

# 植物乳杆菌 KLDS1.0728 质粒 p141 的分子分析

孟祥晨\* 刘红娟 王丽群

(东北农业大学乳品科学教育部重点实验室 食品学院 黑龙江 哈尔滨 150030)

**摘要:** 对分离自植物乳杆菌 KLDS1.0728 的质粒 p141 进行了全序列测定, 结果显示, 该质粒全长为 3597 bp, 平均 G + C mol% 值为 38%, 并利用 DNAMAN6.0 软件得到该质粒限制性内切酶图谱。经 NCBI 网站 ORF Finder 软件分析确定其编码序列即 ORF 为 15 个, 通过与公共数据库比对, 发现可以识别功能的 ORF 有 2 个, 其中包括质粒复制所必需的 *rep* 基因, p141 的 *rep* 基因与已知序列的植物乳杆菌 WCFS1 内源质粒 pWCFS101 以及植物乳杆菌内源质粒 pM4 的复制蛋白基因相似性高达 91%。根据 *rep* 基因的相似性比较, 判断 p141 的复制模式归属于 RCR 模式的 Group III 组, 即 pC194 家族。另外, 还发现质粒 p141 中存在 *mob* 基因, 表明该质粒具有水平转移能力。但没有发现 Tn4430 转座子以及转座酶基因 *topI* 和 *topA*, 所以可以判断该质粒的基因比较稳定。此外, 还发现该质粒序列中存在一定的与质粒复制和转移调控以及蛋白质表达等有关的重复序列, 其对调控质粒的拷贝数有一定意义。

**关键词:** 植物乳杆菌, 质粒, 序列分析

## Molecular Analysis of p141 Isolated from *Lactobacillus plantarum* KLDS1.0728

MENG Xiang-Chen\* LIU Hong-Juan WANG Li-Qun

(Key Laboratory of Dairy Science, Ministry of Education, Food Science & Technology College of Northeast Agricultural University, Harbin, Heilongjiang 150030, China)

**Abstract:** A plasmid from *Lactobacillus plantarum* KLDS1.0728, designated as p141, was sequenced and characterized. It consisted of a 3597 bp circular molecule with a G + C content of 38%. The enzyme digestion map of plasmid p141 was obtained by the software DNAMAN 6.0. The plasmid p141 was predicted to contain 15 ORFs by ORF Finder software in NCBI. Using the blast software to compare and search the genes, we found two known ORFs in the plasmid p141. Among those, *rep* gene was most important for plasmid replication ability. Identity analysis indicated that *rep* gene of p141 was similar to that of *Lactobacillus plantarum* WCFS1 plasmid pWCFS101 and *Lactobacillus plantarum* plasmid pM4. Based on the sequence similarities among minimal replicon modules, p141 belonged to Group III family in the RCR plasmid. In addition, *mob* gene was existed in p141, so this plasmid had level transfer ability. But Tn4430 transposon and transposase gene *topI*, *topA* were not found in p141, and this indicated that genes of the plasmid

基金项目: 黑龙江省教育厅青年学术骨干基金项目资助(No. 1151G008)

\*通讯作者: Tel: 86-451-55191813; Fax: 86-451-55190340; 收稿日期: 2009-08-24; 接受日期: 2009-11-02

✉: xchmc@im.ac.cn 院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

p141 were stable. There were direct and invert repeats in this plasmid. These repeats had certain association with plasmid replication and transfer regulation, protein expression, also had significance on the regulation of plasmid copy number.

