

研究报告



乳链菌肽细胞分子传感器的构建与应用

吴晓峰 王莆杰 李佳玮 张顺 贾笑 姚瑞莲 肖毅*

上海交通大学微生物代谢国家重点实验室 上海 200240

摘要:【背景】乳链菌肽主要是由乳酸乳球菌生产的一类多肽,对革兰氏阳性菌有抑菌作用,是目前联合国粮食及农业组织/世界卫生组织唯一批准使用的天然食品防腐剂。但是其产量低、缺乏简便高效的检测方法,限制了其研究和应用。【目的】构建一种可输出肉眼可见红色荧光的细胞分子传感器,以期能简单方便地检测样品中的乳链菌肽,同时应用该传感器筛选乳链菌肽生产菌株。【方法】用 Golden-Gate 克隆方法构建含乳链菌肽诱导启动子和下游红色荧光蛋白基因(两种)的载体,转入 *Lactococcus lactis* 中。用细胞传感器筛选可能的乳链菌肽生产菌株。【结果】构建的两种乳链菌肽细胞分子传感器都能对 2–200 ng/mL 乳链菌肽有灵敏的响应,可用于定量测定。两种传感器的最大荧光强度和表型也有所不同。利用细胞传感器确定了 *Lactococcus lactis* ATCC 11454 乳链菌肽的产生,同时排除了一个能产其他抗菌化合物的菌株。【结论】构建的细胞分子传感器能特异性地响应乳链菌肽,并能简单快速地筛选乳链菌肽菌株。

关键词: 乳链菌肽, 细胞分子传感器, 红色荧光蛋白, 乳链菌肽生产菌株

Construction of nisin whole-cell biosensors

WU Xiao-Feng WANG Pu-Jie LI Jia-Wei ZHANG Shun JIA Xiao
YAO Rui-Lian XIAO Yi*

State Key Laboratory of Microbial Metabolism, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China

Abstract: [Background] Nisin is a small antibacterial peptide mainly produced by *Lactococcus lactis*. It is the only natural food preservative approved for wide applications. However, its low biosynthesis yield, and lack of simple and efficient detection methods limit its research and applications. [Objective] To develop a simple and efficient method to detect nisin, the nisin controlled gene expression (NICE) system and a visible red fluorescent protein were adopted for construction of a whole-cell nisin biosensor. The biosensor was used to quickly screen for nisin-producing candidate strains. [Methods] A Golden-Gate cloning method was used to construct a vector which contains a nisin-inducible promoter (Pnis) for regulating a red fluorescent protein gene (*rfp*). Two *rfp* genes, identical in protein sequences but different in DNA sequences, were tested. The constructed biosensor plasmids were transferred into *Lactococcus lactis*, generating the whole-cell nisin biosensors and further used for the screening. [Results] Both of the two whole-cell nisin biosensors could specifically and quantitatively respond to nisin varied from 2 to 200 ng/mL.

Foundation items: Science and Technology Commission of Shanghai Municipality (18JC1413600); Shanghai Natural Science Foundation (18ZR1420500)

*Corresponding author: Tel: 86-21-34208601; E-mail: yi_xiao@sjtu.edu.cn

Received: 09-02-2020; Accepted: 10-04-2020; Published online: 09-05-2020

基金项目: 上海市“科技创新行动计划”基础研究领域项目(18JC1413600); 上海市自然科学基金(18ZR1420500)

*通信作者: 021-34208601; E-mail: yi_xiao@sjtu.edu.cn

收稿日期: 2020-02-09; 接受日期: 2020-04-10; 网络首发日期: 2020-05-09

Moreover, the biosensor was applied to screen candidate strains and identified a nisin-producing strain *Lactococcus lactis* ATCC 11454. **[Conclusion]** The developed whole-cell nisin biosensor can specifically respond to nisin, and can be used to simply and quickly identify nisin-producing strains.

Keywords: Nisin, Whole-cell nisin biosensor, Red fluorescent protein, Nisin-producing strain

乳链菌肽(nisin)是由一类乳酸乳球菌产生的含 34 个氨基酸的多肽^[1](图 1), 于 1928 年由 Rogers 和 Whittier 首先在乳酸乳球菌的代谢产物中发现^[2]。乳链菌肽主要对革兰氏阳性菌起抑菌杀菌作用, 尤其是对产生孢子的细菌。另外也有研究表明, 乳链菌肽与 EDTA 二钠联合使用对一些革兰氏阴性菌也有抑制作用^[3]。乳链菌肽能在消化道中很快被 α -胰凝乳蛋白酶消化成氨基酸, 不会改变肠道内的正常菌群, 也不会出现一般抗生素引起的抗药性问题。由于乳链菌肽具有无残留、无抗药性、无毒副作用以及对环境友好等优点, 1969 年乳链菌肽被联合国粮食及农业组织/世界卫生组织批准为一种安全的生物型防腐剂应用于食品工业。目

前, 乳链菌肽的应用已在 50 多个国家获得许可, 并应用于不同类型的食品^[4]。然而, 目前乳链菌肽的生产菌株生物合成效率低且缺乏简便快速检测技术, 制约了乳链菌肽的研究和应用^[5]。因此, 构建简便高效的检测系统、鉴别新颖和高产的菌株显得尤为迫切。

乳链菌肽中的 Nisin A 最早被发现, 也最常见并被广泛使用^[6], 其生物合成涉及 11 个基因, 以 *nisABTCIP*、*nisRK*、*nisFEG* 的 3 个多顺反子排列在约 14 kb 的 DNA 片段上^[7]。其中 *nisR* 和 *nisK* 基因的产物组成一个二元调控系统参与调控乳链菌肽的生物合成。以 NisRK 双组分调控蛋白和相对应的 *nisA* 或 *nisF* 启动子(Pnis)为基础, Kuipers 等开

