

乳酸菌受体菌株的筛选、鉴定及特性研究

王荫榆^{1,2} 陈丽珊² 贾士芳³ 任大明² 郭本恒^{1*}

(光明乳业股份有限公司技术中心 上海 200072)¹ (复旦大学遗传所国家重点实验室 上海 200433)²
(中国科学院微生物研究所 北京 100080)³

摘要: 从乳酸菌保健品中分离筛选到一株能作为受体菌的乳酸菌菌株 COCC101, 经鉴定为粪肠球菌 (*Enterococcus faecali*)。抗药性实验显示这株粪肠球菌对多数药物敏感或中度敏感; 粪肠球菌中没有质粒存在, 转化效率和电场强度有对应的正相关, 最高达到 2×10^4 转化子/ μg DNA, 并且能广泛接受不同来源的质粒; 在 Nisin 诱导下可表达外源的绿色荧光蛋白 (GFP)。这些结果显示 COCC101 菌株在乳酸菌基因工程研究中有望成为受体菌。

关键词: 受体菌, 鉴定, 粪肠球菌, 抗药性, 转化效率

中图分类号: Q93 文献标识码: A 文章编号: 0253-2654 (2005) 02-0060-05

The Selection, Identification and Characteristic Study on a Host Strain of Lactic Acid Bacteria

WANG Yin-Yu^{1,2} CHEN Li-Shan² JIA Shi-Fang³ REN Da-Ming² GUO Ben-Heng^{1*}

(Technical Center, Bright Dairy & Food Co, Ltd, Shanghai 200072)¹

(State Key Laboratory of Genetic Engineering, Institute of Genetics, Fudan University, Shanghai 200433)²

(Institute of Microbiology, The Chinese Academy Of Sciences, Beijing 100080)³

Abstract: As a host strain, Lactic acid bacteria COCC101 strain, isolated from a capsule, was identified as *Enterococcus faecali*. The drug-resistance experiment indicated that it is sensitive or in medium sensitive to most of drugs. There is no plasmid in this strain. The transformation efficiency is in direct proportion to the voltage. The highest efficiency is 2×10^4 transposons/ μg DNA. The strain can accept plasmids derived from different origin, and it expressed heterogeneous Green Fluorescent Protein (GFP) under the Nisin induction. All of these results indicated that the COCC101 strain is hopeful to be a host strain.

Key words: Host strain, Identification, *Enterococcus faecali*, Drug-resistance, Transformation efficiency

乳酸菌作为口服疫苗载体的研究方兴未艾, 而常用来作为乳酸菌基因工程受体菌的标准菌株多为乳酸乳球菌, 但乳酸乳球菌转化效率低、不能持久地在人的肠道中存活^[1], 因此需要发展能够在肠道中定植且转化效率高的乳酸菌作为受体菌株, 以便于基因操作和开发乳酸菌活菌疫苗载体。分离自人类肠道的植物乳杆菌 NCIMB8826 已经成为研究口服疫苗载体的模式菌株^[2], 而粪肠球菌是栖居于人和动物胃肠道的一种乳酸菌, 常作为益生菌用来治疗腹泻等肠道疾病^[3], 有望成为口服疫苗载体的候选者。我们的工作筛选到一株具有高转化效率的粪肠球菌, 并进行了一些初步的研究, 为它的进一步应用奠定基础。

* 通讯作者 Tel: 021-56036625, E-mail: guobenheng@brightdairy.com

收稿日期: 2004-07-05, 修回日期: 2004-08-05

1 材料

1.1 菌株和质粒

本实验用菌株和质粒见表 1。

表 1 菌株和质粒

菌株或质粒	特性	来源
菌株		
<i>E. coli</i> DH5 α	supE44 Δ lacU (Ψ 80 lacZ Δ M15)	本室保存
COCC101	分离自保健品 不含有质粒	研究工作
质粒		
pNZ8037	Cmr, 复制片段来自 pWVO1 nisA 启动子	4
pMSP3535	Eryr, 复制片段来自 pAM β 1 nisR、nisK nisA 启动子	5
pMC36C	Cmr, 复制片段来自 pWVO1 P32 启动子	贾士芳研究员惠赠
pMSP3535-gfp	pMSP3535 克隆了 <i>gfp</i> 基因	研究工作

