

## 利用乳酸乳球菌 AcmA 表面展示 $\beta$ -1, 3-1, 4-葡聚糖酶

李小华, 黄新凤, 邵小虎, 李林

华中农业大学农业微生物学国家重点实验室, 武汉 430070

**摘要:** 采用 PCR 扩增乳酸乳球菌(*Lactococcus lactis*)MB191 菌株的全长肽聚糖水解酶基因 *acmA*, 通过 C-末端融合构建了与绿色荧光基因 *gfp* 的融合基因 *acmA-gfp*, 再连接于表达载体 pMG36k 上后得到可组成型表达 AcmA-GFP 融合蛋白的重组质粒 pMB137, 然后将该质粒电转化导入到乳酸乳球菌 AS1.2829 中获得重组菌 MB137。经 SDS-PAGE 检测, 重组菌 MB137 可表达预期的分子量约 74 kD 的蛋白质。Western blotting、细胞分级分离组分的荧光活性测定和特异 GFP 二抗标记的流式细胞仪检测证实 GFP 被成功锚定在重组菌细胞表面, 被锚定蛋白约占总表达融合蛋白的 35%。进一步通过从枯草芽胞杆菌 BF7658 基因组中扩增去信号肽序列的 $\beta$ -1, 3-1, 4 葡聚糖酶基因 *gls*, 来取代 pMB137 中的 *gfp*, 得到携带融合基因 *acmA-gls* 的重组质粒 pMB138, 经导入到乳酸乳球菌 AS1.2829 后得到重组菌 MB138, 其全细胞 $\beta$ -1, 3-1, 4-葡聚糖水解酶的活性约为 12 U/mL 菌液, 明显高于对照菌株。

**关键词:** 细胞表面展示, N-乙酰胞壁质酶, 葡聚糖酶, 全细胞催化剂

## Functional cell surface display of endo-beta-1, 3-1, 4-glucanase in *Lactococcus lactis* using N-acetylmuraminidase as the anchoring motif

Xiaohua Li, Xinfeng Huang, Xiaohu Shao, and Lin Li

State Key Laboratory of Agricultural Microbiology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China

**Abstract:** In this report, we utilized N-Acetylmuraminidase (AcmA) to develop a whole-cell catalyst of endo-beta-1, 3-1, 4-glucanase in *Lactococcus lactis*. The PCR-amplified full-length *acmA* gene from *L. lactis* MB191 was fused with the green fluorescent gene (*gfp*), followed by ligating the chimeric *acmA-gfp* into the *Escherichia coli*-*L. lactis* shuttle expression vector pMG36k, yielding the recombinant plasmid pMB137. SDS-PAGE analysis showed that the constitutive expression of AcmA-GFP fusion protein in the *L. lactis* AS1.2829 construct harboring pMB137 (named MB137), with the predicted Mr of 74 kD. Western blotting, GFP specific fluorescence intensity assays and flow cytometry analysis confirmed that AcmA-GFP was immobilized on the outer membrane, which constituted approx. 35% of the total intracellular fusion protein. Furthermore, *acmA* was fused with a PCR-amplified encoding fragment of the endo-beta-1, 3-1, 4-glucanase gene (*gls*) from *Bacillus subtilis* BF7658, resulting in the recombinant plasmid pMB138. By transferring pMB138 into *L. lactis* AS1.2829, the derived *L. lactis* MB138 expressing the AcmA-GLS fusion enzyme exhibited a distinct whole-cell glucanase activity (by 12 U/mL) compared to the control strain, indicating AcmA had served as a functional anchoring motif to immobilize the heterologous enzyme on the cell surface of *L. lactis*.

