

免疫与感染

DOI: 10.13406/j.cnki.cyx.000182

铬还原酶 T 体外合成及活性鉴定

谭小庆, 邓 鹏, 吴 颖, 白群华, 贾 燕, 肖 虹

(重庆医科大学公共卫生与管理学院卫生检验教研室, 重庆 400016)

【摘要】目的:克隆沙雷氏菌 CQMUS2 中铬还原酶 T(Chromate reductase T, ChrT)的全基因,构建其原核表达载体并转化至大肠杆菌中表达蛋白,分析表达产物的活性。**方法:**应用 PCR 技术,以耐铬沙雷氏菌 CQMUS2 基因组 DNA 为模板扩增 ChrT 全基因,将该基因连接至表达载体 pET-28a(+)并转化进大肠杆菌感受态细胞 *E.coli* BL21(DE3)表达,用酶促反应鉴定重组 ChrT 酶的活性和 Cr(VI)还原能力,探索其最适 pH 和温度。**结果:**克隆出的 ChrT 全基因长为 567 bp,编码 188 个氨基酸,分子量约 20 kD;IPTG 诱导 10 h 后,在大肠杆菌中成功表达了目的蛋白,其碱基序列和分子量与 ChrT 酶一致;纯化后,ChrT 酶能还原酶促反应体系中的 Cr(VI),使实验组 Cr(VI)含量明显低于对照组($P=0.000$),其酶活可达 997 U/L;ChrT 酶的最适 pH 为 6.5~7.5,最适温度为 37 ℃。**结论:**ChrT 酶具有 Cr(VI)还原活性,为进一步研究高效除铬基因工程菌奠定了基础。

【关键词】沙雷氏菌;铬还原酶;克隆;表达;六价铬;还原

【中图分类号】Q786

【文献标志码】A

【收稿日期】2013-12-19

In vitro synthesis and activity identification of Chromate reductase T

Tan Xiaoqing, Deng Peng, Wu Ying, Bai Qunhua, Jia Yan, Xiao Hong

(Teaching and Research Section of Health Laboratory Science, College of Public Health and Administration, Chongqing Medical University)

【Abstract】Objective: To clone the full length gene of Chromate reductase T(ChrT) from *Serratia* sp. CQMUS2, to construct the prokaryotic expression vector and to transform it into *E.coli* to express

protein, and to analyze the activity of expression products.

研究方向:微生物与环境污染治理。

通信作者:肖 虹, Email: xhk20@163.com。

基金项目:重庆市自然科学基金计划资助项目(编号:2010BB5360)。

优先出版: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.13406/j.cnki.cyx.000182.html>

otic expression vector and to transform it into *E.coli* to express protein, and to analyze the activity of expression products.

Methods: The ChrT gene was cloned from DNA template of *Serratia* sp. CQMUS2, a chromium-resistant bacteria by PCR and was connected with prokaryotic vector pET-28a(+). Then the

and risk factors for non-alcoholic fatty liver disease[J]. *Arq Gastroenterol*, 2012, 49(1): 89-96.

[6] Day CP, James OF. Steatohepatitis: a tale of two 'hits'? [J]. *Gastroenterology*, 1998, 114(4): 842-845.

[7] Henao-Mejia J, Elinav E, Jin C, et al. Inflammasome mediated dysbiosis regulates progression of NAFLD and obesity [J]. *Nature*, 2012, 482(7384): 179-185.

[8] Shimano H. SREBPs: physiology and pathophysiology of the SREBP family [J]. *FEBS J*, 2009, 276(3): 616-621.

[9] 林胜利, 卓德祥, 王晓红, 等. 氧化损伤与内质网应激在四氯化碳致大鼠肝脂肪变性中的作用机制 [J]. *中国生物化学与分子生物学杂志*, 2006, 22(5): 422-430.

[10] Kubota N, Kado S, Kano M, et al. A high-fat diet and multiple administration of carbon tetrachloride induces liver injury and pathological features associated with non-alcoholic steatohepatitis in mice [J]. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2013, 40(7): 422-430.

[11] Boll M, Weber LW, Becker E, et al. Mechanism of carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity. Hepatocellular damage by reactive carbon tetrachloride metabolites [J]. *Z Naturforsch C*, 2001, 56(7-8): 649-659.

