

通过定点突变提高乳链菌肽对热及 pH 的稳定性

路遥¹, 蒋立科¹, 陈美玲², 还连栋², 钟瑾^{2*}

(¹ 安徽农业大学生命科学学院, 合肥 230036)

(² 中国科学院微生物研究所, 北京 100101)

摘要:【目的】通过定点突变技术改变乳链菌肽(nisin)特定位置氨基酸,获得性质改善的nisin突变体,为扩大其应用范围提供依据。【方法】在抑菌谱扩大的nisin单突变体M21K nisinZ的基础上,对M21K nisZ基因第29位丝氨酸密码子进行定点突变;将其克隆至乳酸菌表达载体pMG36e,并在*Lactococcus lactis* NZ9800中进行表达;双突变体M21K/S29K nisinZ经分离纯化后检测其在抑菌活性、抑菌谱和稳定性等方面的变化。【结果】与单突变体M21K nisinZ及野生型nisinZ(wild-type, WT)相比,双突变体M21K/S29K nisinZ对指示菌的抑菌活性虽有所下降,但其对温度及pH值的稳定性有显著提高。同时其抑菌谱与M21K nisinZ相同,可抑制革兰氏阴性菌,扩大了WT的抑菌谱。【结论】通过改变nisin分子特定位置的氨基酸可以改善nisin分子的理化性质,有可能得到应用范围更广的nisin品种。

关键词: 乳链菌肽; 稳定性; 温度; pH; 定点突变

中图分类号: Q933 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2010) 11-1481-07

乳链菌肽(nisin)是主要由乳酸乳球菌产生,通过核糖体合成并经翻译后修饰形成的阳离子多肽,其分子结构包括N端头部、ABC环结构域、铰链区、DE环结构域和C端柔性尾部等几部分。Nisin属AI类羊毛硫细菌素,可有效抑制多种食物腐败菌和病原菌,被广泛用作食品防腐剂。目前共发现6种nisin的天然变体,分别为nisinA、nisinZ、nisinQ、nisinF、nisinU和nisinU2。其中用于食品防腐剂的nisinA和nisinZ性质基本相似,其区别仅在第27位氨基酸,分别为组氨酸和天冬酰胺。由于nisin抑菌谱较窄,通常只能抑制革兰氏阳性菌,在物理(脉冲电场)或化学(EDTA)处理条件下才对革兰氏阴性菌有抑制作用^[1];而且只在低pH条件时表现较高的溶解度和稳定性^[2],在中性和碱性条件下几乎不溶解,并很快降解失活,这导致nisin在食品防腐剂

的实际应用中受到一些限制。因此,人们希望在进一步了解nisin分子结构与功能关系的基础上,对nisin分子进行改造,获得性质改善、应用范围更广的nisin产品。

本实验室在以往对nisin分子铰链区结构功能的研究中获得一个抑菌谱扩大、溶解度提高的突变体M21K nisinZ,其对革兰氏阴性菌亦出现抑制作用,但抑菌活性和稳定性无明显改变^[3]。因此我们在M21K nisinZ分子的基础上对其进行进一步改造,希望获得性质更优的nisin。而近期本实验室在研究乳链菌肽抗性蛋白(NSR)作用机制的过程中,发现NSR是通过在nisin分子C末端第29位丝氨酸之前切割nisin来发挥抗性作用的^[4],同时第29位丝氨酸还是nisin成熟分子中唯一未经翻译后修饰的丝氨酸,提示其可能对nisin的功能有重要影

基金项目: 国家“863计划”(2006AA10Z319); 中国科学院知识创新重要方向项目(KSCX2-YW-G-016)

* 通信作者。Tel: +86-10-64807401; E-mail: zhongj@im.ac.cn

作者简介: 路遥(1979-), 男, 安徽亳州人, 硕士研究生。主要从事乳酸菌分子遗传学研究。E-mail: luyao_6@hotmail.com

收稿日期: 2010-05-04; 修回日期: 2010-05-20

响。本研究即对 M21K *nisZ* 第 29 位丝氨酸进行定点突变,将其替换为带正电荷的赖氨酸,并检测所得双突变体 M21K/S29K *nisinZ* 在抑菌活性、抑菌谱和稳定性等方面的变化。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株及质粒:本研究所用菌株及质粒见表 1。

