

解淀粉芽孢杆菌单链核苷酸介导的同源重组系统的构建

廖瑜玲^{1,2}, 潘力¹, 王斌¹

(1. 华南理工大学生物科学与工程学院, 广东广州 510006)

(2. 广东肇庆星湖生物科技股份有限公司, 广东肇庆 526040)

摘要: 解淀粉芽孢杆菌 (*Bacillus amyloliquefaciens*) 是一类重要的工业微生物, 在农业、医药和食品等领域有广泛用途。为了开发高效的基因操作技术, 在解淀粉芽孢杆菌中引入单链核苷酸 (ssDNA) 介导的同源重组方法。首先, 通过敲除 *mutS* 基因干扰解淀粉芽孢杆菌的错配修复系统, 然后导入单链结合蛋白 (Beta) 表达质粒, 构建了宿主菌 *B. amyloliquefaciens* XH7(*mutS*⁻, *bet*⁺)。其次, 通过设计 88 bp 的 ssDNA 电转化导入以上构建的宿主菌中实现了以 *ropB* 基因为靶点的有效同源重组, 转化株产生利福平抗性。实验优化了 ssDNA 介导同源重组的参数: 75 μg 的 ssDNA, 电转细胞复苏时间为 6~12 h。本研究首次成功实现了 ssDNA 同源重组技术在解淀粉芽孢杆菌的应用, 对解淀粉芽孢杆菌和其它难转化的芽孢杆菌属进行有效的遗传操作手段提供新的思路。

关键词: 单链核苷酸; 同源重组; 解淀粉芽孢杆菌; 错配修复系统; 单链结合蛋白

文章编号: 1673-9078(2016)8-96-102

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2016.8.015

Construction of Single-stranded Oligonucleotide-mediated Homologous Recombination in *Bacillus amyloliquefaciens*

LIAO Yu-ling^{1,2}, PAN Li¹, WANG Bin¹

(1. School of Bioscience and Bioengineering, South China University of Technology, Guangzhou 510006, China)

(2. Star Lake Bioscience Co., Inc. Zhaoqing, 526040, China)

Abstract: *Bacillus amyloliquefaciens* is an important industrial microorganism that has been widely used in agriculture, pharmaceutical, and food industries. In order to develop highly efficient genetic manipulation techniques in *B. amyloliquefaciens*, a single-stranded oligonucleotide (ssDNA)-mediated recombination method was introduced. First, the *mutS* gene involved in mismatch repair was knocked out, followed by introduction of the expression plasmid for the *bet* gene encoding the beta protein (a ssDNA-binding protein) into *B. amyloliquefaciens*, to construct the *B. amyloliquefaciens* XH7 host (*mutS*⁻, *bet*⁺), where the *mutS* gene was inactivated and the beta protein was expressed. Second, homologous recombination targeting the *ropB* gene was successfully achieved by designing an 88-bp ssDNA oligonucleotide and transforming it into the *B. amyloliquefaciens* XH7 host (*mutS*⁻, *bet*⁺) by electroporation, followed by antibiotic selection. The parameters for ssDNA-mediated recombination were optimized as follows: 75 μg ssDNA oligonucleotide and 6 h to 12 h of cell recovery from electroporation. Here, oligonucleotide-mediated recombination was successfully applied in *B. amyloliquefaciens* for the first time, providing a new approach for developing an effective genetic manipulation technique in *B. amyloliquefaciens* and other *Bacillus* spp. that are not naturally transformable.

Key words: *Bacillus amyloliquefaciens*; homologous recombination; mismatch repair; single-stranded DNA-binding protein; single-stranded oligonucleotide

收稿日期: 2015-08-01

基金项目: 863 计划资助项目 (2014AA021304); 广东省自然科学基金资助项目 (S2012030006235); 广东省科技计划资助项目 (2013B010404007); 广州市科技计划项目 (201510010191); 广东省科技计划项目 (2013B090800003); 中央高校基本科研业务费专项资金项目 (2015ZP032, 2015ZZ040)

