

## 通过改换大肠杆菌腺苷酸代谢途径来增加胞内能荷水平

顾振霆, 吕晓冰, 张惠展\*

(华东理工大学生物工程学院, 生物反应器工程国家重点实验室, 上海 200237)

**摘要:** 原核生物细胞能量和物质代谢的途径是一个很复杂的网络, 改变代谢途径中的基因会对能量和物质流产生怎样的影响, 仍然不是很清楚。以往的文献和研究已经将大肠杆菌的腺嘌呤核苷酸补救合成途径研究的很透彻。使用 HPLC 对删除了 *add* 基因的大肠杆菌细胞内腺苷类核苷酸分析表明, 在腺嘌呤核苷酸补救途径中单一基因的途径操作不能有效改变腺嘌呤类核苷酸的代谢流向。实验中通过删除大肠杆菌 JM83 株中的 *add* 基因(编码腺苷脱氨酶[EC:3.5.4.4]<sup>[1, 2]</sup>), *deoD* 基因(编码腺嘌呤核苷酸磷酸酶[EC:2.4.2.1]<sup>[3, 4]</sup>), *amn* 基因(编码 AMP 核苷酶 [EC:3.2.2.4]<sup>[5]</sup>)并引入外源 *ado1* 基因(来自酵母编码腺苷激酶[EC:2.7.1.20]<sup>[6, 7, 8]</sup>), 构建了菌株 J991+ (*add*<sup>-</sup>, *deoD*<sup>-</sup>, *amn*<sup>-</sup>, *ado1*<sup>+</sup>, JM83), 将其在含腺苷的 LB 培养基培养, 使用 HPLC 分析其胞内腺苷类能量物质发现, ATP, ADP, AMP 胞内含量都有所增加, 分别都比对照 JM83 菌株提高一倍左右, 大大加强了腺苷转化 AMP 的代谢流量, 实现了改变物质代谢流向并使 ATP 积累的目的。该菌种实现了高产 ATP 代谢通路的构建, 为下游生物工程发酵提供了较野生菌更高效的菌种, 有望通过发酵工程优化培养, 大幅提高 ATP 产量。同时, “尝试改变 AMP 的浓度而非直接针对 ATP 调节代谢途径, 达到 ATP 积累的目的”这一思路为同类研究提供参考。最后也表明在腺嘌呤核苷酸补救代谢途径中, 为达到物质代谢流改变的目的, 多基因联合操作较之单基因敲除更为有效。

**关键词:** 嘌呤补救合成途径; 基因删除; 代谢流; ATP

**中图分类号:** Q935 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2008) 01-0026-07

大肠杆菌嘌呤合成补救途径(如图 1 所示)中, 腺苷有两条分解途径, 一是通过腺苷脱氨酶 [EC:3.5.4.4](由 *add* 基因编码)分解为肌苷; 另一途径是通过腺嘌呤核苷酸磷酸酶[EC:2.4.2.1](由 *deoD* 基因编码)分解成腺嘌呤, 然后通过腺嘌呤磷酸核糖转移酶[EC:2.4.2.7]<sup>[9, 10]</sup> 次黄嘌呤鸟嘌呤磷酸核糖转移酶 [EC:2.4.2.8]<sup>[11]</sup>(分别由 *apt* 和 *hpt* 编码)途径转变为 AMP。细胞需要通过大量能量来合成 pRpp, 用以将腺嘌呤转化成为 AMP<sup>[9~11]</sup>。而在酵母中还有一条通过腺苷激酶[EC:2.7.1.20]将腺苷直接转化 AMP, 只消耗一分子 ATP 的代谢途径。将一株实验室保存的 *add* 基因删除并含有 *ado1* 基因(通过 *trc* 启动子引

入, 并且腺苷激酶已胞外测活, 相对于底物腺苷和 ATP 的 Km 值分别为(3.5±0.2) μmol/L 和(100.0±11.0) μmol/L<sup>[12]</sup>)的 JM83(J9+株)于含腺苷的培养基中培养, 通过 HPLC 分析其高氯酸抽提物发现, 胞内 AMP、ATP 并未发生积累。为了使腺苷的代谢流通过腺苷激酶流向 AMP, 以达到大肠杆菌胞内 ATP 积累的目的, 我们删除了 J9 细胞的 *deoD* 基因, 及 *amn* 基因(编码 AMP 核苷酶 [EC:3.2.2.4]), 构建了 J991 细胞。通过 HPLC 分析在含有腺苷的培养基中培养的 J991+(JM83 *deoD*<sup>-</sup>, *amn*<sup>-</sup>, *add*<sup>-</sup>, *ado1*<sup>+</sup>)细胞内的高氯酸抽提物发现, 在补救途径经过改造后, 细胞能量物质发生了积累并达到对照菌 JM83 的 1.8 倍, 大肠

