

植酸酶基因修饰土著皮氏罗尔斯顿氏菌(*Ralstonia pickettii*) G3 对黑土有机磷的高效活化

韩伟, 解雨竹, 陈琦, 刘佳鑫, 张博, 张颖*

东北农业大学 资源与环境学院, 黑龙江 哈尔滨

韩伟, 解雨竹, 陈琦, 刘佳鑫, 张博, 张颖. 植酸酶基因修饰土著皮氏罗尔斯顿氏菌(*Ralstonia pickettii*) G3 对黑土有机磷的高效活化[J]. 微生物学报, 2025, 65(8): 3287-3300.

HAN Wei, XIE Yuzhu, CHEN Qi, LIU Jiabin, ZHANG Bo, ZHANG Ying. Efficient activation of organophosphorus in black soil by the phytase gene-modified indigenous bacterium *Ralstonia pickettii* G3[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2025, 65(8): 3287-3300.

摘要: 磷是植物生长发育必需的营养元素之一, 然而植物从土壤中可获取的磷素十分有限, 土壤中存在大量难利用的有机难降解磷, 其中植酸(肌醇六磷酸)占据了较大部分。**【目的】** 利用植酸酶对植酸的高效水解能力, 对黑土土著细菌进行植酸酶基因修饰, 提高土壤有效磷含量。**【方法】** 利用锚定蛋白 pGSA 对细菌植酸酶 AppA 进行表面展示, 以提高蛋白酶的稳定性和活性以及底物的接触效率。基于 CRISPR 靶向基因插入修饰技术, 将表面展示的植酸酶融合蛋白基因靶向转座至一株从黑土分离的皮氏罗尔斯顿氏菌(*Ralstonia pickettii*) G3 的基因组 16S rRNA 基因位点, 以摆脱传统蛋白表达的载体依赖。**【结果】** 细菌 16S rRNA 基因可以作为基因修饰的通用靶点, 并且不会对该菌的增殖产生明显影响。植酸酶基因修饰菌对植酸的水解能力提高了 8 倍以上, 并且可以在较宽的 pH 范围内发挥作用。将该基因修饰菌施用于黑土后, 土壤植酸酶活性明显提升, 且速效磷含量提高了近 30%。**【结论】** 植酸酶基因修饰的土著细菌能够促进土壤植酸水解, 增加土壤有效磷含量, 提高土壤磷素有效性。

关键词: CRISPR; 植酸酶; 有机磷; 基因修饰; 表面展示

资助项目: 国家重点研发计划(2023YFD1501005); 国家自然科学基金(32101362); 黑龙江省自然科学基金(LH2022D005, LH2022D006)

This work was supported by the National Key R&D Program of China (2023YFD1501005), the National Natural Science Foundation of China (32101362), and the Natural Science Foundation of Heilongjiang Province (LH2022D005, LH2022D006).

*Corresponding author. Tel: +86-451-55190993, E-mail: zhangying_neau@163.com

Received: 2025-01-07; Accepted: 2025-04-16; Published online: 2025-05-26

Efficient activation of organophosphorus in black soil by the phytase gene-modified indigenous bacterium *Ralstonia pickettii* G3

HAN Wei, XIE Yuzhu, CHEN Qi, LIU Jiabin, ZHANG Bo, ZHANG Ying*

School of Resources and Environment, Northeast Agricultural University, Harbin, Heilongjiang, China

Abstract: Phosphorus is an essential nutrient element for plant growth and development. However, the available phosphorus in soil is extremely limited due to the presence of large amounts of organic phosphorus that is difficult to be degraded, with phytate (inositol hexaphosphate) accounting for a significant proportion. Phytases can efficiently hydrolyze phytate and release available phosphorus. **[Objective]** By taking advantage of the efficient hydrolysis ability of phytase, the phytase gene was gene modified in the indigenous bacteria of black soil to increase the available phosphorus content in the soil. **[Methods]** We employed the anchored protein pGSA for surface display of the bacterial phytase AppA, thereby enhancing the stability and enzymatic activity of the protein as well as improving the substrate contact efficiency. Furthermore, leveraging the CRISPR-targeted gene editing technology, we precisely integrated the surface-displayed phytase fusion protein into the 16S rRNA gene of *Ralstonia pickettii* G3 genome, isolated from black soil to overcome the dependence of protein expression on vectors. **[Results]** The 16S rRNA gene site could be used as a target for gene modification without significant effect on the proliferation of the bacteria. The phytase-modified engineered bacteria showed a more than 8-fold increase in the hydrolytic ability of phytate and functioned in a wide pH range. After this indigenous engineered bacterial strain was applied to black soil, the soil phytase activity significantly increased, and the available phosphorus content rose by nearly 30%. **[Conclusion]** Modifying phytase by gene editing can promote the hydrolysis of phytate, increase the content of available phosphorus, and improve the phosphorus availability in the soil.

Keywords: CRISPR; phytase; organophosphorus; gene modification; surface display

土壤中生物可直接利用的磷通常较少,大部分磷以有机磷的形式存在(20%–80%)^[1]。低分子量磷酸单酯(如植酸、磷酸糖和核糖核苷酸)以及磷酸酯聚合物(如核酸和磷脂),是土壤有机磷的主要形式,其主要源于植物和微生物残体^[1]。黑土中,有机磷的占比通常在20%–60%之间^[2-3],高有机质土壤中的有机磷含量甚至可占土壤总磷的50%以上,而植酸是有机磷的重要组成部分^[4]。植酸(肌醇六磷酸)是一种广泛存在于植物中的有机磷化合物,农田土壤中的植

酸主要来源于植物残体分解、根系分泌物、有机肥以及微生物活动,其中植物残体和有机肥输入占比较高^[4]。在耕地土壤中,植酸占到土壤总磷的20%以上,每年在土壤中积累的植酸可达5 100万t,相当于约65%的磷肥施用量^[4]。因此,如何释放土壤中植酸的磷对于提高土壤有效磷具有重要意义。

可以水解植酸的酶有磷酸单酯酶、磷酸二酯酶和植酸酶,其中植酸酶可特异性高效催化植酸水解为肌醇和磷^[5],进而提高土壤中溶解性

磷含量。根据来源不同,植酸酶主要分为细菌植酸酶和植物植酸酶 2 类。目前研究报道的产植酸酶细菌超过 100 种,主要分布于大肠杆菌、芽孢杆菌属、假单胞菌属、乳酸菌属等;而植物植酸酶主要存在于种子(如小麦、玉米、大豆)中,用于种子萌发时释放储存的磷^[6]。植物植酸酶产量低、提取成本高,工业应用较少,主要依赖细菌来源的植酸酶。值得一提的是,细菌植酸酶比植物植酸酶具有更强的水解活力^[7],且无须复杂的蛋白修饰,因此更加适用于土壤有机磷分解研究。研究表明,植酸酶添加可提高土壤有效磷含量 1.18 倍,且明显促进水稻生长^[8]。虽然目前已挖掘了许多解磷菌,但其解磷机制主要依赖分泌有机酸释放矿物中的无机磷,或通过磷酸酶水解结构简单的有机磷,通常对植酸的水解能力有限^[9]。利用微生物植酸酶构建基因工程植物促生菌,可以有效弥补减少磷肥使用后的缺口,提高土壤有效磷含量。大肠杆菌植酸酶 AppA 具有高效催化活性与广谱适应性,在 pH 2.0–7.5 范围内均可高效水解植酸,同时耐受 60–70 °C 高温,此外 AppA 还展现出强抗逆性、易于异源表达,且在复杂基质中保持高底物亲和力^[10],因此细菌植酸酶 AppA 是植酸活化研究的重要蛋白酶之一。

目前,植物促生菌在农业系统中发挥了重要作用,可在一定程度上替代部分传统农用化学品,提高粮食产量^[11]。然而,虽然从土壤中分离并驯化了一些植物促生菌,但这些促生菌的遗传信息不明确,且通常进化出与农业种植不协调的遗传调控模式,同时复杂的土壤环境也会干扰其促生作用,这极大限制了植物促生菌的实际应用^[12]。相比之下,氮固定、磷释放、纤维素分解、植物免疫诱导等相关的微生物促生机制和基因已被广泛研究和报道,为开发农业促产的基因工程菌提供了巨大潜力^[13–14]。随着全球对转基因技术的逐步放开和接受,为农业系统设计相匹配的土壤元素活化和植物促生

