

· 农业生物技术 ·

# 节杆菌 HW08 降解苦马豆素关键基因在乳酸乳球菌中的表达及降解功能分析

滕君洋, 冯玉树, 李勤凡, 王妍\*

西北农林科技大学 动物医学院, 陕西 杨凌 712100

滕君洋, 冯玉树, 李勤凡, 王妍. 节杆菌 HW08 降解苦马豆素关键基因在乳酸乳球菌中的表达及降解功能分析[J]. 生物工程学报, 2024, 40(10): 3666-3676.

TENG Junyang, FENG Yushu, LI Qinfan, WANG Yan. Expression and degradation function analysis of the key genes from *Arthrobacter nitroquajacolicus* HW08 in *Lactococcus lactis* for the degradation of swainsonine[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2024, 40(10): 3666-3676.

**摘要:** 为缓解疯草中毒病对我国畜牧业的不良影响并充分利用潜在牧草资源, 利用生物降解技术对疯草进行处理, 可以去除疯草中的主要毒性成分苦马豆素, 使之作为优质牧草被利用。节杆菌 HW08 被证实对苦马豆素具有稳定高效的降解能力。本研究以被公认为安全的食品级微生物的乳酸乳球菌作为表达载体, 选取节杆菌 HW08 中的 4 个关键降解基因进行表达, 并使用液相色谱法对其降解苦马豆素的能力进行了分析。结果显示, 转化了乙醇脱氢酶 *AIR6C3* 基因的乳酸乳球菌经诱导后, 提取的粗酶液在 30 °C 条件下, 24 h 内能够降解约 323.4 μg 苦马豆素; 转化了谷胱甘肽合酶、酯酶/酰基水解酶、糖基转移酶基因的乳酸乳球菌中提取的粗酶液单独作用时未表现出对于苦马豆素的降解能力, 但混合后在同样条件下能够降解约 140.5 μg 苦马豆素。本研究为苦马豆素降解工程菌的临床推广提供了帮助, 也为动物苦马豆素中毒的防治及疯草的脱毒利用提供了新的研究思路。

**关键词:** 苦马豆素; 生物降解; 节杆菌; 乳酸乳球菌

资助项目: 陕西省科技攻关计划(2019NY-090)

This work was supported by the Key Science and Technology Program of Shaanxi Province (2019NY-090)

\*Corresponding author. E-mail: wangyan11@nwafu.edu.cn

Received: 2023-10-12; Accepted: 2024-06-04

# Expression and degradation function analysis of the key genes from *Arthrobacter nitroquajacolicus* HW08 in *Lactococcus lactis* for the degradation of swainsonine

TENG Junyang, FENG Yushu, LI Qinfan, WANG Yan\*

College of Veterinary Medicine, Northwest A&F University, Yangling 712100, Shaanxi, China

**Abstract:** In order to mitigate the adverse effects of madrassa poisoning disease on our livestock industry and to fully utilize the potential pasture resources, biodegradation of locoweed can remove swainsonine, the major toxic component of locoweed, so that the locoweed can be used as high-quality forage. *Arthrobacter nitroquajacolicus* HW08 can stably and efficiently degrade swainsonine. In this study, *Lactococcus lactis*, as a food-grade microorganism, was used as a vector to express four key degradation genes from *A. nitroquajacolicus* HW08. Subsequently, liquid chromatography was employed to evaluate the swainsonine-degrading performance. The crude enzyme solution extracted from the *L. lactis* strain transformed with the ethanol dehydrogenase gene *AIR6C3* degraded 323.4  $\mu\text{g}$  of swainsonine in 24 h at 30 °C. The crude enzyme solutions from the *L. lactis* strains transformed with the genes encoding glutathione synthase, esterase/acyl hydrolase, and glycosyltransferase did not show any degradation ability for swainsonine when being used alone but degraded about 140.5  $\mu\text{g}$  of swainsonine when being used in mixture. The findings will help the clinical promotion of swainsonine-degrading engineering strains and provide new research ideas for the prevention and treatment of swainsonine poisoning in animals and the detoxification and utilization of locoweed.

**Keywords:** swainsonine; biodegradation; *Arthrobacter*; *Lactococcus lactis*

疯草是一类在世界范围内广泛分布、危害草原畜牧业的重要毒草，能使动物出现精神抑郁、反应迟钝、头部水平震颤、步态蹒跚、后肢麻痹等神经症状，也能导致母畜的生殖机能障碍<sup>[1-2]</sup>，对草地畜牧业的健康发展形成难以忽视的消极影响，至今尚未发现易于推广的防治方法<sup>[3]</sup>。相较于鼠、兔等啮齿类动物，马、牛、羊等畜牧业常见大型家畜对于疯草主要毒性成分——苦马豆素表现出的更高敏感性使之更容易受到疯草中毒病的危害<sup>[4]</sup>。苦马豆素主要通过抑制  $\alpha$ -甘露糖苷酶和甘露糖苷酶II的活性发挥其毒理作用<sup>[5-6]</sup>，能造成甘露糖蓄积，抑制糖

蛋白的合成<sup>[7]</sup>，导致细胞空泡变性，造成中枢神经系统和实质器官的病变。然而，疯草含有多种优质营养物质，可视为一种具有毒性的潜在牧草资源。如果能利用生物降解技术对疯草进行脱毒处理，去除或降低牧草中的苦马豆素，会给草原畜牧业的发展带来巨大的经济效益。

从化学结构来看，苦马豆素具有 3 个直接与碳原子相连的羟基，在有机物分类中属于醇类，被命名为吡啶兹定三醇<sup>[8]</sup>。生物体内的各种酶类可能通过与羟基发生作用而降解苦马豆素。节杆菌 HW08 被证实对苦马豆素具有稳定高效的降解能力，其中的 NADP 依赖性乙醇脱

