

Nisin 抗性菌株的筛选及其抗性基因的克隆

李艳芳¹, 曹健^{1,2,*}, 吴兴泉¹, 万谦¹, 张洁琼¹, 田广兰¹

(1.河南工业大学生物工程学院, 河南 郑州 450001; 2.中原工学院, 河南 郑州 450007)

摘要: 利用乳酸链球菌肽(Nisin)抗性基因常与乳糖利用基因位于同一质粒上这一特性, 在含 300IU/mL Nisin 和质量浓度为 0.004g/100mL 溴甲酚紫的选择性培养基上, 从新鲜牛奶中初筛到 5 株 Nisin 抗性菌株。经脱脂乳培养基培养、革兰氏染色和镜检, 初步确定为乳球菌。分别以 5 株抗性菌株的基因组和质粒 DNA 为模板, 采用 PCR 对其 Nisin 抗性基因(*NSR*)保守序列进行了扩增, 从其中 3 株抗性菌株(分别命名为 N1、N2、N3)的质粒 DNA 上得到大小约 400bp 的目的基因产物。经 16S rDNA 鉴定, 进一步确定 3 株抗性菌株均为乳酸乳球菌。分别以 N1、N2、N3 的质粒为模板, 采用 PCR 扩增其全长 *NSR* 基因, 均得到大小约 1000bp 的目的产物。将从 N1 得到的 *NSR* 基因全长产物与 pMD-19T 进行连接测序, 结果显示, 其与已发表序列的相似性达 99%, 可确定其为 *NSR* 基因, 且位于抗性菌株 N1 的质粒上。

关键词: Nisin 抗性菌株; 筛选; Nisin 抗性基因(*NSR*); 克隆

Screening of Nisin-resistant Strain and Cloning of Its Nisin-resistant Gene

LI Yan-fang¹, CAO Jian^{1,2,*}, WU Xing-quan¹, WAN Qian¹, ZHANG Jie-qiong¹, TIAN Guang-lan¹

(1. College of Bioengineering, Henan University of Technology, Zhengzhou 450001, China;

2. Zhongyuan University of Technology, Zhengzhou 450007, China)

Abstract: According to the fact that Nisin-resistant gene and lactose-fermenting gene often have the same locus, five Nisin-resistant strains were screened from fresh milk with a selective medium (GM17) supplemented with 0.004 g/100 mL bromocresol purple and 300 IU/mL Nisin. By using skimmed culture medium, Gram's staining and microscopic examination, five strains were identified as *Lactococcus lactis*. PCR amplification of Nisin-resistant gene (*NSR*) was carried out with chromosome and plasmid DNA as templates. An expected PCR product with 400 bp was achieved from three out of five strains. The 16S rDNA sequence analysis revealed that three strains named as N1, N2 and N3 belonged to *Lactococcus lactis*. The full-length of Nisin-resistant determinant gene (*NSR*) with 1 kb in size was cloned with the plasmids N1, N2 and N3 as templates, respectively. The PCR product of N1 was sequenced and the amplicon exhibited 99% similarity with the published sequence and was therefore confirmed as *NSR* by Blast analysis.

Key words: Nisin-resistant strain; screening; Nisin-resistant gene (*NSR*); cloning

中图分类号: Q781

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2011)13-0156-05

乳酸链球菌肽(Nisin)又名乳酸链球菌素, 是乳酸乳球菌乳亚种(*Lactococcus lactis* subsp. *lactis*)在代谢过程中产生的一种抗菌肽, 对引起食品腐败的大多数革兰氏阳性菌有很好的抑制作用, 属于高效、无毒副作用的天然生物防腐剂, 其抑菌谱包括营养体和芽孢^[1]。乳酸乳球菌(*Lactococcus lactis*)本身也是一种革兰氏阳性菌, 但有些乳酸乳球菌中含有乳酸链球菌肽抗性基因而对 Nisin 具有抗性。研究表明, 不同的乳酸乳球菌抗性菌

株对 Nisin 产生抗性的机制不同。在 Nisin 产生菌中, 该抗性由 4 个基因共同决定, 其编码产物为细菌脂蛋白、ATP 活性蛋白和膜蛋白, 共同防止其产物对自身细胞的毒害作用^[2]; 而在不产生 Nisin 的乳酸菌中, 该抗性由单独一个基因(nisin resistance determinant gene, *NSR*)决定, *NSR* 含有一个由 957 个碱基组成的开放阅读框(ORF), 编码 318 个氨基酸^[3]。Froseth 等^[4]在不产 Nisin 的乳酸乳球菌中 PCR 扩增得到了 *NSR* 基因, 并证明其

