

朱子薇, 潘丽婷, 周义东, 等. 玉米赤霉烯酮降解菌 *Bacillus amyloliquefaciens* MQ01 突变体文库的构建[J]. 江苏农业学报, 2017, 33(2): 456-462.

doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2017.02.034

玉米赤霉烯酮降解菌 *Bacillus amyloliquefaciens* MQ01 突变体文库的构建

朱子薇^{1,2}, 潘丽婷^{1,2}, 周义东^{1,2}, 王燕霞², 史建荣², 洪青¹, 徐剑宏^{1,2}

(1. 南京农业大学生命科学学院/农业部农业环境微生物工程重点开放实验室, 江苏 南京 210095; 2. 江苏省农业科学院食品质量安全与检测研究所/江苏省食品质量安全重点实验室——省部共建国家重点实验室培育基地/农业部农产品质量安全风险评估实验室(南京)/江苏省转基因安全评价公共服务中心/江苏省现代粮食流通与安全协同创新中心, 江苏 南京 210014)

摘要: 构建玉米赤霉烯酮降解菌 *Bacillus amyloliquefaciens* MQ01 突变体文库, 以期获得丢失玉米赤霉烯酮降解功能的突变子, 克隆玉米赤霉烯酮降解酶基因, 阐明 MQ01 降解玉米赤霉烯酮的分子机制。将携带转座子 TnYLB-1 的穿梭载体 pMarA 电转化至玉米赤霉烯酮降解菌 *Bacillus amyloliquefaciens* MQ01 中, 50 ℃ 高温条件下, 把穿梭载体 pMarA 上转座子 TnYLB-1 随机插入到菌株 MQ01 基因组中, 获得转座子插入突变的阳性克隆, 构建 MQ01 菌株的突变体文库, 随机挑选突变子采用 PCR 和 Southern 杂交方法进行验证。本研究成功获得了 3 000 多个 TnYLB-1 转座子插入突变的阳性克隆, 构建了 *B. amyloliquefaciens* MQ01 的突变子文库, 结果显示 TnYLB-1 转座子以单拷贝的形式随机插入到 *B. amyloliquefaciens* MQ01 的基因组 DNA 中, 从而可以从转座子突变文库中筛选丢失玉米赤霉烯酮降解功能的转座突变子, 从菌株 MQ01 中克隆玉米赤霉烯酮降解酶基因。

关键词: 玉米赤霉烯酮; *Bacillus amyloliquefaciens* MQ01; 转座子突变; 突变体文库

中图分类号: Q785 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2017)02-0456-07

Construction of a mutant library for zearalenone-degrading bacterium *Bacillus amyloliquefaciens* MQ01

ZHU Zi-wei^{1,2}, PAN Li-ting^{1,2}, ZHOU Yi-dong^{1,2}, WANG Yan-xia², SHI Jian-rong², HONG Qing¹, XU Jian-hong^{1,2}

(1. The Key Laboratory of Agricultural Environmental Microbial Engineering of Ministry of Agriculture, College of Life Science, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China; 2. Key Lab of Food Quality and Safety of Jiangsu Province-State Key Laboratory Cultivation Base/Key Laboratory of Control Technology and Standard for Agro-product Quality and Safety, Ministry of Agriculture/Collaborative Innovation Center for Modern Grain Circulation and Safety/Institute of Food Quality and Safety, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014, China)

收稿日期: 2016-08-04

基金项目: 国家自然科学基金项目(31471662、U1604234); 公益性行业(农业)科研专项(201303088); 江苏省农业科技创新基金项目[CX(16)1059]

作者简介: 朱子薇(1990-), 女, 江苏南京人, 硕士研究生, 研究方向为环境微生物。(E-mail) 731632896@qq.com

通讯作者: 徐剑宏, (Tel) 84392001; (E-mail) xujianhongnj@126.com

Abstract: To construct a mutant library for zearalenone-degrading bacterium *Bacillus amyloliquefaciens* MQ01 for cloning zearalenone degrading enzyme gene and defining the molecular mechanisms of zearalenone degradation by MQ01. The shuttle vector pMarA carrying transposon TnYLB-1 was electroporated into zearalenone-degrading bacterium *B. amyloliquefaciens* MQ01. The transposon TnYLB-1 was then inserted randomly into the genomic

DNA of MQ01 at 50°C. A total of 3 000 positive clones of TnYLB-1 transposon inserted mutation were obtained, and a mutant library for MQ01 was constructed there by. PCR and Southern hybridization revealed that the TnYLB-1 transposon was inserted randomly into the genomic DNA of *B. amyloliquefaciens* MQ01 in the form of single copy, enabling the screening of transposon mutants which lose the zearalenone-degrading ability from the mutant library, and the cloning of zearalenone-degrading enzyme gene.