氢酶 A1R6C3 (GeneBank 登录号:ABM09024.1) 对苦马豆素具有显著降解作用,且能够在大肠杆菌中表达<sup>[9]</sup>,形成对于苦马豆素具有一定降解能力的基因工程大肠杆菌;胡延春等<sup>[10]</sup>对节杆菌 HW08 降解苦马豆素的相关基因进行筛选与表达研究,经 *Bam*H I 不完全酶切构建基因库,推测谷胱甘肽合酶、酯酶/酰基水解酶、糖基转移酶等基因(GeneBank 登录号分别为 HQ132736、HQ132737、HQ132740)也可能在节杆菌 HW08 降解苦马豆素的过程中发挥作用。

然而,节杆菌 HW08 及基因工程大肠杆菌由于其自身特性,不适合直接应用于疯草的脱毒处理,所以无法将野生菌株或重组菌表达产物直接用于动物苦马豆素中毒的预防和治疗。而乳酸乳球菌是乳酸菌的代表菌种之一,被公认为安全的食品级微生物<sup>[11]</sup>,其表达外源蛋白具有无内毒素、安全性好等优点<sup>[12]</sup>,其表达产物不经纯化便可直接服用,具有广泛的应用潜力。

本研究选用上文提到的 4 个节杆菌 HW08 中的关键降解基因,以乳酸乳球菌为表达载体,研究每段基因对苦马豆素的降解能力,构建具有苦马豆素降解能力的食品级工程菌。本研究构建的工程菌在动物疯草中毒的临床防治以及疯草的脱毒利用方面具有广泛的应用前景。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌种来源

节杆菌 HW08 由本实验室分离鉴定。乳酸乳球菌 NZ9000 及配套的质粒 pNZ-8048 购自武汉森灵生物科技有限公司。大肠杆菌 MC1061 购自上海唯地生物技术有限公司。

### 1.2 主要试剂

PCR 高保真酶 Ape×HF HS DNA Polymerase FS Master Mix 购自湖南艾科瑞生物科技有限公司;限制性核酸内切酶 *Nco* I 和 *Xba* I、核酸

Marker、蛋白 Marker 购自宝日生物技术(北京)有限公司;ClonExpress<sup>®</sup>II 一步法克隆酶(同源重组试剂盒)购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司;诱导剂乳酸链球菌素购自北京索莱宝科技有限公司;DNA 凝胶回收试剂盒、质粒提取试剂盒购自上海生工生物技术有限公司;DNA 提取试剂盒购自北京天根生化科技有限公司;无机盐培养液(minimal medium, MM)干粉购自北京百奥莱博科技有限公司;其他实验室常用试剂均为国产分析纯。

### 1.3 目的基因的获取

取节杆菌 HW08 于 LB 固体培养基上划线培养,30 °C 恒温培养 12–16 h,挑取纯菌落接种于 LB 液体培养基,200 r/min、30 °C 摇床培养 12–16 h;使用细菌基因组 DNA 提取试剂盒,严格按说明书操作提取节杆菌 HW08 全基因组 DNA,置于–20 °C 备用。以 HW08 菌全基因组 DNA 为模板,使用表 1 中引物 AF/AR、GF/GR、TF/TR、HF/HR,分别对 *SWDR-A*、*SWDR-G*、*SWDR-T*、*SWDR-H* 基因进行 PCR 扩增,1%琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 扩增产物,回收目的基因。

### 1.4 重组质粒的构建

取含有质粒 pNZ-8048 的大肠杆菌在 LB 固体培养基上划线接种,将纯菌落接种至 LB 液体培养基中,37 °C、200 r/min 培养 12–16 h,用质粒提取试剂盒提取 pNZ-8048 DNA。电泳检测质粒 pNZ-8048 的大小,回收目的片段。以两组限制性核酸内切酶 *Nco* I/*Xba* I 对质粒 pNZ-8048 进行双酶切;使用一步同源重组法连接环状质粒与目的基因,然后用热激法将重组质粒转化到大肠杆菌 MC1061 感受态细胞中;将转化产物涂布于含有 10 μg/mL 氯霉素的 LB 固体培养基上培养过夜;挑取单菌落接种于 5 mL 含有 10 μg/mL 氯霉素的 LB 液体培养基中,37 °C、200 r/min 摇床培养 8–12 h,提取质粒经

表 1 本研究所用引物

Table 1 Primers used in this study

Primer name	Sequence (5'→3')
AF	GAGGCACTC <u>ACCATGGG</u> TCTACCGCTAATGCTT
AR	GAAAGCTTGAGCTC <u>TCTAGAT</u> CAGTGATGGT GATGGTGATGCTAGCCGATAGTGGAGACGT
GF	GAGGCACTC <u>ACCATGGG</u> TGTGTGCGTCGACTGCC
GR	GAAAGCTTGAGCTC <u>TCTAGAT</u> CAGTGATGGT GATGGTGATGTAGTGCAGCTCCGTAGGAA
TF	GAGGCACTC <u>ACCATGGG</u> TATGCTCGAAGCCCATTC
TR	GAAAGCTTGAGCTC <u>TCTAGAT</u> CAGTGATGGT GATGGTGATGGACGCGGATTGCAT
HF	GAGGCACTC <u>ACCATGGG</u> TATGGTTCCATTCTTGCAG
HR	GAAAGCTTGAGCTC <u>TCTAGAT</u> CAGTGATGGT GATGGTGATGGCGCCGCGGAAGC

The solid underline is the *Nco* I digest site, in which the ATG sequence will be involved in the translation process as the start codon; the 5' end of the *Nco* I digest site is upstream of the pNZ-8048 upstream homology arm sequence, and the 3' end is downstream of the target gene upstream primer; the dashed underline is the *Xba* I digest site, whose 5' upstream of the 5' end is the sequence of the homology arm downstream of pNZ-8048, and downstream of the 3' end is the stop codon 6×His tag, and the primer downstream of the target gene, in order.