表 1 菌株与质粒

Table 1 Strains and plasmids

Strains and plasmids	Characteristics	Reference
<i>Escherichia coli</i> JM109	<i>recA</i> , <i>supE44</i> , <i>endA</i> , Δ (<i>lac-proA13</i>)F'	Our lab
<i>Lactococcus lactis</i> NZ9800	Tn5276, Δ <i>nisA</i> , non-nisin producer	NIZO ^[5]
<i>Micrococcus flavus</i> NCIB 8166	Gram-positive bacteria	Our lab
<i>Staphylococcus aureus</i> 26071	Gram-positive bacteria	Our lab
<i>Streptococcus pneumoniae</i> 1. 1692	Gram-positive bacteria	CGMCC
<i>Salmonella typhimurium</i> 1. 1174	Gram-negative bacteria	CGMCC
<i>Salmonella choleraesuis</i> 1. 1859	Gram-negative bacteria	CGMCC
<i>Shigella flexneri</i> 1. 1868	Gram-negative bacteria	CGMCC
<i>Shigella dysenteriae</i> 1. 1869	Gram-negative bacteria	CGMCC
pMG36e	3.6 kb, Em ^r , expression vector for <i>L. lactis</i>	J Kok ^[6]
pYWM21K	pUC19 carrying the M21K <i>nisZ</i> gene, Amp ^r	Our lab ^[3]
pHJ201	pMG36e carrying the <i>nisZ</i> gene, Em ^r	Our lab ^[7]
pYJM21K	pMG36e carrying the M21K <i>nisZ</i> gene, Em ^r	Our lab ^[3]
pLY21K29	pUC19 carrying the M21K/S29K <i>nisZ</i> gene, Amp ^r	This study
pLY2129K	pMG36e carrying the M21K/S29K <i>nisZ</i> gene, Em ^r	This study

1.1.2 培养基、工具酶及试剂:大肠杆菌培养用 LB 培养基,根据需要加入 100 mg/L ampicillin (Amp) 或 erythromycin (Em)。乳酸菌培养用 GM17 培养基^[8],必要时加入 5 mg/L Em。*Micrococcus flavus* NCIB 8166 用 S1 培养基^[9]。*Staphylococcus aureus* 26071 培养用 LB 培养基。*Streptococcus pneumoniae* 1. 1692、*Salmonella typhimurium* 1. 1174、*Salmonella choleraesuis* 1. 1859、*Shigella flexneri* 1. 1868 和 *Shigella dysenteriae* 1. 1869 所用培养基参照中国普通微生物菌种保藏管理中心 (CGMCC) 菌种目录。DNA 聚合酶、限制性内切酶、T₄ DNA 连接酶购自 TaKaRa 公司。Nisin 标准品购自 Sigma 公司,其余试剂为国产分析纯。

1.2 DNA 操作

大肠杆菌质粒 DNA 的提取和转化分别使用碱裂解法和 CaCl₂ 法^[10]。质粒电击转化乳酸菌参照文献^[11]方法进行。

1.3 *nisZ* 基因的定点突变和重组质粒的构建

本实验室在前期工作中以质粒 pMG36e^[6] 为骨架,分别构建了野生型 *nisinZ* 和 M21K *nisinZ* 的表达质粒 pHJ201^[7] 和 pYJM21K^[3],其中表达质粒 pYJM21K 构建自以 pUC19 为骨架的突变质粒 pYWM21K^[3] (质粒 pUC19 的 *EcoR* I 和 *Hind* III 位点间插入 M21K *nisZ* 片段)。

本研究中 M21K*nisinZ* 基因的定点突变参照文

献^[12]方法,以 pYWM21K 为模板、表 2 所列序列为引物进行。突变得得到含 M21K/S29K *nisZ* 基因的突变质粒 pLY21K29。为获得可在 *L. lactis* NZ9800 中表达 *nisin* 突变体的表达质粒 pLY2129K,用 *EcoR* I 与 *Hind* III 双酶切突变质粒,回收含突变基因的片段 (457 bp),与同样双酶切并回收的穿梭质粒 pMG36e 质粒片段 (3354 bp) 连接,连接产物转化 *E. coli* JM109 感受态细胞,用含 100 mg/L Em 的 LB 抗性平板筛选重组质粒阳性克隆。重组质粒 pLY2129K 经验证后电击转化 *L. lactis* NZ9800。本研究中引物合成及突变测序均由上海生工公司完成。

表 2 定点突变所用引物

Table 2 Primers used for site-directed mutagenesis

Primers	Sequence (5'→3') ^a
FS	ATTACGTAAGCAAATAACC
RS	TGTTTTTCATGTTACAACCCA
FT	GCAACTTGTAAATTG AAA ATTACGTAAGCAAATAACC
RT	TTT TACAATTACAAGT FGCT GTTTTTCATGTTACAACCCA

^a, Bold indicating the code of mutant amino acid.

