

两种强启动子在枯草芽孢杆菌中调控表达研究

周艳敬^{1,2}, 常晓娇^{2,3}, 吴子丹², 伍松陵², 孙长坡²

(1. 河南工业大学 生物工程学院, 河南 郑州 450000; 2. 国家粮食局科学研究院, 北京 100037;
3. 河南工业大学 粮油食品学院, 河南 郑州 450000)

摘要:通过玉米赤霉烯酮(ZEN)降解酶基因 ZLHY6 的表达水平及降解酶的活性评价, 比较了两种组成型强启动子 P43 与 P_{lapS} 调控异源基因表达的效果。结果表明, 在枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*) Bs 168 中, P_{lapS} 调控的降解酶基因得到了高效表达, 在发酵 12 h 时降解酶活性达到最高值, 酶活为 219.02 U/mL。由启动子 P_{lapS} 介导的 ZEN 降解酶基因表达载体 pWBZ7 可以在 Bs 168 中稳定遗传, 为降解酶的高效分泌表达奠定了基础。

关键词:玉米赤霉烯酮; 枯草芽孢杆菌; 启动子; 高效表达系统

中图分类号: Q 786 文献标识码: A 文章编号: 1007-7561(2015)02-0068-05

Study on the expression of regulation of two strong promoters in *bacillus subtilis*

ZHOU Yan-jing^{1,2}, CHANG Xiao-jiao^{2,3}, WU Zi-dan², WU Song-ling², SUN Chang-po²

(1. College of Bioengineering, Henan University of Technology, Zhengzhou Henan 450000;
2. Academy of State Administration of Grain, Beijing 100037;
3. College of Food Science and Technology, Henan University of Technology, Zhengzhou Henan 450000)

Abstract: The effect of two kinds of constitutive strong promoters P43 and P_{lapS} on regulation of heterologous gene was compared on the expression level of ZEN degrading enzyme gene ZLHY6 and the enzyme activity evaluation. The degrading enzyme gene regulated by P_{lapS} received efficient expression in *bacillus subtilis* 168, and the degrading enzyme activity reached the highest level of 219.02 U/mL after fermentation for 12 h. Moreover, the genetic stability of ZEN degrading enzyme gene expression vector pWBZ7 regulated by P_{lapS} in Bs 168 lays a foundation for efficient expression and secretion of degrading enzyme.

Key words: zearalenone; *bacillus subtilis*; promoter; efficient expression system

玉米赤霉烯酮(Zearaleonoe, ZEN)是由禾谷镰刀菌产生的一种非甾体霉菌毒素,广泛存在于受污染的小麦、玉米、高粱等谷物及其制品中。研究表明,ZEN 具有生殖毒性、肝脏毒性、免疫毒性和遗传毒性,可导致动物生殖障碍、繁殖功能紊乱,人食用被其污染的食物会导致肝癌、食道癌和青春期早熟等疾病^[1-4]。传统的 ZEN 脱毒方法有高温、辐照、压煮等物理法及氨化、臭氧处理、碳酸钠浸泡等化学法。但这些方法效果不稳定,营养成份损失较大,易造成二次污染^[5]。利用微生物产生的胞内、胞外酶将真菌毒素降解成无毒或毒性较低的物质具有去毒

效率高、不破坏营养等优点^[6]。

目前,ZEN 的生物脱毒研究主要侧重在降解菌株的筛选和降解能力的分析方面,而对于降解酶的高效表达和酶制剂的应用研究非常少^[7]。2002 年,El-Sharkawy 等^[8]发现粉红螺旋聚孢霉(*Clonostachys rosea*)菌株可以分泌专化内酯酶,能够将 ZEN 完全转化为无毒物质,随后其降解基因在酿酒酵母中的表达取得了成功。国内关于 ZEN 降解酶基因研究报道较少,刘海燕等^[9]从粉红粘帚霉中克隆到玉米赤霉烯酮降解酶基因 ZLHY6,该基因在毕赤酵母(GS115)中进行表达后能够高效降解 ZEN。随后,郝小龙等^[10]对该降解酶的酶学性质进行了表征。

