

人胰岛素基因在乳酸菌中的表达及其对非肥胖 糖尿病(NOD)小鼠的作用

陈思维^{1,3}, 钟 瑾^{1*}, 还连栋²

(中国科学院微生物研究所 ¹微生物资源前期开发国家重点实验室 ²微生物代谢工程研究中心 北京 100101)

(³中国科学院研究生院 北京 100039)

摘 要:为实现人胰岛素基因在乳酸菌中的表达及探索其用作口服疫苗治疗 I 型糖尿病(T1DM)的可行性,首先将人胰岛素基因密码子替换为乳酸菌偏爱密码子,同时在 A、B 链序列间加入连接短肽序列,经引物退火拼接成人胰岛素基因。克隆至乳酸菌表达载体中后,利用电击转化法实现了带信号肽 SP_{Usp45} 的人胰岛素基因在乳酸乳球菌(*Lactococcus lactis*) MG1363 和干酪乳杆菌(*Lactobacillus casei*) ATCC27092 中的表达。Western blot 检测显示重组胰岛素位于细胞壁上,当菌体生长到 OD₆₀₀ 为 0.4 时达到最大表达量。用含有表达重组人胰岛素的 *Lactobacillus casei* ATCC27092/pSW501 菌体饲喂非肥胖糖尿病(NOD)小鼠,发现可刺激小鼠产生特异性抗体,同时使与免疫耐受相关的细胞因子 IL-4 水平明显升高(38.583 ± 2.083 pg/mL, P < 0.05)提示其对 NOD 小鼠产生免疫耐受有一定的作用,为研制乳酸菌口服疫苗防治 T1DM 的可行性进行了有益的探索。

关键词:胰岛素;干酪乳杆菌;乳酸乳球菌;表达;非肥胖糖尿病(NOD)小鼠

中图分类号:Q936,Q786 文献标识码:A 文章编号:0001-6209(2007)06-0987-05

I 型糖尿病(T1DM)是人体胰岛 β 细胞受到损伤不能分泌胰岛素(Insulin,INS)的一种自身免疫疾病,通过给 T1DM 的模型非肥胖糖尿病(Non-obese diabetic,NOD)小鼠口服胰岛素能减轻或延缓其发病过程^[1]。口服胰岛素能诱导产生免疫耐受,在此过程中,IL-4,TGF-β 等与耐受相关的细胞因子升高,促进了免疫耐受的形成,从而产生对胰岛 β 细胞的保护作用。可是直接口服胰岛素,由于其在胃肠道里的降解,会明显影响抗原的生物利用率。乳酸菌是一类公认为安全的生物体,在食品行业中已得到广泛应用。已有的研究表明,使用乳酸菌作为抗原的表达受体,能够一定程度保护抗原,同时作为免疫佐剂,会更好地刺激免疫系统^[2]。Bermúdez-Humarán LG 等^[3]在乳酸乳球菌(*Lactococcus lactis*)中共表达 HPV-16 的 E7 抗原和 IL-12,不但抑制了 HPV-16 诱导的肿瘤,并且获得长效的免疫力就是很好的例证。

本研究的主要目的是利用乳酸菌表达系统表达密码子优化的人胰岛素基因,并将其饲喂 NOD 小鼠,观察 NOD 小鼠的抗体及细胞因子的变化情况,为深入探索其治疗 T1DM 中的作用奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株与质粒:大肠杆菌(*Escherichia coli*) JTG1 和 JM109,乳酸乳球菌(*Lactococcus lactis*, *L. lactis*) MG1363 和干酪乳杆菌(*Lactobacillus casei*, *Lb. casei*) ATCC27092,质粒 pMG36e 均由本实验室保存;质粒 pVE5523^[4]由 JC. Piard 教授惠赠。

