

乳酸乳球菌乳脂亚种 W56 中质粒 pJW566 的生物学特性^{*}

孔 健 顾笑梅 马桂荣

(山东大学微生物技术国家重点实验室 济南 250100)

摘 要:从丹麦乳酪发酵启子乳酸乳球菌乳脂亚种(*Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*) W56 中,分离到一个 22.4kb 的质粒 pJW566,将该质粒转化到无质粒且噬菌体敏感的 *L. lactis* MG1614、SMQ86 菌株中,所得转化子对常见 963、c2 和 P335 属的噬菌体具有一定抗性。经测定噬菌体以及含有 pJW566 的菌株所繁育的噬菌体效价,发现该质粒对外源 DNA 具有限制和修饰(Restriction and Modification, R/M)作用。将 pJW566 转化到一株噬菌体敏感的乳酪工业生产菌株 *L. lactis* CHCC2281,在牛奶发酵中,表现出较强的噬菌体抗性。体外内切酶活性测定表明,该质粒具有的限制性内切酶需要 Mg^{2+} 和 ATP,而 AdoMet(S-adenosylmethionine, AdoMet)对酶活有促进作用。

关键词: 乳酸乳球菌, 噬菌体, 限制和修饰作用, 质粒 pJW566

中图分类号: Q933 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2001) 05-0542-06

作为发酵启子的乳酸乳球菌(*Lactococcus lactis*) 在乳制品如酸奶,乳酪等生产中起重要作用。但在发酵过程中该类菌株极易遭受噬菌体的感染,使菌株产酸能力降低或死亡,影响产品的质量和风味,给企业带来很大经济损失^[1]。由于乳制品生产的原料牛奶通常采用巴斯德消毒,不能有效杀死噬菌体,所以生产菌株必须具有噬菌体抗性。

近 10 年随着乳酸菌分子生物学研究的深入,国外一些学者在分子水平上从提高菌株抗性、增强菌株自身防御功能方面进行研究,构建了一些抗噬菌体菌株,在乳制品发酵中表现出较强的抗噬菌体性能^[2,3]。根据菌株对噬菌体抗性方式的不同,其抗性机理可分为四种类型:噬菌体吸附抑制, DNA 侵入障碍,限制修饰(restriction and modification, R/M)系统和流产感染机制。R/M 系统是寄主细胞编码的限制性内切酶对外源 DNA 的限制,对自身 DNA 的酶切位点进行甲基化修饰而被保护的防御机制。R/M 系统在乳球菌中广泛存在,被认为是一种有效的抗噬菌体机制。目前在乳球菌中已鉴定出 40 多种不同的限制修饰系统,它们大部分由质粒编码,少数位于染色体上^[4]。

从丹麦乳酪混合发酵启子中分离出一株 *L. lactis* subsp. *cremoris* W56,在多年乳酪生产中表现出极强的抗噬菌体特性。经分析发现,该菌株包含 7 个质粒,至少具有三种不同的抗噬菌体机制^[5],其中质粒 pJW563 和 pJW565 携带的抗噬菌体机理已研究清楚^[6]。本文对质粒 pJW566 的分离及生物学特性进行了研究。

作者简介:孔 健(1964-),女,山东菏泽人,山东大学微生物技术国家重点实验室副教授,博士,1999 年赴丹麦皇家畜牧和农业大学研修,主要从事乳酸菌应用基础性研究。

收稿日期: 2000-11-10, **修回日期:** 2001-03-20

1 材料和方法

1.1 菌种和培养基

本实验所用菌种、噬菌体和质粒列于表 1。乳酸乳球菌培养基(GM17)为 M17 培养基(Difco),加 0.5% 葡萄糖;转化培养基(SGM17)为 M17 培养基,加 1% 葡萄糖,2.5mmol/L $MgCl_2$, 2.5mmol/L $CaCl_2$, 5 $\mu g/mL$ 氯霉素;噬菌体感染培养基为 GM17 培养基加 50mmol/L $CaCl_2$;牛奶培养基为 10% 脱脂牛奶,加 0.5% 葡萄糖和 0.7% 酵母粉。

