

限制和修饰酶基因 *LlaB* III 的克隆及分析

孔 健^{1*} Jytte Josephsen² 马桂荣¹

¹(山东大学微生物技术国家重点实验室, 济南 250100)

²(丹麦皇家畜牧农业大学乳制品和食品科学系, 丹麦)

摘 要 pJW566 是从丹麦乳酪生产菌株 *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* W56 中分离到的, 一个 22.4kb、具有限制和修饰作用的质粒。内切酶 *Cla* I 对 pJW566 不完全消化, 所得片段与来自于质粒 pVC5 的氯霉素抗性基因连接得到一个携带有完整限制和修饰酶基因的质粒 pJK1。基因亚克隆分析发现该基因位于约 5kb 的 *Sph* I - *Hind* III DNA 片段上。序列分析表明该片段包含一个 4572bp 的开放阅读框架, 编码一个由 1576/1584 个氨基酸残基组成的蛋白质, 该基因命名为 *LlaB* III。蛋白质同源性查询发现在该蛋白的 N-末端有 7 个保守区域, 与 R/M 系统 I 型和 III 型内切酶有较高同源性, 在蛋白的中间区域有 4 个代表 N⁶-腺苷酰甲基转移酶的特征序列, 而蛋白的 C-末端不同于任何已知蛋白。这种具有限制、修饰和可能的 DNA 识别作用的多功能蛋白, 可能是一新的 R/M 系统。

关键词 乳酸乳球菌, 噬菌体, 限制修饰系统, 多功能蛋白

中图分类号 Q783 **文献标识码** A **文章编号** 1000-3061(2001)06-0663-06

限制和修饰系统(Restriction and Modification system, R/M system)是指由限制酶和甲基转移酶所组成的单亚基或多亚基的复合酶系统, 两种酶通常成对出现, 具有相同的 DNA 识别位点, 其作用相反。限制酶作用于 DNA 专一位点, 造成 DNA 断裂; 而甲基转移酶(又称甲基化酶)通过对 DNA 的甲基化修饰使得内切酶对该位点不再起作用, 从而保护了 DNA。R/M 系统在原核生物中广泛存在, 在保护细胞免遭外源病毒侵害方面起重要作用^[1]。

在乳制品发酵中, 发酵菌子乳酸菌常常受到噬菌体的侵染, 造成菌株产酸力降低或发酵失败。而许多乳酸菌特别是乳酸乳球菌自身具有不同的抗噬菌体机制, 可将其概括为 4 类: 噬菌体吸附障碍、DNA 侵入抑制、限制和修饰系统和流产感染机制。其中 R/M 系统在乳酸乳球菌中普遍存在, 被认为是一种有效的噬菌体防御机制^[2]。现已有 18 种 R/M 系统被鉴定和分析, 它们大部分由质粒编码, 少数位于染色体上^[3]。根据内切酶的结构、DNA 识别位点、DNA 断裂方式及所需复合因子, 传统上将 R/M 系统分为 3 种类型: I 型、II 型和 III 型^[4]。随着对菌

株抗噬菌体机理研究的深入, 一些不符合上述 3 种类型的 R/M 系统被发现^[5,6]。从丹麦乳酪生产菌株 *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* W56 中分离到一个 22.4kb 质粒 pJW566, 携带有编码限制和修饰作用的基因 *LlaB* III^[7]。通过对该基因的克隆及序列分析发现该基因编码的蛋白为一多功能蛋白, 不同于任何已知的 R/M 系统。

1 材料及方法

1.1 菌株和培养基

本文所用菌株、质粒和噬菌体列于表 1。*E. coli* 培养用 LB 培养基, *L. lactis* 用 GM17 培养基。筛选转化子培养基: *E. coli* 用含有 40 μ g \cdot mL⁻¹ IPTG 和 40 μ g \cdot mL⁻¹ X-gal 的 LB 培养基, *L. lactis* 用 SGM17 培养基。抗生素的使用浓度: *L. lactis* 氯霉素为 5 μ g \cdot mL⁻¹, *E. coli* 氯霉素为 25 μ g \cdot mL⁻¹, 氨苄青霉素为 100 μ g \cdot mL⁻¹。

