

乳链菌肽抗性菌株的定向筛选及鉴定

张丽¹ 秦泽荣¹ 尹燕博² 徐滨蕊¹ 刘尚高^{1*}

(1 中国农业大学动物医学院, 北京 100094)

(2 农业部动物检疫所, 青岛 266032)

摘要 利用乳链菌肽抗性菌株中乳链菌肽抗性和乳糖发酵紧密连锁的原理,在含有乳链菌肽、乳糖和溴甲酚紫的选择培养基上,从205个新鲜的牛奶样品中定向筛选乳链菌肽抗性菌株。对筛选到的4株菌分析鉴定结果表明:4株菌均为革兰氏阳性菌,产乳酸,过氧化氢酶试验阴性;通过质粒的抽提和电泳,发现 *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ZL2009, ZL2010, ZL2024, ZL2030 分别含有1,7,5,3条质粒带,且4株菌的质粒 DAN 分子大小不完全相同。

关键词 乳酸乳球菌; 乳链菌肽抗性; 定向筛选; 鉴定

中图分类号 Q939.117.03

Directional Screening and Identification of Nisin-resistant *Lactococcus lactis*

Zhang Li¹ Qin Zerong¹ Yin Yanbo² Xu Binrui¹ Liu Shanggao¹

(1 College of Veterinary Medicine, China Agricultural University, Beijing 100094, China)

(2 Animal Quarantine Institute of Ministry of Agriculture of China, Qingdao 266032, China)

Abstract According to the genetic loci of nisin-resistant (Nis^r) linking to lactose-fermenting ability (Lac⁺) closely, four nisin-resistant *Lactococcus lactis* strains were directionally screened from 205 samples of fresh milk on a selective medium (M17) supplemented with nisin, lactose and bromocresol purple. The analysis of four strains demonstrated that they are Gram positive bacteria. The extraction of plasmid DNA illustrated that *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ZL2009, ZL2010, ZL2024, ZL2030 individually harboured 1,7,5 and 3 plasmids and they have different molecular weight.

Key words *Lactococcus lactis*; nisin-resistant; directional screening; identification

目前大多数分子生物学操作中选用的载体系统,均以抗生素抗性作为外源基因稳定表达的选择压力。随着载体系统的使用,抗药性因子将有可能在菌群中相互传递而发生扩散。为了保证表达载体的安全性,食品级表达载体的研究越来越为人们所关注。利用分子生物学手段分析乳酸菌的遗传背景并加以改造成食品级表达载体已成为乳酸菌分子遗传学研究领域的前沿和热点。乳链菌肽(Nisin)是一种高效、无毒的天然食品防腐剂,利用乳链菌肽抗性作为选择性标记可构建乳酸菌食品级载体,来逐渐替代目前以抗生素抗性作为外源基因稳定表达的选择

收稿日期: 2001-07-24

国家自然科学基金资助项目(30070571)

* 刘尚高,教授,研究方向为动物医学基因工程和畜禽传染病防治。联系作者。

压力,避免抗药性因子在自然界的扩散^[1]。据此,我们根据文献^[2~5]报道,乳链菌肽抗性基因常和乳糖利用基因位于同一个质粒上,设计了一个简便、快速、定向筛选乳链菌肽抗性菌的方法,对本试验筛选出的乳链菌肽抗性菌株将为乳链菌肽抗性基因的克隆及乳酸乳球菌食品级载体的构建的研究奠定基础。

1 材料与方 法

新鲜牛奶样品来自北京市北郊农场牛奶场。

Lactococcus lactis subsp. *lactis* LM0230(乳酸乳球菌标准菌),不含质粒,本室保存。

乳酸乳球菌平板分离、液体及发酵培养基:均采用 GM17 培养基,固体培养基加入 1.3% 琼脂。选择培养基(筛选乳链菌肽抗性菌用):LM17 培养基,以乳糖为碳源,同时含有 0.002 5% 的溴甲酚紫和 300 IU·mL⁻¹ 乳链菌肽。

质粒 DNA 提取用 GM17 和 Elliker 培养基。

试剂乳链菌肽是英国 Aplin-Barrett 公司产品 Nisaplin。其他试剂为国产。

乳链菌肽抗性菌株的筛选 将新鲜牛奶样品以 10% 接种量分别接种于含 20 IU·mL⁻¹ 乳链菌肽的 GM17 液体培养基中,30℃ 静置培养 16 h,取 30 μL 涂布在选择培养基上,30℃ 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,选出球状或链球状的革兰氏阳性菌作进一步鉴定。

