

SHICHANGQIUJUN

YINBIXING ZHILI ZUIXIAO FUZHIZI DE

FENLI HE JIANDING

屎肠球菌

隐蔽性质粒最小复制子的 分离和鉴定

李梦洋◎著



黑龙江大学出版社
HEILONGJIANG UNIVERSITY PRESS

SHI HANCOCKILLIN

SCIENCE PUBLICATIONS, INC.

FRANKLIN, MASSACHUSETTS

尿腸球菌

陰道性原性菌小量制子時
分離和鑑定



SCIENCE PUBLICATIONS, INC.

SHICHANGQIUJUN

YINBIXING ZHILI ZUIXIAO FUZHIZI DE

FENLI HE JIANDING

屎肠球菌

隐蔽性质粒最小复制子的
分离和鉴定

李梦洋◎著



黑龙江大学出版社

HEILONGJIANG UNIVERSITY PRESS

图书在版编目(CIP)数据

尿肠球菌隐蔽性质粒最小复制子的分离和鉴定/
李梦洋著. -- 哈尔滨: 黑龙江大学出版社, 2010. 8
ISBN 978 - 7 - 81129 - 310 - 4
I. ①尿… II. ①李… III. ①粪链球菌 - 质粒 - 复制
子 - 分离②粪链球菌 - 质粒 - 复制子 - 鉴定 IV. ①Q939.11
中国版本图书馆 CIP 数据核字(2010)第 131409 号

书 名	尿肠球菌隐蔽性质粒最小复制子的分离和鉴定
著作责任者	李梦洋 著
出 版 人	李小娟
责 任 编 辑	赵丽华
出版发行	黑龙江大学出版社(哈尔滨市学府路 74 号 150080)
网 址	http://www.hljupress.com
电 子 信 箱	hljupress@163.com
电 话	(0451)86608666
经 销	新华书店
印 刷	哈尔滨海天印刷设计有限公司
开 本	880 × 1230 1/32
印 张	4.5
字 数	104 千
版 次	2010 年 9 月第 1 版 2010 年 9 月第 1 次印刷
书 号	ISBN 978 - 7 - 81129 - 310 - 4
定 价	16.00 元

本书如有印装错误请与本社联系更换。

版权所有 侵权必究

前 言

乳酸菌是一类能利用可发酵糖产生大量乳酸的细菌的总称,早在远古时代就被人们用于食品加工及保存中,尤其适用于乳制品的生产和肉、蔬菜、面包发酵等方面。乳酸菌不仅可以赋予食品特殊的香味和质感,并且能够延长货架期。一些乳酸菌在人和动物的消化道及雌性生殖道中定殖,可促进机体健康,因而乳酸菌已经成为最重要的益生菌,在医药、工业、农业等与人类生活密切相关的重要领域有很高的应用价值。

由于乳酸菌在发酵、农业、食品、生物加工乃至医药方面的重要应用,在 20 世纪 70 年代,国外开展了对乳酸菌遗传学的研究。到 90 年代中期,此研究已经在不同国家内大范围展开。对乳酸菌遗传系统的研究对于分析乳酸菌的重要工业特性,以及通过遗传、代谢和蛋白质工程对其进行改造有着非常重要的意义。改造后的乳酸菌不但可以用于发酵乳酸和其他食品,而且在工业中可作为用于生产肽、酶或代谢物的宿主菌。

传统的乳酸菌菌种改良方法一般为驯化培养、诱导突变和原生质体融合。但是传统的育种方法都有一定的局限性,常常不能获得满意的新菌株。DNA 重组技术是一种崭新的、定向育种的新技术。运用基因工程手段对乳酸菌进行基因改良,在宿主菌中导入外源基因或改变某些基因,以增强其生理功能或获得新的表型。在将外源基因导入乳酸菌这个过程中,必须有一个载体能够携带外源基因进入宿主菌,并在菌中复制且表达该

