



基于比较转录组分析海洋弧菌 X511 的褐藻胶代谢途径

许超^{1,2}, 熊亚茹², 黄桂媛¹, 王巧贞¹, 卢明倩¹, 张荣灿³, 廖威⁴, 张云开^{2*}, 黄庶识^{1*}

¹广西科学院, 广西海洋天然产物与组合生物合成重点实验室, 广西 南宁 530007

²广西大学生命科学与技术学院, 广西 南宁 530003

³广西北部湾海洋研究中心, 广西 南宁 530007

⁴广西职业技术学院, 广西 南宁 530226

摘要:【目的】从北海涠洲岛海域腐烂的马尾藻中分离得到的海洋弧菌(*Vibrio* X511)具有较强的利用褐藻胶能力, 本文利用转录组测序的方法以研究弧菌 X511 的褐藻胶代谢途径。【方法】采用 Illumina HiSeq2500 测序平台对菌株在褐藻胶及葡萄糖培养下的转录组进行测序; 比较和分析差异转录本, 利用荧光定量 PCR 验证测序结果; 采用 GO (Gene Ontology)和 KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes)对差异转录本进行功能和 Pathway 注释。【结果】经比较发现, 菌株在褐藻胶培养下相对于葡萄糖的培养共有 2024 个差异表达基因, 其中 1066 个基因上调, 958 个基因下调; 某些普遍存在于代谢途径中的基因在不同培养条件下也存在差异表达; 海洋弧菌 X511 中涉及褐藻胶利用的所有基因以及合成乙醇的关键基因其转录量均有一定程度的上调; 此外, 通过分析发现该菌株具有独特的褐藻胶利用方式, 其中的一个代谢过程尚未在弧菌中被报道。【结论】成功解析了海洋弧菌 X511 的褐藻胶代谢途径, 丰富了生物方法降解褐藻胶的研究, 为大型海藻生物质能源的研究提供有价值的技术支持。

关键词: 转录组, 荧光定量, 基因功能, 褐藻胶, 代谢途径

褐藻胶是一种线性高分子多糖, 经甘露醛糖酸 (β -D-mannuronic acid, M) 和古罗醛糖酸 (α -L-guluronic acid, G) 两种单糖以 1,4-糖苷键随机组合而成^[1-2], 由英国科学家 Stanford 于 1881 年

率先自海带中提取获得^[3]。褐藻胶在大型褐藻中的含量尤为丰富, 约占总糖的 30%–60% (*W/W*)^[4], 是最丰富的海洋生物多糖, 也是世界上仅次于纤维素的生物高分子聚合物。以大型海洋藻类尤其

基金项目: 国家自然科学基金(31560017); 广西自然科学基金重点项目(2014GXNSFDA118012); 广西科技计划重点研发项目(桂科 AB16380071); 广西科技计划科技基地和人才专项(桂科 AD17129019)

*通信作者。黄庶识, Tel: +86-771-2503990, E-mail: hshushi@gxas.cn; 张云开, E-mail: yykzhang@gxu.edu.cn

收稿日期: 2017-10-25; 修回日期: 2017-12-25; 网络出版日期: 2018-01-17

是褐藻为原料的第三代生物乙醇技术的研发正在成为能源领域关注的热点，作为褐藻主要多糖成分的褐藻胶储量丰富，以其为原料转化为生物乙醇，是未来解决能源危机的潜在路径之一^[5]。

在海洋和陆地，存在多种类能够降解和同化褐藻胶的降解菌，种类众多^[6]，这些微生物可以利用褐藻胶降解产物作为唯一碳源生长。但是，除了少数几个种类以外^[5,7]，大部分褐藻胶降解菌并不能生产乙醇。由于褐藻胶及其降解产物不能被现有的工业产乙醇菌株利用，通过包括改造原始褐藻胶降解菌菌株的代谢途径，或者构建工程菌株生产乙醇，为大型褐藻生产燃料乙醇开辟了新的途径^[8-10]。阐明藻胶降解菌代谢途径及其关键酶特性，是藻胶降解菌基因改造或者构建产乙醇工程菌的基础。

1962年, Preiss 和 Ashwell 最早发现了假单胞

菌褐藻胶裂解酶分解海藻酸的机制^[11-12]。2010年, Takase 等^[13]对 *Sphingomonas* A1 菌株代谢褐藻胶的研究发现，该菌株通过细胞膜上的超级通道 (superchannel) 直接摄入褐藻胶到细胞体内，在 Al-I、Al-II 和 Al-III 三种裂解酶的作用下，褐藻胶降解成寡糖，进而被内切酶 (Al-IV) 降解为单糖，单糖经非酶促反应转变成 4-脱氧-L-赤藓-糖醛酸 (DEH)，DEH 被还原酶 Al-R 催化为 2-酮-3-脱氧-D-葡萄糖酸 (KDG)，进入 ED 途径 (Entner-Doudoroff pathway)。ED 途径中，KDG 在酶的作用下经两步催化反应被利用 (图 1)，第一步是在 2-酮-3-脱氧葡萄糖酸激酶 (Al-K) 的催化下，KDG 被磷酸化为 2-酮-3-脱氧-6-磷酸-葡萄糖酸 (KDPG)；第二步是 KDPG 经醛缩酶 (Al-A) 催化发生分解反应，产生甘油醛-3-磷酸和丙酮酸，最后进入糖酵解和三羧酸循环。

