

# 片球菌素基因的克隆及表达

韩 烨, 周志江, 王培培, 张丽霞

(天津大学 农业与生物工程学院食品科学系, 天津 300072)

**摘要:** 从乳酸片球菌中提取质粒 DNA 作为模板, 根据 GeneBank 公布的细菌素结构基因, 设计一对特异性引物, 进行 PCR 扩增片段, 将该片段定向克隆到 pTA2 载体, 测序, 与发表的基因序列比较, 同源性为 100%, 然后克隆到表达载体 Pet-28a, 转化到 *Escherichia coli* DH5 $\alpha$ , 经过卡那霉素平皿筛选, 质粒酶切, PCR 两步验证, 获得阳性重组质粒, 并转化表达宿主菌 *E. coli* BL21(DE3) 感受态细胞, 以异丙基硫代- $\beta$ -D-半乳糖苷(IPTG)诱导表达, Tricine-SDS-PAGE 电泳, 显示在 4 600 Da 处出现条带, 与已报道的细菌素分子量大小符合。表达产物对单核细胞增多症李氏杆菌有抗菌作用。

**关键词:** 乳酸片球菌; PCR; 克隆; 原核表达

中图分类号: Q939.11+7 文献标识码: A 文章编号: 1000-7091(2009)02-0032-04

## Cloning and Expression of *Pediocin* Gene

HAN Ye, ZHOU Zhi-jiang, WANG Pei-pei, ZHANG Li-xia

(College of Agriculture and Bioengineering, Tianjin University, Tianjin 300072, China)

**Abstract:** Plasmid DNA was extracted from *Pediococcus acidilactici* as template. The oligonucleotide primers were designed according to the gene sequence reported by GenBank. Amplified the DNA fragment by means of PCR and cloned to pTA2 Vector to sequenced. Compared the inserted DNA fraction and the Ped-A sequence reported by GenBank, and found sequence homology was 100%. Then inserted the segment to expressing vector Pet-28a. The recombinant plasmid transformed to *Escherichia coli* DH5 $\alpha$ , screened by kanamycin resistance and identified by PCR, restriction endonucleases analyzing, obtained positive recombinant plasmid transformed which to *E. coli* BL21(DE3) receptivity cell, induced with IPTG, Tricine-SDS-PAGE showed it's molecular mass as 4 600 Da the same as the reported pediocin PA-1.

**Key words:** *Pediococcus acidilactici*; PCR; Cloning; Heterogenous expression

长期以来, 乳酸菌广泛应用于乳制品、蔬菜及肉制品的发酵与防腐中。其原理是在发酵过程中除产生乳酸、乙酸、双乙酰和过氧化氢外, 还能产生多种具有抑菌或杀菌生物活性的细菌素<sup>[1]</sup>, 是在代谢过程中通过核糖体合成机制产生的一类具有抑菌活性的多肽或前体多肽, 它的抑菌范围为亲缘关系相近的乳酸菌和一些革兰氏阳性细菌, 产生菌对其细菌素有自身免疫性。在食品应用中它主要是作为生物防腐剂控制食品中的杂菌和病原菌。与已经用于工业生产的 nisin 相比, 片球菌素最突出的优点是对李斯特氏菌的抑止作用明显<sup>[2]</sup>, 对其他革兰氏阳性细菌也有较好的抑制作用, 显示了较宽的抑菌谱, 并且在基质或培养基中高浓度的蛋白和脂肪对于细菌素的产生没有很明显的影 响, 所以片球菌素的研究成为了热点。

试验表明乳酸片球菌素的产量不高, 不适合进行产业化开发, 所以近年来, 对于这些重要的工业微生物的遗传信息做了很多工作, 可利用其蛋白质工程、基因工程方法获得更高活性的细菌素<sup>[3]</sup>, 本课题的研究目的就基于这一点, 研究片球菌素异源宿主表达系统, 尤其是食品级表达系统, 将该基因应用到发酵食品出发菌, 提高发酵食品的防腐性能及安全系数, 对片球菌素的广泛应用有重要的意义。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

