# 乳酸乳球菌硫胺素转运蛋白 ThiT 提高酸耐受性的机制

朱政明[1,2]，张 娟[1,2]，堵国成[1,2,3]，吴志猛[*2,3]

（1. 江南大学 工业生物技术教育部重点实验室，江苏 无锡 214122；2. 江南大学 生物工程学院，江苏 无锡 214122；3. 江南大学 糖化学与生物技术教育部重点实验室，江苏 无锡 214122）

**摘要：**碳代谢引起的酸积累严重影响了微生物细胞的代谢活性。为提高细胞在酸性环境下的耐受性，通过过量表达硫胺素转运蛋白 ThiT，研究了重组菌株的酸胁迫耐受性，并在此基础上通过比较转录组学对照菌株和重组菌株在正常和酸胁迫条件下关键基因的转录水平进行了研究。结果表明，经过酸胁迫（pH 4.0）处理后，重组菌株的最大存活率优势是对照菌株的 16.2 倍。转录组学的分析发现，过表达 ThiT 转运蛋白可提高细胞对碳水化合物的转运能力，从而为细胞抵御酸胁迫的耐受性提供更多的能量；此外寡肽、甜菜碱等相关转运基因的显著上调可帮助细胞抵御酸胁迫的损伤。作者探究了在乳酸乳球菌中过表达 ThiT 转运蛋白提高细胞酸胁迫耐受性的具体作用机制，为 ThiT 蛋白在其他工业微生物中的应用提供了理论基础。

**关键词：***thiT* 过表达；酸胁迫耐受性；比较转录组学；抗酸元器件；乳酸乳球菌

**中图分类号：**Q 815　**文章编号：**1673-1689(2020)09-0016-09　**DOI：**10.3969/j.issn. 1673-1689.2020.09.003

# Mechanism of Thiamine Transporter ThiT Improving Acid Tolerance in *Lactococcus lactis* NZ9000

*ZHU Zhengming*[1,2]，*ZHANG Juan*[1,2]，*DU Guocheng*[1,2,3]，*WU Zhimeng*[*2,3]

(1. Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 3. Key Laboratory of Carbohydrate Chemistry and Biotechnology, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

**Abstract:** The acid accumulation caused by carbon metabolism seriously affects the metabolic activity of microbial cells. In order to improve acid tolerance of cells, the acid tolerance of recombinant strain was studied by overexpression of the thiamine transporter ThiT. Based on this, comparative and recombinant strains were studied by comparative transcriptomics. We found that the survival rate of recombinant strain was 2.4 times higher than that of the control strain after 3 h of treatment with acid stress (pH 4.0). Transcriptomic analysis found that overexpression of the ThiT transporter increases the ability of cells to transport carbohydrates, thereby providing more energy for the cells against acid stress tolerance. In addition, significant upregulation of oligopeptides, betaine

**收稿日期：**2018-09-30

**基金项目：**国家自然科学基金项目(31470160)；江苏省产学研前瞻性联合研究项目(BY2016022-39)。

* **通信作者：**吴志猛(1976—)，男，博士，教授，博士研究生导师，主要从事糖化学与糖生物学研究。E-mail：zwu@jiangnan.edu.cn

and other related transporters can help cells resist the damage of acid stress. The authors explored the specific mechanism of ThiT transporter in *Lactococcus lactis* to increasee tolerance of cellular acid stress. This study provided a theoretical basis for the application of ThiT protein in other industrial microorganisms.

**Keywords:** *thiT* overexpression, acid -stress tolerance , comparative transcriptomics analysis, anti-acid components, *Lactococcus lactis* NZ9000

应用微生物细胞工厂进行相关代谢产物的发酵法生产已广泛应用于食品、化工、医药、纺织等众多领域[1]。在这些工业产品的发酵法生产过程中，由于碳代谢流的转化，其导致的产酸积累是微生物代谢过程中必不可少的部分[2]。微生物的代谢产酸对促进细胞能量转化、增强本体细胞的环境竞争性等具有积极的作用。然而，随着胞内代谢产物持续不断积累，导致胞内 pH 不断下降，从而使得维持细胞正常生理功能的相关酶类活性受到严重抑制，影响了细胞的代谢活性和细胞结构的完整性。另外细胞膜流动性的降低影响了胞内外物质的转运，并为下游的加工处理以及工业排放物的治理埋下了诸多隐患[3]。因此，提高微生物细胞的酸胁迫耐受性，增强其在酸性环境下的代谢活性与生产效率，成为学术界和产业界急需解决的问题。

基于对微生物酸胁迫耐受性机制的深入解析，提高微生物细胞对酸胁迫环境的耐受性已成为微生物生理功能研究的重要组成部分。近年来，随着合成生物学和系统生物学技术的快速发展，新技术的出现为微生物耐酸机制的解析、抗酸胁迫元器件的发掘和构建奠定了坚定的理论与技术基础。目前，对抗酸胁迫元器件的研究主要集中于对相关结构基因、调控基因以及代谢/解毒模块的研究。对结构基因抗酸元器件的研究主要集中于 F1F0－ATPase、脲酶等多亚基编码蛋白的结构解析及功能验证[4-5]。对调控基因型抗酸元器件的研究目前主要集中于对分子伴侣、应激蛋白的功能解析及分子改造[6-7]。解毒/代谢模块是抗酸元器件中的重要组成部分，目前对其中的精氨酸脱氨酶系统（Arginine deiminase，ADI）和鲱精氨脱氨酶系统（Agmatine deiminase system，AgDS）已进行了较为深入的研究[8]。