1.4 重组菌生长曲线测定

参照文献 [13] 方法,测定 *L. lactis* NZ9800/pYJM21K 和 *L. lactis* NZ9800/pLY2129K 的生长曲线,以 *L. lactis* NZ9800/pHJ201 作为参照,实验重复 3 次。

1.5 突变体表达产物的纯化

Nisin 突变体粗品的制备参照文献 [14] 的方法

进行; 然后依次进行 Sephadex CM-25 离子交换色谱、Sephadex G-25 凝胶色谱和 RP-HPLC, 并用 RP-HPLC 进行纯度分析。

1.6 突变体抑菌活性检测

参照文献[15]方法, 采用琼脂扩散法检测 nisin 突变体对指示菌 *M. flavus* NCIB 8166 的抑菌活性。具体步骤为在含指示菌的培养基平板上均匀打孔, 孔内加入检测样品 30 μ L (样品为约含 17 mg/L nisin 突变体的 0.05 mol/L Tris-HCl 溶液, pH 值为 6.0), 将平板置 30 $^{\circ}$ C 培养后, 在孔周围会形成透明的抑菌圈, 由此判断样品的抑菌活性。

1.7 突变体抑菌谱测定

选择 7 株指示菌, 包括革兰氏阳性和阴性细菌, 采用琼脂扩散法测定 nisin 突变体对指示菌的抑菌活性, 所用样品为约含 17 mg/L nisin 突变体的 0.05 mol/L Tris-HCl (pH 6.0) 溶液, 样品体积为 30 μ L。

1.8 突变体稳定性检测

参照文献[3]方法, 将纯化后 nisin 突变体样品 (为约含 17 mg/L nisin 突变体的 0.05 mol/L Tris-HCl 溶液, pH 值为 6.0) 的 pH 值调整为 2 至 12, 分别于 25 $^{\circ}$ C 处理 10 min, 55 $^{\circ}$ C 处理 10 min 和 100 $^{\circ}$ C 处理 5 min 后, 用琼脂扩散法测定抑菌活性。

2 结果

2.1 定点突变及重组质粒的构建

考虑到 nisin 是两性分子, N 端含较多疏水氨基酸, C 端多亲水和正电荷氨基酸, 且 C 末端正电荷对其与敏感菌细胞膜的结合作用密切相关, 故选择将

第 29 位丝氨酸替换成带正电荷的赖氨酸。参照文献[12]方法在含单突变体编码基因 M21K *nisZ* 的质粒 pYJM21K 上进行第 29 位丝氨酸的定点突变, 突变质粒经测序验证正确后命名为 pLY21K29。将突变基因克隆至质粒 pMG36e 上, 得到可在 *L. lactis* NZ9800 中进行表达的重组质粒 pLY2129K。重组质粒经 *EcoR* I / *Hind* III 双酶切验证, 可见约 450 bp 和 3.3 kb 大小片段 (图 1-A), 与预期相符。再经测序确认, 保证重组质粒含有正确的突变。

将质粒 pLY2129K (含 M21K/S29K *nisZ* 基因)、pYJM21K (含 M21K *nisZ* 基因) 和 pHJ201 (含 *nisZ* 基因) 分别通过电击法转入 *L. lactis* NZ9800。利用菌落 PCR 检测转化子, 以 5'-ATCTGCCTCCTCA TCCTC-3' 和 5'-CTGCCACCTTCGTTTTCA-3' 为引物, 可分别扩增出约 550 bp 大小片段。图 1-B 显示转化子均扩增出大于 500 bp 片段, 与预期符合, 表明得到了可表达 nisin 及其突变体的重组乳酸菌 *L. lactis* NZ9800/pLY2129K、*L. lactis* NZ9800/pYJM21K 和 *L. lactis* NZ9800/pHJ201。

2.2 重组菌生长曲线的测定

将过夜培养的重组乳酸菌 *L. lactis* NZ9800/pHJ201、*L. lactis* NZ9800/pYJM21K 和 *L. lactis* NZ9800/pLY2129K 分别以 1:100 的比例转接至新鲜的 GM17 培养基中, 测定其生长曲线。实验结果显示, 表达双突变体 M21K/S29K *nisZ* 的 *L. lactis* NZ9800/pLY2129K 生长曲线与表达单突变体 M21K *nisZ* 的 *L. lactis* NZ9800/pYJM21K 和表达野生型 *nisZ* 的 *L. lactis* NZ9800/pHJ201 相比无显著变化 (图 2)。

