

一个含有乳链菌肽抗性基因的乳酸乳球菌 质粒 pTS50 的鉴定*

汤 莎 陈秀珠 杨 巍 陈美玲 还连栋**

(中国科学院微生物研究所 北京 100080)

摘 要:在添加乳链菌肽、乳糖及溴甲酚紫的 M17 选择培养基上,从 197 个新鲜牛奶样品中筛选到 3 株乳链菌肽抗性菌株,PCR 扩增证实它们都含有乳链菌肽抗性基因。菌种生理生化特性鉴定及特异性 16S rDNA PCR 扩增产物的序列测定结果表明这 3 株菌都属于乳酸乳球菌乳酸亚种。质粒转化实验发现乳酸乳球菌乳酸亚种 TS 1640 中的乳链菌肽抗性基因位于一个约 47kb 的大质粒 pTS50 上。Bam HI、Eco RI、Hind III、Nco I、Pst I 酶切分析和 Southern 杂交,进一步将乳链菌肽抗性基因定位于 pTS50 的一个约 1.9kb Eco RI 酶切片段中。

关键词: 乳酸乳球菌, 乳链菌肽抗性, 质粒, 酶切分析, Southern 杂交

中图分类号: Q785 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2001) 05-0536-06

近年来,构建乳酸菌食品级载体-受体系统,探索一些有价值的基因在乳酸菌中的克隆和表达已成为乳酸菌分子遗传学研究的热点^[1]。利用蔗糖发酵基因^[2]、乳糖发酵基因^[3]、tRNA 抑制基因^[4]作为选择性标记已成功构建了乳酸乳球菌食品级载体,但这些载体必需要有相应基因的缺陷型菌株作为克隆受体,使用中具有一定的局限性。美国和澳大利亚的研究者试图用乳链菌肽(Nisin)抗性作为选择性标记构建食品级载体^[5,6]。乳链菌肽是某些乳酸乳球菌产生的一个小肽,是广泛应用的一种高效、无毒的天然食品防腐剂,因而可用作食品级载体的选择性标记。本文报道含有乳链菌肽抗性基因的乳酸乳球菌的筛选及乳链菌肽抗性基因在乳酸乳球菌乳酸亚种 TS1640 中一个大质粒 pTS50 上的初步定位,为用乳链菌肽抗性作为选择性标记构建乳酸乳球菌食品级载体奠定了基础。

1 材料和方法

1.1 菌种与质粒

乳酸乳球菌(*Lactococcus lactis*) MG1363、LM0230、大肠杆菌(*E. coli*) JM109、黄色微球菌(*Micrococcus flavus*) NCIB8166 由本实验室保存。pGEM-T vector 购自 Promega 公司。乳酸乳球菌乳酸亚种(*Lactococcus lactis* subsp. *lactis*) TS1622、TS1640 和 TS1682 由本工作筛选获得。

1.2 培养基、工具酶和化学试剂

乳酸乳球菌用 M17 培养基^[7], 30℃ 培养;大肠杆菌用 LB 培养基^[8], 37℃ 培养;黄色微球菌用 S1 培养基, 30℃ 培养。

* 中国科学院重点研究项目(KY95-J1-331)

** 通讯作者(微生物资源前期开发国家重点实验室)

作者简介:汤 莎(1976-),女,湖北武汉人,中国科学院微生物研究所硕士生,主要从事乳酸菌分子遗传学研究。

收稿日期:2000-11-15,修回日期:2001-02-12

限制性内切酶为华美生物工程公司及 TaKaRa 生物工程公司产品。*Taq* 酶购自 Promega 公司。DIG Labeling and Detection Kit 及 Agarose Gel DNA Extraction Kit 购自 Roche 公司。

1.3 乳链菌肽抗性菌株的分离

将采自北京市通州区渠头牛奶场的 197 个新鲜牛奶样品以 10% 接种量分别接种于含 20IU/mL 乳链菌肽的 M17 液体培养基中,30℃ 静置培养 16h,取 30μL 涂布在添加 0.004% 溴甲酚紫、0.5% 乳糖和 300IU/mL 乳链菌肽的 M17 平板上,30℃ 培养 24h。挑取使周围培养基颜色由紫变黄的菌落,再次在上述选择培养基上复筛,划线分离单菌落。对复筛获得的菌株进行革兰氏染色,镜检,选出球状或链球状的革兰氏阳性菌作进一步鉴定。