基因。我们选择了质粒作为构建表达载体的基础。由于乳酸菌应用的特殊性,要求其表达载体必须具有十分安全的特性。因此,表达系统必须建立在乳酸菌 DNA 或者在食品工业应用中有着悠久应用历史微生物的 DNA 基础之上。所以,对乳酸菌质粒复制子的研究也就成为了运用分子克隆技术构建乳酸菌表达载体的先决条件。

本书的主要内容是如何利用基因工程手段,对乳酸菌质粒的复制子进行分离和鉴定,并得到带有复制子的最小酶切片段,进而得到适用于构建乳酸菌表达载体的复制子。

由于作者学识水平和能力有限,编写时间仓促,书中难免有疏漏和不妥之处,诚恳希望广大读者提出宝贵意见。

李梦洋

2010 年 5 月

目 录

1	绪论	1
1.1	乳酸菌的分类与鉴定	2
1.2	乳酸菌质粒	7
1.3	质粒消除	16
1.4	乳酸菌基因表达载体	22
	小 结	34
2	复制检测载体的构建	35
2.1	质粒 pAT110 的制备	35
2.2	质粒 pUC19 的制备	39
2.3	载体的构建	42
	小 结	47
3	乳酸菌复制子质粒来源的筛选	49
3.1	乳酸菌质粒小量提取	49
3.2	乳酸菌 KLDS 6.0718 菌种鉴定	54
	小 结	65

4	质粒 pEV105 特性鉴定	66
4.1	KLDS 6.0718 菌株内源性质粒数量的鉴定	66
4.2	pEV105 酶切位点的鉴定	69
4.3	质粒消除	74
4.4	质粒复制机制分析	77
	小 结	87
5	pEV105 质粒复制子最小片段的研究	88
5.1	pEV105 质粒复制子最小片段的确定	88
5.2	pEV105 质粒最小复制子片段序列分析	102
	小 结	108
	参考文献	110
	附 录	129
	附录 I 菌株和质粒	129
	附录 II 培养基配制表	129
	附录 III 试剂配制表	131
	附录 IV 溶液配制表	131

1 绪 论

乳酸菌是一类能够利用可发酵糖产生大量乳酸的细菌的总称,在发酵、农业、食品、生物加工乃至医药方面有重要的应用。在 20 世纪 70 年代,国外开展了对乳酸菌遗传学的研究。到 90 年代中期,此研究已经在不同国家大范围地展开。对乳酸菌遗传系统的研究对于分析乳酸菌的重要工业特性,以及通过遗传、代谢和蛋白质工程对其进行改造有着非常重要的意义。改造后的乳酸菌可以用于发酵生产乳酸和发酵其他食品,并且在工业中可以作为生产肽、酶或代谢物的宿主菌。

传统乳酸菌的菌种改良具有一定的局限性,常常不能获得令人满意的新菌株。近年来,随着乳酸菌分子生物学研究的深入,研究人员根据不同的目的,利用基因工程手段,通过乳酸菌基因表达载体,向目标菌株中导入外源基因或改变某些基因,对乳酸菌进行基因改良,以增强其生理功能或者获得新的表型,选育出了大量具有特殊功能的优良菌种。

乳酸菌载体系统按复制方式的不同可分为两大基本类型:染色体整合载体和自主复制型载体。染色体整合载体通过整合到宿主菌的染色体上实现外源基因的复制和表达。这类载体通常由噬菌体改建而成。自主复制型载体通常具有较高的拷贝

数,能够实现外源基因的高效表达。这类载体通常由质粒改建而成^[1]。质粒是指存在于细菌等微生物细胞中染色体以外的、能够独立复制的遗传因子。质粒具有编码多种细菌的表型特征的基因,如抗生素抗性、细菌素合成、糖代谢以及金属离子抗性等。乳酸菌的质粒大部分为隐蔽型质粒,质粒数量为一个或多个,质粒大小也从几千个碱基到几十万个碱基不等。已有研究表明,乳酸菌质粒的功能包括乳糖的代谢、细菌素的合成、胞外多糖的产生以及 DNA 限制修饰系统等。

