

酸、热胁迫条件下酸土脂环酸芽孢杆菌 *SOD* 基因的表达分析

徐茜茜¹, 华承伟¹, 刘晓娇², 焦凌霞¹

(1. 河南科技学院食品学院, 河南新乡 453003) (2. 商洛学院生物医药与食品工程学院, 陕西商洛 726000)

摘要: 本研究在克隆得到酸土脂环酸芽孢杆菌 DSM 3922^T *SOD* 基因全序列的基础上, 利用荧光实时定量 PCR 技术分别检测酸土脂环酸芽孢杆菌 *SOD* 基因在酸、热胁迫条件下的表达差异。结果表明: 该基因在正常生长条件下组成性表达, 在酸、热胁迫下表达量在短时间内迅速上调, 酸胁迫 0.5 h 表达量为对照组的 4.63 倍, 胁迫 1 h 表达量升至最高, 为对照组的 32.55 倍, 随后表达量迅速下调, 胁迫 5 h 时表达量降至对照组的 1.67 倍。70 °C 热胁迫 5 min 时 *SOD* 基因相对表达量为对照组的 2.81 倍, 胁迫 25 min 时表达量升至最高, 为对照组的 15.05 倍, 随后表达量下调, 胁迫 40 min 时表达量降至对照组的 4.93 倍。酸土脂环酸芽孢杆菌 *SOD* 基因对酸、热环境胁迫具有快速反应的特点, 表明酸土脂环酸芽孢杆菌 *SOD* 基因与该菌嗜热耐酸的独特生理适应机制密切相关。

关键词: 酸土脂环酸芽孢杆菌; *SOD*; 基因表达; 酸胁迫; 热胁迫

文章编号: 1673-9078(2015)11-80-85

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2015.11.014

Analysis of *SOD* Gene Expression in *Alicyclobacillus acidoterrestris* under Heat and Acid Stresses

XU Xi-xi¹, HUA Cheng-wei¹, LIU Xiao-jiao², JIAO Ling-xia¹

(1. School of Food Science, Henan Institute of Science and Technology, Xinxiang 453003, China)

(2. College of Biology Pharmacy and Food Engineering, Shangluo University, Shangluo 726000, China)

Abstract: Based on the complete sequence of the *SOD* gene cloned from *Alicyclobacillus (A. acidoterrestris)* DSM 3922, quantitative real time polymerase chain reaction (PCR) was used to analyze the differences in *SOD* mRNA expression levels in *A. acidoterrestris* under acid and heat stresses. The results showed that the *SOD* gene of *A. acidoterrestris* was constitutively expressed under normal growth conditions and was quickly upregulated under acid and heat stress conditions. *SOD* expression level after 0.5 h of acid stress was 4.63 times higher than that of the control group and then increased to a maximum level, which was 32.55 times higher than that of the control group after one hour of acid stress. Subsequently, the *SOD* gene expression level rapidly decreased and was 1.67 times higher than that of the control group when acid stress was applied for five hours. When heat stress was applied at 70 °C for five minutes, the relative expression level of the *SOD* gene was 2.81 times higher than that of the control group and then increased to a maximum level, which was 15.05 times higher than that of the control after 25 minutes of heat stress. Subsequently, the *SOD* gene expression level rapidly decreased and was 4.93 times higher than that of control group when heat stress was applied for 40 minutes. A rapid response is a characteristic of *SOD* gene expression in *A. acidoterrestris* under heat and acid stresses, indicating that the *SOD* gene of *A. acidoterrestris* was closely related to the unique physiological mechanism for thermoacidophilic adaptation of *A. acidoterrestris*.