**Keywords:** cell surface display, N-Acetylmuraminidase, endo-beta-1, 3-1, 4-glucanase, whole-cell catalyst

**Received:** July 31, 2008; **Accepted:** October 27, 2008

**Supported by:** the National Natural Science Foundation of China (Nos. 30670054, 30370026).

**Corresponding author:** Lin Li. Tel: +86-27-87286952; Fax: +86-27-87280670; E-mail: lilin@mail.hzau.edu.cn

国家自然科学基金 (Nos. 30670054, 30370026)资助。

N-乙酰胞壁质酶(N-Acetylmuraminidase, AcmA)是乳酸乳球菌(*Lactococcus lactis*)中一种主要的肽聚糖水解酶,主要参与该菌的细胞分裂和到达稳定期时的菌体自溶过程<sup>[1, 2]</sup>。由于发现 AcmA 的 C-末端具有细胞壁锚定活性<sup>[3]</sup>,同时乳酸乳球菌也是已知的对人体及动物无致病性和无定殖力的食品级微生物,近年来国外已利用该蛋白作为运载蛋白来构建乳酸乳球菌细胞表面展示系统尤其是用于发展活体口服疫苗系统<sup>[4-6]</sup>。与一般革兰氏阳性菌中常用的五肽锚定单元(LPXTG-motif anchor)、S-层蛋白和脂蛋白等运载蛋白相比较,由 AcmA 所构建的展示体系有 2 个明显的优点:1) 在 AcmA 的 C-末端结构域的 3 个重复单元中,仅保留 1 个重复单元即可锚定于细胞壁<sup>[7]</sup>,从而更有利于运载较大分子量的外源蛋白;2) AcmA 还可以从细胞外向乳酸乳球菌细胞壁进行回向锚定,这一特性可使该菌可以同时展示 2 种甚至是多种不同的外源蛋白<sup>[8]</sup>,因此, AcmA 是一种很有研究潜力的运载蛋白。但是,由于胞内表达的 AcmA 往往跨膜转运的活性不强<sup>[7, 8]</sup>,探索新的 *acmA* 基因资源来发展有效的细胞表面展示技术平台,仍是一项亟需加强开展的工作。 $\beta$ -1, 3-1, 4 葡聚糖酶可特异性降解 $\beta$ -葡聚糖分子中的 $\beta$ -1, 3 和 $\beta$ -1, 4 糖苷键,是一种重要的工业用酶<sup>[9, 10]</sup>。该酶可用于水解大麦 $\beta$ -葡聚糖成较小聚合物,从而消除 $\beta$ -葡聚糖在啤酒行业所造成的麦汁粘度增大、难以过滤、啤酒的雾状浑浊和凝胶沉淀等问题。此外有报道 $\beta$ -1, 3-1, 4 葡聚糖酶可能也参与植物抗病过程<sup>[11-13]</sup>。本研究通过从 1 株自行分离的乳酸乳球菌菌株中克隆 N-乙酰胞壁质酶基因 *acmA*, 利用该基因产物作为运载蛋白和绿色荧光蛋白作为报告蛋白,构建了一个在乳酸乳球菌细胞表面展示外源蛋白的平台系统,在此基础上,选用来源于枯草芽胞杆菌(*Bacillus subtilis*)的 $\beta$ -1,3-1,4-葡聚糖酶作为表面展示的目标蛋白,对其在乳酸乳球菌细胞表面的展示性能进行了考察,以期研发具有自我复制和再生性能的、稳定的微生物全细胞催化剂提供研究基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 细菌菌株、载体、试剂和培养基

乳酸乳球菌乳酸亚种(*L. lactis* subsp. *lactis*) MB191 为本实验室从生牛奶中分离并鉴定的一株具较高 Nisin 活性的野生型菌株,在本研究中用作 PCR

扩增 *acmA* 基因的出发菌株;乳酸乳球菌乳酸亚种 AS1.2829 购自中国典型培养物保藏中心(CCTCC),在本研究中作为构建细胞表面展示平台的受体菌;大肠杆菌(*Escherichia coli*) DH5 $\alpha$ 为本实验室保存,用于构建各种重组质粒的受体菌;携带 $\beta$ -1、3-1、4 葡聚糖酶基因 *gls* 的枯草芽胞杆菌 BF7658 菌株以及大肠杆菌-乳酸乳球菌穿梭表达载体 pMG36e 为本室陈守文教授惠赠。携卡那霉素抗性基因(*Kan*)的质粒 pDG780 为本室保藏,携 *gfp* 基因的质粒 pQE60-*gfp* 为刘子锋教授惠赠。质粒载体 pMD18-T、各种限制性内切酶、*Taq* DNA 合成酶和 PCR 片段凝胶回收试剂盒购于宝生物(大连)有限公司;小型质粒提取试剂盒购自北京博大泰克生物基因技术有限公司;T4 DNA 连接酶购于晶美生物公司;DAB 试剂盒购于武汉凌飞生物有限公司;Cy5 标记的羊抗鼠 IgG 购于 Caltag 公司。其他常规生化试剂均为国产或者进口分析纯级。

