



## 专论与综述

## 影响微生物互作的重要基因研究进展：以大肠杆菌为例

李贝贝 朱晗钊 张琦 杨鹏 金一 何晓青\*

北京林业大学生物科学与技术学院 北京 100083

**摘要：**微生物在自然界中广泛存在，微生物间的相互作用对群落结构和功能有重要影响。目前已经对微生物相互作用的机制给予了很大的关注，通过高通量测序技术和统计学分析方法的结合可以定位获得影响菌株互作的重要基因。为了深入研究微生物相互作用的遗传机制，本文以大肠杆菌(*Escherichia coli*)为例，综述了与大肠杆菌运动性、耐药性、营养物质吸收和代谢调节相关的基因在互作条件下发挥的作用，并从这几个方面分别阐述了大肠杆菌互作遗传机制。总之，这些基因在大肠杆菌与其他微生物互作中发挥重要作用，同时增强了对细菌互作机制的理解，为今后研究更复杂的微生物群落互作遗传机制奠定了理论基础。

**关键词：**大肠杆菌，基因，微生物互作

## Research progress in important genes affecting microbial interactions: take *Escherichia coli* as an example

LI Beibei ZHU Hanzhao ZHANG Qi YANG Peng JIN Yi HE Xiaoqing\*

College of Biological Sciences and Biotechnology, Beijing Forestry University, Beijing 100083, China

**Abstract:** Microorganisms exist widely in nature, and the interactions between microorganisms have an important impact on community structure and function. At present, great attention has been paid to the mechanism of microbial interactions, and the important genes affecting the growth of an individual microorganism in the interactions have been identified by high-throughput genome sequencing and statistical analysis. In order to further study the genetic mechanism of microbial interactions, the role of genes related to motility, drug resistance, nutrient absorption and metabolic regulation in *Escherichia coli* under the interaction conditions was reviewed in this paper. The genetic mechanism of interactions among *Escherichia coli* and other microorganisms was discussed from these aspects. In general, these genes are very important for the survival of *E. coli*. These studies enhance our understanding of the mechanism of bacterial interactions, and lay a theoretical foundation for the future study of more complex genetic mechanisms of microbial community interactions.

**Keywords:** *Escherichia coli*, gene, microbial interactions

**Foundation items:** National Natural Science Foundation of China (31971398, 31700633); Science and Technology Service Network Initiative (KFJ-STZ-ZDTP-036); Innovation Program for Under-Graduate Students in Beijing Forestry University (S202010022077)

\*Corresponding author: E-mail: lenahe@bjfu.edu.cn

**Received:** 08-12-2020; **Accepted:** 29-01-2021; **Published online:** 18-03-2021

**基金项目：**国家自然科学基金(31971398, 31700633); 中国科学院科技服务网络计划(KFJ-STZ-ZDTP-036); 北京林业大学大学生创新计划(S202010022077)

\*通信作者: E-mail: lenahe@bjfu.edu.cn

**收稿日期：**2020-12-08; **接受日期：**2021-01-29; **网络首发日期：**2021-03-18

自然界中微生物有着极高的丰富度,微生物之间的相互作用影响着人类健康、环境物质降解利用和元素循环驱动等,它们间的相互作用为维持生态系统的稳定起到重要作用<sup>[1-4]</sup>。近20年来,组学与大数据等技术发展和创新,为攻克细菌群体复杂性研究提供了机遇和可能并获得了长足的发展,使得细菌细胞之间的相互作用和相互关系等社会学行为和机制成为现代微生物学研究的热点,促进了微生物相互作用在疾病控制、粮食生产、气候变化缓解和生物多样性保护方面的认识<sup>[5-7]</sup>。近年来随着高通量测序技术的发展,研究者已经获得了越来越多的基因数据,同时也开始认识到关键基因在物种的作用方式中起着重要的作用,但对这些关键基因如何参与微生物相互作用的了解依然十分有限<sup>[8-9]</sup>。

细菌是微生物群落生态学中研究最多的微生物之一,大肠杆菌(*Escherichia coli*)作为细菌的模式生物和条件病原菌,周身鞭毛,具有运动性,广泛存在于土壤、水体、动植物等环境中。研究发现大肠杆菌群落中存在复杂的相互作用<sup>[10]</sup>,它们竞争资源<sup>[11]</sup>,通过产生有毒代谢产物相互抑制<sup>[12]</sup>,或通过互养作用促进彼此生长<sup>[13]</sup>,或调整自身的新陈代谢、诱导应激保护机制应对不利环境<sup>[14]</sup>。

He等将大肠杆菌和金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)混合培养获得生长量表型数据,全基因组重测序技术获得基因型数据,采用全基因组关联分析(Genome-Wide Association Studies, GWAS)将表型和基因型相结合,定位得到影响大肠杆菌互作的显著基因<sup>[9,15-18]</sup>。Morin等<sup>[10]</sup>实验研究大肠杆菌和蜂房哈夫尼亚菌(*Hafnia alvei*)、白地霉(*Geotrichum candidum*)、卡地干酪青霉(*Penicillium camemberti*)两两互作及群落生长,利用随机条形码转座子序列(Random Barcode Transposon Sequencing, RB-TnSeq)、转录组测序(RNASeq)与DESeq2统计模型结合获得互作条件下对大肠杆菌生存重要的基因。LaSarre等<sup>[19]</sup>研究

将大肠杆菌和沼泽红假单胞菌(*Rhodopseudomonas palustris*)互利共生培养,采用随机条形码转座子测序和适应度分析确定了影响大肠杆菌生长的基因。Barber等<sup>[20]</sup>利用进化实验研究大肠杆菌和酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)间的共存,分别对2个物种的原始菌株和进化菌株测序,筛选出了突变频率较高的基因,基因功能验证实验表明一些突变基因可以改变大肠杆菌和酿酒酵母间的相互作用。

本文综述了与大肠杆菌运动性、耐药性、营养吸收和代谢调节相关基因,研究互作条件下这些基因对大肠杆菌生长的重要性。深入研究基因在大肠杆菌与其他微生物互作中发挥的作用,以期为研究更复杂的微生物群落互作机制奠定基础。

## 1 运动性相关基因

运动是细菌最消耗能量的行为之一,但当细菌生存环境中营养物质缺乏时,运动基因却上调表达,这是因为细菌运动有助于增强趋化性介导的养分吸收<sup>[21]</sup>。在大肠杆菌与微生物互作的环境中,随着菌株群体密度的增加,大肠杆菌面临养分压力、其他菌株产生毒素引起细胞受损伤的压力等,此时大肠杆菌可能上调表达运动相关的基因,运动到远处获取营养物质或躲避对其有毒的代谢产物<sup>[22]</sup>。

大肠杆菌趋化性系统感知环境中化学物质的浓度变化,调节自身运动状态以获取有利的营养物质或躲避对细菌有毒的代谢产物<sup>[21]</sup>。甲基受体蛋白(Methylaccepting Chemotaxis Proteins, MCPs)与适配蛋白CheW和组氨酸激酶CheA组成三元复合体,MCPs与环境中的刺激分子结合调节CheA蛋白磷酸化水平。当环境中引诱剂和MCP绑定减少时,CheA蛋白自磷酸化,然后将磷酸基团转移到CheB蛋白和响应调节蛋白CheY,磷酸化CheY(CheY-P)与鞭毛马达上的FliM蛋白结合,驱动细菌朝引诱剂顺时针运动<sup>[23]</sup>。此外,趋化反应适应