由于乳酸菌应用的特殊性,要求其表达载体必须是十分安全的。因此,表达系统必须建立在乳酸菌 DNA 或者在食品工业中有着悠久应用历史的微生物的 DNA 基础之上。所以对乳酸菌质粒复制子的研究也就成为了运用分子克隆技术构建乳酸菌表达载体的先决条件。

1.1 乳酸菌的分类与鉴定

微生物的一般分类主要是以表型性状和生化特征为基础,但这些性状特征很难明确地将菌株鉴定到种的水平,而现在可以通过检测细胞内生物大分子(主要是各种核酸)的相似性来更加准确地确定不同微生物之间的亲缘关系和遗传起源。随着乳酸菌分类和鉴定技术的不断完善与发展,最有可能作为常规分析方法的是各种核酸探针技术、利用聚合酶链式反应(PCR)技术对 rRNA 进行部分序列分析、细胞可溶性蛋白图谱法。

乳酸菌包括 20 多个属,100 多个种,菌种非常丰富。随着分子生物学技术的不断发展,PCR 技术的日益完善,单独地利用

传统的表型分类方法和生理生化鉴定方法已经不能准确表明细菌间的遗传关系,所以通过对细菌基因类似度的分析来判断细菌的种属,就越来越受到人们的重视。细胞的核糖体 RNA (rRNA) 可将遗传信息表达,然后转译成蛋白质,因此可以想象这些分子具有作为种系发生的指示所必不可少的性质。在相当长的进化过程中,rRNA 分子的功能几乎保持恒定,而且其分子排列顺序有些部位变化非常缓慢,以致保留了古老祖先的一些序列,这就是说,从这种排列顺序可以探测出种系发生上的深远关系。细菌的 rRNA 有三种类型:23S,16S 和 5S rRNA,它们分别含有约 2 900,1 540 和 120 个核苷酸。5S rRNA 虽然容易分析,但由于核苷酸少,所以没有足够的遗传信息用于分类研究。而 23S rRNA 含有的核苷酸数几乎是 16S rRNA 的两倍,分析较困难。16S rRNA 的相对分子质量适中,细菌的 16S rRNA 基因具有高度的保守性,不同科、属、种间细菌 16S rRNA 基因的同源性可达 97% 以上,而且 rRNA 在细胞中含量较高,一个典型的细菌含有 10 000 ~ 20 000 个核糖体,易于提取,可以获得足够的使用量供研究比较之用。

以 16S rRNA/rDNA 为基础的分子生物学技术已成为鉴定微生物时被研究人员普遍接受的方法^[2-3],该技术主要利用不同微生物在 16S rRNA 及其基因(rDNA)序列上的差异来进行微生物种类的鉴定和定量分析。该技术已经受到广泛关注,试验的基本路线也比较明确,各种通用引物早已公开发表,并且许多关键试验试剂已经制成试剂盒投放市场。

