

乳酸菌两组分食品级选择标记复制子 缺失质粒的构建

徐波¹, 曹郁生^{2,*}, 周燕琴²

(1. 江西农业大学生物科学与工程学院, 江西 南昌 330045

2. 食品科学教育部重点实验室, 南昌大学中德联合研究院, 江西 南昌 330047)

摘要: 乳酸菌NICE系统的两组分食品级选择标记具有显性和互补选择标记的优点。含红霉素抗性选择标记的复制子缺失的伴生型质粒是依赖复制子完全且无选择标记的食品级克隆载体而复制的。构建的伴生型质粒的*Emr*和*rep*分别来源于pMG36e和pRAF800, 经酶切、缺刻、补平和连接得到只能在红霉素选择压力下与 θ 型复制子的克隆载体共存的复制子缺失伴生型质粒。

关键词: 乳酸菌; 伴生型质粒; 两组分选择标记

Construction of A Replicon-deficient Plasmid of Two-component Food-grade Selectable
Marker for *Lactococcus lactis*

XU Bo¹, CAO Yu-sheng^{2,*}, ZHOU Yan-qin²

(1. College of Biology Science and Engineering, Jiangxi Agricultural University, Nanchang 330045, China; 2. Key Laboratory of Food Science, Ministry of Education, Jiangxi-OAI Joint Research Institute, Nanchang University, Nanchang 330047, China)

Abstract: The two-component food-grade selectable marker for *Lactococcus lactis* NICE system (the nisin-controlled expression system) has the advantages of dominant and complementation markers. One component is a replicon-deficient companion plasmid, which carries an erythromycin resistance gene (*Emr*) as a selectable marker and its replication is depended on the other food-grade cloning vector which carries the functional replicon, is entirely made up of *L. lactis* DNA and has no selection marker. The pMG36e and pRAF800 are the sources of *Emr* and *rep* for the p*Emr:rep*. The *repB*-deficient companion plasmid can be constructed by enzyme digestion, deficiency and ligation and coexisting with the theta replicon only.

Key words *Lactococcus lactis* companion plasmid two-component selection marker

中图分类号: Q93

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2007)07-0315-05

乳酸菌(lactic acid bacteria, LAB)是食品微生物中的重要成员, 是对人和动物健康有益的益生菌。乳酸乳球菌(*Lactococcus lactis*)是乳品发酵工业重要乳酸菌, 并在食品及医药工程领域具有广阔的应用前景^[1-5]。乳酸菌的分子改良需要发展新的基因工具, 包括质粒载体, 选择标记和转化方案。近十多年来, 随着乳酸乳球菌表达调控元件的分离, 已发展了一系列不同用途的载体和受体系统。

由于红霉素或氯霉素等抗生素抗性基因能转移到环境及内源微生物中, 乳酸菌食品级载体和受体系统的研究成为近年来该领域研究的前沿和热点。人们已用食品级选择标记构建了各种乳酸菌食品级载体^[5]。这些载体

的选择标记可分为显性选择标记、互补选择标记以及最近发展的两组分选择标记。显性标记利用乳酸本身的特性进行标记, 以自身乳链球菌肽基因, 噬菌体抗性基因等代替抗生素抗性基因作为选择标记。显性选择标记提供了新的表型特征, 并且不依靠宿主表达基因^[1-2]。互补选择标记是利用质粒选择标记互补宿主染色体中的缺失突变, 从而恢复宿主原来的某种特性, 并根据这一特征进行选择。互补选择标记需要染色体特异性突变, 并可通过载体的互补选择标记恢复最初的表型特征^[2, 6]。而两组分选择标记具有显性和互补选择标记的优点, 它包括两个质粒组分: 克隆载体和伴生型质粒。克隆载体具有复制功能但无选择标记, 其复制子完全由乳酸菌

收稿日期: 2007-06-03

*通讯作者

基金项目: 江西农业大学博士科研启动基金项目

作者简介: 徐波(1970-), 男, 博士, 研究方向为食品科学。

DNA 组成,是食品级载体。伴生型质粒含有作为显性选择标记的红霉素抗性基因和缺失型复制子,它只能在乳酸菌中复制。由于只有含克隆载体和伴生型质粒的共转化体才能在含红霉素的平板上存活,伴生型质粒能用于筛选已获得克隆载体的细胞。由于复制子缺失,伴生型质粒能很容易在筛选步骤中从红霉素培养基中清除^[1-2]。