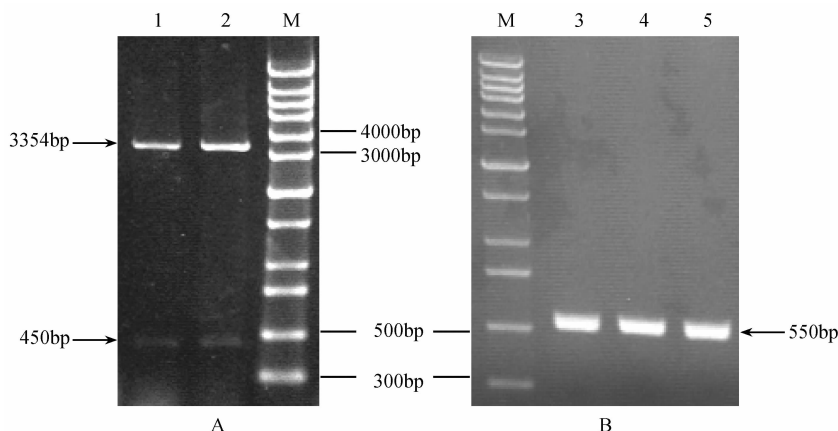


图 1 重组质粒鉴定

Fig. 1 Identification of recombinant plasmids. A: digestion of the plasmids by endonuclease; B: colony PCR. 1: pLY2129K; 2: pHJ201; 3: *L. lactis* NZ9800/pHJ201; 4: *L. lactis* NZ9800/pLY2129K; 5: *L. lactis* NZ9800/pYJM21K; M: Marker.

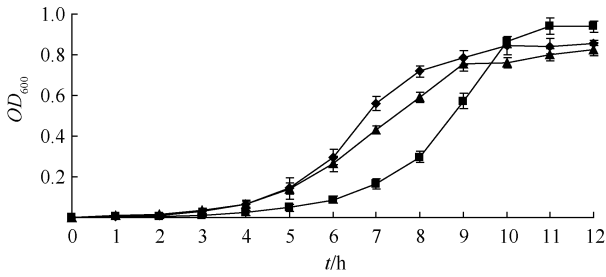


图2 Nisin 及其突变体产生菌的生长曲线

Fig. 2 Growth curve of strains of nisin and its mutants. ▲: *L. lactis* NZ9800/pHJ201; ■: *L. lactis* NZ9800/pYJM21K; ◆: *L. lactis* NZ9800/pLY2129K.

2.3 Nisin 突变体的纯化

按材料方法所述,对重组菌 *L. lactis* NZ9800/pLY2129K 产生的双突变体 M21K/S29K nisinZ 依次进行 Sephadex CM-25 离子交换色谱、Sephadex G-25 凝胶色谱和 RP-HPLC 等纯化。纯化后突变体经冷冻干燥后溶于 50 mmol/L Tris-HCl (pH 6.0)。RP-HPLC 分析显示其纯度达到 90% 以上(图 3-C)。野生型 nisinZ、单突变体 M21K nisinZ 按相同步骤纯化,经检测纯度均达到 90% 以上(结果略)。

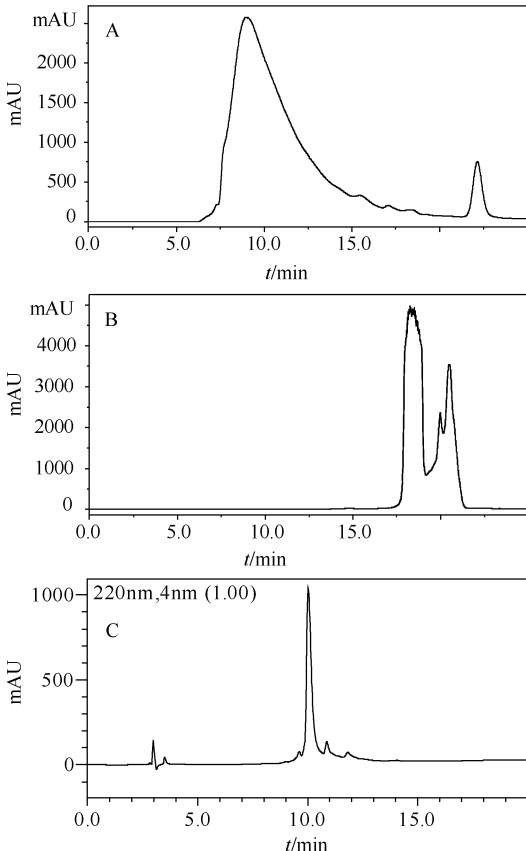


图3 M21K/S29K nisinZ 突变体的纯化

Fig. 3 Purification of M21K/S29K nisinZ. A: Sephadex CM-25; B: Sephadex G-25; C: RP-HPLC.