工程菌将是未来趋势之一。

向导 RNA 辅助的靶向转座元件插入系统 INTEGRATE (insertion of transposable elements by guide RNA-assisted targeting)是 2019 年报道的一种优秀的细菌基因编辑 CRISPR 工具^[15],其可以实现长达 10 kb 碱基的准确、高效、无标记的基因组整合^[16]。这种可编程整合酶系统克服了现有整合子系统的一些重要弊端,例如效率低、依赖重组、需要多个载体辅助、靶点位置固定等。然而,该系统在功能基因移植以及通用编辑靶点挖掘等方面的研究较少。此外,另一种微生物技术是针对细菌膜蛋白的改造。细菌表面展示技术是一种对细菌细胞外膜蛋白的改造技术,通过将靶蛋白的 N 端或 C 端与锚定蛋白融合,进而将感兴趣的蛋白质或酶直接固定在微生物细胞表面上,使目的蛋白定位于宿主细胞表面发挥功能^[17],这一方面可以规避酶的裂解释放过程,减少传质限制,同时可保证酶的活力以及稳定性。相关研究表明,表面展示后的蛋白酶可以提高其在土壤环境中的稳定性,并延长其作用时间^[18],进而充分发挥酶在环境中的作用。

基因修饰是指通过生物技术手段人为改变生物体的基因组,包括插入、删除或修改特定基因,以改变其性状或功能^[19]。本研究针对黑土中植酸的水解,提出了基于 INTEGRATE 靶向转座技术,利用细菌植酸酶基因 *appA* 对土著微生物进行基因插入修饰,并通过表面展示技术进一步发挥植酸酶的作用,旨在实现水解黑土植酸并提高有效磷含量。其中,该研究的关键技术包括 INTEGRATE 转座插入、表面展示的融合蛋白构建、目的基因的功能表达等。本研究对构建好的植酸酶基因修饰菌的酶活进行检测,并将其施用于黑土土壤,以期为黑土保护提供新的微生物策略,也为基因工程菌的构建提供新的思路。

1 材料与amp;方法

1.1 菌株和基因

植酸酶 *appA* 基因(Uniprot ID: P07102)克隆自大肠杆菌 K12, 锚定蛋白 pGSA 基因(ACT52837.1)采用全基因合成(合成基因的载体骨架为 pET-30a), 锚定蛋白和植酸酶的融合可参考文献[20], 融合后的载体为 pET-30a-pGSA-*appA*。其中, 锚定蛋白 pGSA 和乘客蛋白 AppA 之间需用柔性肽(GGGSGGGGS)连接, 以消除 pGSA 和 AppA 之间的干扰, 融合后的表面展示蛋白命名为 pGSA-*appA*。大肠杆菌(*Escherichia coli*) DH5 α 和一株从黑土中分离的菌株皮氏罗尔斯顿氏菌(*Ralstonia pickettii*) G3 分别作为基因的克隆和表达宿主, 质粒转化通过二氨基庚二酸(diaminopimelic acid, DAP)营养缺陷型的大肠杆菌(*Escherichia coli*) WM3064 作为供体菌进行偶联转移实现。INTEGRATE 系统所用载体 pSPIN 骨架的构建步骤可参考文献[15]。其中, CRISPR 间隔区的 Spacer 序列(32 nt)用于基因的靶向定位, R end 和 L end 之间的区域为 Cargo 区(其中包含目的基因)。具体基因和引物序列见表 1。

1.2 主要试剂和仪器

卡那霉素, 生工生物工程(上海)股份有限公司; 二氨基庚二酸, Sigma-Aldrich 公司; 植酸钠、细菌基因组提取试剂盒、土壤速效磷含量检测试剂盒, 北京索莱宝科技有限公司; 超级感受态细菌制备试剂盒、*Taq* 酶、*Pfu* 酶, 上海碧云天生物技术股份有限公司。

PCR 仪, Bio-Rad 公司; 其他所需材料可参考文献[15]。

1.3 载体构建

本研究使用的最终表达载体可参考图 1 中的 pGSA-*appA*-pSPIN, 该载体主要由 QCascade (CRISPR 区、Cas 基因表达区)、TnsABC (转座酶表达区)和 Donor (Cargo 区) 3 部分组成。载体构建的步骤包括 Spacer 区改造、启动子改造和

Cargo 区改造, 其中植酸酶融合蛋白的启动子为 J23119 组成型启动子。利用 SnapGene 软件构建载体图谱, 引物设计和无缝克隆模拟也通过该软件完成。载体的构建步骤主要包括载体线性化和无缝连接, 详细步骤参考文献[15,21]。

1.4 载体的接合转移

使用 *E. coli* DH5 α 扩增目的载体 pSPIN-pGSA-*appA*, 并通过超级感受态细菌制备试剂盒制备 *E. coli* WM3064 供体感受态, 随后将 pSPIN-pGSA-*appA* 转化至 *E. coli* WM3064。将携带载体的供体菌株 WM3064 与受体菌 *R. pickettii* G3 按照 2:1 的比例置于含有 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 卡那霉素和 50 $\mu\text{mol}/\text{L}$ DAP 的 LB 培养基中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养过夜(~10 h), 具体过程可参考文献[16]。利用卡那霉素抗性筛选接合子后, 使用细菌基因组提取试剂盒提取接合子基因组, 并通过引物 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') 和 CM2R (5'-CACCCATAAATTGATAATTATCACACCC-3') 对接合子基因进行 PCR, PCR 反应可参考文献[16] 完成。

1.5 植酸酶活性检测

植酸酶活性的测定采用改良的磷酸根显色法^[22], 该方法主要通过磷酸根与钼酸盐反应生成磷钼酸复合物, 随后被还原生成蓝色钼蓝, 最后根据样品的吸光度值在标准曲线中换算磷酸根浓度。

100 mmol/L 的 NaAc-HAc 缓冲液: 取 4.101 5 g 无水乙酸钠, 溶于 500 mL 蒸馏水中, 用乙酸调节至 pH 6.0。植酸钠底物溶液: 配制 6.25 mmol/L 的植酸钠溶液, 取 1.443 5 g 肌醇六磷酸钠, 溶于 NaAc-HAc 缓冲液中(现配现用)。终止液: 5% 三氯乙酸溶液(5% TCA)。显色液: 将 4 份试剂 A 与 1 份试剂 B 混合, 现配现用。试剂 A: 取 7.5 g 钼酸铵, 溶于 400 mL 蒸馏水中, 加入 22 mL 浓硫酸, 定容至 500 mL, 配成 1.5% 的钼酸铵溶液, 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。试剂 B: 配制 2.7% 硫酸亚铁溶液, 取 6.75 g 十二水硫酸亚铁,

