

## 基于冰核蛋白的乳酸菌表面展示系统的构建

张秋香<sup>1#</sup>, 侯慧丽<sup>2#</sup>, 芦颖<sup>2</sup>, 陈卫<sup>1</sup>, 钟瑾<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>江南大学食品学院, 食品科学与技术国家重点实验室, 无锡 214122

<sup>2</sup>中国科学院微生物研究所, 北京 100101

**摘要:** 【目的】验证来源于丁香假单胞菌的冰核蛋白在乳酸乳球菌表面展示外源蛋白的可能性。【方法】以绿色荧光蛋白 (Green Fluorescence Protein, GFP) 基因 *gfp* 为报告基因, 以冰核蛋白基因的 N 末端和 NC 端作为展示单元, 构建乳酸菌表面展示载体 pHZ101 和 pHZ102, 并转化大肠杆菌 (*Escherichia coli*) JM109 和乳酸乳球菌 (*Lactococcus lactis*) MG1363。【结果】荧光显微镜观察显示重组大肠杆菌和乳酸乳球菌均能检测到绿色荧光。Western blot 结果表明 GFP 蛋白在重组大肠杆菌和乳酸乳球菌中均得到表达, 并且 INPN-GFP 蛋白多数滞留于乳酸乳球菌细胞质内, 而 INPNC-GFP 蛋白则大部分定位于乳酸乳球菌的细胞膜上。【结论】以上结果表明丁香假单胞菌的冰核蛋白能引导外源蛋白定位于乳酸乳球菌的细胞膜上, 为乳酸菌表面展示系统的构建提供了新的方向。

**关键词:** 冰核蛋白, 表面展示, 乳酸菌, 绿色荧光蛋白

**中图分类号:** Q933    **文献标识码:** A    **文章编号:** 0001-6209 (2013) 04-0397-06

冰核蛋白 (ice nucleation protein, INP) 是存在于丁香假单胞菌 (*Pseudomonas syringae*)、欧文氏菌 (*Erwinia*) 和荧光假单胞菌 (*P. fluorescens*) 等细菌菌种中的一种分泌型表面蛋白, 可加速纯水的冰晶形成<sup>[1]</sup>。INP 包括 N 端、C 端及中央重复区 3 个结构域, 其中 N 端结构域通过糖基磷脂酰肌醇 (glucosylphosphatidylinositol, GPI) 锚定于细胞表面, 从而利于大分子蛋白的表面呈现<sup>[2]</sup>。研究表明全长的 INP 序列、截断的 N 末端以及 NC 末端的嵌合体都能有效地在多种革兰氏阴性菌中表达外源蛋白<sup>[3-5]</sup>, 且融合蛋白的表达不影响膜的结构和宿主

细胞的生长, 因此基于 INP 的细胞表面展示系统在疫苗开发、全细胞生物转化、构建和筛选蛋白文库等方面有着广泛的应用前景。

乳酸菌是一类重要的工业菌株, 也是被公认为安全级 (generally regarded as safe, GRAS) 的微生物。利用乳酸菌作为宿主表达外源蛋白是近年的研究热点, 而将外源抗原展示到乳酸菌的表面以制备活疫苗更是受到了广泛的重视。目前用于乳酸菌表面展示外源蛋白的锚定单元有化脓链球菌 (*Streptococcus pyogenes*) 的 M6 蛋白<sup>[6]</sup>、短乳杆菌 (*Lactobacillus brevis*) 的 S-layer 蛋白<sup>[7]</sup> 以及

**基金项目:** 国家自然科学基金 (31200691); 北京市自然科学基金 (5102027); 中科院知识创新重要方向项目 (KSCX2-EW-Q/G-44); 国家“863 计划” (2006AA10Z319)

\* 通信作者。Tel: +86-10-64807401; E-mail: zhongj@im.ac.cn

**作者简介:** # 并列第一作者。张秋香 (1979-), 女, 湖北人, 讲师, 主要从事乳酸菌分子遗传研究, E-mail: zhangqx@jiangnan.edu.cn; 侯慧丽 (1980-), 女, 河南人, 硕士, 主要从事生物制药研发工作, E-mail: houhuili6@126.com

