

# 乳酸乳球菌基因表达载体系统的研究

向 华 谭华荣

(中国科学院微生物研究所 北京 100080)

刘敬忠

(北京红十字朝阳医院基础医学研究中心 北京 100020)

关键词 乳酸乳球菌, 基因表达, 载体系统

分类号 Q344

乳酸乳球菌 (*Lactococcus lactis*) 是乳球菌属 (*Lactococcus*) 最重要和最典型的一个种, 该菌为兼性厌氧的革兰氏阳性菌, 是乳品工业发酵的重要菌类, 是在食品及医药工程领域具有重要应用前景的食品级微生物<sup>[1]</sup>。乳酸乳球菌中存在大量的染色体外因子(如质粒和噬菌体), 为其分子生物学研究和基因载体系统的发展提供了极好的材料。在近十多年中, 随着乳酸乳球菌内源性质粒的去除和电穿孔转基因技术的建立以及乳酸乳球菌各类表达信号的分离和克隆, 已建立和发展了一系列具有不同用途的乳酸乳球菌载体和受体系统。这些载体包括基本的克隆载体, 启动子、终止子及分泌信号等的选择载体, 各类整合载体及基因表达载体<sup>[2]</sup>。食品级基因表达载体和受体系统的研究则是近年来该领域的前沿和热点。本文将主要综述乳酸乳球菌基因表达载体系统的最新进展。

## 1 普通表达载体

**1.1 组成型表达载体** 乳酸乳球菌第一个表达载体是以 *L. lactis* subsp *cremoris* 蛋白酶基因的转录和翻译信号为基础构建而成, 可融合表达被克隆的基因, 通过这一系统, 牛凝乳酶原 B 及 *E. coli* 的 *lacZ* 基因被表达。随着启动子选择载体的发展及其在筛选乳酸乳球菌强启动子中的应用, 这种鸟枪筛选法提供了更为合适的启动子, 其中一个染色体强启动子  $P_{32}$  被用于构建第二个表达载体 pMG36e<sup>[3]</sup>。该载体含有启动子  $P_{32}$  及其下游部分开放阅读框、来自 pUC18 的多克隆位点和来自 *prtP* 基因的转录终止子, 以及 pWV01 复制子和氯霉素抗性基因 *Em<sup>r</sup>* 等, 是目前应用较多的一个组成型表达载体。利用这一载体, 已有多种溶菌酶, 枯草杆菌中性蛋白酶, 以及大肠杆菌 MnSOD 等在乳酸乳球菌中获得表

中国博士后科学基金资助项目和微生物资源前期开发国家重点实验室资助课题

1997-07-17收稿

达。最近, Nilsson 等人利用乳酸乳球菌 *trnA* 基因簇(编码 tRNA 和一个 5S rRNA)的启动子, 在乳酸乳球菌中实现了异源 $\beta$ -半乳糖苷酶的高效表达<sup>[4]</sup>。这个载体系统可能会因其启动子的强力转录作用, 在外源基因的表达方面发挥较好的作用。

**1.2 诱导型表达载体** 外源基因的高效表达通常可能对宿主菌的生长和代谢造成毒害, 诱导表达信号因此被引入某些表达载体, 使外源基因的时空表达得到控制, 使细菌的生长和外源基因的高效表达可以分开。其中乳酸乳球菌 *dnaJ* 启动子是一个热诱导启动子, Van Asseldonk 等用于表达异源的 $\alpha$ -淀粉酶, 经热诱导可使表达量提高 2~3 倍<sup>[5]</sup>。另一个诱导表达系统是 Wells 等人构建的, 该系统将乳酸乳球菌可诱导表达的 *lacA* 启动子与 T7 RNA 聚合酶基因及含 T7 启动子的载体有

机组合而成<sup>[6]</sup>。T7 RNA 聚合酶编码基因被置于 *lacA* 启动子控制之下, 因此, 在乳糖诱导下, T7 RNA 聚合酶得到表达, 其结果是诱导 T7 启动子控制下的外源基因的表达。这一系统表达水平较高, 不过目的基因亦有较高的非诱导表达。Nauta 等(1996)则利用乳酸乳球菌温和噬菌体  $\phi$  rlt 的“抑制-启动”系统构建了又一个诱导表达载体 pIR12。在这个系统中, 外源基因克隆在  $P_2$  下游, 由于  $P_2$  受 *rro* 抑制子基因产物的抑制, 故外源基因不表达; 当加入诱导物丝裂霉素 C 后, 抑制被解除, 则外源基因实现高效表达<sup>[7]</sup>。其它被用于构建诱导表达系统的表达信号还包括 *sodA* 启动子<sup>[8]</sup>, *prtP* 启动子<sup>[9]</sup>, PA170 启动子<sup>[10]</sup>, *trpE* 启动子等<sup>[11]</sup>, 它们的诱导效率在 2~100 倍之间(表 1)。