**Keywords:** *Lactobacillus plantarum*, Plasmid, Sequence analysis

乳杆菌(*Lactobacillus*)是乳酸菌中非常重要的一个属, 由于该属微生物能够产生有机酸、醛和醇等代谢产物, 因此广泛应用于食品发酵<sup>[1]</sup>和工业乳酸发酵<sup>[2]</sup>中; 而且该属的一些菌株还具有拮抗病原微生物、调节免疫、抗感染等益生作用<sup>[3]</sup>, 也常应用于医疗保健领域。部分乳杆菌的产胞外多糖<sup>[4]</sup>和细菌素能力<sup>[5]</sup>以及重金属抗性<sup>[6]</sup>等特性由质粒编码, 因此对乳杆菌质粒的生物学信息和遗传信息进行研究有利于揭示菌株的许多特性, 同时还可利用乳杆菌质粒自身复制子特性作为潜在有用的载体。乳杆菌通常含有 1-10 个质粒, 这些质粒的大小在 1.2-169 kb 范围内, 到目前为止, 已经得到 20 多个乳杆菌质粒的完整核酸序列, 如嗜酸乳杆菌 pLA103、植物乳杆菌 pMD5057、pLP2000 和 pLP9000 等<sup>[6-7]</sup>。也应用部分质粒构建了表达载体, 包括 pSP1、pRV566、pCW4、pWCFS104、pWCFS105、pWCFS106 以及 pLES003<sup>[6,8-11]</sup> 等。

本实验室前期从东北酸菜中分离出一株植物乳杆菌 KLDS1.0728, 该菌株含有一个隐蔽性质粒 p141, 本研究的主要目的是对该质粒的序列进行测定和分析, 为进一步应用其作为表达载体奠定基础。

## 1 材料与方 法

### 1.1 菌株和质粒

植物乳杆菌 KLDS1.0728: 乳品工业微生物菌种保藏中心(KLDS-DICC)冻干保存。大肠杆菌感受态细胞: 北京天为时代公司。pUC57 购自上海生工公司。

### 1.2 试剂及培养基

乳杆菌采用 MRS 培养基<sup>[12]</sup>培养, 大肠杆菌采用 LB 培养基<sup>[13]</sup>进行培养。

各种限制性内切酶、T4 DNA 连接酶、*Taq* DNA 聚合酶等酶制剂以及 Supercoiled DNA Ladder Marker 购自宝生物工程(大连)有限公司;  $\lambda$ DNA/*Hind* III marker、MarkerIII 等 DNA 分子量标准购自北京天为时代公司; 抗生素、溶菌酶及 RNA

酶购自美国 Sigma 公司。

### 1.3 质粒 p141 的提取及 DNA 片段回收

由于植物乳杆菌 KLDS1.0728 只含有 1 个质粒 p141, 因此参考 Anderson 和 Mckay<sup>[14]</sup>、O'Sullivan 和 Klaenhammer<sup>[15]</sup>的方法, 同时应用碱裂解法提取质粒的原理设计乳杆菌质粒的提取方法, 具体过程如下: (1) 取培养至对数生长期的乳杆菌菌液置于离心管中, 12000 × g、4°C 离心 1 min; (2) 加入含溶菌酶 2.5 mg/mL 的 STE 溶液悬浮菌体, 37°C 放置 15 min; (3) 加入碱性 SDS (0.3% SDS, 0.2 mol/L NaOH), 轻轻混匀, 室温放置 5 min; (4) 加入冰冷的乙酸钾溶液(pH 4.8)冰上放置 5 min, 12000 × g、4°C 离心 5 min; (5) 取上清, 加入 4 mL 酚/氯仿/异戊醇(25:24:1), 混匀, 12000 × g、4°C 离心 2 min; (6) 取上清, 加入等体积异丙醇, 混匀, 室温放置 10 min, 4 mL 异丙醇, 18000 × g、4°C 离心 10 min; (7) 弃上清, 用 70% 乙醇(预冷)清洗沉淀; (8) 获得的质粒溶于 50  $\mu$ L 含 0.1 mg/mL RNase 酶的 TE 中; (9) 采用 0.8% 的琼脂糖凝胶进行电泳。

采用 TaKaRa 琼脂糖凝胶回收试剂盒 DV805A 进行质粒及 DNA 片段的回收。

### 1.4 质粒 p141 的限制性内切酶分析及酶切片段的序列测定

分别利用不同的限制性内切酶 *Eco*R I、*Hind* III、*Eco*R II 对分离纯化的质粒 p141 进行酶切分析, 回收各酶切片段。同时利用限制性内切酶对 pUC57 进行酶切, 回收酶切片段, 并与质粒 p141 的各酶切片段进行连接。连接后转化大肠杆菌感受态细胞, 提取重组质粒并送交上海英骏生物技术有限公司测序。

