

## 红球菌启动子识别及 $\beta$ -半乳糖苷酶报告基因表达

刘昌春<sup>1</sup>, 于慧敏<sup>1</sup>, 马玉超<sup>1</sup>, 潘雯宇<sup>2</sup>, 罗晖<sup>2</sup>, 沈忠耀<sup>1</sup>

1 清华大学化工系生物化工研究所, 北京 100084

2 北京科技大学生物科学与技术系, 北京 100083

**摘要:** 红球菌属在生物降解、生物修复、生物转化和生物表面活性剂等领域得到了日益广泛的应用。本研究以红球菌-大肠杆菌穿梭质粒 pNV18.1 为载体, 以腈水合酶为模式酶, 研究了大肠杆菌 *tac*、*lacZ* 启动子和红球菌酰胺酶启动子 (*ami-1/ami-2*) 在红球菌中的启动效率。结果表明, 启动子 *Ptac*、*Pami-1* (7 bp SD-ATG 间隔)、*Pami-2* (13 bp SD-ATG 间隔) 和 *PlacZ* 在紫红红球菌 ATCC 33278 中启动表达腈水合酶的比酶活分别是野生菌株的 7.5、6.3、5.3 和 1.8 倍, 表明这些启动子都可以被红球菌的 RNA 聚合酶所成功识别。采用 *PlacZ* 启动子在红球菌宿主中启动  $\beta$ -半乳糖苷酶报告基因 (*lacZ*), 结果表明, *lacZ* 能够在红球菌中高效表达, 是优选的红球菌报告基因。

**关键词:** 红球菌, 启动子启动效率, 腈水合酶, 报告基因,  $\beta$ -半乳糖苷酶

## Promoter recognition and $\beta$ -galactosidase reporter gene expression in *Rhodococcus*

Changchun Liu<sup>1</sup>, Huimin Yu<sup>1</sup>, Yuchao Ma<sup>1</sup>, Wenyu Pan<sup>2</sup>, Hui Luo<sup>2</sup>, and Zhongyao Shen<sup>1</sup>

1 Department of Chemical Engineering, Tsinghua University, Beijing 100084, China

2 Department of Biological Science and Technology, University of Science and Technology Beijing, Beijing 100083, China

**Abstract:** The genus *Rhodococcus* is of considerable interest in recent years, stemming from their diverse applications in biodegradation, bioremediation, biotransformation and biosurfactant. Using *Nocardia/Rhodococcus-Escherichia coli* shuttle plasmid pNV18.1 as the backbone vector, we tested the driven efficiency of promoters *Ptac* and *PlacZ* of *E. coli* and *Pami-1/Pami-2* of *R. ruber* in host *R. rhodochrous* ATCC 33278 by overexpression of nitrile hydratase. Results showed that the specific activity of nitrile hydratase per dry cell weight in engineered *Rhodococcus* strains driven by *Ptac*, *Pami-1*, *Pami-2* and *PlacZ* was 7.5, 6.3, 5.3 and 1.8 times of that in the wild, respectively. It indicated that these promoters could be well recognized by RNA polymerase of *Rhodococcus*. We further expressed the  $\beta$ -galactosidase reporter gene (*lacZ*) in *R. ruber* driven by promoter *PlacZ*. Results indicated that *lacZ* was an appropriate reporter gene for genetic or metabolic engineering research of *Rhodococcus*.

**Keywords:** *Rhodococcus*, driven efficiency of promoter, nitrile hydratase, reporter gene,  $\beta$ -galactosidase

**Received:** May 11, 2009; **Accepted:** July 20, 2009

**Supported by:** National Excellent Doctoral Dissertation Foundation of China (No. 200345), National High Technology Research and Development Program of China (863 Program) (No. 2007AA02Z201), National Basic Research and Development Program of China (973 Program) (No. 2007CB714304).

