

研究报告

海水中主要金属盐对 4 株 *Kangiella* 属细菌的生长及其蛋白酶相关基因表达的影响徐蕾^{1,2} 王佳华^{1,2} 卢烨^{1,2} 徐俊^{1,2*}

(1. 上海交通大学生命科学技术学院 微生物代谢国家重点实验室 上海 200240)

(2. 上海交通大学海洋研究院 上海 200240)

摘要:【背景】*Kangiella* 是海洋专属的、营异养生长的革兰氏阴性菌。按 16S rRNA 基因系统发育分析, *Kangiella* 属归属于 γ -变形杆菌纲, 但此类细菌的生理生态功能未知。推测该类海洋细菌产生的胞外丝氨酸蛋白酶在其利用有机氮源生长的过程中起重要作用。【目的】研究海水盐中主要金属离子 Na 盐、Mg 盐、Ca 盐、K 盐对海洋来源的 4 株 *Kangiella* 菌株(*K. aquimarina* DSM 16071、*K. geojedonensis* YCS-5、*K. koreensis* DSM 16069 和 *K. profundus* FT102)的生长及胞外蛋白酶表达的影响。【方法】测定 *Kangiella* 属 4 个不同种的模式菌株在 2216E 培养基及不添加 Na 盐、Mg 盐、Ca 盐和 K 盐的 2216E 培养基中的生长情况。以 2% 的酪蛋白为底物, 采用福林酚法分别检测 4 株菌株的胞外蛋白酶酶活。克隆 *K. profundus* FT102 菌株中的 3 个丝氨酸蛋白酶编码基因以及 *phoP* 和 *phoQ* 基因, 使用实时荧光定量 PCR 技术检测 Mg 盐对这些基因表达的影响。【结果】4 株 *Kangiella* 菌株在不添加 Na 盐的 2216E 培养基中均不能生长; 在不添加 Mg 盐、Ca 盐和 K 盐的 2216E 培养基中, *K. aquimarina* DSM 16071、*K. geojedonensis* YCS-5 和 *K. profundus* FT102 这 3 个菌株的生长差异较小; 而 *K. koreensis* DSM 16069 菌株的生物量在不添加上述 3 类主要金属盐的 2216E 培养基中反而增高。各个菌株在对数期时的胞外蛋白酶活差异较大, 最高可以达到 11.23 U/mL, 最低仅为 0.99 U/mL。2216E 培养基中不添加 Mg 盐时, *K. aquimarina* DSM 16071、*K. geojedonensis* YCS-5 和 *K. profundus* FT102 这 3 株菌中的丝氨酸蛋白酶编码基因 *asp1*、*asp2* 和 *asp3* 以及 *phoP* 和 *phoQ* 基因的转录水平无显著差异, 而在 *K. koreensis* DSM 16069 菌株中这 5 个基因的表达却显著上调。【结论】Na 盐是 4 株海洋 *Kangiella* 菌株生长所必需的金属离子, Mg 盐和 Ca 盐对 4 株菌株的生长及其中 3 个保守的丝氨酸蛋白酶基因表达的影响不同。在不添加 Mg 盐的 2216E 培养基中, *K. koreensis* DSM 16069 菌株的生物量、胞外蛋白酶活和 3 个保守的丝氨酸蛋白酶编码基因以及 *phoP* 和 *phoQ* 基因的转录量都显著上升。

关键词: *Kangiella*, 海洋细菌, 丝氨酸蛋白酶, 海水, 金属盐

Foundation item: National Basic Research Program of China (973 Program) (2014CB441503)

***Corresponding author:** E-mail: xujunn@sjtu.edu.cn

Received: May 16, 2017; **Accepted:** June 05, 2017; **Published online** (www.cnki.net): July 11, 2017

基金项目: 国家重点基础研究发展规划(973 计划)(2014CB441503)

***通信作者:** E-mail: xujunn@sjtu.edu.cn

收稿日期: 2017-05-16; 接受日期: 2017-06-05; 网络首发日期(www.cnki.net): 2017-07-11

Effect of major metal ions in sea water on growth and transcription of protease coding gene of 4 *Kangiella* strains

XU Lei^{1,2} WANG Jia-Hua^{1,2} LU Ye^{1,2} XU Jun^{1,2*}

(1. State Key Laboratory of Microbial Metabolism, School of Life Sciences and Biotechnology, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China)

(2. Institute of Oceanography, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China)

Abstract: [Background] *Kangiella* is gram-negative, obligate marine heterotrophic bacteria. The *Kangiella* genus forms deep branches within the class *Proteobacteria* in the phylogenetic analyses based on 16S rRNA gene sequences. The physiology and ecological role of this group of marine bacteria are still unknown. We assume that the extracellular serine proteases play an important role in the growth of *Kangiella* for recycling of organic nitrogen. [Objective] Analyzed physiological effects of different metal salts (Na salt, Mg salt, Ca salt, K salt) on the growth and the expression of alkaline serine protease genes of 4 *Kangiella* strains (*K. aquimarina* DSM 16071, *K. geojedonensis* YCS-5, *K. koreensis* DSM 16069 and *K. profundus* FT102). [Methods] The growth of 4 *Kangiella* strains in different versions of marine broth 2216E were observed. Using Folin method to test the extracellular protease activities with 2% casein as substrate. Three conserved alkaline serine protease coding sequences (*asp1*, *asp2* and *asp3*) and *phoP*, *phoQ* genes in *K. profundus* FT102 were amplified by PCR and cloned. Real-time PCR method was used to evaluate the expression level of these genes in the 4 strains. [Results] Based on the growth curve of 4 *Kangiella* strains in different versions of 2216E, we found that *Kangiella* strains can't grow in the absence of NaCl. However, except *K. koreensis* DSM 16069, the growth curves of other 3 *Kangiella* strains in different version of marine broth 2216E, in which no supplementation of either magnesium salt, or calcium salt, or potassium salt, were found similar. The extracellular protease activities of 4 strains were found different in logarithmic period, the maximum extracellular protease activity was 11.23 U/mL and lowest was 0.99 U/mL. Moreover, the results of Real time-PCR showed that the variety of the transcription level of 3 conserved genes (*asp1*, *asp2*, *asp3*) in *K. aquimarina* DSM 16071, *K. geojedonensis* YCS-5 and *K. koreensis* DSM 16069 was not obvious. But for *K. koreensis* DSM 16069, the transcriptional level of these 3 conserved alkaline serine protease coding genes was significantly upregulated, when either magnesium salt or calcium salt was omitted in the marine broth 2216E. [Conclusion] Na salt is necessary for the growth of *Kangiella* strains, Mg salt and Ca salt have different effects on the transcription of 3 serine protease coding genes *asp1*, *asp2*, *asp3*. The biomass, extracellular protease activity and the transcription level of 3 conserved serine protease genes and *phoP*, *phoQ* were significantly elevated in *K. koreensis* DSM 16069 when Mg salt was not supplemented in the marine broth 2216E.

