

# 乳酸乳球菌食品级诱导表达系统的构建及异源蛋白的表达

徐 波<sup>1</sup> 曹郁生<sup>1\*</sup> 陈 燕<sup>1</sup> 郭兴华<sup>1,2</sup>

(<sup>1</sup>食品科学教育部重点实验室 南昌大学中德联合研究院 南昌 330047)

(<sup>2</sup>中国科学院微生物研究所 北京 100080)

**摘 要** :以  $\alpha$ -*aga* 基因为食品级选择标记构建了乳酸乳球菌食品级高效诱导细胞内和细胞壁锚定表达系统 ,并用这一表达系统表达了铜绿假单胞菌融合外膜蛋白基因 *OprF/H*。首先以 pRAF800 和 pNZ8048 构建了含有  $\alpha$ -*aga*、*P*<sub>nisA</sub>-*MCS-T*<sub>pepN</sub> 和  $\theta$  复制子的乳酸乳球菌食品级细胞内诱导表达载体 pRNA48 ,再以 pRNA48 和 pVE5524 为出发载体构建了含有  $\alpha$ -*aga*、*P*<sub>nisA</sub>-*SPU*<sub>sp45</sub>-*nucA-CWA*<sub>M6</sub>-*U12* 和  $\theta$  复制子的乳酸乳球菌细胞壁锚定诱导表达载体 pRNV48。然后以食品级载体 pRNA48 和 pRNV48 为基础 ,构建了不含抗生素抗性选择标记的铜绿假单胞菌融合外膜蛋白基因的表达质粒 pRNA48-*OprF/H* 和 pRNV48-*OprF/H*。利用 nisin 进行重组乳酸乳球菌菌株的诱导表达 ,通过 SDS-PAGE 和 Western blot 分析 ,检测到表达蛋白分别占细胞内可溶蛋白的 9.6% 和细胞壁锚定蛋白的 9.8% ,表达产物具有免疫原性 ,可与含 *OprF/H* 的乳球菌以及铜绿假单胞菌发生特异性的凝集反应。

**关键词** :乳酸乳球菌 ;食品级载体 ;诱导表达系统 ;融合外膜蛋白

中图分类号 :Q786 Q93 文献标识码 :A 文章编号 :0001-6209 (2007) 04-0604-06

乳酸菌(lactic acid bacteria ,LAB)广泛存在于自然界 ,是人和动物正常菌群的主要成员 ,因其重要的生理功能和公认的安全性 ,在医药和食品工业中有着广泛的应用。随着分子生物学的发展 ,乳酸菌的功能和应用得到进一步开拓。乳酸菌的分子修饰和改造需要适于食品和医药要求的遗传元件 ,包括载体、选择标记和信号序列等。这意味着用于构建重组子的所有基因成分应当来自安全的微生物 ,由于食品用的乳酸菌、酵母等一般认为是安全的 (generally regarded as safe ,GRAS)<sup>[1-4]</sup> ,因而受到广泛地注意。研究与开发乳酸菌食品级载体-受体系统 ,探索重要基因在乳酸菌中的克隆表达已成为乳酸菌分子生物学研究的热点 ,这对于食品与发酵工业将是一个创新和推动。

乳酸菌食品级高效表达系统 NICE (the nisin-controlled expression ,NICE)系统是一个乳酸菌中应用广、可控性强的表达系统 ,它是在乳链菌肽(nisin)诱导下由 *nisA* 启动子控制目的基因表达的 ,含 *nisR* 和 *nisK* 的两组分调节系统的高效诱导表达系统。该系统在加入诱导物-乳链菌肽后其诱导效率可达 1000 倍以上。由于 NICE 系统的诱导剂、宿主菌和载体都是食品级的 ,具有良好的安全性 ,因此该系统

是可控制的蛋白质生产的理想的系统 ,其应用前景十分广阔<sup>[5,6]</sup>。

铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)是一种重要的常见的条件致病菌 ,是医院内感染的主要病原。铜绿假单胞菌的外膜蛋白(outer membrane protein ,Opr)在物质的跨膜运输中起着重要的作用 ,也是重要的抗原成分 ,近年来有许多利用外膜蛋白组分如 *OprF* ,*OprI* 或其融合蛋白制备疫苗的研究 ,并在应用中取得了可信的结果。在以前的工作中 ,本实验室构建了铜绿假单胞菌 *OprF/H* 融合基因和表达质粒 pGEX-*OprF/H* ,用 *E. coli* 成功地表达了 *OprF/H* ,并对重组融合蛋白的免疫原性以及免疫保护性进行了初步研究<sup>[7,8]</sup>。本研究中以  $\alpha$ -*aga* 基因为食品级选择标记 ,构建乳酸乳球菌食品级高效诱导细胞内表达和细胞锚定表达系统 ,利用该系统对铜绿假单胞菌融合外膜蛋白基因 *OprF/H* 进行了表达 ,并对表达蛋白的免疫原性进行了初步研究。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 主要试剂和仪器** :DNA 限制性内切酶购自 TaKaRa 公司 ;T4 DNA 连接酶、CIAP、PCR 产物纯化

