

doi:103969/j. issn. 0490-6756. 2016. 01. 035

运动发酵单胞菌 RecET 重组系统的构建及应用

李 涛, 曹庆华, 吴 燕, 谭雪梅, 张义正

(四川大学生命科学学院四川省分子生物学与生物技术重点实验室, 成都 610064)

摘 要: 为了提高外源基因整合到染色体的效率, 在已构建的运动发酵单胞菌-大肠杆菌穿梭载体基础上, 构建了 RecET 表达质粒 pSUZM3a-RecET. 选取乙醇脱氢酶 I (*adhA*) 基因作为靶基因, 四环素抗性基因 (Tc^r) 作为筛选标记基因, 检测 RecET 重组系统在 *Z. mobilis* 中进行基因重组的可行性. 将两端带有 60bp *adhA* 基因同源臂的四环素抗性基因片段电击转化含有 RecET 重组系统表达质粒的运动发酵单胞菌 ZM4, 获得 *adhA* 基因缺失突变菌株. 对突变菌株 *adhA* 基因的 PCR 产物进行测序发现, *adhA* 基因已被置换为四环素抗性基因. 上述结果表明: RecET 重组系统在运动发酵单胞菌中具有高效、便捷和可操作性, 只需 60bp 同源臂即可完成同源重组.

关键词: 运动发酵单胞菌; RecET 重组系统; 基因敲除; 基因敲入

中图分类号: Q78 **文献标识码:** A **文章编号:** 0490-6756(2016)01-0209-06

Construction and application of RecET recombination system in *Zymomonas mobilis*

LI Tao, CAO Qing-Hua, WU Yan, TAN Xue-Mei, ZHANG Yi-Zheng

(Sichuan Key Laboratory of Molecular Biology and Biotechnology, College of Life Sciences, Sichuan University, Chengdu 610064)

Abstract: In order to increase the recombination efficiency of foreign genes into chromosome of *Z. mobilis*, the RecET genes were cloned into the *E. coli*-*Z. mobilis* shuttle expression vector pSUZM3a, resulted in pSUZM3a-RecET. The *adhA* gene encoding the alcohol dehydrogenase and tetracycline resistant gene were used as the target and the selection marker genes, respectively. The PCR fragments of tetracycline resistant marker with 60bp flanking sequences homologous to *adhA* were electroporated directly into *Z. mobilis* ZM4 cells which harbored pSUZM3a-RecET. After PCR analysis and DNA sequencing, it was found that the RecET-mediated recombination reaction resulted in *adhA* gene replaced by tetracycline resistant gene. The result showed that RecET system could make efficient, rapid targeted gene knock-out with only 60bp homologous arm in *Z. mobilis*.

Key words: *Zymomonas mobilis*; RecET recombination system; Gene knock-out; Gene knock-in

1 引 言

运动发酵单胞菌(*Zymomonas mobilis*)是一种

高产乙醇的革兰氏阴性菌,能够利用独特的 ED 途径(Entner-Doudoroff pathway)代谢葡萄糖、果糖和蔗糖,其产生物量少,乙醇产率可高达 12% (w/

收稿日期: 2014-11-19

项目基金: 国家科技部支撑计划(2007BAD78B04)

作者简介: 李涛(1991-), 男, 硕士研究生, 研究方向为分子遗传学与基因工程. E-mail: litao0308@sina.cn

通讯作者: 张义正. E-mail: yizzhang@scu.edu.cn

v)^[1,2]. 除此之外,它还具有糖类摄取速度快、乙醇耐受性高达 16% (v/v)、广泛的 pH 生长环境(pH 3.5~7.5)等特点,被认为是具有巨大潜力的工业生产菌株^[3].

由于野生型 *Z. mobilis* 只能利用葡萄糖、果糖和蔗糖作为碳源,极大地限制了其在工业上的应用,因此扩大底物利用范围是其研究的主要方向. 为揭示其强大的乙醇发酵能力和独有的生长特性,2005 年完成了对 *Z. mobilis* ZM4(ATCC31821)的全基因组测序和注释^[1,4]. 测序结果表明,其基因组大小为 2,056,416 bp,包含 5 个内源性质粒,为 *Z. mobilis* 的遗传改造提供了理论基础. 目前应用于 *Z. mobilis* 基因组改造方法主要有插入突变、自杀质粒突变、FLP 同源重组等^[5],通过敲除乳酸脱氢酶基因 *ldhA*、NADH 脱氢酶基因 *ndh*、限制修饰系统相关基因等来进行功能研究或改变代谢通路. 来自于大肠杆菌 Rac 噬菌体的 ET 同源重组系统^[6],能够进行大规模的基因直接克隆,实现基因的敲除和插入,是目前进行微生物改造和应用于合成生物学的重要技术^[7],但尚未有在 *Z. mobilis* 中应用的报道.

