

转座子挽救法克隆鞘氨醇单胞菌CDS-1中 呋喃丹水解酶相关基因*

徐剑宏^{1,2} 洪青² 武俊² 严秋香² 李顺鹏^{2**}

(¹江苏省农业科学院食品质量与安全检测研究所, 农业部食品质量安全监控重点开放实验室, 江苏省食品质量安全重点实验室 南京 210014)
(²南京农业大学生命科学学院, 农业部农业环境微生物工程重点开放实验室 南京 210095)

摘要 用含Tn5转座子的自杀性质粒pSC123诱变呋喃丹降解菌*Spingomonas agrestis* CDS-1, 获得失去呋喃丹降解功能的突变株CDS-M1. 以pMD18-T为载体在*E. coli* DH5 α 中构建了CDS-M1的基因组文库, 采用转座子挽救法对Tn5插入位点两侧翼的序列进行克隆与测序, 根据测序结果(共4 551个碱基)设计引物, 从CDS-1的基因组中扩增到同样大小的片段, 将该片段克隆到广宿主载体pPZP201上, 得到重组质粒pCDZ1, 通过三亲接合的方法把pCDZ1导入CDS-M1中进行功能互补实验, 结果显示CDS-M1的呋喃丹水解功能得到了恢复, 表明该片段中包含呋喃丹水解酶相关基因. 图7表1参14

关键词 *Spingomonas agrestis* CDS-1; 呋喃丹; 转座子挽救法; 基因克隆
CLC X172 : Q78

Cloning of a Gene Related to Carbofuran Hydrolyzing from *Spingomonas agrestis* CDS-1 by Transposon Rescue*

XU Jianhong^{1,2}, HONG Qing², WU Jun², YAN Qiuxiang² & LI Shunpeng^{2**}

(¹Key Laboratory of Food Quality and Safety of Jiangsu Province, Key Laboratory of Food Safety Monitoring and Management, Ministry of Agriculture, Institute of Food Safety, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014, China)

(²Key Laboratory of Microbiological Engineering of Agricultural Environment, Ministry of Agriculture, College of Life Science, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract Carbofuran degrading mutant CDS-M1 was obtained by mutating *Spingomonas agrestis* CDS-1 with transposon Tn5 carried on the suicide plasmid pSC123. Genomic DNA library was constructed in *E. coli* DH5 α using pMD18-T as vector. By using transposon rescue, a 4 551 bp DNA sequence of *S. agrestis* CDS-1 flanking the Tn5 insertion site was obtained. A pair of PCR primers were synthesized according to the sequence adjacent to transposon. With these primers, a same size PCR product was amplified from the genomic DNA of CDS-1. The PCR product was ligated into broad host vector pPZP201 to construct recombinant plasmid CDZ1. CDZ1 was then transferred into mutant CDS-M1 by triparental mating. The result showed that the transformant with CDZ1 had regained carbofuran degrading ability. The study indicated that the 4 551 bp DNA sequence was a gene fragment relative to carbofuran hydrolyzing. Fig 7, Tab 1, Ref 14

Keywords *Spingomonas agrestis* CDS-1; carbofuran; transposon rescue; gene cloning
CLC X172 : Q78

呋喃丹作为一种高效的氨基甲酸酯农药, 曾经在防治农作物的害虫方面发挥了巨大的作用, 该农药主要是通过抑制昆虫体内的乙酰胆碱酯酶而杀死害虫^[1-2]. 由于乙酰胆碱酯酶在脊椎动物中普遍存在, 而且呋喃丹水溶性好, 半衰期长, 因此会对非靶标生物产生潜在威胁^[3-4]. 目前, 已从*Achromobacter* sp.、*Spingomonas* sp.、*Pseudomonas* sp.等属中分离到降解这类农药的微生物^[5-9], 但是仅从*Achromobacter* sp. WM111克隆到呋喃丹水解酶基因. 本实验室从长期受呋喃丹污染的污泥中分离到一株能矿化呋喃丹的菌株, 命名为*Spingomonas agrestis* CDS-1^[10]. 该菌株首先把呋喃丹降解成呋喃酚, 然后再进一步降解呋喃酚至二氧化碳和水. 呋喃丹降解为呋喃酚由呋喃丹水解酶催化. 由于没有合适的方法区

分呋喃丹和呋喃酚, 所以很难通过基因文库法克隆呋喃丹水解酶基因. 本研究利用转座子插入突变法^[11], 首先获得突变株, 然后建立突变子基因组文库, 通过转座子挽救法和功能互补的方法克隆呋喃丹水解酶相关基因.

