

王昀璐,花日茂,唐欣昀,等. 2011. 电转化法将 *luxAB* 基因导入毒死蜱降解菌 β 菌株的研究[J]. 环境科学学报, 31(1):40-45
Wang Y L, Hua R M, Tang X Y, et al. 2011. *luxAB* labelling of chlorpyrifos-degrading strain β by electroporation[J]. Acta Scientiae Circumstantiae, 31(1):40-45

电转化法将 *luxAB* 基因导入毒死蜱降解菌 β 菌株的研究

王昀璐¹, 花日茂^{1,*}, 唐欣昀², 李瑞雪¹, 张君², 王道胜²

1. 安徽农业大学资源与环境学院, 安徽省“农产品安全”重点实验室, 合肥 230036
2. 安徽农业大学生命科学学院, 合肥 230036

收稿日期: 2010-04-16 修回日期: 2010-06-07 录用日期: 2010-06-28

摘要: 采用电转化法将带发光酶基因 *luxAB* 的质粒 pTR102 导入毒死蜱降解菌 β 菌株, 研究了细胞生长状态、电压强度、电击时间和质粒浓度对转化效率的影响, 并对转化子的生理特性进行研究. 实验结果表明, 以处于对数生长早期的菌液制备感受态细胞, 在质粒浓度 $16.5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、电压 2.5 kV, 电击时间 3 ms 条件下的转化率最高, 可达 2.73×10^2 个 $\cdot \mu\text{g}^{-1}$ (以每 μg 质粒 DNA 中所含转化子个数计). 转化子 *lux- β* 分别在抗生素平板和 LB 平板中传代 10 次, 仍具有发光活性和对卡那霉素 (Km) 的抗性, 说明质粒 pTR102 在转化子中可以稳定遗传. 转化子的生理特性变化不显著, 对毒死蜱的降解能力较出发菌株提高了近 1 倍.

关键词: 电转化; 发光酶基因; β 菌株; 毒死蜱; 微生物降解

文章编号: 0253-2468(2011)01-40-06 中图分类号: X172 文献标识码: A

luxAB labelling of chlorpyrifos-degrading strain β by electroporation

WANG Yunlu¹, HUA Rimao^{1,*}, TANG Xinyun², LI Ruixue¹, ZHANG Jun², WANG Daosheng²

1. Resources and Environment College of Anhui Agricultural University, Key Laboratory of Anhui Agri-food Safety, Hefei 230036
2. Life Science College of Anhui Agricultural University, Hefei 230036

Received 16 April 2010; received in revised form 7 June 2010; accepted 28 June 2010

Abstract: A new *luxAB* gene-labelling method was established in this study in order to provide a method of investigating and tracing the colonization dynamics and degradation activity of chlorpyrifos-degrading bacteria in the natural environment. The *luxAB* genes were introduced into chlorpyrifos-degrading strain β by electroporation. Cells in initial logarithmic phase were more sensitive to foreign DNA, and the maximum transformation rate was up to 2.73×10^2 transformants per microgram plasmid DNA when the plasmid concentration was $16.5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ under the conditions of voltage 2.5 kV and time 3 ms. After plate transfers with or without antibiotics for 10 generations the transformant *lux- β* still had luminescence activity and Km resistance, indicating that the transformant was genetically stable. In addition, the physiological and biochemical characteristics of *lux- β* changed little, and the chlorpyrifos-degradation rate of *lux- β* doubled compared with that of the wild strain β .

Keywords: electroporation; *luxAB*; strain β ; chlorpyrifos; microbial degradation

1 引言 (Introduction)

利用高效微生物菌株降解农产品和环境中的有机污染物被视为一种“绿色的”污染物去除途径, 但要人工培养的微生物释放到自然环境中, 必须先建立能检测微生物在环境中动态变化的技术. 为

此, 研究人员常向微生物中引入某种标记以追踪标记微生物在环境中的行为 (柏建玲等, 1999; 孙洁梅等, 2003). 近年来, 用于环境微生物监测的标记系统主要有抗性标记系统、发色标记系统、发光基因标记系统 (Prosser *et al.*, 1994). 其中, 发光基因标记因其特异性高、检测方便而得到广泛使用 (Lee

