

乳酸菌载体 pMG36e 的应用现状*

丁寅寅¹ 马会勤² 左芳雷¹ 郝彦玲¹ 陈尚武^{1**}

(1 中国农业大学食品科学与营养工程学院 北京 100083 2 中国农业大学农学与生物技术学院 北京 100193)

摘要 乳酸乳球菌通用表达质粒 pMG36e 是一个经典的人工构建的组成型表达载体,是以乳酸乳球菌乳脂亚种蛋白酶基因的转录和翻译信号为基础构建而成的。它包含一个强启动子,能够在多种细菌中表达外源蛋白。已用于研究细菌素作用机制,乳酸菌基因工程菌株的改造以及口服疫苗的开发等,应用领域十分广泛,已成为乳酸菌基因工程研究的重要工具质粒之一。现主要从载体构成、基因表达与食品级载体改造等三方面的应用对其进行综述,旨在为该质粒今后研究提供资料。

关键词 pMG36e 表达载体 食品级载体 乳酸菌

中图分类号 Q782

乳酸菌 (lactic acid bacteria, LAB) 是一类能够发酵糖类产生乳酸的革兰氏阳性细菌^[1],具有诸如缓解乳糖不耐症、调节消化道微生态平衡等益生作用,应用领域十分广泛。随着近二十几年来分子生物学的发展,以乳酸菌作为宿主,利用质粒表达外源基因,对乳酸菌进行改造以进一步提高其功能已成为目前的研究热点之一。

乳酸菌常用质粒载体主要有 pWV01 衍生载体, pNZ 系列载体^[2] 等。质粒 pMG36e 来源于 pWV01 载体,于 1989 年由 Van De Guchte^[3] 以乳酸乳球菌乳脂亚种蛋白酶基因的转录和翻译信号为基础构建而成,质粒大小约为 3.6kb,便于宿主携带,可表达被克隆的各种基因。目前已在乳球菌属 (*Lactococcus*),链球菌属 (*Streptococcus*),乳杆菌属 (*Lactobacillus*) 等中成功表达如溶菌酶、苯丙氨酸氨酶^[4]、枯草杆菌中性蛋白酶^[5],以及超氧化物歧化酶^[6] 等以及其他蛋白基因,近年来也有学者^[7] 对其进行改造,成功构建了食品级载体。是目前应用较多的一个组成型表达载体。本文主要从载体构成,表达外源基因与构建食品级载体等三方面进行综述,旨在为今后该质粒载体的研究与应用提供有价值的参考。

1 载体构成

载体 pMG36e 由强启动子 p32 及其下游的部分开放阅读框、多克隆位点和来自乳酸乳球菌乳脂亚种 (*Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* Wg2) 蛋白酶基因 (*prtP*)^[8] 的转录终止子以及 pWV01 复制子和来自于质粒 pE194^[9] 的红霉素抗性基因 *Emr* 构成,质粒大小为 3.6kb。质粒 pMG36e 的构成使其有利于表达外源基因。其中强启动子 P32 于 1987 年由 Van Der Vossen 等^[10] 利用鸟枪法从乳脂链球菌 (*S. cremoris* Wg2) 克隆得到,P32 包括开放阅读框架和一个能够被大肠杆菌 (*E. coli*)、枯草芽孢杆菌 (*B. subtilis*)、乳链球菌 (*S. lactis*) 识别的核糖体结合位点。pWV01 复制子来源于广宿主乳球菌质粒 pWV01^[11],能在一系列细菌中行使功能,这其中包括大肠杆菌 (*E. coli*),枯草杆菌 (*B. subtilis*)、乳球菌、乳杆菌、化脓性链球菌 (*S. pyogenes*) 和血链球菌 (*S. sanguis*) 等^[3]。位于翻译起始信号下游的多克隆位点可使外源基因在合适的阅读框架内插入。由于大肠杆菌与枯草杆菌可作为构建重组质粒的中间宿主,这极大地提高了该质粒的表达效果和扩展了宿主应用范围。

2 利用 pMG36e 载体的基因表达

自 20 世纪 80 年代 Van De Guchte 成功构建该质粒

收稿日期:2009-06-29 修回日期:2009-07-07

* 国家“863”计划资助项目(2008AA10Z310,2006AA10Z317)

