

王 平,赵巧巧,黄 鹰. 丙酮醛降解酶基因的克隆与高效表达[J]. 江苏农业科学,2016,44(2):62-65.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.02.017

# 丙酮醛降解酶基因的克隆与高效表达

王 平<sup>1</sup>,赵巧巧<sup>1,2</sup>,黄 鹰<sup>1</sup>

(1. 南京师范大学生命科学学院,江苏南京 210046;2. 邹平第一中学,山东滨州 256200)

**摘要:**由于丙酮醛降解酶(methylglyoxal degradation enzyme, MD)是生物体内代谢丙酮醛的一种关键酶,实现 MD 的高效表达对调控丙酮醛的代谢途径具有重要意义。所以根据 *Schizosaccharomyces pombe* GeneDB 中 MD 的基因序列 (SPAC22E12.03C) 设计引物,以粟酒裂殖酵母(*Schizosaccharomyces pombe*) cDNA 文库为模板通过 PCR 扩增技术得到目标基因,目的片段全长 576 bp。将 SPAC22E12.03C 连接到 pET-28a(+) 上,得到重组质粒 pET-28a(+)-SPAC22E12.03C,并在 *Escherichia coli* BL21(DE3) 中实现表达。同时,对其目的蛋白的表达条件进行了优化,获得最佳表达条件:诱导温度 37 ℃,诱导起始菌体  $D_{600\text{nm}}$  为 0.5~0.6,诱导剂 IPTG 浓度为 0.8 mmol/L。这为研究粟酒裂殖酵母体内丙酮醛的降解途径打下了坚实基础。

**关键词:** 粟酒裂殖酵母;丙酮醛降解酶;丙酮醛;基因克隆;基因表达

**中图分类号:** Q785 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2016)02-0062-04

丙酮醛(methylglyoxal)是在糖酵解、脂质和氨基酸代谢过程中产生的一种对生物体有毒害作用的代谢物<sup>[1-2]</sup>,性质活跃,属于  $\alpha$ -酮基醛类,由糖酵解的中间产物丙糖磷酸化裂解生成,或由丙酮和氨基丙酮代谢生成<sup>[3]</sup>。其醛基可与蛋白

质的氨基基团之间发生非酶性糖基化反应(又称 Maillard 反应)<sup>[4]</sup>形成一系列具有高度活性和高度异质性的终产物,从而导致蛋白功能的修改和缺陷,Ward 等研究证实,丙酮醛能通过细胞内颗粒释放而加强应激反应<sup>[5]</sup>,并进一步诱导细胞的应激反应,包括胞吞、细胞因子释放和细胞凋亡<sup>[6]</sup>等,丙酮醛在生物体内过度累积会导致细胞死亡;此外,丙酮醛与生物体的很多病变有关,如慢性糖尿病<sup>[7-8]</sup>、结肠癌和乳腺癌等。因此,丙酮醛在生物体内的累积量必须受到严格的控制,丙酮醛降解酶是代谢丙酮醛的一种关键酶,于是对丙酮醛降解酶的研究显得尤为重要。

收稿日期:2015-03-24

基金项目:国家自然科学基金(编号:31070703)。

作者简介:王 平(1990—),女,河南南阳人,硕士研究生,从事粟酒裂殖酵母分子机理研究。E-mail:350479708@qq.com。

通信作者:黄 鹰,教授,从事微生物生物化学与分子生物学研究。E-mail:paula\_wong@163.com。

所以,本试验中对耐盐碱性鉴定浓度的筛选是很必要的。本研究最终确定的玉米苗期盐性处理浓度为 100 mmol/L,确定的玉米苗期碱处理浓度为 35 mmol/L;刘芳等研究表明 250 mmol/L NaCl 是玉米苗期耐盐性筛选的理想浓度<sup>[9]</sup>,崔美燕的研究表明 25 mmol/L  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  可以作为玉米苗期耐碱性鉴定的理想浓度<sup>[10]</sup>。本试验中使用的耐盐碱胁迫浓度与其他人的研究存在一定差异,并使用较重的胁迫参数,这样更有利于获得相关的 EST 表达。此外,研究人员曾采用苗情评价的方法对玉米自交系幼苗进行耐盐碱性鉴定,根据盐或碱胁迫处理 7 d 后苗情观察来评价玉米材料的耐盐碱性,非常直观、简单<sup>[10-11]</sup>。本试验中也是收集 7 d 的玉米混合组织作为抽提 RNA 的材料。