基金项目: 国家高技术研究发展计划 (863) 项目 (No. 2007AA10Z403); 安徽省科技攻关项目 (No. 08010302166); 国家科技支撑计划项目 (No. 2007BAD87B06)

Supported by the National High-tech Research and Development Program of China (No. 2007AA10Z403), the Science and Technology Research Project of Anhui Province (No. 08010302166) and the National Key Technology R&D Program (No. 2007BAD87B06)

作者简介: 王昀璐 (1986—), 女, E-mail: wangyunlu_830@126.com; * 通讯作者 (责任作者), E-mail: rimaohua@ahau.edu.cn

Biography: WANG Yunlu (1986—), female, E-mail: wangyunlu_830@126.com; * **Corresponding author**, E-mail: rimaohua@ahau.edu.cn

et al., 1992).

目前,有关发光酶基因标记微生物的研究主要集中在农业根际微生物方面(何林燕等, 2004; 王平等, 2000),农药降解菌发光酶基因标记的研究也多采用三亲本杂交方法,还没有采用电转化法将发光酶基因导入毒死蜱降解菌的研究报道.电转化的基本原理是利用瞬时脉冲电场作用于受体细胞,使细胞膜组分被极化,并在细胞膜两边产生电位差.当电位差超过某一临界水平,细胞膜局部被击穿,形成一些可逆孔洞,其孔径大小足以让大分子和小分子进入或从细胞中排出.与其他方法相比,电转化法具有快速、效率高、电参数容易控制等优点,自1982年 Neumann 等首次应用电穿孔技术实现基因向活细胞的转化,并使外源基因得以稳定表达后,基因电转化已发展成一种重要的分子生物学技术,并广泛应用于生命科学的各领域研究中 (Neumann *et al.*, 1982).

基于此,本文采用电转化法将发光酶基因导入毒死蜱降解菌 β 菌株,研究细胞生长状态、电压强度、电击时间和质粒浓度对转化效率的影响,并对转化子的生理特性进行研究,以期为进一步构建安全、稳定、高效的毒死蜱降解基因工程菌提供基础参数和技术支持.

2 材料和方法 (Materials and methods)

2.1 材料

菌株与质粒:毒死蜱降解菌为微嗜酸寡养单胞菌 (*Stenotrophomonas acidaminiphila*) β 菌株 (Km^s),由本实验室筛选、鉴定、保存;质粒 pTR102 (1.5kb, Km^r)由本实验室保存的 *E. coli* WA803 携带.

试剂与培养基:无菌双蒸水,10% (V/V) 甘油,20% (V/V) 癸醛;基础加富培养基: $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.4g, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.002g, K_2HPO_4 0.2g, $(NH_4)_2SO_4$ 0.2g, $CaSO_4$ 0.08g, 蛋白胨 1.0g, 蒸馏水 1L; LB 培养基:蛋白胨 10g, 酵母膏 5g, NaCl 10g, 琼脂 20g, 蒸馏水 1L; SOC 培养基:胰蛋白胨 20.0g, 酵母膏 5.0g, NaCl 0.5g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 5.0g, 葡萄糖 3.6g, 蒸馏水 1L. 选择性培养基:含 $50\mu g \cdot mL^{-1}$ 卡那霉素 (Km) 的 LB 培养基.

仪器:Bio-Rad 电脉冲仪, LG10-2.4A 型高速离心机, GC-2010 型岛津气相色谱仪, WH-3 微型旋涡混合仪.

2.2 方法

2.2.1 质粒 DNA 的提取 有关质粒 DNA 提取的

具体操作按照参考文献(萨姆布鲁克等, 2002)方法进行.

2.2.2 感受态细胞的制备 从 LB 平板上挑取 β 菌株的单菌落接种于 LB 液体培养基中, $30^\circ C$ 、 $160 r \cdot min^{-1}$ 条件下振荡培养至 OD_{600} 分别为 0.5、0.8、1.2 (即菌株生长的对数早期、中期、晚期), $4^\circ C$ 、 $8000 r \cdot min^{-1}$ 离心 5min 收集细胞,用冰浴后的无菌水洗涤 1 次,再用冰浴后的 10% 甘油洗涤 2 次, $4^\circ C$ 、 $8000 r \cdot min^{-1}$ 离心 5min 后弃上清,各管用 $90\mu L$ (10%) 甘油涡旋混匀, $-70^\circ C$ 保存(萨姆布鲁克等, 2002).

