

欧芹苯丙氨酸脱氨酶 cDNA 在乳酸乳球菌中的表达研究*

向 华¹ 刘敬忠 胡 维 祝 锦 朱章菱

(首都医科大学附属北京红十字朝阳医院 北京 100020)

摘 要 将欧芹(*Petroselinum crispum*)苯丙氨酸脱氨酶(PAL)cDNA 亚克隆到组成型表达载体 pMG36e 启动子 P32 下游,电穿孔法转化乳酸乳球菌,获得有 PAL 表达活性的乳酸乳球菌工程菌(pMG36ePAL/*L. lactis* MG1363)。通过递归 PCR 合成了一段 120bp 的调控片段,用以将 pMG36e 改造为分泌型表达载体 pXHS,以翻译偶联的方式表达 PAL,可使 PAL 的 N 末端带上 usp45 信号肽,结果亦检测到 PAL 酶活性。自行分离克隆了乳酸乳球菌热休克蛋白基因 dnaJ 的启动子区域,构建了热诱导表达载体 pXHJ,获得 PAL 热诱导表达工程菌(pXHJ-PAL/*L. lactis* IL1403),经 30℃ 至 37℃ 热诱导,可使 PAL 表达活性提高至 2 倍。本文还就乳酸乳球菌 PAL 工程菌在经典型苯丙酮尿症防治中的应用进行了分析和讨论。

关键词 苯丙氨酸脱氨酶基因,乳酸乳球菌,基因表达,苯丙酮尿症

分类号 Q785 **文献标识码** A **文章编号** 0001-6209(1999)03-0196-04

乳酸乳球菌(*Lactococcus lactis*)是能在人小肠中短暂生活,对人体有益无害的食品级微生物^[1]。本课题组在国际上首次提出以下治疗经典开型苯丙酮尿症(PKU)的新途径:采用分子克隆技术,构建以乳酸菌为宿主菌的能表达苯丙氨酸脱氨酶(PAL)的工程菌,令其在 PKU 患者小肠内发挥 PAL 酶活性使尚未被吸收的苯丙氨酸(Phe)脱氨变成对人体无毒副作用的肉桂酸(Cin),从而使患者在基本不限制饮食的情况下,通过控制 Phe 的摄入而达到防治经典型 PKU 发生的目的。该途径一方面有可能使 PKU 患儿进食天然食品的愿望得以实现,另一方面有可能解决 PKU 孕妇胎儿的安全问题。

本研究主要进行了 PAL 在乳酸乳球菌中克隆表达的基础性工作,首次构建了欧芹 PAL cDNA 在乳酸乳球菌中的组成型、分泌型及热诱导型三种重组表达质粒,并用电穿孔技术转化乳酸乳球菌,均筛选到能表达活性 PAL 的工程菌。为经典型 PKU 治疗新途径的研究奠定了基础,具有理论意义和临床应用前景。

1 材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 质粒、菌株和培养基:所用质粒和菌株见表 1。大肠杆菌采用 NZCYM 培养基(Gibco BRL)培养;乳酸乳球菌用 M17 培养基(Difco)培养。氨苄青霉素(Amp)用量为

* 北京市自然科学基金资助(No. 7952012)

中国医学科学院基础所卢圣栋教授,北京红十字朝阳医院张鹏,肖白,周艳,李氢元,梁燕参加部分设计或实验

¹ 现在中国科学院微生物所微生物分子遗传室,北京 100080

收稿日期:1997-08-19,修回日期:1997-12-22

60μg/mL;红霉素(Em)在大肠杆菌培养中用量为 200μg/mL,在乳酸乳球菌培养中为 5μg/mL。

1.1. 引物:引物序列见表 2。其中 Pr 和 P2 可用于鉴定 PAL 组成型表达质粒 pMG36ePAL 和分泌型表达质粒 pXHS-PAL;SP1、SP2、SP3 和 SP4 用于递归 PCR 合成分泌型表达载体的翻译偶联调控片段;PJ1 和 PJ2 用于分离克隆 *L. lactis* danaJ 启动子区域;PJ1 和 P2 还可用于鉴定 PAL 热诱导表达质粒 pXHJ-PAL。T7 启动子引物(记为 T7)用于 DNA 测序。

1.1.3 主要工具酶类:内切酶 EcoCR I, EcoR I, Hinc II, Nde I, SnaBI, Sac I, Xba I 等及 T4 DNA 连接酶购自 Promega 公司;Taq DNA 聚合酶为中国科学院遗传研究所产品。