在生物体的遗传系统中,启动子起着重要的作用,选用强启动子介导目的基因的表达是提高基因异源表达非常有效的方法。P43 启动子是来源于枯

收稿日期:2014-08-22

基金项目:粮食公益性行业科研专项(201313005)

作者简介:周艳敬,1986 年出生,女,河南人,在读硕士。

通讯作者:孙长坡,1975 年出生,男,山东人,博士,研究员。

草芽孢杆菌的组成型强启动子,目前在以枯草芽孢杆菌为宿主菌的外源蛋白表达的研究和应用中使用广泛^[11]。杨明明等^[12]以 β -半乳糖苷酶为报告基因,筛选得到能够在枯草芽孢杆菌中高效表达的启动子 P_{lapS} ,其表达的酶活性比P43启动子有很大提高,具有良好的应用前景。

本实验室已经完成了ZEN的降解酶基因ZLHY6在多个表达系统中的高效表达^[13],为了适应实际应用的需要,目前已将该基因克隆到载体pWB980中,得到重组表达载体pWBZ1,电转化枯草芽孢杆菌Bs 168得到降解酶基因ZLHY6阳性转化子Z1,酶活测定结果显示在启动子P43的调控下ZLHY6能够分泌表达。本文研究了两种组成型强启动子在枯草芽孢杆菌Bs 168中介导的ZEN降解酶表达水平的差异,为ZEN降解酶基因在枯草芽孢杆菌中的高效异源表达奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验材料

枯草芽孢杆菌Bs 168和表达载体pWB980为本实验室保存,其中pWB980为带有启动子P43及信号肽(SacB)片段的分泌表达载体。pWBZ1为含有ZLHY6降解酶基因的pWB980载体;启动子 P_{lapS} 及信号肽SacB DNA片段由上海英骏生物技术有限公司合成,并由克隆载体pMD18-T Vector携带转入大肠杆菌DH5 α 中。

1.1.2 培养基及生化试剂

本研究所用限制性内切酶、T4 DNA Ligase均购自TaKaRa公司;胶回收试剂盒和质粒提取试剂盒购自AXYGEN公司;乙腈、甲醇均为色谱纯,购自迪马公司;ZEN标准品购自Sigma公司;KOD-Plus及其它试剂,购自北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司。

枯草芽孢杆菌的培养和发酵均使用LB培养基。LB培养基:胰蛋白胨10 g、酵母提取物5 g、NaCl 10 g,去离子水定容至1 L,121 °C灭菌30 min,室温保存备用;LB固体培养基:于液体培养基中加入1.3%~1.5%琼脂。枯草芽孢杆菌感受态细胞的制备使用BHI(Brain Heart Infusion)培养基,购自BD公司;50 mg/mL卡那霉素(Kan):称取0.5 g固体硫酸卡那霉素,用去离子水定容至10 mL,0.2 μ m进口滤膜过滤除菌,分装后-20 °C保存,使用终浓度为50 μ g/mL。

1.1.3 仪器设备

waters E2695型液相色谱仪(荧光检测器、C-18色谱柱250 mm \times 4.6 mm \times 5 μ m),waters公司;BIO C1000型PCR仪,BIO-RAD公司;EVOLUTION 300全波长分光光度计,Thermo公司。

1.2 实验方法

1.2.1 启动子及信号肽片段的克隆

根据 P_{lapS} 启动子和信号肽的序列,利用Vector NTI软件设计合成一对引物,上游引物:F:5'-CCG-GAATTCTCAGGAGCATTAAACCTAAA-3';下游引物:R:5'-GGCAAAAGCTTGAGTTGC-3',其中下划线分别为EcoR I和Hind III酶切位点,扩增片段为395 bp。引物由北京华大基因股份有限公司合成。以携带 P_{lapS} 和信号肽片段的DH5 α 为模板,PCR反应体系为:10 \times Buffer 5 μ L, MgSO₄ (25 mmol/L) 3 μ L, dNTP (2 mmol/L) 5 μ L, 上、下游引物各1.5 μ L, KOD-Plus 1 μ L, 模板DNA 1 μ L, 用无菌双蒸水补足至50 μ L。PCR反应条件为:94 °C预变性5 min;94 °C 1 min, 50 °C 30 s, 68 °C 30 s, 共31个循环;68 °C延伸10 min。1%的琼脂糖凝胶电泳检测,纯化PCR产物。