本研究构建的乳酸菌两组分食品级 NICE 系统复制子缺失质粒 pEm^r: Δ rep 含有来源于 pMG36e (*E. coli* JM109) 作为显性选择标记的红霉素抗性基因 *Em^r* 和来源于 pRAF800 (*L. lactis* SMQ719) 复制子 *rep* 基因。

1 材料与方法

1.1 材料、试剂与仪器

1.1.1 菌株、质粒

E. coli JM109 本实验室保存; *L. lactis* SMQ719 (pRAF800) 加拿大 Laval 大学 Moineau 博士惠赠; pMG36e、*L. lactis* NZ9000, 中国科学院微生物所郭兴华研究员惠赠。

1.1.2 生化试剂

T4 DNA ligase Promega 公司; ExTaq DNA polymerase、Mung Bean Nuclease 和 *Hind* III Takara 公司; 溶菌酶 北京夏斯公司; *Nhe* I、*Eco*R I 和 ToYoBa 公司; Goldenviewer 北京博大公司。

1.1.3 设备

2400 型 PCR 扩增仪 PE 公司; FR200 型凝胶成像仪 上海复日公司; 3K18 型台式冷冻离心机 Sigma 公司; MLS-3750 型全自动灭菌锅 日本 SANYO 公司; 紫外分光光度计 Pharmacia Biotech 公司; 电转化仪 Bio-Rad 公司。

1.1.4 实验用培养基抗生素以及常用溶液

LB 液体培养基; GEL1 液体培养基; GM17 液体和固体培养基; 质粒提取中碱裂解法溶液: 溶液 I (25% 蔗糖, 30mg/ml 溶菌酶)、溶液 II (0.2N NaOH, 3% SDS, 用前现配) 和溶液 III (3mol/L 乙酸钾, 冰乙酸调 pH 至 4.8); 红霉素终浓度为 5 μ g/ml。

1.2 方法

1.2.1 质粒提取

pRAF800 质粒小量提取参照 Eric Emond 的碱裂解法^[2]; 高纯度中量提取 pMG36e 采用北京 TianGen 公司高纯度质粒小提中量试剂盒 (DP107)。

1.2.2 PCR 及酶切产物的回收纯化

采用 promega 公司 DNA Purification System (Cat. #7170)。

1.2.3 引物设计、合成与目的片段的扩增

引物由上海生物工程公司合成, 根据 GenBank (AY091640) 的 pRAF800 的 *rep* 序列引物设计如下: *repEcoR* I: 5'-GAATTCGAATTCAGGGCTTGCCCTGACCGTCT-3'; *repNhe* I: 5'-GCTAGCGCTAGCTTACACCTAACTCATCCGCA-3', 此引物插入 *EcoR* I 和 *Nhe* I 两个酶切位点, 以 pRAF800 为模板, 进行目的片段 *rep* 的 PCR 扩增反应。PCR 反应体系和反应条件为: 总体积 50 μ l, 10 $\times$ ExTaq buffer 5 μ l, MgCl₂ (25mmol/L) 6 μ l, dNTP (5mmol/L) 2 μ l, 引物 (10 μ mol/L) 各 2 μ l, pRAF800 2 μ l, ExTaq 酶 (1U μ l) 2 μ l, ddH₂O 29 μ l; 反应条件: 95 $^{\circ}$ C 预变性 2min, 94 $^{\circ}$ C 变性 20s, 58.5 $^{\circ}$ C 退火 1min, 72 $^{\circ}$ C 延伸 2min, 30 个循环后 72 $^{\circ}$ C 保温 30min, 扩增片段长度为 1775bp。菌落 PCR 方法参照 [7], PCR 反应体系及反应条件同上。

1.2.4 限制性酶切及重组克隆载体的构建

用限制内切酶 *EcoR* I 和 *Nhe* I 双酶切质粒 pMG36e 和 PCR 产物, 酶切产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳割胶回收, -20 $^{\circ}$ C 保存。将上述酶切产物用 T4 连接酶连接, 连接条件如下: 总体积 10 μ l, 其中 10 $\times$ T4 DNA ligase buffer 1 μ l, *rep* 7 μ l, *Em^r* 1 μ l, T4 DNA ligase 1 μ l, 140 $^{\circ}$ C 连接 18h。将连接产物通过电穿孔转化法^[8]电击转化到 *L. lactis* NZ9000 感受态细胞中, 将转化好的感受态细胞涂布于含有红霉素 GM17 平板, 30 $^{\circ}$ C 培养 48h, 筛选阳性克隆子, 提取质粒 pEm^r:*rep*。

