

乳链球菌Z270乳糖-蛋白酶质粒pUCL22的 消除及其整合

黄道超 杨现芳

(法国冈大学生物应用研究院微生物遗传实验室)

用简单的温和法消除乳链球菌*Lactococcus lactis* subsp. *lactis* Z270的乳糖-蛋白酶质粒pUCL22(54kb)。DNA普通琼脂糖凝胶电泳图和生化检验证明,变异菌株D16和D17的质粒pUCL22被消除了。脉冲电泳图表明,D16的染色体限制酶图谱与野生菌Z270的相似;但D17的染色体被质粒的蛋白酶基因多位点整合,从而改变了其染色体限制酶的酶切图。

关键词 乳链球菌; 乳糖-蛋白酶质粒; DNA整合

大部分用于发酵工业的乳链球菌有1个或多个质粒DNA^[1]。某些质粒的重要功能已被研究清楚,如乳链球菌712的质粒pMG820控制乳糖发酵^[2];乳酪链球菌Wg2的质粒pWV05控制乳中酪蛋白的降解^[3]。本实验室研究的乳链球菌Z270有唯一的质粒pUCL22(54kb),该质粒拥有与乳糖和乳中酪蛋白代谢有关的全部基因,曾被称为乳糖-蛋白酶质粒^[4]。在实验室研究中,有时非常需要消除了质粒的变异菌株作实验。本文报道消除菌株Z270质粒的结果。经生化代谢试验和脉冲电泳分离DNA,我们发现与酪蛋白水解有关的全部基因整合到染色体DNA中。

材料和方法

(一)试剂

λ -DNA、限制酶,购自GIBCO BRL巴黎分公司。溶菌酶、蛋白酶和化学试剂,购自Sigma巴黎分公司。

(二)菌株和菌株培养

乳链球菌Z270,来自巴黎法国国家

农业研究院; ML3由美国Mckay惠赠^[5],用其已知的质粒为分子量标准。乳链球菌D16和D17为本研究得到的变异菌株。Z270和ML3培养于M17培养液^[6],并按0.5%加入乳糖;或培养于5%灭菌乳。D16和D17培养于M17或5%灭菌乳,并按0.5%加入葡萄糖。D17在灰菌乳中培养时还需加入0.25%酪蛋白水解酶。全部菌株在30℃水浴培养。

(三)消除质粒

采用文献〔7〕方法,即将菌株至于M17-(不含甘油磷酸钠)培养液,并按0.5%加入葡萄糖,30℃水浴培养96h。

(四)质粒DNA的分离

采用文献〔1〕、〔5〕方法。

(五)制备染色体DNA琼脂糖凝胶块

按文献〔8〕方法略加改良。过夜培养菌液,按2%接种于10ml M17中,30℃水浴至OD₆₀₀为0.6—0.8时,按100 μ g/ml加入氯霉素,继续培养1h。经3000 \times g离心10min收集菌体。用10ml缓冲液TEE (100mmol/L Tris-Cl, 10mmol/L

本文于1992年3月5日收到。

EDTA, 10mmol/L EGTA) 洗菌 2 次, 经 $5000 \times g$ 离心 10min 收集的菌体至于 $300 \mu\text{l}$ TEE, 同时加入 60°C 的 1% 低熔点琼脂(GTG) $300 \mu\text{l}$, 立即注入铸模, 并在 4°C 环境 20min 冷却。含菌体的琼脂块被放在溶菌液(5ml TEE, 50mg 溶菌酶) 37°C 16h, 然后转移到蛋白酶液中(5ml TEE, 10mg 蛋白酶K), 42°C 消化 16h。最后, 用 $100 \mu\text{mol/L}$ PMSF (phenylmethanesulfonyl fluoride) 漂洗 2h。按说明加入限制酶 Sma I 和缓冲液, 琼脂块中的染色体 DNA, 在 25°C 16h 期间被切割。

(六) 琼脂糖凝胶脉冲电泳

使用 BIORAD 公司的 CHEF DR II 脉冲电泳仪。按 1% 制备普通琼脂糖凝胶。电泳在 200V, 15°C 电泳缓冲液(50m mol/L Tris-Cl, 1m mol/L EDTA, 50m mol/L 硼酸, pH8) 进行 24h。脉冲梯度递增间歇时间为 1—20 秒。