Key words: *Alicyclobacillus acidoterrestris*; superoxide dismutase (*SOD*) gene expression; acid stress; heat stress

超氧化物歧化酶 (Superoxide Dismutase, *SOD*) 广泛存在于各种需氧生物体的各组织内, 是生物体内超氧阴离子自由基清除剂, 能有效防止它们对生物体

收稿日期: 2015-02-04

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (31401673); 河南省基础与前沿技术
研究计划项目 (142300410137)

作者简介: 徐茜茜 (1992-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 食品生物技术

通讯作者: 焦凌霞 (1974-), 女, 博士, 副教授, 研究方向: 食品生物技术

的损害, 几乎参与了生物体对抗各种逆境的生理生化反应, 是生物体内很重要的抗氧化酶类^[1]。目前已证实增强生物抗逆性的途径之一是提高生物体内抗氧化酶类活性及增强抗氧化代谢水平^[2,3]。自从1969年 Mccord 和 Fridovich 首次揭示了 *SOD* 的生物学功能至今, *SOD* 一直倍受国内外科工作者的关注。随着分子生物学与转基因技术的发展, *SOD* 特殊分子结构及诱人的生物学功能越来越引起人们的重视, 利用转

SOD基因技术提高生物胁迫抗性, 培育抗逆生物新品种已成为国内外SOD研究领域的热点。

酸土脂环酸芽孢杆菌 (*Alicyclobacillus acidoterrestris*) 是中度嗜酸耐热菌, 生长pH范围为2.5~5.5, 最适宜生长pH为3.5~4.0, 生长温度范围为20 °C~55 °C, 最适宜生长温度为40 °C~50 °C, 具有嗜酸耐热的双重生理特性和很强的抵抗不良环境的能力, 能够经受酸性条件下的巴士杀菌过程而存活^[4]。该属细菌一经发现便由于其嗜酸耐热的独特生存能力很快受到食品工业界的极大关注。但是, 目前对该菌的基础和应用研究都比较缺乏, 尤其是酸土脂环酸芽孢杆菌嗜酸耐热机理的研究还很缺乏。

本文利用荧光实时定量RT-PCR技术对酸土脂环酸芽孢杆菌 (DSM 3922^T) SOD基因在酸、热胁迫条件下的表达情况进行分析, 从mRNA转录水平探讨了酸、热胁迫条件对酸土脂环酸芽孢杆菌SOD基因表达的影响, 从分子水平探索SOD与其嗜酸耐热独特生存能力之间的关系, 为利用基因工程技术提高生物的胁迫抗性, 开发对发酵工业生产中主要胁迫因素有较强耐受性的生产菌株奠定理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

1.1.1 菌株和培养基

酸土脂环酸芽孢杆菌 (*Alicyclobacillus acidoterrestris* DSM 3922^T): 购于德国菌种保藏中心。

酸土脂环酸芽孢杆菌液体培养基 (AAM) (g/L): 葡萄糖 2.0, 酵母浸粉 2.0, MgSO₄·7H₂O 1.0, CaCl₂·2H₂O 0.5, KH₂PO₄ 1.2, MnSO₄·4H₂O 0.5, (NH₄)₂SO₄ 0.4, pH 4.0, 121 °C 杀菌 25 min 备用。

1.1.2 主要试剂

细菌基因组提取试剂盒: 购自美国 ZYMO RESEARCH 生物科技公司; PrimeScriptTM 反转录试剂盒、Premix Ex TaqTM、PMD18-T 载体、DNA 胶回收试剂盒: 购自宝生物工程 (大连) 有限公司; RNA 提取试剂盒: 购自天根生化科技 (北京) 有限公司; Realtime-PCR 反应八连管: 购自美国 Axygen 公司; 其它试剂均为分析纯。

1.1.3 主要仪器设备

7300 实时荧光定量 PCR 仪: 英国 ABI 公司; TGL-16B 台式高速离心机: 上海安亭科学仪器厂; DYY-6C 型电泳仪: 北京市六一仪器厂; HZP-250 全温振荡培养箱: 上海精宏实验设备有限公司; SE-CJ-1F 型单人双面净化工作台: 苏州安泰空气技术有限公司;

