

文章编号:1671-9352(2008)07-0078-05

# 乳酸乳球菌 nisin 抗性基因的克隆及 作为筛选标记的研究

郭婷婷,孔文涛,孔健\*,季明杰

(山东大学微生物技术国家重点实验室,山东 济南 250100)

**摘要:**在添加 500 U/mL nisin 和溴甲酚紫的 GM17 选择性培养基上,分离到 5 株 nisin 抗性菌株。根据形态观察,生理生化特性和 16S rDNA 基因序列比对被鉴定为乳酸乳球菌。根据已报道 nisin 抗性基因设计引物,分别以这 5 株菌的染色体和质粒 DNA 为模板进行 PCR 扩增,结果从 1 株抗性菌株的染色体上得到目的基因产物。通过序列测定和同源性比对,证明为 nisin 抗性基因(*nsr*)。将 *nsr* 基因克隆到乳酸菌-大肠杆菌穿梭质粒 pTRKH<sub>2</sub> 上,重组质粒命名为 pT-*nsr*。pT-*nsr* 电转化乳酸乳球菌 MG1614,获得的重组菌 MG1614/pT-*nsr* 在含有 500 U/mL nisin 的培养基中生长情况良好。这表明 *nsr* 基因赋予宿主菌抗 nisin 特性,并且与红霉素抗性功能相同,因此 *nsr* 基因可以作为筛选标记用于食品级载体的构建。

**关键词:**乳酸乳球菌;nisin 抗性基因(*nsr*);食品级筛选标记

中图分类号:Q78

文献标志码:A

## Cloning of a nisin resistance gene from *Lactococcus lactis* and its application in food-grade selection marker

GUO Ting-ting, KONG Wen-tao, KONG Jian\*, JI Ming-jie

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

**Abstract:** Five nisin-resistant strains were isolated from fresh milk on GM17 plates supplemented with bromocresol purple and nisin at a final concentration of 500 U/mL. By morphological, physiological, biochemical and 16S rDNA sequence analysis, all of the isolates were identified as *Lactococcus lactis*. A pair of primers was designed on the basis of the DNA sequences of a reported nisin resistance gene. PCR amplification was carried out with chromosome and plasmid DNA as templates from five strains, respectively. An expected PCR product amplified from one of the five strains was obtained. After being sequenced, the amplicon was confirmed as *nsr* by BLAST analysis. The *nsr* gene was cloned into the *E. coli*-*L. lactis* shuttle vector pTRKH<sub>2</sub>, resulting in the plasmid pT-*nsr*. The construct was obtained when the plasmid pT-*nsr* was electroporated into *L. lactis* MG1614 competent cells. When the medium contained a maximum of 500 U/mL nisin, the construct carrying pT-*nsr* showed the same growth curve as *L. lactis* MG1614, which suggests that the *nsr* gene could be used as a marker for constructing a food-grade vector.

**Key words:** *Lactococcus lactis*; nisin resistance gene (*nsr*); food-grade selection marker

## 0 引言

乳链菌肽(nisin),是某些乳酸乳球菌产生的一种羊毛硫细菌素,对革兰氏阳性菌有广泛的抑菌活

性,是目前公认的天然食品防腐剂<sup>[1]</sup>。但是有些乳酸乳球菌却不被 nisin 所抑制,而是对 nisin 表现出抗性。目前研究发现乳酸乳球菌对 nisin 的抗性一般存在有 2 种因素,一种情况是乳链菌素产生菌自身编码的免疫基因 *nisI*,赋予菌株对 nisin 毒害作用的免疫力;另

收稿日期:2008-04-25

基金项目:国家“863 计划”资助项目(2006AA10Z321)

作者简介:郭婷婷(1984-),女,本科生,从事乳酸菌研究。

\* 通讯作者:孔健(1964-),女,教授,博士生导师,从事乳酸菌研究。Email:kongjian@sdu.edu.cn

一种情况是有些乳酸乳球菌自身不产生 nisin,但是具有编码抗 nisin 蛋白的基因(nisin resistance determinant)<sup>[2]</sup>,由于该抗性基因来源于乳酸菌,可以替代传统抗生素抗性选择标记,构建食品级载体,克服了传统遗传操作载体系统对环境及人体带来的安全隐患<sup>[3]</sup>。本实验从鲜奶样品中分离乳酸乳球菌,从中筛选 nisin 抗性菌株,通过 PCR 技术克隆 nisin 抗性基因,并在乳球菌模式菌株中表达了该抗性蛋白。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 菌株与质粒

