

乳链菌肽抗性基因的筛选、分离及鉴定

云雪霞, 胡静, 陈清(南方医科大学公共卫生与热带医学学院流行病学教研室, 广东广州 510515)

摘要:目的 筛选、分离、鉴定乳链菌肽抗性(NSR)基因。方法 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,在含有添加剂的选择性培养基上筛选含有 NSR 基因的乳酸乳球菌,用乳酸乳球菌特异性 16S rRNA 的 PCR 方法对菌株进行鉴定,进一步用一段保守序列进行 NSR 基因筛选,并扩增其全序列,分析其基因特征。结果 两种牛奶样品中均可以分离到乳酸乳球菌,并在从新鲜牛奶中分离到的乳酸乳球菌中筛选出 30 株乳链菌肽抗性菌株,其中 3 株扩增出 NSR 基因,琼脂糖凝胶电泳确定其大小为 1000 bp 左右,进一步酶切鉴定及测序确定其确为 NSR 基因,定位于质粒上。结论 从来源于鲜牛奶的抗乳酸乳球菌菌株中扩增出完整 NSR 基因,定位于质粒上。

关键词:乳链菌肽抗性基因; 筛选; 分离; 乳酸乳球菌

中图分类号:Q78 文献标识码:A 文章编号:1673-4254(2006)06-0839-04

Screening, isolation and identification of nisin resistance determinant gene in strains of *Lactococcus lactis*

YUN Xue-xia, HU Jing, CHEN Qing

Department of Epidemiology, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China

Abstract: Objective To isolate and identify nisin resistance determinant (NSR) gene from *Lactococcus lactis*. **Methods** The *Lactococcus lactis* strains harboring NSR gene were isolated from different milk samples by selective culture supplemented with nisin and confirmed by PCR detection of 16S rRNA. Nisin resistance determinant gene was determined by PCR amplification, enzyme digestion and sequencing. **Results** Thirty nisin-resistant *Lactococcus lactis* strains from fresh milk samples were obtained. Three of these strains contained NSR gene of about 1000 bp as determined by agarose gel electrophoresis and further confirmed by enzyme digestion and sequence analysis. The NSR gene was located on the plasmid of *Lactococcus lactis*. **Conclusion** Complete NSR gene, located on the bacterial plasmid, has been successfully isolated from nisin-resistant *Lactococcus lactis* strains from fresh milk.

Key words: nisin resistance determinant gene; screening; isolation; *Lactococcus lactis*

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⁺菌)。乳酸乳球菌亦为一种 G⁺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 Elliker 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℃保存^[4]。

收稿日期:2005-08-29

作者简介:云雪霞(1976-),女,硕士,电话:020-62789129, E-mail:yunxx1206@163.com

通讯作者:陈清,电话:020-61648312, E-mail:qingchen@fmmu.com

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 Elliker 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^{-1} ~ 10^{-8} 稀释成不同浓度, 分别在上述选择性培养基上取 100 μ l 涂布及划线培养, 32 $^{\circ}$ 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 Elliker 液体培养基中增菌培养, 30%甘油-20 $^{\circ}$ 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 参照文献[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 $^{\circ}$ C 预变性 3 min, 94 $^{\circ}$ C 1 min, 52 $^{\circ}$ C 1 min, 30 个循环, 72 $^{\circ}$ 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 $^{\circ}$ C 预变性 3 min, 94 $^{\circ}$ C 1 min, 55 $^{\circ}$ C 1 min, 30 个循环, 72 $^{\circ}$ 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 *Bam*H I 及 *Eco*R 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 $^{\circ}$ C 预变性 3 min, 94 $^{\circ}$ C 1 min, 55 $^{\circ}$ C 1 min, 30 个循环。以上 PCR 反应均以细菌总 DNA 为模板。

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。

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 GGATCC ATGAAAATAGGTAAGCGCA-3' (<i>Bam</i> H I)	1011
Nsrc-P2	5'-CGC GAATTC GTTTTGACTAGCAAAAAAGAC-3'(<i>Eco</i> R I)	

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 Elliker 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。