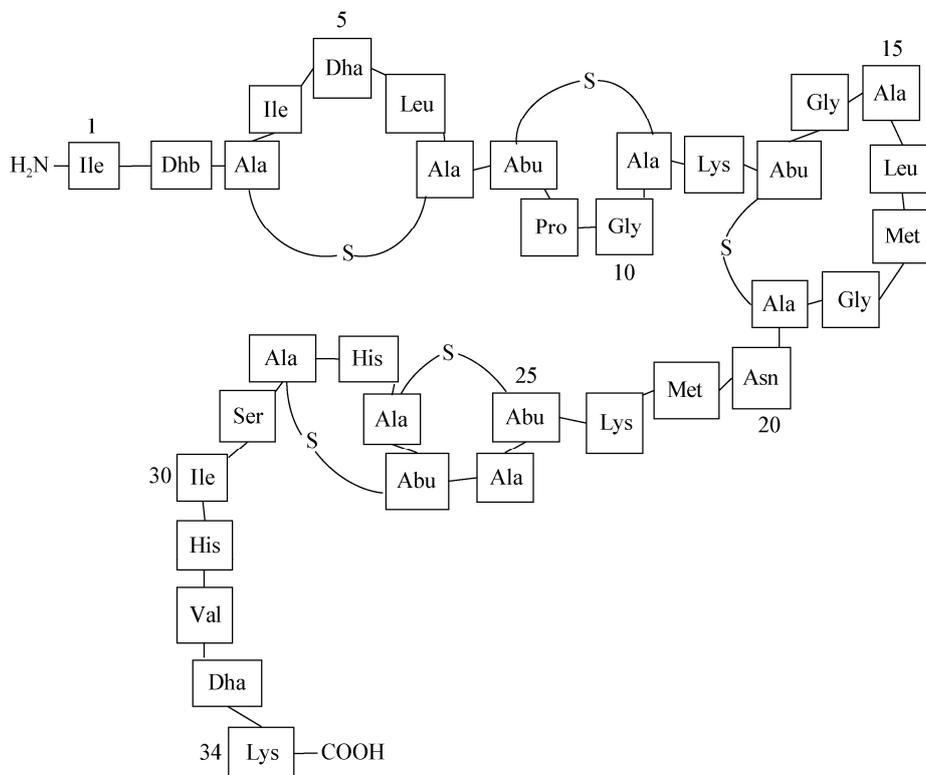


图 1 乳链菌肽 A 的分子结构

Figure 1 The molecular structure of nisin A

发了乳链菌肽诱导控制的基因表达系统 NICE (nisin controlled gene expression system)^[8] (图2)。在适合表达 *nisRK* 的宿主中, 利用 NICE 系统通过外加诱导剂乳链菌肽就可以控制编码目的蛋白基因的表达^[8-9]。

目前乳链菌肽检测鉴定的常用方法是琼脂扩散法、免疫测定法、生物荧光法^[10-12]。琼脂扩散法利用乳链菌肽的抗菌性, 以敏感标准菌株(例如藤黄微球菌)为测试参考, 通过平板上的抑菌圈来判断鉴定有无抑菌效果。此方法不需要特殊的仪器, 但费时且特异性低, 易与其他抗菌肽混淆。免疫测定法利用特异性抗体对乳链菌肽进行检测, 特异性高且灵敏度好, 但是抗体试剂昂贵、操作要求苛刻。Reunanen 等发明了生物荧光法, 将绿色荧光蛋白基因置于 NICE 的控制下, 可将乳链菌肽信号转化为荧光信号, 用于各种食品中乳链菌肽的测定^[11-12]。但是, 目前此类报道的生物荧光检测器的检测上限低(<20 ng/mL), 而且绿色荧光无法直接观察, 需要利用特殊仪器, 这些都增加了实际操作的难度和复杂度, 从而制约了其进一步的应用。因此, 有必要开发一种简单高效的乳链菌肽检测系统应用于乳链菌肽菌株的筛选。

本研究利用胞内 NICE 系统构建了乳链菌肽响

应的一种新型红色荧光输出的细胞分子传感器。该传感器具有广泛的检测范围(2–200 ng/mL)和更简单的操作(普通光照下就可以观察初步定性, 也可用酶标仪进行精确定量), 并成功应用于筛选乳链菌肽的生产菌株。这为鉴定乳链菌肽菌株提供了一种简单的方法, 并为建立高通量快速简单筛选菌株提供了基础。

1 材料与方法

1.1 菌株和质粒

本研究中使用的菌株和质粒信息详见表 1, *Micrococccu luteus* 菌株由中国科学院南海海洋研究所张长生老师惠赠。

1.2 培养基及主要试剂和仪器

GM17 培养基(g/L): 葡萄糖 5.00, 植物蛋白胨 5.00, 聚蛋白胨 5.00, 酵母提取物 2.50, 牛肉提取物 5.00, 抗坏血酸 0.50, β -甘油磷酸二钠 19.00, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.25。用于培养乳酸乳球菌 (*Lactococcus lactis*)。

S1 培养基(g/L): 胰蛋白胨 8.0, 葡萄糖 5.0, 酵母提取物 5.0, NaCl 5.0, $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ 5.0。用于培养藤黄微球菌(*Micrococccu luteus*)。

LB 培养基(g/L): 胰蛋白胨 10.0, 酵母提取物 5.0, NaCl 10.0。用于培养大肠杆菌(*E. coli*)。

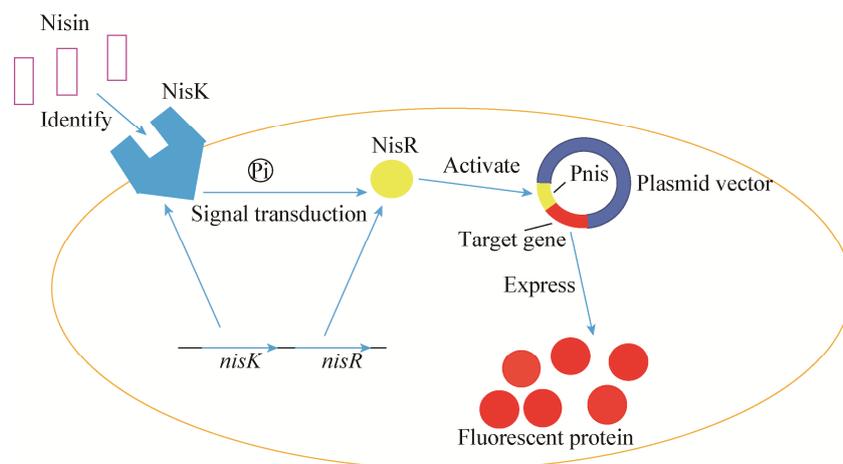


图2 NICE 系统示意图

Figure 2 Nisin controlled gene expression system (NICE)

