

转录组学分析 Fe₃O₄ 纳米颗粒胁迫下盐单胞菌 XH26 与四氢嘧啶代谢相关的差异表达基因

张培霞¹, 陶宇杰¹, 乔丽娟¹, 王嵘¹, 韩睿², 朱德锐¹, 沈国平^{1*}

1 青海大学 医学院, 基础医学研究中心, 青海 西宁 810016

2 青海大学 农林科学院, 蔬菜遗传与生理重点实验室, 青海 西宁 810016

张培霞, 陶宇杰, 乔丽娟, 王嵘, 韩睿, 朱德锐, 沈国平. 转录组学分析 Fe₃O₄ 纳米颗粒胁迫下盐单胞菌 XH26 与四氢嘧啶代谢相关的差异表达基因[J]. 微生物学报, 2025, 65(1): 239-255.

ZHANG Peixia, TAO Yujie, QIAO Lijuan, WANG Rong, HAN Rui, ZHU Derui, SHEN Guoping. Transcriptomics reveals differentially expressed genes related to ectoine metabolism in *Halomonas campaniensis* XH26 under Fe₃O₄ nanoparticle stress[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2025, 65(1): 239-255.

摘要: 【目的】探究 Fe₃O₄ 纳米颗粒(Fe₃O₄ nanoparticles, Fe₃O₄ NPs)与坎帕尼亚盐单胞菌(*Halomonas campaniensis*) XH26 共培养后的差异表达基因(differentially expressed genes, DEGs), 明确 Fe₃O₄ NPs 促进 XH26 胞内四氢嘧啶积聚量增长的分子机制。【方法】设置空白组(C, 0 g/L)、低浓度组(L, 0.01 g/L)、中浓度组(M, 0.10 g/L)和高浓度组(H, 0.50 g/L)的 Fe₃O₄ NPs 与菌株 XH26 共培养。采用 Illumina HiSeq 300PE 进行转录组测序, 探究菌株不同浓度组的 DEGs, 并采用 RT-qPCR 验证关键的 DEGs。【结果】与空白 C 组相比, M 组四氢嘧啶的积累量提高了 55.67% (708.87 mg/L), M 组和 H 组的亚铁离子和抗氧化能力显著升高, 而 H 组的羟基自由基含量高于 M 组。转录组学分析显示, M 组中与菌株 XH26 胞内代谢相关的 DEGs 富集于精/脯氨酸代谢(13 个)、氮代谢通路(11 个)、硫代谢通路(10 个), 主要功能与四氢嘧啶合成通路(11 个)、电子传递途径(7 个)及抗氧化酶系(5 个)相关。RT-qPCR 验证了四氢嘧啶合成代谢关键基因 *lysC*、*asd* 和基因簇 *ectABC*, 精氨酸(arginine, Arg)代谢通路基因 *astA/B/D/E* 以及尿素循环基因 *argE/H* 的表达趋势, 与 RNA-seq 测序结果相一致。【结论】四氢嘧啶是细菌细胞和生物大分子重要的稳定保护剂。Fe₃O₄ NPs 胁迫下菌株 XH26 胞内的活性氧(reactive oxygen species, ROS)增多, 且影响胞内的氨基酸和氮代谢过程。菌株 XH26 通过提升抗氧化能力, 增加胞内的四氢嘧啶积聚量, 以应对 Fe₃O₄ NPs 的胁迫作用。

关键词: Fe₃O₄ 纳米颗粒; 坎帕尼亚盐单胞菌; 转录组学; 四氢嘧啶; 氧化应激

资助项目: 国家自然科学基金(32260019); 青海中央引导地方科技发展资金(2024ZY015)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (32260019) and the Qinghai Central Government Guide Local Science and Technology Development Fund (2024ZY015).

*Corresponding author. E-mail: sgpkkll@126.com

Received: 2024-08-26; Accepted: 2024-09-30; Published online: 2024-10-08

Transcriptomics reveals differentially expressed genes related to ectoine metabolism in *Halomonas campaniensis* XH26 under Fe₃O₄ nanoparticle stress

ZHANG Peixia¹, TAO Yujie¹, QIAO Lijuan¹, WANG Rong¹, HAN Rui², ZHU Derui¹, SHEN Guoping^{1*}

1 Department of Basic Medical Sciences, Medical College, Qinghai University, Xining 810016, Qinghai, China

2 Key Laboratory of Vegetable Genetics and Physiology, Academy of Agriculture and Forestry Science, Qinghai University, Xining 810016, Qinghai, China

Abstract: [Objective] To study hydroxyl radical the differentially expressed genes (DEGs) in *Halomonas campaniensis* XH26 after co-culture with Fe₃O₄ nanoparticles (NPs), and clarify the molecular mechanism of Fe₃O₄ NPs in increasing the ectoine accumulation in strain XH26. [Methods] Strain XH26 was co-cultured with low-, medium-, and high-concentration (0.01, 0.10, and 0.50 g/L respectively in L, M, and H groups) Fe₃O₄ NPs, and the strain cultured without Fe₃O₄ NPs (0 g/L) was taken as the control group (C). Transcriptome sequencing was performed by Illumina HiSeq 300PE. The DEGs between different groups were mined, and key genes were screened for RT-qPCR verification. [Results] Compared with group C, group M showed an increase of 55.67% (708.87 mg/L) in ectoine accumulation, and groups M and H showed increased ferrous ions and antioxidant capacity. The hydroxyl radical content in group H was higher than that in group M. The transcriptomics analysis showed that the DEGs between groups M and C were enriched in arginine/proline metabolism (13), nitrogen metabolism (11), and sulfur metabolism (10) pathways. They were mainly related to the ectoine synthesis pathways (11), electron transport pathways (7), and antioxidant enzyme systems (5). RT-qPCR was employed to verify the expression of *lysC*, *asd*, and *ectABC* involved in ectoine synthesis, *astA/B/D/E* in arginine metabolic pathway, and *argE/H* in urea cycle, which showed the results consistent with the results of RNA-seq. [Conclusion] Ectoine is an important stable protective agent for bacterial cells and biomacromolecules. Strain XH26 exposed to the stress of Fe₃O₄ NPs showed increased intracellular reactive oxygen species and altered amino acid/nitrogen metabolism processes. Strain XH26 increased the accumulation of ectoine to cope with the stress of Fe₃O₄ NPs by improving the antioxidant capacity.

Keywords: Fe₃O₄ nanoparticles; *Halomonas campaniensis*; transcriptomics; ectoine; oxidative stress

金属纳米颗粒(metal nanoparticles, MNPs)与微生物菌群共培养时,其作用表现为两重性^[1]。如氧化铁纳米颗粒(iron oxide nanoparticles)具

有一定的细胞毒性,但选择适宜浓度及粒径大小时它也具有良好的生物催化活性和磁性特征^[2]。Fatollahi等^[3]研究发现,Fe₂O₃ NPs (0.01 g/L)和

多壁碳纳米管(0.10 g/L)均可促进伸长盐单胞菌(*Halomonas elongata*)胞内积聚四氢嘧啶(ectoine),产量分别提高了72%和67%;Wang等^[4]在食物垃圾厌氧发酵时添加 Fe_3O_4 NPs,并分析微生物群落结构的组成变化和挥发性脂肪酸(volatile fatty acids, VFAs)的产量,发现螺旋体菌门(*Spirochaetes*)和拟杆菌门(*Bacteroidetes*)的相对丰度提高了4.3%和1.7%,且VFAs的产量提高了160%。其次,当MNPs与细菌共培养时,细菌能感知不同的MNPs浓度刺激,胞内催化产生活性氧(reactive oxygen species, ROS),促进转录因子调节相关基因的表达量。ROS可同时激活多种信号通路,以诱导生物体抵抗外界的环境胁迫^[5]。如Lyu等^[6]等利用极小(直径约3 nm)的氧化铁纳米颗粒(extremely small iron oxide nanoparticles, ESIONPs)刺激斑马鱼胚胎,发现氧化应激标志物基因(*Cybb*, *NOX1*, *RAC2*)显著上调;Lyu等^[7]分析硫还原地杆菌(*Geobacter sulfurreducens*)与磁铁矿(Fe_3O_4)共培养后的基因表达差异,发现菌毛蛋白基因(*PilA*)的表达量显著上调,而细胞色素c基因(*OmcS*)的表达量显著下调。

四氢嘧啶是嗜盐菌中广泛存在的相容溶质之一,可协助细菌维持渗透压的平衡,抵抗外界极端环境条件的胁迫刺激。四氢嘧啶合成的前体物质为天冬氨酸(aspartate, Asp),由天冬氨酸激酶(aspartate kinase, LysC)将Asp转化为天冬氨酸- β -半缩醛,再经二氨基丁酸转氨酶(diaminobutyrate transaminase, EctB)、二氨基丁酸乙酰基转移酶(diaminobutyrate acetyltransferase, EctA)和四氢嘧啶合成酶(ectoine synthase, EctC)的3步催化合成四氢嘧啶^[8]。田磊等^[9]曾从小柴旦盐湖分离获得一株高效积聚四氢嘧啶的野生型坎帕尼亚盐单胞菌(*Halomonas campaniensis*) XH26,产量约450 mg/L。汪明香等^[10]采用45 mg/L的 Fe_3O_4 NPs与菌株XH26共培养,发

现菌株胞内四氢嘧啶的积聚量提高了55.08%。然而,针对 Fe_3O_4 NPs如何影响菌株XH26胞内四氢嘧啶积聚量的具体机制,尤其涉及某些基因的转录激活和表达调控是否与四氢嘧啶的代谢通路存在关联,有待深入探究。因此,本研究设置不同浓度的 Fe_3O_4 NPs与菌株XH26共培养,并采用转录组学技术分析四氢嘧啶合成代谢相关基因的差异表达,以此探究 Fe_3O_4 NPs促进四氢嘧啶积聚量变化的分子机制,为后续四氢嘧啶的发酵生产和代谢控制提供新的思考方向。

