

## 基于代谢组学探究甲基化转移酶基因的功能特性

田奇芳, 张文羿\*

(内蒙古农业大学 乳品生物技术与工程教育部重点实验室 呼和浩特 010018)

**摘要** 为探究 DNA 甲基化调控 DNA 序列与蛋白间的相互作用与对细胞功能产生的影响。本文采用超高效液相色谱-质谱联用仪比对甲基化转移酶突变体副干酪乳酪杆菌 Zhang $\Delta$ 2054 和野生型副干酪乳酪杆菌 Zhang 在对数生长期(12 h)的差异代谢物,同时进行多变量统计分析。结合数据库搜索和质量光谱信息匹配,共得到 33 个显著差异的代谢物,其中上调和下调的显著差异代谢物分别有 10 和 23 种,主要包括嘌呤、嘧啶及其类似物,核苷、核苷酸和类似物,氨基酸及其衍生物、碳水化合物和碳水化合物结合物等,并富集在嘌呤代谢、嘧啶代谢、赖氨酸生物合成、核黄素代谢、丙酸代谢、磷酸戊糖等代谢通路中。*LCAZH\_2054* 基因虽不是甲基化表型的控制基因,但在参与菌株新陈代谢过程中发挥着重要作用。本研究通过代谢组学的分析,揭示甲基化转移酶突变体副干酪乳酪杆菌 Zhang $\Delta$ 2054 和野生型副干酪乳酪杆菌 Zhang 在化学成分限制培养基中的生长代谢差异情况,并讨论了 *LCAZH\_2054* 基因对生长代谢过程中营养物质的利用以及代谢产物生成等生物学功能的影响。

**关键词** DNA 甲基化; 副干酪乳酪杆菌; 代谢组学

**文章编号** 1009-7848(2025)03-0093-11 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2025.03.010

以 s-腺苷甲硫氨酸为甲基供体,在 DNA 甲基转移酶的作用下,将甲基添加在特定碱基上的过程叫做 DNA 甲基化,是调控基因表达和细胞分化的一种表观遗传学调控机制。DNA 甲基化普遍存在于原核与真核生物基因组的碱基共价修饰过程中,同时参与机体内的许多生理过程<sup>[1]</sup>。DNA 甲基化通过调控 DNA 序列与蛋白间的相互作用影响细胞功能,主要包括 N6-甲基腺嘌呤(N6-methyladenine, m6A),N4-甲基胞嘧啶(N4-methyl-cytosine, m4C)和 5-甲基胞嘧啶(5-methyl-cytosine, m5C)3 种形式<sup>[2]</sup>。DNA 甲基化并非一成不变,其改变的决定因素是 DNA 甲基化转移酶<sup>[3-4]</sup>。

代谢组学是一种通过检测生物体内代谢产物和代谢产物随时间的变化情况来研究生物体系代谢途径的方法,它能够体现基因功能的信息,是功能基因组学的关键组成部分<sup>[5]</sup>。其中,基于质谱技术的代谢组学研究方法,凭借其卓越的检测灵敏

度、优异的选择性特征以及精准的定量分析能力,已成为深入解析复杂生物体系代谢网络的利器<sup>[6]</sup>。通过对不同样本中的小分子代谢物开展定性和定量分析,将差异表达的代谢物与表型变化紧密关联,从而筛选出具有关键调控作用的功能性代谢物<sup>[7]</sup>,是推动代谢组学及其它领域发展的重要途径。

副干酪乳酪杆菌(*Lacticaseibacillus paracasei*)为革兰氏阳性而不产生孢子的兼性异型乳杆菌<sup>[8]</sup>,近年来得到广泛的研究。其在乳制品工业中,常被用作发酵剂或辅助发酵剂,凭借自身特性优化乳制品的风味、质地与品质。从健康角度出发,副干酪乳酪杆菌是一种对人体有益的菌种,能够有效抑制致病菌生长,调节机体肠道微生态平衡,提高机体肠道内环境菌群多样性<sup>[9]</sup>。经大量研究证实,该菌种在发酵过程中产生的功能性物质具备多种益生功效,这些物质在降血压、抗糖尿病<sup>[10]</sup>以及抗牙周炎<sup>[11]</sup>等方面发挥积极作用,在功能性食品<sup>[12]</sup>领域有广阔的应用前景。