表 1 质粒和菌株

Table 1 Strains and plasmids		
质粒和菌株	有关特点	来源
Strain and plasmid	relevant features	Reference or source
<i>L. lactis</i> MG1363	Derived from <i>L. lactis</i> subsp <i>lactis</i> NCDO712 by plasmid curing	[2]
<i>L. lactis</i> IL 1403	Derived from <i>L. lactis</i> subsp <i>lactis</i> IL594 by plasmid curing	[3]
<i>E. coli</i> DH5α		[4]
pET23b	Amp ^r ; unique cloning sites: Nde I, BamH I, EcoR I, Sac I, etc.	Novagen
pMG36e	Em ^r ; expression vector with P32 promoter, multiple cloning site(MCS) and prtP translational terminator.	[5]
pET23b-J	Amp ^r ; source of dnaJ promoter	this work
pBSPAL	Amp ^r ; source of PAL cDNA	[6]
pET23bPAL	Amp ^r ; source of PAL cDNA	[6]
pMG36ePAL	Em ^r ; constitutive expression of PAL in <i>L. lactis</i>	this work
pXHS-PAL	Em ^r ; secretory expression of PAL in <i>L. lactis</i>	this work
pXHJ-PAL	Em ^r ; heat inducible expression of PAL in <i>L. lactis</i>	this work

表 2 引物名称和序列

Table 2 Names and sequences of primers	
引物名称	引物序列(5'→3')
Primer name	Primer sequence(5'→3')
Pr	TCACAAAATGCTATACTAGGTAGG
P2	TTAACAGATTGGAAGAGGAGC
SP1	GTAATTCGAGCTCAAGGAGGTATACAATGAAAAAAA
SP2	GGTATACAATGAAAAAAAAGATTATCTCAGCTATTTTAATGTCTACAGTG
SP3	CACCTGACAACGGGGCTGCAGCAGAAAGTATCACTGTAGACATTAATAAT
SP4	GGATCCGTCGACCAGCGTAAACACCTGACAACGACGGG
PJ1	ACGGAATTCTGTTATTTTAGATGGG
PJ2	ATTCATATGTAAATTACTCACTTCCT
T7	TAATACGACTCACTATAGGG

1.2 实验方法

1.2.1 三种 PAL 表达质粒的构建:目的基因欧芹 PAL cDNA 经 RT-PCR 获得,已克隆至 pBluescript 及 pET23b 进行测序和保存(表 1)。本研究构建的三种 PAL 表达质粒均以 pMG36e^[5]为基础,可在 *L. lactis* 和 *E. coli* 中复制和表达。实验的基本程序是在 *E. coli* 中完成 PAL 表达质粒的重组和鉴定,然后用电穿孔技术转化乳酸乳球菌进行表达研究。酶切、连接和转化 *E. coli* DH5α 的方法按文献[7]。各 PAL 表达质粒构建程序如下:

组成型表达质粒 pMG36ePAL: PAL cDNA 由 pBSPAL 经 SnaB I 和 XbaI 切得 (2.2kb); 载体 pMG36e 经 EcoCR I 和 Xba I 切开。目的基因片段和载体片段按 3:1 混合, T4 DNA 连接酶 14℃ 连接 18h, 常规方法转化氯化钙致敏的 *E. coli* DH5a 感受态细胞。然后筛选和鉴定阳性克隆。

分泌型表达质粒 pXHS-PAL: 递归 PCR(引物 SP1:SP4:SP2:SP3 = 10:10:1:1) 合成 120bp 的翻译偶联调控片段(含信号肽序列等), 并用 SacI 和 Hinc II 酶切; PAL cDNA 仍由 pBSPAL 经 SnaB I 和 Xba I 切得; 载体 pMG36e 经 Sac I 和 Xba I 切开。PAL cDNA 酶切片段、调控序列酶切片段和载体酶切片段按 3:2:1 于 14℃ 连接 18h。

热诱导型表达质粒 pXHJ-PAL: ①热诱导启动子部分: 制备乳酸乳球菌 (*L. lactis* IL1403) 基因组 DNA, 采用 PCR(引物 PJ1 和 PJ2) 方法扩增 dna J 启动子区域, 将 PCR 产物克隆至载体 pET23b 获得 dna J 启动子克隆质粒 pET23b-J, 用 T7 启动子引物测序鉴定, 正确质粒用 Nde I 和 EcoR I 酶切得热诱导启动子部分(约 260bp)。②载体基本部分: pMG36e 经 EcoR I 和 Sal I 酶切去除其原启动子区域后获得。③目的基因 PAL cDNA 部分: pET23bTAL 经 Nde I 和 Sal I 切得(约 2.2kb)。④以上三部分按 2:1:3 混合于 16℃ 连接 16h。

