

研究报告

假单胞菌 NyZ12 基因组的可塑多变特征

张慧玲, 谢琪冲, 叶林燕, 梁潼, 闫达中*

武汉轻工大学生命科学与技术学院, 湖北 武汉 430023

张慧玲, 谢琪冲, 叶林燕, 梁潼, 闫达中. 假单胞菌 NyZ12 基因组的可塑多变特征[J]. 微生物学通报, 2023, 50(4): 1525-1537.

ZHANG Huiling, XIE Qichong, YE Linyan, LIANG Tong, YAN Dazhong. Plasticity and variability of *Pseudomonas plecoglossicida* NyZ12 genome[J]. Microbiology China, 2023, 50(4): 1525-1537.

摘要:【背景】假单胞菌是广泛存在于土壤、水体环境的微生物, 其中 *Pseudomonas plecoglossicida* NyZ12 是一株能够以环己胺为唯一碳源和氮源生长的革兰氏阴性菌, 其基因组达到 7.0 Mb 左右。

【目的】研究假单胞菌 NyZ12 的基因组是否具有可塑性和多变特征。【方法】以环己胺为唯一碳源和氮源生长的 *P. plecoglossicida* NyZ12 为研究对象, 以琥珀酸或者代谢中间产物环己酮为碳源连续传代让其自然发生突变, 然后筛选在以环己胺为唯一碳源和氮源的无机盐培养基上不能生长的突变体。将获得的突变体进行全基因组测序, 并与野生型假单胞菌 NyZ12 的全基因组进行比对。

【结果】以琥珀酸和环己酮为碳源分别筛选到一株突变体 T₁ 和 T₂, 测序比对后发现假单胞菌突变体 T₁、T₂ 的基因组发生大量的缺失和突变。对基因丢失的原因进行了分析, 丢失的 2 个大片段中存在大量的重复序列、转座酶、转座子和原噬菌体。【结论】假单胞菌 NyZ12 的基因组具有可塑多变的特征。其可能的机制为进一步揭示微生物的适应和进化提供了参考。

关键词: 假单胞菌 NyZ12; 突变体; 基因组; 基因组可塑性

Plasticity and variability of *Pseudomonas plecoglossicida* NyZ12 genome

ZHANG Huiling, XIE Qichong, YE Linyan, LIANG Tong, YAN Dazhong*

School of Life Science and Technology, Wuhan Polytechnic University, Wuhan 430023, Hubei, China

Abstract: [Background] *Pseudomonas* is genus of bacteria ubiquitous in soil and water environments, among which *Pseudomonas plecoglossicida* NyZ12 is a Gram-negative bacterium that can grow on cyclohexylamine as the sole carbon and nitrogen source, with the genome up to 7.0 Mb. [Objective] To investigate whether the genome of *P. plecoglossicida*

资助项目: 国家自然科学基金(31270112)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (31270112).

*Corresponding author. E-mail: dazhongyan@whpu.edu.cn

Received: 2022-11-30; Accepted: 2023-02-11; Published online: 2023-02-28

NyZ12 has plasticity and variability. **[Methods]** *P. plecoglossicida* NyZ12 was continuously cultured with succinic acid or the intermediate cyclohexanone as the carbon source for natural mutation, and then the mutants incapable of growing on cyclohexylamine as the sole carbon and nitrogen source were isolated. The whole genomes of the mutants T₁ and T₂ were sequenced and compared with that of the wild-type *P. plecoglossicida* NyZ12. **[Results]** The genomes of mutants T₁ and T₂ presented a large number of deletions and mutations compared with the wild type. A large number of repeats, transposons, and prophages were present in the two missing large gene fragments. **[Conclusion]** The genome of *P. plecoglossicida* NyZ12 is characterized with plasticity and variability. This study explores the possible mechanism and gives insight into the adaptation and evolution of microorganisms.

Keywords: *Pseudomonas plecoglossicida* NyZ12; mutant; genome; genome plasticity

环己胺(cyclohexylamine, 化学式为 C₆H₁₃N)是一种重要的精细化工中间体, 被广泛用于制造杀虫剂、增塑剂、防腐添加剂等^[1]。同时, 环己胺还被用于医药和农业等方面。在化工生产中, 环己胺蒸汽被释放到大气中, 给环境造成污染。近些年, 已经证实了环己胺具有一定的致癌性^[2]。人通过吸入、食入或经过皮肤吸收, 会发生急性中毒。中毒的特征为剧烈呕吐、腹泻、瞳孔散大、视力模糊、对光反应变得迟钝、精神萎靡和语言发生障碍等^[1]。目前报道的可以降解环己胺的纯培养物有 3 种, 分别是革兰氏阳性菌短杆菌(*Brevibacterium oxydans*) IH-35A^[3-5]、革兰氏阴性菌不动杆菌(*Acinetobacter* sp.) YT-02^[6-7] 和 假 单 胞 菌 (*Pseudomonas plecoglossicida*) NyZ12^[1]。其中 *P. plecoglossicida* NyZ12 是由中国科学院武汉病毒研究所环境微生物课题组在土壤中分离获得的能降解环己胺的菌株。

革兰氏阴性菌假单胞菌 *P. plecoglossicida* NyZ12 对环己胺的代谢途径为: 环己胺→环己酮→6-己内酯→6-羟基己酸→己二酸半醛→己二酸, 再将己二酸催化生成乙酰辅酶 A 和琥珀酰辅酶 A, 进入三羧酸循环^[8](图 1)。通过基因组分析发现催化环己酮生成 6-己内酯的是环己

酮单加氧酶, 编码基因为 *chnB* (RK21_02867); 催化 6-己内酯生成 6-羟基己酸的是 6-己内酯水解酶, 编码基因为 *chnC* (RK21_02866); 催化 6-羟基己酸生成己二酸半醛的是 6-羟基己酸脱氢酶, 编码基因为 *chnD* (RK21_02869); 催化己二酸半醛脱氢生成己二酸的是己二酸半醛脱氢酶, 编码基因为 *chnE* (RK21_02870); 并且编码催化环己酮至己二酸的基因 RK21_02866-2870 位于同一个操纵子上^[8]。对 *chnB* 进行敲除和回补实验, 发现 *chnB* 是控制环己酮分解至 6-羟基己酸的唯一基因, 并且实验证明 *P. plecoglossicida* NyZ12 对环己胺是经过环己酮代谢的^[8]。同时, 预测了 5 个可能编码环己胺氧化酶的基因, 分别为 *amo2631*、*amo4207*、*amo5539*、*amo0425* 和 *amo4637*^[9-10]。将这 5 个可能编码环己胺氧化酶的目的基因分别克隆到表达载体并转入大肠杆菌 DH5α 中, 异源表达环己胺氧化酶, 检测其催化能力, 并研究工程菌对底物环己胺的降解情况和产物生成情况, 结合质谱分析催化产物, 最终确定出 NyZ12 编码环己胺氧化酶的关键基因之一 *amo2631*^[11-13]。对这 5 个基因进行单个敲除和累积敲除的结果显示, 敲除后的 NyZ12 突变体依旧能够利用环己胺为唯一碳氮源进行生长, 只是生长速率减慢了一些^[10]。因此, 推测

