



防御假单胞菌双突变体 H78 Δ rsmA/E 中 *hmgA* 基因对藤黄绿菌素生物合成的抑制

关业俊 王正 向涛 张雪洪 黄显清*

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:【背景】防御假单胞菌(*Pseudomonas protegens*) H78 是分离于油菜根际的一株生防菌, 其能合成藤黄绿菌素(pyoluteorin, Plt)等多种广谱抗生素, H78 的 *rsmA/E* 双突变体中 Plt 合成被完全抑制。

【目的】通过转座子诱变技术, 筛选 H78 Δ rsmA/E 双突变体中重新激活 Plt 合成的下游调控因子。【方法】通过同源重组的方法在 *pltL* 基因下游插入红色荧光蛋白(red fluorescent protein, RFP)基因来指示 Plt 操纵子表达的激活情况; 利用转座子随机插入突变、半随机 PCR 技术筛选并定位目标基因; 通过基因回补等方法进一步验证基因功能。【结果】从约 2 万株 H78 Δ rsmA/E 的转座子突变体中筛选到一株高产 Plt 和某种黑色素的菌株, 并确定其插入位点为 *hmgA* 基因, *hmgA* 基因回补能重新抑制 H78 Δ rsmA/E 的 Plt 合成。【结论】假单胞菌双突变体 H78 Δ rsmA/E 中 *hmgA* 基因对 Plt 的合成存在强烈抑制作用, 是潜在的 RsmA/E 下游调控基因。本研究为进一步阐明 Plt 合成的调控机制与网络及通过基因工程提高 Plt 产量奠定了基础。

关键词: 防御假单胞菌, H78 Δ rsmA/E 双突变体, 转座子诱变, *hmgA* 基因, 藤黄绿菌素

Inhibition of the *hmgA* gene on pyoluteorin biosynthesis in *rsmA/E* dual mutant of *Pseudomonas protegens* H78

GUAN Ye-Jun WANG Zheng XIANG Tao ZHANG Xue-Hong HUANG Xian-Qing*

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

Abstract: [Background] *Pseudomonas protegens* H78, a biocontrol strain isolated from the rape rhizosphere, can produce multiple broad-spectrum antibiotics such as pyoluteorin (Plt). Plt biosynthesis is completely inhibited by the *rsmA/E* dual mutation in *Pseudomonas protegens* H78. [Objective] The aim of this study is to screen the downstream regulatory factors for reactivating Plt biosynthesis in the H78 Δ rsmA/E dual mutant by transposon mutagenesis. [Methods] The red fluorescent protein (RFP) gene was inserted downstream of the Plt biosynthetic gene *pltL* by homologous recombination to indicate the activation of Plt operon expression. The target gene was screened and located by the transposon-based random insertion mutation and the semi-random PCR. The gene function was further confirmed by the

Foundation items: Shanghai Natural Science Foundation (19ZR1427600); National Natural Science Foundation of China (31270083, 31470196)

*Corresponding author: Tel: 86-21-34207047; E-mail: xqhuang66@sjtu.edu.cn

Received: 25-03-2020; Accepted: 12-04-2020; Published online: 09-05-2020

基金项目: 上海市自然科学基金(19ZR1427600); 国家自然科学基金(31270083, 31470196)

*通信作者: Tel: 021-34207047; E-mail: xqhuang66@sjtu.edu.cn

收稿日期: 2020-03-25; 接受日期: 2020-04-12; 网络首发日期: 2020-05-09

gene complement method. **[Results]** A mutant with high yield of Plt was screened from about 20 000 transposon insertion mutants of H78 Δ rsmA/E, and its mutation site was determined to be within the *hmgA* gene. In turn, the *hmgA* complementation can inhibit Plt biosynthesis in the H78 Δ rsmA/E strain. **[Conclusion]** In the H78 Δ rsmA/E dual mutant of *P. protegens*, the *hmgA* gene shows strong inhibitory effect on Plt biosynthesis. The *hmgA* gene is a potential downstream regulatory gene of RsmA/E. This study lays a foundation for further elucidating the regulatory mechanism and network of Plt biosynthesis and improving the yield of Plt through genetic engineering.