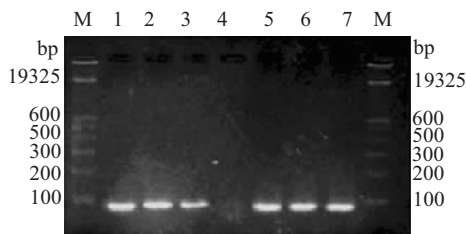


图 2 乳酸乳球菌的 16S rRNA 的 PCR 扩增

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 片段,标记该 10 株菌,用于进一步扩增 NSR 的全序列(图 3)。

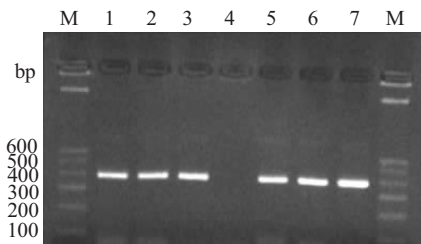


图 3 NSR 基因的保守序列的 PCR 扩增

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 左右的片段,用 *SacI* 单酶切,得到两个片段,分别约为 890、120 bp,与预期的片段大小完全相符(图 4)。

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 的片段(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。

3 讨论

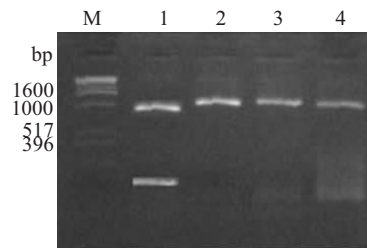


图 4 NSR 全序列的扩增及 *SacI* 单酶切

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

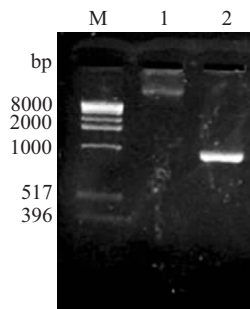


图 5 4 号乳酸乳球菌质粒及其为模板扩增的 PCR 产物

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

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: α -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。

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] Klijn 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] Labrie 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.

(责任编辑:吴锦雅)

艾滋病 8 例临床分析

丁莉¹, 谢知兵², 周轲¹ (¹卫生部纳米重点实验室, 湖南长沙 410078; ²怀化市第一人民医院感染科, 湖南怀化 418000)

摘要:对 8 例艾滋病病毒感染合并机会性感染患者进行研究, 观察高效联合抗病毒 (HAART) 治疗效果。在 8 例艾滋病患者坚持 HAART 的治疗中, 症状好转出院, 出院后分别因为其毒副作用、休眠艾滋病病毒的存在、费用昂贵等问题而不能坚持系统治疗, 再次出现机会性感染而死亡。

关键词:艾滋病; 高效联合抗病毒治疗; 活病毒载体疫苗

中图分类号: R593.32 **文献标识码:** B **文章编号:** 1673-4254(2006)06-0842-02

自 1993 年以来, 在我国一些非法采血、有偿供血、娱乐服务业和吸毒人群中不断发现艾滋病病毒感染者, 近几年艾滋病发病呈迅速上升趋势, 艾滋病疫情已经处在由高危人群向普通人群大面积扩散的临界点, 它已成为一个严峻的公共卫生问题和社会问题。为了解这类患者的临床特征, 找到更好的预防和治疗方案, 现对 2002 年 3 月~2005 年 10 月发现的 8

例艾滋病病人进行分析。

1 临床资料

1.1 一般资料

8 例患者中男 4 例、女 4 例; 年龄 26~47 岁, 平均 36 岁; 静脉吸毒 1 例, 性伴侣吸毒 1 例, 静脉输血感染 1 例, 性乱交者 4 例, 性伴侣有性乱交者 1 例; 农民 5 例, 职工 1 例, 家庭主妇 1 例, 个体户 1 例。所有病例均符合艾滋病国家诊断标准^[1]。

1.2 症状和体征

8 例均有体质性疾病, 即发热、乏力、盗汗、厌食、体质量下

收稿日期: 2006-01-18

基金项目: 国家 863 高技术研究发展计划项目

作者简介: 丁莉 (1982-), 女, 在读硕士研究生, 研究方向: 艾滋病重组脊髓灰质炎病毒疫苗的研制, E-mail: lilyesu@hotmail.com