

DOI: 10.11830/ISSN.1000-5013.202311032



产灵菌红素沙雷氏菌 R18 的 鉴定及基因组特性

陈明霞¹, 邢元军¹, 李和阳^{2,3}, 施俊豪¹

(1. 华侨大学 化工学院, 福建 厦门 361021;

2. 自然资源部 第三海洋研究所, 福建 厦门 361005;

3. 第三海洋研究所 福建省海洋生态保护与修复重点实验室, 福建 厦门 361005)

摘要: 采用形态学、生理生化和分子生物学方法对菌株 R18 进行菌种鉴定。通过基因组测序和生物信息学比较,进一步分析其分类地位和生物学特性,并在基因组水平上探讨该菌株红色素的合成基因簇和代谢路径。结果表明:菌株 R18 最佳生长条件为温度 30~37 °C, pH 值 6~8, NaCl 质量浓度 0~10 g · L⁻¹;菌株 R18 与粘质沙雷氏菌模式菌株 ATCC 13880 的 16S rDNA 相似度为 99.86%,基因组平均核苷酸均一性和数字 DNA-DNA 杂交值分别为 98.73%, 89.5%, 均高于物种界定阈值,属于同一个物种;菌株 R18 灵菌红素合成基因簇全长 35 021 bp, 包含 29 个基因, 其中, 4 个核心合成基因、10 个补充的合成基因、1 个调控基因、1 个转运基因及 13 个其他基因, 具有完整的灵菌红素合成代谢途径。

关键词: 粘质沙雷氏菌; 灵菌红素; 菌种鉴定; 基因组特性

中图分类号: Q 939.1

文献标志码: A

文章编号: 1000-5013(2024)05-0626-10

Identification and Genomic Characterization of Prodigiosin-Producing *Serratia* sp. R18

CHEN Mingxia¹, XING Yuanjun¹, LI Heyang^{2,3}, SHI Junhao¹

(1. College of Chemical Engineering, Huaqiao University, Xiamen 361021, China;

2. Third Institute of Oceanography, Ministry of Natural Resources, Xiamen 361005, China;

3. Fujian Provincial Key Laboratory of Marine Ecological Conservation and Restoration,
Third Institute of Oceanography, Xiamen 361005, China)

Abstract: Strain R18 was identified using morphological, physiological, biochemical and molecular biological methods. Its taxonomic status and biological properties were further analyzed by comparing genome sequencing and bioinformatics, and the synthetic gene cluster and metabolic pathway of the red pigment in this strain were explored at the genomic level. The results showed that the optimal growth conditions for strain R18 were temperature of 30-37 °C, pH value of 6-8, and the mass concentration of NaCl of 0-10 g · L⁻¹. Strain R18 shared a 16S rDNA similarity of 99.86% to *Serratia marcescens* type strain ATCC 13880, the genome average nucleotide identity value and the digital DNA-DNA hybridization value were 98.73% and 89.5%, respectively, both of which were higher than the species identification threshold and belong to the same specie. Strain R18 prodigiosin synthetic gene cluster had a total length of 35 021 bp and contained 29 genes including 4 core syn-

收稿日期: 2023-11-29

通信作者: 李和阳(1978-), 男, 副研究员, 博士, 主要从事海洋微生物生态的研究。E-mail: heyang_li@tio.org.cn。

基金项目: 福建省海洋经济发展专项资金资助项目(FJHJF-L-2022-11); 华侨大学 2023 年实验教学与管理改革课题(SY2023J05); 福建省海洋生态保护与修复重点实验室开放基金资助项目(EPR2020002)

thetic genes, 10 complementary synthetic genes, 1 regulatory gene, 1 transporter gene and 13 other genes, it had a complete prodigiosin synthesis metabolic pathway.

Keywords: *Serratia marcescens*; prodigiosin; bacterial identification; genomic characterization

沙雷氏菌属于细菌界、变形菌门、 γ -变形菌纲、肠杆菌目、肠杆菌科, 该属包含粘质沙雷氏菌 (*Serratia marcescens*)、嗜线虫沙雷氏菌 (*Serratia nematodiphila*)、嗜昆虫沙雷氏菌 (*Serratia entomophila*) 和泉居沙雷氏菌 (*Serratia fonticola*) 等 23 个物种 (<https://lpsn.dsmz.de/genus/serratia>), 其中, 粘质沙雷氏菌是模式种, 包含产灵菌红素的 A1, A2/A6 生物型和不产灵菌红素的 A3, A4, A5/A8 及 TCT 等生物型。A3 和 A4 生物型无处不在, A5/A8 及 TCT 生物型主要来源于医院病人临床样品, A1, A2/A6 生物型主要分布于自然环境中^[1]。粘质沙雷氏菌也是一类生防菌, 可生产多种具抗生性代谢产物, 如灵菌红素、脂肽、碳青霉烯、细菌素等, 具有抗菌、杀虫、杀藻、抗疟疾、抗肿瘤、免疫抑制、促进植物生长等作用^[2-5]。产灵菌红素的粘质沙雷氏菌菌落呈红色、酒红色或粉红色, 无明显扩散性, 菌种资源容易从普通环境样品中获取, 生物安全性较高, 因此, 近年来其成为高校“细菌画”创作中使用频率最高的菌种之一, 第 7 届全国微生物培养皿艺术大赛 153 幅作品中, 有 62 幅作品将粘质沙雷氏菌作为“红色颜料”进行作品创作, 深受广大师生好评^[6]。

在筹办华侨大学微生物培养皿艺术比赛时, 从健康人体皮肤表面分离到一株产红色素菌株 R18, 其菌落颜色鲜红靓丽, 是“细菌画”创作的绝佳“颜料”。为了更安全且有针对性地将该菌株应用于微生物学实验教学和大学生科创活动中, 本文采用形态学、生理生化和分子生物学方法对菌株 R18 进行菌种鉴定, 通过基因组测序和生物信息学分析, 进一步分析其分类地位和生物学特性。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 菌株 沙雷氏菌株 R18 来源于健康人类皮肤表面, 保藏于中国海洋微生物菌种保藏管理中心, 保藏号为 MCCC 1K08643, 生物危害等级为 4 类。