Keywords: *Kangiella*, Marine bacteria, Alkaline serine protease, Sea water, Metal salts

2004年, Yoon等首次从黄海的潮间带沉积物样本中分离获得菌株 *Kangiella koreensis* DSM 16069和 *K. aquimarina* DSM 16071, 为了纪念韩国著名的微生物学家 Kook Hee Kang, 将此类海洋来源的革兰氏阴性杆菌的2个新种代表的新属命名为 *Kangiella*^[1]。目前, 从不同的海洋环境中分离鉴定出了多个 *Kangiella* 属的新种。2010年, Romanenko等从日本海海岸附近的海水中分离出

K. japonica KMM 3899^[2]; 2011年, 美国研究者从佛罗里达州附近海域的海绵体中分离鉴定了 *K. spongicola* JCM 16211^[3]; 2012年, Yoon等又从韩国南部的海水中分离出 *K. geojedonensis* YCS-5^[4]; 同年, Jean等从中国台湾北部浅海海域分离鉴定出 *K. taiwanensis* BCRC 80330^[5]; 2013年, Lee等从韩国南海分离鉴定出 *K. sediminitoris* KCTC 23892^[6]; 2015年, Xu等在西南印度洋 2 784 m 的

海底沉积物中分离鉴定出 *K. profundus* FT102^[7]；同年，Kim 等从韩国济州岛的样本中分离鉴定出 *K. chungangensis* CAU 1040^[8]。

Kangiella 属按 16S rRNA 基因序列一直被归属于 γ -变形杆菌纲海洋螺杆菌目下的食烷菌科 (Alcanivoracaceae)。Wang 等将新发现的与 *K. geojedonensis* YCS-5 亲缘关系较近的 *Aliikangiella marina* GYP-15 鉴定为一个新属，并据此提出在海洋螺杆菌目下建立一个新科，即康氏菌科 (Kangiellaceae)，其下包括 *Kangiella*、*Pleionea* 和 *Aliikangiella* 这 3 个属^[9]。

目前已分离鉴定出的 *Kangiella* 菌株都来自于海洋环境，所有 9 株 *Kangiella* 菌株最适生长温度位于 30–37 °C 范围内，最适 pH 为 7.0 左右，都具有氧化酶和过氧化氢酶；绝大多数菌株能够在无氧条件下还原硝酸盐。*Kangiella* 菌株不能发酵大多数单糖产酸，可利用胶原、酪蛋白、酪氨酸、吐温等有机质^[1-8]，推测该类海洋细菌产生的胞外蛋白酶在其利用有机氮源生长的过程中起重要的作用。

盐度是影响水生系统中生物分布状态的主要因素之一。海洋环境中的盐度差异是影响该环境中微生物群落组成的决定性因素^[10]。除 *K. chungangensis* CAU 1040 以外，其他已知的 *Kangiella* 菌株都必需在有 NaCl (0.5%–16.0%) 的复杂培养基中才能够正常生长。韩国南部半岛海域的盐度为 3.0% 左右^[11]。西南印度洋海域的盐度相对较高，一般为 3.4% 左右^[12]。海水中最主要的 4 种金属盐类分别

为 Na 盐、Mg 盐、Ca 盐和 K 盐，在广泛使用的 2216E 海水培养基中这 4 种金属离子的摩尔浓度依次为：Na 盐 0.335 mol/L、Mg 盐 0.089 mol/L、Ca 盐 0.016 mol/L、K 盐 0.007 mol/L。本文选取分离自韩国周边海域和西南印度洋的 4 株 *Kangiella* 属菌株，研究了海水中主要金属离子对 *Kangiella* 属海洋细菌的生长、胞外蛋白酶活及其中 3 个保守的丝氨酸蛋白酶编码基因转录的影响。

1 材料与方法

1.1 菌株

所用 *Kangiella* 属的 4 个模式菌株除 *K. profundus* FT102 为本实验室前期分离鉴定以外，其余 3 株皆从日本理化学研究所微生物菌种保藏中心 (<http://jcm.brc.riken.jp/ja/catalogue>) 购买获得(表 1)。

1.2 引物

PCR 引物采用 DNAMAN 和 Primer Express 3.0.1 软件设计，由生工生物工程(上海)股份有限公司合成，引物序列见表 2。

1.3 主要试剂和仪器

福林酚试剂，北京索莱宝科技有限公司；酪蛋白、DEPC water，生工生物工程(上海)股份有限公司；PCR 反应中的 *ExTaq* 酶等，TaKaRa 公司；Trizol、DNase I、反转录试剂盒、PoweUpTM SYBR[®] Green Master Mix (AB)，赛默飞世尔科技(中国)有限公司；FastDNA Spin Kit for Soil，MP Biomedicals 公司。

配制培养基的原料均购自生工生物工程(上海)股份有限公司。

表 1 实验涉及的 4 株 *Kangiella* 菌株

Table 1 *Kangiella* strains used in the experiments

物种 Species	样本来源 Sampling site	参考文献 References
<i>K. aquimarina</i> DSM 16071	Tidal flat sediment was collected from Daepo Beach, Yellow Sea, Korea	[1]
<i>K. geojedonensis</i> YCS-5	Seawater off the southern coast of Korea	[4]
<i>K. koreensis</i> DSM 16069	Tidal flat sediment was collected from Daepo Beach, Yellow Sea, Korea	[1]
<i>K. profundus</i> FT102	A deep-sea sediment sample collected in the south-west Indian Ocean at 2 784 m	[7]

表 2 实验中使用的引物

Table 2 Primers used in the experiments

基因 Genes	序列号 Accession No.	引物序列 Primers sequence (5'→3')
<i>A-asp1</i>	WP_018623495.1	F: TCGCAACACTTGAAAGGATAGC R: ACGCAATGACCAGGTGGAA
<i>A-asp2</i>	WP_018623492.1	F: GGTCTTCCGCAGTTGCTTTC R: AAATCACCCAACCTGACTGGTACT
<i>A-asp3</i>	WP_018623491.1	F: GAAGGCATATTGTCAATTTACGTCAA R: CGCGCTAATGGCAATCG
<i>A-16S rRNA</i>	GI: 197260491	F: CCAGCAGCCGCGGTAAT R: TTTACGCCAGTAATCCGATT
<i>G-asp1</i>	WP_046560315.1	F: CACCAGCGGCTGATGAAGA R: ACCGTGTCCTGGCTTAAATTC
<i>G-asp2</i>	WP_052735139.1	F: ATGATTTCGGGCGATCCAA R: TGCGACTGATATAACCGGTATG
<i>G-asp3</i>	WP_046560317.1	F: TTCATGACAGCGTAGCGAAAA R: GCTCGTTGCGCTAAACCATT
<i>G-16S rRNA</i>	GI: 311337312	F: TGGCGGACGGGTGAGTAA R: GGGCTATCCCCGCTATTC
<i>K-asp1</i>	WP_012800119.1	F: GCGCAGTAGCGGCATTG R: ACGGATGTCAGCTGCTGTACAA
<i>K-asp2</i>	WP_012800121.1	F: TGGCACAGCGTTCGAAGA R: GCTGATGCTCGCATTTGAAG
<i>K-asp3</i>	WP_012800122.1	F: TTCGTATTGGCAGCAGGTAATG R: TTAGCACGCGCTGGAGAAT
<i>K-16S rRNA</i>	GI: 41352514	F: CCAGCAGCCGCGGTA R: TTACGCCAGTAATCCGATTAA
<i>P-asp1</i>	KY753907	F: AGTGCGGTAGCTGCATTGG R: CGAATTTCTGCTGCGGTACA
<i>P-asp2</i>	KY753908	F: TGGTTCGCCGTTGAGCTT R: AGCCTTTTGGCCACGAATA
<i>P-asp3</i>	KY753909	F: ACGGCGTGGGTCATTGATA R: TGGCATCAACGCTCAAGTCA
<i>P-16S rRNA</i>	GI: 1018196612	F: CCAGCAGCCGCGGTAAT R: TTTACGCCAGTAATCCGATT
<i>asp1</i>	KY753907	F: ATGWMTTTTAAAKTAAAGATGGCYTYGC R: CTAGYTWGARCTTCCDTCMAGACTAA
<i>asp2</i>	KY753908	F: ATGTCATTWAAAGTAAAGATGGCYTG R: TTATAVKTVGAATGAAGCTGCACAAGTTG
<i>asp3</i>	KY753909	F: ATGAAAAAACRYTWATMGCYAGYGTGT R: CTATAGATGGATRATTGGATCTGGATTBC
<i>K-phoP</i>	ACV25424.1	F: ATGAACTTTTATTAGTCGAA R: TCACAGATCAGCTCTTAAT
<i>K-phoQ</i>	ACV26824.1	F: ATGAGTTTATTCTACTTAATA R: TTAACCATTGAAACTCACTTTT
<i>A-phoP</i>	WP_018624810.1	F: ATGAAATTATTACTGGTTGAAGAT R: TCACAGGTCGCTCTTAGTCGA
<i>A-phoQ</i>	WP_018624811.1	F: ATGTCAATTTACCACGATAAGC R: GTGAGCTTAAATCACTCTTAC
<i>G-phoP</i>	AKE52099.1	F: ATGAAAATACTTTGATGGAAGA R: CTACTTATCTAAATCACTATTCAA
<i>G-phoQ</i>	AKE52098.1	F: ATGCCAATACCCTGCCCTCAAC R: GTGCAGGAACAAGCTGAACATAA

Note: *asp1*, *asp2*, *asp3*: Alkaline serine protease gene; *A*: *K. aquimarina* DSM 16071; *G*: *K. geojedonensis* YCS-5; *K*: *K. koreensis* DSM 16069; *P*: *K. profundus* FT102.

