

专家组稿专栏

编者按:我国具有丰富的乳酸菌和特种乳资源,对这些资源的评价和开发利用以及乳品相关质量安全检测技术的研究,对于促进我国乳品加工业的快速和健康发展具有重要意义.在“简并引物法克隆保加利亚乳杆菌 β -N-乙酰氨基己糖苷酶基因”一文中,从一株分离自传统发酵乳制品的保加利亚乳杆菌中克隆到与细胞自溶相关的 β -N-乙酰氨基己糖苷酶基因片段.在“不同胎次和泌乳天数对牦牛初乳营养品质的影响”一文中,对白牦牛初乳营养品质进行了评价分析.在“牛奶中硫氰酸盐高效液相色谱测定方法”一文中,探讨了采用高效液相色谱方法测定牛奶中的非法添加物硫氰酸盐.通过研究,以期为我国乳酸菌资源和传统乳制品的进一步开发利用提供一定的理论依据.

(栏目主持人:杨贞耐教授)

文章编号:2095-6002(2013)01-0033-05

引用格式:崔文明,刘鹭,张书文,等.简并引物法克隆保加利亚乳杆菌 β -N-乙酰氨基己糖苷酶基因.食品科学技术学报,2013,31(1):33-37.

CUI Wen-ming, LIU Lu, ZHANG Shu-wen, et al. Cloning of β -N-Acetylhexosaminidase Gene Fragment from *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* LJJ with Degenerate Oligonucleotide Primers. Journal of Food Science and Technology, 2013, 31(1):33-37.

简并引物法克隆保加利亚乳杆菌 β -N-乙酰氨基己糖苷酶基因

崔文明, 刘鹭, 张书文, 逢晓阳, 李红娟, 吕加平*

(中国农业科学院农产品加工研究所/农业部农产品加工综合性重点实验室, 北京 100193)

摘要: β -N-乙酰氨基己糖苷酶(β -Hexcase)在细菌、植物和动物中广泛存在,具有典型的外切酶活性并可以催化切除 β -N-乙酰氨基己糖的非还原性氨基己糖残基,在细菌细胞分裂中具有重要作用.选取与保加利亚乳杆菌 LJJ 亲缘关系近的菌种的 β -N-乙酰氨基己糖苷酶蛋白序列,利用 ICODEHOP 和 CODEHOP 在线简并引物设计软件设计 β -Hexcase 简并引物,选取 Hex1-f 和 Hex1-r 引物对,以 LJJ 基因组 DNA 为模板经 PCR 扩增得到 614 bp 产物. PCR 产物连接 pGEM-T 质粒载体后克隆至大肠杆菌 DH5 α 中,筛选阳性克隆提取质粒进行测序.测序结果显示产物长度为 614 bp,该 DNA 序列经 blastx 比对发现与其他已知 β -Hexcase 基因具有相似性,表明所克隆的序列即为 LJJ β -Hexcase 的基因片段. β -N-乙酰氨基己糖苷酶基因的获得为进一步研究 β -N-乙酰氨基己糖苷酶与保加利亚乳杆菌自溶的关系奠定了基础.

关键词: 保加利亚乳杆菌; N-乙酰氨基己糖苷酶; 简并引物

中图分类号: Q939.97; TS252.1

文献标志码: A

β -N-乙酰氨基己糖苷酶(β -N-Acetylhexosaminidase, β -Hexcase)是在细菌、植物和动物中广泛存在的一种多糖水解酶,可以催化切除 β -N-乙酰氨基己

糖的非还原性氨基己糖残基,在细胞的正常分裂增殖中起着重要作用^[1-3].正常细菌分裂增殖过程中,肽聚糖水解酶作用于细胞壁从而实现母代细胞

收稿日期:2012-12-25

基金项目:国家“十二五”科技支撑计划项目(2011BAD09B02; 2012BAD28B7).

作者简介:崔文明,男,博士研究生,研究方向为乳品微生物;

* 吕加平,男,研究员,博士生导师,主要从事乳品微生物与乳品科学方面的研究.通讯作者.

与子代细胞分离. 而当正常的调控失衡时, 肽聚糖水解酶则会导致细胞的自溶^[4].