结果与讨论

(一) 消除质粒 pUCL22

乳链球菌 Z270 在 M17⁻ 培养, 经菌落克隆, 质粒 DNA 分离和凝胶电泳后, 我们发现变异菌株 D16 和 D17 的乳糖-蛋白酶质粒 pUCL22 (54kb) 被消除了(图 1)。用 Api CH50 生化代谢法检验, D16 和 D17 除乳糖代谢阴性外(lac⁻), 其他糖的代谢结果与野生菌 Z270 一致。可以证明 D16 和 D17 是来自 Z270 消除了质粒的变异菌株。D16 在乳液中培养时, 需加入葡萄糖和酪蛋白水解酶。这说明存在于质粒 pUCL22, 与乳糖和酪蛋白代谢有关的基因被破坏了。D17 在乳液中培养时, 只需加入葡萄糖, 而无需加入酪蛋白酶, 4—6h 后, 发酵使乳液凝结。初步认为, 在消除质粒过程中, 乳糖基因被破坏了, 而

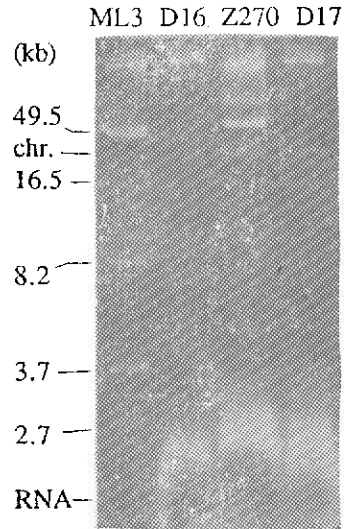


图 1 乳链球菌质粒 DNA 的电泳图

Fig.1 The electrophoretic pattern of plasmid DNA of *Lactococcus lactis*

酪蛋白基因被整合进染色体中。

(二) 染色体 DNA 限制酶图谱的比较

被限制酶 Sma I 切割的染色体和质粒 DNA 经脉冲电泳后, 结果见图 2 和表 1。D16 与 Z270 的染色体图很相似, 分别有 15 和 16 条 DNA 带, 其分子量从 11 至 400kb 不等。图中不难看出, 有些 DNA 带中含有两种或两种以上分子量很接近的片段, 本文不详细说明这个问题。 λ -DNA 表明, 分子量超过 300kb 的片段很难分离。菌株 Z270 的质粒 pUCL22 (54kb) 上有一个 Sma I 位点^[9], 所以在 54kb 范围, 可见有较为明显的一群 DNA 带。变异菌株 D16 没有这一群片段, 再次证明质粒 pUCL22 被消除了。其他 DNA 带的大小与野生菌 Z270 的相似, 说明在消除质粒过程中, 该变异菌株的染色体没有受到影响。

变异菌株 D17 没有 54kb 的质粒带, 这与 D16 的结果是相似的。但 D17 比 Z270 和 D16 多了 5 条长度约为 75 至 160kb 的染色体片段带, 认为这是质粒 pUCL22 被多位

点整合进染色体的结果。由于质粒pUCL22只有一个Sma I 切口, 推理认为, D17也缺失了一些染色体DNA带, 但本实验还不能明显地区别出来, 有待进一步研究。变异菌株D17仍能水解乳中的酪蛋白, 说明与酪蛋白水解有关的基因被整合进一条或多条新的染色体带中。但是与乳糖有关的基因没有被, 或者没有完全被整合, 这与用葡萄糖选择有关。如果用乳糖选择, 是否有可能得到乳糖基因整合进染色体的变异菌株? 如能获得整个质粒无缺失地整合进染色体, 其基因表达与野生菌相同的变异株, 是较理想的。这对研究乳链球菌及其质粒的稳定性, 以及在发酵工业上的应用, 将很有意义。

菌株D17的染色体图的变化和其酪蛋白代谢阳性(prt⁺)已能说明pUCL22局部整合进染色体。我们没有采用DNA-DNA杂交法作验证。因为不同位点的pUCL22片段与染色体有多条杂交带^[9], 所以杂交法在本研究中并非特异性。质粒pUCL22中有两个不同的转位因子即ISS/RS^[10]和IS1076^[11], 每个转位因子有两个拷贝。已查明在染色体中有7—8个ISS/RS和5—6个IS1076的拷贝^[9]。质粒DNA