1.1.2 培养基:大肠杆菌的 LB 培养基参见文献[5],乳酸菌 GM17 和 MRS 培养基参见文献[6,7]。

1.1.3 引物:表 1 为本研究所用引物。

表 1 引物

Table 1 Primers

Primer	Sequences(5'→3')	Size(Da)Ybp
P1	AATTCITTTGTCAACCAACATTTTATG	7561/25
P2	TCGACTTACAGTACAGTACTTCTC	6978/23
P3	CAGTCGACTTTGTCAACCAACATTTATGTG	9121/30
P4	GCGATATCTTAGTTACAGTACTTCTCAAGTTG	9807/32
P5	CAGAATTCGGTATCGATAGCCCGCTAAT	9116/30
P6	GCTCTAGATTAGTTACAGTACTTCTCAAGTTG	9845/32

1.1.4 主要试剂和仪器:质粒 pMD18-T、各种限制性内切酶、T4 DNA 连接酶及 Ex-Taq DNA 聚合酶等

基金项目:国家 863 计划(2006AA10Z319)

* 通讯作者。Tel/Fax: 86-10-64807401; E-mail: zhongj@im.ac.cn

作者简介:陈思维(1981-),女,湖南湘潭人,硕士研究生,研究方向为乳酸菌分子遗传学。E-mail: chensiw@im.ac.cn

收稿日期:2007-03-20;接受日期:2007-04-02;修回日期:2007-08-28

购自 TaKaRa 公司; *pfu* polymerase 购自上海 Sangon 公司; 胰岛素抗体购自中国原子能科学研究院; $0.2\mu\text{m}$ PVDF 膜为 Millipore 公司产品; 小鼠 ELISA kit 购自 Jingmei 公司(R&D 公司产品分装); 其余试剂均为进口或国产分析纯; PCR 仪为 Biometra 公司产品; 电击转化仪和蛋白质电泳装置为 Bio-rad 公司产品。

1.2 DNA 操作

大肠杆菌质粒 DNA 提取、转化、DNA 酶切和连接操作按文献 [5] 进行; 乳酸菌质粒 DNA 提取按文献 [6] 进行; 乳酸菌感受态制备和电击转化按文献 [6, 7] 进行。

1.2.1 根据乳酸菌偏爱密码子设计合成 *ins* 基因: 用乳酸菌偏爱密码子^[8]替换 *ins* 基因(GenBank No.: NM_000207)序列中的 37 个碱基, 并在其 A, B 链序列之间加入连接肽的编码序列 5'-CGTAGATCTCCTAATGGAAAACGT-3', 根据其正负链序列设计八条引物, 用 T4 磷酸激酶加上 5'-Pi, 再加热至 95°C, 缓慢退火至室温, 连接过夜, 用引物 P1 和 P2 扩增得到 180bp 目的片段, 连接至 pMD18-T, 用氨苄西林抗性(100 $\mu\text{g}/\text{mL}$)筛选, PCR 鉴定重组子, 得到重组质粒 pSW101, 同时测序验证。

1.2.2 表达载体的构建: 用引物 P3 和引物 P4(P3 引入 *Sal* I 位点, P4 引入 *Eco* R V 位点)扩增合成的人胰岛素基因, 同时用 *Sal* I / *Eco* R V 酶切带有组成型启动子 P_{59} 和信号肽 sp_{Usp45} 序列的 pVE5523 和上述扩增片段, 连接后转化 *E. coli* JM109, 用氨苄西林抗性(100 $\mu\text{g}/\text{mL}$)筛选, PCR 鉴定重组子, 得到 pSW201。再以 pSW201 为模板, 用引物 P5 和 P6(P6 引入 *Xba* I 位点)扩增含有 $P_{59}::sp_{Usp45}::ins$ 的序列, *Xba* I 酶切该扩增片段, 同时 *Eco* R I 酶切 pMG36e, 平端化后再用 *Xba* I 酶切, 连接转化 *E. coli* JM109, 用红霉素抗性(100 $\mu\text{g}/\text{mL}$)筛选重组子并用 PCR 鉴定, 得到乳酸菌表达载体 pSW501, 同时构建不含有胰岛素基因的 pSW509 作为对照(图 1)。

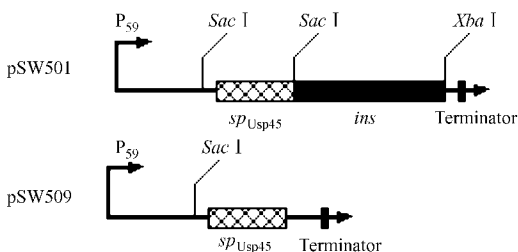


图 1 质粒 pSW501 和 pSW509 的构建

Fig. 1 Schematic diagram of plasmid pSW501 and pSW509.