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 菌株与质粒 本试验所用菌株和质粒见表1.

1.1.2 培养基 无机盐培养基(MM): NH₄NO₃ 1.0 g, KH₂PO₄ 0.5 g, K₂HPO₄ 1.5 g, NaCl 0.5 g, MgSO₄ 0.1 g, pH 7.2, 去离子水1 000 mL; FMM: 加入呋喃丹的MM培养; LB培养基^[12].

1.1.3 抗生素及使用浓度 氨苄青霉素(Amp)为100 μ g mL⁻¹, 链霉素(Str)为50 μ g mL⁻¹, 卡那霉素(Km)为100 μ g mL⁻¹, 壮观霉素(Spe)为100 μ g mL⁻¹.

1.1.4 试剂和酶 限制性内切酶、碱性磷酸酶、蛋白酶K、

收稿日期: 2008-08-15 接受日期: 2008-12-03

*国家自然科学基金项目(No. 30400013)资助 Supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 30400013)

**通讯作者 Corresponding author (E-mail: lsp@njau.edu.cn)

表1 本研究中所用的菌株和质粒
Table 1 Bacterial strains and plasmids used in this study

Strain and plasmid	Characteristics	Reference or source
Bacterial strains		
<i>Sphingomonas agrestis</i>	Str ^r , carbofuran-degrading strain	This laboratory
CDS-1		
CDS-M1	Km ^r , Str ^r , Muants of CDS-1	This work
CDS-MR1	Spe ^r , Km ^r , Str ^r , CDS-M1 intergrated with pCDZ1	This work
CDS-MR2	Spe ^r , Km ^r , Str ^r , CDS-M1 intergrated with pCDZ2	This work
<i>E. coli</i> DH5α	<i>Escherichia coli</i> , supE44, hsdR17, ΔlacU169, reaA1, endA1, gryA96, thi-1 relA1	This laboratory
CDSP1	<i>E. coli</i> DH5α with pCDSP1	This work
Plasmids		
pMD18-T	Amp ^r , cloning vector	TaKaRa
pPZP201	Spe ^r , broad host vector	This laboratory
pRK2013	mob ^r , tra ^r , Km ^r , Triparental conjugation helper	This laboratory
pCDSP1	Km ^r , Str ^r , pUC18 vector with Tn5 and fragment from genomic DNA of CDS-M1	This work
pCDT1	Amp ^r , pUC18 vector with 4.55 kb PCR product	This work
pCDT2	Amp ^r , pUC18 vector with 4.55 kb PCR product different with pCDT1 in opposite direction	This work
pCDZ1	Spe ^r , pPZP201 vector with 4.55 kb fragment from pCDT1	This work
pCDZ2	Spe ^r , pPZP201 vector with 4.55 kb fragment from pCDT2	This work

T₄DNA连接酶等购自TaKaRa Biotechnology公司。

1.2 DNA的分子操作

CDS-1总DNA的提取、质粒提取、酶切、去磷酸化、酶连和转化等分子操作参照文献[12]进行。

1.3 呋喃丹降解相关基因的测定与序列分析

基因序列委托Invitrogen公司测定，序列比较采用Blast软件在<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>在线查询。

