

重组工程法敲除恶臭假单胞菌 KT2440 的染色体基因

杨运文 蒋伏欢 宋 杰 尚广东

(南京师范大学生命科学学院江苏省功能微生物与功能基因组学重点实验室 江苏 南京 210046)

[摘要] 恶臭假单胞菌 KT2440 是在生物降解环境有机物和表达异源基因等方面具重要作用的环境微生物. 基因敲除是研究基因和蛋白功能的必要手段. 常规的基因敲除方法往往会烦琐耗时且易引入突变的基因克隆操作. 本研究采用重组工程(即重组酶催化的 PCR 产物与基因组上同源片段之间的同源重组)来实现恶臭假单胞菌 KT2440 的基因敲除. 本方法高效、简便、快捷且可以同时进行多个基因的操作,可成为通用的恶臭假单胞菌 KT2440 的遗传研究方法.

[关键词] 恶臭假单胞菌 KT2440 基因敲除 重组工程

[中图分类号] Q819 [文献标志码] A [文章编号] 1001-4616(2011) 04-0096-06

Recombineering Mediated Chromosomal Gene Knockout of *Pseudomonas Putida* KT2440

Yang Yunwen ,Jiang Fuhuan ,Song Jie ,Shang Guangdong

(Jiangsu Key Laboratory for Microbes and Functional Genomics , School of Life Sciences ,
Nanjing Normal University , Nanjing 210046 , China)

Abstract: *Pseudomonas putida* KT2440 plays an important role in the degradation of environmental organic compounds and it is a good host for foreign gene expression. Gene knockout is essential to the investigations of genes and proteins. Classic chromosomal gene knockout methods usually involve the gene cloning steps , which are often tedious , time consuming and tend to introduce mutations. In this paper , a recombineering strategy characterized by the homologous recombination between the PCR product and the genome , is used for the *P. putida* KT2440 gene knockout. This strategy is highly efficient , convenient , rapid and amendable for the simultaneously manipulation of many genes , and can be used as a general gene knockout method.

Key words: *Pseudomonas putida* KT2440 , gene knockout , recombineering

恶臭假单胞菌 KT2440(*Pseudomonas putida* KT2440) 属腐生革兰氏阴性假单胞菌,具有降解环境中有害芳香族及脂肪族类化合物、促进化学元素循环、生物催化、生物排污、合成生物塑料等多种功能的模式环境微生物菌株^[1 2],也是基因克隆和蛋白表达的首选菌株之一. *P. putida* KT2440 的基因组已在 2002 年被测序和解析^[3].

基因敲除是阐明基因和蛋白功能的必要手段. 文献报道的 *P. putida* KT2440 的基因敲除方法是将目的基因两侧的同源片段克隆至不能在 *P. putida* KT2440 中复制的自杀载体上. 将抗性基因克隆至同源片段之间后,通过结合转移的方法将重组质粒转化至 *P. putida* KT2440,通过抗生素的筛选,菌株本身的 *recA* 重组系统催化质粒和染色体上同源片段之间的同源重组而将质粒整合至基因组,最后通过质粒携带的编码蔗糖 6-果糖转移酶的 *sacB* 基因所行使的负筛选作用,在含 10% 蔗糖的培养基中再发生一轮同源重组而去除质粒骨架,如此抗性基因取代目的基因而实现了基因敲除^[4 5]. 此方法的缺点是需要多步骤、繁琐又耗时的基因克隆,且敲除效率低,难以进行多个基因的同时操作.

收稿日期: 2010-12-14.

基金项目: “重大新药创制”科技重大专项课题(2009ZX091032674).

