

DOI:10.13350/j.cjpb.241104

• 论著 •

艰难梭菌 CysE 和 CysK 蛋白的克隆、表达 与生物信息学分析*

古文鹏, 贾森泉, 周永明, 尹建雯, 赵世文, 赵晓南, 伏晓庆**

(云南省疾病预防控制中心急性传染病防制所, 云南昆明 650500)

【摘要】 目的 生物信息学分析艰难梭菌半胱氨酸合成蛋白 CysE 和 CysK 的理化性质、三维结构和蛋白互作信息, 并进行两个蛋白的体外克隆表达和纯化。方法 采用 ProtParam 对 CysE 和 CysK 蛋白进行理化性质预测, TMHMM 进行跨膜结构域分析, SignalP 分析蛋白信号肽, SWISS-MODEL 预测二者的三维结构, STRING 分析蛋白互作信息。将 *cysE* 和 *cysK* 目的基因片段分别克隆到 pET-32a 和 pET-28a 载体, 融合 His 标签通过大肠埃希菌表达系统来表达目的蛋白, 并进行表达纯化测试。结果 CysE 蛋白共有 196 氨基酸(AA), 无跨膜区, 信号肽序列为无, 疏水性一般, 有 2 个无序性片段。CysK 蛋白共有 302 AA, 无跨膜区, 信号肽序列为无, 疏水性一般, 有 5 个无序性片段。两个蛋白共产生 α 螺旋、 β 片层、 β 转角和无规卷曲 4 种二级结构。CysE 的二级结构共由 5 个 α 螺旋、15 个 β 片层、10 个 β 转角和 19 个无规卷曲组成; CysK 的二级结构共由 15 个 α 螺旋、16 个 β 片层、16 个 β 转角和 26 个无规卷曲组成。蛋白互作预测结果显示, CysE 与 CysK 涉及菌株的蛋白合成和代谢途径, 主要是半胱氨酸的合成途径、甲硫氨酸的合成以及硫代谢途径等。重组表达载体 pET-32a-*cysE* 和 pET-28a-*cysK* 构建成功, 对蛋白诱导表达条件进行优化后, 进行 SDS-PAGE 电泳。结果显示, 两个蛋白的分子量分别为 CysE 38 ku 和 CysK 34 ku, 二者的纯度大于 85%。最终得到的 CysE 重组蛋白浓度为 0.8 mg/mL, CysK 重组蛋白的浓度为 1 mg/mL。结论 本研究对艰难梭菌 CysE 和 CysK 的蛋白进行了生物信息学分析, 并成功构建和表达了 CysE 与 CysK 重组蛋白, 为进一步探索二者对于艰难梭菌致病性的相关机制提供了基础。

【关键词】 艰难梭菌; CysE; CysK; 克隆表达; 生信分析

【文献标识码】 A

【文章编号】 1673-5234(2024)11-1266-05

[Journal of Pathogen Biology. 2024 Nov.; 19(11):1266-1270.]

Clonal expression and bioinformatics analysis of CysE and CysK proteins of *Clostridioides difficile*

GU Wenpeng, JIA Senquan, ZHOU Yongming, YIN Jianwen, ZHAO Shiwen, ZHAO Xiaonan, FU Xiaoqing (Department of Acute Infectious Disease Control and Prevention, Yunnan Provincial Center for Disease Control and Prevention, Kunming 650500, China)***