目前关于乳酸乳球菌（*Lactococcus lactis*）中酸胁迫耐受性提升的研究已有部分报道。Wu 等通过在 *L. lactis* NZ9000 中异源表达来自干酪乳杆菌的 DNA 修复蛋白 RecO，提升了菌株对酸胁迫的耐受性以及乳酸产量[9]。Abdullah 等通过在 *L. lactis* NZ9000 中异源表达来自大肠杆菌的分子伴侣 DNA 蛋白，重组菌株在 0.5 g/dL 的乳酸（pH 5.47）胁迫下，其最大生物量是对照菌株的 1.44 倍[7]。此外，研究发现在 *L. lactis* MG1363 中过量表达小热休克蛋白 Lo18，明显提升了菌株对酸胁迫和热胁迫的耐受性[10]。关于 *L. lactis* 中酸胁迫耐受性提升的研究主要集中于对分子伴侣、热休克蛋白等一些应激蛋白的研究，而关于其他类型的功能蛋白尤其是转运蛋白帮助乳酸乳球菌细胞提升酸胁迫耐受性目前还缺乏深入研究。

已有研究发现，在单核细胞增多性李斯特氏菌（*Listeria monocytogenes*）中通过敲除 *thiT* 基因，敲除菌株对酸胁迫敏感，其对酸胁迫的耐受性低于未敲除 *thiT* 基因的对照菌株[11]。另外研究发现，在酿酒酵母中通过外源添加硫胺素可帮助细胞抵御氧胁迫[12]。基于此，本研究中通过在乳酸乳球菌中过表达 ThiT 转运蛋白，考察了重组菌株对酸胁迫耐受性的影响，并利用比较转录组学技术研究了重组菌株耐受酸胁迫的具体响应机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

**1.1.1 菌株与质粒** 本研究中所用的菌株和质粒详见表 1。

**1.1.2 主要试剂** Prime STAR（mix）DNA 聚合酶、PCR 产物纯化试剂盒以及 T4 DNA 连接酶：购自 TaKaRa 公司；RNA 提取试剂盒：购自天根生物科技有限公司；限制性内切酶 *Nco* I 和 *Xba* I：购自 Thermo Scientific 公司；Nisin：购买自 Sigma 公司；蛋白胨、酵母粉以及M17 肉汤培养基：购买自 Oxoid 公司；其他常规试剂均为国产分析纯。引物合成及测序均由上海生工有限公司完成。实验中，氯霉素添

表 1　研究所用的菌株及质粒

Table 1　Strains and plasmids used in this study

| 菌株或质粒 | 特性[a] | 参考文献 |
|---|---|---|
| 菌株 | | |
| *L. lactis* ssp. cremoris NZ9000 | MG1363 *pepN::nisRK* | [13] |
| *L. lactis* (Vector) | *L. lactis* NZ9000 containing pNZ8148, $Cm^r$ | 本研究 |
| *L. lactis* (ThiT) | *L. lactis* NZ9000 containing pNZ8148/*thiT*, $Cm^r$ | 本研究 |
| *E. coli* MC1061 | araD139, Δ (ara, leu)7697, ΔlacX74, galU−, galK−, hsr−, hsm+, strA | [14] |
| 质粒 | | |
| pNZ8148 | $Cm^r$; inducible expression vector with nisA promoter | [15] |
| pNZ8148/*thiT* | $Cm^r$; pNZ8148 derivative containing *thiT* gene | 本研究 |

加的质量浓度分别为大肠杆菌中添加质量浓度为 100 μg/mL,乳酸乳球菌中添加质量浓度 10 μg/mL。诱导剂 Nisin 的添加质量浓度为 10 ng/mL。

**1.1.3　培养基**　LB 培养基(g/L):蛋白胨 10,酵母粉 5,NaCl 10;pH 7.4。GM17 培养基:M17 培养基补充 5 g/L 葡萄糖。

## 1.2　方法

**1.2.1　质粒和菌株的构建**　pNZ8148/*thiT* 的构建过程如图 1 所示。首先以乳酸乳球菌 (*L. lactis* NZ9000)的基因组 DNA 为模板,以 pNZ8148/*thiT*–F 和 pNZ8148/*thiT*–R 为引物，通过 PCR 扩增并胶回收得到片段 *thiT*;然后将表达质粒 pNZ8148 和片段用 *Nco* I 和 *Xba* I 双酶切，酶切产物纯化后用 T4 DNA 连接酶连接 6~8 h；连接产物转化 *E. coli* MC1061,最后用引物 pNZ8148–F 和 pNZ8148–R 进行菌落 PCR 验证，并挑取条带大小约 800 bp 的克隆子进行测序验证,得到质粒 pNZ8148/*thiT*。所用引物序列见表 2。将空质粒 pNZ8148 和重组质粒 pNZ8148/*thiT* 电转化进入 *L. lactis* NZ9000，通过氯霉素抗性的平板筛选获得对照菌株 *L. lactis* (Vector)和重组菌株 *L. lactis* (ThiT)。