1 材料与方法

1.1 培养基和主要试剂

菌株发酵培养基(g/L, pH 7.5)^[9]: NaCl 87.50, KCl 55.88, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 24.65, L-谷氨酸钠(mono sodium glutamate, MSG) 5.61, 柠檬酸钠 3.00, 酶水解酪素 7.50, 无水 CaCl_2 0.20, 酵母 2.0。

Fe_3O_4 NPs, 昂星新型碳材料常州有限公司; HPLC级四氢嘧啶标准品, Fluka公司; 乙腈, 赛默飞世尔科技公司; TRIzol UP 强化RNA提取试剂盒, 北京全式金生物技术有限公司; PrimeScriptTM RT reagent Kit with L-gDNA Eraser 逆转录试剂盒和 TB Green Premix Ex TaqTM II qPCR 试剂盒, TaKaRa公司; 亚铁离子含量检测试剂盒, 北京索莱宝科技有限公司; 总抗氧化能力检测试剂盒、超氧化物歧化酶试剂盒和羟自由基含量试剂盒, 江苏艾迪生生物科技有限公司。

1.2 主要仪器

变速组织研磨器, 天根生化科技(北京)有限公司; 多功能酶标仪, Bio-Rad公司; 透射电镜, 成都里来生物科技有限公司; 高效液相色谱仪, Agilent公司; 微孔过滤器, 天津市津腾实验设备有限公司; 色谱分析柱, Merck公司; 超声

波细胞粉碎机, 宁波新芝生物科技股份有限公司; 转录组学测序平台, 武汉贝纳科技有限公司。

1.3 四氢嘧啶积聚量、 Fe^{2+} 浓度及抗氧化能力测定

设置 Fe_3O_4 NPs 与菌株共培养分组: 空白组[control group (C), 0 g/L]、低浓度组[low group (L), 0.01 g/L]、中浓度组[medium group (M), 0.10 g/L]和高浓度组[high group (H), 0.50 g/L]。活化菌种 XH26 (光密度值 OD_{600} 约为 0.8, 培养约 12 h), 按 1% 比例接种于液体培养基(100 mL, $n=3$ /组); 37 °C、180 r/min 摇床培养至生长对数期(约 12 h), 按分组浓度加入 Fe_3O_4 NPs, 继续培养至 42 h, 抽提菌株胞内的四氢嘧啶和 HPLC 定量检测^[9]。使用磁铁吸除培养液中的 Fe_3O_4 NPs, 并对 4 组菌株的培养液进行稀释(OD_{600} 值约 1.0), 取 1.0 mL 稀释后的菌液离心, 菌泥使用 PBS 洗涤 2 次。参考 Fe^{2+} 含量和总抗氧化能力(total antioxidant capacity, T-AOC)检测试剂盒的方法, 建立浓度与吸光度(A_{593} 与 A_{590})的标准曲线, 再进行胞内的 Fe^{2+} 含量和 T-AOC 检测。参考羟基(OH⁻)自由基含量和超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)检测试剂盒的方法, 测定胞内羟基/自由基的吸光度(A_{532})和 SOD 酶活性。

1.4 转录组的文库构建和质量控制

采用 TRIzol UP 试剂提取菌株 XH26 的总 RNA ($n=3$ /组), 使用 1% 琼脂糖凝胶电泳评估 RNA 的完整性。细菌型 Ribo-Zero rRNA 试剂盒去除 rRNA, 以片段化 mRNA 为模板逆转录合成 cDNA。AMPure XP 磁珠纯化修饰后的 cDNA (370–420 bp), 采用 USER 酶降解 cDNA 的第二链, 然后 PCR 扩增并再次纯化 PCR 产物, 采用链特异性建库法建库^[11]。使用 Agilent 2100 和 Qubit 2.0 进行文库验证和定量检测, 合格文库进行高通量测序, 由武汉贝纳科技有限公司

完成。测序片段转化为原始序列数据 reads, 再去除带接头(adapter)、含未确定碱基信息和低质量的 reads (质量参数 $Q_{\text{pred}} \leq 20$ 的碱基数 > 50%; 单个碱基错误率 < 1%), 数据过滤获得 clean reads。采用 Bowtie 2 (v.2.3.4.3) 软件进行 clean reads 与参考基因组比对分析(mismatch 参数为 2), 并根据参考菌株的基因组(*H. campniensis* XH26, NCBI 登录号为 SAMN18316568), 使用 Rockhopper (v.1.2.1) 软件进行转录本预测分析。

1.5 表达差异基因的筛选和功能富集分析

根据定量饱和曲线确定基因的表达水平, 利用软件 RSeQC (v.3.0) 进行总比对 reads 的重采样。使用 Htseq (v.0.6.1) Union 模型计算基因的表达量值 fragments per kilobase million (FPKM) 阈值 > 1.0, 以相对错误率(percent relative error)评估 FPKM 的准确性(Pearson 系数 $R^2 \geq 0.92$)。使用 Bioconductor 软件包 DESeq 2 (v.1.20.0) 进行差异表达基因(differentially expressed genes, DEGs)的基因本体论(gene ontology, GO)数据库(<http://www.geneontology.org>), 分析方法为负二项分布模型, 以 \log_2 fold change > 0 且 $P_{\text{adj}} < 0.05$ 为阈值, 统计差异基因的表达显著性(上调或下调)^[12], 并使用软件 GO-Term Finder (v.0.86) 制作 GO 富集图。参考京都基因和基因组百科全书数据库(Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG, <http://www.kegg.jp>), 使用软件 KOBAS (v.3.0) 进行基因组的背景关联和 pathway 的显著性分析($P_{\text{adj}} < 0.05$), 确定 DEGs 参与的主要代谢途径^[13]。

1.6 RT-qPCR 验证关键 DEGs

采用 TRIzol UP 试剂盒提取 RNA, 检测纯度与浓度(满足 $OD_{260}/OD_{280} = 1.8-2.2$; 有效浓度 ≥ 5 nmol/L), 然后使用逆转录试剂盒和 qPCR 试剂盒进行定量检测。逆转录体系(20 μL): 反应液 I 10 μL ($5 \times$ gDNA eraser buffer 2.0 μL , gDNA

eraser 1.0 μL , total RNA 和 RNase free H_2O 共计 7.0 μL)充分混匀后室温放置 30 min, 再加入反应液 II (PrimeScript RT enzyme mix I 1.0 μL , RT primer mix 1.0 μL , 5 \times Primerscript buffer 4.0 μL , RNase free H_2O 4.0 μL)。定量 PCR 体系 (20 μL): cDNA 2.0 μL , TB GreenTM Premix *Ex Taq*TM II 10.0 μL , 正、反向引物(10 $\mu\text{mol/L}$)各 0.8 μL , 无菌水 6.4 μL 。RT-qPCR 反应条件: 95 $^\circ\text{C}$ 预变性 3 min; 95 $^\circ\text{C}$ 变性 10 s, 58 $^\circ\text{C}$ 退火 20 s, 72 $^\circ\text{C}$ 延伸 30 s, 45 个循环, 循环延伸阶段采集数据。四氢嘧啶合成的关键基因 *asd*、*lysC*、基因簇 *ectABC* 及内参基因(*GADPH*)的引物设计参考文献[14];基因 *astA/B/D/E* 和 *argH/E*

的引物设计采用 NCBI Primer-BLAST 程序进行 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), 引物合成均由生工生物工程(上海)股份有限公司完成(表 1), 基因的相对表达水平采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 公式计算。

2 结果与分析

2.1 Fe_3O_4 NPs 胁迫下菌株 XH26 的四氢嘧啶积聚量与 Fe^{2+} 含量分析

菌株 XH26 培养至对数期(12 h)时, 添加不同浓度的 Fe_3O_4 NPs 再共培养至 42 h, 检测菌株胞内的四氢嘧啶积聚量、 Fe^{2+} 含量及生长曲线(图 1)。结果显示, 随着 Fe_3O_4 NPs 浓度增加, 菌株 XH26 胞内四氢嘧啶积聚量呈先增后减的趋势。当

表 1 RT-qPCR 使用的基因引物序列

Table 1 Primer sequences of the genes for RT-qPCR

Gene name	Primer sequences (5'→3')	Product length (bp)
<i>astA</i>	F: AACGGTCACGAACTGAGCA R: GCTGCTGTGCTATTGAAGGC	264
<i>astB</i>	F: GTAAAATGCACTCGGCGGTC R: ACTGATGGATGCTGGCTACG	231
<i>astD</i>	F: CCAAGCTATCGGCCTCCATT R: GTGAACTGGAACCGCCAAAC	145
<i>astE</i>	F: ACAGGCGAAGAACCTGATCG R: CAACTGTGCTGGTGTGGTG	233
<i>argH</i>	F: CACGCTCTTCATCGGTCAGT R: AGCCAAGCTACGAACCGATC	178
<i>argE</i>	F: CGTTGAAATCACCACCGAGC R: TGAGGTGTTTCTAGCGCCTG	291
<i>lysC</i>	F: CAAGACGAGGACGCTATGGAAGAAC R: TCGGCGATAGGACCAAGAATACG	133
<i>asd</i>	F: CCCGAACGACAAAGACGCTACAG R: TCACCAACACTGAAGGCTGACAAG	132
<i>ectA</i>	F: CAGTCGCTGATGCTGTGGTTGG R: GAATTAACATCAAGCGGCGGACAAG	121
<i>ectB</i>	F: TGCGTGGTATTGATGTTGTCTCTGG R: CACTTCACTACTTCGCCGTCTTGG	112
<i>ectC</i>	F: GCTATGAAGGCGAAGGCGAAGTAG R: AACAGATGTTTCGTCGTGCTGATCC	103
<i>GAPDH</i>	F: TCCTCCCTAAACTCGCACCT R: ATACGATAGTAGCGTCAGCAT	284