作者简介: 廖瑜玲 (1983-), 女, 博士, 研究方向: 发酵工程

通讯作者: 王斌 (1981-), 男, 博士, 副教授, 研究方向: 工业生物技术和丝状真菌遗传生理

按图 1 构建流程所示, 以提取的解淀粉芽孢杆菌基因组 DNA 为模板, 引物 *mutS*-p1/p2 扩增 *mutS-cotE* (与 *mutS* 相邻的基因) L 同源臂, *mutS*-p3/p4 扩增 R 同源臂, 引物序列见表 1。L 臂和 R 臂 PCR 产物经过 PCR 产物纯化试剂盒纯化后, 以其为模板, *mutS*-p1/p4 为引物进行融合 PCR 扩增, 得到 L 臂和 R 臂融合片段。经限制性内切酶 *Kpn* I 和 *Spe* I 酶切后回收片段, 与 pKS2 质粒经过 *Kpn* I 和 *Spe* I 酶切回收的大片段连接, 转化至 *E.coli* Mach1T1, 通过红霉素抗性筛选得到 *mutS* 敲除质粒 pKS2-*mutS-cotE*。挑选大小正确的质粒送 Invitrogen 公司进行测序鉴定。

1.2.2 Beta 蛋白表达质粒 pKS2-P43-*bet* 的构建

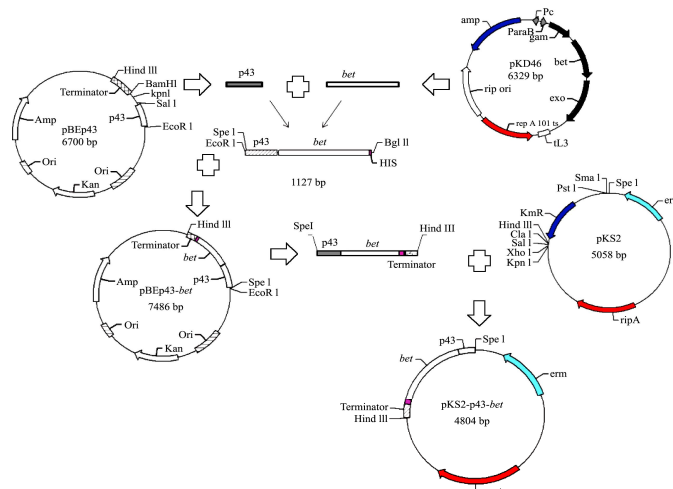


图 2 质粒 pKS2-P43-*bet* 的构建流程

Fig.2 Construction of plasmid pKS2-*mutS-cotE*

构建流程如图 2 所示, 以 pBEP43 质粒 DNA 为模板, *bet*-p1/p2 为引物扩增得到 P43 的 PCR 片段。以 pKD46 质粒 DNA 为模板, *bet*-p3/p4 为引物扩增得到带 his 标签的 Beta 蛋白的 PCR 片段。PCR 片段纯化后, 以 *bet*-p1/p4 为引物进行融合 PCR, 将 P43 的 PCR 片段和带 his 标签的 Beta 蛋白的 PCR 片段融合。融合后的 PCR 片段经过限制性内切酶 *Eco*R I 和 *Bgl* II 酶切与 pBEP43 质粒经过 *Eco*R I 和 *Bam*H I 酶切位点连接, 并转化到 *E.coli* Mach1T1, 挑取阳性转化子质粒, 测序验证得到 Beta 蛋白表达质粒 pBEP43-*bet*。限制性内切酶 *Spe* I 和 *Hind*III 酶切质粒 pBEP43-*bet* 得到的片段插入温敏性质粒 pKS2 相应的酶切位点, 构建得到 Beta 蛋白表达质粒 pKS2-P43-*bet*, 测序验证。

1.2.3 构建 *mutS* 敲除菌株 *B.amyloliquefaciens* XH7 (*mutS*⁻)

构建好的 *mutS* 敲除质粒 pKS2-*mutS-cotE* 转化到 *E.coli* JM110 菌株中去甲基化, 处理后的质粒电转 *B.amyloliquefaciens* XH7 菌株。经过设计的 *mutS-cotE* 缺失部分片段的 L+R 片段同源重组替换基因组原有

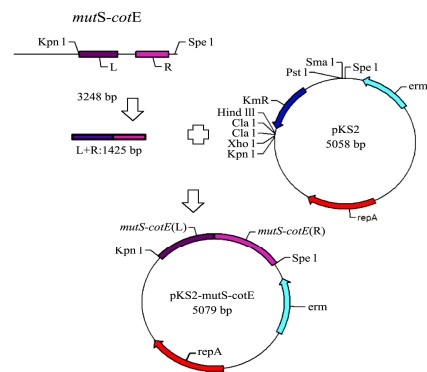


图 1 质粒 pKS2-*mutS-cotE* 的构建流程

Fig.1 Construction of plasmid pKS2-*mutS-cotE*

的片段, 得到 *mutS* 敲除菌株 *B.amyloliquefaciens* XH7 (*mutS*⁻)。

1.2.4 获得带有 Beta 蛋白表达质粒的 *mutS* 敲除菌株 *B.amyloliquefaciens* XH7 (*mutS*⁻, *bet*⁺)