保加利亚乳杆菌 LJJ 是本实验室从传统乳制品中分离得到的一株乳酸菌, 该菌种在乳制品发酵过程中表现出较强的自溶特性, 而在乳制品的发酵过程中, 发酵剂的自溶并不总是有利的^[5]. 因此, 为了有效地调控乳酸菌的自溶性, 拟对其自溶的发生机理进行研究. 已有的研究表明肽聚糖水解酶在乳酸菌自溶过程中起着重要作用^[6-7].

本研究选择 iCODEHOP^[8] 在线软件设计简并引物用于 β -N-乙酰氨基己糖苷酶基因片段的克隆. 鉴于 CODEHOP 的诸多优点^[8-10], 迄今为止, 利用此方法已成功扩增出了鹅^[11]、多种细菌^[12-13]、人^[14]、植物^[15]、动物^[16] 等生物体中的多种未知基因序列片段. 选择 iCODEHOP 在线软件设计简并引物扩增克隆保加利亚乳杆菌 LJJ 的 β -N-乙酰氨基己糖苷酶, 可有效地保证目的基因片段的获取, 为后续荧光定量 RT-PCR 研究其在乳酸菌自溶过程中的作用奠定基础.

1 材料与amp;方法

1.1 材料

1.1.1 主要数据库和生物软件

NCBI、BlockMaker (<http://blocks.fhrc.org/blocks/makeblocks.html> 或 <http://blocks.fhrc.org/blockmkr/makeblocks.html>)、CodeHop (<http://blocks.fhrc.org/blocks/codehop.html>)、clustalW2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>)、iCodeHop (<http://dbmi-icode-01.dbmi.pitt.edu/i-codehop-context/Welcome>).

1.1.2 菌株与质粒

德式乳杆菌保加利亚亚种 (*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*) LJJ, 本实验室 -20 °C 冰箱保存; 大肠杆菌 DH5 α , 北京天根生化公司; 质粒 pGET-T, 美国 Promega 公司.

1.1.3 试剂

细菌基因组提取试剂盒、2 \times Bench Top™ Taq Master Mix、琼脂糖凝胶回收试剂盒, 美国 Biomiga 公司; 克隆试剂盒, 美国 Promega 公司; 引物合成, 北京华大基因公司.

1.2 仪器设备

TP600 型梯度 PCR 仪, 日本 Takara 株式会社; FluorChem FC2 型凝胶成像系统, 美国 Alpha Innotech 公司; DYY-6C 型电泳仪, 北京六一仪器公司; DL-CJ-IN 型高性能无菌试验台, 哈尔滨市东联公

司; DHP-9082 型电热恒温培养箱, 上海一恒科学仪器有限公司; LDZX-50KB 型立式压力蒸汽灭菌锅, 上海申安医疗器械厂.

1.3 方法

1.3.1 简并引物的设计及筛选

从 NCBI 蛋白质数据库中, 查找已知相应菌种 N-乙酰氨基己糖苷酶的氨基酸序列. 通过 16S rDNA 查找比对选取亲缘关系较近、同源性较高菌种的 N-乙酰氨基己糖苷酶的氨基酸序列, 分别为: *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* DSM 20072 GB_EGD27790.1, *Lactobacillus amylovorus* GRL 1112, YP_004031587.1, *Lactobacillus suebicus* KCTC 3549, ZP_09451258.1, *Lactobacillus salivarius* UCC118, YP_536455.1, *Lactobacillus kefiranofaciens* ZW3, YP_004563601.1, 选上述氨基酸序列以 FASTA 格式保存.

利用 iCODEHOP 程序设计简并引物的步骤如下: 1) 进入在线主页选择开始一个 non-named 或者 named session; 2) 选择引物设计 (Design Primers) 选项, 选择上传提交 (SUBMIT) 本地以 FASTA 保存的上述序列; 3) 选择“进行分析” (Proceed with analysis) 选项. 程序显示通过 Clustal W2 对这些氨基酸进行多序列比对, 选择 SUBMIT 生成比对结果. 并可以进化树的形式表示这些氨基酸的关系远近, 命名比对结果后, 选择 Proceed, 获得保守区 (block), 本实验共得到 6 个保守区. 4) 简并引物的设计. 设置引物主要参数为: 遗传密码 (Genetic code) standard, 其余参数均采用默认设置; 简并度 (Degeneracy) 128 (默认); 退火温度 (Temperature) 为 60.0 °C (默认); 精密度 (strictness) 为 0.0 (默认), 选择“找寻引物” (Look for primers). 5) 简并引物的筛选. 页面显示所有符合条件的引物以箭头表示, 并按照保守区的顺序以字母表顺序排列. 点击相应箭头即显示其对应氨基酸序列, 依据得到的引物得分 (Clamp score) 及简并度 (Core degeneracy) 情况选择引物. 引物得分应越高越好, 简并度应越小越好.

