DOI: 10.3969/j.issn.2097-583X.2026.04.007　　文章编号：2097-583X(2026)04-0566-07

贝莱斯芽孢杆菌ZEN降解酶基因的表达及纯化

王　文[1]，王艺培[1]，余祖华[1]，丁　轲[1,2*]

(1. 河南科技大学 动物科技学院，河南 洛阳 471023；2. 河南科技学院 动物科技学院，河南 新乡 453003)

摘　要：为挖掘新的玉米赤霉烯酮(Zearalenone，ZEN)降解酶基因并实现其在大肠杆菌中的异源表达，以筛选获得的一株高效降解ZEN的贝莱斯芽孢杆菌(*Bacillus velezensis*) L9为出发菌株。首先，通过原核转录组测序技术分析ZEN胁迫下的差异表达基因，通过GO、KEGG及COG功能注释筛选潜在降解酶的编码序列，并采用分子对接模拟预测候选蛋白与ZEN的相互作用。其次，以贝莱斯芽孢杆菌L9基因组DNA为模板，针对候选基因*ctg1003*设计特异性引物进行PCR扩增、回收纯化目的片段后，通过同源重组将其与线性化载体pET-32a(＋)连接，构建重组表达质粒pET-32a-*ctg1003*。经双酶切及测序验证后，将鉴定正确的重组质粒转化至表达宿主菌BL21(DE3)中。最后，将重组菌BL21(pET-32a-*ctg1003*)经1 mmol/L IPTG诱导6 h后，利用SDS-PAGE检测目的蛋白的表达情况。结果表明：分子对接提示具有水解酶功能的候选基因*ctg1003*具备与ZEN结合的潜力；通过PCR从L9基因组中成功扩增出长度为1209 bp的目的条带，测序结果与预期相符。该片段插入pET-32a(＋)载体后，经双酶切可获得5896 bp和1209 bp的两个片段，表明重组表达质粒构建成功。该重组质粒经IPTG诱导后，在大肠杆菌BL21(DE3)中表达出分子量约为63.4 kDa(含6×His标签)的重组蛋白，且该蛋白主要以可溶性形式存在。综上所述，本研究成功克隆了*B. velezensis* L9来源的ZEN降解酶基因*ctg1003*，并实现了其在大肠杆菌中的可溶性表达，为后续酶学性质与降解机制的研究奠定了基础。

关键词：玉米赤霉烯酮；贝莱斯芽孢杆菌；基因；克隆；原核表达

中图分类号：S851.2　　**文献标志码：**A　　**开放科学(资源服务)标识码(OSID)：**

Expression and purification of the ZEN degrading enzyme gene from *Bacillus velezensis*

Wang Wen[1], Wang Yipei[1], Yu Zuhua[1], Ding Ke[1,2*]

(1. School of Animal Science and Technology, Henan University of Science and Technology, Luoyang 471023, China;
2. School of Animal Science and Veterinary Medicine, Henan Institute of Science and Technology, Xinxiang 453003, China)

Abstract: To identify novel zearalenone (ZEN)-degrading enzyme genes and achieve their heterologous expression in Escherichia coli, a previously isolated ZEN-degrading strain, *Bacillus velezensis* L9, was employed as the source organism. First, differentially expressed genes under ZEN stress were analyzed by prokaryotic transcriptome sequencing, and coding sequences of potential degrading enzymes were screened through GO, KEGG, and COG functional annotations. Molecular docking was subsequently performed to simulate the interaction between the candidate proteins and ZEN. Second, using genomic DNA of *B. velezensis* L9 as a template, specific primers were designed for the candidate gene *ctg1003*, and the target fragment was amplified by PCR, recovered, and purified. The fragment was then ligated into the linearized vector pET-32a(＋) via homologous recombination to construct the recombinant expression plasmid pET-32a-ctg1003. After verification by double restriction enzyme

收稿日期：2026-03-05；**修回日期：**2026-03-13；*.**通信联系人**，E-mail：keding19@163.com

基金项目：国家自然科学基金项目(32072771)；新乡市重大科技专项(XDYF202605)

作者简介：王　文(2000－)，女，河南周口人，硕士研究生，主要从事功能微生物与畜禽健康的研究；丁　轲(1977－)，男，河南永城人，教授，博士，主要从事动物微生态学与动物传染病的研究。

引用格式：王文，王艺培，余祖华，等. 贝莱斯芽孢杆菌ZEN降解酶基因的表达及纯化[J]. 信阳师范大学学报(自然科学版)，2026，39(4)：566-572.

