

枯草芽孢杆菌 XF1 菌株中 XFsacA 基因的
克隆及功能验证

贾 凡^{1†}, 毛自朝^{1†}, 王志远², 赵 静², 吴毅歆¹, 何月秋^{1,2}
(1 云南农业大学 农学与生物技术学院, 云南 昆明 650201;
2 云南农业大学 农业生物多样性应用技术国家工程中心, 云南 昆明 650201)

摘要:枯草芽孢杆菌 *Bacillus subtilis* XF1 是从土壤中分离的一株利用蔗糖快、能高效防治根肿病的专利菌株. 为探明其高效的蔗糖代谢机制, 用 PCR 从该菌中扩增到蔗糖代谢关键基因蔗糖-6-磷酸水解酶基因 (XF_{sacA} 基因), 其编码的蛋白质氨基酸序列与枯草芽孢杆菌 B168 菌株中的 XF_{sacA} 基因有 97% 的相似性, 且发生了 12 个氨基酸突变. 将该基因中约 1.4 kb 的编码框序列连接到表达载体 pQE30 上, 构建了重组表达质粒 pQE30-XF_{sacA}, 该质粒转入到不能利用蔗糖的 *Escherichia coli* BL21 中, 后者能在以蔗糖为唯一碳源的 M9 无机离子培养基中正常生长, 并表达出了一条约 54 000 蛋白条带. 结果预示 XF_{sacA} 基因氨基酸序列的替代可能是 XF1 高效利用蔗糖的基础, 同时 XF_{sacA} 基因的克隆与其在 *E. coli* 中的表达研究, 为利用蔗糖发酵的工程 *E. coli* 构建奠定了基础.

关键词:枯草芽孢杆菌 XF1; 蔗糖; 代谢; 基因克隆
中图分类号:Q78 **文献标志码:**A **文章编号:**1001-411X(2012)02-0154-05

Cloning and Functional Confirmation of XF_{sacA} Gene from
Bacillus subtilis XF1

JIA Fan^{1†}, MAO Zi-chao^{1†}, WANG Zhi-yuan², ZHAO Jing², WU Yi-xin¹, HE Yue-qiu^{1,2}
(1 Faculty of Agronomy and Biotechnology, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China;
2 National Engineering Center of Agricultural Biodiversity for Applied Technology,
Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China)

Abstract: *Bacillus subtilis* XF1, which is patented and a very efficient biocontrol agent to control clubroot disease of cruciferous crops, grows very quickly when sucrose is used as carbon source. To elucidate the growth promotion mechanism of sucrose, the XF_{sacA} gene, encoding a key enzyme for sucrose metabolism, was amplified by PCR and sequenced. Its amino acid sequence has 97% homolog to *Bacillus subtilis* B168 except 12 amino acids replacement. The coding region of the gene was inserted into plasmid pQE30 to construct an expression plasmid, pQE30-XF_{sacA}. After pQE30-XF_{sacA} was transformed into *Escherichia coli* BL21, which could not use sucrose, a protein band about 54 000 detected by SDS PAGE analysis indicated the gene was successfully expressed in BL21. The function of XF_{sacA} gene was confirmed by the transformed BL21 having the ability to grow and survive in M9 medium with sucrose as sole carbon source. The data indicated that the replacement of 12 amino acids of XF_{sacA} in XF1 strain might improve the efficiency in use of sucrose, and cloning and functional expression of XF_{sacA} in *E. coli* could be a good strategy for developing metabolic engineered *E. coli* strain to use sucrose.

收稿日期:2011-03-15
作者简介: 贾 凡 (1985—), 女, 硕士研究生; 毛自朝 (1969—), 男, 教授, 博士; † 对本文贡献相同; 通信作者: 何月秋 (1956—), 男, 教授, 博士, E-mail: ynfh2007@163.com
基金项目: 科技部国际科技合作项目 (2009DFA32360); 农业部公益性行业 (农业) 科研专项 (201003029); 云南省自然科学基金重点项目 (2008CC024); 云南省科技强省专项 (2009EB060)

