

# 副干酪乳酪杆菌 ZY-1 内源性质粒分析及其表达系统的构建与应用

肖路遥, 石婷婷, 王苏滢, 赵庆尧, 李伟\*

南京农业大学食品科技学院, 江苏 南京 210095

肖路遥, 石婷婷, 王苏滢, 赵庆尧, 李伟. 副干酪乳酪杆菌 ZY-1 内源性质粒分析及其表达系统的构建与应用[J]. 生物工程学报, 2023, 39(3): 1217-1231.

XIAO Luyao, SHI Tingting, WANG Suying, ZHAO Qingyao, LI Wei. Analysis of endogenous plasmids in *Lactocaseibacillus paracasei* ZY-1 and development of expression vectors[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(3): 1217-1231.

**摘要:** 高效稳定的乳杆菌表达载体的构建是实现其菌种改良和个性化菌株开发的关键。本研究从副干酪乳酪杆菌(*Lactocaseibacillus paracasei*) ZY-1 中分离出 4 个内源性质粒并进行功能分析。通过将 pLPZ3 与 pLPZ4 的复制子 *rep*, 与 pNZ5319 质粒的氯霉素乙酰转移酶报告基因 *cat*、pUC19 的复制子 *ori* 构建大肠杆菌-乳酸菌穿梭载体 pLPZ3N 与 pLPZ4N, 进一步加上启动子  $P_{ldh3}$  和 mCherry 红色荧光蛋白, 获得表达载体 pLPZ3E 与 pLPZ4E。pLPZ3 与 pLPZ4 质粒大小分别为 6 289 bp 和 5 087 bp, GC 含量分别为 40.94%和 39.51%。2 个穿梭载体可成功转化至乳酪杆菌属中, pLPZ4N 的转化效率( $5.23 \times 10^2 - 8.93 \times 10^2$  CFU/ $\mu$ g)略高于 pLPZ3N。乳酸菌表达载体 pLPZ3E 与 pLPZ4E 转化至副干酪乳酪杆菌 S-NB 后, 成功获得了 mCherry 红色荧光蛋白的表达。以  $P_{ldh3}$  为启动子构建的重组表达载体 pLPZ4E-*lacG* 转化得到的重组菌, 其  $\beta$ -半乳糖苷酶活性高于野生型菌株。本研究成功构建了大肠杆菌-乳酪杆菌穿梭载体和表达载体, 为乳酪杆菌基因工程菌株的研发提供了新的工具。

**关键词:** 副干酪乳酪杆菌; 内源性质粒; 穿梭载体; 表达载体

资助项目: 国家自然科学基金(31871771, U1903108); 江苏省自然科学基金(BK20201320)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (31871771, U1903108) and the Natural Science Foundation of Jiangsu Province, China (BK20201320).

\*Corresponding author. E-mail: lw1981@njau.edu.cn

Received: 2022-08-20; Accepted: 2022-10-11

## Analysis of endogenous plasmids in *Lacticaseibacillus paracasei* ZY-1 and development of expression vectors

XIAO Luyao, SHI Tingting, WANG Suying, ZHAO Qingyao, LI Wei\*

College of Food Science and Technology, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, Jiangsu, China

**Abstract:** The construction of efficient and stable *Lactobacillus* expression vector is critical for strain improvement and development of customized strains. In this study, four endogenous plasmids were isolated from *Lacticaseibacillus paracasei* ZY-1 and subjected to functional analysis. The *Escherichia coli*-*Lactobacillus* shuttle vectors pLPZ3N and pLPZ4N were constructed by combining the replicon *rep* from pLPZ3 or pLPZ4, the chloramphenicol acetyltransferase gene *cat* from pNZ5319 and the replicon *ori* from pUC19. Moreover, the expression vectors pLPZ3E and pLPZ4E with the promoter  $P_{ldh3}$  of lactic acid dehydrogenase and the mCherry red fluorescent protein as a reporter gene were obtained. The size of pLPZ3 and pLPZ4 were 6 289 bp and 5 087 bp, respectively, and its GC content, 40.94% and 39.51%, were similar. Both shuttle vectors were successfully transformed into *Lacticaseibacillus*, and the transformation efficiency of pLPZ4N ( $5.23 \times 10^2 - 8.93 \times 10^2$  CFU/ $\mu$ g) was slightly higher than that of pLPZ3N. Furthermore, the mCherry fluorescent protein was successfully expressed after transforming the expression plasmids pLPZ3E and pLPZ4E into *L. paracasei* S-NB. The  $\beta$ -galactosidase activity of the recombinant strain obtained from the plasmid pLPZ4E-*lacG* constructed with  $P_{ldh3}$  as promoter was higher than that of the wild-type strain. The construction of shuttle vectors and expression vectors provide novel molecular tools for the genetic engineering of *Lacticaseibacillus* strains.

**Keywords:** *Lacticaseibacillus paracasei*; endogenous plasmid; shuttle vector; expression vector

乳酸菌与双歧杆菌共为人与动物肠道内最为常见的优势菌群,能稳定定殖于宿主肠道、维持宿主体内微生物群的动态平衡,发挥多种益生功效<sup>[1-2]</sup>。乳酸菌是公认安全的(generally recognized as safe, GRAS)食品级微生物,广泛应用于发酵食品、保健产品、饲料工业以及化妆品领域<sup>[3]</sup>。目前对益生乳酸菌的研究已深入到基因组学及基因工程技术的应用方面,使菌种改良和个性化工程菌株的研制成为可能。高效稳定的表达载体是获得工程化乳酸菌菌株的基础,其中构建表达载体所需的元件包括目的基因、复制子、启动子、选择性标记基因等。

复制子是决定载体拷贝数和稳定性的关键元件,而启动子是调控外源基因高效表达的重要元件<sup>[4]</sup>。

质粒是位于细菌染色体之外,可自主复制并能表达所携带的遗传信息的闭合环状 DNA 双链分子。目前应用于乳酸菌的表达载体的质粒主要包括 pMG36e<sup>[5]</sup>, 其由 pGKV432 衍生而来,携带  $P_{32}$  强启动子和红霉素抗性基因,宿主菌包含乳酸乳球菌、乳杆菌、链球菌和肠球菌等; pNZ8048 是携带氯霉素抗性基因的标准载体,携带 *repA* 和 *repC* 复制子,以强 nisin 诱导的启动子( $P_{nisA}$ )严格调控外源目的基因的表达,

且使用食品级的 nisin 诱导剂能有效促进蛋白的超量表达, 目前已在乳酸乳球菌、乳杆菌、明串珠菌、肠球菌等宿主菌中成功应用<sup>[6]</sup>; pIB184 由 pAM $\beta$ 1 的复制子、红霉素抗性基因以及 *repD*、*repE*、*repG* 复制子组成<sup>[7]</sup>。许多乳酸菌被检测到含有不同数量且大小不一的内源性质粒, 大致分为两类: 一种为隐蔽性质粒, 其对于乳酸菌而言是非必需的; 另一类是含有编码与细菌代谢相关的功能蛋白, 被称为显性质粒<sup>[8]</sup>。质粒的复制方式较为常见的是滚环型和  $\theta$  型复制<sup>[9]</sup>, 质粒的复制模式对构建的乳酸菌穿梭载体的宿主范围、稳定性和拷贝数具有重要影响。不同种属的乳酸菌中存在着许多待挖掘的内源性质粒, 这些质粒是乳酸菌遗传操作系统的元件来源, 且基因组学的进步和分子生物学的发展对于乳酸菌内源性质粒的分析和开发利用具有重要意义。目前已有研究对乳酸菌的内源性质粒进行测序分析和功能蛋白预测, 如 Kung 等对来源于戊糖乳杆菌 F03 的 5 个内源性质粒进行序列分析, 发现 pF03-2 上带有林可霉素抗性基因, pF03-5 是以  $\theta$  型复制, 且具有噬菌体抗性的质粒<sup>[10]</sup>; 乳杆菌中研究最为广泛的菌株是植物乳植杆菌与干酪乳酪杆菌, 研究者从中分离出内源性质粒, 选择不同长度范围的复制子构建大肠杆菌-乳酸菌穿梭载体, 并以绿色荧光蛋白为报告基因, 实现在乳酸菌中的成功表达<sup>[11-12]</sup>。另外, 对来源于瑞士乳杆菌、发酵乳杆菌等菌株的质粒分析也为乳酸菌遗传操作系统的发展提供了研究基础<sup>[13-14]</sup>。