Keywords: *Pseudomonas protegens*, rsmA/E dual mutant, Transposon mutagenesis, *hmgA*, Pyoluteorin

Pseudomonas protegens H78 是一株分离于油菜根际的生防细菌, 能产生多种具有抗菌活性的次级代谢产物, 其中藤黄绿菌素(pyoluteorin, Plt) 具有广谱抗真菌、抗细菌活性^[1]。Plt 合成受到 Gac/Rsm 信号转导级联、群体感应系统、RNA 分子伴侣 Hfq 等全局调控系统的控制^[2-4]。

RsmA、RsmE 是位于 Gac/Rsm 信号转导级联下游的两个同源、结合 RNA 的翻译调控蛋白; 前期研究表明, 在 *P. protegens* H78 中, *rsmA* 基因单敲除会引起 Plt 产量降低, *rsmE* 单敲除会导致 Plt 产量显著上升, 然而同时敲除这两个基因后 Plt 合成及 *pltL-G* 合成操纵子的转录均被完全抑制^[5]。我们推测, *rsmA* 和 *rsmE* 双突变可能影响到下游某个重要转录因子的表达, 进而抑制 Plt 合成及基因表达。为此, 本研究拟用转座子

诱变技术筛选 RsmA/E 下游调控因子, 为进一步诠释 Plt 合成调控网络、通过基因工程提高 Plt 产量奠定基础。

据文献报到, 在铜绿假单胞菌中, *hmgA* 基因失活会导致尿黑酸的积累, 使得菌体呈现为褐色^[6-7]。本研究利用转座子诱变技术, 在 Plt 合成受到抑制的 H78 Δ rsmA/E 双突变体中开展随机插入突变, 寻找影响 Plt 合成的基因。旨在证实防御假单胞菌 H78 Δ rsmA/E 双突变体中 *hmgA* 基因对 Plt 合成的作用。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒及引物

研究所用菌株和质粒见表 1, 所用引物委托华大基因进行合成, 引物名称和序列详见表 2。

表 1 菌株和质粒

Table 1 Strains and plasmids used in this study

Strains/Plasmids	Characteristics	Source
<i>P. protegens</i>		
H78	Wild type, Sp ^f	This lab
H78 Δ rsmA/E	Double deletion of <i>rsmA</i> and <i>rsmE</i>	This lab
H78 Δ rsmA/E-TM1	Transposon insertion mutant of <i>hmgA</i> in H78 Δ rsmA/E	This study
H78 Δ rsmA/E-RFP	Insert the RFP gene into the end of the <i>pltL</i> gene	This study
<i>E. coli</i>		
DH5 α	<i>supE44</i> Δ lacU169(Φ 80 <i>lacZ</i> AM15) <i>hsdR17</i> <i>recA1</i> <i>endA1</i> <i>gyrA96</i> <i>thi-1</i> <i>relA1</i>	This lab
S17	<i>res</i> ⁻ <i>pro</i> <i>mod</i> ⁺ integrated copy of RP4, <i>mob</i> ⁺	This lab
Plasmids		
pK18mobsacB	Broad-host-range gene replacement vector; <i>sacB</i> , Km ^r	This lab
pK18-RFP	pK18mobsacB with <i>EcoR</i> I- <i>Hind</i> III insert of 763 bp and 663 bp segments flanking segments <i>pltL</i> and 678 bp RFP coding region was connected in the middle, Km ^r	This study
pME6032	Pvs1-p15A <i>E. coli</i> - <i>Pseudomonas</i> shuttle vector, <i>lacI</i> ^q - <i>Ptac</i> expression vector, Tc ^r	This study
pME6032- <i>hmgA</i>	1 364 bp <i>EcoR</i> I- <i>Xho</i> I fragment containing the entire <i>hmgA</i> ORF and its upstream promoter/operator region was cloned into pME6032, Tc ^r	This study

