

大豆锰超氧化物歧化酶基因在乳酸乳球菌中的分泌表达

马红丹¹, 张丽媛¹, 赵邯郸¹, 徐丹丹¹, 曲 静², 关淑艳^{1,*}, 王丕武^{2,*}

(1.吉林农业大学生命科学院, 吉林长春 130118; 2.吉林农业大学农学院, 吉林长春 130118)

摘要:为使大豆锰超氧化物歧化酶(Mn superoxide dismutase, MnSOD)在乳酸乳球菌中高效表达, 将克隆的MnSOD基因开放阅读框序列分别重组到质粒pNZ8149和经改造的质粒pNZS上, 表达载体pNZ-SOD和分泌表达载体pNZS-SOD, 将两者分别以电穿孔法转化乳酸乳球菌*L. lactis* NZ3900, 经Elliker琼脂板筛选、聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)、酶切鉴定正确后, 获得的两重组菌株加入Nisin进行诱导表达, 对*L. lactis* NZ3900/pNZ-SOD和*L. lactis* NZ3900/pNZS-SOD的表达产物进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecyl sulfate - polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)和酶活性对比分析。结果显示: *L. lactis* NZ3900/pNZS-SOD菌株表达SOD总活性约是*L. lactis* NZ3900/pNZ-SOD菌株的1.6倍, 是*L. lactis* NZ3900/pNZ8149的13.5倍, 且可将表达的约2/3的SOD分泌到胞外, 表明经改造的乳酸菌分泌表达系统*L. lactis* NZ3900/pNZS能够分泌表达SOD, 并增强SOD的表达。

关键词: 锰超氧化物歧化酶(MnSOD); 食品级分泌表达载体; 乳酸乳球菌

Cloning and Expression of Manganese Superoxide Dismutase Gene by Food-Grade Vector in *Lactococcus lactis*

MA Hongdan¹, ZHANG Liyuan¹, ZHAO Handan¹, XU Dandan¹, QU Jing², GUAN Shuyan^{1,*}, WANG Piwu^{2,*}

(1. College of Life Sciences, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China;

2. College of Agriculture, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China)

Abstract: Open reading frame of manganese superoxide dismutase (MnSOD) from soybean was cloned into the plasmid pNZ8149 and plasmid pNZS was reformed to construct the food-grade vector. The recombinant plasmids were then separately transformed into *L. lactis* NZ3900 by electronic perforation, and the growth ability of the transformants was detected in Elliker medium. The recombinant plasmids named pNZ-SOD and pNZS-SOD were thus constructed successfully after PCR amplification, ligation and identification. The expression of *L. lactis* NZ3900/pNZ-SOD and *L. lactis* NZ3900/pNZS-SOD was induced by nisin and their expressed products were analyzed by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). The SOD enzymatic activities of the transformants *L. lactis* NZ3900/pNZ-SOD and *L. lactis* NZ3900/pNZ-SOD were determined by the inhibition of nitrotetrazolium. The SOD enzymatic activity of the transformant *L. lactis* NZ3900/pNZS-SOD (with two thirds of extracellular SOD) was 1.6 times higher than that of the parent strain. Hence, the expression of MnSOD was enhanced in *L. lactis* NZ3900/pNZS.

Key words: manganese superoxide dismutase (MnSOD); food-grade vector; *Lactococcus lactis*

中图分类号: Q786

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630 (2015) 01-01135-05

doi:10.7506/spkx1002-6630-201501026

超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)是生物体防御氧化损伤的重要酶类, 对生物体生命活动具有重要意义。锰超氧化物歧化酶(MnSOD)是SOD的一

收稿日期: 2014-01-15

基金项目: 农业科技成果转化资金项目(2013GB2B100125); 吉林省科技支撑计划项目(20120215);

吉林农业大学启动基金项目(201242)

