

研究报告

限制修饰系统 *cgII* 赋予钝齿棒杆菌抗噬菌体功能活性

胡永飞, 李铁民, 杨智勇, 张博, 李玉

辽宁大学生命科学院, 沈阳 110036

摘要: 为解决氨基酸发酵工业中的噬菌体污染问题, 对 *cgII* 基因复合体在钝齿棒杆菌中的功能活性表达进行研究。通过 PCR 从谷氨酸棒杆菌基因组扩增 *cgII* 基因复合体, 构建重组质粒 pJL23-*cgII*, 转化钝齿棒杆菌 T6-13 后得到重组菌株。定性和定量检测重组菌株的噬菌体抗性。实验结果表明, 携带 *cgII* 基因复合体的重组钝齿棒杆菌显示了明显的抗噬菌体功能活性和较广的抗噬菌体谱, 进而证实了 *cgII* 基因复合体用于构建钝齿棒杆菌抗噬菌体菌株的可行性, 为解决氨基酸发酵生产中的噬菌体污染问题提供了一种有效方法。

关键词: 限制修饰系统, *cgII* 基因复合体, 钝齿棒杆菌, 噬菌体, 基因工程菌

Phage Resistance of *Corynebacterium crenatum* Conferred by the Restriction and Modification System *cgII*

Yongfei Hu, Tiemin Li, Zhiyong Yang, Bo Zhang, and Yu Li

College of Life Science, Liaoning University, Shenyang 110036, China

Abstract: In order to prevent phage contamination in amino acid fermentation, we introduced the restriction and modification system *cgII* gene complex into *Corynebacterium crenatum* and studied their phage-resistance. The *cgII* gene complex was amplified from *Corynebacterium glutamicum* by PCR and constructed into pJL23 vector. The recombinant strains were obtained by transformation of the recombinant plasmid pJL23-*cgII* into *C. crenatum*. Results showed that the recombinant strains possessed strong phage-resistance activity and broad phage-resistance spectrum, demonstrating the feasibility of using *cgII* gene complex for construction of phage-resistance recombinant *C. crenatum* strains and presenting a powerful way to solve the problem of phage contamination in amino acid fermentation industry.

Keywords: restriction and modification system, *cgII* gene complex, *Corynebacterium crenatum*, bacteriophage, genetic engineered strain

限制修饰系统 *cgII* 是在谷氨酸棒杆菌染色体中发现的 II 型限制修饰系统基因复合体^[1], 该复合体基因是由 2117 bp 组成的连锁基因, 中间有 8 个碱基间隔, 分别编码 66.8 kD 的甲基化转移酶(M 酶)和 39.8 kD 的相应限制性内切酶(R 酶)。根据 *cgII* M 基

因编码的氨基酸基序分析, 推测的 *cgII* M 酶的识别序列为 5' GCSGC(S=C 或 G)^[2]。Schäfer 等^[1]利用谷氨酸棒杆菌限制缺陷突变株作为宿主菌, 通过互补实验克隆了 *cgII* R 基因, 证实了其对相应噬菌体的限制活性。

Received: September 14, 2007; **Accepted:** November 9, 2007

Supported by: the Science and Technology Innovation Program of Liaoning Province (No. 2004205004).

Corresponding author: Tiemin Li. Tel: +86-24-62202232; Fax: +86-24-62202796; E-mail: tieminli@lnu.edu.cn

