

大肠杆菌 Nissle 1917 菌株荚膜多糖合成基因 *kfiA* 的功能研究

安翠英, 周贤轩* (合肥工业大学生物与食品工程学院, 安徽合肥 230009)

摘要 [目的]分析益生菌 EcN 的荚膜多糖合成基因簇,寻找致病性大肠杆菌 K5 菌株的肝素前体多糖替代来源。[方法]通过基因敲除、基因回补、¹H 核磁共振(NMR)检测等技术手段,研究了 *kfiA* 基因在 EcN 荚膜多糖合成过程中的功能。[结果]利用 λ-red 重组系统成功构建了 *kfiA* 突变株,利用 NMR 检测发现 *kfiA* 缺失突变株的荚膜多糖特征峰消失,又通过染色体重组技术,把 *kfiA* 基因插入了 EcN 突变株的基因组中,核磁共振检测重新发现了荚膜多糖特征峰。[结论]*kfiA* 基因是 EcN 菌株荚膜多糖合成途径的一个关键基因,参与了荚膜多糖合成。λ-red 重组系统与染色体重组技术同样适用于 EcN 菌株,可为后续的菌株改造提供参考。

关键词 荚膜多糖;肝素前体;大肠杆菌 Nissle 1917;核磁共振

中图分类号 Q939.9 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2017)23-0119-04

The Key Role of *kfiA* Gene in Synthesis of Capsular Polysaccharide of *Escherichia coli* Strain Nissle 1917

AN Cui-ying, ZHOU Xian-xuan* (School of Food Science and Engineering, Hefei University of Technology, Hefei, Anhui 230009)

Abstract [Objective] The aim was to analyze genes in heparosan synthesis of EcN heparosan, and find out alternative sources of heparin precursor polysaccharide for *E. coli* K5 strain. [Method] We studied the key role of *kfiA* gene in heparosan synthesis by using the techniques, such as gene knockout, gene knock-in, NMR, and so on. [Result] The *kfiA* was knock out with the λ-red recombination system. The NMR analysis showed that disappeared the specific signal of heparosan from the *kfiA* mutant. Furthermore, the complementary strain with a *kfiA* gene inserted into the EcN chromosome was constructed with a phage helped recombination system. The insertion of *kfiA* restored the synthesis of heparosan and the specific signal of heparosan in the NMR spectrum. [Conclusion] The *kfiA* plays a critical role in the synthesis of EcN heparosan. Furthermore, both the λ-red recombination system and the phage helped recombination system are useful as a tool for strain engineering in EcN.

Key words Capsular polysaccharide; Heparosan; *E. coli* Nissle 1917; NMR

肝素是一种应用广泛的抗凝血药物。目前,药物类肝素主要从猪小肠黏膜等动物组织中提取纯化。动物源的肝素生产具有一些缺点,如病原污染^[1]、货源不稳定、环境污染等。新的非动物源肝素是一个很有前景的替代品,如化学及酶法合成肝素^[2]。受到成本和产量等因素的影响,很有必要对非动物源生物工程肝素及其衍生物的合成进行深入研究。生物工程肝素的合成以肝素前体多糖为碳链骨架,需要对该糖链上的羟基进行磺基化修饰,使其具有抗凝血活性。肝素前体多糖主要提取自大肠杆菌 K5 菌株的荚膜,又可分为荚膜多糖。大肠杆菌 K5 菌株的肝素前体多糖的二糖骨架与肝素结构相似,但没有被硫酸化,其中的葡糖醛酸也没有被异构化为艾杜糖醛酸^[3]。在 *E. coli* K5 基因组中,控制荚膜多糖合成的基因簇由 3 个不同的区域组成,即 Region 1、Region 2 和 Region 3。其中,Region 1 和 Region 3 的基因主要负责将多糖链从细胞内转运到细胞外;而 Region 2 包括 *kfiA*、*kfiB*、*kfiC* 和 *kfiD* 基因,它们编码的蛋白质通常被认为参与了控制多糖链的合成。Region 1 由 6 个基因(*kpsFEDUCS*)组成,是一个单独的转录单元。在 *kpsF* 上游处有一个 δ⁷⁰ 启动子(PR1)。Region 3 的 *kpsM*、*KpsT* 基因负责转运多糖链跨过细胞膜。Region 3 的启动子从 *kpsM* 基因上游 741 bp 处开始转录,控制 Region 3 及 Region 2 的基因表达。肝素前体多糖结构为[-GlcUA - β(1,4) - GlcNAc - α(1,4) -]_n, GlcUA 表示葡萄糖醛酸, GlcNAc 表示 N - 乙酰氨基葡萄糖, n 的平均值约为 70^[4]。

