

利用 Tn5 转座子介导突变提高大肠杆菌丁醇生产水平

林兆^{1,2}, 董红军¹, 李寅¹

1 中国科学院微生物研究所, 北京 100101

2 中国科学院大学, 北京 100049

林兆, 董红军, 李寅. 利用 Tn5 转座子介导突变提高大肠杆菌丁醇生产水平. 生物工程学报, 2015, 31(12): 1711-1719.

Lin Z, Dong HJ, Li Y. Improvement of butanol production by *Escherichia coli* via Tn5 transposon mediated mutagenesis. Chin J Biotech, 2015, 31(12): 1711-1719.

摘要: 目前, 对于构建高产丁醇大肠杆菌工程菌株的工作, 主要是对丁醇通路和相关途径的基因进行理性改造。为进一步提升菌株的丁醇生产能力, 需要发掘基因组上可影响丁醇生产能力的基因, 但这很难通过已有认识或计算机模型进行预测。本工作以一株实验室前期构建的产丁醇大肠杆菌工程菌株为研究对象, 利用 Tn5 转座子构建了一个含有 1 196 个菌株的突变文库。丙酮酸是丁醇的前体, 并且在发酵终产物中, 副产物丙酮酸的含量与丁醇的含量呈反相关, 因此, 可以利用丙酮酸的含量来间接反映丁醇的含量, 而丙酮酸可用二硝基苯胍显色法进行快速测定, 基于此, 建立了 96 孔板——酶标仪快速筛选方法。利用该方法成功筛选到了比对照菌株丁醇产量提高了 29%、49%、56% 的 3 个突变体菌株。利用反向 PCR 及测序的方法, 确定了其转座子插入位置分别为: *pykA*、*tdk*、*cadC* 基因。这些基因可以作为进一步提高菌株丁醇产量的靶点, 同时这种利用 Tn5 转座子筛选基因靶标的策略也为构建其他微生物细胞工厂提供了新思路。

关键词: 大肠杆菌, 丁醇, Tn5 转座子, 基因组

Received: December 28, 2014; **Accepted:** January 22, 2015

Supported by: National High Technology Research and Development Program of China (863 Program) (No. 2011AA02A208), National Natural Science Foundation of China (No. 31270107).

Corresponding authors: Yin Li. Tel/Fax: +86-10-64807485; E-mail: yli@im.ac.cn

Hongjun Dong. Tel/Fax: +86-10-64807351; E-mail: redarmy305@gmail.com

国家高技术研究发展计划 (863 计划) (No. 2011AA02A208), 国家自然科学基金 (No. 31270107) 资助。

Improvement of butanol production by *Escherichia coli* via Tn5 transposon mediated mutagenesis

Zhao Lin^{1,2}, Hongjun Dong¹, and Yin Li¹

¹ Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China

² University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

Abstract: For engineering an efficient butanol-producing *Escherichia coli* strain, many efforts have been paid on the known genes or pathways based on current knowledge. However, many genes in the genome could also contribute to butanol production in an unexpected way. In this work, we used Tn5 transposon to construct a mutant library including 1 196 strains in a previously engineered butanol-producing *E. coli* strain. To screen the strains with improved titer of butanol production, we developed a high-throughput method for pyruvate detection based on dinitrophenylhydrazine reaction using 96-well microplate reader, because pyruvate is the precursor of butanol and its concentration is inversely correlated with butanol in the fermentation broth. Using this method, we successfully screened three mutants with increased butanol titer. The insertion sites of Tn5 transposon was in the ORFs of *pykA*, *tdk*, and *cadC* by inverse PCR and sequencing. These found genes would be efficient targets for further strain improvement. And the genome scanning strategy described here will be helpful for other microbial cell factory construction.

