

# 深海沉积物微生物宏基因组文库中IMP环水解酶的筛选及基因克隆\*

陈兴麟<sup>1</sup> 赵晶<sup>2</sup> 徐宪忠<sup>1</sup> 曾润颖<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup>国家海洋局第三海洋研究所, 海洋生物遗传资源重点实验室 厦门 361005)

(<sup>2</sup>厦门大学海洋与环境学院, 海洋技术与工程系 厦门 361005)

**摘要** 为了解嘌呤合成途径的关键酶——IMP环水解酶的多样性, 从深海沉积物样品中提取总DNA构建Cosmid宏基因组文库, 从中筛选出一个具有IMP环水解酶活性的克隆(CAIMP1)。通过基因步移的方法从CAIMP1的约35 kb的插入片段中扩增出长度为1 599 bp的完整的IMP环水解酶基因, 该基因包含MGS和AICARFT\_IMPCHas两个保守结构域。活性检测结果表明CAIMP1克隆的发酵液上清具有较强的IMP环水解酶活性。该酶与数据库中收录的IMP环水解酶的氨基酸序列同源性较低, 系统发育分析也表明该酶与其它参照序列亲缘关系较远, 表明该序列可能为一个新的IMP环水解酶基因。图5 表3 参17

**关键词** 深海沉积物; 宏基因组文库; IMP环水解酶; 保守结构域

CLC Q936

## Screening and Cloning of IMP Cyclohydrolase from a Metagenomic Cosmid Library of a Deep-sea Sediment Sample\*

CHEN Xinglin<sup>1</sup>, ZHAO Jing<sup>2</sup>, XU Xianzhong & ZENG Runying<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup>Key Laboratory of Marine Biogenetic Resources, Third Institute Oceanography, State Oceanic Administration of China, Xiamen 361005, China)

(<sup>2</sup>Marine and Environment College, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

**Abstract** IMP cyclohydrolase is a key enzyme in the purine synthesis pathway. A clone (CAIMP1) producing IMP cyclohydrolase activity was isolated from a metagenomic library which was constructed from metagenomic DNA of a deep-sea sediment sample. The gene coding for the IMP cyclohydrolase with the size of 1 599 bp was subcloned from the 35 kb inserted fragment of CAIMP1 by gene walking. Two conserved domains, MGS and AICARFT\_IMPCHas, was found in the gene. The CAIMP1 exhibited high activity towards 5-formaminoimidazole-4-carboxamide ribonucleotide (FAICAR). The alignment and phylogenetic analysis of amino acid sequence of the CAIMP1 IMP cyclohydrolase showed that it had low homology with other referenced sequences in GenBank, indicating that it might be a new sequence. Fig 5, Tab 3, Ref 17

**Keywords** deep-sea sediment; metagenomic library; IMP cyclohydrolase; conserved domain

CLC Q936

嘌呤核苷酸的从头合成途径所产生的嘌呤在许多细胞过程中必不可少, 例如参与DNA和RNA的合成, 在氧化还原反应(NADH、NADPH、FAD等)中作为化学反应的能量来源(ATP), 并在一些调控途径中作为信号分析(cAMP)等<sup>[1]</sup>。由于癌细胞需要大量的嘌呤以维持其加速增长, 因此嘌呤从头合成途径作为癌症化疗的研究目标而得到重视<sup>[2]</sup>。嘌呤的从头合成途径包含10步由不同的酶催化的反应, 可将磷酸核糖焦磷酸转化为次黄嘌呤核苷酸(Inosine monophosphate, IMP), 该途径共有10步反应<sup>[3]</sup>。其中, 最后两步反应是将AICAR(5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleotide)转化成FAICAR(5-formaminoimidazole-4-carboxamide ribonucleotide), 然后将FAICAR再转化成IMP。这两步反应在不同的生物体内以不同的途径进行。IMP环水解酶是一个双功能酶<sup>[4]</sup>, 它能催化AICAR转化成FAICAR, 紧接着将