菌株: 乳酸片球菌 *Pediococcus acidilactici* 由天津大学食品生物技术实验室自行分离获得<sup>[4]</sup>。单核细胞增多症李氏杆菌购自中国农科院。

质粒载体: 质粒 Pet-28a, *Escherichia coli* BL21 及

收稿日期: 2009-01-08

基金项目: 国家自然科学基金项目(30507138)

作者简介: 韩 烨(1968-), 女, 吉林长春人, 蒙族, 讲师, 博士, 主要从事食品生物技术研究。

通讯作者: 周志江(1960-), 男, 山西闻喜人, 教授, 博士生导师, 主要从事乳酸片球菌素的研究与开发。

*E. coli* DH5 $\alpha$  由天津大学食品生物技术实验室保存; pTA2 Vector 购自北京鼎国生物技术有限责任公司。

主要试剂: T4DNA Ligase、Taq DNA Polymerase、dNTP、DNA 片段回收纯化试剂盒、氨苄青霉素、卡那霉素均购自北京鼎国生物技术有限责任公司; 各种限制性内切酶购自宝生物工程(大连)有限公司; 异丙基硫代半乳糖苷(IPTG) 购于长沙欧迈公司。蛋白胨、酵母提取物为英国 OXOID 公司产品; 牛肉膏、琼脂粉、葡萄糖、硫酸锰、吐温 80、硫酸镁、磷酸钠、氯化钠、冰醋酸、Tris、EDFA 等均为国产分析纯。

主要仪器: KDC-160HR 高速冷冻离心机(科大创新股份有限公司), HZQ-X100 恒温振荡培养箱(哈尔滨市东联电子技术开发有限公司), PHS-3B 型精密 pH 计(上海精密科学仪器有限公司雷磁仪器厂), HVE-50 高压蒸汽灭菌器(日本 Hirayama 公司), P $\times$ E 0.2 PCR 扩增仪(美国 Thermo Electron Corporation), DYY-6C 型电泳仪(北京市六一仪器厂), GIS 数码凝胶图像分析系统(日本 Tanon 有限公司)。

## 1.2 方法

1.2.1 细菌培养 TGE(Trypticase glucose yeast extract)<sup>[5]</sup> 液体培养基的配制(蒸馏水 1 L, pH 6.5): 蛋白胨 10.00 g、酵母浸提物 4.00 g、牛肉膏 6.00 g、葡萄糖 10.00 g、硫酸锰 0.05 g、硫酸镁 0.10 g、0.2% 吐温 80(V/V), 0.08MPa 灭菌 30 min。固体 TGE 则加入 12 g 琼脂粉。

挑取乳酸菌单菌落, 接种于 TGE 液体培养基, 摇床振荡培养(37 $^{\circ}$ C, 170 r/min, 12~13 h)至对数生长期, 收集菌液。

1.2.2 *Ped-A* 基因扩增 据文献报道, *Pediocin-PA-1* 的相关基因是大小为 9.4 kb 的质粒 PSRQ11<sup>[6]</sup>, 包括一个操纵子, 其含有 4 个基因, 分别为 *PedA*、*PedB*、*PedC*、*PedD*。而 *PedA* 的单独表达已经足够显示细菌素的活性<sup>[7]</sup>, 从乳酸片球菌中提取质粒 DNA, 根据 NCBI 上 GeneBank 公布的 *Ped-A* 基因序列(Accession number M83924) 设计一对引物用于克隆到 T 载体和表达载体, 便于直接酶切, 酶切位点前加 3 个保护碱基:

上游引物: 5'-CGC CATATG AAA AAA ATT GAA AAA TTA ACT-3'

下游引物: 5'-CGC GAATTC CTA GCA TTT ATG ATT ACC TTG-3'