1.4 菌种鉴定

参见文献[9]。鉴定项目有温度试验、NaCl 浓度试验、产气试验、接触酶试验、淀粉水解酶试验、精氨酸水解酶试验、不同碳源产酸试验(半乳糖,乳糖,麦芽糖,蜜二糖,松三糖,棉子糖,核糖)、16S rDNA 的 PCR 扩增和 DNA 序列分析。

1.5 DNA 操作

乳酸乳球菌总 DNA 提取按文献[10];乳酸乳球菌质粒 DNA 提取按文献[11];大肠杆菌质粒 DNA 提取按文献[8]。质粒 DNA 纯化按 Roche 公司的说明书进行。DNA 酶切和连接反应条件按厂商产品说明书进行。乳酸乳球菌质粒 DNA 的转化按文献[12]。大肠杆菌质粒 DNA 的转化按文献[8]进行。

1.6 PCR 扩增

1.6.1 乳链菌肽抗性基因(*nsr*)部分序列(400bp)的 PCR 扩增;根据已发表的 *nsr* 开放阅读框中的一段保守序列^[6],设计如下两条引物:5'端引物(P1):5'-CCTCAGAAAGTATGT-TCGAGT-3';3'端引物(P2):5'-ATAAGTCTCCACCTCTATTTC-3',引物由博亚生物工程公司合成。PCR 扩增用 *L. lactis* TS 1622, *L. lactis* TS1640, *L. lactis* TS1682 总 DNA 为模板,同时以 *L. lactis* LM0230 总 DNA 为阴性对照。反应条件:95℃ 预变性 3min,94℃ 变性 1min,52℃ 退火 1min,72℃ 延伸 50s,反应进行 30 个循环。

1.6.2 乳酸乳球菌特异性 16S rDNA 的 PCR 扩增;根据乳酸乳球菌 16S rDNA 的保守序列^[13,14],设计一对引物,5'端引物(P3):5'-GCCGCGTGCCTAATACATGC-3';3'端引物(P4):5'-TTCCCCACGCGTTACTCACC-3',由博亚生物工程公司合成。PCR 扩增分别以 *L. lactis* TS 1622、*L. lactis* TS1640、*L. lactis* TS1682 总 DNA 为模板,同时用 *L. lactis* MG1363 总 DNA 为阳性对照。反应条件:95℃ 预变性 3min,93℃ 变性 1min,54℃ 退火 1min,72℃ 延伸 40s,反应进行 30 个循环。

1.6.3 含有转录终止子的乳链菌肽抗性基因部分序列(900bp)的 PCR 扩增:为了制备 Southern 杂交探针,根据 Liu 等已发表的序列^[6],设计引物 P5:5'-GTGTTAACTAG-CAAAAAAGACTTAC-3'。P5 由上海 Sangon 公司合成。用 P1 作为 5'端引物,P5 作为 3'端引物,以 *L. lactis* MG1363/pTS50 总 DNA 为模板,PCR 扩增包括有转录终止子的乳链菌肽抗性基因部分序列。反应条件:95℃ 预变性 3min,94℃ 变性 1min,52℃ 退火 1min,72℃ 延伸 1.5min,反应进行 30 个循环。

1.7 DNA 序列测定

将 PCR 产物连接到 pGEM-T vector 上,转化 *E. coli* JM109,在含 100 µg/mL 氨苄青霉素的 LB 平板上挑取白色菌落,抽提质粒 DNA,经电泳和酶切鉴定,由 TaKaRa 生物工程公司测定重组质粒中 PCR 扩增片段的 DNA 序列。

1.8 Southern 杂交

按文献[8]和 Roche 公司说明书进行。

2 结果和讨论

2.1 乳链菌肽抗性菌株的分离和菌种鉴定

2.1.1 乳链菌肽抗性菌株的分离:按本文材料与方法 1.3 所述,在添加溴甲酚紫、乳链菌肽和乳糖的 M17 选择培养上筛选到 10 株使周围培养基颜色变黄的菌落,经复筛、镜检、革兰氏染色,挑取球状或链球状的革兰氏阳性菌进行发酵,检测发酵液对黄色微球菌 NCIB8166 的抑菌活性。根据文献报道,有两种机制导致乳链菌肽抗性。一种是乳链菌肽产生菌的免疫机制,它由 *nisI*、*nisF*、*nisE* 和 *nisG4* 个基因共同决定^[15];另一种是不产乳链菌肽的乳酸乳球菌,它的乳链菌肽抗性是由单一基因(*nsr*)决定的^[15]。为便于构建载体,选取没有抑制菌活性的 8 株菌作进一步鉴定。