辽宁省科技厅计划项目(No. 2004205004)资助。

通常, 限制修饰系统在胞内的表达可限制外源 DNA 的侵入, 进而使宿主细胞获得抗噬菌体功能, 而且这种功能与噬菌体种类无严格相关性, 只要噬菌体基因组中含有限制修饰系统基因编码产物的识别序列, 则含有限制修饰系统的菌株将对该噬菌体起到限制感染作用。钝齿棒杆菌是氨基酸生产中的重要菌株之一^[3,4]。由于发酵生产的规模化和连续性, 噬菌体污染一直威胁着企业生产^[5]。虽然 *cgII* 基因复合体严格存在于三株谷氨酸棒杆菌中^[1], 但钝齿棒杆菌和谷氨酸棒杆菌同为棒杆菌属菌株, 如果 *cgII* 基因复合体能在钝齿棒杆菌中表达功能活性, 可使其获得抗噬菌体功能。为此, 本文将含有 *cgII* 基因复合体的重组质粒导入钝齿棒杆菌中, 以证实 *cgII* 基因复合体在钝齿棒杆菌中的功能活性表达。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株、质粒及噬菌体

谷氨酸棒杆菌 CICC10226、钝齿棒杆菌 T6-13 均购自中国工业微生物菌种保藏管理中心。大肠杆菌 JM109、HB101、质粒 pMD18-T Simple 均由宝生物工程(大连) 有限公司提供。质粒 pJL23 为复旦大学郑兆鑫教授惠赠。钝齿棒杆菌噬菌体 AS-IV3C44、AS-IV3C45、AS-IV3C46、AS-IV3C47 和 AS-IV3C48 均购于中国科学院武汉病毒研究所。

1.1.2 工具酶与试剂

限制性内切酶、PyrobestTM DNA Polymerase、DNA Ligation Kit Ver. 2.1、TaKaRa Agarose Gel DNA Purification Kit Ver. 2.0、TaKaRa MiniBEST Plasmid Purification Kit Ver. 2.0 等均为宝生物工程(大连) 有限公司产品, 胰蛋白胨、酵母提取物购自 Oxoid 公司; 其它化学试剂均为国产或进口分析纯产品。

1.1.3 引物设计与合成

根据 GenBank 中 *cgII* 基因序列设计引物 P1: 5' -CGGGATCCATGAGTACAAAACCCACTATTG-3' 和 P2: 5' -CGGGATCCTTAATCCTGCCCCAATCTGTGTC-3', 5' 端均加 *Bam*H I 酶切位点序列(阴影标记)。测序用引物 RV-M 位于克隆载体 pMD18-T Simple *Eco*R V 酶切位点上游, M13-47 位于克隆载体 pMD18-T Simple *Eco*R V 酶切位点下游, P3、P4、P5 位于 *cgII* 基因复合体内, 具体序列为: RV-M: 5' -CG

CCAGGGTTTTCCCAGTCACGAC-3', M13-47: 5' -GAGCGGATAACAATTCACAGG-3', P3: 5' -TGAAGACCTCGAAGCTGTTG-3', P4: 5' -AAATCGAGCATTGACCAACC-3', P5: 5' -GACTACTTAAGCGACCATGA-3'。用于鉴定 *cgII* 基因连接方向的引物 P6 以 pJL23 *Bam*H I 酶切位点上游 200 bp 处序列设计, P7 以 *cgII* 基因复合体片段内 1100 bp 处设计, 其序列为: P6: 5' -GAATTCACACGAGCTCAACTG-3', P7: 5' -CGGGATCCTTAATCAGCTTCCTGATCAGC-3'。上述引物均由宝生物工程(大连) 有限公司合成。

1.1.4 培养基

LB 培养基, 需添加抗生素时, K_m 和 Amp 的添加浓度均为 50 μ g/mL。

1.2 方法

1.2.1 重组质粒 pMD18-T Simple-*cgII* 的构建

以谷氨酸棒杆菌 CICC10226 基因组 DNA 为模板, 用引物 P1/P2 进行 PCR 扩增。PCR 反应条件为: 94°C 预变性 5 min, 94°C 变性 30 s, 55°C 退火 30 s, 72°C 延伸 2 min, 30 个循环后, 72°C 再延伸 2 min。回收 *cgII* 基因片段, 3' 末端加“A”反应后与 pMD18-T Simple 连接, 得到重组质粒 pMD18-T Simple-*cgII*。