基金项目 江西省自然科学基金(0330044)

\* 通讯作者。Tel :86-791-8327754 ;Fax :86-791-8333708 ;E-mail :yysccc@hotmail.com

作者简介 徐 波(1970 - )男 ,江西南昌人 ,博士 ,研究方向为食品生物技术。E-mail :xubo583@sohu.com

收稿日期 2006-12-29 接受日期 2007-03-22 修回日期 2007-05-24

试剂盒购自 Promega 公司;质粒提取试剂盒、DNA 回收试剂盒购自北京天为时代科技有限公司;蜜二糖、乳链球菌肽(nisin)、完全福氏佐剂及不完全福氏佐剂均为 Sigma 公司产品,其余常用试剂均为国产或进口分析纯。2400PCR 扩增仪(PE 公司);FR200 凝胶成像仪(上海复日公司);3K18 台式冷冻离心机(Sigma 公司);紫外分光光度计(Pharmacia Biotech 公司);电转化仪(Bio-Rad 公司)。

**1.1.2 菌株、质粒和培养基:**①质粒 pNZ8048、乳酸乳球菌 NZ9000(*L. lactis* NZ9000)由荷兰 NIZO Food Research 惠赠;质粒 pRAF800 由加拿大 Laval 大学 Moineau 博士惠赠;质粒 pVE5524 由法国 INRA 中心 J. C. Piard 博士惠赠;质粒 pGEM-OprF/H 为本实验室构建。②铜绿假单胞菌菌株(*Pseudomonas aeruginosa*) CMCC10104、CMCC10120、CMCC10122、CMCC10125 购自中国药品生物制品检定所。③培养基:GEL1 液体培养基(EL1 培养基<sup>[9]</sup>中含 0.5% 葡萄糖);GM17 液体培养基(M17<sup>[10]</sup>培养基中含 0.5% 葡萄糖);SMM17MC 培养基(M17 中含 0.5mol/L 蔗糖, 20mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 2mmol/L CaCl<sub>2</sub> 和 0.5% Melibiose);Mel-EL1 培养基(EL1 中含 40mg/L 溴甲酚紫和 0.5% Melibiose)。

**1.1.3 实验动物:**日本大耳白兔(购自江西劳动卫生职业病研究所实验动物中心)。

## 1.2 引物设计和 PCR 扩增

由于 pNZ8048 含有 *nisA* 启动子、多克隆位点和终止子的基因片段  $P_{nisA}-MCS-T_{pepN}^{[11]}$ , pVE5524 含有信号肽 *Usp45*、报告基因 *nucA*、细胞壁锚锭子 M6 和终止子的基因片段  $SP_{Usp45}-nucA-CWA_{M6}-t1t2^{[12]}$ , 根据已报道的  $P_{nisA}-MCS-T_{pepN}$ 、 $SP_{Usp45}-nucA-CWA_{M6}-t1t2$  和 *OprF/H*<sup>[8]</sup> 基因序列,设计相应的上游和下游引物,分别引入酶切位点(用下划线标出),见表 1。引物均由上海生物工程技术有限公司合成。PCR 扩增<sup>[11]</sup>反应结束后,取 PCR 产物作琼脂糖凝胶电泳进行分析。

表 1 合成的引物序列及限制性酶切位点

Table 1 Primer sequence and site

Primer	Sequence(5'→3')	Enzyme site
PA1	GCCTCTAGAAATTAATTCGAAAGTTTGTAGATACAAT	<i>Xba</i> I
P2	TAATCTAGAGCTAGCTTGATGTTCTATCGAAAGCGAAATCA	<i>Nhe</i> I
PV1	AGCCATGGAACCGAACTTAATGGGAGG	<i>Nco</i> I
PV2	GAAGCTAGCGCGAAAAAGCCATCCGTCAGGA	<i>Nhe</i> I
PO1	ATCGC <u>AT</u> GGTGTGTCATCGGCTCGCTGGTTGC	<i>Nco</i> I
PO2	ATCGAAGC <u>TT</u> TCGGTCTCGCCCTGGTGC	<i>Hin</i> dIII
PO3	ATCGGTCGAC <u>GT</u> TGTCATCGGCTCGCTGGTTGC	<i>Sal</i> I
PO4	ATCGGATATCGG <u>TT</u> CTCGGCTGGTGC	<i>Eco</i> RV