Key words: *Bacillus subtilis* XF1; sucrose; metabolism; gene cloning

枯草芽孢杆菌 *Bacillus subtilis* XF1 (下称 XF1) 是云南农业大学农业生物多样性应用技术国家工程中心分离于白菜根际土壤,对根肿病有较好防治作用的生防专利菌株^[1]. 为研究其生物防治机制, XF1 菌株的基因组已被测序,目前正对该基因组进行组装、注释和比较分析(相关数据另文发表). 在对其发酵条件及生物学特性的研究过程中,我们发现该菌在含蔗糖的培养基中菌体生长快,形成菌落大. 这一独特的碳源利用特性有别于枯草芽孢杆菌 B168 (下称 B168)、解淀粉芽孢杆菌植生性亚种 *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarium* B9601-Y2 (下称 Y2). 为研究其独特的蔗糖代谢机制,根据已测定的基因组序列,我们预测了 2 个蔗糖利用的代谢途径,即以 sacB 基因为主,催化蔗糖形成果聚糖和葡萄糖,以及以 sacA 基因为主的催化蔗糖分解的代谢途径^[2]. sacA 基因与 sacP 基因组成一操纵子,其中 sacP 基因参与磷酸烯醇式丙酮酸糖磷酸化转运系统(PTS)对蔗糖转运^[3],而 sacA 基因则编码蔗糖-6-磷酸水解酶,催化蔗糖-6-磷酸水解为葡萄糖-6-磷酸和果糖. 比较基因组分析发现 XF1 与 B168 蔗糖代谢基因的结构及其调控相似,在含 sacB 基因的操纵子(以下称 sacB 操纵子)中还含有 levB 基因(编码内切果聚糖水解酶)和 yveA 基因(编码 Glu/Aap 透性酶),而含 sacP 基因和 sacA 基因的操纵子(以下称 sacA 操纵子)还包含有 ywdA 基因(编码一未知蛋白). sacB 及 sacA 操纵子的转录均受抗终止子 sacY 基因和 sacT 基因的调控. 而含 sacX 基因和 sacY 基因的操纵子(以下称 sacX 操纵子)受双组成信号因子 degS 基因/degU 基因调控的同时也受 sacT 基因和 sacY 基因自身的调节^[4-5].

为探寻 XF1 菌株对蔗糖的高效利用机理,本研究首先利用本地 Blast 对 B168 和 XF1 基因组中的蔗糖利用基因的编码蛋白序列及自起始密码子上游 300 bp 的核酸序列进行比较分析,并对其中氨基酸序列差异较大,编码蔗糖-6-磷酸水解酶基因(XF sacA 基因)进行克隆和功能验证.

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 基因或基因组序列 *Bacillus subtilis* 168 基因组序列从 GenBank (www. ncbi. nlm. nih. gov) 或 Biocyc (www. biocyc. org) 数据库下载,而 XF1 基因

组由云南农业大学农业生物多样性应用技术国家工程中心(简称中心)测序并保存.

1.1.2 化学试剂 蛋白胨、酵母粉、氨苄青霉素、葡萄糖、蔗糖、其他的普通化学试剂,均购于国内外化学药品试剂公司.

1.1.3 XFsacA 基因 PCR 引物 根据 XF1 菌株基因组中预测的 XF sacA 基因序列设计,由上海生工生物工程公司(下称生工公司)合成,上游引物 XF-sacAP1 (5'-GAAGATCT ATG ACAGCACATGACCAG-GAG-3',含 Bgl II 位点和起始密码子 ATG),下游引物 XFsacAP2 (5'-CCCAAGCTTCTACATAA GTGTC-CAAATTCC-3',含 Hind III 位点).

1.1.4 质粒、菌株及分子生物学试剂 PCR 所用 Taq 酶、dNTP、克隆载体 pMD18-T、限制性内切酶以及 T4 连接酶均为 TaKaRa 公司产品,表达载体 PQE30 购于德国 Qiagen 公司, B168 菌株由德国洪堡大学 Borriess 教授惠赠. XF1 菌株 Y2 菌株、克隆宿主 *Escherichia coli* JM109 (下称 JM109) 及表达宿主 *E. coli* BL21 (下称 BL21) 为中心保存. 其他 DNA 操作的试剂盒均为生工公司产品.

