

重组 GFP 干酪乳杆菌的构建及其在小鼠肠道内的定植分布

张宁¹, 侯喜林², 余丽芸^{1,2*}, 王桂华¹, 赵志刚², 高宇¹

(黑龙江八一农垦大学,¹ 生命科技学院,² 动物科技学院, 大庆 163319)

摘要:【目的】研究重组干酪乳杆菌 (*Lactobacillus casei*) 在小鼠肠道内定植能力及分布规律。【方法】利用绿色荧光蛋白 (GFP) 基因作为报告基因, 构建 pgsA 基因与 GFP 的融合基因载体 pLA-GFP, 电转化到乳酸杆菌中, 得到阳性重组菌。将重组菌以每只 10^9 mL⁻¹ 的量, 口服接种 SPF 级 BALB/c 小鼠, 分别于口服后的 1.5 h、3 h、12 h、1 d、3 d、5 d、6 d、7 d 之后取其十二指肠、空肠、回肠、盲肠的肠道冲洗液, 通过平板菌落计数法检测肠道内的重组干酪乳杆菌。【结果】Western blot 结果显示约 69 kDa 的融合蛋白在乳酸菌中得到了正确的表达; 重组菌在蓝紫光激发下, 发出绿色荧光。小鼠口服重组菌后能在肠道黏膜的不同部位以一定的比例存活并附着在肠黏膜表面, 口服 6 d 后达到定植高峰期, 7 d 后在十二指肠、空肠、回肠和盲肠定植率分别占第 1 天的 16.49%、25.08%、47.71%、41.03%。【结论】GFP 在干酪乳杆菌中得到了稳定的表达, 且在小鼠肠道内具有良好的定植能力, 定植规律回肠 > 盲肠 > 空肠 > 十二指肠, 这为研究乳酸杆菌作为口服疫苗抗原递送载体及其对小鼠肠道免疫机理提供试验基础。

关键词: 干酪乳杆菌; 绿色荧光蛋白; 肠道; 定植

中图分类号: R392 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2010) 09-1232-07

乳酸菌 (LAB, lactic acid bacteria) 是发酵糖类主要产物为乳酸的一类无芽孢、革兰氏阳性细菌的总称, 被广泛的应用在工业、农业和医药等与人类生活密切相关的重要领域, 特别是用于食品发酵方面, 是具有重要应用前景的食品级微生物^[1-4]。乳酸杆菌是人体和动物胃肠中的一种益生菌, 能长时间的存在于动物机体中, 此外还可促进小肠局部细胞免疫和体液免疫, 因此乳酸杆菌是一种理想的口服疫苗递送载体^[5-7]。若想知道乳酸杆菌在动物体内如何运动和分布, 最好的方法是对乳酸杆菌进行标记后跟踪观察。绿色荧光蛋白 (GFP, Green Fluorescent Protein) 是一种理想的活体荧光标记分子, 该蛋白能够自身催化形成发光结构并在紫外或蓝光激发下发出绿色荧光, 还具有易于检测、荧光稳定、无毒害可

进行活细胞定时定位观察等优点, 上述特性使 GFP 作为分子标记物在基因工程疫苗中得到广泛应用^[8]。另外, 我们采用一种新型的表面展示系统, 利用多聚谷氨酸跨膜蛋白 pgsA 的锚定机制, 将 GFP 基因表达在乳酸菌表面, 使其更加安全, 方便^[9-10]。本研究试图在乳酸杆菌中克隆并高效稳定表达绿色荧光蛋白, 并研究了该重组菌在小鼠肠道中定植能力及分布规律, 为探索其作为乳酸杆菌口服疫苗提供试验基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验材料、菌株和质粒: 源自牙洞的干酪乳杆菌 CICC 6105 (*Lactobacillus casei*) 购自中国工业微

基金项目: 国家人事部留学回国人员科技项目择优资助项目

* 通信作者。Tel: +86-459-6819292; Fax: +86-459-6819290; E-mail: xly_hou@yahoo.com.cn

作者简介: 张宁 (1984-), 女, 黑龙江省富裕县人, 硕士, 研究方向为分子免疫学。E-mail: kedyning@163.com

收稿日期: 2010-03-05; 修回日期: 2010-04-14

生物菌种保藏中心(历史来源:ATCC);pgsA 上下游引物,大肠杆菌 XL1-blue、干酪乳酸菌表面表达载体 pLA-GFP 质粒、兔抗 pgsA 高免血清均由黑龙江八一农垦大学基因工程实验室保存;6~8 周龄 SPF 级 BALB/c 雌性小鼠,购自北京维通利华动物技术有限公司。

