

嗜热链球菌 m6A 甲基化差异研究

王丹, 孙志宏, 赵洁*

(内蒙古农业大学 乳品生物技术与工程教育部重点实验室 农业农村部乳制品加工重点实验室 内蒙古自治区乳品生物技术与工程重点实验室 乳酸菌与发酵乳制品省部共建协同创新中心 呼和浩特 010018)

摘要 嗜热链球菌是乳制品工业生产中最为重要的发酵剂之一,具有良好的发酵特性。DNA 甲基化是 DNA 化学修饰的一种形式,可在不改变 DNA 序列的前提下影响基因表达。本文选取 2 株产酸表型具有较大差异的嗜热链球菌为研究对象,通过甲基化组学探究 m6A 甲基化与遗传表型的关系。利用 PacBio SMRT 测序平台对嗜热链球菌 IMAU80278 与嗜热链球菌 IMAU20416 进行基因组测序及 m6A 甲基化测定,比较 2 株嗜热链球菌功能基因及 m6A 甲基化差异。结果表明,嗜热链球菌 IMAU80278 与嗜热链球菌 IMAU20416 基因组相似,且功能基因均以碳水化合物代谢及氨基酸代谢为主。嗜热链球菌 IMAU80278 与嗜热链球菌 IMAU20416 限制修饰系统, m6A 甲基化位点和 m6A 基序均存在显著差异,特别是在碳水化合物代谢及氨基酸代谢相关功能基因的 m6A 甲基化存在明显差异。推测 m6A 甲基化的差异可能导致嗜热链球菌 IMAU80278 与嗜热链球菌 IMAU20416 产酸表型的不同。此外,从表观遗传学角度探究嗜热链球菌 DNA 甲基化对发酵特性的影响,为优良发酵剂的筛选及利用奠定理论基础。

关键词 嗜热链球菌; m6A 甲基化; 限制修饰系统

文章编号 1009-7848(2023)12-0001-11 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2023.12.001

嗜热链球菌(*Streptococcus thermophilus*)是一种兼性厌氧的革兰氏阳性细菌,无芽孢、无鞭毛,无运动性,菌落形态为圆形或椭圆形,以对或链状排列,且最适生长条件为 38~40℃,pH 值 6.0~7.0^[1]。嗜热链球菌是最有价值的同型发酵乳酸菌之一,可以代谢碳水化合物产生大量乳酸,被作为发酵剂广泛应用于酸奶及奶酪等发酵乳制品的生产中。乳中蕴含着丰富的营养物质,许多微生物可以利用这些营养物质在乳中生长繁殖,而嗜热链球菌在发酵乳时具有快速生长产酸的能力,可有效缩短发酵周期。同时,嗜热链球菌在发酵过程中还会产生胞外多糖及一些风味物质,这些关键的生产特性都对发酵乳制品的质量有重要影响。酸化速率决定着发酵乳制品的发酵时间与质量,是评估菌株是否为发酵剂的重要标准,而菌株的碳水化合物代谢能力与其酸化速率有着密切关系^[2]。氨基酸代谢能力也对菌株的生长繁殖有着重要影

响,可为嗜热链球菌提供大量游离氨基酸,影响发酵乳的风味、营养价值及酸耐受性^[3]。

限制修饰系统(Restriction-modification system)是一种由限制性内切酶及甲基转移酶组成的二元系统,其存在于细菌中保护菌株免受外来 DNA(如噬菌体)的侵入。按照亚基数量、辅因子需求、作用机理、靶序列及切割类型可将限制修饰系统分为 4 类,分别为 I 型、II 型、III 型和 IV 型^[4-5]。在限制修饰系统中,限制性内切酶与甲基转移酶具有相同的 DNA 结合特异性,通常限制性内切酶负责降解外源 DNA,而同源的甲基转移酶则负责甲基化宿主基因组中潜在的限制性内切酶目标位点,保护其免受限制性内切酶的切割。I 型限制修饰系统是复杂的多亚基系统,包括限制性内切酶、甲基转移酶亚基以及 DNA 识别特异性亚基^[6]。该系统识别二分基序,通常在距其结合位点较远的位置处切割。II 型限制修饰系统包含单独的限制性内切酶和甲基转移酶^[7],它们主要识别回文基序,并在所识别的特定 DNA 序列处或靠近该序列的位置进行切割。在 III 型限制修饰系统中,单独的甲基转移酶包含一个 DNA 结合特异性结构域,并与限制性内切酶形成复合物^[8],它们通常结合短的非回文基序并在 DNA 结合位点外切割。最

收稿日期: 2022-12-06

基金项目: 国家自然科学基金项目(31901670);内蒙古自治区科技计划项目(2020GG0101);内蒙古自治区自然科学基金项目(2019BS03003)

第一作者: 王丹,女,硕士生

通信作者: 赵洁 E-mail: nmgzj@imau.edu.cn

后,IV型限制修饰系统没有甲基转移酶成分^[9]。甲基转移酶即可作为限制修饰系统的一部分,也可作为单个基因。甲基转移酶赋予宿主染色体的DNA甲基化模式,可对宿主的基因表达、DNA复制和其它细胞过程产生重大影响^[10]。Militello等^[11]发现DNA胞嘧啶甲基转移酶介导的DNA甲基化会抑制*sugE*的表达,从而影响大肠杆菌K-12的耐药性。

表观遗传学是一项基于非基因序列变化引起的基因表达水平变化的研究,主要包括DNA甲基化、组蛋白修饰以及非编码RNA修饰^[12]。早在1939年,生物学家Waddington首次提出“表观遗传学”这一术语,描述其是一种从基因型到表型的调控机制^[13]。表观遗传信息通过DNA修饰影响微生物的生命进程。而DNA甲基化是目前研究最深入的表观遗传调控机制之一。DNA甲基化是指DNA序列上特定的碱基在DNA甲基转移酶的催化作用下,以S-腺苷甲硫氨酸(S-adenosyl methionine,SAM)作为甲基供体,通过共价键结合的方式获得一个甲基基团的化学修饰过程^[14]。作为一种相对稳定的修饰状态,DNA甲基化在DNA甲基转移酶的作用下,可随DNA的复制过程遗传给新生的子代DNA。大量研究发现甲基化与许多疾病相关,例如宫颈癌^[15]、结肠癌^[16]及前列腺癌^[17]等。目前关于细菌中甲基化修饰的研究还不够深入。传统的甲基化检测方法包括全基因组重亚硫酸盐甲基化测序和化学氧化法结合重亚硫酸盐转化的甲基化测序等,然而,这类方法不能对特定序列和单个核苷酸水平上的全基因组甲基化进行分析,存在着弊端^[18]。近年来,随着单分子实时DNA测序技术(Single molecule real-time,SMRT)的快速发展与应用,在全基因组水平上分析DNA甲基化图谱得以实现,该测序技术能够实时观测DNA碱基修饰^[19]。目前原核生物中DNA甲基化类型主要包括C5-甲基胞嘧啶(m5C)、N4-甲基胞嘧啶(m4C)和N6-甲基腺嘌呤(m6A),而m6A修饰是原核生物中最普遍的修饰,涉及基因表达、DNA复制和修复等。Bendall等^[20]在还原金属细菌希瓦氏菌MR-1中鉴定到41 853个N6-甲基腺嘌呤(m6A),并在复制起点处发现基序GATC的富集,表明DNA甲基化可能影响着基因组的复制。