1.2 方法

1.2.1 XF1 菌株蔗糖代谢相关基因和注释及比较分析 下载 B168 中的蔗糖代谢相关基因,通过本地 Blast(2. 2. 23 + 版本)对 XF1 基因组进行比较分析,获取相似性最高且大于 85% 的基因并命名(如 XF-sacA 基因,为 XF1 中与 B168 菌株中 sacA 基因相似性最高的基因). 将编码基因翻译后进行本地 BlastP 或 DNAMAN 比较获取氨基酸变异或替代信息;下载各相似基因 ATG 上游的 300 bp 序列,用 Blastn 或 DNAMAN 比较这些基因调控序列间的同源关系.

1.2.2 XF1 基因组 DNA 的提取 活化 XF1 菌株,挑单菌落接种于 LB 培养基中,30 °C, 170 r/min 震荡培养 12 ~ 16 h, 12 000 r/min 离心收集菌体用于基因组 DNA 的提取,提取方法参照 Wilson^[6].

1.2.3 XFsacA 基因的克隆 以基因组 DNA 为模板,设计的 sacAP1 和 sacAP2 为引物,进行 sacA 基因的 PCR 扩增. PCR 反应体系(总体积 50 μL)含: 5 μL 10 × ExTaq 缓冲液, 2.5 μL 10 mmol/L 的 dNTP, 各 1 μL 50 mmol/L 的引物, 1.5 × ExTaq. PCR 反应条件: 94 °C 3 min, 94 °C 1 min, 55 °C 45 s, 72 °C 1.5 min, 25 个循环; 72 °C 10 min. PCR 扩增产物以琼脂糖凝胶(8 g/L)电泳分离纯化,纯化后的产物与 pMD18-T

载体连接,连接产物转入 JM109 感受态细胞中进行蓝白斑筛选,挑取白斑经菌液 PCR 鉴定之后送生工公司测序,并将所获质粒命名为 pMDsacA.

1.2.4 重组表达质粒的构建 提取 pMDsacA 质粒,与表达载体 pQE30 同时使用限制性内切酶 *Bgl* II 和 *Hind* III 进行双酶切,经琼脂糖凝胶电泳后,分离纯化目的基因和表达载体;纯化后的产物用 T4 - 连接酶连接,连接产物转入 JM109 中.转化子经 PCR 验证.

1.2.5 蔗糖-6-磷酸水解酶的诱导表达 将空载体(pQE30)及重组质粒(pQE30-XFsacA)转入表达宿主 BL21 菌株中.所获菌株 pQE30/BL21 及 pQE30-XFsacA/BL21 在氨苄抗性的 LB 固体培养基平板上活化后,次日挑取单菌落接种于 5 mL 氨苄抗性的液体 LB 培养基中,37 ℃,200 r/min,震荡培养过夜(12~16 h).之后按体积比 1:100 转接于 100 mL 氨苄青霉素抗性的液体 LB 培养基中,37 ℃,200 r/min 震荡培养,待 $D_{600\text{ nm}}$ 达到 0.4~0.6 时,加入浓度为 0.1 mol/L 的 IPTG 至终浓度为 1 mmol/L,此时将温度调至 30 ℃,200 r/min 震荡培养.在诱导 4 h 后,取样做十二烷基磺酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分析^[7].

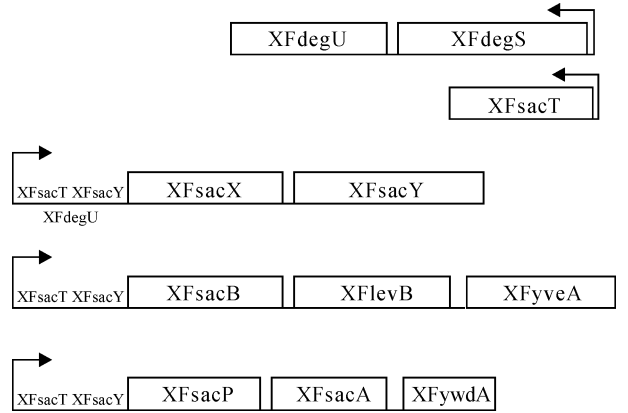
1.2.6 XFsacA 的功能验证 使用含 25 g/L 蔗糖的 M9 液体培养基(17 g Na_2HPO_4 、3 g KH_2PO_4 、0.5 g NaCl 、1.0 g NH_4Cl ,加水定容至 1 L)分别培养经 IPTG 诱导 4 h,携带空载体 pQE30 及重组表达质粒 pQE30-XFsacA 的 BL21 菌株,定期取样监测菌体生长及上清液中蔗糖含量变化.菌体浓度采用分光光度法测定 $D_{600\text{ nm}}$ 的变化,上清液中蔗糖的含量测定采用蒽酮-硫酸法^[8].