1.2.2 穿梭表达载体 pJL23-*cgII* 的构建

用 *Bam*H I 分别酶切克隆重组质粒 pMD18-T Simple-*cgII* 和表达载体 pJL23, 琼脂糖凝胶电泳后, 分别切胶回收基因片段, 用去磷酸化试剂盒处理切胶回收的 6 kb 左右大片段后, 采用 DNA 片段连接试剂盒将 *cgII* 基因片段与表达载体 pJL23 大片段连接。得到穿梭表达载体 pJL23-*cgII*。

1.2.3 穿梭表达载体 pJL23-*cgII* 的鉴定

穿梭表达载体 pJL23-*cgII* 转化至大肠杆菌 HB101^[6], 提取质粒后用 *Bam*H I (10 u/ μ L) 在 30°C 条件下, 酶切重组质粒 pJL23-*cgII* 1 h。利用菌落 PCR 反应确定 *cgII* 基因的连接方向, 所用引物为 P6 和 P7。如果片段正向连接, PCR 扩增后将得到 1300 bp 的片段; 如果反向连接将得不到扩增产物。

1.2.4 穿梭表达载体 pJL23-*cgII* 转化钝齿棒杆菌^[7]

挑取新鲜平板上的钝齿棒杆菌 T6-13 加到含有 0.5% 葡萄糖的 2 mL 液体 LB 培养基中, 30°C, 200 r/min 过夜培养。按 1% 接种量转接到含 3% 甘氨酸和 0.1% Tween 80 的 50 mL 液体 LB 培养基中, 30°C, 200 r/min 培养至细胞 OD_{600} 达 0.6。将菌液冰浴 15 min, 离心

收集菌体。在 4°C 条件下, 用 0.2 mL 10% 甘油重悬细胞, 分装到 1.5 mL 管中, 每管 80 μ L, -70°C 冰箱保存待用。转化时将其冰浴融化, 加入 1 μ L 质粒 DNA 后混合, 转移至预冷的 0.1 cm 电击杯中, 于 1.8 kV, 5 ms 条件下电击细胞, 电击后立即加入含 0.5% 葡萄糖的 LB 液体培养基 1 mL, 混均, 转入 1.5 mL 管后, 46°C 水浴 6 min, 然后, 30°C 水浴 1 h, 离心收集菌体, 涂布于含 0.5% 葡萄糖和 50 μ L/mL 卡那霉素的固体 LB 培养基上, 30°C 培养 36 h。

1.2.5 重组钝齿棒杆菌噬菌体抗性定性检测

采用平板点滴法^[8]。上层平板以 1 mL 大肠杆菌悬液与 5 mL 上层 LB 培养基混合铺展, 于无菌室内晾干后, 在上层中滴加适量噬菌体原液。

1.2.6 重组钝齿棒杆菌噬菌体抗性定量检测

采用平板空斑法^[8]。成斑率 EOP(Efficiency of plaquing)计算方法见下式, 敏感菌株的 EOP 等于 1。

$$\text{成斑率(EOP)} = \frac{\text{抗性菌株中的噬菌斑成斑数}}{\text{敏感菌株中的噬菌斑成斑数}}$$

1.2.7 重组钝齿棒杆菌发酵培养中噬菌体抗性检测

挑取钝齿棒杆菌和重组钝齿棒杆菌单菌落, 分别接种到 LB 液体培养基中, 30°C, 200 r/min 过夜培养后, 按 5% 接种量分别接种到装有 LB 液体培养基试管中。将上述试管置 30°C 水浴, 200 r/min 振荡培养, 培养至 2 h, 分别在钝齿棒杆菌和重组钝齿棒杆菌试样中各加入 10 μ L 噬菌体液(AS-IV3C48, 效价 9×10^9 pfu/mL), 同时设不加噬菌体对照组。在设定时间分别测定菌种生长量(OD_{600})。实验数据为三次独立实验结果的平均值。

