

阿拉伯海假交替单胞菌 N1230-9 几丁质裂解酶的功能

兰肖敏, 周敏婕, 王景, 朱四东, 杨季芳, 陈吉刚*

浙江万里学院 生物与环境学院, 浙江 宁波

兰肖敏, 周敏婕, 王景, 朱四东, 杨季芳, 陈吉刚. 阿拉伯海假交替单胞菌 N1230-9 几丁质裂解酶的功能[J]. 微生物学报, 2025, 65(4): 1774-1787.

LAN Xiaomin, ZHOU Minjie, WANG Jing, ZHU Sidong, YANG Jifang, CHEN Jigang. Functions of five chitin lyases from *Pseudoalteromonas arabiensis* N1230-9[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2025, 65(4): 1774-1787.

摘要: 【目的】几丁质裂解酶是细菌有效降解几丁质的关键酶。阿拉伯海假交替单胞菌 (*Pseudoalteromonas arabiensis*) N1230-9 拥有 5 个几丁质裂解酶编码基因 (*woc28159*、*woc28160*、*woc28161*、*woc27404* 和 *woc27232*)，对这 5 个基因的功能进行鉴定是解析该菌株具有高效几丁质降解能力的关键。【方法】通过生物信息学方法分析菌株 N1230-9 中的 5 个几丁质裂解酶在假交替单胞菌 44 个模式菌株中的分布规律；采用实时荧光定量 PCR 技术(RT-qPCR)检测菌株 N1230-9 中 5 个几丁质裂解酶编码基因在以几丁质为唯一碳源培养基中的转录水平；利用同源重组策略构建菌株 N1230-9 中 5 个几丁质裂解酶编码基因的单基因缺失突变体，并分析突变体的几丁质降解能力。【结果】有 33 株假交替单胞菌模式菌株拥有与菌株 N1230-9 几丁质裂解酶同源的蛋白；几丁质可以强烈诱导 *woc28159*、*woc28160*、*woc28161* 和 *woc27404* 的转录水平上调，且这 4 个基因的单基因缺失均在不同程度上削弱了菌株的几丁质降解能力。然而 *woc27232* 的转录水平不受几丁质的诱导，且该基因的缺失对菌株的几丁质降解能力无影响。【结论】几丁质酶 WOC28159 和 WOC28161 是菌株 N1230-9 降解几丁质所必需的酶，WOC28160 和 WOC27404 增强了菌株的几丁质降解效率，而 WOC27232 并不参与菌株 N1230-9 的几丁质降解过程。

关键词: 假交替单胞菌；阿拉伯海假交替单胞菌；几丁质裂解酶；几丁质酶

资助项目：全球变化与海气相互作用专项(二期) (GASI-04-HYDZ-02)；宁波市自然科学基金(2023J301)；浙江省生物工程一流学科创新基金(CX2024017)

This work was supported by the National Program on Global Change and Air-sea Interaction (Phase II) (GASI-04-HYDZ-02), the Ningbo Natural Science Foundation (2023J301), and the First-class Discipline of Biological Engineering of Zhejiang Province (CX2024017).

*Corresponding author. E-mail: jgchen@zww.edu.cn

Received: 2024-11-13; Accepted: 2025-01-24; Published online: 2025-02-27

Functions of five chitin lyases from *Pseudoalteromonas arabiensis* N1230-9

LAN Xiaomin, ZHOU Minjie, WANG Jing, ZHU Sidong, YANG Jifang, CHEN Jigang*

College of Biological & Environmental Sciences, Zhejiang Wanli University, Ningbo, Zhejiang, China

Abstract: [Objective] Chitin lyases are the key enzymes for bacteria to degrade chitin. *Pseudoalteromonas arabiensis* N1230-9 possesses five chitin lyase-encoding genes (*woc28159*, *woc28160*, *woc28161*, *woc27404*, and *woc27232*). Functional identification of these five genes is crucial for determining the ability of strain to degrade chitin. [Methods] The distribution patterns of five chitin lyases from strain N1230-9 in 44 model strains of *Pseudomonas* were analyzed by bioinformatics methods. The transcription levels of five chitin lyase-encoding genes of strain N1230-9 cultured in the medium with chitin as the sole carbon source were analyzed by RT-qPCR. The mutants with deletion of chitin lyase-encoding genes were constructed by homologous recombination, and their abilities to degrade chitin were evaluated. [Results] Thirty-three *Pseudoalteromonas* strains possessed chitin lyase homologous proteins of strain N1230-9. Chitin significantly upregulated the transcription levels of *woc28159*, *woc28160*, *woc28161*, and *woc27404*, and the deletion of each of the four genes weakened the chitin-degradation ability. The transcription level of *woc27232* was not affected by chitin, and the deletion of this gene did not affect the chitin-degradation ability of the strain. [Conclusion] WOC28159 and WOC28161 are necessary for the degradation of chitin by strain N1230-9. WOC28160 and WOC27404 endow strain N1230-9 with efficient chitin-degrading ability, while WOC27232 does not participate in the chitin degradation process.

Keywords: *Pseudoalteromonas*; *Pseudoalteromonas arabiensis*; chitin lyase; chitinase

几丁质(甲壳素)是由 *N*-乙酰氨基葡萄糖(GlcNAc)通过 β -1,4 糖苷键连接而成的天然聚合物。其以结晶纤维的形式广泛存在于硅藻、原生生物、真菌等单细胞生物,以及海绵、珊瑚、软体动物、节肢动物等多细胞生物中^[1]。几丁质不仅是地球上最丰富的含氮多糖,也是许多细菌的碳源或氮源^[2]。尽管全球海洋环境中每年几丁质的产量约为 10^{11} t,但其在海洋沉积物中的积累却十分有限^[3-4],这主要归因于海洋细菌对几丁质的降解作用^[5-6]。

几丁质降解菌通常通过多种几丁质酶的协同作用降解几丁质^[7],这些几丁质酶主要分布于

糖苷水解酶(glycoside hydrolases, GHs)中的GH18、GH19和GH20家族中(CAZy, <http://www.cazy.org>)^[8]。除了拥有GH家族几丁质酶外,某些几丁质降解菌还拥有隶属于辅助酶AA10家族的多糖裂解单加氧酶(lytic polysaccharide monooxygenases, LPMOs)。LPMOs通过氧化作用裂解多糖链(主要作用于C1和C4位点),降低多糖表面氧化位点附近区域的结晶度,从而使多糖更易于被糖苷水解酶降解^[9]。

假交替单胞菌(*Pseudoalteromonas*)不仅是海洋环境的特有种群,也是海洋环境中的主要

几丁质降解者，其能通过降解甲壳动物的尸体或碎屑，为深海系统中的原核生物提供碳源和氮源^[10]。基因组分析结果表明，假交替单胞菌属中的多个种群普遍拥有多个几丁质裂解酶编码基因，其中包括一个保守的几丁质降解基因簇 *chiC-lpmo-chiA* (以下简称“CLC”)^[11-12]。尽管假交替单胞菌的多个几丁质裂解酶的酶学特性已被表征^[13-15]，但仅凭这些酶的酶学数据无法准确判断它们的确切功能，尤其是无法确定位于基因簇 CLC 之外的几丁质裂解酶基因是否为“冗余”基因。因此，本研究以一株高效几丁质降解菌——阿拉伯海假交替单胞菌 (*Pseudoalteromonas arabiensis*) N1230-9 为研

究对象，通过生物信息学方法、实时荧光定量 PCR (RT-qPCR)技术和同源重组策略，对该菌株中的 5 个几丁质裂解酶的功能进行了分析。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒

实验菌株阿拉伯海假交替单胞菌 (*Pseudoalteromonas arabiensis*) N1230-9 是从太平洋表层海水中分离获得的一株几丁质降解菌^[16]；本研究使用的其他菌株和质粒如表 1 所示。

表1 本研究使用的菌株和质粒

Table 1 Plasmids and bacterial strains used in this study

Strains and plasmids	Genotype/Relevant characteristics	Source
<i>Escherichia coli</i> strains		
DH5α	F [−] Φ80lacZΔM15Δ(<i>lacZYA-argF</i>) U169 <i>recA1 endA1 hsdR17</i> (rK [−] , mK ⁺) <i>phoA supE44</i> λ [−] <i>thi-1 gyrA96 relA1</i>	Invitrogen
WM3064	Donor strain for conjugation, diaminopimelate (DAP) auxotrophic	[17]
<i>Pseudoalteromonas arabiensis</i> strains		
N1230-9	Wild-type strain isolated from Pacific seawater	[16]
Δ <i>woc28159</i>	N1230-9 with the chromosomal <i>woc28159</i> gene deleted	This study
Δ <i>woc28160</i>	N1230-9 with the chromosomal <i>woc28160</i> gene deleted	This study
Δ <i>woc28161</i>	N1230-9 with the chromosomal <i>woc28161</i> gene deleted	This study
Δ <i>woc27232</i>	N1230-9 with the chromosomal <i>woc27232</i> gene deleted	This study
Δ <i>woc27404</i>	N1230-9 with the chromosomal <i>woc27404</i> gene deleted	This study
Plasmids		
pK18 <i>mobsacB</i> -Ery	Kan ^R , Ery ^R , suicide vector for gene knockout	[17]
pK18 <i>mobSacB</i> -Ery- <i>woc28159</i>	pK18 <i>mobsacB</i> -Ery with 1 478 bp upstream fragment and 719 bp downstream fragment of <i>woc28159</i>	This study
pK18 <i>mobSacB</i> -Ery- <i>woc28160</i>	pK18 <i>mobsacB</i> -Ery with 622 bp upstream fragment and 836 bp downstream fragment of <i>woc28160</i>	This study
pK18 <i>mobSacB</i> -Ery- <i>woc28161</i>	pK18 <i>mobsacB</i> -Ery with 760 bp upstream fragment and 1 300 bp downstream fragment of <i>woc28161</i>	This study
pK18 <i>mobSacB</i> -Ery- <i>woc27232</i>	pK18 <i>mobsacB</i> -Ery with 558 bp upstream fragment and 412 bp downstream fragment of <i>woc27232</i>	This study
pK18 <i>mobSacB</i> -Ery- <i>woc27404</i>	pK18 <i>mobsacB</i> -Ery with 441 bp upstream fragment and 417 bp downstream fragment of <i>woc27404</i>	This study

Kan^R: Kanamycin resistance; Ery^R: Erythromycin resistance.

1.1.2 引物

用于 RT-qPCR 扩增、基因缺失突变体构建和 DNA 测序的引物如表 2 所示。

1.1.3 培养基和菌株培养条件

大肠杆菌(*Escherichia coli*) DH5 α 培养采用 LB 培养基; *E. coli* WM3064 培养使用含 2,6-二氨基庚二酸(2,6-diaminopimelic acid, DAP)的 LB 培养基(LB-DAP)^[17]; 菌株 *P. arabiensis* N1230-9

及其基因缺失突变体培养使用 Marine Broth/Agar 2216 培养基(以下简称 2216 培养基); 菌株接合实验和二次同源重组菌株筛选分别使用 LB-DAP 固体培养基和 2216-蔗糖培养基^[17]。根据实验需求, 在培养基中添加 50 $\mu\text{g/mL}$ 的卡那霉素或 30 $\mu\text{g/mL}$ 的红霉素。*E. coli* 菌株的培养温度为 37 $^{\circ}\text{C}$; *P. arabiensis* N1230-9 及其基因缺失突变体的培养温度为 25 $^{\circ}\text{C}$ 。

表2 用于实时RT-qPCR、突变体构建和DNA测序的引物

Table 2 Primers for RT-qPCR, the construction of mutant strains, and for DNA sequencing

Primers name	Primer sequences (5'→3')	Restriction enzyme cutting site
woc28159-f-qPCR	GCACAAGCTGCAGTTGATTGC	
woc28159-r-qPCR	GACAACGCTGTCACAAGC	
woc28160-f-qPCR	GTGGCAAGCACCATGTTGCTT	
woc28160-r-qPCR	TGCTGCTCGACAAGCTAG	
woc28161-f-qPCR	CAGTGAATGCATGGAGTGGT	
woc28161-r-qPCR	TTCCTGCGCGCACAAGT	
woc27404-f-qPCR	GTTGCTCTTATCGCCTCTGCT	
woc27404-r-qPCR	ATTGTCCCTCGTTTCAAGCGC	
woc27232-f-qPCR	GCTAACACAAGGTGCCTTACC	
woc27232-r-qPCR	GCAATGACTGCAATAAGCGTA	
rpoD-f-qPCR	GCACCTGATGCCGATGAATTA	
rpoD-r-qPCR	CATGTACATGCGGACAGGGTC	
woc28159-Uf	AAC <u>TGCAG</u> CGAATAATAATGCCTATGAAGCCAAGTG	<i>Pst</i> I
woc28159-Ur	CGCG <u>TGAC</u> GTAAACAAGTAGCCTGAAGATGGAGAAG	<i>Sal</i> I
woc28159-Df	CGCG <u>TGAC</u> GAGGAACAGGCGTTGGTGAGAAGA	<i>Sal</i> I
woc28159-Dr	GCT <u>CTAG</u> AGCCATTACATCCACAGCCATAC	<i>Xba</i> I
woc28159-wS	GCAGTTGATTGCAGTAATCTTGAAGTATGG	
woc28159-wA	CGATACCTAATGCTCCGTTACCACAT	
woc28159-dS	TTCTCCATCTTCAGGCTACTTGTTACG	
woc28159-dA	ATACATCACTTGGGCATTTACGGTTTG	
woc28160-Uf	CCC <u>AAGCTT</u> CTACAGCGAGAACACAACAATGAA	<i>Hind</i> III
woc28160-Ur	CG <u>GAATTC</u> GACCAGCAGGAATTGAGACACT	<i>Eco</i> R I
woc28160-Df	CG <u>GAATTC</u> GACGCTGGACCAACAGATTCA	<i>Eco</i> R I
woc28160-Dr	CGCG <u>GATC</u> CTTGATAGGTTACTTCGGCACTG	<i>Bam</i> H I
woc28160-wS	TTAACTCAATAAAGCGGAGCAAGGAGA	
woc28160-wA	GCCACCGACAACAGCGTCTT	
woc28160-dS	GGAATGACTTAGAGTTAGTTGCTGAATACG	
woc28160-dA	ATACATCACTTGGGCATTTACGGTTTG	

(待续)

(续表2)

Primers name	Primer sequences (5'→3')	Restriction enzyme cutting site
woc28161-Uf	CGCGT <u>CGAC</u> GTGAGGTGAATTTAGAAGGGACAGGAT	<i>Sal</i> I
woc28161-Ur	CGGAATTCAGGCGACGAAGGTGTCACGATT	<i>Eco</i> R I
woc28161-Df	CGGAATTCGTGTAGATGCTGGTGGTGTTCCTTAT	<i>Eco</i> R I
woc28161-Dr	CGCGGATCCGTCACCTTGGTCGCCGCTGTTAT	<i>Bam</i> H I
woc28161-wS	GCAGCCATTGGTGTTCATTATTCG	
woc28161-wA	TTGAATTGCGTTATCGGTTGTGTAAGC	
woc28161-dS	TCAGTGGGTGGTTGGACGTTATCA	
woc28161-dA	CGGCTGCTTTAGAGGGAAATCACATTA	
woc27404-Uf	AACTGCAGACGATTGTTGATGACCCGAATAAC	<i>Pst</i> I
woc27404-Ur	CGCGT <u>CGAC</u> CCATTCTTCGAGTTGTAATGGGTGTC	<i>Sal</i> I
woc27404-Df	CGCGT <u>CGAC</u> CTCAGTGCGGGAATCGGATAC	<i>Sal</i> I
woc27404-Dr	CGCGGATCCGTGTTAGCGTGTCAACGACTGTTACTTG	<i>Bam</i> H I
woc27404-wS	CTTGCTCTGCAAGTTGCTCTTATC	
woc27404-wA	GTAATATGCCCAGTCTGCTTCCCA	
woc27404-dS	GAAGCTATTACACCTAACAATGCAAGC	
woc27404-dA	ACCTTGAGTCCACCACTTAGC	
woc27232-Uf	CCGCTCGAGTGAATAGGTAAGGGTGTATTGACCAAC	<i>Xho</i> I
woc27232-Ur	CGCGT <u>CGAC</u> CAATTAACACAGCAAGGACAACCG	<i>Sal</i> I
woc27232-Df	CGCGT <u>CGAC</u> CGCAAGTGCGGCAGGTATAAC	<i>Sal</i> I
woc27232-Dr	CGCGGATCCGTTATTGGCACAATTGGTGTGAT	<i>Bam</i> H I
woc27232-wS	CCATTGGCTTGCACATAGTGT	
woc27232-wA	CTTGAGCAAGCAGCCGTAACA	
woc27232-dS	TGTATCGACACTACCCGTGAC	
woc27232-dA	ATGACTGCAATAAGCGTATCTGTACTC	
pK18-f	ATTCCGCTGGCAGCTTAAG	
PK18-r	GGTAACGCCAGGGTTTTCC	

Underlined and italicized sequences indicate restriction enzyme cutting sites.

无机盐溶液(g/L): NH_4Cl 0.500, NaCl 30.000, $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 3.000, K_2SO_4 2.000, K_2HPO_4 0.200, CaCl_2 0.010, $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.006, $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.005, $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.004, Tris 6.000。

几丁质培养基: 在无机盐溶液中添加质量体积分数为 3% 终浓度的胶体几丁质或 1% 终浓度的颗粒几丁质。如需配制几丁质固体培养基, 则在几丁质液体培养基中加入 16 g/L 的琼脂粉。

葡萄糖培养基: 在无机盐溶液中添加质量体积分数为 0.25% 的葡萄糖。

LB 培养基、Marine Broth/Agar 2216 培养基, BD 公司。

1.1.4 主要试剂和仪器

几丁质, Sigma-Aldrich 公司; 葡萄糖、T4 DNA 连接酶、*Eco*R I、*Bam*H I、*Pst* I、*Sal* I、*Hind* III、*Xho* I、*Xba* I, 宝生物工程(大连)有限公司; PCR 扩增试剂盒、DNA 回收试剂盒、RNA 提取试剂盒 RNAPure Bacteria Kit (DNase I)、逆转录试剂盒 HiFiScript gDNA Removal RT MasterMix、RT-qPCR 试剂盒

SuperStar Universal SYBR Master Mix, 江苏康为世纪生物科技股份有限公司。

PCR 仪, Eppendorf 公司; 小型台式高速冷冻离心机, Starorius 公司; 恒温振荡摇床, New Brunswick Scientific 公司; 蛋白核酸测定分光光度计(NanoDrop), ThermoFisher Scientific 公司; 荧光定量 PCR 仪, Bio-Rad 公司; 紫外分光光度计, 上海美谱达仪器有限公司。

1.2 几丁质酶编码基因生物信息学分析

使用 MAFFT (<http://mafft.cbrc.jp/alignment/server>)进行氨基酸序列同源比对; 使用 SignalP 6.0 (<https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?SignalP-6.0>)预测蛋白信号肽; 使用 Compute pI/MW (<https://www.expasy.org/resources/compute-pi-mw>)预测蛋白质分子量及等电点; 使用 InterPro 数据库(<https://www.ebi.ac.uk/interpro/>)^[18]预测结构域; 使用 NCBI BLASTp (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>)和 JGI IMG 数据库(<https://img.jgi.doe.gov/>)进行同源蛋白序列搜索与比对; 从 NCBI 数据库下载 44 株假交替单胞菌属模式菌株的基因组序列, 使用 TYGS 在线服务器(<https://www.dsmz.de/services/online-tools/tygs>)构建基因组系统发育树; 使用 MEGA v7.0.20 构建假交替单胞菌几丁质酶系统发育树, 并使用 Chiplot (<https://www.chiplot.online/>)^[19]进行美化; 使用 GraphPad Prism v9.5.1 进行图表绘制。

1.3 几丁质裂解酶编码基因的转录分析

挑取菌株 N1230-9 单菌落接种至 2216 培养基中, 于 25 °C、180 r/min 振荡培养至细菌对数生长期中期(OD_{600} 约为 0.6)。取培养物, 5 000 r/min 离心 3 min 收集菌体。菌体用无菌海水洗涤 2 次后, 用无菌海水将细胞浓度调整至 OD_{600} 值为 0.5。吸取菌悬液按照 1:100 的体积比分别接种至胶体几丁质培养基和葡萄糖培养基中, 于 25 °C、180 r/min 振荡培养至细菌生长的

对数前期(OD_{600} 约为 0.15)和对数后期(OD_{600} 约为 0.55)。利用 RNApure Bacteria Kit (DNase I)提取细胞 RNA, 并通过逆转录试剂盒 HiFiScript gDNA Removal RT MasterMix 获得 cDNA。利用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 质量, 并用 NanoDrop 2000 对 RNA 和 cDNA 进行定量。利用 SnapGene v6.0.2 软件设计 5 个几丁质裂解酶基因和 RNA 聚合酶 δ 因子 *rpoD* 的特异性引物对(表 2), 使用 SuperStar Universal SYBR Master Mix 配制 RT-qPCR 反应体系, 以 *rpoD* (GenBank 登录号为 WP_011327061)为内参基因进行 RT-qPCR 扩增反应。RT-qPCR 反应体系(20 μ L): 2 $\times$ TransStart Green qPCR SuperMix 10 μ L, cDNA 模板(10 ng/ μ L) 1 μ L, 正、反引物(0.2 μ mol/L)各 0.4 μ L, ddH₂O 8.2 μ L。反应条件: 95 °C 30 s; 95 °C 10 s, 60 °C 30 s, 42 个循环; 95 °C 15 s, 绘制熔解曲线, 采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法进行数据分析^[20], 利用 GraphPad Prism v9.5.1 软件对目标基因在胶体几丁质培养基和葡萄糖培养基中的相对表达量进行显著性差异分析。 $P < 0.05$ 为显著差异, $P < 0.000 1$ 为极显著差异。每个样品均设置 3 个以上生物学平行。

1.4 基因缺失突变体构建

采用假交替单胞菌基因敲除系统^[17], 按金佳凡等^[21]的实验步骤进行菌株 N1230-9 的靶基因敲除。具体操作如下: 首先, 使用 2 对特异性引物对(*wocX*-Uf/*wocX*-Ur 和 *wocX*-Df/*wocX*-Dr, 其中“X”代表靶基因编号, 表 2)分别扩增靶区上下游片段。接着, 通过限制性内切酶对上下游片段进行单酶切, 并使用 T4 连接酶连接上下游片段获得同源臂。随后, 以同源臂为模板, 利用引物对 *wocX*-Uf 和 *wocX*-Dr 进行 PCR 扩增, 获得完整的同源臂片段。该片段依次经双酶切和割胶回收纯化后, 将其亚克隆至自杀质粒 pK18*mobsacB*-Ery 中, 获得重组自杀质粒。

将重组质粒转化至大肠杆菌 WM3064 中, 并利用引物对 pK18-f/pK18-r 对转化子进行 DNA 测序验证。之后, 通过接合转移的方式将 WM3064 中的重组自杀质粒导入到目标菌株 N1230-9 中。基于同源重组的 2 次交换原理, 实现靶基因的无痕敲除。在阳性克隆的筛选过程中, 利用含有红霉素的 2216 培养基筛选发生一次交换的克隆, 并通过引物对 *wocX*-dS/*wocX*-wA 对潜在的阳性克隆进行 PCR 验证; 利用 2216-蔗糖培养基筛选出双交换突变株, 并利用 3 对引物对(*wocX*-wS/*wocX*-wA、*wocX*-dS/*wocX*-dA 和 *wocX*-dS/*wocX*-wA)对疑似阳性克隆进行 PCR 验证, 以确保靶基因的成功敲除。

1.5 基因缺失突变体几丁质降解能力测试

按 1.3 节中描述的步骤分别制备野生菌株和各个突变体的培养物, 并用无菌海水将细胞浓度调整至 OD_{600} 值为 0.5。吸取菌悬液按照 1:100 的体积比分别接种至 2216 培养基和几丁质液体培养基中, 于 25 °C、180 r/min 培养。培养期间定时取样, 用分光光度法检测培养物的 OD_{600} 值。每一种培养基均设 3 个生物学平行。同时取上述菌悬液各 10 μ L 滴加至几丁质固体培养基中央, 于 25 °C 恒温培养箱正置培养 36 h, 观察透明圈产生情况并拍照留存。每个样品均设置 3 个以上生物学平行。

2 结果与分析

2.1 菌株 N1230-9 几丁质裂解酶在假交替单胞菌中的分布规律

菌株 N1230-9 的基因组编码 5 个几丁质裂解酶, 包括 3 个 GH18 家族的几丁质酶 (GenBank 登录号分别为 WOC28159、WOC28161 和 WOC27232), 1 个 GH19 家族的几丁质酶 (GenBank 登录号为 WOC27404), 以及 1 个 AA10 家族的多糖裂解单加氧酶 (LPMO,

GenBank 登录号为 WOC28160), 其中 WOC28159、WOC28160 和 WOC28161 的编码基因位于小染色体上, 形成一个几丁质降解基因簇 (CLC), 而 WOC27232 和 WOC27404 的编码基因则散在地分布于大染色体上。信号肽预测结果表明, 菌株 N1230-9 中的 5 个几丁质裂解酶均含有信号肽序列, 提示它们可能均为分泌酶。蛋白结构域预测结果显示, WOC27404 含有一个未知的 GH19 家族结构域, 而其他 3 个几丁质酶则均拥有一个 GH18 家族的糖苷水解酶催化结构域。此外, 4 个几丁质酶均含有 1–2 个第 5 家族的几丁质结合模块。基因组系统发育树分析显示, 45 株假交替单胞菌形成 2 个大的分支, 其中 15 株有色菌株聚为一支, 而无色菌株和另外 2 株有色菌株则聚为另一支 (图 1)。同源对比结果显示, 33 株假交替单胞菌含有 1–2 个 CLC, 其中 17 株菌株同时拥有 WOC27404 的直系同源蛋白, 且这 17 株菌株均为有色菌株 (图 1)。此外, 通过同源比对仅发现 1 株假交替单胞菌模式菌株拥有 WOC27232 的直系同源蛋白, 且该菌株同样为有色菌株 (图 1)。

2.2 四个几丁质酶的系统发育分析

系统发育树分析显示, 4 个几丁质酶及其假交替单胞菌来源的同源蛋白形成了 4 个分支, 其中隶属于 GH19 家族的 WOC27404 及其同源蛋白形成了 1 个独立的分支 (图 2)。NCBI BLASTp 同源比对结果表明, WOC27404 与一些弧菌和部分陆源细菌的 GH19 家族几丁质酶具有同源性, 且与弧菌的 GH19 家族几丁质酶的一致性较高 (73.86%–91.61%), 而与陆源细菌的 GH19 家族几丁质酶的一致性较低 (26.17%–41.71%)。系统发育树显示, WOC27404 与非假交替单胞菌来源的 GH19 家族几丁质酶形成了 2 个分支, 其中 WOC27404 与陆源细菌的 GH19 家族几丁质酶明显分离 (图 3)。

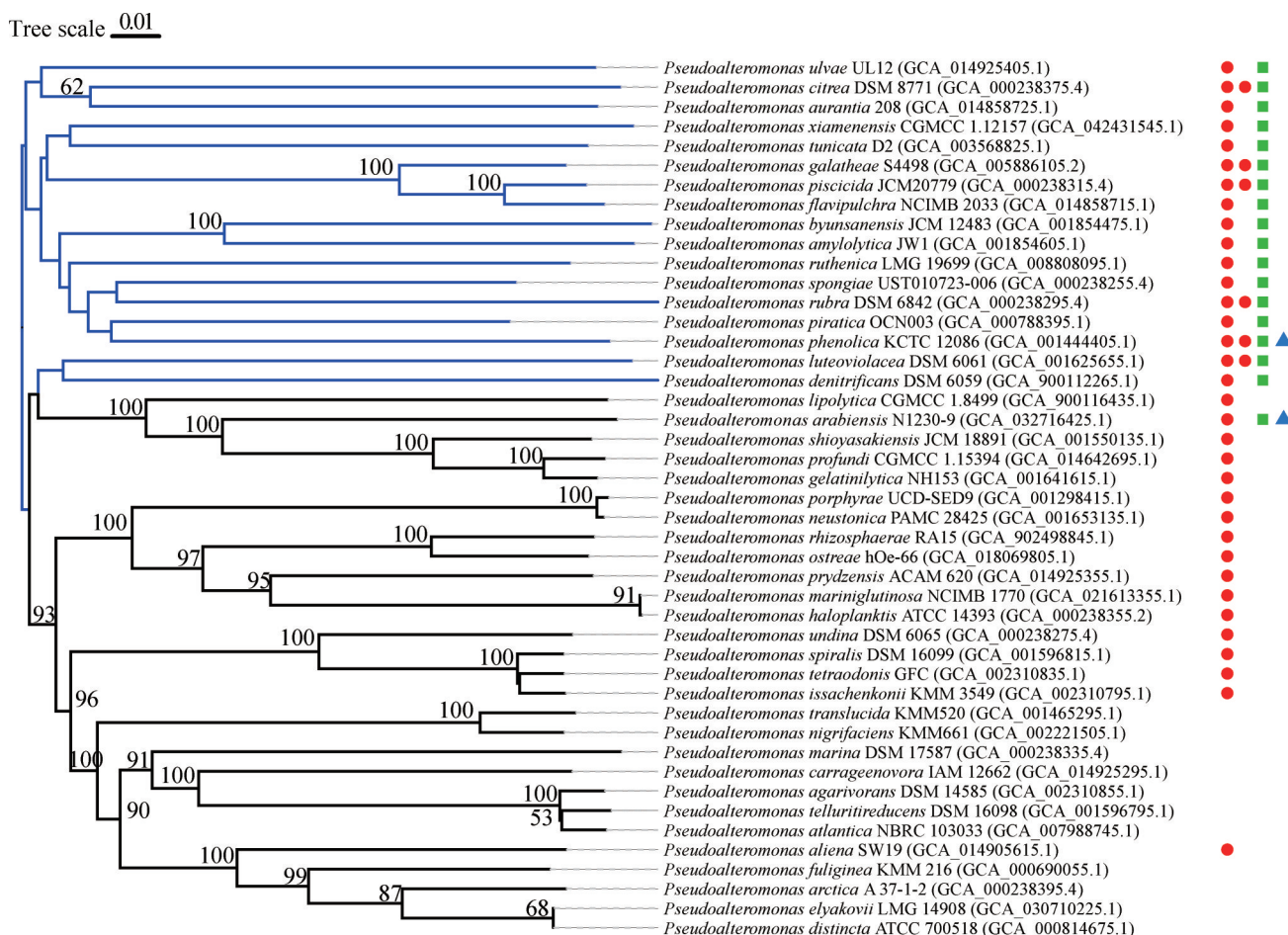


图1 阿拉伯海假交替单胞菌N1230-9的5个几丁质裂解酶的直系同源蛋白在假交替单胞菌中的分布

Figure 1 Distribution of orthologous proteins of five chitin lyases from *Pseudoalteromonas arabiensis* N1230-9 in *Pseudoalteromonas*. Phylogenomic tree based on genome sequences in the TYGS tree inferred with FastME 2.1.6.1^[22] from genome BLAST distance phylogeny approach (GBDP); Distances calculated from genome sequence. The branch lengths are scaled in terms of GBDP distance formula d5. The numbers above branches are GBDP pseudo-bootstrap support values>50.0% from 100 replications. Different symbols indicate *chic-lpmo-chiA* cluster (CLC, filled circle), WOC27404 and its homologs (filled squares), and WOC27232 and its homologs (filled triangles). Blue branches and black branches indicate pigmented *Pseudoalteromonas* species and nonpigmented *Pseudoalteromonas* species, respectively.

2.3 五个几丁质裂解酶基因的转录水平分析

在几丁质培养基和葡萄糖培养基中，对菌株 N1230-9 中 5 个几丁质裂解酶基因的转录水平进行了检测，结果如图 4 所示。相较于葡萄糖培养基，除 *woc27232* 在几丁质培养基中的转

录水平未发生显著上调外，其余 4 个几丁质裂解酶基因的转录水平均显著上调，其中位于 CLC 基因簇内的 3 个裂解酶基因(*woc28159*、*woc28160* 和 *woc28161*)在 2 个检测时间点均表现出显著的转录上调，而 *woc27404* 则仅在对数生长期前期表现出显著的转录上调。

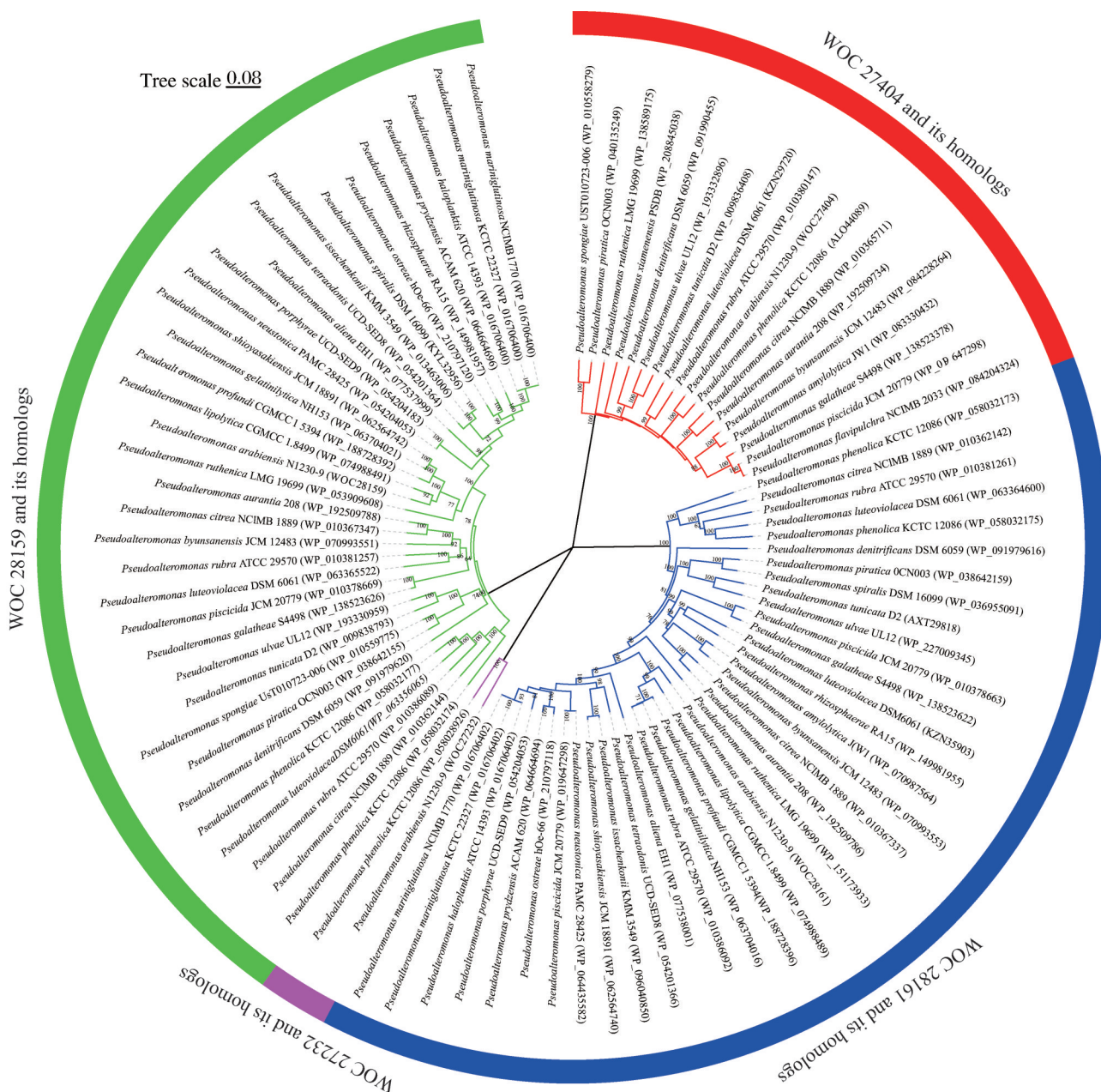


图2 阿拉伯海假交替单胞菌N1230-9中4个几丁质酶同源蛋白的系统发育分析

Figure 2 Phylogenetic analysis of orthologous proteins of four chitinases from *Pseudoalteromonas*. The tree was constructed by the neighbor-joining method with *P*-distance model. Bootstrap analysis of 1 000 replicates is conducted and values above 50% are shown.

2.4 几丁质裂解酶编码基因缺失突变体的几丁质降解能力

采用同源重组策略成功构建了菌株 N1230-9 中 5 个几丁质裂解酶编码基因的单基因缺失突

变体(图 5)。生长能力测试结果显示, 5 个基因缺失突变体在 2216 培养基中的生长状态与野生菌株(WT)无显著差异, 说明这 5 个基因的缺失未对菌株产生极性效应(图略)。在几丁质培养基

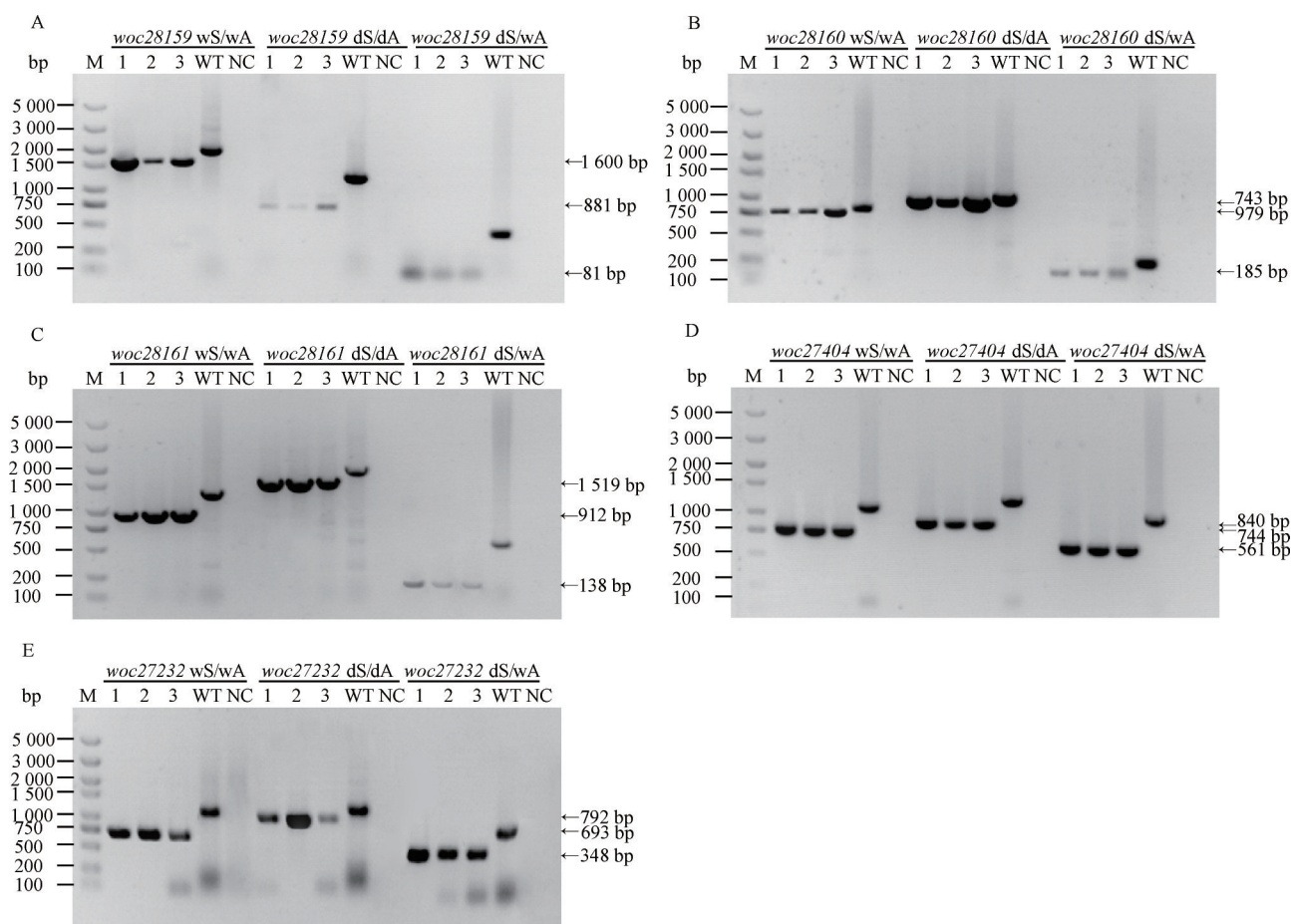


图5 缺失突变株的菌落PCR验证

Figure 5 Colony PCR identification of the mutants. A–E indicated PCR detection of $\Delta woc28159$, $\Delta woc28160$, $\Delta woc28161$, $\Delta woc27404$ and $\Delta woc27232$ double crossover mutants using three primer pairs, respectively. Lane M: DNA marker; Lanes 1–3: Three independent colonies after the second homologous recombination; WT: Wild-type strain N1230-9; NC: Negative control.

中对这 5 个基因缺失突变体的生长状态进行了观察, 结果除了 *woc27232* 基因缺失未对菌株的几丁质降解能力产生显著影响外, 其他 4 个几丁质裂解酶基因的缺失均对菌株的几丁质降解能力产生了不同程度的影响(图 6)。 $\Delta woc28159$ 和 $\Delta woc28161$ 在胶体或颗粒几丁质液体培养基中均无法生长(图 6A、6C), 且这 2 个突变体在胶体或颗粒几丁质平板上也无法产生透明圈(图 6B、6D), 表明它们已丧失了几丁质的降解能力。与野生菌株相比, $\Delta woc28160$ 和

$\Delta woc27404$ 在胶体几丁质或颗粒几丁质液体培养基中的延滞期明显延长, 最高生物量降低(图 6A、6C), 且在胶体几丁质平板上产生的透明圈也明显减小(图 6B)。此外, 相较于 $\Delta woc28160$, $\Delta woc27404$ 在胶体几丁质液体培养基中的延滞期更长, 生物量更低(图 6A)。

3 讨论与结论

同源比对结果显示, 菌株 N1230-9 中的 5 个几丁质裂解酶在其他几丁质降解菌中均存在

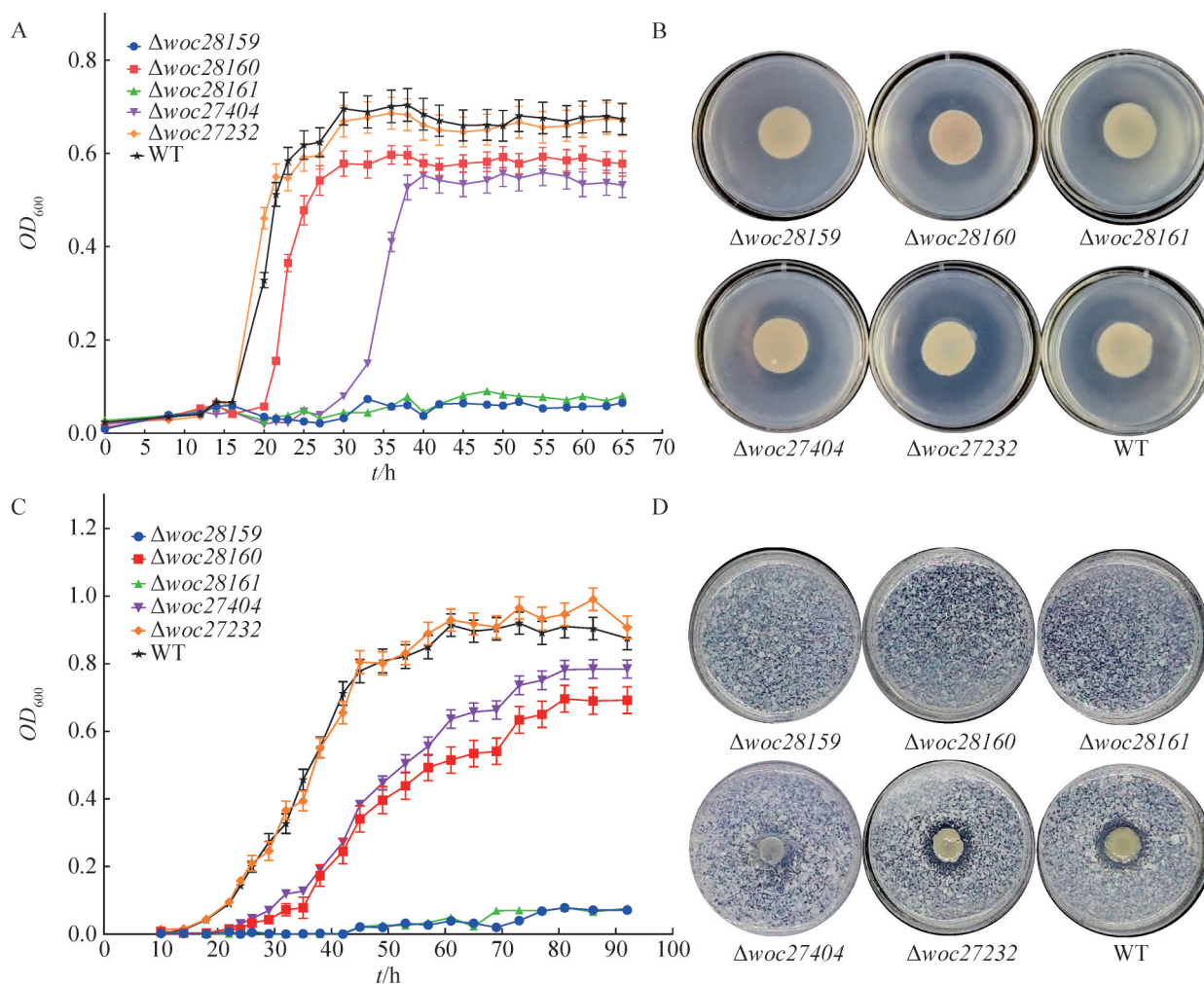


图6 突变体在以胶体几丁质(A、B)或颗粒几丁质(C、D)为唯一碳源的培养基中的生长表型

Figure 6 Growth phenotype of mutants in media with colloidal chitin (A, B) or granular chitin (C, D) as the sole carbon source. WT: Wild-type strain N1230-9.

直系同源蛋白, 且部分同源蛋白的酶学活性已得到了初步表征。普里兹湾假交替单胞菌(*Pseudoalteromonas prydzensis*) ACAM 620 的 ChiC (*PpChiC*) 和 ChiA (*PpChiA*) 分别是 WOC28159 和 WOC28161 的直系同源蛋白。*PpChiC* 和 *PpChiA* 分别具有外切几丁质酶和内切几丁质酶的活性, 均能切割胶体几丁质和结晶几丁质产生还原糖^[23]。海摩替亚氏菌(*Moritella marina*)的 *MmChi60* 是 WOC27232 的同源蛋白, 该酶属于低温胞外几丁质内切酶,

能够有效降解几丁质和几丁寡糖 $[(\text{GlcNAc})_n, n \geq 2]$ ^[24]。长衫假交替单胞菌(*Pseudoalteromonas tunicata*) CCUG 44952 的 *PtChi19* 是 WOC27404 的直系同源蛋白, 该酶对胶体几丁质和结晶几丁质均有降解活性^[25]。*P. prydzensis* ACAM 620 的 LPMO (*PpLMPO*)是 WOC28160 的直系同源蛋白, 该酶介导氧化几丁质中糖苷键的 C1 碳, 并产生具有末端氧化糖 2-(乙酰氨基)-2-脱氧-D-葡萄糖酸(GlcNAc1A)的壳寡糖^[23]。

荧光定量 PCR 结果显示, 在菌株 N1230-9

对数生长期的 2 个检测时间点, 葡萄糖对该菌株中 5 个几丁质降解酶的表达均无诱导能力, 而几丁质却可强烈持续诱导该菌株 CLC 基因簇内的 3 个几丁质裂解酶基因的表达, 这一结果与 *P. prydzensis* ACAM 620 转录组测序结果相吻合^[23], 说明这 3 个几丁质裂解酶均参与了几丁质的降解过程, 并在几丁质的降解过程中发挥了关键作用。RT-qPCR 检测结果还显示, 菌株 N1230-9 CLC 基因簇外的 2 个几丁质酶编码基因对几丁质的响应存在差异: 几丁质不能诱导 *woc27232* 的表达, 但却可以显著诱导 *woc27404* 的表达, 但其诱导能力并不持续, 说明 *woc27232* 很可能并未参与几丁质的降解过程, 而 *woc27404* 可能参与了几丁质的前期降解过程。

基因敲除是验证基因功能的“金标准”, 为此本研究构建了目标菌株的 5 个几丁质酶编码基因的单基因缺失突变体, 并分析了突变体的几丁质降解能力。研究结果显示, 位于 CLC 基因簇内的 *woc28159* 或 *woc28161* 缺失均导致菌株丧失了胶体和颗粒几丁质的降解能力, 这不仅说明 WOC28159 和 WOC28161 是菌株降解几丁质所必需的, 也提示该菌株所拥有的其他几丁质酶并不能替代这 2 个酶的功能。相比之下, 同样位于 CLC 基因簇内的 *woc28160* 缺失并不会导致菌株完全丧失几丁质降解能力, 这进一步说明 WOC28160 主要在解聚复杂几丁质的起始过程中发挥作用^[19]。本研究结果显示, 位于 CLC 基因簇外的 *woc27232* 和 *woc27404* 对菌株降解几丁质的贡献度存在明显差异。*woc27232* 缺失对菌株降解利用胶体和颗粒几丁质均无影响, 这与 RT-qPCR 获得的实验结果相吻合, 说明该基因对假交替单胞菌几丁质降解而言是功能冗余的。此外, 如前文所述, WOC27232 同源蛋白编码基因在假交替单胞菌模式菌株中并

不保守, 说明 *woc27232* 是通过基因水平转移获得的无功能几丁质酶基因。与 WOC27232 相比, WOC27404 赋予了菌株更强的几丁质降解能力, 因为该基因的缺失导致菌株在几丁质培养基中的延滞期延长, 最高生物量降低, 以及对几丁质的降解能力明显减弱, 这一结果不仅与 RT-qPCR 结果相吻合, 且进一步佐证了 *P. tunicata* CCUG 44952 的 *PtChi19* (WOC27404 的同源蛋白) 的酶学特性^[25]。值得注意的是, 在本研究分析的 45 个假交替单胞菌模式菌株中, 所有有色菌株均拥有 WOC27404 同源蛋白, 而所有无色假交替单胞菌模式菌株均缺失 WOC27404 同源蛋白, 提示 *woc27404* 可能是通过基因水平转移方式从有色假交替单胞菌中获得的。

作者贡献声明

兰肖敏: 实验设计与实施, 分析数据、撰写稿件; 周敏婕: 协助实验操作和数据处理; 王景: 协助实验操作; 朱四东: 实验技术支持; 杨季芳: 论文框架指导; 陈吉刚: 组织实施、论文修改和润色。

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] YOUNES I, RINAUDO M. Chitin and chitosan preparation from marine sources. Structure, properties and applications[J]. *Marine Drugs*, 2015, 13(3): 1133-1174.
- [2] ITOH T, KIMOTO H. Bacterial chitinase system as a model of chitin biodegradation[J]. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 2019, 1142: 131-151.
- [3] BASSLER B, GIBBONS P, ROSEMAN S. Chemotaxis to chitin oligosaccharides by *Vibrio furnissii*, a chitinivorous marine bacterium[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1989, 161(3): 1172-1176.
- [4] ARBIA W, ARBIA L, ADOUR L, AMRANE A. Chitin extraction from crustacean shells using biological

- methods: a review[J]. Food Technology and Biotechnology, 2013, 51(1): 12-25.
- [5] WALTER A, FRIZ S, MAYER C. Chitin, chitin oligosaccharide, and chitin disaccharide metabolism of *Escherichia coli* revisited: reassignment of the roles of *ChiA*, *ChbR*, *ChbF*, and *ChbG*[J]. Microbial Physiology, 2021, 31(2): 178-194.
- [6] LI XB, ROSEMAN S. The chitinolytic cascade in *Vibrios* is regulated by chitin oligosaccharides and a two-component chitin catabolic sensor/kinase[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2004, 101(2): 627-631.
- [7] FUCHS RL, McPHERSON SA, DRAHOS DJ. Cloning of a *Serratia marcescens* gene encoding chitinase[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1986, 51(3): 504-509.
- [8] ADRANGI S, FARAMARZI MA. From bacteria to human: a journey into the world of chitinases. Biotechnology Advances, 2013, 31(8): 1786-1795.
- [9] VAAJE-KOLSTAD G, WESTERENG B, HORN SJ, LIU Z, ZHAI H, SØRLIE M, EISINK VG. An oxidative enzyme boosting the enzymatic conversion of recalcitrant polysaccharides[J]. Science, 2010, 330(6001): 219-222.
- [10] RAIMUNDO I, SILVA R, MEUNIER L, VALENTE SM, LAGO-LESTÓN A, KELLER-COSTA T, COSTA R. Functional metagenomics reveals differential chitin degradation and utilization features across free-living and host-associated marine microbiomes[J]. Microbiome, 2021, 9(1): 43.
- [11] YANG C, RODIONOV DA, LI X, LAIKOVA ON, GELFAND MS, ZAGNITKO OP, ROMINE MF, OBRAZTSOVA AY, NEALSON KH, OSTERMAN AL. Comparative genomics and experimental characterization of N-acetylglucosamine utilization pathway of *Shewanella oneidensis*[J]. Journal of Biological Chemistry, 2006, 281(40): 29872-29885.
- [12] PAULSEN SS, STRUBE ML, BECH PK, GRAM L, SONNENSCHNEIN EC. Marine chitinolytic *Pseudoalteromonas* represents an untapped reservoir of bioactive potential[J]. mSystems, 2019, 4(4): e00060-19.
- [13] REN XB, DANG YR, LIU SS, HUANG KX, QIN QL, CHEN XL, ZHANG YZ, WANG YJ, LI PY. Identification and characterization of three chitinases with potential in direct conversion of crystalline chitin into *N,N'*-diacetylchitobiose[J]. Marine Drugs, 2022, 20(3): 165.
- [14] WANG XH, CHI NY, BAI FW, DU YG, ZHAO Y, YIN H. Characterization of a cold-adapted and salt-tolerant exo-chitinase (ChiC) from *Pseudoalteromonas* sp. DL-6[J]. Extremophiles, 2016, 20(2): 167-176.
- [15] WANG X, ZHAO Y, TAN H, CHI N, ZHANG Q, DU Y, YIN H. Characterisation of a chitinase from *Pseudoalteromonas* sp. DL-6, a marine psychrophilic bacterium[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2014, 70: 455-462.
- [16] 徐莹, 兰肖敏, 周敏婕, 陈秀暖, 金佳凡, 朱四东, 杨季芳, 陈吉刚. 一株太平洋表层海水来源阿拉伯海假交替单胞菌 N1230-9 的全基因组测序及比较基因组学分析[J]. 微生物学报, 2024, 64(6): 1691-1703.
- XU Y, LAN XM, ZHOU MJ, CHEN XN, JIN JF, ZHU SD, YANG JF, CHEN JG. Genome sequencing and comparative genomic analysis of *Pseudoalteromonas arabiensis* N1230-9 isolated from the surface seawater of the Pacific Ocean[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2024, 64(6): 1691-1703 (in Chinese).
- [17] WANG PX, YU ZC, LI BY, CAI XS, ZENG ZS, CHEN XL, WANG XX. Development of an efficient conjugation-based genetic manipulation system for *Pseudoalteromonas*[J]. Microbial Cell Factories, 2015, 14: 11.
- [18] PAYSAN-LAFOSSE T, BLUM M, CHUGURANSKY S, GREGO T, PINTO BL, SALAZAR GA, BILESCHI ML, BORK P, BRIDGE A, COLWELL L, GOUGH J, HAFT DH, LETUNIĆ I, MARCHLER-BAUER A, MI H, NATALE DA, ORENGO CA, PANDURANGAN AP, RIVOIRE C, SIGRIST CJA, et al. InterPro in 2022[J]. Nucleic Acids Research, 2023, 51(D1): D418-D427.
- [19] XIE JM, CHEN YR, CAI GJ, CAI RL, HU Z, WANG H. Tree Visualization By One Table (tvBOT): a web application for visualizing, modifying and annotating phylogenetic trees[J]. Nucleic Acids Research, 2023, 51(W1): W587-W592.
- [20] SCHMITTGEN TD, LIVAK KJ. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method[J]. Nature Protocols, 2008, 3: 1101-1108.
- [21] 金佳凡, 舒国靖, 朱四东, 杨季芳, 陈吉刚. 阿拉伯海假交替单胞菌 N1230-9 两个甲基受体趋化蛋白的功能鉴定[J]. 微生物学报, 2024, 64(5): 1641-1653.
- JIN JF, SHU GJ, ZHU SD, YANG JF, CHEN JG. Functions of two methyl-accepting chemotaxis proteins of *Pseudoalteromonas arabiensis* N1230-9[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2024, 64(5): 1641-1653 (in Chinese).
- [22] MEIER-KOLTHOFF JP, CARBASSE JS, PEINADO-OLARTE RL, GÖKER M. TYGS and LPSN: a database tandem for fast and reliable genome-based classification and nomenclature of prokaryotes[J]. Nucleic Acids Research, 2022, 50(D1): D801-D807.
- [23] JIANG WX, LI PY, CHEN XL, ZHANG YS, WANG JP, WANG YJ, SHENG Q, SUN ZZ, QIN QL, REN XB, WANG P, SONG XY, CHEN Y, ZHANG YZ. A pathway for chitin oxidation in marine bacteria[J]. Nature Communications, 2022, 13(1): 5899.
- [24] STEFANIDI E, VORGAS CE. Molecular analysis of the gene encoding a new chitinase from the marine psychrophilic bacterium *Moritella marina* and biochemical characterization of the recombinant enzyme[J]. Extremophiles, 2008, 12(4): 541-552.
- [25] GARCÍA-FRAGA B, da SILVA AF, LÓPEZ-SEIJAS J, SIEIRO C. A novel family 19 chitinase from the marine-derived *Pseudoalteromonas tunicata* CCUG 44952T: heterologous expression, characterization and antifungal activity[J]. Biochemical Engineering Journal, 2015, 93: 84-93.