本研究从源自西藏灵菇的副干酪乳酪杆菌 (*Lacticaseibacillus paracasei*) ZY-1 中分离得到了 4 个内源性质粒, 选取 pLPZ3 和 pLPZ42 个质粒进行序列测定与功能分析, 确定其与质粒复制相关的蛋白, 并推定 pLPZ3 与 pLPZ4 质粒的复制方式。进一步构建大肠杆菌-乳酸菌穿

梭载体 pLPZ3N 与 pLPZ4N, 评价穿梭载体的宿主范围、转化至宿主中的效率和稳定性。在穿梭质粒的基础上加上启动子 P<sub>ldh3</sub> 和 mCherry 红色荧光蛋白, 获得表达载体 pLPZ3E 与 pLPZ4E, 并将其转化至副干酪乳酪杆菌 S-NB, 成功表达 mCherry 荧光蛋白, 细胞在绿光激发下呈现出红色荧光。 $\beta$ -半乳糖苷酶重组载体 pLPZ4E-*lacG* 转化至副干酪乳酪杆菌 S-NB 后也检测出比野生型菌株更强的  $\beta$ -半乳糖苷酶活性。鉴于目前可应用于副干酪乳酪杆菌中的表达系统十分有限, 这将为乳酪杆菌表达载体的构建提供重要的基础元件, 对推动乳酸菌基因工程技术的发展具有重要意义。

## 1 材料与方法

试验于 2020–2021 年在南京农业大学食品科技学院分子生物学实验室进行。

### 1.1 材料和试剂

#### 1.1.1 菌株和质粒

大肠杆菌 (*Escherichia coli*) DH5 $\alpha$ 、副干酪乳酪杆菌 (*L. paracasei*) ZY-1、副干酪乳酪杆菌 (*L. paracasei*) S-NB、副干酪乳酪杆菌 (*L. paracasei*) S-NA5、鼠李糖乳酪杆菌 (*L. rhamnosus*) 9075、乳酸乳球菌乳亚种 (*Lactococcus lactis* subsp. *lactis*) LZ-R-12、短乳杆菌 (*Lactobacillus brevis*) STB3a、植物乳植杆菌 (*Lactiplantibacillus plantarum*) 70810、瑞士乳杆菌 (*Lactobacillus helveticus*) LZ-R-5、pUC19、pNZ5319、pIB184、pYC34 质粒均由本实验室保存。

#### 1.1.2 试剂

质粒 DNA 小量提取、细菌基因组 DNA 提取、DNA 回收、反转录等试剂盒及 SYBR qPCR 预混液均购于山东思科捷 (Sparkjade) 生物技术有限公司; 高保真 DNA 聚合酶、一步克隆连接酶购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司;

RNA 提取试剂盒购自湖南艾科瑞生物工程有限公司。

### 1.1.3 培养基

LB 培养基、MRS 培养基及 M17 培养基均购于北京陆桥技术股份有限公司，固体培养基另加 1.5%–2.0% (质量体积分数) 琼脂粉。GM17 培养基在 M17 培养基的基础上另加 5 g/L 的葡萄糖。

CMRS/CGM17: 在 MRS/GM17 培养基中加入 1% (质量体积分数) 甘氨酸，灭菌保存，用于感受态细胞的培养。

IMRS/IGM17: 在 MRS/GM17 培养基中加入 0.5 mol/L 蔗糖，20 mmol/L 无水氯化镁，灭菌保存，用于感受态细胞经电转化后的复苏培养。

## 1.2 仪器和设备

PCR 扩增仪，Eppendorf 公司；MicroPulser 电穿孔仪、电泳槽、凝胶成像仪，Bio-Rad 公司；Quant Studio 3 实时荧光定量 PCR 仪(配有 QuantStudio™ 设计和分析软件)，Thermo Fisher Scientific 公司；荧光倒置显微镜 Caikon XDS 600D，上海蔡康光学仪器有限公司。

## 1.3 方法

### 1.3.1 引物设计与合成

质粒 pLPZ3、pLPZ4、大肠杆菌-副干酪乳酪杆菌穿梭质粒 pLPZ3N、pLPZ4N 及表达质粒 pLPZ3E、pLPZ4E、pLPZ4E-LacG 的构建过程所用引物及其序列信息见表 1，引物由北京擎科生物科技有限公司合成。

表 1 引物信息

Table 1 Primer sequences used in this study

Primer name	Primer sequence (5'→3')	Purpose
tuf-F	AAGACTACTTTGACCGCGGC	Reference gene
tuf-R	CATATTCAACGTGGGCGGTG	Reference gene
rep3-F	TCGGGATCAGCGTTACTTCC	Determine of copy number
rep3-R	CCGCTCCGCTTGAGATTAAG	Determine of copy number
rep4-F	CGTCATGATTTGAATGCGCG	Determine of copy number
rep4-R	CACTTCGCTTTAGCCCCAAG	Determine of copy number
cat3N-F	AAAACGACGGCCAGTGAATTCGGTCGTTTTAGCCGATGGTTCG	Construction of shuttle vector
cat3N-R	ACAGGCCCTTGATCCAAGTACAGTCGGCATTATCT	Construction of shuttle vector
rep3N-F	TACTTGGATCAAGGGCCTGTACTAGCGTTTCTT	Construction of shuttle vector
rep3N-R	GACCATGATTACGCCAAGCTTGGCAATCATGAGCAAGTCAGC	Construction of shuttle vector
cat4N-F	AAAACGACGGCCAGTGAATTCGGTCGTTTTAGCCGATGGTTCG	Construction of shuttle vector
cat4N-R	CCTTTAGCGCTTGATCCAAGTACAGTCGGCATTATCT	Construction of shuttle vector
rep4N-F	ATTGGATCAAGCGCTAAAGGGCCTGTACT	Construction of shuttle vector
rep4N-R	GACCATGATTACGCCAAGCTTGGTGTACCCTAACGGATCGTTC	Construction of shuttle vector
P <sub>ldh3</sub> -F	AAAACGACGGCCAGTGAATTCATATTTCTGGCCGGACGAGC	Construction of expression vector
P <sub>ldh3</sub> -R	CTCACCATCCACGGTGATATCATCCTTTCTT	Construction of expression vector
mCherry-F	ATATCACCGTGGATGGTGGAGCAAGGGCGAGG	Construction of expression vector
mCherry-R	GGACCGAATTTAAACTGCATGGTACCCTACTTGTACAGCTCGTCC ATGC	Construction of expression vector
P <sub>ldh3</sub> -R(lacG)	TACTCATTGCCACGGTGATATCATCCTTTCTT	Construction of recombinant vector
lacG-F	ATCACCGTGGGCAATGAGTAAACAGCTACCTCAAGA	Construction of recombinant vector
lacG-R	GCATGGTACCTTAATCCGGAATGATGTGGGTC	Construction of recombinant vector
cat-F(lacG)	TCCGATTAAGGTACCATGCAGTTTAAATTCGG	Construction of recombinant vector
M13-F	TGTAACGACGGCCAGT	Verification of plasmid construction
M13-R	CAGGAAACAGCTATGACC	Verification of plasmid construction

### 1.3.2 质粒序列分析

经 Nanopore PromethION48 和 Illumina NovaSeq 双平台的高通量测序结果确定副干酪乳酪杆菌 ZY-1 含有 4 个内源性质粒, 分别命名为 pLPZ1 (47 612 bp, GenBank 登录号: CP065155.1)、pLPZ2 (46 347 bp, GenBank 登录号: CP065156.1)、pLPZ3 (6 289 bp, GenBank 登录号: CP065157.1)和 pLPZ4 (5 087 bp, GenBank 登录号: CP065158.1)。利用 NCBI 网站的 ORF finder (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>)对较小的 pLPZ3 和 pLPZ4 个质粒的开放阅读框(open reading frame, ORF)进行查找, 进一步采用 NCBI 的 BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)数据库对各开放阅读框(open reading frame, ORF)编码的氨基酸序列比对注释, 初步确定与质粒复制相关的蛋白。再将其与已公布的质粒复制相关蛋白(Rep)进行同源性比对, 构建其系统进化树, 推测出 pLPZ3 与 pLPZ4 质粒的复制方式。

### 1.3.3 质粒 pLPZ3 与 pLPZ4 拷贝数的测定

将副干酪乳酪杆菌 ZY-1 接种于 MRS 液体培养基中, 37 °C 静置培养 16 h 至稳定期。以 8 000 r/min 离心并收集菌体, 提取 ZY-1 菌体的总 DNA。采用相对定量聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)的方法对内源性质粒 pLPZ3 与 pLPZ4 的拷贝数进行测定<sup>[10]</sup>。选取副干酪乳酪杆菌基因组上的单拷贝基因 *tuf* 作为内参基因, 以质粒 pLPZ3 与 pLPZ4 上的单拷贝基因(*repZ3* 和 *repZ4*)作为目的基因。将提取得到的 ZY-1 基因组 DNA 进行梯度稀释, 以不同倍数稀释的 DNA 样品为模板进行荧光定量 PCR 反应, 测得  $C_T$  值并绘制标准曲线, 根据公式(1)计算各引物对的扩增效率。再以不同生长时间点的 ZY-1 总 DNA 为模板, 用上述引物对进行荧光定量 PCR 反应, 测得对应的  $C_T$