2216E 完全培养基参考文献[13]配制。2216-Na 盐: 不添加 NaCl 的 2216E 培养基; 2216-Mg 盐: 不添加 MgCl₂ 和 MgSO₄ 的 2216E 培养基; 2216-K 盐: 不添加 KCl 的 2216E 培养基; 2216-Ca 盐: 不添加 CaCl₂ 的 2216E 培养基。

1.4 生长曲线测定

分别挑取 4 个菌株的单克隆接种至 2216E 完全培养基中, 37 °C、220 r/min 培养过夜。按照 0.1% 的比例接入到新鲜的 2216E 液体培养基(pH 7.0)及 4 种不添加主要金属盐的培养基中, 37 °C、200 r/min 培养, 分别在 0、6、8、12、16、20、22、26、34 h 取样, 在 600 nm 处测定光密度 OD₆₀₀, 每个样品 3 个平行。

1.5 胞外蛋白酶活力检测实验

按照 1% (质量体积比)接入相应的培养基中, 菌株生长到 12 h 取样, 4 °C、12 000 r/min 离心 5 min, 上清即为蛋白酶粗酶液。采用福林酚法检测胞外蛋白酶活力, 以 50 mol/L Tris-HCl (pH 8.0) 缓冲液配制 2% 的酪蛋白底物, 用 Tris-HCl 将粗酶液稀释 100 倍, 取 1 mL 稀释的粗酶液在 40 °C 保温 1 min, 加入 1 mL 于 42 °C 保温的 2% 酪蛋白。40 °C 反应 30 min 后, 加入 2 mL 0.4 mol/L 三氯乙酸终止反应。在 40 °C 下保温 15 min 后, 12 000 r/min 离心 15 min。取 1 mL 上清液加入 5 mL 的 0.4 mol/L Na₂CO₃, 混匀加入 1 mL 福林酚试剂, 40 °C 保温 20 min, 酶标仪测定 OD₆₆₀ 值。同时以灭活酶样品作为空白对照, 同样按照上述步骤进行。以不同浓度的酪氨酸绘制标准曲线。酶活单位定义为: 在 40 °C 条件下 1 min 产生 1 μg 的酪氨酸为 1 U^[14]。

1.6 保守的丝氨酸蛋白酶、PhoP 和 PhoQ 编码基因的 PCR 扩增

参照 3 株 *Kangiella* 菌株基因组中 3 个高度保守的丝氨酸蛋白酶编码基因序列 *asp1*、*asp2* 和 *asp3* 设计简并引物, 通过 PCR 扩增 *K. profundus*

FT102 的基因组中对应的丝氨酸蛋白酶编码基因。PCR 反应体系为: 10×*ExTaq* Buffer 2.5 μL, dNTPs (2.5 mmol/L) 2 μL, 正反向引物(10 μmol/L)各 0.5 μL, *ExTaq* 酶(5 U/μL) 0.125 μL, 模板 DNA 1 μL, ddH₂O 补至 25 μL。PCR 反应条件为: 95 °C 5 min; 95 °C 1 min, 52 °C 45 s, 72 °C 1 min, 28 个循环; 72 °C 10 min; 4 °C 保存。纯化 PCR 产物与 pMD19-T 载体连接, 转化至大肠杆菌 DH5α。将阳性克隆菌液送生工生物工程(上海)股份有限公司测序。

1.7 实时荧光定量 PCR 实验

按 Trizol 试剂盒推荐方法制备合格的 RNA 样品。RNA 反转录采用试剂盒, cDNA 反转录条件为 25 °C 10 min, 42 °C 60 min, 70 °C 10 min。反应结束后将 cDNA 立即置于冰上骤冷 5 min, 分管保存于 -80 °C。

Real-Time PCR 反应体系为 20 μL, 各组分溶液分别为 SYBR Green Master 10 μL, 引物混合物 (10 μmol/μL) 1.2 μL, ddH₂O 7.6 μL, cDNA 模板 1.2 μL。扩增阶段 40 个循环(95 °C 20 s, 95 °C 3 s, 60 °C 30 s)。延伸阶段收集荧光信号, 反应结束后对获得的信号进行处理。以 16S rRNA 基因为参比, 2216E 培养基中的菌液为对照组, 每个样品 3 个平行。

2 结果与分析

2.1 不同金属盐对 4 株 *Kangiella* 菌株生长的影响

测定了 4 株菌在 2216E 完全培养基和 4 种不添加主要金属盐培养基中的生长曲线(图 1), 结果显示在培养基中不添加 Na 盐时, 4 株 *Kangiella* 菌均不能够生长; 在不添加 Mg 盐、Ca 盐、K 盐的培养基中, *K. aquimarina* DSM 16071、*K. geojedonensis* YCS-5 和 *K. profundus* FT102 这 3 株菌在稳定期的菌体浓度略低于在 2216E 培养基中的生长曲线, 说明是否添加 Mg 盐、Ca 盐和 K 盐这 3 类金属离子对 3 株菌的生长影响不大。

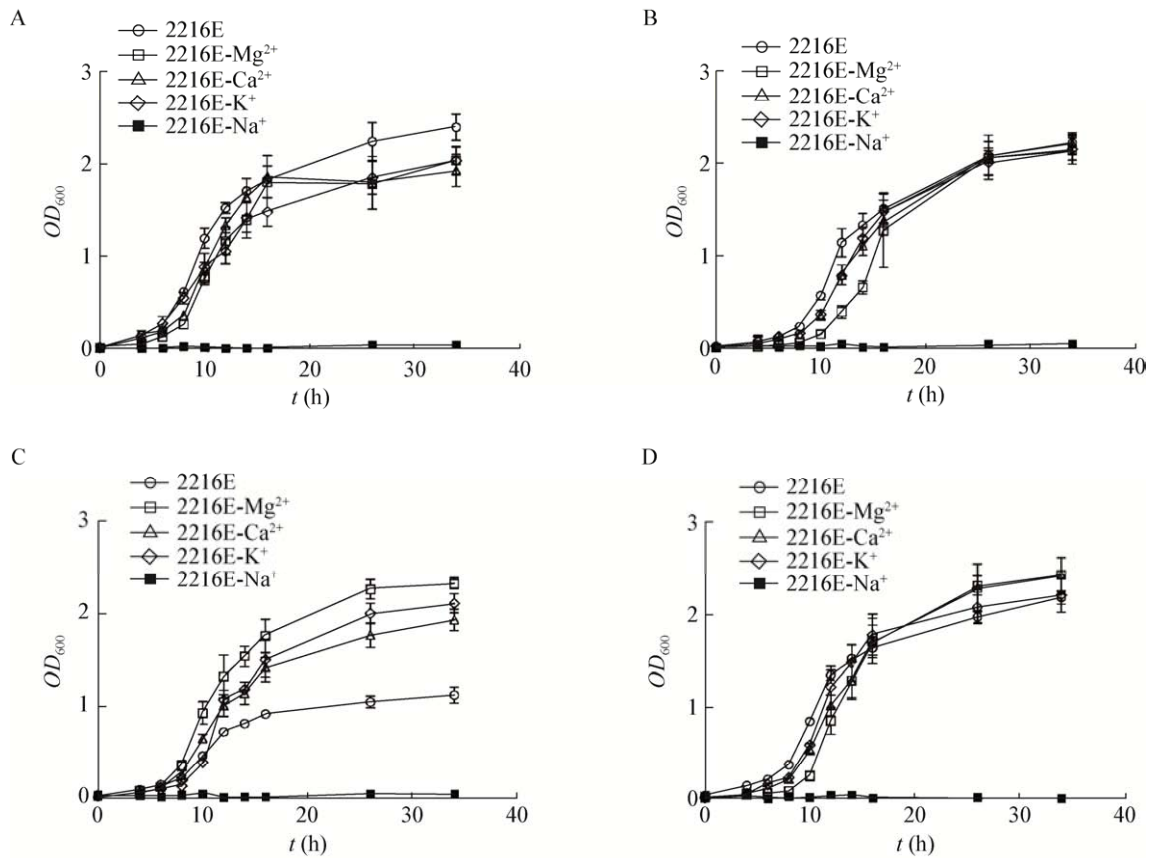


图 1 4 株 *Kangiella* 菌在不同 2216E 培养基中的生长情况

Figure 1 Growth curve of 4 *Kangiella* strains in 2216E broth with different metal ions composition