Fe_3O_4 NPs 浓度为 0–0.10 mol/L 时, 菌株胞内的四氢嘧啶积聚量呈上升态势, 0.10 mol/L 时菌株胞内的四氢嘧啶积聚量达到最大值 708.87 mg/L, 对比空白 C 组(455.36 mg/L)提高了 55.67%; 随着 Fe_3O_4 NPs 浓度继续增高, 菌株胞内的四氢嘧啶积聚量呈现下降趋势(H 组, 604.78 mg/L, 图 1A)。检测胞内 Fe^{2+} 浓度, 并建立浓度(x)与吸光值 A_{593} (y) 的标准曲线 $y=0.013\ 6x-0.017\ 3$ ($R^2=0.99$)。结果显示 M 组和 H 组胞内的亚铁离子含量显著升高, 对比空白 C 组(1.81 $\mu\text{mol/L}$) 分别提高了 41.00% 和 49.00% (图 1B)。酶标仪检测菌株的生长量(0–48 h), 发现菌株的生长趋势相似, 但在 36 h 后各实验组的 OD_{600} 值存在一定差异(图 1C)。透射电镜(200 nm)分析空白组(图 1D)与 M 组(图 1E)的菌株形态, 发现 M 组的细菌结构完整未被破坏, 细胞膜周围吸附

大量的 Fe_3O_4 NPs。

2.2 Fe_3O_4 NPs 胁迫下菌株 XH26 胞内抗氧化水平分析

检测菌株 XH26 胞内的羟基自由基含量、SOD 酶活性和总抗氧化能力(图 2), 并建立总抗氧化能力(x)与吸光值 A_{590} (y) 的标准曲线 $y=0.097\ 2x+0.004\ 2$ ($R^2=0.99$)。结果显示 L、M、H 实验组的羟基自由基含量对比空白 C 组(0.19) 分别提高了 13.65%、33.33% 和 44.15% (图 2A); M 组和 H 组的 SOD 酶活性对比空白 C 组(9.74 U/mL) 分别提高了 17.17% 和 16.63%, 对比 L 组(10.34 U/mL) 分别提高了 10.41% 和 9.91% (图 2B); 总抗氧化能力对比空白 C 组(0.140 $\mu\text{mol/mL}$) 分别提高了 17.34% 和 16.34%, 对比 L 组(0.145 $\mu\text{mol/mL}$) 分别提高了 13.56% 和 12.64% (图 2C)。

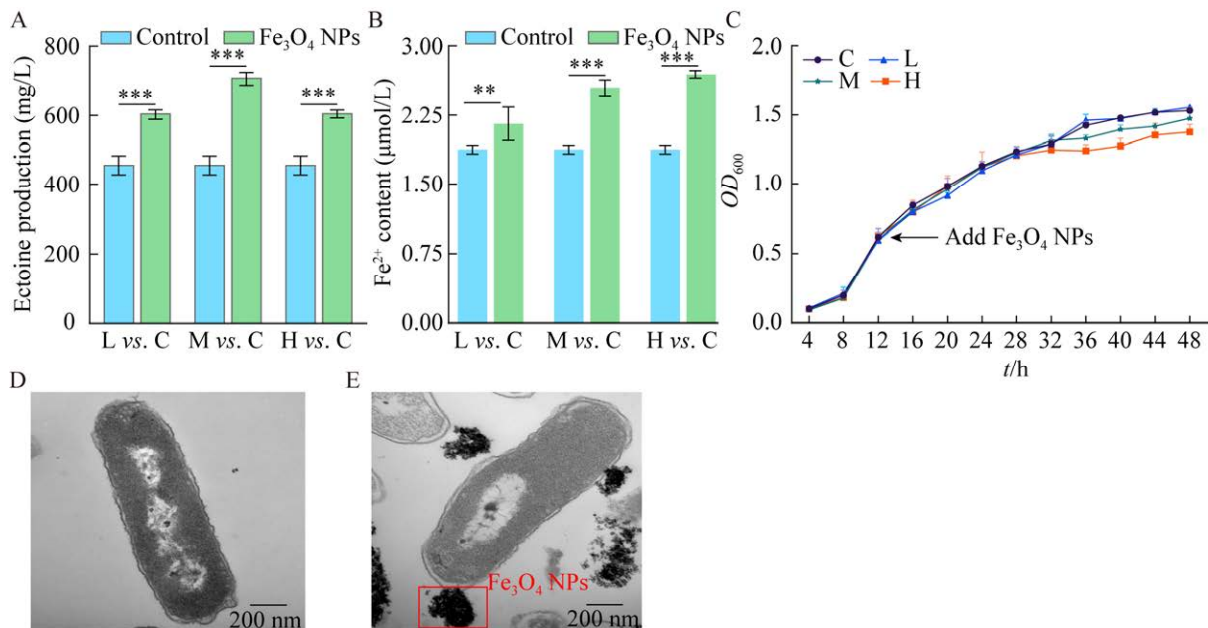


图 1 Fe_3O_4 NPs 作用下菌株 XH26 的生长量、四氢嘧啶积聚量和 Fe^{2+} 含量检测分析

Figure 1 Growth, ectoine accumulation and Fe^{2+} content analysis of strain XH26 treated with Fe_3O_4 NPs. A: Intracellular ectoine accumulation of strain XH26; B: Intracellular ferrous ion (Fe^{2+}) content of strain XH26; C: 48 h growth curves of strain XH26; D: Morphology of strain XH26; E: Morphology of strain XH26 under the treatment with medium concentration of Fe_3O_4 NPs. **: $P<0.01$; ****: $P<0.000\ 1$.

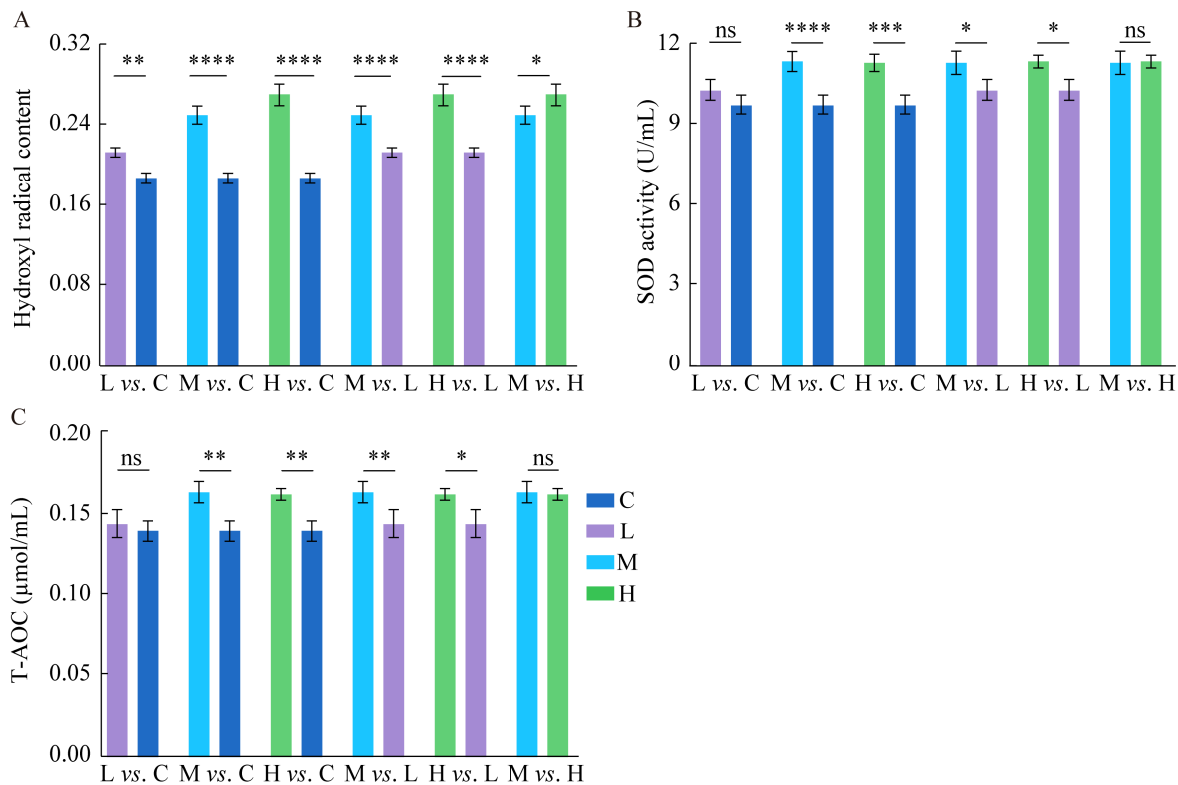


图 2 Fe_3O_4 NPs 作用下菌株 XH26 胞内的抗氧化能力分析

Figure 2 Analysis of intracellular antioxidant capacity of strain XH26 under the different Fe_3O_4 NPs experimental groups. A: Intracellular hydroxyl radical content of strain XH26; B: Superoxide dismutase (SOD) activity of strain XH26; C: Total intracellular antioxidant capacity (T-AOC) of strain XH26. *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$; ****: $P < 0.0001$; ns: No significant difference.