[12] Boll M, Weber LW, Becker E, et al. Pathogenesis of carbon tetrachloride-induced hepatocyte injury bioactivation of CCl₄ by cytochrome P450 and effects on lipid homeostasis [J]. *Z Naturforsch C*, 2001, 56(1-

2): 111-121.

[13] Ma KL, Ruan XZ, Powis SH, et al. Inflammatory stress exacerbates lipid accumulation in hepatic cells and fatty livers of apolipoprotein E knockout mice [J]. *Hepatology*, 2008, 48(3): 770-781.

[14] Malhi H, Kaufman RJ. Endoplasmic reticulum stress in liver disease [J]. *Hepatology*, 2011, 54(4): 795-809.

[15] Knebel B, Haas J, Hartwig S, et al. Liver-specific expression of transcriptionally active SREBP-1c is associated with fatty liver and increased visceral fat mass [J]. *PLoS One*, 2012, 7(2): e31812.

[16] Brown MS, Goldstein JL. The SREBP pathway: Regulation of cholesterol metabolism by proteolysis of a membrane-bound transcription factor [J]. *Cell*, 1997, 89(3): 331-340.

[17] Van Rooyen DM, Farrell GC. SREBP-2: a link between insulin resistance, hepatic cholesterol, and inflammation in NASH [J]. *Gastroenterol Hepatol*, 2011, 26(5): 789-792.

[18] Parker RA, Garcia R, Ryan CS, et al. Bile acid and sterol metabolism with combined HMG-CoA reductase and PCSK9 suppression [J]. *J Lipid Res*, 2013, 54(9): 2400-2409.

[19] Sharpe LJ, Brown AJ. Controlling cholesterol synthesis beyond 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase (HMGCR) [J]. *Biol Chem*, 2013, 288(26): 18707-18715.

(责任编辑:冉明会)

recombinant vector was transformed into the *E.coli* BL21(DE3) to express protein. The activity and the reduction ability of hexavalent chromium of recombinant ChrT enzyme were determined by the enzymatic reaction. The optimal pH and temperature of recombinant ChrT enzyme were also studied. **Results:** The ChrT gene was an ORF of 567 bp that encoded a 188-aa protein with a relative molecular mass of 20 kD. At 10 h after the induction with IPTG, the target protein was successfully expressed in *E.coli* and the base sequences and relative molecular mass were consistent with ChrT enzyme. After the purification, ChrT enzyme reduced Cr(VI) in the enzymatic system and the Cr(VI) concentration was significantly lower in experiment group than in control group ($P=0.000$). The activity of ChrT enzyme was up to 997 U/L, the optimum pH of ChrT enzyme was 6.5–7.5 and the optimum temperature was 37 °C. **Conclusion:** ChrT enzyme can reduce Cr(VI), which provide solid foundation for further study on the high-level expression of Cr(VI)-removal engineering bacteria.

[Key words] *Serratia spec.*; Chromate reductase; clone; expression; hexavalent chromium; reduction

铬还原酶 T(chromate reductase T, ChrT)是一种黄素单核苷酸结合蛋白,属于依赖还原型辅酶 I 或 II 的黄素单核苷酸还原酶家族[NAD(P)H-dependent FMN reductase family, FMN_red],黄素单核苷酸(flavin mononucleotide, FMN)作为黄素蛋白的辅基参与电子从底物向电子受体的传递,可催化铬等重金属的还原反应^[1]。目前,重金属铬在工业上的广泛应用以及含铬废水废渣的大量排放已造成我国土壤和水体的严重污染^[2]。而六价铬 Cr(VI)由于极高的水溶性其毒性远远大于三价铬 Cr(III),且被列为国际公认的 3 种致癌金属物之一^[3]。铬污染治理除传统的物理化学外,微生物的生物修复由于其经济高效的作用已成为当今研究的热点。目前国内外分离出的高效解毒 Cr(VI)的功能菌株已有数十种,包括假单胞菌^[4]、链霉菌^[5]、芽孢杆菌^[6]、大肠杆菌^[7]、布鲁氏菌^[8]等,但对这些菌的研究基本局限在菌种鉴定、活性检测以及解毒机制等方面,而对 Cr(VI)还原相关的基因及蛋白研究并不深入。为了深入探讨 ChrT 的功能,本研究通过基因重组的方法,成功构建了 *E.coli* 重组表达菌株用以高效表达 ChrT 合成酶基因并初步探讨了该酶对铬还原的功能,为下一步构建高效除铬工程菌提供了物种资源及基因资源。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种与质粒 沙雷氏菌 CQMUS2 由实验室保存; *E.coli* DH5 α 感受态细胞、*E.coli* BL21(DE3)感受态细胞购自北京天根公司;克隆载体 pMD19-T 购自大连宝生物 Takara 公司;表达载体 pET-28a(+)购自 Novagen 公司。

