

烟草青枯菌 Tn5 突变体库的构建及突变位点分析

李小杰,李淑君*,李成军,陈玉国,王海涛,邱 睿,胡亚静
(河南省农业科学院 烟草研究所,河南 许昌 461000)

摘要: 为了从烟草青枯菌全基因组范围内发掘致病性相关基因,采用电转化法构建了一个 Ez-Tn5 转座子介导的烟草青枯菌 TXLLJ14-3 菌株插入突变体库,该突变体库包含 1.2 万个突变子,经烟草上的致病性检测,共得到 216 个无致病力或弱致病力突变菌株。利用 TAIL-PCR 扩增获得其中 15 个无致病力烟草青枯菌的 Tn5 侧翼序列,并对其插入位点进行了分析,结果表明,15 个突变菌株的插入位点分别位于核苷酸水解酶、糖基转移酶、转座酶和合成酶等具有不同功能的基因上,这些基因受到干扰或破坏后,可能会抑制致病相关物质的表达或分泌,或者诱导烟草对病原菌产生抗性,从而表现出无致病力特征。

关键词: 烟草青枯菌; Tn5 插入突变; 无致病力菌株; TAIL-PCR; 突变位点

中图分类号: S435.72 **文献标志码:** A **文章编号:** 1004-3268(2017)04-0080-05

Construction of Tn5 Mutant Library of *Ralstonia solanacearum* and Analysis of Mutation Sites

LI Xiaojie, LI Shujun*, LI Chengjun, CHEN Yuguo, WANG Haitao, QIU Rui, HU Yajing
(Tobacco Research Institute of Henan Academy of Agricultural Sciences, Xuchang 461000, China)

Abstract: In order to explore the pathogenic genes from the whole genome range of *Ralstonia solanacearum*, this study constructed a Ez-Tn5 transposon insertion mutant library of *R. solanacearum* TX-LLJ14-3 by electroporation method. The library contained 12 000 mutants. There were 216 non or weak pathogenic mutant strains by the pathogenic detection on tobacco. Tn5 flanking sequences of 15 non pathogenic mutant strains were amplified by TAIL-PCR, and simultaneously, the insertion sites were analyzed. The results showed that the insertion sites of the 15 mutant strains were located at genes with different functions such as nucleotide hydrolases, glycosyltransferases, transposase and synthase. When they were disrupted or destroyed, the expression or secretion of virulence related substances might be inhibited, or tobacco resistance to pathogen be induced, thus showing no pathogenic characteristics.

Key words: *Ralstonia solanacearum*; Tn5 insertion mutation; non pathogenic strain; TAIL-PCR; mutation site

青枯雷尔氏菌 (*Ralstonia solanacearum*) 引起的烟草青枯病是危害世界烟草生产的主要根茎部细菌性病害,目前在河南省信阳、驻马店等夏季高温多雨地区已有发生,其中信阳罗山县,驻马店确山县、遂平县和泌阳县烟区的个别地块烟株发病率较高,达到 80% 左右,严重的地块出现大面积死亡^[1]。青枯

雷尔氏菌侵染寄主范围广,可对多种经济作物的生产造成严重危害,且具有明显的生理分化现象和菌系多样性^[2-3]。

青枯雷尔氏菌基因组大小约为 5.8 Mb,具有很高的 G + C 含量和约 5 120 个可能的编码基因。它由 3.7 Mb 的染色体和 2.1 Mb 的大质粒组成,主要

收稿日期:2016-11-01
基金项目:河南省基础与前沿技术研究计划项目(152300410142);河南省烟草公司科技项目(HYKJ201407)
作者简介:李小杰(1983-),女,河南许昌人,助理研究员,博士,主要从事烟草病理研究。E-mail:lixiaojie000631@sina.com
* 通讯作者:李淑君(1966-),女,河南焦作人,研究员,硕士,主要从事烟草植保研究及技术推广工作。
E-mail:13603749396@126.com

