



DOI:10.13364/j.issn.1672-6510.20140008

瑞替普酶在乳酸乳球菌中的表达

何影影, 罗学刚, 倪萌, 马德云, 王重喜, 张同存

(工业发酵微生物教育部重点实验室, 天津市工业微生物重点实验室, 天津科技大学生物工程学院, 天津 300457)

摘要: 为建立溶栓药物瑞替普酶(rPA)的乳酸菌表达系统,从实验室前期构建的大肠杆菌表达质粒 pET22b-*rpa* 上扩增出目的基因 *rpa*,将该基因与乳酸菌表达质粒 pCYT 连接,构建了 pCYT-*rpa* 质粒.此外,为提高 rPA 在乳酸乳球菌 NZ9000 中的稳定性,同时构建了 *rpa* 位于葡萄球菌(*Staphylococcal*)耐热核酸酶基因 *nuc* 下游融合表达的重组质粒 pCYT-*nuc-rpa*.将质粒 pCYT-*rpa* 和 pCYT-*nuc-rpa* 分别电转化至乳酸乳球菌 NZ9000 中,经 Nisin 诱导表达,Western blot 结果显示 Nuc 可提高 rPA 在乳酸乳球菌中的稳定性,从而增加了 rPA 在乳酸菌中的表达量.重组 rPA 及 Nuc-rPA 在复性后均具有溶栓活性,活性分别为 800 U/L 和 1 000 U/L.

关键词: 瑞替普酶(rPA); Nuc; 乳酸乳球菌; 表达

中图分类号: Q786

文献标志码: A

文章编号: 1672-6510(2015)01-0019-06

Expression of Reteplase in *Lactococcus lactis*

HE Yingying, LUO Xuegang, NI Meng, MA Deyun, WANG Chongxi, ZHANG Tongcun

(Key Laboratory of Industrial Fermentation Microbiology, Ministry of Education, Tianjin Key Laboratory of Industrial Microbiology, College of Biotechnology, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China)

Abstract: To establish an expression system of reteplase (rPA) in *lactic acid bacteria* (LAB), *rpa* gene was amplified from pET22b-*rpa*, a recombinant plasmid constructed in our previous study. After that, the PCR product was ligated with *Lactococcus lactis* expression vector pCYT, which resulted in the recombinant plasmid pCYT-*rpa*. In order to improve the stability of rPA protein in *L. lactis* NZ9000, the *rpa* gene was also inserted into the downstream of thermostable Nuclease (Nuc) tag of *Staphylococcal* in the vector pCYT. The obtained recombinant plasmids pCYT-*rpa* and pCYT-*nuc-rpa* were respectively introduced into *L. lactis* NZ9000 through electroporation. After being induced by Nisin, the Western blot was performed and the result showed that the Nuc did improve the stability of rPA protein in *L. lactis*, suggesting that Nuc-fusion could enhance the production of rPA in *L. lactis*. After being refolded, both recombinants rPA and Nuc-rPA exhibited thrombolysis activity, and the activities were 800 U/L and 1 000 U/L.

Key words: reteplase (rPA); Nuc; *Lactococcus lactis*; expression

瑞替普酶(reteplase, rPA)是人组织纤溶酶原激活剂(tissue type plasminogen activator, tPA)的截短突变体,是一种单链、非糖基化的蛋白.其保留了 tPA 的 Kringle 2 区和 S 区,保留了与纤维蛋白结合以及激活纤维蛋白酶原生物活性的能力. rPA 属于第三代溶栓药,具有体内半衰期长、溶栓活性高、不良反应小等优点^[1-2].

