

Nisin A 前体基因 *nisA* 的过量表达对 Nisin A 产量的影响

樊苗苗¹, 邱一敏¹, 刘晨¹, 冀志霞¹, 马昕¹, 虞沂², 陈守文¹

1 华中农业大学 农业微生物学国家重点实验室, 湖北 武汉 430070

2 武汉大学药学院, 湖北 武汉 430071

樊苗苗, 邱一敏, 刘晨, 等. Nisin A 前体基因 *nisA* 的过量表达及其对 Nisin A 产量的影响. 生物工程学报, 2012, 28(10): 1175-1183.

Fan MM, Qiu YM, Liu C, et al. Effect of overexpressing Nisin A structural gene *nisA* on Nisin A production. Chin J Biotech, 2012, 28(10): 1175-1183.

摘要: Nisin 是一种广泛应用于食品工业的抗菌素。通过基因工程手段分别构建了 Nisin A 前体结构基因 *nisA* 的穿梭表达载体 pMG36ek-*nisA* 和整合型载体 pDG780-*nisA*, 并转入 Nisin A 产生菌乳酸乳球菌 *Lactococcus lactis* ATCC 11454 中, 得到两株基因工程菌 FMM1 和 FMM2。对比工程菌和原始产生菌的生长状态及 Nisin A 产量, 结果表明 FMM1 的生长速度、生物量以及发酵液的酸碱度没有显著变化, 而 Nisin A 产量提高了 31%; 相反, FMM2 的生物量较原始菌株显著降低, 但 Nisin A 产量也有一定程度的提高。通过 RT-PCR 检测工程菌与原始产生菌 Nisin A 生物合成基因簇中 11 个基因的转录水平, 结果显示 FMM1 和 FMM2 的 11 个基因的转录水平均有提高, 其中 FMM1 提高更为显著。因此推测, *nisA* 是 Nisin A 高产的关键因素之一, 其游离型过量表达能显著提高 Nisin A 的产量。该研究为采用基因工程手段提高 Nisin A 的产量提供了新的思路, 并对 Nisin A 的大规模工业生产有指导意义, 同时, 也为其他抗菌肽产生菌的基因工程改造提供了参考。

关键词: Nisin A, *nisA*, 乳酸乳球菌 ATCC 11454, 过量表达

Received: March 19, 2012; **Accepted:** May 19, 2012

Supported by: The "Dawn" Program of Wuhan Science and Technology Bureau for Young Scholars (No. 201050231069).

Corresponding author: Shouwen Chen. Tel: +86-27-87283005-8102; E-mail: chenshouwen@mail.hzau.edu.cn

Yi Yu. Tel: +86-27-68752491; E-mail: yu_yi@whu.edu.cn

武汉市科技局晨光计划 (No. 201050231069) 资助。

Effect of overexpressing Nisin A structural gene *nisA* on Nisin A production

Miaomiao Fan¹, Yimin Qiu¹, Chen Liu¹, Zhixia Ji¹, Xin Ma¹, Yi Yu², and Shouwen Chen¹

1 State Key Laboratory of Agricultural Microbiology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, Hubei, China

2 School of Pharmaceutical Sciences, Wuhan University, Wuhan 430071, Hubei, China

Abstract: Nisin is an antimicrobial peptide widely used in food industry. In this study, Nisin A production in *Lactococcus lactis* ATCC 11454 was improved by overexpression of Nisin A structural gene *nisA* through introducing a shuttle expression vector pMG36ek-*nisA* and an integrated vector pDG780-*nisA* into the host strain. The differences of growth profiles and Nisin A production level between the two obtained genetic engineering strains FMM1/FMM2 and the parent strain were investigated. Our results show that while the growth profile (the growth rate, biomass and pH) of FMM1 was similar to the parent strain, its Nisin A production increased 31%. In contrast, the biomass of FMM2 was notably lower than the parent strain, while its yield of Nisin A enhanced slightly. The transcription level of genes involved in Nisin A biosynthesis in both engineering strains was further detected by RT-PCR. We found that all the 11 Nisin A biosynthetic genes in FMM1 and FMM2 had a higher transcription level than those in the parent strain, and these genes exhibited more significant increasing degree of transcription level in FMM1 which hosted the autonomous replicating *nisA* gene. These data suggest that expression of *nisA* may act as a rate-limit factor in Nisin A biosynthesis. In conclusion, this work provides a new method to improve Nisin A production by increasing the transcription level of *nisA*, paving the way to further large-scale industrial production of Nisin A.