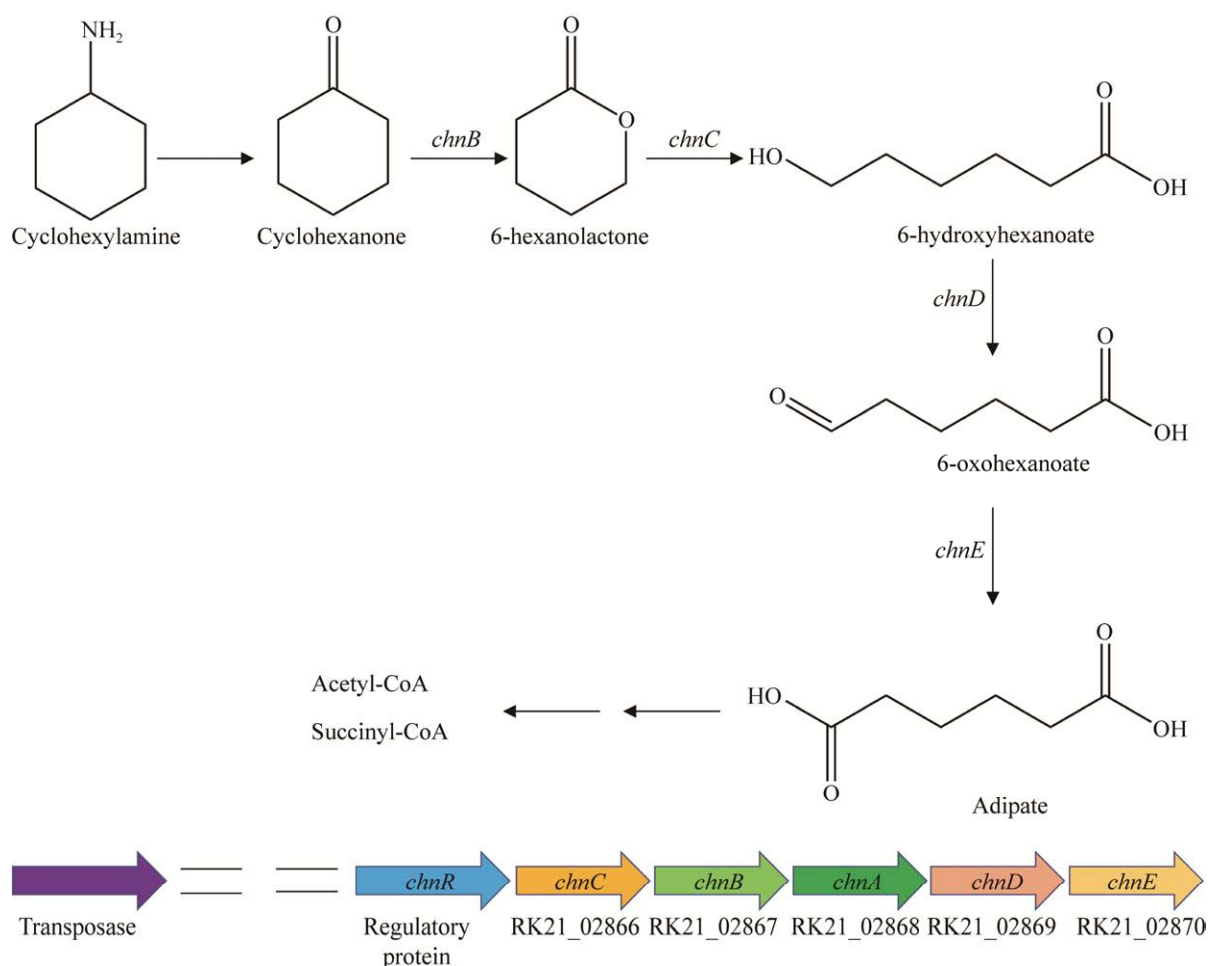


图 1 假单胞菌 NyZ12 降解环己胺的代谢途径

Figure 1 Metabolic pathway of cyclohexylamine by *Pseudomonas plecoglossicida* NyZ12.

催化环己胺到环己酮的酶或者代谢途径存在冗余现象^[9]。这种遗传上的冗余设计有利于其对环境的适应, 冗余基因的丢失和突变不是致死的, 导致其基因组的可塑性和多变特征。

假单胞菌属栖息在广泛的环境中, 它们具有广泛的代谢能力和适应各种环境条件波动变化的潜力。由于他们具有降解有机污染物(包括芳香烃)的能力, 许多假单胞菌从污染的土壤和地下水中分离出来。其中恶臭假单胞菌是具有强大代谢能力的非致病性微生物, 研究者对其基因组学、转录组、代谢组学和应用等方面进行了系统的研究, 它是开展污染物降解的模式

生物之一^[14]。但我们对假单胞菌基因组具有可塑性和多变的特征从而能够适应复杂环境条件变化的理解仍然有限^[15]。全基因组测序能够揭示该属独特代谢能力的遗传基础、基因组动态进化过程和可能的机制。传统观点认为大多数微生物基因组是相对恒定的, 而不像 RNA 病毒突变那么快, 因为 RNA 聚合酶无 3'→5'外切酶活性, 其校对作用有限, 所以 RNA 的复制过程更容易发生碱基突变, 而目前有研究认为微生物的基因组是可塑和变化的, 通过比较细菌和古细菌基因组发现, 大多数古细菌和细菌基因在其他生物中具有保守性和进化上的同源性, 并且

水平基因转移是原核生物进化的主导力量^[16]。水平基因转移在原核生物世界中无处不在,是造成微生物基因组可塑性的重要原因之一。微生物可以通过基因的获得、丢失和转移发生动态的变化而不断进化,可以通过将环境 DNA 整合到其基因组中获得新的基因,也可以通过基因丢失来应对环境的变化。总之,微生物基因组的进化是一个高度动态的过程^[17]。

为了确定假单胞菌 NyZ12 的基因组是相对恒定还是可塑多变的,本研究采取连续传代的方法筛选突变体,并对其进行全基因组测序,通过比对分析,探讨基因突变和丢失的可能原因,以期揭示 *P. plecoglossicida* NyZ12 基因组是否具有可塑性和多变的特点,为进一步揭示微生物的生理生态学机制和物种适应进化机制提供参考。

1 材料与方法

1.1 菌株和主要试剂、仪器

假单胞菌 NyZ12 (Amp^r)、假单胞菌 NyZ12Δ2631 (RK21_02631 无痕敲除)、假单胞菌 NyZ12Δ3 (RK21_00425、RK21_02631 和 RK21_05539 这 3 个基因无痕敲除)和假单胞菌 NyZ12Δ*chnB* 为本实验室保存。

环己胺, Sigma-Aldrich 公司; 环己酮和琥珀酸, 国药集团化学试剂有限公司; 刃天青钠盐, 上海笛柏生物科技有限公司。PCR 仪, Biometra 公司; 琼脂糖凝胶电泳系统, 北京六一生物科技有限公司; 琼脂糖电泳凝胶成像系统, 上海金鹏分析仪器厂; 气相色谱质谱联用仪, 安捷伦科技有限公司。

1.2 培养基

无机盐培养基(mineral salts medium, MSM) (g/L): Na₂HPO₄·12H₂O 3.8, KH₂PO₄ 1.5, CaCl₂·H₂O 0.01, MgSO₄·7H₂O 0.05, MnSO₄·4H₂O