目前,科研工作者已经在多种表达系统中对 rPA

的重组表达进行研究,但其效果均不甚理想:大肠杆菌细胞壁脂多糖是药品内毒素的主要来源, rPA 单剂量通常又是其他重组蛋白如 rhGCSF、INFa2b 的 30 倍以上,因而对 rPA 大肠杆菌重组产品的纯度及内毒素控制要求非常高.这造成生产后期纯化工艺复杂,药物成本增加^[3-4].而用酵母及哺乳动物细胞等真核表达系统表达 rPA 时,则时常由于发生错误的糖基化而造成其生物活性受到影响^[5],而且真核表达

收稿日期: 2014-01-17; 修回日期: 2014-05-22

基金项目: 国家高技术研究发展计划(863 计划)资助项目(2012AA022108, 2012AA021505); 教育部“长江学者和创新团队发展计划”资助项目(IRT1166)

作者简介: 何影影(1987—),女,河北石家庄人,硕士研究生; 通信作者: 张同存,教授, tony@tust.edu.cn.

系统成本较高、生产周期长、产率较低,也使其难以很好地用于实际生产。

乳酸菌(lactic acid bacteria, LAB)是公认对人体安全的(generally regard as safe, GRAS)食品级微生物。利用乳酸菌表达系统重组表达蛋白质多肽类药物可以有效提高产品的安全性,并可以一定程度上简化后期纯化工艺。为建立 rPA 的乳酸菌表达系统,本研究将 *rpa* 基因亚克隆至乳酸菌表达质粒 pCYT。同时,为了提高 rPA 在乳酸菌 NZ9000 中的稳定性,将 rPA 与葡萄球菌(*Staphylococcal*)耐热核酸酶(nuclease, Nuc)进行了融合表达,为 rPA 的基因工程生产提供了新的思路与研究基础。

1 材料与方法

1.1 菌株及质粒

Escherichia coli DH5 α 由本实验室保存,质粒 pET22b-*rpa* 为本实验室前期构建^[6-7],乳酸菌表达质粒 pCYT(含 *nuc* 标签)及宿主菌株 *Lactococcus lactis* NZ9000 由本实验室保存。

1.2 培养基与培养方法

LB 液体培养基:称取胰蛋白胨 10 g、酵母提取物 5 g、NaCl 10 g,加入 800 mL 去离子水溶解,调 pH 至 7.4,定容至 1 L。121 °C 高压蒸汽灭菌 20 min。

GM17 液体培养基:称取 M17 培养基 42.3 g、葡萄糖 5 g,加入 800 mL 去离子水溶解,调 pH 至 7.4,

定容至 1 L。115 °C 高压蒸汽灭菌 20 min。

恢复培养基:称取 M17 培养基 42.3 g、葡萄糖 5 g、MgCl₂ 4.07 g、CaCl₂ 0.22 g,加入 800 mL 去离子水溶解,调 pH 至 7.4,定容至 1 L。115 °C 高压蒸汽灭菌 20 min。

Escherichia coli DH5 α 用 LB 液体培养基,37 °C、200 r/min 振荡培养;*Lactococcus lactis* NZ9000 用 GM17 液体培养基,30 °C 静置培养。

氯霉素的使用质量浓度为 10 μ g/mL。

1.3 试剂与仪器

限制性内切酶 *Nsi* I、*Hind* III、*Sal* I、T4 DNA 连接酶、RNase-Free DNaseI, Fermentas 公司;*Pfu* DNA 聚合酶、DNA 回收试剂盒,康为试剂公司;*EasyTaq* DNA 聚合酶,全式金生物技术有限公司;质粒提取试剂盒,索来宝公司;Nisin, Sigma 公司;M17 培养基,青岛海博公司;RNA 提取试剂盒,Invitrogen 公司;RNA 酶抑制剂,上海生工生物工程有限公司;tPA 抗体,abcam 公司;rPA 标准品,中国食品药品检定研究院;实验所用其他试剂为市售国产分析纯试剂。