2.3 转录组学数据处理与质控分析

原始数据经过滤处理, 获得有效的 clean reads 数目 >13 642 626 条/组, G+C 含量为 53.86%–53.86%, $Q_{30} > 89.84\%$, 误差为 0.03% (表 2)。采用 Bowtie 2 (v.2.3.4.3) 软件进行参考基因组比对和定位分析, 结果显示样本的总匹配率 >91%, 单一匹配率 >85%, 多匹配率为 6.05%–7.02%, 表明测序结果可靠, 满足后期的分析要求。

2.4 Fe_3O_4 NPs 作用下基因表达水平分析

分析不同 Fe_3O_4 NPs 浓度组 (C, L, M, H) DEGs 的表达水平 ($\lg \text{FPKM} + 1$), 并进行层次聚类分析 (hierarchical clustering)。结果显示空白 C 组和 L 组的样本聚类相似, M 组和 H 组的样本

聚类相似; M 组、H 组与空白 C 组对比分析发现, M 组、H 组的基因转录发生逆转差异变化, 即空白 C 组的低表达聚类区在 M 组、H 组中转变高表达聚类区, 或反之 (图 3A)。组间 DEGs ($\log_2 \text{fold change} > 0$ 且 $P < 0.05$) 和共有 DEGs 比较分析发现, L vs. C 比较组存在上调 DEGs 71 个, 下调 DEGs 135 个; M vs. C 比较组存在上调 DEGs 377 个, 下调 DEGs 483 个; H vs. C 比较组中存在上调 DEGs 207 个, 下调 DEGs 266 个; L vs. M 比较组存在上调 DEGs 227 个, 下调 DEGs 259 个 (图 3B)。共性 DEGs 分析显示, 3 个比较组 (L vs. C, M vs. C, H vs. C) 所特有的 DEGs 数目分别为 56、481 和 127 个, 共有 DEGs 为 93 个 (图 3C)。

表 2 数据过滤和质量统计分析

Table 2 Data filtering and quality statistical analysis

Sample	Clean reads	Q_{20} (%)	Q_{30} (%)	Error rate (%)	G+C (%)	Total mapped (%)	Uniquely mapped (%)	Multiple mapped (%)
C ₁	14 866 686	96.38	90.52	0.03	53.42	92.84	86.13	6.71
C ₂	15 372 448	96.39	90.53	0.03	53.78	93.04	86.52	6.52
C ₃	13 642 626	96.08	90.00	0.03	53.68	92.53	85.51	7.02
L ₁	15 587 564	96.54	90.82	0.03	53.86	93.19	86.74	6.44
L ₂	14 179 496	96.43	90.59	0.03	53.28	92.57	86.06	6.51
L ₃	13 819 380	96.52	90.75	0.03	53.52	93.09	86.94	6.15
M ₁	15 599 214	96.18	90.04	0.03	53.09	91.97	85.22	6.75
M ₂	15 368 656	96.49	90.66	0.03	53.57	93.11	87.06	6.05
M ₃	15 754 456	96.31	90.35	0.03	53.63	92.94	86.45	6.48
H ₁	14 431 560	96.06	89.84	0.03	53.36	92.13	85.53	6.60
H ₂	14 331 822	96.04	89.84	0.03	53.61	93.37	87.00	6.37
H ₃	17 921 678	96.48	90.70	0.03	53.41	93.43	87.23	6.20

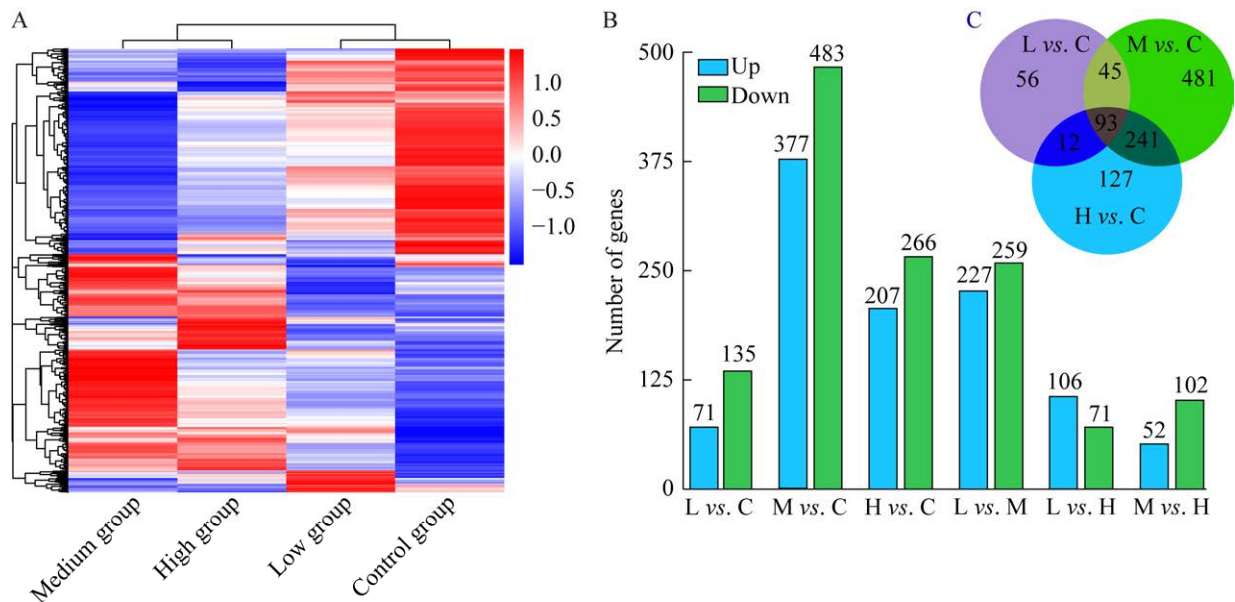


图 3 比较组差异表达基因的聚类分析

Figure 3 Cluster analysis of differentially expressed genes (DEGs) of comparison groups. A: Cluster analysis of DEGs in different groups; B: Numbers of up, down-regulated DEGs; C: Numbers of common genes.

进一步筛选实验组与空白组的显著 DEGs (\log_2 fold change > 0 且 $P_{\text{adj}} < 0.05$), 结果显示显著 DEGs 主要集中在比较组 M vs. C 和 H vs. C, 包括上调基因 169 个, 下调基因 190 个(表 3)。分

析 M vs. C 和 H vs. C 比较组所共有的 36 个显著 DEGs 发现(表 4), 表达量显著上调的基因包括与四氢嘧啶合成直接相关的基因 *lysC* 和基因簇 *ectABC*、精氨酸(arginine, Arg)代谢通路基因

astA/B/D、过氧化物还蛋白基因 *RS04790* 等。表达量显著下调的基因包括辅酶 Q (CoQ)合成相关基因 *aarF/ubiB* 及氧化还原酶相关基因 *RS06850*、*RS06855*、*RS06830* 等。

2.5 差异基因的 GO 和 KEGG 富集分析

利用基因功能分类的 GO 数据库, 整体评

估 6 个比较组(L vs. C, M vs. C, H vs. C, L vs. M, M vs. H, L vs. H)显著 DEGs 的表达水平 ($P_{adj}<0.05$, 图 4)。结果显示, M vs. C 和 H vs. C 比较组的 DEGs 富集度显著高于 L vs. C 比较组 (图 4A); 高丰度 DEGs 主要集中于分子功能 (molecular function, MF)、细胞组分(cellular

表 3 比较实验组与空白组的显著 DEGs

Table 3 Significant DEGs of the experimental groups compared with the control group

Regulate	Comparison group	Gene name
Up genes	M vs. C	<i>fabA, hisI, pilW, surE, lysC, recX, hutC, iscR, lrgB, lpxB, rapZ, mnmC, ccsA, glnD, recF, nadB, ptsN, rnt, rnhB, xthA, flhC, gcvP, gmhB, yhbY, rnhA, uraH, rimP, rlmE, dinB, glxA, folK, yidD, umuD, gcvH, mnmA, hflD, rho, pta, der, asd, flgN/M, argE/H, XdhA/B/C, ectABC, flIE/F/M/N/P, hemA/B/C/D, astA/B/D/E</i> , and 76 undefined genes
	H vs. C	<i>astA/B/D, ectABC, cysD/T/N/P, gcvH, xdhA/B/C, lysC, ahpC, pilW</i> , and 10 undefined genes
Down genes	M vs. C	<i>HutG, safE, recB/D, acrB/D/F, iclR, dctP/M/Q, malT, dgcA, fdhA, gltS, proB, soxZ, hlyD, cobG, sohB, ptsP, antC, eamA, ureD, dctM, eat, urtB/C, kdpA/C, phnE, aqpZ, betT, oprD, moaA, ligB, cobF, nhaC, sstT, ctaG, narH/K, catC, fixB, rluA, coxB, deoR, ribA, nirB/D, menA, ccoG, arsJ, pqqD, qhpC, asnC, tauE, plsY, exbB, ald, mocA, mtnA, smtB, mlaE, peaD, lysE/R, dapE, rluF, purU, xseA, yifB, eutC, chrA, ptsP, pstC/B, ubiB, nagE, thuA, iolC/D, glaH, speB, lptG, acrB/D/F, aarF</i> , and 171 undefined genes
	H vs. C	<i>ubiB, hlyD, fecC/D, tenA, recB/D, tonB, bioD, folE, glaH, aarF, mdoG</i> , and 19 undefined genes

表 4 实验组与空白组共有的显著 DEGs

Table 4 Common significant DEGs between the experimental group and the control group

Up genes	Function	Down genes	Function
<i>ectA/B/C, lysC</i>	Ectoine synthesis pathway	<i>recB/D</i>	Exodeoxyribonuclease V subunit
<i>astA/B/D</i>	Arg and Pro metabolism	<i>RS14435/14800/06820</i>	DUF932/3833/1365 domain-containing protein
<i>RS04790</i>	Peroxiredoxin	<i>RS06850</i>	FAD-dependent oxidoreductase
<i>xdhA/B/C</i>	Xanthine dehydrogenase	<i>RS06856/06825</i>	NAD dependent epimerase/dehydratase family
<i>PilW</i>	Type IV pilus biogenesis/stability protein	<i>aarF, ubiB</i>	AarF/ABC1/UbiB kinase family protein
<i>RS07420</i>	VRR-NUC domain-containing protein	<i>RS06830</i>	SDR family NAD(P)-dependent oxidoreductase
<i>RS04260</i>	Cold-shock protein	<i>RS01840</i>	Efflux RND transporter periplasmic adaptor subunit
<i>gcvH</i>	Glycine cleavage system protein	<i>RS10485</i>	Glycosyltransferase
<i>RS02725</i>	DNA starvation/stationary phase protection protein	<i>RS01690</i>	PAS domain-containing methyl-accepting chemotaxis protein
<i>RS06920/06925/11825</i>	tRNA-Tyr/Gly/Leu	<i>RS06855</i>	TIGR01777 family oxidoreductase

component, CC)和生物过程(biological process, BP),且3个比较组的DEGs分布基本相似。重点分析M vs. C比较组的DEGs,结果显示MF类别主要富集于离子和金属离子转运蛋白活性;BP类别主要富集于细胞定位和离子转运;CC类别主要富集于细胞膜成分。不同Fe₃O₄NPs实验组的组间对比发现,L vs. M比较组的DEGs富集度显著高于M vs. H和L vs. H比较组(图4B),且DEGs富集情况与M vs. C比较组相似。