性由 CheB 和 CheR 蛋白调节, CheR 对 MCPs 进行甲基化修饰, CheB 使 MCPs 去甲基化, 从而调节细菌对引诱剂和毒物的应答能力<sup>[24]</sup>。

大肠杆菌鞭毛基因表达分为 3 个不同的层次, 外界刺激信号调控 1 类启动子 *flhDC* 的转录, FlhD 和 FlhC 是 2 类启动子的转录激活因子, 2 类启动子主要是鞭毛基体和鞭毛钩基因, 并且作为 3 类启动子的转录激活因子, 3 类启动子控制着运动蛋白和趋化蛋白, 引导细胞运动<sup>[25]</sup>。

有研究表明与单独培养相比, 混合培养条件下大肠杆菌趋化性尤为明显<sup>[26]</sup>。野生型、运动但没有趋化性的  $\Delta cheY$  大肠杆菌 MG1655 在以核糖为唯一碳源无营养物质梯度的条件下静置培养, 2 种基因型的大肠杆菌单独培养生长曲线无明显差异, 而将这 2 种菌混合培养时, 任何生长阶段野生型菌株的细胞密度值远大于突变型菌株<sup>[26]</sup>。

2 株基因型不同的大肠杆菌混合培养, 研究在运动能力和空间竞争驱动下双方趋于共存的机制, 结果发现运动慢的菌株生长速度快占据原始

位置, 驱赶运动快生长慢的菌株向远处移动获取营养物质; 为了进一步揭示菌株运动差异, 基因组测序检测到菌株鞭毛结构基因多个氨基酸发生替换, 例如构成鞭毛基体的基因 *flgH*、*flgI*、*fliG*、*fliM*、*fliN*、*fliF*、*motB*, 鞭毛钩和鞭毛丝连接基因 *flgK*, 鞭毛丝基因 *fliC* 等<sup>[27]</sup>。FliG、FliM、FliN 蛋白构成鞭毛基体 C 环调节鞭毛的旋转方向, FliF 蛋白构成鞭毛基体的 MS 环, C 环和 MS 环组成马达转子; MotA 和 MotB 复合体构成马达中的非旋转部分即定子, FliG 可与 MotA 结合从而连接转子和定子, 转子与定子的相互作用激活了定子中的离子通道,  $H^+$  沿着电化学梯度通过通道, 推动鞭毛马达旋转<sup>[28]</sup> (图 1)。

## 2 耐药性相关基因

环境中营养物质丰富时, 细菌代谢加快, 物种间资源竞争加剧, 菌株为争夺营养物质可能产生有毒代谢产物抑制其他菌的生长<sup>[29]</sup>。在群体感应系统的调节下, 与大肠杆菌互作的菌株利用环境中信号分子的浓度监测自身和大肠杆菌细胞数

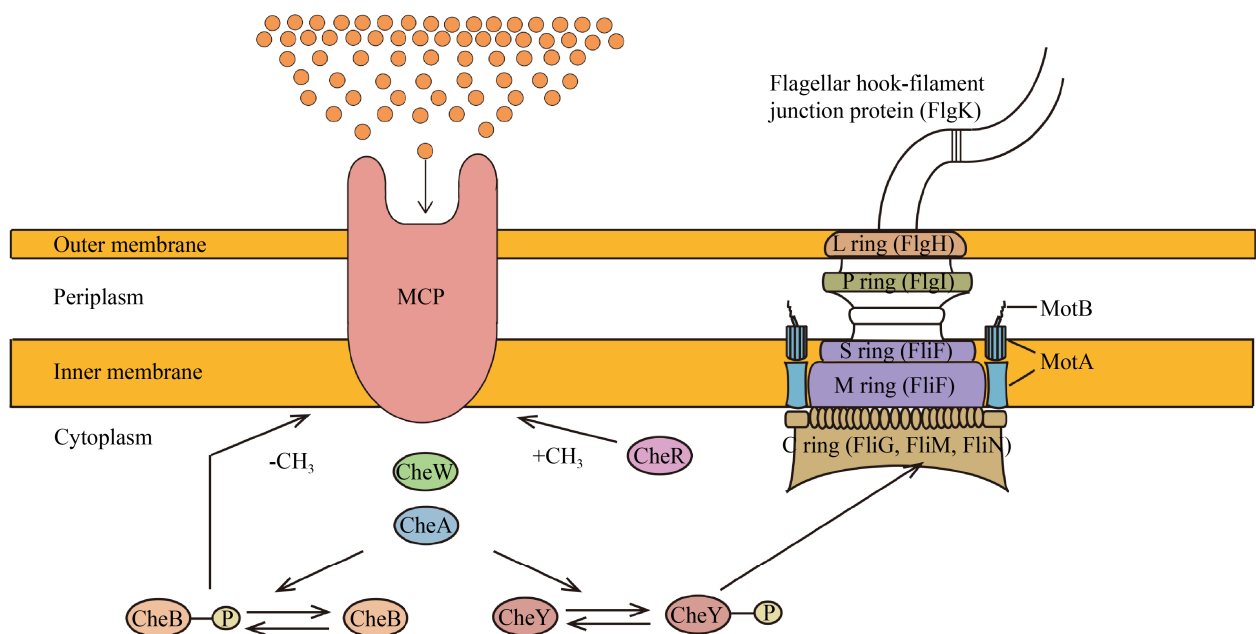


图 1 大肠杆菌运动相关基因<sup>[28]</sup>

Figure 1 Motion related genes in *Escherichia coli*<sup>[28]</sup>

量的变化,并协调群体特异性基因的表达,产生抗生素等各种毒力因子<sup>[30]</sup>。然而大肠杆菌外膜具有对细胞毒性物质的抗药性以及位于细胞膜上的多药外排泵系统,它们能抵抗互作菌株产生的有毒代谢产物,这对大肠杆菌在有毒代谢产物环境中的生存至关重要<sup>[31]</sup>。

对大肠杆菌有毒的代谢产物可能通过菌株通道蛋白进入细胞。Khare 等<sup>[22]</sup>发现大肠杆菌在不同浓度的铜绿假单胞菌培养基中生长,铜绿假单胞菌浓度越高,大肠杆菌细胞密度越小,部分原因是铜绿假单胞菌分泌毒性化合物抑制了大肠杆菌的生长。研究发现 *ompC* 基因敲除的大肠杆菌与铜绿假单胞菌混合培养,降低了铜绿假单胞菌对大肠杆菌的抑制作用,绿脓杆菌素可能通过 OmpC 孔蛋白进入大肠杆菌细胞内<sup>[22]</sup>。

与大肠杆菌互作的菌株产生有毒的代谢产物进入大肠杆菌细胞内,大肠杆菌激活耐药泵将毒性代谢产物转运出细胞<sup>[31]</sup>。耐药节结化细胞分化(Resistance Nodulation Division, RND)家族是耐药泵的一种,其在革兰氏阴性菌耐药性方面起着重要作用,RND 家族最典型的是 AcrAB-TolC 耐药

