

## 基于 ARTP 诱变和高通量筛选的绿针假单胞菌 GP72 育种方法

江耀祖 彭华松\* 张雪洪

(上海交通大学生命科学技术学院 微生物代谢国家重点实验室 上海 200240)

**摘要:**【目的】绿针假单胞菌 GP72 是一种植物根围促生细菌,其分泌的次级代谢产物 2-羟基-吩嗪(2-OH-PHZ)具有广谱抗真菌活性,但其产量较低,不能满足农业生产的应用需求,因此需对 GP72 进行改造,从而提高产量。【方法】从 GP72 的野生株出发,首次将 2-OH-PHZ 合成途径的限制性因子 PhzO 用绿色荧光蛋白(GFP)替换,以一种新型的常压室温等离子体技术(Atmospheric and room temperature plasma, ARTP)进行诱变,通过酶标仪测定 96 孔板中突变株的荧光强度进行高通量筛选;最后将荧光强度高的菌株中绿色荧光蛋白(Green fluorescent protein, GFP)替换为 PhzO 以获得 2-OH-PHZ 高产突变株。【结果】经过五轮诱变后,获得一株荧光强度增加 1.62 倍的突变株,用 *phzO* 基因回替后,该突变株在 KB 培养基中摇瓶培养时 2-OH-PHZ 的产量为野生型的 4.62 倍。【结论】基于安全、高效 ARTP 诱变技术,并以 GFP 替换限制性因子作为标记进行高通量筛选,可以快速获得高产 2-OH-PHZ 的 GP72 突变株,克服了传统诱变育种方法筛选难度大、费时费力的不足,为其它微生物的育种提供了参考。

**关键词:** 绿针假单胞菌, 绿色荧光蛋白, 常压室温等离子体, 高通量筛选

## Breeding of *Pseudomonas chlororaphis* GP72 based on ARTP mutagenesis and high throughput screening

JIANG Yao-Zu PENG Hua-Song\* ZHANG Xue-Hong

(College of Life Sciences and Biotechnology, Shanghai Jiao Tong University, State Key Laboratory of Microbial Metabolism, Shanghai 200240, China)

**Abstract:** [Objective] *Pseudomonas chlororaphis* GP72 is a plant growth-promoting rhizobacterium. Its secondary metabolite 2-hydroxy-phenazine (2-OH-PHZ) has broad-spectrum antimicrobial activity, although its yield is too low to apply in agricultural pest management. [Methods] The limiting factor PhzO in 2-OH-PHZ biosynthesis pathway was replaced by green fluorescent protein (GFP), and a

**Foundation item:** National Natural Science Foundation of China (No. 31270084); National High-Tech Research and Development Program of China (863 Program) (No. 2012AA022107); National Basic Research Program of China (973 Program) (No. 2012CB721005)

\*Corresponding author: Tel: 86-21-34206083; E-mail: hspeng@sjtu.edu.cn

Received: December 20, 2016; Accepted: January 16, 2017; Published online (www.cnki.net): January 16, 2017

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 31270084); 国家高技术研究发展计划(863 计划)项目(No. 2012AA022107); 国家重点基础研究发展规划(973 计划)项目(No. 2012CB721005)

\*通讯作者: Tel: 86-21-34206083; E-mail: hspeng@sjtu.edu.cn

收稿日期: 2016-12-20; 接受日期: 2017-01-16; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2017-01-16

novel atmospheric and room temperature plasma (ARTP) technology was used to mutagenize the strain. High-throughput screening of the mutants in a 96-well plate was done by using a microplate reader. Finally, GFP was replaced reversibly by PhzO in the strain with high fluorescence intensity to obtain the 2-OH-PHZ high-yield mutant. **[Results]** The yield of 2-OH-PHZ was 4.62 times higher than that of the wild-type strain in KB medium in shake flask culture. **[Conclusion]** The high yield of 2-hydroxy-phenazine GP72 mutants could be obtained rapidly and safely by high-throughput screening based on ARTP mutagenesis using GFP substitution of the restriction factor as the marker. This method overcomes the shortcomings of traditional breeding methods. This method could be used as a reference for other microbial breeding.

