

cA-GFP 融合蛋白在大肠杆菌中的高效功能性表达

苏艳芳, 杨晶, 王蒙, 吴少敏, 马毅, 李杉, 王菊芳
(华南理工大学生物科学与工程学院, 广东广州 510006)

摘要: 为了实现乳酸乳球菌锚定蛋白 cA 在大肠杆菌中可溶表达以及直观检测其生物学活性, 以乳酸乳球菌 MG1363 为模板, 扩增 N-乙酰葡萄糖胺糖苷酶 AcmA 基因, 将其 C 末端序列与 GFP 基因融合, 连接至大肠杆菌表达载体 pET28a, 构建重组质粒 pET28a-cA-GFP, 转化至大肠杆菌表达菌株 BL21(DE3), 通过低温诱导表达重组蛋白 cA-GFP。工程菌超声破碎后的上清液与经热酸处理的乳酸乳球菌常温孵育, 经 SDS-PAGE 和荧光显微镜检测。结果表明, 工程菌可以表达分子量约 53 ku 的目的融合蛋白质, 与预期大小相符。cA-GFP 通过锚定蛋白 cA 的引导回向锚定, 成功将 GFP 展示在乳酸乳球菌表面, 目的蛋白 cA-GFP 在乳酸乳球菌表面展示量为 121 mg/g 干重菌体。GFP 锚定至乳酸乳球菌后于 4 °C 保存, 连续 6 d 测定其荧光强度, 荧光强度仍可达 82.2%, 证明其稳定性较好。成功获得了具有生物学功能的 cA-GFP 可溶性蛋白, 为进一步展示功能性外源蛋白奠定了坚实的基础。

关键词: 乳酸乳球菌; 锚定蛋白; 绿色荧光蛋白; 回向锚定

文章编号: 1673-9078(2015)12-128-133

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2015.12.019

Efficient and Functional Expression of cA-GFP Fusion Protein in *Escherichia coli*

SU Yan-fang, YANG Jing, WANG Meng, WU Shao-min, MA Yi, LI Shan, WANG Ju-fang

(School of Bioscience and Bioengineering, South China University of Technology, Guangzhou 510006, China)

Abstract: To achieve soluble expression of the *Lactococcus lactis* anchoring protein cA (C-terminal region of N-acetylmuraminidase [AcmA]) in *Escherichia coli*, and elucidate its biological activity, the AcmA gene was amplified by polymerase chain reaction (PCR) using *L. lactis* MG1363 as the template. The C-terminal of AcmA was fused with green fluorescent protein (GFP), followed by ligation of the chimeric cA-GFP into the *E. coli* expression vector pET28a, yielding the recombinant plasmid pET28a-cA-GFP. Subsequently, the recombinant plasmid was transformed into *E. coli* strain BL21 (DE3), and expression of the recombinant cA-GFP protein was induced at low temperature. After ultrasonic disruption of the recombinant strains, the supernatant was directly incubated with acid-pretreated *L. lactis*, and sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and fluorescence microscopy analyses were conducted. The results showed that the cA-GFP fusion protein with a molecular weight (MW) of about 53 ku (as expected) was expressed in the engineered bacteria. cA-GFP was successfully docked onto the cell surface of *L. lactis* via the inverse docking directed by the anchoring protein cA. One gram of dry bacteria could load 121 mg of cA-GFP protein. The fusion protein (cA-GFP) was very stable and the fluorescence intensity could be maintained at 82.2% when the proteins were stored at 4 °C for six days. The cA-GFP soluble protein with biological function was successfully obtained, which provides a solid basis for developing exogenous proteins with biological functions.

Key words: *Lactococcus lactis*; anchoring protein; green fluorescent protein; inverse docking

GEM(Gram positive enhancer matrix) 颗粒表面展示系统是近十年发展起来的新表面展示技术。GEM 是将革兰氏阳性菌经热酸处理、除去细菌表面的磷壁酸和蛋白质等大分子物质后获得的细胞壁肽聚糖骨架,

收稿日期: 2015-03-13

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (21306055); 高等学校博士学科点专项科研基金 (20130172120041); 广东省自然科学基金资助项目 (2014A030313261)