ES-315 全自动高压灭菌锅: 日本多美公司。

1.2 实验方法

1.2.1 酸、热环境胁迫处理条件

1.2.1.1 对照菌株培养

将菌种于 AAM 培养基 45 °C 活化培养 12 h 后, 1% 接种量接种于 50 mL 发酵培养液中 (250 mL 三角瓶), 于 45 °C 恒温水浴摇床 250 r/min 培养, 在达到生长对数期后, 12,000 r/min 离心收集菌体提取总 RNA, 对样品进行荧光实时定量 RT-PCR 检测。

1.2.1.2 酸胁迫处理

将菌种于 AAM 培养基 45 °C 活化培养 12 h 后, 1% 接种量接种于 50 mL 发酵培养液中 (250 mL 三角瓶), 于 45 °C 恒温水浴摇床 250 r/min 培养 6 h, 在达到生长对数中期后, 离心获取菌体, 用 pH 为 3 的新鲜 AAM 培养基重悬, 于 45 °C 培养条件下分别酸胁迫处理 0 h、0.5 h、1 h、2 h、3 h、4 h、5 h, 然后离心收集菌体提取 RNA, 进行荧光实时定量 RT-PCR 检测。

1.2.1.3 高温胁迫处理

将菌种于 AAM 培养基 45 °C 活化培养 12 h 后, 1% 接种量接种于 50 mL 发酵培养液中 (250 mL 三角瓶), 于 45 °C 恒温水浴摇床 250 r/min 培养 6 h, 在达到生长对数中期后, 于 70 °C 恒温水浴中分别热激处理 5 min、10 min、15 min、20 min、25 min、30 min、40 min, 热激结束后立即离心收集菌体提取 RNA, 进行荧光实时定量 RT-PCR 检测。

1.2.2 酸土脂环酸芽孢杆菌 RNA 提取

按照 RNeasy prep pure Cell/Bacteria Kit 说明进行。4 °C, 12,000 r/min 离心 2 min 收集菌体, 用 100 μL 含有溶菌酶的 TE 缓冲液重悬, 加入裂解液充分裂解后 12,000 r/min 离心 2 min, 转移上清至另一洁净离心管, 加入无水乙醇混合均匀后将其转移到吸附柱中 12,000 r/min 离心 30~60 s, 弃去废液, 再用去蛋白液、DNase I 工作液、漂洗液清洗吸附柱后, 向吸附膜的中心部位滴加 50 μL 灭菌水, 室温下放置 2 min 后 12,000 r/min 离心 2 min 得 RNA 溶液, 经电泳和纯度检测合格后存于 -80 °C 备用。

1.2.3 酸土脂环酸芽孢杆菌生长和存活曲线

1.2.3.1 正常条件下酸土脂环酸芽孢杆菌的生长曲线

将过夜活化的菌株培养液以 1% 接种量转接到新的 AAM 液体培养基中, 45 °C, 250 r/min 振荡, 每隔 1 h 取一次样, 用 0.9% 生理盐水进行 10 倍梯度稀释, 吸取每个梯度的菌液 0.1 mL, 涂布在 AAM 平板上, 每个稀释梯度涂布三个平板, 置于 45 °C 培养箱中培养 12~16 h, 观察菌株生长情况进行平板菌落

计数。以培养时间为横坐标，活菌数的对数值为纵坐标，制作菌株生长曲线。

1.2.3.2 酸、热胁迫条件下的存活曲线

按照 1.2.1 所述酸、热胁迫条件对生长至对数中期的酸土脂环酸芽孢杆菌进行胁迫处理，处理样品用 0.9%生理盐水进行 10 倍梯度稀释后进行平板菌落计数。以胁迫处理时间为横坐标，活菌数的对数值为纵坐标，制作菌株存活曲线。