表 2 引物信息

Table 2 Primers used in this study

Primers name	Sequences (5'→3')	Source
<i>hmgA</i> -F	GAGAGAGAATTC CCCC TCCTATTCCA ACTT CCA (<i>EcoR</i> I)	This study
<i>hmgA</i> -R	GAGAGACTCGAGCTTGCC ACC ATCACCCGTAG (<i>Xho</i> I)	This study
<i>pltL</i> -F1	ACATGATTACGAATTC CGC CTTCATTCTAAATCCTTTTA (<i>EcoR</i> I)	This study
<i>pltL</i> -R1	TTAGGCGCACTCGGCCTTTAGTTGCT	This study
RFP-F	GGCCGAGTGC GC CTAACAGAATTCAAAAGATCTTTTAAGAAGG	This study
RFP-R	TTAAGCACCGGTGGAGTGACGACCTT	This study
<i>pltL</i> -F2	CTCCACCGGTGCTTAACAGGGAGTGGGCAATGAGCGATCATG	This study
<i>pltL</i> -R2	GGCCAGTGCC AAGCTT GTGCGCCGACTTGCGGTGCGAAGTTGTC (<i>Hind</i> III)	This study
P1	AGCGACTTGACCTGATAGTTTGGC	This study
ARB	GGCCACGCGTCGACTAGTAC	This study
ARB1	GGCCACGCGTCGA CTAGTACNNNNN NNNNAGAG	This study
ARB2	GGCCACGCGTCGACTAGTACNNNNN NNNNACGCC	This study
ARB3	GGCCACGCGTCGACTAGTACNNNNN NNNNGATAT	This study
<i>hmgA</i> -F	GAGAGAGAATTC CCCC TCCTATTCCA ACTT CCA (<i>EcoR</i> I)	This study
<i>hmgA</i> -R	GAGAGACTCGAGCTTGCC ACC ATCACCCGTAG (<i>Xho</i> I)	This study
<i>pltL</i> -F1	ACATGATTACGAATTC CGC CTTCATTCTAAATCCTTTTA (<i>EcoR</i> I)	This study

1.1.2 菌株培养基及培养条件

(1) LB 培养基(g/L): 胰蛋白胨 10.0, 酵母提取物 5.0, NaCl 10.0, 加蒸馏水至 1.0 L, 调 pH 至 7.5, 配制成固体培养基需添加 12 g/L 琼脂。(2) KMB (King's Medium B)培养基(g/L): 国产胰蛋白胨 20.0, 甘油 18.96, K₂HPO₄·3H₂O 0.514, MgSO₄ 0.732, 加蒸馏水至 1.0 L, 调 pH 至 7.5, 配制成固体培养基需添加 12 g/L 琼脂。(3) 抗生素使用浓度: 大肠杆菌为 Kan 50 μg/mL、Amp 100 μg/mL、Tc 15 μg/mL; 假单胞杆菌为 Kan 50 μg/mL、Amp 100 μg/mL、Tc 40 μg/mL。(4) 培养条件: 假单胞菌 28 °C、220 r/min; 大肠杆菌 37 °C、220 r/min。

1.1.3 主要试剂和仪器

Easy Taq Mix DNA 聚合酶、DNA Marker, 北京全式金生物技术有限公司; Solution I DNA 连接酶、DNA 限制性内切酶, New England Biolabs 公司; 质粒提取试剂盒、DNA 片段纯化试剂盒, 生工生物工程(上海)股份有限公司; 反相 C18 色谱柱(4.6×150 mm, 5 μm), 安捷伦科技(中国)有限公司。

1.2 构建指示菌株

质粒的提取、DNA 片段纯化、基因组纯化等均按照试剂盒说明书操作。DNA 操作及 PCR 反应参考文献[8]。

为了直观地筛选 *Plt* 操纵子表达显著增强的转座子突变体, 在 *Plt* 合成基因后插入 RFP, 根据 RFP 表达所产生红色的出现与加深, 间接反映 *Plt* 操纵子表达与 *Plt* 合成的激活与提高。

构建同源重组质粒 *pk18-RFP*。利用 *pltL*-F1/*pltL*-R1、*pltL*-F2/*pltL*-R2 两对引物, 以 H78ΔrsmA/E 基因组为模板扩增出 *pltL* 基因末端上下游两个大小分别为 761 bp 和 663 bp 的同源片段; 以携带 RFP 基因的质粒为模板, 利用 RFP-F/RFP-R 扩增出大小为 678 bp 的 RFP 基因; 再利用 *EcoR* I/*Hind* III 双酶切 *pK18mobsacB* 载体; 然后利用 DNA 连接酶将上述 4 个片段连接; 最后将重组质粒 *pk18-RFP* 转入大肠杆菌 DH5α 扩增, 进行测序验证。接着将成功构建的重组质粒 *pk18-RFP* 转入大肠杆菌 S17。

将携带 *pk18-RFP* 质粒的大肠杆菌 S17 与 H78ΔrsmA/E 双突变体进行双亲杂交, 通过单交

换筛选、双交换筛选以及菌落 PCR 验证, 获得指示菌株 H78 Δ rsmA/E-RFP。

1.3 转座子插入突变筛选

将构建好的指示菌株 H78 Δ rsmA/E-RFP, 与携带转座子 Mini-Tn5 *lacZ-tet/1* 的大肠杆菌 S17 进行接合转移实验。如图 1 所示, 转座子插入片段上携带有卡那抗性基因和四环素抗性基因。