嗜热链球菌IMAU80278及嗜热链球菌IMAU20416均分离自乳源,前期研究发现2株嗜热链球菌产酸表型具有明显差异,嗜热链球菌IMAU80278发酵酸度高于嗜热链球菌IMAU20416^[21]。本文以产酸表型具有较大差异的2株嗜热链球菌为研究对象,通过探究其m6A类型甲基化位点、基序、限制修饰系统及功能基因甲基化特征,综合解析m6A甲基化对基因表达的影响,从而为嗜热链球菌的进一步开发利用奠定理论基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 菌株 选取在前期研究中产酸表型具有差异的嗜热链球菌IMAU80278及嗜热链球菌IMAU20416为研究对象,均由内蒙古农业大学乳品生物技术与工程教育部重点实验室提供。嗜热链球菌IMAU80278分离自中国四川省阿坝州红原县瓦切乡二队酸牦牛奶样品,嗜热链球菌IMAU20416分离自蒙古国库苏古尔省耶赫阿古拉苏木酸牛奶样品。

1.1.2 材料与试剂 常规试剂:M17培养基;PBS缓冲液;5×TBE电泳缓冲液;琼脂糖;核酸染料;DNA分子质量标准物,6×DNA凝胶加样缓冲液;AMPure® PB磁珠,DNA纯化试剂。

DNA提取试剂盒:Wizard®基因组DNA纯化试剂盒(Wizard Genomic DNA Purification Kit),美国Promega公司。

SMRT测序试剂:DNA测序包4.0(DNA Sequencing Bundle 4.0);DNA/聚合酶结合试剂盒P6v2(DNA/Polymerase Binding Kit P6v2);太平洋生物SMRT bell模板(Pacific Biosciences SMRT bell Template);MagBead结合缓冲试剂盒v2(MagBead Binding Buffer Kit v2);QubitdsDNA HS检测试剂盒(QubitdsDNA HS Assay Kit);安捷伦DNA 12000试剂(Agilent DNA 12000 Reagents)。

1.1.3 仪器与设备 电子天平(AR2202CN),奥豪斯仪器上海有限公司;电泳仪(DYY-12),北京六一仪器厂;凝胶成像仪(GDS-8000),美国UVP公司;单分子实时测序仪(PacBio RS II),美国安捷伦科技有限公司;电热恒温培养箱(LRH_250)、电

热恒温水浴锅(HWS28型),上海一恒科技有限公司;全自动高压蒸汽灭菌器(HA-300M),日本HIRAYAMA公司;超净工作台(ZHJH-C1214C),上海智城分析仪器制造有限公司;漩涡振荡器(Vortex-genie 2),美国Scientific Industries公司;低速离心机(KDC-1044),安徽中科中佳科学仪器有限公司;高速台式离心机(TGL-168),德国Eppendorf公司;磁力架(DynaMagTM-2),Life Technologies公司。

1.2 试验方法

1.2.1 菌株活化 利用M17液体培养基将2株嗜热链球菌进行活化培养,培养条件为42℃厌氧培养18h,传代培养至第2代后对菌株进行扩培,之后对生长好的培养液离心(4000 r/min,5 min)收集菌泥。

1.2.2 DNA提取及纯化 对上一步骤收集好的菌泥利用Wizard®基因组DNA纯化试剂盒提取全基因组DNA。对提取到的DNA使用0.6%凝胶电泳检测其完整性。将所得完整的全基因组DNA使用磁珠法进行纯化,纯化后的DNA需进行Qubit浓度测定及琼脂糖凝胶电泳检测DNA质量。

1.2.3 文库构建及SMRT测序 将符合测序要求的全基因组DNA用于建库测序。文库构建参考PacBio公司提供的测序流程进行文库构建,之后采用PacBio SMRT测序平台对嗜热链球菌基因组进行测序,通过SMRT® Portal的RS_HGAP_Assembly.3方案对测序所得嗜热链球菌全基因组DNA序列进行拼接、组装。

1.2.4 基因组分析及功能预测 从NCBI(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)下载分离自乳源的嗜热链球菌基因组序列,计算平均核苷酸一致性(Average Nucleotide Identity, ANI)。使用RAST在线注释网站(<https://rast.nmpdr.org/>)对2株嗜热链球菌基因组序列进行功能注释,同时利用KAAS网站(<https://www.genome.jp/kegg/kaas/>)对其进行KEGG注释,获得代谢通路信息。

1.2.5 限制修饰系统注释 利用BLAST分别对2株嗜热链球菌蛋白序列与REBASE Golden数据库^[22]进行比对,比对结果筛选采纳条件为比对结果期望值小于 e^{-10} ,序列比对一致性百分比大于等

于40%,符合比对的比对区域长度与目标序列长度的比值大于等于80%。

1.2.6 甲基化组分析 使用SMRT® Portal中的RS_Modification_and_Motif_Analysis.1模块获得对嗜热链球菌 IMAU80278 与嗜热链球菌 IMAU20416 的全基因组甲基化信息。为获得更加准确的甲基化信息,设定筛选条件为score ≥ 40 ^[23]且coverage ≥ 50 。通过生物信息学方法对m6A类型甲基化位点及基序的种类、数量与分布进行分析。

1.2.7 m6A修饰基序与功能基因分析 利用1.2.5节中所得菌株全基因组甲基化信息结合全基因组KEGG注释结果统计碳水化合物代谢相关通路及氨基酸代谢相关通路中m6A甲基化修饰基序数量。