0.002, FeSO₄·7H₂O 0.005。固体培养基加琼脂粉 16 g/L。

根据实验需求在无机盐培养基中分别添加终浓度为 5 mmol/L 的环己胺、环己酮和琥珀酸作为碳源, 其中添加环己酮或者琥珀酸时需同时添加 5 mmol/L 过滤除菌的硫酸铵作为氮源。

LB 培养基(g/L): NaCl 10.0, 蛋白胨(tryptone) 10.0, 酵母提取物(yeast extract) 5.0。

1.3 方法

1.3.1 假单胞菌 NyZ12 突变体的筛选与鉴定

挑取 NyZ12、NyZ12Δ2631 和 NyZ12Δ3 的单菌落, 分别接种在含 5 mmol/L 琥珀酸无机盐液体培养基和含 5 mmol/L 环己酮无机盐液体培养基中, 28 °C、200 r/min 进行连续传代培养, 每 24 h 转接 1 次。每 3 天取样品稀释到 10⁻⁶ 涂布至琥珀酸或环己酮无机盐固体培养基上, 28 °C 培养 3 d 左右。取平板上的单菌落于环己胺无机盐液体培养基中, 28 °C、200 r/min 培养, 观察 24–36 h, 若未生长立刻接至琥珀酸液体培养基中, 待长出菌液, 划线至琥珀酸固体平板上, 于 28 °C 培养箱培养, 验证琥珀酸平板上的单菌落在环己胺和环己酮无机盐液体培养基中的生长情况。

挑取突变体的单菌落于含有 5 mmol/L 琥珀酸的无机盐培养基中, 28 °C、200 r/min 培养 20 h 左右, 取 1 mL 该菌液 4 °C、12 000 r/min 离心 1 min, 去掉上清, 加入 1 mL 无菌水重悬, 再次 4 °C、12 000 r/min 离心 1 min 后去掉上清, 再加入 100 μL 无菌水悬浮, 在 100 °C 沸水浴煮 10 min 后 4 °C、12 000 r/min 离心 2 min, 取上清为 PCR 模板。采用引物 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3')和 1492R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3')扩增 16S rRNA 基因。PCR 反应体系(50 μL): 2×Taq Master Mix 25 μL, 正、反向引物(10 μmol/L)各 1 μL, 细菌 DNA 1 μL,

无菌水 22 μL 。PCR 反应条件: 95 $^{\circ}\text{C}$ 5 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 56 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 1 min 30 s, 30 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 5 min。PCR 产物送生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序。

1.3.2 刃天青钠盐验证突变体的生长情况

刃天青是一种传统的氧化还原染料, 常被用于微生物的生存和增殖情况评估。活细胞的代谢反应将蓝色、弱荧光的刃天青还原为粉红色、强荧光的试卤灵, 说明细菌生长增殖^[18]。如果还原反应进一步发生, 试卤灵将继续被还原成无色、无荧光的二氢试卤灵^[18]。

挑取 NyZ12、NyZ12 突变体 T₁、NyZ12 突变体 T₂ 和 NyZ12 Δ chnB 单菌落分别接种于含有 5 mmol/L 环己胺、琥珀酸和环己酮的无机盐液体培养基中, 28 $^{\circ}\text{C}$ 、200 r/min 培养至对数生长期(OD_{600} 达到 0.4–0.5 左右)。用 MSM 洗 2 次菌体后, 再重悬, 取 2 μL 菌液分别加入到含有刃天青(终浓度为 2 $\mu\text{g/mL}$)的环己胺无机盐液体培养基和环己酮无机盐液体培养基中, 28 $^{\circ}\text{C}$ 、200 r/min 培养 5 d, 观察颜色反应, 从而判断突变体在环己胺和环己酮无机盐培养基中的生长情况。

1.3.3 突变体全基因组测序

用含琥珀酸(终浓度为 5 mmol/L)的无机盐液体培养基 28 $^{\circ}\text{C}$ 、200 r/min 培养 NyZ12 突变体 T₁ 20 h 左右, 4 $^{\circ}\text{C}$ 、12 000 r/min 离心 5 min 收集菌体后彻底去除上清, 冻存于 -80 $^{\circ}\text{C}$; 用含环己酮(终浓度为 5 mmol/L)的无机盐培养基 28 $^{\circ}\text{C}$ 、200 r/min 培养 NyZ12 突变体 T₂ 20 h 左右, 4 $^{\circ}\text{C}$ 、12 000 r/min 离心 5 min 收集菌体后彻底去除上清, 冻存于 -80 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱。将这两株突变体送至北京百迈客生物科技公司进行全基因组测序。使用 Canu V1.5^[19-20] 软件对过滤后 subreads 进行组装, 通过 Racon V3.4.3 软件^[21]

利用三代 subreads 对组装结果进行矫正, 通过 Circlator V1.5.5 软件^[22] 进行环化和调整起始位点, 采用 Pilon V1.22 软件^[23] 利用二代数据进一步进行纠错, 得到准确度更高的基因组进行后续分析。通过软件 Prodigal V2.6.3^[24] 进行基因预测, 该软件使用动态编程算法预测新测序基因组中的基因。

将突变体完成图与野生型基因组测序的数据进行比对分析, 对突变体插入、缺失和点突变的信息进行统计分析, 找出关键信息进行解析。

1.3.4 静息细胞(resting cell)实验和 GC-MS 检测中间产物

将 NyZ12 野生型单菌落接入 5 mL 环己胺无机盐液体培养基, 28 $^{\circ}\text{C}$ 、200 r/min 培养 20 h 左右, 将筛选到的 2 个突变体 T₁ 和 T₂ 的单菌落分别接到 5 mL 琥珀酸无机盐液体培养基中, 以同样的温度和转速培养相同的时间。再将其扩大培养后, 4 $^{\circ}\text{C}$ 、8 000 r/min 离心收菌, 并用 MSM 清洗 2 遍, 再悬浮于 30 mL MSM 培养基中进行饥饿处理 2 h, 再加入 5 mmol/L 环己胺作为碳氮源进行培养, 分别在 30、60、90、120、180、240、360 min 取培养物 3 mL, 加入 0.5 mL 乙腈终止反应, 再 8 000 r/min 离心 2 min, 取上清加入 1 mL 乙酸乙酯萃取, 无水硫酸钠干燥, 采用 0.22 μm 有机相滤膜过滤至色谱瓶。气质联用(GC-MS)检测中间产物。

GC-MS 条件为: 气相色谱质谱联用仪为 Agilent Technologies 7890B、Agilent Technologies 5977B MSD, 色谱柱为 HP-5, 载气为 N₂, 流量为 25 cm/min, 检测器温度为 280 $^{\circ}\text{C}$ 。柱温采用程序升温: 初始温度为 75 $^{\circ}\text{C}$, 初始时间为 5 min, 升温速率为 10 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$, 升温至 175 $^{\circ}\text{C}$, 保留时间为 10 min, 继续以 10 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 的升温速率升温至 200 $^{\circ}\text{C}$, 保留 2.5 min。进样量为 1 μL 。