作者简介: 苏艳芳 (1989-), 女, 硕士, 研究方向: 分子生物学

通讯作者: 马毅 (1982-), 男, 博士, 讲师, 研究方向: 蛋白质工程

能与细菌细胞壁肽聚糖水解酶(N-Acetylmuraminidase, AcmA)的 C 端结构域(C-terminal region, cA)特异性非共价结合。因此, 与 cA 融合的目标蛋白, 可以高密度地展示在 GEM 颗粒表面。国外多位学者已利用乳酸乳球菌 nisin 表达系统在 GEM 颗粒表面展示多种蛋白, 如 MSA2、 β -内酰胺酶、 α -淀粉酶、病毒衣壳蛋白等^[1~2]。

AcmA 是一种肽聚糖水解酶, 与乳酸乳球菌 (*Lactococcus lactis*, *L.lactis*) 的细胞分裂、分离和到稳定期时的菌体自溶相关^[3]。在结构上, AcmA 含有 3

个结构域,即 N-末端信号序列、中央活性区和 C-末端结构域(cA)。其中,cA 是 3 个由 45 个氨基酸残基组成的重复单元(同源性约 50~63%)以及重复单元之间的间隔序列组成,主要执行以非共价形式与细胞壁锚定的生物学功能^[4]。cA 除了可以从细胞基质部位向细胞壁方向锚定^[5-6],cA 结构域还可以在特定的环境下,从细胞外环境中向细胞壁回向锚定^[7]。目前,cA 融合蛋白在乳酸乳球菌表达系统中的表达已经很成熟,但是在其他表达系统的研究并不多见。李鹏成等在大肠杆菌中以包涵体形式表达了 cA 锚定蛋白,需要通过变性和长时间的复性,cA 蛋白才具有锚定功能^[8]。

自 1994 年,美国学者 Chalfie 等首次在线虫和大肠杆菌中成功地表达了 GFP 之后,开启了 GFP 作为报告因子的先河^[9]。GFP 蛋白具有性质稳定、操作简易、检测灵敏度高、无生物毒性等优点,且无须辅助因子和任何外源反应底物即可在紫外光或蓝光激发下发射强烈绿色荧光^[9],因此被广泛用于基因的表达与调控,蛋白质翻译后修饰的监控、蛋白质定位、转运以及定量分析等研究领域^[10-12]。

本研究将 cA 蛋白与绿色荧光蛋白(Green fluorescent protein, GFP)进行融合,首次实现了 cA 蛋白在大肠杆菌中的可溶性表达,未纯化的融合蛋白 cA-GFP 可以在 cA 结构域的引导下,将功能性 GFP 蛋白成功地回向锚定并展示在乳酸乳球菌 GEM 颗粒表面。本研究为进一步展示功能性外源蛋白奠定了坚实的基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒

克隆菌株为 *E. coli* DH5 α , 表达菌株为 *E. coli* BL21(DE3)。 *L. lactis* subsp. *cremoris* MG1363 为 cA 基因的来源菌株,也是报告蛋白 GFP 表面展示菌株。以上菌株均为本室保存。

质粒 pMD18-T 购于宝生物(大连)有限公司,质粒 pET28a 为本室保存。

1.1.2 培养基及培养条件

乳酸乳球菌采用 GM17 培养基,30 °C 静置培养;大肠杆菌采用 LB 培养基,37 °C 震荡培养;筛选和培养大肠杆菌重组蛋白工程菌时,在 LB 培养基中添加终浓度为 50 μ g/mL 的抗生素卡那霉素(Kan)。

1.1.3 主要试剂

各种限制性内切酶、DNA 聚合酶和 T4 DNA 连

接酶购于宝生物(大连)有限公司。基因组提取试剂盒、质粒提取试剂盒、PCR 产物纯化试剂盒、DNA 凝胶回收试剂盒购于天根生化科技有限公司。BCA 蛋白浓度测定试剂盒购于 Thermo 公司。其他试剂均为分析纯。