1.2.2 PAL 重组表达质粒的筛选和鉴定(宿主 *E. coli*): ①质粒大小比较法: 少量制备质粒 DNA 电泳^[7], 可判断有无插入片段。②菌落 PCR 鉴定法^[8]: PCR 引物分别位于载体启动子部位(Pr 或 PJ1)和插入片段 PAL cDNA 3'端(P2)。可判断插入片段是否为 PAL 及方向正确与否。③PAL 酶活性检测法: 取 20μL 菌液加 1.5μL 85% 磷酸酸化, 3×200μL 乙酸乙酯抽提, 真空挥发溶剂, 100μL 甲醇溶解, 20μL 用于 HPLC 分析。流动相分为 A 相(5% 乙酸)和 B 相(20% 乙酸 + 25% 乙腈), AB 相由双泵按 1:19 自动混合, 流速为 1mL/min, 层析柱为 0.46×25cm 的 C18 柱, 检测波长为 290nm。根据有无特异的 PAL 催化反应产物肉桂酸可判断重组质粒有无 PAL 表达活性。

1.2.3 重组 PAL 表达质粒电穿孔法转化乳酸乳球菌: 乳酸乳球菌电穿孔转化用细胞的制备及转基因方法根据文献[9]改进: 从具有 PAL 活性的大肠杆菌中常规方法提取重组质粒, PEG 纯化, 使 OD_{260}/OD_{280} 达 1.8 水平, 取 250ng 质粒 DNA 与 80μL 乳酸乳球菌混合, 利用 Bio-Rad Gene Pulsor 电穿孔法将重组质粒转入乳酸乳球菌中, 脉冲参数为 1.25kV/mm, 25μF 和 200Ω, 恢复培养基用 SGM17MC^[9](含 Em50ng/mL, Phe 250μg/mL), 铺平板固体培养基用 SGM17 + agar^[9](含 Em 5μg/mL, Phe 250μg/mL), 30℃ 厌氧培养 2~3d。

1.2.4 乳酸乳球菌工程菌 PAL 表达分析: ①SDS-PAGE 观察 PAL 表达: 收集对数晚期的乳酸乳球菌工程菌, 按文献[7]方法进行 SDS-PAGE 分析。②活菌 PAL 表达活性实验: 单菌落接种于 GM17 培养基^[9](加 phe 至 2.5mg/mL, 加红霉素至 5μg/mL), 30℃ 培养过夜。过夜培养物用相同培养基 1:100 稀释后继续培养, 每 6h 一次取菌液 20μL, HPLC 法测产物肉桂酸含量, 研究 24h 内, 培养基中肉桂酸含量进行性增长情况, 分析活菌 PAL 酶活性。设含空载体的乳酸乳球菌作对照。热诱导表达株经 30℃ 至 37℃ 热诱导, 分析热诱导表达效率。

2 结果和分析

2.1 分泌型表达载体调控片段的递归 PCR 合成

图 1 为递归 PCR 示意图及 PCR 产物电泳结果,结果表明:递归 PCR 合成的调控片段与预期大小(120bp)相符合(图 1B)。图 2 示该调控序片段的序列结构,有如下特征:两端含有合适的酶切位点 Sac I 和 Hinc II;含有一个新的 SD 序列和一个 ATGA(起始编码和终止密码相重叠)的翻译偶联序列^[10];含有一个乳酸乳球菌分泌蛋白 usp45 的信号肽序列^[11]。可通过翻译偶联的方式使 PAL 的 N 末端带上 usp45 信号肽,实现分泌表达。含有信号肽的翻译偶联调控片段的合成,为构建 PAL 分泌型表达质粒奠定了基础。

