

谷氨酸棒杆菌中芳香化合物降解的 β -酮己二酸途径中原儿茶酸分支关键酶的鉴定*

沈锡辉 刘双江**

(中国科学院微生物研究所, 北京 100080)

摘要 β -酮己二酸途径的原儿茶酸分支在革兰氏阴性细菌中研究较多,但在革兰氏阳性细菌中的研究却很少. 本研究表明谷氨酸棒杆菌能以原儿茶酸、4-羟基苯甲酸、香草醛和对甲酚作为惟一碳源和能源生长,并且生长时诱导表达原儿茶酸 3,4-双加氧酶. 对谷氨酸棒杆菌基因组分析表明,基因位点 *ncg12314~ncg12315* 可能编码原儿茶酸 3,4-双加氧酶. 通过 PCR 反应扩增了 *ncg12314~ncg12315*,并克隆到表达载体 pET21a 上,获得质粒 pET21aP34D;携带 pET21aP34D 的重组大肠杆菌经诱导表达原儿茶酸 3,4-双加氧酶. 敲除 *ncg12314~ncg12315* 后,谷氨酸棒杆菌突变株失去原儿茶酸 3,4-双加氧酶活性,同时丧失了利用原儿茶酸、对甲酚、香草醛和 4-羟基苯甲酸作为惟一碳源和能源的能力;通过基因互补,这些能力又可重新获得. 这些结果证实 *ncg12314* 和 *ncg12315(pcaHG)* 编码原儿茶酸 3,4-双加氧酶. 进一步对谷氨酸棒杆菌基因组分析后鉴定到一个完整的编码原儿茶酸分支途径中相关酶的基因簇,该基因簇的独特组织方式为芳香化合物的降解研究提供了新的视点.

关键词 谷氨酸棒杆菌 原儿茶酸 3,4-双加氧酶 β -酮己二酸途径 芳香化合物降解

β -酮己二酸途径在土壤细菌和真菌中广泛分布^[1],是天然芳香化合物和人工合成芳香化合物降解的重要途径. 该途径的两个并行分支分别由原儿茶酸 3,4-双加氧酶和邻苯二酚 1,2-双加氧酶催化,编码这些酶的基因定位在染色体上. 在细菌中这两个分支具有共同的中间代谢产物- β -酮己二酸烯醇内酯,

该中间代谢产物进一步裂解形成三羧酸循环中间产物琥珀酰-CoA 和乙酰-CoA 进入中心代谢途径(三羧酸循环)^[2]. 虽然在一些革兰氏阴性细菌如 *Pseudomonas*^[3~5], *Acinetobacter*^[6,7] 和 *Agrobacterium*^[8] 中 β -酮己二酸途径的原儿茶酸分支已经有较多的研究,但直到最近才有关于革兰氏阳性细菌 *Streptomyces* sp.

2004-08-13 收稿, 2004-10-11 收修改稿

* 中国科学院知识创新工程资助项目(批准号: KSCX2-SW-113)

** 联系人, E-mail: shuangjiang@hotmail.com

2065^[9]和*Rhodococcus opacus* 1CP^[10]中原儿茶酸分支途径的研究报告。*Corynebacterium* 属于高GC含量革兰氏阳性细菌,广泛分布于土壤、沉积物等自然环境中。已经发现有些土壤棒杆菌能降解苯乙烯、4-氯苯甲酸及其他芳香化合物^[11~13],但关于其降解的分子机制仍未阐明。本研究利用谷氨酸棒杆菌基因组数据,在对基因组分析的基础上结合实验研究,鉴定了原儿茶酸分支途径的关键酶基因(原儿茶酸 3,4-双加氧酶),并分析和讨论了这条分支途径中其他相关基因。

1 材料与方法

1.1 试验菌种、质粒和培养条件

本研究中所使用的菌种和质粒列于表1中。谷氨酸棒杆菌在LBG培养基(LB培养基中加入终浓度为2 g/L的葡萄糖,即是LBG培养基)中30℃培养。根据需要加入茶啉酮酸至终浓度为50 μg/mL。在测试菌株的芳香化合物利用能力时,将菌株接种于无机盐培养基中,该培养基配方为(每1升蒸馏水中):Na₂HPO₄·12H₂O 2.0 g, KH₂PO₄ 0.5 g, MgSO₄·7H₂O 0.03g, NH₄Cl, 0.53 g, 微量元素溶液^[14]5 mL, 酵母粉0.05 g, 调pH至8.4。原儿茶酸、4-羟基苯甲酸及其他芳香化合物的添加量为4 mmol/L, 30℃, 150 r/min摇床振荡培养。细菌生长用721分光光度计测定600 nm处的光吸收表示。大培养肠杆菌使用LB培养基, 抗生素使用量为氨基青霉素 100 μg/mL, 卡那霉素 50 μg/mL, 氯霉素 20 μg/mL。