**Corresponding author:** Huimin Yu. Tel: +86-10-62788568; E-mail: yuhm@tsinghua.edu.cn

全国优秀博士学位论文作者专项资金资助项目(No. 200345), 国家高技术研究发展计划(863 计划) (No. 2007AA02Z201), 国家重点基础研究发展计划(973 计划) (No. 2007CB714304)资助。

红球菌 (*Rhodococcus*) 属于放线菌目 (Actinomycetales), 介于分枝杆菌 (*Mycobacterium*) 和诺卡氏菌 (*Nocardia*) 之间, 是一类好氧、不运动、含分枝菌酸、G+C 含量高的革兰氏阳性菌, 菌丝体可以分裂成棒状或球状<sup>[1]</sup>。红球菌属中的主要成员包括马红球菌 (*R. equi*)、红平红球菌 (*R. erythropolis*)、紫红红球菌 (*R. rhodochrous*) 和红色红球菌 (*R. ruber*) 等 12 种, 在自然界广泛存在<sup>[1-2]</sup>。红球菌具有广泛的底物作用谱, 在生物降解、生物修复、生物转化和生物表面活性剂等领域得到了越来越普遍的应用<sup>[2]</sup>。比如, 红球菌能有效地降解苯酚、有机含硫芳香化合物、甲苯和二甲苯、多氯联苯、萘和吡啶、烷烃、二苯并咪唑以及除草剂 atrazine 等有机物<sup>[3-9]</sup>。在生物转化领域, 红球菌被广泛用于生物法生产丙烯酰胺、丙烯酸、烟酰胺以及羟基乙酸等化学品<sup>[10-12]</sup>。红球菌还可以用于生产海藻糖脂等生物表面活性剂、多肽和脂类等生物絮凝剂以及重要的药物前体等<sup>[13-16]</sup>。然而, 到目前为止, 尽管 1 株红球菌 *Rhodococcus* sp. RHA1 的测序工作已经完成<sup>[17]</sup>, 大多数红球菌的基因背景和代谢途径还不清晰, 可用于红球菌宿主的启动子、复制子及报告基因等遗传工具的信息也很缺乏。

启动子是基因表达水平的重要决定因素之一<sup>[18]</sup>。启动子强度通常取决于其转录起始位点之前的-35 和-10 区的特征序列, 以及起始密码子之前的核糖体结合位点 (RBS) 的结构, 如 Shine-Dalgarno (SD)-ATG 间隔长度<sup>[19-20]</sup>。启动子 *tac* 是 *trp-lac* 杂合启动子, 广泛应用于大肠杆菌<sup>[21]</sup>, 其启动效率至少是 *lac UV5* 启动子的 5 倍。日本研究人员曾将大肠杆菌 *lac* 启动子成功用于紫红红球菌穿梭质粒 pK4 及其衍生质粒中<sup>[22]</sup>。Mizunashi 等则直接应用红球菌 N-774 的酰胺酶基因天然启动子 (*Pami*) 在紫红红球菌 ATCC 12674 中成功表达了腈水合酶 (Nitrile hydratase, NHase)<sup>[23]</sup>。

报告基因 (Reporter gene) 是一种编码可以被便捷检测的蛋白质或酶的基因, 是基因工程、蛋白质工程和代谢工程研究的重要遗传工具。常见的报告基因有氯霉素乙酰转移酶基因 (*cat*)、β-半乳糖苷酶基因 (*lacZ*)、荧光酶基因 (*luc*) 以及绿色荧光蛋白基因

(*gfp*) 等<sup>[24-25]</sup>。

本研究以紫红红球菌 *R. rhodochrous* ATCC 33278 和红色红球菌 *R. ruber* TH 为模式宿主, 以诺卡氏菌/红球菌-大肠杆菌穿梭质粒为载体, 研究了 *PlacZ*、*Ptac*、*Pami-1/ami-2* 等启动子被红球菌 RNA 聚合酶的识别情况, 以及 β-半乳糖苷酶报告基因 (*lacZ*) 在红色红球菌宿主中的表达效果, 为红球菌的基因工程与代谢工程研究提供重要的遗传信息。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌株、基因和质粒

