

# 构建食品级表达纳豆激酶的乳酸乳球菌重组菌株

冯 浩, 余凤云, 单凤娟, 马 婷, 闫达中\*

(武汉工业学院生物与制药工程学院, 湖北 武汉 430023)

**摘 要:** 构建整合型表达载体pFY008, 以 $HisH$ 基因作为同源重组的靶位点, 通过同源重组将含有纳豆激酶原基因的表达式 $PnisA-aprN$ 整合到乳酸菌的基因组上, 实现纳豆激酶在乳酸乳球菌中食品级的表达。构建的食品级基因工程菌安全性高、稳定性好, 并赋予了其溶栓的功能。

**关键词:** 纳豆激酶; 同源重组; 乳酸乳球菌

## Construction of a Strain of Recombinant *Lactococcus lactis* Expressing Food-Grade Nattokinase

FENG Hao, YU Feng-yun, SHAN Feng-juan, MA Ting, YAN Da-zhong\*

(School of Biology and Pharmaceutical Engineering, Wuhan Polytechnic University, Wuhan 430023, China)

**Abstract:** An integrative expression vector designated as pFY008 was constructed with  $HisH$  gene as a homologous recombination target site. For food-grade expression of nattokinase gene ( $aprN$ ) in *Lactococcus lactis*, the expression cassette  $PnisA-aprN$  gene was integrated into the genome of *Lactococcus lactis* by homologous recombination. A food-grade recombinant *Lactococcus lactis* was constructed to produce a thrombolytics protein. The recombinant *Lactococcus lactis* was found to have fibrinolytic activity. Meanwhile, it had fine stability and high safety.

**Key words:** nattokinase; homologous recombination; *Lactococcus lactis*

中图分类号: Q786

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2012)21-0208-05

纳豆激酶(nattokinase, NK)是从日本传统食品纳豆中分离到的、具有高效溶栓活性的蛋白激酶, 它能够很好地弥补传统溶血栓药物的缺陷, 极有可能开发为新一代口服制剂用于血栓性疾病的预防和治疗。1992年Nadamura等<sup>[1]</sup>采用鸟枪法首次从分泌纳豆激酶的枯草芽孢杆菌中克隆到包括调控序列在内的纳豆激酶全长基因 $aprN$ , 并对1473bp的 $aprN$ 编码序列进行分析。纳豆激酶是分子质量较小的单链蛋白, 易被人体吸收; 并可以直接降解交联纤维蛋白, 且对纤维蛋白原不敏感, 而且能促进内源性t-PA(tissue-type plasminogen activator)增生<sup>[2]</sup>, 药效时间长, 价格低廉; 有一定的抗胰酶水解能力, 可由肠吸收入血, 口服效果好, 具备一定的抗凝血功能, 安全性高。纳豆激酶很好地弥补了传统溶血栓药物的缺陷, 极有可能作为新一代口服制剂用于血栓性疾病的预防和治疗。

近年来, 纳豆激酶作为功能性食品、食品添加剂和普通食品发展的十分迅速。一些制药公司已转向生产功能性食品, 这也是保健食品发展的趋势。就世界范围而

言, 所有的制药企业也都在努力占领保健品市场。仅美国和欧洲的营养品和功能性食品的市场销售额就达5000亿美元, 并以17%~20%的增长率, 逐年增加, 一些制药企业开始生产功能性食品。

乳酸乳球菌(*Lactococcus lactis*)是乳球菌属中最重要和最典型的一个种, 在食品工业中应用广泛, 被公认为安全的(generally-regarded-as-safe, GRAS)食品级微生物。以乳酸乳球菌作为宿主菌, 构建表达载体用来表达异源蛋白和酶, 逐渐成为食品工业、生物制药和疫苗研究的热点。可以把感兴趣的基因导入这种系统中制成制剂或疫苗, 因为乳酸菌食品级基因表达系统中的载体、受体及诱导物均为食品级, 这种活菌制剂可以直接口服, 从而可简化或免除一般基因工程所需的烦琐、复杂的提取工艺, 降低基因工程产物的危险性, 为用基因工程生产安全廉价的生物制品提供了一种新思路。