目前,已有多种可以用于构建细菌 16S rDNA 文库^[4]的试剂盒上市,如 pGEM2T 克隆试剂盒^[5]和 TA 克隆试剂盒^[6-7]。

建立文库之后的工作是获取质粒中的 16S rDNA 序列,通常采用全细胞 PCR 扩增^[8]或质粒提取方法^[6-7]。

国内外目前比较通用的几种 16S rRNA PCR 扩增引物见表 1-1^[9-10]。

表 1-1 目前比较通用的几种 16S rDNA 基因 PCR 扩增引物

引物	序列(5'→3')	适用范围
fD1	ccgaattcgtcgacaacAGAGTTTGATC-CTGGCTCAC	大多数真细菌
fD2	ccgaattcgtcgacaacAGAGTTTGATC-ATGGCTCAC	肠道细菌及其相关细菌
fD3	ccgaattcgtcgacaacAGAGTTTGATC-CTGGCTTAG	<i>Spirochetes</i> 属螺旋体
fD4	ccgaattcgtcgacaacAGAATTTGATC-TTGGTTCAG	衣原体属
rD1	cccgggatccaagcttAAGGAGGTGATC-CAGCC	许多真细菌
rP1	cccgggatccaagcttACGGTTACCTTG-TTACGACTT	肠道细菌
rP2	cccgggatccaagcttACGGCTCCTTG-TTACGCTT	大多数真细菌
rP3	cccgggatccaagcttACGGATACCTT-GTTACGACTT	梭杆菌

近年来,Yamamoto 等设计、合成出人肠道区系中常见的双歧杆菌属五个种(两歧双歧杆菌、青春双歧杆菌、婴儿双歧杆菌、短双歧杆菌和长双歧杆菌)的特异性寡核苷酸探针,它们的长度为 16~19 个碱基,并与这五个种的 16S rRNA 序列互补。用天然高相对分子质量的 RNA 制备物作为靶子,用对于人肠道中这些菌株具有高度种特异性的寡核苷酸作为探针,结果表明用此法检测这五个种的 16S rRNA 序列能取得所期望的结果,并

且整个试验过程从获得纯细胞培养物后至检测完成只需 6 h。

16S rRNA/rDNA 分子生物技术的基本方法见图 1-1。

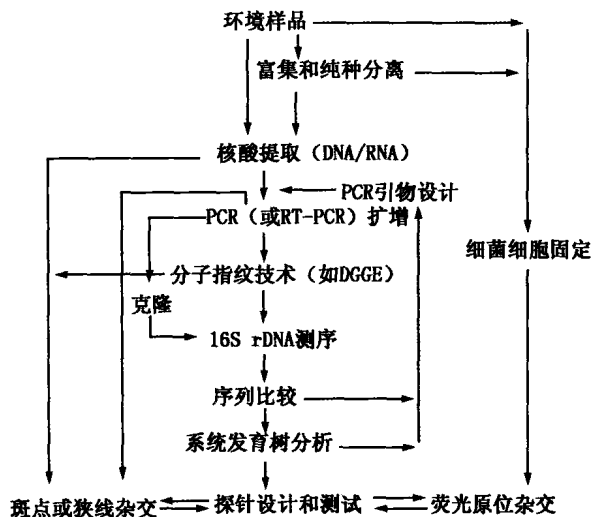


图 1-1 以 16S rRNA/rDNA 为基础的微生物分子生态技术

Kaufmann 等^[11]用 16S rRNA 探针杂交技术和 PCR 技术定量鉴定了分离自食物的 30 株双歧杆菌。

1997 年, Mora 等^[12]利用套式 PCR 方法扩增 16S rRNA 序列和一段 D-乳酸脱氢酶基因, 对乳酸片球菌 (*Pediococcus acidilactici*) 和戊糖片球菌 (*Pediococcus pentosaceus*) 进行了鉴定。后来, Parola 等^[13]又利用 16S rRNA 基因序列分析技术从败血症患者术后感染区域成功分离出干酪乳杆菌。

1998 年, Berthier 等^[14]利用 16S rRNA 和 23S rRNA (16s-23s rRNA) 间区序列快速鉴定了两组 (共 32 株) 亲缘关系较近的乳杆菌。Matsuki 等^[15]利用 16S rRNA 序列分析快速鉴定了人肠道中的 46 株双歧杆菌。Patel 等^[16]应用 16S rRNA 序列分析将一株鸡肠球菌鉴定到种。