1.2.4 SOD 基因表达的 RT-PCR 检测

根据本实验室克隆得到的酸土脂环酸芽孢杆菌 SOD 基因全序列设计 RT-PCR 特异性引物 RTSOD1 和

RTSOD (表1)，内参基因 (管家基因) 引物 RT16S1 和 RT16S2 根据酸土脂环酸芽孢杆菌的 16SrRNA 可变区设计的引物序列 (Table 1)。RNA 提取按照 RNAprep pure Cell/Bacteria Kit 说明书进行，荧光实时定量 RT-PCR 按 SYBR PrimeScript RT-PCR Kit 说明书进行。实时定量 PCR 反应条件：95 °C 预变性 4 min，95 °C 变性 45 s，55 °C 反应 31 s，进行 35 个循环后，添加溶解曲线。试验结果分析采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法，SOD 基因相对表达量 = $(E_{\text{target}})^{\Delta Ct, \text{target} (\text{control-sample})} / (E_{\text{reference}})^{\Delta Ct, \text{reference} (\text{control-sample})}$ 。

表 1 荧光实时定量 RT-PCR 所使用的引物序列

Table 1 Primer sequences for quantitative real time RT-PCR

基因	引物名称	引物类型	引物序列 (5'→3')	扩增子长度/bp
SOD	RTSOD1	Forward primer	CTTTGGCAGTGGTTGGGCGT	195
	RTSOD2	Reverse primer	CCAGTTGACGACATTCCAGAACG	
16S	RT16S1	Forward primer	ACGGGTAGGCATCTACTTGT	298
	RT16S2	Reverse primer	AGGAGCTTCCACTCTCCITGT	

1.2.5 数据分析

所有试验数据均为三次生物学重复平均值，数据的单因素方差分析利用 SAS (SAS version 9.4, USA) 进行，差异显著性分析采用 Duncan 氏新复极差法进行，大写字母表示在 1% 水平上差异显著 (P<0.01)。

注：A：酸胁迫处理后提取的菌体 RNA。M. Marker III；1-7. 酸胁迫时间分别为 0 h、0.5 h、1 h、2 h、3 h、4 h、5 h，B：热胁迫处理后提取的菌体 RNA。M. Marker III；1-8. 热胁迫时间分别为 0 min、5 min、10 min、15 min、20 min、25 min、30 min、40 min。

2 结果与分析

2.1 提取 RNA 的电泳鉴定

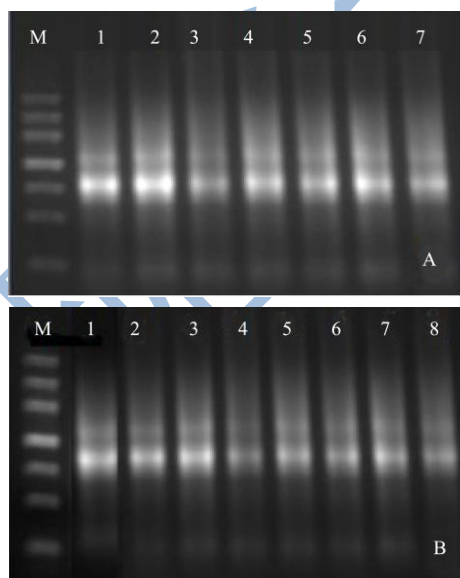


图 1 胁迫处理后提取的菌体 RNA

Fig.1 RNA extracted from *Alicyclobacillus acidoterrestris* after stress treatment

由于 RNA 核糖残基的 2'和 3'位置带有羟基，易被水解；加之生物体内源和外源 RNA 酶含量丰富且加热后仍能正确折叠恢复活性，不易失活，因此，RNA 很不稳定，易被降解。两步法 RT-PCR 实验中，模板 RNA 质量的高低是决定 RT-PCR 反应特异性及灵敏性的关键因素之一。

本实验采用天根公司的 RNAprep pure Cell/Bacteria Kit 进行菌体 RNA 分离及纯化。12,000 r/min 离心正常条件下培养及胁迫处理后的菌液获取菌体，按照 RNAprep pure Cell/Bacteria Kit 说明提取菌体 RNA，试验结束后取 1 μL RNA，进行 1% 琼脂糖凝胶电泳检测，结果如图 1 所示，所得 RNA 完整，无 DNA 污染，无蛋白残留，符合试验要求。