2 结果与分析

2.1 XF1 菌株基因组中蔗糖代谢相关基因的注释及与模式菌株 *B. subtilis* B168 基因组的比较分析

用 B168 基因组中蔗糖代谢相关基因序列为参考序列,通过本地 Blast 分析测序的 XF1 基因组数据.结果(图 1)表明:XF1 基因组中含有与 B168 菌株相似的 XFsacB 和 XFsacA 操纵子,相应的调控基因 XFsacX、XFsacY、XFsacT 及双组成信号传递系统 XFdegS 和 XFdegU 基因及相应的操纵子.比较 B168 和 XF1 菌株中上述基因编码的蛋白序列,发现除 XFsacA 和 XFsacB 外,其他 XF1 中编码蔗糖代谢相关的基因均与 B168 菌株中的基因具有完全相同的相似性.而 XFsacB 基因编码蛋白有 13 个氨基酸的缺失(IYMLGYFSISLPA)和 2 个基因的突变(S69→P;K174→H),其相似性为 96%;相应的 XFsacA 有 12 个氨基酸的替换(L8→F, N24→D, V56→A,

C315→Y, G358→E, K367→N, T371→A, H397→Y, K408→T, I441→M, L448→F, A465→S),其相似性为 97%;sacP 有 1 个氨基酸的替换和 1 个氨基酸的缺失(D93→N, △ N190),其相似性为 99%(表 1).用上述基因起始密码子(通常为 ATG, XFsacT 和 XFsacX 为 TTG)上游 300 bp 的调控序列比对 B168 基因组,发现上述基因的调控序列与 B168 基因组序列均有 98% 以上的相似性.这些生物信息学的分析结果预示 XF1 中 XFsacA、XFsacP 和 XFsacB 的氨基酸序列改变可能是导致该生物防治菌株具有高效蔗糖利用效率的主要原因,为证实这一假设,我们首先对 XFsacA 基因的编码区序列进行 PCR 克隆.



箭头表示操纵子的转录方向,显示 sacT、XFsacY 正调控 XFsacX、XFsacA 和 XFsacB 操纵子;degU 正调控 XFsacX 操纵子.

图 1 枯草芽孢杆菌 XF1 中蔗糖代谢与调控相关基因的结构及调控关系

Fig. 1 The organization of sucrose metabolic related to genes and their regulation in *Bacillus subtilis* XF1

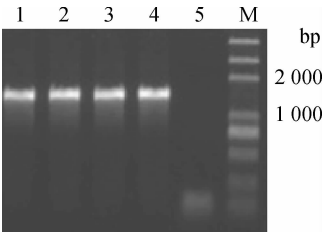
表 1 枯草芽孢杆菌 XF1 和 B168 菌株蔗糖代谢相关基因的比较分析

Tab.1 Comparison of genes related to sucrose metabolism between genomes of *Bacillus subtilis* strains XF1 and B168

基因	基因编码区氨基酸	基因上游调控
B168 菌株	XF1 菌株	序列相似性/%
168degS	XFdegS	100
168degU	XFdegU	100
168sacT	XFstacT	100
168sacX	XFstacX	100
168sacY	XFstacY	100
168sacB	XFstacB	96
168sacA	XFstacA	97
168sacP	XFstacP	99