首先将两株菌在平板上分别转接活化2次, 然后接种至添加相应抗生素(假单胞菌 Amp 100 μ g/mL, 大肠杆菌 Kan 50 μ g/mL、Tc 15 μ g/mL)的 LB 液体培养基中, 培养 12–16 h 后, 分别取 2 mL 假单胞菌和 1 mL 大肠杆菌培养液, 12 000 r/min 离心 30 s 去上清, 加入 2 mL LB 悬浮, 再次离心去上清, 尽量除去抗生素; 接着用 100 μ L LB 混合两者, 接种至无抗 LB 平板静置接合培养 48 h 后, 刮取适量菌体均匀涂抹至三抗平板上(Kan 50 μ g/mL、Amp 100 μ g/mL、Tc 40 μ g/mL), 培养约 48 h 后, 挑取单克隆接种至相同三抗平板上培养, 观察并筛选与原始菌株颜色发生显著变化的菌株进行发酵, 参照文献[4]测定 Plt 产量是否发生显著变化。

1.4 确定转座子插入突变位点

利用半随机任意 PCR 技术确定转座子在基因组上的插入位点, 通过查阅文献得知, 序列 AGAG、ACGCC 和 GATAT 在假单胞菌基因组中重复出现的频率很高^[10-12], 设计出 3 条随机引物 ARB1、ARB2 和 ARB3, 然后根据已知的插入片段序列设计引物 P1。利用 P1/ARB1、P1/ARB2、P1/ARB3 三对引物, 以 H78 Δ rsmA/E-TM1 突变株

基因组为模板进行 PCR, 利用胶回收试剂盒纯化回收克隆出最大的 DNA 片段, 再利用 P1/ARB 为引物对, 以回收的 DNA 片段为模板, PCR 扩增出单一条带进行测序。测序结果与假单胞菌 H78 全基因组进行比对, 确定插入突变位点。

1.5 *hmgA* 基因过表达质粒的构建

以 *hmgA*-F/*hmgA*-R 为引物对, 提取野生型假单胞菌基因组 DNA 作为模板, PCR 扩增出 *hmgA* 基因, 利用 *EcoR* I/*Xho* I 双酶切扩增出的 *hmgA* 基因和 pK18mobsacB 载体, 再通过 DNA 连接酶将两个片段连接在 pME6032 质粒上, 再将重组质粒 pME6032-*hmgA* 转化至筛选所得到的转座子突变株中。

2 结果与分析

2.1 指示菌株 H78 Δ rsmA/E-RFP 的构建及验证

通过同源重组的方式构建指示菌株, 原理如图 2A 所示。最后利用菌落 PCR 验证, 如图 2B 所示为 PCR 产物电泳图, 并经测序进一步验证指示菌株构建成功, 命名为 H78 Δ rsmA/E-RFP。

2.2 在 H78 Δ rsmA/E 中进行转座子诱变筛选并确定转座子插入位点

将构建成功的 H78 Δ rsmA/E-RFP 突变菌株与携带转座子 Mini-Tn5 *lacZ-tet/1* 的大肠杆菌 S17 进行接合转移实验, 通过大量筛选得到一株红色菌株, 如图 3A 所示, 命名为 H78 Δ rsmA/E-TM1。将该突变株接种在 KMB 培养基(28 $^{\circ}$ C、220 r/min)进行发酵, 如图 3B 所示, H78 Δ rsmA/E-TM1 发酵液颜色为褐色, 相比于 H78 野生型菌株和 H78 Δ rsmA/E

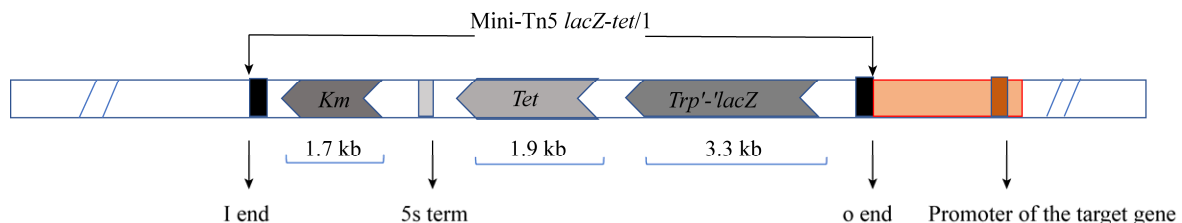


图 1 双元报告转座子 Mini-Tn5 *lacZ-tet/1* 结构示意图^[9]

