



乳酸菌食品级表达载体的研究与应用

梁琰 崔欣 王哲 王婷 徐振上*

齐鲁工业大学(山东省科学院)生物工程学院 山东 济南 250353

摘要: 乳酸菌是能够发酵糖类产生大量有机酸的革兰氏阳性菌的通称, 在发酵食品中有着悠久的历史。乳酸菌通常被认为是安全菌株, 这些微生物的基因工程操作在食品、医学等方面具有广阔的应用前景。表达载体是基因工程中常用的工具之一, 大多数乳酸菌的表达载体通常以抗生素抗性基因作为选择标记, 然而抗性基因具有潜在的转移性, 因此需要开发食品级表达载体。食品级表达载体不含有抗生素的抗性基因, 仅包含来自同源宿主或通常被认为是安全生物体的 DNA。本文介绍了乳酸菌食品级表达载体的构成及其常用宿主, 同时对乳酸菌食品级表达载体的应用进行了归纳总结。

关键词: 乳酸菌, 食品级表达载体, 构成, 宿主, 应用

Research and application of food-grade expression vectors of lactic acid bacteria

LIANG Yan CUI Xin WANG Zhe WANG Ting XU Zhenshang*

School of Bioengineering, Qilu University of Technology (Shandong Academy of Sciences), Jinan, Shandong 250353, China

Abstract: Lactic acid bacteria are the general name for Gram-positive bacteria that can ferment sugars and produce large amounts of organic acids. They have a long history of application in fermented foods. Lactic acid bacteria are generally considered to be safe strains. The genetic engineering operations of these microorganisms have broad application prospects in food and medicine. Expression vectors are one of the commonly used tools in genetic engineering. Most lactic acid bacteria expression vectors usually use antibiotic resistance genes as selection markers. However, resistance genes have potential metastasis, so food-grade expression vectors need to be developed. Food-grade expression vectors do not contain antibiotic resistance genes and only contain DNA from homologous hosts or generally considered safe organisms. This review introduces the composition of lactic acid bacteria food-grade expression vectors and their common hosts, and summarizes the application of lactic acid bacteria food-grade expression vectors.

Keywords: lactic acid bacteria, food-grade expression vector, composition, host, application

Foundation items: National Natural Science Foundation of China (31701576, 31901665)

*Corresponding author: E-mail: xuzhenshang@126.com

Received: 29-04-2020; Accepted: 18-07-2020; Published online: 06-10-2020

基金项目: 国家自然科学基金(31701576, 31901665)

*通信作者: E-mail: xuzhenshang@126.com

收稿日期: 2020-04-29; 接受日期: 2020-07-18; 网络首发日期: 2020-10-06

乳酸菌是一类革兰氏阳性细菌,可以发酵糖类产生有机酸,包括乳球菌、乳杆菌、双歧杆菌、链球菌、明串珠菌和片球菌等^[1]。乳酸菌被公认为是安全的食品级微生物,在发酵食品如泡菜、酸奶中具有悠久的历史,能够延长食品的保质期并提高营养价值。近年来的研究表明乳酸菌还是具有益生功能的微生物。目前对乳酸菌的研究已经深入到了基因工程方面,基因组整合和表达载体是基因工程中表达外源蛋白的2种常用方式。虽然基因组整合具有不需筛选压力、遗传稳定性好和外源片段容量大的特点,但是其技术要求高且操作步骤复杂。利用表达载体可以方便地表达高水平外源蛋白,国内外的专家学者相继开发、构建了许多以抗生素抗性基因作为选择标记的乳酸菌表达载体。这些操作改进了传统的食品技术,但是抗性基因很容易转移到环境中,可能会对生物和生态造成危害^[2]。因此,研究人员一直在研究获取无毒性且无副作用的食品级表达载体。食品级表达载体有以下要求:(1)载体的宿主必须是食品级,具有稳定且可鉴定的遗传特性和已知的遗传组成。(2)载体的构成必须是食品级,载体必须由同源宿主或通常被认为是安全生物的DNA组成,特别是使用食品级选择标记而非抗生素抗性标记。(3)载体的诱导物必须是食品级,如乳糖、乳链菌肽(Nisin)等。

1 食品级表达载体的构成

表达载体通常包含目的基因、复制子、启动子、选择标记以及其他一些元件等。食品级表达载体具备表达载体的一般特征,但是其选择标记是食品级别的。

1.1 复制子

复制子是在质粒DNA中能进行自主复制并维持一定拷贝数的DNA序列。根据质粒的复制类型,可以分为低拷贝质粒和高拷贝质粒两大类。对表达载体来说,表达量会随拷贝数的增加而提高,但是拷贝数并非越大越好。当拷贝数很大时会增加载体的不稳定性,因此研究人员致力于开发合适拷贝数

且稳定性高的食品级载体。Platteeuw等构建了高拷贝食品级表达载体pNZ2118,包括乳酸乳球菌内源pSH71复制子,选择标记基因*lacF*和乳糖诱导的*lacA*启动子等元件^[3]。为了评估载体的表达水平和稳定性,克隆了大肠杆菌的 β -葡萄糖醛酸苷酶基因*gusA*,发现大多数载体能稳定地维持在宿主中;Kaur等构建了低拷贝穿梭表达载体pPBT-GFP,其包含2个 θ 型复制子,分别在乳酸片球菌MTCC5101和短乳杆菌MTCC1750中具有4.4和2.8个拷贝数,且不包含任何抗生素的抗性标记基因。pPBT-GFP具有低拷贝数、高稳定性和在多个宿主中复制的能力,是作为遗传工程改良乳酸菌的理想工具^[4]。