*E. coli* DH5 $\alpha$ , *E. coli* XL1-Blue, *L. lactis* MG1614 均由实验室保存。

pTRKH<sub>2</sub>, 大肠杆菌-乳酸菌穿梭载体,携带有红霉素抗性(Em<sup>r</sup>),由实验室保存。

pMD-18T, 载体购自 Takara 公司。

#### 1.1.2 培养基与试剂

GM17 培养基: M17 培养基(Oxoid)中含 0.5% 的葡萄糖。需要时加入终质量浓度为 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的红霉素。

LB 培养基: 蛋白胨 10 g, 酵母粉 5 g, 氯化钠 5 g, 水 1 L, pH 7.2-7.4。需要时加入终质量浓度为 250  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的红霉素。

限制性内切酶、DNA 连接酶、*Taq* DNA 聚合酶、胶回收试剂盒、PCR 纯化试剂盒、质粒提取试剂盒等分子操作试剂均购自 OMEGA。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 nisin 抗性菌株的分离及鉴定

将采集自济南郊区牛奶场的鲜奶样品接种到含有 500 U/mL nisin 的 GM17 液体培养基中, 30  $^{\circ}\text{C}$  静置培养 16 h, 取 50  $\mu\text{L}$  菌液涂布在添加 0.002% 溴甲酚紫和 500 U/mL nisin 的 GM17 平板上, 30  $^{\circ}\text{C}$  培养 24 h。挑取使周围培养基颜色由紫变黄的菌落, 再次在上述选择培养基上复筛, 划线分离单菌落。对复筛获得的菌株进行革兰氏染色, 镜检, 选出球状或链状的革兰氏阳性菌, 进一步做 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 酶检测, 筛选 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 酶阴性菌落。

对获得的目的菌株进行 16S rDNA 鉴定, PCR 扩增所用引物为乳球菌通用引物, 8F: 5' AGAGTTT-GATCCTGGCTCAG 3'; 1541R: 5' AAGGAGGTGATC-CAGCCGCA 3'<sup>[4]</sup>, 反应条件: 94  $^{\circ}\text{C}$  预变性 3 min; 94  $^{\circ}\text{C}$  变性 30 s, 58  $^{\circ}\text{C}$  退火 40 s, 72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 1 min 30 s, 30 个循环; 72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 10 min。反应体系为: 模板 0.2  $\mu\text{L}$ ,

8F 0.8  $\mu\text{L}$ , 1541R 0.8  $\mu\text{L}$ , dNTP 1.6  $\mu\text{L}$ , 10  $\times$  Buffer 2  $\mu\text{L}$ , *Taq* 酶 0.2  $\mu\text{L}$ , 加 ddH<sub>2</sub>O 补至 20  $\mu\text{L}$ 。PCR 产物经凝胶回收纯化后, 由 Invitrogen 公司测序。序列同源性分析利用 BLAST 软件在线比对(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>)。