FAICAR转化成IMP, 是嘌呤从头合成途径最后两步的关键酶, 因此已得到较为广泛的研究<sup>[5]</sup>。

目前为止所研究的IMP环水解酶大多来源于陆地的动物、植物以及近海的微生物, You-Na Kang等对*Methanothermobacter thermoautotrophicus*的IMP环水解酶基因MTH1020进行了异源表达<sup>[6]</sup>; Toko Akira等对来自大白鼠肝脏RNA反转录的cDNA文库中IMP环水解酶基因进行异源表达, 并与人的IMP环水解酶基因进行了比较<sup>[7]</sup>; Ralf Boldt等对IMP环水解酶参与的IMP合成在高等植物固氮代谢中的作用进行了分析<sup>[8]</sup>; Marion Graupner对*Methanococcus jannaschii*中的IMP环水解酶进行了研究, 测定了其活性, 并在该细菌中发现了原来认为只存在于古菌的*pruO*基因<sup>[9]</sup>。这些研究均从生长于温和条件下的生物体入手, 研究IMP环水解酶基因的特点。而生活在极端环境中的微生物具有特殊的生理代谢机制, 因此其IMP环水解酶具有特殊的研究意义, 但目前这方面的研究尚未见报道。其主要原因可能是极端微生物的培养不易, 而且环境样品中的微生物绝大部分无法通过现有技术进行人工培养。而宏基因组技术有效地避开了微生物分离纯

收稿日期: 2010-11-15 接受日期: 2011-03-21

\*中国大洋协会项目(No. DYXM-115-02-2-04)资助 Supported by the Project of the China Ocean Mineral Resources R & D Association(No. DYXM-115-02-2-04)

\*通讯作者 Corresponding author (E-mail: runyingzeng@yahoo.com.cn)

化培养的问题,可以直接获得各种功能基因,扩大了微生物资源利用的空间.本研究通过构建深海沉积物样品的微生物宏基因组文库,筛选出能产生IMP环水解酶的克隆,并获得新的IMP环水解酶基因,为IMP环水解酶的多样性研究及极端微生物的嘌呤合成机制研究提供了参考资料.

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 主要实验材料

深海样品为东太平洋5 378 m深的海底沉积物(157°24' E, 19°30' N),样品采用多管采样器采集.样品采集后保存于-20 °C,带回实验室在无菌超净台内去除表层后进行分装,转移至-80 °C保存.构建宏基因组文库所需的试剂盒为SuperCos 1 Cosmid Vector kit和Gigapack III XL Packaging Extract,购自Stratagene公司;Genome Walking Kit 购于TaKaRa.

### 1.2 引物

根据数据库中已知序列设计相关引物,如表1.

### 1.3 宏基因组文库的构建

深海沉积物微生物总DNA采用原位裂解法提取<sup>[10]</sup>,提取后的总DNA用脉冲凝胶电泳进行检测(电压450 V,脉冲时间0.8 s,电流110~120 mA,时间3~4 h),将符合建库大小的片段(30~45 kb)用GELase™ Agarose Gel-Digesting Preparation (Epicentre)进行回收与纯化.宏基因组文库的构建参照试剂盒说明书进行,主要步骤如下:将回收后的DNA补平后与试剂盒所提供的pWEB::TNC Cosmid载体连接.连接产物与包装蛋白进行包装后,加入500 μL噬菌体稀释液混匀,并加入25 μL氯仿后于4 °C保存.以10 μL已包装的Cosmid为单位,分批次转染宿主菌*E. coli* EPI 100-T1,并涂布于LB(含200 μg/mL Amp)的培养基上进行培养,挑单菌落于LB液体培养基中培养,待菌长出后,加入甘油(终浓度20%),保存于-70 °C.

### 1.4 产IMP环水解酶克隆的筛选及基因克隆

以所提取的深海沉积物微生物总DNA为模板,利用上述简并引物,采用不同的配对进行扩增.PCR反应条件为:95 °C 2 min,然后95 °C 1.5 min,55 °C 1.5 min,72 °C 1.5 min,循环30圈,继续72 °C 10 min.PCR产物用1%琼脂糖凝胶进行检测,将各条带从凝胶上回收,与pTA-2载体(Toyobo)连接后进行测序,通过序列比对,确定可稳定扩增出IMP环水解酶

基因的引物配对.