泵,包括位于细菌内膜的转运外排蛋白 AcrB,位于周质空间的膜融合蛋白 AcrA 以及外膜蛋白 TolC<sup>[32]</sup>。在质子动力的驱动下,AcrB 在细胞周质空间捕获毒性代谢产物,然后通过 TolC 蛋白将其转运到细胞外,AcrB 与 TolC 之间的相互作用由辅助蛋白 AcrA 介导<sup>[33]</sup>。研究表明与野生型菌株相比,*tolC* 基因敲除菌株和 *acrAB* 基因敲除菌株表现出更高的抗生素敏感性,突变株对氯霉素、红霉素的最小抑菌浓度值降低,严重损害菌株耐药性<sup>[34-36]</sup>。MacAB-TolC 是在大肠杆菌 ATP 结合盒超家族(ATP-Binding Cassette Family, ABC)中首先发现的耐药泵,MacB 与外膜蛋白 TolC 和周质伴侣蛋白 MacA 形成复合体,驱动大肠杆菌细胞周质空间内的大环内酯类抗生素外排,还驱动多肽毒力因子的转运,转运过程通过 MacB 耦合到 ATP,其水解为转运提供能量<sup>[32,37-39]</sup>。EmrAB-TolC 耐药泵属于主要易化子超家族(Major Facilitator Superfamily, MFS),由膜融合蛋白 EmrA、转运蛋白 EmrB 和外膜通道蛋白 TolC 共同构成一个三元外排系统,作用机制是通过氢离子与毒性代谢产物的交换完成外排过程,向细胞外排出四环素和萘啶酸等<sup>[40]</sup>(图 2)。

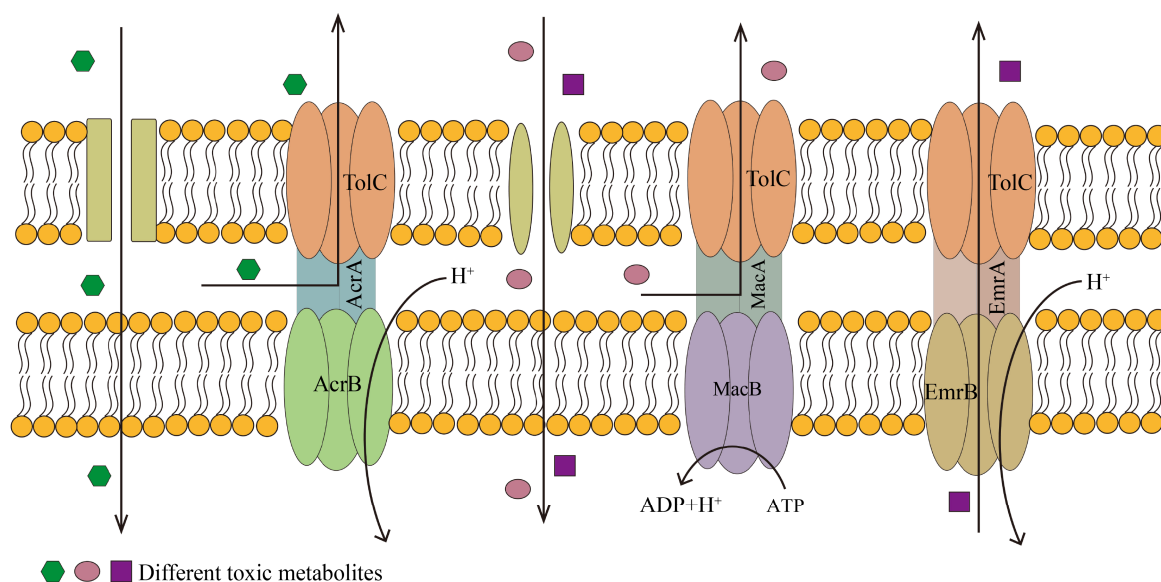


图 2 毒性代谢产物进出大肠杆菌细胞机制<sup>[40]</sup>

Figure 2 Mechanism of toxic metabolites entering and leaving *Escherichia coli* cells<sup>[40]</sup>

### 3 营养吸收相关基因

大肠杆菌的生长繁殖必须从环境吸收营养物质, 通过新陈代谢将这些营养物质转化成自身新的细胞物质, 将代谢活动产生的废物排出体外。互养体系中大肠杆菌与互作菌株可以为彼此提供营养物质, 群落物种得以共存。

互养是微生物间相互作用的一种特殊机制, 即一种微生物消耗另一种微生物排出的代谢物<sup>[41]</sup>, 减轻了群落中微生物的代谢负担, 这种现象多发生在极端或营养不良的环境中, 互养不仅促进了群落微生物的生长, 而且促进了环境中物种多样性<sup>[42]</sup>。在大肠杆菌互作中广泛存在互养现象,  $\Delta proC$ -GFP 脯氨酸营养缺陷型大肠杆菌和  $\Delta trpC$ -GFP 色氨酸营养缺陷型大肠杆菌混合培养, 由于菌株合成的氨基酸可以释放到细胞外, 2 种菌株彼此交换所需氨基酸获得生长<sup>[43]</sup>。厌氧条件下大肠杆菌和沼泽红假单胞菌互利共生培养, 大肠杆菌排出的葡萄糖发酵产物为沼泽红假单胞菌提供了碳源, 沼泽红假单胞菌排出 2 种菌需要的营养物质  $NH_4^+$ , 促进 2 种菌的生长繁殖<sup>[44]</sup>。乳糖培养基中,  $\Delta metB$  甲硫氨酸营养缺陷型大肠杆菌与甲硫氨酸过量表达的 *metA* 和 *metJ* 基因突变的鼠伤寒沙门氏杆菌(*Salmonella typhimurium*)混合培养, 大肠杆菌消耗乳糖排出醋酸盐可以被突变型鼠伤寒沙门氏杆菌利用, 突变型鼠伤寒沙门氏杆菌为营养缺陷型大肠杆菌提供甲硫氨酸, 最终 2 种菌得以生长<sup>[45]</sup>。通过基因工程改造 4 种菌株合成必需氨基酸(甲硫氨酸、组氨酸、色氨酸和精氨酸)的能力, 再将改造后的菌株组成一个互养体系, 体系包括  $\Delta argA\Delta trpC\Delta hisA$  甲硫氨酸过量合成大肠杆菌、 $\Delta argA\Delta trpC\Delta metA$  组氨酸过量合成鼠伤寒沙门氏杆菌、 $\Delta metA\Delta hisG\Delta trpC$  精氨酸过量合成脆弱拟杆菌(*Bacteroides fragilis*)、 $\Delta metA\Delta hisG\Delta argF$  色氨酸过量合成多形拟杆菌(*Bacteroides thetaiotaomicron*), 这 4 种细菌分别只能够过量合成其中一种氨基酸, 而不能合成另外其他 3 种氨基酸, 但是一种细菌需要的氨基酸由

体系另外 3 种菌提供; 研究发现这个系统中 4 种细菌的生长量能够维持平衡; 如果将其中某一种细菌以低于另外 3 种菌量接种, 另外 3 种细菌也会等着生长慢的细菌优先繁殖起来, 最终实现共同生长<sup>[46]</sup>(图 3)。

