

微生物共培养促进植物乳杆菌 RX-8 高效合成细菌素的调控机制

刘国荣^{1,2,3}, 刘洋硕¹, 聂蓉¹

¹北京工商大学食品与健康学院 北京 100048

²北京工商大学老年营养与健康教育部重点实验室 北京 100048

³北京工商大学北京市食品添加剂工程技术研究中心 北京 100048

摘要 目的: 植物乳杆菌 RX-8 是一株分离自中国传统泡菜的益生菌, 该菌株具有产 II b 类细菌素植物乳杆菌素(Plantaricin)EF 的优良特性, 然而产量较低。目前采用与外源微生物共培养的方式提高细菌素产量, 然而共培养体系中具体的调控机制尚不清楚。本研究通过敲除种内群体感应信号分子的关键基因 *plnA*, 构建种内群体感应缺失的共培养体系, 探究微生物共培养对于细菌素高效合成的内在机制。方法: 构建基因缺失突变菌株植物乳杆菌 Δ RX-8, 通过突变菌株和野生菌株与枯草芽孢杆菌 1.8715 在共培养过程中的生长差异、信号分子分泌量变化以及相关基因的表达量, 探究种内群体感应系统促进细菌素高效合成的作用机制。结果: 在敲除关键基因 *plnA* 后, 共培养中突变菌株生长曲线上与野生菌株并无明显差异, 而细菌素产量有所下降。与纯培养相比, 共培养体系中群体感应信号分子 AI-2 的分泌量在前期显著增加, 而后趋于一致, 从菌株水平上看并无明显差异。纯培养体系中, 突变菌株的双组分系统 *plnBCD* 基因表达量略低于野生菌株, 细菌素合成基因 *plnEF* 的表达量同样有所下降, 然而, 并不影响种间信号分子 AI-2 合成的基因 *LuxS* 和 *pfs* 的相对表达量。结论: 在种内信号分子缺失的共培养体系中, 种间信号分子可以正常分泌, 种内群体感应系统可以发挥作用, 推测可能存在共用双组分系统, 共同促进细菌素的高效合成。

关键词 植物乳杆菌; 细菌素; 共培养; 群体感应; 基因表达量

文章编号 1009-7848(2023)09-0032-12 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2023.09.004

乳酸菌细菌素是在乳酸菌生长过程中自身产生的一种具有抗菌活性的多肽类物质, 大部分乳酸菌细菌素具有高疏水性、高等电点以及阳离子性的特性^[1-2]。与抗生素不同, 细菌素可以被胰凝乳蛋白酶以及胃蛋白酶等人体中常见的蛋白酶降解, 具有无毒、无抗药性、无残留等优点^[3-4]。然而, 细菌素的产量受多种因素的影响, 例如培养条件、相关合成基因的表达、是否添加外源刺激物质等。由于外源物质的安全性较高且成本较低, 因此目前的研究集中于构建外源微生物与产细菌素乳酸菌的共培养体系, 以此提高细菌素的产量。有研究表明, 外源微生物可以诱导乳酸菌细菌素的高效合成^[5], Man 等^[6]研究发现嗜热链球菌 STY-31 与植物乳杆菌 KLDS1.0391 共培养会提高植物乳杆菌素(Plantaricin)MG 的产量; 另外, Tabasco 等^[7]研

究表明德氏乳杆菌保加利亚亚种 CECT4005 和德氏乳杆菌乳酸亚种 CECT282 等都会增强嗜酸乳杆菌 La-5 产生乳杆菌素(Lactacin)B 的能力。

群体感应系统(Quorum sensing, QS)是一种细胞间相互交流的“语言”, 分为种内和种内群体感应系统; 信号分子随着细菌的生长不断产生, 当积累到一定量后, 便会被自身或其它细菌所感知, 从而诱导特定基因的表达, 使菌群表现出如形成生物被膜、产生细菌素等生理活动^[8-9]。在纯培养中, 植物乳杆菌素 EF 的合成受到种内群体感应系统的调控, 即: 首先, 植物乳杆菌自身通过 *plnA* 基因编码合成信号分子自诱导肽(Autoinducing peptide, AIP); 当细菌大量繁殖, 种群密度不断增加致 AIP 大量积累达到阈值时, 激活位于细胞膜上的由 *plnB* 基因编码的组氨酸蛋白激酶, 并以磷酸化的方式将群体感应信号分子传递给相应的反应调节蛋白, 这两个蛋白则分别由 *plnC* 和 *plnD* 编码; 接着调控操纵子 *plnEFI* 产生植物乳杆菌素 EF, 并通过 ABC 转运系统分泌到胞外^[10-14]。而在共培养体系中, 同时存在种内群体感应与种内群体

收稿日期: 2022-09-15

基金项目: 广东省基础与应用基础研究基金项目(2022A1515140021); 国家自然科学基金面上项目(31871772)

第一作者: 刘国荣, 女, 博士, 教授

E-mail: liuguorong@th.btbu.edu.cn

感应两种信号分子。目前有研究发现植物乳杆菌 DC400 和罗氏乳杆菌 A7 在共培养过程中, *LuxS* 基因的表达式上升, AI-2 的分泌量增加^[15]。植物乳杆菌 NMD-17 与瑞士乳杆菌 NMD-137 进行共培养时, 会显著增加 AI-2 信号分子的活性, 因此推测 AI-2/*LuxS* 介导的种间群体感应系统在其中发挥一定的作用^[16]。

本课题组发现植物乳杆菌 RX-8 与枯草芽孢杆菌 1.8715 共培养可以提高植物乳杆菌素 EF 的产量。在阻断种间信号分子 AI-2 后, 会降低枯草芽孢杆菌 1.8715 对共培养植物乳杆菌素 EF 的诱导效应, 说明种内群体感应系统参与调控共培养中植物乳杆菌素 EF 的合成^[17]。本研究基于以上结

果, 敲除种内群体感应系统关键基因信号分子 AIP 的编码基因 *plnA*, 将突变菌株植物乳杆菌 Δ RX-8、野生菌株植物乳杆菌 RX-8 分别与枯草芽孢杆菌 1.8715 共培养后, 测定信号分子的分泌情况及相关基因的表达式, 探究群体感应系统调控细菌素合成的作用机制。这对于在共培养体系中提高乳酸菌细菌素的产量, 以及群体感应相关基因的研究提供理论依据, 为乳酸菌细菌素的工业化生产提供技术支持。

1 试验材料

1.1 菌株与质粒

本研究所用的菌株和质粒见表 1。

表 1 菌株和质粒

Table 1 Bacterial strains and plasmids

菌株和质粒	描述	来源
菌株		
植物乳杆菌 RX-8	<i>plnA</i> 基因供体	本实验室所存
植物乳杆菌 Δ RX-8	突变菌株	本研究构建
大肠杆菌 DH5 α	质粒的构建和复制	本实验室所存
质粒		
pMG36e	Em ^r , 敲除质粒骨架	本实验室所存
pMG36e-red/cas	插入 CRISPR/Cas9 系统组件	本研究构建
pNZ8148	Cm ^r , P _{nucA} , sgRNA 启动子供体	本实验室所存
pUC57	克隆载体	本实验室所存
pMG36e-red/cas-sgRNA/ <i>plnA</i> -LR	敲除质粒	本研究构建

