

苯丙氨酸脱氨酶在乳酸乳球菌 NICE 系统的高效表达 及其实验动物研究

张晶 刘敬忠* 谭淑珍 贾兴元 周艳

(首都医科大学附属北京朝阳医院基础医学研究中心,北京市基因诊断实验室,北京 100020)

摘 要 为构建苯丙氨酸脱氨酶的一种更新更高表达的基因工程菌,取得治疗高苯丙氨酸血症大鼠的更佳疗效。将欧芹 PAL cDNA 重组到质粒 pNZ8048 中,构建翻译融合载体和转录融合载体,分别转化乳酸乳球菌 NZ9000。对两种高效表达菌株的酶活性差异进行比较,观察 Nisin 诱导的动态进程,并利用新鲜培养的 μ (NZ8048-PAL)/NZ9000 工程菌进行了高苯丙氨酸血症大鼠(称 PKU 动物模型)的治疗实验。结果表明(1)翻译融合型菌株具有更高的酶活性(2)当 Nisin 的诱导时间达 6h 时,产物肉桂酸生成量基本达到峰值(3)给高苯丙氨酸血症大鼠灌喂新鲜培养的 μ (NZ8048-PAL)/NZ9000 工程菌(翻译融合型),观察到该工程菌能显著降低模型动物血中 Phe 浓度,从而取得了更好的疗效。

关键词 苯丙酮尿症,乳酸乳球菌,NICE 表达系统,基因治疗

中图分类号 Q786 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2002)06-0713-05

经典型苯丙酮尿症(以下简称 PKU)是由于苯丙氨酸羟化酶(PAH)基因缺陷引起肝细胞内 PAH 严重缺乏所致的常染色体隐性遗传病。由于 PAH 缺陷,来自膳食及体内循环再利用的苯丙氨酸就不能正常代谢成酪氨酸,因而患者体内有 Phe 及其不正常代谢产物大量积累,后者损伤患儿脑细胞正常发育而导致智力低下、呆傻。现行治疗方法是低苯丙氨酸饮食疗法,但此法要求严格限制天然蛋白的摄取,不但价格昂贵,而且病人难以长期接受^[1]。国际上自 80 年代初开始酶法治疗 PKU,但由于酶用量大,价格昂贵等诸多原因,尚未见有用于 PKU 病人的临床报导。因而,PKU 的基因治疗是一个颇具吸引力的研究方向。国际上多采用逆转录病毒和重组腺病毒载体介导的方法,来实现 PAH 在 PKU 模型小鼠的肝细胞表达。但主要问题是转移效率低,免疫原性强,因而外源基因在细胞中只能短期表达^[2]。

本研究是在我室过去研究的基础上^[3],利用一种新的乳链杆菌肽诱导表达系统——载体 pNZ8048 及其相应菌株乳酸菌 NZ9000 来完成欧芹 PAL cDNA 的高效诱导表达,并将该基因工程菌用于 PKU 模型

大鼠的治疗实验,使之在大鼠小肠中表达出有活性的 PAL 酶,将食品中的 Phe 脱氨,转化成对人体无害的肉桂酸,从而降低外周血中 Phe 浓度,达到治疗 PKU 的目的。

1 材料与方 法

1.1 质粒与菌株

质粒 pBS-PAL 含有 PAL-cDNA 基因,由向华博士构建^[4];质粒 pNZ8048 和乳酸菌 NZ9000 购自荷兰 NIZO 研究所。pNZ8048 是一种具有广泛宿主范围的载体,可在乳酸乳球菌和大肠杆菌中复制,它带有氯霉素(Cm)抗性筛选标记;L. lactis NZ9000 由泛素缺陷型菌株 MG1363 衍生而来,其染色体上整合有 nisK 和 nisR 基因;E. coli MC1061 用于重组载体的克隆和大量 DNA 制备。