**1.3 食品级表达载体的构建和 OprF/H 的诱导表达**  
分子生物学的常规操作参照文献[13]及有关产品的说明书进行。

以 pNZ8048 为模板用引物 PA1 和 PA2 扩增  $P_{nisA}-MCS-T_{pepN}$ , 回收、纯化 PCR 产物, *Xba* I 酶切后, 与用 *Xba* I 酶切并去磷酸化的 pRAF800 载体连接, 转化入 *L. lactis* NZ9000<sup>[14]</sup>, 由于 pRAF800 含有食品级选择标记  $\alpha$ -*aga*, 因此可根据发酵蜜二糖的特征筛选重组子<sup>[9]</sup>, 经克隆子鉴定, 得到的乳酸菌食品级细胞内诱导表达载体命名为 pRNA48。然后以 pVE5524 为模板, 用引物 PV1 和 PV2 扩增  $SP_{Usp45}-nucA-CWA_{M6}-t1t2$ , 回收、纯化 PCR 产物, *Nco* I 和 *Nhe* I 酶切后, 与用 *Nco* I 和 *Nhe* I 酶切的载体 pRNA48 连接, 电转化法转入 *L. lactis* NZ9000 中, 经食品级标记筛选和克隆子鉴定, 获得的乳酸菌细胞壁锚定诱导表达载体命名为 pRNV48。以 pGEX-OprF/H 为模板, 用引物 PO1 和 PO2、PO3 和 PO4 扩增出 *OprF/H* 基因, 分别克隆入载体 pRNA48 和 pRNV48 中, 用电转化法将重组载体转入 *L. lactis* NZ9000 中, 经筛选和克隆子鉴定, 获得重组载体 pRNA48-OprF/H 和 pRNV48-OprF/H。

*OprF/H* 的诱导表达按照文献[15]的方法进行。乳酸球菌细胞总蛋白和细胞壁蛋白的提取参照文献[16]的方法进行。SDS-PAGE 鉴定表达产物的分子量参照文献[17]方法进行。Western blot 按文献[13]进行。

## 1.4 重组蛋白动物免疫试验

将实验动物随机分为 4 组:注射组、口服组、实验对照组以及空白对照组。口服免疫和注射免疫同步进行。实验对照组用 *L. lactis* NZ9000 粗蛋白注射或 *L. lactis* NZ9000 活菌液口服。

**1.4.1 注射免疫试验:**提取 *L. lactis* NZ9000/pRNA48-OprF/H 细胞内蛋白和 *L. lactis* NZ9000/pRNV48-OprF/H 细胞壁蛋白, 分别加入等体积的完全福氏佐剂或不完全福氏佐剂制备抗原用于免疫。制备抗原的免疫剂量为每 kg 体重 200 $\mu$ g, 采用皮下多点注射的方法进行免疫, 共 3 次, 免疫间隔为 1 周。首次免疫采用加有完全福氏佐剂加蛋白注射, 后两次采用不完全福氏佐剂加蛋白进行免疫, 免疫后第 6 周从兔耳静脉采血并分离血清。

**1.4.2 口服免疫:**取 nisin 诱导 3h 后的 *L. lactis* NZ9000/pRNA48-OprF/H 活菌液( $1 \times 10^9$  cfu/mL), 以及 nisin 诱导 1h 后的 *L. lactis* NZ9000/pRNV48-OprF/H 菌液( $4 \times 10^9$  cfu/mL) 分别灌入实验兔胃中, 用量为

20mL。一周饲喂两次,共6周,到第6周采血并取血清。

### 1.5 凝集反应

按常规免疫学方法操作。将铜绿假单胞菌菌株(CMCC10104、CMCC10120、CMCC10122、CMCC101-25) *L. lactis* NZ9000、*L. lactis* NZ9000/pRNA48-OprF/H 和 *L. lactis* NZ9000/pRNV48-OprF/H 菌悬液与稀释的抗血清在微量滴定板上进行直接凝集反应,以未免疫血清和生理盐水为对照。

## 2 结果

### 2.1 乳酸乳球菌食品级诱导表达系统细胞内表达及细胞壁锚定表达载体的构建

从 pNZ8048 中扩增  $P_{nisA}$ -MCS- $T_{pepN}$  片段,克隆到食品级载体 pRAF800 中,得到乳酸乳球菌食品级细胞内诱导表达载体 pRNA48。经质粒大小比较、PCR法和限制酶酶切法鉴定以及目的基因测序,证明 pRNA48 构建正确(图1)。然后,从 pVE5524 中扩增  $SP_{Usp45-nucA-CWA_{M6-tIt2}}$  片段,克隆到 pRNA48 中,构建乳酸乳球菌食品级细胞壁锚定诱导表达载体 pRNV48,经检测,证明 pRNV48 构建正确(图2)。