Figure 1 Structure diagram of Mini-Tn5 *lacZ-tet/1* transposon^[9]

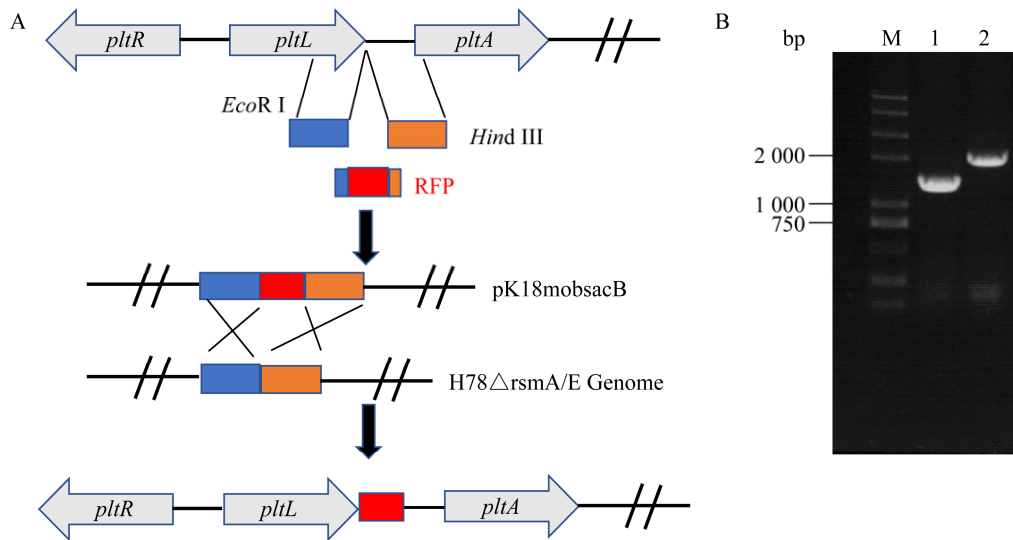


图 2 H78 Δ rsmA/E-RFP 突变株构建图谱(A)和 PCR 产物电泳验证图(B)
Figure 2 Construction map (A) and PCR confirmation (B) of H78 Δ rsmA/E-RFP mutant
 Note: M: DNA Marker; 1: H78 Δ rsmA/E; 2: H78 Δ rsmA/E-RFP.