Keywords: Nisin A, *nisA*, *Lactococcus lactis* ATCC 11454, overexpression

乳链菌肽 (Nisin), 亦称乳酸链球菌素或尼生素, 是乳酸乳球菌 *Lactococcus lactis* 某些亚种在生长过程中所产生的一类属于羊毛硫抗生素家族的天然活性多肽类细菌素。它对许多革兰氏阳性菌有强烈的抑制作用。1969年, FAO/WHO 食品添加剂联合专家委员会批准 Nisin 作为食品添加剂使用; 1988年, 食品应用工业中评定 Nisin 为公认安全的 (GRAS)^[1]。迄今为止, Nisin 是世界上唯一允许在食品防腐方面使用的抗菌素, 已被 60 多个国家和地区广泛用于食品防腐保鲜中, 并且在医药和轻工业等领域也极具广阔的应用前景。

Nisin 是一种由 34 个氨基酸组成的抗菌肽, 典型特征是分子结构中含有许多稀有氨基酸, 以

及稀有氨基酸之间形成的 5 个硫醚环^[2-3], 其活性分子常以二聚体或是四聚体的形式存在。目前, 已经发现 6 种 Nisin 类型 (A, B, C, D, E, Z), 研究最深入的是 Nisin A 和 Nisin Z^[4]。Nisin 的生物合成涉及到 11 个基因, 其中, *nisA/Z* 是编码 Nisin 的前体肽结构基因^[5], *nisRK* 是 Nisin 生物合成的双组分调控基因^[6], *nisI* 和 *nisFEG* 是 Nisin 抗性基因和免疫基因^[7], 其余基因与 Nisin 后期加工成熟相关^[8-9]。

近年来, 随着 Nisin 市场需求的扩大以及分子生物学技术与理论的成熟, 人们逐渐摒弃传统的菌株改良方法, 进而将目光转向运用基因工程手段获取 Nisin 高产菌株, 并取得一定成效。Kim 等^[10]将 Nisin 生物合成相关的调控和免疫基因

nisRK、*nisFEG* 构建在一个 16 kb 的载体 pND300 上, 在 *L. lactis* ATCC 11454 中过量表达后, 工程菌生长速度加快, 而且 Nisin 产量也提高了 20% 左右; Wu 等^[11]利用 Mu 转座复合体突变技术来提高 Nisin 产量, 其中有 3 个突变体 Nisin 产量降低, 其余的没有提高; 胡红梅等^[12]通过增加 Nisin 产生菌的免疫基因 *nisI* 的拷贝数使 Nisin 产量提高 32%。Cheigh 等^[13]尝试在 Nisin 产生菌中加强表达 *nisZ*、*nisRK*、*nisFEG*, 其中 *nisRK*、*nisFEG* 的加强表达菌株的 Nisin 产量有所提高, 但是菌体生长速度却受到影响, 而 *nisZ* 的加强表达菌株未构建成功。

迄今为止, 还没有关于通过过量表达 *nisA* 来提高 Nisin A 产量的相关报道。本研究首次通过构建前体肽编码基因 *nisA* 的穿梭表达载体和整合载体来提高 *L. lactis* ATCC 11454 中 Nisin A 的产量, 并对产量提高的分子机理进行了初步探索。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 菌株和质粒

大肠杆菌 *Escherichia coli* DH5 α 、藤黄微球菌 *Micrococcus luteus*、乳酸乳球菌 *Lactococcus lactis* ATCC 11454 购自美国菌种保藏中心 ATCC; 大肠杆菌-乳酸菌穿梭表达载体 pMG36ek 为本实验室改造并保存, 是在 pMG36e 的多克隆位点 *Hind* III 位点插入卡那霉素抗性基因片段; 含卡那霉素抗性基因的质粒 pDG780 为本实验室保存; 克隆表达载体 pMD19-T 购自 TaKaRa 公司。