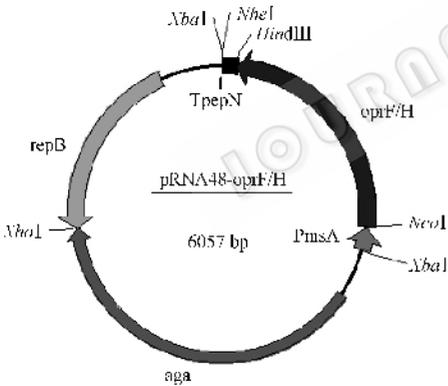


图1 质粒 pRNA48-OprF/H 的物理图谱

Fig.1 The physical map of plasmid pRNA48-OprF/H. The gene *OprF/H* was inserted into the site of *Nco*I and *Hind*III of pRNA48.

### 2.2 含铜绿假单胞菌融合外膜蛋白基因 *OprF/H* 的乳酸乳球菌重组表达载体的构建

从 pGEX-OprF/H 中扩增出 *OprF/H* 基因(图3),分别克隆入食品级载体 pRNA48 和 pRNV48 中,得到乳酸乳球菌食品级细胞内诱导表达重组载体 pRNA48-OprF/H 和细胞壁锚定诱导表达重组载体 pRNV48-OprF/H,其物理图谱如图1,图2所示。

### 2.3 *L. lactis* NZ9000/pRNA48-OprF/H 融合蛋白 SDS-PAGE 检测结果和分析

对数生长期的重组菌株 *L. lactis* NZ9000/

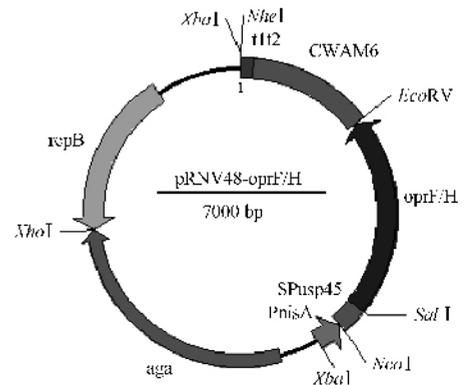


图2 质粒 pRNV48-OprF/H 的物理图谱

Fig.2 The physical map of plasmid pRNV48-OprF/H. The gene *OprF/H* was inserted into the site of *Sal*I and *Eco*RV of pRNV48.

pRNA48-OprF/H 分别用 5ng/mL 和 10ng/mL 的 nisin 诱导 1~12h,提取细胞总蛋白,用 SDS-PAGE 检测 *OprF/H* 的表达量,结果表明采用 10ng/mL 的 nisin 诱导重组菌株 3h,*OprF/H* 表达量达到最高,占细胞内可溶蛋白的 9.6%(图3泳道3)。

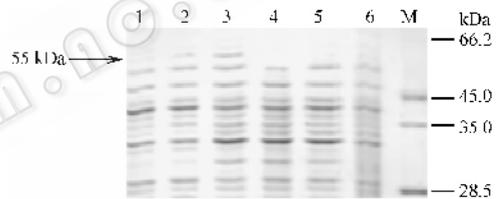


图3 pRNA48-OprF/H 在 *L. lactis* NZ9000 中的诱导表达凝胶电泳分析(nisin 诱导浓度 10ng/mL)

Fig.3 SDS-PAGE analysis of the extracts of strain *L. lactis* NZ9000 containing pRNA48-OprF/H. 1~5: induction with 10ng of nisin per ml after 1h, 2h, 3h, 6h, 12h respectively; 6: *L. lactis* NZ9000/pRNA48 as control; M: low-range protein molecular weight markers (kDa). The bands of *OprF/H* are indicated by arrow.