本研究在探讨乳酸乳球菌中实现纳豆激酶活性表达的可行性及其表达所需的各个元件的基础上<sup>[3]</sup>, 构建乳酸乳球菌基因整合型表达载体, 通过同源重组将含有纳豆

收稿日期: 2011-09-10

基金项目: 湖北省教育厅科研中青年项目(Q200718003); 武汉工业学院研究生教育创新计划项目(09cx018)

作者简介: 冯浩(1988—), 男, 硕士研究生, 研究方向为微生物学。E-mail: sqfenghao@sina.com

\*通信作者: 闫达中(1968—), 男, 副教授, 博士, 研究方向为微生物学、酶工程。E-mail: yandz6808@163.com

激酶原基因的表达盒整合到乳酸乳球菌基因组上, 最终获得食品级的具有溶栓活性的重组乳酸乳球菌, 表达具有药用价值的溶栓蛋白, 赋予乳酸菌溶栓功能。本研究为生产新型溶栓保健乳酸饮料提供理论和技术支持。

## 1 材料与方法

### 1.1 试剂

*Ex Taq* DNA聚合酶、T4 DNA连接酶、限制性内切酶宝生物工程(大连)有限公司; PCR纯化试剂盒、DNA凝胶回收试剂盒、质粒提取试剂盒 上海捷瑞生物工程有限公司; 革兰氏阳性菌基因组抽提试剂盒 美国Omega公司; 酵母提取物、胰蛋白胨 Oxoid公司; Nisin A 浙江银象生物工程有限公司; 其他试剂均为分析纯。引物合成与测序由生工生物工程(上海)有限公司完成。

### 1.2 培养基与培养方法

*E.coli* DH5 $\alpha$ 用LB培养基<sup>[4]</sup>, 37℃、200r/min振荡培养。

*L.lactis* NZ9000生长于GM17培养基<sup>[5]</sup>(M17培养基添

加质量浓度为0.5g/100mL的葡萄糖), 30℃静置培养。

用于保存和筛选转化子的抗生素终质量浓度: 氨苄100 $\mu$ g/mL, 氯霉素10 $\mu$ g/mL。

### 1.3 菌株与质粒

研究使用的菌株及质粒见表1。

### 1.4 引物及序列

本实验所用引物与序列见表2。

### 1.5 方法

#### 1.5.1 重组表达载体的构建

##### 1.5.1.1 含氯霉素抗性基因的重组质粒pFY003构建

以P3、P4为引物, pNZ8048为模板, 扩增氯霉素抗性基因片段。循环参数: 95℃预变性5min; 94℃变性1min, 30℃退火1min, 72℃延伸80s, 30个循环; 72℃延伸10min。电泳后凝胶回收938bp氯霉素抗性基因片段, 与pTG-19载体连接获得重组质粒, 转化感受态细胞*E.coli* DH5 $\alpha$ 。用含氯霉素的LB平板筛选阳性克隆。