2.1.2 *nsr* 基因的 PCR 扩增:为了证实这 8 株菌的乳链菌肽抗性确是由 *nsr* 基因决定的,我们用 P1、P2 为引物,以这 8 株菌的总 DNA 为模板进行 PCR 扩增。结果其中 3 株菌扩增出了预期的 400bp 产物。扩增产物的 DNA 序列测定结果表明,它们彼此的 DNA 序列完全一致,与 Liu 等人发表的序列^[6]相比,在第 657 位有一个核苷酸的差异(A→C),从而导致 ORF 中编码第 74 位氨基酸由 Asn 改变为 His。该结果证实有 3 株菌含有 *nsr* 基因,将它们暂时称之为 TS1622、TS1640 和 TS1682。

2.1.3 菌种鉴定:已往报道的含有乳链菌肽抗性基因的菌株均为乳酸乳球菌,为了搞清 TS1622、TS1640 和 TS1682 的分类学地位,故对它们进行了菌种分类和鉴定。(1)菌株生理生化特征:乳酸纸层析实验结果表明,TS1622、TS1640 和 TS1682 的发酵液中都含乳酸。其它生理生化特征见表 1 和表 2。根据乳酸菌分类检索表^[9]及乳酸乳球菌标准菌株的特性,其中 TS1622 和 TS1640 与标准菌株完全一致,而 TS1682 仅有 NaCl 浓度试验与标准菌株不符。综合菌株生理生化特征,可以初步认为 TS1622、TS1640 和 TS1682 都属于乳酸乳球菌乳酸亚种。(2)特异性 16S rDNA 的分析:为了进一步证实上述 3 株菌确是乳酸乳球菌乳酸亚种,以 TS1622、TS1640 和 TS1682 总 DNA 为模板,用 P3、P4 为引物进行 PCR 扩增。结果都获得预期产物。DNA 序列测定结果表明,3 个扩增产物在对应于大肠杆菌 16S rDNA 第 92 位有一个碱基的差异,TS1622 和 TS1682 都是 A,与 *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ATCC11454 的 16S rDNA 序列一致;TS1640 是 G,与 *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* 7962 的 16S rDNA 序列相同。这 3 株菌确实属于乳酸乳球菌乳酸亚种。因此,将它们分别命名为 *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* TS1622、*Lactococcus lactis* subsp. *lactis* TS1640 和 *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* TS1682。

表 1 菌株的生理生化特性

Table 1 The physiological and biochemical characteristics of the screened strains

Strain	Temperature/℃			NaCl concentration/%		Gas producing	Catalase	Amylase	Arginase
	10	40	45	4.0	6.5				
TS1622	+	+	-	+	-	-	-	-	+
TS1640	+	+	-	+	-	-	-	-	+
TS1682	+	+	-	+	+	-	-	-	+

表 2 利用糖类产酸试验

Table 2 The test of acid producing from carbon resources

Strain	Galactose	Lactose	Maltose	Melibiose	Melzitose	Raffinose	Ribose
TS1622	+	+	+	-	-	-	+
TS1640	+	+	+	-	-	-	+
TS1682	+	+	+	-	-	-	+

2.2 乳链菌肽抗性菌质粒的抽提与转化

2.2.1 质粒的分布:根据文献[15]报道,在某些菌株中编码乳链菌肽抗性的基因位于质粒上。抽提这 3 株菌的质粒 DNA,琼脂糖凝胶电泳结果(图 1)显示, *L. lactis* subsp. *lactis* TS1622 有 3 条质粒带, *L. lactis* subsp. *lactis* TS1640 有 11 条质粒带, *L. lactis* subsp. *lactis* TS1682 有 3 条质粒带,质粒数目和分子量与文献报道的菌株都不相同。此结果也说明了这 3 株菌是从自然界新分离到的乳链菌肽抗性菌。

2.2.2 质粒 DNA 转化:将上述 3 株菌的质粒 DNA 电击转化 *L. lactis* MG1363,在含有 100IU/mL 乳链菌肽的 M17 平板上筛选转化子,结果 TS1640 的转化平板上出现抗性菌落。抽提转化子的质粒,发现它们都有一条位于染色体带之后的大质粒(图 1)。用转化子质粒 DNA 再次电击转化 *L. lactis* MG1363,仍可得到乳链菌肽抗性转化子,且质粒 DNA 大小与前相同,说明该质粒携带有乳链菌肽抗性基因。我们将此质粒命名为 pTS50。为进一步证明 pTS50 的确含有乳链菌肽抗性基因,用从转化子(*L. lactis* MG1363/pTS50)中抽提的质粒 DNA 为模板,以 P1 和 P2 为引物进行 PCR 扩增。结果扩增出了 400bp 的条带,而以 *L. lactis* MG1363 总 DNA 为阴性对照的反应未见扩增产物,从而证明乳链菌肽抗性基因确是位于 pTS50 质粒上。