表 1 实验所用菌株、质粒和噬菌体
Table 1 Strains, plasmids and bacteriophages

Strain, plasmid Or phage	Relevant features	Source/reference
Strains		
<i>L. lactis</i>		
W56	Industrial strain with multiple plasmids	Obtained from J Josephsen
MG1614	Plasmid-free, host for 936 and c2 phages	[14]
CHCC2281	Industrial strain, host for CHCP412 phage	Chr. hansen A/S Hørsholm, DK
SMQ86	Derivative of the industrial strain <i>L. lactis</i> UL8, host for P335 phages	[15]
Plasmids		
pJW566	Resident plasmid of W56, R ⁺ M ⁺ , 24.4kb	This study
pSA2	Marker plasmid, cat ^r , erm ^r	Obtained from J Josephsen
Phages		
p2	Small, isometric-headed 936 species	Obtained from T R Klaenhammer
sk1	Small, isometric-headed 936 species	[15]
jj50	Small, isometric-headed 936 species	Otained from J Josephsen
CHPC412	Small, isometric-headed 936 species	Chr. hansen A/S Hørsholm, DK
c2	Prolate-headed, c2 species	Obtained from T R Klaenhammer
ul36	Small, isometric-headed P335 species	[15]
Q30	Small, isometric-headed P335 species	[15]
Q36	Small, isometric-headed P335 species	[15]

1.2 噬菌体效价 (efficiency of plating, EOP) 的测定

噬菌体在抗性菌株中的噬菌斑数与在敏感菌株中的噬菌斑数之比,敏感菌株的 EOP 为 1。

1.3 质粒 DNA 的提取

将 *L. Lactis* 培养到指数生长期,离心收集菌体。菌体细胞用 10mg/mL 溶菌酶 37℃ 酶解 20min,用 GIAGEN plasmid Mini-prep kit (Chatsworth, USA),按照实验说明提取质粒 DNA。

1.4 电转化

参见 Holo 和 Nes 的方法^[7]。电穿孔仪为 BioRad 公司 Gene Pulser,脉冲参数 1.25kV/mm, 25 μF 和 200 Ω 。

1.5 内切酶活性测定

将菌株 *L. Lactis* 接种到 1L GM17 培养基中,培养 8h,离心收集菌体。用 200mL 50mmol/L Tris-HCl 缓冲液 (pH8.0) 洗涤细胞,然后溶解在 10mL buffer A (50mmol/L Tris-HCl (pH7.6), 10mmol/L $MgCl_2$, 25mmol/L NaCl, 7mmol/L β -mercaptoethanol) 中,用 French Press 破碎细胞,在 4℃, 10 000r/min 离心 10 min,除细胞碎片。取 200 μ L 上清液与 100 μ L Dextran 和 PEG 混合液充分混合,冰浴 5min,离心去除沉淀的 RNA,上清液即为粗酶液。内切酶活性测定以未甲基化的 λ DNA 为底物,在 NEB Buffer 1 (10mmol/L bio Tris, propane-HCl, 10mmol/L $MgCl_2$, 1mmol/L DTT, pH7.0) 中, 37℃ 酶解 60min。DNA 样品在 0.8% 琼脂糖胶板上电泳。

1.6 牛奶培养基中抗噬菌体性能的测定

将 1% 的 *L. lactis* 菌种和 10^4 pfu/mL CHPC412 噬菌体分别接种于 9mL 无菌牛奶培养基,混合后培养在 30℃ 的 Malthus 128H 容器中。根据培养基不同时间内电流的变化来测定菌株生长的情况 (生长曲线)。