1.1.2 主要仪器和试剂 Multiskan FC 型酶标仪(美国 ThermoFisher 公司); Centrifuge5417R 型低温高速离心机(德国 Eppendorf 公司); 1-14 型高速离心机(德国 Sigma 公司); GE9612T-S 型基因扩增仪(浙江省杭州市柏恒科技有限公司); DT 93-3 型微量振荡器(江苏省大唐医疗器械有限公司)。

胰蛋白胨(英国 OXOID 公司); 酵母提取物(英国 OXOID 公司); 2 \times premix Taq(日本 TaKaRa 公司); λ -Hind III digest DNA marker(日本 TaKaRa 公司); DL2000 DNA marker(日本 TaKaRa 公司); 细菌基因组 DNA 快速抽提试剂盒(北京市百泰克生物技术有限公司); 其他试剂为国产分析纯。

1.1.3 培养基 1) LB 培养基: 蛋白胨 1 g, 酵母提取物 0.5 g, NaCl 1 g, dH₂O 100 mL, pH 值为 7.2~7.8; 2) 牛奶琼脂平板: 蛋白胨 0.1 g, 酵母提取物 0.02 g, NaCl 1 g, 琼脂 2 g, 市售脱脂牛奶 50 mL, dH₂O 50 mL; 3) 淀粉/吐温 80 琼脂平板: 蛋白胨 0.1 g, 酵母提取物 0.02 g, NaCl 1 g, 琼脂 2 g, 淀粉/吐温 80 0.2 g, dH₂O 100 mL。

1.2 实验方法

1.2.1 菌株鉴定 参照《常见细菌系统鉴定手册》^[7] 进行菌落形态、菌体形态、生长温度范围等生理生化特征测定。使用细菌 16S rDNA 通用引物 (27F: 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCA-3'; 1492R: 5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3')^[8] 进行聚合酶链式反应(PCR)扩增, PCR 产物使用 10 g \cdot L⁻¹ 的琼脂糖凝胶电泳检测, 并委托擎科科技有限公司进行 DNA 序列测定。所得序列校正后, 在 EzBioCloud 数据库 (<http://eztaxon-e.ezbiocloud.net>) 进行同源性分析^[9], 从数据库下载相近菌种的 16S rDNA 序列。使用 DNAMAN 5.1 软件和 MEGA 7 软件, 采用邻近连接法构建系统进化树^[10]。

1.2.2 基因组测序和拼装 采用细菌基因组 DNA 快速抽提试剂盒提取细菌基因组 DNA, 使用 10 g \cdot L⁻¹ 琼脂糖凝胶电泳、NanoDrop one 型分光光度计和 Qubit 3.0 型荧光光度计检测 DNA 样品的质量浓度、纯度和降解程度。委托广东省美格基因科技有限公司进行基因组测序分析。采用 NEB Next 注册商标 Recalbon[®] Ultra DNA Library Prep Kit 试剂盒(美国 New England Biolabs 公司)构建测序

文库,使用 Illumina Novaseq 6000 测序平台(美国 New England Biolab 公司)进行高通量测序,测序原始数据通过 FastQC v0.11.9 软件^[11]和 Trimmomatic v0.36 软件^[12]进行质控,并去除低质量数据,采用 SPAdes v3.9.0 软件^[13]拼接构建 contigs/scaffolds(>500 nt),并用 QUAST v5.0.2 软件^[14]评估拼接质量。

1.2.3 基因预测和功能注释 采用 GeneMarkS v4.17 软件(<http://topaz.gatech.edu/GeneMark/>)^[15]进行编码基因预测。采用 tRNAscan-SE v1.3.1 软件^[16]预测 tRNA 基因,采用 RNAmmer v1.2 软件^[17]预测 rRNA 基因,采用 Rfam 数据库 Blast 程序(<https://rfam.org/>)^[18]预测 snRNA 基因。采用 BLAST v2.14.1 软件(<https://ftp.ncbi.nlm.nih.gov/blast/executables/LATEST/>)将编码基因与 Gene Ontology(GO)^[19], Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes(KEGG)^[20-21], Cluster of Orthologous Groups of Proteins(COG)^[22], Non-Redundant Protein Database(NR)^[23], Carbohydrate-Active EnZymes Database(CAZy)^[24]数据库进行比对,获得基因功能注释信息。

1.2.4 比较基因组学分析 使用 EzBioCloud 中的在线工具 ANI Calculator(<https://www.ezbiocloud.net/tools/ani>)分析菌株 R18 与近源物种的基因组平均核苷酸均一性(gANI)^[25]。使用 Genome-to-Genome Distance Calculation(GGDC) version 2.1 formula 2(<https://ggdc.dsmz.de/distcalc2.php>)分析菌株 R18 与近源物种的基因组同源性,即数字 DNA-DNA 杂交(dDDH)值^[26]。

1.2.5 次级代谢产物合成基因簇分析 采用 antiSMASH 7.0 在线工具(<https://antismash.secondarymetabolite.org/>)对菌株 R18 中的次级代谢产物合成基因簇进行预测^[27]。

1.2.6 GenBank 登录号 菌株 R18 的 16S rDNA 和基因组序列已提交到 GenBank 数据库,登录号分别为 OR043023, JASKOU000000000.1。

2 实验结果与分析

2.1 菌株形态及生理生化特征

菌株 R18 不同条件下的生长状况,如图 1 所示。图 1 中: t 为时间; $D(620)$ 为吸光度; $\rho(\text{NaCl})$ 为 NaCl 的质量浓度; θ 为温度。