Key words: zearalenone; *Bacillus amyloliquefaciens* MQ01; transposon mutants; mutant library

玉米赤霉烯酮是一种真菌毒素,主要由镰刀菌产生,如禾谷镰刀菌(*Fusarium graminearum*)、亚洲镰刀菌(*F. asiaticum*),黄色镰刀菌(*F. culmorum*)等,广泛分布于世界各地^[1-2]。镰刀菌病害主要发生于玉米、小麦和其他的谷物类作物上^[3-4]。玉米赤霉烯酮不仅对畜牧业产生严重影响,也给人类的身体健康造成巨大威胁^[5-6]。玉米赤霉烯酮可以改变猪、牛、羊、鸡的生殖系统^[7-8]。据报道,玉米赤霉烯酮对老鼠有致癌作用,刺激人和动物的乳腺细胞生长,使人和动物产生高雌激素综合症^[9-10]。

因此,我们有必要加强有效降低谷物中玉米赤霉烯酮方法的研究。目前,已经有一些吸附剂被用来控制玉米赤霉烯酮的污染,如:粘土、活性炭、膨润土、消胆胺和 1,3- β -D-葡聚糖等^[11-12]。另外,臭氧对玉米赤霉烯酮也有解毒作用^[13]。然而,这些方法只能部分解除玉米赤霉烯酮的毒性,而且还有很多的副作用。生物方法是一种更有效,更有前景的方法,已经有不少关于细菌、丝状真菌和酵母等被用于玉米赤霉烯酮解毒的报道。如粉红粘帚霉(*Clonostachys rosea*) IFO 7063 可以把玉米赤霉烯酮转变为毒性较低的产物^[14],解毒毛孢酵母(*Trichosporon mycotoxinivorans*)可以将玉米赤霉烯酮降解为无毒无雌激素毒性的物质 ZOM-1。恶臭假单胞菌(*Pseudomonas putia*) ZEN-1 和耳炎假单胞菌(*Pseudomonas otitidis*) TN-N1 也有降解玉米赤霉烯酮的效果^[15-16]。

在玉米赤霉烯酮(ZEN)降解的代谢途径和分子机制方面,也有一些报道,如匍枝根霉和部分丝状真菌及酵母可以将 ZEN 转化为 α -Zearalenol 和 β -Zearalenol^[17];粉红色螺旋聚孢霉(*Clonostachys rosea*) IF7063 在 *zhd101* 基因编码的 ZEN 降解酶的作用下,可以将 ZEN 转化为没有雌激素活性的代谢产物-1-(3,5-二羟苯基)-10'-羟基-1'反式-十一碳烯-6'-酮^[18-19];不动杆菌属(*Acinetobacter* sp.) SM04 中的硫氧还蛋白过氧化物酶可以氧化 ZEN

生成[M-H]⁻为 489 和 405 的产物,虽然产物的雌激素活性有所减少,但没有完全解除 ZEN 的毒性^[20-21]。

本研究室在前期的研究中已经成功分离到了 1 株能够降解玉米赤霉烯酮的解淀粉芽孢杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*) MQ01, MQ01 作为 1 株解淀粉芽孢杆菌,不仅能解除玉米赤霉烯酮的毒性,而且还具有很好的环境适应性,能促进作物的生长,因此具有很好的应用潜力。但是菌株 MQ01 降解玉米赤霉烯酮的代谢途径和机制还不清楚。解淀粉芽孢杆菌 MQ01 作为一种革兰氏阳性细菌,在分子操作方法上有一定的难度。本研究旨在建立 *B. amyloliquefaciens* MQ01 的转化体系,通过转座子随机突变技术构建 MQ01 的突变体文库,为进一步克隆降解玉米赤霉烯酮的降解基因,为阐明 MQ01 降解玉米赤霉烯酮的分子机制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 供试菌株、质粒及培养条件

