

大肠杆菌 *trpBA* 和 *serA* 基因的串联表达

张绪梅^{1,2} 郭长江^{1*} 刘云³ 徐琪寿³

(1. 军事医学科学院卫生学环境医学研究所 天津 300050)

(2. 天津医科大学公共卫生学院 天津 300070)

(3. 军事医学科学院放射医学研究所 北京 100850)

摘要: 大肠杆菌 *trpBA* 基因编码的色氨酸合成酶(tryptophan synthetase, TSase)是色氨酸合成的关键酶; *serA* 基因编码的磷酸甘油酸脱氢酶(D-3-phosphoglycerate-dehydrogenase, PGDH)为 L-丝氨酸合成(色氨酸合成的底物)的关键酶。为了通过基因工程手段来增加色氨酸的产量, 在利用高效的原核表达载体 pET22b(+)分别对 *trpBA* 和 *serA* 基因克隆表达的基础上, 采用 PCR 方法扩增了抗反馈抑制的 *serA* 和 *trpBA* 基因, 将两基因串联于 pET22b(+)载体上, 共构建了 4 种方式的串联质粒, 实现了 2 种蛋白酶在大肠杆菌中的共表达。聚丙烯酰胺电泳分析显示, ABA-I 重组菌株在 37 kD (PGDH)、29 kD(色氨酸合成酶的 α 亚基)、44 kD(β 亚基)处均有明显的蛋白表达带。4 种串联表达质粒重组菌的 TSase 酶活性, 分别比含空载体菌相应酶的活性提高 2~4 倍, PGDH 酶活性分别提高约 2.1~3.6 倍。经摇瓶发酵实验表明酶活性较高的 ABA-I 菌株色氨酸合成量亦最高, 约为对照菌株的 20.2 倍。

关键词: 色氨酸, 大肠杆菌, *serA* 基因, *trpBA* 基因, 串联表达

Co-expression of *trpBA* and *serA* Genes in *Escherichia coli*

ZHANG Xu-Mei^{1,2} GUO Chang-Jiang^{1*} LIU Yun³ XU Qi-Shou³

(1. Institute of Hygiene & Environmental Medicine, Academy of Military Medical Sciences, Tianjin 300050, China)

(2. The Department of Nutrition and Food Hygiene, School of Public Health, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China)

(3. Institute of Radiation Medicine, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850, China)

Abstract: *Escherichia coli trpBA*-encoded tryptophan synthetase (TSase) and *serA*-encoded D-3-phosphoglycerate dehydrogenase (PGDH) are key enzymes in tryptophan and serine biosynthesis pathway, respectively. In order to improve bio-production of tryptophan through bioengineering means, a feedback inhibition resistant *serA* gene was cloned by PCR and co-expressed with *trpBA* gene, which was cloned and expressed before. Four recombinant plasmids were constructed successfully in the recombinant strains. SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis) showed target protein products of 37 kD (PGDH), 29 kD (TSase α subunit), 44 kD (TSase β subunit). The enzyme activity analysis indicated the specific activities of TSase was increased by 2~4-fold, and that of PGDH was increased by 2.1~3.6-fold, compared to the control. High enzyme activities could lead to high tryptophan production by the shake flask fermentation. The amount of tryptophan biosynthesis in ABA-I strain was increased by 20.2 folds compared

with that of the host strains.

Keywords: Tryptophan, *Escherichia coli*, *serA*, *trpBA*, Co-expression

色氨酸作为人和动物自身不能合成而又具有多项生理功能的必需氨基酸, 在医药、食品和饲料添加剂等方面具有广泛的用途。传统色氨酸生产方法主要有蛋白水解提取法、化学合成法、微生物发酵法和酶促转化法, 这 4 种方法分别存在材料来源有限、需多步合成工艺及光学拆分难、周期长、底物价格昂贵等缺点, 因此在工业生产中受到极大限制, 远远满足不了当今世界市场每年万吨以上的实际需求。近年来由于分子生物学技术(特别是基因重组技术和基因组全序列测定技术等)的兴起及代谢工程概念的提出, 为色氨酸的工业化生产注入新的活力^[1]。有目的的设计和构建适合色氨酸生产的代谢路线已成为提高 L-色氨酸产量的有效措施, 也将是今后育种的主要方向。