### 2.4 *L. lactis* NZ9000/pRNV48-OprF/H 融合蛋白 SDS-PAGE 检测结果和分析

经 1ng/mL 和 5ng/mL 的 nisin 诱导对数期的重组菌株 1~12h 后,提取细胞壁蛋白,用 SDS-PAGE 检

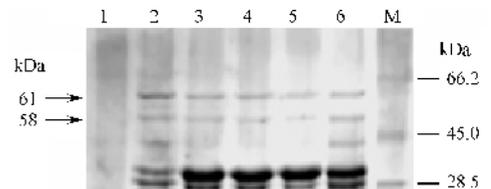


图4 pRNV48-OprF/H 在 *L. lactis* NZ9000 中的诱导表达凝胶电泳分析(nisin 诱导浓度 1ng/mL)

Fig.4 SDS-PAGE analysis of the cell wall protein from *L. lactis* NZ9000 containing pRNV48-*oprF/H*. 1: *L. lactis* NZ9000 control; 2-6: induction with 1ng of nisin per ml after 12h, 6h, 3h, 2h, 1h respectively; M: low-range protein molecular weight markers (kDa). The bands of

测 OprF/H 的表达量。结果显示(图 4), 采用 1ng/mL 的 nisin 诱导重组菌株 1h, OprF/H 表达量达到最高, 含细胞壁锚定的 OprF/H (OprF/H + CWA<sub>M6</sub>, 55kDa) 和细胞壁锚定的 OprF/H 前体 (OprF/H + CWA<sub>M6</sub> + SP<sub>USP45</sub>, 61kDa) 占细胞壁蛋白的 9.8%。

## 2.5 重组菌株蛋白的免疫原性

重组菌株细胞内蛋白和细胞壁蛋白免疫动物结束后采集抗血清进行直接凝集反应, 结果显示(表 2~5)免疫抗血清与重组菌和铜绿假单胞菌的直接凝集反应均显阳性。

表 2 注射组直接凝集反应结果

Table 2 Results of the direct agglutination of injection group.

Antiserum and control group	Bacteria					
	<i>L. lactis</i>		PA		PA	
	NZ9000/pRNA48-OprF/H	NZ9000/pRNV48-OprF/H	CMCC 10104	CMCC 10120	CMCC 10122	CMCC 10125
<i>L. lactis</i> NZ9000/pRNA48-OprF/H	+	+	+	+	+	+
<i>L. lactis</i> NZ9000/pRNV48-OprF/H	+	+	+	+	+	+
0.9% NaCl control group	-	-	-	-	-	-

PA: *Pseudomonas aeruginosa*.

表 3 口服组直接凝集反应结果

Table 3 Results of the direct agglutination of oral group

Antiserum and control group	Bacteria					
	<i>L. lactis</i>		PA		PA	
	NZ9000/pRNA48-OprF/H	NZ9000/pRNV48-OprF/H	CMCC 10104	CMCC 10120	CMCC 10122	CMCC 10125
<i>L. lactis</i> NZ9000/pRNA48-OprF/H	+	+	+	+	+	+
<i>L. lactis</i> NZ9000/pRNV48-OprF/H	+	+	+	+	+	+
0.9% NaCl control group	-	-	-	-	-	-

PA: *Pseudomonas aeruginosa*.

表 4 注射对照组直接凝集反应

Table 4 Results of the direct agglutination of injection control

Serum and control group	Bacteria					
	<i>L. lactis</i> NZ9000	PA CMCC 10104	PA CMCC 10120	PA CMCC 10122	PA CMCC 10125	PA CMCC 10125
	<i>L. lactis</i> NZ9000 serum	+	-	-	-	-
0.9% NaCl control group	-	-	-	-	-	-

PA: *Pseudomonas aeruginosa*.

表 5 口服对照组直接凝集反应

Table 5 Results of the direct agglutination of oral control

Serum and control group	Bacteria				
	<i>L. lactis</i> NZ9000	PA CMCC 10104	PA CMCC 10120	PA CMCC 10122	PA CMCC 10125
	<i>L. lactis</i> NZ9000 serum	+	-	-	-
0.9% NaCl control group	-	-	-	-	-

PA: *Pseudomonas aeruginosa*.

## 2.6 重组菌株融合蛋白 Western blot 分析

在免疫第 4 周至第 5 周阶段采集兔血清进行 Western blot 免疫印迹分析, 结果表明注射组和口服组的兔体内均能产生相应的抗 OprF/H 血清, 能分别与重组菌株细胞内诱导表达的 OprF/H (55kDa)、细胞壁锚定诱导表达的 OprF/H (58kDa) 和细胞壁锚定诱导表达的 OprF/H 前体 (61kDa) 起阳性反应(图 5),