副干酪乳酪杆菌 Zhang(*Lacticaseibacillus paracasei* Zhang, *L. paracasei* Zhang)是从草原牧民的传统发酵酸马奶中分离筛选获得的 1 株益生菌<sup>[13]</sup>。副干酪乳酪杆菌 Zhang 除了有降血脂、免疫调节<sup>[14]</sup>、抗氧化<sup>[15]</sup>等益生功能外,对乳腺炎也具有

收稿日期: 2024-03-11

基金项目: 国家自然科学基金项目(32372304);内蒙古青年科技人才发展项目(创新团队 NMGIRT2411);内蒙古自治区科技领军人才团队项目(2022LJRC0003)

第一作者: 田奇芳,女,硕士

通信作者: 张文羿 E-mail: zhangwenyizi@163.com

预防作用,可以减轻乳腺炎对乳腺组织的损伤<sup>[16]</sup>,同时在恢复肠道菌群稳态,保护和改善被破坏肠黏膜屏障等方面有着卓越的能力<sup>[17]</sup>。之前的研究中,作者发现副干酪乳酪杆菌 Zhang 存在 N6-甲基腺嘌呤位点<sup>[18]</sup>,通过基因敲除甲基化转移酶 *LCAZH\_2054* 基因<sup>[19]</sup>,构建了副干酪乳酪杆菌 Zhang 甲基化转移酶突变体副干酪乳酪杆菌 Zhang  $\Delta 2054$ <sup>[20]</sup>。

本文通过对比甲基化转移酶突变体副干酪乳酪杆菌 Zhang  $\Delta 2054$  和野生型副干酪乳酪杆菌 Zhang 对数生长期 12 h 的差异代谢物,从代谢组学角度探讨 *LCAZH\_2054* 基因的生物学功能。本研究旨在从表观遗传学角度拓展副干酪乳杆菌在食品领域的应用,为菌株选择提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料与仪器

菌株:甲基化转移酶突变体副干酪乳酪杆菌 Zhang  $\Delta 2054$  和野生型副干酪乳酪杆菌 Zhang,自内蒙古农业大学乳品生物技术与工程教育部重点实验室。

试剂:甲醇、乙腈,上海安谱实验科技股份有限公司;乙酸铵,Sigma-AldrichS 公司;氨水,Fisher Chemical 公司;MRS 肉汤,Oxoid 公司。

乳酸菌适宜化学成分限制培养基 (CDM):参考 Hui 等<sup>[19]</sup>的制备方法。

仪器与设备:Vanquish 超高效液相,赛默飞世尔科技公司;Q Exactive HFX 高分辨质谱,赛默飞世尔科技公司;Heraeus Fresco17 离心机,赛默飞世尔科技公司;ACQUITY UPLC BEH Amide 液相色谱柱,Water 公司;BSA124S-CW 天平,Sartorius 公司;PS-60AL 超声仪,深圳市雷德邦电子有限公司;WFO-700 送风定温干燥箱,上海爱朗仪器有限公司;LTI-700W 低温恒温培养箱,上海爱朗仪器有限公司;MLS-3751L-PC 高压蒸汽灭菌锅,广州硕谱生物科技有限公司。

### 1.2 代谢组样本的制备

将保藏的突变体副干酪乳酪杆菌 Zhang  $\Delta 2054$  和野生型副干酪乳酪杆菌 Zhang 在固体 MRS 培养基上平板划线,37 °C 静置培养 48 h,使其长出单一菌落。随后挑取单菌落至液体 MRS 培

养基,活化传代两次后控制接种量一致并接种至 CDM 液体培养基中,培养 12 h 后在离心机 4 °C,4 000 r/min 离心 10 min 条件下收取上清液放入 EP 管中,立即液氮速冻并放入-80 °C 超低温冰箱保存,进行后续代谢组学分析。

