

转录-蛋白组学关联分析坎帕尼亚盐单胞菌野生型与紫外突变型菌株的差异表达基因与蛋白质

崔金子¹, 韩睿², 乔丽娟¹, 李永臻¹, 邢江娃¹, 王嵘¹, 沈国平^{1*}, 朱德锐¹

1 青海大学 医学院, 基础医学研究中心, 青海 西宁

2 青海大学 农林科学院, 蔬菜遗传与生理重点实验室, 青海 西宁

崔金子, 韩睿, 乔丽娟, 李永臻, 邢江娃, 王嵘, 沈国平, 朱德锐. 转录-蛋白组学关联分析坎帕尼亚盐单胞菌野生型与紫外突变型菌株的差异表达基因与蛋白质[J]. 微生物学报, 2025, 65(4): 1601-1615.

CUI Jinzi, HAN Rui, QIAO Lijuan, LI Yongzhen, XING Jiangwa, WANG Rong, SHEN Guoping, ZHU Derui. Transcriptomics-proteomics conjoint analysis of differentially expressed genes/proteins between wild type and ultraviolet radiation-mutated *Halomonas campaniensis* strains[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2025, 65(4): 1601-1615.

摘要: 野生型坎帕尼亚盐单胞菌(*Halomonas campaniensis*)经9轮紫外循环诱变, 获得1株高产四氢嘧啶(ectoine)的突变菌株G₉-72, 关于菌株差异表达基因、蛋白质以及四氢嘧啶产量暴发的分子机制有待深入探讨。【目的】探讨野生菌株XH26和突变菌株G₉-72的差异表达基因或蛋白质(differential expression genes/proteins, DEGs/DEPs), 并关联分析四氢嘧啶高效积聚的分子响应机制。【方法】在无盐和1.5 mol/L NaCl条件下培养菌株XH26和G₉-72, 利用Illumina HiSeq高通量测序和定量质谱蛋白组学技术分析菌株转录组-蛋白质组学的差异变化, 并采用逆转录定量PCR对显著DEGs的表达进行验证。【结果】转录组学筛选出11条氨基酸代谢通路(涉及44个DEGs)与四氢嘧啶合成代谢相关; 蛋白组学筛选出10条氨基酸代谢通路(涉及50个DEPs)与四氢嘧啶合成代谢相关。转录-蛋白关联分析筛选出15个显著DEGs, 其中7个基因(*ectB*、*betB*、*betA*、*asd*、*doeD*、*doeC*、*gabD*)在2个组学中表达上调; 4个基因(*ItaE*、*gdhA*、*gabT*、*acnB*)在2个组学中表达下调; 3个基因(*gltD*、*atoB*、*narG*)在转录组学中下调, 而在蛋白组学中表达上调; 基因*narK*在转录组学中表达上调, 但在蛋白组学中未检测到表达。RT-qPCR验证结果与RNA-seq测序分析一致。【结论】突变菌株四氢嘧啶的积聚量暴发与代谢通路的关键基因有关(合成基因*asd*和*ectB*, 分解基因*doeD*和*doeC*), 与代谢通路上游的参与基因间接相关(*betB*、*betA*、*ItaE*、*gltD*、*gadA*和*acnB*), 以及四氢嘧啶的生物合成与Ala/Asp/Glu/His代谢途径(*gabD*、*gdhA*、*gabT*、*atoB*)和氮源代谢(*narK*和*narG*)高度关联。

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

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

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

Received: 2024-08-01; Accepted: 2024-10-15; Published online: 2024-11-11

关键词：坎帕尼亚盐单胞菌；四氢嘧啶；转录组学；蛋白质组学；差异表达基因

Transcriptomics-proteomics conjoint analysis of differentially expressed genes/proteins between wild type and ultraviolet radiation-mutated *Halomonas campaniensis* strains

CUI Jinzi¹, HAN Rui², QIAO Lijuan¹, LI Yongzhen¹, XING Jiangwa¹, WANG Rong¹, SHEN Guoping^{1*}, ZHU Derui¹

¹ Research Center of Basic Medical Science, Medical College, Qinghai University, Xining, Qinghai, China

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

Abstract: A mutant strain G₉-72 with a high yield of ectoine was obtained from wild type *Halomonas campaniensis* after nine rounds of ultraviolet mutagenesis. The differentially expressed genes/proteins (DEGs/DEPs) and the molecular mechanism underlying the excessive increase in the ectoine yield remain to be explored for the mutant strain. **[Objective]** To explore the DEGs/DEPs between the wild type strain XH26 and G₉-72 and decipher the molecular mechanism of efficient ectoine production by conjoint analysis. **[Methods]** A non-salt (NS, 0 mol/L NaCl) group and a high-salt (HS, 1.5 mol/L NaCl) group were designed for the culture of XH26 and G₉-72. Illumina HiSeq and quantitative mass spectrometry were employed to identify the DEGs/DEPs between the two strains by transcriptomics-proteomics conjoint analysis. Furthermore, RT-qPCR was carried out to verify the expression of significant DEGs. **[Results]** The transcriptomics analysis revealed 11 amino acid metabolic pathways (44 DEGs) associated with ectoine anabolism, and the proteomics analysis revealed ten amino acid metabolic pathways (50 DEPs) associated with ectoine anabolism. The transcriptomics-proteomics conjoint analysis identified 15 significant DEGs, including seven genes (*ectB*, *betB*, *betA*, *asd*, *doeD*, *doeC*, and *gabD*) with up-regulated mRNA and protein level, four genes (*ItaE*, *gdhA*, *gabT*, and *acnB*) with down-regulated mRNA and protein levels, three genes (*gltD*, *atoB*, and *narG*) with down-regulated mRNA levels and up-regulated protein levels, and one gene *narK* with up-regulated mRNA level and no protein level. Additionally, the RT-qPCR results were consistent with the transcriptomics analysis. **[Conclusion]** The excessive increase in the ectoine yield of the mutant strain was associated with key genes in the ectoine metabolic pathway (including the synthesis genes *asd* and *ectB* and the catabolism genes *doeD* and *doeC*) and indirectly associated with several genes (*betB*, *betA*, *ItaE*, *gltD*, *gdaA*, and *acnB*) in the upstream metabolic pathway. Notably, ectoine biosynthesis was highly associated with the Ala/Asp/Glu/His metabolic pathway (*gabD*, *gdhA*, *gabT*, and *atoB*) and nitrogen source metabolism (*narK* and *narG*).

Keywords: *Halomonas campaniensis*; ectoine; transcriptomics; proteomics; differentially expressed genes

目前, 转录组学(transcriptomics)、蛋白质组学(proteomics)及关联分析技术已成为关键的研究工具, 广泛应用于基因差异表达、基因间互作关系以及影响基因表达的变量等多个领域。Chen 等^[1]利用转录组学和 Tn5 转座子诱变分析北门盐单胞菌(*Halomonas beimenensis*)的盐适应机制, 结果显示突变基因 *atpC*、*nadA*、*nqrA*、*gdhB* 和 *TrkA* 等与氧化磷酸化、吸 K^+ 排 Na^+ 和相容溶质合成等过程有关, 而基因 *prkA*、*smpB*、*tatB*、*mtnN*、*spoT*、*acrR1*、*lacA*、*rsbV*、*lon*、*rfbP* 和 *rfbC* 等与细胞运动、群体感应、细胞信号传递和转录/翻译调控等途径有关。Kindziarski 等^[2]运用 LC-MS 技术分析延长盐单胞菌(*H. elongata*)在不同盐度下的蛋白差异表达, 表明在 0.17 mol/L NaCl (1.0%) 条件下, 蛋白 Hda (与蛋白 DnaA 同源) 的表达受到抑制; 当 NaCl 浓度升高至 1.0 mol/L 时, 蔗糖孔蛋白 ScrY 的含量增加了 335 倍。Li 等^[3]利用转录-蛋白组学整合分析揭示乳酸乳球菌(*Lactococcus lactis*)的生理调控, 发现果糖和 pH 值显著影响乳酸乳球菌的糖代谢, 而 Ca^{2+} 离子和棕榈酸则影响脂肪酸的合成代谢。

盐单胞菌属(*Halomonas*)是四氢嘧啶(ectoine)工业化生产的重要模式菌株之一^[4], 其典型代表包括延长盐单胞菌(*H. elongata*) ATCC 2581^T 和嗜盐盐单胞菌(*H. halophila*)^[5-6]。实验室前期以野生型坎帕尼亚盐单胞菌 [*H. campaniensis*] XH26, 四氢嘧啶单批次摇瓶产量为(0.51±0.01) g/L] 为研究材料, 经过 9 轮紫外循环诱变, 筛选获得 1 株四氢嘧啶产量为(1.92±0.01) g/L 的高产突变菌株 G₉-72。值得注意的是, 与野生菌株相比, 突变菌株 G₉-72 在菌落形态、生物量和四氢嘧啶积聚量等方面均存在显著差异。我们推测紫外诱变可能导致某些基因突变, 进而影响基因的表达调控, 最终导致四氢嘧啶的合成量显

著增加。因此, 本研究通过转录-蛋白组学技术关联分析野生菌株 XH26 和突变菌株 G₉-72 的基因转录和蛋白表达差异, 以探究哪些关键基因参与四氢嘧啶合成代谢的启动应答或网络代谢调控, 从而揭示四氢嘧啶产量暴发的分子响应机制, 为突变菌株的后续工业应用提供理论参考。

1 材料与方法

1.1 菌株来源和培养基

野生型坎帕尼亚盐单胞菌(*H. campaniensis*) XH26 (CCTCC 2019776^M) 分离自柴达木盆地小柴旦湖, 菌株 XH26 与突变菌株 G₉-72 现保存于青海大学基础医学研究中心。基础培养基(basal medium, BM) (g/L): NaCl 87.8, MgSO₄·7H₂O 25.0, KCl 55.0, CaCl₂ 0.2, 柠檬酸钠 3.0, L-谷氨酸钠 6.5, 酶水解酪素 19.7, pH 8.0, 培养温度 37 °C。固体培养基中补加 15.0 g/L 琼脂^[7]。

1.2 主要试剂和仪器

分析纯 NaCl、KCl、MgSO₄·7H₂O、柠檬酸钠、酵母抽提物、L-谷氨酸钠、酶水解酪素和 NaOH 等, 北京索莱宝科技有限公司; Invitrogen TRIzol 试剂盒、细菌蛋白质提取试剂盒, ThermoFisher Scientific 公司; 细菌 RiboZero rRNA 去除试剂盒, Illumina 公司; DIA 校正试剂盒, Biognosys 公司。

Q-Exactive HF 质谱仪、SDS-PAGE 凝胶电泳仪, ThermoFisher Scientific 公司; 高通量测序平台, Illumina 公司; 实时荧光定量 PCR 仪, Roche 公司。

1.3 菌株生长量测定与胞内四氢嘧啶的 HPLC 分析

基于 BM 培养基, 设置 6 个 NaCl 梯度培养条件组(0.5–3.0 mol/L, 浓度间隔 0.5), 活化菌种 XH26 和 G₉-72, 按 1% 接种量分别接种于盐梯度培养基(50 mL), 35 °C、120 r/min 摇床培养

48 h。诱导培养结束后,测定光密度值 OD_{600} ($n=3$), 4°C 、 $4\,000\times g$ 离心 5 min 收集菌泥。按照文献[8]的方法进行菌泥四氢嘧啶的提取,并采用高效液相色谱(high performance liquid chromatography, HPLC)检测胞内四氢嘧啶的积累量。HPLC 检测条件:流动相乙腈/纯水(80/20, 体积比),检测波长 210 nm,流速 1.0 mL/min,柱压 3.48–4.76 MPa,柱温 30°C ,上样量 $10\,\mu\text{L}$ [8-9]。

1.4 转录组测序与数据分析

基于 BM 培养基,设置无盐组(no salt group, NS, 0 mol/L NaCl)和高盐组(high salt group, HS, 1.5 mol/L NaCl),分别接种培养野生菌株 XH26 (wild type, WT) 和突变菌株 G₉-72 (ultraviolet type, UV),分组编号为 WT(NS)、WT(HS)、UV (NS)和 UV(HS),每组设 3 个生物学重复。采用 Invitrogen TRIzol 试剂盒提取上述 12 个样品的总 RNA ($\geq 30\,\mu\text{L}/\text{样}$),利用细菌 Ribo-zero rRNA 去除试剂盒去除 rRNA,随后进行 mRNA 片段化和反转录 [10]。使用 NanoDrop 和 Qubit 2.0 检测 RNA 的纯度和浓度,采用 Agilent 2100 检测 RNA 样品的完整性,合格的 mRNA 样品 RNA integrity number (RIN)数值 ≥ 8 ,用于 RT-PCR 扩增,构建 cDNA 扩增文库 [11]。基于 Illumina HiSeq 300PE 平台进行 cDNA 文库测序分析,由苏州金唯智生物科技有限公司完成。采用 Bcl2fastq (v2.17.1.14)软件获取原始测序数据,使用 Fast QC (v0.10.1)软件进行数据质量评估,碱基质量值(quality score, Q -score)以 $-\lg P$ 计算,错误概率 P 值为 0.001 (Q_{30}) [12]。利用 Cutadapt (v1.9.1)软件进行原始数据预处理和过滤 [13]。以菌株 XH26 参考基因组为依据,采用 Rockhopper (v2.0.3)软件进行转录本预测分析。

1.5 蛋白质组测序与数据分析

利用细菌蛋白质提取试剂盒提取样本的总

蛋白质(12 个样本/4 组),采用总蛋白比色法(bicinchoninic acid, BCA)测定蛋白浓度。合格样品进行 12.5% SDS-PAGE 定量、酶解和 HPLC 分离,具体方法参考文献 [14-16]。采用 Q-Exactive HF 质谱仪进行样品分析,检测条件:进样量为 3 次/样,分析时长 60 min,正离子模式/扫描范围(300–1 800 m/z),质谱分辨率 60 000 (200 m/z),AGC target 为 3×10^{-6} ,最大离子注入时间(maximum IT)为 200 ms [17]。将 LC-MS/MS 原始文件导入 Spectronaut(v15)软件,构建 data-independent acquisition (DIA)数据库,对肽段和蛋白质进行数据处理。检索参数设置:retention time prediction type 为内标校正肽段(dynamic iRT),interference on MS2 level correction 为 enabled。cross run normalization 为 enabled,设定过滤参数 P 值为 0.01 [false discovery rate (FDR)<1%]。采用 SIMCA-P (v14.11)软件分析各样本队列的主成分(principle component analysis, PCA)、组内变异系数(coefficient of variation, CV)和相关系数等 [18]。

1.6 转录-蛋白组学关联分析

转录组测序过滤处理获得 mapped data 后,采用 HTSeq(v2.0.5)软件分析各样品的基因表达水平,明确差异表达基因(differential expression genes, DEGs)。使用 fragments per kilobase of exon per million fragments mapped (FPKM)法进行比对分析,筛选参数为 $\log_2$ fold change ≥ 1 且 FDR<0.05,统计 DEGs 的差异显著性 [19]。基于 KEGG 数据库 (<http://www.kegg.jp>) 和 KOBAS (v2.0)软件,采用超几何检验法,以 KEGG pathway 为单位,进行基因组背景关联和显著性 pathway 富集分析($P<0.05$) [20]。蛋白组测序获得 DIA 数据集,同样使用 Spectronaut™ (v15)软件,根据表达丰度和 P 值进行差异和定量分析 [21]。差异表达蛋白(differential expression

proteins, DEPs)的表达丰度/倍数 >1.5 ($P<0.05$), 即为蛋白表达上调; 如表达丰度/倍数 <0.67 ($P<0.05$), 即为蛋白表达下调。将 DEPs 对应的 DEGs 进行生物信息分析(分析工具和条件均与上述转录组学分析方法相同)。整合分析相同样本来源的转录组和蛋白质组数据, 统计关联的显著 DEPs/DEGs 数量, 运用 SPSS (27.0)软件计算相关性系数(r), 比较蛋白质与关联转录本的表达趋势。基于 KEGG 数据库分析四氢嘧啶合成代谢相关的氨基酸通路和差异基因的显著性, 筛选关键 DEGs/DEPs 并分析四氢嘧啶生物合成的分子机制^[22]。

1.7 逆转录定量 PCR 验证关键 DEGs 的表达

采用 Invitrogen TRIzol 试剂盒提取菌株 XH26 和菌株 G₉-72 的总 RNA (NS 与 HS 组/3 个重复), 使用 NanoDrop 和 Qubit 2.0 检测 RNA 纯度和浓度。RNA 样品符合 $OD_{260}/OD_{280}=1.8-2.2$, 有效浓度 >500 ng/mL。采用逆转录试剂盒进行 cDNA 定量检测, 内参基因为磷酸甘油酸脱氢酶 (GAPDH), 扩增引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成, 反应体系参考文献[23]。使用 SPSS (v27.0)统计软件进行数据分析。组内/组间比较分析采用差异倍数(fold change, FC)表示各基因或蛋白平均定量的比值。DEGs/DEPs 的显著性分析采用相对定量值, 组间比较采用独立样本 t 检验, $P<0.05$ 具有统计学意义。采用 Origin (v8.6)软件和微生信平台 (<https://www.bioinformatics.com.cn/>)制图, 采用 SPSS (v27.0)软件进行组间差异 ANOVA 方差分析($P<0.05$)。

2 结果与分析

2.1 野生菌株 XH26 与突变菌株 G₉-72 的理化性质与基因组差异分析

野生菌株 XH26 与突变菌株 G₉-72 均为革兰

氏阳性菌。在相同温度、pH、培养基和培养时间下, 菌株的电镜菌体形态均呈长杆状, 略带弯曲, 两端圆润, 无鞭毛。菌株 XH26 的菌体大小为 $(1.64-5.98) \mu\text{m} \times (0.54-0.85) \mu\text{m}$ (图 1A), 菌株 G₉-72 的菌体大小为 $(1.87-5.27) \mu\text{m} \times (0.63-0.88) \mu\text{m}$ (图 1B)。比较分析发现野生菌株和突变菌株的生长量 OD_{600} 值与四氢嘧啶积聚量均存在明显差异。菌株 XH26 胞内的四氢嘧啶最大积聚量为 (0.51 ± 0.01) g/L, 而菌株 G₉-72 的四氢嘧啶最大积聚量为 (1.92 ± 0.01) g/L (图 1C), 且二者最适盐浓度均为 1.5 mol/L NaCl。因此, 后续的转录组学和蛋白组学研究设置为无盐 (0 mol/L NaCl)和有盐(1.5 mol/L NaCl) 2 个梯度条件。

菌株 XH26 和 G₉-72 的全基因序列分析显示: 基因组 DNA 均以环状形式存在, 分子量分别为 4.11 Mb 和 4.06 Mb; G+C 含量分别为 52.62% 和 52.55%; 预测的编码基因数分别为 3 927 个和 3 882 个; 两者预测的 tRNA (36 个)和 rRNA 数量(18 个)一致。菌株 XH26 和 G₉-72 的基因分别在 COG 数据库中注释到 3 252 个和 3 217 个基因; 在 KEGG 数据库注释到 2 305 个和 2 272 个基因; 在 GO 数据库(Gene Ontology)中分别注释到 2 618 个和 2 592 个基因。以野生菌株 XH26 为参考基因组, 利用 Mummer 4.0 软件进行突变菌株基因组的比对分析, 结果显示突变菌株 G₉-72 的单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphisms, SNP)数目为 18 个, 小片段序列插入(insertion)或删除(deletion)数目为 17 个。突变蛋白/基因主要分布在细胞组分和细胞代谢过程, 如细胞膜(membrane)、细胞组分(cellular part)、细胞膜组分(membrane part)等, 主要涉及 TonB 家族转录调节因子(基因 *tonB* 编码)、30S 核糖体蛋白(*orf00550*)、假定蛋白(*orf01398*、*orf02033*)、 α 脲酶亚基(*ureC*)、吡啶

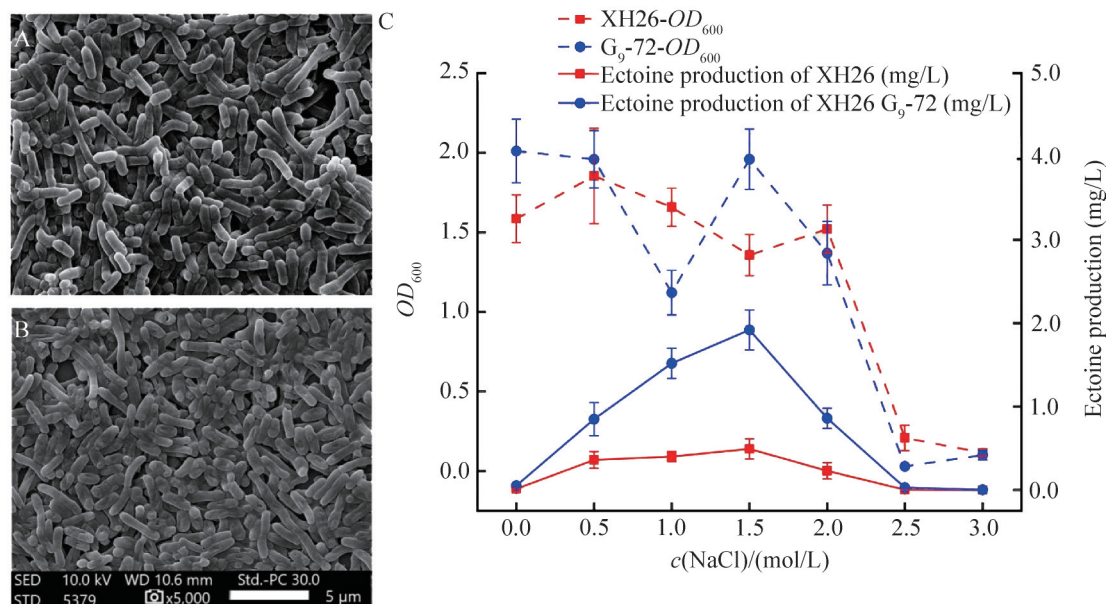


图1 菌株形态特征和盐梯度生长特性分析。A: 野生菌株XH26; B: 突变菌株 G_9-72 ; C: 菌株XH26和 G_9-72 的生长特性比较。

Figure 1 Comparative analysis of strain morphological characteristics and salt gradient growth characteristics. A: Wild strain XH26; B: Mutant strain G_9-72 ; C: Comparison of the growth characteristics of strains XH26 and G_9-72 .

丙酮酸铁氧化还原酶家族蛋白(*iorA*)、ABC 转运蛋白(*mntA*)、荚膜多糖蛋白(*lipA*)、GntR 家族转录调节因子(*phnR*)等。可能涉及四氢嘧啶合成相关的上游代谢突变蛋白, 如 γ -氨基丁酸转移酶(基因 *davT* 编码)、琥珀酸半醛脱羧酶(基因 *gabD* 编码)以及谷氨酸脱羧酶(基因 *gadA* 编码)。

2.2 野生菌株 XH26 与突变菌株 G_9-72 的比较转录组学与 DEGs 分析

利用 Cutadapt (v4.0) 软件去 bwt 污染和低质量序列后, 将 clean reads 与参考基因组比对。结果显示样本的单一匹配率均 $\geq 83\%$, Q_{30} 值 $> 92.39\%$, 表明测序数据可靠且无污染。研究数据与参考基因组比对结果良好, 可满足后续实验和组学分析的要求。在 WT(HS) vs. WT(NS) 和 UV(HS) vs. UV(NS) 两组中分别统计到 DEGs 为 1 141 个和 597 个; 两组共同上调的 DEGs 为

117 个, 共同下调的 DEGs 为 207 个。此外 16 个基因表现出相反的表达趋势, 包括在 WT 比较组中上调而在 UV 比较组中下调的基因 5 个, 以及在 UV 比较组中上调而在 WT 比较组中下调的基因 11 个(图 2A)。

DEGs 的 KEGG 富集分析显示(图 2C、2D), WT 比较组和 UV 比较组的上调/下调 DEGs 主要富集在 75 条 KEGG 通路中。显著富集的氨基酸代谢通路包括精氨酸(Arg)生物合成; 丙氨酸(Ala)、天冬氨酸(Asp)和谷氨酸(Glu)代谢; 甘氨酸(Gly)、丝氨酸(Ser)和苏氨酸(Thr)的代谢; 缬氨酸(Val)、亮氨酸(Leu)和异亮氨酸(Ile)降解; 赖氨酸(Lys)生物合成与分解和脂肪酸降解通路等。将两组结果整合后, 得到 11 条与四氢嘧啶代谢相关的氨基酸代谢通路及 44 个 DEGs, 其中包括上调表达的 DEGs 13 个和下调表达的 DEGs 31 个(表 1)。

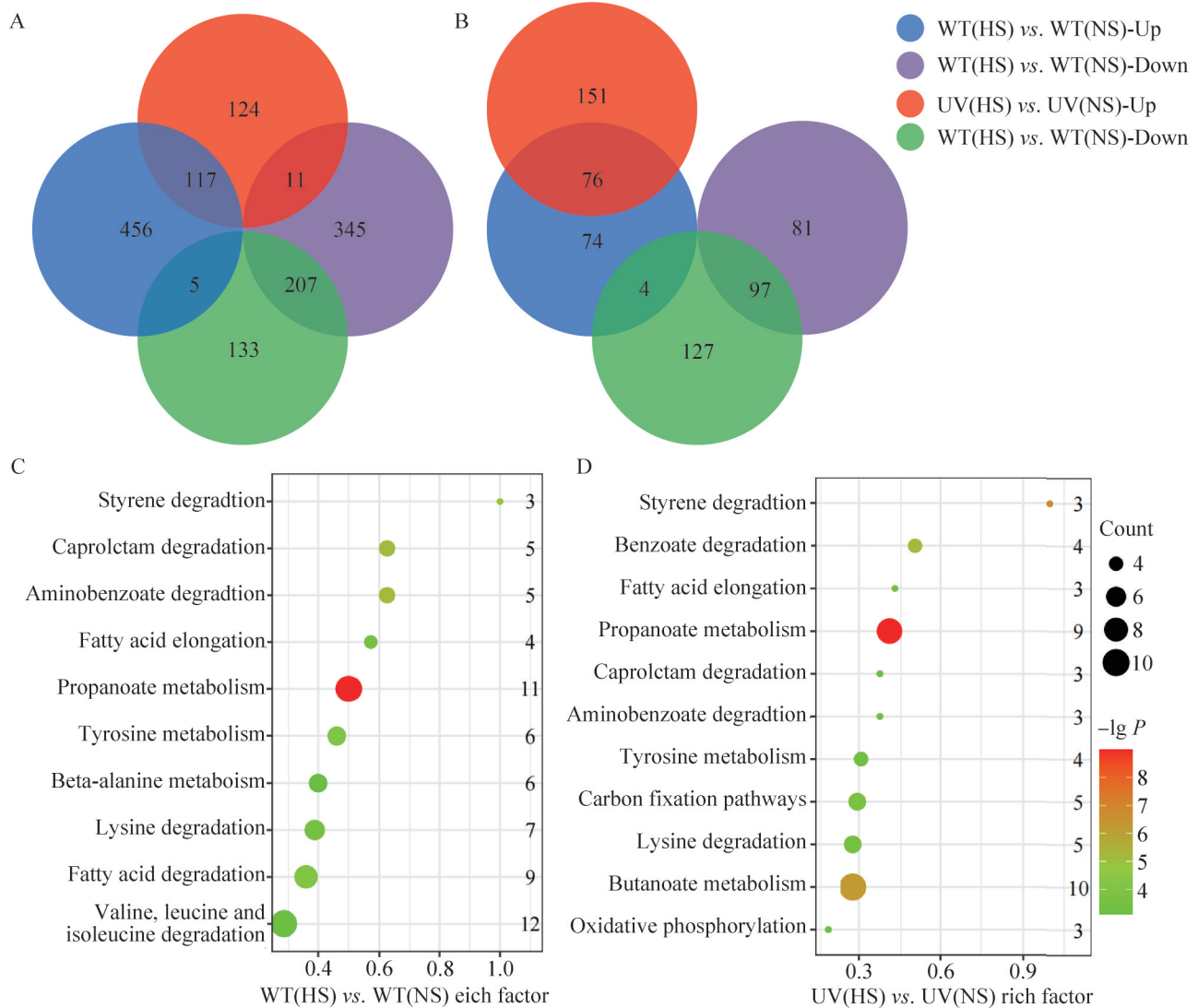


图2 差异因子韦恩图和DEGs的KEGG富集分析。A: DEGs韦恩图; B: DEPs韦恩图; C: WT比较组; D: UV比较组。

Figure 2 Venn diagram and KEGG enrichment analysis of DEGs. A: Venn diagram of DEGs; B: Venn diagram of DEPs; C: WT comparison group; D: UV comparison group.

2.3 野生菌株 XH26 与突变菌株 G₉-72 的比较蛋白组学与 DEPs 分析

蛋白组学测序数据显示, iRT 保留时间整体较稳定。QC 样本主成分分析(principal component analysis, PCA)显示组内样本聚集性高(图 3A), 变异系数(CV)为 12.9%(图 3B), 相关系数 R 值 > 0.9, 表明本研究的非标记定量结果可靠且数据

体系稳定, 可进行后续分析。4 个样本组 [WT(NS)、WT(HS)、UV(NS)、UV(HS)] 分别鉴定到 2 468、2 376、2 443 和 2 397 个蛋白。在 WT 比较组和 UV 比较组中, 共上调表达的 DEPs 为 76 个, 共同下调表达的 DEPs 为 97 个; 在 WT 比较组中上调, 而在 UV 比较组中下调表达的 DEPs 为 4 个(图 2B)。

表1 转录组学分析四氢嘧啶代谢相关的氨基酸代谢通路与主要DEGs

Table 1 Transcriptomic analysis of ectoine metabolism related amino acid metabolism pathways and DEGs

KEGG ID	Name	Up DEGs	Down DEGs
map00220	Arginine biosynthesis	<i>ectB, argE, argG</i>	<i>argD, gdhA</i>
map00250	Alanine, aspartate, and glutamate metabolism	<i>SSADH, ansA, argG, purB</i>	<i>gdhA</i>
map00260	Alanine, aspartate, and glutamate metabolism	<i>ectB, betB</i>	<i>ItaE, garK, ilvA, kbl</i>
map00270	Cysteine and methionine metabolism	<i>metH</i>	<i>metE, mdh, spE</i>
map00280	Valine, leucine, and isoleucine degradation	None	<i>bkdA/B, atoB, ECHS1, fabM, ivd, mmsA</i>
map00340	Histidine metabolism	None	<i>hutG, hisC</i>
map00350	Tyrosine metabolism	None	<i>hmgA, faaH, maiA, frmA</i>
map00360	Phenylalanine metabolism	None	<i>paaH, hisC</i>
map00380	Tryptophan metabolism	None	<i>atoB, ECHS1, GCDH, HADHA</i>
map00910	Nitrogen metabolism	<i>can, narK</i>	<i>gdhA</i>
map00020	Citrate cycle (TCA cycle)	<i>IDH3</i>	<i>mdh</i>

WT 和 UV 比较组的 KEGG 富集分析表明(图 3C、3D), 两组共表达的 DEPs 多富集于双组分系统、Val/Leu/Ile 分解、丙酸与苯丙烷代谢、细菌趋药性以及苯甲酸盐降解等通路; UV 比较组显著表达的 DEPs 还存在于谷胱甘肽代谢和丁酸代谢通路。综合分析显示(表 2), 四氢嘧啶代谢通路与 10 条氨基酸代谢或氮代谢通路相关, 如 Gly、Ser、Thr、Ala、Asp 及 Glu 代谢和氮代谢等, 共计涉及 50 个 DEPs (包括 23 个上调 DEPs)。

2.4 野生菌株 XH26 与突变菌株 G₉-72 转录-蛋白组学关联分析

通过转录-蛋白组学关联分析, 明确基因转录水平(mRNA)与蛋白翻译水平上显著差异表达的一致性。结果呈现以下 4 种趋势: (1) mRNA 与蛋白均有表达差异, 且趋势相同(same trend, [ST], $r=0.84$); (2) mRNA 与蛋白均有表达差异, 但趋势相反(opposite trend, [OT], $r=-0.71$); (3) mRNA 表达无差异, 但蛋白表达有差异([NDEGs-DEPs], $r=0.11$); (4) mRNA 表达有差异, 但蛋白表达无差异([DEGs-NDEPs],

$r=0.09$), 综合分析 WT 和 UV 比较组的结果显示(表 3), ST 类的共表达基因共计 30 个; OT 类的共表达基因 4 个; NDEGs-DEPs 类的共表达基因 85 个; 此外, 还有 59 个基因在两组中分别呈现出 mRNA 与蛋白均有表达差异和 mRNA 转录无差异而蛋白表达有差异的 2 种情况。

根据上述 4 种趋势的相关系数, 并结合四氢嘧啶生物合成途径, 筛选出 15 个 DEGs (表 4)。在 ST 类别中, 7 个上调的 DEGs 分别为 *ectB*、*betB*、*betA*、*asd*、*doeD*、*doeC* 和 *gabD*, 依次编码 L-二氨基丁酸转氨酶(EctB)、NAD⁺/NADP⁺依赖性甜菜碱醛脱氢酶(BetB)、胆碱脱氢酶(BetA)、天冬氨酸半缩醛脱氢酶(Asd)、L-2,4-二氨基丁酸转氨酶(DoeD)、天冬氨酸半缩醛脱氢酶(DoeC)和 γ -氨基丁酸转移酶(GabD); 4 个下调的 DEGs 分别为 *ItaE*、*gdhA*、*gabT* 和 *acnB*, 依次编码低特异性 L-苏氨酸醛缩酶(ItaE)、谷氨酸脱氢酶(GDH)、4-氨基丁酸氨基转移酶(GabT)和苹果酸水解酶(AcnB)。在 OT 类别中, 筛选到 3 个在转录组下调但蛋白组学上调的 DEGs (*gltD*、*atoB* 和 *narG*), 分别编码谷氨酸合成酶

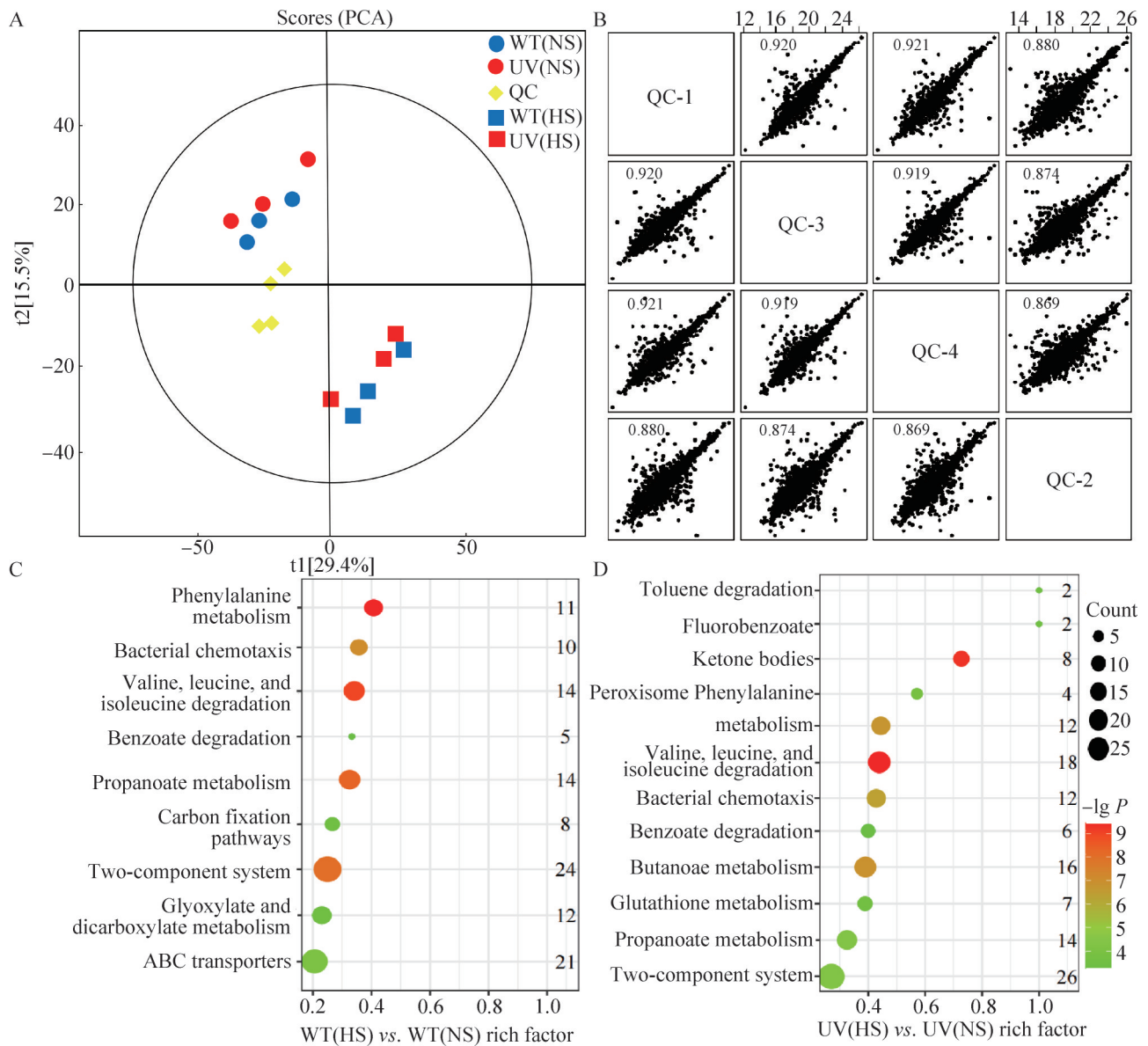


图3 蛋白组学数据质控和DEPs的KEGG富集分析。A: PCA分析; B: QC相关系数; C: WT比较组; D: UV比较组。

Figure 3 Proteomics data quality control and KEGG enrichment analysis of DEPs. A: PCA analysis; B: QC correlation coefficient; C: WT comparison group; D: UV comparison group.

(GOGAT)、乙酰 CoA 酰基转移酶(AtoB)和硝酸还原酶(NarG)。在 DEGs-NDEPs 类别中, 存在 1 个 mRNA 表达有差异但蛋白表达无差异的 DEGs (*narK*), 编码硝酸铁氧还蛋白还原酶(NarK)。综合分析表明, 直接涉及四氢嘧啶代谢通路的关键基因共计 4 个(合成基因 *asd* 和 *ectB*,

分解基因 *doeD* 和 *doeC*), 与四氢嘧啶合成代谢通路间接相关的上游参与基因共计 6 个(*betB*、*betA*、*ItaE*、*gltD*、*gadA* 和 *acnB*), 以及四氢嘧啶的生物合成与 Ala/Asp/Glu/His 代谢(*gabD*、*gdhA*、*gabT* 和 *atoB*)和氮源代谢基因(*narK* 和 *narG*)高度关联。

表2 蛋白质学分析四氢嘧啶代谢相关的氨基酸代谢通路 with 主要DEPs

KEGG ID	Name	Up DEPs	Down DEPs
map00220	Arginine biosynthesis	GlsA, ArgE	ArgD, AlaA
map00250	Alanine, aspartate and glutamate metabolism	GltD, GabD, GabT	CarA, AlaA
map00260	Alanine, aspartate and glutamate metabolism	EctB, BetB, BetA, Asd, DoeD, DoeC, GhrA, GpmB	HprA, SerA
map00280	Valine, leucine and isoleucine degradation	GabT	BkdA, BkdB, LiuC, Ivd, MmsA
map00330	Arginine and proline metabolism	AguB	AstA, AstD
map00350	Tyrosine metabolism	AdhP, FrmA, GabD	HPD, FaaH
map00360	Phenylalanine metabolism	None	HipO, PaaA/B/C/D/G/H/Z, DadA
map00380	Tryptophan metabolism	GabT	HAAO
map00910	Nitrogen metabolism	GltD, NarH, NarG	None
map00020	Citrate cycle (TCA cycle)	ACO	AcnB

表3 转录-蛋白组学关联分析的共表达DEGs

WT(HS) vs. WT(NS)	UV(HS) vs. UV(NS) [ST]	UV(HS) vs. UV(NS) [OT]	UV(HS) vs. UV(NS) [NDEGs-DEPs]
[ST]	30	0	30
[OT]	0	4	14
[NDEGs-DEPs]	9	4	85

2.5 关键 DEGs 的表达验证分析

对上述筛选的 15 个与四氢嘧啶合成代谢显著相关的 DEGs 进行荧光 RT-qPCR 表达差异验证(图 4)。结果显示, 15 个 DEGs 的 RT-qPCR 统计结果与 RNA-seq 测序结果基本一致, 即上调和下调表达的趋势一致, 但具体的表达量差异可能因实验敏感度而有所不同。

3 讨论

3.1 比较基因组学分析盐单胞菌野生菌株 XH26 与突变菌株 G₉-72 的突变基因

目前, 多组学分析技术已广泛应用于盐单胞菌的四氢嘧啶生物合成、代谢通路和网络调控研究, 揭示盐梯度变化下盐单胞菌的分子适应机制和相容溶质的代谢积累机制。课题组前

期对野生菌株 XH26 与突变菌株 G₉-72 基因组进行比较分析, 发现突变菌株 G₉-72 的单核苷酸多态性数目为 18 个, 小片段序列插入或删除数目为 17 个(结果未公开发表)这些突变涉及 RNA 结合途径(基因 *orf00034*)、ABC 转运(基因 *orf02141/mntA*)、 γ -氨基丁酸转移酶(基因 *davT* 编码)、琥珀酸半醛脱羧酶(基因 *gabD* 编码)以及谷氨酸脱羧酶(基因 *gadA* 编码)等^[24]。在本研究中, 通过比较转录-蛋白组学分析各突变基因的表达差异, 仅发现基因 *coaBC* 及其编码的磷酸泛酰半胱氨酸脱羧酶(PPCDC), 在两两比较组中存在不同的表达趋势。例如, 野生菌株 XH26 比较组中属于 DEGs-NDEPs 类别, 而在突变菌株 G₉-72 比较组中属于 NDEGs-DEPs 类别。这种表达差异, 可能是导致菌株 G₉-72 四氢嘧啶

表4 转录-蛋白组学关联的显著DEGs/DEPs注释

Table 4 Annotation of significant DEGs/DEPs across transcription-proteomic associations

Protein	Gene	Description	DEGs	Gene (fold change)	DEPs	Protein (fold change)
orf01883	<i>ectB</i>	Diaminobutyrate-2-oxoglutarate transaminase	Up	2.410	Up	2.229
orf02074	<i>betB</i>	Dependent betaine aldehyde dehydrogenase	Up	5.570	Up	1.753
orf02075	<i>betA</i>	Choline dehydrogenase	Up	4.456	Up	1.507
orf01624	<i>asd</i>	Aspartate-semialdehyde dehydrogenase	Up	0.521	Up	0.113
orf02975	<i>doeD</i>	Diaminobutyrate-2-oxoglutarate transaminase	Up	0.299	Up	1.264
orf02976	<i>doeC</i>	Aspartate-semialdehyde dehydrogenase	Up	1.124	Up	2.537
orf00898	<i>ItaE</i>	L-threonine aldolase	Down	1.970	Down	0.203
orf00776	<i>gltD</i>	Glutamate synthase	Down	0.534	Up	1.212
orf02005	<i>gabD</i>	Glutarate-semialdehyde dehydrogenase	Up	0.013	Up	0.909
orf02411	<i>gdhA</i>	Glutamate dehydrogenase	Down	1.875	Down	0.946
orf03515	<i>gabT</i>	4-aminobutyrate aminotransferase	Down	4.250	Down	3.539
orf00396	<i>atoB</i>	Acetyl-CoA acetyltransferase	Down	2.498	Up	0.944
orf00937	<i>narK</i>	Nitrite transporter	Up	2.383	None	None
orf02054	<i>narG</i>	Respiratory nitrate reductase	Down	1.945	Up	0.633
orf01682	<i>acnB</i>	Aconitate hydratase B	Down	1.097	Down	0.898

积聚量暴发的关键原因,有待代谢组学的进一步分析。

3.2 比较转录组学分析盐单胞菌野生菌株 XH26 与突变菌株 G₉-72 的 DEGs

研究表明,嗜盐菌胞内四氢嘧啶(或其衍生物 5-HE)的生物合成途径为:草酰乙酸→天冬氨酸(Asp)→L-天冬氨酸磷酸→天冬氨酸半缩醛→醛氨酸→草酰乙二氨基丁酸→N-γ-乙酰二氨基丁酸→四氢嘧啶→5-HE^[25]。其中,前体底物草酰乙酸(或 Asp/Asn)与四氢嘧啶的合成代谢通路直接相关,而碳/氮代谢、三羧酸循环(如琥珀酸、延胡索酸、苹果酸),以及上游 Glu/Gln/Ala 等氨基酸代谢网络与四氢嘧啶的合成代谢通路间接关联。Jadhav 等^[26]在桑珀尔盐单胞菌(*H. sambharensis*)基因组中鉴定出多个耐盐适应相关基因,涉及氨基酸代谢基因(如 *gadA*、*argJ*、*argG*、*gdhA*)和离子转运基因(如 *kdpA*、*trkA*、*nhaD*)。

在不同的培养条件下(如盐度、温度、pH 值

等),利用比较转录组学分析细菌生长过程中的基因表达变化、特定化合物的代谢途径和生理生化反应,可揭示细菌的环境适应和代谢反应机制^[27]。Hobmeier 等^[28]利用 RNA-seq 技术分析延长盐单胞菌(*H. elongata* DSM 2581^T)在不同碳源(乙酸盐和葡萄糖)条件下的 DEGs,结果显示,以葡萄糖为碳源时磷酸葡萄糖酸途径的相关基因(如 *zwf*、*pgl*、*edd*、*eda*)优先表达,而葡萄糖氧化途径相关基因(如 *pgi1*、*pgi2*、*pykA1* 和 *adh2*)上调表达。翟立公等^[29]采用转录组测序技术研究高渗胁迫条件下德尔卑沙门氏菌(*Salmonella enterica*)的 DEGs,发现细胞膜蛋白和氨基酸代谢通路中有 21 个显著上调的 DEGs,而糖转运系统(sugar transport system, STS)、糖酵解和抗氧化相关通路中有 38 个显著下调的 DEGs,表明高渗环境下胞内需要储存大量糖类,同时抑制胞外脂多糖的合成。在本研究中,通过设置无盐(NS)和高盐(HS)条件,对野生菌株 XH26 和突变菌株 G₉-72 进行比较转录组学分析,明确了

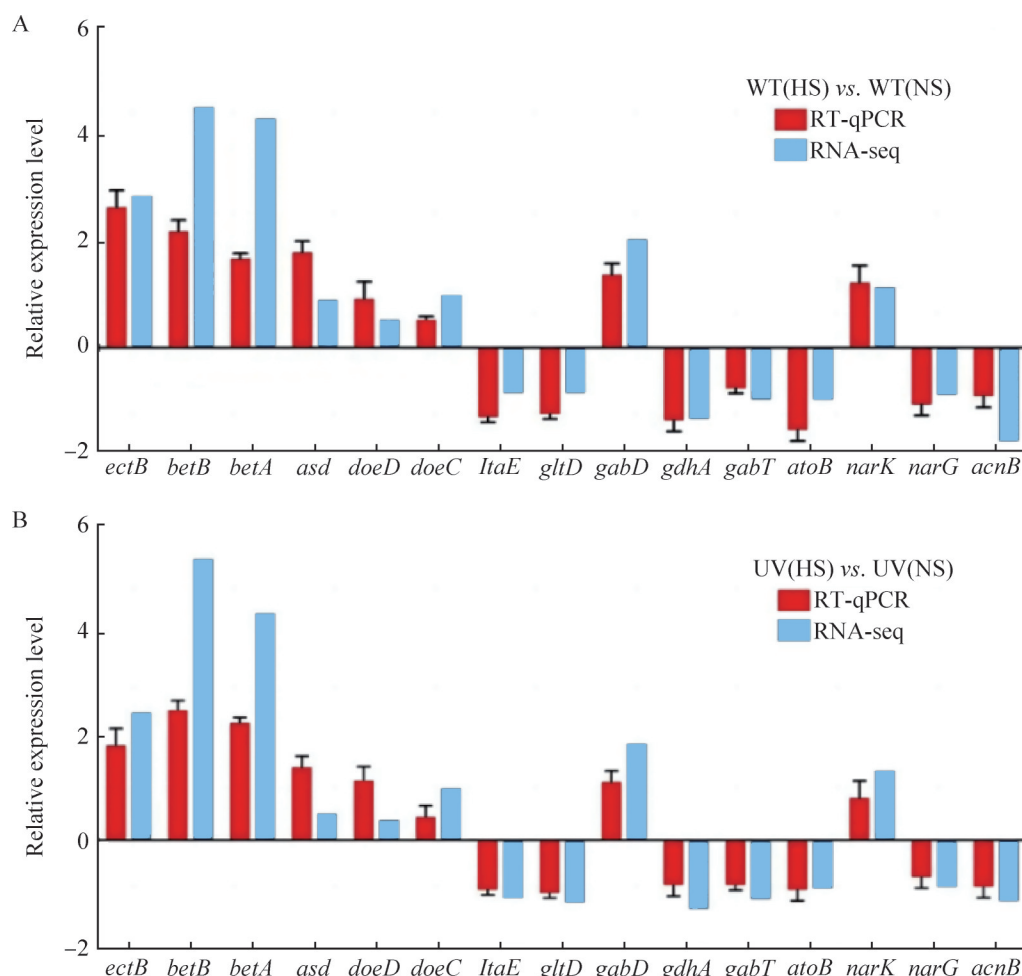


图4 RT-qPCR验证结果

Figure 4 Validation results of the RT-qPCR. A: WT comparison group; B: UV comparison group.

11 条氨基酸代谢通路(44 个 DEGs)与四氢嘧啶的合成代谢相关, 其中 13 个 DEGs 显著上调, 31 个 DEGs 显著下调。

3.3 比较蛋白组学分析盐单胞菌野生菌株 XH26 与突变菌株 G₉-72 的 DEPs

蛋白质组学是在全局水平上鉴定和分析蛋白质的特征, 涉及蛋白质的表达水平、翻译的修饰、蛋白与蛋白的互作等, 进而揭示细胞的环境应激、功能适应和细胞代谢等分子机制^[30]。Xing 等^[31]采用定量蛋白质组学(tandem mass tag, TMT)分析盐湖碱球菌(*Alkalicoccus halolimnae*) 在盐梯度条件下(4%、8%、12%、16% NaCl)的

生长代谢和相容溶质积累, 结果显示胞内四氢嘧啶的积聚量与盐适应密切相关。在中盐度(8% NaCl)时, 基因 *ectA*、*ectB* 和 *ectC* 的表达量最为显著; 胞内 Gln 和 Glu 的总量保持动态平衡, 主要在低盐度(4% NaCl)诱导时发挥渗透适应作用。本研究利用 LC-MS 技术对野生菌株 WT(HS) vs. WT(NS) 和突变菌株 UV(HS) vs. UV(NS)比较组进行分析, 明确了 10 条氨基酸代谢通路(Gly/Ser/Thr/Ala/Asp/Glu/Val/Leu/Ile 和氮代谢)与四氢嘧啶的合成代谢相关, 涉及 50 个 DEPs (包括 23 个上调 DEPs 和 27 个下调 DEPs)。

3.4 转录-蛋白组学关联分析野生菌株 XH26 与突变菌株 G₉-72 的基因表达一致性

转录-蛋白组学关联分析是探讨转录组和蛋白质组数据的差异性和互补性,明确细胞中全部 mRNA 与蛋白质的表达水平和一致性,全方位评估关键基因的表达水平和调控模式。盐胁迫下,基于多组学并联分析细菌的四氢嘧啶生物合成启动、应答以及网络代谢调控的研究并不多见。Chen 等^[32]通过转录组学关联分析嗜盐生地所球菌(*Egicoccus halophilus*) EGI 80432^T 的盐适应机制,发现海藻糖、Glu、His、Thr、Pro 和四氢嘧啶的含量随盐度增加而增加,且在中等盐度(9% NaCl)时最为显著。本研究设置无盐(0 mol/L NaCl)和有盐(1.5 mol/L NaCl)梯度条件,采用转录-蛋白组学技术关联分析野生菌株 XH26 和突变菌株 G₉-72,发现 15 个关键的 DEGs (*ectB*、*betB*、*betA*、*asd*、*doeD*、*doeC*、

gabD、*ItaE*、*gdhA*、*gabT*、*acnB*、*gltD*、*atoB*、*narG* 和 *narK*)与四氢嘧啶生物合成密切相关(图 5)。首先,与四氢嘧啶代谢通路直接相关的 DEGs: 基因 *asd* 编码的 Asd 酶催化 L-天冬氨酸磷酸脱氢生成四氢嘧啶生物合成前体 L-天冬氨酸-β-半缩醛(ASA), 基因 *ectB* 编码的 EctB 酶催化生成 2-氧戊二酸和 L-2,4-二氨基丁酸(DAB), 参与底物谷氨酸(Glu)与天冬氨酸-β-半缩醛间的转氨基反应,完成四氢嘧啶生物合成的第一步。同时,基因 *doeD/doeC* 编码的 DoeD/DoeC 酶将二氨基丁酸依次转化为 L-天冬氨酸-4-半醛和天冬氨酸,参与四氢嘧啶的降解。其次,与四氢嘧啶合成代谢通路上游间接相关的 DEGs: 基因 *betB/A* 和 *ItaE* 参与编码 Gly 代谢生成甘氨酸甜菜碱; 基因 *gltD* 通过编码 GOGAT 酶的小亚基,参与氮代谢与 Glu 生物合成; 基因 *gadA* 编码 GDH 酶催化 L-Glu 氧化脱氨为 2-氧代戊二酸,连接氨基酸代谢与 TCA 循环; 基因 *acnB* 编码

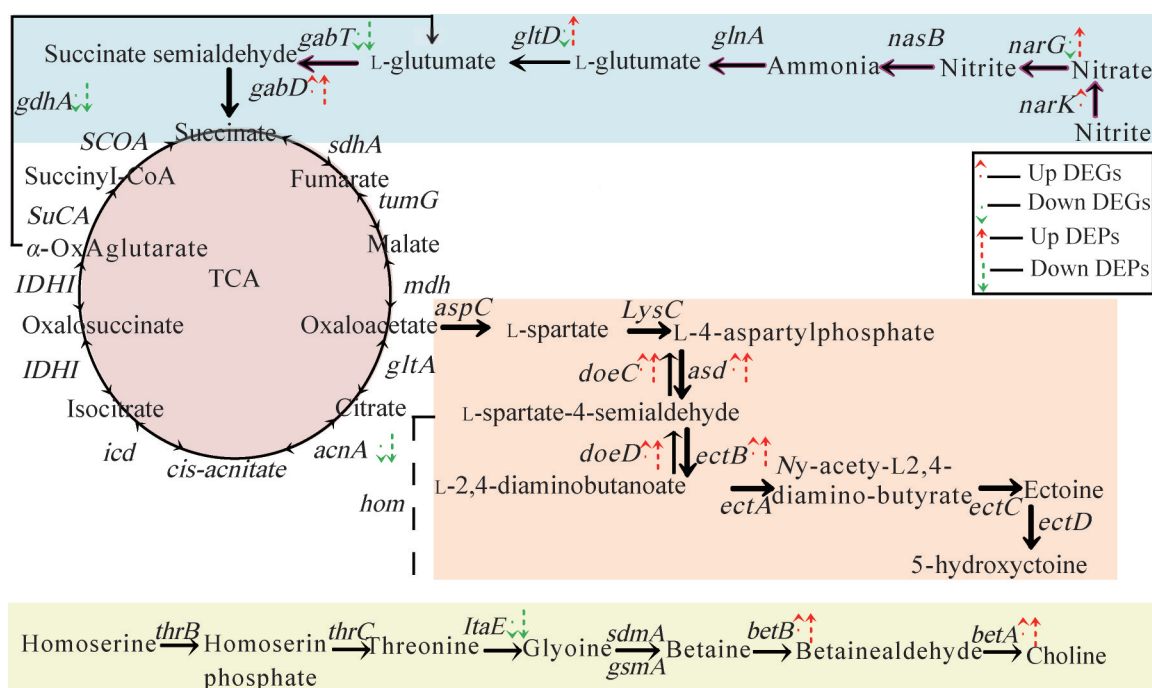


图5 四氢嘧啶生物合成的相关通路及重点DEGs

Figure 5 Related pathways and key DEGs of ectoine biosynthesis.

的 AcnB 酶是 TCA 循环的关键酶, 不仅催化柠檬酸转化为异柠檬酸, 还可感知活性氧(ROS)和细胞铁水平的变化。这些结果与我们先前的研究一致, 即野生菌株四氢嘧啶的生物合成与 Glu、Asp 和氮代谢密切相关, 且合成量受到代谢网络调控^[33]。最后, 与旁路氨基酸代谢关高度关联的 DEGs: 基因 *gabT/D* 编码 GabT/D 酶将 γ -氨基丁酸(γ -aminobutyric acid, GABA)转氨脱氢为琥珀酸, 增加进入 TCA 循环的流量^[34]; 在氮循环中基因 *narK* 和 *narG* 编码 NarK 酶催化氮/硝酸盐/亚硝酸盐还原为气态形式(反硝化反应), 如一氧化氮(NO)、一氧化二氮(N_2O)/氮气(N_2)^[35], 具体作用机制尚不清楚。

值得注意的是, 先前研究已证实基因 *gab* 的转录可能受到氮循环基因簇 *nar* 的调控影响^[36]。我们推测在紫外突变菌株中, 源自 *GabCTDP* 基因簇的基因 *gabD* 和 *gabT* 的差异表达可能影响氨基酸代谢率。同时氮源代谢中的差异表达基因 *narK* 和 *narG* 可能与基因 *gabD* 和 *gabT* 存在某种表达关联, 或许基因 *gabD* 的表达量及活性受到 *narK* 和 *narG* 的调控影响, 尚需后续的基因敲除实验深入解析 *nar* 基因簇与基因 *gabD* 间的作用机制。利用硝酸盐、亚硝酸盐或氮代谢流模型探究硝酸盐的代谢去路机制, 并关联分析四氢嘧啶的合成/降解途径, 有望最大限度地减少氮的溢出代谢, 优化四氢嘧啶的工业生产率。

参考文献

- [1] CHEN YH, LU CW, SHYU YT, LIN SS. Revealing the saline adaptation strategies of the halophilic bacterium *Halomonas beimenensis* through high-throughput omics and transposon mutagenesis approaches[J]. Scientific Reports, 2017, 7(1): 13037.
- [2] KINDZIERSKI V, RASCHKE S, KNABE N, SIEDLER F, SCHEFFER B, PFLÜGER-GRAU K, PFEIFFER F, OESTERHELT D, MARIN-SANGUINO A, KUNTE HJ. Osmoregulation in the halophilic bacterium *Halomonas elongata*: a case study for integrative systems biology[J]. PLoS One, 2017, 12(1): e0168818.
- [3] LI L, YANG XY, HONG R, LIU F. Combined proteomics and transcriptomics analysis of *Lactococcus lactis* under different culture conditions[J]. Journal of Dairy Science, 2021, 104(3): 2564-2580.
- [4] HE YZ, GONG J, YU HY, TAO Y, ZHANG S, DONG ZY. High production of ectoine from aspartate and glycerol by use of whole-cell biocatalysis in recombinant *Escherichia coli*[J]. Microbial Cell Factories, 2015, 14: 55.
- [5] BENÍTEZ-MATEOS AI, PARADISI F. *Halomonas elongata*: a microbial source of highly stable enzymes for applied biotechnology[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2023, 107(10): 3183-3190.
- [6] YOO W, KIM B, JEON S, KIM KK, KIM TD. Identification, characterization, and immobilization of a novel YbFf esterase from *Halomonas elongata*[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2020, 165: 1139-1148.
- [7] 田磊, 张芳, 沈国平, 高翔, 龙启福, 朱德锐. Ectoine 高产菌株 *Halomonas* sp. XH26 的鉴定及紫外诱变选育[J]. 生物学杂志, 2020, 37(4): 31-35.
TIAN L, ZHANG F, SHEN GP, GAO X, LONG QF, ZHU DR. Identification of high-yielding strain *Halomonas* sp. XH26 for producing ectoine and UV mutagenesis breeding[J]. Journal of Microbiology, 2020, 37(4): 31-35 (in Chinese).
- [8] DUTTA B, BANDOPADHYAY R. Biotechnological potentials of halophilic microorganisms and their impact on mankind[J]. Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Sciences, 2022, 11(1): 75.
- [9] DasSARMA S, DasSARMA P. Halophiles and their enzymes: negativity put to good use[J]. Current Opinion in Microbiology, 2015, 25: 120-126.
- [10] PARWATA IP, WAHYUNINGRUM D, SUHANDONO S, HERTADI R. Heterologous ectoine production in *Escherichia coli*: optimization using response surface methodology[J]. 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[J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2020, 130(2): 200-204.
- [12] MORTAZAVI A, WILLIAMS BA, McCUE K, SCHAEFFER L, WOLD B. Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-seq[J]. Nature Methods, 2008, 5(7): 621-628.
- [13] CHUNG M, BRUNO VM, RASKO DA, CUOMO CA, MUÑOZ JF, LIVNY J, SHETTY AC, MAHURKAR A, DUNNING HOTOPP JC. Best practices on the differential expression analysis of multi-species RNA-seq[J]. Genome Biology, 2021, 22(1): 121.
- [14] 唐正露, 朱艳艳, 李琳, 李亮, 刘雪兰, 孙裴, 李郁. 基于转录组学与蛋白质组学对猪丹毒丝菌耐药性的研究[J]. 微生物学通报, 2021, 48(10): 3736-3752.
TANG ZL, ZHU YY, LI L, LIU XL, SUN P, LI Y. Study on the resistance of *Erysipelothrix rhusiopathiae* based on transcriptomics and proteomics[J]. Microbiology China, 2021, 48(10): 3736-3752 (in Chinese).
- [15] REITER L, RINNER O, PICOTTI P, HÜTTENHAIN R, BECK M, BRUSNIAK MY, HENGARTNER MO, AEBERSOLD R. mProphet: automated data processing and statistical validation for large-scale SRM experiments[J].

- Nature Methods, 2011, 8(5): 430-435.
- [16] ROSENBERGER G, KOH CC, GUO TN, RÖST HL, KOUVONEN P, COLLINS BC, HEUSEL M, LIU YS, CARON E, VICHALKOVSKI A, FAINI M, SCHUBERT OT, FARIDI P, EBHARDT HA, MATONDO M, LAM H, BADER SL, CAMPBELL DS, DEUTSCH EW, MORITZ RL, et al. A repository of assays to quantify 10 000 human proteins by SWATH-MS[J]. Scientific Data, 2014, 1: 140031.
 - [17] 海云翔, 宋敏, 杨秀娟, 蒋宜伟, 董万涛, 巩彦龙. 基于 DIA 蛋白质组学技术联合 PRM 验证探讨去卵巢骨质疏松大鼠差异蛋白表达[J]. 中药药理与临床, 2023, 39(11): 87-93.
HAI YX, SONG M, YANG XJ, JIANG YW, DONG WT, GONG YL. Differential protein expression in ovariectomized osteoporosis rats based on DIA protein omics and PRM verification[J]. Pharmacology and Clinics of Chinese Materia Medica, 2023, 39(11): 87-93 (in Chinese).
 - [18] 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*[J]. Microbiological Research, 2020, 235: 126448.
 - [19] McCLURE R, BALASUBRAMANIAN D, SUN Y, BOBROVSKYY M, SUMBY P, GENCO CA, VANDERPOOL CK, TJADEN B. Computational analysis of bacterial RNA-seq data[J]. Nucleic Acids Research, 2013, 41(14): e140.
 - [20] GÖTZ S, GARCÍA-GÓMEZ JM, TEROL J, WILLIAMS TD, NAGARAJ SH, NÚEDA MJ, ROBLES M, TALÓN M, DOPAZO J, CONESA A. High-throughput functional annotation and data mining with the Blast2GO suite[J]. Nucleic Acids Research, 2008, 36(10): 3420-3435.
 - [21] FAN MH, SUN X, XU NJ, LIAO Z, LI YH, WANG JX, FAN YP, CUI DL, LI P, MIAO ZL. Integration of deep transcriptome and proteome analyses of salicylic acid regulation high temperature stress in *Ulva prolifera*[J]. Scientific Reports, 2017, 7(1): 11052.
 - [22] 钟紫旋. 基于转录、蛋白和代谢水平联合解析白腐菌种间漆酶诱导表达机制[D]. 重庆: 西南大学博士学位论文, 2020.
ZHONG ZX. Mechanism of laccase-induced expression among white rot fungi based on transcription, protein and metabolism[D]. Chongqing: Doctoral Dissertation of Southwest University, 2020 (in Chinese).
 - [23] 张鑫, 王智博, 缪增强, 邢江娃, 王嵘, 李永臻, 朱德锐, 沈国平. 转录组学分析盐单胞菌四氢嘧啶合成代谢相关的表达差异基因与 RT-qPCR 验证[J]. 微生物学报, 2022, 62(3): 1083-1098.
ZHANG X, WANG ZB, MIAO ZQ, XING JW, WANG R, LI YZ, ZHU DR, SHEN GP. Transcriptome analysis of differential genes associated with the ectoine synthesis pathway of *Halomonas campaniensis* under salt stress and expression verification by RT-qPCR[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2022, 62(3): 1083-1098 (in Chinese).
 - [24] WANG ZB, LI YZ, GAO X, XING JW, WANG R, ZHU DR, SHEN GP. Comparative genomic analysis of *Halomonas campaniensis* wild-type and ultraviolet radiation-mutated strains reveal genomic differences associated with increased ectoine production[J]. International Microbiology, 2023, 26(4): 1009-1020.
 - [25] 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[J]. Current Microbiology, 2020, 77(8): 1412-1418.
 - [26] JADHAV K, KUSHWAHA B, JADHAV I, SHANKAR P, GEETHADEVI A, KUMAR G, MITTAL S, SHARMA GP, PARASHAR M, PARASHAR D. Genomic analysis of a novel species *Halomonas shambharensis* isolated from hypersaline lake in Northwest India[J]. Molecular Biology Reports, 2021, 48(2): 1045-1053.
 - [27] THOMAS J, HARDEN A. Methods for the thematic synthesis of qualitative research in systematic reviews[J]. BMC Medical Research Methodology, 2008, 8: 45.
 - [28] HOBMEIER K, CANTONE M, NGUYEN QA, PFLÜGER-GRAU K, KREMLING A, KUNTE HJ, PFEIFFER F, MARIN-SANGUINO A. Adaptation to varying salinity in *Halomonas elongata*: much more than ectoine accumulation[J]. Frontiers in Microbiology, 2022, 13: 846677.
 - [29] 翟立公, 李港回, 黄菊, 蔡秋慧, 魏照辉, 何晓东, 曹睿, 王俊颖. 基于比较转录组学分析 NaCl 胁迫影响德尔夫沙门氏菌的耐渗机制[J]. 微生物学报, 2023, 63(8): 3219-3234.
ZHAI LG, LI GH, HUANG J, CAI QH, WEI ZH, HE XD, CAO R, WANG JY. Analysis of the mechanism of NaCl stress affecting the osmotic tolerance of *Salmonella delbeiy* based on comparative transcriptomics[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2023, 63(8): 3219-3234 (in Chinese).
 - [30] LIU C. Comparative proteomics for an in-depth understanding of bioadhesion mechanisms and evolution across metazoans[J]. Journal of Proteomics, 2022, 256: 104506.
 - [31] XING QH, MESBAH NM, WANG HS, ZHANG YJ, LI J, ZHAO BS. Tandem mass tag-based quantitative proteomics reveals osmotic adaptation mechanisms in *Alkalicoccus halolimnae* BZ-SZ-XJ29^T, a halophilic bacterium with a broad salinity range for optimal growth[J]. Environmental Microbiology, 2023, 25(10): 1967-1987.
 - [32] CHEN DD, FANG BZ, MANZOOR A, LIU YH, LI L, MOHAMAD OAA, SHU WS, LI WJ. Revealing the salinity adaptation mechanism in halotolerant bacterium *Halococcus halophilus* EGI 80432^T by physiological analysis and comparative transcriptomics[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2021, 105(6): 2497-2511.
 - [33] SCHNEIDER BL, KIUPAKIS AK, REITZER LJ. Arginine catabolism and the arginine succinyltransferase pathway in *Escherichia coli*[J]. Journal of Bacteriology, 1998, 180(16): 4278-4286.
 - [34] 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 socii* CKY01 and identification of osmolytes-related genes by genome sequencing[J]. Journal of Biotechnology, 2020, 322: 21-28.
 - [35] SONG WS, KIM JH, NAMGUNG B, CHO HY, SHIN H, OH HB, HA NC, YOON SI. Complementary hydrophobic interaction of the redox enzyme maturation protein NarJ with the signal peptide of the respiratory nitrate reductase NarG[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2024, 262: 129620.
 - [36] XIAN L, YU G, MACHO AP. The GABA transaminase GabT is required for full virulence of *Ralstonia solanacearum* in tomato[J]. MicroPublication Biology, 2021. DOI: 10.17912/micropub.biology.000478.