Wang Wen, Wang Yipei, Yu Zuhua, et al. Expression and purification of the ZEN degrading enzyme gene from *Bacillus velezensis* [J]. Journal of Xinyang Normal University (Natural Science Edition), 2026, 39(4): 566-572.

digestion and sequencing, the confirmed recombinant plasmid was transformed into the expression host E.coli BL21 (DE3). Finally, the recombinant strain BL21(pET-32a-ctg1003) was induced with 1 mmol/L IPTG for 6 h, and the expression of the target protein was examined by SDS-PAGE. Molecular docking suggested that the candidate gene ctg1003, encoding a putative hydrolase, possessed ZEN-binding potential. A specific band of 1209 bp was successfully amplified from the L9 genome by PCR, and the sequencing result was consistent with the expected sequence. Following insertion of this fragment into the pET-32a(+) vector, two fragments of 5896 bp and 1209 bp were obtained by double enzyme digestion, indicating that the recombinant expression plasmid was successfully constructed. After IPTG induction, a recombinant protein with a molecular weight of approximately 63.4 kDa (including the 6×His tag) was expressed in *E. coli* BL21(DE3) and was found to exist predominantly in a soluble form. In conclusion, the ZEN-degradation-related gene *ctg1003* derived from *B. velezensis* L9 was successfully cloned, and its soluble expression was achieved in *E. coli*, thereby establishing a foundation for further investigation of the enzymatic properties and degradation mechanisms of this protein.

Key words: zearalenone; *Bacillus velezensis*; gene; cloning; prokaryotic expression

0　引言

玉米赤霉烯酮(Zearalenone, ZEN)是镰刀菌属真菌产生的一种非甾体雌激素类次级代谢产物，是污染玉米、小麦、大麦等谷物及饲料的主要真菌毒素之一[1]。ZEN在结构上与天然雌激素相似，可通过结合雌激素受体而表现出明显的雌激素活性。作为一种生殖系统的内分泌干扰物，ZEN能够干扰人类和动物的生殖激素代谢平衡，诱发生殖器官形态与结构改变、生殖细胞凋亡、精液品质下降及子代生殖功能损伤，对生殖系统构成严重威胁[2]。尤其在养猪生产中，饲料中低剂量的ZEN污染即可诱发母猪外阴红肿、假发情、子宫增生及后备母猪阴道脱垂等典型中毒症状，导致繁殖障碍和经济损失[3]。

近年来，全球范围内的监测数据显示，ZEN在饲料及原料中的污染已呈普遍且严重趋势，部分地区原料中ZEN的阳性检出率高达85%～100%[4]。从全球分布来看，ZEN检出率持续处于高位，亚洲地区的超标风险尤为突出。统计资料表明，亚洲主要谷物中霉菌毒素总体污染水平达33.06%，居各大洲第二位，表明该区域饲料及食品原料超标风险持续存在，对畜牧业可持续发展与食品安全构成显著挑战[5]。此外，由于ZEN化学性质稳定且具有耐热性(可耐受120 ℃高温)，常规谷物加工过程难以将其有效去除，致使该毒素在产业链中广泛残留[6]，不仅造成巨大的经济损失，还严重危害动物生产性能与食品安全。因此，研发高效、安全的ZEN生物脱毒技术已成为行业的迫切需求。

目前，缓解ZEN危害的主要策略包括物理吸附、化学降解、生物降解[7]。然而，物理吸附法存在吸附效率低与选择性有限、可能干扰饲料营养成分等问题[8]；化学降解法通常反应条件剧烈，易造成试剂残留、成本高昂及潜在的二次污染风险[9]。相比之下，基于微生物或其酶系的生物降解法，能通过特异性催化作用将ZEN转化为低毒或无毒产物，具有作用条件温和、降解效率高、环境友好等突出优势，已成为当前领域的研究热点并展现出广阔的应用前景[10]。

尽管已有多种ZEN降解酶相继被发现，例如来源于乳酸杆菌的水解酶、芽孢杆菌的酯酶与过氧化物酶等[11]，但现有酶种资源仍较为有限，且不同酶在降解效率、异源表达水平及环境适应性(如pH、温度与热稳定性)方面差异显著[12]。在生物降解的实施策略上，以芽孢杆菌为代表的全细胞降解法虽表现出一定效果[13]，却受到菌体生长周期、培养条件复杂及潜在生物安全风险等制约。相比之下，酶降解法直接利用纯化或重组的降解酶进行毒素定向转化，具有反应过程可控、效率高、便于规模化生产与应用等优势[12]。随着转录组学、蛋白质组学及分子对接技术的不断发展，从高效降解菌中系统挖掘并鉴定关键降解酶基因已成为可能。因此，持续挖掘和表征新型高效的ZEN降解酶，对推动生物脱毒技术的实用化进程具有重要意义。

