

# Construction of Gene Inactivation System for *Leuconostoc mesenteroides*

Xiaoyan Ju, Zhou Zhang, Wenyu Cheng, Hongxing Jin\*

School of Chemical Engineering and Technology, Hebei University of Technology, Tianjin

Email: [\\*jinhx87@126.com](mailto:jinhx87@126.com)

Received: Aug. 1<sup>st</sup>, 2014; revised: Aug. 27<sup>th</sup>, 2014; accepted: Sep. 10<sup>th</sup>, 2014

Copyright © 2014 by authors and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

## Abstract

To develop an efficient gene inactivation system for *L. mesenteroides*, tetracycline-resistant gene cassettes were ligated with pTA2 T vector. Then upstream and downstream flanking regions of the *ack* (acetate kinase) gene were directionally inserted into left and right MCS (multiple cloning site) of the T vector, respectively. The resulting homologous recombination suicide vector was transformed into *Leuconostoc*. The *ack* gene of chromosome was inactivated and a mutant strain was obtained. To confirm whether *ack* was inactivated, the ability of mutant strain synthesizing acetic acid was analyzed and an *ack* fragment was amplified by PCR. PCR analysis showed that a fragment of *ack* gene in the mutant strain was 1200 bp longer than that in the original strain. Compared with the original strain, the yield of acetic acid in the mutant was decreased by 49.1%. The results indicated that *ack* gene was successfully knocked out. The gene inactivation system for *L. mesenteroides* was constructed.

## Keywords

*Leuconostoc*, Gene Inactivation, Homologous Recombination, Acetate Kinase

# 肠膜明串珠菌基因失活体系的建立

菅晓艳, 张舟, 成文玉, 金红星\*

河北工业大学化工学院, 天津

Email: [\\*jinhx87@126.com](mailto:jinhx87@126.com)

\*通讯作者。

收稿日期：2014年8月1日；修回日期：2014年8月27日；录用日期：2014年9月10日

## 摘要

构建肠膜明串珠菌的基因失活体系。四环素抗性基因表达盒连接到pTA2 T载体上，在T载体的左右多克隆位点上分别定向插入 $ack$ (乙酸激酶)的上、下游同源臂，构建成自杀性同源重组载体，转化明串珠菌，使染色体的 $ack$ 失活，得到突变型。检测突变型产乙酸的量并利用PCR验证 $ack$ 失活。与原始菌株相比，突变型的乙酸产量减少49.1%；突变型的 $ack$  PCR扩增产物比原始菌株的大1200 bp左右。成功地使 $ack$ 基因失活，说明肠膜明串珠菌基因失活体系的构建成功。

## 关键词

明串珠菌，基因失活，同源重组，乙酸激酶

## 1. 引言

明串珠菌(*Leuconostoc*)是韩国泡菜、德国泡菜和腌菜等发酵蔬菜中的优势细菌，在保持产品的质量中起着重要作用[1]。明串珠菌是耐氧的革兰氏阳性细菌[2]，底物通过戊糖磷酸解酮酶(Pentose PhosphoKetolase, PPK)途径而脱氢并产生能量(见图1)。

明串珠菌在食品和医药工业中具有生成双乙酰、葡聚糖、甘露醇和2,3-丁二醇、代谢产生细菌素等应用[3] [4]。明串珠菌是美国FDA认可的GRAS菌，也是国家卫计委认可的安全菌[5]，不产内毒素，能分泌特异性胞外蛋白且没有蛋白降解活性，因此明串珠菌是表达异源蛋白的很好的候选菌[6]。

产业升级转化过程中甘露醇和2,3-丁二醇等化学品需要微生物发酵产生，从而有利于绿色和环保。还有，明串珠菌的染色体基因组只有2 Mb左右[7]，故发酵周期短且可作为底盘生物或精简基因组而构建成优势小基因组微生物。因此，明串珠菌具有巨大的应用价值，已成为国内外学者的研究热点[8]-[15]。