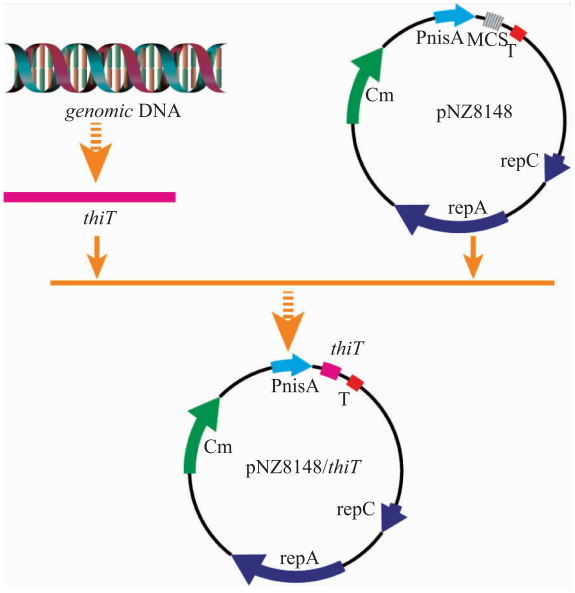



图 1　pNZ8148/*thiT* 质粒的构建

Fig. 1　Construction of plasmid pNZ8148/*thiT*

表 2　本研究所用的引物及序列

Table 2　Primers used in this study

| 引物 | 序列 (5′ - 3′)[a] | 酶切位点 | 目的 |
|---|---|---|---|
| pNZ8148/*thiT*–F | CATGCCATGGGGATGTCTAATTCTAAGTTCAATGTCC | *Nco* I | pNZ8148/*thiT* |
| pNZ8148/*thiT*–R | GCTCTAGATTAGTAATTACTATGGATAAAAAGTTTAGG | *Xba* I | |
| pNZ8148–F | ATTATTGTCGATAACGCGAG | | 菌落 PCR |
| pNZ8148–R | AATTGCCATTTCAATTGAACG | | |

注:下划部分代表酶切位点。

**1.2.2　生长曲线的测定**　将经过活化的种子培养液以体积分数 2%的接种量接入 GM17 培养基（含 10 μg/mL 的氯霉素),30 ℃静置培养至 $OD_{600}$ 0.4 左右，加入 10 ng/mL 的 Nisin 诱导培养。每隔 2 h 取样，使用多功能酶标仪测定 $OD_{600}$ 处的吸光值,以 GM17 培养基为空白对照。最后以 $OD_{600}$ 为纵坐标，培养时间为横坐标,绘制对照菌株和重组菌株的生长曲线。每个菌株测定 3 个平行,计算其平均值。

**1.2.3　酸胁迫下的存活率测定**　根据 1.2.2 生长至 $OD_{600}$ 0.4 左右的菌液加入 10 ng/mL 的 Nisin 诱导培养(5 h),取 4 mL 的菌液于8 000 *g* 离心 5 min 后用等体积的生理盐水(0.85 g/dL)洗涤离心 2 次,加入

等体积的胁迫培养基(GM17，pH 4.0，含 10 μg/mL 的氯霉素和 10 ng/mL 的 Nisin)进行胁迫处理。分别胁迫不同的时间取样后，离心洗涤，用生理盐水等体积重悬后梯度稀释至适宜的菌体浓度，然后取 10 μL 分别点样于 GM17 的固体平板上，于 30 ℃条件下培养 24 h 左右。最后进行菌落计数并计算存活率，存活率的计算方法参考之前报道的方法[16]。

**1.2.4 RNA 样品的提取** 将诱导培养至对数中期(4 h)的微生物细胞于 8 000 *g* 离心 5 min 后用预冷的 50 mmol/L 的 PBS(pH 7.4)离心洗涤 2 次后收集菌体，加入等体积的胁迫培养基(GM17，pH 4.0，含 10 μg/mL 的氯霉素和 10 ng/mL 的 Nisin)进行胁迫处理。然后分别胁迫 0 h 和 2.5 h 后离心洗涤并收集菌体，迅速放入液氮中冻存。最后采用液氮研磨菌体，并按照 RNAprep Pure Cell/Bacteria Kit 说明书提取总 RNA。使用 NanoDrop ND-2000 对纯化的 RNA 进行定量并将其保存于-80 ℃冰箱。

**1.2.5 转录组学分析** RNA 样品送往南京诺唯赞生物有限公司进行转录组测序。转录组测序所得的数据成为 raw data，随后对 raw data 进行质控(QC)。质控后，经过滤得到 clean reads，然后用 HISAT2[17]将 clean reads 比对到参考序列上。比对完，通过统计 reads 在参考序列上的分布情况和覆盖度，以此判断比对结果是否可靠。之后采用 RSEM[18]计算基因的表达量。差异表达基因的分析采用 DEGseq[19]的方法进行分析。我们将差异倍数为 2 倍以上且 pValue≤0.05 的基因筛选为显著差异表达基因。基于 Gene Ontology (GO) 和 Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes(KEGG)数据库，采用 phyper 对分别差异基因进行 GO 功能富集分析和 pathway 功能富集分析，随后对 pValue 进行 FDR 校正，并以 FDR≤0.01 的功能视为显著富集。

## 2 结果与分析

### 2.1 重组菌株的生长性能分析

为了考察过表达 ThiT 转运蛋白对乳酸乳球菌生长的影响，实验测定了乳酸乳球菌在正常生长条件下的生长曲线。如图 2(a)所知，根据生长曲线可以确定对数中期的培养时间约为 4 h。同时，图 2 所示的重组菌株和对照菌株的生长情况基本相同，在对数期重组菌株的菌体浓度略微低于对照菌株，且生长过程中 2 株菌株的环境 pH 基本相同。推测这可能是由于加入 Nisin 诱导培养后，重组菌株由于重组蛋白开始快速表达，给菌体细胞的代谢造成一定的代谢负担所导致[20]。