大肠杆菌利用氨基酸作为碳源和氮源, 氨基酸由 2 个趋化性受体蛋白 Tar 和 Tsr 感应, 这 2 个受体蛋白分别对天冬氨酸和丝氨酸有最高的亲和力, 环境中微摩尔的天冬氨酸和丝氨酸能够被趋化性受体感应到, 这 2 种氨基酸也会在复杂介质中被大肠杆菌首先消耗, 并作为其他重要氨基酸合成的前体, 然而苏氨酸和甲硫氨酸在毫摩尔浓度下才能观察到大肠杆菌微弱的趋化性。但是天冬氨酸经过一系列代谢过程可以合成苏氨酸和甲硫氨酸<sup>[21]</sup>。大肠杆菌和金黄色葡萄球菌混合培养实验<sup>[9,15-18]</sup>、以奶酪为营养的大肠杆菌互作实验都定位得到了许多编码苏氨酸和甲硫氨酸合成代谢基因<sup>[10]</sup>, 苏氨酸合成代谢基因 *thrA* 和 *metL* 分别编码天冬氨酸激酶 I-高丝氨酸脱氢酶 I 和天冬氨酸激酶 II-高丝氨酸脱氢酶 II, 这些基因编码了合成途径中的关键酶<sup>[47-48]</sup>。甲硫氨酸合成代谢基因 *metC* 编码胱硫醚  $\beta$  裂解酶(Cystathionine Beta-Lyase, CBL)<sup>[49]</sup>。Morin 等<sup>[10]</sup>研究认为生长初期这些氨基

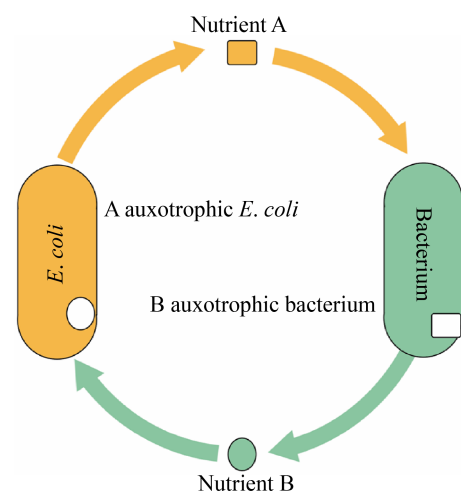


图 3 大肠杆菌互养机制<sup>[46]</sup>

Figure 3 The mechanism of *Escherichia coli* mutualism<sup>[46]</sup>



酸生物合成基因由于互作菌株的存在不再重要, 因为氨基酸合成代谢途径终产物或中间产物可能发生了互养作用, 这些终产物或中间产物由大肠杆菌互作的菌株直接提供, 或由于互作菌株的代谢活动而在环境中更易获得; 但是氨基酸生物合成基因在生长后期对大肠杆菌的生存尤为重要, 因为大肠杆菌与其他菌株一起生长时, 它们最终会竞争氨基酸, 导致氨基酸生物合成基因上调表达。

物种间竞争营养物质, 造成氮营养缺乏, 此时富氮氨基酸可能是唯一氮源。以奶酪为营养的大肠杆菌互作实验发现, 与单独生长相比, 混合培养下大肠杆菌精氨酸降解途径的 *astB* 基因上调表达<sup>[10]</sup>, 大肠杆菌与金黄色葡萄球菌的互作实验也定位得到了该基因<sup>[9,15-18]</sup>。*astB* 基因编码大肠杆菌精氨酸分解代谢精氨酸琥珀酰转移酶途径 (Arginine Succinyltransferase Pathway, AST) 中的琥珀酰精氨酸二氢水解酶, 在氮源受限有氧条件下可能通过 AST 途径降解富含氮的氨基酸并以此作为唯一氮源, 而 *astB* 基因突变株在以精氨酸为唯一氮源的培养基无法生长<sup>[50-51]</sup>。

铁几乎是全部微生物生长必需的微量元素, 但是在许多微生物群落中, 铁是一种稀缺资源。大肠杆菌进化出了许多吸收环境中铁的途径, 最主要的是利用铁载体吸收铁<sup>[52]</sup>。EntF 蛋白参与大肠杆菌铁载体肠杆菌素生物合成, 在低铁培养基中, 野生型大肠杆菌生长良好,  $\Delta entF$  突变菌株生长较差, 但是在添加铁载体肠杆菌素的低铁培养基中  $\Delta entF$  突变菌株生长良好<sup>[53]</sup>。野生型大肠杆菌和  $\Delta entF$  突变菌株混合培养时, 野生型大肠杆菌细胞密度高时,  $\Delta entF$  突变菌株在低铁培养基中能与野生型竞争, 这是由于野生型细胞释放的铁载体可以被突变株利用, 野生型大肠杆菌细胞密度低时, 野生型细胞合成的铁载体供给自身生长,  $\Delta entF$  突变菌株生长受限<sup>[53]</sup>。

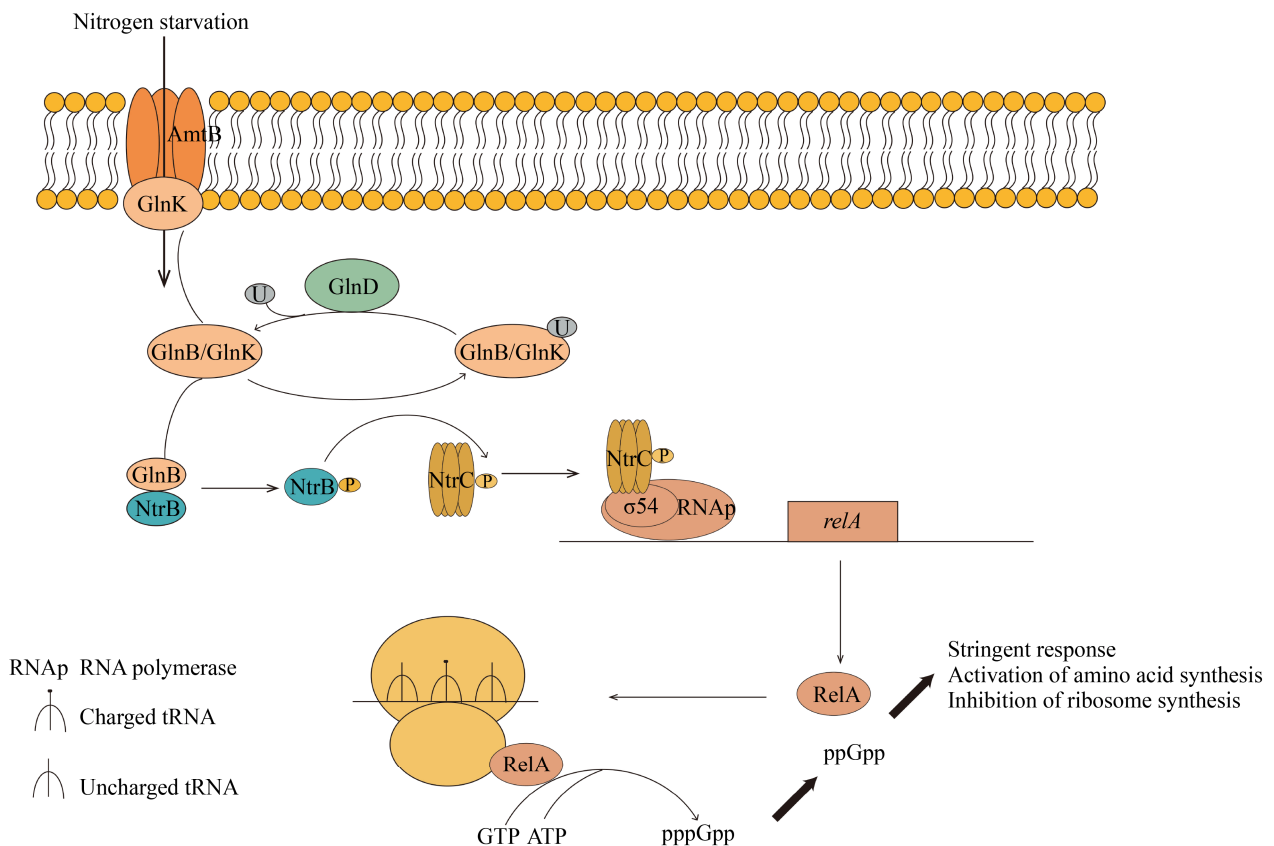
#### 4 代谢调节相关基因

群落中大肠杆菌遇到多种环境压力, 物种间竞

争导致营养物质缺乏、环境温度过高等, 但是大肠杆菌能调动自身调节系统, 适应环境获得生长。

大肠杆菌与其他菌株共存时, 随着菌株的生长, 环境中的营养物质被过度消耗掉, 大肠杆菌细胞遇到严重的营养限制, 为了保证种群在这种逆境状态下的存活, 细菌需要随时响应环境来调节自身全局的基因表达调控网络, 由此引发严谨反应, 这种反应是平衡细胞代谢的全局调控机制<sup>[54]</sup>。利用这种机制大肠杆菌在营养缺乏环境中生存。严谨反应的触发最终导致生物大分子合成的停止和应激生存途径的激活, 从而提高大肠杆菌细胞在环境中的竞争力。