本研究提取处理玉米品系 YQ7-96 的 3 叶 1 心期的茎叶混合组织的总 RNA,运用 SMART 技术构建 pDNR-LIB 载体的 cDNA 文库,在成功构建了盐和碱胁迫的玉米 cDNA 文库的基础上,对产生的 EST 进行了测序和分析归类,筛选出细胞功能相关 EST,为后续研究提供了基础数据。

## 参考文献:

[1] 江香梅,黄敏仁,王明庥. 植物抗盐碱、耐干旱基因工程研究进展

[J]. 南京林业大学学报:自然科学版,2001,25(5):57-62.

[2] 王 宁. 不同玉米品种苗期对盐胁迫的生物学响应及耐性机制研究[D]. 沈阳:沈阳农业大学,2009.

[3] Munns R, Tester M. Mechanisms of salinity tolerance[J]. Annual Review of Plant Biology, 2008, 59: 651-681.

[4] 张 洁,焦岳宏,陆海峰,等. 玉米混合组织的 EST 文库的构建和部分 EST 序列的分析[J]. 广西农业生物科学, 2004, 23(3): 243-248.

[5] Barrels D, Sunkar R. Drought and salt tolerance in plants[J]. Critical Reviews in Plant Sciences, 2005, 24: 23-58.

[6] 王翠亭,沈银柱,黄占景. 高等植物中的逆激蛋白及交叉适应综述[J]. 保定师专学报, 1999, 12(4): 34-37.

[7] 彭立新,李德全,束怀瑞. 植物在渗透胁迫下的渗透调节作用[J]. 天津农业科学, 2002(8): 38-43.

[8] Morgan M J. Osmoregulation and water stress in higher plants[J]. Annual Review of Plant Biology, 1984, 35: 299-391.

[9] 刘 芳,付 艳,高树仁,等. 玉米幼苗的盐胁迫反应及玉米耐盐性的鉴定[J]. 黑龙江八一农垦大学学报, 2007, 19(6): 22-26.

[10] 崔美燕. 玉米苗期耐碱种质资源评价及盐碱条件下部分性状遗传分析[D]. 大庆:黑龙江八一农垦大学, 2009.

[11] 付 艳,高树仁,王振华. 玉米种质苗期耐盐性的评价[J]. 玉米科学, 2009, 17(1): 36-39, 50.

近年来,各种慢性病患病率的增加,使得丙酮醛在体内的代谢途径受到越来越多的关注,丙酮醛代谢相关酶的研究也成为国际热点。研究报道在细菌体内丙酮醛的降解主要通过 3 条途径:(1)依赖于谷胱甘肽的醛酮变位酶 I 和醛酮变位酶 II<sup>[9]</sup>;(2)不依赖于谷胱甘肽的醛酮变位酶 III;(3)依赖于 NADPH 的醛还原酶和依赖于 NADH 的乙醇脱氢酶<sup>[10]</sup>。人体内的 DJ-1 也具有分解丙酮醛的作用,我们以粟酒裂殖酵母 (*Schizosaccharomyces pombe*) 为模式生物,通过构建系统进化树和基因比对,找到了粟酒裂殖酵母体内的能够降解丙酮醛的酶,即 SPAC22E12.03C 的产物。

本试验根据 SPAC22E12.03C 的基因序列设计引物,以粟酒裂殖酵母的 cDNA 为模板通过 PCR 扩增技术得到了目标酶的基因,构建 T7 强启动子表达载体和重组工程菌株,研究丙酮醛降解酶的高效表达,希望以后能够通过高效表达丙酮醛降解酶来调控和优化丙酮醛的代谢途径,从而为解决因丙酮醛在体内累积过多引起的各种慢性疾病提供研究基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌株与质粒

本试验中所用的菌株名为 *Escherichia coli* BL21 (DE3)、*Escherichia coli* top10,所用的质粒为 pET-28a(+),这些材料均为笔者所在实验室保存。粟酒裂殖酵母 cDNA 文库来自美国,重组克隆 pET-28a(+)-SPAC22E12.03C 为笔者所在实验室构建。