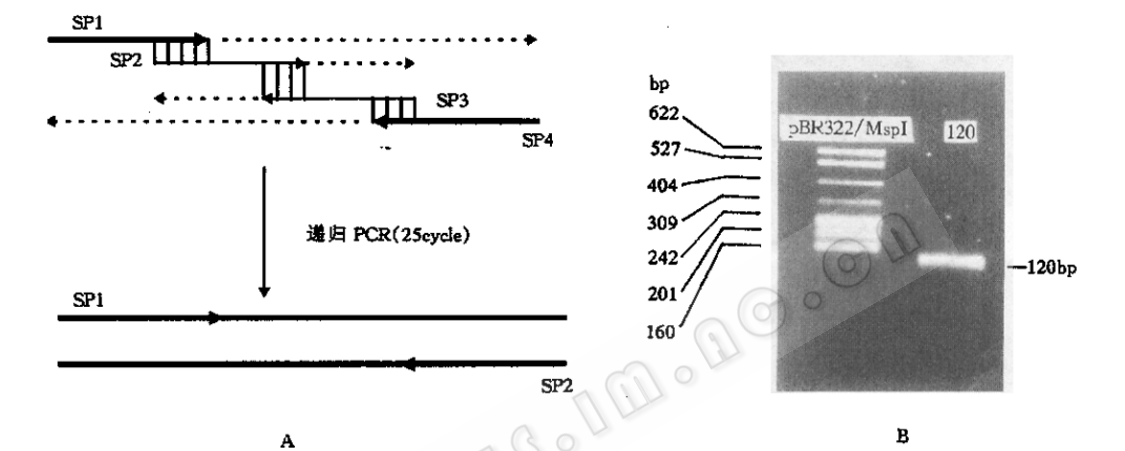


图 1 递归 PCR 合成的分泌型载体 pXHS 翻译偶联调控片段(120bp)
A. 示意图 B. 电泳结果

Fig.1 The DNA fragment(120bp)synthesized by progressive PCR used for translational coupling expression in secretory vector pXHS

A. Schema B. Electrophoresis results

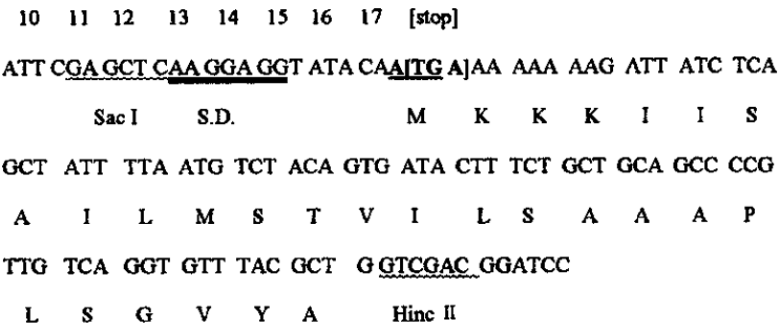


图 2 分泌型载体 pXHS 翻译偶联调控片段各元件组成

浪线示酶切位点 Sac I 和 Hinc II, 双底线示 SD 序列, 单底线示信号肽起始密码 ATG, [TGA] 为载体小肽的终止密码, 载体小肽密码子用数字标出, 信号肽氨基酸序列用单字母缩写形式表示。

Fig.2 Nucleotide sequences of the translational coupling regulation fragment in secretory vector pXHS
The restriction enzyme recognition sites(Sac I and Hinc II)are indicated with wave lines; Shine-Dalgarno(SD)sequences are doubly underlined; underlined ATG, translational start codon of the signal peptide; [TGA], translational stop codon of the vector peptide; the codon numbers of vector peptide are shown above the nucleotide sequences; the amino acids of signal peptide are shown with one-letter codes under the nucleotide sequences.

2.2 *L. lactis* IL 1403 基因组 DNA 制备及 *dnaJ* 启动子区域的分离和克隆

L. lactis IL 1403 基因组 DNA 及 *dnaJ* 启动子区域 PCR 扩增产物电泳结果(267bp)如图 3 示。图 4 为该 PCR 产物(*dnaJ* 启动子)的克隆质粒 pET23b-J 的测序及分析结果,与文献[12]报道的 *dnaJ* 启动子区域相比存在一个碱基 G→A 差异(图中 79 位)。
dnaJ 启动子区域的分离和克隆,为构建 PAL 热诱导表达质粒准备了条件。

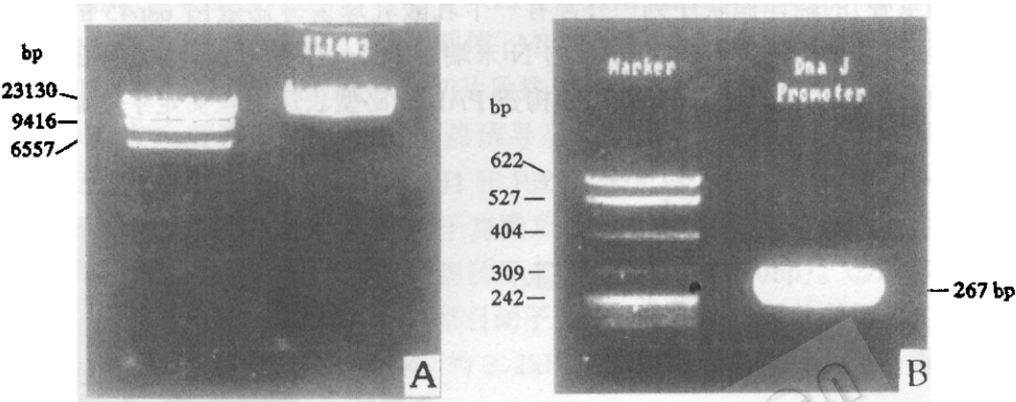


图 3 *L. lactis* IL 1403 基因组 DNA 及 *dnaJ* 启动子区域 PCR 扩增产物
A. IL1403 基因组 DNA B. *dnaJ* 启动子区域 PCR 片段