基于上述背景，以实验室前期从某学校食堂食品原料样品中分离获得的一株高效降解ZEN的*B. velezensis* L9为出发菌株[14]，通过原核转录组测序分析ZEN胁迫下的差异表达基因，结合GO、

KEGG、COG功能注释及分子对接模拟,筛选获得候选降解酶基因*ctg1003*。旨在完成该基因的克隆及其在大肠杆菌中的异源表达,实现重组蛋白的可溶性表达与纯化,以期为获得新型ZEN降解酶并进一步解析其酶学性质与催化机理奠定基础。

1　材料与方法

1.1　材料

1.1.1　菌株

B. velezensis L9 菌株为本实验室前期从霉变饲料及食品原料等108份样品中分离获得,现由河南科技大学功能微生物与畜禽健康实验室保存。

1.1.2　试剂

2.5× OK Clon Master Mix购自湖南艾科瑞生物工程有限公司;限制性内切酶购自北京擎科生物科技股份有限公司;DNA Marker、蛋白Marker及10% SDS-PAGE彩色凝胶超快速配制试剂盒购自武汉赛维尔生物科技有限公司;DNA胶回收试剂盒、质粒提取试剂盒购自北京全式金生物科技有限公司;细菌DNA提取试剂盒、大肠杆菌DH5α及大肠杆菌BL21(DE3)感受态细胞购自上海生工生物工程股份有限公司;酵母浸粉、胰蛋白胨、氯化钠及琼脂粉购自北京奥博星生物技术有限公司。

LB液体培养基:酵母浸粉0.5 g,胰蛋白胨1.0 g,氯化钠1.0 g,蒸馏水100 mL。固体培养基另加琼脂粉2.0 g。上述培养基均置于121 ℃的高压蒸汽灭菌锅中灭菌20 min。

1.2　试验方法

1.2.1　ZEN降解酶基因的筛选

通过原核转录组测序获得ZEN胁迫下的显著差异表达基因,并对其进行GO、KEGG和COG功能注释,以挖掘潜在的降解酶编码基因。采用AutoDockTools 4.2.6软件对候选基因所编码蛋白质的三级结构与ZEN分子结构进行对接模拟。将蛋白质受体结构与ZEN配体导入软件后,进行预处理并输出为PDBQT格式。依据靶蛋白潜在结合口袋位置,设定Grid Box参数,利用AutoGrid生成格点能量文件,采用LGA(Lamarckian Genetic Algorithm)进行分子对接计算,独立运行次数设为50次,其余参数保持默认值。计算结束后,使用PyMOL 3.0.3软件进行可视化与绘图分析,重点观察ZEN与蛋白之间的氢键、疏水相互作用等关键结合模式。

1.2.2　*B. velezensis* L9基因组DNA提取

按照生工细菌DNA提取试剂盒说明书进行操作,提取*B. velezensis* L9基因组DNA。

1.2.3　PCR扩增与载体质粒的提取及鉴定

基于*B. velezensis* L9基因组中*ctg1003*基因的完整编码区序列,遵循引物设计的核心原则,设计并合成具有同源特异性的上游引物(F):5′-gccatggctgatatcggatccATGACATTAAATATGAAAGTAGAAAGCATG-3′和下游引物(R):5′-gtggtggtggtggtgctcgagTTATACCGTTTTCGGCGTTAAGT-3′。以*B. velezensis* L9基因组DNA为模板进行扩增,PCR反应体系(总体积50 μL):2×Es Taq MasterMix(Dye)25 μL,F/R引物各2 μL,DNA模板2 μL,补加无菌水至50 μL。扩增程序为:94 ℃预变性2 min;94 ℃变性30 s,55 ℃退火30 s,72 ℃延伸30 s,共30个循环;最后72 ℃延伸10 min。PCR产物经1%琼脂糖凝胶电泳检测后,切取目的条带,使用DNA胶回收试剂盒进行纯化回收、备用。同时,将保存的含pET-32a(+)质粒的大肠杆菌接种于含氨苄青霉素(Ampicillin,Amp)的LB液体培养基中培养过夜。取20 mL菌液,参照质粒提取试剂盒说明书提取pET-32a(+)质粒。随后,使用Q.Cut *Bam*H Ⅰ和Q.Cut *Xho* Ⅰ进行双酶切鉴定。酶切体系(总体积10 μL)如下:pET-32a(+)质粒5 μL,10×Buffer 1 μL,Q.Cut *Bam*H Ⅰ和Q.Cut *Xho* Ⅰ各0.5 μL,补加ddH_2O至10 μL。酶切产物经电泳检测正确后,切胶回收线性化载体片段,纯化后用于后续连接反应实验。

