



“实践十号”搭载大肠杆菌代谢组学分析

王佳平¹ 赵光显¹ 刘宇¹ 高建义¹ 谢琼¹ 韩延平² 李勇枝^{*1}

1 中国航天员科研训练中心 北京 100094

2 军事医学科学院微生物所 病原微生物生物安全国家重点实验室 北京 100071

摘要:【背景】随着载人飞行时间的延长,微生物安全问题越来越凸显。载人航天疾病谱显示感染性疾病是航天员在轨常发的疾病之一,影响航天员健康。大肠杆菌是人体肠道存在的正常菌群,也是条件性致病菌,可引起感染性疾病,因此有必要分析研究太空环境对大肠杆菌代谢的影响。【目的】通过“实践十号”返回式科学实验卫星搭载大肠杆菌近地轨道飞行12 d后,分析鉴定大肠杆菌在太空环境下代谢水平的变化。【方法】应用非靶向代谢组学技术对卫星搭载的大肠杆菌 K12 及地面同种对照组进行质谱分析,通过主成分分析(PCA 分析)和正交偏最小二乘判别分析(OPLS-DA 分析)找出组间潜在的差异生物标志物。【结果】通过分析鉴定,共发现12种显著差异生物标志物,其中搭载组11种参与能量代谢和甘油磷脂代谢的生物标志物含量上调,1种脂肪酸含量下调。【结论】太空飞行可提高大肠杆菌能量代谢与甘油磷脂代谢水平,相关代谢产物的变化提示太空飞行可能会促进大肠杆菌增殖。

关键词: 太空飞行, 大肠杆菌, 代谢组学

Effects of space flight by “SJ-10” satellite on metabolic characteristics of *Escherichia coli*

WANG Jia-Ping¹ ZHAO Guang-Xian¹ LIU Yu¹ GAO Jian-Yi¹ XIE Qiong¹
HAN Yan-Ping² LI Yong-Zhi^{*1}

1 Astronaut Center of China, Beijing 100094, China

2 State Key Laboratory of Pathogen and Biosecurity, Beijing Institute of Microbiology and Epidemiology, Beijing 100071, China

Abstract: [Background] In recent years, with the continuous development of manned spaceflight, the issue of space microbial safety cannot be ignored. The disease spectrum of manned spaceflight indicates that infectious diseases have great impact on the health of astronauts. *Escherichia coli* is a normal flora in the human intestinal tract. Meanwhile, it can cause intestinal infection under certain conditions and become a conditional pathogen. It is of great significance to analyze the effect of space environment on the metabolism of *E. coli*. [Objective] *E. coli* was carried on the “SJ-10” satellite for 12 days to analyze and

Foundation items: National Science and Technology Major Projects for “Major New Drugs Innovation and Development” (2015ZX09J15102); “1226” Major Project (AWS16J018)

***Corresponding author:** Tel: 86-10-66362380; E-mail: liyongzhi666@sina.com

Received: 19-09-2018; **Accepted:** 24-01-2019; **Published online:** 19-02-2019

基金项目: “重大新药创制”科技重大专项项目(2015ZX09J15102); 1226 工程卫生专业重大项目(AWS16J018)

***通信作者:** Tel: 010-66362380; E-mail: liyongzhi666@sina.com

收稿日期: 2018-09-19; **接受日期:** 2019-01-24; **网络首发日期:** 2019-02-19

identify the changes in the metabolic level of *E. coli* in the space environment. **[Methods]** The non-targeted metabolomics technique was used to collect data and perform mass spectrometry analysis from *E. coli* carried on the satellite. At the same time, a ground control group was set up. Principal component analysis and orthogonal partial least squares discriminant analysis were used to identify potential differential biomarkers between groups. **[Results]** A total of 12 significant biomarkers were found by analysis and identification. In the spaceflight group, 11 biomarkers involved in energy metabolism and glycerophospholipid metabolism were up-regulated, and one fatty acid content was down-regulated. **[Conclusion]** Space flight can improve the level of energy metabolism and glycerophospholipid metabolism of *E. coli*, and the changes of related metabolites suggest that space flight may promote the proliferation of *E. coli*.