1.2 试剂

Q5 高保真 DNA 聚合酶, 购于北京欣华绿源科技有限公司; E.Z.N.A 质粒小提试剂盒, 购于上海索宝莱科技有限公司; ClonExpress II 克隆试剂盒, 购于南京诺唯赞生物技术有限公司; 红霉素、氨苄青霉素、DNA marker、多功能 DNA 纯化回收试剂盒, 购于北京半夏生物科技有限公司; 限制性内切酶, 购于 Takara 公司。

1.3 仪器与设备

C1000 Touch PCR 仪, 美国 BIO-RAD2 公司; SPX-150B 生化培养箱, 上海博讯医疗生物仪器股份有限公司; BSA224S 型数字电子天平, 德国 Sartorius 公司; 涡旋振荡器, 德国 IKA 公司; 小型高速离心机, 美国 SIGMA 公司; BioSpectrum 凝胶成像仪, 美国 UVP 公司; UB-7 pH 计, 美国 DEN-

VER 仪器公司; 电穿孔仪, 德国 Eppendorf 公司。

1.4 引物设计

利用 Primer Premier 5.0 进行引物设计, 如表 2 所示。

2 试验方法

2.1 基因缺失菌株及种内群体感应系统缺失共培养体系的构建

2.1.1 质粒 pMG36e-red/cas 的构建 从含有 pCas 的大肠杆菌 (*Escherichia coli*)DH5 α 中提取质粒, 操作步骤参考试剂盒说明书, 以质粒 pCas 为模板, 使用引物 Cas9-F/R 和 Red-F/R 扩增 CRISPR/Cas9 基因编辑所需的敲除元件内切酶基因 Cas9 和重组修复酶基因 λ -Red。

利用 TaKaRa Quickcut SacI、KpnI 限制性内

表2 引物列表
Table 2 Primer design

引物名称	引物序列(5'-3')
<i>Cas9</i> -F	GTAGATCTGGGCTCGAGCCTTGTATTACTGTTTATGTAAGC
<i>Cas9</i> -R	CAGACTTTGCAAGCTTTCTAGATTAAGAAATAATCTTCATC
<i>Red</i> -F	CAGACTTTGCAAGCTTTCTAGATTAAGAAATAATCTTCATC
<i>Red</i> -R	GCTCGAGCCCAGATCTACTGGTATTGGCACAAACC
<i>plnA</i> -LF	CCTACAATATGAAATTGAACCGCG
<i>plnA</i> -LR	GCCCGCTAATGAGCGGGCTTTTTTTTTTAAAGGTATGAAGCAACTTAG
<i>plnA</i> -RF	GCCCGCTCATTAGGCGGGCTGGGAAAATTTGAATTTTCATAATAATCACC
<i>plnA</i> -RR	CTTTTCCTTAATAATTGCCCC
$\Delta plnA$ -F	CGACATCTGAGCTCGAGCATGTAATACTGTCCATG
$\Delta plnA$ -R	GCTGATCTGGGATGAGCGTTGTACTACTGTATGTAAGC

切酶切质粒 pMG36e, 将环形 pMG36e 质粒线性化, 所得酶切产物电泳验证并回收。将切胶回收后的线性质粒 pMG36e 和纯化后的 *Cas9* 和 λ -*Red* 片段进行多片段一次性连接。将得到的产物与感受态细胞混匀冰上静置, 随后热激冰浴并加入 LB 培养基。37 °C 充分复苏后, 取菌液涂布于氨苄青霉素抗性 LB 平板上, 37 °C 培养 24 h。

2.1.2 sgRNA 的设计 根据植物乳杆菌 RX-8 种内信号分子编码基因 *plnA* 的序列和靶位点设计原则, 选择带有 PAM(NGG) 位点的位置设计靶向 sgRNA, 命名为 *plnA*-sgRNA, 并以质粒 pNZ8148 来源的 PNis 启动子作为 sgRNA 的启动子, 诱导表达 sgRNA。

2.1.3 *plnA* 同源臂片段的扩增及与质粒的连接转化 分别以 *plnA*-L F/R 和 *plnA*-R F/R 为引物, 以植物乳杆菌 RX-8 基因组为模板扩增 *plnA* 基因两侧同源臂。将纯化回收的同源臂片段和线化的质粒连接并转化入大肠杆菌 DH5 α 。

2.1.4 敲除质粒 pMG36e-red/cas-sgRNA/*plnA*-LR 构建 将线性化质粒 pMG36e-red/cas-pNis-sgRNA 和同源臂片段 *plnA*-LR 进行多片段一次性连接, 连接后转化入大肠杆菌 DH5 α 进行酶切并测序验证。

2.1.5 敲除菌株乳杆菌 RX-8 $\Delta plnA$ 构建 将原始菌株 RX-8 活化两代后, 接种至含 2% 甘氨酸的 MRS 培养基中, 静置培养至对数生长期, 加入氨苄青霉素(终质量浓度为 10 μ g/mL), 继续培养至其 OD_{600nm} 在 0.4~0.5。离心收集菌体细胞。用预冷的

电穿孔缓冲液清洗细胞 2 次后, 加入预冷的 500 μ L 30% PEG-1500 重悬菌体, 得到感受态细胞。

将上述得到的质粒 DNA 加入感受态细胞中, 移液枪吹吸混匀后冰浴 5 min, 转移至提前预冷的电转杯, 设置电击参数为: 电压 2.5 kV, 电脉冲 25 μ F, 电阻 200 Ω 。电击后立即用含 2 mmol/L CaCl₂ 和 20 mmol/L MgCl₂ 的预冷的 MRS 肉汤稀释, 并在 30 °C 下孵育 3 h。吸取 200 μ L 到红霉素 MRS 固体平板上, 涂布后培养 24 h。挑取生长情况良好的单个菌落, 分别接种于具有氨苄青霉素抗性和自诱导肽的 LB 试管中, 37 °C, 200 r/min 摇菌扩增 12 h 后, 提取植物乳杆菌 RX-8 基因组 DNA。用引物 $\Delta plnA$ -F/R 扩增敲除片段, 将 PCR 产物测序与野生菌株序列进行对比。

2.2 共培养中突变菌株的产细菌素变化分析

2.2.1 突变菌株生长曲线的测定 将野生菌株 RX-8 和敲除菌株 Δ RX-8 接种到 MRS 培养基中, 并将枯草芽孢杆菌 1.8715 的种子液等比例分别接入, 形成共培养体系后连续培养 32 h, 每隔 4 h 取样测 OD_{600nm}, 绘制生长曲线。