收稿日期: 2012-09-28; 修回日期: 2013-01-12

*Lactococcus lactis* 的 AcmA 蛋白<sup>[8]</sup>等。其中 AcmA 蛋白是存在于 *L. lactis* 中的一种主要的肽聚糖水解酶,也是该菌的一种自溶素,与该菌的细胞分离和到达稳定期时的菌体自溶性相关。鉴于 INP 的氨基末端结构域与 AcmA 蛋白的氨基末端结构域具有一定程度的相似性,为了进一步研究来自于革兰氏阴性菌的 INP 是否能在革兰氏阳性菌中也具有细胞表面的定位活性,以扩大其应用范围,本研究通过扩增得到 INP 的 N 端和 NC 端结构域,利用绿色荧光蛋白(Green Fluorescence Protein)基因 *gfp* 作为报告基因,通过检测 GFP 蛋白在乳酸菌中的表达情况,证实 INP 在乳酸菌中的锚定功能。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 菌株和质粒:**大肠杆菌 (*Escherichia coli*) JM109,乳酸乳球菌 (*L. lactis*) MG1363,质粒 pMGFP 和 pMG36e 为本实验室保存,质粒 pINPN-GFP 和 pINPNC-GFP 为韩国 Cha HJ 博士惠赠<sup>[9]</sup>。

**1.1.2 培养基:**大肠杆菌 LB 培养基成分见文献[10];乳酸菌 GM17 培养基成分参照文献[11]配制。

**1.1.3 主要仪器和试剂:**限制性内切酶,T4 DNA 连接酶,PCR 使用的 Pyrobest 酶和三磷酸脱氧核苷酸混合物(dNTP)均购自 TaKaRa 公司。1 kb plus DNA ladder 购自中科瑞泰,蛋白低分子量 Marker 购自 Fermentas 公司。GFP 抗体为碧云天生物有限公司产品,辣根过氧化物酶(Horseradish peroxidase, HRP)标记羊抗兔 IgG 为百汇中原产品。PCR 引物由上海生工合成,其他化学试剂均为国产或进口分析纯试剂。荧光电子显微镜(Axio imager A1)为德国 Zeiss 公司产品,电击转化仪和蛋白电泳装置为 Bio-Rad 公司产品。

### 1.2 重组质粒 pHZ101 和 pHZ102 的构建

以质粒 pINPN-GFP 和 pINPNC-GFP 为模板,*inpn* (5'-TGCCTGCAGATGGCTCTCGACAAGGCGT TGG-3') 为上游引物,*gfp3'* (5'-CGAAGCTTTCAT TATTTGTAGAGCTCATC-3') 为下游引物,PCR 扩增得到 *-inpngfp* 和 *-inpngcgp* 片段,长度分别为 1.3 kb 和 1.4 kb。纯化后以 *Pst*I 和 *Hind*III 双酶切并回收酶切产物,与同样双酶切并回收 3.6 kb 大片的 pMG36e 载体相连接,得到重组质粒 pHZ101 (含有-