2 结果与分析

2.1 对筛选的突变体进行 16S rRNA 基因的 PCR 扩增测序

采取琥珀酸无机盐培养基对 NyZ12 野生型、NyZ12 Δ 2631 和 NyZ12 Δ 3 分别进行传代, 每天传代 1 次, 大概传代 20 次后从 NyZ12 野生型的传代中获得了一株在环己胺和环己酮无机盐培养基中均不生长的突变体 T₁。将 NyZ12 野生型、NyZ12 Δ 2631 和 NyZ12 Δ 3 均在环己酮无机盐培养基中进行传代培养, 反复传代 30 次左右, 在 NyZ12 Δ 3 的传代中获得不能在环己胺上生长的突变体 T₂。将这两株突变体进行 PCR 验证, 并送至生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序, 将测序结果进行 BLAST 比对, 结果显示两株突变体与野生型假单胞菌 NyZ12 的 16S rRNA 基因序列一致性(identity)为 100%。

2.2 刃天青钠盐验证突变体的生长

接种 NyZ12 野生型、NyZ12 突变体 T₁、NyZ12 突变体 T₂ 和 NyZ12 Δ chnB 的单菌落于环己胺无机盐培养基中, NyZ12 野生型在环己胺无机盐培养基中培养 36 h 后 OD₆₀₀ 可以达到

0.666 0 \pm 0.013 8, 而各种突变体培养 5 d 后 OD₆₀₀ 仍然低于 0.002 00 \pm 0.002 65, 表明突变体 NyZ12 T₁、NyZ12 T₂ 和 NyZ12 Δ chnB 不能利用环己胺为碳源生长; 接种以上菌株的单菌落于环己酮无机盐培养基中, NyZ12 野生型和 NyZ12 突变体 T₂ 在环己酮无机盐培养基中培养 36 h 后, OD₆₀₀ 分别达到 0.849 0 \pm 0.034 0 和 0.726 0 \pm 0.021 9, NyZ12 突变体 T₁ 和 NyZ12 Δ chnB 即使培养 5 d, OD₆₀₀ 仍然低于 0.012 70 \pm 0.002 52, 表明它们不能利用环己酮为碳源生长。为了进一步确定突变体是否能利用环己胺或者环己酮生长, 采用刃天青染料的方法进一步定性确定。

用刃天青进行突变体的生长情况验证, 设置不接菌为阴性对照, 接种野生型 NyZ12 为阳性对照, 并且设置 3 个重复。将其培养 5 d 后观察其颜色变化。

观察生长实验结果可知, NyZ12 突变体 T₁ 不能以环己胺和环己酮为唯一碳源生长; NyZ12 突变体 T₂ 不能以环己胺为唯一碳源生长, 但是仍然能以环己酮为唯一碳源生长(图 2、图 3)。利用刃天青染料获得的结果与测定 OD₆₀₀ 的结果一致。

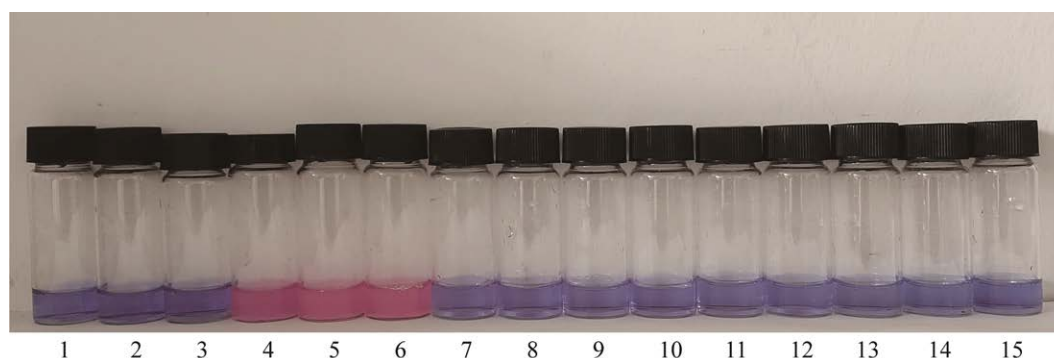


图 2 利用刃天青测试菌株在环己胺无机盐培养基中的生长 从左到右依次为: 阴性对照(1-3), NyZ12 野生型(4-6), NyZ12 突变体 T₂ (7-9), NyZ12 突变体 T₁ (10-12), NyZ12 Δ chnB (13-15)

Figure 2 Growth analysis of wild type NyZ12 and its mutants in mineral salts medium containing cyclohexylamine with resazurin sodium treatment, from left to right are Negative control (1-3), NyZ12 wild type (4-6), NyZ12 mutant T₂ (7-9), NyZ12 mutant T₁ (10-12) and NyZ12 Δ chnB (13-15).

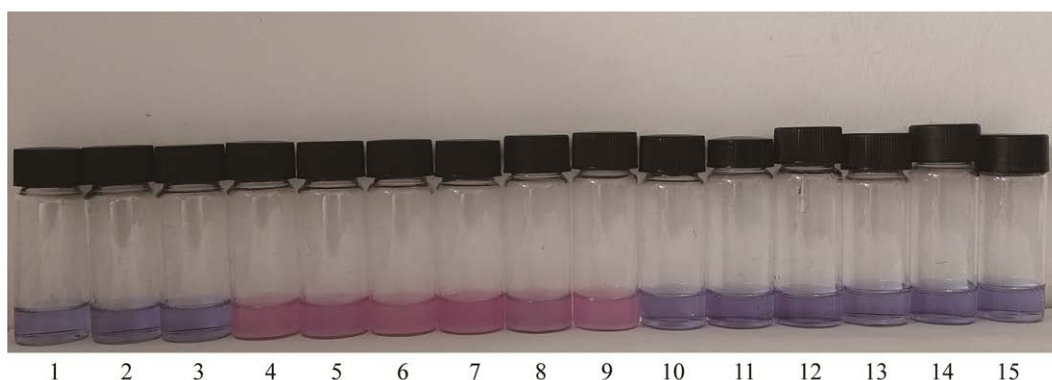


图3 利用刃天青测试菌株在环己酮无机盐培养基中的生长 从左到右依次为:阴性对照(1-3),NyZ12野生型(4-6),NyZ12突变体 T_2 (7-9),NyZ12突变体 T_1 (10-12),NyZ12 Δ chnB (13-15)

Figure 3 Growth analysis of wild type NyZ12 and its mutants in mineral salts medium containing cyclohexanone with resazurin sodium treatment, from left to right are Negative control (1-3), NyZ12 wild type (4-6), NyZ12 mutant T_2 (7-9), NyZ12 mutant T_1 (10-12) and NyZ12 Δ chnB (13-15).