**1.4.1 质粒 p141 及 pUC57 的酶切:** 灭菌 ddH<sub>2</sub>O 11  $\mu$ L, 10 × Buffer 4  $\mu$ L, 质粒和 pUC57 各 20  $\mu$ L, *Hind* III 5  $\mu$ L, 组成 40  $\mu$ L 反应体系, 37°C 保温反应 5 h。

**1.4.2 pUC57 酶切片段的去磷酸化:** pUC57 酶切片段去磷酸化的反应体系: 灭菌 ddH<sub>2</sub>O 128  $\mu$ L, 10 × Buffer 15  $\mu$ L, pUC57 5  $\mu$ L, CIAP 2  $\mu$ L, 总体积

150  $\mu\text{L}$ 。具体操作方法: 在微量离心管中依次加入上述溶液, 50°C 水浴保温 30 min, 然后加入 150  $\mu\text{L}$  25:24:1 (V/V/V) 的 Tris 平衡酚/氯仿/异戊醇, 均匀混合形成乳浊液。12000  $\times g$  离心 1 min, 取上层水相至一个新的离心管中, 弃去两相间的介面层和有机层。再次加入 150  $\mu\text{L}$  25:24:1 (V/V/V) 的 Tris 平衡酚/氯仿/异戊醇, 重复上面操作, 直到有机相和水相之间的界面上看不到蛋白质。加入等体积的 24:1 (V/V) 的氯仿/异戊醇, 均匀混合形成乳浊液, 12000  $\times g$  离心 1 min, 取上层水相至一个新的离心管中, 弃去两相间的介面层和有机层。用乙醇沉淀法回收载体片段。

**1.4.3 连接:** 将质粒的各酶切片段分别连接到 pUC57 载体上, 进行测序。条件如下: 灭菌 ddH<sub>2</sub>O 2  $\mu\text{L}$ , Ligase 10  $\times$  Buffer 1  $\mu\text{L}$ , pUC57 1  $\mu\text{L}$ , 酶切片段 DNA 5  $\mu\text{L}$ , T4 DNA 连接酶 1  $\mu\text{L}$  (50 U), 于 16°C 反应 4 h。

**1.4.4 转化:** 参照文献[16]进行。

**1.4.5 筛选:** 采用蓝白斑法筛选。选择在 IPTG/X-gal 平板上生长的白色菌落, 用牙签挑至含氨苄青霉素的液体培养基, 37°C 培养过夜。

**1.4.6 转化子的鉴定:** 对上述菌液抽提质粒, 用 *Hind* III 进行单酶切鉴定, 琼脂糖凝胶电泳检查片段大小, 确定是否含有目的片段。

## 1.5 质粒 p141 全序列的测定

根据已知序列设计引物, 进行 PCR 扩增将序列拼接, 获得完整序列。根据已测序列, 利用 DNAMAN6.0 设计如下引物: S1 (5'-CCCTGACTTTGACCGATCAAC-3'); S2 (5'-TGCGGCTTATATTAACGAGCA-3')。PCR 扩增条件: 95°C 3 min; 95°C 30 s, 55°C 30 s, 68°C 2 min, 35 个循环; 68°C 10 min。

## 1.6 质粒 p141 全序列的分析

**1.6.1 质粒 p141 的一般结构特征分析:** 利用 DNAMAN6.0 对质粒 p141 的一般结构进行分析, 并绘制限制性内切酶图谱。

**1.6.2 利用 NCBI 网站上的 ORF Finder 软件预测 ORFs:** 进入 NCBI 主页, 利用 ORF Finder 软件 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>) 对质粒 p141 中的 ORFs 进行分析预测。

**1.6.3 利用 NCBI 网站上的 BLAST 比对分析:** 利用 NCBI 网站上的 BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/blast.cgi>) 进行进一步分析, 得到 p141 上分布的