Keywords: *Escherichia coli*, butanol, Tn5 transposon, genome

丁醇是一种重要的化学品，可直接用作有机溶剂和合成多种酯类化合物的前体，同时它也是一种比乙醇更有优势的生物燃料^[1]。生物丁醇可由一些梭菌菌株在厌氧条件下经过 ABE (Acetone-butanol-ethanol) 发酵产生，至今已有超过 100 年的历史^[2]。但是由于梭菌菌株本身是严格厌氧的革兰氏阳性细菌，遗传操作困难，并且由于本身复杂的代谢调控机制，因此很难提升梭菌发酵生产丁醇的能力，从而限制了生物丁醇市场竞争力。借助于现代生物技术，科学家开始利用易于操作的模式细菌大肠杆菌来生产丁醇，取得了显著的进展。

2008 年，来自 University of California, Los Angeles 的 Liao 研究组最先报道了把一条完整的梭菌丁醇发酵途径导入到大肠杆菌中 (*thl*、*hbd*、*crt*、*bcd*、*etfA*、*etfB*、*adhE2*)，第一次实现利用大肠杆菌生产丁醇^[3]。在随后的几年里，

大量的相关工作逐渐开展和发表，主要包括：

1) 选择更为高效的酶。利用酶活更高的乙酰辅酶 A 乙酰转移酶 AtoB (由大肠杆菌的 *atoB* 基因编码) 来替代硫解酶 Thl (由丙酮丁醇梭菌的 *thl* 基因编码)，丁醇的产量提高了 3 倍^[3]；使用可催化不可逆反应且利用 NADH 为辅因子的顺式酰基辅酶 A 还原酶 Ter (由齿垢密螺旋体的 *ter* 基因编码) 替代丁酰辅酶 A 脱氢酶复合体 BCD (由丙酮丁醇梭菌的 *bcd*、*etfAB* 基因编码)，使丁醇产量提高了 17 倍^[4-5]。2) 还原力平衡设计。使用来自酵母菌的甲酸脱氢酶 FDH (*fdh* 基因编码)，可把厌氧发酵时产生的甲酸转化为二氧化碳和 NADH，可实现丁醇合成的还原力平衡，在丰富培养基中丁醇得率最大可达 36% (W/W)^[4-5]，也可以通过过表达丙酮酸脱氢酶 PDH 复合体 (由 *aceEF.lpd* 基因编码)，增强丙酮酸到乙酰辅酶 A 且偶联产生 NADH 的能力，丁醇得率可达

到 28% (W/W)^[4]。3) 由于大肠杆菌本身存在一些副产物途径,从而影响了丁醇的产量和得率,去除这些副产物途径中关键基因(主要是产琥珀酸的 *frdABCD*、产乳酸的 *ldhA*、产乙酸的 *pta-ack* 和产乙醇的 *adhE*),可显著提高丁醇的合成能力^[4-5],目前报道最高的大肠杆菌丁醇产量是 14–15 g/L^[5-6],略低于梭菌^[7]。

基于理性知识指导的生产丁醇的大肠杆菌改造已经取得了显著的进展^[8-9]。但是与梭菌相比较并没有绝对的优势,还远未达到有市场竞争力的产业化水平,仍需要更多的改进^[10]。现在的菌株改造局限于有限的几个基因,然而细胞本身是一个系统性的整体,若要实现丁醇的高产,必然有基因组上其他基因的支持,但是具体哪些基因起作用目前还难以预测。为了发现这些潜在的基因靶标,我们利用 Tn5 转座子^[11-12]对一株可生产丁醇的大肠杆菌工程菌株进行了基因组水平的随机插入,构建了一个突变体文库,通过对文库筛选得到了丁醇产量提高的突变体,再对转座子插入位点进行定位,找出了有效的基因靶点,为构建更高效的产丁醇大肠杆菌提供了指导。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 菌 株

实验所用菌株为大肠杆菌 EB216 菌株。EB216 菌株是实验室前期根据 Liao 研究组^[5]的工作构建,在 15 mL BD 小管中,利用 M9 培养基静置发酵能够产生 1 g/L 左右的丁醇。

1.1.2 试剂及引物

EZ-Tn5 转座子试剂盒 (EZ-Tn5TM <KAN-2> Tnp TransposomeTM Kit, Cat. No. TSM99K2) 购自 Epicentre 公司,内含可直接用于转化的卡那

霉素抗性转座子复合体及用于插入位点定位的反向 PCR 引物 KAN-2 FP-1 Forward Primer (5'-ACCTACAACAAAGCTCTCATCAACC-3') 和 KAN-2 RP-1 Reverse Primer (5'-GCAATGTA ACATCAGAGATTTTGAG-3');细菌基因组提取试剂盒、胶回收试剂盒购自 Omega 公司;限制性内切酶 *Sal* I、T4 DNA 连接酶等购自 NEB 公司;Taq DNA 聚合酶、dNTPs 等购自北京全式金生物技术有限公司。

