

乳酸乳球菌 AL2 基因文库的构建及乳链菌肽生物合成基因簇的筛选*

陈秀珠 胡海菁 贾士芳 陈美玲 还连栋**

(中国科学院微生物研究所微生物资源前期开发国家重点实验室 北京 100080)

摘 要 用本实验室获得的乳链菌肽高产菌株乳酸乳球菌 AL2 总 DNA 为供体,以 λ EMBL3 为载体,构建了该菌株的基因文库,共获得 3900 多个噬斑。通过 Southern 杂交、PCR 扩增及 DNA 序列测定,证实从该文库中筛选到一个含有完整乳链菌肽生物合成基因簇的重组噬菌体 λ HJ-3。

关键词 乳酸乳球菌,基因文库,乳链菌肽,生物合成基因簇

中图分类号:Q785 文献标识码:A 文章编号:0001-6209(2000)05-0465-69

乳链菌肽(Nisin)是由某些乳酸乳球菌(*Lactococcus lactis*)产生的小肽,对许多革兰氏阳性菌有强烈抑制作用,是一种广泛应用的高效、无毒的天然食品防腐剂。成熟的乳链菌肽分子含有 34 个氨基酸残基,分子量约 3510Da。在生物合成过程中,它首先以前体的形式在核糖体上合成,随后通过翻译后酶修饰作用在特定的位点脱水、形成硫醚桥,产生羊毛硫氨酸和 β -甲基羊毛硫氨酸等稀有氨基酸,并切除前导肽,赋予乳链菌肽分子以杀菌活性和热稳定性。由于乳链菌肽的生物学功能及其独特的结构,加之它是一个含 34 个氨基酸残基的小肽,因此,对乳链菌肽生物合成有关基因的克隆与表达不仅对研究乳链菌肽的分子结构和功能,而且对进一步研究乳链菌肽的翻译后修饰及建立蛋白质工程研究的模式系统都有重要意义。本工作构建了乳链菌肽高产菌株 *L. lactis* AL2 的基因文库,从中筛选到含有完整乳链菌肽生物合成基因的基因簇。为研究乳链菌肽的生物合成及乳链菌肽的分子结构与功能奠定了基础。

1 材料和方法

1.1 菌株与质粒

Lactococcus lactis AL2、*Escherichia coli* JM109、pMG503 由本实验室保存。*E. coli* LE392 购自 Promega 公司。pMOSBlue T-vector 购自 Amershan 公司。

1.2 工具酶与试剂

限制性内切酶、T4 DNA 连接酶、EMBL3 *Bam*HI Arms Cloning System Plus Packa-

* 国家自然科学基金资助项目(3957008),国家“九五”科技攻关项目(96-C03-01-05)

** 通讯联系人

本文作者还有吴晓勇、张成康(北京大学生命科学学院细胞生物学及遗传学系 1992 级本科生)

作者简介:陈秀珠(1944-),女,浙江宁波人,副研究员,主要从事乳酸菌分子遗传学研究

收稿日期:1999-07-05,修回日期:1999-11-10

gene System 购自 Promega 公司。DIG DNA Labeling and Detection Kit 购自 Boehringer Mannheim 公司。Taq 酶购自华美公司。

1.3 DNA 的提取

1.3.1 乳酸乳球菌总 DNA 的提取按文献 [1]。

1.3.2 质粒 DNA 及 λ 噬菌体 DNA 的提取按文献 [2]。

1.4 *nisG* 基因的 PCR 扩增

1.4.1 引物设计 根据已发表的 *nisG* DNA 序列^[3]设计如下两条引物:5'端引物(P3):5'-TGGGAATTCCATAGTTGTAACG-3'并引入 *EcoRI* 酶切位点 3'端引物(P4):5'-ATTAAGCTTAGAGTAAGAAGCTG-3'并引入 *HindIII* 酶切位点。

1.4.2 PCR 扩增:用 *L. lactis* AL2 总 DNA 为模板。PCR 反应条件:94℃ 变性 1min, 45℃ 退火 1min, 72℃ 延伸 1min, 反应进行 30 个循环。

1.5 基因文库的构建

用 *L. lactis* AL2 总 DNA 为供体 λ EMBL3 为载体, *E. coli* LE392 为转染受体菌。具体操作按 Promega 公司 Genomic Cloning Manual 进行。