收稿日期: 2010-10-25

基金项目: 河南省高校杰出科研人才创新工程资助项目(2006KYCX008)

作者简介: 李艳芳(1986—), 女, 硕士研究生, 研究方向为食品微生物学。E-mail: liyanfang0602@126.com

* 通信作者: 曹健(1969—), 女, 教授, 博士, 研究方向为食品微生物学。E-mail: biotech@haut.edu.cn

位于一个 60kb 的质粒上, 编码一个 35kD 的蛋白。云霞等^[5]从 20 份经巴氏消毒的牛奶及未经任何处理的若干新鲜牛奶的混合样品中, 在选择性培养基上分离了 3 株含有 *NSR* 基因的乳酸乳球菌, 并克隆了其全序列, 大小约为 1000bp。由于该 *NSR* 抗性基因来源于乳酸菌, 可以将这些标记基因整合到乳酸菌来源的多拷贝质粒中, 替代传统的抗生素抗性选择标记, 从而建立起乳酸菌食品级表达载体, 应用于食品工业、生物制药、疫苗研究等领域。国外已有利用 Nisin 抗性基因代替传统抗生素抗性选择标记, 发挥食品级表达载体特有优势的报道^[6-7]。目前, 我国对 Nisin 抗性基因作为筛选标记的研究还很少。本实验从新鲜牛奶中筛选 Nisin 抗性菌株, 采用 PCR 技术对其 Nisin 抗性基因进行克隆并测序, 以期为进一步构建乳酸菌食品级表达载体提供参考。

1 材料与方法

1.1 菌株与质粒

大肠杆菌(*E.coli*)DH5 α 菌株、金黄色葡萄球菌为河南省谷物资源与利用省级重点实验室生物转化与利用分实验室保藏; 其他乳酸乳球菌为本实验筛选获得; pMD19-T 载体购自宝生物工程(大连)有限公司。

1.2 培养基与试剂

GM17 液体培养基: 在 M17 培养基中加入 0.5g/100mL 葡萄糖。脱脂乳培养基: 脱脂奶粉 12.0g, 加水定容至 100mL, 混匀后分装, 115℃ 灭菌 30min。LB 培养基: 蛋白胨 10.0g、酵母粉 5.0g、氯化钠 10.0g(配制固体培养基时另加琼脂 15.0g)、水 1000mL, 调节 pH7.0~7.4, 121℃ 灭菌 20min。营养琼脂培养基: 称取营养琼脂 45.0g, 加入水 1000mL, 121℃ 灭菌 20min。

Nisin 美国 Sigma 公司; 溴甲酚紫 天津市瑞金特化学品有限公司; 氨苄青霉素(Amp)、5-溴-4-氯-3-吡啶- β -D 半乳糖苷(X-Gal)、异丙基- β -D-硫代吡喃半乳糖苷(IPTG)、溶菌酶 美国 Amresco 公司; 质粒小提试剂盒、细菌基因组提取试剂盒 天根生化科技(北京)有限公司; 凝胶回收试剂盒 上海捷瑞生物工程有限公司; DNA Marker、Taq PCR Master Mix 上海莱枫生物科技有限公司; 限制性内切酶 宝生物工程(大连)有限公司; 其他试剂均为分析纯。

1.3 仪器与设备

SPX-150BS- II 型生化培养箱 上海新苗医疗器械制造有限公司; SW-CT-2F 型超净工作台 苏州净化设备有限公司; 电子天平 日本岛津公司; Biofuge 台式高速冷冻离心机 德国 Heraeus 公司; DYY-III-6B 型稳压稳流电泳仪 北京市六一仪器厂; 凝胶成像仪

美国 Bio-Rad 公司; Tpersonal-48 型 PCR 仪 德国 Biometra 公司。

1.4 方法

1.4.1 Nisin 活性的验证

将直径 5mm 的滤纸片在 10⁴ IU/mL 的 Nisin 原液中浸泡后, 贴在涂布有金黄色葡萄球菌的营养琼脂平板上, 37℃ 培养 18~14h 后, 观察是否有抑菌圈出现。