1.2 方法

1.2.1 AcmA 基因的 PCR 扩增

按照细菌基因组提取试剂盒提取乳酸乳球菌基因组,根据乳酸乳球菌 MG1363 菌株的 AcmA 基因序列(GenBank 登录号为 CAL96887.1)进行设计,其上游引物(Acma-S)为:5'-ATGCCAGTATCACG TGTTAAAGT-3',下游引物(Acma-A)为:5'-TTTT ATTTCGTAGATACTGACCAA-3'。扩增 AcmA 的 PCR 反应程序为 98 °C 4 min; 98 °C 10 s, 55 °C 30 s, 72 °C 90 s, 30 个循环; 72 °C 10 min 后置于 4 °C 保温。PCR 扩增产物经纯化回收后连接于 pMD18-T,送北京华大科技有限公司测序。测序结果在 GenBank 数据库进行 BLAST 分析。

1.2.2 重组质粒的构建

通过重叠 PCR 将 cA 基因与 GFP 基因进行拼接,两者之间以 GGGS linker 相连。引物设计如下, F1: 5'-CATATG(*Nde* I)AATACTAATTCTGGTGGCTC-3'; R1:5'-AAGTTCTTCTCCTTTGCTGGTGGTGGTCTG CAGTTTTATTTCGTAGATACTGAC-3'; F2:5'-GTCAG TATCTACGAATAAAAGGTGGTGGTCTGCAGAGC AAAGGAGAAGAAGCTT-3'; R2:5'-AAGCTT(*Hind* III) TTATTTGTAGAGCTCATCCAT-3'。扩增 cA 的 PCR 反应程序为 98 °C 4 min; 98 °C 10 s, 55 °C 30 s, 72 °C 45 s, 30 个循环; 72 °C 10 min 后置于 4 °C 保温。以 pET21a-GFP(本室保存)为模板,扩增 GFP 基因的反应程序为 98 °C 4 min; 98 °C 10 s, 55 °C 30 s, 72 °C 45 s, 30 个循环; 72 °C 10 min 后置于 4 °C 保温。用 DNA 回收试剂盒纯化 PCR 产物,将纯化后的产物进行重叠延伸,程序为 98 °C 4 min; 98 °C 10 s, 55 °C 30 s, 72 °C 90 s, 30 个循环; 72 °C 10 min 后置于 4 °C 保温。将 PCR 产物用 1% 的琼脂糖凝胶电泳并切胶回收,回收产物连接于 pMD18T,送北京华大科技有限公司测序。

分别将 pMD18-cA-GFP、pET28a 用 *Nde* I、*Hind* III 进行双酶切,然后加入 T4 连接酶体系,于 16 °C 进行连接过夜,转化至大肠杆菌 DH5 α ,挑选阳性克隆并双酶切鉴定。

1.2.3 重组蛋白的诱导表达

将重组质粒转化至大肠杆菌 BL21(DE3),挑取单

菌落接种于 5 mL LB 液体种子培养基中置于 37 °C、220 r/min 过夜培养。1:100 接种于 100 mL LB 液体培养基中至 $OD_{600} \approx 0.6$ 时加入终浓度 1 mmol/L 的 IPTG 进行诱导。同时进行温度梯度优化, 分别置于 37 °C、30 °C、25 °C 培养约 5 h 至 OD_{600} 达到 1.8 时, 离心收集菌体。PBS 缓冲液重悬菌体后, 进行超声破碎, 分别制备全菌、上清和沉淀 SDS-PAGE 电泳样品进行电泳检测。

1.2.4 蛋白的分离纯化

将诱导后的菌液离心, 每克湿菌体用 3 mL 5 mM 咪唑缓冲液重悬, 冰浴条件下进行超声破碎, 4 °C 12000 r/min 离心 30 min 收集上清液。将上清液加入预先用 5 mM 咪唑缓冲液平衡的 Ni-NTA 层析柱内, 分别用 50 (10% buffer B)、100 (20% buffer B)、200 (40% buffer B) 和 500 (100% buffer B) mM 咪唑缓冲液洗脱, 并收集洗脱液, SDS-PAGE 电泳检测目的蛋白分离纯化效果, 将收集的蛋白洗脱液透析至 PBS 溶液, 使用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒测定蛋白浓度。并配制不同浓度梯度的 cA-GFP 溶液, 向酶标板中每孔加入 100 μ L 溶液, 每个浓度平行 3 个样, 采用激发波长 395 nm, 发射波长 509 nm 测其荧光强度, 绘制 cA-GFP 荧光标准曲线和方程, 该标准曲线中, 横坐标为 cA-GFP 蛋白的质量, 纵坐标为荧光强度, 方程和 R^2 值由仪器自动生成导出。

