

大肠杆菌单拷贝 rRNA 操纵元菌株的构建及其生长特性研究

杨瑾, 李晓丹, 曹慧, 管莉波, 崔中利*

(南京农业大学生命科学学院/农业部农业环境微生物工程重点开放实验室, 江苏 南京 210095)

摘要: 以 1 株染色体上的 5 个 rRNA 操纵元 (*rrnA*、*rrnD*、*rrnE*、*rrnG* 和 *rrnH*) 被敲除的大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 菌株 SQ88 为出发菌, 运用 λ Red 同源重组系统和卡那霉素抗性基因筛选重组子, 并利用抗性基因两端的 FRT 位点通过位点专一性重组将抗性基因去除, 最终成功构建了 1 株仅具有单拷贝 rRNA 操纵元 (*rrnB*) 的 *E. coli* 菌株——SQ88C。试验结果发现, 此菌株并未出现明显的生长障碍, 其生长速率和 rRNA/蛋白值与出发菌株 SQ88 相比有所下降, 但并不显著。从而证明了单拷贝 rRNA 操纵元在一定条件下能够满足大肠杆菌正常生长的需要, 也为在大肠杆菌及其他菌株中快速精确地构建多 rRNA 基因缺失菌株提供了有益的参考, 并可望在 16S rRNA 基因突变研究等方面发挥一定的作用。

关键词: 大肠杆菌; Red 同源重组; rRNA 操纵元; 16S rRNA 基因

中图分类号: Q933 文献标识码: A 文章编号: 1000-2030 (2008) 03-0060-05

Construction and growth characteristics of an *Escherichia coli* strain with single copy of rRNA operon

YANG Jin, LI Xiao-dan, CAO Hui, GUAN Li-bo, CUI Zhong-li*

(College of Life Sciences/Key Laboratory of Microbiology Engineering of Agricultural Environment, Ministry of Agriculture, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract: The *Escherichia coli* strain SQ88 was selected as the target strain, to which five of rRNA operons (*rrnA*, *rrnD*, *rrnE*, *rrnG* and *rrnH*) were sequentially inactivated using λ Red recombination system. Using Red recombination system, SQ88C, a strain just carrying one copy of rRNA operon (*rrnB*) was constructed by screening Kan resistance mutant. The Kan resistant gene between two FRT recognizing sites was then eliminated designedly. The manipulated strain SQ88C showed no obvious defects in growth rates, and the rRNA/protein ratio remained as the target one. The results suggested that the one copy of rRNA operon could support the growth of *E. coli* in normal conditions. It indicated that Red *in vivo* recombination was a convenient method to construct rRNA genes deletion strain. This strain is of potential in the research of 16S rRNA gene mutations.

Key words: *Escherichia coli*; Red recombination; rRNA operon; 16S rRNA gene

20 世纪 70 年代后期, 美国伊利诺伊大学 Woese 建议把核糖体小亚基的核酸序列, 也就是 16S rDNA 序列当作分子钟, 并从中提取进化信息, 按照这一思路进行的分子进化研究取得了很大成功^[1-2]。16S rRNA 基因作为原核生物的分类地位标志, 使得其在微生物多样性研究中具有重要的使用价值。同时, 它又是组成原核生物核糖体小亚基的骨架, 其重要性显而易见。

在原核生物中, 23S rRNA、16S rRNA、5S rRNA 基因不仅连锁, 而且共用一个启动子, 组成 rRNA (*rrn*) 操纵元^[3]。rRNA 操纵元由结构区及间隔区组成。原核生物中结构区包括 16S rRNA、23S rRNA、5S rRNA 3 部分基因; 间隔区包括 16S ~ 23S rRNA 和 23S ~ 5S rRNA 2 段序列^[4]。细菌基因组中 rRNA 操纵元数量可达到 15 个, 其中 7 个是比较常见的, 但是目前已分析的生物中, 有 40% 只含有 1 个或 2 个操纵元。在古菌中, 基本上都只含有 1 个 rRNA 操纵元, 最多也只有 5 个^[5]。长期以来, 不同菌株中 rRNA 操纵元数量为何有如此大的差别, 多拷贝 rRNA 操纵元是否为菌株生长的必需条件渐渐成为人们关注的焦点。

