

# 人铜锌超氧化物歧化酶基因在乳酸乳球菌中的食品级表达

卫文仲 向 华 谭华荣\*

(中国科学院微生物研究所 北京 100080)

**摘 要:**以 *lacF* 基因为食品级选择标记,构建了乳酸乳球菌食品级基因表达系统,并进而实现了人铜锌超氧化物歧化酶基因在乳酸乳球菌中的食品级表达。首先构建了含有 *lacF* 基因两侧同源 DNA 序列(0.5kb)的整合型质粒 pUCEmDE,通过 pUCEmDE 与乳酸乳球菌 MG5267 染色体上单拷贝的乳糖操纵子之间的同源双交换,构建了 *lacF* 基因缺失突变的食品级受体菌 WZ103( $Lac^-$ ),并经 PCR 及  $Lac$  表型检测所验证。然后构建了互补质粒 pMG36eF,其 *lacF* 基因的表达受组成型的强启动子  $P_{32}$  的控制。将其电转化导入 WZ103 后, $Lac^+$  表型得到恢复,表明 WZ103 中 *lacF* 基因的功能可被互补质粒 pMG36eF 上的 *lacF* 基因互补。随后,以互补质粒 pMG36eF 为基础,构建了不含任何抗生素抗性选择标记的人铜锌超氧化物歧化酶基因的食品级表达质粒 pWZ104。通过非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳和 SOD 活性凝胶染色分析,检测到 WZ103(pWZ104)中 Cu/Zn SOD 的表达,并且具有生物活性。

**关键词:** 乳酸乳球菌,食品级,铜锌超氧化物歧化酶,基因表达

中图分类号:Q786 文献标识码:A 文章编号:1006-6179(2003)03-0347-07

乳酸菌应用于食品工业,用来制作酸乳,干酪等发酵乳制品,起到改善风味、防治食物腐败、增加养分、提高免疫力等重要作用。乳酸乳球菌(*Lactococcus lactis*)是其中最重要的菌种之一,是在食品及医药工业具有重要应用前景的食品级微生物。几十年来乳酸乳球菌的分子遗传学研究发展迅速,目前已构建了多种基因表达系统,其中食品级表达系统要求宿主菌,选择标记和诱导物均为食品级,这为异源表达产物的直接应用提供了基础<sup>[1,2]</sup>。在这些系统中,传统表达系统中的抗生素抗性基因被食品级的选择标记如 *lacF* 基因<sup>[3,4]</sup>、无义抑制基因(*sup*)、细菌素(如乳链菌肽)抗性或免疫基因等替代,避免了抗生素抗性基因种间水平转移到胃肠道菌群中,使其产生耐药性而影响一些有重要医疗作用的抗生素的有效使用。乳酸乳球菌食品级基因工程菌株可以直接口服,而且不需要进一步的蛋白纯化,可简化生产工艺,降低生产成本。因此,在食品级表达系统中表达有重要生理功能的蛋白,这对产物的深入开发和应用是极为重要的。

超氧化物歧化酶(Superoxide dismutase, EC 1.15.1.1,简称 SOD)是广泛存在于生物体内,能清除体内有氧代谢产生的超氧自由基( $O_2^-$ ),因此是防御氧化损伤的重要酶类,已在化妆品、食品及保健品等领域获得应用,并在抗肿瘤发生,消炎和抗衰老等领域有临床应用前景<sup>[5,6]</sup>。本实验室通过逆转录 PCR 方法从人肝总 RNA 中克隆了人铜锌超氧化物

基金项目:国家自然科学基金资助项目(39800080)