值, 根据公式(2)计算质粒的拷贝数。

$$E = 10^{(-1/k)} - 1 \quad (1)$$

式中:  $k$  为不同引物对扩增标准曲线的斜率。

$$N_{\text{relative}} = (1 + E)^{-\Delta C_T} \quad (2)$$

式中:  $E$  为引物对的扩增效率;  $\Delta C_T$  为目的基因与内参基因进行荧光定量 PCR 扩增测得的  $C_T$  的差值。

### 1.3.4 大肠杆菌-乳酸菌穿梭载体的构建

用 *EcoR* I 和 *Hind* III 限制性内切酶对 pUC19 质粒进行双酶切, 纯化回收酶切产物获得复制子 *ori* 片段, 分别用 *cat3N-F/cat3N-R* 和 *cat4N-F/cat4N-R* 引物对扩增 pNZ5319 质粒上的氯霉素抗性基因 *cat* 片段, 采用 *rep3N-F/rep3N-R* 和 *rep4N-F/rep4N-R* 引物对扩增 pLPZ3 与 pLPZ4 质粒上的复制子 *rep* 区域, 将酶切回收产物与 *cat* 和 *rep* 进行一步克隆连接反应, 连接产物热击转化至大肠杆菌 DH5 $\alpha$  感受态细胞中, 涂布于含 10  $\mu\text{g/mL}$  氯霉素的 LB 平板上, 过夜培养后挑取转化子经 M13-F/M13-R 引物对 PCR 验证和测序验证, 获得正确的重组质粒, 命名为 pLPZ3N 与 pLPZ4N。

### 1.3.5 乳酸菌感受态细胞制备

参照 Xin 等<sup>[15]</sup>的方法制备各类乳酸菌感受态细胞, 首先活化菌株: 将菌株 LZ-R-12 划线于 GM17 平板上, 30 °C 培养, 菌株 ZY-1、S-NB、S-NA5、9075、STB3a、70810 及 LZ-R-5 均划线于 MRS 平板, 37 °C 培养至长出单菌落, 挑单菌落接种于液体培养基中, 静置培养至对数生长后期。再以 2% (体积分数)的比例接种于 CMRS/CGM17 培养基中培养至  $OD_{600}=0.4-0.5$ ; 冰浴 15 min 后 5 000 r/min 离心 10 min, 弃上清, 用电转缓冲液(含 1 mol/L 蔗糖, 10%甘油)重悬洗涤菌体, 冰浴 15 min 后 5 000 r/min 离心 10 min, 弃上清; 再用 1 mL 的电转缓冲液重悬菌体, 分装于 1.5 mL 离心管中, -80 °C 保存待用。

### 1.3.6 电击转化

将 500 ng 的穿梭载体 pLPZ3N 和 pLPZ4N 与 100  $\mu$ L 的感受态细胞混匀, 调节电击转化参数为 2.0 kV, 4.0 ms, 进行电转化<sup>[16]</sup>。迅速向电转杯中加入 900  $\mu$ L 预冷的 IMRS/IGM17 溶液重悬细胞, 于 37  $^{\circ}$ C/30  $^{\circ}$ C 静置复苏培养 2 h。孵育结束后按 5 000 r/min 离心, 留取 100  $\mu$ L 上清液重悬菌体细胞, 涂布于含 10  $\mu$ g/mL 氯霉素的 MRS 平板上, 于 37  $^{\circ}$ C/30  $^{\circ}$ C 倒置培养 48 h。

### 1.3.7 穿梭载体的宿主范围、电转效率及稳定性测试

按 1.3.6 所述将穿梭载体 pLPZ3N 和 pLPZ4N 分别与各类乳酸菌感受态细胞混匀, 电击转化后, 通过观察抗性平板上是否长出转化子菌落, 以确定穿梭质粒的宿主范围, 以 pIB184 质粒(Addgene, Catalog 90194)作为阳性对照。并计量每转化 1  $\mu$ g 穿梭质粒所得的转化子个数, 电转化效率(CFU/ $\mu$ g DNA)=稀释倍数 $\times$ 菌落个数 $\times$ 2。同时将氯霉素抗性平板上的单菌落接种于液体抗性培养基中, 过夜培养后再以 1% (V/V)的比例接种于不含氯霉素的液体培养基中, 持续传代培养 50 代。并在传代培养第 50 代时稀释菌液涂布于含氯霉素的抗性 MRS 平板及普通平板上, 根据菌落数量计算穿梭质粒的传代稳定性。

### 1.3.8 表达载体的构建

以副干酪乳酪杆菌 S-NB 基因组 DNA 为模板扩增启动子  $P_{ldh3}$ , 因 mCherry 蛋白能在绿光激发下显示出红光, 选择 mCherry 作为标靶蛋白; 用 *EcoR* I 和 *Kpn* I 限制性内切酶对 pLPZ3N 和 pLPZ4N 质粒进行双酶切, 采用一步克隆方法将酶切产物与启动子  $P_{ldh3}$  以及 mCherry 进行连接, 转化至大肠杆菌 DH5 $\alpha$  感受态细胞中, 在含氯霉素 10  $\mu$ g/mL 的 LB 平板上筛选获得阳性转化子, 并命名为 pLPZ3E 和 pLPZ4E。

### 1.3.9 荧光活性观察与检测

先后将 pLPZ3E 和 pLPZ4E 电转化到 S-NB 感受态细胞中, 挑取阳性重组菌株 S-NB-pLPZ3E 与 S-NB-pLPZ4E 接种于含 10  $\mu$ g/mL 的氯霉素的 MRS 液体培养基中培养过夜, 收集菌体沉淀并用 PBS 洗涤, 吸取 2  $\mu$ L 滴加在载玻片上, 盖上盖玻片在倒置荧光显微镜下观察红色荧光, 激发波长(excitation wavelength, EX): 587 nm, 发射波长(EM): 620 nm。

### 1.3.10 $\beta$ -半乳糖苷酶重组载体的构建

在表达载体 pLPZ4E 的基础上将 mCherry 替换成  $\beta$ -半乳糖苷酶 *lacG* 基因, *lacG* 从副干酪乳酪杆菌 S-NB 的基因组 DNA 上通过引物对 *lacG*-F/*lacG*-R 扩增获得, 构建的  $\beta$ -半乳糖苷酶重组载体命名为 pLPZ4E-*lacG*。将 pLPZ4E-*lacG* 转化至 S-NB 感受态细胞中, 在含 10  $\mu$ g/mL 的氯霉素的 MRS 平板上筛选出阳性克隆子。

### 1.3.11 $\beta$ -半乳糖苷酶活性测定

分别将 S-NB-pLPZ4E 和 S-NB-pLPZ4E-*lacG* 接种于液体培养基中培养过夜,  $\beta$ -半乳糖苷酶活性测试根据 BCA 蛋白浓度测定试剂盒和  $\beta$ -GAL 活性检测试剂盒进行。10 000 r/min 离心 2 min 收集菌体于离心管中, 加入提取液重悬菌体, 超声破碎细菌。超声条件: 冰浴, 功率 200 W, 超声 3 s, 间隔 10 s, 重复 30 次。10 000 r/min 离心 10 min 取上清, 置于冰上待测。以 BSA 标准品做标准曲线, 计算上清液中的总蛋白含量, 以每 1 mg 蛋白每小时产生 1 nmol 对-硝基苯酚定义为一个酶活力单位。 $\beta$ -GAL (U/mg prot)=( $y \times V_{总}$ )/( $V_{样} \times C_{pr}$ )/ $T$ 。其中  $y$  是浓度, nmol/mL,  $V_{总}$  代表反应体系总体积,  $V_{样}$  是加入反应体系中的样本体积,  $C_{pr}$  代表样本总蛋白质浓度, mg/mL,  $T$  是反应时间。