1.3.2 简并引物扩增 N-乙酰氨基己糖苷酶基因

依照 Biomiga 细菌组 DNA 提取试剂盒中操作提取细菌总 DNA, 用设计筛选的简并引物进行扩增.

PCR 反应体系为 20 μ L: 2 \times Bench Top™ Taq Master Mix, 10 μ L, 上游引物为 20 μ mol, 1 μ L, 下游引物为 20 μ mol, 1 μ L, DNA 模板, 5 ng, 加 ddH₂O 补至 20 μ L. PCR 反应条件: 94 °C 预变性, 5 min, 然后

94 °C 变性 30 s, 60 °C 至 50 °C 间退火, 72 °C 延伸 1 min, 共进行 30 个循环; 最后 72 °C 延伸 10 min.

1.3.3 PCR 产物的检测、鉴定、回收、克隆及测序

采用 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 扩增产物. 采用北京天根生化公司的凝胶回收试剂盒回收目的片段. 克隆步骤参见 Promega 公司的 pGEM-T 试剂盒说明书所述方法. 胶回收 DNA 片段与 pGEM-T 载体在 4 °C 连接过夜, 转化大肠杆菌 DH5 α , 37 °C 培养 14 ~ 16 h, 挑选 6 个白色菌落溶于 10 μ L ddH₂O 中, 以此为 DNA 模板, 以 RV-M 和

M13-47 通用引物进行菌落 PCR 鉴定, 将阳性克隆送至华大基因进行测序.

2 结果与分析

2.1 筛选得到的简并引物

综合考虑不同引物对的引物简并度, 引物得分及引物退火温度情况, 选取引物对 Hex1-f, Hex1-r 和 Hex2-f, Hex2-r 作为扩增 β -Hexase 基因的简并引物. 引物具体序列如表 1. 预计两引物对所扩增产物大小约为 620 bp.

表 1 N-乙酰氨基己糖苷酶的简并引物

Tab. 1 Degenerate primer sequences of β -Hexcase

保守区	引物名称	引物序列(5' - 3')	简并度	引物得分	退火温度/°C
x6110vhx2b	Hex1-f	TGATGCCACCGACcargargngg	16	71	61.3
x6110vhx2d	Hex2-f	TGGCATCAACTGGAAttygencng	64	82	60.5
x6110vhx2e	Hex1-r	GCGCCCATCGCCadrtertngt	48	74	63.9
x6110vhx2f	Hex2-r	GCCTTGATGCCGcgytraanggna	64	72	61.2

注: *n* 为 A、T、C 或 G; *y* 为 C 或 T; *r* 为 A 或 G

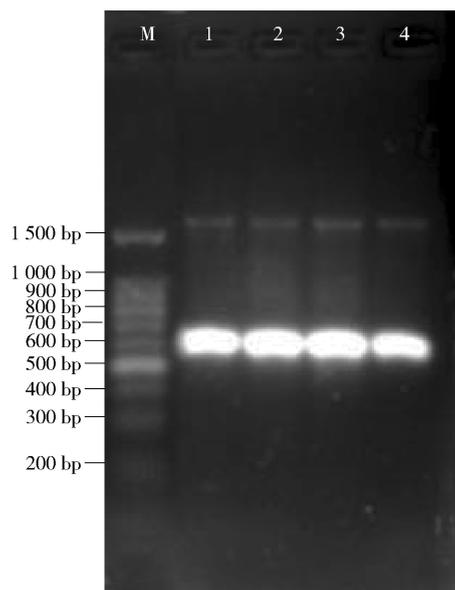
2.2 简并引物 PCR 扩增结果

分别以 Hex1-f, Hex1-r 和 Hex2-f, Hex2-r 作为上下游引物, 以 LJJ 基因组 DNA 为模板, 经梯度 PCR 扩增. 由图 1 可知, 引物对 Hex1-f, Hex1-r 在约 600 bp 处获得清晰明亮的产物条带, 与目的产物片段大小一致. 此时在大于 1 500 bp 处亦存在较模糊的条带, 而随着退火温度提高到 60 °C, 条带开始变得模糊, 这主要是由于简并引物具有一定的简并性, 存在

扩增出其他非特异性片段的可能性. 退火温度较低时, 由于引物特异性有所降低, 这一现象表现得较为严重, 该非特异性产物经目的条带的凝胶回收分离后将不会影响后续的实验结果^[17-19].