1.1.2 主要试剂和仪器:琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒 (Agarose Gel DNA Purification Kit) 购自 TIANGEN 公司;pMD18-T 载体购自大连宝生物公司;MRS 培养基和辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的羊抗鼠 IgG 抗体购自 Sigma 公司。其它生化试剂均为国产分析纯产品。电穿孔仪,美国 BIO-RAD 公司;半干转移槽 JY-ZY5,北京博斯拜公司;荧光显微镜,德国 Lecia 公司;流式细胞仪,法国 BECTON DICKINSON 公司。

1.1.3 引物:根据 GFP 基因序列 (Access number: EU056363 133-852 bp) 设计一对引物,酶切位点分别是 *Bam*H I 和 *Hind* III (下划线标出),引物由上海生物工程公司合成:

P1 5'-CGCGGATCCATGCTGAGCAAG-3'

P2 5'-AAGCTTCTTGTACAGCTCGTCCAT-3'

1.2 pLA-GFP 质粒的构建

PCR 扩增得到 720 bp GFP 片段。将该片段插入到穿梭载体 pLA 中。按照 Aymerich 等^[11]方法制备 *L. casei* 感受态细胞,将重组质粒和空载体对照在 2.0 kV、200 Ω 、25 μ F 的电击条件下进行转化,电击时间 4.2 ms。电转化结束后,静止厌氧培养 12 h。按照 Daniel 等^[12]的方法从乳酸杆菌转化子中提取质粒 DNA,PCR 鉴定阳性克隆,重组质粒命名为 pLA-GFP。

1.3 GFP 在干酪乳杆菌中的表达及鉴定

1.3.1 重组干酪乳杆菌的表达:将重组菌 pLA-GFP/*L. casei*、pLA/*L. casei*、*L. casei* 分别按 2% 接种于 10 mL MRS 培养基中进行表达。分别取表达 6 h 的菌液样品,在 10% SDS-PAGE 上进行电泳分析,通过 Western blot 检测目的蛋白的表达。

1.3.2 绿色荧光蛋白的荧光观察 取过夜培养的阳性乳酸杆菌离心后收集沉淀,PBS 洗涤 3 次,取 20 μ L 涂在载玻片上,于荧光显微镜下观察,同时以未转化任何质粒的乳酸杆菌作为对照,确认绿色荧光蛋白表达与否。

1.3.3 流式细胞检测分析 取过夜培养的阳性乳酸

杆菌和空载体对照组,300 目筛网过滤,4000 \times g 离心 5 min 收集菌体,PBS 洗 3 次,重悬于 PBS 中,调整菌体数达 5×10^7 CFU/mL,取 1 mL 加入上样管,进行流式细胞仪检测。

1.4 重组菌稳定性

将重组菌和空质粒乳杆菌分别进行 12 h 和 24 h 为一代的传代培养,连续传 50 代,荧光显微镜下观察重组菌荧光的稳定性。将重组菌提取质粒 DNA 进行 PCR 鉴定,检测 GFP 基因是否稳定存在于重组菌中。

1.5 重组干酪乳杆菌在小鼠体内定植测定

取过夜培养的重组干酪乳杆菌,3000 \times g 离心 5 min 离心收集菌体,PBS 洗 2 次,重悬于 PBS 中,调整菌体细胞密度至 10^9 CFU/mL。将 6-8 周龄 SPF 级 BALB/c 雌性小鼠随机分为两组,每组 24 只,一组口服重组干酪乳杆菌 10^9 个,另一组口服等体积的灭菌 PBS 溶液作为对照。分别于口服后的 1.5 h、3 h、12 h、1 d、3 d、5 d、6 d、7 d,每次引颈处死 3 只小鼠,分别取小鼠的十二指肠、空肠、回肠和盲肠,弃去肠道内容物,各肠段每次均取约 2 cm,PBS 按照 100 μ L/cm 肠段反复冲洗肠道,收集洗液,混匀,各取 100 μ L 洗液,用 PBS 分别进行 1000 倍稀释,混匀后各取稀释洗液 100 μ L 涂布于含氯霉素 (10 mL) MRS 固体平板,各肠道稀释后,各取洗液 3 次,分别进行涂板,厌氧培养 10 h,检测菌落个数,计算出原肠道内菌落数。

2 结果

2.1 重组乳酸杆菌质粒 PCR 鉴定及序列分析

以提取的重组质粒作为模板,分别以 GFP 和 pgsA 的引物进行 PCR 扩增,扩增出约 720 bp 和 1116 bp 的基因片段,与预期结果大小一致。PCR 产物连接到 T 载体进行 DNA 序列测定,测序结果与 GenBank 所公布的 GFP 基因序列比较,核苷酸序列的一致性达到 100%。