### 1.2 试剂及其来源

限制性内切酶 *Nco* I 和 *Xho* I、solution I [kite code. 6022]、*rTaq* DNA 聚合酶、*PrimeSTAR* DNA 聚合酶、蛋白 marker、异丙基硫代- $\beta$ -D-半乳糖苷 (IPTG),均购自 TaKaRa 公司;DNA 割胶回收试剂盒,来源于 BioSpin Gel Extraction Kit;PCR 过柱纯化,来源于 BioFLUX BioSpin PCR Purification Kit 试剂盒;DNA marker 来源于北京全式金生物技术有限公司;PCR 引物由南京思普金生物科技有限公司合成;卡那霉素 (Kan) 来源于 Sigma 公司,其他常规试剂均为国产分析纯。

### 1.3 粟酒裂殖酵母中目的片段 SPAC22E12.03C 的获得

根据 *S. pombe* GeneDB 数据库中的丙酮醛降解酶基因 (SPAC22E12.03C) 序列设计上、下游引物,分别为 SPAC22E12.03C-*Nco* I-up:5'-CATGCCATGGTAAAG-GTTTGCCTATTTGTTG-3',SPAC22E12.03C-*Xho* I-down:5'-CCGCTCGAGGGGCATACTAAGAGATTATAGACA-3' (下划线分别为 *Nco* I 和 *Xho* I 酶切识别位点)。以粟酒裂殖酵母 cDNA 为模板扩增丙酮醛降解酶基因,PCR 反应体系为 25  $\mu$ L:ddH<sub>2</sub>O 14.7  $\mu$ L,5 $\times$ PS buffer 5  $\mu$ L,dNTP (2.5 mmol/L) 2  $\mu$ L,cDNA 模板 1  $\mu$ L,SPAC22E12.03C-*Nco* I-up 1  $\mu$ L、SPAC22E12.03C-*Xho* I-down 1  $\mu$ L、高保真 DNA 聚合酶 0.3  $\mu$ L。PCR 反应条件为:95 $^{\circ}$ C 预变性 2 min;95 $^{\circ}$ C 变性 30 s,50 $^{\circ}$ C 退火 30 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min,共 30 个循环;最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。用 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 扩增结果。

### 1.4 重组表达质粒的构建和鉴定

将上述 PCR 扩增片段 SPAC22E12.03C 过柱纯化后与质粒 pET-28a(+) 双酶切验证。酶切位点为 *Nco* I 和 *Xho* I。将酶切产物回收得到目的 DNA 片段与质粒 pET-28a(+) 酶切产物。

接下来建立酶连体系为 16.6  $\mu$ L:SPAC22E12.03C 目的片段 8  $\mu$ L、pET-28a(+) 酶切产物 0.3  $\mu$ L、连接酶 (Solution I) 8.3  $\mu$ L。16 $^{\circ}$ C 连接 4 h,将酶连产物导入到 *E. coli* Top10 感受态细胞中,涂布到含 Kan 抗性的 LB 培养基上。随机挑取转化子提其质粒进行酶切验证,将阳性质粒送到南京斯普金科技有限公司测序。将测序正确的重组质粒和 pET-28a(+) 空载质粒分别通过转化导入 *E. coli* BL21 (DE3) 感受态细胞,得到重组表达菌和带有空载质粒的对照菌。

### 1.5 目的蛋白的表达

将得到的重组表达菌和带有空载质粒的对照菌分别接种于 5 mL LB 培养基中,其中含有 50 mg/L Kan。37 $^{\circ}$ C 220 r/min 恒温摇床过夜培养之后将重组表达菌和对照菌分别转接至 15 mL 同样含 50 mg/L Kan 的 LB 培养基中,此时菌液  $D_{600\text{ nm}} \approx 0.2$ ,继续培养,当  $D_{600\text{ nm}}$  达到 0.6 时,加入 1 mmol/L IPTG,37 $^{\circ}$ C 220 r/min 培养过夜,次日,4 $^{\circ}$ C 8 000 r/min 离心 5 min,收集菌体,用 100 mmol/L 磷酸钠缓冲液 (pH 值为 7.0) 重悬菌体进行洗涤,重复洗涤 3 遍后加入适量的缓冲液 (包含 0.1 mmol/L PMSF 和 14.3 mmol/L 的  $\beta$ -巯基乙醇) 置于冰浴中进行超声波破碎,破碎 10 s,冷却 10 s,待菌体破碎完全后,4 $^{\circ}$ C 12 000 r/min 离心 20 min,收集细胞上清,取适量进行 SDS-PAGE,分析目标产物表达情况。