1.4 转座子的导入

在含有50 mg L⁻¹链霉素的LB试管中培养CDS-1，同时在加入50 mg L⁻¹卡那霉素和20 mg L⁻¹氯霉素的LB试管中培养*E. coli* DH5α (pSC123)，分别取3 mL $D_{600\text{nm}} \approx 1.0$ 的菌液于10 000 r min⁻¹离心5 min，收集菌体，用LB洗涤菌体2次，每管加入50 μL的LB液体重悬菌体，把两管菌悬液混匀，在LB固体平板上放上灭过菌的细菌滤膜（孔径0.45 μm），把混合菌液滴在滤膜上，30 °C培养过夜，用LB液体把滤膜上的菌体洗下，取适当菌液涂布于含50 mg L⁻¹链霉素和50 mg L⁻¹卡那霉素的LB平板上，30 °C培养。挑取在双抗平板上长出的菌落点到贴有96格纸的含有链霉素和卡那霉素的LB平板上，30 °C培养，等菌体长出后把菌落一一对应点到含有FMM的96孔板中，挑取不变红的菌落再在LB试管中扩增培养，按5%的接种量加入含有FMM的试管中，30 °C、180 r min⁻¹摇床培养3 d后用液相色谱法检测呋喃丹的含量，不能降解呋喃丹的插入子被初步确定为插入突变子。

1.5 呋喃丹含量的检测

将经过不同处理的FMM，加入5倍体积的二氯甲烷，剧烈震荡5 min，静置分层后，吸弃上清液，过无水硫酸钠柱，取1.0 mL置于微量离心管中，氮气吹干；加入0.5 mL甲醇溶解（色谱纯），用孔径0.45 μm的有机相针头过滤器过滤后，液相色谱测定样液中呋喃丹的含量，液相色谱条件：Waters C₁₈反相柱：250 mm×4.6 mm，粒径5 μm；流动相：甲醇/水（体积比70/30），流速：1 mL min⁻¹，紫外检测器，波长280 nm；进样量：20 μL。

1.6 三亲接合

参照文献[12]进行，将三亲本分别接入加有相应抗生素

的LB液体培养基中培养，取培养至对数中期的3种菌液（供体菌，辅助菌，受体菌）各3 mL，10 000 r min⁻¹离心并用LB培养基洗涤，把洗涤后的3种菌液混在一起，在LB固体平板上放上灭过菌的细菌滤膜（孔径0.45 μm），把混合菌液滴在滤膜上，30 °C培养过夜，用LB液体把菌体洗下，取适量涂布于含有相应抗生素的平板上，筛选接合子。

1.7 突变子中转座子序列的检测

根据转座子左右侧翼序列设计一对引物：pL：5'-TTAAGTGTTCCTGTGTCACCT-3'（126~145位）；pR：5'-TCAACATAGTTCCTTCAAG-3'（3 472~3 491位）。分别以插入突变子基因组DNA和pSC123的质粒DNA作为模板，用LA-Taq酶进行PCR，PCR反应条件：94 °C预变性5 min，进入热循环：94 °C变性30 s，50 °C退火30 s，72 °C延伸3 min，共30个循环。取PCR产物在0.7%的琼脂糖凝胶进行电泳。PCR产物的酶切验证：用限制性内切酶HindⅢ和SmaⅠ对PCR产物进行酶切，把以突变子总DNA为模板的PCR产物和以pSC123质粒DNA作模板的PCR产物的酶切产物片段大小和数量作对比，并和理论值进行比较。

1.8 突变子中转座子侧翼序列的克隆

提取CDS-M1总DNA，用*NspⅠ*酶切，酚：氯仿：异戊醇抽提后，沉淀回收，加入TE（pH 8.0）溶解沉淀。以此作模板，按下面的反应体系：10×Taq buffer（Mg²⁺ free）10 μL，MgCl₂（25 mmol L⁻¹）6 μL，dNTP mixer（2.5 mmol L⁻¹）8 μL，模板（10 ng μL⁻¹）1 μL，Taq DNA聚合酶（5 U μL⁻¹）1 μL，ddH₂O加至100 μL。72 °C延伸30 min，（以使酶切片段两头的粘性末端补平，在两侧各添上一个A，这样的酶切片段就可以和pMD18-T连接），把PCR产物沉淀回收后和pMD18-T酶连，转化至*E. coli*DH5α中，在含有卡那霉素和氨苄青霉素的平板上挑取阳性克隆，并对阳性克隆进行转座子插入序列的PCR验证。验证正确后，以转座子两侧的序列为引物，对转座子侧翼序列分别进行测序。