### 1.3 高效液相色谱-串联质谱法分析

两种样本分别采集 100  $\mu$ L 于 2 mL EP 管,然后分别加入 400  $\mu$ L 提取液 ( $V_{\text{甲醇}}:V_{\text{乙腈}}=1:1$ ),经过涡旋搅拌 30 s 后,使用冰浴超声波处理 10 min 并放入-40 °C 下静置 1 h。在 4 °C 条件下,通过 12 000 r/min 离心处理 15 min,以去除蛋白质等大分子化合物。将得到的上清液加入进样瓶中上机检测<sup>[21-22]</sup>。质控样本(QC)是将各样本等量混合,首先对 QC 样品和空白进行色谱分析,以保证色谱系统的稳定性和重复性,样品(正离子和负离子模式)随机注入系统,每 8 个样品注入后重复 QC 样品,以控制仪器的稳定性。该试验使用超高效液相色谱仪,通过液相色谱柱对两个样品进行色谱分离。液相色谱中 A 相为水相(包含 25 mmol/L 乙酸铵和 25 mmol/L 氨水),B 相为乙腈。实际操作过程中保证样品盘的温度为 4 °C,进样体积精确为 3  $\mu$ L。

质谱仪采集一级、二级质谱数据的详细参数如表 1。

表 1 质谱检测参数

| Table 1 Parameters of mass spectrum detection |                      |
|-----------------------------------------------|----------------------|
| 条件                                            | 参数                   |
| 加热器温度(柱温)                                     | 30 °C                |
| 鞘气流量                                          | 50 Arb               |
| 辅助气体流量                                        | 15 Arb               |
| 毛细管温度                                         | 320 °C               |
| 全 MS 分辨率                                      | 60 000               |
| MS/MS 分辨率                                     | 15 000               |
| 负离子模式下碰撞能量                                    | 10/30/60             |
| 喷射电压                                          | 3.8 kV(正)或-3.4 kV(负) |
| ESI+ S-lens RF leave                          | 80%                  |
| ESI- S-lens RF leave                          | 80%                  |

### 1.4 代谢组学统计分析

将原始数据经过预处理后,原始数据导入在线分析软件 MetaboAnalyst 5.0 进行一系列的多

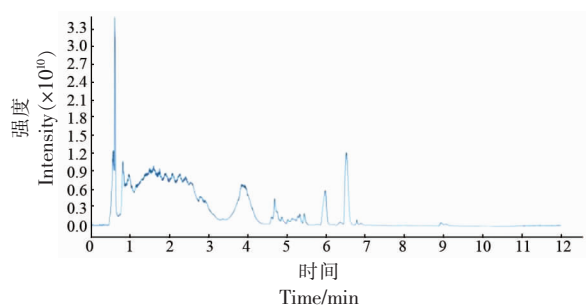
元变量模式识别分析,包括主成分分析(Principal component analysis, PCA)<sup>[23]</sup>、正交偏最小二乘法-判别分析(Orthogonal partial least squarediscriminate analysis, OPLS-DA)<sup>[24]</sup>。依据 OPLS-DA 模型的变量投影重要性指标(Variable importance in the projection, VIP)  $\geq 1$ 、 $P < 0.05$  及差异倍数(Fold change, FC)  $< 0.5$  或  $> 2$  的方法筛选显著差异代谢物。利用关联分析、京都基因与基因组百科(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG)通路数据库通路分析、聚类分析等高级分析方法,对筛选出的差异代谢集进行生物信息挖掘<sup>[25]</sup>。

