

基于代谢组学分析 Slr0643 蛋白在调控集胞藻 PCC6803 葡萄糖混养适应中的重要性

许白雪, 陈谷, 刘秤利, 周健

(华南理工大学食品科学与工程学院, 广东广州 510640)

摘要: 本研究文采用集胞藻 PCC6803 野生型藻株和 Slr0643 敲除突变体 ($\Delta slr0643$) 藻株, 通过生理实验和基于气相色谱-质谱联用 (GC-MS) 技术的植物代谢组学分析, 对 Slr0643 蛋白调控集胞藻 PCC6803 葡萄糖混养适应的机制进行探讨。在 2.5 mM 葡萄糖混养条件下, 野生型藻株的生长速率较光自养条件明显加快, 而 $\Delta slr0643$ 藻株的生长速率较光自养条件显著下降, 在添加葡萄糖其混养培养 4 d 后的 OD₇₃₀ 值仅为野生型藻株的 47.25%, 且其利用葡萄糖的速率也始终低于野生型藻株。通过对野生型藻株和 $\Delta slr0643$ 藻株在 2.5 mM 葡萄糖混养过程中细胞内代谢物进行鉴定, 发现了显著差异代谢物各 11 种, 其中, 有 9 种差异代谢物在野生型藻株混养过程中含量明显上升。通过对各时间点下突变体相对于野生型的差异代谢物所参与的代谢通路进行富集分析发现, 差异代谢物主要富集在三羧酸循环、丙酮酸代谢、谷氨酸代谢等 8 个代谢途径, 表明 Slr0643 通过参与调控这些代谢途径使集胞藻 PCC6803 适应葡萄糖混养。本研究发现了 *slr0643* 的缺失使细胞内多种代谢途径受损, 从而使细胞无法正常利用葡萄糖, 揭示了 Slr0643 蛋白在集胞藻葡萄糖混养适应中扮演着重要的作用。

关键词: 集胞藻 PCC6803; 葡萄糖混养; Slr0643 蛋白

文章编号: 1673-9078(2021)04-56-63

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2021.4.0359

Metabolomics-based Analysis of the Importance of Slr0643 Protein in Regulating *Synechocystis* sp. PCC6803 to Acclimate to Glucose Mixotrophic Conditions

XU Bai-xue, CHEN Gu, LIU Cheng-li, ZHOU Jian

(School of Food Sciences and Engineering, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

Abstract: In this study, a wild-type strain of *Synechocystis* sp. PCC6803 and a Slr0643 knockout mutant ($\Delta slr0643$) strain were used. The mechanism underlying the regulatory role of Slr0643 protein in the acclimation of *Synechocystis* sp. PCC6803 to glucose mixotrophic conditions was investigated through physiological experiments and gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS)-based plant metabolomic analysis. Under mixotrophic conditions with 2.5 mM glucose, the growth rate of the wild-type was significantly higher than that under autotrophic condition, while the growth rate of $\Delta slr0643$ strain was significantly lower than that under autotrophic condition. After four days of mixotrophic growth with glucose, the OD₇₃₀ value of $\Delta slr0643$ mutant was only 47.25% of that for the wild type, and the glucose utilization rate of $\Delta slr0643$ mutant was consistently lower than that the wild-type strain. Through the identification of the differential metabolites of the $\Delta slr0643$ mutant strain and wild-type strain over the mixotrophic cultivation with 2.5 mM glucose, 11 significantly different metabolites were

引文格式:

许白雪, 陈谷, 刘秤利, 等. 基于代谢组学分析 Slr0643 蛋白在调控集胞藻 PCC6803 葡萄糖混养适应中的重要性[J]. 现代食品科技, 2021, 37(4): 56-63

XU Bai-xue, CHEN Gu, LIU Cheng-li, et al. Metabolomics-based analysis of the importance of Slr0643 protein in regulating *Synechocystis* sp. PCC6803 to acclimate to glucose mixotrophic conditions [J]. Modern Food Science and Technology, 2021, 37(4): 56-63

收稿日期: 2020-04-20

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (31270085); 广东省自然科学基金项目 (2018A030313783)

作者简介: 许白雪 (1995-), 女, 硕士, 研究方向: 藻类基因组学

通讯作者: 陈谷 (1973-), 女, 博士, 教授, 研究方向: 研究方向: 功能基因组学

found, with the contents of 9 differential metabolites in the wild-type strain increasing significantly during mixotrophic cultivation. Through the enrichment analysis of the metabolic pathways involved in the different metabolites of the mutant strain relative to the wild-type strain at each culture time point, it was found that the differential metabolites were mainly enriched in 8 metabolic pathways, the tricarboxylic acid cycle, pyruvate metabolism, glutamate metabolism, suggesting that Slr0643 protein was involved in regulating these metabolic pathways to make *Synechocystis* sp. PCC6803 adapt to glucose mixotrophic conditions. This study showed that the deletion of *slr0643* damaged multiple metabolic pathways in cells, thereby making the cells unable to utilize glucose normally, and Slr0643 plays an important role in the acclimation of *Synechocystis* sp. PCC6803 to glucose mixotrophic conditions.