2.2.3 电转化 将 3 个不同浓度 (0.165 、 1.65 、 $16.5\mu g \cdot mL^{-1}$) 的质粒各 $2\mu L$ 分别加入到 $90\mu L$ 新鲜制备的处于对数生长初期的感受态细胞中,混合均匀后转入预冷的电极间距为 0.2cm 的电击杯中,设置电压分别为 2.0kV、2.5kV,电击时间分别为 3ms、4ms,电击后立刻加入 $500\mu L$ 温热的 SOC 培养液, $30^\circ C$ 振荡培养 1.5h 左右,涂布于含 $50\mu g \cdot mL^{-1}$ Km 的 LB 平板, $30^\circ C$ 培养 2~4d,每个处理 3 次重复,计数转化子并计算转化效率(每 μg 质粒 DNA 所得转化子个数)(萨姆布鲁克等, 2002; Kazuaki *et al.*, 2001; 韦晓明等, 2003; 格日勒图等, 2009).根据最优的电压、电击时间、质粒浓度条件,取不同对数生长期的菌液制备感受态细胞进行电转化.

2.2.4 转化子的遗传稳定性和生理特性 将 *luxAB* 标记菌株在 LB + Km ($50\mu g \cdot mL^{-1}$) 平板和 LB 平板上连续传代 10 次,检测标记菌株的发光情况.同时,设定不同 pH (5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、7.5 和 8.0) 和温度 (25、30、35、40 和 $45^\circ C$),比较标记菌株与出发菌株 (β 菌株) 的最优生长条件,根据二者的最适生长条件测定生长曲线(周长林, 2004).

2.2.5 转化子对毒死蜱的降解能力 降解:将 $50\mu L$ 浓度为 $1mg \cdot mL^{-1}$ 的毒死蜱石油醚溶液加入到 25mL 比色管管底,吹干石油醚,再加入 0.5mL 用基础培养基洗脱后涡旋混匀的菌液和 4.5mL 基础加富培养基,使毒死蜱终浓度为 $10mg \cdot L^{-1}$.同时设置不加菌液的空白对照,每个处理 3 次重复, $30^\circ C$ 、 $160 r \cdot min^{-1}$ 黑暗振荡培养.

萃取:在比色管中加入 5mL 石油醚涡旋仪上振荡 2min,待静置分层后吸取上清液,再加入 3mL 石油醚复萃取一次,最后定容至 10mL 容量瓶待测.

测定:用岛津 AOC-20I-GC-2010-E 气相色谱仪

(日本)测定, ECD 检测器, 色谱柱 (Agilent): DB-5, 内径 0.23 mm、长度 30 m、膜厚 0.25 μm ; 进样口温度 240 $^{\circ}\text{C}$, 检测器温度 280 $^{\circ}\text{C}$, 柱温 210 $^{\circ}\text{C}$; 载气 (N_2) 流速 27 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$, 柱流量 4.00 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$, 进样量 1 μL (吴祥为等, 2006; 杨丽等, 2005)。

3 结果 (Results)

3.1 不同质粒浓度条件下的转化结果

取处于对数生长早期 ($\text{OD}_{600} = 0.5$) 的菌液制备感受态细胞, 与不同浓度的质粒 DNA 混合, 在不同电压和电击时间下进行转化, 结果见表 1。

表 1 质粒浓度对转化效率的影响

质粒浓度/ ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	转化效率/(个 $\cdot\mu\text{g}^{-1}$)			
	2.0kV/3ms	2.0kV/4ms	2.5kV/3ms	2.5kV/4ms
0.165	—	—	—	—
1.65	2.12×10^3	1.52×10^3	6.36×10^3	6.67×10^3
16.5	1.21×10^2	1.51×10^2	2.72×10^2	1.36×10^2