RecET 系统能够高效介导带有短同源序列的 PCR 产物在原核生物体内进行同源重组. 该系统由两种蛋白质 RecE 和 RecT 组成,分别由基因 *recE*(2,601bp)、*recT*(810bp)所编码. RecE 具有 5'→3'双链外切酶活性,可作用线状片段产生 3'-突出端,而 RecT 是一种单链结合蛋白和退火蛋白. 当发生同源重组时,带有同源臂的供体 DNA 分子首先经 RecE 蛋白作用而使其两端形成单链悬突,接着 RecT 蛋白结合到 3'-突出末端,对 ssDNA 进行保护,并依靠被结合的同源臂进行配对重组,对靶基因进行分子遗传修饰^[8]. RecET 同源重组所需的同源臂很短,30~60bp 的同源臂即可实现高效率的重组.

由于 *Z. mobilis* 具有强大的限制-修饰系统和 *recA* 依赖型的修复系统^[9],所以其基因组不易发生突变,外源载体不易在宿主内复制和重组. 因此,建立一种稳定的基因组重组方法具有重要意义. 本研究采用本实验室构建的表达载体,构建可以在运动发酵单胞菌中表达的 RecET 系统,再将含有短同源臂的 PCR 片段进行电转化,使其与靶基因发生同源重组,导致感兴趣基因直接置换靶基因,即基因敲入和敲除同时发生. 这种高效、快捷的基因操作系统,为构建高产乙醇的运动发酵单胞

菌工程菌株奠定基础.

2 材料与方法

2.1 材料

2.1.1 菌种和载体 *Z. mobilis* ZM4(ATCC31821)由本室保存,作为同源重组宿主菌;*E. coli* DH10B 由本实验室保存,用于克隆 RecET 基因;*E. coli* JM109 由本室保存,用于质粒克隆;大肠杆菌-运动发酵单胞菌穿梭表达载体 pSUZM3a(未发表)由本室构建,其组成包含来自于运动发酵内源性质粒 pZZM402 上的复制蛋白序列、来自于质粒 pUC18 上的复制起点、卡那霉素筛选标记基因、组成型基因启动子-丙酮酸脱羧酶(Pyruvate Decarboxylase)基因的启动子 *Ppdc*,用于构建 RecET 重组系统表达质粒;pBR322 质粒为本室保存,用于克隆长为 1442 bp 的四环素抗性基因(Tc^r基因).

2.1.2 培养基和溶液 RM 培养基:酵母粉 5 g/L,葡萄糖 20 g/L,(NH₄)₂SO₄ 1 g/L,KH₂PO₄ 1 g/L,MgSO₄·7H₂O 0.5 g/L;RMG 培养基:酵母粉 5 g/L,葡萄糖 20 g/L, KH₂PO₄ 1 g/L;固体培养基加琼脂粉 1.8%. LB 培养基,SOB 培养基, SOC 培养基,TE 缓冲液等按照实验室常规方法配置.

2.1.3 试剂 DNA 胶回收试剂盒为 OMEGA 产品,限制性内切酶、T4 DNA 聚合酶购自 Fermentas 公司,PrimeSTAR MAX DNA 聚合酶为 TaKaRa 公司产品.

2.2 方法

2.2.1 质粒或基因组 DNA 提取、*E. coli* 的转化 参照产品说明书或《分子克隆指南》(第三版)^[10]进行.

2.2.2 引物设计 根据 NCBI 公布的 *Z. mobilis* ZM4 和 *E. coli* DH10B 基因组序列,采用 Primer 5 软件进行引物设计. 表 1 列出了本研究所使用的引物及其信息.