作者简介: 马红丹(1988—), 女, 硕士, 研究方向为植物分子生物学与基因工程。E-mail: mhd522@126.com

*通信作者: 关淑艳(1971—), 女, 教授, 博士, 研究方向为分子生物学与基因工程。E-mail: 458194095@qq.com

王丕武(1958—), 男, 教授, 博士, 研究方向为分子生物学与基因工程。E-mail: piuwu@163.com

种, 已有研究表明MnSOD基因过量表达与多种肿瘤(如乳腺癌、肺癌、胃癌等)相关, 被认为是一种新的抗癌基因, 因而受到广泛关注^[1-4]。但MnSOD在生物体内表达

量较低，获取困难，而应用重组微生物发酵生产可解决这一难题。目前，多种来源的MnSOD基因已在不同微生物中成功克隆和表达^[5-7]。

乳酸菌是公认的食品级安全微生物，在食品工业和生物制药等诸多领域广泛应用。在基因工程领域，已建立一系列基于乳酸菌的遗传转化系统，应用这些系统定向生产人类所需要的产品将成为热点。乳酸菌遗传转化系统中应用较多的是NICE系统，*L. lactis* NZ3900/pNZ8149是NICE系统中的一种，其诱导剂、筛选标记和宿主均为食品级，符合美国食品和药物管理局（Food and Drug Administration, FDA）安全标准，是食品级安全的外源基因表达系统^[8]，已有来源于动物、植物、微生物的不同外源基因在该系统中成功表达^[9-11]。但外源基因在该系统中为胞内表达，可能存在外源基因产物在细胞内大量表达积累容易形成包涵体、产物容易被细胞内水解酶系统识别作为异源入侵物水解、获得目的蛋白需要对菌体进行破碎处理等缺点，因此该系统在实际应用中具有一定局限性。

本实验室已利用基因工程技术，对质粒pNZ8149进行改造，在其启动子PnisA后插入乳酸乳球菌MG1363未知分泌蛋白Usp45胞外分泌信号肽基因序列SPusp45，并利用聚合酶链式反应（polymerase chain reaction, PCR）技术定点删除启动子与信号肽之间的酶切位点，获得分泌表达载体pNZS，重新建立分泌表达系统*L. lactis* NZ3900/pNZS^[12]，以打破该系统局限性。本实验分别将大豆MnSOD基因导入*L. lactis* NZ3900/pNZ8149和*L. lactis* NZ3900/pNZS系统进行表达，尝试对两系统表达MnSOD基因的表达量和表达方式进行对比分析，为MnSOD的高效表达和直接应用研究提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

1.1.1 质粒和菌种

L. lactis NZ3900和配套载体pNZ8149 荷兰NIZO研究所；大肠杆菌DH5α和质粒pREP5N-MnSOD、经改造质粒pNZS 吉林农业大学植物生物技术中心^[12]；克隆用质粒pMD18-T 大连宝生物公司。

1.1.2 引物

上游引物1：5'-GG ACT AGT ATG GCC GCG CGA GCT CTG T-3'；下游引物2：5'-TGC TCT AGA CTA AGA GCT CTC TTT CTC ATA C-3'；以下划线标记的序列为引入的限制性酶切位点（Spe I、Xba I），引物由北京三博远志生物技术有限责任公司合成。

1.1.3 试剂

pMD18-T克隆载体、质粒提取试剂盒、凝胶

DNA回收试剂盒、T4 DNA连接酶、限制性内切酶及DL2000Mark0er 日本TaKaRa公司；蛋白分子质量标准品（116、66.2、45、35、25、18.4、14.4 kD）加拿大MBI公司；Nisin标准品 美国Sigma公司；其他化学试剂均为分析纯。

1.2 仪器与设备

UNO PCR仪 德国Biometra公司；DYY-4型稳压稳流电泳仪（配有DYY-33A型水平电泳槽、DYCZ-21型垂直电泳槽） 北京六一仪器厂；MicroPulser™型电击仪、Universal Hood S.N. 75s/01700凝胶成像仪 美国Bio-Rad公司。

1.3 方法

1.3.1 引物设计与合成

根据GenBank已发表的大豆MnSOD基因（序列号AJ440726）的开放阅读框序列及pNZ8149和pNZS载体序列，应用Premier5.0软件设计一对特异性引物，并分别在上游引物和下游引物5'端引入限制性酶切位点Spe I、Xba I，引物由北京三博远志生物技术有限责任公司合成。