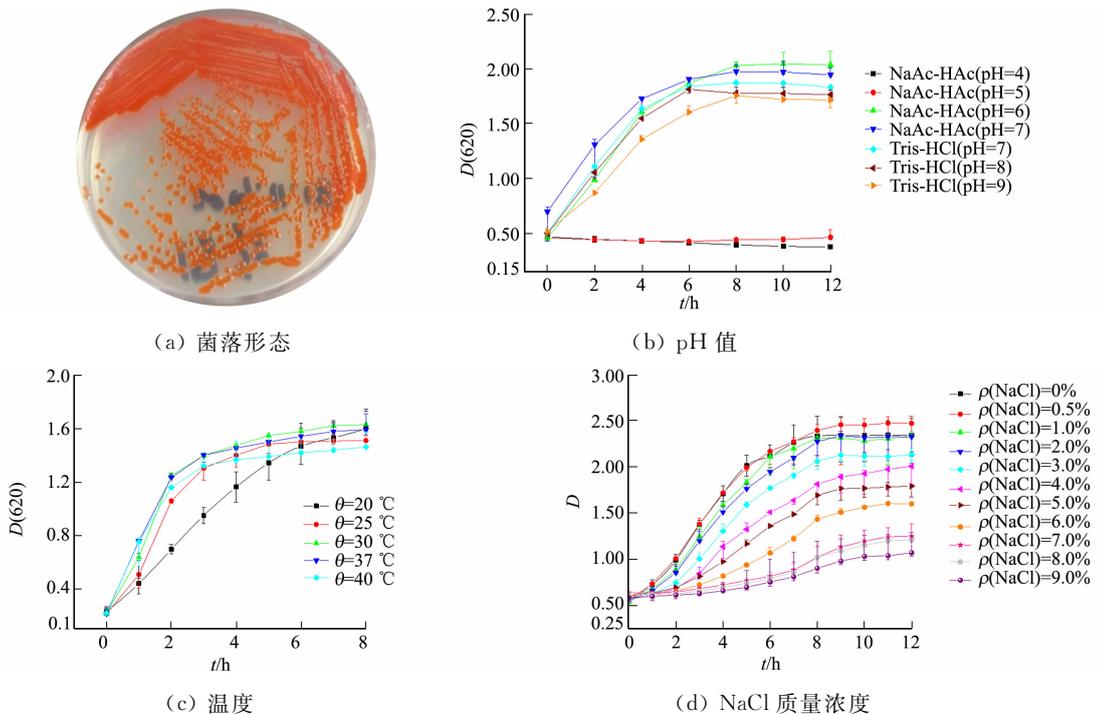


图 1 沙雷氏菌 R18 不同条件下的生长状况

Fig. 1 Growth status of *Serratia* sp. R18 at different conditions

菌株 R18 置于 LB 平板(LB 平板直径 $\phi = 80$ mm),在 30 °C 条件下培养 24 h 后,形成红色菌落,直

径 2~4 mm, 菌落表面光滑湿润、边缘整齐、突起且不透明(图 1(a))。菌体为革兰氏染色阴性, 形态近球形或短棒状, 宽 0.4~0.5 μm, 长 0.4~0.8 μm; 氧化酶和过氧化氢酶阳性, 产胞外酯酶和蛋白酶, 不产淀粉酶。

菌株 R18 在温度 20~37 °C, pH 值 6.0~9.0, NaCl 质量浓度 0~90 g · L⁻¹ 条件下均可生长, 最佳生长条件为温度 30~37 °C, pH 值 6.0~8.0, NaCl 质量浓度 0~10 g · L⁻¹(图 1(b)~(d))。菌株 R18 的形态和各类生理生化特征与模式菌株 *S. marcescens* ATCC 13880 一致^[1]。

2.2 16S rDNA 系统发育分析

菌株 R18 16S rDNA 基因序列全长 1 530 bp, 在 EzBioCloud 数据库中的比对结果表明, 菌株 R18 属于 *Serratia* 属, 与模式菌株 *S. marcescens* ATCC 13880 和 *S. nematodiphila* DSM 21420 相似度最高, 均为 99.86%。系统发育分析也显示 3 个菌株亲缘关系最近, 处于同一个进化分支。

采用邻近连接法构建系统进化树, 沙雷氏菌 R18 与其近源种的 16S rDNA 系统发育树, 如图 2 所示。图 2 中: 节点数值为大于 40% 的 Bootstrap 值; 括号内为 GenBank 登录号; 比例尺为进化距离。

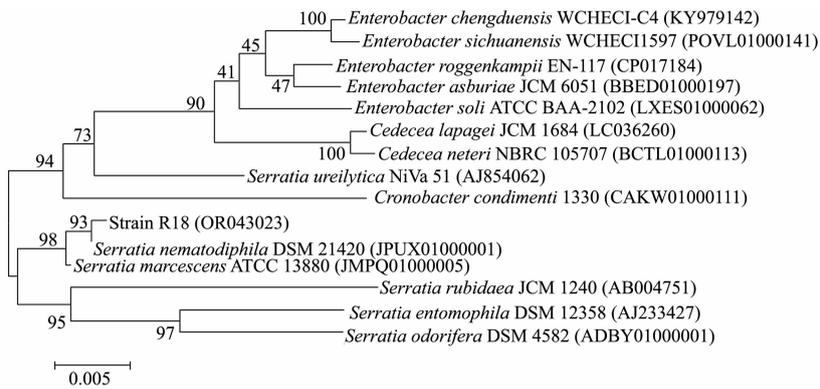


图 2 沙雷氏菌 R18 与其近源种的 16S rDNA 系统发育树

Fig. 2 16S rDNA-based phylogenetic tree of *Serratia* sp. R18 and closely related species