2.3 GC-MS 检测中间产物结果分析

对 2 个突变体培养后进行全细胞转化,分别在 30、60、90、120、180、240、360 min 取样,加入乙腈进行终止反应,用乙酸乙酯萃取,取有机相加入无水硫酸钠干燥,并且过滤至色谱瓶中。通过 GC-MS 检测发现,阴性对照中只能检测到环己胺(图 4A),NyZ12 突变体 T_1 在 240 min (图 4B、4C)和 360 min 的样品中能够同时检测到环己胺和环己酮。然而,NyZ12 突变体 T_2 中只能检测到环己胺,未检测到环己酮(图 4D)。这些结果表明 NyZ12 突变体 T_2 不能利用环己胺为唯一碳源生长,推测 NyZ12 突变体 T_1 中控制环己酮代谢的操纵子可能发生了丢失,所以检测到环己酮的积累。

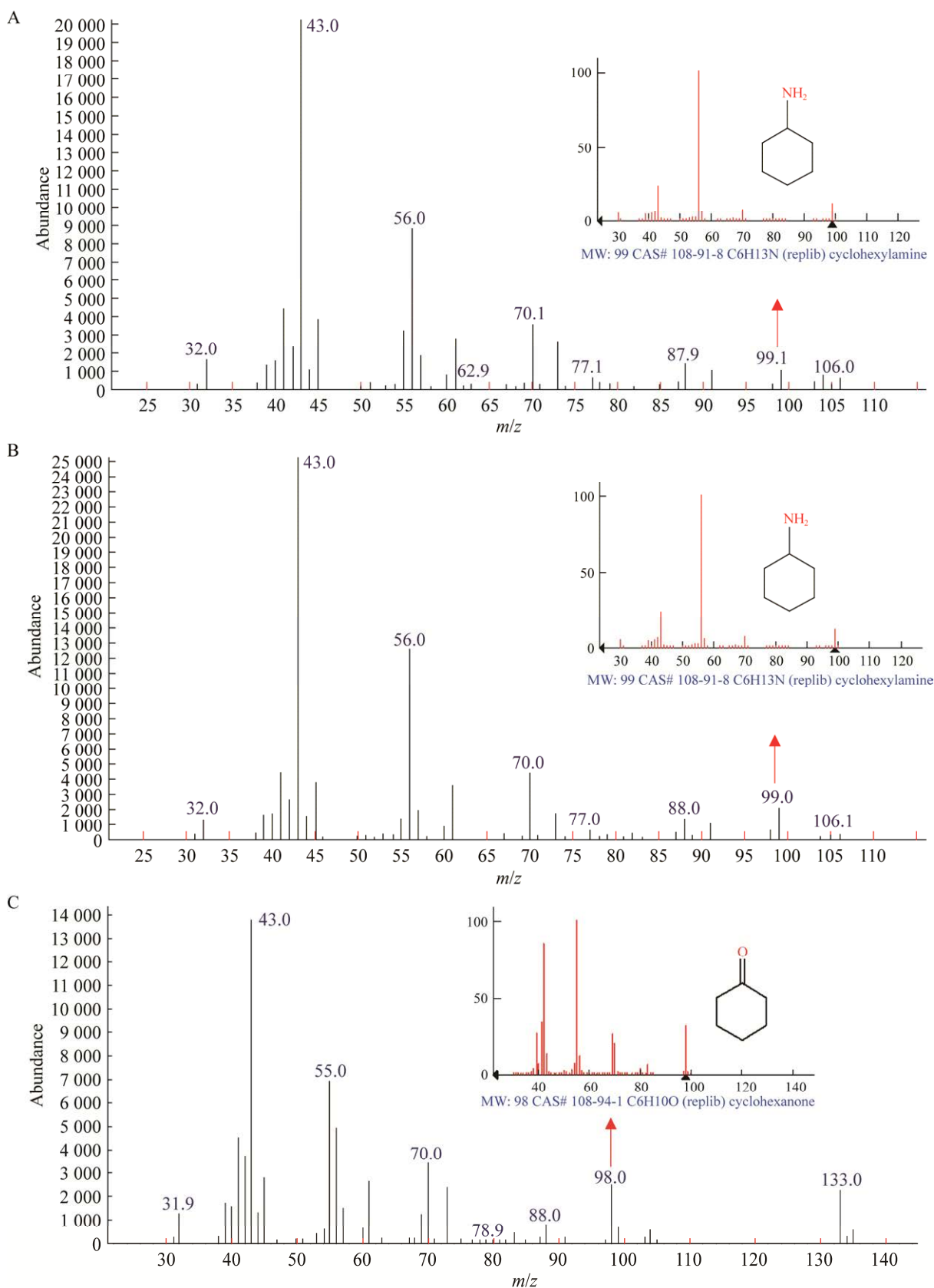
2.4 突变体全基因组测序分析

提取两株突变体的基因组,由北京百迈客生物科技公司进行全基因组测序,以野生型基因组为参考进行比对分析,获得突变体的插入、缺失和点突变情况,分析结果见表 1 和表 2。NyZ12 突变体 T_1 有 8 处插入、5 处单碱基突变和 5 处缺失,其中缺失了 2 个大片

RK21_01203-01278 和 RK21_02818-02937。NyZ12 突变体 T_2 有 14 处插入、7 处单碱基突变和 5 处缺失,其中有一大段 RK21_01203-01278 缺失。统计发现更多单碱基突变成 G 或 C。这些结果表明,微生物的基因组可以自发发生大片段缺失、单碱基突变,微生物基因组是柔性多变的。

3 讨论

假单胞菌是广泛存在于土壤和水体环境的微生物,其基因组达到 7.0 Mb 左右,一般都比较较大,参与代谢的基因冗余使其在环境中有很好的适应性,但冗余的基因特点也带来了不稳定性。本研究将假单胞菌 NyZ12 在以琥珀酸为底物的情况下进行传代培养,获得了 NyZ12 突变体 T_1 ,分析其全基因组发现主要缺失了 RK21_01203-01278 和 RK21_02818-02937 这 2 个基因大片段。然而假单胞菌 NyZ12 Δ 3 在以环己酮为底物进行传代培养获得的 NyZ12 突变体 T_2 主要缺失了一大段 RK21_01203-01278。巧合的是在上述 2 种不同底物培养条件下,均丢失了 RK21_01203-01278 这一段。NyZ12 突变