Keywords: Space flight, *Escherichia coli*, Metabolomics

大肠杆菌是一种常见的革兰氏阴性菌,主要存在于人和动物的肠道,一般情况下多不致病,当外界环境发生变化时,可引起肠道外感染,危及人类健康^[1]。而随着抗生素的广泛使用和介入技术的不断发展,大肠杆菌感染水平不断增加,耐药性不断增加^[2]。近年来,随着载人航天事业的不断发展,航天员在轨作业的时间越来越长,而大肠杆菌广泛存在于人体肠道内,同时俄罗斯生物医学问题研究所对国际空间站的环境监测也发现了大肠杆菌的存在^[3],究竟空间环境对大肠杆菌会产生怎样的影响一直是个疑问。太空环境因素复杂,微重力、高真空、强辐射等因素都可能诱导大肠杆菌发生基因突变,进而影响其生物学性状及代谢水平。已有多项研究表明太空环境可影响细菌的增殖水平、毒力以及耐药性^[4-6]。因此,研究太空环境下大肠杆菌相应的生物学改变可为载人航天医监医保提供理论依据和技术支持。

代谢组学是20世纪90年代中期迅速发展起来的一门学科,它作为系统生物学中重要的组成部分,具有易检测、信息量大、高效率等特点,已被广泛应用于微生物领域、植物领域、疾病诊断、制药等多个方面^[7]。本实验通过“实践十号”返回式科学实验卫星搭载大肠杆菌 K12 在轨飞行 12 d。应用非靶向代谢组学技术分析太空飞行后大肠杆菌代谢水平的变化,找出潜在差异代谢物,并由此推论太空环境可能对大肠杆菌生物学性状的影响,以期空间环境微生物相关性状及机理的研究提供

新的参考。

1 材料与方法

1.1 菌株

大肠杆菌 K12 (*Escherichia coli* 1.2389)购自中国普通微生物菌种保藏管理中心。

1.2 培养基

LB 液体培养基(g/L): 含胰蛋白胨 10.0, 酵母粉 5.0, 氯化钠 10.0, 用于大肠杆菌培养。

1.3 主要试剂和仪器

甲醇, Fisher Scientific 公司; PBS 溶液, Gibco 公司; 其余常规代谢分析试剂均为进口纯级产品。反向色谱柱、超快速液相色谱、四极杆飞行时间质谱, Waters 公司; 台式高速冷冻离心机, Hettich 科学仪器公司; 超声波振荡器, 昆山市超声仪器有限公司; 进样瓶, DIKMA 公司; 内插管, ANPEL 公司; 生物安全柜, 北京东联哈尔公司; 恒温振荡培养箱, 上海知楚仪器有限公司; 分光光度计, 上海第三分析仪器厂。

1.4 搭载菌株的培养

将大肠杆菌 K12 培养到对数生长中期 ($OD_{600}=1.0$), 取菌液 20 μ L 涂布到 LB 斜面培养基上, 37 $^{\circ}$ C 恒温培养 16 h 后, 搭载“实践十号”返回式科学实验卫星在轨飞行 12 d, 返回后-20 $^{\circ}$ C 保存菌种。

1.5 样本制备

将卫星搭载的大肠杆菌和地面对照组甘油种

接种在营养琼脂平板上, 37 °C 培养过夜, 搭载组与地面对照组各挑 6 个单菌落依次接种于含 10 mL LB 液体培养基的 12 个试管中, 37 °C、200 r/min 振荡培养至对数生长中期($OD_{600}=1.0$), 将菌液依次装入 1.5 mL 离心管中 4 °C、4 000 r/min 离心 5 min, 弃上清, 无菌 PBS 溶液冲洗菌液 3 次, 收集大肠杆菌沉淀于-80 °C 保存以待样本制备。将大肠杆菌沉淀样本 4 °C 融化 30–60 min 后加入 300 μ L 的甲醇, 超声提取 10 min。振荡 15 s, 进行蛋白沉淀。经上述处理后样本蛋白 4 °C、12 000 r/min 离心 10 min, 取上层溶液 100 μ L, 置于 200 μ L 内衬管中, 待测。

1.6 检测方法

本实验主要通过高效液相色谱-飞行时间质谱进行检测分析, 首先使用高效液相色谱(Ultra performance liquid chromatography, UPLC)对菌液样本进行反相色谱分离, 其次运用四极杆飞行时间质谱仪进行一二级质谱扫描, 提取代谢物母离子以及碎片离子信息, 然后运用主成分分析(Principal component analysis, PCA)及正交偏最小二乘判别分析(Orthogonal partial least squares discriminant analysis, OPLS-DA)鉴定两组样本差异的显著性, 最后根据一二级质谱扫描信息匹配公共数据库找出组间的潜在生物标志物及可能代谢途径。

1.6.1 色谱条件

色谱分离, 采用 Waters 公司的 UPLC 对菌液样本进行分析。梯度系统的条件分别见表 1。

1.6.2 反相色谱分离条件

色谱柱: Waters UPLC HSS T3 (1.8 μ m \times 2.1 mm \times 100 mm)。

表 1 C18 反相色谱测定离子洗脱程序

Table 1 The gradient conditions for reversed phase C18 separation for ion

Time (min)	A (%)	B (%)
0	100	0
1	100	0
7	0	100
11	0	100
14	100	0

流动相: A (水, 0.1%甲酸)和 B (乙腈, 0.1%甲酸); 洗脱程序见表 1, 流速: 0.3 mL/min; 进样量为 1.0 μ L; 柱温: 45 °C。