基于DEGs的KEGG代谢通路富集分析,

绘制各比较组的气泡图(前20个,图5)。结果显示,空白C组与不同Fe₃O₄NPs浓度实验组相比较(图5A、5C、5E),M vs. C比较组存在显著差异(图5C),与菌株XH26胞内代谢相关的DEGs主要富集于精/脯氨酸代谢(arginine/proline, Arg/Pro, 13个)和氮代谢(11个)。在L vs. M比较组中(图5B),DEGs主要富集于Arg/Pro共代谢(10个)及硫代谢途径(10个);在M vs. H比较组(图5D),DEGs主要富集于Arg/Pro共代谢(5个);在L vs. H比较组(图5F),DEGs主要富集于硫代谢(10个)。

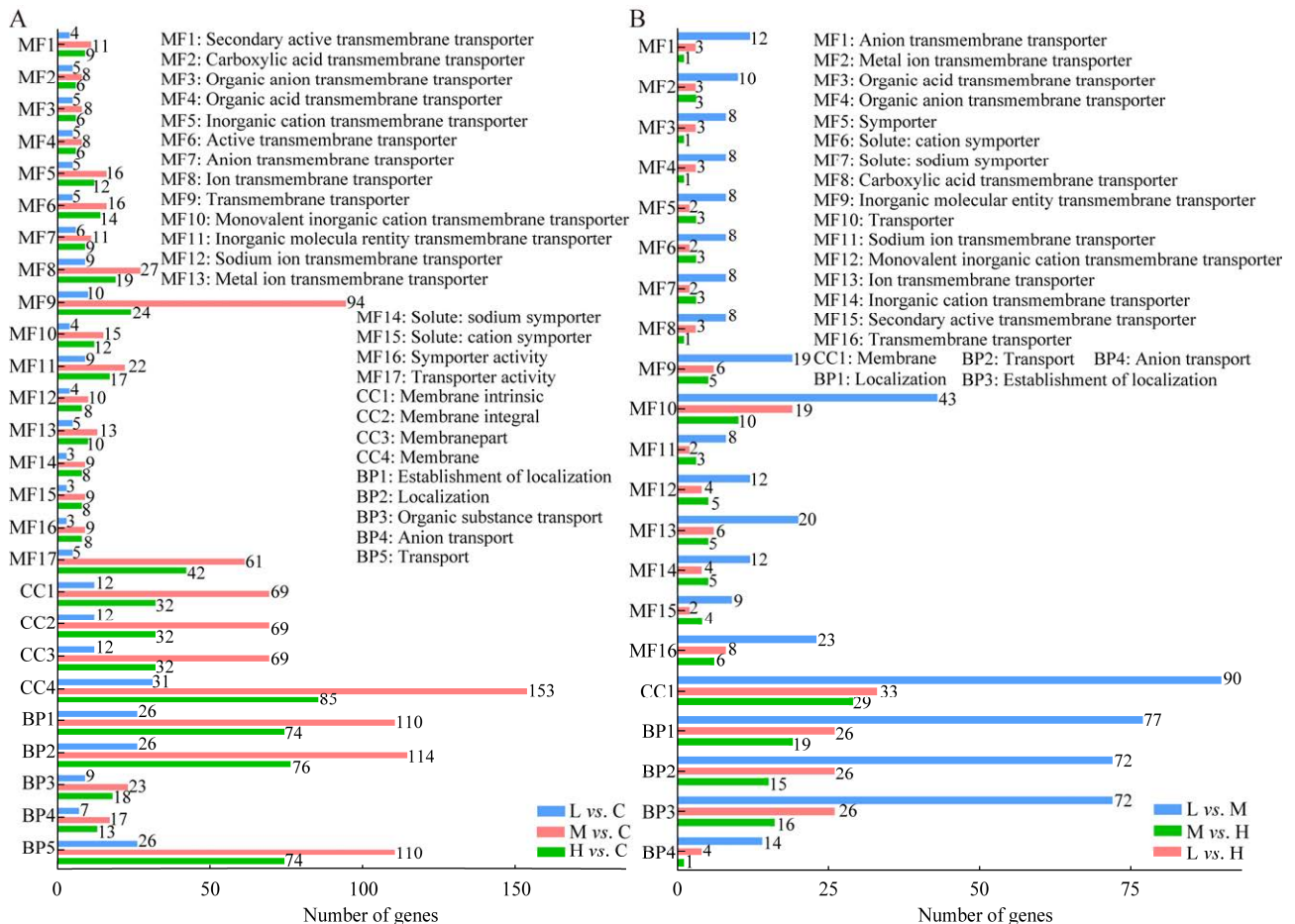


图4 GO富集分析不同比较组的DEGs

Figure 4 GO enrichment analysis of DEGs within the different comparison groups. A: Comparison analysis of groups L, M, H vs. C; B: Comparison analysis between groups L, M and H. BP: Biological process; MF: Molecular function; CC: Cellular component.



图 5 不同比较组的 KEGG 富集分析

Figure 5 KEGG enrichment analysis of different comparison groups. A: Comparison groups of L vs. C; B: Groups L vs. M; C: Groups of M vs. C; D: Groups of M vs. H; E: Groups of H vs. C; F: Groups of L vs. H.

2.6 RT-qPCR 验证四氢嘧啶合成的关键 DEGs

Fe₃O₄ NPs 胁迫作用下, 菌株 XH26 胞内的四氢嘧啶积聚量均有所增长, 筛选 Fe₃O₄ NPs 实验组(L, M, H)与四氢嘧啶合成直接相关的共

有 DEGs (11 个, 表 5), 包括四氢嘧啶合成通路的关键基因 *lysC*、*asd* 和基因簇 *ectABC*; Arg 代谢通路的基因 *astA/B/D/E*; 尿素循环的基因 *argE/H*。RT-qPCR 验证 11 个关键的 DEGs, 结果显示(图 6), (1) 四氢嘧啶的合成通路涉及 5 个

表 5 四氢嘧啶合成通路关键的上调表达 DEGs 与 FPKM 值

Table 5 FPKM values and key up-regulated DEGs of the ectoine synthetic pathway

Gene	Description of genes or factors	FPKM values of RNA-seq in different groups				Regulate
		C	L	M	H	
<i>astA</i>	Arginine N-succinyltransferase	239.65	222.21	330.96	287.26	Up
<i>astB</i>	N-succinylarginine dihydrolase	154.50	162.55	230.63	199.76	Up
<i>astD</i>	Succinylglutamate-semialdehyde dehydrogenase	303.23	298.12	350.58	418.82	Up
<i>astE</i>	Succinylglutamate desuccinylase	414.34	532.87	612.34	458.88	Up
<i>argH</i>	Argininosuccinate lyase	406.67	446.99	531.84	501.08	Up
<i>argE</i>	Acetylornithine deacetylase	371.84	428.38	483.91	428.41	Up
<i>lysC</i>	Aspartate kinase	669.51	792.61	971.45	964.37	Up
<i>asd</i>	Aspartate-semialdehyde dehydrogenase	182.14	172.84	216.33	203.34	Up
<i>ectA</i>	Diaminobutyrate acetyltransferase	604.69	764.54	940.39	925.42	Up
<i>ectB</i>	Diaminobutyrate transaminase	1 864.03	2 047.36	2 243.04	2 227.50	Up
<i>ectC</i>	Ectoine synthase	3 074.22	3 127.61	3 130.82	3 286.80	Up

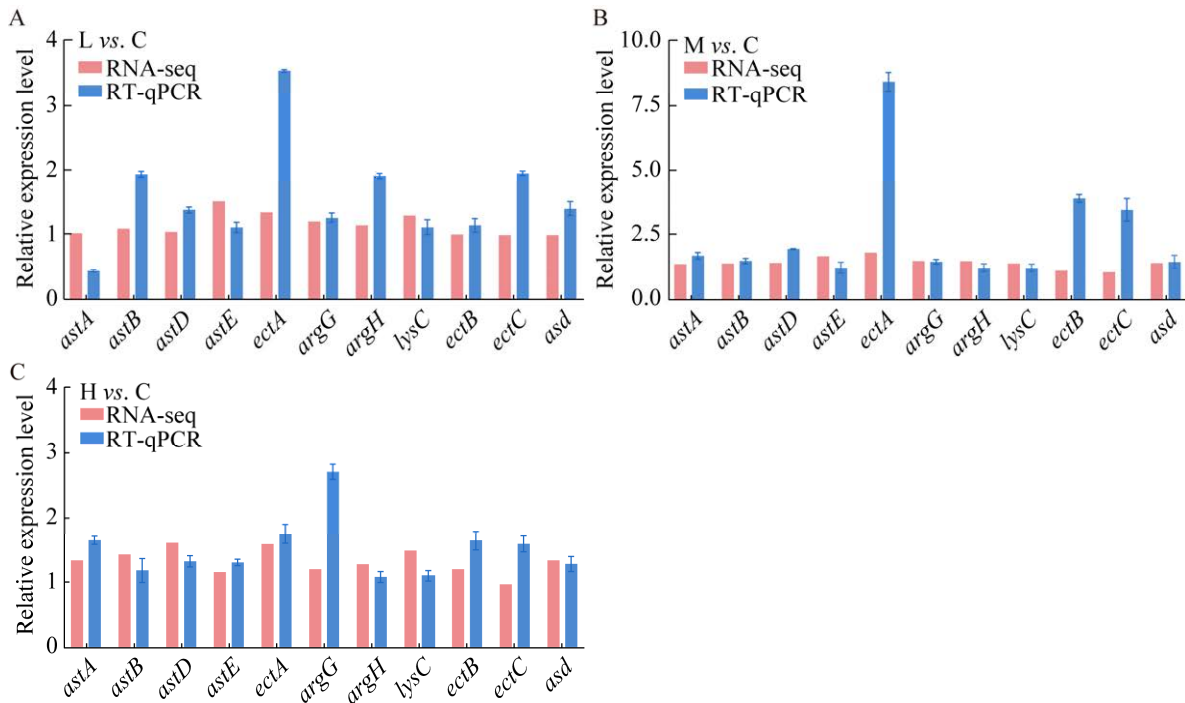


图 6 RT-qPCR 验证关键 DEGs 的表达量

Figure 6 RT-qPCR verification expression results of key DEGs. A: Comparison groups of L vs. C; B: Groups M vs. C; C: Groups of H vs. C.

