



# 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 qRT-PCR 验证

张鑫, 王智博, 缪增强, 邢江娃, 王嵘, 李永臻, 朱德锐, 沈国平\*

青海大学医学院基础医学研究中心, 青海 西宁 810016

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 qRT-PCR 验证. 微生物学报, 2022, 62(3): 1083–1098.

Zhang Xin, Wang Zhibo, Miao Zengqiang, Xing Jiangwa, Wang Rong, Li Yongzhen, Zhu Derui, Shen Guoping. Transcriptome analysis of differential genes associated with the ectoine synthesis pathway of *Halomonas campaniensis* under salt stress and expression verification by qRT-PCR. *Acta Microbiologica Sinica*, 2022, 62(3): 1083–1098.

**摘要:** 【目的】探究盐适应条件下坎帕尼亚盐单胞菌(*Halomonas campaniensis*)的差异基因表达水平, 挖掘四氢嘧啶(ectoine)合成代谢相关联的差异基因。【方法】设置无盐组 NS (0 mol/L NaCl)、中盐组 MS (1.5 mol/L NaCl)和高盐组 HS (2.5 mol/L NaCl), 培养 *H. campaniensis* XH26 菌株, 利用 Illumina HiSeq 测序进行转录组学分析, 筛选四氢嘧啶合成代谢关联的差异基因, 并进行 qRT-PCR 验证。【结果】菌株 XH26 胞内四氢嘧啶的积累量与盐度变化密切相关, 1.5 mol/L NaCl 时积聚量最大为 419.2 mg/L。转录组测序( $n=3$ /组)能定位到基因组测序序列的数量统计为 87.24%–95.87%, 共注释操纵子 748 个(涉及 2 182 个基因), 转录起始-终止位点 941 个, 预测新转录本 456 个, 上调基因 385 个和下调基因 326 个(涉及 245 个 KEGG 通路)。组间 NS vs MS 分析表明, 合成基因 *ectABC* 和 *lysC* 表达上调以促进四氢嘧啶生成, 关联基因 *gltB*、*gltD*、*davT*、*hisD*、*alh-9*、*betA*、*acnB*、*pckA* 以及 *gadA* 表达上调, 参与四氢嘧啶合成关联通路的上游调控。比较组 MS vs HS 分析表明, 基因 *ectA*、*acnB*、*pckA*、*gadA* 和 *gdhA* 表达下调致使四氢嘧啶产量减少。qRT-PCR 验证结果与组学测序的表达趋势相一致。【结论】四氢嘧啶生物合成与 Asp(或天冬氨酸

**基金项目:** 国家自然科学基金(31860030, 21967018); 青海省重点研发与转化计划(2019SF121); 青海省基础应用研究计划(2020ZJ767); 高原特色盐湖生物资源的集成研发与转化团队计划(2018KYT1)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (31860030, 21967018), by the Key Research Foundation of Development and Transformation of Qinghai Province (2019SF121), by the Basic Applied Research Plan of Qinghai Province (2020ZJ767) and by the Team's Research Program of Microbial Resources in Salt-Lakes of Qinghai-Tibetan Plateau (2018KYT1)

\*Corresponding author. Tel/Fax: +86-971-6153778; E-mail: sgpkkll@126.com

Received: 6 July 2021; Revised: 30 September 2021; Published online: 17 January 2022

半缩醛)、上游氨基酸代谢网络(Asn、Glu、Gln 和 His)以及三羧酸循环(琥珀酸、延胡索酸和草酰乙酸)密切相关,此为后续四氢嘧啶合成途径的优化和代谢通路的整合设计提供重要的参考依据。

**关键词:** 坎帕尼亚盐单胞菌; Illumina HiSeq; 四氢嘧啶; 盐适应; 转录组分析; qRT-PCR

## Transcriptome analysis of differential genes associated with the ectoine synthesis pathway of *Halomonas campaniensis* under salt stress and expression verification by qRT-PCR

ZHANG Xin, WANG Zhibo, MIAO Zengqiang, XING Jiangwa, WANG Rong, LI Yongzhen, ZHU Derui, SHEN Guoping\*

Research Center of Basic Medical Science, Medical College of Qinghai University, Xining 810016, Qinghai, China

**Abstract:** [Objective] The study explored the differentially expressed genes of *Halomonas campaniensis* under salt stress and identified the differential genes associated with anabolism of ectoine. [Methods] Three experimental groups were set up: no-salt group (NS, 0 mol/L NaCl), medium-salt group (MS, 1.5 mol/L NaCl), and high-salt group (HS, 2.5 mol/L NaCl), and then *H. campaniensis* XH26 was respectively cultured. Illumina HiSeq was employed for transcriptome analysis, and differential genes associated with ectoine metabolism were screened and then verified by qRT-PCR. [Results] The accumulation of ectoine in XH26 was closely related to salinity and the maximum (419.2 mg/L) was achieved in MS (1.5 mol/L NaCl). According to the transcriptome sequencing ( $n=3$ ) result, total mapped reads accounted for 87.24%–95.87% of the clean reads. A total of 748 operons (2 182 related genes) and 941 transcription start/stop sites were annotated and 456 new transcripts were predicted in addition to 385 up-regulated genes and 326 down-regulated genes (involving 245 KEGG pathways). For the differential genes between NS and MS, synthetic *ectABC* and *lysC* were up-regulated to promote the ectoine production, and associated genes *gltB*, *gltD*, *davT*, *hisD*, *alh-9*, *betA*, *acnB*, *pckA*, and *gadA* were up-regulated to modulate the upstream of ectoine synthesis pathway. As for the differential genes between MS and HS, *ectA*, *acnB*, *pckA*, *gadA*, and *gdhA* were down-regulated, thus decreasing ectoine production. qRT-PCR result supported the transcriptome sequencing result. [Conclusion] The biosynthesis of ectoine was closely related to the aspartic acid (or aspartic acid hemiacetal), the upstream amino acid metabolism networks (e.g., asparagine, glutamate, glutamine, and histidine), and tricarboxylic acid cycle (succinic acid, fumaric acid, and oxaloacetic acid). These results can serve as a reference for the optimization or integration design of ectoine synthesis pathway in the future.

**Keywords:** *Halomonas campaniensis*; Illumina HiSeq; ectoine; salt adaptation; transcriptomics; qRT-PCR

高盐极端环境中生存的微生物必须具有产生与胞外基质相同渗透压的潜力(或至少相当)。当细胞内部渗透压低于周围环境的盐浓度时,

可使细胞快速失水而死亡<sup>[1]</sup>。典型嗜盐细菌如盐红螺菌属(*Halorhodospira*)、色盐杆菌属(*Chromohalobacter*)、盐单胞菌属(*Halomonas*)

和盐水杆菌属(*Salinibacter*)以及嗜盐古菌如盐盘菌属(*Haloplanus*)、盐棍菌属(*Halorhabdus*)和盐红菌属(*Halorubrum*)等,为了实现渗透压的稳定,通过自然进化已形成两种主要应对策略,策略一是:胞内积累  $K^+$ 和  $Cl^-$ ,可与介质中的离子浓度相平衡;其二是:胞外吸收与积累,或通过胞内生物合成低分子量有机中性的相容溶质(compatible solute),以此防止细胞的水分损失<sup>[2-3]</sup>。微生物胞内可以积聚或合成不同的相容溶质,如糖类或糖苷类(海藻糖或葡萄糖苷)、氨基酸类(Glu、Pro 和 Gln)、甜菜碱类(甘氨酸甜菜碱、脯氨酸甜菜碱)、四氢嘧啶类(ectoine 与 5-hydroxyectoine)以及乙酰氨基酸类(乙酰鸟氨酸与乙酰赖氨酸)等。研究表明,在 1.5–3.0 mol/L NaCl 浓度范围内,模式菌株盐单胞菌属(*Halomonas*)和色盐杆菌属(*Chromohalobacter*)可生物合成高浓度相容溶质<sup>[4]</sup>。在低盐条件培养菌株 *H. elongata* DSM2581<sup>T</sup>,维持渗透压平衡的关键因素是  $K^+$ 浓度;而在高盐条件下,菌株既可通过吸收积聚谷氨酸钾盐,以维持渗透压平衡,又可通过胞内高浓度积聚相容溶质四氢嘧啶提高菌株的耐盐性,致使菌株能在饱和盐水环境(> 3 mol/L, 30% NaCl)中生存<sup>[5]</sup>。Peng 等<sup>[6]</sup>通过探究菌株 *Halomonas* sp. NY-011 在不同盐离子培养基中耐盐生长的状态,发现缺少  $Cl^-$ 明显抑制菌株的耐盐生长,相比  $Li^+$ 与  $Mg^{2+}$ 而言,  $K^+$ 更优于平衡内部渗透压力。

目前,随着高通量测序技术的广泛应用,全局性转录组学探索细胞的群体感应、表型变化、代谢功能适应及关键靶向基因差异调控已日趋成熟。Ceylan 等<sup>[7]</sup>通过盐胁迫蛋白组分析菌株 *Halomonas* sp. AAD12 的渗透压适应策略,发现运输关联蛋白质的显著差异表达与渗透调节、盐胁迫反应和能量产生密切相关。盐单胞菌胞内的四氢嘧啶生物合成,依赖于保守的连

