苜蓿中华根瘤菌(*Sinorhizobium meliloti*)中 两个 *gcvA* 基因的鉴定及其特性

戚铭盛, 罗利, Hai-ping Cheng, 朱家璧, 俞冠翘*

中国科学院上海生命科学研究院植物生理生态研究所, 植物分子遗传国家重点实验室, 上海 200032;

中国科学院研究生院, 北京 100049;

Biological Sciences Department, Lehman College, The City University of New York, Bronx, New York 10468, USA

* 联系人, E-mail: gqyu@siippe.ac.cn

2008-07-28 收稿, 2008-09-24 接受

国家重点基础研究发展计划(批准号: 2001CB108901)资助项目

摘要 GcvA 蛋白是 LysR 转录因子家族成员, 在大肠杆菌(*Escherichia coli*)中, 它激活编码裂解甘氨酸酶系(GCV)操纵子(*gcvTHP*)的表达, 这一过程受甘氨酸诱导。在以前的工作中, 我们分别突变了苜蓿中华根瘤菌(*Sinorhizobium meliloti*)中 90 个 LysR 家族转录因子, 并鉴定了突变株的表型。本研究证明了苜蓿中华根瘤菌基因组中存在 2 个 *gcvA* 基因 *gcvA1* 和 *gcvA2*; 苜蓿中华根瘤菌 *gcvTHP* 操纵子的充分激活需要它们的同時存在。*gcvA1* 对 *gcvTHP* 操纵子的激活需要甘氨酸诱导, 而 *gcvA2* 对 *gcvTHP* 操纵子的激活则不需要甘氨酸诱导, 推测苜蓿中华根瘤菌中 *gcvTHP* 表达的调控机制与大肠杆菌中的不同。进化分析显示, 很多原细菌中都存在 GcvA 蛋白, 而苜蓿中华根瘤菌的 GcvA1 和 GcvA2 与大肠杆菌的 GcvA 的亲缘关系很远, 这也许可以解释它们 *gcvTHP* 表达调控模式的不同。研究结果为 LysR 基因家族的功能提供了新的线索。

关键词

gcvA

gcvTHP 操纵子

LysR 家族转录调控因子

苜蓿中华根瘤菌

LysR 家族转录因子广泛存在于原细菌各属中, 它们的结构相当保守, 长度基本上为 300 个左右氨基酸, N 端是识别靶基因启动子的 DNA 结合结构域, C 端是感受信号分子的结构域^[1]。靶基因的启动子通常具有保守的 DNA 序列以及至少一个 TN₁₁A 模体^[1]。靶基因通常还与相应的 *lysR* 调节基因在基因组上呈反向排列、启动子区域重合, 这种现象可以使人们很容易识别受该调节蛋白调节的靶标基因。

GcvA 蛋白为 LysR 转录因子家族成员, 在大肠杆菌(*Escherichia coli*)中调节甘氨酸裂解酶系(GCV)操纵子(*gcvTHP*)的表达, 在有外源甘氨酸存在条件下激活 *gcvTHP* 操纵子的表达, 而没有外源甘氨酸的情况下则抑制其表达^[2,3]。*gcvTHP* 操纵子负责甘氨酸的氧化酶解, 是生物合成一碳单位的次要途径^[4]。生物合成一碳单位的主要途径为通过 *glyA* 的基因产物

——丝氨酸羟甲基转移酶将丝氨酸分解为甘氨酸和 5,10-二甲基四氢叶酸^[5]。大肠杆菌的 *gcvA* 突变株——GS786 具有 GCV⁻表型, 这意味着它不能利用甘氨酸生成丝氨酸并需要外源丝氨酸, 同时甘氨酸无法诱导激活 *gcvTHP* 操纵子^[3]。进一步研究说明 GcvA 蛋白三个启动子结合位点中的两个对于激活是必需的^[6,7], 它可能与 *gcv* 启动子激活时形成的核蛋白复合体所需的 DNA 弯曲相关^[8]。另一个转录因子——GcvR 蛋白则是抑制 *gcvTHP* 操纵子所必需^[9], 研究表明, GcvR 和 GcvA 直接相互作用形成蛋白复合体, 使 GcvA 失活, 从而抑制 *gcv* 操纵子, 而诱导物甘氨酸能与 GcvR 蛋白结合、解聚此异源二聚体, 从而解除抑制达成激活^[8]。大肠杆菌中 GcvA 蛋白调节 *gcvTHP* 操纵子的机制已经阐述得比较清晰, 但在其他原细菌中却鲜有报道。在苜蓿中华根瘤菌(*Sinorhizobium*