2 实验结果

2.1 质粒 pJW566 的分离

L. lactis subsp. *cremoris* W56 为乳酪生产菌株,含有多个质粒,表现出不同的抗噬菌体特性^[5]。为搞清其抗噬菌体机理,对所含质粒进行了分离。提取 *L. lactis* subsp. *cremoris*

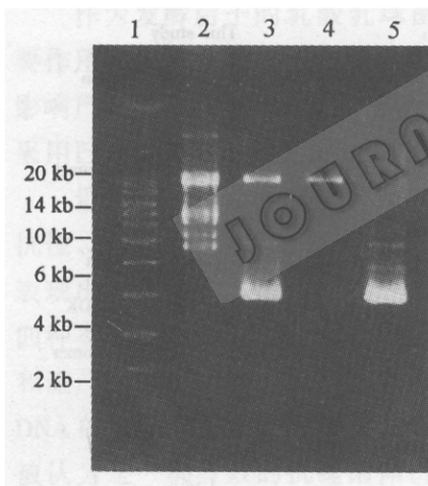


图 1 质粒 pJW566 的分离

Fig.1 Isolation of plasmid pJW566 from *L. lactis* W56

1: Supercoiled DNA ladder; 2: Total DNA from P335; 3: pJW566 + pSA2; 4: pJW566; 5: pSA2.

W56 总的质粒 DNA,与标志质粒 pSA2 以 10:1 比例共转化到无质粒且噬菌体敏感的 *L. lactis* MG1614 中。在含有氯霉素的 SGM17 平板上挑取菌落,用交叉划线法检测所挑菌落对噬菌体 sk1 的抗性。结果得到 5 个阳性菌落。提取质粒 DNA 分析发现,其中一转化子 MG1614-26 包含质粒 pSA2 和大小约为 22.4kb 的质粒 pJW566。用 novobiocin 处理,从 MG1614-26 中消除标志质粒 pSA2,得到只含有 pJW566 的转化子 MG1614 [pJW566]。结果见图 1。

2.2 含有质粒 pJW566 菌株对常见噬菌体的抗性

在乳制品发酵中,侵染发酵启子的噬菌体种类是多种多样的,根据其形态和 DNA 同源性的不同,常常分为 12 个属。而乳酪生产中分布最广,最易感染发酵启子的烈性噬菌体仅有 3 个属,它们是圆头状噬菌体 P335 属,长头状噬菌体 c2 属和圆头状噬菌体 936 属^[8]。本文选取代表这 3 个属又最常见的 7 种噬菌体来检测含有质粒 pJW566 的菌株对噬菌体的抗性 (表

2)。噬菌体 p2, sk1 和 jj50 代表 936 属,它们几乎具有相同的 EOP 值为 10^{-3} ;噬菌体 c2 代表 c2 属,其 EOP 值与 936 属的噬菌体相同。而以 ul36, Q30 和 Q33 为代表的 P335 属的噬菌体因不能在 MG1614 中繁殖,故将质粒 pJW566 转化到噬菌体敏感的 *L. lactis* SMQ86 中,再测定 EOP。结果发现这些噬菌体的 EOP 值为 10^{-3} 到 10^{-4} 。由此可见,含有质粒 pJW566

的菌株具有较广的噬菌体抗性,并且这种抗性在温度 25℃,30℃ 和 37℃ 时对噬菌体的 EOP 值相同,表明了质粒 pJW566 具有的抗噬菌体特性是温度不敏感型。