1.9 突变子的功能回复试验

根据测序结果，以两侧的序列设计引物，以CDS-1的总DNA作模板，进行LA-PCR。扩增出和理论大小相同的片段

和pMD18-T载体连接, 转化至*E. coli* DH5 α 中, 挑取阳性克隆, 提取质粒, 用*Pst*I 酶切, 根据不同的酶切类型, 分别挑选两种和pMD18-T载体不同方向连接的质粒, 分别命名为pCDT1和pCDT2, 用*Hind*III和*Kpn*I 酶切, 回收酶切片段并和pPZP201连接, 转化至*E. coli* DH5 α 中, 挑取阳性克隆通过三亲接合的方法分别把重组质粒pCDZ1和pCDZ2转入到CDS-M1中, 验证功能回复情况。

2 结果与分析

2.1 突变子的初筛

由于CDS-1能够完全降解呋喃丹, 在降解过程中伴随着一种目前未知的红色物质的产生^[13], 因此可以通过红色物质的产生与否初步判断呋喃丹的降解情况。在本实验中, 就是以此为筛选标记, 用96孔板进行操作, 在2万多个插入子中共初筛出260个不变红色的插入突变子, 把这260个插入突变子分别培养后按5%接种量接入到含100 mg L⁻¹呋喃丹的FMM中, 30 °C培养3 d后, 液相色谱检测呋喃丹的降解情况, 从这260个插入突变子中复筛出8个不能降解呋喃丹的突变子, 选择其中一株编号CDS-M1(图1)。从图1可以看出, 经过CDS-M1的作用, 呋喃丹含量没有变化, 而相同条件下经过CDS-1处理, 已检测不到呋喃丹的存在, 这说明CDS-M1确实已经失去了降解呋喃丹的功能。

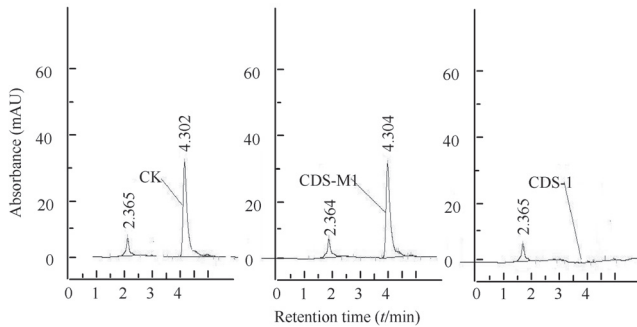


图1 液相色谱法测定突变子对呋喃丹的降解性能
Fig. 1 Degradation ability of carbofuran of CDS-M1 detected by liquid chromatogram

2.2 突变子的验证

经HPLC检测, 可以判定突变子确实已失去了降解呋喃丹的能力, 但为了验证突变子确实是由于转座子插入而造成突变的, 首先把突变子接种于含氯霉素的LB中培养, 结果显示突变子都不能生长, 由于氯霉素抗性基因是位于pSC123质粒的非转座子序列部位, 由此可以判断突变子中不含有整个pSC123质粒, 而只含有转座子片段。另外, 根据转座子中的已知片段设计引物pL和pR进行PCR扩增, 结果显示, 以突变子的基因组DNA和pSC123的质粒DNA为模板, 都扩增出了大小相同的片段, 并且和理论大小3 365 bp相符合, 在分析转座子序列的基础上, 对PCR产物分别用*Hind*III和*Sma*I 酶切(图2), 结果表明, 以突变子的基因组DNA和pSC123的质粒DNA为模板的PCR产物经*Hind*III酶切, 都切出了3个条带, 大小约为100 bp、500 bp、2 700 bp, 和理论值101 bp、526 bp、2 738 bp相一致, 而用*Sma*I 酶切, 切出了两条大小约为2 600 bp、750 bp的条带, 和理论值2 595 bp、771 bp也一致。这表明突变子中确实存在该转座子序列, 也就是说突变子CDS-M1确实是因

