



## 乳链菌肽抗性基因的筛选、分离及鉴定

乳酸链球菌素, 又名乳链菌肽, 是某些乳酸乳球菌(*Lactococcus lactis*, L.L)产生的一种小分子多肽抗菌物质, 为一种无毒性的天然食品防腐剂, 能杀死大部分革兰氏阳性菌(G<sup>+</sup>菌)。乳酸乳球菌亦为一种G<sup>+</sup>菌, 可被乳酸链球菌素所杀灭, 但部分乳酸乳球菌可抵抗乳酸链球菌素对其的杀灭作用。研究证明, 部分乳酸乳球菌含有乳链菌肽抗性基因, 从而产生对乳酸链球菌素的抵抗作用。由于该抗性基因来源于益生菌, 国外已有报道将其用作筛选标记替代传统抗生素抗性选择标记构建载体, 发挥食品级载体特有的优势[1][2]。目前, 国内少有利用乳链菌肽抗性(nisin resistance determinant, NSR)进行研究的报道。为构建具有自主知识产权的食品级载体, 本实验从牛奶场采取的鲜奶样品中筛选具有对乳酸链球菌素抗性的乳酸乳球菌, 并进一步从中分离和鉴定NSR基因。

### 1 材料和方法

#### 1.1 材料

1.1.1 菌株 L.L标准株MAFF 400203及MAFF 516032 由日本MAFF GENE BANK Toyazo Sato 博士惠赠, 其他乳酸乳球菌均为本实验筛选获得。大肠杆菌*E. coli* 44813由本实验室保存, 购于卫生部生物制品鉴定研究所。

1.1.2 培养基 乳酸乳球菌培养用Elikker琼脂培养基及液体培养液, 配方见文献[3]。大肠杆菌培养用LB培养基。

1.1.3 主要试剂 乳酸链球菌素购自天津耀彭生物技术有限公司(1000 IU/mg), PCR试剂及琼脂糖购自上海生工生物技术有限公司, 相对分子质量标准物及DNA纯化回收试剂盒, 溶菌酶等均购自北京鼎国生物技术有限公司, 限制性内切酶为TOYOBO公司产品, 其他化学试剂均为分析纯。

#### 1.2 方法

1.2.1 乳酸链球菌素储存液的配制 用0.02 mol/L的HCl(pH2.0)溶解, 浓度为 1 mg/ml, 0.22 μm滤膜除菌, 于-20 °C保存[4]。

1.2.2 乳酸链球菌素活性验证 分别在添加350 IU/ml及不添加乳酸链球菌素的Elikker琼脂平板上, 接种MAFF 400203及MAFF 516032, 观察是否有菌落生长。

1.2.3 含NSR基因的乳酸乳球菌的初步筛选 参照文献[5]: 在乳酸乳球菌选择性培养基(含乳糖)上加入两种一定浓度的添加剂: 350 IU/ml 乳酸链球菌素及溴甲酚紫指示剂(使培养基显示紫色), 20份经巴氏消毒牛奶及广州燕塘牛奶场采取的未经任何处理的混合新鲜牛奶样品, 每份均从10<sup>-1</sup>~10<sup>-8</sup>稀释成不同浓度, 分别在上述选择性培养基上取100 μl涂布及划线培养, 32 °C培养16~24 h。选取培养基上可以生长并使周围培养基变黄的菌落, 反复划线纯培养, 获得单菌落, 镜下观察呈球状或者链球状的菌株于Elikker液体培养基中增菌培养, 30%甘油-20 °C保存, 备用。

1.2.4 DNA提取、质粒提取、PCR反应见文献[6]。

1.2.5 乳酸乳球菌的鉴定 参考文献[7]发表的乳酸乳球菌16S rRNA基因的保守序列设计引物Lac-P1及Lac-P2(表1)。以MAFF 400203及MAFF 516032为阳性对照, 以大肠杆菌E. coli 44813为阴性对照, 进行乳酸乳球菌特异性16S rRNA的PCR扩增。反应条件: 95 °C 预变性3 min, 94 °C 1 min, 52 °C 1 min, 30个循环, 72 °C 50 s。

1.2.6 NSR基因的PCR扩增性筛选 根据Froseth等[8]发表的NSR基因序列中一段保守序列设计引物Nsr-P1及Nsr-P2(表1), 扩增抗性基因的保守序列, 从而在表型筛选的基础上进一步用PCR扩增性筛选含抗性基因的菌株。以MAFF 400203及MAFF 516032为阴性对照。反应条件: 95 °C 预变性3 min, 94 °C 1 min, 55 °C 1 min, 30个循环, 72 °C 50 s。