表1 本研究使用的基因和引物序列

Table 1 Gene and primer sequences used in this study

Gene name	Primer sequences (5'→3')
Spacer	ACTAACGAAGCAGAGATGCATTAGGTGCTCGA
PAM	CC
pGSA	ATGAAAAAAGAAGCTGAGCTTTCATGAAAAGCTGCTAAAAGCTGACAAAACAGCAAAAAAGAAAACCAA TAAGCACGTATTTATTGCCATTCGATCGTTTTTGTCTTATGTTTCGCTTTCATGTGGGCGGGAAAAGCGGA AACGCCGAAGGTCAAAACGTATTCTGACGACGTAATCTCAGCCTCATTGTAGGCGATATTATGATGGGAC GCTATGTTGAAAAAGTAACGGGGCAAAAAGGGGCAGACAGTATTTTCAATATGTTGAACCGATCTTTAG AGCCTCGGATTATGTAGCAGGAACTTTGAAAACCCGGTAACCTATCAAAAGAATTATAACAAGCAGAT AAAGAGATTATCTGCAGACGAATAAGGAATCAGTGAAAAGCTTGAAGGATATGAATTTACGGTTCTCA ACAGCGCAACAACCACGCAATGGATTACGGCGTTACGGGCATGAAAGATACGCTTGGAGAATTTGCGA AGCAAAACCTTGATATCGTTGGAGCGGGATACAGCTTAAGTGATGCGAAAAAGAAAATTTGATACCAGAA AGTCAACGGGGTAACGATTGCGACGCTTGGCTTTACCGATGTGTCCGGGAAAAGGTTTCGCGGCTAAAAA GAATACGCCGGGCGTGCTGCCCGCAGATCCTGAAATCTTATCCCTATGATTTTCAGAAGCGAAAAACAT GCTGACATTGTTGTTGTGCAGTCACACTGGGGCCAAGAGTATGACAATGATCCAAACGACCGCCAGCGCC AGCTTGCAAGAGCCATGTCTGATGCGGGAGCTGACATCATCGTCGGCCATCATCCGCACGTCTTAGAAC GATTGAAGTATATAACGGAACCGTCATTTTCTACAGCCTCGGCAACTTTGTCTTTGACCAAGGCTGGACGA GAACAAGAGACAGTGCAGTGGTTCAGTATCACCTGAAGAAAAATGGAACAGGCCGCTTTGAAGTGACAC CGATCGATATCCATGAAGCGACACCTGCACCTGTGAAAAAAGACAGCCTTAAACAGAAAACCATTATTG CGAACTGACGAAAGACTCTAATTTGCTTGGAAAAGTAGAAGACGGAAAACCTGACGTTTGATATAGATCAT AGTGACAAACTAAAATCTAAA
appA	ATGAAGGCCATTCTGATCCCGTTTCTGAGCCTGCTGATTCCGCTGACCCCGCAGAGCGCATTGCTCAGTC AGAACCGBAACTGAAACTGGAAAGCGTTGTTATTGTGAGCCGCCATGGCGTTCGTGCACCTACCAAAGC TACCCAGCTGATGCAGGATGTGACCCCTGATGCATGGCCGACATGGCCTGTAAACTGGGTTGGCTGACC CCGCGTGGTGGTGGAGCTGATCGCATATCTGGGTCAATTATCAGCGTCAGCGCCTGGTTGCCGATGGTTACT GGCAAAAAAAGGCTGCCCGCAGAGCGGTCAGGTGGCAATCATTGCTGATGTGGATGAACGCACCCGTAA AACCGGTGAAGCCTTTGCCCGAGGTCTGGCACCTGATTGTGCAATTACCGTTCATACCCAGGCAGATACC AGCAGCCCGGATCCTTTATTTAATCCGCTGAAAACCGCGTTTGGCAGCTGGATAATGCAAATGTGACCGA TGCAATTCTGAGTCGCGCAGGTGGCAGTATTGCAGATTTTACCGTTCATCGCCAGACCGCATTTCGCGAAC TGGAACGTGTTCTGAATTTTCCGCGAGAGTAATCTGTGTCTGAAGCGCGAAAAACAGGATGAAAGCTGCA GTCTGACCCAGGCAGTGCCTAGTGAAGTGAAGTGAAGCGCCGATAATGTGAGCCTGACCGGTGCTGTTAG CCTGGCAAGTATGCTGACCGAAATTTTCTGCTGCAGCAGGCACAGGGTATGCCGGAGCCTGGTTGGGGT CGTATTACCGATAGTCATCAGTGGAAATACCCTGCTGAGCCTGCATAATGCCAGTTTTATCTGCTGCAGCGT ACCCCGGAAGTTGCAAGAAGTCGTGCAACCCCGCTGCTGGATCTGATTAACCCGCACTGACCCCGCATC CGCCGCAGAAGCAGGCATACGGTGTACTGACCGACCAGCGTTCTGTTTATTGCAGGCCATGATACCAAT CTGGCAATCTGGGTGGCGCACTGGAATTAATTGGACCCTGCCGGGCCAGCCGGATAATACCCCTCCTG GTGGTGAAGTGGTGTGTTGAACGTTGGCGTGCCTGAGTGATAATAGCCAGTGGATTGAGGTTAGCCTGGT TTTTCAGACCCTGCAGCAGATGCGTGATAAAACCCCGCTGAGTCTGAATACCCCGCCGGGTGAGGTTAAA CTGACCTTAGCCGGTGCAGAAGACGTAATGCACAGGGTATGTGTAGCCTGGCCGGTTTTACCCAGATTG TGAATGAAGCCCGTATTCCGGCATGTAGCCTG
J23119	TTGACAGCTAGCTCAGTCCTAGGTATAATGCTAGC
27F/CM2R	GGAAGTGAAGACACGGTCCAG/CACCCATAAATTGATAATTATCACACCC

溶于 250 mL 蒸馏水中，4 °C 保存。KH₂PO₄ 母液(50 mmol/L)：取 0.680 5 g KH₂PO₄ 固体，溶于 100 mL 0.1 mol/L 的 NaAc-HAc 缓冲液中。

取 0.1 mL 菌液，置于 37 °C 水浴预热

5 min，加入 0.4 mL 底物溶液并充分混合，置于 37 °C 水浴反应 30 min 后，加入 0.5 mL 终止液及 0.5 mL 显色液，显色 10 min，检测 OD₇₀₀ 数值。

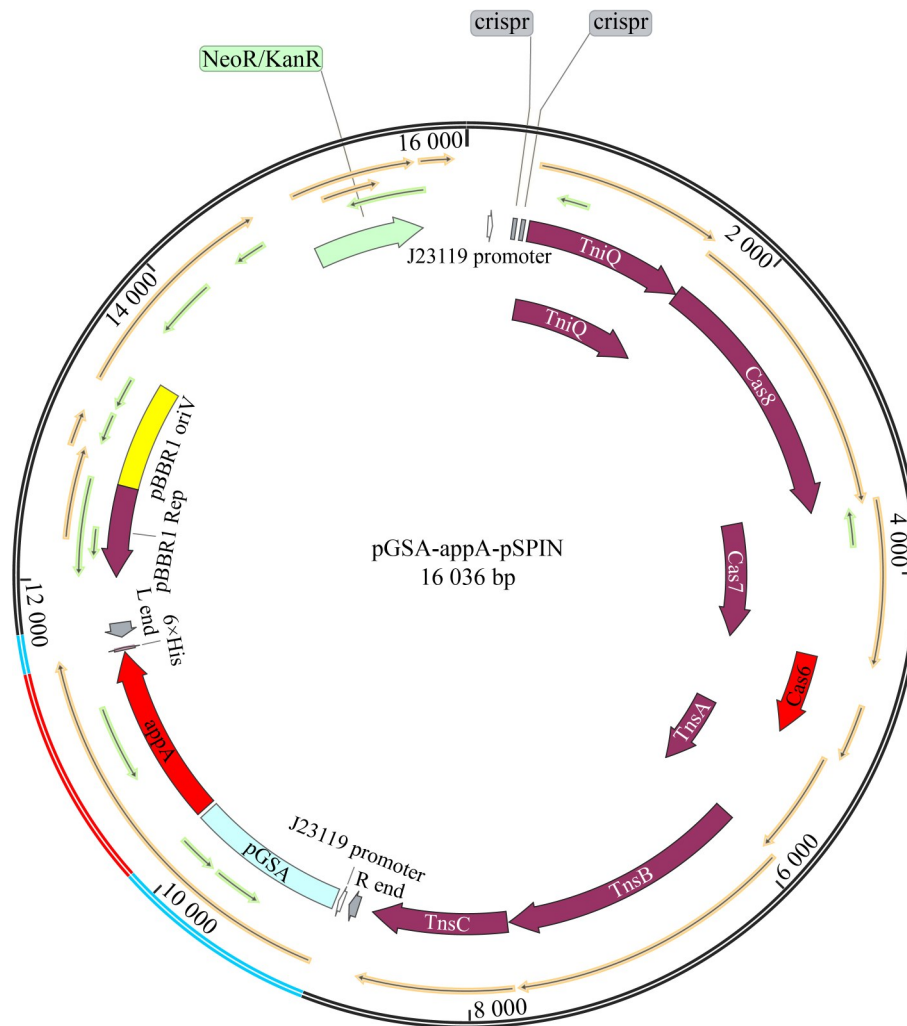


图1 pGSA-appA-pSPIN载体图谱

Figure 1 The map of the pGSA-appA-pSPIN vector.

