

食品级分泌表达载体的构建及报告蛋白在乳酸乳球菌中的表达

孙强正, 熊衍文, 叶长芸, 徐建国*

(中国疾病预防控制中心传染病预防控制所, 传染病预防控制国家重点实验室, 北京 102206)

摘要: 为构建乳酸乳球菌食品级分泌表达载体, 通过 PCR 扩增质粒 pMG36e 的 p32 启动子片段及乳酸乳球菌 MG1363 未知分泌蛋白(Usp45)基因的核糖体结合位点、分泌信号肽和成熟肽前 11 个氨基酸的编码序列(*SPusp45*), 克隆到食品级载体 pSH91 中, 构建食品级分泌性表达载体 pSQ; 克隆报告基因金黄色葡萄球菌核酸酶(NucA)成熟肽的编码序列 *nucA* 到 pSQ 中分泌信号后, 转化乳酸乳球菌 MBP71, 构建了乳酸乳球菌食品级分泌性表达系统 *L. lactis*/pSQ-*nucA*; 通过 TB-D 法和酶谱法检测 *L. lactis*/pSQ-*nucA* 的表达形式、表达量并与以前构建的 *L. lactis*/pSQZ-*nucA* 系统表达能力进行比较, 结果发现 *L. lactis*/pSQ-*nucA* 能够分泌性表达 NucA, 分泌性表达的 NucA 量大约是胞内 NucA 的 10 倍; *L. lactis*/pSQ-*nucA* 的表达量高于 *L. lactis*/pSQZ-*nucA*。为进一步目的蛋白的分泌性表达及食品级疫苗的研制奠定了基础。

关键词: 乳酸乳球菌; p32 启动子; 食品级载体; 分泌性表达; 报告蛋白

中图分类号: Q786 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209 (2008) 03-0293-06

乳酸乳球菌(*Lactococcus lactis*)是一种广泛应用于食品工业的微生物,用来生产和保存乳制品,被公认为安全的食品级微生物(generally regarded as safe, GRAS)。以乳酸乳球菌作为异源蛋白的输送载体,逐渐成为食品工业、生物制药和疫苗研究的热点。一系列基于乳酸乳球菌的表达系统已经构建,某些异源蛋白、细胞因子和酶以各种形式得到表达^[1-3]。其中,食品级表达系统因其安全、符合 FDA 要求而日益受到重视。

在以前的研究中,我们已经成功构建了一个食品级载体系统,它以染色体上 *thyA* 基因缺失的乳酸乳球菌 MBP71 作为宿主菌,以质粒 pSH91 作为表达载体。质粒 pSH91 由来自 *L. lactis subsp. cremoris* Wg2 隐性质粒 pWV01 的复制子(RepA、ORF C 和 ori+)、来自 pUC18 质粒的全部多克隆位点和、来自 *L. lactis* MG1363 的 *thyA* 选择标记构成,质粒载体和宿主菌实现营养缺陷互补。在整个载体系统中,除了来源于

pUC18 质粒的多克隆位点外,其余成分来源于 GRAS 级微生物-乳酸菌,不含有抗生素抗性基因,符合食品级载体系统的要求^[4]。在此食品级载体系统的基础上,我们克隆乳酸乳球菌 MG1363 染色体上 Usp45 蛋白的启动子、核糖体结合位点、信号肽和部分成熟肽的编码序列,成功构建了一个组成性分泌表达系统,并且实现了报告蛋白 NucA 的分泌性表达^[5]。但是,由于启动子的启动效率较低,表达的报告蛋白量较少,限制了其进一步的应用。

pMG36e 是 Maarten 等^[6]构建的一个乳酸乳球菌表达质粒载体,它由 *L. lactis subsp. cremoris* Wg2 隐性质粒 pWV01 的复制子、pUC18 质粒的部分多克隆位点、来自 *L. lactis subsp. cremoris* Wg2 的强启动子 p32 片段和蛋白酶基因的终止子片段构成。利用此表达载体,一些蛋白已经得到表达^[7-9]。但是,为了便于筛选, pMG36e 携带红霉素抗性基因作为选择标志,限制了其作为食品级表达载体的应用。