Key words: *Synechocystis* sp. PCC6803; glucose mixotrophic acclimation; Slr0643 protein

蓝藻是地球上最主要的光合生物之一,它们可以利用光作为能源,吸收二氧化碳并产生氧气,对当今地球的生存环境起着至关重要的作用^[1]。虽然蓝藻主要是在光自养条件下生长,但有些种类在有机碳源存在的情况下也能进行光混养或异养。集胞藻 PCC6803 (*Synechocystis* sp. PCC6803) 作为一种模式蓝藻,可以在光混养和异养条件下,通过糖酵解、不完全的 TCA 循环以及氧化磷酸戊糖 (OPP) 途径来代谢葡萄糖,生成 ATP、NADPH 和碳骨架,同时葡萄糖代谢水平和呼吸作用增强^[2,3]。

在过去的几十年里,已经发现了许多对集胞藻在光混养条件下生长至关重要的基因。一些是起调控作用的基因,例如:三个组氨酸激酶: Hik31 (*sll0790*)、Hik8 (*sll0750*) 和 Hik33 (*sll0698*),它们在葡萄糖代谢中扮演主要的角色。 Δ *hik31* 突变体会失去葡萄糖激酶活性,变得对葡萄糖更加敏感^[4], *hik8* 的缺失将会阻止基因 *gap1* (编码 GAPDH) 的转录,导致细胞不能在葡萄糖存在时生长^[5]。相比之下, *hik33* 敲除突变体的在光自养条件下生长受到严重抑制,而在加入葡萄糖之后这种抑制出现了缓解,主要是因为在此条件下突变体中 OPP 途径中的酶的表达明显上调,而在野生型中并没有这种现象^[6]。编码假想调控蛋白的基因 *pmgA* (*sll1968*) 以及水通道蛋白 AqpZ (*slr2057*),都受到基因 *sll1961* 的正向调控,它们在葡萄糖代谢中至关重要,它们的缺失突变体会变得对葡萄糖更加敏感^[7]。*pmgA* (*sll1968*) 的缺失破坏了 OPP 途径和卡尔文循环之间的碳流平衡,阻止了突变体在光异养条件下的持续生长^[3]。转录调节因子 CyabrB2 (*sll0822*) 对当细胞从自养转移至光异养条件下时细胞代谢的激活至关重要, *sll0822* 的敲除突变体可能使碳代谢失调,从而丧失生存能力^[8]。SigE 是 RNA 聚合酶中的一种 sigma 因子,其突变会使 OPP 通路的关键酶出现下调,同时葡萄糖摄取率下降^[9]。此外,一些特定的蛋白质也参与了集胞藻对葡萄糖混养的适应,它们的突变体均表现出对葡萄糖敏感的表型。Sml0013 是 NAD(P)H 脱氢酶 (NDH) 亚基,它的突变体使通过呼吸或光合

电子流能力下降,从而变得对葡萄糖更加敏感^[10]。*sll1028* (编码二氧化碳浓缩机制蛋白 CcmK2)、*slr1916* (编码酯酶)、*slr1860* (*icfG*) 和 *sml0005* (编码 PSII 的跨膜成分) 的突变体也显示出了葡萄糖敏感性^[11]。最近的一项研究表明,非编码 RNA Ncr0700 通过调节糖原积累参与葡萄糖的适应,并在 PmgA 下游发挥作用^[12]。

代谢组学技术可以鉴别出细胞内大量的小分子及其丰度的差异,因此被广泛用于分析微生物面对环境胁迫时出现的变化。非靶向气相色谱-质谱 (GC-MS) 代谢组学相对于靶向液相色谱-质谱 (LC-MS) 而言,可以检测到更多的代谢物,其中包括一些稳定的小分子,如氨基酸,糖类以及有机酸等^[1]。S2P 蛋白酶最早在人体内被发现,在人体内甾醇和脂肪酸的合成中起调节作用^[13]。集胞藻 PCC6803 中共存在 4 个 S2P 蛋白酶,分别为 Slr0862、Slr0643、Sll0528 和 Slr1821。我们以前的研究已经表明 Sll0528 参与各种环境胁迫,包括盐、寒冷、高渗和铵盐等, *Asll0528* 突变体在这些环境中比野生型更敏感^[14,15]。Slr0862 参与调控着热胁迫和氧化胁迫^[16], Slr1821 在热胁迫适应中发挥着重要作用^[17], Slr0643 在适应酸胁迫中起关键作用^[18]。本文通过 GC-MS 技术对葡萄糖混养下的野生型和 Δ *slr0643* 突变体中的代谢物进行研究,结合差异代谢物及代谢通路分析,从代谢组学的角度上揭示了 Slr0643 在集胞藻适应葡萄糖混养中的重要作用。

1 材料与方法

1.1 实验材料与仪器

主要材料: 甲醇 (CNW)、氯仿 (Adamas)、吡啶 (Adamas)、甲氧铵盐 (TCI)、L-2-氯苯丙氨酸, 上海恒柏生物科技; BSTFA (REGIS)、饱和脂肪酸甲酯 (REGIS)、ddH₂O (纯水仪)、葡萄糖, 北京普博欣生物; BG11 培养基, 实验室自配; 集胞藻 PCC6803 野生型, 购自 ATCC 菌种库; 集胞藻 PCC6803 Δ *slr0643*

突变体, 实验室构建。

主要仪器: 气相色谱 (Agilent, 7890B)、质谱仪 (LECO, PEGASUS HT)、色谱柱 (Agilent, DB-5MS)、离心机 (Thermo Fisher Scientific, Heraeus Fresco17)、超低温冰箱 (Thermo Fisher Scientific, Forma 900 series)、分析天平 (Sartorius, BSA124S-CW)、研磨仪 (JXFSTPRP-24), 上海净信科技有限公司; 纯水仪 (Merck Millipore, 明澈 D24 UV)、超声仪 (YM-080S), 深圳市方奥微电子有限公司; 烘箱 (DHG-9023A), 上海一恒科学仪器有限公司; 真空干燥仪 (LNG-T98), 太仓市华美生化仪器厂; 紫外可见分光光度计 (UV-2300 II), 上海天美科学仪器有限公司; 葡萄糖分析仪 (SBA-40C), 北京金洋万达科技公司。