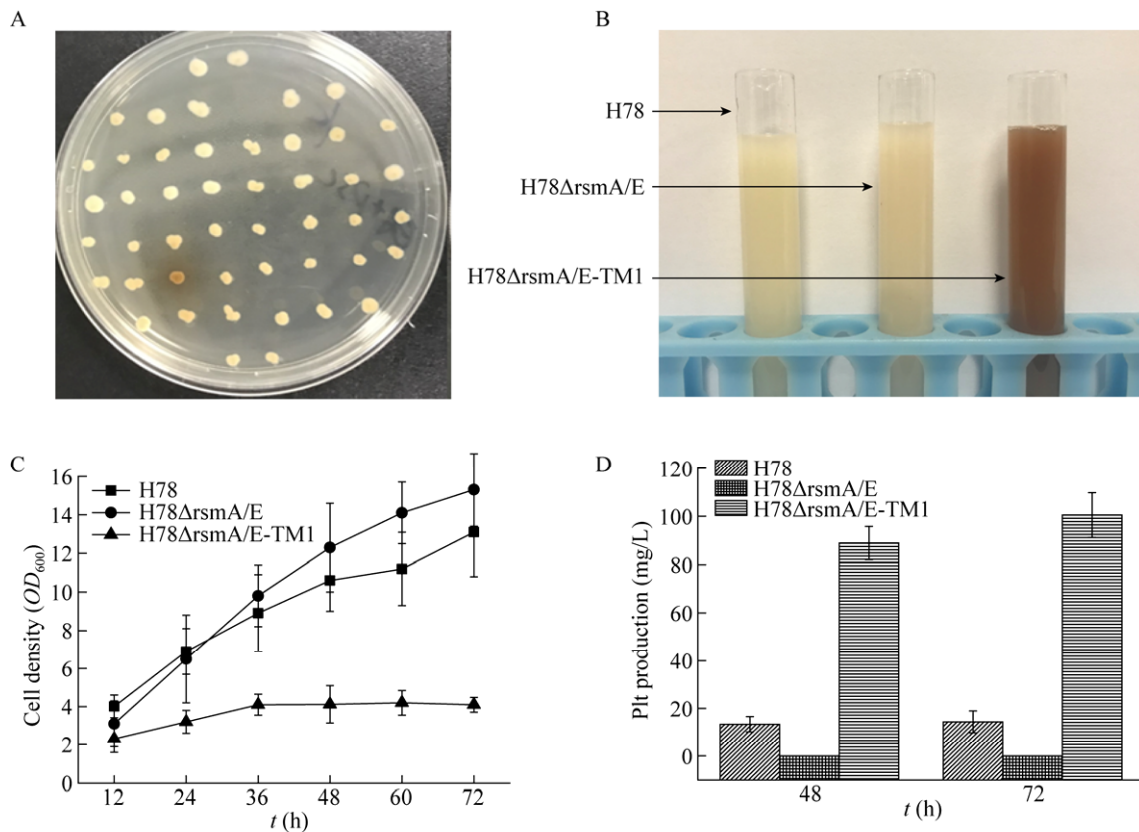


图 3 转座子插入突变体 H78 Δ rsmA/E-TM1 的筛选及其对细菌生长、Plt 合成的影响
Figure 3 Screening of transposon insertion mutant H78 Δ rsmA/E-TM1 and its influence on bacterial growth and Plt biosynthesis
 Note: A: Screening of the H78 Δ rsmA/E-TM1 strain; B: Fermentation liquor color; C: Cell density (OD_{600}); D: Plt production of H78, H78 Δ rsmA/E and H78 Δ rsmA/E-TM1 in KMB media.

突变体的发酵液颜色存在较大差别。H78 Δ rsmA/E-TM1 突变株的生长受到严重抑制, 最大 OD_{600} 值为 4.0 左右, 如图 3C 所示。在 48、72 h 分别取样检测 Plt 产量, 如图 3D 所示, H78 野生型菌株 Plt 的产量为 14 mg/L, 双突变株 H78 Δ rsmA/E Plt 产量为零, 转座子插入突变株 H78 Δ rsmA/E-TM1 的 Plt 产量为 100.5 mg/L。在 *rsmA/rsmE* 同时被敲除时, Plt 合成基因簇的表达几乎完全被关闭, 但是突变株 H78 Δ rsmA/E-TM1 的产量急剧升高, 且生长状况受到严重抑制, 说明插入突变的位点的基因与 Plt 的合成有着密切关系。

接着利用半随机任意 PCR 技术确定转座子插

入位点位于 *hmgA* 基因, *hmgA* 基因编码尿黑酸基因 1,2-双加氧酶, 与尿黑酸合成有关, 这可能导致发酵呈现褐色的原因。

2.3 *hmgA* 基因的过表达对 H78 Δ rsmA/E-TM1 中 Plt 生物合成的影响

实验结果如图 4 所示, 空质粒 pME6032 对突变株 H78 Δ rsmA/E-TM1 的生长和 Plt 的合成没有产生明显的影响, 而当过表达质粒 pME6032-*hmgA* 转入突变株 H78 Δ rsmA/E-TM1 后发酵液颜色由褐色显著变淡, 细胞生长相比于突变株 H78 Δ rsmA/E-TM1 明显变好, OD_{600} 值显著上升, 由 4.0 上升至 9.1, 但是并没有恢复到野生型和双突