## 2 结果与分析

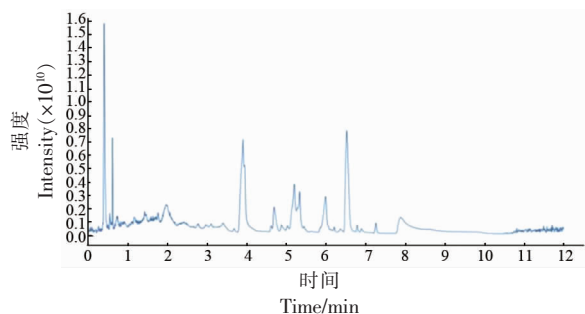
### 2.1 色谱图分析

本文采用高效液相色谱-串联质谱法(High

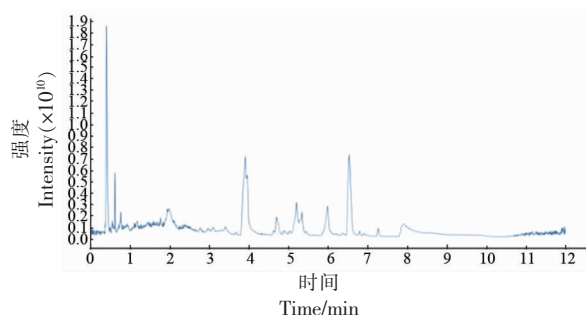
Performance Liquid Chromatograph Mass Spectrometer, UPLC-MS)代谢组学技术,分析和检测了 DNA 甲基化转移酶突变株副干酪乳酪杆菌 Zhang  $\Delta 2054$  和野生型副干酪乳酪杆菌 Zhang 两种细菌在正离子和负离子模式中所检测到的代谢物。图 1 中分别展示突变体副干酪乳酪杆菌 Zhang  $\Delta 2054$  和野生型副干酪乳酪杆菌 Zhang 正离子模式和负离子模式总离子流色谱图。图中色谱峰基线平稳保留时间的重现性较好,突变体副干酪乳酪杆菌 Zhang  $\Delta 2054$  与野生型副干酪乳酪杆菌 Zhang 两种菌株代谢物的色谱峰数量、离子强度以及色谱峰的保留时间等方面均存在一些差异。在正离子和负离子模式下检测共到 33 个差异代谢物,其中上调和下调的差异代谢物分别有 10 和 23 种。



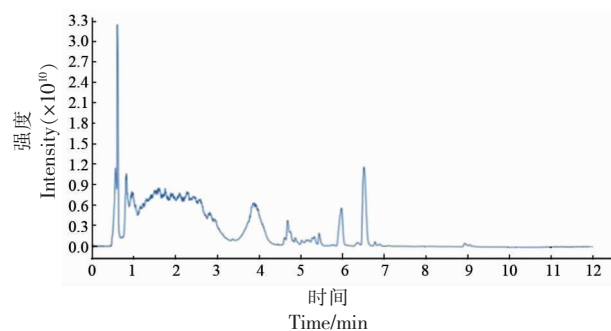
(a) 副干酪乳酪杆菌 Zhang 在正离子模式下离子流色谱图



(b) 副干酪乳酪杆菌 Zhang 在负离子模式下离子流色谱图



(c) 副干酪乳酪杆菌 Zhang  $\Delta 2054$  在正离子模式下离子流色谱图



(d) 副干酪乳酪杆菌 Zhang  $\Delta 2054$  在负离子模式下离子流色谱图

图 1 总离子流色谱图

Fig.1 Total ion flow chromatogram

### 2.2 主成分分析(PCA)比较分析

主成分分析(PCA)是目前应用最广泛的一种无监督模式识别方法,它可以直观地反映样本的整体分布<sup>[23]</sup>。通过对突变体副干酪乳酪杆菌 Zhang  $\Delta 2054$  与野生型副干酪乳酪杆菌 Zhang 的

代谢物进行主成分分析比较,由图 2 可知,突变体副干酪乳酪杆菌 Zhang  $\Delta 2054$  与野生型副干酪乳酪杆菌 Zhang 呈分离趋势,说明突变体副干酪乳酪杆菌 Zhang  $\Delta 2054$  的代谢物与野生型副干酪乳酪杆菌 Zhang 的代谢物存在差异。

2.3 OPLS-DA 比较分析

通过对突变体副干酪乳酪杆菌 Zhang Δ2054 与野生型副干酪乳酪杆菌 Zhang 的代谢物进行 OPLS-DA 比较分析,结果图 3 中可见正离子与负离子模式的甲基转移酶突变体与野生型两组之间的分离作用显著。OPLS-DA 判别分析参数为

$R^2Y=1, Q^2=0.998$ ,模型  $R^2Y$  与  $Q^2$  均在 0.5 以上,越趋近于 1 说明模型效果越好,说明构建的两个 O-PLS-DA 模型在拟合度与预测能力上均表现出较强,适用于探究两株菌在对数生长后期的差异代谢物。

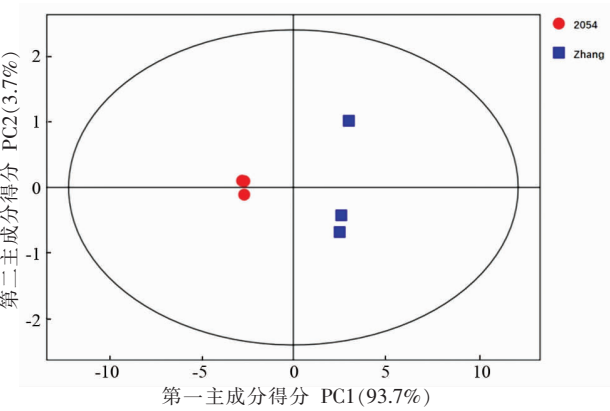


图 2 副干酪乳酪杆菌 Zhang Δ2054 与副干酪乳酪杆菌 Zhang PCA 比较分析

Fig.2 Comparative analysis of *L. paracasei* Zhang Δ2054 and *L. paracasei* Zhang PCA