Fig. 3 *L. lactis* IL 1403 genomic DNA and the PCR product of its *dnaJ* promoter region
A. IL 1403 genomic DNA B. PCR product of *dnaJ* promoter region

EcoR I				
<u>GAATTC</u> GTTT	ATTTTAGATG	GGTATAACGA	AAAGAAAAAT	1 ... 40
GAGTTTCATG	TTACTGATCC	AATAAAAAGGA	AAATAT TGAT	41 ... 80
TGGCTGAATC	TACAGTTGAT	TCGGTTTATA	GTGGAACAAA	81 ... 120
TCAATTGCG	ATAGAA TT	TATAGTGT<aa	ttagcactctt>	121 ... 161
ATAAA <aaga	gtgctaatt> T	TTTGGCCAAA	AATGAAAAAA	162 ... 200
-35				
CGTGGTAAAA	TAGTGCTATT	GAAAAATTGA	TTTAGT	201 ... 236
-10				
<u>AAAGGAAGTG</u>	AGTA ATTTA	CAT [ATG]		237 ... 261
S.D.		Nde I [Start]		

图 4 pET23b-J *dnaJ* 启动子区域测序结果及调控元件分析(测序引物:T7)
浪线示两侧的酶切位点;小写字母示逆向重复调控序列(IR);单底线示-35 及-10 区域;双底线示 SD 序列;ATG(Start)为翻译起点,该处已引入一个单一酶切位点 Nde I,可用以表达天然蛋白;图中 79 位多态碱基“A”(文献[12]中为 G)用方框标出。

Fig. 4 Sequencing results of the *dnaJ* promoter region of pET23b-J and the deduced regulation elements(sequencing primer: T7 in Table 2)

The restriction enzyme recognition sites are indicated with wave lines;The small letters show the inverted repeat(IR);the -10 and -35 are underlined;the Shine-Dalgarno(SD)sequences are double-underlined;ATG(start), translational start codon;the base “A”(79) differed from which in reference[12] is also indicated.

2.3 重组 PAL 表达质粒的筛查和鉴定

实验表明,所构建的 PAL 表达质粒在 DH5 α 中亦有 PAL 表达活性,工程菌 PAL 表达活性使质粒提取相对困难,因此“菌落 PCR 筛查法”和“活菌 PAL 酶活性鉴定法”因其简单有效而成为本研究筛查和鉴定 PAL 表达质粒的主要手段。

图 5 示菌落 PCR 法筛查三种重组表达质粒的结果。组成型表达(质粒 pMG36ePAL)工程菌菌落 PCR 可获得特异的 2.2kb 特异产物(图 5A,引物 Pr 和 P2)。同样的 PCR 引物,分泌型表达(质粒 pXHS-PAL)工程菌经菌落 PCR 法扩增可获得特异的 2.3kb 的 PCR 产物(图 5B 中 3、4),比“阳性对照”组成型工程菌(图 5B 中 1 号)长约 0.1kb,说明调控片段和 PAL cDNA 均已插入。热诱导表达(质粒 pX-HJ-PAL)工程菌菌落 PCR 可获得 2.4kb 的特异 PCR 产物,图 5C 示部分克隆筛查结果(引物为 PJ1 和 P2)。

PCR 鉴定正确的表达质粒在 DH5 α 中均检测到 PAL 表达活性。

2.4 乳酸乳球菌 PAL 工程的 PAL 酶活性分析

三种 PAL 表达质粒电穿孔法转化乳酸乳球菌的效率均在 1×10^3 (转化子/ μ g 质粒)以上,所得乳酸乳球菌 PAL 工程菌均检测到 PAL 酶活性。

PAL 组成型表达工程菌(pMG36ePAL/*L. lactis* MG1363)表达产物经 SDS-PAGE 分析检测到特定的 PAL 蛋白条带(约 79.1kD),约占菌总蛋白量的 0.9%;分泌型工程菌可能由于表达量低而未发现明显的 PAL 条带;热诱导型表达工程菌(pXHS-PAL/*L. lactis* IL1403)经 30 $^{\circ}$ C $\rightarrow$ 37 $^{\circ}$ C 热诱导, PAL 表达量相对于其在 30 $^{\circ}$ C 有明显提高,并可达总蛋白的 1% 以上。