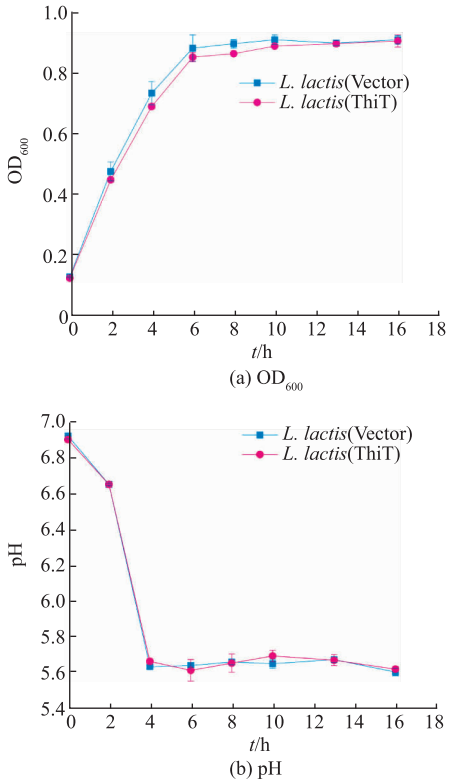



**图 2 *L. lactis* 的生长分析**

**Fig. 2 Growth analysis of *L. lactis***

### 2.2 过表达 ThiT 提高 *L. lactis* NZ9000 的酸胁迫耐受性

基于重组菌株的生长情况，实验进一步考察了对照菌株和重组菌株在酸胁迫条件下的存活率。在乳酸乳球菌代谢过程中，随着主要代谢产物乳酸的不断积累，胞外 pH 也随之不断地下降，最低可降至 pH 4.5~5.0，而在 pH 4.0 的条件下，乳酸乳球菌的存活率迅速下降。因此本研究中选择 pH 4.0 作为考察乳酸乳球菌存活率的实验 pH[21-22]。

如图 3 所示，经过 pH 4.0 胁迫处理后，重组菌株的存活率明显高于对照菌株，且随着胁迫时间的延长，两者之间的差距逐渐增大，在胁迫 2.5 h 后，两者之间存活率差距达到最大，此时重组菌株的存活率是对照菌株的 16.2 倍。在胁迫 3 h 后，2 株菌之间的存活率差距有所缩小，重组菌株的存活率是对照菌株的 2.4 倍。通过存活率实验，发现过表达ThiT 转运蛋白可显著提高乳酸乳球菌的酸胁迫耐受性。

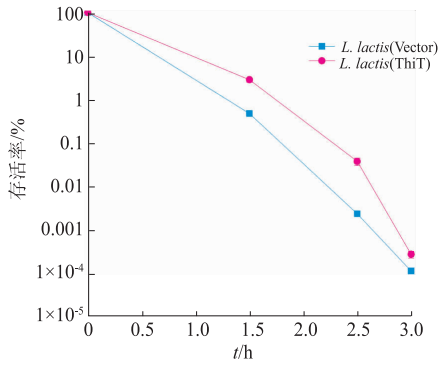



**图 3　酸胁迫条件下过表达 ThiT 对 *L. lactis* NZ9000 存活率的影响**

**Fig. 3　Effect of ThiT overexpression on the survival rates of *L. lactis* NZ9000 during acid stress**

### 2.3　过表达 ThiT 对乳酸乳球菌转录组水平的影响

为进一步揭示 ThiT 转运蛋白帮助细胞耐受酸胁迫的具体作用机制，通过比较转录组分析研究了对照菌株和重组菌株在酸胁迫前后的转录水平变化。如图 4 所示，在正常培养条件下，与对照菌株相比，重组菌株差异表达基因有 207 个，其中有 116 个基因发生了显著上调，91 个基因发生了显著下调。另外，在酸胁迫条件下，相比较对照菌株，重组菌株差异表达基因有 201 个，其中有 99 个基因发生了显著上调，102 个基因发生了显著下调。两组比较情况下，共 155 个基因同时出现了显著上下调，初步分析这些显著差异表达的基因可能和乳酸菌细胞抵御酸胁迫有关。