*通讯作者。Tel: +86-10-61739479; E-mail: xujg@public.bta.net.cn

作者简介: 孙强正(1970-), 男, 山东青岛人, 博士, 主要从事基因工程研究。E-mail: zhlsun@yahoo.com.cn

收稿日期: 2007-07-24; 修回日期: 2007-09-17

本研究克隆 pMG36e 中的启动子 P32 序列和 *L.lactis* MG1363 染色体中 Usp45 的分泌信号肽序列 SPusp45 到 pSH91 中, 构建了一个分泌性表达载体 pSQ, 转化入宿主菌 *L.lactis* MBP71 中, 实现了报告蛋白 NucA 的分泌性表达, 为进一步目的蛋白的高效表达奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株、质粒、培养基和生长条件: 大肠杆菌 (*Escherichia coli*, *E.coli*) X51(LE392, Δ thyA)、金黄色葡萄球菌为本室保存; *L.lactis* MG1363 由 Jan Kok 教授惠赠; *L.lactis* MBP71(CHCC373, Δ thyA) 由 Martin B.Pedersen 博士惠赠; 克隆载体 pMD18-T 购自大连 TaKaRa 公司; 质粒 pSH91^[4]、pSQZ-nucA^[5] 由本室构建; *E.coli* DH5a 感受态细胞购自天象生物技术公司; 质粒 pMG36e(pWV01, Em^r) 由中国疾病预防控制中心诊断室沈立明博士惠赠。

E.coli X51、*E.coli* DH5a 常规培养用 LB 培养基, 37°C 振荡培养; 乳酸乳球菌常规培养在 GM17 培养基 (M17 培养基; Difco, 0.5% 葡萄糖), 30 °C 静止培养; 选择培养基 CBT 和改良 SA 培养基的配制见文献[4]; TB-D 琼脂的配制见文献[10]; 氨苄青霉素、红霉素在大肠杆菌中的使用浓度分别为 100 μ g/mL 和 150 μ g/mL。

1.1.2 主要试剂和材料: 限制性内切酶 *Hind*、*EcoR*、*Xba*、*Kpn*、*Sal*、*Tag* DNA 聚合酶、*Pfu* DNA 聚合酶购自 TaKaLa 公司; T4 DNA 连接酶由美国 Promega 公司提供; 质粒抽提试剂盒、DNA 回收纯化试剂盒为 QIAGEN 公司产品; 试验中所用引物见表 1, 由上海生物工程公司合成; 其它化学试剂均为分析纯。

1.2 分泌性表达质粒 pSQ 的构建

根据发表的启动子 p32 的序列^[11]设计引物 1、2, 以质粒 pMG36e 为模板扩增启动子片段 p32, 包括-35 区、-10 区; 根据 GenBank 公布的 *L.lactis* MG1363 *usp45* 基

表 1 试验中所用的引物
Table 1 primers used in this study

Gne name	Pimer sequence(5'→3')	Length/bp
p32	1 CG <u>AA</u> GCTTAGATTAATAGTTTTAGCTATTAATC (<i>Hind</i>)	138
	2 GCGT <u>CG</u> ACCCTAGTATAGCATTTTGTGAAG (<i>Sal</i>)	
	3 GCGT <u>CG</u> ACAACCGAACTTAATGGGAGGA (<i>Sal</i>)	
Spusp45	4 CGTCTAGACGCATCTTGTTTAGCAATATCTGAG (<i>Xba</i>)	170
	5 GATCTAGATCAACTAAAAAATTACATAAAGAACC (<i>Xba</i>)	
NucA	6 GCGGTACCGATCTAAAAATTATAAAAGT (<i>Kpn</i>)	513

* Restriction sites are underlined

因序列^[12]设计引物, 以 *L.lactis* MG1363 染色体为模板, 以引物对 3、4 扩增 SPusp45, 包括 *usp45* 的核糖体结合位点、翻译起始密码子、信号肽序列及 Usp45 成熟肽前 11 个氨基酸编码序列(图 1-A)。PCR 扩增产物分别回收纯化, 以 *Sal* 酶切, T4 连接酶连接, 取连接产物为模板, 以引物对 1、4 扩增片段 p32-SPusp45, 扩增产物胶回收纯化, 克隆到载体 pMD18-T, CaCl₂ 法转化 *E.coli* DH5a 感受态细胞, 蓝白斑筛选阳性克隆子送上海生物工程公司测序。测序正确的克隆子以 *Hind* 和 *Xba* 双酶切, 胶回收目的基因片段, 与经同样双酶切的 pSH91 质粒连接。以 CaCl₂ 法制备 *E. coli* X51 感受态细胞, 连接产物转化感受态细胞, 在 CBT 培养基上挑选阳性菌落, 经质粒提取、PCR 扩增鉴定, 质粒命名为 pSQ(图 1-B)。