注：A：*K. aquimarina* DSM 16071；B：*K. geojedonensis* YCS-5；C：*K. koreensis* DSM 16069；D：*K. profundus* FT102。2216E：2216E 完全培养基；2216E-Ca 盐：不添加 Ca 盐的 2216E 培养基；2216E-Mg 盐：不添加 Mg 盐的 2216E 培养基；2216E-K 盐：不添加 K 盐的 2216E 培养基；2216E-Na 盐：不添加 Na 盐的 2216E 培养基。

Note: A: *K. aquimarina* DSM 16071; B: *K. geojedonensis* YCS-5; C: *K. koreensis* DSM 16069; D: *K. profundus* FT102. 2216E: Complete marine broth; 2216E-Ca salt: Complete 2216E without calcium salt; 2216E-Mg salt: Complete 2216E without magnesium salt; 2216E-K salt: Complete 2216E without potassium salt; 2216E-Na salt: Complete 2216E without sodium salt.

对于 *K. koreensis* DSM 16069 菌株，在不添加 Mg 盐、Ca 盐、K 盐的培养基中菌株的生长明显快于 2216E 培养基中，在稳定期的菌体量也高于 2216E 培养基中。观察实验组不同金属离子对 *K. koreensis* DSM 16069 菌株生长的影响，在不添加 Mg 盐的培养基中(去除 $MgCl_2$ 和 $MgSO_4$)该菌株的生物量最高，在不添加 K 盐的培养基中(去除 KCl)该菌株的生物量次之，在不添加 Ca 盐的培养基中(去除 $CaCl_2$)该菌株的生物量低于前两者，但仍然高于该菌株在 2216E 培养基中生长的生物量。结果表明 *K. koreensis* DSM 16069 对环境金属离

子的变化较其他 3 株菌株更加敏感。

2.2 4 株菌胞外蛋白酶活力测定结果

4 株 *Kangiella* 菌培养 12 h 后菌液浓度和采用福林酚法检测的胞外蛋白酶活力如图 2 所示。

对于 *K. aquimarina* DSM 16071 菌株，在 2216E 培养基中该菌株的菌体浓度 OD_{600} 为 1.52，胞外蛋白酶活力最高，为 9.70 U/mL；而在 2216E-Mg 盐培养基中菌体浓度 OD_{600} 为 1.16，胞外蛋白酶活力最低，为 4.06 U/mL。对于 *K. geojedonensis* YCS-5 菌株，在 2216E 培养基中菌体浓度 OD_{600} 为 1.139，胞外蛋白酶活力最高为 6.34 U/mL；在 2216E-Mg 盐

菌体浓度 OD_{600} 仅为 0.389, 胞外蛋白酶活最低, 为 1.04 U/mL。对于 *K. koreensis* DSM 16069 菌株, 在 2216E-Mg 盐培养基中菌体浓度 OD_{600} 最高, 达到 1.522, 此时胞外蛋白酶活为 5.89 U/mL; 在 2216E 培养基中菌体浓度反而较低, 为 0.689, 胞外蛋白酶活仅有 1.11 U/mL。对于 *K. profundus* FT102 菌株, 在 2216E 培养基中菌体浓度最高, 为 1.53, 胞外蛋白酶活则达到 10.54 U/mL; 而在 2216E-Mg 盐培养基中菌体浓度最低, 为 0.85, 相对应的胞外蛋白酶活为 1.56 U/mL。

从总体上看, 4 株 *Kangiella* 菌胞外酶活力的变化趋势与菌体浓度的变化趋势基本一致, 说明在 2216E 培养基中 *Kangiella* 属海洋细菌的生物量与其胞外蛋白酶活之间存在正相关性。2216E 培养基中不添加 Mg 盐、Ca 盐和 K 盐时, *K. aquimarina* DSM 16071、*K. geojedonensis* YCS-5 和 *K. profundus* FT102 这 3 株菌的胞外蛋白酶活都呈现降低的趋势。仅有 *K. koreensis* DSM 16069 菌株在不添加 Mg 盐、Ca 盐和 K 盐的 2216E 培养基中, 胞外蛋白酶活性反而增加。

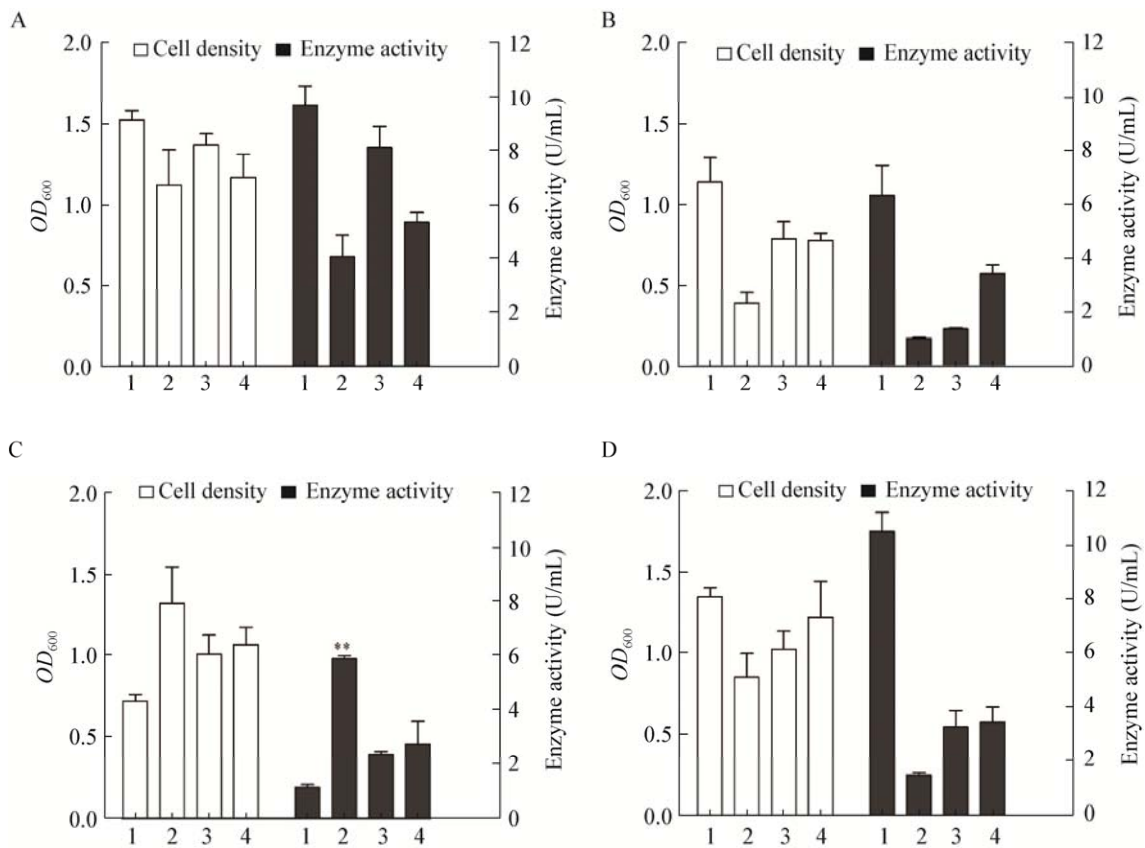


图 2 不同培养基中 4 株 *Kangiella* 菌生长情况及胞外蛋白酶酶活(对数期)

Figure 2 Effect of different metal ions on the cell growth and extracellular protease activity of 4 *Kangiella* strains (Logarithmic period)

注: A: *K. aquimarina* DSM 16071; B: *K. geojedonensis* YCS-5; C: *K. koreensis* DSM 16069; D: *K. profundus* FT102. 1: 2216E 培养基; 2: 不添加 Mg 盐的 2216E 培养基; 3: 不添加 Ca 盐的 2216E 培养基; 4: 不添加 K 盐的 2216E 培养基. **: 统计学差异显著($P < 0.01$).