大肠杆菌中, 色氨酸合成酶(TSase, EC4.2.1.20)是一个具有 $\alpha_2\beta_2$ 亚基结构的异质四聚体, 其 α 、 β 亚基由 *trpBA* 基因编码。该酶能以吲哚和 L-丝氨酸为底物一步酶促合成色氨酸。由于色氨酸合成酶的动力学特征明显优于色氨酸酶, 因此它的开发和应用曾受到国内外研究者的广泛关注^[2,3]。其次, 色氨酸的生产在相当长的一段时间内达不到工业化生产的要求的原因还在于其合成需要多种前体物, 若想进一步提高色氨酸的产量就必需设法增强合成这些前体物的代谢流, 尤其是必须增加市场价格与其相当的重要限制性底物—L-丝氨酸的含量。代谢途径分析表明, *serA* 基因编码的大肠杆菌磷酸甘油酸脱氢酶(PGDH, EC1.1.1.95)是催化 L-丝氨酸生物合成的关键酶。因此本研究将 *serA* 和 *trpBA* 两基因串联于 pET22b(+)载体上, 同时增加色氨酸代谢相关途径中关键酶编码基因的拷贝数, 以使相应酶的产量和活性得以提高, 并研究了它们对色氨酸生物合成的影响, 为进一步探讨色氨酸相关途径多基因之间的相互作用和提高目的菌株的产量奠定基础。

1 材料与与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒: 大肠杆菌(*Escherichia coli*) BL21 作为基因鉴定用的转化受体菌, 其基因型为 $F^- ompT hsdSB(rB^- mB^-) gal dcm(DE3)$ 。DE3-491 菌

株是本室改造的受体菌(即宿主菌经 DE3 溶源化, 在目的菌株染色体上插入一拷贝由 lacUV5 控制的 T7 RNA 聚合酶基因, 并可通过加入 IPTG 诱导表达)。pET22b(+)-*trpBA* 为 pET22b(+)载体中插入 *trpBA* 基因的重组质粒; pET22b(+)-*serA* 为 pET22b(+)载体中插入 *serA* 基因(末端缺失 219 个核苷酸序列, 见文献[4])的重组质粒, 以上两种重组质粒均为本室构建并保存。

1.1.2 工具酶和试剂: *EcoR*、*Hind*、*Bgl*、*Xho*、*BamH*、*Ex Taq* DNA 聚合酶及 T4 DNA 连接酶购自 TaKaRa 公司; 质粒小量提取试剂盒、PCR 产物回收试剂盒为 Promega 公司产品; 蛋白定量试剂盒与吲哚、磷酸吡哆醛、对二甲胺基苯甲醛等酶活测定试剂均为 Sigma 公司产品; 酵母提取物和胰蛋白胨为 Oxoid 公司产品; 其它试剂为国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 PCR 扩增: 根据 GenBank 报道的大肠杆菌 *serA* 基因序列(Gene ID :6059149)及 pET22b(+)载体序列(Novagen Cat. No. 69744-3)。用 DNAClub 软件分析, 设计扩增引物, 并在两端加上合适的酶切位点。引物序列如下: MP1: 5'-GAAGATCTCGA TCCCGCGAAATTA-3'(下划线处为 *Bgl* 酶切位点); SerAP2: 5'-GAAGATCTTTAGTCAGAATACTTGAT CAATTTA-3'(下划线处为 *Bgl* 酶切位点); TrpBAP2: 5'-GAAGATCTTCCGGATATAGTTCCTCCTTTCA-3'(下划线处为 *Bgl* 酶切位点)。

通过 PCR 方法从 pET22b(+)-*serA* 质粒载体上扩增得到 *serA*(带有 T7 启动子)基因, 从 pET22b(+)-*trpBA* 质粒上扩增含有 T7 启动子的 *trpBA* 基因, 测序鉴定其正确性。具体基因操作技术和方法见文献[5], 并略作修改。PCR 反应体系为 50 μ L: 质粒 DNA 1 μ L, 10 mmol/L dNTP 1 μ L, 10 \times buffer 5 μ L, 10 pmol/L MP1、SerAP2(或 TrpBAP2)各 1 μ L, ddH₂O 40 μ L, *Ex Taq* 酶 1 μ L (0.5 U)混合后进行 PCR 扩增。PCR 反应条件为 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 94 $^{\circ}$ C 1 min, 56 $^{\circ}$ C 1 min, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。

1.2.2 DNA 序列的测定: 采用 Sanger 末端终止法,

在 ABI 100 测序仪上进行。

1.2.3 基因表达: 将 pET22b(+)-*serA*、pET22b(+)-*trpBA*、ABA-、ABA-、BAA- 和 BAA- 分别转化到受体菌 DE3-491 后, 挑取单克隆, 提取质粒, 进行限制性酶切分析鉴定其正确性。再划线, 挑单菌落接种于含氨苄青霉素的 LB 培养基中, 37°C 振荡过夜。次日按 1% 接种到 5 mL 的 LB 培养基中, 37°C 振荡培养 2 h~3 h 至 OD_{600} 约为 0.4~0.6 后, 加入 25 mg/L 的 IPTG 诱导 4 h。