**通讯作者,电子信箱:swchen@cau.edu.cn

研制奠定了基础。

2.3.2 低乳糖乳制品 发酵酸奶的过程中,在 β -半乳糖苷酶的作用下,牛奶中只有25%~50%的乳糖被乳酸菌分解,还有较多的乳糖存在。Wang等^[29]利用质粒pMG36e将来自于保加利亚乳杆菌wch9901的 β -半乳糖苷酶基因在乳酸乳球菌乳脂亚种MG1363中表达^[30],其后又将来自于德氏乳杆菌保加利亚亚种的 β -半乳糖苷酶在大肠杆菌中进行非融合表达^[31]。使用具有半乳糖苷酶活性的乳酸菌生产乳制品,可为解决乳糖不耐症提供了方法。

2.3.3 防癌保健乳制品 谷胱甘肽硫转移酶(GST)家族是真核生物重要的解毒酶类。人谷胱甘肽硫转移酶(hGST)对于多种来源的致癌物、诱变剂、具有重要的解毒作用。向华等^[32]将人谷胱甘肽硫转移酶A1基因的cDNA序列亚克隆于表达载体pMG36e,获得hGSTA1乳酸乳球菌表达株,可望应用于研制防癌保健乳制品。

2.4 科学研究与基因治疗

2.4.1 研究益生作用机制 由于很难检测体内吸附在肠上皮细胞的益生菌,因此,到目前为止都没有很好的方法来衡量其在肠道内的吸附能力,蒋爱民等^[33, 34]利用pMG36e构建携带lux基因的重组质粒pMG36e-luxAB和pMG36e-luxCDABE,经电转化获得带lux基因的发光乳球菌。这为研究体内益生菌的分布和存活率以及有利于人体健康的机制提供了思路。

2.4.2 外源基因表达的报告系统 Raha等^[23]将凝结芽孢杆菌ST-6(*Bacillus coagulans* ST-6)中的木聚糖酶基因亚克隆到载体pMG36e,构建了重组载体可作为大肠杆菌和乳球菌含报告基因的载体。

Dup lessis等^[35]利用pMG36e作为中间载体,通过构建pMG36e-SapS研究了金黄色葡萄球菌非特异性酸性磷酸蛋白酶(nonspecific acid phosphatase)在革兰氏阳性与阴性菌中表达的报告基因。

2.4.3 疾病治疗 自1999年以来,有学者利用pMG36e构建携带有苯丙氨酸脱氨酶(PAL)的重组质粒,并得到具有一定酶活性的基因工程菌株,将其制成不同剂型灌喂高苯丙氨酸血症模型大鼠,发现其外周血苯丙氨酸脱氨酶水平显著降低,为基因疗法治疗苯丙酮尿症开辟了一条新途径^[4, 36-38]。另外,pMG36e还应用于口服疫苗的研制,用于避免幽门螺杆菌的感染^[39, 40]等。

3 食品级载体应用

食品级载体(food-grade vector)是安全、稳定的,可在食品加工中使用的质粒载体^[41]。它应具备以下基本条件:(1)选择标志必须是食品级的;(2)表达载体中的启动子、核糖体结合位点、终止子和分泌信号等DNA片段必须来自食品级微生物;(3)启动子的诱导物也必须是食品级的^[42]。

pMG36e参与构建食品级载体主要分为以下两种途径:

一是表达外源基因作为食品级细菌素。McCormick等^[43]在表达载体pMG36e中插入食肉乳杆菌素Carnobacteriocin B2的结构基因,转化到广布肉杆菌LV13菌中并获得表达。Carnobacteriocin B2是一类小分子热稳定肽(SHSP),此类乳酸菌素杀菌机理主要是细菌素能吸附在细胞膜上并形成孔道,使得细胞膜的通透性增加从而引起细胞内各种离子的渗漏和能量物质的消耗,导致细胞解体死亡^[44]。

二是用食品级基因代替pMG36e的抗性基因构建食品级载体。Jeong^[7]以载体pMG36e为基础,使用来自于植物乳杆菌的 α -半乳糖苷酶(aga)基因替换红霉素抗性基因作为选择标记,成功在乳酸乳球菌中构建食品级表达/分泌载体,该载体可用来生产食品或药品。孙强正^[45]将质粒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,构建分泌型食品级表达载体pSQ,为目的蛋白的分泌性表达及食品级疫苗的研制奠定了基础。

4 小结与展望

载体pMG36e已用来表达多种基因,这为乳酸菌基因工程及分子生物学的研究提供了一种技术平台,应用涉及到食品、保健、医药,为相关学科的深入研究提供重要的分子克隆的工具。

今后的研究重点应着眼于拓展“食品级”载体的宿主谱、提高表达产物的生物活性等。构建出的“食品级”乳酸菌高效表达载体系统有望在发酵工程和口服功能性生物制剂方面得到长足的发展。