1.2 实验方法

1.2.1 菌株的培养

所有菌株培养于 20 mM HEPES-NaOH (pH 7.5) 的 BG-11 培养基中, 培养条件为 28 °C, 30 $\mu\text{E}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$, 120 r/min。葡萄糖混养需要在 BG11 培养基中加入 2.5 mM 葡萄糖, 所有溶液和培养基均进行高温高压灭菌。

1.2.2 生理参数的测定方法

1.2.2.1 生长曲线的测定

在需要测定的时间点对藻液进行取样, 将紫外分光光度计设置为单点测量模式, 用培养基调零之后, 测其 730 nm 下的吸光度, 每组样品做三个平行, 最后根据时间与吸光度值绘制生长曲线。

1.2.2.2 培养基上清中葡萄糖含量的测定

向 BG11 培养基中加入 2.5 mM 葡萄糖, 然后放入光照培养箱中进行混养培养, 每隔两小时进行一次取样, 每组样品设置三个平行, 在离心机中经 10000 r/min 离心 2 min 后, 吸取上清至 2 mL 离心管中, 用葡萄糖分析仪进行葡萄糖含量的测定, 具体步骤为: 开机之后, 先吸取 20 μL 葡萄糖标准溶液 (0~1 g/L) 进行定标, 反复操作至仪器显示定标成功, 再依次打入待测样品, 每个样品测完需清洗仪器再进行下一次的测定。

1.2.3 样本制备及代谢物提取

当野生藻株和 *Δslr0643* 藻株在光自养条件下生长至对数生长期时 ($\text{OD}=0.8$), 向培养基中加入 2.5 mM 葡萄糖, 继续培养 0 h、4 h、10 h、16 h、24 h 后, 收集藻泥 (0 h 样品在加入葡萄糖前收集), 液氮速冻存于 -80 °C 保存, 每组四个平行。

藻泥样本中加入 5000 μL 预冷提取液 (甲醇: 氯仿=3:1, V/V), 再加入 5 μL 2-氯苯丙氨酸, 涡旋 30 s;

加入瓷珠, 35 Hz 研磨仪处理 4 min, 超声 5 min (冰水浴); 样品 4 °C 离心, 10000 r/min 离心 10 min; 取 400 μL 上清于 1.5 mL 离心管中, 每个样本各取 60 μL 混合成 QC 样本; 在真空浓缩器中干燥提取物; 向干燥后的代谢物加入 40 μL 甲氧胺盐试剂 (甲氧胺盐酸盐, 溶于吡啶 20 mg/mL), 轻轻混匀后, 放入烘箱中 80 °C 孵育 30 min; 向每个样品中加入 60 μL BSTFA (含有 1% TMCS, V/V), 将混合物 70 °C 孵育 1.5 h; 冷却至室温, 向混合的样本中加入 5 μL FAMES (溶于氯仿); 随机顺序上机检测。

1.2.4 代谢物检测

Agilent 7890 气相色谱-飞行时间质谱联用仪配有 Agilent DB-5MS 毛细管柱 (30 m $\times$ 250 μm $\times$ 0.25 μm), GC-TOF-MS 具体分析条件如表 1 所示。

表 1 GC-MS 仪器参数

Table 1 Instrument parameters of GC-MS

项目	参数
进样量	1 μL
分流模式	Splitless Mode
隔垫吹扫流速	3 mL/min
载气	Helium
色谱柱	DB-5MS (30 m $\times$ 250 μm $\times$ 0.25 μm)
柱流速	1 mL/min
柱箱升温程序	50 °C hold on 1 min, raised to 310 °C at a rate of 10 °C/min, hold on 8 min
前进口温度	280 °C
传输线温度	280 °C
离子源温度	250 °C
电离电压	-70 eV
质量范围	m/z : 50~500
扫描速率	12.5 spectra per second
溶剂延迟	6.33 min

1.2.5 数据分析

使用 ChromaTOF 软件 (V 4.3x, LECO) 对质谱数据进行了峰提取、基线矫正、解卷积、峰积分、峰对齐等预处理。对物质定性工作中, 使用了 LECO-Fiehn Rtx5 数据库, 包括质谱匹配及保留时间指数匹配。最后, 将 QC 样本中检出率 50% 以下或 $\text{RSD}>30\%$ 的峰去除。利用软件 SIMCA-P 14.0 及在线网络软件 Metabo Analyst 4.0 (<http://www.metaboanalyst.ca/MetaboAnalyst>) 对数据归一化和中心标准化后, 进行热图和偏最小二乘判别分析 (partial least-squares discriminant analysis, PLS-DA) 分析, 根据变量对分组贡献值 (variable

importance in the projection, VIP) 大于 1 和变化显著性 $p < 0.05$ 对差异代谢产物进行筛选, 然后利用 MetaboAnalyst 4.0 进行代谢通路分析。