用于培养乳酸乳球菌野生型菌株的培养基成分为:蔗糖 10 g, 酵母提取物 10 g, 蛋白胨 10 g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 10 g, NaCl 2 g, MgSO<sub>4</sub> 0.2 g, 加 H<sub>2</sub>O 至 1000 mL, 调节 pH 6.8 后于 1 × 10<sup>5</sup> Pa 灭菌 30 min;筛选乳酸乳球菌转化子以及培养乳酸乳球菌重组菌株时,在该培养基中添加红霉素(Em)至终浓度 5  $\mu$ g/mL;其他细菌培养采用 LB(Luria-Bertani)培养基<sup>[14]</sup>;筛选和培养大肠杆菌重组菌株时,在 LB 培养基中添加卡那霉素(Kan)或氨苄青霉素(Amp),使其终浓度分别为 25  $\mu$ g/mL 和 100  $\mu$ g/mL。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 引物设计、*acmA* 和 *gls* 基因的 PCR 扩增

细菌总 DNA 的制备按文献[14]的方法进行。用于从乳酸乳球菌 MB191 菌株总 DNA 中扩增 *acmA* 的引物是参照乳酸乳球菌乳酸亚种 IL1403 菌株的 *acmA* 基因序列(GenBank 登录号为 AE006264.1)进行设计,其上游引物(P M1)为:5'-TCC ATG GCA GTT TCT CGT ATT AA-3';下游引物(P M2)为:5'-TAA GAT CTA CGA AGA TAT TGA CCA A-3'。扩增 *acmA* 的 PCR 反应程序为 94°C 5 min; 94°C 30 s, 53°C 1 min, 72°C 90 s, 25 个循环; 72°C 10 min 后置 4°C 保温。另根据 GenBank 数据库中枯草芽胞杆菌 $\beta$ -1、3-1、4-葡聚糖酶基因序列(GenBank 登录序列号为 AF490978)设计上游引物 PG1: 5'-CTA GAT CTC AAA CAG GTG GAT CGT-3'和下游引物 PG2: 5'-GCT GCA

GTT ATT TTT TTG TAT AGC-3', 用于扩增不含有信号肽序列的 $\beta$ -1, 3-1, 4-葡聚糖酶编码基因 *gls*。其 PCR 反应程序为: 94°C 5 min; 94°C 30 s, 47°C 30 s, 72°C 40 s, 20 个循环; 72°C 10 min 后于 4°C 保温。PCR 扩增产物经纯化回收后连接于 pMD-18T, 由北京奥科生物技术有限公司进行测序。测序结果在 GenBank 数据库进行 BLAST 分析。

### 1.2.2 DNA 操作

DNA 的酶切、电泳、连接和大肠杆菌常规转化等均按分子克隆标准方法进行<sup>[14]</sup>。质粒 DNA 制备、DNA 凝胶电泳产物纯化回收均按试剂盒描述的方法进行。乳酸乳球菌的电转化使用 GenePulser™ 电转化仪(Bio-Rad), 参照文献[15]的方法进行。

### 1.2.3 重组菌 GFP 荧光活性的检测

直接用荧光显微镜观测乳酸乳球菌重组菌的菌体荧光。此外, 将重组菌接种于抗性培养基并于 28°C 下培养 36 h, 收集培养物后, 用 PBS (pH 7.5) 洗涤并重悬菌体, 并用 UV/Vis 分光光度计(Beckman Coulter, DU800 nucleic acid/protein Analyzer)测定并调整菌悬液光密度  $OD_{600}$  值为 1, 然后用荧光分光光度计(SHIMADZU RF-5301PC Spectrofluorophotometer)检测菌悬液的 GFP 相对荧光强度(Ex = 495 nm, Em = 510 nm)。

### 1.2.4 细胞分级分离

参照 Li 等<sup>[16]</sup>的方法修改进行。收集 20 mL 菌体培养物, 用 PBS 洗涤 1 次, 然后重悬于 20 mL 含有 1 mmol/L EDTA 的 PBS 缓冲液, 37°C 温育 2 h 后用 French Pressure Cell 细胞破碎仪(Thermo, USA) 处理 2 次(15 000 psi)。经 5000 r/min 离心 10 min 除去未完全破碎的菌体, 转移上清至超速离心专用离心管, 用 39 000 r/min 超速离心 1 h (Optima LE-80K, Beckman)。用含有 0.01 mmol/L  $MgCl_2$  和 2% (V/V) Triton X-100 的 PBS 重悬沉淀, 并在室温下温育 30 min, 再以 39 000 r/min 离心 1 h, 得到的沉淀即为细胞外膜成分, 上清为细胞内膜成分。取相同体积的细胞分级分离得到的各个组分进行 SDS-PAGE 或 Western blotting 分析。