1.2.7 含有转录起始子及终止子的NSR基因的全序列扩增 为后期克隆表达等实验的需要, 根据Froseth等[8]发表的NSR的全序列, 用Primer premier 5.0设计一对引物: Nsrc-P1, Nsrc-P2(表1), 引入 BamH I 及EcoR I两个酶切位点, 对上述扩增出400 bp的菌株进一步扩增其全序列, 并对产物进行纯化回收, 以备后续使用。反应条件: 95 °C 预变性3 min, 94 °C 1 min, 55 °C 1 min, 30个循环。以上PCR反应均以细菌总DNA为模板。

表 1 引物序列

Tab.1 Sequence of the primers for PCR

Primers	Sequence(5-3')	Size of products(bp)
Lac-P1	5'-CCTCAGAAGTATGTTTCGAGT-3'	90
Lac-P2	5'-ATAAGTCTCCACCTCTATTC-3'	
Nsrp-P1	5'-CCTCAGAAGTATGTTTCGAGT-3'	400
Nsrp-P2	5'-ATAAGTCTCCACCTCTATTC-3'	
Nsrc-P1	5'-AGG <u>GGATCC</u> ATGAAAATAGGTAAGCGCA-3' ( <i>Bam</i> HI)	1011
Nsrc-P2	5'-CGC <u>GAATTC</u> GTTTTGACTAGCAAAAAAGAC-3'( <i>Eco</i> R I)	

1.2.8 NSR 基因的定位 革兰氏阳性菌细胞壁厚, 故根据von Wright [9]的方法提取抗性菌株的质粒, 用作PCR反应的模板, 扩增NSR基因, 验证其基因定位。

1.2.9 NSR基因限制性酶切位点分析及酶切鉴定 登陆Genedao分析其酶切位点, 并用Sac I单酶切, 鉴定扩增产物。

1.2.10 序列测定 对PCR产物纯化回收, 具体步骤按试剂盒操作说明进行, 送Invitrogen公司测序, 软件对比分析其序列, 确定是否为NSR基因。

## 2 结果

### 2.1 乳链菌肽杀菌作用验证

在含有乳链菌肽的选择性培养基上, MAFF 400203及MAFF 516032均无菌落生长, 而在不含乳链菌肽的培养基上生长良好。

### 2.2 抗性菌株的表型筛选结果

文献报道乳链菌肽抗性基因与乳糖发酵基因位于同一质粒上[10], 故在添加了乳链菌肽、乳糖及指示剂的选择性培养基上, 菌株既对乳链菌肽有抗性, 又可以发酵乳糖使指示剂变色, 二者紧密连锁。表现为含有乳链菌肽抗性基因的菌株可在含乳链菌肽的E11iker选择性培养基上生长, 同时, 发酵乳糖使培养基由紫变黄。通过此表型, 对经过巴氏消毒的20份新鲜牛奶及未经消毒的新鲜混合牛奶样品进行初步筛选, 从新鲜牛奶样品中筛选到30株乳链菌肽抗性的乳酸乳球菌, 依次命名为Lactococcus lactis Ep0401, Ep0402……Ep0430。革兰氏染色镜检显示该菌为革兰氏阳性菌, 形态呈单个球状或者几个黏附在一起的链球状(图1), 与标准株MAFF 400203及MAFF 516032镜下形态完全一致。

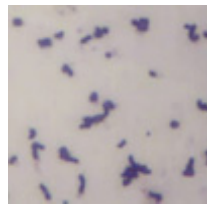


图1 分离的乳酸乳球菌镜下形态

Fig.1 *Lactococcus lactis* under microscope (Gram staining, original magnification:  $\times 40$ )