2 结果

2.1 *cgII* 基因的克隆及序列分析

以谷氨酸棒杆菌(*C. glutamicum* CICC10226)基因组 DNA 为模板, 以 P1/P2 为引物, PCR 扩增 *cgII* 基因片段。实验结果表明, 扩增的基因片段大小与预期的片段大小(2177 bp)一致(图 1)。将 *cgII* 基因片段切胶回收, 加“A”尾后乙醇沉淀, 然后与克隆载体 pMD18-T Simple 连接, 转化至大肠杆菌 JM109 中。涂布于含 50 μ g/mL 氨苄青霉素的 LB 平板, 37°C 过夜培养。挑取单菌落, 菌落 PCR 筛选, 获得阳性克隆。对阳性克隆菌落植菌后, 选取 2 号菌落, 采用

Sanger 链末端终止法对 *cgII* 基因进行测序。BLAST 同源性分析表明, 测序结果与 GenBank 中登记的 *cgII* 基因序列完全一致。

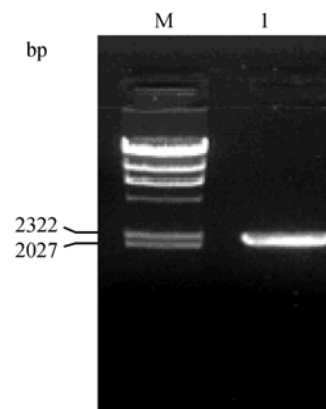


图 1 *cgII* 基因的 PCR 扩增电泳图谱

Fig. 1 Agarose gel electrophoresis of PCR amplification fragment of *cgII* gene

M: λ -Hind III DNA marker;

1: PCR amplification fragment of *cgII* gene

2.2 重组质粒 pJL23-*cgII* 的构建

重组质粒 pMD18-T Simple-*cgII* 经 *Bam*H I 消化后, 取 5 μ L 进行琼脂糖凝胶电泳(图 2)。切胶回收 2177 bp *cgII* 基因片段。*Bam*H I 消化穿梭表达载体 pJL23, 取 5 μ L 进行琼脂糖凝胶电泳(图 3)。pJL23 经 *Bam*H I 消化, 电泳后出现 6.2 kb 和 2.2 kb 两条带, 其中 2.2 kb 片段为 *xyIE* 报告基因片段, 6.2 kb 片段为载体大片段。切胶回收 6.2 kb 大片段, 去磷酸化处理后, 与 2177 bp *cgII* 基因片段进行连接得到重组质粒 pJL23-*cgII*。重组质粒 pJL23-*cgII* 的构建过程见图 4。

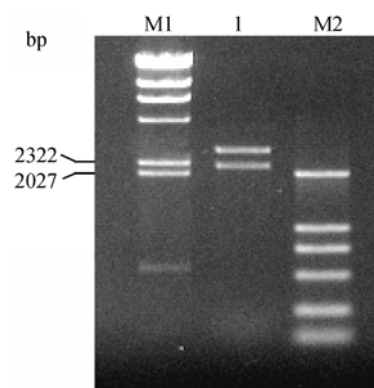


图 2 重组质粒 pMD18-T-*cgII* *Bam*H I 酶切后琼脂糖凝胶电泳图谱

Fig. 2 Agarose gel electrophoresis of pMD18-T-*cgII* digested by *Bam*H I

M1: λ -Hind III DNA marker; 1: pMD18-T-*cgII* digested by *Bam*H I; M2: DL2000 DNA marker

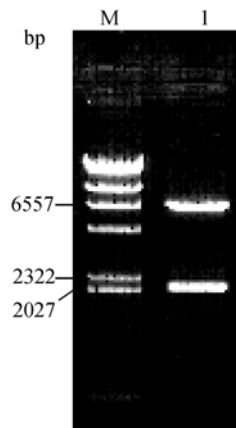


图 3 质粒 pJL23 经 *BamH I* 酶切后的电泳图谱
Fig. 3 Agarose gel electrophoresis of plasmid pJL23 digested by *BamH I*
M: λ -Hind III DNA marker; 1: pJL23 digested by *BamH I*