### 1.2.5 SDS-PAGE 和 Western blotting 分析

取 1 mL 过夜培养物于 4°C 以 13 000 r/min 离心 5 min, 然后将菌体(或细胞分级分离制备物)悬浮于 Laemmli 缓冲液(20 mmol/L Tris · HCl (pH 6.8), 2%

$\beta$ -巯基乙醇, 1 mmol/L EDTA, 1% SDS)并置沸水中 5 min。冷却后离心, 取上清液进行 SDS-PAGE。凝胶浓度为 10%。Western blotting 参照 Li 等<sup>[16]</sup>描述的方法修改进行。SDS-PAGE 后切除浓缩胶, 将分离胶浸于 Towbin Buffer 中平衡 15 min, 再用半干式转膜仪在 25 V 条件下电转膜 35 min, 使蛋白质转移到硝酸纤维素膜上, 然后将该膜浸透到封闭液中 4°C 过夜后, 再在室温下将膜转浸于含有鼠抗-GFP 一抗缓冲液中 1.5 h, 进行一抗杂交反应, 然后用 TTBS 缓冲液洗膜 2~3 次, 再将膜浸入含有辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠 IgG 的二抗杂交液中进行二抗杂交反应 1.5 h, 然后用 TTBS 缓冲液以及 TBS 缓冲液洗膜, 最后用 DAB 显色试剂盒参照说明书进行显色反应。

### 1.2.6 流式细胞仪分析

收集菌体后用 PBS 缓冲液(pH 7.5)洗涤 3 次, 再用含有 5% 脱脂牛奶的 TBS 封闭液于 4°C 封闭 2 h, 离心收集菌体用 PBS 缓冲液(pH 7.5)洗涤菌体 3 次, 加入含有鼠抗-GFP 一抗缓冲液(稀释度 1:100)中进行一抗杂交反应 1.5 h, 然后用 PBS 缓冲液洗 3 次, 然后加入含有 Cy5 标记的羊抗鼠 IgG(稀释度 1:200)的二抗杂交液中进行二抗杂交反应 1.5 h, 最后用 PBS 缓冲液(pH 7.5)洗涤 3 次, 悬浮菌悬液用流式细胞仪(Becton Dickinson)进行检测。

### 1.2.7 $\beta$ -1, 3-1, 4-内切葡聚糖酶的酶活测定

重组菌全细胞 $\beta$ -葡聚糖酶活力测定参见 Teng 等的方法进行<sup>[17]</sup>。1 单位相对酶活定义为每分钟产生 1  $\mu$ mol 还原糖的全细胞菌液酶量。

## 2 结果

### 2.1 *acmA* 基因扩增与序列 BLAST 分析、携带 *acmA-gfp* 融合基因重组质粒的构建与表达活性

以乳酸乳球菌 MB191 总 DNA 为模板和以引物 PM1/PM2(序列中分别引入 *Nco* I 和 *Bgl* II 位点)进行 PCR 扩增, 电泳结果显示得到 1 个长约 1.3 kb 的特异性片段。将纯化的 PCR 产物连接到 pMD18-T 载体, 进行测序分析, 结果表明该片段为 1 个完整编码框, 全长 1320 bp。经 BLAST 分析, 该片段序列与 GenBank 中登记的乳酸乳球菌乳酸亚种 IL1403 的 N-乙酰胞壁质酶编码基因有 99% 的序列相似性, 仅存在 12 个核苷酸和 5 个氨基酸的差异; 与乳酸乳球菌乳脂亚种(*L. lactis* subsp. *cremoris*)MG1363 菌株的

*acmA* 基因的序列相似性也高达 83%。由此确定所扩增的产物为该菌株的 N-乙酰胞壁质酶基因(*acmA*)。

将正向连接 *acmA* 的 pMD18-T 命名为 pTaA。经 *Bgl* II/*Pst* I 酶切质粒 pQE60-gfp 得到的 *gfp* 连接到 pTaA 的相同位点, 得到重组质粒 pTag。另将质粒 pDG780 的 *Kan*<sup>r</sup> 基因插入乳酸乳球菌表达载体 pMG36e 的 *Hind* III 位点, 以便于在大肠杆菌 DH5 $\alpha$  中筛选转化子, 得到带双抗标记(*Em*<sup>r</sup> 和 *Kan*<sup>r</sup>) 的载体 pMG36k。然后通过 *Xba* I/*Sph* I 双酶切 pTag 的 *acmA-gfp* 片段, 将其克隆到 pMG36K 的相同位点上, 得到携带“*acmA-gfp*”融合基因的重组质粒 pMB137, 且融合基因被置于该载体组成型启动子的直接下游(图 1)。