2.3 质粒 pJW566 具有限制和修饰作用

含有质粒 pJW566 的菌株对噬菌体表现出一定的抗性(EOP 为 $10^{-3} \sim 10^{-4}$, 表 2),表明菌株对侵入的噬菌体具有一定的限制作用。在噬菌体 sk1 感染 MG1614[pJW566]的平板上,挑取单个噬菌斑,将分离的噬菌体连续感染菌株 MG1614[pJW566]三次,测定最后一次释放噬菌体对菌株 MG1614[pJW566]的 EOP,结果 $EOP = 1$ 。说明菌株 MG1614[pJW566]不再对自身所释放的噬菌体 sk1 有限制作用,推测噬菌体 sk1 DNA 的酶切位点可能被质粒 pJW566 编码的甲基化酶所修饰,以致不能被 pJW566 编码的限制性内切酶所切割。将这种甲基化的噬菌体再回到原始寄主菌 MG1614 中繁育,结果所释放的噬菌体 EOP 值与初始的 EOP 相同(10^{-3}),表明质粒 pJW566 编码的限制性内切酶对非甲基化的 sk1 DNA 有限制作用。以上现象表明,质粒 pJW566 具有的抗噬菌体机制为典型的限制和修饰(restriction and modification, R/M)系统。

2.4 含有质粒 pJW566 的菌株在牛奶发酵中对噬菌体的抗性

将 pJW566 导入生产乳酪的菌株 *L. lactis* CHCC2281 中,将所得菌株 CHCC2281[pJW566]接种到含有 10^4 pfu/mL 噬菌体 CHPC412 (936 属)的牛奶培养基中,30℃ 培养不同时间,以培养基中电流的变化表示菌株生长情况(图 2)。菌株 CHCC2281 在牛奶培养基无噬菌体存在时,生长较快,培养 3~6h 进入指数生长期,6h 后达到稳定期(C)。当菌株 CHCC2281 被噬菌体感染时,培养基中产生的电流只有前者的 31.8%,说明菌株 CHCC2281 生长几乎被抑制(A);而菌株 CHCC2281[pJW566]培养基中产生的电流为菌株 CHCC2281 的 83.1%,接近于菌株 CHCC2281 生长水平,表现出较强的抗噬菌

表 2 含有质粒 pJW566 的菌株对噬菌体的抗性

Table 2 The resistance levels of the strain containing pJW566 against lactococcal phages		
Bacteriophage species ^a	Bacteriophages	EOP ^b
936	sk1	3.2×10^{-3}
	p2	2.1×10^{-3}
	jj50	6.1×10^{-3}
P335	u136	5.2×10^{-4}
	Q30	2.2×10^{-3}
	Q33	1.8×10^{-4}
c2	c2	1.2×10^{-3}

a: The EOPs of the 936 and c2 phages were tested on *L. lactis* MG1614 [pJW566]. The EOPs of these phages are 1 on MG1614. The EOPs of the P335 phages were tested on *L. lactis* SMQ86[pJW566]. The EOPs of the these phages are 1 on *L. lactis* SMQ86.

b: Calculated as the ratio of plaques on the resistant host to plaques on the sensitive host. The results are averages of at least three independent determinations.

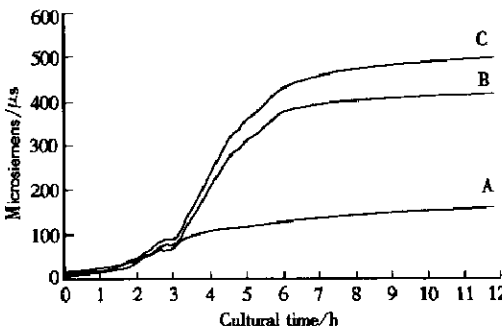


图 2 菌株 *L. lactis* CHCC2281 和 *L. lactis* CHCC2281[pJW566]在牛奶培养基中的生长曲线

Fig.2 The growth curve of CHCC2281 and its transformant CHCC2281[pJW566] in milk

A: *L. lactis* CHCC2281 attacked by phage; B: *L. lactis* CHCC2281 [pJW566] attacked by phage; C: *L. lactis* CHCC2281 without phage.