2 结果与讨论

2.1 葡萄糖混养条件下的生理表征

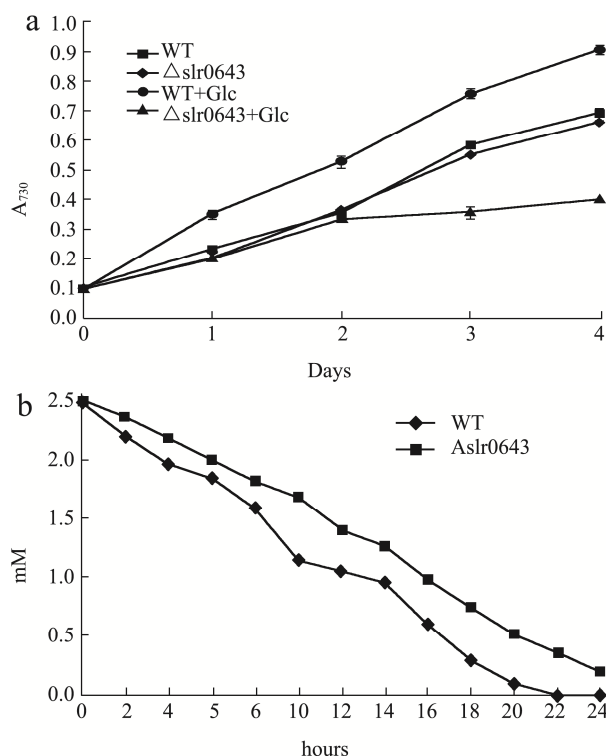


图1 葡萄糖混养下的生理表征

Fig.1 Physiological characteristics in glucose mixotrophic acclimation

注: a: $\Delta slr0643$ 和 WT 在不同营养模式下的生长曲线; b: 培养液上清中葡萄糖含量的变化。

为了探究 *slr0643* 基因在混养条件下的表型变化, 将基因 *slr0643* 的敲除突变体 ($\Delta slr0643$) 藻株和野生型 (WT) 藻株分别在自养和 2.5 mM 葡萄糖混养的条件下培养来测定其生长曲线, 结果见图 1a。自养条件下, $\Delta slr0643$ 藻株的生长速率和 WT 藻株无显著差异。葡萄糖混养时, WT 藻株因为吸收了额外的有机碳源而生长速率明显快于自养条件, 在混养第 4 d 时, 其 OD730 增长到了 0.91。 $\Delta slr0643$ 藻株的生长受到了混养的抑制, 其混养第 4 d 时的 OD730 仅为 0.43, 仅为野生型藻株的 47.25%。图 1b 检测了混养后 24 h 内, 两种藻株培养液上清中葡萄糖含量的变化。结果表明, 野生型藻株培养液内葡萄糖的消耗速率显著高于 $\Delta slr0643$ 藻株, 且在混养 22 h 后已将培养液中葡萄糖完全消耗, 而 $\Delta slr0643$ 藻株混养 24 h 后的

培养液中仍然剩余 0.18 mM 葡萄糖未被消耗。上述结果表明, 在自养条件下, *slr0643* 的缺失并不影响细胞生长, 而在葡萄糖混养时, 它的缺失会显著抑制细胞的生长、造成细胞无法正常利用葡萄糖。前期研究表明, 编码假想调控蛋白的基因 *sll1968* 以及编码水通道蛋白 AqpZ 的基因 *slr2057* 在集胞藻 PCC6803 葡萄糖代谢中至关重要, 它们的缺失突变体也会变得对葡萄糖更加敏感, 且它们通过参与糖酵解、戊糖磷酸途径等代谢途径来影响细胞对葡萄糖的利用^[7]。基于本研究生理实验的结果, 我们推测 *Slr0643* 蛋白可能参与了集胞藻 PCC6803 葡萄糖混养适应的调控。然而, *Slr0643* 调控集胞藻 PCC6803 葡萄糖混养适应的代谢机制目前尚不明确, 需利用代谢组学进行进一步分析。

2.2 代谢组学差异分析

2.2.1 整体差异代谢物分析

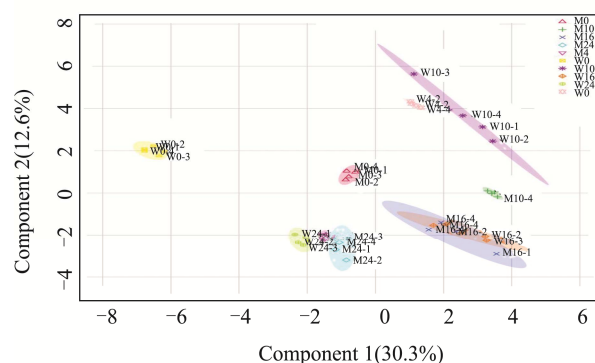


图2 整体差异代谢物的 PLS-DA 得分图

Fig.2 PLS-DA scores plot of global differential metabolites

采用热图以及 PLS-DA 模型对葡萄糖混养不同时间后野生型藻株 (W0:0 h, W4:4 h, W10:10 h, W16:16 h, W24:24 h) 及 $\Delta slr0643$ 藻株 (M0:0 h, M4:4 h, M10:10 h, M16:16 h, M24:24 h) 整体代谢物的差异进行了直观比较。图 3 为整体代谢物及样品的双向聚类, 从图中我们可以看到, 同一组样本的四个平行之间代谢物上下调一致, 表明了样本之间的平行性及稳定性良好。图 2 为 PLS-DA 得分图, 同一组样本的四个平行聚集在一起, 不同组样本分开, 表明此模型可以很好的帮助我们了解组间差异。图中可以看到, 野生型藻株在不同混养时间下的分离比 $\Delta slr0643$ 藻株更加明显, 表明在混养条件下, 野生型藻株比 $\Delta slr0643$ 藻株代谢更加活跃, 代谢物质差异更加明显, 这个结果与生理实验中野生型藻株的生长和葡萄糖利用速率比 $\Delta slr0643$ 藻株更快的结果一致。另外, 在 16 h 和 24 h 时, 野生型和突变体出现重叠, 表明此时两者的差异相对于之前减小。