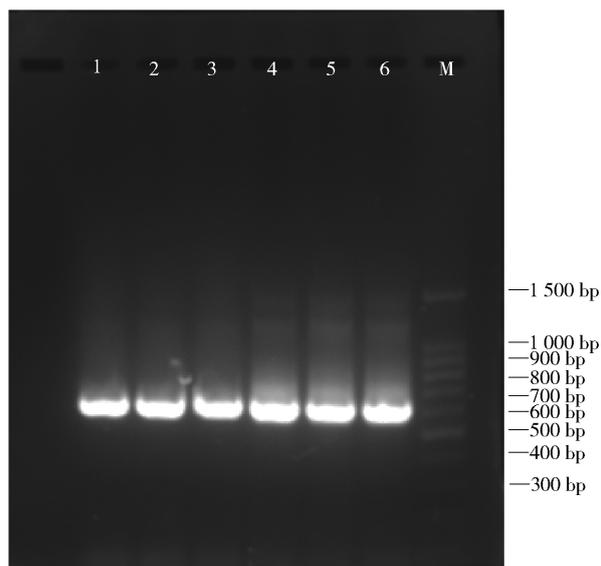
2.3 简并引物 PCR 产物的克隆与鉴定

菌液 PCR 扩增结果如图 2. 以所挑选的 6 个白色菌落菌液为模板, 经载体通用引物扩增 6 个阳性克隆的菌液 PCR 均在略大于 600 bp 处得到清晰明



M: 100 bp DNA ladder; 1, 2, 3, 4 中退火温度分别为 50.0, 53.6, 57.4, 60 °C

图 1 简并引物梯度 PCR 扩增产物结果
Fig. 1 Result of CODEHOP by gradient PCR



1 ~ 6 分别为阳性克隆的菌落 PCR, M 为 100 bp ladder DNA marker
图 2 TA 克隆阳性克隆的菌液 PCR 琼脂糖凝胶电泳图
Fig. 2 Agarose gel electrophoresis of PCR amplification of positive cloning

亮的特异性产物条带,产物大小与插入目的基因片段大小一致。

2.4 PCR产物的测序及序列比对

选取两个阳性克隆进行测序,测序结果显示,简并引物 PCR 产物长度为 614 bp,详细序列如下:
 AACTGGCCAGCCTTTTCTTAATCGACAGCACTGGCGA
 TTTTACTGAAAACCTCCGACTTTTGGAGCACTACCAG
 CCAGCCGGCTCCTACTCTTTGCCAAAGACCTGGCGG
 GCCTAAGCGAAAAGGCTGTTAAAGACGGCTGGCGA
 TTTACCGGCAGGCCGGCCAGGTTTGCTGCTCGCCAT
 TGACCAGGAAGCGGCTTAGTCAGCCGCTTGTCACC
 CTTTACCCAAACCGGCTTACCCAGCCAAGCTGAAC
 TTTTGAAAAAGGGGCTGACTTTTCTTAGCAGAAAA
 CCAAAGACGGCCCTGAAATTTAAAGATTTAGGCAT
 CAACTTGAACTTTGCTCCGCTGGCTGATCTTGCGCTT
 GATCCGGCCAGTTTCATCTACAGCCGGACCCTGCAAG

CAGGAGCTGAGGAAACCGGGCCGGCAATCGCGGCCT
 TTATCAAGCTCTACCGGCAGCTGGGAGTCCGCTCCTG
 CGCCAAGCATTTTCTGCTACGGGGATGCCGGCGAC
 ACCCACCAGGCTCCGGCTAAAGACCTTAGAAGCCTTA
 AAGAAGCCCAGCTGGATCTTTTACCTTTTAAAGCTGC
 GATCGCGGCGAGCGTGCCGACTATC