1.2 试剂和溶液

1.2.1 试剂：葡萄糖、葡萄糖酸钙、蜜二糖、棉子糖购自中国医药（基团）上海化学试剂公司。鉴定用其它试剂由中国科学院微生物研究所菌株保藏中心提供。

1.2.2 转化用缓冲液 PEB2（改良的 PEB）：0.5 mol/L 蔗糖、0.5 mmol/L 氯化镁、1 mmol/L 磷酸钠缓冲液，pH 值为 7.4。

1.3 培养基

乳酸菌生长用培养基 MRS、鉴定用培养基 PY 的成分和配制参见文献 [6]。

2 方法

2.1 乳酸菌的分离、纯化

含有乳酸菌的样品用无菌的生理盐水采用 10 倍稀释法进行稀释后，取 10⁻⁴、10⁻⁵、10⁻⁶ 稀释度的菌液各 100 μ L 涂布在 MRS 固体培养基平板上。37℃ 温箱培养 36 ~ 48 h，待长出单菌落后，挑取单菌落保存及进行实验研究。

2.2 乳酸菌受体菌株的筛选

2.2.1 对从不同样品中分离到的乳酸菌进行电转化：电转化方法参照文献 [7]。条件为：场强为 9.25 kV/cm；电容为 25 μ F；电阻为 200 Ω 。

2.2.2 电转化后转化子的筛选：电脉冲转化后，在电极杯中加入 400 μ LMRS 高渗培养基混合后并全部移入微量离心管中，于 37℃ 静止培养 2 h，取 100 μ L 转化的菌液涂布在含 7.5 μ g/mL 的氯霉素抗性 MRS 平板上；同时设置空白对照。培养 36 h，选择抗性菌落并提取质粒鉴定。

能够筛选到转化子的原菌株即可作为乳酸菌受体菌，继续进行实验以确定受体菌株的一些特性。

2.3 对筛选到的受体菌 COCC101 菌株分类鉴定

COCC101 菌株的分类鉴定由中国科学院微生物研究所菌种保藏中心完成。

2.4 COCC101 菌株自身的质粒检测

质粒的检测采用提取质粒、电泳的方法检查。乳酸菌质粒的提取方法按 O'Sullivan

等^[8]提供的方法进行。

2.5 COCC101 菌株的药物抗药性

采用药物纸片琼脂扩散法。所选的药物纸片有苯唑青霉素、氧哌嗪青霉素、优立新、头孢噻、头孢三嗪、红霉素、环丙沙星、左氧沙星、阿米卡星、复方新诺明、万古霉素。

2.6 COCC101 菌株的转化效率及不同的载体转化效率的比较

利用 0.2 cm 的转化杯，在保证电容为 25 μ F，电阻为 200 Ω 不变的条件下，研究 COCC101 菌株的转化效率和电压的关系。电压分别为：1.00 kV、1.25 kV、1.50 kV、1.75 kV、2.00kV。并比较 pMG36C、pNZ8037、pMSP3535 不同质粒载体的转化效率。

2.7 COCC101 菌株在 Nisin 诱导下表达绿色荧光蛋白 (GFP) 及观察

2.7.1 Nisin 的配制：称取 10 mg Nisin 粉末溶解在 1 mL 含 0.05% 的醋酸溶液中；再利用二甲基亚砷稀释 10 倍分装小管中-20℃保存待用。

2.7.2 Nisin 的诱导：转化子抗性培养生长到对数期之前按 10% 的接种量再转接到新鲜的抗性 MRS 液体培养基中，静止培养 1~2 h，加 Nisin 诱导。Nisin 的浓度分别为 5 ng/mL、25 ng/mL、50 ng/mL、100 ng/mL、200 ng/mL、400 ng/mL、800 ng/mL，诱导时间为 5 h。