\* 通讯作者。Tel/Fax 86-10-62654083; E-mail tanhr@sun.im.ac.cn

作者简介:卫文仲(1973-)男,湖北黄石人,在读博士生,主要从事微生物分子生物学方面的研究。

收稿日期:2002-08-16,修回日期:2002-10-31

歧化酶(Cu/Zn SOD)的cDNA,并在大肠杆菌和乳酸乳球菌中得到了活性表达[7]。

本文构建了以 *lacF* 基因为选择标记的乳酸乳球菌食品级基因表达系统,并在此基础上,实现了人 Cu/Zn SOD 在乳酸乳球菌中的食品级表达。

## 1 材料和方法

### 1.1 菌株、质粒和培养条件

大肠杆菌(*Escherichia coli*)JM109 为基因克隆受体。大肠杆菌 EC101 为染色体上整合了 pWV01 复制子 *repA* 基因的 JM101 衍生菌株,用作 *repA* 基因缺陷的整合型质粒 pORI19 (1)及其衍生质粒保存和扩增的标准菌株<sup>[8]</sup>。乳酸乳球菌 MG5267 染色体上整合了单拷贝的乳糖操纵子,用作构建食品级受体菌的出发菌株<sup>[9]</sup>。质粒 pET23b, pBluescriptM13<sup>-</sup> 和 pUC18 为大肠杆菌基因克隆载体。pMG36e 为乳酸乳球菌表达载体<sup>[10]</sup>。含人 Cu/Zn SOD 的 cDNA 的表达质粒 pET23bsod 由本实验室构建<sup>[7]</sup>。

大肠杆菌用 LB 培养基,37℃ 振荡培养。乳酸乳球菌的常规培养为在 GMRS 培养基,即补加 0.5% 葡萄糖的 MRS 培养基<sup>[11]</sup>中 30℃ 静置培养。食品级载体选择培养基为 LSA 培养基,即补加 1% 乳糖的 SA 培养基<sup>[12]</sup>;扩增用培养基为液体 LMRS 培养基,即补加 0.5% 乳糖的 MRS 培养基。2% 脱脂牛奶溶液用作乳糖利用表型(Lac)指示培养基。氨苄青霉素在大肠杆菌中的使用浓度为 100μg/mL。红霉素在大肠杆菌和乳酸乳球菌中的使用浓度分别为 150μg/mL 和 5μg/mL。

### 1.2 引物和 PCR 条件

本文使用的引物如下:P1 5'-CAGGATCCGTTGAATATGCAAAAG3'; P2 5'-AATCTA-GA-CATCTCTTCTCTGTTAC3'; P3 5'-ATTCTAGAGGAGCAAAGTAATTA3'; P4 5'-ACGAAATTCAG-GCATAACGAATGCT3'; P5 5'-AAGTCGACATAAAAACGGAGGATATTG3'; P6 5'-AAGGATCCAT-CACGAATAGCACGA3'; P7: 5'-CTGGTACCTTTCTTTTCATAAAA-3' 和 P8: 5'-GACAGCTG-CATATGGACTACCTCC-3',下划线处依次为 *Bam*HI、*Xba*I、*Xba*I、*Eco*RI、*Sal*I、*Bam*HI、*Kpn*I 和 *Nde*I 酶切位点。引物对 P1/P2, P3/P4 分别用于扩增乳糖操纵子中分别涵盖 *lacF* 基因内部及两侧部分序列的 D 和 E 片段(0.5kb);P5/P6 用于扩增包含 *lacF* 基因、SD 序列和部分下游序列的 F 片段(0.45kb);P7/P8 用于扩增 *lacA* 基因的启动子序列(*P<sub>lacA</sub>* (0.5kb))<sup>[9]</sup>。以上 PCR 反应均以 MG5267 总 DNA 为模板,反应的条件均为 95℃ 变性 3min,延伸 30 个循环(95℃ 变性 1min,52℃ 复性 1min,72℃ 延伸 1min),72℃ 延伸 7min。

### 1.3 重组质粒的构建

有关分子克隆,大肠杆菌感受态制备及转化均按文献[13]进行。采用碱变性法提取大肠杆菌和乳酸乳球菌的质粒 DNA<sup>[14]</sup>。乳酸乳球菌总 DNA 提取按文献[15]进行。乳酸乳球菌转化采用电穿孔转化法<sup>[16]</sup>。DNA 序列测定由大连宝生物公司完成。