2.2.2 突变菌株抑菌活性的测定 采用硫酸铵沉淀法制备^[18]细菌素粗提液, 采用琼脂扩散法^[19]进行测定抗菌活性。在培养的固体平板上观察是否具有明显的抑菌圈, 并用游标卡尺测量抑菌圈的直径抑菌圈直径越大, 抑菌效果越好。

2.3 共培养体系中种间信号分子 AI-2 的分泌量检测

从野生菌株 RX-8 和敲除菌株 Δ RX-8 种子

培养液中取菌液按照 1% 接种量接种到 MRS 培养基中 37 °C 培养 32 h, 离心收集上清液。从 BB170 种子培养液中取菌液按照 1% 接种量接种到 AB 培养基, 30 °C 培养至 OD_{600nm} 在 0.7~1.2, 稀释后得到 BB170 稀释液, 并以 BB170 荧光值为对照, 计算野生菌株和突变菌株的相对发光值。

2.4 共培养中突变菌株相关基因的转录水平研究

2.4.1 突变菌株与野生菌株总 RNA 提取及反转录 cDNA 的制备

将野生菌株 RX-8、突变菌株 ΔRX-8 进行纯培养并分别与枯草芽孢杆菌 1.8715 共培养提取每隔 4 h 的野生菌株与突变菌株的发酵液, 离心收集菌体, 采用 RNA 提取试剂盒得到总 RNA, 并利用 cDNA 合成试剂盒提取制备 cDNA。

2.4.2 RT-qPCR 分析

对共培养中野生菌株 RX-8 和突变菌株 ΔRX-8 的 ABC 系统转运基因 *LuxS*、甲硫腺苷核苷酶基因 *pfs*、群体感应基因 *plnBCD*、细菌素基因 *plnEF* 的表达量进行测定。测定结果以纯培养时的 RX-8 基因表达量为基准 (即为 1) 进行相对表达量的计算。

3 结果与分析

3.1 构建种内群体感应缺失的共培养体系

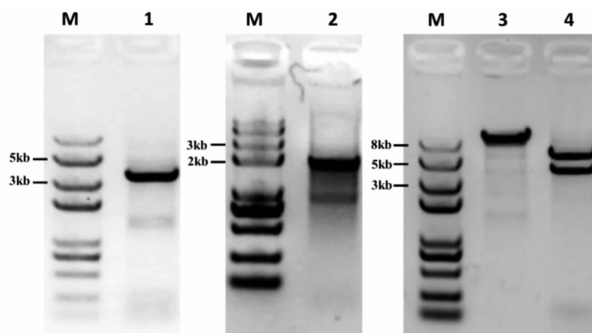
3.1.1 质粒 pMG36e-red/cas 的构建

本研究以质粒 pMG36e 为敲除骨架, 插入 CRISPR/Cas9 基因编辑所需的组件, 初步构建了敲除工具。如图 1 所示, 在第 1 泳道和第 2 泳道分别扩增得到 2 个位于 3~5 kb 和 2~3 kb 之间的 DNA 片段, 与预计扩增片段大小 (4 107, 2 210 bp) 基本一致, 并且测序结果显示序列完全正确。将线性化质粒 pMG36e 与敲除组件 Cas 和 λ-Red 连接转化, 对重组质粒进行酶切 (*XhoI*、*BglIII* 和 *BamHI*、*XhoI*) 验证, 第 3 泳道为重组质粒 pMG36e-red/cas (大小约为 8.8 kb), 第 4 泳道的 cas9 片段和 pMG36e-λ-Red 分别实际长度为 5 820 bp 和 4 107 bp, 测序结果比对正确, 表明成功构建质粒 pMG36e-red/cas。

3.1.2 sgRNA 的设计

根据 <https://links.jianshu.com> 网站在线设计 *plnA* 基因的 sgRNA。在网站中导入 *plnA* 基因后可生成所有可能的靶点位置, 选取得分最高的序列。本研究选择距离启动子 ATG

只有 17 碱基的位置并且尾端带有 PAM 序列的 sgRNA 序列, 以 pNZ8148 来源的 pNis 启动子作为 sgRNA 的启动子, 诱导其表达。目的基因 *plnA* 中 sgRNA 所在位置及其碱基序列如图 2 所示。将设计好的 *plnA* 基因的 sgRNA 序列和 pNis 启动子序列构成的 pNis-sgRNA 进行合成, 电泳结果如图 3 所示。



注: M: DNA Marker DL8000; 1: Cas 的 PCR 产物; 2: λ-Red 的 PCR 产物; 3: 重组质粒的 PCR 产物; 4: Cas 和 pMG36e-λ-Red 的 PCR 产物。

图 1 质粒 pMG36e-red/cas 的构建电泳图

Fig.1 Construction of plasmid pMG36e-red/cas

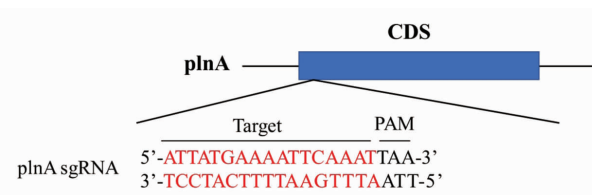


图 2 *plnA* 基因的 sgRNA 位置及序列

Fig.2 Insertion position of sgRNA and sequences of *plnA*



注: M: DL 8000 Marker; 1: pNis-sgRNA。

图 3 pNis-sgRNA 酶切电泳图

Fig.3 Agarose gel electrophoresis pattern of RCR amplification product of pNis-sgRNA

3.1.3 *plnA* 同源臂的设计 扩增 *plnA* 基因左右两端的同源臂 *plnA*-L (493bp) 和 *plnA*-R (526 bp),图 4 中显示分别扩增得到 2 个位于 500~750 bp 之间的 DNA 片段,与预计扩增片段大小(500 bp)条带大小相符且测序结果显示序列完全正确,表明扩增成功。接着将纯化回收后的同源臂和质粒分别连接,酶切鉴定结果图如 4 所示。重组质粒经过 *Xho*I 和 *Spe*I 双酶切后在 1~2 kb 之间可见 1 000 bp 左右的条带,电泳结果与测序结果均表明与预期相符。

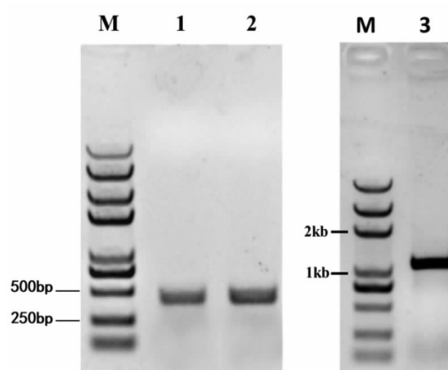
3.1.4 敲除质粒 pMG36e-red/cas-sgRNA/*plnA*-LR 的构建 将质粒 pMG36e-red/Cas 与同源臂 *plnA*-L/R、pNis-gRNA 连接转化。如图 5 所示,经 *Xho*I 和 *Spe*I 双酶切后可见在 1~2 kb 和 8 kb 出现两条特异性条带,均与预期大小一致。将重组的敲除质粒和酶切片段测序,结果与原序列一致,分别为同源臂片段 1 019 bp 和 pMG36e-red/cas-sgRNA 10 680 bp。