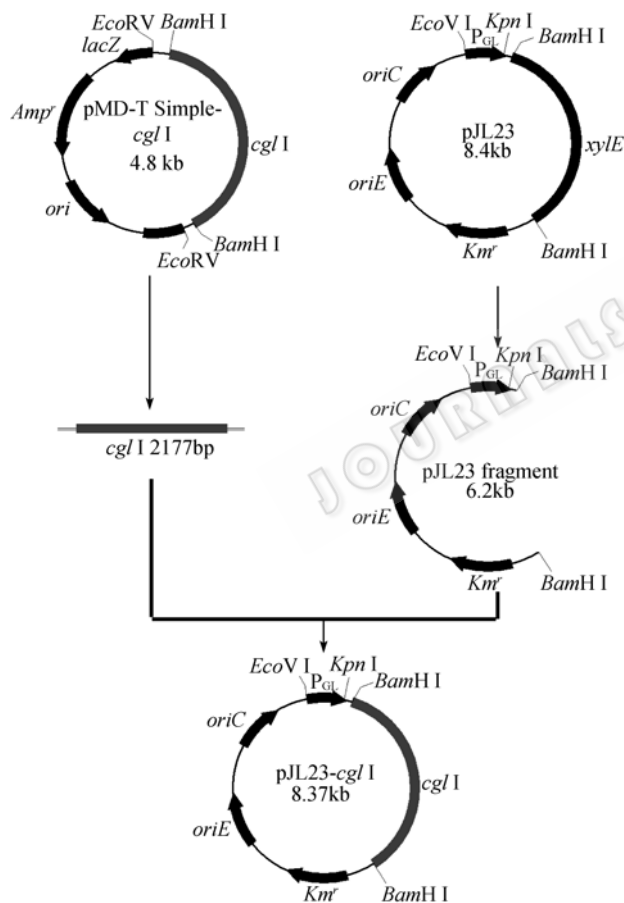


图 4 pJL23-*cgII* 构建示意图
Fig. 4 The construction of pJL23-*cgII*

2.3 重组质粒 pJL23-*cgII* 的鉴定

重组质粒 pJL23-*cgII* 转化大肠杆菌 HB101 感受态细胞, 提取质粒, 选取 94[#]质粒进行酶切鉴定。由

电泳图可以看出(图 5), *cgII* 基因片段大小约为 2177 bp, 与预期片段大小一致。为了得到正向连接重组质粒, 进一步对 94[#]质粒进行 PCR 鉴定。实验结果表明连接的 *cgII* 基因片段为正向连接(图 6)。

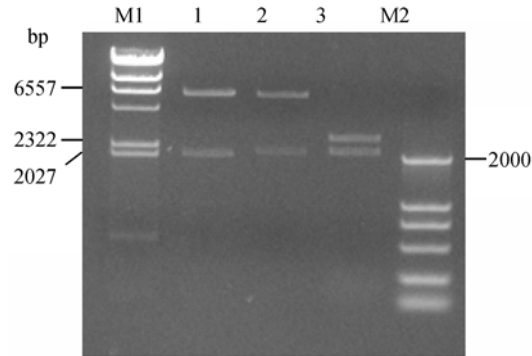


图 5 重组质粒 pJL23-*cgII* 经 *BamH I* 酶切后的电泳图谱
Fig. 5 Agarose gel electrophoresis of recombinant plasmid pJL23-*cgII* digested by *BamH I*
M1: λ -Hind III DNA marker; 1: pJL23 digested by *BamH I*; 2: pJL23-*cgII* by *BamH I*; 3: pMD18-T simple-*cgII* digested by *BamH I*; M2: DL2000 DNA marker

