

两种甲醇脱氢酶在食甲基杆菌甲醇代谢中的作用

郭雅卿, 王东澍, 朱力, 张惟材, 刘颖, 王恒樑

Role of Two Methanol Dehydrogenases in Methanol Metabolism of *Methylobacterium*

GUO Yaqing, WANG Dongshu, ZHU Li, ZHANG Weicai, LIU Ying, and WANG Hengliang

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2023060130>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

凝结芽孢杆菌中与乳酸生产相关的乳酸脱氢酶基因的研究

Lactic Dehydrogenase Gene Related to Lactic Acid Production in *Bacillus coagulans*

食品工业科技. 2018, 39(24): 109-113 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2018.24.020>

保加利亚乳杆菌D-乳酸脱氢酶同工酶基因在大肠杆菌中的表达

Over-expression of D-lactate dehydrogenase isoenzyme genes from *Lactobacillus delbrueckii* spp. *bulgaricus* in *Escherichia coli*

食品工业科技. 2017(05): 159-163 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2017.05.021>

醋酸菌中乙醛脱氢酶的分离纯化及酶学性质

Isolation, purification and enzymatic properties of aldehyde dehydrogenase from *Acetobacter pomorum*

食品工业科技. 2018, 39(10): 100-104 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2018.10.019>

来源于 *P. bacterium* 1109 的甘露醇脱氢酶的重组纯化及酶学性质研究

Purification and Characterization of Recombinant Mannitol Dehydrogenase from *P. bacterium* 1109

食品工业科技. 2020, 41(19): 137-143, 165 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2020.19.022>

油橄榄叶醇提取物对D-半乳糖胺/脂多糖致小鼠急性肝损伤的保护作用及其作用机制

Protective effects and related mechanism of olive leaf methanolic extract against acute liver injury in mice induced by D-galactosamine/lipopolysaccharide

食品工业科技. 2018, 39(3): 315-319 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2018.03.060>

食源复方解酒口服液对小鼠酒精性肝损伤的保护作用

Protective Effect of Homology of Medicine and Food Compound Alleviate a Hangover Oral Liquid on Alcoholic Liver Injury in Mice

食品工业科技. 2021, 42(5): 300-304, 310 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2020040096>



关注微信公众号, 获得更多资讯信息

郭雅卿, 王东澍, 朱力, 等. 两种甲醇脱氢酶在食甲基杆菌甲醇代谢中的作用 [J]. 食品工业科技, 2024, 45(10): 126–132. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2023060130

GUO Yaqing, WANG Dongshu, ZHU Li, et al. Role of Two Methanol Dehydrogenases in Methanol Metabolism of *Methylobacterium* [J]. Science and Technology of Food Industry, 2024, 45(10): 126–132. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2023060130

· 生物工程 ·

两种甲醇脱氢酶在食甲基杆菌甲醇代谢中的作用

郭雅卿¹, 王东澍², 朱力², 张惟材², 刘颖^{1,*}, 王恒樑^{2,*}

(1. 哈尔滨商业大学食品工程学院, 黑龙江哈尔滨 150028;

2. 军事医学研究院生物工程研究所病原微生物生物安全国家重点实验室, 北京 100071)

摘要: 本研究以食葡萄糖甲基杆菌 MP688 (*Methylobacterium glucophilum* MP688) 的吡咯喹啉醌 (pyrroloquinoline quinone, PQQ) 高产突变株 J1-1 为研究对象, 通过生物信息学分析从基因组上找到两个甲醇脱氢酶 (methanol dehydrogenase, MDH) 基因 *mpq0771* 和 *mpq2496*。考察了 Ca^{2+} 及 La^{3+} 对菌体生长、PQQ 合成、MDH 表达及酶活力的影响, 并研究两种酶在甲醇代谢中的作用。结果显示: Ca^{2+} 和 La^{3+} 均能促进 J1-1 菌体生长, 且在菌体快速生长的情况下导致 PQQ 合成下降; Ca^{2+} 存在时, 菌株 J1-1 中 *mpq0771* 表达量较高, 添加 La^{3+} 后 *mpq0771* 表达受到阻遏, 但增强了 *mpq2496* 表达, 菌体 MDH 总活力也有所提高; 敲除菌 J1-1 Δ *mpq0771* 不能利用甲醇生长, 添加 La^{3+} 后可利用甲醇生长并能合成 PQQ, 且能检测到 MDH 活性。*mpq0771* 编码产物是 Ca^{2+} 依赖的 MDH, *mpq2496* 编码产物是严格依赖 La^{3+} 的 MDH, 且 La^{3+} 能够诱导 *mpq2496* 表达并替代 *mpq0771* 发挥甲醇脱氢酶的作用。

关键词: 食甲基杆菌, 甲醇脱氢酶, 吡咯喹啉醌, La^{3+}

中图分类号: TS201.3; Q939.9

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2024)

10-0126-07

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2023060130



本文网刊:

Role of Two Methanol Dehydrogenases in Methanol Metabolism of *Methylobacterium*

GUO Yaqing¹, WANG Dongshu², ZHU Li², ZHANG Weicai², LIU Ying^{1,*}, WANG Hengliang^{2,*}

(1. College of Food Engineering, Harbin University of Commerce, Harbin 150028, China;

2. State Key Laboratory of Pathogen and Biosecurity, Beijing Institute of Biotechnology, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100071, China)

Abstract: In this study, the pyrroloquinoline quinone (PQQ) high-yield mutant J1-1 of *Methylobacterium glucophilum* MP688 was used to do bioinformatics analysis to extract the two methanol dehydrogenase (MDH) genes from the genome, *mpq0771* and *mpq2496*. The effects of Ca^{2+} and La^{3+} on bacterial growth, PQQ synthesis, MDH expression, and enzyme activity were explored, as well as the roles of the two enzymes in methanol metabolism. The results showed that Ca^{2+} and La^{3+} both increased J1-1 bacteriophage growth and decreased PQQ synthesis in the context of fast viral development. In the presence of Ca^{2+} , *mpq0771* expression increased in strain J1-1. La^{3+} inhibited *mpq0771* expression while promoting *mpq2496* expression and increasing total bacterial MDH viability. The knockout bacteria J1-1 Δ *mpq0771* could not grow in methanol, but with the addition of La^{3+} , it could grow in methanol and synthesize PQQ, and MDH activity was identified. The product encoded by *mpq0771* was a Ca^{2+} -dependent MDH, and the product encoded by *mpq2496* was a La^{3+} -dependent MDH, and La^{3+} could increase the production of *mpq2496* and replace *mpq0771* as a methanol dehydrogenase.