琼脂糖凝胶电泳验证插入片段大小, 使用 *Nco* I 和 *Xba* I 酶切位点双酶切验证连接成功, 送至上海生工生物科技有限公司测序。回收重组质粒, 分别将其命名为 pNZ8048-SWDR-A、pNZ8048-SWDR-G、pNZ8048-SWDR-T、pNZ8048-SWDR-H。

取含有质粒 pNZ-8048 的大肠杆菌在 LB 固体培养基上划线接种, 将纯菌落接种至 LB 液体培养基中, 37 °C、200 r/min 培养 12–16 h, 用质粒提取试剂盒提取 pNZ-8048 质粒。电泳检测质粒 pNZ-8048 大小, 回收目的片段。以两组限制性核酸内切酶 *Nco* I/*Xba* I 对质粒 pNZ-8048 进行双酶切; 使用一步同源重组法连接环状质粒与目的基因, 然后用热激法将重组质粒转化到大肠杆菌 MC1061 感受态细胞中; 将转化产物涂布于含有 10 μg/mL 氯霉素的 LB 固体培养基上培养过夜; 挑取单菌落接种于 5 mL 含有 10 μg/mL 氯霉素的 LB 液体培养基中, 37 °C、200 r/min 摇床培养 8–12 h, 提取质粒经琼脂糖凝胶电泳验证插入片段大小, 使用 *Nco*I 和 *Xba*I 酶切位点双酶切验证连接成功, 送至上海生工生

物科技有限公司测序。回收重组质粒, 分别将其命名为 pNZ8048-SWDR-A、pNZ8048-SWDR-G、pNZ8048-SWDR-T、pNZ8048-SWDR-H。

### 1.5 重组质粒的转化

将乳酸乳球菌 NZ9000 单菌落接种至 GM17 培养液中过夜培养, 次日按 1:10 比例接种至新鲜 GM17 中, 培养至  $OD_{600}$  为 0.3 时, 按照参考文献[13]的方法制备感受态。使用 0.2 cm 规格电击杯, 在 2.5 kV、400 Ω、25 μF 条件下将重组质粒 pNZ8048-SWDR-A、pNZ8048-SWDR-G、pNZ8048-SWDR-T、pNZ8048-SWDR-H 用电击法转化到 NZ9000 感受态细胞中。从鉴定正确的转化子中提取重组质粒, 以相关限制酶酶切和电泳的方法检测转化结果。样品送至上海生工生物科技有限公司测序, 与目的基因序列进行比对。成功转入重组质粒的乳酸乳球菌 NZ9000 为阳性转化子, 命名为重组菌 NZ9000/pNZ8048-SWDR-A、NZ9000/pNZ8048-SWDR-G、NZ9000/pNZ8048-SWDR-T、NZ9000/pNZ8048-SWDR-H, 并设置转化空质粒的阴性对照菌, 将

其命名为 NZ9000/pNZ8048。挑取冷冻保存的重组质粒转化菌 NZ9000/pNZ8048-SWDR-A、NZ9000/pNZ8048-SWDR-G、NZ9000/pNZ8048-SWDR-T、NZ9000/pNZ8048-SWDR-H，分别接种于液体 GM17 培养基中培养过夜；次日将转化子重组菌以 1:50 接种于新鲜 GM17 培养液，每隔 2 h 记录其  $OD_{600}$  值。设置 NZ9000/pNZ8048 作为对照。每次检测设置 3 组平行对照，根据结果绘制转化子的生长曲线。

### 1.6 蛋白诱导表达

精密称取乳酸链球菌素，溶解于 0.05% 乙酸钠溶液中，室温下溶解 10 min，过滤除菌收集上清，得到最终浓度为 1 mg/mL 的乳酸链球菌素储存液， $-20^{\circ}\text{C}$  保存，使用时用 ddH<sub>2</sub>O 将储存液稀释至 10 ng/ $\mu\text{L}$ 。取转化子接种至新鲜液体 GM17 培养基，生长至对数生长期时，加入乳酸链球菌素使其终浓度为 20 ng/mL、40 ng/mL、60 ng/mL， $30^{\circ}\text{C}$  诱导 3 h。分别取诱导重组菌液、诱导空载体菌液各 5 mL，离心收集菌体，使用 5 mL PBS 缓冲液重悬并使用超声破碎仪进行菌体破碎，离心收集上清，进行 12% SDS-PAGE 蛋白电泳检测。随后使用 Anti-6 $\times$ His 兔源多克隆抗体为一抗(1:3 000)，以辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔 IgG 为二抗(1:3 000)进行 Western blotting 检测。设置 NZ9000/pNZ8048 空载体菌为阴性对照。

### 1.7 HPLC-ELSD 法定量分析苦马豆素

以 MM 培养液为溶剂，精准配置 1 g/L 的苦马豆素浓缩液，过滤除菌，用 MM 培养液稀释为质量浓度 50–1 000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的系列标准工作曲线溶液，置于  $4^{\circ}\text{C}$  冷藏储存备用；设置流动相 A 液有机相为乙腈，B 液水相为 5 mmol/L 的乙酸铵溶液，并向流动相中添加改性剂 0.02% (体积比)氨水溶液。使用岛津 LC-2030 PLUS 液相色谱仪，Waters X-Bridge HILIC 色谱柱(150 mm $\times$

4.6 mm, 3.5  $\mu\text{m}$ )，设置 A 液与 B 液体积比为 1:1 等度洗脱，总流速 0.5 mL/min，柱温为  $38^{\circ}\text{C}$ 。Essentia ELSD-16 蒸发光检测器设置气体流速 1.00 L/min，漂移管温度为  $55^{\circ}\text{C}$ ，增益值 150。使用 LC-MS 法定性分析苦马豆素色谱峰，并记录其出峰时间。将不同浓度的苦马豆素标准溶液按浓度梯度从低到高进行进样检测，每次进样 20  $\mu\text{L}$ ，每个样品设置 3 次重复，记录苦马豆素色谱峰出峰时间及平均峰面积。以标准样浓度( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )的对数为  $X$ ，以峰面积的对数为  $Y$  作标准曲线。