1.1.2 主要试剂 普通 DNA 产物纯化试剂盒、2 $\times$ Pfu PCR MasterMix 高保真酶、DNA marker(北京天根公司); *Eco*R I、*Hind* III 内切酶、IPTG(Takara 公司);Ni 亲和层析柱(Qiagen 公司);LB 培养基、卡那霉素(上海生工);其他均为国产或进口分析纯试剂。

1.2 实验方法

1.2.1 细菌基因组 DNA 的提取-水煮模板法 提取方法参照谭小庆等的文献^[9]。

1.2.2 ChrT 基因的 PCR 扩增 根据沙雷氏菌 CQMUS2 的 FMN_red(ChrT)基因序列(GenBank ID:KF211434),用 Olig7 软件设计一对引物 P1:5'-ATGAATTCATGTCAGATACCTG-3', P2:5'-ATCAAGCTTATGCTTTAACCCGCC-3',下划线部分分别为 *Eco*R I 和 *Hind* III 的酶切位点,引物由上海生工合成。

以提取的沙雷氏菌 CQMUS2 基因组 DNA 为模板, P1、P2 为引物, 2 $\times$ Pfu PCR MasterMix 聚合酶体系进行 PCR 扩增,反应体积为 25.0 μ l,扩增条件为:94 °C, 3 min; 94 °C, 30 s; 56 °C, 30 s; 72 °C, 1 min, 共 30 个循环; 72 °C, 5 min。采用琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物,由上海生工完成 PCR 产物测序。

1.2.3 克隆载体的连接、转化及测序 将纯化回收的 PCR 产物与克隆载体 pMD19-T 连接,转化至大肠杆菌 *E.coli* DH5 α 感受态细胞中,涂布于含氨苄青霉素的 LB 平板中,经蓝白斑实验筛选得到阳性克隆重组子,随机挑取 3 个蓝色菌落进行 PCR 扩增和琼脂糖凝胶电泳鉴定;将鉴定正确的克隆菌接种于 4 ml 含 100 μ g/ml 氨苄青霉素的 LB 液体培养基中, 37 °C 过夜培养,并送上海生工完成 T 质粒测序。

1.2.4 重组表达质粒的构建 将载有 ChrT 基因的 pMD19-T 质粒、表达载体 pET-28a(+)质粒用内切酶 *Eco*R I、*Hind* III 进行双酶切,并用普通 DNA 产物纯化试剂盒进行回收。将上述纯化的 ChrT 基因与纯化的 pET-28a(+)载体按一定比例,用 T4 DNA 连接酶进行连接。连有 ChrT 基因的表达载体与空白对照转化至大肠杆菌 *E.coli* BL21(DE3)感受态细胞中,转化方法参照厂商提供的试剂说明书。随机挑取 3 个白色菌落进行 ChrT 的 PCR 扩增和琼脂糖凝胶电泳鉴定;将鉴定正确的重组菌接种于 4 ml 30 μ g/ml 卡那霉素的 LB 液体培养基中, 37 °C 150 r/min 过夜培养。为防止基因突变,将重组表达菌送上海生工完成质粒测序。

1.2.5 ChrT 的 IPTG 诱导表达 挑取阳性重组菌接种于 100 ml 含 30 μ g/ml 卡那霉素的 LB 培养液中, 37 °C 250 r/min 振荡培养, 3 h 后加入诱导剂 IPTG 至终浓度为 1 mmol/L, 30 °C 200 r/min 继续振荡 10 h。实验中同时诱导空质粒作为空白对照。

1.3 重组 ChrT 的表达特性

1.3.1 重组 ChrT 酶表达量的测定 将 100 ml 表达菌液

(1.2.5) 4 ℃ 6 000 r/min 离心 30 min, 低温条件下超声波破碎细胞, 4 ℃ 6 000 r/min 离心 30 min, 留取上清即为粗酶液。采用 SDS-PAGE 法检测粗酶液中重组 ChrT 的蛋白表达量。

