

李海娟,徐玲玲.在嗜热栖热菌中开发无需筛选标记的基因敲除手段[J].江西农业大学学报,2019,41(3):577-583.



在嗜热栖热菌中开发无需筛选标记的基因敲除手段

李海娟,徐玲玲

(西安文理学院 生物与环境工程学院,陕西 西安 710065)

摘要:嗜热栖热菌(*Thermus thermophilus*)是多倍体,在基因敲除过程中,可形成同时含有突变型和野生型等位基因的杂合子,在无选择压力下,杂合子会转化成只含有其中一种等位基因的纯合子。利用此原理,在*T. thermophilus*中开发了一种新的基因无痕敲除手段,基本方案是:将目的基因的上下游DNA序列克隆到pUC18载体后转化*T. thermophilus*,将转化混合物涂布在无筛选的平板上;混合池法提取96个单菌落的基因组DNA,PCR鉴定出含有突变型等位基因的菌株;将该杂合型突变菌株在无筛选条件下培养后(使杂合子纯化)涂板,通过PCR法从单菌落中鉴定出纯合的基因无痕敲除突变株。利用该系统成功敲除了*T. thermophilus*的TTC0340_0341基因,获得突变体的概率达到了 10^{-2} 。该方法最显著优点是无需任何筛选标记、能在野生型遗传背景下使用。

关键词:嗜热栖热菌;多倍体;基因无痕敲除手段

中图分类号:Q812 文献标志码:A 文章编号:1000-2286(2019)03-0577-07

Development of A Selection-free Gene Clean Deletion Method in *Thermus thermophilus*

LI Hai-juan, XU Ling-ling

(College of Biological and Environmental Engineering, Xi'an University, Xi'an 710065, China)

Abstract: *Thermus thermophilus* is polyploid, during the process of gene deletion, heterozygotes containing both mutant and wild-type alleles simultaneously will be formed, and these heterozygotes are unstable, without any selection pressure, they will become homozygotes that only contain one of the two alleles. By taking advantage of this principle, a new gene clean deletion method was developed in *T. thermophilus*. The basic procedure of this method is as follows: cloning of the upstream and downstream flanking regions of the target gene into pUC18 followed by transformation into *T. thermophilus*, and plating of transformation reaction on non-selective plates; performing genomic DNA preparation of 96 single colonies by the pooling method, then sorting out the strain containing the mutant allele by PCR; cultivation of this heterozygous strain under non-selective

收稿日期:2018-10-12 修回日期:2018-12-03

基金项目:国家自然科学基金项目(31700059)、陕西省自然科学基金基础研究计划项目(2018JQ3037)和陕西省高校科协青年人才托举计划项目(20180210)

Project supported by the National Natural Science Foundation of China(31700059), Natural Science Foundation of Shaanxi Province (2018JQ3037) and Young Talent fund of University Association for Science and Technology in Shaanxi, China (20180210)

作者简介:李海娟(1984—),女,讲师,博士,主要从事极端微生物生理机制研究,orcid.org/0000-0001-9428-6190, hai-juanli@xawl.edu.cn。

condition (facilitating the heterozygotes become homozygotes) and restreaking on agar plates, homozygous gene clean deletion mutants are then detected from the single colonies by PCR method. The functionality of the system was demonstrated by deletion of the TTC0340_0341 gene in *T. thermophilus*, and the mutant-obtaining frequency reached 10^{-2} . The most prominent advantages of this method is that it requires no selection marker and can be utilized under wild-type genetic background.