### 1.8 重组质粒载体菌降解苦马豆素能力测定

取每种重组质粒转化菌诱导后菌液各 1 mL，离心收集菌体，加入等体积 Tris 缓冲液后超声破碎获得粗酶液。以牛血清白蛋白为标准样，使用考马斯亮蓝(Bardford)法进行蛋白质定量分析。设置节杆菌 HW08 菌体细胞为阳性对照，NZ9000/pNZ8048 空质粒转化菌作为空白对照组。使用单体粗酶液进行苦马豆素降解能力试验。降解体系为：粗酶液 1 mL，苦马豆素 1 000  $\mu\text{g}$ ， $30^{\circ}\text{C}$  水浴 24 h，离心收集上清。使用 HPLC-ELSD 方法检测反应前后苦马豆素浓度，分析各组对苦马豆素的降解能力。每组实验设置 3 组平行对照。随后进行混合酶液降解能力分析；对 SWDR-G、SWDR-T、SWDR-H 表达产物粗酶液进行混合降解实验：等体积混合 3 种粗酶液，取混合酶液 1 mL，加入苦马豆素 1 000  $\mu\text{g}$ ，检测条件同上。

## 2 结果与分析

### 2.1 目的基因提取与质粒重组结果

以 HW08 菌总 DNA 为模板进行目的基因 PCR 扩增，分别获得 1 062、1 224、1 512、933 bp 特异性扩增条带，符合预期目标条带长度；使用同源重组法分别将 4 个基因与载体质粒

pNZ-8048 相连接, 并将重组质粒转化至大肠杆菌 MC1061 感受态; 提取重组质粒, 使用限制性内切酶 *Nco* I 和 *Xba* I 双酶切, 得到长度与预期相符的条带(图 1); 以重组质粒为模板的 PCR 测序结果经 Blast 比对, 其序列和目的基因重合度均高于 98%, 表明重组质粒构建成功。

## 2.2 重组质粒转化结果

从大肠杆菌 MC1061 中提取重组质粒, 电转化至乳酸乳球菌 NZ9000 中; 从电转化后的乳酸乳球菌 NZ9000 中提取得到重组质粒, 经双酶切与 PCR 测序验证为上一步获得的重组质粒, 判定重组质粒已成功转化至乳酸乳球菌 NZ9000 中。重组质粒转化菌生长曲线测定结果见图 2, 转化子在接种后 3 h 开始进入对数生长期, 5 h 后进入平台期, 在 4 h 时生长速度最快, 此时  $OD_{600}$  值约为 0.5。拟在此期间加入诱导剂乳酸链球菌素进行诱导。

## 2.3 重组质粒转化菌的诱导表达结果

在重组质粒载体菌接种后 4 h 加入不同浓度的诱导剂, 观察基因表达结果。菌体经超声破碎后进行 SDS-PAGE 电泳, 发现经 40 ng/mL

乳酸链球菌素诱导后, 目的蛋白在重组质粒转化菌中获得了较高浓度的表达(图 3); 经 Western blotting 对 6×His 标签进行特异性抗性筛选后, 分别在约 38.8、44.7、55.3、34.1 kDa 处得到对应长度的条带, 判定 4 条目的基因均已成功在重组质粒转化菌中表达(图 4)。

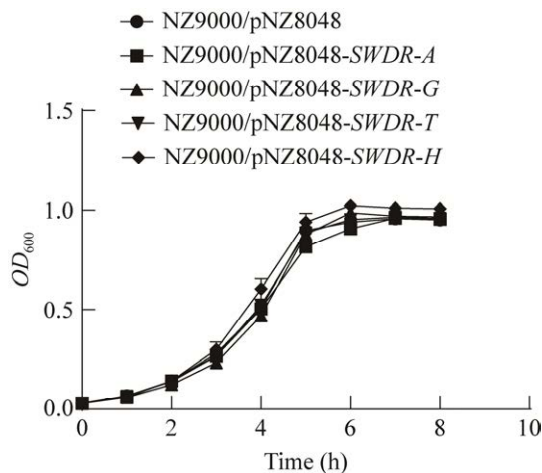


图 2 重组质粒转化菌生长曲线

Figure 2 Growth curves of bacteria that have transformed the recombinant plasmid.

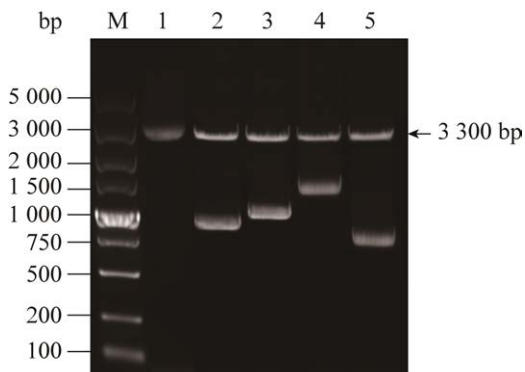


图 1 重组质粒的双酶切鉴定

Figure 1 Double digestion validation results of recombinant plasmid. M: DNA marker; 1-5: electrophoresis results of empty plasmid and recombinant plasmid NZ8048-SWDR-A, pNZ8048-SWDR-G, pNZ8048-SWDR-T and pNZ8048-SWDR-H after double enzyme digestion.

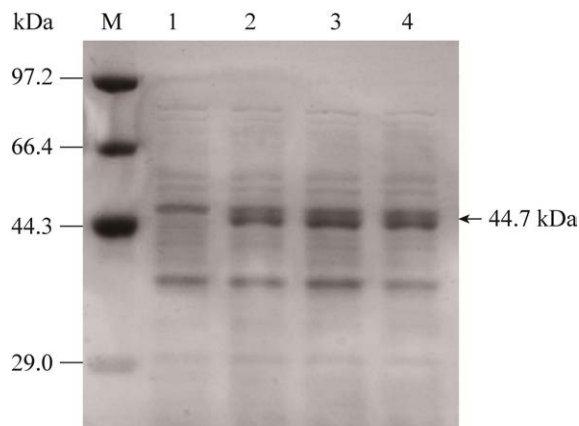


图 3 不同浓度乳酸链球菌素诱导后目的蛋白表达结果

Figure 3 Results of target protein expression after induction by different concentrations of nisin. M: marker; 1-4: recombinant plasmid transformants NZ9000/PNZ8048-SWDR-G protein expression results after induction with no inducer, 20 ng/mL, 40 ng/mL and 60 ng/mL nisin, respectively.