1.2.4　重组质粒pET-32a(+)-*ctg1003*的构建

将回收的目的基因片段与经*Bam*H Ⅰ和*Xho* Ⅰ双酶切线性化的pET-32a(+)载体,通过同源重组法于室温下连接10 min。取5 μL连接产物转化至大肠杆菌DH5α感受态细胞中,转化后的菌液涂布于含氨苄青霉素(Amp)的LB固体培养基平板上,37 ℃培养过夜。次日,从平板上挑取单菌落接种于3 mL含Amp的LB液体培养基中培养,通过菌落PCR进行阳性克隆初步鉴定。将PCR鉴定为阳性的克隆送测序验证,同时提取疑似阳性重组质粒pET-32a(+)-*ctg1003*进行双酶切鉴定。测序结果与酶切图谱均为正确的克隆,确认为阳性重组克隆。

1.2.5　重组蛋白表达

将测序验证正确的重组质粒pET-32a(+)-*ctg1003*转化至表达宿主*E. coli* BL21(DE3)感受态细胞中。具体操作如下：将重组质粒与感受态细胞轻柔混匀，冰浴30 min；42 ℃热激90 s，迅速冰浴2 min；加入500 μL无抗LB液体培养基，于37 ℃、200 r/min振荡复苏1 h。取适量复苏菌液涂布于含Amp(50 μg/mL)的LB琼脂平板上，37 ℃倒置培养过夜。从平板上挑取单菌落接种至3 mL含Amp的LB液体培养基中，37 ℃、200 r/min培养过夜。次日，取100 μL过夜菌液转接至含Amp的新鲜LB液体培养基中，37 ℃、200 r/min振荡培养至OD_{600}约为0.6。此时取1 mL菌液作为未诱导对照，其余加入IPTG至终浓度1.0 mmol/L，于37 ℃、200 r/min条件下继续诱导表达6 h。收集诱导后的菌液，4000 r/min离心10 min，弃上清，菌体沉淀用PBS缓冲液重悬。经超声破碎后，分别收集上清与沉淀组分，加入适量蛋白上样缓冲液并煮沸处理，最后通过10% SDS-PAGE电泳分析蛋白表达情况及存在形式。

1.2.6　重组蛋白纯化

参照1.2.5方法收集上清和沉淀，采用Ni柱亲和层析法进行纯化。

2　结果与分析

2.1　ZEN降解酶基因的筛选

基于原核转录组测序结果，获得ZEN胁迫下的显著差异表达基因，并对其进行GO、KEGG及COG功能注释。筛选具有水解酶功能的酶基因*ctg1003*序列，提交至SWISS-MODEL网站进行三级结构的预测，并与ZEN分子进行分子对接模拟。对接结果如图1所示，清晰地展示了结合位点的精细结构和关键相互作用。分析表明，ZEN与*ctg1003*预测蛋白结构的结合，依赖于多个氨基酸残基(特别是LYS-6、THR-2、LYS-307)的协同作用，且存在明确的氢键网络和空间匹配。

2.2　降解酶基因*ctg1003*的PCR扩增

按照生工细菌基因组DNA提取试剂盒的操作说明，提取*B. velezensis* L9的总DNA。以其为模板，采用针对降解酶基因*ctg1003*设计的特异性引物(F与R)进行PCR扩增。扩增产物经1%琼脂糖凝胶电泳检测，如图2所示。在1200 bp处呈现单一清晰条带，与*ctg1003*基因的理论大小相符，表明所扩增的基因片段符合预期。随后，参照1.2.3节所述方法对目的条带进行切胶回收纯化，以备后续实验使用。