2.2.3 表达质粒的构建 以 *E. coli* DH10B 基因组为模板,采用引物 ET-F 和 ET-R 克隆整合在其基因组上的 *recE* 和 *recT* 的 RecET 系统串联基因 ET;以大肠杆菌-运动发酵单胞菌穿梭质粒 pSUZM3a 为模板,采用引物 pET-F 和 pET-R 克隆载体骨架 pET,PCR 反应体系:PrimeSTAR MAX DNA 聚合酶(2×)10 μL,上下游引物各 0.5 μL,模板 DNA 0.5 μL,加 ddH₂O 至 20 μL 体积.

PCR 程序如下: 98℃ 预变性 3 min; 98℃ 变性 10 s, 55℃ 退火 15s, 72℃ 延伸 1 min, 共 30 次循环; 充分延伸 5 min, PCR 产物用 1% 琼脂糖电泳检测. 目的条带经胶回收纯化后进行不依赖基因序列和连

接反应克隆 (SLIC)^[11], 取 SLIC 退火反应后的片段 10μL 转化 *E. coli* JM109, 涂布于含卡那霉素 50 μg/mL 的 LB 平板筛选阳性克隆. 质粒构建策略见图 1.

表 1 本研究所用引物及其信息
Tab. 1 Primers used for this study

扩增片段	引物名称	引物序列(5'→3')	扩增产物
pSUZM3a	pET-F	tgtaatcgataattcagaggaataaAGGTAGCTTGCAGTGGG	pET 载体骨架
	pET-R	ggaagagtgtttttgtgctcatTGCTTACTCCATATAT	
RecET	ET-F	atatatggagtaagcaATGAGCACAAAACCACTCTTCC	ET 片段
	ET-R	cccactgcaagctacctTTATTCCTCTGAATTATCGATTACA	
adh-tet-1	adh-F1	GAAAAAAGCTTGGATAGCGGCTTATAGCAACGCCACCTGACGTCTAAGAAAC	tet-1
	adh-R1	CGTTTTCCCTATATTCGCAAGATGTATGTCTGTTCTGCCAAGGGTTGG	
adh-tet-2	adh-F2	TAGCGATCGCGAATAGAAGGCATGAGAAGAAAAAGCTTGGATAGCGG	tet-2
	adh-R2	TAAC TTTCTGGATCGTAATCGGCTGGCAATCGTTTTCCCTATATTCGCAAG	
adhA	Test-A F	CGCTATGTTGAATATGGGCA	带有上下游片段的 adhA
	Test-A R	CTCTCAATCCGCTGCCTT	
tet ^r -in	tet-in F	TATCGCCGACATCACCGATGGGGAA	Tc ^r 内部序列
	tet-in R	CGAACGCCAGCAAGACGTAGCCAG	

注: 小写字母为 SLIC 所需同源序列; 下划线标识序列为四环素基因引物

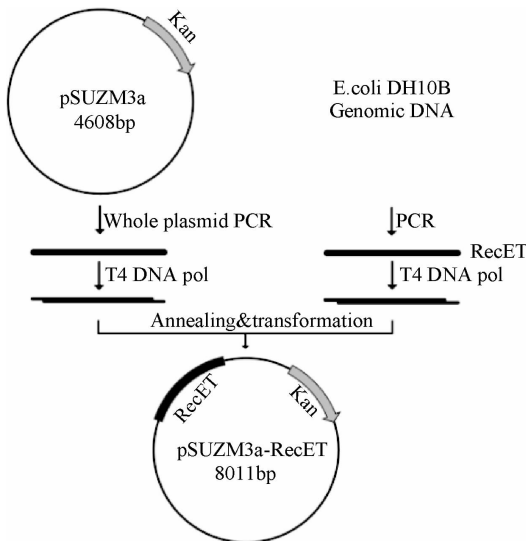


图 1 pSUZM3a-RecET 质粒构建策略

Fig. 1 Construction strategy of the RecET expression plasmid

2.2.4 运动发酵单胞菌 ZM4 质粒和 PCR 片段的电转化 电转化程序参照本室研究结果^[12], 电击后立即将电击产物菌液加入到 3 mL RMG 培养基中, 30℃ 静置恢复培养 6 h (电转化 PCR 片段进行同源重组时恢复培养 16 h), 收集菌体并涂布于含

有 200 μg/mL 卡那霉素的 RM 固体培养基上 (电转化 PCR 片段进行同源重组时涂布于含 20 μg/mL 四环素的 RMG 固体培养基上), 4 d 后挑取单菌落培养并鉴定.