1.4.2 Nisin 抗性菌株的筛选及初步鉴定

将采购自郑州市某牛奶场的新鲜牛奶样品以 10% 的接种量接入含 20IU/mL Nisin 的 GM17 液体培养基中, 30℃ 静置培养 16h。取 15 μ L 培养物, 涂布在添加有 0.004g/100mL 溴甲酚紫和 300IU/mL Nisin 的 GM17 固体培养基平板上, 30℃ 培养 24h。挑取使周围培养基颜色由紫色变黄色的菌落^[8], 在添加有 0.004g/100mL 溴甲酚紫和 300IU/mL Nisin 的 GM17 固体培养基平板上, 采取四区划线法分离单菌落。将分离的单菌落接种到脱脂乳培养基中^[9], 30℃ 培养 24h。选取能使脱脂乳培养基凝固的菌株进行革兰氏染色和镜检^[10], 挑选球状或链球状的革兰氏阳性菌进行保存, 用作进一步的鉴定以及 Nisin 抗性基因保守序列的克隆。

1.4.3 Nisin 抗性基因(*NSR*)保守序列的克隆

按照改良的质粒小提试剂盒提取方法进行 1.4.2 节所筛选菌株的质粒提取, 即在试剂盒提供的溶液 P1 中加入 20mg/mL 溶菌酶, 置于 40℃ 水浴中保持 30min^[11]。利用 Tiangen 细菌基因组提取试剂盒提取 1.4.2 节所筛选菌株的基因组。

根据已发表的 *NSR* 开放阅读框中的一段保守序列^[4], 设计如下两条引物, 分别以抗性菌质粒和基因组为模板, 扩增其 *NSR* 基因保守序列。上游引物 P1: 5'-CCT CAG AAG TAT GTT CGA GT-3'; 下游引物 P2: 5'-ATA AGT CTC CAC CTC TAT TC-3'。

PCR 反应条件如下: 95℃ 预变性 3min; 94℃ 变性 1min, 55℃ 退火 1min, 72℃ 延伸 50s, 进行 30 个循环; 72℃ 延伸 10min。

1.4.4 抗性菌株 16S rDNA 鉴定

以扩增出 *NSR* 保守序列的菌株的基因组为模板, 扩增其 16S rDNA, 所用引物为细菌通用引物: 上游 27F: 5'-AGA GTT GAT CCT GGC TCA G-3'; 下游 1942R: 5'-GGT TAC CTT GTT ACG ACT T-3'。

PCR 反应条件为: 95℃ 预变性 5min; 94℃ 变性 30s, 55℃ 退火 1min, 72℃ 延伸 1.5min, 进行 30 个循环; 72℃ 延伸 10min。PCR 产物经 0.8% 的琼脂糖凝胶电泳, 并回收纯化后, 由宝生物工程(大连)有限公司测序, 并利用 Blast 软件在线比对(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>)进行序列同源性分析。

1.4.5 含有转录起始子及终止子的 *NSR* 基因全序列扩增及测序

以扩增出 *NSR* 保守序列的菌株的质粒为模板, 采用 PCR 扩增其全长 *NSR* 基因。根据 Froseth 等^[14]发表的 *NSR* 基因的全序列设计一对引物: 上游引物(*NSR* 1): 5'-GGG ATG AAA ATA GGT AAG CG-3'; 下游引物(*NSR* 2): 5'-GGG TGA CTA GCA AAA AAG AC-3'。

PCR 反应条件如下: 95℃预变性 3min; 94℃变性 1min, 52℃退火 1min, 72℃延伸 1.5min, 进行 30 个循环; 72℃延伸 10min。

将 PCR 产物连接到 pMD19-T 载体上, 转化 *E. coli* DH5 α , 在含 X-Gal、IPTG、Amp 的 LB 培养基平板上挑取白色菌落, 抽提质粒 DNA。对重组质粒进行 PCR 扩增 *NSR* 基因和用 *Xba* I 和 *Hind* III 双酶切鉴定后, 由宝生物工程(大连)有限公司测定重组质粒中 PCR 扩增片段的 DNA 序列。