1.3 INS 表达产物的制备

将 *L. lactis* MG1363/pSW501 或 *Lb. casei*

ATCC27092/pSW501 分别接种于 GM17 或 MRS 培养基中, 30°C 静置培养, 待菌体生长至所需要浓度时, 取样离心收集菌体和上清, 参照文献 [4] 制备上清浓缩物、细胞壁和细胞内组分。按文献 [9] 方法进行 Tricine SDS-PAGE, 将样品电转移至 PVDF 膜上备用。

1.4 Western blot 检测

参照文献 [5] 方法进行, 但有下列改动: 封闭和一抗温育后用 PBS 漂洗 3 次, 每次 8min; 二抗温育后用 PBS + 0.01% Tween 20 漂洗 3 次, 每次 8min。胰岛素抗体以 1:10000 稀释, 抗豚鼠 IgG-HRP 以 1:1000 稀释。

1.5 NOD 小鼠的饲养

自中国医学科学院实验动物研究所购得 4 周龄 NOD 小鼠 18 只, 将其随机分为 PBS 组, 对照组和实验组, 每组各 6 只。PBS 组用 0.4mL PBS 灌胃, 对照组用含量 10^{10} CFU/0.4mL 的 *Lb. casei* ATCC27092/pSW509 灌胃, 实验组用含量 10^{10} CFU/0.4mL 的 *Lb. casei* ATCC27092/pSW501 灌胃, 第一周每天灌胃一次, 此后每周一次。

1.6 NOD 小鼠肠道内重组 *Lb. casei* ATCC27092 的测定

从灌胃后第二天连续 6d 取实验组和对照组小鼠粪便 1 颗, 加 1mL 无菌水充分混匀, 稀释 10 倍后涂布于 MRS 平板培养基上, 菌落 PCR 鉴定是否有 *Lb. casei* ATCC27092/pSW501 和 *Lb. casei* ATCC27092/pSW509 存在。

1.7 NOD 小鼠血清中 IL-4 水平的检测

取喂养至 12 周龄的小鼠, 每组 4 只, 每只取血 0.2~0.3mL, 37°C 放置 1h, 4°C 过夜, 5000 × g 离心 5min 制备血清。用小鼠 IL-4 ELISA Kit 检测血清中 IL-4 的含量, 操作方法参照 Kit 说明。组间数据比较采用均数 *t* 检验。

1.8 NOD 小鼠血清中 SP_{Usp45}-INS 特异性抗体的检测

Lb. casei ATCC27092/pSW501 的细胞壁组分用 Tricine SDS-PAGE 进行分离, 转移至 PVDF 膜上, 每组各取 3 只小鼠的血清, 以 1:20 稀释作为一抗, 1:500 稀释的抗小鼠 IgG-HRP 作为二抗, 进行 Western blot 检测。

2 结果

2.1 人胰岛素基因的合成及乳酸菌表达载体的构建

2.1.1 人胰岛素基因的合成: 为有利于人胰岛素基因在乳酸菌中的表达, 在不改变人胰岛素一级序列的前提下, 根据密码子偏爱性将其替换为乳酸菌偏

爱密码子^[8],为使合成的人胰岛素接近于天然结构,同时在INS的A、B链之间加入易于形成 β 转角连接短肽RRSPNGKR,用引物退火拼接方法合成 ins 基因,连接至pMD18-T上,得到重组质粒pSW101。DNA测序结果显示, ins 基因中有37个碱基被替换,

```

1 1 TTTGTGAACCAACACCTGTGGGGCTCACAC
2 TTTGTCAACCAACATTATGTGGATCACAT
1 31 CTGGTGAAGCTCTCTACTAGTGTGGGG
2 TTAGTAGAAGCTTTGTATCTTGTTTGTGGT
1 61 GAACGAGGCTTCTTCTACACACCCCAAGAC
2 GAACGTGGATTTTCTATACACCTAAGACA
1 91 .....CGGCATT
2 CGTAGATCTCCTAATGGAAAACGTGGTATT
1 121 GTGGAACAATGCTGTACAGCATCTGCTCC
2 GTTGAACAATGCTGTACATCAATCTGTTC
1 151 CTCTACCAGCTGGAGAACTACTGCAAC
2 TTGTATCAACTTGGAGAACTACTGTAACATA
  