### 1.6 目标蛋白表达条件的优化

优化表达条件时分别选择不同起始诱导菌浓度 ( $D_{600\text{ nm}} = 0.307, D_{600\text{ nm}} = 0.455, D_{600\text{ nm}} = 0.557, D_{600\text{ nm}} = 0.603, D_{600\text{ nm}} = 0.805, D_{600\text{ nm}} = 1.117$ ) 与不同温度 (37、30、25、18 $^{\circ}$ C) 培养;培养基中添加不同终浓度的 IPTG (0.4、0.6、0.8、1.0、1.2 mmol/L) 进行诱导培养,每个试验重复 3 次。通过 SDS-PAGE、总蛋白含量测定和酶活测定考察培养条件对目的蛋白表达的影响。

### 1.7 酶活测定

酶活测定根据丙酮醛降解酶在一定温度条件下能降解丙酮醛,而丙酮醛可以与 2,4-二硝基苯肼反应生成黄橙色的 2,4-二硝基苯腙,苯腙在碱性条件下显紫红色,可在 540 nm 处检测<sup>[11]</sup>。反应体系是用 100 mmol/L 磷酸钠缓冲液 (pH 值为 7.0) 配制成不同丙酮醛浓度的反应液,总体积为 200  $\mu$ L,加入适量的丙酮醛降解酶,在 45 $^{\circ}$ C 反应一定时间,加入 2,4-二硝基苯肼终止反应,室温下静置 15 min,再加入 10% 的 NaOH,室温放置 15 min 后用分光光度计在 540 nm 处测定吸光度。酶活单位 (U) 定义为在该反应条件下,1 min 内催化降解 0.1  $\mu$ mol 丙酮醛所需的酶量。

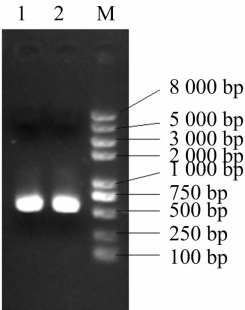
## 2 结果与分析

### 2.1 丙酮醛降解酶基因的克隆

以粟酒裂殖酵母 cDNA 为模板,以 SPAC22E12.03C-*Nco* I-up、SPAC22E12.03C-*Xho* I-down 为引物进行 PCR,扩增获得 1 条大于 500 bp 的 DNA 产物 (图 1),与目的基因 576 bp 相吻合,过柱纯化 PCR 产物,用 *Nco* I 和 *Xho* I 对纯化后的 PCR 产物进行双酶切。

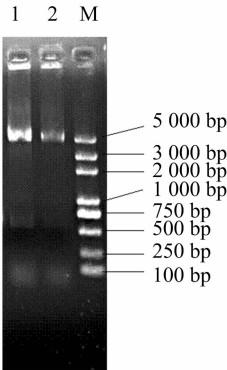
2.2 表达载体 pET-28a(+) - SPAC22E12.03C 的构建及验证

获得丙酮醛降解酶基因并纯化后,将其连接到 pET-28a



M—DNA 分子量标准；1，2—SPAC22E12.03C 基因 PCR 扩增  
图1 丙酮醛降解酶基因 PCR 扩增

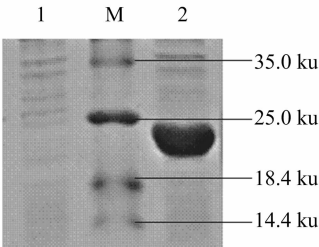
(+) (*Nco* I 和 *Xho* I 双酶切) 得到 pET - 28a ( + ) - SPAC22E12.03C 重组质粒并转化 *E. coli* Top10 感受态细胞, 挑选菌落, PCR 验证有条带的阳性重组子继续培养, 并提取重组质粒进行双酶切验证, 双酶切后得到大小分别为 500 bp 和 5 400 bp 的条带, 基因片段大小正确。重组质粒经测序比对与 *S. pombe*\_Gene DB 上公布的基因序列一致, 证明丙酮醛降解酶基因已插入到 pET - 28a ( + ) 载体中 (图 2), 成功构建了 pET - 28a ( + ) - SPAC22E12.03C 表达载体。将构建成功的 pET - 28a ( + ) - SPAC22E12.03C 转入到 *E. coli* BL21 (DE3) 感受态细胞中, 得到重组菌。