1.2.2 表达载体pWBZ7的构建

用质粒提取试剂盒提取菌株Z1的质粒pWBZ1,该质粒的P43启动子和信号肽序列位于EcoR I和Hind III酶切位点之间,ZLHY6基因位于Hind III酶切位点下游。pWBZ1经EcoR I和Hind III 37 °C过夜酶切。酶切体系为(30 μ L):质粒10 μ L, EcoR I 1.5 μ L, Hind III 1.5 μ L, 10 \times M Buffer 3 μ L, ddH₂O 14 μ L。酶切产物经核酸电泳后切取大片段,用DNA胶回收试剂盒回收。

回收后的目的片段用限制性内切酶EcoR I和Hind III双酶切,酶切体系为(30 μ L):PCR产物2.5 μ L, EcoR I 1.5 μ L, Hind III 1.5 μ L, 10 \times M Buffer 3 μ L, ddH₂O 21.5 μ L, 37 °C温浴过夜。回收纯化酶切产物,并检测纯化后的浓度。

回收后的两个片段经T4 DNA连接酶连接,连接反应体系为(10 μ L):pWBZ1片段5 μ L, P_{lapS} 启动子和信号肽片段3 μ L, 10 \times T4 DNA连接缓冲液1 μ L, T4 DNA连接酶1 μ L, 16 °C连接10 h。对酶连产物醇沉处理:在10 μ L酶连产物中加25 μ L预冷的无水乙醇,-20 °C放置4 h,于4 °C 12 000 r/min离心20 min。缓慢弃去上清,DNA沉淀晾干后用6 μ L去离子水重悬连接产物。

1.2.3 工程菌Z7的构建

1.2.3.1 枯草芽孢杆菌(Bs 168)感受态细胞的制备

挑取Bs 168单菌落,接种于5 mL LB试管培养基中,37 °C,220 r/min培养12 h。按1%接种量转接至含50 mL BHI培养基的三角摇瓶中,于37 °C,220 r/min培养,将菌液培养至OD₆₀₀达到0.8时,约3 h。将细菌培养物于4 °C,7 000 r/min离心5 min。用预冷的无菌水将菌体沉淀重悬,7 000 r/min离心5 min,重复三次。用2 mL无菌的40% PEG4000将

菌体沉淀重悬。充分混匀后分装,每管 150 μL , $-80\text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱保存备用。

1.2.3.2 连接产物的转化

取连接产物 3 μL ,加入 Bs 168 感受态细胞 150 μL 。电转化条件为:2.2 kV,1 000 Ω ,25 mF,电击后,迅速向转化体系中加入 800 μL LB 液体培养基,并转至 1.5 mL 的离心管中, $37\text{ }^\circ\text{C}$ 复苏 3 h。将菌悬液涂布于 Kan 抗性 LB 平板, $37\text{ }^\circ\text{C}$ 培养,筛选阳性转化子。挑取转化子接种至 LB 液体培养基。 $37\text{ }^\circ\text{C}$,220 r/min 培养过夜,分别对转化子进行 PCR、重组质粒酶切鉴定及降解酶活性检测。重组质粒命名为 pWBZ7,转化子命名为 Z7。

1.2.4 ZEN 工程菌 Z1、Z7 的分泌表达

将新鲜平板上的 Z1 和 Z7 单菌落分别接入 5 mL Kan 抗性 LB 液体培养基中, $37\text{ }^\circ\text{C}$ 培养 12 h,分别检测两菌株种子液的 OD_{600} ,将 Z1 和 Z7 以相同接菌量转接于含有 Kan 抗性的 50 mL LB 液体培养基中。分别于 $37\text{ }^\circ\text{C}$ 、220 r/min 发酵培养 2、4、6、8、10、12、15、23、30、35、47、54 h,取发酵液,用于酶活测定和 SDS-PAGE 分析,将含空载体的 Bs 168 作为阴性对照,发酵过程中监测两菌株菌浓变化。