```

图2 ins 基因和改造的 ins 基因序列分析

Fig.2 Nucleotide sequence alignment of human ins gene and designed ins gene. 1: Nucleotide sequence of human ins gene; 2: Nucleotide sequence of designed ins gene.

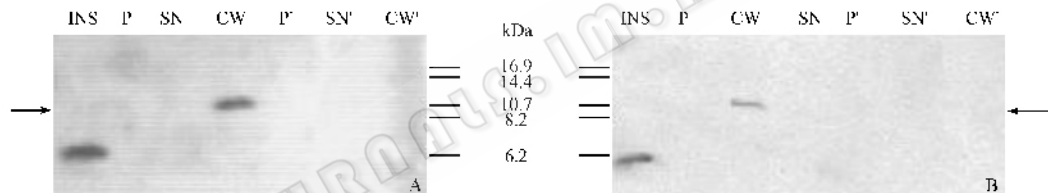


图3 INS在 *L. lactis* (A) 和 *Lb. casei* (B) 中的表达

Fig.3 Expression of INS in recombinant strains *L. lactis* (A) and *Lb. casei* (B). Protein extracts were analyzed by Western blot using anti-INS polyclonal antibodies. P: protoplasts; SN: supernatant; CW: cell wall; P', SN' and CW': negative control of P, CW and SN.

2.2.2 SP_{Usp45}-INS在乳酸菌不同生长期中表达量的分析:为进一步了解表达产物在乳酸菌中表达情况,我们选取不同生长期的培养物进行检测,图4揭示无论是 *L. lactis*/pSW501 还是 *Lb. casei*/pSW501,都是在 OD_{600} 为 0.4 时表达量最高,之后逐渐下降,到

与预先设计的序列相符(图2)。

2.1.2 乳酸菌表达载体的构建:经 *Sac* I / *Xba* I 酶切分析,结果显示除载体带外,还有一条 0.3kb 的 $sp_{Usp45}::ins$ 的片段,与预期一致(图略)。

2.2 人胰岛素基因在乳酸菌中的表达

2.2.1 ins 基因在 *L. lactis* 和 *Lb. casei* 中的表达:将 pSW501 分别电击转化 *L. lactis* MG1363 和 *Lb. casei* ATCC27092,挑取红霉素抗性和 PCR 鉴定阳性的转化子分析表达产物,结果发现将菌液上清浓缩至 50 倍时,仍未检测到 INS 的表达产物,究竟是人胰岛素基因在乳酸菌中没有表达还是表达产物没有如预期那样分泌至胞外呢?我们进一步分离菌体细胞壁和细胞其他组分,Western blot 检测结果表明,表达产物存在于细胞壁上,大小约为 10.7kDa,而在细胞内其他组分未检测到表达产物(图3)。可是该产物大小并非预期,由于所设计的 INS 大小应为 6.8kDa,SP_{Usp45} 的分子量为 4kDa,因此根据分子量推算应该是含有信号肽 SP_{Usp45} 序列的融合蛋白(SP_{Usp45}-INS)。

对数末期则几乎无法检测到蛋白表达,说明它们均在生长旺盛的对数期表达量较高。此外,表达产物在 *Lb. casei* 中不仅表达时间要长于 *L. lactis*,而且表达量也明显高于 *L. lactis*。

