

限制和修饰系统 *LlaBIII* 在构建抗噬菌体菌株中的作用

孔 健¹ Jytte Josephsen² 马桂荣¹

(¹ 山东大学微生物技术国家重点实验室 济南 250100)

(² 丹麦皇家畜牧农业大学乳制品和食品科学系 丹麦)

关键词: 乳酸乳球菌, 噬菌体, 限制和修饰系统, 乳制品发酵

中图分类号: Q933 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209(2002)02-0246-05

限制和修饰(restriction and modification, R/M)系统是指由限制性内切酶和甲基化酶组成的单亚基或多亚基复合酶系统,两者通常成对出现,具有相同的 DNA 识别位点,其作用相反。R/M 系统在原核生物中普遍存在,在保护细胞免遭外源病毒侵害方面具有重要作用^[1]。

作为发酵剂的乳酸乳球菌在乳制品发酵中具有重要作用,但这类菌株极易遭受噬菌体感染,导致菌株产酸力降低,甚至发酵失败,造成严重的经济损失。所以在乳制品发酵过程中防止噬菌体感染就成为十分重要的问题。

通过自然筛选或诱变处理等手段筛选噬菌体不敏感突变株以及利用基因克隆技术构建抗噬菌体菌株在发酵过程中起到了良好的抗噬菌体感染效果^[2,3]。质粒 pJW566 分离于乳酪发酵剂乳酸乳球菌(*Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*)W56^[4],发现携带有一种新的编码限制和修饰(R/M)系统的基因 *LlaBIII*^[5](GenBank 注册号为 AF347071)本文通过电转化方法将 R/M 系统 *LlaBIII* 导入到不同的乳酸乳球菌中,分析含有 R/M 系统 *LlaBIII* 的工程菌株对噬菌体的抗性。

1 材料和方法

1.1 菌株、噬菌体和培养基

1.1.1 菌株和噬菌体 本实验所有菌株和噬菌体列表于 1。

1.1.2 培养基 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 MgCl₂, 2.5mmol/L CaCl₂, 5μg/mL 氯霉素;噬菌体感染培养基为 GM17 培养基加 5mmol/L CaCl₂。

1.2 质粒 DNA 的提取

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 GIA-GEN plasmid Mini-prep kit(Chatsworth, USA)按照实验说明提取质粒 DNA。

1.3 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。噬菌斑的测定采用双层平板法。

1.4 电转化

参见 Holo 和 Nes 的方法^[6]。电穿孔仪为 Gene Pulser(BioRad 公司产品),脉冲参数 1.25kV/mm, 25μF 和 200Ω。

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,主要从事乳酸菌应用基础性研究。

收稿日期 2001-11-06,修回日期 2001-12-19

表 1 实验所用菌株和噬菌体

菌株和噬菌体	相关特性	来源
<i>L. lactis</i>		
W56	Industrial strain with multiple plasmids	[11]
MG1614	Plasmid-free host for 936 and c2 species	[12]
IL1403	Type I R/M system chromosomal located, host for bIL67, bIL 66 bIL170	[13]
Bacteriophages		
sk1	Small, isometric-headed 936 species	[14]
p2	Small, isometric-headed 936 species	Obtained from T R Klaenhammer
jj50	Small, isometric-headed 936 species	Obtained from J Josephsen
c2	Prolate-headed, c2 species	Obtained from T R Klaenhammer
ul36	Small, isometric-headed P335 species	[15]
Q30	Small, isometric-headed P335 species	[15]
Q33	Small, isometric-headed P335 species	[15]
bIL66	Small, isometric-headed 936 species	Obtained from J Josephsen
bIL170	Small, isometric-headed 936 species	Obtained from J Josephsen
bIL67	Prolate-headed, c2 species	Obtained from J Josephsen
CHPC412	Unknown species	Obtained from Chr. Hansen A/S.
CHPC381	Unknown species	Hørsholm, Denmark
CHPC382	Unknown species	

