

一株具有谷胱甘肽合成能力的乳酸乳球菌 的分离与初步研究*

付瑞燕^{1,2,*} 陈 坚¹ 李 寅^{3,*}

(江南大学工业生物技术教育部重点实验室 江南大学生物工程学院 无锡 214036)

(安徽农业大学茶与食品科技学院 合肥 230036)

(中国科学院微生物研究所 北京 100101)

摘要 基于 *gshB* 基因同源性分析设计引物,从采集的菜园地土壤中分离到 1 株具有谷胱甘肽(GSH)合成能力的乳酸乳球菌菌株 CCSYU10100。测定了该菌株的 16S rDNA 序列并根据 16S rDNA 序列构建了系统发育树,结果显示该菌株与乳酸乳球菌乳脂亚种在进化关系上的地位最近。电镜分析表明,菌株 CCSYU10100 与乳酸乳球菌的形态特征基本一致。因此认为菌株 CCSYU10100 属于乳酸乳球菌乳脂亚种,命名为乳酸乳球菌乳脂亚种 CCSYU10100。HPLC 法鉴定出该菌株胞内除 GSH 外,还存在半胱氨酸-甘氨酸。乳酸乳球菌 CCSYU10100 的部分 *gshB* 基因与假单胞菌属的 *gshB* 基因高度同源,这是 *gshB* 基因在乳酸乳球菌中、甚至是革兰氏阳性菌中的首次发现。

关键词 谷胱甘肽 乳酸乳球菌 分离 鉴定

中图分类号:Q93 文献标识码:A 文章编号:0253-2654(2007)06-1057-09

Isolation and Identification of a Strain *Lactococcus lactis* ssp. with Glutathione Biosynthetic Capability*

FU Rui-Yan^{1,2,*} CHEN Jian¹ LI Yin^{3,*}

(The Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education; School
of Biotechnology, Southern Yangtze University, Wuxi 214036)

(School of Tea and Food Science, Anhui Agricultural University, Hefei 230036)

(Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101)

Abstract A bacterial strain that produces glutathione(GSH) was screened from vegetable garden soil based on a polymerase chain reaction(PCR) protocol which could rapidly and specifically identify the *gshB* gene coding for GSH synthetase. Phylogenetic analysis based on 16S rDNA revealed that this strain belongs to *L. lactis* ssp. *cremoris*. Scanning electron microscope analysis indicated that its morphology characteristics were most consistent with *Lactococcus lactis*. So we suggested that the strain belonged to *L. lactis* ssp. *cremoris* and named *L. lactis* CCSYU10100. The intracellular level of GSH in stationary-phase cells of strain CCSYU10100 grown aerobically in chemically-defined medium was 2.39 ± 0.21 nmol/mg protein. Other than GSH, cysteinylglycine was identified by HPLC. The partial *gshB* gene sequence and the deduced amino acid sequence of strain CCSYU10100 were highly similar with that of *Pseudomonas* among different microorganisms, which indicated that strain CCSYU10100 probably possesses independent *gshB* gene. Noticeably, the GC content of the partial *gshB* gene of strain CCSYU10100 was 61.55%, and the GC content of whole genome of *L. lactis* is 35%–40%, which suggested that the *gshB* gene might not be an inherent part of strain CCSYU10100. Considering *Pseudomonas fluorescens* exists in the soil widely, it was speculated that the origin of *gshB* gene of strain CCSYU10100 was from *Pseudomonas fluorescens* by lateral gene transfer. The deduced amino acid sequence of strain CCSYU10100 contained two conserved domain, i. e., prokaryotic GSH synthetase, N-terminal domain (2nd ~ 58th amino acid residues)(identities 44.5%) and prokaryotic GSH synthetase, ATP-binding domain(61st ~ 221st amino acid residues)(identities 93.4%). To our knowledge, this is the first report showing *gshB* gene exists in *Lactococcus lactis*, even in Gram-positive bacteria.

Key words Glutathione, *Lactococcus lactis*, Isolation, Identification

* 国家自然科学基金项目(No. 30300009)安徽农业大学稳定和引进人才科研资助项目

** 通讯作者 Tel: 010-64807485, E-mail: yli@im.ac.cn; furuiyan2002@yahoo.com.cn

收稿日期: 2007-01-22, 修回日期: 2007-04-26

谷胱甘肽 (glutathione, GSH) 主要存在于革兰氏阴性菌和几乎所有的真核生物中, 少数不含线粒体的真核微生物除外^[1]。仅在少数低 GC 含量的革兰氏阳性菌中发现 GSH 的存在, 如变异链球菌 (*Streptococcus mutans*) ATCC 25175、无乳链球菌 (*S. agalactiae*) ATCC 12927、嗜热链球菌 (*S. thermophilus*) ATCC19258 和粪肠球菌 (*Enterococcus faecalis*) JH2-2^[1]。

目前已知的 GSH 合成途径包括 2 个由 ATP 参与的步骤^[2]: L-谷氨酸和 L-半胱氨酸在 γ -谷氨酰半胱氨酸合成酶 (γ -glutamyl-cysteine synthetase, EC 6.3.2.2, γ -GCS) (GshA) 的催化下生成 γ -谷氨酰半胱氨酸 (γ -glutamyl-cysteine, γ -GC), 随后在谷胱甘肽合成酶 (glutathione synthetase, EC 6.3.2.3, GS) (GshB) 的催化下, γ -GC 与甘氨酸缩合形成 GSH。但是, 与谷胱甘肽还原酶 (glutathione reductase, GR) 和谷胱甘肽过氧化物酶 (glutathione peroxidase, GPo) 在革兰氏阳性菌中较为普遍的存在形成鲜明对比的是, 迄今为止, 还没有直接证据表明在革兰氏阳性菌中存在 GSH 生物合成所需要的两个酶: GshA 和 GshB 相应的编码基因 *gshA* 和 *gshB*。值得注意的是, Copley and Dhillon^[3]对 NCBI 蛋白质数据库的搜索表明, 某些革兰氏阳性菌中具有与 *gshA* 基因高度相似的基因。然而, 在这些革兰氏阳性菌中他们并没有发现与 *gshB* 基因相似的基因。并且, 部分具有假定 (putative) *gshA* 基因的革兰氏阳性菌, 如结核分枝杆菌 (*Mycobacterium tuberculosis*)、圈卷产色链霉菌 (*Streptomyces coelicolor*) 和丙酮丁醇梭菌 (*Clostridium acetobutylicum*) 并不能合成 GSH^[1,4]。因而, *gshA* 相似基因的存在与 GSH 的合成并没有因果关联。