1.3 报告基因 nucA 的克隆

根据文献报道的 *nucA* 基因序列^[13]设计引物(表 1), 以金黄色葡萄球菌染色体为模板, PCR 扩增 *nucA* 基因序列。扩增产物为核酸内切酶成熟肽的编码序列, 不包括分泌信号肽编码序列, 扩增产物预期长度约为 510bp。扩增产物回收纯化后, T-A 克隆测序。

1.4 表达质粒 pSQ-nucA 的构建

测序正确的片段经 *Xba* 和 *Kpn* 双酶切, 与同样双酶切的 pSQ 质粒连接。连接产物转化感受态细胞 *E. coli* X51, 经提取质粒、PCR 扩增鉴定, 质粒命名为 pSQ-nucA。

1.5 质粒 pSQ-nucA 转化 L.lactis MBP71

L.lactis MBP71 感受态细胞的制备和电击转化参

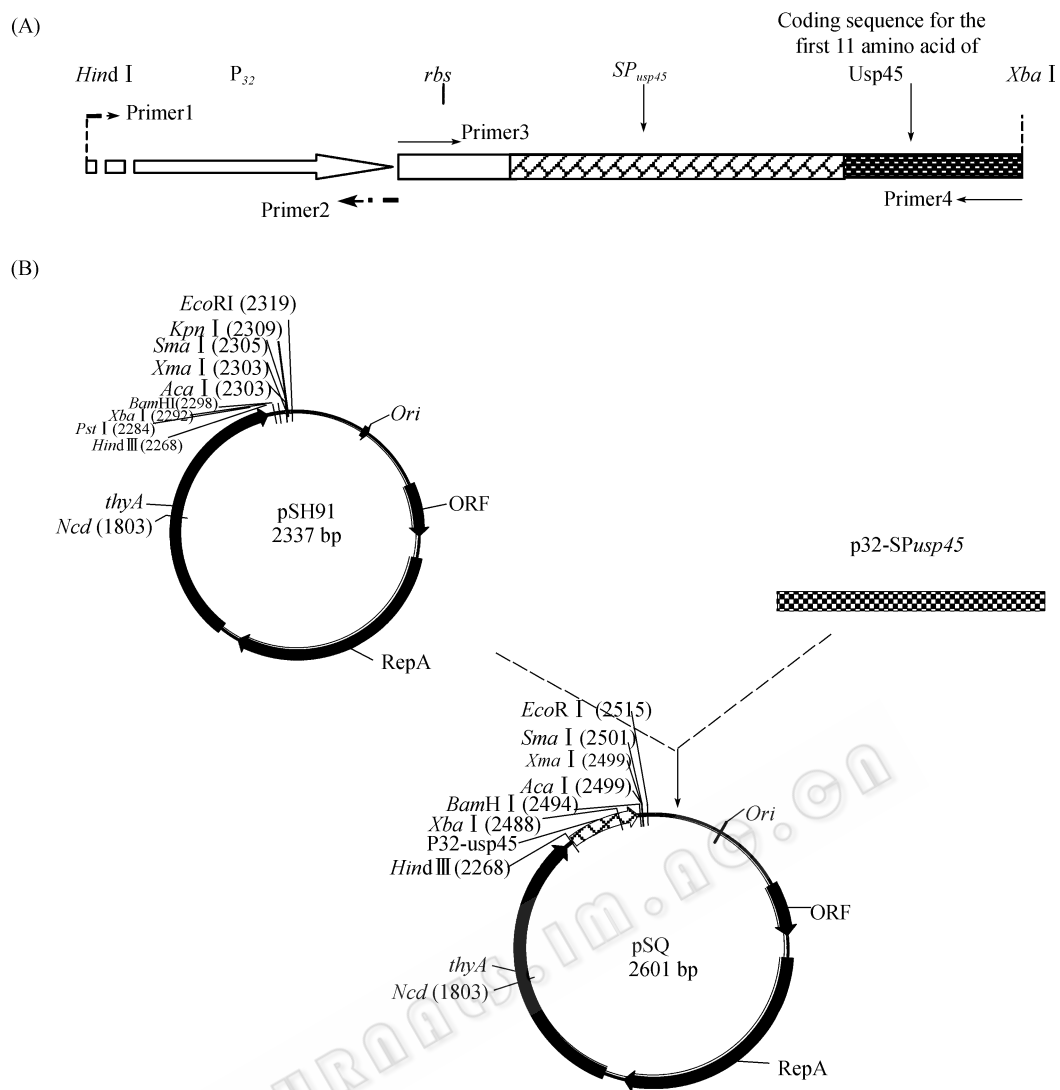


图1 p32-SPusp45 基因结构示意图(A)和质粒 pSQ 的构建示意图(B)

Fig. 1 Schematic structure of the fusion p32-SPusp45 fragment(A), and schematic representation of the organization of the constructed secretion expression vector pSQ containing the constitutive promoter p32(B).

照文献[14], 于 SA 培养基上筛选阳性菌落。

1.6 *L.lactis* MBP71/pSQ-nucA 表达核酸酶活性平板法检测

核酸酶活性检测采用 TB-D 平板法^[15], 具体步骤如下: 挑取 *L.lactis* MBP71/pSH91、*L.lactis* MBP71/pSQ-nucA 和 *L.lactis* MBP71/pSQZ-nucA 单菌落涂在改良的 SA 平板上, 30℃ 培养 24~36 h, 至出现大小合适的单菌落。将融化的 TB-D 琼脂倒在 SA 平板上, 完全覆盖单菌落(10mL/皿), 置 37℃ 培养 15~30 min, 观察单菌落周围颜色变化, 比较不同菌株单菌落周围橙色光晕大小。

1.7 乳酸乳球菌上清和菌体蛋白样品的制备