*inpngfp*) 和 pHZ102 (含有 *-inpngcgp*)。质粒 pHZ101 和 pHZ102 的示意图如图 1 所示。

### 1.3 大肠杆菌的转化与乳酸乳球菌的转化

**1.3.1 大肠杆菌的转化:**大肠杆菌感受态的制备和转化按照分子克隆常规方法进行。

**1.3.2 乳酸乳球菌的转化:**乳酸菌乳球菌的感受态制备及转化方法参照文献[12]进行,稍作改动。过夜培养的乳酸乳球菌按 1:50 接种量转接到 100 mL SGM17 培养基中,30℃ 静置培养至  $OD_{600}$  约为 0.6 时,4℃,4000 × g 离心 10 min 收集菌体。用灭菌的 0.5 mol/L 蔗糖悬浮菌体后冰上放置 30 min,再于 4℃ 以 4000 × g 离心 10 min 收集菌体。随后将菌体小心悬浮在含有 10% 甘油的 0.5 mol/L 蔗糖中,分装到无菌的离心管中 -80℃ 保存备用。转化时将 5 μL 回收的连接产物加入到 45 μL 感受态细胞中,轻轻吹打混匀,转移到冰预冷的 0.2 cm 干净电击杯 (BioRad) 中,置于冰上 5 min。用 Bio-Rad 公司 GenePulser X-cell 电击仪进行电击操作,设置电击条件为 25 μF,200 Ω,2000 V,电击时间 4.5 - 5.0 ms。立即加入 950 μL 复苏液 (SGM17, 20 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 2 mmol/L CaCl<sub>2</sub>),吹打混匀后转移到无菌离心管中,30℃ 复苏 2 h。取 100 μL 菌液涂布于含有红霉素的抗性平板(终浓度为 5 μg/mL)上,倒置于 30℃ 温箱培养 72 h 至单菌落出现。

### 1.4 荧光显微镜观察重组菌中 GFP 的表达情况

过夜培养的重组大肠杆菌和乳酸乳球菌分别以 1% 的量转接到新鲜的培养基中,并培养至  $OD_{600}$  约为 1 时,取 3 μL 菌液置于洁净的载玻片上,盖上盖玻片,选择蓝光激发,在荧光显微镜下观察 GFP 的表达情况并拍照。

### 1.5 Western blot 检测重组菌中 GFP 的表达情况

**1.5.1 大肠杆菌细胞组分的制备:**过夜培养的大肠杆菌 2 mL 于 4℃,5000 × g 离心 5 min 收集菌体,以 PBS 洗涤菌体沉淀一次,重悬于 1/20 体积的 PBS 中。设置超声破碎条件为超声 3s,间隔 5s,功率 30%,持续 6 min。至菌体悬液至半透明状时,4℃,12000 × g 离心 20 min,保存上清于 -20℃ 备用。

**1.5.2 乳酸乳球菌细胞组分的制备:**过夜培养的乳酸菌乳球菌 2 mL 4℃,5000 × g 离心 5 min 收集菌体,以 PBS 洗涤菌体沉淀一次,重悬于 1/40 体积的 PBS 中。设置超声破碎条件为超声 5 s,间隔 8 s,功率 30%,持续 10 min。至菌体悬液至半透明状时,

4℃, 12000 × g 离心 20 min, 上清即为细胞质组分, 保存于 -20℃ 备用。

重组乳酸乳球菌的细胞膜组分的分离参照 Dieye 等的方法进行<sup>[6]</sup>。收集 2 mL 过夜培养的乳酸菌菌体, 以加入了 1 mg/mL 溶菌酶和 0.1 mg/mL RNase 的 TES (10 mmol/L Tris-HCl, 1 mmol/L EDTA, 25% 蔗糖) 重悬, 37℃ 温育 30 min。2500 × g 离心 10 min 收集沉淀, TES 洗涤后重悬于 500 μL 双蒸水中, 进行五次冻化循环。于 4℃ 以 21000 × g 离心 1 h, 沉淀部分以 100 μL TE (10 mmol/L Tris-HCl, 1 mmol/L EDTA) 重悬, 即为细胞膜组分, 保存于 -20℃ 备用。

**1.5.3 Western blot 分析:** 参照文献 [6] 进行, 稍有改动。封闭和一抗温育后用 PBS + 0.05% Tween 漂洗 3 次, 每次 5 min; 二抗温育后用 PBS + 0.05%

Tween 漂洗 3 次, 每次 5 min, 最后一次以纯水漂洗 10 min。GFP 抗体以 1:500 稀释, 羊抗兔 IgG-HRP 以 1:10000 稀释。