的致病因子有Ⅱ型蛋白分泌系统(T2SS)、Ⅲ型蛋白分泌系统(T3SS)、胞外多糖(extracellular polysaccharide, EPS)^[4]、胞外蛋白(extracellular protein, EXP)^[5]、脂多糖(lipopolysaccharides, LPS)和Ⅳ型鞭毛系统(type Ⅳ pilus system)等。其中,Ⅱ型和Ⅲ型蛋白分泌系统主要是将多种致病因子由胞内输送到胞外,从而导致寄主植物感病^[6-7];Ⅳ型鞭毛系统对细菌在植物表面的附着起重要作用,直接影响青枯菌的致病性^[8]。随着基因组测序技术的不断发展,目前已经完成基因组序列测定的雷尔氏菌越来越多,包括烟草青枯菌株系 Y45 和 FQY_4^[9-11],但许多基因的功能还有待于进一步研究,尤其是致病相关基因。

随着分子生物学技术的快速发展,挖掘功能基因的方法越来越多,其中制备突变体是最直接有效的方法。转座子标签(transposontagging)是一种常用的构建突变体库的方法,也是发现新基因和进行基因功能分析的有效工具。20世纪90年代开始,许多研究者通过转座子诱变技术获得了多种类型的青枯菌突变体。康耀卫等^[12]利用转座子 Tn5 在青枯雷尔氏菌基因组单一的 eep 位点中插入,获得了国际上第1例青枯雷尔氏菌胞外蛋白输出功能缺失突变株。程本亮等^[13]利用 EZ-Tn5 转座子随机插入青枯雷尔氏菌 Rs91,构建了青枯雷尔氏菌无致病力突变体库,筛选获得13株具有无致病力菌株形态的突变株。车建美等^[14]利用 Tn5 插入强致病力青枯雷尔氏菌 FJAT-91,获得了无致病力突变株 FJAT-t582 和 FJAT-t583,弱化指数均在0.8以上。

本研究拟利用 Ez-Tn5 转座子标签技术构建烟草青枯菌菌株 TXLLJ14-3 的插入突变体库,以期获得大量无致病力突变菌株,为烟草青枯菌致病相关基因的挖掘及其与寄主互作机制的研究奠定基础,同时为河南省烟草青枯病的防治提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 供试菌株 烟草青枯菌菌株 TXLLJ14-3 分离自河南省信阳市罗山县烟区,由烟草行业黄淮烟区烟草病虫害绿色防控重点实验室长期保存。

1.1.2 培养基 NA 培养基:多聚蛋白胨 5 g、酵母提取物 1 g、牛肉浸膏 3 g、蔗糖 10 g、琼脂 18 g,加水定容至 1 000 mL,121℃灭菌 20 min。

NB 培养基:即不加琼脂的 NA 培养基。

LB 固体培养基:蛋白胨 10 g、牛肉膏 5 g、氯化

钠 5 g、琼脂 18 g,加水定容至 1 000 mL,调 pH 值至 7.0,121℃灭菌 20 min。

TB 甘油培养基:胰蛋白胨 10 g、琼脂 15 g、氯化钠 5 g、甘油 250 mL、七水硫酸镁 2.46 g,加水定容至 1 000 mL,调 pH 值至 7.0,121℃灭菌 20 min。

TTC 培养基:即在 NA 培养基灭菌后加入 0.05% 的氯化三苯基四氮唑(TTC)。

1.1.3 主要试剂和仪器 Ez-Tn5TM < R6Kori/KAN-2 > Tnp TransposomeTM Kit 购自 Epicentre 公司;PCR 扩增所用的 Ex Taq 酶和连接反应所用的 pMD19-T Simple 载体均购于 TaKaRa 公司;引物合成和序列测定均由生工生物(上海)公司完成;所用电转化仪为宁波新芝 SCIENTZ-2C。