\*通讯作者。Tel: +86-21-64252515; Fax: +86-21-64252515; E-mail: huihzhz@ecust.edu.cn

作者简介: 顾振霆(1981-), 男, 上海人, 硕士研究生, 主要进行途径工程研究。E-mail: terry.gzt@163.com

收稿日期: 2007-05-15; 修回日期: 2007-10-17

杆菌能量代谢流向发生了改变。

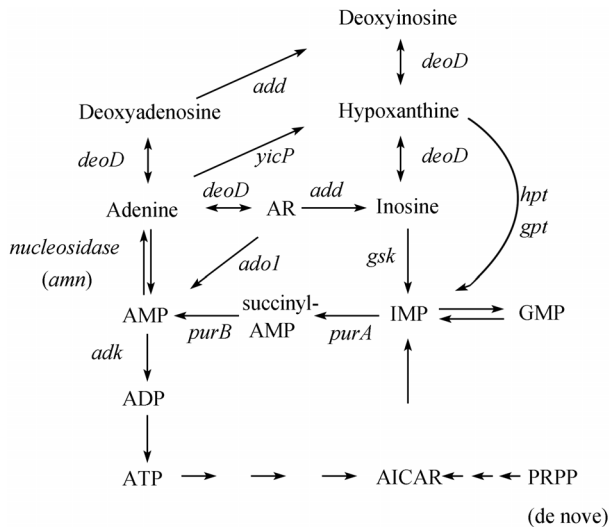


图1 腺嘌呤补救合成途径(*ado1* 为酵母中引入)  
Fig. 1 salvage pathway of adenine.

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

1.1.1 试剂：从 TaKaRa 生物技术有限公司购买 DNA 内切酶和 T4 DNA 连接酶。IPTG 从 Promega

公司购买。三种核苷酸分别从 Biosia, Sigma, 和 Fluka 购买。其他试剂都是分析纯。

1.1.2 菌株和培养条件：表 1 中为本研究所用材料。所有菌株都在 Luria-bertani (LB) 液态和固态(18 g/L Agar)培养基中培养，根据实验要求可加入氨苄青霉素(100 mg/L)和氯霉素(20mg/L)筛选目的菌株。

### 1.2 高氯酸法抽提细胞腺苷类代谢衍生物<sup>[13]</sup>

过夜培养细胞以 1%接种量接种 100ml LB 培养基。收集 OD 0.8 的细胞 40ml, 6000r/min 离心 10 分钟，取沉淀，用 4 0.9% NaCl 洗涤细胞一次，6000r/min 离心 10 分钟，取沉淀，用 0.25ml 4 0.9% NaCl 悬浮于 1.5ml 离心管，加入 100ml 2mol/L 高氯酸混匀，4 15000r/min 离心取上清液，再加入 100ml 2mol/L 氢氧化钾混匀，4 15000r/min 离心取上清液。上清取 0.020ml 进样，HPLC 分析。

### 1.3 腺苷及其衍生物的检测<sup>[14]</sup>

使用安捷伦高压液相色谱于紫外 249nm，柱温 30，流动相：K<sup>+</sup>缓冲液(27.21g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.502g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>定容于 1011ml 无菌双蒸水)，检测腺苷及其衍生物。分离柱型号为安捷伦 C18 Extend 4.6mm × 250mm。

表 1 菌株、质粒、DNA Marker  
Table 1 strain, plasmid, DNA Marker

| Strain and plasmid | Characteristic   | Source                      |
|--------------------|--|-----------------------------|
| <i>E. coli</i>     |  |                             |
| JM83               | F <sup>-</sup> , ra, Δ (lac-proAB), rpsL, (strR), φ80ΔlacZΔM15                     | This laboratory             |
| J9                 | <i>Add<sup>-</sup></i> , JM83  | This laboratory             |
| J9+                | <i>add<sup>-</sup>, ado1<sup>+</sup></i> , JM83                                    | This work                   |
| J99                | <i>add<sup>-</sup>, deoD<sup>-</sup></i> , JM83                                    | This work                   |
| J99+               | <i>add<sup>-</sup>, deoD<sup>-</sup>, ado1<sup>+</sup></i> , JM83                  | This work                   |
| J991               | <i>add<sup>-</sup>, deoD<sup>-</sup>, amn<sup>-</sup></i> , JM83                   | This work                   |
| J991+              | <i>add<sup>-</sup>, deoD<sup>-</sup>, amn<sup>-</sup>, ado1<sup>+</sup></i> , JM83 | This work                   |
| Plasmid            |  |                             |
| pMD18-T            | ampR   | TaKaRa company              |
| pSPORT             | ampR   | This work                   |
| pUC21              | AmpR, <i>lac</i> promoter  | This work                   |
| pUC18              | AmpR, <i>lac</i> promoter  | This work                   |
| pMAK705            | CmR, temp-sensitive replicon   | Present from James R Walker |
| pCM-ΔdeoD          | CmR, homologous sequence of <i>deoD</i>  | This laboratory             |
| pMAK-ΔdeoD         | CmR, homologous sequence of <i>deoD</i> , temp-sensitive replicon                  | This work                   |
| pMAK-Δamn          | CmR, homologous sequence of <i>amn</i> , temp-sensitive replicon                   | This work                   |
| DNA MARKER         |  |                             |
| DNA MARKER         | 0.5, 1.1, 1.6, 2.6, 3.1, 4.1, 5.4, 9.34, 17 kb                                     | This laboratory             |