1.2 工具酶

所用限制酶、T4 连接酶、小牛肠碱性磷酸酶及 Mung bean 核酸酶分别购自 Boehringer Mannheim 公

收稿日期: 2001-04-02, 修回日期: 2001-08-16。

基金项目: 本研究得到丹麦科学研究所资助。

* 通讯作者。 Tel: 86-531-8564429; Fax: 86-531-8565234; E-mail: kongjian@sdu.edu.cn

表 1 所用菌株、质粒和噬菌体
Table 1 Strains, plasmids and Bacteriophages

Strains, plasmids and bacteriophages		Relevant characteristics	Reference or sources
Strain			
<i>L. lactis</i>	W56	Industrial strain with multiple plasmids	Obtained from J Josephsen
	MG1614	Plasmid-free, host for phages sk1, jJ50 and c2	[8]
<i>E. coli</i>	XL1-BlueMRF'	Transformation host, Tc'	Stratagene, La Jolla, CA, USA
Plasmid			
	pCI3340	Shuttle vector, Cm ^r , 5.7kb	[9]
	pVC5	Marker plasmid, with Cm ^r gene,	Obtained from J Josephsen
	pBluscriptSK II +	<i>E. coli</i> cloning vector, Amp ^r	Stratagene, La Jolla, CA, USA
	pJW566	Resident plasmid of W56, R ⁺ M ⁺ , 22.4kb	[7]
	pJK1	Derivative of pJW566, Cm ^r , R ⁺ M ⁺ , 15.5kb	This study
	pJK4	405aa deletion from C-terminal of pJK1, R ⁻ M ⁻	This study
	pJK7	<i>Hind</i> III - <i>Hind</i> III fragment deletion from pJK1, R ⁻ M ⁻	This study
	pJK24	Derivative of pJW566, with Cm ^r gene, R ⁻ M ⁻ ,	This study
Phage			
	sk1	Small, isometric-headed 936 species	[10]
	jJ50	Small, isometric-headed 936 species	[7]
	c2	Prolate-headed, c2 species	Obtained from J Josephsen

司和 New England Biolabs, GIBCO BRL 公司; Nested deletion kit 购自 Pharmacia Biotech 公司; Thermo SequenaseTM Fluorescent Labelled Primer Cycle Sequencing Kit 购自 Amersham Pharmacia 公司。

1.3 噬菌体的增殖和分析

噬菌体的增殖按照 Terzaghi and Sandine 的方法^[11]。噬菌体效价 (Efficiency of plating, EOP) 的测定:噬菌体在抗性菌株 (如含有质粒 pJW566 的菌株) 中的噬菌斑数与在敏感菌株 (如 MG1614) 中的噬菌斑数之比。抗噬菌体菌株的筛选:将噬菌体溶液系列稀释,在含有 10mmol/L CaCl₂ 的 GM17 平板上,与筛选菌株交叉划线,不被裂解的菌株为抗噬菌体菌株,反之为噬菌体敏感菌株。体内甲基化酶活性的测定:将噬菌体在含有甲基化酶的寄主细胞中增殖,所释放的噬菌体感染含有限制酶的细胞,测定噬菌体效价。

1.4 质粒 DNA 的提取和转化

E. coli 质粒 DNA 制备,片段回收及转化,参照文献[12]。*L. lactis* 质粒 DNA 的制备:乳酸乳球菌细胞在 10mg·mL⁻¹溶菌酶的 STE 缓冲液 (6.7% Sucrose, 50mmol/L Tris, 1mmol/L EDTA, pH8.0) 中 37℃ 酶解 30min,用 QIAGEN kit (QIAGEN GmbH, Germany) 提取。乳酸菌转化用电穿孔法。电穿孔仪为 BioRad 公司的 Gene Pulser 产品。

1.5 *LlaB* III 基因序列的测定

pJW566 DNA 经 *Cla* I, *EcoR* I 和 *EcoRV* 消化,

所得片段与质粒 pBluscriptSK II + 连接后,转化 *E. coli* XL1-BlueMRF' 敏感细胞,在含有 IPTG 和 X-gal 的 LB 平板上挑取白色菌落。鉴定白色菌落为转化子后,提取质粒 DNA,利用 T3 和 T7 为正向及反向引物,测定 DNA 序列。再以所得序列设计引物,利用 Walking Primer 法完成整个 *LlaB* III 基因双链 DNA 的序列测定。序列测定用 Automated Laser Fluorescent (ALF) expressTM DNA 测序仪完成。