作者的前期研究表明, GSH 在革兰氏阳性菌的模式菌乳酸乳球菌 (*Lactococcus lactis*) NZ9000^[5] 和乳酸乳球菌 SK11 抵抗氧化胁迫中具有保护作用, 并且讨论了依赖于 GSH 的还原系统即 GSH-GR-GPo 存在的可能性。King 等报道了化脓性链球菌 (*S. pyogenes*) 的 *gpO* (GPo 编码基因) 突变株对氧化剂的敏感度增加^[6]。近来的研究也表明, GSH 在革兰氏阳性菌的抗氧化胁迫中可能具有重要作用^[7]。那么, 是否革兰氏阳性菌整体缺乏 *gshA* 和 *gshB* 基因? 国际上对此还没有定论。为此, 进行了产 GSH 的乳酸乳球菌的筛选研究。本文报道了 1 株具有 GSH 合成能力的

乳酸乳球菌的筛选及鉴定过程。基于 *gshB* 基因同源性分析设计引物, 从土壤中初筛得到的菌株中克隆目标基因, 得到了阳性菌株后进行了菌株的鉴定, 结果表明获得了 1 株产 GSH 的乳酸乳球菌菌株。

1 材料和方法

1.1 菌株

大肠杆菌 (*Escherichia coli*)、金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) 和枯草芽胞杆菌 (*Bacillus subtilis*) 为本实验室研究保存菌株^[8,9]。乳酸乳球菌乳脂亚种 (*L. lactis* ssp. *cremoris*) NZ9000 为荷兰国家乳品研究所 (NIZO Food Research) Jeroen Hugenholtz 博士惠赠。

1.2 试剂

Pyrobest DNA 聚合酶购自 TaKaRa 公司。蛋白酶 K、溶菌酶、十六烷基三甲基溴化铵、饱和酚均购自华美生物工程公司。M17 培养基购自 Oxoid 公司。GR、NADPH、5, 5'-二硫双-(2-硝基苯甲酸) (DTNB)、GSH、半胱氨酸、 γ -谷氨酰半胱氨酸 (γ -glutamyl-cysteine, γ -GC) 和半胱氨酸-甘氨酸、N-(1-pyrenyl) maleimide (NPM) 均购自 Sigma 公司。其它试剂均为国产分析纯。

1.3 培养基和培养条件

乳酸乳球菌选择性培养基 (g/L): 酪蛋白胨 10, 酵母粉 4, 葡萄糖 20, K_2HPO_4 2, 柠檬酸氢二铵 2, 乙酸钠 5, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.2, $MnSO_4$ 0.04, LiCl 2, pH 5.5。待灭菌后的培养基温度降至 50℃ 左右时加入终浓度为 14 μ g/mL 的制霉菌素。乳酸乳球菌增殖培养基: 补充终浓度为 5 g/L 葡萄糖的 M17 培养基 (GM17) 或化学合成培养基 (chemically defined medium, 以下简称 CDM)^[10]。

培养条件: 取一环斜面菌体接种到 15 mL 相应的培养基中, 在 30℃ 下振荡培养 (200 r/min) 24h。

1.4 土壤中筛选菌种方法

初筛: 取 1 g 土样放于三角瓶中, 加入 10 mL 无菌生理盐水 (0.85% NaCl, W/V), 于 30℃ 下振荡 (200 r/min) 20 min, 将土悬液倒入试管中, 待其自然沉降后, 取 1 mL 上清液至灭过菌的乳酸乳球菌选择性培养基中, 于 30℃ 下振荡培养 2 d。取培养液适当稀释后, 取 0.2 mL 涂布于筛菌平板培养。挑取生

长快、菌落大的菌株进一步纯化分离后得到初筛菌株。

复筛:以初筛得到的菌株的基因组 DNA 为模板,以序列 2U+2D 为引物进行 PCR,将具有阳性克隆的菌株接到 CDM 培养基中,于 30℃ 下振荡培养 24h 后,测定胞内 GSH 含量。

1.5 革兰氏阳性菌的鉴别

采用革兰氏染色法。

1.6 *gshB* 部分基因的扩增

基因组 DNA 的提取参照文献 [11] 进行。引物序列如下:2U:5'-TATATGGAGATGGGCGATCT-3'; 2D:5'-GGGCTGGTGACGTTAATTC-3'。PCR 反应条件如下:94℃ 预变性 4 min,随后 95℃ 变性 15 s,40℃ 复性 30 s,72℃ 延伸 2 min,30 个循环,最后 72℃ 保温 10 min。

1.7 无细胞提取物的制备和蛋白质分析

从 10 mL 培养液中离心收集乳酸乳球菌细胞(10000 r/min, 10 min, 4℃),用冰冷的生理盐水洗涤 2 次,重悬于 1 mL 去离子水中。将 1 mL 细胞悬浮液转入装有 1 g 石英砂的小管中,在 4℃ 下,用 FastPrep DNA 提取仪破壁(30 s × 2),随即离心(10000r/min, 10 min)去除细胞碎片,得到 CFE。用 Bradford 法测定蛋白质浓度^[12],以牛血清白蛋白作为标准蛋白。

1.8 GSH 浓度的测定

用 DTNB-GR 循环法测定 GSH 浓度^[13]。

1.9 硫醇的测定

根据文献 [14],用 NPM 荧光标记高效液相色谱法(HPLC)测定胞内硫醇含量(GSH、半胱氨酸、 γ -GC 和半胱氨酸-甘氨酸)。样品的制备:取用水稀释好的样品溶液 1 mL,加入 1 mL 乙腈和 2 mL 1.5 mmol/L NPM 乙腈溶液,混匀后在室温保温 5 min,加入 40 μ L 50%(V/V)乙酸水溶液后用 0.22 μ m 孔径的微滤膜过滤。HPLC 色谱分离柱:Astec(4.6 mm × 100 mm);柱材料: C_{18} ;流动相:以 1:3 的比例混合溶液 A 和溶液 B。溶液 A:含有 1 mL/L 乙酸和 1 mL/L 磷酸的 20% 的乙腈水溶液;溶液 B:含有 1 mL/L 乙酸和 1 mL/L 磷酸的 80% 的乙腈水溶液;流动相流速:0.5 mL/min;荧光检测波长:激发波长 330nm,发射波长 380nm;进样量:10 μ L;柱温:25℃。

