

基于酿酒酵母细胞构建靶向囊泡相关膜蛋白 2 的肉毒神经毒素检测系统

蒋瑶, 陈世林, 李雨晴, 湛佳, 中西秀树*

江南大学 生物工程学院, 江苏 无锡 214122

蒋瑶, 陈世林, 李雨晴, 湛佳, 中西秀树. 基于酿酒酵母细胞构建靶向囊泡相关膜蛋白 2 的肉毒神经毒素检测系统[J]. 生物工程学报, 2025, 41(5): 2132-2144.

JIANG Yao, CHEN Shilin, LI Yuqing, SHEN Jia, Nakanishi Hideki. Construction of a yeast cell-based assay system for synaptobrevin-2-targeting botulinum neurotoxins[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2025, 41(5): 2132-2144.

摘 要: 肉毒神经毒素(botulinum neurotoxins, BoNTs)是一种神经毒性蛋白质, 可水解参与突触囊泡融合的可溶性 N-乙基马来酰亚胺敏感因子附着蛋白受体(soluble N-ethylmaleimide factor attachment protein receptor, SNARE)。其中, 囊泡相关膜蛋白(synaptobrevin-2, Sb2)是 BoNTs 主要靶向的 SNARE 蛋白之一。本研究旨在开发一种基于酵母的 BoNTs 检测系统, 用于分析靶向 Sb-2 的 BoNTs。鉴于 SNARE 蛋白在真核生物中的高度保守性, Snc1 和 Snc2 是酿酒酵母中 Sb-2 的同源物, 本研究构建了功能性的 SNARE 嵌合蛋白, 其中 Snc2 中的 SNARE 结构域的一部分被 Sb-2 的相应区域所取代, 从而 Snc2/Sb2-4 嵌合蛋白可以被 BoNTs 所识别。由于 Snc1 和 Snc2 是酵母产孢所必需的, 因此在携带 Snc2/Sb2-4 嵌合蛋白的 *snc1Δsnc2Δ* 酵母中, 靶向 Sb-2 蛋白的 BoNTs (包括 BoNT/B 在内)表达后显著降低了孢子的形成效率。然而, 在野生型酵母中, BoNTs 表达的影响可以忽略不计。产孢效率在本研究中被用作检验 BoNTs 活性的指标。这种方法的优点在于可以通过荧光比色法来评估酵母的产孢效率, 进而反映出 BoNTs 的活性。最终, 本研究基于酵母细胞构建的体系不仅能够简单便捷地分析 BoNTs, 还能够用于挖掘未鉴定的 BoNTs 和 BoNTs 抑制剂。鉴于 BoNTs 广泛应用于临床和美容领域, 该体系有望为发现和优化具有应用价值的 BoNTs 提供有力支持。

关键词: 肉毒神经毒素; 囊泡相关膜蛋白; 可溶性 N-乙基马来酰亚胺敏感因子附着蛋白受体(SNARE); 酿酒酵母; 孢子

资助项目: 国家自然科学基金(32071467)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (32071467).

*Corresponding author. E-mail: hideki@jiangnan.edu.cn

Received: 2025-01-23; Accepted: 2025-03-03; Published online: 2025-03-04

Construction of a yeast cell-based assay system for synaptobrevin-2-targeting botulinum neurotoxins

JIANG Yao, CHEN Shilin, LI Yuqing, SHEN Jia, Nakanishi Hideki*

School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China

Abstract: Botulinum neurotoxins (BoNTs) are neurotoxic proteins that can hydrolyze soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptors (SNAREs) involved in the synaptic vesicle fusion. Synaptobrevin-2 (Sb-2) is a SNARE targeted by BoNTs. This study aims to develop a yeast cell-based assay system for Sb-2-targeting BoNTs. SNAREs are conserved in eukaryotes and Snc1 and Snc2 are homologues of Sb-2 in *Saccharomyces cerevisiae*. We constructed a functional chimeric SNARE in which a part of Snc2 was replaced with that of Sb-2. The Snc2/Sb2-4 chimera, instead of Snc1 and Snc2, was recognized and cleaved by BoNTs. Since Snc1 and Snc2 are required for sporulation of yeast cells, in *snc1Δsnc2Δ* cells harboring the Snc2/Sb2-4 chimera, the sporulation efficiency was significantly decreased by expression of Sb-2-targeting BoNTs including BoNT/B. However, in wild-type yeast cells, the effects of BoNTs expression were negligible. Thus, sporulation efficiency was used as an indicator of the activity of BoNTs in this study. One advantage of this method is that BoNTs activities can be assessed by colorimetric measurement of sporulation efficiency. Our yeast cell-based BoNTs assay provides easy and rapid analysis of BoNTs, which is useful to characterize and engineer the neurotoxins. Furthermore, the assay will be useful for mining of uncharacterized BoNTs and BoNTs inhibitors. BoNTs are widely used for clinical and cosmetic purposes; thus our assay would be useful to find and modify useful BoNTs.

Keywords: botulinum neurotoxins; synaptobrevin-2; soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptors (SNAREs); *Saccharomyces cerevisiae*; spore

肉毒杆菌神经毒素(botulinum neurotoxins, BoNTs)是由梭状芽胞杆菌分泌的一种具有高度神经毒性的蛋白质^[1], 常用于治疗如眼睑下垂、肌肉过度僵硬等多种疾病。此外, 在美容领域还可以达到祛皱、瘦脸的功效^[2-3]。成熟的BoNTs以独特的双链结构, 即一条轻链(BoNT-LC)和一条重链(BoNT-HC)通过二硫键连接而成^[4]。在神经元的细胞质内部, BoNT-HC 具备识别神经末梢受体的能力, 进而驱动 BoNTs 借助胞吞机制进入到神经元内部^[5], 同时介导 BoNT-LC 的位移, 促使 BoNT-LC 在细胞质中被释放, 专门靶向并切割在突触囊泡融合过程中发挥作用的可溶性 N-乙基马来酰亚胺敏感因子附着蛋白受体(soluble N-ethylmaleimide factor attachment

proteinreceptor, SNARE)蛋白^[6]。根据抗血清中和特性, BoNTs 被划分为 A-G 共 7 种不同血清型。不同的肉毒素对神经元内不同的 SNARE 蛋白的裂解具有高度选择性, 例如, BoNT/B 可以特异性水解 Sb-2 蛋白的 SNARE 区域。

在神经突触中, 突触体相关蛋白(synaptosome-associated protein, SNAP25)、突触融合蛋白(syntaxin-1A, STX1A)和囊泡相关膜蛋白(synaptobrevin-2, Sb-2)是驱动突触囊泡和前膜融合的核心蛋白^[7-9]。这 3 个 SNARE 蛋白分别提供 1 个或 2 个 SNARE 区域, 相互结合后形成 1 个稳定的 SNARE 复合体, 该复合体在膜融合过程中起着至关重要的作用, 进而确保神经递质的有效释放^[10]。考虑到膜融合机制在真