1，2—*Nco* I - *Xho* I 酶切；M—DNA 分子量标准  
图2 表达质粒酶切验证电泳

2.3 重组菌的诱导表达

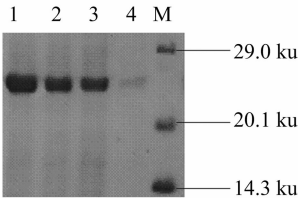
重组菌诱导表达经 SDS - PAGE 验证 (图 3), 得到分子量大小约为 20 ku 的重组酶, 与目的蛋白 *S. pombe*\_GeneDB 上公布的 21.08 ku 相符, 证明丙酮醛降解酶得到了表达。



1—*E. coli* BL21(DE3)pET-28a(+)IPTG 诱导 4 h 破胞后上清；M—蛋白分子量标准；2—*E. coli* BL21(DE3)-pET-28a(+)-SPAC22E12.03C IPTG 诱导 4 h 破胞后上清  
图3 重组蛋白诱导表达

2.4 丙酮醛降解酶的优化表达

2.4.1 温度对丙酮醛降解酶可溶性表达的影响 据文献报道, 温度对目的蛋白的可溶性表达有很大的影响<sup>[12-13]</sup>。选定的条件为: 在 37、30、25、18 ℃, 220 r/min 培养至  $D_{600\text{ nm}}$  为 0.8 时, 加入 1 mmol/L IPTG, 诱导 4 h。由 SDS - PAGE (图 4 和表 1) 分析可得, 丙酮醛降解酶在 37 ℃ 培养后上清中可溶蛋白的含量最多, 相对沉淀中目的蛋白含量最少, 酶活最高。可见 37 ℃ 不仅是 *E. coli* BL21 的最适生长温度, 并且在这个温度下有活性的菌和带外源基因的菌更多, 从而表达的目的蛋白也多, 且大部分以可溶形式存在, 酶的活性也最高。



1—37 ℃ 蛋白表达量；2—30 ℃ 蛋白表达量；3—25 ℃ 蛋白表达量；4—18 ℃ 蛋白表达量；M—蛋白分子量标准

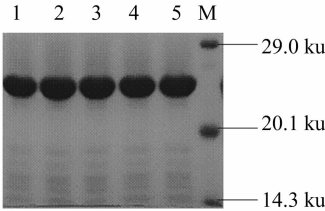
图4 不同温度对蛋白表达量的影响

表 1 不同温度对蛋白表达量和酶活的影响

诱导温度 (℃)	总蛋白 (g/L)	目的蛋白 (g/L)	酶 (U/mL)
18	1.10	0.32	4.60
25	3.29	1.06	4.05
30	3.18	1.26	4.84
37	3.19	1.68	5.53

2.4.2 IPTG 对丙酮醛降解酶可溶性表达的影响 在一定范围内, IPTG 浓度对重组蛋白诱导表达有一定影响<sup>[14]</sup>, 降低表达水平可能提高某些目的蛋白的产量。因此, 本试验选取了 5 个 IPTG 浓度, 分别为 0.4、0.6、0.8、1.0、1.2 mmol/L。在 37 ℃ 220 r/min 培养  $D_{600\text{ nm}} = 0.6$  时, 加入上述不同浓度的 IPTG, 37 ℃ 诱导 4 h, 分析 IPTG 浓度对丙酮醛降解酶可溶性表达的影响。表达载体 pET28a ( + ) - SPAC22E12.03C 含有 T7/Lac 启动子, 受 IPTG 诱导启动表达蛋白。当 IPTG 浓度过低时, 外源基因不能被完全表达, 而高浓度的 IPTG 将对细胞的生长产生毒害作用, 由图 5 和表 2 分析可知, IPTG 浓度在 0.6 ~ 1.0 mmol/L 时, 总蛋白量略微升高, 此范围内酶的活性也相对较高, 但就三者目的蛋白的相对含量分析: 0.6 mmol/L 时相对含量为 74.4%, 0.8 mmol/L 时目的蛋白相对含量为 77.9%, 1.0 mmol/L 时相对含量为 73.3%, 由蛋白相对含量和酶活大小分析可得, 0.8 mmol/L 时蛋白相对表达含量最高, 酶的活性最高, 因此选择 0.8 mmol/L 作为诱导剂 IPTG 的最适浓度。