为插入了转座子而失去降解呋喃丹功能的。

2.3 突变子中转座子侧翼序列的克隆和功能验证

用*Nsp*V酶切突变子CDS-M1总DNA, 回收4~15 kb片段, 把回收片段经72 °C补平后, 和pMD18-T酶连, 转化至*E. coli* DH5 α 中, 在双抗(卡那霉素和氨苄青霉素)平板上挑取阳性克隆, 由于含有转座子的片段很大, 在双抗平板上只挑到了一个阳性克隆, 命名为CDSP1。提取该阳性克隆的质粒(图3), 可以看出该质粒非常大, 应该大于20 kb。为了验证阳性克隆的真假, 所以以转座子的两侧序列作引物(pL和pR), 用阳性克隆的质粒作模板, 进行PCR, 结果见图4, 以CDSP1的质粒作模板和以pSC123为模板都扩出了特异性好、大小相同的片段, 并且和理论值3 365 bp相符合, 表明该阳性克隆是正确的, 确实含有转座子序列。用转座子上的序列作测序引物, 在pCDSP1中转座子两测总共测定了4 551个碱基(该基因序列

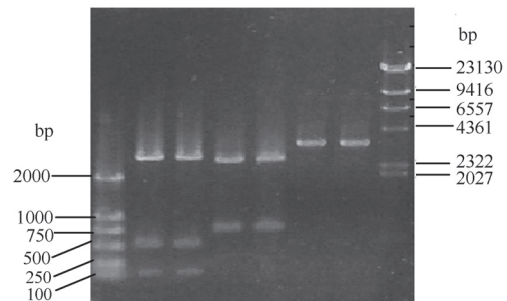


图2 PCR产物酶切图谱
Fig. 2 Restriction analysis of PCR products
M1. DL2000 marker; M2. λ DNA/*Hind*III marker; P1. PCR product of pSC123; P2. PCR product of CDS-M1; S1. PCR product of pSC123/*Sma*I; S2. PCR product of CDS-M1/*Sma*I; H1. PCR product of pSC123/*Hind*III; H2. PCR product of CDS-M1/*Hind*III

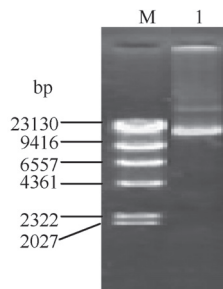


图3 CDSP1的质粒
Fig. 3 Plasmid of CDSP1
M. λ DNA/*Hind*III marker; 1. pCDSP1

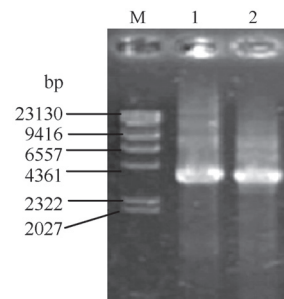


图4 pCDSP1的PCR验证
Fig. 4 Verification of pCDSP1 by PCR
M. λ DNA/*Hind*III marker; 1. PCR product of pSC123; 2. PCR product of pCDSP1

的登录号是DQ423484)。

2.4 突变子中转座子侧翼序列的功能验证

为了确定被测定的4 551个基因序列是否与呋喃丹水解酶基因相关,根据测定序列结果的两侧设计引物,以CDS-1的总DNA作模板进行PCR扩增,扩增出了和已知测序结果相同大小的片段(见图5第1泳道)。将该片段和pMD18-T酶连,转化至*E. coli* DH5 α 中,在含有氨苄青霉素的LB平板上挑选白色菌落,提取质粒。由于PCR产物和T载体连接没有方向性,所以根据已知序列的测序结果,选择*Pst*I酶切质粒,根据测序结果分析该PCR产物中*Pst*I酶切位点在3 261位/4 551 bp。该PCR产物和pMD18-T连接后,再用*Pst*I酶切,酶切结果应该有二种可能:第一种是被切成3 976 bp和3 261 bp大小的2个片段,另一种是被切成5 947 bp和1 290 bp大小的2个片段。实际的酶切结果表明,10个转化子的质粒都被切成了与理论大小一致的二种类型。把这两种不同类型的转化子分别命名为CDT1和CDT2,对应的质粒分别被命名为pCDZ1和pCDZ2。用*Hind*III和*Kpn*I双酶切pCDT1和pCDT2(PCR产物上没有这两个酶的酶切位点),把经过酶切的PCR片段再分别连接到同样用*Hind*III和*Kpn*I双酶切的广宿主载体pPZP201上,重新构建成重组质粒pCDZ1和pCDZ2(图5),从图5可以看出,经过酶切的PCR片段已经成功地连接到了广宿主载体pPZP201上。