说明产生的抗体分别能特异性地识别相应的 OprF/H, 初步证明重组乳酸球菌诱导表达的 OprF/H 具有良好的免疫原性和特异性。

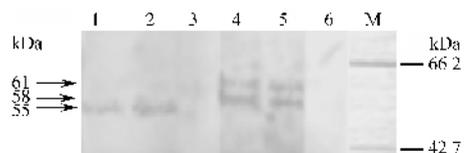


图 5 OprF/H 融合蛋白的免疫印迹分析

Fig. 5 Western blot analysis of fusion OprF/H expressed in recombinant. 1: Reaction between antiserum from *L. lactis* NZ9000/pRNA48-OprF/H protein and cellular OprF/H antigens (oral group); 2: Reaction between antiserum from *L. lactis* NZ9000/pRNA48-OprF/H protein and cellular OprF/H antigens (injection group); 3: Reaction between negative control serum and cellular OprF/H antigens; 4: Reaction between antiserum from *L. lactis* NZ9000/pRNV48-OprF/H CWA protein and CWA OprF/H antigens (oral group); 5: Reaction between antiserum from *L. lactis* NZ9000/pRNV48-OprF/H CWA protein and CWA OprF/H antigens (injection group); 6: Reaction between negative serum and CWA OprF/H antigens; M: Prestained low-range protein molecular weight Marker running on the same gel with antigen samples.

## 3 讨论

与大多数乳酸乳球菌和其他乳酸菌不同, 棉子糖乳球菌 (*L. raffinolactis*) 带有  $\alpha$ -半乳糖苷酶基因

( $\alpha$ -aga) 是降解蜜二糖的关键酶,借此可开发新的食品级选择标记。当  $\alpha$ -aga 基因克隆到其他不能发酵蜜二糖的乳球菌中,重组乳球菌就可发酵蜜二糖产酸,使溴甲酚紫由紫色(pH7.2)变为黄色(pH5.2)。根据这一特征可以进行阳性克隆子的筛选。因此蜜二糖代谢表型特征(Mel<sup>+</sup>)可作为食品级显性选择标记<sup>[9]</sup>。在目的蛋白生产中,乳酸菌分泌表达有很多优点,可使异源蛋白前体逃避蛋白水解作用,并可使目的蛋白与其靶位相互作用,从而大大增加异源蛋白表达量;用同源的乳球菌 SP<sub>usp45</sub> 代替葡萄球菌 SP<sub>Nuc</sub>、将异源蛋白与信号肽融合,均可提高分泌表达效率、增加产量<sup>[15,18~22]</sup>。

本研究根据乳酸菌可控制诱导表达系统和分泌表达原理,以载体 pRAF800、pNZ8048 和 pVE5524 为出发载体,构建乳球菌食品级细胞内诱导表达载体 pRNA48 和细胞壁锚定诱导表达载体 pRNV48,用于乳球菌中外源蛋白细胞内高效诱导表达和细胞壁锚定诱导表达。构建的食品级载体 pRNA48 和 pRNV48 均为  $\theta$  型复制的翻译融合型载体,分别含有  $\alpha$ -aga、*P<sub>nisA</sub>-MCS-T<sub>pepN</sub>*、*P<sub>nisA</sub>-SP<sub>usp45</sub>-nucA-CWA<sub>M6</sub>-tIt2* 和  $\theta$  型复制子。

通过对铜绿假单胞菌外膜蛋白的表达,分析了所构建的载体对异源蛋白的表达能力。在我们以前的工作中构建了铜绿假单胞菌 OprF、OprH 的融合外膜蛋白及表达载体<sup>[7,8]</sup>。本研究中将该 *OprF/H* 融合基因克隆入 pRNA48 和 pRNV48 中,对诱导方法、表达功能以及表达蛋白的免疫原性进行了研究。

当 *L. lactis* NZ9000/pRNA48-OprF/H 和 *L. lactis* NZ9000/pRNV48-OprF/H 培养至对数期时分别加入 10ng/mL<sup>-1</sup> 和 1ng/mL<sup>-1</sup> 诱导剂 nisin,使细菌的生长与外源基因的表达分开成为两个阶段,减轻宿主细胞的代谢负荷,位于 *nisA* 启动子下游的 *OprF/H* 基因被激活转录,表达出所需的 *OprF/H* 融合蛋白。诱导 3h 和 1h 后检测表达的细胞内 *OprF/H* 融合蛋白(55kDa)和细胞壁锚定的 *OprF/H* 融合蛋白(58kDa)与期望的理论值相符,最高表达量可达宿主菌细胞内可溶性蛋白 9.6% 和宿主菌细胞壁的蛋白质 9.8% 左右。但是在 1ng/mL 和 5ng/mL 浓度的 nisin 诱导 *L. lactis* NZ9000/pRNV48-OprF/H 12h 后,SDS-PAGE 显示细胞壁锚定的 *OprF/H* 前体条带的下方均出现了一条带,这可能是乳酸乳球菌细胞壁管家蛋白酶 HtrA 水解 *OprF/H* 的结果。