核生物中的高度保守性，人体神经细胞的突触小泡融合机制与酿酒酵母的胞外分泌过程存在相似性^[11]。因此在酿酒酵母中，分泌蛋白的胞外释放依赖于分泌小泡和质膜融合，这一关键过程由 Sso1/2、Sec9 和 Snc1/2 蛋白协同完成，它们分别是哺乳动物 syntaxin-1A、SNAP25 及 synaptobrevin-2 的同源蛋白^[12]，此外 Sso1 和 Sso2，Snc1 和 Snc2 在膜融合过程中呈现出功能上的重叠与互补。在营养丰富的生长条件下，Sso1/2、Sec9 和 Snc1/2 作为分泌小泡与质膜融合的关键分子，参与形成 SNARE 复合物，进而促进分泌蛋白释放^[13]。此外，当酵母在营养匮乏(如缺乏氮源或碳源)的情况下，会产生一种休眠体，称为孢子。除了在膜融合过程中发挥作用外，Spo20、Sso1 和 Snc1/2 还参与了孢子膜的形成，这是一种在产孢酵母中所特有的膜^[13-14]。同时，研究表明孢子的细胞壁有 4 层结构，由内而外依次为甘露聚糖层、 β -葡聚糖层、壳聚糖层以及二酪氨酸层，而酵母营养细胞的细胞壁中只有 2 层结构，从内向外为甘露聚糖层和 β -葡聚糖层^[15-16]。值得注意的是，孢子细胞壁最外层含有的二酪氨酸是含有双甲酰双酪氨酸的荧光分子。

本研究基于人类与酵母细胞间的高度进化保守性，致力于在酵母系统内表达人类基因，并进一步取代其原有的同源基因，从而开发出人源酵母模型^[17]。野生型酵母的 SNAREs 蛋白因其切割位点氨基酸差异，通常对 BoNT-LCs 的蛋白酶水解作用具有天然抗性，因此 BoNT-

LCs 并不具备水解野生型酵母的 SNAREs 蛋白的能力，然而当将酿酒酵母的 SNARE 区域替换为对应的人源的 SNARE 区域时，所构建的嵌合蛋白能被 BoNT-LCs 有效识别并水解，例如本课题组已经成功在酵母中构建了有关 syntaxin-1A 和 SNAP25 的嵌合蛋白 Sso1/syntaxin 和 Spo20/SNAP25，并且能成功被 BoNT/C-LCs 所识别^[18-19]。此前，已有研究报道过基于酵母的检测系统，用于检测靶向 Sb-2 蛋白的 BoNT-LCs，但该系统仅将 10 个人源 Sb-2 的 SNARE 蛋白的氨基酸整合到酵母基因中^[20]，并且能检测的 BoNTs 种类有限。本研究致力于构建一个更为完善的人源酵母检测系统，并利用该系统识别更多靶向 Sb-2 蛋白的 BoNT-LCs。此外，本研究是在具有产孢功能的酵母中进行的构建，因此可以通过产孢率的变化来监测 BoNTs 是否对 Sb-2 蛋白的 SNARE 区域发挥作用。

本研究可以与课题组先前所构建的体系，即含有 Sso1/syntaxin-1A 和 Spo20/SNAP25 嵌合蛋白的人源化酵母相结合^[18-19]，构成一个更为全面的 BoNTs 检测系统，不仅有助于深入揭示肉毒素的毒性机制，还可为开发新型治疗策略提供参考和思路。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验菌株

本研究所用的菌株和质粒分别见表 1 和表 2。

表 1 本研究所用的酵母菌株
Table 1 *Saccharomyces cerevisiae* strains used in this study

Strains	Genotype	Source
AN117-4B	<i>MATa ura3 leu2 trp1 his3ΔASK arg4-NspI lys2ho::LYS2rmel::LEU2</i>	Laboratory preservation
AN117-16D	<i>MATa ura3 leu2 trp1 his3ΔASK lys2ho::lys2</i>	Laboratory preservation
HWJ7-4B	<i>MATa ura3 leu2 trp1 his3ΔASK arg4-NspI lys2ho::lys2RME1::LEU2</i>	This study
(<i>snc1Δsnc2Δ</i>)	<i>snc1Δ::kan^r/snc1Δ::kan^r snc2Δ::his5⁺/snc2Δ::his5⁺</i>	
HWJ7-16D	<i>MATa ura3 leu2 trp1 his3ΔASK lys2ho::lys2 snc1Δ::kan^r/snc1Δ::kan^r</i>	This study
(<i>snc1Δsnc2Δ</i>)	<i>snc2Δ::his5⁺/snc2Δ::his5⁺</i>	
HWJ7	<i>MATa/MATa ARG4/arg4-NspI his3ΔASK/his3ΔASK ho::lys2/ho::lys2 leu2/leu2</i>	This study
(<i>snc1Δsnc2Δ</i>)	<i>lys2/lys2 RME1/rme1::LEU2 trp1::hisG/trp1::hisG ura3/ura3</i>	
	<i>snc1Δ::kan^r/snc1Δ::kan^r snc2Δ::his5⁺/snc2Δ::his5⁺</i>	

表 2 本研究所用的质粒

Table 2 Plasmids used in this study

Plasmids	Genotype	Source
pRS316TEF1pr-Snc1	URA1, for expression of <i>Snc1</i> from <i>TEF1</i> promoter	This study
pRS314SNC2pr-Snc2/Sb2	TRP1, for expression of <i>Snc2/Sb2</i> from <i>SNC2</i> promoter	This study
pRS314SNC2pr-Snc2/Sb2-1	TRP1, for expression of <i>Snc2/Sb2-1</i> from <i>SNC2</i> promoter	This study
pRS314SNC2pr-Snc2/Sb2-2	TRP1, for expression of <i>Snc2/Sb2-2</i> from <i>SNC2</i> promoter	This study
pRS314SNC2pr-Snc2/Sb2-3	TRP1, for expression of <i>Snc2/Sb2-3</i> from <i>SNC2</i> promoter	This study
pRS314SNC2pr-Snc2/Sb2-4	TRP1, for expression of <i>Snc2/Sb2-4</i> from <i>SNC2</i> promoter	This study
pRS314SNC2pr-Snc2/Sb2-5	TRP1, for expression of <i>Snc2/Sb2-5</i> from <i>SNC2</i> promoter	This study
pRS426SPO20pr-BoNT/B-FLAG	URA1, for expression of BoNT/B-FLAG from <i>SPO20</i> promoter	This study
pRS426SPO20pr-BoNT/C-FLAG	URA1, for expression of BoNT/C-FLAG from <i>SPO20</i> promoter	This study
pRS426SPO20pr-BoNT/A-FLAG	URA1, for expression of BoNT/A-FLAG from <i>SPO20</i> promoter	This study
pRS426SPO20pr-BoNT/B8-FLAG	URA1, for expression of BoNT/B8-FLAG from <i>SPO20</i> promoter	This study
pRS426SPO20pr-BoNT/En-FLAG	URA1, for expression of BoNT/En-FLAG from <i>SPO20</i> promoter	This study
pRS426SPO20pr-BoNT/E12-FLAG	URA1, for expression of BoNT/E12-FLAG from <i>SPO20</i> promoter	This study
pRS426SPO20pr-BoNT/E12 ^{E213Q} -FLAG	URA1, for expression of BoNT/E12 ^{E213Q} -FLAG from <i>SPO20</i> promoter	This study
pRS426SPO20pr-BoNT/B ^{R370E} -FLAG	URA1, for expression of BoNT/B ^{R370E} -FLAG from <i>SPO20</i> promoter	This study

1.1.2 培养基

以下培养基均为 1 L 体系并且经 121 °C 湿热灭菌 15 min 后使用。20% (质量分数)葡萄糖: 母液, 单独灭菌。

YPAD 培养基: 20 g 蛋白胨, 10 g 酵母提取物, 30 mg 腺嘌呤, 20 g 琼脂粉(固体培养基)。高温灭菌冷却至 55 °C 后, 添加 100 mL 的 20% 葡萄糖。

SD 培养基: 6.7 g 无氨基酸酵母氮源(yeast nitrogen base, YNB), 20 g 琼脂粉(固体培养基)。灭菌后冷却至 55 °C, 添加 100 mL 的 20% 葡萄糖和 2 g 氨基酸混合物粉末。