乳酸乳球菌上清和菌体蛋白样品的制备参照文献[16]。

1.8 核酸酶 SDS-PAGE 和酶谱检测

分别取 15μL 上述上清和菌体样品与 5μL 蛋白上样缓冲液(4×)混合, 95℃ 变性 5min 后, 取 15μL 上样进行 SDS-PAGE, 考马斯亮兰染色后, 观察核酸酶特异条带并扫描保存。酶谱检测参照文献[15]: 样品进行 SDS-PAGE 后, 进行蛋白复性处理, 将复性处理后的胶平铺到 TB-D 琼脂上, 保鲜膜包裹后置 37℃ 孵育, 观察橙色条带, 比较其颜色深浅并拍照。

2 结果

2.1 p32、SPusp45 片段的扩增和分泌性表达质粒 pSQ 的构建

p32、SPusp45 基因片段经 PCR 扩增及 1% 琼脂糖电泳检测, 所得产物片段分别约为 138bp 和 170bp,

符合预期片段长度。PCR 扩增产物经胶回收纯化后, 酶切连接, 以连接产物为模板扩增融合基因 p32-*SPusp45*, 所得产物大小约为 308bp, 符合预期片段长度。融合基因扩增产物经 T-A 克隆测序, 证实与文献和 GenBank 上公布的 p32 和 *SPusp45* 序列完全一致。将测序正确的片段以 *Xba*、*Hind* 酶切后, 与同样酶切的 pSH91 质粒连接, 转化 *E.coli* X51, 获得多个克隆子。提取质粒, PCR 扩增 p32、*SPusp45* 及 p32-*SPusp45* 基因片段, 分别在 138bp、170bp 和 308bp 位置有相应的条带, 表明重组分泌性表达质粒 pSQ 构建成功。

2.2 报告基因 *nucA* 的扩增及质粒 pSQ-*nucA* 的构建
nucA 基因 PCR 扩增产物经琼脂糖凝胶电泳, 在约 500bp 位置有一片段, 符合 *nucA* 基因预期片段长度 (513bp)。扩增产物经 T-A 克隆测序, 证实与 GenBank 上公布的 *nucA* 序列完全一致。将测序正确的片段以 *Xba*、*Kpn* 酶切后, 与同样酶切的 pSQ 质粒连接, 转化 *E. coli* X51。提取质粒, PCR 扩增 *nucA* 和 p32-*SPusp45* 序列片段鉴定, 分别在 500bp 和 300bp 位置有相应的条带, 表明重组分泌性表达质粒 pSQ-*nucA* 构建成功。