2.3 沙雷氏菌 R18 基因组比较分析

基因组测序获得 8 037 186 个测序片段(reads)共 1 205 577 900 nt 的原始数据, 去除低质量片段后, 可得 7 446 608 个 reads(1 098 126 252 nt), 序列片段拼装成 23 个重叠群(contigs), 菌株 R18 基因序列总长度为 5 046 985 bp, GC 含量(GC 含量是指 DNA 序列中鸟嘌呤(guanine)和胞嘧啶(cytosine)两种碱基的总比例)为 59.7%, 基因组测序深度为 217×, 预测有 4 872 个编码基因、85 tRNA 基因、1 个 16S rRNA 基因、6 个 5S rRNA 基因和 43 个 sRNA 基因。菌株 R18 与各近源物种基因组大小差异不大(标准差 σ=0.16), GC 含量的比例也较为接近(σ=0.58), 但编码的基因数量存在较大差异(σ=175.25), 可能与测序的完整性、质粒的存在状况有关。

沙雷氏菌 R18 与其近源物种的基因组特征, 如表 1 所示。表 1 中: 1 为菌株 R18; 2 为 *S. marcescens* ATCC 13880(GCA_006974205.1); 3 为 *S. nematodiphila* DSM 21420(GCA_000738675.1); 4 为 *S. bockelmannii* S3(GCA_008011855.1); 5 为 *S. surfactantfaciens* YD25(GCA_001642805.2); 6 为 *S. ureilytica* C7(GCA_008122445.1)。

表 1 沙雷氏菌 R18 与其近源物种的基因组特征

Tab. 1 Genomic characteristics of *Serratia* sp. R18 and closely related species

| 类别 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
|------------|---------|-----------|-----------|---------|-----------|--------|
| 基因组大小/Mbp | 5.05 | 5.16 | 5.22 | 5.29 | 5.12 | 5.54 |
| GC 含量/% | 59.70 | 59.80 | 59.50 | 59.04 | 59.60 | 58.10 |
| 编码基因数量 | 4 872 | 5 283 | 4 807 | 4 907 | 4 727 | 4 921 |
| tRNA 基因数量 | 85 | 91 | 91 | 78 | 83 | 81 |
| Contigs 数量 | 23 | 2 | 2 | 33 | 1 | 1 306 |
| N50 长度/bp | 710 292 | 5 115 562 | 4 451 630 | 524 298 | 5 117 644 | 22 383 |

沙雷氏菌 R18 与其近源物种的 gANI 值/dDDH 值, 如表 2 所示。表 2 中: 1~6 的含义与表 1 相同。

由表 2 可知:菌株 R18 与 4 个近源菌种基因组 gANI 值均高于 94%,基因组的相似度较高,其中,与 *S. marcescens* ATCC 13880 和 *S. nematodiphila* DSM 21420 的 gANI 值高于 95%~96%的物种界定阈值^[28-30],分别为 98.73%,96.98%;dDDH 值分析结果也表明菌株 R18, *S. marcescens* ATCC 13880 和 *S. nematodiphila* DSM 21420 三者之间的 dDDH 值高于同一个物种界定阈值(70%)^[31]。由此可见,菌株 R18, ATCC 13880 和 DSM 21420 属于同一个物种 *S. marcescens*。菌株 ATCC 13880 和 DSM 21420 之间的 gANI 值和 dDDH 值分别为 96.93%,73.40%,其中, dDDH 值符合亚种界定阈值(小于 79%~80%)的要求^[32],故 *S. nematodiphila* 可以重新归类为 *S. marcescens* 的一个亚种。该结果与文献^[33]的结果(65.1%)不一致,主要原因在于计算 DNA-DNA 杂交(DDH)值的方法不同。文中采用的基于基因组序列进行的数字化 DDH 值计算,相较于传统的湿实验室 DDH 分析方法更具准确性、可重复性和可比性^[31],是基因组大数据时代中可靠的替代方法,具有更高的分辨率和可信度。

表 2 沙雷氏菌 R18 与其近源物种的 gANI 值/dDDH 值

Tab. 2 gANI values/dDDH values between *Serratia* sp. R18 and closely related species (unit: %)

| 物种 | gANI 值/dDDH 值 | | | | | |
|----|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
| 1 | 100.00/100.00 | 98.73/89.50 | 96.98/74.40 | 95.89/66.30 | 94.31/56.80 | 94.59/59.10 |
| 2 | | 100.00/100.00 | 96.93/73.40 | 95.93/66.60 | 94.27/56.40 | 94.69/58.80 |
| 3 | | | 100.00/100.00 | 95.43/63.40 | 94.66/58.80 | 94.64/58.80 |
| 4 | | | | 100.00/100.00 | 94.18/55.70 | 94.66/58.80 |
| 5 | | | | | 100.00/100.00 | 93.94/54.70 |
| 6 | | | | | | 100.00/100.00 |