将宏基因组文库克隆分别接种于96孔板中进行培养,待菌长出后,以96孔板上同一行为一组,每组均从12个孔中各吸取20 μL菌液混合,接入5 mL LB液体培养基(含200 μg/mL Amp),在37 °C培养12 h,提取混合质粒,并以所提取的质粒为模板,采用已确定的引物对进行PCR扩增.对可扩增出目的条带的组所对应的12个克隆进一步分别进行PCR反应,从而最终确定含有IMP环水解酶基因的阳性克隆.

根据从阳性克隆中扩增出的IMP环水解酶基因片段,采用Genome Walking试剂盒(Takara)进行步移,最终获得完整的IMP环水解酶基因,基因序列分析采用DNAMAN软件进行,系统发育树的构建采用ClustalW软件进行.

### 1.5 IMP环水解酶活性测定

将37 mg的甲酸钠加入250 μL 98%的甲酸溶液中,再加入20 μmol的AICAR钼盐.然后加入500 μL的乙酸酐,在室温下轻柔混匀.放置10 min后,将混合液移至50 °C水浴锅,静置20 min,冷却后冷冻干燥.将干燥粉末溶于2 mL无菌水中,离心取上清,并用氨水调节pH=6,制作成FAICAR溶液.

挑取阳性克隆及部分阴性克隆,在37 °C发酵16 h.离心取上清进行IMP环水解酶活性的测定<sup>[4]</sup>.在200 μL体系中加入20 μL TES/K+(180 mmol/L)溶液、72 μL Mg<sup>2+</sup>(25 mmol/L)、14 μL FAICAR(10 mmol/L)溶液和94 μL发酵上清,在60 °C条件下反应15 min后测量D<sub>249 nm</sub>,分别以失活酶液及LB液体替代发酵上清液作为阴性对照和空白对照.

## 2 结果与分析

### 2.1 IMP环水解酶基因克隆

将正向引物OFX1~3和反向引物ACR1~4引物进行组合,将其编号为引物组1~12(表2).以样品宏基因组为模板,用这12对引物进行PCR扩增.结果发现只有1、3、5、7、9、11引物对可扩增出条带(图1).引物对1、3在退火温度50 °C有糊状条带,当退火温度提高到55 °C时则没有扩增片段.而5、7、9、11号引物组在退火温度为55 °C时均有较为清晰的大小约2 200 bp左右的片段,将此片段回收纯化并进行测序,结果表明该片段均包含有相同的IMP环水解酶基因,但一端仍有部分序列不完整.根据已知信息,设计筛选引物SHF和SHR,其预计扩增片段大小为653 bp.

表1 引物设计

Table 1 Primer design

引物编号 Primer No.	序列 Sequence <sup>1)</sup>	备注 Remark
OFX1	5'-CCY GTK GTS YTN GTN CAY GG	针对IMP环水解酶基因的简并引物 Degenerate primer for IMP cyclohydrolase gene
OFX2	5'-CCR ATM RTW YTN GTN CAY GG	针对IMP环水解酶基因的简并引物 Degenerate primer for IMP cyclohydrolase gene
OFX3	5'-CCK YTW GTK YTN GTN CAY GG	针对IMP环水解酶基因的简并引物 Degenerate primer for IMP cyclohydrolase gene
ACR1	5'-AGG CCN CCC AKN GAR TGN SC	针对IMP环水解酶基因的简并引物 Degenerate primer for IMP cyclohydrolase gene
ACR2	5'-AGR CCN CCC AKR CTR TGN SC	针对IMP环水解酶基因的简并引物 Degenerate primer for IMP cyclohydrolase gene
ACR3	5'-AGG CCR CCN TGN GAR TGN SC	针对IMP环水解酶基因的简并引物 Degenerate primer for IMP cyclohydrolase gene
ACR4	5'-AGG CCN CCN TGR CTR TGN SC	针对IMP环水解酶基因的简并引物 Degenerate primer for IMP cyclohydrolase gene
SHF	5'-CGC GGC GGG CAT TAC CGT GA	筛选引物(正向) Screening primer (forward)
SHR	5'-GCC TGC TGA TGC GGG TTT TC	筛选引物(反向) Screening primer (reverse)
IMPF	5'-CGCGATCCATGACCACCTCGACGCTT	IMP环水解酶基因扩增正向引物 IMP cyclohydrolase gene amplification forward primer
IMPR	5'-AAGTCGACATGGCGGAAGTGACGCAT	IMP环水解酶基因扩增反向引物 IMP cyclohydrolase gene amplification reverse primer