本研究中所用到的各重组质粒如表 1 所示。

表 1 本研究中所用的质粒

Table 1 Plasmids used in this study

Plasmids	Relevant genotype	Source or reference
pMAL-p2x	6.7 kb, <i>tac</i> , <i>malE</i> , Amp <sup>r</sup>	NEB
pNV18.1	4.4 kb, <i>Nocardia/Rhodococcus-E. coli</i> shuttle vector, <i>PlacZ</i> , Kan <sup>r</sup>	[26]
pNV18- <i>Ptac</i>	4.7 kb, <i>Ptac</i> , Kan <sup>r</sup>	This study
pNV18- <i>Pami-1</i>	4.8 kb, <i>Pami-1</i> , Kan <sup>r</sup>	This study
pNV18- <i>Pami-2</i>	4.8 kb, <i>Pami-2</i> , Kan <sup>r</sup>	This study
pNV18-NH	5.7 kb, <i>PlacZ</i> , NHase gene, Kan <sup>r</sup>	This study
pNV18- <i>Ptac</i> -NH <sup>M</sup>	6.0 kb, <i>Ptac</i> , NHase <sup>M</sup> gene, Kan <sup>r</sup>	This study
pNV18- <i>Pami-1</i> -NH <sup>M</sup>	6.1 kb, <i>Pami-1</i> , NHase <sup>M</sup> , Kan <sup>r</sup>	This study
pNV18- <i>Pami-2</i> -NH <sup>M</sup>	6.1 kb, <i>Pami-2</i> , NHase <sup>M</sup> , Kan <sup>r</sup>	This study
pPR9TT	9.4 kb, promoter-probe plasmid with <i>lacZ</i> , Amp <sup>r</sup> Cm <sup>r</sup>	[27]
pNV- <i>lacZ</i>	6.7 kb, pNV18.1 derivative, <i>lacZ</i> , Kan <sup>r</sup>	This study

*E. coli* TOP-10 从天根生物技术有限公司购买。紫红红球菌 *R. rhodochrous* ATCC 33278 从美国 ATCC 菌种保藏中心购买。红色红球菌 *R. ruber* TH 为本实验室保存。穿梭质粒 pNV18.1 携带 *PlacZ* 启动子和 *LacZ* 的 α 亚基序列<sup>[26]</sup>。启动子 *Ptac* (321 bp) 来自质粒 pMAL-p2x (NEB 公司); *Pami* 来自 *R. ruber* TH (*Pami-1*, 335 bp, SD-ATG 间隔 7 bp; *Pami-2*, 341 bp, SD-ATG 间隔 13 bp); 突变腈水合酶 NHase<sup>M</sup> 长 1.3 kb, 其 α 亚基起始密码子从 *gtg* 突变为 *atg*<sup>[28]</sup>。报告基因 *lacZ* 的全长序列克隆自质粒 pP9R9TT<sup>[27]</sup>。

### 1.2 工具酶和试剂

本研究所用各种工具酶均购自 TaKaRa (大连) 公司。质粒提取、PCR 产物纯化等试剂盒购自北京百

泰克生物技术有限公司。PCR 引物由北京赛百盛基因技术有限公司合成。基因扩增、酶切、连接、转化、电泳等基因工程操作均按常规方法进行<sup>[29]</sup>。

### 1.3 引物

脲水合酶基因(NHase<sup>M</sup>)采用引物 NHM-1/NHM-2 获得; *Ptac* 采用 *Ptac*-1/*Ptac*-2 双引物扩增; *Pami*-1 启动子采用 *Pami*-F/*Pami*-R1 双引物扩增; *Pami*-2 启动子采用 *Pami*-F/*Pami*-R2 双引物扩增; *lacZ* 基因全长的扩增采用双引物 *LacZ*-P1/*LacZ*-P2, 如表 2 所示。引物中所含酶切位点用下划线表示。

表 2 本研究中所用的引物

Table 2 Primers used in this study

Primers	Sequences (5'-3')	Digestion sites
NHM-1	CGGGATCC ATGGATGGTATCCA	<i>Bam</i> H I
NHM-1	CCAAGCTT TCATACGATCACT	<i>Hind</i> III
<i>Ptac</i> -1	CGGAATTCATCTCATGTTTGACAGCT	<i>Eco</i> R I
<i>Ptac</i> -2	CGGGATCCGGTCCTTGTGGTGAAGT	<i>Bam</i> H I
<i>Pami</i> -F	CGGAATTCGCGGACGGCGGATACGT	<i>Eco</i> R I
<i>Pami</i> -R1	CGGGATCCCTCCTTAGTGACT	<i>Bam</i> H I
<i>Pami</i> -R2	CGGGATCCCTAGGACTCCTTAGTGACT	<i>Bam</i> H I
<i>LacZ</i> -P1	TCAGGATCCCTGCCCGTTATTATTA	<i>Bam</i> H I
<i>LacZ</i> -P2	TCAGGATCCATATCGAATTCCTGCAGC CCGG	<i>Bam</i> H I