收稿日期: 2023-06-13

作者简介: 郭雅卿 (1998-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 食品科学, E-mail: gyaqing1998@163.com。

* 通信作者: 刘颖 (1968-), 女, 博士, 教授, 研究方向: 植物蛋白工程与营养功能因子, E-mail: 154057693@qq.com。

王恒樑 (1971-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 生物工程, E-mail: wanghl@bmi.ac.cn。

Key words: *Methylobacterium*; methanol dehydrogenase; pyrroloquinoline quinone; lanthanide

吡咯喹啉醌(pyrroloquinoline quinone, PQQ)是一种不同于烟酰胺和核黄素的第三类氧化还原酶的辅酶^[1],具有增强抗氧化酶活性、促进生成神经生长因子、抗辐射、预防慢性心力衰竭、抗高原缺氧等作用^[2-5],在功能性食品和医药行业都具有良好的开发前景。目前,合成 PQQ 的方式主要有化学合成法和微生物发酵法^[6]。与化学合成法相比,微生物发酵法具有污染小、成本低、产率高等优点,因此在工业化生产中被广泛应用^[7]。迄今自然界中只有某些革兰氏阴性菌能够产生 PQQ,其中甲基营养型细菌的 PQQ 合成水平最高^[8-9]。甲醇脱氢酶(methanol dehydrogenase, MDH)是甲基营养菌代谢甲醇的关键酶,首先催化甲醇还原 PQQ 生成 PQQH₂,并以细胞色素 c 作为电子受体,将两个电子转移至细胞色素 c,在该过程中自由基醌会将 PQQH₂ 再氧化回 PQQ^[10-11]。

甲醇脱氢酶存在于细胞周质中,有 *MxaFI* 和 *XoxF* 两种类型^[12-13]。*MxaFI* 是由 *MxaF* 和 *MxaI* 所编码的两个 α 大亚基和两个 β 小亚基组成的四聚体($\alpha_2\beta_2$),其中 *MxaF* 的活性位点需要 Ca^{2+} 和 PQQ 作为辅基^[14-15]; *XoxF* 型 MDH 需要在活性位点上结合镧系元素(如镧或铈等)和 PQQ 才具有生物活性,实现对甲醇的氧化^[16]。HIBI 等^[17]从含有 La^{3+} 培养基中生长的细胞中纯化的 MDH 对应于 *XoxF*,而从 Ca^{2+} 生长的菌体中纯化得到的 MDH 与 *MxaF* 相对应。在甲醇代谢过程中, *MxaFI* 和 *XoxF* 两种类型的 MDH 存在着某种联系和分工。CHISTOSERDOVA 等^[16]研究发现, *MxaF* 缺陷菌株不能在甲醇上生长,且认为在甲基营养菌中 Ca^{2+} 依赖型的 *MxaF* 型 MDH 是甲醇代谢中唯一活跃的 MDH;后又发现缺失 *XoxF1* 和 *XoxF2* 的菌株不能利用甲醇作为碳源和能源生长,且几乎完全丧失甲醇脱氢酶活性,与 *MxaF* 敲除菌株的表型相同。随着对甲醇脱氢酶的深入研究,发现 La^{3+} 能够对甲醇脱氢酶进行调控。NAKAGAWA 等^[18]向 *MxaF* 缺失株的培养基中补充 La^{3+} ,发现能够恢复菌体的生长,实验表明 *XoxF* 在菌株 AM1 中作为 La^{3+} 依赖型的 MDH 参与甲醇代谢。

甲醇脱氢酶对菌株生长及 PQQ 合成有较大的影响^[19],李森鑫等^[20]发现提高 MDH 的表达水平能够影响 PQQ 的生物合成水平。孙晓宇等^[21]通过突变甲醇脱氢酶的启动子来降低其活性,达到了提高 PQQ 产量的目的。李大攀等^[22]将 MDH 基因敲除后,MDH 的活力、PQQ 合成水平及氧化甲醇的能力均下降。本实验室从土壤中分离筛选得到一株 PQQ 产生菌食葡萄糖食甲基杆菌 MP688,能够以甲醇为唯一碳源进行生长,后经多轮物理和化学诱变得到了高产菌株 J1-1。在前期研究结果中,将菌株 J1-1

中的 *mpq0771* 基因敲除后,敲除菌不能利用甲醇生长,与 Ca^{2+} 依赖的 MDH 特征相似^[21]。现经过基因比对分析,在基因组上找到了另外一个甲醇脱氢酶基因 *mpq2496*,推测可能为 La^{3+} 依赖的 MDH。通过考察菌株生长状态、PQQ 合成、MDH 表达及酶活等因素,初步分析了 *mpq0771* 和 *mpq2496* 基因在菌株生长代谢中的作用和关系,为阐明甲醇脱氢酶在食甲基杆菌的生长和代谢产物合成过程中的调控机制提供了理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

食葡萄糖食甲基杆菌(*Methylobacterium glucophilum*)J1-1、大肠杆菌(*Escherichia coli*)pTIG、敲除菌 J1-1 Δ *mpq0771* 本实验室保存;细菌基因组 DNA 提取试剂盒 北京天根生化科技有限公司;快速质粒小提试剂盒 南京诺唯赞生物科技有限公司;限制性内切酶(10 U/ μL)、琼脂糖凝胶 DNA 回收纯化试剂盒 赛默飞世尔科技公司;Pfu DNA 聚合酶(2.5 U/ μL)、2 $\times$ Basic Assemble Mix 北京全式金生物技术有限公司;细菌 RNA 提取试剂盒、cDNA 第一链合成试剂盒、荧光定量 PCR 试剂盒、大肠杆菌感受态细胞 DH5 α 北京擎科生物科技有限公司;甲醇、酵母提取物、胰蛋白胨、琼脂粉、NaCl、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 、 KH_2PO_4 、 $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 、 CaCl_2 、柠檬酸铁 分析纯,国药集团化学试剂有限公司; $\text{LaCl}_3 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、庆大霉素(Gentamicin, Gm)、氨苄青霉素(Ampicillin, Amp) 分析纯,上海源叶生物科技有限公司;Tris-HCl 分析纯,北京酷莱博科技有限公司;LB 培养基:蛋白胨 10 g/L,酵母粉 5 g/L,NaCl 10 g/L,121 $^{\circ}\text{C}$ 灭菌;MP 基础培养基: $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2 g/L, KH_2PO_4 1.4 g/L, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 3.0 g/L, Na_2HPO_4 3.0 g/L, CaCl_2 30.0 mg/L, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 5.0 mg/L, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 5.0 mg/L, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.5 mg/L, 柠檬酸铁 30.0 mg/L, 115 $^{\circ}\text{C}$ 灭菌,使用时添加甲醇至 10 mL/L,得到 MP 培养基,在 MP 培养基中添加 CaCl_2 或 LaCl_3 的至终浓度为 30 $\mu\text{mol/L}$,得到含各种金属离子的培养基。