大肠杆菌 K5 菌株是一种病原菌,能够感染人的泌尿系

统,形成生物被膜,难以治愈。因此,以大肠杆菌 K5 菌株的荚膜多糖作为肝素前体多糖的来源,存在安全风险。大肠杆菌 Nissle 1917(EcN)菌株与大肠杆菌 K5 菌株的荚膜多糖合成基因簇具有相似性。EcN 是肠道益生菌,有益生菌的诸多特性。它能够合成 3 种不同类型的菌毛粘附于肠上皮细胞,可有效地在肠道中定殖,形成较强的生物被膜以抵御病原菌的入侵。在肠道中, EcN 形成生物被膜的能力要强于致病性大肠杆菌^[5]。EcN 分泌小菌素 H47 和小菌素 M 能够对其他病原菌产生拮抗作用^[6]。EcN 菌体表面的 O6 抗原具有特殊的脂多糖结构, EcN 的这种特殊的多糖结构使其具有免疫调节作用,可以增强宿主体内的免疫调节能力^[7]。EcN 的 H1 型鞭毛使菌体具备较强的迁移能力,有利于菌体广泛分布。此外,这种益生菌还具有 6 种不同的摄铁系统,可通过竞争 Fe³⁺ 来抑制鼠伤寒沙门氏菌等致病菌在肠道中的定殖^[5]。为了找到致病性大肠杆菌 K5 菌株的肝素前体多糖替代来源,笔者分析了益生菌 EcN 的荚膜多糖合成基因簇,通过基因敲除、基因回补、NMR 检测等技术手段,研究了 *kfiA* 基因在 EcN 荚膜多糖合成过程中的功能。

1 材料与方法

1.1 材料 克隆载体 pKD4、pKD46、pCP20、pAH123、pAH162, 大肠杆菌菌株 EcN、BW25142,均由合肥工业大学生物与食品工程学院保存。高保真 PrimeStar DNA 聚合酶、限制性内切酶 *Kpn* I、*Pst* I、*EcoR* I、DNA 连接试剂盒 DNA Ligation Kit Ver 2.1 购于 TaKaRa 公司; *Taq* DNA 聚合酶购于北京全式金生物技术有限公司; SanPrep 柱式 PCR 产物纯化试剂盒、SanPrep 柱式 DNA 胶回收试剂盒、SanPrep 柱式质粒 DNA 小量抽提试剂盒购于生工生物工程(上海)股份有限公司;其余试剂均为进口分装或国产分析纯。引物(表 1)设计采用 Vector NTI 8.0 软件,由通用生物系统(安徽)有限公司合成。大肠杆菌培养所

基金项目 国家自然科学基金项目(31670120)。

作者简介 安翠英(1990—),女,安徽阜阳人,硕士研究生,研究方向:微生物代谢与调控。* 通讯作者,教授,博士,从事微生物与酶工程研究。

收稿日期 2017-05-24

用的抗生素为氨苄青霉素 (Ap, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$)、卡那霉素 (Kan, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$)、四环素 (Tet, 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$)。

表 1 试验所用的引物序列

Table 1 Primer sequences

引物编号 Primers No.	序列(5'→3') Sequences	引物编号 Primers No.	序列(5'→3') Sequences
P0019	CAGTCATAGCCGAATAGCCT	P0028	ACTTAACGGCTGACATGG
P0020	TTGTCAAGACCGACCTGTCC	P0029	ACGAGTATCGAGATGGCA
P0227	ATGATTGTGCAAATATGTCATAC- CCACCTCGAAAAGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC	P0078	CTGCTTGTGGTGGTGAAT
P0228	TTACCCCTTCCACATTATACACTAATTC- GAGGTTAAGTTTATGGGAATTAGCCATGGTCC	P0079	TAAGGCAAGACGATCAGG
P0229	GCAAAGAGTGGTTTGATATGGT	P0262	AAAACTGCAGCTTACCCTTCCACATTATACACTA
P0230	TTGACATATTGCGTTACCACC	P0265	CCCGGAATTGATGATTGTTGCAAATATGTCATCA
P0011	ACGGGGTACCCTATTGCCATTTCTTAACCCCA	P0291	GCAACAATCATTGATGATGTGATCCTA- ATCTCTTCAGGTACGCTACC
P0012	AAAACTGCAGTTGATGATGTGATCCTAATCTCT	P0292	TCACATCATCAAATGATTGTTGCAAATAT- GTCATCATACCCACCTCGA