**1.3.1 pUCEmDE 的构建**:以在乳酸乳球菌中不能独立复制的载体 pUC18 为基础构建整合型质粒 pUCEmDE,用于菌株 MG5267 上的 *lacF* 基因的部分缺失;并以红霉素抗性基因(*erm*)为转化子的选择标记。D 和 E 片段的 PCR 产物分别用 *Bam*HI 和 *Xba*I、*Xba*I 和 *Eco*RI 双酶切,插入到质粒 pET23b 或 pBluescriptM13 的相同位点,得到重组质粒 pET23b::D 和 pM13::E;经 DNA 测序验证后,分别用 *Bam*HI 和 *Xba*I、*Xba*I 和 *Eco*RI 双酶切

pET23b :D 和 pM13<sup>-</sup> :E 将得到的 D 和 E 片段插入 pORI19(1) 的 *Bam*HI 和 *Eco*RI 位点, 得到重组质粒 pORI19(1) :DE。用 *Nhe*I 和 *Eco*RI 从 pMG36e 上双酶切切下 *erm* 基因片段, 分别插入 pET23b 的 *Nhe*I 和 *Eco*RI 位点或 pUC18 的 *Xba*I 和 *Eco*RI 位点, 得到重组质粒 pET23bEm 和 pUCEm。pET23bEm 的 *Nhe*I-*Sal*I 片段(含 *erm* 基因)与 pORI19(1) :DE 的 *Sal*I-*Eco*RI 片段(含 D 和 E 片段)插入 pUC18 的 *Xba*I 和 *Eco*RI 位点, 构建成重组质粒 pUCEmDE。

**1.3.2 pMG36eF 的构建** :F 片段的 PCR 产物经 *Sal*I 和 *Bam*HI 双酶切后, 插入到 pBlue-scriptM13<sup>-</sup> 的相同位点, 再用 *Hinc*II 和 *Xba*I 从所得到的重组质粒 pM13<sup>-</sup> :F 上切下 F 片段并插入到 pMG36e 的 *Sma*I 和 *Xba*I 位点, 构建成互补质粒 pMG36eF。

**1.3.3 pUCAH 和 pWZ104 的构建** :P<sub>lacA</sub> 片段的 PCR 产物直接插入 T 载体 pUCmT( Sangon ) 中, 得到重组质粒 pUCA。从 pET23bsod 上用 *Nde*I 和 *Eco*RI 酶切下 Cu/Zn SOD 的 cDNA 序列, 与来自 pUCA 的含 P<sub>lacA</sub> 的 *Bgl*II-*Nde*I 片段插入 pUC18 的 *Bam*HI 和 *Eco*RI 位点, 得到重组质粒 pUCAD。pUCAD 的 *Eco*RI-*Hinc*II 片段(含 P<sub>lacA</sub> 和 Cu/Zn SOD 的 cDNA)与 pMG36eF 的 *Eco*RI-*Hpa*I 大片段(载体上的 *erm* 基因被去除)连接, 将连接产物转化食品级受体菌 WZ103, 直接涂布 LSA 平皿, 30℃ 培养 4~5d, 挑选并验证转化子, 构建成食品级表达质粒 pWZ104。

## 1.4 SOD 的活性检测

食品级 Cu/Zn SOD 表达菌株在 LMRS 液体培养基中 30℃ 静置培养过夜, 用新鲜培养基 1:50 稀释, 继续培养至对数后期, 离心收集菌体, 超声破碎。通过 7.5% 非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳和 SOD 活性凝胶染色检测 Cu/Zn SOD 的表达<sup>[17]</sup>。