1.2.4 SDS-PAGE 凝胶电泳: 12000 r/min 离心 20 min 收集菌体, 2×SDS 上样缓冲液处理, 沸水浴 10 min, 浓缩胶 5%, 分离胶 10% 进行电泳, 考马斯亮蓝 R250 染色。

1.2.5 粗酶液的制备: 将按 1.2.4 方法诱导 4 h 后的菌液 4°C 离心, 收集菌体, 用 1 mol/L pH 7.8 的 Tris-HCl 缓冲液洗涤 2 遍, 按 1 g 湿菌悬于 5 mL 缓冲液中, 200 W 超声破碎(每次 30 s, 间隔 30 s, 共 40 次), 12000 r/min、4°C 离心 20 min, 上清即为粗酶液。

1.2.6 色氨酸合成酶生物学活性测定: *trpBA* 基因编码的色氨酸合成酶的活性测定见文献[6]。PGDH 酶活性的测定见文献[7], 并略加修改, 1 mL 的反应体系中含有 40 mmol/L 磷酸钾缓冲液(pH 7.5)、1.0 mmol/L DTT、0.25 mmol/L NADH、5 mmol/L α -酮戊二酸(α KG, α -ketoglutaric acid)和 10 μ g~300 μ g 的已纯化蛋白。通过测定样品在 340 nm 条件下的紫外吸光值, 计算反应体系中 NADH 的减少量得到酶

的活性。蛋白浓度测定按试剂盒说明进行。PGDH 的 1 个活力单位定义为: 在 37°C 条件下, 每分钟减少 1 nmol NADH 所需酶量。

1.2.7 对-二甲基胺基苯甲醛比色法测定色氨酸合成量: 将单菌落接种于含氨苄青霉素的 LB 培养基中活化过夜, 次日离心收集菌体, 并用生理盐水洗涤后, 按照 5% 接种量分别接种于含氨苄青霉素的 M63 培养基(以葡萄糖为碳源), 37°C 培养至 OD_{600} 达到 1.0 后加入 IPTG 诱导培养 48 h 左右。取 1 mL 发酵液, 加入 0.5 mL 对-二甲基胺基苯甲醛溶液与 10.4 mL 浓盐酸的混合液, 完毕后于 25°C \pm 1°C, 黑暗下保温, 反应 30 min, 再加入 0.1 mL 1% 的亚硝酸钠溶液, 继续保温 60 min 后于波长 600 nm 下比色。对照以 1 mL 0.1 mol/L NaOH 代替发酵液。

2 结果

2.1 *serA*、*trpBA* 基因的扩增

分别以 pET22b(+)-*trpBA* 和 pET22b(+)-*serA* 质粒载体为模板, 用方法 1.2.1 设计的引物扩增得到 *trpBA* PCR 产物(含 T7 启动子)大小约为 2.5 kb(图 1A), *serA* PCR 产物(含 T7 启动子)大小约为 1.12 kb(图 1B)。与预计大小相符, 说明产物是特异的。选出扩增得到目的片段的重组质粒, 测序分析结果与 GenBank 报道的序列一致。