2.2 重组蛋白的 Western blot 检测结果

经 pgsA 多抗血清作用,再经羊抗兔 IgG/HRP 二抗作用,Western blot 分析,在预期位置出现明显的条带(约 69 kDa),与预计大小一致;而干酪乳杆菌对照未见此条带,含空质粒 pLA 对照可见其标签蛋白(约 43 kDa),未见目的条带(图 1),说明表达的蛋白可被 pgsA 多抗血清所识别。

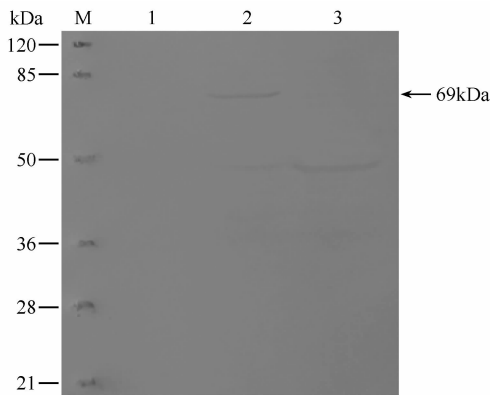


图1 重组蛋白以 pgsA 抗体作为一抗的 Western blot 检测结果

Fig.1 Western blot analysis of the recombinant protein using anti-pgsA. M. Prestained protein molecular weight marker; 1. *L. casei* as control at 6 h; 2. pLA-GFP/*L. casei* at 6 h; 3. pLA/*L. casei* at 6 h.

2.3 荧光显微技术

将含空质粒 pLA 的乳酸杆菌为对照,与含重组质粒的干酪乳杆菌共同进行免疫荧光实验,分别用电子显微镜的明视野和绿色荧光进行检测。结果表明,明视野下均可观察到乳酸杆菌形态。荧光显微镜下重组干酪乳杆菌可见明显的绿色荧光(图 2-A),含空质粒 pLA 乳杆菌未见绿色荧光(图 2-B)。由此表明,重组干酪乳杆菌表达了外源蛋白 pLA-GFP,同时也表明表达的重组蛋白存在于菌体表面。

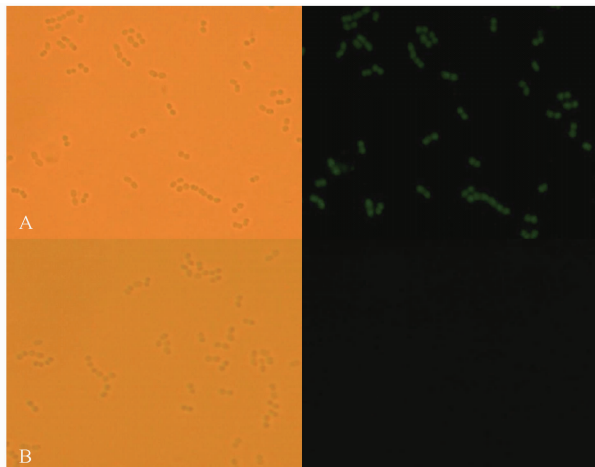


图2 荧光显微技术检测重组蛋白

Fig. 2 Fluorescence microscopy analysis of the recombinant protein. A and B: Representative immunofluorescence images of pLA-GFP/*L. casei* and pLA/*L. casei* (control). Bright-field images are shown on the left.

2.4 流式细胞检测分析

流式细胞计量术在数量上分析表面表达的融合

蛋白,分别将重组干酪乳杆菌 pLA-GFP 和含空质粒 pLA 的干酪乳杆菌进行流式细胞仪检测。结果可见重组干酪乳杆菌的荧光信号强度明显高于含有空质粒 pLA 的干酪乳杆菌阴性对照组(图 3),结果与免疫荧光检测结果相符,证明抗原蛋白大量表达在乳杆菌表面。

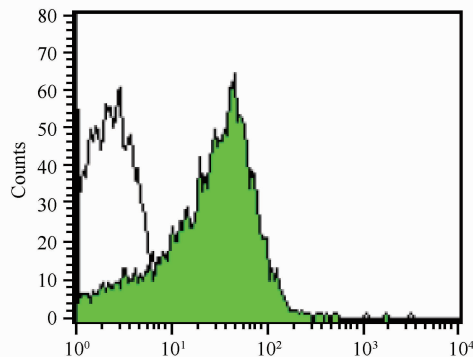


图3 流式细胞术检测重组蛋白

Fig. 3 Flow cytometry analysis of the recombinant protein. Fluorescence-activated cell sorter histograms of pLA/*L. casei*. (open) and of the recombinant pLA-GFP/*L. casei* cells (filled).