【Abstract】 **Objective** The physicochemical properties, three-dimensional structures and protein interactions of the *Clostridioides difficile* cysteine synthesis proteins CysE and CysK were analyzed, and these two proteins were cloned, expressed and purified. **Methods** Physicochemical properties of CysE and CysK proteins were predicted using ProtParam, transmembrane structural domains were analyzed by TMHMM, protein signal peptide were analyzed by SignalP, three-dimensional structure of proteins were predicted by SWISS-MODEL, and protein interactions information were analyzed by STRING. The target gene *cysE* and *cysK* were cloned into pET-32a and pET-28a vectors, respectively, fused with His-tags to express the target proteins through the *E. coli* expression system, and then tested for expression purification. **Results** The CysE protein had a total of 196 amino acids (AA), no transmembrane region, a signal peptide sequence of nil, fair hydrophobicity, and two disordered fragments. The CysK protein had a total of 302 AA, no transmembrane region, a signal peptide sequence of nil, fair hydrophobicity, and five disordered fragments. The two proteins showed a total of 4 secondary structures of α -helices, β -sheet layers, β -turns and random curls. The secondary structure of CysE consisted of a total of 5 α -helices, 15 β -sheet layers, 10 β -turns, and 19 random curls; the CysK consisted of a total of 15 α -helices, 16 β -sheet layers, 16 β -turns, and 26 random curls. The protein interactions prediction showed that CysE and CysK were involved in protein synthesis and metabolic pathways of the strain, mainly referred to cysteine synthesis pathway, methionine synthesis, and sulfur metabolism pathway. The recombinant expression vectors pET-32a-

* **【基金项目】** 国家自然科学基金项目(No. 82360398); 云南省基础研究专项项目(No. 202301AT070160); 云南省技术创新人才培养对象项目(No. 202405AD350003)

** **【通讯作者】** 伏晓庆, E-mail: yncdctxq@163.com

【作者简介】 古文鹏(1982-), 男, 云南昆明人, 博士, 副主任技师, 主要从事艰难梭菌致病机制相关研究。E-mail: gu_02788@163.com

cysE and *pET-28a-cysK* were successfully constructed, and SDS-PAGE electrophoresis was carried out after the optimization of protein-induced expression conditions. The results showed that the molecular weights of the two proteins were 38 ku for *CysE*, 34 ku for *CysK*, respectively, and the purity of the two was greater than 85%. The final concentration of *CysE* recombinant protein was 0.8 mg/ml, and the concentration of *CysK* recombinant protein was 1 mg/ml. **Conclusion** In this study, the bioinformatics analysis of the proteins of *CysE* and *CysK* of *C. difficile* was carried out and recombinant proteins of two genes were successfully constructed and expressed, which provided a basis for further exploring the relevant mechanisms of the pathogenicity of *C. difficile*.

【Keywords】 *Clostridioides difficile*; *CysE*; *CysK*; clonal expression; bioinformatics analysis

艰难梭菌(*Clostridioides difficile*)为革兰氏染色阳性产芽孢的厌氧菌,产毒性艰难梭菌通过分泌肠毒素A和细胞毒素B,部分菌株还具有二元毒素,从而引起患者产生抗生素药物相关性腹泻、结肠炎或是严重的致死性伪膜性肠炎,统称为艰难梭菌感染(CDI)^[1-2]。临床上常见的症状包括轻症的携带状态或是腹泻,到严重的结肠炎、中毒性巨结肠、伪膜性肠炎甚至肠穿孔等^[3]。根据艰难梭菌的监测数据显示,CDI的发病率、病死率和疾病负担在全球范围内呈现逐渐上升的趋势,成为当前全球主要公共卫生问题之一^[4-5]。因此,艰难梭菌造成的感染给经济社会和人群健康带来了巨大的损失与危害。可以说对于艰难梭菌感染领域的相关研究目前已经成为细菌性病原体感染研究的焦点之一。