1.2 翻译融合型载体 μ (NZ8048-PAL) 的构建

以质粒 pBS-PAL 为模板,设计合成 P62' 和 P63 引物用于分离扩增 PAL-cDNA:P62':5' GAG AAC GGT AAC GGT GCA ACT AC 3',P63:5' CTA AGA TCT AGA GCA TGT CAG TTA AC 3'。利用 PCR 方法

从质粒 pBS-PAL 中扩增出 PAL cDNA 全部编码区,并在其 3' 末端引入 *Xba*I 酶切位点。扩增出的 PAL cDNA 片段经 T4 DNA 聚合酶处理后,再用 *Xba*I 酶切,回收 2.2kb 片段。载体 pNZ8048 用 *Nco*I 酶切,然后用 DNA 聚合酶 I Klenow 大片段补平,再用 *Xba*I 酶切,回收 3.3kb 片段。上述 3.3kb 载体片段与制备好的 PAL cDNA 片段连接,转化感受态 *E. coli* MC1061 细胞,筛选得到翻译融合型重组载体 p(NZ8048-PAL)₁ 阳性克隆株。

1.3 转录融合型载体 p(NZ8048-PAL)₂ 的构建

仍以质粒 pBS-PAL 为模板,设计 P62 和 P63 引物用于分离扩增 PAL-cDNA, P62: 5' GGG GTA CCA AAT GGA GAA CGG 3'。P63 同 1.2 中 P63 序列。利用 PCR 方法从质粒 pBS-PAL 中扩增出 PAL cDNA 编码区,并在其 5' 端引入 *Kpn*I 酶切位点,3' 端引入 *Xba*I 酶切位点。扩增出的 PAL cDNA 片段经 *Kpn*I 和 *Xba*I 双酶切, pNZ8048 DNA 经 *Kpn*I 和 *Xba*I 双酶切,然后将 PAL cDNA 片段与载体片段连接,转化 *E. coli* MC1061 细胞,筛选得到转录融合型重组载体。

1.4 电穿孔转化乳酸乳球菌

感受态 *L. lactis* (*L. L*) NZ9000 的制备按文献 [5] 进行。电穿孔用 EquiBio Easyject 细胞打孔仪进行 (2.5kV, 25 μ F, 400 Ω), 恢复培养基用 SGM₁₇ MC, 固体培养基用 SGM₁₇ P + agar (+ Cm), 30 $^{\circ}$ C 厌氧培养 72h。

1.5 菌落 PCR 法鉴定阳性克隆

设计下列引物用于快速鉴定含有 PAL cDNA 片段插入并且方向正确的阳性克隆: Pnis: 5' GAT ACA ATG ATT ACG TTC GAA G 3', P63: 同 1.2 中 P63 序列。PCR 扩增反应按文献 [6] 进行。

1.6 PAL 蛋白在乳酸乳球菌中的诱导表达及活性分析

1.6.1 PAL 蛋白的 SDS-PAGE 检测: 培养菌液至 $OD_{600} = 0.5 \sim 0.6$ 时, 加入诱导物 Nisin (乳链杆菌肽) 至终浓度 50ng/mL, 继续在 30 $^{\circ}$ C 培养 3~4h 后, 按常规方法上样电泳 [7]。以空载体 L.L 为对照。

1.6.2 工程菌 PAL 酶活性分析: 培养菌液至 $OD_{600} = 0.5 \sim 0.6$ 时, 加入 Nisin 至终浓度 50ng/mL, 继续培养 3h。经过样品处理后, HPLC 法测 Phe 被 PAL 脱氨后产生的肉桂酸含量, 方法详见 [3]。