通讯联系人: 尚广东 副教授,研究方向: 微生物药物的研发. E-mail: shanggd@hotmail.com

重组工程是一种利用重组酶催化的 DNA 片段之间的同源重组而进行 DNA 克隆和修饰的基因工程技术^[6,7]。目前所广泛使用的重组酶是来自于 λ 噬菌体的 *exo*、*bet* 和 *gam* 基因, *exo* (red α) 编码 5'→3' DNA 外切酶,其作用于双链 DNA 得到 3' 端突出的 DNA 分子; *bet* (red β) 编码 DNA 单链结合蛋白,其结合在突出的 DNA 分子上保护单链 DNA 免于宿主单链核酸酶的降解, *Bet* 兼有重组酶活性,即催化同源重组; *gam* (red γ) 编码的 Gam 蛋白可保护外源的双链 DNA 片段免受宿主双链核酸酶的降解。重组工程已逐步从大肠杆菌应用到沙门氏菌^[8] 和结核分支杆菌^[9] 等具有重要研究和应用价值的微生物菌株中。

重组工程的突出优点是由于利用 PCR 所获得的 DNA 片段进行转化,省略了基因克隆步骤,因而简便、快速而高效。本文报道了一种利用重组工程对 *P. putida* KT2440 进行基因敲除的方法,我们所选择的三个靶基因分别为烟酸脱氢酶基因 PP_3948,另外两个为 KT2440 染色体中第一和第二大的药物转运体基因簇 PP_2064 至 PP_2069 和 PP_1384 至 PP_1388。三个基因(簇)均可能与菌株环境降解的功能相关,所得基因敲除菌株将利于相关基因的功能研究。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌种和质粒

P. putida KT2440 由美国基因研究所 Karen Nelson 博士惠赠。质粒 pJB866 由挪威科学技术大学 Svein Vall 教授惠赠, pEX100Tlink 由法国 Centre Hospitalier Universitaire 的 Benoit Polack 教授惠赠, pKD4 由美国 Purdue 大学 Barry Wanner 教授惠赠。 *Escherichia coli* DH10B 和 pBluescript KS(-) 为本研究组保存。

1.1.2 试剂和仪器

PCR 引物购自上海生工公司; Pfu、Taq 聚合酶、T4 DNA 连接酶、碱性磷酸酯酶、各种限制性内切酶和 DNA 胶回收试剂盒购自大连宝生物公司; PCR 仪为 Bio - Rad 公司 PTC - 200。

1.1.3 DNA 测序

由上海生工公司和华大基因测序公司完成。

1.2 方法

1.2.1 分子生物学常规操作

大肠杆菌培养以及感受态细胞的转化,质粒提取和鉴定等按手册^[10] 进行。

1.2.2 PCR 扩增

设立 50 μ L 的 PCR 反应体系,含 5 μ L 10 \times PCR 反应缓冲液; 4 μ L 25 mmol/L MgCl₂; 1 μ L 10 mmol/L dNTP; 0.5 μ L 上游引物和下游引物(终浓度均为 0.5 mmol/L); 质粒 50 ng 或基因组 DNA 200 ng; 0.3 μ L Pfu 或 Taq(5 U/ μ L)。PCR 反应程序为: 97 $^{\circ}$ C 变性处理 5 min, 97 $^{\circ}$ C 45 s、60 $^{\circ}$ C 1 min、72 $^{\circ}$ C 1 min ~ 2 min(视目的产物大小而定)、共 30 个循环,最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。所使用的 PCR 引物见表 1,酶切位点以下划线表示。

1.2.3 重组酶表达质粒的构建

以 λ 噬菌体 DNA(购自大连宝生物公司) 为模板, NR1 和 NR2 为引物 PCR 扩增出 1.9 kb 的重组酶基因(*gam* *exo* 和 *bet*) 片段,以 *Sac*I - *Xba*I 酶切后克隆至 pBluescript KS(-) 得到 pNcRed。以 pEX100Tlink 为模板, SAK1 和 SAK2 为引物扩增出 1.9 kb 的 *sacB* 基因,以 *Xba*I - *Bam*HI 酶切后克隆至 pBluescript KS(-) 得到 pKsacB。 *Nco*I 和 *Xba*I 酶切 pNcRed, 分离 1.9 kb 的重组酶基因片段; *Xba*I 和 *Bam*HI 酶切 pKsacB, 分离 1.9 kb 的 *sacB* 基因片段。两片段和以 *Afl*III 和 *Bam*HI 酶切并通过碱性磷酸酯酶去磷酸化的载体 pJB866 相连后得到间甲基苯甲酸诱导重组酶表达的质粒 pLS512。pLS512 的质粒图谱如图 1 所示。