3.1.5 突变菌株 Δ RX-8 的构建 将敲除质粒 CRISPR/Cas-sgRNA-*plnA*-L/R 电击转化入植物乳杆菌 RX-8 中,通过引物 Δ *plnA*-F/R 扩增靶基因的同源臂,判定 *plnA* 基因的敲除情况。由于敲除片段长度较短在电泳图中不明显,这里通过测序序列峰图和序列对比图展示敲除结果如图 6,从峰图中可见敲除 *plnA* 基因后进行了同源修复并引入设计的强终止子序列。

3.2 共培养中突变菌株的产细菌素变化

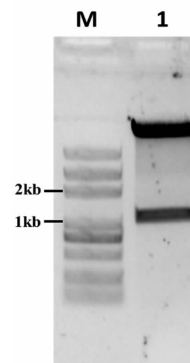
3.2.1 共培养中突变菌株生长情况 为研究在共培养中种内群体感应系统关键基因信号分子 *plnA* 基因敲除后植物乳杆菌 RX-8 的生长代谢变化,本研究绘制了共培养 32 h 的念珠菌的生长曲线图。如图 7 所示,在敲除了 *plnA* 基因之后,无论是纯培养还是共培养过程中,突变菌株仍然保持着良好的生长活性,且共培养的菌体密度高于纯培养。与野生菌株相比,突变菌株的菌体密度整体略低,但是并无明显的差异,依旧保持平稳的生长趋势。

3.2.2 共培养中突变菌株细菌素合成情况 野生菌株 RX-8 和和突变菌株 Δ RX-8 在纯培养和共培养体系中细菌素合成量如图 8 所示。纯培养体系中,由于敲除了 Δ *plnA*,突变菌株不会产生细菌



注:M:DNA Marker DL8000;1:左同源臂 *plnA*-L;2:右同源臂 *plnA*-R;3:同源臂 *plnA*-L/R。

图 4 *plnA* 同源臂 L/R 基因的 PCR 产物和双酶切电泳图
Fig.4 A garose electrophoresis of PCR products of *plnA*-L/R



注:M:DNA Marker DL8000;1:同源臂和 pMG36e-red/cas-sgRNA 酶切 PCR 产物。

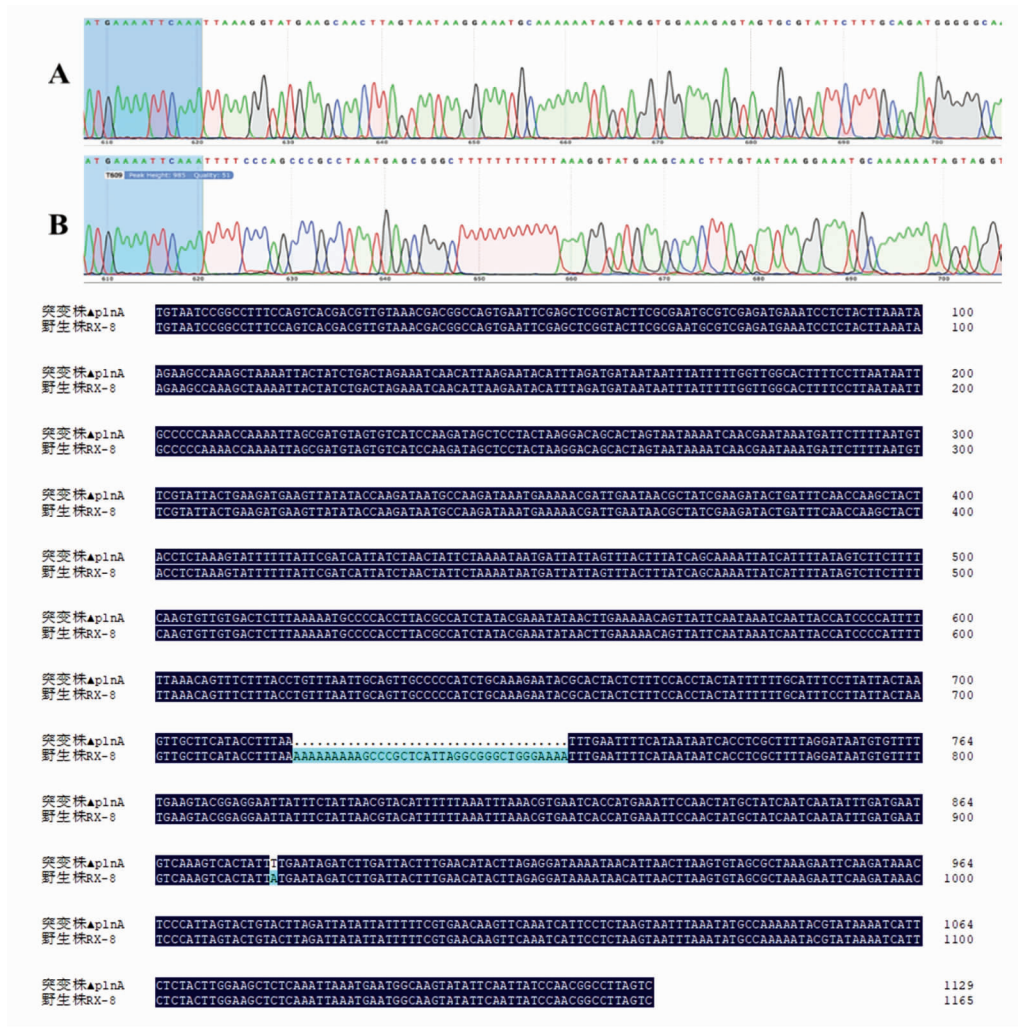
图 5 敲除质粒酶切 PCR 产物电泳图

Fig.5 Electrophoretic pattern of knockout plasmid enzyme digestion PCR products

素,所以抑菌圈直径为 0。在共培养体系中,突变菌株植物乳杆菌 Δ RX-8 的细菌素合成量虽较野生菌株植物乳杆菌 RX-8 有所下降,但却明显高于纯培养体系中野生菌株植物乳杆菌 RX-8 细菌素的合成量,说明敲除 *plnA* 后依然部分存在枯草芽孢杆菌 1.8715 的诱导作用。从整体来看,细菌素在整个培养时期均表现出先上升后下降的趋势,且纯培养体系中细菌素的产量以及合成速度均高于纯培养体系。