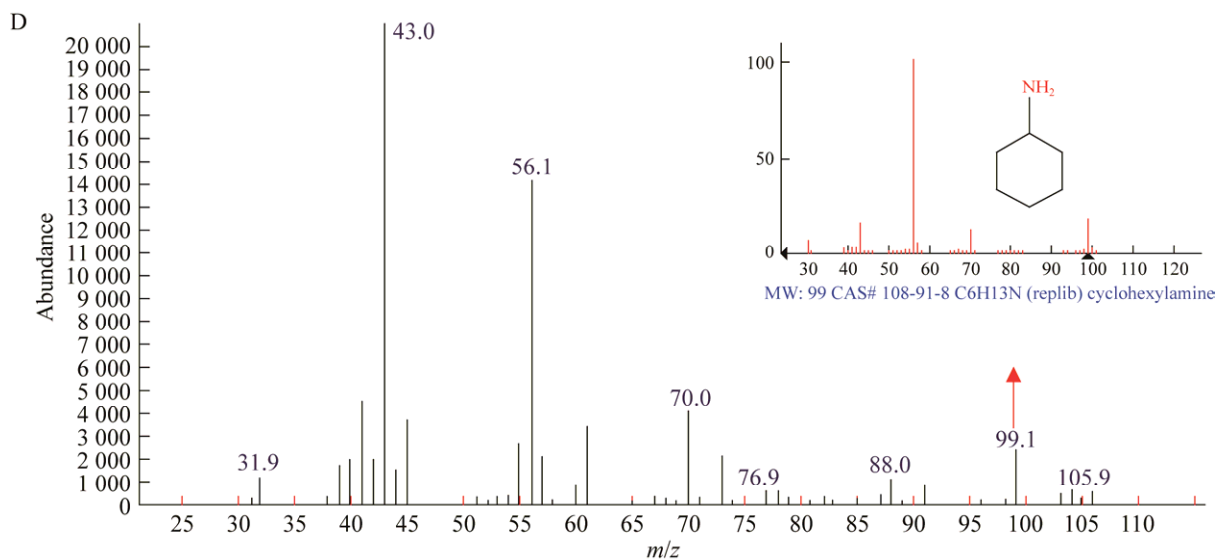


图 4 GC-MS 检测 NyZ12 突变体 T₁、T₂ 全细胞转化环己胺的中间产物 A: 阴性对照(未接菌)含有 5 mmol/L 环己胺无机盐培养基在摇床中反应 30 min 取样进 GC-MS 检测. B: NyZ12 突变体 T₁ 全细胞转化在 240 min. C: NyZ12 突变体 T₁ 全细胞转化在 240 min. D: NyZ12 突变体 T₂ 全细胞转化在 360 min

Figure 4 Identification of intermediates from whole-cell transformation of mutant T₁, T₂ with GC-MS. A: The negative control medium (uninoculated) containing 5 mmol/L cyclohexylamine was incubated in the shaker for 30 min and sampled for GC-MS detection. B: Whole cell transformation of NyZ12 mutant T₁ at 240 min. C: Whole cell transformation of NyZ12 mutant T₁ at 240 min. D: Whole cell transformation of NyZ12 mutant T₂ at 360 min.

表 1 NyZ12 突变体 T₁ 基因组中的突变

| Table 1 Mutation sites from the genome of NyZ12 mutant T ₁ | | | |
|---|-------------|--|---------------------------|
| Type | Base length | Relative to the NyZ12 wild type position | Influence the target gene |
| Insertion | G | 398 176 | No |
| Base substitution | C→G | 640 898 | RK21_00574 |
| Insertion | G | 1 000 945 | No |
| Deletion | 82 383 bp | 1 314 383–1 396 766 | RK21_01203-RK21_01278 |
| Deletion | T | 1 821 732 | No |
| Mutation | G→C | 1 835 512 | RK21_01715 |
| Insertion | G | 2 017 378 | RK21_01875 |
| Base substitution | A→G | 2 178 597 | RK21_02029 |
| Base substitution | A→G | 2 179 147 | No |
| Deletion | 128 804 bp | 2 958 644–3 087 937 | RK21_02818-RK21_02937 |
| Insertion | C | 3 207 111 | RK21_03060 |
| Deletion | 10 bp | 3 816 002-3 816 011 | No |
| Insertion | C | 4 438 674 | RK21_04245 |
| Insertion | 463 bp | 4 957 921 | RK21_04728 |
| Base substitution | C→T | 5 403 797 | RK21_05151 |
| Deletion | 11 bp | 5 621 918–5 621 928 | No |
| Insertion | C | 6 232 635 | RK21_r022 |
| Insertion | G | 6 233 178 | RK21_r022 |

表 2 NyZ12 突变体 T₂ 基因组中的突变Table 2 Mutation sites from the genome of NyZ12 mutant T₂

| Type | Base length | Relative to the NyZ12 wild type position | Influence the target gene |
|-------------------|-------------|--|---------------------------|
| Base substitution | A→G | 272 888 | RK21_00261 |
| Insertion | G | 398 176 | No |
| Deletion | 1 887 bp | 461 894–463 781 | RK21_00425 |
| Insertion | G | 1 000 945 | No |
| Deletion | 82 383 bp | 1 314 383–1 396 766 | RK21_01203-RK21_01278 |
| Insertion | 1 567 bp | 1 421 223 | No |
| Base substitution | T→G | 1 606 650 | RK21_01500 |
| Base substitution | G→C | 1 835 512 | RK21_01715 |
| Insertion | G | 2 017 378 | RK21_01875 |
| Deletion | 1 181 bp | 2 760 848–2 762 029 | RK21_02631 |
| Deletion | 209 bp | 3 017 742–3 017 951 | RK21_02872 |
| Base substitution | A→T | 3 038 203 | RK21_02893 |
| Insertion | 1 235 bp | 3 077 522 | No |
| Insertion | C | 3 207 111 | RK21_03060 |
| Insertion | 6 bp | 3 357 920 | RK21_03207 |
| Insertion | 28 bp | 4 425 234 | RK21_04226 |
| Insertion | C | 4 438 674 | RK21_04245 |
| Base substitution | C→G | 4 782 509 | RK21_r012 |
| Insertion | 1 567 bp | 5 252 716 | RK21_05012 |
| Base substitution | A→C | 5 510 973 | RK21_r018 |
| Insertion | 1 567 bp | 5 559 665 | No |
| Base substitution | C→G | 5 644 413 | RK21_05366 |
| Insertion | 3 bp | 5 840 753 | RK21_05539 |
| Deletion | 1 735 bp | 5 840 755–5 842 490 | RK21_05539 |
| Insertion | C | 6 232 635 | RK21_r022 |
| Insertion | G | 6 233 178 | RK21_r022 |

体 T₁ 以 NyZ12 野生型为出发菌株筛选获得, 结合表型分析, 它不能以环己胺和环己酮为唯一碳源生长。通过比较基因组分析发现, 该突变体缺失的 RK21_02818–02937 片段中包含了环己胺代谢下游途径(即催化环己酮分解进入三羧酸循环的操纵子 RK21_2866–2870), 导致 NyZ12 突变体 T₁ 不能利用环己酮为唯一碳源生长。由于催化环己胺至环己酮的酶还存在, 所以利用 GC-MS 可以检测 NyZ12 突变体 T₁ 静息细胞转化环己胺的产物有环己酮生成, 但是初始第 1 步产生的能量不足以维持其利用环己胺为唯一碳源生长。NyZ12 突变体 T₂ 以假单胞菌 NyZ12

的突变体 NyZ12Δ3 (RK21_00425, RK21_02631 和 RK21_05539 这 3 个基因已无痕敲除) 为出发菌株筛选获得, 其不能以环己胺为唯一碳源生长, 但是仍然能以环己酮为唯一碳源生长。因为 NyZ12 突变体 T₂ 是在环己酮为碳源传代培养过程中获得的突变体, 在筛选压力下, 催化环己酮分解进入三羧酸循环的操纵子 RK21_2866–2870 仍存在于基因组中, 但是参与初始步骤催化环己胺生成环己酮的环己胺氧化酶、转氨酶或者羟化酶基因已经全部缺失, 所以利用 GC-MS 无法检测到中间产物环己酮。后续我们将在丢失大片段或者突变序列中鉴定参

