



## napF3 调控腾冲嗜热厌氧杆菌热适应机制

王若彤<sup>1</sup>, 刘亚娟<sup>1</sup>, 郑航辉<sup>1</sup>, 陈宜军<sup>2</sup>, 万学瑞<sup>1</sup>, 赵春林<sup>3</sup>, 王川<sup>1\*</sup>, 杨宇泽<sup>2\*</sup>

1 甘肃农业大学 动物医学院, 甘肃 兰州 730030

2 北京市畜牧总站, 北京 100101

3 天水师范学院, 甘肃 天水 741000

王若彤, 刘亚娟, 郑航辉, 陈宜军, 万学瑞, 赵春林, 王川, 杨宇泽. *napF3* 调控腾冲嗜热厌氧杆菌热适应机制[J]. 微生物学报, 2024, 64(10): 3825-3839.

WANG Ruotong, LIU Yajuan, ZHENG Hanghui, CHEN Yijun, WAN Xuerui, ZHAO Chunlin, WANG Chuan, YANG Yuze. *napF3* regulates thermophilic mechanism of *Thermoanaerobacter tengcongensis*[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2024, 64(10): 3825-3839.

**摘要:**【目的】研究腾冲嗜热厌氧杆菌 *napF3* 在不同温度下的功能。【方法】通过同源重组构建腾冲嗜热厌氧杆菌的  $\Delta napF3$  株, 观察并比较其在 50、60、75 和 80 °C 下野生株和  $\Delta napF3$  株的生长趋势。通过转录组测序确定  $\Delta napF3$  株与野生株在 75 °C 的差异表达基因。采用荧光定量 PCR 分析野生株和  $\Delta napF3$  株中 13 个基因和 3 个 sRNA 在 50、60、75 和 80 °C 下的转录水平。【结果】成功构建了  $\Delta napF3$  株, 生长曲线结果显示其在 50 °C 和 80 °C 不生长, 60 °C 和 75 °C 生长速度显著减缓。转录组结果显示: 有 899 个基因表达发生差异, 包括 363 个上调基因和 536 个表达下调基因, 这些差异表达基因主要富集在缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸的生物合成、ABC 运输工具、双组分系统、脂肪酸合成、硫胺素代谢等途径, 并发现与嗜热机制相关的 13 个基因和 3 个非编码 RNA 的转录水平在特定温度下发生了变化。【结论】腾冲嗜热厌氧杆菌 *napF3* 在热适应过程中发挥重要作用。

**关键词:** 腾冲嗜热厌氧杆菌; *napF3*; 热适应; 机制; 转录组; 差异表达基因

资助项目: 甘肃农业大学青年导师扶持基金(GAU-QDFC-2023-04); 国家自然科学基金(31500067)

This work was supported by the Youth Mentor Fund of Gansu Agricultural University (GAU-QDFC-2023-04) and the National Natural Science Foundation of China (31500067).

\*Corresponding authors. E-mail: WANG Chuan, wangchuan@gsau.edu.cn; YANG Yuze, yyz84929056@126.com

Received: 2024-04-08; Accepted: 2024-07-05; Published online: 2024-07-11

# *napF3* regulates thermophilic mechanism of *Thermoanaerobacter tengcongensis*

WANG Ruotong<sup>1</sup>, LIU Yajuan<sup>1</sup>, ZHENG Hanghui<sup>1</sup>, CHEN Yijun<sup>2</sup>, WAN Xuerui<sup>1</sup>, ZHAO Chunlin<sup>3</sup>, WANG Chuan<sup>1\*</sup>, YANG Yuze<sup>2\*</sup>

1 College of Veterinary Medicine, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730030, Gansu, China

2 Beijing Municipal Animal Husbandry Station, Beijing 100101, China

3 Tianshui Normal University, Tianshui 741000, Gansu, China

**Abstract:** [Objective] To study the role of *napF3* in *Thermoanaerobacter tengcongensis* at different temperatures. [Methods] We constructed  $\Delta napF3$  from *T. tengcongensis* by homologous recombination and observed the growth of  $\Delta napF3$  at 50 °C, 60 °C, 75 °C, and 80 °C. Transcriptome sequencing was employed to identify the differentially expressed genes (DEGs) between  $\Delta napF3$  and the wild type (WT) at 75 °C. real-time PCR was conducted to measure the transcriptional levels of 13 genes and 3 sRNAs in WT and  $\Delta napF3$  at 50 °C, 60 °C, 75 °C, and 80 °C. [Results]  $\Delta napF3$  was successfully constructed, and it showcased suspended growth at 50 °C and 80 °C and slow growth at 60 °C and 75 °C. A total of 899 DEGs between WT and  $\Delta napF3$  at 75 °C were identified, including 363 genes with up-regulated expression and 536 genes with down-regulated expression. These DEGs were mainly involved in the biosynthesis of valine, leucine and isoleucine, ABC transporters, two-component system, fatty acid synthesis, thiamine metabolism and other pathways. The transcriptional levels of 13 genes and 3 sRNAs related to the thermophilic mechanism changed under specific temperatures. [Conclusion] *napF3* plays a role in the thermophilic adaptation of *T. tengcongensis*.

**Keywords:** *Thermoanaerobacter tengcongensis*; *napF3*; thermophilic adaptation; mechanism; transcriptome; differentially expressed genes

嗜热菌通常是指生活在 50 °C 以上的微生物, 虽然热适应的单一因素被基本阐明, 但由于细菌的生命活动在很大程度上是一个很复杂的分子网络, 热适应的分子机制至今仍不清楚。随着测序技术的快速发展, 目前在 NCBI 的数据库里有超过 80 株嗜热菌的基因组被公布, 这对热适应机制的研究提供了有利的条件。目前对热适应机制的研究主要集中在基因组 G+C 含量<sup>[1-2]</sup>、mRNA 的 G+C 含量<sup>[3]</sup>、氨基酸组成<sup>[4]</sup>和热适应

蛋白<sup>[5]</sup>等。

腾冲嗜热厌氧杆菌 (*Thermoanaerobacter tengcongensis*) MB4 是 1998 年从云南腾冲温泉内分离的革兰氏阴性杆菌, 可在 50–80 °C 生存, 其最适生长温度 75 °C, 最适 pH 7.5<sup>[6]</sup>。该基因组为闭合的双链环状 DNA, 是我国第一个自主完成基因组测序和注释的原核微生物<sup>[7]</sup>。在转录组分析中, 信号转导、脂肪酸合成和 ABC 转运系统在腾冲嗜热厌氧杆菌的热适应过

程中起到重要作用, 在 I-A 亚型和 III-B 亚型的 CRISPR-Cas 系统和 sRNA 也可能同样起到作用<sup>[8]</sup>, 其中 CRISPR-Cas 系统内, III-B 亚型的 *cmr3*、*cmr4* 和普遍存在于各亚型的 Cas2 均参与热适应过程<sup>[9-11]</sup>。同时, 氨基酸组成不同对蛋白质的稳定性有重要的影响<sup>[12]</sup>, AhpC 中 Glu (E)和 Lys (K)的含量高于常温细菌, 并且 AhpC 更加紧凑的三级蛋白结构, 也使腾冲嗜热厌氧杆菌比常温菌更能适应高温环境<sup>[13]</sup>。Wang 等使用双向电泳(2DE)和 MALDI-TOF/TOF 质谱法, 鉴定了在 55、75 和 80 °C 下生长的腾冲嗜热厌氧杆菌中的 23 种温度依赖性蛋白质<sup>[14-15]</sup>。Chen 等使用同位素标记相对和绝对定量技术 (isobaric tags for relative and absolute quantification, iTRAQ)检测了在 55、65、75 和 80 °C 条件下生长的腾冲嗜热厌氧杆菌的差异表达蛋白并定义了 251 种温度依赖性蛋白质<sup>[16]</sup>。

