

NisinZ 的定点突变及突变体性质的研究

袁 静^{1,3} 张振中^{1,2} 杨 巍¹ 陈秀珠¹ 还连栋^{1,2*}

(中国科学院微生物研究所¹ 分子微生物学研究中心和² 微生物资源前期开发国家重点实验室,北京 100080)

³(西北农林科技大学食品科学与工程学院,陕西 712100)

摘 要 以本实验室构建的含 *nisZ* 基因的质粒 pHJ201 为模板,采用定点突变技术将乳链菌肽 Z 分子中 B 环第 8 位 Thr 突变为 Ser(T8S),将第 2 位 Dhb 突变为 Dha 和第 31 位 His 突变为 Lys(T2S/H31K)以及将第 27 位 Asn 突变为 Lys 和第 31 位 His 突变为 Lys(N27K/H31K),以 pMG36e 为载体,电击转化乳酸乳球菌(*L. lactis*)NZ9800 进行表达。对表达产物性质的研究表明,3 个突变体的抑菌谱和溶解度未发生变化,其抑菌活性略有下降,但它们的稳定性表现各不相同。N27K/H31K 的稳定性与 NisinZ 几乎一致,而 T8S 和 T2S/H31K 的稳定性有明显提高,在 pH9 条件下 100℃加热 5min 仍不丧失抑菌活性。

关键词 NisinZ, 定点突变, 稳定性

中图分类号 Q754 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2003)02-0185-05

乳链菌肽(Nisin)是某些乳酸乳球菌(*Lactococcus lactis*)产生的一种小肽,对许多革兰氏阳性菌有强烈抑制作用,是一种被世界 50 多个国家和地区广泛应用的高效、无毒的天然食品防腐剂。成熟的乳链菌肽分子由 34 个氨基酸组成,分子量约 3510。在生物合成过程中,它首先在核糖体上合成前乳链菌肽(Prenisin)分子,随后通过翻译后修饰在特定的位点脱水、形成硫醚桥,产生羊毛硫氨酸和 β -甲基羊毛硫氨酸等稀有氨基酸,最后切除前导肽,赋予乳链菌肽分子以杀菌活性。乳链菌肽分子在低 pH 条件下表现出较高的稳定性和溶解性,而在高 pH 时溶解性低且不稳定,易裂解失活^[1],这就限制了它在食品中应用的范围。因此,人们试图通过基因工程的方法改良乳链菌肽。近年来,许多实验室利用定点突变技术广泛而深入地研究了乳链菌肽分子结构与功能的关系,获得了一些鼓舞人心的结果。如 Rollema 等人得到的含 N27K 和 H31K 的 NisinZ 突变体在中性 pH 条件下溶解度分别提高大约 4 倍和 7 倍^[2], Demel 等人得到的含 T2S 的 NisinZ 突变体对黄色微球菌(*Micrococcus flavus*)和嗜热链球菌(*Streptococcus thermophilus*)的抑菌活性增加 2 倍^[3]。此外, Kuipers 等人得到的含 S3T 的 NisinZ 突变体将 A 环由羊毛硫

氨酸变为了 β -甲基羊毛硫氨酸,对黄色微球菌的抑菌活性剧烈下降^[4]。本实验室从乳链菌肽高产菌株乳酸乳球菌 AL2 的基因文库中筛选到完整的乳链菌肽生物合成基因簇,并克隆和表达了编码乳链菌肽前体的结构基因(*nisZ*)^[5]。本论文采用已克隆到的 *nisZ* 基因为模板,利用定点突变技术,将乳链菌肽分子中 B 环第 8 位的 Thr 突变为 Ser,使 β -甲基羊毛硫氨酸变为羊毛硫氨酸,同时结合前人研究结果,对 *nisZ* 结构基因进行定点突变,并研究了这些突变体的抑菌谱、溶解度和稳定性等性质,为进一步了解乳链菌肽分子结构与功能的关系和利用定点突变技术改造乳链菌肽分子的特性进行了探索。

1 材料与方 法

1.1 菌株与质粒

本文所用菌株和质粒见表 1。

1.2 培养基和试剂

1.2.1 培养基 大肠杆菌的培养用 LB 培养基,必要时加入 100 μ g/mL 的 Amp 或 Em。乳酸菌的培养用 GM17 培养基,必要时加入 5 μ g/mL 的 Em。黄色微球菌用 S1 培养基,其余菌均用 LB 培养基。