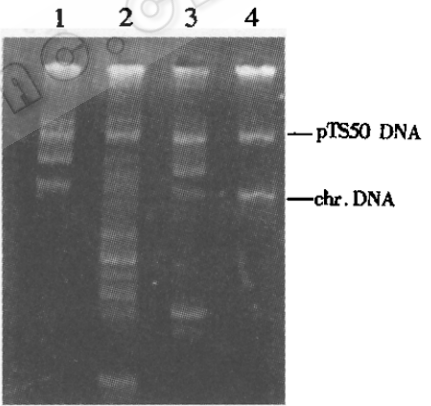


图 1 质粒 DNA 的琼脂糖凝胶电泳

Fig.1 Agarose gel electrophoresis of plasmid DNA

1. *L. lactis* TS1622; 2. *L. lactis* TS1640; 3. *L. lactis* TS1682; 4. *L. lactis* MG1363/pTS50.

2.3 pTS50 的酶切分析及 Southern 杂交

2.3.1 酶切分析:用 *Bam*HI、*Eco*RI、*Hind*III、*Nco*I 和 *Pst*I 5 种限制性内切酶对 pTS50 进行单酶切分析(图 2A),分别得到 3、14、7、6 和 3 个片段。用 *Bam*HI、*Nco*I 和 *Pst*I 3 种酶两两配对,对 pTS50 进行双酶切分析,结果见表 3。综合单酶切和双酶切的结果,pTS50 质粒大小约为 47kb。

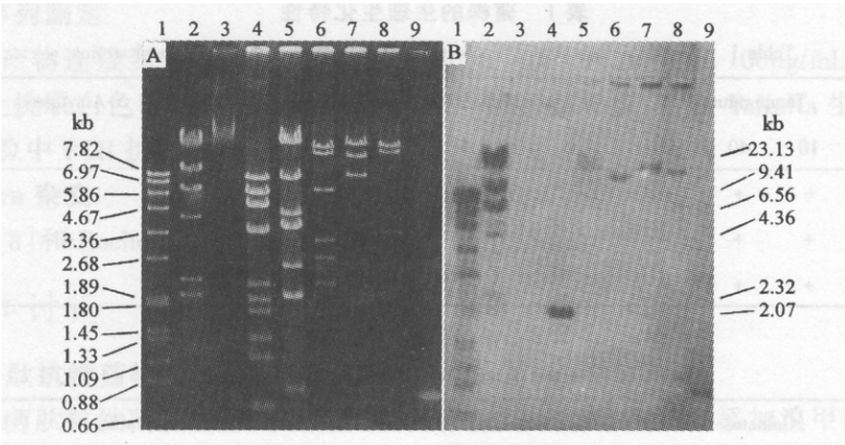


图 2 Southern 杂交

Fig.2 Southern hybridization patterns

A. Agarose gel stained by EB; B. Hybridization patterns.

1. SPPI/*Eco*RI; 2. λ DNA/*Hind*III; 3. *L. lactis* MG1363 chromosome DNA; 4. pTS50/*Eco*RI; 5. pTS50/*Hind*III; 6. pTS50/*Nco*I; 7. pTS50/*Bam*HI; 8. pTS50/*Pst*I; 9. PCR product.

表 3 pTS50 的酶切片段数和分子量

Table 3 The fragment numbers and molecular weight of restriction enzyme digested pTS50

Restriction enzymes	Fragment numbers	Molecular weight of the individual fragment/kb													Total /kb
<i>Eco</i> RI	14	7.6	6.1	6.0	4.8	4.7	3.5	3.4	2.2	1.9	1.7	1.4	1.2	0.8×2	46.1
<i>Hind</i> III	7	25.5	7.6	4.5	3.8	2.5	2.1	0.8							46.8
<i>Bam</i> HI	3	25.0	14.0	7.8											46.8
<i>Pst</i> I	3	23.5	19.0	3.5											46.0
<i>Nco</i> I	6	20.5	14.2	6.0	3.0	2.7	2.1								48.5
<i>Bam</i> HI- <i>Nco</i> I	9	12.5	7.1	7.0	6.1	4.3	3.4	3.0	2.7	2.1					48.2
<i>Bam</i> HI- <i>Pst</i> I	6	21.5	12.0	5.8	3.1	2.7	2.1								47.2
<i>Pst</i> I- <i>Nco</i> I	9	12.0	6.8	6.7	6.0	4.3	3.4	3.0	2.7	2.1					47.0