1.2.5 ZEN 降解酶活性测定

将 ZEN 标准品溶液分装于 2 mL 的 EP 管中,含量为每管 10 μg ,样品发酵液稀释 2.5 倍后取 500 μL 与 ZEN 于 $37\text{ }^\circ\text{C}$ 、220 r/min 共培养 20 min。参照 GB/T 23504—2009^[14],高效液相色谱检测 ZEN 含量。检测条件为:柱温箱 $25\text{ }^\circ\text{C}$,荧光检测器激发波长 274 nm,发射波长 440 nm,流动相为乙腈—水(50:50, V/V),流速为 1 mL/min,进样量 10 μL 。根据 ZEN 的残留量计算工程菌对 ZEN 的降解率和酶活。酶活定义为:1 mL 发酵液在 $37\text{ }^\circ\text{C}$ 、220 r/min 条件下,1 h 降解 1 μg ZEN 所需的酶量为一个酶活单位。

1.2.6 发酵上清液的 SDS-PAGE 检测

取样品发酵液 1.5 mL,离心后吸取发酵上清液 1.3 mL 于 1.5 mL 离心管中,TCA 法浓缩蛋白^[15]。将 20 μL 蛋白浓缩产物与 5 μL 的 5 \times SDS-PAGE 上样缓冲液混合均匀,沸水浴 10 min。样品浓缩 30 倍,上样量为 10 μL 。

1.2.7 重组质粒的稳定性分析

重组质粒 pWBZ7 的稳定性分析参照文献^[16]进行。

1.2.8 启动子的结构分析

结合 BPROM (Softberry) 软件对启动子 P43 和 P_{lapS} 进行结构分析。

2 结果与分析

2.1 表达载体 pWBZ7 的构建与重组子鉴定

EcoR I 和 *Hind* III 双酶切的启动子和信号肽片

段与载体片段经连接(图 1)、电转化入 Bs 168 感受态细胞中,涂布于卡那抗性平板, $37\text{ }^\circ\text{C}$ 培养 12 h。阴性对照无菌落长出,挑取目标平板阳性菌落,分别接 LB 液体培养基培养后进行 PCR 及质粒酶切鉴定。转化子经目的片段 PCR 扩增后在 400 bp 处有清晰条带(图 2 A)。转化子质粒经 *EcoR* I、*Bam*H I 和 *Hind* III 酶切后被切成大小分别为 3 310 bp 的载体片段、795 bp 的 ZLHY6 降解酶基因片段和大小为 395 bp 的目的片段(图 2B),与理论结果相符。测序分析与实验结果完全一致,证明 P_{lapS} 和 SacB 片段已成功插入 pWBZ1,载体 pWBZ7 及工程菌 Z7 构建成功。