注:划线序列与模板配对;粗体部分序列为限制性酶切位点;斜体部分序列为酶切位点的保护碱基

Note: The scribing sequence was matched with template; The bold sequence was restriction enzyme site; the italic sequence was the protective base of the enzyme site

1.2 方法

1.2.1 EcN 菌株中 *kfiA* 基因敲除。 EcN 菌株中 *kfiA* 基因敲除采用已发表的大肠杆菌 K12 菌株基因敲除方法,并作少量修改^[8]。根据 EcN 中 *kfiA* 基因编码区的序列 (GenBank 登陆号: AJ586888.1) 上下游 39 bp 为同源臂设计扩增引物 P0227/P0228。聚合物链式反应 (PCR) 以 pDK4 为模板扩增基因敲除片段 FRT - Kan - FRT, 反应条件: 95 $^{\circ}\text{C}$ 2 min, 95 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 51 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 90 s, 30 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 总延伸 10 min。PCR 产物经 PCR 产物纯化试剂盒纯化后直接转化 EcN/pKD46 电击感受态细胞。卡那抗性平板用于 *kfiA* 突变株的筛选。

抗性平板上的单菌落重悬于超纯水中,作为 PCR 模板。PCR 体系中加入 4 条引物,分别为抗性基因 *Kan* 上的通用检测引物 P0019/P0020 及 *EcN* 基因组 *kfiA* 基因上下游 200 bp 处的检测引物 P0229/P0230。反应条件: 98 $^{\circ}\text{C}$ 3 min, 95 $^{\circ}\text{C}$ 5 s, 51 $^{\circ}\text{C}$ 15 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 10 s, 30 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 总延伸 10 min。

1.2.2 抗性基因的去除。 将温敏型质粒 pCP20 转化 EcN Δ *kfiA*。: Kan 中,挑取单菌落于 LB 培养基 (Ap 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$), 30 $^{\circ}\text{C}$ 过夜培养。取菌液划线于 LB 平板, 42 $^{\circ}\text{C}$ 培养过夜 (高温诱导质粒丢失)。将单菌落分别依次划线于 Ap100 板、Kan50 板、LB 板, 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养。选择只能在 LB 板上正常生长的菌落进行 PCR 检验。PCR 检测得到的阳性菌送至通用生物系统 (安徽) 有限公司进行测序检验。利用 Vector NTI 8.0 软件将测序结果与预测序列进行比对。

1.2.3 荚膜多糖的检测。 将过夜菌液稀释至 OD₆₀₀ = 0.2, 接至 30 mL 新鲜培养基, 37 $^{\circ}\text{C}$ 振荡培养过夜。以 12 000 r/min 离心 5 min, 收集上清液各 10 mL, 去离子水透析。冷冻离心干燥后的样品用 500 μL D₂O 重悬, 加入 5 μL 对苯二甲酸二钠作为内标, 混匀后加入核磁管送样进行 NMR 分析^[9]。

1.2.4 pAH162 - *kfiA* 载体构建。 按照 *kfiA* 基因序列设计引物: P0262/P0265, 两端分别引入 *Pst* I、*Eco*R I, KpsMP 扩增引物: P0011/P0012, 两端分别引入 *Kpn* I、*Pst* I, 两段 DNA 序列

通过 *Pst* I 位点酶切连接成片段 KpsMP - *kfiA*, 连接体系通过胶回收得到目的条带。为了保证启动子 KpsMP 能够正常启动 *kfiA* 基因的转录, 设计引物拼接 P0291/P0292。将 KpsMP - *kfiA* 片段通过 *Kpn* I、*Eco*R I 酶切连接构建到载体 pAH162 中, 重组载体命名为 pAH162 - *kfiA*, 重组载体通过测序鉴定。