2.4 沙雷氏菌 R18 基因组注释

沙雷氏菌 R18 基因组 COG, GO, CAZy 和 KEGG 功能分类,如图 3 所示。

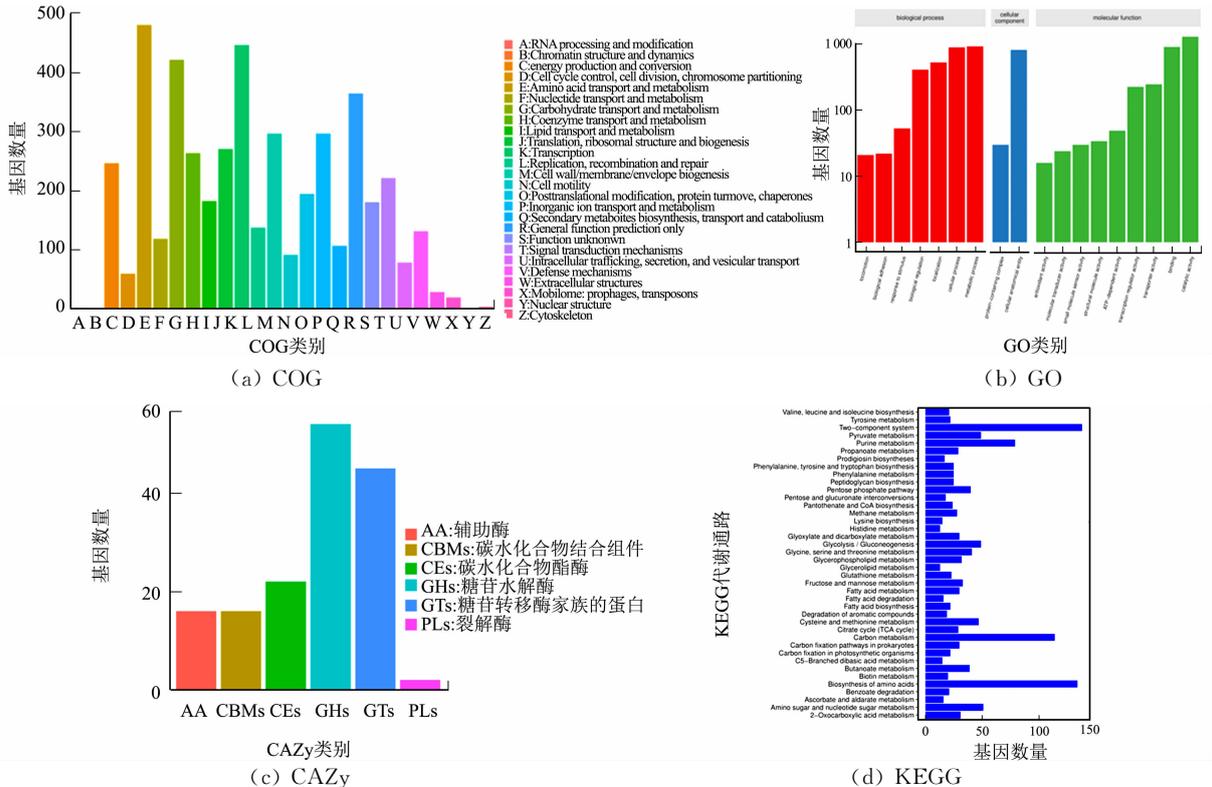


图 3 沙雷氏菌 R18 基因组 COG, GO, CAZy 和 KEGG 功能分类

Fig. 3 COG, GO, CAZy and KEGG functional classification of *Serratia* sp. R18 genome

由图 3(a)及相关分析可知:菌株 R18 共注释到 4 630 个基因,注释率为 95%;COG 数据库的 26 种功能组中,与氨基酸转运与代谢、糖类转移及代谢和转录相关的基因数量最多,分别为 480(10.4%), 421(9.1%)和 446(9.6%),没有发现与核结构和染色质结构及动力学有关的基因,另有 180 个未知功

能基因。

由图 3(b)及相关分析可知:菌株 R18 共有 2 774 个基因在 GO 数据库中被注释,GO 数据库按照细胞组分、生物学过程和分子功能 3 个方面对蛋白进行注释,而生物学过程、细胞组分和分子功能分支分别为 7,2,9 个,共计 18 个分支;大部分基因具有多功能,可以被同时注释在不同组分或功能过程分支中,2 774 个基因共被注释了 6 529 次,其中,2 个基因被注释了 9 次,7 个基因被注释了 8 次,17 个基因被注释了 7 次,46 个基因被注释了 6 次,62 个基因被注释了 5 次,236 个基因被注释了 4 次,565 个基因被注释了 3 次,1 213 个基因被注释 2 次,626 个基因被注释 1 次;在细胞组分中,共 848 个基因得到注释;生物学途径类共 2 851 个基因得到注释,涉及细胞内过程与代谢过程的基因最多,分别为 893,924 个;分子功能分支共 2 830 个基因得到注释,涉及结合和催化活性的基因最多,分别为 908,1 296 个。

由图 3(c)及相关分析可知:菌株 R18 的基因组中共有 155 个基因编码的蛋白质结构域属于 CAZy 家族,包括糖苷水解酶(glycoside hydrolases, GHs)家族的蛋白 54 个、糖苷转移酶家族的蛋白(glycosyl transferases, GTs)45 个、碳水化合物酯酶(carbohydrate esterases, CEs)22 个、裂解酶(polysaccharide lyases, PLs)2 个、辅助酶(auxiliary activities, AA)16 个、碳水化合物结合组件(carbohydrate-binding modules, CBMs)16 个。

由图 3(d)及相关分析可知:菌株 R18 的 4 587 个基因富集在 215 条 KEGG 代谢通路中占菌株基因总数的 94.2%;基因数大于 25 的代谢通路有 40 个;KEGG 富集分析显示,ABC 转运蛋白、双组分调节系统、氨基酸生物合成、碳代谢是主要的 4 类代谢通路,分别包含 236,138,134 和 114 个基因获得注释。

2.5 次级代谢产物合成基因簇分析

沙雷氏菌 R18 次级代谢物基因簇,如表 3 所示。通过 antiSMASH 软件预测分析,在菌株 R18 基因组中共检测到 10 个与次级代谢产物合成相关的基因簇。这些基因簇可能编码的代谢产物包括以非核糖体肽合成酶途径(non-ribosomal peptide synthetase, NRPS)合成的小菌素(microcin)、紫杆菌素(viobactin)等,以聚酮合酶途径(polyketide biosynthase, PKS)合成的耶尔森杆菌素(yersiniabactin)、灵菌红素(prodigiosin),以及硫肽类抗生素(thiopeptide)的 O-抗原(O-antigen)和氧化还原辅因子(redox-cofactor)的兰卡杀菌素(lankacidin)等。这些代谢产物与抗菌、抗癌、杀虫等功能密切相关,另有 2 个基因簇(cluster 3. 2, cluster 3. 3)无法匹配到已知基因簇,显示出这些基因簇具有产生新代谢物的潜能。以上基因簇中,prodigiosin, ririwpeptide, trichrysobactin 和 viobactin 的合成基因簇与已知基因簇的相似性分别为 100%, 100%, 46% 和 46%, 其余的则低于 20%。由此可见,从基因组水平看,菌株 R18 具有生产多种具有拮抗作用的次级代谢产物的功能,对其环境竞争力和适应力都具有重要意义。