## 1.4 数据与图像处理

用 Oligo 7 软件进行相关引物的设计, 分

别采用 MEGA 6.0 和 SnapGene 3.2.1 进行系统进化树与质粒图谱的绘制。

## 2 结果与分析

### 2.1 质粒序列分析与注释

本研究从副干酪乳酪杆菌 ZY-1 菌株中筛选内源性质粒, 以期获得适用于乳酸菌的基因操作系统可用元件。用 SnapGene 对 ZY-1 的 2 个内源性质粒(pLPZ3 和 pLPZ4)的 DNA 序列进行图谱绘制, 如图 1 所示。质粒 pLPZ3 与 pLPZ4 均为双链环状 DNA 分子, 碱基数分别为 6 289 bp 和 5 087 bp, GC 含量分别为 40.94% 和 39.51%。BLAST 比对结果显示, pLPZ3 的核苷酸序列与 p0562-1 (9 778 bp, GenBank: CP091290.1)和 pMGB0734-6 (7 123 bp, GenBank: CP064310.1)序列一致性分别为 99.93%和 99.92%。而 pLPZ4 的核苷酸序列与 pMA3 (5 089 bp, GenBank: EU255257.1)和 p0562-4 (5 087 bp,

GenBank: CP091293.1) 2 个质粒序列的一致性最高, 分别达到 99.91%和 99.84%。

通过对开放阅读框进行检索与序列比对, 预测 2 个质粒中所有 ORF 的功能(表 2), 发现 pLPZ3 含有 6 个 ORF, pLPZ4 含有 5 个 ORF。pLPZ3 质粒中 ORF 1、ORF 2 和 ORF 3 均被注释为与质粒复制相关的功能蛋白, 其中 ORF 2 编码的含 260 个氨基酸的复制起始蛋白与副干酪乳酪杆菌(*L. paracasei*) Lpp7 的复制起始蛋白(RepB)具有 83%的同源性; 而 ORF 3 编码的含 187 个氨基酸的复制蛋白与副干酪乳酪杆菌(*L. paracasei*) HN001 的质粒复制蛋白(RepB family)相似率达到 97%。RepB 蛋白属于 Rep\_3 超家族(pfam01051), 推测与质粒的  $\theta$  型复制相关。此外, pLPZ3 质粒还含有 2 个功能未知的蛋白 ORF 4 和 ORF 5。pLPZ4 质粒中 ORF 1 与 pLPZ3 的 ORF 1 相似性为 100%, 均为与质粒复制相关的功能蛋白; ORF 2 和 ORF 3 也分别编

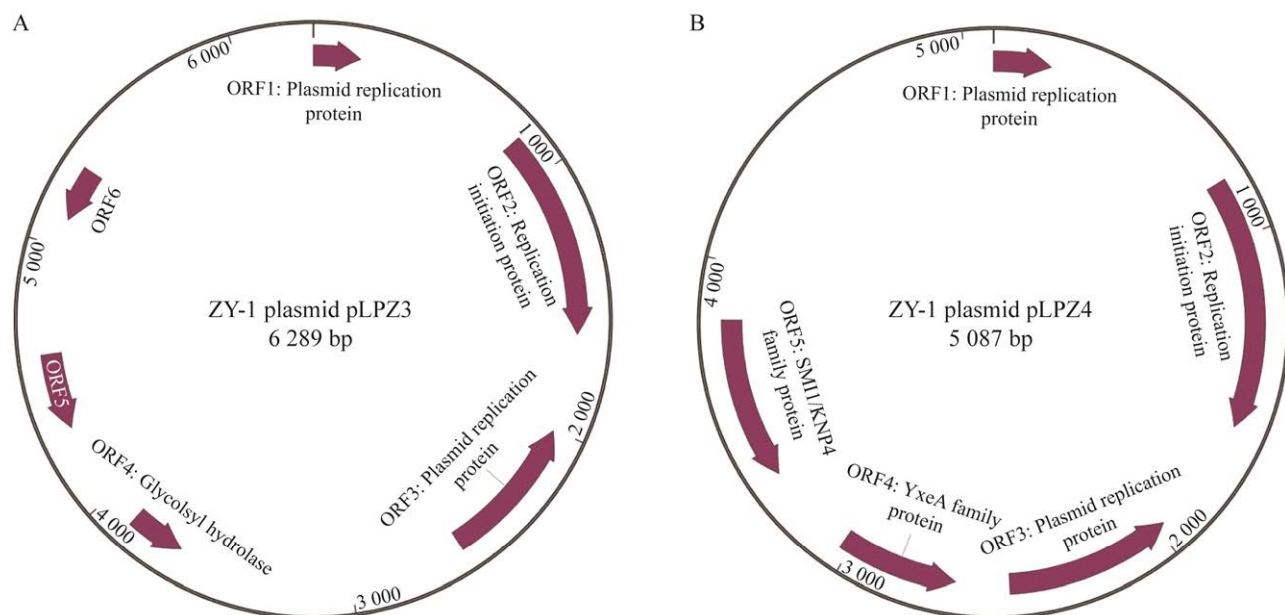


图 1 副干酪乳酪杆菌 ZY-1 的内源性质粒 pLPZ3 与 pLPZ4 的图谱

Figure 1 Physical map of the endogenous plasmids pLPZ3 and pLPZ4 in *Lacticaseibacillus paracasei* ZY-1. Map of plasmid pLPZ3 (A) and plasmid pLPZ4 (B).

表 2 质粒 pLPZ3 与 pLPZ4 的 ORF 信息

Table 2 Open reading frame information for plasmids pLPZ3 and pLPZ4

Feature	Coding sequence	Product size (nt/aa)	Proposed function	Organism and sequence similarity (GenBank accession No.)
pLPZ3-ORF 1	1-180	180/60	Plasmid replication protein	95% plasmid replication protein [ <i>Lactocaseibacillus rhamnosus</i> HN001] (GenBank: ACH91615.1)
pLPZ3-ORF 2 (RepZ3)	848-1 627	780/260	Replication initiation protein	83% replication initiation protein RepB [ <i>Lactocaseibacillus paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> Lpp7] (GenBank: EPC48833.1)
pLPZ3-ORF 3	2 006-2 566	561/187	Plasmid replication protein	97% plasmid replication protein (RepB family) [ <i>Lactocaseibacillus paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> HN001] (GenBank: EPC47444.1)
pLPZ3-ORF 4	3 668-3 877	210/70	Glycosyl hydrolase family 25	100% glycosyl hydrolase [ <i>Lactocaseibacillus paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> Lpp7] (GenBank: EPC24088.1)
pLPZ3-ORF 5	4 298-4 588	291/97	Hypothetical protein	99% hypothetical protein [ <i>Lactocaseibacillus paracasei</i> ] (GenBank: WP_016383322.1)
pLPZ3-ORF 6	5 105-5 305	201/67	Hypothetical protein	100% hypothetical protein [ <i>Lactocaseibacillus paracasei</i> ] (GenBank: WP_128524391.1)
pLPZ4-ORF 1	1-180	180/60	Plasmid replication protein	94% plasmid replication protein [ <i>Lactocaseibacillus rhamnosus</i> HN001] (GenBank: ACH91615.1)
pLPZ4-ORF 2 (RepZ4)	822-1 601	780/260	Replication initiation protein	99% replication initiation protein [ <i>Lactocaseibacillus paracasei</i> ] (GenBank: WP_057709164.1)
pLPZ4-ORF 3	1 973-2 494	522/174	Plasmid replication protein	96% plasmid replication protein [ <i>Lactocaseibacillus paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> Lpp14] (GenBank: EPC69099.1)
pLPZ4-ORF 4	2 662-3 030	369/123	YxeA family protein	99% YxeA family protein [ <i>Lactocaseibacillus paracasei</i> ] (GenBank: WP_016373475.1)
pLPZ4-ORF 5	3 321-3 824	504/168	SMI1/KNP4 family protein	99% SMI1/KNP4 family protein [ <i>Lactocaseibacillus rhamnosus</i> ] (GenBank: WP_204129214.1)

nt: The number of bases; aa: The number of amino acids.