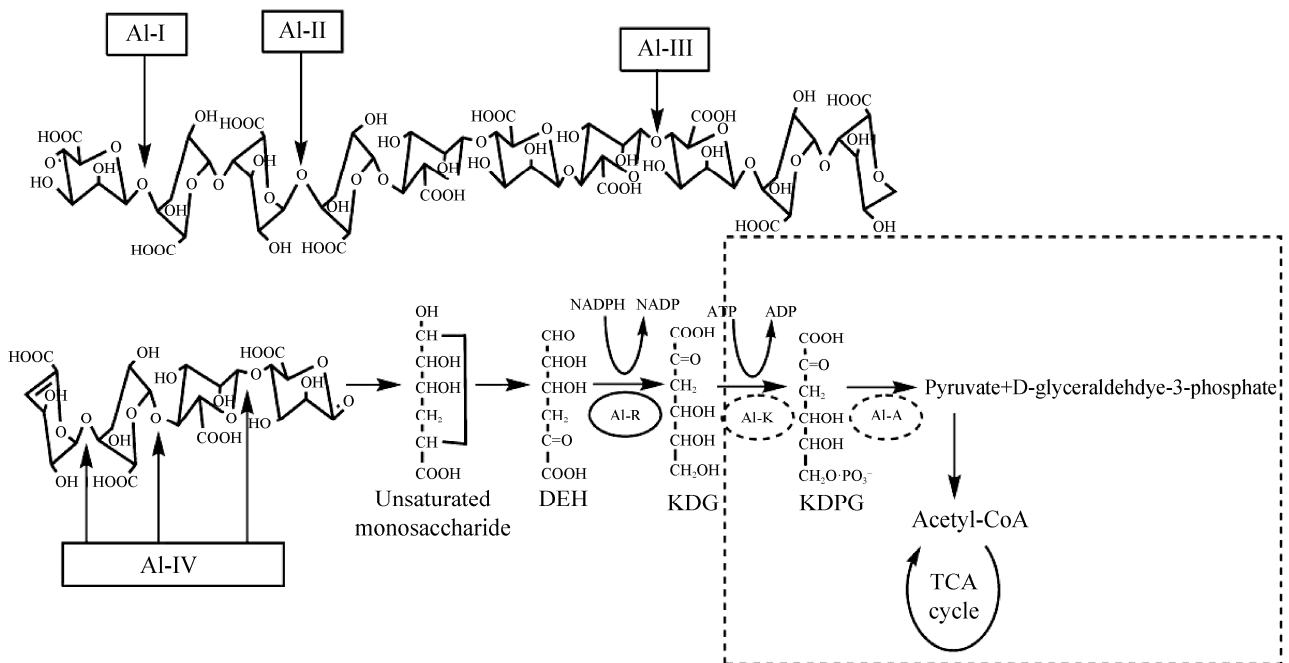


图 1. Takase 预测的褐藻胶代谢途径^[13]

Figure 1. The metabolic pathway of alginate predicted by Takase.

我们早期筛选鉴定的海洋弧菌 X511 是一株新型的褐藻胶降解菌株, 能够分泌高活性的海藻酸裂解酶。本研究在基于 X511 菌株全基因组测序基础上, 分别对其在以葡萄糖和褐藻胶为唯一碳源培养下的转录组进行了比较研究, 通过基因的转录差异快速定位目的基因及对应的代谢途径, 为后续完全阐明 X511 菌株基本的遗传信息以及褐藻胶在该菌细胞内的代谢途径提供依据。

1 材料和方法

1.1 试剂和仪器

海藻酸钠、硫酸镁、葡萄糖、氯化钠、七水硫酸镁、硫酸亚铁、硫酸铵均为市售分析纯。细菌总 RNA 提取试剂盒购自 Transgen 公司, 反转录试剂盒 PrimeScript™ RT-PCR Kit 及荧光定量试剂盒 SYBR Premix EX Taq 购自 TaKaRa 公司, 超低温冰箱购自美国 Themro 公司, ABI 7500 Fast 实时荧光定量 PCR 仪购自美国应用生物系统公司。

1.2 菌种与培养基

供试 X511 菌株为本实验室筛选自广西北海涠洲岛海域。

种子培养基: 海藻酸钠 6 g, NaCl 15 g, 蛋白胨 5 g, 磷酸氢二钾 1 g, 硫酸镁 1 g, 硫酸亚铁 0.001 g, 加去离子水定容到 1 L, pH 7.5, 121 °C 灭菌 20 min。

海藻酸钠培养基: 将种子培养基的蛋白胨换成等量的硫酸铵。

葡萄糖培养基: 将海藻酸钠培养基中的海藻酸钠换成等量的葡萄糖。

1.3 样品处理

将低温保藏的菌种接至种子培养基中摇床培

养活化 24 h, 然后接种至海藻酸钠培养基培养至对数期(约 8 h), 按 2% 的接种量转接至葡萄糖培养基中培养至对数期, 取样, 编号 X1; 从葡萄糖培养基中取处于对数期的 X511 菌液, 以 2% 的接种量接种至海藻酸钠培养基, 待菌株 X511 生长至对数期, 取样, 编号 X2; 样品 X1 和 X2 均取 3 组平行, 培养条件为 30 °C, 200 r/min。

1.4 转录组测序和生物信息学分析

采用天根公司细菌总 RNA 提取试剂盒提取菌株 X511 的总 RNA, 送北京诺禾致源生物信息科技有限公司基于 Illumina HiSeq 进行转录组测序。原始测序结果经质量评估、与相关物种参考序列进行比对分析、基因表达分析及基因差异表达分析后, 采用 GO、KEGG、COG、NR 和 Swiss-Prot 等数据库进行生物信息学分析。

1.5 定量 PCR 验证转录组

在相同条件下将 X511 分别培养至与样品 X1 和 X2 相同的状态, 提取其总 RNA, 采用 TaKaRa 反转录试剂盒将总 RNA 反转录为 cDNA。由于任何管家基因的稳态表达都有一定的适用范围^[14-15], 故挑选菌株 X511 中注释为 recA、16S rRNA、fadL、rpoA、gyrB、GAPDH (3 个) 的共 8 个待选管家基因进行试验^[16-19], 以得到本供试菌株中表达最稳定的管家基因。为验证转录组结果的可靠性, 拟挑选 14 个与褐藻胶及葡萄糖代谢相关的基因进行 RT-PCR, 利用 Primer Premier 5 软件设计产物长度为 100-300 bp 的引物(表 1), 委托北京奥科公司合成。利用 SYBR Premix EX Taq (Perfect Real time 染料法实时荧光定量试剂盒) 进行定量检测, 采用 2^{-ΔCt} 的方法进行数据分析^[20]。