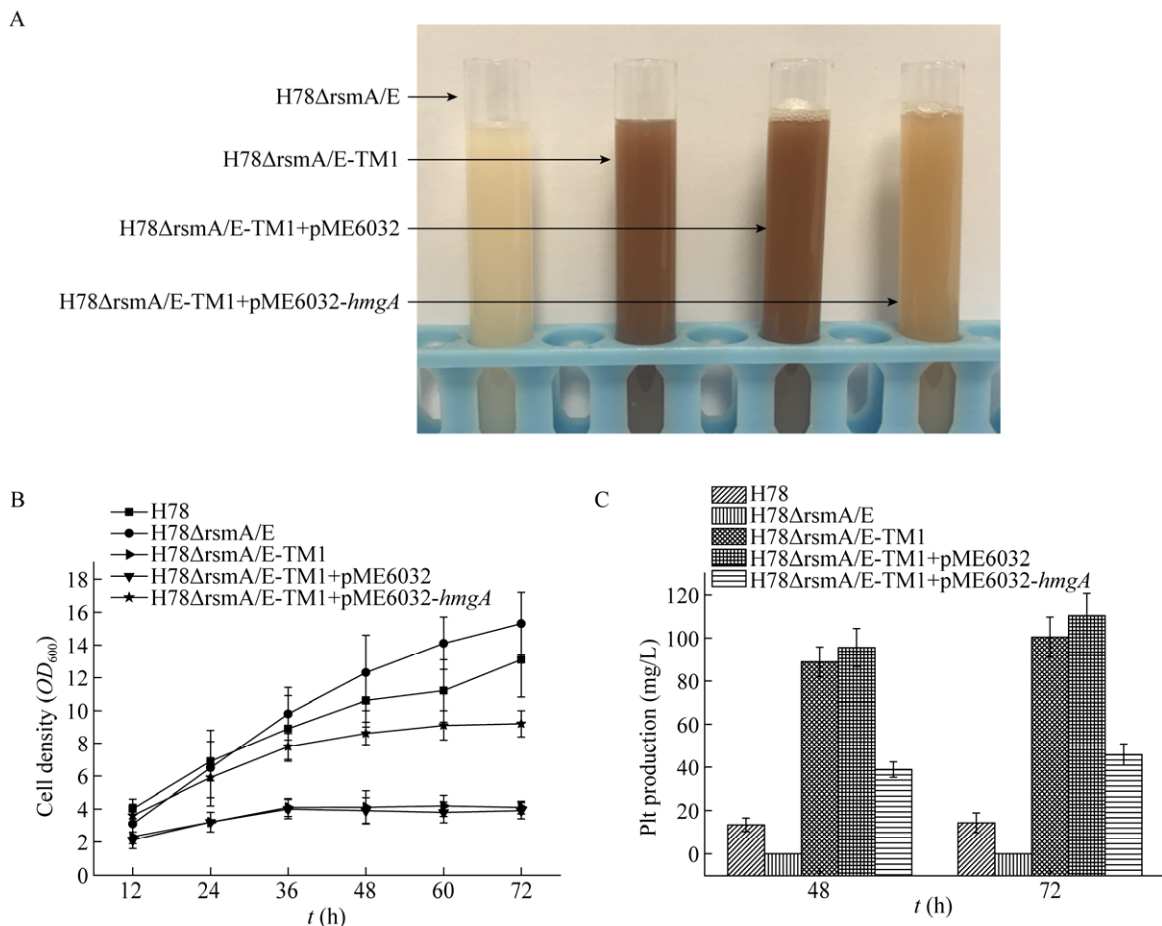


图 4 *hmgA* 基因过表达对 H78 Δ rsmA/E-TM1 生长及 Plt 合成的调控

Figure 4 Regulation of the *hmgA* overexpression on bacterial growth and Plt biosynthesis in H78 Δ rsmA/E-TM1

Note: A: Fermentation liquor color; B: Cell density (OD_{600}); C: Plt production of five strains, including H78, H78 Δ rsmA/E, H78 Δ rsmA/E-TM1 and its derivative strains harboring the *hmgA* overexpression plasmid or the empty plasmid pME6032, in KMB media.

变株 H78 Δ rsmA/E 生长水平; 同时过表达质粒 pME6032-*hmgA* 的导入使 H78 Δ rsmA/E-TM1 的 Plt 产量由 100.5 mg/L 显著下降至 45.8 mg/L。进一步证实了 *hmgA* 基因对 H78 Δ rsmA/E 中 Plt 的合成存在强烈的抑制作用, 是参与 Plt 生物合成的 RsmA/E 调控蛋白的潜在下游调控因子。