MRS 培养基(g/L): 蛋白胨 10.00, 酵母提取物 10.00, 柠檬酸二铵 2.00, 葡萄糖 20.00, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.58, 牛肉提取物 10.00, $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ 2.00, 乙酸钠 5.00, $MnSO_4 \cdot 4H_2O$ 0.25, 吐温-80 (1 mL/L)。

氯霉素购自生工生物工程(上海)股份有限公司; *Bsa* I 限制性内切酶购自 NEB (北京)有限公司; Phusion DNA polymerase 购自 Thermo Fisher 公司; 乳链菌肽(A 型)购自 Macklin 公

司。甜蒜、榨菜、牛奶、酸奶发酵粉购自上海市闵行区沧源路农贸市场。多功能酶标仪购自 Tecan 公司。

1.3 引物设计与合成

根据质粒 pNZ8148 和 *rfp*、*mrfp* 基因(GenBank 登录号 MT210047)的核苷酸序列, 设计了表 2 中的扩增引物, 全部引物均合成于生工生物工程(上海)股份有限公司, *mrfp* 基因序列合成于苏州金唯智生物科技有限公司。

表 1 本研究中使用的菌株和质粒

Table 1 Plasmids and strains used in this study

菌株或质粒	描述	来源
Strains or plasmids	Description	Source
pNZ8148	Plasmid, Cm^r , containing nisin A promoter	Purchased from Wuhan Miaoling Biological
pNZ8148-RFP	Plasmid, Cm^r , containing nisin A promoter, <i>rfp</i> inserted into pNZ8148	This study
pNZ8148-mRFP	Plasmid, Cm^r , containing nisin A promoter, <i>mrfp</i> inserted into pNZ8148	This study
<i>E. coli</i> MC1061	Cloning host (F ⁻)	Purchased from Shanghai Weidi Biotechnology
<i>E. coli</i> MC1061-RFP	Cm^r , pNZ8148-RFP transformed into MC1061	This study
<i>E. coli</i> MC1061-mRFP	Cm^r , pNZ8148-mRFP transformed into MC1061	This study
<i>L. lactis</i> NZ9000	Expression host, containing <i>nisR</i> and <i>nisK</i>	Purchased from Wuhan Miaoling Biological
<i>L. lactis</i> NZ9000-RFP	Cm^r , pNZ8148-RFP transformed into NZ9000	This study
<i>L. lactis</i> NZ9000-mRFP	Cm^r , pNZ8148-mRFP transformed into NZ9000	This study
<i>L. lactis</i> ATCC11454	Nisin A producing strain	Purchased from ATCC
<i>Micrococcus luteus</i>	Indicator strain sensitive to nisin	Zhang lab

表 2 本研究中所用的引物

Table 2 Primers used in this study

引物名称	序列	修饰
Primers name	Sequences (5'→3')	Modification
pNZ8148-F1	TTTTT <u>GGTCTC</u> ACCATGGTGAGTGCCTCCTATAATTTATTTTGTAGTTC	<i>Bsa</i> I
pNZ8148-R1	TTTTT <u>GGTCTC</u> ATGCTTAAATGGGTAAGTGCAGGCATGC	<i>Bsa</i> I
<i>rfp</i> -F1	TTTTT <u>GGTCTC</u> AAGCACCAGGTGGAGTGAC	<i>Bsa</i> I
<i>rfp</i> -R1	TTTTT <u>GGTCTC</u> AAATGGCGAGTAGCGAAGACG	<i>Bsa</i> I
pNZ8148-F2	TTTTT <u>GGTCTC</u> ACCATGGTGAGTGCCTCCTATAATTTATTTTGTAGTTC	<i>Bsa</i> I
pNZ8148-R2	TTTTT <u>GGTCTC</u> AGGAGCTTAAATGGGTAAGTGCAGGCATGC	<i>Bsa</i> I
<i>mrfp</i> -F1	TTTTT <u>GGTCTC</u> AAATGGCTTCTTCAGAAGATGTTATTAAGAATTTATGC	<i>Bsa</i> I
<i>mrfp</i> -R1	TTTTT <u>GGTCTC</u> ACTCCAGTTGAATGACGACCTTCTG	<i>Bsa</i> I
27F	AGAGTTTGATCMTGGCTCAG	—
1492R	GGTTACCTTGTTACGACTT	—

注: 下划线序列为引入的 *Bsa* I 识别位点。

Note: The underlined is the *Bsa* I site.

1.4 重组质粒的构建

根据 pNZ8148 表达质粒和 *rfp* 基因序列, 设计如表 2 所示的引物, 用 Phusion DNA Polymerase 进行 PCR 扩增。PCR 反应体系(20 μ L): 模板 DNA (100 ng/ μ L) 0.2 μ L, 正、反向引物(50 μ mol/L)各 0.2 μ L, dNTPs mixture (10 mmol/L) 0.4 μ L, 5 \times Buffer 4 μ L, DMSO 1 μ L, Betaine 4 μ L, Phusion DNA polymerase (2 U/mL) 0.1 μ L, 灭菌双蒸水 9.9 μ L。PCR 反应条件: 98 $^{\circ}$ C 30 s; 98 $^{\circ}$ C 10 s, 53 $^{\circ}$ C 20 s, 72 $^{\circ}$ C 2 min, 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10 min。用 1%琼脂糖凝胶电泳进行验证并切胶回收, 得到 pNZ8148 骨架片段(引物-pNZ8148-F1/R1) 和 *rfp* 基因片段(引物-rfp-F1/R1), 片段两端均带有 *Bsa* I 的识别位点。利用 Golden-Gate 方法将两个片段进行连接, 如图 3 所示, 最终得到重组质粒 pNZ8148-RFP。同样地, 将优化合成的 *mrfp* (引物-mrfp-F1/R1)基因与 pNZ8148 质粒(引物-pNZ8148-F2/R2)连接, 得到重组质粒 pNZ8148-mRFP。