1.3.2 重组 ChrT 酶活性的判断 将 1.2.5 步骤中获得的粗酶液用 Ni 亲和层析柱纯化得到重组蛋白的纯酶液, 进行酶促反应。1 ml 酶促反应体系: 0.2 mmol/L NADPH, 0.05 mmol/L Cr(VI) 反应液, pH 5.0 的 PBS 缓冲液。37 ℃ 反应 30 min, 每 1 min 检测 340 nm 下 NADPH 的吸光度值, 至 30 min 反应结束。根据 NADPH 的 A₃₄₀ 值判断酶促反应进行程度。

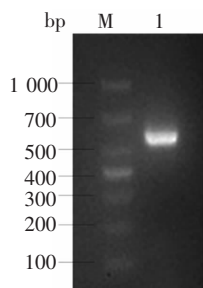
1.3.3 重组 ChrT 酶 Cr(VI) 还原能力的测定 酶活定义: 37 ℃, 30 min 能转化 1 μmol 底物 Cr(VI) 的酶量为 1 U。共配制 5 个酶促反应体系, 每个都配制为 2 ml, 取出其中 1 ml 加入重组蛋白纯酶液 25 μl 为实验组, 另外 1 ml 不加酶液为对照组。采用 GB/T 7467-1987 二苯碳酰二肼分光光度法检测反应后体系中 Cr(VI) 浓度, 通过比较反应后实验组与对照组的 Cr(VI) 含量差异来鉴定 ChrT 酶的 Cr(VI) 还原能力。

1.3.4 重组 ChrT 酶最适 pH 和最适温度的探索 将 ChrT 酶置于 37 ℃、不同 pH 环境中进行酶促反应, 测定 ChrT 酶的活性, 以找出其最适 pH。然后, 将 ChrT 酶置于最适 pH、不同温度条件下进行酶促反应, 测定 ChrT 酶的活性, 探索其最适温度。

2 结果与分析

2.1 ChrT 全基因的克隆

以沙雷氏菌 QMUS2 基因组 DNA 为模板, P1、P2 为引物进行 PCR 扩增, 琼脂糖凝胶电泳显示 ChrT 全基因的片段大小为 600 bp 左右 (图 1)。测序结果表明该基因 DNA 长为 567 bp, 在 GenBank 中的登录号为 KF211434。该基因编码 188 个氨基酸, 分子量约 20 kD; ChrT 的 DNA 电泳结果和测序结果一致。



M. DNA marker DL1000; 1. ChrT 基因

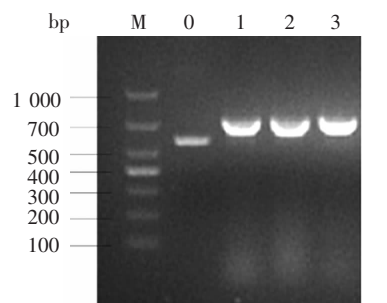
图 1 ChrT 基因琼脂糖凝胶电泳

Fig.1 Agarose gel electrophoresis of ChrT gene

2.2 克隆载体的鉴定

将纯化回收的 ChrT 基因与 pMD19-T 载体连接转化至 *E. coli* DH5α 感受态细胞中, 阳性克隆重组子 pMD19-T-ChrT 的 PCR 产物的琼脂糖凝胶电泳结果如图 2 所示。结果表明, pMD19-T-ChrT 条带的大小在 700 bp 左右, 符合 pMD19-T 空质粒 155 bp 与 ChrT 567 bp 联接成功的表现。对 pMD19-T-ChrT 的测序结果显示除去质粒 155 bp 的序列外, 其余序列

与 GenBank 发表的序列完全一致。成功构建的克隆载体, 既证明了 ChrT 全基因序列的正确性, 也为后续表达提供了充足稳定的目的基因。



M. DNA marker DL1000; 0. ChrT 基因;

1~3. 重组克隆质粒 pMD19-T-ChrT

图 2 重组克隆质粒的 PCR 鉴定

Fig.2 PCR identification of the recombinant plasmid

pMD19-T-ChrT

2.3 重组表达载体的鉴定

将 T-ChrT 质粒和 pET-28a(+) 质粒构建的重组表达载体 pET-28a(+)-ChrT 如图 3 所示。将此重组质粒转化至大肠杆菌 BL21(DE3) 感受态细胞中, 其菌落中 PCR 扩增结果如图 4 所示。由图可见, 重组质粒大小约为 900 bp, 符合空白质粒 320 bp 和 ChrT 567 bp 联接成功的表现。测序结果显示除去质粒 320 bp 的序列外, 其余序列与 GenBank 发表的序列完全一致。