5-氟乳清酸(5-fluoroorotic acid, 5-FOA)平板(用于移除 Ura 标记质粒): 在 SD 固体培养基的配方的基础上, 添加 1 g 的 5-FOA 粉末^[21]。

YPace 培养基: 10 g/L 酵母提取物, 20 g/L 蛋白胨, 20 g/L 醋酸钾。

产孢培养基: 20 g 醋酸钾, 去离子水定容至 1 L。

LB 培养基: 10 g/L 胰蛋白胨, 5 g/L 酵母提取物, 10 g/L 氯化钠, 20 g/L 琼脂粉(固体培

培养基)^[21]。灭菌后冷却至 55 °C 加 100 mg/mL 的氨苄西林(ampicillin, AMP)或卡那霉素(kanamycin, KAN)抗生素。

YPAD-G418 培养基: 20 g 蛋白胨, 10 g 酵母提取物, 30 mg 腺嘌呤, 20 g 琼脂粉(固体培养基)。灭菌后冷却至 55 °C 加 500 mg G418。

1.1.3 试剂与仪器

Ready-to-use seamless cloning kit 购于武汉爱博泰克生物科技有限公司; 5-FOA、AMP 抗生素购于生工生物工程技术有限公司^[22]; 产物纯化试剂盒、胶回收和质粒抽提试剂盒购于北京全式金生物技术有限公司; 鲑鱼精 DNA 购于北京索莱宝科技有限公司。DS-Ri 2 共聚焦显微镜购于 Nikon 公司; LX-100 通用离心机购于海门市林贝尔仪器有限公司; PCR 仪购于艾德本有限公司; 超净 T 台购于三发仪器有限公司; 恒温摇瓶柜购于太仓强乐设备厂。

1.2 方法

1.2.1 菌株构建

首先在野生型单倍体酵母中敲除 *snc2* 基因。具体步骤如下: 基于同源重组的原理, 根

据酿酒酵母以及质粒模板基因序列, 首先设计出含有 *snc2* 基因前后 50 bp 同源臂的引物, 通过 PCR 扩增得到含有 *kan* 基因的线性化产物, 利用试剂盒纯化后转入酵母中, 在 YPAD-G418 抗性平板上筛选得到 *snc2Δ* 的阳性克隆。随后, 在 *snc2Δ* 的酵母中转入 316TEF-Snc1 质粒。同时, 设计含有 *snc1* 基因前后 50 bp 同源臂的引物, 通过 PCR 扩增得到含有 *his* 基因的线性化产物, 利用试剂盒纯化后转入酵母中, 在 SD 缺组氨酸(histidine, His)的平板上筛选得到 *snc1Δsnc2Δ* 双敲除阳性克隆, 最终获得 *snc1Δsnc2Δ* 且含有 316TEF1-Snc1 质粒的单倍体酵母菌株, 并将敲除成功的 2 个单倍体融合为二倍体菌株, 并命名为 HWJ7。

1.2.2 质粒构建

本研究构建了 pRS314TEFSNC2pr-Snc2/Sb2、-1、-2、-3、-4、-5 质粒用于敲除菌株的回补实验并验证其功能区域, 这些质粒均以人脑组织来源的 cDNA 文库为模板进行 PCR 扩增, 并利用同源重组的方法构建至 pRS314TEFSNC2pr-Snc2 的载体上。

质粒 pRS426SPO20pr-BoNT/A、B、C、E12、En-FLAG 分别以质粒 424TEFpr-BoNT/A、B、C、E12、En-FLAG 为模板, 经 *Spe* I 和 *Xho* I 双酶切后与同样经双酶切处理的 pRS426SPO20pr 载体连接。

BoNT/B8 由天霖生物科技有限公司基因合成, 并根据酿酒酵母密码子偏好进行优化, 设计引物扩增 C 端带有 FLAG 标签的 *BoNT/B8* 基因, 经 *Spe* I 和 *Xho* I 双酶切后与同样经双酶切处理的 426SPO20pr 载体连接, 成功构建出质粒 426SPO20pr-BoNT/B8-FLAG。

1.2.3 酵母线性转化

在 5 mL 相应培养基中接种酵母, 30 °C 培养过夜。取 0.5 mL 种子液至 5 mL 新鲜的培养基中, 30 °C 培养至 $OD_{660}=0.8-1.2$ 时, 收集菌体。依次通过无菌水和 100 mmol/L 的 LiAc 溶液重悬洗涤后, 将菌体用 50 mL 100 mmol/L 的

LiAc 溶液重悬后与 95 °C 处理 5 min 后预变性的鲑鱼精 DNA 以及 240 mL 50% PEG, 16 mL 2 mol/L LiAc, 50 μL 带有同源臂的 PCR 扩增产物, 振荡混匀。孵育后, 涂匀在相应平板上, 30 °C 培养箱培养 3-4 d。最后通过 PCR 筛选获得基因敲除的酵母菌株。

1.2.4 酵母一步转化

在 5 mL 相应培养基中接种酵母, 30 °C 培养过夜。取 0.5 mL 菌液离心收集菌体。加入由二硫苏糖醇(dithiothreitol, DTT)、50%聚乙二醇(polyethyleneglycol, PEG)、2 mol/L LiAc 混合而成的一步转化液 50 mL, 经孵育后, 均匀涂在相应的筛选型培养基上, 最后通过平板验证得到含有相应质粒的酵母转化子。

1.2.5 生长分析

将 Snc2/Sb2 重组质粒转化至 HWJ7 酵母, 获得的阳性转化子在 5-FOA 平板上划线, 于 30 °C 恒温培养箱中培养 2-3 d, 观察酵母生长情况。

1.2.6 产孢分析

挑取单菌落接种于 5 mL 相应缺陷型液体培养基中, 30 °C 摇床培养过夜。接种 1 mL 菌液到 50 mL 的 YPAce 培养基中, 30 °C 摇床培养 24 h。随后将 YPAce 培养基中菌体静置 0.5 h, 去上清, 并加入 50 mL 2% KAc, 30 °C 摇床分别培养 24、48、72 h, 镜检观察产孢情况。

1.2.7 二酪氨酸荧光定量分析

按照 1.2.6 的方法产孢。酵母细胞在 2% KAc 中培养 48 h。将 0.2 mL 的孢子悬浮液置于 96 孔板中, 使用酶标仪, 激发波长为 285 nm, 发射波长为 425 nm 时测量荧光值。

1.2.8 数据统计分析

在本研究中, 所有的实验均采纳了至少 3 组独立的数据集, 运用 GraphPad Prism 软件来执行双尾未配对 *t* 检验, 以评估统计显著性。当 $P<0.05$ 时具有统计学上的显著性, 表明数据间的差异具有意义。

2 结果与分析

2.1 构建可识别 BoNT-LC 的人源化酵母系统

snc1 和 *snc2* 是酿酒酵母中功能冗余的同源基因，对酵母产孢起着决定性作用，*synaptobrevin-2* 是酿酒酵母中 *snc2* 基因在人体内的同源基因。为了验证 *synaptobrevin-2* 是否能回补因 *snc1* 和 *snc2* 敲除而引起的生长以及产孢缺陷，首先构建了 *snc1Δsnc2Δ* 双敲除且携带由 *TEF1* 启动子调控的 *Snc1* 基因的菌株，并将此酵母菌株命名为 HWJ7。然而，HWJ7 酵母菌株并不适用于测试 BoNTs-LC，因为酵母的 Snc1/2 蛋白的 SNARE 区域并不能被 BoNTs-LC 所识别，BoNTs 只能识别人类神经元的 SNARE 区域。因此，为了构建