1.2 DNA 操作和 *pcaHG* 基因的克隆

谷氨酸棒杆菌基因组DNA按Tauch等人^[15]的方法制备。DNA酶切、连接、质粒提取、凝胶电泳等按Sambrook等人^[16]的方法进行。大肠杆菌和谷氨酸棒杆菌的电转化参考文献^[17]。

通过PCR反应以谷氨酸棒杆菌基因组DNA为模板进行扩增 *pcaHG* 基因。正向引物为: 5'-ACA-GAATTCCGCATGGACATCCAC-3'; 反向引物为: 5'-GATAAGCTTTCGGGTCAATTTAGAGTC-3'。为便于克隆, 正向引物带有一个 *EcoR* I 酶切位点(下划线), 反向引物带有一个 *Hind*III 酶切位点(下划线)。

PCR 反应程序为: 95℃变性1 min, 42℃退火1 min, 72℃延伸1.5 min, 30个循环后72℃延伸10 min。纯化的PCR产物用 *EcoR* I 和 *Hind*III 双酶切后连入分别用同样酶切处理的克隆载体 pSK⁻和表达载体 pET21a 中, 得到 pSKP34D 和 pET21aP34D。重组大肠杆菌 *E. coli* BL21/pET21aP34D 在 LB 液体培养基中培养至 $A_{600} = 0.4$ 时加入 0.6 mmol/L IPTG 诱导表达。

1.3 谷氨酸棒杆菌中 *pcaHG* 基因的敲除

使用含有 *sacB* 反选择标记的自杀载体 pK18mobsacB 进行 *pcaHG* 基因的敲除。首先用 *EcoR* I 和 *Sal* I 双酶切从 pSKP34D 获得完整的 *pcaHG* 基因片段, 将之插入同样酶切处理的载体 pK18mobsacB, 进一步通过 *Bam*H I 酶切处理, 使 *pcaHG* 基因缺失内部对应于 PcaH 的 C-端 50 个氨基酸残基和 PcaG 的 N-端 92 个氨基酸残基的 0.43 kb 片段, 重新连接载体 DNA 片段, 得到敲除质粒 pK18mobsacBΔ*pcaHG*。通过电转化将敲除质粒 pK18mobsacBΔ*pcaHG* 转入谷氨酸棒杆菌 RES167, 在含 25 μg/mL 卡那霉素的 BH (brain-heart broth) 平板上筛选发生了第一次重组的卡那霉素抗性克隆, 并在 LBG 培养基中 30℃过夜培养后涂布于含 10% 蔗糖的 LBG 平板上筛选发生第二次重组的克隆, 挑选其中对卡那霉素敏感的克隆接种在苯甲酸和原儿茶酸无机盐平板上 30℃培养, 其中不能在原儿茶酸无机盐平板上生长而能在苯甲酸无机盐平板上生长的克隆即为已发生了敲除的克隆, 并进一步通过 PCR 进行证实, 突变菌株命名为 *C. glutamicum* RES167 Δ*pcaHG*。

1.4 质粒 pXMJ19P34D 的构建和遗传互补

通过PCR反应以谷氨酸棒杆菌基因组DNA为模板扩增全长 *pcaHG* 基因。所用正向引物为: 5'-GATTCTAGAAAGGAGGACACGCATGGACATC-CCAC-3'), 反向引物为: 5'-ACAGAATTCTCGGGTCAATTTAGAGTC-3')。为增强转录, 用高表达基因RBS共有序列(粗体, 与16S rRNA的mRNA结合位点相互补^[18])代替*pcaHG*基因本身的*rbs*位点, 此外正向引物带有一个 *Xba* I 酶切位点(下划线), 反向引物带有一个 *EcoR* I 酶切位点(下划线)。纯化的PCR产物

用EcoR I 和Xba I 双酶切后连入用相应酶切处理的*E. coli*-*C. glutamicum*穿梭表达载体pXMJ19 中得到互补质粒pXMJ19P34D, 用该质粒电转化*C. glutamicum* RES1674pcaHG, 在合成培养基中直接加入 0.6 mmol/L IPTG以诱导pcaHG的表达。