注: “—”表示未得到转化子。

实验检测了转化子 *lux- β* 在 LB + Km ($50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 抗性平板上的发光情况, 当质粒浓度为 $1.65 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时得到的转化子呈乳白色球状, 不发光; 当质粒浓度为 $16.5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时得到的转化子呈金黄色球状, 与出发菌株 β 菌形态特征相似, 并且每一个转化子均具有发光现象 (图 1)。

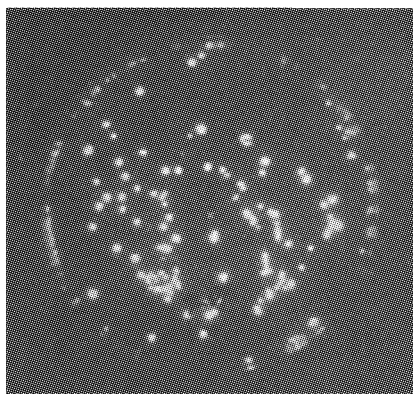


图 1 转化子 *lux- β* 的发光情况

Fig. 1 Fluorescence emitted by *lux- β* populations

3.2 不同对数生长期下的转化效率

根据最优的质粒浓度, 分别取处于对数生长早、中、晚期的菌液制备感受态细胞, 在不同电压和电击时间下进行转化, 结果见表 2。从表 2 可以看出, 利用处于对数生长早期的菌液制备的感受态细

胞的转化效率最高, 最优转化条件为: 电压 2.5kV, 电击时间 3ms, $\text{OD}_{600} = 0.5$ 。

表 2 细胞生理状态对转化效率的影响

Table 2 Effects of physiological characteristics on the transformation efficiency of strain β

OD_{600}	转化效率/(个 $\cdot\mu\text{g}^{-1}$)			
	2.0kV/3ms	2.0kV/4ms	2.5kV/3ms	2.5kV/4ms
0.5	1.21×10^2	1.52×10^2	2.73×10^2	1.36×10^2
0.8	0	6.67×10^1	1.33×10^2	1.17×10^2
1.2	3.33×10^1	3.33×10^1	1.17×10^2	6.67×10^1

3.3 转化子 *lux- β* 中 pTR102 的遗传稳定性和标记菌株的生理特性

将转化子 *lux- β* 在 LB + Km ($50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 平板和 LB 平板上连续传代 10 次, 经检测发现, 转化子 *lux- β* 仍具有抗生素抗性和发光活性, 表明 pTR102 在转化子中能够稳定遗传和表达。

为了解 pTR102 转入 β 菌株后是否会对其生理特性产生影响, 对转化子 *lux- β* 和 β 菌株的最优生长条件进行了测定。图 2 结果表明, *lux- β* 的最优生长条件为 pH = 6.8, 温度 30 $^{\circ}\text{C}$ 。而 β 菌株在 pH = 7.5、温度 35 $^{\circ}\text{C}$ 时生长最快 (图 3), 说明在外源性 DNA 导入 β 菌株后, 转化子的生理特性略微发生了变化。

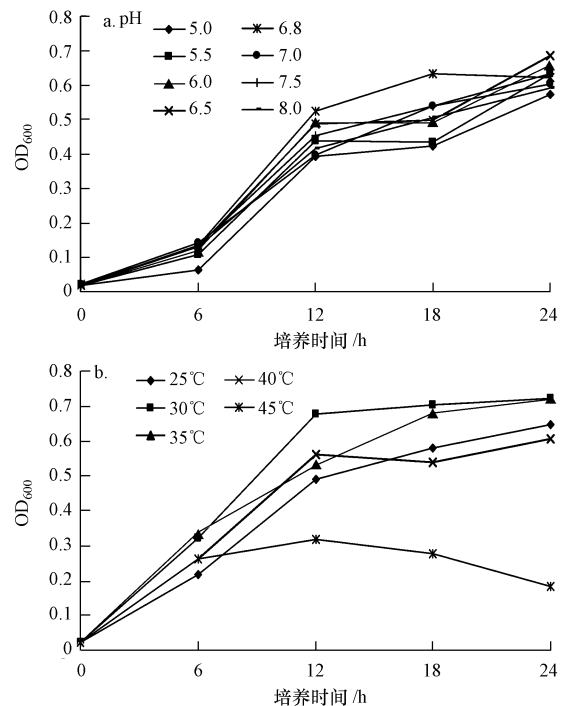


图 2 转化子 *lux- β* 在不同 pH (a) 和温度 (b) 下的生长动态

Fig. 2 The growth dynamic of *lux- β* at different pH (a) and temperatures (b)