将重组质粒 pMB137 电转化宿主菌乳酸乳球菌 AS1.2829, 得到工程菌 MB137。经 SDS-PAGE 分析, 可检测到 74 kD 的蛋白条带(图 2A), 与融合蛋白 AcmA-GFP 预期值相符, 表明融合基因已实现在重组菌株中的组成型表达。经荧光显微镜观测, 重组菌株 MB137 具有明显的 GFP 绿色荧光活性(结果未显示); 流式细胞仪(FACS)检测亦证实 MB137 可发

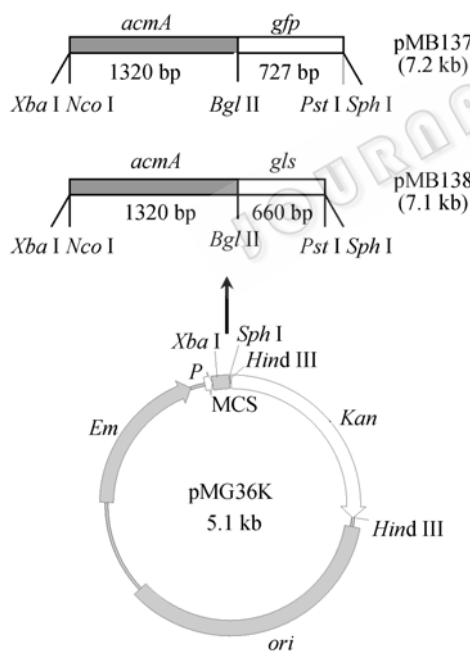


图 1 重组质粒 pMB137 和 pMB138 结构示意图

Fig. 1 Diagrammatic view of the recombinant plasmid pMB137 and pMB138. *E. coli*-*L. lactis* shuttle expression vector pMG36k was used as the parent vector for constructing pMB137 and pMB138. Abbreviations: *acmA*: N-Acetylmuraminidase gene; *gfp*: green fluorescence protein gene; *gls*: endo-beta-1, 3-1: 4-glucanase gene; *P*: promoter; *Em*: erythromycin resistance gene; *Kan*: kanamycin resistance gene; *ori*: replication origin.

射出 GFP 特异性荧光(图 4A); 而相对荧光强度测定结果表明, 重组菌具有比出发菌株明显较高的荧光活性(图 3)。

## 2.2 融合蛋白在乳酸乳球菌重组菌细胞表面定位分析

重组菌 MB137 经与特异 GFP 抗体的结合反应后, 通过流式细胞仪分别检测菌体 GFP 活性以及二抗上特异荧光标记 Cy5 荧光。如图 4 所示, 以出发菌株 AS1.2829 为对照, 可以检测到重组菌 MB137 带有明显的 GFP 以及 Cy5 双荧光。由于 GFP 抗体

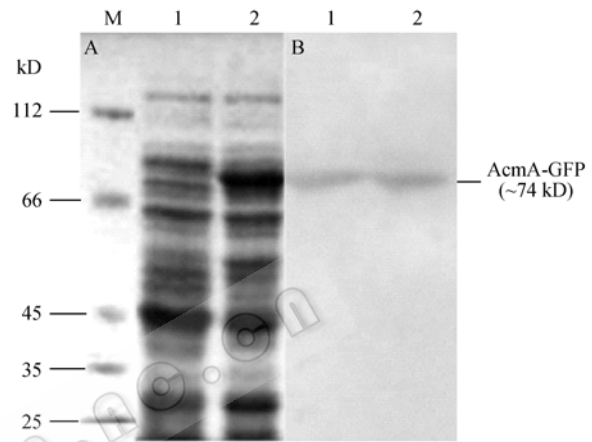


图 2 乳酸乳球菌重组菌株 MB137 表达融合蛋白的 SDS-PAGE 和 Western blotting 分析

Fig. 2 SDS-PAGE and Western blotting analysis of the recombinant *L. lactis* MB137 cells expressing AcmA-GFP fusion protein. (A) SDS-PAGE profile of the total intracellular expressed proteins. M: protein MW marker; 1: *L. lactis* AS1.2829 (as the negative control); 2: *L. lactis* MB137. (B) Western blotting profile of the cell fractionation components. 1: outer membrane component; 2: intact cells of *L. lactis* MB137.