2 结果

2.1 含有 R/M 系统 *LlaBIII* 的菌株对噬菌体的抗性

R/M 系统 *LlaBIII* 基因位于质粒 pJW566 上,在转化实验中为了易于筛选含有 R/M 系统 *LlaBIII* 的转化子,将 pJW566 DNA 经 *ClaI* 内切酶不完全消化,所得片段与来自于质粒 pVC5 的氯霉素抗性基因 *Cat* 连接,构建了携带有完整 R/M 系统 *LlaBIII* 又具有氯霉素抗性标志的质粒 pJK1^[5]。

将质粒 pJK1 分别转化到无质粒且噬菌体敏感的菌株 *L. lactis* MG1614 和无质粒且携带有染色体编码的 R/M 系统 I 型的菌株 *L. lactis* IL1403 中,在含有氯霉素平板上选取菌落,测定转化子对噬菌体的抗性。

菌株 *L. lactis* MG1614 是圆头状噬菌体 sk1 p2 jj50 和长头状噬菌体 c2 的寄主菌,用 *L. lactis* MG1614 释放的噬菌体感染转化子 MG1614[pJK1],结果菌株 MG1614[pJK1]表现出对四种噬菌体具有一定的抗性,其 EOP 值相同,约为 10^{-3} ,结果见表 2。菌株 *L. lactis* IL1403 与 MG1614 具有较高的相似形,并且都不含有质粒。Schouler *et al.* (1998) 发现菌株 IL1403 携带有染色体编码的 type I R/M 系统,表现弱噬菌体抗性(EOP 为 $10^{-1} \sim 10^{-2}$)^[7]。将质粒 pJK1 转化到 *L. lactis* IL1403 菌株中,得到转化子 IL1403[pJK1]对 936 类型中的圆头状噬菌体 bIL66、bIL170 限制作用大幅度提高, EOP 为 10^{-5} ;对 c2 类型中的长头状噬菌体 bIL67 的作用由弱抗性提高到中抗性(EOP 由 10^{-1} 降低到 2.5×10^{-3}),说明基因 *LlaBIII* 的导入,增强了菌株 IL1403 对噬菌体的抗性。

表 2 含有质粒 pJK1 的转化子对噬菌体的抗性

噬菌体	种	噬菌体效价			
		MG1614	MG1614[pJK1]	IL1403	IL1403[pJK1]
sk1	936	1	3.0×10^{-3}	ND	ND
p2	936	1	2.0×10^{-3}	ND	ND
jj50	936	1	6.0×10^{-3}	ND	ND
bIL66	936	ND	ND	1	2.2×10^{-5}
bIL170	936	ND	ND	1	5.3×10^{-5}
c2	c2	1	1.2×10^{-3}	ND	ND
bIL67	c2	ND	ND	1	2.5×10^{-3}

ND means no detection.

The EOP were an average of at least three independent determinations.

2.2 R/M 系统 LlaBIII 与流产感染 AbiS 机制的协同效应

质粒 pAW601 携带有流产感染基因 *AbiS* (Josephsen J 提供), 将质粒 pJK1 转化到含有流产感染质粒 pAW601 的菌株 *L. lactis* MG1614[pAW601] 中, 测定所得转化子对噬菌体 sk1、c2 的抗性。结果表 3 所示。

表 3 R/M 系统 LlaBIII 与流产感染基因 AbiS 的协同作用

菌株	噬菌体效价	
	sk1	c2
MG1614	1	1
MG1614[pAW601]	2.1×10^{-3}	3.2×10^{-2}
MG1614[pJK1]	2.3×10^{-3}	1.1×10^{-3}
MG1614[pAW601 + pJK1]	1.5×10^{-5}	5.2×10^{-4}

The EOP were an average of at least three independent determinations.