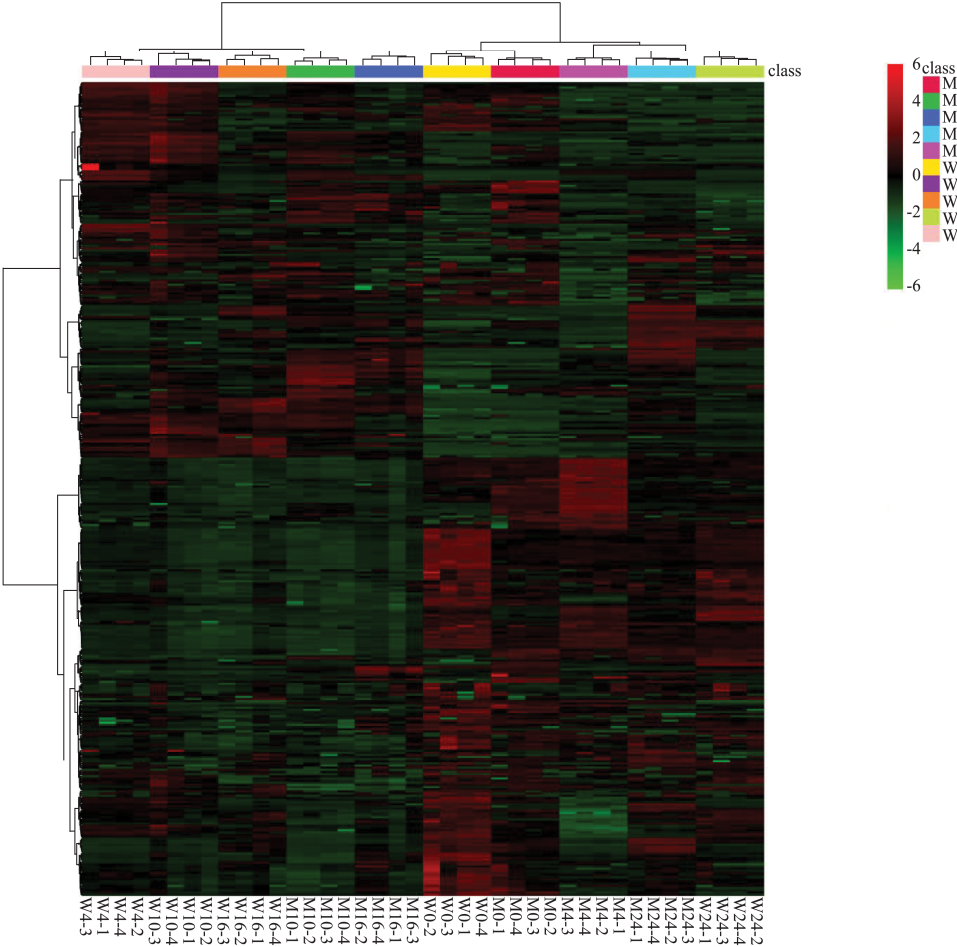


图3 整体差异代谢物的热图

Fig.3 The heat map of global differential metabolite

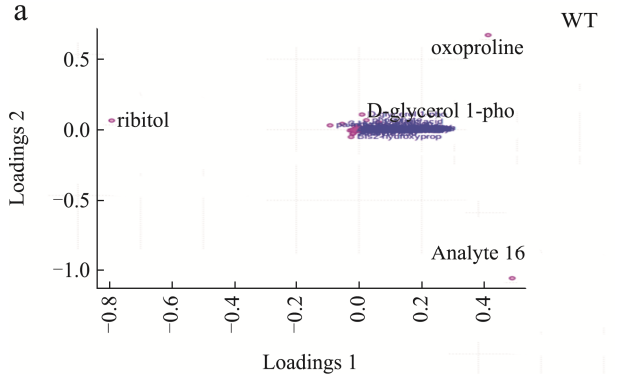
2.2.2 野生型与 *Δslr0643* 突变体间差异代谢物的鉴定

表 2 野生型藻株不同混养时间代谢标志物的变化

Table 2 Fold changes of identified biomarkers in WT with different mixed culture times

序号	代谢物名称	log ₂ (Fold Change)			
		W4	W10	W16	W24
1	蔗糖	2.69	4.31	2.19	0.58
2	琥珀酸	0.99	1.003	1.60	0.86
3	核糖醇	0.59	1.11	1.11	1.11
4	棕榈酸	0.15	0.12	0.25	0.13
5	羟脯氨酸	0.90	1.25	1.37	0.56
6	N-乙酰甲硫氨酸	0.06	0.96	1.02	0.24
7	L-苹果酸	2.25	2.76	1.16	0.26
8	乳酸	0.99	1.02	1.36	1.37
9	谷氨酸	1.70	2.19	1.90	1.15
10	D-甘油-1-磷酸	1.36	1.88	1.96	1.63
11	3-羟丙酸	2.86	3.33	2.32	1.79

为了进一步明确葡萄糖混养过程中, *Δslr0643* 藻株和野生型藻株在代谢产物方面的差异, 我们分别对不同混养时间野生型藻株和 *Δslr0643* 藻株中的差异代谢物的动态变化进行了比较, 得到了两种藻株差异代谢物动态变化的 PLS-DA 荷载图 (图 4a, 4b), 结合 VIP>1 及 $p<0.05$ 共同筛选来寻找贡献大的代谢物。表 2 和表 3 分别列出了野生型藻株和 *Δslr0643* 藻株在不同混养阶段的差异标志代谢物以及它们相对于自养时的变化量。



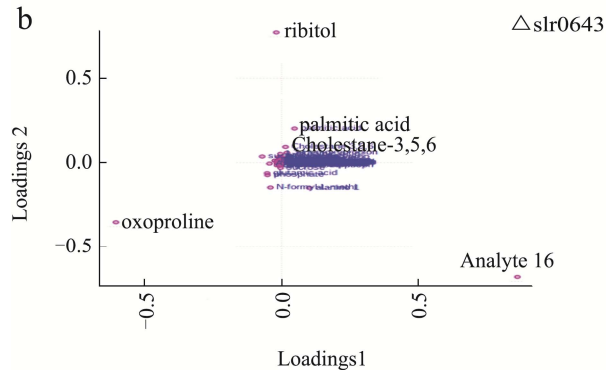


图4 不同培养时间下差异代谢物的 PLS-DA 荷载图

Fig.4 PLS-DA loadings plots of differential metabolites with different culture times