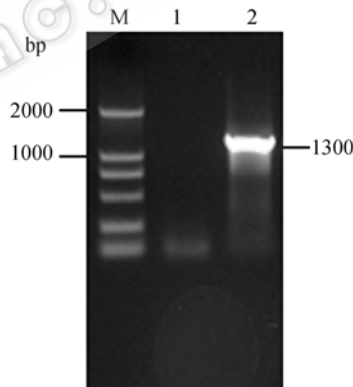


图 6 *cgII* 基因连接方向鉴定
Fig. 6 Identification of ligation oritation of *cgII* gene by PCR
M: DL2000 DNA marker; 1: only primers P6/P7; 2: amplification product with primers P6/P7

2.4 重组钝齿棒杆菌抗噬菌体活性定性鉴定

从大肠杆菌 HB101 中提取重组质粒 pJL23-*cgII* 转化钝齿棒杆菌, PCR 鉴定转化子, 琼脂糖凝胶电泳结果表明 90%的转化子为阳性转化子。采用双层平板点滴法定性鉴定重组钝齿棒杆菌抗噬菌体活性。由图 7 可以看出, 野生钝齿棒杆菌在滴加的五种噬菌体原液处有清晰的透明圈, 而重组钝齿棒杆菌在滴加的五种噬菌体原液处无透明圈, 表明质粒携带的 *cgII* 基因复合体赋予了重组钝齿棒杆菌对相应噬菌体的明显抗性。

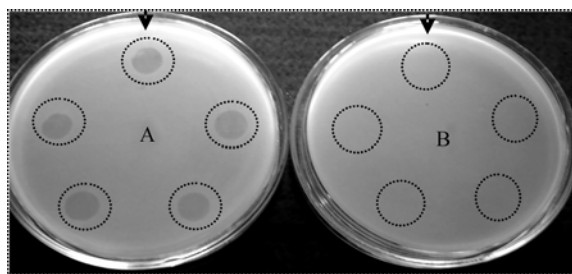


图 7 重组钝齿棒杆菌抗噬菌体活性检测

Fig. 7 Resistance detection of the recombinant *C. crenatum* against phages

Plate A: Wild *C. crenatum*; plate B: recombinant *C. crenatum*. As showed in the figure, phages AS-IV3C44, AS-IV3C45, AS-IV3C46, AS-IV3C47, AS-IV3C48 (10^8 pfu/mL) were clockwise added with beginning from the arrow on the top, and the circles on the plates indicate the position of original phage liquid added

2.6 重组钝齿棒杆菌抗噬菌体活性的定量鉴定

为了鉴定重组钝齿棒杆菌的抗噬菌体活性强度,采用双层平板空斑法分别对 5 种钝齿棒杆菌噬菌体 AS-IV3C44、AS-IV3C45、AS-IV3C46、AS-IV3C47、AS-IV3C48 进行噬菌斑数量测定,同时,以野生钝齿棒杆菌作对照。实验结果表明(表 1),重组钝齿棒杆菌对 5 种相应噬菌体的 EOP 均小于 10^{-8} ,表明感染重组钝齿棒杆菌的 5 种相应噬菌体在胞内均未增殖。

表 1 重组钝齿棒杆菌抗噬菌体活性的定量检测(pfu/mL)
Table 1 Quantitative detection of the resistance of recombinant *C. crenatum* against phages (pfu/mL)

Phages	Strains		EOP
	<i>C. crenatum</i>	Recombinant <i>C. crenatum</i>	
AS-IV3C44	3.1×10^8	10^0	$<10^{-8}$
AS-IV3C45	6.8×10^8	10^0	$<10^{-8}$
AS-IV3C46	4.6×10^8	10^0	$<10^{-8}$
AS-IV3C47	4.9×10^8	10^0	$<10^{-8}$
AS-IV3C48	4.3×10^8	10^0	$<10^{-8}$

