

大肠杆菌重组乳链菌肽抗性蛋白(NSR)的 表达纯化及其功能分析

刘家乐^{1,2} 孙志增² 刘一苇² 高学玲¹ 钟 瑾^{2*}

(1. 安徽农业大学茶与食品科技学院 安徽 合肥 230036)

(2. 中国科学院微生物研究所 北京 100101)

摘要: 乳链菌肽(Nisin)是由某些乳酸菌产生的一种阳离子抗菌肽,而 Nisin 抗性蛋白(Nisin resistance protein, NSR)的表达则使一些非 Nisin 产生菌获得 Nisin 抗性。为深入探索 NSR 的作用机制,本研究在大肠杆菌中表达了去除 N 末端 38 个氨基酸残基的 NSR(NSR Δ 38)与 GST 的融合蛋白 GST-NSR Δ 38。通过谷胱甘肽(GSH)亲和层析和 GST 标签的切除后,得到纯化的 NSR Δ 38,并测定了该蛋白可能的 nisin 降解活性。反应产物的抑菌活性测定结果表明被 NSR Δ 38 作用后的 Nisin 丧失了抑菌活性,而反相高效液相层析(RP-HPLC)分析结果进一步表明这是由 NSR Δ 38 具备 Nisin 降解活性所造成的。本研究为 NSR 功能的深入研究奠定了工作基础。

关键词: 乳链菌肽, 乳链菌肽抗性蛋白, 末端特异性蛋白酶, GST 融合蛋白

Purification and Functional Analysis of Recombinant Nisin Resistance Protein (NSR) Expressed in *Escherichia coli*

LIU Jia-Le^{1,2} SUN Zhi-Zeng² LIU Yi-Wei² GAO Xue-Ling¹ ZHONG Jin^{2*}

(1. College of Tea & Food Science and Technology, Anhui Agricultural University, Hefei, Anhui 230036, China)

(2. Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China)

Abstract: Nisin is a cationic antimicrobial peptide produced by some lactic acid bacteria. However, expression of nisin resistance protein (NSR) could confer nisin resistance on some non-nisin-producing *Lactococcus lactis*. To deeply elucidate molecular mechanism underlying NSR-mediated nisin resistance, an NSR mutant with N-terminal 38 amino acid residues deleted (NSR Δ 38) was overexpressed in *Escherichia coli* by fusion with GST. Purified NSR Δ 38 was obtained through glutathione (GSH) affinity chromatography followed by cleavage of GST tag. Putative proteolytic activity of NSR Δ 38 was determined *in vitro* against nisin. Antimicrobial activity analysis revealed that nisin lost its bactericidal activity after incubation with NSR Δ 38. Further reversed-phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC) analysis indicated that NSR Δ 38 displayed proteolytic activity against nisin, thus inactivating the antimicrobial peptide. The current study paves the way for in-depth functional studies on NSR.

Keywords: Nisin, Nisin resistance protein, Tail-specific protease, GST fusion protein

基金项目: 国家 863 计划项目(No. 2006AA10Z319); 中国科学院知识创新重要方向项目(No. KSCX2-YW-G-016)

* 通讯作者: Tel: 86-10-64807401; 信箱: zhongj@im.ac.cn

收稿日期: 2009-03-04; 接受日期: 2009-05-04

乳链菌肽 (Nisin) 是某些乳酸乳球菌 (*Lactococcus lactis*) 或乳房链球菌 (*Streptococcus uberis*) 产生的一种阳离子小肽, 它对包括食品腐败菌和致病菌在内的许多革兰氏阳性菌有强烈的抑制作用, 且对人体安全无毒, 已被 50 多个国家和地区广泛用作食品防腐剂^[1,2]。

革兰氏阳性菌对 Nisin 产生耐受的方式主要有两种。一种是 Nisin 产生菌为防止受自身产生 Nisin 的杀伤作用而形成的免疫机制(Nisin immunity), 另一种是非 Nisin 产生菌中由于 Nisin 抗性基因(Nisin resistance gene, *nsr*) 表达所表现出的 Nisin 抗性(Nisin resistance)^[3]。目前, 对于 Nisin 免疫蛋白(NisI 及 NisEFG)参与形成的免疫机制的研究相对较为深入, 而关于 *nsr* 的研究仅局限于利用其 Nisin 抗性功能构建食品级表达载体^[4]。

nsr 编码一个含有 318 aa 的 Nisin 抗性蛋白 NSR, Blast 比对结果发现 NSR 中存在一个 C-端保守的末端特异性蛋白酶(C-terminal conserved tail-specific proteases, TSPc) 结构域, 而末端特异性蛋白酶是一类能够特异性识别蛋白或多肽底物 C-端的蛋白内切酶^[5], 这提示 NSR 所介导的 Nisin 抗性可能是通过降解 Nisin 实现的。