1.5 细胞裂解液的制备和酶活分析

10000 × g离心收集菌体, 以pH 8.0 的 50 mmol/L 磷酸缓冲液洗涤细胞 2 次, 然后悬浮在相同的缓冲液中超声波处理; 19000 × g离心 30 min, 其上清液即为细胞裂解液, 用于酶活测定和SDS-PAGE分析。3,4-双加氧酶的活性通过底物原儿茶酸在 290 nm处的光吸收降低测定^[19]。酶活单位定义为每分钟氧化 1 μmol/L 底物所需的酶量。

1.6 蛋白浓度测定和 SDS-PAGE

蛋白浓度测定采用Bradford法^[19]。SDS-PAGE采用分离胶浓度为 12%, 浓缩胶浓度为 5%, 考马斯亮蓝R-250 染色^[20]。

1.7 序列分析

谷氨酸棒杆菌ATCC13032 的全基因组序列数据获自GenBank(登录号 NC003450)^[21], 使用BLAST程序(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>)在GenBank中进行DNA和氨基酸序列的同源性搜索。用CLUSTAL W程序进行氨基酸序列比对^[22]。

1.8 工具酶与化学试剂

所用限制性内切酶和 T₄ DNA 连接酶购自TaKaRa 公司(大连)。Taq DNA 聚合酶购自 Promega 公司(San Luis Obispo, CA, 美国)。所用化学试剂均为分析纯。

2 结果分析

2.1 谷氨酸棒杆菌中原儿茶酸 3,4-双加氧酶活性的诱导表达

实验表明, 尽管谷氨酸棒杆菌能以苯酚、苯甲酸、原儿茶酸、对甲酚、4-羟基苯甲酸和香草醛等作为惟一碳源和能源生长, 但只有以原儿茶酸、对甲酚、香草醛和 4-羟基苯甲酸作为惟一碳源生长时, 才

能诱导原儿茶酸 3,4-双加氧酶活性的表达, 表明原儿茶酸 3,4-双加氧酶是一个诱导酶, 并参与谷氨酸棒杆菌中原儿茶酸、对甲酚、香草醛和 4-羟基苯甲酸的降解。当以苯酚和苯甲酸作为惟一碳源生长时不能诱导原儿茶酸 3,4-双加氧酶活性的表达, 表明这些化合物是通过其他代谢途径降解。

2.2 谷氨酸棒杆菌基因组中原儿茶酸 3,4-双加氧酶基因(pcaHG)的分析

原儿茶酸 3,4-双加氧酶含有 α -和 β -亚基(分别由pcaG和pcaH编码)。通过查询谷氨酸棒杆菌基因组序列信息(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes>), 发现有 4 个开放阅读框(ncg12314, ncg12315, ncg12319 和 ncg11113)被注释为原儿茶酸 3,4-双加氧酶 β -亚基, 没有原儿茶酸 3,4-双加氧酶 α -亚基。进一步用CLUSTAL W及其他生物软件分析这 4 个被注释为原儿茶酸 3,4-双加氧酶 β -亚基的阅读框, 发现阅读框NCg12314 与原儿茶酸 3,4-双加氧酶 α -亚基具有较高的序列相似性: 与*R. opacus*, *Streptomyces* sp. 2065, *Acinetobacter* sp. ADP1 和*Pseudomonas putida*的原儿茶酸 3,4-双加氧酶 α -亚基分别具有 49%, 37%, 37%和 36%的氨基酸序列同源性; 而开放阅读框NCg12315 与原儿茶酸 3,4-双加氧酶 α -亚基具有较高的序列相似性: 与*R. opacus*, *Streptomyces* sp. 2065, *Acinetobacter* sp. ADP1 和*P. putida*的原儿茶酸 3,4-双加氧酶 β -亚基分别具有 74%, 52%, 45%和 50%的氨基酸序列同源性。由此推测ncg12314 和ncg12315 分别编码原儿茶酸 3,4-双加氧酶的 α -和 β -亚基。ncg12314 和ncg12315 序列上的直接相连更加强了这一推测, 因为迄今为止鉴定的原儿茶酸 3,4-双加氧酶 α -和 β -亚基编码基因都是连在一起作为一个单元的^[11]。另外的两个开放阅读框, ncg12319 和ncg11113, 分别与邻苯二酚 1,2-双加氧酶和偏苯三酚 1,2-双加氧酶具有高度序列相似性(图 1), 其中ncg12319 最近已经被证实为编码邻苯二酚 1,2-双加氧酶^[23]。

2.3 在大肠杆菌中克隆和表达原儿茶酸 3,4-双加氧酶基因(pcaHG)