##### 1.5.1.2 重组质粒pFY004的构建

以P5、P6为引物, pUC18为模板, 扩增pUC18载体

表1 质粒和菌株

Table 1 Plasmids and bacteria

菌株和质粒	相关特征	来源或参考文献
<i>E.coli</i> DH5 $\alpha$ (pFY003)	氨苄抗性(Amp <sup>R</sup> )和氯霉素抗性(Cm <sup>R</sup> )	本研究构建
<i>E.coli</i> DH5 $\alpha$ (pFY004)	氯霉素抗性(Cm <sup>R</sup> )	本研究构建
<i>E.coli</i> DH5 $\alpha$ (pFY005)	氨苄抗性(Amp <sup>R</sup> )	本研究构建
<i>E.coli</i> DH5 $\alpha$ (pFY006)	氯霉素抗性(Cm <sup>R</sup> )	本研究构建
<i>E.coli</i> DH5 $\alpha$ (pFY007)	氨苄抗性(Amp <sup>R</sup> )	本研究构建
<i>E.coli</i> DH5 $\alpha$ (pFY008)	氯霉素抗性(Cm <sup>R</sup> )	本研究构建
<i>L.lactis</i> NZ9000	无氯霉素和氨苄抗性	荷兰NIZO研究所
<i>L.lactis</i> NZ9000(pNZ8048)	氯霉素抗性(Cm <sup>R</sup> )	荷兰NIZO研究所
<i>L.lactis</i> NZ9000(pFY002)	氯霉素抗性(Cm <sup>R</sup> )	参考文献[3]
<i>L.lactis</i> NZ9000::pFY008	发生单交换的重组子, 氯霉素抗性(Cm <sup>R</sup> )	本研究构建
<i>L.lactis</i> NZ9000::Pnis-aprN	发生双交换的重组子	本研究构建
pUC18	pMB1复制子, 氨苄抗性(Amp <sup>R</sup> ), 克隆载体	参考文献[6]
pNZ8048	氯霉素抗性(Cm <sup>R</sup> ), 表达载体	荷兰NIZO研究所
pFY002	表达框PnisA-aprN克隆到pNZ8048, 氯霉素抗性(Cm <sup>R</sup> )	参考文献[3]
pTG19-T	氨苄抗性(Amp <sup>R</sup> ), 克隆载体	上海捷瑞生物工程有限公司
pFY003	氯霉素基因( <i>cat</i> )克隆到pTG19-T, 氨苄抗性(Amp <sup>R</sup> )和氯霉素抗性(Cm <sup>R</sup> )	本研究构建
pFY004	氯霉素抗性基因( <i>cat</i> )替换pUC18中的氨苄抗性基因( <i>bla</i> )	本研究构建
pFY005	<i>HisH</i> 基因克隆到pTG19-T, 氨苄抗性(Amp <sup>R</sup> )	本研究构建
pFY006	<i>HisH</i> 基因克隆到pFY004, 氯霉素抗性(Cm <sup>R</sup> )	本研究构建
pFY007	表达框PnisA-aprN克隆到pTG19-T, 氨苄抗性(Amp <sup>R</sup> )	本研究构建
pFY008	表达框 PnisA-aprN克隆到pFY006, 氯霉素抗性(Cm <sup>R</sup> )	本研究构建

表2 所用引物及序列

Table 2 Primers used in this study

引物	序列(5'→3')	引物	序列(5'→3')
pF1	ATTCCATGGCCGAAAAAGCAGTACAGAA	P5	AAACTCGAG CAATATTATTGAAGCATTTA
pR1	GGAGTCGCCATTGACGTTCCGTTATAA	P6	GAAGTCGAG CTGTCAGACCAAGTTTACT
pF2	ATAACGGAACGTCAATGGCGACTCCT	P7	TGAATTCTCCTCCAAAAACGCTCT
pR2	TGCTCTAGATTATTGTGCAGCTGCTTGACGT	P8	TAAGCTTGTATATCATCGACTACAACC
P3	AAACTCGAGAATGTGGTCTTTATTCTTCA	P9	AGCATGCCTAGTCTTATAACTATAC
P4	AAACTCGAGTGGAGCTGTAATATAAAAAAC	P10	AGCATGCAAACGAATAATTTATAA

骨架基因片段, 循环参数: 95℃预变性5min, 94℃变性1min, 57℃退火1min, 72℃延伸80s, 30个循环, 72℃延伸10min。电泳后凝胶回收1500bp的片段, *Xba* I 酶切该片段后电泳凝胶回收并去磷酸化。pFY003经过*Xba* I 酶切后回收938bp的氯霉素基因片段与处理好载体骨架连接获得重组质粒, 转化感受态细胞*E.coli* DH5 $\alpha$ 。用氯霉素抗性LB平板筛选阳性克隆酶切鉴定。

#### 1.5.1.3 含*HisH*基因的重组质粒pFY005的构建

以P7、P8为引物, *L.lactis* NZ9000基因组为模板, 扩增*HisH*基因片段, 循环参数: 95℃预变性5min; 94℃变性1min, 50℃退火1min, 72℃延伸80s, 30个循环; 72℃延伸10min。电泳后凝胶回收600bp的片段, 与pTG-19载体连接获得重组质粒, 转化感受态细胞*E.coli* DH5 $\alpha$ 。随机挑取克隆酶切鉴定。