1) K=G, T; S=G, C; R=A, G; N=A, G, C, T; Y=C, T; W=A, T

表2 简并引物组编号  
Table 2 No. of degenerate primer group

引物 Primer	ACR1	ACR2	ACR3	ACR4
OFX1	1	2	3	4
OFX2	5	6	7	8
OFX3	9	10	11	12

以SHF和SHR为引物对文库进行筛选,共进行了32组克隆的筛选,获得了1个含有IMP环水解酶基因的阳性克隆,编号为CAIMP1.图2是部分筛选结果.采用染色体步移试剂盒获得了IMP环水解酶的完整基因,根据测序及拼接结果最终设计引物IMPf和IMPr,对CAIMP1进行扩增(图3),对扩增产物进行验证,测序结果与步移结果一致,将编码该IMP环水解酶的基因命名为*caimp1*,该基因大小为1 599 bp,在GenBank中的登录号为JF747230.

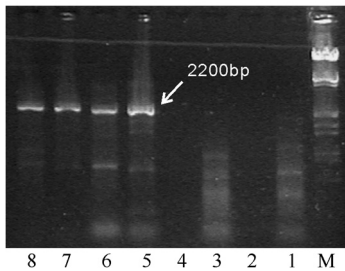


图1 相关引物组扩增情况

Fig. 1 Gene amplification with designed primers

M.  $\lambda$ DNA/*EcoR*I + *Hind*III; 1、3泳道引物对分别为1号和3号,退火温度50°C; 2、4泳道引物对分别为1号和3号,退火温度55°C; 5~8泳道引物对分别为5、7、9、11号,退火温度55°C

M.  $\lambda$ DNA/*EcoR*I + *Hind*III; Line 1 and 3: Correspond primer pair 1 and 3, with annealing temperature 50°C; Line 2 and 4: Correspond primer pair 1 and 3, with annealing temperature 55°C; Line 5~8: Correspond primer pair 5, 7, 9, 11, with annealing temperature 55°C

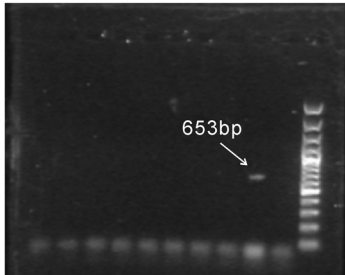


图2 引物SHF和SHR筛选的部分结果

Fig. 2 Partial results using primers SHF and SHR

M. 100 bp Marker; 1为阴性对照; 2~10为PCR扩增结果

M. 100 bp Marker; 1. Control; 2~10: Results of PCR amplification

## 2.2 CAIMP1环水解酶序列分析

*Caimp1*基因编码一个由535个氨基酸残基组成的蛋白质,其相对分子质量预计为56 107,通过Blastx比较发现,CAIMP1的氨基酸序列与嗜麦芽窄食单胞菌(*Stenotrophomonas maltophilia*)的IMP环水解酶同源性最高.选取数据库中与之同源性最高的13株细菌的IMP环水解酶氨基酸序列一起构建系统发育树(图4).系统发育分析表明,这些IMP环水解酶可以分为3个簇,与CAIMP1最为接近的簇包含来自黄单胞菌科(Xanthomonadaceae)的4个氨基酸序列,CAIMP1与其中3个黄单胞菌属(*Xanthomonas*)菌株

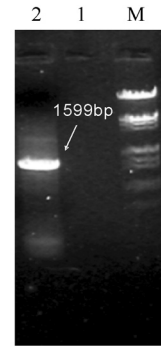


图3 *caimp1*基因扩增结果

Fig. 3 Amplification of *caimp1* gene

M.  $\lambda$ DNA/*EcoR*I + *Hind*III; 1为阴性对照; 2为PCR扩增结果

M.  $\lambda$ DNA/*EcoR*I + *Hind*III; 1: Control; 2: Results of PCR amplification

的IMP环水解酶的同源性在66.67%~67.04%之间<sup>[11-12]</sup>,与来自嗜麦芽窄食单胞菌(*Stenotrophomonas maltophilia*)的同源性为68.16%.系统发育树上中间一簇有8个菌株,同样来自于 $\gamma$ -变形菌纲的细菌.该簇的氨基酸序列与CAIMP1的同源性在59.22%~62.38%之间.最远的一簇中的睾丸酮丛毛单胞菌<sup>[13]</sup>(*Comamonas testosteroni*)来自 $\beta$ -变形菌纲,其IMP环水解酶与CAIMP1的同源性只有55.40%.