2.5 重组菌稳定性结果

经过 50 代的传代培养,发现无论是以 12 h 为一代或 24 h 为一代的重组菌,均可见绿色荧光,由此证明重组菌具有很好的稳定性。以传 50 代重组菌质粒作为模板,PCR 扩增出 720 bp 特异性条带,与 GFP 基因大小相符,而空质粒对照未见此条带。由此可见 GFP 基因稳定的存在于重组菌中。

2.6 重组干酪乳杆菌在小鼠体内定植检测

对小鼠口服免疫重组干酪乳杆菌,之后的不同时间收集肠道冲洗液,确定重组菌在小鼠肠道黏膜表面的黏附和定植能力。结果表明,小鼠在口服重组乳杆菌后,在肠道黏膜的不同部位,重组菌能够以一定的比例存活并附着在肠黏膜表面。平板菌落计数肠道黏膜的重组乳杆菌,在肠道各部位的菌数分布结果如表 1 所示。表 1 结果显示,1.5 h 后可在小鼠各肠道内检测到干酪乳杆菌(图 4),1 d 后肠道内菌数基本稳定在 10^7 这个数量级,5 d 后可以在肠道内定植,并在 6 d 可达到定植高峰期,重组菌数量有所增加。7 d 后,存留在小鼠肠道黏膜表面的重组干酪乳杆菌在十二指肠、空肠、回肠、盲肠中分别占第 1 天的 16.49%、25.08%、47.71%、41.03%。对照组中未观察到重组干酪乳杆菌。从图 5 可以看出,重组干酪乳杆菌在小鼠肠道内的定植能力回肠 > 盲肠 > 空肠 > 十二指肠。

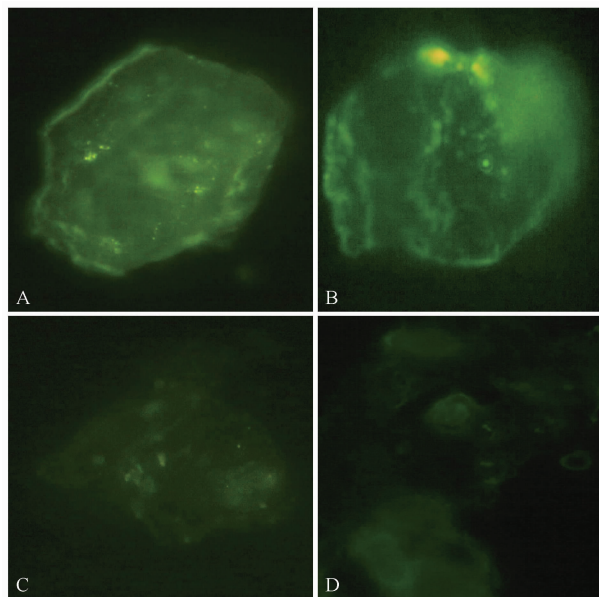


图4 接菌后 1.5 h 小鼠各肠道冲洗液中重组干酪乳杆菌荧光检测

Fig. 4 Intestinal tract of mice re-washing liquid *Lactobacillus casei* fluorescence detection in 1.5 hours after inoculation. 4A. Duodenum; 4B. Jejunum; 4C. Ileum; 4D. Caecum.

表 1 小鼠各肠道内分离的重组菌平均数

Table 1 The average number of isolated recombinant bacteria in the intestinal of BALB/c mice

Oral Times/h	Duodenum/ (CFU/mL)	Jejunum/ (CFU/mL)	Ileum/ (CFU/mL)	Caecum/ (CFU/mL)
1.5	6.12×10^8	5.35×10^8	9.72×10^7	7.36×10^7
3	4.28×10^8	3.94×10^8	7.35×10^7	6.81×10^7
12	2.13×10^8	2.53×10^8	6.96×10^7	6.47×10^7
24	5.76×10^7	6.02×10^7	6.35×10^7	6.19×10^7
72	4.73×10^7	4.32×10^7	4.57×10^7	4.61×10^7
120	3.16×10^7	3.87×10^7	4.13×10^7	4.18×10^7
144	3.25×10^7	3.99×10^7	4.41×10^7	4.39×10^7
168	0.95×10^7	1.51×10^7	3.03×10^7	2.54×10^7

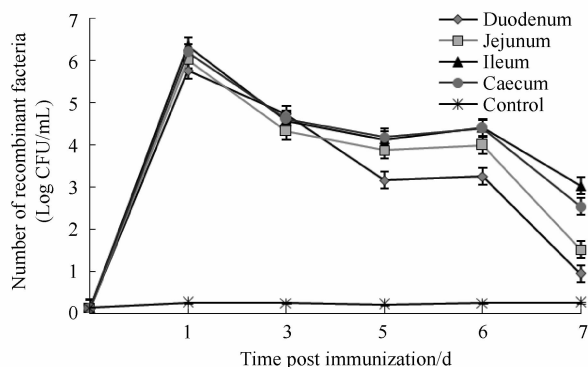


图5 小鼠肠道重组菌分布规律

Fig. 5 Disposition regularity of recombinant bacteria in the intestinal of BALB/c mice.