ORFs 编码蛋白质的同源片段的基本情况。

**1.6.4 质粒 p141 启动子的分析:** 利用 Softberry 网站 (<http://www.softberry.com>) 上提供的细菌启动子预测分析软件 BPROM 搜索启动子。

**1.6.5 质粒 p141 重复序列的预测:** 利用巴斯德研究所网站提供的 Palindrome 软件 (<http://bioweb2.pasteur.fr/nucleic/intro-en.html>) 进行重复序列预测, 同时用该网站的 Mreps (<http://bioinfo.lifl.fr/mreps/mreps.php>) 进行串联重复序列的检索。

## 2 结果与分析

### 2.1 质粒 p141 的酶切分析

纯化后的质粒 p141 (图 1A) 分别采用限制性内切酶 *Eco*R I、*Hind* III、*Eco*R II 进行酶切分析, 最终发现该质粒只有经 *Hind* III 酶切后获得 3 个片段 (图 1B), 大小分别约为 2.5、0.8 和 0.5 kb, 适宜与 pUC57 载体连接。

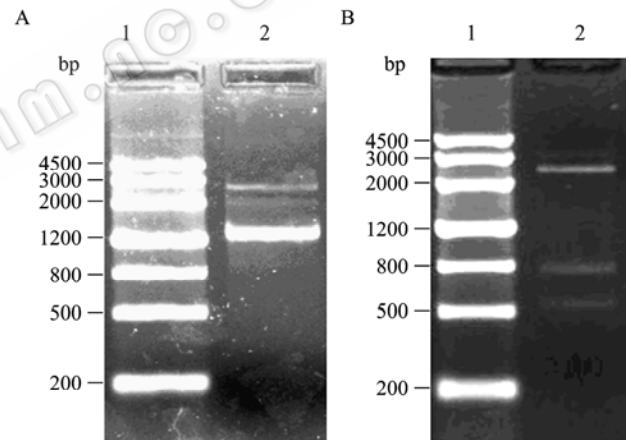


图 1 质粒 p141 及其酶切片段的电泳分析

Fig. 1 Electrophoretic analysis of plasmid p141 and its digested products

Note: A: 1: Marker III; 2: Plasmid p141; B: 1: Marker III; 2: Plasmid p141 digested with *Hind* III.

### 2.2 质粒 p141 酶切片段序列的测定

将经 *Hind* III 酶切后的各片段分别进行回收, 然后与 pUC57 相应的酶切片段进行连接, 转化大肠杆菌感受态细胞, 过夜培养后挑选可能的转化子, 培养后提取重组质粒, 重组质粒经限制性内切酶 *Hind* III 单酶切鉴定转化成功后, 对重组质粒进行测序, 获得相应片段的序列。

### 2.3 质粒 p141 全序列的测定

为确定各片段之间的连接顺序, 在已知序列的两个片段两端设计引物进行 PCR 扩增。将 PCR 产

物回收后测序, 测序结果与各酶切片段测序结果比对显示无小片段丢失, 匹配率可达 99%。比连接各片段序列, 最终得到 p141 完整的序列(DDBJ 登录号 AB517606)。

## 2.4 质粒 p141 全序列的分析

**2.4.1 一般结构:** 利用 DNAMAN6.0 对质粒 p141 的全序列进行 DNA 特性和限制性内切酶图谱分析(图 2), 结果显示该质粒是双链环状 DNA 分子, 共

计 3597 bp, 平均 G + C mol% 为 38%。

**2.4.2 ORFs 的预测:** 根据质粒 p141 的全序列, 利用 NCBI 网站上的 ORF Finder 软件查找 ORF, 搜索到 15 个大于 100 bp 的 ORFs。由于任何一个具有起始密码子和终止密码子的 ORF 不一定是蛋白质的编码序列, 因此搜索到的 ORFs 中还有非编码基因和重复序列, 所以再将 p141 序列用 BLASTn 进行蛋白质同源片段分析。