3 讨论与结论

以 Plt 合成受到完全抑制的 H78 Δ rsmA/E 双突变体为对象开展转座子随机诱变, 筛选得到 Plt 合成被重新激活并显著提升的三突变体 H78 Δ rsmA/E-TM1, 并确定其插入位点为编码尿黑酸基因 1,2-双加氧酶的 *hmgA* 基因。研究显示, 在双突变株 H78 Δ rsmA/E 中, *hmgA* 基因对 Plt 合成存在显著的抑制作用。*hmgA* 基因为 RsmA/E 调控蛋白潜在的下游调控因子。在防御假单胞菌株 H78 中, Gac/Rsm 信号转导调控系统对 Plt 合成存在多条复杂的调控通路^[5]。GacA/GacS 二元调控系统通过 sRNA RsmXYZ、翻译调控蛋白 RsmA/E 级联调控 Plt 生物合成, 在 *rsmA* 和 *rsmE* 双敲除的情况下, Plt 的合成完全被抑制^[5], 但当 *hmgA* 突变, Plt 的合成被重新激活并显著提升至 100.5 mg/L, 我们推测 *hmgA* 可能通过一条新的调控路径参与 Plt 合成的调控。*hmgA* 基因与 RsmA/E 调控系统如何调控 Plt 合成及其调控机制有待进一步研究。本研究为进一步阐明 Plt 合成的调控机制与网络提供了新的方向, 同时为通过基因工程技术提高 Plt 合成提供了新的思路。

REFERENCES

- [1] Nowak-Thompson B, Gould SJ, Loper JE. Identification and sequence analysis of the genes encoding a polyketide synthase required for pyoluteorin biosynthesis in *Pseudomonas fluorescens* Pf-5[J]. *Gene*, 1997, 204(1/2): 17-24
- [2] Wei X, Huang XQ, Tang LL, et al. Global control of GacA in secondary metabolism, primary metabolism, secretion systems, and motility in the rhizobacterium *Pseudomonas aeruginosa* M18[J]. *Journal of Bacteriology*, 2013, 195(15): 3387-3400
- [3] Wang GH, Huang XQ, Li SN, et al. The RNA chaperone Hfq regulates antibiotic biosynthesis in the rhizobacterium *Pseudomonas aeruginosa* M18[J]. *Journal of Bacteriology*, 2012, 194(10): 2443-2457
- [4] Huang XQ, Zhu DH, Ge YH, et al. Identification and characterization of *pltZ*, a gene involved in the repression of pyoluteorin biosynthesis in *Pseudomonas* sp. M18[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2004, 232(2): 197-202
- [5] Wang Z, Huang XQ, Liu YJ, et al. GacS/GacA activates pyoluteorin biosynthesis through Gac/Rsm-RsmE cascade and RsmA/RsmE-driven feedback loop in *Pseudomonas protegens* H78[J]. *Molecular Microbiology*, 2017, 105(6): 968-985
- [6] Rodríguez-Rojas A, Mena A, Martín S, et al. Inactivation of the *hmgA* gene of *Pseudomonas aeruginosa* leads to pyomelanin hyperproduction, stress resistance and increased persistence in chronic lung infection[J]. *Microbiology*, 2009, 155(4): 1050-1057
- [7] Arias-Barrau E, Olivera ER, Luengo JM, et al. The homogentisate pathway: a central catabolic pathway involved in the degradation of L-phenylalanine, L-tyrosine, and 3-hydroxyphenylacetate in *Pseudomonas putida*[J]. *Journal of Bacteriology*, 2004, 186(15): 5062-5077
- [8] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*[M]. Jin DY, Li MF, trans. 2nd ed. Beijing: Science Press, 1992 (in Chinese)
萨姆布鲁克 J, 弗里奇 EF, 曼尼阿蒂斯 T. *分子克隆实验指南*[M]. 金冬雁, 黎孟枫, 译. 2 版. 北京: 科学出版社, 1992
- [9] Miller VL, Mekalanos JJ. A novel suicide vector and its use in construction of insertion mutations: osmoregulation of outer membrane proteins and virulence determinants in *Vibrio cholerae* requires *toxR*[J]. *Journal of Bacteriology*, 1988, 170(6): 2575-2583
- [10] Jacobs MA, Alwood A, Thaipisuttikul I, et al. Comprehensive transposon mutant library of *Pseudomonas aeruginosa*[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2003, 100(24): 14339-14344
- [11] Chun KT, Edenberg HJ, Kelley MR, et al. Rapid amplification of uncharacterized transposon-tagged DNA sequences from genomic DNA[J]. *Yeast*, 1997, 13(3): 233-240
- [12] O'Toole GA, Kolter R. Initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* WCS365 proceeds via multiple, convergent signalling pathways: a genetic analysis[J]. *Molecular Microbiology*, 1998, 28(3): 449-461