1.2.8 数据分析 使用R语言(4.0.3)软件绘制柱形图、热图、气泡图及折线图。利用TBTOOLS(v1.098696)软件^[24]绘制基因组圈图。

2 结果分析

2.1 嗜热链球菌基因组特征与功能预测

本研究选取2株分离自乳源且具有优良发酵特性的嗜热链球菌为研究对象,嗜热链球菌 IMAU80278 的基因组大小为2.01 Mb,GC含量为38.80%,嗜热链球菌 IMAU20416 基因组大小为1.90 Mb,GC含量为39.20%。平均核苷酸一致性(Average Nucleotide Identity, ANI)被用于在全基因组水平评估物种间的亲缘关系,一般认为ANI大于等于95%为同一种。从NCBI下载3株同样分离自乳源的嗜热链球菌 NCTC12958(NCBI登录号: SAMEA3594354)、EPS(NCBI登录号: SAMN05226830)及ST106(NCBI登录号: SAMN09909637)基因组序列,由图1a可知,5株嗜热链球菌 ANI值均大于98.00%,嗜热链球菌 IMAU80278 与嗜热链球菌 IMAU20416 间 ANI值高达98.64%,说明选取的2株嗜热链球菌基因组相似性较高。

为进一步了解2株嗜热链球菌的功能特性,对嗜热链球菌 IMAU80278 及嗜热链球菌 IMAU20416 进行了功能预测。KEGG注释结果如图1b显示,2株嗜热链球菌基因组中均以碳水化

合物代谢及氨基酸代谢相关功能基因为主,且在相同通路分类中蛋白编码基因数量与种类相近。RAST 注释结果如图 1c 所示,2 株嗜热链球菌基因组共注释到 26 个功能类别。2 株嗜热链球菌基因组中占比最大的均为“氨基酸及其衍生物”这一功能类别,该功能类别在嗜热链球菌 IMAU80278 中占比 16.36%,在嗜热链球菌 IMAU20416 中占

比 15.97%。其次,“蛋白质代谢”(嗜热链球菌 IMAU80278 中占比 12.09%,嗜热链球菌 IMAU20416 中占比 13.21%)及“碳水化合物”(嗜热链球菌 IMAU80278 中占比 11.17%,嗜热链球菌 IMAU20416 中占比 12.44%)这两个功能类别在 2 株嗜热链球菌中占比仅次于“氨基酸及其衍生物”功能类别。

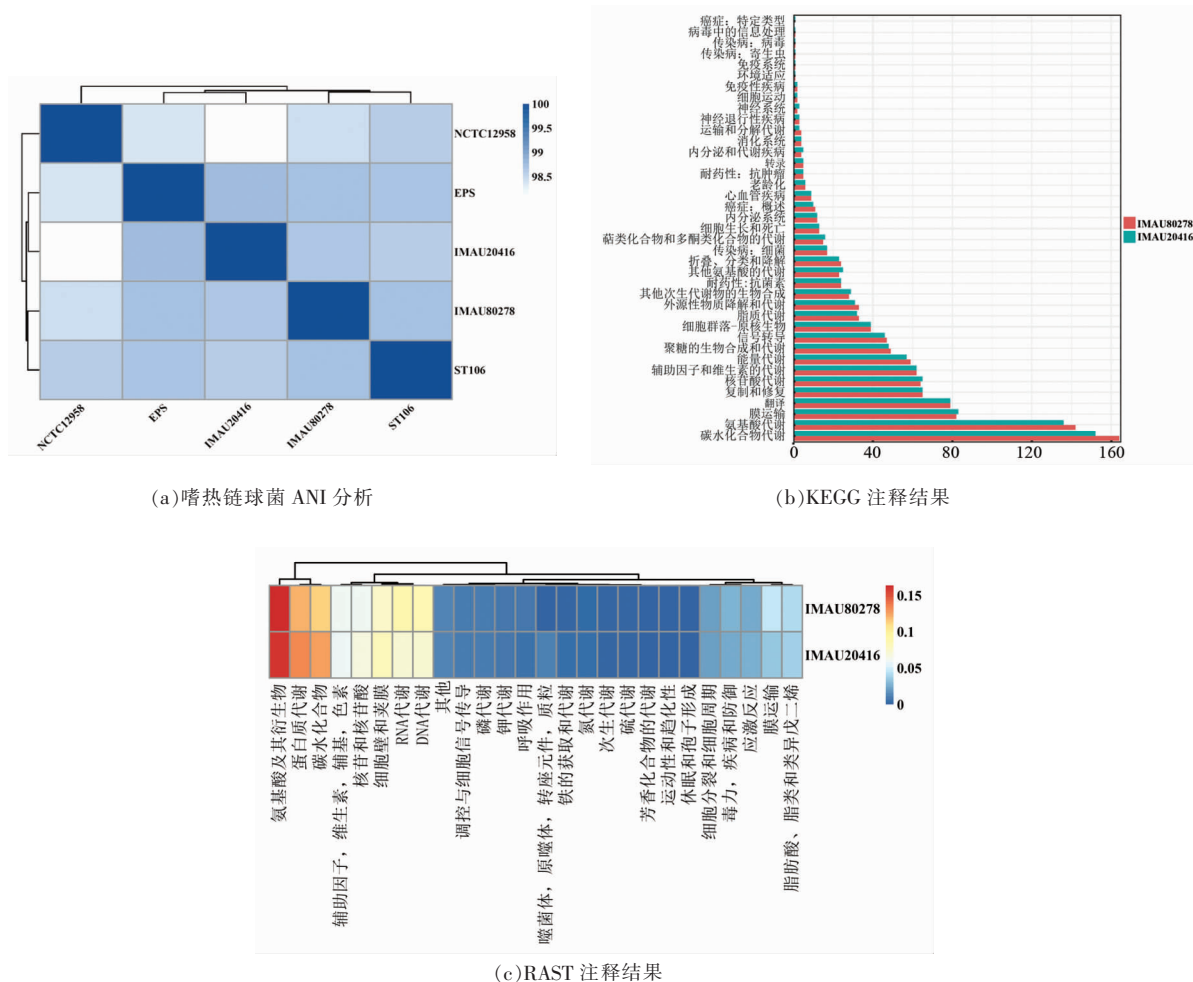


图 1 嗜热链球菌 ANI 分析及功能注释结果

Fig.1 Functional annotation and ANI analysis of *Streptococcus thermophilus*

综上所述,2 株嗜热链球菌基因组较为相似,且 KEGG 注释及 RAST 注释结果共同表明 2 株嗜热链球菌功能基因均以碳水化合物代谢及氨基酸代谢为主,这类功能基因是维持嗜热链球菌生命活动所必须的。