1.1.2 培养基

L. lactis: M17 培养基, 30 °C 静置培养^[14];

E. coli: LB 培养基, 37 °C 振荡培养^[15]; *M. flavus*: 同乳链菌肽效价测定培养基 BHI medium (Difco), 30 °C 静置培养。

1.1.3 工具酶和试剂

pfu DNA 聚合酶、*Ex Taq* 酶、*Taq* DNA 聚合酶、限制性内切酶、T4 DNA 连接酶、T4 DNA 聚合酶、Klenow fragment、溶菌酶、dNTPs、DNA 分子量标准均购自 TaKaRa 公司; Nisin A 标准品购自 Sigma 公司; RNA Extraction Kit 购自 Omega 公司; RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit 购自 Fermentas 公司; 质粒提取试剂盒购自北京庄盟国际生物基因科技有限公司; DNA 片段快速纯化/回收试剂盒购自北京赛百盛基因技术有限公司; 其他试剂均为进口分装或国产分析纯。

1.2 方 法

1.2.1 DNA 的提取

大肠杆菌质粒 DNA 和乳酸菌基因组 DNA 的提取方法参见分子克隆^[15]; 乳酸乳球菌质粒 DNA 的抽提方法参见文献^[16]。

1.2.2 DNA 的酶切、纯化、连接和转化

DNA 的酶切、纯化、连接按 TaKaRa 公司相应试剂说明书进行。

1.2.3 感受态细胞的制备及转化

大肠杆菌的感受态制备和转化参见分子克隆 CaCl₂ 介导转化法; 乳酸乳球菌的感受态制备和电转化根据文献^[17-18]进行。

1.2.4 *nisA* 基因与相关调控元件的拼接合成及重组质粒的构建与鉴定

根据 P32 启动子和 *nisA* 序列各设计一对引物 (表 1)。其中粗体部分为酶切位点, 下划线为 SOE-PCR 重叠引物。

表 1 本研究中所用的 PCR 引物

Table 1 Primers used in this study

Primer name	Primer sequence (5'-3')	Size (bp)
P32-F	TCCCCCGGGAATTCAGATTAATAGTTTTAGCTAT	187
P32-R	<u>GTAAAATCTTTTGTACTCATTTCAA</u> AATTCCTCCGAATAT	
<i>nisA</i> -F	<u>ATATTCGGAGGAATTTTGAAATGAGTACAAA</u> AAGATTTTAAC	202
<i>nisA</i> -R	CCATCGATTTATTTACTTACGTGAATACTACAATGAC	

^a Regions highlighted in bold represent restriction sites; The overlapping region in SOE primers are underlined.

nisA 片段扩增以 *L. lactis* ATCC 11454 总 DNA 为模板, *nisA*-F 和 *nisA*-R 为引物, 反应条件: 95 °C 预变性 5 min; 94 °C 变性 45 s, 42 °C 退火 45 s, 72 °C 延伸 30 s, 共 30 个循环; P32 片段扩增以 pMG36ek 质粒为模板, P32-F 和 P32-R 为引物, 反应条件: 95 °C 预变性 5 min; 94 °C 变性 45 s, 62 °C 退火 45 s, 72 °C 延伸 30 s, 共 30 个循环。以 PCR 纯化产物为模板, P32-F 和 *nisA*-R 为引物, 采用重叠延伸 PCR 方法^[19]拼接合成目的基因 P32-*nisA*。扩增产物用 2.5% 琼脂糖凝胶电泳检测, 并纯化回收。PCR 产物与质粒 pMG36ek 经 *EcoR* I 和 *Cla* I 双酶切后连接, 转化感受态 DH5 α 。涂布于含卡那霉素抗性的 LB 平板, 37 °C 培养。次日挑取单菌落增菌, 提取质粒进行 PCR 和双酶切验证, 并测序确证。构建的游离型载体命名为 pMG36ek-*nisA*; 将构建好的 pMG36ek-*nisA* 质粒用 *Kpn* I 和 *Nsi* I 酶切, 得到 Er-P32-*nisA* 片段, 连接到 pDG780 载体上, 转化验证步骤同上, 得到整合型载体命名为 pDG780-*nisA*。