2.2 *serA* 和 *trpBA* 基因串联表达重组子的构建

由于基因的排列顺序、启动子的类型和数量及其终止子的有无都会影响到所串联的两个基因的表

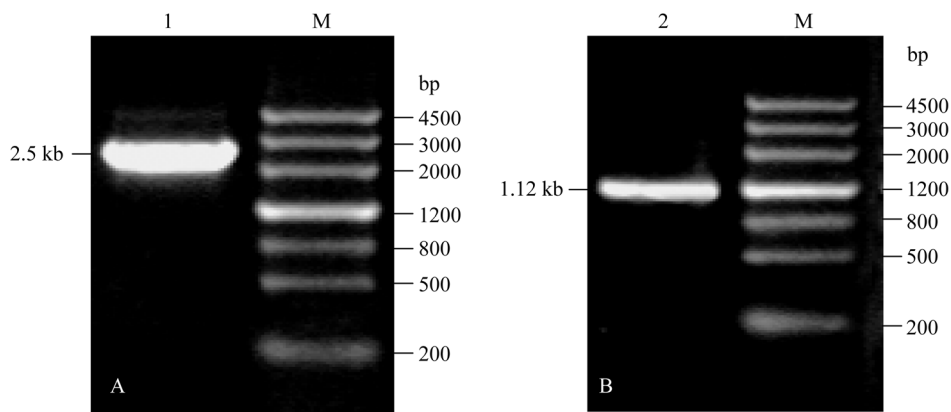


图 1 *trpBA*、*serA* 基因 PCR 扩增

Fig. 1 The amplification of *trpBA* and *serA* gene by PCR

M: DNA 分子量标准; 1: *trpBA* 基因(含 T7 启动子)PCR 产物; 2: *serA* 基因(含 T7 启动子)PCR 产物。

M: DNA marker III; 1: PCR product of *trpBA* gene with T7 promoter; 2: PCR product of *serA* gene with T7 promoter.

达情况, 因此我们设计了两基因不同排列顺序和两基因各自独立的启动子方向相同或相反 4 种组合情况, 分别命名为 BAA- (*serA* 位于 *trpBA* 之前, 启动子在载体上的方向相同)、BAA- (*serA* 位于

trpBA 之前, 启动子方向相反)、ABA- (*trpBA* 位于 *serA* 基因之前, 启动子方向相同)、ABA- (*trpBA* 位于 *serA* 基因之前, 启动子方向相反)。串联重组子的构建过程如图 2 所示。