1.2.5 GEM 颗粒的制备

取少量甘油冻存菌种划线至 GM17 平板固体培养基中, 置于培养箱 30 °C 静置培养 24 h。挑取单菌落接种于 5 mL GM17 液体培养基中于 30 °C 静置培养 12 h。酸处理 *L. lactis* 参照文献^[1]。取 *L. lactis* MG1363 过夜培养物, 按 1:100 接种到 500 mL 新鲜 M17 培养基, 30 °C 静置培养 16 h。离心收集菌体, 用 250 mL 无菌水洗涤一次, 100 mL 的 100 mmol/L 醋酸溶液 (pH=1) 重悬菌体, 并于沸水中煮沸 30 min。250 mL 无菌的 PBS 缓冲液洗涤 3 次, 用 50 mL 无菌的 PBS 缓冲液重悬菌体, 置于 4 °C 保存。

1.2.6 重组蛋白回向锚定至乳酸乳球菌表面

取 1 mL 上述酸处理 *L. lactis*, 离心收集菌体。向装有菌体的离心管中加入 1 mL 表达重组蛋白 cA-GFP 工程菌破碎后的上清 (测定其荧光强度为 c1), 对照组加入表达 GFP 蛋白的工程菌上清 (课题组成员制备), 均置于室温静置孵育 30 min。菌体与蛋白的混合物经 9000 r/min 离心 1 min, 取上清液 (测定其荧光强度为 c2), 同时制备 SDS-PAGE 电泳样品进行电泳检测, 菌体用 PBS 洗涤三次去除非特异吸附蛋白。取少量于荧光显微镜下观察。菌体放置 65 °C 干燥箱进

行干燥后称量干重, 或用 1 mL PBS 缓冲液重悬, 置于 4 °C 保存。在保证 cA-GFP 过量的前提下, 根据 c1 与 c2 的差值, 再结合测定的 cA-GFP 荧光标准曲线和方程即可计算出锚定 cA-GFP 的总量, 除以菌体干重即为单位菌体锚定 cA-GFP 的数量。

1.2.7 cA-GFP 锚定至乳酸乳球菌后稳定性测定

根据方法 1.2.6 制备表面展示重组蛋白 cA-GFP 的乳酸乳球菌样品置于 4 °C 冰箱, 每隔 24 h 取样, 测定其荧光强度, 连续测定 6 d。

2 结果与分析

2.1 AcmA 基因的扩增

以 *L. lactis* MG1363 总 DNA 为模板, PCR 扩增目的基因。电泳结果 (图 1) 显示扩增得到 1 个长约 1.3 kb 的特异性片段, 与预计大小一致。PCR 产物经纯化后连接到 pMD18-T 载体, 测序结果表明该片段为 1 个完整编码框, 全长 1311 bp, 与 GenBank 中登记的乳酸乳球菌乳脂亚种 (*L. lactis subsp. cremoris*) MG1363 菌株的 N-乙酰胞壁质酶编码基因完全相同, 说明已经成功扩增 AcmA 基因。

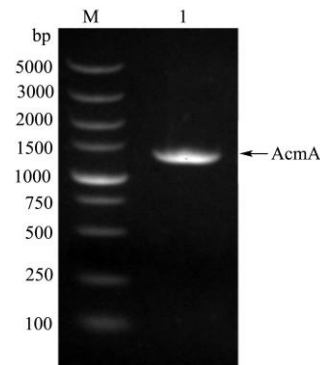


图 1 AcmA 基因扩增

Fig.1 PCR amplification of the AcmA gene

注: M: DNA marker DL5000; 1: AcmA PCR 产物。

2.2 重组质粒的构建

根据克隆融合基因 cA-GFP 的重叠引物设计方案, 克隆得到了 AcmA 基因的 C-末端序列 cA 和 GFP 基因, 如图 2a 所示, 两者的 DNA 分子大小与预期完全一致。以 cA 序列和 GFP 基因为模板, 利用重叠 PCR 将 GFP 基因连接到 cA 序列的 3' 端, 克隆得到与预期结果一致的 1400 bp 左右 DNA 条带。PCR 产物 cA-GFP 经纯化后, 连接于 pMD18-T 载体, 测序结果表明, 所得序列与预期完全一致。pMD18T 载体的 cA-GFP 序列经经 *Nde* I、*Hind* III 双酶切后与同样双酶切的

pET28a 载体连接, 转化大肠杆菌 DH5 α 感受态, 菌液 PCR 筛选后提取转化子质粒进行双酶切鉴定, 如图 2b 所示, 结果得到 2 个片段, 其中大片段在 4 kb~7 kb 之间, 与小片段在 1 kb~2 kb 之间, 与 cA-GFP 的大小 1.4 kb 相符。说明重组表达载体 pET28a-cA-GFP 构建成功。