1.2.4 *P. putida* KT2440 与重组酶诱导表达的 *P. putida* KT2440/pLS512 电转化感受态细胞的制备和 DNA 的转化

挑取 *P. putida* KT2440 单菌落接至 3 mL LB 液体培养基中, 30 $^{\circ}$ C 振荡培养过夜。以 1:60 转接至 60 mL 相同培养基, 30 $^{\circ}$ C 振荡培养至 OD₆₀₀ 约为 0.6。将菌液倒入预冷的离心管, 冰浴 10 min, 4 $^{\circ}$ C, 7 000 r/min 离心 5 min, 弃上清。以冰冷的 3 mmol/L 4 - 羟乙基哌嗪乙磺酸(HEPES, pH = 7.0) 洗涤菌体 3 次, 菌体浓缩 300 倍, 50 μ L 分装, 并用于一次电转化。

表 1 本研究所使用的引物
Table 1 Primers used in this study

NR1	GGGGAGCTCCATGGATATTAATACTGAAACTG
NR2	GGGTCTAGAGTCATCGCCATTGCTCCCAAATAC
SAK1	GGGTCTAGATTATTTGTTAACTGTTAATTGTC
SAK2	GGGGGATCCGGCAACTTTATGCCCATGCAAC
R401	GCCGGCGCCGCGCGCCGCAATATC
R402	CCGGTTCGCTTGCTGTCCATACAGCGAGGTACGGATGCCAGTG
R403	CACTGGCATCCGTACCTCGCTGTATGGACAGCAAGCGAACC GG
R404	CTGCACCGCACGGACAGCAGCATCAGAAGAAGCTCGTCAAGAAG
R405	CTTCTTGACGAGTTCTTCTGATGCTGCTGTCGCGTGCAG
R406	GGGCCGGGTATGCGGCTGCCATTG
R407	GGCCCAAGTACGGCTGCGGC
R408	CCACGCGGTGACGGCCACTTC
KSD1	GTCGACGAAGTTGCGGTTGATG
KSD2	CCGGTTCGCTTGCTGTCCATATGATCGGCCTTGTGCAAAAGC
KSD3	GCTTTGCAACAAGGCCGATCATATGGACAGCAAGCGAACC GG
KSD4	GACAAAACAAGGTATTCCCGTGTGAGAAGAAGCTCGTCAAGAAG
KSD5	CTTCTTGACGAGTTCTTCTGACACGGGAATACCTTGTTTTGTC
KSD6	GCGTGCCGACATTGGGTCGAAC
KSD7	TGAAACCGGAACGGGCATCGAG
KSD8	AGGGTGATCAGAGCGAAGTCC
KAE1	TGTGTCTGCGCTTATGAATCG
KAE2	CCGGTTCGCTTGCTGTCCATACATGCACAGCTCCGATCACAGG
KAE3	CCTGTGATCGGAGCTGTGCATGTATGGACAGCAAGCGAACC GG
KAE4	CGACCTTTGAGCGACAATCGTGTGAGAAGAAGCTCGTCAAGAAG
KAE5	CTTCTTGACGAGTTCTTCTGACACGATTGTGCTCAAAGGTCG
KAE6	TGATCCTGTACGAACTCGCCG
KAE7	GATTGGGTCGTTACGGCAGTAG
KAE8	TGCTGCGCGAACTGATCCTCG

P. putida KT2440/pLS512 于含 10 μg/ml 四环素的 LB 液体培养基中进行培养,OD₆₀₀ 约为 0.2 时,加入终浓度为 2 mmol/L 的间甲基苯甲酸,培养至 OD₆₀₀ 约为 0.6。后续操作同上。

DNA 转化: 将 DNA 加至感受态细胞,轻弹混匀后转移至冰上预冷的 1 mm 电转杯中,电击转化,条件: 1.2 kV 200 Ω (Bio-Rad 公司 Gene Pulser II^R 电转化仪)。以 1 mL SOC 悬浮后,转至 15 mL 聚丙烯离心管,30℃ 振荡培养 2 h,涂布至含相应抗生素的 LB 平板。在构建基因敲除的变株时,同时将转化液稀释 10⁶ 后涂布在不加抗生素的 LB 平板上计算总菌数。计算重组效率,即抗性转化子的数目和总菌数之比。