### 1.4 重组红球菌的电穿孔转化与培养

重组质粒在红球菌 *R. rhodochrous* ATCC 33278 和 *R. ruber* TH 中的转化采用电穿孔方法<sup>[30]</sup>, 在 R2L 培养基中 28°C 活化 2 h 后, 涂布在 S27M 固体平板上(Kan<sup>r</sup>) 28°C 培养 2 d 即可获得重组菌的单菌落<sup>[30]</sup>。野生红球菌和重组红球菌的培养基和培养条件同文献<sup>[31]</sup>, 500 mL 摇瓶内装液量 50 mL, 接种后 28°C 培养 48~72 h, 收获细胞, 测定菌干重和目标酶的酶活。其中, 紫红红球菌中脲水合酶的表达加入 0.2 g/L 甲基丙烯酰胺和 0.06 mmol/L CoCl<sub>2</sub> 作为诱导剂, 而红色红球菌中则以 7.5 g/L 尿素和 0.06 mmol/L CoCl<sub>2</sub> 作为诱导剂, 诱导脲水合酶表达。

### 1.5 脲水合酶和β-半乳糖苷酶的酶活测定

脲水合酶酶活采用气相色谱法测定。色谱仪 GC-2010 (SHIMADZU Japan), 内标物为 40 g/L 乙酰胺, 聚乙二醇高分子毛细管柱 PEG-30M (30 m×0.25 mm×2 μm)。进样口为 SPL, 温度 260°C;

FID 检测器, 温度 260°C; 柱温 190°C; 载气为氮气, 流速 25 cm/min; 分流进样, 进样量 0.4 μL, 分流比为 50:1。

β-半乳糖苷酶活测定采用 Genstar 的β-半乳糖苷酶检测试剂盒法。在有β-半乳糖苷酶存在的条件下, 无色的反应底物会转化生成黄色的硝基酚 (*o*-nitrophenol)。向各管中加入一定量的反应终止液, 离心测定 420 nm 和 550 nm 下的吸光度。

β-半乳糖苷酶活性单位数(U)=1000-(OD<sub>420</sub>-1.7 OD<sub>550</sub>)/Time(min)×V(mL)×OD<sub>600</sub>

## 2 结果和讨论

### 2.1 重组质粒构建

启动子 *Ptac*、*Pami*-1 和 *Pami*-2 具有不同的-35 区、-10 区和 Shine-Dalgarno (SD)-ATG 间隔长度。为了考察上述启动子在红球菌中的启动表达效果, 本研究以脲水合酶为模式酶, 以诺卡氏菌/红球菌-大肠杆菌穿梭质粒 pNV18.1 为载体, 分别构建了重组穿梭质粒 pNV18-*Ptac*-NH<sup>M</sup>, pNV18-*Pami*-1-NH<sup>M</sup> 和 pNV18-*Pami*-2-NH<sup>M</sup>(图 1), 对脲水合酶进行重组表达研究。

### 2.2 脲水合酶在紫红红球菌中的表达

将重组穿梭质粒 pNV18-*Ptac*-NH<sup>M</sup>、pNV18-*Pami*-1-NH<sup>M</sup>、pNV18-*Pami*-2-NH<sup>M</sup> 和 pNV18-NH (*PlacZ* 启动子) 分别转入初始脲水合酶活性很低的紫红红球菌 *R. rhodochrous* ATCC 33278 中, 获得 4 株重组菌株。在摇瓶中以野生菌株为对照, 对 4 株重组菌株进行 72 h 诱导培养表达脲水合酶。结果表明, 各重组菌株和野生对照菌株的细胞密度相差不多, 均为 16.0~16.2 g/L; 而采用不同启动子表达的脲水合酶比酶活却具有显著差异(表 3)。

由表 3 可见, 重组紫红红球菌的脲水合酶酶活水平均较野生对照菌株具有显著提高, 说明 *Ptac*、*Pami*-1/*Pami*-2 和 *PlacZ* 都可以作为启动子信号被红球菌的 RNA 聚合酶成功识别。其中, 携带 *Ptac* 启动子的重组菌脲水合酶活性最高, 是野生菌株 (2.9 U/mg 干菌重) 的 7.5 倍; 此后依次是 *Pami*-1、*Pami*-2 和 *PlacZ* 启动子重组菌株, 分别是野生对照菌株的 6.3、5.3 和 1.8 倍。*Pami*-1 和 *Pami*-2 重组菌株的酶活差异, 还进一步说明在以红球菌为宿主时,