1.10 16S rDNA 的扩增

基因组 DNA 的提取参照文献 [11] 进行。

采用细菌 16S rDNA 通用引物进行 PCR 扩增,其引物序列如下:27-F:5'-AGAGTTGATCTGG-CTCAG-3';1492-R:5'-GGTACCTTGTACGACTT-3'。PCR 反应条件如下:94℃ 预变性 2 min,随后 94℃ 变性 15 s,45℃ 复性 30 s,72℃ 延伸 2 min,30 个循环,最后 72℃ 保温 10 min。

1.11 DNA 测序

菌株 3C 的 16S rDNA、乳酸乳球菌 NZ9000 的 16S rDNA 及 *gshB* 基因中间片段的 PCR 产物经 PCR 纯化试剂盒(Roche, Germany)纯化后用于测序。测序反应在 MWG Biotech(Ebersberg, Germany)进行。分别以 27-F 和 1492-R 为引物,对菌株 3C 和乳酸乳球菌 NZ9000 的 16S rDNA 的 PCR 产物进行双向测序。分别以 2U 和 2D 为引物,对菌株 3C 的 *gshB* 基因中间片段的 PCR 产物进行双向测序。用 DNA star 软件包中的 SeqMan 软件对序列文件进行组装,输出可信用度符合要求的共有序列(consensus sequence)。

1.12 系统发育分析

将菌株 3C 和乳酸乳球菌 NZ9000 的 16S rDNA 序列通过 Blastn 与 GenBank 中核酸数据库(<http://ncbi.nlm.nih.gov/blast>)进行比对分析,同时采用 DNA star 软件包中的 MegAlign 软件与其它 22 株已被报道的乳酸乳球菌菌株的 16S rDNA 序列进行同源性分析,并构建系统发育树。用于系统发育树构建的分离菌株和相关参比菌株的名称、菌株编号和序列登录号见表 1。

表 1 用于系统发育树构建的分离菌株和相关参比菌株的名称、菌株编号和序列登录号

亚种	菌株	登录号
乳酸乳球菌乳脂亚种	NCDO 607T	AB100802
乳酸乳球菌乳脂亚种	NIRD 924	AB100794
乳酸乳球菌乳脂亚种	NIRD HC-1	AB100793
乳酸乳球菌乳脂亚种	NIRD Ho-6	AB100791
乳酸乳球菌乳脂亚种	NIAI H-61	AB100792
乳酸乳球菌乳酸亚种	IL1403	AE006456
乳酸乳球菌乳酸亚种	NCDO 604T	AB100803
乳酸乳球菌乳酸亚种	NIAI SLN	AB100797
乳酸乳球菌乳酸亚种	NIAI 527	AB100795
乳酸乳球菌乳酸亚种	NIRD SC-10	AB100798
乳酸乳球菌乳酸亚种	14456	AJ421069

续表

亚种	菌株	登录号
乳酸乳球菌乳酸亚种	LL3	AJ419572
乳酸乳球菌乳酸亚种	K335	AB118033
乳酸乳球菌乳酸亚种	K336	AB118034
乳酸乳球菌乳酸亚种	K337	AB118035
乳酸乳球菌乳酸亚种	K338	AB118036
乳酸乳球菌乳酸亚种	—	AB083092
乳酸乳球菌双乙酰乳酸亚种 (<i>L. lactis</i> ssp. <i>diacetylactis</i>)	NIAI N-7	AB100799
乳酸乳球菌双乙酰乳酸亚种	NIRD DRC-1	AB100800
乳酸乳球菌双乙酰乳酸亚种	NIRD DRC-2	AB100801
乳酸乳球菌双乙酰乳酸亚种	ATCC 13675	AB100805
乳酸乳球菌叶蝉亚种 (<i>L. lactis</i> ssp. <i>hordniae</i>)	NCDO 2181T	AB100804

1.13 扫描电镜样品的制备

将样品离心(2500 r/min, 5 min)后,在4℃下,用2.5%的戊二醛固定,用0.1 mol/L磷酸缓冲液漂洗数次。离心(2500 r/min, 5 min)后用1%的四氧化锇固定,再用0.1 mol/L磷酸缓冲液漂洗数次。每隔15 min依次使用30%、50%、70%、90%、100%浓度的乙醇梯度脱水,用醋酸异戊酯过渡。将其进行干冰临界点干燥,离子溅射。最后用扫描电镜观察并摄片。

2 结果

2.1 乳酸乳球菌选择性培养基的确定

由于乳酸乳球菌选择性培养基未见报道,因此,首先进行了培养基的设计。据文献报道,氯化锂可抑制革兰氏阴性细菌生长,丙酸对革兰氏阴性菌也有较好的抑菌效果,酸性条件(pH 5.5)利于长双歧杆菌的选择性生长^[15]。因此,以大肠杆菌为革兰氏阴性菌代表性菌株、以乳酸乳球菌 NZ9000 为乳酸乳球菌代表性菌株、以金黄色葡萄球菌和枯草芽胞杆菌为除乳酸菌外的革兰氏阳性菌代表性菌株,在改良 MRS 培养基的基础上添加不同抑制因子进行了选择性乳酸乳球菌培养基的研究。

结果显示(表2),大肠杆菌、金黄色葡萄球菌和枯草芽胞杆菌在B培养基中均无菌落长出,而乳酸乳球菌可以生长,说明B培养基对乳酸乳球菌有较好的选择性。因此,将B培养基作为乳酸乳球菌选择性培养基。

表2 实验菌株在不同选择性培养基中的生长状况比较

培养基	添加	乳酸乳球菌	大肠杆菌	金黄色葡萄球菌	枯草芽胞杆菌
A	2 g/L 氯化锂	+	+	+	+
B	2 g/L 氯化锂, pH 5.5	+	-	-	-
C	2 g/L 氯化锂, 4 mL/L 丙酸	-	-	-	-

注: + 表示菌株生长, - 表示菌株不生长

2.2 产 GSH 的乳酸乳球菌的初筛

土壤是微生物的大本营。土壤为微生物提供了良好的生活环境,土壤里有丰富的矿物元素和有机营养底物,在有良好团粒结构的土壤中,既有水分和空气,又有厌氧环境。土壤的 pH 也适合大多数微生物的要求,昼夜温差小,还可避免太阳光中紫外光的照射,因此,土壤也应是乳酸菌的良好生活环境。土壤中乳酸菌数量和种类,取决于土壤中含有的可发酵性基质及其它环境条件。在一般情况下,耕作土壤有机质丰富,所以乳酸菌较多^[16]。因此在土质肥沃的菜园地土壤中采集土样10份。通过乳酸乳球菌选择性培养基的平板分离纯化,共得到22株生长快、菌落大的菌株进行进一步的复筛,并做菌体形态观察。用革兰氏染色法对这22个菌株进行镜检,结果显示所检的都是革兰氏阳性菌。菌落形态比较一致:圆形,乳白色,表面光滑,突起,边缘整齐,不透明,质地软。并且,细胞呈现多种形态,有短杆状、长杆状、球形和卵圆形,单生、成对排列或成链状。