1.2 启动子

启动子是DNA分子上一段可以与RNA聚合酶结合并开始将DNA转录成mRNA的序列。启动子的基本结构分为4个部分:(1)+1位点:转录起始点,通常为一个嘌呤。(2)-10区:RNA聚合酶的紧密结合位点。(3)-35区:RNA聚合酶的识别位点。(4)-10区和-35区间的间隔序列。启动子与RNA聚合酶的亲和力越高,启动子越强,基因的表达水平越高。根据下游基因表达的类型,乳酸菌表达载体中的启动子分为组成型启动子和诱导型启动子。

1.2.1 组成型启动子

组成型启动子构成的表达载体能随着乳酸菌的生长持续稳定地表达而积累异源蛋白,从而得到较高的异源蛋白表达量。带有强启动子P32的pMG36e是典型的组成型启动子载体,其中强启动子P32是从乳脂链球菌中克隆得到的。以载体pMG36e为基础,首尔大学的Jeong等成功在乳酸乳球菌中构建了带有P32启动子的食品级表达载体pFMN30,可以有效地生产外源蛋白^[5];孙正义等构建了包含P32启动子片段的食品级表达载体pSQ,为食品级疫苗的开发奠定了基础^[6]。除了P32启动子外,Li等构建了带有乳球菌组成型启动子P45的食品级载体pLEB690,在食品行业具有潜在

的用途^[7]。

1.2.2 诱导型启动子

组成型启动子的蛋白表达不受外界条件的影响,但是随着蛋白在细胞内高水平的积累,可能会导致细胞质降解,甚至对乳酸菌产生毒害作用,此时诱导型启动子就显得尤为重要^[8]。诱导型启动子可以通过外界条件的改变,如添加诱导物来控制诱导蛋白表达的时间点和强度,以减少蛋白的累积和对宿主正常生长的阻碍。目前乳酸菌表达载体的诱导型启动子主要有糖诱导启动子和细菌素诱导启动子。糖诱导启动子的诱导物大多具有价格低廉、简单易得的优势,最具代表性的是来自乳酸乳球菌乳糖操纵子的 *lacA* 启动子。Platteeuw 等构建了食品级表达载体 pNZ2218,乳糖能诱导重组菌株在 *lacA* 启动子的控制下表达 β -葡萄糖醛酸苷酶^[3]; Zhang 等优化了植物乳杆菌中编码 β -半乳糖苷酶基因的启动子 P_{lacA} 和 P_{lacLM} ,提供了一组新颖且具有高表达效率的乳糖/半乳糖诱导型启动子,为植物乳杆菌中表达重组蛋白提供了有利的元件^[9]。此外, Nisin 启动子表达系统也是常用的诱导型系统之一。Nisin 是乳酸乳球菌产生的一种食品级抗菌肽。乳链菌肽控制表达系统是在 Nisin 诱导下由 *nisA* 启动子控制的目的基因高效表达的系统, Wu 等构建了质粒 pSTE32,包括 *nisA* 启动子与 *nis R/K* 调节因子,于罗伊氏乳杆菌中成功表达了淀粉酶^[10]。pNZ8149 是目前常用的诱导型食品级表达载体,研究人员已经以此为基础构建了一系列表达载体,在 *nisA* 启动子的控制下表达外源基因^[11]。

1.3 选择标记

食品级表达载体应具有稳定、安全的选择标记。食品级的选择标记分为显性标记和互补标记两大类。

1.3.1 显性标记

显性标记与抗生素筛选标记原理相似,糖类利用基因、细菌素免疫基因和重金属抗性基因已成为主要的显性标记,取代了抗生素的抗性标记。显性标记具有广泛的宿主适用性,然而食品级显性标记

系统仍然较少,主要与复杂的选择过程和过大的标记系统有关。

以乳链菌肽免疫基因(*nisI*)作为显性标记代替抗生素的抗性基因是常用的显性标记之一。赫尔辛基大学的 Takala 等以 *nisI* 作为选择标记构建了食品级质粒 pLEB590,并用植物乳杆菌、乳酸乳球菌 MG1614 和工业发酵菌株乳酸乳球菌 SSL110 这 3 种不同的菌株来研究 *nisI* 的功能^[12]。*nisI* 可以赋予宿主菌对 Nisin 的抗性,王成构建了以 *nisI* 作为选择标记的食品级表达载体 pMG36N,用增强绿色荧光蛋白在 *nisI* 的下游进行了活性表达^[13]。

1.3.2 互补标记

互补标记需要开发具有特定缺陷的宿主菌株,即通过基因敲除技术构建可行的敲除突变体,使其在宿主染色体中缺失必需的基因,然后构建互补的表达载体,经互补载体补全后又恢复其原始表型。互补标记依赖于宿主菌株染色体的缺失,相较于显性标记操作更为复杂。

编码丙氨酸消旋酶的 *alr* 是常用的基于互补的食品级选择标记。D-丙氨酸对乳酸菌的生长至关重要,乳酸菌 *alr* 的破坏将导致菌株在不含 D-丙氨酸的培养基上无法生长,而含有 *alr* 的载体可在不添加外源 D-丙氨酸的情况下恢复菌株生长能力^[14]。研究学者以 *alr* 为筛选标记,分别建立了植物乳杆菌和乳酸乳球菌诱导型食品级表达载体^[15-16]。另一组互补标记基于乳酸菌染色体乳糖操纵子中的关键基因。Maccormick 等通过双重交换同源重组从乳酸乳球菌 MG5267 中敲除了 *lacF*,缺乏 *lacF* 的菌株不能够利用乳糖,含有 *lacF* 的表达载体与 *lacF* 缺陷型菌株互补,恢复菌株利用乳糖的能力^[17]。徐振上等敲除了植物乳杆菌 WCFS1 的 *lacA* 和 *lacM*,基因缺失菌株在含乳糖的培养基中失去生长能力,含有 *lacM* 的食品级表达载体 pLP4180 与缺陷型菌株互补,恢复了菌株在乳糖培养基中的生长状况^[18]。