## 2 结果和分析

### 2.1 *lacF* 基因缺失突变株 WZ103 的构建

整合型质粒 pUCEmDE 上含有 *lacF* 基因两侧(含部分内部序列)各 0.5kb 的同源 DNA 片段 D 和 E。将 pUCEmDE 电转化导入 MG5267, 经筛选得到了红霉素抗性表型(Em<sup>R</sup>)的整合转化子(IT01), 而在相同条件下, 对照质粒 pUCEm 得不到任何转化子, 表明 pUCEmDE 与乳酸乳球菌 MG5267 染色体上的同源片段(D 或 E)发生了重组整合。将 IT01 在没有红霉素的 GMRS 液体培养基中连续传代培养, 分别稀释涂布至 GMRS 培养基平板上, 通过影印法筛选红霉素敏感表型(Em<sup>S</sup>)的菌落。经 36 次传代培养及筛选, 得到八个 Em<sup>S</sup> 的菌落(其中一个命名为 WZ103), 即整合到染色体上的 pUCEmDE 通过第二次同源重组而从染色体环出的重组菌株。分别提取菌株的总 DNA, 用引物 P5 和 P6, 通过 PCR 检测染色体上 *lacF* 基因的结构。结果表明:MG5267 的染色体上含有完整的 *lacF* 基因, PCR 扩增出 444bp 的 DNA 片段(图 1, 带 1); IT01 的染色体上同时有完整的和有 282bp 的缺失的 *lacF* 基因, PCR 扩增出 444 和 162bp 的 DNA 片段(图 1, 带 2); 而 WZ103 的染色体上只有部分缺失的 *lacF* 基因, 只扩增出 162bp 的 DNA 片段(图 1, 带 3)。另外, 对各菌株的 Lac 表型进行了检测。脱脂牛奶中乳糖为主要碳源, 只有能以乳糖为唯一碳源生长的菌株才能正常生长并形成絮状沉淀, 因此 2% 的脱脂牛奶溶液可作为 Lac 表型的指示培养基。检测结果表明, 接种了 MG5267 的脱脂牛奶溶液在培养后产生了絮状沉淀, 而上层无色透明, 表明

MG5267 能以乳糖为唯一碳源进行生长,表型为  $Lac^+$ 。相反,接种了 IT01 和 WZ103 的脱脂牛奶溶液在培养后仍为乳白色浑浊液,表明它们的表型为  $Lac^-$ (图 2,管 1~3)。以上结果证明,通过同源双交换,构建了 *lacF* 基因缺失突变(内部发生 282bp 的缺失)的突变株 WZ103,并在以下实验中用作食品级受体菌。

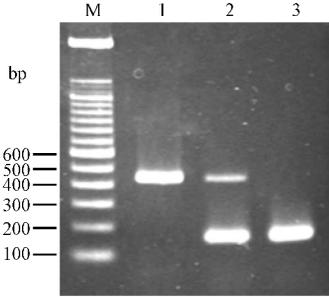


图 1 重组菌株的 PCR 验证

Fig. 1 PCR confirmation of recombinant strains

M. 100bp DNA ladder; 1. PCR product from MG5267; 2. PCR product from IT01; 3. PCR product from WZ103.

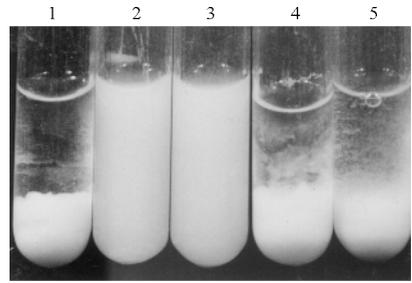


图 2 重组菌株的  $Lac$  表型检测

Fig. 2 Examination of  $Lac$  phenotype of recombinant strains

1. MG5267; 2. IT01; 3. WZ103; 4. WZ103( $pMG36eF$ ); 5. WZ103( $pWZ104$ ).

## 2.2 WZ103 中 *lacF* 基因功能的互补

在表达质粒  $pMG36e$  上,用于目的基因表达的强的组成型启动子  $P_{32}$  的下游,有一个仅编码部分氨基酸残基的开放阅读框(ORF32),使目的基因通常表达为融合蛋白,对产物的活性可能会有影响。因此,我们扩增了包括 *lacF* 基因的编码序列及其 SD 序列的 F 片段并插入到启动子  $P_{32}$  的下游,构建了互补质粒  $pMG36eF$ ;在该质粒上,*lacF* 基因的 SD 序列上游形成了一个翻译终止子,从而使 ORF32 的翻译提前终止,*lacF* 基因能通过翻译偶联<sup>[18]</sup>,以非融合蛋白的形式正确而有效的表达。质粒  $pMG36eF$  经限制性内切酶 *HincII*、*KpnI*、*NdeI* 酶切验证正确。

含互补质粒  $pMG36eF$  的受体菌 WZ103 在 2% 的脱脂牛奶溶液中的生长状况与 MG5267 相近(图 2,管 4),说明在 WZ103 中,通过  $pMG36eF$  上 *lacF* 基因的表达,能使 *lacF* 基因的功能得到互补, $Lac^+$  表型得到恢复。同时也说明,WZ103 染色体上 *lacF* 基因内部 282bp 的非移码缺失对同一转录元中 *lacF* 下游其它基因的表达和功能没有明显的影响。