3 讨论

大部分病原体是由肠道、呼吸道和泌尿生殖道黏膜入侵机体的,因此黏膜免疫对机体防御病原体的入侵有着十分重要的作用^[13]。胃肠道黏膜免疫是机体免疫系统的一个重要组成部分,是动物胃肠道免疫防护的第一道屏障^[14]。黏膜免疫不仅激发产生大量的 sIgA,而且也产生 IgG;在黏膜组织中免疫球蛋白总量的 80% 是 IgA,特别是 sIgA,每天随分泌物排泄的 sIgA 可高达 10 g。黏膜抵抗感染的功能主要依赖于 sIgA 的免疫屏障作用。一方面能防止微生物的毒素等小分子的致病因子以扩散或渗透的方式穿越黏膜屏障,另一方面能阻止大分子的致病因子和上皮细胞的受体结合,从而封闭了它们黏附到黏膜上皮细胞、入侵机体的致病途径。同时口服免疫可避免传统疫苗注射免疫所产生的应激反应,可大范围应用而且相对经济。另外,口服免疫可产生群体免疫力,使整个动物群体对某种疾病具有抵抗力。然而口服疫苗在通过消化道时易受到消化液的降解,使免疫效果受到一定限制。为能够有效的诱导黏膜免疫应答,最成功的策略是使用活体微生物作为疫苗载体来运送抗原到达黏膜表面。乳酸菌的某些菌株如乳杆菌可避免消化液的作用,定植在肠道内,有效引起机体的免疫应答,提高对人、畜的免疫作用,是一种理想的食品级抗原呈递载体^[15],近年来已成为黏膜疫苗研究领域的热点。

针对以上特点,我们以食品级干酪乳杆菌作为抗原递送的活菌载体,利用绿色荧光蛋白作为报告基因,构建重组质粒 pLA-GFP,并将其转化到干酪乳杆菌中。经 Western blot 检测,构建的重组干酪乳杆菌表达系统能够有效表达外源目的蛋白。一般可溶性蛋白的免疫原性口服时较低,但当它与载体如细菌偶联时就会得到较大的提高,或者可以运用基因工程的手段使细菌产生此种抗原。抗原产生有 3 种途径:胞内产生、分泌到胞外和展示于菌体表面。因此我们采用了一种新型细胞表面表达系统,即枯草芽孢杆菌 pgsA 锚定蛋白,在此系统中,pgsA 与目的蛋白的 N 端相连,使融合蛋白高效的表达在细胞表面。

外源性乳酸菌能否在肠道黏膜黏附和增殖是其益生性所面临的关键问题。近些年已有报道称在不连续的摄入乳酸菌后,检验中发现人的结肠活组织乳酸菌有增长的趋势^[16-17]。关于乳酸菌(双歧杆菌、乳酸杆菌)对于消化道黏膜的黏附机制有不同

的说法,一是乳酸菌黏附的特异性与非特异性。宿主特异性学说认为,乳酸菌的黏附可能与宿主肠道上皮细胞上具有某种不同物质有关,黏附物质多少与黏附程度有关。而非特异性学说认为乳酸菌的黏附特性,并不具有宿主特异性,而是其自身的菌系特异性。不同菌株表面物质不同,因而与肠道上皮细胞黏附程度不同^[18]。二是乳酸菌黏附的表面分子与肠道黏膜上皮细胞黏附受体学说。黏附作用主要是乳酸菌体表面一些特定的分子如 LTA(脂磷壁酸)、PSC(多糖)和黏附素蛋白等识别宿主表面特异受体的结果。乳酸菌在肠道内被宿主表面的蛋白选择性的吸附,没有被吸附的菌体被流体带到不利于其生长的环境中去。邓一平等^[19]用猪胃黏膜糖蛋白与双歧杆菌及表面分子作用表明,双歧杆菌在体内定植和黏附与其表面分子 LTA(脂磷壁酸)、WPG(完整肽聚糖)有关,它们与胃黏膜糖蛋白黏附性强。Jeffrey 等^[20]研究表明,经蛋白酶处理后,对不同的乳酸菌株的黏附能力影响有差异,说明乳酸杆菌物种对人类肠道细胞的黏附机制与细胞表面不同的碳水化合物或蛋白因素都有关系。