锁基因簇 *ectABC* 或 *ectABCD-ask* 操纵子,合成前体底物与 L-Asp 和天冬氨酸半缩醛直接相关,而 L-Asp 与 Asn、Glu 或 Gln 等代谢通路存在关联<sup>[8]</sup>。至此,在不同盐适应条件下研究四氢嘧啶生物合成全局性基因表达差异及其关联氨基酸(或衍生物)的代谢通路变化,值得深入探讨。本研究以高效积聚四氢嘧啶菌株 *H. campaniensis* XH26 为研究对象,采用高通量测序和比较转录组学分析盐适应条件下的基因表达水平和表达差异,并以荧光定量 qRT-PCR 技术验证四氢嘧啶积累与代谢通路网络关联的调控功能基因。该研究可能揭示四氢嘧啶的代谢互作网络与相关调控等信息,亦可能为后续四氢嘧啶的高效积聚与产量优化提供新的思考方向。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌株来源和培养基

野生菌株 *H. campaniensis* strain XH26 (CCTCC2019776M)分离于柴达木盆地小柴旦盐湖,可高积聚四氢嘧啶,现保存于青海大学基础医学研究中心<sup>[8]</sup>。基础培养基(1 L): NaCl 50 g (可调节),  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  25.0 g, KCl 55.0 g,  $CaCl_2$  0.2 g, 柠檬酸钠 3.0 g, L-谷氨酸钠 6.5 g 和酶水解酪素 7.5 g,调节 pH 值 8.0。固体培养基加入 15 g/L 琼脂粉<sup>[8]</sup>。

### 1.2 主要试剂和仪器

NaCl、KCl、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 、柠檬酸钠、酵母抽提物、L-谷氨酸钠、酶水解酪素和 NaOH 等均为分析纯(天津永大公司);乙腈(HPLC 级)和 Invitrogen Trizol 试剂(美国赛默飞公司);细菌 Ribo-Zero RNA 去除试剂盒(美国 Illumina 公司);四氢嘧啶标准对照品(HPLC 级 > 95%,德国 Fluka 分析公司);逆转录试剂盒(PrimeScript<sup>TM</sup> RT Reagent Kit with gDNA Eraser, RR047A)和 qPCR 试剂盒(TB Green<sup>®</sup>

Premix Ex Taq™ II, RR820A) (日本 TaKaRa 公司); 变速组织研磨器(OSE-Y50 型, 北京天根公司); 高效液相色谱仪(HPLC-2100 型, 美国 Agilent 公司); 色谱分析柱(SeQuant ZIC-HILIC, 5  $\mu\text{m}$ , 150 mm $\times$ 4.6 mm, 德国 Merck 公司); 微孔过滤器(0.22  $\mu\text{m}$  水系膜, 天津毫津公司); NanoDrop 2000 微量检测仪(美国 Thermo 公司); Qubit 2.0 Fluorometer (美国 Invitrogen 公司); 测序平台 Illumina HiSeq 300PE (美国 Illumina 公司); 实时荧光定量 PCR 仪(Roche Light Cycler®96, 瑞士 Roche 公司)。

### 1.3 盐适应诱导和 HPLC 检测四氢嘧啶积累量

设置盐梯度(NaCl)诱导条件: 无盐组 NS (no salt, 0 mol/L)、中盐组 MS (medium salt, 1.5 mol/L)和高盐组 HS (high salt, 2.5 mol/L)。活化菌种 *H. campaniensis* XH26 ( $OD_{600}$  约 1.2, 培养 12 h), 按 1%接种于 NaCl 梯度培养基 (250 mL), 进行盐适应诱导培养, 3 个生物学重复/组, 摇床培养 48 h 后(120 r/min, 35  $^{\circ}\text{C}$ ), 发酵液测定光密度值  $OD_{600}$ , 离心收集细菌菌泥并抽提细菌胞内四氢嘧啶<sup>[9]</sup>。具体方法: 取 1 mL 菌液, 12 000 r/min 离心 5 min, 弃上清液; 再加入超纯水 1 mL, 用组织研磨器高速研磨 5 min, 8 000 r/min 离心 5 min, 分离上清液, 经 0.22  $\mu\text{m}$  水系微孔过滤器过滤, 即四氢嘧啶提取液<sup>[10]</sup>。配制 0.1 mg/mL 四氢嘧啶标准品母液, 梯度稀释, 高效液相色谱(HPLC)检测四氢嘧啶浓度, 以吸收峰面积(纵坐标)和标准浓度(横坐标)制作标准曲线。HPLC 检测条件: 流动相乙腈/纯水(V/V: 80/20), 检测波长 210 nm, 流速为 1.0 mL/min, 柱压 3.486–4.761 MPa, 柱温 30  $^{\circ}\text{C}$ , 上样量 10  $\mu\text{L}$ <sup>[11]</sup>。

### 1.4 核糖核酸提取和文库构建

采用 Invitrogen Trizol 试剂提取菌株 XH26

的总 RNA (NS、MS 和 HS 组, 3 个重复/组)。细菌型 Ribo-Zero RNA 试剂盒去除 rRNA, 并将 mRNA 进行片段化和反转录<sup>[12]</sup>。使用 NanoDrop 和 Qubit 2.0 检测 RNA 纯度和浓度, Agilent 2100 用于检测 RNA 样品完整性。合格样品首先采用 Proto Script II 逆转录酶与随机引物和 actinomycin D 合成第一链 cDNA, 第二链 cDNA 使用第二链合成酶 Mix (包括 dACG-TP/dUTP)合成; 再用 AMPure XP 磁珠纯化双链 cDNA, 纯化双链 cDNA 先进行末端修复、加 A 尾并连接测序接头, 然后用 AMPure XP 磁珠进行片段大小选择。最后利用 PCR 扩增构建 DNA 扩增文库<sup>[13]</sup>。使用 Agilent 2100 和 Qubit 2.0 进行文库的验证和量化, 以及 NanoDrop 2000 分光光度计测定 RNA 质量<sup>[14]</sup>。

### 1.5 测序数据处理和质量控制

以 Illumina HiSeq 300PE 平台进行 RNA 测序, 由苏州金唯智公司完成。通过 HiSeq 平台软件(HCS)+OLB+GAPipeline -1.6 进行碱基识别, 采用 Bcl2fastq (v2.17.1.14)软件获取原始测序数据(pass filter data), 使用软件 FastQC (v0.10.1)进行测序数据质量评估, 碱基质量值(quality score, Q-score)以 $-10\lg P$ 计算, 错误概率  $P$  值为 0.001(Q30)<sup>[15]</sup>。利用软件 Cutadapt (v1.9.1)进行原始数据预处理过滤, 去除污染及接头序列。过滤的测序序列(clean data)使用软件 Bowtie2 (v2.1.0)进行参考基因组比对分析(alignment analysis, mismatch 参数为 2), 统计分析外显子(exon)、内含子(intron)、基因间隔区域(intergenic)以及总比对率(total mapped reads)的分布情况, 并采用 IGV (integrative genomics viewer)浏览器进行 Bam 注释文件可视化分析<sup>[16]</sup>。根据 NCBI 参考基因组(菌株 *H. campaniensis* LS21), 采用 Rockhopper (v2.0.3) 软件进行转录本预测分析。

## 1.6 差异表达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, 采用软件 RSeQC 进行总比对 reads 重采样。使用 Htseq 软件(v0.6.1) Union 模型计算基因表达量 FPKM (fragments per kilobase per million, 阈值>1.0), 以相对错误率(percent relative error)评估 FPKM 准确性(Pearson 系数  $R^2 \geq 0.92$ )<sup>[17]</sup>。差异基因(gene ontology, GO, <http://www.geneontology.org/>)富集与层次聚类(hierarchical clustering)分析使用 Bioconductor 软件包 DESeq 2 (v1.6.3), 分析方法为负二项分布模型(3 个重复/组), 设置差异显著性参数为两倍变化值( $\log_2(\text{foldchange}) > 1$ ,  $P < 0.05$ ), 以此统计基因差异表达显著性(上调或下调); 采用软件 GO-Term Finder(v0.86)和 topGO (v2.22)制作 GO 富集图与差异基因聚类图。基于 KEGG (kyoto encyclopedia of genes and genomes; <http://www.kegg.jp>)数据库和软件 KOBAS (v2.0), 采用超几何检验方法, 以 KEGG pathway 为单位, 进行基因组背景关联和 pathway 显著性富集分析( $0 < Q \text{ value} < 1$ ,  $P < 0.05$ ), 以此确

定差异表达基因参与的最主要生化代谢途径和信号转导途径<sup>[18]</sup>。

## 1.7 逆转录定量实时 PCR 验证相关差异基因

采用 Invitrogen Trizol 试剂盒提取菌株 XH26 总 RNA (NS、MS 与 HS 组/3 个重复), RNA 样品符合要求( $OD_{260}/OD_{280} = 1.8-2.2$ ; 有效浓度>4 nmol/L)。使用 Nanodrop 和 Qubit 2.0 检测 RNA 纯度和浓度。采用逆转录试剂盒进行 qRT-PCR (2  $\mu\text{g}$  RNA), 产物 cDNA 稀释 20 倍用于 qPCR 的模板。qPCR 试剂盒进行定量检测, 反应体系 20  $\mu\text{L}$ : cDNA 6  $\mu\text{L}$ , TB 溶液 10  $\mu\text{L}$ , 正/反向引物各 0.5  $\mu\text{L}$ , 无菌水 3  $\mu\text{L}$ , 将样品混合均匀于 96 孔板, 上机运行。qRT-PCR 运行条件为: 95  $^{\circ}\text{C}$  3 min, 95  $^{\circ}\text{C}$  10 s, 65  $^{\circ}\text{C}$  20 s, 72  $^{\circ}\text{C}$  30 s, 40 个循环, 每个循环设定在延伸阶段采集数据。内参基因为磷酸甘油酸脱氢酶 (*GADPH*), 3 个重复/样, 采用  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  计算各基因的相对表达水平。本研究中所使用的引物由南京金斯瑞生物公司合成(表 1)。

