

# 牛源大肠杆菌对喹诺酮类抗生素耐药相关基因的筛选及鉴定

王少华<sup>1,3</sup> 吴清民<sup>1</sup> 王真<sup>2\*</sup>

(1. 中国农业大学 动物医学院,北京 100193;

2. 北京农学院 动物科学技术学院,北京 102206;

3. 河北北方学院 动物科技学院,河北 张家口 075131)

**摘要** 为在大肠杆菌全基因组范围内筛选和鉴定与喹诺酮类抗生素耐药性相关的基因,通过对临床分离的13株大肠杆菌进行药敏试验,选择耐药谱较广泛的菌株作为研究对象,利用Mariner转座子对其基因组进行随机突变,获得转座子突变株文库,并以亲本菌株为对照筛选文库中对喹诺酮类抗生素敏感的突变体,通过套式PCR、核苷酸测序及序列比对确定突变株中转座子的插入位点及其破坏的基因。结果表明:从突变株文库中筛选得到22株分别对诺氟沙星、环丙沙星、左氧氟沙星、茶啉酸敏感的突变株,其中7株对4种抗生素都敏感;插入位点分析发现,抗生素敏感突变株中被转座子破坏的基因包括*ecs4206*(磷酸核酮糖激酶)、*ecs3959*( $\beta$ -D-半乳糖苷酶 $\beta$ 亚基)、*ecs3946*(假定蛋白)和*ecs1857*(DNA结合转录调控因子)。筛选出的基因可被开发为控制或扭转大肠杆菌耐药性的作用靶点。

**关键词** 大肠杆菌; 转座子突变; 耐药性; 筛选

中图分类号 S855.1+2

文章编号 1007-4333(2017)11-0101-07

文献标志码 A

## Screening and identification of quinolones antibiotic resistance related genes of *Escherichia coli*

WANG Shaohua<sup>1,3</sup>, WU Qingmin<sup>1</sup>, WANG Zhen<sup>2\*</sup>

(1. College of Veterinary Medicine, China Agricultural University, Beijing 100193, China;

2. Animal Science and Technology College, Beijing University of Agriculture, Beijing 102206, China;

3. Animal Science College, Hebei North University, Zhangjiakou 075131, China)

**Abstract** To screen and identify quinolones antibiotic resistance genes of *Escherichia coli* genome, drug sensitivity tests were performed on clinically separated 13 *E. coli* strains for relatively wide resistance strains. Mariner transposons were used to construct transposon mutant library of *E. coli*, and quinolones antibiotics were used to screen the antibiotics sensitive mutants from the library. The transposon insertion sites were then determined by nested-PCR, nucleotide sequencing and sequence alignment. The results showed that: Twenty-two strains, which were sensitive to norfloxacin, ciprofloxacin, levofloxacin and nalidixic acid, were selected from the library; Transposon insertion sites analysis results showed that the damaged genes were *ecs4206* (Phosphoribulo kinase), *ecs3959* (Cryptic beta-D-galactosidase subunit beta), *ecs3946* (Hypothetical protein), and *ecs1857* (DNA-binding transcriptional regulator). These antibiotic resistance genes identified in this study were potential targets for antimicrobial agents.

**Keywords** *Escherichia coli*; transposon mutagenesis; antibiotic resistance; screening

抗生素的应用延长了人类的平均寿命,对于临床外科手术和化学疗法起着举足轻重的作用。然而,在全球范围内多重耐药细菌引起的感染越来越

多,治愈多重耐药细菌引起的感染愈加困难<sup>[1]</sup>。世界经济论坛全球风险报告中列出抗生素耐药性是人类最大的威胁之一<sup>[1]</sup>。在畜禽养殖中,抗生素在

收稿日期:2016-12-03

基金项目:国家自然科学基金青年基金(31402197)