2.2 限制性修饰系统

限制修饰系统包含甲基转移酶和限制性内切酶,而 DNA 甲基化是在 DNA 甲基转移酶催化作

用下生成的一种 DNA 修饰过程。REBASE 注释结果显示(表 1),2 株嗜热链球菌共检测到 10 种限制性修饰系统相关基因,其中 7 个基因属于 I 型,2 个基因属于 II 型,1 个基因属于 IV 型,未注释到 III 型限制性修饰系统相关基因。丁秀云^[29]在对嗜热链球菌 KLDS_SM 的限制修饰系统分析时发现该菌株并未注释到编码 IV 型限制修饰系统的基因,但存在 10 个编码 I 型限制修饰系统的基因、1

个编码 II 型限制修饰系统的基因以及 1 个编码 III 型限制修饰系统的基因。综上所述,嗜热链球菌的

表 1 嗜热链球菌 IMAU80278 及 IMAU20416 限制修饰系统信息

名称	蛋白序列长度	类型
LldI	1 025aa	I 型限制内切酶
M.LldI	531aa	I 型甲基转移酶
M.Ssa72FI	534aa	I 型甲基转移酶
M.Ssa813I	534aa	I 型甲基转移酶
S.Ssa72FI	382aa	I 型特异性亚基
S.Eox12280I	387aa	I 型特异性亚基
S.Sth301I	396aa	I 型特异性亚基
M.Lla5598I	185aa	II 型甲基转移酶
AteTI	934aa	II 型限制内切酶及甲基转移酶
SauUSI	953aa	IV 型限制内切酶

由图 2 可知,2 株嗜热链球菌限制性修饰系统相关酶种类多样,均以 I 型限制修饰系统为主,且仅有 1 个共同存在的 IV 型限制性修饰酶。嗜热链球菌 IMAU20416 注释到 1 个 m6A 限制内切酶和甲基转移酶 AteTI 以及 1 个识别 m6A 基序的甲基转移酶亚基 M.Ssa813I。嗜热链球菌 IMAU80278 注释到一种识别 m6A 基序的甲基转移酶亚基 M.LldI。与嗜热链球菌 IMAU20416 相比,嗜热链球菌 IMAU80278 具有更加丰富的 I 型限制修饰酶相关基因。

2.3 嗜热链球菌甲基化位点分析

m6A 甲基化修饰在原核生物中普遍存在,且对微生物的基因表达有一定影响,因此从甲基化组角度对微生物进行分析同样重要。2 株嗜热链球菌均预测到 m6A 甲基化位点,嗜热链球菌 IMAU80278 含有 4 731 个 m6A 类型甲基化位点,嗜热链球菌 IMAU20416 则含有 4 966 个 m6A 甲基化位点。图 3a 展示了两株嗜热链球菌 m6A 类型甲基化位点在全基因组水平上的分布情况,嗜热链球菌 IMAU80278 及嗜热链球菌 IMAU20416 所含 m6A 类型甲基化位点在全基因组水平上分布广泛,仅极少数区域不存在甲基化位点,与嗜热链球菌 IMAU80278 相比,嗜热链球菌 IMAU20416 在基因组起始位置存在甲基化位点发生热区。这些甲基化热区主要发生在嗜热链球菌 IMAU20416 的细胞生长及碳水化合物相关编码基因上,推测

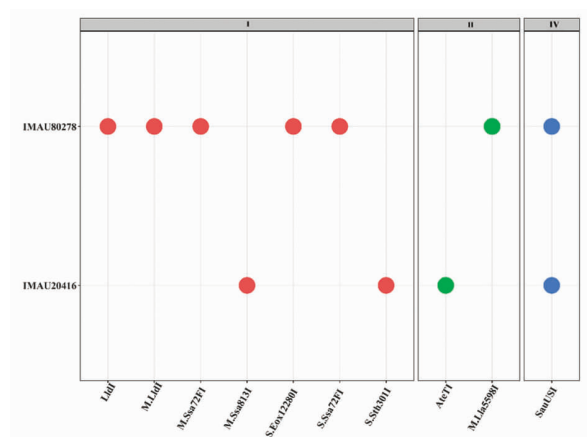


图 2 嗜热链球菌 REBASE 注释结果

Fig.2 REBASE annotation results of *Streptococcus thermophilus*

DNA 甲基化会影响细菌的生长繁殖和碳水化合物的代谢。王昊明等^[26]研究表明 m6A 甲基化位点在六妹羊肚菌 SCLS 菌株逆转录转座子上的显著富集可能调控着逆转录转座子的活性。

为探究甲基化位点对基因组的影响,绘制 2 株嗜热链球菌 m6A 类型甲基化位点在基因区与基因间区分布情况,结果如图 3b 所示,嗜热链球菌 IMAU80278 m6A 甲基化位点主要分布在基因间区(2 649 个,所占比例为 55.99%),而嗜热链球菌 IMAU20416 m6A 甲基化位点主要分布在基因区(2 593 个,所占比例为 52.22%)。2 株嗜热链球菌具有高度甲基化特点,在基因组中的分布存在