最近, O' Sullivan 等利用裂解噬菌体的表达信号构

表1 乳酸乳球菌诱导型基因表达载体

诱导元件	诱导物	表达基因	诱导效率	参考文献
<i>dnaJ</i> promoter	High temperature	<i>amyS</i>	<4	[5]
<i>lccA</i> , T7 promoter	Lactose	T7FC	<20	[6]
$\phi$ rlt repressor/operator	Mitomycin C	<i>lacZ</i>	70	[7]
<i>sodA</i> promoter	Aeration	<i>lacZ</i>	2	[8]
<i>prtP</i> promoter	Absence of peptides	<i>gusA</i>	<8	[9]
PA170 promoter	low pH, temperature	<i>lacZ</i>	50~100	[10]
<i>trpE</i> promoter	Absence of tryptophan	<i>lacZ</i>	100	[11]
$\phi$ 31 promoter and ori	$\phi$ 31 infection	<i>lacZ</i>	>1000	[12]
<i>nisA</i> or <i>nisF</i> promoter	Nisin	<i>gusA et al</i>	>1000	[13,14]

建了一个新型的表达系统 pTRK392, 该载体含有一个来自 pSA3 的低拷贝数复制子和一个噬菌体中  $\phi$  31 的复制子, 并含有一个  $\phi$  31 启动子和 Em, Cm 选择标记。转化乳酸乳球菌后, 表达载体处于低拷贝状态, 宿主菌可以大量生长。然后用  $\phi$  31 进行感染, 即触发表达载体以  $\phi$  31 复制子大量复制进而以  $\phi$  31 启动子大量表达外源基因, 其表达量可提高至 1000 倍。最后细胞被裂解, 外源基因表达产物被释放<sup>[12]</sup>。

目前更具应用前景的乳酸乳球菌高效诱导表达系统是 *nisA* 系统。乳链菌肽(Nisin)是一个 3.5ku 的高度修饰的抗菌小肽, 广泛应用于食品保藏。细胞外的乳链菌肽作为一种转录调节信号, 可调控其自身的结构基因及其他相关基因的表达。当带有 *NisA* 启动子及所控制外源基因的质粒导入不产乳链菌肽而具有 *NisR* 和 *NisK* 蛋白的乳酸菌中时, 外源基因的表达很弱; 当在对

数生长期时往培养基中加入乳链菌肽后, 由 *NisA* 启动子控制的外源基因的转录被激活, 外源基因表达水平在一定范围内随乳链菌肽加入量成比例上升, 诱导效率最高可达一千倍以上<sup>[13]</sup>。

## 2 食品级基因表达系统

食品级基因表达系统一直是微生物遗传学家研究乳酸乳球菌分子生物学及载体系统的重要目标。食品级基因表达系统一般要求如下: (1) 宿主菌为食品级微生物如乳酸乳球菌、乳酸杆菌及双歧杆菌等; (2) 采用食品级选择标记, 且载体不含非食品级功能性 DNA 片段; (3) 采用食品级诱导物等。

**2.1 食品级选择标记** 传统的乳酸乳球菌克隆及表达载体因带有抗生素抗性选择标记而限制了其在食品工业中的直接应用。因此, 有必要研究食品级的选择标记, 这在过去几年已经进行了许多有益的尝试<sup>[15~17]</sup>。

乳酸乳球菌编码乳糖磷酸转移酶系统和塔格糖-6-磷酸途径的 *lac* 操纵子的详尽揭示,则为发展以乳糖利用互补为基础的显性同源选择标记提供了可能。这个选择标记系统的两部分是:载体部分,克隆了 0.3kb 的 *lacF* 基因,位于载体启动子控制之下,表达乳糖利用必需的可溶性酶 IIA<sup>lac</sup>;受体部分,为 *L.lactis* YR2-5 等乳糖利用缺陷型菌株,其 *lacF* 基因含有一个错义突变。作为乳酸菌第一个较完善的食物级同源选择系统,它的优点之一是在乳糖指示剂平板中,可以方便地筛查并能在含乳糖的工业培养基中稳定存在<sup>[18]</sup>。