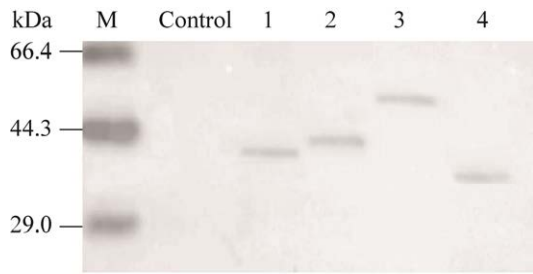


图4 目的蛋白免疫印迹结果

Figure 4 Western blotting results of target proteins. M: Marker; Control: plasmid transformants NZ9000/PNZ8048 protein expression results after induction; 1-4: recombinant plasmid transformants NZ9000/PNZ8048-SWDR-A, NZ9000/PNZ8048-SWDR-G, NZ9000/PNZ8048-SWDR-T, NZ9000/PNZ8048-SWDR-H protein expression results after induction, respectively.

## 2.4 HPLC-ELSD 检测苦马豆素标准曲线

使用岛津 LC-2030 PLUS 液相色谱仪对苦马豆素标准样溶液进行检测, Essentia ELSD-16 蒸发光检测器可于 3.37 min 左右检测到液相色谱峰, 经 LC-MS 分析, 判定为苦马豆素峰(图 5); 记录苦马豆素色谱峰峰面积, 以标准样浓度的对数为  $X$ , 以峰面积的对数为  $Y$  作标准曲线图(图 6), 经 SPSS 软件进行线性拟合, 得到回归直线  $Y=0.8217X+3.484$ , 决定系数  $R^2=0.9914$ , 判定在 50-1 000  $\mu\text{g/mL}$  范围内, 苦马豆素浓度与峰面积呈良好的线性相关性。结合信噪比分析, 确定本方法的检出限为 4  $\mu\text{g/mL}$  ( $S/N=3$ ), 定量限为 20  $\mu\text{g/mL}$  ( $S/N=10$ )。

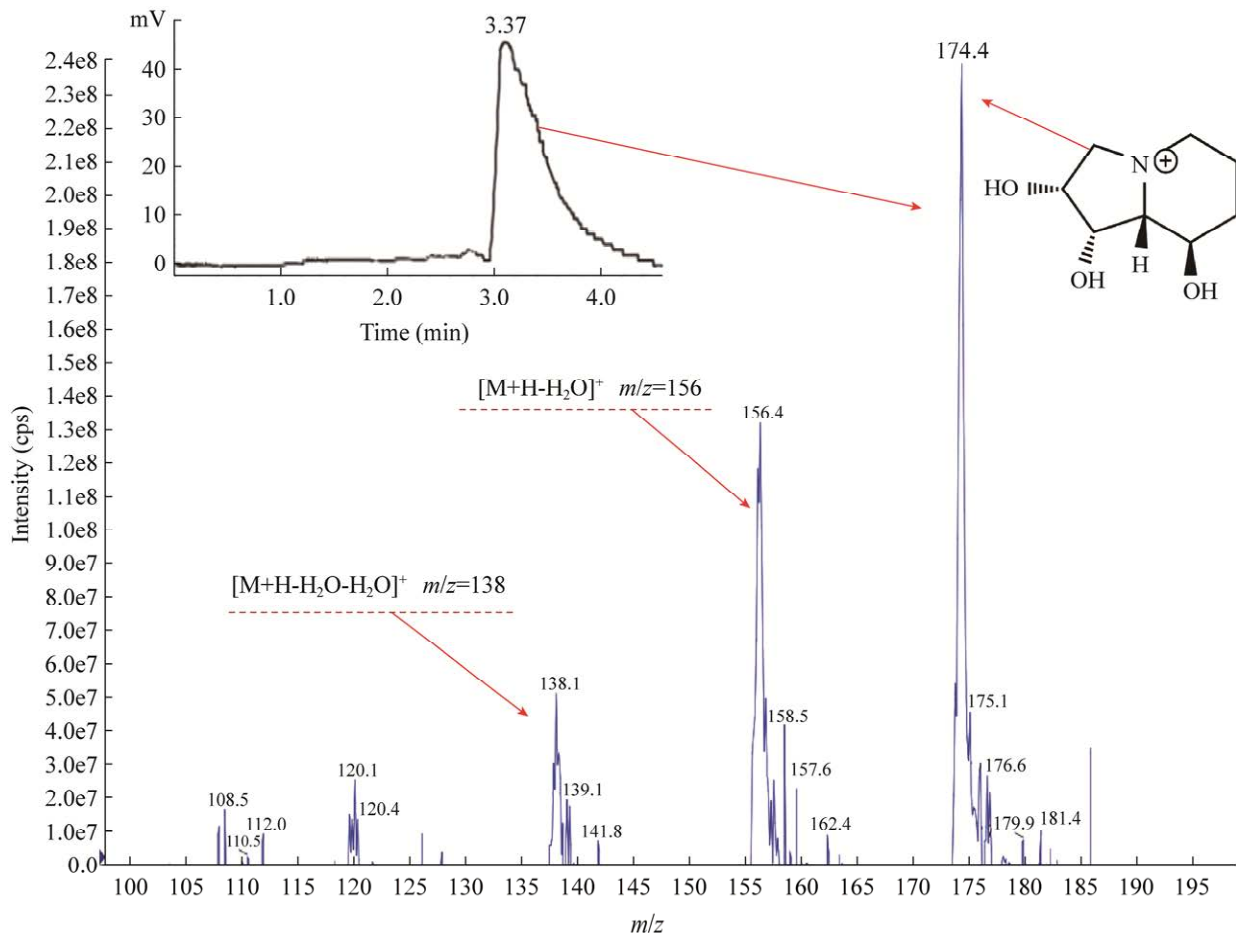


图5 苦马豆素标准样二级质谱图

Figure 5 Secondary mass spectra of swainsonine standards.