## 2 结果

### 2.1 重组质粒的构建

以质粒 pINPN-GFP 和 pINPNC-GFP 为模板, 通过 PCR 扩增得到 1.3 kb 的 *-inpngfp* 片段和 1.4 kb 的 *-inpncgfp* 片段, 酶切后连接到乳酸菌-大肠杆菌穿梭载体 pMG36e 上, 所得到的重组质粒分别命名为 pHZ101 和 pHZ102, 其结构示意图见图 1。以 *Pst*I、*Pst*I/*Hind*III 对重组质粒进行单、双酶切鉴定, 同时通过 PCR 进行外源片段的扩增验证, 结果均与预期相符 (图 2)。

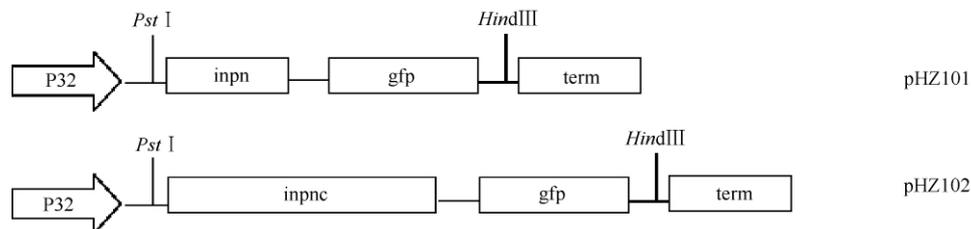


图 1. 质粒 pHZ101 和 pHZ102 的示意图

Figure 1. Schematic diagram of plasmids pHZ101 and pHZ102.

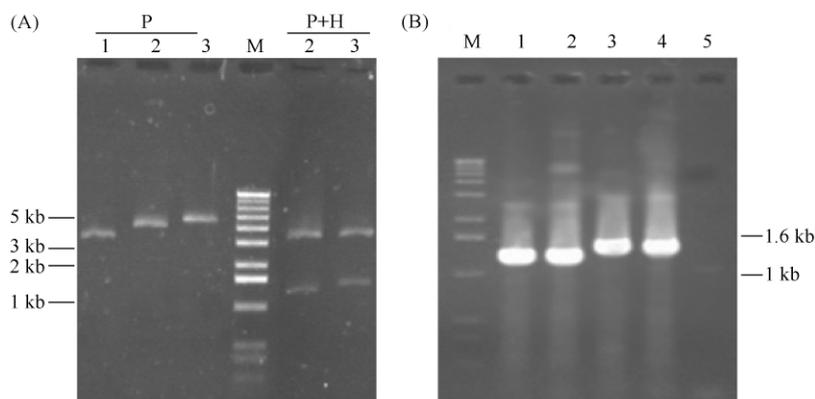


图 2. 质粒 pHZ101 和 pHZ102 的鉴定

Figure 2. Identification of plasmids pHZ101 and pHZ102. A: digestion of the plasmids by enzymes. Lane 1, pMG36e; lane 2, pHZ101; lane 3, pHZ102; M, DNA ladder. P is *Pst*I and H is *Hind*III. B: colony PCR. M, DNA ladder; Lane 1, pHZ101; lane 2, pINPN-GFP; lane 3, pHZ102; lane 4, pINPNC-GFP; lane 5, pMG36e.