菌株互作环境中极度缺乏氮源时, 为了在氮饥饿环境中生存, 细菌在营养物质耗尽之前就产生了抗压能力, 氮调节应激反应机制被激活以此来适应低氮环境, 缺乏氮源供应的大肠杆菌细胞合成了信号分子鸟苷四磷酸(ppGpp)和鸟苷五磷酸(pppGpp)<sup>[55]</sup>。首先, GlnD 感应到细胞内氮浓度信号谷氨酰胺浓度, 当细胞内谷氨酰胺浓度低时, GlnB 和 GlnK 蛋白去尿酸化, 去尿酸化的 GlnB 与 NtrB 结合, 相应地催化自身和 NtrC 蛋白磷酸化, 去尿酸化的 GlnK 与铵转运蛋白 AmtB 相互作用, 抑制铵离子的摄取, 磷酸化的 NtrC 与 *relA* 上游结合激活  $\sigma^{54}$  依赖型启动子,  $\sigma^{54}$  与 RNA 聚合酶结合起始 *relA* 基因的转录, RelA 与空载 tRNA 结合将 ATP 中的 2 个磷酸基团加入 GTP 或 GDP 中, 从而分别生成 pppGpp 和 ppGpp, 导致 RNA 合成(rRNA 和 tRNA)的下调, 并且不产生新的核糖体, 造成蛋白质和 DNA 合成受到抑制, 但严谨反应会激活氨基酸生物合成启动子的转录<sup>[54-57]</sup>。另有研究表明 RelA 蛋白突变导致合成 ppGpp 的能力受损<sup>[58]</sup>。SpoT 蛋白感知包括脂肪酸、铁、碳源饥饿等多种营养胁迫信号, 同时合成和水解 (p)ppGpp, 而 RelA 只能诱导合成反应<sup>[59]</sup>。SpoT 的水解功能对于在 RelA 存在下平衡细胞 (p)ppGpp 浓度至关重要, SpoT 蛋白的突变在野生型大肠杆菌中是致命的<sup>[60]</sup> (图 4)。

图4 大肠杆菌氮饥饿应激反应机制<sup>[60]</sup>Figure 4 Response mechanism of *Escherichia coli* to nitrogen starvation<sup>[60]</sup>

## 5 结论与展望

基因极大地影响着物种间相互作用的方式,近年来科研人员越来越关注基因如何参与物种间的相互作用<sup>[61]</sup>。本文综述了通过测序技术和统计学模型定位得到互作条件下大肠杆菌的运动性、耐药性、营养吸收、代谢调节相关基因,当环境条件不利于细菌生存时,各物种间资源竞争加剧,大肠杆菌发挥运动性获取养分,躲避毒性化合物,或利用其耐药系统应对环境中的毒性分子,或调节相关代谢维持生命最低能量需要,这些相关基因对大肠杆菌在复杂的群落环境中生存发挥至关重要的作用。互作条件下大肠杆菌重要基因信息汇总于表1。

目前生态学基础理论研究越来越重视微生物互作显著基因背后的遗传机制,但是采用统计模

型得到的显著基因的准确性有待进一步验证,所以今后研究对微生物间相互作用可以关注如下几个问题。

(1) 测序技术和统计学分析相结合。测序技术的发展获得了微生物互作大量的基因数据,但是如何定位到显著基因解释生态遗传机制是一项挑战,而统计模型能够帮助量化不同微生物在群落内相互作用的类型和程度,二者的结合极大地促进了微生物种间相互作用显著基因的挖掘。全基因组关联分析能识别细菌中高密度的分子标记,将细菌的表型数据和基因型相关联,可用于分析影响细菌互作的显著基因。系统作图把表型作为一个动态过程或系统来定位数量性状位点(Quantitative Trait Locus, QTL),具有更高的生物学内涵<sup>[17]</sup>,提升了基因定位的精度,有助于解析

表 1 互作条件下大肠杆菌的重要基因

Table 1 The important genes of *Escherichia coli* under the interaction conditions

基因分类	重要基因	基因功能	参考文献
Gene classification	Important genes	Gene function	References
运动相关基因 Motion related genes	<i>cheB</i>	趋化性信号转导系统的一部分，具有脱甲基酶活性，从甲基趋化性蛋白上脱甲基	[23]
		A part of chemotactic signal transduction system that has demethylase activity and demethylates from methylated chemotactic proteins	
	<i>cheY</i>	调节鞭毛运动方向改变	[23]
		Regulate the direction of flagella movement	
	<i>cheA, cheW</i>	甲基趋化性蛋白与 CheW、CheA 组成三元复合体，响应环境中化学物质浓度变化	[23]
		Methylaccepting chemotaxis proteins, CheW and CheA form a ternary complex in response to the change of chemical concentration in the environment	
	<i>cheR</i>	趋化性信号转导系统的一部分，作为甲基供体，将甲基基团加到甲基趋化性蛋白上	[24]
		As a part of chemotactic signal transduction system, methyl groups are added to methylated chemotactic proteins as methyl donors	
	<i>flhD, flhC</i>	FlhD 与 FlhC 作为主要的转录调节因子，通过与启动子区域结合来调节一些鞭毛和非鞭毛操纵子的转录	[25]
		FlhCD as a master transcriptional regulator that regulates transcription of several flagellar and non-flagellar operons by binding to their promoter region	
耐药性相关基因 Drug resistance related genes	<i>flgH, flgI, fliG, fliM, fliN, fliF, motB, fliC</i>	合成鞭毛基体蛋白	[27]
		Encode the flagellar basal body	
	<i>fliC</i>	编码鞭毛丝蛋白	[27]
		Encode the flagellar filament	
	<i>flgK</i>	编码鞭毛钩和鞭毛丝连接蛋白	[27]
		Encode the flagellum hook and flagellum filament link protein	
	<i>acrA, acrB, tolC</i>	AcrAB-TolC 是一种具有广泛底物特异性的药物外排泵，利用质子动力输出底物	[32]
		AcrAB-TolC is a drug efflux protein complex with broad substrate specificity that uses the proton motive force to export substrates	
	<i>macA, macB, tolC</i>	MacAB-TolC 是 ATP 结合盒超家族耐药泵，主要驱动细胞内大环内酯类抗生素外排	[32,37-39]
		AcrAB-TolC belongs to ATP-binding cassette family, which mainly drives the efflux of macrolide antibiotics	
营养吸收相关基因 Nutrition absorption related genes	<i>emrA, emrB, tolC</i>	EmrAB-TolC 是易化子超家族耐药泵，对四环素和萘啶酸等抗生素产生耐药性	[40]
		EmrAB-TolC is the major facilitator superfamily, which is resistant to tetracycline and nalidixic acid	
	<i>ompC</i>	编码外膜蛋白	[22]
		Encode the outer membrane protein	
	<i>proC</i>	催化脯氨酸生物合成	[43]
	<i>trpC</i>	催化色氨酸生物合成	[43]
		Catalyze the tryptophan biosynthesis	
	<i>metB</i>	编码甲硫氨酸生物合成途径酶	[45]
		Catalyze the methionine biosynthesis	