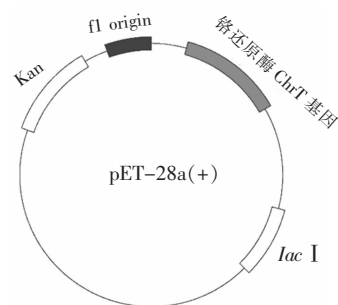
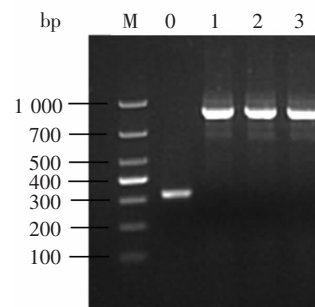


图 3 重组质粒 pET-28a(+)-ChrT

Fig.3 Recombinant plasmid pET-28a(+)-ChrT



M. DNA marker DL1000; 0. 空质粒 pET-28a(+);

1~3. 重组表达质粒 pET-28a(+)-ChrT

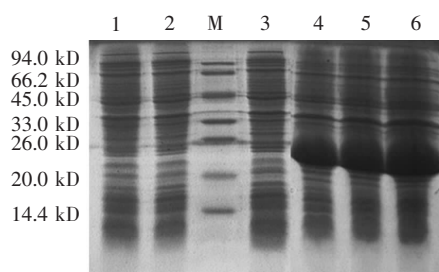
图 4 重组表达质粒 PCR 鉴定

Fig.4 PCR identification of the recombinant plasmid

pET-28a(+)-ChrT

2.4 重组蛋白的诱导表达

重组蛋白的 SDS-PAGE 电泳如图 5 所示,表达出来的目的蛋白大小约为 25 kD 左右,除去 pET-28a(+)载体组氨酸标签的分子量 5 kD,与铬还原酶 ChrT 分子量 20 kD 相符。从图 5 可看到重组质粒在诱导前无 ChrT 蛋白表达,诱导 10 h 后表达量大幅度提高,而空质粒无论诱导前还是诱导后都无 ChrT 蛋白的表达。



M. marker; 1~2. 空质粒 IPTG 诱导表达前后; 3. 重组质粒诱导表达前; 4~6. 重组质粒诱导表达 10 h 后

图 5 重组大肠杆菌 *E. coli* [pET-28a(+)-ChrT] 表达蛋白的

SDS-PAGE 电泳图

Fig.5 SDS-PAGE analysis of proteins expressed in the recombinant *E. coli* [pET-28a(+)-ChrT]

2.5 重组 ChrT 酶活性的判断

将粗酶液中的 ChrT 酶提纯,以 NADPH 为辅酶进行酶促反应。340 nm 下 NADPH 的吸光度值变化如图 6 所示。由图可见,酶促反应进行 5 min 后,实验组 NADPH 的 $A_{340\text{ nm}}$ 从 0.811 降至 0.234,其降低程度为总降低值的 94.5%,说明体系中的 NADPH 能被利用,重组 ChrT 酶具备活性;10 min 后,酶促反应基本完成。而对照组 NADPH 的 $A_{340\text{ nm}}$ 值始终没有明显变化,说明在没有 ChrT 酶存在时,体系内各成分基本不发生反应。

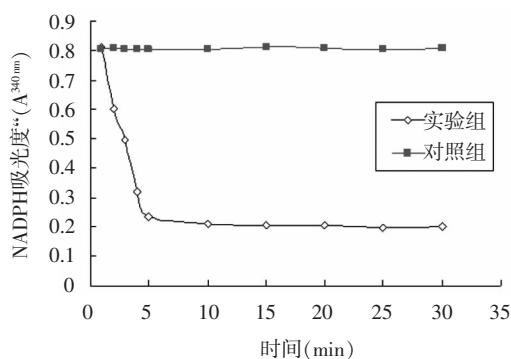


图 6 酶促反应中的 NADPH 变化

Fig.6 Change of NADPH during enzymatic reaction

2.6 重组 ChrT 酶 Cr(VI)还原能力的分析

酶促反应后体系中 Cr(VI)含量如表 1 所示。利用 SPSS 进行配对资料比较的 t 检验,结果表明反应后 2 组间的 Cr(VI)含量差异存在统计学意义($P=0.000$),说明 ChrT 酶能还