体特性(B)。由此证明质粒 pJW566 具有的限制和修饰系统可以用来构建抗噬菌体工业生产菌株。

2.5 复合因子对 pJW566 内切酶活性的影响

根据酶的结构,DNA 断列方式及复合因子对酶活性的影响,传统上将 R/M 系统分为三种类型:Ⅰ型、Ⅱ型和Ⅲ型^[9]。为判断质粒 pJW566 具有的限制和修饰系统的类型,对所需复合因子进行了测定(图 3)。结果表明,质粒 pJW566 编码的限制性内切酶需要 MgCl₂和 ATP,GTP 的作用效果不明显,而 AdoMet(S-adenosylmethionine, AdoMet)对酶活性有促进作用。根据此结论可以断定,质粒 pJW566 具有的 R/M 系统符合Ⅰ型。

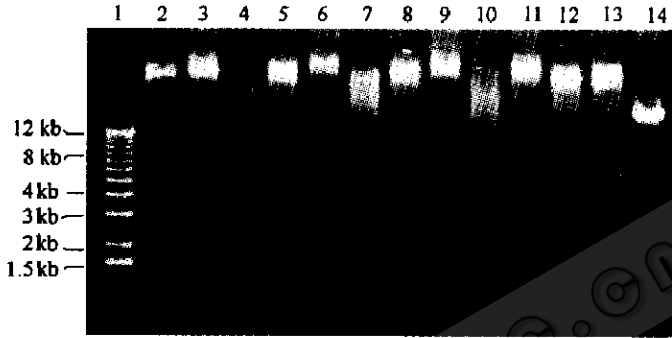


图 3 复合因子 Mg²⁺、ATP 和 AdoMet 对内切酶活性的影响

Fig.3 Agarose gel electrophoresis of λ DNA digested with partial purified enzyme preparation from MG1614[pJW566], Showing the effects of Mg²⁺,ATP and AdoMet on the endonuclease activity

1:λDNA/ *Hind*Ⅲ standard marker;2:λDNA plus heated extract;3:Extract plus Mg²⁺;4:Extract plus ATP;5:Extract plus GTP;6:Extract plus AdoMet;7:Mg²⁺ plus ATP;8:Mg²⁺ plus GTP;9:Mg²⁺ plus AdoMet;10:Mg²⁺ plus ATP plus AdoMet;11:ATP plus AdoMet;12:Mg²⁺ plus GTP plus AdoMet;13:GTP plus AdoMet;14:λDNA.

3 讨论

烈性噬菌体感染含有质粒 pJW566 的乳球菌后,在平板上形成噬菌斑,说明有完整的噬菌体颗粒释放,由此排除了 pJW566 产生的噬菌体吸附抑制和 DNA 侵入障碍机制。通过测定噬菌体及菌株 MG1614[pJW566]所释放噬菌体的 EOP,证明了质粒 pJW566 具有对外源 DNA 的限制和修饰作用。这种方法简单、快速,常被用来判断质粒具有的限制和修饰酶的存在。本研究采用噬菌体 sk1 在菌株 MG1614[pJW566]内繁殖三次,其目的是使 sk1 DNA 上的限制性酶切位点彻底被 pJW566 上的甲基化酶修饰,以致不再被限制性内切酶切割,结果所得 EOP = 1。

R/M 系统在乳酸菌中广泛存在,在保护发酵启子不受噬菌体感染方面起着积极的作用。根据 R/M 系统对噬菌体的限制程度,其抗性可分为强抗性(EOP 10⁻⁷ ~ 10⁻⁹)、中度抗性(EOP 10⁻⁴ ~ 10⁻⁶)和弱抗性(EOP 10⁻¹ ~ 10⁻³)^[10]。质粒 pJW566 编码的 R/M 系统具有广泛的抗噬菌体特性,质粒 pJW566 具有的抗性机制属弱抗性 R/M 系统。而 EOP 的大小与抗性基因剂量成反比,与噬菌体 DNA 上的酶切位点成指数关系^[11],质粒 pJW566 对 P335 属噬菌体 EOP 的差异,可能由于噬菌体 DNA 上酶切位点的不同造成的。