值得注意的是,来源于同一科的IMP环水解酶氨基酸序列极为相似.例如,4个源于黄单胞菌科细菌的氨基酸序列(*X. campestris*、*X. axonopodis*、*X. Oryzae*<sup>[14]</sup>以及*S. maltophilia*)大小均为527aa,同源性达到94.78%.除*S. maltophilia*外,同属的3个氨基酸序列同源性更是高达98.04%,并且起始的45个氨基酸以及结尾处的12个氨基酸完全一致.

此外,3个来源于肠内细菌科(Enterobacteriaceae)的IMP环水解酶氨基酸序列(*Yersinia enterocolitica*<sup>[15]</sup>、*Escherichia coli*<sup>[14]</sup>、*Salmonella enterica*<sup>[16]</sup>),其大小均为529aa,同源性也达到94.20%.这在一定程度上说明,亲缘关系较近的菌株,其IMP环水解酶的氨基酸序列也极为相似.而CAIMP1与所有菌株的氨基酸序列最高相似度仅为68.16%,说明CAIMP1中的IMP环水解酶可能来源于新的科.

## 2.3 CAIMP1环水解酶功能预测

检索Sanger数据库,CAIMP1可分为两部分(图5),依次为甲基乙二醛合成酶结构域(MGS-like domain)和一个双功能酶. MGS结构域能与异构鸟氨酸效应器结合,形成一个调节区,该结构域所在家族普遍具有一个磷酸结合位点.而AICARFT\_IMPCHas双功能酶在原核生物及真核生物中均广泛存在,它具有5-氨基咪唑-4-羧胺核苷酸甲酰基转移酶(EC: 2.1.2.3)活性,能在存在10-甲基四氢叶酸的情况下,催化AICAR甲酰化为FAICAR,并产生四氢叶酸.它还具备IMP环水解酶(EC: 3.5.4.10)活性,能进一步环化FAICAR为IMP.

## 2.4 CAIMP1克隆的IMP环水解酶活性检测

随机选取8个用筛选引物(SHF和SHR)没有扩增出条带的克隆以及CAIMP1克隆进行发酵,检测发酵上清中IMP环水解酶的酶活(表3).结果表明在空白和阴性对照组中,以LB培养基和失活酶液进行测定,均没有检测到反应系统中IMP的产生;进一步将同一个宏基因组文库中不含有IMP