本课题组的前期研究结果显示,艰难梭菌半胱氨酸合成蛋白 *CysK* 和 *CysE* 在其致病性中可能起到关键作用^[6]。半胱氨酸是一种重要的含硫氨基酸,在细胞正常生理活动中起着重要作用,是甲硫氨酸和一些辅因子(生物素、硫辛酸、硫胺素和辅酶A等)生物合成的前体,也是铁硫簇的硫供体,还能够参与蛋白质折叠和组装、一些酶的催化,维持胞内的氧化还原环境^[7]。细菌中半胱氨酸的从头生物合成需要两种酶,分别是 *cysE* 和 *cysK* 基因编码的丝氨酸乙酰转移酶和 O-乙酰丝氨酸硫氢化酶。*CysE* 催化乙酰盐从乙酰辅酶A转移到丝氨酸,从而产生 O-乙酰丝氨酸(OAS)。*CysK* 是该途径的下一个酶,它以 5'-磷酸吡哆醛(PLP)作为辅助因子,将 OAS 和硫化物转化为半胱氨酸和乙酸盐^[8]。目前关于 *CysK* 和 *CysE* 在艰难梭菌中的相关研究尚未见系统的报道。

为了研究 *CysK* 和 *CysE* 蛋白在艰难梭菌致病性中的作用和相关机制,本研究首次采用大肠埃希菌原核表达系统,在体外克隆和表达上述两个蛋白,并用于下游相关实验研究和科研工作。

材料与方法

1 材料

1.1 菌株与载体 采用艰难梭菌参考菌株 CD12038 (GenBank accession:CP033214)作为研究对象,感受

态细胞 BL21 (DE3)、原核表达载体 *pET-32a* 和 *pET-28a* 购自昆明硕擎公司。

1.2 试剂与仪器 LB琼脂和肉汤购自北京路桥技术股份公司;高保真酶、T4 DNA连接酶、氨苄青霉素、卡那霉素、IPTG(异丙基-β-D-硫代半乳糖苷酶)、内切酶 *NcoI* 和 *XhoI* 购自 TaKaRa 公司;SDS-PAGE 预制胶套装试剂盒购自索莱宝公司;质粒提取试剂盒和 DNA 纯化回收试剂盒购自北京天根公司;蛋白定量试剂盒自购上海生工公司。

PCR 仪、水平电泳仪和 SDS-PAGE 垂直电泳仪 (Bio-Rad 公司);台式离心机 (Thermo 公司);超声破碎仪 (Bandelin 公司)。

2 方法

2.1 生物信息学分析 使用 MEGA 6.0 软件将 CD12038 菌株的 *cysE* 和 *cysK* 基因序列转换成氨基酸序列,并用于后续生物信息学分析。采用 ProtParam 对 *CysE* 和 *CysK* 蛋白进行理化性质预测, TMHMM 2.0 在线进行跨膜结构域分析, SignalP 5.0server 分析蛋白信号肽, SOPMA 预测蛋白的二级结构, SWISS-MODEL 预测二者的三维结构, STRING 分析蛋白互作信息。

2.2 蛋白的克隆与表达

2.2.1 *cysE* 和 *cysK* 基因的扩增 根据 Clone Manager 软件设计两个基因的 PCR 引物。*cysE* 的引物序列为:(F)5'-CCATGGTTGTTTAAAGAAAATAAATAA-3', (R)5'-CTCGAGCTATATATAATATACATTAT-3'。*cysK* 基因的引物序列为:(F)5'-CCATGGATGTTATATAATAATGCATT-3', (R)5'-CTCGAGTTAAAATATTCCCATCGACA-3'。下划线处分别为 *NcoI* 和 *XhoI* 的酶切位点和保护碱基。

2.2.2 重组质粒的构建 将 PCR 产物纯化后分别连接到 pMD-18-T 载体,进行蓝白斑筛选后,对阳性克隆开展测序。然后对测序正确的 T 载体、表达载体 *pET-32a* 和 *pET-28a* 分别用 *NcoI* 和 *XhoI* 酶切,酶切完成的片段与表达载体进行连接后转化入感染态细胞 BL21 (DE3) 中,其中 *cysE* 采用 *pET-32a*, # *cysK* # 采用 *pET-28a* 克隆载体。两个分别在含氨苄