(待续)



			(续表 1)
	<i>argA</i>	编码精氨酸和鸟氨酸生物合成途径的第一步酶 Carries out the first step in the pathway of arginine biosynthesis and the pathway of ornithine biosynthesis	[46]
	<i>hisA</i>	催化组氨酸生物合成 Catalyze the histidine biosynthesis	[46]
	<i>thrA, metL</i>	催化苏氨酸生物合成 Catalyze the threonine biosynthesis	[47-48]
	<i>metC</i>	催化甲硫氨酸生物合成 Catalyze the methionine biosynthesis	[49]
	<i>astB</i>	参与精氨酸分解代谢 Involved in arginine catabolism	[50-51]
	<i>entF</i>	参与大肠杆菌铁载体肠杆菌素生物合成 Participate in the biosynthesis of enterobactericin in <i>Escherichia coli</i>	[53]
代谢调节相关基因	<i>glnD</i>	感应细胞内氮浓度 Induction of intracellular nitrogen concentration	[56-57]
Metabolic regulation	<i>glnB, glnK</i>	参与细菌氮代谢调节 Involved in the regulation of bacterial nitrogen metabolism	[56-57]
related genes	<i>amtB</i>	参与铵离子的吸收 Involved in the uptake of $\text{NH}_4^+$	[56-57]
	<i>ntrB, ntrC</i>	双组分调节系统 NtrB/NtrC, 控制氮调节基因的表达以响应氮限制 Member of the two-component regulatory system NtrB/NtrC, which controls expression of the nitrogen-regulated genes in response to nitrogen limitation	[56-57]
	<i>relA, spoT</i>	编码信号分子鸟苷四磷酸和鸟苷五磷酸 Encode the signal molecules of ppGpp and pppGpp	[56-60]

全基因组水平细菌互作的遗传机制。近期有研究利用全基因组重测序和 BreSeq 算法相结合, 定位得到大肠杆菌和酿酒酵母混合培养进化过程中突变的基因<sup>[20]</sup>。但是有研究表明重要基因预测的精度有待提高, 所以需要优化调整统计模型, 提高其对微生物互作重要基因预测的准确性, 同时挖掘更多对微生物生长重要的基因, 加强对微生物生态学基础理论的认识<sup>[62]</sup>。

(2) 基因功能验证实验。虽然测序技术和统计模型相结合获得了显著基因, 但是这些基因的具体功能仍需进一步验证。随着 CRISPR 技术的发展, 使得上述基因验证实验成为可能, 由 CRISPR 技术发展而来的碱基编辑器技术操作简便、特异性高, 广受研究者青睐<sup>[63]</sup>, 其利用脱氨酶实现碱基转换, CBE 系统和 ABE 系统在大肠杆菌都有广泛应用, 研究人员为了提高基因编辑效率, 已经开发出了可以同时多基因进行编辑的碱基编辑器系统, 该技

术的快速发展利于深入研究细菌间的相互作用。CRISPR 技术作为一种强大的基因编辑工具受到科学家重视, Cas9、Cpf1 等 CRISPR 系统在大肠杆菌上广泛应用, 实现了基因组高效多重编辑。有研究基于 CRISPR-Cas12a 系统在一轮重组和选择过程中成功地插入了 3 个异源基因, 获得大肠杆菌三基因敲除菌株<sup>[64]</sup>。Jiang 等<sup>[65]</sup>利用化脓链球菌 II 型 CRISPR-Cas9 系统实现了包括基因缺失和插入在内的多种精确基因组修饰, 最高效率达 100%, 能够实现多达 3 个靶点的同时多基因编辑。张琦等<sup>[66]</sup>将传统基因编辑技术和 CRISPR/Cas9 技术相结合建立了一种省时、高效的大肠杆菌点突变策略, 采用传统基因编辑技术获得带有氨苄抗性基因的大肠杆菌基因敲除菌株, 通过设计氨苄基因的 Spacer 序列, 借助 Cas9 蛋白的靶向切割以及同源重组系统实现靶基因的点突变, 该策略设计出了针对抗性基因的 Spacer, 在点突变实验中可以反复利

用,有助于深入研究微生物间互作遗传机制。随着CRISPR技术的发展,新型CasX被发掘出来,新型CasX系统比Cas9、Cpf1蛋白小很多,更利于基因编辑<sup>[67]</sup>。