第一作者:王少华,博士研究生,E-mail:wangshaohua08@163.com

通讯作者:王真,副教授,主要从事病原菌致病机制研究,E-mail:wangzhen3355@163.com

治疗动物细菌性疾病的同时,也常以亚治疗剂量被作为抗菌生长促进剂在饲料中添加,结果造成多重耐药或泛耐药菌的大量出现和传播<sup>[2]</sup>。

大肠杆菌(*Escherichia coli*)是兽医临床和医学上最常见的病原菌之一,也是极易诱发产生耐药性的细菌类型<sup>[3]</sup>。大肠杆菌的耐药性已经严重影响临床治疗效果<sup>[4]</sup>。由于细菌耐药机制复杂和普遍存在的交叉抗性,导致细菌病难以控制和根除<sup>[5]</sup>,目前大肠杆菌代谢相关基因对细菌耐药性影响的研究报道较少。因此,寻找耐药相关基因、研究可能存在的耐药机制是应对耐药性病原菌威胁的重要方向。

本研究拟利用转座子对临床分离的耐药大肠杆菌进行突变株文库构建,通过不同抗生素培养板筛选对喹诺酮类抗生素敏感的突变体;再用套式PCR、测序、序列比对后,确定突变基因位点,寻找与喹诺酮类抗生素耐药性相关的新基因,以期深入了解细菌多重耐药性的分子机制、寻找药物作用的新靶点提供依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 质粒和菌株

13株临床分离的牛源大肠杆菌(自河北、山东、内蒙等地区10个养牛场采集的腹泻犊牛直肠棉拭子中分离鉴定和保存);大肠杆菌 $\beta$ 2155(含转座子质粒)菌株,均由本实验室保存。

#### 1.1.2 培养基

LB液体培养基:10 g/L胰蛋白胨,5 g/L酵母粉,10 g/L NaCl;LB固体培养基:10 g/L胰蛋白胨,5 g/L酵母粉,10 g/L NaCl,1.2%~1.5%的琼脂粉;TSB液体培养基:30 g/L胰蛋白胨大豆肉汤(TSB);TSB固体培养基:30 g/L胰蛋白胨大豆肉汤(TSB),1.2%~1.5%的琼脂粉。根据试验需要添加相应的抗生素。

#### 1.1.3 抗菌药物

诺氟沙星(NOR)、复方磺胺甲恶唑(SXT)、阿米卡星(AN)、新霉素(N)、利福平(RA)、克林霉素(CM)、头孢曲松(CRO)、环丙沙星(CIP)、阿莫西林(AMX)、链霉素(S)、头孢唑啉(CZ)、头孢哌酮(CFP)、多西环素(DO)、红霉素(E)、氯霉素(C)、阿奇霉素(AZI)、卡那霉素(K)、庆大霉素(GM)、万古霉素(VA)、四环素(TE)、萘啶酸(NAL)、呋喃妥因

(FT)、左氧氟沙星(LVF)、青霉素G(P)、氨苄西林(AM)药敏片,购自北京天坛生物制品股份有限公司;诺氟沙星、环丙沙星、左氧氟沙星、萘啶酸粉末,购自sigma公司。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 大肠杆菌药敏试验

分别挑取纯化的13株大肠杆菌的单菌落接种到4 mL LB液体培养基中,在恒温摇床37 °C过夜振荡培养。用LB液体培养基校正菌液浓度与0.5麦氏单位标准比浊管相同。吸取200  $\mu$ L校正后的菌液涂布于LB固体培养基中,直至菌液干燥后,在每块培养基中均匀贴药敏片,选择25种常用的抗生素类药物药敏片。37 °C恒温培养24 h后,用卡尺测量并记录各药敏片的抑菌环直径,确定13株大肠杆菌对药物的敏感情况。同时依据药敏试验的结果,选择对卡那霉素敏感的菌株作为突变株文库的亲本菌株。

#### 1.2.2 大肠杆菌转座子突变体文库构建

通过双亲株杂交的方法进行转座突变<sup>[6]</sup>。将携带转座子质粒的供体菌 $\beta$ 2155涂布在LB+DAP+K固体培养基(DAP为二氨基庚二酸,K为卡那霉素)上,受体菌(从13株大肠杆菌中选定的对卡那霉素敏感的一株)涂布在LB固体培养基上,37 °C温箱培养24 h。将培养后的受体菌和供体菌悬浮于LB+DAP液体培养基中,充分混合均匀,6 000 r/min离心10 min,弃去上清,将离心后菌体于37 °C温箱孵育40 min,然后加入LB+K液体培养基,重悬菌体。吸取200  $\mu$ L接合后菌液涂布于LB+K固体培养基,37 °C温箱过夜培养,同时以供体菌和受体菌作为阴性对照。选择LB+K培养基上长出的单克隆,用牙签接种到96孔板中,37 °C培养24 h后,4 °C保存。