1.6.3 质谱条件

质谱分析采用配备了热电喷雾离子源的飞行时间质谱仪。正负离子离子源电压分别为 3.7 kV 和 2.2 kV。毛细管加热温度 320 °C。鞘气压力 30 psi, 辅助气压力 10 psi。容积加热蒸发温度 300 °C。鞘气和辅助气均为氮气。碰撞气为氮气, 压力为 1.5 mTorr。液质系统由 MassLynx 4.1 软件控制, 数据采集也由该软件操作。

质谱数据的采集方法利用的是 Waters 质谱仪高分辨质谱正负离子模式下的全信息串联质谱(MS^E)数据采集模式。 MS^E 检测时通过低能量和高能量两种模式进行交替扫描。低能量模式进行一级质谱扫描, 能量为 15 eV, 质谱检测器采集检测物的分子离子峰, 记录母离子质荷比、离子强度等信息; 高能量模式进行二级质谱扫描, 能量为 45 eV, 这时气态离子发生碰撞, 碎裂成子离子碎片, 通过分析化学键断裂位置及断裂形成的离子碎片大小辅助定性鉴别。 MS^E 数据采集模式通过母离子与其碎片离子具有相同色谱行为的特性进行母-子离子的关联归属。

1.6.4 质量控制

为了评价样品采集过程中系统的稳定性和重复性, 将所有样本均移取固定体积混合均匀后得到质控样本。实验首先采用 5 个空白样本平衡色谱柱, 再采用 3 个质控样本平衡柱条件, 然后每间隔 3 个样本后插入 1 个质控样本以监测系统的稳定性及重复性。同时计算质控样本中提取的代谢特征的变异系数值, 删除变异系数超过 15% 的代谢特征。

1.6.5 数据处理

所有采集好的数据, 无论是正离子还是负离子模式, 均采用 Progenesis QI 软件处理, 包括的步骤依次为导入原始数据、峰对齐、峰提取、归一化处理, 最终形成保留时间、质荷比和峰强度的表格。色谱柱自动峰采集时长为 14 min, 峰提取的强度

限定为模式 1。对采集过程中得到的各种加合离子相关参数进行解卷积。运用 Simca 软件对采集的离子数据进行 PCA 分析及 OPLS-DA 分析。

1.6.6 差异性代谢物的鉴定

为寻找两组间的差异生物标志物,本实验采用 OPLS-DA 模型的变量重要性值(Variable importance in the projection, VIP) (阈值>1)筛选出代谢物,并结合 ANOVA 分析的 P 值($P<0.05$)来寻找显著性差异生物标志物。差异生物标志物的定性方法为:搜索公共数据库 METLIN (<https://metlin.scripps.edu>)、ECMDB (<http://www.ecmdb.ca>)、LIPID MAPS (<https://www.lipidmaps.org>)及 KEGG (<https://www.kegg.jp>),比较质谱的质荷比 m/z 或者精确分子质量 Mass, 误差限制 0.01 kD, 并根据二级图谱中特征碎片离子进行辅助定性鉴别,最后找出其可能的代谢途径。

2 结果与分析

2.1 质控评估结果

采用无监督技术 PCA 分析对质控样本进行分析。质控样本是相同的成分,若系统重复性好,质控样本应该在 PCA 得分图中聚在一起。在图 1、2 中分别显示了 ESI 反相色谱正离子、负离子分离的 PCA 得分图,其中每组图中横坐标代表第一主成分,纵坐标代表第二主成分,椭圆内代表主成分积分值 95%可信区间范围,其中 qc (Quality