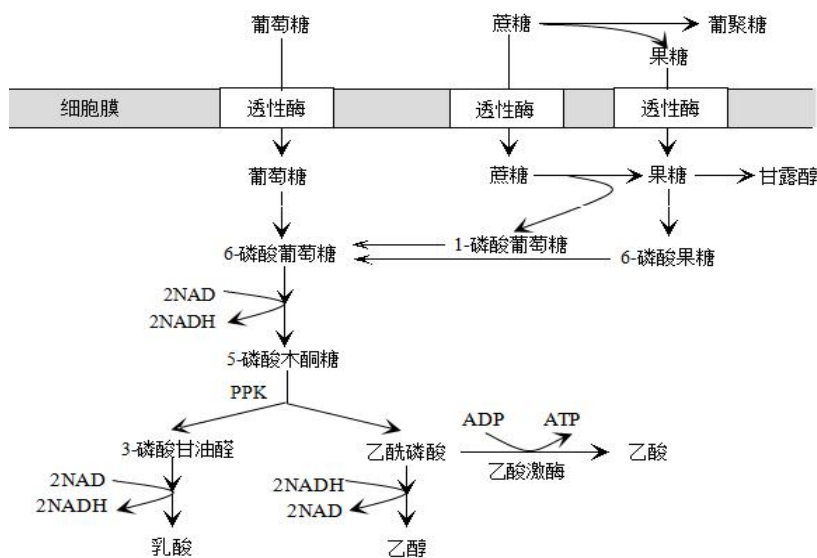


Figure 1. The main carbon metabolic pathway of *L. mesenteroides*  
图1. 肠膜明串珠菌主要碳代谢途径

本文以乙酸激酶基因 *ack* 为目标序列，以四环素为筛选标记，构建自杀性重组质粒，转化肠膜明串珠菌，使染色体上基因失活，获得突变型菌株。通过 PCR 扩增和产物检测，验证基因失活体系的构建成功。

## 2. 材料与方法

### 2.1. 材料

#### 2.1.1. 菌株与质粒

本文所用的菌株和质粒，见表 1。

#### 2.1.2. 试剂和仪器

工具酶为 TaKaRa 的；其它试剂为分析纯；主要仪器有 DL9700 型基因扩增仪、Bio-Rad Gene Pulser Xcell™ 电击仪、722N 型可见分光光度计。

#### 2.1.3. 培养基和培养条件

在 37℃、150 r/min 下用 LB 培养大肠杆菌；在 30℃、120 r/min 下用 MRS[16]培养肠膜明串珠菌。

## 2.2. 方法

### 2.2.1. DNA 操作

明串珠菌基因组 DNA 的提取参照文献[16]，电转化参照文献[9]。

大肠杆菌的质粒提取参照文献[17]，大肠杆菌的转化采用 CaCl<sub>2</sub> 法。

引物序列见表 2，PCR 扩增过程见表 3。

### 2.2.2. *ack* 的 PCR 扩增与测序

参照 *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* ATCC 8293(GenBank accession number CP000414) 的乙酸激酶基因(*ack*)序列设计引物对 A1-A2，扩增 *ack*。将扩增产物连接到 pTA2-T 载体上，转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$ ，送样测序。

**Table 1.** Bacterial strains and plasmids used in this study

**表 1.** 实验所用的菌株和质粒

| Strains or plasmids               | Phenotypes and correlative characters  | Sources   |
|-----------------------------------|--|-----------|
| Bacterial strains                 |  |           |
| <i>E. coli</i> DH5 $\alpha$       | $\phi$ 80 <i>LacZ</i> $\Delta$ M15, <i>deoR</i> , <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>hsdR17</i> , <i>supE</i> , <i>thi</i> , <i>gyrA</i> , <i>relA</i> | This lab  |
| CGMCC1.10327                      | <i>L. mesenteroides</i>  | This lab  |
| <i>Leu ack</i> ::Tet <sup>R</sup> | CGMCC1.10327 with <i>ack</i> knock-out   | This work |
| Plasmids                          |  |           |
| pBR322                            | Tet <sup>R</sup>   | This lab  |
| pTA2-T                            | T-Vector, 2.98kb, Amp <sup>R</sup> , <i>lacZ</i>   | TOYOBO    |
| pTA2- <i>ack</i>                  | pTA2 containing <i>ack</i> fragment from <i>L. mesenteroides</i>   | This work |
| pTA2-Tet                          | pTA2 containing Tet <sup>R</sup> fragment from pBR322  | This work |
| pTA2-T-U                          | pTA2-Tet containing <i>ack</i> upstream fragment from pTA2- <i>ack</i>   | This work |
| pTA2-T-U-D                        | pTA2-T-U containing <i>ack</i> downstream fragment from pTA2- <i>ack</i>   | This work |