1.4 其他元件

构建表达载体除了复制子、启动子和选择标记之外,还需要根据表达载体的特点添加其他元件。

Usp45 蛋白是在乳酸菌中大量分泌表达的蛋白, 在乳酸菌的食品级表达中通常用于构建分泌型表达载体^[19]。孙强正等在食品级载体 pSH91 的基础上, 克隆了来自乳酸乳球菌 MG1363 的 *usp45* 片段, 构建了食品级表达载体 pSQZ, 将金黄色葡萄球菌核酸酶基因 *nucA* 作为报告基因, 证明该载体具有良好的分泌性表达^[20]; Cheng 等在食品级载体 pNZ8149 的基础上插入了 *usp45* 片段, 又插入了编码白细胞介素-1 受体拮抗剂的 *IL1RA*, 构建了新的表达载体 *IL1RA:pNZ8149*, 胞外蛋白检测证明了该载体的分泌表达能力^[21]。

在基因工程中经常要对 DNA 片段进行多种限制酶的酶切反应, 且载体上的限制性酶切位点是引入外源基因的必要元件。多克隆位点 (Multiple Cloning Site, MCS) 是包含多个限制性酶切位点的一段很短的 DNA 序列, 是构建表达载体时常用到的标准配置序列。Platteuw 等通过用新设计的 MCS 替换非必需限制性位点, 进一步改进并构建了 pNZ2120/pNZ2121 和 pNZ2122/pNZ2123 食品级表达载体, 从而使克隆变得容易且有效^[3]。食品级载体 pNZ2122/pNZ2123 最初来自质粒 pSH71, 具有良好的设计并且适合于食品级表达, 但是缺乏一个紧凑的 MCS; 引入 MCS 后可用于从 MCS 序列中以最少的额外密码子轻松克隆^[22]。

2 食品级表达载体的常用宿主

鉴于乳酸菌作为公认的安全级微生物及其益生作用, 多个物种的相关菌株已被开发为食品级表达宿主。乳酸乳球菌是乳酸菌的模式生物, 已经构建了一系列较为成熟的食品级表达载体, 在食品、医药等领域具有应用潜力; 植物乳杆菌广泛存在于不同的生态环境中, 如泡菜、酸奶、青贮饲料等^[23]。植物乳杆菌作为食品级表达宿主能够在多方面发挥作用, 如可以代谢乳糖与半乳糖, 具有与酸奶发酵物共培养发酵低糖酸奶的潜力^[24]; 嗜热链球菌是发酵酸奶的常用菌株, 利用开发的食品级表达载体来表达功能产物能够增加酸奶的

功能性。

2.1 乳酸乳球菌

乳酸乳球菌是乳酸菌中的模式菌株, 具有生长快、免疫原性弱和自分泌蛋白量少的特点, 成为表达外源蛋白的理想候选者^[25]。研究学者已经借助分子生物学工具建立和发展了一系列以乳酸乳球菌为宿主的食品级表达载体(表 1), 在基因工程及代谢中已成为理想的微生物细胞工厂、口服疫苗传递载体和异源蛋白质生产的宿主^[29]。苏少锋等构建了食品级表达载体 NN-1, 包括 pWV01 的复制子、*nisI* 和 *mela* 的双选择标记以及 MCS, 在乳酸乳球菌 MG1363 中证明了载体的可行性^[30]; Gu 等从 pRAF800 中扩增出 α -半乳糖苷酶基因 *aga*, 引入载体 pMG36e 并删除抗性基因, 得到食品级表达载体 pMG36-aga, 将外源的 α -淀粉酶基因 *amy* 引入食品级载体 pMG36-aga, 转化至乳酸乳球菌 ML23, 证明了外源基因在 pMG36-aga 中的表达效率^[26]; Tian 等从嗜热链球菌菌株 St-QC 克隆出编码热激蛋白基因 *shsp* 的开放阅读框 (Open Reading Frame, ORF), 插入到 pMG36e 中, 构建出表达载体 pMG36e-shsp, 然后删除红霉素抗性基因, 产生了食品级表达载体 pMG-shsp; 在环境压力下, 表达 *shsp* 的乳酸乳球菌 ML23 的存活率有所提高, 证明了基因的有效表达^[31]。食品级表达载体 pNZ8149 包括 *nisA* 启动子、来自 pSH71 的复制子和 *lacF*, 而乳酸乳球菌 NZ3900 是 *lacF* 缺陷型菌株, 因此 NZ3900/PNZ8149

表 1 以乳酸乳球菌为宿主的食品级表达载体
Table 1 Food-grade expression vectors used in *Lactococcus lactis*

选择标记	文献	基因
Selective marker	References	Gene
Sucrose	[3]	<i>scrAB</i>
Nisin	[12]	<i>nisI</i>
Alanine	[16]	<i>alr</i>
Lactose	[17]	<i>lacF</i>
α -galactosidase	[26]	<i>aga</i>
Heavy metals	[27]	<i>Cdr/Cur</i>
Thymidine	[28]	<i>thyA</i>

是常用的乳酸乳球菌的食品级表达系统^[11]。王琛在此基础上成功构建了乳酸乳球菌 NZ3900 的食品级表达载体 pNZ8149-hpaA 和 pNZ8149-napA, 并进行了蛋白的表达和递送^[32]; Azizpour 等利用了上述食品级系统, 并将羊布鲁氏杆菌的 *bp26* 克隆于载体 pNZ8149 中, 在乳酸乳球菌 NZ3900 中成功生产出 BP26 蛋白^[33]; Yildiz 等利用该系统, 将来自铜绿假单胞菌编码天青素的 *azurin* 克隆到了载体中, 构建了新的表达载体 pNZ8149-azu, 并在乳酸乳球菌 NZ3900 中成功表达出天青蛋白^[34]。