Note: A: *K. aquimarina* DSM 16071; B: *K. geojedonensis* YCS-5; C: *K. koreensis* DSM 16069; D: *K. profundus* FT102. 1: 2216E complete marine broth; 2: Complete 2216E without magnesium salt; 3: Complete 2216E without calcium salt; 4: Complete 2216E without potassium salt. **: Statistically significant ($P < 0.01$).

2.3 *K. profundus* FT102 菌株中 *phoP/phoQ* 基因和 3 个保守的丝氨酸蛋白酶编码基因的克隆

丝氨酸蛋白酶在海洋细菌利用有机氮源生长的过程中起重要的作用, 如与 *Kangiella* 同属于 γ -变形杆菌纲的海洋细菌 *Pseudoaltermonas* sp. SM9913 菌株能分泌多种丝氨酸蛋白酶, 其中包括 MCP-01 和 MCP-03^[14-17]。在已公开的 *K. aquimarina* DSM 16071、*K. geojedonensis* YCS-5 和 *K. koreensis* DSM 16069 这 3 株菌的基因组序列中也发现了多个保守的丝氨酸蛋白酶(序列号见表 2)。

采用简并引物, 以 *K. profundus* FT102 菌株的基因组 DNA 为模板, 通过 PCR 扩增得到 *Kangiella* 属中保守存在的 3 个碱性丝氨酸蛋白酶编码基因, 如图 3A 所示。*K. profundus* FT102 菌株中的 *P-asp1* 基因的长度约为 2 500 bp, *P-asp2* 基因的长度约为 1 800 bp, *P-asp3* 基因的长度约为 1 100 bp, DNA 测序确定的 *K. profundus* FT102 菌株的 3 个碱性丝氨酸蛋白酶编码基因序列已上传至 GenBank (序列号为 KY753907、KY753908、KY753909)。

鉴于在不添加 Mg 盐的 2216E 培养基中观察到 4 株菌在生长和胞外蛋白酶酶活上的差异, 需进一步考察 4 株 *Kangiella* 菌中响应环境中 Mg 盐浓度变化的 *phoP* 和 *phoQ* 的表达情况。根据

K. aquimarina DSM 16071 菌株的 *phoP* 和 *phoQ* 基因序列设计引物, 通过 PCR 扩增获得了 *K. profundus* FT102 菌株的 *phoQ* 基因长度约为 1 350 bp, *phoP* 基因长度约为 650 bp (图 3B), 基因序列已上传至 GenBank (序列号为 MF179122、MF179121)。

从上述生理实验中发现菌株 *K. koreensis* DSM 16069 与 *K. aquimarina* DSM 16071、*K. geojedonensis* YCS-5 和 *K. profundus* FT102 在 2216E 培养基中不添加 Mg 盐条件下胞外的蛋白酶酶活上存在显著差异 ($P < 0.01$), 因此对 *Kangiella* 菌株中 3 个保守的碱性丝氨酸蛋白酶的氨基酸序列进行比对分析。结果如表 3 所示, 4 株菌中的 ASP1 蛋白的氨基酸序列相似度高达 77%; ASP2 蛋白的氨基酸序列相似度大于 78%; ASP3 蛋白的氨基酸序列相似度为 76% 以上。

采用 MEGA 系统发育分析软件包(Molecular evolutionary genetics analysis, version 6.06, <http://megasoftware.net/>)对来源于 *Kangiella* 属 4 个种中的 3 类保守蛋白酶的氨基酸序列构建进化树, 根据 NCBI 在线 BLASTp 分析结果绘制这 3 类蛋白酶的保守结构域示意图。如图 4 所示, ASP1、ASP2 和 ASP3 均为丝氨酸蛋白酶家族的 S8 家族。ASP2 和 ASP3 两类蛋白酶具有 S8 家族保守结构

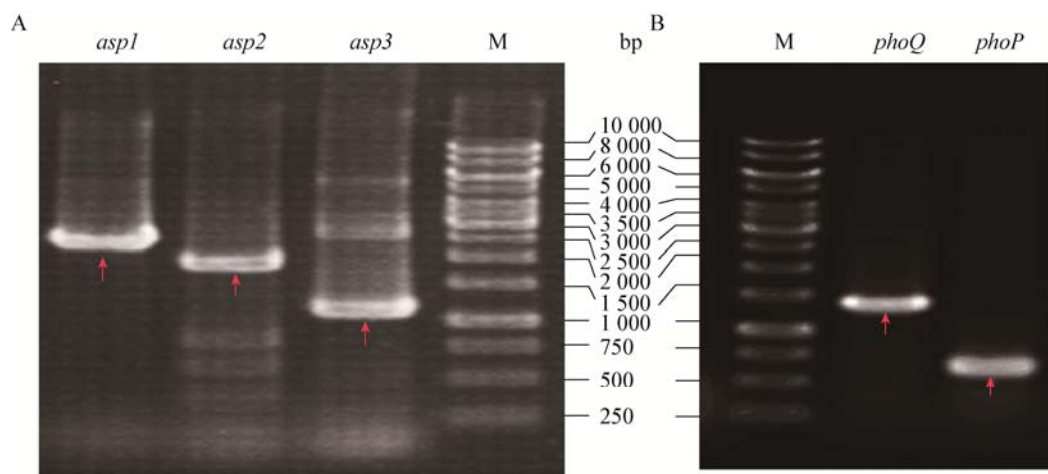


图 3 *K. profundus* FT102 中基因的 PCR 扩增

Figure 3 PCR amplification of *K. profundus* FT102

注: A: 3 个丝氨酸蛋白酶编码基因; B: *phoP* 和 *phoQ* 基因.

Note: A: 3 Serine protease genes; B: *phoP* and *phoQ* genes.

表 3 4 株 *Kangiella* 菌中 3 个保守丝氨酸蛋白酶的氨基酸序列相似性Table 3 The alignment result of the amino acid sequences in 3 conserved serine proteases in 4 *Kangiella* strains

菌株 Strains	ASP1			ASP2			ASP3		
	Amino acids	Identity (%)	Query coverage (%)	Amino acids	Identity (%)	Query coverage (%)	Amino acids	Identity (%)	Query coverage (%)
K	767			611			377		
P	766	90	100	608	94	100	377	94	100
A	768	90	100	607	93	100	374	76	100
G	766	77	99	528	78	84	375	76	100

注: K: *K. koreensis* DSM 16069; P: *K. profundus* FT102; A: *K. aquimarina* DSM 16071; G: *K. geojedonensis* YCS-5. 以 *K. koreensis* DSM 16069 菌株的 3 个丝氨酸蛋白酶氨基酸序列为参考, 分别比对其他 3 株 *Kangiella* 菌株中相关蛋白与参考序列的差异性; E 值=0.

Note: K: *K. koreensis* DSM 16069; P: *K. profundus* FT102; A: *K. aquimarina* DSM 16071; G: *K. geojedonensis* YCS-5. Amino acid sequence of 3 conserved serine proteases from *K. koreensis* DSM 16069 was used as query sequence in BLASTp analysis; E-value=0.