2.4 Nisin 突变体的活性检测

对指示菌 *M. flavus* NCIB 8166 的抑菌实验显示:与野生型 nisinZ 和单突变体 M21K nisinZ 相比,双突变体 M21K/S29K nisinZ 的抑菌活性降低,其中较 nisinZ 明显降低。

2.5 Nisin 突变体的抑菌谱

表 3 所列 nisin 及其突变体对革兰氏阳性菌 (G^+) 和阴性菌 (G^-) 的抑菌活性比较。结果显示:对 G^+ 菌 *M. flavus* NCIB 8166、*S. aureus* 26071 和 *S. pneumoniae* 1.1692 及 G^- 菌 *S. typhimurium* 1.1174、*S. choleraesuis* 1.1859、*S. flexneri* 1.1868 和 *S. dysenteriae* 1.1869, M21K nisinZ、M21K/S29K nisinZ 均有抑制作用;对 G^- 菌 *E. coli* JM109 则均无抑制作用。与 M21K nisinZ 相比, M21K/S29K nisinZ 在抑菌谱上未表现出差别,也显示其具有对某些革兰氏阴性菌的抑菌活性。

表3 Nisin 及其突变体的抑菌谱

Table 3 Antibacterial spectrum of nisin and its mutants

Strains	Characters	nisinZ	M21K nisinZ	M21K/S29K nisinZ
<i>Micrococcus flavus</i> NCIB 8166	G^+	+	+	+
<i>Staphylococcus aureus</i> 26071	G^+	+	+	+
<i>Streptococcus pneumoniae</i> 1.1692	G^+	+	+	+
<i>Escherichia coli</i> JM109	G^-	-	-	-
<i>Salmonella typhimurium</i> 1.1174	G^-	-	+	+
<i>Salmonella choleraesuis</i> 1.1859	G^-	-	+	+
<i>Shigella flexneri</i> 1.1868	G^-	-	+	+
<i>Shigella dysenteriae</i> 1.1869	G^-	-	+	+

+ :inhibition, - :without inhibition.

2.6 突变体对热及 pH 值稳定性

调整 nisinZ、M21K nisinZ 和 M21K/S29K nisinZ 突变体溶液的 pH 为 2 至 12,分别于 25℃、55℃ 加热 10 min,100℃ 加热 5 min,用琼脂扩散法测定其抑菌活性。从图 4 中可看出, nisinZ 及突变体在低 pH 值时稳定性较好,随着 pH 和温度的升高而逐渐降低。在 pH 值为 2 时, nisinZ、M21K nisinZ 和 M21K/S29K nisinZ 均表现最高稳定性;当 pH 从 2 升高到 8 时,经 25℃、55℃ 处理 10 min 和 100℃ 处理 5 min 后, M21K nisinZ 与 nisinZ 即完全失活,但 M21K/S29K nisinZ 仍保持缓慢下降趋势,当 pH 升至 12, M21K/S29K nisinZ 和 nisinZ 经 25℃ 处理 10 min 即完全失活,而 M21K/S29K nisinZ 经 25℃ 处理 10 min 后保留约 70% 活性,即使经 100℃ 处理 5 min 后,仍保留约 40% 活性,显示了其对热及 pH 的极高稳定性。