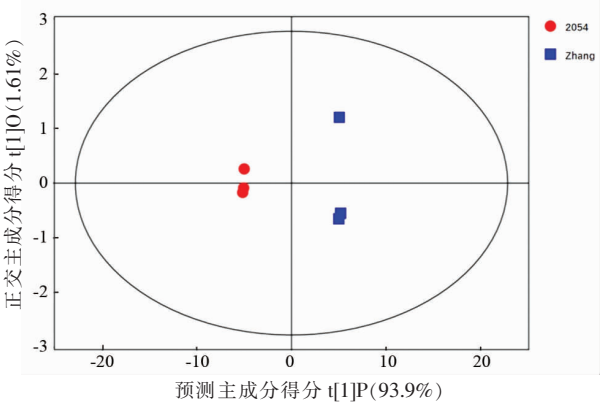


图 3 副干酪乳酪杆菌 Zhang Δ2054 与副干酪乳酪杆菌 Zhang OPLS-DA 比较分析

Fig.3 Comparative analysis of *L. paracasei* Zhang Δ2054 and *L. paracasei* Zhang OPLS-DA

2.4 差异代谢物热图分析

基于 OPLS-DA 模型分析结果,筛选 VIP>1 的差异代谢物,并结合 T 检验  $P<0.05$ ,Fold change<0.5 或>2 3 个条件,筛选显著差异代谢物。

通过差异倍数分析和火山图(图 4),可直接说明突变体副干酪乳酪杆菌 Zhang Δ2054 与野生型副干酪乳酪杆菌 Zhang 样本间代谢物的显著性,进而得到差异代谢物。结果共筛选出 33 个显著差异

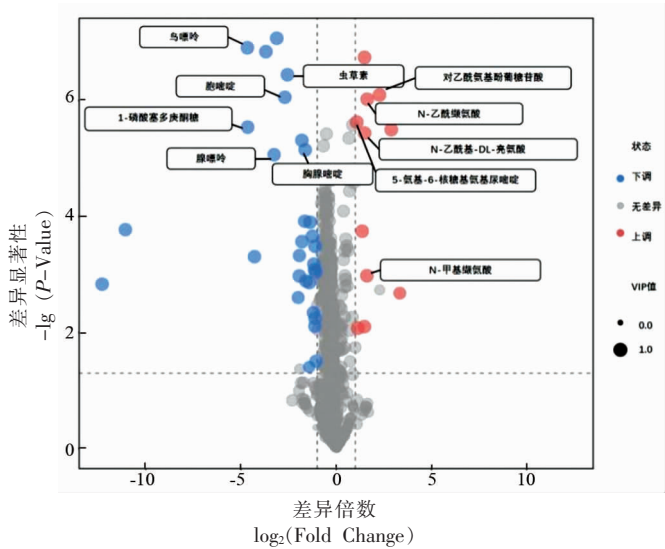


图 4 副干酪乳酪杆菌 Zhang Δ2054 与副干酪乳酪杆菌 Zhang 差异代谢火山热图

Fig.4 Differential metabolic volcanic heat maps of *L. paracasei* Zhang Δ2054 and *L. paracasei* Zhang



代谢物,如表 1 所示。显著差异代谢物主要包括在 氨基酸及其衍生物、碳水化合物和碳水化合物结 有嘌呤、嘧啶及其类似物,核苷、核苷酸和类似物, 合物等物质,见表 2。