2.2 胁迫处理对酸土脂环酸芽孢杆菌生长情况的影响

酸土脂环酸芽孢杆菌在 45 °C 条件下生长状况良好，培养至 6 h 即进入对数中期，10~13 h 为生长稳定期，活菌数最高可达 9.2×10^8 CFU/mL，之后进入衰亡期 (图 2)。

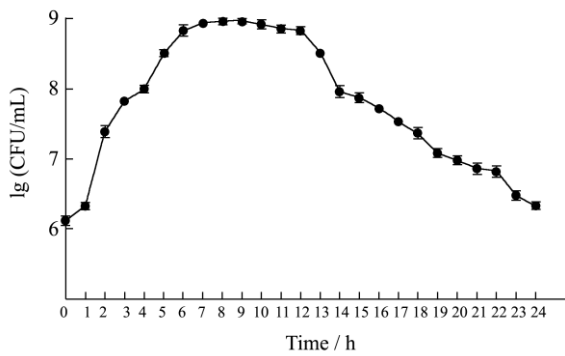


图2 酸土芽孢杆菌在最适温度(45 °C)下的生长曲线

Fig.2 Growth curve of *Alicyclobacillus acidoterrestris* under optimum growth temperature at 45 °C

对数生长中期的酸土脂环酸芽孢杆菌经受 70 °C 热胁迫处理时间为 5~15 min 时, 菌体数量迅速下降, 处理至 15 min 时, 菌体生存率只有 50%。酸胁迫条件下, 在处理至 0.5 h 时, 菌体数量基本不变, 随后随着处理时间延长, 菌体数目大幅度下降, 处理至 2 h 时, 菌体生存率为 40% (图 3)。

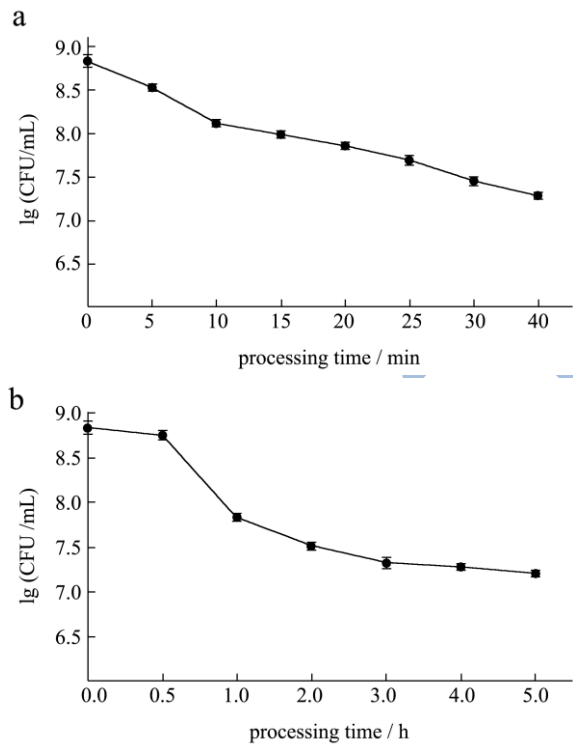


图3 酸土芽孢杆菌在酸热胁迫处理条件下的存活曲线 (a) 70 °C热胁迫 (b) pH3 酸胁迫

Fig.3 Survival curves of *Alicyclobacillus acidoterrestris* under acid and heat stresses

2.3 酸胁迫条件下酸土脂环酸芽孢杆菌 SOD 基因的表达

超氧化物歧化酶是抗氧化防御系统中的第一道防

线, 与生物的抗逆性密切相关。将生长至对数中期的酸土脂环酸芽孢杆菌菌体重悬于 pH 为 3 的新鲜 AAM 培养基中, 分别于 45 °C 恒温水浴下进行酸胁迫处理后进行荧光实时定量 RT-PCR 检测。结果表明, 在酸胁迫条件下, SOD 基因表达量迅速上调, 0.5 h 表达量为对照组的 4.63 倍, 胁迫 1 h 表达量升至最高, 为对照组的 32.55 倍, 随后表达量迅速下调, 胁迫 2 h 时为对照组的 14.98 倍, 胁迫 5 h 时表达量降至对照组的 1.67 倍, 说明酸土脂环酸芽孢杆菌 SOD 基因在该菌响应酸胁迫逆境应答中担负着重要的作用。