A-14 型常温高速离心机、1-15K 型低温高速离心机 美国 Sigma 公司;9080 型恒温培养箱 上海一恒科技公司;BP211D 型分析天平(精度 0.01 mg) 德国 Sartorius 公司;DYY-III-8B 型稳压稳流型电泳仪 北京六一仪器厂;WDP-160 型低温振荡摇床 北京沃德创新医药科技中心;Gel-pro 2020D 型凝胶成像仪 美国 Pharmacia Biotech 公司;FLC-3 型超净台 哈尔滨东联有限公司;PRO-2612433 型金属浴 北京金银杏生物科技有限公司;HZQ-F160 型恒温振荡摇床 苏州培英实验设备有限公司;

CFX96TM 型荧光定量 PCR 仪、MiniPROTEAN®3 Cell 型蛋白电泳仪 美国 Bio-RAD 公司; T-1 型 PCR 仪 德国 Biometra 公司; UV-2100 型紫外分光光度计 美国 UNICO 公司; VC505 型超声细胞破碎仪 美国 Sonics 公司; Milropulser 型电转化仪 北京友华照钦医疗器械有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 生物信息学分析 利用 J1-1 基因组序列和生物信息学分析筛选出基因组中甲醇脱氢酶基因, 再通过 BLAST 与扭脱甲基杆菌 AM1 中的甲醇脱氢酶基因进行比对分析。基因和蛋白序列获得及序列比对分析网址: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>, MP688 登录号为 CP002252.1, AM1 登录号为 CP001510.1。

1.2.2 分子生物学操作 基因组提取、质粒提取、PCR 产物扩增、酶切、连接、转化等常规分子生物学操作参照文献 [23] 方法。

1.2.3 引物设计 文中所需引物序列如表 1。

1.2.4 敲除菌 J1-1 $\Delta mpq0771$ 的构建 以 J1-1 基因组为模板, 采用表 1 引物 UP-F、UP-R、DOWN-F、DOWN-R 分别扩增上、下游同源臂基因片段(1500 bp), 引物 Gm-F 和 Gm-R 扩增 Gm 抗性基因片段(789 bp), 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳后, 用胶回收试剂盒纯化。pTIG 质粒用 *EcoR* I、*Xho* I 内切酶进行双酶切, 37 °C 反应 2 h, 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳回收。将上述回收产物利用 2×Basic Assemble Mix 重组试剂盒进行连接, 获得的产物通过热激转化法转入 *E. coli* DH5 α 感受态细胞中, 转化后涂布至含有 Amp 抗性的 LB 平板上, 37 °C 培养。挑取单克隆并活化, 菌液 PCR 进行验证, 结果为阳性的菌液进行测序鉴定。鉴定结果正确后, 提取质粒 pTIG-UP-Gm-DOWN, 以该质粒为模板, 使用引物 UP-F、DOWN-R 扩增片段 UP-Gm-DOWN, 片段经 1% 琼脂糖凝胶电泳回收, 回收后电击转入 J1-1 感受态细胞中, 通过 Gm 抗性筛选得到敲除菌 J1-1 $\Delta mpq0771$ 。

1.2.5 生长曲线及 PQQ 生物合成测定 将菌株接种至 MP 基础培养基中, 30 °C、200 r/min 进行活化, 活化后分别接种至含有不同金属离子的培养基中, 每隔 12 h 测定 OD₆₀₀ 及 PQQ 合成水平, 绘制生长曲线及 PQQ 合成曲线图, PQQ 测定方法参考文献 [24] 中的光谱法。

1.2.6 甲醇脱氢酶酶活测定 取 1 mL 培养至对数

中期的菌液, 10000 r/min 离心 10 min 后弃上清, 重悬于 1 mL 20 mmol/L 的 Tris-HCl(pH7.0)缓冲液中, 置于冰浴中超声处理, 4 °C 低温 10000 r/min 离心 5 min, 上清液用于酶活性检测, 测定方法参考文献 [20]。

1.2.7 甲醇脱氢酶蛋白表达测定 取 1 mL 已培养至对数中期的菌液, 12000 r/min 离心 1 min 后弃上清, 重悬于 500 μ L 1×TE(10 mmol/L pH8.0 Tris-HCl)缓冲液中, 置于冰上进行超声破碎(工作 3 s, 间歇 3 s, 2 min)。破碎后的菌液在 12000 r/min 下离心 1 min, 取上清进行十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodiumdodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)。

1.2.8 质谱鉴定 目的电泳条带切下装入无酶 EP 管中, 封口膜封闭管口, 送至北京华大基因有限公司进行蛋白质谱鉴定。

1.2.9 实时荧光定量 PCR 将菌株 J1-1 分别接种至甲醇/无、甲醇/Ca²⁺、甲醇/La³⁺和甲醇/Ca²⁺+La³⁺培养基中, 培养至对数生长期, 利用试剂盒提取 RNA 并逆转录为 cDNA 后进行荧光定量 PCR, 检测不同培养条件下 *mpq0771*、*mpq2496* 基因相对表达情况。