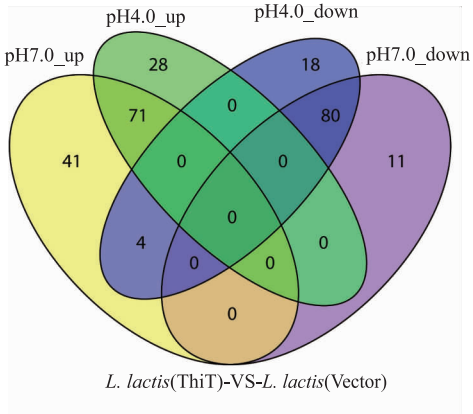


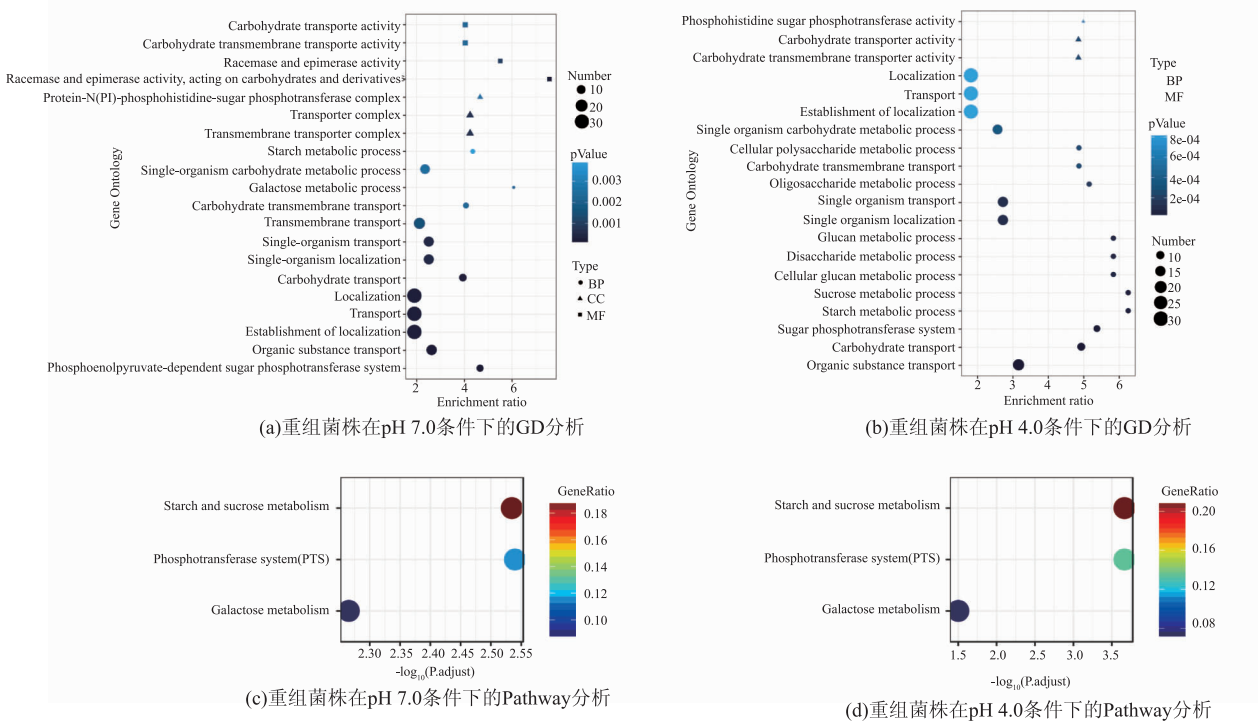

**图 4　2 株菌在正常(pH 7.0)和酸胁迫(pH 4.0)条件下的差异基因分析**

**Fig. 4　Significant differentially expressed genes in the recombinant strain relative to the parent strain at pH 7.0 and pH 4.0**

为进一步揭示这些差异表达基因参与的具体细胞生理功能和代谢途径，分别对两组比较情况下的差异基因进行 GO 和 Pathway 功能富集分析。由图 5 可知，GO 功能显著性分析发现在正常培养条件下，重组菌株中差异表达的基因主要参与转运过程，尤其是营养物质如糖类物质的转运(图 5(a))。同样地，在酸胁迫条件下，重组菌株中差异表达的基因主要参与碳水化合物的转运和转膜的过程(图 5(b))。由此可以分析过表达 ThiT 转运蛋白可提高细胞对碳水化合物的转运能力，酸胁迫条件下碳水化合物转运的增强可为提高抵御酸胁迫提供更多的能量[23]。通过 Pathway 显著性富集发现在正常培养和酸胁迫条件下，差异表达基因主要参与 PTS 途径和糖代谢途径（图 5（c）、(d))。差异基因的 Pathway 富集结果和 GO 的富集分析结果成正相关性，进一步解释了 GO 富集分析的结果。

为深入解析在两组比较情况下，共有差异基因参与的细胞功能和代谢过程。进一步对共有的差异基因进行 GO 和 Pathway 富集分析发现，这些共有的差异基因主要参与细胞的胞内外物质的转运过程，尤其是对糖类等营养物质的转运(图 6(a)(b))。为了应对酸胁迫的环境，细胞通过加强营养物质的转运，从而强化细胞的碳代谢途径，以提供更多的能量，提供的能量在细胞抵御酸胁迫的过程中被消耗掉，从而帮助细胞更好地抵御酸胁迫的环境[24]。

前期研究发现，酸胁迫条件下，过表达 ThiT 蛋白对胞内外物质的转运过程具有较大影响，因此本研究中对转运过程中的相关差异基因进行了具体分析。见图 7(a)，*oppD*(ABC 家族的 ATP 结合的转运蛋白)、*oppF*（寡肽转运的 ATP 结合蛋白)、*bioY*(生物素转运蛋白)和 *busAA*(甘氨酸、甜菜碱 ABC 转运 ATP 结合蛋白)等基因在正常以及酸胁迫条件下均发生了显著上调。OppD 和 OppF 都属于 ABC 家族的寡肽转运蛋白，它们的显著上调可帮助细胞在酸胁迫条件下更高效地转运寡肽，而转运到胞内的寡肽可被分解成氨基酸，多种氨基酸已被证实可帮助细胞抵御酸胁迫的损伤。Wang 等通过在唾液乳杆菌(*Lactobacillus salivarius*)中过表达寡肽转运底物结合蛋白 OppA 明显提高了重组菌株对多种胁迫的耐受性[25]。此外，*busAA* 基因的显著上调，可帮助酸胁迫条件下的细胞更多地转运甘氨酸和甜菜碱等物质，而甜菜碱已被证实可提高细胞的酸胁迫耐受性[26]。作者继续考察了过表达 ThiT 蛋白对胞内