1.2.5 pEm^r:*rep* 的复制子缺刻、缺口削平及平末端连接

Hind III 限制性酶切 pEm^r:*rep* 质粒, 用绿豆核酸酶削平粘性末端, 使 DNA 两末端平滑化, 反应条件如下: 总体积 50 μ l, 其中线性 pEm^r:*rep* 20 μ l, 10 $\times$ Mung Bean Nuclease Buffer 5 μ l, Mung Bean Nuclease (45U μ l) 1 μ l, ddH₂O 24 μ l, 37 $^{\circ}$ C 反应 30min, 等体积 Tris- 饱和酚 / 氯仿 / 异戊醇抽提 1~2 次, 4 $^{\circ}$ C 16000r/min 离心 5min, 回收 DNA。参照方法 1.2.4 连接平末端 DNA, 回收纯化连接产物, 从而构建成复制子缺失的克隆质粒 pEm^r: Δ rep。

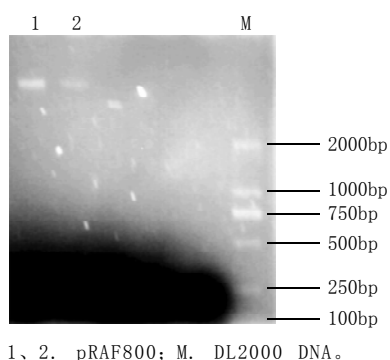
2 结果与分析

2.1 pEm^r:*rep* 质粒的构建

2.1.1 pRAF800 的提取及 *rep* 的扩增

采用碱裂解法提取质粒 pRAF800 (*L. lactis* SMQ719), 并用玻璃奶 DNA 回收试剂盒吸附质粒 DNA, 去除蛋白质和盐成分, 得到高纯度的 pRAF800, 可用于 PCR 和酶切等。质粒提取的结果见图 1。

图 1 中, 在 4.2kb 处有一亮带, 与文献的 pRAF800 (4245bp) 大小吻合, 且没有杂带, 提取效果很好。

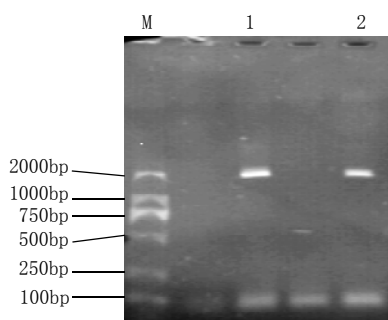


1、2. pRAF800; M. DL2000 DNA。

图1 pRAF800的提取

Fig.1 Agarose gel electrophoresis of plasmid pRAF800 DNA from *L.lactis* SMQ719/pRAF800

在充分考虑和分析了引物二级结构、引物错配和 T_m 值等影响后, 根据的 pRAF800 (GenBank AY091640) 的 *rep* 序列用 oligo 6.0 软件设计上游和下游引物, 并分别在上游的 5' 端和下游的 3' 端设计有 *EcoR* I 和 *Nhe* I 酶切位点。PCR 扩增结果见图 2 所示。图 2 中, 泳道 1、2 大约 1.8kb 的位置处有一清晰亮带, 与文献的 *rep* 大小相符, 且无非特异性扩增条带。

M. DL2000 DNA Marker; 1、2. *repAB*。图2 *repAB* 基因的 PCR 扩增图Fig.2 *repAB* PCR amplifying products

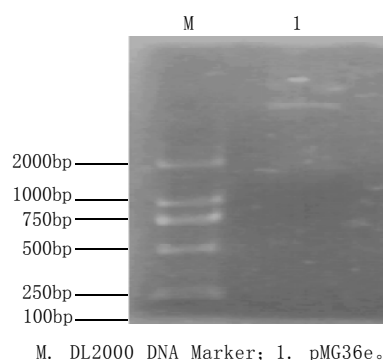
2.1.2 pMG36e 的提取及酶切回收 Em^r

用质粒提取试剂盒提取 pMG36e (*E. coli* JM109), 提取的结果见图 3 所示。图 3 中, 在泳道 2 大约 3.6kb 处有一条带与文献上的 pMG36e 大小相符。然后用 *EcoR* I 和 *Nhe* I 分别对所获得的产物进行限制性双酶切和单酶切, 酶切结果见图 4。