关键基因, 在 3 个比较组中的基因簇 *ectABC* 均显著上调表达, 且高于 RNA-seq 结果; 基因 *lysC* 表达验证结果略低于 RNA-seq 测序; 基因 *asd* 的表达验证结果与 RNA-seq 测序相一致。(2) Arg 代谢通路涉及 4 个相关基因, 基因 *astB/D/E* 在 3 个比较组中均上调表达; 基因 *astA* 在 M vs. C 和 H vs. C 比较组中上调表达, 但在 L vs. C 比较组中的表达量较低。(3) 尿素循环涉及 2 个相关基因, 基因 *argE* 在 3 个比较组中的表达量均上调, 且在 H vs. C 组中高于 RNA-seq 测序结果; 基因 *argH* 在 L vs. C、M vs. C 比较组中的表达量显著上调, 而在 H vs. C 比较组中表达量较低。总体而言, 关键 DEGs 在 M vs. C 比较组中的上调趋势显著高于 L vs. C 和 H vs. C 比较组, RT-qPCR 验证的表达趋势与 RNA-seq 测序结果相一致。

3 讨论与结论

3.1 Fe₃O₄ NPs 胁迫刺激促进菌株 XH26 合成四氢嘧啶

MNPs 刺激细胞产生氧化应激是毒理学的主要假设之一, 可通过检测细胞产生的氧化应激能力进行验证^[15]。适宜浓度 Fe₃O₄ NPs 的细菌毒性远低于其他的 MNPs, 但仍可促进 ROS 的产生^[16-17]。细菌胞内的 ROS 稳态和氧化还原平衡, 主要由酶/非酶系统调节完成^[18], 如烷基氢过氧化物还原酶/硫醇特异性抗氧化剂家族蛋白(AhpC/TSA)、硫氧还蛋白(thioredoxin)等^[19]。本研究 M 和 H 实验组中, AhpC/TSA 家族过氧化物还蛋白基因 *RS04790* 显著上调, FAD 依赖性氧化还原酶基因 *RS06850*、NAD(P)⁺ 依赖性氧化还原酶基因 *RS06830*、TIGR01777 家族氧化还原酶(TIGR01777 family oxidoreductase)

基因 *RS06855* 的表达量显著下调。此外, M 实验组硫氧还蛋白 *RS07995* 的表达量显著上调。分析菌株 XH26 的抗氧化能力, 发现 M 和 H 实验组菌株胞内的羟基自由基含量、总抗氧化能力和 SOD 酶活性显著升高, 且 H 实验组羟基自由基的含量远高于 M 组, 可能导致细菌的增殖和能量代谢能力下降。

细菌胞内的 ROS 水平升高可以激活多种蛋白激酶, 通过信号转导调节细胞的代谢活动, 以产生应激适应^[20]。同时, ROS 升高可能破坏细胞的氧化还原平衡, 损害蛋白质、DNA 和 RNA 等生物大分子^[21]。四氢嘧啶属于高度亲水性的相容溶质, 具有良好的生物稳定和细胞保护作用, 能够维持细胞膜、酶或功能蛋白质的空间结构稳定, 缓解 ROS 的细胞损伤, 以此抵抗外界环境的胁迫^[22]。Fe₃O₄ NPs 胁迫下, M 组与四氢嘧啶代谢直接相关基因的表达量显著上调(*lysC*、*asd* 和基因簇 *ectABC*), 如图 7 红色通路所示, 这些基因的表达量上调, 可以直接促进 Asp 代谢合成四氢嘧啶。Hernández 等^[23]曾证实细菌 Arg 的代谢通路与三羧酸循环(tricarboxylic acid cycle, TAC)、尿素循环(urea cycle)以及谷氨酸(L-glutamate, Glu)代谢密切相关。本研究中, 基因 *argE/H* 的上调表达, 有效促进中间产物精氨酸代琥珀酸(L-arginosuccinate)转化为 Arg 和延胡索酸(fumarate); 同时, 基因 *astA/B/D/E* 的上调表达, 促进 Arg 转化为 Glu 和 α -酮戊二酸(图 7)。由此表明, 在 Fe₃O₄ NPs 胁迫下, 菌株 XH26 胞内的 ROS 水平升高, 可能通过激活多种蛋白激酶来实现代谢调节, 最终促进菌株合成四氢嘧啶, 以此缓解 ROS 引起的细胞和生物大分子损伤作用。

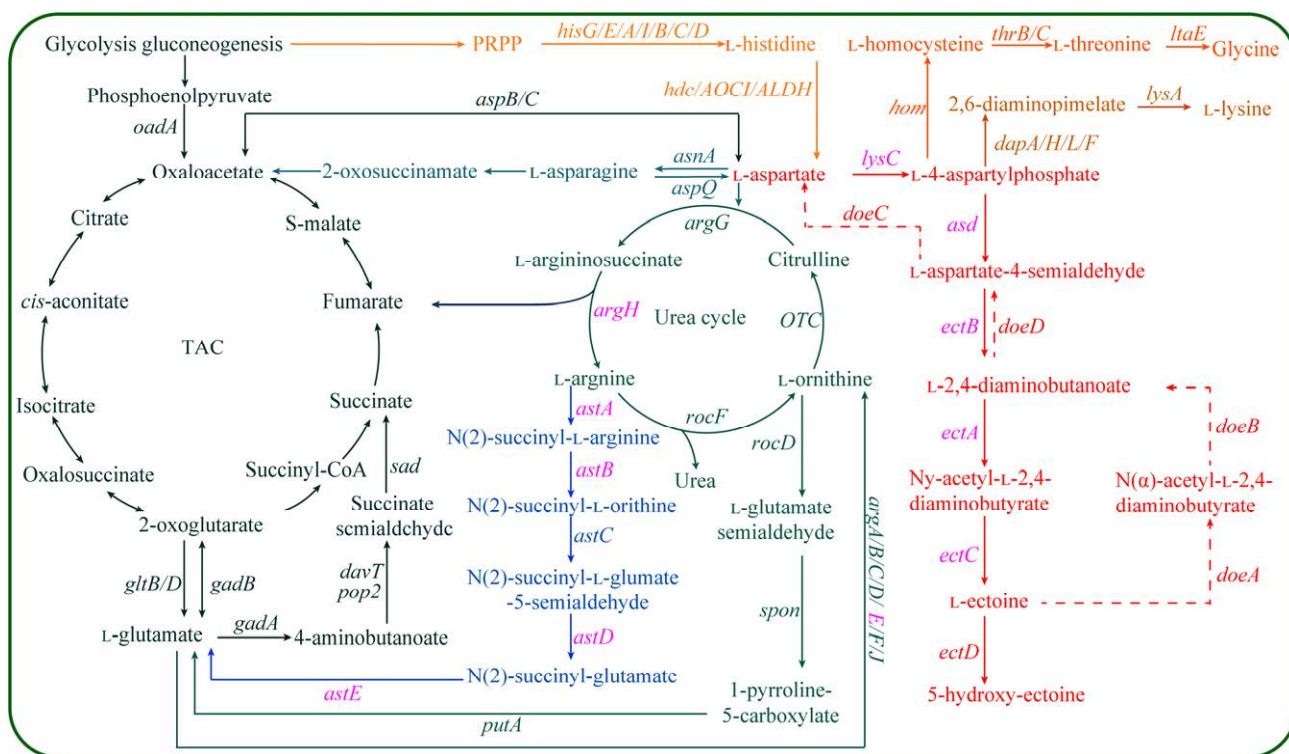


图7 四氢嘧啶合成通路

Figure 7 Ectoine synthesis pathway.

3.2 Fe₃O₄ NPs-Fe²⁺作为酶蛋白 EctC 的辅因子促进四氢嘧啶合成

在生物体酸性物质或溶酶体的作用下, Fe₃O₄ NPs 可以释放铁离子至细胞, 参与胞内的酶促代谢和金属酶类的调节作用^[24-25]。Zhong 等^[26]分析膨胀颗粒污泥床(expanded granular sludge bed, EGSB)中 Fe₃O₄ NPs 的 Fe²⁺释放量, 发现在添加 Fe₃O₄ NPs 20 d 后, Fe²⁺浓度从 0.71 mg/L 迅速增至 5.10 mg/L。酶蛋白 EctC (14.70 kDa)隶属于 Cupin 超家族成员, 辅助因子为 Fe²⁺, 负责催化底物(N-γ-乙酰基-L-2,4-二氨基丁酸)的羰基与 α-氨基分子内环化, 脱水缩合成四氢嘧啶(图 8)^[27]。Widderich 等^[28]分析阿拉斯加鞘氨醇盒菌(*Sphingopyxis alaskensis*) EctC 酶活性与金属辅因子的关系, 发现 Fe²⁺可能通过结合 EctC 的 3 个氨基酸残基(Glu⁵⁷, Tyr⁸⁵, His⁹³), 促进酶与底物的结合, 从而提高