## REFERENCES

- [1] Xiao YD, Angulo MT, Friedman J, Waldor MK, Weiss ST, Liu YY. Mapping the ecological networks of microbial communities[J]. *Nature Communications*, 2017, 8: 2042
- [2] Hao YQ, Zhang QG. Microbial interactions: from observation to prediction[J]. *Journal of Beijing Normal University: Natural Science*, 2016, 52(6): 809-815 (in Chinese)  
郝祎祺, 张全国. 微生物相互作用研究进展: 从观察到预测[J]. *北京师范大学学报(自然科学版)*, 2016, 52(6): 809-815
- [3] Widder S, Allen RJ, Pfeiffer T, Curtis TP, Wiuf C, Sloan WT, Cordero OX, Brown SP, Momeni B, Shou WY, et al. Challenges in microbial ecology: building predictive understanding of community function and dynamics[J]. *The ISME Journal*, 2016, 10(11): 2557-2568
- [4] Gong Y, Li YZ. Kin discrimination and interactions between bacterial siblings[J]. *Microbiology China*, 2019, 46(2): 332-338 (in Chinese)  
龚亚, 李越中. 近缘细菌细胞间的相互识别与相互作用[J]. *微生物学通报*, 2019, 46(2): 332-338
- [5] Zhang ZJ, Van Kleunen M, Becks L, Thakur MP. Towards a general understanding of bacterial interactions[J]. *Trends in Microbiology*, 2020, 28(10): 783-785
- [6] Deng Y, Jiang YH, Yang YF, He ZL, Luo F, Zhou JZ. Molecular ecological network analyses[J]. *BMC Bioinformatics*, 2012, 13: 113
- [7] Ji HF, Wang Y. Advances in molecular approach applications in microbial ecology studies[J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2016, 36(24): 8234-8243 (in Chinese)  
姬洪飞, 王颖. 分子生物学方法在环境微生物生态学中的应用研究进展[J]. *生态学报*, 2016, 36(24): 8234-8243
- [8] Whitham TG, Bailey JK, Schweitzer JA, Shuster SM, Bangert RK, LeRoy CJ, Lonsdorf EV, Allan GJ, DiFazio SP, Potts BM, et al. A framework for community and ecosystem genetics: from genes to ecosystems[J]. *Nature Reviews Genetics*, 2006, 7(7): 510-523
- [9] Zhang ZR, Li JT, Liang YJ, Zhang Q, Jin Y, He XQ. Analysis of interaction mode between *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* by systems mapping[J]. *Microbiology China*, 2019, 46(2): 292-300 (in Chinese)  
张佐然, 李金婷, 梁雅静, 张琦, 金一, 何晓青. 利用系统作图(Systems mapping)研究大肠埃希菌和金黄色葡萄球菌的互作遗传机制[J]. *微生物学通报*, 2019, 46(2): 292-300
- [10] Morin M, Pierce EC, Dutton RJ. Changes in the genetic requirements for microbial interactions with increasing community complexity[J]. *eLife*, 2018, 7: e37072
- [11] Hibbing ME, Fuqua C, Parsek MR, Peterson SB. Bacterial competition: surviving and thriving in the microbial jungle[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2010, 8(1): 15-25
- [12] Granato ET, Meiller-Legrand TA, Foster KR. The evolution and ecology of bacterial warfare[J]. *Current Biology*, 2019, 29(11): R521-R537
- [13] Pande S, Merker H, Bohl K, Reichelt M, Schuster S, De Figueiredo LF, Kaleta C, Kost C. Fitness and stability of obligate cross-feeding interactions that emerge upon gene loss in bacteria[J]. *The ISME Journal*, 2014, 8(5): 953-962
- [14] Zhu ML, Pan YG, Dai XF. (p)ppGpp: the magic governor of bacterial growth economy[J]. *Current Genetics*, 2019, 65(5): 1121-1125
- [15] He XQ, Jin Y, Ye MX, Chen N, Zhu J, Wang JQ, Jiang LB, Wu RL. Bacterial genetic architecture of ecological interactions in co-culture by GWAS-Taking *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* as an example[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2017, 8: 2332
- [16] Liang YJ, He XQ, Jin Y, Jiang LB, Ye MX, Wu RL. Progress in next generation sequencing (NGS) combined with genetic statistical model in microbial molecular ecology[J]. *Scientia Sinica: Vitae*, 2020, 50(2): 207-214 (in Chinese)  
梁雅静, 何晓青, 金一, 姜立波, 叶梅霞, 邬荣领. 二代测序技术(NGS)结合遗传统计模型在微生物分子生态学中的研究进展[J]. *中国科学(生命科学)*, 2020, 50(2): 207-214
- [17] Jiang LB, He XQ, Jin Y, Ye MX, Sang MM, Chen N, Zhu J, Zhang ZR, Li JT, Wu RL. A mapping framework of competition—cooperation QTLs that drive community dynamics[J]. *Nature Communications*, 2018, 9(1): 3010
- [18] Liang YJ, Li BB, Zhang Q, Zhang SL, He XQ, Jiang LB, Jin Y. Interaction analyses based on growth parameters of GWAS between *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*[J]. *AMB Express*, 2021, 11(1): 34
- [19] LaSarre B, Deutschbauer AM, Love CE, McKinlay JB. Covert cross-feeding revealed by genome-wide analysis of fitness determinants in a synthetic bacterial mutualism[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2020, 86(13): e00543-20
- [20] Barber JN, Sezmis AL, Woods LC, Anderson TD, Voss JM, McDonald MJ. The evolution of coexistence from competition in experimental co-cultures of *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *The ISME Journal*, 2021, 15(3): 746-761
- [21] Yang YL, M Pollard A, Höfler C, Poschet G, Wirtz M, Hell R, Sourjik V. Relation between chemotaxis and consumption of amino acids in bacteria[J]. *Molecular Microbiology*, 2015, 96(6): 1272-1282

- [22] Khare A, Tavazoie S. Multifactorial competition and resistance in a two-species bacterial system[J]. PLoS Genetics, 2015, 11(12): e1005715
- [23] Shi H. Studies on the dynamics of *Escherichia coli* flagellar motor[D]. Hefei: Doctoral Dissertation of University of Science and Technology of China, 2019 (in Chinese)  
史慧. 大肠杆菌鞭毛马达的动力学研究[D]. 合肥: 中国科学技术大学博士学位论文, 2019
- [24] Bi SY, Lai LH. Bacterial chemoreceptors and chemoeffectors[J]. Cellular and Molecular Life Sciences, 2015, 72(4): 691-708
- [25] Kalir S. Ordering genes in a flagella pathway by analysis of expression kinetics from living bacteria[J]. Science, 2001, 292(5524): 2080-2083
- [26] Ni B, Colin R, Link H, Endres RG, Sourjik V. Growth-rate dependent resource investment in bacterial motile behavior quantitatively follows potential benefit of chemotaxis[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2020, 117(1): 595-601
- [27] Gude S, Pinçe E, Taute KM, Seinen AB, Shimizu TS, Tans SJ. Bacterial coexistence driven by motility and spatial competition[J]. Nature, 2020, 578(7796): 588-592
- [28] Wang B. Studies on the mechanical properties of the flagellar motor output in *E. coli*[D]. Hefei: Doctoral Dissertation of University of Science and Technology of China, 2018 (in Chinese)  
王彬. 大肠杆菌鞭毛马达力学输出性质的研究[D]. 合肥: 中国科学技术大学博士学位论文, 2018
- [29] Ratzke C, Barrere J, Gore J. Strength of species interactions determines biodiversity and stability in microbial communities[J]. Nature Ecology & Evolution, 2020, 4(3): 376-383
- [30] Abisado RG, Benomar S, Klaus JR, Dandekar AA, Chandler JR. Bacterial quorum sensing and microbial community interactions[J]. mBio, 2018, 9(3): e02331-e02317
- [31] Xu ZL, Yan AX. Multidrug efflux systems in microaerobic and anaerobic bacteria[J]. Antibiotics, 2015, 4(3): 379-396
- [32] Wang CM, He QG, Cao JY. Multidrug efflux systems involved in resistance to antibacterial drugs[J]. Chinese Journal of Animal and Veterinary Sciences, 2011, 42(4): 455-467 (in Chinese)  
王春梅, 何启盖, 操继跃. 细菌多重耐药泵的研究进展[J]. 畜牧兽医学报, 2011, 42(4): 455-467
- [33] Zwama M, Yamaguchi A. Molecular mechanisms of AcrB-mediated multidrug export[J]. Research in Microbiology, 2018, 169(7/8): 372-383
- [34] Bay DC, Stremick CA, Slipski CJ, Turner RJ. Secondary multidrug efflux pump mutants alter *Escherichia coli* biofilm growth in the presence of cationic antimicrobial compounds[J]. Research in Microbiology, 2017, 168(3): 208-221
- [35] Sulavik MC, Houseweart C, Cramer C, Jiwani N, Murgolo N, Greene J, DiDomenico B, Shaw KJ, Miller GH, Hare R, et al. Antibiotic susceptibility profiles of *Escherichia coli* strains lacking multidrug efflux pump genes[J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2001, 45(4): 1126-1136
- [36] Piddock LJV. Multidrug-resistance efflux pumps — not just for resistance[J]. Nature Reviews Microbiology, 2006, 4(8): 629-636
- [37] Li XZ, Plésiat P, Nikaido H. The challenge of efflux-mediated antibiotic resistance in Gram-negative bacteria[J]. Clinical Microbiology Reviews, 2015, 28(2): 337-418
- [38] Du DJ, Wang-Kan X, Neuberger A, Van Veen HW, Pos KM, Piddock LJV, Luisi BF. Multidrug efflux pumps: structure, function and regulation[J]. Nature Reviews Microbiology, 2018, 16(9): 523-539
- [39] Greene NP, Kaplan E, Crow A, Koronakis V. Antibiotic resistance mediated by the MacB ABC transporter family: a structural and functional perspective[J]. Frontiers in Microbiology, 2018, 9: 950
- [40] Puértolas-Balint F, Warsi O, Linkevicius M, Tang PC, Andersson DI. Mutations that increase expression of the EmrAB-TolC efflux pump confer increased resistance to nitroxoline in *Escherichia coli*[J]. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2020, 75(2): 300-308
- [41] Gudelj I, Kinnersley M, Rashkov P, Schmidt K, Rosenzweig F. Stability of cross-feeding polymorphisms in microbial communities[J]. PLoS Computational Biology, 2016, 12(12): e1005269
- [42] Seth EC, Taga ME. Nutrient cross-feeding in the microbial world[J]. Frontiers in Microbiology, 2014, 5: 350
- [43] Dal Co A, Van Vliet S, Kiviet DJ, Schlegel S, Ackermann M. Short-range interactions govern the dynamics and functions of microbial communities[J]. Nature Ecology & Evolution, 2020, 4(3): 366-375
- [44] McCully AL, LaSarre B, McKinlay JB. Recipient-biased competition for an intracellularly generated cross-fed nutrient is required for coexistence of microbial mutualists[J]. mBio, 2017, 8(6): e01620-e01617
- [45] Hammarlund SP, Chacón JM, Harcombe WR. A shared limiting resource leads to competitive exclusion in a cross-feeding system[J]. Environmental Microbiology, 2019, 21(2): 759-771
- [46] Ziesack M, Gibson T, Oliver JKW, Shumaker AM, Hsu BB, Riglar DT, Giessen TW, DiBenedetto NV, Bry L, Way JC, et al. Engineered interspecies amino acid cross-feeding increases population evenness in a synthetic bacterial consortium[J]. mSystems, 2019, 4(4): e00352-19
- [47] Dong XY, Quinn PJ, Wang XY. Microbial metabolic engineering for L-threonine production reprogramming microbial metabolic pathways[J]. Journal of Immunology, 2012, 64: 283-302
- [48] Li YJ, Wei HB, Wang T, Xu QY, Zhang CL, Fan XG, Ma Q, Chen N, Xie XX. Current status on metabolic engineering