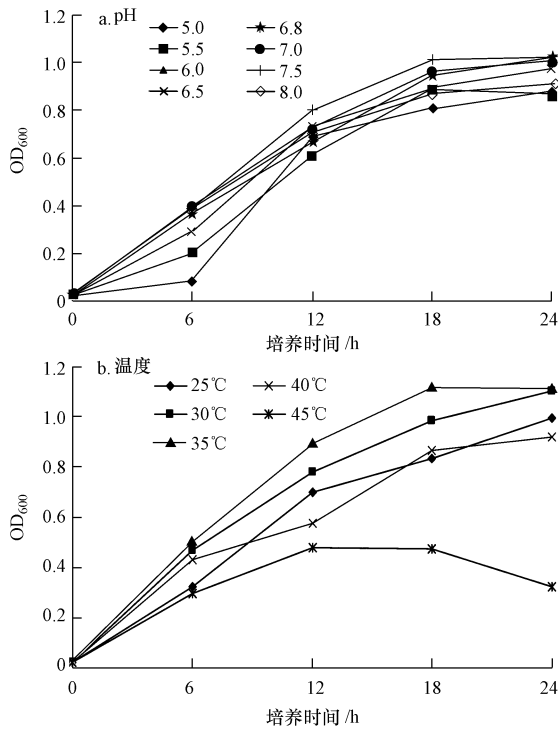


图3 β 菌株在不同 pH (a) 和温度 (b) 下的生长动态

Fig. 3 The growth dynamic of strain β at different pH (a) and temperatures (b)

根据转化子 *lux- β* 与 β 菌株的最优生长条件,测定了二者的生长曲线(图4),用于比较转化子和出发菌株的生长动态.由图4可知,转化子与出发菌株进入延滞期、对数期和衰亡期的时间基本一致,生长趋势未发生较大变化.

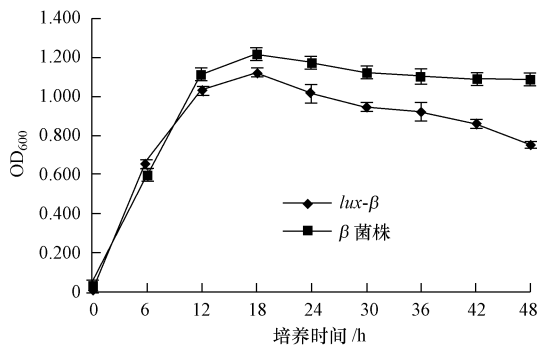


图4 转化子 *lux- β* 与 β 菌株的生长曲线

Fig. 4 The growth curves of transformant *lux- β* and strain β

3.4 转化子 *lux- β* 与 β 菌株对毒死蜱的降解能力

从 LB + Km ($50 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 平板上随机挑选第一代转化子的单菌落,对该单菌落和出发菌株 β 菌进行毒死蜱降解能力的测定(图5).结果发现,将培养了12h的转化子 *lux- β* 和 β 菌株菌液取出后,二者在600nm处的吸光度值分别为0.917和1.013,转化

子 *lux- β* 在48、72、96h对毒死蜱的降解率分别为46.91%、59.9%、83.29%,而 β 菌株在48、72、96h对毒死蜱的降解率分别为30.89%、25.36%、40.32%,转化子对毒死蜱的降解能力比出发菌株提高了近1倍.