The strains and plasmids used in the study are listed in Table 1. All *E. coli* strains were grown in Luria-bertani (LB) medium and LB agar (18 g/L) plates supplemented with ampicillin (100 mg/L) or chloromycetin (20mg/L) when needed.

### 1.4 温敏法基因删除<sup>[15]</sup>

将待删除基因前后同源区克隆到含温敏复制子质粒 pMAK705 中。将此质粒转化目的菌株并涂布于 42℃ 氯霉素平板上。由于质粒 pMAK705 复制子在 42℃ 不能复制, 只有质粒通过同源区整合到染色体上, 利用染色体复制子复制, 宿主才能在氯霉素平板上生长。挑选 4~6 个共整合子(质粒整合到染色体上的克隆)接种于 30ml LB 培养基 30℃ 培养并以 1% 接种量传代培养 2 次。取传代细胞稀释涂布于 30℃ 氯霉素抗性平板(此培养条件可以促使质粒从染色体上掉落)。挑取 12-24 个二次重组子(质粒从染色体回到胞质中, 即发生了二次重组)进行 PCR 检测, 挑选目的克隆。见图 2。

## 2 结果

### 2.1 温敏灭活质粒构建

用 *Hind* 和 *Bam*H 酶切 pCM- $\Delta$ deoD(实验室收藏), 回收 1.3kb 片段(含有 *deoD* 基因右同源区)与 *Hind* 和 *Bam*H 酶切的 pSPORT 连接得到质粒 pSPORT-deoRH。所得质粒再用 *Hind* 和 *Sac* 酶切回收 1.3kb 片段(含有 *deoD* 基因右同源区), 与 *Hind* 和 *Sac* 的 pMAK705 连接得到 pMAK-deoRH。用 *Hind* 和 *Bam*H 酶切 pCM- $\Delta$ deoD 回收 1.0kb 片段(含有 *deoD* 基因左同源区), 与 *Hind* 和 *Bam*H 酶切的 pUC21 连接得到 pUC21-deoLH。用 *Cla*I 酶切 pUC21-deoLH 回收 1.0kb 片段(含有 *deoD* 基因左同源区), 与用 *Cla*I 酶切的 pMAK-