上下游引物上分别设置酶切位点: *Nde* I、*Bam*HI, 上下游引物之间所扩增片段长度 189 bp, 引物由北京鼎国生物技术有限责任公司合成。

碱裂解法提取片球菌质粒, 作为 PCR 模板, 反

应体系为 50  $\mu$ L: 片球菌质粒模板 2  $\mu$ L, 上下游引物(10 pmol/L) 各 1  $\mu$ L, Taq DNA Polymerase 1  $\mu$ L, 10 $\times$  Taq Buffer(Mg<sup>2+</sup> plus) 2  $\mu$ L, dNTP mixture 2  $\mu$ L, 三蒸水 38  $\mu$ L。

根据 PCR 反应机理<sup>[8,9]</sup>, 设计并不断优化反应条件, 最终得到目的条带特异性较强的反应条件: 94 $^{\circ}$ C 预变性 3 min; 94 $^{\circ}$ C 30 s, 44 $^{\circ}$ C 15 s, 72 $^{\circ}$ C 10 s, 共 30 个循环; 最后 72 $^{\circ}$ C 温育 10 min。1.2% 琼脂糖凝胶电泳, 拍照, 切取目的条带试剂盒回收。

1.2.3 扩增产物的电泳分析 以 0.5 倍 TAE 缓冲液配制 1.2% 琼脂糖凝胶。取 PCR 扩增产物 6.5  $\mu$ L, 加入 3.5 mol/L 溴酚蓝指示剂, 混匀后加样。95 V 电泳 30 min。溴化乙锭染色 20 min, 于凝胶成像仪下观察电泳结果。

1.2.4 目的条带纯化 凝胶成像仪下切取目的条带, 回收纯化, 以进行下一步的连接转化。

1.2.5 连接 将纯化回收的 PCR 产物连接到 T 载体, 连接体系为: PCR 产物 1  $\mu$ L, pTA2 Vector(50 ng/ $\mu$ L) 1  $\mu$ L, 2 $\times$  Ligation Buffer 5  $\mu$ L, T4DNA Ligase 1  $\mu$ L, 三蒸水 1  $\mu$ L, 于 16 $^{\circ}$ C 水浴过夜。

1.2.6 转化 参照文献[7] 方法, 用 CaCl<sub>2</sub> 法制备 *E. coli* DH5 $\alpha$  感受态细胞, 将上述连接产物用热冲击转化法转化至大肠杆菌 DH5 $\alpha$  感受态细胞。取转化后的菌液 100  $\mu$ L 涂布于含氨苄青霉素(50 ng/mL) 固体 LB 培养基上, 室温至液体完全被吸收, 然后倒置于 37 $^{\circ}$ C 培养箱中过夜培养, 观察菌落的生长情况。

1.2.7 鉴定测序 在过夜培养的菌落中挑取单菌落, 碱裂解法提取质粒, 用 *Nde*I、*Bam*HI 进行酶切和 PCR 两种方法鉴定。取符合要求的阳性菌落进行过夜培养, 制备甘油菌, 由上海生工生物工程技术有限公司测定序列。测序结果用序列分析软件进行分析。