2 结果与分析

2.1 Nisin 活性的验证

根据文献[12]报道, Nisin 对金黄色葡萄球菌具有很强的抑制作用。本实验发现在涂布有金黄色葡萄球菌的营养琼脂平板上, 浸泡过 Nisin 原液的滤纸片周围出现明显的抑菌圈, 平均直径为 2cm(图 1)。说明 Nisin 原液具有抑菌活性, 可用于下一步实验。

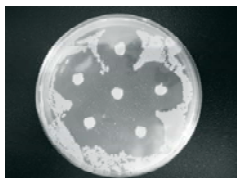


图 1 Nisin 原液抑菌实验结果

Fig.1 Anti-*Staphylococcus aureus* effect of Nisin

2.2 Nisin 抗性菌株的筛选及初步鉴定结果

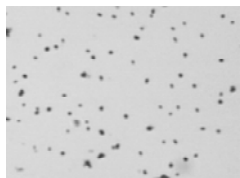


图 2 Nisin 抗性菌株革兰氏染色镜检结果

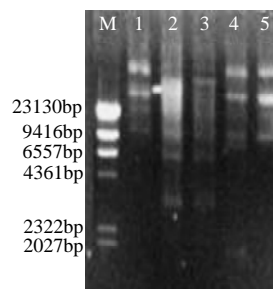
Fig.2 Results of Gram's staining

Nisin 抗性基因常与乳糖利用基因位于同一个质粒上^[13]。在以乳糖作为碳源, 并添加适当 Nisin 的 GM17 培养基上, 以溴甲酚紫作为指示剂, 进行 Nisin 抗性菌株的筛

选。如果菌株既对 Nisin 有抗性, 又能利用乳糖, 则能使菌落周围的培养基由紫色转变为黄色。实验中, 在添加有溴甲酚紫和 Nisin 的 GM17 选择性培养上, 共筛选到 5 个能使周围培养基颜色由紫色变为黄色的有代表性的单菌落。经复筛, 它们均能使脱脂乳液体培养基凝固。经镜检为球菌, 革兰氏染色阳性(图 2), 初步鉴定为乳球菌。

2.3 Nisin 抗性菌株 *NSR* 基因保守序列的克隆

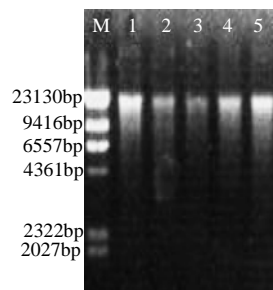
据文献[7]报道, 有两种机制可导致 Nisin 抗性的产生, 一是 Nisin 产生菌的免疫机制导致的 Nisin 抗性, 它由 4 个基因 *nis I*、*nis F*、*nis E* 和 *nis G* 共同决定; 二是不产 Nisin 的乳酸乳球菌的 Nisin 抗性, 它由单一基因 *NSR* 决定。为了后续实验的需要, 本实验以单一 *NSR* 抗性基因作为研究对象。分别以抗性菌质粒和基因组为模板, 扩增其 *NSR* 基因保守序列。筛选得到的 5 株乳球菌, 其质粒和基因组提取结果如图 3、4 所示。质粒提取结果显示, 5 株菌都出现了多个条带。基因组提取结果显示, 5 株菌都出现了条带, 且位置相同, 在 23130bp 左右, 可以作为模板用于后续实验。



M. λ -Hind III Marker; 泳道 1~5.5 株抗性菌的质粒 DNA。

图 3 5 株 Nisin 抗性菌质粒提取结果

Fig.3 PCR amplified products of conserved DNA sequence from plasmids of five Nisin-resistant strains



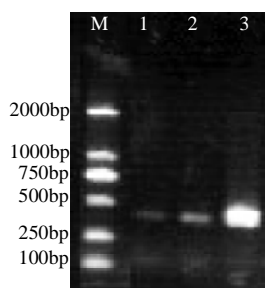
M. λ -Hind III Marker; 泳道 1~5. 5 株抗性菌的基因组 DNA。

图 4 5 株 Nisin 抗性菌基因组 DNA 提取结果

Fig.4 PCR amplified products of conserved DNA sequence from plasmids chromosomes of five Nisin-resistant strains