由此可见,乳酸菌若要在消化道内黏附与定植,首先要具有高黏附性菌株,寻求不同动物不同肠道黏膜表面的不同黏附受体及其所适宜的黏附菌株;其次需要探讨不同的菌株参与黏附的表面分子机理,通过营养和物理化学途径创造适宜的环境,使其有利于菌株的黏附和定植^[21]。

虽然在实验室中抗原的表达水平可以精确测定,但目前有关重组基因工程乳杆菌在活体内表达和黏附定植情况少见报道。益生乳酸菌在宿主肠道细胞的黏附能力大多是体外研究,如黏附上皮细胞系(Caco-2, HT-29)或固定的小肠黏膜或细胞外胶原蛋白、纤连蛋白分子等。重要的是体外黏附能力很难推测体内胃肠道情况,体内胃肠道抵御系统、营养和空间的竞争、黏膜的脱落、肠道蠕动,内容物持续冲洗肠道上皮等等,都可能影响黏附和定植^[22]。目前很少有在动物体内研究乳酸菌黏附定植,重组乳酸菌的这方面研究更鲜为报道。

本实验选择干酪乳杆菌作为 GFP 的表达菌株,我们发现口服之后在肠黏膜的各个肠段分布是不均匀的,1.5 h 后即在各肠道内发现重组菌,但由于其未消化完全,在回肠和盲肠中没有十二指肠和空肠中的数量多。随着时间的增加,1 d 后,菌体数量基本趋于平稳期,消化代谢掉部分菌体,此时肠道中的菌体逐渐定植在肠道内。5 d 后,发现重组乳杆菌

在小鼠体内定植,在第 6 天时,菌体繁殖而导致数量有所增加,其中回肠中定植的数量较多。在第 7 天时,存留在肠道黏膜表面的重组乳杆菌数量在十二指肠、空肠、回肠和盲肠中分别占 1 d 的 16.49%、25.08%、47.71%、41.03%。因此说明重组菌主要在小鼠的下游肠道内定植,在上游肠道内停留时间较短,数量较少。本实验的定植率与唐丽杰^[23]等所报道的相一致,但定植量相对比较多。这可能与所用菌株及实验动物种类等的不同而有所差异。李平兰^[24]等研究表明,同种不同株的乳酸菌黏附能力有差异,双歧杆菌的黏附能力最高,平均在 10.5 个菌/细胞;乳杆菌的黏附能力较低,平均在 3.2 个菌/细胞;球菌的黏附能力很低,平均在 2.3 个菌/细胞。曾有人研究很多不同种乳酸菌在肠道内的存活率问题,包括保加利亚乳酸菌和噬热链球菌^[25-26]。Marteau^[25]认为在上消化道内菌体存活率很低。然而,细菌的死亡是否是由于细胞的快速溶解现在还是未知。由此可见,本试验所研究的重组干酪乳杆菌不仅可以避免消化液的作用顺利通过胃肠环境,还可以在鼠肠道内存活并定植。

另外,通过荧光观察,可以清楚的看见小鼠肠道冲洗液中重组菌的存在,这是由于乳酸杆菌的黏附性,使其可以定植到小鼠肠道内。乳酸杆菌通过一些黏附蛋白与肠黏膜细胞紧密结合,在肠黏膜表面定植占位,形成生理屏障,维持肠道正常菌群平衡,抵御外来病原菌的入侵。口服 3.5 h 后,在小鼠的粪便中可检测到重组菌,说明其中少数重组菌在 3.5 h 后即可代谢排出,其余大部分菌体仍存留于肠道内。

本实验成功在干酪乳杆菌中稳定表达了 GFP 基因,并利用枯草芽孢杆菌的跨膜蛋白作为锚定基,使融合蛋白高效的表达在细胞表面。通过口服该重组菌,初步了解其在小鼠体内的分布及存活稳定性,为以乳酸菌作为口服疫苗活载体及口服免疫程序方面的研究奠定了基础,提供具有一定参考价值的实验数据。

参考文献

- [1] Elmer GW, Surawicz CM, McFarland LV. Biotherapeutic agents. A neglected modality for the treatment and prevention of selected intestinal and vaginal infection. *Journal of the American Medical Association*, 1996, 275: 870-876.
- [2] Oddone GM, Mills DA, Block DE. Incorporation of nisl-mediated nisin immunity improves vector-based nisin-controlled gene expression in lactic acid bacteria. *Plasmid*,