**Keywords:** *Pseudomonas chlororaphis*, GFP, ARTP, High-throughput screening

绿针假单胞菌 GP72 是从上海郊区甜椒根围土壤中分离得到的一株具有广谱抗真菌活性的生防菌株<sup>[1]</sup>, 其抗菌活性主要依赖于它产生的 3 种吩嗪化合物, 即吩嗪-1-羧酸(Phenazine-1-carboxylic acid, PCA)、2-羟基-吩嗪(2-Hydroxyphenazine, 2-OH-PHZ) 和 2-羟基-吩嗪-1-羧酸(2-Hydroxy-phenazine-1-carboxylic acid, 2-OH-PCA), 其中 2-OH-PCA 是以 PCA 为底物在 PhzO 蛋白作用下生成<sup>[2]</sup>, 随后自发脱羧生成 2-OH-PHZ。GP72 具有吩嗪合成基因簇, 共 10 个基因, 大小约 12 000 bp, 分别是群体感应调控基因 *phzI* 和 *phzR*, PCA 合成基因 *phzABCDEFG*, 以及 2-OH-PHZ 合成基因 *phzO*。但是由于 PhzO 蛋白活性低、表达量少等因素, 只有少部分 PCA 可以转化为 2-OH-PCA 和 2-OH-PHZ, 尤其是具有更强抑菌活性的 2-OH-PHZ 产量较低, 因而 PhzO 成为 2-OH-PHZ 生物合成的限制性因子之一<sup>[1-3]</sup>。

Liu 等<sup>[2]</sup>通过基因敲除、替换和过表达等方式对绿针假单胞菌 GP72 进行基因工程改造, 2-OH-PHZ 产量最高达到 450.4 mg/L; 但是多重改造后的基因工程菌株不仅难以进一步提高产量, 而且其过表达株使用抗性标记, 存在一定安全性和稳定性问题, 也增加了生产成本。然而诱变育种相对来说较为简单, 目前大多数的工业生产菌株都是通过诱变育种技术获得<sup>[4]</sup>。因此, 利用新型的技术手段进行诱变育种, 同时将具有易表达、易定量检测等优势 GFP 作为标记基因来提高筛选效率将是获得 2-OH-PHZ 高产菌种的有效途径之一。

常压室温等离子体(ARTP)诱变育种是一种新型的育种技术, 安全性好、正突变率高<sup>[5]</sup>; 由清华大学和北京思清源生物公司合作研发的 ARTP 育种仪, 其在放电时产生的各种电子流对微生物基因进行损伤从而诱导其进行诱变, 具有活性粒子浓度高、操作容易、运行成本低廉以及对环境无污染和危害小等特点, 使其在微生物突变育种及生物医学领域中引起人们广泛关注<sup>[5-6]</sup>。

绿色荧光蛋白是从水母中分离出来, 其蛋白质具有荧光效应, 已经被广泛用于基因表达的检测和细胞中蛋白质的定位等方面, 被称为一种“有生命”的荧光<sup>[7]</sup>, GFP 与其他荧光标记物兼容, 并且不需要其它辅助因子或种特异性的荧光修饰<sup>[8]</sup>。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒: 实验所用的菌株和质粒见表 1。

1.1.2 培养基及培养条件: LB 培养基(g/L): 蛋白胨 10.0, 酵母提取物 5.0, 氯化钠 10.0, pH 7.0; KB 培养基(g/L): 蛋白胨 20.000, 甘油 18.915, 磷酸氢二钾 0.514, 硫酸镁 0.732, pH 7.5; 固体培养基中加琼脂粉 15.0, 蔗糖培养基为 LB 培养基中加蔗糖 15.0。抗生素用量(mg/L): 硫酸卡那霉素(Kan) 50.0, 氨苄青霉素钠(Amp) 100.0。其中大肠杆菌在 37 °C、180 r/min 振荡培养; 假单胞菌在 28 °C、180 r/min 振荡培养。

1.1.3 主要试剂和仪器: 2×Taq Master Mix, 南京诺唯赞生物科技有限公司; PrimeSTAR DNA 聚合酶、限制性内切酶和 Infusion 酶, 宝生物工程(大连)