2.2 乳杆菌

乳杆菌是乳酸菌中最大的属, 具有低价和低免疫原性的特点; 此外, 由于它们对恶劣条件的抵抗力强, 因此是递送免疫活性分子的绝佳候选者^[35]。中国农业大学的 Yin 等利用来自植物乳杆菌的胆盐水解酶基因 *bsh* 作为食品级选择标记, 开发了一种新型载体 pM4aB, 该载体含有植物乳杆菌质粒 pM4 的复制子, 可以在副干酪乳杆菌中表达来自清酒乳杆菌的过氧化氢酶基因^[36]; 齐少卿将胸腺嘧啶合成酶基因 *thyA* 插入到了不含抗性基因的载体 pMG36e, 构建了食品级载体 pMGthyA; 又插入了信号肽序列 pre-pro-NK, 构建了食品级表达载体 pMGthyA-ppNK, 最终在 *thyA* 缺陷型保加利亚乳杆菌中实现了食品级的表达^[37]; Lu 等构建了食品级表达载体 pALRc 和 pALRb, 包括来自 pALR 的复制子、卷曲乳杆菌 K313 的 S 层蛋白的信号肽以及乳酸乳球菌的 *alr*, 同时将金黄色葡萄球菌的核酸酶基因 *nuc* 用作报告基因, 在 *alr* 缺陷的干酪乳杆菌中表达核酸酶^[38]; Liu 等使用来自枯草芽孢杆菌的聚γ-谷氨酸合成酶 A 基因 *pgsA* 构建了食品级表达载体 pLQa-pgsA', 在植物乳杆菌中成功表达外源蛋白^[39]; Chen 等开发了植物乳杆菌 WCFS1 的新型食品级表达系统, 在来自植物乳杆菌 WCFS1 的 P_{ldhL} 启动子的控制下, 用植物乳杆菌葡萄糖胺-6-磷酸合成酶编码基因 *glmS1* 用作互补标记, 于 pSIP 载体的基础上构建了食品级表达载体 pSIPH497, 在

glmS1 缺陷的植物乳杆菌 NZ5333 中显示出良好的选择效率和稳定性, 进一步使用红色荧光蛋白基因 *mCherry* 作为报告基因证明了该系统的可行性^[40]; 徐振上等开发了食品级表达载体 pLP4180 和 pLP5120, 包括植物乳杆菌 WCFS1 的 P_{ldhL} 启动子和 T_{ldhL} 终止子、食品级载体 pNZ8149 的复制子, 以及植物乳杆菌的 *lacM* 和 *lacL* 分别作为 2 个载体的互补标记^[41]。

2.3 嗜热链球菌

嗜热链球菌是唯一用于食品发酵的链球菌, 已被广泛用作酸奶的发酵剂, 与德式乳杆菌保加利亚亚种一起生产酸奶已有数千年的历史。嗜热链球菌产酸速度快, 极大缩短了发酵乳的凝乳时间, 在食品行业具有很大的商业价值。根据这一特点, 可以在乳品中筛选具有优良发酵特性的嗜热链球菌, 并通过食品级载体的构建及其异源蛋白的表达来提高乳品的性能。徐振上等构建了以编码 β-半乳糖苷酶 N 端的部分基因作为互补标记的食品级表达载体 pST4040 和以编码乳糖透过酶基因 (*LPlacS*) 作为互补标记的食品级表达载体 pST5240, 并在制备酸奶的过程中异源表达了 γ-氨基丁酸, 展现出了良好的应用潜力^[42-43]。胸苷酸合成酶在 DNA 合成中有关键性作用, 缺失胸苷酸合成酶基因 (*thyA*) 的菌株不能在基本培养基中生长, Sasaki 等构建了以 *thyA* 为选择标记的食品级表达载体, 用外源 α-淀粉酶基因 (*amyA*) 在营养缺陷型的嗜热链球菌自发突变体 TM1-1 中测试了其表达能力, 开发了一种用于嗜热链球菌的安全食品级表达系统^[44]。

3 食品级表达载体的应用

乳酸菌是人体内具有重要生理功能的菌群, 调节着人体的健康。乳酸菌的食品级表达载体的操作技术较为成熟且应用性强, 因此适用于食品、医学等领域, 具有应用前景和商业价值。

3.1 食品级表达载体在食品方面的应用

3.1.1 提高产品品质

乳酸菌的基因工程技术改善了菌种的特性, 提

高了菌种的品质, 增加了一定的商业价值。食品级载体 pFG1 表达瑞士乳杆菌编码的肽酶基因, 能够减少奶酪生产中的成熟期, 对生产具有改良特性的特殊奶酪至关重要^[45]; Douglas 等构建了产 β -半乳糖苷酶的嗜酸乳杆菌菌株, 该菌应用于奶业生产中, 提高了乳糖的水解率和在人体中的吸收利用率^[46]; 之后, Li 等构建了表达食品级 β -半乳糖苷酶的重组乳酸乳球菌 MG1363, 并通过小鼠实验评估发现该系统有效地减轻了乳糖不耐患者摄取乳糖后引起的腹泻症状, 有望成为缓解乳糖不耐症的益生菌^[47]。近几年的研究中, Nguyen 等应用食品级表达载体将罗伊氏乳杆菌的 β -半乳糖苷酶表达于植物乳杆菌, 为食品级工业应用奠定了基础^[48]; 天青蛋白是一种抗癌细菌素, 常被用来提高食品的安全性和质量, Yildiz 等使用食品级表达载体, 在乳酸乳球菌 NZ3900 中成功表达了天青蛋白用于食品生物防腐剂的研究^[34]。