2.7.3 绿色荧光的观察：离心收集诱导过的菌体，无菌水清洗一次，然后取一滴滴在洁净的载玻片上，盖上盖玻片，在共聚焦显微镜下观察菌体颜色。

3 结果与讨论

3.1 筛选到的受体菌形态观察

对分离到的乳酸菌通过电转化法和抗性条件筛选转化子。筛选到一株可作为受体菌的乳酸菌菌株 COCC101。显微镜下显示 COCC101 菌株乳酸细菌为椭球型，中间粗两端稍细，能够形成短链或长链状。

3.2 COCC101 菌株的分类鉴定

对 COCC101 菌株鉴定采用表 2 的实验项目，包括生理生化和碳水化合物指标。根据实验结果和伯杰细菌分类鉴定手册进行对比。结果显示 COCC101 菌株为粪肠球菌 (*Enterococcus faecalis*)。

表 2 COCC101 菌株实验项目和结果

实验项目	结果	实验项目	结果
革兰氏染色	阳性	葡萄糖	+
细胞形状	球形椭圆	阿东醇	-
黄色素	-	甘油	+
接触酶	-	蔗糖	+
氧化酶	-	木糖	-
空气中生长	+	棉子糖	-
兼性厌养生长	+	乳糖	+
O/F 试验	发酵	松三糖	+
产生乳酸	+	鼠李糖	-
45℃ 生长	+	甘露醇	+
pH9.6 生长	+	山梨醇	+

续表 2

6.5% NaCl 生长	+	蜜二糖	-
V-P 试验	-	葡萄糖产气	-
MR 试验	+		
鉴定结果	<i>Enterococcus faecalis</i>		

3.3 抗药性试验结果

采用药物纸片琼脂扩散法对 COCC101 菌株进行抗药性实验测试结果如表 3 所示：COCC101 菌株对复方新诺明表现出很强的抗性，对其它大部分的药物的抗性表现为敏感或中度敏感，包括对万古霉素的中度敏感性，这和大多数的粪肠球菌抗万古霉素有明显的差别。一般认为肠球菌对万古霉素的抗性是染色体 DNA 编码的，最近 Paulsen 等^[9]对粪肠球菌 V583 基因组测序结果也证明了这一点。因此，COCC101 菌株对万古霉素的只表现为中度敏感的机制有待探讨。

表 3 COCC101 菌株的抗药性

药物名称	抑菌直径/mm	敏感度*	药物名称	抑菌直径/mm	敏感度
氧哌嗪青霉素	18 ~ 20	S	环丙沙星	16 ~ 20	M
优立新	14 ~ 17	S	万古霉素	15 ~ 16	M
头孢噻	15 ~ 22	S	氯霉素	16 ~ 18	M
左氧沙星	14 ~ 16	S	阿米卡星	15 ~ 16	R
头孢三嗪	14 ~ 20	M	复方新诺明	0	R
红霉素	14 ~ 22	M	苯唑青霉素	11 ~ 12	R

*：S 敏感，M 中度敏感，R 抗性

3.4 COCC101 的菌株转化效率

COCC101 菌株的转化效率和电压的关系如图 1 所示。在选定的电压范围内，COCC101 菌株的转化效率随电压的升高而升高，在 2.0 kV 电压下获得最大转化效率，达到 2.9×10^4 转化子/ μg DNA。比乳酸菌模式受体菌 LM0230 菌株在常用的乳酸菌培养基中只有 $10^2/\mu\text{g}$ DNA 的转化效率高 100 倍，LM0230 菌株要获得较高的转化率必需特殊的培养基^[10]，而 COCC101 菌株在常用的 MRS 培养基时，转化效率就可以达到 10^4 转化子/ μg DNA。这样，在构建乳酸菌载体时，可以直接在 COCC101 菌株中操作，不需要再构建穿梭载体，因为穿梭载体会增加质粒横向扩散的潜在危险性。