2.3 引物的设计及产 GSH 的乳酸乳球菌的复筛

采用 Clustal W 软件将 GenBank 核酸数据库中的革兰氏阴性菌和酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)的 *gshB* 全长序列进行比对分析,发现革兰氏阴性菌和酿酒酵母的同源性很差,这与文献报道的一致^[3]。因此以革兰氏阴性菌为比对对象,找出高度同源性序列作为扩增 *gshB* 部分基因的引物。通过基因序列比对,发现 TATATGGAGATGGCCGATCT 和 GAAATTAACGTCACCAGCCCAAC 这两段序列较为保守,即。因此根据这两段序列来设计扩增 *gshB* 部分序列的上下游引物,分别命名为 2U 和 2D,对初筛得到的22个菌株进行进一步复筛。结果显示只有1个菌株扩增出大小在750 bp左右的条带(图1),将该菌株编号为3C。

2.4 菌株 3C 的系统发育树分析与形态鉴定

获得分离菌株 3C 的 16S rDNA 序列,共 1490 bp,并通过 Blastn 与 GenBank 中已知的各种微生物核苷酸序列进行相似性比对,寻找同源核苷酸序列,结果显示,菌株 3C 的 16S rDNA 序列与乳酸乳球菌 16S rDNA 基因序列的同源性较高。其中,与乳酸乳球菌乳脂亚种 NZ9000 的同源性高达 100%,用 DNASTar 软件包中的 MegAlign 软件对相关序列进行系统进化分析(图 2)。结果显示与乳酸乳球菌乳脂亚种在进化关系上的地位最近,从而在分子水平上证实了菌株 3C 属于乳酸乳球菌乳脂亚种。

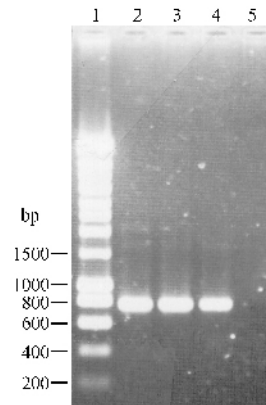


图 1 3 株 3C 的 *gshB* 部分基因片段的扩增
1 Marker, 2-4 菌株 3C, 5 阴性对照

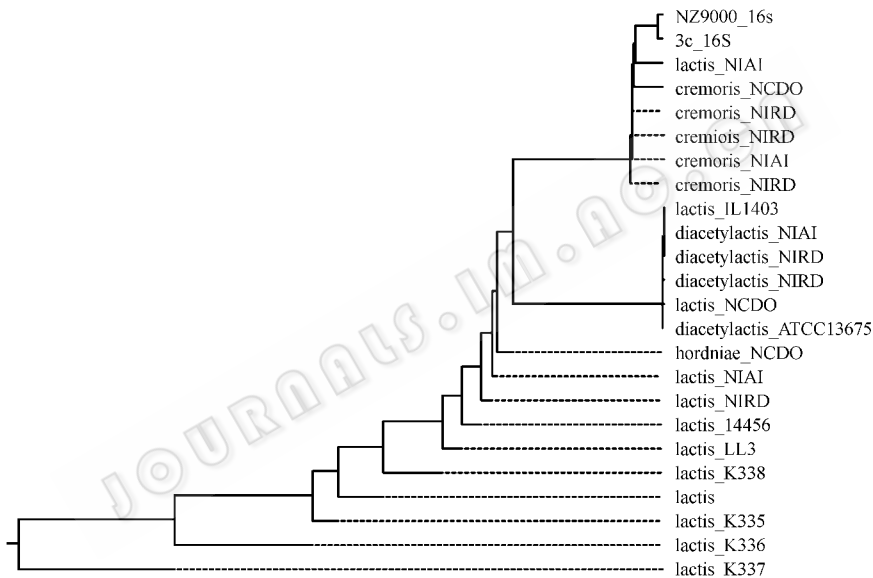


图 2 菌株 3C 的系统发育树状图

电镜分析表明(图 3),菌株 3C 的细胞形态一致,均为球形,单生,分裂时细胞伸长似杆状。符合乳酸乳球菌的一般细胞形态。因此,基本确定菌株 3C 属于乳酸乳球菌乳脂亚种,命名为乳酸乳球菌乳脂亚种 CCSYU10100。

2.5 乳酸乳球菌 CCSYU10100 产 GSH 能力的鉴定

在 CDM 中好氧培养乳酸乳球菌 CCSYU10100 生长至稳定期,用酶法测其胞内 GSH 含量,为 2.39 ± 0.21 nmol/mg 蛋白。同时用 HPLC 法分离鉴定出其胞内除 GSH 外,还存在半胱氨酸-甘氨酸(图 4)。表明乳酸乳球菌 CCSYU10100 具有 GSH 合成能力,并且半胱氨酸-甘氨酸的存在说明可能存在 γ -谷氨酰转肽酶,这个酶在革兰氏阳性菌中也是很少见的。

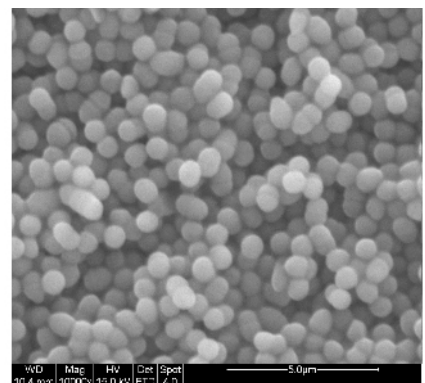


图 3 菌株 3C 的扫描电镜照片(10000 倍)