乳酸乳球菌的鉴定 参照《一般细菌常用鉴定方法》^[6]和《乳酸细菌分类鉴定及实验方法》^[7]进行乳酸纸层析及生理生化特征的检测。生理生化特征的检测包括:温度试验、耐盐性试验、产气试验、接触酶试验、淀粉水解酶试验、精氨酸水解酶试验和不同碳源产酸试验。

质粒 DNA 的分离及琼脂糖凝胶电泳 乳酸乳球菌质粒 DNA 的抽提参照 Anderson^[8]方法进行,略有改进。取 5 mL GM17 过夜培养物或 10 mL 在 Elliker 中培养 6 h 的培养物,6 000 r·min⁻¹ 离心 4 min,弃上清,收集菌体;将菌体悬浮于 379 μL 含 6.7% 蔗糖 TE 溶液中;加 96.5 μL 10 mg·mL⁻¹ 的溶菌酶溶液,37℃ 保温 5~10 min;加 48.2 μL TE 混匀;加 27.6 μL 20% SDS 混匀,37℃ 保温 5~10 min,旋转振荡 30 S;加 27.6 μL 3 mol·L⁻¹ NaOH,温和混匀 8 min;加 49.6 μL 2 mol·L⁻¹ TE,温和混匀 3 min;加 71.7 μL 5 mol·L⁻¹ NaCl 混匀;加入等体积 Tris-Cl 饱和酚、Tris-Cl 饱和酚:氯仿/异戊醇和氯仿各提取一次,10 000 r·min⁻¹ 离心 5 min;小心吸出上清,加 1/10 体积的 3 mol·L⁻¹ NaAc(pH5.2),等体积异丙醇,混合均匀后室温放置 30 min;10 000 r·min⁻¹ 离心 10 min,弃上清,沉淀用 70% 乙醇洗涤一次;沉淀干燥后溶于 20 μL TE 中;取 5~10 μL 进行琼脂糖凝胶电泳观察。

2 结 果

2.1 乳链菌肽抗性菌株的筛选

根据乳链菌肽抗性基因常和乳糖利用基因位于同一个质粒上,即在乳糖作碳源和添加适当乳链菌肽的 M17 培养基上,配以溴甲酚紫作指示剂,如果一个菌株既对乳链菌肽具有抗性,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,很容易用肉眼加以辨别。我们从

北京市北郊牛奶场采集的 205 份新鲜牛奶样品中,共收集到 8 株可在这种选择培养基上生长的菌,经连续生长 5 代,并使周围培养基由紫变黄的菌株有 4 株,依次命名为 ZL2009、ZL2010、ZL2024、ZL2030。

2.2 菌株的鉴定

菌株的一般鉴定参照《一般细菌常用鉴定方法》和《乳酸细菌分类鉴定及实验方法》对以上 4 株菌在上述培养基上复筛后,经革兰氏染色和镜检都为革兰氏阳性菌,呈球状或链球状。将这 4 株菌的发酵液用新华滤纸层析,展开液用正丁醇和冰醋酸和水(体积比为 4:2:1),显色剂用 0.05% 溴酚蓝酒精溶液,用乳酸及 *L. lactis* LM0230 发酵液为阳性对照,空白基础培养基为阴性对照。结果表明,这 4 株菌的发酵液中都含有乳酸,属于乳酸菌。

生理生化特征按照乳酸菌分类鉴定指标进行。从表 1 可知,4 株菌都可在 10℃、40℃ 生长,而不能在 45℃ 生长;ZL2009、ZL2024、ZL2030 可在含 4.0% NaCl 的 GM17 培养基中生长,而不在含 6.5% NaCl 的 GM17 培养基中生长,但 ZL2010 在这 2 种盐浓度的培养基中都可生长;4 株菌都不产气;滴加 5% H₂O₂ 后无气泡产生,接触酶实验阴性;滴加碘液后蓝色不改变,淀粉水解酶实验阴性;生长 24 h 后使 Thornley 培养基由黄色变为红色,精氨酸水解酶阳性;它们可利用乳糖、半乳糖、麦芽糖、核糖产酸而不能发酵蜜二糖、松三糖和棉籽糖产酸。综合以上结果,可以认为这 4 株菌属于乳酸乳球菌乳酸亚种。