取 0.0、0.8、1.6、2.4、3.2、4.0 mmol/L 的 KH_2PO_4 标准液各 0.1 mL，置于 37 °C 水浴预热 5 min。反应结束后，取 1 mL 上述样品于狭缝比色皿，用分光光度计测量 OD_{700} ，根据分光光度计数值绘制标准曲线。

1.6 基因修饰菌的酶活性能分析

取对数生长期 (OD_{600} 约为 0.7) 的基因修饰菌液，7 000 r/min 离心 5 min，去上清后收集菌体。菌体用生理盐水吹洗 3 次，将清洗后的菌体重悬于生理盐水中，制成细胞密度为 1.0×10^8 CFU/mL 的细胞悬浮液。

设置不同植酸钠底物浓度，取 0.1 mL 上述菌液于 37 °C 水浴预热 5 min；加入不同浓度的植酸钠底物溶液 0.4 mL，混合均匀后置于 37 °C 水浴反应 30 min；加入终止液，混匀；加入显色剂显色 10 min；取 1 mL 上述样品于狭缝比色皿，用分光光度计测量 OD_{700} ；通过标准曲线获取水解后的磷酸根浓度。

取 0.1 mL 菌液于 37 °C 水浴预热 5 min，加入 0.1 mmol/L 的植酸钠底物溶液 0.4 mL，并使用盐酸和氢氧化钠溶液分别调节 pH 至 3.0、4.0、5.0、6.0、7.0、8.0，37 °C 水浴反应 30 min，后

续检测方法同上。

1.7 基因修饰菌对土壤植酸的活化

将 500 g 过筛黑土土壤与 10 mL 生理盐水清洗后的 *R. pickettii* G3 菌液 (OD_{600} 值为 1.0) 混合均匀后, 放入 5 粒大小均匀的已发芽大豆种子, 每组重复 5 次(以无菌的生理盐水作为对照)。从播种大豆开始, 每 7 天取一次表层土壤, 储存于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱待测。称取 0.1 g 过筛土样, 加入 1 mL NaAc-HAc 缓冲液, 1 500 r/min 振荡 1 h, 10 000 r/min 离心 10 min, 取上清液 0.1 mL 作为待测样品(空白组将菌液换成缓冲液即可), 按照植酸酶活性检测方法进行操作。土壤植酸酶活性(单位 U/g)计算如公式(1)所示。

$$\text{酶活} = \frac{k(A_0 - A_1) \times L \times D}{MTV} \quad (1)$$

式中: k 为标准曲线斜率, A_1 和 A_0 分别为反应 30 min 和对照的 OD_{700} 值, L 为提取植酸酶时加入的缓冲液总体积, D 为提取液稀释倍数, M 为称取的土样质量, T 为反应时间, V 为反应液的体积。

取不同时间段的土壤, 利用试剂盒检测土壤速效磷含量, 检测方法可参考试剂盒说明书。使用 SPSS 30.0.0 进行 ANOVA 分析。

2 结果与讨论

2.1 植酸酶 AppA 靶向基因修饰系统构建

为了实现 pGSA-appA 基因在目标细菌基因组中 16S rRNA 基因位点的靶向修饰, 需要对原始 pSPIN 载体骨架进行逐步改造。原始 pSPIN 的 Spacer 引导序列靶向定位于 lacZ 基因(图 2A)。第一步, 将原始 Spacer 序列改造为针对目标菌株的 16s-spacer (该序列引导整个转座复合体对靶点的识别), 见图 2B。第二步, 以 16s-pSPIN 为基础, 对 Cargo 转座子的启动子进行改造。原始载体的 Cargo 基因缺少启动子, 因此采用组成型启动子 J23119, 以实现目的基因的稳定表达^[23], 改造后得到质粒 J23119-16s-pSPIN(图 2C)。

随后, 在 J23119-16s-pSPIN 质粒基础上对 Cargo 转座子区域进行改造, 将 pGSA-AppA 融合蛋白基因酶切(图 3B)并连接在 J23119 启动子后 10 bp 左右处, 构建最终的植酸酶 AppA 表面展示系统载体, 使其能够在 16S rRNA 基因位点上表达(图 2D)。

锚定蛋白 pGSA 是枯草芽孢杆菌的 γ -谷氨酸合成酶 A (poly- γ -glutamic synthetase A) 膜蛋白, 被广泛应用于蛋白质的表面展示^[24]。该锚定蛋白具有表面展示效率高、使用方便等优点, 且表面展示后的蛋白具有更高的活性和环境耐受性^[18]。AppA 植酸酶最初发现于大肠杆菌, 由其基因组中的 *appA* 基因编码, 属于组氨酸酸性磷酸酶(HAP)家族。植酸酶 AppA 的三维结构包含一个催化域(负责水解植酸)和一个结构辅助域(增强了底物结合能力), 是一种典型的 6-植酸酶(6-phytase), 即优先从植酸的 D-6 位点开始水解磷酸酯键, 依次生成 IP5、IP4 等低磷酸化肌醇衍生物, 最终产物是无机磷酸和肌醇^[10]。

根据从黑土中分离的土著细菌皮氏罗尔斯顿氏菌(*Ralstonia pickettii*) G3 的 16S rRNA 基因序列特征, 设计 pGSA-appA-pSPIN 的 Spacer 序列, 用于 pGSA-appA 的基因修饰, 靶向位点位于 27F 后 962 bp 处。INTEGRATE 系统通过 Spacer 序列的引导, 会将整个 R end-L end 的 Cargo 区域转座至目标位点。为了验证转座插入的成功, 针对插入序列设计了特异性引物(27F/CM2R), 对嵌合 16S rRNA 基因的 27F 到 R end 之间的序列进行 PCR, 其中 CM2R 是 R end 上的特征序列。凝胶电泳结果显示, 由于外源基因已成功插入基因组的目标位置形成融合基因, 因此可以通过特异性引物完成 PCR 过程; 而原始菌株由于缺乏 Cargo 转座区, 因此无 R end 段序列, 进而无 PCR 产物(图 3A)。 *R. pickettii* G3 属于革兰氏阴性好氧菌, 致病性较低^[25], 是环境中常见的一种细菌, 能够适应复杂及恶劣环境, 在许多环境污染修复方面表现出潜力^[26], 并且该菌可以通过共代谢的方式, 与其他微生