1999年,Tannock等^[17]利用16S-23S rRNA 间区序列的比较分析分别对分离自胃肠道、青贮饲料和酸奶中的40株乳杆菌进行了鉴定。

2000年,Kullen等^[18]利用细菌16S rRNA的包括可变区V1和V2的500 bp长度片段序列快速准确地从人肠道混合物中鉴定出嗜酸乳杆菌。黄锡全等^[19]对一株明串珠菌的16S rRNA基因序列进行分析,并与其他21株乳酸菌16S rRNA基因序列进行了同源性比较,发现其与柠檬色明串珠菌的同源性为99%,认为该菌株是一株柠檬色明串珠菌。Manzano等^[20]利用温度梯度凝胶电泳的方法分析16S rRNA,对分离自食物的李斯特氏菌进行了鉴定。

2001年,Monstein等^[21]利用温度梯度凝胶电泳和PCR扩增16S rRNA的V6区(可变区)片段的方法对16株肠球菌进行了鉴定。沈永才等^[22]利用16S rRNA的PCR法鉴定了八株双歧杆菌,并用16S rRNA荧光定量PCR法对双歧杆菌进行了定量检测。

2002年,Manero等^[23]对利用16S rRNA探针杂交方法鉴定肠球菌属细菌的研究进行了综述。2003年,Seto等^[24]对16S rRNA序列特定长度片段进行分析,对人粪便样品中嗜酸乳杆菌(*Lactobacillus acidophilus*)的分布情况进行了检测。Byun等^[25]利用分析16S-23S rRNA 间区序列的方法对一株鼠李糖乳杆菌(*Lactobacillus rhamnosus* ATCC 53103)进行了鉴定,并与干酪乳杆菌(*L. casei*)、嗜酸乳杆菌(*L. acidophilus*)和瑞士乳杆菌(*L. helveticus*)的16S-23S rRNA 间区片段进行了比较。Jang等^[26]利用PCR-RFLP(限制性片段长度多态性)方法通过扩增出16S rDNA序列的976 bp长度片段,对从韩国传统泡菜中分离的明

串珠菌进行了鉴定。Rachman 等^[27]使用种特异性寡核苷酸引物扩增 16S-23S rDNA 的方法对食品乳杆菌(*Lactobacillus alimentarius*)和香肠乳杆菌(*Lactobacillus fauciminis*)进行了检测,证明该引物对上述两种菌的鉴定特异性较高。Somer 等^[28]利用 PCR 扩增 16S rRNA 序列的方法对食物中的单核细胞增生李斯特氏菌(*Listeria monocytogenes*)进行了鉴定。Mullie 等^[29]利用套式 PCR 扩增 16S rRNA 的方法对人源 26 株双歧杆菌进行了鉴定。

2004 年, Kwon 等^[30]通过对 16S-23S rRNA 进行套式 PCR 扩增的方法, 对多株乳杆菌进行了快速鉴定。Altun 等^[31]利用 16S rRNA 序列分析对分离自虹鳟鱼的格氏乳球菌(*Lactococcus garvieae*)进行了鉴定。Bonjoch 等^[32]利用套式 PCR 法分析 16S rRNA 序列, 对粪便中污染的双歧杆菌的来源进行了鉴定。

1.2 乳酸菌质粒

质粒是指存在于细菌等微生物细胞中染色体以外的、能够独立复制的遗传因子, 它由环状双链 DNA 组成。在原生生物、细菌以及真核细胞中都发现了这样的复制单位。通过重组或转座作用, 质粒能够结合基因并转移到其他细胞内, 促进细菌之间的基因交换。

在许多乳酸菌中都发现了质粒的存在。细胞内具有一个或多个质粒, 质粒大小也由几千个碱基到几百万个碱基不等。已有研究表明: 乳酸菌质粒的功能包括乳糖的代谢、细菌素的合成、胞外多糖的产生以及 DNA 限制修饰系统等^[33-47]。