### 2.2 GFP 蛋白在大肠杆菌和乳酸乳球菌中的荧光结果

重组质粒 pHZ101 和 pHZ102 转化 *E. coli* JM109 和 *L. lactis* MG1363, 挑取红霉素抗性和 PCR

鉴定正确的转化子进行荧光分析。结果表明, *E. coli* JM109/pHZ101 和 *E. coli* JM109/pHZ102 均能检测到很强的绿色荧光, 且几乎 100% 的菌体都能发光 (图 3)。 *L. lactis* MG1363/pHZ101 和 *L. lactis*

MG1363/pHZ102 也能检测到绿色荧光, 但强度较弱, 可能是因为 GFP 在乳酸菌中的表达量不如大肠杆菌中高的缘故。对照菌株 *E. coli* JM109/pMG36e 和 *L. lactis* MG1363/pMG36e 均未观察到荧光(结果未显示)。

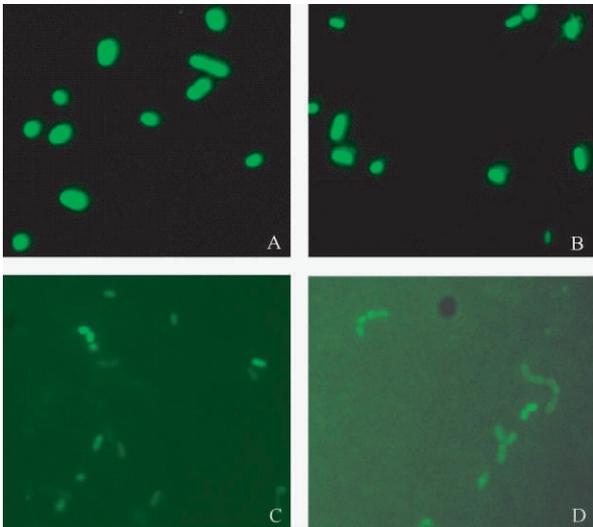


图 3. 荧光显微镜观察 GFP 在大肠杆菌和乳酸乳球菌中的表达情况

Figure 3. Expression of GFP in recombinant *E. coli* and *L. lactis* observed by fluorescence microscope. A, *E. coli* JM109/pHZ101; B, *E. coli* JM109/pHZ102; C, *L. lactis* MG1363/pHZ101; D, *L. lactis* MG1363/pHZ102.

### 2.3 GFP 蛋白在大肠杆菌中的 Western blot 检测结果

图 4 表明, 携带质粒 pHZ101 和质粒 pHZ102 的

重组大肠杆菌在预期的 47 kDa 和 51 kDa 处均有杂交条带出现, 且大小与预期相符, 但后者的表达量明显低于前者。

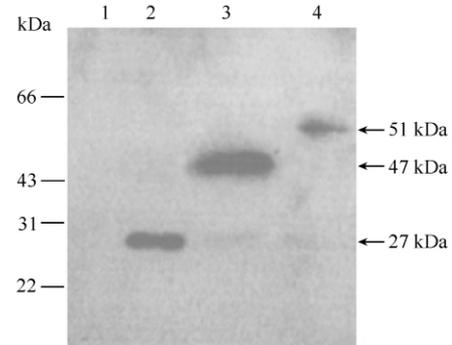


图 4. Western blot 检测 GFP 蛋白在大肠杆菌中的表达

Figure 4. Western blotting analysis of GFP expressed in recombinant *E. coli*. lane 1, *E. coli* JM109/pMG36e; lane 2, *E. coli* JM109/pMGFP; lane 3, *E. coli* JM109/pHZ101; lane 4, *E. coli* JM109/pHZ102.

### 2.4 GFP 蛋白在乳酸乳球菌中的定位分析

为进一步验证 GFP 蛋白在乳酸乳球菌中的表达及定位情况, 分离重组菌的细胞质组分和细胞膜组分并分别进行 Western blot 分析。结果表明(图 5), *L. lactis* MG1363/pHZ101 中 GFP 大部分滞留在细胞质组分中, 降解程度比较高, 分布在细胞膜上的量较少。而 *L. lactis* MG1363/pHZ102 中的 GFP 的胞内降解程度较弱, 大部分展示在细胞膜上。说明 INP 蛋白能引导 GFP 蛋白定位于乳酸乳球菌的细胞膜上。