1.2.5 重组质粒的电转化、筛选及验证

L. lactis ATCC 11454 感受态制备与电转化参考文献[17-18], 电击后涂布于含红霉素的 GM17 平板上, 30 °C 培养 48 h。挑取单菌落在含

红霉素的 GM17 液体培养基中增菌后提取质粒, 因 *L. lactis* ATCC 11454 含内源质粒, 且外源质粒在该菌中拷贝数极低, 故对外源质粒进行以下鉴定: 1) 取适量质粒为模板, 用 P32-F 和 *nisA*-R 为引物进行 PCR 验证。2) 经 PCR 鉴定后的质粒重新转化到感受态 DH5 α , 涂布卡那霉素抗性平板; 次日挑取单菌落增菌, 提取质粒作双酶切鉴定。得到工程菌并命名为 FMM1 和 FMM2, 连续传代十次稳定后, 进行后续试验。

1.2.6 工程菌与原始菌的生长状况的测定与比较

对 FMM1 和 FMM2 的生长曲线和发酵液的 pH 变化进行测定, 实验重复 3 次。

1.2.7 工程菌与原始菌 Nisin A 产量的测定与比较

采用琼脂扩散法, 参考文献[20]并略加改进, 测定 Nisin A 效价。以 Nisin A 标准品作为对照, 测定 FMM1 和 FMM2 对指示菌 *M. flavus* 的抑菌活性实验, 检测其抑菌圈直径, 根据直径大小作标准曲线, 再根据标准曲线公式计算出待测样品的效价; 以原始产生菌 *L. lactis* ATCC 11454 为对照, 实验重复 3 次。

1.2.8 RNA 的提取和 RT-PCR 检测

乳酸乳球菌 RNA 的提取以及反转录参见试剂盒说明书, RT-PCR 以 cDNA 为模板, 反应条件: 95 °C 预变性 5 min; 94 °C, 变性 45 s, 50 °C

退火 45 s, 72 °C 延伸 30 s, 共 30 个循环。琼脂糖凝胶电泳检测 RT-PCR 产物。

2 结果与分析

2.1 PCR 拼接合成目的基因及重组质粒的构建

经琼脂糖凝胶电泳鉴定, SOE-PCR 产物片段约 340 bp, 符合预期片段长度 (图 1)。进一步测序鉴定 (测序图略), 证实与设计序列一致。按照“材料与方法”中的重组质粒构建流程, 得到游离型载体 pMG36ek-*nisA* 和整合型载体 pDG780-*nisA* (图 2), 并验证正确 (图略)。

2.2 工程菌的构建

将游离型载体 pMG36ek-*nisA* 和整合型载体 pDG780-*nisA* 分别电转化到 *L. lactis* ATCC 11454 中, 以红霉素抗性为筛选标记筛选阳性转化子, 进行 PCR 和酶切鉴定 (图略)。结果成功获得 Nisin A 前体结构基因 *nisA* 的过量表达工程菌株 FMM1 和 FMM2。

2.3 重组菌与原始菌的生长状况的测定与比较

为了解 *nisA* 基因的过量表达对宿主菌的生长是否造成影响, 将过夜培养的 FMM1、FMM2

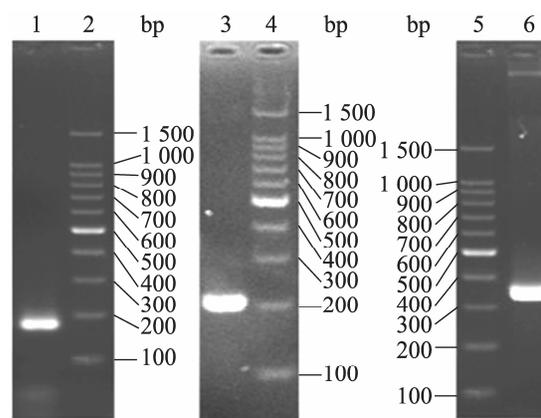


图 1 P32 启动子、*nisA* 及两者重叠延伸 PCR 产物的鉴定

Fig. 1 PCR analysis of P32 promoter, *nisA* gene and their SOE product. 1: P32, a strong constitutive promoter; 2, 4, 5: 100 bp DNA ladder marker; 3: PCR product of *nisA* gene; 6: SOE-PCR product of P32-*nisA*.