1.3 数据处理

各实验的指标测定均重复 3 次, 结果用平均值±标准偏差表示, 使用 Microsoft Excel 进行绘图; 序列比对使用 DNAMAN 软件进行比对。

2 结果与分析

2.1 菌株 J1-1 中甲醇脱氢酶基因的生物信息学分析

通过对 J1-1 全基因组序列系统的比对, J1-1 中 *mpq0771* 基因与 *MxaF* 基因的核苷酸序列同源性的 72%, 氨基酸序列同源性为 53%; *mpq2496* 基因与 *XoxF* 基因的核苷酸序列同源性的 66%, 氨基酸序列同源性为 53%; *mpq0771* 基因与 *mpq2496* 基因的核苷酸序列同源性为 61%, 氨基酸序列同源性为 48%。如图 1 所示, 与 *MxaF* 型 MDH 的氨基酸序列的 D303、E177 对应 *mpq0771* 的 D323、E198, 推测为催化反应过程中所必需的, 与 Ca²⁺发生相互作用^[25]; 如图 2 所示, 与 *XoxF* 型 MDH 的氨基酸序列的 D320 对应 *mpq2496* 的 D357, 推测参与催化反应并与 La³⁺进行配位^[26]。综上结果提示, 在菌株 J1-1 中可能也存在两种类型的甲醇脱氢酶。

表 1 引物名称及序列

Table 1 Names and sequences of primers

引物名称	引物序列
UP-F	CCGTAAGGAGGAATTCTAACCGCCTTGATTCTTTCACGCATGC
UP-R	CCGTTTCCACGGTGTGCGTCCTTCGGAATCCTCCTCGTATGTTG
Gm-F	ATACGAGGAGGATCCGAAGGACGCACACCGTGGAAACGG
Gm-R	GCCTAATCACAAGGCCTGTATTAGGTGGCGGTACTTGGGTCG
DOWN-F	ACCCAAGTACCGCCACCTAATACAGGCCTTGTGATTAGGCCGC
DOWN-R	GGTGGTGGTGCCTGAGTTTTCAGGATCGCCCTGATAAATGGAACG

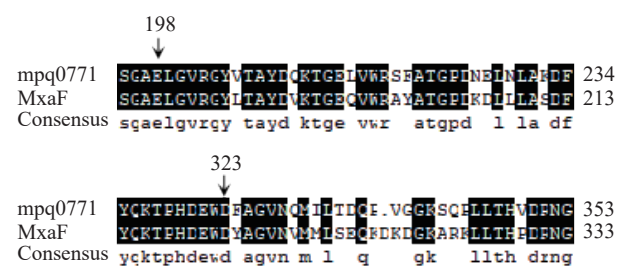


图1 mpq0771 中 198、323 位氨基酸序列与 MxaF 中 177、303 位氨基酸序列比对

Fig.1 Alignment of amino acid sequences 198 and 323 in mpq0771 and 177 and 303 in MxaF

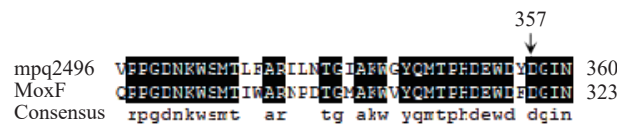


图2 mpq2496 中 357 位氨基酸序列与 XoxF 中 320 位氨基酸序列比对

Fig.2 Alignment of amino acid sequences 320 in mpq2496 and 357 in XoxF

2.2 Ca^{2+} 、 La^{3+} 对菌株 J1-1 生长及 PQQ 生物合成的影响

将菌株 J1-1 分别在甲醇/无、甲醇/ Ca^{2+} 、甲醇/ La^{3+} 和甲醇/ $\text{Ca}^{2+}+\text{La}^{3+}$ 4 种培养基中培养,每隔 12 h 取样测定其 OD_{600} 及 PQQ 产量并绘制曲线(如图 3)。菌株 J1-1 在含有 Ca^{2+} 、 La^{3+} 的培养基中的生长速率均高于在无离子添加培养下的生长速率。前期时,菌株 J1-1 在添加 Ca^{2+} 条件下的 PQQ 合成量高于野生菌,后期时合成量低于野生菌;菌株 J1-1 在

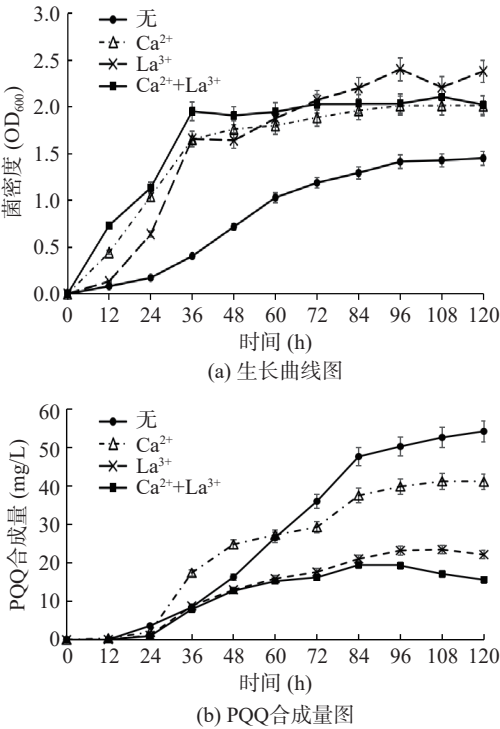


图3 菌株 J1-1 在不同培养条件下表型图

Fig.3 Phenotypic maps of J1-1 strain under different culture conditions

两种含 La^{3+} 培养基中的 PQQ 合成量一直低于野生菌。实验表明 Ca^{2+} 、 La^{3+} 均能够促进菌体的生长,但会显著降低 PQQ 合成量。

2.3 Ca^{2+} 、 La^{3+} 对菌株 J1-1 甲醇脱氢酶活力的影响

取 1 mL 在甲醇/无、甲醇/ Ca^{2+} 、甲醇/ La^{3+} 和甲醇/ $\text{Ca}^{2+}+\text{La}^{3+}$ 4 种培养基中的 J1-1 菌液,测定甲醇脱氢酶总酶活。如图 4 所示,在甲醇/ La^{3+} 和甲醇/ $\text{Ca}^{2+}+\text{La}^{3+}$ 的培养条件下,菌株 J1-1 的甲醇脱氢酶活性高于甲醇/ Ca^{2+} 的培养条件。前期研究表明,菌株 J1-1 的甲醇脱氢酶活性与 PQQ 产量呈负相关,MDH 氧化甲醇速率加快,导致生成的甲醛累积,菌体“中毒”,从而 PQQ 产量下降^[21],该实验结果与 J1-1 在甲醇/ La^{3+} 和甲醇/ $\text{Ca}^{2+}+\text{La}^{3+}$ 中的 PQQ 合成量低于甲醇/ Ca^{2+} 的现象相符。