## 2.3 Cu/Zn SOD 在乳酸乳球菌中的食品级表达

为了使异源基因能得到有效的表达,首先在重组质粒  $pUCAD$  上构建了一个基因表达框:Cu/Zn SOD 的 cDNA 的表达受上游的启动子  $P_{lacA}$  的控制;并且由于在引物中, $P_{lacA}$  的 5' 端和 Cu/Zn SOD 的 cDNA 的 3' 端均设计了含 ATG 起始密码子的 *NdeI* 位点,使表达的 Cu/Zn SOD 可以为天然蛋白。随后,将该表达框替代互补质粒  $pMG36eF$  上的 *erm* 基因片段,从而构建不含任何抗生素抗性基因,而以 *lacF* 基因为唯一选择标记的 Cu/Zn SOD 的食品级基因表达质粒  $pWZ104$ 。重组质粒  $pWZ104$  经限制性内切酶 *HincII*、*KpnI*、*NdeI* 酶切验证正确。

通过 7.5% 非变性聚丙烯酰胺电泳和 SOD 活性凝胶染色,对在 LMRS 培养基中生长的重组菌株 WZ103( $pWZ104$ ) 的蛋白提取物进行 Cu/Zn SOD 表达产物的检测,并以含互补

质粒 pMG36eF 的 WZ103 为阴性对照。结果表明,阴性对照菌株只能表达乳酸乳球菌的内源性 MnSOD<sup>[19]</sup>(图 3,1),而 WZ103(pWZ103)除了表达内源性 MnSOD 外,还特异地表达异源的人 Cu/Zn SOD,并具有生物活性(图 3,2 和 3)。另外,WZ103(pWZ104)在脱脂牛奶溶液中也能正常的生长(图 2,管 5),表明在乳糖选择压力下,食品级表达质粒 pWZ104 能在受体菌 WZ103 中稳定的遗传。

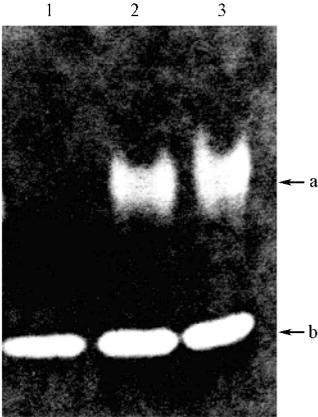


图 3 Cu/Zn SOD 在乳酸乳球菌中食品级表达产物的活性检测

Fig.3 Activity assay of Cu/Zn SOD expressed in *L. lactis*

1. SOD from WZ103(pMG36eF);
- 2,3. SOD from WZ103(pWZ104).

The arrows on the right side showed the positions of Cu/Zn SOD(a) and *L. lactis* MnSOD(b).

### 3 讨论

由于 SOD 有广泛的应用前景,对 SOD 的生理功能以及各种来源(包括动物、植物、微生物等)的 Cu/Zn SOD 的提取、纯化等进行了深入研究。目前,市场上的 Cu/Zn SOD 主要是从牛血清中提取的,其原材料来源比较丰富,但由于存在病原体的污染问题,特别是近年来朊病毒的流行使动物制品的应用受到了冲击。虽然有报道从多种植物中提取 Cu/Zn SOD,但需大规模的种植,受自然条件的影响较大,且生产周期长以及提取工艺复杂等因素限制了其工业化生产,而且动植物来源的 Cu/Zn SOD 对人体有一定的抗原性。利用微生物生长速度快,不受原材料及环境的影响,表达稳定且易于控制,工业化生产工艺成熟等优势生产重组人 Cu/Zn SOD 将是一个很好的发展方向,本实验室在大肠杆菌中高效诱导表达了人 Cu/Zn SOD,表达量占总蛋白的 50% 以上<sup>[7]</sup>,但大肠杆菌还含有一些毒蛋白,表达产物需要一系列纯化过程。为此,我们在乳酸乳球菌中表达了有活性的人 Cu/Zn SOD<sup>[7]</sup>。由于乳酸乳球菌是一种食品级的安全的微生物,表达产物无须纯化就可直接得到应用,