meliloti)基因组中已经命名了*gcvTHP*操纵子^[10],但*gcvTHP*操纵子的调节基因尚未发现,调节机制还不清楚。

苜蓿中华根瘤菌的全基因组测序最近已经完成。在以前的工作中^[11],我们通过插入自杀性质粒获得90个LysR家族基因的突变株。本研究通过鉴定表型发现其中2个突变株Sm392和Sm395,具有类似Gcv⁻的表型,同时它们的*gcvTHP*操纵子表达水平很低。这两个突变株对应的基因是大肠杆菌*gcvA*的高度同源体,并都能激活*gcvTHP*操纵子的表达。因此这两个基因分别命名为*gcvA1*和*gcvA2*。但是它们响应甘氨酸的调节机制却与大肠杆菌中的机制相差很大。

1 材料和方法

() 细菌菌株、质粒和培养基。所用菌株和质粒列于表1。Luria-Bertani (LB)培养基用于培养大肠杆菌。添加2.5 mmol/L MgSO₄和2.5 mmol/L CaCl₂^[12]的LB培养基用于培养根瘤菌。所用基本培养基(GM)为添加了葡萄糖(0.4%)的Vogel和Bonner基本培养基^[13]。固体培养基为液体培养基添加琼脂粉(1.5%)。所用氨基酸和抗生素按照如下浓度使用:甘氨酸,300 μg/mL;丝氨酸,420 μg/mL;卡那霉素,25 μg/mL;氨基青霉素,100 μg/mL;新霉素,200 μg/mL;链霉素,

500 μg/mL;四环素,10 μg/mL;壮观霉素,100 μg/mL;庆大霉素,50 μg/mL。

() DNA操作。质粒DNA的抽提、限制性酶切以及连接均按照文献^[18]所述进行。

() 酶活测定。细菌粗提液中β-半乳糖苷酶活性通过测定邻硝基苯-β-D-半乳糖苷的水解来表示^[19]。

() RT-PCR。利用Trizol试剂(中国北京鼎国生物科技有限公司)抽提苜蓿中华根瘤菌的总RNA。程序如下:将离心收集的细菌悬浮于Trizol试剂中,用氯仿抽提;取上清,加异丙醇沉淀总RNA,加乙醇清洗,RNA沉淀干燥后溶解于DEPC处理过的重蒸水。RNA粗提样品用DNase (25 U/30 μg RNA)(中国大连宝生物)去除基因组DNA。基因表达通过反转录PCR(RT-PCR)反应检测,使用RT-PCR试剂盒(宝生物),操作按照厂家使用说明。

() 多序列比对。BlastP (美国国立生物信息中心,NCBI)和ClustalW (欧洲生物信息研究所,EBI)等程序用于搜寻同源物、比对序列以及构建进化分析,程序使用时所有的参数都选择默认值。

2 结果与讨论

2.1 苜蓿中华根瘤菌基因组中含有两个*gcvA*基因

在以前的工作中,我们将苜蓿中华根瘤菌中90

表1 细菌菌株和质粒

菌株和质粒	特性 ^{a)}	参考文献
菌株		
大肠杆菌		
DH5α	supE44ΔlacU169(φ80lacZΔ15)hsdR17recA1endA1	实验室保藏
DHgT	含有pGGQ1质粒的DH5α菌株	本研究
MT616	pro-82thi-1endA1supE44 ⁻ ,Cm ^r ,含有pRK600质粒	[14]
苜蓿中华根瘤菌		
Rm1021	Str ^r , 源自SU47	[15]
Sm392	<i>gcvA1</i> ::pK19mob2ΩHMB, <i>gcvA2</i> ⁺ , Nm ^r	[11]
Sm395	<i>gcvA2</i> ::pK19mob2ΩHMB, <i>gcvA1</i> ⁺ , Nm ^r	[11]
质粒		
pK19mob2ΩHMB	Km ^r ,	[11]
pGD926	Tc ^r , <i>IncP lacZ</i> 融合载体	[16]
pGGQ1	Tc ^r , <i>gcvT</i> :: <i>lacZ</i> 启动子融合质粒, 源自pGD926	本研究
pWB5	Tc ^r , Km ^r , 广宿主质粒	Ausubel F.M.
pWGQ1	Tc ^r , <i>gcvA1</i> 持续表达, 源自pWB5	本研究
pWGQ2	Tc ^r , <i>gcvA2</i> 持续表达, 源自pWB5	本研究
pKT230	Km ^r , Str ^r , 广宿主质粒	[17]
pKGQ1	Str ^r , <i>gcvA1</i> ^c , 源自pKT230	本研究
pKGQ2	Str ^r , <i>gcvA2</i> ^c , 源自pKT230	本研究
pKGQ3	Str ^r , <i>gcvA1</i> ^c 和 <i>gcvA2</i> ^c , 源自pKT230	本研究