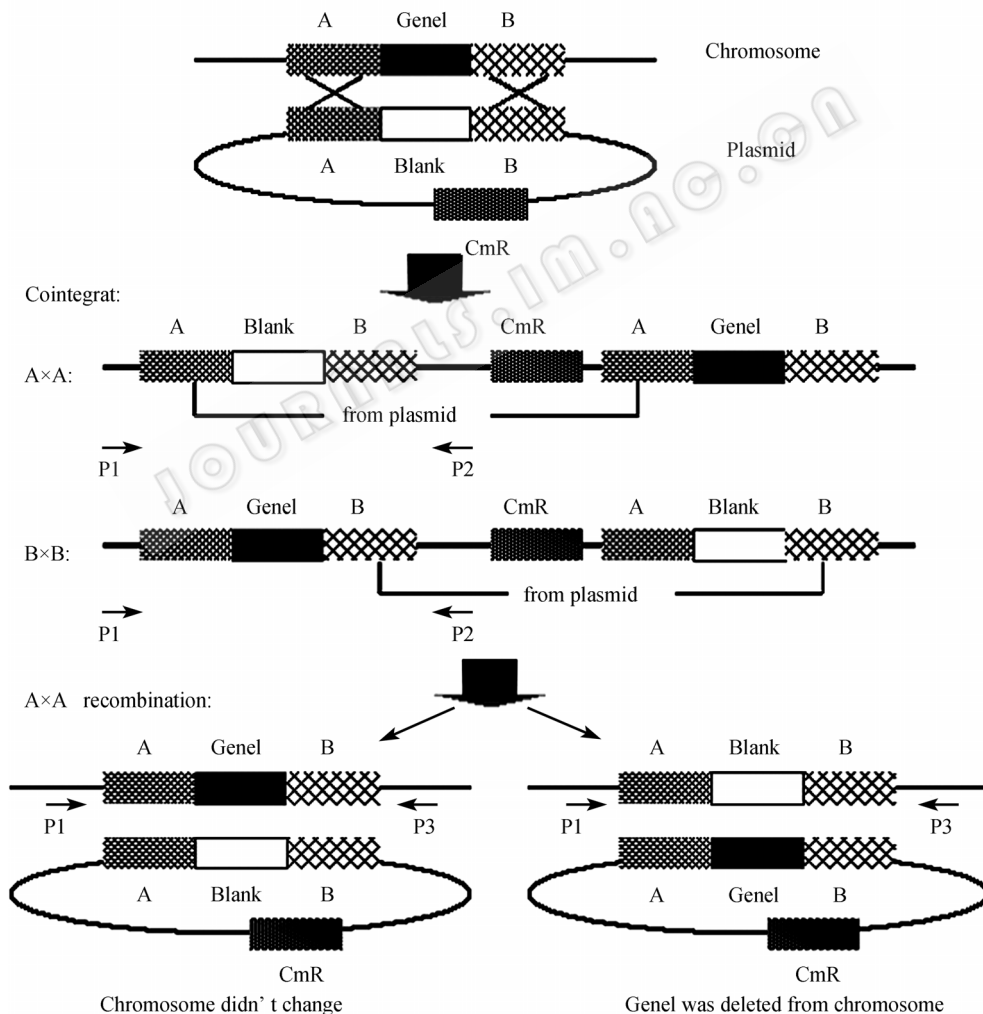


图 2 温敏法基因删除

Fig. 2 gene deletion with temp-sensitive replicon. Because of the temp-sensitive replicon the strains incubated on chloromycetin plate in 42 must contain the plasmid sequence in its chromosome through recombination of homologous region A or B. Primer P1 was designed to anneal only with chromosome sequence while P2 anneal only with plasmid sequence. PCR products were found only with the cointegrate samples, and the length difference of PCR products shows the different length of Gene1 and the Blank. When cointegrates were incubated in 30℃, the temp-sensitive replicon was not so stable, the plasmid would melt into cytoplasm and left the Gene1 or the Blank in chromosome. Primers P1 and P3 could be used to identify the recombinants interested.

deoRH 的连接, 得到 *deoD* 基因的温敏灭活质粒 pMAK- $\Delta$ deoD。

用引物 amnLHP1 : 5'-TTTCCTTTCTTTATG-GCG-3'、amnLHP2 : 5'-GAAATGGCTTCTTCTGG-C-3' 和引物 amnRHP1 : 5'-GCCATACGGGACAC-TACT-3'、amnRHP2 : 5'-TTCCAGCTGCTTTTAG-AG-3' 分别将 *amn* 基因的前后同源区克隆在 T 载体上。得到质粒 pTamnL 和 pTamnR。将 pTamnR 用 *Pst* 和 *Bam*H 酶切回收 1.1kb 片断(含 *amn* 基因右同源区), 与用 *Pst* 和 *Bam*H 酶切的 pMAK705 连接, 得到 pMAK-amnR。用 *pst* 酶切 pTamnL 回收 0.9kb 片断(含有阿买那基因左同源区)与用 *Pst* 酶切的 pMAK-amnR 连接, 得到 *amn* 基因的温敏灭活质粒 pMAK- $\Delta$ amn。

## 2.2 *DeoD* 和 *amn* 基因删除

用温敏基因删除法得到 *deoD* 及 *amn* 基因共整合子(即菌株内基因灭活质粒通过同源片段整合到染色体上), 分别用引物 deoDintePB1 : 5'-TCGCC-CTATAGTGAGTCG-3'、deoDintePB2 : 5'-CGACC-ATCGTTACCTTTG-3' 和用引物 amnintePB1 : 5'-CCAGTAGTAGGTTGAGGC-3'、amnintePB2 : 5'-TTGTACATCGTCGACAT-3' 进行 PCR 鉴定。

引物 deoDintePB1 设计为与质粒序列配对, 引物 deoDintePB2 设计为与染色体片断配对。*deoD* 共整合子染色体可以扩增出 1.2kb 片断, 而非共整合子只有一端与引物配对, 扩增不出片断。

引物 amnintePB1 设计为与质粒序列配对, 引物 amnintePB2 设计为只与染色体片断配对。*amn* 共整合子若发生左同源区整合染色体可扩增出 3.0kb 片断, 若发生右同源区重组染色体扩增出 2.4kb 片断, 未发生共整合则无扩增条带。鉴定结果如图 3。

用引物 deoDresoP1 : 5'-CGTTGACTCCGCC-TTTGTTATGT-3'、deoDresoP2 : 5'-CGACCATCGTT-ACCTTTG-3' 对 *deoD* 基因二次重组子(即整合到染色体上的质粒通过培养掉落到胞质内)进行 PCR 鉴定。若检测出 1.3kb 片断, 则染色体保留了 *deoD* 的起始同源区, 若检测出 0.8kb 片断, 染色体与质粒交换了同源区。