二硝基苯胍购自国药集团化学试剂有限公司,溶于 2 mol/L 的 HCl 中制备 0.1%的二硝基苯胍母液,最终稀释成 0.037 5%的二硝基苯胍使用;NaOH 购自北京化工厂,配成浓度为 2.81 mol/L 溶液备用。

1.1.3 培 养 基

菌株发酵培养基为 M9 培养基,其 1 L 组成为:20 g 葡萄糖,17.1 g Na₂HPO₄·12H₂O,3.0 g KH₂PO₄,0.5 g NaCl,1.0 g NH₄Cl,0.002 mol MgSO₄,0.000 1 mol CaCl₂,0.5 mg VB₁,1 g 酪蛋白氨基酸 (CA)。1 L 的 LB 培养基组成为:10 g 胰化蛋白胍,5 g 酵母提取物,10 g NaCl。1 L 的 SOC 培养基组成为:20 g 胰化蛋白胍,5 g 酵母提取物,0.5 g NaCl,2.5 mmol KCl,0.01 mol MgCl₂,20 mmol 葡萄糖。

pUC19 筛选平板为含 100 μg/mL 氨苄青霉素的 LB 琼脂平板,EZ-Tn5 转座复合物转化子筛选平板为含 50 μg/mL 卡那霉素的 LB 琼脂平板。

1.2 方 法

1.2.1 感受态细胞制备至转化

EB216 菌株的电转感受态细胞制备参考《分子克隆》^[13]中的甘油法,制备感受态细胞使用 pUC19 质粒测试转化效率,以确保达到 10⁹/μg DNA 以上。电击采用 Gene Pulser Xcell 电穿孔

系统 (Bio-Rad), 使用 2 mm 电击杯, 电击参数为: 2 500 V, 25 μ F, 200 Ω 。

1.2.2 突变文库的制备

利用制备好的 EB216 感受态细胞, 电转 1 μ L Tn5 转座子复合体。利用 SOC 液体培养基对电转菌株 37 $^{\circ}$ C 复壮培养 1 h 后, 涂布于含 50 μ g/mL 卡那霉素的 LB 琼脂平板。

1.2.3 用二硝基苯肼法测定丙酮酸

丙酮酸在酸性条件下与 2,4-二硝基苯肼发生缩合反应形成丙酮酸二硝基苯腙。二硝基苯腙在碱性条件下呈现红色, 可在 520 nm 处比色后灵敏地反映出丙酮酸的含量^[14]。

以 M9 培养基作为溶剂, 配置 6.248 g/L 的丙酮酸钠母液, 再用 M9 培养基稀释成 0、0.625、1.250、1.875、2.499、3.124、3.749、4.998 g/L 的溶液, 取 80 μ L 不同稀释度丙酮酸钠溶液、80 μ L 0.037 5% 的二硝基苯肼、80 μ L 2.81 mol/L NaOH 混合, 静置反应 10 min, 利用 Molecular Device Spectra Max 190 酶标仪在 520 nm 的波长下测定吸光度。每个梯度重复 3 次。

1.2.4 突变菌株 96 孔深孔板内发酵及筛选

将成功插入 Tn5 转座子的菌株, 利用灭菌的牙签接种于 96 孔深孔板, 每个孔装有 1.25 mL 的 M9 液体培养基, 37 $^{\circ}$ C 条件下厌氧培养箱 (Bactron I-2, Shellab) 中培养 72 h。取发酵液 200 μ L 于 96 孔酶标板, 以空白为对照, 利用酶标仪在 600 nm 的波长下测定吸光度。

同时将发酵液稀释 25 倍后利用二硝基苯肼法测定丙酮酸含量。

1.2.5 菌株的发酵评价

将最终筛选到的菌株进行小管发酵验证。首先在 LB 培养基里 37 $^{\circ}$ C 培养过夜, 转接 0.5 mL 的 LB 菌液至 9.5 mL 的 M9 培养基中, 在厌氧