1.2.2 工具酶和试剂 限制酶、T4 DNA 连接酶、T4

多核苷酸激酶购自 TaKaRa 公司。ATP、Nisin 购自 Sigma 公司。pfu Taq 酶、DNA 纯化回收 Kit 购自 Bio-

Dev 公司。Site-directed Mutagenesis Kit 购自 Clontech 公司。

表 1 菌株与质粒
Table 1 Strains and plasmids

Strain and plasmid	Relevant properties	Source
pMG36e	Expression vector , Em ^r	J Kok
pUC19	Cloning vector , Amp ^r	Our lab.
pHJ201	pMG36e carrying the <i>nisZ</i> gene	Our lab.
pYWS2731	pUC19 carrying the mutation <i>nisZ</i> gene (AAT→AAA , CAC→AAA)	This paper
pYWS231	pUC19 carrying the mutation <i>nisZ</i> gene (ACA→AGT , CAC→AAA)	This paper
pYWT8S	pUC19 carrying the mutation <i>nisZ</i> gene (ACA→AGT)	This paper
pYJS2731	pMG36e carrying the mutation <i>nisZ</i> gene (AAT→AAA , CAC→AAA)	This paper
pYJS231	pMG36e carrying the mutation <i>nisZ</i> gene (ACA→AGT , CAC→AAA)	This paper
pYJT8S	pMG36e carrying the mutation <i>nisZ</i> gene (ACA→AGT)	This paper
<i>E. coli</i> JM109	<i>recA supE44 endA1 hsdR17 gyrA96 relA1 thi</i> △(<i>lac</i> - <i>proAB</i>) F [<i>traD36 proAB⁺ lacI^q lacZ</i> △M15]	Our lab
<i>L. lactis</i> NZ9800	Tn5276 △ <i>nisA</i> non-nisin producer	NIZO
<i>Bacillus subtilis</i> 63501		Our lab
<i>L. lactis</i> MG1363		Our lab
<i>Staphylococcus aureus</i> 26071		Our lab
<i>Clostridium butyricum</i> (miya)		Our lab
<i>Micrococcus flavus</i> NCIB8166		Our lab
<i>Listeria monocytogenes</i> 54003		Our lab
<i>Shigella flexneri</i> 51285		Our lab
<i>Salmonella</i> 50311		Our lab
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 10105		Our lab

1.3 DNA 操作

大肠杆菌质粒 DNA 提取和转化按文献 [6] , 乳酸乳球菌质粒 DNA 的提取按文献 [7] , 电击转化按文献 [8] , DNA 操作按文献 [6] .

1.4 *nisZ* 基因的定点突变及序列分析

根据本实验室得到的 *nisZ* 结构基因序列 , 设计突变引物 , T8S : 5'-GTATTTCGCTATGAGTCCCGTTG-TAAAACAGG-3' ; T2S/H31K : 一条为 5'-CCACG-CATTAGTAGTATTTTCGC-3' , 突变第 2 位氨基酸 , 另一条为 5'-GTAATTGTAGTATTA44GTAAGCAAATAACC-3' , 突变第 31 位氨基酸 ; M27K/H31K : 5'-GCAACTT-GTAAATGTAGTATT44GTAAGCAAATAACC-3' . 选择性引物 : 5'-GAGTGCACCATGGGAGGTGTGAAAT-3' , 并引入 *Nco* I 酶切位点 . 以上引物均由上海生工公司合成 , 定点突变方法按 Clontech 公司的说明书进行 .

突变产物送上海生工测序 , 经 *Eco* R I / *Hind* III

双酶切后与 pMG36e 连接转化 *L. lactis* NZ9800 .

1.5 突变体表达产物的纯化及 SDS-PAGE 电泳

突变体表达产物粗制品的制备按文献 [9] , 采用阳离子交换树脂 Sephadex CM-25 层析及凝胶 Sephadex G-25 层析纯化 . SDS-PAGE 电泳按 Promega 公司操作手册进行 .