码复制起始蛋白和质粒复制蛋白。因 ZY-1 的内源性质粒 pLPZ3 与 pLPZ4 上除含有与质粒复制相关的蛋白质外，还包含某些与菌株生长代谢相关的特定功能蛋白，因此 pLPZ3 与 pLPZ4 应归为显性质粒<sup>[17]</sup>。

## 2.2 质粒复制方式推测

乳酸菌中环状质粒多以滚环型或  $\theta$  型 2 种

模式进行复制。 $\theta$  型复制模式较为常见，至少 5 类  $\theta$  型复制子已被鉴定出来。许多革兰氏阴性菌株的质粒归属为 A 类，这类质粒可编码 Rep 蛋白并具有染色体样复制源点，通常称之为 *oriA*，其中富含 AT 碱基的区域包含重复序列<sup>[18]</sup>。而革兰氏阳性菌的重复编码质粒一般属于 D 类，以 pAM $\beta$ 1/pIP501 型为主<sup>[19]</sup>。通过对



质粒 ORF 区域的比对分析,初步确定了质粒 pLPZ3 与 pLPZ4 上与复制相关的蛋白。进一步对 2 个质粒的复制起始蛋白的上游 DNA 序列进行分析(图 2),通过重复序列检索发现 2 个质粒都存在与起始质粒复制相关的反向重复序列(invert repeats, IR)和正向重复序列(direct repeats, DR)。pLPZ3 与 pLPZ4 质粒上都存在 1 对 18 bp 的反向重复序列 IR,在 pLPZ3 质粒的 612–620 bp 和 622–632 bp 处有 2 个 9 bp 的正向重复序列 DR1,在 683–783 bp 含有 4.5 个正向重复序列 DR2。而在 pLPZ4 质粒含有 2 个 10 bp 的正向重复序列 DR1 和 5 个 22 bp 的正向重复序列 DR2。同时在 2 个质粒复制起始蛋白的转录起始位点上游 DNA 序列中也检测到与细菌启动子-10 区和-35 区高度相似的区域。pLPZ3 质粒的启动子(GAGTCA-N15-TACTTT)位于起始密码子上游 18 bp 处,而 pLPZ4 质粒的启动子(ACGACA-N17-TACTAT)位于起始密码子上游 25 bp 处。分别将 RepZ3 和 RepZ4 与可检索到的质粒复制相关蛋白制作系统发育树(图 2C)。由副干酪乳酪杆菌质粒复制相关蛋白同源性的系统进化树结果可推测 pLPZ3 与 pLPZ4 质粒编码的 Rep 蛋白均属于 Rep\_3 超家族(pfam01051),因此推测 RepZ3 和 RepZ4 2 个复制蛋白都以  $\theta$  型复制模式进行复制。

### 2.3 质粒拷贝数的测定

通过相对定量 PCR 方法对 2 个内源性质粒 pLPZ3 与 pLPZ4 在 ZY-1 的拷贝数进行测定,以 ZY-1 基因组上的单拷贝基因 *tuf* 作为内参基因, *repZ3* 和 *repZ4* 分别为目的基因。荧光定量 PCR 引物对 *tuf*-F/*tuf*-R、*rep3*-F/*rep3*-R 和 *rep4*-F/*rep4*-R 见表 1,产物大小分别为 139 bp, 192 bp 和 136 bp。对提取得到的副干酪乳酪杆菌 ZY-1 的基因组 DNA 进行梯度稀释,以稀释后的 DNA 样品为模板进行荧光定量 PCR 反

应,测得各个样品的  $C_T$  值,将  $C_T$  值与  $\lg C_0$  ( $C_0$  为样品的稀释度)作标准曲线,如图 3A 所示。引物对 *tuf*-F/*tuf*-R 的标准曲线为  $y = -3.4178x + 7.7202$ ,  $R^2 = 0.9997$ ; 引物对 *rep3*-F/*rep3*-R 的扩增标准曲线为  $y = -3.4366x + 5.1392$ ,  $R^2 = 0.9994$ ; 引物对 *rep4*-F/*rep4*-R 的扩增标准曲线为  $y = -3.3977x + 3.7561$ ,  $R^2 = 0.9988$ 。将 3 个扩增标准曲线的斜率代入公式(2),得出引物对的扩增效率分别为 96.15%、95.43%、96.93%。高于 95% 的引物扩增效率表明这 3 个引物对可用作荧光定量 PCR,读取相应的  $C_T$  值,并代入公式计算在副干酪乳酪杆菌 ZY-1 不同生长期时 pLPZ3 与 pLPZ4 的质粒拷贝数。如图 3B 所示,菌株 ZY-1 长至 18 h 进入生长稳定期。随着菌株的生长,质粒 pLPZ3 与 pLPZ4 的拷贝数呈现先升高后降低的趋势,且均在 21 h 的拷贝数最高,分别为  $6.15 \pm 0.23$  和  $8.13 \pm 0.15$ 。2 个质粒的拷贝数在 24 h 都发生明显下降,可能是由于乳酸菌在生长代谢达到稳定期后胞内 DNA 的合成逐渐减慢,因而其内源性质粒复制所需的 DNA 聚合酶的生成量随之下降,且过程中必要酶系的缺乏也使质粒的复制进一步受到阻碍<sup>[20]</sup>。

### 2.4 穿梭载体的宿主范围、转化效率和稳定性测试

以 pUC19 的复制子 *ori* 片段, pNZ5319 质粒的 *cat* 片段,和 pLPZ3 与 pLPZ4 质粒上的复制子区域连接后得到的穿梭载体经 M13-F/M13-R 引物对 PCR 电泳(图 4)和测序验证构建成功,分别命名为 pLPZ3N 与 pLPZ4N。为研究这 2 个穿梭载体的宿主范围,对其在几个不同的乳酸菌中的转化效率进行了测定,培养 48 h 后观察是否长出转化子。表 3 表明,穿梭质粒 pLPZ3N 与 pLPZ4N 均可在菌株 S-NB、S-NA5 以及 9075 中获得转化子,在 LZ-R-12、STB3a、70810 以

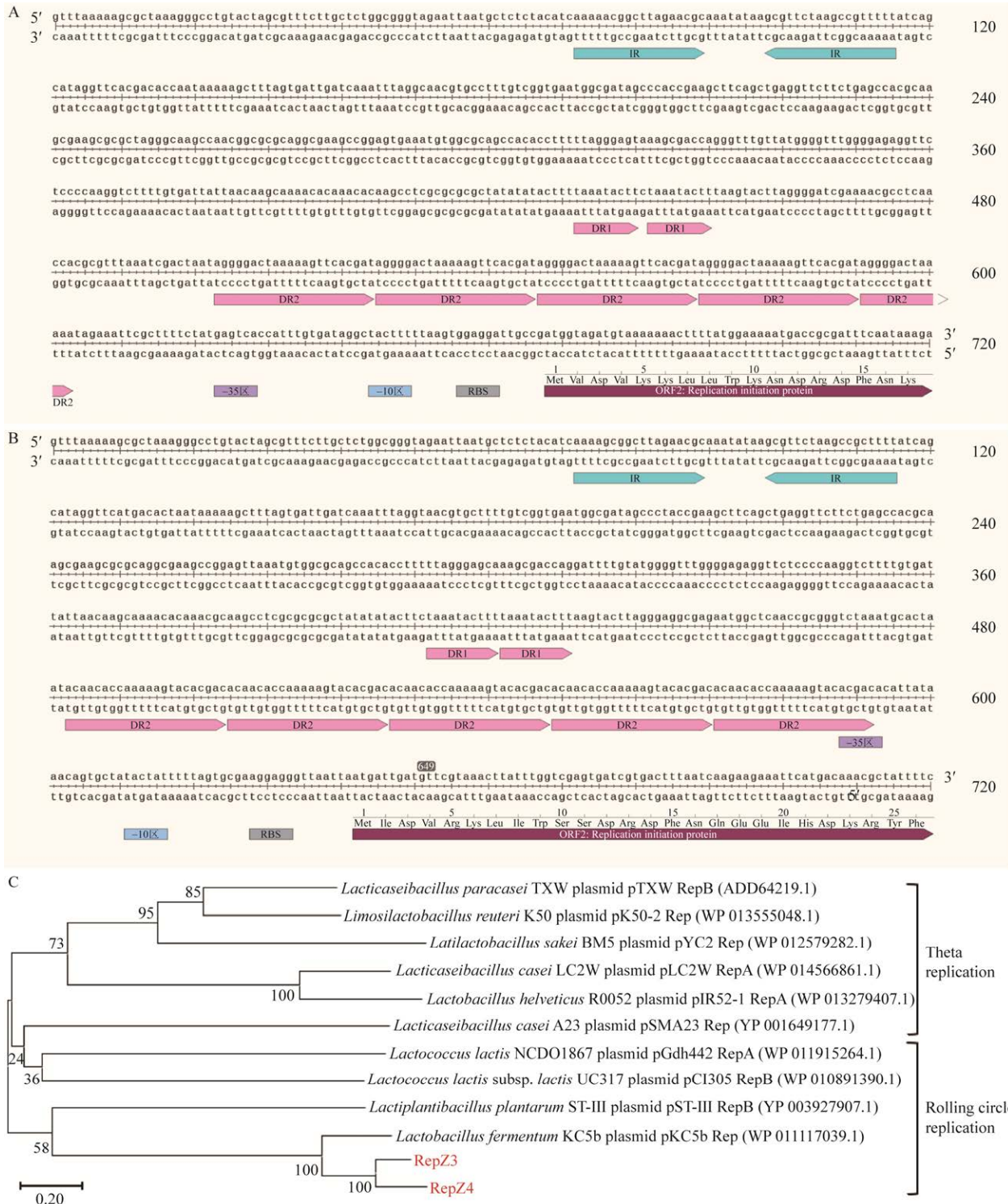


图 2 副干酪乳酪杆菌 ZY-1 内源性质粒 pLPZ3 与 pLPZ4 复制区域的分析及其系统发育树构建

Figure 2 Analysis and phylogenetic tree of the replication regions of endogenous plasmids pLPZ3 and pLPZ4 in *Lacticaseibacillus paracasei* ZY-1. Sequence analysis of the replication regions of pLPZ3 (A) and pLPZ4 (B), and the phylogenetic tree of RepZ3 and RepZ4 (C).