紫外可见分光光度计, Thermo 公司;电击转化仪、蛋白质电泳装置, BioRad 公司。

1.4 乳酸菌表达质粒的构建

以实验室前期构建的大肠杆菌表达质粒 pET22b-*rpa* 为模板,根据 *rpa* 基因序列和 pCYT 上多克隆位点设计引物,引物信息见表 1。

表 1 PCR 引物信息

Tab. 1 Primers used in this research

引物用途	引物名称	引物序列	长度/bp
<i>rpa</i> 全长基因扩增	P1	5'-CCAATGCATCAATGTCTTACCAAGGAAACAGTG-3'	1 073
	P2	5'-CGCAAGCTTTTACGGTCGCATGTTGTCAC-3'	
	P3	5'-CGCAAGCTTTAGAAAATCTTTATTTTCAAGGATC TTACCAAGGAAACAG-3'	1 091
	P4	5'-CGCGTCTGACTTACGGTCGCATGTTGTC-3'	
16S rRNA RT-PCR 分析	16S F	5'-TGGTAGTCCACGCCGTA AAC-3'	199
	16S R	5'-TGTC AAGACCTGGTAAGGTTC-3'	
<i>rpa</i> RT-PCR 分析	<i>rpa</i> -RT F	5'-TTCTCTCTGCCGCCACTGCTT-3'	169
	<i>rpa</i> -RT R	5'-GCAATGTCATTGTCGTAAGTG-3'	

以质粒 p22b-*rpa* 为模板,进行 PCR 扩增 *rpa* 基因。其中 pCYT-*rpa* 的构建以 P1、P2(下划线分别为:*Nsi* I 和 *Hind* III 酶切位点)为引物,PCR 反应条件为:94 °C 预变性 5 min,94 °C 变性 45 s,60 °C 退火 45 s,72 °C 延伸 2 min,共循环 30 次,72 °C 延伸 10 min。将

PCR 产物与表达载体 pCYT 分别用限制性内切酶 *Nsi* I 和 *Hind* III 双酶切后(pCYT 上原有的 *nuc* 标签将被切除),通过琼脂糖胶电泳纯化,经 T4 连接酶 16 °C 连接。pCYT-*nuc-rpa* 的构建以 P3、P4(下划线分别为:*Hind* III 和 *Sal* I 酶切位点)为引物,PCR 反应条

件与上述条件相同, 扩增获得目的基因 *rpa*. 将连接产物转化大肠杆菌感受态细胞 DH5 α , 涂布于含 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 氯霉素的 LB 平板, 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 12 h. 次日挑取单菌落增菌, 提取质粒进行双酶切后电泳鉴定, 送至 Invitrogen 公司测序.

1.5 rPA 的诱导表达

将测序正确的重组质粒 pCYT-*rpa* 和 pCYT-*nuc-rpa* (图 1) 电转化表达菌株乳酸乳球菌 NZ9000 的感受态细胞, 电转化条件为: 电压 2 000 V、电容 25 μF 、电阻 200 Ω , 电击后迅速加入 1 mL 恢复培养基, 30 $^{\circ}\text{C}$ 恢复培养 2 h, 涂布于含 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 氯霉素的 GM17 固体平板, 30 $^{\circ}\text{C}$ 厌氧培养 48 h. 挑取单菌落, 进行 PCR 验证. 将含有目的基因的重组菌 30 $^{\circ}\text{C}$ 厌氧过夜培养, 第 2 天以 4% 的接种量转接于 10 mL GM17 液体培养基中, 30 $^{\circ}\text{C}$ 静置培养至 $A_{600} = 0.4$ 时, 加入诱导剂 Nisin 至终质量浓度为 10 $\mu\text{g}/\text{L}$, 30 $^{\circ}\text{C}$ 诱导 2 h.