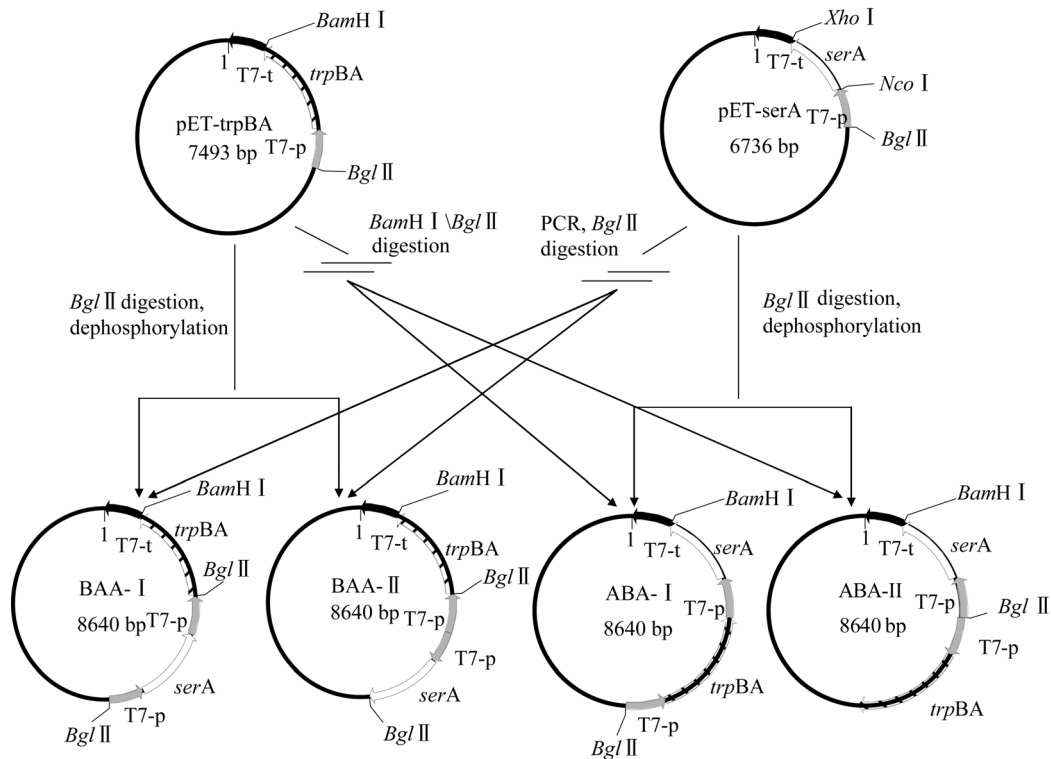


图 2 *trpBA* 和 *serA* 基因串联表达质粒的构建

Fig. 2 Construction of recombinant plasmids of *trpBA* and *serA* co-expression

2.3 二基因串联表达重组子的鉴定

将 pET22b(+)-*trpBA*、pET22b(+)-*serA* 质粒载体及相应的 PCR 扩增产物进行酶切、去磷酸化、连接、转化入大肠杆菌 BL21, 然后挑菌落、提取质粒, 每一种串联质粒采用两种酶切方法进行酶切鉴定, 以确定连接后的排列顺序。ABA- 串联质粒分别经 *EcoR* +*Hind* 和 *Bgl* +*Xho* 双酶切后, 所得小片段大小约为 2.93 kb 和 3.22 kb; ABA-II 串联质粒经 *EcoR* +*Hind* 和 *Bgl* +*Xho* 双酶切后, 所得小片段大小约为 1.21 kb 和 1.05 kb, 见图 3。BAA-I 串联质粒经 *EcoR* 和 *BamH* 单酶切后, 所得小片段大小约为 2.27 kb 和 2.85 kb; BAA- 串联质粒经 *EcoR* 和 *BamH* 单酶切后, 所得小片段大小分别约为 3.12 kb 和 2.57 kb, 见图 4。

2.4 二基因串联质粒在 DE3-491 中的表达

取诱导后的全菌体离心、收集沉淀, 分别进行

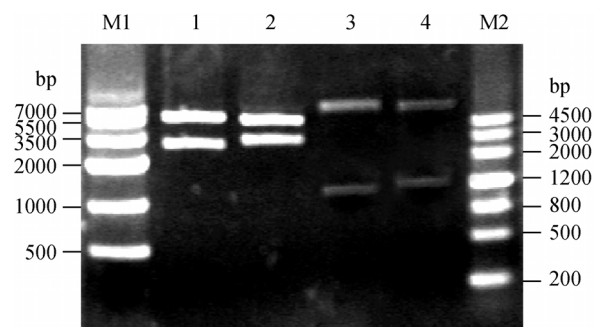


图 3 ABA-I、ABA-II 串联质粒的酶切鉴定

Fig. 3 Digestion of ABA- and ABA- recombinant plasmids

M1、M2: DNA 分子量标准; 2: ABA- 重组质粒 *EcoR* +*Hind* 双酶切; 3: ABA- 重组质粒 *Bgl* +*Xho* 双酶切; 4: ABA- 重组质粒 *Bgl* +*Xho* I 双酶切; 5: ABA- 重组质粒 *EcoR* +*Hind* 双酶切。

M1: DNA marker IV; 2: ABA- /*EcoR* I+*Hind* III; 3: ABA-II/ *Bgl* II+*Xho* I; 4: ABA-I/*Bgl* II+*Xho* I; 5: ABA-I/*EcoR* I+*Hind* III; M2: DNA marker III.

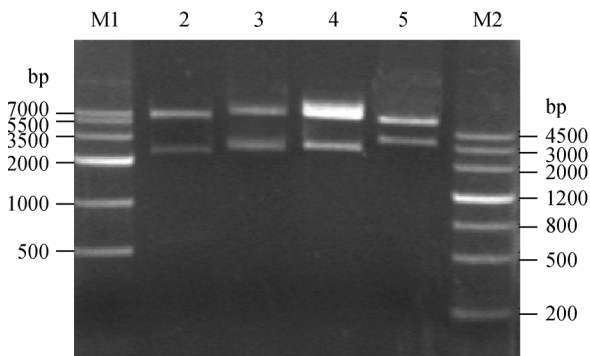


图4 BAA-I、BAA-II 串联质粒的酶切鉴定

Fig. 4 Digestion of BAA-I and BAA-II recombinant plasmids

M1、M2: DNA 分子量标准; 2: BAA-I 重组质粒 *EcoRI* 单酶切; 3: BAA-I 重组质粒 *BamHI* 单酶切; 4: BAA-II 重组质粒 *EcoRI* 单酶切; 5: BAA-II 重组质粒 *BamHI* 单酶切。

M1: DNA marker IV; 2: BAA-I/*EcoRI*; 3: BAA-I/*BamHI*; 4: BAA-II/*EcoRI*; 5: BAA-II/*BamHI*; M2: DNA marker III.