2.2 XFsacA 基因编码区序列的 PCR 扩增 以 XF1 菌株的基因组 DNA 为模板进行 PCR 扩增,以 8 g/L 琼脂糖凝胶电泳检测产物.所得片段约

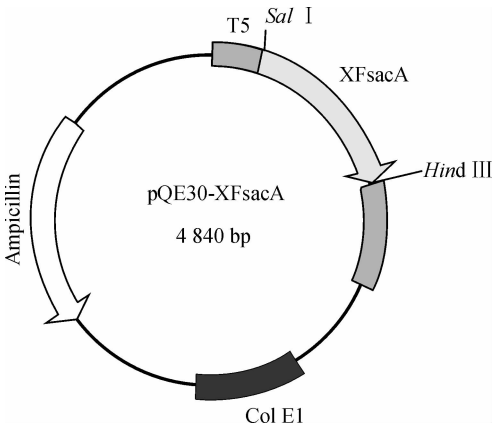
1.4 kb(图2),该片段与预期扩增目的片段大小相符.扩增片段经电泳分离纯化,连接入 pMD18 中,经测序分析确定无突变后命名为 pMD_{sac}A. PCR 扩增片段序列与基因组测序的序列完全一致,即 XF_{sac}A 基因编码的蛋白相对于模式菌株 B168 的序列发生了如下氨基酸替换:亮氨酸₈ - 苯丙氨酸;天冬酰胺₂₄ - 天冬氨酸;缬氨酸₅₆ - 丙氨酸;半胱氨酸₃₁₅ - 酪氨酸;甘氨酸₃₅₈ - 谷氨酸;赖氨酸₃₆₇ - 天冬氨酸;苏氨酸₃₇₁ - 丙氨酸;组氨酸₃₉₇ - 酪氨酸;赖氨酸₄₀₈ - 苏氨酸;异亮氨酸₄₄₁ - 甲硫氨酸;亮氨酸₄₄₈ - 苯丙氨酸;丙氨酸₄₆₅ - 丝氨酸.上述突变中除缬氨酸₅₆ - 丙氨酸,苏氨酸₃₇₁ - 丙氨酸,丙氨酸₄₆₅ - 丝氨酸这3个突变对蛋白结构影响较小外,其余9个氨基酸的替代可能对其结构与功能有较大的影响.



M: DNA Marker; 1~4: XF_{sac}A 基因编码区 PCR 扩增产物;5:对照
图2 XF_{sac}A 基因编码区的 PCR 扩增
Fig.2 PCR amplification of coding region sequence of XF_{sac}A gene

2.3 重组表达质粒 PQE30-XF_{sac}A 的构建

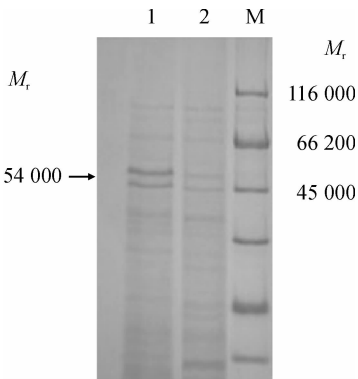
对 pMD-XF_{sac}A 质粒进行 Bgl II 和 Hind II 双酶切,回收 1.4 kb 的 XF_{sac}A 基因,插入到表达载体 pQE30 BamH I 和 Hind III 的位点上,转入 JM109 菌株的感受态中.通过菌液 PCR 检测,获得阳性菌落.将所获表达载体命名为 pQE30-XF_{sac}A(图3).



Ampicillin: 氨苄青霉素抗性基因, T5: T5 启动子, ColE1: 质粒在大肠埃希菌中的复制位点, XF_{sac}A: 枯草芽孢杆菌 XF1 中蔗糖 - 6 - 磷酸水解酶编码区序列.
图3 表达载体 pQE30-XF_{sac}A 图示
Fig.3 Map of the expression vector pQE30-XF_{sac}A

2.4 XF_{sac}A 基因的诱导表达

将重组质粒 pQE30-XF_{sac}A 转入原核表达宿主 BL21 中得转化菌株 pQE30-XF_{sac}A/BL21,该菌株过夜培养后,以体积比 1: 100 稀释,再培养于含氨苄青霉素的 LB 培养基中,待 D_{600 nm} 至 0.5 ~ 0.6 时,加入 0.1 mmol/L 的 IPTG 使其终浓度 1 mmol/L,诱导表达,取 4 h 诱导培养的菌体提取可溶性蛋白用于 SDS-PAGE 检测.结果显示,与未转基因对照相比,在 54 000 附近有增强表达的蛋白条带(图4),与目标蛋白相对分子质量基本一致,表明 XF_{sac}A 基因获得表达.