#### 1.2.2 DNA 提取

分别提取分离得到的 nisin 抗性菌株的染色体 DNA<sup>[5]</sup>和质粒 DNA<sup>[6]</sup>。

#### 1.2.3 nisin 抗性基因的克隆

根据已报道 nisin 抗性基因的开放阅读框和启动子区设计一对特异性引物 *nsrF*: 5'-TGATTATATC-CITTATCACTTAGAGACAC-3' 和 *nsrR*: 5'-TGACTAG-CAAAAAGACTTACCATAT-3', 分别以抗性菌株的染色体 DNA 或质粒 DNA 为模板, 进行 PCR 扩增。反应条件: 94  $^{\circ}\text{C}$  预变性 4 min; 94  $^{\circ}\text{C}$  变性 30 s, 53  $^{\circ}\text{C}$  退火 30 s, 72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 1 min 30 s, 30 个循环; 72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 10 min。反应体系为: 模板 0.75  $\mu\text{L}$ , *nsrF* 1  $\mu\text{L}$ , *nsrR* 1  $\mu\text{L}$ , dNTP 2  $\mu\text{L}$ , 10  $\times$  Buffer 2.5  $\mu\text{L}$ , *Taq* 酶 0.2  $\mu\text{L}$ , 加 ddH<sub>2</sub>O 补至 25  $\mu\text{L}$ 。将 PCR 产物切胶回收, 使用 OMEGA 纯化试剂盒进行纯化。将纯化后的 DNA 片段与 pMD18-T 连接, 连接液热激转化 *E. coli* DH5 $\alpha$ 。在含有终质量浓度为 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  氨苄青霉素的 LB 平板上挑取白色转化子, 提取质粒酶切验证。对阳性转化子送交 Invitrogen 公司测序。测序结果与 NCBI 数据库比对。

#### 1.2.4 nisin 抗性基因在 *L. lactis* MG1614 中的表达

根据已知酶切位点将克隆得到的 *nsr* 基因进行 *Xho*I 和 *Bam*HI 双酶切, 然后与相同酶处理的载体 pTRKH<sub>2</sub> 连接, 连接液热激转化 *E. coli* XL1-Blue。在含有红霉素(终质量浓度为 250  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )的 LB 平板上挑取转化子, 然后提取质粒酶切验证为重组质粒 pT-*nsr*。再将重组质粒电转化 *L. lactis* MG1614, 电转化条件为: 电压 2 000 V, 电容 25  $\mu\text{F}$ , 电阻 400  $\Omega$ 。在红霉素终质量浓度为 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的 GM17 平板上出现的抗性菌落即为重组乳球菌 MG1614/pT-*nsr*。

将获得的重组乳球菌 MG1614/pT-*nsr* 接种到含有 0、100、200、300、400、500 U/mL nisin 的 GM17 培养基中, 比较不同时间重组乳球菌的生长情况, 并与 MG1614、MG1614/pTRKH<sub>2</sub> 在相同培养基中的生长情况进行比较。

#### 1.2.5 nisin 抗性基因与红霉素抗性基因对菌株生长的影响

重组菌 MG1614/pT-*nsr* 接种到含有 500 U/mL nisin 的 GM17 培养基中, 同时 MG1614/pT-*nsr* 接种到含有终质量浓度为 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  红霉素的 GM17 培养基

中作对照。比较 *nsr* 基因和 *Erm<sup>r</sup>* 基因对两重组菌生长的影响。

## 2 结果

### 2.1 nisin 抗性菌株的分离与鉴定

在添加溴甲酚紫、nisin 的 GM17 选择培养上分离筛选到 5 株使周围培养基颜色由紫变黄的菌落,经复筛、镜检、革兰氏染色、过氧化氢酶等检测,确定为乳球菌。经过 16S rDNA 序列比对鉴定为乳酸乳球菌,命名为 N1、N2、N3、N4 和 N5。

### 2.2 nisin 抗性基因的克隆

分别提取这 5 株乳球菌的染色体 DNA 和质粒 DNA,如图 1(a)和 1(b),然后以它们为模板,PCR 扩增 *nsr* 抗性基因,结果在以菌株 N1 的染色体为模板时得到了目的条带,大小约为 1.2 kb,结果如图 2。PCR 产物序列测定结果表明,该 DNA 序列与 Liu CQ 等人发表的抗 *nisin* 基因(Accession No: U25181)序列同源性 98%<sup>[7]</sup>,它包含 957 bp 的开放阅读框,命名为 *nsr* 基因,在其上游有转录调控区。

### 2.3 *nsr* 基因在乳球菌 MG1614 中的表达

将 *nsr* 基因与大肠杆菌-乳球菌穿梭载体 pT-RKH<sub>2</sub> 连接,所获得的重组质粒 pT-*nsr* 电转化乳酸乳球菌 MG1614,获得重组乳球菌 MG1614/pT-*nsr*。在 GM17 培养基中添加 *nisin*,使其分别为 0、100、200、300、400、500 U/mL,接种重组乳球菌 MG1614/pT-*nsr*,培养不同时间,测定其对 *nisin* 的抗性情况,同时以乳球菌 MG1614,重组菌 MG1614/pTRKH<sub>2</sub> 的生长作对照,结果如图 3。