a) Str^r, 抗链霉素; Tc^r, 抗四环素; Cm^r, 抗氯霉素; Nm^r, 抗新霉素; Km^r, 抗卡那霉素。c, 组成性表达

个LysR家族调节基因分别进行突变, 构建成 90 个插入突变株, 并鉴定了它们的表型^[11]. 其中一项便是分析这些突变株是否能利用氨基酸作为唯一氮(N)源. 其中两株, Sm392 和Sm395, 在以甘氨酸为唯一氮源的培养基上不能生长. 由于氨基酸代谢调控是LysR家族调节蛋白重要生物功能之一, 因此之后进行了进一步更细致的表型分析和生物信息学研究.

利用Plamann等人^[20]描述的方法, 我们进一步确定了Sm392 和Sm395 的表型. 在添加了甘氨酸的无氮GM培养基中, 这两个突变株生长非常缓慢并无法达到与野生型Rm1021 一致的最高细菌浓度(图 1(a)和(b)). 而在添加了丝氨酸的无氮GM培养基中突变株和野生型并无太大差别(图 1(c)). 同时, 我们构建了两个互补质粒pWGQ1 和pWGQ2 (表 1), 分别携带这 2 个基因, 并进行互补分析. 结果表明, 在添加了甘氨酸的无氮GM培养基中, 互补菌株Sm392/ pWGQ1 和Sm395/pWGQ2 的生长与野生型相似(图 1(a)和(b)). 这些结果表明, 这两个突变株具有甘氨酸酶解缺陷(GCV⁻)表型, 也就是说他们无法利用甘氨酸生成丝氨酸.

多序列比对结果表明, 这 2 个基因编码的蛋白与大肠杆菌的 GcvA 蛋白以及根癌农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*)的 GcvA 蛋白具有高度的一致性(表 2),

显示与大肠杆菌和根癌农杆菌的GcvA蛋白具有相似的域结构(图 2). 对于大肠杆菌的GcvA蛋白, 以下几点是已知的: 框中氨基酸(图 2)为保守的螺旋-转角-螺旋(HTH)模体的一部分^[21]. 前一个框中氨基酸组成稳定螺旋而后一个框中氨基酸组成识别螺旋, 之间的氨基酸VT则构成转角. 星号标注的氨基酸对于GcvA调节功能特别重要. L30 和F31 对于gcv操纵子的激活时必须的, 而V32 和S38 则对结合DNA至关重要^[22]. 在其他 3 个蛋白中, HTH模体以及大多数重要的氨基酸都与大肠杆菌的GcvA蛋白高度保守, 这提示它们的功能也有可能是相似的. 4 个蛋白的C端氨基酸序列保守度相对较低, 因此它们可能具有不同的信号感受机制和/或感受不同的信号分子.

为了鉴定这两个基因在苜蓿中华根瘤菌中是否调节 *gcvTHP* 操纵子, 用 RT-PCR 方法在野生型、突变株和互补菌株中检测 *gcvT* 的表达. 结果显示, 每一个基因突变都导致 *gcvT* 表达的下调(图 3). 而互补质粒导入突变株以后, *gcvT* 的表达又恢复到野生型水平. 这就说明这些基因能够调节苜蓿中华根瘤菌中的 *gcvTHP* 操纵子.

以上结果显示, 这两个基因是苜蓿中华根瘤菌 *gcvA* 的候选基因, 因此突变株 Sm392 和 Sm395 对应的突变基因被分别命名为 *gcvA1* 和 *gcvA2*.