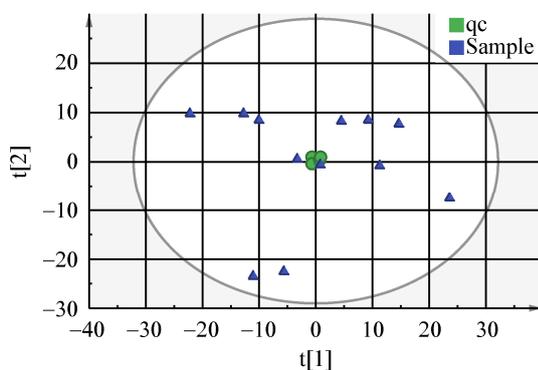


图 1 正离子模式质控样本评估
Figure 1 Quality control in positive ion mode

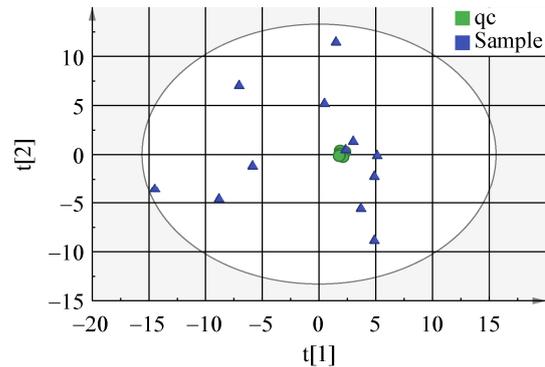


图 2 负离子模式质控样本评估
Figure 2 Quality control in negative ion mode

control)代表质控样本, Sample 代表普通样本。相对聚集在一起的 qc 样品表明,系统重复性好,所采集的数据满足质控要求。

2.2 总离子流图

图 3、4 依次为反相色谱正离子、负离子模式下的总离子流图。每幅图中的 A 图为搭载组总离子流图, B 图为地面对照组总离子流图。其中正离子模式下有 448 个特征峰被保留,负离子模式下有 427 个特征峰被保留。从图中可看出,无论是正离子模式下的总离子流图,还是负离子模式下的总离子流图,搭载组与地面对照组整体离子变化趋势大体一致,但反应在个别细节处时有变化。

2.3 两组样本统计分析

2.3.1 PCA 分析结果

两组样本 PCA 得分图(Scores plot)如图 5、6 所示,图 5 代表正离子 PCA 得分图,图 6 代表负离子 PCA 得分图,每组图中 X 轴代表第一主成分, Y 轴代表第二主成分,椭圆内代表主成分积分值 95%可信区间范围,绿色圆圈符号代表搭载组 6 个样本,蓝色三角符号代表地面对照组 6 个样本。从图 5、6 可以看出,搭载组(Space flight)和地面对照组(Control)样本均在 95%可信区间内,虽然两组代谢差异并没有明显分离,但整体反映出组间代谢谱有明显差异。

2.3.2 OPLS-DA 分析结果

OPLS-DA 得分图(Scores plot)如图 7、8 所示。

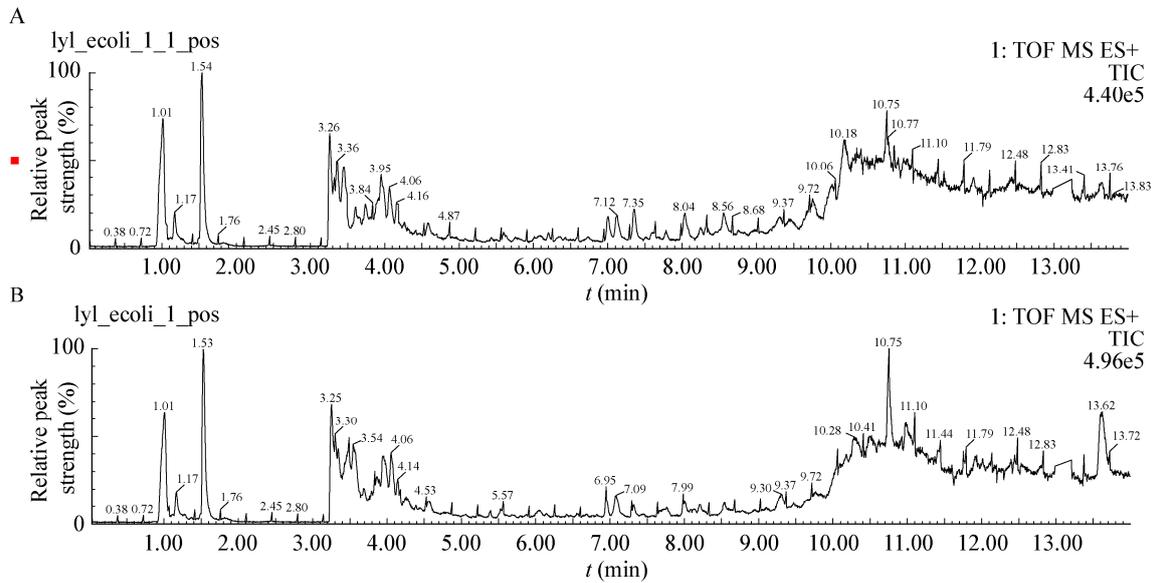


图 3 正离子模式总离子流图

Figure 3 Total ion current map in positive ion mode

注: A: 搭载组总离子流图; B: 地面对照组总离子流图.

Note: A: Total ion current map of space flight; B: Total ion current map of ground control.