将构建好的 Beta 蛋白表达质粒 pKS2-P43-*bet* 电转化于 *mutS* 敲除菌 *B.amyloliquefaciens* XH7 (*mutS*⁻) 中, 筛选阳性克隆, 得到具有 Beta 蛋白表达质粒的 *mutS* 敲除菌株 *B.amyloliquefaciens* XH7 (*mutS*⁻, *bet*⁺)。

1.2.5 Beta 蛋白在大肠杆菌中的表达

将 pBEP43-*bet* 质粒转化至 *E.coli* BL21 表达宿主中, 得到转化子 *E.coli* BL21/pBEP43-*bet*, 并接种于 LB 液体培养基 (50 μg/mL Amp), 37 °C 200 rpm 培养过夜后取 1 mL 转接 50 mL 的 LB 液体培养基 (50 μg/mL Amp) 中, 37 °C 200 r/min 24 h 后 4 °C 10000 g 离心 2 min 收集菌体, 用 TE buffer 洗涤后, 超声破碎细胞, 收集上清液, 上清液过滤后经亲和层析纯化 (采用 GE 公司的 His-tag 亲和层析柱), 梯度洗脱, 收集出峰样, 样品经 SDS-PAGE 电泳验证。

1.2.6 单链核苷酸电击宿主菌 *B.amyloliquefac*

iens XH7 (*mutS*⁻, *bet*⁺)

感受态细胞的制备参考 Zakataeva^[6]的电转化感受态细胞制备,感受态细胞从-80℃冰箱取出后,置于冰上放置 10 min,加入一定量的 ssDNA,冰上孵育 5~10 min。电击仪是德国 Eppendorf 公司,使用的是 2 mm 电击杯 (BioRad),电压设定 2500 kV,电击时间在 4.5~6.0 ms,电击后细胞迅速加入 1 mL 的复苏培养液^[6],置于 37℃,150 rpm 下进行复苏培养,复苏一定时间后取一定体积复苏培养液涂布利福平抗性平板。对照是:感受态细胞加纯水电击后涂布利福平抗性平板。

1.2.7 突变株遗传稳定性实验

将突变株接种于无利福平抗性的 LB 液体培养基中,37℃,200 r/min 培养过夜,按 1%接种量转接于新鲜 LB 液体培养基中 37℃,200 r/min 培养 12 h。连续转接 6 次,将每次转接的转化子按 10⁴~10⁶ 稀释,取 100 μL 涂布于利福平抗性平板上,对平板上菌落的生长情况进行统计。

2 结果与分析

2.1 解淀粉芽孢杆菌同源重组系统的建立

2.1.1 构建 *mutS* 敲除菌 *B.amyloliquefaciens* XH7 (*mutS*⁻)

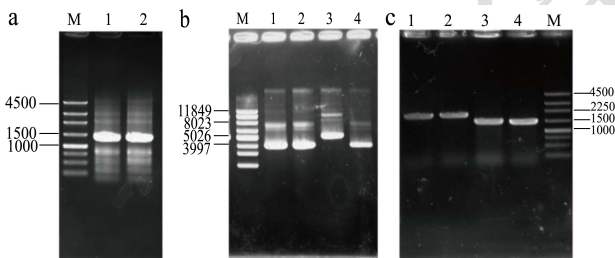


图 3 (a) 扩增 *mutS-cotE* 融合 L+R 臂, (b) pKS2-*mutS-cotE* 质粒鉴定, (c) PCR 验证 *B. amyloliquefaciens* XH7 (*mutS*⁻) 敲除菌株

Fig.3 (a) PCR amplification of homologous L- and R-arm fusion fragments of target gene *mutS-cotE*, (b) Identification of pKS2-*mutS-cotE* by agarose gel electrophoresis, (c) Identification of *B. amyloliquefaciens* XH7 (*mutS*⁻) by PCR amplification

注:(a)泳道 1,2 为 PCR 扩增 L+R 臂产物, M 为 250 bp DNA marker; (b) 泳道 1-4 为筛选的 pKS2-*mutS-cotE* 质粒, M 为 supercoiled DNA marker; (c) 泳道 1, 2 为 *B.amyloliquefaciens* XH7 野生型菌株基因组 DNA 为模板扩增 L+R 臂, 泳道 3, 4 为 *B.amyloliquefaciens* XH7 (*mutS*⁻) 敲除菌株的基因组 DNA 为模板扩增 L+R 臂, M 为 250 bp DNA marke.