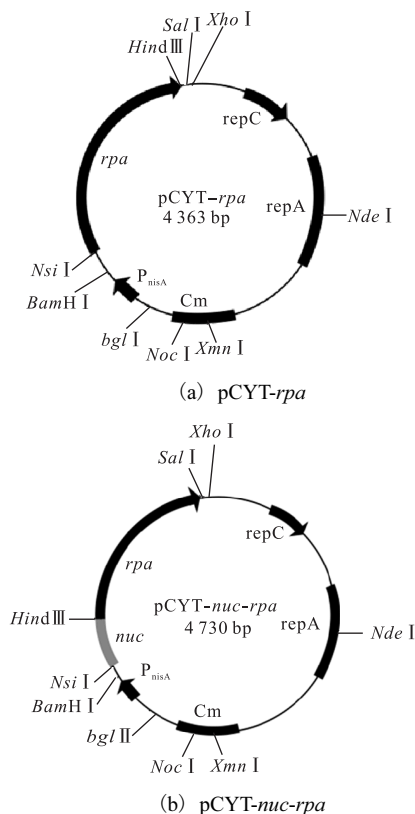


图 1 重组质粒 pCYT-*rpa* 和 pCYT-*nuc-rpa* 的结构示意图

Fig. 1 Schematic representation of recombinant plasmids pCYT-*rpa* and pCYT-*nuc-rpa*

1.6 RT-PCR 分析 *rpa* 基因的表达

1.6.1 乳酸菌总 RNA 的提取

离心收集 3 mL 诱导后的菌体, 用灭过菌的 TE

缓冲液洗涤 3 次, 最后用 200 μL TE 缓冲液吹悬菌体, 加入终质量浓度为 20 mg/mL 的溶菌酶, 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 30 min. 每管加入 0.5 mL Trizol, 室温放置 10 min, 使其充分裂解, 然后轻轻吹匀. 每管加入 100 μL 冰冷的氯仿, 手动颠倒 2 min, 室温放置 5 min. 4 $^{\circ}\text{C}$ 、13 000 r/min 离心 15 min. 吸取上层水相至另一个 EP 管中. 每管加入 250 μL 冰冷的异丙醇, 上下晃动 2 min, 冰上放置 10 min, -20 $^{\circ}\text{C}$ 放置 1 h, 沉淀 RNA. 4 $^{\circ}\text{C}$ 、13 000 r/min 离心 10 min. RNA 沉于 EP 管底部, 轻轻弃去上清液. 加入 500 μL 体积分数为 75% 的冰冷乙醇, 剧烈振荡 EP 管以悬浮沉淀, 4 $^{\circ}\text{C}$ 、13 000 r/min 离心 10 min. 轻轻弃去上清液, 打开 EP 管, 室温放置 10 min, 使残余的乙醇挥发. 每管加入 20 μL DEPC 处理过的水溶解 RNA 样品, 60 $^{\circ}\text{C}$ 放置 10 min. 将提取的 RNA 经紫外可见分光光度计测定浓度后, 加入 RNase-Free DNase I 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 消化 30 min 后, 利用随机六聚体引物, 经 M-MLV 逆转录酶反转录为 cDNA.

1.6.2 RT-PCR 检测 *rpa* 基因

依据 *rpa* 基因序列设计扩增引物 *rpa*-RT F 和 *rpa*-RT R; 以 *L. lactis* NZ9000 的 16S rRNA 作为 RT-PCR 反应的内参基因, 上游和下游引物分别为 16S F 和 16S R (表 1). RT-PCR 反应体系为: *EasyTaq* buffer (10 \times) 2.5 μL , dNTP 1.0 μL , 上游和下游引物 (10 $\mu\text{mol}/\text{L}$) 各 0.25 μL , cDNA 模板 1.0 μL , *EasyTaq* DNA 聚合酶 (5 U/ μL) 0.25 μL , Nuclease-Free water 19.25 μL , 总计 25.0 μL . 优化后的 PCR 反应条件为: 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min, 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 45 s, 56 $^{\circ}\text{C}$ 退火 45 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 20 s, 30 个循环, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min. 所有待测样品均设 3 个重复, 并用 Nuclease-Free water 代替模板作为阴性对照, 以乳酸菌 NZ9000 的 16S rRNA 作为 RT-PCR 的内参基因.