注: a 为野生型中差异代谢物的 PLS-DA 荷载图, b 为 *Δslr0643* 突变体中差异代谢物的 PLS-DA 荷载图。

表3 *Δslr0643* 藻株间不同时间代谢标志物的变化

Table 3 Fold changes of identified biomarkers in *Δslr0643* with different mixed culture times

序号	代谢物名称	log ₂ (FC)			
		M4	M10	M16	M24
1	蔗糖	2.31	3.11	2.20	1.10
2	琥珀酸	-1.68	-0.56	-1.61	-0.78
3	核糖醇	0.49	0.96	0.63	0.55
4	磷酸	-0.26	0.87	0.66	0.32
5	棕榈酸	-0.13	0.06	0.18	0.03
6	羟脯氨酸	-0.10	0.85	0.36	0.10
7	N-甲酰甲硫氨酸	-2.10	0.03	0.04	-1.09
8	谷氨酸	-0.53	1.11	0.39	-1.98
9	D-甘油-1-磷酸	-0.21	0.55	0.37	0.26
10	3β, 5α, 6β-三羟基胆甾烷	1.04	-0.59	-1.03	-1.36
11	3-羟基丙酸	1.57	2.66	1.68	1.63

从表中可以看出, 这些差异标志物主要为糖类, 氨基酸, 有机酸, 脂肪酸等。代谢标志物大部分相同, 但表达量却差异很大。其中, 野生型藻株中有关糖代谢的标志物如蔗糖, 琥珀酸, 苹果酸, 乳酸, 3-羟基丙酸, 核糖醇等在葡萄糖加入后均大幅上升, 表明其混养时利用葡萄糖的速度加快, 而 *Δslr0643* 藻株突变体中糖代谢标志物的数量下降, 其中, 蔗糖及 3-羟基丙酸的表达量均低于野生型藻株, 唯一参与三羧酸循环的标志物琥珀酸表达量在加入葡萄糖后始终呈现下调状态。研究显示, 高产 3-羟基丙酸的集胞藻菌株相对于野生型藻株, 其中心碳代谢的水平会明显提高^[19], 因此, 结合我们的数据可以推测, 野生型藻株混养时的中心碳代谢途径得到加强, 使得细胞生长加快, 而 *slr0643* 的缺失, 导致了细胞内葡萄糖代谢的效率下降, 从而利用葡萄糖的速度下降。从表 2 和表 3 中

还可以发现, 混养 24 h 后, 野生型藻株中蔗糖的含量低于 *Δslr0643* 藻株。事实上, 根据上清中葡萄糖含量的变化曲线 (图 1b) 可以发现, 混养 24 h 后, 野生型藻株培养基中葡萄糖已经消耗完毕, 而 *Δslr0643* 藻株培养基中葡萄糖还没有被完全消耗, 故此时 *Δslr0643* 藻株转化生成蔗糖的量高于野生型藻株。另外, 从表 2 和表 3 中发现, 野生型藻株中氨基酸的表含量高于 *Δslr0643* 藻株。当微藻处于缺氮和缺碳环境时, 氨基酸的含量会减少, 故 *slr0643* 的缺失似乎影响了细胞对碳、氮等营养物质的吸收, 从而导致了藻株生长速率变慢。棕榈酸的含量在两种藻株中没有明显差别, 且在混养过程中变化不大。固醇类物质 3β, 5α, 6β-三羟基胆甾烷只在 *Δslr0643* 藻株标志物中出现, 在混养后期表达量均未下降, 故可推测 *slr0643* 的突变影响了部分脂质的合成。

2.2.3 差异代谢物代谢通路分析

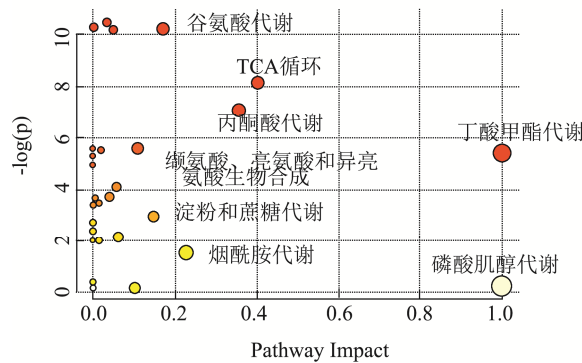


图5 混养过程中 *Δslr0643* 藻株相对于野生型藻株代谢标志物的通路富集分析

Fig.5 Pathway enrichment analysis of biomarkers in *Δslr0643* compared to WT with different mixed culture times

为了进一步了解差异代谢物所处的代谢通路, 按照 $VIP>1$ 及 $p<0.05$ 的筛选标准, 分别对比各个时间点下 *Δslr0643* 藻株相对于野生型藻株的变化情况, 筛选出差异标志物, 然后将这些差异标志物输入 Metabo Analyst 4.0 中的代谢通路富集分析模块进行代谢物的通路分析^[20], 结果如图 5 所示。这些差异标志物主要涉及到 8 条代谢途径。其中, 三羧酸循环, 丙酮酸代谢等糖代谢途径以及谷氨酸, 缬氨酸等氨基酸代谢途径的显著富集, *Δslr0643* 藻株和野生型藻株的代谢在这些通路上出现了明显的差异, 结合之前对代谢标志物的分析可以看出, *Δslr0643* 藻株无法正常利用葡萄糖, 从而影响了糖代谢, 进而导致了氮源吸收的减少、氨基酸合成变慢。烟酰胺是 NAD 和 NADH 的主要成分, 而 NAD 和 NADH 作为递氢的辅酶, 在细胞的各种代谢途径中均起着重要的作用, 因此, 烟酰胺代谢的差异可能是导致糖代谢差异的重要原因之一。