2.6 乳酸乳球菌 CCSYU10100 部分 *gshB* 基因的分析 获得乳酸乳球菌 CCSYU10100 的部分 *gshB* 基

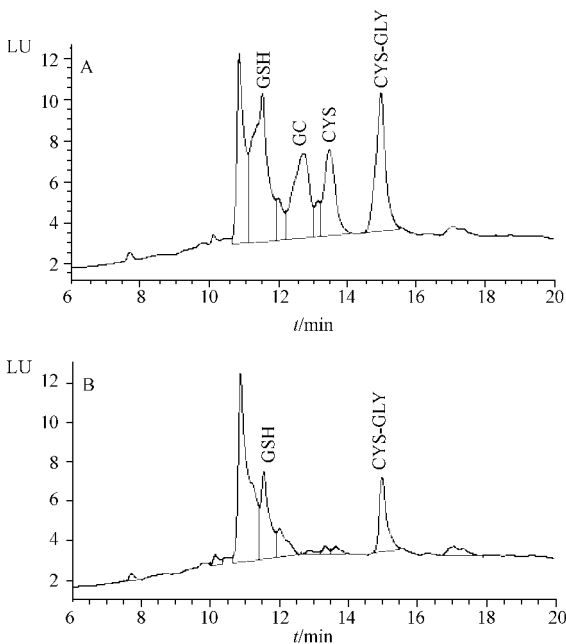


图4 乳酸乳球菌 CCSYU10100 胞内硫醇组成

A 混标, B 乳酸乳球菌 CCSYU10100, γ -GC γ -谷氨酰半胱氨酸, CYS 半胱氨酸, CYS-GLY 半胱氨酸-甘氨酸

因序列,共 671 bp。通过 Blastn 软件在 GenBank 中核酸数据库进行同源性检索,如表 3 所示,在不同种属的微生物中,乳酸乳球菌 CCSYU10100 在核苷酸水平上与假单胞菌属具有高度同源性。为进一步分析乳酸乳球菌 CCSYU10100 的部分 *gshB* 基因序列与假单胞菌属的异同点,将乳酸乳球菌 CCSYU10100 的部分 *gshB* 基因进行 6 框架翻译,得到所对应的氨基酸序列。通过 Bioedit 软件包的 Alignment 软件将

乳酸乳球菌 CCSYU10100 的部分 GshB 氨基酸序列与荧光假单胞菌(*Pseudomonas fluorescens*) PfO-1、丁香假单胞菌(*P. syringae* pv. *tomato* str. DC3000) 和恶臭假单胞菌(*P. putida*) KT2440 的 GshB 氨基酸序列进行比对。结果显示,乳酸乳球菌 CCSYU10100 的 GshB 与荧光假单胞菌同源性(identities)为 94% 相似性(Similarities)为 98%;与丁香假单胞菌同源性为 88% 相似性为 95%;与恶臭假单胞菌的同源性为 87% 相似性为 97%。由于遗传密码的简并性,基因序列包含了比其编码的氨基酸序列更多的信息。用 Clustal W 软件将乳酸乳球菌 CCSYU10100 的部分 *gshB* 基因序列与荧光假单胞菌、丁香假单胞菌和恶臭假单胞菌的 *gshB* 基因序列进行了比对。结果显示,乳酸乳球菌 CCSYU10100 的 *gshB* 基因与荧光假单胞菌基因序列的同源性为 88%;与丁香假单胞菌的同源性为 85%;与恶臭假单胞菌的同源性为 83%。对照遗传密码表,由图 5 可以看出,乳酸乳球菌 CCSYU10100 的部分 *gshB* 基因序列与假单胞菌属的不同之处多在同义密码子的简并范围内。这些摆动中,有 34 处是三联体的第 3 位密码子,只有 1 处是三联体的第 1 位密码子。并且,三联体第 3 位密码子的摆动中有 26 处属于 G/C 向 A/T 的变动,只有 8 处属于 A/T 向 G/C 的变动。由于属于同一家族的基因,在不同的生物中,其密码子偏好(codon bias)往往也不同。因此,可能这些差异简并碱基是被宿主乳酸乳球菌在进化的过程中修饰成了自己偏好的 A/T 碱基。

表 3 乳酸乳球菌 CCSYU10100 部分 *gshB* 基因与其他种属微生物的 *gshB* 基因序列同源性的比较

	pfl	sen	xor	cvi	eco	sfl	eca	bps	reu	tde	gox	vvu	bpe	mca
分值(bits)	674	109	87.7	85.7	75.8	73.8	67.9	67.9	63.9	61.9	58	54	50.1	46.1
同源性(%)	88	86	84	85	83	88	95	97	90	91	94	90	93	91

pfl 荧光假单胞菌, sen 伤寒玛丽沙门氏杆菌(*Salmonella enterica*) ssp. *enterica* serovar *Choleraesuis* str. SC-B67, xor 水稻白叶枯病菌(*Xanthomonas oryzae*) pv. *oryzae* KACC10331, cvi 紫色杆菌(*Chromobacterium violaceum*) ATCC 12472, eco 大肠杆菌 O157, sfl 弗氏志贺菌 2a str. 301, eca 胡萝卜软腐欧文氏菌 ssp. *atroseptica* SCRI1043, bps 类鼻疽杆菌(*Burkholderia pseudomallei*) strain K96243, reu 真养雷氏菌(*Ralstonia eutropha*) JMP134, tde 脱氮硫杆菌(*Thiobacillus denitrificans*) ATCC 25259, gox 氧化葡萄糖醋杆菌(*Gluconobacter oxydans*) 621H, vvu 创伤弧菌(*Vibrio vulnificus*) YJ016, bpe 百日咳杆菌(*Bordetella pertussis*) strain Tohama I, mca 荚膜甲基球菌(*Methylococcus capsulatus*) str. *Bath*

通过 NCBI 的 Blastp 软件检索到乳酸乳球菌 CCSYU10100 部分 GshB 氨基酸序列与原核生物 GshB 蛋白的 N 端结构域(N-terminal domain)的同源性为 44.5%、原核生物 GshB 蛋白的结合 ATP 结构域(ATP-binding domain)的同源性为 93.4%(图 6)。表明乳酸乳球菌 CCSYU10100 的 GshB 具有这两个