表 1 菌株和质粒  
Table 1 Strains and plasmids used in the study

Strains/Plasmids	Genotype and relevant characteristics	Reference
<i>P. chlororaphis</i> GP72	Wild type, Amp <sup>r</sup> , Sp <sup>r</sup>	This lab
<i>E. coli</i>		
DH5 $\alpha$	supE44 $\Delta$ lacU169( $\Phi$ 80lacZ $\Delta$ M15)hsdR17recA1 gyrA96 thi-1 relA1	This lab
S17	res-pro mod+integrated copy of RP4, mod+	This lab
Plasmids		
pK18mobSacB	Broad-host-range gene replacement vector, SacB, Kan <sup>r</sup>	[9]
pK18-G-O	pK18mobSacB carrying <i>EcoR</i> I- <i>Bam</i> H I insert of 597 and 403 bp flanking <i>phzO</i> and replace with GFP, SacB, Kan <sup>r</sup>	This study
pBbB5k-GFP	contain a sequence 695 bp of GFP	[10]

注: Amp<sup>r</sup>: 氨苄青霉素抗性; Sp<sup>r</sup>: 壮观霉素抗性; Kan<sup>r</sup>: 卡那霉素抗性.

Note: Amp<sup>r</sup>: Ampicillin resistance; Sp<sup>r</sup>: Spectinomycin resistance; Kan<sup>r</sup>: Kanamycin resistance.

有限公司; 基因组提取试剂盒 Genomic DNA Kit、质粒提取试剂盒 Plasmid MiniPrep Kit、电泳凝胶回收试剂盒 Quick Gel Extraction Kit、酶切产物纯化试剂盒 PCR Purification Kit, 北京全式金生物技术有限公司; IPTG 和 X-gal, 生工生物工程(上海)股份有限公司。高效液相色谱仪, 安捷伦公司; 色谱柱为 WondaSil-WR 反相柱, 岛津公司; 常压室温等离子体诱变仪, 北京思源清生物科技公司; 全波长酶标仪, PE&ENSPiRE 2300; 倒置荧光显微镜, Nikon&Ti 公司; 透明及全黑 96 孔板、96 方形深孔板, 美国 Corning 公司。

1.1.4 引物: 引物的合成委托苏州金唯智生物技术有限公司, 各引物的序列见表 2。

## 1.2 以 GFP 基因替换 *phzO* 基因

以 pBbB5k 质粒为模板, 引物为 GFP-F2 和 GFP-R2, 将 GFP 基因从 pBbB5k 质粒上扩增出来。以 GP72 全基因组为模板, 并设计引物, 扩增 *phzO* 基因上下游同源臂, 上游同源臂引物对为 PhzO-F1 和 PhzO-R1, 下游同源臂引物对 PhzO-F3 和 PhzO-R3。其中 F1、R3 包含与 pK18 质粒(*EcoR* I 和 *Bam*H I 酶切之后)反向互补的一段序列, R1、F3 包含一段与 GFP 反向互补的一段序列, 以便 4 个片段能够在 Infusion 酶作用下连在一起。基因组、质粒的提取, 以及电泳片段回收、酶切、产物纯化和连接等均按试剂盒说明书进行。采用同源重组的方法<sup>[11]</sup>, 将 *phzO* 上游同源臂、GFP 基因片段、*phzO*

表 2 引物序列  
Table 2 The sequence of each primers

引物 Primers	序列 Sequences (5'→3')	大小 Sizes (bp)
PhzO-F1	<u>ACATGATTACGAATTTCATCCTCAATGGCCAG</u>	32
PhzO-R1	<u>TTCTCCTTTACTCATGGTAGCAGCCTCAGTAATGT</u>	35
GFP-F2	ATGAGTAAAGGAGAAGAAGACTTTTCACTGG	29
GFP-R2	TTATTTGTAGAGCTCATCCATGCCA	25
PhzO-F3	<u>GAGCTCTACAAATAAACCTGATTGCCGTGTAG</u>	32
PhzO-R3	<u>CGACTCTAGAGGATCTGCTGAGCCTTTCGTGGAT</u>	34

注: 引物 PhzO-F1、PhzO-R3 序列下划线部分为与 pK18mobSacB 质粒酶切后反向互补的一段序列; 引物 PhzO-R1、PhzO-F3 序列下划线部分分别为与 GFP-F2、GFP-R2 从 5' 开始的一段序列。

Note: The underlined parts of the primers PhzO-F1 and PhzO-R3 are in reverse complement to the pK18 plasmid which had been digested. The underlined parts of the primers PhzO-R1 and PhzO-F3 are the sequences starting from 5' of GFP-F2 and GFP-R2 respectively.