3.1.2 作为功能性食品

乳酸菌是公认安全的食品级微生物, 一些对人体有益的外源基因已经在乳酸菌的食品级系统中表达, 具有成为功能性食品的价值。此外, 基因工程技术改善了菌种的特性, 增加了一定的商业价值。纳豆激酶作为食源性溶栓药物的发展已十分迅速, 具有降血压、降血脂、抗血栓等多种生理调节功能。齐少卿通过将载体 pMGthyA-ppNK 电转德式乳杆菌保加利亚亚种 *thyA* 缺陷型菌株, 实现了纳豆激酶在乳酸菌中的食品级表达, 并经体外实验发现, 表达的食品级外源纳豆激酶其溶栓活性较为明显^[37]。胆盐水解酶能够降低血清中的胆固醇含量, 在益生菌制品中可以检测到其活性。Dong 等使用食品级表达载体 pNZ8149 生产出了食品级胆盐水解酶, 并将细胞内和细胞外胆盐水解酶活性分别提高了 12 倍和 9.5%^[49]。低聚半乳糖是人体肠道中双歧杆菌的增殖因子, 常作为营养物质添加在婴幼儿的食品中, 能够改善婴幼儿的消化吸收。Kittibunchakul 等构建了食品级载体 p609LacLMLh, 其表达产物 β -半乳糖苷酶用于乳糖转化和低聚半

乳糖的形成^[50]。

3.2 食品级表达载体在医学方面的应用

3.2.1 免疫领域

乳酸菌是维持肠道菌群平衡的益生菌, 能够在肠道内定殖并具有黏附作用, 因此可作为疫苗的递送载体。此外, 乳酸菌还能调节机体的免疫能力, 促进机体产生免疫应答。3D8 单链抗体 (3D8 Single-Chain Variable Fragment, 3D8 scFv) 具有渗透细胞和水解核酸的能力, 因此具有潜在的抗病毒活性。Hoang 等构建了分泌 3D8 scFv 的副干酪乳杆菌, 开发了抵抗胃肠道病毒的感染的益生菌^[51]; Grangette 等在植物乳杆菌 NCIMB8826 中构建了表达破伤风毒素的食品级载体, 通过鼻腔试验证实了免疫原性, 并引起了全身免疫球蛋白 (Immunoglobulin A, IgA) 和 (Immunoglobulin G, IgG) 的高水平应答^[52]; Guo 等利用梭状芽胞杆菌的细胞毒素 TcdA 和 TcdB 对乳酸乳球菌进行了食品级改造, 为艰难梭菌感染的疫苗研发起到了促进作用^[53]; 王琛利用乳酸乳球菌 NZ3900 的食品级表达载体 pNZ8149, 分别构建了表达幽门螺杆菌的中性粒细胞激活蛋白 A 和黏附素 A 这 2 个重要候选抗原基因的重组菌株, 通过小鼠的免疫实验, 促进了幽门螺杆菌口服疫苗的研发^[32]。Sun 等构建了表达大肠杆菌不耐热性肠毒素 (*Escherichia coli* Heat-Labile Enterotoxin B Subunit, LTb) 的食品级表达载体 pNZ8149-SP-ltB, 在乳酸乳球菌 NZ3900 中有效地生产和递送了 LTb^[54]。这是一种有潜力的黏膜佐剂, 在黏膜免疫中起着关键作用。该表达载体具有出色的安全性、佐剂活性和高产量的特点, 为黏膜疫苗的配制奠定了至关重要的基础。

3.2.2 治疗领域

乳酸菌是生产异源蛋白的理想工具, 其用途是作为治疗性蛋白质的宿主递送治疗性分子。成纤维细胞生长因子 21 (Fibroblast Growth Factor 21, FGF21) 是一种代谢调节剂, 对肥胖症和糖尿病等代谢性疾病具有重要的治疗作用。由于 FGF21 是一种基于蛋白质的激素, 因此无法通过

口服轻易吸收到血液中,且半衰期较短,不利于临床应用。Cao等从基因库中克隆了人的 *FGF21*,构建了食品级载体 pNZ8149-Human *FGF21*,成功在乳酸乳球菌中异源表达,并通过小鼠实验证明了该载体在临床应用中具有潜力^[55]。白细胞介素-1 (Interleukin 1, IL1)能介导免疫和炎症反应,而 IL1 受体拮抗剂 (Interleukin 1 Receptor Antagonist, IL1RA)能够竞争性抑制 IL1 与 IL1 受体的结合从而阻断 IL1 的生物学活性,对炎症性肠炎等慢性炎症疾病具有治疗作用。Cheng等构建了食品级载体 IL1RA:pNZ8149 用于抗炎生物大分子药物的进一步研究,为蛋白质的口服递送和结肠部位特异性递送提供了实用的方法^[21]。

4 展望

乳酸菌中食品级表达载体的研究逐步成熟,已在多种菌株里实现了目的基因的食品级表达,对食品、医药等方面的发展起到了推动作用。在今后的研究中需要重视以下问题:(1)在构建食品级表达载体的过程中,尽量选择具有广谱宿主的载体开发食品级系统,并且合适拷贝数的载体才能稳定维持和表达。应该根据乳酸菌菌株的使用场景来选择适宜的显性标记或互补标记。随后将相关载体转化到菌株中。然而,多数乳酸菌菌株已经进化出了针对外源 DNA 的防御策略,例如限制-修饰系统和成簇的规律间隔的短回文重复序列及其关联蛋白 (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats/CRISPR-Associated Protein 9, CRISPR/Cas9) 系统,给转化带来了难度。因此,载体转化时需要避开这些系统,防止载体 DNA 被修饰。此外,虽然 CRISPR-Cas9 系统是细菌为了抵抗外源遗传物质入侵而产生的自身免疫系统,其衍生出的基因组编辑工具能对基因组进行定点的精准编辑,可以在未来以更加简单、灵活的方式开发食品级载体。(2)从菌株的功能出发,开发个性化的食品级表达菌株。大量研究表明,同种属的不同乳酸菌菌株其益生功能存在着巨大差异,而且同一乳酸菌菌