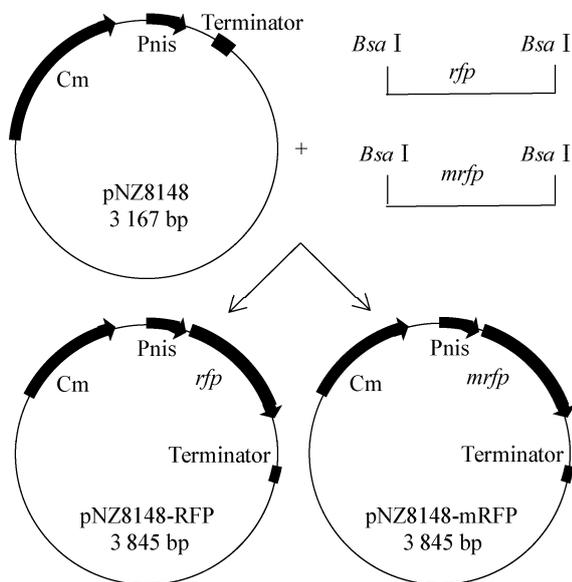


图 3 pNZ8148-RFP 和 pNZ8148-mRFP 载体构建示意图

Figure 3 Schematic diagram of pNZ8148-RFP and pNZ8148-mRFP vectors

1.5 细胞分子传感器的构建

将重组的 pNZ8148-RFP 和 pNZ8148-mRFP 转化 *E. coli* MC1061, 在含有 10 μ g/mL 氯霉素(Cm)的 LB 培养基筛选平板上挑取单克隆, 进行菌落 PCR 验证, 将验证结果正确的菌株进行培养, 得到菌株 *E. coli* MC1061-RFP 和 *E. coli* MC1061-mRFP (表 1)。用质粒小提试剂盒抽提质粒进行酶切并测序验证。

将 pNZ8148-RFP 和 pNZ8148-mRFP 质粒用电转法转化 *L. lactis* NZ9000, 在含有 10 μ g/mL 氯霉素的 GM17 培养基筛选平板上挑取单克隆, 得到菌株 *L. lactis* NZ9000-RFP 和 *L. lactis* NZ9000-mRFP, 见表 1。

为测试鉴定细胞传感器, 将菌株 *L. lactis* NZ9000-RFP 和 *L. lactis* NZ9000-mRFP 于 GM17 培养基中 30 $^{\circ}$ C、200 r/min 培养至 OD_{600} 为 0.4, 加入 5 ng/mL 乳链菌肽, 继续培养 6–8 h, 观察检测培养物荧光。

同上, *L. lactis* NZ9000-RFP 和 *L. lactis* NZ9000-mRFP 培养至 OD_{600} 为 0.4, 用 GM17 培养基将菌液稀释 10 倍, 加入到 96 孔板中, 再加入不同浓度梯度(终浓度 0、0.1、1、2、5、10、20、50、100、200、500 和 1 000 ng/mL)的乳链菌肽, 在 30 $^{\circ}$ C 条件下用酶标仪检测并记录 24 h。激发波长 560 nm 以及发射波长 612 nm 检测荧光及 OD_{600} 值。

1.6 乳链菌肽天然候选菌株的筛选及鉴定

从甜蒜、榨菜、牛奶、酸奶发酵粉 4 种样品出发, 分别进行样品处理, 甜蒜、榨菜提取浸出液, 酸奶发酵粉溶解。进行梯度稀释, 使用涂布法将稀释液培养在含 1% CaCO_3 (质量体积比)的 MRS 培养基中, 挑出有溶钙圈的单菌落保存于甘油管中^[13]。用引物 27F/1492R (表 2)扩增各个菌株的 16S rRNA 基因片段, 测序并提交至 EzBioCloud 数据库进行基因序列比对, 排除相同序列的菌株, 并从中挑选出与乳酸乳球菌序列相似度高, 有可能产生乳链菌肽的菌株。重要的 16S rRNA 基

因序列已经上传到 GenBank, 并获得了登录号。

1.7 琼脂扩散法对天然菌株的鉴定

将吐温-20 与纯水以体积比 1:1 混合, 1×10^5 Pa 灭菌 20 min。用 S1 培养基 30 °C、200 r/min 培养藤黄微球菌 24 h, 按体积比 1:200 比例加入到固体 S1 培养基中, 并加入体积比 1:50 的吐温溶液。倒平板后放入 4 °C 冰箱至少 1 h。将 1.6 中筛选得到的菌株用 GM17 培养基 30 °C、200 r/min 培养 24 h, 12 000 r/min 离心 1 min 取上清液。在混有藤黄微球菌的 GM17 培养基平板上用打孔器打孔, 在孔中分别加入各菌株发酵上清 30 μ L, 待完全吸收后, 放入 30 °C 培养箱培养 24 h, 观察是否有抑菌圈^[14]。

1.8 利用细胞传感器对天然菌株的鉴定

将 1.6 中筛选得到的天然菌株接种到 GM17 培养基, 30 °C、200 r/min 培养 24 h, 12 000 r/min 离心 1 min 取上清液。*L. lactis* NZ9000-RFP 接种到 GM17 培养基中, 30 °C、200 r/min 培养至 OD_{600} 为 0.4。分别取各菌株发酵液上清 500 μ L 加入到 2 mL *L. lactis* NZ9000-RFP 菌液中, 30 °C、200 r/min 培养 6 h, 用酶标仪检测红色荧光。同时用 1 μ L 的 ATCC11454 发酵液上清作为阳性对照。

2 结果与分析

2.1 乳链菌肽响应的细胞分子传感器的构建

为了方便观察, 选用了可以在普通白光下显色的红色荧光蛋白作为报告标记。由于荧光蛋白基因需要在宿主 *L. lactis* 中表达, 为了比较选择适合的报告基因, 试用了(G+C)mol%含量为 50%的 *rfp* 基因和(G+C)mol%含量为 41%的基因 *mrfp* (modified *rfp*)。基因 *rfp* 来源于适合大肠杆菌表达的基因序列, 其 50%的(G+C)mol%含量接近大肠杆菌(*E. coli* K12)基因组 50.8%的含量; 而基因 *mrfp* 由公司序列优化后合成, 其 41%的(G+C)mol%的含量接近乳酸乳球菌(*Lactococcus lactis* CV56)基因组 35.2%的含量^[15]。*rfp* 与 *mrfp* 产物蛋白质序列一致, 但是在 DNA 水平上只有 81%