1.7 Western blot 鉴定表达产物

离心收集 5 mL 诱导后的菌体, 用 PBS 洗涤 3 次, 最后用 1 mL PBS 重悬菌体, 然后进行超声破碎. 取等量超声破碎液进行 SDS-PAGE 分析. SDS-PAGE 结束后, 将凝胶中的蛋白经半干转印至 NC 膜上; 转印结束后将 NC 膜浸于质量分数 5% 的脱脂乳溶液中进行封闭, 室温静置封闭 1 h; TBST 洗去脱脂乳, 用 tPA 兔源单克隆抗体作为第一抗体进行封闭 (一抗稀释比例为 1 : 800), 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜放置; TBST 洗 3 次, 每次 10 min; 辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔 IgG 作为第二抗体 (二抗稀释比例为 1 : 5 000), 避光

封闭 1 h, TBST 洗 3 次, 每次 10 min. 利用 Odyssey™ 近红外双色激光成像系统显色检测. 同时用 Quantity one 软件对 Western blot 条带的光密度进行分析, 并与 rPA 诱导 1 h 参比, 进行相对定量.

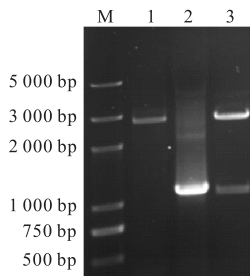
1.8 包涵体复性及活性测定

将菌体破碎液离心后取沉淀, 经洗涤液 (3 mol/L 尿素, 体积分数 0.6% 的 TritonX-100, 50 mmol/L Tris-HCl, 2 mmol/L EDTA, pH 8.0) 于摇床 4 °C 洗涤 1 h, 10 000 r/min 离心 20 min, 取沉淀. 然后用变性液 (8 mol/L 尿素, 100 mmol/L GSH, 50 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0) 吹悬, 于 100 r/min 摇床, 25 °C 变性 2 h, 10 000 r/min 离心 20 min 取上清液. 向上清液中加入等体积的 50 mmol/L Tris-HCl 将尿素浓度稀释至 4 mol/L, 然后加到透析袋中, 于复性液 (50 mmol/L Tris-HCl, 20 mmol/L 咪唑, 300 mmol/L NaCl, 2 mol/L 尿素, 3 mmol/L GSH, 0.6 mmol/L GSSG, pH 8.0) 中 4 °C 过夜进行透析复性. 最后, 采用目前使用最广泛的纤溶活性筛选方法——纤维蛋白平板法对样品的溶栓活性进行分析. 取 100 μL 复性后的 rPA 及 Nuc-rPA 蛋白样品, 分别点加于纤维蛋白板上, 37 °C 放置 12 h 进行溶栓活性分析^[8-9].

2 结果

2.1 rPA 乳酸菌表达载体的构建及鉴定

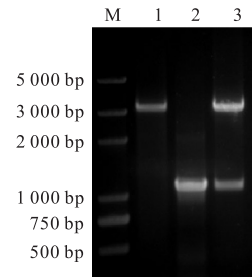
pCYT-rpa 和 pCYT-nuc-rpa 阳性克隆子经扩大培养、提取质粒后, 用相应的限制性内切酶对质粒进行酶切鉴定, 酶切结果均可看到大小约 1 100 bp 的片段 (图 2 和图 3), 与预期片段大小一致, 进一步通过序列测定, 确认了目的基因 rpa 正确克隆到 pCYT 表达载体中, 并具有正确的读码框.