表 2 副干酪乳酪杆菌 ZhangΔ2054 与副干酪乳酪杆菌 Zhang 的显著差异代谢物  
Table 2 Significant differences in metabolites between *L. paracasei* Zhang Δ2054 and *L. paracasei* Zhang

| 化合物名称                      | 保留时间/min | 质核比    | 变化趋势 |
|----------------------------|----------|--------|------|
| 嘌呤、嘧啶及其类似物                 |          |        |      |
| 胞嘧啶                        | 220.66   | 112.05 | ↓    |
| 鸟嘌呤                        | 248.44   | 152.06 | ↓    |
| 胸腺嘧啶                       | 85.56    | 127.05 | ↓    |
| 腺嘌呤                        | 139.47   | 136.06 | ↓    |
| 7-氨基-7-氨基鸟嘌呤               | 488.62   | 180.09 | ↓    |
| 5-氨基-6-核糖基氨基尿嘧啶            | 198.87   | 277.12 | ↑    |
| 核苷、核苷酸及其类似物                |          |        |      |
| 5'-脱氧腺苷                    | 218.01   | 252.11 | ↓    |
| 二磷酸腺苷                      | 174.39   | 596.24 | ↓    |
| N,N-二甲基鸟苷                  | 142.43   | 310.11 | ↓    |
| 2'-脱氧鸟苷                    | 249.16   | 266.09 | ↓    |
| 琥珀酰拉地诺辛                    | 412.99   | 384.12 | ↓    |
| 胸苷                         | 86.95    | 241.08 | ↓    |
| 虫草素                        | 142.05   | 250.09 | ↓    |
| 脱氧腺苷                       | 139.97   | 252.11 | ↓    |
| 吡啶乳酸                       | 153.55   | 204.07 | ↑    |
| 3-氧丁酸                      | 316.45   | 85.03  | ↓    |
| 氨基酸及其衍生物                   |          |        |      |
| N-乙酰基-DL-亮氨酸               | 204.40   | 172.10 | ↑    |
| 精氨酸蛋氨酸                     | 504.42   | 306.17 | ↓    |
| N-乙酰缬氨酸                    | 225.78   | 158.08 | ↑    |
| N-甲基缬氨酸                    | 204.55   | 130.09 | ↑    |
| N-琥珀酰基-2-氨基-6-酮咪酸酯         | 248.77   | 290.09 | ↓    |
| 丝氨酸羟脯氨酸                    | 87.91    | 219.10 | ↓    |
| 3-羧基硫代吗啉                   | 214.87   | 148.04 | ↑    |
| 环蒜氨酸                       | 293.10   | 178.05 | ↓    |
| 碳水化合物和碳水化合物结合物             |          |        |      |
| 1,3,1,2-四氢-3-甲基-β-卡博林-4-羧酸 | 253.92   | 231.11 | ↑    |
| 1-甲基-2-吡咯甲醛                | 45.58    | 110.06 | ↓    |
| 对乙酰氨基酚葡萄糖苷酸                | 214.06   | 326.09 | ↑    |
| 脛素                         | 230.39   | 328.10 | ↑    |
| 葡萄糖酸                       | 382.42   | 195.05 | ↓    |
| 吗啡糖                        | 124.33   | 286.14 | ↑    |
| 新海藻糖                       | 394.60   | 365.10 | ↓    |
| 1-磷酸塞多庚酮糖                  | 189.26   | 291.05 | ↓    |
| 四氢戊氧喹                      | 320.76   | 367.15 | ↓    |

2.5 差异代谢物热图分析

为了方便比较突变体副干酪乳酪杆菌 Zhang Δ2054 与野生型副干酪乳酪杆菌 Zhang 在对数生长末期的代谢物,将样本中聚类层次分析差异代谢物归一化处理后得到全部样本聚类热图,绘制聚类热图,见图 5。图中横坐标代表不同样本分

组,纵坐标代表所有的代谢物,不同位置的色块代表对应位置代谢物的相对表达量,红色表示该物质含量高表达,蓝色表示该物质含量低表达。10 种代谢物显著上调,即培养物中相对含量较高包括乙酰亮氨酸、N-甲基缬氨酸、N-乙酰缬氨酸、对乙酰氨基酚葡萄糖苷酸等代谢物。23 种代谢物显著