3.3 共培养中突变菌株群体感应系统信号分子分泌情况

敲除种内信号分子基因 *plnA* 后,研究共培养过程中野生菌株 RX-8 与突变菌株 Δ RX-8 种间



注:A:野生菌株植物乳杆菌 RX-8;B:突变菌株植物乳杆菌 $\Delta RX-8$ 。

图 6 *plnA* 基因敲除前后的测序鉴定结果

Fig.6 Sequencing results before and after *plnA* gene knockout

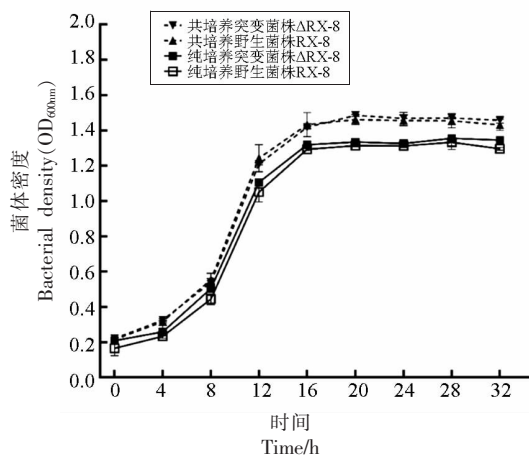


图 7 野生菌株 RX-8 和突变菌株 $\Delta RX-8$ 的生长曲线
Fig.7 Growth curve of wild plant RX-8 and mutation plant $\Delta RX-8$

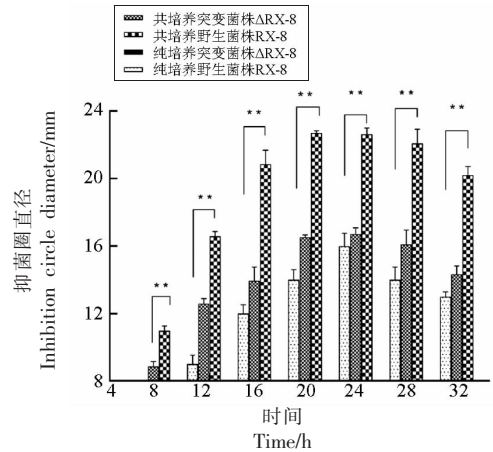


图 8 细菌素合成量变化
Fig.8 The changes in bacteriocin synthesis

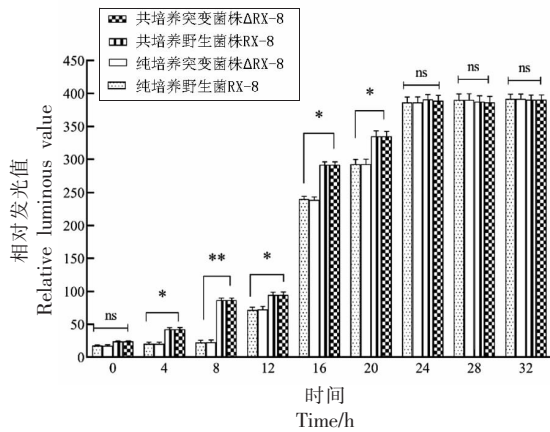


图9 种间信号分子 AI-2 分泌情况

Fig.9 Secretion of interspecies signaling molecule AI-2

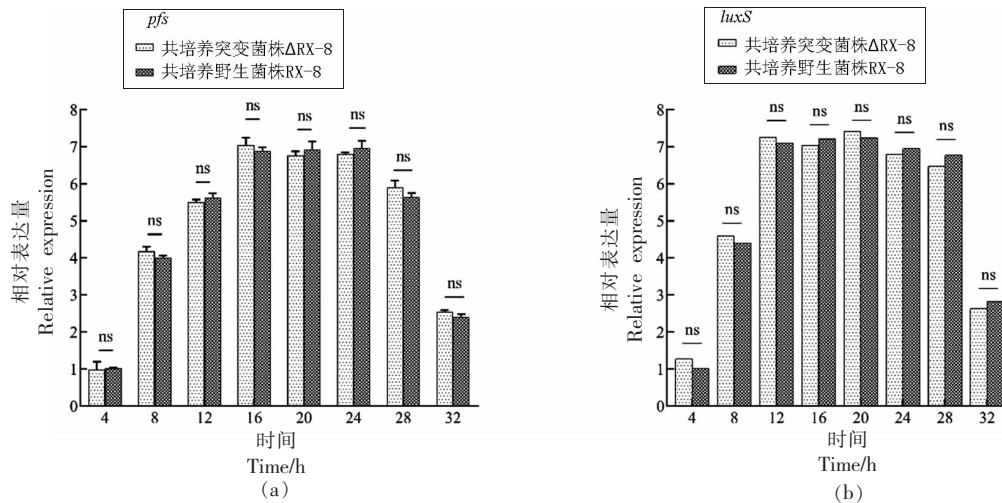
信号分子 AI-2 分泌量,结果如图 9 所示。以上清液的相对发光量作为 AI-2 分泌量的判断依据,在 4~20 h 的培养过程中,纯培养体系 AI-2 分泌量

显著低于共培养体系,但是在 20 h 之后便无明显差异。从菌株水平来看,在整个培养过程中,无论是共培养还是纯培养,突变菌株与野生菌株 AI-2 的分泌量始终保持在同一水平。

3.4 共培养体系中突变菌株群体感应系统相关基因的表达情况

3.4.1 对种间信号分子合成基因 *LuxS*、*pfs* 的影响

对种间信号分子合成相关基因 *LuxS*、*pfs* 的相对表达量进行测定,结果如图 10 所示。在整个培养的过程中,共培养体系的突变菌株与野生菌株在 *LuxS*、*pfs* 的表达量上均未有明显差异,但是与纯培养相比表达量均有所上升。由此可以看出敲除种内信号分子编码基因 *plnA* 对种间信号分子合成基因的转录无影响,这与 AI-2 分泌量未发生变化的结果一致。

图 10 基因 *LuxS*、*pfs* 表达量变化Fig.10 Changes in expression of *LuxS* and *pfs*

3.4.2 共培养中突变菌株群体感应系统双组分系统基因表达情况 敲除种内信号分子基因 *plnA* 后,研究共培养过程中野生菌株 RX-8 与突变菌株 Δ RX-8 的群体感应系统中双组分系统编码基因 *plnBCD* 的转录水平,结果如图 11 所示。相对表达量是以纯培养过程中植物乳杆菌 RX-8 的基因表达量为基准,因此相对表达量大于 1 即为基因表达上调。由图 11 可知,在敲除了 *plnA* 之后,基因 *plnBCD* 的相对表达量均大于 1,这意味着相关基因仍然表达且处于上调水平,由此推测在共培

养的过程中可能存在某些物质刺激相关的受体蛋白,从而调控相应基因的表达。与野生菌株相比,突变菌株的组氨酸激酶编码基因 *plnB* 表达量有所下降,差异主要集中在菌株生长的对数期及稳定期,即 12~32 h;而作为下一级信号基因的 *plnCD*,表达差异略有滞后且时间缩短,集中在 16~28 h。从整体上看,3 个基因的相对表达量变化与细菌素的产量具有相同的变化趋势,呈现出先上升后下降。