下游同源臂、pK18mobSacB 连接后转大肠杆菌 DH5 $\alpha$  感受态, 并进行蓝白斑筛选、PCR 验证、测序, 验证正确后将获得的重组质粒 pK18-G-O 转入大肠杆菌 S17 感受态, 在 Kan、Amp 双抗培养基中与菌株 GP72 共培养, 进行结合转移后利用含 Kan 平板进行单交换筛选, 以及蔗糖平板进行双交换筛选, 选择只能在 LB 板中生长的菌株。最后用引物 PhzO-F1 和 PhzO-R3 进行 PCR 验证, 可扩增出 *phzO* 上下游同源臂和 *GFP* 基因片段条带者为绿色荧光蛋白(GFP)成功替换 PhzO 的突变株, 命名为 GP72-G。

### 1.3 ARTP 诱变及筛选

参考谭剑等 ARTP 诱变方法, 取对数期的 GP72-G 菌悬液( $OD_{600}$  约为 0.6), 用 0.01 mol/L PBS 稀释 10 倍, 取 10  $\mu$ L 菌液均匀涂抹于金属载片, 设置仪器功率 100 W, 气流量 10 SLM, 照射距离 2 mm<sup>[12-13]</sup>。实验中以时间为变量, 各组处理时间为 0、10、15、20、35、50、70、90 s, 制作致死率曲线。致死率=(未经诱变处理菌落数-经诱变处理菌落数)/未经诱变菌落数 $\times 100\%$ <sup>[4-5]</sup>。

选择最优辐照时间, 将诱变菌液稀释涂布 KB 平板, 将生长出来的单菌落用牙签接种在另一块 KB 板上, 标记好相应的序号; 待菌落长大后, 按序号依次用牙签接种于 96 孔板, 每个孔预先加入 600  $\mu$ L 的 KB 培养基, 盖上盖子后于摇床上振荡 48 h, 分别吸取 200  $\mu$ L 菌液至透明的 96 孔板和全黑 96 孔板<sup>[14]</sup>, 分别用于测  $OD_{600}$  和荧光强度值。测绿色荧光强度值的激发波长为 488 nm, 发射波长为 510 nm<sup>[13,15]</sup>。以单位  $OD_{600}$  的荧光强度值表示相对荧光强度, 代表突变菌株的 PhzO 活性变化<sup>[10]</sup>。每次实验中初筛出较高荧光强度的 5 株, 通过摇瓶培养重测一次, 每组实验做 3 个平行对照, 筛出荧光强度最高的一株菌后完成一轮诱变, 并作为下一轮诱变出发菌。

### 1.4 突变株中 *phzO* 的回替

将第 5 轮诱变后获得的最高荧光强度菌株命名为 GP72-G5。以类似于 1.2 中 *GFP* 基因替换 *phzO* 的方式, 引物为 PhzO-F1 和 PhzO-R3, 以 GP72 基

因组为模板, 扩增出一条包含 *phzO* 上游同源臂、*phzO* 基因、*phzO* 下游同源臂共 2 476 bp 的一段基因序列, 并按 1.2 中的方法连上 pK18mobSacB 质粒后, 利用同源重组方法筛选 *phzO* 回替菌株。经过测序验证正确后进行保藏, 将该菌株命名为 GP72Y5。

### 1.5 发酵及吩嗪产量测定

以 GP72 野生型为对照, 将突变株在 KB 培养基中(每瓶 60 mL)进行摇瓶发酵, 定时取样, 分别测定发酵液中菌体浓度及吩嗪产量, HPLC 检测方法参照本实验室方法<sup>[1-3]</sup>。每个菌株分别以 3 个摇瓶进行发酵作为平行实验。