然而, 对于 NSR 是否具备 Nisin 降解功能, 目前仍存在诸多疑问^[6]。因此, 对这个问题的解答是阐

明 NSR 所介导的抗性机制的前提。而本实验室的前期工作表明去除信号肽序列的 NSR(NSRSD)在体外能够表现出 Nisin 降解活性, 且作用位点位于 Nisin 的第 28 位和 29 位氨基酸残基之间(图 1)^[8]。然而, NSRSD 的体外稳定性较差, 容易发生降解(未发表结果)。因此, 为获得足够量且稳定性较高的 NSR 蛋白进行其生化功能研究, 本工作在对 NSR 进行疏水性分析的基础上, 进一步开展了去除 N-末端 38 个氨基酸残基的 NSR(NSRΔ38)在 *E. coli* 中的表达和纯化工作, 体外功能测定结果表明 NSRΔ38 具备 Nisin 降解活性且其稳定性明显增加, 这为进一步了解 NSR 的结构功能并深入研究 NSR 介导的 Nisin 抗性机制奠定了基础。

1 材料和方法

1.1 试验材料

1.1.1 菌株与质粒: 质粒 pGEX-6P-1 和菌株 *E. coli* BL21(DE3)、*E. coli* JM109、黄色微球菌 NCIB8166 (*Micrococcus flavus* NCIB8166)等均由本实验室保存。其中, *E. coli* BL21(DE3)、*E. coli* JM109 使用 LB 培养基, 培养条件为 37°C 振荡培养, 根据需要, 向培养基中加入氨苄青霉素(Amp)至终浓度为 100 μg/mL。 *M. flavus* NCIB8166 使用 S1 培养基

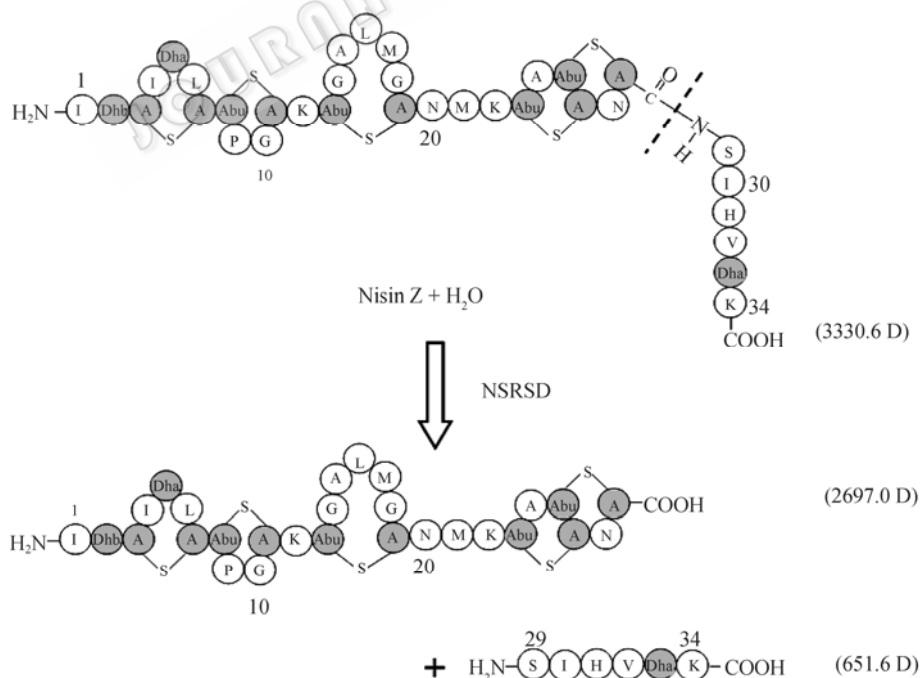


图 1 NSRSD 催化 nisin 降解反应示意图^[8]
Fig. 1 Proteolysis of nisin catalyzed by NSRSD^[8]

(0.8% Tryptone, 0.5% Yeast extract, 0.5% Glucose, 0.5% NaCl, 0.2% Na₂HPO₄, 0.75% Tween 20), 培养条件为 30°C 静止培养。

1.1.2 酶与试剂: Pyrobest DNA 扩增酶、限制性内切酶(*Bam*H I、*Xho* I)、T₄ DNA 连接酶、dNTP 混合物等购于 TaKaRa 公司, 凝胶回收试剂盒购于 OMEGA 公司, Tryptone、Yeast extract 为 Oxoid 公司产品, SDS、Tris、Acrylamide、Bisacrylamide 等为 Sigma 公司产品; Glutathione sepharose 4B、PreScission 蛋白酶购于 GE Healthcare; 还原型谷胱甘肽(GSH)购于 Roche; 其余一般分析试剂均为国产分析纯。C-18 SinoChrom ODS-BP 分析柱(10 μm 10 mm×250 mm)购于大连依利特公司, 乙腈为色谱纯, 三氟乙酸(TFA)为 Merck 公司产品。高纯度 Nisin (nisinZ) 由浙江银象生物工程有限公司提供。