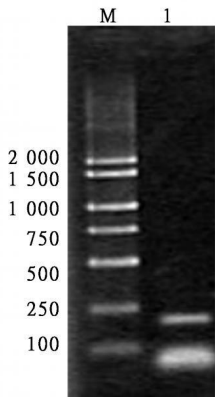
1.2.8 原核表达与鉴定 经鉴定阳性的菌落提取 T 质粒, 双酶切切下 *Ped-A* 基因片段, 与同样进行双酶切的质粒 Pet28a 连接, 连接体系和反应条件同上, 转化至 *E. coli* DH5 $\alpha$ , 卡那霉素平板培养, 挑取单菌落验证筛选转化子, 然后转化 *E. coli* BL21, 将含有 Pet28a-*Ped-A* 质粒的菌株接种于含卡那霉素的液体 LB 培养基中, 37 $^{\circ}$ C, 170 r/min, 摇床培养。取扩大培养体积 0.1% 量的菌液加入含有卡那霉素的 LB 培养基中, 37 $^{\circ}$ C, 170 r/min 振荡培养至 OD<sub>600</sub>=0.4~1.0, 加 IPTG 至终浓度为 1 mmol/L, 37 $^{\circ}$ C 诱导培养过夜, 分别在 2, 6 h 收集菌液, 后放在冰浴上 5 min, 停止菌生长。在相同条件下应用带有质粒 Pet28a 的 *E. coli* (DE3) 菌作为对照组, 同步诱导表达, 离心回收

菌体,裂解,对表达产物进行聚丙烯酰胺凝胶电泳 (Tricine-SDS-PAGE) 分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 *Ped-A* 基因扩增

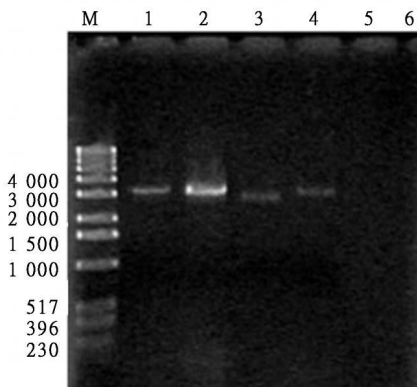
经 PCR 扩增反应之后,1.2% 琼脂糖电泳,EB 染色,紫外下拍照,见图 1。目的基因是 189 bp,加上碱基序列 201 bp,条带在 200 bp 左右出现特异条带,说明 PCR 反应扩增了预计长度的基因序列。



M. DNA 标准; 1. *Ped-A* 基因。  
M. DNA Marker; 1. *Ped-A* Gene.

图 1 PCR 反应凝胶电泳

Fig. 1 Gel electrophoresis of PCR



M. DNA 标准; 1~ 6. 质粒酶切。

M. DNA Marker; 1~ 6. Plasmid digestion.

图 2 重组质粒 pTA2- *Ped-A* 酶切 (*Hind*III) 鉴定

Fig. 2 Identification of recombinant plasmid

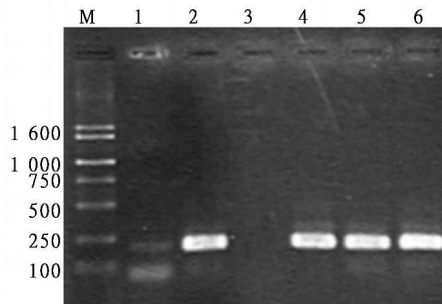
pTA2- *Ped-A* digested with *Hind*III

### 2.2 测序

把 PCR 产物纯化连接到 T 载体后,转化到感受态受体菌,固体 LB 平板培养,挑取几个单菌落,标记 1~ 6 号,提取重组质粒,作为模板,进行酶切鉴定和 PCR 鉴定,琼脂糖电泳,EB 染色,紫外灯下观察并照相。由图 2 可以看出,T 载体为 2 981 bp,连接 *Ped-A* 片段后理论上为 3 182 bp,1~ 4 号重组质粒酶切后 3 000 bp 左右,序列大小基本符合。图 3 中,PCR 鉴定 2,4,5,6 号在 200 bp 左右出现特异的条

带,符合预期结果。

对经过以上两种鉴定方法鉴定后均认为符合要求的 2 号菌进行过夜培养,制备甘油菌,由上海生物工程技术有限公司测定序列。将测得的核苷酸序列用 DNA TOOLS 和 BLAST 分析表明,同源性和 100%,没有氨基酸变异。