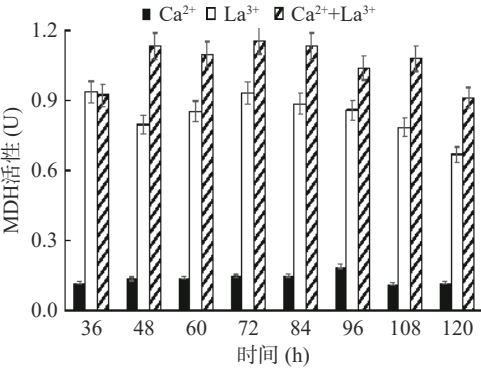


图4 菌株 J1-1 在不同培养条件下甲醇脱氢酶酶活测定

Fig.4 Determination of methanol dehydrogenase activity of strain J1-1 under different culture conditions

2.4 Ca^{2+} 、 La^{3+} 对菌株 J1-1 甲醇脱氢酶蛋白表达的影响

取 1 mL 在甲醇/无、甲醇/ Ca^{2+} 、甲醇/ La^{3+} 和甲醇/ $\text{Ca}^{2+}+\text{La}^{3+}$ 4 种培养基中的 J1-1 菌液,进行超声处理,取全菌进行 SDS-PAGE,蛋白电泳图谱如图 5。根据前期实验结果可知,65 kDa 处的蛋白条带为 mpq0771 基因编码的甲醇脱氢酶。mpq0771 在甲醇/无(泳道 1 和 2)、甲醇/ Ca^{2+} (泳道 3 和 4)条件下有明

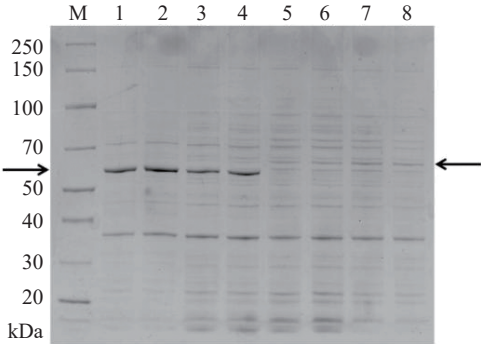


图5 菌株 J1-1 在不同培养条件下蛋白表达图

Fig.5 Protein expression map of J1-1 strain under different culture conditions

注: M: Marker; 1~2: 甲醇/无; 3~4: 甲醇/ Ca^{2+} ; 5~6: 甲醇/ La^{3+} ; 7~8 甲醇/ $\text{Ca}^{2+}+\text{La}^{3+}$ 。

表 2 质谱检测结果

Table 2 Results of mass spectrum detection

蛋白描述	分子量(Da)	分值	总肽段数	总序列数	丰度指数	覆盖率
PQQ依赖性脱氢酶	68 102	4754	231(183)	28(26)	5.57	46%
TonB依赖性受体	68 330	3179	127(103)	20(20)	2.55	31%
甲酰甲基呋喃脱氢酶亚基 α	62 050	1571	95(60)	19(18)	3.24	39%
TonB依赖性受体塞	71 117	1243	76(49)	21(18)	1.70	36%
脯氨酰-tRNA合成酶	63 216	1018	69(39)	20(16)	1.75	39%
乙酰乳酸合成酶	64 977	949	66(39)	19(12)	1.68	26%

注: 总肽段数: 匹配到的总肽段数(高于显著性阈值的匹配数); 总序列数: 匹配到的总序列数(高于显著性阈值的序列数)。

显的表达; 在甲醇/ La^{3+} (泳道 5 和 6)和甲醇/ Ca^{2+} + La^{3+} (泳道 7 和 8)的条件下无肉眼可见的条带,但在其上方处出现一条蛋白表达量增加的条带(蛋白分子量大约为 68 kDa),胶内酶切并进行质谱分析鉴定。质谱结果如表 2 所示,该蛋白条带与 *mpq2496* 基因编码的甲醇脱氢酶匹配最佳,分值为 4757,覆盖率为 46%,且分子量大小也相符。以上结果显示 *mpq2496* 与文献 [27–28] 报道中 XoxF 的特征相似, La^{3+} 存在时 XoxF 基因表达更强。

2.5 Ca^{2+} 、 La^{3+} 对菌株 J1-1 甲醇脱氢酶基因相对表达量的影响

以 cDNA 为模板, *GAPDH* 为内参基因,测定菌株 J1-1 在不同条件下 *mpq0771*、*mpq2496* 基因相对表达水平,结果分别如图 6a 和图 6b 所示。*mpq0771* 和 *mpq2496* 参与甲醇代谢并发挥作用,且 Ca^{2+} 、 La^{3+} 对二者的表达水平均有影响。与甲醇/无条件相

比, La^{3+} 存在时, *mpq2496* 的表达水平均上调, *mpq0771* 的表达水平均下调。与 SDS-PAGE 电泳结果相符,无离子添加和只添加 Ca^{2+} 时, *mpq0771* 表达水平较高,但在 La^{3+} 存在时, *mpq0771* 表达受到阻遏, *mpq2496* 表达被激活。WANG 等[29]研究也表明 La^{3+} 可能会阻遏 Ca^{2+} 依赖型酶和其他蛋白表达。

2.6 Ca^{2+} 、 La^{3+} 对敲除菌 J1-1 Δ *mpq0771* 生长及 PQQ 生物合成的影响

mpq0771 所编码的甲醇脱氢酶是菌株 J1-1 能够利用甲醇进行生长的关键基因,在甲醇代谢过程中发挥重要作用。如图 7a 所示,菌株 J1-1 在缺失 *mpq0771* 基因后,培养 5 d 后其菌密度仍低于 0.2,不能利用甲醇生长。图 7b 为 PQQ 合成量图,结果显示 J1-1 Δ *mpq0771* 菌株可在含 La^{3+} 的培养基中利用甲醇生长并能合成 PQQ,说明有除 *mpq0771* 基因编码的甲醇脱氢酶在发挥作用,使菌株能够正常生长。