域; ASP1 蛋白酶除了具有 S8 家族保守结构域外, 还有 PPC (Pre-peptidase C-terminal domain) 结构域。此外, 来自 *K. geojedonensis* YCS-5 菌株中的 ASP1 蛋白(WP040560315.1)还具有 Peptidase inhibitor I9 家族结构域。已有研究表明, 海洋细菌分泌的胞外酶类除了具有催化结构域以外, 在其 C 端还具有 1-2 个 PPC 结构域或 PKD (Polycystic kidney disease I domain) 结构域^[18], Inhibitor 结构域在蛋白前肽中具有分子伴侣的作用, 有助于成熟肽的折叠。

2.4 3 种金属盐对 4 株 *Kangiella* 菌保守丝氨酸蛋白酶基因表达的影响

采用 Real-Time PCR 比较了 4 株 *Kangiella* 菌中 3 个保守的丝氨酸蛋白酶基因在 2216E 完全培养基及不添加 3 种金属盐的 2216E 培养基中的表达情况, 结果如图 5 所示。在不添加 Mg 盐、Ca 盐和 K 盐的 2216E 培养基中, *K. aquimarina* DSM 16071、*K. geojedonensis* YCS-5 和 *K. profundus* FT102 这 3 个菌株中的 *asp1*、*asp2* 和 *asp3* 基因相对表达量变化值均不超过 2 倍, 与在 2216E 完全培养基中的表达水平相比无明显变化。

对于 *K. koreensis* DSM 16069 菌株, 在不添加 Ca 盐和 Mg 盐的 2216E 培养基中, 这 3 个保守的丝氨酸蛋白酶基因的表达都表现为显著上调; 而在不添加 K 盐的培养基中, 基因相对表达量变化并不明显。在不添加 Ca 盐的培养基中, *asp1* 基因相对表达量上调约 6 倍, *asp2* 基

因的相对表达量上调约 2.5 倍, *asp3* 基因的相对表达量上调约 2 倍。值得注意的是, 在不添加 Mg 盐的培养基中, *asp1* 基因相对表达量上调约 15 倍, *asp2* 基因的相对表达量上调约 5 倍, *asp3* 基因的相对表达量上调约 6 倍。综上所述, 在不添加 Ca 盐和 Mg 盐的 2216E 培养基中, *K. koreensis* DSM 16069 菌株中 3 个丝氨酸蛋白酶基因表达的增加与其生物量和胞外酶酶活提高的趋势一致。

2.5 4 株 *Kangiella* 菌中 *phoP* 和 *phoQ* 基因的表达水平

细菌中 *phoP/phoQ* 操纵子能够对环境中的 Mg 盐含量变化发生响应^[19]。采用 Real-Time PCR 比较了 4 株 *Kangiella* 菌的 *phoP* 和 *phoQ* 基因在 2216E 完全培养基及不添加 Mg 盐的 2216E 培养基中的表达情况。结果如图 6 所示, 在不添加 Mg 盐的 2216E 培养基中, *K. koreensis* DSM 16069 菌株的 *phoP* 和 *phoQ* 基因表达量均显著上调。其中, *phoQ* 基因相对表达量上调约 10 倍, *phoP* 基因的相对表达量上调约 5 倍。而 *K. aquimarina* DSM 16071、*K. geojedonensis* YCS-5、*K. profundus* FT102 菌株中的 *phoQ* 和 *phoP* 基因在转录水平上的表达量并未发生显著变化。这说明 *K. koreensis* DSM 16069 菌株的 *phoP/phoQ* 操纵子对培养基中 Mg 盐浓度的变化更加敏感。

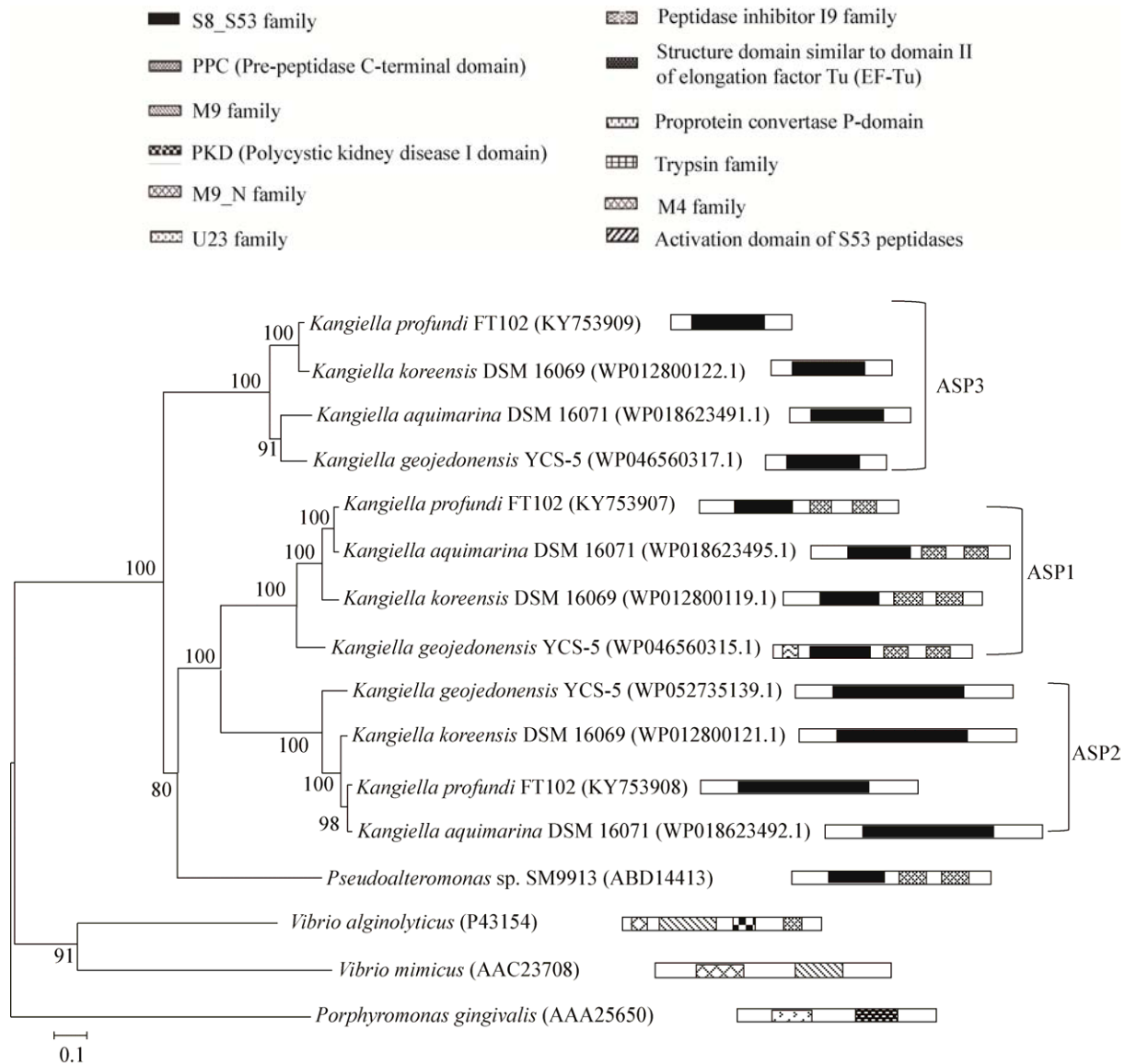
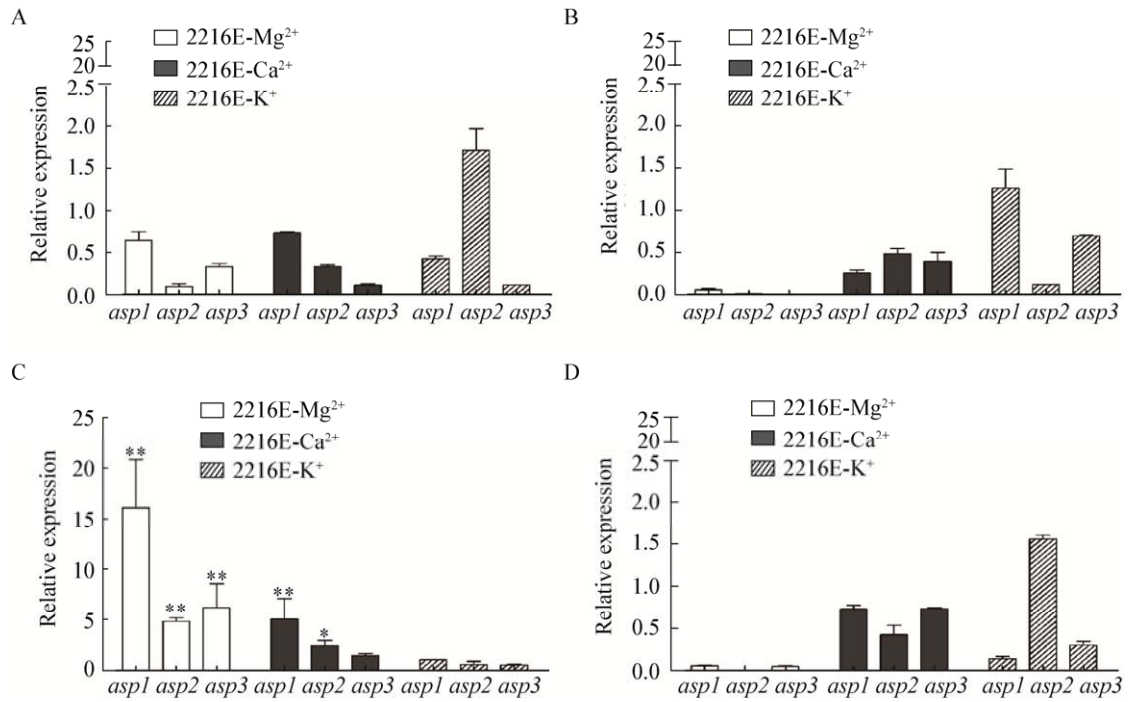