表 1 测试菌株的生理生化特征

菌株	温度试验			NaCl 浓度		产气 试验	接触酶 试验	淀粉酶 试验	精氨 酸水 解酶 试验	不同碳源产酸试验						
	t/℃			试验						半 乳 糖	乳 糖	麦 芽 糖	蜜 二 糖	松 三 糖	棉 籽 糖	核 糖
	10	40	45	4.0	6.5											
ZL2009	+	+	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+
ZL2010	+	+	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+
ZL2024	+	+	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+
ZL2030	+	+	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+

2.3 菌株遗传特性分析

我们抽提了分离到的 4 株菌的质粒 DNA,同时以 *L. lactis* subsp. *lactis* LM0230 作为对照。通过质粒 DNA 电泳,发现 *L. lactis* subsp. *lactis* ZL2009, ZL2010, ZL2024, ZL2030 分别含有 1,7,5,3 条质粒带,且 4 株菌的质粒 DNA 分子量不完全相同(图 1)。

3 讨 论

利用乳链菌肽抗性菌株中 Nis⁺Lac⁺ 紧密连锁的原理,在含有乳链菌肽、乳糖和溴甲酚紫的选择培养基上,从新鲜的牛奶样品中定向筛选乳链菌肽抗性菌,使乳链菌肽抗性菌的筛选工作由某种程度上的随机性和盲目性变成直接和定向筛选,简化了筛选程序。

据文献报道,迄今为止所发现的乳链菌肽抗性基因都在大质粒上,和乳糖利用基因常位于同一质粒上,且它们所在的菌含有较多的质粒。Mckay 等^[2]分离了 *S. lactis* subsp. *diacetylactis*

DRC3,电泳发现此野生菌株含有7条质粒带,大小依次为52,34,26.5,5.5,3.5,3.2和1.8 Mdal;后来又分离了*S. lactis* subsp. *diacetylactis* D56,电泳发现此野生菌株含有7条质粒带,大小依次为60,40,26.5,5.5,3.5,3.2和1.8 Mdal。Klaenhammer等^[3]分离了*Streptococcus lactis* ME2,电泳发现此野生菌株含有13条质粒带,大小依次为40,34,30,20,16,7.5,5.8,3.6,2.6,2.0,1.9,1.7和1.6 Mdal。von Wright等^[4]从自然界分离到*L. lactis* subsp. *Lactis biovar diacetylactis* SSD207,电泳发现此菌株至少含有12条质粒带,大小从2~30 kb以上。Liu等^[5]分离了*L. lactis* subsp. *lactis* M189,电泳发现此野生菌株含有5条质粒带,大小依次为60,56,40,24和3.7 kb。本试验从205个新鲜牛奶样品中分离到了4株乳链菌肽抗性的乳酸乳球菌,进行质粒DNA抽提和凝胶电泳后,分别含有1,7,5,3条质粒带,发现它们的质粒数目和分子量不完全相同,与目前所分离到的含乳链菌肽抗性的乳酸乳球菌有所差异,为今后基因的定位研究提供了参考数据。



A:CK,LM0230; B:ZL2009; C:ZL2010;
D:ZL2024; E:ZL2030

图1 *Lactococcus lactis* 几个菌株的
质粒DNA图谱

参 考 文 献

- 1 杨洁彬,郭兴华,张箴,等. 乳酸菌——生物学基础及应用. 北京:中国轻工业出版社,1996
- 2 McKay L L, Baldwin K A. Conjugative 40-megadalton plasmid in *Streptococcus lactis* subsp. *diacetylactis* DRC3 is associated with resistance to nisin and bacteriophage. *Appl Environ Microbiol*, 1984, 47: 68~74
- 3 Klaenhammer T R, Sanozky R B. Conjugal transfer from *Streptococcus lactis* ME2 of plasmids encoding phage resistance, nisin resistance and lactose-fermenting ability: evidence for a high-frequency conjugative plasmid responsible for abortive infection of virulent bacteriophage. *J Gen Microbiol*, 1985, 131: 1531~1541
- 4 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, *Appl Environ Microbiol*, 1990, 56: 2029~2035
- 5 Liu C Q, Harvey M L, Novel W Dunn. Cloning of a gene encoding nisin resistance from *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* M189 which is transcribed from an extended-10 promoter. *J Gen Appl Microbiol*, 1997, 43: 67~73
- 6 中国科学院微生物研究所细菌分类组. 一般细菌常用鉴定方法. 北京:科学出版社,1978
- 7 凌代文,东秀珠. 乳酸细菌分类鉴定及实验方法. 北京:中国轻工业出版社,1999
- 8 Anderson D G, McKay L L. Simple and rapid method for isolating large plasmid DNA from *Lactic streptococci*. *Appl Environ Microbiol*, 1983, 46: 549~552