表 2 不同来源的 GcvA 蛋白序列的一致性(%)

	大肠杆菌 GcvA	根癌农杆菌 GcvA	苜蓿中华根瘤菌 GcvA1	苜蓿中华根瘤菌 GcvA2
大肠杆菌 GcvA	—	35	34	36
根癌农杆菌 GcvA	—	—	79	28
苜蓿中华根瘤菌 GcvA1	—	—	—	28
苜蓿中华根瘤菌 GcvA2	—	—	—	—

图 1 基本培养基中苜蓿中华根瘤菌的生长曲线

(a) Rm1021, Sm392 及其互补菌株在添加甘氨酸的无氮 GM 基本培养基中的生长; (b) Rm1021, Sm395 及其互补菌株在添加甘氨酸的无氮 GM 基本培养基中的生长; 图内小图为对照, 显示苜蓿中华根瘤菌在不添加甘氨酸的无氮 GM 基本培养基中的生长曲线; (c) 苜蓿中华根瘤菌在添加丝氨酸的无氮 GM 基本培养基中的生长. 起始细菌浓度 $A_{600\text{ nm}} = 0.02$

图2 苜蓿中华根瘤菌 GcvA1 与 GcvA2 和其他来源的 GcvA 蛋白的氨基酸序列比较

蛋白序列中一致的氨基酸残基以黑色阴影标记, 相似残基以灰色阴影标记. HTH 模体残基以黑框圈出, 特别重要的残基以星号标出. 空缺用“-”表示, 蛋白名字在每一行开始处标出. E.co 代表大肠杆菌, A.tu 代表农杆菌, S.me 代表苜蓿中华根瘤菌

图3 用 RT-PCR 方法检测苜蓿中华根瘤菌中 *gcvT* 的表达
rpsC 作为内标. 根瘤菌用 GM 基本培养基培养并于细菌浓度达到 $A_{600\text{ nm}} = 0.8$ 时提取 RNA

2.2 *gcvA1* 和 *gcvA2* 对于 *gcvT* 的充分激活是必需的

为了研究 *gcvA1* 和 *gcvA2* 的调节特性, 我们构建了 *gcvT::lacZ* 融合质粒 pGGQ1, 并将其导入野生型 Rm1021 和两个突变株 Sm392 和 Sm395. β -半乳糖苷酶活性显示, *gcvA1* 和 *gcvA2* 都能激活苜蓿中华根瘤菌中 *gcvTHP* 操纵子的表达(图4). 但这两个基因的突变都不能完全阻断 *gcvT* 的表达. 不同菌株中 *gcvT::lacZ* 融合质粒的 β -半乳糖苷酶活性比较显示, 在不添加甘氨酸的情况下, Sm392 和 Sm395 中的活性分别为 Rm1021 的 46% 和 47%; 而添加甘氨酸条件下, 活性分别为 Rm1021 的 31% 和 47%. 因此, 不管甘氨酸是否存在, *gcvA1* 或 *gcvA2* 的突变能使 *gcvTHP* 操纵子的表达下降大约 50%. 这两个 *gcvA* 基因都只能部

图4 在添加或不添加甘氨酸的情况下苜蓿中华根瘤菌中 *gcvT::lacZ* 融合子的 β -半乳糖苷酶活性

分影响 *gcvTHP* 操纵子的表达.

为了进一步证明这个推测, 我们构建了组成性表达 *gcvA1*, *gcvA2* 以及同时包含 *gcvA1* 和 *gcvA2* 的质粒 pKGQ1, pKGQ2 和 pKGQ3. 将其分别导入含有 *gcvT::lacZ* 融合质粒 pGGQ1 的大肠杆菌 DH5 α 菌株

(即菌株 DHgT, 表 1)之后在添加或不添加甘氨酸的无氮 GM 培养基中检测大肠杆菌的 β -半乳糖苷酶活性. 结果与上述结果相似, 在不含甘氨酸的培养基中, DHgT/pKGQ1 和 DHgT/pKGQ2 中的表达水平分别为 DHgT/pKGQ3 的 68%和 78%; 而在含甘氨酸的培养基中, 表达水平分别为 76%和 59%(图 5), 这两个 *gcvA* 基因都只能部分影响 *gcvTHP* 操纵子的表达, 可以推测 *gcvTHP* 操纵子的充分激活则同时需要 *gcvA1* 和 *gcvA2* 这两个基因. 只有当 *gcvTHP* 操纵子被充分地激活后苜蓿中华根瘤菌才能在甘氨酸作为唯一氮源的培养基中生长(图 1).