#### 1.5.1.4 含*HisH*基因的重组质粒pFY006的构建

质粒pFY005经过*Bam*H I 酶切后回收600bp左右的基因片段, 将回收后片段经过*Hind*III和*Eco*R I 酶切后与经*Hind*III和*Eco*R I 双酶切的载体pFY004连接可得到重组载体。转化感受态细胞*E.coli* DH5 $\alpha$ 。随机挑取克隆酶切鉴定。

#### 1.5.1.5 包含*Pnis-aprN*基因序列的重组质粒pFY007的构建

以P9、P10为引物, 质粒pFY002为模板, 扩增*Pnis-aprN*基因片段, 循环参数: 95℃预变性5min, 94℃变性1min, 50℃退火1min, 72℃延伸80s, 30个循环, 72℃延伸10min。电泳后凝胶回收1500bp的序列与pTG-19载体连接获得重组质粒, 转化感受态细胞*E.coli* DH5 $\alpha$ 。随机挑取克隆酶切鉴定。

#### 1.5.1.6 包含*Pnis-aprN*基因序列的整合型表达载体pFY008的构建

质粒pFY007经*Sph* I 酶切后琼脂糖电泳凝胶回收1500bp片段与经*Sph* I 酶切质粒pFY006连接获得重组质粒, 转化感受态细胞*E.coli* DH5 $\alpha$ , 随机挑取克隆酶切鉴定。

#### 1.5.2 电转化及重组子的筛选

##### 1.5.2.1 单交换重组子的筛选

提取重组质粒pFY008, 电转*L.lactis* NZ9000, 电转方法参照文献[7], 涂布平板(氯霉素10 $\mu$ g/mL), 得到转化子, 随机挑选转化子, 提取基因组, 用扩增纳豆激酶原基因*pF1*、*pR2*和氯霉素基因*P3*、*P4*分别进行PCR扩增, PCR条件与上面叙述的相同, 鉴定发生单交换的重组子。

##### 1.5.2.2 双交换重组子的筛选

将单交换重组菌株*L.lactis* NZ9000::pFY008在无氯霉素抗性下传代约100代, 预期发生双交换。稀释后涂布在无抗性的GM17固体培养基上, 随机将单个菌落用牙签分别点板到无氯霉素抗性和氯霉素抗性平板上, 筛选在无

抗性的平板上生长而不能在含氯霉素的平板上生长的菌落, 筛选到的克隆则可能是发生了双交换重组子, 其基因组上氯霉素抗性基因可能因重组而丢失。将筛选的重组子重新点板到两种培养基上, 再次鉴定。随机挑选转化子, 提取基因组, 用扩增纳豆激酶原基因*pF1*、*pR2*和氯霉素基因*P3*、*P4*分别进行PCR扩增, 鉴定发生双交换的重组子。

#### 1.5.3 纳豆激酶的诱导表达及酶活测定

##### 1.5.3.1 纳豆激酶的诱导表达

将获得的重组子*Lactococcus lactis* NZ9000::Pnis-*aprN*涂布平板, 挑单菌落接种于GM17液体培养基, 30℃过夜培养; 转接到新鲜的GM17培养基(接种量4%), 培养至OD<sub>600nm</sub>值约为0.4时, 加入诱导剂NisinA, 30℃静置培养, 收集菌体, 用1 $\times$ PBS(pH7.4)洗菌体, 用超声波破碎(功率200W, 每次工作时间2s, 每次间隔6s, 共25min), 破碎液10000r/min、4℃离心10min, 上清即为粗酶液, 检测纳豆激酶活性。

##### 1.5.3.2 表达产物纤溶活性的检测<sup>[8]</sup>

用8mL纤维蛋白原溶液(1.2mg/mL), 400 $\mu$ L凝血酶(30BP/mL)制成纤维蛋白平板, 凝固1h, 取粗酶液50 $\mu$ L点到纤维蛋白平板上, 37℃恒温培养18h, 以尿激酶标准曲线为参照, 测定其活性。