表 1 用于相关基因 qRT-PCR 分析的引物

Table 1 Primers used for the qRT-PCR analysis of related genes

Genes name	Primer sequences (5'→3')	Length/bp
<i>gltB</i>	F: GTGTTGGAAGGCAATACGG; R: CGCTGCGGTCACAGTTAGT	223
<i>gltD</i>	F: CTGAACGACGGCTTTGGT; R: ACGGGTTTGACGCCATTA	191
<i>davT</i>	F: CGACGGCAACCGCTTTAT; R: GCATTACTTTGGCGTGGC	206
<i>hisD</i>	F: GAGGTGACAGTGCGGTGGTT; R: GTCGGCACAACCATCACA	261
<i>alh-9</i>	F: CGCCGCTTAGTCGTTTCAT; R: TAGCCTTCGTTGCTGTTGG	227
<i>beta</i>	F: TGCCATTGCCTCACACAGATTC; R: ACGACTGAAATGCCTAATCCCCGAAG	181
<i>gdhA</i>	F: CTTCCACCAAAGAGGCGGTAGATG; R: CCACTGCTCCATACTGCTGTTCTG	131
<i>acnB</i>	F: CGTAACTTCCCGAACCGCTTAGG; R: CACTCATGTATCGCTGGTACTCTTCC	124
<i>pckA</i>	F: TCGACTCTAGCCTGCTCAATCCTC; R: ACTGCGGACCTGCCTTGATAATTG	147
<i>gada</i>	F: TGGATGAGCCTATGTCCG; R: CTGCGAGTGATGTCTTTCCT	261
<i>lysC</i>	F: CAAGACGAGGACGCTATGGAAGAAC; R: CATCGGCGATAGGACCAAGAATACG	133
<i>asd</i>	F: CCCGAACGACAAAGACGCTACAG; R: TCACCAACTGAAGGCTGACAAG	132
<i>ectB</i>	F: TGCGTGGTATTGATGTTGTCTCTGG; R: CACTTCACTACTTCGCCGTCTTGG	112
<i>ectA</i>	F: CAGTCGCTGATGCTGTGGTTGG; R: GAATTAACATCAAGCGGCGGACAAG	121
<i>ectC</i>	F: GCTATGAAGGCGAAGGCGAAGTAG; R: AACAGATGTTTCGTCGTGCTGATCC	103
<i>orhR</i>	F: GTTGCCGATAAGTAGCTGGTCAC; R: CTTACCCGCAATACCTCGCCATG	147
<i>pecS</i>	F: CCAGTTCACGGGTTAAGCAGTAGC; R: TTAATCAGTGGCGACAGGAAAGACC	121
<i>ydgJ</i>	F: ACGTTCCTCAGCGACTGAATAGC; R: GGCCTGTACTTGCGTGGCTTAG	116
<i>orf02069</i>	F: GAAATGGCGTCTCTTCTGCAAATG; R: GGCCTGAGGATCGTCGTCAAATAG	120
<i>GAPDH</i>	F: TCCTTCCCTAAACTCGCACCT; R: ATACGATAGTAGCGTCAGCAT	284

## 2 结果与分析

### 2.1 盐适应条件下四氢嘧啶积聚量和生长量差异分析

菌株 *H. campariensis* XH26 的菌落形态为圆形、形态较小,乳白色、增殖快速、易粘连、隆起、湿润、边缘规则、不透明,革兰氏阴性,显微形态长杆状(3.0–5.0)  $\mu\text{m} \times (0.5\text{--}0.75) \mu\text{m}$ ,该菌株能适应高盐生长(0–3.0 mol/L NaCl),最适生长盐度 1.0 mol/L NaCl,进入生长稳定期的培养时间为 36 h ( $OD_{600}$  值最大)。配置标准母液溶液(0.1 mg/L 四氢嘧啶)进行 HPLC 检测,建立浓度( $x$ )与吸收峰面积( $y$ )的变量关系,标准曲线为  $y=24\,912x+9.819\,5$  ( $R^2=0.999\,9$ )。设置系列盐梯度条件 0–3.0 mol/L NaCl (梯度间隔 0.5),菌株 XH26 单批次培养 36 h 后,检测生长  $OD_{600}$  值和 HPLC 分析胞内四氢嘧啶积聚量(图 1)。结果分析表明:当 NaCl 浓度为 0–1.0 mol/L 时,菌株 XH26 生长量呈上升趋势;当 NaCl 浓度为 1.0–3.0 mol/L 时,菌株 XH26 生长量呈抑制态势,尤以 NaCl 浓度大于 2.0 mol/L 以后,生长量急剧下降。四氢嘧啶积聚量分析显示:当 NaCl 浓度为 0–1.5 mol/L 时,四氢嘧啶积聚量随盐度的升高而增加,积聚峰值为 1.5 mol/L NaCl (即 MS 组);当 NaCl 浓度为 1.5–3.0 mol/L 时,四氢嘧啶积聚量随盐度的升高而降低。此外,NS 组、MS 组和 HS 组的四氢嘧啶积聚量均值( $n=3$ )分别为 130.0、419.2 和 52.1 mg/L。

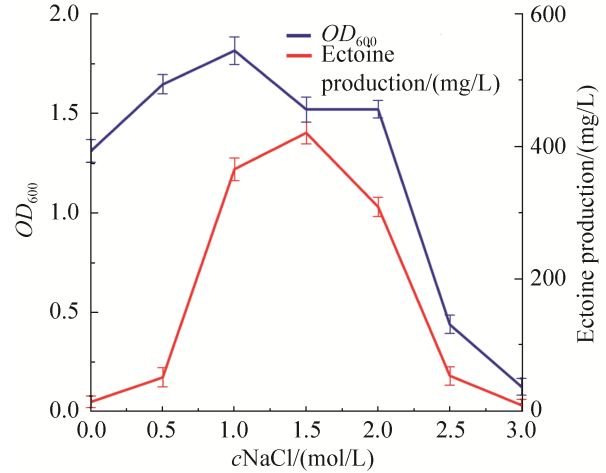


图 1 菌株 XH26 的生长量及四氢嘧啶积聚量变化  
Figure 1 Growth curve of the strain XH26 and variation in accumulation of ectoine under salt stress, the error bar represents the standard deviation of three parallel samples.

### 2.2 转录组数据处理和质控分析

利用软件 Cutadapt (version 1.9.1) 过滤掉污染和低质量的序列,获得合格 Reads (99.02%–99.80%)和碱基数量( $1.9 \times 10^3$ – $3.2 \times 10^3$  Mb, 表 2),其中 GC 含量 (最大值 57.15%)和 Q30 (>94.51%),误差低于 0.02%。Clean reads 比对到参考基因组,样本的单一匹配率均在 83%以上,且多匹配率远低于 10%,说明测序结果处理可靠不存在污染并且参考基因组选择合适,满足后期的分析要求。基于参考基因组,转录本共计注释到 operon 748 个(2 182 个基因),转录起始位点(TSS)-终止位点(TTS) 941 个,预测新转录本 456 个。

表 2 数据过滤与质量统计

Table 2 Filtered data and quality statistics

Samples	Raw reads	Clean reads	Q20/%	Q30/%	GC/%	Uniquely mapped/%	Multiple mapped/%	Total mapped/%
NS1	17 684 786	17 544 016	97.42	93.32	57.15	92.09	3.78	95.87
NS2	18 229 260	18 073 330	97.46	93.43	56.87	89.18	4.61	93.80
NS3	15 573 320	15 429 404	97.51	93.56	57.15	90.43	4.04	94.48
MS1	16 003 056	15 859 660	97.53	93.58	56.44	90.71	3.84	94.55
MS2	15 394 402	15 249 924	97.40	93.30	56.78	90.70	3.72	94.42
MS3	13 407 768	13 276 170	97.16	93.02	52.40	83.01	4.23	87.24
HS1	21 065 752	21 019 614	97.88	94.12	52.28	87.96	7.36	95.32
HS2	20 947 020	20 904 764	98.04	94.51	52.41	87.92	7.72	95.64
HS3	21 569 442	21 518 928	97.86	94.09	52.14	87.72	7.57	95.30

### 2.3 盐适应条件下基因表达水平分析

基于无盐 NS 组、中盐 MS 组和高盐 HS 组差异基因的表达水平( $\log_{10}[\text{FPKM}+1]$ ), 进行层次聚类分析(hierarchical clustering, 图 2)。聚类分析显示: 颜色从蓝到红, 表示基因表达量逐渐升高。无盐组 NS1/2/3 和中盐组 MS1/2/3 样本聚类相似, 具有相同功能或密切联系的基因聚集成类, 且同一组内的基因表达模式相近, 可能具有相似的功能或参与相同的生物学过程。同时, 高盐组 HS1/2/3 组样本聚类相似, 高表达聚类 2 个区域模块, 低表达 3 个区域模块, 表明菌株从无盐或中盐状态转变为高盐应激时, 基因转录发生巨大的逆转差异变化, 如无盐或中盐转录组的高表达相似聚类, 转变为高盐转录组的低表达聚类, 或反之。