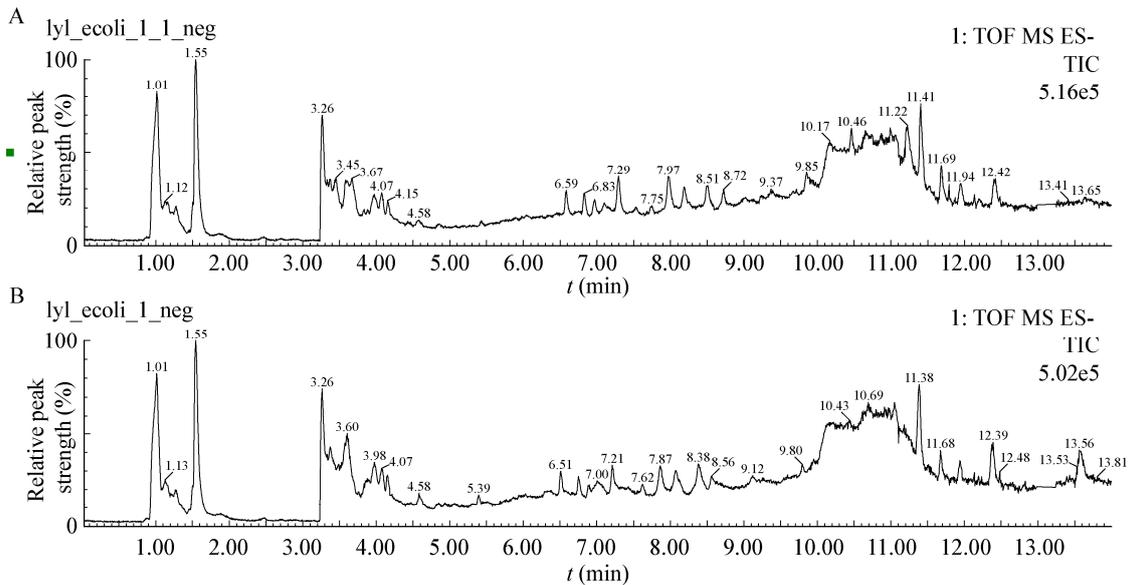


图 4 负离子模式总离子流图

Figure 4 Total ion current map in negative ion mode

注: A: 搭载组总离子流图; B: 地面对照组总离子流图.

Note: A: Total ion current map of space flight; B: Total ion current map of ground control.

图 7 代表正离子 OPLS-DA 得分图, 图 8 代表负离子 OPLS-DA 得分图, 图中圆圈符号代表搭载组 6 个样本, 三角符号代表地面对照组 6 个样本, 椭圆内代表 OPLS-DA 积分值 95% 可信区间范围。从

正、负离子 OPLS-DA 得分图可以看出搭载组样本 (Space flight) 和地面对照组样本 (Control) 显著分成两群, 且均在 95% 可信区间内, 两组代谢谱有明显组间差异。

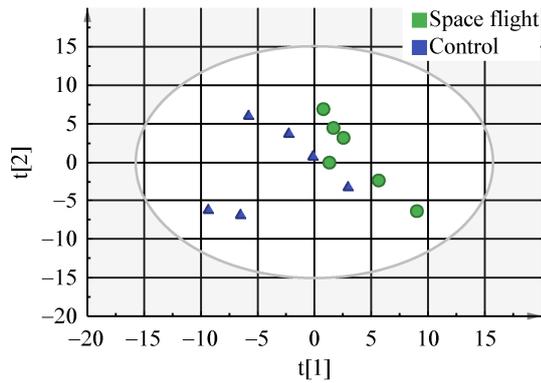


图5 正离子模式 PCA 得分图

Figure 5 PCA scores plot in positive ion mode

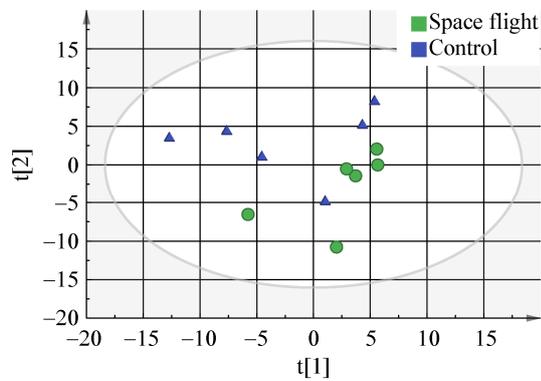


图6 负离子模式 PCA 得分图

Figure 6 PCA scores plot in negative ion mode

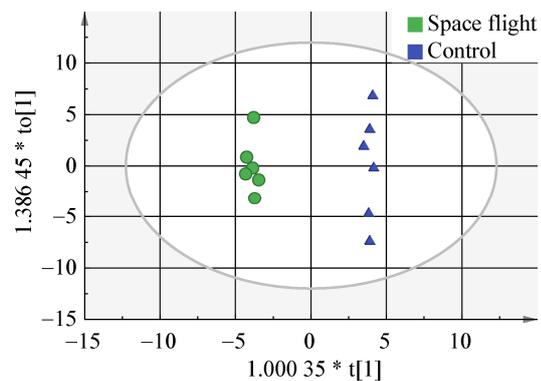


图7 正离子模式 OPLS-DA 得分图

Figure 7 OPLS-DA scores plot in positive ion mode

2.4 潜在差异生物标志物鉴定分析

通过对差异代谢物的定性共找出 12 种显著差异生物标志物。其中,正离子模式下有 5 种,负离子模式下有 7 种,根据差异代谢物一二级质谱信息代入公共数据库中匹配其分子式及可能的代谢途