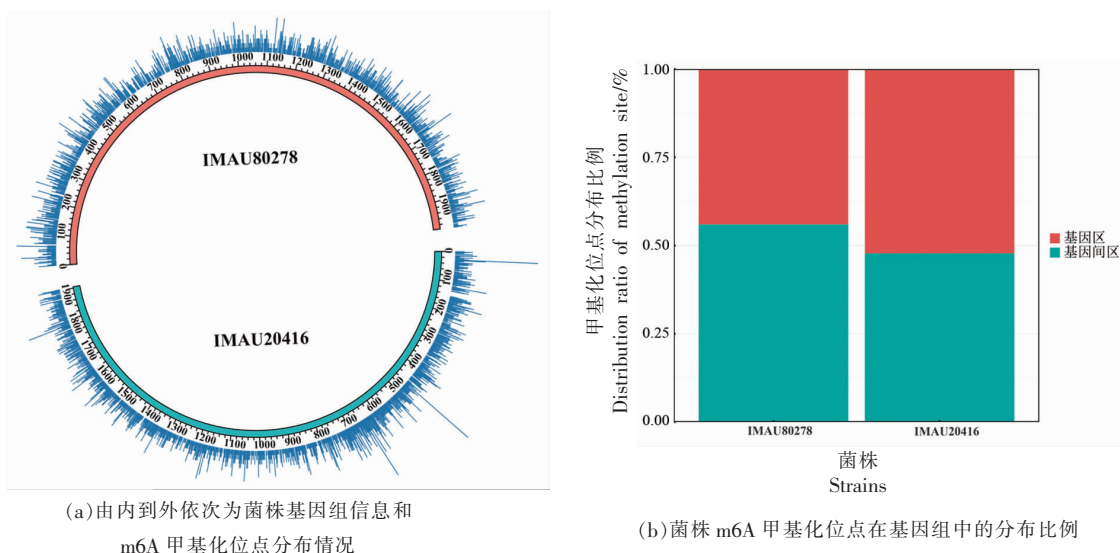


图3 嗜热链球菌甲基化位点情况

Fig.3 *Streptococcus thermophilus* methylation sites

差异。

2.4 嗜热链球菌 DNA 甲基化基序

嗜热链球菌 IMAU80278 及嗜热链球菌 IMAU20416 m6A 基序统计情况如表 2 所示,2 株嗜热链球菌共鉴定到 11 种不同的 m6A 甲基化基序。嗜热链球菌 IMAU80278 鉴定到 7 种甲基化基序,其中基序 CRTANNNNNNTAC 及 DGTANNNNNNTAYG 在基因组中分别有 250 个和 203 个,两种基序发生甲基化比率均为 100%;此外,嗜热链球菌 IMAU80278 中发生甲基化比率最

低的基序为 ADGCAGCH (71.38%)。嗜热链球菌 IMAU20416 共鉴定到甲基化基序 4 种,发生甲基化比率最高的基序为 CAGRAG (99.85%),发生甲基化比率最低的基序为 ANNYAGYA (83.55%)。11 种基序均发生高度甲基化 (发生甲基化比率 $\geq 70\%$),且具有高度多样性。Pirone-Davies 等^[27]采用 SMRT 测序技术对 9 个不同血清型的 11 株肠道沙门氏菌分析了全基因组甲基化模式,发现了 16 种不同的 m6A 类型甲基化基序,甲基化模式具有高度多样性。

表2 嗜热链球菌甲基化基序信息

Table 2 Methylation motif information of *Streptococcus thermophilus*

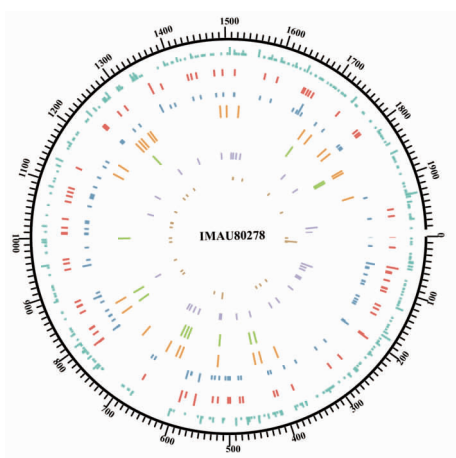
基序	基因组中基序数/个	甲基化比率/%	所属菌株
AAAYNNNNNGTC	627	98.41	IMAU80278
ADGCAGCH	318	71.38	IMAU80278
AGNNRNNW	1 585	88.45	IMAU80278
ANNTAGYAD	265	88.68	IMAU80278
CRTANNNNNNTAC	250	100	IMAU80278
DGTANNNNNNTAYG	203	100	IMAU80278
GACNNNNNRITTT	673	99.55	IMAU80278
ANNYAGYA	608	83.55	IMAU20416
CACNNNNNTCG	340	99.71	IMAU20416
CAGRAG	2 064	99.85	IMAU20416
CGANNNNNNGTG	274	97.08	IMAU20416

为探究甲基化基序在全基因组水平上的分布情况,对 2 株嗜热链球菌所含 m6A 类型甲基化基

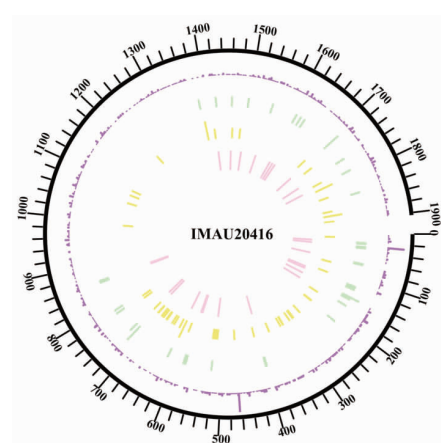
序在基因组中的位置进行分析。结果如图 4a 与 4b 所示,嗜热链球菌 IMAU80278 及嗜热链球菌 I-

MAU20416 所含 m6A 甲基化基序在基因组中呈现随机分布的特点。Zhu 等^[28]发现结核杆菌的甲基化基序在基因组中的分布同样也呈现随机分布的特点。嗜热链球菌 IMAU20416 所含基序 CACNNNNNTCG 和 CGANNNNNNGTG 在全基因组水平分布情况相似,均主要分布在基因组起始位置和终止位置,在约 900 kb 到 1 350 kb 间不存在两种基序。此外,2 株嗜热链球菌所含甲基化修饰基序在基因区与基因间区分布情况如图 4c 与 4d

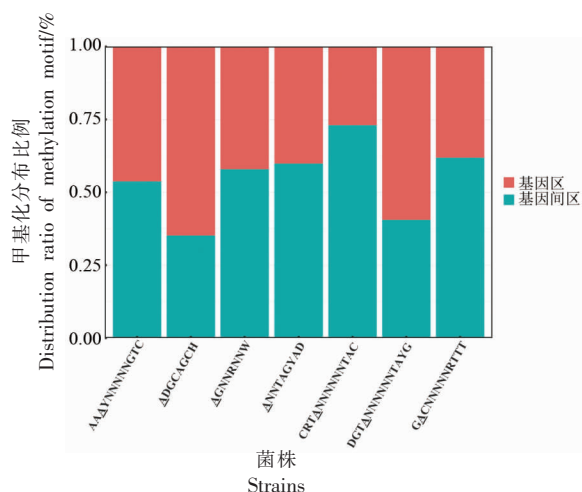
所示,嗜热链球菌 IMAU80278 所含基序 ADGCAGCH、DGTANNNNNTAYG 及嗜热链球菌 IMAU20416 所含基序 CAGRAG 主要分布在基因间区(分布比例 $\geq 50\%$),其余 8 种基序均主要分布在基因区。Cohen 等^[29]发现在基序 GATC 没有发生腺嘌呤甲基化的情况下,抗生素压力下的大肠杆菌存活率受到严重损害。因此,甲基化基序的存在可能影响着嗜热链球菌基因的表达。