1.6.3 不同诱导时间 PAL 酶活性的监测: 为了观察 PAL 酶活性的动态情况, 选 3 株活性较高的工程

菌, 分别在加入 Nisin (终浓度 50ng/mL) 后 2h, 6h, 14h 终止培养。取菌液用 HPLC 法测产物肉桂酸含量。

1.7 高苯丙氨酸血症大鼠模型的治疗实验

1.7.1 基因工程菌口服悬液制备: 培养菌液至 $OD_{600} = 0.5 \sim 0.6$ 时, 加 Nisin 至终浓度 50ng/mL, 继续培养 6h。终止培养, 将菌液离心, 弃上清后加入适量的培养基使其浓缩 10 倍 (使活菌数达 10^{10} / mL), 以此作为工程菌口服悬液。

1.7.2 采用 Wistar 雄性大鼠, 体重 140~170g。从第 1~3 天连续 3 天, 每天 1 次腹腔注射 p-CR (对-氯苯丙氨酸甲酯) 300mg/kg 体重及 Phe 100mg /kg 体重 [8]。第 4~12 天, 每天灌喂 1 次 50mg/2mL 的 Phe 溶液。从第 1 天到第 12 天, 治疗组 (15 只) 每天喂一次含活菌数达 10^9 的 PAL L.L 工程菌培养液 (翻译融合型工程菌); 对照组 (15 只) 每天喂一次含空载体 pNZ8048 的 L.L. 新鲜菌悬液。于治疗第 1、5、9、13 天取大鼠尾尖血, HPLC 法测定 Phe 含量。

1.7.3 统计学处理方法, 采用 *t* 检验, 在 SPSS 软件包上完成。

2 结 果

2.1 菌落 PCR 法筛选鉴定阳性克隆

PCR 技术快速筛选阳性克隆的电泳结果, 见图 1 3 4 7 9 号有 2.2kb 扩增带, 为阳性克隆。这些阳性克隆后来用内切酶图谱法和 DNA 测序方法得到了证实。

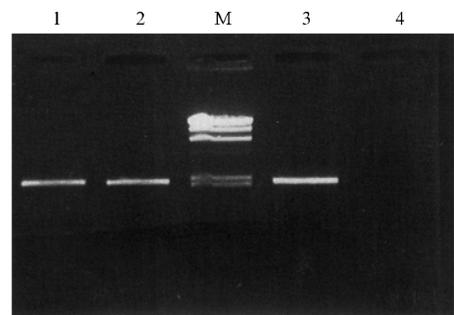


图 1 菌落 PCR 法鉴定重组阳性克隆

Fig. 1 The positive clones detected by bacteria clones PCR
M. λ -DNA/*Hind* III; 1. 2. Different clones; 3. Positive control; 4. Negative control

2.2 PAL 在乳酸乳球菌中的诱导表达及活性研究

2.2.1 PAL 蛋白的 SDS-PAGE 检测: 图 2 是一张 SDS-PAGE 电泳图。与 pNZ8048 空质粒转化菌比较, 经 Nisin 诱导的 p(NZ8048-PAL)₁/NZ9000 转化菌和

$p(NZ8048-PAL)_2$ /NZ9000 转化菌在分子量 78kD 处均出现一条蛋白条带,这一分子量与基因表达产物理论值相符。另外 $p(NZ8048-PAL)_1$ /NZ9000 转化菌与 $p(NZ8048-PAL)_2$ /NZ9000 转化菌相比较,前者表达的 78kD 条带比后者明显更浓。经密度扫描结果表明,前者 PAL 表达量占总蛋白的 5.16%,后者 PAL 表达量占总蛋白的 2.76%。