#### 1.2.3 抗生素敏感突变体筛选

根据亲本大肠杆菌耐药性分析结果,选择诺氟沙星、环丙沙星、左氧氟沙星、萘啶酸4种喹诺酮类抗生素进行抗生素敏感突变体的筛选。分别配置含1/2MIC浓度筛选抗生素(诺氟沙星、环丙沙星、左氧氟沙星、萘啶酸)和卡那霉素的LB固体培养基,用无菌48齿复制器将96孔板内的突变株复制接种在上述不同抗生素培养板上,37 °C培养24 h。以亲本菌株为对照,自诺氟沙星、环丙沙星、左氧氟沙星、萘啶酸培养板上挑选抗生素抗性产生变化的突变株,划线、挑取单菌落后保存于-20 °C冰箱。

### 1.2.4 突变体中转座子插入位点分析

首先提取抗生素敏感突变株的基因组 DNA, 用 TaqI 限制性内切酶对基因组随机酶切, 连接 Linker (Linker1: CGACCACGACCA; Linker2: AGTCTC-GCAGATGATAAGGTGGTCGTGGT), 然后进行套式 PCR。第 1 次 PCR 引物为 P1: TATAATCA-CCGTCATGGTCTTTGTAG, P2: GTCCAGT-CTCGCAGATGATAAGG; 第 2 次 PCR 引物为 P1: TGATAAGGTGGTCGTGGT, P2: CGGGG-ACTTATCAGCCAACCTGT。反应程序为: 94 °C 30 s; 55 °C 40 s; 72 °C 1 min, 扩增 30 个循环后进行 72 °C 延伸 10 min。将 PCR 产物进行 1% 的琼脂糖凝胶电泳, 切取目的条带, 按照 DNA 凝胶回收试剂盒说明书回收目的基因进行测序。测序后, 在 NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>) 上与大肠杆菌 O<sup>157</sup> 染色体序列进行比对, 对转座子的插入位点进行定位。

## 2 结果与分析

### 2.1 大肠杆菌药敏试验

通过药敏片试验法测定 13 株大肠杆菌对常用抗菌药物的敏感程度, 结果见表 1。13 株大肠杆菌对常用抗菌药均能产生不同程度的耐药性, 其中 2 号菌对诺氟沙星、四环素、环丙沙星、万古霉素、阿奇霉素、阿莫西林、头孢唑肟、复方新诺明、萘啶酸、利福平、青霉素 G、多西环素、左氧氟沙星、克林霉素、链霉素、氨苄西林 16 种抗生素均产生耐药性, 是耐药最严重的菌株, 因此挑选 2 号菌为亲本菌株进行转座子突变株文库的构建。

### 2.2 抗生素敏感突变株的筛选

以携带转座子质粒的  $\beta$ 2155 为供体菌, 以 2 号大肠杆菌为受体菌, 构建含有 4 000 个单克隆的转座突变株文库。选择亲本菌株耐药的 4 种喹诺酮类抗生素即诺氟沙星、环丙沙星、左氧氟沙星和萘啶酸, 以卡那霉素作为对照, 对突变株文库进行筛选。在突变株文库中筛选得到 22 株 (表 2) 分别对诺氟沙星、环丙沙星、左氧氟沙星和萘啶酸敏感的突变株, 如图 1 箭头所示, 以亲本菌株为对照, 在卡那霉素培养板生长, 在诺氟沙星培养板上不生长的细菌即为抗生素敏感突变株。