利用 PCR 反应扩增包含 ncg12314 和 ncg12315 编码区的全长序列并克隆到表达载体 pET21a 上(图

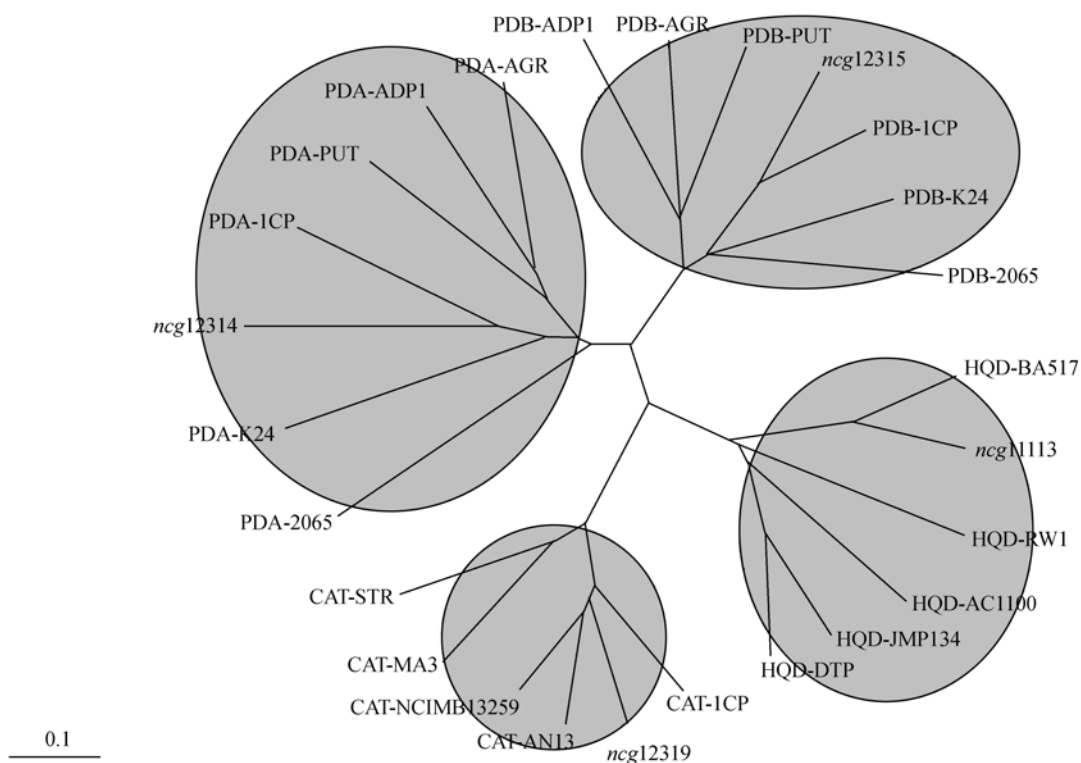


图 1 谷氨酸棒杆菌和其他细菌的开环双加氧酶在系统进化中的相关性

PDA 示原儿茶酸 3,4-双加氧酶 α -亚基; PDB 示原儿茶酸 3,4-双加氧酶 β -亚基; HQD 示偏苯三酚 1,2-双加氧酶; CAT 示邻苯二酚 1,2-双加氧酶; “-”后为菌株编号(见下面菌种名称)各序列在 GenBank 中的登录号为: *Streptomyces* sp. 2065, AF109386; *Acinetobacter lwoffii* K24, AY099487; *R. opacus* 1CP, AF003947; *P. putida*; L14836; *Acinetobacter* sp. ADP1, L05770; *Agrobacterium tumefaciens*, AF230649; *Ralstonia pickettii* DTP0602, D86544; *B. cepacia* AC1100, U19883; *Arthrobacter* sp. BA-5-17, AB016258; *R. eutropha* JMP134, AF498371; *Sphingomonas* sp. RW1, X72850; *Str. setonii*, AF277051; *Arthrobacter* sp. maA3, M94318; *R. rhodochrous* NCIMB13259, AF043741; *R. erythropolis* AN13, JC6206; *R. opacus* 1CP, X99622

2), 转化 *E. coli* BL21(DE3)得到阳性克隆 *E. coli* BL21/pET21aP34D, 该阳性克隆经 IPTG 诱导后, 表达了原儿茶酸 3,4-双加氧酶活性(表 2)。通过 SDS-PAGE 分析发现两个分子量分别为 23.3 和 28.6 kD 的蛋白特异表达, 分别对应 *ncg12314* 和 *ncg12315* 的理论分子量(PcaG 为 22.9 kD, PcaH 为 26.3 kD)。