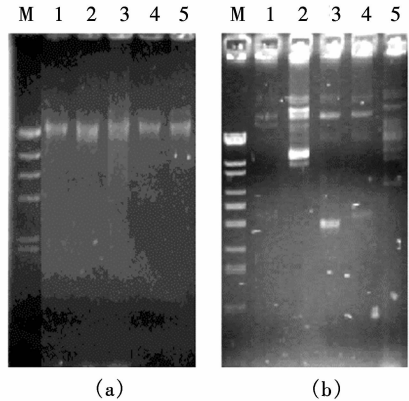


图 1 N1-N5 染色体和质粒 DNA  
(a)M:λ-HindIII marker; 1-5:N1-N5 的染色体  
(b)M:λ-EcoT14I marker;6-10:N1-N5 的质粒  
Fig.1 DNA of the chromosome and plasmid isolated from the strains N1-N5

(a)M: λ-HindIII marker; 1-5: the chromosome of N1-N5  
(b)M: λ-EcoT14I marker; 6-10: the plasmid of N1-N5

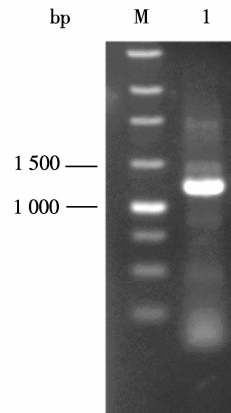
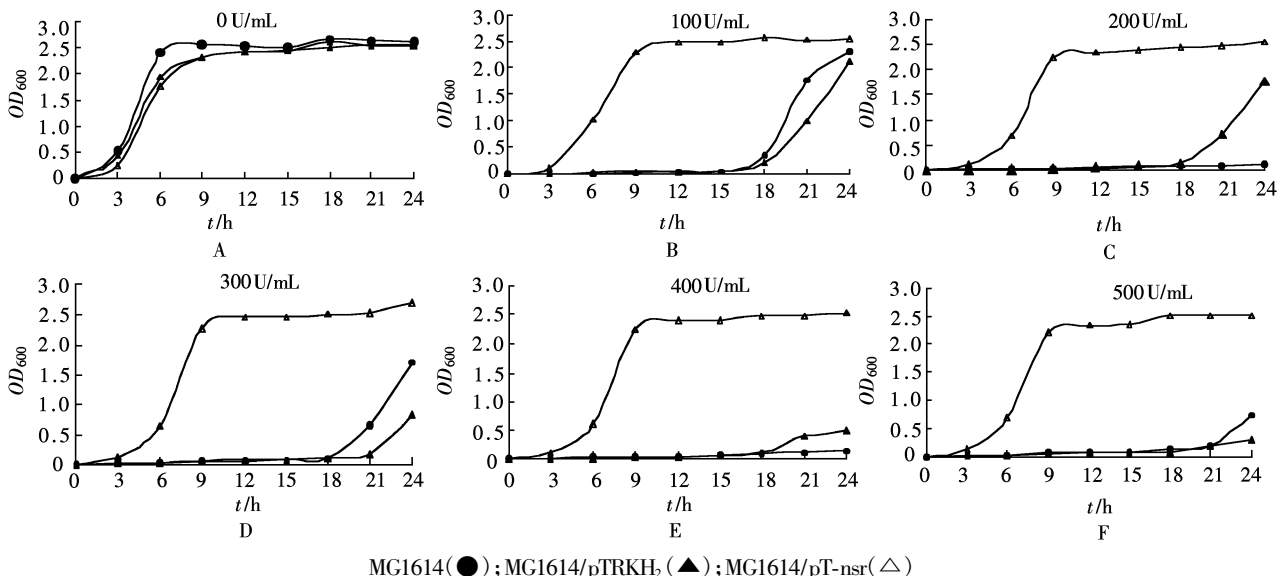


图 2 *nsr* 基因的 PCR 产物  
M:250 bp Marker; 1: *nsr* 基因的 PCR 产物  
Fig.2 PCR product of *nsr* gene  
M:250 bp Marker; 1:PCR product of *nsr* gene