### 2.3 突变体中转座子插入位点分析

为了确定转座子插入基因序列的具体位置, 对筛选得到的 22 株突变株进行插入位点分析, 套式

PCR 结果如图 2 和 3, 切取第二次 PCR 条带, 回收后测序。将测序结果与大肠杆菌 O157 的基因组数据库进行对比, 共发现 4 个与耐药性有关的基因, 分别为 *ecsA206* (Phosphoribulokinase)、*ecs3959* (Cryptic beta-D-galactosidase subunit beta)、*ecs3946* (Hypothetical protein) 和 *ecsI857* (DNA-binding transcriptional regulator)。

## 3 讨论与结论

本研究首先对 13 株临床分离的大肠杆菌进行了耐药性分析, 结果显示分离菌株对常用抗菌药物普遍耐药, 选择耐药谱相对较广的 2 号菌株构建突变株文库, 筛选出 22 株对诺氟沙星、环丙沙星、左氧氟沙星和萘啶酸敏感的突变株。通过插入位点分析发现 22 株突变株中存在不同菌株同一个插入位点的现象, 后共比对分析发现 4 个耐药性相关基因: *ecsA206* (Phosphoribulokinase)、*ecs3959* (Cryptic beta-D-galactosidase subunit beta)、*ecs3946* (Hypothetical protein) 和 *ecsI857* (DNA-binding transcriptional regulator)。

细菌对喹诺酮类药物耐药的机制主要有: 细菌细胞膜通透性的改变; 药物作用靶位的结构基因突变致 DNA 旋转酶和拓扑异构酶 IV 突变; 控制细菌主动外排系统的外排能力增强<sup>[7]</sup>。细菌除了上述耐药机制外, 一些与细菌基础代谢相关的基因也影响着细菌对抗生素的敏感性<sup>[8]</sup>。大肠杆菌的顺乌头酸酶 B 基因缺失后, 会影响呼吸链的代谢途径, 使细菌对喹诺酮类抗生素产生耐受性<sup>[9]</sup>。通过宏基因组分析发现了 1 个应答调控子能够调控大肠杆菌对氨苄青霉素产生耐药性, 该调控子能够下调大肠杆菌的 OmpF 蛋白以及上调外排泵相关基因 *acrD*、*mdtA* 和 *mdtB* 的表达<sup>[10]</sup>, 说明调控基因在大肠杆菌耐药产生中也起着非常重要的作用。

*ecsA206*<sup>[11]</sup> 是磷酸核酮糖激酶基因, 其催化的底物是 5-磷酸核酮糖, 5-磷酸核酮糖也是磷酸戊糖途径中的重要中间产物。磷酸戊糖途径为细菌的核酸和蛋白质的合成提供原料, *ecsA206* 基因的缺失可能影响了细菌的相关代谢从而影响了细菌对药物的敏感性<sup>[11]</sup>。*ecs3959* 基因编码  $\beta$ -半乳糖苷酶的  $\beta$ -亚基, 它的缺失导致  $\beta$ -半乳糖苷酶结构遭到破坏及功能发生改变, 进而影响了乳糖及具有  $\beta$ -半乳糖苷键相关多糖转变成单糖的进程, 从而影响了细菌的糖