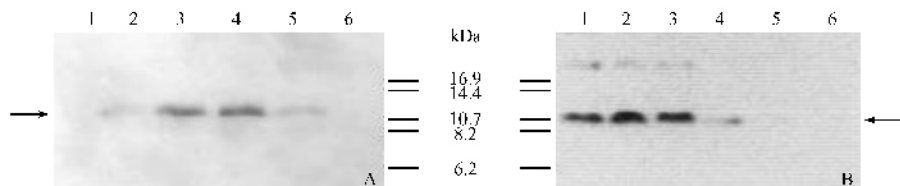


图4 SP_{Usp45}-INS 在不同生长时期的表达量分析

Fig.4 Expression of SP_{Usp45}-INS at different growth periods of recombinant strains *L. lactis* (A) and *Lb. casei* (B). Protein extracts were analyzed by Western blot using anti-INS antibodies. A: Line 1 to 6: 5×10^9 CFU cell wall extracts at OD_{600} 0.126, 0.225, 0.452, 0.887, 1.115, 1.326; B: Line 1 to 6: 10^9 CFU cell wall extracts at OD_{600} 0.316, 0.413, 0.433, 0.613, 0.833 and 1.158.

2.3 表达产物对 NOD 小鼠的作用

2.3.1 重组 *Lb. casei* ATCC27092 在 NOD 小鼠肠道内的存活时间:为检验表达产物是否具有预期的生

物学功能,我们选取 *Lb. casei* ATCC27092/pSW501 喂饲非肥胖糖尿病(NOD)小鼠,并观察其在 NOD 小鼠肠道内的存活时间。结果显示(表2)给小鼠口服

后第一天,所有鼠的肠道内均能检测到重组 *Lb. casei* ATCC27092 的存在。口服后第二天,仍有大部分鼠肠道能检测到重组 *Lb. casei* ATCC27092,但第三天所有小鼠均检测不到其的存在。该结果表明 *Lb. casei* ATCC27092/pSW501 可在 NOD 小鼠肠道内存活 48 h 以上。

表 2 重组 *Lb. casei* ATCC27092 在 NOD 小鼠肠道内存活时间

Table 2 Living time of recombinant *Lb. casei* ATCC27092 in NOD mice's gastrointestinal tract

Treatment group	Days		
	Day 1	Day 2	Day 3
<i>Lb. casei</i> ATCC27092/pSW501	6/6	5/6	0/6
<i>Lb. casei</i> ATCC27092/pSW509	6/6	4/6	0/6

2.3.2 NOD 小鼠血清中 IL-4 水平分析:图 5 结果显示对照组血清中 IL-4 水平为 31.917 ± 0.417 pg/mL,与 PBS 组 29.167 ± 1.448 pg/mL 相比有显著差异 ($P < 0.05$),而实验组血清中 IL-4 水平为 38.583 ± 2.083 pg/mL,与 PBS 组、对照组相比则有明显升高 ($P < 0.05$)。作为免疫耐受相关的典型细胞因子 IL-4 的升高,表明 *Lb. casei* ATCC27092/pSW501 可促进 NOD 小鼠免疫耐受的产生。

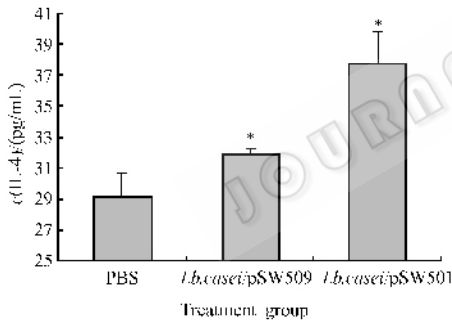


图 5 NOD 小鼠血清中 IL-4 水平检测

Fig. 5 Sera IL-4 levels in groups of mice immunized orally with PBS ($n = 4$), control strain *Lb. casei* ATCC27092/pSW509 ($n = 4$) or recombinant strain *Lb. casei* ATCC27092/pSW501 ($n = 4$). * $P < 0.05$

2.3.3 NOD 小鼠血清中 SP_{Usp45}-INS 特异性抗体的分析:由 Western blot 实验结果(图 6)可知,实验组小鼠体内产生了 SP_{Usp45}-INS 特异性的抗体,而其他两组并未发现特异性抗体的存在。这表明, *Lb. casei* ATCC27092/pSW501 可成功刺激 NOD 小鼠免疫系统产生抗体。



图 6 NOD 小鼠血清中 SP_{Usp45}-INS 特异性抗体的分析

Fig. 6 Analysis of specific anti-SP_{Usp45}-INS antibodies in NOD mice's sera. Protein extracts were analyzed by Western blotting using sera of group PBS ($n = 3$), control strain *Lb. casei* ATCC27092/pSW509 ($n = 3$) or recombinant strain *Lb. casei* ATCC27092/pSW501 ($n = 3$).