## 2.5 粗酶液对苦马豆素降解能力分析结果

未纯化的粗酶液经 Bardford 法测定, 蛋白浓度约为 400  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (含细胞碎片), HPLC-ELSD 分析粗酶液对苦马豆素的降解结果显示, 阳性对照节杆菌 HW08 休止细胞在 30  $^{\circ}\text{C}$  条件下, 24 h 能够降解全部 1 000  $\mu\text{g}$  苦马豆素; 在同样的条件下, 从 NZ9000/PNZ8048-SWDR-A 重组质粒转化菌中提取的粗酶液降解约 323.4  $\mu\text{g}$  苦

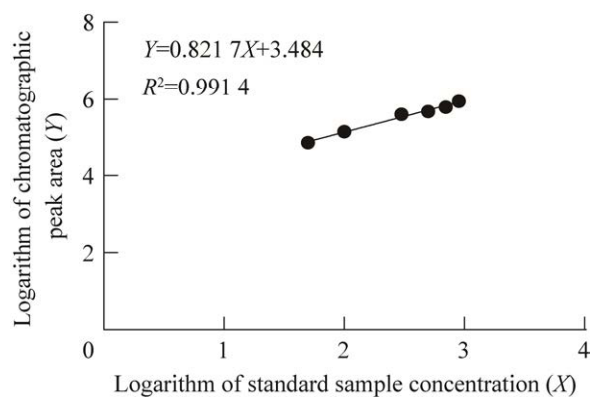


图 6 色谱峰面积对数与苦马豆素标准样浓度对数线性关系

Figure 6 Linearity of logarithm of swainsonine concentration and logarithm of HPLC peak area.

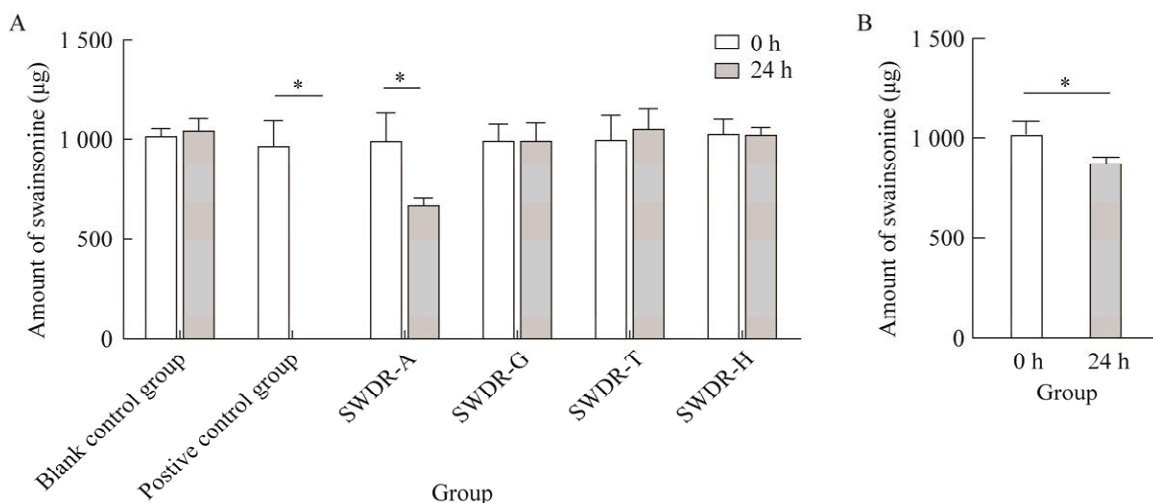


图 7 粗酶液对苦马豆素的降解能力

Figure 7 Degradation of swainsonine by several crude enzyme solutions. A: Degradation ability of various crude enzyme solutions to coumarin. B: Degradation ability of mixed crude enzyme solution to coumarin. \* indicates  $P < 0.05$ .

马豆素; 其他 3 种粗酶液及空载体转化菌空白对照对苦马豆素未表现显著的降解能力(图 7A)。

对 3 种无明显降解能力的粗酶液进行混合降解试验结果显示, 3 种粗酶液混合后, 在相同条件下降解苦马豆素约为 140.5  $\mu\text{g}$  (图 7B)。

## 3 讨论

本研究利用蒸发光检测器对苦马豆素的响应原理, 使用 HPLC-ELSD 方法分析了基因重组乳酸乳球菌以及节杆菌 HW08 降解苦马豆素的能力<sup>[14]</sup>。结果发现, 提取自重组质粒转化菌 NZ9000/PNZ8048-SWDR-A 的 1 mL 单粗酶液(蛋白浓度约为 400  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )在 24 h 内降解约 323.4  $\mu\text{g}$  苦马豆素, 阴性对照的空质粒转化菌中提取的粗酶液未表现出对苦马豆素的降解能力。SWDR-A 编码的乙醇脱氢酶(GenBank 登录号: ABM09024.1)是一种在醇类代谢途径中起重要作用的脱氢还原酶, 在人和动物的肝脏、植物和微生物中大量存在, 能催化反应: 短链醇+NADP $^{+}$  $\rightarrow$ 醛+NADPH+H<sup>[15]</sup>。研究发



现, 乙醇脱氢酶具有降解多种化合物的能力, 如真氧产碱杆菌中依赖醌的乙醇脱氢酶可降解四氢糠醇<sup>[16]</sup>; 小鼠肝脏中的乙醇脱氢酶能将视黄醇氧化为视黄酸<sup>[17]</sup>。本课题组曾将乙醇脱氢酶 *AIR6C3* 基因 *AAur-2040* 导入大肠杆菌, 重组大肠杆菌获得了对苦马豆素的降解能力, 与本试验结果一致, 证明来自节杆菌 HW08 的依赖 NADP 的乙醇脱氢酶对苦马豆素具有一定的降解能力, 但其降解能力远低于阳性对照节杆菌 HW08 的 100%<sup>[9]</sup>。该结果提示, 在节杆菌 HW08 中, 乙醇脱氢酶并不作为降解苦马豆素的唯一功能酶。降解反应下游可能存在其他降解相关功能因子, 将乙醇脱氢酶代谢产物进行进一步分解, 促进苦马豆素降解过程的完整进行。