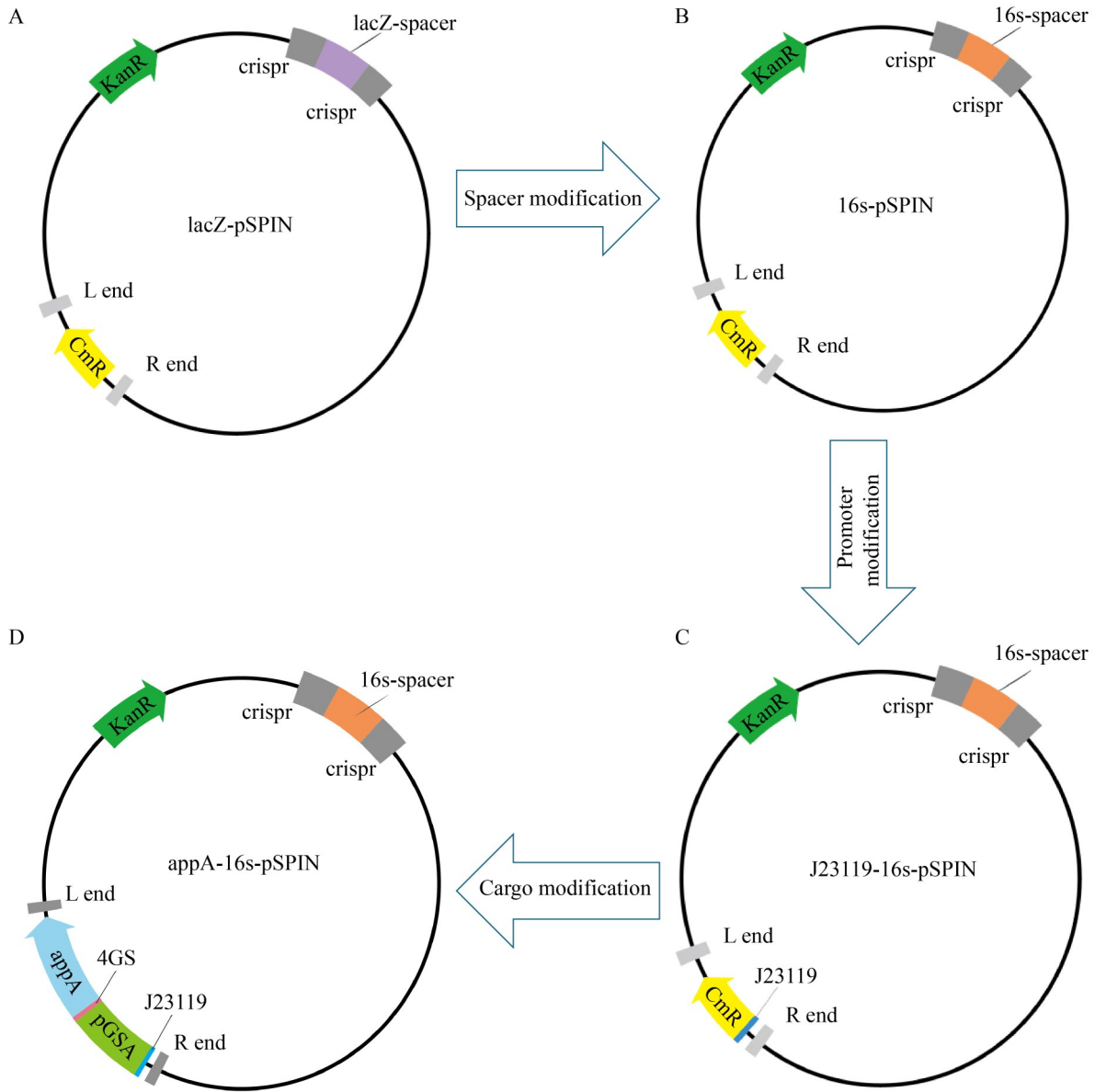


图2 pGSA-appA-pSPIN载体的构建流程

Figure 2 Construction process of pGSA-appA-pSPIN vector.

物互利共生，促进生长并提高环境修复效果^[27]。核糖体 16S rRNA 由细菌基因组上的基因序列转录而成，*rrnDB* 数据库^[28]显示，*Ralstonia* 通常含有 3-4 个 16S rRNA 基因拷贝，因此其冗余的 16S rRNA 基因可以作为基因修饰的位点。

INTEGRATE 系统的 PAM 序列为“CC”，紧随其后的是引导的 Spacer 序列。对 PCR 测序结果显示，pGSA-appA 的 Cargo 区域插入到

Spacer 序列后 49 bp 处(图 4)。通常 Cargo 区域会插入到靶点 Spacer 序列后 50 bp 左右处^[15]，这与本研究的结果一致。Klompé 等^[15]研究结果表明，当转座子序列的两端(L end 和 R end)交换位置后其转座效率更高。因此，本研究采用“R end”在前的载体构建方法(图 1)。

基因修饰是通过在宿主细胞内插入一段目的基因或删除某段特定基因，从而使原有宿主

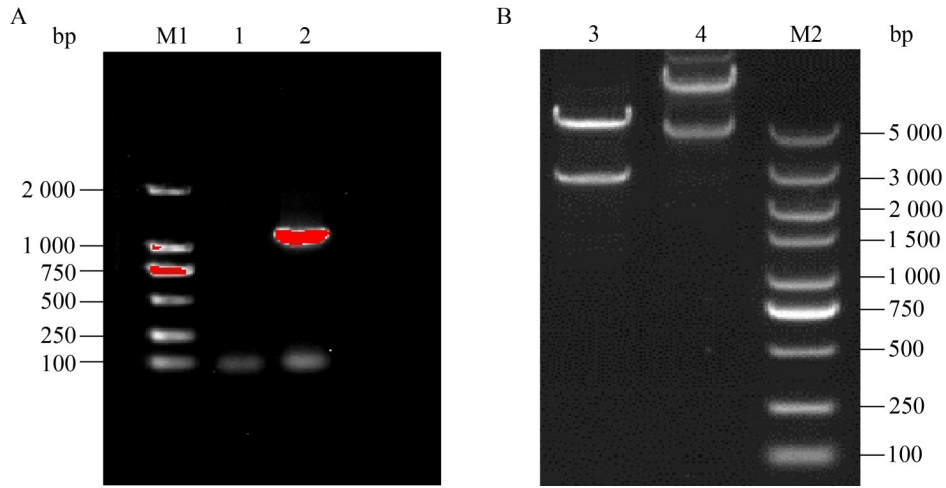


图3 转座插入(A)和pGSA-appA载体构建(B)的PCR凝胶图谱。M1: DL2000 DNA marker; 泳道1: 土著菌; 泳道2: 基因修饰菌; 3: pGSA-appA酶切验证; 4: pET-30a-pGSA的载体克隆验证; M2: DL5000 DNA marker。

Figure 3 PCR gel profile verification of transposable insertion (A) and pGSA-appA vector (B). M1: DL2000 DNA marker; 1: Indigenous bacteria; 2: Genetically modified bacteria; 3: pGSA-appA enzyme digestion verification; 4: Vector cloning verification of pET-30a-pGSA; M2: DL5000 DNA marker.

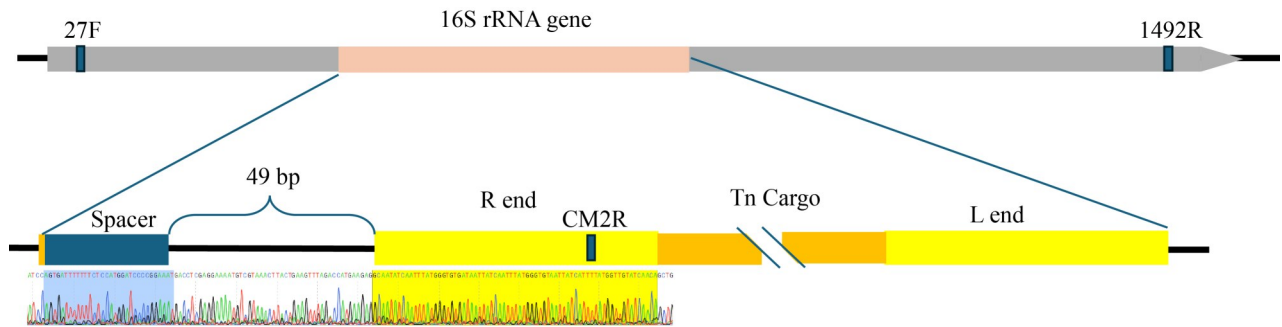


图4 pGSA-appA的插入位点

Figure 4 Insertion site of pGSA-appA.

获得新的功能或改变其基因型。理想的基因修饰技术应不依赖 DNA 断裂及同源重组，同时具备特异性和可编程性。基于 CRISPR 技术的最新进展为微生物染色体的便捷整合提供了新的思路和方法。传统的基因工程菌构建通常使用模式菌株，或者具有特殊整合位点的菌株。最新研究表明，CRISPR-Cas 系统可以与细菌类 Tn7 转座子结合，完成 RNA 引导的转座整合^[29]。随着该技术的不断改进，INTEGRATE 编辑系统得

以开发并初步应用^[15]。该系统主要包括 3 个部分：目标基因、TnsABC 转座酶复合体以及 Cas 蛋白串，最终目标基因在向导 RNA 的引导下，在目标位点下游 50 bp 左右处完成整合。然而，将该技术应用于黑土根际微生物菌群的功能基因修饰方面，目前仍处于空白状态。目前，该系统的插入目标位点主要为 LacZ 以及一些经过筛选的安全位点，缺乏更便利的候选插入位点。本研究使用 16S rRNA 基因作为修饰基因的靶

点, 并验证了该位点的可行性, 从而实现了在任意菌株上快速的靶向转座和基因修饰。值得注意的是, 由于载体的转化需要借助 *E. coli* WM3064 的结合转移, 因此该方法仅适用于革兰氏阴性菌。此外, 更为复杂的环境, 例如土壤中的微生物菌群能否实现快速的基因整合, 也是重要的研究方向。