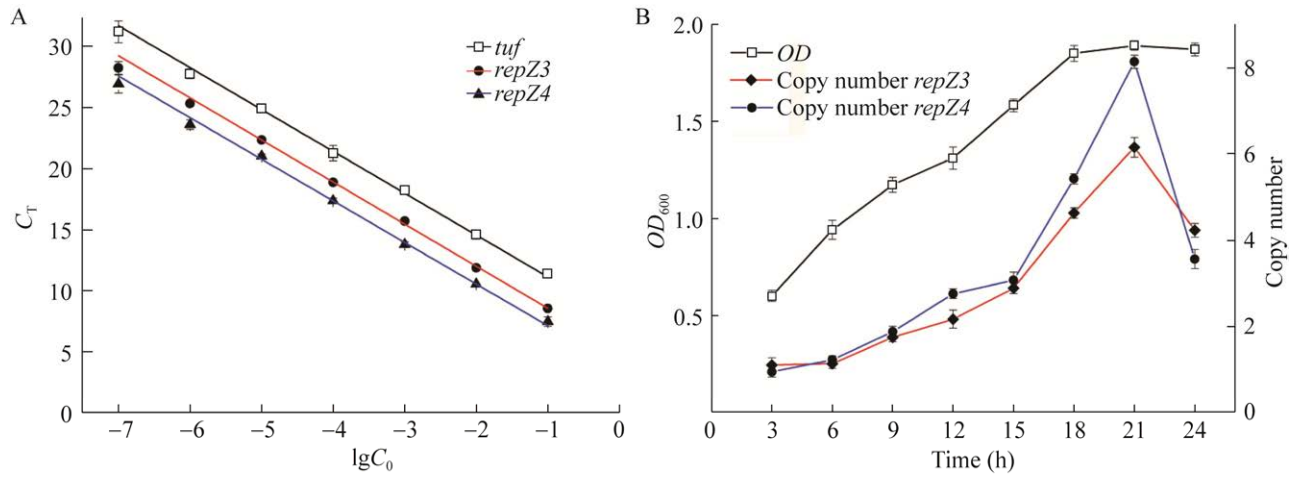


图3 引物扩增效率和 pLPZ3 与 pLPZ4 质粒拷贝数的测定

Figure 3 Determination of the amplification efficiency of primers (A, *tuf* was used as the reference gene) and the copy number of plasmids pLPZ3 and pLPZ4 (B).

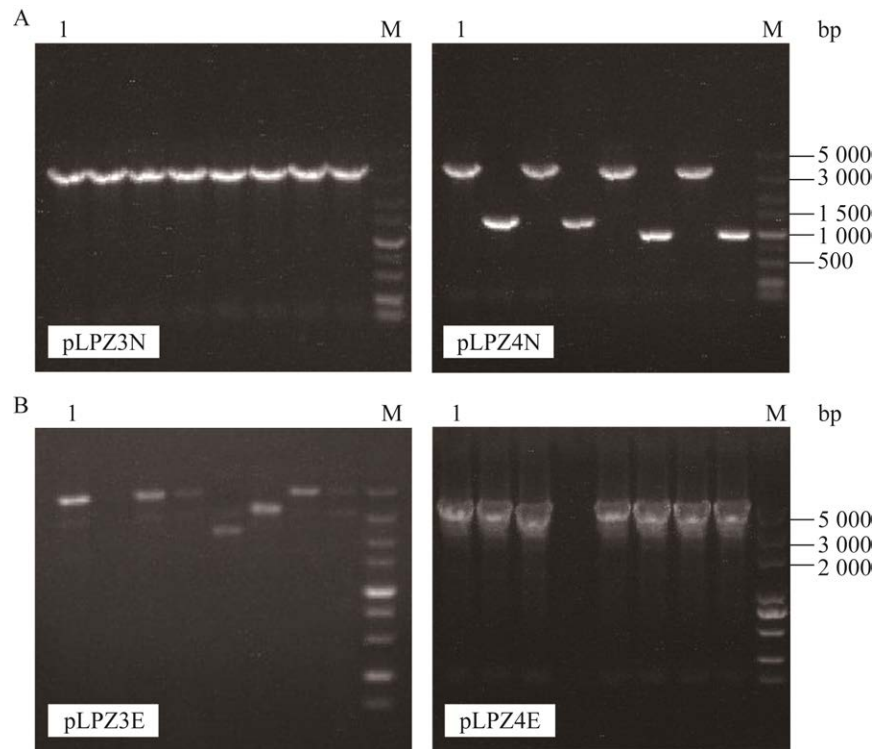


图4 穿梭载体 pLPZ3N 及 pLPZ4N 和表达载体 pLPZ3E 及 pLPZ4E 的 PCR 鉴定

Figure 4 PCR identification of shuttle vectors pLPZ3N and pLPZ4N and expression vectors pLPZ3E and pLPZ4E. A: Results of PCR amplification (M13-F/M13-R). M: 5 000 DNA marker; 1: Positive transformant of pLPZ3N and pLPZ4N. B: Results of PCR amplification (M13-F/M13-R). M: 5 000 DNA marker; 1: Positive transformant of pLPZ3E and pLPZ4E.

表3 穿梭质粒 pLPZ3 和 pLPZ4 在不同乳酸菌中的转化效率和稳定性

Table 3 Transformation efficiency and stability of pLPZ3 and pLPZ4 in different lactic acid bacteria

Host strain	Transformation efficiency (CFU/ $\mu\text{g}$ )		Plasmid loss rate (%)	
	pLPZ3 ( $\times 10^2$ )	pLPZ4 ( $\times 10^2$ )	pLPZ3	pLPZ4
<i>L. paracasei</i> S-NB	5.78 $\pm$ 0.33	8.93 $\pm$ 0.26	88.93	73.69
<i>L. paracasei</i> S-NA5	3.24 $\pm$ 0.42	5.23 $\pm$ 0.61	100.00	100.00
<i>L. rhamnosus</i> 9075	3.78 $\pm$ 0.25	8.24 $\pm$ 0.37	93.92	75.37
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> LZ-R-12	—	—	—	—
<i>Lactobacillus brevis</i> STB3a	—	—	—	—
<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> 70810	—	—	—	—
<i>Lactobacillus helveticus</i> LZ-R-5	—	—	—	—

—: No transformant.

及 LZ-R-5 菌株中均未获得转化子。这可能与不同乳酸菌菌株的特异性与差异性相关,且转化前细胞所处的生长状态以及细胞对于电击转化条件的敏感性也会影响转化结果。菌株 S-NB、S-NA5 和 9075 同属于乳酪杆菌属,因此可初步判断穿梭载体 pLPZ3N 与 pLPZ4N 为窄宿主范围的质粒,可在乳酪杆菌属的菌株中转化获得阳性转化子。2 个质粒的转化效率介于  $3.24 \times 10^2$ – $8.93 \times 10^2$  CFU/ $\mu\text{g}$  之间,而商业化的乳酸菌质粒 pIB184 在 S-NB、S-NA5 和 9075 宿主菌中的转化效率在  $5.76 \times 10^3$ – $7.26 \times 10^3$  CFU/ $\mu\text{g}$  之间,相比之下 pLPZ3N 与 pLPZ4N 的转化效率略低。另外,电击转化参数、缓冲液配方、感受态细胞状态以及质粒 DNA 的浓度都会影响转化效率。pLPZ4N 的转化效率高于 pLPZ3N,且其在宿主菌中传代 50 代后的质粒丢失率略低于 pLPZ3N。与 pLPZ3N 和 pLPZ4N 相比,源自干酪乳酪杆菌的衍生质粒 pUE-F1 在干酪乳酪杆菌(*L. casei*) BDII 中的转化效率可高达  $2.2 \times 10^5$  CFU/ $\mu\text{g}$ ,其传代稳定性为 65.43%<sup>[11]</sup>,略高于穿梭质粒 pLPZ3N 与 pLPZ4N。