本研究还发现, 提取自重组质粒转化菌 NZ9000/PNZ8048-*SWDR-G*、NZ9000/PNZ8048-*SWDR-T*、NZ9000/PNZ8048-*SWDR-H* 且未纯化(含细胞碎片)的粗酶液对苦马豆素未表现出降解能力, 但 3 种未纯化粗酶液混合后的酶液 1 mL (蛋白浓度约为 400  $\mu\text{g/mL}$ ) 在 24 h 内能够降解约 140.5  $\mu\text{g}$  苦马豆素。对以上 3 段基因进行酶与非酶检测结果显示, *SWDR-G* 编码蛋白属于谷胱甘肽合酶, 可催化精脒与谷胱甘肽羧化物之间的酰胺键的形成<sup>[18]</sup>; *SWDR-T* 编码蛋白与血杆菌属(*Sanguibacter keddieii*) DSM 10542 的糖基转移酶(glycosyltransferase, GenBank 登录号: ACZ20833.1) 同源性为 47%, 该酶可催化葡萄糖从尿苷二磷酸葡萄糖转移至脱氧萎镰菌醇第 3 位碳的羟基, 起到镰刀菌属毒素脱氧萎镰菌醇的脱毒作用<sup>[19]</sup>; *SWDR-H* 表达产物可能以脂酶/酰基水解酶双功能酶的功能发挥作用<sup>[20]</sup>。该结果提示这 3 种基因表达产物可能以在整个代谢过程中的不同步骤分别参与了节杆菌 HW08 降解苦马豆素的过程, 共同作用下产生了一定

的降解能力, 此代谢过程中应还存在其他酶催化的关键降解步骤, 限制了整个代谢过程的反应速率。值得一提的是, *SWDR-T* 表达产物与乙醇脱氢酶均可能以羟基作为主要作用位点, 提示二者可能通过不同的代谢路径参与苦马豆素的降解, 即节杆菌 HW08 对于苦马豆素的降解路径不止一条。后续仍需通过进一步的生物化学手段确定节杆菌 HW08 的中间以及最终代谢产物, 以推测完整的降解代谢流程及其网络, 发掘其他可能发挥作用的功能基因。

本研究获得了对于苦马豆素具有降解能力的乳酸乳球工程菌。动物种属不同其毒性表现存在差异, 其中马、牛、羊等畜牧业常见大型家畜对苦马豆素敏感性远高于家兔、大鼠等啮齿类动物<sup>[5]</sup>。Steglmeier 等<sup>[21]</sup>通过每天给绵羊以 1.00 mg/kg 体重的剂量进行苦马豆素染毒, 成功使其出现疯草中毒症状, 证明苦马豆素具有蓄积毒性。如能利用生物技术等手段将其摄入饲草中的苦马豆素含量降低, 将会大大降低家畜疯草中毒的风险。以往研究中发现的苦马豆素降解野生菌株或基因工程大肠杆菌虽然对苦马豆素有一定的降解能力, 但因野生菌株和重组宿主菌自身的生理特性, 不适合直接应用于动物的苦马豆素中毒防治及疯草的脱毒利用。本研究进行的降解实验均在适宜乳酸乳球菌生长的 30  $^{\circ}\text{C}$  条件下进行, 为后续苦马豆素降解菌株的临床应用提供可行性, 且本研究构建的苦马豆素降解乳酸乳球工程菌, 其载体菌株及诱导剂均为食品级, 其代谢及诱导表达产物中均不含毒性成分。本研究可为降解菌和重组菌的临床推广提供帮助, 也为动物苦马豆素中毒的防治及疯草的脱毒利用奠定基础。但本研究所使用质粒 PNZ8048 仍具有氯霉素耐药基因, 若要将工程菌投入实际生产, 仍需要进一步的试验研究。

## 4 结论

本研究将 4 个节杆菌 HW08 降解苦马豆素相关基因在食品级表达载体乳酸乳球菌 NZ9000 中进行表达, 获得了对于苦马豆素具有降解能力的乳酸菌。实验结果表明来自节杆菌 HW08 的依赖 NADP 的乙醇脱氢酶对苦马豆素具有降解能力, 节杆菌 HW08 中编码谷胱甘肽合酶、酯酶/酰基水解酶、糖基转移酶的 3 段基因单独表达无法降解苦马豆素, 但所提取的粗酶液混合后对苦马豆素有一定的降解作用。综上, 本研究成功构建了对于苦马豆素具有降解能力的乳酸乳球工程菌。