1.2 方法

1.2.1 烟草青枯病菌感受态细胞制备及电转化 从新鲜活化的 NA 平板上挑取单菌落,接种于 50 mL NB 液体培养基中,28℃、180 r/min 振荡培养 48 h,按 1% 转接到 200 mL NB 液体培养基中,28℃、180 r/min 振荡培养一定时间至菌液浓度 OD₆₀₀ ≈ 0.7;将菌液置于冰上冷却 10~15 min,随后转移至预冷的 50 mL 离心管中,4℃、6 000 r/min 离心 10 min,弃上清,将细胞重悬于预冷的去离子水中,4℃、6 000 r/min 离心 10 min,重复清洗 3 次;再将细胞重悬于预冷的 10% 甘油溶液中,4℃、8 000 r/min 离心 10 min,重复清洗 3 次;最后沉淀用 1/1 000 初始菌液体积的预冷 10% 甘油溶液重悬,以 100 μL 分装至 1.5 mL 离心管中,保存于 -80℃ 备用。

将 1 μL Ez-Tn5 转座子和 50 μL 烟草青枯菌感受态细胞混合,置于预冷的 1 mm 电击杯中,立即用于转化。电转仪参数设置为:1.8 kV、25 μF、200 Ω。电击后立即加 950 μL NB 培养液在 28℃ 下振荡复苏培养 4~6 h。

1.2.2 转化子的筛选与 PCR 鉴定 将复苏培养的细胞液稀释 100 倍,取稀释液 100 μL 涂到含有卡那霉素(Kan, 25 μg/mL)的 NA 培养基上,28℃培养 2~3 d,筛选具有卡那霉素抗性(Kan^r)的转化子,并计算电转化率,计算公式为:转化率(cfu/μg) = 克隆数(cfu)/DNA 质量(ng) × 10³。根据 Ez-Tn5 的 Kan^r 基因设计特异性引物对 Kan-F(5'-AAGG-TAGCGTTGCCAATGAT-3')和 Kan-R(5'-GC-CGTTTCTGTAATGAAGGA-3'),对转化子进行 PCR 验证。PCR 扩增体系为 25 μL,扩增条件为:95℃ 5 min;94℃ 45 s、53℃ 40 s、72℃ 45 s,28 个循环;72℃ 10 min;4℃ 保存。用 1.0% 琼脂糖凝胶电泳

检测。

1.2.3 突变菌株的致病性测定 将保存的突变体菌株在 NA 平板上活化培养,28 ℃ 培养 2 ~ 3 d,将菌苔刮下,用无菌水配成 10⁸ cfu/mL 的菌悬液,采用无针头注射法接种烟草活体叶片进行致病性测定,以烟草青枯病菌野生型菌株为阳性对照,水为空白对照。

1.2.4 TAIL-PCR 获取突变体插入位点侧翼序列 根据 Ez-Tn5 转座子的两端臂结构分别设计 3 对特异性引物,根据细菌基因组 DNA 特点设计 4 条简并引物(表 1),组合后,以新鲜的突变体菌液为模板进行 TAIL-PCR。第 1 轮 TAIL-PCR 的反应体系是:10 × Ex Taq buffer 2.5 μL、25 mmol/L MgCl₂ 2 μL、2.5 mmol/L dNTP 2 μL、20 μmol/L 特异性引物 SP1

1 μL、20 μmol/L 简并引物 AD 混合物 4 μL、Ex Taq DNA 聚合酶 0.5 μL,加入相应的模板,用去离子水补至 25 μL。在第 2 轮 TAIL-PCR 中,以第 1 轮的产物稀释 50 倍为模板,特异性引物采用 SP2,用去离子水补至 30 μL,其他与第 1 轮相同。第 3 轮以第 2 轮产物稀释 20 倍为模板,特异性引物采用 SP3,加入 20 μmol/L 简并引物 AD 混合物 2 μL,用去离子水补至 50 μL,其他与第 1 轮相同。PCR 的条件见表 2。对 TAIL-PCR 第 2 轮和第 3 轮产物进行电泳检测,然后回收第 3 轮与第 2 轮 TAIL-PCR 大小接近、条带清晰的产物,连接 T-载体后,转化大肠杆菌 DH5α,在含氨苄青霉素(Amp,100 μg/mL)的 LB 平板上筛选转化子。