#### 1.5.4 转化子的稳定性测试

将重组子*Lactococcus lactis* NZ9000::Pnis-*aprN*在无选择压力传代约100~150代, 按上述方法测定其活性, 以检测整合在宿主基因组上的表达单元的稳定性。

## 2 结果与分析

### 2.1 重组质粒pFY003、pFY005、pFY007的鉴定

氯霉素抗性基因, *HisH*基因, *Pnis-aprN*基因片段通过PCR扩增, 分别与pTG-19载体连接获得重组质粒pFY003、pFY005、pFY007, 送生工生物工程(上海)有限公司测序鉴定, 测序结果表明克隆的基因序列正确。

### 2.2 重组质粒pFY004、pFY006、pFY008的鉴定

用*Xba* I 酶切pFY003后回收938bp的氯霉素基因片段与处理好的pUC18载体骨架连接获得重组质粒, 转化感受态细胞*E.coli* DH5 $\alpha$ 。用含氯霉素的LB平板筛选阳性克隆培养后提取质粒。重组质粒经*Xba* I 酶切, 可得到与插入基因大小近似的片段, 酶切结果与预期一致, 重组质粒命名为pFY004。重组菌*E.coli* (pFY004)不能在含有抗生素氨苄青霉素的培养基上生长。pFY004是将pUC18中的氨苄抗性基因用氯霉素基因替换构建而成的。

用*Bam* H I 酶切质粒pFY005, 回收600bp左右的基因片段, 回收后片段经*Hind*III和*Eco*R I 酶切, 与经*Hind*III和*Eco*R I 双酶切的载体pFY004连接可分别得到重组载



体。转化感受态细胞*E.coli* DH5 $\alpha$ 。随机挑取克隆,培养后提取质粒。重组质粒经*Hind*III和*Eco*R I 双酶切得到大约600bp的条带,与目的基因*HisH*基因大小相符,重组质粒命名为pFY006。

用*Sph*I 酶切质粒pFY007,回收1500bp左右片段,与经*Sph*I 酶切质粒pFY006连接获得重组质粒,转化感受态细胞*E.coli* DH5。随机挑取克隆,培养后提取质粒。重组质粒经过*Sph*I 单酶切,得到大约1500bp的条带,与目的基因*Pnis-aprN*基因序列大小相符,重组质粒命名为pFY008。基因整合型表达载体pFY008的构建过程见图1。

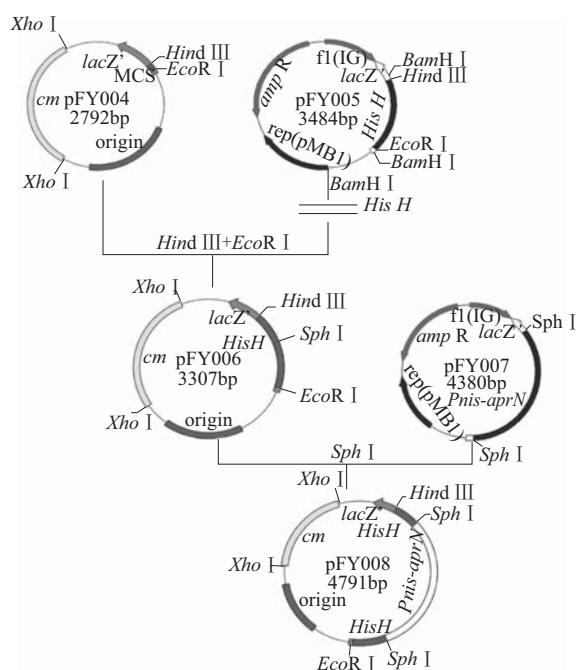
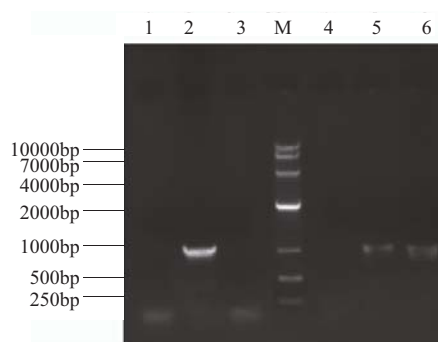