1.2.5 *kfiA* 基因的回补。 将 pAH162 和重组载体 pAH162 - *kfiA* 分别电击转化进电击感受态 EcN Δ *kfiA*/pAH123 中, 通过四环素抗性平板筛选得到的单克隆用 PCR 进行鉴定^[10]。PCR 体系中加入 4 条引物, 分别为抗性基因上的通用检测引物 P0028/P0029 及 EcN 基因组 Int Φ 80 位点的上下游检测引物 P0078/P0079。反应条件: 98 $^{\circ}\text{C}$ 3 min, 95 $^{\circ}\text{C}$ 5 s, 46 $^{\circ}\text{C}$ 15 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 10 s, 30 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 总延伸 10 min。获得的阳性克隆分别命名为 EcN Δ *kfiA* Int Φ 80。: pAH162 和 EcN Δ *kfiA* Int Φ 80。: pAH162 - *kfiA*。

2 结果与分析

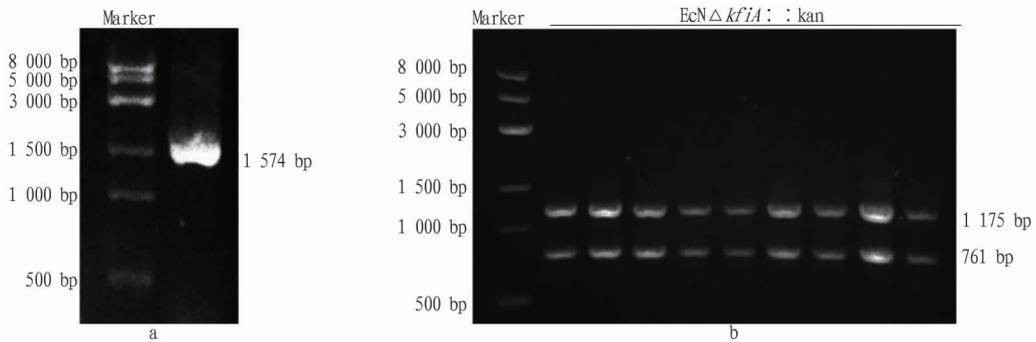
2.1 EcN 菌株中 *kfiA* 基因敲除 高保真酶扩增质粒 pKD4 中的 FRT - Kan - FRT 片段, 用于基因敲除。PCR 产物片段长 1 574 bp (图 1a), 电泳结果与目的片段大小一致。

利用 λ - Red 重组系统进行 *kfiA* 基因在 EcN 菌株中的敲除^[8]。在 EcN/pKD46 菌株诱导表达的重组酶作用下, FRT - Kan - FRT 片段中同源臂序列可以和基因组上的同源序列发生同源重组。利用 PCR 反应检测 *kfiA* 基因突变阳性克隆。菌落 PCR 体系中加入 4 条引物, 条带大小分别为 1 175、761 bp (图 1b), 电泳检测结果与预期相符, 9 个菌落全为阳性菌。

2.2 *kfiA* 突变株的荚膜多糖检测 利用 ¹H 核磁共振鉴定突变株是否能够合成荚膜多糖。首先提取 EcN 和 EcN Δ *kfiA* 的荚膜多糖, 将水溶性的稳定且不与样品反应的对苯二甲酸二钠添加到样品中作为内标, 用 ¹H 核磁共振进行鉴定。得到谱图如图 2a 所示, 可以看出在 ¹H NMR 谱约为 2 ppm 处存在特征峰, 是荚膜多糖的 N - 乙酰基上的氢峰 (GlcNAc,