两者的“协同作用”。

表 3 结果表明, 质粒 pJK1 的导入, 使菌株 MG1614[pAW601] 对圆头状噬菌体 sk1 和长头状噬菌体抗性分别提高了 100 倍, 也就是说, 由于 R/M 系统 LlaBIII 中甲基化酶的识别错误, 修饰了侵入噬菌体 DNA 的限制性内切酶的酶切位点, 或噬菌体的突变, 逃脱了体内 LlaBIII 限制性内切酶的切割作用, 而欲生长繁殖, 却被流产感染机制 *AbiS* 所阻断, 表现出

2.3 含有 R/M 系统 LlaBIII 的工业菌株对噬菌体的抗性

L. lactis SMQ86 和 *L. lactis* CHCC2281 是工业生产乳酪的常用菌株, SMQ86 又是 P335 类型噬菌体的

表 4 菌株 SMQ86、CHCC2281 及其转化子对噬菌体的抗性

噬菌体	噬菌体效价			
	SMQ86	SMQ86[pJK1]	CHCC2281	CHCC2281[pJK1]
Q30	1	2.2×10^{-3}	ND	ND
Q33	1	1.8×10^{-3}	ND	ND
ul36	1	1.0×10^{-3}	ND	ND
CHPC412	ND	ND	1	2.4×10^{-5}
CHPC831	ND	ND	1	3.0×10^{-5}
CHPC832	ND	ND	1	5.2×10^{-5}

ND means no detection.

EOP were an average of at least three independent determinations. ©中国科学微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

寄主菌 *L. lactis* CHCC2281 是噬菌体 CHPC412, CHPC831 和 CHPC832 的寄主菌。将质粒 $pJK1$ 分别转化到菌株 *L. lactis* SMQ86 和 *L. lactis* CHCC2281 中, 所得转化子对噬菌体的抗性结果见表 4。

由表 4 可知, 含有质粒 $pJK1$ 的菌株 SMQ86 [$pJK1$] 对 P335 类型中噬菌体的 EOP 与 MG1614 [$pJK1$] 对 936 类型中噬菌体的 EOP 相同, 为 10^{-3} ; 而菌株 CHCC2281 [$pJK1$] 对原始菌株 CHCC2281 繁育的噬菌体 EOP 为 $\sim 10^{-5}$, 其抗性高于对 P335 和 936 类型噬菌体的 100 倍, 表现出 R/M 系统 *LlaBIII* 能够赋予菌株 CHCC2281 极强的抗噬菌体性能。

3 讨论

在乳制品发酵过程中, 感染噬菌体的种类是多种多样的, 根据 DNA 同源性分为 12 大类型 (species), 分布比较普遍的只有 3 种类型, 小圆头 936 类噬菌体、长头状 $c2$ 类噬菌体和圆头状 P335 类噬菌体^[8]。将携带有 *LlaBIII* 基因的质粒 $pJK1$ 转化到不同的乳酸乳球菌中, 所得菌株表现出对这 3 种类型中的噬菌体具有一定抗性, 尤其对菌株 IL1403 和 CHCC2281 繁育的噬菌体抗性较强, 表明了 R/M 系统 *LlaBIII* 在构建抗噬菌体工业菌株中具有良好的应用潜力。

由于乳制品生产的原料牛奶通常采用巴氏消毒, 不能彻底杀死噬菌体, 使得生产菌株总是受到噬菌体的威胁。在长期的噬菌体存在压力下, 有些乳酸菌自身携带了一些抗性基因, 根据菌株与噬菌体作用方式的不同, 抗性机制分为四类: 噬菌体吸附障碍, DNA 侵入抑制, 限制修饰系统和流产感染机制, 这些抗性机制大部分由质粒基因编码, 少数位于染色体上^[9]。*L. lactis* subsp. *lactis* ME2 是从乳酪混合发酵剂中分离的一株具有较强噬菌体抗性的野生菌株, 含有多个质粒, 其中在质粒上携带一个吸附障碍、两个 R/M 系统和两个流产感染^[10]。本文表 2 和表 3 结果表明, 当 R/M 系统 *LlaBIII* 基因与菌株 IL1403 的 R/M 系统基因和菌株 MG1614 [$pAW601$] 的流产感染基因 *AbiS* 在细胞内同时存在时, 对噬菌体的抗性表现出“协同效应”。这一结果与 Josephsen [1990] 将三种编码不同的 R/M 抗性机制的质粒共转化到乳酸乳球菌 MG1316 时构建的抗噬菌体菌株结论一致^[11], 并证明了采用共转化法将 *LlaBIII* 基因与其它抗性基因转化到同一株乳酸菌中以构建抗噬菌体工业菌株是可行的。但是本方法的不足是有些质粒间往往存在着复制的不兼容性而导致菌株遗传性状的不稳定, 所以在采用质粒的共转化时应考虑质粒间的兼容性。