Keywords: *Thermus thermophilus*; polyploid; gene clean deletion method

嗜热栖热菌 *Thermus thermophilus* 可在 55~85 °C 的温度范围内生长, 已成为研究高温嗜热微生物的模式物种。主要原因在于该菌生长速度快, 容易实现实验室培养, 另外其具备极高效的遗传转化系统^[1-2]。过去的十几年间, 已在 *T. thermophilus* 的模式菌株 HB27 和 HB8 中开发了多个遗传操作手段^[3]。其中, 进行基因敲除最常采用的方法是利用抗生素抗性基因将靶基因取代敲除^[4-7]。这种方法虽然简单, 却有不可避免的缺点, 如: 1) 该抗性标记基因不可在该突变株的遗传背景中得到再次利用, 因为该突变株已经对此特定抗生素产生了抗性; 2) 在突变株的基因组中, 插入的抗性标记基因的启动子很可能会对靶基因的下流基因的表达造成严重影响, 即极性效应 (polar effect), 导致基因组改造达不到预期效果。因此, 该基因操作手段的应用受到了一定限制。为了避免上述缺点, 得到优良的突变体, 研究人员也开发了一些基于“正向-反向筛选原则”(或称“pop-in/pop-out”)的基因无痕敲除手段, 例如, *pyrE* 系统^[8-9]、*rpsL1* 系统^[10]、*bgl-lacZ* 系统^[11]以及 *codA* 系统^[12]。这些系统确实能使目标基因被完全敲除, 没有在基因组中引入不相关的遗传背景。但是, 这些方案基本都需要在特殊的遗传背景下操作、需要筛选标记基因和相对应的筛选底物, 另外需要多个步骤才能实现。以最早开发的 *pyrE* 系统为例, 第一步, 获得 $\Delta pyrE$ 突变株; 第二步, 正向筛选 (pop-in): 将 *pyrE* 作为筛选标记基因构建载体, 再将载体转化 $\Delta pyrE$ 突变株, 在不含尿嘧啶的基础培养基上筛选整合子 (即整个载体插入到目标区域); 第三步, 反向筛选 (pop-out), 使整合子在无筛选的条件下生长一段时间, 让其进行充分的同源重组以使部分细胞切除载体的同时切除基因组中的目标基因; 而后在含有 5-氟乳清酸 (5-FOA, 对表达有 *pyrE* 的细胞具有强烈抑制作用) 和尿嘧啶的基础培养基上筛选出目的基因被切除后单克隆。总体分析, 这些方法步骤繁多, 筛选工作量大, 另外还伴随着相当高的假阳性几率, 因此, 使用范围也受到了限制。在 *T. thermophilus* 中, 目前尚缺乏步骤简单、无需在特殊遗传背景下操作, 另外不需要任何筛选标记基因的基因无痕敲除手段。

T. thermophilus 是多倍体细菌, 对其进行基因敲除过程中, 经常能发现同时含有野生型和突变型等位基因的杂合型细胞, 这种杂合型细胞在无筛选条件下不稳定, 经过一段时间培养后会转化为只含有野生型或只含有突变型等位基因的纯合型细胞^[13]及本研究组未发表数据)。本文正是利用此原理, 在 *T. thermophilus* 中开发了一个无需任何筛选标记基因、可在野生型遗传背景下使用的基因无痕敲除手段, 该手段在染色体基因位点 TTC0340_0341 (后文用 0340_0341 表示) 中得到了成功验证, 获得突变体的几率高达 10^{-2} 。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 菌株 嗜热栖热菌 *T. thermophilus* HB27 (购买自德国微生物菌种保藏中心, NO.DSM7039); *Escherichia coli* DH5 α 来自 Takara 公司。

1.1.2 培养基及培养条件 *T. thermophilus* 用 TB 培养基, 其配方为: 胰化蛋白胨 8 g/L, 酵母提取物 4 g/L, NaCl 3 g/L, pH 7.5, 若为固体培养基, 添加 15 g/L 的琼脂粉。 *T. thermophilus* 的培养条件为 70 °C。大肠杆菌 *E. coli* 用 LB 培养基, 其配方为: 胰化蛋白胨 10 g/L, 酵母提取物 5 g/L, NaCl 5 g/L。 *E. coli* 培养条件为 37 °C。若需要往 LB 培养基中添加氨苄青霉素, 其浓度为 100 μ g/mL。

1.2 试验方法

1.2.1 基因组DNA的提取 利用 TaKaRa MiniBEST Bacteria Genomic DNA Extraction Kit 提取 *T. thermophilus* 的基因组DNA,具体方案参考试剂盒介绍。

