

利用 PCR 技术克隆乳链菌肽前体基因

还连栋 陶 勇 田宇清 何 松 薛禹谷

(中国科学院微生物研究所 北京 100080)

乳链菌肽 (Nisin) 是由核糖体合成, 经翻译后修饰、加工而含有稀有氨基酸的一种小肽分子。它对许多革兰氏阳性菌, 包括利斯特氏菌属、梭菌属和芽孢杆菌属这些腐败菌和病原菌有强烈抑制作用。已被 50 多个国家和地区广泛应用于乳制品、罐头食品、高蛋白食品及乙醇饮料的防腐保鲜, 是越来越受到人们重视的一种无毒的天然食品防腐剂^[1]。对乳链菌肽分子结构与功能及生物合成遗传控制的研究不仅有应用价值, 而且有其理论意义。本实验室以产乳链菌肽的乳酸乳酸球菌 ATCC 11454 总 DNA 为模板, 利用 PCR 技术成功地扩增了乳链菌肽前体基因, 并对其核苷酸序列进行了测定。

1 材料和方法

1.1 菌株和质粒

乳酸乳酸球菌 (*Lactococcus lactis*) ATCC 11454 由本实验室保藏。大肠杆菌 (*E. coli*) JM109 由本室沈天翔同志赠送。pUC18、M13mp18/19 DNA 均购自华美生物工程公司。

1.2 DNA 的提取

pUC18、M13mp18/19 DNA 的提取, 纯化按文献 [2] 方法。乳酸乳酸球菌 ATCC 11454 总 DNA 的提取按文献 [3] 方法。

1.3 乳链菌肽前体基因的 PCR 扩增

利用乳酸乳酸球菌 ATCC11454 总 DNA 为模板, 依据 Buchman 等^[4]发表的序列, 设计了两个 PCR 引物。5'端引物 (P1) 为 5'-AATGAATTCTAAGGAGGCAC, 并引进了 EcoR I 切点。3'端引物 (P2) 为 5'-GGTGAAGCTTTAAATGAACT, 并引入 Hind III 切点。用 Cetus 公司生产的 PCR 试剂盒扩增乳链菌肽前体基因。扩增条件为: 变性、退火及延伸温度和时间分别为 93℃、1min; 55℃、1min; 70℃, 1.5min, 反应进行 30 个循环。

1.4 乳链菌肽前体基因的 DNA 序列测定

利用扩增片段中的 EcoR I 和 Hind III 切点, 把 PCR 产物分别亚克隆到 M13mp18/19 上。依据 Sanger 双脱氧终止法测定 DNA 序列^[5]。使用美国 ABI 公司 373A 自动序列分析仪。测序反应试剂盒购自 ABI 公司。测序全过程按 ABI 公司操作说明书进行。

2 结果与讨论

2.1 乳链菌肽前体基因的克隆

以乳链菌肽产生菌乳酸乳酸球菌 ATCC 11454 总 DNA 为模板, 按材料和方法所述条件进行 PCR 扩增。电泳检查扩增产物, 有一约 330bp 的单一区带, 符合设计要求。用 EcoR I 和 Hind III 双酶切扩增片段与 pUC18 载体, 连接后转化大肠杆菌 JM109, 得到含有外源片段的白色菌落。经酶切证实, 重组质粒 pMG503 上含有的外源片段大小与扩增产物相当。结果见图 1。

2.2 乳链菌肽前体基因的亚克隆及 DNA 序列测定

用 EcoR I 和 Hind III 双酶切重组质粒 pMG503, 将扩增片段分别亚克隆到 M13mp18 和 M13mp19,

转染大肠杆菌 JM109, 获得 5'→3' 为 EcoR I → Hind III 及 5'→3' 为 Hind III → EcoR I 的 2 种亚克隆。提取它们的单链 DNA 作为模板, 采用 Sanger 的双脱氧终止法进行 DNA 序列测定。两种亚克隆序列结果互为互补。现将 M13mp18 亚克隆序列测定结果列于图 2。该序列不仅含有编码 57 个氨基酸的乳链菌肽前体基因, 还包括核糖体结合位点和起转录终止作用的反向重复序列。此序列与已发表的乳链菌肽前体基因 DNA 序列完全一致^(4,6,7)。说明我们利用 PCR 方法已成功地扩增了乳链菌肽前体基因, 为研究乳链菌肽前体基因在乳酸乳球菌系统中的高表达及乳链菌肽前体基因结构与功能的关系奠定了基础。