解淀粉芽孢杆菌 MQ01 及其突变子、大肠杆菌 *E. coli* DH5 α 均在 LB 培养基 37 °C 培养,解淀粉芽孢杆菌 MQ01 转化子 MQ01-MA 在 LB 培养基 30 °C 培养。所用抗生素浓度如下:氨苄青霉素(Amp)为 100 μ g/ml,链霉素(Str)为 50 μ g/ml,卡那霉素(Km)为 50 μ g/ml,红霉素(Erm)为 100 μ g/ml。供试菌株及质粒见表 1。

1.2 培养基、试剂和引物

LB 培养基:蛋白胨 10.0 g/L,酵母膏 5.0 g/L, NaCl 10.0 g/L (pH 7.0~7.5),琼脂 15.0~20.0 g/L。电转试剂:GM (LB + 0.5 mol/L 山梨醇)、ETM (0.5 mol/L 山梨醇 + 0.5 mol/L 甘露醇 + 10% 甘油)、RM (LB + 0.5 mol/L 山梨醇 + 0.38 mol/L 甘露醇)。本研究中所用的限制性内切酶均为 TaKaRa 公司提供,抗生素和其他化学试剂购自 Sigma 公司,引物的合成及测序均由上海生工生物工程有限公司完成,所需引物参照表 2。

表 1 本研究中所用的菌株和质粒

Table 1 Bacterial strains and plasmids used in this study

菌株/质粒	相关基因型或性状	参考文献或来源
菌株 <i>B.amyloliquefaciens</i> MQ01	Str ^r , 玉米赤霉烯酮降解菌	本实验室保存
<i>B.amyloliquefaciens</i> MQ01-MA	Str ^r 、Erm ^r 、Km ^r , 带有质粒 pMarA 的玉米赤霉烯酮降解菌	本研究
<i>E.coli</i> DH5 α	supE44、hsdR17、 Δ lacU169、reaA1、endA1、gryA96、thi-1、relA1	本实验室保存
质粒 pMarA	Amp ^r 、Erm ^r 、Km ^r , 携带 TnYLB-1 转座子和 mariner-Himar1 转座元件; pUC 复制子, 适用于 G+ 的温敏型复制子	参考文献[22]

Str^r:链霉素抗性;Erm^r:红霉素抗性;Km^r:卡那霉素抗性;Amp^r:氨苄青霉素抗性。

表 2 本研究所用的引物序列

Table 2 The primers used in this study

引物名称	引物序列(5'→3')	参考文献或来源
oAtnp-Fwd	CCCGGTCAATGGAGCAATTCGGACGATTGACAAGC(<i>Kpn</i> I)	参考文献[22]
oAtnp-Rev	CCCGGTCAAGTCGACGCAGATTCCGGTCTAACAAAG (<i>Kpn</i> I)	参考文献[22]
OITR	CCCCTGCAGTAACAGGTTGGCTGATAAGTCCCCGGTCT(<i>Pst</i> I)	参考文献[22]
Kan- Fwd	TCCCCAGTAAGTCAAAAAATAG	本研究
Kan-Rev	ATCAGGCTCTTTCACTCCATCG	本研究

1.3 解淀粉芽孢杆菌 MQ01 突变体文库的构建

1.3.1 菌株 MQ01 的电转化感受态的制备 从-70℃冰箱取出菌株 MQ01,在含 100 μ g/ml Str 的 LB 平板上活化,37℃培养至平板上产出单菌落,接种于 5 ml 的 LB(含 100 μ g/ml Str)培养基中,37℃过夜培养后,接种到 50 ml GM 培养基中,控制好接种量,使接种后培养液的 OD_{600} 为 0.19~0.20,37℃,200 r/min,培养约 3~4 h 后,检测培养液 $OD_{600} \approx 1.0$,取全部菌液冰水浴 10 min,然后于 5 000 r/min,4℃离心 8 min,弃上清液,用 40 ml 预冷的电转缓冲液 ETM 洗涤菌体,5 000 r/min,4℃离心 8 min,弃上清液,如此重复洗涤 3 次后,把菌体悬浮于 200 ml ETM 中,制成菌株 MQ01 的电转化感受态细胞,具体方法参照文献[23]。