1.3.2 MnSOD基因的克隆与鉴定

以含有MnSOD基因全序列的pREP5N-MnSOD为模板，以引物1、2扩增MnSOD开放阅读框序列，产物以凝胶DNA回收试剂盒回收后，克隆到pMD18-T上，CaCl₂法转化*E.coli* DH5α感受态细胞。蓝白斑筛选阳性转化子，试剂盒提质粒，经PCR验证，Spe I、Xba I双酶切验证，送北京三博远志生物技术有限责任公司测序。

1.3.3 食品级载体的构建及乳酸菌转化

测序正确的转化子，试剂盒提质粒，以Spe I、Xba I双酶切，凝胶回收目的片段后分别与同样经双酶切回收的pNZ8149和pNZS质粒以T4连接酶连接12 h，连接产物以电穿孔法转化*L. lactis* NZ3900感受态细胞^[13]，Elliker琼脂板筛选阳性菌落^[14]。挑取阳性菌落提质粒进行PCR及Spe I、Xba I双酶切鉴定。鉴定正确的两重组质粒送北京三博远志生物技术有限责任公司测序，测序正确的表达载体命名为pNZ-SOD，分泌表达载体命名为pNZS-SOD。

1.3.4 SOD的诱导表达和乳酸乳球菌上清和菌体蛋白样品的制备

L. lactis NZ3900/pNZ8149、*L. lactis* NZ3900/pNZS和*L. lactis* NZ3900/pNZS-SOD分别接种于5 mL GM17的液体培养基内，30 ℃过夜，次日以1%接种量接入新鲜培养基，至OD_{600 nm}在0.4~0.5之间，加入质量浓度为5 ng/mL的Nisin诱导，继续培养5 h，4 ℃离心分别收集上清和菌体，上清于-20 ℃冷冻12 h，4 ℃解冻、离心，收集沉淀，-20 ℃备用；菌体用0.1倍原培养体积磷酸盐缓冲溶液（phosphate buffered solution, PBS）重悬，加溶

菌酶37 °C, 0.5 h后用超声波细胞破壁仪破壁, 4 °C离心收集上清液, 即为菌体蛋白, -20 °C备用。

1.3.5 表达产物的SDS-PAGE分析

分别取上清样品(0.1倍原上清体积的PBS溶解)和菌体样品16 μL与4 μL蛋白上样缓冲液(5×)混合, 95 °C变性8 min后, 4 °C离心, 取16 μL上清液上样, 进行SDS-PAGE, 考马斯亮兰染色后, 观察SOD特异条带并扫描保存。

1.3.6 表达产物的酶活性检测

以氯化硝基四氮唑蓝(nitroblue tetrazolium, NBT)光照还原法^[15]分别测定新鲜制备的上清和菌体样品SOD活性。3 mL反应体系在光照结束后迅速以722分光光度计在560 nm波长处测定吸光度, 每个样品设5个重复, 取5次测定的平均值, 以抑制NBT光化还原反应速率的50%所需的酶量为一个酶活力单位。

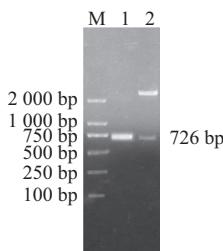
2 结果与分析

2.1 MnSOD基因开放阅读框序列的PCR扩增

PCR扩增MnSOD基因开放阅读框序列, 产物经1.0%琼脂糖凝胶电泳, EB染色后紫外灯下观察, 有与目的基因大小相符的条带, 大小为726 bp左右, 目的片段成功扩增。

2.2 重组质粒pMD18-T-MnSOD的构建及鉴定

PCR扩增产物经凝胶回收克隆到pMD18-T载体上。经蓝白斑筛选得阳性菌株, 提质粒进行PCR和双酶切鉴定。重组质粒PCR及双酶切产物进行琼脂糖凝胶电泳, 得到与期望大小相一致的726 bp条带(图1), 说明外源基因成功插入pMD18-T载体。将含有重组质粒pMD18-T-MnSOD的菌体送至北京三博远志生物技术有限责任公司测序。测序结果表明克隆到T载体上的MnSOD基因序列与GenBank中检索到的大豆MnSOD序列一致, 成功克隆目的基因。