图 4 中泳道 1、2 处分别为双酶切后的 Em^r (~1000bp) 和线性 pMG36e, 泳道 3、4 分别为 *EcoR* I 和 *Nhe* I 单酶切后的线性 pMG36e, 并割胶回收 Em^r 基因备用。

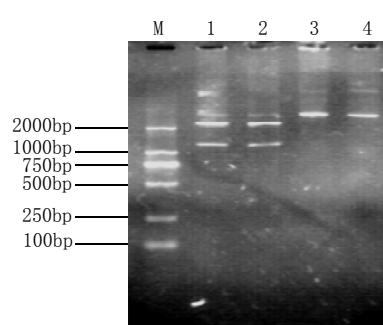
2.1.3 *rep* 和 Em^r 的连接转化

用 *EcoR* I 和 *Nhe* I 限制酶消化 *rep* 的 PCR 产物, 使 *rep* 与 Em^r 粘性末端互补配对。用 T4 DNA 连接酶在 14℃ 连接 *rep* 和 Em^r 18h。在基因克隆技术中质粒 DNA 能否转化进入受体细胞取决于受体细胞是否处于感受态, 因



M. DL2000 DNA Marker; 1. pMG36e。

图3 pMG36e 的提取

Fig.3 Agarose gel electrophoresis of plasmid pMG36e DNA from *E.coli* JM109/pMG36eM. DL2000 DNA Marker; 1、2. pMG36e/*EcoR* I+*Nhe* I; 3、4. pMG36e。图4 *EcoR* I 和 *Nhe* I 酶切 pMG36eFig.4 Agarose gel electrophoresis analysis of pMG36e digested by *EcoR* I and *Nhe* I

此我们选用含有甘氨酸的 SGM17 培养基培养 *L. lactis* NZ9000 至 $OD_{600}=0.4$, 并采用电穿孔转化法提高转化率。

2.1.4 克隆子的筛选

由于重组质粒 $pEm^r:rep$ 含红霉素抗性基因显性选择标记, 故可在含红霉素平板上筛选出阳性克隆子。筛选结果如图 5 所示。

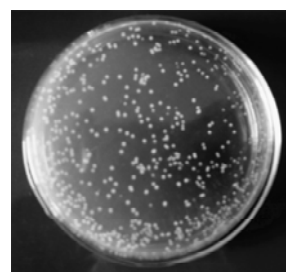
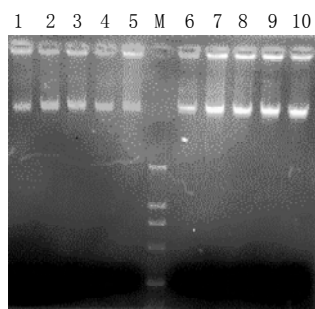


图5 红霉素平板上的阳性克隆子

Fig.5 Positive clones on plate containing emthromycin

随机抽取 10 个转化子过夜培养后快速提取质粒并电泳检测, 结果见图 6。图 6 中, 大约在 2998bp 处有亮带, 与预期的 $pEm^r:rep$ 的大小相符。为进一步确定是

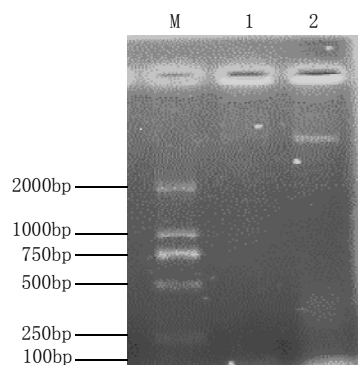
否为阳性克隆,用质粒快速提取法提取起始宿主菌 *L. lactis* NZ9000 与质粒进行对比,结果如图 7 所示。



M. DL2000 DNA Marker; 1~10. pEm^r:rep。

图 6 转化子 pEm^r:rep 质粒 DNA 的提取

Fig.6 Agarose gel electrophoresis of plasmid pEm^r:rep DNA from *L.lactis* NZ9000/pEm^r:rep



M. DL2000 DNA Marker; 1. *L. lactis* NZ9000 作为阴性对照; 2. 质粒快速提取法提取 pEm^r:rep 结果。

图 7 质粒快速提取法提取的起始宿主菌 *L.lactis* NZ9000 和克隆子对比

Fig.7 Agarose gel electrophoresis analysis of plasmids extracted by rapid plasmid extraction method, *L.lactis* NZ9000 used as a negative control