表 1. RT-PCR 基因及引物
Table 1. RT-PCR genes and primers

Gene ID	Gene name	R-primer	F-primer
GM004415	recA	GTGATAACCGAGCAATG	CTTCTACGATACGACCC
GM001922	16S rRNA	AAAAGGGCAAGTGGGT	CGCAGGGTCAATAGCA
GM001598	fadL	AGGTTCTTACCGTCTCA	TCCATTTCTGGGCTAT
GM003897	rpoA	CTATGCCAGGTTGTGC	GCGTTGTCATCCGTTA
GM004299	gyrB	GGCAAACAAGAGCAGT	GCGTTAGACGAGGAGT
GM001542	GAPDH	CCGTATCGGTCGTTTCGTATT	CATTTAAGGTCCGCTGGGTT
GM002328	GAPDH	TTTCTTCGTGTCGTGTAGATGTTG	GCTCGCAGTCGTAGTGGGTAA
GM004585	GAPDH	GGCTGCGATGTTGTGATTGA	GGCTGTCACGATACGATGTTTT
GM001982	algL	ACCTACATTTCGACTTGCTTCTG	TTGTCGTTACGGCTTTGTTGTG
GM001989	algL	GTTGCGAATCAAGCAGGGAC	GGTTGCGTGGGTACGAGTGT
GM003561	rpiB	GATGGAAAACAGCCAAGCAGC	AGTACCACAACCAGTTACCACGAA
GM003558	kduD	CAAGGTGAAGGCGGCAAGA	GCCATGTAACCCGGAGCAA
GM003563	kdgK	ATGCGGCGGCAAAATACT	TGTCGGTGACGCTGAGGAT
GM002020	eda	TTTCGCAGCATCCCCTATC	TTCAACCGCCGCATCAT
GM003564	eda	GGATGAAGCGATTGATGCG	TTGTTGACACCAGGGACGAT
GM000293	PTS-Glc-EIIA	ATCAAGCCAGCAGGCAACA	CGATACCGAAGTGAACGAAAAG
GM000031	pfk	TCATGGGTCGTCACTGTGGT	TGCGATGCCGTCTTGG A
GM003325	fsaA	GTCAAAGTGCCAGCAACCG	CAATGCCGCAAGGAAACC
GM003942	tpiA	ATGCGTCGTCCTGTAGTGATG	TGAGTGACCGATGATGATGTGA
GM000053	PGAM	GCTATGGACCGTGACAACA ACT	GGAATACCGCACGCTCAA A
GM001436	pyk	GACTACCTTGCTATTTTCGTTCCC	TTCTGCTCGTTCGACTTTGG
GM002414	korA	AACGGCTCCGAATCTTGG	ACACGTCATCACGGGCATAG

2 结果和分析

2.1 总 RNA 电泳结果

X511 菌株的总 RNA 电泳结果如图 2, 平行样品间的一致性较好, 基本无蛋白质和 DNA 的污染, 无明显的 RNA 降解现象, 可作为转录组测序样品。

2.2 RT-PCR 验证

2.2.1 内参基因的选择: 选择菌株 X511 的 8 个管家基因分别进行 RT-PCR, 以得到在不同培养下转录最为稳定的内参基因(偏差 $C.V$ 越小, 说明表达越稳定), 结果见表 2。分别在葡萄糖和褐藻胶培

养下, 菌株 X511 中转录最为稳定的基因为 GM004585, 其基因表达的产物为甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH), 故选择该基因为内参基因进行 RT-PCR 验证试验。

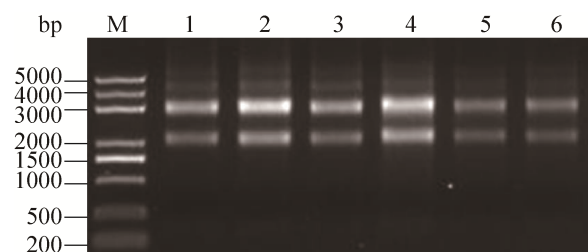


图 2. 菌株 X511 的总 RNA 电泳结果
Figure 2. Agarose gel electrophoresis of total RNAs from strain X511. M: Marker; 1-3: X1; 4-6: X2.

表 2. 不同培养下各管家基因的转录稳定性

Table 2. Transcriptional stability of each housekeeper gene under different cultures

Gene ID	Gene name	Product	<i>C.V</i>
GM004415	<i>recA</i>	Recombination protein	0.0132
GM001922	16S rRNA	16S rRNA processing protein	0.0155
GM001598	<i>fadL</i>	Long-chain fatty acid transport protein	0.0492
GM003897	<i>rpoA</i>	DNA-directed RNA polymerase subunit alpha	0.0149
GM004299	<i>gyrB</i>	DNA gyrase subunit B	0.0121
GM001542	GAPDH	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase	0.0267
GM002328	GAPDH	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase	0.0120
GM004585	GAPDH	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase	0.0107

2.2.2 RT-PCR 验证: 挑选 14 个与褐藻胶及葡萄糖代谢相关的基因进行 RT-PCR, 从表 3 可以看出, 基因 RT-PCR 的定量结果与转录组的差异转录倍数(FC)基本吻合, 说明转录组测序结果的可信度较高, 可作为生物信息学分析的参考。

2.3 差异表达基因

在不同培养下菌株 X511 的差异表达基因火山图(图 3), X2 相对于 X1(X2 vs X1, 下同)有 2024 个基因的转录水平存在显著性差异, 占该菌株总基因数目(5434 个)的 37.2%, 其中 1066 个基因转录上调, 958 个基因下调, 说明不同碳源的培养能显著影响该菌株的生长及代谢方式。

2.4 差异基因的 GO 富集分析

样品 X2 相对 X1 的差异转录基因($P < 0.05$) GO 分析见图 4, 根据功能将基因分为 3 类, 分别为细胞组分(cellular component)、分子功能(molecular function)和生物学过程(biological process)。

细胞组分类别中存在显著差异的代谢途径总数最少, 且发生上调和下调的代谢途径数量相当, 与葡萄糖培养相比, 以褐藻胶作为碳源的培养基对菌株 X511 的细胞组分产生较小的影响; 上调基因明显的途径是“被膜组分(envelope)”和“表面封装结构组分(external encapsulating structure part)”, 而“质子

表 3. RT-PCR 结果

Table 3. The results of RT-PCR

Gene ID	RT-PCR	FC	Gene ID	RT-PCR	FC
GM1989	5.270	44.067	GM3942	0.160	0.74
GM1982	1.488	153.190	GM0031	0.223	0.50
GM3561	3.620	1.970	GM2414	0.350	0.35
GM3558	1.100	2.330	GM2020	0.450	0.80
GM3564	1.960	4.120	GM3325	0.510	0.59
GM1436	1.870	4.080	GM0053	0.250	0.56
GM3563	0.720	3.870	GM0293	0.990	0.71

FC was the fold changes in the results of the transcriptome, RT-PCR was the fold changes in the quantitative results of the fluorescence quantitative PCR.

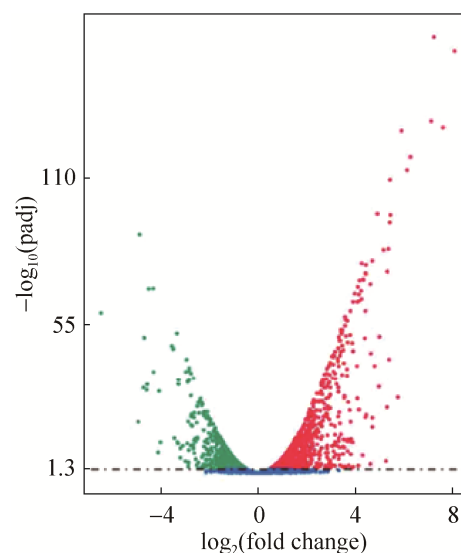


图 3. X2 vs X1 差异表达基因的火山图

Figure 3. Speckle diagram of differentially expressed genes in X2 vs X1.