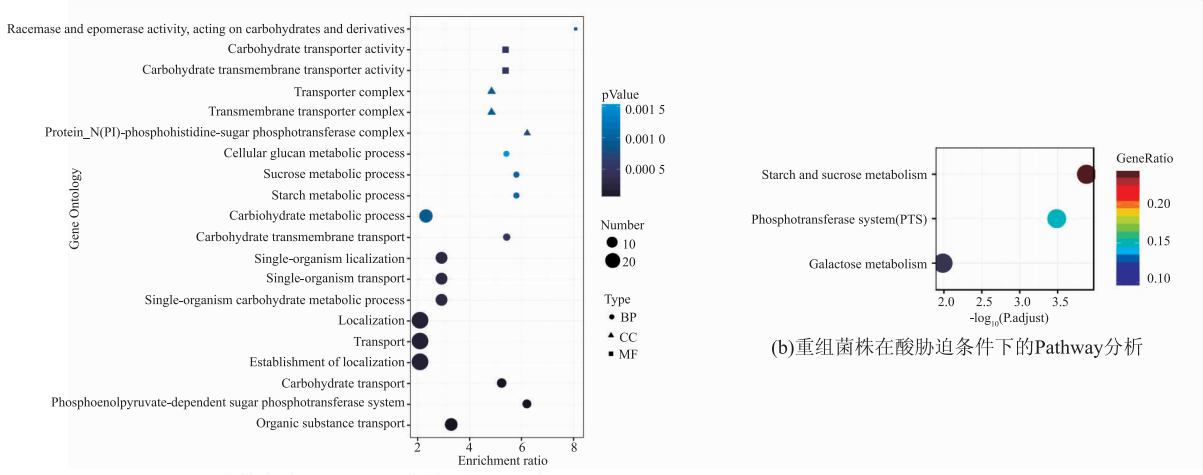



(a)重组菌株在pH 7.0条件下的GD分析　(b)重组菌株在pH 4.0条件下的GD分析

(c)重组菌株在pH 7.0条件下的Pathway分析　(d)重组菌株在pH 4.0条件下的Pathway分析

**图 5　2 株菌在正常(pH 7.0)和酸胁迫(pH 4.0)条件下的 GO 和 Pathway 富集分析**

**Fig. 5　Gene ontology and pathway classification analysis in the recombinant strain relative to the parent strain at pH 7.0 and pH 4.0**

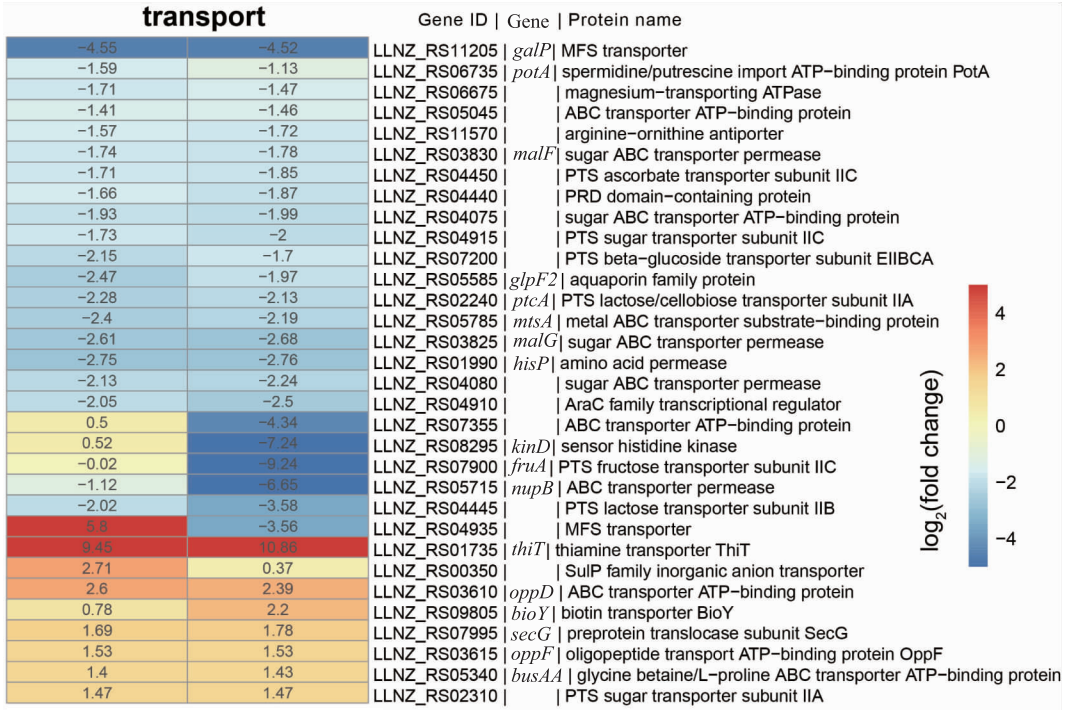



(a)重组菌株在酸胁迫(pH 4.0)条件下的GD分析　(b)重组菌株在酸胁迫条件下的Pathway分析

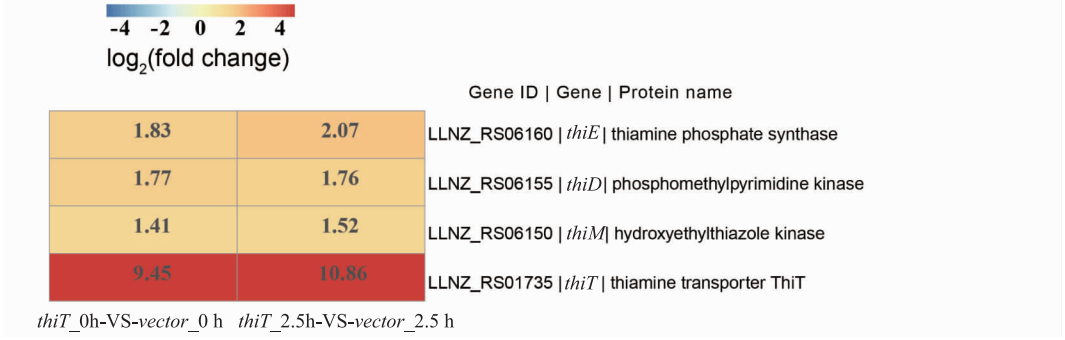
**图 6　2 株菌在正常(pH 7.0)和酸胁迫(pH 4.0)条件下的共有差异基因表达分析**