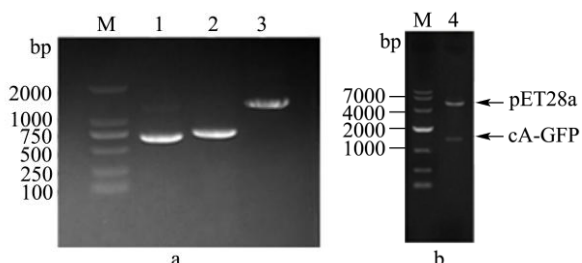


图 2 构建重组质粒 pET28a-cA-GFP

Fig.2 Construction of the recombinant plasmid pET28a-cA-GFP

注: M: DNA marker; 1: cA PCR 产物, 651bp; 2: GFP PCR 产物, 711bp; 3: cA-GFP PCR 产物, 1.4kb; 4: pET28a-cA-GFP 经 Nde I、Hind III 双酶切产物。

2.3 重组蛋白的表达

将含有 pET28a-cA-GFP 表达载体的大肠杆菌工程菌置于不同温度过夜培养, IPTG 诱导, 另设一份不加 IPTG 作为对照, 离心收菌, 超声破碎后, 分别制备 SDS-PAGE 电泳样品, 进行电泳检测。结果如图 3 所示, 与未诱导菌相比, 由诱导菌在 45~66 kD 之间出现了一条明显的目的条带, 这与重组蛋白 cA-GFP 的理论分子量 (53 kD) 是一致的, 由此判断重组蛋白已成功表达。与 37 °C 和 30 °C 培养的工程菌相比, 在 25 °C 诱导时, 工程菌上清液中出现 cA-GFP 重组蛋白, 说明低温有助于重组蛋白的可溶性表达。因此, 本文最终选定的诱导温度为 25 °C。

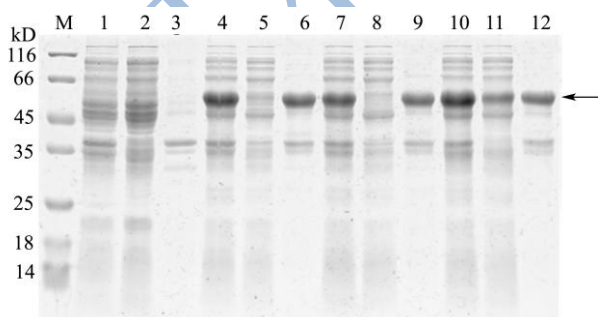


图 3 不同温度诱导 pET28a-cA-GFP 的表达结果

Fig.3 Optimization of pET28a-cA-GFP expression at different temperatures

注: M: protein marker; 1-3 为未诱导全菌、上清、沉淀; 4-6 分别为 37 °C 下的诱导全菌、上清、沉淀; 7-9 分别为 30 °C 下的诱导全菌、上清、沉淀; 10-12 分别为 25 °C 下的诱导全菌、

上清、沉淀。

2.4 蛋白纯化

将纯化前后蛋白样品进行 SDS-PAGE, 结果如图 4 所示, 53 kD 处有明显的诱导蛋白条带, 目的蛋白主要在 200 mM 咪唑浓度处被洗脱下来, 穿过液中未见目的蛋白, 证明目的蛋白完全挂柱。使用 Bandscan 软件进行灰度分析表明, 纯化后 cA-GFP 的纯度达到了 95%。使用 BCA 试剂盒对 cA-GFP 做蛋白浓度测定, 浓度为 678 μ g/mL。cA-GFP 荧光强度与蛋白浓度关系曲线为 $y = 499.25x - 468.19$, ($R^2 = 0.9991$)。