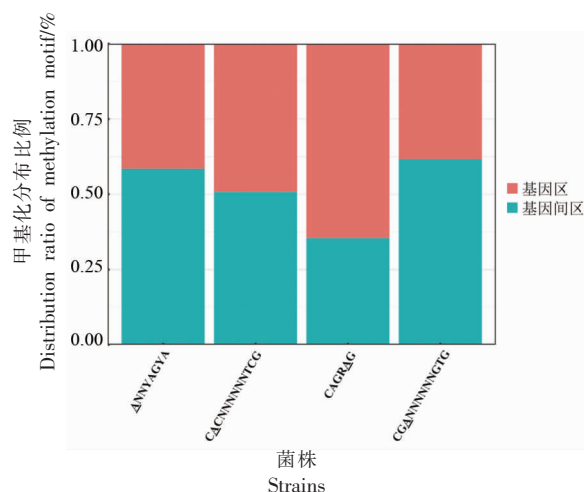
(a)嗜热链球菌 IMAU80278 的 m6A 基序在基因组中的分布(以 1 000 bp 为单位),由内到外分别为 ADGCAGCH、ANNTAGYAD、DGTANNNNNTAYG、CRTANNNNNTAC、GACNNNNRTRT、AAAYNNNNNGTC、AGNRRNW



(b)嗜热链球菌 IMAU20416 的 m6A 基序在基因组中的分布(以 1 000 bp 为单位),由内到外分别为 CGANNNNNNGTG、ANNYAGYA、CACNNNNNTCG、CAGRAG



(c)嗜热链球菌 IMAU80278 的 m6A 基序在基因组中的分布比例



(d)嗜热链球菌 IMAU20416 的 m6A 基序在基因组中的分布比例

图 4 嗜热链球菌甲基化基序分布情况

Fig.4 Distribution of methylation motifs in *Streptococcus thermophilus*

2.5 甲基化修饰基序与功能注释

本研究选取的 2 株嗜热链球菌产酸表型存在

差异,嗜热链球菌 IMAU80278 的发酵酸度为 52.56 °T,嗜热链球菌 IMAU20416 的发酵酸度为 69.45

°T,结合全基因组功能预测结果,针对碳水化合物代谢及氨基酸代谢相关功能基因存在 m6A 类型基序情况进行分析。图 5a 显示在碳水化合物代谢相关途径中 m6A 甲基化基序数量存在差异,嗜热链球菌 IMAU80278 中存在 175 个 m6A 甲基化基序,嗜热链球菌 IMAU20416 中存在 228 个 m6A 甲基化基序,且嗜热链球菌 IMAU20416 在磷酸戊糖途径(Pentose phosphate pathway)、半乳糖代谢(Galactose metabolism)、糖酵解/糖异生(Glycolysis/Gluconeogenesis) 及氨基糖和核苷酸糖代谢途径(Amino sugar and nucleotide sugar metabolism) 中 m6A 甲基化基序数量远高于嗜热链球菌 IMAU80278(数量差值 ≥ 10 个)。推测 m6A 甲基化基序在碳水化合物代谢途径中分布的差异会导致 2 株嗜热链球菌对糖类代谢能力的差异^[30]。

由图 5b 可知,2 株嗜热链球菌在氨基酸代谢相关通路中 m6A 甲基化基序数量同样存在差异,嗜热链球菌 IMAU80278 存在 159 个 m6A 甲基化基序,嗜热链球菌 IMAU20416 存在 190 个 m6A 甲基化基序,且嗜热链球菌 IMAU20416 在甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢(Glycine, serine and threonine metabolism) 及半胱氨酸和蛋氨酸代谢途径(Cysteine and methionine metabolism) 中 m6A 甲基化基序数量远高于嗜热链球菌 IMAU80278(数量差值 ≥ 10 个)。甘氨酸和丝氨酸等氨基酸对嗜热链球菌的生长有着重要影响,而半胱氨酸和蛋氨酸作为含硫氨基酸通过氨基酸代谢途径可转化为风味化合物^[31-32]。推测 m6A 甲基化基序在氨基酸代谢途径中分布的差异会导致 2 株嗜热链球菌生长繁殖及产香能力的差异。

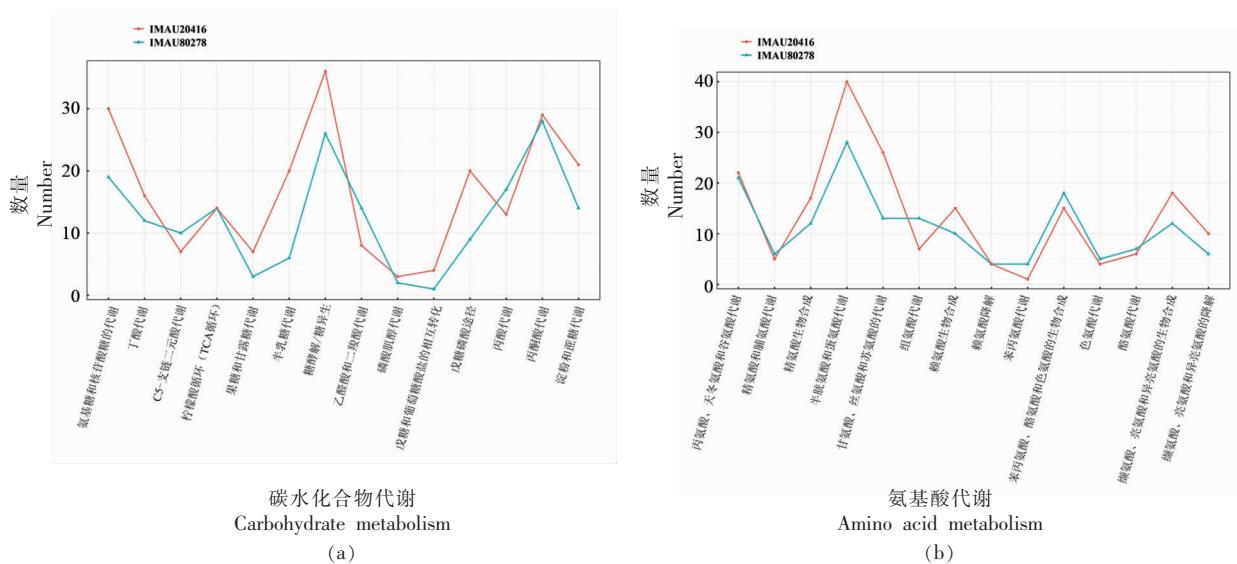


图 5 碳水化合物代谢途径及氨基酸代谢途径甲基化基序修饰情况

Fig.5 Modification of methylation motifs in carbohydrate metabolism pathways and amino acid metabolism pathways