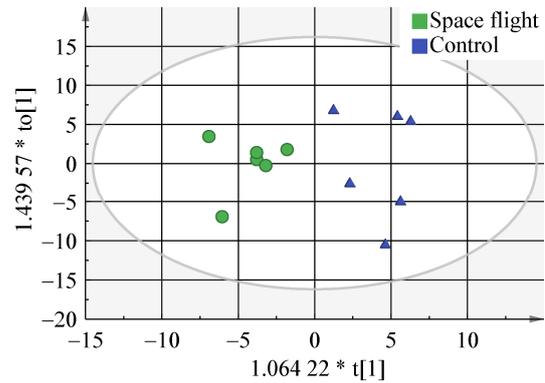


图8 负离子模式 OPLS-DA 得分图

Figure 8 OPLS-DA scores plot in negative ion mode

径如表 2 所示。通过代谢物质谱峰的峰面积(丰度)进行定量,如图 9 所示,这 12 种细菌代谢物的水平发生了明显改变,搭载组与地面对照组相比,除右-3-羟基-十八烷酸[(R)-3-Hydroxy-octadecanoic acid]代谢水平下调,其余 11 种生物标志物代谢水平平均呈上调趋势。

3 讨论与结论

在本研究中,如图 9 所示,搭载组大肠杆菌与地面对照组相比,共发现了 11 种潜在生物标志物代谢上调,1 种生物标志物代谢下调,整体代谢水平呈上调趋势。在上调的 11 种生物标志物中,我们发现参与甘油磷脂代谢的 5 种溶血磷脂酰乙醇胺(Lyso PE)和 2 种溶血磷脂酰胆碱(Lyso PC)代谢上调,磷脂酰胆碱(Phosphatidyl cholines, PC)和磷脂酰乙醇胺(Phosphatidyl ethanolamine, PE)是构成生物细胞膜双分子层的重要磷脂分子^[8],而 Lyso PE 和 Lyso PC 通常则是由 PC 和 PE 通过磷脂酶水解得到。Lyso PE 和 Lyso PC 代谢上调表明搭载组大肠杆菌细胞膜磷脂代谢水平增加,潜在生物膜形成能力可能增加。我们课题组在模拟微重力条件下对大肠杆菌的研究中发现模拟微重力组生物膜形成能力增加^[9]。

其次,在搭载组我们也发现 4 种与能量代谢相关的生物标志物含量上调,它们分别是 3'-一磷酸腺苷(3'-AMP)、黄素腺嘌呤二核苷酸(Flavin adenine