- for the production of L-aspartate family amino acids and derivatives[J]. *Bioresource Technology*, 2017, 245: 1588-1602
- [49] Ferla MP, Patrick WM. Bacterial methionine biosynthesis[J]. *Microbiology*, 2014, 160(8): 1571-1584
- [50] Schneider BL, Kiupakis AK, Reitzer LJ. Arginine catabolism and the arginine succinyltransferase pathway in *Escherichia coli*[J]. *Journal of Bacteriology*, 1998, 180(16): 4278-4286
- [51] Lu CD. Pathways and regulation of bacterial arginine metabolism and perspectives for obtaining arginine overproducing strains[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2006, 70(3): 261-272
- [52] Dong ZY, Hu JJ, Hu BL. Regulation of microbial siderophore transport and its application in environmental remediation[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2019, 35(11): 2189-2200 (in Chinese)  
董子阳, 胡佳杰, 胡宝兰. 微生物铁载体转运调控机制及其在环境污染修复中的应用[J]. *生物工程学报*, 2019, 35(11): 2189-2200
- [53] Scholz RL, Greenberg EP. Sociality in *Escherichia coli*: enterochelin is a private good at low cell density and can be shared at high cell density[J]. *Journal of Bacteriology*, 2015, 197(13): 2122-2128
- [54] Zhu ML, Dai XF. Growth suppression by altered (p)ppGpp levels results from non-optimal resource allocation in *Escherichia coli*[J]. *Nucleic Acids Research*, 2019, 47(9): 4684-4693
- [55] Brown DR, Barton G, Pan ZS, Buck M, Wigneshweraraj S. Nitrogen stress response and stringent response are coupled in *Escherichia coli*[J]. *Nature Communications*, 2014, 5: 4115
- [56] Kudrin P, Dzhygyr I, Ishiguro K, Beljantseva J, Maksimova E, Oliveira SRA, Varik V, Payoe R, Konevega AL, Tenson T, et al. The ribosomal A-site finger is crucial for binding and activation of the stringent factor RelA[J]. *Nucleic Acids Research*, 2018, 46(4): 1973-1983
- [57] Switzer A, Brown DR, Wigneshweraraj S. New insights into the adaptive transcriptional response to nitrogen starvation in *Escherichia coli*[J]. *Biochemical Society Transactions*, 2018, 46(6): 1721-1728
- [58] Turnbull KJ, Dzhygyr I, Lindemose S, Haurlyuk V, Roghanian M. Intramolecular interactions dominate the autoregulation of *Escherichia coli* stringent factor RelA[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2019, 10: 1966
- [59] Haurlyuk V, Atkinson GC, Murakami KS, Tenson T, Gerdes K. Recent functional insights into the role of (p)ppGpp in bacterial physiology[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2015, 13(5): 298-309
- [60] Germain E, Guiraud P, Byrne D, Douzi B, Djendli M, Maisonneuve E. YtfK activates the stringent response by triggering the alarmone synthetase SpoT in *Escherichia coli*[J]. *Nature Communications*, 2019, 10: 5763
- [61] Cordero OX, Datta MS. Microbial interactions and community assembly at microscale[J]. *Current Opinion in Microbiology*, 2016, 31: 227-234
- [62] Deng T, Guan XT, Wu B, He ZL. Applying mathematical models in the construction of synthetic microbial communities[J]. *Chinese Journal of Applied and Environmental Biology*, 2020, 26(4): 809-819 (in Chinese)  
邓婷, 关晓彤, 吴波, 贺志理. 数学模型在合成微生物群落构建中的应用[J]. *应用与环境生物学报*, 2020, 26(4): 809-819
- [63] Zong Y, Gao CX. Progress on base editing systems[J]. *Hereditas*, 2019, 41(9): 777-800 (in Chinese)  
宗媛, 高彩霞. 碱基编辑系统研究进展[J]. *遗传*, 2019, 41(9): 777-800
- [64] Ao X, Yao Y, Li T, Yang TT, Dong X, Zheng ZT, Chen GQ, Wu Q, Guo YY. A multiplex genome editing method for *Escherichia coli* based on CRISPR-Cas12a[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2018, 9: 2307
- [65] Jiang Y, Chen B, Duan CL, Sun BB, Yang JJ, Yang S. Multigene editing in the *Escherichia coli* genome via the CRISPR-Cas9 system[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2015, 81(7): 2506-2514
- [66] Zhang Q, Liang YJ, Zhang YX, Chen LH, Han ZR, Li BB, Jin Y, He XQ. Two-step strategy for point mutation of *yjiW* in *Escherichia coli* by gene editing[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2021, 61(1): 183-194 (in Chinese)  
张琦, 梁雅静, 张宇馨, 陈玲慧, 韩钟尧, 李贝贝, 金一, 何晓青. 基因编辑技术对大肠杆菌 *yjiW* 基因点突变的两步法策略[J]. *微生物学报*, 2021, 61(1): 183-194
- [67] Wang KK, Wang YL. Basic properties and research methods of a new CRISPR-Cas system: CasX as an example[J]. *Microbiology China*, 2021, 48(4): 1227-1238 (in Chinese)  
王康康, 王艳丽. 以 Cas X 为例简述新型 CRISPR-Cas 系统的基本属性和研究方法[J]. *微生物学通报*, 2021, 48(4): 1227-1238