不论是在碳水化合物代谢途径还是氨基酸代谢途径中,嗜热链球菌 IMAU20416 所含 m6A 甲基化基序数量均高于嗜热链球菌 IMAU80278 所含 m6A 甲基化基序数量,结合产酸表型,推断 m6A 修饰基序的差异可能导致了菌株产酸表型及生长繁殖速率的不同。郑慧娟等^[33]同样发现了 2 株基因组相似的乳酸乳球菌乳脂亚种在肽转运载体、PTS 系统及 2,3-丁二醇脱氢酶相关功能基因上 m6A 甲基化基序修饰具有差异,推测可能导致

了菌株发酵特性的差异。

3 结论

本研究对产酸表型存在差异的嗜热链球菌 IMAU80278 及嗜热链球菌 IMAU20416 进行了甲基化组分析,结果显示虽然基因组及功能预测结果具有相似性,但 2 株嗜热链球菌 m6A 类型甲基化差异极大。嗜热链球菌 IMAU20416 m6A 甲基化位点数量高于嗜热链球菌 IMAU80278 m6A 甲

甲基化数量,且 2 株嗜热链球菌 m6A 甲基化位点在基因组分布上存在差异。嗜热链球菌 IMAU80278 及嗜热链球菌 IMAU20416 m6A 基序种类多样且均具有高度甲基化特点,同时 2 株嗜热链球菌限制修饰系统均以 I 型为主,甲基转移酶种类多样且存在甲基化基序修饰情况。2 株嗜热链球菌甲基化基序对碳水化合物代谢及氨基酸代谢编码基因的修饰存在差异,与具有低酸度的嗜热链球菌 IMAU80278 相比,高酸度的嗜热链球菌 IMAU20416 在碳水化合物代谢及氨基酸代谢相关编码基因上 m6A 甲基化基序数量更多,这些 m6A 甲基化基序的差异可能导致 2 株嗜热链球菌产酸表型和生长繁殖速率的差异。

参 考 文 献

- [1] 于洁. 中国、俄罗斯和蒙古国地区传统发酵乳制品中嗜热链球菌的多位点序列分型研究[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2013.
YU J. Multilocus sequence typing of *Streptococcus thermophilus* from traditional fermented dairy products in China, Russia and Mongolia[D]. Hohhot: Inner Mongolia Agricultural University, 2013.
- [2] CUI Y, XU T, QU X, et al. New insights into various production characteristics of *Streptococcus thermophilus* strains[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2016, 17(10): 1701.
- [3] 马立清. 嗜热链球菌 S4 在牛乳中发酵代谢特性的研究[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2021.
MA L Q. Study on the fermentation and metabolic characteristics of *Streptococcus thermophilus* S4 in milk[D]. Hohhot: Inner Mongolia Agricultural University, 2021.
- [4] MURRAY N E. Immigration control of DNA in bacteria: self versus non-self[J]. Microbiology, 2002, 148(1): 3–20.
- [5] ROBERTS R J, BELFORT M, BESTOR T, et al. A nomenclature for restriction enzymes, DNA methyltransferases, homing endonucleases and their genes[J]. Nucleic Acids Research, 2003, 31(7): 1805–1812.
- [6] LOENEN W A, DRYDEN D T, RALEIGH E A, et al. Type I restriction enzymes and their relatives [J]. Nucleic acids research, 2014, 42(1): 20–44.
- [7] PINGOUD A, WILSON G G, WENDE W. Type II restriction endonucleases—a historical perspective and more[J]. Nucleic acids research, 2014, 42(12): 7489–7527.
- [8] RAO D N, DRYDEN D T, BHEEMANAİK S. Type III restriction–modification enzymes: a historical perspective[J]. Nucleic Acids Research, 2014, 42(1): 45–55.
- [9] LOENEN W A, RALEIGH E A. The other face of restriction: modification–dependent enzymes[J]. Nucleic Acids Research, 2014, 42(1): 56–69.
- [10] ANTON B P, ROBERTS R J. Beyond restriction modification: epigenomic roles of DNA methylation in prokaryotes[J]. Annual Review of Microbiology, 2021, 75: 129–149.
- [11] MILITELLO K T, MANDARANO A H, VARECHTCHOUK O, et al. Cytosine DNA methylation influences drug resistance in *Escherichia coli* through increased sugE expression[J]. FEMS Microbiology Letters, 2014, 350(1): 100–106.
- [12] JAENISCH R, BIRD A. Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals[J]. Nature Genetics, 2003, 33(3): 245–254.
- [13] HOLLIDAY R. Epigenetics: a historical overview[J]. Epigenetics, 2006, 1(2): 76–80.
- [14] 李胜杰. 耐辐射奇球菌特异 DNA 甲基化修饰模式及其参与维持基因组稳定性的功能研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2019.
LI S J. A novel DNA methylation and its function in the maintenance of genomic stability in *Deinococcus radiodurans*[D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2019.
- [15] WIDSCHWENDTER A, MÜLLER H M, FIEGL H, et al. DNA methylation in serum and tumors of cervical cancer patients[J]. Clinical Cancer Research, 2004, 10(2): 565–571.
- [16] SEO J S, CHOI Y H, MOON J W, et al. Hinokitiol induces DNA demethylation via DNMT1 and UHRF1 inhibition in colon cancer cells[J]. BMC Cell Biology, 2017, 18(1): 1–11.
- [17] WU L, YANG Y, GUO X, et al. An integrative multi-omics analysis to identify candidate DNA methylation biomarkers related to prostate cancer risk[J]. Nature Communications, 2020, 11(1): 1–11.