分别以 5 株乳球菌的基因组和质粒为模板, PCR 扩增其 Nisin 抗性基因保守序列, 结果以其中 3 株菌的质

粒为模板时,得到了预期的条带,大小约为400bp(图5),将该3株菌标记为N1、N2、N3。此结果也表明,Nisin抗性基因位于质粒上。



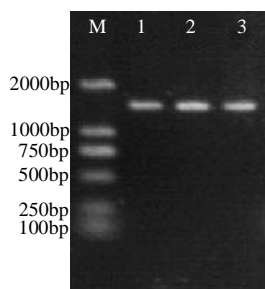
M. DL 2000 Marker; 泳道1~3. N1、N2、N3 NSR 保守序列 PCR 扩增产物。

图5 N1、N2、N3 NSR 保守序列 PCR 扩增结果

Fig.5 PCR amplified products of conserved sequences in NSR gene of strains N1, N2 and N3

2.4 Nisin 抗性菌株 16S rDNA 鉴定

16S rRNA 为核糖体 RNA 的一个亚基,而 16S rDNA 是编码该亚基的基因。在细菌的 16S rDNA 中有多个区段高度保守,根据这些保守区,可以设计出细菌的通用引物^[14]。分别以 N1、N2、N3 的基因组为模板,扩增其 16S rDNA,在 1500bp 左右的位置出现了预期的条带(图6)。将 PCR 产物纯化后测序,并进行 Blast 比对,结果显示 N1、N2、N3 均为乳酸乳球菌。



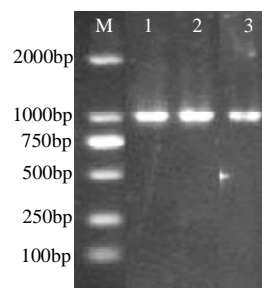
M. DL 2000 Marker; 泳道1~3. N1、N2、N3 NSR 16S rDNA PCR 扩增产物。

图6 N1、N2、N3 16S rDNA 扩增结果

Fig.6 PCR amplified products of 16S rDNA sequences in strains N1, N2 and N3

2.5 Nisin 抗性菌株 NSR 基因全序列扩增及测序

分别以 N1、N2、N3 的质粒为模板,经 PCR 扩增得到了预期的基因片段,大小在 1000bp 左右(图7)。将 N1 的 PCR 产物与 pMD19-T 载体连接,进行测序。将测序结果与 Genbank 中公布的 Nisin 抗性基因进行 Blast 比对,发现其序列相似性达 99%,证明该基因为 Nisin 抗性基因,可用于下一步实验。



M. DL 2000 Marker; 泳道1~3. N1、N2、N3 NSR 全长序列 PCR 扩增产物。

图7 NSR 全序列的 PCR 扩增结果

Fig.7 PCR amplified products of full-length NSR

3 结论与讨论

本实验利用 Nisin 抗性基因常与乳糖利用基因位于同一个质粒上的特性,在含有 Nisin 和溴甲酚紫的选择性培养基上,初步筛选得到具有 Nisin 抗性的菌株,并对其生理生化鉴定和 Nisin 抗性基因保守序列的克隆,进一步筛选含 Nisin 抗性基因的菌株,然后再进行 16S rDNA 鉴定,确定筛选得到的 3 株菌株均为乳酸乳球菌。最后扩增得到其 Nisin 抗性基因全长序列,并进行测序,结果显示,其与已发表的 Nisin 抗性基因序列相似性达 99%。在实验中,分别以基因组和质粒为模板进行 Nisin 抗性基因保守序列的扩增,其中,以质粒为模板时得到了目的片段,表明 Nisin 抗性基因位于质粒上,与文献报道相符^[15-16]。

乳酸菌(lactic acid bacteria, LAB)是一类在食品工业中应用最为广泛的重要菌株,它包括乳球菌、乳酸杆菌、双歧杆菌等十几个属^[17],很早以来就被人类用于制作泡菜、酱油、奶酪和酸奶等而家喻户晓,是公认安全的(generally regarded as safe, GRAS)食品级微生物。利用乳酸菌作为食品级基因表达系统,来表达重要的医用功能蛋白,以赋予乳酸菌新的生理功能,正成为目前研究的一个热点。同时,乳酸菌食品级表达系统的载体、受体及诱导物均为食品级^[18],可直接制成口服制剂,省去一般基因工程菌所需的繁琐、复杂的后续提取工艺,从而可为利用基因工程技术生产安全、廉价的生物制品开辟新途径。不过,目前所构建的重组乳酸菌多经过了遗传修饰,存在安全隐患,使重组菌的应用受到限制。如乳酸乳球菌通用表达质粒 pMG36e 是一个经典的人工构建的组成型表达载体,但是含有红霉素抗性基因,这在一定程度上就限制了它的使用^[19]。而 Nisin 抗性基因来自于乳酸菌自身,用其代替传统的抗生素抗性筛选标记,可构建出具有良好应用潜力的食品级载体。