自 20 世纪 50 年代中期发现核糖体是蛋白质合成所必需的翻译元件之后, 关于核糖体和 rRNA 的研究大多数是在大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 中进行的, 使用大肠杆菌为研究材料最重要的原因就是有关它的信息是极其丰富和全面的, 而且研究手段也比较丰富。*E. coli* 基因组上有 7 个拷贝的 *rrn* 操纵元,

这7个拷贝的操纵元已成为研究 rRNA 的一个障碍, 这是因为在1个操纵元发生突变之后, 另外6个拷贝的野生型操纵元的存在必然使突变带来的效应减弱^[6]。为了研究多拷贝 *rrn* 操纵元在大肠杆菌中的作用及其必要性, 构建多拷贝 *rrn* 操纵元敲除的 *E. coli* 菌株就显得尤为重要了。

近年来发展起来的依赖 λ 噬菌体的 Red 重组系统, 可以直接利用含同源臂的 PCR 线性片段替换出同源臂内的目的基因, 这种敲除方式无需克隆靶基因, 效率比较高^[7-9]。利用此系统, 本研究在美国 Tufts 大学 Selwyn Quan 赠送的 *E. coli* 菌株 SQ88 的基础上构建了1个染色体上仅含有1个完整 *rrn* 操纵元即单拷贝的 16S rRNA 基因的菌株——SQ88C。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒 本研究所使用和构建的菌株及质粒见表1。

表1 质粒和菌株

Table 1 Bacterial strains and plasmids used

菌株和质粒 Strain or plasmid	特性描述 Description and relevant characteristics	文献和来源 Reference or source
细菌菌株 Bacterial strains		
DH5 α	<i>E. coli</i> , <i>supE44</i> , <i>hsdR17</i> , Δ <i>lacU169</i> , <i>reeA1</i> , <i>endA1</i> , <i>gryA96</i> , <i>thi-1 relA1</i>	This laboratory
SQ88	Derivative of <i>E. coli</i> MG1655, with two copies of <i>rrn</i> operons, <i>rrnB</i> and <i>rrnC</i>	Selwyn Quan
SQ88C-Kan	Derivative of SQ88, just with one copy of intact <i>rrn</i> operon, <i>rrnB</i> , Kan ^r	This work
SQ88C	Derivative of SQ88C-Kan, Kan ^s	This work
质粒 Plasmids		
pKD46	<i>oriR101 repA101 (ts) ParaB-gam-bet-exo</i> ; Amp ^r	CGSC (Coli Genetic Strain Center)
pKD4	<i>oriR6K bla (ApR) rgnB (Ter)</i> ; Kan ^r	CGSC
pCP20	<i>ts-rep</i> , [<i>cl857</i>] (<i>lambda</i>) (<i>ts</i>), <i>bla (ApR)</i> , <i>FLP</i> ; Cm ^r	CGSC

1.1.2 酶和分子试剂 *Taq* DNA 聚合酶、*Pfu* DNA 聚合酶为申能博彩生物公司产品; *LA-Taq* 酶及限制性内切酶购于大连宝生物工程公司; *Dpn* I 购自 NEB 公司; PCR 引物和测序工作由上海英骏公司提供和完成。*L*-阿拉伯糖和 Folin-phenol 购自 Sigma 公司, 使用质量浓度为 $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。甘油购自 Amresco 公司。

1.1.3 培养基 LB 培养基: 蛋白胨 10 g, 酵母膏 5 g, 氯化钠 10 g, 去离子水定容至 1 000 mL, pH 7.2。配制固体培养基时加入 $15 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的琼脂。