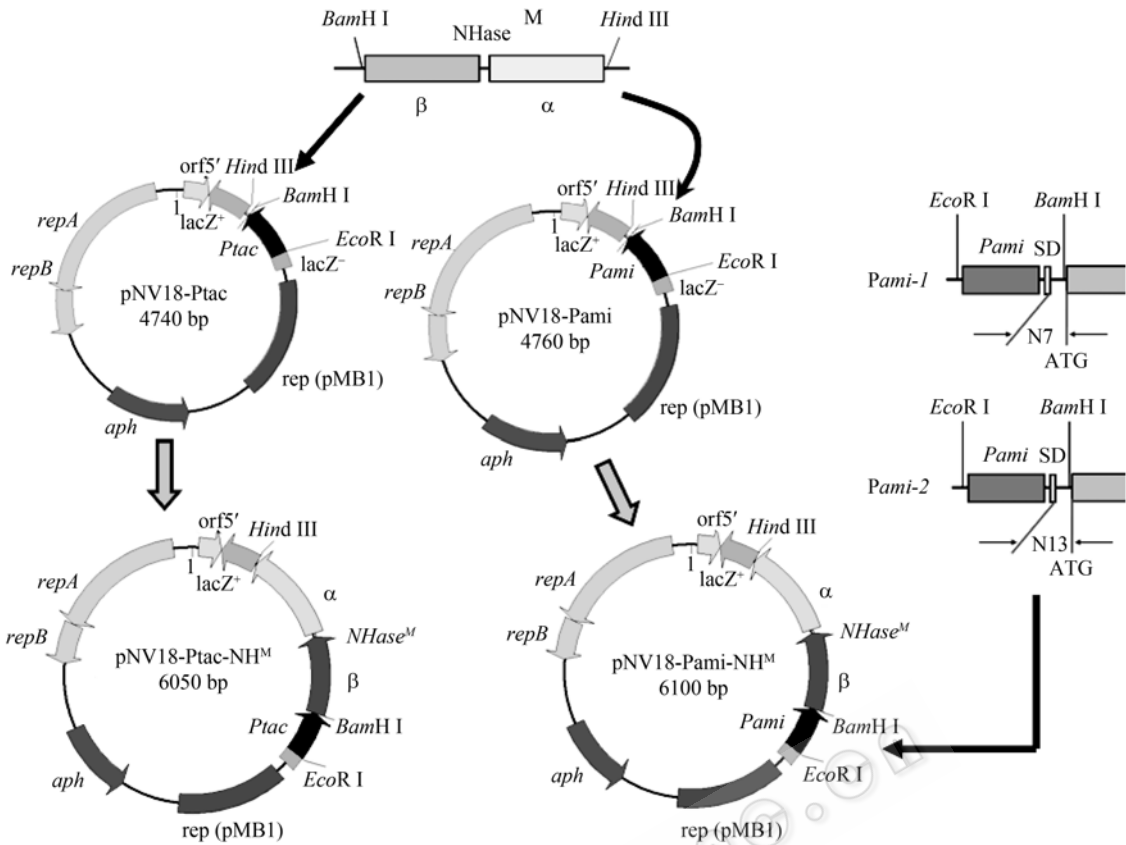


图 1 重组穿梭质粒 pNV18-Ptac-NH<sup>M</sup>、pNV18-Pami-1-NH<sup>M</sup> 和 pNV18-Pami-2-NH<sup>M</sup> 的构建示意图

Fig. 1 Construction of recombinant shuttle plasmids pNV18-Ptac-NH<sup>M</sup>, pNV18-Pami-1-NH<sup>M</sup> and pNV18-Pami-2-NH<sup>M</sup>. Pami comprises Pami-1 and Pami-2 with different SD-ATG space distance, as denoted by N7 (7 bp) and N13 (13 bp). The mutant NHase gene (NHase<sup>M</sup>) is abbreviated as NH<sup>M</sup>.