青霉素和卡那霉素的 LB 培养基中进行菌落鉴定以及重组质粒的双酶切鉴定,验证克隆成功。

2.2.3 重组蛋白的诱导表达、纯化和定量 将鉴定正确的重组质粒接种在抗性 LB 固体培养基上,挑取单克隆过夜培养,按 1:100 的比例扩大培养至含有抗性的 LB 液体培养基中,待 A₆₀₀ 的值升高到 0.5~0.6 时,加入终浓度为 0.5 mmol/L 的 IPTG 诱导剂,15 °C 诱导表达 24 h。将表达后的菌液离心洗涤、超声破碎后再次离心,上清用 0.45 μm 滤膜过滤后,用 AKTA 蛋白纯化仪-镍亲和层析柱纯化带有 His 标签的重组蛋白,纯化完后进行 SDS-PAGE 观察蛋白的纯化效果,并利用 BCA 蛋白定量试剂盒对重组蛋白 CysK 和 CysE 进行定量检测。

结果

1 CysE 和 CysK 的生信分析

CysE 蛋白共有 196 氨基酸(AA),无跨膜区,信号肽序列为无,疏水性一般,有 2 个无序性片段。CysK 蛋白共有 302 AA,无跨膜区,信号肽序列为无,疏水性一般,有 5 个无序性片段。CysE 和 CysK 的二级结构预测结果显示,两个蛋白共产生 α 螺旋、β 片层、β 转角和无规卷曲 4 种二级结构,其中氨基酸组成各二级结构的数量和构成比见表 1。CysE 的二级结构共由 5 个 α 螺旋、15 个 β 片层、10 个 β 转角和 19 个无规卷曲组成;CysK 的二级结构共由 15 个 α 螺旋、16 个 β 片层、16 个 β 转角和 26 个无规卷曲组成。SWISS-MODEL 预测的 CysE 和 CysK 蛋白的三级结构见图 1。

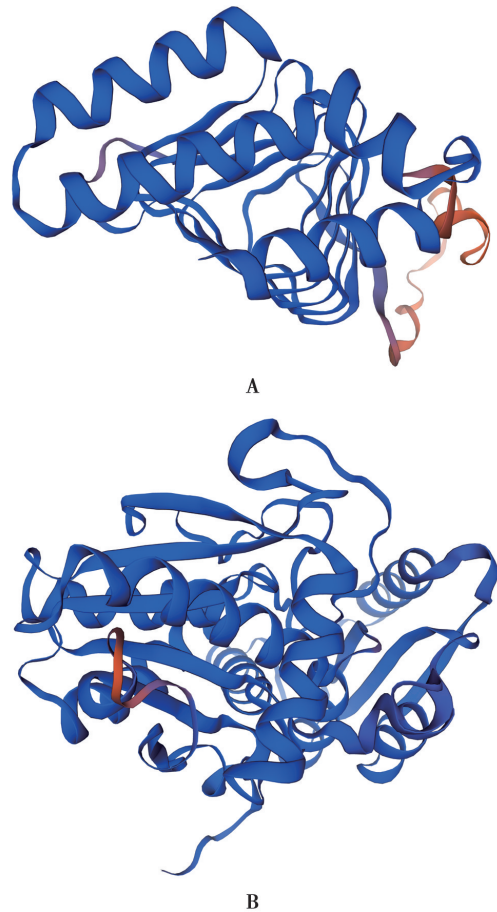
表 1 CysE 和 CysK 蛋白的二级结构氨基酸组成和构成比
Table 1 Amino acid composition and composition ratio of the secondary structure of CysE and CysK proteins

蛋白 Protein	α 螺旋 Alpha helix	β 片层 Extended strand	β 转角 Beta turn	无规卷曲 Random coil
CysE	53 (27.04%)	56 (28.57%)	18 (9.18%)	69 (35.20%)
CysK	105 (34.77%)	60 (19.87%)	33 (10.93%)	104 (34.44%)