结构域。

3 讨论

在许多生物中,GshA 和 GshB 是被独立编码的。然而,在一些细菌的开放阅读框(open reading frame, ORF)中,包括产气荚膜梭状芽孢杆菌(*Clostridium*

```

11a -----
pfl ATGAGCGTTGCGCTCGGGATTGTCATGACCCATCGCCAGCATTTCCTATAAAAAAGGAT 60
psy ATGAGCGTTGCGCTAGGGATTGTCATGACCCATTGAGCGCATCTCTATAAAAAAGGAC 60
ppu ATGAGCGTTGCGCTCGGCATTGTGATGACCCCATCGCGTCCATCTCTACAAAGAGGAC 60

11a -----
pfl AGCTCGCTGGCCATGCTGCTGGCGGCCAAAAGCGCGGCTGGGACTGTTCTATATGGAA 120
psy AGCTCGCTGGCCATGCTCCTTGCCGCACAGGATCGCGGCTGGACGTTGTTCTATATGGAA 120
ppu AGCTCGCTGGCCATGCTGCTGGCCGCCAGGACCGCGGCTGGAGCCTGTTCTACATGGAA 120

11a -----
pfl CAGAAAGACCTTTATCAGGGTGAAGGCCAGGACCGGCCGCGGATGAAGCCGCTGAAAGTC 180
psy CAGAAAGACCTGTACCAGAACGCGAGGCCAGGCCCGCGCGCGCATGAAGCCGCTGAAAGTG 180
ppu CAGCAAGACCTGTATCAGGGCGAAGGCCAAGGCCCGCGCCGCGCATGCGCCCGCTGAAGGTG 180

11a TTT GCC A C C C T G A G A A G T G G T T T G A G C T G C G G A C G A G A T C G A C A G C C G G T T G A G C G A T 59
pfl TTC GCC AAC C G G G A A A T G G T T C G A A C T G C A C C A G A G C A G A T T C G C C G T T G A G C G A C 240
psy TTC GCC G A T C G G C C A A A T G G T T C G A G T T C G A A C C G A A A T C G A C G C A G G C T T T G A G A T 240
ppu TTT GCC C A C C C T G C A C G C T G G T T C G A A C T G C G C G A G G A G C A G A G C A G C C G C T G C G C G A G 240

11a C T G A C G T G A T C T G A T G C G C A A G G A C C G C C G T T C G A C A T G G A A T T C G T A C T C C A C T 119
pfl C T G A A C G T G A T C T G A T G C G C A A G G A T C C G C C G T T C G A C A T G G A G T T C G T A C T C C A C C 300
psy C T G A C G T G A T C T G A T G C G T A A G G A T C C G C C G T T C G A C A T G G A A T T C A T A C C A C T 300
ppu C T G A C G T G A T C T G A T G C G C A A G G A C C G C C T T C G A C A T G G A G T T C G T A C T A G C A C T 300

11a T A C C T G C T G A A C A G G C C G A G C G C G C C G T G C T G A T C G T C A A C A A G C C G C A G A G C C T G 179
pfl T A C C T G C T G A A C A G G C C G A G T C C G C C G C G T G C T G T G T C A A C A A G C C G C A G A G C C T G 360
psy T A C C T G C T G A A C A G G C C G A G A G C G T G G C G T G C T G T G T C A A C A A G C C G C A G A G C C T G 360
ppu T A C C T G C T G A A C A A G C C G A G A A C G A C G G C G T A C T G T G T A A C C G C C A C A A G C C A G 360

11a G G C G A C T G C A A T G A A A A G C T G T T C G C C A C G C T G T T C C G C A G T G C A C G C C G C C G A C C G T G 239
pfl G G C G A C T G C A A C G A A A A C T G T T C G C C A C C C T G T T C C C G C A G T G C A C G C C G C C A C T G T G 420
psy G G C G A C T G C A A C G A A A A G C T G T T C G C C A C G C T T T C C G C A G T G C A C C C C G C C A C A C T G 420
ppu G G C G A C T G C A A C G A G A A G A T G T T C G C C A C G C T G T T C C G C A A T G C A C C A C C G G A C C C T G 420

11a G T C A G C C G C C G C G C G A C G T G C T G C G T G A A T T C G C C G C A A C A C G G T G A T G T G A T C C T C 299
pfl G T C A G C C G C C G C G C G A C G T G C T G C G T G A G T T C G C C G C A A C A T G G C G A C G T G A T C C T C 480
psy G T C A G C C G C C G C G C G A C A T C T G C G C G A G T T C G C C G A C A A C A G G C G A C G T G A T C C T C 480
ppu G T C A G C C G C C G C G A C A T C A T T C G C G A A T T C A C C G C C A A C A T T G C C G A C G T G A T C C T C 480

11a A A A C C G C T G A C G G C A T G G C G C A C G T C G A T T C C G T C A C C G C C G G T G A C C G A A C 359
pfl A A G C C G C T G A C G G C A T G G C G C A C C T C G A T T C C G T C A C C G C C G C G A T C C G A A C 540
psy A A G C C G C T G A C G G C A T G G C G C C G C T C G A T T C C G T C A T C G T G C C G G C G A C C G A A C 540
ppu A A G C C A C T G A T G G C A T G G C G G T A C G T C G A T T C C G T C A C C G C G C T G G C G A C C C A A C 540

11a C T G T C G G T G A T C T G G A A C C C T G A C C G C C T G G C A C C C A G C A G A T C A T G G C C A G G C T 419
pfl C T G T C G G T A T T C T G G A A C C C T G A C C G C C C T C G G C G C C A G C A G A T C A T G G C C A G G C G 600
psy C T C T C G G T A T C C T C G A A C C C T G A C C G C C A C G G C A C C A G C A G A T C A T G C G C A G G C C 600
ppu C T G T C G G T A T C T G G A A C C C T G A C C G C A C T G G C A C C C A G C A G A T C A T G C G C A G G C T 600

11a T A T A T T C C G G G A T C A A G G A T G G C G A C A A G C G C A T C T G A T G A T C G A C G G C G A A C C G G T G 479
pfl T A C C T G C C G G G A T C A A G G A C G G T G A C A A G C G C A T C T G A T G A T C G A C G A C G A C C G G T G 660
psy T A C T T G C C G G C A T C A A G G A C G G C G A C A A C G C A T C T G A T G G T G A C G G T G A G C C G G T G 660
ppu T A C C T G C C G G A A T C A A G G A C G G C G A C A A G C G C A T C T G A T G A T C G A T G G C G A G C C A G T G 660

11a G A T T A C T G C C T G G G C G T A T T C G G C A G C C G G C G A G A C C C G T G G C A A C C T G C G C C C G G T 539
pfl G A T T A C T G C C T G G G C G C A T T C G G C C A G G C G A A A C C C G T G G C A A C C T C G C G C C G G C 720
psy C C A T A C T G C G C C G A T C C T G C C G C T G G C G A A A C C C G T G G C A A C C T G C G C G C A G C 720
ppu G A C T A T T G C C T G G A C C G A T T C G G C A G C G G C G A A A C C C G T G G C A A C C T G C G C C A G C 720

11a G G T C G C G G T G A A G A C G C C G T T G C G A C A A G A C C G T T G G A T C G C C T C T C A G G T T G C C 599
pfl G G C C G T G G C G A A G C C G T C G G T T G A C G A C A A G A C C G T T G G A T C G C C G C T C A G G T C G C C 780
psy G G G C G T G G C G A A G C C G T C C G C T G A G T G A C A A G A C C C T G G A T C G C C G A A C A T C G C C 780
ppu G G G C G T G G C G A A G C C G C C A C T G A C C G A G C G C G A C C C T G G A T C G C C G C T C A G G T A T C G C C 780

11a C C A A C C C T G C G G A A A A G G C C T G C T A T T T G A G G A C T A G A C G T A A T T G G T G A G A A C C T C 659
pfl C C G A C C T T G C C C G G A A G G C C T G C T G T T C G T C G C C T G A C G T G A T C G G T G A G C A C C T G 840
psy C C C A C C C T G C C C G A A A A G G C C T G C T G T T C G T C G C C C T G A C G T G A T C G G T G A C C C T G 840
ppu C C G A C C C T G C C C G A G A A G G C C T G C T G T T C G T T G C C C T G A C G T G A T C G G C G A C T A C C T G 840

11a A C C G A A A T T A A C ----- 671
pfl A C C G A A A T C A A C G T C A C C A G C C C A C C T G C A T C C G C G A A A T C G A C A A T G C C T T C G G C A C C 900
psy A C C G A A A T C A A C G T C A C C A G C C C A C C T G C A T C C G C G A A A T C G A C A A C G C T T T C G G C A C C 900
ppu A C C G A A A T C A A C G T C A C C A G C C C A C C T G T A T C C G C G A A A T C G A T G C C C G C T A C A A C A C C 900

11a -----
pfl G A C A T C G G C G G G A T G C T G A T G G A T G C G A T C G A G A A A A A G C T G C A A G C T T G A ----- 951
psy A A T A T C G G T G G C C T G T T G A T G G A T G C G A T C G A G A A G A A G C T G C A G G C G C G C A A G G G T A A 960
ppu G A T A T C G G T G G C A A G C T G A T G G A T G C C A A G C T A A A A G C A C G C T G A ----- 954