的一致性(图 4)。

利用 *Bsa* I 酶通过 Golden-Gate 方法将 *rfp* 和 *mrfp* 基因分别连入 pNZ8148 表达质粒中, 成功构建质粒 pNZ8148-*rfp* 和 pNZ8148-*mrfp* (表 1)。其中, 报告基因 *rfp* 和 *mrfp* 在控制响应乳链菌肽的启动子 Pnis 下游。当加入乳链菌肽时, 报告基因将会转录表达, 释放出红色荧光信号。将构建的 pNZ8148-*rfp* 和 pNZ8148-*mrfp* 质粒转入到表达宿主 *L. lactis* NZ9000 中, 产生了细胞分子传感器 *L. lactis* NZ9000-RFP 和 *L. lactis* NZ9000-mRFP。

2.2 乳链菌肽细胞分子传感器的鉴定

为初步鉴定乳链菌肽细胞分子传感器, 将 5 ng/mL 乳链菌肽加入到 *L. lactis* NZ9000-RFP 菌液中, 8 h 后观察。与不加入乳链菌肽的对照比较(显示为白色菌体), 很明显实验组有红色荧光蛋白表达(图 5), 这表明传感器构建是成功的。

为进一步对其鉴定, 分别加入终浓度 0、0.1、1、2、5、10、20、50、100、200、500 和 1 000 ng/mL 的乳链菌肽到传感器细胞中, 检测其 24 h 内荧光信号变化。对于 *L. lactis* NZ9000-RFP 传感器细胞, 其结果如图 6 所示: 在 0–2 ng/mL 浓度的乳链菌肽条件下, 传感器细胞的荧光信号非常弱(<30 荧光值); 而当加入 5 ng/mL 浓度的乳链菌肽时, 可以观察到明显的荧光信号(约 100 荧光值); 随着乳链菌肽浓度的增加, 荧光信号逐步增加。当浓度达到 50–200 ng/mL 时, 荧光信号达到最强(约 800 荧光值); 但是当浓度达到 500 ng/mL 时, 荧光信号没有进一步地上升, 而且观察到传感器细胞的生长受到影响; 当加入 1 000 ng/mL 乳链菌肽时, 传感器细胞生长完全被抑制, 没有荧光信号。

在当前条件下, *L. lactis* NZ9000-RFP 传感器细胞能对 2–200 ng/mL 浓度的乳链菌肽有响应。由此, 提取出荧光稳定的第 10 h 的荧光信号, 在对应的浓度下用 Hill equation 作曲线拟合(图 7)。拟合得到的方程为 $y=735x^{2.16}/(162+x^{2.16})$, 拟合程度很高 ($R^2>0.99$)。这个方程能应用于样品中乳链菌肽的定量测试。

```

rfp      ATGGCGAGTAGCGAAGACGTTATCAAAGAGTTCATGCGTTTCAAAGTTCGTATGGAAGGT
mrfp    ATGGCTTCTTCAGAAGATGTTATTAAGAATTTATGCGTTTTAAAGTTCGTATGGAGGGA
***** * *****

rfp      TCCGTTAACCGTACAGGATTCGAAATCGAAGGTGAAGGTGAAGTTCGTCCGTACGAAGGT
mrfp    TCAGTTAACCGTACAGGATTCGAGATTGAGGGAGAGGGTGAAGGTCGTCTTACGAAGGA
***** * *****

rfp      ACCCAGACCGCTAAACTGAAAGTTACCAAAGGTGGTCCGCTGCCGTTCCGTTGGGACATC
mrfp    ACACAAACTGCTAAATTAAGTTACAAAGGGAGGACCTCTTCCATTGCGATGGGATATF
***** * *****

rfp      CTGTCCCGCAGTTCAGTACGGTTCCAAAGCTTACGTTAAACACCCGGCTGACATCCCG
mrfp    TTATCACCACAATTTCAATATGGATCTAAGGCTTACGTTAAGCACCAGCTGACATTCGA
***** * *****

rfp      GACTACCTGAAACTGTCTTCCCGAAGGTTTCAAATGGGAACGTTTATGAACTTCGAA
mrfp    GATTACCTTAAGCTTTCATTCCAGAGGATTCAAGTGGGACCGTGTAAATGAACTTCGAG
***** * *****

rfp      GACGGTGGTGTGTACCGTTACCCAGGACTCCTCCCTGCAAGACGGTGAGTTCATCTAC
mrfp    GACGGAGGAGTGTGTACTGTACACAAGATTCACTTTACAGATGGTGAATTTAATTTAT
***** * *****

rfp      AAAGTTAAACTGCGTGGTACCAACTTCCCGTCCGACGGTCCGTTATGCAGAAAAAACCC
mrfp    AAAGTTAAATTACGTGGTACTAACTTCCCATCTGACGGTCCAGTTATGCAGAAGAAGACA
***** * *****

rfp      ATGGGTTGGGAAGCTTCCACCGAACGTATGTACCCGGAAGACGGTGCTCTGAAAGGTGAA
mrfp    ATGGGATGGGAGGCTTCTACAGAACGTATGTACCCAGAGGACGGGACACTTAAAGGTGAA
***** * *****

rfp      ATCAAATGCGTCTGAAACTGAAAGACGGTGGTCACTACGACGCTGAAGTTAAAACCACC
mrfp    ATTAATAATGCGTCTTAAGCTTAAGGACGGAGGACACTACGACGCTGAAGTTAAAACAACA
***** * *****

rfp      TACATGGCTAAAAAACCGGTTTCAGCTGCGGGGTGCTTACAAAACCGACATCAAACCTGGAC
mrfp    TATATGGCTAAAAAACCGGTTTCAGCTTCCGGGAGCTTATAAAACAGATATTAACCTTGAT
***** * *****

rfp      ATCACCTCCCAACAAGACTACACCATCGTTGAACAGTACGAACGCTGTAAGGTTCGT
mrfp    ATTACATCTCATAATGAAGATTATACTATTGTAGAGCAGTACGAGCGTGCAGAAGGTTCGT
***** * *****

rfp      CACTCCACCGGTGCTTAA
mrfp    CATTCAACTGGAGCTTAA
***** * *****