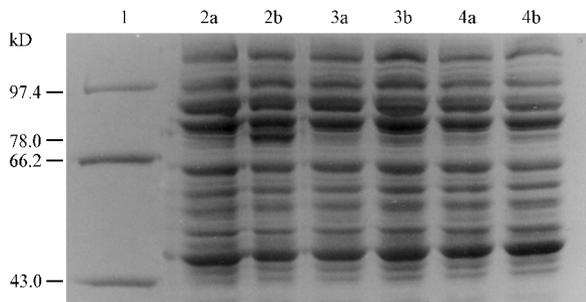


图 2 两种工程菌在乳酸菌 NZ9000 中的 SDS-PAGE 电泳分析

Fig. 2 SDS-PAGE analysis of extracts of strain NZ9000

containing pNZ(8048-PAL)₁ or pNZ(8048-PAL)₂

1. Marker; 2a. Uninduced pNZ(8048-PAL)₁/NZ9000 cells; 2b. Induced pNZ(8048-PAL)₁/NZ9000 cells; 3a. Uninduced pNZ(8048-PAL)₂/NZ9000 cells; 3b. Induced pNZ(8048-PAL)₂/NZ9000 cells; 4a. Uninduced pNZ8048/NZ9000 cells; 4b. Induced pNZ8048/NZ9000 cells

2.2.2 $p(NZ8048-PAL)_1$ /NZ9000(翻译融合型)与 $p(NZ8048-PAL)_2$ /NZ9000(转录融合型)酶活力之比较 通过 HPLC 法检测培养液中有无 PAL 酶反应产物肉桂酸,可证明菌株有无 PAL 活性。结果两种培养液的 HPLC 分析图谱中均出现一个与标准肉桂酸 HPLC 图谱相同时间的吸收峰,表明两种工程菌均可催化 Phe 生成肉桂酸。经过 Nisin 3h 诱导后,转录融合型所测结果 Cin 为 22.492mg/100mL,其 Phe 转化率为 9.00%;翻译融合型工程菌所测结果 Cin 为 37.912mg/100mL,其 Phe 转化率为 15.16%。可以看出翻译融合型工程菌的酶活性较转录融合型高一些。

2.2.3 不同诱导时间 PAL 酶活性监测结果:取两种工程菌(培养基中含有 2.5mg/mL 的 Phe),观察其在加入诱导物 Nisin 后 2h,6h,14h 的产物肉桂酸的生成情况,如表 1 所示。

结果表明,随着时间延长,Cin 浓度进行性升高,当诱导时间达 6h 后,肉桂酸生成量基本达到高值。另外,比较两种工程菌的 PAL 酶活性,仍然是翻译融合型高于转录融合型,这一结果与 2.2.2

是一致的。

表 1 两种工程菌不同诱导时间的 Cin 生成情况(HPLC 结果)

Table 1 The product of cin by two kinds of engineering strains on different inducing times(HPLC results)

	2 hours	6 hours	14 hours
pNZ8048/NZ9000 strain	0.000	0.002	0.001
$p(NZ8048-PAL)_1$ /NZ9000 strain	8.811	39.751	29.211
$p(NZ8048-PAL)_2$ /NZ9000 strain	6.604	26.321	18.465

Note : mg/100mL

2.3 高苯丙氨酸血症动物模型的治疗实验结果

动物实验结果见表 2 和图 3。第 1 天(处理前)各组基本一致;第 5 天,两组均值虽有差异,但 $P = 0.1055 > 0.05$,统计学处理显示无明显差异;第 9 天,对照组血中 Phe 浓度平均值 4.998 ± 3.01 ,治疗组血中 Phe 浓度平均值 2.62 ± 0.390 ,治疗组明显低于对照组,统计学检验 $P = 0.012 < 0.05$,两组有显著性差异;第 12 天,治疗组血 Phe 平均浓度 1.056 ± 0.40 ,对照组血 Phe 平均浓度 2.987 ± 1.065 ,治疗组血 Phe 浓度明显低于对照组。经统计学处理二组有非常显著的差异($P = 0.0001 < 0.01$)。