**Fig. 6　Common genes of significant differentially expressed in the recombinant strain relative to the parent strain at pH 7.0 and pH 4.0**

硫胺素合成途径中关键基因的影响。如图 7 (b)所示,在正常条件和酸胁迫条件下,过表达 ThiT 蛋白,显著提高了 *thiT* 基因的转录水平,其转录水平分别提高了 699 和 1 859 倍,说明 *thiT* 基因在 *L. lactis* NZ9000 中成功转录,且其转录水平得到显著提高。另外,研究发现硫胺素合成途径中的基因 *thiDEM* 也发生了显著上调,酸胁迫条件下过表达 ThiT 转运蛋白同时提高了胞内硫胺素合成途径中关键基因的表达,进一步强化胞内硫胺素的合成,从而帮助细胞更高效地抵御酸胁迫的损伤。




(a)转运过程中的差异基因分析




(b)硫胺素合成途径中的差异基因分析

**图 7　2 株菌在正常(pH 7.0)和酸胁迫(pH 4.0)条件下的关键差异基因表达分析**

**Fig. 7　Key genes of significant differentially expressed in the recombinant strain relative to the parent strain at pH 7.0 and pH 4.0**

## 3 结　语

本研究中通过过表达 ThiT 硫胺素转运蛋白,考察了其对乳酸乳球菌酸胁迫耐受性的影响,并在此基础上对重组菌株和对照菌株在正常和酸胁迫条件下进行转录组学分析。研究发现过表达 ThiT 硫胺素转运蛋白可显著提高细胞在酸胁迫条件下的存活率,接下来通过转录组学分析发现,过表达 ThiT 转运蛋白可提高细胞对碳水化合物的转运能力,从而为细胞抵御酸胁迫的耐受性提供更多的能量;此外寡肽、甜菜碱等相关转运基因的显著上调可帮助细胞抵御酸胁迫的损伤。作者首次报道了在乳酸菌中关于 ThiT 转运蛋白提高酸胁迫耐受性的作用效果,为进一步对硫胺素代谢改造提高细胞酸胁迫耐受性提供了新的思路。同时,上述研究结果也对关于 ThiT 转运蛋白在其他工业微生物中的应用提供了重要的参考意义。

## 参考文献：

[1] HAYES M，ROSS R P，FITZGERALD G F，et al. Putting microbes to work：dairy fermentation，cell factories and bioactive peptides. part I：overview[J]. **Biotechnology Journal**，2007，2(4)：426-434.

[2] PAPAGIANNI M. Recent advances in engineering the central carbon metabolism of industrially important bacteria[J]. **Microbial Cell Factories**，2012，11：50.

[3] BROADBENT J R，LARSEN R L，DEIBEL V，et al. Physiological and transcriptional response of *Lactobacillus casei* ATCC 334 to acid stress[J]. **Journal of Bacteriology**，2010，192(9)：2445-2458.

[4] LORCA G L，FONT DE VALDEZ G. Acid tolerance mediated by membrane ATPases in *Lactobacillus acidophilus* [J]. **Biotechnology Letters**，2001，23(10)：777-780.

[5] SCOTT D R，MARCUS E A，WEN Y，et al. Cytoplasmic histidine kinase （HP0244)-regulated assembly of urease with UreI，a channel for urea and its metabolites，$CO_2$，$NH_3$，and $NH_4^+$，is necessary for acid survival of *Helicobacter pylori*[J]. **Journal of Bacteriology**，2010，192(1)：94-103.

[6] WU C，ZHANG J，CHEN W，et al. A combined physiological and proteomic approach to reveal lactic-acid-induced alterations in *Lactobacillus casei* Zhang and its mutant with enhanced lactic acid tolerance[J]. **Applied Microbiology and Biotechnology**，2012，93(2)：707-722.

[7] ABDULLAH A L M，SUGIMOTO S，HIGASHI C，et al. Improvement of multiple-stress tolerance and lactic acid production in *Lactococcus lactis* NZ9000 under conditions of thermal stress by heterologous expression of *Escherichia coli* DnaK [J]. **Applied and Environmental Microbiology**，2010，76(13)：4277-4285.

[8] RYAN S，BEGLEY M，GAHAN C G，et al. Molecular characterization of the arginine deiminase system in *Listeria monocytogenes*：regulation and role in acid tolerance[J]. **Environmental Microbiology**，2009，11(2)：432-445.

[9] WU C，ZHANG J，DU G，et al. Heterologous expression of *Lactobacillus casei* RecO improved the multiple-stress tolerance and lactic acid production in *Lactococcus lactis* NZ9000 during salt stress[J]. **Bioresource Technology**，2013，143：238-241.

[10] WEIDMANN S，MAITRE M，LAURENT J，et al. Production of the small heat shock protein Lo18 from *Oenococcus oeni* in *Lactococcus lactis* improves its stress tolerance[J]. **International Journal of Food Microbiology**，2017，247：18-23.

[11] MADEO M，O'RIORDAN N，FUCHS T M，et al. Thiamine plays a critical role in the acid tolerance of *Listeria monocytogenes*[J]. **FEMS Microbiology Letters**，2012，326(2)：137-143.