3 讨论

乳酸菌是一类革兰氏阳性菌,其中的某些益生菌对人体健康大有裨益,长期以来在人类生活和食品工业中获得广泛应用,被认为是一种安全的微生物(GRAS)^[2],近年来已经成为基因工程疫苗载体的研究热点。而在乳酸菌中表达外源基因时,其密码子第三位偏向于使用 A 或 U^[9],为更有利于人胰岛素基因在乳酸菌中表达,有必要将人胰岛素基因替换成乳酸菌偏爱的密码子。由于改造的胰岛素基因仅有 180bp,因此可直接替换全部乳酸菌偏爱的密码子,同时设计合适的连接短肽,通过引物拼接的办法进行人工合成。

本研究原本构建了含有和不含有 *sp*_{Usp45} 的重组质粒,可是不含有 *sp*_{Usp45} 的重组乳酸菌,无论胞内还是胞外都未见外源基因表达(结果未显示),而仅发现含有 *sp*_{Usp45} 的重组乳酸菌,其表达产物位于细胞壁上。SP_{Usp45} 是一个在乳酸菌基因工程中常用的信号肽,它可引导其 C 端的蛋白跨越乳酸菌的细胞壁,但已有研究结果显示 SP_{Usp45} 的分泌效率有时并不完全,它也导致蛋白会滞留在细胞内无法分泌^[4],或使蛋白停留在细胞壁上^[10],这种现象推测与表达蛋白本身的性质有关。本实验中的表达产物未能分泌于胞外而定位于细胞壁上,其原因可通过替换或改造信号肽基因增强分泌效率,或替换报告基因分析信号肽分泌效率等进行进一步的研究。

I 型糖尿病的发病原因是由于人体免疫系统识别自身抗原胰岛素,攻击胰岛 β 细胞导致损伤并进而影响胰岛素产生^[11,12]。近年来,人们不断探索将胰岛素作为口服黏膜免疫的疫苗的可能性,其原理是胰岛素抗原通过小肠黏膜的 Peyer's 区吸收,从而激活肠道相关淋巴组织,之后与耐受性相关的效应 T 细胞被激活,引发口服免疫耐受,从而保护胰岛不被损伤^[1]。前人研究工作表明,用胰岛素等自身抗原作为抗原给 NOD 小鼠口服,可以延缓或者降低糖尿病的发作^[13,14]。本研究在乳酸乳球菌和干酪乳杆菌中表达了胰岛素基因,用干酪乳杆菌作为 INS 的载体给 NOD 小鼠口服,实验结果表明其促进了 NOD 小鼠 IL-4 水平的升高,对产生免疫耐受有一定的作用,为人胰岛素基因在乳酸菌中的表达及研制口服疫苗的可行性进行了有益的探索。

参 考 文 献

- [1] Weiner HL. Oral tolerance: immune mechanisms and the generation of Th3-type TGF-beta-secreting regulatory cells. *Microbes and*
 © 中国科学出版社 2007 年 3 月 17 日出版 编辑部 http://journals.im.ac.cn