1.6 噬斑原位杂交、点杂交和 Southern 杂交

按文献 [2] 和 Boehringer Mannheim 公司的说明书进行。

1.7 DNA 序列测定

PCR 扩增产物连接到 pMOSBlue T-vector 上, 转化 *E. coli* JM109, 依据 Sanger 双脱氧终止法测定 DNA 序列。使用 ABI 公司 373A 自动序列分析仪, 测序反应试剂盒购自 ABI 公司, 测序全过程按 ABI 公司操作说明书进行。

2 结果和讨论

2.1 基因文库的构建

以 λ EMBL3 为载体, *Sau3A1* 部分酶切本实验室得到的乳链菌肽高产菌株乳酸乳球菌 AL2 总 DNA^[4], 回收 15~23kb 大小的 DNA 片段, 与 EMBL3 双臂连接, 用 λ 包装抽提物(packagene)体外包装, 转染 *E. coli* LE392, 构建 *L. lactis* AL2 基因文库, 共获得 3900 多个噬斑。随机选取 3 个噬斑提取 DNA, 证实插入片段在 16~23kb 之间。乳酸乳球菌染色体基因组大小为 2300~2600kb, 乳链菌肽生物合成基因簇共有 11 个基因, 全长约 14kb, EMBL3 载体包装外源片段大小为 9~23kb, 按照 Clarke-Carbon 公式 $N = \frac{\ln(1-p)}{\ln(1-f)}$, 要使基因文库中所含乳链菌肽生物合成基因簇的概率(P)达到 99%, 则需重组噬菌体数(N)900 个, 而本实验获得的重组噬菌体数远远超过 99% 的理论值要求, 使乳链菌肽生物合成基因簇在该文库中出现的概率大于 99.99%。

2.2 乳链菌肽生物合成基因簇的筛选

2.2.1 *nisA*、*nisG* DNA 探针的制备 根据文献报道, 乳链菌肽生物合成基因簇的两端分别为编码乳链菌肽前体蛋白的 *nisA/nisZ* 及与乳链菌肽免疫有关的 *nisG* 基因^[3,5]。我们以这个基因簇两端的 DNA 片段作为探针与已得到的噬斑进行杂交, 筛选含有完整乳链菌肽生物合成基因簇的重组噬菌体。© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

本实验室构建的质粒 pMG503 含有来自乳链菌肽产生菌 *L. lactis* ATCC11454 的 *nisA*^[6]。将 *nisA* 基因用 *Eco*RI、*Hind*III 双酶切取下后,以非放射性同位素地高辛标记制备探针。同时,按本文材料和方法所述另外设计一对引物(P3、P4),用 *L. lactis* AL2 总 DNA 为模板,PCR 扩增 *nisG* 基因片段。将 PCR 产物连接到 pMOSBlue T-vector 上,经 *Eco*RI、*Hind*III 酶切取下外源片段,地高辛标记制备探针,用于筛选含有完整乳链菌肽生物合成基因簇的重组噬菌体。

2.2.2 乳链菌肽生物合成基因簇的筛选 首先以部分 *nisG* DNA 片段为探针,用噬斑原位杂交方法对构建的基因文库进行筛选,得到 21 个阳性噬斑(图 1)。再以 *nisA* DNA 片段为探针,对这 21 个噬菌体 DNA 进行点杂交,最后得到一个对两个探针杂交都呈阳性的重组噬菌体 λHJ-3(图 2)。

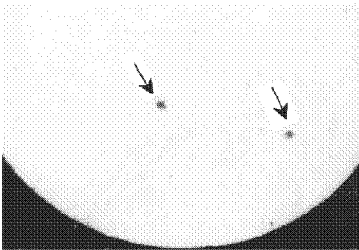


图 1 噬斑的原位杂交

Fig. 1 In situ hybridization of λ plaques

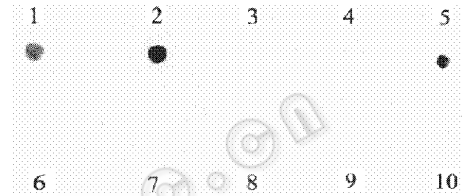


图 2 点杂交结果

Fig. 2 Results of dot hybridization

1. *L. lactis* AL2 total DNA ; 2. *nisA* DNA from pMG503 ; 3-9. Positive plaques identified by hybridization with *nisG* probe ; 10. λ DNA.