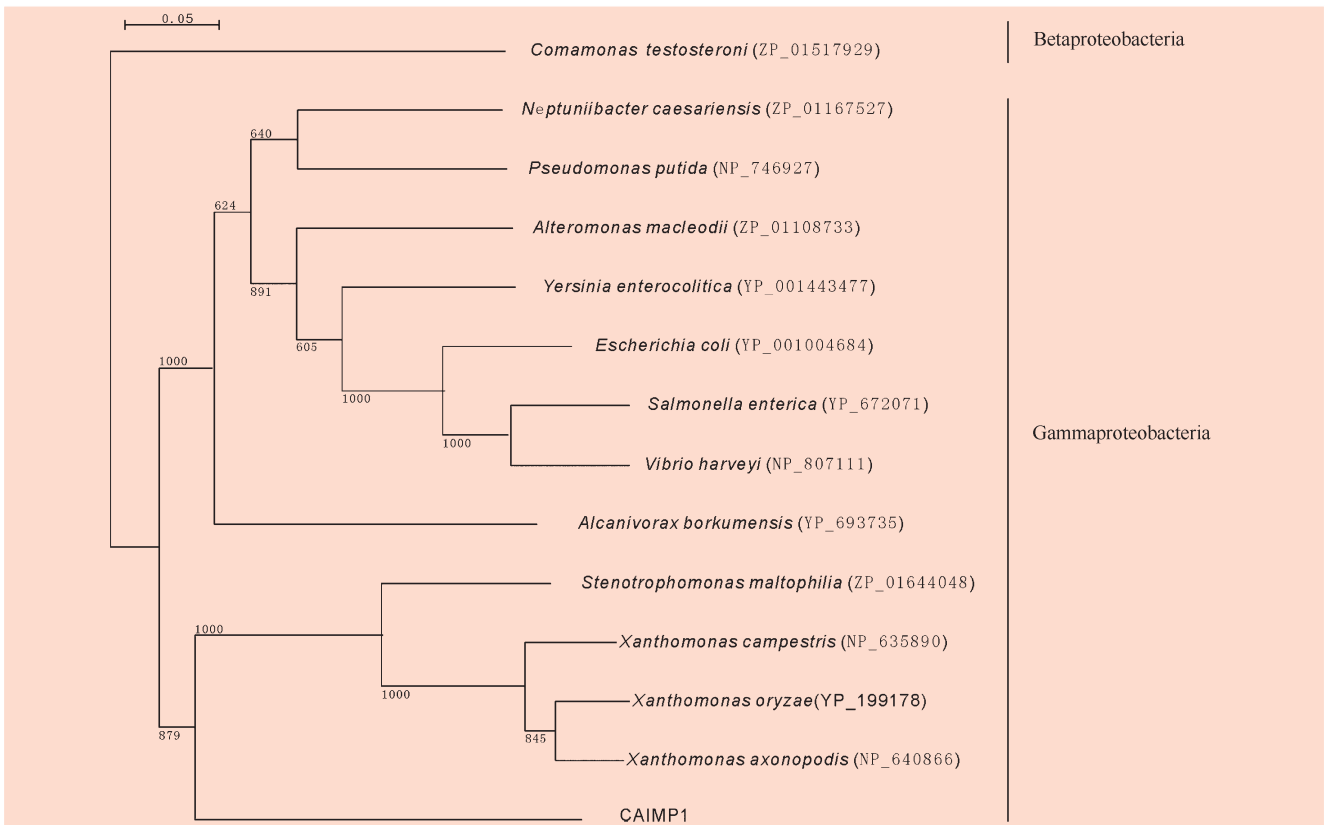


图4 CAIMP1 IMP环水解酶氨基酸序列的系统发育分析  
Fig. 4 Phylogenetical analysis of amino acid sequences of CAIMP1 IMP cyclase



图5 CAIMP1序列结构域组成

Fig. 5 Structural domains of CAIMP1 sequence

MGS: 甲基乙二醛合成酶结构域; AICARFT\_IMPCHas: AICARFT/IMPCHase双功能酶家族

MGS: Structural domain of methylglyoxal synthesis; AICARFT\_IMPCHas: AICARFT/IMPCHase bifunctional enzyme

表3 CAIMP1克隆的IMP环水解酶活性

Table 3 Activity of CAIMP1 IMP cyclase

编号 No.	$D_{249nm}$
A	0
B	0.2
CAIMP1	2.538
1	0.101
2	0.060
3	0.198
4	0.271
5	0.140
6	0.153
7	0.210
8	0.082

A为阴性对照, 采用失活酶液测定; B为空白对照, 采用LB液体培养基测定; 1~8为无IMP环水解酶基因的克隆

A as negative control is determined with inactive enzyme solution; B as blank control is determined with LB liquid medium. 1~8: Clones without IMP cyclase gene

环水解酶基因的8个克隆的发酵液设定为对照, 发现这些克隆的发酵液中也未检测到IMP的产生, 而只有CAIMP1克隆的发酵上清液中检测到IMP环水解酶活性, 表明该克隆可表达

IMP环水解酶.

### 3 讨论

通过序列比对发现, 来源菌株相近的IMP环水解酶氨基酸序列同源性非常高, 来源于同科细菌的序列, 其同源性可达到90%以上. 而CAIMP1中的IMP环水解酶序列与数据库中所有参照序列的同源性最高也仅为68.16%, 说明CAIMP1中的IMP环水解酶与已知的IMP环水解酶有着较为显著的差异, 可能来源于新的科, 值得进一步研究.