与催化环己胺生成环己酮的冗余代谢基因。

利用 DNASTar 统计, 发现丢失的 2 个大片段中 RK21_01203–01278 的 GC 含量为 58.51%, RK21_02818–02937 的 GC 含量为 58.4%。这 2 个片段的 GC 含量显著低于 NyZ12 野生型基因组的平均 GC 含量 64.2%, 表明这 2 段可能来源于基因的水平转移。原核生物种群的进化受同源重组的显著影响, 同源重组可以阻止基因转换而导致的序列趋异, 从而维持遗传的相对稳定^[25]。由于从外界获得新的基因簇导致同源重组频率降低, 重组障碍形成, 尤其是新获得的基因参与了不同栖息地(生境)的适应, 重组障碍导致新获得的有利于适应生境的基因发生选择性丢失^[26-27]。NyZ12 在以琥珀酸为碳源的生长过程中, 由于无环己胺或者环己酮为碳源的筛选压力, 微生物不需要合成相关代谢环己酮的酶, 参与下游代谢的基因簇 RK21_02818–02937 就容易丢失。

细菌物种的适应能力与遗传多样性有关, 各种最适应环境的突变体被选择保留下来, 目前认为产生遗传多样性的机制有 3 种, 分别是点突变、水平基因转移和基因组内的重排。基因的获得和丢失是通过插入和缺失大小不等的基因组片段, 包括大的基因组岛; 通过非同源重组的机制通常涉及可移动的遗传元件^[17]。统计发现, NyZ12 突变体 T₁ 有 8 处插入、5 处单碱基突变和 5 处缺失, NyZ12 突变体 T₂ 有 14 处插入、7 处单碱基突变和 5 处缺失(其中 RK21_00425, RK21_02631 和 RK21_05539 这 3 个基因在出发菌株已经存在)。同时, 分析发现 2 个突变体的单碱基突变大多数都是由 A 或 T 转变为 G 或 C。通常 C 更容易经过氧化或者甲基化而突变成 T, Wu 等^[28]提出 *polC* 和 *dnaE2* 基因对基因组 GC 含量有很大影响, 然而 GC 碱基对转换为 AT 碱基对(GC>AT)的突变发生频率高于任何其他类型的突变, 主要是由于自

发的胞苷脱氨基^[29-30]。然而这 2 个突变体中这种 GC 碱基对转换为 AT 的变化在 NyZ12 突变体 T₁ 中仅有 1 处, 可见不能以传统的思维研究基因组的变化, 同时也说明微生物基因组的变化规律十分复杂。

原核生物中水平基因转移频繁发生, 其中噬菌体、质粒及转座元件负责大量的水平基因转移^[31]。分析 RK21_01203–01278 和 RK21_02818–02937 这 2 个基因片段, 发现 RK21_01203–01278 这一段中有 1 个编码转座酶的基因(RK21_01277)和 1 个编码噬菌体整合酶的基因(RK21_01278); RK21_02818–02937 这一段中有 7 个编码转座酶的基因(RK21_02844、RK21_02846、RK21_02912、RK21_02915、RK21_02921、RK21_02925、RK21_02927)和 2 个编码噬菌体整合酶的基因(RK21_02818、RK21_02841)。由于缺失的这 2 个片段中含有水平基因转移元件, 所以基因的丢失不足为奇。此外, 这 2 个片段都各自包含一个基因岛。基因岛主要是由一些灵活的基因高度聚集形成, 岛形成的潜在机制多种多样, 包括温和噬菌体和接合型接合转移元件的优先插入位点, 以及基因捕获系统如整合子^[31]。在 RK21_01203–01278 中还发现了 102 个小片段重复序列, 在 RK21_02818–02937 中有 49 个小片段重复序列, 这些重复序列经过同源重组容易环化使该区域整片脱落下来, 从而造成基因的缺失。

本研究分析了 NyZ12 突变体 T₁ 和 NyZ12 突变体 T₂ 这 2 个突变体的基因组, 发现假单胞菌 NyZ12 的基因组是可塑和多变的, 在不同的环境压力下会自然丢失一部分基因, 使得细菌更好地适应环境的变化。基因丢失成为微生物进化的主要因素, 基因的丢失似乎已经帮助许多生物体进化, 并战胜了新的环境挑战。基因丢失尤其在共生或寄生物种中最为常见, 它们

通过将许多功能需求“外包”给其伴侣或宿主来简化自身^[32]。但是在非寄生和共生培养条件下,相关基因丢失的研究很少,本研究填补了这方面的空白。德国进化基因组学家 Michael Hiller 认为,进化过程中的大多数基因丢失很可能是中性的,不会对有机体造成适应性后果^[33]。本研究发现在微生物群体培养过程中,微生物突变进化速度远超过我们的想象,它是快速进化的,个体之间的基因组的确存在一些差异,表明未来微生物单细胞测序的重要性。

4 结论

微生物突变进化速度比较快,远超过我们传统的认知。本研究对假单胞菌 NyZ12 的两株突变体进行了全基因组测序,并与野生型 NyZ12 全基因组测序结果进行了比对分析,发现假单胞菌 NyZ12 的基因组具有可塑性和多变的特征并探究了可能的机制,研究结果为阐明生物的环境适应性和物种进化机制提供了参考。

REFERENCES

- [1] SHEN Y, YAN DZ, CHI XQ, YANG YY, LEAK DJ, ZHOU NY. Degradation of cyclohexylamine by a new isolate of *Pseudomonas plecoglossicida*[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2008, 24(8): 1623-1625.
- [2] KROES R, PETERS PW, BERKVENES JM, VERSCHUUREN HG, VRIES TD, ESCH GJV. Long term toxicity and reproduction study (including a teratogenicity study) with cyclamate, saccharin and cyclohexylamine[J]. Toxicology, 1977, 8(3): 285-300.
- [3] IWAKI H, SHIMIZU M, TOKUYAMA T, HASEGAWA Y. Biodegradation of cyclohexylamine by *Brevibacterium oxydans* IH-35A[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1999, 65(5): 2232-2234.
- [4] IWAKI H, SHIMIZU M, TOKUYAMA T, HASEGAWA Y. Purification and characterization of a novel cyclohexylamine oxidase from the cyclohexylamine-degrading *Brevibacterium oxydans* IH-35A[J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 1999, 88(3): 264-268.
- [5] MIRZA IA, BURK DL, XIONG B, IWAKI H, HASEGAWA Y, GROSSE S, LAU PCK, BERGHUIS AM. Structural analysis of a novel cyclohexylamine oxidase from *Brevibacterium oxydans* IH-35A[J]. PLoS One, 2013, 8(3): e60072.
- [6] YAN DZ, GAN YT, ZHOU H, LIU J, LI X. Draft genome sequence of cyclohexylamine-degrading strain *Acinetobacter* sp. YT-02 isolated[J]. Current Microbiology, 2018, 75(3): 284-287.
- [7] ZHOU H, HAN ZG, FANG T, CHEN YY, NING SB, GAN YT, YAN DZ. Characterization of a new cyclohexylamine oxidase from *Acinetobacter* sp. YT-02[J]. Frontiers in Microbiology, 2018, 9: 2848.
- [8] YAN DZ, LI X, LI CZ, MAO LQ, CHI XQ, ZHOU NY, LIU DY. Genome-wide identification and characterization of genes encoding cyclohexylamine degradation in a novel cyclohexylamine-degrading bacterial strain of *Pseudomonas plecoglossicida* NyZ12[J]. Journal of Biotechnology, 2017, 251: 166-173.
- [9] 周慧. 假单胞菌 NyZ12 降解环己胺初始步骤冗余机制研究[D]. 武汉: 武汉轻工大学硕士学位论文, 2019. ZHOU H. Studies on the redundancy mechanism of the initial step of cyclohexylamine degradation in *Pseudomonas plecoglossicida* NyZ12[D]. Wuhan: Master's Thesis of Wuhan Polytechnic University, 2019 (in Chinese).
- [10] 毛灵琪. 环己胺降解菌 NyZ12 胺氧化酶基因敲除突变体的构建及特性研究[D]. 武汉: 武汉轻工大学硕士学位论文, 2016. MAO LQ. Research on the construction and characteristics of amine oxidase gene knockout mutants of cyclohexylamine degrading bacteria NyZ12[D]. Wuhan: Master's Thesis of Wuhan Polytechnic University, 2016 (in Chinese).
- [11] 毛灵琪, 李存治, 闫达中. *Pseudomonas plecoglossicida* NyZ12 基因无痕敲除方法的建立[J]. 生物技术通报, 2016, 32(4): 203-209. MAO LQ, LI CZ, YAN DZ. A method for constructing unmarked deletion mutants of *Pseudomonas plecoglossicida* NyZ12[J]. Biotechnology Bulletin, 2016, 32(4): 203-209 (in Chinese).
- [12] 李存治. 假单胞菌 NyZ12 中环己胺氧化酶基因的克隆、表达与纯化[D]. 武汉: 武汉轻工大学硕士学位论文, 2016. LI CZ. Cloning, expression and purification of cyclohexylamine oxidase from *Pseudomonas plecoglossicida* NyZ12[D]. Wuhan: Master's Thesis of Wuhan Polytechnic University, 2016 (in Chinese).
- [13] 李存治, 毛灵琪, 晏婷, 周宁一, 闫达中. 环己胺降解菌的筛选及其生理生化特性研究[J]. 环境科学与