2.4.3 诱导起始菌浓度不同对丙酮醛降解酶可溶性表达的影响 据文献报道, 诱导起始菌浓度不同, 菌体的生长速率不同, 外源蛋白表达水平会受到影响<sup>[15]</sup>。本试验选取了 6 个不同起始菌浓度:  $D_{600\text{ nm}} = 0.307$ ,  $D_{600\text{ nm}} = 0.455$ ,  $D_{600\text{ nm}} = 0.557$ ,  $D_{600\text{ nm}} = 0.603$ ,  $D_{600\text{ nm}} = 0.805$ ,  $D_{600\text{ nm}} = 1.117$ , 加入 0.8 mmol/L 的 IPTG, 37 ℃ 诱导 4 h。由图 6 和表 3 分析可知, 随着诱导起始菌浓度的增加, 总蛋白水平在增加, 目的蛋白的表达量也有

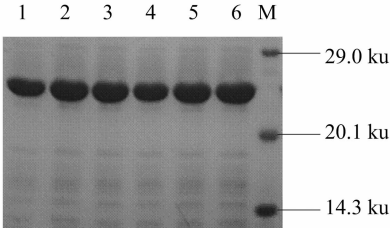


1—0.4 mmol/L 蛋白表达量; 2—0.6 mmol/L 蛋白表达量;  
3—0.8 mmol/L 蛋白表达量; 4—1.0 mmol/L 蛋白表达量;  
5—1.2 mmol/L 蛋白表达量; M—蛋白分子量标准

图5 不同 IPTG 浓度对蛋白表达量的影响

表 2 不同 IPTG 浓度对蛋白表达量和酶活的影响

IPTG 浓度 (mmol/L)	总蛋白 (g/L)	目的蛋白 (g/L)	酶活 (U/mL)
0.4	3.96	2.58	5.21
0.6	3.90	2.90	5.49
0.8	3.75	2.92	5.70
1.0	4.04	2.96	5.51
1.2	3.97	2.60	5.36



1— $D_{600\text{ nm}}=0.307$  蛋白表达量; 2— $D_{600\text{ nm}}=0.455$  蛋白表达量;  
3— $D_{600\text{ nm}}=0.557$  蛋白表达量; 4— $D_{600\text{ nm}}=0.603$  蛋白表达量;  
5— $D_{600\text{ nm}}=0.805$  蛋白表达量; 6— $D_{600\text{ nm}}=1.117$  蛋白表达量;  
M—蛋白分子量标准

图6 不同起始菌浓度对蛋白表达量的影响

表 3 不同诱导起始菌浓度对蛋白表达量和酶活的影响

起始菌浓度 $D_{600\text{ nm}}$	总蛋白 (g/L)	目的蛋白 (g/L)	酶活 (U/mL)
0.307	3.13	1.60	5.18
0.455	4.13	1.70	5.20
0.557	4.04	2.13	5.67
0.603	3.73	2.02	5.43
0.805	4.16	2.18	5.34
1.117	5.10	2.52	5.27

所增加,但目的蛋白的相对含量在  $D_{600\text{ nm}}$  为 0.557、0.603、0.805 时较高,结合酶活性分析,起始诱导菌浓度  $D_{600\text{ nm}}$  在 0.5~0.6 为诱导的最佳起始浓度。