1.2 试验方法

1.2.1 GST-NSRΔ38 融合蛋白表达载体的构建及大肠杆菌的转化: 根据 *nsr* 序列设计上游引物 *nsr*5'(5'-cgc gga tcc cag aag tat gtt cga gtt gcc-3')及下游引物 *nsr*3'(5'-cgg ctt gag tta ctt tat ttg aga ttt-3'), 并分别引入 *Bam*H I 和 *Xho* I 酶切位点, 扩增 *nsr* 中编码 39 aa~318 aa 的核酸片段 *nsr*Δ38。引物由北京奥科生物技术有限公司合成。PCR 反应条件为: 94°C 5 min; 94°C 30 s, 58°C 30 s, 72°C 1 min, 30 个循环; 72°C, 10 min。

PCR 扩增产物经纯化后用 *Bam*H I 及 *Xho* I 双酶切并回收纯化, 然后与经同样酶切并纯化的 pGEX-6P-1 质粒连接, 转化 *E. coli* JM109 感受态细胞并用 Amp 筛选转化子, 后经 PCR 和提取质粒的限制性酶切分析鉴定重组菌株, 并经 DNA 序列测定(北京奥科生物技术有限公司), 获得 GST-NSRΔ38 融合蛋白表达载体 pGEX-6P-NSRΔ38。

将鉴定正确的重组表达质粒 pGEX-6P-NSRΔ38 转化 *E. coli* BL21(DE3), 经过提取质粒酶切鉴定后获得阳性转化子。以上所有步骤均参照“分子克隆”^[7]实验方法进行。

1.2.2 重组蛋白的诱导表达: 将振荡培养过夜的 *E. coli* BL21(DE3)/pGEX-6P-NSRΔ38 菌液 1:100 转接至 5 mL 含有 Amp 的新鲜 LB 培养基中, 37°C、180 r/min 振荡培养至对数生长期(*OD*₆₀₀ 约为 0.6), 加入异丙基-β-D-硫代半乳糖苷(IPTG)至终浓度为 0.6 mmol/L, 在 16°C 条件下分别振荡培养 2 h、4 h

和 6 h。然后, 4°C、10000 r/min 离心 10 min 收集菌体, 菌体沉淀用磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤一次后重悬于 0.5 mL 该溶液中。超声破碎菌体, 4°C、10000 r/min 离心 10 min 收集上清, 沉淀用等体积的 PBS 重悬。12% SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)检测重组蛋白 GST-NSRΔ38 在不同诱导时间下的表达。

为获得大量表达 GST-NSRΔ38 融合蛋白的菌体, 将上述菌液培养体积扩大至 1 L, IPTG 诱导时间选用 6 h, 其余同上所述。

1.2.3 表达产物的分离纯化: 采用 GSH 亲和柱层析对表达产物进行分离纯化。先用 5 倍柱床体积的 PBS 平衡 Glutathione Sepharose 层析柱, 超声破碎的菌液上清经抽滤(0.22 μm)后上样, 然后用 10 倍柱床体积的 PBS 冲洗柱积 3 次以除去非特异性结合的杂蛋白。再用 10 倍柱床体积的 PreScission 酶切缓冲液 [50 mmol/L Tris-HCl (pH 7.0), 150 mmol/L NaCl, 1 mmol/L EDTA, 1 mmol/L DTT] 平衡柱子后加入 PreScission 蛋白酶混合液 [80 μL (160 个单位) PreScission 蛋白酶与 920 μL PreScission 酶切缓冲液] 于 4°C 酶切过夜, 用 PreScission 酶切缓冲液洗脱目标蛋白。而与 GSH 层析柱结合的 GST 标签及 PreScission 蛋白酶则被 GSH 洗脱缓冲液 [含有 10 mmol/L 还原型 GSH 的 50 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0) 溶液] 分 3~4 次洗脱下来。

1.2.4 表达产物的体外活性检测: 待测样品 NSRΔ38 与 Nisin 的体外反应体系为: Nisin Z [2 mg/mL, 50 mmol/L Tris-HCl (pH 6.0) 配制] 25 μL, NSRΔ38 样品 5 μL, 50 mmol/L Tris-HCl (pH 6.0) 20 μL, 共计 50 μL; 阳性对照 NSRSD 与 Nisin 的体外反应体系为: Nisin Z [2 mg/mL, 50 mmol/L Tris-HCl (pH 6.0) 配制] 25 μL, NSRSD 浓缩样品 5 μL, 50 mmol/L Tris-HCl (pH 6.0) 20 μL, 共计 50 μL^[8]; 空白对照为 Nisin Z 与 50 mmol/L Tris-HCl (pH 6.0) 溶液反应的产物。这 3 个反应体系均在 30°C 恒温水浴中温育 6 h 后, 分别通过抑菌活性测定和反相高效液相色谱 (RP-HPLC) 分析来检测 NSRΔ38 或 NSRSD 的体外 Nisin 降解活性。