## 2 结果与分析

### 2.1 标记基因的克隆

首先克隆出 *GFP* 基因, 然后克隆出 *phzO* 上下游同源臂, 并将它们和质粒 pK18 连在一起后, 用同源重组的方法将 *phzO* 替换为 *GFP* 基因, 替换之后片段大小由约 2 500 bp 变为 1 800 bp。利用 PCR 获得该片段, 将该片段进行测序。序列比对结果显示, *phzO* 上下游同源臂以及 *GFP* 基因片段与测序结果完全一致, 证明 *GFP* 基因已经存在 GP72 菌株的基因组之中(图 1), *GFP* 基因大小 695 bp, *phzO* 基因大小约 1 476 bp, 上下游同源臂共约 1 100 bp。

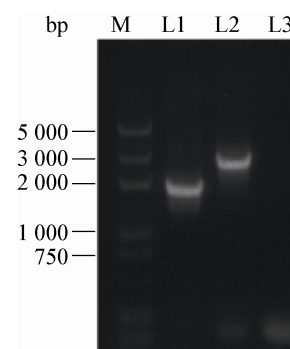


图 1 *GFP* 基因替换 *phzO* 的 PCR 验证

Figure 1 Identification of *phzO* replaced by *GFP* gene

注: 引物为 PhzO-F1 和 PhzO-R3. L1: 以 GP72-G 基因组为模板; L2: 以 GP72 基因组为模板; L3: 以 ddH<sub>2</sub>O 为模板; M: Marker. Note: Amplification using primers PhzO-F1 and PhzO-R3. L1: Genome of GP72-G as a template; L2: Genome of GP72 as a template; L3: ddH<sub>2</sub>O as a template; M: Marker.

## 2.2 ARTP 诱变及筛选

**2.2.1 ARTP 诱变致死率曲线:** 根据致死率公式, 以诱变时间为横坐标, 制作 GP72-G 致死率曲线。等离子体照射处理时间与 GP72-G 的致死率存在明显相关性。照射时间 15 s 时, 致死率为 77.80%, 照射时间 20 s 时致死率为 80.65%, 照射超过 35 s 后致死率接近 100% (图 2)。由于致死率在 75% 左右有较高的正突变率<sup>[10]</sup>, 所以选择 15 s 作为合适的照射处理时间, 即致死率在 75% 左右的诱变剂量。后续每轮诱变均采用 15 s 等离子体诱变处理时间。

**2.2.2 ARTP 诱变后的筛选:** 每次诱变后, 将诱变菌液稀释后涂布 3 块 KB 平板, 挑 90 个单菌落在 96 方形深孔板中培养。与出发株进行对照, 通过酶标仪初筛, 选出单位荧光强度较高 5 株菌, 然后通过摇瓶培养对这 5 株菌重测一次, 每组 3 个平行对照, 确定相对荧光强度最高的突变株。随后, 从此株出发进行下一轮诱变, 共完成了 5 次诱变。每轮高产突变株的相对荧光强度见图 3。

每轮诱变过后获得的突变株单位  $OD_{600}$  的荧光强度值均有一定程度的提高, 经 Excel 统计分析,  $F$  大于  $F_{crit}$ , 且  $P$ -value 小于 0.01, 表示差异极显著。与诱变出发菌株 GP72-G 相比, 第一轮到第五轮诱变后获得的最高荧光强度突变株, 其单位荧光强度分别提高为 1.17、1.40、1.44、1.52、1.62 倍。