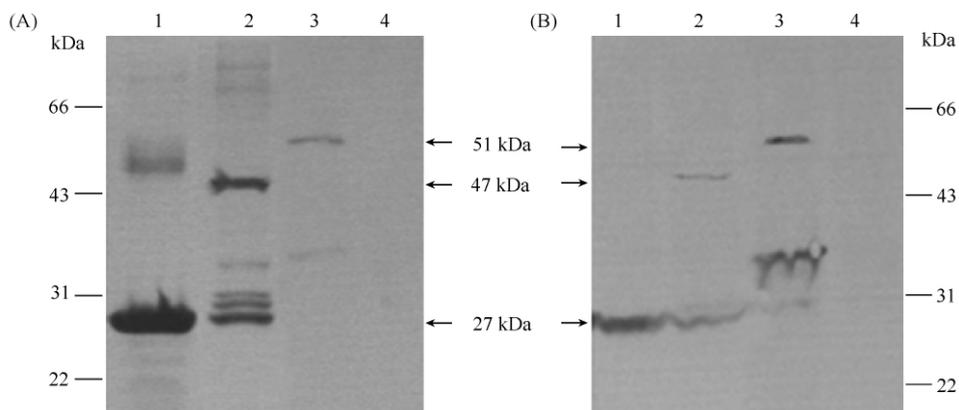


图 5. Western blot 检测重组乳酸菌的细胞质组分(A)和细胞膜组分(B)中 GFP 蛋白的表达及定位

Figure 5. Western blotting analysis of GFP expression in cell plasma fraction (A) and cell membrane fraction (B) of recombinant *L. lactis* MG1363. Lane 1, *L. lactis* MG1363/pMGFP; lane 2, *L. lactis* MG1363/pHZ101; lane 3, *L. lactis* MG1363/pHZ102; lane 4, *L. lactis* MG1363/pMG36e.

### 3 讨论

基于 INP 的活细胞展示系统能在细胞表面表达分子量高达 90 kDa 的异源蛋白, 且融合蛋白并不导致膜结构的破坏或宿主生长的障碍, 因其展示外源蛋白大、稳定、安全、检测方便等特性, 近年来引起了不少学者的关注。INP 的 N 末端区域占全序列的 15%, 包含 3-4 个可能与膜转移相关的结构域, 可通过膜插入信号肽序列将蛋白固着在外膜表面; C 末端区域富含碱性氨基酸, 占全序列的 4%, 高度亲水, 定位于细胞外; 圆柱状的中间结构单元约占全序列的 80%, 由 8-, 16-, 48- 个氨基酸残基的重复序列组成, 富含 Ala、Ser、Thr、Gly 等亲水性氨基酸残基, 在冰晶的形成过程中起催化作用。由于全长的 INP 分子量较大, 再融合并定位一定长度的外源蛋白有一定的困难。Li 等首次尝试将 INP 的中央重复区去掉, 使用 N-末端和 NC-末端作为锚定单元, 在 *E. coli* 中成功展示了有生物活性的有机磷水解酶 (Organophosphorus Hydrolase, OPH)<sup>[9]</sup>。随后有一系列的报道应用截断的 INP 的 N-末端或 NC-末端在 *Salmonella* 中展示乙脑 E 病毒 III 结构域<sup>[13]</sup>、在 *E. coli* 中表达几丁质酶 Chi92<sup>[14]</sup>、在恶臭假单胞菌 (*P. putida*) 中展示 MPH (Methyl parathion hydrolase)<sup>[15]</sup> 等。但目前的报道主要是将 INP 用于革兰氏阴性菌的表面展示, 尚未见在其革兰氏阳性菌中展示外源蛋白的报道。由于 INP 中主要负责锚定的 N 末端结构域与 *L. lactis* MG1363 的自溶素 N 末端结构域相似, 因此本研究尝试选用 *P. syringae* 冰核蛋白 INP 的 N-末端和 NC-末端作为锚定单元, 在 *L. lactis* 的表面展示报告基因 *gfp*。