1.2.2 0340_0341 基因敲除载体的构建 根据 *T. thermophilus* HB27 染色体上的 (NCBI 登录号 NC_005835) 的 TTC0340_0341 基因位点 (由两个基因即 TTC0340 和 TTC0341 组成的操纵子, NCBI 蛋白质 ID 分别为 WP_011172790.1 和 WP_011172791.1; 两个基因总长度为 1 498 bp, 文中敲除的长度为 1 475 bp, 区域位于 +15 ~ +1 489 bp) 上下游 DNA 序列设计引物 (即 F2-F、F2-R 以及 F1-F、F1-R), 引物位置见图 1, 序列见表 1; 通过 PCR 反应获取 DNA 片段 (上游和下游序列扩增的片段大小分别为 936 bp 和 1 424 bp)。PCR 反应以 *T. thermophilus* HB27 的总基因组 DNA 为模板, 使用 Q5 热启动超保真 DNA 聚合酶 (NEB) 进行反应, 具体条件为 98 °C 30 s; 98 °C 10 s, 60 °C 30 s, 72 °C 50 s, 30 个循环; 72 °C 2 min。使用 *Xba*I 将 pUC18 载体 (2 686 bp) 酶切。采用 1.0% 的琼脂糖凝胶回收以上的 PCR 扩增片段以及线性化的 pUC18 载体后, 通过 Gibson Assembly 反应将两个目的片段连接到载体上, 具体参考 NEB 公司的 Gibson 组装反应试剂盒提供的方案。将 5 μ L 的 Gibson Assembly 反应物直接转化到 100 μ L 的 *E. coli* DH5 α 感受态细胞中, 在含有 100 μ g/mL 氨苄青霉素的 LB 培养平板上筛选得到转化子。使用高纯度质粒小提试剂盒 (TaKaRa) 提取转化子的质粒 DNA, 通过限制性内切酶 *Bam*HI 及 *Eco*RI 对质粒 DNA 进行酶切, 根据酶切片段大小是否符合理论预测值鉴定出含有 pUC- Δ 0340_0341 的目标重组子。将通过限制性内切酶反应筛选出来的目标重组载体进一步进行 DNA 测序验证 (上海生工), 以此分析插入片段的序列准确性。