用引物 amnLHP1 : 5'-TTTCCTTTCTTTATGG-CG-3'、amnintePB2 : 5'-TTTGTACATCGTCGACA-T-3' 对 *amn* 基因二次重组子进行 PCR 鉴定。若检测出 2.9kb 片断, 则染色体保留了 *amn* 的起始同源区若检测出 2.2kb 片断。染色体与质粒交换了同源区。鉴定结果如图 3。



图 3 PCR 筛选结果

Fig. 3 Results of PCR. Primers deoDintePB1 and deoDintePB2 were used to identify *deoD* cointegrates(1-5), 1-4 were *deoD* cointegrates with 1.2kb band, 5 was control which used J9 chromosome as PCR sample. Primers deoDresoP1 and deoDresoP2 were used to select *deoD* mutants(6-8), 6 was control which used J9 chromosome as PCR sample, 8 was the *deoD* mutant with 0.8kb band. Primers amnintePB1 and amnintePB2 were used to identify *amn* cointegrates(9-11), 9 was *amn* cointegrates with 3.0kb band when 10 was also *amn* cointegrates with 2.4kb band, 11 was the control which used J99 chromosome as PCR sample. Primers amnLHP1 and amnintePB2 were used to select *amn* mutants(12-14), 12 was the *amn* mutant with 2.2kb band, 14 was the control which used J99 chromosome as PCR sample.

## 2.3 细胞内腺苷类能量物质分析

2.3.1 相同条件下 8 菌株对照培养胞内腺苷类能量物质对比: 相同条件下培养(培养条件见材料方法)JM83, J9, J99, J991 及 JM83+, J9+, J99+, J991+(带+表示在菌株内引入了 *ado1* 基因)。取相同 OD 细胞, 抽提腺苷类核苷酸, HPLC 分析胞内 ATP、ADP、AMP 积累情况, 结果如图 4。

腺嘌呤核苷酸代谢在大肠杆菌中已经研究的十分清楚了。在酵母中存在一条大肠杆菌中不存在的由腺苷激酶催化 腺苷+ATP AMP+ADP 的途径。

通过引入有活性的腺苷激酶(*trc* 启动子介导 *ado1* 启动), 在大肠杆菌中建立一条由腺苷直接转变 AMP 的途径。

在大肠杆菌中, 腺苷由活性十分强的腺苷脱氨酶(由 *add* 基因编码)和嘌呤核苷磷酸酶(由 *deoD* 基因编码)分别催化转变肌苷和腺嘌呤。由图 4 JM83 和 JM83+ 的比较可以看到, 外源基因 *ado1* 的引入对细胞代谢流向并未起明显的作用。当 *add* 基因被删除后, 由图 4 J9 和 J9+ 的比较可以发现 AMP、ADP、ATP 的积累总量似乎在引入 *ado1* 基因后有所增加,

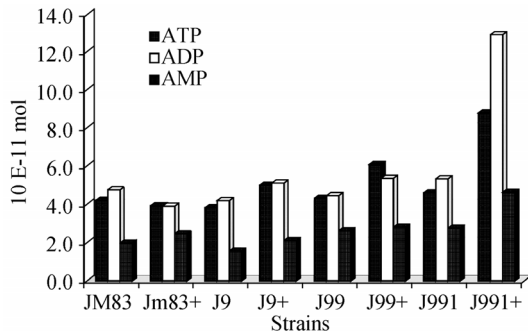


图4 大肠杆菌细胞内腺苷类能量物质含量分析

Fig. 4 Chromatogram analysis of *E. coli* endocytic ATP, ADP, AMP. The unit is  $1 \times 10^{-11}$  mol/(ml extracts of OD 0.8 cells), strain with "+" means it contains gene *ado1*.

但不十分明显。这一积累现象在删除 *deoD* 基因后变得清晰起来(尤其是 ADP、ATP 的总量增幅)(通过图 4 J99 和 J99<sup>+</sup> 的比较可以发现)。但细胞内腺嘌呤核苷酸的代谢调节是十分严谨的, 还存在一条由 AMP 核苷酶[EC:3.2.2.4](由 *amn* 基因编码)催化 AMP→腺嘌呤的途径。AMP 核苷酶的作用是感应细胞内 AMP 含量与能荷的相对值。当细胞内能荷过低, 无法维持正常代谢时, AMP 核苷酶会分解多余的 AMP, 来维持正常能荷范围<sup>[16]</sup>。据此推测在删除 *add* 和 *deoD* 基因后, 所有培养基中额外的腺苷都通过 *ado1* 途径转化成 AMP, 同时大量消耗了 ATP, 使能荷大幅降低, 低能荷状态激活了 AMP 核苷酶活性, 开始大量分解 AMP 以维持基础代谢必须的能荷值(公式  $EC=(ATP+1/2ADP)/(ATP+ADP+AMP)$ )。所以 J99<sup>+</sup> 菌株较之 J99 株的积累并不显著。在删除 *amn* 基因后, 腺苷类核苷酸的大量积累证实了推测(图 4 J991 和 J991<sup>+</sup> 的比较可以发现)。