以 *B.amyloliquefaciens* XH7 基因组 DNA 为模板,扩增与 *mutS-cotE* 基因的同源臂 L, R 臂,融合得到的 L+R 片段(约 1.5 kb)缺失 *mutS* 基因部分片段,结果如图 3 (a) 所示。构建得到的 *mutS* 基因敲除质粒 pKS2-*mutS-cotE* (约 5.0 kb) 经 DNA 电泳验证,图 3

(b) 泳道 3 大小正确,经过测序结果验证插入片段序列与融合得到的 L+R 片段完全一致,说明 pKS2-*mutS-cotE* 质粒构建成功。提取 *B.amylo liquefaciens* XH7 野生型菌株和 *B.amyloliquefaciens* XH7 (*mutS*⁻) 敲除菌株的基因组为模板,以合成的引物 *mutS*-p1/p4 扩增 *mutS-cotE* 同源臂 L+R 臂,野生型得到的 L+R 片段大小约 1.9 kb,而敲除 *mutS* 部分片段的基因的敲除菌得到的 L+R 片段大小约 1.5 kb,结果如图 3 (c) 所示表明 *mutS* 敲除菌 *B.amyloliquefaciens* XH7 (*mutS*⁻) 构建成功。

2.1.2 构建有 Beta 蛋白表达质粒的宿主菌株 *B.amyloliquefaciens* XH7 (*mutS*⁻, *bet*⁺)

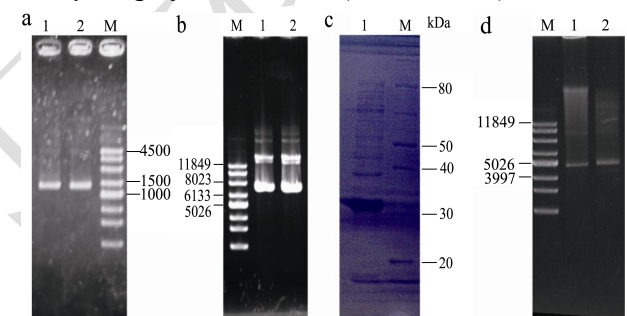


图 4 (a) 融合 P43 和 *bet* 基因片段 (b) pBEP43-*bet* 质粒鉴定 (c) SDS-PAGE 验证 *bet* 基因在 *E. coli* BL21 中表达 (d) pKS2-P43-*bet* 质粒鉴定

Fig.4 (a) PCR amplification of fusion fragments of P43 and the *bet* gene, (b) Identification of pBEP43-*bet* by agarose gel electrophoresis, (c) SDS-PAGE analysis of *bet* gene expression in *E. coli* BL21 cells, (d) Identification of pKS2-P43-*bet* by agarose gel electrophoresis

注:(a)泳道 1,2 为 PCR 扩增 P43+*bet* 的融合 PCR 产物, M 为 250 bp DNA marker; (b) 泳道 1, 2 为筛选的 pBEP43-*bet* 质粒, M 为 supercoiled DNA marker; (c) 泳道 1 为亲和层析纯化上样, M 为蛋白 marker No.84786; (d) 泳道 1, 2 为筛选的 pKS2-P43-*bet* 质粒, M 为 supercoiled DNA marker。

分别以 pBEP43 和 pKD46 质粒为模板扩增 P43 片段和 *bet* 基因片段,融合 PCR 得到 P43 和 *bet* 基因融合片段(约 1.1 kb),如图 4 (a) 所示。P43 和 *bet* 基因融合片段(带 his 标签)通过 *EcoR* I 和 *Bgl* II 酶切位点插入 pBEP43 的 *EcoR* I 和 *Bam*H I 酶切位点,构建得到 pBEP43-*bet* 质粒(约 7.5 kb),如图 4 (b) 所示。将测序验证正确的 pBEP43-*bet* 质粒转化大肠杆菌表