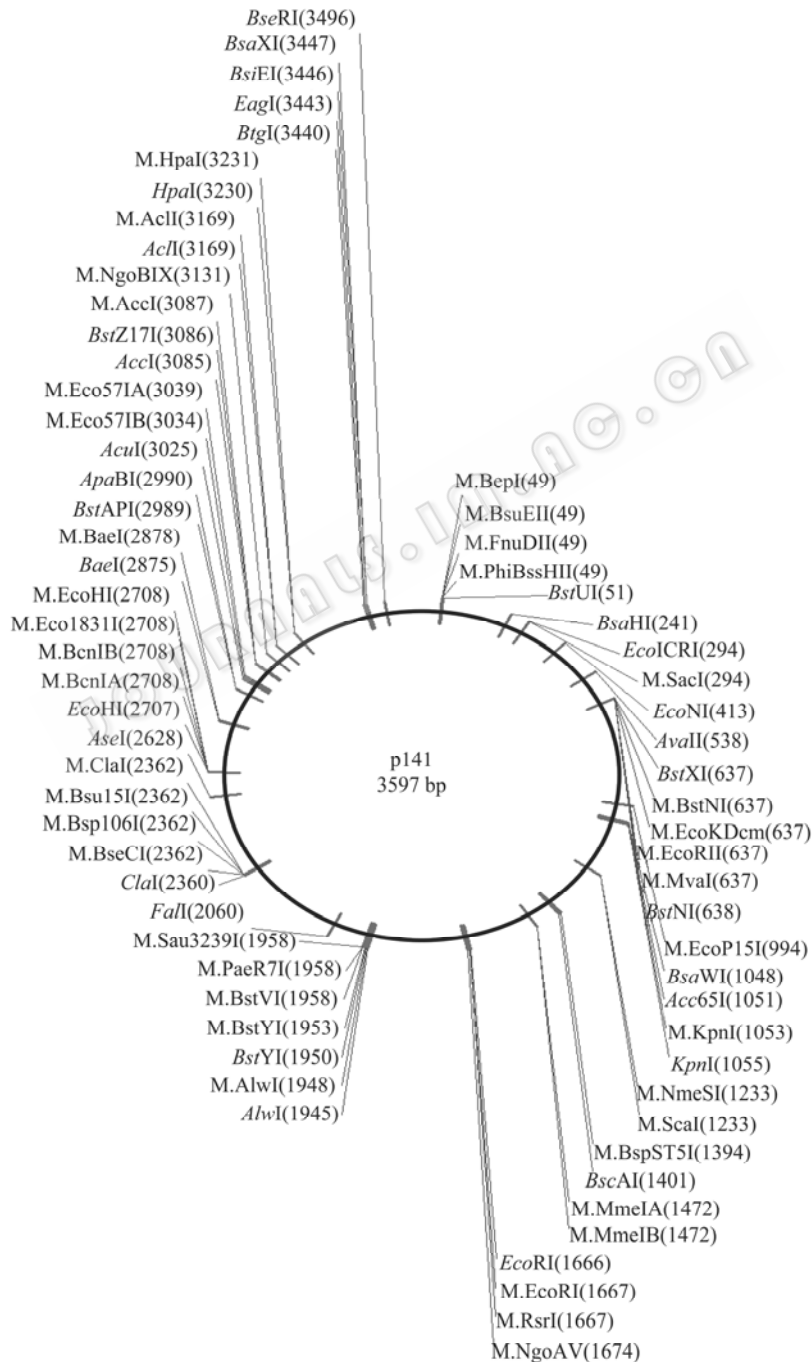


图 2 质粒 p141 限制性内切酶图谱

Fig. 2 Restriction enzyme map of plasmid p141

**2.4.3 质粒 p141 的 BLAST 比对分析:** 经 NCBI 网站上的 ORF Finder 分析后, 再采用 BLAST 对 p141 进行蛋白质同源片段比对, 获得质粒 p141 两个推断的 ORF 编码蛋白的性质和可能的功能(表 1)。

ORF1 编码可移动蛋白(Mob), 该蛋白与戊糖片球菌和干酪乳杆菌的可移动蛋白具有很高的相似性(分别为 99%和 94%), 与植物乳杆菌内源质粒 pM4 也有较高的相似性(73%)。ORF2 编码复制蛋白(Rep), 该蛋白与植物乳杆菌 WCFS1 内源质粒 pWCFS101 和植物乳杆菌内源质粒 pM4 的复制蛋白有很高的相似性(都为 91%), 与四联球菌内源质粒 pF8801 的复制蛋白相似性为 90%。