通过在Sanger数据库中比对, 发现所有的IMP环水解酶都包含了MGS (甲基乙二醛合成酶结构域) 和AICARFT/IMPCHase 双功能酶家族两部分. 选取与CAIMP1基因最为接近的、进化距离最远的, 以及位于中间簇 (图4) 的IMP环水解酶氨基酸序列进行分析 (数据库中序列号分别为: YP\_199178、NP\_640866、ZP\_01517929和YP\_001004684). 发现除了ZP\_01517929以外, 其它酶的MGS结构域均由113个氨基酸组成. 而ZP\_01517929的酶基因长度与其余酶基因相差较大, 但它的MGS结构域为115个氨基酸, 仅相差两个氨基酸. 将它们的MGS结构域通过隐马尔科夫模型进行比对, 发现参照序列的后验概率都较高, 均只有1个氨基酸的后验概率在75%以下. 而CAIMP1酶基因在此区域则有16个氨基酸的后验概率在65%以下, 其中15个是连续的, 说明此区域的氨基酸序列保守性较差, 可能是由于适应深海特殊环境而产生突变所致.

宏基因组技术因其避开微生物分离纯化培养的技术瓶

颈而成为广泛筛选微生物酶基因,特别是极端环境微生物酶基因的一种有力工具.构建宏基因组文库可直接获得产酶克隆<sup>[7]</sup>,但是一些酶无法简单地通过透明圈产生与否来进行筛选,例如本实验的IMP环水解酶,因此对宏基因组文库克隆进行一一筛选工作量巨大.本实验首先采用简并引物对宏基因组DNA进行检测,确认是否存在相关酶基因,并确定相应的筛选引物,进而先将文库克隆进行分组,提取每组的混合质粒进行检测,最后对阳性组中的各克隆逐一进行检测以最终获得产酶克隆,从而有效地降低了工作量,提高了效率.

构建宏基因组文库所用的Cosmid载体并非专门的表达载体,但CAIMP1克隆的发酵上清液检测出了较强的IMP环水解酶活性,表明在该ORF的上游很可能有相应的启动子,满足其异源表达的需求.而且在随后的实验中还发现CAIMP1的发酵上清也有较强的脂肪酶活性,表明该克隆的插入片段中含有多个酶基因.这些结果进一步表明宏基因组文库的构建和筛选可有效地获取极端环境微生物,特别是未培养微生物的酶基因.