1.2.5 pLS512 从重组菌株中的消除

将含有 pLS512 的重组菌株划线于含 10% 蔗糖的 LB 固体平板上,30℃ 培养过夜,挑取单菌落至 LB 液体培养基中培养至对数生长期,以 1 × 10⁶ 稀释后涂布 LB 固体平板,随机挑取 30 个单菌落至无抗性 LB 平板和含四环素的抗性 LB 平板,过夜培养后,在不加抗生素的 LB 平板上生长而不能在含四环素抗性的 LB 平板上生长的菌株即为 pLS512 消除的菌株。实验发现变株中的 pLS512 均得到 100% 的消除。

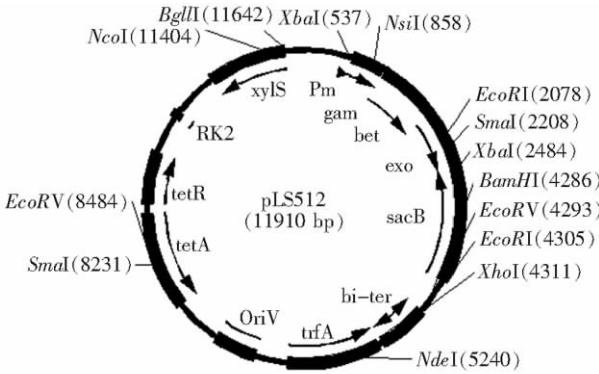


图 1 pLS512 的质粒图谱
Fig.1 Restriction maps of pLS512

2 结果

2.1 重组工程法对 *P. putida* KT2440 基因敲除的策略

为建立简便高效的 *P. putida* KT2440 基因敲除方法,本研究尝试了噬菌体介导的重组工程方法. pJB866 为四环素抗性,可在 *P. putida* KT2440 中自主复制的质粒,将重组酶基因克隆至由间甲基苯甲酸诱导表达的严谨型启动子 $P_m^{[11]}$ 之下获得质粒 pLS512. 基因敲除的流程如图 2 所示. 基因表示待敲除的靶基因;上游和下游表示靶基因上游和下游的同源基因, P1 和 P2 为扩增靶基因上游同源基因的引物, P3 和 P4 为扩增卡那霉素抗性基因片段的引物, P5 和 P6 为扩增靶基因下游同源基因的引物, P2 和 P3、P4 和 P5 含有重叠的碱基以利于重叠-延伸 PCR(OE-PCR)反应的进行;PCR 表示聚合酶链式反应;重叠区以含斜线的方框表示;粗线条表示基因组上靶基因两侧片段. 首先以 P1 至 P6 为引物,PCR 扩增出上游同源基因、卡那霉素抗性基因和下游同源基因