并且乳酸乳球菌在胃肠道内的抗逆性也可改善 SOD 的半衰期短及口服时易被胃肠道内的蛋白酶降解等不足,但该表达系统仍使用红霉素抗性基因(*erm*)作为选择标记,在生产 and 应用上受到了限制。食品级表达系统由于受体菌、选择标记及诱导物均为食品级,其突出的安全性特点使基因工程菌株可直接用于乳品发酵,表达产物无需纯化,从而在功能性食品的研制和生产中有很好的发展前景。因此,本文以 *lacF* 基因为唯一的选择标记构建了食品级表达系统,并利用该系统表达了有生物活性的 Cu/Zn SOD,表明该系统能很好的进行异源基因的表达,但表达水平还有待于对表达元件等的改进来得到进一步的提高;同时,乳酸乳球菌在生产中的主要原料是以乳糖为主要的碳源的牛奶等乳制品,能在生产过程中持续提供乳糖选择压力,也使该系统具有很强的实用性。可以预见,乳酸乳球菌的食品级基因表达系统是有重要的应用前景的。

## 参 考 文 献

- [ 1 ] 向 华, 譚华荣, 刘敬忠. 乳酸乳球菌基因表达载体受体系统的研究. 微生物学通报, 1998, **25**(4): 230 ~ 232.
- [ 2 ] 张振中, 陈秀珠, 贾土方, 等. 乳酸菌食品级基因表达系统. 生物工程学报, 2002, **18**(4): 516 ~ 520.
- [ 3 ] Platteeuw C, van Alen-Boerrigter I, van Schalkwijk S, et al. Food-grade cloning and expression system for *Lactococcus lactis*. *Appl Environ Microbiol*, 1996, **62**: 1008 ~ 1013.
- [ 4 ] MacCormick C A, Griffin H G, Gasson M J. Construction of a food-grade host/vector system for *Lactococcus lactis* based on the lactose operon. *FEMS Microbiol Lett*, 1995, **127**: 105 ~ 109.
- [ 5 ] 陈淮杨, 刘望夷. 从超氧化物歧化酶的发布和结构看其分子进化. 生物化学与生物物理进展, 1996, **23**(5): 408 ~ 413.
- [ 6 ] 袁勤生, 王志友, 翁清清, 等. 超氧化物歧化酶的研究现状及研究前景. 中国药学杂志, 1991, **26**(8): 456 ~ 459.
- [ 7 ] 向 华, 卫文仲, 譚华荣. 人铜锌超氧化物歧化酶基因的克隆和在乳酸乳球菌中的表达. 生物工程学报, 2000, **16**(1): 6 ~ 9.
- [ 8 ] Law J, Haandrikman A, Kok J, et al. A system to generate chromosomal mutations in *Lactococcus lactis* which allows fast analysis of targeted genes. *J Bacteriol*, 1995, **177**(24): 7011 ~ 7018.
- [ 9 ] van Rooijen R J, Gasson M J, de Vos M W. Characterization of the *Lactococcus lactis* lactose operon promoter: contribution of flanking sequences and LacR repressor to promoter activity. *J Bacteriol*, 1992, **174**(7): 2273 ~ 2280.
- [ 10 ] van de Guchte M, van der Vossen J M B M, Kok J, et al. Construction of a lactococcal expression vector: expression of hen egg white lysozyme in *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. *Appl Environ Microbiol*, 1989, **55**: 224 ~ 228.
- [ 11 ] de Man J C, Rofosa M, Sharpe M E. A medium for the cultivation of lactobacilli. *J Appl Microbiol*, 1960, **23**(1): 130 ~ 135.
- [ 12 ] van Niel E W, Hahn-Hägerdal B. Nutrient requirements of lactococci in defined growth media. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1999, **52**: 617 ~ 627.
- [ 13 ] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular cloning: A Laboratory Manual*, 2<sup>nd</sup> ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory press. 1989.
- [ 14 ] Birboim H C, Doly J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res*, 1979, **7**: 1513 ~ 1523.
- [ 15 ] Leenhouts K J, Kok J, Venema G. Stability of integrated plasmids in the chromosome of *Lactococcus lactis*. *Appl Environ Microbiol*, 1990, **56**: 2726 ~ 2735.
- [ 16 ] Holo H, Nes I F. High-frequency transformation, by electroporation, of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* grown with glycine in osmotically stabilized media. *Appl Environ Microbiol*, 1989, **55**: 3119 ~ 3123.
- [ 17 ] Beauchamp C, Fridovich I. Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Anal Biochem*, 1971, **44**: 276 ~ 287.
- [ 18 ] van de Guchte M, Kok J, Venema G. Distance-dependent translational coupling and interference in *Lactococcus lactis*. *Mol Gen Genet*, 1991, **227**: 65 ~ 71.
- [ 19 ] Sanders J W, Leenhouts K J, Haandrikman A J, et al. Stress response in *Lactococcus lactis*: Cloning, expression analysis, and mutation of the lactococcal superoxide dismutase gene. *J Bacteriol*, 1995, **177**(18): 5254 ~ 5260.