表 1 质粒 p141 推断的 ORF 编码的蛋白质  
Table 1 The putative ORFs and the encoded proteins of plasmid p141

阅读框 Reading frames	碱基位置 Base position	氨基酸数 Numbers of amino acids (aa)	编码蛋白功能 Functional protein encoded
ORF1	530-1618	363	可移动蛋白
ORF2	2542-3495	319	复制蛋白

**2.4.4 质粒 p141 中启动子的分析:** 利用启动子预测软件预测质粒 p141 中的启动子见表 2。

**2.4.5 质粒 p141 中的重复序列分析:** 利用 Palindrome 软件分析发现 2 个 100%配对的回文结构(Palindromes), 即反向重复序列(Inverted repeats), 见表 3。Palindromes 参数如下: Minimum length of Palindromes is 10, Maximum length of Palindromes is 100, Maximum gap between elements is 100, Number of mismatches allowed in Palindrome is 0。

表 2 质粒 p141 序列中的启动子  
Table 2 Promoters in plasmid p141

Promoter position	-35	-10
106	69 TTTCGA	91 TTTTATATT
2970	2932 TTGTGA	2955 CCTAAAAT
1840	1808 TTAACA	1825 AAATAAAAAT
2473	2434 TTAATA	2458 TTAACAAT
3393	3358 TTCTTT	3378 TCTTATAAT
497	462 TTGACT	482 AGCTCCAAT
1054	1016 TTGTTT	1039 CTTTATATT
2140	2100 TTACCG	2119 TTTTATTAT
1468	1431 TTAATA	1453 TTTTAAAAT

表 3 质粒 p141 序列中的回文结构  
Table 3 Palindromes in plasmid p141

196	agaaactggtc	206	284	tgagcgggag	293
223	tctttgaccag	213	303	actcgcctc	294

利用 mreps (<http://bioinfo.lifl.fr/mreps/mreps.php>)检索串联重复序列, 发现一个 19 bp 的串联重复序列, 序列结构如下:

```

4 gagagga
  |||||
12 gagagga
   |||
20 gag
  
```

### 3 讨论

本研究中的质粒 p141 序列测定采用合适的限制性内切酶酶切后, 将各个酶切片连接到测序载体上, 再分别测序各酶切片段, 相对简单。在全序列拼接方面, 多数做法是根据不同的双酶切片段的测序结果, 通过对其中不同克隆子之间的重叠区进行拼接, 数据的处理量较大。本研究利用已测两片段序列, 根据其序列两端设计引物, 然后以原始质粒 p141 为模板, PCR 扩增, 测序得到的序列与已知序列进行比对, 既解决了拼接方向的问题, 又测出了未成功克隆片段的序列数据。但是该方法不适用于未克隆片段较长的情况(一般不超过 1500 bp), 否则将会导致结果准确度不高。同时这种方法应用于质粒酶切片段比较少情况, 如果酶切片段过多, 反而不方便<sup>[17]</sup>。

本研究只是对质粒 p141 进行了初步的研究, 还需要进一步的试验工作确定质粒 p141 的复制子区域, 最小复制单元, 最终准确判断出该质粒的复制机制。确定复制子之后可将该质粒的复制子区域进行克隆, 为进一步构建质粒载体打下基础。

### 4 结论

测得植物乳杆菌 KLDS1.728 隐蔽性质粒 p141 的全序列, 对全序列结果分析显示: 该质粒全长为 3597 bp, 编码 2 个推定的 ORF, 这 2 个 ORF 编码推定的蛋白分别与 Mob、Rep 有很高的相似性, 并分析得到该质粒序列中含有的启动子和重复序列。