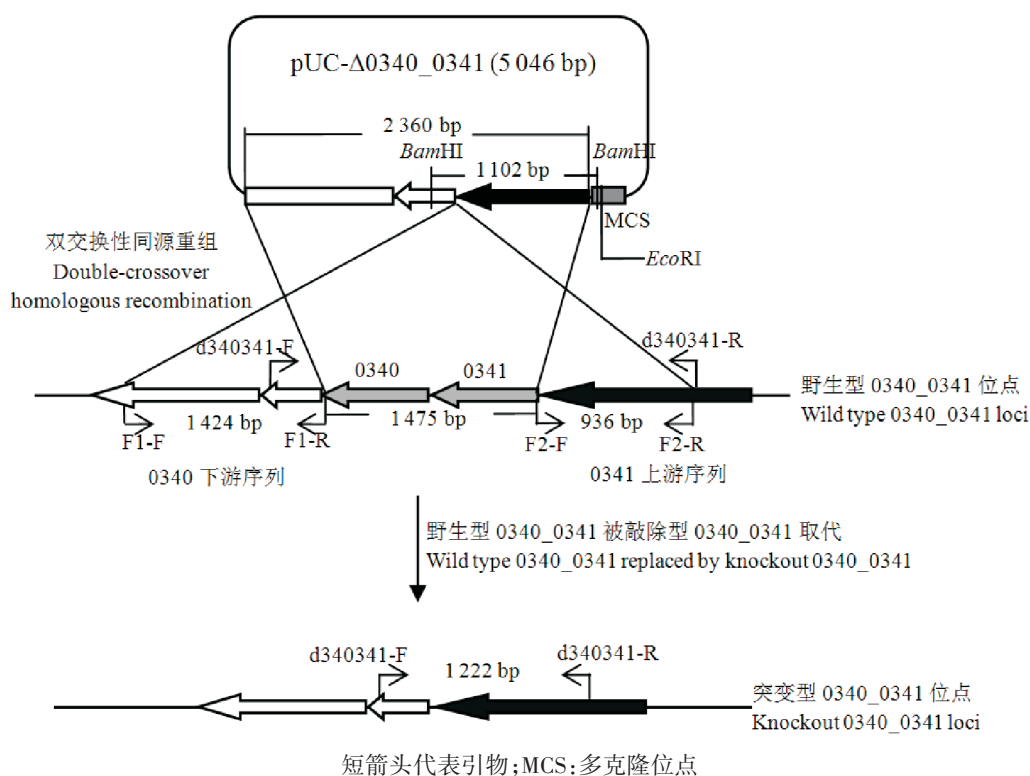


图1 无筛选标记法敲除 *T. thermophilus* HB27 0340_0341 基因的原理示意图

Fig.1 Schematic drawing of the principle of the selection-free gene clean deletion method for deletion of the 0340_0341 gene in *T. thermophilus*

1.2.3 0340_0341 基因敲除突变体的构建 将 pUC- Δ 0340_0341 载体直接转化 *T. thermophilus* HB27, 具体转化方法参考^[14]。将转化混合物稀释 10^{-6} 或 10^{-7} 后, 取 100 μ L 涂布于 TB 培养平板上, 置于 70 °C 培养。随机挑取 96 个单菌落 (每个单菌落形成一个单菌株) 分别置于含有 1.0 mL TB 培养液的 96 孔细胞培养平板中, 70 °C, 150 r/min, 过夜培养。采用混合菌株池法提取基因组 DNA, 将每个横向的 12 个菌株混合, 总

共设计 8 个池。PCR 法挑选出含有突变型等位基因的菌株池,使用的引物(d340341-F 与 d340341-R)根据 *T. thermophilus* HB27 的染色体序列设计,分别位于 0340_0341 基因的上下游 DNA 序列中(图 1、表 1)。进一步,逐个提取该池中的 12 个菌株的基因组 DNA,采用同样的 PCR 定位含有突变型等位基因的菌株。若该菌株为杂合型(即同时含有突变型和野生型的 0340_0341 基因),将其置于无任何筛选的 TB 培养液中培养 24 h,稀释 10^{-6} 或 10^{-7} 后取 100 μ L 涂板。从平板中随机挑选数个单菌落,通过同样的 PCR 方法验证单菌落的基因型,从中即可鉴定出纯合型的 Δ 0340_0341 突变株。

表 1 本文所用到的引物

Tab.1 Primers used in this study

名称 Name	序列*(5' - 3') Sequences (5' - 3')	用途 Usages
F1-F	tgcattgcctgcaggtegactTCGGCGATGCGGTTCTTGTC	用于 PCR 扩增 340_341 基因位点下游序列
F1-R	agcagcatggccaggcttagGCGGGATGAGGTTCCGCGTC	
F2-F	gacggggaacctcatcccgCTAAGCCTGGCCATGCTGCT	用于 PCR 扩增 340_341 基因位点上游序列
F2-R	gtcgggtaccggggatcctGACCGGTACATCCTCGCCAC	
d340341-F	CGGAGGGTCTGGGAGAGGTAG	用于 PCR 检测 340_341 突变体
d340341-R	AACGCGGTCCAGACCGCATTCTC	

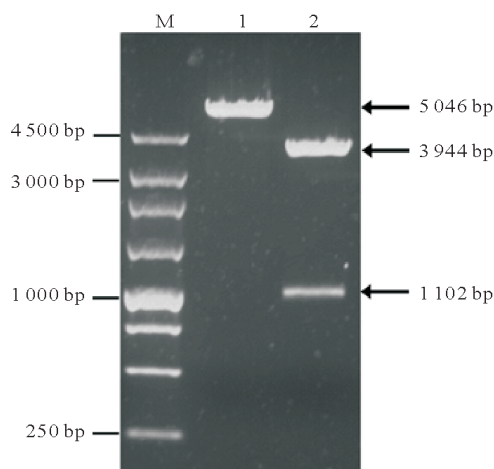
*小写碱基代表两个插入片段之间,或插入片段与载体之间重叠的序列,以便使用 Gibson Assembly 方法进行载体构建