1.3.2 质粒 pMarA 转化至菌株 MQ01 将 50.0 μ l 感受态细胞加入 2.5 μ l pMarA 质粒,轻轻混匀后,冰浴 5 min,加入到预冷的电极间距为 2 mm 电转杯中,在 2.0 kV、25 μ F、200 Ω 的条件下,进行电转化,电击完毕后,立即加入 1 ml 复苏培养基 RM,30℃,180 r/min 复苏 3 h 后,涂布于含有 10 μ g/ml Erm 和 50 μ g/ml 的 Km 的双抗 LB 平板,30℃过夜培养。

1.3.3 转化子 MQ01-MA 的验证-质粒验证 挑取在 Erm 和 Km 双抗 LB 平板上生长的单菌落转化子 MQ01-MA,接种于含有 50 μ g/ml Kan 的 3 ml LB 培养基中,30℃,180 r/min 过夜培养。采用质粒试剂盒提取质粒,用限制性内切酶 *Kpn* I 对质粒进行单酶切验证^[24]。

1.3.4 转化子 MQ01-MA 的 PCR 验证 以上面提取的质粒作为模板,用 oAtnp-Fwd 和 oAtnp-Rev 作为引物,进行 PCR 扩增,扩增 *Himar* I 转座酶编码的基因片段,PCR 程序为:96℃,2 min;94℃ 45 s,62℃ 1 min,72℃ 1 min,30 个循环;70℃,10 min。

1.4 转化子 MQ01-MA 的高温诱导随机突变

将转化子 MQ01-MA,接种到含 10 μ g/ml Erm 的 LB 中,30℃,200 r/min,培养 18 h,取菌液 150 μ l 接种到含 10 μ g/ml Erm 的 LB 中,30℃,200 r/min,培养 12 h,将菌液稀释 $10^5 \sim 10^6$ 倍,取 200 μ l 涂布于含有 50 μ g/ml Kan 的 LB,50℃高温培养 12~16 h,随机挑取平板上长出的单菌落,一一对应地分别点到含有 10 μ g/ml Erm 和 50 μ g/ml Km 和只含有 50 μ g/ml Km 单抗 LB 平板上,挑起只能在 Km 单抗 LB 平板上生长,不能在 Erm 和

Km 双抗 LB 平板上生长的菌落,构建 MQ01 的转座突变子文库。

1.5 突变体中 TnYLB-1 插入位点随机性及拷贝数检测

随机挑选 10 个突变体,用 CTAB 法提取突变体基因组^[25],采用引物 OITR 扩增突变体基因组的 TnYLB-1 片段,PCR 程序为:96 °C 2 min;94 °C 45 s,66 °C 1 min,72 °C 1 min,30 个循环;70 °C,10 min。用引物 Kan-Fwd、Kan-Rev 扩增转座子 TnYLB-1 中 370 bp 的卡那霉素抗性编码基因的部分片段,PCR 程序为:95 °C 2 min;94 °C 45 s,66 °C 30 s,72 °C 1 min,30 个循环;70 °C 10 min,纯化回收后经 DIG 标记为探针。*Eco* R I 过夜酶切 15 个突变体基因组,电泳后进行转膜,然后进行 Southern 杂交^[26]。