2.7 重组钝齿棒杆菌发酵培养中抗噬菌体活性鉴定

为了进一步证实构建的重组钝齿棒杆菌的抗噬菌体活性,我们进行了发酵培养条件下重组钝齿棒杆菌对其相应噬菌体的抗性活性研究。实验结果表明(图 8),发酵培养过程中钝齿棒杆菌在培养 2 h 加入噬菌体后,4 h 菌量开始减少,随培养时间延长,菌量逐渐减少,到 12 h 菌量远低于接种菌量。而未加噬菌体的钝齿棒杆菌对照组,随时间延长,菌量逐渐增加,到 10 h 菌量趋于恒定,表明钝齿棒杆菌对相应噬菌体敏感。重组钝齿棒杆菌在培养 2 h 加

入噬菌体后,随培养时间延长,菌量逐渐增加,与未加噬菌体的重组钝齿棒杆菌对照组相比,菌量未发生变化,表明重组钝齿棒杆菌对相应噬菌体具有明显抗性。

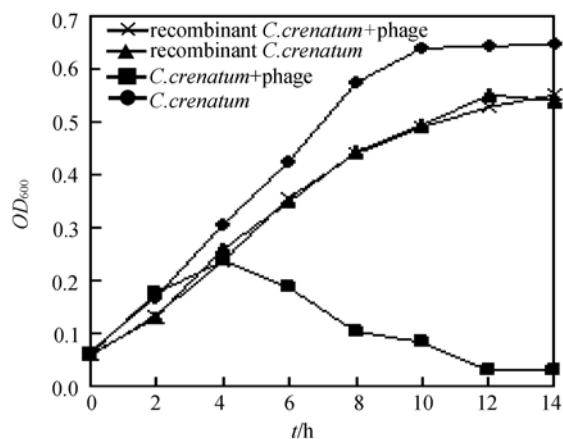


图 8 发酵培养中重组钝齿棒杆菌抗噬菌体活性

Fig. 8 Phage resistance activity of recombinant *C. crenatum* in fermentation culture

3 讨论

限制修饰(Restriction and modification, RM)系统是由限制酶(R)和甲基转移酶(M)单亚基或多亚基构成的复合酶系统,两种酶通常成对出现,具有相同的 DNA 识别位点,其作用相反。限制酶作用于 DNA 专一位点,造成 DNA 断裂;而甲基转移酶(又称甲基化酶)通过对 DNA 的甲基化修饰使得内切酶对该位点不再起作用,从而保护 DNA。编码 RM 系统的基因定位在质粒或染色体基因组中。正常情况下,含有 RM 的细胞在 DNA 复制过程中被甲基化,而侵入的非己 DNA(如噬菌体和质粒 DNA)由于不能被甲基化而被受到严格限制^[9]。RM 系统广泛存在于原核生物中,其功能主要是作为原核生物的免疫系统防御外源 DNA 的侵入^[10]。

本文将含有 *cgII* 基因复合体重组质粒导入钝齿棒杆菌,功能活性检测表明,构建的重组钝齿棒杆菌具有很强的广谱抗噬菌体活性,完全限制 5 种钝齿棒杆菌噬菌体的感染,而且,重组钝齿棒杆菌在发酵培养过程中加入噬菌体同样表现了明显抗性。这些研究结果表明来自谷氨酸棒杆菌的限制修饰系统 *cgII* 基因复合体可在钝齿棒杆菌中表达功能活性,进而证实了利用 *cgII* 基因复合体构建抗噬菌体重组

钝齿棒杆菌的可行性。

cgII 基因复合体进入钝齿棒杆菌后, 首先通过 M 酶在特异识别序列上使宿主基因组 DNA 胞嘧啶甲基化, 以避免相应 R 酶对其切割。新近的报道表明在原核细胞中, 腺嘌呤(A)甲基化对细胞生理代谢有一定影响, 而胞嘧啶(C)甲基化对细胞的影响还未被发现^[11]。*cgII* 基因复合体对宿主基因组 DNA 的胞嘧啶甲基化是否会影响钝齿棒杆菌的生理代谢, 我们正在研究中。