图4 *Kangiella* 属中3类蛋白酶中的保守结构域和系统发育树

Figure 4 Phylogenetic tree and conserved domains of the serine proteases in *Kangiella* strains

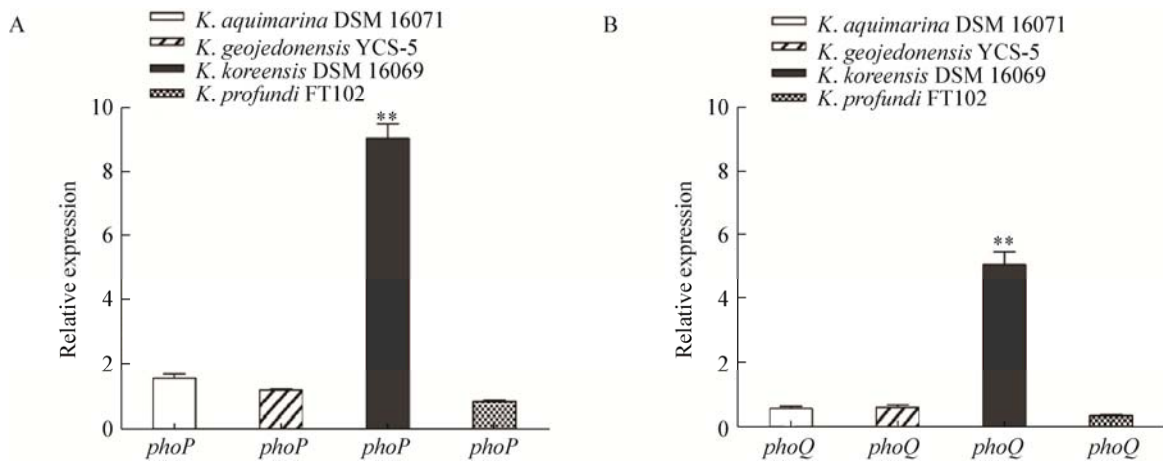
注：左侧为采用 Neighbor-Joining 法构建的进化树，右侧为 ASP1、ASP2、ASP3 蛋白酶保守结构域示意图；进化树中的数字表示蛋白在 NCBI 中对应的序列号，括号内表示该条序列所属蛋白家族；进化树采用 MEGA 6.06 构建，Bootstrap 为 1 000，分支点上的数字表示 Bootstrap 超过 40% 分支，标尺 0.1 表示碱基替换率为 10%；蛋白保守结构域依据 BLASTp 结果绘制而成，保守结构域包括 S8_S53 家族、前肽酶 C-末端结构域(PPC)、M9 家族、多囊肾病 I 域(PKD)、M9_N 家族、U32 家族、Peptidase inhibitor I9 家族、类似于延伸因子 Tu 结构域 II 的部分(EF-Tu)、Pro 蛋白的 P 结构域、Trypsin 家族、M4 家族、S53 肽酶的活化结构域。

Note: Representative consensus Neighbor-Joining tree of the catalytic domain (left part of figure), and schematic diagrams of the domain structure (right part of figure) of ASP1, ASP2 and ASP3; The accession number of each sequence was labelled, the family of protein in brackets; The phylogenetic tree was constructed using MEGA 6.06; One thousand bootstrap replicates were used; Only bootstrap percentages >40% are shown on the branches, 0.1 means 10% changes were observed between two sequence; The conserved domain architectures of the sequences were identified using BLASTp service available at NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>); The conserved domains are S8_S53 family, PPC (pre-peptidase C-terminal domain), M9 family, PKD (polycystic kidney disease I domain), M9_N family, U32 family, peptidase inhibitor I9 family, structure domain similar to domain II of elongation factor Tu (EF-Tu), proprotein convertase P-domain, trypsin family, M4 family, activation domain of S53 peptidase.

图 5 不同金属盐对 *Kangiella* 菌株中保守丝氨酸蛋白酶基因表达的影响Figure 5 Differential gene expression of serine protease in *Kangiella* strains with different metal salts

注：A：*K. aquimarinum* DSM 16071；B：*K. geojedonensis* YCS-5；C：*K. koreensis* DSM 16069；D：*K. profunda* FT102。*：具有显著差异($P < 0.05$)；**：具有十分显著差异($P < 0.01$)。

Note: A: *K. aquimarinum* DSM 16071; B: *K. geojedonensis* YCS-5; C: *K. koreensis* DSM 16069; D: *K. profunda* FT102. * Indicates statistically significant ($P < 0.05$), ** Indicates highly statistically significant ($P < 0.01$).

图 6 不添加 Mg 盐的 2216E 培养基对 4 株 *Kangiella* 菌 *phoP* 和 *phoQ* 基因表达的影响Figure 6 Relative quantification of *phoP* and *phoQ* gene expression about 4 *Kangiella* strains in 2216E broth without Mg salt

注：A：*phoP* 基因的表达；B：*phoQ* 基因的表达。**：统计学差异显著($P < 0.01$)。

Note: A: *phoP* gene expression; B: *phoQ* gene expression. **: Greatly statistically significant ($P < 0.01$).

3 讨论与结论

本实验研究了海水中主要金属离子 Na 盐、Mg 盐、Ca 盐、K 盐对 4 株 *Kangiella* 属细菌的生长及其丝氨酸蛋白酶基因表达的影响。培养实验显示, Na 盐离子为 *Kangiella* 属菌株生长所必需的金属元素。通过对该类菌株在不同培养基中的生长曲线测定结果显示, Mg 盐对该类菌株生长的影响较其他金属离子更为明显。Mg 盐是海水中除 Na 盐以外含量最多的金属离子, 在维持海洋细菌细胞的渗透压平衡方面起着十分重要的作用。有研究表明, Mg 盐是海洋细菌细胞内主要的无机阳离子, 部分海洋细菌细胞内的 Mg 盐甚至是海水中 Mg 盐含量的 10–20 倍^[20]。Mg 盐是海洋细菌营养状态的指示物之一, Heldal 等发现当环境中含有丰富有机物时, 海洋细菌胞内的 Mg 盐浓度降低, 细菌处于代谢活跃的生长状态^[21]。

K. koreensis DSM 16069 菌株在不添加 Mg 盐的 2216E 培养基中的胞外蛋白酶酶活高于其在 2216E 完全培养基中, 说明 Mg 盐对 *K. koreensis* DSM 16069 菌株产酶具有一定的抑制作用。山东大学边斐等对分离自海洋环境的 *Pseudoalteromonas* sp. SM9913 菌株胞外酶酶活的研究结果也显示, 高浓度的 Mg 盐对 *Pseudoalteromonas* sp. SM9913 胞外酶酶活也具有一定的抑制作用^[22]。