能被 BoNTs-LC 识别的人源酵母体系，需要在酵母中表达人类神经元 Sb-2 蛋白的 SNARE 区域，并使其代替酵母 Snc2 蛋白原有的 SNARE 区域。

此前，已有研究证明，在酵母中 BoNT/B-LC 可以裂解 Snc2/Sb2 嵌合蛋白中 Sb-2 蛋白仅 10 个氨基酸片段的 SNARE 区域^[20]，基于此，首先在 HWJ7 酵母菌株中转入 Snc2/Sb2 嵌合蛋白以及野生型 Snc2 蛋白(图 1A)。随后，将阳性转化子在 5-FOA 平板上划线，5-FOA 平板可以帮助移除野生型 Snc1 质粒，使 *snc1Δsnc2Δ* 双敲除酵母仅含有嵌合蛋白，从而能够更直观地看到嵌合蛋白是否能发挥作用。结果显示，Snc2/Sb2 嵌合蛋白与野生型 Snc2 蛋白一样都能够恢复由于 *snc1* 和 *snc2* 基因双敲除带来的生长缺陷(图 1B)。

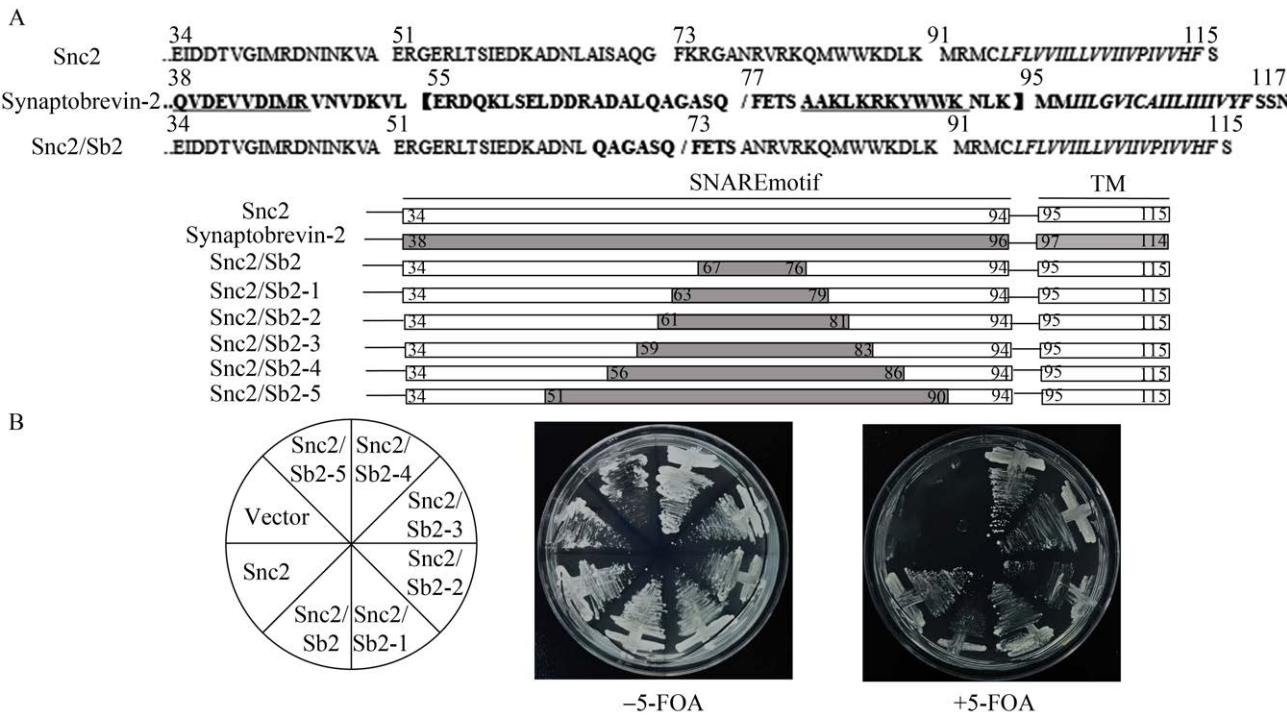


图 1 Snc2/Sb2 嵌合蛋白的结构示意图及生长分析 A: 嵌合蛋白结构示意图。Sb2 序列用加粗表示；BoNT-LC 裂解 Sb-2 蛋白需要的最小序列用括号表示；BoNT/B-LC 的裂解位点用斜线表示；Sb-2 中可能的 SNARE 区域用下划线表示；可能的跨膜区域用斜体表示。B: 嵌合蛋白的生长分析。

Figure 1 The structures of Snc2/Sb2 chimeras and their functionality in yeast cells. A: The structures of Snc2/Sb2 chimeras. Sb2 sequences are in boldface; The minimal Sb sequence required for efficient BoNT/B-LC cleavage is enclosed by brackets; The BoNT-LC cleavage site is indicated by the slashes; The two SNARE motifs in Sb2 are underlined; Sequences of probable transmembrane segments are indicated by italics. B: Grow assay of Snc2/Sb2 chimeras.

接下来,本研究进一步聚焦于在酵母系统中最大化存在人源 SNARE 区域的可能性,如能更大程度地在酵母中引入人类的 SNARE 区域,势必可以增加 BoNTs 的识别位点,从而拓宽 BoNTs 的检测范围。因此,本研究将 Snc2 的整个 SNARE 蛋白区域均替换为 Sb-2 的相应 SNARE 蛋白区域,构建了 Snc2/Sb2-5 嵌合蛋白,并采用同样的方式将该嵌合蛋白转入 HWJ7 酵母中,验证该嵌合蛋白是否能代替 Snc1 和 Snc2 的功能并维持 *snc1Δsnc2Δ* 双敲除菌株的生长。然而,当利用 5-FOA 平板移除了野生型 Snc1 质粒后,未观察到 Snc2/Sb2-5 嵌合蛋白对 *snc1Δsnc2Δ* 双敲除突变酵母生长缺陷的回补(图 1B)。因此,这一结果表明尽管 Sb-2 与 Snc2 具有同源性,但在酵母中 Sb-2 无法完全取代 Snc2 的功能。

基于以上结论,为了找到能用于回补酵母生长缺陷的 Sb-2 蛋白的 SNARE 区域,本研究通过逐步替换酵母 Snc2 蛋白的 SNARE 区域为人源 Sb-2 蛋白的相应区域,构建了一系列嵌合蛋白分别命名为 Snc2/Sb2-1、2、3、4 嵌合蛋白(图 1A),随后将这些嵌合蛋白转入 HWJ7 菌株中以同样的方式验证其功能,结果显示,含有以上任一嵌合蛋白的菌株都能够成功回补 *snc1Δsnc2Δ* 双敲除菌株的生长缺陷(图 1B)。因此,在酵母的 Snc2 蛋白中,将部分的 SNARE 区域替换为人源的 Sb-2 的相应区域是可行的。最后,本研究将对以上所构建的含有嵌合蛋白的人源化酵母的产孢效率进行进一步验证。

2.2 Snc2/Sb2 嵌合蛋白在酵母中的产孢分析

本研究通过产孢率来监测 BoNTs 是否对 Sb-2 蛋白的 SNARE 区域发挥作用,因此需要进一步分析含有 Snc2/Sb2-1、2、3、4 嵌合蛋白的酵母的产孢功能。结果显示,当野生型 Snc2、Snc2/Sb2 嵌合蛋白与 Snc2/Sb2-1、2、3、4 嵌合蛋白在该突变酵母中表达后,可以观察到酵母具有产孢功能(图 2)。这一结果进一