蛋白互作预测结果显示,CysE 与 CysK、CysM、CysS、ThrB、SdaB 等构成了蛋白互作网络(图 2A)。这些蛋白均涉及菌株的蛋白合成和代谢途径,主要是半胱氨酸的合成途径、甲硫氨酸的合成、丝氨酸和嘌呤的合成途径以及硫代谢途径等。基因排列预测结果表明,CysE 在大部分原核生物中均存在,同时在大部分细菌中 *cysE* 基因均在染色体中呈现连续排列(图 2B)。

蛋白互作预测结果显示,CysK 与 CysE、CysM、CysS、AspB、MdeA 等构成了蛋白互作网络(图 3A)。这些蛋白均涉及菌株的蛋白合成和代谢途径,主要是丝氨酸和甲硫氨酸合成、半胱氨酸的合成途径、蛋白的

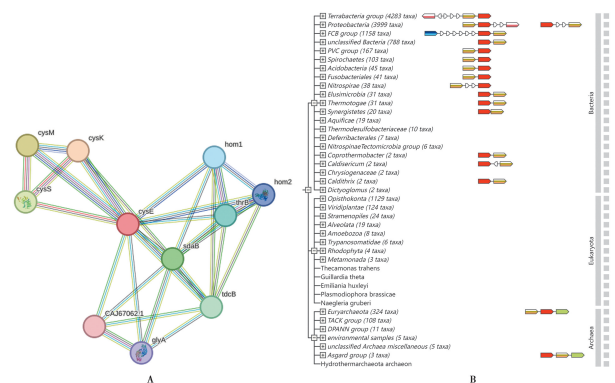
磷酸化修饰途径等。基因排列预测结果表明,CysK 与 CysE 的基因排列结果相似。在大部分原核生物中均存在,同时在大部分细菌中 *cysK* 基因均在染色体中呈现连续排列(图 3B)。



A CysE 蛋白三级结构示意图 B CysK 蛋白三级结构示意图
图 1 CysE 和 CysK 蛋白的三级结构预测示意图

A Schematic representation of the tertiary structure of CysE protein
B Schematic representation of the tertiary structure of CysK protein

Fig. 1 Schematic representation of the predicted tertiary structure of CysE and CysK proteins



A 预测的 CysE 蛋白与其它蛋白的互作网络图 B CysE 蛋白的基因排列预测分析

图 2 CysE 的蛋白互作分析示意图

A Predicted interaction network diagram of CysE protein with other proteins
B Predicted gene alignment analysis of CysE protein

Fig. 2 Schematic diagram of protein interactions analysis of CysE

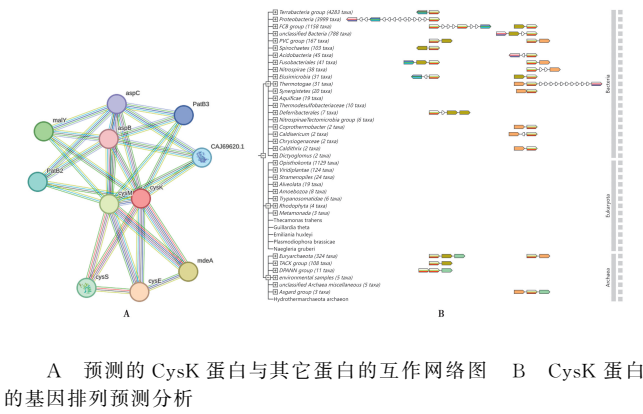


图 3 CysK 的蛋白互作分析示意图

A Diagram of the predicted interactions network of CysK proteins with other proteins B Analysis of the predicted gene alignment of CysK proteins