-CH₃)。核磁共振谱用 MestReNova 软件进行分析,利用峰面积对荚膜多糖的含量进行测定,如图 2b 所示,野生型能够正常合

成荚膜多糖,而 *kfiA* 突变株完全不能合成荚膜多糖,说明 EcN 菌株的 *kfiA* 基因对该菌株荚膜多糖合成的重要性。



注:a. *kfiA* 基因;b. EcNΔ*kfiA*::kan 菌株筛选

Note:a. *kfiA* gene;b. The screening of EcNΔ*kfiA*::kan strain

图 1 EcN 菌株中 *kfiA* 基因敲除

Fig. 1 The knockout of *kfiA* gene in EcN strain

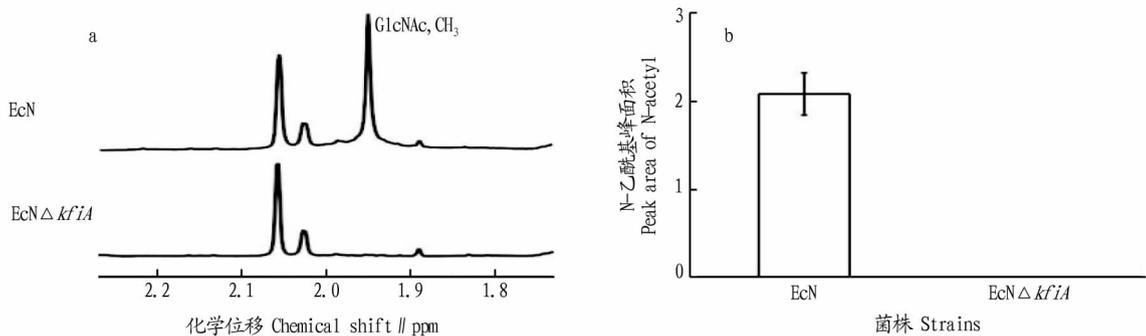


图 2 *kfiA* 突变株荚膜多糖的测定

Fig. 2 The detection of capsular polysaccharide of *kfiA* mutant strain

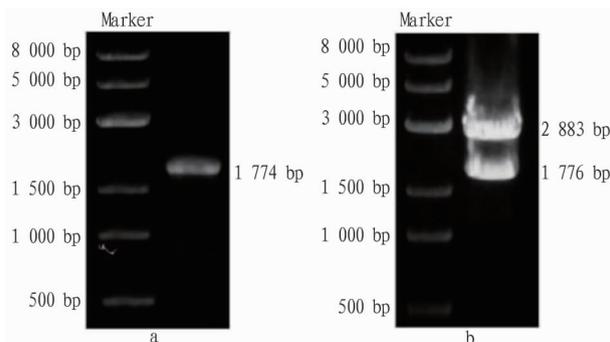
2.3 pAH162-*kfiA* 载体构建 利用 PCR 扩增 *kfiA* 基因的 DNA 序列,*kfiA* 基因全长 717 bp,以及荚膜多糖合成基因的三区启动子的 1 057 bp 序列。将 2 个 DNA 片段分别酶切连接得到 KpsMP-*kfiA* 片段,片段长度为 1 774 bp(图 3a)。再将 KpsMP-*kfiA* DNA 片段用引物 P0291/P0292 扩增,去除中间的内切酶位点,以保证 *kfiA* 基因的正常表达。

期相符。为了排除 PCR 扩增的 DNA 片段出现碱基突变和移码突变的可能性,试验中还对拼接的 DNA 片段进行了序列测定。测序结果与预期相符,没有碱基突变和移码突变。

2.4 *kfiA* 基因的回补 从菌落 PCR 检验、质粒酶切检验,以及测序检验都符合预期的菌株 BW25142/pAH162-KpsMP-*kfiA* 中提取质粒,并通过电击转化,将重组质粒转化进 EcNΔ*kfiA*/pAH123 感受态中,菌落 PCR 检测结果如图 4 所示,泳道 1 和 4 以 EcNΔ*kfiA* 为模板作为对照,泳道 2 和 5、3 和 6 分别是同一单克隆,在泳道 1~3 的 PCR 体系中加入 4 条引物:P0028、P0029、P0078、P0079,用来检测重组质粒是否插入 IntΦ80 位点,在泳道 4~6 的 PCR 体系中加入引物 P0230/P0263 用来检测原来的 *kfiA* 基因是否被敲除。

在泳道 2、3 中可以扩出 2 个 DNA 条带,且与预期大小相符,说明重组质粒已经成功插入到 EcN 基因组的 IntΦ80 位点。泳道 5、6 条带大小与泳道 4(EcNΔ*kfiA*)一致,说明所挑选的 2 个单克隆均为阳性克隆(EcN Δ*kfiA* IntΦ80::pAH162-KpsMP-*kfiA*)。