* Lower cases indicate the overlapping sequences between the two inserting fragments, or between the inserts and the vector, which facilitated the vector construction by Gibson Assembly method

2 结果与分析

2.1 基因敲除载体 pUC- Δ 0340_0341 的构建

PCR 分别扩增 0340_0341 基因位点上游 936 bp 和下游 1 424 bp 的 DNA 序列,PCR 产物纯化后经 Gibson 组装反应试剂盒(NEB)克隆到线性化的 pUC18 载体上(2 686 bp,在 *T. thermophilus* 中为非复制型载体)。目标重组载体总大小应为 5 046 bp,插入片段大小应为 2 360 bp(即为 0340_0341 上游 936 bp 和下游 1 424 bp 之和),插入片段中含有一个 *Bam*HI 酶切位点,位于 0340_0341 下游序列中(图 1)。pUC18 载体的多克隆位点上也含有一个 *Bam*HI 酶切位点,以及其他多个单酶切的限制性内切酶位点,如 *Eco*RI。生物信息学预测显示,目标重组载体经 *Bam*HI 酶切,将产生两个片段,大小分别为 1 102 bp(包含 0340_0341 上游序列及部分下游序列)和 3 944 bp(包含 0340_0341 下游的另一部分序列及大部分载体序列);经 *Eco*RI 酶切,将只产生一个大小为 5 046 bp 的片段(图 1)。本文分别采用了 *Bam*HI 以及 *Eco*RI 对转化子中的重组载体进行了酶切验证。通过琼脂糖凝胶电泳分离酶切产物,结果显示 *Bam*HI 酶切产生了 1 102 bp 和 3 944 bp 两个片段,*Eco*RI 酶切产生了 5 046 bp 的一个片段(图 2)。因此,该重组载体的插入片段大小及序列是正确的,为期望的目标重组载体 pUC- Δ 0340_0341。后续,DNA 测序方法进一步验证了 pUC- Δ 0340_0341 载体中插入片段的序列准确性。



1: 重组载体 pUC- Δ 0340_0341 经 *Eco*RI 酶切产生的条带(5 046 bp); 2: 重组载体 pUC- Δ 0340_0341 经 *Bam*HI 酶切产生的条带(1 102 bp 和 3 944 bp); M: 250 bp DNA ladder

1: the band of recombinant vector pUC - Δ 0340_0341 generated by *Eco*RI digestion (5 046 bp); 2: the bands of recombinant vector pUC - Δ 0340_0341 generated by *Bam*HI digestion (1 102 bp and 3 944 bp); M: 250 bp DNA ladder

图 2 利用限制性内切酶反应验证重组载体 pUC- Δ 0340_0341 插入片段的正确性

Fig.2 Restriction digestion reactions were used to verify the correctness of the inserted fragments of recombinant vector pUC- Δ 0340_0341

2.2 PCR 鉴定出含有敲除型 0340_0341 等位基因的菌株池

将 pUC- Δ 0340_0341 转化 *T. thermophilus* HB27 中,由于该载体上含有融合的 0340_0341 基因上下游 DNA 序列,转化后,这两个序列将与染色体上同源的序列发生双交换性同源重组,由此,部分细胞染色体上的野生型 0340_0341 等位基因将被载体上的突变型等位基因取代敲除(原理及设计见图 1)。由于 *T. thermophilus* 的单个细胞含有多条染色体^[13],在转化过程中,有的细胞会出现只有部分染色体上的基因被取代敲除的现象,即形成同时含有野生型和突变型等位基因的杂合细胞。根据此原理,本文首先筛选含有突变型 0340_0341 等位基因的杂合型转化子,因为杂合型转化子出现的几率比纯合的转化子高。将转化混合物稀释后直接涂布在无筛选底物的 TB 平板上,随机挑取 96 个单菌落,采用混合菌株池法(8 个池)提取基因组 DNA,PCR 验证混合菌株的基因型,使用的引物为 d340341-F 与 d340341-R(引物位置见图 1,具体步骤见材料与方 1.2.3)。野生型染色体上含有 0340_0341 等位基因,预测扩增片段大小为 2 697 bp,而突变型染色体上 0340_0341 等位基因(1 475 bp)被敲除,预测扩增片段大小应为 1 222 bp(图 1)。PCR 结果显示 7 个混合菌株池中均含有野生型 0340_0341 等位基因,其中有 4 个池明显含有敲除型 0340_0341 等位基因(图 3,泳道 2、4、8、9),因此,这 4 个池中有部分菌株的 0340_0341 基因已被载体上的突变型等位基因取代敲除。