酶的催化活性。本研究 M 和 H 实验组中, 菌株胞内的 Fe²⁺浓度分别提高了 41.00%和 49.00%, 且基因 *ectC* 的表达量均显著上调。因此, 我们推测 Fe₃O₄ NPs 与菌株 XH26 共培养时, 可能通过释放 Fe²⁺激活酶 EctC, 促进 XH26 胞内积聚四氢嘧啶, 具体的反应机制需进行体外 Fe₃O₄ NPs 与 EctC 酶活性实验验证。

3.3 Fe₃O₄ NPs 可能影响电子传递促进四氢嘧啶合成

细菌具有复杂的细胞外电子摄取系统(extracellular electron uptake, EEU), 可从不溶性电子供体中攫取电子^[29]。Fe₃O₄ NPs 作为一种多孔水性介质, 其末端的电子受体(水合铁)可作为细菌胞内的能量转换驱动器^[30]。如 Vu 等^[31]利用 Fe₃O₄ NPs 改良的微生物电化学系统(microbial electrochemical system, MES)进行厌氧发酵, 发现 Fe₃O₄ NPs 可增强生物膜导电率或电极募集,

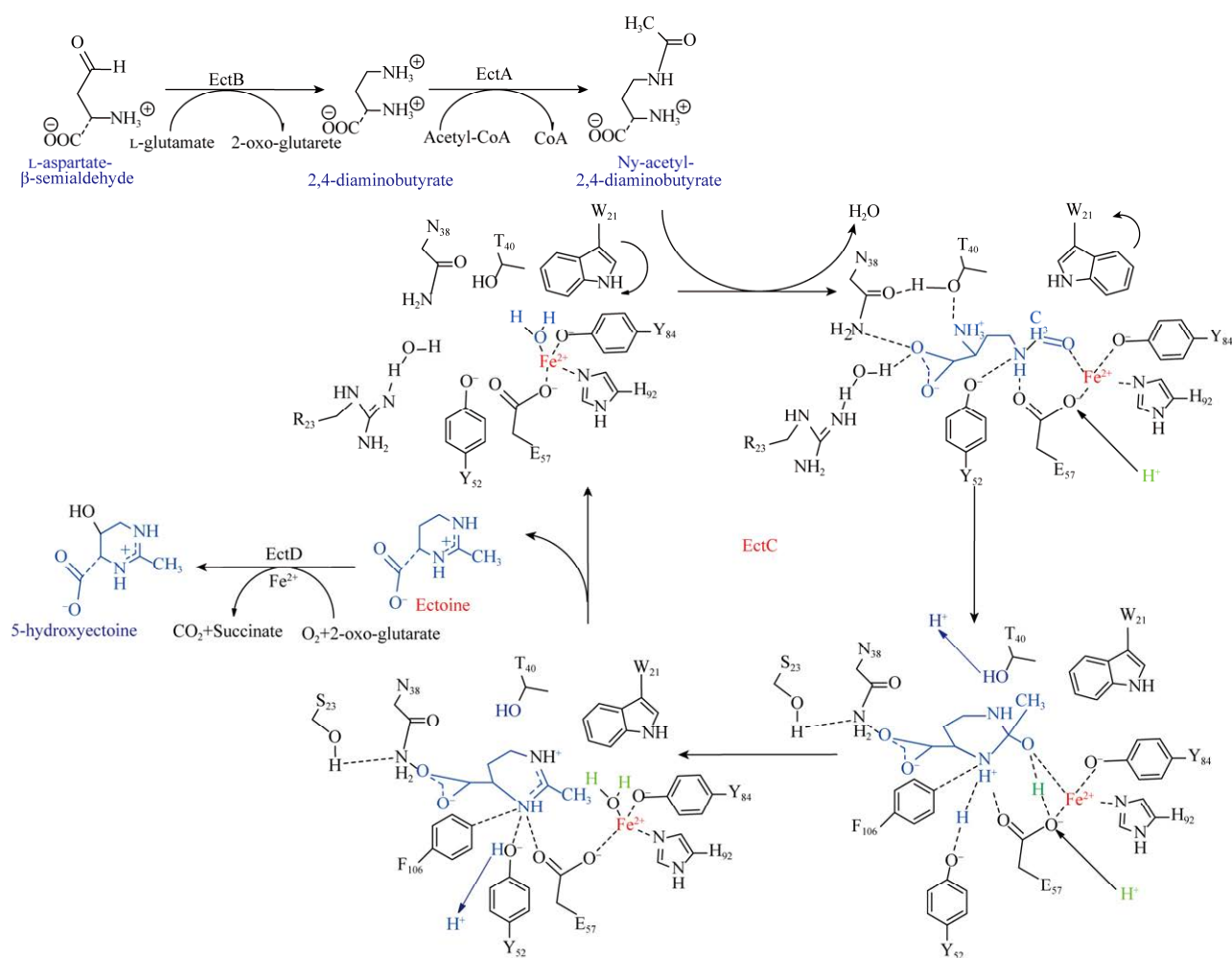


图 8 EctC 酶介导的环化缩合四氢嘧啶的催化机制^[27]

Figure 8 Ectoione synthesis mechanism of cyclic condensation mediated by EctC enzyme^[27].

促进电子转移, 从而增加甲烷的产量(与未添加 Fe_3O_4 NPs 的 MES 系统相比提高 22.1%)。Zheng 等^[32]采用磁铁矿 (Fe_3O_4) 与金属还原地杆菌 (*Geobacter metallireducens*) 和硫还原地杆菌 (*G. sulfurreducens*) 共培养并进行转录组学分析, 发现金属还原地杆菌细胞色素 b6 基因 (*RS02690*)、细胞色素 c 相关基因 (*RS15860*, *RS02890*, *RS02575*, *RS01255*, *RS09110*) 的表达量显著上调; 硫还原地杆菌细胞色素 c 相关基因 (*omcX*, *omcI*, *ppcE*, *ppcH*) 的表达量显著上调。本研究中, M 实验组卟啉代谢通路基因 *hemA/B/C/D*、

细胞色素 c 组装蛋白基因 *ccsA* 的表达量均显著上调, 辅酶 Q 合成相关基因 *aarF*、*ubiB* 的表达量显著下调。血红素是血红蛋白(氧转运)、肌红蛋白(氧储存)和细胞色素(电子传递)的辅助因子^[33], 辅酶 Q 和细胞色素 c 主要参与呼吸链的电子传递^[34], 且辅酶 Q 还参与呼吸过程中 ROS 的产生^[35]。因此, Fe_3O_4 NPs 可能影响电子传递过程, 从而为四氢嘧啶的合成提供能量, 但具体涉及呼吸链电子转移的影响作用, 尚需体外电化学实验验证。

综上所述, 本文设置不同浓度 Fe_3O_4 NPs

与 *H. campaniensis* XH26 菌株共培养, 利用转录组学分析探究了 Fe_3O_4 NPs 培养条件下的差异表达基因。 Fe_3O_4 NPs 胁迫下, 菌株 XH26 胞内的 DEGs 主要与四氢嘧啶合成通路、电子传递途径及抗氧化酶系相关, 表明菌株 XH26 通过促进四氢嘧啶合成和提升抗氧化能力, 以应对胞外 Fe_3O_4 NPs 的胁迫作用。

作者贡献声明

张培霞: 研究设计、数据处理、论文撰写及修改; 陶宇杰: 研究方法指导、参与论文讨论; 乔丽娟: 参与论文讨论; 王嵘: 研究方法指导; 韩睿: 研究方法指导; 朱德锐: 研究设计、研究方法指导、参与论文讨论; 沈国平: 研究方法指导、参与论文讨论。