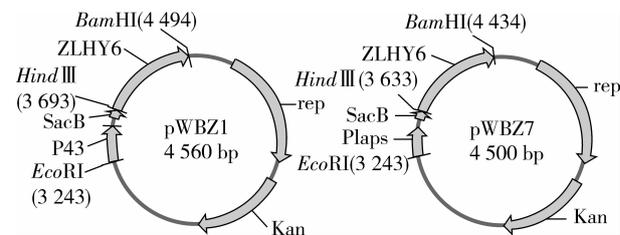


图 1 质粒 pWBZ1 和 pWBZ7 示意图

注:ZLHY6:ZEN 降解酶基因;SacB:信号肽;Kan:卡那抗性标记。

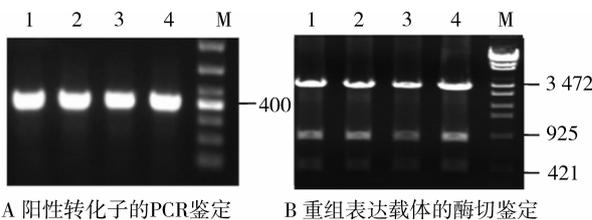


图 2 阳性转化子的分子鉴定

注:1,2,3,4:阳性转化子;M:DNA 标记。

2.2 重组子 Z7 酶活性验证

取转化子 1、2、3、4 的菌液各 500 μL 分别加入 ZEN 毒素管,终浓度 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$,对照中加入 500 μL LB。 $37\text{ }^\circ\text{C}$ 、220 r/min 反应 3 h 后,液相色谱检测 ZEN 残留量,检测结果见图 3。由图 3 可看出,对照的 ZEN 出峰时间在 10 min 后,样品中无 ZEN 检出,说明经几个转化子处理的 ZEN 毒素均降解完全,启动子 P_{lapS} 能够调控 ZEN 降解酶基因在枯草芽孢杆菌中的表达。

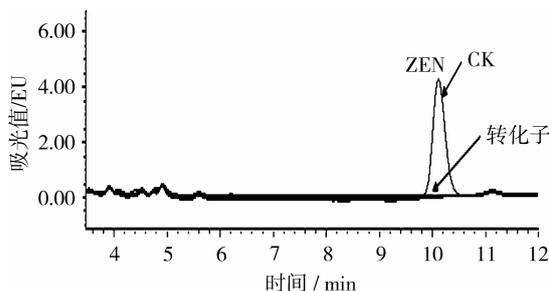


图 3 HPLC 检测阳性转化子 1、2、3、4 对 ZEN 标准品的降解效果
注:CK:未做处理的实验对照;转化子:Z7 转化子 1、2、3、4。

2.3 ZEN 工程菌的摇瓶发酵和降解酶的活性

Z1、Z7 发酵液经不同时间取样后立即进行 ZEN 标准品的降解实验。每个处理三次重复,检测结果取平均值。酶活测定结果显示,含空表达载体的 Bs 168 对 ZEN 无降解作用,工程菌 Z1、Z7 对 ZEN 具有明显的降解活性。两菌株的降解活性都在 12 h 达到最高,此时 Z7 的 ZEN 降解酶的酶活是 Z1 的 2.2 倍,分别为 219.02 U/mL 和 99.6 U/mL(图 4),之后随着细胞活力衰退和目的蛋白被宿主菌分泌到胞外的蛋白酶分解,降解酶活性也随之降低。在发酵过程中,同时监测了不同时间发酵液菌体浓度的变化,发现两发酵液在发酵过程中菌体浓度基本保持相同,并在开始发酵 10~35 h 过程中,Z7 的降解酶活性较 Z1 均有明显提高,说明重组子 Z7 中的 ZEN 降解酶基因 ZLHY6 在枯草芽孢杆菌中启动子 P_{lapS} 的介导下得到了加强表达。

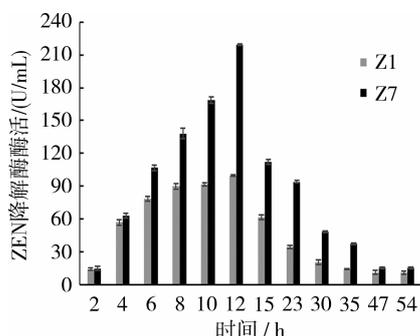


图 4 工程菌 Z1、Z7 发酵过程中不同时间连续取样的降解酶活性比较

2.4 ZEN 降解酶 SDS - PAGE 分析

将工程菌 Z1、Z7 发酵中期样品发酵液取上清浓缩后进行检测,SDS - PAGE 分析结果显示,在目标位置有清晰条带(图 5),与从氨基酸推断出的 ZEN 降解酶的理论分子质量大小一致。说明 ZEN 降解酶在启动子 P_{lapS} 和 P43 调控下均得到了表达。