图 5 添加或不添加甘氨酸的情况下大肠杆菌中由 *gcvA1* 和/或 *gcvA2* 激活的 *gcvT::lacZ* 融合子的 β -半乳糖苷酶活性

2.3 *gcvA1* 和 *gcvA2* 对于甘氨酸的响应不同

为了确定苜蓿中华根瘤菌中*gcvTHP*操纵子的调节机制是否与受甘氨酸诱导, 我们比较了甘氨酸存在或不存在条件下*gcvT*的表达情况. 在野生型 Rm1021 和突变株 Sm395 中, 添加甘氨酸使得*gcvT*的表达水平比无甘氨酸的情况分别增加了 0.57 倍和 0.56 倍, 而 Sm392 中则变化不大(图 4). 在大肠杆菌背景下, 添加甘氨酸使得 DHgT/pKGQ1 和 DHgT/pKGQ3 中*gcvT*的表达水平比无甘氨酸的情况分别增加了 0.5 倍和 0.33 倍, 而 DHgT/pKGQ2 则没什么变化. 这些结果表明, *gcvA1* 介导的*gcvTHP*操纵子的表达可以被甘氨酸诱导, 而*gcvA2* 介导的则不能被甘氨酸诱导. 由

于在野生型中添加甘氨酸可使*gcvT*的表达水平达到最大值, 因此有理由推测甘氨酸诱导对于*gcvTHP*操纵子的最大限度激活是必需的. 尽管结果证明苜蓿中华根瘤菌中*gcvTHP*操纵子的表达是可以被甘氨酸诱导, 但诱导效率却远远小于在大肠杆菌中的诱导效率^[3]. 我们推测苜蓿中华根瘤菌中*gcvTHP*操纵子的调节机理可能不同于大肠杆菌. 进一步研究正在进行中.

2.4 进化分析中苜蓿中华根瘤菌的两个 GcvA 蛋白和大肠杆菌 GcvA 蛋白的亲缘关系很远

不管是否添加甘氨酸, 苜蓿中华根瘤菌的 *gcvT::lacZ* 融合质粒在大肠杆菌中都只有微弱的活性(图 5, 菌株 DHgT/pKT230), 说明大肠杆菌 *gcv* 操纵子的调节蛋白并不能有效激活苜蓿中华根瘤菌的 *gcvTHP* 操纵子. 另外, 甘氨酸对苜蓿中华根瘤菌中 *gcvTHP* 操纵子表达的诱导效率远小于在大肠杆菌中的诱导效率. 生物信息分析也显示, 苜蓿中华根瘤菌中并不含有 GcvR 候选蛋白, 这与大肠杆菌很不一样. 同时, 这两个物种 *gcvT* 启动子的结构分析显示, 虽然苜蓿中华根瘤菌 *gcvT* 的启动子拥有典型保守的 TN₁₁A 模体, 但并没有与大肠杆菌 *gcvT* 启动子中相似的 GcvA 蛋白结合位点. 这些结果暗示, 苜蓿中华根瘤菌中 *gcv* 操纵子的调节机制很可能与大肠杆菌中的不一样.

为了评估苜蓿中华根瘤菌的 GcvA 蛋白和大肠杆菌 GcvA 蛋白的差别, 我们搜寻了不同原细菌科属中所有 GcvA 蛋白的序列并在 EBI ClustalW 服务器上构建进化分析. 这些细菌属被分成 3 大比较接近的亲缘关系(图 6). 苜蓿中华根瘤菌 GcvA1, GcvA2 蛋白和农杆菌 GcvA 蛋白位于同一大类并非常接近, 特别是 GcvA1 蛋白和农杆菌 GcvA 蛋白. 由于苜蓿中华根瘤菌和农杆菌同属于原细菌 α -亚科的根瘤菌属, 所以这个结果是合情合理的. 而苜蓿中华根瘤菌 GcvA1, GcvA2 蛋白和大肠杆菌 GcvA 蛋白的亲缘关系则很远, 这可能是他们功能上产生差别的原因.

LysR 转录调节因子家族是原细菌中最大的转录因子家族^[4]. 其调节机制非常灵活和有效. 不同属细菌肠细菌和根瘤菌的相同调节蛋白功能相似, 调节机制却相去甚远. 本研究为苜蓿中华根瘤菌 GcvA 蛋白的调节机制以及 GcvA 蛋白功能和进化过程提供了更多信息.