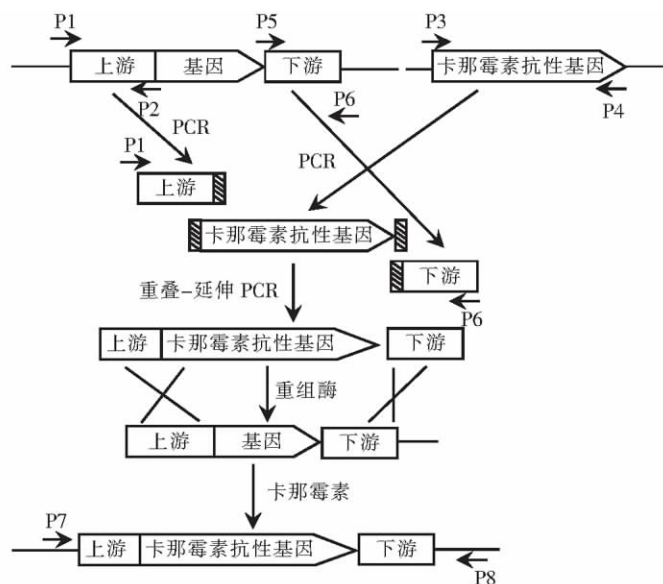


图 2 *P. putida* KT2440 基因敲除示意图

Fig.2 Schematic diagram of the gene knockout of *P. putida* KT2440

随后以 3 个片段为模板, P1 和 P6 为引物以 OE-PCR 扩增出 3 个片段融合的 DNA 产物. 如扩增产物较少, 则回收融合的片段后以之为模板再次扩增 DNA 产物. 电转化表达重组酶的恶臭假单胞菌 *P. putida* KT2440/pLS512 的电转化感受态细胞, 在卡那霉素的筛选下, 同源片段之间发生同源重组, 卡那霉素抗性基因取代了靶基因而获得靶基因得以敲除的变株. 靶基因为读码框内敲除, 即靶基因敲除后所留下的卡那霉素抗性基因不造成破坏相邻基因的极性效应. P7 和 P8 是针对于整合位点上下游序列用来验证突变株的基因型的引物.

2.2 PP_3948 基因敲除

为验证本重组工程策略的可行性, 首先尝试烟酸脱氢酶基因 PP_3948^[12] 的基因敲除. 以 *P. putida* KT2440 基因组 DNA 为模板, R401 和 R402 以及 R405 和 R406 为引物, PCR 扩增得到 PP_3948 基因上游和下游各 500bp 的 DNA 片段. 以 pKD4 为模板, R403 和 R404 为引物, PCR 扩增得到 0.9 kb 的卡那霉素抗性基因片段. 以 3 个片段为模板, R401 和 R406 为引物, 通过 OE-PCR 扩增得到 3 个片段融合的 1.9 kb 的 DNA 片段. 2 μ g DNA 片段至电转化重组酶表达的 *P. putida* KT2440/pLS512, 在卡那霉素抗性筛选之下, 得到抗性转化子. 经 3 次实验, 平均可获得 116 个转化子. 在没有加间甲基苯甲酸进行诱导的对照实验中, 没有或仅有一两个抗性转化子的出现, 这表明间甲基苯甲酸诱导表达的重组酶所催化的同源重组是得到基因敲除菌株的决定因素.

随机挑取 10 个抗性菌落, 以其基因组为模板, PCR 扩增, 产物酶切鉴定. 8 个菌株表现正确的基因型. 电泳结果见图 3A. 随机挑取 2 个变株的扩增产物, 克隆至 pGEM-T easy 后, 测序发现序列与预期完全一致. 证明 *P. putida* KT2440 基因组中 PP_3948 基因中 1.0 kb 的片段被敲除. 最后按“1.2.5”所述方法对 pLS512 进行消除. 变株的表型和生长与原株相比无异常.

2.3 PP_3948 基因敲除条件的优化

我们随后对最终菌液的 OD 值、甲基苯甲酸的浓度以及电转化 DNA 的量等关键的重组工程参数进行了优化. 实验表明在 OD₆₀₀ 约为 0.2 时, 加入终浓度为 2 mmol/L 的甲基苯甲酸, 培养至 OD₆₀₀ = 0.6, 1 μ g DNA 能得到 40 个左右的抗性转化子, 基因型正确的克隆保持在 60% 以上, 重组效率约为 5×10^{-5} . 随着 DNA 量的增加, 抗性转化子的数目呈增加趋势, 但 1 μ g DNA 已足以达到实验要求.

2.4 PP₁₃₈₄ – PP₁₃₈₈ 7.3 kb 片段的敲除

P. putida KT2440 含多个药物转运体, 7.3 kb 的 PP₁₃₈₄ – PP₁₃₈₈ 以及 9.3 kb PP₂₀₆₄ – PP₂₀₆₉ (见下述) 为其中最大的 2 个. 采用与 PP₃₉₄₈ 基因敲除相同的策略, KSD1 和 KSD2 以及 KSD3 和 KSD4 分别扩增 PP₁₃₈₄ 至 PP₁₃₈₈ 上游和下游的同源片段, KSD5 和 KSD6 扩增卡那霉素抗性基因, KSD1 和 KSD6 扩增得到融合片段. 1 μg DNA 电转化重组酶表达的 *P. putida* KT2440/pLS512 感受态细胞, 得到约 30 个转化子. 10 个抗性菌落的 PCR 扩增和产物酶切鉴定发现 6 个菌株表现正确的基因型. 证明 *P. putida* KT2440 基因组中 7.3 kb 的 PP₁₃₈₄ – PP₁₃₈₈ 被敲除. 变株的表型和生长与原株相比无异常. 电泳结果见图 3B. 两个变株扩增产物的克隆和测序、pLS512 消除的结果同上.