1.6 乳链菌肽突变体最小抑菌浓度 (MIC) 测定

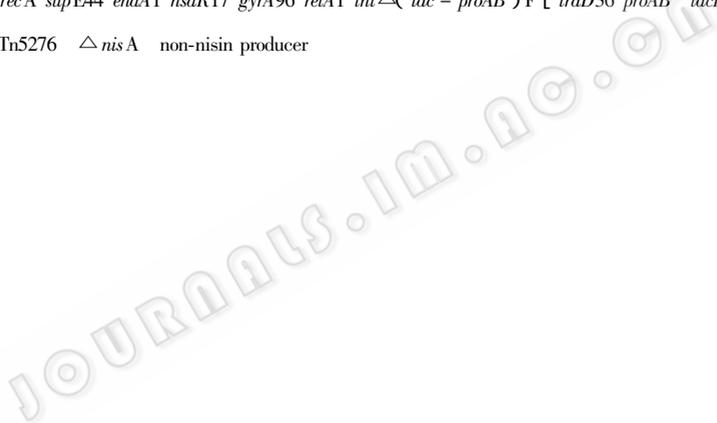
乳链菌肽及其突变体的纯化产物 MIC 的测定方法参见文献 [2] , 指示菌为黄色微球菌 NCIB 8166 .

1.7 抑菌谱测定

选取不同指示菌 (包括常见的食品腐败菌及病原菌) , 采用琼脂平板扩散法测定抑菌活性 .

1.8 稳定性的测定

用 1mol/L 的 HCl 和 NaOH 调突变体粗提液的 pH 分别为 2 , 3 , 4 , 5 , 6 , 7 , 8 , 9 , 10 , 11 , 12 ; 分别在 25℃ , 55℃ 加热 10min , 100℃ 加热 5min , 测定方法参



见文献 [2]。

1.9 溶解度的测定

将各突变体纯化产物溶于 0.15mol/L NaCl 溶液中,调 pH 从 2 至 12,测定方法参照文献 [2]。

2 结果和讨论

2.1 *nisZ* 基因的定点突变

2.1.1 含 T8S 突变的重组质粒构建:成熟的乳链菌肽分子含有 5 个硫醚键形成的内环,其中一个为羊毛硫氨酸(A 环),其它 4 个为 β -甲基羊毛硫氨酸(B、C、D 和 E 环)^[4]。为了考察 B 环结构的改变对乳链菌肽分子功能的影响,我们将乳链菌肽 B 环中第 8 位的 Thr 突变为 Ser,使 β -甲基羊毛硫氨酸突变为羊毛硫氨酸。根据乳酸菌密码子的偏好性,选择 Ser 的密码子为 AGT。突变用 pUC19 载体在大肠杆菌中进行。首先将 pHJ201 上的 *nisZ* 片段用 *EcoR* I 和 *Hind* III 双酶切克隆到 pUC19 上,用 Clontech 公司的 Site-directed Mutagenesis Kit 进行定点突变。提取转化子的质粒(pYWT8S)DNA,经 *Nde* I 和 *Nco* I 酶切验证。若突变成功,原 pUC19 载体上的 *Nde* I 被突变为 *Nco* I,*Nde* I 将不能切开 pYWT8S DNA 而 *Nco* I 能切开。酶切验证(图 1)确如预期。经 DNA 测序,结果也显示得到预期的突变。

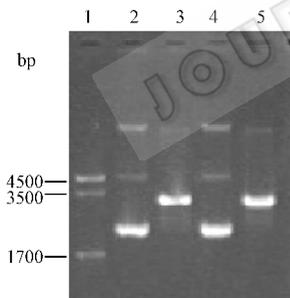


图 1 pYWT8S 酶切的琼脂糖凝胶电泳

Fig.1 Agarose gel electrophoresis of pYWT8S digested by restriction enzymes

1. DNA Marker ; 2. pYWT8S ; 3. pYWT8S/*EcoR* I ;
4. pYWT8S/*Nde* I ; 5. pYWT8S/*Nco* I

用 *EcoR* I 和 *Hind* III 双酶切 pYWT8S DNA,得到含 T8S 突变的 *nisZ* 基因片段,与经同样双酶切的乳酸菌载体 pMG36e 大片段连接,构建重组质粒 pYJ18S,电击转化 *L. lactis* NZ9800,在含红霉素的 GM17 平板上筛选转化子。*L. lactis* NZ9800 是乳链菌肽前体结构基因缺失 4bp 而不能产生有生物活性乳链菌肽的突变体,但乳链菌肽生物合成所需的其它基因是完整的^[11],故使含 T8S 突变的 *nisZ* 基因能