培养箱中, 利用 15 mL BD 试管 (非密封) 于 37 $^{\circ}$ C 厌氧条件静置培养 72 h。取 1.5 mL 发酵液 12 000 \times g 下离心 1 min, 将上清液过滤后利用 HPLC (液相色谱仪) 检测丁醇的含量, 以最终确定丁醇产量得到明显提高的菌株, 对高产丁醇菌株进行 3 轮以上发酵重复验证, 每轮 3 个平行, 以证明其产量提高的稳定性。

1.2.6 利用 HPLC 对丁醇产量进行测定

丁醇产量利用高压液相 (HPLC system 1260 Infinity Series, Agilent Technologies) 测定。所用分析柱为 Bio-Rad (Hercules, CA) Aminex HPX-87H (7.8 mm \times 300 mm); 流动相为 5 mmol/L 硫酸溶液, 流速为 0.5 mL/min, 柱温是 15 $^{\circ}$ C; 检测器为折光检测器, 检测温度为 30 $^{\circ}$ C; 检测时间为 45 min。

1.2.7 反向 PCR 及测序确定 Tn5 插入位置

提取高产丁醇突变菌株的基因组 DNA。根据 EZ-Tn5 结构, 用限制性内切酶 *Sal* I 酶切基因组 DNA。由于 EZ-Tn5 转座子上含有 *Sal* I 酶切位点, 同时基因组上其他位置同样有 *Sal* I 位点, 当细菌基因组被切成零碎片段后, 用 T4 DNA 连接酶保证 DNA 片段自连接成环状 DNA。以此为模板, 以 EZ-Tn5 反向 PCR 引物 (KAN-2 FP-1 Forward Primer 及 KAN-2 RP-1 Reverse Primer) 进行反向 PCR, 并用琼脂糖电泳分离纯化 PCR 产物。反向 PCR 产物通过北京擎科公司测序。测序引物同样为 KAN-2 FP-1 Forward Primer 及 KAN-2 RP-1 Reverse Primer。根据测序结果来确定转座子插入位点。

2 结果与分析

2.1 构建 Tn5 转座子突变文库

根据试剂盒说明书, 通过电击转化的方式

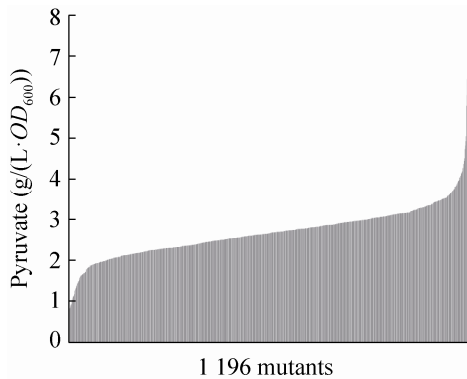


图2 突变菌株的丙酮酸浓度/ OD_{600} 值

Fig. 2 Pyruvate/ OD_{600} of 1 196 mutants.

发现菌株分布呈现正偏态(朝左偏)曲线,十分陡峭,大部分丙酮酸浓度/ OD_{600} 值比较接近,没有发生显著变化,平均值为 $2.35 \text{ g}/(\text{L} \cdot OD_{600})$,我们选择低于平均值 15%的 200 个菌株作为潜力菌株,通过小管发酵进一步筛选获得了 16 个菌株,经过了再次评价,筛选出了丁醇产量得到稳定提高的 3 个菌株进行后续评价。

2.4 潜力菌株发酵能力的 HPLC 再分析

把上述筛选得到的菌株接种于含 M9 培养基的试管中进行发酵评价,用 HPLC 对发酵产物进行分析(表 1),发现筛选得到的菌株丙酮酸含量比对照偏低,相应的丁醇产量则偏高,说明筛选策略是成功的。其中 EB216-Tn5-17#、

EB216-Tn5-304#、EB216-Tn5-599# 丁醇产量分别提高了 29%、49%、56%。

2.5 突变体菌株转座子插入位置的确定

通过对 EB216-Tn5-17#、EB216-Tn5-304#、EB216-Tn5-599# 三个菌株进行反向 PCR,分别获得了 1.8、2.8、1.2 kb 左右的条带,经过测序,以及与大肠杆菌上的基因组进行对比,我们发现这 3 个菌株的插入位点分别为 *cadC* 基因(1 539 bp)上的 124/125 位点、*tdk* 基因(618 bp)上的 581/582 位点以及 *pykA* 基因(1 443 bp)上的 909/910 位点(表 2,图 2)。