作者利益冲突公开声明

作者声明不存在任何可能会影响本文所报告工作的已知经济利益或个人关系。

参考文献

- [1] DINALI R, EBRAHIMINEZHAD A, MANLEY-HARRIS M, GHASEMI Y, BERENJIAN A. Iron oxide nanoparticles in modern microbiology and biotechnology[J]. *Critical Reviews in Microbiology*, 2017, 43(4): 493-507.
- [2] 孙剑飞, 张宇, 杨芳, 马明, 熊非, 顾宁. 医药磁性氧化铁纳米材料的研究和发展[J]. *科学通报*, 2019, 64(8): 842-853.
- [3] SUN JF, ZHANG Y, YANG F, MA M, XIONG F, GU N. Research and development of medical magnetic nanomaterials[J]. *Chinese Science Bulletin*, 2019, 64(8): 842-853 (in Chinese).
- [4] FATOLLAHI P, GHASEMI M, YAZDIAN F, SADEGHI A. Ectoine production in bioreactor by *Halomonas elongata* DSM2581: using MWCNT and Fe-nanoparticle[J]. *Biotechnology Progress*, 2021, 37(1): e3073.
- [5] WANG LT, LEI ZF, YANG XJ, ZHANG C, LIU C, SHIMIZU K, ZHANG ZY, YUAN T. Fe_3O_4 enhanced efficiency of volatile fatty acids production in anaerobic fermentation of food waste at high loading[J]. *Bioresource Technology*, 2022, 364: 128097.
- [6] CHEN S, LIU HL, YANGZONG ZX, GARDEA-TORRESDEY JL, WHITE JC, ZHAO LJ. Seed priming with reactive oxygen species-generating nanoparticles enhanced maize tolerance to multiple abiotic stresses[J]. *Environmental Science & Technology*, 2023, 57(48): 19932-19941.
- [7] LYU ZJ, KOU Y, FU Y, XIE YX, YANG B, ZHU HJ, TIAN J. Comparative transcriptomics revealed neurodevelopmental impairments and ferroptosis induced by extremely small iron oxide nanoparticles[J]. *Frontiers in Genetics*, 2024, 15: 1402771.
- [8] LIU FH, ROTARU AE, SHRESTHA PM, MALVANKAR NS, NEVIN KP, LOVLEY DR. Magnetite compensates for the lack of a pilin-associated c-type cytochrome in extracellular electron exchange[J]. *Environmental Microbiology*, 2015, 17(3): 648-655.
- [9] 张鑫, 舒志万, 李永臻, 邢江娃, 王嵘, 沈国平, 朱德锐. 相容溶质四氢嘧啶的微生物合成研究进展[J]. *生物工程学报*, 2022, 38(3): 868-881.
- [10] ZHANG X, SHU ZW, LI YZ, XING JW, WANG R, SHEN GP, ZHU DR. Advances in the microbial production of the compatible solute ectoine: a review[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2022, 38(3): 868-881 (in Chinese).
- [11] 田磊, 张芳, 沈国平, 高翔, 龙启福, 朱德锐. Ectoine 高产菌株 *Halomonas* sp. XH26 的鉴定及紫外诱变选育[J]. *生物学杂志*, 2020, 37(4): 31-35.
- [12] TIAN L, ZHANG F, SHEN GP, GAO X, LONG QF, ZHU DR. Identification of high-yielding strain *Halomonas* sp. XH26 for producing ectoine and UV mutagenesis breeding[J]. *Journal of Microbiology*, 2020, 37(4): 31-35 (in Chinese).
- [13] 汪明香, 郭敏, 高翔, 李永臻, 韩睿, 朱德锐, 沈国平. 磁性纳米金属对盐单胞菌生长特性及胞内 Ectoine 的积聚影响[J]. *中国生物工程杂志*, 2023, 43(5): 45-54.
- [14] WANG MX, GUO M, GAO X, LI YZ, HAN R, ZHU DR, SHEN GP. Effects of magnetic nano-metals on growth characteristics and intracellular ectoine accumulation of *Halomonas* sp. XH26[J]. *China Biotechnology*, 2023, 43(5): 45-54 (in Chinese).
- [15] PARKHOMCHUK D, BORODINA T, AMSTISLAVSKIY V, BANARU M, HALLEN L, KROBITSCH S, LEHRACH H, SOLDATOV A. Transcriptome analysis by strand-specific sequencing of complementary DNA[J]. *Nucleic Acids Research*, 2009, 37(18): e123.
- [16] PINEL GD, HORDER JL, KING JR, McINTYRE A, MONGAN NP, LÓPEZ GG, BENEST AV. Endothelial cell RNA-seq data: differential expression and functional enrichment analyses to study phenotypic switching[J]. *Methods in Molecular Biology*, 2022, 2441: 369-426.
- [17] DAS P, BEHERA BK, CHATTERJEE S, DAS BK, MOHAPATRA T. *De novo* transcriptome analysis of halotolerant bacterium *Staphylococcus* sp. strain P-TSB-70 isolated from East coast of India: in search of salt stress tolerant genes[J]. *PLoS One*, 2020, 15(2): e0228199.
- [18] 张鑫, 王智博, 缪增强, 邢江娃, 王嵘, 李永臻, 朱德锐, 沈国平. 转录组学分析盐单胞菌四氢嘧啶合成代谢相关的表达差异基因与 RT-qPCR 验证[J]. *微生物学报*, 2022, 62(3): 1083-1098.
- [19] ZHANG X, WANG ZB, MIAO ZQ, XING JW, WANG R, LI YZ, ZHU DR, SHEN GP. Transcriptome analysis

- of differential genes associated with the ectoine synthesis pathway of *Halomonas campaniensis* under salt stress and expression verification by RT-qPCR[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2022, 62(3): 1083-1098 (in Chinese).
- [15] DUAN JC, KODALI VK, GAFFREY MJ, GUO J, CHU RK, CAMP DG, SMITH RD, THRALL BD, QIAN WJ. Quantitative profiling of protein S-glutathionylation reveals redox-dependent regulation of macrophage function during nanoparticle-induced oxidative stress[J]. *ACS Nano*, 2016, 10(1): 524-538.
- [16] LEWIŃSKA A, RADOŃ A, GIL K, BŁONIAK D, CIURASZKIEWICZ A, KUBACKI J, KAŹDIOŁKA-GAWĘŁ M, ŁUKOWIEC D, GĘBARA P, KROGUL-SOBCZAK A, PIOTROWSKI P, FIJAŁKOWSKA O, WYBRANIEC S, SZMATOŁA T, KOLANO-BURIAN A, WNUK M. Carbon-coated iron oxide nanoparticles promote reductive stress-mediated cytotoxic autophagy in drug-induced senescent breast cancer cells[J]. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2024, 16(12): 15457-15478.
- [17] KICHEEVA AG, SUSHKO ES, BONDARENKO LS, BAIMURATOVA RK, KYDRALIEVA KA, SCHWAMINGER SP, PRASSL R, TROPSKAYA NS, DZHARDIMALIEVA GI, SMIRNYKH DV, MARTYNOVA AA, KUDRYASHEVA NS. Cytotoxic and radical activities of metal-organic framework modified with iron oxide: biological and physico-chemical analyses[J]. *Chemico-Biological Interactions*, 2024, 399: 111150.
- [18] BU T, YANG JX, LIU JX, FAN XF. NaHS immersion alleviates the stress effect of chromium (III) on alfalfa seeds by affecting active oxygen metabolism[J]. *Plant Signaling & Behavior*, 2024, 19(1): 2375673.
- [19] MYKYTCZUK NCS, TREVORS JT, FOOTE SJ, LEDUC LG, FERRONI GD, TWINE SM. Proteomic insights into cold adaptation of *psychrotrophic* and mesophilic *Acidithiobacillus ferrooxidans* strains[J]. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 2011, 100(2): 259-277.
- [20] SNIECKUTE G, RYDER L, VIND AC, WU ZZ, ARENDRUP FS, STONELEY M, CHAMOIS S, MARTINEZ-VAL A, LELEU M, DREOS R, RUSSELL A, GAY DM, GENZOR AV, CHOI BSY, BASSE AL, SASS F, DALL M, DOLLET LCM, BLASIUS M, WILLIS AE, et al. ROS-induced ribosome impairment underlies ZAK α -mediated metabolic decline in obesity and aging[J]. *Science*, 2023, 382(6675): eadf3208.
- [21] SCHIEBER M, CHANDEL NS. ROS function in redox signaling and oxidative stress[J]. *Current Biology*, 2014, 24(10): R453-R462.
- [22] 许慧娴, 陈永涛, 黄建忠, 陶勇, 柯崇榕, 杨欣伟. 四氢嘧啶生物合成及其关键酶生化特性研究进展[J]. *生物工程学报*, 2024, 40(6): 1620-1643.
- XU HX, CHEN YT, HUANG JZG, TAO Y, KE CR, YANG XW. Advances in ectoine biosynthesis and biochemical characteristics of key enzymes[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2024, 40(6): 1620-1643 (in Chinese).
- [23] HERNÁNDEZ VM, ARTEAGA A, DUNN MF. Diversity, properties and functions of bacterial arginases[J]. *FEMS Microbiology Reviews*, 2021, 45(6): fuab034.
- [24] 张珺哲. 四氧化三铁纳米颗粒的代谢过程研究[D]. 北京: 中国科学院大学博士学位论文, 2019.
- ZHANG JZ. Study on metabolic process of Fe₃O₄ nanoparticles[D]. Beijing: Doctoral Dissertation of University of Chinese Academy of Sciences, 2019 (in Chinese).
- [25] LUO T, GAO JL, LIN N, WANG JK. Effects of two kinds of iron nanoparticles as reactive oxygen species inducer and scavenger on the transcriptomic profiles of two human leukemia cells with different stemness[J]. *Nanomaterials*, 2020, 10(10): 1951.
- [26] ZHONG D, LI JX, MA WC, XIN HM. Magnetite nanoparticles enhanced glucose anaerobic fermentation for bio-hydrogen production using an expanded granular sludge bed (EGSB) reactor[J]. *International Journal of Hydrogen Energy*, 2020, 45(18): 10664-10672.
- [27] CZECH L, HÖPPNER A, KOBUS S, SEUBERT A, RICLEA R, DICKSCHAT JS, HEIDER J, SMITS SHJ, BREMER E. Illuminating the catalytic core of ectoine synthase through structural and biochemical analysis[J]. *Scientific Reports*, 2019, 9(1): 364.
- [28] WIDDERICH N, KOBUS S, HÖPPNER A, RICLEA R, SEUBERT A, DICKSCHAT JS, HEIDER J, SMITS SHJ, BREMER E. Biochemistry and crystal structure of ectoine synthase: a metal-containing member of the cupin superfamily[J]. *PLoS One*, 2016, 11(3): e0151285.
- [29] GUPTA D, GUZMAN MS, BOSE A. Extracellular electron uptake by autotrophic microbes: physiological, ecological, and evolutionary implications[J]. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 2020, 47(9/10): 863-876.
- [30] ZHANG JR, HUANG S, YIN YG, YANG LQ, LI XN, JIAO WT, SAKAMAKI T. Fe₂O₃ micron particles are critical for electron transfer and the distribution of electrochemically active bacteria in soil MFCs[J]. *Science of the Total Environment*, 2023, 893: 164909.
- [31] VU MT, NOORI MT, MIN B. Conductive magnetite nanoparticles trigger syntrophic methane production in single chamber microbial electrochemical systems[J]. *Bioresource Technology*, 2020, 296: 122265.
- [32] ZHENG SL, LIU FH, LI M, XIAO LL, WANG OM. Comparative transcriptomic insights into the mechanisms of electron transfer in *Geobacter* co-cultures with activated carbon and magnetite[J]. *Science China Life Sciences*, 2018, 61(7): 787-798.
- [33] FUJIWARA T, HARIGAE H. Biology of heme in mammalian erythroid cells and related disorders[J]. *BioMed Research International*, 2015, 2015: 278536.
- [34] 汤明芳, 盛光遥, 李长鑫, 丁静. 基于细胞色素 c 的胞外电子传递过程[J]. *微生物学报*, 2023, 63(2): 509-522.
- TANG MF, SHENG GY, LI CX, DING J. The process of extracellular electron transfer based on cytochrome c[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2023, 63(2): 509-522 (in Chinese).
- [35] WANG Y, LILIENFELDT N, HEKIMI S. Understanding coenzyme Q[J]. *Physiological Reviews*, 2024, 104(4): 1533-1610.