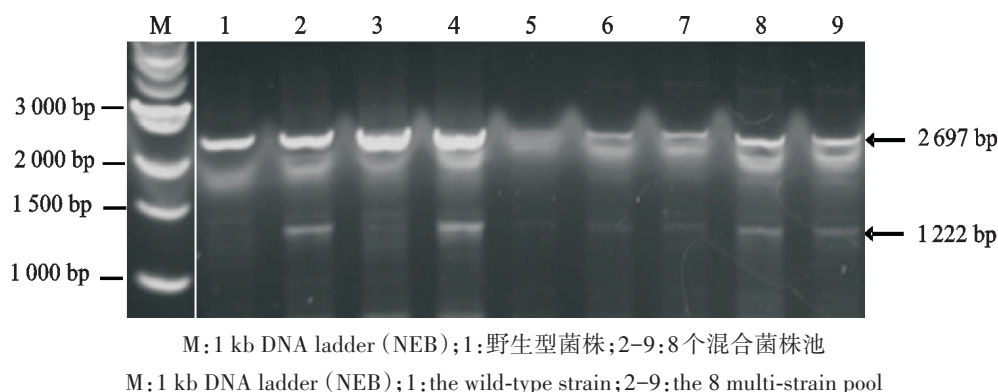
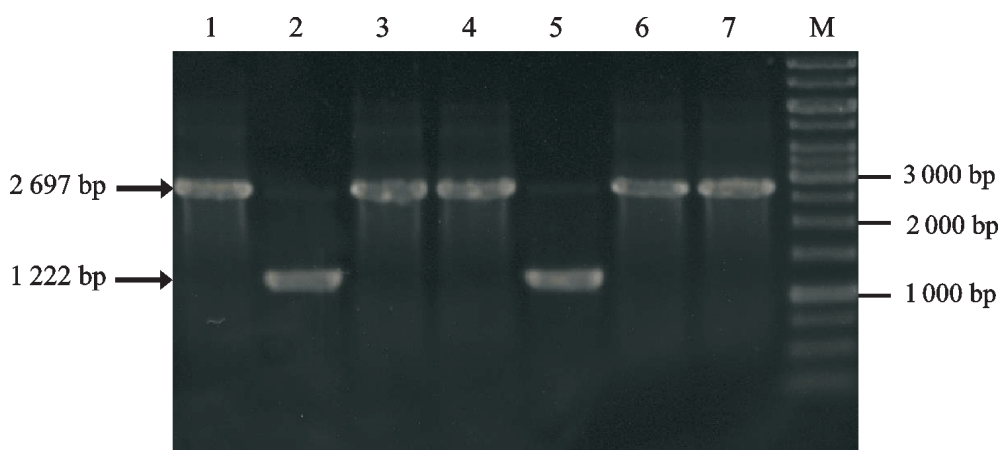


图3 PCR 鉴定出含有敲除型 0340_0341 等位基因的菌株混合池

Fig.3 PCR analysis for sorting out the multi-strain pool that contained the knockout 0340_0341 allele



1, 3, 4, 6, 7: homozygous strains containing the wild-type 0340_0341 allele; 2, 5: homozygous strains containing the knockout 0340_0341 allele (i.e. Δ 0340_0341 mutants); M: 1kb DNA ladder (Thermo Scientific)