表 1 TAIL-PCR 所用引物

特异引物	序列	简并引物	序列
LSP1	5'-TCAGAATTGGTTAATTGGTTGTA-3'	AD1	5'-TGWGNAGWANCASAGA-3'
LSP2	5'-TTAATTGGTTGTAACACTGGCAGAGC-3'	AD2	5'-NGTCGASWGANAAGAA-3'
LSP3	5'-ACCTACAACAAAGCTCTCATCAACC-3'	AD3	5'-AGWGNAGWANCAGAGG-3'
RSP1	5'-GGGTGCGGAGAAAAGAGGTAATGAA-3'	AD4	5'-NTCGASTWTSWGWT-3'
RSP2	5'-CTACCCTGTGGAACACCTACATCT-3'		
RSP3	5'-AAGCAATTCATCGATGATGGTTGAG-3'		

表 2 TAIL-PCR 反应条件

反应	循环数/个	温度设置
第 1 轮	1	95 ℃ 5 min
	5	94 ℃ 1 min,62 ℃ 1 min,72 ℃ 2 min
	1	94 ℃ 30 s,30 ℃ 2 min,以 0.5 ℃/s 的速率升至 72 ℃,保持 2 min
	10	94 ℃ 30 s,44 ℃ 1 min,72 ℃ 2 min
	12	94 ℃ 30 s,62 ℃ 1 min,72 ℃ 2 min
	1	72 ℃ 8 min
第 2 轮与第 3 轮	1	94 ℃ 30 s,62 ℃ 1 min,72 ℃ 2 min
	15	94 ℃ 30 s,62 ℃ 1 min,72 ℃ 2 min,94 ℃ 30 s,44 ℃ 1 min,72 ℃ 2 min
	1	72 ℃ 8 min

1.2.5 侧翼序列测定及比对分析 TAIL-PCR 扩增获得的侧翼序列由生工生物(上海)公司测序。通过 Blastn 程序(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)与青枯病菌基因组进行比对,分析侧翼序列与目的基因的同源性和相关生物学信息。

2 结果与分析

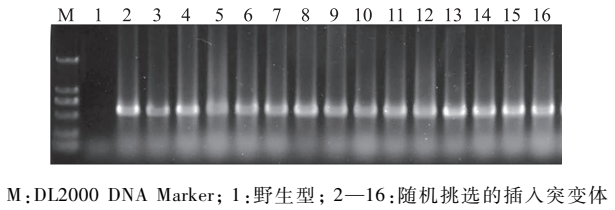
2.1 烟草青枯病菌 Tn5 插入突变体库的构建

利用 Ez-Tn5 转座子插入突变技术构建了烟草青枯菌菌株 TXLLJ14-3 的突变体库,分 3 次转化共得到了约 1.2 万个转化子,转化率约为 3.8 × 10³ cfu/μg。将转化子分别点接于表面铺有灭菌滤膜

(孔径为 0.22 μm)的 TB 甘油培养基平板上,-80 ℃ 冰箱保存备用。

2.2 Tn5 插入突变体的分子验证

根据 Ez-Tn5 的 Kan^r 基因设计特异性引物对 Kan-F/Kan-R,对插入突变体进行 PCR 扩增,均能得到 567 bp 的目的片段,而野生型菌株中未扩出相应的条带(图 1)。将突变体菌株进行划线继代培养 4 ~ 5 代后,PCR 检测仍然能够得到相应的目的片段,说明转座子已稳定地插入到突变体基因组中。