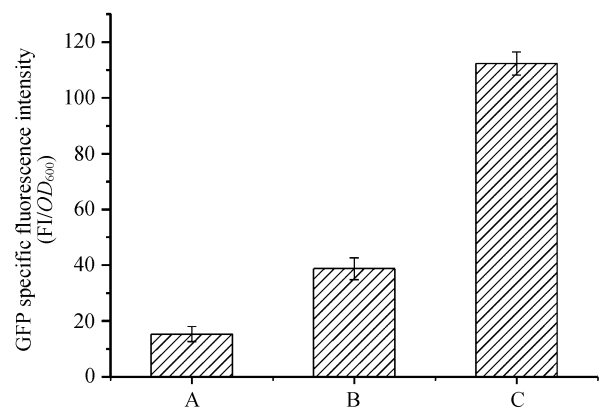


图 3 乳酸乳球菌重组菌株 MB137 的 GFP 荧光活性检测

Fig. 3 GFP fluorescence intensity of the recombinant *L. lactis* MB137 cells expressing AcmA-GFP fusion protein. A: *L. lactis* AS1.2829 (as the control); B: outer membrane component that prepared from the equal aliquot of cultures referred to  $OD_{600}$  with C); C: *L. lactis* MB137 intact cells expressing AcmA-GFP fusion protein.

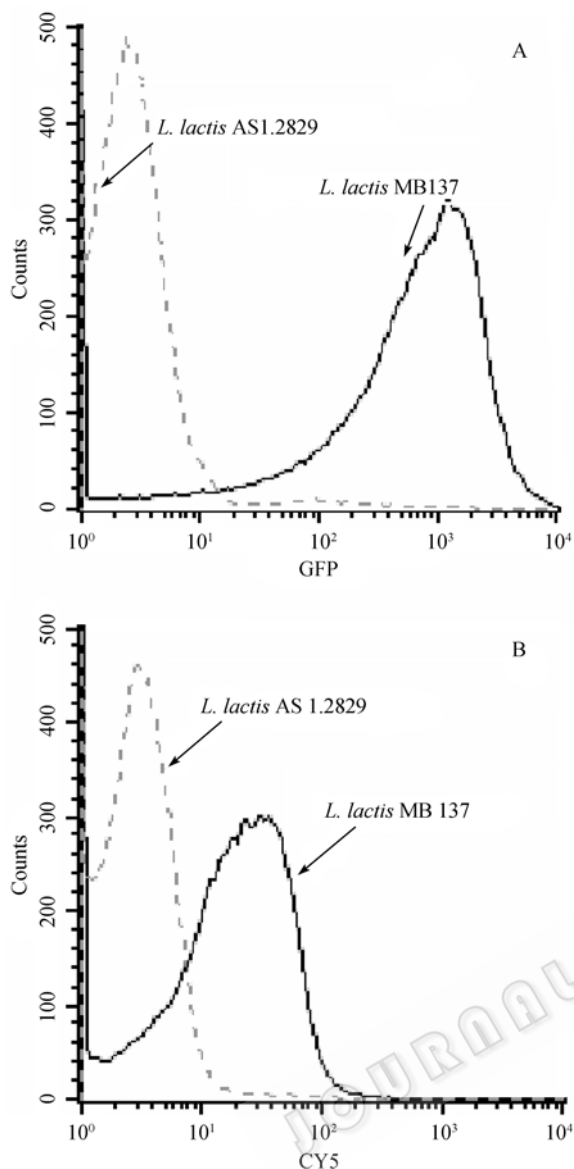


图 4 流式细胞仪分析测定乳酸乳球菌重组菌 MB137 表达 AcmA-GFP 融合蛋白的结果

Fig. 4 Flow cytometric analysis of fluorescence luminance by the recombinant *L. lactis* MB137 intact cells expressing AcmA-GFP fusion protein. *L. lactis* AS1.2829 was used as the negative control. The left histogram in each figure indicates the fluorescence background. The right histograms indicate the result for (A) specific GFP fluorescence and (B) Cy5-labeled fluorescence.

不能进入到细胞内部, 只能与锚定于细胞表面的 GFP 发生结合反应, 因此根据所检测 Cy5 标记荧光信号, 可证实外源蛋白 GFP 被成功锚定到重组菌 MB137 的细胞表面。

重组菌 MB137 经过细胞分级分离, 获得其细胞外膜组分, 经 SDS-PAGE 和 Western blotting 验证(图 2B), 证实 GFP 在重组菌外膜分离成分中的存在, 且

印迹信号带大小与 AcmA-GFP 融合蛋白的理论值一致, 从而进一步证实外源蛋白 GFP 被锚定于重组菌 MB137 的细胞表面。此外, 经比较测定等组分的细胞外膜分级分离组分与重组菌 MB137 全细胞的 GFP 荧光活性(图 3B), 细胞外膜组分的 GFP 荧光活性约占全细胞荧光活性的 35.4%。结合图 2、图 3 和图 4 结果, 可知所构建的表面展示工程菌可在其细胞表面展示外源蛋白, 其展示效率约为 35%。