表 3 沙雷氏菌 R18 次级代谢物基因簇

Tab. 3 Secondary metabolic gene clusters of *Serratia* sp. R18

| 区域 | 基因簇类型 | 长度/bp | 最似已知基因簇 | 相似度/% |
|-----|---------------|--------|--|-------|
| 1.1 | T1PKS, NRPS | 56 238 | 耶尔森杆菌素 | 4 |
| 1.2 | NRPS | 47 151 | 紫杆菌素 | 46 |
| 1.3 | 氧化还原因子 | 22 163 | 兰卡杀菌素 | 13 |
| 1.4 | NRPS | 47 952 | 小菌素 E492 | 12 |
| 1.5 | 硫肽类抗生素 | 26 445 | O 抗原 | 14 |
| 2.1 | 灵菌红素 | 35 021 | 灵菌红素 | 100 |
| 3.1 | NRP-金属团, NRPS | 50 861 | Trichrysobactin/cyclic trichrysobactin/ chrysobactin/dichrysobactin | 46 |
| 3.2 | NRPS-like | 42 964 | — | — |
| 3.3 | β 内脂 | 25 671 | — | — |
| 4.1 | NRPS | 43 768 | Ririwpeptide A/ririwpeptide B/ririwpeptide C | 100 |

2.6 灵菌红素基因簇分析

与产红色素现象相对应,菌株 R18 含有完整的灵菌红素合成基因簇,处于 ctg002 拼装片段上,全长跨度 35 021 bp,包含 29 个基因,其中,包含 4 个核心合成基因、10 个补充的合成基因、1 个调控基因、1 个转运基因及 13 个其他基因。沙雷氏菌 R18 和粘质沙雷氏菌 ATCC 13880 灵菌红素合成基因簇的比

较,如图4所示。由图4可知:基因簇序列与粘质沙雷氏菌模式菌株 ATCC 13880 有 100% 的一致性;该基因簇与模式菌株 ATCC 13880 还存在 4 处小片段未知功能基因差异和一处基因位置偏差(箭头),故推测其基因组上存在基因跳跃的现象,这可能与粘质沙雷氏菌不同颜色自然突变株的高发生率有关。

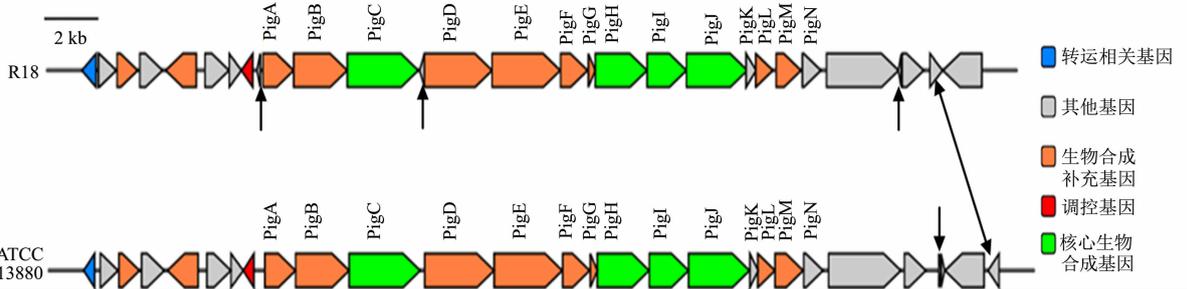


图4 沙雷氏菌 R18 和粘质沙雷氏菌 ATCC 13880 灵菌红素合成基因簇比较

Fig. 4 Comparison of prodigiosin synthetic gene cluster of *Serratia* sp. R18 and *S. marcescens* ATCC 13880

沙雷氏菌 R18 灵菌红素合成代谢途径,如图5所示。由图5可知:菌株 R18 完整的灵菌红素合成代谢途径包括 3 个部分:2-甲基-3-戊基吡咯(MAP)、4-甲氧基-2,2-二吡咯-5-羧甲基乙醛(MBC)的合成,以及在 ATP 的存在下灵菌红素缩合酶 PigC 催化 MAP 和 MBC 合成灵菌红素,这与早期的研究结果一致^[34-35]。