2.4 谷氨酸棒杆菌中 *pcaHG* 基因的敲除与互补分析

为了鉴定 *ncg12314* 和 *ncg12315* 基因在谷氨酸棒杆菌中的生理功能和进一步证明其参与原儿茶酸、4-羟基苯甲酸、香草醛和对甲酚的代谢, 通过敲除 *ncg12314~ncg12315* (*pcaHG*) 基因内部 0.43 kb 片段, 构建了突变菌株 *C. glutamicum* RES167 Δ *pcaHG*。基

因敲除通过 PCR 检测得到了证实。酶活分析表明突变菌株完全丧失了原儿茶酸 3,4-双加氧酶活性(表 2)。突变菌株失去了利用原儿茶酸、对甲酚、香草醛和 4-羟基苯甲酸作为惟一碳源和能源生长的能力, 但仍保留以苯甲酸和苯酚作为惟一碳源和能源生长的能力(图 3)。进一步通过用互补质粒 pXMJ19P34D 转化突变菌株并用 IPTG 诱导, 突变菌株又重新获得了以原儿茶酸、对甲酚、香草醛和 4-羟基苯甲酸作为惟一碳源和能源生长的能力(图 3)以及原儿茶酸 3,4-双加氧酶活性的表达。以上结果证实 *ncg12314* 和 *ncg12315*(*pcaHG*)编码原儿茶酸 3,4-双加氧酶, 该酶在谷氨酸棒杆菌代谢原儿茶酸、对甲酚、香草醛和 4-羟基苯甲酸的过程中是必需的。

表 1 本试验用菌种和质粒		
菌株和质粒	特性和用途	来源
<i>C. glutamicum</i>		
ATCC13032	野生型, Nx ^r	ATCC
RES167	ATCC 13032 的限制缺陷突变株	Claes等人 ^[24]
RES167Δ <i>pcaHG</i>	<i>pcaHG</i> 基因突变的 RES167	本研究
<i>Escherichia coli</i>		
HB101	克隆用宿主	Boyer等人 ^[25]
BL21	表达用宿主	Promega
质粒		
pSK ⁻	克隆载体	
pSK ⁻ -P34D	含 <i>pcaHG</i> 基因的 pSK ⁻	本研究
pET21a	表达载体, Ap ^r	Novagen
pET21aP34D	含 <i>pcaHG</i> 基因的 pET21a	本研究
pK18 <i>mobsacB</i>	敲除用自杀载体(km ^r)	Schäfer等人 ^[26]
pK18 <i>mobsacBpcaHG</i>	含 <i>pcaHG</i> 基因的 pK18 <i>mobsacB</i>	本研究
pK18 <i>mobsacBΔpcaHG</i>	含缺失 <i>pcaHG</i> 基因的 pK18 <i>mobsacB</i>	本研究
pXMJ19	<i>E. coli</i> - <i>C. glutamicum</i> 穿梭表达载体	Jakoby等人 ^[27]
pXMJ19 P34D	pXMJ19	本研究

表 2 重组大肠杆菌以及谷氨酸棒杆菌 RES167, RES167Δ*pcaHG* 中原儿茶酸 3,4-双加氧酶的活性

菌株 ^{a)} (碳源)	比活/U · mg ⁻¹ 蛋白
<i>C. glutamicum</i> RES 167 (乙酸钠/4-羟基苯甲酸)	0.20
<i>C. glutamicum</i> RES 167 (乙酸钠/原儿茶酸)	0.20
<i>C. glutamicum</i> RES 167 (乙酸钠/对甲酚)	0.22
<i>C. glutamicum</i> RES 167 (乙酸钠/香草醛)	0.15
<i>C. glutamicum</i> RES 167 Δ <i>pcaHG</i> (乙酸钠/4-羟基苯甲酸)	0.00
<i>C. glutamicum</i> RES 167 Δ <i>pcaHG</i> (乙酸钠/原儿茶酸)	0.00
<i>C. glutamicum</i> RES 167 Δ <i>pcaHG</i> (乙酸钠/对甲酚)	0.00
<i>C. glutamicum</i> RES 167 Δ <i>pcaHG</i> (乙酸钠/香草醛)	0.00
<i>E. coli</i> BL21/pET21aP34D (LB)	0.11
<i>E. coli</i> BL21/pET21a (LB)	0.00