除质粒 pMG36C 能够转化 COCC101 菌株外，我们又利用不同来源的质粒 pMSP3535、pNZ8037 转化 COCC101 菌株，结果这些质粒均可以转化 COCC101 菌株，并且各种质粒并没有转化效率上的差异（见图 1）。

3.5 COCC101 菌株表达绿色荧光蛋白（GFP）

COCC101 菌株表达外源基因通过表达报告基因 GFP 来检测。含有质粒 pMSP3535-gfp 的 COCC101 转化子在 Nisin 的诱导下表达 GFP 使菌

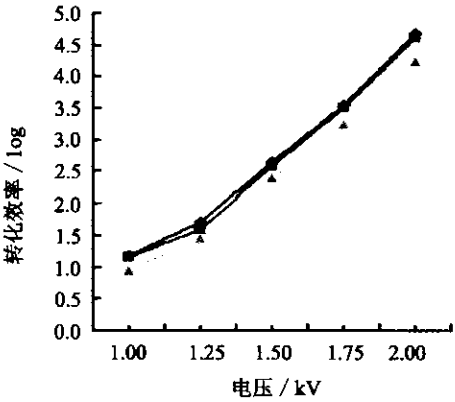


图 1 不同的质粒在 COCC101 菌株转化效率和电压的关系
◆ 系列 1, ■ 系列 2, ▲ 系列 3

体带有绿色荧光。在实验中, Nisin 的诱导浓度达到 200 ng/mL 时, GFP 基因在 COCC101 菌株中有较强的表达, 共聚焦显微镜下可以看到大部分的菌都有绿色荧光发出 (见图 2)。而在 Nisin 浓度低于 50ng/mL 时, 共聚焦显微镜下只能看到有少数的菌能够发出微弱的绿色荧光。



图 2 共聚焦显微镜下
COCC101 GFP⁺ 菌株 (×1,000)
Nisin 诱导浓度为 200ng/mL

4 结 论

筛选到的 COCC101 菌株对多数药物敏感、无质粒 (照片未展示)、转化效率高等优点, 能够成为乳酸菌基因工程操作的良好宿主菌; COCC101 菌株属于粪肠球菌, 对逆境的良好抗性以及自身是肠道中的正常菌等特性, 是潜在的乳酸菌口服疫苗载体。

参 考 文 献

- [1] Vesa T, Pochart P, Marteau P. *Aliment Pharmacol Ther*, 2000, **14**: 823 ~ 828.
- [2] Reveneau N, Geoffroy M C, Loch C, *et al.* *Vaccine*, 2002, **20**: 1769 ~ 1777
- [3] Franz C M A P, Holzapfel W H, Stiles M E. *Int J Food Microbiol*, 1999, **47**: 1 ~ 24.
- [4] de Ruyter P G, Kuipers O P, de Vos W M. *Appl Environ Microbiol*, 1996, **62** (10): 3662 ~ 3667.
- [5] Bryan E M, Bae T, Dunny G M, *et al.* *Plasmid*, 2000, **44** (2): 183 ~ 190.
- [6] 凌代文, 东秀珠. 酸细菌分类鉴定及实验方法. 北京: 中国轻工业出版社, 1998.
- [7] 贾士芳, 王荫榆, 还连栋, 等. *生物工程学报*, 1998, **14**: 429 ~ 433.
- [8] O'Sullivan D J, Klaenhammer T R. *Appl Environ Microbiol*, 1993, **59**: 2730 ~ 2733.
- [9] Paulsen I T, Banerjee L, Myers G S, *et al.* *Science*, 2003, **299**: 2071 ~ 2074.
- [10] McIntyre D A, Harlander S K. *Appl Environ Microbiol*, 1989, **55** (10): 2621 ~ 2626.