本次实验,共死亡了 2 只大鼠,其中 1 只属于对照组,一只属于治疗组。

3 讨论

我们所用的乳酸菌表达系统是目前国际上最新发展的一种高度通用、食品级的 NICE 系统(Nisin-Controlled Expression system)。它包括三种必要的组成成分(1)能表达 NisR 基因到一定水平的革兰氏阳性细菌 NZ9000(2)含 NisA 启动子片段的质粒载体(3)Nisin 诱导物,在这里 Nisin 作为自身结构基因转录激活的信号分子^[9]。当带有 NisA 启动子及 PAL 基因的质粒 pNZ8048-PAL 导入不能产 Nisin 但含有 NisR 和 NisK 蛋白的乳酸菌菌株 NZ9000 后, PAL 基因以很低的水平表达。这种表达水平检测不到。当细菌达到对数生长期时向培养基中加入 Nisin 后,位于 NisA 启动子下游的 PAL 基因被激活转录,表达出所需的苯丙氨酸脱氨酶蛋白。该诱导表达系统具有以下优点:食品级的诱导物和宿主菌,严谨性高,本底表达水平低,诱导效率高,表达产量高。

PAL 酶可将苯丙氨酸代谢生成肉桂酸,而苯丙氨酸又是工程菌生长所必需的营养物质。因此 PAL 酶本身对于宿主菌而言,可能是一种“毒性”蛋白,它的表达活性与工程菌本身的生长繁殖之间有矛盾。

组成型工程菌株,就不可避免地受到这一矛盾的制约。本研究采取 *nisin* 诱导表达的方式,使细菌的生长与外源基因的表达分开成为两个阶段,从而减轻

宿主细胞的代谢负荷,增加了基因工程菌的生长速度和蛋白产量。

表 2 不同时间各组大鼠血中 Phe 浓度

Table 2 The blood Phe concentration of each group on different days

(mg/100mL)

	The 1th day		The 5th day		The 9th day		The 12th day		
	Control	Therapy	Control	Therapy	Control	Therapy	Control	Therapy	
1		1.306	1.285	45.349	64.512	9.473	2.802	2.727	0.842
2		1.419	1.479	/	56.602	/	2.470	/	2.149
3		0.907	1.231	48.361	47.448	4.241	2.777	4.193	1.226
4		1.244	1.450	26.742	42.209	11.384	3.055	2.005	1.581
5		0.994	1.243	9.368	/	3.124	/	1.975	/
6		1.307	1.319	23.142	15.876	7.412	2.263	1.786	0.924
7		1.548	0.767	8.574	7.206	7.925	2.750	2.434	1.299
8		1.410	1.002	22.966	46.135	2.993	1.778	4.801	0.687
9		1.451	1.193	8.068	51.248	1.262	2.296	3.022	0.894
10		1.220	1.246	17.547	7.602	0.887	2.605	3.630	1.091
11		1.403	1.137	10.842	20.512	3.768	2.750	4.193	0.751
12		0.995	1.080	13.523	6.832	4.706	3.216	2.670	0.886
13		0.885	1.039	12.119	41.381	4.374	2.132	4.456	0.767
14		1.194	1.574	12.371	11.640	3.740	2.871	1.992	0.891
15		1.111	1.127	15.257	10.089	4.551	2.972	1.940	0.801
Expectancy ± standard deviation	1.226 ± 0.209	1.212 ± 0.204	19.588 ± 12.92	30.664 ± 21.06	4.998 ± 3.01	2.621 ± 0.390	2.987 ± 1.056	1.056 ± 0.400	
	P = 0.845		P = 0.1055		P = 0.012		P = 0.0001		
	No significant difference		No significant difference		Significant difference		Significant difference		