图 6 为通过 HPLC 检测培养基中肉桂酸生成的方法对工程菌 PAL 酶活性进行分析的结果。其中图 6A 为肉桂酸标准(肉桂酸特异峰出现在 8.92~8.96min)。图 6B 示组成型工程菌(pMG36ePAL/*L. lactis* MG1363)单菌落液体培养过程中,培养基中肉桂酸产量递增的 HPLC 分析结果。分析表明,24h 内培养基中的 Phe 除细菌本身生长利用外,可大部分脱氨生成了肉桂酸(Phe 初始浓度约 2.5mg/mL,至 24h 时肉桂酸终浓度可达

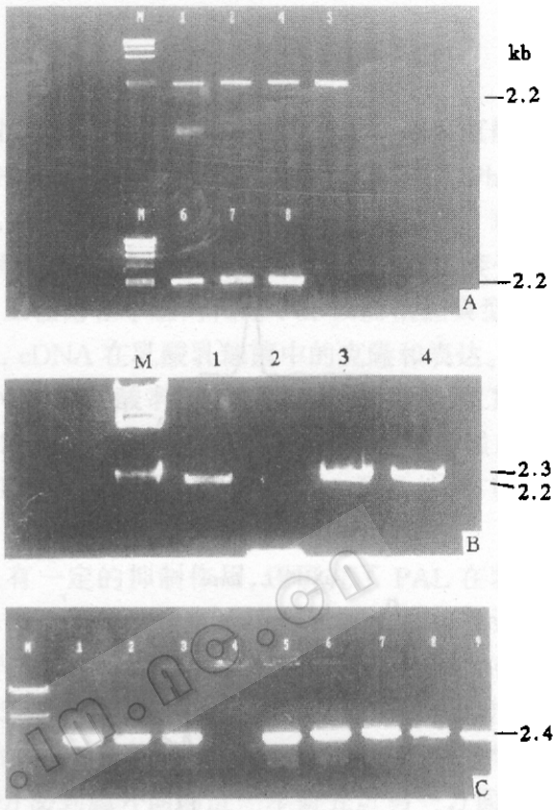


图 5 菌落 PCR 法筛查各重组表达质粒的结果
A. 组成型(引物 Pr/P2), B. 分泌型(引物 Pr 和 P2),
C. 热诱导型(引物 PJ1/P2)

Fig. 5 Direct PCR of bacterial colonies screening for recombinant plasmids

- A. Constitutive expression type (primer: Pr/P2);
- B. Secretory expression type (primer: Pr/P2);
- C. Heat inducible expression type (primer: PJ1/P2).