M. DNA Marker; 1. T/MnSOD PCR产物; 2. T/MnSOD酶切产物。

图1 T/MnSOD的鉴定

Fig.1 Restriction enzyme digestion of recombinant plasmid T/MnSOD

2.3 重组质粒pNZ-SOD、pNZS-SOD的构建及鉴定

质粒pMD18-T-MnSOD经Spe I、Xba I双酶切、凝

胶回收后获得线性目的基因与同样经双酶切、凝胶回收的线性质粒pNZ8149、pNZS以T4连接酶连接, 构建了重组质粒pNZ-SOD和pNZS-SOD, 重组质粒分别电转化*L. lactis* NZ3900, 经Elliker琼脂板筛选, 均得到多个转化子, 转化成功。转化子摇菌、提质粒后, PCR扩增和双酶切鉴定, 琼脂糖电泳后均得到与预期大小(726 bp)相一致的片段, 重组质粒送北京三博远志生物技术有限责任公司测序, 测序结果显示, 重组质粒所携带的目的基因与MnSOD基因序列一致, 重组质粒构建成功, 并成功导入*L. lactis* NZ3900(图2~4)。

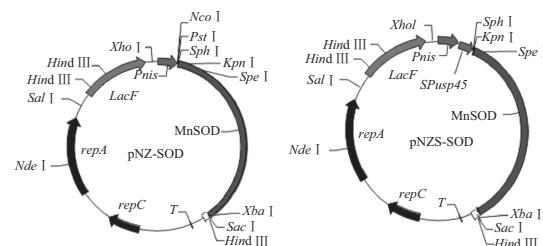
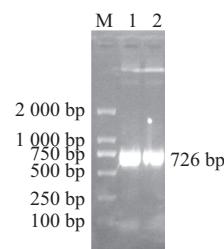


图2 重组质粒pNZ-SOD和pNZS-SOD的构建示意图

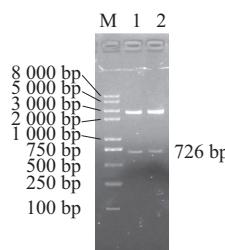
Fig.2 Schematic representation of the organization of recombinant plasmids pNZ-SOD and pNZS-SOD



M. DL2000 DNA Marker; 1. pNZ-SOD PCR产物; 2. pNZS-SOD PCR产物。

图3 重组质粒pNZ-SOD、pNZS-SOD的PCR扩增产物

Fig.3 PCR products of recombinant plasmids pNZ-SOD and pNZS-SOD



M. DL8000 DNA Marker; 1. pNZ-SOD酶切产物; 2. pNZS-SOD酶切产物。

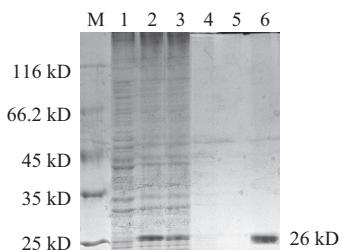
图4 重组质粒pNZ-SOD、pNZS-SOD的限制性酶切产物

Fig.4 Restriction enzyme digestion of recombinant plasmids pNZ-SOD and pNZS-SOD

2.4 重组质粒表达产物的SDS-PAGE分析

L. lactis NZ3900/pNZ8149、*L. lactis* NZ3900/pNZ-SOD和*L. lactis* NZ3900/pNZS-SOD经Nisin诱导表达后

提取蛋白样品进行SDS-PAGE分析, 与*L. lactis* NZ3900/pNZ8149和*L. lactis* NZ3900/pNZ-SOD相比, *L. lactis* NZ3900/pNZS-SOD上清样品在约26 kD处多出一条明显的特异性谱带; 而两重组菌株菌体蛋白样品比*L. lactis* NZ3900/pNZ8149均多出一条约26 kD大小的特异性谱带, 并且*L. lactis* NZ3900/pNZ-SOD株谱带较*L. lactis* NZ3900/pNZS-SOD株谱带深(图5), 这表明经改造的乳酸菌分泌表达系统能够将外源的目的蛋白分泌到胞外, 且表达量明显高于*L. lactis* NZ3900/pNZ8149胞内表达系统。