M. DNA marker; 1. pCYT digested with *Nsi* I and *Hind* III; 2. gene *rpa*; 3. pCYT-rpa digested *Nsi* I with and *Hind* III

图 2 重组质粒 pCYT-rpa 酶切鉴定图

Fig. 2 Restriction enzyme digestion analysis of recombinant plasmid pCYT-rpa



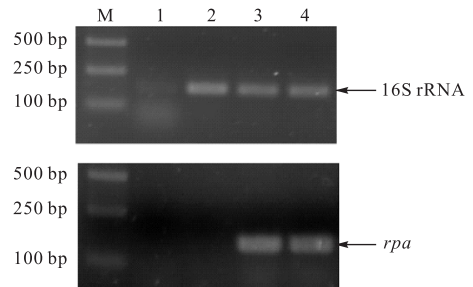
M. DNA marker; 1. pCYT digested with *Hind* III and *Sal* I; 2. gene *rpa*; 3. pCYT-nuc-rpa digested with *Hind* III and *Sal* I

图 3 重组质粒 pCYT-nuc-rpa 酶切鉴定图

Fig. 3 Restriction enzyme digestion analysis of recombinant plasmid pCYT-nuc-rpa

2.2 rpa 在重组 *L. lactis* NZ9000 中的转录水平分析

将提取的乳酸菌 RNA 逆转录成的 cDNA 进行 RT-PCR, 结果如图 4 所示. 由图 4 可知: 与 *L. lactis* NZ9000/pCYT 相比, *rpa* 重组菌 *L. lactis* NZ9000/pCYT-rpa 和 *L. lactis* NZ9000/pCYT-nuc-rpa 中可检测到 *rpa* mRNA, 表明外源基因 *rpa* 在两种重组菌中能够有效被转录.



M. DNA marker; 1. negative control; 2. *L. lactis* NZ9000/pCYT; 3. *L. lactis* NZ9000/pCYT-rpa; 4. *L. lactis* NZ9000/pCYT-nuc-rpa

图 4 乳酸菌 *L. lactis* NZ9000 中 *rpa* 转录的 RT-PCR 分析

Fig. 4 RT-PCR analysis of *rpa* transcription in *L. lactis* NZ9000

2.3 rPA 在重组 *L. lactis* NZ9000 中的表达水平分析

将提取的乳酸菌菌体蛋白进行 Western blot 及 Quantity one 半定量分析, 结果如图 5 所示. 由图 5 可知: 目的蛋白 rPA 和 Nuc-rPA 在两种重组乳酸乳球菌中均得到了有效的表达, 相对分子质量分别为 3.9×10^4 和 5.3×10^4 , 与预测的蛋白相对分子质量一致. 对比两种菌株在诱导 1 h 和诱导 2 h 时的蛋白表达量可知: 在 *L. lactis* NZ9000/pCYT-rpa 菌株中, 目的蛋白 rPA 在诱导 2 h 时比诱导 1 h 时表达量减少; 而融合了 Nuc 的菌株 *L. lactis* NZ9000/pCYT-nuc-rpa, 诱导 2 h 时的目的蛋白 Nuc-rPA 与 1 h 的相比表

达量增加,说明融合表达 Nuc 可降低胞内酶对 rPA 的降解,提高了 rPA 的稳定性.

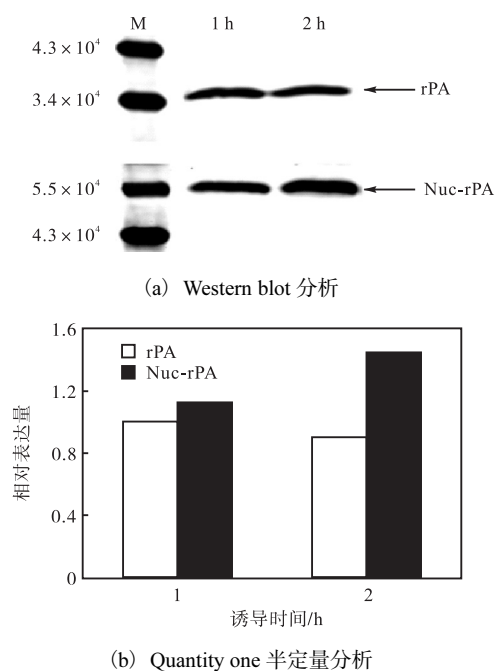
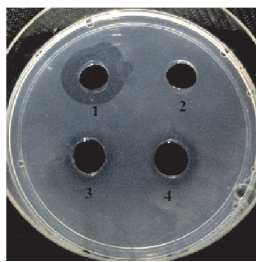