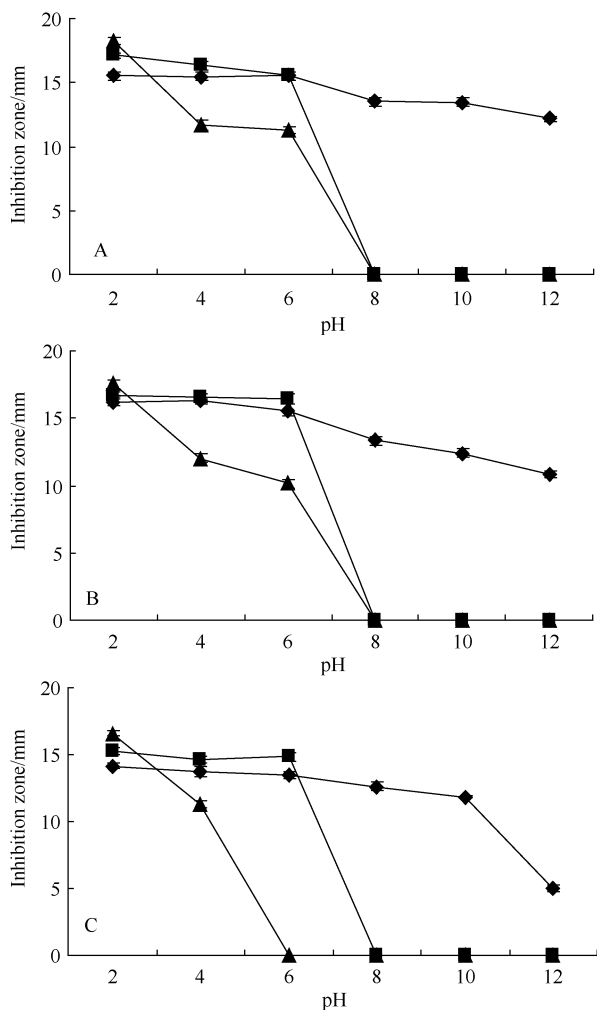


图4 Nisin及其突变体的稳定性

Fig. 4 Stability of nisin and its mutants. A: 25°C for 10 min; B: 55°C for 10 min; C: 100°C for 5 min. ▲: nisinZ; ■: M21K nisinZ; ◆: M21K/S29K nisinZ.

3 讨论

Nisin的生物合成涉及到结构基因、成熟基因、免疫基因及调节基因等,它们以一个完整的基因簇定位于转座子 Tn5276 上^[16]。对含 Tn5276 转座子的菌株 *L. lactis* NZ9700 进行改造构建的 *L. lactis* NZ9800,含有 nisin 成熟所需的全套基因,但 nisin 结构基因被破坏^[5],只有在引入外源 nisin 结构基因后才能产生 nisin。这一表达系统的建立极大方便及促进了对 nisin 结构与功能关系的研究。但目前只发现有少数特定位置氨基酸对改善 nisin 的性质有影响,如增大活性、提高稳定性或者扩大抑菌谱等^[17-18]。

在对 nisin 稳定性的研究中,稳定性明显提高突变的报道较少:其中A环S5T突变提高了低pH

条件下 nisin 的稳定性^[19];铰链区突变 N20Q、M21G 提高了高 pH 条件下的稳定性^[3],其中稳定性最高的 M21G 在 25°C、55°C 和 100°C 条件下可耐受的最高 pH 值分别为 11、10 和 9^[3]。而本研究中,双突变 M21K/S29K nisinZ 的稳定性,特别是高 pH 值条件下的稳定性较 nisinZ 及 M21K nisinZ 明显提高。结合 NSR 在 nisin 尾部第 29 位丝氨酸之前切割使 nisin 失活,提示 nisinZ 第 29 位丝氨酸可能与 nisin 的稳定性有密切关系。

Nisin 突变体抑菌谱扩大的报道极少,本实验室前期工作发现 N20K、M21K 突变体对某些革兰氏阴性菌出现抑制作用^[3]。在本研究中,双突变体 M21K/S29K nisinZ 的抑菌谱较野生型 nisinZ 的确发生了改变,对某些革兰氏阴性菌出现抑制作用,但与 M21K nisinZ 的抑菌谱相同。推测 M21K/S29K nisinZ 抑菌谱的改变主要是由于铰链区 21 位氨基酸的改变,与第 29 位氨基酸的改变关系不大。

在目前已报道的抑菌活性扩大的 nisin 突变体中,如 T2S、N20P、M21V、K22T、K22S,其突变位点均分别位于 nisin 的 N 端和铰链区;对 C 端尾部氨基酸与 nisin 活性关系的研究结果显示:引入负电荷氨基酸和芳香族氨基酸对活性通常是有害的(如 V32E nisinZ、V32W nisinZ^[20]),但引入额外正电荷氨基酸(如 H31K nisinZ、V32K nisinZ^[19-20])通常对活性影响不大。本研究将丝氨酸替换成赖氨酸,引入额外正电荷的双突变体 M21K/S29K nisinZ 活性较单突变体 M21K nisinZ 及野生型 nisinZ 降低,说明在 nisinZ 第 29 位引入正电荷氨基酸对 nisin 活性不利,也从侧面进一步说明了第 29 位丝氨酸对 nisin 活性的重要性。