在牛奶发酵中,以培养基电流的改变表示乳酸菌的生理活性,被认为是一种简便快速

的方法^[12]。由于感染噬菌体的乳酸菌产酸力降低或死亡,影响其生理活性,所以根据培养基电流的变化来判定菌株对噬菌体的抗性是可行的。

在 R/M 系统中, I 型是最复杂的一种 R/M 系统, 尽管在乳球菌中广泛存在, 但对其遗传和生化特性研究却很少^[13]。从质粒 pJW566 编码的限制性内切酶对复合因子的需要上断定该 R/M 系统符合 I 型。通过对编码这一 R/M 系统基因的克隆、序列测定及功能分析, 也证实了质粒 pJW566 具有的 R/M 系统不同于已报道的 R/M 系统, 为 I 型的一个变种。

致谢 本研究得到丹麦皇家畜牧农业大学乳制品和食品科学系教授 Jytte Josephsen 的耐心指教, 和实验材料的惠赠, 特表示感谢。

参 考 文 献

- [1] Stadhouders J. *Milk Dairy J*, 1986, **40**: 155 ~ 159.
- [2] Josephsen J, Klaenhammer T R. *Plasmid*, 1990, **23**: 71 ~ 75.
- [3] Coffey A, Coakley M, McGarry A, et al. *Lett Appl Microbiol*, 1998, **26**: 51 ~ 55.
- [4] Forde A, Fitzgerald G F. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 1999, **76**: 89 ~ 113.
- [5] Josephsen J, Vogensen, F K. *FEMS Microbiol Lett*, 1989, **59**: 161 ~ 166.
- [6] Nyengard N R, Falkenberg K J, Josephsen J. *Appl Environ Microbiol*, 1996, **62**: 3494 ~ 3498.
- [7] Holo H, Nes I F. *Appl Environ Microbiol*, 1989, **55**: 3119 ~ 3123.
- [8] Jarvis A W, Fitzgerald G F, Mata M, et al. *Internirology*, 1991, **32**: 2 ~ 9.
- [9] Bickle T A, Kruger D H. *Microbiol Rev*, 1993, **57**: 434 ~ 450.
- [10] Moineau S. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 1999, **76**: 377 ~ 382.
- [11] Wilson G C, Murray N E. *Annu Rev Genet*, 1991, **25**: 585 ~ 627.
- [12] Lanzasova M, Mucchetti G, Neviani E. *J Dairy Sci*, 1993, **76**: 20 ~ 28.
- [13] Schouler C, Clier F, Lerayer A, et al. *J Bacteriol*, 1998, **180**: 407 ~ 411.
- [14] Gordon J J, Delome C, Ehrlich S D, et al. *Appl Environ Microbiol*, 1992, **58**: 4045 ~ 4047.
- [15] Moineau S, Pandian S, Klaenhammer T R. *Appl Environ Microbiol*, 1993, **59**: 197 ~ 202.
- [16] Chandry P S, Moore S C, Davidson B E, et al. *Gene*, 1994, **138**: 123 ~ 126.

THE CHARACTERIZATION OF pJW566 FROM *L. LACTIS* SUBSP. *CREMORIS* W56

Kong Jian Gu Xiaomei Ma Guirong

(The State Key Lab of Microbial Technology, Shandong University, Jinan 250100, China)

Abstract: The plasmid pJW566 was isolated from *L. lactis* subsp. *cremoris* W56, one strain for Danish chadder mixed starter cultures. The strain containing plasmid pJW566 showed resistance against three common phages species 936, c2 and P335 worldwide. It was found that pJW566 encoded for an restriction and modification system, and showed strong resistance to phage CHCP412 when it was introduced into the industrial strain *L. lactis* CHCC2281 in milk medium. The endonuclease activity analysis indicated that the endonuclease required Mg^{2+} , ATP, and was stimulated by AdoMet.

Key words: *Lactococcus lactis*, Bacteriophage, Restriction and modification system, Plasmid pJW566