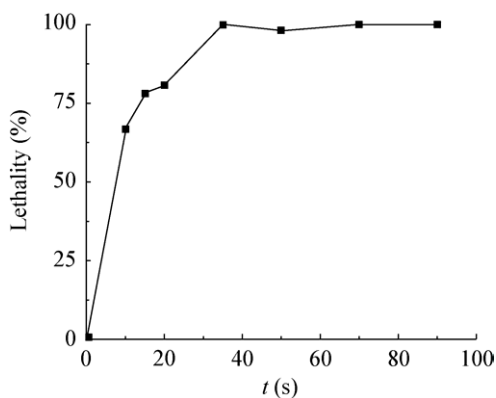


图 2 菌株 GP72-G 的 ARTP 致死率曲线

Figure 2 The ARTP lethality curve of the strain GP72-G

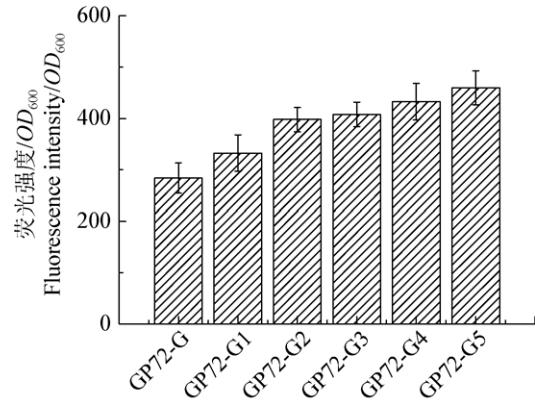


图 3 每轮诱变后突变株荧光强度变化

Figure 3 Fluorescence intensity changes of the different mutants

## 2.3 突变株中 *phzO* 的回替及发酵验证

**2.3.1 *phzO* 基因的回替:** 以同样的分子操作步骤, 在诱变株 GP72-G5 中用 *phzO* 基因替换 *GFP* 基因并整合到 GP72 基因组中。用引物对 PhzO-F1 和 PhzO-R3 克隆出 *phzO* 基因及上下游同源臂。

由图 4A 中可知, 以 GP72-G 为模板时, *GFP* 基因及上下游同源臂共约 1 800 bp, 在突变株 GP72-G5 中用 *phzO* 回替后, *phzO* 及其上下游同源臂共约 2 500 bp, 且经测序比对结果显示一致, 表明替换成功。

在 KB 平板上培养时 GP72 菌落呈橙色。将五轮诱变获得的突变株进行 *phzO* 回替后, 获得的突变株 GP72Y5, 其菌落颜色较 GP72 野生株明显加深, 由于 PCA 呈黄色, 2-OH-PHZ 呈砖红色, 初步推断出吩嗪产量, 尤其是 2-OH-PHZ 产量有所提高, 如图 4B 所示。

**2.3.2 发酵验证:** 将 *phzO* 回替后获得的突变株 GP72Y5 在 KB 培养基中进行摇瓶培养, 定时取样, 分别测定  $OD_{600}$  和吩嗪产量(图 5)。

突变株 GP72Y5 生长情况比野生型好, 平衡期 GP72Y5 最高生物量较野生型提高约 20% (图 5A)。

突变株 GP72Y5 的 2-OH-PHZ 最高产量为 28.94 mg/L, 是野生型的 4.62 倍。由此可见, 以 ARTP 技术对菌种 GP72 进行诱变后, 可以大大提高 2-OH-PHZ 的产量(图 5B)。

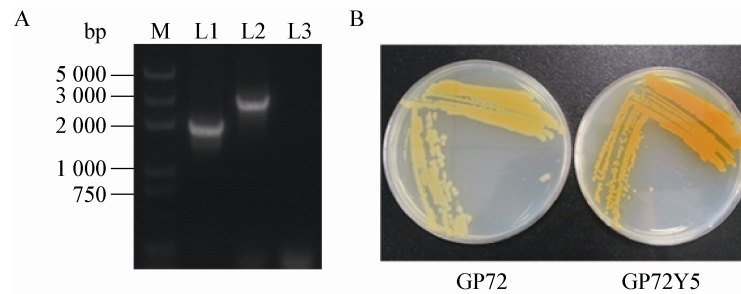


图4 *phzO* 替换 *GFP* 基因的 PCR 验证(A)及突变株颜色变化(B)

Figure 4 Identification of *phzO* replace *GFP* gene (A) and the color change of mutant strain (B)

注:引物为 PhzO-F1 和 PhzO-R3. L1: 以 GP72-G 基因组为模板; L2: 以 GP72Y5 基因组为模板; L3: 以 ddH<sub>2</sub>O 为模板; M: Marker. Note: Amplification using primers PhzO-F1 and PhzO-R3. L1: Genome of GP72-G as a template; L2: Genome of GP72 as a template; L3: ddH<sub>2</sub>O as a template; M: Marker.