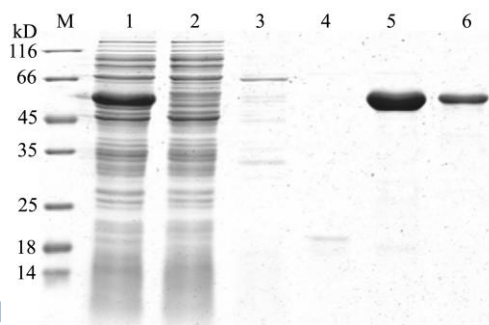


图 4 纯化 cA-GFP 蛋白电泳结果图

Fig.4 SDS-PAGE image of the purified cA-GFP

注: M: protein marker, 1: 上柱样, 2: 穿过液, 3: 10% buffer B 洗脱, 4: 20% buffer B 洗脱, 5: 40% buffer B 洗脱, 6: 100% Buffer B 洗脱。

2.5 重组蛋白回向锚定至 *L. lactis* MG1363

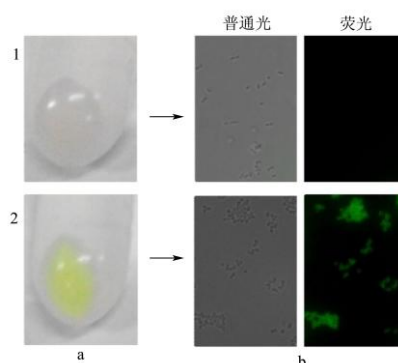


图 5 cA-GFP 锚定至 *L. lactis* MG1363

Fig.5 cA-GFP docking onto *L. lactis* MG1363

注: 1: GFP 与酸处理 *L. lactis* 孵育; 2: cA-GFP 与酸处理 *L. lactis* 孵育。

重组蛋白 cA-GFP 在特定的环境中与 *L. lactis* MG1363 接触, 会在 cA 转运蛋白的引导下与菌体细胞壁以非共价键形式结合, 用 PBS 洗涤菌体三次, 除去非特异性结合的蛋白。结果见图 5a 所示: GFP 蛋白与经酸处理的乳酸乳球菌进行孵育所得到的对照组 1, 洗涤后菌体呈现白色, 说明 GFP 不能锚定至 *L.*

lactis。当 cA-GFP 与乳酸乳球菌进行孵育后, 菌体很快就变成了黄绿色, 说明 cA-GFP 可以锚定至 *L. lactis* 菌体表面。分别取少量菌体于荧光显微镜 ($\times 100$) 下观察, 结果如图 5b 所示, 与 GFP 蛋白孵育的 *L. lactis* 在荧光显微镜下无法检测到荧光。而与 cA-GFP 蛋白孵育的 *L. lactis* 在荧光显微镜下呈现出较为明亮的绿色荧光, 表明在运载蛋白 cA 的引导下, 目的蛋白可以回向锚定在 *L. lactis* 表面。

2.6 cA-GFP 蛋白锚定效率的分析

为了分析 cA-GFP 蛋白与 *L. lactis* 的锚定效率, 表达 cA-GFP 蛋白大肠杆菌工程菌超声破碎后, 将离心所得的上清液与经酸处理的 *L. lactis* 进行孵育, 洗涤除去非特异性结合蛋白。

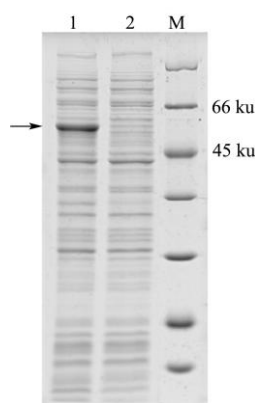


图 6 SDS-PAGE 检测锚定前后上清液的成分

Fig.6 SDS-PAGE patterns of the supernatant components before and after docking

注: M: protein marker; 1: 重组大肠杆菌破碎后上清; 2: 重组大肠杆菌破碎后上清与酸处理 *L. lactis* 孵育后离心的上清。

分别制备孵育前后的上清液 SDS-PAGE 电泳样品, 进行电泳检测。结果如图 6 所示, 孵育后的上清液中 cA-GFP 蛋白明显减少, 而其他蛋白与孵育前的上清液中蛋白基本保持一致, 结合 2.5 的结果, cA-GFP 蛋白在 *L. lactis* 表面呈现的绿色荧光, 进一步说明只有在运载蛋白 cA 的引导下, 外源目的蛋白能够通过回向锚定稳定地展示在 *L. lactis* 菌体表面。在保证 cA-GFP 过量的条件下, 根据 1.2.6 的方法以及标准曲线和方程计算得到 cA-GFP 蛋白的锚定量。cA-GFP 锚定至经酸处理 *L. lactis* 的量为 121.51 mg/g 干菌体。