M: 蛋白相对分子质量标准;1: *E. coli* BL21/pQE30-XF_{sac}A;2: 对照 *E. coli* BL21/pQE30.
图4 XF_{sac}A 在 *E. coli* BL21 菌株中的表达
Fig.4 The expression of XF_{sac}A in *E. coli* BL21

2.5 含表达质粒转化子的功能验证

使用含 25 g/L 蔗糖的 M9 液体培养基,分别培养经 IPTG 诱导携带空载体 pQE30 及重组表达质粒 pQE30-XF_{sac}A 的 BL21 菌株,定期取样监测菌液 D_{600 nm} 和蔗糖含量的变化(图5).携带重组表达质粒 pQE30-XF_{sac}A 的菌株在只添加蔗糖为唯一碳源的 M9 培养基中能够正常生长,而携带空载体的菌株在其中基本不能生长.在 25 h 的培养中,pQE30-XF_{sac}A/BL21 菌液 D_{600 nm} 在 17 h 达到最高,为 0.749,且蔗糖在 21 h 基本消耗完,这说明该 XF_{sac}A 基因在 *E. coli* 中得到很好的表达,并赋予了 *E. coli* 蔗糖利用的能力.

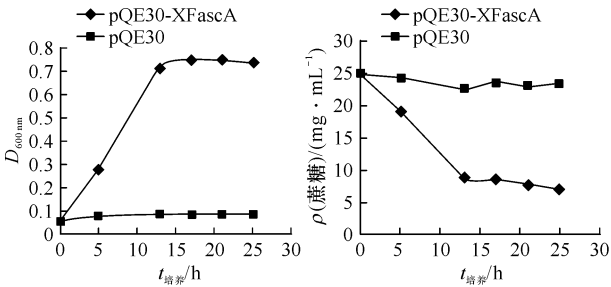


图5 不同时期菌液 D_{600 nm} 及蔗糖质量浓度的变化曲线图
Fig.5 The curve of D_{600 nm} and sucrose consumption of bacteria liquid in different time

3 讨论

蔗糖是自然界中储量丰富并较廉价的二糖. 其作为植物的主要运输糖类, 在体内有渗透调节和提高植物抗性的作用. 蔗糖主要从甘蔗和甜菜中提取获得. 多数微生物均能在仅含蔗糖为碳源的培养基中生长. 枯草芽孢杆菌 B168 菌株的蔗糖代谢主要有以 *sacB* 催化为主的胞外途径, 其催化蔗糖转化为果聚糖和葡萄糖, 后者被细胞吸收并转化利用. 另一条则以 *sacA*、*sacP* 为主的胞内代谢途径, 蔗糖通过含 *sacP* 在内的 PTS 系统, 在消耗高能分子磷酸烯醇式丙酮酸后, 将蔗糖从胞外转运到胞内并转化为蔗糖-6-磷酸^[4-5]. 蔗糖-6-磷酸在 *sacA* 编码产物的作用下水解为葡萄糖-6-磷酸和果糖, 葡萄糖-6-磷酸直接进入糖代谢, 果糖在己糖或果糖激酶的催化下利用 ATP 活化为果糖-6-磷酸而进入糖代谢. *sacA* 操纵子和 *sacB* 操纵子的表达均受抗终止转录因子 *sacT* 和 *sacY* 的正调控和 *sacX* 的负调控. *sacX* 和 *sacY* 组成以操纵子的表达受 *sacY* 自身和双组成 *degS*、*degU* 及培养基中蔗糖的调节(图2). 我们的专利生防菌株枯草芽孢杆菌 XF1 在含蔗糖的培养基中生长快速, 这一独特的特征有别于同一物种不具生物防治功能的 B168 菌株.