荧光观察结果表明转化有 pHZ101 和 pHZ102 的重组 *E. coli* 在蓝光激发下均能发出明亮的绿色荧光, 两者的亮度比较相似。Western Blot 的结果进一步证实了 GFP 基因的表达, 融合蛋白的大小符合预期, 且 INPN-GFP 的表达量比 INPNC-GFP 的表达量稍高。这与 Li 等的结果一致, 他们以 1 mmol/L IPTG 诱导时 InaK-N/GFP 与 InaK-NC/GFP 的表达量没有太大的差别, 但在 0.1 mmol/L IPTG 诱导条件下, InaK-GFP 比 InaK-NC/GFP 的表达效率高 1.8 倍<sup>[9]</sup>。在 *L. lactis* 中 GFP 蛋白的荧光则弱得多, 且淬灭比较迅速, 说明其表达量不如 *E. coli* 中高。这与 pMG36e 载体本身的性质相关, 尽管是穿梭载体,

但它在 *L. lactis* 中的质粒拷贝数远低于 *E. coli*, 外源蛋白的表达效率也相应降低很多<sup>[16]</sup>。Western blot 显示 INPN-GFP 的表达效率仍稍高于 INPNC-GFP, 而对 GFP 的定位分析则表明, INPN-GFP 大部分定位于细胞质内, INPNC-GFP 则大部分展示在细胞膜上。造成这种现象的原因可能与 INPN-GFP 在胞内的降解程度较高有关, 如果融合蛋白在胞内的降解较少, 表面展示的效率可能会更高一些。以上结果说明 INPN 和 INPNC 也能在乳酸菌中成功展示报告基因 *gfp*, 下一步优化条件进而提高其展示外源蛋白的效率, 并将 *gfp* 基因替换为感兴趣的病毒抗原基因, 为乳酸菌活疫苗的开发提供一条新的方向。

### 参考文献

- [1] Margaritis A, Bassi AS: Principles and biotechnological applications of bacterial ice nucleation. *Critical Reviews in Biotechnology*, 1991, 11 (3): 277-295.
- [2] Jung HC, Lebeault JM, Pan JG: Surface display of *Zymomonas mobilis* levansucrase by using the ice-nucleation protein of *Pseudomonas syringae*. *Nature Biotechnology*, 1998, 16 (6): 576-580.
- [3] He X, Chen W, Huang Q: Surface display of monkey metallothionein alpha tandem repeats and EGFP fusion protein on *Pseudomonas putida* X4 for biosorption and detection of cadmium. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2012, 95 (6): 1605-1613.
- [4] Wu PH, Giridhar R, Wu WT: Surface display of transglucosidase on *Escherichia coli* by using the ice nucleation protein of *Xanthomonas campestris* and its application in glycosylation of hydroquinone. *Biotechnology and Bioengineering*, 2006, 95 (6): 1138-1147.
- [5] Shimazu M, Nguyen A, Mulchandani A, Chen W: Cell surface display of organophosphorus hydrolase in *Pseudomonas putida* using an ice-nucleation protein anchor. *Biotechnology Progress*, 2003, 19 (5): 1612-1614.
- [6] Dieye Y, Usai S, Clier F, Gruss A, Piard JC: Design of a protein-targeting system for lactic acid bacteria. *Journal of Bacteriology*, 2001, 183 (14): 4157-4166.
- [7] Avall-Jaaskelainen S, Lindholm A, Palva A: Surface display of the receptor-binding region of the *Lactobacillus brevis* S-layer protein in *Lactococcus lactis* provides nonadhesive lactococci with the ability to adhere to intestinal epithelial cells. *Applied and Environmental Microbiology*, 2003, 69 (4): 2230-2236.
- [8] Raha AR, Varma NR, Yusoff K, Ross E, Foo HL: Cell surface display system for *Lactococcus lactis*: a novel