Fig. 3 Schematic diagram of protein interactions analysis of CysK

2 重组蛋白的克隆与表达

cysE 和 *cysK* 基因以 CD12038 为模板进行扩增,产物分别与 T 载体连接成功后进行测序分析,结果显示,*cysE* 和 *cysK* 基因全长分别为 602 bp 和 941 bp (图 4A),无碱基突变。将测序正确的 *cysE* 和 *cysK* 基因片段分别与 pET-32a 和 pET-28a 表达载体连接成功后,提取质粒进行双酶切鉴定,在目的片段大小位置分别出现条带,提示重组表达载体 pET-32a-*cysE* 和 pET-28a-*cysK* 构建成功(图 4B)。

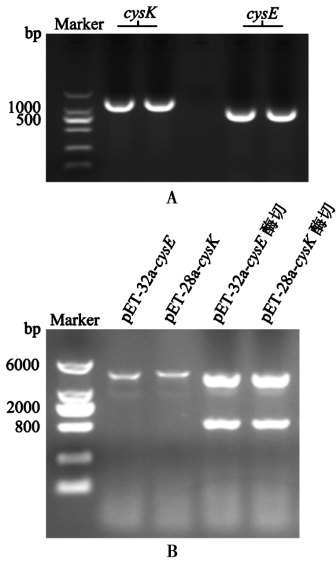


图 4 *cysE* 和 *cysK* 基因 PCR 扩增和质粒双酶切鉴定电泳图

A PCR amplification electropherograms of *cysE* and *cysK* genes B Dual enzyme digestion electropherograms of recombinant plasmids

Fig. 4 *cysE* and *cysK* gene PCR amplification and plasmid double enzyme digestion identification electropherograms

对蛋白诱导表达条件进行优化后,采用 0.5 mmol/L 的 IPTG、15 °C 诱导表达 24 h。表达好的细菌经过超声破碎,离心收集上清经 AKTA 纯化仪进行

纯化,然后进行 SDS-PAGE 电泳,结果见图 5 所示。两个蛋白的分子量分别为 CysE 38 ku 和 CysK 34 ku,二者的纯度大于 85%。蛋白定量结果显示,得到的 CysE 重组蛋白浓度为 0.8 mg/mL, CysK 重组蛋白的浓度为 1 mg/mL。

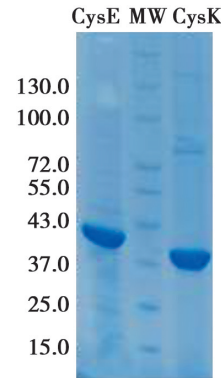


图 5 CysE 和 CysK 重组蛋白的 SDS-PAGE 电泳图
Fig. 5 SDS-PAGE electropherogram of CysE and CysK recombinant proteins

讨论

CysE 是细菌半胱氨酸生物合成途径中的第一个酶,研究显示其对大肠埃希菌、流感嗜血杆菌、金黄色葡萄球菌和枯草芽孢杆菌造成的感染非常重要^[9-13]。CysE 能够让结核分枝杆菌在宿主体内持续存活、能增强粘质沙雷菌的磷脂酶/卵磷脂酶活性,以及鞭毛运输作用^[14-15]。因此,CysE 在多种病原微生物的致病机制中起关键作用。本课题组的前期研究结果提示,艰难梭菌的半胱氨酸合成关键基因 *cysE/cysK* 可能在其致病性中起重要作用,因此,本研究开展艰难梭菌 CysE 和 CysK 蛋白的克隆与表达,为后续相关科研工作提供基础。

在细菌中,CysE 在乙酰 CoA 的帮助下将 L-丝氨酸转化为 OAS。CysE 属于细菌 O-乙酰转移酶家族和 O-乙酰转移酶亚家族,由 6 个氨基酸残基的串联重复序列组成。CysE 蛋白的总体特征折叠由两个结构域组成:N-末端的 SATase 结构域,包括约 1 至 140 个残基(在不同物种中各不相同)和 C-末端 L β H 结构域或六肽重复结构域,包括从残基 141 到 260 残基。大多数原核生物的 CysE 只具有 C 端六肽重复结构域,但 *Entamoeba* 原虫的 CysE 却具有两个结构域^[16]。本研究中,课题组对 CysE/CysK 蛋白开展了生物信息学的初步分析,结果显示,二者在大部分细菌中是普遍存在的基因,同时,与 CysE/CysK 互作的蛋白构成的互作网络主要的功能涉及半胱氨酸的合成与代谢和细菌的硫代谢途径等。