图1 基因整合型表达载体pFY008的构建

Fig.1 Construction of the integrative expression vector pFY008

## 2.3 重组子的PCR鉴定

### 2.3.1 单交换重组子PCR鉴定



1. 对照, 以*L.lactis* NZ9000基因组为模板, pF1、pR2为引物扩增; 2. 以转化子基因组为模板, pF1、pR2为引物扩增; 3. 对照, *L.lactis* NZ9000基因组为模板, P3、P4为引物扩增; 4. 以转化子基因组为模板, P3、P4为引物扩增; 5. 对照, *L.lactis* NZ9000基因组为模板, P3、P4为引物扩增; 6. 以转化子基因组为模板, P3、P4为引物扩增; M. 10000 Marker。

图2 PCR扩增纳豆激酶原基因和氯霉素基因鉴定单交换重组子

Fig.2 Identification of single cross-over recombinant *Lactococcus lactis* NZ9000::pFY008 by PCR amplification

随机挑选转化子,以提取的基因组为模板,用引物pF1、pR2和P3、P4分别扩增纳豆激酶原基因和氯霉素基因,PCR条件与上述条件相同。琼脂糖凝胶电泳PCR产物,可检测到与纳豆激酶原基因和氯霉素基因大小相近的条带,而对照菌*L.lactis* NZ9000中没有相应的PCR产物,符合预期结果(图2),表明构建的重组质粒整合到基因组上,重组菌命名为*L.lactis* NZ9000::pFY008。

### 2.3.2 双交换重组子PCR鉴定

将单交换重组菌株*L.lactis* NZ9000::pFY008在无氯霉素抗性下传代大约100代,预期发生双交换,涂布GM17平板,随机挑选转化子,以基因组为模板进行PCR扩增鉴定,用引物pF1、pR2扩增出1000bp左右与纳豆激酶原基因大小相近的条带,用引物P3、P4不能扩增出氯霉素基因条带的克隆即为阳性克隆,命名为*L.lactis* NZ9000::Pnis-aprN。由图3可知,泳道3、8和泳道4、9为对应的两个阳性克隆,泳道5、10为一假阳性。

根据点在筛选平板上的克隆总数和从中筛选鉴定得到的阳性重组子计算发生双交换的概率大约是1/350。

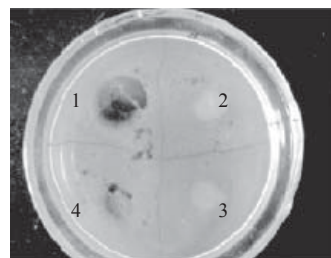


1. 重组子*L.lactis* NZ9000::pFY008基因组为模板, P3、P4为引物扩增; 2. 菌株*L.lactis* NZ9000基因组为模板, P3、P4为引物扩增; 3、4、5. 以转化子基因组为模板, 以P3、P4为引物扩增; 6. 重组子*L.lactis* NZ9000::pFY008基因组为模板, pF1、pR2为引物扩增; 7. 菌株*L.lactis* NZ9000基因组为模板, pF1、pR2为引物扩增; 8、9、10. 以转化子基因组为模板, pF1、pR2为引物扩增; M. 10000 Marker。

图3 PCR扩增鉴定发生双交换的重组子

Fig.3 Identification of double cross-over recombinant *Lactococcus lactis* NZ9000::Pnis-aprN by PCR amplification

## 2.4 表达产物的活性检测



1、4. 30℃, NisinA 诱导重组子*L.lactis* NZ9000::Pnis-aprN, 细胞裂解物; 2、3. 阴性对照, 30℃ NisinA 诱导菌株*L.lactis* NZ9000, 细胞裂解物。

图4 双交换重组子中表达产物的活性测定

Fig.4 Fibrinolytic activity of expression products of *Lactococcus lactis* NZ9000::Pnis-aprN and *Lactococcus lactis* NZ9000