MG1614(●);MG1614/pTRKH<sub>2</sub>(▲);MG1614/pT-*nsr*(△)  
图 3 乳球菌 MG1614, MG1614/pTRKH<sub>2</sub>, MG1614/pT-*nsr* 在含 0、100、200、300、400 和 500 U/mL *nisin* 的 GM17 中的生长曲线  
Fig.3 Growth curves of *L. lactis* MG1614, MG1614/pTRKH<sub>2</sub>, MG1614/pT-*nsr* in medium containing 0, 100, 200, 300, 400 and 500 U/mL *nisin*

图3结果所示,A、B、C、D、E、F培养基中的 nisin 分别为 0、100、200、300、400、500 U/mL。在不含 nisin 的培养基中,菌株 MG1614、MG1614/pTRKH<sub>2</sub> 和 MG1614/pT-*nsr* 生长情况正常,培养 3 h 开始进入指数生长期,9 h 后进入稳定期;加入 100 U/mL nisin 后,菌株 MG1614、MG1614/pTRKH<sub>2</sub> 生长受到抑制,在 0~18 h 内基本没有生长;18 h 后,由于添加到培养基中的 nisin 抑菌活性丧失,菌株 MG1614、MG1614/pTRKH<sub>2</sub> 出现生长趋势;而菌株 MG1614/pT-*nsr* 生长不受培养基中 nisin 的影响,说明该菌株具有 nisin 抗性。在含有 200、300、400、500 U/mL 的 nisin 的培养基中,3 株菌的生长曲线与含有 100 U/mL nisin 的生长情况基本相同。由此说明 *nsr* 基因编码的抗性蛋白在乳球菌中得到表达,赋予菌株对 nisin 产生抗性,可以用于载体的筛选标记。

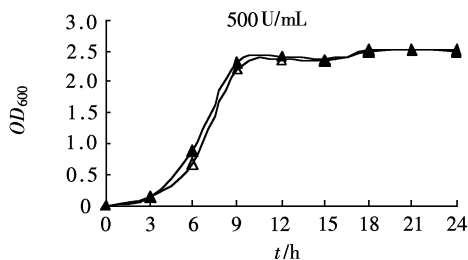


图4 *nsr* 与 *Erm*<sup>r</sup> 作为选择标记的比较

MG1614/pT-*nsr* 加 nisin(△);MG1614/pT-*nsr* 加 *Erm*(▲)

Fig.4 Comparison with *nsr* and *Erm*<sup>r</sup> as selective marker

MG1614/pT-*nsr* added nisin(△);MG1614/pT-*nsr* added *Erm*(▲)

## 2.4 *nsr* 基因作为载体筛选标记与红霉素抗性标记的比较

载体 pTRKH<sub>2</sub> 含有红霉素抗性标记,当 *nsr* 基因插入 pTRKH<sub>2</sub> 的多克隆位点后,得到重组质粒 pT-*nsr*,因此在质粒 pT-*nsr* 上还携带有红霉素抗性基因。为了检测 *nsr* 基因作为载体筛选标记的可行性,重组菌 MG1614/pT-*nsr* 接种到含有 500 U/mL nisin 的 GM17 培养基中,对照组 MG1614/pT-*nsr* 接种到含有终质量浓度为 10 μg/mL 红霉素的 GM17 培养基中,测定该菌株在 2 种选标条件性的生长情况,结果如图 4。

实验结果表明,培养基中含有 nisin 和含有红霉素,菌株 MG1614/pT-*nsr* 的生长曲线基本相同,说明 MG1614/pT-*nsr* 并未因为缺少红霉素的选择压力而使质粒丢失从而失去对 nisin 的抗性,所以 *nsr* 可以替换 *Erm*<sup>r</sup> 用作食品级载体的选择标记。

## 3 讨论

本实验利用含有 nisin 高抑菌含量(500 U/mL)