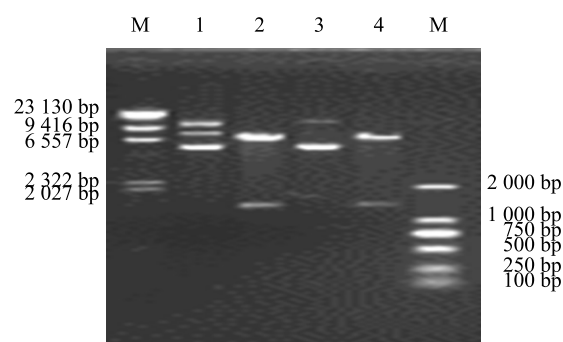
2 结果与分析

2.1 解淀粉芽孢杆菌 MQ01 菌株转化质粒 pMarA

将穿梭载体 pMarA 通过电转化的方法转入到解淀粉芽孢杆菌 MQ01 的感受态细胞中,挑取在 Erm 和 Km 双抗的 LB 平板上生长的单菌落转化子 MQ01-MA,提取质粒,和转化前的载体 pMarA 同时进行电泳,结果如图 1 所示,从转化子 MQ01-MA 提取到的质粒和载体 pMarA 大小一致(图 1),并进行了限制性酶切验证和 PCR 验证,结果显示用限制性内切酶 *Kpn* I 对质粒 pMarA 和从 MQ01-MA 中提取的质粒进行酶切后,都形成了 2 个大小约为 1.5 kb 和 6.5 kb 的片段(图 1)。以提取质粒为模板进行 PCR 扩增,从质粒 pMarA 和从 MQ01-MA 中提取的质粒中都分别扩增到了 2 个大小约为 1.5 kb 的 PCR 产物,且与目的基因 *Himar* I 转座酶编码基因的长度是一致的(图 2)。据此,我们可以判断,质粒 pMarA 已经成功转入到解淀粉芽孢杆菌 MQ01。

2.2 高温诱导转座子 TnYLB-1 随机插入 MQ01 菌株基因组

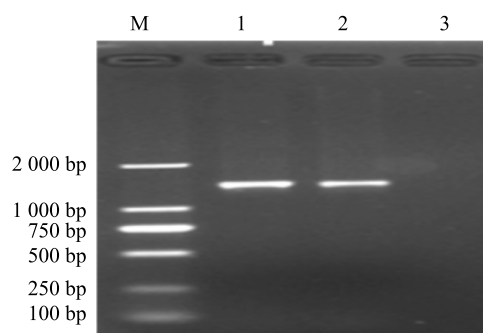
50 °C 高温条件下,质粒 pMarA 中对高温敏感的芽孢杆菌复制子会失活,从而使质粒 pMarA 无法复制。然后在 *Himar* I 转座酶的催化下,TnYLB-1 转座子可以随意插入到解淀粉芽孢杆菌 MQ01 基因组的任意 TA 序列中,使其基因被随机诱变失活。同时质粒 pMarA 也会失去编码 *Erm* 抗性基因的片段,使得突变体丧失红霉素抗性。因此将高温突变产生的突变株,一一对应地转接到 LB (含 10 μg/ml Erm 和



M: DNA maker; 1: 质粒 pMarA; 2: 质粒 pMarA 的 *Kpn* I 酶切产物; 3: 从 MQ01-MA 中提取出的质粒; 4: 从 MQ01-MA 中提取出的质粒的 *Kpn* I 酶切产物。

图 1 解淀粉芽孢杆菌 MQ01-MA 转化子质粒的酶切验证

Fig.1 Enzymatic digestion of the plasmid *Bacillus amyloliquefaciens* MQ01-MA



M: DNA marker; 1: 质粒 pMarA 的 PCR 产物; 2: MQ01-MA 的 PCR 产物; 3: 阴性对照。

图 2 解淀粉芽孢杆菌 MQ01-MA 转化子质粒的 PCR 验证

Fig.2 PCR amplification of *B. amyloliquefaciens* MQ01-MA

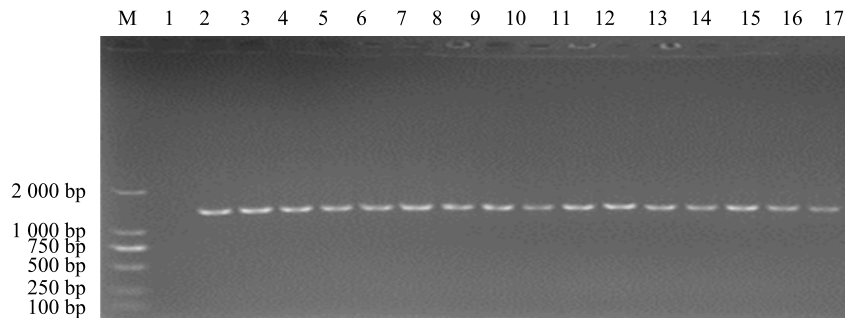
50 μg/ml Km) 和 LB (含 50 μg/ml Kmr) 平板上,获得了在双抗平板上不生长,仅在含卡那霉素的平板上生长的转化子 3 000 多个,构建了 MQ01-MA 的突变体文库。