磷酸肌醇是重要的信号分子,与植物体的抗胁迫过程密切相关。有研究指出,苜蓿的单磷酸肌醇合成酶(MIPS)转基因株对盐、冷等非生物胁迫的适应性增加^[21],拟南芥中 MIPS 转基因株对盐的耐受程度同样提高了^[22]。因此,本研究中磷酸肌醇代谢通路的差异可能导致了野生型藻株和 *Δslr0643* 藻株适应葡萄糖混养适应能力的差异。值得注意的是,丁酸甲酯代谢通路差异较为明显,丁酸甲酯可以合成乙酰辅酶 A,而后者是生物体内各个能量代谢必不可少的物质。此前一些研究指出,参与集胞藻葡萄糖混养适应的蛋白有 Slr0280 (一种周质蛋白)、Sml0013 (NAD(P)H 脱氢酶亚基)、CcmK2 (二氧化碳浓缩机制蛋白,由 *slr1028* 编码)以及非编码 RNA Ncr0700 等,主要是通过调节糖酵解、三羧酸循环、糖原分解代谢、戊糖磷酸通路和卡尔文循环等途径中的代谢物或者酶的活性,从而参与调节细胞对葡萄糖的适应^[2,10,12],它们可能与 Slr0643 调控集胞藻葡萄糖混养适应机制存在着密切的联系。综上所述可以看出,Slr0643 的缺失导致了集胞藻细胞内葡萄糖混养适应混养时的糖代谢、氨基酸代谢、磷酸肌醇代谢和乙酸甲酯代谢等途径的代谢物出现较大差异,由此推测,Slr0643 通过直接或间接地参与这些代谢途径来调节集胞藻葡萄糖混养适应。另外,之前通过对 Slr0643 在酸胁迫中的转录组学研究分析,发现 Slr0643 在酸胁迫中起着重要的作用,并且可能是通过 Slr0643/Sll0857/SigH 调控机制进行调控^[18],这个结果为我们进一步探索 Slr0643 在混养胁迫中的具体调控机制提供了思路。

3 结论

本文采用集胞藻 PCC6803 野生型藻株和 Slr0643 敲除突变体 (*Δslr0643*) 藻株,通过生理实验和基于气相色谱-质谱联用 (GC-MS) 技术的植物代谢组学分析,对 Slr0643 蛋白调控集胞藻 PCC6803 葡萄糖混养适应的机制进行研究。生理结果发现虽然 *Δslr0643* 藻株在自养条件下与野生型无明显差异,但在 2.5 mM 葡萄糖混养条件下,野生型藻株的生长速率较光自养条件明显加快,而 *Δslr0643* 藻株的生长速率较光自养条件显著下降,在添加葡萄糖其混养培养 4 d 后的 OD730 值仅为野生型藻株的 47.25%,且其利用葡萄糖的速率也始终低于野生型藻株。在对培养液中 24 h 葡萄糖的消耗实验中,*Δslr0643* 藻株在 24 h 内消耗葡萄糖的速率始终慢于野生型,野生型培养液中的葡萄糖在 22 h 时已全部消耗完毕,而 *Δslr0643* 藻株在 24 h 时培养液中仍然剩余 0.18 mM 葡萄糖。通过代谢组学分别对野生型和 *Δslr0643* 藻株在不同培养时间下的显

著差异代谢物进行鉴定,发现它们的显著差异代谢物各有 11 种,均主要分属于糖类、有机酸类、氨基酸类及脂类,其中有 9 种相同,但其表达量的变化却截然不同,由此可看出 *slr0643* 基因的敲除影响了这些物质的正常代谢。进一步对各个时间点下 *Δslr0643* 突变体相对于野生型的差异代谢物进行筛选鉴定,并将这些显著差异代谢物的代谢通路进行富集分析,发现差异物质主要富集在三羧酸循环,丙酮酸代谢,丁酸甲酯代谢,谷氨酸代谢,缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸生物合成,淀粉和蔗糖代谢,烟酰胺代谢,磷酸肌醇代谢这 8 个代谢途径,提示 Slr0643 主要是通过调控 8 个代谢通路来使细胞适应葡萄糖的混养。本研究揭示了 Slr0643 在葡萄糖利用中的重要作用,为进一步阐述 Slr0643 在集胞藻中的调控方式及蓝藻对葡萄糖的利用机制奠定了基础。