图 7 中,泳道 1 只有一条亮带即 *L. lactis* NZ9000 基因组 DNA,泳道 3 则与图 6 克隆子相同,有质粒 pEm^r:rep,证明所检测到的是阳性克隆子。

2.2 pEm^r:rep 质粒的 PCR 检测和酶切鉴定

对筛选到的克隆子,进行菌落 PCR 检测,如图 8 所示。图 8 中,泳道 1 至 10 的 1775bp 处均有带,为 *rep* 的 PCR 产物,证明经红霉素平板筛选获得是阳性克隆子。

分别用 *EcoR* I 和 *Nhe* I 单酶切和双酶切质粒 pEm^r:rep,结果如图 9 所示。图 9 中,泳道 1、2 为 *EcoR* I 和 *Nhe* I 双酶切质粒 pEm^r:rep,可见有两条酶切片段,分别为 *rep* 和 *Em^r*,泳道 3、4 分别为 *EcoR* I、*Nhe* I 酶切线性质粒 pEm^r:rep。

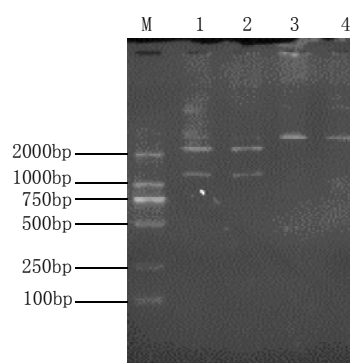
2.3 pEm^r:Δrep 质粒的构建



M. DL2000 DNA Marker; 1~10. 阳性克隆的 PCR 结果。

图 8 菌落 PCR 检测阳性克隆子的结果

Fig.8 Agarose gel electrophoresis analysis of the PCR products with pEm^r:rep as templates



M. DL2000 DNA Marker; 1, 2. pEm^r:rep/*EcoR* I+*Nhe* I; 3. pEm^r:rep/*EcoR* I; 4. pEm^r:rep/*Nhe* I。

图 9 pEm^r:rep 质粒的酶切鉴定

Fig.9 Agarose gel electrophoresis analysis of pEm^r:rep digested by *EcoR* I and *Nhe* I

2.3.1 pEm^r:rep 的酶切、削平及连接

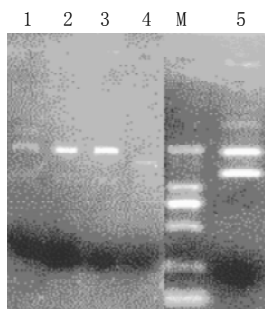
由于在 *rep* 基因 5' 端的 478bp 处有唯一的 *Hind* III 酶切位点,而 *Em^r* 基因内无此位点,故选用限制酶 *Hind* III 酶切 *rep* 基因,再用绿豆核酸酶切除粘性末端,使 *rep* 成为平末端。再用 T4 连接酶进行平末端构建含 *Em^r* 的 *rep* 复制子缺失伴生型质粒 pEm^r:Δrep,构建好的 pEm^r:Δrep 可以与含完整 θ 型复制子的食品级克隆载体共转化进行食品级两组分筛选。

2.3.2 pEm^r:Δrep 质粒的检测

提取质粒 pEm^r:Δrep,分别用 *EcoR* I 和 *Nhe* I 单酶切和双酶切鉴定质粒 pEm^r:Δrep,酶切结果如图 10。图 10 中,泳道 1、2、3 为质粒 pEm^r:Δrep,泳道 4 为 *EcoR* I 酶切质粒 pEm^r:Δrep,泳道 5 为 *EcoR* I 和 *Nhe* I 酶切质粒 pEm^r:Δrep。由图 10 可知, pEm^r:Δrep 为正确的构建。

3 讨论

本实验主要构建含红霉素抗性基因选择标记的 θ 型复制子缺失伴生型质粒。此伴生型质粒无完整的 θ 型复



M. DL2000 DNA Marker; 1~3. pEm^f: Δrep; 4. pEm^f: Δrep/EcoR I; 5. pEm^f: Δrep/EcoR I+Nhe I。

图10 pEm^f: Δrep 质粒及酶切鉴定

Fig.10 Identification of recombinant plasmid pEm^f: Δrep and agarose gel electrophoresis analysis of pEm^f: Δrep digested by EcoR I and Nhe I