表 3 重组紫红红球菌与野生菌株的脲水合酶酶活比较

Table 3 NHase activity of the recombinants and the wild

Strains	Ptac	Pami-1	Pami-2	PlacZ	Wild
Biomass (g/L)	16.0	16.1	16.1	16.2	16.1
NHase activity (U/mg dry cell)	21.8	18.2	15.4	5.2	2.9

Ptac, Pami-1, Pami-2 and PlacZ represent the recombinants with plasmid pNV18-Ptac-NH<sup>M</sup>, pNV18-Pami-1-NH<sup>M</sup>, pNV18-Pami-2-NH<sup>M</sup> and pNV18-NH, respectively. The wild type is *R. ruber* ATCC 33278. Experiments were reproduced three times.

启动子中 7 bp 的 SD-ATG 间隔距离优于 13 bp, 与在大肠杆菌中的规律类似<sup>[20]</sup>。

进一步将上述重组质粒转入初始脲水合酶活性很高的红色红球菌 *R. ruber* TH。结果表明, 各启动子对红色红球菌中脲水合酶基因的启动表达效果具有与紫红红球菌同样的规律。携带 Ptac 启动子的重组菌的脲水合酶酶活最高, 达到 264.3 U/mg 干菌重, 比野生菌株提高 20%。

### 2.3 β-半乳糖苷酶报告基因 lacZ 质粒的构建

β-半乳糖苷酶具有较高的检测灵敏度, 在多种

生物体中均能正确表达和折叠<sup>[32]</sup>, 因此经常作为报告基因用于基因启动子及调控序列的研究。

采用穿梭质粒 pNV18.1 为骨架, 将来自启动子探测质粒 pPR9TT 的 lacZ 基因全长阅读框(无启动子)插入到 pNV18.1 自身携带的 lacZ 启动子区的下游, 得到重组穿梭质粒 pNV-lacZ(图 2)。

### 2.4 β-半乳糖苷酶报告基因的表达

将 pNV-lacZ 质粒电击转化入红色红球菌宿主, 筛选获得重组菌 *R. ruber*/pNV-lacZ。在 28°C 下, 200 r/min 摇瓶培养 24 h, 超声破碎裂解红球菌细胞, 并用试剂盒法检测β-半乳糖苷酶活性。结果发现, 检测样品在 5 min 内显现出明黄色的硝基酚产物, 而野生对照菌株则无色。进一步定量分析结果表明, 重组菌 *R. ruber*/pNV-lacZ 的β-半乳糖苷酶活性单位数达到 332 U。说明采用启动强度较弱的 PlacZ 启动子, lacZ 报告基因也能在红球菌中实现有效表达。因此, β-半乳糖苷酶基因 lacZ 可以作为高效的红球菌

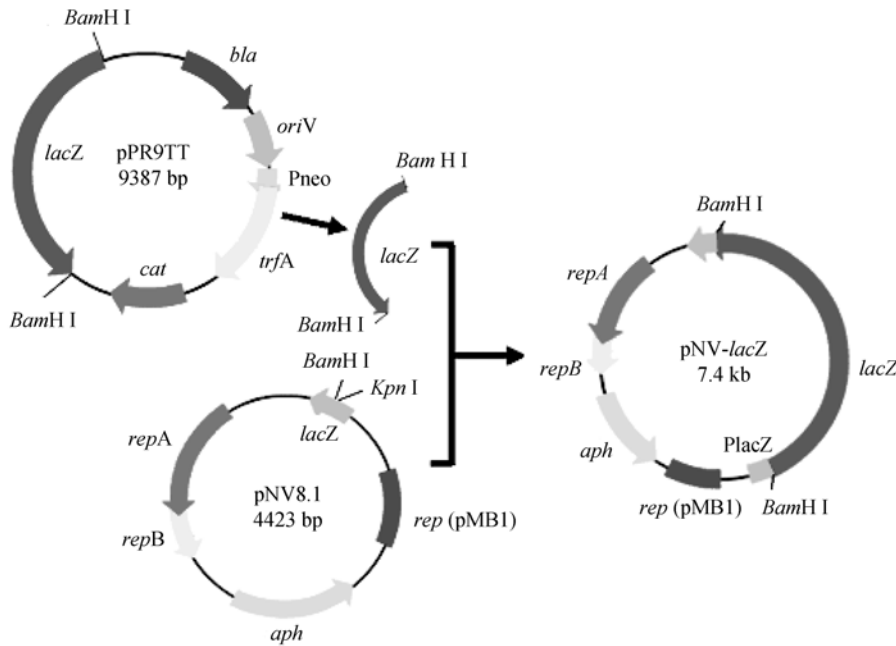


图 2 表达 *lacZ* 的质粒 pNV-*lacZ* 的构建示意图  
Fig. 2 Schematic construction of plasmid pNV-*lacZ*.