2.7 cA-GFP 锚定稳定性检测

为测定 cA-GFP 蛋白在 *L. lactis* 菌体表面锚定的稳定性, 将表达 cA-GFP 蛋白大肠杆菌工程菌的上清液与经酸处理的 *L. lactis* MG1363 菌体孵育 2 h, 经洗涤和离心后的样品置于 4 °C 保存。每隔 24 h 取样, 共

测定 6 d。结果如图 7 所示, 随着时间的延长, 菌体荧光强度略为下降, 但是变化不明显, 第六天菌体仍保持 82.2% 的荧光强度。说明在 4 °C 环境下保存, 锚定至经酸处理 *L. lactis* MG1363 表面的 cA-GFP 蛋白稳定性较高, 对于后续研究的影响较小。

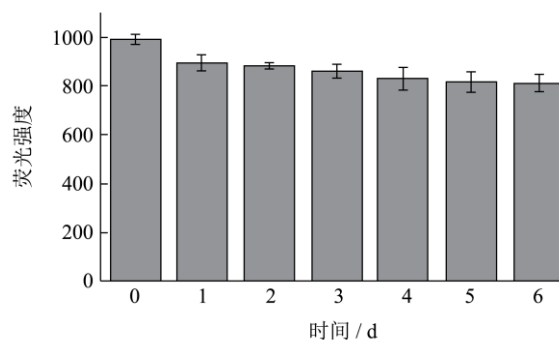


图 7 锚定在 *L. lactis* MG1363 菌体表面的 cA-GFP 稳定性测定

Fig.7 Stability assessment of cA-GFP docked onto *L. lactis* MG1363

3 结论

3.1 乳酸乳球菌是公认的食品安全级革兰氏阳性菌, 被广泛应用于食品工业和生物医药业等研究领域。它生长速度快, 安全性高, 对人不具致病性, 在肠道不定植, 分子生物学研究的深入以及能够在细菌表面展示抗体系统的建立等特点, 使之成为理想的粘膜免疫载体^[13-14]。但是, 外源重组蛋白在乳酸乳球菌工程菌的表达量少、菌体表面的展示效率低, 且采用的表达载体带有一个或者多个抗生素抗性基因, 由此导致抗性因子转移, 容易给环境、人或动物存在严重的安全隐患^[2], 限制了乳酸乳球菌表面展示系统在食品、化妆品和医药领域的应用。GEM 表面展示技术的发展, 在展示效率以及转基因安全方面有了很大的改善, 但是乳酸乳球菌在外源蛋白表达方面仍不乐观, 外源基因的转化、表达较难, 蛋白表达产量较低。因此, 能否用具有基因操作技术简单、容易培养且周期短, 蛋白表达量高等特点的大肠杆菌表达出可溶性 cA 融合蛋白, 是本研究探索的重点。

3.2 本研究采用重叠 PCR 技术将 cA 与 GFP 进行融合, 两者以 GGGGS linker 相连, 这样既能保持 cA 的锚定活性, 还能通过 GFP 自带的荧光进行直观检测。对 cA-GFP 融合蛋白的表达形式进行分析, 结果表明, 降低表达温度可以有效增加 cA-GFP 的可溶量, 但是, 低温会影响宿主菌的生长, 导致蛋白表达量降低, 因此, 本文最终选择 25 °C 进行诱导, 既有大量的可溶性融合蛋白, 其表达量又不至于太低。本实验构建的工程菌经 IPTG 诱导后, 将破碎后的上清直接与 GEM

颗粒常温孵育,并不需要纯化 cA-GFP 蛋白, cA-GFP 由于具有锚定至肽聚糖的活性,可 30 min 内锚定至 GEM 颗粒,非特异性蛋白通过洗涤的方式即可去除。本研究得到的融合蛋白还需要在原有的基础上进一步进行 cA 蛋白三维结构的解析以及其单克隆抗体制备的研究等。