简并引物预测的产物长度约为 620 bp,而实际测序得到的产物长度为 614 bp. 可能是在去除载体序列时多去掉了几个碱基造成的,但测序结果与预测产物长度基本一致. 如表 2 所示,扩增物序列的 blastx 比对结果显示, LJJ 与 *L. delbrueckii* subsp. *lactis* DSM 20072 中 β -N-乙酰氨基己糖苷酶的一致性最高,而与 *Lactobacillus suebicus* KCTC 3549 中 β -N-乙酰氨基己糖苷酶的一致性最低,其一致性仍达到 40%. 因此,可以证明该扩增片段确为 LJJ 中 β -N-Acetylhexosaminidase 的部分基因片段。

表 2 简并引物 Hex1-f, Hex1-r 扩增序列的 blastx 比对结果

Tab. 2 Blastx results of amplified sequence with degenerate primer Hex1-f and Hex1-r

序列相似性比较	得分	期望值	一致性
β -N-Acetylhexosaminidase [<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i> DSM 20072]	396	9×10^{-137}	200/204 = 98
β -N-Acetylhexosaminidase [<i>Lactobacillus amylovorus</i> GRL 1112]	148	3×10^{-39}	88/208 = 42
β -N-Acetylhexosaminidase [<i>Lactobacillus salivarius</i> UCC118]	150	2×10^{-40}	85/209 = 41
β -N-Acetylhexosaminidase [<i>Lactobacillus kefiranofaciens</i> ZW3]	139	4×10^{-36}	84/208 = 40
β -N-Acetylhexosaminidase [<i>Lactobacillus suebicus</i> KCTC 3549]	135	8×10^{-35}	82/207 = 40

3 结 论

利用 iCODEHOP 在线简并引物设计软件,设计得到的简并引物对 Hex1-f 和 Hex1-r,可以从保加利亚乳杆菌 LJJ 中扩增得到大小为 614 bp 的扩增产物,经 TA 克隆测序,blastx 比对验证其为 β -N-乙酰氨基己糖苷酶部分基因片段. β -N-乙酰氨基己糖苷酶基因的获得为下一步采用荧光定量 RT-PCR 分析 β -N-乙酰氨基己糖苷酶基因在 LJJ 自溶的变化调控创造了条件。

LJJ β -N-乙酰氨基己糖苷酶保守基因片段的成功克隆证明由已知亲缘关系较近的同源物种的已知基因序列,利用 iCODEHOP 简并引物设计软件设计的简并引物可有效地扩增克隆得到目的物种的基因序列片段,从而为未知基因片段的获取提供高效便捷的途径。

参考文献:

[1] Slámová K, Bojarová P, Gerstorferová D, et al. Sequen-

cing, cloning and high-yield expression of a fungal β -N-acetylhexosaminidase in *Pichia pastoris* [J]. Protein Expression and Purification, 2012, 82:212-217.

[2] Slámová K, Bojarová P, Petrúšková L, et al. β -N-Acetylhexosaminidase: What's in a name...? [J]. Biotechnology Advances, 2010, 28:682-693.

[3] Masahiro Ogawa, Mai Kitagawa, Hideharu Tanaka, et al. A β -N-acetylhexosaminidase from *Symbiobacterium thermophilum* gene cloning, overexpression, purification and characterization [J]. Enzyme and Microbial Technology, 2006, 38:457-464.

[4] Uehara T, Parzych K R, Dinh T, et al. Daughter cell separation is controlled by cytokinetic ring-activated cell wall hydrolysis [J]. EMBO Journal, 2010, 29: 1412-1422.

[5] Chopin A, Bolotin A, Sorokin A, et al. Analysis of six prophages in *Lactococcus lactis* IL1403 different genetic structure of temperate and virulent phage populations [J]. Nucleic Acids Research, 2001, 29: 644-651.

[6] Bernard E, Rolain T, Courtin P, et al. Characterization of O-Acetylation of N-Acetylglucosamine a novel structural variation of bacterial peptidoglycan [J]. Journal of Biological Chemistry, 2011, 286: 23950-23958.