M. 标准蛋白Marker; 1. *L. lactis* NZ3900/pNZ8149菌株胞内总蛋白样品; 2. *L. lactis* NZ3900/pNZ-SOD菌株胞内总蛋白样品; 3. *L. lactis* NZ3900/pNZS-SOD菌株胞内总蛋白样品; 4. *L. lactis* NZ3900/pNZ8149菌株培养物样品; 5. *L. lactis* NZ3900/pNZ-SOD菌株培养物样品; 6. *L. lactis* NZ3900/pNZS-SOD菌株培养物样品。

图5 重组质粒pNZ-SOD、pNZS-SOD在*L. lactis*NZ3900中表达产物的SDS-PAGE分析

Fig.5 SDS-PAGE analysis of pNZ-SOD, pNZS-SOD expression in *L. lactis*NZ3900

2.5 SOD活性检测

经Nisin诱导培养5 h后, 提取SOD粗酶液, 以Beauchamp建立的NBT还原法分别测定重组质粒表达的SOD活性(表1), 结果发现: *L. lactis* NZ3900/pNZS-SOD表达SOD总活性和*L. lactis* NZ3900/pNZ-SOD、*L. lactis* NZ3900/pNZ8149菌株相比, 均有极显著($P<0.01$)提高; 3组上清样品中, 1组样品有SOD活力, 约为该组总酶活力的2/3(31.54 U/mL/47.12 U/mL), 而2、3组没有SOD活力, 说明*L. lactis* NZ3900/pNZ8149和*L. lactis* NZ3900/pNZ8149菌株表达SOD在胞内, 而*L. lactis* NZ3900/pNZS系统可将外源基因分泌到胞外, 这便于目的产物的纯化和利用; *L. lactis* NZ3900/pNZS-SOD表达SOD总活性是*L. lactis* NZ3900/pNZ-SOD菌株的1.6倍, 说明经改造的分泌表达系统*L. lactis* NZ3900/pNZS能够增强活性SOD表达。综上所述, *L. lactis* NZ3900/pNZS系统能够分泌表达外源的MnSOD, 并增强其活性表达量, 这为高效表达MnSOD的研究提供了理论依据。

表1 不同乳酸乳球菌株SOD酶活力测定结果

Table 1 SOD activity in different *L. lactis* strains

菌株及组别	SOD酶活力/(U/mL)			对照倍数
	上清样品	菌体样品	总活力	
<i>L. lactis</i> NZ3900/pNZS-SOD (1)	31.54	15.63	47.12±0.50 ^{aA}	1.6 (2); 13.5 (3)
<i>L. lactis</i> NZ3900/pNZ-SOD (2)	<0.1	28.74	28.74±0.29 ^{bB}	8.3 (3)
<i>L. lactis</i> NZ3900/pNZ8149 (3)	<0.1	3.48	3.48±0.32 ^{cC}	

注: 同列肩标小写字母不同表示差异显著($P<0.05$); 大写字母不同表示差异极显著($P<0.01$)。

3 讨论

MnSOD是SOD家族中的一员, 其表达量与人类的衰老和多种疾病相关^[16-20]。已发表的研究成果表明, MnSOD存在于真核生物的线粒体基质中^[21]。以组织破碎的分离提取工艺大量获取成本较高; 传统微生物发酵生产, 菌种自身MnSOD表达量较低, 且后提纯工艺繁琐, 也难于大幅提高SOD产量。而应用基因工程技术将外源的MnSOD基因导入受体菌, 获得高效分泌表达MnSOD基因的菌株进行生产将解决以上难题。