3 结论

在前期研究基础上,本试验开展了对丙酮醛降解酶基因的克隆及其目的蛋白表达的研究。在对目的基因 SPAC22E12.03C 进行克隆时,选取的验证酶切位点为 *Nco* I 和 *Xho* I。接下来经过酶联与转化,得到重组质粒,经测序,确定其为阳性质粒。再次经过转化,成功得到重组表达菌和带有空载质粒的对照菌。

接下来本试验采取单因素控制变量法对目的蛋白最佳表达条件的进行了探索。试验采用的 3 个变量分别为温度、诱

导剂 IPTG、起始诱导菌浓度。检测最佳条件的 3 个指标为 SDS-PAGE、总蛋白含量测定和酶活测定。结果表明,在培养温度为 37℃,IPTG 浓度为 0.8 mmol/L,诱导起始菌浓度的  $D_{600\text{ nm}}$  在 0.5~0.6 时,结合酶活性分析,目的蛋白相对含量最高。通过对目的蛋白诱导表达条件的优化,为更好地揭示丙酮醛降解酶的作用机理提供了很好的平台。

参考文献:

[1]Thornalley P J,Langborg A,Minhas H S. Formation of glyoxal,methylglyoxal and 3 - deoxyglucosone in the glycation of proteins by glucose[J]. Biochemical Journal,1999,344(1):109 - 116.

[2]刘学伟,杨 克,张 杰. 丙酮醛对人牙周膜成纤维细胞的毒性作用[J]. 云南大学学报:自然科学版,2006,28(增刊1):393 - 395.

[3]Murata - Kamiya N,Methylglyoxal K H,Aldehyde A E. Crosslinks DNA polymerase and the substrate DNA [J]. Nucleic Acids Research,2001,29(16):3433 - 3438.

[4]Ferguson G P,Tötemeyer S,Maclean M J,et al. Methylglyoxal production in bacteria: suicide or survival? [J]. Archives of Microbiology,1998,170(4):209 - 218.

[5]Ward R A,McLeish K R. Methylglyoxal;a stimulus to neutrophil Oxygen radical production in chronic renal failure? [J]. Nephrology Dialysis Transplantation,2004,19(7):1702 - 1707.

[6]Okado A,Kawasaki Y,Hasuiki Y,et al. Induction of apoptotic cell death by methylglyoxal and 3 - deoxyglucosone in macrophage - derived cell lines [J]. Biochemical and Biophysical Research Communications,1996,225(1):219 - 224.

[7]McLellan A C,Thornalley P J,Benn J,et al. Glyoxalase system in clinical diabetes mellitus and correlation with diabetic complications [J]. Clinical Science,1994,87(1):21 - 29.

[8]Ahmed N,Babaei - Jadidi R,Howell S K,et al. Degradation products of proteins damaged by glycation,oxidation and nitration in clinical type 1 diabetes[J]. Diabetologia,2005,48(8):1590 - 1603.

[9]Thornalley P J. The glyoxalase system; new developments towards functional characterization of a metabolic pathway fundamental to biological Life[J]. Biochemical Journal,1990,269(1):1 - 11.

[10]van der Jagt D L,Robinson B,Taylor K K,et al. Reduction of trioses by NADPH - dependent aldo - keto reductases. Aldose reductase, methylglyoxal, and diabetic complications [J]. The Journal of Biological Chemistry,1992,267(7):4364 - 4369.

[11]Lee J Y,Song J,Kwon K,et al. Human DJ - 1 and its homologs are novel glyoxalases[J]. Human Molecular Genetics,2012,21(14):3215 - 3225.

[12]Sorensen H P,Mortensen K K. Soluble expression of recombinant proteins in the cytoplasm of Escherichia coli [J]. Microbial Cell Factories,2005,4(1):1.

[13]Williams R E,Bruce N C. 'New uses for an old enzyme'—the old yellow enzyme family of flavoenzymes[J]. Microbiology,2002,148(Pt 6):1607 - 1614.

[14]冯志国,刘慧娟,陆 婕,等. 一新富含甘氨酸果蝇抗菌肽在大肠杆菌中的优化表达[J]. 生物技术,2008,18(4):18 - 20.

[15]Xu Z,Peng L,Zhong Z,et al. High - level expression of a soluble functional antimicrobial peptide,human beta - defensin 2,in Escherichia coli[J]. Biotechnology Progress,2006,22(2):382 - 386.