## 2.5 mCherry 荧光蛋白的重组表达

将副干酪乳酪杆菌 S-NB 菌株乳酸脱氢酶基因的上游非编码区克隆为启动子  $P_{ldh3}$ ,以源

自质粒 pYC34 的 mCherry 为靶蛋白构建重组表达载体 pLPZ3E 和 pLPZ4E (图 5),经 M13-F/M13-R 引物对扩增,凝胶电泳(图 4)和测序验证其大小及序列均正确。再将重组质粒电转化至 *L. paracasei* S-NB 感受态细胞中,挑取平板上的阳性转化子 S-NB-pLPZ3E 与 S-NB-pLPZ4E 接种于 MRS 培养基中,培养过夜后置于倒置荧光显微镜下观察。结果表明,在绿光激发下,重组菌 S-NB-pLPZ3E (图 6B)与 S-NB-pLPZ4E (图 6D)的红色荧光标记清晰可见。副干酪乳酪杆菌 S-NB 不存在红色荧光背景,因而通过  $P_{ldh3}$  启动子的诱导 mCherry 蛋白表达,重组菌株显示出明显的红色荧光。在乳酪杆菌中引入这种载体不仅可以高效表达外源基因,还可以用于发酵产品或益生菌产品制造过程或试验期间的荧光跟踪<sup>[21]</sup>。目前,已有文献相继报道 eGFP 蛋白可用于植物乳植杆菌、短乳杆菌以及干酪乳酪杆菌等的荧光标记示踪中<sup>[22-24]</sup>,本研究首次使用 mCherry 红色荧光蛋白标记副干酪乳酪杆菌 S-NB,为国内关于副干酪乳酪杆菌的红色荧光蛋白标记研究技术提供参考,为研究乳酪杆菌种属在生物体内黏附、定殖及分布情况提供了技术支持,更有利于阐述菌株发挥益生功能的作用机制。pLPZ3E 与 pLPZ4E 表达载体的构建,可在乳酪杆菌属中实现内源性



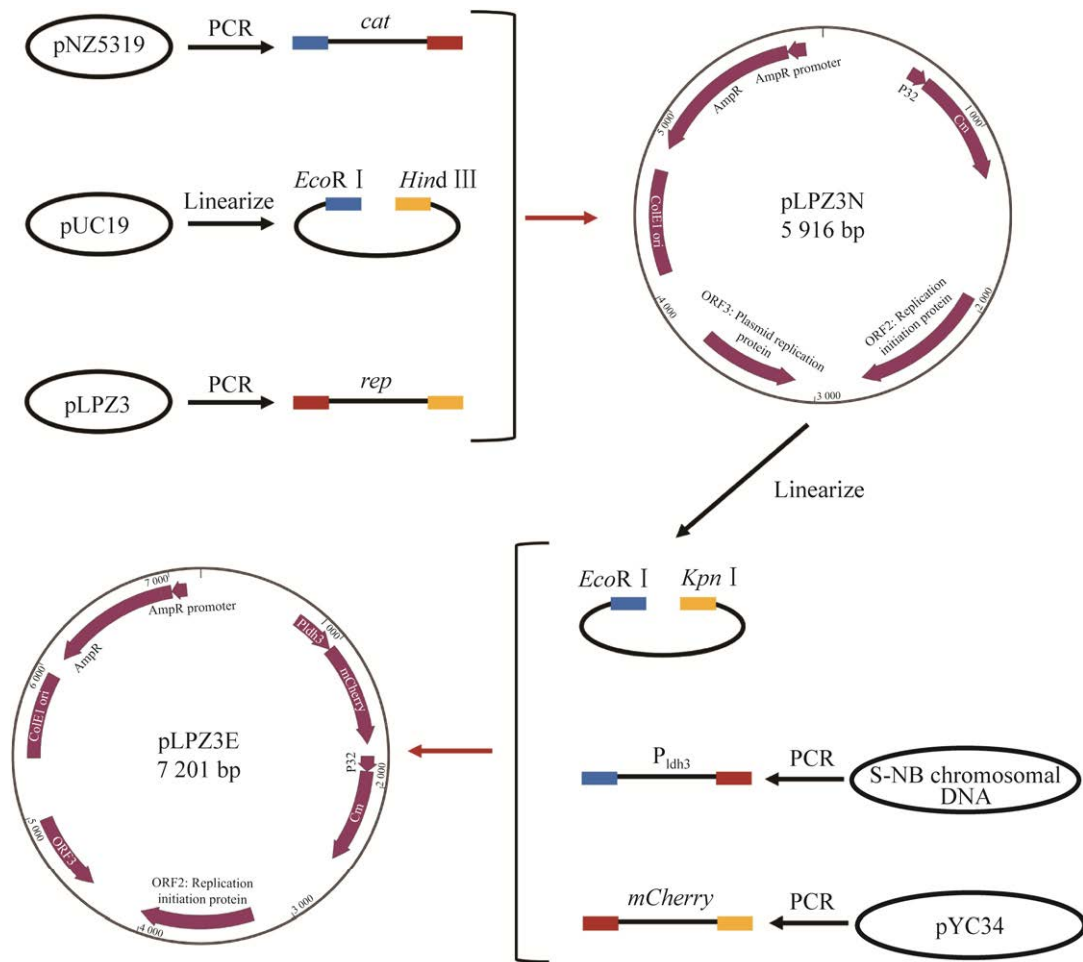


图5 表达载体 pLPZ3E 构建流程图

Figure 5 Schematic illustration of construction of expression vector pLPZ3E.

及外源性基因的高效表达,为乳酪杆菌功能基因的研究或基因工程疫苗的研制提供了有利条件。此外,乳酸菌因其“公认安全性”已成为极具应用前景的基因工程菌株,但许多宿主菌中广泛存在着复杂的限制修饰系统,导致以同源重组双交换进行的基因编辑不易成功。在这种情况下,乳酪杆菌表达载体的成功构建也为复制型载体应用于实验菌株的基因编辑提供可能。

## 2.6 $\beta$ -半乳糖苷酶重组载体的构建及活性检测

$\beta$ -半乳糖苷酶是用于乳制品和合成糖化学工业中的重要生物催化剂,来源于乳酸菌等

GRAS 级别菌株的  $\beta$ -半乳糖苷酶可直接应用于食品中,无需纯化加工<sup>[25]</sup>。以源于副干酪乳酪杆菌 S-NB 的 *lacG* 替换 *mCherry* 构建的重组表达载体 pLPZ4E-*lacG*,经测序验证正确。将 S-NB-pLPZ4E 和 S-NB-pLPZ4E-*lacG* 转化至副干酪乳酪杆菌 S-NB 中,挑取出阳性转化子并测定其  $\beta$ -半乳糖苷酶活性。经测定, S-NB-pLPZ4E-*lacG* 的  $\beta$ -半乳糖苷酶活性达  $(24.42 \pm 0.26)$  U/mg prot,是 S-NB-pLPZ4E  $(16.23 \pm 0.17)$  U/mg prot 的 1.5 倍。酶活性测定结果表明,在启动子  $P_{ldh3}$  的调节下,以 LacG 为目的蛋白构建的重组表达载体转化得到的重

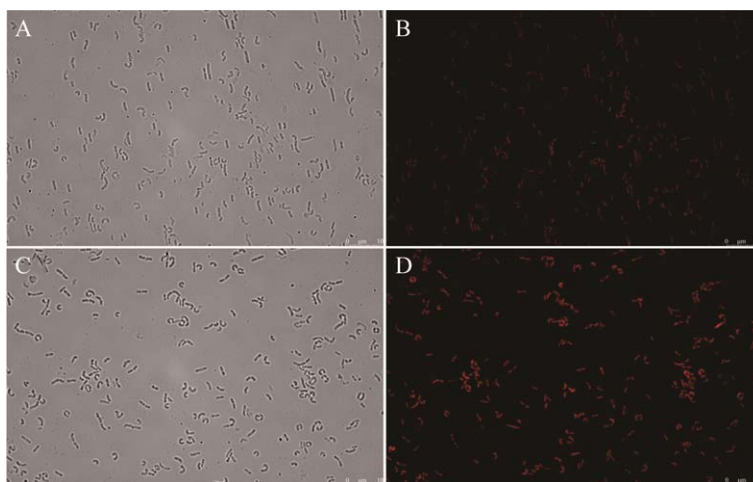


图 6 重组菌株 S-NB-pLPZ3E 及 S-NB-pLPZ4E 的明场及荧光观察图

Figure 6 Bright field and fluorescence detection images of recombinant cells. Bright field image of S-NB-pLPZ3E (A) and S-NB-pLPZ4E (C). Fluorescence image of S-NB-pLPZ3E (B) and S-NB-pLPZ4E (D).