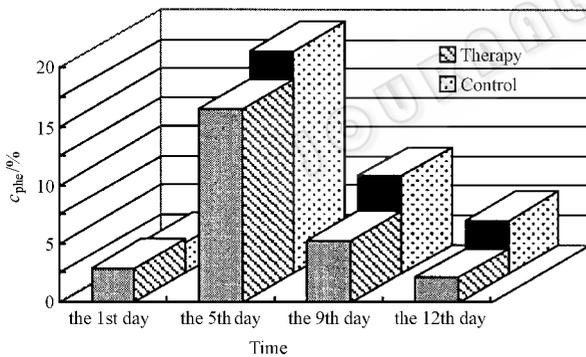


图 3 不同时间各组大鼠血中 Phe 的浓度变化

Fig.3 The blood Phe Concentration of each group on different days

从结果 2.2.2 可以看出,在诱导 3h 后检测,翻译融合型菌株产生的肉桂酸含量是转录融合型的 1.6 倍左右,前者 Phe 转化率是后者的 1.6 倍,这与文献报道一致。因此,利用这种翻译融合型载体表达外源基因生产异源蛋白更好。但有一个前提是,必须用含有 *NisR* 和 *NisK* 基因的乳酸菌,*NisR* 编码一种调控因子,*NisK* 编码一种组氨酸激酶敏感物。只有 *NisR*,*NisK* 蛋白存在才能启动 *NisA* 转录。另外,本研究室以前构建的热诱导型表达工程菌株 *pXHJ* -

PAL/L.L. 在经过 37°C 热诱导 3h 之后,产生的 *Cin* 为 11.3mg/100mL,其 Phe 转化率为 4.52%。由此得出结论,*Nisin* 诱导的表达工程菌 ρ (NZ8048-PAL)₁/NZ9000 和 ρ (NZ8048-PAL)₂/NZ9000 的酶活性明显高于以前的工程菌株 *pXHJ*-*PAL/L.L.*。其中 ρ (NZ8048-PAL)₂/NZ9000 较之高出 6.6%,而 ρ (NZ8048-PAL)₁/NZ9000 较之高出 10.64%

关于 *PAL* 酶诱导的动力学过程,从表 1 可以看出,两种工程菌酶活力都是在诱导 6h 达到峰值,随后开始下降,其原因可能是随着时间延长,对 *PAL* 专一性的蛋白酶使其分解^[10],也可能是由于表达的 *PAL* 对宿主菌产生不利影响的结果,或是高浓度肉桂酸对 *PAL* 产生抑制作用。其真正原因尚须进一步研究。不过从这里我们探索到 *PAL* 发生其最大活力的诱导时间,这对实际应用是极为有用的。

我们利用翻译融合型工程菌进行了高苯丙氨酸血症大鼠模型的治疗试验。第一天的结果说明在处理前两组血中 Phe 浓度基本一致,所以这种随机分组进行以下的 PKU 模型诱导和用工程菌治疗,结果可靠,第 5 天时,血中 Phe 浓度上升到正常值的 7~8 倍,这是因为连续 4 天注射 *p*-CP/Phe 注射液中含有

p-CP 可抑制 PAH 活性,另外注射液中含一定量 Phe,更使血中 Phe 大幅上升。但治疗组与对照组之间无显著性差异,分析可能是由于时间较短,PAL 作用还不显著,到第 9 天时,两组之间有非常显著性差异($P = 0.008 < 0.01$),治疗组明显低于对照组,这说明治疗组中 PAL 工程菌在肠液中发挥了 PAL 活性;第 13 天时,由于继续口服 Phe,使对照组血中 Phe 维持在正常值的 1.5~2 倍左右,而治疗组 Phe 明显低于对照组,经统计学处理,两组有非常显著性差异($P = 0.000 < 0.01$)。这说明口服的 PAL 工程菌在肠道中确实发挥了活性,起到了显著降低血中 Phe 的作用。

与我室以前构建的 PAL 工程菌 pMG36e-PAL/L.L 相比,用 NICE 系统来表达 PAL 酶并进而用于 PKU 模型大鼠的治疗实验,具有以下突出的优势(1)采用诱导表达的方式替代原来的组成型表达,使细菌生长与外源基因的表达成为两阶段,从而减轻宿主细胞的代谢负荷(2)该诱导表达系统诱导效率高,表达产量高。翻译融合型工程菌的 PAL 表达产量为 5.16%,比以前构建的工程菌株 pMG36e-PAL/L.L 的表达产量 0.9% 明显高出 4.2%(3)从动物实验的疗效看,本次动物实验到第 12 天时可降低血中 Phe 浓度达 52.4%,而采用以前构建的组成型工程菌株 pMG36e-PAL/L.L 进行 PKU 模型动物治疗,到第 12 天时可降低血中 Phe 浓度 30.8%。说明采用 NICE 诱导表达系统构建的 p(NZ8048-PAL)/NZ9000 工程菌株在经典型 PKU 基因治疗的探索中又跨进