```

图 4 基因 *rfp* 和 *mrfp* 的 DNA 比对
 Figure 4 Comparing *rfp* and *mrfp* genes' DNA sequences

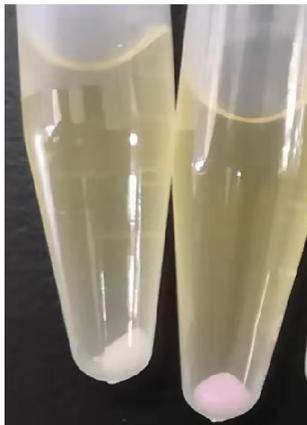


图 5 细胞传感器对 Nisin 的响应以及红色荧光输出
 Figure 5 Cell biosensor responds to nisin and presents red fluorescence

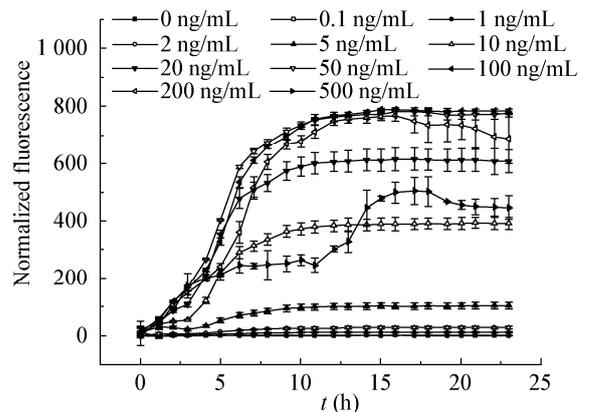


图 6 细胞传感器 *L. lactis* NZ9000-RFP 在 23 h 内对不同浓度乳链菌肽的响应
 Figure 6 Time course of cell biosensor *L. lactis* NZ9000-RFP to various concentrations of nisin within 23 hours

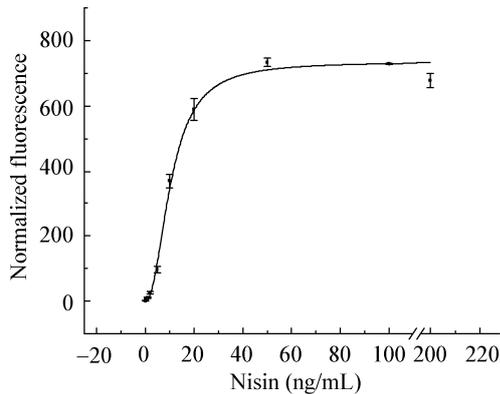


图7 细胞传感器 *L. lactis* NZ9000-RFP 对不同浓度乳链菌肽的响应拟合曲线

Figure 7 Responses of cell biosensor *L. lactis* NZ9000-RFP to various concentrations of nisin

对于 *L. lactis* NZ9000-mRFP 传感器细胞, 同样加入终浓度 0、0.1、1、2、5、10、20、50、100、200、500 和 1 000 ng/mL 的乳链菌肽到传感器细胞中, 检测其 24 h 内荧光信号变化。结果显示(图 8), *L. lactis* NZ9000-mRFP 与 *L. lactis* NZ9000-RFP 有类似的表型, 其传感器细胞的响应范围也是 2–200 ng/mL 的浓度。拟合得到的方程为 $y=97.3x^{1.7}/(438+x^{1.7})$, 拟合程度很高 ($R^2>0.98$) (图 9), 可用于定量测定。另外, 相比于 *L. lactis* NZ9000-RFP, *L. lactis* NZ9000-mRFP 的荧光信号输出弱, 最高的荧光输出也仅有 120 荧光值, 远小

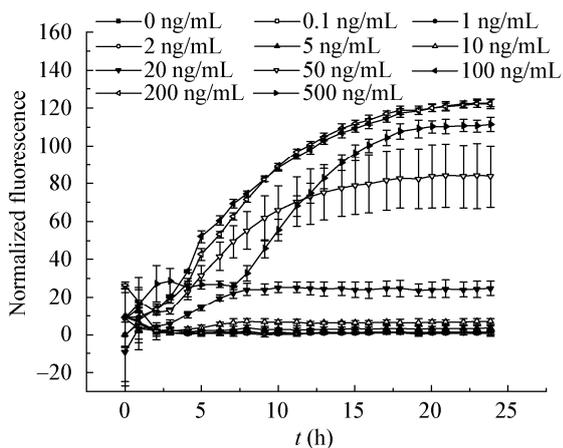


图8 细胞传感器 *L. lactis* NZ9000-mRFP 24 h 内对不同浓度乳链菌肽的响应

Figure 8 Time course of cell biosensor *L. lactis* NZ9000-mRFP to various concentrations of nisin within 24 hours

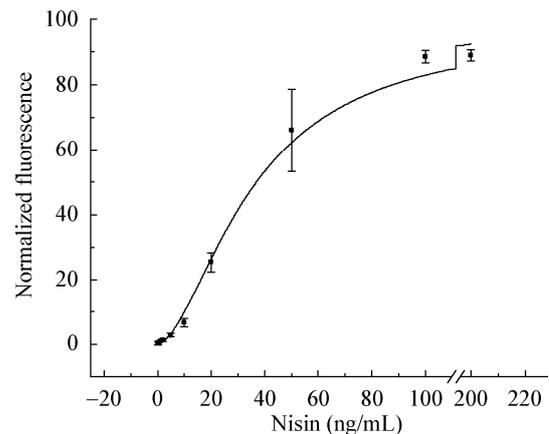


图9 细胞传感器 *L. lactis* NZ9000-mRFP 对不同浓度乳链菌肽的响应拟合曲线

Figure 9 Responses of cell biosensor *L. lactis* NZ9000-mRFP to various concentrations of nisin