随着人们对噬菌体研究的不断深入以及基因工程技术的广泛应用, 工程策略构建抗噬菌体菌株得到了广泛研究, 并取得了较好的效果。已报道的策略主要有噬菌体编码的抗性、反义 RNA 技术、自杀陷阱、亚单位中毒和限制和修饰系统的应用等工程防御策略^[12]。在这些策略中, 除限制修饰系统的应用外, 均需要获悉噬菌体基因组的信息, 这就为其广泛应用带来了一定的局限性。而应用限制修饰系统构建抗噬菌体工程菌则无需获悉噬菌体基因组的信息, 目前该策略已用于构建乳酸菌抗噬菌体菌株^[13-15]。所以应用限制修饰系统 *cgII* 基因复合体构建抗噬菌体重组钝齿棒杆菌用于解决氨基酸发酵生产中的噬菌体污染问题具有潜在的应用前景。

REFERENCES

- [1] Schäfer A, Schwarzer A, Kalinowski J, *et al.* Cloning and characterization of a DNA region encoding a stress-sensitive restriction system from *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 and analysis of its role in intergeneric conjugation with *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, 1994, **176**(23): 7309-7319.
- [2] Schäfer A, Tauch A, Droste N, *et al.* The *Corynebacterium glutamicum* *cgII*M gene encoding a 5-cytosine methyltransferase enzyme confers a specific DNA methylation pattern in a McrBC-deficient *Escherichia coli* strain. *Gene*, 1997, **203**(2): 95-101.
- [3] Hermann T. Industrial production of amino acids by coryneform bacteria. *J Biotech*, 2003, **104**(1-3): 155-172.
- [4] Peng RZ. Microbial resources and production and application of amino acid. *Chemistry & Bioengineering*, 2003, **6**: 7-9.
- [5] Yuan PY. A new talk of phage pollution and prevention. *Communication of Fermentation Scientific Technology*, 1999, **28**(4): 22-27.
- [6] Sambrook J, Russell DW. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd Ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.
- [7] Yu BQ, Shen W, Zhu GJ. An improved method for integrative electrotransformation of *Corynebacterium glutamicum* with xenogeneic DNA. *China Biotechnology*, 2005, **25**(2): 78-81.
- [8] Yu MX, Si XD. *Phage Experiment Technology*. Beijing: Scientific Publishing Press, 1991.
- [9] Kobayashi I. Behavior of restriction-modification systems as selfish mobile elements and their impact on genome evolution. *Nucleic Acids Research*, 2001, **29** (18): 3742-3756.
- [10] Pingoud A, Fuxreiter M, Pingoud V, *et al.* Type II restriction endonucleases: structure and mechanism. *Cell Mol Life Sci*, 2005, **62**(6): 685-707.
- [11] Casadesus J, Low D. Epigenetic gene regulation in the bacterial world. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2006, **70**(3): 830-856.
- [12] Sturino JM, Klaenhammer TR. Engineered bacteriophage-defence system in bioprocessing. *Nat Rev Microbiol*, 2006, **4**(1): 395-404.
- [13] Mollet B, Pridmore D, Zwahlen MC. Phage-resistant streptococcus. US Patent, C12N 121, 5766904. 1998, 6-16.
- [14] Moineau S, Emond E, Shirley A, *et al.* DNA encoding phage resistance protein. US Patent, C12N 120, 5994118. 1999, 11-30.
- [15] Kong J, Josephsen J. The ability of the plasmid-encoded restriction and modification system LlaB III to protect *Lactococcus lactis* against bacteriophages. *Lett Appl Microbiol*, 2002, **34**(4): 249-253.