a) 括号内为培养时使用的碳源。各种芳香底物的添加浓度为 4 mmol/L

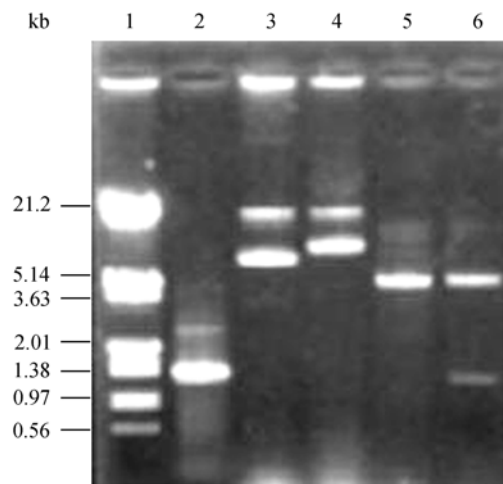


图 2 原儿茶酸 3,4-双加氧酶基因的 PCR 扩增和克隆
1 示λDNA Marker; 2 示 *pcaHG* 基因 PCR 扩增产物; 3 示 pET21a; 4 示 pET21aP34D; 5 示 *EcoR* I + *Hind*III 双酶切 pET21a; 6 示 *EcoR* I + *Hind*III 双酶切 pET21aP34D

2.5 原儿茶酸分支途径中其他基因的分析

通过对谷氨酸棒杆菌基因组序列信息的进一步分析,在原儿茶酸 3,4-双加氧酶基因上下游分别发现了 6 个其他β-酮己二酸途径功能基因以及 2 个调控蛋白基因(表 3),它们共同组成一个完整的原儿茶酸分支途径.该基因簇的结构及其催化的反应见图 4.

3 讨论

虽然棒杆菌属广泛分布于环境中,并已经分离得到一些能够降解芳香化合物的棒杆菌^[11,12],但是对于芳香族化合物污染的生物修复作用尚未得到足够重视,其代谢途径及机制也未能在分子水平上得到阐明.通过谷氨酸棒杆菌中*pcaHG*基因的克隆表达、敲除和互补分析,本实验表明基因*ncg12314~ncg12315* 编码原儿茶酸 3,4-双加氧酶,该酶参与谷氨

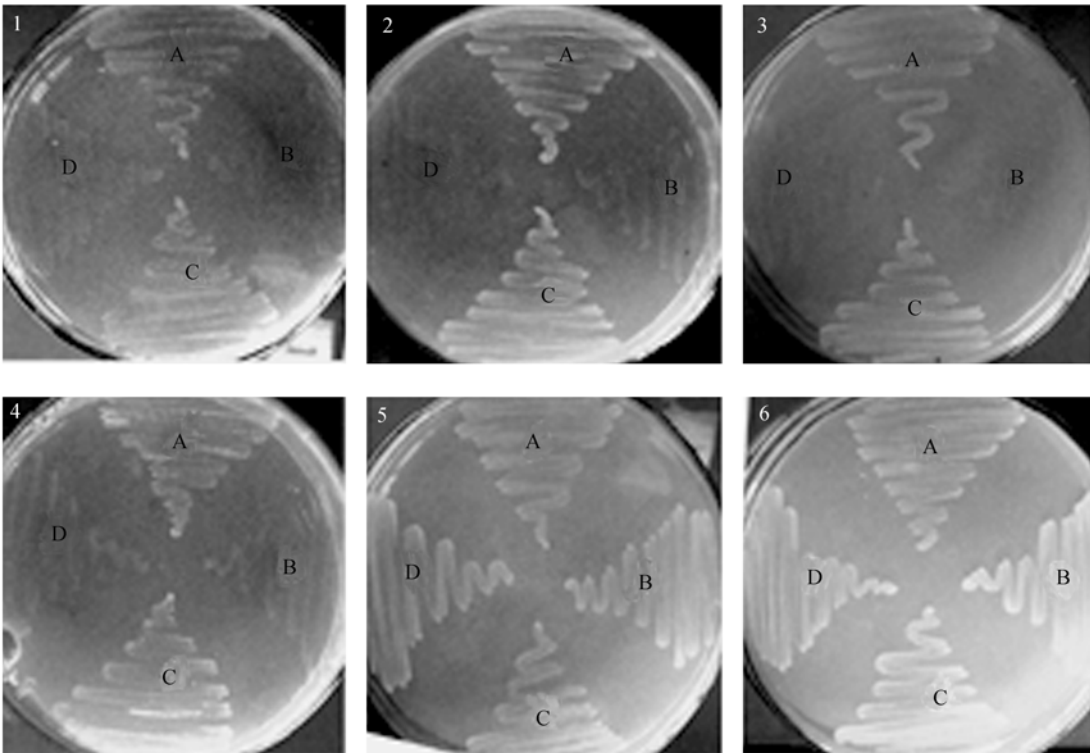


图 3 谷氨酸棒杆菌野生型和 *pcaHG* 突变型的表型
平板 1~6 分别以原儿茶酸、4-羟基苯甲酸、对甲酚、香草醛、苯甲酸和苯酚作为惟一碳源. A 示 RES167; B 示 RES167*ΔpcaHG*;
C 示 RES167*ΔpcaHG*-pXMJ19P34D; D 示 RES167*ΔpcaHG*-pXMJ19