2.2 基因修饰菌的生长和植酸酶活性检测

在生长曲线对比分析中发现, 与未改造的原始菌相比, 基因修饰菌在稳定期的 OD_{600} 吸光度略低, 但二者较为接近(图 5A)。由于转座的位置是核糖体的 16S rRNA 基因位点, 核糖体主要负责蛋白质的合成和加工, 对其位置进行改造可能会导致细菌生长状况的改变。然而, 本研究结果表明, 对冗余的 16S rRNA 基因进行嵌入不会明显抑制或影响细菌的生长。

细菌的核糖体 16S rRNA 基因通常是多拷贝基因, 例如大肠杆菌可拥有高达 8 个拷贝的 16S rRNA 基因^[28], 这有助于细菌在短时间内实现更高的蛋白质合成效率。然而, 在大多数情况下, 16S rRNA 基因是冗余的, 部分基因处于沉默状态^[30]。当环境变为富营养状态时, 细菌才可能启用全部 rRNA 基因的转录, 并且细菌可以通过调节 rRNA 基因的活跃度来弥补拷贝数低的劣势^[31]。因此, 沉默或冗余的 16S rRNA 基因可以作为 INTEGRATE 转座插入系统的靶点。本研究开创性地使用细菌基因组上的 16S rRNA 基因作为 INTEGRATE 转座系统的靶点, 克服了原系统缺乏通用转座位点的弊端。此外, 将 16S rRNA 基因作为靶点还可以与传统的 16S rRNA 基因菌种鉴定相结合。

随后, 检测了植酸酶基因修饰菌在不同植酸浓度条件下的水解能力。结果显示基因修饰菌表现出更高的水解能力(图 5B), 其水解植酸的能力是原始菌的 8 倍以上。由于原始菌拥有其他种类的磷酸酶, 这些酶也会在一定程度上

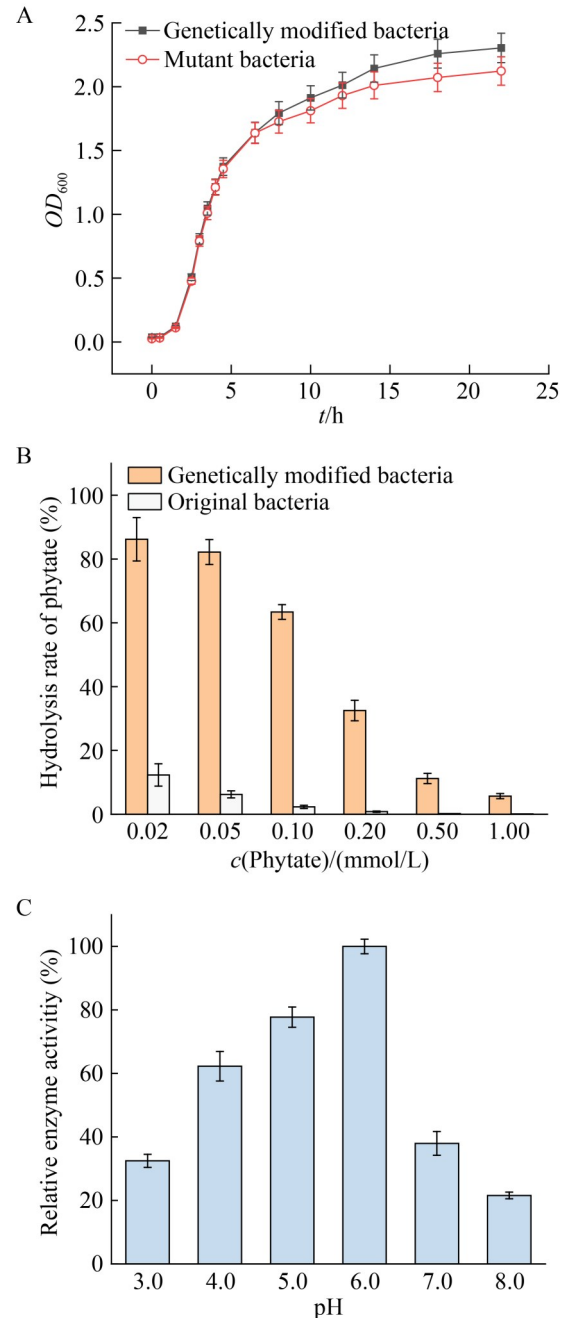


图5 基因修饰菌的生长趋势对比及对植酸的水解。A: 生长曲线对比; B: 不同底物浓度的水解率; C: pH对植酸酶活性的影响。

Figure 5 Comparison of the growth trends of genetically modified bacteria and the hydrolysis of phytic acid. A: Growth curves comparison; B: Hydrolysis rates of different substrate concentrations; C: Effect of pH on phytase activity.

水解植酸, 因此原始菌也表现出一定的植酸水解能力, 但远低于基因修饰菌。此外, 在低浓度植酸条件下, 基因修饰菌(OD_{600} 值为 1.0)可以在 1 h 内水解超过 80% 的植酸, 并且其水解率会随着底物浓度升高而降低。

pH 对基因修饰菌植酸酶活性的影响如图 5C 所示。随着 pH 值的增加, 酶活性呈现出先增加后降低的趋势, 在 pH 6.0 时表现出最高的相对酶活性, 随后在碱性环境下酶活性会迅速下降, 其相对酶活性在 pH 8.0 时仅为 20% 左右。植酸酶是一种酸性磷酸酶, 因此碱性环境不利于植酸酶活性的维持, 之前的研究结果也表明植酸酶在碱性环境中活性会迅速降低^[32]。

为了使植酸酶在基因修饰菌中稳定表达, 本研究使用了组成型的 J23119 启动子。该启动子可以不依赖诱导物而自行启动下游基因的表达^[33], 并且其表达量适中, 基本不会影响宿主的生长^[34]。目前, 只有少数植酸酶成功展示在细胞表面, 且常用模式生物作为宿主, 例如酵母和枯草芽孢杆菌, 并且其表面展示通常借助表达载体^[35]。虽然表达载体使用较为便捷, 但其使用会导致一些潜在问题, 例如持续的筛选压力、抗生素抗性基因转移、载体丢失等, 这使得其在使用过程中存在更高的风险。本研究将整个植酸酶表面展示的融合蛋白转座至细菌基因组, 可以保证其稳定表达, 且由于该系统是无痕编辑, 因此不存在抗生素抗性基因泄漏的风险。

2.3 土壤有机磷活化

在添加植酸酶基因修饰的 *R. pickettii* G3 菌后, 处理组的土壤表现出更高的植酸酶活性, 是对照土壤植酸酶活性的 2 倍以上。在第 21 天时, 植酸酶活性缓慢下降, 但其活性仍可长期保持, 在 28 d 后其植酸酶活性依然保留 1.5 倍左右(图 6A)。土壤植酸酶活性结果显示, 植酸酶基因修饰菌株极大地提高了对土壤植酸的水解潜力。

植酸酶会水解土壤中的植酸并释放磷酸根,

从而提高土壤速效磷含量。对土壤速效磷的检测结果显示, 从第 7 天开始, 土壤速效磷含量显著提高, 在第 14 天后达到最高水平, 提高了近 30% (图 6B)。由于大豆对土壤磷的摄取, 土壤中磷含量会缓慢下降, 但整体上基因修饰菌添加组的速效磷含量高于对照组。其他研究结果表明, 提高土壤植酸酶活性可以显著提高土壤速效磷水平, 最高可提高 54.48% 的速效磷含量, 并且这种促进效果可以维持较长时间^[36]。此外, 其他研究也采用类似策略, 通过添加外源植酸酶的方式, 水解了土壤中近 17.0% 的植

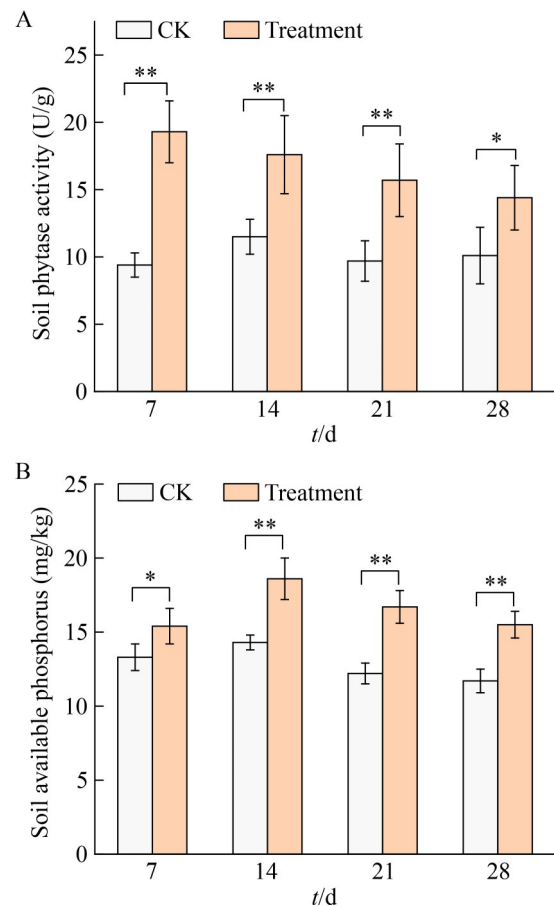


图6 土壤植酸酶活性和有效磷含量变化。A: 土壤植酸酶活性对比; B: 土壤速效磷含量对比。

Figure 6 Changes in soil phytase activity and available phosphorus contents. A: Comparison of soil phytase activity; B: Soil available phosphorus content comparison. *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$.