图5 乳酸菌 *L. lactis* NZ9000 中 rPA 和 Nuc-rPA 表达的分析

Fig. 5 Analysis of rPA and Nuc-rPA expression in *L. lactis* NZ9000

2.4 乳酸菌表达 rPA 及 Nuc-rPA 的溶栓活性分析

将复性后的 rPA 和 Nuc-rPA 点加于纤维蛋白板中进行活性分析,结果如图 6 所示.由图 6 可知:除 rPA 标准品外,重组 rPA 及 Nuc-rPA 在复性后均具有溶栓活性,活性分别为 800 U/L 和 1 000 U/L.而 pCYT 空质粒转化菌表达产物则没有溶栓活性.



1. rPA standard (50 000 U/mL); 2. *L. lactis* NZ9000/pCYT;
3. *L. lactis* NZ9000/pCYT-rpa; 4. *L. lactis* NZ9000/pCYT-nuc-rpa

图6 乳酸菌 *L. lactis* NZ9000 中 rPA 和 Nuc-rPA 表达活性分析
Fig. 6 Activities of rPA and Nuc-rPA in *L. lactis* NZ9000

3 讨论

乳酸菌作为基因工程表达菌株具有无内毒素、安全性好、遗传背景清楚、表达效率高、分泌特性好等

优点^[10-11].随着对其分子生物学的迅速发展,一系列乳酸菌基因表达载体和受体系统逐步建立. Nisin 诱导的基因表达系统(Nisin controlled gene expression system, NICE)是目前最为成功且应用最广的乳酸菌表达系统^[12]. NICE 系统是利用 nisinA 启动子和 nisK、nisR 基因构建的一系列表达载体和相应的宿主菌,1996 年起开始用于目的基因的表达研究.其中, nisinA 可以诱导其自身启动子进行转录,诱导效率在 1 000 倍以上,而调节因子 nisK 和 nisR 则是诱导过程中信号传导所必需的.此外,报道显示,乳酸菌 NICE 系统重组蛋白的合成可以达到很高的水平,能达到总胞内蛋白的 60%.由于 Nisin 诱导表达系统的诱导物和宿主菌都是食品级的,因此利用该系统表达具有临床应用价值的多肽或蛋白,可提高产品安全性,并简化表达产物的后处理工艺^[13].国外研究已成功在乳酸乳球菌中表达了葡萄糖苷酶、脂肪酶等多种生物活性酶^[14-15].

在乳酸菌异源蛋白的表达研究方面,人们已开发了多种表达目的蛋白的基因工具,其中葡萄球菌耐热 Nuc 由于很方便于生化分析,可作为一个报告蛋白监测蛋白质靶定和构象状态^[16].同时 Nuc 具有很高的稳定性,与异源蛋白融合表达时可以降低胞内酶对目的蛋白的降解,并且不会影响目的蛋白的活性,因此, Nuc 是一种非常理想的融合蛋白表达标签^[17]. Bermúdez-Humarán 等^[18]研究表明,在乳酸乳球菌中将 E7 与 Nuc 融合表达可以显著提高 E7 表达产物的稳定性,使表达产量得到显著提高,而未与 Nuc 融合的林 7 则易被胞内酶分解.鉴于此,本研究构建了两种 rPA 表达质粒 pCYT-rpa 和 pCYT-nuc-rpa, Western blot 分析结果显示,目的蛋白 rPA 和 Nuc-rPA 均获得表达,将 rPA 与 Nuc 进行融合表达可降低胞内酶对 rPA 的降解,提高了 rPA 的稳定性.溶栓活性实验结果显示,融合表达 Nuc 并没有影响 rPA 的活性,并且,由于提高了 rPA 的表达量使得溶栓活性也增加了.