2.3.2 Southern 杂交:为将乳链菌肽抗性基因定位于 pTS50 的某一酶切片段,按材料与方
法 1.6.3 所述,PCR 扩增乳链菌肽抗性基因中的 900bp 片段(实际约为 850bp,比预期略
小,原因待研究),并克隆到 pGEM-T 载体上。抽提重组质粒,*Pst*I 和 *Nco*I 双酶切下外源片
段,用地高辛标记制备探针,与 *Bam*HI、*Eco*RI、*Hind*III、*Nco*I 和 *Pst*I 酶切的 pTS50 产物进
行 Southern 杂交。结果(图 2B)探针与 *Bam*HI、*Hind*III、*Nco*I 和 *Pst*I 酶切的大片段有清晰
可见的杂交带,与 *Eco*RI 酶切的小片段(~1.9kb)有明显的杂交带,表明乳链菌肽抗性基
因位于这些片段中。特别是 1.9kb 的 *Eco*RI 小片段很适宜用于构建乳酸菌食品级载体。

致谢 本工作得到中国科学院微生物研究所东秀珠研究员和西北农林科技大学 97 级硕
士生(微生物研究所代培)王明华的热情帮助,特致谢意。

参 考 文 献

- [1] de Vos W M. *International Dairy Journal*, 1999, 9:3 ~ 10.
- [2] Leenhouts K, Bolhuis A, Venema G, et al. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1998, 49:417 ~ 423.
- [3] Leenhouts K, Buist G, Bolhuis A, et al. *Mol Gen Genet*, 1996, 253:217 ~ 224.
- [4] Dickely F, Nilsson D, Hansen E B, et al. *Mol Microbiol*, 1995, 15(5):839 ~ 847.
- [5] Froseth B R, McKay L L. *Appl Environ Microbiol*, 1991, 57(3):804 ~ 811.
- [6] Liu C Q, Harvey M L, Dunn N W. *J Gen Appl Microbiol*, 1997, 43(1):67 ~ 73.
- [7] 还连栋,陈秀珠,才 迎,等.微生物学报,1997,37(4):292 ~ 300.
- [8] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- [9] 凌代文,东秀珠.乳酸细菌分类鉴定及实验方法.北京:中国轻工业出版社,1999.
- [10] Lewington J, Greenaway S D, Spillane B J. *Let Appl Microbiol*, 1987, 5:51 ~ 53.
- [11] Anderson D G, McKay L L. *Appl Environ Microbiol*, 1983, 46(3):549 ~ 552.
- [12] Wells J M, Wilson P W, Le Page R W F. *J Appl Bacteriol*, 1993, 74:629 ~ 636.
- [13] Klijn N, Weerkamp A H, de Vos W M. *Appl Environ Microbiol*, 1991, 57(11):3390 ~ 3393.
- [14] Salama M, Sandine W, Giovannoni S. *Appl Environ Microbiol*, 1991, 57(5):1313 ~ 1318.
- [15] Duan K, Harvey M L, Liu C Q, et al. *J Appl Bacteriol*, 1996, 81:493 ~ 500.

ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF A PLASMID pTS50, WHICH ENCODES NISIN RESISTANCE DETERMINANT IN *LACTOCOCCUS LACTIS* TS1640

Tang Sha Chen Xiuzhu Yang Wei Chen Meiling Huan Liandong*

(Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080, China)

Abstract: Three nisin-resistant *Lactococcus lactis* strains were screened from 197 samples of fresh milk on a selective medium (M17) supplemented with nisin, lactose and bromocresol purple, and were confirmed to have the nisin resistance determinant (*nsr*) by PCR amplification. Physiological and biochemical tests as well as *Lactococcus lactis* specific 16S rDNA sequence analysis revealed that the three strains all belong to *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. A large plasmid, pTS50, was identified in *L. lactis* subsp. *lactis* TS1640 which encodes resistance to nisin following electroporation of the total plasmids DNA into *L. lactis* MG1363. The molecular weight of plasmid pTS50 was estimated to be 47kb by restriction analysis of *Bam*HI, *Eco*RI, *Hind*III, *Nco*I, *Pst*I and *nsr* was localized on a 1.9kb *Eco*RI fragment by Southern hybridization.

Key words: *Lactococcus lactis*, Nisin resistance, Plasmid, Restriction enzyme digest, Southern blot