达宿主 *E.coli* BL21(DE3), 亲和层析纯化后, SDS-PAGE 结果显示 30 KD 附近有明显条带, 分子量与 Beta 蛋白的理论大小相符合, 如图 4 (c) 所示。通过 *Spe* I 和 *Hind*III 将 P43, *bet* 融合片段插入 pKS2 质粒相同酶切位置, 得到 Beta 蛋白的表达质粒 pKS2-P43-*bet* 质粒 (约 5.0 kb), 结果如图 4 (d) 所示。Beta 蛋白表达质粒 pKS2-P43-*bet* 质粒转入 *B.Hamyloliquefaciens* XH7 (*mutS*) 敲除菌株, 得到有 Beta 蛋白表达的 *mutS* 敲除菌株 *B.amyloliquefaciens* XH7 (*mutS*, *bet*⁺) 作为 ssDNA 介导同源重组的宿主菌。

2.2 以 *rpoB* 为靶点的 ssDNA 介导同源重组的应用

B.subtilis 168:
 蛋白序列: Q F M D Q T N P L A E L T H K R R L S
 CAATTCATGGATCAGACGAACCCGCTTGCTGAATTACGCACAAGCGTCGCTGTCA
B.amyloliquefaciens XH7:
 Q F M D Q T N P L A E L T H K R R L S
 基因序列: CAATTCATGGATCAGACGAACCCGCTTGCTGAATTGACGCATAAACGCCGCTGTCA

图 5 比较分析 *B. subtilis* 168 和 *B. amyloliquefaciens* XH7 的 *rpoB* 基因突变产生抗性的基因序列和蛋白序列

Fig.5 Comparison of the nucleotide and amino acid sequences in rifampin-resistance regions of *rpoB* in *B. subtilis* and *B. amyloliquefaciens* XH7

rpoB 基因编码细菌 RNA 聚合酶的 β 亚基, 该基因发生突变会使细菌产生利福平抗性。在 *B.subtilis*168 中, 所有的利福平抗性菌株在 Q469R 或 Q469K、

H482R 或 H482Y 和 S487L 发生核苷酸的替换而产生了抗性^[13]。参考 *B.subtilis* 168 *rpoB* 突变的基因序列, 发现 *B.amyloliquefaciens* XH7 宿主 *rpoB* 基因的该段碱基序列与 *B.subtilis* 有 92%一致, 蛋白序列 100%一致, 结果如图 5 所示。

根据 *B.subtilis* 168 的 *rpoB* 的抗性位点设计 *B.amyloliquefaciens* XH7 的 *rpoB* 基因的突变位点如表 2 所示, 设计突变的单链 DNA 链序列如表 3 所示。设计的 SD004 与正链一致, SD005 与 SD004 反向互补。

将设计的 ssDNA 导入宿主 *B.amyloliquefaciens* XH7(*mutS*, *bet*⁺), 通过利福平抗性平板筛选得到突变株 (图 6d、6e)。为了提高重组效率, 优化了 ssDNA 浓度和复苏时间两个因素, 结果如图 6 所示。实验设计了 25 μ g 和 75 μ g 的 ssDNA 图 6 (a), 转化效果显示浓度 75 μ g 的 ssDNA 在抗性平板上得到的转化子较多。同时结果显示 SD005 的转化效率要高于 SD004 的转化效率, 原因是 DNA 复制过程中 ssDNA 与后滞链碱基匹配产生错配碱基更能避开错配修复系统从而提高转化效率, 与文献^[10-12]所得结论一致。图 6 (b) 显示复苏 4 h 产生的转化子明显低于 6 h 和 12 h, 转化复苏时间 6~12 h 能提高 ssDNA 转化的效率。图 6 (c) 通过测序分析转化子, 结果显示产生 Q357R 的频率是最高的, 其次是 H370Y, 最后是 S375L。在 370 位置上出现了新的突变 H370Y (CAT-TAT) 和 H370R (CAT-CGT) 与原来设计的 H370R(CAT-CGC)不同。

表 2 设计 *B. amyloliquefaciens* XH7 的 *rpoB* 基因蛋白突变位点

Table 2 Design for amino acid mutations of the *rpoB* gene product in *B. amyloliquefaciens* XH7