采用口服重组菌株菌体和注射 *L. lactis* NZ9000/pRNA48-OprF/H 细胞内蛋白及 *L. lactis*

NZ9000/pRNV48-OprF/H 细胞壁锚定蛋白免疫大白兔,得到的抗血清可与铜绿假单胞菌不同菌株发生特异性的凝集反应,也可与携带 *OprF/H* 的乳酸乳球菌发生特异性的凝集反应。注射组抗血清对铜绿假单胞菌的滴度达到 1:1280,口服组达到 1:640。

Western blot 分析结果表明 *L. lactis* NZ9000/pRNA48-OprF/H 胞内表达的 *OprF/H* 和 *L. lactis* NZ9000/pRNV48-OprF/H 细胞壁锚定表达的 *OprF/H* 具有较好的免疫原性,产生的抗体分别在 55kDa、58kDa 和 61kDa 处能特异性识别胞内 *OprF/H* 融合蛋白、细胞壁锚定的 *OprF/H* 和细胞壁锚定的 *OprF/H* 前体,同时发现口服重组菌体也能产生特异的抗体血清,初步证明重组蛋白具有黏膜免疫原性。

研究表明重组菌株通过诱导,可在细胞内表达和细胞壁锚定表达 *OprF/H*,细胞壁锚定的 *OprF/H* 可避免受到降解和变性,如人和动物胃的酶或酸性环境,使 *OprF/H* 融合蛋白能稳定表达并保持生物活性,增强宿主免疫反应,这对于探索抗铜绿假单胞菌口服疫苗具有一定意义。构建的系统还可用作其他活性蛋白的传递和表达,有着潜在的应用前景。

## 参 考 文 献

- [1] Lin MY, Harlander S, Savaiano D. Construction of an integrative food-grade cloning vector for *Lactobacillus acidophilus*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1996 **45**: 484 - 489.
- [2] Bron PA, Benchimol MG, Lambert J, et al. Use of the *alr* gene as a food-grade selection marker in lactic acid bacteria. *Appl Environ Microbiol*, 2002 **68**: 5663 - 5670.
- [3] Allison GE, Klaenhammer TR. Functional analysis of the gene encoding immunity to lactacin F, *laf I* and its use as a *lactobacillus*-specific food-grade genetic marker. *Appl Environ Microbiol*, 1996 **62**: 4450 - 4460.
- [4] Hickey RM, Twomey DP, Ross RP, et al. Exploitation of plasmid pMRC01 to direct transfer of mobilizable plasmids into commercial *lactococcal* starter strains. *Appl Environ Microbiol*, 2001 **67**: 2853 - 2858.
- [5] Pascalle GGA, de Ruyter, Oscar P Kuipers, et al. Controlled gene expression systems for *Lactococcus lactis* with the food-grade inducer nisin. *Appl Environ Microbiol*, 1996 **62**: 3662 - 3667.
- [6] Kuipers OP, De Ruyter PG, Kleerebezem M, et al. Quorum sensing-controlled gene expression in lactic acid bacteria. *J Biotechnology*, 1998 **64**: 15 - 21.
- [7] 廖立新,曹郁生,李国辉,等.铜绿假单胞菌外膜蛋白的免疫原性及免疫保护性.中华微生物学与免疫学杂志,2004, **24** (7): 571 - 572.
- [8] 张万山,陈燕,曹郁生.铜绿假单胞菌外膜蛋白 OprF 和 OprH 基因扩增、融合、克隆及原核表达.江西医学院学报, 2004, **44**(2): 59-61.