通过基因组比较分析, 我们发现 XF1 和 B168 菌株中, 蔗糖代谢调控相关基因的编码蛋白没有变化. 各基因的调控序列均有高达 98% 的相似性. 蔗糖转运相关蛋白 *sacP* 有 99% 相似性, 而 *sacB* 和 *sacA* 差异较大, 可能是生物防治菌株 XF1 高效利用蔗糖的基因基础. 因在胞外途径中蔗糖只有其中的葡萄糖被利用, 而果糖形成果聚糖, 且许多菌株异源表达 *sacB* 基因, 在约 5% 的高蔗糖浓度培养基中出现生长限制和致死的表型^[2]. 我们初步推论 XF*sacA* 可能是该菌高效蔗糖利用的基因基础.

E. coli BL21 菌株, 含有蔗糖转运的 PTS 系统, 和相应的己糖激酶或果糖激酶^[9], 但缺少蔗糖-6-磷酸或蔗糖水解酶, 单一 β -果糖呋喃糖苷酶(β -Fructofuranosidase)的准入就能赋予其蔗糖利用能力^[1], 因而是很好的 XF*sacA* 基因功能验证宿主. 我们克隆 XF*sacA* 基因, 构建其 *E. coli* 表达载体, 转化 *E. coli* BL21 菌株, 在 IPTG 的诱导下获得表达, BL21 菌株获得蔗糖利用能力, 说明该基因编码蔗糖水解酶, 并能活性表达.

E. coli BL21 菌株, 因其安全性、清晰的遗传背景和基因组的易操作性, 是目前被工程化修饰而用

于多种高附加值产品的发酵生产的菌株^[10]. *E. coli* BL21 菌株不能利用蔗糖的特性限制了其发酵产品的生产成本. XF*sacA* 基因的克隆和功能表达为代谢工程改造 *E. coli*, 利用蔗糖为发酵碳源准备了基础.

因植物含有较多的被运输或储藏的蔗糖, 我们推测 XF1 菌株高效蔗糖利用能力容易使其增加定殖能力而提高其生物防治功能. 因此阐述该菌高效蔗糖利用的基因基础不但可揭示枯草芽孢杆菌 XF1 的生物防治机制, 也为利用 XF*sacA* 基因来提高其他生物防治菌的病原拮抗活性准备了条件.

参考文献:

- [1] 范成明. 土壤生物消毒对大白菜根肿病的防效评估及防治机理研究[D]. 昆明: 云南农业大学, 2007.
- [2] 吴菁, 刘秀敏, 张维, 等. 枯草芽孢杆菌 *sacB* 基因的功能验证及应用[J]. 核农学报, 2008, 22(5): 590-594.
- [3] TORTOSA P, LE COQ D. A ribonucleic antiterminator sequence (RAT) and a distant palindrome are both involved in sucrose induction of the *Bacillus subtilis* *sacXY* regulatory operon[J]. Microbiology, 1995, 141: 2921-2927.
- [4] TORTOSA P, DECLERCK N, DUTARTRE H, et al. Sites of positive and negative regulation in the *Bacillus subtilis* antiterminators LicT and SacY [J]. Molecular Microbiology, 2001, 41(6): 1381-1393.
- [5] CRUTZ A M, STEINMETZ M. Transcription of the *Bacillus subtilis* *sacX* and *sacY* genes, encoding regulators of sucrose metabolism, is both inducible by sucrose and controlled by the DegS-DegU signaling system[J]. Journal of Bacteriology, 1992, 10: 6087-6095.
- [6] WILSON K. Preparation of genomic DNA from bacteria [M] // AUSUBUL F M, BENT R. Current protocols in molecular biology. New York: J Wiley & Sons, 1987: 10-12.
- [7] 萨姆布鲁克 J, 拉塞尔 D W. 分子克隆实验指南[M]. 3版. 金冬雁, 译. 北京: 科学出版社, 2002: 1228-1232.
- [8] 李利军, 孔红星, 陆丹梅. 蒽酮-硫酸法快速测定蔗糖的研究及应用[J]. 食品工业科技, 2003, 24(10): 145-149.
- [9] LOPIAN L, ELISHA Y, NUSSBAUM-SHOCHAT A, et al. Spatial and temporal organization of the *E. coli* PTS components[J]. EMBO J, 2010, 29(21): 3630-3645.
- [10] LEE J W, CHOI S, PARK J H, et al. Development of sucrose-utilizing *Escherichia coli* K-12 strain by cloning β -fructofuranosidases and its application for L-threonine production[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2010, 88: 905-913.