够表达。提取转化子质粒并进行酶切分析,结果与预期一致(图 2)。

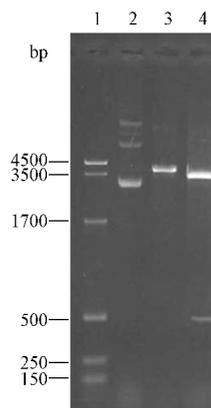


图 2 pYJ18S 重组质粒酶切的琼脂糖凝胶电泳

Fig.2 Agarose gel electrophoresis of recombinant plasmid pYJ18S digested by restriction enzymes

1. DNA Marker ; 2. pYJ18S ; 3. pYJ18S/*EcoR* I ;
4. pYJ18S/*EcoR* I + *Hind* III

2.1.2 含 N27K/H31K 和 T2S/H31K 突变的重组质粒构建:根据前人研究结果,我们将 N27K 和 H31K、T2S 和 H31K 组合到一起,构建成分别含有 N27K/H31K 和 T2S/H31K 的 2 个突变体,以试验能否得到溶解度进一步提高或溶解度和抑菌活性都有改善的 NisinZ 突变体。得到的重组质粒分别命名为 pYJS2731 和 pYJS231。构建方法和程序同前。酶切分析和 DNA 测序结果均如预期。

2.2 乳链菌肽 Z 突变体的纯化及 SDS-PAGE 分析

按材料方法所述,分别对 T8S、N27K/H31K 和 T2S/H31K 乳链菌肽突变体的粗提液进行阳离子交换树脂 Sephadex CM-25 层析纯化,检测各收集管样品的抑菌活性,可知 T8S 乳链菌肽 Z 突变体的活性峰在 110~140 管,NaCl 浓度为 0.3~0.4mol/L 之间,样品回收率为 58.4%。N27K/H31K 和 T2S/H31K 乳链菌肽 Z 突变体的活性峰均在 80~120 管,NaCl 浓度为 0.3~0.4mol/L 之间,样品回收率为 53.6% 和 52.2%。合并所需样品,进行凝胶 Sephadex G-25 层析纯化。T8S 乳链菌肽 Z 突变体纯化结果见图 3。

从图 3 可见,T8S 突变体纯化图谱有两个明显的吸收峰,检测各峰收集管的抑菌活性,第二个峰为活性峰。合并 30-50 管的样品,冷冻干燥,溶于 pH2 的 ddH₂O。电泳结果显示只有一条分子量约为 3.5kD 的蛋白带。N27K/H31K 及 T2S/H31K 乳链菌肽 Z 突变体纯化方法同 T8S。纯化产物的 SDS-PAGE 见图 4。

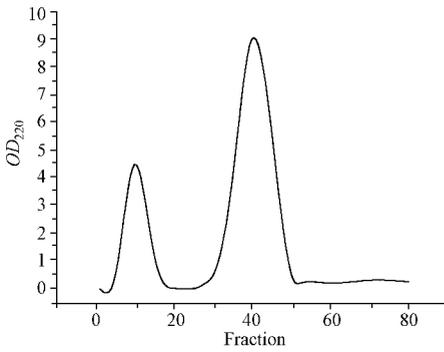


图3 T8S 突变体 Sephadex G-25 层析图谱

Fig.3 Sephadex G-25 chromatography of NisinZ T8S

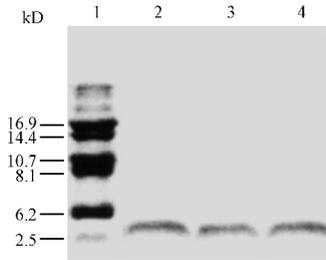


图4 乳链菌肽 Z 突变体纯化产物的 SDS-PAGE

Fig.4 SDS-PAGE of the purified NisinZ mutants

1. Protein size marker ; 2. N27K/H31K ; 3. T2S/H31K ; 4. T8S

2.3 乳链菌肽 Z 突变体的性质研究

2.3.1 突变体的最小抑菌浓度(MIC)试验: 试验重复 3 次,取其平均值。结果表明 NisinZ 的 MIC 值为 $13\mu\text{g/L}$,而 T8S、N27K/H31K 和 T2S/H31K 的 MIC 值分别为 $15\mu\text{g/L}$ 、 $20\mu\text{g/L}$ 和 $17\mu\text{g/L}$ 。说明突变体对黄色微球菌 NCIB 8166 均有抑菌活性,只是活性略有下降,可见这些位点的改变对乳链菌肽的生物活性没有什么大的影响。