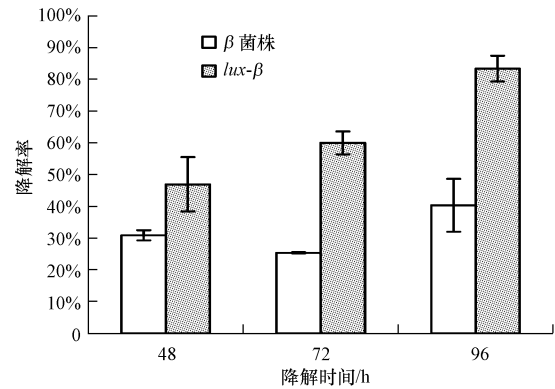


图5 转化子 *lux- β* 与 β 菌株在不同时间的降解率

Fig. 5 Degradation of chlorpyrifos by transformant *lux- β* and strain β at different times

4 讨论 (Discussion)

应用电转化技术将外源 DNA 导入受体菌受诸多因素的影响,如细菌的属性 (Davalos *et al.*, 2005)、生长周期、转化时所加脉冲场强 (Cukjat *et al.*, 2007)、质粒 DNA 的大小 (De *et al.*, 1999) 和浓度 (Rittich *et al.*, 1996) 等. 本实验以毒死蜱降解菌 β 菌株作为受体菌,利用电转化的方法将发光酶基因成功导入其中,所得转化子连续转接10代后仍具有发光特性和毒死蜱降解能力.

一般来说, $50 \mu\text{L}$ 感受态细胞通常可被 1ng 超螺旋 DNA 饱和,虽然增加 DNA 的量并不会影响总产量,但过多的 DNA 会降低转化效率 (萨姆布鲁克等, 1993), 本实验中将提取的质粒 DNA 稀释了100倍 (即 $0.165 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 并未得到转化子; 稀释10倍 (即 $1.65 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 时虽然得到了转化子但并未发光,而未加质粒转化的感受态细胞在抗性平板上并未生长,说明抗性平板并未失去抗性,出现这种现象的原因是 pTR102 仅有抗性基因得到了表达而发光酶基因并未得到表达,这可能与在宿主细胞中插入的位点有关或者是质粒在细胞内分裂时分配不均导致部分基因未能表达; 将未稀释的质粒 ($16.5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 进行转化后在抗性平板上成功地得到了发光的转化子,从两次的转化效率来看(表1),质粒浓度为 $16.5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的转化子个数和转化效

率均低于 $1.65 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 下的转化子个数和转化效率,这与文献(萨姆布鲁克等,1993)描述的一致,但有关 ng 级的 DNA 就能够成功转化进入宿主细胞的结论在本实验中并未得到验证. 高压电击虽然能够提高受体菌对外源性 DNA 的吸纳能力,但电击时间过长会降低转化效率. 可能是因为较长的电击时间会导致大量的受体菌死亡. 本文实验结果表明,以处于对数生长早期的菌液制备感受态细胞,采用质粒浓度 $16.5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$,电压 2.5kV 和电击时间 3ms 的参数组合可以获得较佳结果,得到的转化率最高可达 $2.73 \times 10^2 \text{个} \cdot \mu\text{g}^{-1}$.

转化子 *lux-β* 在 LB + Km ($50 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 平板和 LB 平板上连续传代 10 次仍具有抗生素抗性和发光活性,说明质粒 pTR102 在转化子中能够稳定遗传和表达. 转化子 *lux-β* 与出发菌株 β 相比生长趋势并未发生较大变化,但其生理特性略微发生了变化,对毒死蜱的降解能力也比出发菌株提高了近 1 倍. 这可能是由于外源 DNA 进入 β 菌株后整合到 β 菌株基因组中,引发了染色体重组、易位等基因结构变化,从而产生了基因突变,也有可能是外源 DNA 的导入使得酶活位点结构发生了改变,而降解酶分子结构又与活性关系有关(Sioudi *et al.*, 2007). 但是,由于外源基因在细菌基因组中的整合带有随机性,转化子对毒死蜱降解能力的遗传稳定性和最佳活性还有待进一步研究.

总体而言,本研究以含发光酶基因的非重组型质粒 pTR102 为转化材料,毒死蜱降解菌——微嗜酸寡养单胞菌(*Stenotrophomonas acidaminiphila*)β 菌株为受体菌,研究了不同条件下的最佳电转化参数,为人工培养的微生物在环境监测和毒死蜱污染治理中的应用提供了实践依据.