应用大肠杆菌受体系统表达外源的SOD已有报道^[5], 但大肠杆菌自身会产生有毒性的蛋白, 所以在分离纯化环节的损失和成本问题使其在生产中的应用受到限制。乳酸乳球菌表达系统*L. lactis* NZ3900/pNZ8149是食品级安全表达系统, 可通过Nisin的诱导作用, 大幅度提高外源基因的表达效率, 表达产物可直接应用于食品及医药领域^[22-23]。但其胞内表达特性使该系统的应用受到限制, 而利用基因工程手段改造的食品级分泌表达系统*L. lactis* NZ3900/pNZS, 可以分泌表达的方式表达外源基因, 从而提高了外源基因的表达量。因此, 应用食品级分泌表达系统表达外源基因, 获得重组微生物菌株进行发酵生产MnSOD前景广阔。使用受体菌偏好密码子可有效提高外源基因的表达^[24], 但根据Kazusa DNA Research Institute密码子数据库中乳酸乳球菌基因组密码子使用频率数据, 及GenBank已发表的大豆MnSOD基因(序列号AJ440726)密码子使用数据, 进行对比分析发现, MnSOD序列可优化密码子低于1%, 对该基因在乳酸乳球菌中的表达几乎无影响。

本实验分别构建了表达载体pNZ-SOD和分泌表达载体pNZS-SOD, 并转化受体菌*L. lactis* NZ3900, 对表达产物进行SDS-PAGE和酶活性对比分析。结果表明, 经改造的*L. lactis* NZ3900/pNZS分泌表达系统可通过SPsp45引导约2/3的外源的MnSOD基因表达产物分泌到胞外, 从而增强MnSOD在乳酸菌中的表达, 表达SOD总活性为出发菌株的13.5倍, 而孙强正等^[25]以*L. lactis* MBP71为受体表达的MnSOD活性达到了出发菌株的17倍, 分析其高效表达原因可能有两点: 一是克隆的sodA基因来源于乳酸菌, 与受体菌亲缘关系较近, 易于表达, 二是克隆