2.3.2 突变体的抑菌谱测定 参照乳链菌肽的抑菌

谱,我们选取了 9 株指示菌,包括常见的食品腐败菌及几种病原菌,既有革兰氏阳性菌,也有革兰氏阴性菌,用琼脂平板扩散法测定其抑菌圈。表 2 结果显示,3 个突变体的抑菌谱基本没有改变,与突变前的乳链菌肽 Z 一样。

2.3.3 突变体稳定性的测定: 将突变体粗提液调整 pH 从 2 至 12,分别于 25°C 、 55°C 加热 10min, 100°C 加热 5min,采用琼脂平板扩散法测定抑菌圈。从图 5 可知,乳链菌肽 Z 及其突变体在低 pH 值时均具有较好的稳定性,随着 pH 和温度的升高,活性逐渐降低直至完全丧失。

另外也可看到,在室温下,乳链菌肽 Z 和 N27K/H31K 在 pH2~7 范围内相对稳定, pH8~9 时活性开始剧烈下降,至 pH10 时完全失活;而 T8S 和 T2S/H31K 在低 pH 时抑菌活性虽比乳链菌肽小,但随 pH 值的增加,其活性仅呈缓慢下降, pH12 时仍具有一定的活性。在 55°C 加热 10min, 100°C 加热 5min 处理后,乳链菌肽 Z 和 N27K/H31K 的活性随 pH 值的增加迅速降低,在 pH6 时完全失活;而 T8S 和 T2S/H31K 在 pH9 时仍具有活性。因此, T8S 和 T2S/H31K 在中性或碱性 pH 以及高温条件下,比野生型乳链菌肽 Z 有更好的稳定性。

2.3.4 乳链菌肽突变体溶解性的测定: 将乳链菌肽及其突变体经 Sephadex CM-25 及 Sephadex G-25 层析纯化后的产品,用 0.1mol/L HCl 及 0.1mol/L NaOH 调 pH 从 2 至 12,测定不同 pH 条件下的溶解性,结果表明各乳链菌肽突变体的溶解度与突变前几乎一致。与预期结果不同, T2S/H31K 及 N27K/H31K 的溶解度并未提高,推测可能是由于双突变导致乳链菌肽的空间构型发生一定程度的改变,因此影响了它们的理化特性,具体原因及机理需进一步研究。

表 2 乳链菌肽 Z 突变体抑菌谱

Table 2 The spectrums of antibacterial activity of NisinZ and its mutants

Strains	Antibacterial activity/mm				
	<i>L. lactis</i> NZ9800/pMG36e	NisinZ	N27K/H31K	T2S/H31K	T8S
<i>Baillus subtilis</i> 63501	0	13.80	10.90	10.30	10.84
<i>L. lactis</i> MG1363	0	17.00	13.50	15.00	16.00
<i>Staphylococcus aureus</i> 26071	0	12.66	9.40	11.00	11.30
<i>Clostridium butyricum</i> (miya)	0	14.00	10.00	11.30	10.20
<i>Micrococcus flavus</i> NCIB8166	0	22.37	19.33	20.62	20.54
<i>Listeria monocytogenes</i> 54003	0	11.00	8.06	10.50	9.09
<i>E. coli</i> JM109	0	0	0	0	0
<i>Shigella flexneri</i> 51285	0	0	0	0	0
<i>Salmonella</i> 50311	0	0	0	0	0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 10105	0	0	0	0	0

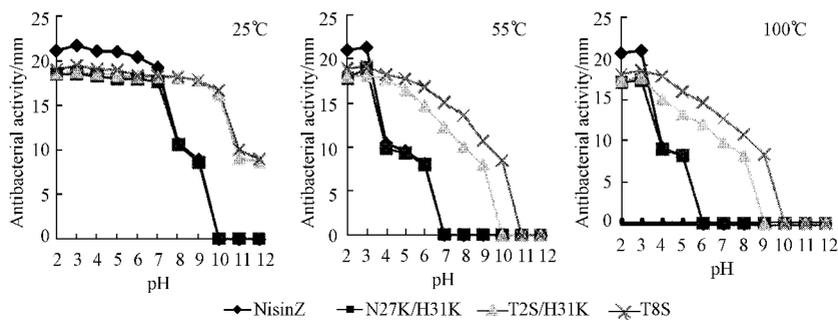


图 5 乳链菌肽 Z 及突变体分别在 25°C、55°C 和 100°C 处理后的抑菌活性

Fig.5 Antibacterial activity of NisinZ and its mutants after treatment at 25°C, 55°C and 100°C

REFERENCES (参考文献)