1.1.4 抗生素及其使用浓度 各抗生素终质量浓度如下: 卡那霉素 (Kan) $25 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 氨苄青霉素 (Amp) $100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 壮观霉素 (Spc) $40 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

1.2 DNA 操作和 *E. coli* 转化

质粒 DNA 的提取 (碱裂解法)、酶连接和转化等常规分子生物学操作均按文献 [10] 进行, DNA 的纯化回收参照试剂盒说明书进行。

1.3 Red 同源重组方法进行基因敲除

1.3.1 线性双链 DNA 打靶分子的制备与处理 用于基因敲除的 PCR 扩增引物为 C2-Red-5 和 C2-Red-3, 由上海英骏公司合成并纯化, 它们分别由 5' 端 38 nt 的 16S rDNA 序列同源区和 3' 端 20 nt 的模板质粒 pKD4 的 Kan 抗性基因同源区组成。敲除引物序列为: C2-Red-5: 5'-AGCTAATACCGCATA-ACGTCGCAAGACCAAAGAGGGGGTAGGCTGGAGCTGCTTC-3'; C2-Red-3: 5'-GACTCCAATCCGGAC-TACGACGCACTTTATGAGGTCGGGAATTAGCCATGGTCC-3'。使用高保真 DNA 聚合酶 (*Pfu* DNA 聚合酶), 经 PCR 合成线性双链 DNA 打靶分子 (5'同源臂 + 筛选标记 + 3'同源臂, 同源部分已用下划线标出)。PCR 产物中存在的质粒模板会造成重组子的假阳性化, 用 *Dpn* I 酶作用于 PCR 产物, 可以将甲基化的模板质粒分解, 对于没有甲基化的 PCR 产物则没有作用。将 *Dpn* I 作用后的 PCR 产物用乙醇沉淀法进行回收后即可用于 Red 同源重组。采取直接切胶回收的方法也可以达到同样的效果。

1.3.2 诱导及电转感受态细胞的制备 将编码 Red 重组系统的质粒 pKD46 用 CaCl_2 法转化至 *E. coli* 菌株 SQ88 中, 将其在含有 Amp 的 LB 液体试管中 $30 \text{ }^\circ\text{C}$ 过夜振荡培养, 接种 1 mL 菌液于 50 mL 含有 Amp 的 LB 三角瓶中, $30 \text{ }^\circ\text{C}$ 振荡培养 3~4 h, 至 D_{600} 约为 0.5~0.6。在培养终止前 1 h 加入 *L*-阿拉伯糖, 使之终质量浓度为 $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。离心收集菌体, 用 10% 甘油或超纯水洗 3~4 次, 最后将菌体重悬于 500 μL 预冷的 10% 无菌甘油中, 取 50 μL 用于电击转化, 其余可存放于 $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱中备用。以上操作步骤均

在冰上进行。

1.3.3 电击转化 取 2 μL (20 ~ 100 ng) PCR 产物与 50 μL 刚制备的感受态混合, 采用 BioRad 公司 MicroPulser 电穿孔仪 0.2 cm 电转化杯, 以 2.5 kV, 5.8 ms 进行电击转化, 然后迅速加入 LB 培养基 1 mL, 置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 摇床中复苏 1 ~ 2 h, 用含筛选标记的 LB 平板筛选阳性克隆。

1.3.4 验证引物的设计 鉴定重组子时引物设计的一般原则是: 1 对引物设计在打靶区外围, 另外 1 对则位于线性打靶序列内部。所以本试验设计了 FRT - 23S 和 Kan 这 2 对引物。由于大肠杆菌 7 个 rRNA 操纵元的 16S ~ 23S rRNA 间隔区 (16S - 23S rRNA spacer region) 的序列有一定的差异, 根据引物对 FRT - 23S 扩增产物的测序结果可判断敲除发生在哪一操纵元上。