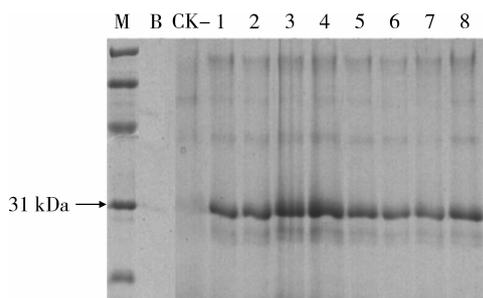


图 5 工程菌 Z1、Z7 发酵上清液 30 倍浓缩的 SDS - PAGE 分析结果

注: M: 蛋白分子量标准, B: 空白对照, CK -: 阴性对照, 1、3、5、7: Z1 在发酵 10、12、15、23 h 处理的发酵上清液, 2、4、6、8: 分别为 Z7 在发酵 10、12、15、23 h 处理的发酵上清液。

2.5 重组质粒的稳定性分析

将含有表达载体 pWBZ7 的枯草芽孢杆菌 Bs 168 转接于 LB 液体培养基,无抗性,37 °C 220 r/min 条件下培养,同时每 24 h 转接一次,5 d 后将菌液(第 60 代菌)稀释 10^6 倍涂布 LB 平板,37 °C 培养,待菌落长出后随机挑选 100 个单菌落复制到 Kan 抗性 LB 平板,37 °C 培养。结果显示,工程菌 Z7 在 Kan 抗性 LB 平板上 100% 生长,提取第 60 代菌以及第一代菌的质粒进行双酶切验证,结果显示两者所含质粒相同(图 6),说明重组质粒 pWBZ7 在枯草芽孢杆菌中非常稳定。

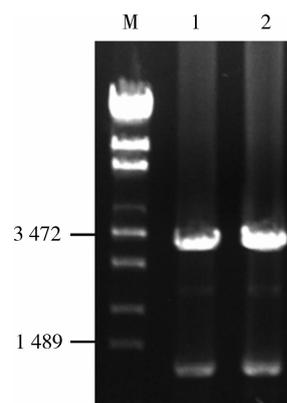


图 6 pWBZ7 在枯草芽孢杆菌 Bs 168 中的稳定性验证

注: M: DNA marker, 1、2 分别为枯草芽孢杆菌 Z7 第 1 代和第 60 代菌的质粒双酶切结果。

2.6 两种启动子的结构差异分析

P_{lapS} 启动子序列为 246 bp, 由一个杂合启动子和一个 P_{luxS} 启动子构成, 杂合启动子位于 P_{luxS} 上游, 保守序列 -10 区 TATTAT 和 -35 区 ATGATA 分别来自于地衣芽孢杆菌 P_{luxS} 启动子上游序列和枯草芽孢杆菌 P_{apr} 启动子, 保守区之间的间隔为 17 bp。 P_{luxS} 启动子结构为 -35 区 TGAAAA 和 -10 区 TATAAT, 保守区之间的间隔为 17 bp, 被 σ^A (σ^{55}) 因子识别; P43 启动子序列为 312 bp, 含双启动子结构, 被两种 RNA 聚合酶的 σ 因子所识别^[17], 有被 σ^B (σ^{37}) 识别的 -35 区 AGAAAT 和 -10 区 GCGATT, 间隔 15 bp, 还有被 σ^A (σ^{55}) 识别的 -35 区 GTGAAA 和 -10 区 TAAAAT, 间隔 17 bp。对 P_{lapS} 和 P43 的启动子区的保守性进行分析发现 P43 被 σ^A 识别的启动子区和 P_{luxS} 启动子区的保守率相同(-35 区 66.7%, -10 区 83.3%)^[18]。 SacB 序列位于 P43 与 P_{lapS} 下游, 富含 AG 的 SD 序列位于 SacB 上游 10 bp 处(图 7)。

P43 1 GAGCTCAGCATTATTGAGTGGATGATTATATTCCTTTTGATAGGTGGTATGTTTCGCTT
 61 GAACTTTTAAATACAGCCATTGAACATACGGTTGATTAATAACTGACAAACATCACCTT
 121 CTTGCTAAAGCGCCCAAGGACGCTGCCCGGGGCTGTTTGCCTTTTTCGCGTATTTCG
 181 TGTATCATGGTTTACTTATTTTTTGGCAAAGCTGTAATGGCTGAAAATTTTACATTT
 -35 signal -35 signal -10 signal -10 signal
 241 ATTTTACATTTTTAGAAATGGCGGTGAAAAGCGCGGATTATGTAATAATAAAGTG
 SD
 301 ATAGCGGTACCAGGAGGGCTGGAAGAAGCAGACCGCTAACACAGTACATAAAAAAGGAGA
 361 CATGAACGATGAACATCAAAAAGTTTGCAAAACAAGCAACAGTATTAACCTTTACTACCG
 SacB
 421 CACTGCTGGCAGGAGGCGCACTCAAGCTTATG
 ZLHY6