**Table 2. Primers used in this study**

**表 2. 实验所用的引物**

| Primers | Sequences(5'→3')                      |
|---------|---------------------------------------|
| T1      | TTTGACAGCTTATCATCGA                   |
| T2      | ATTCTTGGAGTGGTGAATC                   |
| A1      | TGCAATCATCACAGTTAAG                   |
| A2      | CTTAATTACTGACGTGCAC                   |
| U1      | TTTCGGTACCCATCACAGTT( <i>KpnI</i> )   |
| U2      | GCAGTCTCGAGCGTTCAGTTA( <i>XhoI</i> )  |
| D1      | ATAGTCTGCAGTCATTTAGGT( <i>PstI</i> )  |
| D2      | CAGCTCTAGACTTCTTCATTTA( <i>XbaI</i> ) |
| Y1      | GGGTTGTTGTTGATGATG                    |
| Y2      | TGTGCGTGAGTATTGGTT                    |

**Table 3. Steps of PCR**

**表 3. PCR 步骤**

| Fragment                   | Denaturation  | Circulation (×30)                | Extension      |
|----------------------------|---------------|----------------------------------|----------------|
| Tet <sup>R</sup>           |               | 94°C 30 s, 47°C 30 s, 72°C 1 min |                |
| <i>ack</i>                 |               | 94°C 30 s, 50°C 30 s, 72°C 1 min |                |
| upsteam fragment           | 94°C<br>5 min | 94°C 30 s, 52°C 30 s, 72°C 30 s  | 72°C<br>10 min |
| downsteam fragment         |               | 94°C 30 s, 52°C 30 s, 72°C 30 s  |                |
| recombination confirmation |               | 94°C 30 s, 50°C 30 s, 72°C 90 s  |                |

### 2.2.3. 同源重组载体的构建

参照质粒 pBR322 序列, 设计引物对 T1-T2, 扩增四环素抗性基因表达盒, 将扩增产物连接到 pTA2-T 上, 转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$ , 提取质粒得到中间载体 pTA2-Tet。根据扩增的 *ack* 序列设计引物对 U1-U2, 扩增 *ack* 上游片段, 将扩增产物连接到 pTA2-Tet 的 *KpnI* 和 *XhoI* 位点上, 转化 DH5 $\alpha$ , 提取质粒得到 pTA2-T-U; 设计引物对 D1-D2, 扩增 *ack* 下游片段, 将扩增产物连接到 pTA2-T-U 的 *PstI* 和 *XbaI* 位点上, 转化 DH5 $\alpha$ , 提取质粒得到同源重组载体 pTA2-T-U-D。

### 2.2.4. 肠膜明串珠菌的电转化

同源重组载体 pTA2-T-U-D 转化肠膜明串珠菌, 从平板上挑取单菌落进行液体 MRS 培养, 用 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  四环素和 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  氨苄检验菌株的抗性。保留具有四环素抗性且对氨苄敏感的菌株, 作为疑似失活菌株。

### 2.2.5. 突变型菌株的 PCR 验证

分别在 *ack* 基因上游和下游片段序列上设计引物 Y1、Y2, 提取疑似失活菌株的基因组 DNA 作为模板, 通过 PCR 验证菌株的 *ack* 基因是否失活。

### 2.2.6. 发酵实验

以 1% 接种于 MRS 中, 发酵 24 h 后参照文献[18]-[21]检测培养基中的乙酸、乳酸、乙醇、双乙酰和甘露醇含量。

### 3. 结果与分析

#### 3.1. *ack* 基因克隆和序列同源性

约 1.1 kb 的 PCR 扩增片段连接到 pTA2-T 载体上, 转化 DH5 $\alpha$ , 获得重组子, 重组质粒命名为 pTA2-*ack*。测序分析表明长度为 1112 bp, 与 *L. mesenteroides* ATCC8293 的乙酸激酶基因序列比对结果: 核酸序列同源性为 99%, 有 9 个碱基的差异, 氨基酸序列同源性为 100%。已提交到 GenBank, 接收号为 JF837336。

#### 3.2. 同源重组载体的构建

以质粒 pBR322 为模板, 扩增 Tet<sup>R</sup> 基因表达盒, 获得的 PCR 产物长约 1.2 kb, 与 pTA2-T 载体连接, 重组质粒命名为 pTA2-Tet。扩增的 *ack* 上游片段为约 500 bp, 与 pTA2-Tet 连接, 重组质粒命名为 pTA2-T-U。扩增的 *ack* 下游片段大小约 450 bp, 与 pTA2-T-U 连接, 同源重组载体命名为 pTA2-T-U-D。