表 3 谷氨酸棒杆菌中参与β-酮己二酸途径原儿茶酸分支的基因在染色体上的定位及功能

基因	Orf no.	位置/bp	产物/aa	功能	同源性	来源(登录号) ^{a)}
<i>pcaJ</i>	Ncg12306	2531964~2532602	211	β-酮己二酸琥珀酰 CoA 转移酶亚基	63%	<i>Str. sp.</i> 2065 (AAD40813)
					54%	<i>P. putida</i> (AAN68731)
<i>pcaI</i>	Ncg12307	2532602~2533354	250	β-酮己二酸琥珀酰 CoA 转移酶亚基	68%	<i>R. opacus</i> (AF003947)
					60%	<i>Str. sp.</i> 2065 (AAD40812)
					51%	<i>P. putida</i> (AAN68730)
<i>pcaF</i>	Ncg12309	2534202~2535428	408	β-酮己酰 CoA 硫激酶	63%	<i>R. opacus</i> (AF003947)
					42%	<i>P. putida</i> (AAN69348)
					43%	<i>Alcaligenes sp.</i> (AAP41838)
<i>pcaD</i>	Ncg12310	2535431~2536186	251	β-酮己二酸烯醇内酯水解酶	50%	<i>R. opacus</i> (AAC38246)
					37%	<i>Str. sp.</i> 2065 (AAD40815)
					33%	<i>P. putida</i> (AAD39558)
<i>pcaC</i>	Ncg12312	2538246~2538614	122	γ-羧基粘糠酸内酯脱羧酶	78%	<i>R. opacus</i> (AAC3826)
					46%	<i>Str. sp.</i> 2065 (AAD40815)
					45%	<i>P. putida</i> (AAD39557)
<i>pcaB</i>	Ncg12313	2538614~2539732	372	β-羧基-cis,cis-粘糠酸环异构酶	45%	<i>R. opacus</i> (AAC38245)
					40%	<i>Str. sp.</i> 2065 (AAD40814)
					37%	<i>P. putida</i> (AAD39559)
<i>pcaG</i>	Ncg12314	2539707~2540321	204	原儿茶酸 3,4-双加氧酶α-亚基	49%	<i>R. opacus</i> (AAC38244)
					37%	<i>Str. sp.</i> 2065 (AAD05270)
					36%	<i>P.putida</i> (AAA25921)
<i>pcaH</i>	Ncg12315	2540333~2541025	230	原儿茶酸 3,4-双加氧酶β-亚基	74%	<i>R. opacus</i> (AAC38243)
					52%	<i>Str. sp.</i> 2065 (AAD05269)
					50%	<i>P. putida</i> (AAA25919)
<i>pcaR</i>	Ncg12308	2533419~2534186	255	转录激活蛋白(Icl R 家族)	58%	<i>R. opacus</i> (AAC38247)
					41%	<i>P. putida</i> (CAB64601)
<i>pcaO</i>	Ncg12311	2536197~2538160	687	LuxR-家族转录调节蛋白	26%	<i>R. erythropolis</i> (AAD28307)