质粒 DNA 分子可以持续稳定地处于独立于染色体外的游

离状态,遇到细胞分裂时,就将它的拷贝数准确地分配给每个子细胞,但在一定条件下,质粒又会可逆地整合到寄主染色体上,随着染色体的复制而复制,通过细胞分裂传递到后代。就相对分子质量大小比较而言,质粒 DNA 仅占细胞染色体组的一小部分,一般约为 3% 左右,但却编码着一些重要的非染色体控制的遗传性状。正是由于质粒的存在,才赋予寄主细胞一些特性。例如,对抗生素的抗性就是其中最突出的代表。还有一类质粒,它们究竟赋予寄主细胞何种表型,迄今仍不清楚,因此特称这类质粒为隐性质粒。

乳酸菌广泛地存在于自然界中,绝大部分是人和动物机体内必不可少的具有重要生理功能的菌群。因为乳酸菌种属的多样性和种内的差异性,乳酸菌的质粒绝大多数目前都为隐性质粒,不论是质粒的大小还是质粒的数目均有很大差异。但随着研究的深入,人们相继在一些乳酸菌中发现,菌株本身许多重要的生理功能都直接或间接地与其携带的质粒有关。所以,乳酸菌质粒的研究对于筛选新的优良菌种,改良现有的生产菌种,组建食品级载体-受体系统,建立乳酸菌食品及基因表达载体都具有重大意义。同时,在食品工业、医药工业以及保健业等行业中也有着巨大的应用前景和潜在的经济价值。

乳酸菌遗传学研究开始于 20 世纪 70 年代初。由于乳酸菌许多重要的代谢功能的不稳定性和易缺失现象,激发了人们对染色体外遗传物质即质粒的研究。1972 年 McKay 等通过质粒消除方法发现乳链球菌(*S. lactis*)和乳脂链球菌(*S. cremoris*)的乳糖代谢功能与质粒有关^[48]。1973 年,McKay 等又利用氯化铯-溴化乙啶密度梯度离心的方法,检测到了用紫外线和吡啶黄处理的菌株质粒消失的现象,从而证明了乳链球菌 C2 的蛋

白酶产生和乳糖发酵均与质粒有关^[49]。随后,在1976年 McKay 等^[50]又用转导的方法和DNA杂交技术进一步证明了质粒编码的乳糖代谢性状。此外,在越来越多的研究中还发现,与乳酸菌质粒有关的代谢性状还有蛋白酶的产生、柠檬酸的代谢、细菌素的产生与免疫、氨基酸代谢等等^[51]。

1.2.1 乳酸菌质粒的提取

研究质粒性状首先的工作是质粒的分离,但由于乳酸菌是革兰氏阳性菌,其细胞壁较厚、肽聚糖含量较高、分子交联度比较紧密,同时质粒大小差异较大,质粒在提取过程中易断裂且拷贝数低,细胞裂解也有一定困难,所以一般的质粒提取方法对于提取乳酸菌质粒不是很有效。1983年,Anderson 等^[52]首次提出了一种适用于提取乳酸球菌质粒的方法。他们采用合适的生长和裂解条件,并将碱变性和热变性结合使用,成功地从乳酸链球菌中提取到了多个质粒,得到了较好的效果。

1.2.2 乳酸菌质粒的功能

早在20世纪70年代 McKay 及其同事就提供证据证明了 *Lactococcus lactis* (乳酸乳球菌,当时为N组链球菌)的许多代谢特性是乳球菌所固有的且不稳定,这与其所含的大量丰富的质粒DNA相关。例如,乳糖分解代谢、蛋白酶产生、柠檬酸吸收、噬菌体抗性、细菌素产生、多糖的生物合成、细菌素产生、金属离子抗性 or 敏感性、抗生素抗性、热胁迫反应等遗传性状皆由质粒编码。

利用改良现有的生产菌株,筛选新的优良菌株,通过对乳酸菌质粒编码特性的研究,构建合适的质粒载体,通过转导、结合、