致谢 本文得到原中国科学院微生物研究所研究员郭兴华先生的精心斧正与修改,在此谨表谢忱。

参考文献

- [1] De Vos W M. Gene expression systems for lactic acid bacteria. *Current Opinion in Microbiology*, 1999, 2 (3): 289 ~ 295
- [2] 吕晓英,张朝武. 乳球菌基因克隆载体系统的研究近况. 现代预防医学, 2003, 30 (2): 222 ~ 225
- Lv X Y, Zhang C W. *Modern Preventive Medicine*, 2003, 30 (2): 222 ~ 225
- [3] Van De Guchte M, Van Der Vossen J M B M, Kok J, et al. Construction of a lactococcal expression vector; Expression of hen egg white lysozyme in *Lactococcus lactis subsp. lactis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 1989, 55 (1): 224 ~ 228
- [4] 向华,刘敬忠,胡维,等. 欧芹苯丙氨酸脱氨酶 cDNA 在乳酸乳球菌中的表达研究. 微生物学报, 1999,39 (3): 196 ~ 204
- Xiang H, Liu J Z, Hu W, et al. Expression in *Lactococcus Lactis* of catalytically active phenylalanine aminin-lyase from parsley. *Acta Microbiologica Sinica*, 1999, 39(3): 196 ~ 204
- [5] Van De Guchte M, Kodde J, Van Der Vossen J M B M, et al. Heterologous gene expression in *Lactococcus lactis subsp. lactis*; Synthesis, secretion, and processing of the *Bacillus subtilis* neutral protease. *Applied and Environmental Microbiology*, 1990, 56 (9): 2606 ~ 2611
- [6] 向华,卫文仲,谭华荣,等. 人铜锌超氧化物歧化酶基因的克隆和在乳酸乳球菌中的表达. 生物工程学报. 2000, 16(1): 6 ~ 9
- Xiang H, Wei W Z, Tan H R, et al. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2000, 16(1): 6 ~ 9
- [7] Jeong D W, Lee J H, Kim K H, et al. A food-grade expression/secretion vector for *Lactococcus lactis* that uses an α -galactosidase gene as a selection marker. *Food Microbiology*, 2006, 23 (5): 468 ~ 475
- [8] Van Der Vossen J M B M, Kodde J, Haandrikman A J, et al. Characterization of transcription initiation and termination signals of the proteinase genes of *Lactococcus lactis* Wg2 and enhancement of proteolysis in *L. lactis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 1992, 58 (9): 3142 ~ 3149
- [9] Horinouchi S, Weisblum B. Nucleotide sequence and functional map of pE194, a plasmid that specifies inducible resistance to macrolide, lincosamide, and streptogramin type B antibiotics. *Journal of Bacteriology*, 1982, 150 (2): 804 ~ 814
- [10] Van Der Vossen J M, Van Der Lelie D, Venema G. Isolation and characterization of *Streptococcus cremoris* Wg2-specific promoters. *Applied and Environmental Microbiology*, 1987, 53 (10): 2452 ~ 2457
- [11] Leenhouts K J, Tolner B, Bron S, et al. Nucleotide sequence and characterization of the broad-host-range lactococcal plasmid pWVO1. *Plasmid*, 1991, 26 (1): 55 ~ 66
- [12] Franke C M, Leenhouts K J, Haandrikman A J, et al. Topology of LcnD, a protein implicated in the transport of bacteriocins from *Lactococcus lactis*. *Journal of Bacteriology*, 1996, 178 (6): 1766 ~ 1769
- [13] Diep D B, Godager L, Brede D, et al. Data mining and characterization of a novel pediocin-like bacteriocin system from the genome of *Pediococcus pentosaceus* ATCC 25745. *Microbiology*, 2006, 152 (6): 1649 ~ 1659
- [14] Diep D B, Skaugen M, Salehian Z, et al. Common mechanisms of target cell recognition and immunity for class II bacteriocins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2007, 104 (7): 2384 ~ 2389
- [15] Van Reenen C A, Van Zyl W H, Dicks L M T. Expression of the immunity protein of plantaricin 423, produced by *Lactobacillus plantarum* 423, and analysis of the plasmid encoding the bacteriocin. *Applied and Environmental Microbiology*, 2006, 72 (12): 7644 ~ 7651
- [16] Sun Z, Zhong J, Liang X, et al. Novel mechanism for nisin resistance via proteolytic degradation of nisin by the nisin resistance protein NSR. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2009, 53 (5): 1964 ~ 1973
- [17] Fernández M, Sánchez-Hidalgo M, García-Quintáns N, et al. Processing of as-48ABC RNA in AS-48 enterocin production by *Enterococcus faecalis*. *Journal of Bacteriology*, 2008, 190 (1): 240 ~ 250
- [18] Brurberg M B, Haandrikman A J, Leenhouts K J, et al. Expression of a chitinase gene from *Serratia marcescens* in *Lactococcus lactis* and *Lactobacillus plantarum*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 1994, 42 (1): 108 ~ 115
- [19] 霍丹群,范守城,张云茹,等. phyA 基因的克隆及其新型表达载体的构建. 中国兽医科技, 2004, 34(3): 26 ~ 30
- Huo D Q, Fan S C, Zhang Y R, et al. *Chinese Journal of Veterinary Science and Technology*, 2004, 34(3): 26 ~ 30
- [20] Xiang H, Wei W, Zhang Y, et al. Human glutathione-S-transferase; Cloning and expression in *Lactococcus Lactis*. *Biomolecular Engineering*, 2000, 16 (6): 207 ~ 209
- [21] Varma N R S, Raha A R, Ross E, et al. Inducible expression of green fluorescence protein in *Lactococcus lactis*. *Current Science*, 2004, 87 (9): 1185 ~ 1187
- [22] Gobbetti M, Corsetti A, Morelli L, et al. Expression of α -amylase gene from *Bacillus stearothermophilus* in *Lactobacillus sanFrancisco*. *Biotechnology Letters*, 1996, 18 (8): 969 ~ 974
- [23] Raha A R, Chang L Y, Sipat A, et al. Expression of a thermostable xylanase gene from *Bacillus coagulans* ST-6 in *Lactococcus lactis*. *Letters in Applied Microbiology*, 2006, 42 (3): 210 ~ 214