a) *Str.* 示 *Streptomyces*; *R.* 示 *Rhodococcus*; *P.* 示 *Pseudomonas*

- 370
- 5 Overhage J, Kresse A U, Priefert H, Sommer H, Krammer G, Rabenhorst H, Steinbüchel A. Molecular characterization of the genes *pcaG* and *pcaH*, encoding protocatechuate 3,4-dioxygenase, which are essential for vanillin catabolism in *Pseudomonas* sp. strain HR199. *Appl Environ Microbiol*, 1999, 65: 951~960
 - 6 Doten R C, Ngai K L, Mitchell D J, Ornston L N. Cloning and genetic organization of the *pca* gene cluster from *Acinetobacter calcoaceticus*. *J Bacteriol*, 1987, 169: 3168~3174
 - 7 Gerischer U, Ornston L N. Spontaneous mutations in *pcaH* and *pcaG*, structural genes for protocatechuate 3,4-dioxygenase in *Acinetobacter calcoaceticus*. *J Bacteriol*, 1995, 177: 1336~1347
 - 8 Parke D. Supraoperonic clustering of *pca* genes for catabolism of the phenolic compound protocatechuate in *Agrobacterium tumefaciens*. *J Bacteriol*, 1995, 177: 3808~3817
 - 9 Iwagami S G, Yang K Q, Davies J. Characterization of the protocatechuic acid catabolic gene cluster from *Streptomyces* sp. Strain 2065. *Appl Environ Microbiol*, 2000, 66: 1499~1508[DOI]
 - 10 Eulberg D, Lakner S, Golovleva L A, Schlomann M. Characterization of a protocatechuate catabolic gene cluster from *Rhodococcus opacus* 1CP: Evidence for a merged enzyme with 4-carboxymuconolactone-decarboxylating and 3-oxoadipate enolactone-hydrolyzing activity. *J Bacteriol*, 1998, 180: 1072~1081
 - 11 Sikkema J, de Bont J A. Metabolism of tetralin (1,2,3,4-tetrahydronaphthalene) in *Corynebacterium* sp. strain C125. *Appl Environ Microbiol*, 1993, 59: 567~572
 - 12 Itoh N, Yoshida K, Okada K. Isolation and identification of styrene-degrading *Corynebacterium* strains, and their styrene metabolism. *Biosci Biotech Biochem*, 1996, 60: 1826~1830
 - 13 Romanov V, Hausinger R P. NADPH-dependent reductive ortho dehalogenation of 2,3-dichlorobenzoic acid in *Corynebacterium sepedonicum* KZ-4 and *Coryneform bacterium* strain NTB-1 via 2,4-dichlorobenzoyl coenzyme A. *J Bacteriol*, 1996, 178: 2656~2661
 - 14 Konopka A. Isolation and characterization of subsurface bacterium that degrades aniline and methylanilines. *FEMS Microbiol Lett*, 1993, 111: 93~100[DOI]
 - 15 Tauch A, Kassing F, Kalinowski J, Pühler A. The *Corynebacterium xerosis* composite transposon Tn5432 consists of two identical insertion sequences, designated IS1249, flanking the erythromycin resistance gene *ermCX*. *Plasmid*, 1995, 34: 119~131[DOI]
 - 16 Sambrook J, Fritsh E F, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1989
 - 17 Tauch A, Kirchner O, Löffler B, Gotker S, Pühler A, Kalinowski J. Efficient electrotransformation of *Corynebacterium diphtheriae* with a mini-replicon derived from the *Corynebacterium glutamicum* plasmid pGA1. *Curr Microbiol*, 2002, 45: 362~367[DOI]
 - 18 Amador E, Castro J M, Correia A, Martin J F. Structure and organization of the *rrnD* operon of '*Brevibacterium lactofermentum*': analysis of the 16S rRNA gene. *Microbiol*, 1999, 145: 915~924
 - 19 Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Ana Biochem*, 1976, 72: 248~254
 - 20 Laemmli U K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 1970, 227: 680~685
 - 21 Ikeda M, Nakagawa S. The *Corynebacterium glutamicum* genome: features and impacts on biotechnological processes. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2003, 62: 99~109[DOI]
 - 22 Thompson J D, Higgins D G, Gibson T J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucl Acid Res*, 1994, 22: 4673~4680
 - 23 Shen X H, Liu Z, Liu S J. Functional identification of the gene locus (*ncg12319*) and characterization of catechol 1,2-dioxygenase in *Corynebacterium glutamicum*. *Biotechnol Lett*, 2004, 26: 575~580[DOI]
 - 24 Claes W A, Pühler A, Kalinowski J. Identification of two *prpDBC* gene clusters in *Corynebacterium glutamicum* and their involvement in propionate degradation via the 2-methylcitrate cycle. *J Bacteriol*, 2002, 184: 2728~2739[DOI]
 - 25 Boyer H W, Roulland D D. A complementation analysis of the restriction and modification of DNA in *Escherichia coli*. *J Mol Biol*, 1969, 41: 459~472
 - 26 Schäfer A, Tauch A, Jäger W, Kalinowski J, Thierbach G, Pühler A. Small mobilizable multi-purpose cloning vectors derived from the *Escherichia coli* plasmids pK18 and pK19: selection of defined deletions in the chromosome of *Corynebacterium glutamicum*. *Gene*, 1994, 145: 69~73[DOI]
 - 27 Jakoby M, Ngoueto-Nkili C E, Burkovski A. Construction and application of new *Corynebacterium glutamicum* vectors. *Biotechnol Tech*, 1999, 13: 437~441[DOI]