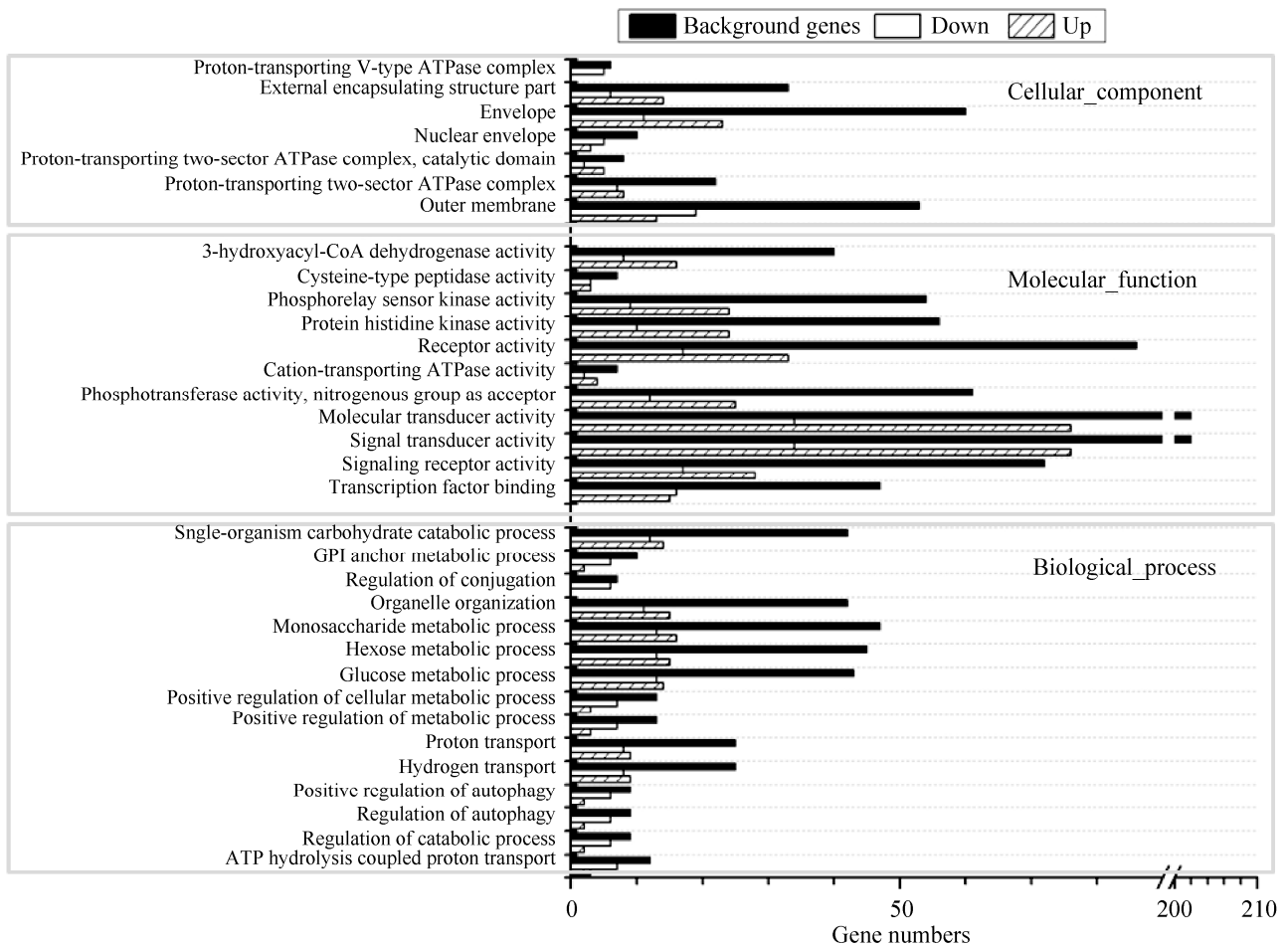


图 4. X2 vs X1 的差异基因 GO 富集分析

Figure 4. GO enrichment analysis of differentially expressed genes in X2 vs X1.

运输 V 型 ATP 酶复合体(proton-transporting V-type ATPase complex)”及“外膜组分(outer membrane)”则下调基因较多，可能是细菌因为应不同底物的吸收及代谢产物的分泌，导致这些细胞组分基因的上调和下调。

归类为分子功能的差异转录代谢途径数量其次，大部分的差异途径中上调基因总数多于下调基因，主要包括“磷酸转移传感器激酶活性(phosphorelay sensor kinase activity)”、“受体活性(receptor activity)”、“磷酸转移酶活性(phosphotransferase activity)”、“分子传导活性

(molecular transducer activity)”以及“信号传导活性(signal transducer activity)”等代谢途径，磷酸转移酶、激酶、信号传递及分子运输相关的代谢途径均发生了不同程度的上调，上述上调的代谢途径与基因多与碳水化合物的利用有关^[21-22]，显示了菌株 X511 利用两种碳源的分子机制存在较大差异，褐藻胶作为高分子聚糖，其被利用的途径相较于葡萄糖更为复杂，褐藻胶分子在经一系列酶的作用后被细菌利用吸收的方式有待进一步研究。

在生物学过程类别中，除“细胞器组织(organelle organization)”和“单糖代谢过程

(monosaccharide metabolic process)”上调基因数量略高于下调外, 其余代谢途径如“ATP 水解偶联质子转运(ATP hydrolysis coupled proton transport)”、“调节分解代谢过程 (regulation of catabolic process)”、“自噬调节(regulation of autophagy)”、“代谢过程的积极调节 (positive regulation of metabolic process)”、“共轭调节 (regulation of conjugation)”及“GPI 锚代谢过程 (GPI anchor metabolic process)”等下调基因数量较多, 说明在用褐藻胶培养该菌株时, 其参与生物过程基因的活跃数量少于葡萄糖培养, 推测其维持菌体自身稳态的能力可能发生了下降^[23-24], 对菌种保藏培养基的选择有一定的指导意义。