15% SDS-PAGE 电泳检测。结果表明, 经 IPTG 诱导后, 二基因串联表达 4 种重组质粒 BAA-I、BAA-II、ABA-I、ABA-II 在大肠杆菌 DE3-491 中蛋白表达水平有显著差异。ABA-I 重组菌株在分子量 37 kD(PGDH)、29 kD(色氨酸合成酶 α 亚基)、44 kD(色氨酸合成酶 β 亚基)处均有明显的蛋白表达带; BAA-I、BAA-II 在 44 kD 处蛋白表达明显; ABA-II 在 44 kD、29 kD 处有明显的蛋白表达, 且与预计分子量大小一致(图 5)。

2.5 二基因串联表达重组菌表达的目的蛋白在 DE3-491 中酶活性测定

对含有不同质粒的重组菌株进行粗酶液的相应酶活性测定, 计算出粗酶的比活, 以携带空载体 pET22b(+)质粒的 DE3-491 菌的酶比活为 1, 计算携带其它表达重组质粒的大肠杆菌粗酶的相对比活。结果发现, 携带 pET22b(+)-*trpBA* 质粒的宿主菌(491-BA), 其 TSase 酶活性提高 3.7 倍(491-A); 携带 pET22b(+)-*serA* 质粒的宿主菌, 其 PGDH 活性提高 3 倍; BAA-I、ABA-I、BAA-II、ABA-II 串联表达质粒菌株 TSase 酶活性, 分别比含空载体菌相应酶的活性提高 2、3.6、3.1、4 倍左右, PGDH 酶总活性比对照菌分别提高约 2.1、1.5、1.8、3.6 倍(图 6)。

2.6 基因串联表达对色氨酸发酵产量的影响

大肠杆菌工程菌在液体种子培养基中活化过夜后, 接种于装有发酵培养基的锥形瓶中进行发酵。按方法 1.2.7 测定发酵液中的色氨酸产量。以没有携带外源基因的亲株(即 DE3-491 菌株)为对照, 它的

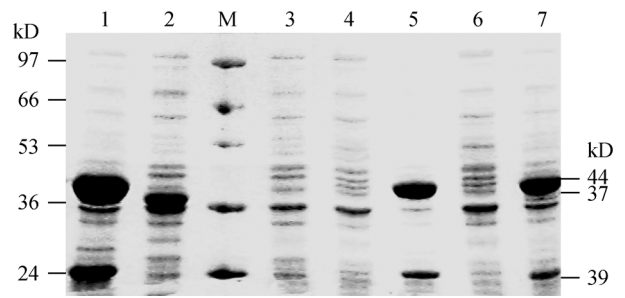


图5 *trpBA*、*serA* 单独及串联表达的聚丙烯酰胺电泳分析

Fig. 5 SDS-PAGE analysis of total protein for the single and co-expression of *trpBA* and/or *serA* in *E. coli* DE3-491

1、2、3、4、5、6、7 :含 pET22b(+)-*trpBA*、pET22b(+)-*serA*、pET22b(+)-BAA-I、ABA-II、BAA-II、ABA-I 的大肠杆菌 DE3-491 菌株所表达蛋白; M: 蛋白质分子量标准。

1: DE3-491/pET22b(+)-*trpBA*; 2: DE3-491/pET22b(+)-*serA*; 3: DE3-491/pET22b(+); 4: DE3-491/BAA-I; 5: DE3-491/ABA-II; 6: DE3-491/BAA-II; 7: DE3-491/ABA-I; M: Protein molecular weight markers.

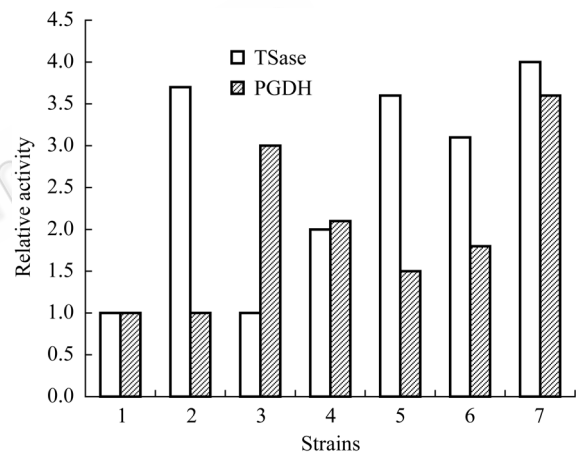


图6 串联重组子 TSase, PGDH 相对酶活性比较

Fig. 6 Relative activity of the enzymes TSase, PGDH in crude extracts of recombinants

1、2、3、4、5、6、7 :含 pET22b(+), pET22b(+)-*trpBA*、pET22b(+)-*serA*、BAA-I、ABA-I、BAA-II、ABA-II 的大肠杆菌 DE3-491 粗酶液相对比活。

1: DE3-491/pET22b(+); 2: DE3-491/pET22b(+)-*trpBA*; 3: DE3-491/pET22b(+)-*serA*; 4: DE3-491/BAA-I; 5: DE3-491/ABA-II; 6: DE3-491/BAA-II; 7: DE3-491/ABA-I.