以*E. coli* pCDZ1和*E. coli* pCDZ2分别作供体菌,*E. coli* pRK2013作辅助菌,CDS-M1作受体菌进行三亲接合,在含50 mg L⁻¹壮观霉素、50 mg L⁻¹卡那霉素和40 mg L⁻¹链霉素的LB

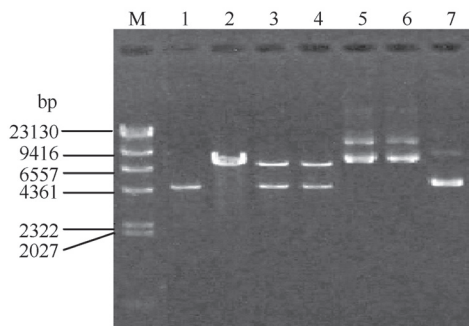


图5 重组质粒pCDZ1和pCDZ2的酶切分析

Fig. 5 Restriction analysis of pCDZ1 and pCDZ2

M. λ DNA/*Hind*III marker; 1. PCR product; 2. pPZP201/*Hind*III & *Kpn*I; 3. pCDZ1/*Hind*III & *Kpn*I; 4. pCDZ2/*Hind*III & *Kpn*I; 5. pCDZ1; 6. pCDZ2; 7. pPZP201

平板上挑选接合子,提取结合子的质粒(图6),从图6可以看出,突变子CDS-M1经过三亲接合后,在8 kp左右明显多了一条超螺旋条带,并且和供体菌*E. coli* pCDZ1和*E. coli* pCDZ2中的质粒大小是一致的,表明经过三亲接合,重组质粒pCDZ1和pCDZ2已经成功地进入了突变子CDS-M1中,把接合有pCDZ1和pCDZ2的CDS-M1分别命名为CDS-MR1和CDS-MR2。在含有壮观霉素、链霉素和卡那霉素的LB培养基中,30 $^{\circ}$ C分别培养CDS-MR1和CDS-MR2,把培养后的菌液按5%的接种量分别接入含有50 mg L⁻¹呋喃丹的MM中,30 $^{\circ}$ C、180 r min⁻¹培养1 wk,用液相色谱测定呋喃丹的降解情况(图7),结果显示CDS-MR1已经恢复了降解呋喃丹至呋喃酚的能力,但是降解速率要远小于CDS-1,可能是因为克隆的片段中缺少该基因的调控区,也可能因为水解产物呋喃酚的生成对该水解反应形成反馈抑制而影响了降解的顺利进行。而CDS-MR2没有降解呋喃丹的功能,说明pCDZ1中含有的基因序列是呋喃丹水解酶相关基因片段。

3 讨论

关于呋喃丹降解菌的分离和降解特性在国外已经进行了不少的研究,如*Pseudomonas* sp. 50432^[14]、*Sphingomonas* sp. CF06^[7]等,但是到目前为止,对于呋喃丹水解酶基因只有在*Achromobacter* sp. WM111中被成功克隆到,但该菌只能把呋喃丹降解为呋喃酚,而且在其它的降解菌中都没有检测到相同呋喃丹水解酶基因的存在,这一方面说明了在其它降解菌中可能存在着不同的呋喃丹水解酶基因,另一方面也说明了克隆呋喃丹水解酶具有很大的难度。本实验室分离得到