将 R/M 系统 *LlaBIII* 与氯霉素抗性基因连接构建质粒 $pJK1$, 只是为了筛选方便, 如将 R/M 系统 *LlaBIII* 应用于工业生产菌株的构建, 需要与食品级载体连接或自然存在质粒 $pJW566$ 的直接转化, 这方面工作正在进行中。

致谢 本论文得到丹麦科学研究院的项目资助, 并感谢丹麦皇家畜牧和农业大学食品科学和乳制品系 Annete Madson 和 BashirAideh 在实验操作中给予的指导

参 考 文 献

- [1] Roberts R J. *Gene*, 1978 **4** :183 ~ 193.
- [2] Marshall R J, Berridge N J. *J Dairy Res*, 1976 **43** :1481 ~ 1485.
- [3] O ' Sullivan D J, Coffey A, Fitzgerald G F, et al. *Appl Environ Microbiol*, 1998 **64** :4618 ~ 4612.
- [4] 孔 健, 顾笑梅, 马桂荣. 微生物学报, 2001 **41** (5) :542 ~ 547.
- [5] 孔 健, Josephsen J, 马桂荣. 生物工程学报, 2001 **17** (6) :68 ~ 73.
- [6] Holo H, Nes I F. *Appl Environ Microbiol*, 1989 **55** :3119 ~ 3123.
- [7] Schouler C, Gautier M, Ehrlich S D, et al. *Mol Microbiol*, 1998 **28** :169 ~ 178.
- [8] Jarvis A W, Fitzgerald G F, Mata M, et al. *Intervirology*, 1991 **32** :2 ~ 9.
- [9] Forde A, Fitzgerald G F. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 1999 **76** :89 ~ 113.
- [10] Garvey P A, Hill C, Fitzgerald G F. *Appl Environ Microbiol*, 1996 **62** :676 ~ 679.

- [11] Josephsen J , Klaenhammer T. *Plasmid* ,1990 ,**23** :71 ~ 75 .
- [12] Gasson M J. *J Bacteriol* ,1983 ,**154** :1 ~ 9 .
- [13] Chopin A , Chopin M C , Moillo-Batt A , *et al* . *Plasmid* ,1984 ,**11** :260 ~ 263 .
- [14] Chandry P S , Moore S C , Davidson B E , *et al* . *Gene* ,1994 ,**138** :123 ~ 126 .
- [15] Moinean S , Fortier J , Ackermann H W , *et al* . *Appl Environ Microbiol* ,1993 ,**59** :197 ~ 202 .

The Resistance Conferred by the R/M System *Lla*BIII Against Bacteriophages

Kong Jian¹ Jytte Josephsen² Ma Gui-Rong¹

(¹ State Key Laboratory of Microbial Technology , Shandong University , Jinan 250100 , China)

(² Department of Dairy and Food Science , The Royal Veterinary and Agricultural University , Denmark)

Abstract : *Lla*BIII , isolated from the naturally occurring plasmid pJW566 from *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* W56 , encoded a restriction and modification (R/M) system. The plasmid pJK1 carrying the R/M system *Lla*BIII was transformed into *L. lactis* IL1403 with type I R/M system located on chromosome and the strain MG1614 [pAW601] with *Abi*S gene on plasmid pAW601 , respectively. The transformants obtained showed stacking resistance against bacteriophages. The plasmid pJK1 was transformed into industrial strains *L. lactis* SMQ86 and CHCC2281 , the transformants showed the EOP of the bacteriophages decreased by 10^{-3} and 10^{-5} , respectively. The results indicated that the R/M system *Lla*BIII could protect strains from bacteriophages in dairy fermentation.

Key words : *Lactococcus lactis* , Bacteriophages , Restriction and modification system , Dairy fermentation