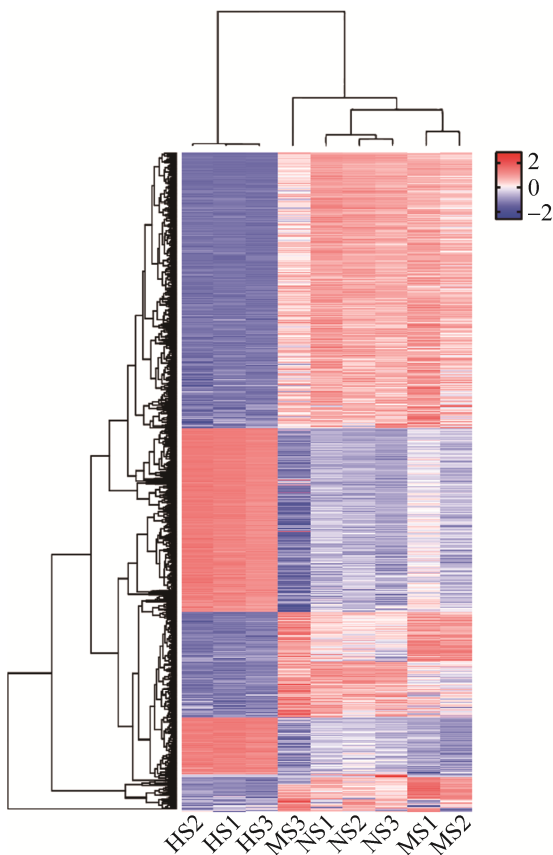


图 2 差异表达基因聚类分析

Figure 2 Cluster analysis of differentially expressed genes.

基于 NS 组、MS 组 and HS 组差异基因表达量, 进行组间基因显著性差异(图 3A,  $\log_2(\text{foldchange}) > 1$  且  $P \leq 0.05$ )和共有基因差异比较分析(图 3B)。结果显示: NS vs MS 比较组存在 272 个表达差异基因, 其中上调基因 155 个, 下调基因 117 个; MS vs HS 比较组鉴定出 1 095 个表达差异基因, 包括上调基因 436 个, 下调基因 659 个; NS vs HS 比较组中存在 1 231 个表达差异基因, 上调基因 519 个和下调基因 712 个。此外, 韦恩图分析 NS vs MS、MS vs HS 和 NS vs HS 比较组, 发现特有差异基因的数量分别为 45、227 和 343 个, 3 个比较组的共有差异基因为 51 个。

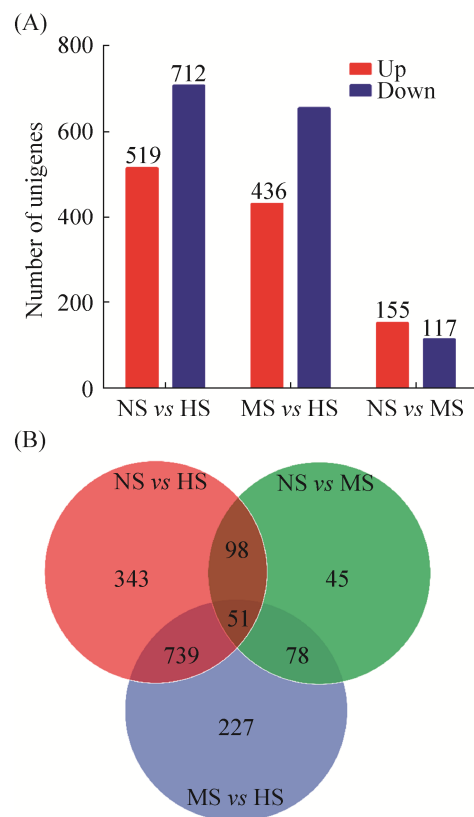


图 3 盐适应下基因显著性差异表达上下调数量 (A)和差异基因韦恩图(B)

Figure 3 Numbers of up and down regulated genes significantly differentially expressed (A) and Venn diagram of differential genes (B) under salt stress.

## 2.4 差异基因 GO 富集分析

基于基因功能分类 GO 数据库, 进行菌株 XH26 盐适应差异基因表达的整体评估分析 ( $P < 0.05$ ), 主要涉及生物过程、细胞组分和分子功能富集分析(展示丰度值前 20 项, 图 4)。GO 注释富集表明: 在分子功能方面, 菌株 XH26 的差异表达基因主要富集在分子催化活性(366 个)、

锚定或结合作用(253 个), 以及分子转运体活性(45 个); 在生物过程方面, 主要富集在细胞过程(256 个)、物质代谢过程(241 个)和生物调节过程(57 个); 在细胞组分方面, 主要富集在细胞组件部分(189 个)、细胞膜组件(149 个)和膜蛋白(65 个)。3 个比较组 GO 富集对比分析显示 (图 5): NS vs HS 和 MS vs HS 比较组的差异

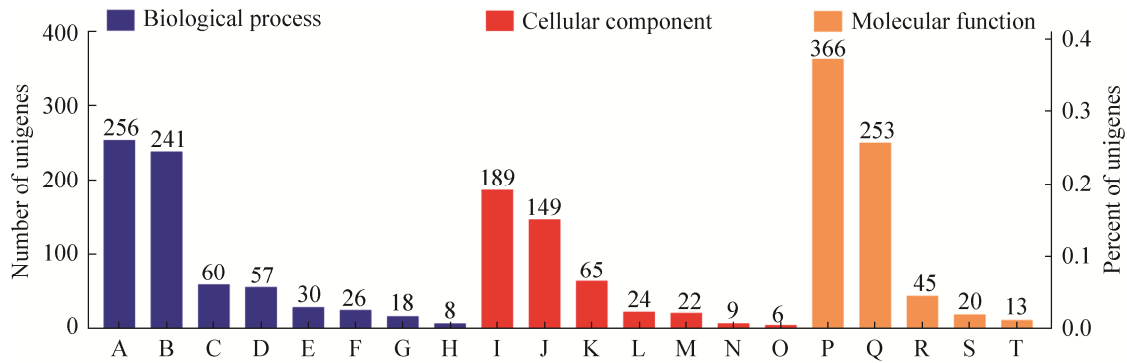


图 4 GO 富集分析差异基因分布图

Figure 4 Distribution of differential genes for GO enrichment analysis. A: cellular process; B: metabolic process; C: locomotion; D: biological; E: locomotion; F: cellular component organization or biogenesis; G: response to stimulus; H: detoxification; I: cell part; J: membrane part; K: membrane; L: protein-containing; M: organelle part; N: organelle; O: cell; P: catalytic activity; Q: binding; R: transcription activity; S: transcription regulator activity; T: structural molecule activity.

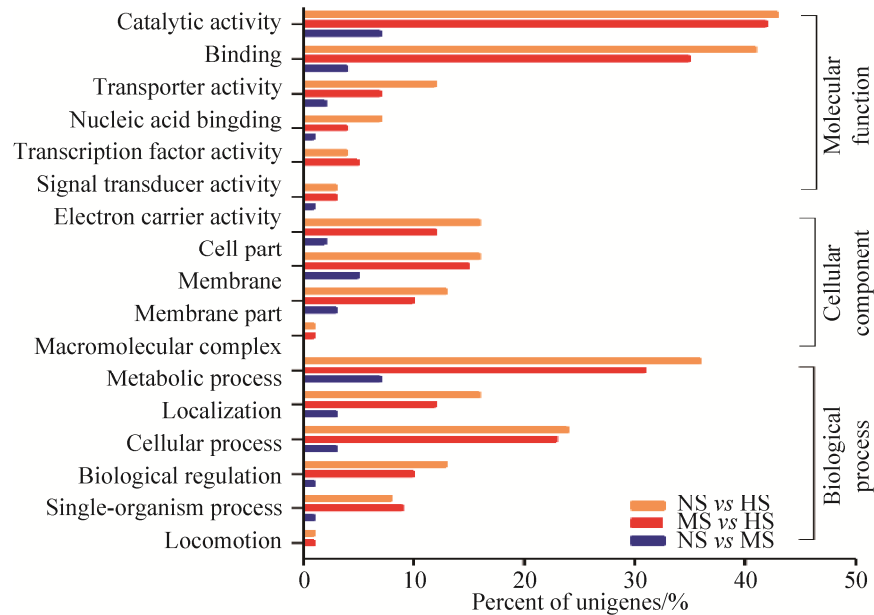


图 5 不同比较组中差异表达基因 GO 富集分析

Figure 5 GO enrichment analysis of differentially expressed genes within the different groups.