作为一种天然食品防腐剂,nisin 广泛应用于罐头食品、肉制品、奶制品、植物蛋白食品和啤酒等的防腐保鲜,而且加入 nisin 还可降低食品加工过程中的能源消耗,显著改善食品的营养价值、外观、风味和质地,延长食品货架寿命,同时 nisin 在医药领域和轻工领域也极具应用潜力。但由于只在低 pH 值时才较稳定,限制了 nisin 的应用。我们通过定点突变提高了 nisin 的稳定性,获得了耐高温及高 pH 值的 nisin 突变体,可以很好地扩大 nisin 的应用范围。此外我们的研究也进一步探索了 nisin 结构对功能的影响,对帮助我们更深入地了解 nisin 结构与功能的关系,为 nisin 的性质优化提供了可行的依据。

参考文献

- [1] Stevens KA, Sheldon BW, Klapes NA, Klaenhammer TR. Nisin treatment for inactivation of *Salmonella* species and other gram-negative bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 1991, 57 (12): 3613-3615.
- [2] Liu W, Hansen JN. Some chemical and physical properties of nisin, a small-protein antibiotic produced by *Lactococcus lactis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 1990, 56(8):2551-2558.
- [3] Yuan J, Zhang ZZ, Chen XZ, Yang W, Huan LD. Site-directed mutagenesis of the hinge region of nisinZ and properties of nisinZ mutants. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2004, 64(6):806-815.
- [4] Sun Z, Zhong J, Liang X, Liu J, Chen X, Huan L. Novel mechanism for nisin resistance via proteolytic degradation of nisin by the nisin resistance protein NSR. *Antimicrobial Agents & Chemotherapy*, 2009, 53 (5): 1964-1973.
- [5] Kuipers OP, Beerthuyzen MM, Siezen RJ, De Vos WM. Characterization of the nisin gene cluster *nisABTCIPR* of *Lactococcus lactis*. Requirement of expression of the *nisA* and *nisI* genes for development of immunity. *European Journal of Biochemistry*, 1993, 216(1):281-291.
- [6] van de Guchte M, van der Vossen JM, Kok J, Venema G. Construction of a lactococcal expression vector: expression of hen egg white lysozyme in *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 1989, 55(1):224-228.
- [7] 陈秀珠, 胡海菁, 杨巍, 还连栋. 乳链菌肽前体基因 (*nisZ*) 在乳酸乳球菌中的克隆和表达. 遗传学报 (*Journal of Genetics and Genomics*), 2001, 28(3):285-290.
- [8] Van Den Hooven HW, Doeland CC, Van De Kamp M, Konings RN, Hilbers CW, Van De Ven FJ. Three-dimensional structure of the lantibiotic nisin in the presence of membrane-mimetic micelles of dodecylphosphocholine and of sodium dodecylsulphate. *European Journal of Biochemistry*, 1996, 235 (1-2): 382-393.
- [9] Cabo ML, Pastoriza L, Sampedro G, Gonzalez MP, Murado MA. Joint effect of nisin, CO₂, and EDTA on the survival of *Pseudomonas aeruginosa* and *Enterococcus faecium* in a food model system. *Journal of Food Protection*, 2001, 64(12):1943-1948.
- [10] Sambrook J, Russell DW. Molecular cloning: a laboratory manual. 3rd edn. Cold Spring Harbor N Y: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.
- [11] Wells JM, Wilson PW, Le Page RW. Improved cloning vectors and transformation procedure for *Lactococcus lactis*. *The Journal of applied bacteriology*, 1993, 74 (6): 629-636.
- [12] Chiu J, March PE, Lee R, Tillett D. Site-directed, Ligase-Independent Mutagenesis (SLIM): a single-tube methodology approaching 100% efficiency in 4 h. *Nucleic Acids Research*, 2004, 32(21):e174.
- [13] Takala TM, Saris PE. C terminus of NisI provides specificity to nisin. *Microbiology*, 2006, 152 (Pt 12): 3543-3549.
- [14] Kuipers OP, Rollema HS, Yap WM, Boot HJ, Siezen RJ, de Vos WM. Engineering dehydrated amino acid residues in the antimicrobial peptide nisin. *Journal of Biological Chemistry*, 1992, 267(34):24340-24346.
- [15] 张国只, 陈林海, 杨天佑, 陈洪卫, 秦广雍 王段. 琼脂扩散法测定乳链菌肽效价的优化. 食品科学 (*Food Science*), 2007, 28(3):175-177.
- [16] Dodd HM, Horn N, Gasson MJ. Analysis of the genetic determinant for production of the peptide antibiotic nisin. *The Journal of General Microbiology*, 1990, 136 (3): 555-566.
- [17] Asaduzzaman SM, Sonomoto K. Lantibiotics: diverse activities and unique modes of action. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2009, 107(5):475-487.
- [18] Lubelski J, Rink R, Khusainov R, Moll GN, Kuipers OP. Biosynthesis, immunity, regulation, mode of action and engineering of the model lantibiotic nisin. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2008, 65(3):455-476.
- [19] Rollema HS, Kuipers OP, Both P, de Vos WM, Siezen RJ. Improvement of solubility and stability of the antimicrobial peptide nisin by protein engineering. *Applied and Environmental Microbiology*, 1995, 61(8):2873-2878.
- [20] van Kraaij C, Breukink E, Rollema HS, Bongers RS, Kusters HA, de Kruijff B, Kuipers OP. Engineering a disulfide bond and free thiols in the lantibiotic nisin Z. *European Journal of Biochemistry*, 2000, 267(3):901-909.