### 3 结论与讨论

ARTP 诱变技术是一种新型诱变育种技术,具有安全性好、正突变率高等优点,已被广泛用于微生物育种。Lu 等<sup>[16]</sup>利用 ARTP 诱变技术,提高产气肠杆菌的氢气产量 14.5%。本文使用 ARTP 技术对绿针假单胞菌 GP72 进行诱变,显著提高 2-OH-PHZ 产量,诱变时间仅 15 s,而且在室温下进行,无需进行辐射防护。由此可见,该方法设备简单、操作易行、运行成本低、诱变育种过程安全高效。

*GFP* 被广泛用于组织基因表达的检测和细胞中蛋白质的定位<sup>[17]</sup>,但是使用 *GFP* 基因替换合成途径的限制性因子作为标记基因进行诱变育种研究未见报道,本方法使得在某些微生物育种过程中,较难进行筛选的问题得到解决,并且提高了筛选的效率,使高通量筛选得以进行。本研究中首次

以 *GFP* 作为筛选标记,通过同源重组的方法将 *GFP* 替换 2-OH-PHZ 合成途径的限制性因子 *PhzO*,以酶标仪测定荧光强度进行高通量筛选,成功获得一株荧光倍数提高为 1.62 倍的突变株;在突变株中进行 *PhzO* 的回替后,其 2-OH-PHZ 产量为野生株的 4.62 倍。由此可见,以 *GFP* 替换合成途径的限制性因子作为筛选标记,可以显著提高筛选效率和微生物诱变育种水平。

本研究中,首先选取了 *GFP* 来替代 *PhzO*,使得原来表达吩嗪化合物 2-OH-PHZ,变为表达 *GFP*,从而使原本无法高通量地定量检测,变为仅使用高通量的孔板和酶标仪检测便可实现,该方法可大大提高筛选效率,获得更多正突变菌株。其次,在诱变方法上采用新型的诱变手段——ARTP,该方法具有较高的正突变率,而且诱变操作简单,快速易

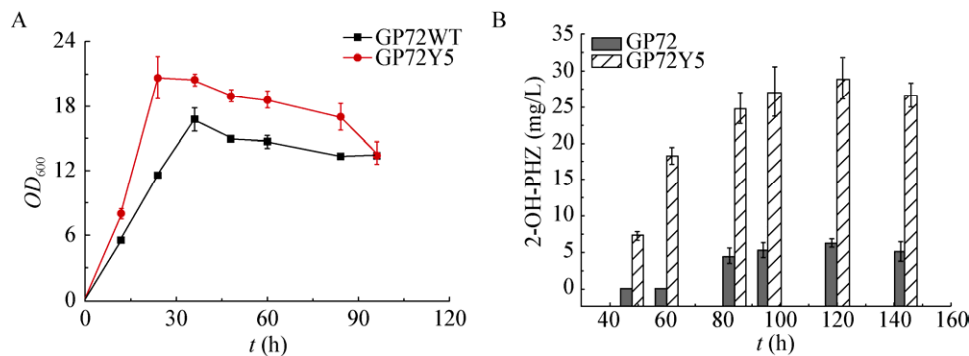


图5 菌株 GP72 与 GP72Y5 生长曲线(A)和 2-OH-PHZ 产量变化(B)

Figure 5  $OD_{600}$  value (A) and 2-OH-PHZ production of the strains GP72 and GP72Y5 (B)

行,可较快完成一轮诱变,这也为高产菌株的育种打下基础。经过诱变可能造成 GP72 基因突变,从而影响吩嗪合成的调控通路,对转录或翻译造成影响,致使产量得到提高。当然本研究在诱变方式上如果采用组合诱变的方式或许产量提高更加显著。