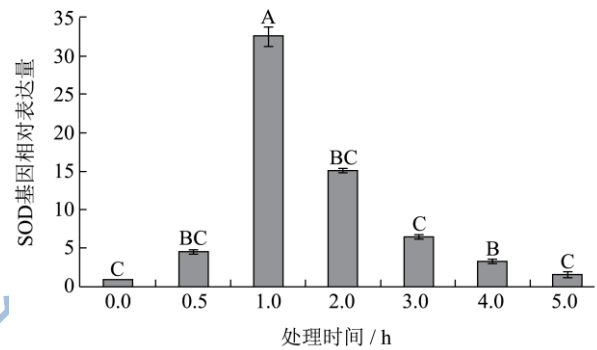


图4 酸胁迫条件下酸土脂环酸芽孢杆菌 SOD 基因的相对表达量

Fig.4 Relative mRNA expression levels of the SOD gene in *Alicyclobacillus acidoterrestris* under acid stress treatment

注: 数据均为三次重复平均值, 采用Duncan氏新复极差法进行差异显著性分析, 大写字母表示在1%水平上差异显著 (P < 0.01)。

2.4 高温胁迫条件下酸土脂环酸芽孢杆菌 SOD 基因的表达

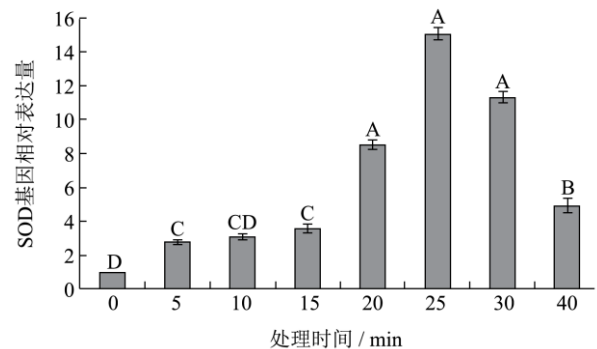


图5 热胁迫条件下酸土脂环酸芽孢杆菌 SOD 基因的相对表达量

Fig.5 Relative mRNA expression levels of the SOD gene in *Alicyclobacillus acidoterrestris* under heat stress treatment

注: 数据均为三次重复平均值, 采用Duncan氏新复极差法进行差异显著性分析, 大写字母表示在1%水平上差异显著 (P < 0.01)。

将 45 °C 条件下培养至生长对数中期的菌悬液分

别于 70 °C 恒温水浴进行热激处理后进行荧光实时定量 RT-PCR 检测。结果表明, 70 °C 热胁迫条件下, 酸土脂环酸芽孢杆菌 *SOD* 基因表达量迅速上调, 5 min 时 *SOD* 基因相对表达量为对照组的 2.81 倍, 胁迫 25 min 时表达量升至最高, 为对照组的 15.05 倍, 胁迫处理 30 min 后 *SOD* 基因表达量呈下降趋势, 热胁迫 40 min 时表达量降至对照组的 4.93 倍。酸土脂环酸芽孢杆菌 *SOD* 基因对热胁迫在时间上具有快速反应的特点, 表明 *SOD* 基因在调控酸土脂环酸芽孢杆菌的耐热性胁迫抗性中发挥着重要作用。

3 讨论

在发酵工业生产中, 微生物细胞会面临各种胁迫作用, 如酸胁迫、高温胁迫及渗透压胁迫等, 如何提高微生物的胁迫抗性一直是发酵微生物育种领域研究的热点^[5,6]。要显著提高发酵工业微生物对生产环境胁迫的适应能力, 需要首先了解微生物应答不同胁迫条件的生理机制, 研究相关基因及蛋白质间的相互作用。随着分子生物学与转基因技术的发展, 人们开始从分子水平深入探讨微生物抗逆基因与逆境之间的关系。目前已证实 *SOD* 与生物体内多种生理过程密切相关, 国内外学者已从多种微生物中克隆得到 *SOD* 基因^[7,8], 从氧自由基产生与清除失调的观点研究生物的抗热、抗碱、抗冻、抗辐射等日益活跃^[8-10], 为阐明生物抗逆的分子机理以及利用转基因技术培育抗逆菌株奠定了基础。