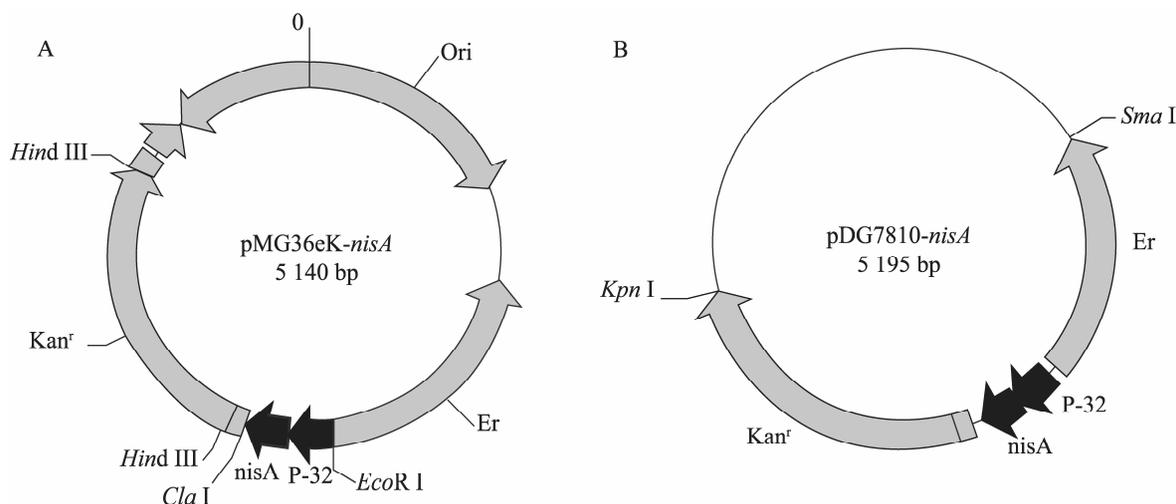


图 2 *nisA* 过量表达载体的图谱

Fig. 2 Map of the recombinant plasmid for *nisA* overexpression. (A) Shuttle expression vector pMG36ek-*nisA*. (B) Integrated expression vector pDG780-*nisA*.

和 *L. lactis* ATCC 11454 分别以 1% 的接种量转接至新鲜的 GM17 培养基中发酵, 每 2 h 取发酵液测定 OD_{600} 和 pH (图 3)。结果表明, 在发酵 24 h 周期内, FMM1 和出发菌株 *L. lactis* ATCC 11454 的生长速率和生物量相近, 表明该工程菌中 *nisA* 基因的导入对细菌生长基本没影响; FMM2 的生物量则比二者低 10% 左右, 推测原因可能是 pDG780-*nisA* 质粒整合入 *L. lactis* ATCC 11454 基因组后, 整合位点周边基因的表达发生变化, 进而对细胞生长造成影响, 具体机制还待深入研究。对 3 株菌发酵液的 pH 检测显示无明显差别。

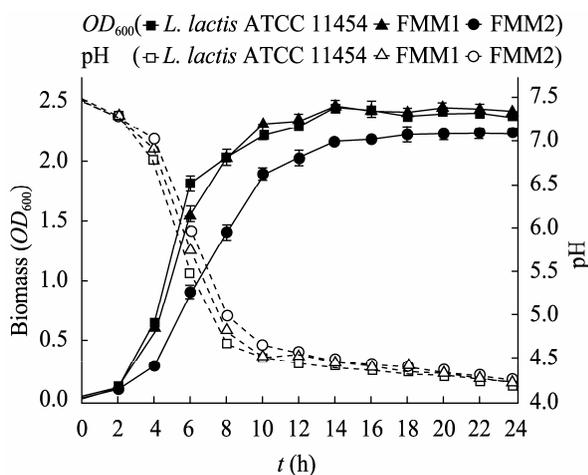


图 3 工程菌 FMM1、FMM2 和野生菌 *L. lactis* ATCC 11454 发酵过程中 OD_{600} 和 pH 变化曲线

Fig. 3 Cell density (OD_{600}) and pH value of FMM1, FMM2 and *L. lactis* ATCC 11454 culture over a 24 h time period of fermentation.