```

图5 乳酸乳球菌 CCSYU10100 的部分 *gshB* 基因与假单胞菌属三株菌的 *gshB* 基因序列的比对
注1: 11a 乳酸乳球菌 CCSYU10100, pfl 荧光假单胞菌, psy 丁香假单胞菌, ppu 恶臭假单胞菌
注2: 黑色背景表示与乳酸乳球菌 CCSYU10100 的 *gshB* 基因相同的碱基

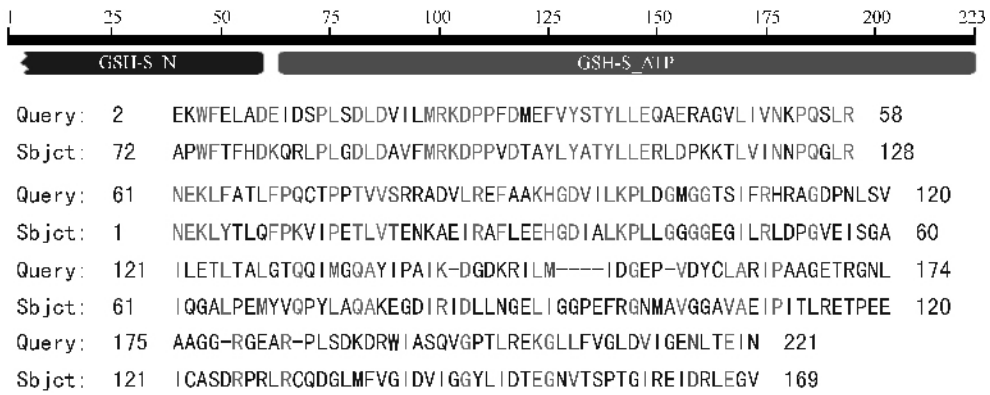


图6 乳酸乳球菌 CCSYU10100 的部分 GshB 蛋白的保守结构域

GSH-S_N 原核生物 GshB 蛋白的 N 端结构域, GSH-S_ATP 原核生物 GshB 蛋白的结合 ATP 结构域, Query 原核生物 GshB 蛋白序列, Sbjct 乳酸乳球菌 CCSYU10100 的 GshB 蛋白序列

perfringens) 单核细胞增多性李斯特菌 (*Listeria monocytogenes*) 无害李斯特菌 (*Listeria innocua*) 和多杀性巴氏杆菌 (*Pasteurella multocida*), Copley 和 Dhillon 发现编码 GshA 的基因与结合 ATP 的超级家族成员 (ATP-grasp superfamily member) 相融合, 说明该蛋白可能具有 GSH 合成途径的两个酶的活性^[3]。最新研究表明, 无乳链球菌具有一个双功能酶 γ -GCS-GS, 该酶可以在 ATP 的参与下催化谷氨酸和半胱氨酸生成 γ -GC, 并且催化 γ -GC 与甘氨酸缩合形成 GSH^[7]。这是首例在基因和酶水平上证明革兰氏阳性菌具有生物合成 GSH 能力的报道。无乳链球菌的 γ -GCS-GS 的 γ -GCS 结构域与原核生物的 γ -GCS 序列同源。然而, 其 GS 结构域与原核生物的 GS 序列没有显著的同源性, 但与同属于结合 ATP 超级家族的大肠杆菌的 D-Ala, D-Ala 连接酶同源。因此在 GS 的真核生物和原核生物进化树上, 无乳链球菌的 γ -GCS-GS 的 GS 结构域归属于原核生物的 GS 序列, 但是在进化树上是一个很远的分支^[7]。并且, Janowiak 和 Griffith 以 γ -GCS-GS 编码基因 SAG1821 对 NCBI 核苷酸数据库进行搜索发现, 13 个菌种中具有同源序列 (homologous sequences), 包括变异链球菌 (*S. mutans*) 猪链球菌 (*S. suis*) 嗜热链球菌 (*S. thermophilus*) 嗜血杆菌 (*Haemophilus somnus*) 单核细胞增多性李氏杆菌、无害李斯特菌、产气荚膜梭状芽孢杆菌和植物乳杆菌 (*Lactobacillus plantarum*) 等。不久, Gopal 等也发现在单核细胞增多性李氏杆菌中存在与无乳链球菌的双功能酶类似的多结构域融合蛋白 (multidomain fusion protein)。以上一系列相关研究成果表明, GSH 具有另外一个合

成途径, 即 GshA 与结合 ATP 的超级家族成员相融合, 成为一个具有 GSH 合成途径两个酶活性的酶蛋白。这种新近发现的合成途径可能也是某些不具有 *gshB* 基因革兰氏阳性菌中含有 GSH 的原因。

然而, 乳酸乳球菌 CCSYU10100 的部分 *gshB* 基因与原核生物的 *gshB* 基因的同源性较高, 特别是与假单胞菌属高度同源, 表明乳酸乳球菌 CCSYU10100 可能存在独立的 *gshB* 基因。值得注意的是, 乳酸乳球菌 CCSYU10100 的部分 *gshB* 基因的 GC 含量为 61.55%, 而乳酸乳球菌整个基因组的 GC 含量为 35% ~ 40%^[17], 表明这个基因可能不是乳酸乳球菌固有的。