5 结论 (Conclusions)

1) 采用电转化法可成功地将含发光酶基因 *luxAB* 的质粒 pTR102 导入毒死蜱降解菌 β 菌株. 利用处于对数生长早期的菌液制备的感受态细胞的转化效率最高,可达 $2.73 \times 10^2 \text{个} \cdot \mu\text{g}^{-1}$,最优转化条件为:电压 2.5kV,电击时间 3ms, $\text{OD}_{600} = 0.5$. 转化子 *lux-β* 在 LB + Km ($50 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 平板和 LB 平板上连续传代 10 次后仍具有抗生素抗性和发光活性,表明 pTR102 在转化子中能够稳定遗传和表达.

2) *lux-β* 的最优生长条件为 pH = 6.8, 温度 30°C , 而 β 菌株在 pH = 7.5, 温度 35°C 时生长最快,

说明在外源性 DNA 导入 β 菌株后,转化子的生理特性略微发生了变化. 转化子与出发菌株进入延滞期、对数期和衰亡期的时间基本一致,生长趋势未发生较大变化.

3) 转化子 *lux-β* 在 48、72、96h 对 $10 \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 毒死蜱的降解率分别为 46.91%、59.9%、83.29%, 而 β 菌株在 48、72、96h 对毒死蜱的降解率分别为 30.89%、25.36%、40.32%, 转化子对毒死蜱的降解能力比出发菌株提高了近 1 倍.

责任作者简介: 花日茂 (1961—), 男, 教授, 博士生导师. 主要研究方向为: 农药残留分析与环境毒理、农药科学应用与风险评估、污染物在环境中的降解与修复、食品安全技术及生物农药创制等. E-mail: rimaohua@ahau.edu.cn.

参考文献 (References):

- 柏建玲, 王平, 胡正嘉. 1999. 利用发光酶基因标记技术跟踪棉花根圈中的绿针假单胞菌 PL9L[J]. 微生物学报, 39(1):43-48
- Bai J L, Wang P, Hu Z J. 1999. Using *lux* genes marker technique to track *Pseudomonas Chlororaphis* PL9L in cotton rhizosphere [J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 39(1):43-48 (in Chinese)
- Cukjati D, Batiukaite D, Mir L M, *et al.* 2007. Real time electroporation control for accurate and safe in vivo non-viral gene therapy [J]. *Bioelectrochemistry*, 70:501-507
- Davalos R V, Mir L M, Rubinsky B. 2005. Tissue ablation with irreversible electroporation [J]. *Annals of Biomedical Engineering*, 33:223-231
- De Bruin K A, Krassowska W. 1999. Modeling electroporation in a single cell. I. Effects of field strength and rest potential [J]. *Biophysical J*, 77:1213-1223
- 格日勒图, 王艳霞, 包秋华, 等. 2009. 电转化方法将外源性质粒导入干酪乳杆菌的研究 [J]. *中国乳品工业*, 37(2):9-12
- Geriletu, Wang Y X, Bao Q H, *et al.* 2009. Study on exogenous plasmids transformed into *Lactobacillus casei* by electroporation [J]. *China Dairy Industry*, 37(2):9-12 (in Chinese)
- 何琳燕, 黄为一. 2004. 发光酶基因 *luxAB* 标记硅酸盐细菌 NBT 菌株的研究 [J]. *应用生态学报*, 15(7): 1241-1244
- He L Y, Huang W Y. 2004. Introduction of bioluminescence genes into silicate dissolving bacterial strain NBT [J]. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 15(7):1241-1244 (in Chinese)
- J. 萨姆布鲁克, D. W. 拉塞尔. 2002. 分子克隆实验指南 [M]. 北京: 科学出版社. 27-30; 96-99; 99-102; 611-618
- Sambrook J, Russell D W. 2002. *The Condensed Protocols from Molecular Cloning* [M]. Beijing: Science Press. 27-30; 96-99; 99-102; 611-618 (in Chinese)
- J. 萨姆布鲁克, D. W. 拉塞尔. 1993. 分子克隆实验指南 [M]. 北京: 科学出版社. 54-55
- Sambrook J, Russell D W. 1993. *The Condensed Protocols from Molecular Cloning* [M]. Beijing: Science Press. 54-55 (in