的*soda*基因包含了同源的启动子，增强了目的基因的表达。本实验为SOD的高效表达研究和直接应用奠定了理论基础，为外源基因在乳酸菌中分泌表达提供了参考。

参考文献：

- [1] SOINI Y, VAKKALA M, KAHLOS S K, et al. *MnSOD* expression is less frequent in tumor cells of invasive breast carcinomas than *in situ* carcinomas or nonneoplastic breast epithelial cells[J]. American Journal of Pathology, 2001, 195(2): 156-162.
- [2] WANG Yadi, KUMDA M, GAO Xianshu, et al. Hydronen peroxide overload increases adriamycin-induced apopiosis of SaOS₂FM, manganese superoxide dismutase-overexpressing human osteosarcoma cell line[J]. International Journal of Radiation Oncology, 2005, 26(5): 1291-1300.
- [3] ZEJNIOVIC J, AKEV N, YILMAZ H, et al. Association between manganese superoxide dismutase polymorphism and risk of lung cancer[J]. Cancer Genet and Cytogenet, 2009, 189(1): 1-4.
- [4] 陈坚, 林庚金, 程建, 等. 锰型超氧化物岐化酶基因转染抑制SGC7901胃癌细胞增殖的机制[J]. 世界华人消化杂志, 2005, 13(12): 1386-1389.
- [5] BREHM J K, CHAMBERS S P, BROM K J. Molecular cloning and nucleotide sequence determination of the *Bacillus stearothermophilus* NCA1503 superoxide dismutase and its overexpression in *Escherichia coli*[J]. Applied Microbiology Biotechnology, 1991, 36(3): 358-363.
- [6] ZHANG Yanhong, GU Jinfa, Zhao Lili, et al. Complete elimination of colorectal tumor-xenograft by combined manganese superoxide dismutase with tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand gene virotherapy[J]. Cancer Research, 2006, 66(8): 4291-4298.
- [7] SONG Ningning, ZHENG Yan, LI Duochuan, et al. Cloning, expression, and characterization of thermostable manganese superoxide dismutase from *Thermoascus aurantiacus* var. *levisporus*[J]. The Journal of Microbiology, 2009, 47(1): 123-130.
- [8] ZHOU Xuxia, LI Weifen, MA Guoxia. The nisin-controlled gene expression system: construction, application and improvements[J]. Biotechnology Advances, 2006, 24: 285-295.
- [9] 董丽娜, 高凤山, 许崇波, 等. 表达猪流行性腹泻病毒COE基因的重组乳酸菌的构建与鉴定[J]. 畜牧兽医学报, 2008, 39(12): 1743-1747.
- [10] 顾文亮, 夏启玉, 姚晶, 等. 重组植物甜蛋白马宾灵的食品级乳酸乳球菌诱导表达系统的构建[J]. 中国农学通报, 2012, 28(30): 196-200.
- [11] 陈帅印, 张荣光, 范清堂, 等. 乳酸菌中幽门螺杆菌*ureB*基因的食品级表达与优化[J]. 郑州大学学报: 医学版, 2011, 46(3): 396-400.
- [12] 马超, 王丕武, 付永平, 等. 乳酸乳球菌食品级表达载体的改造[J]. 安徽农业科学, 2010, 38(19): 10247-10250.
- [13] HOLO H, NES I F. Electroporation of *Lactococcus lactis*[J]. Applied and Environment Microbiology, 1989, 55: 3119-3123.
- [14] MIERAU I, OLIEMAN K, MOND J, et al. Optimization of the *Lactococcus lactis* nisin-controlled gene expression system NICE for industrial applications[J]. Microbial Cell Factories, 2005, 4(1): 4-16.
- [15] BEAUCHAMP C, FRIDOVICH I. Superoxide dismutase: Improved assay and an assay applicable to acrylamide gels[J]. Analytical Biochemistry, 1971, 44(1): 276-287.
- [16] SHIMODA M S, HATTORI T, MATSUMINE H, et al. MnSOD activity and protein in a patient with chromosome 6-linked autosomal recessive parkinsonism in comparison with Parkinson disease and control[J]. Neurology, 1997, 49: 1257-1261.
- [17] YEH C C, WAN X S, ST C D. Transcriptional regulation of the 5'-proximal promoter of the human manganese superoxide dismutase gene[J]. DNA and Cell Biology, 1998, 17(11): 921-930.
- [18] OBERLEY L W. Mechanism of the tumor suppressive effect of MnSOD overexpression[J]. Biomedicine and Pharmacotherapy, 2005, 59(4): 143-148.
- [19] HITCHLER M, WIKAINAPAKU K, YU Lei, et al. Epigenetic regulation of manganese superoxide dismutase expression in human breast cancer cells[J]. Epigenetics, 2006, 1(4): 163-171.
- [20] WANG Juan, LU Youyong. Mitochondrial DNA 4977 bp deletion correlated with reactive oxygen species production and manganese superoxide dismutase expression in gastric tumor cells[J]. Chinese Medical Journal, 2009, 122(4): 431-436.
- [21] 王义华, 徐梅珍, 党云琨, 等. 拟南芥MnSOD的原核表达、纯化及抗体制备[J]. 生物技术通讯, 2004, 15(2): 112-114.
- [22] TEUBER M, MEILE L, SCHWARZ F. Acquired antibiotic resistance in lactic acid bacteria from food[J]. Antonie Van Leeuwenhoek International Journal of Microbiology, 1999, 76(1): 115-137.
- [23] 徐义刚, 崔丽春. 乳酸菌作为基因工程受体菌的研究展望[J]. 中国微生态学杂志, 2007, 19(1): 118-120.
- [24] 贾兴元, 陈星, 苏畅, 等. 人工合成苯丙氨酸脱氨酶基因在乳酸乳球菌中的食品级表达[J]. 中华微生物学和免疫学杂志, 2006, 26(1): 23-26.
- [25] 孙强正, 熊衍文, 李振军, 等. 乳酸乳球菌食品级载体的构建及Mn-SOD基因的克隆和表达[J]. 中国人兽共患病学报, 2006, 22(6): 498-501.