## 致谢

感谢西北农林科技大学动物医学院、西北农林科技大学公共实验平台在本研究中提供的技术支持。

## REFERENCES

- [1] MICHELOUD JF, MARIN R, COLQUE-CARO LA, MARTÍNEZ OG, GARDNER D, GIMENO EJ. Swainsonine-induced lysosomal storage disease in goats caused by the ingestion of *Sida rodrigo* Monteiro in north-western Argentina[J]. *Toxicon: Official Journal of the International Society on Toxinology*, 2017, 128: 1-4.
- [2] 孙一丹. 苦马豆素对母畜繁殖机能的影响及防控[J]. *中国兽医学报*, 2022, 42(2): 370-375.  
SUN YD. Effects and prevention of swainsonine on reproductive function of female livestock[J]. *Chinese Journal of Veterinary Science*, 2022, 42(2): 370-375 (in Chinese).
- [3] 郭蓉, 郭亚洲, 王帅, 杨晨, 苏永霞, 吴晨晨, 路浩, 赵宝玉. 中国天然草地有毒植物及其放牧家畜中毒病研究进展[J]. *畜牧兽医学报*, 2021, 52(5): 1171-1185.  
GUO R, GUO YZ, WANG S, YANG C, SU YX, WU CC, LU H, ZHAO BY. Advances in research on poisonous plants and grazing livestock poisoning diseases of natural grassland in China[J]. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 2021, 52(5): 1171-1185 (in Chinese).
- [4] 黄睿杰, 马永嘉, 赵世姣, 王帅, 吴晨晨, 路浩, 赵宝玉. 苦马豆素历史、来源及生物活性研究进展[J]. *中国兽医学报*, 2022, 42(11): 2326-2336.  
HUANG RJ, MA YJ, ZHAO SJ, WANG S, WU CC, LU H, ZHAO BY. Review on history, source and bioactivity of swainsonine[J]. *Chinese Journal of Veterinary Science*, 2022, 42(11): 2326-2336 (in Chinese).
- [5] 赵一字, 吴莹, 赵影, 赖毕, 李勤凡. 山羊溶酶体  $\alpha$ -甘露糖苷酶不同结构域片段的制备及酶活性的鉴定[J]. *中国兽医学报*, 2022, 42(12): 2495-2499.  
ZHAO YY, WU Y, ZHAO Y, LAI B, LI QF. Expression and characterization of different domain fragments from *Capra hircus* lysosomal  $\alpha$ -mannosidase[J]. *Chinese Journal of Veterinary Science*, 2022, 42(12): 2495-2499 (in Chinese).
- [6] GRUM DS, COOK D, BAUCOM D, MOTT IW, GARDNER DR, CREAMER R, ALLEN JG. Production of the alkaloid swainsonine by a fungal endophyte in the host *Swainsona canescens*[J]. *Journal of Natural Products*, 2013, 76(10): 1984-1988.
- [7] MOLYNEUX RJ, McKENZIE RA, O'SULLIVAN BM, ELBEIN AD. Identification of the glycosidase inhibitors swainsonine and calystegine B2 in Weir vine (*Ipomoea* sp. Q6[aff. calobra]) and correlation with toxicity[J]. *Journal of Natural Products*, 1995, 58(6): 878-886.
- [8] TAN XM, CHEN AJ, WU B, ZHANG GS, DING G. Advance of swainsonine biosynthesis[J]. *Chinese Chemical Letters*, 2018, 29(3): 417-422.
- [9] WANG Y, ZHAI A, ZHANG Y, QIU K, WANG J, LI Q. Degradation of swainsonine by the NADP-dependent alcohol dehydrogenase A1R6C3 in *Arthrobater* sp. HW08[J]. *Toxins (Basel)*, 2016, 8(5): 145.
- [10] 胡延春, 王妍, 杨国栋, 王建华. 节杆菌 HW08 降解 SW 相关基因的筛选与鉴定[C]//中国畜牧兽医学学会 2010 年学术年会: 第二届中国兽医临床大会论文集(下册). 长春, 2010: 642-646.
- [11] AUBRY C, MICHON C, CHAIN F, CHVATCHENKO Y, GOFFIN L, ZIMMERLI SC, LEGUIN S, LANGELLA P, BERMUDEZ-HUMARAN L, CHATEL JM. Protective

- effect of TSLP delivered at the gut mucosa level by recombinant lactic acid bacteria in DSS-induced colitis mouse model[J]. *Microbial Cell Factories*, 2015, 14(1): 176.
- [12] ACUÑA L, CORBALÁN N, QUINTELA-BALUJA M, BARROS-VELÁZQUEZ J, BELLOMIO A. Expression of the hybrid bacteriocin Ent35-MccV in *Lactococcus lactis* and its use for controlling *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* in milk[J]. *International Dairy Journal*, 2020, 104: 104650.
- [13] 韦云莹, 王立峰, 熊智强, 王世杰, 赵林森, 艾连中. 响应面法优化乳酸乳球菌电转化效率研究[J]. *上海理工大学学报*, 2018, 40(6): 566-571.  
WEI YY, WANG LF, XIONG ZQ, WANG SJ, ZHAO LS, AI LZ. Optimization of electroporation efficiency of *Lactococcus lactis* using response surface methodology[J]. *Journal of University of Shanghai for Science and Technology*, 2018, 40(6): 566-571 (in Chinese).
- [14] MOLYNEUX RJ, GARDNER DR, JAMES LF, COLEGATE SM. Polyhydroxy alkaloids: chromatographic analysis[J]. *Journal of Chromatography A*, 2002, 967(1): 57-74.
- [15] LEITSCH D, WILLIAMS CF, LLOYD D, DUCHÊNE M. Unexpected properties of NADP-dependent secondary alcohol dehydrogenase (ADH-1) in *Trichomonas vaginalis* and other microaerophilic parasites[J]. *Experimental Parasitology*, 2013, 134(3): 374-380.
- [16] ZARNT G, SCHRÄDER T, ANDREESEN JR. Degradation of tetrahydrofurfuryl alcohol by *Ralstonia eutropha* is initiated by an inducible pyrroloquinoline quinone-dependent alcohol dehydrogenase[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1997, 63(12): 4891-4898.
- [17] MOLOTKOV A, GHYSELINCK NB, CHAMBON P, DUESTER G. Opposing actions of cellular retinol-binding protein and alcohol dehydrogenase control the balance between retinol storage and degradation[J]. *The Biochemical Journal*, 2004, 383(Pt 2): 295-302.
- [18] PAI CH, CHIANG BY, KO TP, CHOU CC, CHONG CM, YEN FJ, CHEN SJ, COWARD JK, WANG AHJ, LIN CH. Dual binding sites for translocation catalysis by *Escherichia coli* glutathionylspermidine synthetase[J]. *The EMBO Journal*, 2006, 25(24): 5970-5982.
- [19] POPPENBERGER B, BERTHILLER F, LUCYSHYN D, SIEBERER T, SCHUHMACHER R, KRŠKA R, KUHLER K, GLÖSSL J, LUSCHNIG C, ADAM G. Detoxification of the *Fusarium* mycotoxin deoxynivalenol by a UDP-glucosyltransferase from *Arabidopsis thaliana*[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2003, 278(48): 47905-47914.
- [20] REINA JJ, GUERRERO C, HEREDIA A. Isolation, characterization, and localization of AgaSGNH cDNA: a new SGNH-motif plant hydrolase specific to *Agave americana* L. leaf epidermis[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2007, 58(11): 2717-2731.
- [21] STEGELMEIER BL, JAMES LF, PANTER KE, MOLYNEUX RJ. Serum swainsonine concentration and alpha-mannosidase activity in cattle and sheep ingesting *Oxytropis sericea* and *Astragalus lentiginosus* (locoweeds)[J]. *American Journal of Veterinary Research*, 1995, 56(2): 149-154.

(本文责编 郝丽芳)