基因富集度显著高于 NS vs MS 比较组。在分子功能方面, 差异基因主要富集在酶催化活性、蛋白结合与锚定以及转运体活性等, 盐胁迫时受到显著影响; 在细胞组分方面, 差异基因主要富集在细胞膜、细胞膜组分和细胞组分等; 在生物过程方面, 差异基因主要富集在生物合成代谢过程与定位、细胞过程、单一生物合成过程以及生物调节等。

## 2.5 差异表达基因 KEGG 富集分析

利用 KEGG 代谢通路分类数据库, 进行盐适应差异基因表达的代谢过程和信号通路分析(图 6), 并挖掘可能参与四氢嘧啶合成代谢关联的氨基酸代谢通路(表 3 与表 4)。KEGG 分析结果显示: XH26 菌株盐适应转录组的差异基因主要涉及 245 个 KEGG 途径或通路, 主要分为

5 类: ①代谢过程, 主要涉及氨基酸(77 个)、碳水化合物(52 个)与能量代谢通路(33 个), 以及辅酶与维生素作用通路(32 个); ②遗传信息过程, 主要涉及 DNA 回补与修复(11 个)、蛋白折叠分类与降解(6 个)和翻译过程(6 个); ③环境信息过程, 主要涉及信号传输通路(37 个)和细胞膜运输过程(35 个); ④细胞过程, 主要涉及细胞运动(46 个)和细胞生长与凋亡过程(8 个); ⑤有机体系统, 主要涉及分泌过程(3 个)和衰老过程(2 个)。

结合 KEGG 数据库, 挖掘盐适应条件下相关的氨基酸代谢通路, 分析可能与四氢嘧啶合成代谢关联的代谢途径(表 3)。结果表明: 在比较组 NS vs MS 中, 差异基因主要富集于 5 个 KEGG 通路, 关联涉及乙醛酸循环途径、氮源代

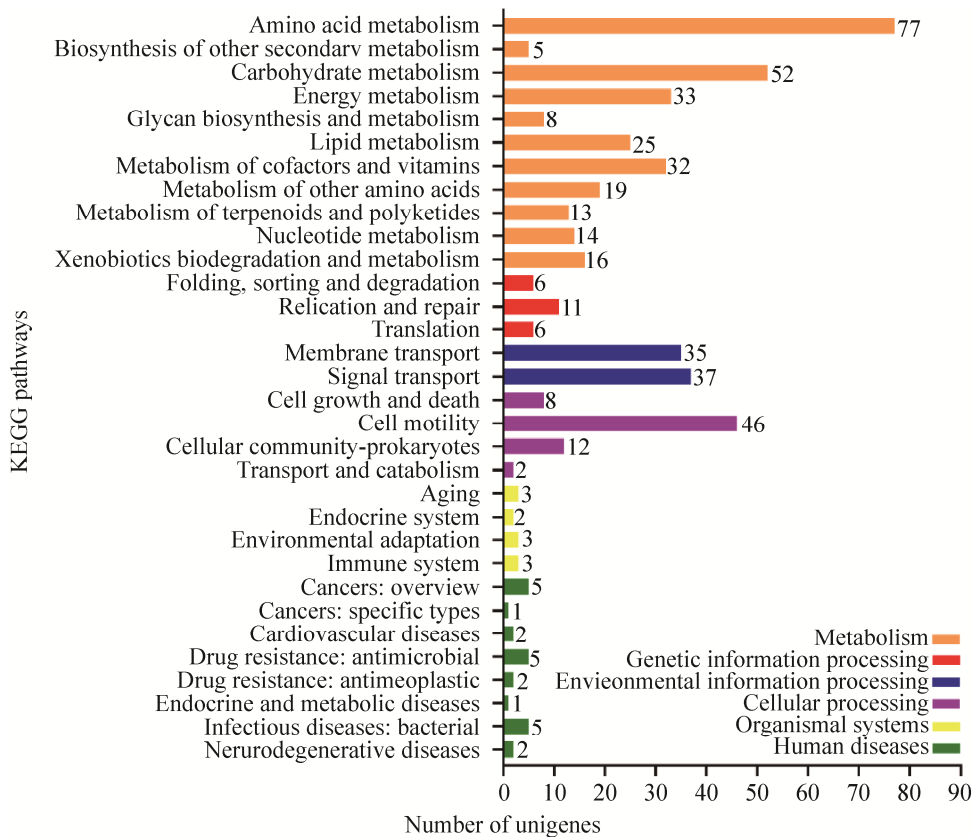


图 6 差异基因 KEGG 富集分析

Figure 6 KEGG enrichment analysis of differential genes.

表 3 盐适应条件下氨基酸代谢通路与差异基因表达分析

Table 3 Analysis of amino acid metabolic pathway and expression of differential genes under salt stress

Pathway ID	Pathway description	Gene number	Up genes	Down genes
Map00250	Alanine, aspartate and glutamate metabolism	10	<i>sad, davT, gltB, gltD, putA</i>	<i>ald, gdhA, gadA, puuA, carB</i>
Map00260	Glycine, serine and threonine metabolism	9	<i>ectB, ectC, betA, betB, lysC, ectD</i>	<i>doeC, doeD, ectA</i>
Map00280	Valine, leucine and isoleucine degradation	18	<i>ilvE, alh-9, davT</i>	<i>bkdA, bkdB, dbt, thlA, mmsB, lpsJ, scoA, pacF, atoB, lpdG, fabM, ivd, mmsA, paaF, mccA</i>
Map00340	Histidine metabolism	2	<i>hisD, alh-9</i>	–
Map00350	Tyrosine metabolism	7	<i>davD</i>	<i>hpaF, vllY, hmgA, faaH, maiA, frmA</i>
Map00360	Phenylalanine metabolism	17	<i>dmpG, mhpF, hipO</i>	<i>styD, dadA, paaA, paaB, paaC, paaD, paaE, paaF, paaG, paaK, paaH, paaZ, oxyL, amiE</i>
Map00380	Tryptophan metabolism	12	<i>alh-9, nbaC, ACMSD</i>	<i>fadB, paaF, thlA, atoB, katG, GCDH, kynU, amiE, kynA</i>
Map00620	Pyruvate metabolism	14	<i>pykA, glol, glcB, gloB, maeB, aldA, maeA, ddh, iidD, levA2, acyP, xylQ, alh-9, accA</i>	
Map00910	Nitrogen metabolism	7	<i>gltB, gltD, can, narK, nasB</i>	<i>gdhA, glnA</i>

谢、丙酮酸代谢、Phe、Tyr、Lys 以及 Try 生物合成代谢途径；在比较组 MS vs HS 中，差异基因富集于 2 个 KEGG 通路，关联涉及 ABC 转运系统、His/Ala/Asp/Glu 的合成代谢途径。在比较组 NS vs HS 中，差异基因关联 6 个 KEGG 通路，主要涉及氮源代谢、ABC 转运途径、生物素的合成途径、His 合成代谢、Leu/Ile/Val 合成代谢，以及 Ala/Asp/Glu 合成代谢。

四氢嘧啶属于氨基酸的衍生物，合成前体与 Asp 和天冬氨酸半缩醛直接相关。基于菌株 XH26 的四氢嘧啶生物合成途径和 KEGG 数据库的氨基酸代谢网络通路，以 Asp、草酰乙酸和 Glu 为代谢节点，筛选四氢嘧啶合成代谢直接或间接关联的代谢通路所涉及的表达差异基因或相关转录因子(表 4)。分析结果表明：盐适应转录组中，存在四氢嘧啶合成代谢通路直接相关的基因 *lysC* (天冬氨酸激酶)、*asd* (天冬氨酸半醛脱氢酶)、*ectB* (L-二氨基丁酸转氨酶)、

*ectA* (L-二氨基丁酸乙酰转移酶)和 *ectC* (四氢嘧啶合成酶)。在 NS vs MS 比较组中，基因 *lysC*、*ectB*、*ectA* 和 *ectC* 转录表达上调，基因 *asd* 转录表达下调；在 NS vs HS 和 MS vs HS 比较组中基因 *lysC*、*asd*、*ectB* 和 *ectC* 转录表达上调，基因 *ectA* 转录表达下调。

L-谷氨酸钠是菌株 XH26 的最佳发酵氮源或碳源，亦是四氢嘧啶积聚高产的关键影响因素。关联通路基因分析显示：盐适应转录组数据中，存在 10 个上游表达差异基因与四氢嘧啶的合成代谢间接关联，如基因 *gltB* (谷氨酸合酶大亚基)、基因 *gltD* (谷氨酸合成酶)、基因 *alh-9* (醛类脱氢酶家族蛋白)、基因 *davT* (4-氨基丁酸转氨酶)、基因 *betA* (胆碱脱氢酶)、基因 *hisD* (组氨酸脱氢酶)、基因 *gdhA* (谷氨酸脱氢酶)、基因 *acnB* (苹果酸水解酶)、基因 *pckA* (磷酸烯醇式丙酮酸羧激酶)以及基因 *gadA* (谷氨酸脱羧酶)，关联基因的具体转录表达差异见表 4。

表 4 四氢嘧啶合成代谢涉及的关联基因与转录调节因子

Table 4 Key genes and transcriptional regulators associated with ectoine anabolic pathway