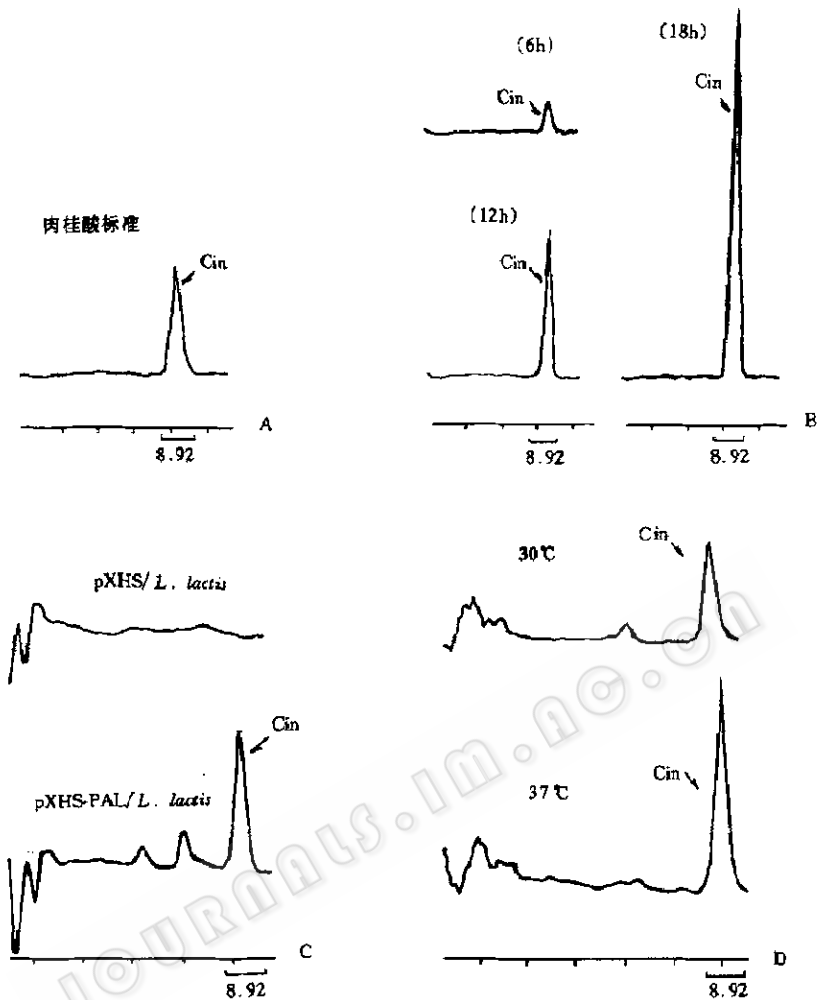


图 6 乳酸乳球菌 PAL 工程菌的 PAL 酶活性分析

A. 肉桂酸标准 B. 组成型 C. 分泌型 D. 热诱导型

Fig. 6 The PAL activity of *L. lactis* (PAL engineering bacteria) determined by HPLC

A. Cinnamic acid standard; B. Constitutive expression type;
C. Secretory expression type; D. Heat inducible expression type.

1.8mg/mL),说明该工程菌具有较好的 PAL 活性。图 6C 示一个乳酸乳球菌分泌型工程菌(pXHSPAL/*L. lactis* MG1363)单菌落液体培养 12h,检测培养液中 PAL 代谢产物肉桂酸生成量的 HPLC 结果,检测灵敏度提高了 5 倍,表明其酶活性约为相同菌量的组成型表达工程菌的 1/5,而空载体菌对照未检测到肉桂酸。图 6D 示热诱导工程菌(pXHJ-PAL/*L. lactis* IL 1403)相同菌量(过夜培养)在新鲜培养基中经 30℃ 和 37℃ 分别培养 2h 后,培养基中肉桂酸的 HPLC 分析结果。2h 后测菌液 OD_{600} 表明,二者细菌浓度无明显差异,说明肉桂酸产量的不同主要由 PAL 酶表达量差异引起。37℃ 培养物中肉桂酸含量为 $P_1 = 137\mu\text{g/mL}$, 30℃ 培养物中肉桂酸含量为 $P_2 = 78\mu\text{g/mL}$, 热诱导前原培养液中残留的肉桂酸含量 $P_0 = 24\mu\text{g/mL}$, 热诱导效率约为 $K = (137 - 24) / (78 - 24) \approx 2.1$, 即 37℃ 热诱

导可使 PAL 表达增加至 2 倍以上。

3. 讨论

经典型 PKU 是一种常见的氨基酸代谢异常遗传病。致病根源是患者苯丙氨酸羟化酶(PAH)基因突变,肝内缺乏有活性的 PAH, Phe 不能正常羟化为酪氨酸,导致 Phe 及其有害代谢物在体内大量积累,严重损害患儿神经系统发育致使智力低下和呆傻。现行低苯丙氨酸食物疗法需要严格限制天然蛋白摄取,价格昂贵且味道难吃,患儿难以接受和持久。本研究首次提出了用乳酸乳球菌 PAL 工程菌在小肠内代谢 Phe 以防治经典型 PKU 的基因治疗新途径,并首次实现了欧芹 PAL cDNA 在乳酸乳球菌中的克隆和表达。

本研究首先成功地组建了 PAL cDNA 在乳酸乳球菌中的组成型表达工程菌(pMG36ePAL/*L. lactis* MG1363),载体 pMG36e 含有来自乳酸乳球菌染色体的强启动子 P32,结果表明可有效启动 PAL 的表达,使工程菌活菌具有较好的 PAL 酶活性,有望用于 PKU 治疗。

鉴于 PAL 的表达对工程菌本身的生长有一定的抑制作用,还研究了 PAL 在乳酸乳球菌中的分泌型和热诱导型表达。一方面,构建了分泌型表达载体 pXHS,采用翻译偶联的原理在 pMG36e 多克隆位点 Sac I 处插入一个人工合成的调控片段,该片段含有新的 SD 序列、ATGA 翻译偶联序列和来自 *usp45* 的信号肽序列^[11]。用以表达 PAL 时,可通过偶联翻译使 PAL 的 N 末端带上从新开始的 *usp45* 信号肽,实现分泌表达,结果检测到 PAL 酶活性;但由于表达量较低,PAL 是否分泌到胞外尚需进一步研究。另一方面,自行分离克隆了乳酸乳球菌热休克蛋白 dna J 基因启动子区域,并用以构建了乳酸乳球菌热诱导型表达载体 pXHJ,进而重组获得 PAL 热诱导型表达工程菌 pXHJ-PAL/*L. lactis* IL 1403,经 30℃→37℃ 热诱导可使其 PAL 表达活性提高至 2 倍以上。*L. lactis* dna J 基因是由 Van Asseldonk 等 1993 年首先分离克隆的,其分析表明:dnaJ 基因的热诱导表达受转录水平调控,而启动子前的一个反向重复序列 AATTAGCACTCTTATAAAAAGAGT-GCTAATT 对于表达调控起决定作用。当用一个不含启动子的 *usp45*-*amyS* 融合基因作为报告系统时发现 37℃ 热诱导可使表达约增加至 2 倍,42℃ 热诱导表达则增加至 3~4 倍^[12],与本研究 PAL 热诱导表达效率相似。PAL 热诱导表达在一定程度上缓解了 30℃ 培养工程菌时 PAL 对工程菌本身的生长抑制。而进一步研究其热诱导表达机制,并用以改造表达载体,进而提高热诱导表达效率则是值得深入研究的课题。