1.6 缺失突变

Sph I 位于 *LlaB* III 基因下游,质粒 pJK1 经该酶消化后,用 Mung Bean 核酸酶在 30℃ 酶解 30min,使之成为平末端,再用 Nested Deletion Kit 处理不同时间,然后自身连接,转化到无质粒且噬菌体敏感的 *L. lactis* MG1614 中,筛选噬菌体敏感突变株。在所得突变株中增殖噬菌体 sk1,以测定突变株的甲基化酶活性。筛选目的突变株,并测定突变点附近的 DNA 序列。

2 结 果

2.1 pJK1 质粒的构建

为克隆限制和修饰酶基因,质粒 pJW566 经 *Cla* I 限制酶消化,所得片段与 *L. lactis*-*E. coli* 穿梭载体 pCI3340 连接,转化到无质粒且噬菌体敏感的 *L. lactis* MG1614。经过反复筛选,没有得到完整的 *LlaB* III 基因,说明该基因不在 *Cla* I 片段上。将质粒 pJW566 经 *Cla* I 不完全消化,所得片段与来自质

粒 pVC5 的氯霉素抗性基因连接后,转化到 *L. lactis* MG1614 中,在 SGM17 平板上挑取氯霉素抗性菌落,共得到 24 个阳性菌落;再在平板上用交叉划线法对这 24 个氯霉素抗性菌落进行噬菌体 sk1 抗性筛选,其中 4 个转化子具有噬菌体抗性,其余 20 个表现为噬菌体敏感型。提取这些转化子的质粒 DNA、酶切、电泳,发现在抗噬菌体转化子中有一个含最小质粒,大小为 15.5kb 被定名为 pJK1 的转化子,具有噬菌体抗性,其限制性酶切图谱如图 1 所示;而含有最小质粒 pJK24 的转化子是噬菌体敏感型。测定含有质粒 pJK1 的转化子 MG1614[pJK1]对噬菌体的限制和修饰作用,结果见表 2。

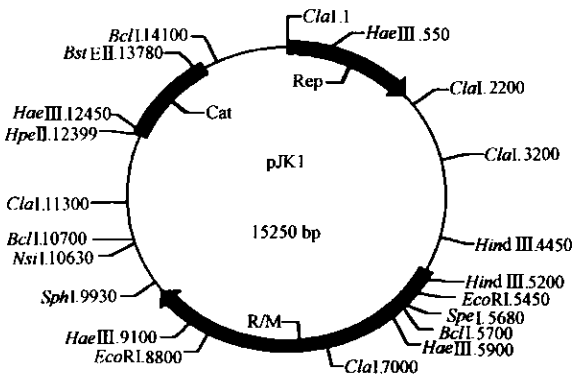


图 1 质粒 pJK1 的物理图谱
Fig.1 The physical map of plasmid pJK1

表 2 *L. lactis* MG1614 及其转化子所增殖噬菌体的效价 (EOP)
Table 2 The EOP of phages propagated on *L. lactis* MG1614 and its transformants

Host strains of phages	Phages propagated on MG1614 and its transformants	EOP ^a of phages propagated on		
		MG1614	MG1614[pJW566]	MG1614[pJK1]
MG1614	sk1	1.0	5.0 × 10 ⁻³	5.0 × 10 ⁻³
	jj50	1.0	2.4 × 10 ⁻³	4.0 × 10 ⁻³
	c2	1.0	5.0 × 10 ⁻³	5.1 × 10 ⁻³
MG1614[pJW566]	sk1	1.0	1.0	1.0
	jj50	1.0	1.0	1.0
	c2	1.0	1.0	1.0
MG1614[pJK1]	sk1	1.0	1.0	1.0
	jj50	1.0	1.0	1.0
	c2	1.0	1.0	1.0

a. Calculated as the ratio of plaques on the resistant host to plaques on the sensitive host. The EOP of phages are 1.0 on the sensitive host. The results are averages of at least three independent determinations.