2.3 突变体中转座子插入位点随机性及拷贝数

从解淀粉芽孢杆菌 MQ01-MA 的突变体文库中随机挑选了 15 个突变体,提取突变子的基因组 DNA,PCR 扩增 *TnYLB-1* 基因片段,结果扩增到了长度约为 1.5 kb 的片段(图 3),与质粒 pMarA 作为阳性模板扩增出的片段大小一致,而以野生型 MQ01 的 DNA 为模板没有扩增出相应的片段,说明转座子 TnYLB-1 被成功插入到 MQ01 的基因组 DNA 中。进一步的 Southern 杂交验证结果(图 4)显

示,10 个突变体的杂交信号带都是单一的且位置几乎各不相同,这说明转座子 TnYLB-1 是以单拷贝、

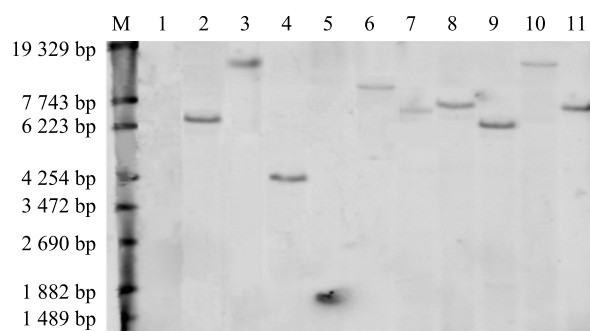
随机插入到解淀粉芽孢杆菌 MQ01 基因组中的。



M: DNA maker; 1: MQ01 的 PCR 产物; 2~16: MQ01-MA 的 PCR 产物; 17: 质粒 pMarA 的 PCR 产物。

图 3 解淀粉芽孢杆菌 MQ01-MA 突变子中 TnYLB-1 转座子的 PCR 验证

Fig.3 PCR amplification of TnYLB-1 transposon gene from mutants randomly selected from the mutant library of *B. amyloliquefaciens* MQ01-MA



M: DNA marker; 1: MQ01; 2~11: MQ01-MA 的突变体。

图 4 解淀粉芽孢杆菌 MQ01-MA 突变体基因组中 TnYLB-1 的 Southern blot 检测

Fig.4 Southern blot hybridization analysis of TnYLB-1 inserted position and copies in transposon mutants of *B. amyloliquefaciens* MQ01-MA

3 讨论

本研究以玉米赤霉烯酮降解菌 *Bacillus amyloliquefaciens* 菌株 MQ01 为研究对象,制备其电转化感受态细胞,并成功地把 pMarA 转化到菌株 MQ01 中。但是在菌株 MQ01 的转化过程中,因为质粒 pMarA 较大(约 8 253 bp),再加上解淀粉芽孢杆菌 MQ01 为较难进行遗传转化的野生型芽孢杆菌,所以在转化过程中经历了很多失

败。刚开始的时候,使用了芽孢杆菌转化过程中经常使用的传统的 Spizizen 化学转化法^[24],但是多次试验都没有转化成功。为此后来选择了电转化方法,本方法在电转化细胞的制备过程中,严格控制菌体的生成时期非常关键,过早过晚地收集细胞都会造成转化失败,菌体细胞适合在 $OD_{600} = 0.9 \sim 1.0$ 的时候收集。在电转化时电压的选择,也要进行不断优化,找到本野生型芽孢杆菌适合的转化电压。本研究中最后优化选择了 2.0 kV 为菌株 MQ01 的转化电压。

当 pMarA 成功转化到菌株 MQ01 中后,本研究采用 50 ℃ 高温诱导转座子 TnYLB-1 插入转化子 MQ01-MA 的方法,得到了菌株 MQ01 的转座插入突变子。Southern 杂交结果显示, TnYLB-1 在菌株 MQ01 的突变子中是以单拷贝的形式存在的,并且插入位置各不相同,说明转座子在菌株 MQ01 中是随机、单拷贝地插入的,从而成功构建了菌株 MQ01 的随机突变文库。

穿梭载体 pMarA 上的 Himar I 转座元件,是细菌诱变应用中最广泛的 Mariner 家族转座元件之一^[27]。Mariner 类转座元件具有非寄主特异性特点,因此可以广泛地应用于细菌诱变,并且除了二核苷酸 TA 之外,它的插入没有特定的靶标序列,从 MQ01 中 9 个突变子的 Southern 杂交信号带都是单一的、且位置几乎各不相同的结果也