致谢: 董可宁、庄增辉同志也参加了本文的工作, 特致谢意。

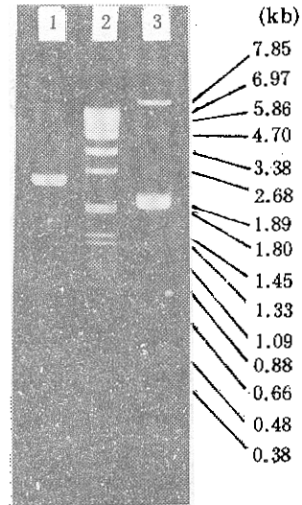


图 1 重组质粒 pMG503DNA 双酶切电泳图

1. pMG503 DNA/EcoR I-Hind III
2. SPPI DNA/EcoR I 3. pMG503 DNA

EcoRI
 ACCATGATTACGAATTCTAAGGAGGCACTCAAAATGAGTACAAAAGATTTTAACTTGGAT
 TGGTACTAATGCTTAAGATTCTCCGTGAGTTTACTCATGTTTTCTAAAATTGAACCTA
 P1: AATGaATTcTAAGGAGGCAC--> METSerThrLysAspPheAsnLeuAsp
 ----- -23-22-21-20-19-18-17-16-15
 r.b.s.

TTGGTATCTGTTTCGAAGAAAGATTTCAGGTGCATCACCACGCATTACAAGTATTTTCGCTA
 AACCATAGACAAAGCTTCTTTCTAAGTCCACGTAGTGGTGCGTAATGTTCATAAAGCGAT
 LeuValSerValSerLysLysAspSerGlyAlaSerProArgIleThrSerIleSerLeu
 -14-13-12-11-10 -9 -8 -7 -6 -5 -4 -3 -2 -1 1 2 3 4 5 6

TGTACACCCGGTTGTAAAACAGGAGCTCTGATGGGTTGTAACATGAAAAACAGCAACTTGT
 ACATGTGGGCCAACATTTTGTCTCGAGACTACCCAACATTGTACTTTTGTCTGTTGAACA
 CysThrProGlyCysLysThrGlyAlaLeuMETGlyCysAsnMETLysThrAlaThrCys
 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26

CATTGTAGTATTCACGTAAGCAAATAACCAAATCAAAGGATAGTATTTTGTAGTTTCAGA
 GTAACATCATAAAGTGCATTCGTTTATTGGTTTAGTTTTCCTATCATAAAAAATCAAGTCT
 HisCysSerIleHisValSerLysTER
 27 28 29 30 31 32 33 34

[<----- 反向重复序列 ----->]
 CATGGATACTATCTATTTTTTATAAGTTATTTAGGGTTGCTAAATAGCTTATAAAAAATAA
 GTACCTATGATAGGATAAAAAATATTCAATAAATCCCAACGATTTATCGAATATTTTTTATT

HindIII
 <--TGAAGTAAATTTTCAAGTGG : P2
 AGAGAGGAAAAACATGATAAAAAGTTTCATTTAAAGCTTGGCACTGGCC
 TCTCTCCTTTTTTGTACTATTTTCAAGTAAATTTTCGAACCGTGACCGG
 ----- METileLysSerSerPheLysAla
 r.b.s. [----- 下游 ORF -----]

图 2 乳链菌肽前体基因的 DNA 序列及其 PCR 扩增的寡核苷酸引物

依据 DNA 序列推出的前乳链菌肽 (prenisin) 序列含有 57 个氨基酸残基。N-端的 23 个氨基酸 (→23~-1) 是前导序列、C-端的 34 个氨基酸 (1~34) 是原乳链菌肽 (pronisin) 序列。左、右两端方框中的序列是 M13mp18DNA 序列。P1 和 P2 是 PCR 扩增的寡核苷酸引物。

参 考 文 献

- [1] Broughton J D. Food Technology, 1990, 44: 100.
- [2] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Second Edition. Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1989.
- [3] Lewington J, Greenaway S D, Spillane B J. Lett Appl Microbiol, 1987, 5: 51.
- [4] Buchman G W, Banerjee S, Hansen J N. J Biol Chem, 1988, 263: 16260.
- [5] Sanger F, Nicklen S, Coulson A R. Proc Natl Acad Sci USA, 1977, 74: 5463.
- [6] Kaletta C, Entian K D. J Bacteriol. 1989, 171: 1597.
- [7] Dodd H M, Horn N, Gasson M J. J Gen Microbiol, 1990, 136: 555.

Cloning of a Gene Encoding the Precursor of Nisin by PCR

Huan Liandong Tao Yong Tian Yuqing He Song Xue Yugu

(Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing 100080)

Abstract The structural gene for the precursor of nisin was synthesized by polymerase chain reaction and then cloned in pUC18. The nucleotide sequence of the cloned precursor nisin gene was determined by dideoxy termination method. The sequence data obtained agreed with those of precursor nisin genes isolated by other workers from different *Lactococcus lactis* strains.

Key words *Lactococcus lactis*, nisin precursor gene, PCR