- [24] 陆东林,张瑞梅. 功能性乳制品开发现状和前景. 新疆畜牧业, 2008, (4): 50~52
Lu D L, Zhang R M. Xinjiang Livestock Industry, 2008, (4): 50~52
- [25] Roy D G, Klaenhammer T R, Hassan H M. Cloning and expression of the manganese superoxide dismutase gene of *Escherichia coli* in *Lactococcus lactis* and *Lactobacillus gasserii*. Molecular and General Genetics. 1993, 239 (1,2): 33~40
- [26] 余保宁. 超氧化物歧化酶益生菌发酵酸奶的研究. 现代食品科技, 2007, 23 (4): 42~46
Yu B N. Modern Food Science and Technology, 2007, 23 (4): 42~46
- [27] 黄勇,张德纯. 锰超氧化物歧化酶基因的克隆和在保加利亚乳杆菌中的表达. 食品科学, 2005, 26(5): 92~95
Huang Y, Zhang D C. Food Science, 2005, 26(5): 92~95
- [28] 钟燕. 益生菌与乳糖不耐受研究进展. 国外医学(卫生学分册), 2003, 30 (2): 101~105
Zhong Y. Foreign Medical Sciences Hygienics, 2003, 30 (2): 101~105
- [29] Wang C, Zhang C W, Liu H C, et al. Non-fusion and fusion expression of β -galactosidase from *Lactobacillus bulgaricus* in *Lactococcus lactis*. Biomedical and Environmental Sciences, 2008, 21 (5): 389~397
- [30] Wang C, Liu H C, Pei X F, et al. Construction and property study of recombinant *Lactococcus lactis* with non-fusion expressing of β -galactosidase. Journal of Sichuan University (Medical Science Edition), 2009, 40 (1): 29~32
- [31] Wang C, Zhang C W, Yu Q, et al. β -galactosidase gene from *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* gets non-fusion expression in *Escherichia coli*. Journal of Sichuan University (Medical Science Edition), 2008, 39 (4): 544~546
- [32] 向华,张亦清,卫文仲,等. 人谷胱甘肽硫转移酶 A1 在乳酸乳杆菌中的表达及活性研究. 微生物学报, 2000, 40(2): 130~138
Xiang H, Xiang Y Q, Wei W Z, et al. Acta Microbiologica Sinica, 2000, 40(2): 130~138
- [33] 蒋爱民,杨公明,李元瑞,等. *lux* 基因发光乳杆菌构建方法的研究. 中国食品学报, 2003, 3(3): 19~23
Jiang A M, Yang G M, Li Y R, et al. Study on construction method of luminescent *Lactococcus*. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2003, 3(3): 19~23
- [34] Jiang A, Wang H, Lee N, et al. Biological characteristics of luminescent *Lactococcus lactis* transformed with *lux* genes. Food Research International, 2006, 39 (4): 426~432
- [35] Dup lessis E, Theron J, Berger E, et al. Evaluation of the *Staphylococcus aureus* class C nonspecific acid phosphatase (SapS) as a reporter for gene expression and protein secretion in gram-negative and gram-positive bacteria. Applied and Environmental Microbiology, 2007, 73 (22): 7232~7239
- [36] 胡维,刘敬忠,向华,等. 苯丙氨酸脱氨酶 cDNA 在大肠杆菌中的克隆与表达及酶法合成 L-苯丙氨酸. 微生物学杂志, 2000, 20(3): 30~32
Hu W, Liu J Z, Xiang H, et al. Journal of Microbiology, 2000, 20(3): 30~32
- [37] 贾兴元,刘敬忠,向华,等. 高苯丙氨酸血症大鼠基因疗法的实验研究. 中华医学杂志, 2000, (6): 464~467
Jia X Y, Liu J Z, Xiang H, et al. National Medical Journal of China, 2000, (6): 464~467
- [38] 张晶,刘敬忠,谭淑珍,等. 苯丙氨酸脱氨酶在乳酸乳球菌 NICE 系统的高效表达及其实验动物研究. 生物工程学报, 2002, 18 (6): 713~717