1) 抑菌活性检测: 指示菌平板的制备。将指示菌 *M. flavus* NCIB8166 接种于 S1 培养基平板, 30°C 过夜培养后于 4°C 冰箱放置 10 d 备用。用接种环从该平板上刮取一环菌体, 加入适量无菌水(约 6

<http://journals.im.ac.cn/wswxtbcn>

mL), 振荡混匀, 倒入 200 mL 融化并冷却至适当温度的 S1 培养基中, 混匀并倒入玻璃培养皿内, 待其自然冷却凝固。

待测样品的配制。待测样品为 NSR Δ 38 作用后 Nisin 的反应液, 吸取 1 μ L 被 NSR Δ 38 作用后 Nisin 的反应液溶于 9 μ L 0.02 mol/L HCl 溶液中混匀, 再吸取上述混合液 1 μ L 于 49 μ L 0.02 mol/L HCl 溶液中混匀, 计量 50 μ L 备用; 阳性对照是被 NSRSD 作用后 Nisin 的反应液, 阴性对照为只有 Nisin 的反应液, 稀释方法同待测样品。

反应产物抑菌活性测定。用一内径约 7 mm 的打孔器在 *M. flavus* NCIB8166 指示菌平板上均匀打孔, 依次加入 50 μ L 待测样品或对照, 超净工作台吹 0.5 h 后移至 4 $^{\circ}$ C 冰箱, 待加入样品扩散吸收 2 h 后转入 30 $^{\circ}$ C 培养箱内培养 24 h。

2) RP-HPLC 检测: 待测反应样品 30 μ L 经过 12000 r/min 离心 20 min 后待用, 配制流动相 A 液 (H₂O+0.1% TFA), B 液(乙腈+0.1% TFA), 经 0.45 μ m 微孔滤膜过滤后待用。使用 Waters 600 HPLC 系统和 C-18 SinoChrom ODS-BP 5 μ m 4.6 mm \times 250 mm RP-HPLC 柱(大连依利特)进行分离, 分离条件为 10%~50% B 液 [$V_B/V_{(A+B)}$] 梯度洗脱 15 min 后, 再用 90% B 液洗脱 5 min。洗脱流速 1 mL/min, 洗脱物用 220 nm 紫外光吸收进行检测^[8]。

2 结果

2.1 *nsr* 编码产物分析

对 *nsr* 编码产物 NSR 进行保守结构域分析发现, 该蛋白的 C-末端(107 aa~303 aa)存在一个 TSPc 结构域, 这提示 NSR 可能是通过降解 Nisin 而发挥 Nisin 抗性功能的。为了获得足量的 NSR 进行其可能酶活性的测定, 我们曾试图在 *E. coli* 中表达 NSR 与 GST 的融合蛋白 GST-NSR。然而, 即使经过多次表达条件的优化, GST-NSR 的表达水平仍较低且可溶性差(图 2 及未显示结果), 这不利于后续纯化工作的进行。

NSR 的疏水性分析结果表明在其 N-端存在一个强疏水区(图 3), 而该疏水区可能是导致 GST-NSR 可溶性差的原因所在。因此, 为获得可溶性的 NSR 蛋白以对其进行深入的功能研究, 我们可在 *E. coli* 中表达去除 N-末端 38 个氨基酸残基的 NSR(NSR Δ 38)与 GST 的融合蛋白 GST-NSR Δ 38。

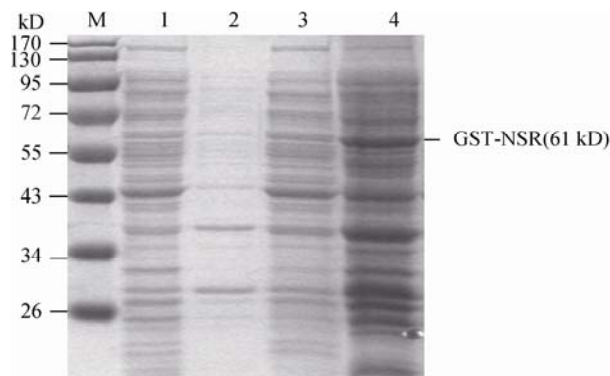


图 2 GST-NSR 在 *E. coli* 中诱导表达的可溶性分析

Fig. 2 Solubility analysis of inducible expression of GST-NSR in *E. coli*

Note: M: Molecular weight marker; 1, 2: Soluble and insoluble fractions of uninduced *E. coli* BL21(DE3) cells transformed with GST-NSR expression vector; 3, 4: Soluble and insoluble fractions of *E. coli* BL21(DE3) cells transformed with GST-NSR expression vector induced by 0.6 mmol/L IPTG at 16 $^{\circ}$ C for 6 hours.