#### 3.3. 疑似失活菌株的筛选

将 pTA2-T-U-D 经电击转化肠膜明串珠菌后, 涂布于含四环素的 MRS 平板上, 保留抗四环素而对氨苄青霉素敏感的重组子(发生二次交换的), 废弃对四环素和氨苄青霉素都具有抗性的重组子(只发生一次交换的), 从而获得疑似失活菌株。

#### 3.4. 疑似失活菌株的 PCR 检测

为了验证疑似失活菌株染色体上的 *ack* 基因已被失活, 对重组子进行了 PCR 检测。分别以 CGMCC 1.10327(原始菌株)和疑似失活菌株的染色体 DNA 为模板, 用相同的引物对 Y1-Y2 进行 PCR 扩增, 对得到的产物进行琼脂糖凝胶电泳。疑似失活菌株的扩增产物长度比 CGMCC1.10327 的大 1200 bp 左右(图 2), 与预期结果一致。将该疑似失活菌株命名为 *Leu ack::Tet<sup>R</sup>*。

#### 3.5. 种菌株的生理特性比较

为了进一步验证 *ack* 基因的失活并研究 *ack* 基因失活对肠膜明串珠菌碳代谢的影响, 用 MRS 进行发酵 24 h 时并考察乙酸、乙醇、乳酸、双乙酰、甘露醇的量。

在相同条件下, CGMCC1.10327 和 *Leu ack::Tet<sup>R</sup>* 两种菌株的生物量基本一致。比较两者的代谢产物

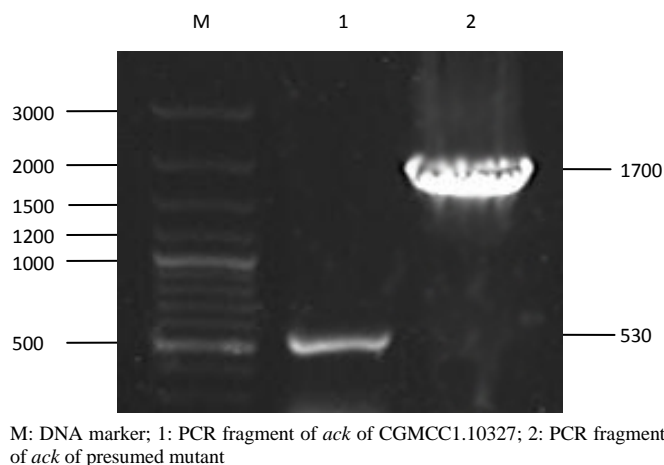


Figure 2. Characterization of defined *ack* inactivated mutant by PCR analysis

图 2. *ack* 基因失活菌株的 PCR 鉴定

**Table 4.** Comparison of fermentation parameters of the two strains (Unit: g/L)  
**表 4.** 两菌株的发酵参数比较(单位: g/L)

| Strains                         | Acetic acid | Diacetyl    | Ethanol     | Lactate     | Mannitol    |
|---------------------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| CGMCC1.10327                    | 0.40 ± 0.02 | 1.56 ± 0.06 | 2.02 ± 0.11 | 9.15 ± 0.31 | 3.04 ± 0.11 |
| <i>Leu ack::Tet<sup>R</sup></i> | 0.21 ± 0.01 | 1.31 ± 0.04 | 2.18 ± 0.12 | 9.14 ± 0.26 | 3.02 ± 0.09 |

表明, 突变菌株的乙酸浓度为 0.20 g/L, 比原始菌株少 49.1%; 突变菌株的双乙酰浓度为 1.21 g/L, 比原始菌株少 16.3%; 突变菌株的乙醇浓度为 2.21 g/L, 比原始菌株高 8.3%; 产乳酸和甘露醇的差不多(见表 4)。

## 4. 讨论

自然情况下, 菌体内自发的同源重组效率相当低。2008 年韩国的 Eom[22]以摘要形式报道过柠檬明串珠菌的基因失活, 此后还没有明串珠菌的相关报道。本研究成功建立了肠膜明串珠菌的基因失活体系。

本研究使肠膜明串珠菌的 *ack* 基因失活, 从而阻碍了乙酸合成, 导致乙酸的量减少和乙醇的量增加, 符合理论上的预期结果。由此可见, 乙酸的合成没有完全阻断, 因为染色体上存在另一个拷贝的乙酸激酶基因(已克隆该 *ack*, GenBank 的接收号为 JF809796)。若使另一个拷贝的 *ack* 也失活, 就可以改造成为高产乙醇的明串珠菌菌株。