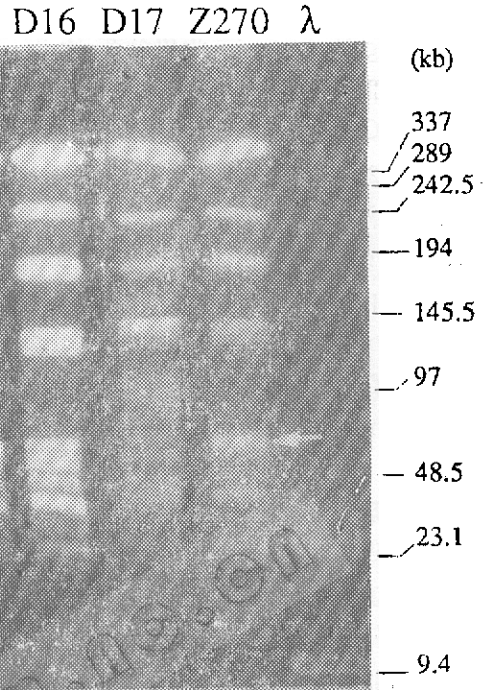


图 2 乳链球菌染色体和质粒DNA Sma I 限制性脉冲电泳图

Fig.2 DNA restriction profiles of *Lactococcus lactis* chromosomal and plasmid DNA after digestion with Sma I and pulsed-field electrophoresis on a 1% agarose gel. Electrophoresis was for 24h, with a pulse time increasing linearly from 1 to 20 s. λ, λ/Hind III and λ oligomers. Arrow indicates the plasmid pUCL22(54kb) DNA band

表 1 乳链球菌染色体和质粒DNA Sma I 限制酶酶切片段分子量
Table 1 Chromosomal and plasmid DNA molecular weight of Sma I fragments of *Lactococcus lactis*.

strain	DNA molecular weight of Sma I fragments(kb)
Z270	>400--240--185--180-----130--120-----60--54--50--45--40--35--28--21--14--11
D16	>400--240--185--180-----130--120-----60-----50--45--40--35--28--21--14--11
D17	>400--240--185--180--160--135--130--120--100--87--75--60-----50--45--40--35--28--21--14--11

整合进染色体的机制是与转位因子(IS)有关, 还是依赖于DNA重组机制, 在未获

得Z270 recA⁻菌株和作深入研究前, 我们还不能下结论。

参 考 文 献

[1] 黄道超等: 遗传, 11(5):26—28, 1989.
[2] De Vos W. M. and Gasson, M. J.: J. Gen. Microbiol., 135:1833—1846, 1989.

- [3] Haandrikman, A.J. et al., *J. Bacteriol.*, 171:2789-2794, 1989.
- [4] Ramos, P. et al., *Ann. Microbiol., Institut Pasteur, Paris*, 134B:387-399, 1983.
- [5] Anderson, D.G. and McKay, L.L.: *Appl. Environ. Microbiol.*, 46:549-552, 1983.
- [6] Terzaghi, B.K. and Sandine N. R.: *Appl. Environ. Microbiol.*, 29:807-813, 1975.
- [7] Sinha, R.P.: *FEMS Microbiol. Letters*, 57:349-352, 1989.
- [8] Tanskanen E.I. et al.: *Appl. Environ. Microbiol.*, 56:3105-3111, 1990.
- [9] Huang, D.C.: Doctoral Thesis, Caen University, France, 1990.
- [10] Huang, D.C. et al., *Gene*, 118:39-46, 1992.
- [11] Huang, D. C. et al.: *FEMS Microbiol. Letters*, 77:101-106, 1991.

Curing and Integration of Lactose-protease Plasmid pUCL22 in *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* Z270

Huang Daochao Yand Xianfang

(Laboratoire de Genetique Microbienne, Institut de Recherche en Biologie
Appliquee(IRBA), Universite de Caen, 14032 Caen Cedex, France)

A simple method for curing *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* Z270 of a lactose-protease plasmid pUCL22 was used. The derivative strain D16 and D17 of Z270 no longer contained the plasmid as seen by electrophoresis. The chromosomal DNA Sma I fragments of D16 were identical to those of the wild strain Z270 in pulsed-field gel electrophoresis. However, the chromosomal DNA restriction profile of D17, which remained protease positive, was different from that of Z270, probably because the protease gene integrated into the chromosome.

Key words *Lactococcus lactis*; lactose-protease plasmid; DNA integration