Improving heat and pH stability of nisin by site-directed mutagenesis

Yao Lu¹, Like Jiang¹, Meiling Chen², Liandong Huan², Jin Zhong^{2*}

(¹College of Life Science, Anhui Agricultural University, Hefei 230036, China)

(²Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China)

Abstract: [**Objective**] The aim of this study was to optimize the property of nisin through altering its specific amino acid by site-directed mutagenesis method. [**Methods**] On the basis of M21K nisinZ, a former reported nisinZ mutant that exhibited antimicrobial activity against Gram-negative bacteria, the 29th amino acid of it was mutated from serine to lysine. The mutant M21K/S29K *nisZ* gene was cloned into vector pMG36e and the recombinant plasmid was introduced into *Lactococcus lactis* NZ9800. The resulting M21K/S29K nisinZ was then isolated and purified, and its antibacterial activity, antibacterial spectrum and stability were analyzed and compared to those of M21K nisinZ and nisinZ. [**Results**] Compared with wild-type nisinZ and M21K nisinZ, the M21K/S29K nisinZ displayed reduced antimicrobial activity, but showed significantly increased stabilities to heat and pH stress. Moreover, M21K/S29K nisinZ also exhibited antimicrobial activity against Gram-negative bacteria as M21K nisinZ did. [**Conclusion**] By changing the 29th amino acid of nisin, we can optimize the property of nisin, especially its stability to heat and pH stress.

Keywords: nisin; stability; heat; pH; site-directed mutagenesis

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the National High Technology Research and Development Program of China (863 Program) (2006AA10Z319) and by the Program of Knowledge Innovation, Chinese Academy of Sciences (KSCX2-YW-G-016)

* Corresponding author. Tel: +86-10-64807401; E-mail: zhongj@im.ac.cn

Received: 4 May 2010 / Revised: 20 May 2010

系统发育树的构建方法

构建系统树是为了鉴定菌株的分类学地位, 应该使用正确的方法构建。具体要求如下:

1. 将鉴定菌的 16S rRNA 序列递交 GenBank, 用 Blast 软件搜索相似的 16S rRNA, 然后一起构树。
2. 采用能反应分支长度的软件(如 NJ 法), 并用 Bootstrap 值分析分支聚类的稳定性。
3. 用国际较为通用的一些建树方法, 如 Neighbour - Joining 等, 这样结果就更为可靠, 更直观。
4. 请严格按照下列具体要求写作[参见: 微生物学报, 2004, 44(2): 143.]

① 系统树中: 菌名应列出全称, 且属和种名应斜体, 名称后再加括号, 其内含序列号。

② 图注(本刊的图注要求用英文写作): 应表明"树"上所有的内容, 包括: 括号中的序号、分支点上的数字涵义、0.01 代表的意义。

③ 作图要求: 要求达到印刷清晰, 字体为"Time New Roman", 字号为"8p"。可以选用两种方式——(A)文件格式为"*.Tif", 分辨率为 600 线;(B)文件格式为"word", 画出树, 输入文字。