- [ 9 ] Boucher I ,Parrot M ,Gaudreau H ,et al. Novel food-grade plasmid vector based on melibiose fermentation for the genetic engineering *Lactococcus lactis*. *Appl Environ Microbiol* 2002 **68** : 6152 – 6161.
- [ 10 ] Terzaghi BE ,Sandine WE. Improved medium for lactic streptococci and their bacteriophages. *Appl Microbiol* ,1975 ,**29** :807 – 813.
- [ 11 ] De Ruyter PG ,Kuipers OP ,Vos WMD. Controlled gene exoression system for *Lactococcus lactis* with the food-grade inducer nisin. *Appl Environ Microbiol* ,1996 **62** :3662 – 3667.
- [ 12 ] Dieye Y ,Usai S ,Clier F ,et al. Design of a protein-targeting system for lactic acid bacteria. *J Bacteriol* 2001 **183** :4157 – 4166.
- [ 13 ] Sambrook J ,Russell DW. 分子克隆实验指南. 第三版. 黄培堂,等译. 北京: 科学出版社 2003.
- [ 14 ] Holo H ,Nes IF. High-frequency transformation ,by electroporation , of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* grown with glycine in osmotically stabilized media. *Appl Environ Microbiol* ,1989 ,**55** : 3119 – 3123.
- [ 15 ] Ribeiro LA ,Azevedo V ,Le Loir Y ,et al. Production and targeting of the *Brucella abortus* antigen L7/L12 in *Lactococcus lactis* : a first step towards food-grade live vaccines against brucellosis. *Appl Environ Microbiol* 2002 **68** :910 – 916.
- [ 16 ] Piard JC ,Hautefort I ,Fischetti VA ,et al. Cell wall anchoring of the *Streptococcus pyogenes* M6 protein in various lactic acid bacteria. *J Bacteriol* ,1997 **179** : 3068 – 3072.
- [ 17 ] 杨安钢,毛积芳,药立波. 生物化学与分子生物学实验技术. 第一版. 北京: 高等教育出版社 2001.
- [ 18 ] Bermudez-Humaran LG ,Langella P ,Commissaire J ,et al. Controlled intra- or extracellular production of *staphylococcal* nuclease and ovine omega interferon in *Lactococcus lactis*. *FEMS Microbiol Lett* ,2003 , **224** :307 – 313.
- [ 19 ] Le Loir Y ,Nouaille S ,Commissaire J ,et al. Signal peptide and propeptide optimization for heterologous protein secretion in *Lactococcus lactis*. *Appl Environ Microbiol* 2001 **67** :4119 – 4127.
- [ 20 ] Miyoshi A ,Poquet I ,Azevedo V ,et al. Controlled production of stable heterologous proteins in *Lactococcus lactis*. *Appl Environ Microbiol* 2002 **68** :3141 – 3146.
- [ 21 ] Bermudez-Humaran LG ,Langella P ,Miyoshi A ,et al. Production of human papillomavirus type 16 E7 protein in *Lactococcus lactis*. *Appl Environ Microbiol* 2002 **68** :917 – 922.
- [ 22 ] Enouf V ,Langella P ,Commissaire J ,et al. Bovine rotavirus nonstructural protein 4 produced by *Lactococcus lactis* is antigenic and immunogenic. *Appl Environ Microbiol* 2001 **67** :1423 – 1428.

## Construction of food-grade inducible expression system in *Lactococcus lactis* and expression of fusion OprF/H from *Pseudomonas aeruginosa*

XU Bo<sup>1</sup> ,CAO Yu-sheng<sup>1\*</sup> ,CHEN Yan<sup>1</sup> ,GUO Xing-hua<sup>1 2</sup>

(<sup>1</sup> The Key Laboratory of Food Science of Ministry of Education ,Jiangxi-OAI Joint Research Institute , Nanchang University ,Nanchang 330047 ,China )

(<sup>2</sup> Institute of Microbiology ,Chinese Academy of Sciences ,Beijing 100080 ,China )

**Abstract** :The food-grade inducible gene expression system in *L. lactis* was constructed for expression of cytoplasmic and anchored heterologous proteins. Gene  $\alpha$ -*aga* encoding  $\alpha$ -galactosidase was used as food-grade selectable marker instead of antibiotic resistance gene. Firstly a food-grade cytoplasmic inducible expression vector pRNA48 containing  $\alpha$ -*aga* ,theta replicon from pRAF800 ,and  $P_{nisA}$ -MCS- $T_{pepN}$  from pNZ8048 was constructed. Then the cell wall anchored expression vector pRNV48 containing  $\alpha$ -*aga* ,theta replicon ,and  $P_{nisA}$ - $SP_{Usp45}$ -*nucA*- $CWA_{M6}$ -*t1t2* was constructed based on the plasmids pRNA48 and pVE5524 ,which was suitable for the heterologous proteins anchored to the cell wall of *L. lactis* NZ9000. The fusion *OprF/H* derived from *Pseudomonas aeruginosa* was cloned into plasmids pRNA48 and pRNV48 to construct the pRNA48-OprF/H and 3RNV48-OprF/H for the expression of OprF/H. OprF/H was produced by the recombinant strains when induced with nisin. The highest yield of active OprF/H was 9.6% of intracellular soluble protein and 9.8% of cell wall anchored protein in *L. lactis* NZ9000 ,respectively. The immunogenicity and specificity of the expressed protein from recombinant were tested by animal immunization and Western blot.

**Keywords** : *Lactococcus lactis* ; food-grade vector ; inducible expression ; fusion outer membrane protein

Foundation item : Natural Science Foundation of Jiangxi Province of China( 0330044 )

\* Corresponding author. Tel : 86-791-8327754 ; Fax : 86-791-8333708 ; E-mail : yysccc@hotmail.com

Received : 29 December 2006/ Accepted : 22 March 2007/ Revised : 24 May 2007

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