参考文献:

- [1] Noble S, McTavish D. Reteplase: A review of its pharmacological properties and clinical efficacy in the management of acute myocardial infarction[J]. *Drugs*, 1996, 52(4): 589-605.
- [2] Davidson S. New clot busters threaten Genentech's tPA[J]. *Nature Biotechnology*, 1997, 15(5): 405.
- [3] Kohnert U, Rudolph R, Verheijen J H, et al. Biochemical

- properties of the kringle 2 and protease domains are maintained in the refolded t-PA deletion variant BM 06.022[J]. *Protein Engineering*, 1992, 5(1): 93–100.
- [4] 邓长江, 刘向勇, 鲍晓明. 分泌性表达人 rPA 毕赤酵母工程菌株的构建及发酵条件的初步优化[J]. *山东大学学报: 理学版*, 2004, 39(5): 107–111.
- [5] Ebert K M, Selgrath J P, DiTullio P, et al. Transgenic production of a variant of human tissue-type plasminogen activator in goat milk: Generation of transgenic goats and analysis of expression[J]. *Nature Biotechnology*, 1991, 9: 835–838.
- [6] Luo X G, Tian W J, Ni M, et al. Soluble expression of active recombinant human tissue plasminogen activator derivative(K2S) in *Escherichia coli*[J]. *Pharmaceutical Biology*, 2011, 49(6): 653–657.
- [7] 田文静, 罗学刚, 吕丽慧, 等. 乳糖诱导瑞替普酶在大肠杆菌中的可溶性表达[J]. *中国生化药物杂志*, 2011, 32(5): 341–348.
- [8] Deogny L, Weidenbach A, Hampton J W. Improved fibrin plate method for fibrinolytic activity measurements: Use of bentonite precipitation and agar solidification[J]. *Clinica Chimica Acta*, 1975, 60(1): 85–89.
- [9] 李华, 陈陵霞, 许瑞安. 纤溶活性的药理学测定方法研究[J]. *中国临床药理学与治疗学*, 2008, 13(9): 1066–1070.
- [10] Bolotin A, Wincker P, Mauger S, et al. The complete genome sequence of the lactic acid bacterium *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* IL1403[J]. *Genome Research*, 2001, 11(5): 731–753.
- [11] Mierau I, Kleerebezem M. 10 years of the nisincontrolled gene expression system (NICE) in *Lactococcus lactis*[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2005, 68(6): 705–717.
- [12] 向华, 张亦清, 卫文仲, 等. 人谷胱甘肽硫转移酶 A1 在乳酸乳球菌中的表达及活性研究[J]. *微生物学报*, 2000, 40(2): 132–138.
- [13] 孙超, 陈秀珠, 还连栋, 等. 多肽抗生素 apidaecin 基因在乳酸乳球菌中的融合表达[J]. *生物工程学报*, 2001, 17(1): 20–23.
- [14] Giuliano M, Schiraldi C, Marotta M R, et al. Expression of *Sulfolobus solfataricus* α -glucosidase in *Lactococcus lactis*[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2004, 64(6): 829–832.
- [15] Drouault S, Corthier G, Ehrlich D S, et al. Expression of the *Staphylococcus hyicus* lipase in *Lactococcus lactis* [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2000, 66(2): 588–598.
- [16] 徐波, 曹郁生, 陈燕, 等. 乳酸乳球菌 NICE 系统食品级分泌表达载体 pRNV48 的构建及铜绿假单胞菌融合外膜蛋白的表达[J]. *江西农业大学学报*, 2006, 28(5): 745–752.
- [17] Ravn P, Arnau J, Madsen S M, et al. The development of TnNuc and its use for the isolation of novel secretion signals in *Lactococcus lactis*[J]. *Gene*, 2000, 242(1/2): 347–356.
- [18] Bermúdez-Humarán L G, Langella P, Miyoshi A, et al. Production of human papillomavirus type 16 E7 protein in *Lactococcus lactis*[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2002, 68(2): 917–922.

责任编辑: 周建军