步支持了本研究所构建的 Snc2/Sb2-1、2、3、4 嵌合蛋白在生长和产孢功能上都能够替代野生型 Snc2 蛋白的观点。

通过分别测量在产孢诱导液中培养了 24、48、72 h 的人源酵母的产孢率,发现野生型酵母和人源化酵母均在 48 h 达到平台期(图 2)。此外,还发现含有 Snc2/Sb2-4 嵌合蛋白的酵母在产孢诱导液中培养 48 h 后的产孢率与野生型酵母 Snc2 相比,仅下降 5%。更重要的是,该人源化酵母还保留了相对最大的人源 SNARE 区域,所以在后续的研究中,均采用含有 Snc2/Sb2-4 嵌合蛋白的人源酵母体系,并均以在产孢诱导液中培养 48 h 的产孢率作为判断标准。最后,本研究将会进一步验证 BoNTs 对含有此嵌合蛋白的人源化酵母的产孢效率的影响,以全面评估所构建的人源酵母体系在 BoNTs 检测中的潜在应用。

2.3 BoNT-LCs 在酵母中的活性分析

为了深入探究含有 Snc2/Sb2-4 嵌合蛋白的人源化酵母作为 BoNT-LCs 检测工具的可行性,首先需要验证 BoNT-LCs 对野生型酵母是否具有显著的影响。由于是以产孢效率作为判断肉毒素是否发挥作用的标准,为了使 BoNT/A、B、C-LCs 在人源酵母中发挥作用,本研究将 BoNT/A、B、C-LCs 置于 SPO20 启动

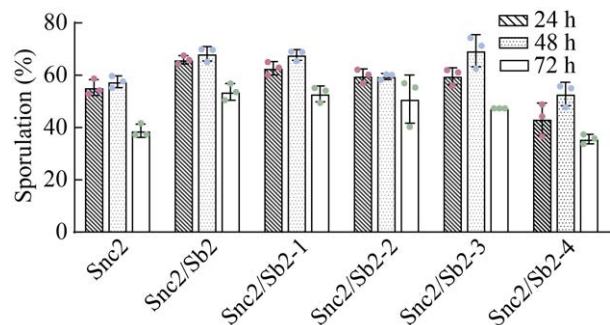


图2 Snc2/Sb2 嵌合蛋白取代酵母的 Snc2 形成孢子的功能分析

Figure 2 Analysis Snc2/Sb2 chimeras to replace the function of yeast Snc2 proteins required for sporulation.

子下诱导, 因为 SPO20 启动子诱导的蛋白在酵母营养液中不表达, 但在孢子诱导液中可以表达^[23]。随后, 将 SPO20 启动子诱导下的 BoNT/A、B、C-LCs 转入 Snc2 野生型酵母系统中, 得到的阳性转化子在产孢诱导液中培养 48 h 并观察其产孢率。结果显示野生型酵母的产孢率并没有受到 BoNT/A、C-LCs 的明显影响(图 3A), 而 BoNT/B-LC 对野生型酵母的影响也仅仅下降了 7%。

检测了 BoNTs 对野生型酵母的影响后, 进一步验证含有 Snc2/Sb2-4 嵌合蛋白的人源化酵母是否能被 BoNT/B-LC 靶向。因此, 先将 SPO20 启动子诱导下的 BoNT/A、B、C-LCs 质粒转入该酵母系统中, 将得到的阳性克隆子在孢子诱导液中培养 48 h 并观察其产孢率。结果显示, 与转入空载对照的人源化酵母相比, BoNT/B-LC 使人源化酵母的产孢率下降 40% 左右(图 3B)。以上结果表明 BoNT/B-LC 可能靶向酵母的 Snc2 蛋白, 但与 Snc2/Sb2-4 嵌合蛋白相比, 含有嵌合蛋白的人源酵母的产孢率受

BoNT/B-LC 的影响更为明显, 这与 BoNT/B-LC 能够靶向 Sb-2 的 SNARE 区域的观点一致。

同时, 为了验证在此人源酵母体系中, 产孢缺陷确实是因为 BoNT/B 裂解 Sb-2 蛋白所引起, 本研究还在此人源化酵母系统中表达了无催化活性的 BoNT/B^{R370E}-LC 突变质粒, 其中 R370E 是 BoNT/B 的活性位点突变^[24]。结果显示, 当无催化活性的 BoNT/B^{R370E}-LC 在酵母系统中表达时, 并没有降低其产孢率(图 3B), 这说明 BoNT/B-LC 在这个系统中具有催化活性, 并且通过特异性识别并裂解含有 Snc2/Sb2-4 嵌合蛋白的人源酵母中 Sb-2 蛋白的 SNARE 区域来降低人源化酵母的产孢率。鉴于 BoNT/B-LC 能够靶向切割 Sb-2 蛋白的 SNARE 区域, 使得产孢率下降, 而 BoNT/A、C 作为阴性对照, 其裂解位点并不在 Sb-2 蛋白上, 与预期一致, BoNT/A、C 并没有对该人源酵母的产孢率产生显著影响。因此, 含有 Snc2/Sb2-4 嵌合蛋白的人源化酵母可以作为 BoNT/B-LCs 的检测工具。

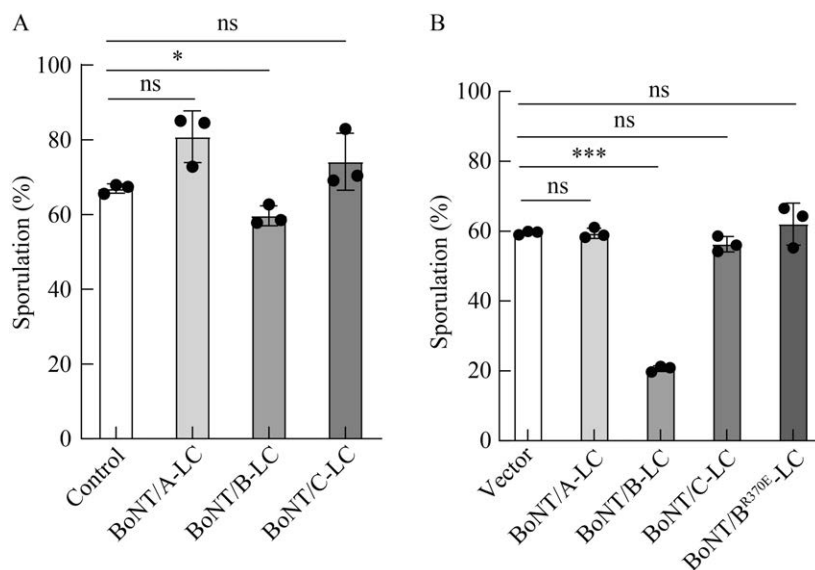


图 3 BoNT/A、B、C-LCs 在酵母中的活性分析 A: BoNT/A、B、C-LCs 对野生型酵母的影响; B: BoNT/A、B、C-LCs 对人源酵母的影响。P≥0.05 标记为 ns; P<0.05 标记为*; P<0.001 标记为***。

Figure 3 Analysis of BoNT/A, B, C-LCs activity in yeast. A: The effects of BoNT/A, B, C-LCs on wild-type yeast; B: The effects of BoNT/A, B, C-LCs on humanized yeast. P≥0.05 is denoted as ns; P<0.05 is denoted as*; P<0.001 is denoted as***.