制子, 只能通过完整的 θ 型复制子产生的 RepB 蛋白反向互补才能复制。利用这一特征, 我们可以构建乳酸菌两组分食品级选择标记。

在乳酸菌食品级选择标记应用方面, 人们一直使用显性选择标记和互补选择标记^[1-2]。最近 Eric 等人开发的两组分食品级选择系统是建立在显性选择标记和互补选择标记的优势基础发展起来的, 它兼有两种选择标记的优点, 又克服了它们的缺点。这种系统由两个质粒组成, 一个是伴生型质粒, 它含有作为显性选择标记的红霉素抗性基因, 但无完整的复制子, 不具有复制能力。另一个是完全由乳酸菌基因构成, 具有功能性完整的 θ 型复制子无任何选择标记的克隆载体^[1-3]。

θ 型复制子比滚环型(rolling circle replication, RCR)复制子具有更高的内部结构的稳定性, 在复制中期无单链结构。克隆载体和伴生型质粒都是 θ 型复制质粒, 能共用相同的 RepB 蛋白进行复制, 因为 *repB* 编码的 386 个氨基酸与乳酸菌 θ 型复制质粒的 RepB 起始子蛋白具有极其相似的序列^[2]。

在红霉素选择压力存在的条件下, 只有共含伴生型质粒和克隆载体两组分的 *L. lactis* 才能存活, 因此可在

红霉素平板上初步筛选出含伴生质粒和克隆载体的菌株。在无红霉素选择压力的情况下, 克隆载体由于具有完整的 θ 型复制子故不需要依赖伴生质粒, 并且由于克隆载体和伴生型质粒的结构不相容性, 数代后伴生型质粒由于没有选择压力逐步被清除掉, 从而筛选出克隆有目的基因的克隆载体。

此两组分食品级克隆载体选择系统可应用于乳酸菌目前最有效的食品级高效诱导表达系统 NICE (the nisin-controlled expression) 系统。由于 NICE 系统的诱导剂、宿主菌和载体都是食品级的, 并可控制目的基因的表达, 在食品、医药工业应用前景十分广阔^[9]。

参考文献:

- [1] 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.
- [2] EMOND E, LEE R, GENEVIEVE D, et al. Molecular characterization of a theta replication plasmid and its use for development of a two-component food grade cloning system for *Lactococcus lactis*[J]. Appl Environ Microbiol, 2001, 67(4): 1700-1709.
- [3] ISABELLE B, MARC P, HELENE G, et al. Novel food-grade plasmid vector based on melibiose fermentation for the genetic engineering of *Lactococcus lactis*[J]. Appl Environ Microbiol, 2002, 68(2): 6152-6161.
- [4] PASCALLE G G A, de Ruyter, OSCAR P, et al. Controlled gene expression systems for *Lactococcus lactis* with the food-grade inducer nisin[J]. Appl Environ Microbiol, 1996, 62(2): 3662-3667.
- [5] SØRENSEN K I, LARSEN R, KIBENICH A, et al. A food-grade cloning system for industrial strains of *Lactococcus lactis*[J]. Appl Environ Microbiol, 2000, 66(4): 1253-1258.
- [6] OSCAR P, KUIPERS, PASCALLE G G A, et al. Quorum sensing-controlled gene expression in lactic acid bacteria[J]. J Biotechnol, 1998, 64: 15-21.
- [7] LEE A B, et al. Improved directed PCR screen for bacterial colonies: Wooden toothpicks inhibit PCR amplification[J]. Bio Techniques, 1995, 18(2): 225-226.
- [8] WELLS J M, et al. Improved cloning vectors and transformation procedure for *Lactococcus lactis*[J]. J Appl Bacteriol, 1993, 74: 629-636.
- [9] 徐波, 曹郁生. 食品级高效诱导表达系统-NICE 系统[J]. 生物技术通报, 2005, 21(2): 14-17.



日本科学家从水母体内提取商用原料

受到水母数量爆增的启发, 日本科学家开发了一种工艺从水母中提取有用的商业材料。

据《科技日报》报道, 由于全球变暖和海岸沿线的人造珊瑚导致的世界范围内的水母数量爆增致使核电站和传统水电站的进水通道堵塞, 造成了非常糟糕的局面。

在此项研究中, 日本国家材料科学研究所的研究人员开发了一种工艺, 可以从水母体内提取大量的被称为黏液素的蛋白质物质, 这种物质可以作为药物、化妆品和食品添加剂的原料, 它呈微小的颗粒状, 具有光滑的外表, 表面布满粘液, 有的还具有抗菌性。研究人员表示: 水母粘液素与人类粘液素性状很相似, 可以替代目前取自于猪和牛体内的生物材料。