## Food-grade Expression of Human Cu/Zn-superoxide Dismutase Gene in *Lactococcus lactis*

Wei Wenzhong Xiang Hua Tan Huarong\*

( Institute of Microbiology , Chinese Academy of Sciences , Beijing 100080 , China )

**Abstract :** A food-grade gene expression system in *L. lactis* using the *lacF* gene as selection marker was constructed and further used for food-grade expression of human Cu/Zn superoxide dismutase ( Cu/Zn SOD ). Firstly , an integrative plasmid pUCEmDE containing homologous fragments with 0.5kb flank sequences of the *lacF* gene was constructed. The *lacF* gene was in-frame deleted by double cross-over between the plasmid pUCEmDE and the chromosomal DNA in *L. lactis* MG5267 and resulted in a food-grade host WZ103 that was confirmed by PCR and Lac phenotype examination. After that , a complementary plasmid pMG36eF in which the *lacF* gene was controlled by the strong constitutive promoter P<sub>32</sub> was electroporated into WZ103 and resulted in the restoration of Lac<sup>+</sup> phenotype , indicating that the *lacF* function in WZ103 could be complemented by the *lacF* gene in pMG36eF. Finally , a food-grade plasmid pWZ104 used for the expression of Cu/Zn SOD was constructed , in which the *lacF* gene was used as a selective marker instead of any antibiotic resistance genes. Expressed Cu/Zn SOD in WZ103( pWZ104 ) was demonstrated and showed biological activity through non-denatured PAGE and SOD activity gel-staining.

**Key words :** *Lactococcus lactis* , Food-grade , Cu/Zn SOD , Gene expression

Foundation item : Chinese National Natural Science Fund( 39800080 )

\* Corresponding author. Tel/Fax 86-10-62654083 ; E-mail tanhr@sun.im.ac.cn

Received date 08-16-2002

### 《微生物学报》投稿要求

1. 投稿范围 :凡有关微生物学基础研究、应用基础研究及其高技术创新等领域的研究成果 ,包括普通微生物学、工业、农业、医学和兽医微生物学、免疫学以及与微生物学有关的生物工程等方面的研究报告、简报等 本刊均欢迎投稿。

2. 应首次发表 :所有来稿均应未在公开出版的刊物上发表过。要求论点明确、数据可靠、行文简练、用词规范、图表清晰、结论合理。

3. 介绍信 :所有来稿要求一式两份。论文是否涉及保密、署名是否无误 ,请出示第一署名单位的介绍信。若是与国外作者合写的论文 ,应出示国外作者同意以中文形式发表及署名顺序的信函说明。

4. 作者联系方式 :请在投稿时提供通讯作者或第一作者的 Tel、Fax 和 E-mail 地址。

5. 审稿费 :投稿时请随寄 100 元审稿费 ,可通过邮局汇来( 务请在汇款单上注明汇款单位和稿件第一作者 ,我们将开具正式发票 )。

6. 投稿及汇款地址 ( 100080 )北京中关村 中国科学院微生物研究所内 《微生物学报》编辑部

欲知更详细的投稿要求请登陆我刊的网址 :Http://www.im.ac.cn/journals