的选择培养基,从鲜牛奶样品中筛选到 5 株具有 nisin 抗性菌株,初步的形态观察和生理生化实验鉴定这 5 株菌为乳球菌,可以用于 nisin 抗性基因的克隆。目前报道的 nisin 抗性的基因多位于质粒上<sup>[8]</sup>,以已报道的 *nsr* 基因序列设计引物,利用 5 株抗性菌株的质粒 DNA 为模板,通过 PCR 扩增没有得到目的基因产物,而在以抗性菌株 N1 的染色体为模板时获得目的条带,其大小与预期结果相同,通过序列比对鉴定为 nisin 抗性基因。有关另外 4 株菌的 nisin 抗性机制,有可能为 nisin 产生菌,也有可能为 nisin 产生菌的亲缘关系较远,不受 nisin 抑制。

乳酸菌是食品安全性微生物,利用乳酸菌表达重要的医药功能蛋白以赋予乳球菌新的生理功能,是开发乳酸菌应用的新领域。但是目前构建的重组乳酸菌多经过了遗传修饰,存在安全隐患如抗性素抗性,使重组菌的应用受到限制。因此食品级载体系统的研制为重组乳酸菌的潜在应用提供了可能。目前国内外已有食品级选择标记如有 α-半乳糖苷酶<sup>[9]</sup>,镉抗性基因<sup>[10]</sup>,噬菌体抗性基因<sup>[11]</sup>,thyA 互补选择标记<sup>[12]</sup>等的报道,由于 nisin 抗性基因来自于乳酸菌自身,作为乳酸菌食品级筛选标记更有优势。本文克隆的 *nsr* 抗性基因构建的载体 pT-*nsr*,导入乳酸菌后能赋予菌株很强的 nisin 抗性,与红霉素抗性标记比较,两者对宿主菌的生长影响没有差异,即菌株生长过程中在选择压力下,遗传性能稳定,不丢失。因此,可以将载体 pT-*nsr* 上的红霉素抗性基因敲除,以 *nsr* 基因代替,成为一个具有应用潜力的食品级载体。

## 参考文献:

- [1] EEFFJAN Breukink, BEN de Kruijff. The lantibiotic nisin, a special case or not? [J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1999(1462):223-234.
- [2] TAKALA T M, SARIS P E J. A food-grade cloning vector for lactic acid bacteria based on the nisin immunity gene *nisI*[J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2002(59): 467-471.
- [3] 徐波,曹郁生,李海星. 乳酸菌食品级载体选择标记[J]. *生命的化学*, 2004, 24(5): 391-393.
- [4] EDWARDS Ulrike, ROGALL Till, BLOCKER Helmut, et al. Isolation and direct complete nucleotide determination of entire genes. Characterization of a gene coding for 16S ribosomal RNA[J]. *Nucleic Acids Research*, 1989, 17(19): 7843-7853.
- [5] 奥斯伯. 精编分子生物学实验指南[M]. 第4版. 北京: 科学出版社, 2005: 55-56.
- [6] O' SULLIVAN J Daniel, KLAENHAMMER R Todd. Rapid mini-prep isolation of high-quality plasmid DNA from lactococ-

- cus and lactobacillus spp[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1993(8):2730-2733.
- [7] LIU C Q, 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]. Journal of General and Applied Microbiology, 1997(43): 67-73.
- [8] VON WRIGHT A, WESSELS S, TYNKKYNNEN S, M Saarela. Isolation of a replication region of a large lactococcal plasmid and use in cloning of a nisin resistance determinant[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1990, 56(7): 2029-2035.
- [9] BOUCHER Isabelle, PARROT Marc, GAUDREAU Hélène, et al. Novel food-grade plasmid vector based on melibiose fermentation for the genetic engineering of *Lactococcus lactis*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2002, 68(12): 6152-6161.
- [10] WONG Wing Yee, SU Ping, ALLISON Gwen E, et al. A potential food-grade cloning vector for *Streptococcus thermophilus* that uses cadmium resistance as the selectable marker[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2003, 69(10): 5767-5771.
- [11] HUGHES Brenda F, MCKAY Larry L. Deriving phage-insensitive lactococci using a food-grade vector encoding phage and nisin resistance[J]. J Dairy Sci, 1992, 75(4):914-923.
- [12] SASAKI Yasuko, Y ITO oshiyuki, SASAKI Takashi. *thyA* as a selection marker in construction of food-grade host-vector and integration systems for *Streptococcus thermophilus*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2004, 70(3): 1858-1864.

(编辑:于善清)