色氨酸发酵产量设定为 1.00, 其余工程菌的色氨酸摇瓶发酵产量与之进行比较, 获得各基因工程菌株的色氨酸相对产量, 即工程菌产量与对照菌产量之比。其结果列于表 1。由表 1 可看出: TSase 酶活性和 PGDH 酶活性均较高的 ABA-I 菌株其产量亦相对较高, 是对照菌株的 20.2 倍; 其它菌株的产量也有不同程度的提高, 其中 491-BA、491-A、BAA-I、ABA-I、BAA-II 分别为对照菌色氨酸产量的 4.9、

表 1 工程菌株的色氨酸发酵产量比较
Table 1 Tryptophan production of engineered strains compare with that of the host strain

工程菌株 Engineered strains	外源基因 Heterologous genes	摇瓶培养产量 Yields in flask culture (mg/L)	色氨酸相对产量 Relative yields of <i>trp</i> (Times)
DE3-491(Control)	pET22b(+) plasmid	2.0	1.0
DE3-491-BA	<i>trpBA</i>	9.8	4.9
DE3-491-A	<i>serA</i>	12.4	6.2
BAA-	<i>serA trpBA</i> cis-promoter	24.2	12.1
BAA-	<i>serA trpBA</i> trans-promoter	26.6	13.3
ABA-	<i>trpBA serA</i> cis-promoter	40.4	20.2
ABA-	<i>trpBA serA</i> trans-promoter	14.0	7.0

6.2、12.1、7、13.3 倍。

3 讨论

代谢物质的最终形成需要多个关键酶的协同作用。为了使代谢流最大限度地流向目的产物,故需要同时适量地表达多个关键酶,以改变多个关键酶的酶量和酶活性。一种方法是通过两种共存质粒来实现^[8,9];另一种方法便是使两个基因在同一质粒中共表达^[10]。双质粒表达系统虽可在同一菌株中共表达,但鉴于资源的限制、质粒的不相容性以及质粒稳定性的考虑,因此我们采用了 pET22b(+)单质粒多基因串联表达的策略。在单基因 *trpBA*、*serA* 克隆表达研究的基础上,我们进行了双基因串联表达重组子的构建。据本实验所获得的 4 种串联方式的蛋白表达状况分析,由于两基因串联后其前后顺序、顺反方向各不相同,故它们的表达水平存在显著差异,这说明了控制蛋白表达因素的多样性和复杂性。因此在研究蛋白表达时,尤其多蛋白共表达时,要多种因素综合考虑,比如启动子的种类与位置、基因的前后与顺反排列顺序、基因片段与载体在空间结构上的匹配程度等等。

另外,从各串联重组菌的酶活性测定结果来看,*trpBA*、*serA* 两基因串联表达时,其 TSase 和 PGDH 酶活力与 *trpBA*、*serA* 串联前单独表达时相近,这与吴永庆等^[11]所报道的多基因在含 p_{trp} 启动子的质粒上共表达比单独表达时活性降低的结果有所不同。我们认为尽管所串联基因在共表达和单独表达时蛋白表达量可能存在显著差异,本实验中 *trpBA*、*serA* 单基因重组菌株的蛋白表达量显著高于共表达菌株(见图 5),但往往在蛋白表达量较高的情况下,其活性的大小与表达量之间并非呈线性关系,推测

原因可能为各基因单独表达时常导致蛋白的过量表达,形成大量不溶性的包涵体进而影响到其活性。

本研究在对基因 *serA* 和 *trpBA* 分别进行克隆与表达基础上,将两基因以多种方式串联在表达载体 pET22b(+)中,实现了两个基因分别在各自启动子下的共表达,最后对重组菌表达的相应酶的酶活性进行了检测,筛选出 TSase 和 PGDH 酶活性水平较高的重组菌株 ABA-,并通过摇瓶发酵发现该菌株色氨酸产量亦相对较高(约 40.4 mg/L),为对照菌的 20.2 倍。最近,于金龙等^[12]对色氨酸生物合成途径中的关键基因 *aroG* 和 *trpED* 进行了串联表达,并将之转入 *tnaA* 和 *trpR* 基因双敲菌(产量约为 168 mg/L)中,色氨酸产量提高到 820 mg/L(约 17.1 倍)。可见由于色氨酸合成代谢途径较漫长及其代谢途径调控机制的复杂性,使得目前运用代谢工程取得工业化的产量尚面临一定的困难。因此今后我们需对通路中的其它限制性因素进行改造,并将构建的重组质粒转入本身性状相对优良的选育菌株(如易于分泌色氨酸或经代谢类似物筛选的抗色氨酸反馈抑制菌株等)中,以期获得高产量的色氨酸基因工程菌。