原体系中的 Cr(VI),使实验组 Cr(VI)含量明显低于对照组。根据实验组中 Cr(VI)含量变化,可计算出 ChrT 酶活性为 997 U/L。

表 1 酶促反应后体系中 Cr(VI)含量

Tab.1 Concentration of Cr(VI) after enzymatic reaction				
分组	样本数	Cr(VI)含量(μg)	t 值	P 值
对照组	5	2.621 ± 0.025	72.486	0.000
实验组	5	1.325 ± 0.018		

2.7 重组 ChrT 酶最适 pH 和最适温度的探索

重组 ChrT 酶的最适 pH 和最适温度如图 7 所示。由图可见,pH 和温度对铬还原酶活性影响较大,在 pH 6.5~7.5 酶活性都接近最大,因此,重组 ChrT 酶的最适 pH 为 6.5~7.5;随着温度的升高 ChrT 酶活性增大,在 37 °C 达到最大,因此,重组 ChrT 酶的最适温度为 37 °C。30 °C~60 °C 酶都能发挥最大活性的 60%以上,而 10 °C 时酶几乎没有活性。

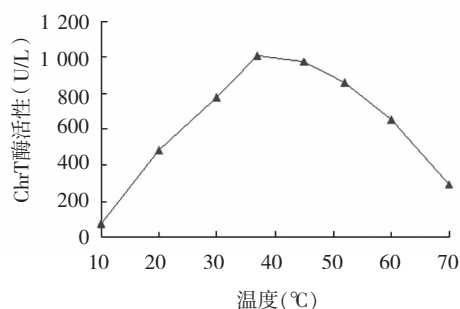
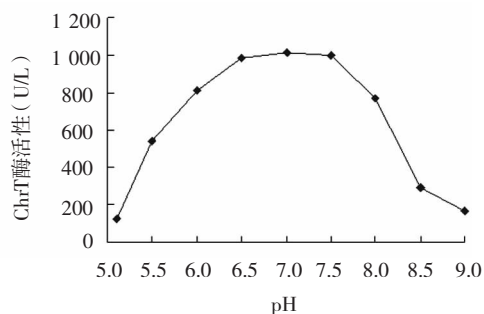


图 7 重组 ChrT 酶的最适 pH 和最适温度

Fig.7 Optimal pH and temperature of recombinant ChrT enzyme

3 讨论

自 20 世纪 70 年代以来,国内外科研人员不断分离出高效还原 Cr(VI)的功能菌株,其中以国外分离出的菌株较多,包括假单胞菌^[4]、脱硫弧菌^[9]、芽胞杆菌^[6]、希瓦氏菌^[10]等,而国内分离出的铬还原菌相对较少^[2,11-12]。本研究中所用的沙雷氏菌 CQMUS2 是在 2008 年筛选得到且能够耐受 1 000 mg/L Cr(VI)

并在 30 h 完全还原 20 mg/L Cr(VI)^[1]。目前,国内对除 Cr(VI)功能菌株的研究主要集中在菌种的鉴定、活性检测以及粗酶液的酶学特性等方面,几乎没有解毒 Cr(VI)机制方面的相关研究。

国外对铬还原酶活性的研究最早始于 1990 年,研究人员从阴沟肠杆菌中分离出铬还原酶,其活性分别为 1.40 U/mg^[13]。而迄今为止研究得最深入的 ChrR,其活性为 374 mmol/L^[14]。2008 年 Ramírez-Díaz 等^[15]对微生物耐受及还原 Cr(VI)的机制进行了综合分析,发现了由微生物质粒基因编码的铬泵具有 Cr(VI)外排的功能以及由染色体基因编码的铬还原酶能将 Cr(VI)还原为 Cr(III),其中研究比较透彻的还原酶是来自恶臭假单胞菌的 ChrR 和大肠杆菌的 YieF,且都属于 FMN_red 家族成员。另外,He 等^[12]通过全基因组测序在梭形芽胞杆菌基因组中发现了可能与铬还原相关的基因,包括硝基还原酶、黄素氧化还原酶、FMN 还原酶、醌氧化还原酶。国际上对铬还原酶的研究至今还主要集中在对菌株中酶的分离提取研究,很少见对其进行表达以及功能上的分析,也没有关于相关工程菌的研究报道。基于此,本研究首次从高铬耐受菌沙雷氏菌 CQMUS2 中克隆得到一个 ChrT 基因并对其进行了重组表达,空间结构分析发现该 ChrT 酶也属于 FMN_red 家族,与 ChrR 酶的相似度高达 85.6%,说明他们极有可能分享着共同的铬还原机制及相同的还原能力,同时,重组表达的 ChrT 蛋白表现出极强的活性,使得辅酶 NADPH 在 5 min 内吸光度降至近乎最低,同时铬含量的变化与对照组相比具有明显的统计学差异,且活性在 37 ℃、pH 为 6.5~7.5 时最高,达到 997 U/L。