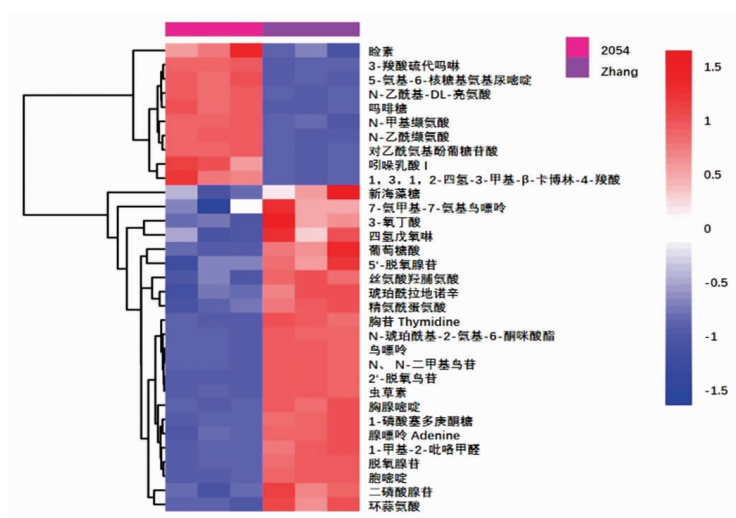


图5 副干酪乳酪杆菌 Zhang Δ2054 与副干酪乳酪杆菌 Zhang 差异代谢物热图

Fig.5 Heat maps of different metabolites between *L. paracasei* Zhang Δ2054 and *L. paracasei* Zhang

下调,包括脱氧鸟苷、鸟嘌呤、1-磷酸塞多庚酮糖、脱氧腺苷、N,N-二甲基鸟苷等代谢物。

## 2.6 显著差异代谢物通路注释

将所有的显著差异代谢物匹配 KEGG 的数据库从而获得代谢物参与的通路信息。利用 KEGG Pathway 数据库<sup>[26]</sup>对突变体副干酪乳酪杆菌 Zhang Δ2054 与野生型副干酪乳酪杆菌 Zhang 的显著差异代谢物进行通路注释分析,结果见图 6 显示,显著差异代谢物主要可分为 3 大类:第 1 类为环境

信息加工,包括信号转导和跨膜运输;第 2 类为遗传信息加工,包括分类及降解,第 3 类为新陈代谢,该分类中显著差异代谢物占全部差异代谢物数量的 85.71%,包括氨基酸代谢、碳水化合物代谢、辅助因子和维生素的代谢、核苷酸代谢、异种生物降解和代谢等。生物合成显著差异代谢物占包括次生代谢物的生物合成、辅因子的生物合成、氨基酸的生物合成、赖氨酸生物合成、叶酸生物合成等。

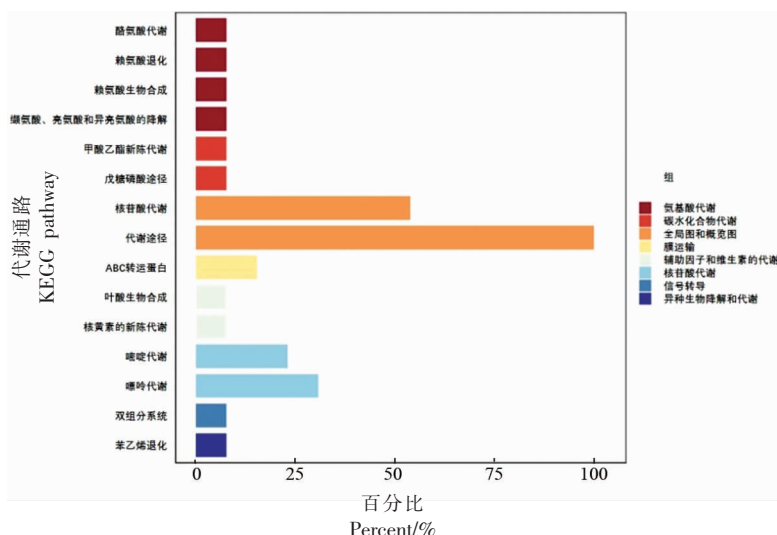


图6 副干酪乳酪杆菌 Zhang Δ2054 与副干酪乳酪杆菌 Zhang 差异代谢物 KEGG 通路注释

Fig.6 Annotation of the KEGG pathway of *L. paracasei* Zhang Δ2054 and *L. paracasei* Zhang differential metabolites