据报道, 生物的抗热、抗酸、耐盐等能力均与 *SOD* 活性有关^[11,12], 相关基因的表达差异会导致微生物耐高温及环境 pH 值等多种胁迫抗性发生相应变化。Benov 的研究表明, 超氧化物歧化酶能够提高大肠杆菌在高温及稳定期的生存能力^[8]。Clements 等研究发现, 缺失 *SOD* 基因的金黄色葡萄球菌突变菌株对酸胁迫和饥饿胁迫的抗性降低^[13]。刘向勇研究发现在 pH 7.9 条件下处理 2 h 可明显诱导酿酒酵母内 *SOD* 活性升高, 而缺失 *SOD* 基因的酿酒酵母突变株则表现出碱胁迫敏感表型, 并且在碱胁迫条件下细胞存活率降低^[9]。这些研究表明 *SOD* 基因在调控微生物对抗非生物环境胁迫中发挥着重要的作用。

酸土脂环酸芽孢杆菌生活在特殊的酸热环境中, 代表着生命对环境的适应能力, 在基因工程、发酵工业及新资源利用等方面具有广阔应用前景和开发潜力。本论文利用荧光实时定量 RT-PCR 技术对酸土脂环酸芽孢杆菌 *SOD* 基因在酸、热环境胁迫下的表达差异进行研究, 发现酸土脂环酸芽孢杆菌 *SOD* 基因在正常生长条件下 (45 °C) 组成型表达, 而在酸、热胁迫条

件下表达量在短时间内迅速上调, 酸胁迫 1 h 和热胁迫 25 min 时达到最高表达量, 分别为对照组的 32.55 倍和 15.05 倍。说明在酸土脂环酸芽孢杆菌遭受高酸及高温环境胁迫时其 *SOD* 基因在应激时间上有迅速响应的特点。

当微生物处于高温、高酸、高盐等非生物环境胁迫时, 会引发菌株细胞中 ROS 大量积累^[14]。氧自由基的存在会破坏细胞膜, 蛋白和核酸而导致细胞或组织的生理病变或老化。*SOD* 作为重要的活性氧清除剂, 在维持生物体内 ROS 生成与清除的动态平衡中发挥着重要作用。酸土脂环酸芽孢杆菌 *SOD* 基因在菌体遭受高温及高酸环境胁迫时表达量在短时间内迅速上调, 表明 *SOD* 基因在调控酸土脂环酸芽孢杆菌对酸热环境胁迫的耐受性中发挥重要作用, 可能对酸土脂环酸芽孢杆菌经受酸性条件下的巴氏杀菌过程而存活具有一定的意义。该基因启动子克隆和分析以及如何受外部的酸热环境调控值得进一步研究。

4 结论

4.1 酸土脂环酸芽孢杆菌 *SOD* 基因在高酸及高温胁迫环境下大量表达, 说明在酸热胁迫条件下酸土脂环酸芽孢杆菌需要大量的 *SOD* 维持细胞内氧自由基的低浓度动态平衡。

4.2 酸土脂环酸芽孢杆菌 *SOD* 基因在其遭受高酸及高温环境胁迫时具有迅速响应的特点, 表明 *SOD* 基因对其在酸、热胁迫条件下的生存起着重要作用, 与其独特的嗜酸耐热生理机制密切相关。