- [18] 葛元洁, 陈实. 单分子实时测序及其在微生物表观遗传学中的应用[J]. 微生物学通报, 2017, 44(1): 186-199.
- GE Y J, CHEN S. Single molecule real time sequencing and its applications in microbial epigenetics—a review[J]. Microbiology China, 2017, 44(1): 186-199.
- [19] FLUSBERG B A, WEBSTER D R, LEE J H, et al. Direct detection of DNA methylation during single-molecule, real-time sequencing[J]. Nature Methods, 2010, 7(6): 461-465.
- [20] BENDALL M L, LUONG K, WETMORE K M, et al. Exploring the roles of DNA methylation in the metal-reducing bacterium *Shewanella oneidensis* MR-1[J]. Journal of Bacteriology, 2013, 195(21): 4966-4974.
- [21] 赵洁. 自然发酵乳中嗜热链球菌群体遗传学和功能基因组学研究[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2018.
- ZHAO J. Population genetics and functional genomics of *Streptococcus thermophilus* isolated from natural fermented dairy products[D]. Hohhot: Inner Mongolia Agricultural University, 2018.
- [22] ROBERTS R J, VINCZE T, POSFAI J, et al. REBASE—a database for DNA restriction and modification: enzymes, genes and genomes[J]. Nucleic Acids Research, 2015, 43(D1): D298-D299.
- [23] BOTTACINI F, MORRISSEY R, ROBERTS R J, et al. Comparative genome and methylome analysis reveals restriction/modification system diversity in the gut commensal *Bifidobacterium breve* [J]. Nucleic Acids Research, 2018, 46(4): 1860-1877.
- [24] CHEN C, CHEN H, ZHANG Y, et al. TBtools: an integrative toolkit developed for interactive analyses of big biological data[J]. Molecular Plant, 2020, 13(8): 1194-1202.
- [25] 丁秀云. 嗜热链球菌 KLDS SM 基因组学分析及比较基因组学分析[D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2017.
- DING X Y. Genome and functional genomic analysis of *Streptococcus thermophilus* KLDS SM applied in dairy production[D]. Harbin: Northeast Agricultural University, 2017.
- [26] 王昊明, 范立刚, 董永睿, 等. 六妹羊肚菌 PacBio 基因组测序和 DNA 6mA 甲基化分析[J]. 菌物学报, 2021, 40(9): 2299-2316.
- WANG H M, FAN L G, DONG Y R, et al. High-quality N⁶-methyladenine analysis of *Morchella sextelata* strain SCLS using PacBio SMRT sequencing[J]. Mycosystema, 2021, 40(9): 2299-2316.
- [27] PIRONE-DAVIES C, HOFFMANN M, ROBERTS R J, et al. Genome-wide methylation patterns in *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovars[J]. PLoS one, 2015, 10(4): e0123639.
- [28] ZHU L, ZHONG J, JIA X, et al. Precision methylome characterization of *Mycobacterium tuberculosis* complex (MTBC) using PacBio single-molecule real-time (SMRT) technology[J]. Nucleic Acids Research, 2016, 44(2): 730-743.
- [29] COHEN N R, ROSS C A, JAIN S, et al. A role for the bacterial GATC methylome in antibiotic stress survival[J]. Nature Genetics, 2016, 48(5): 581-586.
- [30] 代晓斐. 蜜蜂肠道乳酸菌多样性及糖代谢特性的研究[D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2021.
- DAI X F. Research on the diversity and carbohydrate metabolism characteristics of lactic acid bacteria in bee intestines[D]. Harbin: Northeast Agricultural University, 2021.
- [31] 陈合, 杨君, 彭丹. 氨基酸与牛乳复合培养液对嗜热链球菌生长的影响[J]. 食品科技, 2009, 34(4): 18-20.
- CHEN H, YANG J, PENG D. Effect of amino acid and milk composite culture on the growth of *Streptococcus thermophilus*[J]. Food Science and Technology, 2009, 34(4): 18-20.
- [32] LIU M, NAUTA A, FRANCKE C, et al. Comparative genomics of enzymes in flavor-forming pathways from amino acids in lactic acid bacteria[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2008, 74(15): 4590-4600.
- [33] 郑慧娟, 李伟程, 赵飞燕, 等. 乳酸乳球菌乳酸亚种的 (m6)A 甲基化差异研究[J]. 中国食品学报, 2021, 21(5): 14-22.
- ZHENG H J, LI W C, ZHAO F Y, et al. Studies on the difference about N⁶-methyladenine methylation of *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis*[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2021, 21(5): 14-22.

Studies on the Difference about m6A Methylation of *Streptococcus thermophilus*

Wang Dan, Sun Zhihong, Zhao Jie*

(Key Laboratory of Dairy Biotechnology and Engineering, Ministry of Education, Key Laboratory of Dairy Products Processing, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Inner Mongolia Key Laboratory of Dairy Biotechnology and Engineering, Cooperative Innovation Center of Lactic Acid Bacteria and Fermented Dairy Products, Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot 010018)

Abstract *Streptococcus thermophilus* is one of the most important starters in the dairy industry, with good fermentation characteristics. DNA methylation is a form of chemical modification of DNA that can affect gene expression without altering the DNA sequence. In this paper, two strains of *Streptococcus thermophilus* with large differences in acid-producing phenotype were selected as the research objects, and the relationship between m6A methylation and genetic phenotype was explored through methylome. The PacBio SMRT sequencing platform was used to sequence the genomes of *Streptococcus thermophilus* IMAU80278 and *Streptococcus thermophilus* IMAU20416 and measure the m6A methylation to compare the functional genes and m6A methylation differences between the two strains of *Streptococcus thermophilus*. The results showed that the genomes of *Streptococcus thermophilus* IMAU80278 and *Streptococcus thermophilus* IMAU20416 were similar, and the functional genes were mainly carbohydrate metabolism and amino acid metabolism. *Streptococcus thermophilus* IMAU80278 and *Streptococcus thermophilus* IMAU20416 showed significant differences in restriction modification systems, m6A methylation sites and m6A motifs, especially in the m6A methylation of genes related to carbohydrate metabolism and amino acid metabolism. It is speculated that the difference in m6A methylation may lead to the different acid-producing phenotypes between *Streptococcus thermophilus* IMAU80278 and *Streptococcus thermophilus* IMAU20416. In addition, this study explored the effect of *Streptococcus thermophilus* DNA methylation on fermentation characteristics from the perspective of epigenetics, and laid a theoretical foundation for the selection and utilization of excellent starter.

Keywords *Streptococcus thermophilus*; m6A methylation; restriction-modification system