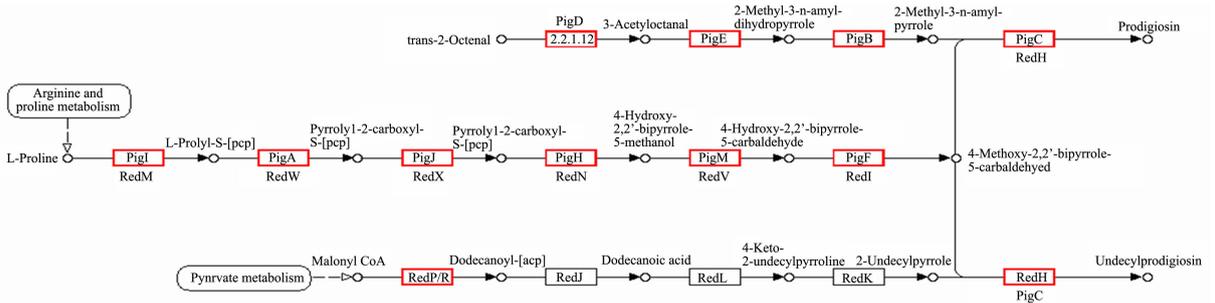


图5 沙雷氏菌 R18 灵菌红素合成代谢途径

Fig. 5 Prodigiosin biosynthesis metabolic pathway of *Serratia* sp. R18

3 结论

采用形态学、生理生化、分子生物学及基因组测序分析的方法对菌株 R18 进行物种鉴定和生物学特性分析,并着重分析菌株 R18 次级代谢产物灵菌红素的基因簇及代谢途径。研究表明,菌株 R18 属于 *Serratia* 属,与模式菌株 *S. marcescens* ATCC 13880 和 *S. nematodiphila* DSM 21420 的 16S rDNA 相似度皆为 99.86%,3 个菌株处在同一个进化分支上。gANI 值和 dDDH 值分析结果也表明,3 个菌株基因组的相似度极高,属于同一个物种 *S. marcescens*。

基因组序列注释有助于深入了解菌株 R18 生命现象的基因本质,尤其是了解各类次级代谢产物的基因簇和代谢途径,有利于探索它们的调控机理,为基因改造和生产应用奠定基础。粘质沙雷氏菌生产的灵菌红素是目前研究较为清楚的次级代谢产物,代谢途径包括 2-甲基-3-戊基吡咯(MAP)、4-甲氧基-2,2-二吡咯-5-羧甲基乙醛(MBC)的合成,以及在 ATP 的存在下灵菌红素缩合酶 PigC 催化 MAP 和 MBC 合成灵菌红素。通过 antiSMASH 软件预测的菌株 R18 灵菌红素基因簇由 29 个基因组成,包含了 PigA-PigN 及转运、调控等相关基因。

致谢:厦门市金安小学李昊城同学为本研究提供菌种,从他皮肤表面分离得到实验菌株 R18。

参考文献:

[1] GRIMONT F, GRIMONT P A D, GENUS X X X I V. Bergey's manual of systematic bacteriology[M]. 2nd ed. Ber-

- lin:Springer,2005.
- [2] ARAÚJO R G,ZAVALA N R,CASTILLO-ZACARÍAS C,*et al.* Recent advances in prodigiosin as a bioactive compound in nanocomposite applications[J]. *Molecules*,2022,27(15):4982. DOI:10.3390/molecules27154982.
- [3] ESPONA-FIEDLER M,MANUEL-MANRESA P,BENÍTEZ-GARCÍA C,*et al.* Antimetastatic properties of prodigiosin and the BH3-mimetic obatoclox (GX15-070) in melanoma[J]. *Pharmaceutics*,2022,15(1):97. DOI:10.3390/pharmaceutics15010097.
- [4] CHEN P,WU H,BIAN T,*et al.* Prodigiosin improves acute lung injury in a rat model of rheumatoid arthritis *via* down-regulating the nuclear factor kappaB/nucleotide-binding domain, leucine-rich-containing family, pyrin domain-containing-3 signaling pathway[J]. *Journal of Physiology and Pharmacology*,2023,74(1):43-54. DOI:10.26402/jpp.2023.1.05.
- [5] YOUNAS H,NAZIR A,BAREEN F E,*et al.* Metabolic profile and molecular characterization of endophytic bacteria isolated from *Pinus sylvestris* L. with growth-promoting effect on sunf-lower[J]. *Environmental Science and Pollution Research*,2023,30(14):40147-40161. DOI:10.1007/s11356-022-25118-7.
- [6] 中国轻工业联合会,中国生物发酵产业协会. 第一届菌种培养职业技能竞赛暨第七届微生物培养皿艺术大赛[EB/OL]. (2023-07-05)[2023-11-20]. https://vote.isv.youzan.com/h5?banner_id=f.110709144~image_ad.5~0~30rBitpJ&.reft=1697538254536&.spm=f.110709144#/h5/1681269487132774/1/122509290/0.
- [7] 东秀珠,蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京:科学出版社,2001.
- [8] DELONG E F. Archaea in coastal marine environments[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*,1992,89(12):5685-5689. DOI:10.1073/pna.89.12.5685.
- [9] KIM O S,CHO Y J,LEE K,*et al.* Introducing EzTaxone: A prokaryotic 16S rRNA gene sequence database with phylotypes that represent uncultured species[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*,2012,62(Pt3):716-721. DOI:10.1099/ij.0.038075-0.
- [10] KUMAR S,STECHER G,TAMURA K,MEGA7: Molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets[J]. *Molecular Biology and Evolution*,2016,33(7):1870-1874. DOI:10.1093/molbev/msw054%20.
- [11] CHEN Shifu,ZHOU Yanqing,CHEN Yaru,*et al.* fastp: An ultra-fast all-in-one FASTQ preprocessor[J]. *Bioinformatics*,2018,34(17):i884-i890. DOI:10.1093/bioinformatics/bty560.
- [12] BOLGER A M,LOHSE M,USADEL B. Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina sequence data[J]. *Bioinformatics*,2014,30(15):2114-2120. DOI:10.1093/bioinformatics/btu170.
- [13] BANKEVICH A,NURK S,ANTIPOV D,*et al.* SPAdes: A new genome assembly algorithm and its applications to single cell sequencing[J]. *Journal of Computational Biology*,2012,19(5):455-477. DOI:10.1089/cmb.2012.0021.
- [14] GUREVICH A,SAVELIEV V,VYAHHI N,*et al.* QUAST: Quality assessment tool for genome assemblies[J]. *Bioinformatics*,2013,29(8):1072-1075. DOI:10.1093/bioinformatics/btt086.
- [15] BESEMER J,LOMSADZE A,BORODOVSKY M. GeneMarkS: A self-training method for prediction of gene starts in microbial genome: Implications for finding sequence motifs in regulatory regions[J]. *Nucleic Acids Research*,2001,29(12):2607-2618. DOI:10.1093/nar/29.12.2607.
- [16] LOWE T M,EDDY S R. tRNAscan-SE: A program for improved detection of transfer RNA genes in genomic sequence[J]. *Nucleic Acids Research*,1997,25(5):955-964. DOI:10.1093/nar/25.5.955.
- [17] LAGESEN K,HALLIN P,RØDLAND E A,*et al.* RNAmmer: Consistent and rapid annotation of ribosomal RNA genes[J]. *Nucleic Acids Research*,2007,35(9):3100-3108. DOI:10.1093/nar/gkm160.
- [18] GARDNER P P,DAUB J,TATE J G,*et al.* Rfam: Updates to the RNA families database[J]. *Nucleic Acids Research*,2009,37(Database issue):D136-D140. DOI:10.1093/nar/gkn766.
- [19] ASHBURNER M,BALL C A,BLAKE J A,*et al.* Gene ontology: Tool for the unification of biology[J]. *Nature Genetics*,2000,25(1):25-29. DOI:10.1038/75556.
- [20] KANEHISA M,GOTO S,KAWASHIMA S,*et al.* The KEGG resource for deciphering the genome[J]. *Nucleic Acids Research*,2004,32(Database issue):D277-D280. DOI:10.1093/nar/gkh063.
- [21] KANEHISA M,GOTO S,HATTORI M,*et al.* From genomics to chemical genomics: New developments in KEGG [J]. *Nucleic Acids Research*,2006,34(Database issue):D354-D357. DOI:10.1093/nar/gkj102.
- [22] TATUSOV R L,FEDOROVA N D,JACKSON J D,*et al.* The COG database: An updated version includes eukaryotes[J]. *BMC Bioinformatics*,2003,4(1):41. DOI:10.1186/1471-2105-4-41.