单链核苷酸	蛋白质序列																		
原序列	357										370						375		
	Q	F	M	D	Q	T	N	P	L	A	E	L	T	H	K	R	R	L	S
设计的位点突变	R	F	M	D	Q	T	N	P	L	A	E	L	T	R	K	R	R	L	L
	Q357R													H370R					S375L

表 3 设计以 *B. amyloliquefaciens* XH7 的 *rpoB* 基因为靶点的单链核苷酸序列

Table 3 Design of the oligonucleotides targeting the *rpoB* gene of *B.amyloliquefaciens* XH7

单链核苷酸	序列 (5'→3')
原序列	CACAGCTTTCTCAATTCATGGATCAGACGAACCCGCTTGCTGAATTGACGCATAAACGCCGTCTGTCAAGCTCTCGGACCGGGCGGTTT
SD004	CACAGCTTTCTCGATTCATGGATCAGACGAACCCGCTTGCTGAATTGACGCGCAAACGCGTCTGTTAGCTCTCGGACCGGGCGGTTT
SD005	AAACCGCCCGGTCCGAGAGCTAACAGACGGCGTTTTCGCGTCAATTCAGCAAGCGGGTTCGCTGTATCCATGAATCGAGAAAGCTGTG

2.3 突变株遗传稳定性分析

出发菌株 *B.amyloliquefaciens* XH7 不能在含有利福平抗性的平板上生长, 而 *rpoB* 突变株能在含有利福

平抗性的平板上生长, 连续培养 6 代的突变株稀释一定倍数涂布在利福平抗性平板上的生长情况如图 7 和表 4 所示, 说明 *rpoB* 突变株的遗传性状稳定。ssDNA 介导与宿主基因组 DNA 发生重组发生在 DNA 的一条

链上(正链或负链),初始形成的杂合子,经过不断复制传代,形成遗传性状稳定的纯合突变株。

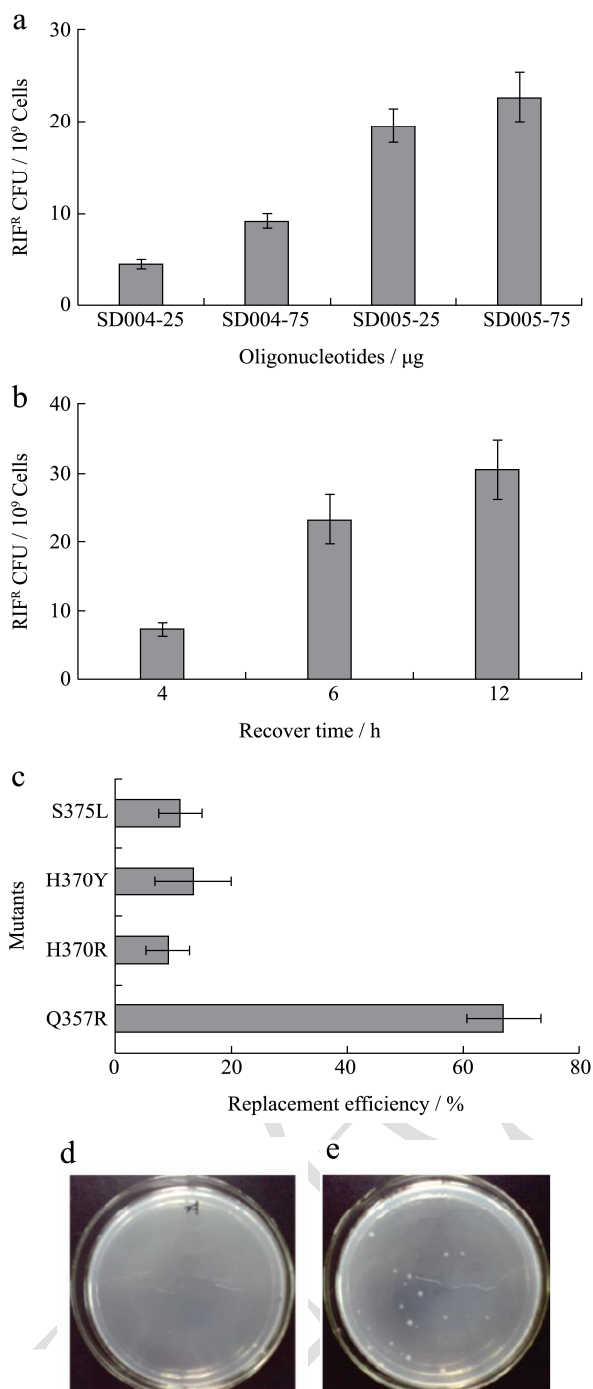


图6 建立并优化 ssDNA 介导的在解淀粉芽孢杆菌中的重组
Fig.6 Establishment and optimization of the oligonucleotide-mediated recombineering in *B. amyloliquefaciens*

