适应性无关。本研究一方面可为抗胁迫益生乳酸菌的筛选提供一定的理论依据，另一方面也可为益生乳酸菌工业化生产工艺的优化改进提供必要的理论指导。

参考文献：

[1] AFRC R F. Probiotics in man and animals[J]. **Journal of Applied Microbiology**, 1989, 66(5): 365-378.

[2] 乌日娜, 张和平, 孟和毕力格. 酸马奶中乳杆菌 *L.casei* Zhang 和 ZL12-1 的 16S rDNA 基因序列及聚类分析 [J]. 中国乳品工业, 2005, 33(6): 4-9.

[3] 张和平, 张七斤, 孟和毕力格, 等. *L.casei* Zhang 对小鼠 T 淋巴细胞亚群及血清 IgG 和肠黏膜 SIgA 的影响[J]. 中国乳品工业, 2006, 34(10): 4-8

[4] NYANHONGO G S, SYGMUND C, LUDWIG R, et al. Synthesis of multifunctional bioresponsive polymers for the management of chronic wounds[J]. **Journal of Biomedical Materials Research Part B Applied Biomaterials**, 2013, 101B(5): S19-S19.

[5] SCHULTZ M J, HAAS L E. Antibiotics or probiotics as preventive measures against ventilator-associated pneumonia: a literature

review[J]. **Critical Care**, 2011, 15(1): R18.

[6] WRIGHT K, WRIGHT H, MURRAY M. Probiotic treatment for the prevention of antibiotic-associated diarrhoea in geriatric patients: a multicentre randomised controlled pilot study[J]. **Australasian Journal on Ageing**, 2015, 34(1): 38.

[7] ABOUELNAGA M, LAMAS A, QUINTELABALUJA M, et al. Evaluation of the extent of spreading of virulence factors and antibiotic resistance in Enterococci isolated from fermented and unfermented foods [J]. **Annals of Microbiology**, 2016, 66(2): 577-585.

[8] VASQYEZ K M, MARBURGER K, INTODY Z, et al. Manipulating the mammalian genome by homologous recombination[J]. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 2001, 98(15): 8403-8410.

[9] WANG J C, GUO H L, CAO C X, et al. Characterization of the adaptive amoxicillin resistance of *Lactobacillus casei* Zhang by proteomic analysis[J]. **Frontiers in Microbiology**, 2018, 9:292.

[10] ZHANG W Y, GUO H L, CAO C X, et al. Adaptation of *Lactobacillus casei* Zhang to gentamycin involves an alkaline shock protein[J]. **Frontiers in Microbiology**, 2017, 8: 2316.

[11] ZHANG W Y, CAO C X, ZHANG J, et al. *Lactobacillus casei* asp23, gene contributes to gentamycin resistance via regulating specific membrane-associated proteins[J]. **Journal of Dairy Science**, 2017,(11):633.

[12] WOODCOCK D M, CROWTHER P J, DOHERTY J, et al. Quantitative evaluation of *Escherichia coli* host strains for tolerance to cytosine methylation in plasmid and phage recombinants[J]. **Nucleic Acids Research**, 1989, 17(9): 3469-3478.

[13] WU R N, WANG L P, WANG J C, et al. Isolation and preliminary probiotic selection of lactobacilli from koumiss in Inner Mongolia[J]. **Journal of Basic Microbiol**, 2009, 49(3): 318-326.

[14] WANG J C, DONG X, SHAO Y Y, et al. Genome adaptive evolution of *Lactobacillus casei* under long-term antibiotic selection pressures[J]. **BMC Genomics**, 2017, 18(1): 320.

[15] LAMBERT J M, BONGERS R S, KLEEREBEZEM M. Cre-lox-based system for multiple gene deletions and selectable-marker removal in *Lactobacillus plantarum*[J]. **Applied & Environmental Microbiology**, 2007, 73(4): 1126.

[16] STADDON J H, BRYAN E M, MANIAS D A, et al. Conserved target for group II intron insertion in relaxase genes of conjugative elements of gram-positive bacteria [J]. **Journal of Bacteriology**, 2004, 186(8): 2393-2401.

[17] KLARE I, KONSTABEL C, MULLER- BERTLING S, et al. Evaluation of new broth media for microdilution antibiotic susceptibility testing of *Lactobacilli, Pediococci, Lactococci*, and *Bifidobacteria* [J]. **Applied and Environmental Microbiology**, 2005, 71(12): 8982-8986.

[18] GUO H L, PAN L, LI L N, et al. Characterization of antibiotic resistance genes from *Lactobacillus* isolated from traditional dairy products[J]. **Journal of Food Science**, 2017, 82(3): 724-730.

[19] ARNOLD C N, MCELHANON J, LEE A, et al. Global analysis of *Escherichia coli* gene expression during the acetate-induced acid tolerance response[J]. **Journal of Bacteriology**, 2001, 183(7): 2178.

[20] 李宗梅. 嗜热链球菌发酵中酸性相关基因的筛选与分析[D]. 天津: 天津科技大学, 2014.

[21] LIU Y Q, ZHOU J Z, OMELCHENKO M V, et al. Transcriptome dynamics of *Deinococcus radiodurans* recovering from ionizing radiation[J]. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 2003, 100(7): 4191-4196.

[22] AZCARATE-PERIL M A, ALTERMANN E, HOOVER-FITZULA R L, et al. Identification and inactivation of genetic loci involved with *Lactobacillus acidophilus* acid tolerance[J]. **Applied and Environmental Microbiology**, 2004, 70(9): 5315-5322.

[23] BORDEN J R, PAPOUTSAKIS E T. Dynamics of genomic-library enrichment and identification of solvent tolerance genes for clostridium acetobutylicum[J]. **Applied and Environmental Microbiology**, 2007, 73(9): 3061-3068.

[24] BELLETTI N, GATTI M, BOTTARI B, et al. Antibiotic resistance of lactobacilli isolated from two italian hard cheeses [J]. **Journel of Food Protection**, 2009, 72(10): 2162-2169.

[25] DAWSON R J, LOCHER K P. Structure of a bacterial multidrug ABC transporter[J]. **Nature**, 2006, 443(7108): 180-185.

[26] 乌日娜. 益生菌 *Lactobacillus casei* Zhang 蛋白质组学研究[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2009.