[12] WOLAK N，KOWALSKA E，KOZIK A，et al. Thiamine increases the resistance of baker's yeast *Saccharomyces cerevisiae* against oxidative，osmotic and thermal stress，through mechanisms partly independent of thiamine diphosphate-bound enzymes[J]. **FEMS Yeast Research**，2014，14(8)：1249-1262.

[13] KUIPERS O P，DE RUYTER P G G A，KLEEREBEZEM M，et al. Quorum sensing-controlled gene expression in lactic acid bacteria[J]. **Journal of Biotechnology**，1998，64(1)：15-21.

[14] CASADABAN M J，COHEN S N. Analysis of gene control signals by DNA fusion and cloning in *Escherichia coli*[J]. **Journal of Molecular Biology**，1980，138(2)：179-207.

[15] LI Y，HUGENHOLTZ J，SYBESMA W，et al. Using *Lactococcus lactis* for glutathione overproduction[J]. **Applied Microbiology and Biotechnology**，2005，67(1)：83-90.

[16] WU C，ZHANG J，DU G，et al. Aspartate protects *Lactobacillus casei* against acid stress[J]. **Applied Microbiology and Biotechnology**，2013，97(9)：4083-4093.

[17] KIM D，LANGMEAD B，SALZBERG S L. HISAT：a fast spliced aligner with low memory requirements[J]. **Nature Methods**，2015，12(4)：357-360.

[18] LI B，DEWEY C N. RSEM：accurate transcript quantification from RNA-Seq data with or without a reference genome[J]. **BMC Bioinformatics**，2011，12：323.

[19] WANG L，FENG Z，WANG X，et al. DEGseq：an R package for identifying differentially expressed genes from RNA-seq data[J]. **Bioinformatics**，2010，26(1)：136-138.

[20] ZHANG J，CAIYIN Q，FENG W J，et al. Enhance nisin yield via improving acid-tolerant capability of *Lactococcus lactis* $F_{44}$[J]. **Scientific Reports**，2016，6：27973.

[21] O'SULLIVAN E，CONDON S. Intracellular pH is a major factor in the induction of tolerance to acid and other stresses in

*Lactococcus lactis*[J]. **Applied and Environmental Microbiology**,1997,63(11):4210-4215.
[22] 张梦汝,张娟,堵国成,等. 外源添加亮氨酸提高乳酸乳球菌酸胁迫抗性[J]. 食品与生物技术学报,2015,34(2):134-139.
[23] SUN Y R,FUKAMACHI T,SAITO H,et al. ATP requirement for acidic resistance in *Escherichia coli*[J]. **Journal of Bacteriology**,2011,193(12):3072-3077.
[24] EVEN S,LINDLEY N D,LOUBIÈRE P,et al. Dynamic response of catabolic pathways to autoacidification in *Lactococcus lactis*:transcript profiling and stability in relation to metabolic and energetic constraints[J]. **Molecular Microbiology**,2002,45(4):1143-1152.
[25] WANG G H,LI D,MA X Y,et al. Functional role of oppA encoding an oligopeptide-binding protein from *Lactobacillus salivarius* Ren in bile tolerance[J]. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**,2015,42(8):1167-1174.
[26] SHEEHAN V M,SLEATOR R D,HILL C,et al. Improving gastric transit,gastrointestinal persistence and therapeutic efficacy of the probiotic strain *Bifidobacterium breve* UCC2003[J]. **Microbiology**,2007,153(10):3563-3571.

## 科　技　信　息

**一步法构建高强度自主发光铜绿假单胞菌**

中国科学院广州生物医药与健康研究院研究员张天宇课题组一步法构建了无抗性标记的高强度自主发光铜绿假单胞菌,可用于快速连续检测活体小鼠体内菌量。相关研究2020年6月29日发表于《生物传感器与生物电子》。

铜绿假单胞菌又叫绿脓杆菌,是一种环境中广泛存在的革兰氏阴性菌,是医院内感染的主要病原菌之一。目前抗菌药仍是治疗铜绿假单胞菌感染的首选。然而,抗生素的广泛应用及不合理使用导致细菌的耐药性问题日益严重。因此,新的抗铜绿假单胞菌药物和新疗法的研发迫在眉睫,而高效的动物模型更有利于加快新药的研发。

研究人员利用合成生物学原理和技术将带有优选启动子的自主发光操纵子元件、Mini—Tn7系统和Xer/dif系统相结合,利用内源XerC/D酶删除抗性基因,一步法构建了无抗性标记的高强度自主发光铜绿假单胞菌(SfAlPa)。在暗室,不仅肉眼可见SfAlPa菌落可发出蓝绿色光,更惊人的是可见到感染小鼠发光并可用家用相机拍摄出清晰图像,发光值与细菌载量具有良好的相关性且发光非常稳定。

“给药5 h后在小动物活体中不仅可以判断药物是否具有体内活性,而且可以初步判断是具有杀菌还是抑菌活性,甚至是用肉眼观察即可判断初步药效。”张天宇表示,利用SfAlPa建立的小鼠感染模型可实现无创、高效、实时监测活体小鼠体内菌载量及分布变化,显著提升抗铜绿假单胞菌药物的筛选效率,大幅降低所需的小鼠数量和经济成本等。

相关论文信息:https://doi.org/10.1016/j.bios.2020.112396

[信息来源] 中国科学报 朱汉斌. 一步法构建高强度自主发光铜绿假单胞菌 [EB/OL]. (2020-07-9). http://paper.sciencenet.cn/htmlpaper/2020/7/20207914101155857475.shtm