P_{lapS} 1 TCAGGAGCATTAACTAAAAAGCATGACATTTTCAGCATAATGAACATTTACTCATGTC
 61 TATTTTCGTTCTTTCTGTATGAAAATAGTATTTTCGAGTCTCTACGAAATAGCGAGAG
 -35 signal -10 signal
 121 ATGATACAAGAACGCTCTGATCTTATTATAATATAAGCAAAAACATATAAAAAGGAAAA
 -35 signal -10 signal
 181 GCATTGACCTGAAAACCTTATCGGTAAGATGATATAATACAAAAGACCGATTAGAGGG
 SD
 241 GAGAGAGGAAACGAGGGCTGGAAGAAGCAGACCGCTAACACAGTACATAAAAAAGGAGA
 301 CATGAACGATGAACATCAAAAAGTTTGCAAAACAAGCAACAGTATTAACCTTTACTACCG
 SacB
 361 CACTGCTGGCAGGAGGCGCACTCAAGCTTATG
 ZLHY6

图7 启动子 P_{lapS}和 P43 结构分析图

注:启动子 P43 被 σ^{37} 和 σ^{55} 识别的保守序列分别用下划线和阴影标出;启动子 P_{lapS} 的保守序列用下划线标出;SD 序列用斜体下划线标出;SacB 及 ZLHY6 的起始密码子用箭头标出。

3 结论

启动子的结构是影响其表达活性的关键因素。一般来说,启动子和保守区之间的间隔为 17 bp 时该启动子的活性最强,偏离 17 bp 时启动子活性会变弱^[19]。此外,启动子保守序列与 σ 因子识别保守序列之间的相似程度越高,其表达能力也就越强^[20]。P43 被 σ^A 识别的启动子区和 P_{lapS} 的 P_{luxS} 启动子区间隔相同,保守率也相同。不同的是 P_{lapS} 的杂合启动子和 P43 被 σ^B 识别的启动子区,这两个启动子保守区间隔分别为 17 bp 和 15 bp,这可能是 P_{lapS} 表达活性高于 P43 的原因之一。

实验中构建的质粒 pWBZ7 是将表达载体 pWBZ1 降解酶基因 ZLHY6 上游的启动子 P43 替换为 P_{lapS},质粒其余部分完全相同,两个表达载体均转化枯草芽胞杆菌 Bs 168 进行表达。由于这两株工程菌发酵及取样处理 ZEN 毒素的方法和条件均相同,两个启动子均为组成型启动子,因此两种质粒介导的降解酶基因表达水平的不同取决于两个启动子的强弱。实验结果表明降解酶基因 ZLHY6 在两个启动子调控下都得到了高效表达,整个发酵期间的 12 次取样酶活测定结果显示 P_{lapS} 的表达活性均高于 P43,12 h 时酶活最高,P_{lapS} 为 P43 的两倍。而且重组质粒 pWBZ7 在枯草芽胞杆菌 Bs 168 中非常稳定。因此,较 P43 启动子,P_{lapS} 是一个活性更强的启动子,为介导枯草芽胞杆菌表达系统中异源基因的高效表达奠定基础。

本研究通过构建含 P_{lapS} 强启动子的 ZEN 降解酶表达载体,获得一株 ZEN 降解酶高效表达工程菌,对不同强启动子调控降解酶基因表达的研究和

真菌毒素的降解有非常重要的意义。

参考文献:

- [1] Minervini F, Dell'Aquila M E, Maritato F, et al. Toxic effects of the mycotoxin zearalenone and its derivatives on in vitro maturation of bovine oocytes and 17 β - estradiol levels in mural granulosa cell cultures [J]. Toxicology in Vitro, 2001, 15(4): 489 - 495.
- [2] Igawa T, Takahashi - Ando N, Ochiai N, et al. Reduced contamination by the fusarium mycotoxin zearalenone in maize kernels through genetic modification with a detoxification gene[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2007, 73(5): 1622 - 1629.
- [3] 曹慧英,伍松陵,沈晗,等. 粮食中真菌毒素的控制策略 [J]. 粮油食品科技,2012,20(6):45 - 48.
- [4] 路子显,伍松陵,孙长坡. 玉米赤霉烯酮生物合成和降解的研究进展[J]. 中国生物工程杂志,2011,31(2):116 - 123.
- [5] Tinyiro S E, Wokadala C, Xu D, et al. Adsorption and degradation of zearalenone by bacillus strains [J]. Folia Microbiologica, 2011, 56(4): 321 - 327.
- [6] Sato I, Ito M, Ishizaka M, et al. Thirteen novel deoxynivalenol - degrading bacteria are classified within two genera with distinct degradation mechanisms[J]. FEMS Microbiology Letters, 2012, 327(2): 110 - 117.
- [7] 孙长坡,代岩石,王松雪,等. 利用生物技术防控,消减粮食及其制品中的真菌毒素[J]. 中国粮油学报,2009,24(11):97 - 101.
- [8] Kakeya H, Takahashi - Ando N, Kimura M, et al. Biotransformation of the mycotoxin, zearalenone, to a non - esrtogenic compound by a fungal strain of Clonostachys sp [J]. Bioscience Biotechnology and Biochemistry, 2002, 66(12): 2723 - 2726.
- [9] 刘海燕,孙长坡,伍松陵,等. 玉米赤霉烯酮毒素降解酶基因的克隆及在毕赤酵母中的高效表达[J]. 中国粮油学报,2011,26(5): 12 - 17.
- [10] 郝小龙,常晓娇,伍松陵,等. 玉米赤霉烯酮降解酶 ZLHY6 活性影响因素研究[J]. 粮油食品科技, 2013,21(3):99 - 101.
- [11] Yang M M, Zhang W W, Zhang X F, et al. Construction and characterization of a novel maltose inducible expression vector in *Bacillus subtilis* [J]. Biotechnology Letters, 2006, 28(21): 1713 - 1718.
- [12] Yang M M, Zhang W W, Ji S Y, et al. Generation of an artificial double promoter for protein expression in *Bacillus subtilis* through a promoter trap system [J]. PloS One, 2013, 8(2): e56321.
- [13] 张来忠,孙长坡,吴子丹,等. 毕赤酵母工程菌 ZLHY6 发酵条件优化[J]. 粮油食品科技,2014,22(2):100 - 103.
- [14] GB/T 23504 - 2009, 食品中玉米赤霉烯酮的测定[S].
- [15] Wessel D, Flügge U I. A method for the quantitative recovery of protein in dilute solution in the presence of detergents and lipids [J]. Analytical Biochemistry, 1984, 138(1): 141 - 143.
- [16] 梁晓梅,黎明,成望,等. 大肠杆菌 - 枯草芽胞杆菌穿梭质粒的构建及碱性蛋白酶的表达 [J]. 生物技术通报,2011(6):166 - 167.
- [17] Wang P Z, Doi R H. Overlapping promoters transcribed by *Bacillus subtilis* sigma 55 and sigma 37 RNA polymerase holoenzymes during growth and stationary phases [J]. Journal of Biological Chemistry, 1984, 259(13): 8619 - 8625.
- [18] 马磊. 穿梭表达载体 pYG43 的构建及在生物素合成酶基因表达中的初步应用 [D]. 咸阳:西北农林科技大学,2005.
- [19] 吴乃虎. 主编基因工程原理 [M]. 北京:科学出版社,1997.
- [20] 伍辉军. 枯草芽胞杆菌脂肽化合物合成调控基因功能研究及多功能生防工程菌株的构建 [D]. 南京:南京农业大学,2008.