2.5 差异代谢途径 KEGG 富集分析

利用 KEGG 数据库对各代谢通路的差异代谢途径(表 4)进行富集: 相对于葡萄糖培养基而言, 菌种在褐藻胶培养基中的基础代谢产能途径如柠檬酸循环 (TCA cycle) 和氧化磷酸化 (oxidative phosphorylation) 均发生了上调; 其中 TCA 循环产生的一系列中间产物能作为其他诸多代谢途径的前体, 如氨基酸和脂肪酸等大分子物质的合成及氧化磷酸化等, 该代谢通路的极显著上调说明该菌株在褐藻胶培养下其体内的诸多代谢途径比葡

萄糖培养时更为活跃; 而氧化磷酸化则直接与电子传递链的产能方式相关, 说明菌株在褐藻胶培养基中的生长繁殖更为活跃; 此外, 缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸降解 (valine, leucine and isoleucine degradation) 与丁酸代谢 (butanoate metabolism) 也发生了上调, 推测该菌株的生长过程中可能有丁酸生成; 值得一提的是, 菌株中可能存在与光合作用 (photosynthesis) 相关的代谢途径且在褐藻胶培养下有一定的上调。代谢途径如泛醌等萘醌类生物合成 (ubiquinone and other terpenoid-quinone biosynthesis)、核苷酸切除修复 (nucleotide excision repair) 及维生素 B6 代谢 (vitamin B6 metabolism) 的下调, 以及核苷酸切除修复途径的下调, 推测菌株 X511 在褐藻胶培养基中传代数过多易发生基因突变^[25-26]。

2.6 菌株 X511 中与葡萄糖及褐藻胶代谢途径相关基因的转录组分析

结合菌株 X511 的全基因组测序结果及相关文献对褐藻胶裂解酶产生菌代谢褐藻胶途径^[27-28]的报道, 推测并绘制该菌株代谢葡萄糖与褐藻胶的可能途径(图 5), 葡萄糖经糖酵解、磷酸戊糖途径和三羧酸循环被菌株利用。褐藻胶在该菌株产生的褐藻胶裂解酶作用下被降解为褐藻胶寡糖, 发生非酶促

表 4. X2 vs X1 中显著上调和下调代谢途径

Table 4. Significant upregulation and downregulation of metabolic pathways in X2 vs X1

Pathway	Up (Down)-regulated gene numbers	Background gene numbers	P-value
TCA cycle(up)	23	28	0.000791
Valine, leucine and isoleucine degradation (up)	19	31	0.020097
Oxidative phosphorylation (up)	23	41	0.022647
Butanoate metabolism (up)	20	35	0.028532
Photosynthesis (up)	7	8	0.048415
Ubiquinone and other terpenoid-quinone biosynthesis (down)	8	17	0.040378
Nucleotide excision repair (down)	5	8	0.047832
Vitamin B6 metabolism (down)	5	8	0.047832

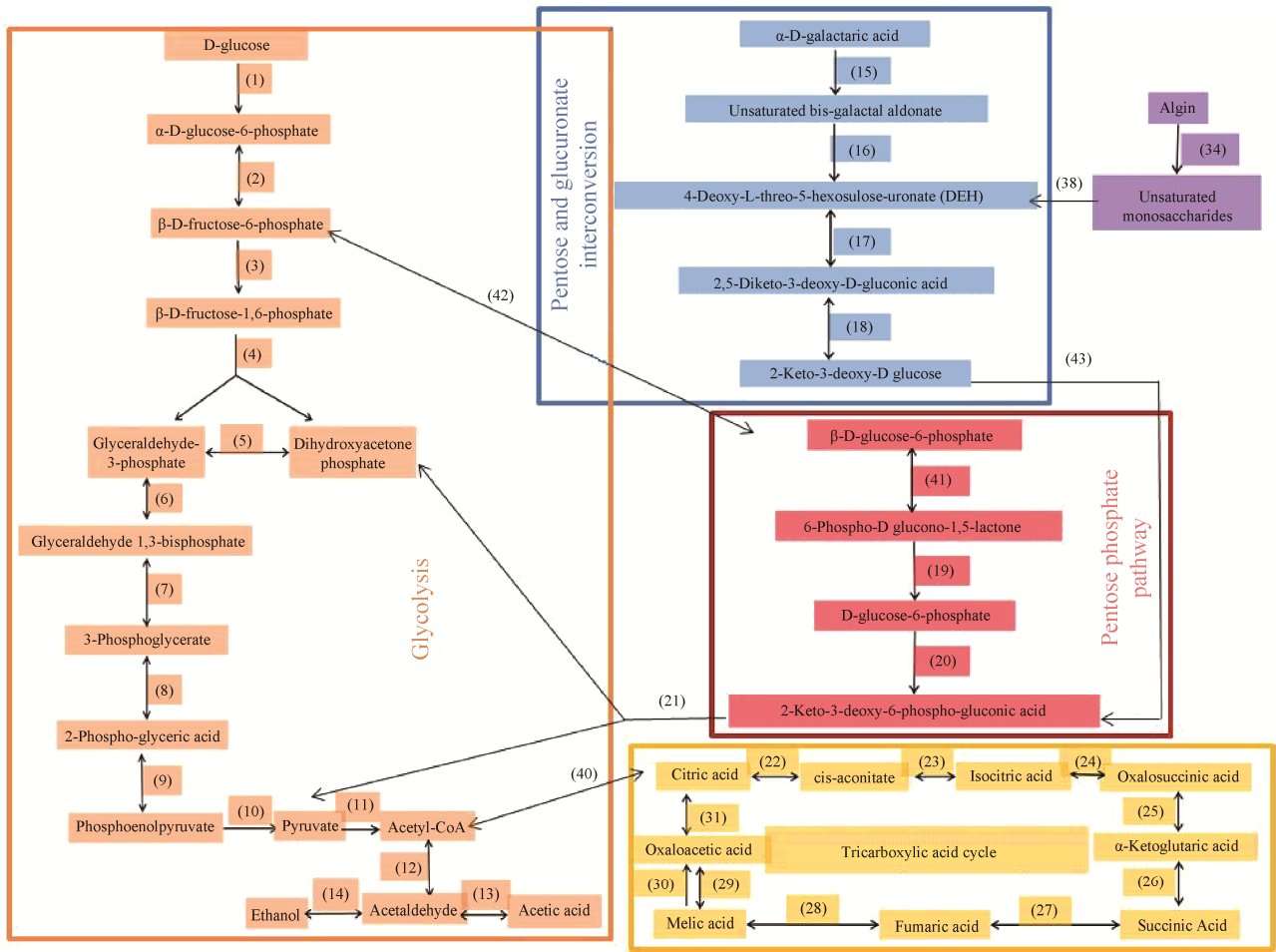


图 5. 菌株 X511 中葡萄糖及褐藻胶的代谢途径

Figure 5. Metabolic pathway of glucose and alginate in strain X511.