病原微生物生活在氧化的宿主环境中,需要吸收氧化形式的硫,然后在细胞内还原成硫化物。因此,半胱氨酸生物合成途径有两个分支,分别在吸收和还原

硫酸盐以及形成半胱氨酸方面发挥作用^[17]。半胱氨酸的硫醇分子具有高活性,浓度越高对细胞的毒性越大。因此,该氨基酸的合成和降解受到多层次的严格调控。大多数半胱氨酸生物合成基因在转录水平上受到 CysB 转录激活因子的正向调控,但编码 CysE 和 CysK 的基因则不受此调控^[18]。

研究显示,从头开始的半胱氨酸生物合成受细胞内硫和 OAS 水平制约。首先,CysE 的最终产物 L-半胱氨酸对 CysE 的反馈抑制^[19]。L-半胱氨酸与底物 L-丝氨酸竞争结合到活性位点,其结构基础在于 C 端伸展构象的改变,将残基置于乙酰 CoA 结合位点,排除了与酶结合的半胱氨酸的乙酰化。其次,CysE 和 CysK 之间可逆的蛋白质-蛋白质相互作用。CysE 的 C 端尾部与 CysK 的活性位点裂隙高亲和力结合,形成异构双酶半胱氨酸合成酶复合物(CSC),CSC 抑制 CysK 的活性^[20-21]。硫的可用性影响微生物中 CSC 的形成和 CysE 的活性,以及 OAS 的水平,进而影响半胱氨酸的产生。在富含硫的条件下,游离的 CysK 会将 OAS 转化为 L-半胱氨酸,降低 OAS 的水平,从而有利于 CSC 的形成。当硫受到限制时,CysK 无法将 OAS 转化为半胱氨酸,导致 OAS 积累、双酶复合物解离和 CysE 部分失活。CysE 与 CysK 蛋白的互作用在我们的生信分析中也得到了证实,二者共同调节艰难梭菌的关键氨基酸合成和代谢途径。实际上,半胱氨酸对于艰难梭菌 *cysE* 和 *cysK* 基因的反馈性抑制作用在本课题组的研究和既往的报道中也得到了证实^[22]。在艰难梭菌培养基中添加不同浓度的半胱氨酸会显著抑制上述两个基因的转录水平,同时造成了菌株的毒素分泌水平的改变。而造成这种现象的原因则主要与艰难梭菌培养环境中硫化物的积累有关,当向培养基中添加的半胱氨酸达到一定浓度时,菌株会产生明显的黑色硫化氢代谢物,而硫化物的产生与后续的一系列基因表达变化具有十分重要的相关性。