## References

- Warren MS, Mattia KM, Marolewski AE, Benkovic SJ. The transformylase enzymes of de novo purine biosynthesis. *Pure & Appl Chem*, 1996, **68**: 2029~2036
- Elion GB. The purine path to chemotherapy. *Science*, 1989, **244**: 41~47
- Gooljarsingh LT, Ramcharan J, Gilroy S, Benkovic SJ. Localization of GAR transformylase in *Escherichia coli* and mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, **98**: 6565~6570
- Boccalatte FE, Voena C, Riganti C, Bosia A, D'Amico L, Riera L, Cheng M, Ruggeri B, Jensen O N, Goss V L, Lee K, Nardone J, Rush J, Polakiewicz R D, Comb M J, Chiarle R, Inghirami G. The enzymatic activity of 5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleotide formyltransferase/IMP cyclohydrolase is enhanced by NPM-ALK: new insights in ALK-mediated pathogenesis and the treatment of ALCL. *Blood*, 2009, **113**: 2776~2790
- Camici M, Micheli V, Ipata PL, Tozzi MG. Pediatric neurological syndromes and inborn errors of purine metabolism. *Neurochem Int*, 2010, **56**: 367~378
- Kang YN, Tran A, White RH, Ealick SE. A novel function for the N-terminal nucleophile hydrolase fold demonstrated by the structure of an archaeal inosine monophosphate cyclohydrolase. *Biochemistry*, 2007, **46**: 5050~5062
- Akira T, Komatsu M, Nango R, Tomooka A, Konaka K, Yamauchi M, Kitamura Y, Nomura S, Tsukamoto I. Molecular cloning and expression of a rat cDNA encoding 5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleotide formyltransferase/IMP cyclohydrolase. *Gene*, 1997, **197**: 289~293
- Boldt R, Zrenner R. Purine and pyrimidine biosynthesis in higher plants. *Physiol Plant*, 2003, **117**: 297~304
- Graupner M, Xu H, White RH. New class of IMP cyclohydrolases in *Methanococcus jannaschii*. *J Bacteriol*, 2002, **184**: 1471~1473
- Zeng R, Zhao J, Zhang R. Bacterial community in sediment from the western Pacific "warm pool" and its relationship to environment. *Sci China D*, 2005, **48**: 282~290
- Nelson KE, Weinl C, Paulsen IT, Dodson RJ, Hilbert H, Martins DSV, Fouts DE, Gill SR, Pop M, Holmes M, Brinkac L, Beanan M, Deboy RT, Daugherty S, Kolonay J, Madupu R, Nelson W, White O, Peterson J, Khouri H, Hance I, Chris L P, Holtzapple E, Scanlan D, Tran K, Moazzez A, Utterback T, Rizzo M, Lee K, Kosack D, Moestl D, Wedler H, Lauber J, Stjepandic D, Hoheisel J, Straetz M, Heim S, Kiewitz C, Eisen J A, Timmis KN, Dusterhoft A, Tumbler B, Fraser CM. Complete genome sequence and comparative analysis of the metabolically versatile *Pseudomonas putida* KT2440. *Environ Microbiol*, 2002, **4**: 799~808
- Da SA, Ferro JA, Reinach FC, Farah CS, Furlan LR, Quaggio RB, Monteiro-Vitorello CB, Van Sluys MA, Almeida NF, Alves LM, Do AA, Bertolini MC, Camargo LE, Camarotte G, Cannavan F, Cardozo J, Chambergo F, Ciapina LP, Cicarelli RM, Coutinho LL, Cursino-Santos JR, El-Dorry H, Faria JB, Ferreira AJ, Ferreira RC, Ferro MI, Formighieri EF, Franco MC, Greggio CC, Gruber A, Katsuyama AM, Kishi LT, Leite RP, Lemos EG, Lemos MV, Locali EC, Machado MA, Madeira AM, Martinez-Rossi NM, Martins EC, Meidanis J, Menck CF, Miyaki CY, Moon DH, Moreira LM, Novo MT, Okura VK, Oliveira MC, Oliveira VR, Pereira HA, Rossi A, Sena JA, Silva C, de Souza RF, Spinola LA, Takita MA, Tamura RE, Teixeira EC, Tezza RI, Trindade DSM, Truffi D, Tsai SM, White FF, Setubal JC, Kitajima JP. Comparison of the genomes of two *Xanthomonas* pathogens with differing host specificities. *Nature*, 2002, **417**: 459~463
- Schleheck D, Knepper T P, Fischer K, Cook A M. Mineralization of individual congeners of linear alkylbenzenesulfonate by defined pairs of heterotrophic bacteria. *Appl Environ Microbiol*, 2004, **70**: 4053~4063
- Hochhut B, Wilde C, Balling G, Middendorf B, Dobrindt U, Brzuszkiewicz E, Gottschalk G, Carniel E, Hacker J. Role of pathogenicity island-associated integrases in the genome plasticity of uropathogenic *Escherichia coli* strain 536. *Mol Microbiol*, 2006, **61**: 584~595
- Thomson NR, Howard S, Wren BW, Holden MT, Crossman L, Challis GL, Churcher C, Mungall K, Brooks K, Chillingworth T, Feltwell T, Abdellah Z, Hauser H, Jagels K, Maddison M, Moule S, Sanders M, Whitehead S, Quail MA, Dougan G, Parkhill J, Prentice MB. The complete genome sequence and comparative genome analysis of the high pathogenicity *Yersinia enterocolitica* strain 8081. *PLoS Genet*, 2006, **2**: e206
- Deng W, Liou SR, Plunkett GR, Mayhew GF, Rose DJ, Burland V, Kodoyianni V, Schwartz D C, Blattner FR. Comparative genomics of *Salmonella enterica* serovar *Typhi* strains Ty2 and CT18. *J Bacteriol*, 2003, **185**: 2330~2337
- Guo QL (郭巧玲), Yang XS (杨祥胜), Zhao J (赵晶), Zeng RY (曾润颖). Screening and characterization of protease from metagenomic library of deep sea sediment. *Chin J Appl Environ Biol (应用与环境生物学报)*, 2009, **15** (4): 507~510