于前者的 800 荧光输出。可能是 *mrfp* 基因密码子优化后, 虽然 (G+C)mol% 含量降低, 但是并不利于在 *L. lactis* 中表达。同时, 比较两个细胞传感器(图 7 和图 9), 红色荧光蛋白的表达不同, 也影响了细胞传感器的表型(拟合曲线也不一致)。这可能是蛋白表达对宿主造成的代谢负担不同产生的影响^[16]。另一方面, 不同的表型可以拓展传感器的应用, 表达 RFP 的传感器更灵敏, 可用于较低浓度(2–50 ng/mL), 表达 mRFP 的传感器可用于较高浓度(10–200 ng/mL)乳链菌肽的测试。

2.3 天然抗菌菌株的筛选

为测试构建的细胞分子传感器用于乳链菌肽菌株的筛选, 首先分离了可能的天然乳链菌肽乳酸乳球菌。在含有 1% CaCO_3 的 MRS 固体平板挑取有溶钙圈的单菌落共 71 株。根据初步的菌落形态等特征, 选取 40 株菌进行 16S rRNA 基因测序鉴定, 将菌株的 16S rRNA 基因序列提交至 EzBioCloud 数据库。经序列比对, 去除序列相同菌株, 剩下共 11 株菌, 序列比对结果如表 3 所示。

首先用琼脂扩散法对候选菌株进行检验。在混有藤黄微球菌的平板上打孔, 加入 30 μL 各菌株发酵液上清, 待完全吸收后放入培养箱培养 24 h。观察到 BX-3 菌株、已知的 Nisin 生产菌 *L. lactis* ATCC 11454 和阳性对照 Nisin 有抑菌圈(图 10)。

表 3 筛选分离的乳链菌肽候选菌株

Table 3 The selected nisin-producing candidate strains

No.	Sample	The most similar strain	Name	Accession No.
T9	Sweet garlic	<i>Lactobacillus buchneri</i>	JCM 1115(T)	MT192646
T14	Sweet garlic	<i>Lactobacillus buchneri</i>	JCM 1115(T)	MT197392
T15	Sweet garlic	<i>Lactobacillus buchneri</i>	JCM 1115(T)	MT197395
N1	Fresh milk	<i>Lactobacillus casei</i>	BL23(T)	MT197397
N5	Fresh milk	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	JCM 1136(T)	MT197400
N13	Fresh milk	<i>Lactobacillus pentosus</i>	DSM 20314(T)	MT197401
F4	Yogurt baking powder	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	JCM 5805(T)	MT197405
F5	Yogurt baking powder	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	JCM 5805(T)	MT197492
F1	Yogurt baking powder	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	CIP 76.13(T)	MT197493
F2	Yogurt baking powder	<i>Streptococcus thermophilus</i>	ATCC 19258(T)	MT197482
BX-3	Fresh milk	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	JCM 5805(T)	MT211277

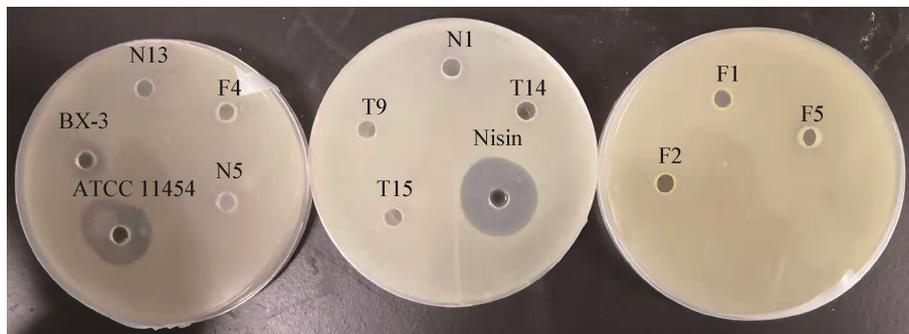


图 10 平板琼脂扩散法测试乳链菌肽产生菌株

Figure 10 Testing nisin-producing candidate strains by agar diffusion method

2.4 细胞传感器对潜在的乳链菌肽菌株的鉴定和筛选

乳链菌肽不易被仪器检测,常用的琼脂扩散法不仅操作繁琐,而且不能区分乳链菌肽与其他抗菌化合物^[10]。因此,本研究尝试使用构建的乳链菌肽细胞传感器对筛选到的潜在的乳链菌肽生产菌株进行鉴定筛选。将菌株 N1、N5、N13、T9、T14、T15、F1、F2、F4、F5 和 BX-3 以及 *L. lactis* ATCC 11454 对照菌的发酵液加入到 *L. lactis* NZ9000-RFP 传感器细胞中,结果显示(表 4)所有筛选得到的菌株都未能产生荧光信号(<5 荧光值),表明这些菌株似乎都不能产生乳链菌肽。但是已知的能产生乳链菌肽的 ATCC 11454 菌株发酵液可以开启荧光信号的输出(>200 荧光值),表明了传感器细胞能很好地鉴定乳链菌肽的生产菌株。鉴于

BX-3 有明显的抑菌圈产生,用细胞传感器精细地测试了不同浓度的 BX-3 发酵液,表 5 结果显示,即使加入高达 45%的发酵液也不能开启细胞传感器(荧光值<5),这个结果表明了 BX-3 产生的抗菌化合物不是乳链菌肽。因此,构建的细胞传感器对乳链菌肽产生菌 ATCC 11454 发酵液有特异性响应,充分表明了构建的传感器在乳链菌肽产生菌鉴定应用方面的适用性和特异性。

3 讨论与结论

本研究利用 NICE 系统和红色荧光蛋白构建了一种新型的细胞分子传感器,可以特异性地识别乳链菌肽,并以红色荧光蛋白为输出信号。与以往报道相比^[11-12],该传感器具有更广泛的响应范围(2–200 ng/mL),而且简单易于观察,红色荧

表 4 加入不同菌株发酵液的传感器响应荧光值

Table 4 The normalized fluorescence of the biosensor to fermentation broth of different strains

Strains	Normalized fluorescence
Control	1.9±1.1
N1	4.0±1.3
N5	3.7±1.2
N13	4.0±2.4
T9	4.8±2.4
T14	4.9±0.4
T15	3.3±1.0
F1	1.6±0.6
F2	1.9±0.8
F4	1.9±0.7
F5	1.9±1.0
BX-3	3.5±0.7
ATCC 11454	232.4±36.0