图 6 苜蓿中华根瘤菌 GcvA1, GcvA2 蛋白和其他属细菌的 GcvA 蛋白的进化分析
输入 20 属细菌的 21 个 GcvA 蛋白的氨基酸序列进入 EBI ClustalW 服务器进行进化分析

参考文献

- Schell M A. Molecular biology of the LysR family of transcriptional regulators. *Annu Rev Microbiol*, 1993, 47: 597—626[DOI]
- Wilson R L, Stauffer L T, Stauffer G V. Roles of GcvA and PurR proteins in negative regulation of the *Escherichia coli* glycine cleavage enzyme system. *J Bacteriol*, 1993, 175: 5129—5134
- Wilson R L, Steiert P S, Stauffer G V. Positive regulation of the *Escherichia coli* glycine cleavage enzyme system. *J Bacteriol*, 1993, 175: 902—904
- Sagers R D, Gunsalus I C. Intermediary metabolism of *Diplococcus glycinophilus*. I. Glycine cleavage and one-carbon interconversions. *J Bacteriol*, 1961, 81: 541—549
- Mudd S H, Cantoni G L. Biological transmethylation, methyl-group neogenesis and other “one-carbon” metabolic reactions dependent upon tetrahydrofolic acid. In: Florkin M, Stotz E H, eds. *Comprehensive Biochemistry*, Vol. 15. Amsterdam: Elsevier Publishing, 1964. 1—47
- Wilson R L, Urbanowski M L, Stauffer G V. DNA binding sites of the LysR-type regulator GcvA in the *gcv* and *gcvA* control regions of *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, 1995, 177: 4940—4946
- Wonderling L D, Urbanowski M L, Stauffer G V. GcvA binding site 1 in the *gcvTHP* promoter of *Escherichia coli* is required for GcvA-mediated repression but not for GcvA-mediated activation. *Microbiology*, 2000, 146: 2909—2918
- Heil G, Stauffer L T, Stauffer G V. Glycine binds the transcriptional accessory protein GcvR to disrupt a GcvA/GcvR interaction and allow GcvA-mediated activation of the *Escherichia coli gcvTHP* operon. *Microbiology*, 2002, 148: 2203—2214
- Ghris A C, Stauffer G V. Characterization of the *Escherichia coli gcvR* gene encoding a negative regulator of *gcv* expression. *J Bacte-*

- riol, 1995, 177: 4980—4984
- 10 Galibert F, Finan T M, Long S R, et al. The composite genome of the legume symbiont *Sinorhizobium meliloti*. Science, 2001, 293: 668—672[DOI]
- 11 Luo L, Yao S Y, Becker A, et al. Two new *Sinorhizobium meliloti* LysR-type transcriptional regulators required for nodulation. J Bacteriol, 2005, 187: 4562—4572[DOI]
- 12 Leigh J A, Signer E R, Walker G C. Exopolysaccharide-deficient mutants of *Rhizobium meliloti* that form ineffective nodules. Proc Natl Acad Sci USA, 1985, 82: 6231—6235[DOI]
- 13 Vogel H J, Bonner D M. Acetylornithinase of *Escherichia coli*: Partial purification and some properties. J Biol Chem, 1956, 218: 97—106
- 14 Finan T M, Kunkel B, De Vos G F, et al. Second symbiotic megaplasmid in *Rhizobium meliloti* carrying exopolysaccharide and thiamine synthesis genes. J Bacteriol, 1986, 167: 66—72
- 15 Meade H M, Long S R, Ruvkun G B, et al. Physical and genetic characterization of symbiotic and auxotrophic mutants of *Rhizobium meliloti* induced by transposon mutagenesis. J Bacteriol, 1982, 149: 114—122
- 16 Ditta G, Schmidhauser T, Yakobson E, et al. Plasmids related to the broad host range vector, pRK290: Useful for gene cloning and for monitoring gene expression. Plasmid, 1985, 13: 129—153[DOI]
- 17 Carlson C A, Stewart G J, Ingraham J L. Thymidine salvage in *Pseudomonas stutzeri* and *Pseudomonas aeruginosa* provided by heterologous expression of *Escherichia coli* thymidine kinase gene. J Bacteriol, 1985, 163: 291—295
- 18 Sambrook, J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular Cloning: a Laboratory Manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989
- 19 Miller J H. Experiments in Molecular Genetics. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1972. 352—355
- 20 Plamann M D, Rapp W D, Stauffer G V. *Escherichia coli* K12 mutants defective in the glycine cleavage enzyme system. Mol Genet, 1983, 192: 15—20[DOI]
- 21 Wilson R L, Stauffer G V. DNA sequence and characterization of GcvA, a LysR family regulatory protein for the *Escherichia coli* glycine cleavage enzyme system. J Bacteriol, 1994, 176: 2862—2868
- 22 Jourdan A D, Stauffer G V. Mutational analysis of the transcriptional regulator GcvA: Amino acids important for activation, repression, and DNA binding. J Bacteriol, 1998, 180: 4865—4871