由表 2 可知,转化子 MG1614[pJK1]对噬菌体 sk1, c2 和 jj50 的效价 (EOP) 与菌株 MG1614 [pJW566] 相同,表明质粒 pJK1 携带了 *LlaB* III 的限制酶基因。噬菌体 sk1, c2 和 jj50 在转化子 MG1614 [pJK1] 中增殖三代后所释放的噬菌体不再为菌株 MG1614[pJW566] 限制, EOP 为 1.0, 说明噬菌体 DNA 的限制性酶切位点被质粒 pJK1 进行了甲基化;反之,经 MG1614[pJW566] 菌株甲基化修饰的噬菌体也不能被 pJK1 所限制, EOP 为 1.0, 由此证明质粒 pJK1 携带了完整的 R/M 基因。

2.2 *LlaB* III 基因的亚克隆及序列分析

将质粒 pJK1 用 *Hind* III 内切酶消化后,再用 T4 连结酶处理,然后转化到 *L. lactis* MG1614 中。所得转化子 MG1614[pJK7]对噬菌体 sk1 的 EOP 为 1,表明菌株丧失了对噬菌体 sk1 的限制作用。提取质粒 pJK7 DNA 电泳检测,发现质粒 pJK7 缺失了 pJK1 上的 *Hind* III - *Hind* III 片段,由此证明了该片段对 *LlaB*

III 基因的表达是必需的。从质粒 pJK1 的 *Sph* I 酶切位点经核酸外切酶 III 处理后,得到缺失突变质粒 pJK4,将 pJK4 导入 *L. lactis* MG1614 中,所得菌株同时失去了对噬菌体 sk1 的限制和修饰作用,表明 *LlaB* III 基因位于 *Hind* III - *Sph* I 的 DNA 片段上。其亚克隆程序见图 2。

利用 T3 和 T7 为正向及反向引物,以及 Walking Primer 法对约 5kb 的 *Hind* III - *Sph* I DNA 片段全序列双链 DNA 测定,序列用 FramePlot 软件进行分析,发现该片段包含一个 4572bp 的开放阅读框架 (Open Reading Frame, ORF, GenBank 注册号为 AF347071),编码一个由 1584/1576 个 (取决于所使用的起始密码子) 氨基酸残基组成的蛋白,预测该蛋白质分子量为 180.6kD, pI 为 5.52。

该 ORF 有两个相同的起始密码子 ATG,相隔 8 个氨基酸,在位于 408bp 处的 ATG 上游 20 个或位于 434bp 处的 ATG 上游 8 个碱基处,有一段保守的与

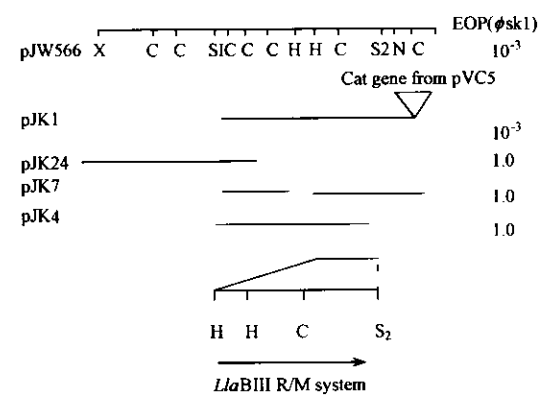


图 2 基因 *LlaBIII* 的亚克隆程序

Fig.2 The schedule of the subcloning of *LlaBIII*

The position of the *LlaBIII* gene and direction of transcription are indicated. Plasmid pJW566 and its derivatives were transferred into *L. lactis* MG1614, transformants were tested for phage resistance against phage sk1. X. *Xho* I; C. *Cla* I; S1. *Sal* I; H. *Hind* III; S2. *Sph* I; N. *Nsi* I

L. lactis 16S-rRNA 相匹配的核糖体结合位点(Ribosome binding site, RBS)AAGAA 或 AAGGA。但没有发现保守的启动子序列。但在 ATG 上游有一段富含嘌呤的重复区域(GATAAATA, TACAAAAA),推断该区域对 *LlaBIII* 翻译和 DNA 复制起调节作用。