注: (a) ssDNA 浓度对同源重组的影响, (b) 复苏时间对同源重组的影响, (c) 利福平抗性突变株对应的氨基酸突变位点, (d) 感受态细胞加纯水电击后涂布利福平抗性平板作为对照, (e) 感受态细胞加 ssDNA 电击后涂布利福平抗性平板。

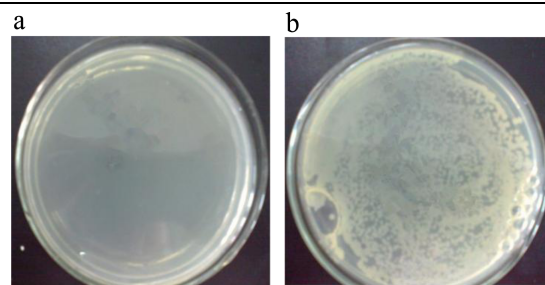


图7 出发株和突变株在利福平抗性平板的生长情况
Fig.7 Growth conditions of parent and mutant on rifampicin-resistant plates

注: (a) 出发株; (b) 连续传代6代的突变株。

表4 突变株抗性传代稳定性实验

Table 4 Genetic stability of mutants tested by multipassage-resistance study

传代次数	出发菌株	突变株
1	-	+
2	-	+
3	-	+
4	-	+
5	-	+
6	-	+

注: “-”表示不能生长, “+”表示正常生长。

3 讨论

本研究构建了 *mutS* 基因缺失, 表达 Beta 蛋白(单链结合蛋白)的解淀粉芽孢杆菌宿主用于 ssDNA 介导的同源重组系统。首先, *mutS* 基因编码的 MutS 蛋白负责识别错误配对的碱基对, 通过敲除 *mutS* 基因而干扰错配修复系统, 使导入的 ssDNA 与基因组发生同源重组后杂合双链分子的错配碱基不易被识别^[14]。Beta 蛋白的表达能增大 ssDNA 介导的同源重组效率, 另外通过低拷贝的温敏性质粒 pKS2 作为载体表达 Beta 蛋白, 一方面不会对宿主产生过大的负担, 另一个方面是完成同源重组的突变株通过简单的升温(温度升高到 37 °C)就可以去除 Beta 蛋白的表达质粒得到遗传稳定的突变株^[12]。其次, ssDNA 介导的同源重组中, 在 370 位置的第二个和第三个碱基连续设计了两个 GC 突变碱基, 结果得到了与原设计 H370R(CAT-CGC)不同的 H370Y (CAT-TAT) 和 H370R (CAT-CGT) 两种突变, 推测的原因可能是解淀粉芽孢杆菌的错配修复系统比想象的严谨, 基因组上除了 *mutS* 是与错配修复系统相关的基因, 其还有 *mutL* 也是其相关的基因, 连续多个在密码子的简并性位置上出现突变子可能不能

完全避开错配修复系统的修饰^[11,15]。

在解淀粉芽孢杆菌以 *rpoB* 基因为靶点上实现了同源重组,说明了 ssDNA 介导的同源重组技术在解淀粉芽孢杆菌中是可行的。下一步的工作将其进一步运用到敲除其它单个或者多个基因,直至运用到整个基因组规模的改造上,提高对解淀粉芽孢杆菌这一重要工业微生物遗传体系的可操作性。工作的重点是仍是需要进一步提高 ssDNA 介导的重组效率, Wang H.H. 提出通过循环操作,反复突变,可以提高其突变效率,实现在组学规模上细胞的快速进化^[10,15]。

4 结论

解淀粉芽孢杆菌是一类非常重要的工业微生物属种,因此开发对其有效的基因改造手段有重要价值。ssDNA 介导的同源重组既能免去构建质粒载体的工作,又无需引入任何抗性标记。本研究构建了敲除 *mutS* 基因并表达单链结合蛋白(Beta 蛋白)的解淀粉芽孢杆菌宿主菌株,通过 88 bp 的 ssDNA 介导完成以 *rpoB* 为突变靶点的同源重组,成功在解淀粉芽孢杆菌中建立了 ssDNA 介导的同源重组系统。