2.3 质粒 pSQ-*nucA* 转化乳酸乳球菌

提取质粒 pSQ-*nucA*, 电转化 *L.lactis* MBP71, 涂在改良 SA 培养基平板上, 得到多个克隆子, *L.lactis* MBP71/pSQ-*nucA* 克隆子在改良 SA 培养基上回复了生长能力。转化克隆子经 PCR 扩增鉴定, 均含有质粒 pSQ-*nucA*, 乳酸乳球菌分泌表达系统 *L.lactis* MBP71/pSQ-*nucA* 构建成功。

2.4 TB-D 平板法检测核酸酶活性

分别涂 *L.lactis* MBP71/pSQ-*nucA*、*L.lactis* MBP71/pSH91 和 *L.lactis* MBP71/pSQZ-*nucA* 到改良 SA 平板上, 30 培养 24~36 h 后, 菌落生长至针尖大小。将融化的 TB-D 培养基覆盖单菌落, 37 培养 15 min 后, *L.lactis* MBP71/pSQ-*nucA* 和 *L.lactis* MBP71/pSQZ-*nucA* 菌落周围出现橙色光晕, 但 *L.lactis* MBP71/pSQ-*nucA* 菌落光晕半径较 *L.lactis* MBP71/pSQZ-*nucA* 菌落光晕半径大; 37°C 培养 45 min 后, *L.lactis* MBP71/pSQ-*nucA* 和 *L.lactis* MBP71/pSQZ-*nucA* 菌落周围光晕半径较 15 min 时增大; *L.lactis* MBP71/pSH91 菌落周围没有橙色光晕出现(图 2)。结果提示 *L.lactis* MBP71/pSQ-*nucA* 和 *L.lactis* MBP71/pSQZ-*nucA* 能够分泌性表达核酸酶, 而且 *L.lactis* MBP71/pSQ-*nucA* 表达核酸酶量较 *L.lactis* MBP71/pSQZ-*nucA* 多, 表达效率高。

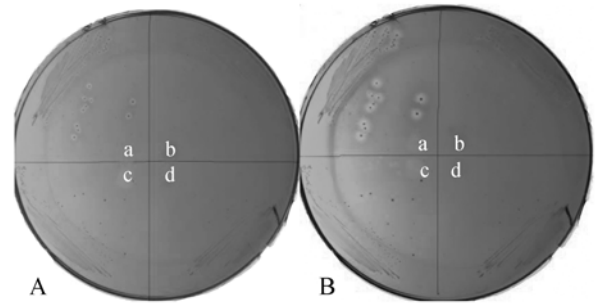


图 2 *L.lactis* MBP71 表达核酸酶活性检测及不同工程菌表达量的比较

Fig. 2 Detection of enzyme activity performed by NucA secreted from *L.lactis* MBP71 harboring different recombinant plasmid on TB-D agar plate. A: *L.lactis* MBP71 covered with TB-D medium were inoculated for 15 min at 37 °C; B: *L.lactis* MBP71 were inoculated for 45 min. a. clone of *L.lactis* MBP71 harboring the plasmid pSQ-*nucA*; b. clone of *L.lactis* MBP71 harboring the plasmid pSQZ-*nucA*; c and d. clone of *L.lactis* MBP71 harboring the plasmid pSH91.

2.5 核酸酶 SDS-PAGE 和酶谱检测

上清和菌体样品 SDS-PAGE 电泳后, 经考马斯亮兰染色和脱色处理, 与空白对照比较, *L.lactis* MBP71/pSQ-*nucA* 上清样品在 18kDa 位置有一条特异的条带, 而 *L.lactis* MBP71/pSQZ-*nucA* 在相应位置没有明显的特异条带; 基因改造菌株的菌体样品与空白对照比较, 没有观察到特异条带的存在(图 3-A)。