3 讨论

生物的生理代谢是一个复杂过程,由一个整体网络中的相互作用所决定。在菌株改造实践中,除了对已知的相关基因以及代谢通路进行改造外,在基因组上同样可能存在着一些目前我们不了解以及无法预测的、却对目的产物有影响的基因。我们利用 Tn5 转座子对一株产丁醇的大肠杆菌工程菌株构建了一个突变体文库,对其进行基于酶标仪的快速筛选,成功获得了丁醇产量提高的突变体,基于此获得的基因靶点为构建高产菌株提供了解决方案。

表 1 突变菌株 HPLC 分析结果

Table 1 The HPLC analysis results of mutants

| Strains | EB216 | EB216-Tn5-17# | EB216-Tn5-304# | EB216-Tn5-599# |
|------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| Glucose consumed (g/L) | 6.61±1.02 | 7.64±0.62 | 7.15±0.47 | 9.00±1.46 |
| Pyruvate (g/L)* | 0.90±0.15 (0.78±0.02) | 0.88±0.10 (0.75±0.01) | 0.42±0.03 (0.34±0.01) | 0.31±0.07 (0.30±0.03) |
| Butanol (g/L) | 1.08±0.06 | 1.39±0.25 | 1.61±0.11 | 1.70±0.02 |
| Butanol yield (W/W, %) | 16 | 18 | 23 | 19 |
| OD_{600} | 0.75±0.04 | 0.92±0.00 | 0.93±0.03 | 1.18±0.03 |

*: the numbers in bracket are pyruvate concentrations detected by 2,4-dinitrophenylhydrazine reaction.

表 2 转座子插入位点的鉴定

Table 2 Identification of the transposon insertion sites

| Genes | <i>pykA</i> | <i>cadC</i> | <i>tdk</i> |
|----------|---------------------------------|---|--|
| Function | Pyruvate kinase II (glycolysis) | <i>cadBA</i> operon transcriptional activator (lysine metabolism) | Thymidine kinase/deoxyuridine kinase (DNA synthesis) |

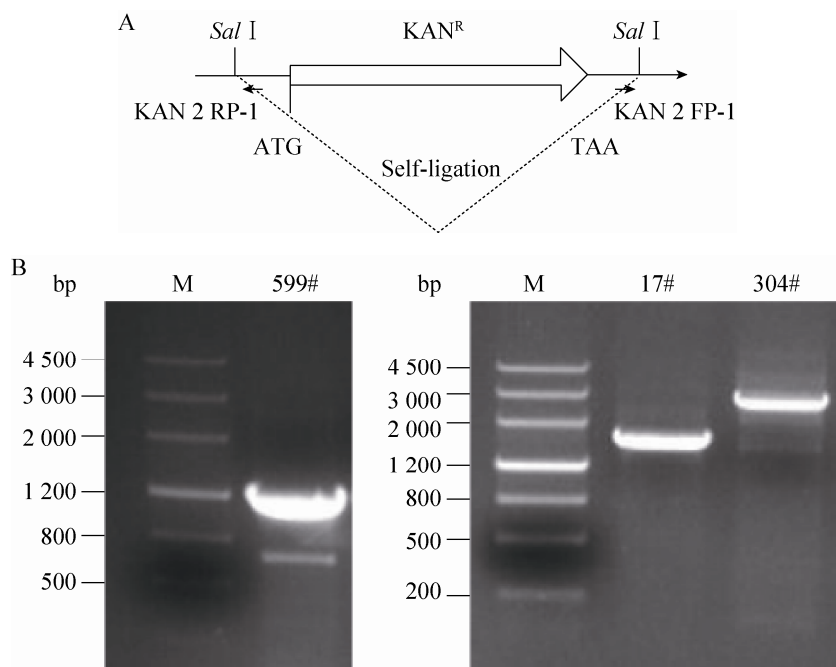


图 2 利用反向 PCR 进行突变位点鉴定

Fig. 2 Identification of insertion sites by reverse PCR. (A) Reverse PCR. (B) Reverse PCR of self-ligation. M: Marker III.