双交换重组子*Lactococcus lactis* NZ9000::Pnis-aprN经

NisinA诱导,纤维蛋白平板测定纤溶活性。由图4可知,以*L.lactis* NZ9000作为负对照,无纤溶活性。重组子加入诱导物后,检测其表达产物有纤溶活性。

以尿激酶标准品为参照,测得双交换重组子*Lactococcus lactis* NZ9000::Pnis-aprN经NisinA诱导,其纳豆激酶的表达量约为50U/L。

## 2.5 重组子稳定性测试结果

重组子*Lactococcus lactis* NZ9000::Pnis-aprN在无选择压力传代约100~150代,经扩大培养后,能测到明显的纤溶活性,说明获得的重组子具有稳定的遗传特性。

## 3 讨论

食品级系统是一种不依靠传统抗生素标记选择,能最大限度地应用于食品工业,或产生用在食品中的产物的系统<sup>[9]</sup>。这类表达系统一般具有以下3个特点:1)载体必须是食品级的,不得含有非食品级功能性DNA片段,传统的乳酸菌载体都带有一个或多个编码特定抗生素(如红霉素、氯霉素等)抗性的基因。虽然这为遗传操作时保持一定的选择压力,对载体的选择作用是有效的。但将抗生素抗性基因投放到环境中或人和动物体内,由于抗性因子的转移,将可能引起生物安全性问题。2)表达宿主必须是安全的、特性清楚而稳定的食品级微生物,如乳酸球菌、乳酸杆菌及其他已在食品工业中得到长期而广泛应用的菌株。3)诱导物必须是食品级的,如乳糖、蔗糖、乳链菌肽等可被人食用的物质。

Liang Xiaobo等<sup>[10]</sup>将纳豆激酶原基因克隆到带有分泌信号序列的表达载体上,转入乳酸菌中表达,在培养基的上清中检测有活性表达产物,而在乳酸菌中胞内表达纳豆激酶原基因,没有得到活性表达产物,其构建的基因工程菌实现了纳豆激酶的分泌型表达。而纳豆激酶在pH值低于5.0时迅速失活,乳酸菌在发酵后培养基pH值往往达到3~4左右,分泌到细胞外的纳豆激酶可能因此而失活,加之构建的不是食品级表达系统,故应用于实际生产中会有相应的局限性。本研究中所构建的基因工程菌,在细胞破壁以后可以检测到明显的活性,证实纳豆激酶原基因在胞内实现功能性表达产生有活性的表达产物。

乳酸乳球菌的基因组测序工作已经完成<sup>[11-12]</sup>,乳酸菌基因组学研究正式启动。随着工作的逐步深入,研究背景的丰富和运用经验的积累,NICE系统<sup>[13]</sup>在乳酸菌等益生菌中的广泛应用十分值得期待。Leenhouts等<sup>[14]</sup>成功的将pepXP通过双交换重组到乳酸菌基因组。Delorme等<sup>[15]</sup>发现*L.lactis* NZ9000菌株的His基因簇的缺失对菌株的生长没有影响。所以,选择HisH作为同源重组的靶点。

以HisH基因作为同源重组的靶位点,构建基因整合型表达载体pFY008,通过两次单交换将含有纳豆激酶原基因的表达盒PnisA-aprN整合到乳酸菌的基因组上,构建食品级的基因工程菌,实现纳豆激酶在乳酸乳球菌中食品级的表达。基因整合型表达载体pFY008是以载体pUC18作为骨架构架的,它不能在乳酸乳球菌中自主

复制,将氨苄基因替换为能在乳酸菌中表达的氯霉素基因,氯霉素基因来自于载体pNZ8048,它能赋予受体菌对抗生素氯霉素的抗性便于筛选。但是经过两次重组后,氯霉素基因及其他来自pUC18载体的序列从受体菌的基因组中丢失了,从而获得了食品级的表达体系,实现纳豆激酶在乳酸乳球菌中食品级的表达。