M. DNA 标准; 1~ 6. 重组质粒的 PCR 结果。

M. DNA Marker; 1~ 6. Recombinant plasmid by PCR.

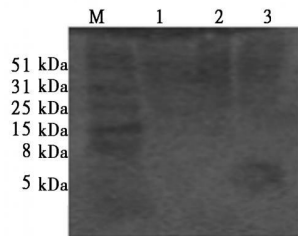
图 3 重组质粒的 PCR 鉴定

Fig. 3 Identification of recombinant

plasmid pTA2- *Ped-A* by PCR

### 2.3 原核表达与鉴定

重组质粒 Pet28a- *ped-A* 转化 BL21 受体菌后,筛选转化子,经 IPTG 诱导表达,聚丙烯酰胺凝胶电泳检测,在紫外下拍照,结果如图 4 所示,1 号泳道是对照菌不含外来质粒的 BL21,2 号泳道是诱导 2 h 的结果,都不含有诱导表达蛋白;3 号泳道是经 1 mmol/L 的 IPTG 诱导 6 h 后表达菌的裂解产物,与对照菌相比,在 5 kDa 附近,出现了一条新的表达带,符合预期结果。工程菌株经培养后,从裂解液中提取重组片球菌素,以单核细胞增多症李氏杆菌为指示菌,发现重组片球菌素具有和天然片球菌素相同的抗菌活性。



M. 标准分子量蛋白; 1. 阴性对照; 2, 3 分别为诱导 2, 6 h 后的表达产物。

M. Protein Marker; 1. Negative control; 2, 3. Expressing production of induced 2, 6 hours.

图 4 乳酸片球菌素的 Tricine-SDS-PAGE

Fig. 4 Tricine-SDS-PAGE analysis of bacteriocin

## 3 讨论

由微生物引起的食品腐败和食源性疾病对食品工业和食品安全造成了很大的危害,为解决这些问题常用的方法是向食品中添加化学防腐剂,但防腐

剂的滥用又造成了新的食品安全问题。寻找安全、无毒副作用的食品防腐剂的必要性显著增加。比较成功的例子就是乳酸链球菌产生的 nisin 作为天然生物防腐剂,已在包括我国在内的世界许多国家获得许可和推广应用。除 nisin 之外,许多乳酸菌也产生具有抗菌作用的细菌素,更多的乳酸菌细菌素有望用作食品防腐剂,以保证食品质量和安全。

本研究室从发酵白菜中分离出一株乳酸片球菌,发现该菌产生的片球菌素,对单核细胞增多症李氏杆菌等革兰氏染色阳性菌有抗菌作用,具有开发为食品生物防腐剂的潜力。我们虽对该菌的培养条件进行了优化,但细菌素产量仍然比较低,只达到 160 AU/mL<sup>[10]</sup>。国外一些研究室分离的乳酸片球菌产生片球菌素的水平也比较低,也难以直接用于工业化生产<sup>[11]</sup>。

基因工程技术为解决野生菌片球菌素产量低的问题提供了一个有效的解决方案。Moon 等<sup>[12]</sup>采用融合表达载体在大肠杆菌中实现了片球菌素的高效表达,提取和纯化的片球菌素具有和天然片球菌素同样的抗菌活性,但该法的缺点是表达产物中的融合蛋白部分需要酶切去除,增加了试验步骤和产品成本。Beaulieu 等<sup>[13]</sup>在毕赤酵母中实现了片球菌素的表达,发现在酵母细胞外有高浓度的重组片球菌素(74 µg/mL),但表达产物无生物活性。因此,片球菌素的基因工程表达还存在不少的问题。为解决我们分离的野生乳酸片球菌细菌素产量低的问题,吸取国外片球菌素异源表达的经验教训,我们根据已发表的乳酸片球菌素基因设计了一对引物,引物两端分别加了 *Nde* I 和 *Bam* H I 两个限制性内切酶位点,以便进行定向克隆,片球菌素基因在大肠杆菌中实现了表达,提取的表达产物对指示菌单核细胞增多症李氏杆菌有抗菌作用。和 Moon 等的方法相比,本研究也采用大肠杆菌表达体系,但没有采用融合表达的方法,因此,重组片球菌素的提取和纯化更加的简便。和 Beaulieu 等的方法相比较,本试验所获得重组片球菌素具有对单核细胞增多症李氏杆菌的抗菌活性。以大肠杆菌为宿主表达片球菌素虽然可以实现高效表达,但由于我们的目标是将片球菌素作为食品防腐剂进行研究,所以仍然有其缺陷,获得许可并推广应用存在争议。但由于在大肠杆菌中实现高效表达,使我们可以方便地获得大量的片球菌素,对开展其结构功能等研究提供了便利。今后,需要探索片球菌素在食用级微生物如酵母和乳酸菌中的异源高效表达,获得成功后可以为片球菌素作为食品防腐剂的开发奠定理论和技术基础。