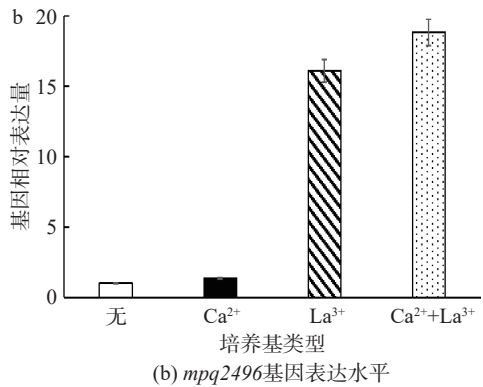
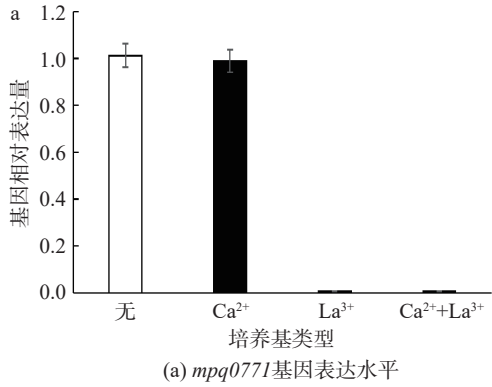


图 6 不同基因在不同培养条件下相对表达水平

Fig.6 Relative expression of different genes under different culture conditions

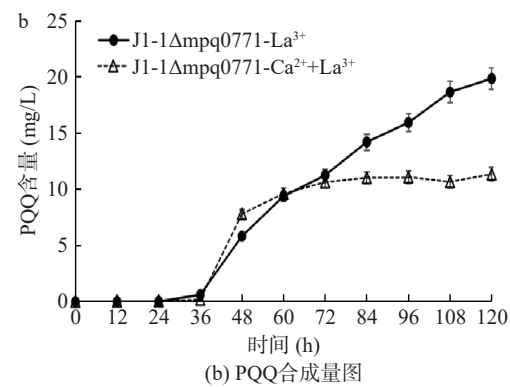
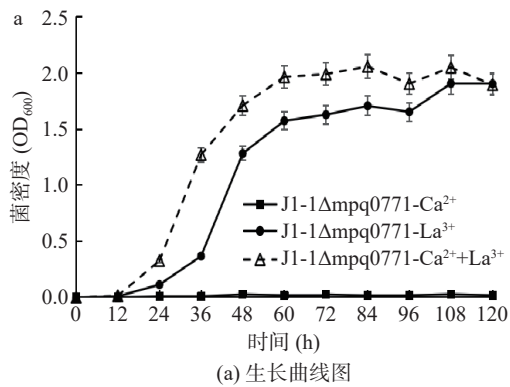


图 7 敲除菌 J1-1 Δ *mpq0771* 在不同培养条件下表型图

Fig.7 Phenotypic maps of J1-1 Δ *mpq0771* knockout strain under different culture conditions

2.7 Ca^{2+} 、 La^{3+} 对敲除菌 J1-1 $\Delta mpq0771$ 甲醇脱氢酶活性的影响

如图 8 所示, 敲除菌 J1-1 $\Delta mpq0771$ 在 Ca^{2+} 的培养基中不能利用甲醇进行生长, 检测不到甲醇脱氢酶的活性; 在甲醇/ La^{3+} 和甲醇/ $\text{Ca}^{2+}+\text{La}^{3+}$ 条件下的甲醇脱氢酶酶活, 敲除菌 J1-1 $\Delta mpq0771$ 可以利用甲醇且能检测到甲醇脱氢酶活性, 说明 *mpq2496* 能够发挥甲醇脱氢酶的作用, 也进一步反映了甲醇脱氢酶对于菌株利用和代谢甲醇的重要性。

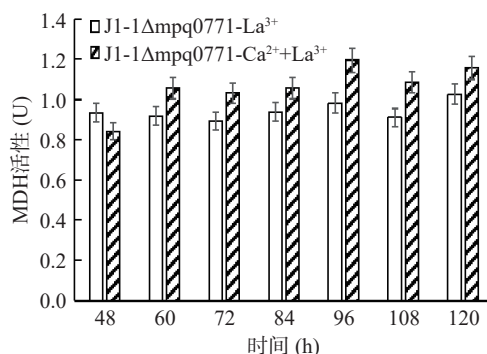


图 8 敲除菌 J1-1 $\Delta mpq0771$ 在不同培养条件下甲醇脱氢酶酶活测定

Fig.8 Determination of methanol dehydrogenase activity of J1-1 $\Delta mpq0771$ knockout strain under different culture conditions

2.8 Ca^{2+} 、 La^{3+} 对敲除菌 J1-1 $\Delta mpq0771$ 甲醇脱氢酶蛋白表达的影响

敲除菌 J1-1 $\Delta mpq0771$ 的 SDS-PAGE 电泳结果如图 9 所示。J1-1 $\Delta mpq0771$ 在甲醇为碳源的培养基中不能生长, 但可在果糖为碳源的培养基中生长。在 MP/果糖中 J1-1 $\Delta mpq0771$ (泳道 2) 相较于野生菌 J1-1 (泳道 1) 的蛋白指纹图谱缺失一条 65 kDa 的甲醇脱氢酶蛋白条带, 说明在 J1-1 $\Delta mpq0771$ 中 *mpq0771* 编码的甲醇脱氢酶不能正常表达, 也印证

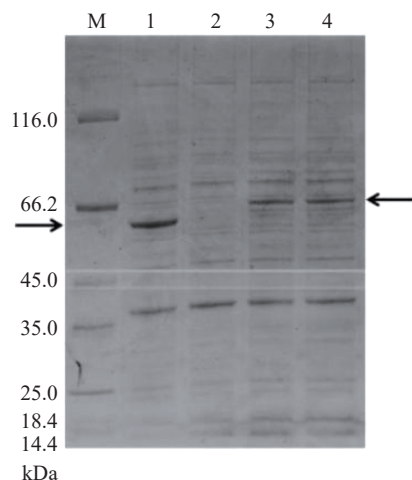


图 9 敲除菌 J1-1 $\Delta mpq0771$ 在不同培养条件下蛋白表达图

Fig.9 Protein expression profiles of J1-1 $\Delta mpq0771$ knockout bacteria under different culture conditions

注: M: Marker; 1: J1-1; 2: J1-1 $\Delta mpq0771$ -果糖; 3: J1-1 $\Delta mpq0771$ -甲醇/ La^{3+} ; 4: J1-1 $\Delta mpq0771$ -甲醇/ $\text{Ca}^{2+}+\text{La}^{3+}$ 。