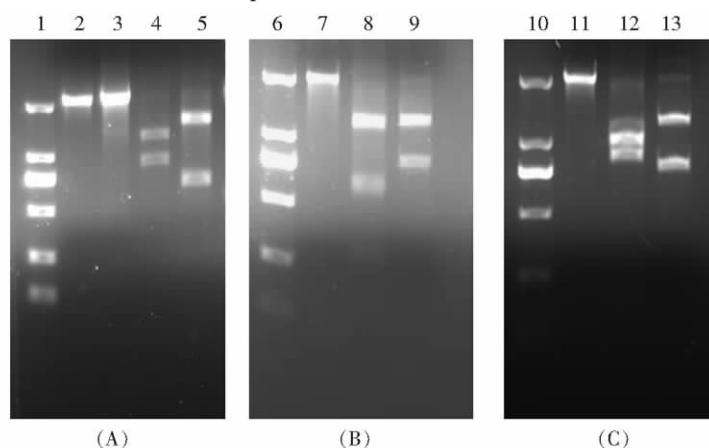


图3 (A) PP₁₃₈₄, (B) PP₁₃₈₄–PP₁₃₈₈ 以及 (C) PP₂₀₆₄–PP₂₀₆₉ 基因敲除所得突变株的基因型分析的凝胶电泳结果
Fig.3 Agarose electrophoresis of the genotypes of the mutants obtained from the gene knockout experiments. (A) PP₁₃₈₄, (B) PP₁₃₈₄–PP₁₃₈₈ and (C) PP₂₀₆₄–PP₂₀₆₉

2.5 PP₂₀₆₄ – PP₂₀₆₉ 9.3 kb 片段的敲除

采用与 PP₃₉₄₈ 基因敲除相同的策略, KAE1 和 KAE2 以及 KAE3 和 KAE4 分别扩增 PP₂₀₆₄ – PP₂₀₆₉ 上游和下游的同源片段, KAE5 和 KAE6 扩增卡那霉素抗性基因, KAE1 和 KAE6 扩增得到融合片段. 1 μg DNA 电转化重组酶表达的 *P. putida* KT2440/pLS512 感受态细胞, 得到约 20 个转化子. 8 个抗性菌落的 PCR 扩增和产物酶切鉴定发现 6 个菌株表现正确的基因型. 证明 *P. putida* KT2440 基因组中 9.3 kb 的 PP₂₀₆₄ – PP₂₀₆₉ 被敲除. 变株的表型和生长与原株相比无异常. 电泳结果见图 3C. 两个变株的扩增产物的克隆和测序、pLS512 消除的结果同上.

1, 6, 10 DL2000 DNA 分子量标准: 2.0, 1.0, 0.75, 0.5, 0.25, 0.1 kb. 2, 以 PP₁₃₈₄ 基因敲除变株的基因组为模板, R407 和 R408 扩增得到 2.2 kb; 3, 以原株的基因组为模板, R407 和 R408 扩增得到 2.25 kb 片段; 4, 2.2 kb 以 *Pst*I 酶切得到 0.9 kb 和 1.3 kb; 5, 2.25 kb 以 *Pst*I 酶切得到 0.7 kb 和 1.5 kb. 6, 以 PP₁₃₈₄ – PP₁₃₈₈ 基因敲除变株的基因组为模板, KSD7 和 KSD8 扩增得到 2.1 kb; 7, 2.1 kb 以 *Pst*I 酶切得到 0.3, 0.6 kb 和 1.2 kb; 8, 2.1 kb 以 *Nco*I 酶切得到 0.8 kb 和 1.3 kb. 11, 以 PP₂₀₆₄ – PP₂₀₆₉ 基因敲除变株的基因组为模板, 扩增得到 2.1 kb; 12, 2.1 kb 以 *Nco*I 酶切得到 0.9 kb 和 1.2 kb; 13, 2.1 kb 以 *Pst*I 酶切得到 0.8 kb 和 1.3 kb.