- 技术, 2016, 39(8): 1-5, 50.
- LI CZ, MAO LQ, YAN T, ZHOU NY, YAN DZ. Screening and identification of a cyclohexylamine-degrading strain and studies on its physiological and biochemical characteristics[J]. Environmental Science & Technology, 2016, 39(8): 1-5, 50 (in Chinese).
- [14] SILBY MW, WINSTANLEY C, GODFREY SAC, LEVY SB, JACKSON RW. *Pseudomonas* genomes: diverse and adaptable[J]. FEMS Microbiology Reviews, 2011, 35(4): 652-680.
- [15] SUENAGA H, FUJIHARA H, KIMURA N, HIROSE J, WATANABE T, FUTAGAMI T, GOTO M, SHIMODAIRA J, FURUKAWA K. Insights into the genomic plasticity of *Pseudomonas putida* KF715, a strain with unique biphenyl-utilizing activity and genome instability properties[J]. Environmental Microbiology Reports, 2017, 9(5): 589-598.
- [16] KOONIN EV, WOLF YI. Genomics of bacteria and archaea: the emerging dynamic view of the prokaryotic world[J]. Nucleic Acids Research, 2008, 36(21): 6688-6719.
- [17] IRANZO J, WOLF YI, KOONIN EV, SELA I. Gene gain and loss push prokaryotes beyond the homologous recombination barrier and accelerate genome sequence divergence[J]. Nature Communications, 2019, 10: 5376.
- [18] MARISCAL A, LOPEZ-GIGOSOS RM, CARNERO-VARO M, FERNANDEZ-CREHUET J. Fluorescent assay based on resazurin for detection of activity of disinfectants against bacterial biofilm[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2009, 82(4): 773-783.
- [19] JAIN M, OLSEN HE, PATEN B, AKESON M. The Oxford Nanopore MinION: delivery of nanopore sequencing to the genomics community[J]. Genome Biology, 2016, 17(1): 239.
- [20] KOREN S, WALENZ BP, BERLIN K, MILLER JR, BERGMAN NH, PHILLIPPY AM. Canu: scalable and accurate long-read assembly via adaptive *k*-mer weighting and repeat separation[J]. Genome Research, 2017, 27(5): 722-736.
- [21] SENOL CALI D, KIM JS, GHOSE S, ALKAN C, MUTLU O. Nanopore sequencing technology and tools for genome assembly: computational analysis of the current state, bottlenecks and future directions[J]. Briefings in Bioinformatics, 2019, 20(4): 1542-1559.
- [22] RHOADS A, AU KF. PacBio sequencing and its applications[J]. Genomics, Proteomics & Bioinformatics, 2015, 13(5): 278-289.
- [23] XIE X, ZHANG JL, WANG HN, LEI CW. Whole genome sequence of a New Delhi metallo- β -lactamase 1-producing *Proteus mirabilis* isolate SNYG35 from broiler chicken in China[J]. Journal of Global Antimicrobial Resistance, 2021, 24: 266-269.
- [24] HYATT D, CHEN GL, LOCASCIO PF, LAND ML, LARIMER FW, HAUSER LJ. Prodigal: prokaryotic gene recognition and translation initiation site identification[J]. BMC Bioinformatics, 2010, 11: 119.
- [25] MARTTINEN P, CROUCHER NJ, GUTMANN MU, CORANDER J, HANAGE WP. Recombination produces coherent bacterial species clusters in both core and accessory genomes[J]. Microbial Genomics, 2015, 1(5): e000038.
- [26] LAWRENCE JG, RETCHLESS AC. The interplay of homologous recombination and horizontal gene transfer in bacterial speciation[J]. Methods in Molecular Biology (Clifton, N J), 2009, 532: 29-53.
- [27] SHAPIRO BJ, FRIEDMAN J, CORDERO OX, PREHEIM SP, TIMBERLAKE SC, SZABÓ G, POLZ MF, ALM EJ. Population genomics of early events in the ecological differentiation of bacteria[J]. Science, 2012, 336(6077): 48-51.
- [28] WU H, ZHANG Z, HU SN, YU J. On the molecular mechanism of GC content variation among eubacterial genomes[J]. Biology Direct, 2012, 7: 2.
- [29] HERSHBERG R, PETROV DA. Evidence that mutation is universally biased towards AT in bacteria[J]. PLoS Genetics, 2010, 6(9): e1001115.
- [30] LONG HA, SUNG W, KUCUKYILDIRIM S, WILLIAMS E, MILLER SF, GUO WF, PATTERSON C, GREGORY C, STRAUSS C, STONE C, BERNE C, KYSELA D, SHOEMAKER WR, MUSCARELLA ME, LUO HW, LENNON JT, BRUN YV, LYNCH M. Evolutionary determinants of genome-wide nucleotide composition[J]. Nature Ecology & Evolution, 2018, 2(2): 237-240.
- [31] POLZ MF, ALM EJ, HANAGE WP. Horizontal gene transfer and the evolution of bacterial and archaeal population structure[J]. Trends in Genetics, 2013, 29(3): 170-175.
- [32] OCHMAN H, MORAN NA. Genes lost and genes found: evolution of bacterial pathogenesis and symbiosis[J]. Science, 2001, 292(5519): 1096-1099.
- [33] SHARMA V, HECKER N, ROSCITO JG, FOERSTER L, LANGER BE, HILLER M. A genomics approach reveals insights into the importance of gene losses for mammalian adaptations[J]. Nature Communications, 2018, 9: 1215.