微生物对 Cr(VI)的抗性及其还原能力不仅仅是一个基因、一个蛋白的作用,而是细胞内多种铬还原酶成组型表达的结果,本研究对高铬耐受菌沙雷氏菌 CQMUS2 其中一个 ChrT 进行了克隆和表达的研究,初步证明了其对 Cr(VI)具备较强的还原能力,这为下一步研究该酶的稳定性、持久性以及环境因素对表达及功能的影响奠定了基础,同时也为构建高效除铬工程菌提供了菌种资源以及基因资源。

参 考 文 献

- [1] 谭小庆,白群华,韩令力,等.耐铬沙雷氏菌 CQMUS2 FMN_red 基因片段的克隆与序列分析[J].生物技术,2013,23(5):8-11.
- [2] 魏 斐,杨丽荣,薛保国,等.还原六价铬细菌及其还原酶的研究[J].中国生物工程杂志,2012,32(4):53-59.
- [3] Costa M, Klein CB. Toxicity and carcinogenicity of chromium compounds in humans[J]. Crit Rev Toxicol, 2006, 36(2): 155-163.
- [4] Dogan NM, Kantar C, Gulcan S, et al. Chromium(VI) bioremoval by pseudomonas bacteria: role of microbial exudates for natural attenuation and biotreatment of Cr(VI) contamination[J]. Environ Sci Technol, 2011, 45(6): 2278-2285.
- [5] Polti MA, Amoroso MJ, Abate CM. Chromate reductase activity in Streptomyces sp. MC1[J]. J Gen Appl Microbiol, 2010, 56(1): 11-18.
- [6] Masood F, Malik A. Hexavalent chromium reduction by Bacillus sp. strain FM1 isolated from heavy-metal contaminated soil[J]. Bull Environ Contam Toxicol, 2011, 86(1): 114-119.
- [7] Liu GF, Yang H, Wang J, et al. Enhanced chromate reduction by resting Escherichia coli cells in the presence of quinone redox mediators[J]. Bioresour Technol, 2010, 101(21): 8127-8131.
- [8] Thacker U, Parikh R, Shouche Y, et al. Reduction of chromate by cell-free extract of Brucella sp. isolated from Cr(VI) contaminated sites[J]. Bioresour Technol, 2007, 98(8): 1541-1547.
- [9] Mabbett AN, Lloyd JR, Macaskie LE. Effect of complexing agents on reduction of Cr(VI) by Desulfovibrio vulgaris ATCC 29579[J]. Biotechnol Bioeng, 2002, 79(4): 389-397.
- [10] Myers CR, Carstens BP, Antholine WE, et al. Chromium(VI) reductase activity is associated with the cytoplasmic membrane of anaerobically grown Shewanella putrefaciens MR-1[J]. J Appl Microbiol, 2000, 88(1): 98-106.
- [11] 肖 伟,王 磊,李倬锴,等.六价铬还原细菌 Bacillus cereus S5.4 还原机理及酶学性质研究[J].环境科学,2008,29(3):751-755.
- [12] He M, Li X, Liu H, et al. Characterization and genomic analysis of a highly chromate resistant and reducing bacterial strain? Lysinibacillus fusiformis ZC1[J]. J Hazard Mater, 2011, 185(2-3): 682-688.
- [13] Wang PC, Mori T, Toda K, et al. Membrane-associated chromate reductase activity from Enterobacter cloacae[J]. J Bacteriol, 1990, 172(3): 1670-1672.
- [14] Park CH, Keyhan M, Wielinga B, et al. Purification to homogeneity and characterization of a novel Pseudomonas putida chromate reductase[J]. Appl Environ Microbiol, 2000, 66(5): 1788-1795.
- [15] Ramírez-Díaz MI, Díaz-Pérez C, Vargas E, et al. Mechanisms of bacterial resistance to chromium compounds[J]. Biometals, 2008, 21(3): 321-332.

(责任编辑:冉明会)