- 2009(3):151-158.
- [3] Wells JM, Mercenier A. Mucosal delivery of therapeutic and prophylactic molecules using lactic acid bacteria. *Nature Reviews Microbiology*, 2008, 6: 349-362.
- [4] Kleerebezemab M, Hols P, Hugenholtz J. Lactic acid bacteria as a cell factory: rerouting of carbon metabolism in *Lactococcus lactis* by metabolic engineering. *Enzyme and Microbial Technology*, 2000, 26(9-10): 840-848.
- [5] Scheppeler L, Vogel M, Zuercher AW, Zuercher M, Germond JE, Miescher SM, Stadler BM. Recombinant *Lactobacillus johnsonii* as a Mucosal Vaccine Delivery Vehicle. *Vaccine*, 2002, 20(23-24): 2913-2920.
- [6] Bermúdez-Humarán LG. *Lactococcus lactis* as a live vector for mucosal delivery of therapeutic proteins. *Human Vaccines*, 2009, 5(4): 264-267.
- [7] Mercenier A, Muller-Alouf H, Grangette C. Lactic acid bacteria as live vaccines. *Current Issues in Molecular Biology*, 2000, 2(1): 17-25.
- [8] Ishii M, Kunimura JS, Penna TCV, Cholewa O. Study on the thermal stability of green fluorescent protein (GFP) in glucose parenteral formulations. *International journal of Pharmaceutics*, 2007, 7(1-2): 109-117.
- [9] Ashiuchi M, Misono H. Biochemistry and molecular genetics of poly- γ -glutamate synthesis. *Applied and Environmental Microbiology*, 2002(1): 59:9-14.
- [10] Narita J, Okano K, Kitao T, Ishida S, Sewaki T, Sung MH, Fukuda H, Kondo A. Display of α -amylase on the surface of *Lactobacillus casei* cells by use of the pgsA anchor protein, and production of lactic acid from starch. *Applied and Environmental Microbiology*, 2006, 72(1): 269-275.
- [11] Aymerich MT, Hugas M, Garriga M, Vogel RF, Monfort JM. Electrotransformation of meat lactobacilli. Effect of several parameters on their efficiency of transformation. *Journal of Applied Bacteriology*, 1995, 75(4): 320-325.
- [12] O'Sullivan DJ, Klaenhammer TR. Rapid Mini-Prep Isolation of High-Quality Plasmid DNA from *Lactococcus* and *Lactobacillus* spp. *Applied and Environmental Microbiology*, 1993, 59(8): 2730-2733.
- [13] Bailey M, Haverson K. The postnatal development of the mucosal immune system and mucosal tolerance in domestic animals. *Veterinary Research*, 2006, 37(3): 443-453.
- [14] Macdonald TT, Monteleone G. Immunity, inflammation, and allergy in the gut. *Science*, 2005, 307: 1920-1925.
- [15] Mannam P, Jones KF, Geller BL. Mucosal vaccine made from live, recombinant *Lactococcus lactis* protects mice against pharyngeal infection with *Streptococcus pyogenes*. *Infection and Immunity*, 2004, 72(6): 3444-3450.
- [16] Alander M, Satokari R, Korpela R, Saxelin M, Vilpponen-Salmela T, Mattila-Sandholm T, Wright A. Persistence of colonization of human colonic mucosa by a probiotic strain, *Lactobacillus rhamnosus* GG, after oral consumption. *Applied and Environmental Microbiology*, 1999, 65(1): 351-354.
- [17] Wright A, Vilpponen-Salmela T, Llopis MP, Collins K, Kiely B, Shanahan F, Dunne C. The Survival and colonic adhesion of *Bifidobacterium infantis* in patients with ulcerative colitis. *International Dairy Journal*, 2002, 12(2-3): 197-200.
- [18] Rinhinen M, Westermarck E, Salminen S, Ouwehand AC. Absence of host specificity for in vitro adhesion of probiotic lactic acid bacteria to intestinal mucus. *Veterinary Microbiology*, 2003, 97(1-2): 55-61.
- [19] 邓一平, 王跃, 胡宏. 双歧杆菌及表面分子对胃黏膜糖蛋白的黏附作用. 中国微生态学杂志 (*Chinese Journal of Microecology*), 2002, 12(4): 193-195.
- [20] Jeffrey G, Klaenhammer TR. Factors involved in adherence of lactobacilli to human CaCo-2 cells. *Applied and Environmental Microbiology*, 1994(60): 4487-4494.
- [21] 林雪彦, 牛钟相. 动物消化道乳酸菌黏附机制及影响因素研究进展. 家畜生态学报 (*Acta Ecologiae Animalis Domastici*), 2006, 27(3): 109-112.
- [22] Lebeer S, Vanderleyden J, De Keersmaecker SCJ. Genes and Molecules of Lactobacilli Supporting Probiotic Action. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2008, 72(4): 728-764.
- [23] 唐丽杰, 徐毅刚, 葛俊伟, 任晓峰, 汪淼, 李一经. 乳酸乳球菌 NZ9000 在小鼠体内的定植研究. 中国乳品工业 (*China Dairy Industry*), 2001, 35(7): 11-12.
- [24] 李平兰, 张箴, 郑海涛. 乳酸菌及其生物工程研究新进展. 中国乳品工业 (*China Dairy Industry*), 2000, 28(4): 50-53.
- [25] Marteau P, Pochart P, Bouhnik Y, and Rambaud JC. The fate and effects of transiting, nonpathogenic microorganisms in the human intestine. *World review of nutrition and dietetics*, 1993, 74: 1-21.
- [26] Pochart P, Marteau P, Bouhnik Y, Goderel I, Bourlioux P, Rambaud JC. Survival of bifidobacteria ingested via fermented milk during their passage through the human small intestine; an in vivo study using intestinal perfusion. *American Journal of Clinical Nutrition*, 1992, 55: 78-80.