表1 13株大肠杆菌的药敏试验结果

Table 1 Drug sensitivity test results of 13 *Escherichia coli* strains

药物 Drug	抑菌圈/mm Zone of inhibition													含药量/ ( $\mu\text{g}/\text{片}$ ) Drug concentration	判定标准/mm Judgment standard		
	E.1	E.2	E.3	E.4	E.5	E.6	E.7	E.8	E.9	E.10	E.11	E.12	E.13		耐药 R	中介 I	敏感 S
氨苄西林 AM	0	0	0	0	0	0	0	0	13	0	0	0	17	10	$\leq 13$	14~16	$\geq 17$
阿米卡星 AN	15	18	20	13	14	15	0	12	13	0	16	17	0	30	$\leq 14$	15~16	$\geq 17$
阿莫西林 AMX	19	0	20	17	18	19	15	15	18	17	15	16	17	10	$\leq 14$	15~19	$\geq 20$
头孢哌酮 CFP	0	19	0	0	0	0	14	17	17	18	0	18	20	75	$\leq 15$	16~20	$\geq 21$
环丙沙星 CIP	22	0	0	19	0	20	9	15	16	8	0	9	18	5	$\leq 15$	16~20	$\geq 21$
头孢曲松 CRO	0	20	0	0	20	0	19	15	17	20	0	20	21	30	$\leq 13$	14~20	$\geq 21$
头孢唑肟 CZ	19	0	23	22	22	0	23	20	18	22	23	20	21	30	$\leq 14$	15~19	$\geq 20$
多西环素 DO	10	0	16	11	11	0	13	0	10	15	11	11	15	30	$\leq 17$	18~22	$\geq 23$
呋喃妥因 FT	15	13	20	17	13	15	17	14	18	14	15	16	18	300	$\leq 14$	15~16	$\geq 17$
庆大霉素 GM	19	18	20	17	19	17	0	15	16	0	17	18	16	10	$\leq 12$	13~14	$\geq 15$
卡那霉素 K	14	17	0	13	15	0	0	12	12	0	0	13	12	30	$\leq 13$	14~17	$\geq 18$
左氧氟沙星 LVF	20	0	18	19	16	10	11	13	13	12	0	0	19	5	$\leq 13$	14~16	$\geq 17$
新霉素 N	15	15	0	13	15	10	13	12	13	13	15	16	13	30	$\leq 12$	13~16	$\geq 17$
萘啶酸 NAL	0	0	20	0	0	16	0	0	15	0	0	0	0	30	$\leq 13$	14~18	$\geq 19$
诺氟沙星 NOR	20	0	20	20	0	16	9	20	15	0	0	0	19	10	$\leq 12$	13~16	$\geq 17$
链霉素 S	0	0	11	0	0	0	0	0	0	0	0	0	12	10	$\leq 11$	12~14	$\geq 15$
复方磺胺甲恶唑 SXT	0	0	0	0	0	0	16	0	0	16	0	0	21	1.25/23.75	$\leq 10$	11~15	$\geq 16$
四环素 TE	0	0	15	8	0	0	9	0	0	9	0	0	14	30	$\leq 11$	11~14	$\geq 15$
万古霉素 VA	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	30	$\leq 14$	15~16	$\geq 17$
阿奇霉素 AZI	12	14	0	0	0	0	0	0	0	13	0	0	0	15	$\leq 13$	14~17	$\geq 18$
红霉素 E	8	0	9	8	0	0	9	0	0	0	0	0	0	15	$\leq 13$	14~22	$\geq 23$
氟霉素 C	0	19	14	16	0	0	0	0	15	18	0	0	14	30	$\leq 12$	13~17	$\geq 18$
青霉素 P	0	0	0	0	0	0	0	8	9	0	0	0	9	10U	$\leq 14$	15~17	$\geq 18$
克林霉素 CM	9	0	8	10	0	0	9	0	12	12	0	0	0	2	$\leq 14$	15~20	$\geq 21$
利福平 RA	0	0	0	0	10	0	14	0	11	12	0	9	0	5	$\leq 16$	17~19	$\geq 20$

表 2 22 株突变株耐药变化筛选结果

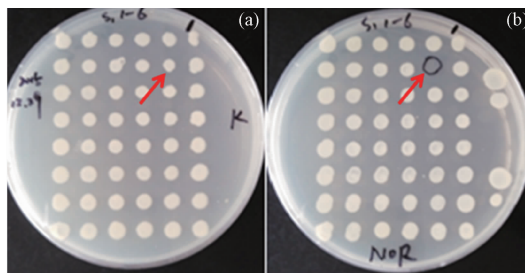
Table 2 Drug sensitivity test results of 22 mutants