报告基因来探测红球菌基因组中的启动子信息或其他基因的表达信息。

综上所述,本研究分别探索了 *Ptac*、*Pami-1/Pami-2* 及 *PlacZ* 等启动子以及 $\beta$ -半乳糖苷酶报告基因 *lacZ* 在红色红球菌中的应用可行性。结果表明,当以穿梭质粒 pNV18.1 为出发载体表达脲水合酶时,大肠杆菌强启动子 *Ptac* 优于红球菌酰胺酶天然启动子 *Pami*, 具有最好的启动效果;  $\beta$ -半乳糖苷酶基因的 *PlacZ* 启动子的启动强度则相对较弱。此外,启动子中 SD-ATG 间隔序列的长度也能够影响脲水合酶的表达水平, 7 bp 是较好的 SD-ATG 距离。采用同样的穿梭质粒作为出发载体,以 *PlacZ* 为启动子,表达报告基因 *lacZ*, 结果发现, *lacZ* 基因能够在红球菌中高效表达,且可以采用试剂盒法进行快速定量分析。因此, *lacZ* 在红球菌宿主中作为报告基因具有明显的优势。上述结果为红球菌的基因工程和代谢工程研究提供了可靠的遗传信息。

致谢 感谢日本 Jun Ishikawa 教授惠赠诺卡氏菌/红球菌-大肠杆菌穿梭质粒 pNV18.1。

## REFERENCES

- [1] Bell KS, Philp JC, Aw DWJ, *et al.* The genus *Rhodococcus*. *J Appl Microbiol*, 1998, **85**: 195-210.
- [2] Martínková L, Uhnáková B, Pátek M, *et al.* Biodegradation potential of the genus *Rhodococcus*. *Environ Int*, 2009, **35**: 162-177.
- [3] Baxter J, Cummings SP. The current and future applications of microorganism in the bioremediation of cyanide contamination. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 2006, **90**: 1-17.
- [4] Briglia M, Rainey FA, Stackebrandt E, *et al.* *Rhodococcus percolatus* sp. nov., a bacterium degrading 2,4,6-trichlorophenol. *Int J Syst Bacteriol*, 1996, **46**: 23-30.
- [5] Di Gennaro P, Rescalli E, Galli E, *et al.* Characterization of *Rhodococcus opacus* R7, a strain able to degrade naphthalene and o-xylene isolated from a polycyclic aromatic hydrocarbon-contaminated soil. *Res Microbiol*, 2001, **152**: 641-651.
- [6] Kim YH, Engesser KH. Degradation of alkyl ethers, aralkyl ethers, and dibenzyl ether by *Rhodococcus* sp. strain DEE5151, isolated from diethyl ether-containing enrichment cultures. *Appl Environ Microbiol*, 2004, **70**: 4398-4401.
- [7] Kim D, Chae JC, Zylstra GJ, *et al.* Identification of a novel dioxygenase involved in metabolism of o-xylene, toluene, and ethylbenzene by *Rhodococcus* sp. strain DK17. *Appl Environ Microbiol*, 2004, **70**: 7086-7092.
- [8] Iwasaki T, Takeda H, Miyauchi K, *et al.* Characterization