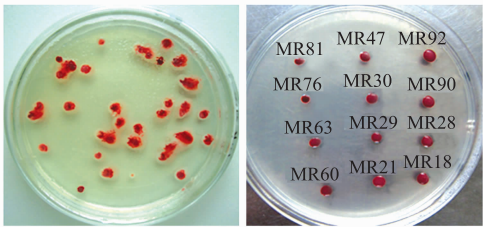


M:DL2000 DNA Marker; 1:野生型; 2—16:随机挑选的插入突变体

图 1 Kan^r 基因的 PCR 扩增

2.3 无致病力突变菌株的筛选

通过注射接种烟草叶片,对突变体菌株进行了致病性测定,筛选到无致病力或弱致病力菌株 216 个。从 TTC 培养基上的菌落形态(图 2)看,野生型菌株菌落表面较湿润,中间呈粉红色,白边较宽,且流动性强,为典型的强致病力青枯菌;无致病力突变体菌株菌落表面较干燥,中间呈暗红色,白边较窄,无流动性。

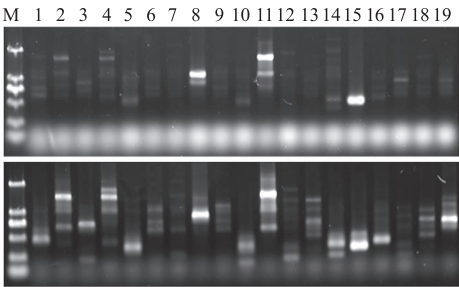


左图为野生型,右图为部分无致病力突变菌株
图 2 烟草青枯菌在 TTC 平板上的菌落形态

2.4 无致病力突变菌株 Tn5 侧翼序列的获得

根据 Ez - Tn5 转座子的两侧序列设计了 6 条特异性引物,其中 LSP1—LSP3 引物和 RSP1—RSP3 引物分别位于转座子的左端和右端臂上,随机与简并引物 AD1—AD4 进行组合,以筛选出的部分无致病力突变体菌株的菌液为模板,按照表 2 条件进行 TAIL - PCR。电泳结果显示,TAIL - PCR 可有效扩增转座子的侧翼序列,第 2 轮和第 3 轮 TAIL - PCR 产物大小基本接近(图 3)。将第 3 轮 PCR 产量较高且与第 2 轮产物大小接近的 TAIL - PCR 产物进行切胶回收,连接 T - 载体后进行序列测定。测序结果表明,TAIL - PCR 产物序列中均存在 Tn5 的 2 个臂端序列和 Tn5 插入的青枯菌基因组序列。由

此说明,TAIL - PCR 可有效鉴别 Tn5 的插入位点和扩增 Tn5 转座子的侧翼序列。



上图为第 2 轮 TAIL - PCR 电泳结果,下图为第 3 轮 TAIL - PCR 电泳结果。M:DL2000 DNA Marker; 1—19:无致病力突变体菌株

图 3 部分无致病力突变体菌株的 TAIL - PCR 电泳结果

2.5 无致病力突变菌株 Tn5 插入位点分析

将 TAIL - PCR 扩增获得的 15 个无致病力烟草青枯菌菌株的 Tn5 侧翼序列进行 TA 克隆后测序,测序结果在 NCBI 数据库中进行比对,结果(表 3)表明,15 个突变菌株的插入位点分别位于核苷酸水解酶、糖基转移酶、转座酶和合成酶等具有不同功能的基因上,这些基因受到干扰或破坏后,可能会抑制致病相关物质的表达或分泌,或者是诱导烟草对病原菌产生抗性,从而表现出无致病力特征。