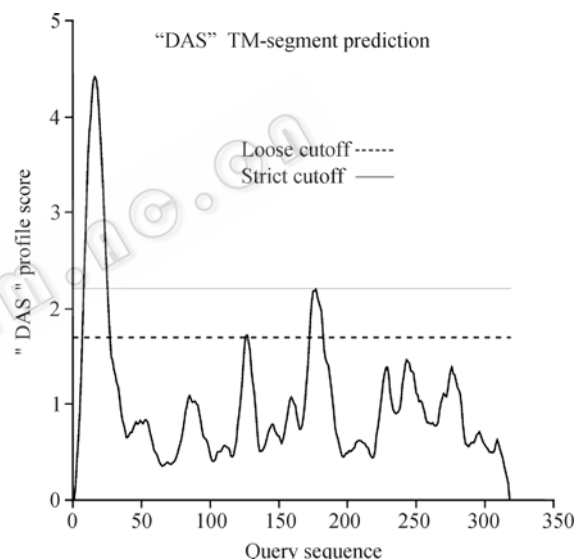


图 3 NSR 的疏水性分析

Fig. 3 Hydrophobic analysis of NSR

2.2 GST-NSR Δ 38 表达载体 pGEX-6P-NSR Δ 38 的构建及鉴定

我们将目的片段 *nsr* Δ 38 克隆到表达质粒 pGEX-6P-1 上得到重组质粒 pGEX-6P-NSR Δ 38, 重组质粒经过 *Bam*H I 和 *Xho* I 双酶切后得到约 5 kb 和 0.8 kb 两个片段, 与预期相符, 进一步测序结果表明表达质粒 pGEX-6P-NSR Δ 38 构建正确。重组质粒转化 *E. coli* BL21(DE3)后得到 GST-NSR Δ 38 表达菌株。

2.3 GST-NSR Δ 38 融合蛋白的诱导表达

在 37 $^{\circ}$ C 培养温度下, 菌液 OD₆₀₀ 达到 0.6 时, 经

0.6 mM IPTG 16°C 诱导后的菌体样品经超声破碎, 离心分离可溶性组分和不溶性组分, 它们的 SDS-PAGE 检测结果如图 4 所示。由此可知, IPTG 诱导表达的 GST-NSR Δ 38 大部分存在于可溶性组分中(泳道 1、3、5), 且其表达量随诱导时间的延伸而明显升高。而在不可溶性组分中, 即使当诱导时间延长至 6 h 后, 仅检测到 GST-NSR Δ 38 的少量表达(泳道 2、4、6)。因此, 我们选择以上诱导条件(菌液 OD_{600} 值 0.6、IPTG 浓度 0.6 mmol/L、诱导温度 16°C)诱导表达 6 h 作为大量诱导表达 GST-NSR Δ 38 的条件。

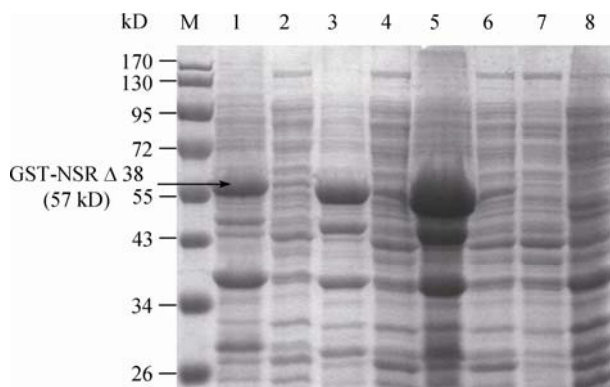


图 4 GST-NSR Δ 38 在 *E. coli* 中诱导表达的可溶性分析
Fig. 4 NSR protein without N-terminal 38 aa expressed in *E. coli* BL21(DE3) was induced with IPTG in different time
 Note: M: protein marker; 1 and 2: Soluble and insoluble fractions of *E. coli* BL21(DE3) cells transformed with GST-NSR Δ 38 expression vector induced by 0.6 mM IPTG at 16°C for 2 hours; 3 and 4: Soluble and insoluble fractions of *E. coli* BL21(DE3) cells transformed with GST-NSR Δ 38 expression vector induced by 0.6 mM IPTG at 16°C for 4 hours; 5 and 6: Soluble and insoluble fractions of *E. coli* BL21(DE3) cells transformed with GST-NSR Δ 38 expression vector induced by 0.6 mM IPTG at 16°C for 6 hours; 7 and 8: Soluble and insoluble fractions of uninduced *E. coli* BL21(DE3) cells transformed with GST-NSR Δ 38 expression vector.