在终止密码子 TAA 下游,有一个转录回文信号序列,其自由能 $\Delta G = -41.8 \text{ kcal mol}^{-1}$,后为一段 polyT(TTTTGTTTT)尾巴,表明该结构是一个不依赖于 ρ 因子的终止子。

2.3 推断 *LlaBIII* 氨基酸序列的同源性分析

根据 *LlaBIII* ORF 核苷酸序列推断得到该蛋白的一级结构,用 BLAST 软件在蛋白质序列数据库中

进行同源性查询。结果表明,该蛋白与其它已知蛋白质序列同源性较低。但在该蛋白的 N-末端的 650 个氨基酸残基长,发现与菌株 *Helicobacter pylori* 26695 和 *Chlamydia trachomatis* MoPn 的解旋酶(Helicase, Accession No. 为 AE000580 和 AE002329)同源性分别为 33% 和 28%,与 *Escherichia coli* 15T 编码的 R/M I 型的限制酶亚单位 *EcoA* (Accession No. I41291)同源性为 22%。并且发现该片段有 7 个保守功能区域,与 R/M 系统 I 型和 III 型的限制酶或称作解旋酶的特征序列同源性较高,分别记作 I, IA, II, III, IV, V, VI。在这 7 个保守区域之前,还有一个由 20 个氨基酸残基组成的特征序列,该序列常存在于 R/M 系统的 I 型的限制酶亚单位中,具有催化 DNA 断裂的功能^[13]。以上查询表明,该蛋白的 N-末端可能为 *LlaBIII* R/M 系统的限制性内切酶的功能区域。

在推测蛋白的第 720 到第 1200 个氨基酸残基的中间区域,发现 4 个 N⁶-腺苷酰甲基转移酶(N⁶-Adenine methyltransferase)的保守区域,其顺序为 CMIs, CM I, CM II 和 CM III, CM II 的氨基酸组成为 -GN-PPY-。根据保守区域的顺序和 CM II 的氨基酸残基组成, *LlaBIII* 编码的甲基化酶属于 N⁶-腺嘌呤甲基转移酶的 N₁₂类, γ 组^[14]。在这蛋白的中间区域,尤其是 4 个保守序列,显示出与 *Helicobacter pylori* 26695, *Borrelia burgdorferi* 和 *Bacillus stearothermophilus* (Accession No. 分别为 AE000636, AE001584 和 AF098974)的 DNA N⁶-腺苷酰甲基转移酶较高的同源性,表 3 所示。

表 3 几种菌的 N⁶-腺苷酰甲基转移酶的保守序列的同源性比较

Table 3 Alignment of the conserved motifs in *LlaBIII* with N⁶-Adenine methylase motifs from the N₁₂ group

Methyltransferase	Four conserved motifs			
	CMIs	CM I	CM II	CM III
M. <i>HypA</i>	GIVYTPIEVVDIFILRAT	IFDPFTGTGTSFIARLL	IRVIIGNPPYSA	VKDRGVIGFVVN
<i>LlaBIII</i>	GIVFTPIEVVDIFIVHSV	ILDPTGTGTFTIVRTL	ITVIMGNPPYSA	ISDNGVIGFITN
M. <i>Blu</i>	GVYYTSPISVFIVSSL	VLDFATGTGTFTLEVI	ILVILGNPPYSA	IKCSEEGLLGIITN
M. <i>Bst</i> LVI	GAHFTPKDLAEVIAKR	VLDPACGDGELLAIN	VDIIIANPPYVR	QLKSNHGIVITS

* The bold were indicated the conserved motifs of N⁶-Adenine methylase

多肽 *LlaBIII* 的 C-末端没有发现与任何 R/M 系统 I 型的识别亚基(HsdS)有同源性,推测该区域具有 DNA 识别功能。

3 讨 论

质粒 pJW566 和 pJK1 导入无质粒且噬菌体敏感

的 *L. lactis* MG1614 中,所得转化子表现较强的噬菌体抗性(EOP 为 10^{-3}),而对自身繁育的噬菌体没有限制作用(EOP = 1),说明了质粒 pJW566 携带有限制酶和甲基化酶的基因,这种作用机理为典型的限制和修饰(Restriction and modification)类型。通过基因克隆和亚克隆将该基因定位于约 5kb *Hind* III-