本研究将 ARTP 诱变育种技术与 GFP 作为标记基因的方法相结合,并采用高通量筛选方法,取得较好的效果,为其他菌株育种提供了参考,具有一定的应用价值。

## 参 考 文 献

- [1] Liu HM, He YJ, Jiang HX, et al. Characterization of a phenazine-producing strain *Pseudomonas chlororaphis* GP72 with broad-spectrum antifungal activity from green pepper rhizosphere[J]. *Current Microbiology*, 2007, 54(4): 302-306
- [2] Liu KQ, Hu HB, Wang W, et al. Genetic engineering of *Pseudomonas chlororaphis* GP72 for the enhanced production of 2-Hydroxyphenazine[J]. *Microbial Cell Factories*, 2016, 15(1): 131
- [3] Huang L, Chen MM, Wang W, et al. Enhanced production of 2-hydroxyphenazine in *Pseudomonas chlororaphis* GP72[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2011, 89(1): 169-177
- [4] Gepts P. A comparison between crop domestication, classical plant breeding, and genetic engineering[J]. *Crop Science*, 2002, 42(6): 1780-1790
- [5] Wang Q, Feng LR, Wei L, et al. Mutation breeding of lycopene-producing strain *blakeslea trispora* by a novel atmospheric and room temperature plasma (ARTP)[J]. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2014, 174(1): 452-460
- [6] Zong H, Zhan Y, Li X, et al. A new mutation breeding method for *Streptomyces albulus* by an atmospheric and room temperature plasma[J]. *African Journal of Microbiology Research*, 2012, 6(13): 3154-3158
- [7] Long H, Masato K. Application of GFP mark on inbred depuration of transgenic medaka (*Oryzias latipes*)[J]. *Hereditas*, 2003, 25(4): 409-413 (in Chinese)  
龙华, 木下政人. GFP 标记在转基因青鳞同系繁殖纯化中的应用[J]. *遗传*, 2003, 25(4): 409-413
- [8] Ha DS, Schwarz JK, Turco SJ, et al. Use of the green fluorescent protein as a marker in transfected *Leishmania*[J]. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 1996, 77(1): 57-64
- [9] Yakoby, Bristow, Christopher A, et al. A combinatorial code for pattern formation in *Drosophila* oogenesis[J]. *Developmental Cell*, 2008, 15(5): 725
- [10] Tang YJ, Martin HG, Dehal PS, et al. *Shewanella* spp. reveals evolutionary robustness in central carbon metabolism[J]. *Biotechnology & Bioengineering*, 2009. DOI: 10.1002/bit.22129
- [11] Schweizer HP, Hoang TT. An improved system for gene replacement and *xylE* fusion analysis in *Pseudomonas aeruginosa*[J]. *Elsevier Science*, 1995, 158(1): 15-22
- [12] Tan J, Xiong X, Liang WL, et al. Breeding of a phenazine-1-carboxamid-producing strain by ARTP mutation and its optimization of fermentation[J]. *Biotechnology Bulletin*, 2016, 32(1): 174-179 (in Chinese)  
谭剑, 熊欣, 梁万利, 等. ARTP 技术选育吩嗪-1-甲酰胺高产菌株及发酵优化[J]. *生物技术通报*, 2016, 32(1): 174-179
- [13] Yuan J, Zhao B, Sun MY, et al. Rapid mutation breeding schizochytrium strains producing high-yield docosahexenoic acid by atmospheric and room temperature plasmas (ARTP)[J]. *Biotechnology Bulletin*, 2015, 31(10): 199-204 (in Chinese)  
袁军, 赵桦, 孙梦玉, 等. 常压室温等离子体(ARTP)诱变快速选育高产 DHA 的裂殖壶菌突变株[J]. *生物技术通报*, 2015, 31(10): 199-204
- [14] Shi WJ, Tan J, Chu J, et al. High-throughput screening for high-yield strains of *Monascus* pigment[J]. *China Brewing*, 2012, 31(7): 25-28 (in Chinese)  
石文娟, 谭俊, 储炬, 等. 红曲色素高产菌株的高通量选育[J]. *中国酿造*, 2012, 31(7): 25-28
- [15] Li XM, Luo FN, Wang X, et al. Bioassay of recombinant green fluorescent protein gene yeast cell for a high throughput to screen estrogenic compounds[J]. 2008, 24(12): 2093-2097 (in Chinese)  
李湘鸣, 罗方妮, 汪霄, 等. 高通量筛选雌激素类化合物重组绿色荧光蛋白酵母细胞测评体系[J]. 2008, 24(12): 2093-2097
- [16] Lu Y, Wang LY, Ma K, et al. Characteristics of hydrogen production of an *Enterobacter aerogenes* mutant generated by a new atmospheric and room temperature plasma (ARTP)[J]. *Biochemical Engineering Journal*, 2011, 55(1): 17-22
- [17] Cheng HY, Silberg J, Masiello C. Gas replacements for GFP to track microbial dynamics in soils and sediments[A]//EGU General Assembly Conference Abstracts[C]. Vienna Austria, 2016, 18: 11287