**2.2 食品级克隆和表达系统** Platteeuw 等(1996)建立了一套以 *lacF* 为选择标记的食品级克隆和表达系统<sup>[19]</sup>。克隆载体含 *lacF* 选择标记及高拷贝内源性的乳酸乳球菌 pSH71 复制子等,而表达载体还含有 *lacA* 启动子及 *pepN* 终止子等元件,配套的菌株为 *L.lactis* NZ3000,该菌株已通过重组删除其 *lacF* 基因。因此所有携带 *lacF* 基因的载体可以通过与 *L.lactis* NZ3000 的乳糖利用互补作用而得以检出,方法是:在含乳糖指示剂的培养基平板上,直接筛查可发酵乳糖产乳酸的菌落。这类系统采用了全部的 *L.lactis* DNA 及选择标记,并已实现了外源基因的表达。

鉴于 *lacA* 启动子诱导效率一般不超过 10 倍,而且由中期产物塔格糖-6-磷酸诱导,其浓度不易控制,这在一定程度上可能会限制上述食品级载体系统的应用。最近,由于以食品级诱导物乳链菌肽(Nisin)诱导的高效表达系统的构建成功<sup>[13,14]</sup>,以食品级选择标记取代其抗生素抗性选择标记即可构建成高效的食品级表达系统。基因表达载体系统采用 *nisA* 启动子,该启动子的转录可受细胞内外的乳链菌肽的有效诱导。因此,一方面可以用产乳链菌肽的菌株(如 *L.lactis* NZ9700)为宿主菌,可以持续表达外源基因,而不必外加乳链菌肽。另一方面,更有效的则是应用另一些不产乳链菌肽的菌株(如 *L.lactis* NZ9800 或 NZ3900),进行诱导表达。这些菌株均做了适当改进,其中 NZ3900 缺失了 *nisI* 和 *nisFEG* 基因,而保留 *nisRK* 基因,以适合 Nisin 诱导;并且缺失了 *lacF* 基因,以配合 *lacF* 阳性选择。该系统保持了高的诱导效率<sup>[20]</sup>。

这类载体及菌株实现了食品级、可控制及高水平

表达同源和异源基因的目的,在食品工业及其它相关领域将具有很好的应用前景。

## 参 考 文 献

- [1] Gasson M J. FEMS Microbiol Rev, 1993, 12:1~21.
- [2] Leenhouts K J, Venema G. Plasmids, Hardy KG (eds), Oxford University Press, New York, 1993, 65~94.
- [3] Van de Guchte M, Van der Vossen JMBM, Kok J et al. Appl Environ Microbiol, 1989, 55:224
- [4] Nilsson D, Johansen E. Biochim Biophys Acta, 1994, 1219:141.
- [5] Van Asseldonk M, de Vos W M, Simons G et al. J Bacteriol, 1993, 175:1637.
- [6] Wells J M, Wilson P W, Norton P M et al. Mol Microbiol, 1993, 8:1155.
- [7] Nauta A, van Smderen D, Karsens H et al. Mol Microbiol, 1996, 19:1331.
- [8] Sanders J W, Leenhouts K J, Haandrikman A J et al. J Bacteriol, 1995, 177:5254.
- [9] Marugg J D, Meijer W, van Kranenburg R et al. J Bacteriol, 1995, 177:2982.
- [10] Israelsen H, Madsen S M, Vrang A et al. Appl Environ Microbiol, 1995, 61:2540.
- [11] Chopin A, Bardowski J, Raya R et al. Latt, 1993, 73:119.
- [12] O'Sullivan D J, Walker S A, West S G et al. Biotechnology, 1996, 14:82.
- [13] Kuipers O P, Beerthuvzen M M, de Ruyter PGG A et al. J Biol Chem, 1995, 270:27299.
- [14] De Ruyter PGG A, Kuipers O P, Beerthuvzen M M et al. J Bacteriol, 1996, 178:3434.
- [15] Ross P, O'Gara F, Condon S. Appl Environ Microbiol, 1990, 56:2164.
- [16] Froseth B R, McKay L L et al. J Dairy Sci, 1991, 74:1445.
- [17] Dickely F, Nilsson D, Hansen E B et al. Mol Microbiol, 1995, 15:839.
- [18] De Vos W M et al. J Biol Chem, 1990, 265:22554.
- [19] Platteeuw C, van Alen-Boerigter I, van Schalkwijk S et al. Appl Environ Microbiol, 1996, 62:1008.
- [20] De Ruyter PGG A, Kuipers O P, de Vos W M et al. Appl Environ Microbiol, 1996, 62:3662.