【参考文献】

- [1] Buffie CG, Bucci V, Stein RR, et al. Precision microbiome reconstitution restores bile acid mediated resistance to *Clostridium difficile* [J]. Nature, 2015, 517(7533): 205-208.
- [2] Collins J, Robinson C, Danhof H, et al. Dietary trehalose enhances virulence of epidemic *Clostridium difficile* [J]. Nature, 2018, 553(7688): 291-294.
- [3] Kuehne SA, Cartman ST, Heap JT, et al. The role of toxin A and toxin B in *Clostridium difficile* infection [J]. Nature, 2010, 467(7316): 711-713.
- [4] Stausberg J. Epidemiology of *Clostridium difficile* infection [J]. Dtsch Arztebl Int, 2015, 112(19): 345.
- [5] Bloomfield LE, Riley TV. Epidemiology and risk factors for community-associated *Clostridium difficile* infection: A narrative review [J]. Infect Dis Ther, 2016, 5(3): 231-251.
- [6] Gu W, Wang W, Li W, et al. New ribotype *Clostridioides difficile* from ST11 group revealed higher pathogenic ability than RT078 [J]. Emerg Microbes Infect, 2021, 10(1): 687-699.
- [7] Rosa B, Marchetti M, Paredi G, et al. Combination of SAXS and protein painting discloses the three-dimensional organization of the bacterial cysteine synthase complex, a potential target for enhancers of antibiotic action [J]. Int J Mol Sci, 2019, 20(20): 5219.
- [8] Takagi H, Ohtsu I. L-cysteine metabolism and fermentation in microorganisms [J]. Adv Biochem Eng Biotechnol, 2017, 159: 129-151.
- [9] Verma D, Gupta V. New insights into the structure and function of an emerging drug target CysE [J]. Biotech, 2021, 11(8): 373.
- [10] Zhang R, Lin Y. DEG 5.0, a database of essential genes in both prokaryotes and eukaryotes [J]. Nucleic Acids Res, 2009, 37 (Database issue): D455-458.
- [11] Akerley BJ, Rubin EJ, Novick VL, et al. A genome-scale analysis for identification of genes required for growth or survival of *Haemophilus influenzae* [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002, 99 (2): 966-971.
- [12] Chaudhuri RR, Allen AG, Owen PJ, et al: Comprehensive identification of essential *Staphylococcus aureus* genes using transposon-mediated differential hybridisation (TMDH) [J]. BMC Genomics, 2009, 10: 291.
- [13] Kobayashi K, Ehrlich SD, Albertini A, et al: Essential bacillus subtilis genes [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003, 100(8): 4678-4683.
- [14] Rengarajan J, Bloom BR, Rubin EJ. Genome-wide requirements for *Mycobacterium tuberculosis* adaptation and survival in macrophages [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005, 102(23): 8327-8332.
- [15] Anderson MT, Mitchell LA, Mobley HLT. Cysteine biosynthesis controls *Serratia marcescens* phospholipase activity [J]. J Bacteriol, 2017, 199(16): e00159-17.
- [16] Yeon JY, Yoo SJ, Takagi H, et al. A novel mitochondrial serine O-acetyltransferase, OpSAT1, plays a critical role in sulfur metabolism in the thermotolerant methylotrophic yeast *ogataea parapolyomorpha* [J]. Sci Rep, 2018, 8(1): 2377.
- [17] Kari C, Nagy Z, Kovacs P, Hernadi F. Mechanism of the growth inhibitory effect of cysteine on *Escherichia coli* [J]. J Gen Microbiol, 1971, 68(3): 349-356.
- [18] Kredich NM. The molecular basis for positive regulation of *cys* promoters in *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* [J]. Mol Microbiol, 1992, 6(19): 2747-2753.
- [19] Olsen LR, Huang B, Vetting MW, et al. Structure of serine acetyltransferase in complexes with CoA and its cysteine feedback inhibitor [J]. Biochemistry, 2004, 43(20): 6013-6019.
- [20] Burkhard P, Tai CH, Jansonius JN, et al. Identification of an allosteric anion-binding site on O-acetylserine sulfhydrylase: structure of the enzyme with chloride bound [J]. J Mol Biol, 2000, 303(2): 279-286.
- [21] Huang B, Vetting MW, Roderick SL. The active site of O-acetylserine sulfhydrylase is the anchor point for hienzyme complex formation with serine acetyltransferase [J]. J Bacteriol, 2005, 187(9): 3201-3205.
- [22] Joshi P, Gupta A, Gupta V. Insights into multifaceted activities of CysK for therapeutic interventions [J]. Biotech, 2019, 9(2): 44.

【收稿日期】 2024-04-26 【修回日期】 2024-07-15