图4 PCR 方法鉴定出纯合型 Δ 0340_0341 突变体

Fig.4 PCR analysis for determination of the homozygous Δ 0340_0341 mutant

2.3 纯合型 Δ 0340_0341 突变体的构建

采用与上述同样的 PCR 方法从挑选出的菌株池中(图 3 泳道 4, 含有 12 个菌株)鉴定出含有突变型

等位基因的菌株,该菌株为含有野生型和突变型0340_0341等位基因的杂合子,因此,将其置于无筛选的TB培养液中培养,以使杂合细胞纯合化,之后将培养液稀释涂布,从涂布平板上随机挑取数个单菌落,通过PCR验证单菌落的基因型(引物为d340341-F与d340341-R)。结果显示,挑取的7个菌株中,有两个菌株不含有任何拷贝的野生型0340_0341等位基因,只含有敲除型0340_0341等位基因(条带大小1 222 bp),是完全纯合的 Δ 0340_0341突变株(图4)。因此,采用此方法对*T. thermophilus*进行基因无痕敲除,获得突变体的概率达到了 10^{-2} (即2/96)。

3 结论与讨论

嗜热栖热菌*T. thermophilus*是研究极端微生物的模式物种,具有重要的研究与市场应用价值。例如,该菌提取出来的耐高温蛋白在突然降温的环境下更容易结晶,因此,该菌对蛋白质结构组学研究具有特殊意义^[15];另外,具有作为一个细胞工厂的潜力,可利用其筛选并表达自然环境中耐高温的蛋白质或酶^[16]。为了充分利用该菌,简单有效的基因敲除手段的开发是必备前提,例如,要实现在*T. thermophilus*中筛选有活性的耐高温酶,就必须首先把其自身能表达相关活性的酶基因敲除。目前虽然已有几个可利用的基因无痕敲除手段^[4-12],但都各有缺点,最明显的不足是不能在野生型遗传背景下操作。最近的研究表明^[13]与传统的模式细菌如枯草芽孢杆菌*Bacillus subtilis*、新月柄杆菌*Caulobacter crescentus*不同,*T. thermophilus*是多倍体,意味着其单个细胞含有多条染色体。在特殊情况下,该菌可形成杂合细胞,如在基因敲除过程中,经常就会发现有的突变体是杂合型的,在目标基因位点中可同时含有突变型和野生型等位基因^[13]。本研究正是基于此原理,在*T. thermophilus*中开发了一种新的基因敲除手段。除了*T. thermophilus*,目前已有诸多细菌或古细菌被报道为多倍体,比如蓝藻菌*Synechocystis* sp. PCC6803^[17]和*Anabaena* sp. PCC 7120^[18]、嗜盐杆菌*Halobacterium salinarum*^[19]及沃氏嗜盐富饶菌*Haloferax volcanii*^[20]等多种嗜盐古菌。因此,本文开发的新基因无痕敲除手段具有在这些物种中通用的潜力,只要这些微生物具备使杂合子转化为纯合子的功能。总结起来,与先前报道的方法相比,本研究开发的新基因敲除手段具有诸多优越性:只需要构建一个载体;无需任何筛选标记;可在野生型遗传背景下操作;具有在其他多倍体细菌或古细菌中应用的潜力。

参考文献:

- [1] Hidaka Y, Hasegawa M, Nakahara T, et al. The entire population of *Thermus thermophilus* cells is always competent at any growth phase[J]. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 1994, 58(7): 1338-1339.
- [2] Salzer R, Joos F, Averhoff B. Type IV pilus biogenesis, twitching motility, and DNA uptake in *Thermus thermophilus*: discrete roles of antagonistic ATPases PilF, PilT1, and PilT2[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2014, 80(2): 644-652.
- [3] Togawa Y, Nunoshiba T, Hiratsu K. Cre/lox-based multiple markerless gene disruption in the genome of the extreme thermophile *Thermus thermophilus* [J]. *Molecular Genetics and Genomics*, 2018, 293(1): 277-291.
- [4] Hoseki J, Yano T, Koyama Y, et al. Directed evolution of thermostable kanamycin-resistance gene: a convenient selection marker for *Thermus thermophilus* [J]. *Journal of Biochemistry*, 1999, 126(5): 951-956.
- [5] Hashimoto Y, Yano T, Kuramitsu S, et al. Disruption of *Thermus thermophilus* genes by homologous recombination using a thermostable kanamycin-resistant marker[J]. *FEBS Letters*, 2001, 506(3): 231-234.
- [6] Brouns S J, Wu H, Akerboom J, et al. Engineering a selectable marker for hyperthermophiles[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2005, 280(12): 11422-11431.
- [7] Ohtani N, Tomita M, Itaya M. Curing the Megaplasmid pTT27 from *Thermus thermophilus* HB27 and maintaining exogenous plasmids in the plasmid-free strain[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2015, 82(5): 1537-1548.
- [8] Tamakoshi M, Yaoi T, Oshima T, et al. An efficient gene replacement and deletion system for an extreme thermophile, *Thermus thermophilus* [J]. *FEMS Microbiology Letters*, 1999, 173(2): 431-437.

- [9] Ohta T, Tokishita S, Imazuka R, et al. Beta-Glucosidase as a reporter for the gene expression studies in *Thermus thermophilus* and constitutive expression of DNA repair genes[J]. *Mutagenesis*, 2006, 21(4): 255-260.
- [10] Blas-Galindo E, Cava F, López-Viñas E, et al. Use of a dominant *rpsL* allele conferring streptomycin dependence for positive and negative selection in *Thermus thermophilus* [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2007, 73(16): 5138-5145.
- [11] Angelov A, Li H, Geissler A, et al. Toxicity of indoxyl derivative accumulation in bacteria and its use as a new counterselection principle[J]. *Systematic and Applied Microbiology*, 2013, 36(8): 585-592.
- [12] Wang L, Hoffmann J, Watzlawick H, et al. Markerless gene deletion with cytosine deaminase in *Thermus thermophilus* strain HB27[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2015, 82(4): 1249-1255.
- [13] Ohtani N, Tomita M, Itaya M. An extreme thermophile, *Thermus thermophilus* is a polyploid bacterium[J]. *Journal of Bacteriology*, 2010, 192(20): 5499-5505.
- [14] de Grado M, Castan P, Berenguer J. A high-transformation-efficiency cloning vector for *Thermus thermophilus* [J]. *Plasmid*, 1999, 42(3): 241-245.
- [15] Kobayashi N, Harano Y, Tochio N, et al. An automated system designed for large scale NMR data deposition and annotation: application to over 600 assigned chemical shift data entries to the BioMagResBank from the Riken Structural Genomics/Proteomics Initiative internal database[J]. *Journal of Biomolecular NMR*, 2012, 53(4): 311-320.
- [16] Angelov A, Pham V T T, Übelacker M, et al. A metagenome-derived thermostable β -glucanase with an unusual module architecture which defines the new glycoside hydrolase family GH148[J]. *Scientific Report*, 2017, 7(1): 17306.
- [17] Zerulla K, Ludt K, Soppa J. The ploidy level of *Synechocystis* sp. PCC 6803 is highly variable and is influenced by growth phase and by chemical and physical external parameters[J]. *Microbiology*, 2016, 162(5): 730-739.
- [18] Hu B, Yang G, Zhao W. MreB is important for cell shape but not for chromosome segregation of the filamentous cyanobacterium *Anabaena* sp. PCC 7120[J]. *Molecular Microbiology*, 2007, 63(6): 1640-1652.
- [19] Breuert S, Allers T, Spohn G, et al. Regulated polyploidy in halophilic archaea[J]. *PLoS ONE*, 2006, 1(1): e92.
- [20] Maurer S, Ludt K, Soppa J. Characterization of copy number control of two *Haloferax volcanii* replication origins using deletion mutants and haloarchaeal artificial chromosomes[J]. *Journal of Bacteriology*, 2017, 200(1): e00517-17.