表 3 TAIL - PCR 法获得的 Tn5 插入位点及相应的功能基因

突变菌株	TAIL - PCR 片段大小/bp	基因产物
MRs3	584	trigger factor
MRs6	535	hypothetical protein; putative nucleoside triphosphate hydrolase domain
MRs7	566	lipopolysaccharide core biosynthesis glycosyltransferase WaaE
MRs8	485	transposase
MRs9	944	putative glycosyl transferase, family 2 signal peptide protein
MRs10	663	hydroxymethylglutaryl-CoA lyase
MRs12	413	putative cytochrome b-561 transmembrane protein
MRs13	591	acyl-CoA synthetase (long-chain-fatty-acid-CoA ligase)
MRs15	344	methyltransferase ,SAM-dependent methyltransferase ,glucose-inhibited cell-division protein
MRs16	460	hypothetical protein ,TPR repeat
MRs17	428	phosphopantetheine adenyllyltransferase
MRs40	570	phytoene dehydrogenase-related protein
MRs41	545	conserved protein of unknown function
MRs47	836	putative htra-like serine protease signal peptide protein
MRs62	640	phenylalanine-4-hydroxylase

3 结论与讨论

与常规的转座子技术相比, Ez - Tn5TM < R6 K γ ori/KAN - 2 > Tnp TransposomeTM转座系统是一种转化细菌的新技术^[15],其介导的 DNA 转化稳定性和重复性较好,操作简便且转化效率高,可以直接通过电转化将转座子导入活细胞中,实现突变体库的构建。

本研究利用 Ez - Tn5TM < R6 K γ ori/KAN - 2 >

Tnp TransposomeTM转座子试剂盒,构建了烟草青枯菌菌株 TXLLJ14 - 3 的突变体库,电转化率为 3.8 \times 10³ cfu/ μ g,共得到约 1.2 万个转化子。随机挑选具有 Kan^r 的转化子,采用 Kan^r 基因引物进行特异性 PCR 扩增,均获得 567 bp 的目标片段,初步表明转座子已成功插入到烟草青枯菌基因组中。通过对烟草的致病性测定,筛选到无致病力或弱致病力突变菌株 216 个,为烟草青枯菌致病相关基因的挖掘提

(下转第 94 页)

- [11] 陈颖,王竹红,黄建,等. 杂色刺桐叶片上刺桐姬小蜂虫瘿的分布与抽样技术[J]. 植物保护,2010,36(6):45-49.
- [12] 杨洪珍. 榆树虫瘿空间分布格局的研究[J]. 林业勘查设计,2012(4):58-59.
- [13] 卜玉强,郭素娟,李文泉,等. 栗瘿蜂虫瘿在板栗林内空间分布格局研究[J]. 北方园艺,2009(11):40-44.
- [14] 张小勇,张庆丽,田群芳. 河南省杨树病虫害的发生现状及防治策略[J]. 河南林业科技,2011,31(1):30-31,34.
- [15] 孟馨卓,赵婧,王江美,等. 浙江上虞杨树病虫害种类调查[J]. 江西林业科技,2013(5):48-51.
- [16] 林思俊. 杨树病虫害发生原因及防治技术[J]. 现代农业科技,2011(5):183,186.
- [17] 陈杰. 兴安盟扎赉特旗杨树病虫害的种类及其防治措施[J]. 内蒙古林业科技,2012,38(1):62-64.
- [18] 张丽敏,杨玉巧,杨旭琦,等. 欧美杨纯林主要病虫害发生现状及对策[J]. 河南林业科技,2010,30(1):29-30.
- [19] 于锦婧. 浅谈人工杨树林病虫害的防治方法[J]. 黑龙江科学,2014,5(2):168.
- [20] 卢杰,郭其强,郑维列,等. 藏东南高山松种群结构及动态特征[J]. 林业科学,2013,49(8):154-160.
- [21] 陈顺立,杨子旺,江涛. 栗瘿蜂虫瘿空间格局的研究[J]. 福建林业科技,1996,23(1):12-15.
- [22] 徐汝梅,成新跃. 昆虫种群生态学——基础与前沿[M]. 北京:科学出版社,2005:3-18.
- [23] 张国安,赵惠燕. 昆虫生态学与害虫预测预报[M]. 北京:科学出版社,2012:63-102.
- [24] 丁岩钦. 昆虫种群数学生态学原理与应用[M]. 北京:科学出版社,1980:113-125.
- [25] 林龙,吴淑灵,梁光红. 南非刺桐叶片上刺桐姬小蜂虫瘿分布特征[J]. 江西农业大学学报,2012,34(5):928-932.