用于检测卡那霉素抗性基因的 PCR 扩增引物为: Kan - 5: 5'-CGGTGCCCTGAATGAACTGC-3', Kan - 3: 5'-GGC2CACAGTCGATGAATCC-3'; FRT - 23S - 5: 5'-TAGGAACCTCGGAATAGG-3', FRT - 23S - 3: 5'-CACCTTACCGACGCTTAT-3'。

1.3.5 卡那霉素抗性基因的去除 质粒 pCP20 表达的 FLP 重组酶, 可作用在重组子染色体上 2 个 FRT 靶位点上, 使 Kan 抗性基因丢失。将具有 Amp 抗性的质粒 pCP20 利用 CaCl_2 方法转化进入具有 Kan 抗性的阳性菌株中, 于 30 $^{\circ}\text{C}$ 培养条件下在含有 Amp 和 Kan 的平板上获得阳性转化子。然后转接至无抗生素的 LB 液体试管中, 42 $^{\circ}\text{C}$ 培养 5 h, 37 $^{\circ}\text{C}$ 平板划线培养。对所得到的单菌落进行 Amp 和 Kan 敏感性检测, 最后获得的 Amp 和 Kan 敏感的表型菌株就是去除 Kan 基因的重组子。

1.4 倍增时间的测定

根据公式: $G = (t_2 - t_1) / 3.322 (\lg D_2 - \lg D_1)$ 计算倍增时间。式中: G 表示倍增时间 (增代时间, generation time), $t_2 - t_1$ 表示所取两点之间的间隔时间; D_1 、 D_2 为对应菌液用 721 型分光光度计在 600 nm 处测得的光密度值。测定倍增时间时, 一般将接种量控制在 2%, 并保持初始 D_{600} 在 0.05 ~ 0.10 范围内。在到达对数生长期后, 应调整测定频率, 大约控制在每 10 min 测量 1 次, 以获得更为准确的测量值。生长速率常数 R ($R = 1/G$) 也是判定微生物生长情况的重要参数之一。

1.5 rRNA/蛋白值的测定

菌体总 RNA 和总蛋白的测定见文献 [11]。

1.6 冷敏感试验

采用 20 $^{\circ}\text{C}$ 条件培养菌株, 以菌株是否生长作为冷敏感的判断标准。

2 结果与分析

2.1 卡那霉素抗性基因在染色体上的整合

以 *E. coli* 菌株 SQ88 为出发菌株制备感受态时, 提高 L -阿拉伯糖诱导浓度是由于本试验所用菌株 SQ88 染色体上的阿拉伯糖操纵元未被敲除, 这使得 L -阿拉伯糖在未充分诱导重组基因表达之前就被利用。因此, 提高 L -阿拉伯糖浓度可使重组更易进行。

以 C2 - Red - 5 和 C2 - Red - 3 为引物扩增 pKD4 质粒上的 Kan 抗性基因, 扩增片段上带有 16S rRNA 基因片段、FRT 位点和 Kan 抗性基因, 约为 1.6 kb。将扩增片段通过电转化转入菌株 SQ88 (预先已导入 pKD46 质粒) 后, 涂布于含 25 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ Kan 的 LB 平板上, 挑取部分转化子进行 Kan 基因扩增验证, 利用引物 Kan - 5 和 Kan - 3 扩增 Kan 基因, 发现在 500 bp 位置上出现 Kan 基因特异性片段 (图 1), 证明 PCR 扩增片段已成功整合在染色体上。此外, 引物 FRT - 23S - 5 和 FRT -

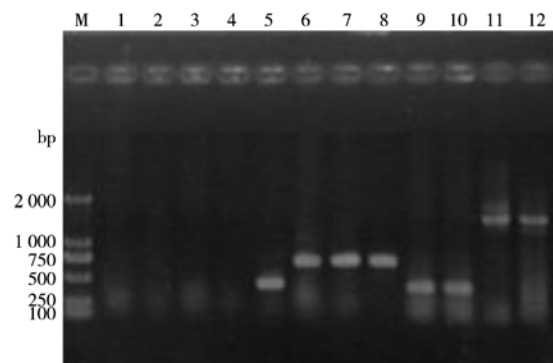


图 1 Kan^r 重组体 Kan 抗性基因消除前后的 PCR 鉴定

Fig. 1 PCR bands amplified from the DNA of Kan resistant strain SQ88C-Kan and SQ88C