表 2 组间显著差异代谢物及可能的代谢途径

Table 2 Significantly different metabolites and possible metabolic pathways

模式 Mode	质荷比 <i>m/z</i>	碎片离子 MS ^E fragment ions	保留时间 Retention time (min)	代谢物名称 Accepted description	分子式 Formula	相关代谢途径 Related pathway
ESI+	480.308 886 7	339.291 0, 149.025 3, 116.977 4	8.45	LysoPE (18:1 (11Z)/0:0)	C ₂₃ H ₄₆ NO ₇ P	甘油磷脂代谢 Glycerophospholipid metabolism
	452.277 467 2	311.260 2, 149.022 9, 119.086 7	7.28	LysoPE (16:1 (9Z)/0:0)	C ₂₁ H ₄₂ NO ₇ P	甘油磷脂代谢 Glycerophospholipid metabolism
	466.293 236 4	325.273 7, 200.202 3, 149.026 8	7.94	LysoPC (14:1 (9Z))	C ₂₂ H ₄₄ NO ₇ P	甘油磷脂代谢 Glycerophospholipid metabolism
	664.116 564 0	428.038 9, 524.058 4, 136.062 5	1.52	Fenugreekine	C ₂₁ H ₂₇ N ₇ O ₁₄ P ₂	能量代谢 Energy metabolism
ESI-	348.070 754 0	235.121 2, 136.062 5, 110.071 9	1.52	3'-AMP	C ₁₀ H ₁₄ N ₅ O ₇ P	嘌呤代谢 Purine metabolism
	299.258 331 1	281.246 8, 267.232 1, 253.216 9	9.34	(R)-3-Hydroxy-octadecanoic acid	C ₁₈ H ₃₆ O ₃	脂肪酸代谢 Fatty acid metabolism
	784.148 965 9	655.251 3, 569.291 3, 128.034 4	3.45	FAD	C ₂₇ H ₃₃ N ₉ O ₁₅ P ₂	能量代谢 Energy metabolism
	464.277 554 0	267.232 6, 253.216 6, 196.038 5	7.96	LysoPC (14:1 (9Z))	C ₂₂ H ₄₄ NO ₇ P	甘油磷脂代谢 Glycerophospholipid metabolism
	424.246 319 4	374.244 2, 253.216 1, 227.201 4	7.01	LysoPE (0:0/14:0)	C ₁₉ H ₄₀ NO ₇ P	甘油磷脂代谢 Glycerophospholipid metabolism
	450.261 896 6	253.217 1, 215.008 4, 199.038 6,	7.34	LysoPE (16:1 (9Z)/0:0)	C ₂₁ H ₄₂ NO ₇ P	甘油磷脂代谢 Glycerophospholipid metabolism
	478.293 216 9	281.247 4, 253.217 1, 196.037 2	8.46	LysoPE (18:1 (11Z)/0:0)	C ₂₃ H ₄₆ NO ₇ P	甘油磷脂代谢 Glycerophospholipid metabolism
	218.102 677 2	180.103 3, 128.033 5, 88.047 0	3.40	Pantothenic acid	C ₉ H ₁₇ NO ₅	能量代谢 Energy metabolism

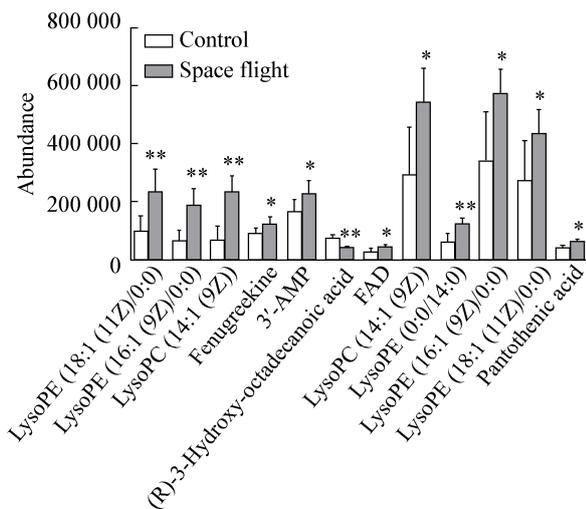


图 9 12 种显著差异生物标志物

Figure 9 12 significant difference biomarkers

Note: *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$.

dinucleotide, FAD)、葫芦巴肽脂(Fenugreekine)和泛酸(Pantothenic acid)。3'-AMP 参与嘌呤代谢,可由 ATP 水解转化生成^[10], FAD 是三羧酸循环中的一种重要黄素辅基,参与能量代谢中的电子传递及氧化磷酸化过程^[11], Fenugreekine 属于嘌呤核苷酸糖类有机化合物,即它是由嘌呤核苷酸末端磷酸基团结合到糖类衍生物所生成,有研究表明它能促进能量代谢中葡萄糖转运和碳水化合物的吸收^[12],泛酸(Pantothenic acid)是形成 CoA 的重要组成部分,而 CoA 参与糖、脂肪、蛋白质和能量代谢,是生物体能量提供的重要物质^[13]。以上 4 种物质都与细菌的能量代谢密切相关。搭载组大肠杆菌 3'-AMP、FAD、Fenugreekine 和 Pantothenic acid

代谢水平提高高度说明搭载组大肠杆菌能量代谢旺盛,结合细胞膜形成相关甘油磷脂代谢水平提高,潜在提示搭载组大肠杆菌增殖能力可能增强。Zea 等^[14]在国际空间站针对大肠杆菌的研究中发现空间站搭载的大肠杆菌相对于地面对照组存活率有明显提高,而且这些大肠杆菌能够在通常条件下抑制其生长的庆大霉素硫酸盐中生长,细胞聚集能力增加,潜在生物膜形成能力增加,这些都证实了之前的推断。

最后,在鉴定的潜在生物标志物中,我们发现了一种标志物在搭载组代谢水平下调,就是(R)-3-Hydroxy-octadecanoic acid,其中文名是(R)-3-羟基-十八烷酸,它是脂肪酸生物合成的中间体,参与脂肪酸代谢^[15]。搭载组大肠杆菌(R)-3-羟基-十八烷酸代谢下调提示脂肪酸合成相关通路代谢水平下调,相反提示能量代谢相关通路代谢水平可能上调,再结合之前有关能量代谢的相关生物标志物的推论,我们由此推测搭载组大肠杆菌能量代谢水平提高,潜在增殖水平可能提高。