2.4 基于产孢率对 BoNT-LCs 进行定量分析

鉴于显微镜计数法在测定产孢率方面耗时且效率低下,难以满足 BoNTs 高通量检测的需求,本研究探索了更为高效的替代方法。孢子细胞壁最外层的二酪氨酸是一个含有双甲酰二酪氨酸的荧光分子,基于这一特性,本课题组先前报道过可以利用二酪氨酸的荧光强度来代替计算孢子的产孢率^[19]。于是,将这种方法应用于本研究所构建的人源酵母中,以分析靶向 Sb-2 蛋白的 BoNTs。

先将野生型酿酒酵母在孢子诱导液中诱导 24 h,获得的酵母的产孢率接近 100%。随后,将该孢子与未产孢的酵母混合,确保混合液中酵母总数量不变,而产孢率覆盖 10%–100% 的范围,将混合的样品利用酶标仪测量其二酪氨酸荧光强度。实验结果显示,二酪氨酸的荧光强度与孢子的形成效率之间存在显著的正相关(图 4A)。本研究通过荧光测定的方法对上述实验中受到 BoNT/B-LC 切割的人源化酵母菌株进行测定,发现在人源化酵母系统中表达 BoNT/B-LC 后,与空载对照相比,荧光强度显著下降,与显微镜计数法所得的数据呈现出高

度一致性(图 4B)。综上所述,此后实验均可以利用二酪氨酸的荧光强度作为检测产孢率的有效指标,不仅简化了检测流程,还提高了检测效率,为高通量检测 BoNTs 提供了新的可能途径。

2.5 BoNT/B8、E12、En-LC 在酵母中的活性分析

上述结果表明,本研究所构建的人源化酵母系统可以用来分析靶向 Sb-2 的 BoNTs,并且已经成功证明该系统能被 BoNT/B-LC 所靶向,因此后续实验利用此人源化酵母体系进一步分析了其他的 BoNTs。BoNT/B8 是从发酵大豆中回收出来的一种 B 型肉毒杆菌分离株,是 BoNT/B 的一种新的亚型,其底物切割特异性此前尚未明确鉴定^[25]。将 SPO20 启动子诱导的 BoNT/B8-LC 分别转入野生型酵母、含有 Snc2/Sb2-4 嵌合蛋白的人源化酵母以及含有 Snc2/Sb2 嵌合蛋白的人源化酵母中,发现 BoNT/B8-LC 对野生型 Snc2 酵母的产孢率并没有影响(图 5A),然而含有 Snc2/Sb2-4 嵌合蛋白的人源酵母以及含有 Snc2/Sb2 嵌合蛋白的人源酵母的产孢率却表现出明显的下降(图 5B、5C)。这一结果表明,BoNT/B8 作为 BoNT/B 的亚型具有与 BoNT/B 相同的能够特异性水解

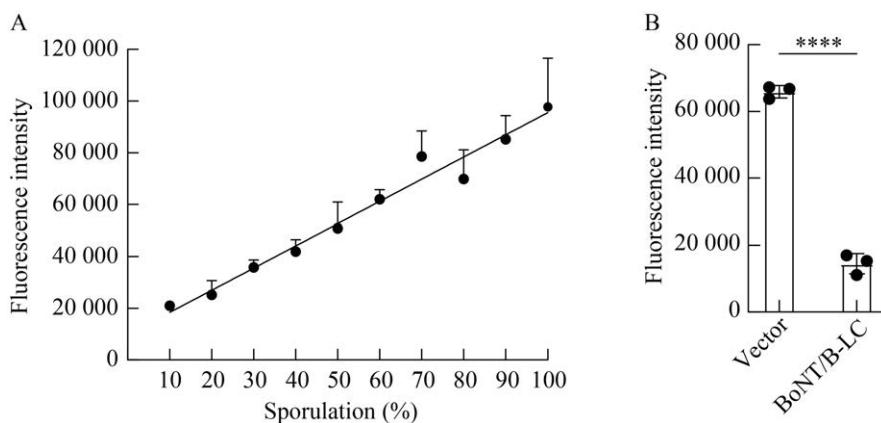


图 4 比色法测定产孢效率及其在基于酵母的 BONT 测定中的应用 A: 一定数量下荧光强度和孢子百分比的关系; B: 用荧光强度验证 BoNT/B-LCs 对人源酵母的影响。P<0.000 1 标记为****。

Figure 4 Colorimetric assay of sporulation efficiency and its application to the yeast-based BoNT assay. A: The relationship between fluorescence intensity and spore percentage under a certain quantity; B: Verification of the effect of BoNT/B-LCs on human yeast using fluorescence intensity. P<0.000 1 is denoted as ****.

人源化酵母中 Sb-2 蛋白的 SNARE 区域的能力。本研究所构建的人源化酵母不仅能够识别新型 BoNT/B, 还能够通过产孢率判断肉毒素的是否发挥作用。

此外, 还验证了 BoNT/E12 对人源化酵母的影响, BoNT/E12 是 BoNT/E 的一种亚型, 与其他已鉴定的 BoNT/E 亚型在序列上有非常高的同源性^[26]。MAZUET 等^[27]提出 BoNT/E12 是 BoNT/E 的一个新的谱系并且可能来源于一个古老的 B 型肉毒杆菌, 因此, BoNT/E12 可能会靶向多个 SNARE 蛋白, 包括 Sb-2 和 SNAP25 的 SNARE 区域。此前, 本课题组成功揭示了 BoNT/E12 能够裂解 SNAP25 的 SNARE 区域^[18], 但 BoNT/E12 在其他 SNARE 蛋白中的活性尚未得到验证。为了探究 BoNT/E12 是否也会裂解 Sb-2 蛋白, 在野生型酵母和人源化酵母体系中分别转入 BoNT/E12-LC 来验证其功能, 发现 BoNT/E12-LC 对野生型 Snc2 酵母的产孢率并没有影响(图 5A), 而本研究构建的

含有 Snc2/Sb2-4 嵌合蛋白的人源化酵母体系的产孢率却表现出明显的下降。同时, 本研究还将有催化活性 BoNT/E12-LC 通过点突变, 改造成无催化活性的 BoNT/E12^{E213Q}, 利用同样的方法将 SPO20 启动子诱导的 BoNT/E12^{E213Q}-LC 转入人源化酵母中, 发现无催化活性的 BoNT/E12^{E213Q}-LC 的表达不抑制人源化酵母系统的产孢效率。因此, 结果显示 BoNT/E12 能特异性裂解上述人源酵母中 Sb-2 蛋白的 SNARE 区域。另外, 也在含有 Snc2/Sb2 嵌合蛋白的人源化酵母中分析了 BoNT/E12, 发现 BoNT/E12-LC 并没有使该人源化酵母的产孢率下降。基于以上结果, 推测可能是该人源化酵母中含有人源 Sb-2 蛋白的 SNARE 区域较短, 且在这段氨基酸序列中缺乏 BoNT/E12 的识别位点。

BoNT/En-LC 是在肠球菌中发现的一种 BoNT 类蛋白^[28], 已知该 BoNT 靶向多个受体, 包括 SNAP25 和 Sb-2, 于是将 SPO20 启动子诱导下的 BoNT/En-LC 转入野生型酵母和人