3 讨论

重组工程是上个世纪末兴起并逐渐得到广泛应用的基因克隆和修饰的生物技术, 其优点在于简便易行, 尤其适用于大片段 DNA、没有合适的酶切位点以及需要复杂多步骤的基因操作的研究. 由于不涉及电泳和紫外照射等步骤, 不会引入突变. 在时间和操作步骤上, 重组工程也大大优于经典的方法. 鉴于此, 重组工程已逐渐成为常规的分子生物学手段.

本研究首次将重组工程技术应用到重要的环境微生物 *P. putida* KT2440 中, 所建立的方法保留了重组工程方法所具有的普遍优点. 即使是敲除 9.3 kb 这样的大片段, 正确克隆的效率也维持在 60% 以上, 高于文献报道的基因操作. 由于操作简便, 一次可以进行多个基因敲除或修饰等工作, 大大减少了工作量. 后

续的工作将尝试减少同源片段的长度和快速消除抗性片段和重组酶质粒等研究以进一步优化本方法。

总之,本方法可作为常规的 *P. putida* KT2440 遗传操作,也必将进一步开发 *P. putida* KT2440 在研究和应用上的潜力。

[参考文献]

- [1] Timmis K. *Pseudomonas putida*: a cosmopolitan opportunist par excellence[J]. Environ Microbiol 2002 4(12) : 779-781.
- [2] Jimenez J , Jose B , Garcia L , et al. Genomic analysis of the aromatic catabolic pathways from *Pseudomonas putida* KT2440 [J]. Environ Microbiol 2002 4(12) : 824-841.
- [3] Nelson K , Weinel C , Paulsen I , et al. Complete genome sequence and comparative analysis of the metabolically versatile *Pseudomonas putida* KT2440 [J]. Environ Microbiol 2002 4(12) : 799-808.
- [4] Lee Y , Oh S , Park W. Inactivation of the *Pseudomonas putida* KT2440 dsbA gene promotes extracellular matrix production and biofilm formation [J]. FEMS Microbiol Lett 2009 297(1) : 38-48.
- [5] Kim J , Yeom J , Jeon C , et al. Intracellular 2 - keto - 3 - deoxy - 6 - phosphogluconate is the signal for carbon catabolite repression of phenylacetic acid metabolism in *Pseudomonas putida* KT2440 [J]. Microbiology 2009 155(7) : 2 420-2 428.
- [6] Zhang Y , Buchholz F P , Stewart A. A new logic for DNA engineering using recombination in *Escherichia coli* [J]. Nat Genet 1998 20(2) : 123-128.
- [7] Sharan S K , Thomason L C , Kuznetsov S G et al. Recombineering: a homologous recombination-based method of genetic engineering [J]. Nat Protoc 2009 4(2) : 206-223.
- [8] Karlinsey J E , Hughes K T. Genetic transplantation: *Salmonella enterica* serovar Typhimurium as a host to study sigma factor and anti-sigma factor interactions in genetically intractable systems [J]. J Bacteriol 2006 188 (1) : 103-114.
- [9] van Kessel J C , Hatfull G F. Efficient point mutagenesis in mycobacteria using single-stranded DNA recombineering: characterization of antimycobacterial drug targets [J]. Mol Microbiol 2008 67(5) : 1 094-1 107.
- [10] Sambrook J , Fritsch E F , Maniatis T. Molecular cloning: a laboratory manual[M]. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press , 1989: 16-34.
- [11] Blatny J M , Brautaset T , Winther-Larsen H C , et al. Improved broad-host-range RK2 vectors useful for high and low regulated gene expression levels in gram-negative bacteria [J]. Plasmid 1997 38(1) : 35-51.
- [12] Yang Y , Yuan S , Chen T , et al. Cloning , heterologous expression , and functional characterization of the nicotinate dehydrogenase gene from *Pseudomonas putida* KT2440 [J]. Biodegradation , 2009 20(4) : 541-549.

[责任编辑:黄 敏]