酸, 并提高了 22.5% 的有效磷含量^[37]。目前, 许多产植酸酶的根本菌被用于植物促生, 接种促生菌后, 根长、磷含量、生物量和产量均有显著改善^[38]。然而, 野生菌的遗传调控通常难以控制, 实际应用可能会超出预期。

转基因微生物在环境修复和药品生产等领域表现出巨大潜力。随着转基因技术的发展, 转基因微生物的环境风险可以得到有效控制和评估。CRISPR 基因组编辑是一种典型的“无标记”基因编辑技术, 可避免抗性基因的潜在危害^[12]。此外, 荷兰的研究团队进行了 30 多年的观察, 未发现转基因细菌有明显的环境影响, 表明它们是可以安全使用的^[12]。

3 结论

目前, 已报道的 CRISPR 引导转座研究中均缺乏通用的基因转座位点。许多细菌基因是单拷贝基因, 并且由于环境中的细菌通常为营养缺陷型, 许多细菌并不一定拥有已报道的转座靶位点, 例如 LacZ 基因, 这无疑限制了 INTEGRATE 等 CRISPR 转座技术的应用。本研究基于 CRISPR 引导的转座插入技术, 创造性地将目标菌的 16S rRNA 基因位点作为靶点, 进行快速基因修饰。16S rRNA 基因位点作为转座靶点, 一方面省去了复杂的安全位点筛选, 同时由于其为多拷贝基因, 因此在基因组中部分 16S rRNA 基因位点的转座并不会对转基因菌的生长造成影响。此外, 通过实验证明, 功能基因可以快速完成靶向转座, 其位置可以通过 Spacer 序列进行精确定位。此外, 细胞分裂基因也是微生物所共有的基因之一, 同样可以作为基因修饰的候选靶点。

完成外来基因在目标细菌基因组上的整合后, 其功能能否发挥是另一个重要的研究内容。本研究使用组成型启动子 J23119, 可保证目的基因在土壤环境中的稳定表达。结果显示, 经过植酸酶基因修饰的土著菌获得了极高的植酸酶活性, 并且其功能具有较宽的 pH 谱。将基因

修饰菌施用于黑土后, 土壤植酸酶活性提高了 2 倍左右, 土壤速效磷含量也显著提高。因此, 通过 CRISPR 转座介导的基因修饰可以赋予土著菌新的功能。植酸酶活性的提高可以有效活化土壤有机磷库, 释放速效磷。通过基因修饰的微生物策略对于黑土等土壤的元素活化具有一定的潜力和研究价值。

作者贡献声明

韩伟: 提出概念, 撰写文章, 获取基金; 解雨竹: 数据收集及分析; 陈琦: 数据分析, 文章编辑; 刘佳鑫: 图表绘制、编辑; 张博: 参与论文讨论, 方法论, 项目管理; 张颖: 研究构思和设计, 提供资源, 监督管理, 审阅文章。

作者利益冲突公开声明

作者声明不存在任何可能会影响本文所报告工作的已知经济利益或个人关系。

参考文献

- [1] PARK Y, SOLHTALAB M, THONGSOMBOON W, ARISTILDE L. Strategies of organic phosphorus recycling by soil bacteria: acquisition, metabolism, and regulation[J]. *Environmental Microbiology Reports*, 2022, 14(1): 3-24.
- [2] 孙元宏. 长期施肥对黑土磷素分子形态及有效性的影响[D]. 长春: 吉林农业大学, 2022.
SUN YH. Effects of long-term fertilization on phosphorus molecular forms and availability in black soil[D]. Changchun: Jilin Agricultural University, 2022 (in Chinese).
- [3] 雷烁. 磷肥调控措施对黑土磷素形态转化及有效性的影响[D]. 长春: 吉林农业大学, 2023.
LEI S. Effects of phosphate fertilizer regulation measures on phosphorus transformation and availability in black soil[D]. Changchun: Jilin Agricultural University, 2023 (in Chinese).
- [4] LIU X, HAN R, CAO Y, TURNER BL, MA LQ. Enhancing phytate availability in soils and phytate-P acquisition by plants: a review[J]. *Environmental Science & Technology*, 2022, 56(13): 9196-9219.
- [5] MOOTAPALLY CS, NATHANI NM, PATEL AK, JAKHESARA SJ, JOSHI CG. Mining of ruminant microbial phytase (RPHY1) from metagenomic data of mehsani buffalo breed: identification, gene cloning, and characterization[J]. *Journal of Molecular Microbiology*