了非常有意义的一步。

REFERENCES (参考文献)

- [1] Scriver C R. The Hyperphenylalanine in "The metabolic basis of inherited disease" edited by Scriver C R *et al.* 6th ed, Mc Craw-Hill Co. New York, 1989
- [2] Harvey L Levy. Phenylketonuria: old disease, new approach to treatment. *Proc Natl Acad Sci, USA* 1999, **96**: 1811~1813
- [3] LIU J Z (刘敬忠), XIANG H (向华), HU W (胡维) *et al.* The Cloning and expression of PAL cDNA in *E. coli*. *Chinese Journal of Biotechnology* (生物工程学报), 1998, **14**(4): 384~388
- [4] JIA X Y (贾兴元), LIU J Z (刘敬忠), XIANG H (向华) *et al.* A new strategy of gene therapy for hyperphenylalaninemia rats. *National Medical Journal of China* (中华医学杂志), 2000, **80**(6): 464~467
- [5] Wells J M, Willson P W, Le page R W F. Improved cloning vectors and transformation procedure for *Lactococcus lactis*. *J Appl Bacter*, 1993, **74**: 629~636
- [6] Lee A B, Cooper T A. Improved direct PCR screen for bacterial colonies: wooden toothpicks inhibit PCR amplification. *Biotechniques*, 1995, **18**: 225~226
- [7] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular Cloning: A laboratory manual*. 2nd ed, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989
- [8] Greengard O D G, Delvalle J. In: Models for the study of inborn errors metabolism. Hommes FA (ed), Elsevier North/Holland Biomedical press. Amsterdam, 1979, pp. 125~130
- [9] De Vos W M, Kuipers O P, Vander Meer J R *et al.* Maturation pathway of nisin and other lantibiotics: post-translational modification of antimicrobial peptides exported by Gram-positive bacteria. *Mol Microbiol*, 1995, **17**: 427~437
- [10] DING X H (丁新华), WU J B (吴锦斌), CEN P L (岑沛霖). Studies on the induction of L-Phenylalanine ammonia lyase (PAL) in *rhodotorula glutinis* and transformation of phenylalanine from trans-cinnamic acid. *Acta Microbiologica Sinica* (微生物学报), 1994, **34**(2): 137~142

The Progressive Study on Gene Therapy for Hyperphenylalaninemia Rats

ZHANG Jing LIU Jing-Zhong TAN Shu-Zhen JIA Xing-Yuan ZHOU Yan

(Basic Medical Research Center, Beijing Chaoyang Hospital, Beijing 100020, China)

Abstract To construct a new high effective genetic engineering strain which can express active PAL enzyme in *Lactococcus lactis* (L.L), and acquire better effect on curing hyperphenylalaninemia rats, Firstly translational fusion vector and transcriptional fusion vector were constructed in *E. coli* MC1061, and then PAL cDNA was transformed into L.L. Two kinds of high effect strain were compared with their enzyme activity and animal experiment was carried out. The results showed: (1) Two kinds of engineering L.L. were obtained and translational fusion strain has higher level enzyme activity. (2) The amount of trans-cinnamic acid reach peak when induced for 6 hours. (3) The blood phe level of the treated rats was significantly reduced compared with non-treated rats when receiving fresh p(NZ8048-PAL)/NZ9000. The engineering L.L (translational fusion strain) can significantly reduce the blood phe level of the hyperphenylalaninemia rats, which has more superiority than pMG36e-PAL/L.L.

Key words phenylketonuria, *Lactococcus lactis*, NICE system; gene therapeutics