表 5 加入不同比例 BX-3 发酵液的传感器响应荧光值

Table 5 The normalized fluorescence of the biosensor to BX-3 fermentation broth with different proportions

Proportions (%)	Normalized fluorescence
0	1.0±1.0
5	1.8±0.8
10	2.0±0.7
15	3.8±1.2
20	3.5±0.7
25	4.3±0.1
30	1.0±0.9
35	2.9±1.4
40	2.8±1.0
45	3.7±0.1

光可以直接观察并做定性检测，不需要额外设备。另外，通过本研究中的传感器以及拟合的公式，能够通过简单的红色荧光测量对乳链菌肽样本进行定量分析。这些特性能使乳链菌肽检测流程更加方便、迅速和准确，为样本中乳链菌肽的检测提供了一种简单可靠的方法。同时，我们注意到不同(G+C)mol%含量的红色荧光报告基因序列所产生的最高荧光强度和检测表型也有所不同，mRFP 更适合较高浓度(10–200 ng/mL)乳链菌肽的检测，而 RFP 更适合较低浓度(2–50 ng/mL)下

的检测，这为开发不同灵敏度和检测范围的细胞分子传感器提供了可能。

此外，本研究还探究了该传感器在筛选天然乳链菌肽生产菌株上的可能性。用传感器筛选了从样品中分离出的疑似乳链菌肽生产菌株。值得注意的是，在琼脂扩散法中能产生抑菌圈的菌株 BX-3 并没有诱导细胞产生红色荧光蛋白，而乳链菌肽生产菌株 ATCC 11454 产生抑菌圈并诱导了红色荧光的产生，充分说明该细胞分子传感器具有更高的特异性，具有快速简便筛选乳链菌肽生产菌株的潜力。

随着人们对食品安全的重视程度日益加深，乳链菌肽作为一种对人体和环境安全无害的食品防腐剂，有广阔的应用前景。在今后的研究中，可以将该分子传感器与定向进化等技术结合进一步优化，最终应用于对乳链菌肽生产菌株的高通量筛选中，获得更高产量的菌株。

REFERENCES

- [1] Huan LD, Chen XZ. Genetic control of Nisin biosynthesis[J]. Microbiology China, 1993, 20(5): 301-307 (in Chinese)
还连栋, 陈秀珠. 乳链菌肽(Nisin)生物合成的遗传控制[J]. 微生物学通报, 1993, 20(5): 301-307
- [2] Rogers LA, Whittier EO. Limiting factors in the lactic fermentation[J]. Journal of Bacteriology, 1928, 16(4): 211-229
- [3] Stevens KA, Sheldon BW, Klapes NA, et al. Nisin treatment for inactivation of *Salmonella* species and other gram-negative bacteria[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1991, 57(12): 3613-3615
- [4] Cheigh CI, Pyun YR. Nisin biosynthesis and its properties[J]. Biotechnology Letters, 2005, 27(21): 1641-1648
- [5] Zhou B, Wei CN, Chen XL. Research progress in genetic engineering of nisin[J]. Bulletin of Fermentation Science and Technology, 2014, 43(2): 34-37,46 (in Chinese)
周斌, 魏春埏, 陈小龙. 乳链菌肽的基因工程研究进展[J]. 发酵科技通讯, 2014, 43(2): 34-37,46
- [6] Mulders JWM, Boerrigter IJ, Rollema HS, et al. Identification and characterization of the lantibiotic nisin Z, a natural nisin variant[J]. European Journal of Biochemistry, 1991, 201(3): 581-584
- [7] Buchman GW, Banerjee S, Hansen JN. Structure,

- expression, and evolution of a gene encoding the precursor of nisin, a small protein antibiotic[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 1988, 263(31): 16260-16266
- [8] Kuipers OP, de Ruyter PGGA, Kleerebezem M, et al. Quorum sensing-controlled gene expression in lactic acid bacteria[J]. *Journal of Biotechnology*, 1998, 64(1): 15-21
- [9] Zhang JJ, Li TM, Tan SH. Food-grade nisin controlled gene expression system NICE of lactic acid bacteria[J]. *China Biotechnology*, 2006, 26(3): 68-72 (in Chinese)
张晶晶, 李泰明, 谭树华. 乳酸菌食品级 nisin 控制的基因表达系统 NICE[J]. *中国生物工程杂志*, 2006, 26(3): 68-72
- [10] Chen HW, Chen LH. Research progress on the determination method of nisin titer[J]. *Journal of Anhui Agricultural Science*, 2008, 36(7): 2624-2625,2641 (in Chinese)
陈洪卫, 陈林海. Nisin 效价测定方法研究进展[J]. *安徽农业科学*, 2008, 36(7): 2624-2625,2641
- [11] Hakovirta J, Reunanen J, Saris PEJ. Bioassay for nisin in milk, processed cheese, salad dressings, canned tomatoes, and liquid egg products[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2006, 72(2): 1001-1005
- [12] Reunanen J, Saris PEJ. Microplate bioassay for nisin in foods, based on nisin-induced green fluorescent protein fluorescence[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2003, 69(7): 4214-4218
- [13] Yang YX, Li P, Xu YS, et al. Isolation and identification of antimicrobial peptides-producing lactic acid bacteria and optimization of the culture conditions[J]. *Chinese Journal of Applied and Environmental Biology*, 2014, 20(5): 817-824 (in Chinese)
杨云喜, 李佩, 徐岳松, 等. 产抗菌肽乳酸菌的分离、鉴定及培养条件优化[J]. *应用与环境生物学报*, 2014, 20(5): 817-824
- [14] Tramer J, Fowler GG. Estimation of nisin in foods[J]. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 1964, 15(8): 522-528
- [15] Gao Y, Lu Y, Teng KL, et al. Complete genome sequence of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CV56, a probiotic strain isolated from the vaginas of healthy women[J]. *Journal of Bacteriology*, 2011, 193(11): 2886-2887
- [16] Wu SG, He L, Wang QZ, et al. An ancient Chinese wisdom for metabolic engineering: Yin-Yang[J]. *Microbial Cell Factories*, 2015, 14(1): 39