### 2.3 重组菌 MB138 的构建与全细胞 $\beta$ -1, 3-1, 4-葡聚糖酶活性分析

使用引物对 PG1/PG2 (序列中分别引入 *Bgl* II 和 *Pst* I 位点), 以枯草芽胞杆菌 BF7658 总 DNA 为模板, 经 PCR 扩增得到预期大小 (660 bp) 的 $\beta$ -1, 3-1, 4-葡聚糖酶基因(不含信号肽序列), 命名为 *gls*。经测序和 BLAST 分析, 该基因序列与枯草芽胞杆菌枯草亚种(*B. subtilis* subsp. *subtilis*) str. 168 菌株的 *endo-beta-1, 3-1, 4-glucanase* 基因(GenBank 登录号为 NC000964)具有 97% 相似性, 在 5 个氨基酸位置存在差异。进一步将扩增的 *gls* 基因通过 *Bgl* II/*Pst* I 酶切, 替换质粒 pMB137 中的 *gfp* 基因, 得到 1 个大小约 7.1 kb 的重组质粒 pMB138 (图 1)。将重组质粒 pMB138 电转化导入到乳酸乳球菌 AS1.2829 菌株, 筛选得到重组菌 MB138。

对重组菌 MB138 全细胞 $\beta$ -1, 3-1, 4-葡聚糖酶酶活进行了测定, 结果显示作为阴性对照的受体菌 AS1.2829 未检测到酶活, 而重组菌株的酶活达到 12 U/mL 全细胞酶液。

## 3 讨论

微生物细胞表面展示 (Microbial cell surface display) 是指通过遗传操作手段将外源功能蛋白表达并定位于特定微生物细胞的表面。外源蛋白的这种定位表达不仅可以使所锚定的反应在细胞表面直接发生而提高反应效率, 并且可以克服某些大分子底物不能穿越细胞膜而进入胞内等弊端, 还可以使产物的提取纯化过程简化, 因而在许多生物技术领域展现出良好的发展前景<sup>[18,19]</sup>。本研究利用从 1 株自行分离的乳酸乳球菌野生菌株中扩增表达的 AcmA 作为运载蛋白, 利用 GFP 作为报告蛋白, 构建 1 株可在其细胞表面展示 GFP 的重组展示工程菌, 并对工程菌细胞表面展示蛋白的定位与展示性能进行了分析。在此基础上, 选用 $\beta$ -1, 3-1, 4-葡聚糖酶

作为目标蛋白, 对其表面展示后获得的全细胞酶活性进行了考察。由于作为生物大分子的 $\beta$ -1、3-1、4-葡聚糖酶的作用底物不能进入到细胞内, 而细胞内表达的融合蛋白也不能自由穿越细胞膜而分泌到培养基中, 因此重组菌株的全细胞酶活明显是由于表面展示目标蛋白 GLS 所致。这种不同来源的目标蛋白均能被成功展示在宿主菌的细胞表面, 使得本研究所构建的重组质粒(pMB137)与受体菌, 完全可以作为一种通用技术平台, 用于更多异源目标蛋白的展示, 例如, 展示各种抗原(或者抗原决定簇)、金属吸附蛋白等, 从而拓宽其可能的应用领域。

与所收获的在重组菌胞内表达的纯酶相比较<sup>[17]</sup>, 本研究构建的重组菌展示 $\beta$ -1、3-1、4-葡聚糖酶性能还比较低。其原因可能有: 1) AcmA 作为运载蛋白的锚定性能还不强, 尤其是与目标蛋白组成融合蛋白后, 可能降低其跨膜运载与细胞壁锚定性能; 2) 表达载体的启动子活性不强, 且表达载体是组成型表达, 这也是目前困扰乳酸乳球菌开发利用的一个普遍性的技术障碍; 3) 所表达的融合蛋白在细胞内被部分降解; 4)  $\beta$ -1、3-1、4-葡聚糖酶的 N-末端在与 AcmA 组成融合蛋白后, 影响了其酶活性等。当然, 本研究所获得的是一种全细胞酶催化剂, 与从细胞内表达的纯化酶特性不同, 具有可直接再生和无需纯化等优点, 但尽管如此, 如何提高其酶活性仍需进一步深入的工作。另外, 本研究所构建的工程菌还携带有抗生素抗性基因, 尚难以达到在环境中自由释放的要求, 这些方面有待于进一步地研究并加以改进。