当然,究竟是何种因素导致太空环境下大肠杆菌能量代谢和甘油磷脂相关标志物代谢水平提高目前还不十分清楚。然而也有研究指出在太空环境下大肠杆菌的增殖速率下降,生长变缓^[16]。由于“实践十号”卫星的辐射剂量为0.26 mGy/d,属于辐射水平较大的太空飞行,而上述大肠杆菌实验是在“神舟十号”舱内进行,辐射水平低,这提示太空辐射可能是影响大肠杆菌增殖水平的重要因素之一。然而,究竟是否是辐射因素导致上述代谢水平变化还需后续一系列实验研究。相信随着对空间环境下致病微生物不断深入的研究,可为航天员未来在轨作业以及长时间太空驻留提供重要安全保障和理论基础。

REFERENCES

- [1] Vila J, Sáez-López E, Johnson JR, et al. *Escherichia coli*: an old friend with new tidings[J]. FEMS Microbiology Reviews, 2016, 40(4): 437-463
- [2] Mellata M. Human and avian extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*: infections, zoonotic risks, and antibiotic resistance trends[J]. Foodborne Pathogens and Disease, 2013, 10(11): 916-932
- [3] Novikova N, de Boever P, Poddubko S, et al. Survey of environmental biocontamination on board the International Space Station[J]. Research in Microbiology, 2006, 157(1): 5-12
- [4] Kim W, Tengra FK, Young Z, et al. Spaceflight promotes biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa*[J]. PLoS One, 2013, 8(4): e62437
- [5] Wilson JW, Ott CM, Quick L, et al. Media ion composition controls regulatory and virulence response of *Salmonella* in spaceflight[J]. PLoS One, 2008, 3(12): e3923
- [6] Hammond TG, Stodieck L, Birdsall HH, et al. Effects of microgravity on the virulence of *Listeria monocytogenes*, *Enterococcus faecalis*, *Candida albicans*, and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*[J]. Astrobiology, 2013, 13(11): 1081-1090
- [7] Klassen A, Faccio AT, Canuto GAB, et al. Metabolomics: definitions and significance in systems biology[A]/Sussulini A. Metabolomics: From Fundamentals to Clinical Applications[M]. Cham: Springer, 2017
- [8] Sohlenkamp C, López-Lara IM, Geiger O. Biosynthesis of phosphatidylcholine in bacteria[J]. Progress in Lipid Research, 2003, 42(2): 115-162
- [9] Rong D, Wang JP, Wang HL, et al. Effect of microgravity on *Escherichia coli* K12 phenotype and gene expression[J]. Microbiology China, 2017, 44(5): 1038-1046 (in Chinese)
容丹, 王佳平, 王海立, 等. 模拟失重对大肠杆菌 K12 基因表达及表型的影响[J]. 微生物学通报, 2017, 44(5): 1038-1046
- [10] Bushfield M, Shoshani I, Johnson RA. Tissue levels, source, and regulation of 3'-AMP: an intracellular inhibitor of adenylyl cyclases[J]. Molecular Pharmacology, 1990, 38(6): 848-853
- [11] de-Los-Santos-Álvarez N, de-Los-Santos-Álvarez P, Lobo-Castañón MJ, et al. Flavin adenine dinucleotide as precursor for NADH electrocatalyst[J]. Analytical Chemistry, 2005, 77(13): 4286-4289
- [12] Bharti SK, Krishnan S, Kumar A, et al. Antidiabetic phytoconstituents and their mode of action on metabolic pathways[J]. Therapeutic Advances in Endocrinology and Metabolism, 2018, 9(3): 81-100
- [13] Yang YH, Xiao CL. The functions and biosynthesis of pantothenate[J]. Chemistry of Life, 2008, 28(4): 448-452 (in Chinese)
杨延辉, 肖春玲. 泛酸的功能和生物合成[J]. 生命的化学, 2008, 28(4): 448-452
- [14] Zea L, Larsen M, Estante F, et al. Phenotypic changes exhibited by *E. coli* cultured in space[J]. Frontiers in Microbiology, 2017, 8: 1598
- [15] Suda Y, Kim YM, Ogawa T, et al. Chemical structure and biological activity of a lipid A component from *Helicobacter pylori* strain 206[J]. Journal of Endotoxin Research, 2001, 7(2): 95-104
- [16] Zhang XL, Xie Q, Liu CT. Effects of space flight on biological characteristics of *Escherichia coli*[J]. Manned Spaceflight, 2015, 21(2): 200-204 (in Chinese)
张学林, 谢琼, 刘长庭. 太空飞行对大肠杆菌生物学性状影响的研究[J]. 载人航天, 2015, 21(2): 200-204