反应变成 DEH，进入戊糖和葡萄糖醛酸互变途径，经过两步反应过程生成 2-酮-3 脱氧-D 葡萄糖，被激酶(2-dehydro-3-deoxygluconokinase, KDGK)催化为 2-酮-3 脱氧-6 磷酸-葡萄糖，在醛缩酶(2-dehydro-3-deoxyphosphogluconate aldolase)的作用下发生分解反应，得到糖酵解途径的中间产物二羟丙酮磷酸和丙酮酸，经糖酵解途径和三羧酸循环合成该菌株生长和繁殖一系列的中间产物和能量。

各代谢途径中涉及的基因(对应图 5 的序号)见表 5 所示，相比于葡萄糖培养基，菌株 X511 在褐藻胶培养基的培养下，涉及催化褐藻胶代谢途

径每一步的酶基因，包括褐藻胶裂解酶(序号 34, Gene ID: GM001982, GM001986, GM001987, GM001989)、核糖 5-磷酸异构酶(序号 17, Gene ID: GM003561)、2-酮-D-葡萄糖酸 3-脱氢酶(序号 18, Gene ID: GM003558)、2-脱氢-3-脱氧葡萄糖激酶(序号 43, Gene ID: GM001997, GM002016, GM003563)、2-脱氢-3-脱氧磷酸葡萄糖醛缩酶(序号 21, Gene ID: GM003564)，均发生了大幅度的上调，其中，编码褐藻胶裂解酶的 4 个基因(序号 34)和 2-脱氢-3-脱氧葡萄糖激酶的 3 个基因(序号 43)，当菌株 X511 从葡萄糖培养基转入褐藻胶培

表 5. 图 4 代谢途径中对应的基因及转录差异倍数(X2 vs X1)

Table 5. The genes and transcriptional multiple (X2 vs X1) corresponding to the metabolic pathway in Figure 4

Number	Gene ID	Products	FC
1	GM000293	Glucose-specific IIA component	0.71
2	GM004524	Glucose-6-phosphate isomerase	0.59
3	GM000031	6-Phosphofructokinase	0.50
4	GM003325	Fructose-6-phosphate aldolase	0.59
	GM004461	Fructose-bisphosphate aldolase	0.89
5	GM003942	Triosephosphate isomerase	0.74
6	GM004585	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase	0.48
7	GM004462	Phosphoglycerate kinase	0.61
8	GM000053	Phosphoglycerate mutase	0.56
9	GM004426	Enolase	0.77
10	GM003820	Pyruvate kinase	0.72
11	GM002414	2-Oxoglutarate ferredoxin oxidoreductase	0.35
12	GM000009	Acetyl-CoA synthetase	3.11
13	GM001101	Aldehyde dehydrogenase	12.81
	GM002912	Aldehyde dehydrogenase	5.08
14	GM000869	Alcohol dehydrogenase	7.73
	GM004314	Alcohol dehydrogenase	NC
15	GM003567	Pectate disaccharide-lyase	NC
16	GM003569	Oligogalacturonate lyase	NC
17	GM003561	Ribose 5-phosphate isomerase	1.97
18	GM003558	2-Deoxy-D-gluconate 3-dehydrogenase	2.33
19	GM001107	6-Phosphogluconolactonase	NC
20	GM002019	Phosphogluconate dehydratase	NC
	GM004187	Phosphogluconate dehydratase	NC
21	GM003564	2-Dehydro-3-deoxyphosphogluconate aldolase	4.12
22, 23	GM001041	Aconitate hydratase	5.46
24, 25	GM000493	Isocitrate dehydrogenase	2.08
26	GM000341	2-Oxoglutarate dehydrogenase	4.40
	GM000342	Dihydrolipoamide succinyltransferase	3.874
	GM000344	Succinyl-CoA synthetase	7.17
27	GM000043	Fumarate reductase	4.91
28	GM001281	Fumarate hydratase	2.96
30	GM002060	Malate dehydrogenase	NC
31	GM000336	Citrate synthase	4.27
34	GM001982	Poly (beta-D-mannuronate) lyase	153.19
	GM001986	Alginate lyase	61.36
	GM001987	Alginate lyase	26.50
	GM001989	Alginate lyase	44.06
38	Nonenzymatic reaction		
40	GM000336	Type II citrate synthase	4.40
41	GM004524	Glucose-6-phosphate isomerase	0.59
42	GM001543	Glucose-6-phosphate 1-epimerase	0.48
	GM004524	Glucose-6-phosphate isomerase	0.59
43	GM001997	2-Dehydro-3-deoxygluconokinase	26.32
	GM002016	2-Dehydro-3-deoxygluconokinase	1.77
	GM003563	2-Dehydro-3-deoxygluconokinase	3.87

“NC” represent no transcriptional differences.

培养基后, 转录量上调明显, 褐藻胶裂解酶 4 个基因差异转录倍数(FC)分别是 153.19、61.36、26.50、44.06, 2-脱氢-3-脱氧葡萄糖激酶 3 个基因差异转录倍数(FC)分别是 26.32、1.77、3.87; 同时, 涉及三羧酸循环的酶基因也呈现一定程度的上调(FC>1), 表明菌株在褐藻胶诱导下, 菌株细胞为了获得生长所需的营养然后启动后续代谢途径不同关键酶基因的转录与表达, 进而进入以褐藻胶为底物的生长模式。而葡萄糖代谢途径中所涉及酶基因(序号 1-10 对应的基因), 在褐藻胶培养下的转录量都发生下调(FC<1)。

首先, 值得关注的是该菌株的乙醇生成途径的几个关键酶基因乙酸辅酶 A 合成酶基因(序号 12, Gene ID: GM000009)、乙醇脱氢酶基因(序号 14, Gene ID: GM000869)以及乙醛脱氢酶(序号 13, Gene ID: GM000869, GM001101, GM002912), 在褐藻胶培养基条件下, 其转录量及表达量都出现了一定程度的上调, 我们后续研究中发现, 该菌株发酵葡萄糖和褐藻胶的产物中存在少量乙醇, 说明该菌株具备一定产乙醇的能力; 同时, 我们对菌株 X511 进行全基因组注释以及前期研究发现^[27], 该菌株除了可以直接利用褐藻胶和葡萄糖作为碳源产生乙醇外, 还可以利用褐藻的其他组分包括甘露醇(占总糖 5%-10%)、昆布多糖、岩藻糖; 褐藻转化为液体燃料是大型海藻生物质能源发展的重要途径, 但是褐藻多糖成分复杂, 难以被工业微生物转化利用, 野生菌中发现能同时发酵褐藻的主要成分的菌株不多^[5], 该菌株利用褐藻生物质为底物在常温下条件下发酵褐藻产乙醇, 对于发展褐藻生物转化有潜在研究价值。第二, 菌株 X511 代谢褐藻胶的途径与文献报道^[13,28]的路径基本一致, 但是该菌株褐藻胶代谢途径中