Genes	Description of genes or factors	NS(FPKM)	MS(FPKM)	HS(FPKM)	Significant	Regulate	P value
<i>lysC</i>	Aspartate kinase	372.01	420.09	719.94	Yes	Up	2.23E-06
<i>asd</i>	Aspartate-semialdehyde Dehydrogenase	488.16	366.75	730.93	Yes	Down/up	5.324 7E-06
<i>ectB</i>	Diaminobutyrate-2-oxoglutarate Transaminase	402.13	409.36	996.56	Yes	Up	3.465 5E-06
<i>ectA</i>	Diaminobutyrate Acetyltransferase	605.03	682.26	423.23	Yes	Up/down	4.381 1E-06
<i>ectC</i>	L-ectoine synthase	921.37	2 067.95	3 745.7	Yes	Up	2.822 3E-06
<i>gltB</i>	Glutamate synthase large subunit	14.11	17.77	93.73	Yes	Up	8.854 6E-127
<i>gltD</i>	Glutamate synthase	30.34	31.27	95.21	Yes	Up	2.820 07E-32
<i>alh-9</i>	Aldehyde dehydrogenase family protein	47.02	55.51	190.49	Yes	Up	7.435 42E-61
<i>davT</i>	4-aminobutyrate transaminase	206.63	195.02	504.61	Yes	Up	1.852 57E-48
<i>betA</i>	Succinate-semialdehyde dehydrogenase	76.78	142.84	741.48	Yes	Up	2.173 7E-249
<i>hisD</i>	Histidinol dehydrogenase	230.81	351.77	470.58	Yes	Up	1.84E-28
<i>gdhA</i>	Glutamate dehydrogenase	120.65	71.53	19.65	Yes	Down	2.721 9E-17
<i>acnB</i>	Aconitate hydratase B	370.56	402.38	160.03	Yes	Up/down	6.778 8E-25
<i>pckA</i>	Phosphoenolpyruvate carboxykinase	631.52	733.94	319.30	Yes	Up/down	4.695 1E-25
<i>gadA</i>	Glutamate decarboxylase	234.33	411.37	117.13	Yes	Up/down	7.2107E-19
<i>ohrR</i>	MarR family transcriptional regulator	39.94	70.30	53.08	No	Up/down	0.206 193
<i>pecS</i>	MarR family transcriptional regulator	35.32	32.41	48.79	No	Down/up	0.591 254
<i>ydgJ</i>	MarR family transcriptional regulator	68.56	81.22	47.57	No	Up/down	0.016 707
<i>orf02069</i>	MarR family transcriptional regulator	129.99	88.11	19.67	No	Down	0.528 755

FPKM: expected number of fragments per kilobase of transcript sequence per millions base pairs sequenced, the normalization using FPKM method normalized not only the sequencing depth but also the gene length, which made the estimates of gene expression level obtained by different lengths of genes at different sequencing depths comparable.

在 NS vs MS 比较组中, 基因 *gltB*、*gltD*、*davT*、*hisD*、*alh-9*、*betA*、*acnB*、*pckA* 和基因 *gadA* 表达上调, 而基因 *gdhA* 表达下调; 又如在 MS vs HS 和 LS vs HS 比较组中, 基因 *gltB*、*gltD*、*davT*、*hisD*、*alh-9* 以及基因 *betA* 表达上调, 而基因 *acnB*、*pckA*、*gadA* 与 *gdhA* 表达下调。此外, 关联转录因子分析显示: 4 个转录调节因子基因存在表达差异, 如 *ohrR*、*pecS*、*ydgJ* 和 *orf02069* (比对 NCBI 和 KEGG 数据库, 仅知隶属于 MarR 家族转录调节因子)。研究表明, MarR 家族转录调节因子是四氢嘧啶生物合成

连锁基因簇 *ask-ectABC* 和抵抗渗透压的主要转录调节因子, 其功能有待深入研究<sup>[19]</sup>。

## 2.6 关键差异表达基因的验证

基于上述候选的四氢嘧啶合成代谢和转录调控有关的 19 个差异基因, 进行荧光 qRT-PCR 表达差异验证(图 7)。分析表明: 四氢嘧啶合成代谢和转录调控有关的 19 个差异基因的 qRT-PCR 统计结果与 RNA-seq 测序结果相一致, 即上调表达和下调表达的趋势一致, 但具体表达量差异因实验手段的不同而有所变化。qRT-PCR 验证结果显示:(1) 四氢嘧啶合成代谢通路直接参

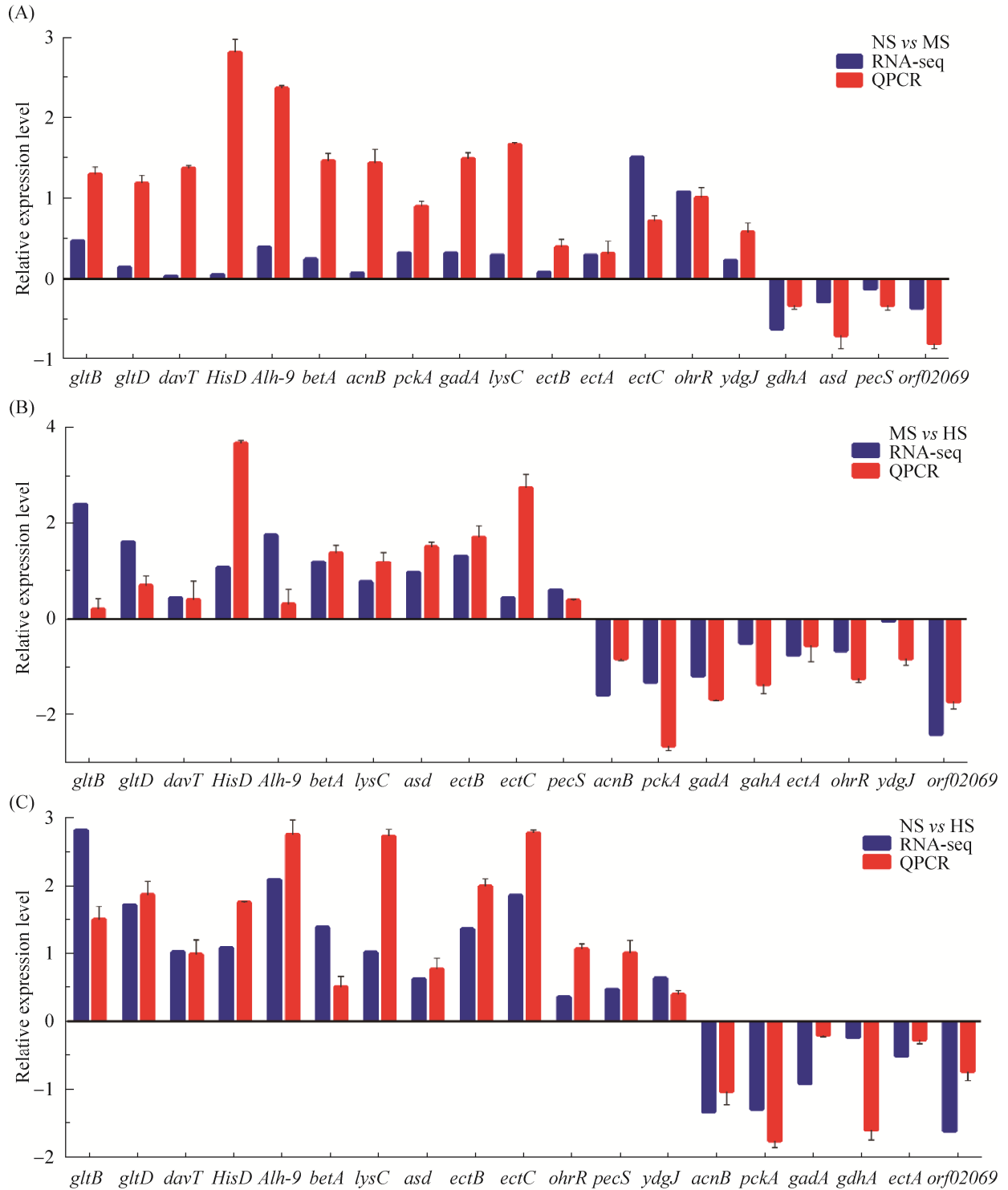


图 7 qRT-PCR 的验证结果

Figure 7 Validation results of qRT-PCR. The error bar represents the standard deviation of three parallel samples.

与基因 5 个, 在 NS vs MS 比较组中(图 7A), 基因 *lysC*、*ectB*、*ectA* 和 *ectC* 表达上调, 而基因 *asd* 表达下调; 在 MS vs HS (图 7B)和 NS vs HS (图 7C)比较组中, 基因 *lysC*、*asd*、*ectB* 和 *ectC* 表达上调, 而基因 *ectA* 则表达下调。(2) 四氢嘧啶合成代谢通路上游关联基因 10 个, 在 NS vs MS 比较组中, 显示基因 *gltB*、*gltD*、*davT*、*hisD*、*alh-9*、*betA*、*acnB*、*pckA* 和 *gadA* 表达上调, 而基因 *gdhA* 表达下调(图 7A); 在 MS vs HS (图 7B)和 NS vs HS (图 7C)比较组中, 基因 *gltB*、*gltD*、*davT*、*hisD*、*alh-9* 和 *betA* 表达上调, 而基因 *acnB*、*pckA*、*gadA*、*gdhA* 表达下调。(3) 涉及四氢嘧啶转录调控的候选基因 4 个, 盐适应表达情况变化较大。如在 NS vs MS 比较组中, 基因 *ohrR* 和 *ydgJ* 表达上调, 而基因 *pecS* 和 *orf02069* 表达下调(图 7A); 在 MS vs HS 比较组中, 基因 *pecS* 表达上调, 而基因 *ohrR*、*ydgJ* 和 *orf02069* 表达下调(图 7B); 在 NS vs HS 比较组中, 基因 *ohrR* 和 *pecS* 表达上调, 而基因 *ydgJ* 和 *orf02069* 表达下调(图 7C)。此外, qRT-PCR 结果与 RNA-seq 结果在表达差异倍数方面, 存在明显不同, 如 NS vs MS 比较组中, qRT-PCR 统计差异倍数均高于 RNA-seq 测序结果; 在 MS vs HS 和 NS vs HS 比较组中, qRT-PCR 统计部分基因的表达差异倍数又低于 RNA-seq 测序结果。目前, 基因表达定量的准确性涉及多种因素的综合影响, 如仪器灵敏度、目的基因扩增区域选择、引物扩增效率、化学试剂以及统计分析等<sup>[20]</sup>, 有待深入探讨。