- and Biotechnology, 2016, 26(4): 252-260.
- [6] RIZWANUDDIN S, KUMAR V, SINGH P, NAIK B, MISHRA S, CHAUHAN M, SARIS PEJ, VERMA A, KUMAR V. Insight into phytase-producing microorganisms for phytate solubilization and soil sustainability[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2023, 14: 1127249.
- [7] TARAFDAR JC, YADAV RS, MEENA SC. Comparative efficiency of acid phosphatase originated from plant and fungal sources[J]. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 2001, 164(3): 279-282.
- [8] GUJAR PD, BHAVSAR KP, KHIRE JM. Effect of phytase from *Aspergillus niger* on plant growth and mineral assimilation in wheat (*Triticum aestivum* Linn.) and its potential for use as a soil amendment[J]. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2013, 93(9): 2242-2247.
- [9] CHENG YY, NARAYANAN M, SHI XJ, CHEN XP, LI ZL, MA Y. Phosphate-solubilizing bacteria: their agroecological function and optimistic application for enhancing agro-productivity[J]. *Science of the Total Environment*, 2023, 901: 166468.
- [10] ACQUISTAPACE IM, THOMPSON EJ, KÜHN I, BEDFORD MR, BREARLEY CA, HEMMINGS AM. Insights to the structural basis for the stereospecificity of the *Escherichia coli* phytase, AppA[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2022, 23(11): 6346.
- [11] 马雪晴, 冀傲冉, 郑娇莉, 曹春霞, 龚艳, 黄大野, 王蓓蓓. 植物根际促生菌促生机制及其应用研究进展[J]. *中国农业科技导报(中英文)*, 2025, 27(2): 13-23.
- MA XQ, JI AR, ZHENG JL, CAO CX, GONG Y, HUANG DY, WANG BB. Research progress on growth-promoting mechanism and application of plant growth-promoting rhizobacteria[J]. *Journal of Agricultural Science and Technology*, 2025, 27(2): 13-23 (in Chinese).
- [12] HASKETT TL, TKACZ A, POOLE PS. Engineering rhizobacteria for sustainable agriculture[J]. *The ISME Journal*, 2021, 15(4): 949-964.
- [13] JONES EM, MARKEN JP, SILVER PA. Synthetic microbiology in sustainability applications[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2024, 22(6): 345-359.
- [14] 刘悦, 李青超, 兰英, 赵秀梅, 刘洋, 王立达, 闫锋, 韩业辉. 农业基因工程微生物及其安全性风险评估[J]. *黑龙江农业科学*, 2023(7): 122-126, 136.
- LIU Y, LI QC, LAN Y, ZHAO XM, LIU Y, WANG LD, YAN F, HAN YH. Agricultural genetically engineered microorganisms and their safety risk assessment[J]. *Heilongjiang Agricultural Sciences*, 2023(7): 122-126, 136 (in Chinese).
- [15] KLOMPE SE, VO PLH, HALPIN-HEALY TS, STERNBERG SH. Transposon-encoded CRISPR-Cas systems direct RNA-guided DNA integration[J]. *Nature*, 2019, 571(7764): 219-225.
- [16] VO PLH, RONDA C, KLOMPE SE, CHEN EE, ACREE C, WANG HH, STERNBERG SH. CRISPR RNA-guided integrases for high-efficiency, multiplexed bacterial genome engineering[J]. *Nature Biotechnology*, 2020, 39(4): 480-489.
- [17] PHAM ML, POLAKOVIČ M. Microbial cell surface display of oxidoreductases: concepts and applications[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2020, 165: 835-841.
- [18] HAN W, ZHAO Y, CHEN Q, XIE YZ, ZHANG M, YAO HK, WANG L, ZHANG Y. Laccase surface-display for environmental tetracycline removal: from structure to function[J]. *Chemosphere*, 2024, 365: 143286.
- [19] 闫艳霞, 李紫聪, 董亚铮, 李政, 黄思秀. 基因修饰技术及其在动物育种和生物医药领域的应用[J]. *中国畜牧兽医*, 2024, 51(2): 659-667.
- YAN YX, LI ZC, DONG YZ, LI Z, HUANG SX. Gene modification technology and its application in animal breeding and biomedicine[J]. *China Animal Husbandry & Veterinary Medicine*, 2024, 51(2): 659-667 (in Chinese).
- [20] HAN W, ZHANG J, CHEN Q, XIE YZ, ZHANG M, QU JH, TAN YJ, DIAO YR, WANG YX, ZHANG Y. Biodegradation of poly(ethylene terephthalate) through PETase surface-display: from function to structure[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2024, 461: 132632.
- [21] 琚慧敏, 杨键, 张偲, 李洁. 荧光标记珊瑚组织来源细菌及其与虫黄藻相互作用的显微观察[J]. *微生物学通报*, 2021, 48(2): 351-361.
- JU HM, YANG J, ZHANG S, LI J. Labeling a coral tissue-derived bacterium with stable fluorescence and microscopic observation of the interaction between the labeled strain and *Symbiodiniaceae*[J]. *Microbiology China*, 2021, 48(2): 351-361 (in Chinese).
- [22] 曾静, 郭建军, 王通, 袁林. 蛋白质分子表面氨基酸突变提高植酸酶 Yi APPA 的活性和热稳定性[J]. *食品科学*, 2024, 45(18): 77-86.
- ZENG J, GUO JJ, WANG T, YUAN L. Mutation of amino acid residues on the protein surface improves the activity and thermostability of phytase Yi APPA[J]. *Food Science*, 2024, 45(18): 77-86 (in Chinese).
- [23] ZUO ZQ, GONG T, CHE Y, LIU RH, XU P, JIANG H, QIAO CL, SONG CJ, YANG C. Engineering *Pseudomonas putida* KT2440 for simultaneous degradation of organophosphates and pyrethroids and its application in bioremediation of soil[J]. *Biodegradation*, 2015, 26(3): 223-233.
- [24] CAI RP, JIANG YL, YANG W, YANG WT, SHI SH, SHI CW, HU JT, GU W, YE LP, ZHOU FY, GONG QL, HAN WY, YANG GL, WANG CF. Surface-displayed IL-10 by recombinant *Lactobacillus plantarum* reduces Th1 responses of RAW_{264.7} cells stimulated with poly(I:C) or LPS[J]. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2016, 26(2): 421-431.
- [25] RYAN MP, PEMBROKE JT, ADLEY CC. *Ralstonia pickettii*: a persistent Gram-negative nosocomial infectious organism[J]. *Journal of Hospital Infection*, 2006, 62(3): 278-284.
- [26] RYAN MP, PEMBROKE JT, ADLEY CC. *Ralstonia pickettii* in environmental biotechnology: potential and applications[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2007, 103(4): 754-764.
- [27] PURNOMO AS, MAULIANAWATI D, KAMEI I. *Ralstonia pickettii* enhance the DDT biodegradation by *Pleurotus eryngii*[J]. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2019, 29(9): 1424-1433.

- [28] STODDARD SF, SMITH BJ, HEIN R, ROLLER BRK, SCHMIDT TM. rrnDB: improved tools for interpreting rRNA gene abundance in bacteria and archaea and a new foundation for future development[J]. *Nucleic Acids Research*, 2015, 43(D1): D593-D598.
- [29] STRECKER J, LADHA A, GARDNER Z, SCHMIDBURGK JL, MAKAROVA KS, KOONIN EV, ZHANG F. RNA-guided DNA insertion with CRISPR-associated transposases[J]. *Science*, 2019, 365(6448): 48-53.
- [30] NELSON JO, WATASE GJ, WARSINGER-PEPE N, YAMASHITA YM. Mechanisms of rDNA copy number maintenance[J]. *Trends in Genetics*, 2019, 35(10): 734-742.
- [31] ROLLER BRK, STODDARD SF, SCHMIDT TM. Exploiting rRNA operon copy number to investigate bacterial reproductive strategies[J]. *Nature Microbiology*, 2016, 1: 16160.
- [32] GOLOVAN S, WANG G, ZHANG J, FORSBERG CW. Characterization and overproduction of the *Escherichia coli appA* encoded bifunctional enzyme that exhibits both phytase and acid phosphatase activities[J]. *Canadian Journal of Microbiology*, 2000, 46(1): 59-71.
- [33] KIM SK, YOON PK, KIM SJ, WOO SG, RHA E, LEE H, YEOM SJ, KIM H, LEE DH, LEE SG. CRISPR interference-mediated gene regulation in *Pseudomonas putida* KT2440[J]. *Microbial Biotechnology*, 2020, 13(1): 210-221.
- [34] 陈春梅. 产琥珀酸放线杆菌的基因工程改造及其发酵产丁二酸[D]. 无锡: 江南大学, 2024.
CHEN CM. Genetic engineering of *Actinobacillus succinogenes* for succinic acid production[D]. Wuxi: Jiangnan University, 2024 (in Chinese).
- [35] MUÑOZ-MUÑOZ PLA, TERÁN-RAMÍREZ C, MARES-ALEJANDRE RE, MÁRQUEZ-GONZÁLEZ AB, MADERO-AYALA PA, MELÉNDEZ-LÓPEZ SG, RAMOS-IBARRA MA. Surface engineering of *Escherichia coli* to display its phytase (AppA) and functional analysis of enzyme activities[J]. *Current Issues in Molecular Biology*, 2024, 46(4): 3424-3437.
- [36] 杨萍萍, 杨洪强, 毕润霞, 范伟国, 冉昆, 吴瑞刚, 樊树雷. 外源植酸酶对土壤磷酸酶、微生物及平邑甜茶幼苗生长的影响[J]. *山东农业科学*, 2013, 45(10): 81-85.
YANG PP, YANG HQ, BI RX, FAN WG, RAN K, WU RG, FAN SL. Response of soil phosphatase, microorganism and *Malus hupehensis* seedling growth to exogenous phytase[J]. *Shandong Agricultural Sciences*, 2013, 45(10): 81-85 (in Chinese).
- [37] 李江涛, 鲁芳, 王思齐, 张一彤, 任养杰, 国世阳, 王奔, 高伟. 双功能域 β -折叠桶植酸酶提高土壤有效磷含量研究[J]. *中国土壤与肥料*, 2024(2): 27-32.
LI JT, LU F, WANG SQ, ZHANG YT, REN YJ, GUO SY, WANG B, GAO W. Study on the enhancement of soil effective phosphorus content by dual-domain β -propeller alkaline phytase[J]. *Soil and Fertilizer Sciences in China*, 2024(2): 27-32 (in Chinese).
- [38] VASHISHTH A, TEHRI N, TEHRI P, SHARMA A, SHARMA AK, KUMAR V. Unraveling the potential of bacterial phytases for sustainable management of phosphorous[J]. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 2023, 70(5): 1690-1706.