2.4 NSR Δ 38 蛋白的分离纯化

由于重组蛋白融合有 GST 标签, 可利用 GST 与琼脂糖凝胶珠上偶联的 GSH 之间特异的亲和力, 将 GST 融合蛋白从细菌总蛋白溶液中分离出来。为排除 GST 蛋白对 NSR Δ 38 蛋白功能的影响, 我们通过同为 GST 融合蛋白的 PreScission 蛋白酶切除 GST 标签, 获得目的蛋白 NSR Δ 38。而 GST 标签和 PreScission 蛋白酶仍与偶联有 GSH 的琼脂糖凝胶珠结合, 只有在加入 GSH 洗脱缓冲液的情况下才能被特异性洗脱下来。图 5A 中为经过 GSH 亲和层析和切除 GST 标签后获得的 NSR Δ 38 蛋白的 SDS-PAGE 结果(泳道 2), 其分子量与预期(31.4 kD)相符。图 5B

中是用 GSH 洗脱缓冲液分 2 次洗脱获得的 GST 标签蛋白及 PreScission 蛋白酶。

2.5 NSR Δ 38 的体外功能检测

NSR Δ 38 保留了 NSR 中完整的 TSPc 结构域, 为检测其在体外是否具备 Nisin 降解功能, 我们将 Nisin 与 NSR Δ 38 温育后, 通过反应产物的抑菌活性测定和 RP-HPLC 分析来检测 NSR Δ 38 可能的 Nisin 降解活性。

2.5.1 反应产物的抑菌活性检测: Nisin 可以强烈抑制 *M. flavus* NCIB8166 的生长, 在 *M. flavus* NCIB8166 的平板上可以呈现明显的抑菌圈(图 6 中

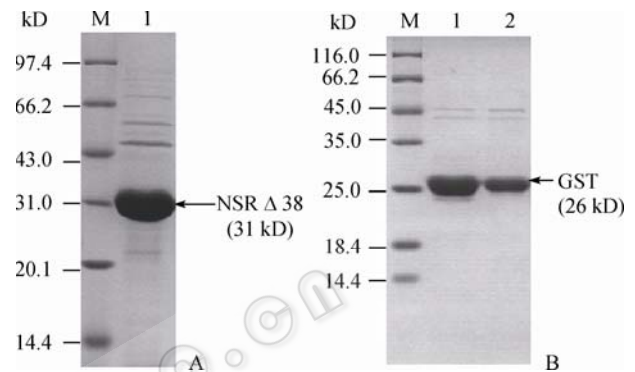


图 5 GST 亲和纯化切除标签后的重组蛋白 NSR Δ 38 与 GST
Fig. 5 Purification by GST-affinity column with PreScission protease
 Note: A: M: Protein marker; 1: NSR Δ 38 purification by GST-affinity column; B: M: Protein marker; 1: First GST by glutathione elution buffer (10 mmol/L); 2: Second GST by glutathione elution buffer (10 mmol/L).

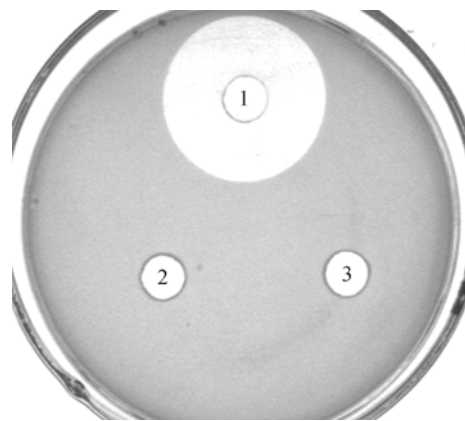


图 6 对照 Nisin 及被 NSRSD 或 NSR Δ 38 作用后 Nisin 抑菌活性的测定

Fig. 6 Antimicrobial activity of control nisin and that after incubation with NSRSD or NSR Δ 38

Note: 1: Control nisin (0.1 μ g); 2: Nisin after incubation with NSRSD (0.1 μ g); 3: Nisin after incubation with NSR Δ 38 (0.1 μ g); *M. flavus* NCIB8166 was selected as indicator strain.

<http://journals.im.ac.cn/wswxtbcn>

1)。然而,当 Nisin 与 NSRSD 或 NSR Δ 38 温育后,则完全失去了对 *M. flavus* NCIB8166 的生长抑制能力(图 6 中 2 和 3)。这提示 NSR Δ 38 可能和 NSRSD 一样具备体外 Nisin 降解活性。

2.5.2 反应产物的 RP-HPLC 分析: 为了验证 NSR Δ 38 所导致的 Nisin 抑菌活性的丧失是否由 NSR Δ 38 对 Nisin 的降解所造成的,我们对反应产物