Sph I 片段上。DNA 序列分析和同源性查询发现, *Hind* III-*Sph* I 片段编码一个 4572bp 的 ORF, 推测蛋白的 N-末端为内切酶功能区域, 中间为甲基化酶的功能区域, 而蛋白的 C-末端与已知蛋白无任何同源性, 可能具有 DNA 识别功能, 这种具有限制、修饰和可能的 DNA 识别功能的多功能蛋白不同于任何已知的 R/M 系统, 可能为一新的 R/M 类型。

在 *Sph* I-*Hind* III 片段上, 有一个大的 ORF, 含有 2 个起始密码子, *LlaB* III 的翻译利用哪一个, 或者两者都利用, 还有待进一步证实。在 2 个起始密码子的上游存在各自的核糖体结合位点 (RBS), 但未发现保守的启动子序列, 说明 *LlaB* III 的翻译可能包含在一个多顺反子结构的操纵子内。在该蛋白的 N-末端发现 R/M I 型和 III 型内切酶特有的 7 个保守序列和催化 DNA 断裂的特征区域, 其中 I 序列为 ATP 的结合位点, II 序列具有催化 ATP 的水解作用^[15], 表明 *LlaB* III 系统内切酶断裂 DNA 方式类似于解旋酶 (Helicase) 作用, 需要 ATP 水解提供能量, 这点在体外测定内切酶活性时已得到证实 (实验数据待发表)。

LlaB III 推测蛋白中间区域存在的 4 个保守序列, 并且于 N⁶-腺苷酰甲基转移酶特征序列有较高的同源性, 表明该区域为甲基化酶功能区域, 保守序列 CM I 和 CM II 分别为 S-Adenosyl-L-Methionine (甲基供体) 和甲基转移酶的结合位点, 根据 Timinskas 等人制定的甲基酶分类标准, *LlaB* III 的甲基化酶属于 N⁶-腺苷酰甲基转移酶 N₁₂ 类。

Sph I 位于 *LlaB* III 基因终止子下游, 在亚克隆分析时, *Sph* I 位点片段的缺失, 得到 MG1614 [pJK4], 表现 R⁻M⁻ 表型, 经序列测定发现该位点缺失了 405 个氨基酸残基 (D¹¹⁷⁹⁻¹⁵⁸⁴), 说明 *LlaB* III 的限制和修饰作用需要这个片段参与, 由此推测该区域类似于 R/M I 型 HsdS 亚单位, 具有 DNA 识别的功能。根据以上结论 *LlaB* III 蛋白可分为 3 个不同的功能区域, 分别对应于 R/M I 型的 HsdR、HsdM 和 HsdS, 所不同的是 R/M I 型中 3 个基因独立存在, 组成一个多亚基复合体 (R₂M₂S₁), 而在 *LlaB* III 系统中 3 个基因融合在一起翻译成多功能蛋白, 这种基因融合现象在 *Heamophilus aegyptius* 具有的 R/M 系统中曾有报道^[8], 但在乳酸菌的 R/M 系统中尚属首次, 所以 *LlaB* III 可能是一个新的 R/M 系统。

致谢 本文部分工作是在丹麦皇家畜牧农业大学食品和乳制品系完成, 并得到 Jytte Josephsen 教授的悉心指教, 在此特表示感谢。

REFERENCES (参考文献)