参考文献

- [1] Terato H, Suzuki K, Nishioka N, et al. Characterization and radio-resistant function of manganese superoxide dismutase of rubrobacter radiotolerans [J]. Journal of Radiation Research, 2011, 52(6): 735-742
- [2] Du J, Zhu Z, Li W C. Over-expression of exotic superoxide dismutase gene MnSOD and increase in stress resistance in maize [J]. Journal of Plant Physiology and Molecular Biology, 2006, 32(1): 57-63
- [3] Kwon S I I, Chung S A. Differential expression of two *SOD* (Superoxide Dismutase) genes (*Rhaphanus sativus* L var *sativus*) from small radish [J]. Journal of Plant Biology, 2006, 49(6): 477-483
- [4] McKnight I C, Eiroa M N U, Sant A A S, et al. *Alicyclobacillus acidoterrestris* in pasteurized exotic Brazilian fruit juices: Isolation, genotypic characterization and heat resistance [J]. Food Microbiology, 2010, 27(8):

- 1016-1022
- [5] Al-Mahin A, Sugimoto S, Higashi C, et al. Improvement of multiple-stress tolerance and lactic acid production in *Lactococcus lactis* NZ9000 under conditions of thermal stress by heterologous expression of *Escherichia coli dnaK* [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2010, 76(13): 4277-4285
- [6] 吕春微,李霜,徐晴.工业微生物的酸胁迫响应及其抵御策略[J].中国生物工程杂志,2014,34(3):132-137
LV Chun-wei, LI Shuang, XU Qing. Response and resistance of acid stress in industry microbiology [J]. China Biotechnology, 2014, 34(3): 132-137
- [7] 李文凤,季静,王罡,等.乳酸克鲁维酵母 Cu/Zn-SOD 基因的克隆及在酿酒酵母中的表达研究[J].中国生物工程杂志,2010,30(8):60-66
LI Wen-feng, JI Jing, WANG Gang, et al. Clone of cu/zn-superoxide dismutase gene from *Kluyveromces lactis* and its expression in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. China Biotechnology, 2010, 30(8): 60-66
- [8] Benov L, Fridovich I. A superoxide dismutase mimic protects *sodA*, *sodB* *Escherichia coli* against aerobic heating and stationary-phase death [J]. Archives Biochemistry and Biophysics, 1995, 332(1): 291-294
- [9] 刘向勇,张小华,单长民,等.超氧化物歧化酶在调控酿酒酵母碱胁迫抗性胁迫中的作用[J].安徽农业科学, 2010, 38(26):14277-14278
LIU Xiang-yong, ZHANG Xiao-hua, SHAN Chang-min, et al. Effect of superoxide dismutase on alkaline stress resistance of *Saccharomyces cerevisiae* [J]. Journal of Anhui Agricultural Science, 2010, 38(26): 14277-14278
- [10] Mckersie D B, Murnaghan J, Jones S K, et al. Iron superoxide dismutase expression in transgenic alfalfa increases winter survival without a detectable increase in photosynthetic oxidative stress tolerance [J]. Plant Physiology, 2000, 122(4): 1427-1437
- [11] Fernández-Ocaña A, Chaki M, Luque F, et al. Function analysis of superoxide dismutases (SODs) in sunflower under biotic and abiotic stress conditions. Identification of two new genes of mitochondrial Mn-SOD [J]. Journal of Plant Physiology, 2011, 168(11): 1303-1308
- [12] 何敬和,姚丽.小麦 Mn-SOD 基因的克隆及其在盐胁迫下的表达分析[J].麦类作物学报,2010,30(4):630-633
HE Jing-he, YAO Li. Cloning and expression of Mn-SOD gene of wheat under salt stress [J]. Journal of Triticeae Crops, 2010, 30(4): 630-633
- [13] Clements M O, Watson S P, Foster S J. Characterization of the major superoxide dismutase of *Staphylococcus aureus* and its role in starvation survival, stress resistance, and pathogenicity [J]. Journal of Bacteriology, 1999, 181(13), 3898-3903
- [14] 刘向勇.酿酒酵母BDF-1P转录因子在高盐胁迫中的调控机制[D].济南:山东大学,2008
LIU Xiang-yong. Regulation of the BDF-1P transcription factor in the salt stress response of *saccharomyces cerevisiae* [D]. Jinan: Shandong University, 2008