本研究中发现的 3 个基因中, *tdk* 基因编码胸苷激酶是 DNA 补救合成途径中的关键酶, 又称为补救酶^[15], 它在 Mg^{2+} 参与的情况下, 催化胸苷磷酸化生成胸苷一磷酸, 进而形成胸苷三磷酸, 这是 DNA 合成中的 4 个必需脱氧核苷酸之一。胸苷激酶广泛存在于原核生物、真核生物以及少数病毒中^[16]。已有研究发现, 在经过驯化得到的生长速率加快的大肠杆菌中, *hns* 和 *tdk* 基因之间插入了一个 IS 片段, 转录组分析发现该菌株中 *tdk* 的转录水平显著下调^[17]。这说明我们得到的 *tdk* 失活突变体菌株, 可能是由于生

长速率的加快导致了丁醇产量的提高。*cadC* 是 *cad* 操纵子的转录活化子, 处在 *cadBA* 的上游, 负责激活 *cadBA* 编码的赖氨酸脱羧酶以及赖氨酸胺转运蛋白^[18-19]。有研究表明在沙门鼠伤寒沙门氏菌中, 如果敲除 *cadC* 基因, 糖酵解途径相关酶的活性会有所提高, 同时 *cadC* 突变菌株更能耐酸^[20]。而在大肠杆菌的耐酸进化实验 (pH 4.5-4.8) 中也发现, 所有的进化种群都表现出赖氨酸脱羧酶活性的逐渐降低^[21]。因此我们推测 *cadC* 突变体中的糖酵解可能是加快了, 从而利用了更多的葡萄糖生产丁醇, 此外突变体

的耐酸能力也有可能提升从而延长了丁醇的生产周期。*pykA* 基因编码丙酮酸激酶 A, 负责催化磷酸烯醇式丙酮酸 (PEP) 形成丙酮酸以及 ATP。它有一个丙酮酸激酶异构酶 *pykF*。通常认为 *pykF* 是大肠杆菌中主要的丙酮酸激酶, 而 *pykA* 所起作用相对较小^[22]。然而我们通过 Tn5 转座子插入到 *pykA* 导致该基因的失活以及目的产物丁醇的提高, 说明 *pykA* 是一个参与了重要生理过程的基因, 我们推测在厌氧条件下 *pykA* 编码丙酮酸激酶是负责磷酸烯醇式丙酮酸转化为丙酮酸的关键酶, 由于 *pykA* 的失活, 导致了生成的丙酮酸含量降低。细胞处在相对比较“饥饿”的状态, 导致细胞更多地吸收外界的葡萄糖代谢以产生足够多的丙酮酸。同时这种“饥饿感”能够保证细胞更长时间处于“兴奋”状态, 以致更迟进入衰退期, 于是 *pykA* 基因失活的菌株能够生成更多的丁醇。进一步生理及遗传学的研究, 将可能会重新认识 *pykA* 基因的生理功能, 我们也正在进行该部分工作。

Tn5 转座子插入突变是一种早就认识的遗传学机制, 通常被用于发现特定功能的未知基因, 主要应用于微生物遗传学研究^[23]。我们将这种方法应用到菌株的遗传改造过程中, 为高产菌株构建提供有效的靶点。相比于理性改造, 它能够提供更多、更有效的靶点, 相比于传统诱变, 它没有大量的无效突变背景干扰, 更容易确定关键基因, 因此将是代谢工程的一种有效策略。为了发挥这种策略的最大功效, 我们拟继续利用 Tn5 转座子进行更大规模的筛选, 将利用自动接种仪进行高通量培养, 利用自动移液工作站对发酵液进行显色测定, 通过全基因组规模的饱和突变, 找出所有可以提高丁醇产量基因靶点, 然后整合这些靶点到一个菌株