在微生物进化中, 侧向基因转移 (lateral gene transfer) 被认为是一种重要的推动力量^[18-20]。以 GSH 合成途径编码基因的进化为例, 有文献报道, γ -GCS 可能源自藻青菌 (cyanobacterium), 后经侧向基因转移至其它原核生物和真核生物中^[3]。侧向基因转移除了通过质粒和病毒为媒介外, 也发现了大量的不需要媒介的“直接”转移。这种“直接”转移被认为很可能是侧向基因转移的重要途径^[21]。大量研究证实, 无论在正常条件下, 还是在逆境条件下, 尤其是后者, 细菌能够主动分泌 DNA 到环境中并从环境中摄取 DNA^[22-23]。研究表明, 土壤中存在大量胞外 DNA, 并且可以保持数月不降解^[24]。此外, 土壤颗粒可以吸附大分子而不会完全抑制 DNA 的转化活性^[25]。但是, 在营养贫乏的条件下, 细菌大多处于休眠状态, 特别不适宜于感受态的形成^[26], 而营养丰富的条件利于转化的进行^[25]。

中^[16]。本研究在菜园地中分离出的乳酸乳球菌乳脂亚种可能不是土壤的土著微生物,而是在施肥的过程被引入土壤的。而荧光假单孢菌存在于大多数土壤中^[25]。这样,土质肥沃的菜园土为荧光假单孢菌和乳酸乳球菌乳脂亚种之间进行侧向基因转移创造了良好条件。于是, *gshB* 等基因成功转化进乳酸乳球菌乳脂亚种,产生了具有 GSH 合成能力的乳酸乳球菌乳脂亚种菌株,其中包括本研究分离得到的乳酸乳球菌 CCSYU10100。

通常整个基因组的 GC 含量会反映在密码子的使用偏好上,如 GC 含量丰富的天蓝色链霉菌 (*Streptomyces coelicolor*) 偏好 GC 丰度大的密码子,而 AT 含量丰富的空肠弯曲杆菌 (*Campylobacter jejuni*) 则偏好 AT 丰度大的密码子^[27,28]。因此,从乳酸乳球菌 CCSYU10100 的部分 *gshB* 基因在同义密码子上对 AT 的偏好可以推测,乳酸乳球菌 CCSYU10100 的 *gshB* 基因确实来源于侧向基因转移,但被宿主精密地修饰过了。

虽然 GSH 合成途径可能不是乳酸乳球菌 CCSYU10100 自身固有的,但这是 *gshB* 基因在乳酸乳球菌中、甚至是革兰氏阳性菌中的首次发现,也有助于深入研究 GSH 在革兰氏阳性菌中的生理作用。因此,本研究结果具有较高的理论意义和科研价值。

参考文献

[1] Newton G L, Arnold K, Price M S, *et al.* J Bacteriol, 1996, **178** (7): 1990 ~ 1995.
 [2] Meister A, Anderson M E. Glutathione. Annu Rev Biochem, 1983, **52**: 711 ~ 760.
 [3] Copley S D, Dhillon J K. Genome Biol, 2002, **3**(5): 1 ~ 16.
 [4] Newton G L, Fahey R C, Cohen G, *et al.* J Bacteriol, 1993, **175** (9): 2734 ~ 2742.
 [5] Fu R Y, Bongers R S, van Swam I I, *et al.* Metabolic Engineering, 2006, **8**: 662 ~ 671.

[6] King K Y, Horenstein J A, Caparon M G. J Bacteriol, 2000, **182** (19): 5290 ~ 5299.
 [7] Janowiak B E, Griffith O W. J Biol Chem, 2005, **280**(12): 11829 ~ 11839.
 [8] 刘腊芹, 华兆哲, 王重辉, 等. 食品与生物技术学报, 2005, **24** (5): 55 ~ 63.
 [9] 张健红, 李寅, 刘和, 等. 应用与环境生物学报, 2005, **11** (3): 354 ~ 358.
 [10] Li Y, Hugenholtz J, Abee T. *et al.* Applied and Environmental Microbiology, 2003, **69**: 5745.
 [11] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular cloning: a laboratory manual. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
 [12] Bradford M M. Anal Biochem, 1976, **72**: 248 ~ 254.
 [13] Tietze F. Anal Biochem, 1969, **27**(3): 502 ~ 522.
 [14] Winters R A, Zukowski J, Ercal N, *et al.* Anal Biochem, 1995, **227** (1): 14 ~ 21.
 [15] 孙纪录, 贾英民, 田洪涛, 等. 食品与发酵工业, 2003, **29**(4): 99 ~ 100.
 [16] 杨洁彬, 郭兴华, 张箴, 等. 乳酸菌-生物学基础及应用. 北京: 中国轻工业出版社, 1996, pp. 85.
 [17] Bolotin A, Wincker P, Mauger S, *et al.* Genome Res, 2001, **11**: 731 ~ 753.
 [18] Ochman H. Curr Opin Genet Dev, 2001, **11**(6): 616 ~ 619.
 [19] Ochman H, Lawrence J G, Groisman E A. Nature, 2000, **405** (6784): 299 ~ 304.
 [20] Arber W. FEMS Microbiol Rev, 2000, **24**(1): 1 ~ 7.
 [21] 欧剑虹, 谢志雄, 陈向东, 等. 遗传, 2003, **25**(5): 623 ~ 627.
 [22] Baur B, Hanselmann K, Schlimme W, *et al.* Appl Environ Microbiol, 1996, **62**(10): 3673 ~ 3678.
 [23] Lorenz M G, Wackernagel W. Microbiol Rev, 1994, **58**(3): 563 ~ 602.
 [24] Recorbet G, Picard C, Normand P, *et al.* Appl Environ Microbiol, 1993, **59**(12): 4289 ~ 4294.
 [25] Demaneche S, Jocteur-Monrozier L, Quiquampoix H, *et al.* Appl Environ Microbiol, 2001, **67**(1): 293 ~ 299.
 [26] Nielsen K M., van Weerelt M D, Berg T N, *et al.* Appl Environ Microbiol, 1997, **63**(5): 1945 ~ 1952.
 [27] Wright F, Bibb M J. Gene, 1992, **113**(1): 55 ~ 65.
 [28] Gray S A, Konkel M E. Adv Exp Med Biol, 1999, **473**: 231 ~ 235.