- [2] Nouaille S, Ribeiro LA, Miyoshi A, et al. Heterologous protein production and delivery systems for *Lactococcus lactis*. *Genet Mol Res* 2003 **2**(1): 102 – 111.
- [3] Bermúdez-Humarán LG, Cortes-Perez NG, Lefevre F, et al. A novel mucosal vaccine based on live Lactococci expressing E7 antigen and IL-12 induces systemic and mucosal immune responses and protects mice against human papillomavirus type 16-induced tumors. *J Immunol* 2005 **175**(11): 7297 – 7302.
- [4] Dieye Y, Usai S, Clier F, et al. Design of a protein-targeting system for lactic acid bacteria. *J Bacteriol* 2001 **183**(14): 4157 – 4166.
- [5] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 3rd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press 2001.
- [6] 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.
- [7] Berthier F, Zagorec M, Champonnier-Vergès M, et al. Efficient transformation of *Lactobacillus sake* by electroporation. *Microbiology* 1996 **142**: 12173 – 12179.
- [8] Fuglsang A. Lactic acid bacteria as prime candidates for codon optimization. *Biochem Biophys Res Commun* 2003 **312**(2): 285 – 291.
- [9] Schagger H, von Jagow G. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100kDa. *Anal Biochem* 1987 **166**(2): 368 – 379.
- [10] Oliveira ML, Areas AP, Campos IB, et al. Induction of systemic and mucosal immune response and decrease in *Streptococcus pneumoniae* colonization by nasal inoculation of mice with recombinant lactic acid bacteria expressing pneumococcal surface antigen A. *Microbes Infect* 2006 **8**(4): 1016 – 1024.
- [11] Atkinson MA, Maclaren NK. The pathogenesis of insulin-dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med* 1994 **331**(21): 1428 – 1436.
- [12] Hanninen A. Prevention of autoimmune type 1 diabetes via mucosal tolerance: is mucosal autoantigen administration as safe and effective as it should be? *Scand J Immunol* 2000 **52**(3): 217 – 222.
- [13] Ma S, Huang Y, Yin Z, et al. Induction of oral tolerance to prevent diabetes with transgenic plants requires glutamic acid decarboxylase (GAD) and IL-4. *J Immunol* 2005 **174**(8): 4516 – 4524.
- [14] Maron R, Guerau-de-Arellano M, Zhang X, et al. Oral administration of insulin to neonates suppresses spontaneous and cyclophosphamide induced diabetes in the NOD mouse. *J Autoimmun* 2001 **16**(1): 21 – 28.

Expression of human insulin in lactic acid bacteria and its oral administration in non-obese diabetic mice

CHEN Si-wei^{1,3}, ZHONG Jin^{1*}, HUAN Lian-dong²

(¹ State Key Laboratory of Microbial Resources, ² Center for Microbial Metabolism and Metabolic Engineering, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China)

(³ Graduate School of the Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039, China)

Abstract Type 1 diabetes mellitus (T1DM) is an auto-immune disease while oral administrating its autoantigens could be a treatment of T1DM. To express human insulin gene (*ins*) in lactic acid bacteria (LAB) for oral vaccine, *ins* gene was replaced by LAB bias codon and an 8-amino-acid-residue linker peptide forming a β -turn was designed to link insulin chain A and B. After synthesized by primer annealing method, the whole *ins* gene was fused with signal peptide sequence *sp*_{Usp45} subcloned into a LAB secretory expressive vector pSW501 and then introduced to *Lactococcus lactis* (*L. lactis*) MG1363 and *Lactobacillus casei* (*Lb. casei*) ATCC27092 respectively. Western blot showed that the expression product (SP_{Usp45}-INS protein) targeted mainly at the cell wall while little was found in cytoplasm or supernatant. The highest expression level emerged in exponential phase when the optical density at 600nm of the culture was 0.4. The culture of the recombinant strain *Lb. casei*/pSW501 was administered to non-obese diabetic (NOD) mice orally. ELISA and Western blot results showed that the recombinant strain could induce SP_{Usp45}-INS-specific antibodies and raise IL-4 level (38.583 ± 2.083 pg/mL, $P < 0.05$) in the mice's sera. Expression of insulin in the food-grade vehicle LAB could induce oral immune tolerance in NOD mice and protect it from pancreas injury, suggesting it might be a new way to the treatment of T1DM.

Keywords: insulin; *Lactobacillus casei*; *Lactococcus lactis*; expression; non-obese diabetic (NOD) mice

Foundation item: National Programs for High Technology Research and Development of China (2006AA10Z319)

* Corresponding author. Tel: 86-10-64807401; Fax: 86-10-64807401; E-mail: zhongj@im.ac.cn

Received: 20 March 2007/ Accepted: 2 April 2007/ Revised: 28 August 2007

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>