株在不同环境中发挥的功能也有一定的差异性。因此,未来乳酸菌食品级宿主的开发需要首先在菌株的水平上筛选具有理想功能的乳酸菌,明确菌株的功效,从而获得个性化的食品级表达菌株。(3)食品级表达载体的应用价值已在实验中得到证实,还需解决载体在实际运用中的局限性。例如在食品应用方面,尽管表达产物已于动物模型中成功表达并展现出功能性食品的价值,但考虑到动物模型与人体具有差异性,因而表达系统需要进一步通过人体细胞研究和临床试验后才能应用于食品中。在医学应用方面,尽管可以利用乳酸菌在肠道内定殖和黏附的特点开发疫苗,然而表达产物在人肠道内的表达状况难以准确检测,抗原蛋白在人肠道内表达并积累对细胞带来的影响还需深入研究。此外,乳酸菌促进机体产生免疫应答的机理尚未明确,在人肠道内定殖并释放的表达产物有可能引发机体的免疫耐受,如何解决耐受问题也需要进一步研究。通过对以上问题的深入研究和解答,我们将会得到更多具有实际应用价值的食品级载体和益生功能的重组菌株。

REFERENCES

- [1] Khalid K. An overview of lactic acid bacteria[J]. International Journal of Biosciences, 2011, 1(3): 1-13
 - [2] Trombert A. Recombinant lactic acid bacteria as delivery vectors of heterologous antigens: the future of vaccination?[J]. Beneficial Microbes, 2015, 6(3): 313-324
 - [3] Platteeuw C, Van Alen-Boerrigter I, Van Schalkwijk S, De Vos WM. Food-grade cloning and expression system for *Lactococcus lactis*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1996, 62(3): 1008-1013
 - [4] Kaur T, Balgir PP, Kaur B. Construction of a shuttle expression vector for lactic acid bacteria[J]. Genetic Engineering and Biotechnology, 2019, 17(1): 10
 - [5] Jeong DW, Lee JH, Kim KH, Lee HJ. A food-grade expression/secretion vector for *Lactococcus lactis* that uses an α -galactosidase gene as a selection marker[J]. Food Microbiology, 2006, 23(5): 468-475
 - [6] Sun QZ, Xiong YW, Ye CY, Xu JG. Construction of a food-grade secretion expression vector and use it for reporter protein expression in *Lactococcus lactis*[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2008, 48(3): 293-298 (in Chinese)
- 孙强正,熊衍文,叶长芸,徐建国.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[J]. 微生物学报, 2008, 48(3): 293-298
- [7] Li RQ, Takala TM, Qiao MQ, Xu HJ, Saris PEJ. Nisin-selectable food-grade secretion vector for *Lactococcus lactis*[J]. Biotechnology Letters, 2011, 33(4): 797-803
- [8] De Castro CP, Drumond MM, Batista VL, Nunes A, Mancha-Agresti P, Azevedo V. Vector development timeline for mucosal vaccination and treatment of disease using *Lactococcus lactis* and design approaches of next generation food grade plasmids[J]. Frontiers in Microbiology, 2018, 9: 1805
- [9] Zhang SS, Xu ZS, Qin LH, Kong J. Development of strong lactose/galactose-inducible expression system for *Lactobacillus plantarum* by optimizing promoter[J]. Biochemical Engineering Journal, 2019, 151: 107316
- [10] Wu CM, Lin CF, Chang YC, Chung TC. Construction and characterization of nisin-controlled expression vectors for use in *Lactobacillus reuteri*[J]. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 2006, 70(4): 757-767
- [11] Gao SY, Li DD, Liu Y, Zha EH, Zhou TZ, Yue XQ. Oral immunization with recombinant hepatitis E virus antigen displayed on the *Lactococcus lactis* surface enhances ORF2-specific mucosal and systemic immune responses in mice[J]. International Immunopharmacology, 2015, 24(1): 140-145
- [12] Takala TM, Saris PEJ. A food-grade cloning vector for lactic acid bacteria based on the nisin immunity gene *nisI*[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2002, 59(4/5): 467-471
- [13] Wang C. Construction of an expression vector with Nisin resistant gene *nisI* as a food grade selection marker for *Lactococcus lactis*[D]. Guangzhou: Master's Thesis of South China University of Technology, 2010 (in Chinese)
王成. 以 *nisI* 为选择标记的乳酸乳球菌食品级表达载体的构建[D]. 广州: 华南理工大学硕士学位论文, 2010
- [14] Bron PA, Benchimol MG, Lambert J, Palumbo E, Deghorain M, Delcour J, de Vos WM, Kleerebezem M, Hols P. Use of the *atr* gene as a food-grade selection marker in lactic acid bacteria[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2002, 68(11): 5663-5670
- [15] Nguyen TT, Mathiesen G, Fredriksen L, Kittl R, Nguyen TH, Eijnsink VGH, Haltrich D, Peterbauer CK. A food-grade system for inducible gene expression in *Lactobacillus plantarum* using an alanine racemase-encoding selection marker[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2011, 59(10): 5617-5624
- [16] Lu WW, Kong J, Kong WT. Construction and application of a food-grade expression system for *Lactococcus lactis*[J]. Molecular Biotechnology, 2013, 54(2): 170-176
- [17] McCormick CA, Griffin HG, Gasson MJ. Construction of a food-grade host/vector system for *Lactococcus lactis* based on the lactose operon[J]. FEMS Microbiology Letters, 1995, 127(1/2): 105-109
- [18] Xu ZS, Liu XL, Wang T, Zhang SS. Food-grade *Lactobacillus plantarum* expression system and application thereof to yogurt preparation: CN, 201911223430.9[P]. 2020-02-28 (in Chinese)
徐振上, 刘新利, 王婷, 张凤凤. 一种食品级植物乳杆菌表达系统及其在酸奶制备中的应用: 中国, 201911223430.9[P]. 2020-02-28
- [19] Dieye Y, Usai S, Clier F, Gruss A, Piard JC. Design of a protein-targeting system for lactic acid bacteria[J]. Journal of Bacteriology, 2001, 183(14): 4157-4166
- [20] Sun QZ, Xiong YW, Ye CY, Xu JG. Construction of a food-grade secretion expression vector and the expression of reporter protein in *Lactococcus lactis*[J]. Chinese Journal of Zoonoses, 2008, 24(3): 224-228,275 (in Chinese)
孙强正, 熊衍文, 叶长芸, 徐建国. 乳酸乳球菌食品级分泌性表达载体 pSQZ 的构建及报告蛋白的表达[J]. 中国人兽共患病学报, 2008, 24(3): 224-228,275
- [21] Cheng J, Cao J, Cao J, Wang XF, Ge RY. A food-grade, secretory expression of *il1ra* protein in a *Lactococcus lactis* system for potential oral therapy on IBD[A]//Proceedings of the 2nd International Conference on Biomedical and Biological Engineering 2017 (BBE 2017)[C]. Guilin, China: Atlantis Press, 2017: 386-391
- [22] Tagliavia M, Nicosia A. Advanced strategies for food-grade protein production: a new *E. coli*/lactic acid bacteria shuttle vector for improved cloning and food-grade expression[J]. Microorganisms, 2019, 7(5): 116
- [23] Xu ZS. Selection of excellent inoculant strains and their effects on corn stover silages[D]. Jinan: Doctoral Dissertation of Shandong University, 2018 (in Chinese)
徐振上. 优良青贮剂菌株选育及对青贮饲料品质影响[D]. 济南: 山东大学博士学位论文, 2018
- [24] Zhang SS, Xu ZS, Qin LH, Kong J. Low-sugar yogurt making by the co-cultivation of *Lactobacillus plantarum* WCFS1 with yogurt starter cultures[J]. Journal of Dairy Science, 2020, 103(4): 3045-3054
- [25] Zhu DL, Liu FL, Xu HJ, Bai YL, Zhang XM, Saris PEJ, Qiao MQ. Isolation of strong constitutive promoters from *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* N8[J]. FEMS Microbiology Letters, 2015, 362(16): fmv107
- [26] Gu XX, Tan JX, Tian HT, Zhang YL, Luo YB, Guo XH. Construction of a food-grade expression vector based on pMG36e by using an α -galactosidase gene as a selectable marker[J]. Journal of Integrative Agriculture, 2014, 13(8): 1802-1808
- [27] Liu CQ, Su P, Khunajakr N, Deng YM, Sumual S, Kim WS, Tandianus JE, Dunn NW. Development of food-grade cloning and expression vectors for *Lactococcus lactis*[J].