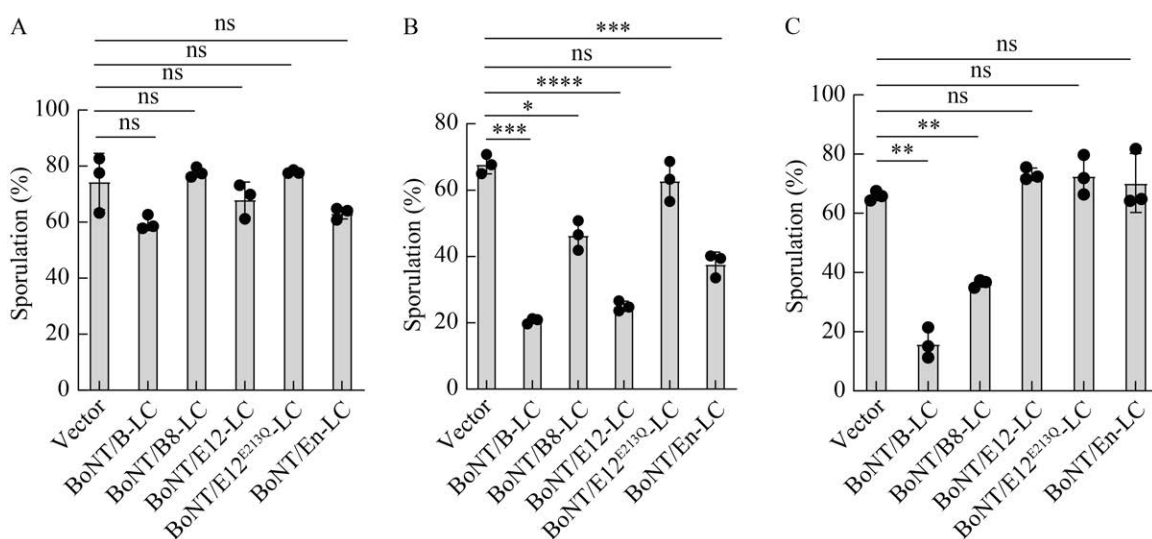


图 5 BoNT/B8、En、E12、E12(mut)-LCs 在酵母中的活性分析 A: 肉毒素对野生型酵母的影响; B: 肉毒素对 Snc2/Sb2-4 人源酵母的影响; C: 肉毒素对 Snc2/Sb2 人源酵母的影响。P≥0.05 标记为 ns; P<0.05 标记为*; P<0.01 记为**; P<0.001 标记为***; P<0.000 1 标记为****。

Figure 5 Analysis of BoNT/B8, En, E12, E12(mut)-LCs activity in yeast. A: The effect of botulinum toxin on wild-type yeast; B: The effect of botulinum toxin on Snc2/Sb2-4 humanized yeast; C: The effect of botulinum toxin on Snc2/Sb2 humanized yeast. P≥0.05 is denoted as ns; P<0.05 is denoted as *; P<0.01 is denoted as **; P<0.001 is denoted as ***; P<0.000 1 is denoted as ****.

源化酵母中,将阳性克隆子置于产孢诱导液中检测其产孢率,发现 BoNT/En-LC 对野生型 Snc2 酵母和含有 Snc2/Sb2 嵌合蛋白酵母体系的产孢率并没有影响(图 5A),而含有 Snc2/Sb2-4 嵌合蛋白酵母体系的产孢率却表现出明显的下降(图 5B)。这一结果表明,BoNT/En-LC 同样能够特异切割本研究所构建的 Snc2/Sb2-4 嵌合蛋白酵母中 Sb-2 蛋白的 SNARE 区域,这与 BoNT/En-LC 针对 Sb-2 进行靶向作用的观点相吻合,而 BoNT/En-LC 对含有 Snc2/Sb2 嵌合蛋白的人源化酵母依旧没有影响。

总而言之,表达 Snc2/Sb 嵌合蛋白的酵母在产孢诱导液中,孢子形成因 BoNT/B 和 B8 的表达而减少。然而,BoNT/En 和 E12 并没有裂解 Snc2/Sb 嵌合蛋白的 SNARE 区域使酵母的产孢率产生明显的下降。这些结果都表明本研究所构建的含有 Snc2/Sb2-4 嵌合蛋白的人源化酵母能识别更多类别的 BoNTs,具有更全面的应用潜力,可作为一个高效且可靠的鉴定工具,专门用于筛选和鉴定那些以 Sb-2 为靶标的 BoNTs。此外,以上结果进一步揭示了 BoNTs 底物切割方面的特异性,后续可以通过逐个突变人源酵母中 SNARE 区域的氨基酸来确定不同肉毒素的具体裂解位点。

3 讨论与结论

此前,本课题组已经开发了基于酵母的靶向 SNAP-25^[13]和 syntaxin-1A^[17]中 SNARE 区域的 BoNTs 检测体系,也有其他研究人员开发了一个能够特异性靶向 Sb-2 的检测系统^[20],然而在该系统中,仅有一小部分的 SNARE 蛋白区域被替换,所以能识别的 BoNTs 有限。本研究以酿酒酵母为载体,构建了靶向 Sb-2 的 BoNTs 的识别体系,尽可能地将人源 SNARE 区域的氨基酸在酵母中表达,这对于一些以 Sb-2 的 SNARE 区域特定位点为靶点的 BoNTs 至关重要。此外,本研究中的检测系统使用产孢分析,可以进行定量,通过产孢率的变化来

判断肉毒素是否能够特异性裂解 Sb-2 蛋白。研究结果也显示,Snc2/Sb2-4 人源酵母体系能够被 BoNT/B8、En、E12 所裂解,而 Snc2/Sb2 并不能被 BoNT/B 以外的这些肉毒素识别。

本研究在酵母的 Snc2 蛋白的 SNARE 区域中替换了不同长度的 Sb-2 蛋白的 SNARE 结构域,但是无法将所有 Snc2 的 SNARE 区域都进行替换。此前,在构建 Sso1 及其人类同源蛋白 syntaxin1A 的嵌合蛋白时,也无法将全长的人源 SNARE 区域在酵母中重构^[17]。然而,当在 SNARE 结构域或结构域外引入单点突变时,突变的 Sso1/syntaxin1A 嵌合蛋白在酵母中能够发挥作用。推测也许能够通过 Sb-2 的 SNARE 区域内或结构域外中引入少量突变,进一步使全长的 Sb-2 的 SNARE 区域能在酵母中发挥作用。

目前,已经将在膜融合过程中所涉及的 3 个人源 SNARE 蛋白 syntaxin1、SNAP25、synaptobrevin-2 成功地构建出了功能性的嵌合蛋白,且分别含有这 3 个嵌合蛋白的人源酵母都能特异性地被不同的肉毒素所识别。这一完整的基于酵母所构建的 BoNTs 检测体系,可以更高效更精准地鉴定各种 BoNTs,也可以用于分析以前从未鉴定的 BoNTs。此外,该系统还可用于筛选肉毒素的抑制剂或寻找和优化更多有应用潜力的 BoNTs。

作者贡献声明

蒋瑶:方案设计、实验操作、初稿写作、稿件润色修改;陈世林:数据管理、方案设计;李雨晴:提供材料、稿件润色修改;谌佳:数据管理、实验操作;中西秀树:监督指导、稿件润色修改、经费支持。