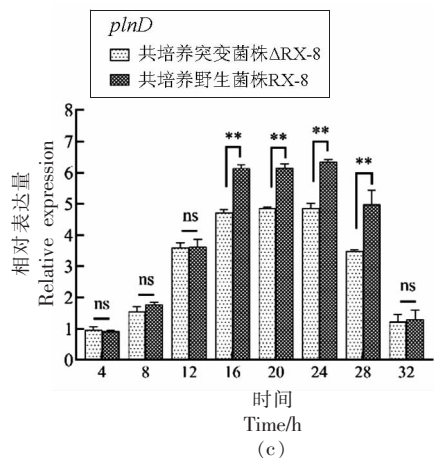
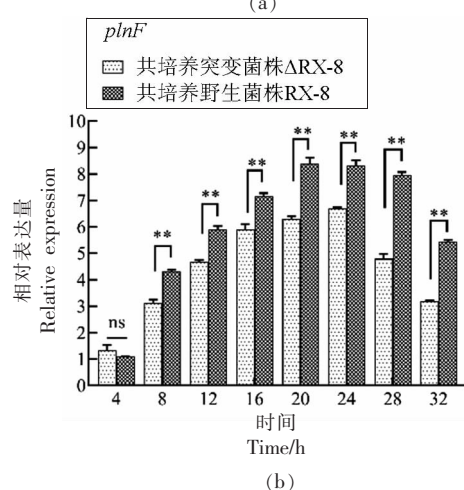
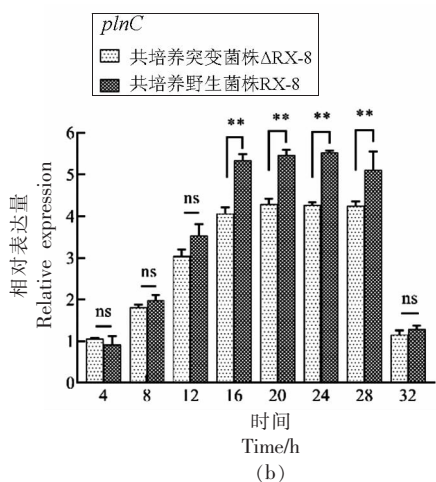
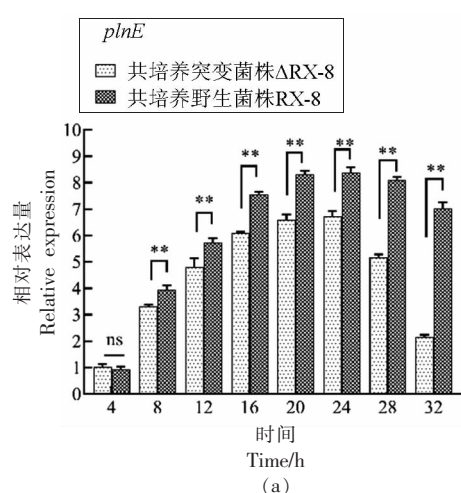
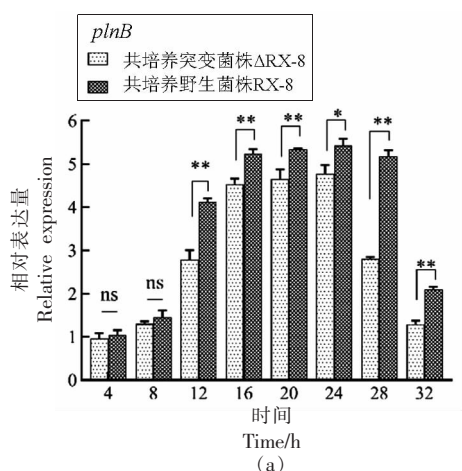


图 11 双组分系统基因 *plnBCD* 表达情况

Fig.11 Changes in expression of two-component system gene *plnBCD*

图 12 细菌素结构基因 *plnEF* 表达量变化

Fig.12 Changes in expression of bacteriocin structural gene *plnEF*

相对表达量仍然大于 1，与纯培养相比基因表达上调。共培养体系中，0~4 h 由于在细菌处于迟滞期，细菌素并未开始合成，因此两菌株的基因表达量并无显著差异；从 8 h 开始进入对数生长期，菌体密度开始增加，同时细菌素开始合成，相关的细菌素结构基因开始表达，导致二者的表达量开始具有显著差异直至培养结束。

3.4.3 对细菌素合成基因表达的影响 从基因的转录水平上可以看出，细菌素合成基因 *plnEF* 的表达量有显著差异，在敲除了 *plnA* 基因之后，突变菌株的 *plnEF* 表达量明显低于野生菌株，但是

4 讨论与结论

本研究对采用 CRISPR/Cas9 基因敲除技术构建突变菌株植物乳杆菌 Δ RX-8，将其与枯草芽孢杆菌 1.8715 进行共培养，同时以野生菌株 RX-8 与枯草芽孢杆菌 1.8715 的共培养体系为对照，研究种内群体感应系统在枯草芽孢杆菌 1.8715 诱

导植物乳杆菌 RX-8 细菌素产生增加过程中所起的作用以及相关基因的变化情况。

根据敲除菌株与野生菌株的生长曲线结果显示,在敲除了 *plnA* 基因之后,植物乳杆菌 RX-8 仍然可以正常生长。共培养体系和纯培养体系中,两者的菌体密度并无显著差异,具有相同的生长趋势,这表明 *plnA* 基因是一种非致死性基因,敲除之后对植物乳杆菌 RX-8 生长情况没有明显的影响,可以排除因为生长情况而导致细菌素产量下降的干扰因素,同时也说明种间信号分子缺失共培养体系的成功构建。

从细菌素的合成情况可以发现,相较于纯培养体系中的野生菌株 RX-8,共培养体系中突变菌株 Δ RX-8 的细菌素产量显著上升,但是仍然低于野生菌株的共培养体系,这说明细菌素的诱导合成途径并不完全是由种内群体感应系统所调控的,种间群体感应系统在细菌素的合成过程中同样发挥作用。而种间信号分子 AI-2 分泌量的结果显示,当细菌处于对数生长期时,共培养体系与纯培养体系的分泌量具有显著差异,待进入稳定期后便无明显区别。在共培养过程中,敲除菌株与野生菌株种间信号分子 AI-2 的分泌量始终保持一致,且在纯培养体系中亦是如此。上述结果均表明在种内群体感应系统的缺失的共培养体系中,种间群体感应系统信号分子的分泌不会受到影响。

从转录水平上看,在共培养体系中,敲除了 *plnA* 基因之后,调控双组分系统 *plnBCD* 基因的表达量略低于野生菌株,但是依旧属于正常水平。共培养体系中组氨酸蛋白激酶编码基因 *plnB* 的表达量略有降低,这是因为构建种内群体感应系统缺失共培养体系后,突变菌株 Δ RX-8 不再分泌种内信号分子 AIP,而组氨酸蛋白激酶恰好是 AIP 的受体蛋白,导致受体蛋白只能被部分激活^[20-22]。在 Zhang 等^[23-24]的研究中,敲除了 *plnB* 基因之后的突变菌株植物乳杆菌 Δ LXM-1 的细菌素产量明显降低,在补充 PlnA 之后仍然无法恢复,这是由于在缺乏受体蛋白的情况下,即使有信号分子 PlnA 也无法激活种内群体感应系统来调控细菌素合成。而在本研究中,缺失了 PlnA 之后,*plnB* 的表达量虽然有所下降,却不会降低至纯培养水平,说明了 PlnB 可能被其它信号分子激活。另外,与