2.4 工程菌与原始菌 Nisin A 产量的比较

为检测 *nisA* 的引入对 Nisin A 产量的影响, 本研究采用琼脂扩散法分别检测工程菌 FMM1、FMM2 和原始菌 *L. lactis* ATCC 11454 的 Nisin A 产量。将过夜培养物分别以 1% 的接种量转接至新鲜的 GM17 培养基中。发酵第 6 h 开始取样, 每 2 h 取一次。以 Nisin A 标准品作对照, 测定

发酵液的抑菌活性 (图 4 和表 2)。结果表明, 进入发酵稳定期后, FMM1 菌株的 Nisin A 产量显著提高 31% 左右; 而 FMM2 菌株的产量提高则稳定在 8% 左右。这说明 *nisA* 的加强表达能够提高 Nisin A 的产量, 因此预测, 进一步改造 *nisA* 游离型表达载体, 可大幅提高 Nisin A 产量, 继而通过对其机制研究和优化培养, 最终应用于 Nisin A 的大规模工业生产。

2.5 工程菌与原始菌的基因表达水平的比较

为进一步了解过量表达 *nisA* 致使 Nisin A 产量提高的机制, 本研究分别提取工程菌和原始菌的总 RNA, 然后通过 RT-PCR 检测工程菌与原始菌 Nisin A 生物合成基因簇中 11 个基因的转录水平 (图 5)。结果显示 *nisA* 的过量表达能够提高 Nisin A 生物合成基因簇的 11 个基因的转录水平, 说明 Nisin A 前体结构基因 *nisA* 过量表达可以促使 Nisin A 基因簇的高效转录, 从而提高 Nisin A 前体的产量, 为其高产提供了可行性策略。

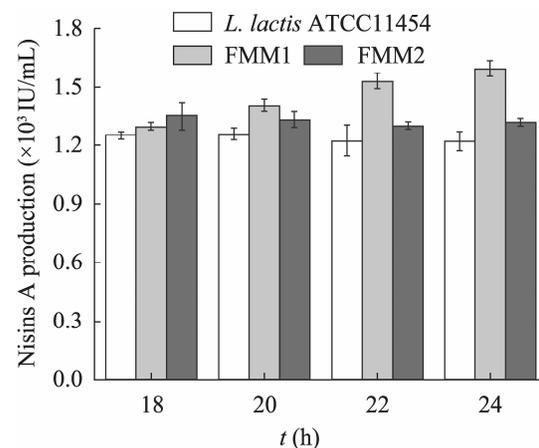


图 4 FMM1、FMM2 和 *L. lactis* ATCC 11454 的 Nisin A 产量的比较

Fig. 4 Comparison of Nisin A production of FMM1, FMM2 and *L. lactis* ATCC 11454.

表 2 Nisin A 产量的比较

Table 2 Comparison of Nisin A production among the three strains in the different time

<i>t</i> (h)	Nisin A production (IU/mL)				
	<i>L. lactis</i> ATCC 11454	FMM1	The percentage increased in production	FMM2	The percentage increased in production
18	1250.53±0.02 ^a	1299.29±0.01 ^b	4	1353.81±0.07 ^b	8
20	1261.35±0.03 ^a	1405.32±0.03 ^b	11	1336.35±0.04 ^b	6
22	1226.30±0.08 ^a	1532.45±0.04 ^b	25	1303.09±0.02 ^b	6
24	1221.20±0.05 ^a	1599.78±0.04 ^b	31	1322.56±0.01 ^b	8

The different letters represent significant difference ($P < 0.05$) according to *t*-test (Student's test) analysis after oneway ANOVA.

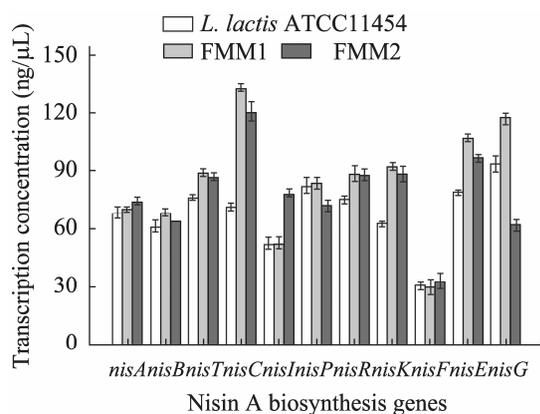
图 5 FMM1、FMM2 和 *L. lactis* ATCC 11454 的 Nisin A 基因簇的转录水平比较

Fig. 5 Comparison of the transcription of Nisin A biosynthesis genes of FMM1, FMM2 and *L. lactis* ATCC 11454.