### 3 讨论与结论

目前, 针对盐单胞菌的盐适应机制研究, 众多学者已开展了广泛和深入的探究, 主要的适应策略(如盐溶质平衡和相容溶质积累), 多集中关注不同属种的基因组或渗透压差异基因变

化。然而, 盐适应条件下相容溶质四氢嘧啶的生物合成启动、应答以及关联基因的网络调控等多组学串联分析, 有待深入研究<sup>[21]</sup>。Cheng 等<sup>[22]</sup>利用酸/碱条件胁迫菌株 *Halomonas* sp. Y2 并进行转录组学分析, 发现 4 个编码  $\text{Na}^+(\text{K}^+)/\text{H}^+$  反转运蛋白的差异基因(*nhaD2*、*nhaD1*、*mrp* 和 *nhaP*), 具有较强的离子抗性和转运活性, 参与维持酸碱胁迫下的稳态平衡。Chen 等<sup>[20]</sup>通过转录组学分析盐单胞菌 *H. beimenensis* 的盐适应机制, 鉴定出 16 个可能的相关基因(*spoT*、*prkA*、*mtnN2*、*rsbV*、*lon*、*smpB*、*rfbC*、*rfbP*、*tatB*、*acrR1* 和 *aca* 等)参与耐盐适应, 并验证 4 个基因 *nqrA*、*trkA2*、*nadA* 和 *gdhB* 分别参与  $\text{Na}^+$  外排、 $\text{K}^+$  吸收、 $\text{H}^+$  能量转换和四氢嘧啶的生物合成, 具有重要的调节作用。本研究利用 Illumina 高通量测序分析盐单胞菌 *H. campaniense* XH26 的盐适应转录组学变化和差异基因表达(0→1.5→2.5 mol/L NaCl; 谷氨酸钠为主要碳/氮源), 研究发现, 转录本共计注释到 748 个 operon (2 182 个基因), 941 个 TSS-TTS 以及 456 个预测新转录本。基于差异基因的 GO 功能富集和 KEGG 富集分析, 表明盐适应转录差异基因主要集中在物质代谢过程和分子功能方面, 共计涉及 711 个参与基因, 包括 385 个上调基因和 326 个下调基因。KEGG Pathway 对比分析, 结果显示菌株 XH26 的盐适应转录差异主要涉及 ABC 转运系统、氨基酸代谢通路和离子转运蛋白/载体。盐适应条件下, 菌株的转录调节水平和分子结构活性受到制约, 从而改变酶分子的结合力和催化活性; 同时, 盐胁迫下菌体细胞膜表面载体或受体的转运功能下降, 显著影响菌株的生长和四氢嘧啶积聚产量。基于组间全局性分析菌株从无盐(或中盐)至高盐状态变化时, 基因表达均呈现显著性差异改变, 表明高盐盐适应(2.5 mol/L NaCl)可能是转

录组学表达差异的重要影响因素。

嗜盐菌胞内四氢嘧啶的主要合成途径为草酰乙酸→Asp→天冬氨酸-β-半缩醛→醛氨酸→草酰乙二氨基丁酸→N-γ-乙酰二氨基丁酸→四氢嘧啶，其中天冬氨酸-β-半缩醛为重要的代谢节点，与草酰乙酸和 Asp 代谢关联<sup>[23]</sup>。盐适应转录组学分析菌株 *Halomonas* sp. MC1，发现转录差异基因与 104 种 KEGG 代谢途径有关，调节细胞代谢过程和丙酮酸代谢途径可促进四氢嘧啶合成量<sup>[24]</sup>。Eronen-Rasimus 等<sup>[25]</sup>通过控制发酵的氮/氧含量进行菌株 *Halomonas* sp. 363 和 *Paracoccus* sp. 392 转录组学对比分析，发现差异基因主要富集在 3 个 KEGG 途径(如碳水化合物合成、脂肪酸生物合成和亚硝酸盐氧化代谢)，富氧条件下提高氮源利用可增加四氢嘧啶产量。本研究中，盐胁迫条件下四氢嘧啶的合成量逐渐增加，且 1.5 mol/L NaCl 时呈现积累量峰值。根据 GO 和 KEGG 数据库分析，XH26 菌株存在四氢嘧啶生物合成的主要基因 *lysC*、

*asd* 和连锁基因簇 *ectABC*，其次 Ala/Asp/Glu 合成代谢、His 合成代谢以及氮源代谢(图 8)与四氢嘧啶生物合成密切相关，如差异基因 *gltB* (谷氨酸合酶大亚基)、基因 *gltD* (谷氨酸合酶)和基因 *gadA* (谷氨酸脱羧酶)均上调表达，参与谷氨酸合成过程；差异基因 *davT* (4-氨基丁酸转氨酶)和 *sad* (琥珀酸半醛脱氢酶)上调表达，参与 Glu 转化代谢至琥珀酸的过程；又如差异基因 *nadB1* (谷氨酸脱氢酶)参与 Glu 代谢流从三羧酸循环到 L-Asp 的关键节点。在 His 代谢中存在 2 个与 L-Asp 代谢密切相关的上调基因，分别是基因 *alh-9* (醛类脱氢酶家族蛋白)和基因 *hisD* (组氨酸脱氢酶)。在氮代谢过程中存在 2 个差异基因 *nasB* (亚硝酸还原酶小亚基)和 *can* (碳酸酐酶)均为上调表达，与 Glu 代谢密切相关。结合 Map00110 次级代谢 pathway 分析发现，上述差异表达基因均定位于四氢嘧啶合成代谢通路的上游方向：L-Glu 转化至琥珀酸，经过三羧酸循环流向草酰乙酸，草酰乙酸再代谢

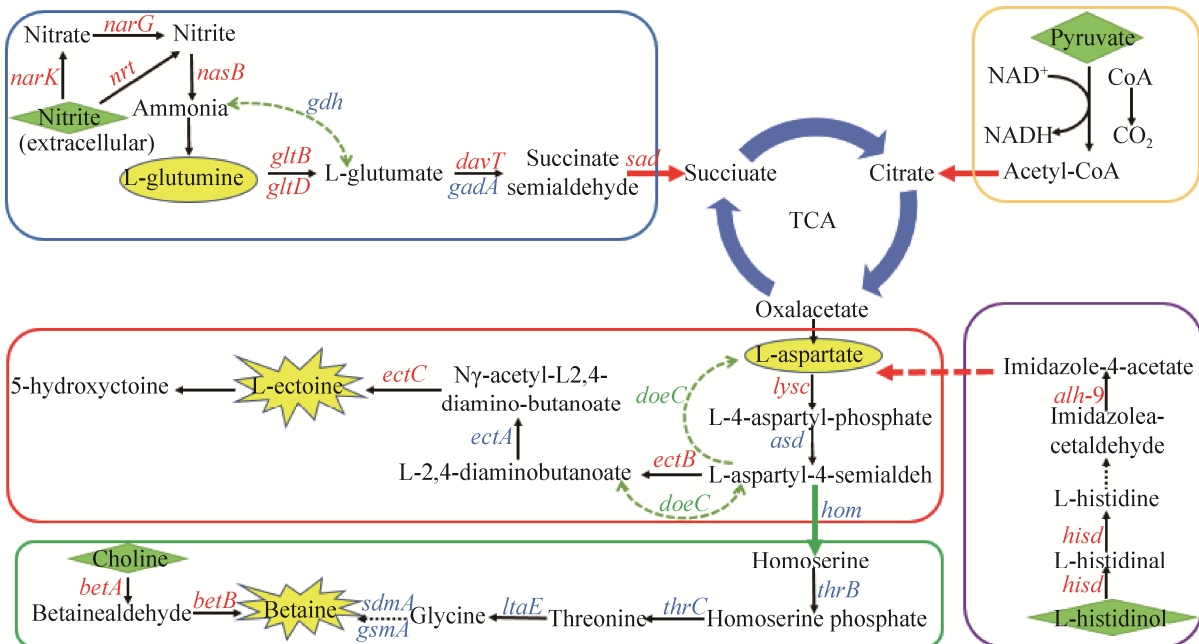


图 8 四氢嘧啶强化合成通路

Figure 8 Ectoine enhanced synthesis pathway.