作者利益冲突公开声明

作者声明没有任何可能会影响本文所报告工作的已知经济利益或个人关系。

REFERENCES

- [1] SCHIAVO G, MATTEOLI M, MONTECUCCO C. Neurotoxins affecting neuroexocytosis[J]. *Physiological Reviews*, 2000, 80(2): 717-766.
- [2] ELEOPRA R, TUGNOLI V, QUATRALE R, ROSSETTO O, MONTECUCCO C, DRESSLER D. Clinical use of non-A botulinum toxins: botulinum toxin type C and botulinum toxin type F[J]. *Neurotoxicity Research*, 2006, 9(2/3): 127-131.
- [3] SUNDARAM H, SIGNORINI M, LIEW S, de ALMEIDA ART, WU Y, BRAZ AV, FAGIEN S, GOODMAN GJ, MONHEIT G, RASPALDO H, GROUP GAC. Global aesthetics consensus: botulinum toxin type A: evidence-based review, emerging concepts, and consensus recommendations for aesthetic use, including updates on complications[J]. *Plastic and Reconstructive Surgery*, 2016, 137(3): 518e-529e.
- [4] GOBEIL SM, JANOWSKA K, McDOWELL S, MANSOURI K, PARKS R, MANNE K, STALLS V, KOPP MF, HENDERSON R, EDWARDS RJ, HAYNES BF, ACHARYA P. D614G mutation alters SARS-CoV-2 spike conformation and enhances protease cleavage at the S1/S2 junction[J]. *Cell Reports*, 2021, 34(2): 108630.
- [5] RUMMEL A. Two feet on the membrane: uptake of clostridial neurotoxins[J]. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 2017, 406: 1-37.
- [6] ROSSETTO O, PIRAZZINI M, MONTECUCCO C. Botulinum neurotoxins: genetic, structural and mechanistic insights[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2014, 12(8): 535-549.
- [7] FASSHAUER D, SUTTON RB, BRUNGER AT, JAHN R. Conserved structural features of the synaptic fusion complex: SNARE proteins reclassified as Q- and R-SNAREs[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1998, 95(26): 15781-15786.
- [8] CHEN YA, SCHELLER RH. SNARE-mediated membrane fusion[J]. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2001, 2(2): 98-106.
- [9] BAKER RW, HUGHSON FM. Chaperoning SNARE assembly and disassembly[J]. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2016, 17(8): 465-479.
- [10] BRUNGER AT. Structure and function of SNARE and SNARE-interacting proteins[J]. *Quarterly Reviews of Biophysics*, 2005, 38(1): 1-47.
- [11] DILCHER M, VEITH B, CHIDAMBARAM S, HARTMANN E, SCHMITT HD, FISCHER von MOLLARD G. Use1p is a yeast SNARE protein required for retrograde traffic to the ER[J]. *EMBO Journal*, 2003, 22(14): 3664-3674.
- [12] MUNSON M, CHEN X, COCINA AE, SCHULTZ SM, HUGHSON FM. Interactions within the yeast t-SNARE Sso1p that control SNARE complex assembly[J]. *Nature Structural Biology*, 2000, 7(10): 894-902.
- [13] 陈世林. 基于酿酒酵母的肉毒毒素检测系统的开发[D]. 无锡: 江南大学, 2023.
CHEN SL. Construction of a botulinum toxin detection system based on *Saccharomyces cerevisiae*[D]. Wuxi: Jiangnan University, 2023 (in Chinese).
- [14] SHAO KK, LI F, YANG Y, WANG N, GAO XD, NAKANISHI H. Characteristics of SNARE proteins are defined by distinctive properties of SNARE motifs[J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 2020, 1864(10): 129658.
- [15] BASIONY M, YANG Y, LIU GY, GAO XD, NAKANISHI H. Studies on the properties of the sporulation specific protein Dit1 and its product formyl tyrosine[J]. *Journal of Fungi*, 2020, 6(2): 77.
- [16] BRIZA P, ELLINGER A, WINKLER G, BREITENBACH M. Chemical composition of the yeast ascospore wall. The second outer layer consists of chitosan[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1988, 263(23): 11569-11574.
- [17] 邵侃凯. 酵母细胞人源化重组突触囊泡 SNARE 融合机制及应用研究[D]. 无锡: 江南大学, 2020.
SHAO KK. Study and application of reconstituted human neuronal SNARE fusion mechanism in *Saccharomyces cerevisiae*[D]. Wuxi: Jiangnan University, 2020 (in Chinese).
- [18] SHAO KK, WANG Q, WANG N, GAO XD, NAKANISHI H. Construction of functional chimeras of syntaxin-1A and its yeast orthologue, and their application to the yeast cell-based assay for botulinum neurotoxin serotype C[J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 2019, 1863(11): 129396.
- [19] CHEN SL, LI F, LIU GY, LI YQ, LI ZJ, LIU YS, NAKANISHI H. Construction of a yeast cell-based assay system to analyze SNAP25-targeting botulinum neurotoxins[J]. *Microorganisms*, 2023, 11(5): 1125.
- [20] FANG H, LUO WT, HENKEL J, BARBIERI J, GREEN N. A yeast assay probes the interaction between botulinum neurotoxin serotype B and its SNARE substrate[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2006, 103(18): 6958-6963.
- [21] 杜祥坤, 费康清, 王亚森, 白佳文, 中西秀树, 李子杰. 酿酒酵母孢子“微胶囊”表面展示乙醛脱氢酶以及检测乙醛的应用[J]. *食品与发酵工业*, 2024, 50(22): 318-326.
DU XK, FEI KQ, WANG YS, BAI JW, ZHONGXI XS, LI ZJ. Displaying of acetaldehyde dehydrogenase on surface of “microcapsules” of *Saccharomyces cerevisiae* spores and applications for detection of acetaldehyde[J]. *Food and Fermentation Industries*, 2024, 50(22): 318-326 (in Chinese).
- [22] 成卓, 刘国玉, 中西秀树. 3-磷酸甘油醛对酵母孢子萌发的抑制作用分析[J]. *食品与发酵工业*, 2025, 51(4): 42-48.
CHENG Z, LIU GY, ZHONGXI XS. Analysis of the inhibitory effect of 3-glyceraldehyde phosphate in

- yeast spore germination[J]. Food and Fermentation Industries, 2025, 51(4): 42-48 (in Chinese).
- [23] NEIMAN AM. Prospore membrane formation defines a developmentally regulated branch of the secretory pathway in yeast[J]. Journal of Cell Biology, 1998, 140(1): 29-37.
- [24] CLEVELAND JD, TASLIMI A, LIU Q, van KEUREN AM, CHURCHILL MEA, TUCKER CL. Reprogramming the cleavage specificity of botulinum neurotoxin serotype B1[J]. ACS Synthetic Biology, 2022, 11(10): 3318-3329.
- [25] HALPIN JL, WANGROONGSARB P, JITTAPRASARTSIN C, DYKES JK, LÚQUEZ C. Draft genome sequence of a *Clostridium botulinum* isolate from Thailand harboring the subtype *bont/B8* gene[J]. Microbiology Resource Announcements, 2019, 8(5): e01216-18.
- [26] RAPHAEL BH, LAUTENSCHLAGER M, KALB SR, de JONG LIT, FRACE M, LÚQUEZ C, BARR JR, FERNÁNDEZ RA, MASLANKA SE. Analysis of a unique *Clostridium botulinum* strain from the Southern hemisphere producing a novel type E botulinum neurotoxin subtype[J]. BMC Microbiology, 2012, 12: 245.
- [27] MAZUET C, SAUTEREAU J, LEGEAY C, BOUCHIER C, BOUVET P, POPOFF MR. An atypical outbreak of food-borne botulism due to *Clostridium botulinum* types B and E from ham[J]. Journal of Clinical Microbiology, 2015, 53(2): 722-726.
- [28] ZHANG SC, LEBRETON F, MANSFIELD MJ, MIYASHITA SI, ZHANG J, SCHWARTZMAN JA, TAO L, MASUYER G, MARTÍNEZ-CARRANZA M, STENMARK P, GILMORE MS, DOXEY AC, DONG M. Identification of a botulinum neurotoxin-like toxin in a commensal strain of *Enterococcus faecium*[J]. Cell Host & Microbe, 2018, 23(2): 169-176.e6.