2.2.5 扩增两侧带有 60bp adhA 同源臂的四环素抗性基因片段 采用两轮 PCR 的方法, 第一轮扩增以 pBR322 质粒为模板, 采用引物 adh-F1 和 adh-R1, 获得 PCR 产物 tet-1; 第二轮扩增以第一轮扩增的 PCR 产物为模板, 采用引物 adh-F2 和 adh-R2, 获得 PCR 产物 tet-2, 扩增流程如图 2 所示.

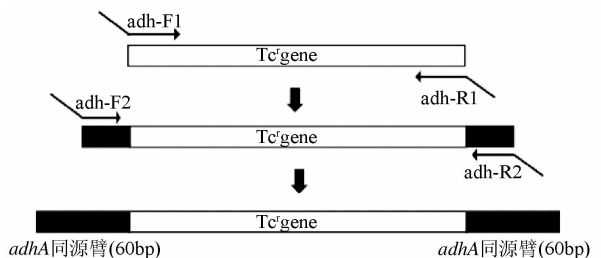


图 2 带有 adhA 同源臂的 Tc^r 基因的扩增

Fig. 2 Amplification of Tc^r gene flanked with homologous arms

2.2.6 基因敲除突变体的 PCR 鉴定 电击转化带有同源臂的四环素片段后,对四环素平板上长出的重组子进行 PCR 鉴定,在 *adhA* 基因同源臂上游和下游分别设计引物 Test-A F 和 Test-A R,与四环素基因内部的引物 tet-in F 和 tet-in R 两两配对进行 PCR 扩增,排除假阳性干扰,引物位置如图 3。

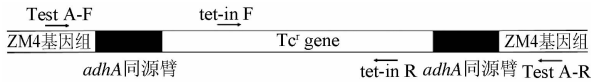


图 3 重组子鉴定引物位置示意图

Fig. 3 Position of primers used for identification of recombinants

2.2.7 pSUZM3a-RecET 质粒消除 接种 $\Delta adhA$ -ZM4 单菌落于 3 mL 不添加卡那霉素的 RM 培养基,静置于 37℃ 培养,待生长至对数期(大量产生气泡)后,重新接种 1% (v/v) 于新的 3mL 无抗 RM 培养基中,持续传代 20 次,将 1 μ L 菌液稀释 10⁶ 倍,取 200 μ L 菌体涂布 RM 平板,筛选质粒消除菌株。

3 结果

3.1 pSUZM3a-RecET 表达质粒的构建

对扩增得到的表达载体骨架(4,608bp)和 RecET 系统编码基因 ET(3,403bp)进行电泳检测,结果见图 4 中的 1 和 2 道。采用 SLIC 方法将纯化得到的载体骨架和 ET 片段进行连接,连接产物转化 *E. coli* JM109,由于 pSUZM3a 带有 Kan^r 基因,因此在卡那霉素平板上筛选阳性重组子。提取阳性重组子质粒进行 PCR 和酶切鉴定,电泳检测结果见图 4 中的 3 道和 4 道。PCR 鉴定在 3,400bp 处有特异性条带,与预期大小一致。采用 *Bam*H I 单酶切鉴定重组质粒,结果在 8,000bp 处出现特异性条带,与预期大小一致,证明 pSUZM3a-RecET 表达质粒构建正确。

3.2 含有 RecET 表达质粒运动发酵单胞菌的构建

为了简化基因重组时的操作过程,我们先将构建的 pSUZM3a-RecET 在大肠杆菌中增殖后,大量提取该质粒,采用电转化方法导入 *Z. mobilis* ZM4 菌株中,在含有 200 μ g/mL 的卡那霉素 RM 培养基上筛选,得到的阳性菌株经过鉴定后,将该菌株命名为 *Z. mobilis* ZM4-ET,用于下一步的基因敲入和敲除。