- Journal of Applied Microbiology, 2005, 98(1): 127-135
- [28] Landete JM. A review of food-grade vectors in lactic acid bacteria: from the laboratory to their application[J]. Critical Reviews in Biotechnology, 2017, 37(3): 296-308
- [29] Song AAL, In LLA, Lim SHE, Rahim RA. A review on *Lactococcus lactis*: from food to factory[J]. Microbial Cell Factories, 2017, 16(1): 55
- [30] Su SF, Sa CL, Wang X, Wu QH, Qi BR, Gao W, Zhao JL, Liu HK, Wang YH, Hu H. Construction of *Lactococcus lactis* food-grade double-screening-labeled secretory expression vector[J]. Animal Husbandry and Feed Science, 2020, 41(2): 66-77 (in Chinese)
苏少锋, 萨初拉, 王潇, 吴青海, 其布日, 高娃, 赵俊利, 刘红葵, 王蕴华, 呼和. 乳酸乳球菌食品级双筛选标记的分泌型表达载体的构建[J]. 畜牧与饲料科学, 2020, 41(2): 66-77
- [31] Tian HT, Tan JX, Zhang LF, Gu XX, Xu WT, Guo XH, Luo YB. Increase of stress resistance in *Lactococcus lactis* via a novel food-grade vector expressing a *shsp* gene from *Streptococcus thermophilus*[J]. Brazilian Journal of Microbiology, 2012, 43(3): 1157-1164
- [32] Wang C. Construction of an anti-*Helicobacter pylori* vaccine using a food-grade lactic acid bacterium as the vector and evaluation of its immune efficacy[D]. Zhengzhou: Master's Thesis of Zhengzhou University, 2019 (in Chinese)
王琛. 以食品级乳酸菌为载体的抗幽门螺杆菌疫苗的构建及免疫效果[D]. 郑州: 郑州大学硕士学位论文, 2019
- [33] Azizpour MM, Jafari P, Hoseini SD, Behrozikhah AM. Cloning and expression of *B. mellitensis* *bp26* gene in *Lactococcus lactis* as a food grade vaccine[J]. Avicenna Journal of Medical Biotechnology, 2019, 11(3): 264-267
- [34] Yildiz M, Askin H. Heterologous expression of azurin from *Pseudomonas aeruginosa* in food-grade *Lactococcus lactis*[J]. Preparative Biochemistry and Biotechnology, 2019, 49(8): 800-806
- [35] Bermúdez-Humarán LG, Kharrat P, Chatel JM, Langella P. Lactococci and lactobacilli as mucosal delivery vectors for therapeutic proteins and DNA vaccines[J]. Microbial Cell Factories, 2011, 10(Suppl 1): S4
- [36] Yin S, Zhai ZY, Wang GH, An HR, Luo YB, Hao YL. A novel vector for lactic acid bacteria that uses a bile salt hydrolase gene as a potential food-grade selection marker[J]. Journal of Biotechnology, 2011, 152(1/2): 49-53
- [37] Qi SQ. Food-grade expressing and analysis of nattokinase in *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*[D]. Baoding: Master's Thesis of Hebei Agricultural University, 2015 (in Chinese)
齐少卿. 纳豆激酶在保加利亚乳杆菌中食品级表达及分析[D]. 保定: 河北农业大学硕士学位论文, 2015
- [38] Lu WW, Wang T, Wang Y, Xin M, Kong J. A food-grade fimbrial adhesin FaeG expression system in *Lactococcus lactis* and *Lactobacillus casei*[J]. Canadian Journal of Microbiology, 2016, 62(3): 241-248
- [39] Liu Q, Jiang YL, Yang WT, Liu YS, Shi CW, Liu J, Gao X, Huang HB, Niu TM, Yang GL, et al. Protective effects of a food-grade recombinant *Lactobacillus plantarum* with surface displayed AMA1 and EtMIC2 proteins of *Eimeria tenella* in broiler chickens[J]. Microbial Cell Factories, 2020, 19(1): 28
- [40] Chen Y, Qi M, Xu MQ, Huan HL, Shao WL, Yang Y. Food-grade gene transformation system constructed in *Lactobacillus plantarum* using a *GlmS*-encoding selection marker[J]. FEMS Microbiology Letters, 2018, 365(21): fny254
- [41] Xu ZS, Wang T, Liu XL, Zhang SS. Dual-plasmid food-grade *Lactobacillus plantarum* expression system and application thereof: CN, 201911223427.7[P]. 2020-02-14 (in Chinese)
徐振上, 王婷, 刘新利, 张凤凤. 一种双质粒食品级植物乳杆菌表达系统及其应用: 中国, 201911223427.7[P]. 2020-02-14
- [42] Xu ZS, Wang T, Liang Y. Food-grade *Streptococcus thermophilus* expression system and application thereof to yogurt preparation: CN, 202010229538.5[P]. 2020-06-09 (in Chinese)
徐振上, 王婷, 梁琰. 一种食品级嗜热链球菌表达系统及其在酸奶制备中的应用: 中国, 202010229538.5[P]. 2020-06-09
- [43] Xu ZS, Liu XL, Wang T. Construction method of food-grade *Streptococcus thermophilus* expression vector: CN, 202010266247.3[P]. 2020-07-03 (in Chinese)
徐振上, 刘新利, 王婷. 一种食品级嗜热链球菌表达载体的构建方法: 中国, 202010266247.3[P]. 2020-07-03
- [44] Sasaki Y, Ito Y, Sasaki T. *thyA* as a selection marker in construction of food-grade host-vector and integration systems for *Streptococcus thermophilus*[J]. Applied and Environment Microbiology, 2004, 70(3): 1858-1864
- [45] Joutsjoki V, Luoma S, Tamminen M, Kilpi M, Johansen E, Palva A. Recombinant *Lactococcus* starters as a potential source of additional peptidolytic activity in cheese ripening[J]. Journal of Applied Microbiology, 2002, 92(6): 1159-1166
- [46] Douglas GL, Goh YJ, Klaenhammer TR. Integrative food grade expression system for lactic acid bacteria[A]//Methods in Molecular Biology. Humana Press, 2011, 765: 373-387
- [47] Li JJ, Zhang W, Wang C, Yu Q, Dai RR, Pei XF. *Lactococcus lactis* expressing food-grade β -galactosidase alleviates lactose intolerance symptoms in post-weaning Balb/c mice[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2012, 96(6): 1499-1506