流向 L-Asp。此外, 从中盐(1.5 mol/L NaCl)到高盐(2.5 mol/L NaCl)盐适应条件转换下, 四氢嘧啶合成量减少, 可能与四氢嘧啶合成通路关联的差异基因 *pckA* (磷酸烯醇丙酮酸羧激酶)、*gadA* (谷氨酸脱羧酶)和 *gdhA* (谷氨酸脱氢酶)下调表达有关, 或可能与四氢嘧啶合成通路分流合成甜菜碱有关, 如基因 *betA* (胆碱脱氢酶)上调表达。4 个隶属于 MarR 家族转录调节因子的基因需要进一步的研究和探究有助于完善四氢嘧啶的合成代谢机制。

综上所述, 基于盐单胞菌 *H. campaniense* XH26 盐适应转录组学数据, 本研究共计筛选出约 1 200 个差异基因参与 245 个 KEGG 代谢途径。代谢关联分析显示, 四氢嘧啶的主要生物合成通路(*lysC+asd+ectABC*)与 Asp、天冬氨酸半缩醛代谢直接关联, 主要代谢流又与上游 Asn、Glu、Gln 和 Ala 代谢网络密切相关。四氢嘧啶生物合成的碳/氮代谢流与三羧酸循环(琥珀酸、延胡索酸、草酰乙酸)密切相关, 可为后续四氢嘧啶合成途径优化和代谢通路整合实验设计(Glu→TCA→Asp→四氢嘧啶), 提供新的参考依据。如构建重组整合质粒(*gadA+davT+sad+sdhA+fumB+mdh+nadBI+ask/lysc+asd+ectABC*)约 15 kb, 并利用 T7 强启动子诱导表达代谢通路的相关基因, 以此实现四氢嘧啶的过量化生产; 又可通过构建盐单胞菌 CRISPR/Cas9 基因敲除系统敲除四氢嘧啶分解代谢基因簇 *doeABCD*, 或敲除甜菜碱合成的关键基因 *hom*, 同时增加四氢嘧啶上游合成代谢的底物浓度(L-Glu 与 His), 以此提高四氢嘧啶的生物合成量。此外, 由于 ATP-ABC 转运系统与丙酮酸氧化有关, 可弱化 ABC 转运蛋白系统的负反馈调控, 并强化丙酮酸至草酰乙酸的代谢流量, 以此促进四氢嘧啶合成, 而且使细胞自动分泌四氢嘧啶至胞外, 尚需深入探索与验证<sup>[26]</sup>。

## 参考文献

- [1] Montalvo-Rodríguez R, Maupin-Furlow JA. Insights through genetics of halophilic microorganisms and their viruses. *Genes*, 2020, 11(4): 388.
- [2] Meng YW, Lv P, Cui YB, Zhang LN, Wang Y, Ma CQ, Xu P, Yang CY. Potassium resistance of halotolerant and alkaliphilic *Halomonas* sp. Y2 by a Na<sup>+</sup>-induced K<sup>+</sup> extrusion mechanism. *Microbiology: Reading, England*, 2019, 165(4): 411–418.
- [3] Harding T, Brown MW, Simpson AG, Roger AJ. Osmoadaptative strategy and its molecular signature in obligately halophilic heterotrophic protists. *Genome Biology and Evolution*, 2016, 8(7): 2241–2258.
- [4] Park YL, Choi TR, Han YH, Song HS, Park JY, Bhatia SK, Gurav R, Choi KY, Kim YG, Yang YH. Effects of osmolytes on salt resistance of *Halomonas* sp. CKY01 and identification of osmolytes-related genes by genome sequencing. *Journal of Biotechnology*, 2020, 322: 21–28.
- [5] Fatollahi P, Ghasemi M, Yazdian F, Sadeghi A. Ectoine production in bioreactor by *Halomonas elongata* DSM2581: using MWCNT and fenanoparticle. *Biotechnology Progress*, 2021, 37(1): e3073.
- [6] Peng SL, Kai M, Yang XY, Luo YY, Bai LH. Study on the osmoregulation of “*Halomonas* sp. NY-011” and the degradation of organic pollutants in the saline environment. *Extremophiles*, 2020, 24(6): 843–861.
- [7] Ceylan S, Yilan G, Akbulut BS, Poli A, Kazan D. Interplay of adaptive capabilities of *Halomonas* sp. AAD12 under salt stress. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2012, 114(1): 45–52.
- [8] 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. *生物学杂志*, 2020, 37(4): 31–35.  
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. *Journal of Biology*, 2020, 37(4): 31–35. (in Chinese)
- [9] Salvador M, Argandoña M, Naranjo E, Piubeli F, Nieto JJ, Csonka LN, Vargas C. Quantitative RNA-seq analysis unveils osmotic and thermal adaptation mechanisms relevant for ectoine production in *Chromohalobacter salexigens*. *Frontiers in Microbiology*, 2018, 9: 1845.
- [10] Parwata IP, Wahyuningrum D, Suhandono S, Hertadi R. Heterologous ectoine production in *Escherichia coli*:

- optimization using response surface methodology. *International Journal of Microbiology*, 2019, 2019: 5475361.
- [11] Ng HS, Wan PK, Ng TC, Lan JCW. Primary purification of intracellular *Halomonas salina* ectoine using ionic liquids-based aqueous biphasic system. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2020, 130(2): 200–204.
- [12] Jin DF, Gu BT, Xiong DW, Huang GC, Huang XP, Liu L, Xiao J. A transcriptomic analysis of *Saccharomyces cerevisiae* under the stress of 2-phenylethanol. *Current Microbiology*, 2018, 75(8): 1068–1076.
- [13] Zhang Y, Gao JX, Huang YY, Wang JB. Recent developments in single-cell RNA-seq of microorganisms. *Biophysical Journal*, 2018, 115(2): 173–180.
- [14] Guo JF, Li X, Li BK, Yang J, Jin D, Li KX. Transcriptome analysis of *Lactobacillus paracasei* SMN-LBK under ethanol stress. *Journal of Dairy Science*, 2020, 103(9): 7813–7825.
- [15] Zhang YB, Liu HH, Gu D, Lu XX, Zhou XH, Xia XD. Transcriptomic analysis of PhoR reveals its role in regulation of swarming motility and T3SS expression in *Vibrio parahaemolyticus*. *Microbiological Research*, 2020, 235: 126448.
- [16] Trapnell C, Williams BA, Pertea G, Mortazavi A, Kwan G, Van Baren MJ, Salzberg SL, Wold BJ, Pachter L. Transcript assembly and quantification by RNA-Seq reveals unannotated transcripts and isoform switching during cell differentiation. *Nature Biotechnology*, 2010, 28(5): 511–515.
- [17] McClure R, Balasubramanian D, Sun Y, Bobrovskyy M, Sumbly P, Genco CA, Vanderpool CK, Tjaden B. Computational analysis of bacterial RNA-Seq data. *Nucleic Acids Research*, 2013, 41(14): e140.
- [18] 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. *PLoS One*, 2020, 15(2): e0228199.
- [19] 张芳, 沈国平, 李永臻, 朱德锐. 相容溶质四氢嘧啶与羟基四氢嘧啶的代谢调控研究进展. *微生物学报*, 2020, 60(8): 1548–1562.
- Zhang F, Shen GP, Li YZ, Zhu DR. Metabolic regulation of compatible solutes ectoine and 5-hydroxyectoine. *Acta Microbiologica Sinica*, 2020, 60(8): 1548–1562. (in Chinese)
- [20] Chen YH, Shyu YT, Lin SS. Characterization of candidate genes involved in halotolerance using high-throughput omics in the halotolerant bacterium *Virgibacillus chiguensis*. *PLoS One*, 2018, 13(8): e0201346.
- [21] Reshetnikov AS, Rozova ON, Trotsenko YA, But SY, Khmelenina VN, Mustakhimov II. Ectoine degradation pathway in halotolerant methylotrophs. *PLoS One*, 2020, 15(4): e0232244.
- [22] Cheng B, Meng YW, Cui YB, Li CF, Tao F, Yin HJ, Yang CY, Xu P. Alkaline response of a halotolerant alkaliphilic *Halomonas* strain and functional diversity of its Na<sup>+</sup>(K<sup>+</sup>)/H<sup>+</sup> antiporters. *Journal of Biological Chemistry*, 2016, 291(50): 26056–26065.
- [23] Chen J, Liu PF, Chu XH, Chen JW, Zhang HW, Rowley DC, Wang H. Metabolic pathway construction and optimization of *Escherichia coli* for high-level ectoine production. *Current Microbiology*, 2020, 77(8): 1412–1418.
- [24] Zhang J, Wang PC, Tian HM, Tao Z, Guo TT. Transcriptome analysis of ice plant growth-promoting endophytic bacterium *Halomonas* sp. strain MC1 to identify the genes involved in salt tolerance. *Microorganisms*, 2020, 8(1): 88.
- [25] Eronen-Rasmus E, Hultman J, Hai T, Pessi IS, Collins E, Wright S, Laine P, Viitamäki S, Lyra C, Thomas DN, Golyshin PN, Luhtanen AM, Kuosa H, Kaartokallio H. Sea-ice bacteria *Halomonas* sp. strain 363 and *Paracoccus* sp. strain 392 produce multiple types of poly-3-hydroxyalkanoic acid (PHA) storage polymers at low temperature. *Applied and Environmental Microbiology*, 2021, 87(17): e0092921.
- [26] Wang T, Li YJ, Zhang LH, Liu WF, Zhu YM. Salt tolerance of nitrate reductase in *Halomonas* sp. B01. *Folia Microbiologica*, 2020, 65(5): 909–916.

(本文责编 张晓丽)