### 2.3 乳酸乳球菌的分子生物学鉴定

对筛选出的30株菌进行乳酸乳球菌特异性16S rRNA的PCR扩增，结果显示，均扩增出预期90 bp大小的片段(图2)。从而确定分离出的30株菌确为乳酸乳球菌。

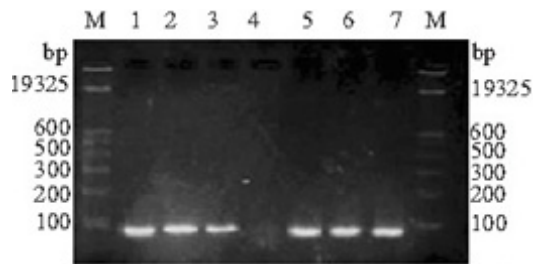


图2 乳酸乳球菌的16S rRNA的PCR扩增

Fig.2 PCR products of *Lactococcus lactis* 16S rRNA amplified with specific primers  
Lane 1: *L. lactis* MAFF 400203; Lane 7: *L. lactis* MAFF 516032; M: 100-bp DNA ladder;  
Lanes 2, 3, 5, 6: *L. lactis* Ep0401, Ep0402, Ep0403, and Ep0422; Lane 4: Negative control

### 2.4 NSR基因保守序列的扩增结果

由于基因两端序列的可变区域，不利于扩增性筛选，故根据文献报道的全序列中的保守序列，用特异性引物进行PCR扩增，有10株扩增出预期的400 bp片断，标记该10株菌，用于进一步扩增NSR的全序列(图3)。

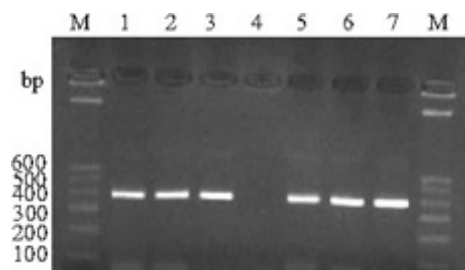


图3 NSR基因的保守序列的PCR扩增

Fig.3 PCR products of the conserved sequence of NSR gene  
M: 100-bp DNA ladder; Lanes 1, 2, 3, 5, 6, 7: *L. lactis* Ep0401, Ep0402, Ep0403, Ep0404, Ep0405, Ep0422 Ep0424 ; Lane 4: Negative control

### 2.5 NSR基因全序列的扩增及单酶切鉴定

对扩增出400 bp保守序列的10株乳酸乳球菌用Nsrc-P1及Nsrc-P2扩增全序列，结果L. LEp0404, Ep0405, Ep0424 扩增出预期的1.0 kb左右的片断，用SacI单酶切，得到两个片段，分别约为890、120 bp，与预期的片断大小完全相符(图4)。

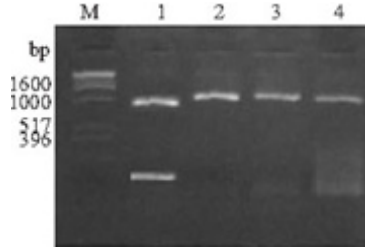


图4 NSR 全序列的扩增及Sac I 单酶切

Fig.4 PCR products of the complete sequence of NSR gene and enzyme digestion  
M: 1 kb DNA ladder; Lane 1: SacI digestion; Lanes 2-4: *L. lactis* Ep0404, Ep0405, and Ep0424

## 2.6 测序结果

用DNA STAR软件对序列进行分析，证明该基因确为乳链菌肽抗性基因。

## 2.7 NSR基因定位初步分析

用提取的乳酸乳球菌质粒为模板扩增NSR基因，均可扩增出1.0 kb的片断(图5)，从而证明NSR确实定位于质粒上，其在质粒上的精确定位有待进一步研究。

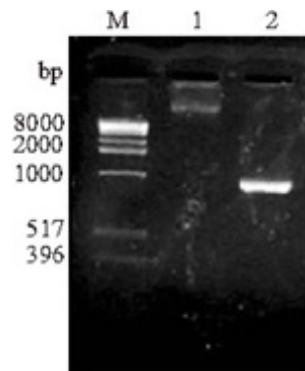


图5 4号乳酸乳球菌质粒及其为模板扩增的PCR产物

Fig.5 No.4 *L. lactis* plasmid and its PCR products  
M: 1 kb DNA ladder; Lane 1: No.4 *L. lactis* plasmid; Lane 2: PCR products of *L. lactis* plasmid

## 3 讨论

近年来，食品级载体逐渐成为分子生物领域研究的热点，食品级筛选标记是构建该载体的关键，它可以避免传统抗生素抗性选择标记的缺点抗性基因水平转移到胃肠道菌群中，使其产生耐药性，导致肠道微生态的破坏。国外一些研究者用不同的筛选标记构建了食品级载体，例如： $\alpha$ -半乳糖苷酶[11]，胸腺嘧啶核苷酸合酶[12]，镉抗性基因[13]等，均显示了传统载体所没有的优势。而细菌素(如乳酸链球菌素)抗性做筛选标记构建载体，国外也有一些报道[1]，由于其来源及特性等的特有优势，作为食品级筛选标记具有重要的意义。