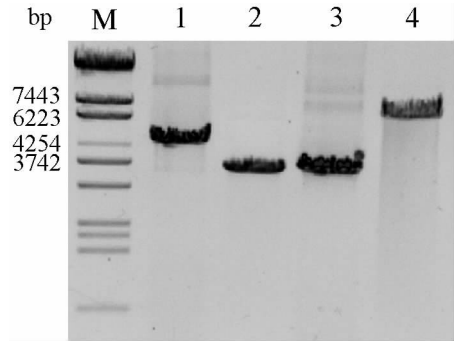


图 4 表达质粒 pSUZM3a-RecET 的 PCR 和酶切鉴定 M; λ -EcoT14 I digest DNA Marker;泳道 1:载体骨架片段;2:ET 片段;3:PCR 鉴定产物;4:*Bam*H I 酶切

Fig. 3 Gel electrophoresis of PCR identification and restriction enzyme analysis of the pSUZM3a-RecET expression vector

M: λ -EcoT14 I digest DNA Marker; 1: pSUZM3a PCR fragment; 2: ET fragment; 3: PCR identification; 4: pSUZM3a-RecET-*Bam*H I

3.3 Tc^r 基因片段的敲入

采用电击转化方法,将大量扩增的带有 *adhA* 同源臂的 Tc^r 基因片段,导入到上述构建的 *Z. mobilis* ZM4-ET 菌株和野生型 ZM4 对照中,经过恢复培养,首先在含有 20 μ g/mL 四环素的 RMG 平板上筛选转化子,结果显示,只有 ZM4-ET 菌株经电转化 Tc^r 基因片段后可获得四环素抗性的重组菌落,而野生型 ZM4 对照不能得到重组子。经三次重复实验统计,ZM4-ET 菌株重组子获得率为 6 \pm 2 个/600ng Tc^r DNA。对筛选到的重组子进行菌液 PCR 筛选和鉴定,采用不同引物进行 PCR 时,野生型 ZM4 采用 Test A-F 和 Test A-R 引物组合扩增出条带大小应为 1,582bp,而发生了基因置换的突变菌株采用相同引物组合扩增出条带大小应为 1,846bp,与电泳结果完全相符(图 5 第 8 和 7 道)。当采用 Tc^r 内部引物 tet-in F 和 tet-in R 配对或与引物 Test A-F 和 Test A-R 分别配对进行 PCR 反应时,只有在发生基因置换突变体中才能扩增出条带(图 5 第 1、3、5 道)。对所有得到的重组子进行如上鉴定,均可扩增出阳性条带,即转化子阳性克隆率为 100%。这些结果表明:Tc^r 基因与 *adhA* 基因发生了替换重组(该菌株命名为 *Z. mobilis* ZM4-SCU01)。

3.4 基因置换突变体 *adhA* 基因 PCR 产物测序分析

以突变菌株 DNA 为模版,采用 Test A-F 和 Test A-R 为引物进行 PCR,对产物进行测序。测序结果显示,在同源臂的位置(阴影部分)*adhA* 基因被替换成为 Tc^r 基因(图 6)。

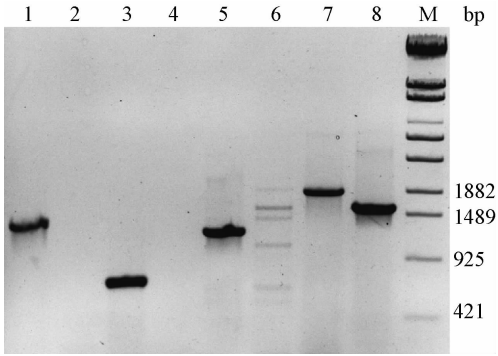


图 5 采用不同引物组合对基因置换突变体进行的 PCR 鉴定

1, 3, 5, 7 泳道: 采用引物 Test A-F 和 tet-in R, tet-in F 和 tet-in R, tet-in F 和 Test A-R, Test A-F 和 Test A-R 以突变体为模板的 PCR 验证; 2, 4, 6, 8 泳道: 相应的野生型 ZM4 扩增对照; M: λ -EcoT14 I digest DNA Marker

Fig. 5 Gel electrophoresis of identification of gene replacement mutant using different combinations of primers

1, 3, 5, 7: PCR amplification using different primers; 2, 4, 6, 8: wild ZM4 control; M: λ -EcoT14 I digest DNA Marker