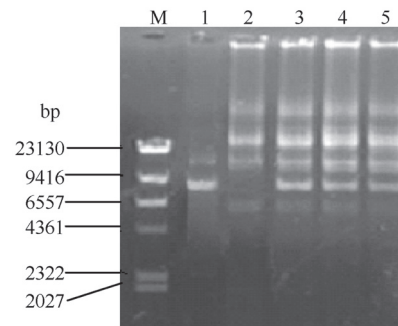


图6 回复突变子的质粒图谱

Fig. 6 Plasmids profiles of CDS-MR

M. λ DNA / *Hind*III marker; 1. pCDZ1; 2. Plasmids of CDS-1; 3~4. Plasmids of CDS-MR1; 5. Plasmids of CDS-MR2

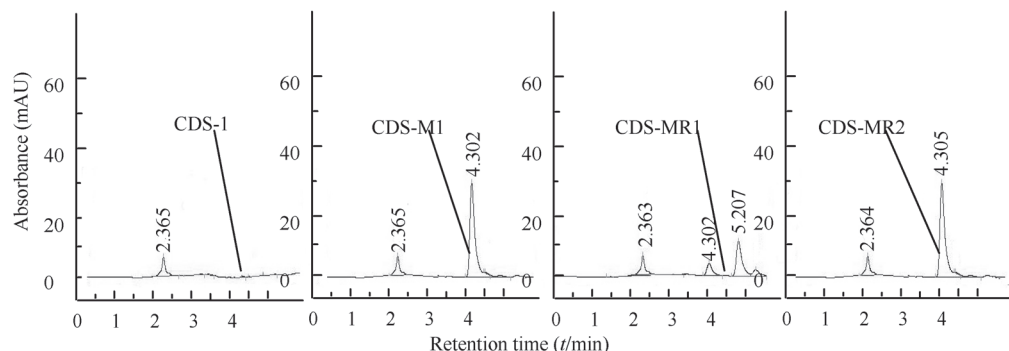


图7 液相色谱法检测呋喃丹的降解

Fig. 7 Degradation of carbofuran by liquid chromatogram

的呋喃丹降解菌 *S. agrestis* CDS-1 不但能降解呋喃丹, 而且能继续降解呋喃酚, 但是该菌不能利用在克隆 *Achromobacter* sp. WM111 菌中的呋喃丹水解酶基因时所用到的呋喃丹的结构类似物——邻硝基苯酚二甲基氨基甲酸酯 (o-nitrophenyl dimethylcarbamate) 作为底物^[5], 而且也没有找到其它区分呋喃丹和呋喃酚的简单可行的方法, 这给克隆呋喃丹水解酶基因带来了困难. 同时在实验过程中, 利用 *Achromobacter* sp. WM111 中克隆到的呋喃丹水解酶基因序列, 设计 PCR 引物, 用 *S. agrestis* CDS-1 的基因组 DNA 为模板, 都没有扩增到相关的 PCR 产物, 表明在 CDS-1 中可能存在着新的呋喃丹水解酶基因. 由于没有简单可行的方法从 *S. agrestis* CDS-1 中克隆到呋喃丹水解酶基因, 因此本实验中采用转座子挽救法, 通过把自杀性质粒 pSC123 中的 Tn5 转座子插入到呋喃丹高效降解菌 CDS-1 中, 通过对插入子在降解呋喃丹过程中的颜色变化和降解功能变化获得插入突变子. 然后构建突变子的基因组 DNA 文库, 筛选含有转座子序列的克隆, 对阳性克隆的转座子侧翼进行测序, 根据测序结果设计引物, 扩增出的 PCR 产物和广宿主载体 pPZP201 连接, 构建了重组质粒 pCDZ1 和 pCDZ2, 通过三亲接合的方法再进行突变子的功能互补实验, 功能互补实验显示突变子 CDS-M1 中转入 pCDZ1 后, 降解功能得到了回复, 只是降解效率要低于原始菌 CDS-1, 这可能是因为克隆的片段中缺少该基因的调控区, 也可能是因为水解产物呋喃酚的生成对该水解反应形成反馈抑制造成降解效率比较低, 但具体的原因还有待下一步深入的研究.