第 17 步的反应过程(图 5)尚未在弧菌中被报道, 其具体的反应机理有待进一步研究。

3 结论

本研究在菌株 X511 的全基因组测序结果基础上, 通过比较菌株 X511 在葡萄糖和褐藻胶培养基培养下的基因转录差异, 利用 GO 和 KEGG 数据库对差异转录基因进行了功能归类及代谢途径富集分析, 快速定位出该菌株中可能与褐藻胶代谢相关的基因及代谢途径。结果显示, 在两种培养条件下共存在 2024 个差异转录基因, 其中有上调基因 1066 个, 下调基因 958 个; KO 功能注释中与“分子功能”相关的多个代谢途径如“磷酸转移酶”和“分子传导”等途径发生了上调, 说明菌株可能以多种方式吸收和利用褐藻胶多糖的降解产物; KEGG 富集时发现柠檬酸循环和氧化磷酸化途径发生了上调而核苷酸切除修复途径发生下调, 说明褐藻胶培养基能使该菌株的生长代谢更为活跃但不适合菌种的长期保藏; 依据全基因组测序以及转录组结果, 推绘制菌株 X511 代谢褐藻胶的途径, 褐藻胶在菌株 X511 褐藻胶裂解酶作用下, 产生不饱和的褐藻胶单糖, 通过酶促反应变成 DEH, 经酮醇异构酶逆催化为 2,5-二酮-3-脱氧-D-葡萄糖酸(2,5-Diketo-3-deoxy-D-gluconic acid), 进而在 2-脱氧-D-葡萄糖酸脱氢酶(kduD)的作用下以 NADH 为还原力, 被还原成 2-酮-3-脱氧-D 葡萄糖酸(KDG), 经 KDG 激酶催化, 并消耗 1 mol ATP, 底物被磷酸化为 2-酮-3-脱氧-磷酸葡萄糖酸(KDPG), 被丙酮酸醛缩酶催化裂解为丙酮酸和甘油醛-3-磷酸, 进入糖酵解途径从而被菌株利用; 菌株 X511 代谢褐藻胶的途径关键酶基因的功能, 将在后续的克隆研究中予以验证。

参考文献

- [1] Gacesa P. Enzymic degradation of alginates. *International Journal of Biochemistry*, 1992, 24(4): 545–552.
- [2] Eftekhar F, Speert DP. Alginase treatment of mucoid *Pseudomonas aeruginosa* enhances phagocytosis by human monocyte-derived macrophages. *Infection and Immunity*, 1988, 56(11): 2788–2793.
- [3] Osawa T, Matsubara Y, Muramatsu T, Kimura M, Kakuta Y. Crystal structure of the alginate (poly α -L-guluronate) lyase from *Corynebacterium* sp. at 1.2 Å resolution. *Journal of Molecular Biology*, 2005, 345(5): 1111–1118.
- [4] Chapman VJ. Seaweeds and Their Uses. 2nd ed. London: Methuen, 1970.
- [5] Ji SQ, Wang B, Lu M, Li FL. Direct bioconversion of brown algae into ethanol by thermophilic bacterium *Defluviitalea phaphyphila*. *Biotechnology for Biofuels*, 2016, 9: 81.
- [6] Zhang X, Zhao L, Qian L, Huang SS, Irbsi C. Research progress of alginolytic bacteria. *Chinese Bulletin of Life Sciences*, 2012, 24(5): 475–482. (in Chinese)
张绪, 赵琳, 钱龙, 黄庶识, 伊日布斯. 海藻酸分解菌研究进展. *生命科学*, 2012, 24(5): 475–482.
- [7] Zhang W, Zhang J, Cui H. The isolation and performance studies of an alginate degrading and ethanol producing strain. *Chemical and Biochemical Engineering Quarterly*, 2014, 28(3): 391–398.
- [8] Takeda H, Yoneyama F, Kawai S, Hashimoto W, Murata K. Bioethanol production from marine biomass alginate by metabolically engineered bacteria. *Energy & Environmental Science*, 2011, 4(7): 2575–2581.
- [9] Wargacki AJ, Leonard E, Win MN, Regitsky DD, Santos CN, Kim P B, Cooper SR, Raisner RM, Herman A, Sivitz AB, Lakshmanaswamy A, Kashiya Y, Baker D, Yoshikuni Y. An engineered microbial platform for direct biofuel production from brown macroalgae. *Science*, 2012, 335(6066): 308–313.
- [10] Enquist-Newman M, Faust AM, Bravo DD, Santos CN, Raisner RM, Hanel A, Sarvabhowman P, Le C, Regitsky DD, Cooper SR, Peereboom L, Clark A, Martinez Y, Goldsmith J, Cho MY, Donohoue PD, Luo L, Lamberson B, Tamrakar P, Kim EJ, Villari JL, Gill A, Tripathi SA, Karamchedu P, Paredes CJ, Rajgarhia V, Kotlar HK, Bailey RB, Miller DJ, Ohler NL, Swimmer C, Yoshikuni Y. Efficient ethanol production from brown macroalgae sugars by a synthetic yeast platform. *Nature*, 2014, 505(7482): 239–243.
- [11] Preiss J, Ashwell G. Alginic acid metabolism in bacteria. II. The enzymatic reduction of 4-deoxy-L-erythro-5-hexoseulose uronic acid to 2-keto-3-deoxy-D-gluconic acid. *Journal of Biological Chemistry*, 1962, 237: 317–321.
- [12] Preiss J, Ashwell G. Alginic acid metabolism in bacteria. I. Enzymatic formation of unsaturated oligosaccharides and 4-deoxy-L-erythro-5-hexoseulose uronic acid. *The Journal of Biological Chemistry*, 1962, 237(3): 309–316.
- [13] Takase R, Ochiai A, Mikami B, Hashimoto W, Murata K. Molecular identification of unsaturated uronate reductase prerequisite for alginate metabolism in *Sphingomonas* sp. A1. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*, 2010, 1804(9): 1925–1936.
- [14] Remans T, Smeets K, Opdenakker K, Mathijssen D, Vangronsveld J, Cuypers A. Normalisation of real-time RT-PCR gene expression measurements in *Arabidopsis thaliana* exposed to increased metal concentrations. *Planta*, 2008, 227(6): 1343–1349.
- [15] Zhang JS, Li W, Que YX, Ruan MH, Zhang MQ, Chen RK. Cloning of Two House-keeping Genes from *Erianthus arundinaceus* and the Application in cDNA Microarray. *Journal of Tropical and Subtropical Botany*, 2007, 15(4): 277–283. (in Chinese)
张积森, 李伟, 阙友雄, 阮妙鸿, 张木清, 陈如凯. 斑茅两个看家基因片段的克隆及其在基因芯片中的应用. *热带亚热带植物学报*, 2007, 15(4): 277–283.
- [16] Da Fonseca ÉL, Dos Santos Freitas F, Vicente ACP. Pc promoter from class 2 integrons and the cassette transcription pattern it evokes. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2011, 66(4): 797–801.
- [17] Bhowmick R, Ghosal A, Chatterjee NS. Effect of environmental factors on expression and activity of chitinase genes of vibrios with special reference to *Vibrio cholerae*. *Journal of Applied Microbiology*, 2007, 103(1): 97–108.
- [18] Guérout AM, Iqbal N, Mine N, Ducos-Galand M, van Melderen L, Mazel D. Characterization of the *phd-doc* and *ccd* Toxin-Antitoxin Cassettes from *Vibrio* Superintegrons. *Journal of Bacteriology*, 2013, 195(10): 2270–2283.
- [19] Asakura H, Ishiwa A, Arakawa E, Makino SI, Okada Y, Yamamoto S, Igimi S. Gene expression profile of *Vibrio cholerae* in the cold stress-induced viable but non-culturable state. *Environmental Microbiology*, 2007, 9(4): 869–879.
- [20] Schmittgen TD, Livak KJ. Analyzing real-time PCR data by the comparative C_T method. *Nature Protocols*, 2008, 3(6): 1101–1108.
- [21] Postma PW, Lengeler JW. Phosphoenolpyruvate: carbohydrate phosphotransferase systems of bacteria. *Microbiological Reviews*, 1985, 49(3): 232–269.
- [22] Deutscher J, Francke C, Postma PW. How phosphotransferase system-related protein phosphorylation regulates carbohydrate metabolism in bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2006, 70(4): 939–1031.
- [23] Turina P, Samoray D, Gräber P. H^+ /ATP ratio of proton transport-coupled ATP synthesis and hydrolysis catalysed by CF_0F_1 -liposomes. *The EMBO Journal*, 2003, 22(3): 418–426.
- [24] Lum JJ, Bauer DE, Kong M, Harris MH, Li C, Lindsten T, Thompson CB. Growth factor regulation of autophagy and cell survival in the absence of apoptosis. *Cell*, 2005, 120(2): 237–248.
- [25] Kemp MG, Sancar A. DNA excision repair. *Cell Cycle*, 2012, 11(16): 2997–3002.
- [26] De Laat WL, Jaspers NGJ, Hoeijmakers JHJ. Molecular