Colonization and distribution of recombinant *Lactobacillus casei* with Green fluorescent protein in mice intestine

Ning Zhang¹, Xilin Hou², Liyun Yu^{1,2*}, Guihua Wang¹, Zhigang Zhao², Yu Gao¹

(¹College of Life Science and Technology, Heilongjiang BaYi Agricultural University, Daqing 163319, China)

(²College of Animal Science and Technology, Heilongjiang BaYi Agricultural University, Daqing 163319, China)

Abstract: [**Objective**] We studied the colonization ability and the distribution of the recombinant *Lactobacillus casei* in mouse intestine. [**Methods**] We used Green fluorescent protein (GFP) gene as reporter in constructing the recombinant plasmid pLA-GFP, which was electrotransformed into the host cells *L. casei*. Six-week-old female SPF BALB/c mice were orally fed with the recombinant *L. casei* of approximately 10⁹. Groups of at least three mice per condition were killed at 1.5 h, 3 h, 12 h, 1 d, 3 d, 5 d, 6 d, 7 d, and its duodenum, jejunum, ileum, caecum intestinal tract rinse solution was sampled separately. The recombinant bacteria in intestinal tracts were examined by plate culture count. [**Results**] The molecular weight of the recombinant protein was about 69 kDa in the result of western blot. The GFP fusion protein on the cell surface was confirmed by fluorescence microscopy and flow cytometric analysis. A portion of the recombinant *L. casei* was able to adhere and colonize in different regions of murine intestinal tract, and the planting peak was appeared on day 6 postinoculation. The ratio of the seventh day to the first day of the recombinant *L. casei* adhered to the intestinal mucosa in the duodenum, jejunum, ileum, and caecum was 16.49%, 25.08%, 47.71%, and 41.03%, respectively. [**Conclusion**] The recombinant *L. casei* stably expressing GFP could colonize mouse intestine. The field planting rule was ileum > caecum > jejunum > duodenum. Our findings indicated that *L. casei* used as a deliver vector in oral vaccine is feasible, but the impact on intestinal immune mechanism in mice is needed more research.

Keywords: *Lactobacillus casei*; Green fluorescent protein; Intestinal tract; Colonization

(本文责编:王晋芳)

Supported by the Science and Technology Project for Returned by National Ministry of Personnel

* Corresponding author. Tel: +86-459-6819292; Fax: +86-459-6819290; E-mail: xly_hou@yahoo.com.cn

Received: 5 March 2010/Revised: 14 April 2010

《微生物学报》综述文章投稿要求

为了避免篇幅庞大、罗列文献、内容空泛、缺乏观点,力求内容更加新颖、并更具可读性,本刊提出以下几点要求,欢迎大家根据要求踊跃投稿。

1. 本刊主要刊登微型综述(mini review),来稿字数最好控制在5000字以内(不包括参考文献)。
2. 综述的选题要有新意,对读者及同行确有一定的启发作用和参考价值。
3. 参考文献应控制在40篇以内,近3年发表的文献不少于10篇。
4. 应结合文献扼要评述国内外学者在本领域的研究进展,不要泛泛罗列文献,只述不评。
5. 应结合自己的研究工作,就该研究领域存在的问题和解决的途径提出自己的观点。
6. 欢迎投送"能够反映国际研究热点、对学科发展有指导意义"的述评类文章。