NapF3 是腾冲嗜热厌氧杆菌中的铁氧还蛋白 2 (ferredoxin proteins 2, Fd-2), 是由 *tte1339* 编码的电子载体, 为 2-氧代戊二酸-受体氧化还原酶亚基<sup>[7]</sup>。Fd-2 是香叶基香叶基氢化酶 (geranylgeranyl hydrogenase, GGR)的唯一电子供体, 而在古菌中与细胞膜热适应机制相关的类异戊二烯链双键的氢化由 GGR 催化的<sup>[17]</sup>。然而它在腾冲嗜热厌氧杆菌中的热适应机制尚不清楚, 因此, 本研究利用同源重组法获得腾冲嗜热厌氧杆菌 *napF3* 的敲除株  $\Delta napF3$ , 通过比较野生株和  $\Delta napF3$  株在 50、60、75 和 80 °C 的生长状况, 发现 *napF3* 与腾冲嗜热厌氧杆菌热适应机制有一定的相关性, 通过进一步分析敲除株和野生株的转录组, 利用荧光定量 PCR 对差异表达的基因表达量进行验证, 从而为阐明 *napF3* 在嗜热菌的热适应分子机制中的作用提供了一定的理论基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌株及培养条件

本研究所用腾冲嗜热厌氧杆菌 *MB4* 菌株由中国科学院微生物研究所谭华荣研究员惠赠, 大肠埃希菌 (*Escherichia coli*) DH5 $\alpha$  为本实验室保存。腾冲嗜热厌氧杆菌在特定温度下用 TTE 培养基<sup>[18]</sup>静置培养, 大肠埃希菌 DH5 $\alpha$  用肉汤培养基 (Luria-Bertani, LB) 在 37 °C 振荡培养。

### 1.2 试剂

*Hind* III、*Xho* I、*Bam*H I、*Eco*R I、T4 连接酶均购自 TaKaRa 公司; *Taq* 酶、DNA Marker、SuperScript III 反转录酶均购自 Invitrogen 公司; RNA 提取试剂盒、基因组 DNA 提取试剂盒、质粒小提试剂盒、PCR 产物纯化试剂盒、*EasyPfu* DNA Polymerase 均购自 TransGen Biotech 公司。

### 1.3 引物

本研究用引物序列见表 1, 根据 AE008691.1 序列设计。

### 1.4 *napF3* 敲除株构建及生长曲线的测定

通过 CTAB 法提取腾冲嗜热厌氧杆菌全基因组, 以此为模板, 用引物 P1 和 P2 (表 1) 通过 PCR 方法扩增 *napF3* 左臂片段, 将左臂片段和敲除质粒 pBOL01<sup>[7]</sup> 分别经 *Xho* I 和 *Hind* III 双酶切后用 T4 连接酶将两者连接得到质粒 pBOL01::*napF3*::left arm, 用引物 P3 和 P4 通过 PCR 方法扩增 *napF3* 右臂片段, 将右臂片段和质粒 pBOL01::*napF3*::left arm 分别经 *Bam*H I、*Eco*R I 双酶切后用 T4 连接酶将两者连接得到质粒 pBOL01:: $\Delta napF3$ 。

将腾冲嗜热厌氧杆菌菌液按照 1% 接入 10 mL TTE 培养基中, 75 °C 静置培养 5 h 至  $OD_{600}$  值为 0.6–0.8, 随后将 50  $\mu$ L 敲除质粒 pBOL01::

表 1 实验用寡核苷酸序列

Table 1 Experimental oligonucleotide sequences were used

Primers name	Primer sequences (5'→3')
P1	CCGCTCGAGGGCAAATCCTCAAATCCAGA
P2	CCCAAGCTTTACCAGTTTTTTCTCCAATAT
P3	CGGAATTCGTTAATGCAGGGAAATGAG
P4	CGGGATCCGTCCACTTCATAGTATAGCTGC
P5	TCTATTGTCCACCCGTCTCC
P6	ACTACCCTGTCCACTTCATAG
P7	TTGCGGTATCTGTGTCGAGT
P8	TCATCTCACACAGTCCGCAT
16S-F	CGTAGGCGGTTTAGCAAGTC
16S-R	CTACGCATTTACCGCTACA
<i>tte2227</i> -F	GTCCATTTTCTGAGCCCACT
<i>tte2227</i> -R	ATTTTACACGGAGCAGGCAG
<i>thiE</i> -F	GCAAATACGGATCCTGCTCC
<i>thiE</i> -R	GTTGGCGTTGTGAGGAGAAT
<i>thiD</i> -F	AAGTGCATCCTGTCCCATGT
<i>thiD</i> -R	GTTTTGGTAAAGGGCGGACA
<i>tte0620</i> -F	AGAAGGGGTTTTAGAGGGCC
<i>tte0620</i> -R	TCCTCTAATGAAAGCTCCGCA
<i>tte0003</i> -F	GTGCGATACAGGTGGACAAG
<i>tte0003</i> -R	TCACAAAAGTCTTTCCTTCCACT
<i>tte0272</i> -F	GCATAATAGCATCTTTTGGGTGA
<i>tte0272</i> -R	CCAGGTGACATTGCCGAAAA
<i>rnhA</i> -F	GGATGGAATTAAGGCAGCCA
<i>rnhA</i> -R	TGCCACTTTTCAATCCATCCC
<i>napF3</i> -F	TTGCGGTATCTGTGTCGAGT
<i>napF3</i> -R	TCATCTCACACAGTCCGCAT
<i>ccmA2</i> -F	GGTGAGGGATTGGTTTTGGT
<i>ccmA2</i> -R	CAGCACCATTTTACCCAAA
<i>tte2763</i> -F	CACCTCCCAGACACTGCAAA
<i>tte2763</i> -R	GGCGCCATTTTGATATCTTCG
<i>galU</i> -F	CCTTTCGCAGTGCTTTTAGG
<i>galU</i> -R	CATCCTCTCAGGCACTTCC
<i>nanE</i> -F	CAACAACCTGCATACGCTCCT
<i>nanE</i> -R	TGGAAGGCCAGATTATGAG
<i>tte2411</i> -F	CGGATGAAATAGCCCTCAA
<i>tte2411</i> -R	CGACTGAAAGCCCAATGAGT
sRNA49-F	CGTAGCGATACCTGAAGCCT
sRNA49-R	AGTGCCATTAAGCCAAGAGT
sRNA103-F	TTCGTGTGACCCGGTGAAA
sRNA103-R	CCTCTTGGCAGCTTCATGTT
sRNA104-F	GAGAGCTATGGGGTAGGCAG
sRNA104-R	CCTAGCCTCTTTTGCAACCC

*ΔnapF3* 和 1 mL 培养好的腾冲嗜热厌氧杆菌菌液加入 10 mL TTE 培养基的厌氧管中, 在 60 °C 静置培养 3 h, 将随后将 1 mL 培养好的菌液加入到融化的固体 TTE 培养基中, 再加入 0.5 mL 100 μg/mL 卡那霉素, 颠倒混匀后放平厌氧管, 在冰水混合物中迅速旋转, 使固体 TTE 培养基均匀地吸附到管壁上, 将固体 TTE 培养基放入 60 °C 恒温箱中培养 3–4 d, 待固体厌氧管管壁长出单个菌落后, 挑取 *ΔnapF3* 固体厌氧管中的单菌落, 分别培养于腾冲嗜热厌氧杆菌 TTE 液体培养基中, 加 0.5 mL 100 μg/mL 卡那霉素, 于 60 °C 培养箱中培养 2–3 d 直至菌液浑浊, 将转化液铺在选择性培养基上, 挑取单菌落于 60 °C 培养箱中孵育, 提取基因组<sup>[19]</sup>, 用引物 P5 和 P6 (表 1) 进行特异性扩增验证, 将验证正确的 *napF3* 基因敲除的菌株定名为 *ΔnapF3* 株。

腾冲嗜热厌氧杆菌野生株和 *ΔnapF3* 株用 TTE 液体培养基在 50、60、75、80 °C 条件下培养, 每隔 2 h 取样测定  $OD_{600}$  值, 直到野生株生长到稳定期, 并绘制生长曲线。

### 1.5 腾冲嗜热厌氧杆菌野生株和 *ΔnapF3* 株转录组分析

收集 75 °C 条件下培养的腾冲嗜热厌氧杆菌野生株和 *ΔnapF3* 菌株, 提取总 RNA, 使用 Illumina® (New England Biolabs 公司) 的 NEBNext®Ultra™ 方向 RNA 文库准备试剂盒的推荐程序建立测序文库, 并在 Illumina HiSeq 平台上测序。原始数据被储存在 NCBI 生物项目中, 登录号为 PRJNA1095691。移除原始数据中低质量的读数后获得处理后数据, 使用软件 Bowtie2-2.2.3 建立参考基因组, 并将清洁读数匹配到参考基因组上<sup>[18]</sup>。使用 DESeq R (1.18.0) 包进行野生株和 *ΔnapF3* 株的差异表达分析, 采用 Benjamini 和 Hochberg 法调整得到的 *P* 值,  $P < 0.05$  时被指定为差异表达基因。利用 GSeq

R 包对差异表达基因进行基因本体 (gene ontology, GO) 富集分析<sup>[20]</sup>; 使用 KOBAS 软件测试京都基因与基因组百科全书 (Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG) 途径中差异表达基因的统计富集情况<sup>[21]</sup>。对有价值的 KEGG 富集途径进行人工筛选, 使用 STRING 数据库 (<https://string-db.org/>) 获得 DEGs 的蛋白质-蛋白质相互作用网络数据 (PPI) (置信度得分  $\geq 0.40$ )。用 Cytoscape 软件 (v3.7.2) 构建 DEGs 的可视化 PPI 网络图并筛选出枢纽基因。

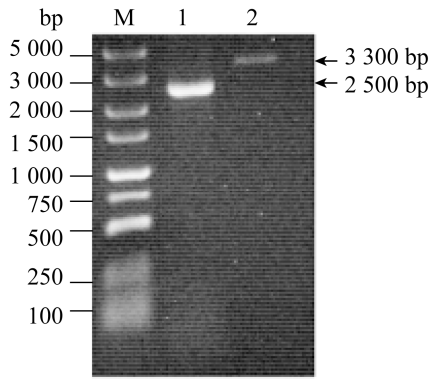
### 1.6 荧光定量 PCR 检测差异基因表达

收集 50、60、75 °C 条件下培养的野生株和 *ΔnapF3* 株菌体进行荧光定量 PCR, 提取样品 RNA 并转录为 cDNA, 以 16S rRNA 作为内参基因。荧光定量 PCR 反应体系: 2×SuperReal PreMix 12.5 μL, 上、下游引物 P7、P8 (10 μmol/L) 各 0.8 μL, cDNA 1.0 μL, 加双蒸水至 25 μL, 共 4 个生物学重复。荧光定量 PCR 反应条件: 95 °C 预变性 5 min; 95 °C 5 s, 60 °C 10 s, 72 °C 20 s, 进行 35 个循环, 于延伸阶段收集荧光信号。荧光定量 PCR 结束后立即进行熔解曲线分析, 验证引物扩增的特异性。反应结束后对  $C_t$  值采用  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  法进行计算, 以 50 °C 野生株的各基因表达量为 1, 分析 13 个基因 *tte2227*、*thiE*、*thiD*、*tte0620*、*tte0003*、*tte0272*、*rnhA*、*napF3*、*ccmA2*、*tte2763*、*galU*、*nanE*、*tte2411* 和 3 个非编码 RNA 基因 *sRNA49*、*sRNA104*、*sRNA103* 的表达水平。

## 2 结果与分析

### 2.1 *napF3* 敲除株的构建及鉴定

以构建的 *ΔnapF3* 提取的基因组为模板, P5 和 P6 为引物扩增得到 3 300 bp 片段; 以野生株基因组为模板, P5 和 P6 为引物扩增得到 2 500 bp 条带 (图 1), 表明敲除株 *ΔnapF3* 构建成功。



**图1**  $\Delta napF3$  的 PCR 鉴定 M: DNA 分子量标准物(DL5000); 泳道 1: 以野生株基因组为模板的 PCR 扩增; 泳道 2: 以  $\Delta napF3$  株基因组为模板的 PCR 扩增

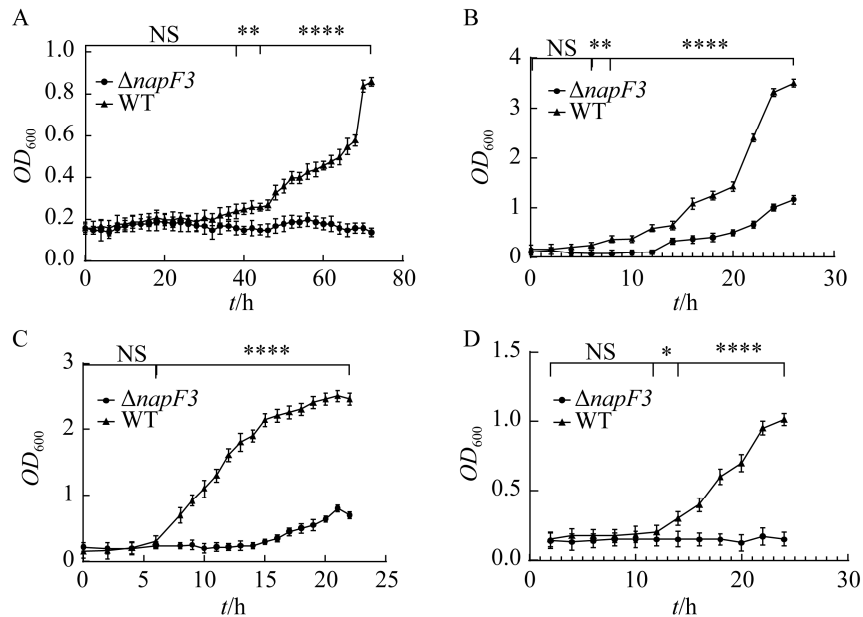
Figure 1 PCR identification of  $\Delta napF3$ . M: DL5000 DNA Marker; Lane 1: PCR amplification of WT genome as template; Lane 2: PCR amplification using  $\Delta napF3$  genome as template.

## 2.2 腾冲嗜热厌氧杆菌野生株和 $\Delta napF3$ 株在不同温度下生长曲线的比较

在 50、60、75 和 80 °C 条件下, 腾冲嗜热厌氧杆菌野生株、 $\Delta napF3$  的生长曲线显示,  $\Delta napF3$  菌株在 50 °C 和 80 °C 条件下不生长, 在 60、75 °C 条件下腾冲嗜热厌氧杆菌野生株生长速度显著高于  $\Delta napF3$  (图 2)。

## 2.3 腾冲嗜热厌氧杆菌野生株和 $\Delta napF3$ 株在 75 °C 的转录组分析

为了阐明腾冲嗜热厌氧杆菌热适应机制, 以其 75 °C 的基因表达作为参照, 分别对比了 75 °C 下  $\Delta napF3$  株与野生株基因表达情况, 定义了 899 个差异表达基因, 其中包括 363 个表达上调基因和 536 个表达下调基因(图 3A)。选取了 10 个上调和 10 个下调变化最大的基因(表 2)。



**图 2**  $\Delta napF3$  和野生株在不同温度下生长曲线

Figure 2 Growth curves of  $\Delta napF3$  and WT strains at different temperatures. A: Growth curves of  $\Delta napF3$  and WT strains at 50 °C. B: Growth curves of  $\Delta napF3$  and WT strains at 60 °C. C: Growth curves of  $\Delta napF3$  and WT strains at 75 °C. D: Growth curves of  $\Delta napF3$  and WT strains at 80 °C. \*:  $P < 0.05$ ; \*\*:  $P < 0.01$ ; \*\*\*\*:  $P < 0.0001$ ; ns: No significant difference.

表 2 10 个上调和 10 个下调变化最大的基因

Table 2 Ten up-regulated and ten down-regulated genes with the most changes

Rank	Gene	log <sub>2</sub> fold change	Function
1↑	TTE1340	7.533 4	Pyruvate:ferredoxin oxidoreductase and related 2-oxoacid:ferredoxin oxidoreductases alpha subunit
2↑	TTE1692	5.635 4	Ribosomal protein L35
3↑	TTE0016	5.028 3	Isopropylmalate/homocitrate/citramalate synthases
4↑	TTE0018	5.016 7	3-isopropylmalate dehydratase small subunit
5↑	TTE0019	5.014 3	Isocitrate/isopropylmalate dehydrogenase
6↑	TTE0020	4.518 5	Dihydroxyacid dehydratase/phosphogluconate dehydratase
7↑	TTE0017	4.463 9	3-isopropylmalate dehydratase large subunit
8↑	TTE1229	4.062 9	Hypothetical protein
9↑	TTE2551	3.961 0	Spore cortex-lytic enzyme prepeptide
10↑	TTE0954	3.883 5	Molecular chaperone GrpE (heat shock protein)
1↓	TTE0421	-6.180 4	Hypothetical protein
2↓	Novel00341	-5.303 5	Hypothetical protein
3↓	TTE2082	-4.742 0	Hypothetical protein
4↓	TTE0883	-4.594 7	Soluble lytic murein transglycosylase and related regulatory proteins (some contain LysM/invasin domains)
5↓	TTE2072	-4.470 0	Hypothetical protein
6↓	TTE2099	-4.431 5	Hypothetical protein
7↓	TTE2049	-4.290 8	Hypothetical protein
8↓	TTE0504	-4.189 7	Uncharacterized flagellar protein FlaG
9↓	TTE1719	-4.188 6	Hypothetical protein
10↓	TTE2060	-4.181 1	Hypothetical protein

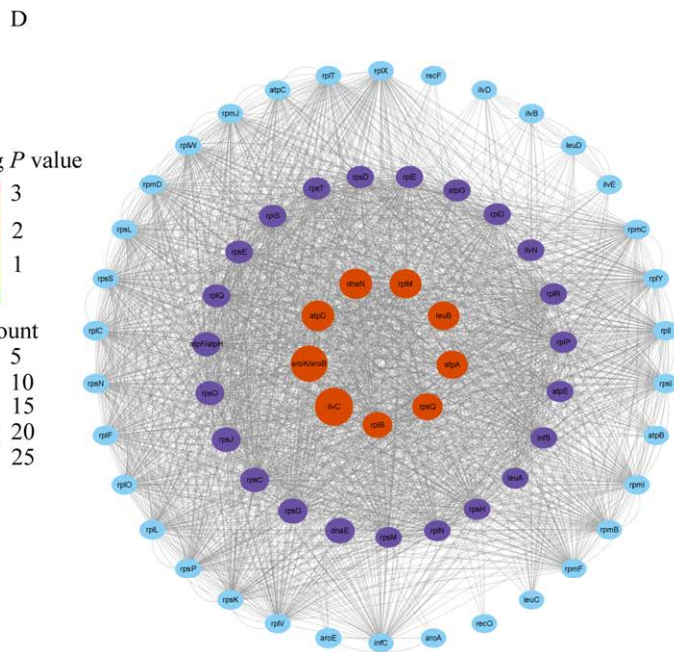
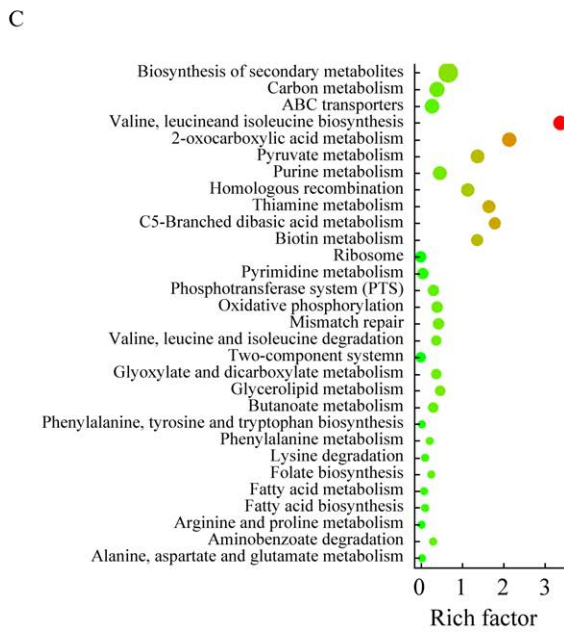
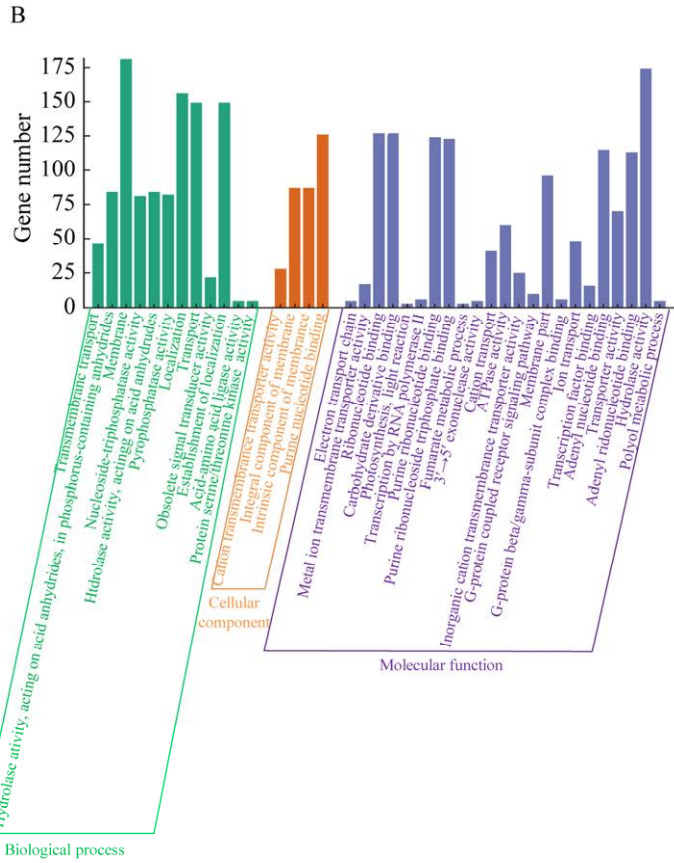
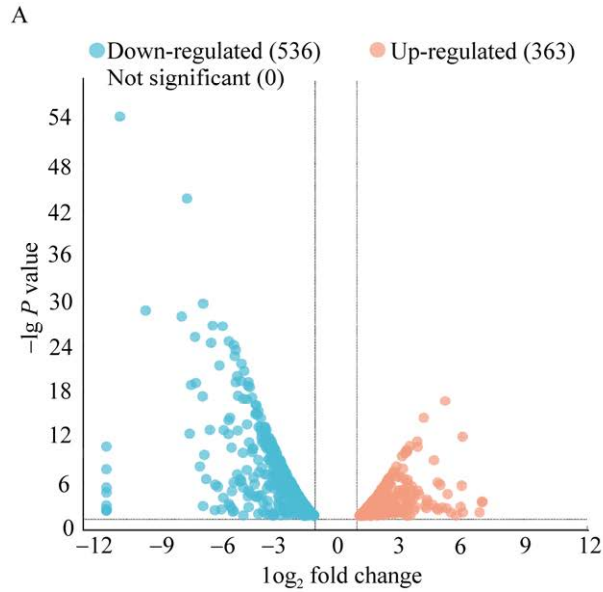
↑: Up-regulated gene; ↓: Down-regulated gene.

对腾冲嗜热厌氧杆菌的差异基因通过 GO 分析显示, 899 个差异表达基因富集于 1 812 个条目, 其中显著富集在 39 个条目中, 分别参与了细胞功能中的膜功能、生物过程中的定位、运输及分子功能中的嘌呤核苷酸结合, 碳水化合物衍生物结合, 水解酶活性等条目(图 3B)。

对腾冲嗜热厌氧杆菌的差异基因通过 KEGG 分析显示, 899 个差异表达基因定义了 53 个代谢途径, 差异表达基因主要富集在缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸的生物合成、ABC 转运系统、双组分系统、脂肪酸合成、硫胺素代谢等途径(图 3C); 缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸的生物合成途径的 11 个基因中有 6 个基因(*ilvD*、*ilvB*、*leuB*、*leuD*、*leuC*、*leuA*)表达上调, 2 个基因(*gdhA3*、*ilvE*)表达下调; 2-氧代羧酸代谢

途径的 20 个基因中, 7 个基因(*ilvD*、*ilvB*、*leuB*、*leuD*、*acnA*、*leuC*、*leuA*)表达上调, 1 个基因(*ilvE*)表达下调; 同源重组途径的 22 个基因中有 3 个基因(*dnaN*、*recO*、*recF*)表达上调, 3 个基因(*recD2*、*recJ2*、*ssb2*)表达下调; 在 ABC 转运系统的 73 个基因中有 8 个基因(*araH3*、*fecB2*、*btuC2*、*fepC2*、*rbsD*、*mglA*、*araH*、*rbsB*)表达上调, 1 个基因(*ugpB5*)表达下调; 在双组分系统途径的 56 个基因中, 2 个基因(*kdpB*、*baeS12*)表达上调; 在脂肪酸合成途径的 12 个基因中, 1 个基因(*fabG6*)表达下调; 在硫胺素代谢途径的 11 个基因中, 5 个基因(*tte2233*、*tte1733*、*thiM*、*thiD*、*nifS2*)表达上调。

根据 30 个 KEGG 代谢途径富集的 66 个差异表达基因的结果, 筛选出 66 个 DEGs 进行 PPI





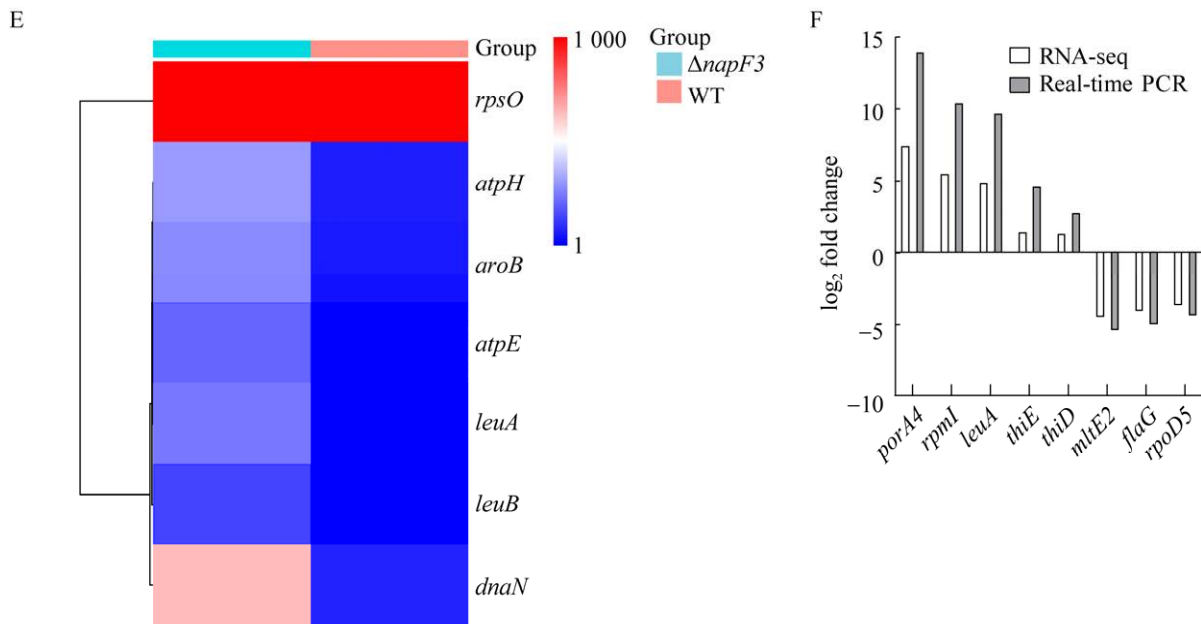


图 3 腾冲嗜热厌氧杆菌野生株和  $\Delta napF3$  株的转录组分析

Figure 3 Transcriptome analysis of WT and  $\Delta napF3$  strains in *Thermoanaerobacter tengcongensis*. A: Volcano plot of total DEGs in  $\Delta napF3$  compared with WT groups. B: GO functional enrichment pathways of DEGs. C: KEGG enrichment analysis of selected DEGs. D: The PPI networks of selected DEGs. E: Clustering diagram of major differentially expressed genes. F: Validation of DEGs by real-time PCR.

互相作用分析(图 3D), 发现有 74 个互作节点和 1 183 条边, 互相作用最强的基因是 *aroB*。通过 PPI 数据, 选择程度大于 10 的 DEGs, 利用 FPKM 作为表达水平来生成热图(图 3E)。热图中共有 7 个 DEGs, 其中 1 个基因(*rpsO*)下调, 6 个基因(*atpH*、*atpE*、*leuA*、*aroB*、*dnaN*、*leuB*)上调。

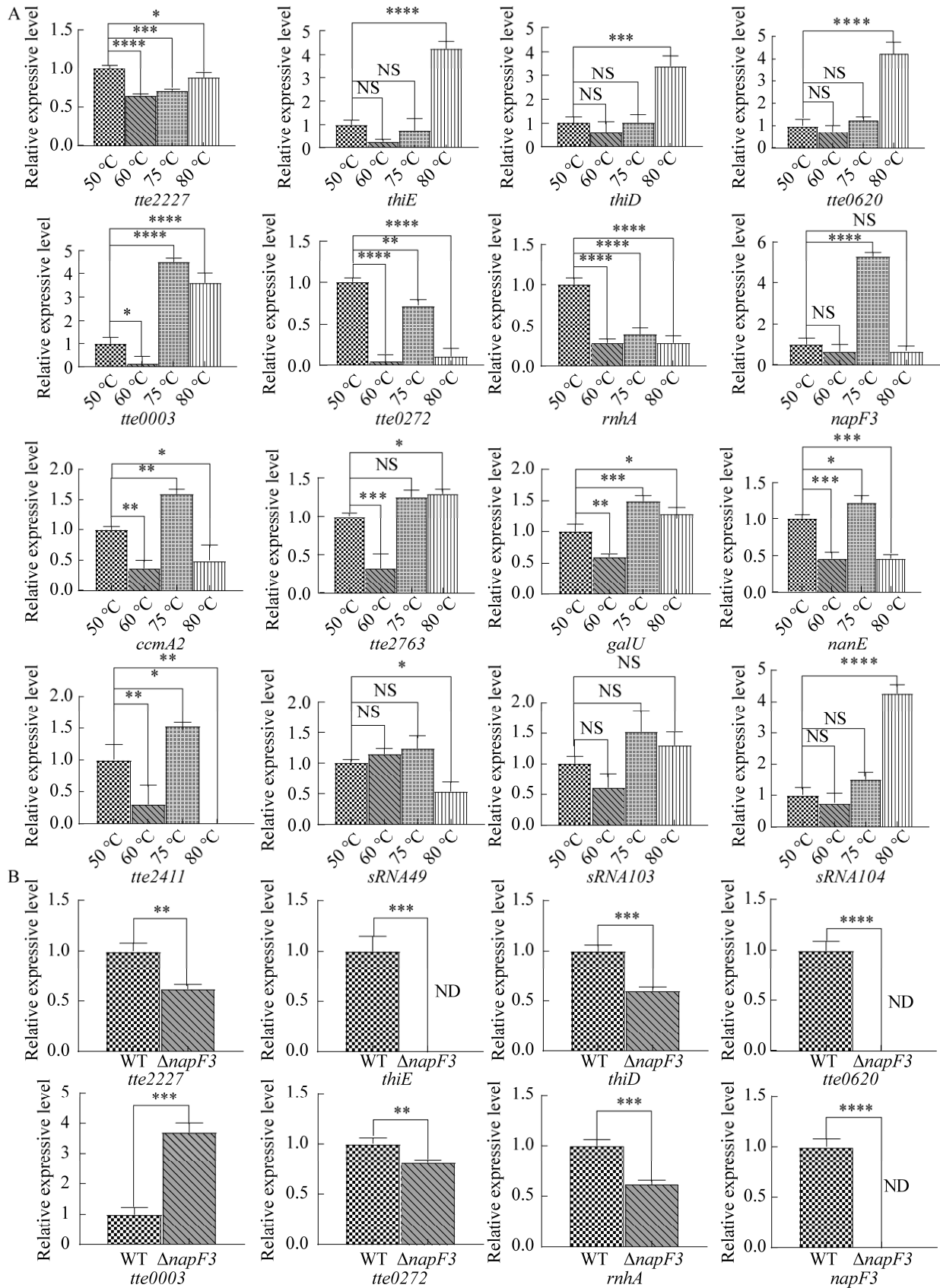
为了检验 RNA-seq 的测序结果, 对 5 个上调基因(*porA4*、*rpml*、*leuA*、*thiE*、*thiD*)和 3 个下调基因(*mltE2*、*flaG*、*rpoD5*)进行了荧光定量 PCR。所选基因通过荧光定量 PCR 的表达谱与 RNA-seq 检测的表达谱表现出相同的趋势, 两种方法的数量差异很小(图 3F)。

**2.4 不同条件下腾冲嗜热厌氧杆菌野生株和  $\Delta napF3$  株的嗜热相关基因的相对表达量**  
在 50、60、75、80 °C 条件下特定基因的表

达结果显示: 在 75 °C 条件下, *napF3* 表达量为差异极显著; 在 80 °C 条件下, *thiE*、*thiD*、*tte0620*、*sRNA104* 表达量为差异极显著(图 4A)。

在 60 °C 条件下,  $\Delta napF3$  相对野生株的各基因表达量中, *thiD*、*thiE*、*tte0620*、*tte003*、*rnhA*、*napF3*、*ccmA2*、*tte2763*、*galU*、*nanE*、*tte2411*、*sRNA104* 为差异极显著, *tte2227*、*tte072*、*sRNA49*、*sRNA103* 为差异非常显著, 另外 *thiE*、*tte0620*、*tte2763*、*galU*、*tte2411* 表达量太低未检测到荧光信号(图 4B)。

在 75 °C 条件下,  $\Delta napF3$  相对野生株的各基因表达量中, *tte0003*、*napF3*、*galU*、*nanE* 为差异极显著, *tte227*、*thiD*、*thiE*、*tte2411* 为差异非常显著, *tte0272*、*rnhA*、*sRNA49* 为差异显著, *tte0620*、*ccmA2*、*tte2763*、*sRNA103*、*sRNA104* 为差异不显著(图 4C)。



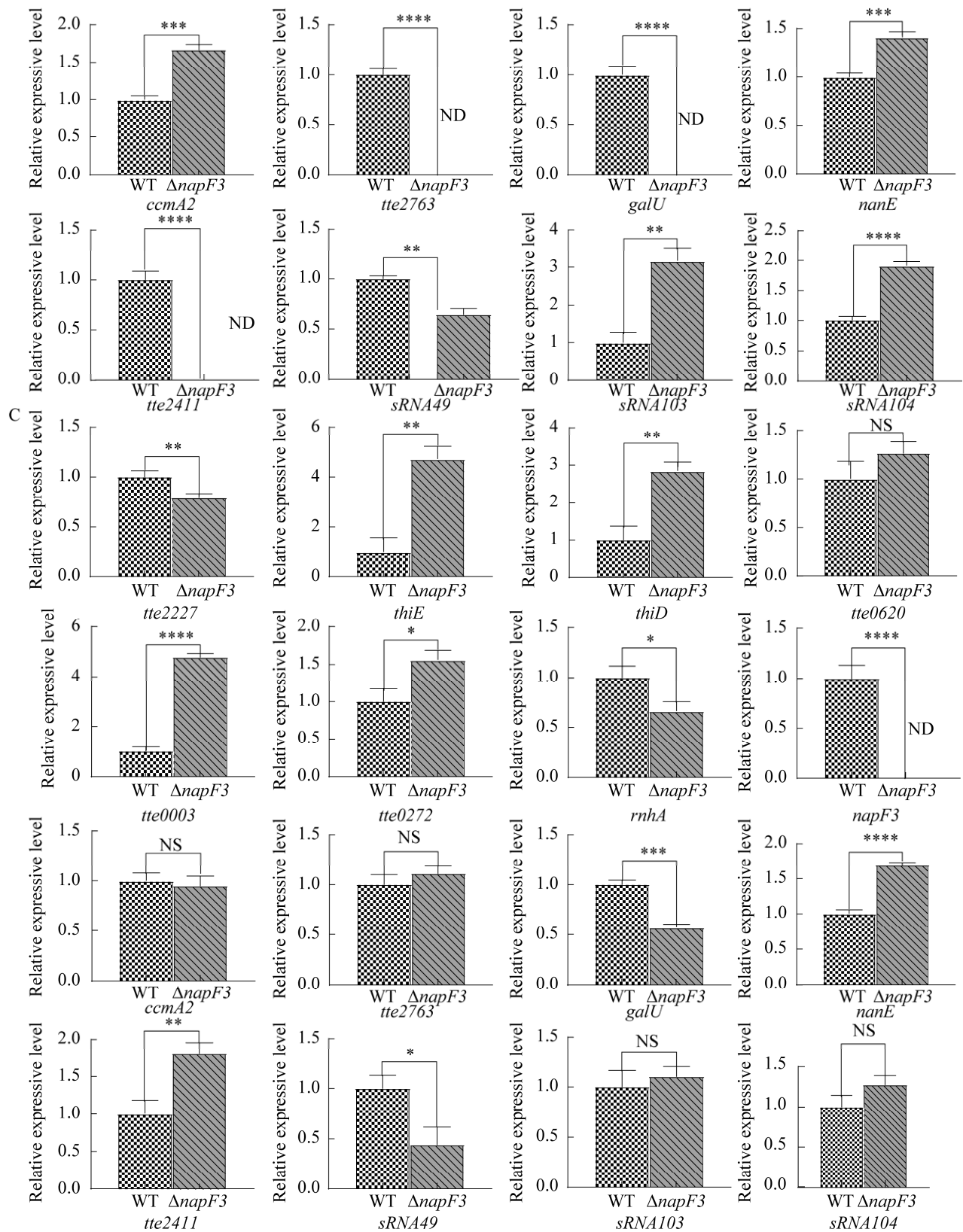


图 4 野生株和  $\Delta napF3$  在不同温度下的特定基因相对表达量分析

Figure 4 Analysis of relative expression of specific genes in  $\Delta napF3$  and WT strains at different temperatures. A: Analysis of relative expression levels of specific genes in WT strains at 50 °C, 60 °C, 75 °C, and 80 °C. B: Analysis of relative expression levels of specific genes of  $\Delta napF3$  and WT strains at 60 °C. C: Analysis of relative expression levels of specific genes of  $\Delta napF3$  and WT strains at 75 °C. ND: Not detected; NS: No significant difference; \*:  $P < 0.05$ ; \*\*:  $P < 0.01$ ; \*\*\*:  $P < 0.001$ ; \*\*\*\*:  $P < 0.0001$ .

### 3 讨论与结论

本研究成功构建了 *napF3* 敲除株，观察了其野生株在 50、60、75 和 80 °C 条件下的生长趋势。 $\Delta napF3$  株在 50 °C 和 80 °C 不生长，在 60 °C 和 75 °C 生长速度比野生株缓慢，这可能是由于 *napF3* 敲除后 2-氧代戊二酸-受体氧化还原酶亚基生物活性丧失，导致嗜热菌的能量供应发生障碍，因此推测 *napF3* 与嗜热厌氧杆菌热适应相关。*napF3* 在 75 °C 时，野生株中表达水平显著升高，可在 60 °C 和 80 °C 时表达水平与 50 °C 无明显区别，这与 Wang 等对嗜热厌氧杆菌不同温度的转录组学中 *napF3* 的分析结果一致<sup>[8]</sup>。此外 Chen 等发现在 75 °C 条件下，嗜热厌氧杆菌参与糖酵解和相关能量产生的几种蛋白质显著上调<sup>[16]</sup>。嗜热菌通过增强来自糖酵解的关键酶或将其他来源转化为葡萄糖的催化能力来增加糖酵解途径，是嗜热生物在环境胁迫下存活的有效解决方案。通过荧光定量 PCR 分析发现，在 60 °C 的  $\Delta napF3$  中，*tte0003*、*ccmA2*、*nanE*、sRNA103、sRNA104 表达量明显高于野生株。在 75 °C 的  $\Delta napF3$  中，*thiE*、*thiD*、*tte0003*、*tte0272*、*nanE*、*tte2411* 表达量明显高于野生株。其中，*thiE* 为硫胺素磷酸合成酶基因，*thiD* 为双功能羟甲基嘧啶/磷酸甲基嘧啶激酶基因，它们是硫胺素合成途径的关键基因，参与硫胺素的生物合成<sup>[22]</sup>；*napF3* 为铁氧还蛋白 2 基因，是 2-氧代戊二酸-受体氧化还原酶亚基，相关蛋白 NapF3 能在极端嗜热环境中提供稳定的

氧化还原电子载体，2-氧代戊二酸-受体氧化还原酶能催化  $\alpha$ -酮戊二酸氧化脱羧生成琥珀酰-CoA 和 CO<sub>2</sub>， $\alpha$ -酮戊二酸+辅酶 A+Fdox $\leftrightarrow$ 琥珀酰-CoA+CO<sub>2</sub>+Fdred<sup>[23]</sup>。因此，*napF3* 能够参与细胞膜脂质合成，是嗜热厌氧杆菌嗜热性的相关基因；*ccmA2* 为多药 ABC 转运蛋白 ATP 酶基因，其与维持细菌正常形态有关<sup>[24]</sup>，而正常的形态与嗜热厌氧杆菌热适应机制的运行息息相关。sRNA49、sRNA103、sRNA104 为非编码 RNA，其可能与嗜热相关蛋白表达的激活或抑制有关。因此，在  $\Delta napF3$  中发现 *tte0003*、*tte2227*、*ccmA2*、*thiD*、*thiE*、*tte0272*、*nanE*、*tte2411*、sRNA103、sRNA104 在特定温度下表达显著上调，这些基因产物和 sRNA 可能在不同温度下与 *napF3* 相互作用影响其功能的发挥。

分解代谢释放的高能电子需要通过合适的小分子或蛋白质电子载体暂时捕获。NAD (NAD<sup>+</sup>，还原时为 NADH) 和 NADP (NADP<sup>+</sup>，还原时为 NADPH) 是常见的电子载体，但鉴于其热不稳定性，NAD(P)<sup>+</sup> 的效用受限于许多情况<sup>[25]</sup>。此外，仅 320 mV 的中点电位限制了 NAD(P)H 的还原能力，因为 H<sub>2</sub>/H<sup>+</sup> 的中点电位为 414 mV，所以直接从 NADH 中还原质子是不可能的<sup>[26]</sup>。鉴于 NAD(P) 的局限性，许多物种编码蛋白质电子载体，其中最常见且丰富的称为铁氧还蛋白 (Fds)<sup>[27-28]</sup>。在极端嗜热环境中，Fds 以及相关蛋白，如黄素氧还蛋白、红素氧还蛋白、硫氧还蛋白和谷氧还蛋白，提供稳定的氧化还原电子载体<sup>[29]</sup>。

对差异表达基因进行 KEGG 分析发现, 在  $\Delta napF3$  中差异表达基因在缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸的生物合成、ABC 转运系统、双组分系统、脂肪酸合成、硫胺素代谢等途径富集程度最大。通过对 KEGG 中相关基因的通路分析发现, *aroB*、*dnaN*、*leuB*、*rpsO*、*atpH*、*atpE*、*leuA* 这 7 个基因为互作中心, *leuB*、*leuA* 在缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸的生物合成途径中发挥作用。亮氨酸和异亮氨酸的疏水作用有利于蛋白质折叠成更紧密的结构从而更有利于蛋白质的热稳定性<sup>[30]</sup>。在嗜热生物中 DNA 修复机制特别重要, 因为自发性 DNA 突变的比率在高温下升高<sup>[31]</sup>。脂肪酸含量会影响细胞膜的流动性<sup>[32]</sup>, 冷休克后, 腾冲嗜热厌氧杆菌中参与脂肪酸和磷脂生物合成的负调控基因 *paal* 上调 2.9 倍, 导致脂肪酸生物合成减少<sup>[33]</sup>。同样, 在敲除 *napF3* 后, 参与脂肪酸合成的 *fabG6* 表现出显著下调, 因此可以推断, *napF3* 可以通过影响膜流动性适应环境温度。

ABC 转运系统家族在不同的生物中执行多样的功能, 如抗酸性环境下的离子转运<sup>[34-35]</sup>。同时, ABC 转运系统在热压力和冷压力下起着重要的功能, 在热压力中, 超氧化物歧化酶和锌离子 ABC 转运蛋白上调, 而铁离子 ABC 转运蛋白下调。活性氧或活性氮清除活性也有所增加。为了响应较低的溶解度, 在转录水平上观察到硝酸盐呼吸的短暂激活<sup>[36]</sup>。在众多 ABC 转运系统家族基因作用下, 核糖、木糖、阿拉伯糖、半乳糖苷及铁离子相关基因显著上调。

双组分系统通常可以与生物体的系统发育位置、生活方式和遇到的典型环境挑战相关联。编码信号转导的数量, 可以用来衡量生物体适应不同条件的能力<sup>[37]</sup>。在  $\Delta napF3$  转录组中, 双组分系统中 *kdMpB* 显著上调, 促进  $K^+$  流动, 激活了能量传导和信号传导, 使基因表达

更加活跃, 从而参与调控了腾冲嗜热厌氧杆菌的热适应机制。

双功能羟甲基嘧啶/磷酸甲基嘧啶激酶基因 *thiD*, 噻唑激酶基因 *thiM* 显著上调, 证明硫胺素代谢途径参与腾冲嗜热厌氧杆菌的热适应机制的调控。硫胺素焦磷酸作为碳水化合物和氨基酸代谢所必需的酶的辅因子, 包括转酮酶、2-氧代酸脱羧酶、2-氧代酸脱氢酶和乙酰乳酸合成酶<sup>[21]</sup>。

本研究通过对  $\Delta napF3$  的分析, 更深入解析了 *napF3* 在热适应机制中所起到的作用, 该研究结果为更深入探索腾冲嗜热厌氧杆菌的热适应机制奠定了基础。

## 参考文献

- [1] GALTIER N, LOBRY JR. Relationships between genomic G+C content, RNA secondary structures, and optimal growth temperature in prokaryotes[J]. Journal of Molecular Evolution, 1997, 44(6): 632-636.
- [2] McDONALD JH. Patterns of temperature adaptation in proteins from the bacteria *Deinococcus radiodurans* and *Thermus thermophilus*[J]. Molecular Biology and Evolution, 2001, 18(5): 741-749.
- [3] MIRALLES F. Compositional properties and thermal adaptation of SRP-RNA in bacteria and Archaea[J]. Journal of Molecular Evolution, 2010, 70(2): 181-189.
- [4] SINGER GAC, HICKEY DA. Thermophilic prokaryotes have characteristic patterns of codon usage, amino acid composition and nucleotide content[J]. Gene, 2003, 317(1/2): 39-47.
- [5] de VENDITTIS E, CASTELLANO I, COTUGNO R, RUOCCO MR, RAIMO G, MASULLO M. Adaptation of model proteins from cold to hot environments involves continuous and small adjustments of average parameters related to amino acid composition[J]. Journal of Theoretical Biology, 2008, 250(1): 156-171.
- [6] XUE Y, XU Y, LIU Y, MA Y, ZHOU P. *Thermoanaerobacter tengcongensis* sp. nov., a novel anaerobic, saccharolytic, thermophilic bacterium isolated from a hot spring in Tengcong, China[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2001, 51(Pt 4): 1335-1341.

- [7] BAO QY, TIAN YQ, LI W, XU ZY, XUAN ZY, HU SN, DONG W, YANG J, CHEN YJ, XUE YF, XU Y, LAI XQ, HUANG L, DONG XZ, MA YH, LING LJ, TAN HR, CHEN RS, WANG J, YU J, et al. A complete sequence of the *T. tengcongensis* genome[J]. *Genome Research*, 2002, 12(5): 689-700.
- [8] WANG C, JIN CL, ZHANG JH, BAO QY, LIU B, TAN HR. Transcriptomic analysis of *Thermoanaerobacter tengcongensis* grown at different temperatures by RNA sequencing[J]. *Journal of Genetics and Genomics*, 2015, 42(6): 335-338.
- [9] 毛耀芳, 魏亚琴, 杨宇泽, 孙康永杰, 郑航辉, 王川, 万学瑞. 腾冲嗜热厌氧杆菌 *Cmr3* 的生物信息学分析及原核表达[J]. *基因组学与应用生物学*, 2021, 40(S2): 2643-2648.
- MAO YF, WEI YQ, YANG YZ, SUN KYJ, ZHENG HH, WANG C, WAN XR. Bioinformatics analysis and prokaryotic expression of thermophilic anaerobic bacterium *Cmr3* in Tengchong[J]. *Genomics and Applied Biology*, 2021, 40(S2): 2643-2648 (in Chinese).
- [10] 俞海山, 魏亚琴, 杨宇泽, 万学瑞, 王川, 曾巧英. 腾冲嗜热厌氧杆菌 *cmr4* 基因的表达及生物信息学分析[J]. *基因组学与应用生物学*, 2021, 40(S3): 3088-3094.
- YU HS, WEI YQ, YANG YZ, WAN XR, WANG C, ZENG QY. Expression and bioinformatics analysis of *cmr4* gene of thermophilic anaerobic bacteria in Tengchong[J]. *Genomics and Applied Biology*, 2021, 40(S3): 3088-3094 (in Chinese).
- [11] 王川, 刘原子, 魏亚琴, 毛婷, 杨宇泽, 俞海山, 张钊, 万学瑞. 腾冲嗜热厌氧杆菌 *Cas2* 原核表达及生物信息学分析[J]. *微生物学杂志*, 2021, 41(2): 10-16.
- WANG C, LIU YZ, WEI YQ, MAO T, YANG YZ, YU HS, ZHANG Z, WAN XR. Prokaryotic expression and bioinformatics analysis of *Cas2* in *Thermoanaerobacter tengcongensis*[J]. *Journal of Microbiology*, 2021, 41(2): 10-16 (in Chinese).
- [12] ZHOU XX, WANG YB, PAN YJ, LI WF. Differences in amino acids composition and coupling patterns between mesophilic and thermophilic proteins[J]. *Amino Acids*, 2008, 34(1): 25-33.
- [13] 郑航辉, 高昇, 杨宇泽, 吴润, 万学瑞, 王川, 刘磊. 腾冲嗜热厌氧杆菌 *ahpC* 编码基因的克隆表达及生物信息学分析[J]. *生物学杂志*, 2019, 36(5): 36-40.
- ZHENG HH, GAO S, YANG YZ, WU R, WAN XR, WANG C, LIU L. Cloning, expression and bioinformatics analysis of *ahpC* gene of *Thermoanaerobacter tengcongensis*[J]. *Journal of Biology*, 2019, 36(5): 36-40 (in Chinese).
- [14] WANG JQ, XUE YF, FENG XL, LI XL, WANG H, LI W, ZHAO CF, CHENG XJ, MA YH, ZHOU PJ, YIN JN, BHATNAGAR A, WANG R, LIU SQ. An analysis of the proteomic profile for *Thermoanaerobacter tengcongensis* under optimal culture conditions[J]. *Proteomics*, 2004, 4(1): 136-150.
- [15] WANG JQ, ZHAO CF, MENG B, XIE JH, ZHOU CQ, CHEN XS, ZHAO K, SHAO JM, XUE YF, XU NZ, MA YH, LIU SQ. The proteomic alterations of *Thermoanaerobacter tengcongensis* cultured at different temperatures[J]. *Proteomics*, 2007, 7(9): 1409-1419.
- [16] CHEN Z, WEN B, WANG QH, TONG W, GUO J, BAI X, ZHAO JJ, SUN Y, TANG Q, LIN ZL, LIN L, LIU SQ. Quantitative proteomics reveals the temperature-dependent proteins encoded by a series of cluster genes in *Thermoanaerobacter tengcongensis*[J]. *Molecular & Cellular Proteomics*, 2013, 12(8): 2266-2277.
- [17] BURKHART BW, FEBVRE HP, SANTANGELO TJ. Distinct physiological roles of the three ferredoxins encoded in the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus kodakarensis*[J]. *mBio*, 2019, 10(2): e02807-e02818.
- [18] LIU B, WANG C, YANG HH, TAN HR. Establishment of a genetic transformation system and its application in *Thermoanaerobacter tengcongensis*[J]. *Journal of Genetics and Genomics*, 2012, 39(10): 561-570.
- [19] LANGMEAD B, SALZBERG SL. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2[J]. *Nature Methods*, 2012, 9: 357-359.
- [20] YOUNG MD, WAKEFIELD MJ, SMYTH GK, OSHLACK A. Gene ontology analysis for RNA-seq: accounting for selection bias[J]. *Genome Biology*, 2010, 11(2): R14.
- [21] MAO XZ, CAI T, OLYARCHUK JG, WEI LP. Automated genome annotation and pathway identification using the KEGG Orthology (KO) as a controlled vocabulary[J]. *Bioinformatics*, 2005, 21(19): 3787-3793.
- [22] JURGENSON CT, BEGLEY TP, EALICK SE. The structural and biochemical foundations of thiamin biosynthesis[J]. *Annual Review of Biochemistry*, 2009, 78: 569-603.

- [23] HUGHES NJ, CLAYTON CL, CHALK PA, KELLY DJ. *Helicobacter pylori* porCDAB and oorDABC genes encode distinct pyruvate: flavodoxin and 2-oxoglutarate: acceptor oxidoreductases which mediate electron transport to NADP[J]. *Journal of Bacteriology*, 1998, 180(5): 1119-1128.
- [24] HAY NA, TIPPER DJ, GYGI D, HUGHES C. A novel membrane protein influencing cell shape and multicellular swarming of *Proteus mirabilis*[J]. *Journal of Bacteriology*, 1999, 181(7): 2008-2016.
- [25] ANDERSON BM, ANDERSON CD. The effect of buffers on nicotinamide adenine dinucleotide hydrolysis[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 1963, 238: 1475-1478.
- [26] SCHUT GJ, ZADVORNY O, WU CH, PETERS JW, BOYD ES, ADAMS MWW. The role of geochemistry and energetics in the evolution of modern respiratory complexes from a proton-reducing ancestor[J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2016, 1857(7): 958-970.
- [27] ATKINSON JT, CAMPBELL I, BENNETT GN, SILBERG JJ. Cellular assays for ferredoxins: a strategy for understanding electron flow through protein carriers that link metabolic pathways[J]. *Biochemistry*, 2016, 55(51): 7047-7064.
- [28] HANKE G, MULO P. Plant type ferredoxins and ferredoxin-dependent metabolism[J]. *Plant, Cell & Environment*, 2013, 36(6): 1071-1084.
- [29] MEYER J. Iron-sulfur protein folds, iron-sulfur chemistry, and evolution[J]. *JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 2008, 13(2): 157-170.
- [30] DIAS CL, ALA-NISSILA T, WONG-EKKABUT J, VATTULAINEN I, GRANT M, KARTTUNEN M. The hydrophobic effect and its role in cold denaturation[J]. *Cryobiology*, 2010, 60(1): 91-99.
- [31] LINDAHL T. Instability and decay of the primary structure of DNA[J]. *Nature*, 1993, 362(6422): 709-715.
- [32] GRAU R, de MENDOZA D. Regulation of the synthesis of unsaturated fatty acids by growth temperature in *Bacillus subtilis*[J]. *Molecular Microbiology*, 1993, 8(3): 535-542.
- [33] LIU B, ZHANG YH, ZHANG W. RNA-Seq-based analysis of cold shock response in *Thermoanaerobacter tengcongensis*, a bacterium harboring a single cold shock protein encoding gene[J]. *PLoS One*, 2014, 9(3): e93289.
- [34] CHENG J, GUFFANTI AA, KRULWICH TA. A two-gene ABC-type transport system that extrudes Na<sup>+</sup> in *Bacillus subtilis* is induced by ethanol or protonophore[J]. *Molecular Microbiology*, 1997, 23(6): 1107-1120.
- [35] TAHARA H, UCHIYAMA J, YOSHIHARA T, MATSUMOTO K, OHTA H. Role of Slr1045 in environmental stress tolerance and lipid transport in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC6803[J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2012, 1817(8): 1360-1366.
- [36] SHIH TW, PAN TM. Stress responses of thermophilic *Geobacillus* sp. NTU 03 caused by heat and heat-induced stress[J]. *Microbiological Research*, 2011, 166(5): 346-359.
- [37] GALPERIN MY. A census of membrane-bound and intracellular signal transduction proteins in bacteria: bacterial IQ, extroverts and introverts[J]. *BMC Microbiology*, 2005, 5: 35.