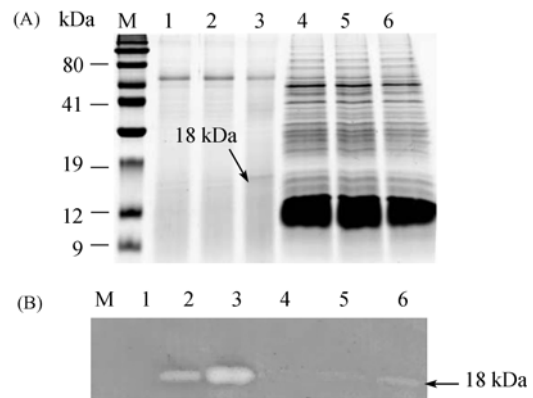


图 3 上清和菌体样品核酸酶 SDS-PAGE 及酶谱检测

Fig. 3 The SDS-PAGE and zymogram analysis of expressed NucA. A: SDS-PAGE for detection the NucA in supernatant and cell lysate of cultured *L.lactis* MBP71; B: zymogram for detection of enzyme activity performed with the same protein sample after SDS-PAGE and gel renaturation. M: Marker. 1. proteins from culture supernatant of *L.lactis* MBP71 harboring the plasmid pSH91; 2. proteins from culture supernatant of *L.lactis* MBP71 harboring the recombinant plasmid pSQZ-*nucA*; 3. proteins from culture supernatant of *L.lactis* MBP71 harboring the recombinant plasmid pSQ-*nucA*; 4. proteins from cell lysate of *L.lactis* MBP71 harboring the plasmid pSH91; 5. proteins from cell lysate of *L.lactis* MBP71 harboring the recombinant plasmid pSQZ-*nucA*; 6. proteins from cell lysate of *L.lactis* MBP71 harboring the recombinant plasmid pSQ-*nucA*.

酶谱结果显示, TB-D 琼脂胶与 SDS-PAGE 胶作用 1 h 后, *L.lactis* MBP71/pSQ-*nucA* 与 *L.lactis* MBP71/pSQZ-*nucA* 上清和菌体样品在 18 kDa 位置出现橙色条带, 而且上清样品中条带的亮度和宽度远远高于菌体样品条带, 根据条带的宽度和亮度判断, 上清样品中核酸酶含量大约是菌体的 10 倍; *L.lactis* MBP71/pSQ-*nucA* 上清和菌体样品条带亮度和宽度高于 *L.lactis* MBP71/pSQZ-*nucA* 上清和菌体样品, *L.lactis* MBP71/pSQ-*nucA* 核酸酶总量大约是 *L.lactis* MBP71/pSQZ-*nucA* 的 5 倍(图 3-B)。结果提示在 *L.lactis* MBP71/pSQ-*nucA* 中, 核酸酶大多以分泌形式表达, 分泌到培养液上清中, 而菌体中含有少量核酸酶; *L.lactis* MBP71/pSQ-*nucA* 表达的核酸酶量高于 *L.lactis* MBP71/pSQZ-*nucA*。

3 讨论

p32 是 van der Vossen 等^[17]从 *L.lactis* subsp. *cremoris* Wg2 染色体中分离的强启动子, 可作为构建表达载体的启动子。van der Maarten 等^[6]以此启动子构建了乳酸菌表达载体 pMG36 和 pMG36e, 并成功表达了鸡蛋白溶菌酶。利用此表达载体, Kim SJ 等^[7]在乳酸乳球菌中表达幽门螺杆菌外膜蛋白 Cag12, 口服免疫小鼠后产生抗-Cag12 抗体; Roy DG 等^[18]在乳酸乳球菌和 *gasseri* 乳杆菌中成功表达 Mn-超氧化物歧化酶(Mn-SOD)。但是, 为了便于筛选, pMG36 及其系列衍生质粒携带卡那霉素或红霉素抗性基因, 存在抗性基因横向转移的可能, 限制了其作为食品级载体的应用。本研究在食品级载体 pSH91 的基础上, 克隆 pMG36e 的 p32 启动子、*L.lactis* MG1363 的分泌信号 *SPusp45*, 成功构建了食品级分泌表达载体 pSQ。在本表达系统中, 载体以来源于 *L.lactis* MG1363 的 *thyA* 基因作为筛选标志, 与宿主菌 *L.lactis* MBP71 Δ *thyA* 构成营养缺陷互补; p32、*SPusp45* 及构成 pSH91 的各组份均来自食品级微生物, 不含有任何抗生素抗性基因; 而且宿主菌也为食品级微生物, 因此此系统完全符合食品级表达系统的要求。此系统中出发质粒载体 pSH91 在宿主菌中的稳定性、转化株的生长速率和酸化能力与野生株基本相同^[4], 质粒的存在不会干扰宿主菌的性状, 这为此表达系统的实际应用提供了可能。