2.5 *kfiA* 突变株及回补菌株的荚膜多糖检测 提取 4 株的荚膜多糖并通过¹H 核磁共振检测,核磁共振谱用 MestReNova 软件进行分析。如图 5a 所示,EcN 野生型和 *kfiA* 回补菌株能够正常合成荚膜多糖,而 *kfiA* 突变株和回补对照菌株不能合成荚膜多糖。将波谱中对二苯二甲酸二钠的峰面积(化学



注:a. KpsMP-*kfiA*;b. 载体酶切检验

Note:a. KpsMP-*kfiA*;b. The carrier enzyme cutting test

图 3 pAH162-*kfiA* 载体构建

Fig. 3 The vector construction of pAH162-*kfiA*

提取菌落 PCR 检测的阳性菌株的质粒,利用限制性酶切反应进行检验。电泳检测结果如图 3b 所示,质粒被限制性酶切成 2 个片段,条带分别为 2 883 和 1 776 kb,条带大小与预

位移为 7.9 ppm) 作为标准, 分别对 4 株菌的荚膜多糖的 N-乙酰基的峰面积进行积分, 结果如图 5b 所示, 野生型和回补菌株能够正常合成荚膜多糖, 而 *kfiA* 突变株和 *EcNΔkfiA* IntΦ80::pAH162 完全不能合成荚膜多糖, 说明 *kfiA* 基因是 *EcN* 荚膜多糖合成所必需的基因。

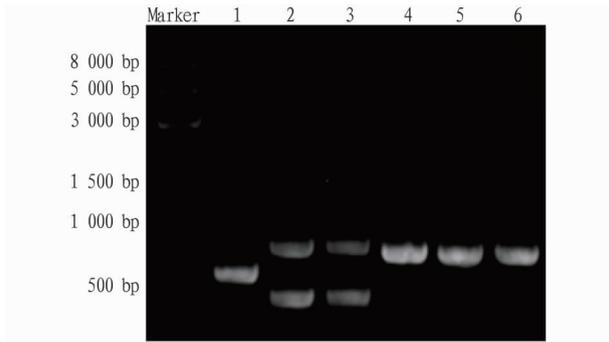


图 4 回补菌株的构建

Fig. 4 The construction of covering strain

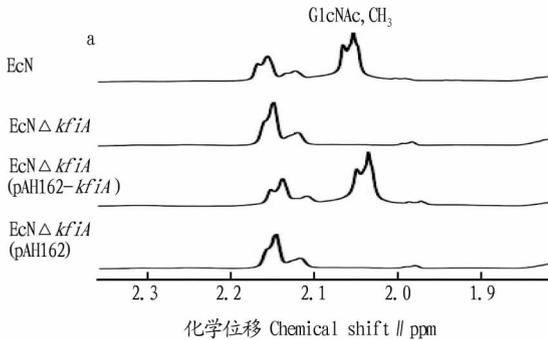


图 5 核磁共振检测荚膜多糖

Fig. 5 The detection of capsular polysaccharide by NMR

菌株中具有相似的荚膜多糖合成基因簇, 但还缺乏相应的研究, 证明这些基因的确切功能及相应的肝素前体多糖合成能力。该研究通过分子生物学技术, 对 *kfiA* 基因的功能进行了研究, 发现 *kfiA* 基因编码产物是该菌株的荚膜多糖合成所必需的蛋白质。 *kfiA* 基因的敲除使 *EcN* 失去了荚膜多糖合成能力; 同时, 该基因的回复突变, 又重新恢复了该菌的荚膜多糖合成能力。目前, 关于益生菌 *EcN* 肝素前体多糖合成的相应研究较少, 该菌的肝素前体多糖合成机制还有更进一步的研究价值。此外, 对益生菌 *EcN* 肝素前体多糖生物合成的调控机制研究也将有助于研究宿主对病原菌的抵抗。该研究还表明了 λ -red 重组系统与染色体重组技术除了可应用于常见的无荚膜菌株之外, 同样适用于具有荚膜覆盖的大肠杆菌 *EcN* 菌株, 为后续的菌株改造奠定了技术基础。