菌株编号 Strain number	不同抗生素培养板 Different antibiotic culture plates				
	萘啶酸 Nalidixic acid	左氧氟沙星 Levofloxacin	环丙沙星 Ciprofloxacin	诺氟沙星 Norfloxacin	卡那霉素 Kanamycin
亲本菌株	+	+	+	+	—
1	—	—	—	—	+
2	+	+	—	—	+
3	+	+	—	—	+
4	—	—	—	—	+
5	—	—	—	—	+
6	—	+	—	—	+
7	—	+	—	—	+
8	+	+	—	—	+
9	—	—	—	—	+
10	—	+	—	—	+
11	—	+	—	—	+
12	+	—	—	—	+
13	+	—	—	—	+
14	—	+	—	—	+
15	—	—	—	—	+
16	—	—	—	—	+
17	—	+	—	—	+
18	—	+	—	—	+
19	+	+	—	—	+
20	—	—	—	—	+
21	+	+	—	—	+
22	+	+	—	—	+

注：亲本菌株对上述 4 种抗生素存在耐药性。突变株在各抗生素培养板上不生长说明耐药性发生变化。

+, 生长; —, 不生长

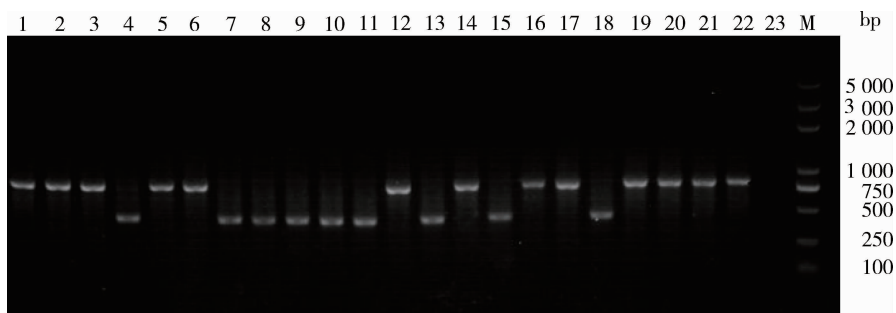
Note: Parent bacteria is resistant to four quinolone antibiotics, and mutant strains are sensitive to different antibiotics respectively. +, live; —, dead.



(a) 亲本菌 Parent bacteria; (b) 诺氟沙星敏感突变株 Norfloxacin sensitive mutant

图 1 突变体文库的筛选

Fig. 1 Screening of mutant libraries



M. D2000 梯度标记;1~22. 以 22 株敏感突变株为模板的扩增产物;23. 空白对照。下同。

M. D2000 ladder marker;1-22. PCR amplification of 22 mutants DNA;23. Water control. The same below.

图2 第一次 PCR 扩增结果

Fig. 2 Result of the first round PCR amplification

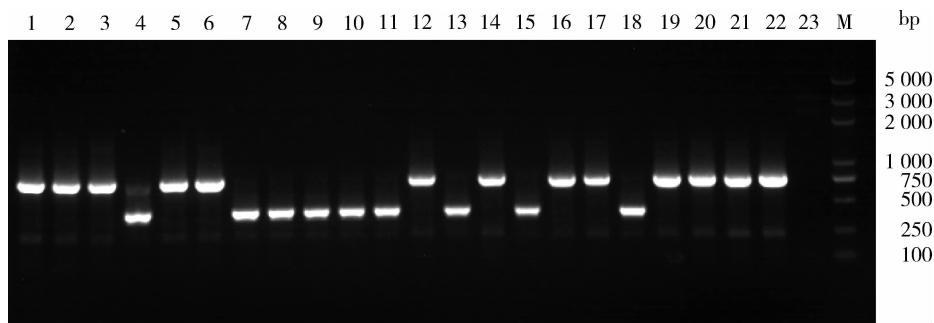


图3 第二次 PCR 结果

Fig. 3 Result of the second round PCR amplification

代谢及能量应用<sup>[12]</sup>。通过分析发现 *ecs3946* 基因转运蛋白的功能,在细菌的糖代谢过程中向胞内转运酒石酸盐,向胞外排琥珀酸盐<sup>[13]</sup>。喹诺酮类药与琥珀酸盐结构上都有羧基组成,因此推测 *ecs3946* 基因也可能会有外排喹诺酮类药的可能,因此 *ecs3946* 基因的缺失造成了细菌对喹诺酮类药物的敏感。*ecs1857* 基因具有转录调控功能, *ecs1857* 基因可能参与了大肠杆菌的外膜蛋白和相关外排泵基因的调控从而导致了大肠杆菌的耐药表型的变化,当然这种调控功能预测还需要验证。