- [23] LI Weizhong, JAROSZEWSKI L, GODZIK A. Tolerating some redundancy significantly speeds up clustering of large protein databases[J]. *Bioinformatics*, 2002, 18(1): 77-82. DOI: 10. 1093/bioinformatics/18. 1. 77.
- [24] CANTAREL B L, COUTINHO P M, RANCUREL C, *et al.* The carbohydrate-active EnZymes database (CAZy): An expert resource for glycogenomics[J]. *Nucleic Acids Research*, 2009, 37(Database issue): D233-D238. DOI: 10. 1093/nar/gkn663.
- [25] YOON S H, HA S M, LIM J, *et al.* A large-scale evaluation of algorithms to calculate average nucleotide identity [J]. *Antonie van Leeuwenhoek*, 2017, 110(10): 1281-1286. DOI: 10. 1007/s10482-017-0844-4.
- [26] MEIER-KOLTHOFF J P, SARDÀ C J, PEINADO-OLARTE R L, *et al.* TYGS and LPSN: A database tandem for fast and reliable genome-based classification and nomenclature of prokaryotes[J]. *Nucleic Acids Research*, 2022, 50(Database issue): D801-D807. DOI: 10. 1093/nar/gkab902.
- [27] BLIN K, SHAW S, AUGUSTIJN H E, *et al.* AntiSMASH 7. 0: New and improved predictions for detection, regulation, chemical structures and visualisation[J]. *Nucleic Acids Research*, 2023, 51(W1): W46-W50. DOI: 10. 1093/nar/gkad344.
- [28] KIM M, OH H S, PARK S C, *et al.* Towards a taxonomic coherence between average nucleotide identity and 16S rRNA gene sequence similarity for species demarcation of prokaryotes[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2014, 64(Pt2): 346-351. DOI: 10. 1099/ij. 0. 059774-0.
- [29] CHUN J, OREN A, VENTOSA A, *et al.* Proposed minimal standards for the use of genome data for the taxonomy of prokaryotes[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2018, 68(1): 461-466. DOI: 10. 1099/ijsem. 0. 002516.
- [30] RICHTER M, ROSSELLÓ-MÓRA R. Shifting the genomic gold standard for the prokaryotic species definition[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2009, 106(45): 19126-19131. DOI: 10. 1073/pna. 0906412106.
- [31] MEIER-KOLTHOFF J P, AUCH A F, KLENK H P, *et al.* Genome sequence-based species delimitation with confidence intervals and improved distance functions[J]. *BMC Bioinformatics*, 2013, 14: 60. DOI: 10. 1186/1471-2105-14-60.
- [32] MEIER-KOLTHOFF J P, HAHNKE R L, PETERSEN J, *et al.* Complete genome sequence of DSM 30083T, the type strain (U5/41T) of *Escherichia coli*, and a proposal for delineating subspecies in microbial taxonomy[J]. *Standards in Genomic Sciences*, 2014, 9: 2. DOI: 10. 1186/1944-3277-9-2.
- [33] ZHANG Chongxing, YANG Shouyun, XU Mingxu, *et al.* *Serratia nematodiphila* sp. nov. associated symbiotically with the entomopathogenic nematode *Heterorhabditidoides chongmingensis* (*Rhabditida*: *Rhabditidae*) [J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2009, 59(Pt7): 1603-1608. DOI: 10. 1099/ij. 0. 65718-0.
- [34] HARRIS A K P, WILLIAMSON N R, SLATER H, *et al.* The *Serratia* gene cluster encoding biosynthesis of the red antibiotic, prodigiosin, shows species- and strain-dependent genome context variation[J]. *Microbiology*, 2004, 150(Pt11): 3547-3560. DOI: 10. 1099/mic. 0. 27222-0.
- [35] LI Peishan, HE Shufen, ZHANG Xuejiao, *et al.* Structures, biosynthesis, and bioactivities of prodiginine natural products[J]. *Applied Microbiology Biotechnology*, 2022, 106(23): 7721-7735. DOI: 10. 1007/s00253-022-12245-x.

(责任编辑: 钱筠 英文审校: 刘源岗)