Véscovi 等报道 *Salmonella typhimurium* 中的 *phoP/phoQ* 操纵子受环境中 Mg 盐浓度的调控^[19]。对 *Escherichia coli* 和 *Salmonella enterica* 中 *phoP/phoQ* 操纵子的调控机制研究表明, 膜上的 PhoQ 蛋白可感知 Mg 盐浓度^[23]。在胞外 Mg 盐浓度较低的情况下, 磷酸化的 PhoQ 蛋白可以激活胞内转录调控因子 PhoP, 从而激活 Mg 盐转运蛋白以及毒力相关的多个基因表达^[24]。此外, 在肠杆菌科细菌中广泛存在的 *phoP/phoQ* 操纵子还可以对自身的表达进行调控, 从而维持胞内 Mg 盐的稳态^[25]。

本实验 Real-Time PCR 检测结果显示, 在不添加 Mg 盐的培养基中, *K. koreensis* DSM 16069 菌株

的 *phoP*、*phoQ*、*asp1*、*asp2* 和 *asp3* 等基因的转录水平明显上调, 而其他 3 株 *Kangiella* 菌的对应基因并未发生显著变化。结果说明, 培养基中较低浓度的 Mg 盐可被 *K. koreensis* DSM 16069 菌株膜上的 PhoQ 感知, 并通过经典的 PhoQ/PhoP 信号通路激活包括丝氨酸蛋白酶在内的众多基因的表达, 进而使得 *K. koreensis* DSM 16069 菌株在不添加 Mg 盐的培养基中生长情况优于 2216E 完全培养基中。而对于其他 3 株 *Kangiella* 菌株中, *phoP/phoQ* 操纵子对 Mg 盐浓度变化响应的调控机制还有待深入探究。

REFERENCES

- [1] Yoon JH, Oh TK, Park YH. *Kangiella koreensis* gen. nov. sp. nov. and *Kangiella aquimarina* sp. nov. isolated from a tidal flat of the Yellow Sea in Korea[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2004, 54(5): 1829-1835
- [2] Romanenko LA, Tanaka N, Frolova GM, et al. *Kangiella japonica* sp. nov. isolated from a marine environment[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2010, 60(11): 2583-2586
- [3] Ahn J, Park JW, Mcconnell JA, et al. *Kangiella spongicola* sp. nov. a halophilic marine bacterium isolated from the sponge *Chondrilla nucula*[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2011, 61(4): 961-964
- [4] Yoon JH, Kang SJ, Lee SY, et al. *Kangiella geojedonensis* sp. nov. isolated from seawater[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2012, 62(3): 511-514
- [5] Jean WD, Huang SP, Chen JS, et al. *Kangiella taiwanensis* sp. nov. and *Kangiella marina* sp. nov. marine bacteria isolated from shallow coastal water[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2012, 62(9): 2229-2234
- [6] Lee SY, Park S, Oh TK, et al. *Kangiella sediminilitoris* sp. nov. isolated from a tidal flat sediment[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2013, 63(3): 1001-1006
- [7] Xu FD, Li XG, Xiao X, et al. *Kangiella profundi* sp. nov. isolated from deep-sea sediment[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2015, 65(7): 2315-2319
- [8] Kim JH, Ward AC, Kim W. *Kangiella chungangensis* sp. nov. isolated from a marine sand[J]. Antonie Van Leeuwenhoek, 2015, 107(5): 1291-1298
- [9] Wang G, Tang M, Wu H, et al. *Aliikangiella marina* gen. nov. sp. nov. a marine bacterium from the culture broth of *Picochlorum* sp. 122 and proposal of *Kangiellaceae* fam. nov. in the order *Oceanospirillales*[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2015, 65(12): 4488-4494
- [10] Hu YOO, Karlson B, Charvet S, et al. Diversity of pico-to mesoplankton along the 2000 km salinity gradient of the Baltic Sea[J]. Frontiers in Microbiology, 2016, 7: 679

- [11] Szefer P, Kim BS, Kim CK, et al. Distribution and coassociations of trace elements in soft tissue and byssus of *Mytilus galloprovincialis* relative to the surrounding seawater and suspended matter of the southern part of the Korean Peninsula[J]. Environmental Pollution, 2004, 129(2): 209-228
- [12] Donohue KA, Toole JM. A near-synoptic survey of the Southwest Indian Ocean[J]. Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography, 2003, 50(12/13): 1893-1931
- [13] Oppenheimer CH. The growth and viability of sixty-three species of marine bacteria as influenced by hydrostatic pressure[J]. Journal of Marine Research, 1952, 11: 10-18
- [14] Xu GY. Characterization, cloning and expression of a cold-active protease from psychrophilic bacterium *Pseudoalteromonas* sp. QI-1[D]. Jinan: Master's Thesis of Shandong University, 2010 (in Chinese)
徐国英. 极地嗜冷菌 *Pseudoalteromonas* sp. QI-1 产适冷蛋白酶及其基因克隆与表达的研究[D]. 济南: 山东大学硕士学位论文, 2010
- [15] Zhao GY, Chen XL, Zhao HL, et al. Hydrolysis of insoluble collagen by deseasin MCP-01 from deep-sea *Pseudoalteromonas* sp. SM9913: collagenolytic characters, collagen-binding ability of C-terminal polycystic kidney disease domain, and implication for its novel role in deep-sea sedimentary particulate organic nitrogen degradation[J]. Journal of Biological Chemistry, 2008, 283(52): 36100-36107
- [16] Qiang YB, Lan CX, Hou XY, et al. Molecular analysis of the gene encoding a cold-adapted halophilic subtilase from deep-sea psychrotolerant bacterium *Pseudoalteromonas* sp. SM9913: cloning, expression, characterization and function analysis of the C-terminal PPC domains[J]. Extremophiles, 2009, 13(4): 725-733
- [17] Chen XL, Zhang YZ, Gao PJ, et al. Two different proteases produced by a deep-sea psychrotrophic bacterial strain, *Pseudoalteromonas* sp. SM9913[J]. Marine Biology, 2003, 143(5): 989-993
- [18] Guo J. Multiple mature forms of metalloprotease E495 in Thermolysin family secreted by sea ice bacteria *Pseudoalteromonas* sp. SM495 and function of its C-terminal PPC domain[D]. Jinan: Master's Thesis of Shandong University, 2011 (in Chinese)
郭君. 海冰细菌 *Pseudoalteromonas* sp. SM495 分泌的 Thermolysin 家族金属蛋白酶 E495 的多种成熟形式及 C 端 PPC 结构域的功能研究[D]. 济南: 山东大学硕士学位论文, 2011
- [19] Vescovi EG, Soncini FC, Groisman EA. Mg²⁺ as an extracellular signal: environmental regulation of *Salmonella virulence*[J]. Cell, 1996, 84(1): 165-174
- [20] Fagerbakke KM, Norland S, Heldal M. The inorganic ion content of native aquatic bacteria[J]. Canadian Journal of Microbiology, 1999, 45(4): 304-311
- [21] Heldal M, Norland S, Erichsen ES. Mg²⁺ as an indicator of nutritional status in marine bacteria[J]. ISME Journal, 2012, 6(3): 524-530
- [22] Bian F, He HL, Chen XL, et al. The effects of ions on the secretion of extracellular proteases produced by cold-adapted deep-sea bacterium *Pseudoalteromonas* sp. SM9913[J]. Journal of Shandong University (Natural Science), 2006, 41(5): 166-172 (in Chinese)
边斐, 何海伦, 陈秀兰, 等. 离子对深海嗜冷菌 *Pseudoalteromonas* sp. SM9913 胞外蛋白酶分泌的影响[J]. 山东大学学报: 理学版, 2006, 41(5): 166-172
- [23] Zwir I, Shin D, Kato A, et al. Dissecting the PhoP regulatory network of *Escherichia coli* and *Salmonella enterica*[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2005, 102(8): 2862-2867
- [24] Kato A, Groisman EA. The PhoQ/PhoP regulatory network of *Salmonella enterica*[A]/Utsumi R. Bacterial Signal Transduction: Networks and Drug Targets[M]. New York: Springer, 2008: 7-21
- [25] Perez JC, Shin D, Zwir I, et al. Evolution of a bacterial regulon controlling virulence and Mg²⁺ homeostasis[J]. PLoS Genetics, 2009, 5(3): e1000428