部分乳酸链球菌对乳酸链球菌素的抵抗作用主要由两种机制决定[2]：一种是在产乳酸链球菌素的乳酸乳球菌株中，由于表达自身免疫基因(nisI)及其他三个基因nsiFEG共同作用[14][15]，另一种是单一基因发挥作用，即抗性基因NSR，为了后续实验的需要，故本实验筛选单一NSR抗性基因做研究对象。

牛奶中富含乳酸乳球菌，但只有部分菌株含有NSR。按传统方法鉴定每株分离出的乳酸乳球菌是否含有抗性基因，工作量巨大，国内外也有一些报道显示该基因筛选几率较小。本实验采用表型特征与分子生物学方法

相结合的方法进行筛选和鉴定。先在选择性培养基上粗筛牛奶样本中具有乳链菌肽抗性的乳酸乳球菌，然后用特异性16S rRNA鉴定其为乳酸乳球菌，进一步用保守序列进行筛选，排除了部分表型筛选的假阳性株，从而在较小范围内进行NSR基因的分离鉴定，大大简化了筛选程序，减少了工作量。本实验还表明是否经过巴氏消毒的牛奶均可分离出乳酸乳球菌，但只有从未经消毒的牛奶中分离到了乳链菌肽抗性菌株。

(责任编辑：吴锦雅)

#### 参考文献：

- [1]Liu CQ, Su P, Khunajakr N, et al. Development of food-grade cloning and expression vectors for *Lactococcus lactis*[J]. *J Appl Microbiol*, 2005, 98(1): 127-35.
- [2]Takala TM, Saris PE. 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.
- [3]凌代文, 东秀珠. 乳酸细菌分类鉴定及实验方法[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1999: 59.
- [4]Stevens KA, Sheldon BW, Klapes NA. Nisin treatment for inactivation of *Salmonella* species and other gram-negative bacteria[J]. *Appl Environ Microbiol*, 1991, 57(12): 3613-5.
- [5]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): 536-41.
- [6]Sambrook J. 分子克隆实验指导 [M]. 黄培堂译. 第3版, 北京: 科学出版社, 2002: 85-92.
- [7]Klijin N, Weerkamp AH, de Vos WM, et al. Identification of mesophilic lactic acid bacteria by using polymerase chain reaction-amplified variable regions of 16S rRNA and specific DNA probes [J]. *Appl Environ Microbiol*, 1991, 57(11): 3390-3.
- [8]Froseth BR, McKay LL. Molecular characterization of the nisin resistance region of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* DRC3[J]. *Appl Environ Microbiol*, 1991, 57(3): 804-11.
- [9]von Wright A, Wessels S, Tynkkynen 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): 2029-35.
- [10]Duan K, Harvey ML, Liu CQ, et al. Identification and characterization of a mobilizing plasmid, pND300, in *Lactococcus lactis* M189 and its encoded nisin resistance determinant[J]. *J Appl Bacteriol*, 1996, 81(5): 493-500.
- [11]Abrie S, Bart C, Vadeboncoeur C, et al. Use of an alpha-galactosidase gene as a food-grade selection marker for *Streptococcus thermophilus*[J]. *J Dairy Sci*, 2005, 88(7): 2341-7.
- [12]Sasaki Y, Ito Y, Sasaki T. *ThyA* as a selection marker in construction of food-grade host-vector and integration systems for *Streptococcus thermophilus*[J]. *Appl Environ Microbiol*, 2004, 70(3): 1858-64.
- [13]Wong WY, Su P, Allison GE, et al. A potential food-grade cloning vector for *Streptococcus thermophilus* that uses cadmium resistance as the selectable marker[J]. *Appl Environ Microbiol*, 2003, 69(10): 5767-71.
- [14]Stein T, Heinzmann S, Solovieva I, et al. Function of *Lactococcus lactis* nisin immunity genes *nisI* and *nisFEG* after coordinated expression in the surrogate host *Bacillus subtilis*[J]. *J Biol Chem*, 2003, 278(1): 89-94.
- [15]Koponen O, Takala TM, Saarela U, et al. Distribution of the *NisI* immunity protein and enhancement of nisin activity by the lipid-free *NisI*[J]. *FEMS Microbiol Lett*, 2004, 231(1): 85-90.