由图 4 结果发现, ADP 是能量物质中积累最大的。可能的原因是由  $ATP+腺苷 \rightarrow ADP+AMP$  和  $AMP+ATP \rightarrow ADP+ADP$  两个反应产生大量 ADP, 并消耗 ATP 和 AMP, 使得 ATP 增幅不如 ADP 那么明显, 并形成一种 AMP、ATP 向 ADP 转化的趋势, 导致 ADP 大量产生。

**2.3.2 葡萄糖浓度梯度培养结果:** J991<sup>+</sup> 胞内大量腺苷类核苷酸的积累表明有大量外源腺苷转化成 AMP, 但要形成 ATP 除了底物供给之外, 能量也是关键因素。于是细菌被放置于不同葡萄糖浓度的培养基中培养, 并测量其能荷值变化。

将 J99<sup>+</sup>, J991<sup>+</sup> 分别培养在含葡萄糖 0.5%, 1.0%, 1.5% 的 LB 培养基上, 并以不含葡萄糖 LB 培养基作为对照。相同 OD 下收获菌体, 抽提其中腺苷类能量物质, HPLC 分析其中 ATP、ADP、AMP 等物质

含量, 并通过公式  $(ATP+1/2ADP)/(ATP+ADP+AMP)$  计算细胞能荷值<sup>[17, 18]</sup>。结果如图 5。

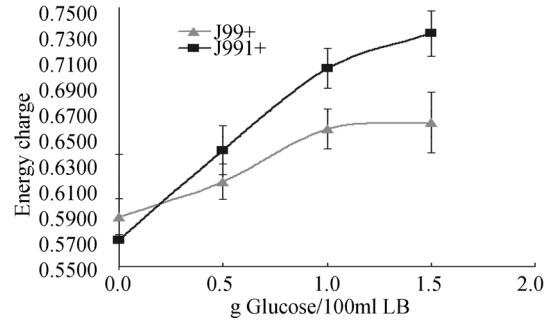


图5 J991<sup>+</sup>和 J99<sup>+</sup>能荷比较

Fig. 5 Energy charge contrast of J991<sup>+</sup> and J99<sup>+</sup>.

能荷值代表细胞内 AMP、ADP、ATP 中高能磷酸键的含量, 在本实验中可以代表能量从 AMP 传递到 ATP 的速度。我们对 J99<sup>+</sup> 和 J991<sup>+</sup> 进行了葡萄糖浓度梯度实验, J99<sup>+</sup> 与 J991<sup>+</sup> 的细胞能荷在无葡萄糖的 LB 培养基中相近, 随着葡萄糖浓度上升, 差距增大。细胞在未加入葡萄糖的培养基中, 由于补充了腺苷使得 ADP 和 AMP 增多(如图 4)而细胞能荷维持在低水平上, 葡萄糖浓度增加加速 ADP 转化为 ATP 的过程而细胞能荷上升。J991<sup>+</sup> 在能量转换速度上的优势在高葡萄糖浓度培养基中表现出来。他们在能荷增幅上的区别也说明 *amn* 基因的删除是成功的。

图 4 中 J991<sup>+</sup> 相对于 JM83 在腺苷类能量物质总量上(ATP+ADP+AMP)增加了 2.5 倍。大量的腺苷通过 *ado1* 途径转化成腺苷类核苷酸, 进入了能量代谢, 达到了 AMP、ADP、ATP 积累的目的。这个结果表明, 通过途径操作, 大肠杆菌能量物质代谢流动途径是可以被改变的, 能量物质是可以积累的。

### 3 讨论

#### 3.1 关于 AMP 的含量

当 *add* 基因被删除后, 腺苷在细胞内的唯一分解途径就是由腺嘌呤核苷磷酸酶转变成腺嘌呤, 而腺嘌呤是细胞内腺嘌呤从头合成途径的调控酶腺苷酸基琥珀合成酶[EC: 6.3.4.4]<sup>[19]</sup>(由 *purA* 基因编码)的强烈抑制因子, 腺苷酸基琥珀合成酶催化的途径同时也是鸟嘌呤从头合成的起始, 过量腺嘌呤抑制了鸟嘌呤的合成使得细胞生长停滞, 在培养过程中可观察到该现象<sup>[20, 21]</sup>。在继续删除了 *deoD* 基因后, 抑制得到缓解, 细胞正常生长。