- [48] Nguyen TT, Nguyen HM, Geiger B, Mathiesen G, Eijssink VGH, Peterbauer CK, Haltrich D, Nguyen TH. Heterologous expression of a recombinant lactobacillal β -galactosidase in *Lactobacillus plantarum*: effect of different parameters on the sakacin P-based expression system[J]. *Microbial Cell Factories*, 2015, 14(1): 30
- [49] Dong ZX, Zhang J, Li HZ, Du GC, Chen J, Lee B. Codon and propeptide optimizations to improve the food-grade expression of bile salt hydrolase in *Lactococcus lactis*[J]. *Protein and Peptide Letters*, 2015, 22(8): 727-735
- [50] Kittibunchakul S, Pham ML, Tran AM, Nguyen TH. β -Galactosidase from *Lactobacillus helveticus* DSM 20075: Biochemical characterization and recombinant expression for applications in dairy industry[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2019, 20(4): 947
- [51] Hoang PM, Cho S, Kim KE, Byun SJ, Lee TK, Lee S. Development of *Lactobacillus paracasei* harboring nucleic acid-hydrolyzing 3D8 scFv as a preventive probiotic against murine norovirus infection[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2015, 99(6): 2793-2803
- [52] Grangette C, Müller-Alouf H, Goudercourt D, Geoffroy MC, Turneer M, Mercenier A. Mucosal immune responses and protection against tetanus toxin after intranasal immunization with recombinant *Lactobacillus plantarum*[J]. *Infection and Immunity*, 2001, 69(3): 1547-1553
- [53] Guo SG, Yan WW, McDonough SP, Lin NF, Wu KJ, He HX, Xiang H, Yang MS, Moreira MAS, Chang YF. The recombinant *Lactococcus lactis* oral vaccine induces protection against *C. difficile* spore challenge in a mouse model[J]. *Vaccine*, 2015, 33(13): 1586-1595
- [54] Sun N, Zhang RH, Duan GC, Peng XY, Wang C, Fan QT, Chen SY, Xi YL. An engineered food-grade *Lactococcus lactis* strain for production and delivery of heat-labile enterotoxin B subunit to mucosal sites[J]. *BMC Biotechnology*, 2017, 17(1): 25
- [55] Cao WY, Dong M, Hu ZY, Wu J, Li YC, Xu HD. Recombinant *Lactococcus lactis* NZ3900 expressing bioactive human FGF21 reduced body weight of Db/Db mice through the activity of brown adipose tissue[J]. *Beneficial Microbes*, 2020, 11(1): 67-78