- [1] Roberts R J. Restriction and modification enzymes and their recognition sequences. *Gene*, 1978, 4: 183 ~ 193
- [2] Moineau S, Pandian S, Klaenhammer T R. Restriction/modification systems and restriction endonucleases are more effective on lactococcal bacteriophages that have emerged recently in the dairy industry. *Appl Environ Microbiol*, 1993, 59: 197 ~ 202
- [3] Forde A, Fitzgerald G F. Bacteriophage defense systems in lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 1999, 76: 89 ~ 113
- [4] Yuan R. Structure and mechanism of multifunctional restriction endonucleases. *Annu Res Biochem*, 1981, 50: 285 ~ 319
- [5] Piekarowicz A, Golaszewska M, Sunday A O *et al*. The *Hae* IV restriction modification system of *Heamophilus aegyptius* is encoded by a single polypeptide. *J Mol Biol*, 1999, 293: 1055 ~ 1065
- [6] Kong H, Roemer S E, Waite-Reese P A *et al*. Characterization of *Bcg* I, a new kind of restriction-modification system. *J Biol Chem*, 1994, 269: 683 ~ 690
- [7] Josephsen J, Vogensen F V. Identification of three different plasmids-encoded restriction-modification system in *Streptococcus lactis* subsp. *cremoris* W56. *FEMS Microbiol Lett*, 1989, 59: 161 ~ 166
- [8] Gasson, M F. Plasmid complements of *Streptococcus lactis* NCD0712 and other lactic streptococci after protoplast-induced curing. *J Bacteriol*, 1983, 154: 1 ~ 9
- [9] Hayes F, Daly C, Fitzgerald G F. Identification of the minimal replication of *L. lactis* subsp. *lactis* plasmid pCI305. *Appl Environ Microbiol*, 1990, 56: 202 ~ 209
- [10] Chandry P S, Davidson B E, Hillier A J. Temporal transcription map of the lactococcus lactis bacteriophage sk1. *Microbiology*, 1994, 140: 2251 ~ 2261
- [11] Terzaghi B E, Sandine W E. Improved medium for lactic streptococci and their bacteriophages. *Appl Environ Microbiol*, 1975, 29: 807 ~ 813
- [12] Sambrook J, Fritsch F E, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Second edition, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989
- [13] Titheradge A J B, Terment D, Murray N E. A third family of allelic *hsd* genes in *salmonella enterica*-sequence comparisons with related proteins identify conserved region implicated in restriction DNA. *Mol Microbiol*, 1996, 22: 437 ~ 447
- [14] Timinskas A, Butkus V, Janulaitis A. Sequence motifs characteristic for DNA [cytosine-N4] and DNA [adenine-N6] methyltransferases. Classification of all DNA methyltransferases. *Gene*, 1995, 157: 3 ~ 11
- [15] Gorbalenya A E, Koonin E V. Endonuclease (R) subunits of type- I and typ-III restriction-modification enzymes contain a helicase-like domain. *FEBS Lett*, 1991, 291: 277 ~ 281

Cloning and Structure Analysis of A Restriction and Modification System, *LlaB* III from *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* W56

KONG Jian*¹ JYTTE Josephsen² MA Gui-Rong¹

¹ (State Key Laboratory of Microbial Technology, Shandong University, Jinan 250100, China)

² (Department of Dairy and Food Science, The Royal Veterinary and Agricultural University, Denmark)

Abstract A 22.4kb naturally occurring plasmid pJW566, isolated from *L. lactis* W56, was found to encode an R/M system named *LlaB* III^[1]. The *LlaB* III R/M system was isolated on a chloramphenicol resistant derivative of plasmid pJW566, resulting in a plasmid pJK1. Subcloning analysis showed that the *LlaB* III determinant was located on a 5 kb *Hind* III - *Sph* I fragment. The fragment was sequenced. It contained a single open reading frame (ORF), corresponding to a protein of 1584 or 1576 aa. In the deduced amino acid sequence seven helicase motifs characteristic of endonuclease type I and type III and a conserved catalysis motif X in the R subunits of type I R/M systems were located in the N-terminus, followed by four conserved motifs found in DNA N⁶-adenine methyltransferases. The C-terminus of the deduced amino acid sequence showed no homology to known R/M systems. Therefore, this polypeptide encoded by *LlaB* III is a multifunctional protein possessing putative DNA recognition, methylation and restriction activities.

Key words *Lactococcus lactis*, bacteriophage, restriction and modification system, multifunctional protein

Received: April 2, 2001

This work was supported by Grant from the Danish Research Academy.

* Corresponding author. Tel: 86-531-8564429; Fax: 86-531-8565234; Email: kongjian@sdu.edu.cn

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>