参考文献:

- [1] 焦世耀, 张兰威, 韩建春, 等. 乳链菌肽抗性嗜热链球菌的筛选[J]. 东北农业大学学报: 自然科学版, 2005, 36(1): 66-70.
- [2] SIEGERS K, ENTIAN K D. Genes involved in immunity to the lactibiotic Nisin produced by *Lactococcus lactis* 6F3[J]. Appl Environ Microbiol, 1995, 61(3): 1082-1089.
- [3] 刘家乐, 孙志增, 刘一苇, 等. 大肠杆菌重组乳链菌肽抗性蛋白(NSR)的表达纯化及其功能分析[J]. 微生物学通报, 2009, 36(10): 1519-1525.
- [4] FROSETH B R, MCKAY L L. Molecular characterization of the Nisin resistance region of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar diacetyllactis DRC3[J]. Appl Environ Microbiol, 1991, 57(3): 804-811.
- [5] 云雪霞, 胡静, 陈清. 乳链菌肽抗性基因的筛选、分离及鉴定[J]. 南方医科大学学报, 2006, 26(6): 839-842.
- [6] LIU C Q, SU P, KHUNAJAKR N, et al. Development of food-grade cloning and expression vectors for *Lactococcus lactis*[J]. J Appl Microbiol, 2005, 98(1): 127-135.
- [7] TAKALA T M, SARIS P E. A food-grade cloning vector for lactic acid bacteria based on the Nisin immunity gene *nisI*[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2002, 59(4/5): 467-71.
- [8] 汤莎, 陈秀珠, 杨巍, 等. 一个含有乳链菌肽抗性基因的乳酸乳球菌质粒 pTS50 的鉴定[J]. 微生物学报, 2001, 41(5): 536-541.
- [9] 马国辰. 乳酸菌混合菌株增菌培养基的筛选[D]. 北京: 中国农业大学, 2006.
- [10] 周德庆. 微生物学实验教程[M]. 2版. 北京: 高等教育出版社, 2006: 29-31.
- [11] 万谦, 曹健, 吴兴泉, 等. 乳酸菌天然质粒提取方法的优化[J]. 中国生物工程杂志, 2010, 30(2): 94-99.
- [12] 吕淑霞, 白泽朴, 代义, 等. 乳酸链球菌素(Nisin)抑菌作用及其抑菌机理的研究[J]. 中国酿造, 2008(9): 87-91.
- [13] DUAN K, HARVEY M L, LIU Chunqiang, et al. Identification and characterization of a mobilizing plasmid, pND300, in *Lactococcus lactis* M189 and its encoded Nisin resistance determinant[J]. J Appl Bacteriology, 1996, 81(5): 493-500.
- [14] 郭凤莲, 陈村社. 产淀粉酶枯草芽孢杆菌的 16S rRNA 测序鉴定[J]. 中国酿造, 2007(8): 26-28.
- [15] LIU Chunqiang, HARVEY M L, DUNN N W. Cloning of a gene encoding Nisin resistance from *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* M189 which is transcribed from an extended -10 promoter[J]. J Gen Appl Microbiol, 1997, 43(1): 67-73.
- [16] von WRIGHT A, WESSELS S, TYNKKYNNEN S, et al. Isolation of a replication region of a large lactococcal plasmid and use in cloning of a Nisin resistance determinant[J]. Appl Environ Microbiol, 1990, 56(7): 2029-2035.
- [17] 张刚. 乳酸细菌: 基础、技术和应用[M]. 北京: 化学工业出版社, 2007: 22-23.
- [18] 张振中, 陈秀珠, 贾士芳, 等. 乳酸菌食品级基因表达系统[J]. 生物工程学报, 2002, 18(4): 516-520.
- [19] van de GUCHTE M, van der VOSSSEN J M B M, KOK J, et al. Construction of a lactococcal expression vector: expression of hen egg white lysozyme in *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*[J]. Appl Environ Microbiol, 1989, 55(1): 224-228.