组菌，其酶活性高于野生型菌株，且表达过程中无需加入诱导剂，简化了实验操作，在诱导剂添加困难的操作条件或特殊环境下具有应用优势(如基因工程菌株在实验物种的胃肠道环境内表达目的蛋白)。经进一步研究，若以食品级筛选标记替换抗生素标记基因，构建食品级表达载体，将有望开发出高  $\beta$ -半乳糖苷酶活性的食品级微生物，减轻乳糖吸收不良问题<sup>[26]</sup>。

### 3 结论

本研究测序分析了副干酪乳酪杆菌 ZY-1 内源性质粒的全序列，pLPZ3 与 pLPZ4 质粒全长分别为 6 289 bp 和 5 087 bp，以  $\theta$  型方式复制，均归为显性质粒。基于质粒的复制子比对分析结果，构建了大肠杆菌-乳酸菌穿梭质粒 pLPZ3N 和 pLPZ4N，可在乳酪杆菌中转化获得阳性克隆。pLPZ4N 的转化效率略高于 pLPZ3N，但稳定性稍低。表达载体 pLPZ3E 和 pLPZ4E 均具有潜在的应用前景和利用价值，构建食品级乳酪杆菌表达载体将成为后续的研究重点。

### REFERENCES

- [1] NURAIDA L. A review: health promoting lactic acid bacteria in traditional Indonesian fermented foods[J]. Food Science and Human Wellness, 2015, 4(2): 47-55.
- [2] GASBARRINI G, BONVICINI F, GRAMENZI A. Probiotics history[J]. J Clin Gastroenterol, 2016, 50(Suppl 2, Proceedings from the 8th Probiotics, Prebio): S116-S119.
- [3] MORADI M, KOUSHEH SA, ALMASI H, ALIZADEH A, GUIMARÃES JT, YILMAZ N, LOTFI A. Postbiotics produced by lactic acid bacteria: the next frontier in food safety[J]. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 2020, 19(6): 3390-3415.
- [4] SONG AAL, IN LLA, LIM SHE, RAHIM RA. Erratum to: a review on *Lactococcus lactis*: from food to factory[J]. Microbial Cell Factories, 2017, 16(1): 1-15.
- [5] van de GUCHTE M, van der VOSSEN JM, KOK J, VENEMA G. 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.
- [6] KUIPERS OP, de RUYTER PGGA, KLEEREBEZEM M, de vos WM. Quorum sensing-controlled gene expression in lactic acid bacteria[J]. Journal of Biotechnology, 1998, 64(1): 15-21.
- [7] BISWAS I, JHA JK, FROMM N. Shuttle expression plasmids for genetic studies in *Streptococcus mutans*[J]. Microbiology: Reading, England, 2008, 154(Pt 8): 2275-2282.

- [8] LANDETE JM. A review of food-grade vectors in lactic acid bacteria: from the laboratory to their application[J]. *Critical Reviews in Biotechnology*, 2017, 37(3): 296-308.
- [9] CUI YH, HU T, QU XJ, ZHANG LW, DING ZQ, DONG AJ. Plasmids from food lactic acid bacteria: diversity, similarity, and new developments[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2015, 16(6): 13172-13202.
- [10] KUNG LS, YANG MT, LIN JS. Sequence analysis of five endogenous plasmids isolated from *Lactobacillus pentosus* F<sub>03</sub>[J]. *Plasmid*, 2016, 84/85: 1-10.
- [11] SONG X, HUANG H, XIONG ZQ, XIA YJ, WANG GQ, YIN BX, AI LZ. Characterization of a cryptic plasmid isolated from *Lactobacillus casei* CP002616 and construction of shuttle vectors based on its replicon[J]. *Journal of Dairy Science*, 2018, 101(4): 2875-2886.
- [12] SUN ZL, KONG J, KONG WT. Characterization of a cryptic plasmid PD403 from *Lactobacillus plantarum* and construction of shuttle vectors based on its replicon[J]. *Molecular Biotechnology*, 2010, 45(1): 24-33.
- [13] HAGEN KE, TRAMP CA, ALTERMANN E, WELKER DL, TOMPKINS TA. Sequence analysis of plasmid pIR52-1 from *Lactobacillus helveticus* R0052 and investigation of its origin of replication[J]. *Plasmid*, 2010, 63(2): 108-117.
- [14] PAVLOVA SI, KILIÇ AO, TOPISIROVIC L, MILADINOV N, HATZOS C, TAO L. Characterization of a cryptic plasmid from *Lactobacillus fermentum* KC5b and its use for constructing a stable *Lactobacillus* cloning vector[J]. *Plasmid*, 2002, 47(3): 182-192.
- [15] XIN YP, GUO TT, MU YL, KONG J. Coupling the recombineering to Cre-lox system enables simplified large-scale genome deletion in *Lactobacillus casei*[J]. *Microbial Cell Factories*, 2018, 17(1): 1-11.
- [16] 迟涛, 徐晓娟, 刘洋硕, 张文羿. 干酪乳杆菌 *yhaI* 基因敲除菌株的构建及其耐药表型的分析[J]. *食品工业科技*, 2020, 41(6): 106-110.
- CHI T, XU XJ, LIU YS, ZHANG WY. Construction of *yhaI* gene knockout mutant strains of *Lactobacillus casei* and analysis of its antibiotic resistance[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2020, 41(6): 106-110 (in Chinese).
- [17] HEISS S, GRABHERR R, HEINL S. Characterization of the *Lactobacillus plantarum* plasmid pCD033 and generation of the plasmid free strain *L. plantarum* 3NSH[J]. *Plasmid*, 2015, 81: 9-20.
- [18] del SOLAR G, GIRALDO R, RUIZ-ECHEVARRÍA MJ, ESPINOSA M, DÍAZ-OREJAS R. Replication and control of circular bacterial plasmids[J]. *Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR*, 1998, 62(2): 434-464.
- [19] ALPERT CA, COQ AM CL, MALLERET C, ZAGOREC M. Characterization of a theta-type plasmid from *Lactobacillus sakei*: a potential basis for low-copy-number vectors in lactobacilli[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2003, 69(9): 5574-5584.
- [20] AKASAKA N, ASTUTI W, ISHII Y, HIDESE R, SAKODA H, FUJIWARA S. Change in the plasmid copy number in acetic acid bacteria in response to growth phase and acetic acid concentration[J]. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2015, 119(6): 661-668.
- [21] SPACOVA I, LIEVENS E, VERHOEVEN T, STEENACKERS H, VANDERLEYDEN J, LEBEER S, PETROVA MI. Expression of fluorescent proteins in *Lactobacillus rhamnosus* to study host-microbe and microbe-microbe interactions[J]. *Microbial Biotechnology*, 2018, 11(2): 317-331.
- [22] LIU Q, JIANG YL, YANG WT, LIU YS, SHI CW, LIU J, GAO X, HUANG HB, NIU TM, YANG GL, WANG CF. Protective effects of a food-grade recombinant *Lactobacillus plantarum* with surface displayed AMA1 and EtMIC2 proteins of *Eimeria tenella* in broiler chickens[J]. *Microbial Cell Factories*, 2020, 19(1): 28.
- [23] LIZIER M, SARRA PG, CAUDA R, LUCCHINI F. Comparison of expression vectors in *Lactobacillus reuteri* strains[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2010, 308(1): 8-15.
- [24] YU XL, WANG L, YANG XR, ZHANG SS, LI GW, ZHANG LL, LI JX, WANG XN, ZHOU H, JIANG YP, CUI W, LI YJ, TANG LJ, QIAO XY. *Lactobacillus casei* ghosts as a vehicle for the delivery of DNA vaccines mediate immune responses[J]. *Frontiers in Immunology*, 2022, 13: 849409.
- [25] HUSAIN Q. Beta galactosidases and their potential applications: a review[J]. *Critical Reviews in Biotechnology*, 2010, 30(1): 41-62.
- [26] CORGNEAU M, SCHER J, RITIE-PERTUSA L, le DTL, PETIT J, NIKOLOVA Y, BANON S, GAIANI C. Recent advances on lactose intolerance: tolerance thresholds and currently available answers[J]. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2017, 57(15): 3344-3356.

(本文责编 陈宏宇)