- [1] HUAN L D (还连栋). NisinZ (乳酸链球菌肽). YOU X (尤新). Functional Fermented products (功能性发酵制品). Beijing :China Light Industry Press (中国轻工业出版社), 2000
- [2] Rollema H S , Kuipers O P , Both P *et al.* Improvement of solubility and stability of the antimicrobial peptide nisin by protein engineering. *Appl Environ Microbiol* , 1995 , **61** :2873 ~ 2878
- [3] Demel R A , Peelen T , Siezen R J *et al.* NisinZ , mutant nisin Z and lactacin 481 interactions with anionic lipids correlate with antimicrobial activity-A monolayer study. *Eur J Biochem* , 1996 , **235** :267 - 274
- [4] Kuipers O P , Rollema H S , Bongers R *et al.* Structure-function relationships of nisin studied by protein engineering. 2nd International Workshop on Lantibiotics , Arnhem , the Netherlands . November 20 - 24 , 1994
- [5] CHEN X Z (陈秀珠) , HU H X (胡海菁) , YANG W (杨巍) *et al.* Cloning and Expression of *nisZ* Gene in *Lactococcus lactis* . *Acta Genetica Sinica* (遗传学报) , 2001 , **28** :285 - 290
- [6] Sambrook J , Fritsch E F , Maniatis T. *Molecular Cloning : A Laboratory Manual*. 2nd ed. New York :Cold Spring Harbor Laboratory Press , 1989
- [7] Anderson D G , McKay L L. Simple and rapid method for isolating large plasmid DNA from lactic streptococci. *Appl Environ Microbiol* , 1983 , **46** :549 - 552
- [8] McIntyre D A , Harlander S K. Improved electroporation efficiency of intact *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* cells grown in defined media. *Appl Environ Microbiol* , 1989 , **55** :2621 - 2626
- [9] Cheeseman G C , Berridge N J. An improved method of preparing nisin. *Biochem J* , 1957 , **65** :603 - 608
- [10] Tramer J , Fowler G G. Estimation of nisin in foods. *J Sci Food Agric* , 1964 , **15** :522 - 528
- [11] Kuipers O P , Beerthuyzen M M , Siezen R J *et al.* Characterization of the nisin gene cluster *nisABTCIPR* of *Lactococcus lactis* requirement of expression of the *nisA* and *nisI* genes for development of immunity. *Eur J Biochem* , 1993 , **216** :281 - 291

Site-directed Mutagenesis of NisinZ and Properties of NisinZ Mutants

YUAN Jing^{1,3} ZHANG Zhen-Zhong^{1,2} YANG Wei¹ CHEN Xiu-Zhu¹ HUAN Lian-Dong^{1,2*}

(¹ Molecular Microbiology Research Center and ² State Key Laboratory of Microbial Resource² ,
Institute of Microbiology , Chinese Academy of Sciences , Beijing 100080 , China)

³(College of Food Science and Engineering , Northwest Sci-Tech University of Agriculture and Forestry , Yangling 712100 , China)

Abstract According to the knowledge gained from engineering of nisinZ , using plasmid pHJ201 DNA as template , NisinZ was mutated by site-directed mutagenesis , NisinZ mutant T8S contains Serine at position 8 instead of Threonine , NisinZ mutant N27K/H31K contains Lysine at position 27 and 31 , respectively , instead of Asparagine and Histidine and NisinZ mutant T2S/H31K contains dehydrobutyrine and Lysine at position 2 and 31 instead of dehydroalanine and Histidine. They are cloned into pMG36e and expressed in *L. Lactis* NZ9800 , the expression products of these mutants purified by Sephadex CM-25 and Sephadex G-25 chromatography , some properties of NisinZ mutants (T8S , T2S/H31K and N27K/H31K) were studied. The results showed that the spectrum of antimicrobial activity and solubility of these mutants had not been changed , their antimicrobial activities were found to be slightly lower than that of the wild-type NisinZ. but mutants T8S and T2S/H31K showed higher stability , which were significantly more stable than wild-type NisinZ at 55 ~ 100°C and pH7 ~ 9.

Key words NisinZ , site-directed mutagenesis , stability

Received : 10-28-2002

This work was supported by the Tenth Five-year Key Program of the State Science and Technology (No. 2001BA708B05-07) and the Innovation Fundation of the Chinese Academy of Sciences.

* Corresponding author. Tel 86-10-62652851 ; Fax 86-10-62581447 ; E-mail : huanld@im.ac.cn 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn