



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

金佳凡, 舒国靖, 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 315100

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 Jiafan, SHU Guojing, ZHU Sidong, YANG Jifang, CHEN Jigang. Functions of two methyl-accepting chemotaxis proteins of *Pseudoalteromonas arabiensis* N1230-9[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2024, 64(5): 1641-1653.

摘要:【目的】作为海洋中的特有及优势种群, 假交替单胞菌(*Pseudoalteromonas*)普遍拥有多个甲基受体趋化蛋白(methyl-accepting chemotaxis protein, MCP), 探究这些趋化受体的功能。【方法】以太平洋表层海水来源的一株阿拉伯海假交替单胞菌(*Pseudoalteromonas arabiensis*) N1230-9 为研究对象, 利用软琼脂平板法测试该菌株对 23 种碳源的趋化能力, 继而利用同源重组策略构建 2 个含 sCache 结构域 MCP 编码基因(*woc28264* 和 *woc27036*)缺失突变体, 并分析突变体对 10 种碳源的趋化能力。【结果】菌株 N1230-9 对海藻糖、麦芽糖、蔗糖、N-乙酰氨基葡萄糖、L-苹果酸、乙酸钠、丙酸钠、丙酮酸钠、柠檬酸和琥珀酸 10 种碳源具有趋化能力。WOC28264 是 L-苹果酸和蔗糖的特异性趋化受体, WOC27036 则是柠檬酸和琥珀酸的特异性趋化受体。此外, WOC28264 和 WOC27036 还均是 N-乙酰氨基葡萄糖和海藻糖的趋化受体。【结论】WOC28264 和 WOC27036 存在重叠的碳源效应物。

关键词: 假交替单胞菌; 趋化; 甲基受体趋化蛋白

资助项目: 浙江省生物工程一流学科创新基金(CX2022011); 宁波市自然科学基金(2023J301); 全球变化与海气相互作用专项(二期)(GASI-04-HYDZ-02)

This work was supported by the First-class Discipline of Biological Engineering of Zhejiang Province (CX2022011), the Ningbo Natural Science Foundation (2023J301), and the National Program on Global Change and Air-Sea Interaction (Phase II) (GASI-04-HYDZ-02).

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

Received: 2023-12-19; Accepted: 2024-01-30; Published online: 2024-02-02

Functions of two methyl-accepting chemotaxis proteins of *Pseudoalteromonas arabiensis* N1230-9

JIN Jiafan, SHU Guojing, ZHU Sidong, YANG Jifang, CHEN Jigang*

College of Biological & Environmental Sciences, Zhejiang Wanli University, Ningbo 315100, Zhejiang, China

Abstract: [Objective] *Pseudoalteromonas*, an endemic and dominant genus in the ocean, possesses multiple methyl-accepting chemotaxis proteins (MCPs), the functions of which remain unclear. [Methods] The chemotaxis of *Pseudoalteromonas arabiensis* N1230-9 isolated from surface seawater of the Pacific Ocean towards 23 carbon sources was analyzed by a plate-based assay for swimming motility. Two sCache domain-containing genes (*woc28264* and *woc27036*) encoding MCPs were deleted by homologous recombination. The chemotaxis of the two mutants to 10 carbon sources was then analyzed. [Results] Strain N1230-9 showed obvious chemotaxis to 10 carbon sources: trehalose, maltose, sucrose, N-acetylglucosamine, L-malic acid, sodium acetate, sodium propionate, sodium pyruvate, citric acid, and succinic acid. WOC28264 was a specific chemotactic receptor for L-malic acid and sucrose, while WOC27036 was a specific chemotactic receptor for citric acid and succinic acid. Both WOC28264 and WOC27036 were chemotactic receptors for N-acetylglucosamine and trehalose. [Conclusion] WOC28264 and WOC27036 have overlapping carbon source effectors. **Keywords:** *Pseudoalteromonas*; chemotaxis; methyl-accepting chemotaxis protein

细菌趋化性(chemotaxis)是一种感应环境中化学物质浓度变化而调控自身运动的基本生理机制,其在细菌趋近有利环境而避开不利环境过程中发挥关键作用^[1]。趋化响应受化学感觉信号通路控制,该通路广泛分布于细菌和古生菌中^[2]。趋化信号通路,始于化学效应物即配体与化学受体的特异性结合,化学受体在趋化信号转导系统中,又称甲基受体趋化蛋白(methyl-accepting chemotaxis protein, MCP)。经典的 MCP 由配体结合结构域(ligand binding domain, LBD)和组氨酸激酶、腺苷酸环化酶、甲基接受趋化蛋白、磷酸酶(histidine kinases, adenylyl cyclases, methyl-accepting chemotaxis proteins, phosphatases, HAMP)及胞质信号转换结构域(cytoplasmic signaling domain, SD)组成^[3]。

化学效应物与 LBD 结合,引起 LBD 构象改变并产生信号刺激,这种刺激通过胞质 HAMP 结构域传递给偶联蛋白 CheW 和组氨酸激酶 CheA,并改变 CheA 的自磷酸化活性;磷酸化的 CheA 将其磷酸基团传递给响应调节蛋白 CheY,磷酸化的 CheY 与鞭毛马达蛋白结合并调节鞭毛马达的运动,最终调节细菌的运动方向导致趋化响应^[4-5]。除了介导趋化,化学感觉信号通路还参与多种生物过程的调控,如生物膜的形成、胞外多糖产生、鞭毛生物合成和致病性等^[6-7]。

由于海洋细菌的趋化性微观行为并不立即显现出来,因此海洋细菌的趋化性长期被研究者所忽视。细菌趋化性不仅在海洋环境中广泛存在,而且在海洋生态学和生物地球化学中发

挥着非常关键的作用^[8-10]。海洋细菌的进化发生于复杂而多变且营养匮乏的异质环境,因此它们所呈现出的趋化性可能明显不同于处于特定生态位的肠道细菌或陆源细菌。海洋环境拥有多样的微尺度化学生态位,其中的大分子和营养物质可通过聚集成颗粒的形式进行积累,导致营养丰富的颗粒或点源微环境在营养缺乏的微环境中不断形成^[11-14]。然而,由于上述微环境通常是短暂且容易耗尽的,因此海洋细菌对营养源的有效趋化对于它们的生存至关重要^[8,15]。

作为海洋环境的特有种群,假交替单胞菌(*Pseudoalteromonas*)的适应机制和存活策略具有多样性和有效性,这使得它们能够在各种海洋环境中生存^[16-20]。对已测序的假交替单胞菌基因组分析表明,该属成员普遍拥有数量众多的 MCP 编码基因,这表明假交替单胞菌可能响应环境中的多种信号分子。然而,目前尚不清

楚假交替单胞菌所拥有的 MCP 具体响应哪些化学效应物。为此,本研究选择一株阿拉伯海假交替单胞菌(*Pseudoalteromonas arabiensis*) N1230-9 作为代表菌株,通过实验深入探讨 2 个具有同一结构域的甲基受体趋化蛋白与菌株碳源趋化间的关联。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒

阿拉伯海假交替单胞菌(*Pseudoalteromonas arabiensis*) N1230-9 为本实验室成员在参加大洋 54 航次科考期间,从太平洋表层海水(178.71°W, 12.51°N)中分离获得的一株具有几丁质降解能力的菌株^[21]。该菌株以甘油菌的形式保存于实验室-80 °C超低温冰箱。本研究所使用的其他菌株和质粒如表 1 所示。

表 1 实验用的菌株和质粒

Table 1 Plasmids and bacterial strains used in this study

Strains and plasmids	Genotype/Relevant characteristics	Source
<i>Escherichia coli</i> strains		
DH5 α	F ⁻ Φ 80 <i>lacZ</i> Δ M15 Δ (<i>lacZYA-argF</i>) U169 <i>recA1 endA1 hsdR17</i> (rK ⁻ , mK ⁺)	Invitrogen
WM3064	Donor strain for conjugation, diaminopimelate (DAP) auxotrophic	[22]
<i>Pseudoalteromonas arabiensis</i> strains		
N1230-9	Wild-type strain isolated from pacific seawater	This study
Δ <i>woc28264</i>	N1230-9 with the chromosomal <i>woc28264</i> gene deleted	This study
Δ <i>woc27036</i>	N1230-9 with the chromosomal <i>woc27036</i> gene deleted	This study
Δ <i>woc28264</i> -C	<i>woc28264</i> cloned into Δ <i>woc28264</i>	This study
Δ <i>woc27036</i> -C	<i>woc27036</i> cloned into Δ <i>woc27036</i>	This study
Plasmids		
pK18 <i>mobsacB</i> -Ery	Kan ^R , Ery ^R , suicide vector for gene knockout	[22]
pBBR1MCS-Ery	Ery ^R , broad-host-range mobilizable plasmid	[22]
pK18 <i>mobSacB</i> -Ery- <i>woc28264</i>	pK18 <i>mobsacB</i> -Ery with 679 bp upstream fragment and 646 bp downstream fragment of <i>woc28264</i>	This study
pK18 <i>mobSacB</i> -Ery- <i>woc27036</i>	pK18 <i>mobsacB</i> -Ery with 713 bp upstream fragment and 712 bp downstream fragment of <i>woc27036</i>	This study
pBBR1MCS-Ery- <i>woc28264</i>	Ery ^R , Kan ^R ; pBBR1Ery containing <i>woc28264</i> and its own promoter	This study
pBBR1MCS-Ery- <i>woc27036</i>	Ery ^R , Kan ^R ; pBBR1Ery containing <i>woc27036</i> and its own promoter	This study

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

1.1.2 引物

用于菌株 N1230-9 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、试剂和菌株培养条件

基础培养基(minimal medium, MM): 取适量体积的人工海水(0.4 mol/L NaCl、0.1 mol/L MgSO₄·7H₂O、0.02 mol/L KCl 和 0.02 mol/L CaCl₂·2H₂O), 加入等体积的蒸馏水, 1×10⁵ Pa 高压灭菌处理后, 加入经过滤除菌的 50 mmol/L HEPES 缓冲液(pH 7.5)、19 mmol/L NH₄Cl、0.33 mmol/L K₂HPO₄·3H₂O、0.01 mmol/L FeSO₄·7H₂O 和适宜浓度的无菌碳源。如配制

MM 软琼脂培养基则在 MM 培养基中加入 0.25%终浓度琼脂粉。

PCR 扩增试剂盒、DNA 回收试剂盒, 康为世纪生物科技股份有限公司; T4 DNA 连接酶、*Bam*H I、*Eco*R I、*Pst* I、*Sal* I和 *Xho* I, 宝生物工程(大连)有限公司。

E. coli 采用 LB 培养基培养, 培养温度为 37 °C; *P. arabiensis* N1230-9 及其基因缺失突变体采用 Marine Broth/Agar 2216 培养基(BD Difco 公司, 以下简称 2216 培养基)培养, 培养温度为 25 °C; *E. coli* WM3064 使用含 0.3 mmol/L 终浓度的 2,6-二氨基庚二酸(2,6-diamino-pimelic

表 2 用于突变体构建和 DNA 测序的引物

Table 2 Primers used for the construction of mutant strains, and for DNA sequencing

Primer names	Direction (5'→3')	Restriction enzyme cutting site
<i>woc27036</i> -up-F	CGCGT <u>CGAC</u> GTTGGTGAGCGTAGTAGTGATTGGT	<i>Sal</i> I
<i>woc27036</i> -up-R	AGGTTGGTCTTACTGGCATCATCGAGCGATAACCGTGATACTTCATCATTACC	
<i>woc27036</i> -dn-F	GGTAATGATGAAGTATCACGGTTATCGCTCGATGATGCCAGTAAGACCAACCT	
<i>woc27036</i> -dn-R	CGCGGAT <u>CC</u> TTGAGTATTTGATAGGGATTGCTCTGTT	<i>Bam</i> H I
<i>woc27036</i> -wS	CCTATGAGCATGACGAAGGAACATACAT	
<i>woc27036</i> -wA	GCTGTAGCCACTTGAGTTGAACTGT	
<i>woc27036</i> -dS	GGAGAAGGTGACTTAACTCAGCAACT	
<i>woc27036</i> -dA	CGAGCTTGAAGCGGTTTACAACATC	
<i>woc28264</i> -up-F	AA <u>CTGCAG</u> CTTCTTGCCCTTCTTCCACCTTTA	<i>Pst</i> I
<i>woc28264</i> -up-R	CTTCCATTGACGCTGCCGACATCGGACTTGTGATACTGCGAGATACC	
<i>woc28264</i> -dn-F	GGTATCTCGAGTATCACAAGTCCGATGTCGGCAGCGTCAATGGAAG	
<i>woc28264</i> -dn-R	CGCGGAT <u>CC</u> GCATATAAGAGGTTGCTACATCAGTATCAC	<i>Bam</i> H I
<i>woc28264</i> -wS	AGGCGAATTTGATGCGACTGTGTAT	
<i>woc28264</i> -wA	CTTCCATTGACGCTGCCGACAT	
<i>woc28264</i> -dS	TTGCCTCGGTGCTTGCTGTTG	
<i>woc28264</i> -dA	AAGTGTGACCTAACCTAAGCCTTATAACG	
<i>woc28264</i> -F	CCG <u>CTCGAG</u> ATGGCGCTATCAATTCAGCAA	<i>Xho</i> I
<i>woc28264</i> -R	CCGGAAT <u>CC</u> CTAACCTAAGCCTTATAACGGCT	<i>Eco</i> R I
<i>woc27036</i> -F	CCG <u>CTCGAG</u> GAGCATGACGAAGGAACATAC	<i>Xho</i> I
<i>woc27036</i> -R	CCGGAAT <u>CC</u> TTGTCGTTAGTCGAGCTTGAAGCG	<i>Eco</i> R I
pK18-F	ATCCGCTGGCAGCTTAAG	
PK18-R	GGTAACGCCAGGGTTTTCC	
pBBR1MCS-F	TCGTAAATAGCCGCTTATG	
pBBR1MCS-R	AATTCACACAGGAAACAGC	

F indicates the forward primer and R indicates the reverse primer. Underlined and italicized sequences indicate restriction enzymes.

acid, DAP) LB (LB-DAP)培养基^[22]培养, 培养温度为 37 °C; 菌株接合实验使用 1/2 SW-LB-DAP 固体培养基^[22]。二次同源重组菌株筛选使用含 15%终浓度蔗糖的 2216-蔗糖培养基^[22]。根据实验需求, 培养基中添加 15 µg/mL 的红霉素。

1.2 MCP 编码基因及其结构域分析

菌株 *P. arabiensis* N1230-9 全基因组已完成测序 (GenBank 登录号: CP090419.1 & CP090420.1)^[21]。基于 NCBI 和 JGI 数据库^[23] 的基因组注释结果, 获得菌株 N1230-9 的 MCP 编码基因。利用 InterPro 数据库 (<https://www.ebi.ac.uk/interpro/>)^[24] 在线预测 MCP 结构域。使用 MAFFT 软件 (<http://mafft.cbrc.jp/alignment/server/>) 进行结构域氨基酸序列同源比对。

1.3 野生菌株碳源利用能力检测

挑取单菌落接种至 2216 培养基中, 25 °C、180 r/min 培养 6–8 h 至细菌对数生长期中期 (OD_{600} 约为 0.5)。取细菌培养液, 4 500 r/min 离心 5 min 收集菌体。菌体用无菌人工海水离心洗涤 2 次后, 再用无菌人工海水将细胞浓度调整至 OD_{600} 为 0.5。取菌液按 1:100 (体积比) 比例接种至新鲜 MM 培养基中振荡培养, 并在培养过程中定时取样, 用分光光度法测定培养物的 OD_{600} 值。每个实验样本均设置 3 个生物学重复。MM 培养基中添加的碳源为 L-阿拉伯糖、海藻糖、麦芽糖、乳糖、蔗糖、D-果糖、甘露糖、甘露醇、D-葡萄糖、N-乙酰氨基葡萄糖、L-苹果酸、D-半乳糖、N-乙酰氨基半乳糖、D-山梨醇、L-鼠李糖、L-岩藻糖、D-核糖、D-木糖、柠檬酸、琥珀酸、乙酸钠、丙酸钠和丙酮酸钠这 23 种碳源中的任意一种, 添加终浓度均为 10 mmol/L。

1.4 野生菌株碳源趋化能力检测

挑取单菌落接种于 2216 培养基中, 25 °C、180 r/min 培养 12–16 h。次日, 取细菌培养液

按 1:100 (体积比) 比例接种至新鲜 2216 培养基中, 继续培养 6–8 h 至细菌对数生长期中期, 3 800 r/min 离心 5 min 收集菌体。菌体用无菌人工海水离心洗涤 2 次后, 用适量无菌人工海水将细胞浓度调整至 OD_{600} 为 0.6。取 5 µL 菌液接种至含有不同碳源的 MM 软琼脂平板中央, 置于 25 °C 恒温培养箱中培养, 并在培养后的第 18 小时测量趋化圈直径。MM 软琼脂培养基的碳源添加量均为 0.5 mmol/L, 以不添加任何碳源的 MM 软琼脂培养基作为阴性对照组。每个实验样本均设置 3 个生物学重复。

1.5 基因缺失突变体及回补菌株的构建

基因敲除实验使用 Wang 等^[22] 建立的假交替单胞菌基因敲除系统。以 *woc27036* 基因敲除为例, 简要描述基因敲除步骤。使用两对引物 (*woc27036-up-F/woc27036-up-R* 和 *woc27036-dn-F/woc27036-dn-R*) 扩增靶区的上游片段 (713 bp) 和下游片段 (712 bp), 继而利用引物对 (*woc27036-up-F* 和 *woc27036-dn-R*) 进行融合 PCR, 获得上游片段和下游片段的融合片段。将融合片段用 *Sal I/BamH I* 双酶切后亚克隆至自杀质粒 pK18*mobsacB-Ery* 中获得重组质粒 pK18*mobsacB-Ery-woc27036*。将重组质粒转化至 *E. coli* WM3064 中, 并利用引物对 pK18-F/pK18-R 进行 DNA 测序验证。通过属间接合方式将重组自杀质粒从 WM3064 转移至菌株 N1230-9 中, 基于同源重组的两次交换原理, 实现靶基因的无痕敲除^[22]。以第 1 次交换成功菌株染色体中自带的 *Ery* 抗性基因筛选标识, 利用含 *Ery* 的 2216 培养基筛选发生一次交换的克隆, 并用 *woc27036-dS/woc27036-wA* 引物对筛选的克隆进行 PCR 验证。以第 2 次交换成功菌株对蔗糖的敏感性作为筛选标识, 利用 2216-蔗糖培养基筛选基因缺失菌株, 并利用 3 对引物对 (*woc27036-dS/woc27036-wA*、*woc27036-wS/woc27036-wA* 和

woc27036-dS/woc27036-dA)对筛选的基因缺失突变体进行 PCR 验证。

基因回补实验使用宽宿主范围质粒 pBBR1MCS-Ery^[22]。以菌株 N1230-9 基因组 DNA 为模板, 分别利用引物对 *woc28264C-F/woc28264C-R* 和 *woc27036C-F/woc27036C-R* 进行 PCR 扩增, 获得含有自身启动子的 *woc28264* 基因片段和 *woc27036* 基因片段, 并分别将其亚克隆至质粒 pBBR1MCS-Ery 中, 获得重组质粒 pBBR1MCS-Ery-*woc28264* 和 pBBR1MCS-Ery-*woc27036*。将 2 个重组质粒分别转入 WM3064 中, 继而使用引物对 pBBR1MCS-F/pBBR1MCS-R 进行 DNA 测序验证后, 通过接合方式^[22]分别将其转移至 $\Delta woc28264$ 和 $\Delta woc27036$ 中, 获得基因回补菌株 $\Delta woc28264-C$ 和 $\Delta woc27036-C$ 。

1.6 基因缺失突变体碳源趋化能力分析

按照 1.4 中的实验步骤, 测定基因缺失突变体和基因回补菌株的碳源趋化能力。以野生

菌株为阳性对照菌株, 且每个实验组至少设置 3 个生物学重复。趋化圈记录时间为培养后的第 18 小时。以基因缺失突变体或基因回补菌株的趋化圈直径与野生菌株的趋化圈直径的百分比为纵坐标作图。

2 结果与分析

2.1 菌株 N1230-9 趋化受体编码基因

菌株 N1230-9 基因组大小 4 627 470 bp, G+C 含量为 40.85%, 共编码 4 202 个蛋白^[21]。基因组注释结果显示, 菌株 N1230-9 基因组共编码 28 个 MCP (图 1)。InterPro 数据库预测结果显示, 28 个 MCP 呈现出 3 种结构特征, 包括有跨膜区和 LBD、无跨膜区但有 LBD, 以及有跨膜区但无 LBD (图 1)。此外, LBD 结构域类型也呈现出多样性, 不但包括可被 InterPro 数据库预测的 8 个类型结构域(4HB、HBM、sCache、dCache、Tar、PAS、PDC1 和 PDC2),

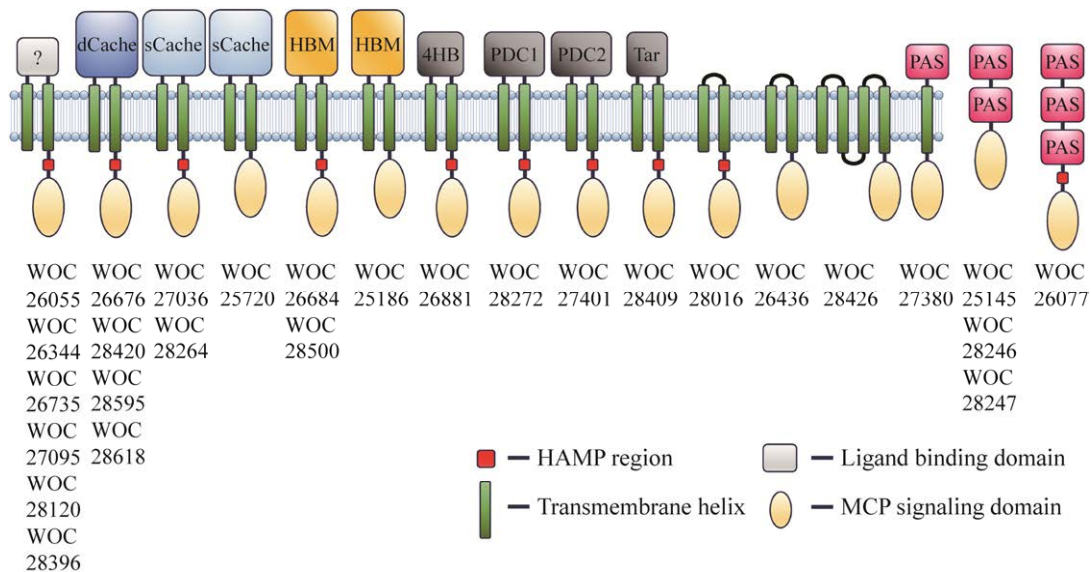


图 1 菌株 *Pseudomonas arabiensis* N1230-9 化学感受器的结构域展示

Figure 1 Domains display of chemoreceptor of *Pseudomonas arabiensis* N1230-9. Cache: Calcium channels and chemotaxis receptors; HBM: Helical bimodular; 4HB: Four helix bundle; PDC: PhoQ/DcuS/CitA sensor domains; PAS: Per-Arnt-Sim. Chemoreceptors are present in higher oligomeric states *in vivo* but are shown as monomers for simplicity. WOC numbers mean GenBank protein ID.

还包括未能被数据库预测的潜在 LBD 结构域 (“?”) (图 1)。在上述含有 LBD 结构域 MCP 中, 6 个 MCP 因缺失 HAMP 结构域(图 1), 无法将感应信号传递给下游的信号转导蛋白, 因此推测这 6 个 MCP 是“无功能性”甲基受体趋化蛋白。

2.2 菌株 N1230-9 信号传导蛋白编码基因

菌株 N1230-9 含有 19 个信号传导蛋白编码基因(*che*), 包括 1 个 *cheD*、2 个 *cheR*、2 个 *cheB*、1 个 *cheA*、3 个 *cheW*、2 个 *cheV*、6 个 *cheY*、1 个 *cheZ* 和 1 个 *cheX*。这 19 个 *che* 基因中, 12 个 *che* 基因形成 2 个基因簇(cluster I、cluster II, 图 2), 而其他 *che* 基因则分散在基因组中。进一步比较分析发现, 菌株 N1230-9 的 2 个 *che* 基因簇与铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*) PAO1 的 2 个 *che* 基因簇中的 *che* 基因组成和排布方式非常相似^[25] (图 2)。目前, 已经证实 *P. aeruginosa* PAO1 的 cluster I 和 cluster V 形成具有趋化功能的 F6 型通路(*che*), 而 cluster II 形成的 F7 型(*che2*)通路的功能尚不清楚^[25]。以此推断, 菌株 N1230-9 中与菌株 *P. aeruginosa* PAO1 的 2 个 cluster (I 和 II) 相对应的 cluster (I 和 II) 也发挥类似功能。此外, cluster II 中的 *woc26077* 所处位置对应 *P. aeruginosa* PAO1 cluster II 中的趋氧受体编码基因 *mcpB/aer2*。同

源性比较分析发现, WOC26077 是菌株所有编码蛋白中与 *McpB* 氨基酸序列一致性最高的蛋白(56%), 因此推测 WOC26077 可能是菌株 1230-9 的趋氧受体。

2.3 菌株 N1230-9 对 23 种碳源的趋化性

为了分析菌株 N1230-9 的碳源利用能力与碳源趋化性之间的联系, 本研究首先测定了该菌株对 23 种碳源的利用能力。碳源利用能力实验结果显示, 菌株 N1230-9 能以 L-阿拉伯糖、L-岩藻糖、海藻糖、麦芽糖、蔗糖、琥珀酸、D-葡萄糖、N-乙酰氨基葡萄糖、L-苹果酸、N-乙酰氨基半乳糖、乙酸钠、丙酸钠或丙酮酸钠为唯一碳源生长, 而不能以甘露糖、甘露醇、乳糖、D-果糖、D-半乳糖、D-山梨醇、L-鼠李糖、D-核糖、D-木糖或柠檬酸为唯一碳源生长。趋化实验结果显示, 菌株 N1230-9 不但对海藻糖、麦芽糖、蔗糖、N-乙酰氨基葡萄糖、L-苹果酸、琥珀酸、乙酸钠、丙酸钠和丙酮酸钠 9 种可作为唯一碳源支持细菌生长的碳源具有趋化性, 且对柠檬酸这 1 种不能作为唯一碳源支持菌株生长的碳源具有趋化能力, 而对其他 13 种碳源均无趋化能力(图 3)。此外, 趋化实验结果还显示, 菌株 N1230-9 对柠檬酸和琥珀酸的趋化能力最强, 而对丙酮酸钠的趋化能力最弱(图 3)。

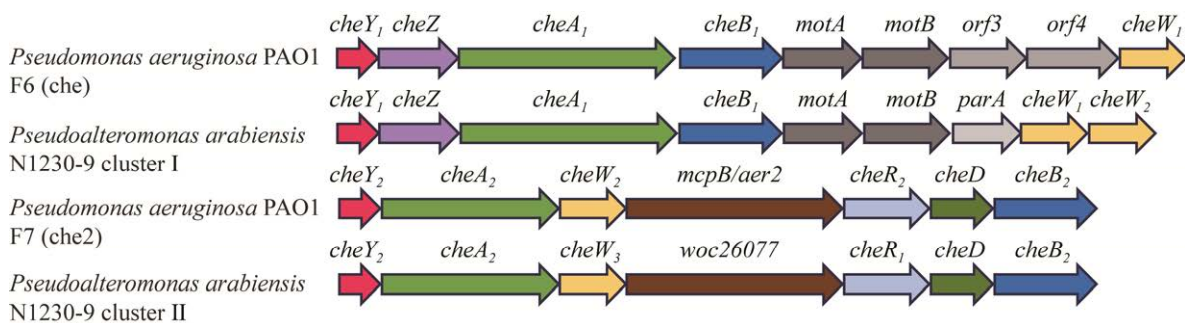


图 2 菌株 *Pseudoalteromonas arabiensis* N1230-9 和 *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 的化学通路比较分析^[25]
Figure 2 Comparative analysis of chemosensory pathways of *Pseudoalteromonas arabiensis* N1230-9 and *Pseudomonas aeruginosa* PAO1^[25].

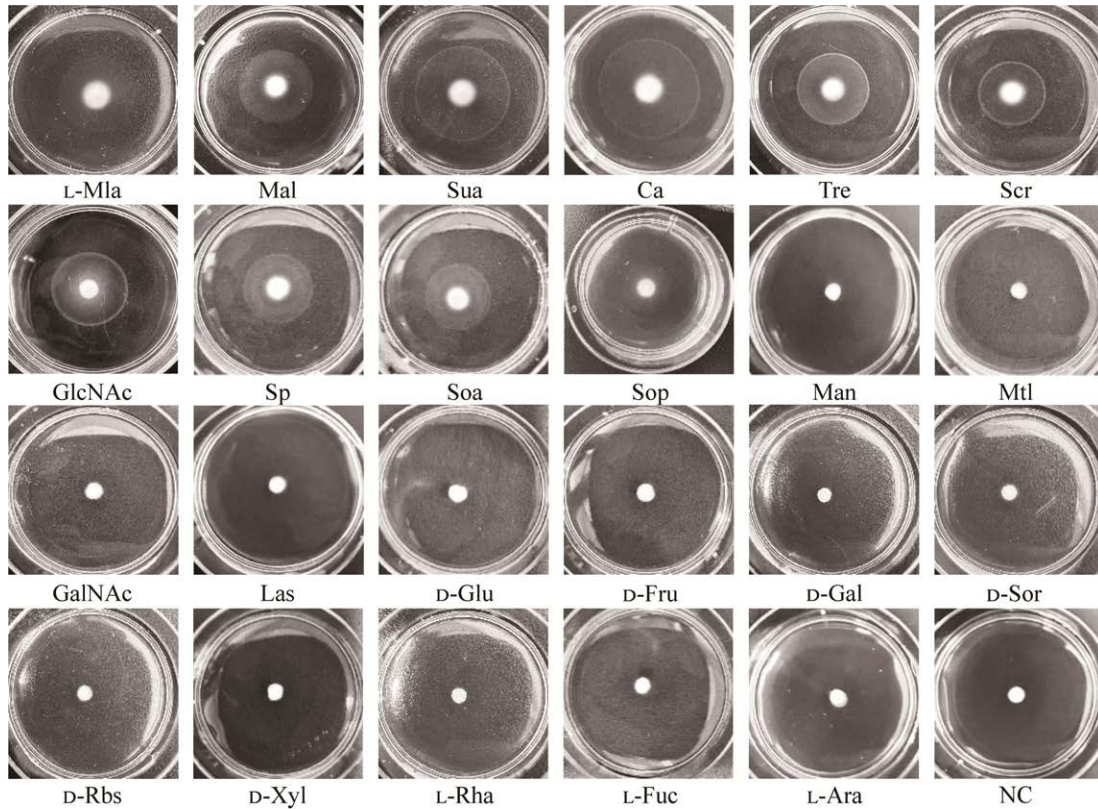


图 3 泳动平板法检测 *Pseudoalteromonas arabiensis* N1230-9 对 23 种碳源的趋化性

Figure 3 The chemotaxis phenotype of *Pseudoalteromonas arabiensis* N1230-9 to 23 carbon sources in swimming plate assay. L-Mla: L-malic acid; Mal: Maltose; Sua: Succinic acid; Ca: Citric acid; Tre: Trehalose; Scr: Sucrose; GlcNAc: N-acetylglucosamine; Sp: Sodium propionate; Soa: Sodium acetate; Sop: Sodium pyruvate; Man: Mannose; Mtl: Mannitol; GalNAc: N-acetylgalactosamine; Las: Lactose; D-Glu: D-gluconate; D-Fru: D-fructose; D-Gal: D-galactose; D-Sor: D-sorbitol; D-Rbs: D-ribose; D-Xyl: D-xylose; L-Rha: L-rhamnose; L-Fuc: L-fucose; L-Ara: L-arabinose; NC: Negative control.

2.4 基因缺失突变体对碳源的趋化响应

已有结果表明, 某些细菌主要利用含 sCache 型 LBD 的 MCP 感应环境中的碳源^[26]。基于此, 本研究以含有 sCache 型 LBD, 同时具有 HAMP 结构域的 2 个 MCP 编码基因为靶标基因, 利用同源重组技术分别构建了 *woc28264* 缺失突变体 $\Delta woc28264$ 和 *woc27036* 缺失突变体 $\Delta woc27036$ (图 4A、4B), 继而检测了这 2 个突变体的碳源趋化能力。趋化实验结果显示, 2 个突变体对各种碳源的趋化能力既存在相同点也存在不同之处。相同的是, 2 个突变体对乙酸

钠、丙酸钠、丙酮酸钠和麦芽糖的趋化能力相对于野生菌株均没有发生变化, 且 2 个突变体对 N-乙酰氨基葡萄糖和海藻糖的趋化能力均较野生菌株明显减弱(图 5A)。不同的是, $\Delta woc28264$ 对 L-苹果酸和蔗糖的趋化能力较野生菌株明显减弱, 而 $\Delta woc27036$ 对这两种碳源的趋化能力与野生菌株的没有明显差异(图 5A)。此外, $\Delta woc27036$ 对柠檬酸和琥珀酸的趋化能力较野生菌株明显减弱, 而菌株 $\Delta woc28264$ 对柠檬酸的趋化能力则强于野生菌株, 且对琥珀酸的趋化能力与野生菌株的基本相同(图 5A)。

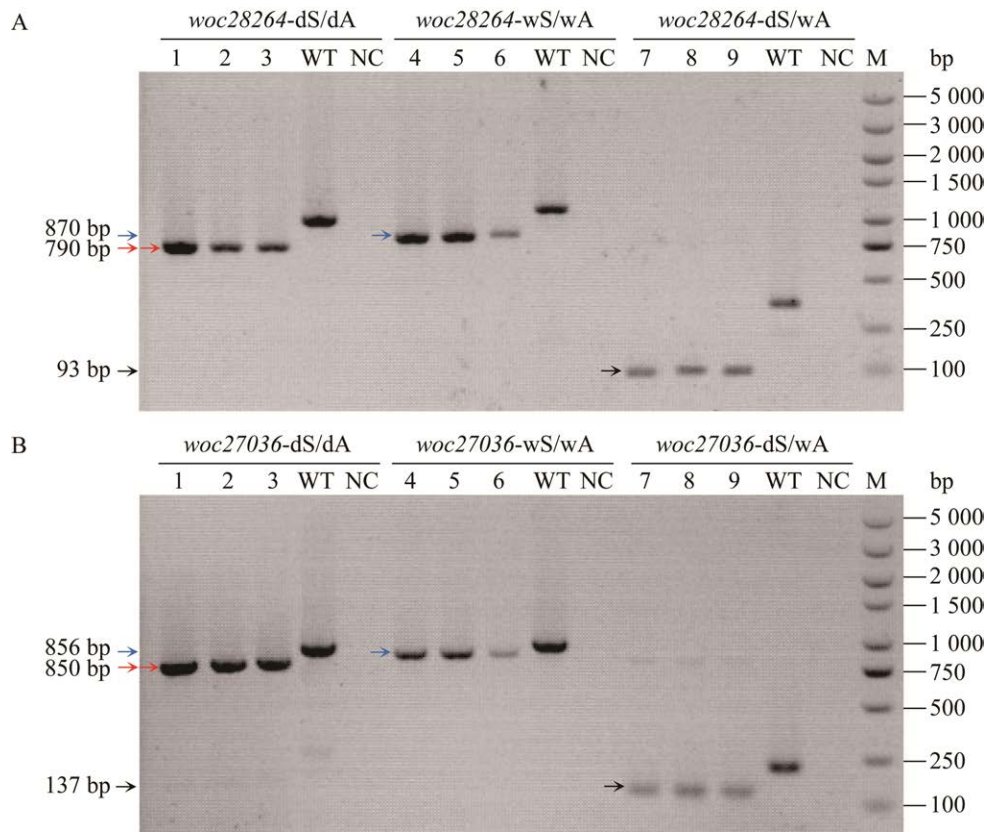


图 4 缺失突变株的菌落 PCR 验证

Figure 4 Identification of the mutants by colony PCR. A: PCR detection of $\Delta woc28264$ double crossover mutants using three primer pairs. B: PCR detection of $\Delta woc27036$ double crossover mutants using three primer pairs. M: DNA marker. PCR templates used are: 1–9, nine independent colonies that can grow on the selective plate after mating. WT: N1230-9 wild-type strain. NC: Negative control.

对基因回补菌株的趋化性检测结果显示, $\Delta woc28264$ -C 和 $\Delta woc27036$ -C 对 10 种碳源的趋化能力与野生菌株无明显差异(图 5B), 说明靶基因的敲除没有产生极性效应。

3 讨论与结论

大多数细菌已经进化出检测各种环境信号的能力, 以便在快速变化的条件下生存和繁殖。控制运动的趋化性网络是最突出的原核感应系统之一^[27]。虽然信号通路的核心部件在细菌中是保守的, 但化学受体的数量和特异性是高度可变的, 并且是菌株特异性的^[3]。不同于

E. coli 所拥有的 4 个趋化受体仅参与一种化学感应途径, 类球红细菌(*Rhodobacter sphaeroides*)^[28]、霍乱弧菌(*Vibrio cholerae*)^[29]、*P. aeruginosa*^[30]、黄色黏球菌(*Myxococcus xanthus*)^[31]和伯氏疏螺旋体(*Borrelia burgdorferi*)^[32]等多种细菌不仅具有数量众多的化学受体, 还具有多个化学感应途径。确定哪种化学受体进入哪种途径是复杂化学感受系统研究的核心问题。多项研究已证实 *P. aeruginosa* PAO1 的 WSP 和 CHP 途径分别由单个化学受体 McpB/Aer2、WspA 和 PilJ 刺激, 而分散在基因组中的化学受体被预测为进入介导趋化性的 F6 途径^[33-36]。比较分析发现,

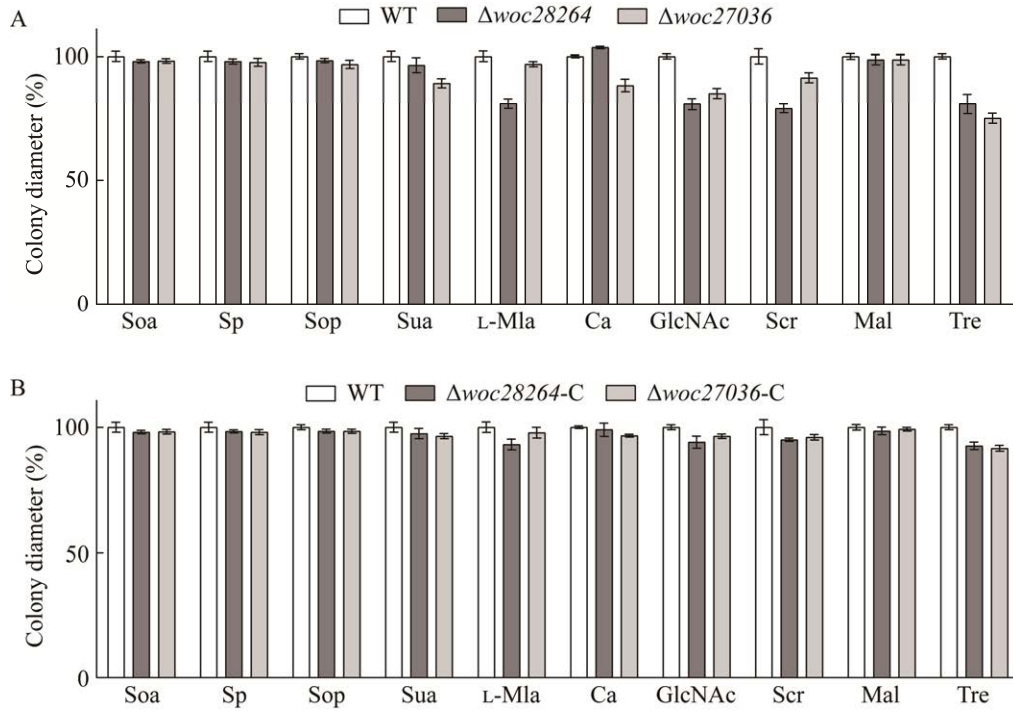


图 5 基因缺失突变体及基因回补菌株对 10 种碳源的趋化表型

Figure 5 Participation of *woc28264*, *woc27036*, *woc28264-C* and *woc27036-C* in the chemotactic responses to 10 carbon sources demonstrated in swimming plate assays. A: Chemotactic responses to 10 carbon sources with WT and two mutants ($\Delta woc28264$ and $\Delta woc27036$). B: Chemotactic responses to 10 carbon sources with WT and two complement mutants ($\Delta woc28264-C$ and $\Delta woc27036-C$).

菌株 *P. arabiensis* N1230-9 具有类似于铜绿假单胞菌 F6 和 F7 途径相关基因簇，而不具有其他类别的化学感受途径相关基因簇，因此推断菌株 N1230-9 的 28 个化学受体只能进入 F6 型和 F7 型途径，其中位于 cluster II 中的 WOC26077 负责 F7 途径的激活，而其他散在分布在基因组中的 27 个 MCP 可能进入 F6 途径。不同于目前报道的趋氧受体通常只具有一个 PAS 结构域^[25]，潜在的趋氧受体 WOC26077 具有 3 个 PAS 结构域，因此不排除该化学受体除了作为 O₂ 受体外，还可能在感应胞内外其他刺激信号中发挥重要作用。

综合菌株 N1230-9 对 23 种碳源的利用能力和趋化性结果，该菌株并非对其能代谢利用的碳源均有趋化性，也并非对不能利用的碳源均

不具有趋化能力。此外，趋化实验结果还表明，菌株 N1230-9 对同一检测浓度下的不同碳源的趋化能力也存在较大差异。上述实验结果说明，有效的趋化因子并不一定是菌株 N1230-9 优先代谢的或其用作碳源时生长滞后时间最短的化合物。为了证明具有 sCache 结构域的 MCP 是否参与了菌株 N1230-9 对碳源的趋化，本研究通过软琼脂平板法分析了 2 个基因缺失突变体和基因回补菌株对 10 种碳源的趋化能力，得到了 3 个主要实验结论：(1) WOC28264 和 WOC27036 所结合的化学效应因子存在重叠，如这两个化学受体均是 N-乙酰氨基葡萄糖和海藻糖的趋化受体；(2) WOC28264 和 WOC27036 具有化学效应因子的特异性，前者是 L-苹果酸和蔗糖的特异性受体，而后者则是柠檬酸和琥珀酸

的趋化受体; (3) WOC28264 和 WOC27036 均不是乙酸钠、丙酸钠、丙酮酸钠和麦芽糖的趋化受体。相对于其他检测碳源, N-乙酰氨基葡萄糖和海藻糖在菌株生存环境中出现的频率高, 因此不难理解菌株 N1230-9 为何拥有多个响应这两种碳源的化学受体。突变菌株趋化实验还显示了有趣的实验现象, 即 *woc28264* 缺失突变体对柠檬酸的趋化性增强。多项研究表明, 细菌趋化受体与趋化效应因子的结合需要周质结合蛋白的参与^[37]。同源比对结果显示, WOC27036 的 LBD 结构域与 WOC28264 的 LBD 结构域间的氨基酸序列一致性最高(29%)。因此, 我们推测 WOC27036 与柠檬酸和琥珀酸的结合可能也需要某种周质结合蛋白的参与, 以及同样具有 sCache 型 LBD 的 WOC28264 可与 WOC27036 竞争结合这一周质结合蛋白。

致谢

感谢中国科学院南海海洋研究所王晓雪研究员团队提供菌株和质粒。

参考文献

- [1] LARSEN SH, READER RW, KORT EN, TSO WW, ADLER J. Change in direction of flagellar rotation is the basis of the chemotactic response in *Escherichia coli*[J]. *Nature*, 1974, 249(452): 74-77.
- [2] SZURMANT H, ORDAL GW. Diversity in chemotaxis mechanisms among the bacteria and archaea[J]. *Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR*, 2004, 68(2): 301-319.
- [3] SALAH UD-DIN AIM, ROUJEINIKOVA A. Methyl-accepting chemotaxis proteins: a core sensing element in prokaryotes and archaea[J]. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2017, 74(18): 3293-3303.
- [4] BI S, LAI L. Bacterial chemoreceptors and chemoeffectors[J]. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2015, 72(4): 691-708.
- [5] HUANG Z, PAN X, XU N, GUO M. Bacterial chemotaxis coupling protein: structure, function and diversity[J]. *Microbiological Research*, 2019, 219: 40-48.
- [6] HUANG Z, WANG YH, ZHU HZ, ANDRIANOVA EP, JIANG CY, LI D, MA L, FENG J, LIU ZP, XIANG H, ZHULIN IB, LIU SJ. Cross talk between chemosensory pathways that modulate chemotaxis and biofilm formation[J]. *mBio*, 2019, 10(1): e02876-18.
- [7] KEEGSTRA JM, CARRARA F, STOCKER R. The ecological roles of bacterial chemotaxis[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2022, 20(8): 491-504.
- [8] STOCKER R, SEYMOUR JR. Ecology and physics of bacterial chemotaxis in the ocean[J]. *Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR*, 2012, 76(4): 792-812.
- [9] SMRIGA S, FERNANDEZ VI, MITCHELL JG, STOCKER R. Chemotaxis toward phytoplankton drives organic matter partitioning among marine bacteria[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2016, 113(6): 1576-1581.
- [10] STOCKER R, SEYMOUR JR, SAMADANI A, HUNT DE, POLZ MF. Rapid chemotactic response enables marine bacteria to exploit ephemeral microscale nutrient patches[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2008, 105(11): 4209-4214.
- [11] AZAM F. Microbial control of oceanic carbon flux: the plot thickens[J]. *Science*, 1998, 280(5364): 694-696.
- [12] BLACKBURN N, FENCHEL T, MITCHELL J. Microscale nutrient patches in planktonic habitats shown by chemotactic bacteria[J]. *Science*, 1998, 282(5397): 2254-2256.
- [13] FENCHEL T. Microbial behavior in a heterogeneous world[J]. *Science*, 2002, 296(5570): 1068-1071.
- [14] MITCHELL JG, OKUBO A, FUHRMAN JA. Microzones surrounding phytoplankton form the basis for a stratified marine microbial ecosystem[J]. *Nature*, 1985, 316(6023): 58-59.
- [15] YAWATA Y, CARRARA F, MENOLASCINA F, STOCKER R. Constrained optimal foraging by marine bacterioplankton on particulate organic matter[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2020, 117(41): 25571-25579.
- [16] ZHENG K, DONG Y, LIANG Y, LIU Y, ZHANG X, ZHANG W, WANG Z, SHAO H, SUNG YY, MOK WJ, WONG LL, McMINN A, WANG M. Genomic diversity and ecological distribution of marine *Pseudoalteromonas phages*[J]. *Marine Life Science & Technology*, 2023, 5(2): 271-285.

- [17] WEI W, WANG L, FANG J, LIU R. Population structure, activity potential and ecotype partitioning of *Pseudoalteromonas* along the vertical water column of the New Britain Trench[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2021, 368(13): fnab078.
- [18] DUHAIME MB, SOLONENKO N, ROUX S, VERBERKMOES NC, WICHELS A, SULLIVAN MB. Comparative omics and trait analyses of marine *Pseudoalteromonas* phages advance the phage OTU concept[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2017, 8: 1241.
- [19] LIU J, ZHENG Y, LIN H, WANG X, LI M, LIU Y, YU M, ZHAO M, PEDENTCHOUK N, LEA-SMITH DJ, TODD JD, MAGILL CR, ZHANG WJ, ZHOU S, SONG D, ZHONG H, XIN Y, YU M, TIAN J, ZHANG XH. Proliferation of hydrocarbon-degrading microbes at the bottom of the Mariana Trench[J]. *Microbiome*, 2019, 7(1): 47.
- [20] MÉDIGUE C, KRIN E, PASCAL G, BARBE V, BERNSEL A, BERTIN PN, CHEUNG F, CRUVEILLER S, D'AMICO S, DUILIO A, FANG G, FELLER G, HO C, MANGENOT S, MARINO G, NILSSON J, PARRILLI E, ROCHA EP, ROUY Z, SEKOWSKA A, et al. Coping with cold: the genome of the versatile marine Antarctica bacterium *Pseudoalteromonas haloplanktis* TAC125[J]. *Genome Research*, 2005, 15(10): 1325-1335.
- [21] 徐莹, 兰晓敏, 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 的全基因组测序与比较基因组学分析 [J]. *微生物学报*, 2024. DOI: 10.13343/j.cnki.wsxb.20230669.
- 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 Pacific Ocean surface-seawater[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2024. DOI: 10.13343/j.cnki.wsxb.20230669 (in Chinese).
- [22] WANG P, YU Z, LI B, CAI X, ZENG Z, CHEN X, WANG X. Development of an efficient conjugation-based genetic manipulation system for *Pseudoalteromonas*[J]. *Microbial Cell Factories*, 2015, 14: 11.
- [23] NORDBERG H, CANTOR M, DUSHEYKO S, HUA S, POLIAKOV A, SHABALOV I, SMIRNOVA T, GRIGORIEV IV, DUBCHAK I. The genome portal of the Department of Energy Joint Genome Institute: 2014 updates[J]. *Nucleic Acids Research*, 2014, 42(D1): D26-D31.
- [24] 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.
- [25] MATILLA MA, MARTÍN-MORA D, GAVIRA JA, KRELL T. *Pseudomonas aeruginosa* as a model to study chemosensory pathway signaling[J]. *Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR*, 2021, 85(1): e00151-20.
- [26] ALVAREZ-ORTEGA C, HARWOOD CS. Identification of a malate chemoreceptor in *Pseudomonas aeruginosa* by screening for chemotaxis defects in an energy taxis-deficient mutant[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2007, 73(23): 7793-7795.
- [27] BI S, SOURJIK V. Stimulus sensing and signal processing in bacterial chemotaxis[J]. *Current Opinion in Microbiology*, 2018, 45: 22-29.
- [28] MARTIN AC, WADHAMS GH, ARMITAGE JP. The roles of the multiple CheW and CheA homologues in chemotaxis and in chemoreceptor localization in *Rhodobacter sphaeroides*[J]. *Molecular Microbiology*, 2001, 40(6): 1261-1272.
- [29] GOSINK KK, KOBAYASHI R, KAWAGISHI I, HÄSE CC. Analyses of the roles of the three *cheA* homologs in chemotaxis of *Vibrio cholerae*[J]. *Journal of Bacteriology*, 2002, 184(6): 1767-1771.
- [30] STOVER CK, PHAM XQ, ERWIN AL, MIZOGUCHI SD, WARRENER P, HICKEY MJ, BRINKMAN FS, HUFNAGLE WO, KOWALIK DJ, LAGROU M, GARBER RL, GOLTRY L, TOLENTINO E, WESTBROCK-WADMAN S, YUAN Y, BRODY LL, COULTER SN, FOLGER KR, KAS A, LARBIG K, et al. Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen[J]. *Nature*, 2000, 406(6799): 959-964.
- [31] YANG Z, GENG Y, XU D, KAPLAN HB, SHI W. A new set of chemotaxis homologues is essential for *Myxococcus xanthus* social motility[J]. *Molecular Microbiology*, 1998, 30(5): 1123-1130.
- [32] FRASER CM, CASJENS S, HUANG WM, SUTTON GG, CLAYTON R, LATHIGRA R, WHITE O, KETCHUM KA, DODSON R, HICKEY EK, GWINN M, DOUGHERTY B, TOMB JF, FLEISCHMANN RD, RICHARDSON D, PETERSON J, KERLAVAGE AR,

- QUACKENBUSH J, SALZBERG S, HANSON M, et al. Genomic sequence of a Lyme disease spirochaete, *Borrelia burgdorferi*[J]. *Nature*, 1997, 390(6660): 580-586.
- [33] ORTEGA DR, FLEETWOOD AD, KRELL T, HARWOOD CS, JENSEN GJ, ZHULIN IB. Assigning chemoreceptors to chemosensory pathways in *Pseudomonas aeruginosa*[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2017, 114(48): 12809-12814.
- [34] GARCÍA-FONTANA C, CORRAL LUGO A, KRELL T. Specificity of the CheR2 methyltransferase in *Pseudomonas aeruginosa* is directed by a C-terminal pentapeptide in the McpB chemoreceptor[J]. *Science Signaling*, 2014, 7(320): ra34.
- [35] GARCÍA-FONTANA C, REYES-DARIAS JA, MUÑOZ-MARTÍNEZ F, ALFONSO C, MOREL B, RAMOS JL, KRELL T. High specificity in CheR methyltransferase function: CheR2 of *Pseudomonas putida* is essential for chemotaxis, whereas cher1 is involved in biofilm formation[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2013, 288(26): 18987-18999.
- [36] COVARRUBIAS PC, MOYA-BELTRÁN A, ATAVALES J, MOYA-FLORES F, TAPIA PS, ACUÑA LG, SPINELLI S, QUATRINI R. Occurrence, integrity and functionality of *AcaML1*-like viruses infecting extreme acidophiles of the *Acidithiobacillus* species complex[J]. *Research in Microbiology*, 2018, 169(10): 628-637.
- [37] WADHAMS GH, ARMITAGE JP. Making sense of it all: bacterial chemotaxis[J]. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2004, 5(12): 1024-1037.