纯培养的野生菌株相比,共培养的野生菌株和突变菌株种间信号分子 AI-2 的分泌量明显增加,同时基因 *LuxS*,*pfs* 的表达量均有上调。姜雪雍等^[25]的研究结果显示,在副干酪乳杆菌 HD1.7 与枯草芽孢杆菌构成的共培养体系中,细菌素的合成量是纯培养组的 1.21 倍,群体感应相关基因 *LuxS* 上调 2.31 倍。而在孙思睿等^[26-28]的研究中,纯培养体系下组氨酸蛋白激酶基因细菌素结构基因 *plnC8HK*、双组分调节基因 *plnD* 以及细菌素结构基因 *plnEF* 均因 *LuxS* 基因的缺失,表达显著下调,这与本研究结果一致。因此推测种间信号分子 AI-2 可能与 AIP 共用同一套双组分系统。在共培养 12 h 时,二者 *plnB* 基因的表达量已经具有显著差异,但是其下级传导基因的表达量虽有差异却并不显著,直至 16 h 时差异开始显著,因此存在基因表达的滞后性^[29-31]。同时,细菌素合成基因 *plnEF* 的表达量有明显差异,突变菌株 Δ RX-8 的 *plnEF* 基因的表达量比野生菌株略有降低,但细菌素的产量仍然高于纯培养中的野生菌株,这与细菌素表达量的变化趋势相符。

综合以上结果,在种内信号分子缺失的共培养体系中,诱导效应并未因为缺失 PlnA 而完全丧失,表明除 PlnA 介导的种内群体感应系统之外,还有其它系统调控诱导效应。由于在种内群体感应系统缺失的共培养体系中不会影响种间信号分子 AI-2 的合成,而结果显示 AI-2 的分泌量提高,推测可能是存在种间信号分子 AI-2 与种间信号分子 AIP 共用同一套双组分系统的现象,两种信号分子共同促进细菌素的高效合成。

参 考 文 献

- [1] YI L H, QI T, HONG Y, et al. Screening of bacteriocin-producing lactic acid bacteria in Chinese homemade pickle and dry-cured meat, and bacteriocin identification by genome sequencing[J]. LWT, 2020, 125: 109177.
- [2] DES F, PAUL R, COLIN H. Developing bacteriocins of lactic acid bacteria into next generation biopreservatives[J]. Current Opinion in Food Science, 2018, 20: 1-6.
- [3] 章检明. 植物乳杆菌素 Q7 合成与代谢关键蛋白挖掘

- 及调控研究[D]. 哈尔滨: 哈尔滨工业大学, 2019.
- ZHANG J M. Exploration of key proteins for plantaricin Q7 biosynthesis and metabolism regulation[D]. Harbin: Harbin Institute of Technology, 2019.
- [4] ZHAO Z, ZHANG H L, REN Y, et al. Optimization of fermentation process for the production of bacteriocins from lactic acid bacteria[J]. *Agricultural Biotechnology*, 2015, 4(2): 50-53.
- [5] ALKHATIB Z, LAGEDROSTE M, ZASCHKE J, et al. The C-terminus of nisin is important for the ABC transporter NisFEG to confer immunity in *Lactococcus lactis*[J]. *Microbiology Open*, 2014, 3(5): 752-763.
- [6] MAN L L, MENG X C, ZHAO R H. Induction of Plantaricin MG under co-culture with certain lactic acid bacterial strains and identification of *LuxS* mediated quorum sensing system in *Lactobacillus plantarum* KLDS1.0391[J]. *Food Control*, 2012, 23(2): 462-469.
- [7] TABASCO R, GARCÍA-CAYUELA T, PELÁEZ C, et al. *Lactobacillus acidophilus* La-5 increases lactacin B production when it senses live target bacteria[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2009, 132(2/3): 109-116.
- [8] 李雷兵, 朱寒剑, 郑心, 等. 乳酸菌群体感应的研究进展[J]. *中国酿造*, 2021, 40(2): 5-11.
- LI L B, ZHU H J, ZHENG X, et al. Research progress of lactic acid bacteria quorum sensing[J]. *China Brewing*, 2021, 40(2): 5-11.
- [9] DÍAZ M A, GONZÁLEZ S N, ALBERTO M R, et al. Human probiotic bacteria attenuate *Pseudomonas aeruginosa* biofilm and virulence by quorum-sensing inhibition[J]. *Biofouling*, 2020, 36(5): 579-609.
- [10] CZÁRÁN T, HOEKSTRA R F. A spatial model of the evolution of quorum sensing regulating bacteriocin production[J]. *Behavioral Ecology*, 2007, 18(5): 866-873.
- [11] 刘国荣, 孙勇, 李平兰. IIa类乳酸菌细菌素的异源表达研究进展[J]. *食品科学*, 2012, 33(5): 323-327.
- LIU G R, SUN Y, LI P L. Research advances in heterologous expression of class IIa bacteriocins from lactic acid bacteria[J]. *Food Science*, 2012, 33(5): 323-327.
- [12] JIA F F, MENG X C. Research progress of co-culture-inducible bacteriocin production in lactic acid bacteria[J]. *Journal of Food Safety and Quality*, 2017, 8(4): 1298-1304.
- [13] 聂蓉, 李雪, 郜亚昆, 等. 微生物共培养对植物乳杆菌RX-8合成细菌素的诱导作用[J]. *中国食品学报*, 2022, 22(1): 21-30.
- NIE R, LI X, GAO Y K, et al. Induction of plantaricin RX-8 from *Lactobacillus plantarum* RX-8 production by co-culture[J]. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 2022, 22(1): 21-30.
- [14] 李雪. 特定微生物共培养对细菌素Plantaricin RX-8合成的诱导作用研究[D]. 北京: 北京工商大学, 2020.
- LI X. Study on the induction of bacteriocin plantaricin RX-8 synthesis by co-culture of specific microorganisms[D]. Beijing: Beijing Technology and Business University, 2020.
- [15] CAGNO R D, ANGELIS M D, CODA R, et al. Molecular adaptation of sourdough *Lactobacillus plantarum* DC400 under co-cultivation with other *Lactobacilli*[J]. *Research in Microbiology*, 2009, 160(5): 358-366.
- [16] MAN L L, XIANG D J. *LuxS*-mediated quorum sensing system in *Lactobacillus plantarum* NMD-17 from koumiss: induction of Plantaricin MX in co-cultivation with certain lactic acid bacteria[J]. *Folia Microbiologica*, 2021, 66(5): 855-871.
- [17] LIU G R, NIE R, LIU Y S, et al. Combined antimicrobial effect of bacteriocins with other hurdles of physicochemic and microbiome to prolong shelf life of food: A review[J]. *The Science of the Total Environment*, 2022, 825: 154058.
- [18] 刘国荣, 王成涛, 孙宝国. 长寿老人源双歧杆菌BL-8产细菌素的提纯及其分子特性[J]. *中国食品学报*, 2018, 18(5): 115-121.
- LIU G R, WANG C T, SUN B G. Purification and molecular characteristics of bacteriocin produced by *Bifidobacterium* BL-8 from centenarians' intestine[J]. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 2018, 18(5): 115-121.
- [19] LIU G R, V Y, LI P L, et al. Pentocin 31-1, an anti-*Listeria* bacteriocin produced by *Lactobacillus pentosus* 31-1 isolated from Xuan-Wei Ham, a traditional China fermented meat product[J]. *Food Control*, 2008, 19(4): 59.
- [20] HERNÁNDEZ R L C, MORGAN R M L, BARRY S, et al. Multi-chaperone function modulation and