目前对细菌中有关功能新基因的克隆大多采用的是图位克隆的方法, 也就是通过构建细菌的基因组文库, 如 YAC 文库、BAC 文库、cosmid 文库等, 对文库中的每个克隆进行表达功能测定, 从而获得带有功能基因的阳性克隆. 如果没有简单可行的方法来鉴别功能表达情况, 这种方法的工作量非常巨大. 在这种情况下, 可以采用转座子挽救法, 通过把转座子插入到细菌中, 根据菌体的表性和功能变化等挑取插入突变子, 然后再构建插入突变子的基因组文库, 筛选含有转座子序列的克隆, 从而获得转座子侧翼序列及被转座子破坏的基因序列, 通过验证获得所要的新功能序列.

References

- Scholz NK, Truelove NK, Labenia JS, Baldwin DH, Collier TK. Dose-additive inhibition of chinook salmon acetylcholinesterase activity by mixtures of organophosphate and carbamate insecticides. *Environ Toxicol Chem*, 2004, **25** (5): 283~290
- Gianessi LP, Anderson JE. Pesticide use in the US crop production: National summary report. Washington DC: The National Center for Food and Agricultural Policy, 1995
- Begum G. Carbofuran insecticide induced biochemical alterations in liver and muscle tissues of the fish *Clarias batrachus* and recovery response. *Aquat Toxicol*, 2004, **66** (1): 83~92
- Das AC, Chakravarty A, Sukul P, Mukherjee D. Influence and persistence of phorate and carbofuran insecticides on microorganisms in rice field. *Chemosphere*, 2003, **53** (8): 1033~1037
- Paul HT, Jeffrey SK. Cloning of a carbofuran hydrolase gene from *Achromobacter* sp. strain WM111 and its expression in gram-negative bacteria. *J Bacteriol*, 1989, **171** (7): 4038~4044
- Topp E, Hanson RS, Ringelberg DB, White DC, Wheatcroft R. Isolation and characterization of an N-methylcarbamate insecticide-degrading methylotrophic bacterium. *Appl Environ Microbiol*, 1993, **59** (10): 3339~3349
- Feng XH, Ou LT, Ogram A. Cloning and sequence analysis of a novel insertion element from plasmids harbored by the carbofuran-degrading bacterium, *Sphingomonas* sp. CFO6. *Plasmid*, 1997, **37** (3): 169~179
- Gou M (苟敏), Qu YY (曲媛媛), Yang H (杨桦), Zhou JT (周集体), Li A (李昂), Guan XY (关晓燕), Ai FF (艾芳芳). *Sphingomonas* sp.: A novel microbial resource for biodegradation of aromatic compounds. *Chin J Appl Environ Biol* (应用与环境生物学报), 2008, **14** (2): 276~282
- Feng X (冯妍), Liu XH (刘宪华), Song WH (宋文华), Dai SG (戴树桂). Characterization of superior strain AEBL3 of degrading carbamate pesticides. *Urban Environ & Urban Ecol* (城市环境与城市生态), 2003, **26** (6): 144~146
- Wu J (武俊), Xu JH (徐剑宏), Hong Q (洪青), Liu Z (刘智), Zhang XH (张小华), Li SP (李顺鹏). Isolation of a carbofuran degrading bacterium (CDS-1) and its characterization. *Acta Sci Circumst* (环境科学学报), 2004, **24** (2): 338~342
- Banh Q, Arenskotter M, Steinbuchel A. Establishment of Tn5096-based transposon mutagenesis in *Gordonia polyisoprenivorans*. *Appl Environ Microbiol*, 2005, **71** (9): 5077~5084
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor, 1989
- Feng XH, Ou LT, Ogram A. Plasmid-mediated mineralization of carbofuran by *Sphingomonas* sp. strain CF06. *Appl Environ Microbiol*, 1997, **63** (4): 1332~1337
- Chaudhry GR, Mateen A, Kaskar B. Purification and biochemical characterization of the carbamate hydrolase from *Pseudomonas* sp. 50432. *Biotechnol Appl Biochem*, 2002, **36** (1): 63~70