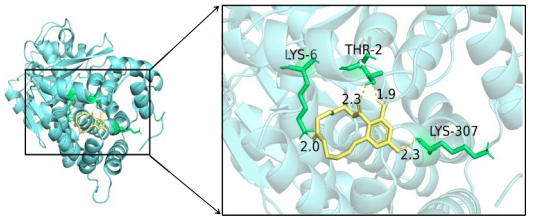


图1　*ctg1003*与ZEN分子对接结合模型

Fig. 1　Binding model of *ctg1003* with ZEN by molecular docking

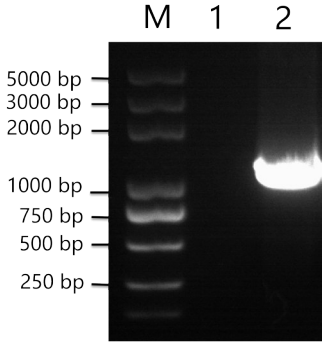


图2　*B. velezensis* L9 *ctg1003*基因的PCR扩增

Fig. 2　PCR amplification of the *ctg1003* gene from *B. velezensis* L9

注　M：DNA相对分子质量标准；1：H_2O对照；2：*ctg1003*基因PCR扩增产物。

2.3　DH5α的构建及菌落PCR鉴定

提取pET-32a(+)质粒后，参照试剂盒说明书，使用限制性内切酶*Bam*HⅠ和*Xho*Ⅰ进行双酶切，获得线性化载体。酶切产物经1%琼脂糖凝胶电泳验证后，按1.2.3节所述方法回收线性化质粒条带。随后，将纯化后的目的基因*ctg1003*片段与线性化载体通过同源重组酶进行连接，构建重组质粒pET-32a(+)-*ctg1003*。将连接产物转化至感受态细胞，获得重组菌株DH5α(pET-32a(+)-*ctg1003*)。通过菌落PCR对转化子进行初步筛选，如图3所示。

2.4　DH5α的酶切鉴定

从经菌落PCR初步鉴定为阳性的克隆中提取重组质粒pET-32a(+)-*ctg1003*。如图4所示，经*Bam*HⅠ单酶切后，在约7105 bp处呈现单一酶切条带；而经*Bam*HⅠ和*Xho*Ⅰ双酶切后，则在约5896 bp和1209 bp处分别呈现2条清晰的条带，其大小分别与线性化载体及目的基因相符。PCR与

酶切结果均证实,重组质粒中已正确插入预期大小的目的片段。随后,选取对应菌液送至生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序分析。测序结果表明,插入序列无碱基错配、缺失或插入,目的片段已准确连接至载体多克隆位点且未发生突变。综上,重组菌株DH5α(pET-32a(+)-*ctg1003*)构建成功。

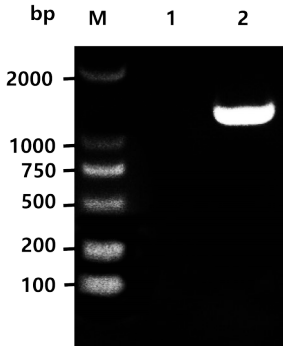


图 3　重组菌株 DH5α 的菌落 PCR 鉴定

Fig. 3　Colony PCR identification of the recombinant *E. coli* strain DH5α

注　M:DNA 相对分子质量标准;1:H_2O 对照;2:*ctg1003* 基因 PCR 扩增产物。

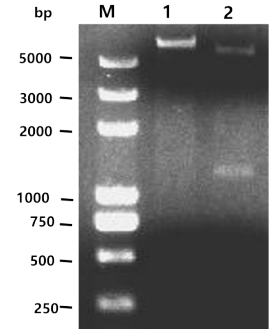


图 4　重组质粒单酶切和双酶切鉴定电泳图

Fig. 4　Agarose gel electrophoresis of the recombinant plasmid digested with single and double restriction enzymes

注　M:DNA 相对分子质量标准;1:*Bam*H Ⅰ单酶切;2:*Bam*H Ⅰ和 *Xho* Ⅰ双酶切。

2.5　BL21 重组蛋白表达

将构建成功的重组质粒转化至大肠杆菌表达宿主BL21(DE3)中,经筛选获得阳性克隆并扩大培养。以终浓度为 1 mmol/L 的 IPTG 于 37 ℃条件下诱导重组蛋白表达。诱导结束后,收集菌体,在冰浴条件下超声破碎,于 4 ℃离心分离上清与沉淀组分。通过SDS-PAGE电泳对表达产物进行分析,结果如图 5 所示。在分子量约 63.4 kDa 处出现一条特异性蛋白条带(包含 6×His 标签),其大小与理论预测值一致,表明IPTG成功诱导了目标蛋白的高效表达。泳道 2 为破碎上清样品,泳道 3 为破碎沉淀样品。结果显示,重组蛋白同时存在于上清与沉淀组分中,表明该蛋白以可溶性与包涵体两种形式共同表达。