进行了 RP-HPLC 分析,结果如图 7 所示,对照 Nisin 的洗脱时间为 16.3 min(图 7 A),而当 Nisin 与 NSR Δ 38 反应后,可检测到洗脱时间分别为 9.8 min 和 17.2 min 的两个肽段(图 7 B),这与 NSRSD 降解 Nisin 产物的 RP-HPLC 结果一致^[8]。因此,重组蛋白 NSR Δ 38 具备体外 Nisin 降解活性,且其作用 Nisin 的位点与 NSRSD 相同。

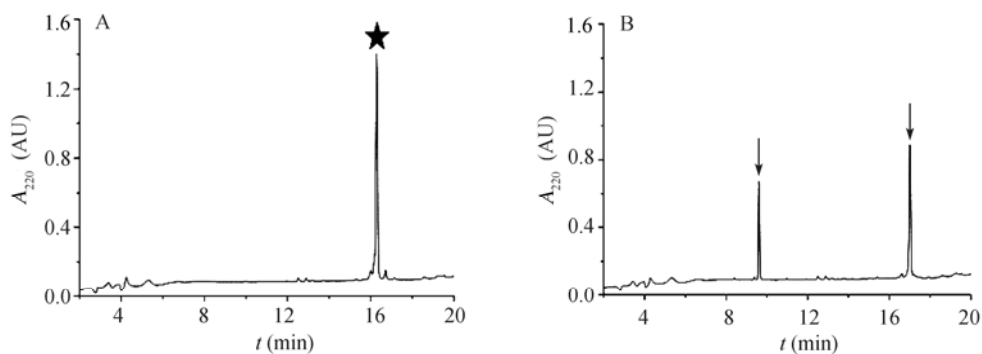


图 7 对照 Nisin(A)及其被 NSR Δ 38 作用后产物(B)的 RP-HPLC 分析

Fig. 7 RP-HPLC profiles for nisin and the products of NSR Δ 38 cleavage of nisin

注: 星号指示的为 Nisin; 箭头指示的为 Nisin 降解产物。

Note: 2 μ g purified protease in a 50 μ L reaction buffer at 30 $^{\circ}$ C for 6 h. A: control nisin. Asterisk indicates intact nisin; B: The products of NSR Δ 38 cleavage of nisin. Arrows indicate degraded products of nisin by NSR Δ 38.

3 讨论

随着天然食品防腐剂 Nisin 的广泛应用, Nisin 的抗性也逐渐引起了人们的关注。在实验室条件下,当生长环境中的 Nisin 浓度逐渐增加时,在敏感菌株中就能够形成 Nisin 抗性。然而,这种抗性是一个复杂的表型,涉及到细菌细胞壁和/或细胞膜成分改变等多方面的机制的参与^[9-12]。

一些非 Nisin 产生菌对 Nisin 有着天然的抗性,研究结果表明这种抗性多与 Nisin 抗性蛋白(NSR)的表达有关。本实验室前期研究结果表明去除信号肽序列的 NSR(NSRSD)在体外能够降解 Nisin,降解位点位于 Nisin 分子的第 28 和 29 位氨基酸之间,而且降解产物 Nisin¹⁻²⁸的细胞膜结合能力和孔洞形成能力大大降低,从而使其抑菌活性比完整 Nisin 分子降低百倍以上^[8]。但是由于重组蛋白 NSRSD 还存在稳定性较差、与 GST 融合蛋白可溶性有待提高等方面的问题,本文根据疏水性分析结果,在 *E. coli* 中表达了去除 N-端 38 个氨基酸残基的 NSR(NSR Δ 38)与 GST 的融合蛋白 GST-NSR Δ 38,并经 GSH 亲和纯

化和 GST 标签切除后获得了 NSR Δ 38。体外蛋白酶活性测定结果表明,NSR Δ 38 与 NSRSD 一样也具备 Nisin 降解活性。但与 NSRSD 相比较,NSR Δ 38 与 GST 融合蛋白的表达量更高,而且纯化得到的 NSR Δ 38 的稳定性更好(结果未显示)。这为深入研究乳链菌肽抗性蛋白 NSR 的结构与功能奠定了良好的工作基础。

参考文献

- [1] Delves Broughton J, Blackburn P, Evans RJ, *et al.* Applications of the bacteriocin, nisin. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 1996, **69**(2): 193–202.
- [2] Liu CQ, Su P, Khunajakr N, *et al.* Development of food-grade cloning and expression vectors for *Lactococcus lactis*. *J Appl Microbiol*, 2005, **98**(1): 127–135.
- [3] Kim WS, Hall RJ, Dunn NW. The effect of nisin concentration and nutrient depletion on nisin productin of *Lactococcus lactis*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1997, **48**(4): 449–453.
- [4] Takala TM, Saris PE. A food-grade cloning vector for lactic acid bacteria based on the nisin immunity gene nisI.