3 讨论

本研究比较了 Nisin A 前体编码基因 *nisA* 以游离型和整合型方式过量表达对 Nisin A 产量的影响,结果表明 *nisA* 的游离型过量表达对 Nisin A 增产有良好的效果,可能因为提高 *nisA* 拷贝数后能够供应更多的 Nisin A 前体,从而在一定程度上增加了 Nisin A 的产量。另外, *nisA* 整合型过

量表达菌株的 Nisin A 产量也有较大提高,但菌株的生物量明显降低,可能因为外源基因整合入基因组后,整合位点上下游基因的表达受到影响,从而改变了宿主菌生理状态所致。为从分子水平上解释工程菌株 Nisin A 产量提高机理,本研究对工程菌株进行了 RT-PCR 实验,结果表明,游离型工程菌 FMM1 中 *nisA* 的过量表达可以促使 Nisin A 基因簇中大部分基因的高效转录,尤其与前体肽修饰相关的 *nisB* (脱水酶) 和 *nisC* (环化酶) 的转录水平显著增加,从而使 Nisin A 合成量提高 31%;另一方面,整合型工程菌 FMM2 中 *nisA* 的加强表达在一定程度上可以提高 *nisB* 和 *nisC* 的转录水平,但是相比于 FMM1, FMM2 中负责前体肽切割的 *nisP* 转录量降低,这可能是导致其成熟的 Nisin A 产量较低的原因;同时,可能由于 FMM2 的单位菌体 Nisin A 产量增加,其免疫基因 *nisI* 的表达量大幅增加以提高菌体的耐受性,但是具体分子机制还有待进一步揭示。此外,实验结果也暗示 *nisA* 基因对其他 Nisin A 生物合成相关基因的表达具有协同效应,这在 Nisin A 生物合成研究中也是首次报道。

与此同时,本研究也尝试了通过过量表达 *nisRK* 与 *nisFEG* 提高 Nisin A 的产量,结果也能够使 Nisin A 的产量提高(结果未显示),并且根据文献报道^[13],在 Nisin Z 产生菌 *L. lactis* A164 中过量表达 *nisRK* 和 *nisFEG* 能够使 Nisin Z 的产量提高 56%,这与我们的结果一致。因此推测,在 Nisin A 的生物合成过程中调控基因和免疫基因对 Nisin A 产量也有影响,其分子机理还有待进一步探讨。

综合以上结果,本研究一方面通过基因工程手段提高了 Nisin A 的产量,弥补了传统工业生产弊端,为 Nisin A 规模化生产和后续研究奠定了一定的基础;另一方面,相比其他 Nisin 类型,针对 Nisin A 高产工程菌株的构建,优选方案是有效提高其生物合成前体物的供应,本研究将进一步改造 *nisA* 游离型表达载体,并尝试利用其他启动子带动 *nisA* 的高效转录,更大幅度地提高 Nisin A 的产量。