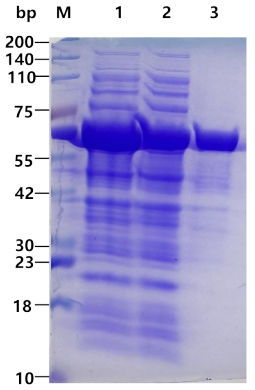


图 5　重组蛋白的 SDS-PAGE 分析

Fig. 5　SDS-PAGE analysis of recombinant proteins

注　M:蛋白质相对分子质量标准;1:诱导后菌体;2:破碎上清;3:破碎沉淀。

2.6　BL21 重组蛋白纯化

将超声破碎后的菌液离心,分离获得上清液与沉淀组分,对上清液中的可溶性重组蛋白进行纯化。该重组 ZEN 降解酶的 C 端带有 6×His 标签,可与镍柱上的 Ni^{2+} 发生螯合作用,实现特异性结合。利用咪唑与 Ni^{2+} 的竞争性结合能力,采用含适宜浓度咪唑的洗脱液进行梯度洗脱,收集洗脱峰以获得纯化的蛋白酶液。纯化产物经 SDS-PAGE 检测,结果如图 6 所示。上清纯化样品在约 63.4 kDa 处呈现单一清晰条带,与预期分子量一致,且无明显杂蛋白条带,表明已成功获得纯度较高的重组蛋白。

3　讨论

ZEN 是由镰刀菌产生的类雌激素真菌毒素,是全球谷物及饲料中污染最普遍的真菌毒素之一[15]。该毒素可通过竞争性结合雌激素受体,干扰动物机体的正常激素调控网络,进而诱导生殖功能障碍、发育异常及繁殖能力下降;长期摄入还可增加氧化损伤、遗传物质突变乃至肿瘤发生的风险[7, 16]。鉴于传统物理与化学脱毒方法存在效率低、成本高且易影响饲料营养品质等不足,基于微生物及其分泌酶的生物降解法因具有作用条件温和、底物专一性强、环境友好且不易产生有毒次

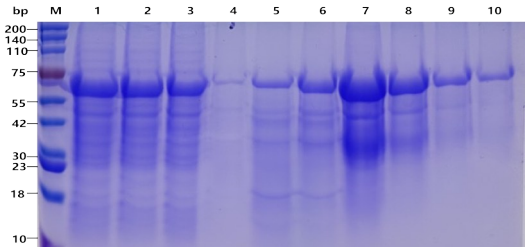


图 6　BL21重组蛋白纯化的 SDS-PAGE 分析

Fig. 6　SDS-PAGE purification analysis of BL21 recombinant protein

注　M：蛋白质相对分子质量标准；1：BL21（pET-32a-*ctg1003*）诱导；2：BL21（pET-32a-*ctg1003*）诱导超声破碎上清；3-4：BL21（pET-32a-*ctg1003*）非变性裂解液洗涤；5-6：BL21（pET-32a-*ctg1003*）非变性洗涤液洗涤；7-10：BL21（pET-32a-*ctg1003*）纯化蛋白。

级产物等优势，已成为当前ZEN脱毒研究的前沿方向之一。迄今，研究者已从不同生态环境中分离获得多种具有高效ZEN降解能力的细菌（如芽孢杆菌[17]、乳杆菌[18]等）和真菌（如酵母菌[15]、木霉[19]），为开发安全高效的生物解毒剂奠定了菌种资源基础。

近年来，ZEN生物降解的研究策略已从早期依赖宏基因组文库构建与活性筛选的传统路径（通量较低、操作烦琐），逐步转向高效的新型技术路线。当前的主流策略是整合全基因组与转录组学分析，从已鉴定的高效降解菌株中定向挖掘关键功能基因，从而显著提升降解机制解析与基因克隆的效率。例如，有研究通过该策略从*Gordonia hydrophobica* HAU421中鉴定出新型内酯水解酶基因，并阐明了其降解途径[20]；在*Priestia megaterium* MF3中，全基因组测序发现了可能参与ZEN水解与磷酸化过程的α/β水解酶及磷酸转移酶基因[21]；而对*Levilactobacillus brevis* PYN10_6_2的基因组分析则定位了可能负责ZEN还原反应的3α-/3β-羟基类固醇脱氢酶基因[22]。类似地，通过转录组分析在解淀粉芽孢杆菌H6中鉴定出新型硫酯酶ZTE138，该酶属于CoA硫酯酶家族，可水解ZEN的内酯键[23]；在酵母菌株68的转录组研究中，则发现其降解过程与胞内氧化还原酶系统及能量代谢密切相关[24]。上述研究体现了该策略在关键降解酶基因发掘中的高效性与实用性。