## REFERENCES

- [1] Buist G, Karsens H, Nauta A, *et al.* Autolysis of *Lactococcus lactis* caused by induced overproduction of its major autolysin, AcmA. *Appl Environ Microbiol*, 1997, **63**(7): 2722–2728.
- [2] Buist G, Kok J, Leenhouts KJ, *et al.* Molecular cloning and nucleotide sequence of the gene encoding the major peptidoglycan hydrolase of *Lactococcus lactis*, a muramidase needed for cell separation. *J Bacteriol*, 1995, **177**: 1554–1563.
- [3] Leenhouts K, Buist G, Kok J. Anchoring of proteins to lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*, 1999, **76**: 367–376.
- [4] Ramasamy R, Yasawardena S, Zomer A, *et al.* Immunogenicity of a malaria parasite antigen displayed by *Lactococcus lactis* in oral immunisations. *Vaccine*, 2006, **24**: 3900–3908.
- [5] Tarahomjoo S, Katakura Y, Satoh E, *et al.* Bidirectional cell-surface anchoring function of C-terminal repeat region of peptidoglycan hydrolase of *Lactococcus lactis* IL1403. *J Biosci Bioeng*, 2008, **105**: 116–121.
- [6] van Roosmalen ML, Kanninga R, El Khattabi M, *et al.* Mucosal vaccine delivery of antigens tightly bound to an adjuvant particle made from food-grade bacteria. *Methods*, 2006, **38**: 144–149.
- [7] Okano K, Zhang Q, Kimura S, *et al.* System using tandem repeats of the cA peptidoglycan-binding domain from *Lactococcus lactis* for display of both N- and C-terminal fusions on cell surfaces of lactic acid bacteria. *Appl Environ Microbiol*, 2008, **74**: 1117–1123.
- [8] Raha AR, Varma NR, Yusoff K, *et al.* Cell surface display system for *Lactococcus lactis*: a novel development for oral vaccine. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2005, **68**: 75–81.
- [9] Heinemann U, Ay J, Gaiser O, *et al.* Enzymology and folding of natural and engineered bacterial beta-glucanases studied by X-ray crystallography. *Biol Chem*, 1996, **377**: 447–454.
- [10] Planas A. Bacterial 1,3-1,4-beta-glucanases: structure, function and protein engineering. *Biochim Biophys Acta*, 2000, **1543**: 361–382.
- [11] Kiselev KV, Kusaykin MI, Dubrovina AS, *et al.* The *rolC* gene induces expression of a pathogenesis-related beta-1, 3-glucanase in transformed ginseng cells. *Phytochemistry*, 2006, **67**: 2225–2231.
- [12] Li YF, Zhu R, Xu P. Activation of the gene promoter of barley beta-1, 3-glucanase isoenzyme GIII is salicylic acid (SA)-dependent in transgenic rice plants. *J Plant Res*, 2005, **118**: 215–221.
- [13] Riviere MP, Marais A, Ponchet M, *et al.* Silencing of acidic pathogenesis-related PR-1 genes increases extracellular beta-(1->3)-glucanase activity at the onset of tobacco defence reactions. *J Exp Bot*, 2008, **59**: 1225–1239.
- [14] Sambrook J, Russell DW. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 3rd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.
- [15] Papagianni M, Avramidis N, Filioussis G. High efficiency electrotransformation of *Lactococcus lactis* spp. *lactis* cells pretreated with lithium acetate and dithiothreitol. *BMC Biotechnol*, 2007, **7**: 15.
- [16] Li L, Kang DG, Cha HJ. Functional display of foreign protein on surface of *Escherichia coli* using N-terminal domain of ice nucleation protein. *Biotechnol Bioeng*, 2004, **85**: 214–221.
- [17] Teng D, Wang JH, Fan Y, *et al.* Cloning of beta-1, 3-1, 4-glucanase gene from *Bacillus licheniformis* EGW039 (CGMCC 0635) and its expression in *Escherichia coli* BL21 (DE3). *Appl Microbiol Biotechnol*, 2006, **72**: 705–712.
- [18] Georgiou G, Stathopoulos C, Daugherty PS, *et al.* Display of heterologous proteins on the surface of microorganisms: from the screening of combinatorial libraries to live recombinant vaccines. *Nat Biotechnol*, 1997, **15**: 29–34.
- [19] Lee SY, Choi JH, Xu Z. Microbial cell-surface display. *Trends Biotechnol*, 2003, **21**: 45–52.