2.3 含有完整乳链菌肽生物合成基因簇的验证

2.3.1 Southern 杂交 提取杂交呈阳性的重组噬菌体 λ HJ-3 DNA, *Sal* I 酶切,琼脂糖凝胶电泳结果显示有 4 条带。其中 20kb 和 9kb 为 λ EMBL3 的双臂,14kb 和 3.5kb 为外源插入片段(图 3A、3C)。分别用 *nisA* DNA 片段和 *nisG* DNA 片段作探针进行 Southern 杂交,结果 *nisA* DNA 片段与 14kb 片段(图 3B),*nisG* DNA 片段与 3.5kb DNA 片段(图 3D)有清晰可见的杂交信号,而与 λ DNA/*Hind*III 无杂交信号,说明这两个片段分别含有 *nisA/nisZ* 和 *nisG* 基因,并且这两个片段共有 17.5kb,超过了编码完整的乳链菌肽生物合成基因簇所需的长度。

2.3.2 PCR 扩增 为了进一步证明 Southern 杂交呈阳性的重组噬菌体 λ HJ-3 的确含有 *nisA/nisZ* 和 *nisG* 基因,我们以 λ HJ-3 DNA 为模板,用 PCR 扩增 *nisA* 的引物 P1 和 P2^[6]及 PCR 扩增 *nisG* 的引物 P3 和 P4 为引物,分别进行 PCR 扩增,结果获得预期大小的 330bp 和 850bp 的 DNA 片段(图 3A、3C)。这两个扩增片段分别与 *nisA* 和 *nisG* 探针 Southern 杂交,结果都呈阳性(图 3B、3D)。将 *nisG* 扩增片段进行 DNA 序列测定(测定部分序列),结果与文献 3 报道的 DNA 序列基本一致(图 4)。图 4 序列与文献 3 序列有 3 个核苷酸差异,其中 2 个在 *nisG* 编码区,并造成一个氨基酸残基差异,使谷氨酰胺变为组氨酸。这些差异是由于不同菌株还是实验误差造成的,有待于进一步验证。

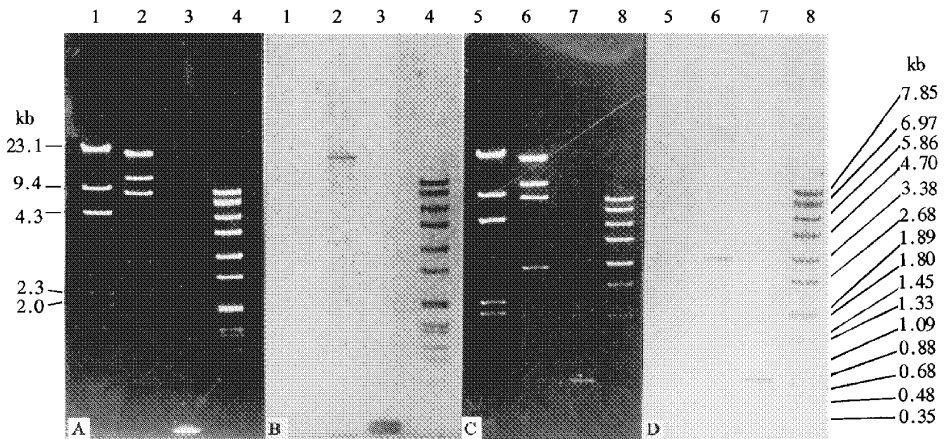


图3 Southern 杂交

Fig.3 Southern hybridization patterns

A, C. Agarose gel stained by EB ; B, D. Hybridization patterns.