在上述研究背景下，贝莱斯芽孢杆菌（*Bacillus velezensis*）作为一种重要的研究对象，引起了广泛关注。Li等报道了一株新的*B. velezensis* L9菌株，该菌株为好氧、非致病性的革兰氏阳性菌，被普遍认为是安全的（GRAS）[14, 25]。研究表明，该菌株在ZEN生物降解方面表现优异，24 h内降解率高达91.14%；全基因组分析提示，其可能通过几丁质酶、羧酸酯酶和内酯水解酶等多种酶类的协同作用实现降解[14]。本研究基于实验室前期筛选的同一菌株L9，通过原核转录组测序与分子对接分析，鉴定出一个潜在的ZEN降解酶基因*ctg1003*。进一步利用同源重组克隆技术，成功构建了重组表达质粒pET-32a（+）-*ctg1003*，并借助大肠杆菌BL21（DE3）表达系统实现了该蛋白的可溶性异源表达，获得了分子量约为63.4 kDa的重组蛋白。该成果不仅为ZEN的生物解毒提供了新的候选基因资源，也为利用基因工程技术高效生产ZEN降解酶奠定了基础。

值得注意的是，降解酶的成功异源表达是研究其功能与后续应用的关键。大肠杆菌BL21（DE3）表达系统因其成熟稳定，已广泛用于各类ZEN降解酶的异源表达与功能验证。例如，Fu等[26]利用该体系成功获得可溶性重组内酯水解酶，并改善了其应用稳定性；类似地，在贝莱斯芽孢杆菌B.26中，通过基因组挖掘获得两个关键ZEN降解酶基因*CotA*和*Prx*，并成功在大肠杆菌中实现异源表达[27]，进而通过此系统高效表达了从贝莱斯芽孢杆菌中挖掘出的新型漆酶与过氧化物还原酶，并证实了其降解活性。另有研究将粉红黏帚霉的ZEN降解酶基因在毕赤酵母中表达，实现了对液体中ZEN的完全降解[28]。上述案例均表明，异源表达系统在ZEN降解酶功能研究与开发中具有重要价值。

4　结束语

综上所述，在已有高效降解菌株*B. velezensis* L9的基础上，借助转录组学与生物信息学分析定向挖掘出潜在降解酶基因*ctg1003*，并利用成熟的大肠杆菌表达系统成功实现了该基因的可溶性异源表达。研究结果为后续深入开展该酶的酶学性质表征、降解机制解析以及高效生物解毒剂的开发奠定了坚实基础，对于保障粮食安全、促进畜牧业健康发展具有重要的现实意义。