## 5. 结论

本研究成功地使染色体的 *ack* 基因失活, 说明肠膜明串珠菌基因失活体系的构建成功。

## 项目基金

天津市科技计划项目(“明串珠菌发酵生产甘露醇研究”, No. 12ZXCXSY06900); 河北省自然科学基金项目(“通过基因敲除研究明串珠菌的中心碳代谢调控”, No. C2011202112); 河北省科技支撑计划项目(“以甘蔗/红糖为原料用明串珠菌发酵生产甘露醇”, No. 13212405)。

## 参考文献 (References)

- [1] 成文玉, 金红星 (2012) 明串珠菌的基因研究进展. *中国酿造*, **2**, 24-28.
- [2] Eom, H.-J., Cho, S.K., Park, M.S., *et al.* (2010) Characterization of *Leuconostoc citreum* plasmid pCB18 and development of broad host range shuttle vector for lactic acid bacteria. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, **15**, 946-952.
- [3] Yi, A.-R., Lee, S.-R., Jang, M.-U., *et al.* (2009) Cloning of dextransucrase gene from *Leuconostoc citreum* HJ-P4 and its high-level expression in *E. coli* by low temperature induction. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, **8**, 829-835.
- [4] 成文玉, 金红星, 金正焕 (2012) 明串珠菌的碳代谢调控研究进展. *中国酿造*, **6**, 6-8.
- [5] 卫生部 (2012) 关于将肠膜明串珠菌肠膜亚种列入可用于食品的菌种名单的公告. *中国食品卫生杂志*, **4**, 305.
- [6] Hemme, D. and Foucaud-Scheunemann, C. (2004) *Leuconostoc*, characteristics, use in dairy technology and prospects in functional foods. *International Dairy Journal*, **6**, 467-494.
- [7] 明串珠菌的基因组. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/?term=leuconostoc>
- [8] Eom, H.-J., Moon, J.-S., Cho, S.K., *et al.* (2012) Construction of theta-type shuttle vector for *Leuconostoc* and other lactic acid bacteria using pCB42 isolated from kimchi. *Plasmid*, **67**, 35-43.
- [9] 张舟, 成文玉, 金红星 (2014) 明串珠菌的稳定高效电转化. *中国乳品工业*, **1**, 18-20.
- [10] 崔虎山, 李冬梅, 李艳茹等 (2013) 抑菌性明串珠菌的筛选及发酵特性研究. *生物技术*, **6**, 93-96.
- [11] 李自强, 成文玉, 金红星 (2013) 牛乳中添加不同果汁对明串珠菌发酵产双乙酰的影响. *河北工业大学学报*, **4**,

44-47.

- [12] 成文玉, 金红星, 胡炎华等 (2010) 明串珠菌筛选与分类的研究进展. *中国酿造*, **3**, 7-9.
- [13] 金红星, 成文玉 (2012) 明串珠菌发酵产甘露醇的研究进展. *中国酿造*, **10**, 4-6.
- [14] 金红星, 成文玉, 周亚欣 (2013) 提取明串珠菌质粒方法的优化. *中国调味品*, **2**, 84-86.
- [15] 周亚欣 (2013) 明串珠菌乙醛脱氢酶基因失活的研究. 硕士学位论文, 河北工业大学, 天津.
- [16] Kim, J., Chun, J. and Han, H.-U. (2000) *Leuconostoc kimchii* sp. nov., a new species from kimchi. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **5**, 1915-1919.
- [17] Sambrook, J. and Russell, D.W., 著 (2002) 黄培堂等, 译. 分子克隆实验指南第三版. 科学出版社, 北京, 27-29.
- [18] 金红星, 史建波, 成文玉等 (2011) 以蔗糖为原料明串珠菌发酵生产甘露醇. *食品与发酵工业*, **2**, 91-93.
- [19] 王秉栋, 张立克, 于静涛等 (1984) 肉中乳酸的分光光度微量测定法. *江苏农学院学报*, **4**, 57-58.
- [20] 何惠昭, 郑战军, 吴春燕 (2003) 一种简单快速检测冰乙酸含量的方法. *酿酒*, **2**, 79-80.
- [21] 林仁权, 胡文兰, 陈国亮 (2006) 重铬酸钾氧化分光光度法测定酒中乙醇含量. *浙江预防医学*, **3**, 78-79.
- [22] Eom, H.-J., Jin, Q., Moon, J.-S., et al. (2008) Development of gene expression/knock-out system for genetic engineering of *Leuconostoc citreum*. *Journal of Biotechnology*, **136**, S346.