参 考 文 献

- [1] 张绪梅,郭长江,李剑欣,等. 基因工程在 L-色氨酸生产中的应用研究进展. 军事医学科学院院刊, 2005, 29(4): 379-382.
- [2] 恽定方,刘玉方,蔡金科. 酵母菌色氨酸合成酶基因的克隆与表达. 微生物学报, 1989, 29(3): 174-179.
- [3] Joachim WS, Klaus M, Matthias R, et al. Metabolic design based on a coupled gene expression-metabolic network model of tryptophan production in *Escherichia coli*.

- Metabolic Engineering*, 2004, 6: 364–377.
- [4] 张绪梅, 郭长江, 刘云, 等. 大肠杆菌 PGDH 末端缺失突变体的构建及抗反馈抑制效应分析. *中国生物化学与分子生物学报*, 2006, 22(10): 806–810.
- [5] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T, *et al.* *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2nd ed. The Science Press, 2002.
- [6] Zhao G, Winkler ME. A novel α -Ketoglutarate reductase activity of the *serA*-encoded 3-phosphoglycerate dehydrogenase of *Escherichia coli* K-12 and its possible implications for human 2-hydroxyglutaric aciduria. *J bacteriol*, 1996, 178(1): 232–239.
- [7] 徐世华, 戚天庆. 创新霉素对其大肠杆菌抗性变株色氨酸合成途径酶合成的促进作用. *中国医学科学院学报*, 1990, 12(1): 25–29.
- [8] 范立强, 袁勤生, 吴祥甫. 双质粒系统共表达大肠杆菌肉碱脱水酶基因 *CaiB* 及其辅酶合成基因 *CaiE*. *生物化学与生物物理学报*, 2002, 34(1): 104–108.
- [9] Held D, Yaeger K, Novy R. New coexpression vectors for expanded compatibilities in *E. coli*. In *Novations*, 2003, 18: 4–6.
- [10] 李永辉, 刘云, 王世春, 等. 大肠杆菌 *ppsA* 和 *tktA* 基因的串联表达. *生物工程学报*, 2003, 19(3): 301–306.
- [11] 吴永庆, 江培翊, 范长胜, 等. 大肠杆菌 *ppsA*, *pckA* 基因的克隆与串联表达. *复旦学报(自然科学版)*, 2002, 41(1): 31–35.
- [12] 于金龙, 王静, 李剑欣, 等. 大肠杆菌色氨酸生物合成途径关键酶的调控研究. *生物工程学报*, 2008, 24(5): 844–850.

稿件书写规范

高校教改纵横栏目简介及撰稿要求

“高校教改纵横”栏目,原“高等院校教学”,是中国微生物学会主办的科技期刊中唯一的教学类栏目,也是中国自然科学核心期刊中为数不多的教学栏目。该栏目专为微生物学及其相关学科领域高校教师开辟,一方面为高校微生物学学科的教师提供一个发表论文的平台,同时微生物关联学科的一部分确实优秀的论文也可以在此发表,是微生物学及相关领域教学研究、交流、提高的园地。

本栏目的文章有别于其它实验类研究报告,特色非常鲜明。要求作者来自教学第一线,撰写的稿件内容必须要有新意、要实用,不是泛泛地叙述教学设计与过程,而是确实有感而发,是教学工作中的创新体会,或者在教学中碰到的值得商榷的、可以与同行讨论的有价值的论题。在内容选材上应该有鲜明的特点和针对性,做到主题明确、重点突出、层次分明、语言流畅。教师的教学思路应与时俱进,注意将国内外新的科技成果和教学理念贯穿到教学之中,只有这样才能真正起到教与学的互动,促进高校生物学教学的发展,更好地培养出国家需要的高科技创新人才。这也是本栏目的目的所在。

同时,为了给全国生物学领域的教学工作者提供一个更广阔更高层次的交流平台,本栏目还开辟了“精品教学”版块,原“名师讲堂”。邀约相关生命科学领域,如微生物学、分子生物学、生物医学、传染病学、环境科学等的教学名师、知名科学家就教学和学生培养发表观点,推荐在教学改革、教学研究、引进先进教学手段或模式以及学生能力培养等方面有突出成绩的优秀论文,为高校教师以及硕士、博士研究生导师提供一个可资交流和学习的平台,促进高校教学和人才培养水平的提高。

欢迎投稿!欢迎对本栏目多提宝贵意见!