REFERENCES

- [1] Hansen JN. Antibiotics synthesized by posttranslational modification. *Annu Rev Microbiol*, 1993, 47: 535–564.
- [2] Xu QJ, Li XL, Li XX, et al. The natural peptide antimicrobial agent of nisin and its application of food preservation. *Food Res Dev*, 2008, 29(4): 177–182.
徐启军,黎锡流,李晓玺,等.天然多肽抗菌活性物质 Nisin 及其在食品抗菌保鲜中的应用. *食品研究与开发*, 2008, 29(4): 177–182.
- [3] Ross AC, Vederas JC. Fundamental functionality: recent developments in understanding the structure-activity relationships of lantibiotic peptides. *J Antibiot (Tokyo)*, 2011, 64(1): 27–34.
- [4] Kramer NE, Smid EJ, Kok J, et al. Resistance of Gram-positive bacteria to nisin is not determined by lipid II levels. *FEMS Microbiol Lett*, 2004, 239(1): 157–161.
- [5] Engelke G, Gutowski-Eckel Z, Hammelmann M, et al. Biosynthesis of the lantibiotic nisin: genomic organization and membrane localization of the NisB protein. *Appl Environ Microbiol*, 1992, 58(11): 3730–3743.
- [6] Engelke G, Gutowski-Eckel Z, Kiesau P. Regulation of nisin biosynthesis and immunity in *Lactococcus lactis* 6F3. *Appl Environ Microbiol*, 1994, 60(3): 814–825.
- [7] Kuipers OP, Beerthuyzen MM, Siezen RJ, 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(1): 281–291.
- [8] van der Meer JR, Rollema HS, Siezen RJ, et al. Influence of amino acid substitutions in the nisin leader peptide on biosynthesis and secretion of nisin by *Lactococcus lactis*. *J Biol Chem*, 1994, 269(5): 3555–3562.
- [9] Koponen O, Tolonen M, Qiao M, et al. NisB is required for the dehydration and NisC for the lantionine formation in the post-translational modification of nisin. *Microbiology*, 2002, 148(11): 3561–3568.
- [10] Kim WS, Hall RJ, Dunn NW. Improving nisin production by increasing nisin immunity/resistance genes in the producer organism *Lactococcus lactis*. *App Microbiol Biotechnol*, 1998, 50(4): 429–433.
- [11] Wu Z, Xuanyuna Z, Li R, et al. Mu transposition complex mutagenesis in *Lactococcus lactis*—identification of genes affecting nisin production. *J Appl Microbiol*, 2009, 106(1): 41–48.
- [12] Hu HM, Jiang LK, Lin YH, et al. Enhanced nisin production by overexpression of nisin immunity gene *nisI* in the nisin-producing strain. *Acta Microbiol Sin*, 2010, 50(10): 1341–1346.
胡红梅,蒋立科,林宇恒,等.乳链菌肽自身免疫基因 *nisI* 的表达对乳链菌肽产量的影响. *微生物*

- 物学报, 2010, 50(10): 1341–1346.
- [13] Cheigh CI, Park H, Choi HJ, et al. Enhanced nisin production by increasing genes involved in nisin Z biosynthesis in *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* A164. *Biotechnol Lett*, 2005, 27(3): 155–160.
- [14] Guo ZW. Genetic breeding of *Lactococcus lactis* ATCC11454 for high-yield nisin strain [D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2007. 郭志伟. 乳酸乳球菌 ATCC11454 高产乳链菌肽的遗传育种[D]. 武汉: 华中农业大学, 2007. (未链接到本条文献信息)
- [15] Sambrook J, Russell DW, ed. Huang PT, et al, *Trans. Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 3rd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2002. Sambrook J, Russell DW, 著. 黄培堂, 等译. 分子克隆实验指南. 3 版. 北京: 科学出版社, 2002.
- [16] O'sullivan DJ, Klaenhammer TR. Rapid mini-prep isolation of high-quality plasmid DNA from *Lactococcus* and *Lactobacillus* spp. *Appl Environ Microbiol*, 1993, 59(8): 2730–2733.
- [17] Gerber SD, Solioz M. Efficient transformation of *Lactococcus lactis* IL1403 and generation of knock-out mutants by homologous recombination. *J Basic Microbiol*, 2007, 47(3): 281–286.
- [18] Turgeon N, Laflamme C, Ho J, et al. Elaboration of an electroporation protocol for *Bacillus cereus* ATCC 14579. *J Microbiol Methods*, 2006, 67(3): 543–548.
- [19] Xu F, Yao QH, Xiong AS, et al. SOE PCR and its application in genetic engineering. *Mol Plant Breed*, 2006, 4(5): 747–750. 徐芳, 姚泉洪, 熊爱生, 等. 重叠延伸 PCR 技术及其在基因工程上的应用. *分子植物育种*, 2006, 4(5): 747–750.
- [20] Wolf CE, Gibbons WR. Improved method for quantification of the bacteriocin nisin. *J Appl Bacteriol*, 1996, 80(4): 453–457.