1. SQ88 (阴性对照) 扩增 Kan 基因 Kan gene amplified from strain SQ88 (negative control); 2~4. SQ88C 扩增 Kan 基因 Kan gene amplified from strain SQ88C; 5. SQ88C - Kan 扩增 Kan 基因 Kan gene amplified from strain SQ88C-Kan; 6~8. SQ88C - Kan 扩增 FRT - 23S 片段序列 FRT-23S amplified from strain SQ88C-Kan; 9~10. SQ88C 扩增 16S rDNA 16S rDNA amplified from strain SQ88C; 11~12. SQ88 扩增 16S rDNA 16S rDNA amplified from strain SQ88; M. DL 2000 marker

23S-3 也扩增到了与理论值大小相符的条带 (图 1), 测序后根据 *E. coli* 7 个 rRNA 操纵元的 16S ~ 23S 间隔区序列的差异性, 确定敲除发生的具体位置。最后选取其中 1 株敲除 *rrnC* 的重组子 SQ88C-Kan 来进行抗性消除试验。

2.2 整合卡那霉素基因的消除

用 SQ88C-Kan 来进行抗性消除试验, 挑取单菌落进行 Amp 和 Kan 敏感性检测, 通过 PCR 的方法验证了 Kan 基因的丢失, 最后获得的 Amp 和 Kan 敏感菌株即为去除 Kan 基因的重组子——SQ88C。

2.3 敲除后各菌株倍增时间的测定

在高营养培养基上, 由于细胞分裂时间缩短, 细胞需要合成大量的核糖体来满足对数生长期快速生长的需要, 这样敲除给菌株带来的影响就变得十分明显了, 也就是说敲除 *rrn* 操纵元后倍增时间可能会有显著改变^[12]。所以用 LB 培养基来测量敲除菌株的倍增时间可以看出细胞在核糖体合成上是否受到影响。通过对 *rrn* 操纵元敲除后各菌株的倍增时间测定, 发现大肠杆菌 SQ88C 菌株的倍增时间并没有因为 16S rRNA 基因拷贝数减少而显著下降, SQ88 倍增时间为 34 min, 而 SQ88C 为 35 min, 两者相比几乎没有改变, 甚至与 DH5 α (26 min) 的差异也不是十分明显 (表 2)。

表 2 *rrn* 操纵元敲除的大肠杆菌倍增时间和 rRNA/蛋白值

Table 2 Doubling times and rRNA/protein ratios of *rrn* deletion cells

菌株 Strain	倍增时间/min Doubling time	R/min^{-1} Growth rate constant	rRNA/蛋白 (相对值) rRNA/protein ratios		冷敏感 Cold sensitive
DH5 α	26	0.038 5	1.198 9	1.000 0	—
SQ88	34	0.029 4	1.000 0	0.834 1	—
SQ88C	35	0.028 6	0.947 7	0.790 4	—

2.4 rRNA/蛋白值和冷敏感性

通过测定快速生长细胞中总 RNA 和总蛋白量, 确定了 rRNA/蛋白值。同时也与 DH5 α 的相应值进行了比较。发现 SQ88 和 SQ88C 的 rRNA/蛋白值相差并不明显, 有一定程度的下降, 相对值为 0.947 7, 而与野生大肠杆菌菌株 DH5 α 相比, 下降比较明显, 相对值为 0.790 4 (表 2)。

由于在低温条件下, 核糖体装配若出现问题, 菌株会出现冷敏感的表型^[13], 所以试验同时检测了菌株的冷敏感型。但在 SQ88C 和 SQ88 菌株中都没有发现这一现象 (表 2)。