3.5 RecET 表达质粒的消除

为了消除基因置换菌株中的 RecET 表达质粒, 在不添加卡那霉素的 RM 液体培养基中连续

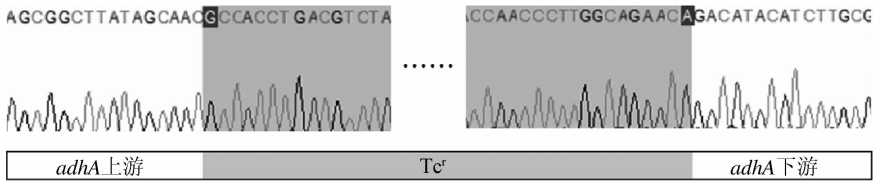


图 6 突变菌株 $\Delta adhA$ 基因的测序

Fig. 6 Sequencing of *adhA* from knockout mutant

在已报道的研究中, 应用于 *Z. mobilis* 基因敲除的方法包括自杀载体^[13], 利用约 1.3kb 同源臂与 *SacB* 基因进行同源重组交换, 使其失活; 或采用转座子突变^[14]失活 *himA* 基因来提高突变株的乙醇产量等. 以自杀性载体系统失活或敲除基因时, 需要构建长同源重组序列(约 1kb)的载体, 要经过多次酶切连接, 操作繁琐, 且针对不同靶基因, 每次都要构建新的自杀载体, 加之重组效率相对不稳定, 不适合用于 ZM4 的多基因改造. 最新的报道还采用了来自酵母的位点特异性重组酶来对 *Z. mobilis* 进行基因无痕突变^[15,16]. RecET 重组系统相对于其它重组方法的优势体现在: 它只需在含有 RecET 表达质粒的宿主菌 ZM4 中导入需要靶向的 PCR 线性片段即可, 在敲除靶基因的同时引入能够稳定遗传的外源基因.

pSUZM3a-RecET 表达质粒在介导宿主完成

传代 20 次, 菌液稀释后涂布于含 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Kan 的平板检测, 菌体不能生长, 然后以该菌株进行菌液 PCR 扩增 ET 片段, 得不到特异性条带(结果未显示), 说明质粒被完全消除. 同时将传代后的菌液划线于四环素平板, 仍能生长, 说明整合到染色体上的 *Tc^r* 基因能够稳定遗传, 证明 RecET 系统作用所获得的突变株能够稳定传代(此菌株命名为 *Z. mobilis* ZM4-SCU01-1).

4 讨论

本研究建立了一种快速、简便的运动发酵单胞菌的基因同源重组方法和相应的 RecET 重组系统. 结果显示, 成功构建了大肠杆菌-运动发酵单胞菌穿梭表达载体 pSUZM3a-RecET, 将 RecET 置于 *Z. mobilis* 自身丙酮酸脱羧酶基因启动子 *P_{pdh}* 下控制其进行组成型表达, 在 RecET 重组系统的驱动下, 带有同源臂的 *Tc^r* 基因可以与 *Z. mobilis* 染色体中的 *adhA* 发生置换, 从而使突变菌株获得了四环素抗性(抗四环素浓度达到 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$), 同时完成了基因的敲除和敲入.

同源重组之后, 即不需要持续表达两种重组蛋白, 对其进行质粒消除来减小 ZM4 的生理负荷. 参照 SDS-高温高浓度双重处理交替培养法^[17]进行质粒消除, 对该方法进行简化, 使含有 pSUZM3a-RecET 表达质粒的 ZM4 在高于最适温度条件下(37 $^{\circ}\text{C}$)生长, 并向培养基中添加消除剂 SDS(十二烷基磺酸钠), 但即使将 SDS 添加量减少到 0.005%, ZM4 仍不能生长, 即无法完成质粒的消除. 采用高压电穿孔的方法^[18]消除质粒时, 操作较为繁琐, 加之所得菌落数较多, 难以筛选质粒消除的单克隆. 采用高温培养和连续传代的方法, 外源质粒的复制滞后于染色体复制, 同时高温导致质粒的不稳定, 在没有卡那霉素选择压力条件下, 经过 20 代以上的简单传代, 即可获得大量消除质粒的基因置换突变菌株.