说明了 Mariner 类转座元件的这个特点。这也验证了转座子 TnYLB-1 是随机、单拷贝地插入到解淀粉芽孢杆菌 MQ01 菌株的基因组 DNA 中。目前,对玉米赤霉烯酮降解基因的克隆已有报道,如从粉红粘帚霉 (*Clonostachys rosea*) IFO 7063 中克隆到水解酶基因 (*zhd101*),该基因可以把玉米赤霉烯酮转变为毒性较低的产物;从不动杆菌属 (*Acinetobacter* sp.) SM04 中克隆到了硫氧还蛋白过氧化物酶基因 (*prx*),该基因也可以降解玉米赤霉烯酮^[21]。在前面的研究中,我们已经对菌株 MQ01 的全基因组序列进行了测序并进行了基因分析,并没有发现和 *zhd101* 和 *prx* 基因相关的序列,因此我们计划采用转座子插入突变的方法克隆玉米赤霉烯酮降解基因。今后的研究将利用本研究所构建的 MQ01-MA 转座子插入突变体文库,考虑到突变体文库的库容量,接下来将首先进一步扩大突变体文库的库容量,然后通过检测突变体文库中每个突变子对 ZEN 的降解情况,从中筛选出丧失玉米赤霉烯酮降解能力的突变子。获得丧失玉米赤霉烯酮降解能力的突变子后,通过对突变子中转座子侧翼序列的克隆,从而克隆出玉米赤霉烯酮降解相关基因,从基因水平进一步地研究解淀粉芽孢杆菌 MQ01 降解玉米赤霉烯酮的分子机制。

参考文献:

- [1] ALMEIDA-FERREIRA G C, BARBOSA-TESSMANN I P, SEGA R, et al. Occurrence of zearalenone in wheat- and corn-based products commercialized in the State of Parana [J]. *Brazil J Microbiol*, 2013, 44(2): 371-375.
- [2] BERTUZZI T, CAMARDO LEGGIERI M, BATTILANI P, et al. Co-occurrence of type A and B trichothecenes and zearalenone in wheat grown in northern Italy over the years 2009-2011 [J]. *Food Addit Contam Part B Surveill*, 2014, 7(4): 273-281.
- [3] KLARIC M S, CVETNIC Z, PEPELJNJAK S, et al. Co-occurrence of aflatoxins, ochratoxin A, fumonisins, and zearalenone in cereals and feed, determined by competitive direct enzyme-linked immunosorbent assay and thin-layer chromatography [J]. *Arch Hig Rada Toksikol*, 2009, 60(4): 427-434.
- [4] RASHEDI M, SOHRABI H R, ASHJAAZADEH M A, et al. Zearalenone contamination in barley, corn, silage and wheat bran [J]. *Toxicol Ind Health*, 2012, 28(9): 779-782.
- [5] LU J, YU J Y, LIM S, et al. Cellular mechanisms of the cytotoxic effects of the zearalenone metabolites alpha-zearalenol and beta-zearalenol on RAW264.7 macrophages [J]. *Toxicol In Vitro*, 2013, 27(3): 1007-1017.
- [6] PISTOL G C, BRAICU C, MOTIU M, et al. Zearalenone mycotoxin affects immune mediators, MAPK signalling molecules, nuclear receptors and genome-wide gene expression in pig spleen [J]. *PLoS One*, 2015, 10(5): e0127503.
- [7] CHOI B K, CHO J H, JEONG S H, et al. Zearalenone affects immune-related parameters in lymphoid organs and serum of rats vaccinated with porcine parvovirus vaccine [J]. *Toxicol Res*, 2012, 28(4): 279-288.
- [8] ZATECKA E, DED L, ELZEINOVA F, et al. Effect of zearalenone on reproductive parameters and expression of selected testicular genes in mice [J]. *Reprod Toxicol*, 2014, 45: 20-30.
- [9] BELHASSEN H, JIMENEZ-DIAZ I, ARREBOLA J P, et al. Zearalenone and its metabolites in urine and breast cancer risk: a case-control study in Tunisia [J]. *Chemosphere*, 2015, 128: 1-6.
- [10] NOGOWSKI L, NOWAK K W, KACZMAREK P, et al. The influence of coumestrol, zearalenone, and genistein administration on insulin receptors and insulin secretion in ovariectomized rats [J]. *J Recept Signal Transduct Res*, 2002, 22(1-4): 449-457.
- [11] AVANTAGGIATO G, HAVENAAR R, & VISCONTI A. Assessing the zearalenone-binding activity of adsorbent materials during passage through a dynamic *in vitro* gastrointestinal model [J]. *Food Chem Toxicol*, 2003, 41(10): 1283-1290.
- [12] SASAKI R, TAKAHASHI N, SAKAO K, et al. Adsorption of zearalenone to Japanese acid clay and influencing factors [J]. *Mycotoxin Res*, 2014, 30(1): 33-41.
- [13] LEMKE S L, MAYURA K, OTTINGER S E, et al. Assessment of the estrogenic effects of zearalenone after treatment with ozone utilizing the mouse uterine weight bioassay [J]. *J Toxicol Environ Health A*, 1999, 56(4): 283-295.
- [14] KOSAWANG C, KARLSSON M, VELEZ H, et al. Zearalenone detoxification by zearalenone hydrolase is important for the antagonistic ability of *Clonostachys rosea* against mycotoxigenic *Fusarium graminearum* [J]. *Fungal Biol*, 2014, 118(4): 364-373.
- [15] VEKIRU E, HAMETNER C, MITTERBAUER R, et al. Cleavage of zearalenone by *Trichosporon mycotoxinivorans* to a novel nonestrogenic metabolite [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2010, 76(7): 2353-2359.
- [16] TAN H, ZHANG Z, HU Y, et al. Isolation and characterization of *Pseudomonas otitidis* TH-N1 capable of degrading Zearalenone [J]. *Food Control*, 2015, 47: 285-290.
- [17] KARLOVSKY P. Biological detoxification of fungal toxins and its use in plant breeding, feed and food production [J]. *Natural Toxins*, 1999, 7(1): 1-23.
- [18] TAKAHASHI-ANDO N, KIMURA M, KAKEYA OSADA, et al. A novel lactonohydrolase responsible for the detoxification of zearalenone: enzyme purification and gene cloning [J]. *Biochemistry*, 2002, 365(Pt1): 1-6.
- [19] TAKAHASHI-ANDO N, TOKAI T, HAMAMOTO H, et al. Efficient decontamination of zearalenone, the mycotoxin of cereal