在乳酸乳球菌表达外源蛋白用于疫苗研究中, 分泌性表达有诸多优点。为实现分泌性表达, 通常在启动子后、目的蛋白前融合一分泌信号肽, 引导目的蛋白分泌到细胞膜外, *Usp45* 的分泌信号 *SPusp45* 最

常用于构建乳酸菌分泌表达载体。本研究克隆 *SPusp45* 于 p32 的-10 区后, p32 的-10 区与 *SPusp45* 的 RBS 间的距离为 22bp, 接近 *Usp45* 自身-10 区与 RBS 间的距离(24bp); 而 RBS 与 ATG 间的距离及 RBS 后碱基 A、T 含量维持 *Usp45* 自身组成不变, 有效保持了重组启动子的启动效率。为了增强表达蛋白的稳定性, 我们在目的蛋白的 N 端融合了 *Usp45* 成熟肽的前 11 个氨基酸。研究证明, 此表达系统能够有效分泌表达报告蛋白。TB-D 试验中, 分泌表达的核酸酶水解细菌周围的 DNA, 形成特殊的菌落周围光晕; SDS-PAGE 中, 在上清中可见区别于阴性对照的阳性条带; 在酶谱检测中, 在上清和菌体样品中均可见阳性条带, 但上清条带的亮度和宽度明显大于菌体中, 上清核酸酶含量大约是菌体的 10 倍, 说明核酸酶大多以分泌的形式表达。

在本研究中构建的分泌性表达载体 pSQ 与以 *Usp45* 本身启动子构建的表达载体 pSQZ 比较, 其分泌表达报告蛋白 NucA 的能力显著提高。在 TB-D 平板试验中, 培养相同时间时, *L.lactis* MBP71/pSQ-*nucA* 菌落周围光晕直径大于 *L.lactis* MBP71/pSQZ-*nucA*; 而在 SDS-PAGE 中, *L.lactis* MBP71/pSQ-*nucA* 上清样品在 18 kDa 位置可见特异的、区别于阴性对照的阳性条带, 而 *L.lactis* MBP71/pSQZ-*nucA* 在相应位置却没有特异阳性条带出现; 在酶谱检测中, *L.lactis* MBP71/pSQ-*nucA* 和 *L.lactis* MBP71/pSQZ-*nucA* 的上清和菌体在 18 kDa 位置都有特异的阳性条带, 但 *L.lactis* MBP71/pSQ-*nucA* 上清和菌体条带的亮度和宽度均大于 *L.lactis* MBP71/pSQZ-*nucA*, *L.lactis* MBP71/pSQ-*nucA* 表达的核酸酶总量大约是 *L.lactis* MBP71/pSQZ-*nucA* 的 5 倍, 说明 *L.lactis* MBP71/pSQ-*nucA* 的表达效率高于 *L.lactis* MBP71/pSQZ-*nucA*。

本研究构建的分泌性表达载体能够有效分泌表达报告蛋白, 而且表达效率高于以前所构建的 pSQZ 载体, 这为进一步表达目的蛋白, 研究乳酸乳球菌食品级口服疫苗奠定了基础。