Zhang J, Liu J Z, Tan S Z, et al. Chinese Journal of Biotechnology, 2002, 18 (6): 713~717
- [39] Kim S J, Jun D Y, Yang C H, 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. Applied Microbiology and Biotechnology, 2006, 72 (3): 462~470
- [40] Zhang X J, Duan G, Zhang R, et al. Optimized expression of *Helicobacter pylori ureB* gene in the *Lactococcus lactis* nisin-controlled gene expression (NICE) system and experimental study of its immunoreactivity. Current Microbiology, 2009, 58 (4): 308~314
- [41] De Vos W M. Safe and sustainable systems for food-grade fermentations by genetically modified lactic acid bacteria. International Dairy Journal, 1999, 9 (1): 3~10
- [42] 孙强正,徐建国. 乳酸乳球菌食品级表达载体的研究进展. 中国微生物学杂志, 2006, 18(3): 260~封三
Sun Q Z, Xu J G. Chinese journal of microecology, 2006, 18 (3): 260~inside back cover
- [43] McCormick J K, Worobo R W, Stiles M E. Expression of the antimicrobial peptide carnobacteriocin B2 by a signal peptide-dependent general secretory pathway. Applied and Environmental Microbiology, 1996, 62 (11): 4095~4099
- [44] 赵玲艳,邓放明,杨细平,等. 生物防腐剂——乳酸菌素. 中国食物与营养, 2005, (2): 27~29
Zhao L Y, Deng F M, Yang X P, et al. Food and Nutrition in China, 2005, (2): 27~29
- [45] 孙强正,熊衍文,叶长芸,等. 食品级分泌表达载体的构建及报告蛋白在乳酸乳杆菌中的表达. 微生物学报, 2008, 48 (3): 293~298
Sun Q Z, Xiong Y W, Ye C Y, et al. Acta Microbiologica Sinica, 2008, 48 (3): 293~298

Application of Lactic Acid Bacteria Vector pMG36e

DING Yin-yin¹ MA Hui-qin² ZUO Fang-lei¹ HAO Yan-ling¹ CHEN Shang-wu¹

(1 College of Food Science and Nutritional Engineering, China Agricultural University, Beijing 100083, China)

(2 College of Agriculture and Biotechnology, China Agricultural University, Beijing 100193, China)

Abstract Plasmid pMG36e, based on protease gene transcription and translation signals from *Lactococcus lactis cremoris*, is a typical artificial constitutive expression vector as a main expression system in *Lactococcus*. It has a strong promoter and has been used for expression of heterologous protein such as enzyme in a variety of bacteria. In recent years, it was used to investigate the mechanism of bacteriocin as an intermediate vector, to construct lactic acid bacteria genetic strains and develop oral vaccine, even in gene therapy study. pMG36e has been used so widely in multi-disciplinary applications, it becomes one of the most important plasmid in the lactic acid bacteria genetic engineering. The basic plasmid composition, structure, and application of pMG36e in gene expression and food-grade vector construction were reviewed to provide reference for future research.

Key words pMG36e Expression vector Food-grade vector Lactic acid bacteria