参考文献：

[1] Han Xiao, Huangfu Bingxin, Xu Tongxiao, et al. Research progress of safety of zearalenone: a review[J]. Toxins, 2022, 14(6): 386.
[2] Wang Jingjing, Tian Hairui, Liu Hongyang, et al. Low dose of zearalenone inhibited the proliferation of porcine prospermatogonia and transformed the physiology through cytokine-cytokine receptor interaction[J]. Theriogenology, 2023, 211: 49-55.
[3] 钱利纯, 尹兆正. 玉米赤霉烯酮对畜禽的毒害作用研究进展[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2005(9): 78-80.
[4] Liu Meng, Xia Zhiyuan, Zhang Yu, et al. Contamination of aflatoxin B1, deoxynivalenol and zearalenone in feeds in China from 2021 to 2024[J]. Journal of Animal Science and Biotechnology, 2025, 16(1): 66.
[5] Niaz W, Iqbal S Z, Ahmad K, et al. Mycotoxins: a comprehensive review of its global trends in major cereals, advancements in chromatographic detections and future prospectives[J]. Food Chem X, 2025, 27: 102350.
[6] Li Lanxue, Bai Yingguo, Zhang Yifan, et al. Rational design of an engineered zearalenone lactone hydrolase with enhanced thermostability and acid tolerance for zearalenone degradation in food[J]. Food Chemistry, 2025, 497: 147005.
[7] 詹清宇, 邓娟丽, 刘虎军, 等. 玉米赤霉烯酮及其衍生物的毒性和减毒机制研究进展[J]. 畜牧兽医学报, 2025, 56(5): 2056-2069.
[8] 冯雪莲, 周英焕, 李留安, 等. 不同吸附剂对玉米赤霉烯酮的脱毒效果研究[J]. 中国饲料, 2022(3): 122-125.
[9] Rogowska A, Pomastowski P, Sagandykova G, et al. Zearalenone and its metabolites: effect on human health, metabolism and neutralisation methods[J]. Toxicon: Official Journal of the International Society on Toxinology, 2019, 162: 46-56.
[10] Zhang Yawei, Ren Xianfeng, Xu Baocheng, et al. Green solutions for food safety: the emerging applications of zearalenone-degrading enzymes[J]. Foods, 2025, 14(17): 3010.
[11] Tang Yu, Chen Aimin, Guo Yongpeng, et al. Advances in zearalenone-degrading enzymes research: characteristics, mining, improvement, and application[J]. Journal of Animal Science and Biotechnology, 2025, 16(1): 146.
[12] Fang Yuanyuan, Zhang Zhenxia, Xu Wei, et al. Zearalenone lactonase: characteristics, modification, and application[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2022, 106(21): 6877-6886.
[13] Chang Jiagao, Dong Wenxuan, Gao Shansong, et al. Biodegradation of ZEN by *Bacillus* mojavensis L-4: analysis of degradation conditions, products, degrading enzymes, and whole-genome sequencing, and its application in semi-solid-state fermentation of contaminated cornmeal[J]. Frontiers in Microbiology, 2025, 16: 1512781.
[14] Li Yijia, Chen Songbiao, Yu Zuhua, et al. A novel *Bacillus* velezensis for efficient degradation of zearalenone[J]. Foods, 2024, 13(4): 530.
[15] 董曼佳, 杨其亚, 孙伟, 等. 拮抗酵母菌控制玉米赤霉烯酮的研究进展[J]. 食品科学, 2016, 37(1): 230-234.
[16] Lü Qiongxia, Xu Wenjing, Yang Fan, et al. Reproductive toxicity of zearalenone and its molecular mechanisms: a review[J]. Molecules, 2025, 30(3): 505.
[17] 薛琳琳, 张朋振, 杨小进, 等. 玉米赤霉烯酮降解菌的筛选鉴定及降解效果评价[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2025, 53(1): 13-22.
[18] Harčárová M, Čonková E, Naď P, et al. Zearalenone biodegradation by the *Lactobacillus* Spp. and *Bacillus* Spp. *in vitro*[J]. Folia Veterinaria, 2022, 66(1): 70-74.
[19] Tian Ye, Tan Yanglan, Yan Zheng, et al. Antagonistic and detoxification potentials of *Trichoderma* isolates for control of zearalenone (ZEN) producing *Fusarium* graminearum[J]. Frontiers in Microbiology, 2018, 8: 2710.
[20] Chen Xiaoshuang, Li Zeyun, Zhang Xingke, et al. Insights into the zearalenone degradation performance and pathway by *Gordonia hydrophobica* HAU421 and characterization of a novel lactonohydrolase involved[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2025, 296: 139631.
[21] Meng Di, Xu Kaizhong, Hou Hongjian, et al. A *Priestia megaterium* MF3 with high-efficiency zearalenone degradation: functional genomic insights and mechanistic exploration[J]. Frontiers in Microbiology, 2025, 16: 1630165.
[22] Zhao Mengru, Guo Baoyuan, Jiang Shuzhen, et al. Whole genome sequence data of ZEN-degrading strain *Levilactobacillus brevis* PYN10_6_2 isolated from *Tenebrio molitor* larval feces[J]. Data in Brief, 2024, 57: 110911.
[23] Xu Laipeng, Sun Xiangli, Wan Xianhua, et al. Identification of a *Bacillus amyloliquefaciens* H6 thioesterase involved in zearalenone detoxification by transcriptomic analysis[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2020, 68(37): 10071-10080.
[24] 许志良, 陈英波, 孟可亮, 等. 一株西藏卡里比克迈耶氏酵母对玉米赤霉烯酮的降解效果及作用机制研究[J]. 广东农业科学, 2025, 52(5): 64-75.
[25] 皮娜娜, 王玺茜, 罗建军, 等. 贝莱斯芽孢杆菌防控植物病害的研究进展[J]. 广东农业科学, 2024, 51(6): 48-59.
[26] Fu X, Xu M, Li T, et al. The improved expression and stability of zearalenone lactonohydrolase from *Escherichia coli* BL21 (DE3)[J]. Applied Biochemistry and Microbiology, 2021, 57(1): 79-85.
[27] Wei Zifan, Zhang Xinyue, Shi Lingfang, et al. Functional characterization and mechanism of two zearalenone-degrading enzymes from *Bacillus velezensis* B. 26[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2025, 73(23): 14629-14640.
[28] 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.

责任编辑：陈松楠　申晓伟