- development for oral vaccine. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2005, 68 (1) :75-81.
- [9] Li L, Kang DG, Cha HJ: Functional display of foreign protein on surface of *Escherichia coli* using N-terminal domain of ice nucleation protein. *Biotechnology and Bioengineering*, 2004, 85 (2) :214-221.
- [10] Sambrook J, Fritsch E, Maniatis T: *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 3<sup>rd</sup> eds. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.
- [11] Wells JM, Wilson PW, Le Page RW: Improved cloning vectors and transformation procedure for *Lactococcus lactis*. *The Journal of Applied Bacteriology*, 1993, 74 (6) :629-636.
- [12] Holo H, Nes IF: High-Frequency Transformation, by Electroporation, of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* Grown with Glycine in Osmotically Stabilized Media. *Applied and Environmental Microbiology*, 1989, 55 (12) : 3119-3123.
- [13] Fan LH, Liu N, Yu MR, Yang ST, Chen HL: Cell surface display of carbonic anhydrase on *Escherichia coli* using ice nucleation protein for CO<sub>2</sub> sequestration. *Biotechnology and Bioengineering*, 2011, 108 (12) :2853-2864.
- [14] Wu ML, Tsai CY, Chen TH: Cell surface display of Chi92 on *Escherichia coli* using ice nucleation protein for improved catalytic and antifungal activity. *FEMS Microbiology Letters*, 2006, 256 (1) :119-125.
- [15] Yang C, Cai N, Dong M, Jiang H, Li J, Qiao C, Mulchandani A, Chen W: Surface display of MPH on *Pseudomonas putida* JS444 using ice nucleation protein and its application in detoxification of organophosphates. *Biotechnology and Bioengineering*, 2008, 99 (1) :30-37.
- [16] Mills S, McAuliffe OE, Coffey A, Fitzgerald GF, Ross RP: Plasmids of lactococci – genetic accessories or genetic necessities? *Fems Microbiology Review*, 2006, 30 (2) : 243-273.

## Construction of cell surface display system in lactic acid bacteria by using ice nucleation protein

Qiuxiang Zhang<sup>1#</sup>, Huili Hou<sup>2#</sup>, Ying Lu<sup>2</sup>, Wei Chen<sup>1</sup>, Jin Zhong<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>State Key Laboratory of Food Science and Technology, School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China

<sup>2</sup>Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China

**Abstract:** [Objective] The gene of ice nucleation protein (INP), an outer membrane of *Pseudomonas syringae* was tested to display foreign proteins on the surface of *Lactococcus lactis*. [Methods] Plasmids pHZ101 and pHZ102 were constructed using *gfp* (Green Fluorescence Protein) as the reporter gene and N-terminal and NC-terminal of *inp* as the anchoring units. Plasmids pHZ101 and pHZ102 were subsequently transformed into *Escherichia coli* JM109 and *Lactococcus lactis* MG1363. [Results] Fluorescence microscope shows that green fluorescence was observed in both recombinant *E. coli* and *L. lactis* strains. Western blot indicated that GFP was expressed in both recombinant *E. coli* and *L. lactis* strains. INPN-GFP was mostly trapped in cytoplasmic fraction while INPNC-GFP was mainly targeted on the cell membrane of *L. lactis*. [Conclusion] The results suggest a new way to construct cell surface display system of lactic acid bacteria by using ice nucleation protein.

**Keywords:** ice nucleation protein, surface display, lactic acid bacteria, green fluorescence protein

(本文责编:王晋芳)

Supported by the Beijing Natural Science Foundation (5102027), by the Knowledge Innovation Program of the Chinese Academy of Sciences (KSCX2-EW-G/Q-14) and by the National Program for High Technology Research and Development of China (2006AA10Z319)

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

# These authors contributed equally to this work.

Received: 28 September 2012 / Revised: 12 January 2013