了敲除基因 *mpq0771* 后菌株不能再利用甲醇。J1-1 $\Delta mpq0771$ 菌株在 La^{3+} (泳道 3) 和 $\text{Ca}^{2+}+\text{La}^{3+}$ (泳道 4) 的培养条件下, *mpq2496* 编码的甲醇脱氢酶蛋白表达量较野生菌高, 说明当 La^{3+} 存在时, *mpq2496* 能够代替 *mpq0771* 发挥甲醇脱氢酶的作用, 即能够利用甲醇进行生长。

3 结论

在菌株 J1-1 中存在着两种类型的甲醇脱氢酶, *mpq0771* 基因编码的是 Ca^{2+} 依赖的 MxaF 型 MDH, *mpq2496* 基因编码的是 La^{3+} 依赖的 XoxF 型 MDH, 且均参与甲醇代谢。通过考察 Ca^{2+} 、 La^{3+} 对菌株 J1-1 生长状态、PQQ 合成、MDH 表达及酶活等的影响, 发现敲除 *mpq0771* 基因会对菌株的生长及对甲醇的利用产生较大影响, 提示该基因在甲醇代谢中的重要性, 且当其表达量高时 PQQ 合成水平较高。研究还发现, La^{3+} 能使敲除菌 J1-1 $\Delta mpq0771$ 利用并代谢甲醇, 该结果反映了 La^{3+} 存在时 *mpq2496* 可以代替 *mpq0771* 发挥甲醇脱氢酶的作用, 维持菌体生长, 即 La^{3+} 可使 XoxF 型 MDH 成为食甲基杆菌的主要甲醇脱氢酶^[30], *mpq0771* 与 *mpq2496* 之间还具有分工作用。

综上, 菌株 J1-1 中 *mpq0771* 及 *mpq2496* 基因编码的甲醇脱氢酶在甲醇代谢中具有重要作用, 也进一步说明了甲醇脱氢酶是甲醇代谢过程中的关键调控点^[31]。菌株 J1-1 中的两种甲醇脱氢酶具有高表达的特性, 提示可利用基因工程技术对此开发一种表达外源蛋白的系统。甲基营养菌具有特殊的一碳代谢网络, 可实现利用生物转化生产高附加值产品, 如化工产品、天然产物、食品添加剂等^[32-33], 因此对甲醇脱氢酶作用的研究不仅可为后续深入研究甲基营养菌甲醇利用途径提供理论依据, 还有利于生物发酵业的发展。

© The Author(s) 2024. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

参考文献

- [1] WANG C X, ZHANG B R, ZHANG H Y, et al. Effect of dietary pyrroloquinoline quinone disodium in sows on intestinal health of the offspring[J]. Food & Function, 2020, 20(4): 581-585.
- [2] LIU L X, ZHANG Y Y, LIU T, et al. Pyrroloquinoline quinone protects against exercise-induced fatigue and oxidative damage via improving mitochondrial function in mice[J]. The FASEB Journal, 2021, 35(4): 21394.
- [3] XU X, CHEN C, LU W J, et al. Pyrroloquinoline quinone can prevent chronic heart failure by regulating mitochondrial function[J]. Cardiovascular Diagnosis and Therapy, 2020, 10(3): 453-469.
- [4] YAMADA Y, NISHII K, KUWATA K, et al. Effects of pyrroloquinoline quinone and imidazole pyrroloquinoline on biological activities and neural functions[J]. Heliyon, 2020, 6(1): 3240.
- [5] 杨嵘, 张连成, 陶慧敏, 等. 吡咯喹啉酮对模拟急性高原暴露小鼠的抗缺氧和抗疲劳作用的研究[J]. 营养学报, 2020, 42(6): 602-606. [YANG R, ZHANG L C, TAO H M, et al. Effects of