参考文献

- [1] Shi M, Chen L, Zhang W. Regulatory diversity and functional analysis of two-component systems in cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 by GC-MS based metabolomics [J]. *Frontiers in Microbiology*, 2020, 11: 403
- [2] Dong L, Li Q, Wu D, et al. A novel periplasmic protein (Slr0280) tunes photomixotrophic growth of the cyanobacterium, *Synechocystis* sp. PCC 6803 [J]. *Gene*, 2016, 575(2): 313-320
- [3] Takahashi H, Uchimiya H, Hihara Y. Difference in metabolite levels between photoautotrophic and photomixotrophic cultures of *Synechocystis* sp. PCC 6803 examined by capillary electrophoresis electrospray ionization mass spectrometry [J]. *Journal of Experimental Botany*, 2008, 59 (11): 3009-3018
- [4] Kahlon S, Beerli K, Ohkawa H, et al. A putative sensor kinase, Hik31, is involved in the response of *Synechocystis* sp. strain PCC 6803 to the presence of glucose [J]. *Microbiology*, 2006, 152(3): 647-655
- [5] Singh A K, Sherman L A. Pleiotropic effect of a histidine kinase on carbohydrate metabolism in *Synechocystis* sp. strain PCC 6803 and its requirement for heterotrophic growth [J]. *Journal of Bacteriology*, 2005, 187(7): 2368-2376
- [6] Ge H, Fang L, Huang X, et al. Activation of the oxidative pentose phosphate pathway is critical for photomixotrophic growth of a hik33 deletion mutant of *Synechocystis* sp. PCC 6803 [J]. *Proteomics*, 2018, 18(20): e1800046
- [7] Akai M, Onai K, Kusano M, et al. Plasma membrane aquaporin AqpZ protein is essential for glucose metabolism

- during photomixotrophic growth of *Synechocystis* sp. PCC 6803 [J]. Journal of Biological Chemistry, 2011, 286(28): 25224-25235
- [8] Kaniya Y, Kizawa A, Miyagi A, et al. Deletion of the transcriptional regulator CyAbrB2 deregulates primary carbon metabolism in *Synechocystis* sp. PCC 6803 [J]. Plant Physiology, 2013, 162(2): 1153-1163
- [9] Osanai T, Kanesaki Y, Nakano T, et al. Positive regulation of sugar catabolic pathways in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 by the group 2 σ factor SigE [J]. Journal of Biological Chemistry, 2005, 280(35): 30653-30659
- [10] Schwarz D, Schubert H, Georg J, et al. The gene *sml0013* of *Synechocystis* species strain PCC 6803 encodes for a novel subunit of the NAD(P)H oxidoreductase or complex I that is ubiquitously distributed among cyanobacteria [J]. Plant Physiology, 2013, 163(3): 1191-1202
- [11] Kobayashi M, Okada K, Ikeuchi M, et al. A suppressor mutation in the α -phycocyanin gene in the light/glucose-sensitive phenotype of the *psbK*-disruptant of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 [J]. Plant and Cell Physiology, 2005, 46(9): 1561-1567
- [12] De Porcellinis A J, Klähn S, Rosgaard L, et al. The non-coding RNA Ncr0700/PmgR1 is required for photomixotrophic growth and the regulation of glycogen accumulation in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 [J]. Plant and Cell Physiology, 2016, 57(10): 2091-2103
- [13] Chen G, Zhang X. New insights into S2P signaling cascades: regulation, variation, and conservation [J]. Protein Science, 2010, 19(11): 2015-2030
- [14] Chen L, Wu L, Zhu Y, et al. An orphan two-component response regulator Slr1588 involves salt tolerance by directly regulating synthesis of compatible solutes in photosynthetic *Synechocystis* sp. PCC 6803 [J]. Mol. BioSyst, 2014, 10(7): 1765-1774
- [15] 刘小芳,陈谷,林诗琪,等.集胞藻 PCC6803 中 S2P 蛋白酶 Sll0528 参与铵盐胁迫响应的重要性[J].现代食品科技,2018,34(10):29-37
- LIU Xiao-fang, CHEN Gu, LIN Shi-qi, et al. Importance of the S2P protease Sll0528 of *Synechocystis* sp. PCC6803 to ammonium stress tolerance [J]. Modern Food Science and Technology, 2018, 34(10): 29-37
- [16] 曾小琳,闻盼盼,陈谷.集胞藻 PCC6803 中 S2P 同源蛋白基因 *sll0862* 缺失突变株对热胁迫与氧化胁迫的响应[J].微生物学报,2012,52(5):594-601
- ZENG Xiao-lin, WEN Pan-pan, CHEN Gu. Stress response of *Synechocystis* *sll0862* mutant to heat shock and oxidative stress [J]. Acta Microbiologica Sinica, 2012, 52(5): 594-601
- [17] 陈谷,李仕良,刘小芳,等.集胞藻 PCC6803 中 S2P 蛋白酶 Slr1821 参与热胁迫响应的研究[J].现代食品科技,2017, 33(9):20-27
- CHEN Gu, LI Shi-liang, LIU Xiao-fang, et al. Exploration of the involvement of the S2P protease Slr1821 of *Synechocystis* sp. PCC6803 in heat stress response [J]. Modern Food Science and Technology, 2017, 33(9): 20-27
- [18] Zhang X, Chen G, Qin C, et al. Slr0643, an S2P homologue, is essential for acid acclimation in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 [J]. Microbiology, 2012, 158 (11): 2765-2780
- [19] Wang Y, Chen L, Zhang W. Proteomic and metabolomic analyses reveal metabolic responses to 3-hydroxypropionic acid synthesized internally in cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 [J]. Biotechnology for Biofuels, 2016, 9(1): 209
- [20] Xia J, Sinelnikov I V, Han B, et al. MetaboAnalyst 3.0 - making metabolomics more meaningful [J]. Nucleic Acids Research, 2015, 43(1): 251-257
- [21] Tan J, Wang C, Xiang B, et al. Hydrogen peroxide and nitric oxide mediated cold and dehydration-induced myo-inositol phosphate synthase that confers multiple resistances to abiotic stresses [J]. Plant, Cell & Environment, 2013, 36(2): 288-299
- [22] Kaur H, Verma P, Petla B P, et al. Ectopic expression of the ABA-inducible dehydration-responsive chickpea L-myo-inositol 1-phosphate synthase 2 (*CaMIPS2*) in *Arabidopsis* enhances tolerance to salinity and dehydration stress [J]. Planta, 2013, 237(1): 321-335