3 讨论

20 世纪 80 年代初, Ellwood 等^[14]就已成功敲除了 *E. coli* 的 *rrnE* 操纵元, 甚至在实验室的极端条件下发现敲除后的菌株与野生菌株在表型上没有显著的变化。已经证明在 *E. coli* 和 *Bacillus subtilis* 这 2 种细菌中敲除 1 个 *rrn* 操纵元对细胞在生长速率上和生理上都没有很大的影响^[15-16]。

有研究显示, 当缺失 2 个操纵元后菌株在生长速率和 rRNA/蛋白质值上都有所下降。缺失的操纵元数量增加到 3 ~ 6 个时, 生长速率下降与 rRNA/蛋白质值的下降相比更显著, 这一结果表示多个 *rrn* 敲除的菌株倍增时间下降并不仅仅是由核糖体浓度下降造成的, 还可能是由于核糖体效率下降导致的^[13]。本研究运用 λ 噬菌体的 Red 重组系统, 构建了染色体上只带有 1 个拷贝 16S rRNA 基因的 *E. coli* 菌株 SQ88C。通过测定敲除后各菌株的倍增时间, 发现 *E. coli* 菌株 SQ88C 的倍增时间并没有因为 *rrn* 拷贝数减少而显著下降, 与 DH5 α 比只是延长了 10 min 左右。

Asai 等^[6]一步步地敲除 7 个操纵元上跨越 16S rRNA 到 23S rRNA 基因的片段, 最后, 获得的 1 个菌株在染色体上不含有任何完整的 rRNA 操纵元, rRNA 分子是由多拷贝的质粒 (prn) 上包含的单一 rRNA 操纵元 (*rrnC*) 表达出来的。在 Asai 等的论文中, 并没有比较 D7 prn 菌株与没有进行 *rrn* 敲除菌株之间的区别, 但 D7 prn 菌株可以很好的生长这一事实就可以说明即使 rRNA 操纵元之间存在差异, 它们也肯定是很小的并且是在标准培养条件下对生长无关紧要的^[17]。

由于总 RNA 中 98% 的 RNA 是稳定的, rRNA 占细胞中总 RNA 的比率也比较稳定, 一般为 70% 左右, 在进行不同菌株 rRNA/蛋白值的比较时, 用相对值进行比较更为直观。rRNA/蛋白值与每个蛋白的核糖体数量成正比, 也就是说 rRNA/蛋白值代表了细胞中核糖体的浓度。曾经有人据此提出核糖体浓度和效率在活细胞中是受生长速率限制的, 而且对数生长期培养物的生长速率与这两个值相乘的值是成正比的^[6]。我们测量了各敲除菌株快速生长细胞中的总 RNA 和总蛋白量, 并依此确定了敲除菌株的

rRNA/蛋白值, 经比较发现 SQ88C 和 SQ88 的 rRNA/蛋白值相差并不明显, 为 SQ88 的 94.77%, 而与 *E. coli* 菌株 DH5 α 相比, 则有一定幅度的下降, 为 79.04%。根据生长速率和核糖体浓度及效率的关系, 我们可以得出这样的结论, SQ88C 和 SQ88 相比, 核糖体效率几乎没有改变, 这说明当染色体上 *rrn* 操纵元数量为 1 个或 2 个时, 核糖体不论在浓度和效率上都基本维持一致。从生长速率和 rRNA/蛋白值两个参数来看, SQ88 和 SQ88C 的差异并不大, 但是与未敲除 rRNA 操纵元的 *E. coli* 菌株 DH5 α 相比差异较明显。总的来看, 生长速率的下降比 rRNA/蛋白值的下降幅度稍大一些, SQ88C 与 DH5 α 相比生长速率下降了约 26%, 而 rRNA/蛋白值下降了约 21%, 可见虽然 SQ88 在生长速率和核糖体浓度两方面与 DH5 α 相比都有所下降, 但其核糖体效率的下降却并不显著。另外, 在 SQ88C 和 SQ88 菌株中并没有发现冷敏感现象, 也就是说在敲除菌株中核糖体装配并没有由于 rRNA 操纵元变为单拷贝后受到很大影响。