- pyrroloquinoline quinone on anti-hypoxia and anti-fatigue[J]. *Acta Nutrimenta Sinica*, 2020, 42(6): 602–606.]
- [6] 寇航, 王艳梅, 李彤, 等. 基于 *Methylovorus* sp. J1-1 基因组尺度代谢网络优化吡咯喹啉醌合成[J]. *生物技术通报*, 2022, 38(2): 173–183. [KOU H, WANG Y M, LI T, et al. Fermentation optimization for PQQ synthesis based on the genome-scale metabolic model of *Methylovorus* sp. J1-1 [J]. *Biotechnology Bulletin*, 2022, 38(2): 173–183.]
- [7] 张静, 刘孟粟, 秦志杰, 等. 吡咯喹啉醌高产菌株选育及发酵优化[J]. *食品与发酵工业*, 2022, 48(16): 56–64. [ZHANG J, LIU M S, QIN Z J, et al. Breeding and fermentation optimization of high titer pyrroloquinoline quinone strain[J]. *Food and Fermentation Industries*, 2022, 48(16): 56–64.]
- [8] AKAGAWA M, MINEMATSU K, SHIBATA T, et al. Identification of lactate dehydrogenase as a mammalian pyrroloquinoline quinone (PQQ)-binding protein[J]. *Scientific Reports*, 2016, 6(1): 26723.]
- [9] JANJA T, KATARINA J, KAZUNOBU M. The highly tolerant acetic acid bacterium *Gluconacetobacter europaeus* adapts to the presence of acetic acid by changes in lipid composition, morphological properties and PQQ-dependent ADH expression[J]. *Extremophiles*, 2007, 11(4): 627–635.]
- [10] 孙青, 刘德华, 陈振. 甲醇的生物利用与转化[J]. *中国生物工程杂志*, 2020, 40(10): 65–75. [SUN Q, LIU D H, CHEN Z. Bioutilization and transformation of methanol[J]. *China Biotechnology*, 2020, 40(10): 65–75.]
- [11] ANTHONOT C, WILLIAMS P. The structure and mechanism of methanol dehydrogenase[J]. *BBA-Proteins and Proteomics*, 2003, 1647(1): 18–23.]
- [12] RAN F. Preferential binding of lanthanides to methanol dehydrogenase evaluated with density functional theory[J]. *The Journal of Physical Chemistry*, 2021, 125(9): 2251–2257.]
- [13] 姚伦, 周雍进. 一碳化合物生物利用和转化研究进展[J]. *化工进展*, 2023, 42(1): 16–29. [YAO L, ZHOU Y J. Progress in microbial utilization of one-carbon feedstocks for biomanufacturing[J]. *Chemical Industry and Engineering Progress*, 2023, 42(1): 16–29.]
- [14] 凡立稳, 王钰, 郑平, 等. 一碳代谢关键酶—甲醇脱氢酶的研究进展与展望[J]. *生物工程学报*, 2021, 37(2): 530–540. [FAN L W, WAGN Y, ZHEGN P, et al. Methanol dehydrogenase, a key enzyme of one-carbon metabolism: A review[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2021, 37(2): 530–540.]
- [15] WILLIAMS P A, COATES L, MOHAMMED F, et al. The atomic resolution structure of methanol dehydrogenase from *Methylobacterium extorquens* [J]. *Acta Crystallographica. Section D, Biological Crystallography*, 2005, 61: 75–79.]
- [16] CHISTOSERDOVA L, LIDSTROM M E. Molecular and mutational analysis of a DNA region separating two methylotrophy gene clusters in *Methylobacterium extorquens* AM1 [J]. *Microbiology*, 1997, 143: 1729–1736.]
- [17] HIBI Y, ASAI K, ARAFUKA H, et al. Molecular structure of La³⁺-induced methanol dehydrogenase-like protein in *Methylobacterium radiotolerans* [J]. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2010, 111(5): 547–549.]
- [18] NAKAGAWA T, MITSUI R, TANI A, et al. A catalytic role of XoxF1 as La³⁺-dependent methanol dehydrogenase in *Methylobacterium extorquens* strain AM1 [J]. *PLoS ONE*, 2017, 7(11): 50480.]
- [19] 邹琪琪, 齐姗姗, 谢录翰, 等. 细菌单杂交方法在筛选甲基营养菌甲醇脱氢酶启动子结合蛋白中的应用[J]. *浙江农业学报*, 2018, 30(10): 1705–1714. [ZOU Q Q, QI S S, XIE L H, et al. Application of bacterial-one-hybrid system in screening factors interacting with methanol dehydrogenase gene promoter in a methylotrophic bacteria strain [J]. *Acta Agriculturae Zhejiangensis*, 2018, 30(10): 1705–1714.]
- [20] 李森鑫, 熊向华, 汪建华, 等. 甲基营养菌甲醇脱氢酶基因的克隆及表达[J]. *生物技术通讯*, 2010, 21(6): 779–782. [LI M X, XIONG X H, WAGN J H, et al. Cloning and expression of methanol dehydrogenase gene of a *Methylobacterium* bacteria strain [J]. *Lett Biotechnol*, 2010, 21(6): 779–782.]
- [21] 孙晓宇, 薄明井, 杨亚欣, 等. 通过突变甲醇脱氢酶启动子提高甲基营养菌吡咯喹啉醌产量[J]. *生物技术通讯*, 2019, 30(5): 609–613, 692. [SUN X Y, BO M J, YANG Y X, et al. Increasing pyrroloquinoline quinone yield of *Methylovorus* sp. by methanol dehydrogenase promoter mutation [J]. *Letters in Biotechnology*, 2019, 30(5): 609–613, 692.]
- [22] 李大攀, 葛欣, 魏静远, 等. 甲基营养菌 MP688 甲醇脱氢酶基因 mpq1818 的敲除及功能研究[J]. *生物技术通讯*, 2014, 25(5): 632–635. [LI D P, GE X, WEI J Y, et al. Knockout and characterization of mpq1818 gene of *Methylovorus* sp. MP688 [J]. *Letters in Biotechnology*, 2014, 25(5): 632–635.]
- [23] 奥斯博. 精编分子生物学实验指南[M]. 第4版. 北京: 科学出版社, 1998: 25–127, 652. [AUSUBEL F M. Short protocols in molecular biology [M]. 4th ed. Beijing: Science Press, 1998: 25–127, 652.]
- [24] 杨延新, 熊向华, 游松, 等. 3种检测吡咯喹啉醌的方法比较[J]. *生物技术通讯*, 2011, 22(4): 544–547. [YANG Y X, XIONG X H, YOU S, et al. Comparing three kinds of pyrroloquinoline quinone detection methods [J]. *Letters in Biotechnology*, 2011, 22(4): 544–547.]
- [25] 董方, 张惟材, 汪建华, 等. 醌蛋白研究进展[J]. *生物技术通讯*, 2007, 18(1): 132–136. [DONG F, ZHANG W C, WANG J H, et al. Advances in quinoprotein research [J]. *Letters in Biotechnology*, 2007, 18(1): 132–136.]
- [26] NATHAN M G, MATTHIAS F, KEMAL D, et al. Lanthanide-dependent alcohol dehydrogenases require an essential aspartate residue for metal coordination and enzymatic function [J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2020, 295(24): 8272–8284.]
- [27] PAULA R J, TOMASZ K, ROBERT S, et al. Occurrence of XoxF-type methanol dehydrogenases in bacteria inhabiting light lanthanide-rich shale rock [J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2021, 97(2): 259.]
- [28] CHU F, LIDSTROM M E. XoxF acts as the predominant methanol dehydrogenase in the type I *Methanotroph Methylobacterium buryatense* [J]. *Journal of Bacteriology*, 2016, 198(8): 1317–1325.]
- [29] WANG L H, ZHOU Q, LU T H, et al. Molecular and cellular mechanism of the effect of La(III) on horseradish peroxidase [J]. *Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 2010, 15(7): 1063–1069.]
- [30] TANI A, MITSUI R, NAKAGAWA T. Discovery of lanthanide-dependent methylotrophy and screening methods for lanthanide-dependent methylotrophs [J]. *Methods in Enzymology*, 2021, 650: 11–18.]
- [31] 周狄霏, 冯晨曦, 宋书真, 等. 甲基营养菌代谢过程新进展与代谢工程改造[J]. *南京工业大学学报(自然科学版)*, 2022, 44(5): 511–522. [ZHOU D F, FENG C X, SONG S Z, et al. New advances in metabolic process and metabolic engineering in methylotrophs [J]. *Journal of Nanjing Tech University (Natural Science Edition)*, 2022, 44(5): 511–522.]
- [32] CHISTOSERDOVA L. Modularity of methylotrophy, revisited [J]. *Environmental Microbiology*, 2011, 13(10): 2603–2622.]
- [33] 郭妹媛, 吴良煊, 刘香健, 等. 微生物中一碳代谢网络构建的进展与挑战[J]. *合成生物学*, 2022, 3(1): 116–137. [GUO S Y, WU L H, LIU X J, et al. Developing C₁-based metabolic network in methylotrophy for biotransformation [J]. *Synthetic Biology Journal*, 2022, 3(1): 116–137.]