mechanism of nucleotide excision repair. *Genes & Development*, 1999, 13(7): 768–785.

- [27] Xu C, Xiong YR, Lu MQ, Liao W, Zhang YK, Huang SS. Screening and identification of a marine alginate-degrading bacterium and the utilization capacity of polysaccharide. *Biotechnology Bulletin*, 2017, 33(4): 198–204. (in Chinese)
许超, 熊亚茹, 卢明倩, 廖威, 张云开, 黄庶识. 一株具有褐

藻胶降解能力的海洋细菌的筛选鉴定及其多糖利用能力研究. *生物技术通报*, 2017, 33(4): 198–204.

- [28] Takase R, Maruyama Y, Oiki S, Mikami B, Murata K, Hashimoto W. Structural determinants in bacterial 2-keto-3-deoxy-D-gluconate dehydrogenase KduD for dual-coenzyme specificity. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 2016, 84(7): 934–947.

Analysis of the alginate metabolic pathways in the marine *Vibrio* X511 based on comparative transcriptome

Chao Xu^{1,2}, Yaru Xiong², Guiyuan Huang¹, Qiaozhen Wang¹, Mingqian Lu¹, Rongcan Zhang³, Wei Liao⁴, Yunkai Zhang^{2*}, Shushi Huang^{1*}

¹ Guangxi Key Laboratory of Marine Natural Products and Combinatorial Biosynthesis Chemistry, Guangxi Academy of Sciences, Nanning 530007, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China

² College of Life Science and Technology, Guangxi University, Nanning 530003, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China

³ Guangxi Beibu Gulf Marine Research Center, Nanning 530007, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China

⁴ Guangxi Vocational and Technical College, Nanning 530226, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China

Abstract: [Objective] A marine *Vibrio* X511 with strong ability to use alginate was isolated from the rotten *Sargassum* in the Weizhou Island of the North Sea. The metabolic pathway of using alginate by *Vibrio* X511 was studied by transcriptome sequencing. [Methods] Transcriptions sequencing was done by Illumina HiSeq2500 sequencing platform and the transcriptome of the strains cultured in alginate and glucose were sequenced. Differential transcripts were compared and analyzed, and the sequencing results were confirmed by fluorescence quantitative PCR. The fluorescence quantitative PCR was applied to verify the sequencing results. Gene Ontology and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes were used to annotate the function and pathway in differential transcripts. [Results] There were 2024 differentially expressed genes in the culture of alginate compared to those in glucose, with 1066 genes up-regulated and 958 genes down-regulated. Some genes in the ubiquitous metabolic pathway were also differentially expressed in different cultures. The transcriptions of all the genes involved in alginate utilization and the key genes of synthetic ethanol in *Vibrio* X511 were up-regulated. In addition, the strain had a unique way to utilize alginate and one of the metabolic processes has not been reported in *Vibrio*. [Conclusion] Our findings enrich the research of biological method for degradation of alginate, and provide valuable data for the research of large seaweed biomass-based energy.

Keywords: transcriptome, fluorescence quantification, gene function, alginate, metabolic pathway

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (31560017), by the Key Project of the Natural Science Foundation of Guangxi (2014GXNSFDA118012), by the Key Project of Science and Technology Department of Guangxi (AB16380071) and by the Key Project of Science and Technology Department of Guangxi (AD17129019)

*Corresponding authors. Shushi Huang, Tel: +86-771-2503990, E-mail: hshushi@gxas.cn; Yunkai Zhang, E-mail: yykzhang@gxu.edu.cn

Received: 25 October 2017; Revised: 25 December 2017; Published online: 17 January 2018