参 考 文 献

- [1] 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(2): 307-313.
- [2] 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.
- [3] De Vos WM. Gene expression systems for lactic acid bacteria. *Curr Opin Microbiol*, 1999, 2(3): 289–295.
- [4] 孙强正, 熊衍文, 李振军, 等. 乳酸乳球菌食品级载体的构建及 Mn-Sod 基因的克隆和表达. *中国人兽共患病学报(Chinese Journal of Zoonoses)*, 2006, 22: 498–501
- [5] 孙强正. 乳酸乳球菌食品级分泌性表达载体的构建及报告蛋白的表达. 中国疾病预防控制中心博士论文, 2006.
- [6] van de GM, van der Vossen JM, 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.
- [7] Kim SJ, Jun DY, Yang CH, *et al.* Expression of Helicobacter pylori cag12 gene in *Lactococcus lactis* MG1363 and its oral administration to induce systemic anti-Cag12 immune response in mice. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2006, 72: 462–470.
- [8] Brurberg MB, Haandrikman AJ, Leenhouts KJ, *et al.* Expression of a chitinase gene from *Serratia marcescens* in *Lactococcus lactis* and *Lactobacillus plantarum*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1994, 42: 108–115.
- [9] McCormick JK, Worobo RW, Stiles ME. Expression of the antimicrobial peptide carnobacteriocin B2 by a signal peptide-dependent general secretory pathway. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1996, 62: 4095–4099.
- [10] Lachica RVF, Genigeorgis C, Hoepflich PD. Metachromatic agar-diffusion methods for detecting staphylococcal nuclease activity. *Appl Microbiol*, 1971, 21: 585–587.
- [11] van der Vossen JM, van der LD, Venema G. Isolation and characterization of *Streptococcus cremoris* Wg2-specific promoters. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1987, 53: 2452–2457.
- [12] van Asseldonk M, Rutten G, Oteman M, *et al.* Cloning of usp45, a gene encoding a secreted protein from *Lactococcus lactis subsp. lactis* MG1363. *Gene*, 1990, 95: 155–160 .
- [13] Kuroda M, Ohta T, Uchiyama I, *et al.* Whole genome sequencing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Lancet*, 2001, 357: 1225–1240 .
- [14] Martin B P, Peter R J, Thomas J, *et al.* Bacteriophage Resistance of a Δ thyA Mutant of *Lactococcus lactis* blocked in DNA replication. *Appl Environ Microbiol*, 2002, 68: 3010–3023 .
- [15] Liebl W, Sinskey A J, and Schleifer K H. Expression, secretion, and processing of staphylococcal nuclease by *Corynebacterium glutamicum*. *J Bacteriol*, 1992, 174: 1854–1861.
- [16] Le Loir Y, Gruss A, Ehrlich SD, *et al.* A nine-residue synthetic propeptide enhances secretion efficiency of heterologous proteins in *Lactococcus lactis*. *J Bacteriol*, 1998, 180: 1895–1903.
- [17] van der Vossen JM, van der LD, Venema G. Isolation and characterization of *Streptococcus cremoris* Wg2-specific promoters. *Appl Environ Microbiol*. 1987, 53: 2452–2457.
- [18] Roy DG, Klaenhammer TR, Hassan HM. Cloning and expression of the manganese superoxide dismutase gene of *Escherichia coli* in *Lactococcus lactis* and *Lactobacillus gasserii*. *Mol Gen Genet*. 1993, 239: 33–40.

Construction of a food-grade secretion expression vector and use it for reporter protein expression in *Lactococcus lactis*

Qiangzheng Sun, Yanwen Xiong, Changyun Ye, Jianguo Xu*

(State Key Laboratory for Infectious Disease Prevention and Control, National Institute for Infectious Disease Control and Prevention, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing 102206, China)

Abstract: We constructed a food-grade secretion expression vector and used it for reporter protein expression in live delivery vehicle *L. lactis*MBP71. The p32 fragment, which containing the stronger p32 promoter, was amplified by polymerase chain reaction(PCR) with the plasmid pMG36e as template. After being purified, the p32 fragment was ligated with *SPusp45* fragment amplified from genomic DNA of *L. lactis* MG1363. The fusion fragment p32-*SPusp45* was inserted into the food-grade vector pSH91 to construct a secretion expression vector, pSQ. The coding sequence of NucA (*nucA*) was also amplified from *Staphylococcus aureus* chromosome and inserted into pSQ under the control of p32 promoter to construct a recombinant plasmid pSQ-*nucA*. Nuclease plate activity assay and zymogram assay demonstrate that NucA was secretion expressed from *L. lactis* harboring the recombinant plasmid pSQ-*nucA*, and the quantity of NucA secreted into supernatant was about ten times more than which in cell lysate. Results also indicate that expression efficiency of *L. lactis*/pSQ-*nucA* was higher than that of *L. lactis*/pSQZ-*nucA*, constructed by us earlier.

Keywords: *Lactococcus lactis*; p32 promoter; food-grade vector; secretion expression; reporter protein

*Corresponding author. +86-10-61739479; E-mail: xujg@public.bta.net.cn
Received: 27 July 2007/ Revised: 17 September 2007