- Chinese)
- Kazuaki H, Yoshitaka I, Morio K, *et al.* 2001. Improvement of desulfurization activity in *Rhodococcus erythropolis* KA2-5-1 by genetic engineering [J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 65 (2): 239-246
- Kyu-Ho Lee, Ruby E G. 1992. Detection of the light organ symbiont, *Vibrio sischeri*, in Hawaiian seawater by using *lux* gene probes [J]. *Appl Environ Microbiol*, 58(3):942-947
- Neumann E, Schaefer R M, Wang Y, *et al.* 1982. Gene transfer in mouse lymphoma cells by electroporation in high electric fields [J]. *Eur Mol Biol Organ*, 1(7):841-845
- Prosser J I. 1994. Molecular marker systems for detection of genetically engineered microorganisms in the environment [J]. *Microbiology*, 140:5-17
- Rittich B, Spanova A. 1996. Electrotransformation of bacteria by plasmid DNA: statistical evaluation of a model quantitatively describing the relationship between the number of electrotransformants and DNA concentration [J]. *Bioelectrochemistry and Bioenergetics*, 40:233-238
- Sioudi B, Grimsley J K, Wild J R. 1999. Modification of near active site residues in organophosphorus hydrolase reduces metal stoichiometry and alters substrate specificity [J]. *Biochemistry*, 38 (10): 2866-2872
- 孙洁梅, 崔中利, 邱珊莲, 等. 2003. *luxAB* 基因标记甲基对硫磷降解菌 DLL-1 在土壤和植株根部的生态行为研究[J]. *农村生态环境*, 19(1):43-46
- Sun J M, Cui Z L, Qiu S L, *et al.* 2003. Ecological behaviors of *luxAB*-labeled parathion-methyl-degrading strain DLL-1 in rhizosphere of plant[J]. *Rural Eco-Environment*, 19(1):43-46 (in Chinese)
- 王平, 胡正嘉, 李阜棣, 等. 2000. 土壤因子对发光酶基因标记荧光假单胞菌 X16L2 在小麦根圈定殖的影响[J]. *微生物学报*, 40(3):312-316
- Wang P, Hu Z J, Li F D, *et al.* 2000. Soil factors impact on bioluminescence genes into *Pseudomonas fluorescens* bacterial strain X16L2[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 40(3): 312-316 (in Chinese)
- 韦晓明, 苏明权, 杨安钢, 等. 2003. 电转化条件对大肠杆菌 XL1-Blue 菌株转化效率的影响[J]. *生物技术通讯*, 14(6):566-568
- Wei X M, Su M Q, Yang A G, *et al.* 2003. The effect of electroporation conditions on the transformation efficiency of *E. coli* XL1-Blue[J]. *Letters in Biotechnology*, 14(6):566-568 (in Chinese)
- 吴祥为, 花日茂, 操海群, 等. 2006. 毒死蜱降解菌的分离鉴定与降解效能测定[J]. *环境科学学报*, 26(9):1433-1439
- Wu X W, Hua R M, Cao H Q, *et al.* 2006. Isolation, identification and degradation-efficiency measurement of chlorpyrifos-degrading bacteria[J]. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 26(9):1433-1439 (in Chinese)
- 杨丽, 赵宇华, 张炳欣, 等. 2005. 一株毒死蜱降解细菌的分离鉴定及其在土壤修复中的应用[J]. *微生物学报*, 45(6):905-906
- Yang L, Zhao Y H, Zhang B X, *et al.* 2005. Isolation and characterization of a chlorpyrifos degrading bacteria and its bioremediation application in the soil [J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 45(6):905-906 (in Chinese)
- 周长林. 2004. *微生物学实验与指导* [M]. 北京: 中国医药科技出版社. 91; 131-133
- Zhou C L. 2004. *Experiment and Guide for Microbiology* [M]. Beijing: TCM Science & Technology Publishing House. 91; 131-133 (in Chinese)