- Appl Microbiol Biotechnol*, 2002, **59**(4-5): 467-471.
- [5] Kirk D Beebe, Shin J, Peng J, *et al.* Substrate Recognition through a PDZ Domain in Tail-Specific Protease. *Biochemistry*, 2000, **39**: 3149-3155.
- [6] Moushumi Paul, Lili Xie, Wilfred A van der Donk. Biosynthesis and mode of action of lantibiotics. *Chem Rev*, 2005, **105**: 633-683.
- [7] 萨姆布鲁克 J, 拉塞尔 DW. 分子克隆实验指南. 第三版. 北京: 科学出版社, 2002.
- [8] Sun Z, Zhong J, Liang X, *et al.* Novel mechanism for nisin resistance via proteolytic degradation of nisin by nisin resistance protein (NSR). *Antimicrob Agents Chemother*, 2009, **53**(5): 1964-1973.
- [9] Crandall AD, Montville TJ. Nisin resistance in *Listeria monocytogenes* ATCC 700302 is a complex phenotype. *Appl Environ Microbiol*, 1998, **64**(1): 231-237.
- [10] Anne Gravesen, Birgitte Kallipolitis, Kim Holmström, *et al.* Pbp2229-mediated nisin resistance mechanism in *Listeria monocytogenes* confers cross-protection to class IIa bacteriocins and affects virulence gene expression. *Appl Environ Microbiol*, 2004, **70**(3): 1669-1679.
- [11] Gravesen A, Sørensen K, Aarestrup FM, *et al.* Spontaneous nisin-resistant *Listeria monocytogenes* mutants with increased expression of a putative penicillin-binding protein and their sensitivity to various antibiotics. *Microb Drug Resist*, 2001, **7**(2): 127-135.
- [12] Cotter PD, Guinane CM, Hill C. The LisRK signal transduction system determines the sensitivity of *Listeria monocytogenes* to nisin and cephalosporins. *Antimicrob Agents Chemother*, 2002, **46**(9): 2784-2790.

征 稿 简 则

1 刊物简介与栏目设置

《微生物学通报》是由中国科学院微生物研究所和中国微生物学会主办的, 以微生物学应用基础研究及高新技术创新为主的综合性学术期刊。刊登内容包括: 微生物学、生物工程、病毒学、酶工程、发酵工程、细胞工程等领域的最新研究成果, 产业化新技术和新进展。设置的栏目有: 研究报告、专论与综述、生物实验室(原技术与方法)、高等院校教学、名师讲堂、教学与科研成果展示、显微世界、专题专栏、专家论坛、书讯、会讯等。

2 投稿方式

投稿时请登陆我刊主页 <http://journals.im.ac.cn/wswxtbcn>, 点击作者投稿区, 第一次投稿请先注册, 获得用户名和密码, 然后依照提示提交稿件, 详见主页“投稿、征稿须知”。

作者必须在网站投.doc 格式的电子稿, 图与文字编好页码、图号后合成一个文件上传。凡不符合(投稿须知)要求的文稿, 本部恕不受理。

3 写作要求

来稿要求论点明确, 数据可靠, 简明通顺, 重点突出。

3.1 篇幅

以 A4 纸 5 号字计算, 综述、教学和方法类文章最好在 3 页以内, 研究报告 4~6 页(以上均包括图表)。

3.2 图表

文中的图表须清晰简明, 文字叙述应避免与图表重复。所有小图的宽度应小于 8 cm(占半栏), 大图的宽度应小于 17 cm(通栏)。

3.3 参考文献及脚注

参考文献按文内引用的先后顺序排序编码, 未公开发表的资料请勿引用。我刊的参考文献需要注明著者(文献作者不超过 3 人时全部列出, 多于 3 人时列出前 3 人, 后加“等”或“*et al.*”, 作者姓前、名后, 名字之间用逗号隔开)、文献名、刊名、年卷期及页码。国外期刊名可以缩写, 但必须标准, 不加缩写点, 斜体。参考文献数量不限。

参考文献格式举例:

期刊: [1] 刘 杰, 成子强, 史宣玲. SARS 冠状病毒 nsp14 基因的克隆和表达. *微生物学通报*, 2007, **34**(2): 1-3.

[2] Kajiura H, Mori K, Tobimatsu T, *et al.* Characterization and mechanism of action of a reactivating factor for adenosylcobalamin-dependent glycerol dehydratase. *J Biol Chem*, 2001, **276**(39): 36514-36519.

图书: [3] 钱存柔, 黄仪秀. 微生物实验教程. 北京: 北京大学出版社, 2000, p.4.

[4] 董志扬, 张树政, 方宣钧, 等. 海藻的生物合成及抗逆机理. 见: 华 珞等. 核农学进展. 北京: 中国农业出版社, 1996, pp.115-120.

脚注(正文首页下方):

基金项目: 基金资助(No.)

*通讯作者 Tel: ; Fax: ; E-mail:

收稿日期: 2009-00-00 ; 接受日期: 2009-00-00

(下转 p.1624)

<http://journals.im.ac.cn/wswxtbcn>