3.3 本研究成功构建 pET28a-cA-GFP 重组表达质粒,并在大肠杆菌 BL21 (DE3) 实现了 cA-GFP 蛋白的可溶性功能表达。在运载蛋白 cA 的引导下,外源 GFP 成功特异性地锚定至乳酸乳球菌表面。每克干菌体可锚定约为 121 mg 的 cA-GFP 蛋白,且锚定至乳酸乳球菌的 cA-GFP 蛋白稳定性较高。

参考文献

- [1] Steen A, Buist G, Leenhouts KJ, et al. Cell wall attachment of a widely distributed peptidoglycan binding domain is hindered by cell wall constituents [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2003, 278(26): 23874-23881
- [2] 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 [J]. *Methods*, 2006, 38(2): 144-149
- [3] Buist G, Karsens H, Nauta A, et al. Autolysis of *Lactococcus lactis* caused by induced overproduction of its major autolysin, AcmA [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1997, 63(7): 2722-2728
- [4] 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]. *Journal of Bacteriology*, 1995, 177(6):1554-1563
- [5] 李小花,黄新风,邵小虎,等.利用乳酸乳球菌 AcmA 表面展示 β -1,3-1,4-葡聚糖酶[J].*生物工程学报*,2009,1:89-94
LI Xiao-hua, HUANG Xin-feng, SHAO Xiao-hu, et al. Functional cell surface display of endo-beta-1, 3-1, 4-glucanase in *Lactococcus lactis* using N-acetyl muramidase as the anchoring motif [J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2009, 1: 89-94
- [6] 黄新风,李小花,李林.利用 N-乙酰葡糖胺糖苷酶在乳酸乳球菌表面展示超氧化物歧化酶[J].*微生物学通报*,2010, 7: 992-8
HUANG Xin-feng, LI Xiao-hua, LI Lin. Display of superoxide dismutase on the surface of *Lactococcus lactis* by use of the N-acetylglucosaminidase anchor [J]. *Microbiology China*, 2010, 7: 992-998
- [7] Audouy SAL, van Selm S, van Roosmalen ML, et al. Development of lactococcal GEM-based pneumococcal vaccines [J]. *Vaccine*, 2007, 25(13): 2497-506
- [8] 李鹏成,孙冰,乔绪稳,等.乳酸乳球菌肽聚糖锚钩蛋白原核表达载体的构建与表达[J].*江苏农业学报*,2013,6: 1399-1404
LI Peng-cheng, SUN Bing, QIAO Xu-weng, et al. Construction of prokaryotic expression vector of *Lactococcus lactis* peptidoglycan protein anchor and its expression [J]. *Jiangsu Journal of Agricultural Sciences*, 2013, 6: 1399-1404
- [9] Chalfie M, Tu Y, Euskirchen G, et al. Green fluorescent protein as a marker for gene expression [J]. *Science*, 1994, 263(5148): 802-805
- [10] Ikawa M, Kominami K, Yoshimura Y, et al. Green fluorescent protein as a marker in transgenic mice [J]. *Development, Growth & Differentiation*, 1995,37(4):455-459
- [11] Hack NJ, Billups B, Guthrie PB, et al. Green fluorescent protein as a quantitative tool [J]. *Journal of Neuroscience Methods*, 2000, 95(2): 177-184
- [12] 关新刚,苏维恒,于欣,等.Tat-GFP 融合蛋白的表达纯化及其穿膜活性[J].*吉林大学学报(医学版)*,2014,4:725-728, 914
GUAN Xin-gang, SU Wei-heng, Yu Xin, et al. Expression and purification of Tat-GFP fusion protein and its cell membrane penetrating activity [J]. *Journal of Jilin University (Medicine Edition)*, 2014, 4:725-728, 914
- [13] Wells J. Mucosal vaccination and therapy with genetically modified lactic acid bacteria [J]. *Annual Review of Food Science and Technology*, 2011,2:423-45
- [14] 余丽芸,王桂华,唐彦君.乳酸菌作为口服疫苗载体的研究进展[J].*生物技术通报*,2008,5:48-50
YU Li-yun, WANG Gui-hua, TANG Yan-jun. Advancement of lactic acid bacteria as oral vaccine [J]. *Biotechnology Bulletin*, 2008, 5: 48-50