## 参考文献:

- [1] Cotter P D, Hill C, Ross R P. Bacteriocins: developing innate immunity for food [J]. Food Microbiology, 2005, 3: 777–788.
- [2] Reviriego C, Fernández A, Hom N, et al. Production of pediocin PA–1, and coproduction of nisin A and pediocin PA–1, by wild *Lactococcus lactis* strains of dairy origin [J]. International Dairy Journal, 2005, 15(1): 45–49.
- [3] Willem M de Vos. Gene expression systems for lactic acid bacteria [J]. Ecology and Industrial Microbiology, 1999, 2(3): 289–295.
- [4] 周志江, 韩 烨, 韩 雪, 等. 从酸白菜中分离出一株产细菌素的乳酸片球菌 [J]. 食品科学, 2006, 27(4): 89–91.
- [5] Francisco B E, Wang J K, Dae Y K. Rapid purification, partial, characterization, and antimicrobial spectrum of the bacteriocin, Pediocin AcM, from *Pediococcus acidilactici* M [J]. International Journal of Food Microbiology, 1997, 37(17): 1–11.
- [6] Manugg J D, Gonzalez C F, Kunka B S, et al. Cloning, expression, and nucleotide sequence of genes involved in production of pediocin PA–1, a bacteriocin from *Pediococcus acidilactici* PAC1.0 [J]. Applied and Environmental Microbiology, 1992, 58(8): 2360–2367.
- [7] Schoeman H, Vivier M A, Du Toit M, et al. The development of bactericidal yeast strains by expressing the *Pediococcus acidilactici* pediocin gene (*pedA*) in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. Yeast, 1999, 15(8): 647–656.
- [8] 王延华, 景 强, Pierre Dubus. PCR 理论与技术 [M]. 北京: 科学出版社, 2005.
- [9] 迪芬巴赫 C W, 德维克斯勒 G S. PCR 技术实验指南 [M]. 种 康, 瞿礼嘉 译. 北京: 科学出版社, 1998: 234–256.
- [10] 韩 雪, 周志江. 乳酸片球菌细菌素的活性及特性的研究 [J]. 食品研究与开发, 2006, 27(4): 19–21.
- [11] Nikki H, Maria I M, Jose M M, et al. Enhanced production of pediocin PA–1 and coproduction of nisin and pediocin PA–1 by *Lactococcus lactis* [J]. Applied and Environmental Microbiology, 1999, 65(10): 4443–4450.
- [12] Moon G S, Pyun Y R, Kim W J. Expression and purification of a fusion-typed pediocin PA–1 in *Escherichia coli* and recovery of biologically active pediocin PA–1 [J]. International Journal of Food Microbiology, 2006, 108(1): 136–140.
- [13] Beaulieu L, Groleau D, Miguez C B, et al. Production of pediocin PA–1 in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* reveals unexpected inhibition of its biological activity due to the presence of collagen-like material [J]. Protein Expression and Purification, 2005, 43: 111–125.