通过 RecET 同源重组系统, 可将不同单糖(如

木糖)代谢相关基因和多糖(如淀粉)降解酶基因(糖化酶或淀粉酶基因)等多种碳源代谢基因重组整合到 *Z. mobilis* 染色体中,以拓宽其底物利用范围。因此,RecET 重组系统为运动发酵单胞菌基因组编辑提供了新的技术,以及各种基因组工程菌的建立奠定了基础。

参考文献:

- [1] Seo J S, Chong H, Park H S, *et al.* The genome sequence of the ethanogenic bacterium *Zymomonas mobilis* ZM4[J]. *Nat Biotechnol*, 2005, 23(1): 63.
- [2] Lee K Y, Park J M, Kim T Y, *et al.* The genome-scale metabolic network analysis of *Zymomonas mobilis* ZM4 explains physiological features and suggests ethanol and succinic acid production strategies [J]. *Microb Cell Fact*, 2010, 9: 94.
- [3] Rogers P L, Jeon Y J, Lee K J, *et al.* *Zymomonas mobilis* for Fuel Ethanol and Higher Value Products [J]. *Biofuels*, 2007, 108: 263.
- [4] Yang S, Pappas K M, Hauser L J, *et al.* Improved genome annotation for *Zymomonas mobilis* [J]. *Nat Biotechnol*, 2009, 27(10): 893.
- [5] He M X, Wu B, Qin H, *et al.* *Zymomonas mobilis*: a novel platform for future biorefineries [J]. *Biotechnology for biofuels*, 2014, 7(1): 101.
- [6] Zhang Y M, Buchholz F, Muyrers J P P, *et al.* A new logic for DNA engineering using recombination in *Escherichia coli* [J]. *Nature genetics*, 1998, 20(2): 123.
- [7] Fu J, Bian X Y, Hu S B, *et al.* Full length RecE enhances linear-linear homologous recombination and facilitates direct cloning for bioprospecting [J]. *Nature biotechnology*, 2012, 30(5): 440.
- [8] Groth A C, Calos M P. Phage integrases: biology and applications [J]. *Journal of molecular biology*, 2004, 335(3): 667.
- [9] Kerr A L, Jeon Y J, Svenson C J, *et al.* DNA restriction-modification systems in the ethanologen, *Zymomonas mobilis* ZM4 [J]. *Applied microbiology and biotechnology*, 2011, 89(3): 761.
- [10] J 萨姆布鲁克, DW 拉塞尔著, 黄培唐等译. 分子克隆实验指南(第三版) [M]. 北京: 科学出版社, 2002.
- [11] 王广珺, 何川, 张义正. 不依赖基因序列和连接反应克隆(SLIC)方法的改进 [J]. *四川大学学报: 自然科学版*, 2010, 47(4): 893.
- [12] Wang G J, Wang Z S, Zhang Y W, *et al.* Cloning and expression of amyE gene from *Bacillus subtilis* in *Zymomonas mobilis* and direct production of ethanol from soluble starch [J]. *Biotechnology and Bio-process Engineering*, 2012, 17(4): 780.
- [13] Senthilkumar V, Rameshkumar N, Busby S J W, *et al.* Disruption of the *Zymomonas mobilis* extracellular sucrose gene (sacC) improves levan production [J]. *Journal of applied microbiology*, 2004, 96(4): 671.
- [14] Viitanen P V, TAO L, Knoke K. *Zymomonas* with improved ethanol production in medium containing concentrated sugars and acetate; U. S. Patent, 7803623 [P]. 2010.
- [15] Wang C, Liu C, Hong J F, *et al.* Unmarked insertional inactivation in the *gfg* gene improves growth and ethanol production by *Zymomonas mobilis* ZM4 in sucrose without formation of sorbitol as a by-product, but yields opposite effects in high glucose [J]. *Biochemical Engineering Journal*, 2013, 72: 61.
- [16] Zou S L, Hong J F, Wang C, *et al.* Construction of an unmarked *Zymomonas mobilis* mutant using a site-specific FLP recombinase [J]. *Food Technology and Biotechnology*, 2012, 50(4): 406.
- [17] 龙海英, 刘衡川, 方梅. 质粒消除方法及消除效果的评价研究 [J]. *中国卫生检验杂志*, 2007, 17(3): 413.
- [18] Heery D M, Powell R, Gannon F, *et al.* Curing of a plasmid from *E. coli* using high-voltage electroporation [J]. *Nucleic acids research*, 1989, 17(23): 10131.