## 参 考 文 献

- [1] Sharp MD, McMahon DJ, Broadbent JR. Comparative evaluation of yogurt and low-fat cheddar cheese as delivery media for probiotic *Lactobacillus casei*. *Journal of Food Science*, 2008(73): M375-377.
- [2] 王玉华. 干酪乳杆菌的分子育种及 L-乳酸发酵工艺研究. 吉林大学博士学位论文, 2006.
- [3] Lebeer S, Vanderleyden J, De Keersmaecker SC. Genes and molecules of *Lactobacilli* supporting probiotic action. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2008(72): 728-764.
- [4] Kojic M, Vujcic M, Banina A, et al. Analysis of exopolysaccharide production by *Lactobacillus casei* CG11, isolated from cheese. *Applied and Environmental Microbiology*, 1992(58): 4086-4088.
- [5] Lozo J, Vukasinovic M, Strahinic I, et al. Characterization and antimicrobial activity of bacteriocin 217 produced by natural isolate *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* BGBUK2-16. *Journal of Food Protection*, 2004(67): 2727-2734.
- [6] van Kranenburg R, Golic N, Bongers R, et al. Functional analysis of three plasmids from *Lactobacillus plantarum*. *Applied and Environmental Microbiology*, 2005(71): 1223-1230.
- [7] Danielsen M. Characterization of the tetracycline resistance plasmid pMD5057 from *Lactobacillus plantarum* reveals a composite structure. *Plasmid*, 2000(48): 98-103.
- [8] Pavlova SI, Kilic AO, Topisirovic L, et al. Characterization of a cryptic plasmid from *Lactobacillus fermentum* KC5b and its use for constructing a stable *Lactobacillus* cloning vector. *Plasmid*, 2002(47): 182-192.
- [9] Alpert CA, Crutz-Le Coq AM, Malleret C, et al. Characterization of a theta-type plasmid from *Lactobacillus sakei*: a potential basis for low-copy-number vectors in *Lactobacilli*. *Applied and environmental microbiology*, 2003(69): 5574-5584.
- [10] Park WJ, Lee KH, Lee JM, et al. Characterization of pC7 from *Lactobacillus paraplantarum* C7 derived from Kimchi and development of lactic acid bacteria-*Escherichia coli* shuttle vector. *Plasmid*, 2004(52): 84-88.
- [11] Wada T, Noda M, Kashiwabara F, et al. Characterization of four plasmids harboured in a *Lactobacillus brevis* strain encoding a novel bacteriocin, brevicin 925A, and construction of a shuttle vector for lactic acid bacteria and *Escherichia coli*. *Microbiology*, 2009(155): 1726-1737.
- [12] 凌代文, 东秀珠. 乳酸细菌分类鉴定及试验方法. 北京: 中国轻工业出版社, 1999: 117-129.
- [13] J 萨姆布鲁克, DW 拉塞尔著. 黄培堂译. 分子克隆实验指南. 第 3 版. 北京: 科学出版社, 2002: 1565-1604.
- [14] Anderson DG, McKay LL. A simple and rapid method for isolation large plasmid DNA from lactic streptococci. *Applied and environmental microbiology*, 1983, 46(3): 549-552.
- [15] O'sullivan DJ, Klaenhammer TR, et al. Rapid mini-prep isolation of high-quality plasmid DNA from *Lactococcus* and *Lactobacillus* spp.. *Applied and environmental microbiology*, 1993, 59(8): 2730-2733.
- [16] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular cloning: a laboratory manual. 2nd edition. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1989: 1-38.
- [17] 梁钧, 袁志明. 杀蚊球形芽孢杆菌 pLG 质粒的序列分析及复制单元特性. 中国科学院硕士论文, 2003.

稿件书写规范

## 论文中有关正、斜体的约定

物种的学名: 菌株的属名、种名(包括亚种、变种)用拉丁文斜体。属的首字母大写, 其余小写, 属以上用拉丁文正体。病毒一律用正体, 首字母大写。

限制性内切酶: 前 3 个字母用斜体, 后面的字母和编码正体平排, 例如: *Bam*H I、*Msp* I、*Sau*3A I 等。

氨基酸和碱基的缩写: 氨基酸缩写用 3 个字母表示时, 仅第一个字母大写, 其余小写, 正体。碱基缩写为大写正体。

基因符号用小写斜体, 蛋白质符号首字母大写, 用正体。