(上接第 83 页)

供了基础材料。进一步通过 TAIL-PCR 法分析了其中 15 个无致病力突变体转座子插入位点的侧翼序列,所测得的序列包括转座子的 2 个臂端序列,证明转座子已成功插入到烟草青枯菌的基因组中。序列测定结果比对分析表明,转座子插入具有随机性,各个类型的基因都有插入,如编码水解酶、转移酶和合成酶等的基因。由于 Tn5 也可能多位点插入,所以对突变体还需进行 Southern 杂交以测定 Tn5 插入的拷贝数。

参考文献:

- [1] 曾强,李小龙,汪莹,等. 生物有机肥和土壤调理剂对烤烟生长发育和产、质量的影响[J]. 河南农业科学,2014,43(11):36-40.
- [2] 徐树德,尚志强,秦西云. 烟草青枯病研究进展[J]. 天津农业科学,2010,16(4):49-53.
- [3] 卢同. 我国作物细菌性青枯菌的研究进展[J]. 福建农业学报,1998,13(2):33-40.
- [4] 王胜坤. 桉树青枯菌菌株致病力分化、吸附识别及 PCR 快速检测研究[D]. 北京:中国林业科学研究院,2007.
- [5] Von Bodman S B, Bauer W D, Coplin D L. Quorum sensing in plant-pathogenic bacteria[J]. Annual Review of Phytopathology,2003,41(1):455-482.
- [6] Poueymiro M, Genin S. Secreted proteins from *Ralstonia solanacearum*: A hundred tricks to kill a plant[J]. Current Opinion in Microbiology,2009,12(1):44-52.
- [7] 杨军,尹启生,宋纪真,等. 植物病原细菌的 *hrp* 基因[J]. 遗传,2005,27(5):852-858.
- [8] Kang Y, Liu H, Genin S, et al. *Ralstonia solanacearum* requires type 4 pili to adhere to multiple surfaces and for natural transformation and virulence[J]. Molecular Microbiology,2002,46(2):427-437.
- [9] Salanoubat M, Genin S, Artiguenave F, et al. Genome sequence of the plant pathogen *Ralstonia solanacearum*[J]. Nature,2002,415:497-502.
- [10] Li Z F, Wu S L, Bai X F, et al. Genome sequence of the tobacco bacterial wilt pathogen *Ralstonia solanacearum*[J]. J Bacteriol,2011,193(21):6088-6089.
- [11] Cao Y, Tian B Y, Liu Y X, et al. Genome sequencing of *Ralstonia solanacearum* FQY_4, isolated from a bacterial wilt nursery used for breeding crop resistance[J]. Genome Announcements,2013,1(3):e00125-13.
- [12] 康耀卫,黄键中. 利用转座子 Tn5 诱变植物青枯菌获得胞外蛋白输出功能丧失突变体[J]. 植物病理学报,1994,24(3):265-269.
- [13] 程本亮,车建美,刘波. 青枯雷尔氏菌 Tn5 转座子无致病力突变株构建及其生物学特性[J]. 农业生物技术学报,2011,19(1):26-38.
- [14] 车建美,马桂美,刘波,等. 青枯雷尔氏菌 TN5 转座子无致病力突变株插入位点的鉴定与分析[J]. 福建农业学报,2012,27(11):1231-1236.
- [15] Douglas D, Igor Y G, Willian S, et al. Three dimensional structure of the Tn5 synaptic complex transposition intermediate[J]. Science,2000,289:77-85.