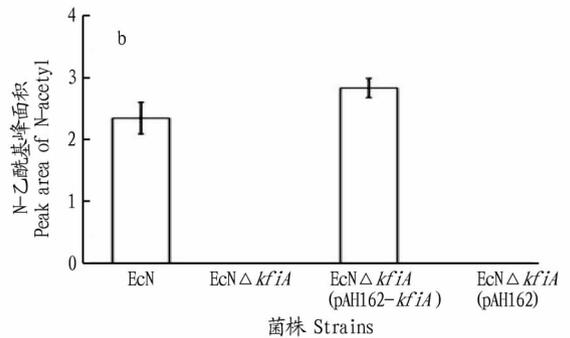
参考文献

- [1] KISHIMOTO T K, VISWANATHAN K, GANGULY T, et al. Contaminated heparin associated with adverse clinical events and activation of the contact system[J]. The New England journal of medicine, 2008, 358(23): 2457-2467.
- [2] TOSCHI V, LETTINO M. Fondaparinux: Pharmacology and clinical experience in cardiovascular medicine[J]. Minireviews in medicinal chemistry, 2007, 7(4): 383-387.

3 结论与讨论

大肠杆菌可以表达超过 80 种荚膜多糖, 这些荚膜多糖被定义为 K 抗原。细菌的荚膜多糖通常对菌体的生长和繁殖有着重要影响, 还对病毒的侵染具有较强的抵御作用^[11]。大肠杆菌 K5 的荚膜多糖属于糖胺聚糖类多聚物。其中, K5 荚膜多糖又被称为脱硫酸肝素, 或 N-乙酰肝素, 由 $[(\rightarrow 4)\beta - D - \text{GlcA}(1 \rightarrow 4)N - \text{acetyl} - \alpha - D - \text{GlcNAc}(1 \rightarrow)]_n$ 重复二糖单元组成。细菌的荚膜多糖未被硫酸化, 也没有差向异构化形成艾杜糖醛酸, 这与哺乳动物源的硫酸肝素在结构与活性上都所有差别。以 K5 荚膜多糖为起始碳链骨架, 可通过酶法合成非动物源肝素, 使其具有抗凝血活性。但是大肠杆菌 K5 菌株对人体具有致病性, 可引起尿道感染。若从大肠杆菌 K5 的荚膜中提取肝素前体多糖用来合成肝素, 必须非常小心, 需要经过严格的多步纯化过程以排除致病因子污染。

据目前的报道, 大肠杆菌 *EcN* 菌株是益生菌, 还没有发现任何致病因子, 被认为是一种安全菌株。在大肠杆菌 *EcN*



- [3] BENTOLILLA A, VLODAVSKY I, HALOUN C, et al. Synthesis and heparin-like biological activity of amino acid-based polymers[J]. Polymers for advanced technologies, 2000, 11(8/9/10/11/12): 377-387.
- [4] WANG Z Y, LY M, ZHANG F M, et al. *E. coli* K5 fermentation and the preparation of heparosan, a bioengineered heparin precursor[J]. Biotechnology and bioengineering, 2010, 107(6): 964-973.
- [5] HANCOCK V, DAHL M, KLEMM P. Probiotic *Escherichia coli* strain Nissle 1917 outcompetes intestinal pathogens during biofilm formation[J]. Journal of medical microbiology, 2010, 59(Pt 4): 392-399.
- [6] PATZER S I, BAQUERO M R, BRAVO D, et al. The colicin G, H and X determinants encode microcins M and H47, which might utilize the catecholate siderophore receptors FepA, Cir, Fiu and Iron[J]. Microbiology, 2003, 149(Pt 9): 2557-2570.
- [7] SCHLEE M, WEHKAMP J, ALTENHOEFER A, et al. Induction of human β -defensin 2 by the probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 is mediated through flagellin[J]. Infection and immunity, 2007, 75(5): 2399-2407.
- [8] DATSENKO K A, WANNER B L. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2000, 97(12): 6640-6645.
- [9] YAN H H, BAO F F, ZHAO L P, et al. Cyclic AMP (cAMP) receptor protein-cAMP complex regulates heparosan production in *Escherichia coli* strain Nissle 1917[J]. Applied and environmental microbiology, 2015, 81(22): 7687-7696.
- [10] HALDIMANN A, WANNER B L. Conditional-replication, integration, excision, and retrieval plasmid-host systems for gene structure-function studies of bacteria[J]. Journal of bacteriology, 2001, 183(21): 6384-6393.
- [11] ROBERTS I S. The biochemistry and genetics of capsular polysaccharide production in bacteria[J]. Annu Rev Microbiol 1996, 50: 285-315.