实验最终使 ATP 的胞内浓度相对对照菌 JM83

提高了 1.8 倍。据推测 AMP 的大量生成是主要原因, 尽管在 HPLC 分析细胞抽提物的结果中并未出现高浓度的 AMP。可以想象, AMP 这个节点上的流量应当是很大的, 迅速由腺苷生成又迅速转化成 ADP, 大量生成的 AMP 是 ADP、ATP 产生的基础, 最终大量的 ADP、ATP 也都起始于 AMP, 由此检测结果验证了我们的推测。

### 3.2 关于 ATP 的积累

在删除 *amn* 基因(编码 AMP 核苷酶)后, ATP、ADP 浓度的大幅上升表明了 J99+菌株中, 外源补充的腺苷确实大量流向了 AMP, 只是由于其过高的浓度稀释了 ATP 的含量导致细胞能荷降低, 而被激活的 AMP 核苷酶分解了。在嘌呤代谢途径中, 那些能够使 AMP 发生积累的改变, 都可以达到使 ATP 积累的目的(只要培养基中能源物质充足)。其原因一方面是因为 AMP 是 ATP 合成的直接前体, 而更为重要的是细胞能荷的存在使 ATP 的浓度不可能超过 AMP 太多。单纯提高 ATP 的浓度会使细胞消耗多余的 ATP 而维护能荷稳定, 所以提高 AMP 胞内浓度的同时给与相应的能量补充可以有效提高 ATP 的量, 因为 AMP 的存在不会使能荷过高而导致 ATP 的额外消耗。

### 3.3 关于腺苷节点的刚性

在引入 *ado1* 基因后, 腺苷这一节点上的分支变成了 3 条。在分别删除了 *add*, *deoD* 基因后, 胞内腺嘌呤和肌苷的浓度并未出现大的改变(数据并未给出)。对于腺苷激酶来说, 腺嘌呤和肌苷的浓度环境并未改变, 而增高的 AMP, ADP ATP 浓度也说明他们对于腺苷激酶似乎没有反馈抑制的作用。这条通向 AMP 的分支似乎可以看作腺苷节点的主导分支。一个弱刚性的节点一般包括一条主导分支, 它不受最终产物的反馈抑制, 和一条从属分支, 它受到其自身分支代谢终产物的反馈抑制。而刚性的分支终产物不但反馈抑制本分支途径, 而且是其他分支的代谢激活剂<sup>[22, 23]</sup>。从而可以推测, 腺苷节点不是强刚性节点, 更接近于弱刚性节点。

### 参 考 文 献

- [1] Kaplan NO, Colowick SP, Ciotti MM. Enzymatic deamination of cytosine nucleosides. *J Biol Chem*, 1952, 194: 579-591.
- [2] Powell JF, Hunter JR. Adenosine deaminase and ribosidase in spores of *Bacillus cereus*. *Biochem J*, 1956, 62: 381-387.
- [3] Friedkin M, Kalckar H. Nucleoside phosphorylases. In: Boyer PD, Lardy H, Myrback K. The Enzymes. 2<sup>nd</sup> ed. New York: Academic Press, 1961.
- [4] Kalckar HM. The enzymatic synthesis of purine ribosides. *J Biol Chem*, 1947, 167: 477-486.
- [5] Hurwitz J, Heppel LA, Horecker BL. The enzymatic cleavage of adenylic acid to adenine and ribose 5-phosphate. *J Biol Chem*, 1957, 226: 525-540.
- [6] Lindberg B, Klenow H, Hansen K. Some properties of partially purified mammalian adenosine kinase. *J Biol Chem*, 1967, 242: 350-356.
- [7] Caputto R. The enzymatic synthesis of adenylic acid: adenosine kinase. *J Biol Chem*, 1951, 189: 801-814.
- [8] Kornberg A, Pricer WE. Enzymatic phosphorylation of adenosine and 2, 6-diaminopurine riboside. *J Biol Chem*, 1951, 193: 481-495.
- [9] Flaks JG, Erwin MJ, Buchanan JM. Biosynthesis of the purines XVI, the synthesis of adenosine 5'-phosphate and 5-amino-4-imidazolecarboxamide ribotide by a nucleotide pyrophosphorylase. *J Biol Chem*, 1957, 228: 201-213.
- [10] Kornberg A, Lieberman I, Simms ES. Enzymatic synthesis of purine nucleotides. *J Biol Chem*, 1955, 215: 417-427.
- [11] Remy CN, Remy WT, Buchanan JM. Biosynthesis of the purines VIII, enzymatic synthesis and utilization of alpha-5-phosphoribosylpyrophosphate. *J Biol Chem*, 1955, 217: 885-895.
- [12] LV Xiao-Bing, WU Hai-Zhen, ZHANG Hui-Zhan. Expression, Purification, and Characterization of Recombinant *Saccharomyces cerevisiae* Adenosine Kinase. *ACTA BIOCHIMICA et BIOPHYSICA SINICA* 2003, 35(7): 666-670
- [13] William CB. Hypochlorous acid-promoted loss of metabolic energy in *E. coli*. *Infection and Immunity*, 1987: 2518-2525.
- [14] 常平. DNA 加合物检测方法的研究进展. 国外医学: 卫生学分册(*Foreign Medical Sciences: Section of Hygiene*), 1995, 22(5): 273-276.
- [15] Carol MH, Marti A, Briank W, et al.. New method for generating deletions and gene replacements in *E. coli*. *Journal of Bacteriology*, 1989: 4617-4622.
- [16] Hazel BL, Vern LS. A mutant AMP nucleosidase. *J Biol Chem*, 1981, 256(24): 12823-12829.
- [17] Christopher CG, Astrid GC, Daniel EA. Adenylate energy charge in *E. coli* CR341T28 and properties of heat-sensitive adenylate kinase. *J Biol*, 1981: 1374-1385.
- [18] Astrid GC, Lana F, Daniel EA. Adenylate energy charge in *E. coli* during growth and starvation. *J Biol*, 1971: 1072-1086.
- [19] Lieberman I. Enzymatic synthesis of adenosine-5'-phosphate from inosine-5'-phosphate. *J Biol Chem*, 1956, 223: 327-339.
- [20] Xi HL, Barbara LS, Larry R. Purine catabolism in *E. coli* and function of xanthine dehydrogenase in purine sal-