综上所述, 我们得出这样一个结论, 大肠杆菌菌株染色体上仅存单拷贝 rRNA 操纵元时对其生长并不会造成明显的负面影响。

参考文献:

- [1] Pace N R. A molecular view of microbial diversity and the biosphere [J]. *Science*, 1997, 276: 734-740
- [2] Woese C R. Bacterial evolution [J]. *Microbiol Rev*, 1987, 51(2): 221-271
- [3] Andersson S G E, Zomorodipour A, Winkler H H, et al. Unusual organization of the rRNA genes in *Rickettsia prowazekii* [J]. *J Bacteriol*, 1995, 177(14): 4171-4175
- [4] García-Marín J, Acinas S G, Antón A I, et al. Use of the 16S-23S ribosomal genes spacer region in studies of prokaryotic diversity [J]. *Journal of Microbiological Methods*, 1999, 36: 55-64
- [5] Osorio C R, Collins M D, Romalde J L, et al. Variation in 16S-23S rRNA intergenic spacer regions in *Photobacterium damsela*: a mosaic-like structure [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2005, 71(2): 636-645
- [6] Asai T, Condon C, Voulgaris J, et al. Construction and initial characterization of *Escherichia coli* strains with few or no intact chromosomal rRNA operons [J]. *J Bacteriol*, 1999, 181(12): 3803-3809
- [7] Poteete A R. What makes the bacteriophage λ Red system useful for genetic engineering: molecular mechanism and biological function [J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2001, 201(1): 9-14
- [8] Ellis H M, Yu D, Ditzio T, et al. High efficiency mutagenesis, repair, and engineering of chromosomal DNA using single-stranded oligonucleotides [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98(12): 6742-6746
- [9] Yu D, Ellis H M, Lee E C, et al. An efficient recombination system for chromosome engineering in *Escherichia coli* [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97(11): 5978-5983
- [10] 萨姆布鲁克 J, 拉塞尔 D W. 分子克隆实验指南 [M]. 3 版. 黄培堂, 王嘉玺, 朱厚础, 等译. 北京: 科学出版社, 2002
- [11] Brunschede H, Dove T L, Bremer H. Establishment of exponential growth after a nutritional shift-up in *Escherichia coli* B/r: accumulation of deoxyribonucleic acid, ribonucleic acid, and protein [J]. *J Bacteriol*, 1977, 129(2): 1020-1033
- [12] Condon C, French S, Squires C, et al. Depletion of functional ribosomal RNA operons in *Escherichia coli* causes increased expression of the remaining intact copies [J]. *EMBO J*, 1993, 12: 4305-4315
- [13] Dammel C S, Noller H F. A cold-sensitive mutation in 16S rRNA provides evidence for helical switching in ribosome assembly [J]. *Genes Dev*, 1993, 7: 660-670
- [14] Ellwood M, Nomura M. Deletion of a ribosomal ribonucleic acid operon in *Escherichia coli* [J]. *J Bacteriol*, 1980, 143(2): 1077-1080
- [15] Condon C, Philips J, Fu Z Y, et al. Comparison of the expression of the seven ribosomal RNA operons in *Escherichia coli* [J]. *EMBO J*, 1992, 11: 4175-4185
- [16] Widom R L, Jarvis E D, Lafauci G, et al. Instability of rRNA operons in *Bacillus subtilis* [J]. *J Bacteriol*, 1988, 170(2): 605-610
- [17] Nomura M. Engineering of bacterial ribosomes: replacement of all seven *Escherichia coli* rRNA operons by a single plasmid-encoded operon [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96(5): 1820-1822

责任编辑: 夏爱红