- association with cytoskeletal proteins are key features of the function of AIP in the pituitary gland[J]. *Onco-target*, 2018, 9(10): 9177-9198.
- [21] GE C, RUN S Q, JIA H K, et al. Leveraging quorum sensing system for automatic coordination of *Escherichia coli* growth and lactic acid biosynthesis[J]. *Annals of Microbiology*, 2022, 72(1): 1-13.
- [22] 励建荣, 李婷婷, 王当丰. 微生物群体感应系统及其在现代食品工业中应用的研究进展[J]. *食品科学技术学报*, 2020, 38(1): 1-11.
- LI J R, LI T T, WANG D F. Research progress on microbial quorum sensing system and its application in modern food industry[J]. *Journal of Food Science and Technology*, 2020, 38(1): 1-11.
- [23] ZHANG X M, SHANG N, ZHANG X, et al. Role of *plnB* gene in the regulation of bacteriocin production in *Lactobacillus paraplantarum* L-XM1[J]. *Microbiological Research*, 2013, 168(5): 305-310.
- [24] JOHNSBORG O, DIEP D B, NES I F. Structural analysis of the peptide pheromone receptor PlnB, a histidine protein kinase from *Lactobacillus plantarum* [J]. *Journal of bacteriology*, 2003, 185(23): 6913-6920.
- [25] 姜雪雍, 岳元春, 孙养存, 等. 副干酪乳杆菌与芽孢杆菌属共培养种间关系对产细菌素的影响[J]. *中国农学通报*, 2021, 37(24): 124-132.
- JIANG X Y, YUE Y C, SUN Y C, et al. Interspecific relationship of *Lactobacillus paracasei* co-cultured with *Bacillus* sp. affects bacteriocin production[J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2021, 37(24): 124-132.
- [26] 孙思睿, 万峰, 赵鹏昊, 等. *LuxS* 基因对盐胁迫下植物乳杆菌生长及细菌素合成的影响[J]. *食品科学*, 2019, 40(14): 69-76.
- SUN S R, WAN F, ZHAO P H, et al. Effect of *luxS* gene on growth and bacteriocin synthesis of *Lactobacillus plantarum* under NaCl stress[J]. *Food Science*, 2019, 40(14): 69-76.
- [27] MUNIA A, STEVEN L P, ORKUN S S. Split histidine kinases enable ultrasensitivity and bistability in two-component signaling networks[J]. *PLoS Computational Biology*, 2017, 9(3): e1002949.
- [28] ZHANG T, TIAN J J, LI Z Y, et al. Research of the relationship between AI-2/LuxS quorum sensing system and biofilm formation in *Lactobacillus plantarum* HE-1[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2014, 35(5): 130-132, 136.
- [29] PAPPENFORTH K, BASSLER B L. Quorum sensing signal-response systems in gram-negative bacteria[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2016, 14(9): 576-588.
- [30] SUN Y C, LI Y, LUO Q, et al. LuxS/AI-2 Quorum sensing system in *Edwardsiella piscicida* promotes biofilm formation and pathogenicity[J]. *Infection and Immunity*, 2020, 88(5): e00907-19.
- [31] ZHU Y L, SANG X, LI X, et al. Effect of quorum sensing and quorum sensing inhibitors on the expression of serine protease gene in *Hafnia alvei* H4 [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2020, 104(17): 7457-7465.

The Regulation Mechanism of Microbial Co-cultivation to Promote the Efficient Synthesis of Bacteriocin by *Lactobacillus plantarum* RX-8

Liu Guorong^{1,2,3}, Liu Yangshuo¹, Nie Rong¹

¹School of Food and Health, Beijing Technology and Business University, Beijing 100048

²Key Laboratory of Geriatric Nutrition and Health, Ministry of Education, Beijing Technology and Business University, Beijing 100048

³Beijing Engineering and Technology Research Center of Food Additives, Beijing Technology and Business University, Beijing 100048

Abstract Objective: *Lactobacillus plantarum* RX-8 is isolated from traditional Chinese pickles. This strain has the excellent characteristics of producing IIb bacteriocin Plantaricin EF, but the yield is low. At present, co-cultivation with exogenous microorganisms is often used to increase the production of bacteriocin, but the specific regulatory mechanism in the co-cultivation system is still unclear. Therefore, in this study, by knocking out *plnA* of the intraspecific quorum

sensing signal molecule, a co-culture system with lack of intraspecific quorum sensing was constructed to explore the regulation mechanism of the interspecific quorum sensing system on bacteriocin synthesis. Methods: A gene deletion mutant strain *Lactobacillus plantarum* Δ RX-8 was constructed, and the difference in growth, the secretion of signaling molecules and the expression of related genes between the mutant strain and the wild strain with *Bacillus subtilis* 1.8715 during the co-cultivation process, and analyzed the regulation of the induction system for bacteriocin synthesis. Results: After knocking out the key gene *plnA*, the growth curve of the mutant strain in co-culture was not significantly different from that of the wild strain, but the production of bacteriocin was decreased. Compared with mono-culture, the secretion of the quorum sensing signalling molecule AI-2 in the co-culture system was significantly increased in the early stage, and then converged to the same level, with no significant difference at the strain level. In the mon-culture system, the expression of *plnBCD* gene in the two-component system of the mutant strain was slightly lower than that of the wild strain, and the expression of the bacteriocin synthesis gene *plnEF* also decreased. The expression levels of the genes *LuxS* and *pfs*, which regulate the synthesis of the interspecific signaling molecule AI-2, were not affected by the knock-out. Conclusion: In the co-culture system lacking of intraspecific signal molecules, the interspecific quorum sensing system can still make effects, and there may be a phenomenon of sharing a two-component system, which jointly regulates the synthesis of bacteriocin.

Keywords *Lactobacillus plantarum*; bacteriocin; co-culture; quorum sensing; gene expression