- pathogen, by transgenic yeasts through the expression of a synthetic lactonohydrolase gene [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2005, 67(6): 838-844.
- [20] YU Y S, QIU L P, WU H, et al. Oxidation of zearalenone by extracellular enzymes from *Acinetobacter* sp. SM04 into smaller estrogenic products [J]. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2011, 27(11): 2675-2681.
- [21] YU Y S, WU H, TANG Y Q, et al. Cloning, expression of a peroxidase gene from *Acinetobacter* sp. SM04 and characterization of its recombinant protein for zearalenone detoxification [J]. *Microbiol Res*, 2012, 167(3): 121-126.
- [22] LE BRETON Y, MOHAPATRA N P, HALDENWANG W G. *In vivo* random mutagenesis of *Bacillus subtilis* by use of TnYLB-1, a mariner-based transposon [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2006, 72(1): 327-333.
- [23] NATHALIE T, CHRISTIAN L, JIM H E J, et al. Elaboration of an electroporation protocol for *Bacillus cereus* ATCC 14579 [J]. *Journal of Microbiological Methods*, 2006, 67(3): 543-548.
- [24] SPIZIZEN J. Transformation of biochemically deficient strains of *Bacillus subtilis* by deoxyribonucleate [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1958, 44(10): 1072-1078.
- [25] LIU J, HE D, LI X Z. γ -Polyglutamic acid (γ -PGA) produced by *Bacillus amyloliquefaciens* co6 promoting its colonization on fruit surface [J]. *Int J Food Microbiol*, 2010, 142(1/2): 190-197.
- [26] SOUTHERN E M. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis [J]. *Mol Biol*, 1975, 98(3): 503-517.
- [27] LAMPE D J, AKERLEY B J, RUBIN E J, et al. Hyperactive transposase mutants of the Himar1 mariner transposon [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96(20): 11428-11433.

(责任编辑:陈海霞)