- of two biphenyl dioxygenases for biphenyl/PCB degradation in a PCB degrader, *Rhodococcus* sp. strain RHA1. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2007, **71**: 993–1002.
- [9] Holtze MS, Sørensen J, Hansen HC, *et al.* Transformation of the herbicide 2,6-dichloro- benzonitrile to the persistent metabolite 2,6-dichloro- benzamide (BAM) by soil bacteria known to harbour nitrile hydratase or nitrilase. *Biodegradation*, 2006, **17**: 503–510.
- [10] Asano Y, Tani Y, Yamada H. A new enzyme “nitrile hydratase” which degrades acetonitrile in combination with amidase. *Agri Biol Chem*, 1981, **44**: 2251–2252.
- [11] Beard TM, Page MI. Enantioselective biotransformations using *rhodococci*. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 1998, **74**: 99–106.
- [12] Brady D, Beeton A, Zeevaart J, *et al.* Characterisation of nitrilase and nitrile hydratase biocatalytic systems. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2004, **64**: 76–85.
- [13] Finnerty WM. Biosurfactants in environmental biotechnology. *Curr Opin Biotechnol*, 1994, **5**: 291–295.
- [14] Kurane R, Hatamochi K, Kakuno T, *et al.* Chemical structure of lipid bioflocculant produced by *Rhodococcus erythropolis*. *Biosci Biotechnol Biochem*, 1995, **59**: 1652–1656.
- [15] Kreit J, Lefebvre G, Germain P. Membrane-bound cholesterol oxidase from *Rhodococcus* sp. cells-production and extraction. *J Biotechnol*, 1994, **33**: 271–282.
- [16] Finnerty WM. The biology and genetics of the genus *Rhodococcus*. *Annual Rev Microbiol*, 1992, **46**: 193–218.
- [17] McLeod MP, Warren RL, Hsiao WW, *et al.* The complete genome of *Rhodococcus* sp. RHA1 provides insights into a catabolic powerhouse. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, **103**: 15582–15587.
- [18] Alper H, Fischer C, Nevoigt E, *et al.* Tuning genetic control through promoter engineering. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, **102**: 12678–12683.
- [19] Rosenberg M, Court D. Regulatory sequences involved in the promotion and termination of RNA transcription. *Ann Rev Genet*, 1979, **13**: 319–353.
- [20] Ringquist S, Shinedling S, Barrick D, *et al.* Translation initiation in *Escherichia coli*: sequences within the ribosome-binding site. *Mol Microbiol*, 1992, **6**: 1219–1229.
- [21] Boer HAD, Comstock LJ, Vasser M. The *tac* promoter: a functional hybrid derived from the *trp* and *lac* promoters. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1983, **80**: 21–25.
- [22] Hashimoto Y, Nishiyama M, Yu F, *et al.* Development of a host-vector system in a *Rhodococcus* strain and its use for expression of the cloned nitrile hydratase gene cluster. *J Gen Microbiol*, 1992, **138**: 1003–1010.
- [23] Mizunashi W, Nishiyama M, Horinouchi S, *et al.* Overexpression of high molecular-mass nitrile hydratase from *Rhodococcus rhodochrous* J1 in recombinant *Rhodococcus* cells. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1998, **49**: 568–572.
- [24] Zhang M, Ren HX. Progress in application of report gene. *Food and Drug*, 2007, **9**(9): 45–48.  
张敏, 任慧霞. 报告基因的应用研究进展. *食品与药品*. 2007, **9**(9): 45–48.
- [25] Knoppová M, Phensajai M, Veselý M, *et al.* Plasmid vectors for testing *in vivo* promoter activities in *Corynebacterium glutamicum* and *Rhodococcus erythropolis*. *Curr Microbiol*, 2007, **55**(3): 234–239.
- [26] Chiba K, Hoshino Y, Ishino K, *et al.* Construction of *Nocardia-Escherichia coli* shuttle vectors. *Jpn J Infect Dis*, 2007, **60**: 45–47.
- [27] Blatny JM, Brautaset J, Winther-Larsen HC, *et al.* Construction and use of a versatile set of broad-host-range cloning and expression vectors based on the PK2 replicon. *Appl Environ Microbiol*, 1997, **62**: 370–379.
- [28] Shi Y, Yu HM, Sun XD, *et al.* Cloning of the nitrile hydratase gene from *Nocardia* sp. in *Escherichia coli* and *Pichia pastoris* and its functional expression using site-directed mutagenesis. *Enz Microb Technol*, 2004, **35**: 557–562.
- [29] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1998.
- [30] Schupp T, Divers M. Protoplast preparation and regeneration in *Nocardia mediterranei*. *Microbiol Lett*, 1986, **36**: 159–162.
- [31] Sun XD, Shi Y, Yu HM, *et al.* Bioconversion of acrylonitrile to acrylamide using hollow-fiber membrane bioreactor system. *Biochem Eng J*, 2004, **18** (3): 239–243.
- [32] Chen K, Li M, Fan XY, *et al.* Construction of prokaryotic promoter function analysis system using  $\beta$ -galactosidase report system. *Biotechnol*, 2008, **18**(1): 13–16.  
陈坤, 黎明, 樊欢迎, 等. 以 $\beta$ -半乳糖苷酶为报告基因的原核启动子检测体系构建. *生物技术*, 2008, **18**(1): 13–16.