- vage. *J Biol*, 2000, 182(19): 5332–5341.
- [21] Karine R, Christine D, Françoise B, et al.. Yeast AMP pathway genes respond to adenine through regulated synthesis of a metabolic intermediate. *Mol Cell Biol*, 2001, 21(23): 7901–7912.
- [22] Gregory S, Joseph JV. Network rigidity and metabolic engineering in metabolite overproduction. *Science*, 1991, 251: 1675–1680.
- [23] Gregory S. Metabolic fluxes and metabolic engineering. *Metabolic Engineering*, 1998, 1: 1–11.

## Energy charge changing by pathway manipulation of adenosine triphosphate metabolism in *Escherichia coli*

Zhenting Gu, Xiaobing Lv, Huizhan Zhang\*

(State Key Laboratory of Bioreactor Engineering, East China University of Science and Technology, Shanghai 200237, China)

**Abstract:** Endocystic metabolism of energy and material is a complex matrix. We do not know the consequence of replacing the genes controlling the metabolic fluxes. Single gene(*add*) deletion cannot change the direction of metabolic fluxes of adenosine. Through deleting 3 genes, namely *add* (encoding adenosine deaminase [EC:3.5.4.4]), *deoD* (encoding purine-nucleoside phosphorylase [EC:2.4.2.1]) and *amn* (encoding AMP nucleosidase [EC:3.2.2.4]), and introducing *ado1* gene(encoding adenosine kinase in *S. cerevisiae*[EC:2.7.1.20]), we modified the salvage pathway of adenine metabolism, and constructed a strain named J991. Extract of J991 was analyzed by HPLC. The endocystic concentration of ATP, ADP and AMP raised 2-fold as the control, and the metabolic fluxes of adenosine are also changed. It is a new way for ATP stimulation. Multi-gene manipulation is more effective than single-gene manipulation in salvage pathway of adenine.

**Keywords:** Purine salvage pathway; Gene deletion; Metabolic flux; ATP

\*Corresponding author. Tel: +86-21-64252515; Fax: +86-21-64252515; E-mail: huizhzh@ecust.edu.cn  
Received: 15 May 2007/ Revised: 17 October 2007

### 2008年《微生物学报》改用新的“稿件远程处理系统”

自2006年本刊开通使用了“稿件远程处理系统”，因软件使用不畅，本刊决定2008年改用新的稿件处理系统，随之也不得不更换网站名称。由此会给作者和专家带来不便，敬请大家谅解！

2007年12月31日之前的来稿，依然使用原网站 <http://journal.im.ac.cn/xuebao> 进行投稿、查询和审稿，直到稿件处理终结为止。2008年1月1日以后，本刊的旧网站的投稿窗口将关闭，所有投稿将在新系统下进行。

2008年1月1日以后的投稿，将在新的网站 <http://journals.im.ac.cn> 上操作，原有的“作者库”将全部导入新的系统，凡是进行过网上投稿的作者仍然可以使用原来的“用户名”和“口令”，不必再重新注册。新系统使用起来非常方便！欢迎大家进行在线投稿、查询、修稿和审稿。

衷心感谢广大读者、专家对本刊的支持！