此外,本研究筛选到的 4 个大肠杆菌耐药性相关基因,可能并非直接对抗生素起作用,而通过改变耐药基因的功能,或影响外膜蛋白和外排泵相关基因,使细菌产生了耐药性。

在大肠杆菌中,可能存在尚未确定抗生素抗性相关基因,有待于进一步深入研究发掘,研究其功能及相应的耐药机制。本研究筛选了新的耐药相关基因,对于深入了解细菌多重耐药性的分子机制、寻找药物作用的新靶点具有重要意义。

## 参考文献 References

- [1] Blair J M A, Webber M A, Baylay A J, Ogbolu D O, Piddock L J. Molecular mechanisms of antibiotic resistance [J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2014, 13(1): 42-51
- [2] Taubes G. The bacteria fight back [J]. *Science*, 2008, 321(5887): 356-361
- [3] 王晓, 王新, 郝丹, 唐晓双, 周传丽, 王雅春, 张胜利, 张沅, 俞英. 奶牛乳源大肠杆菌耐药性、毒素基因鉴定及 PFGE 分型研究 [J]. *畜牧兽医学报*, 2014(3): 463-470  
Wang X, Wang X, Hao D, Tang X S, Zhou C L, Wang Y C, Zhang S L, Zhang Y, Yu Y. Study on antibiotic resistance, virulence toxin genes and PFGE patterns of *Escherichia coli* strains isolated from dairy cattle milk [J]. *Chinese Journal of Animal and Veterinary Sciences*, 2014 (3): 463-470 (in Chinese)
- [4] 马长宾, 陈文武, 王忠山, 崔蕾, 郭文, 张子荣. 致犊牛腹泻大肠杆菌的分离鉴定及药敏试验 [J]. *中国动物检疫*, 2015(3): 78-82  
Ma C B, Chen W W, Wang Z S, Cui L, Guo W, Zhang Z R. Isolation, identification and drug susceptibility test of *E coli* strain isolated from calves with diarrhea [J]. *China Animal Health Inspection*, 2015(3): 78-82 (in Chinese)

- [5] Szmolka A, Nagy B. Multidrug resistant commensal *Escherichia coli* in animals and its impact for public health[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2013, 4: 258
- [6] Salipante S J, Barlow M, Hall B G. GeneHunter, a transposon tool for identification and isolation of cryptic antibiotic resistance genes[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2003, 47 (12): 3840-3845
- [7] Aldred K J, Kerns R J, Osheroff N. Mechanism of quinolone action and resistance[J]. *Biochemistry*, 2014, 53 (10): 1565-1574
- [8] Martinez J L, Rojo F. Metabolic regulation of antibiotic resistance[J]. *FEMS Microbiology Review*, 2011, 35 (5): 768-789
- [9] Gruer M J, Bradbury A J, Guest J R. Construction and properties of aconitase mutants of *Escherichia coli* [J]. *Microbiology*, 1997, 143 (Pt 6): 1837-1846
- [10] Allen H K, An R, Handelsman J, Moe L A. A response regulator from a soil metagenome enhances resistance to the  $\beta$ -lactam antibiotic carbenicillin in *Escherichia coli* [J]. *PLOS ONE*, 2015, 10 (3): e120094
- [11] Hallenbeck P L, Kaplan S. Cloning of the gene for phosphoribulokinase activity from *Rhodobacter sphaeroides* and its expression in *Escherichia coli* [J]. *Journal of Bacteriology*, 1987, 169 (8): 3669-3678
- [12] Matthews B W. The structure of *E coli*  $\beta$ -galactosidase[J]. *Comptes Rendus Biologies*, 2005, 328 (6): 549-556
- [13] Kim O B, Uden G. The L-tartrate/succinate antiporter TtdT (YgjE) of L-tartrate fermentation in *Escherichia coli* [J]. *Journal of Bacteriology*, 2007, 189 (5): 1597-1603

责任编辑：杨爱东