具有 PAL 活性的食品级乳酸乳球菌工程菌的获得,为口服工程菌制剂治疗经典型 PKU 提供了可能,并将提供一条与现行基因治疗方法完全不同的 PKU 治疗新途径,因此该方法经过进一步完善将具有重要理论意义和应用前景。

致谢 荷兰 Groningen 大学 Prof. G. Venema 和 Dr. J. Kok 分别惠赠质粒 pMG36e 和菌株 *L. lactis* MG1363、*L. lactis* IL 1403,在此表示感谢。

参考文献

- [1] Klijn N, Weerkamp A H, de Vos W M. *Appl Environ Microbiol*, 1995, 61(7):2771~2774.

- [2] Gasson M J. *J Bacteriol*, 1983, **154**:1~9.
- [3] Chopin A, Chopin M C, Moillo A. *Plasmid*, 1984, **11**:260~263.
- [4] Bethesda Research Laboratories. *Bethesda Res Lab Focus*, 1986, **8**(2):9
- [5] Van de Guchte M, Van der Vossen J M B M, Kok J. *Appl Environ Microbiol*, 1989, **55**:224~228.
- [6] 刘敬忠, 向 华, 胡 维等. 生物工程学报, 1998, **14**(4):384~388.
- [7] Sambrook J, Fritsch F F, Maniatis T. *Molecular Cloning: A laboratory manual*. Second edition. New York: Cold Spring Harbor laboratory press, 1989.
- [8] Lee A B, Cooper T A. *Bio Techniques*, 1995, **18**(2):225~226.
- [9] Wells J M, Willson P W, Le Page R W F. *J Appl Bacteriol*, 1993, **74**:629~636.
- [10] Van de Guchte M, Kok J, Venema G. *Mol Gen Gener*, 1991, **227**:65~71.
- [11] Van Asseldonk M, Ruffen G, Oteman M. *Gene*, 1991, **59**:155~160.
- [12] Van Asseldonk M, Simons A, Visser H. *J Bacteriol*, 1993, **175**:1637~1644.

EXPRESSION IN *LACTOCOCCUS LACTIS* OF CATALYTICALLY ACTIVE PHENYLALANINE AMMONIA-LYASE FROM PARSLEY

Xiang Hua Liu Jingzhong Hu Wei Zhu Jin Zhu Zhangling

(Beijing Red Cross Chaoyang Hospital, Beijing 100020)

Abstract The phenylalanine ammonia-lyase (PAL) cDNA of parsley (*Petroselinum crispum*) was subcloned into constitutive expression vector pMG36e downstream of the P32 promoter. The resulting plasmid pMG36ePAL was introduced into *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* MG1363 by electroporation. The recombinant strain showed its PAL activity converting the L-phenylalanine in the culture medium into trans-cinnamic acid. A new secretory vector pXHS was constructed by recombination of pMG36e with a Lactococcal usp45 secretion leader coding sequence and a translational coupling sequence. Then the pXHSPAL was constructed and used for expression of PAL in *L. lactis*, the PAL activity was also detectable. The *L. lactis* dnaJ promoter sequence was cloned and used to construct a heat inducible vector pXHJ. PAL cDNA was cloned into pXHJ and the *L. lactis* IL1403 was transformed with the recombinant plasmid pXHJPAL. After a heat shock from 30°C to 37°C, the PAL activity of the pXHJPAL strain could increase approximately onefold. The prospect of using these engineering *L. lactis* strains for PKU therapy was also discussed.

Key words Phenylalanine ammonia-lyase (PAL), Gene expression, *Lactococcus lactis*, Phenylketonurea (PKU).

• Project Granted by Beijing National Natural Science Fund (No. 7952012)