[7] Atsushi Furukawa, Kumiko Nakadi-Tsukui, Tomoyoshi

- Nozaki. Novel transmembrane receptor involved in phagosome transport of lysozymes and b-hexosaminidase in the enteric protozoan *Entamoeba histolytica* [J]. *PLoS Pathogens*, 2012, 8:1-15.
- [8] Boycel R, Chilana P, Rose T M. iCODEHOP a new interactive program for designing consensus-degenerate hybrid oligonucleotide primers from multiply aligned protein sequences [J]. *Nucleic Acids Research*, 2009, 37:222-228.
- [9] Rose T M, Schultz E R, Henikoff J G, et al. Consensus-degenerate hybrid oligonucleotide primers for amplification of distantly related sequences [J]. *Nucleic Acids Research*, 1998, 26: 1628-1635.
- [10] 高安崇, 史旭升, 孙永峰, 等. 鹅 *CAT-4* 基因的简并引物设计及克隆 [J]. *中国家禽*, 2010, 32(12):15-19.
- [11] 逢晓阳, 刑鑫, 刘国文, 等. 用 CODEHOP 设计简并引物克隆反刍月形单胞菌 K6 乙酸激酶基因片段 [J]. *中国兽医学报*, 2010, 30(1):102-106.
- [12] 任南琪, 林海龙, 李建政, 等. 用 CODEHOP 设计简并引物克隆 B49 乙酸激酶基因片段 [J]. *哈尔滨工业大学学报*, 2007, 39(8):1226-1230.
- [13] 李夏, 袁建军, 卢英华, 等. 简并 PCR 法克隆 *L. starkeyi* 苹果酸酶基因 [J]. *泉州师范学院学报: 自然科学版*, 2010, 28(2):59-62.
- [14] 姜晶, 孙颖, 刘红艳, 等. 人免疫球蛋白重链可变区基因引物设计方法的改良 [J]. *微生物学杂志*, 2012, 32(2):60-63.
- [15] 智强, 李淑慧, 高利宏, 等. 利用简并 PCR 克隆烟草节杆菌 02181 肌酸酶基因 [J]. *第三军医大学学报*, 2007(12): 65-68.
- [16] 侯林, 李楠, 伊男, 等. 中国卤虫早期胚胎发育相关基因的研究—*Orthodenticle* 基因克隆中简并引物的设计和优化 [J]. *辽宁师范大学学报: 自然科学版*, 2009, 32(1):99-101.
- [17] Chen M, Liu H L, Bai Y F, et al. Homologous-restraint polymerase Chain reaction: an efficient and rapid protocol to clone multiple homologous genes [J]. *Current Microbiology*, 2008, 57:51-54.
- [18] Zlateva K T, Crusio K M, Leontobich A M, et al. Design and validation of consensus-degenerate hybrid oligonucleotide primers for broad and sensitive detection of corona- and toroviruses [J]. *Journal of Virological Methods*, 2011, 177: 174-183.
- [19] Acevedo J P, Reyes F, Parra L P, et al. Cloning of complete genes for novel hydrolytic enzymes from Antarctic sea water bacteria by use of an improved genome walking technique [J]. *Journal of Biotechnology*, 2008, 13: 277-286.

Cloning of β -N-Acetylhexosaminidase Gene Fragment from *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* LJJ with Degenerate Oligonucleotide Primers

CUI Wen-ming, LIU Lu, ZHANG Shu-wen, PANG Xiao-yang, LI Hong-juan, LÜ Jia-ping*
(Key Laboratory of Agro-products Processing and Quality Control, Ministry of Agriculture/Institute of Agro-products Processing Science and Technology, Chinese Academy of Agricultural Science, Beijing 100193, China)

Abstract: β -N-Acetylhexosaminidase (β -Hexcase), produced by a wide variety of bacteria, plants and animals, behaves like typical exo-enzymes, catalyzing the cleavage of terminal non-reducing N-acetyl- β -hexosamine residues with important physiological roles in cell wall recycling. The β -hexcase sequence of relevant strains genetically close to *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* LJJ was selected, and degenerate primers were designed using online iCODEHOP and CODEHOP software. A pair of degenerate primers named hex1-f and hex1-r was chosen for PCR with the LJJ genome DNA as a template. A 614 bp PCR product was obtained, and was transformed into *E. coli* DH5 α using pGEM-T vector and sequenced after extraction of plasmids. Similarity alignment showed that the sequence of the cloned DNA was similar to those of known β -hexcase gene from other bacterial strains. Therefore, the cloned sequence was confirmed to be the putative β -hexcase gene fragment from LJJ strain. The results obtained in this study would provide basis for studying roles of β -Hexcase in cell wall lysis of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* strains.

Key words: *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*; β -N-Acetylhexosaminidase; degenerate primers

(责任编辑:叶红波)