参考文献

- [1] Liu L, Liu Y, Shin H, et al. Developing *Bacillus* spp. as a cell factory for production of microbial enzymes and industrially important biochemicals in the context of systems and synthetic biology [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2013, 97(14): 6113-6127
- [2] Fan B, Carvalhais L C, Becker A, et al. Transcriptomic profiling of *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 in response to maize root exudates [J]. *BMC Microbiology*, 2012, 12: 116
- [3] 陈成,崔堂兵,于平儒.一株抗真菌的解淀粉芽孢杆菌的鉴定及其抗菌性研究[J].现代食品科技,2011,27(1):36-39
CHEN Cheng, CUI Tang-bing, YU Ping-ru. Identification of an anti-fungal strain of amyloliquefaciens *Bacillus* and the properties of the antifungal substance [J]. *Modern Food Science & Technology*, 2011, 27(1): 36-39
- [4] Yang H, Liao Y, Wang B, et al. Complete genome sequence of *Bacillus amyloliquefaciens* XH7, which exhibits production of purine nucleosides [J]. *Journal of Bacteriology*, 2011, 193(19): 5593-5594
- [5] Welker N E, Campbell L L. Unrelatedness of *Bacillus amyloliquefaciens* and *Bacillus subtilis* [J]. *Journal of Bacteriology*, 1967, 94(4): 1124-1130
- [6] Zakataeva N P, Nikitina O V, Gronskiy S V, et al. A simple method to introduce marker-free genetic modifications into the chromosome of naturally nontransformable *Bacillus amyloliquefaciens* strains [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2010, 85(4): 1201-1209
- [7] 方海田,周运佼,谢希贤,等.大肠杆菌 *cdd* 和 *thrA* 基因的敲除及其对胞苷积累量的影响[J].现代食品科技,2012,28(10): 1306-1310
FANG Hai-tian, ZHOU Yun-jiao, XIE Xi-xian, et al. Effect of Gene knockout of *cdd* and *thrA* on Cytidine Production in *E. coli* [J]. *Modern Food Science & Technology*, 2012, 28(10): 1306-1310
- [8] Doublet B, Douard G, Targant H, et al. Antibiotic marker modifications of λ Red and FLP helper plasmids, pKD46 and pCP20, for inactivation of chromosomal genes using PCR products in multidrug-resistant strains [J]. *Journal of Microbiological Methods*, 2008, 75(2): 359-361
- [9] 梁媛,杨书尧,刘宏亮,等.大肠杆菌转运蛋白 SstT 和 RhtC 的改造对 L-苏氨酸产量的影响[J].现代食品科技, 2014, 30(4): 99-103
LIANG Yuan, YANG Shu-yao, LIU Hong-liang, et al. Effect of transport proteins SstT and RhtC modification on L-threonine production in *Escherichia coli* [J]. *Modern Food Science & Technology*, 2014, 30(4): 99-103
- [10] Wang H H, Isaacs F J, Carr P A, et al. Programming cells by multiplex genome engineering and accelerated evolution [J]. *Nature*, 2009, 460(7257): 894-898
- [11] van Pijkeren J P, Britton, R A. High efficiency recombineering in lactic acid bacteria [J]. *Nucleic Acids Research*, 2012, 40(10): e76
- [12] Wang Y, Weng J, Waseem R, et al. *Bacillus subtilis* genome editing using ssDNA with short homology regions [J]. *Nucleic Acids Research*, 2012; 40(12): e91
- [13] Nicholson W L, Maughan H. The spectrum of spontaneous rifampin resistance mutations in the *rpoB* gene of *Bacillus subtilis* 168 spores differs from that of vegetative cells and resembles that of *Mycobacterium tuberculosis* [J]. *Journal of Bacteriology*, 2002, 184(17): 4936-4940
- [14] Pedraza-Reyes M, Yasbin R E. Contribution of the mismatch DNA repair system to the generation of stationary -phase-induced mutants of *Bacillus subtilis* [J]. *Journal of Bacteriology*, 2004, 186(19): 6485-6491
- [15] Wang H H, Church G M. Multiplexed genome engineering and genotyping methods: applications for synthetic biology and metabolic engineering [J]. *Methods in Enzymology*, 2011, 498: 409-426

现代食品科技