中, 构建出高效的微生物细胞工厂。

REFERENCES

- [1] Green EM. Fermentative production of butanol-the industrial perspective. *Curr Opin Biotechnol*, 2011, 22(3): 337–343.
- [2] Jones DT, Woods DR. Acetone-butanol fermentation revisited. *Microbiol Rev*, 1986, 50(4): 484–524.
- [3] Atsumi S, Cann AF, Connor MR, et al. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for 1-butanol production. *Metab Eng*, 2008, 10(6): 305–311.
- [4] Bond-Watts BB, Bellerose RJ, Chang MCY. Enzyme mechanism as a kinetic control element for designing synthetic biofuel pathways. *Nat Chem Biol*, 2011, 7(4): 222–227.
- [5] Shen CR, Lan EI, Dekishima Y, et al. Driving forces enable high-titer anaerobic 1-butanol synthesis in *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol*, 2011, 77(9): 2905–2915.
- [6] Dellomonaco C, Clomburg JM, Miller EN, et al. Engineered reversal of the β -oxidation cycle for the synthesis of fuels and chemicals. *Nature*, 2011, 476(7360): 355–359.
- [7] Xue C, Zhao J, Zhao JB, et al. High-titer *n*-butanol production by *Clostridium acetobutylicum* JB200 in fed-batch fermentation with intermittent gas stripping. *Biotechnol Bioeng*, 2012, 109(11): 2746–2756.
- [8] Wen M, Bond-Watts BB, Chang MCY. Production of advanced biofuels in engineered *E. coli*. *Curr Opin Chem Biol*, 2013, 17(3): 472–479.
- [9] Branduardi P, de Ferra F, Longo V, et al. Microbial *n*-butanol production from Clostridia to non-Clostridial hosts. *Eng Life Sci*, 2014, 14(1): 16–26.
- [10] Choi YJ, Lee JM, Jang YS, et al. Metabolic engineering of microorganisms for the production of higher alcohols. *mBio*, 2014, 5(5): e01524–14.
- [11] Goryshin IY, Jendrisak J, Hoffman LM, et al. Insertional transposon mutagenesis by electroporation of released Tn5 transposition

- complexes. *Nat Biotechnol*, 2000, 18(1): 97–100.
- [12] Reznikoff WS. Transposon Tn5. *Annu Rev Genet*, 2008, 42: 269–286.
- [13] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989: 119–123.
- [14] Eze LC, Echetebe CO. Some properties of aspartate and alanine aminotransferases from *trichoderma viride*. *J Gen Microbiol*, 1980, 120(2): 523–527.
- [15] Segura-Peña D, Lichter J, Trani M, et al. Quaternary structure change as a mechanism for the regulation of thymidine kinase 1-like enzymes. *Structure*, 2007, 15(12): 1555–1566.
- [16] Sandrini MPB, Clausen AR, Munch-Petersen B, et al. Thymidine kinase diversity in bacteria. *Nucleos Nucleot Nucl Acides*, 2006, 25(9/11): 1153–1158.
- [17] LaCroix RA, Sandberg TE, O'Brien EJ, et al. Use of adaptive laboratory evolution to discover key mutations enabling rapid growth of *Escherichia coli* K-12 MG1655 on glucose minimal medium. *Appl Environ Microbiol*, 2015, 81(1): 17–30.
- [18] Küper C, Jung K. CadC-mediated activation of the *cadBA* promoter in *Escherichia coli*. *J Mol Microbiol Biotechnol*, 2005, 10(1): 26–39.
- [19] Rhee JE, Kim KS, Choi SH. CadC activates pH-dependent expression of the *Vibrio vulnificus cadBA* operon at a distance through direct binding to an upstream region. *J Bacteriol*, 2005, 187(22): 7870–7875.
- [20] Lee YH, Kim BH, Kim JH, et al. CadC has a global translational effect during acid adaptation in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *J Bacteriol*, 2007, 189(6): 2417–2425.
- [21] Harden MM, He A, Creamer K, et al. Acid-adapted strains of *Escherichia coli* K-12 obtained by experimental evolution. *Appl Environ Microbiol*, 2015, 81(6): 1932–1941.
- [22] Ponce E, Flores N, Martinez A, et al. Cloning of the two pyruvate kinase isoenzyme structural genes from *Escherichia coli*: the relative roles of these enzymes in pyruvate biosynthesis. *J Bacteriol*, 1995, 177(19): 5719–5722.
- [23] Miller WJ, Capy P. *Mobile Genetic Elements*. New Jersey: Humana Press, 2004: 83–96.

(本文责编 郝丽芳)