1, 5. λ DNA/*Hind*III ; 2, 6. Recombinant λ DNA digested with *Sal*I ;3. PCR amplification product of *nisA/nisZ* gene ; 4, 8. SPPI DNA/*Eco*RI ; 7. PCR amplification product of *nisG* gene.

```

1  AAAAAAAGTAGCAGAATTTGGTTATCAAAGCTAATAGTAGTGGATTTCCTTTTGTCTTT
   K K S S R I W L S K L I V V D F L L F F
61  CCATCAGCAATGATCTGGATAATTACGGGAGTTTCACAGGCAGTAGGGCACCAAGGAATG
   P S A M I W I I T G V S Q A V G H Q G M
121 ATGATCGCAACAGCTAGCTGGTTGATGGCAATTTTTCTTAATCATTTTCATCTTTTATTG
   M I A T A S W L M A I F L N H F H L L L
181 ACCTTTTATAATCAATCGAGGAGGGAGCATGATTATCGCGATTATTGAAATATTACTCATT
   T F I I N R G G S M I I A I I E I L L I
241 ATTTTTGCCAGTAATAAAGTTTTATTAGCAGCTTATTGGTGTCCtATTGCTTTACCTGTT
   I F A S N K V L L A A Y W C P I A L P V
301 AATTTTATGATAACTGGGCGGTGTGCTTATCTGATAGCTGCCGTAGGTTGGATTGTTTTTA
   N F M I T G R C A Y L I A A V G W I V L
361 TCCACAATAATCTTGTAGCATTATCTAAAAAAAAGATTAGATAAAGTATTTTTTCTTAT
   S T I I L V A L S K K K I R *
421 GGTAATTCGACCTAATATGTTTTTGCTATTTATCTCTTATTTCTGTCTATAGTAATTTAT
481 TCAAAGTACCTTAGACTCATAAGTTTGAATAAAATTTCTtATCAATATG

```

图4 *nisG* PCR 扩增产物的部分核苷酸序列Fig.4 The partial nucleotide sequence of PCR amplification product of *nisG* gene

上述工作说明我们已构建了乳链菌肽高产菌株 *L. lactis* AL2 的基因文库,并从文库中筛选到含有完整的乳链菌肽生物合成基因簇的重组噬菌体(λ HJ-3)。国外已有的工作只是克隆与乳链菌肽生物合成有关的部分基因^[3,7],而分离完整的乳链菌肽生物合成基因簇尚未见报道,本工作为全局性研究乳链菌肽的生物合成及其遗传调控提供了素材。对乳链菌肽生物合成有关基因的克隆和表达研究正在进行中。

致谢 薛禹谷先生对本工作给予热情关心和指导 特此致谢。

参 考 文 献

- [1] Lewington J , Greenaway S D , Spillane B J. *Lett Appl Microbiol* , 1987 **5** :51~53.
- [2] Sambrook J , Fritsch E F , Maniatis T. *Molecular Cloning : A Laboratory Manual*. 2nd ed. New York : Cold Spring Harbor Laboratory Press , 1989.
- [3] Siegers K , Entian K-D. *Appl Environ Microbiol* , 1995 **61** :1082~1089.
- [4] 还连栋 陶 勇 何 松 等 . 微生物学报 , 1995 **35** :364~367.
- [5] Dodd H M , Horn N , Chan W C , *et al.* *Microbiology* , 1996 **142** :2385~2392.
- [6] 还连栋 陶 勇 田宇清 等 . 生物工程学报 , 1995 **11** :389~391.
- [7] Kuipers O P , Beerthuyzen M M , Siezen R J , *et al.* *Eur J Biochem* , 1993 **216** :281~291.

CONSTRUCTION OF GENOMIC LIBRARY FROM *L. lactis* AL2 AND ISOTATION OF ENTIRE NISIN BIOSYNTHESIS GENE CLUSTER*

Chen Xiuzhu Hu Haijing Jia Shifang Chen Meiling Huan Liandong**

(State Key laboratory of Microbial Resources , Institute of Microbiology , Chinese Academy of Sciences , Beijing 100080)

Abstract : A total DNA library of *Lactococcus lactis* AL2 with high yield of nisin was successfully constructed using lambda EMBL3 as vector. 3900 plaques were obtained , which is much more than the required number of recombinants that represents an entire *L. lactis* genome according to Clarke and Carbon formula. Southern hybridization , PCR amplification and DNA sequencing revealed that the entire nisin biosynthesis gene cluster was isolated from the constructed library.

Key words : *L. lactis* , Genomic library , Nisin , Biosynthesis gene cluster

* Project supported by the National Natural Science Foundation of China(39570008) and Chinese National Programs for Science and Technology Development(96-C03-01-05).

**Corresponding author

《微生物学报》第七届编辑委员会名单

主 编 李季伦

副主编 陆德如 朱关福 李阜棣 王敖全 谭华荣

编 委 王修垣 邓子新 田 波 刘志恒 朱庆裴 孙志浩 李焕娄

陈世平 陈永青 杨苏声 周培瑾 范云六 范孝用 钱新民

钱世钧 诸葛健 徐怀恕 翟中和

顾 问 张树政