虽然纳豆激酶原基因在重组乳酸乳球菌*L.lactis* NZ9000::Pnis-aprN中是单拷贝,纳豆激酶的表达量不高;在重组菌NZ9000(pFY002)<sup>[3]</sup>中表达载体是多拷贝,表达量相对较高,但表达载体pFY002带有氯霉素抗性筛选标记,构建的重组乳酸菌不是食品级的。而且NZ9000(pFY002)中重组质粒以附加体形式存在,在发酵过程中会随着传代丢失,将表达框整合在宿主的染色体上会获得更稳定的表达系统。

本研究中,表达载体以食用型的乳酸乳球菌为受体菌株,在诱导表达纳豆激酶的过程中,诱导物为Nisin。Nisin作为食品添加剂已于1969年被FAO/WHO专家委员会所接受,现在已被应用于世界上的50多个国家,是公认的食品级的诱导物。实验中所构建的表达体系,使用受体菌株及诱导物等均为食品级,从而为实现食品级乳酸乳球菌表达系统的构建打下坚实的理论基础。

## 参考文献:

- NAKAMURA T, YAMAGATA Y, ICHISHIMA E. Nucleotide sequence of the subtilisin NAT gene *aprN* of *Bacillus subtilis*(natto)[J]. Biosci Biotech Biochem, 1992, 56(11): 1869-1871.
- SUMI H, HAMMDA H, TSUSHIMA H, et al. A novel fibrinolytic enzyme(nattokinase) in the vegetable cheese natto; A typical and popular soybean food in the Japanese diet[J]. Experientia, 1987, 43(10): 1110-1111.
- 余风云, 冯浩, 许芳, 等. 具有溶血栓活性的乳酸菌的构建[J]. 中国酿造, 2011(1): 100-103.
- SAMBROOK J, FRITSCH E F, MANIATIS T. 分子克隆实验指南[M]. 2版. 金冬雁, 译. 北京: 科学出版社, 1992: 908.
- TERZAGHI B E, SANDINE W E. Improved medium for lactic streptococci and their bacteriophages[J]. Appl Microbiol, 1975, 29(6): 807-813.
- YANISCH-PERRON C, VIEIRA J, MESSING J. Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors[J]. Gene, 1985, 33(1): 103-119.
- WELLS J M, WILSON P W, le PAGE R W. Improved cloning vectors and transformation procedure for *Lactococcus lactis*[J]. J Appl Bacteriol, 1993, 74(6): 629-636.
- FUJITA M, NOMURA K, HONG K, et al. Purification and characterization of a strong fibrinolytic enzyme (nattokinase) in the vegetable cheese natto, a popular soybean fermented food in Japan[J]. Biochem Biophys Res Commun, 1993, 197(3): 1340-1347.
- 王奎明, 王昌禄, 陈铁涛, 等. 乳酸菌食品级基因表达系统[J]. 安徽农业科学, 2007, 35(33): 10619-10621.
- LIANG Xiaobo, ZHANG Lixin, ZHONG Jin, et al. Secretory expression of a heterologous nattokinase in *Lactococcus lactis*[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2007, 75(1): 95-101.
- BOLOTIN A, WINCKER P, MAUGER S, et al. The complete genome sequence of the lactic acid bacterium *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* IL1403[J]. Genome Res, 2001, 11(5): 731-753.
- PRIDMORE R D, BERGER B, DESIERE F, et al. The genome sequence of the probiotic intestinal bacterium *Lactobacillus johnsonii* NCC 533[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2004, 101(8): 2512-2517.
- MIERAU I, KLEEREBEZEM M. 10 years of the nisin-controlled gene expression system (NICE) in *Lactococcus lactis*[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2005, 68(6): 705-717.
- LEENHOUTS K, KOK J, VENEMA G. Replacement recombination in *Lactococcus lactis*[J]. J Bacteriol, 1991, 173(15): 4794-4798.
- DELORME C, GODON J J, EHRLICH S D, et al. Gene inactivation in *Lactococcus lactis*: histidine biosynthesis[J]. J Bacteriol, 1993, 175(14): 4391-4399.