根据 KEGG 通路注释的结果进行分类,差异代谢物的富集代谢通路主要在嘌呤代谢、嘧啶代

谢、氨基酸生物合成与代谢、核黄素代谢、丙酸代谢等代谢途径中,见图 7。其中嘌呤代谢通路中富

集到脱氧腺苷、腺嘌呤、鸟嘌呤、脱氧鸟苷这 4 种代谢物；嘧啶代谢通路中富集到胞嘧啶和胸苷两

种代谢物；其它代谢通路仅富集有一种差异代谢物。

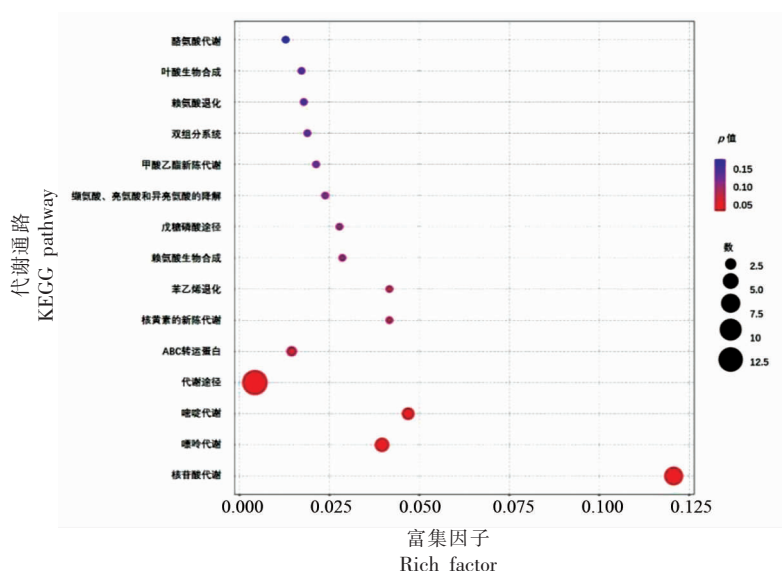


图 7 副干酪乳酪杆菌 Zhang  $\Delta$ 2054 与副干酪乳酪杆菌 Zhang 差异代谢物富集分析

Fig.7 Differential metabolite enrichment analysis between *L. paracasei* Zhang  $\Delta$ 2054 and *L. paracasei* Zhang

## 2.7 HMDB 分类注释

通过 Human Metabolome Database 数据库对突变体副干酪乳酪杆菌 Zhang  $\Delta$ 2054 与野生型副干酪乳酪杆菌 Zhang 的显著差异代谢物进行 HMDB 分类注释,图 8 为差异代谢物与人类代谢数据库 (Human metabolome database, HMDB) 进行匹配的结果,从化合物分类上看,突变体副干酪乳酪杆菌 Zhang  $\Delta$ 2054 与野生型副干酪乳酪杆菌 Zhang 的显著差异代谢物主要分布在 7 条代谢途径中,代谢物数量富集最多的前 4 条通路分别是 1)有机酸及其衍生物代谢通路,主要包括 *N*-乙酰基-*DL*-亮氨酸、精氨酸蛋氨酸、环蒜氨酸、*N*-乙酰缬氨酸、*N*-甲基缬氨酸、*N*-琥珀酰基-2-氨基-6-酮咪酸酯、丝氨酸羟脯氨酸、3-羧酸硫代吗啉、3-氧丁酸(乙酰乙酸)。2)有机氧化合物代谢通路,主要包括 5-氨基-6-核糖基氨基尿嘧啶、对乙酰氨基酚葡萄糖苷酸、海藻糖、1-磷酸塞多庚酮糖、葡萄糖酸、脘缘、1-甲基-2-吡咯甲醛。3)核苷、核苷酸和类似物代谢通路,主要包括 5'-脱氧腺苷、二磷酸腺苷、*N*, *N*-二甲基鸟苷、琥珀酰拉地诺辛、2'-脱氧腺苷(脱氧腺苷)、胸苷、虫草素、2'-脱氧鸟苷。4)有机杂环化合物代谢通路,主要包括胞嘧啶、腺嘌呤、鸟嘌呤、3-吡啶乙酸(吡啶乳酸)、7-氨

甲基-7-氨基鸟嘌呤、胸腺嘧啶。

## 3 讨论

细胞代谢是由一系列连续的生化反应组成,这些生化反应被高度调节,其目的是生产基本细胞过程所必需的底物。嘌呤代谢包括核酸碱基腺嘌呤、鸟嘌呤和其它嘌呤衍生物活体合成与分解<sup>[27]</sup>。嘌呤代谢物主要有核酸碱基腺嘌呤和鸟嘌呤及其它嘌呤衍生物,在发挥 DNA, RNA 基础作用的同时也提供细胞所需能量及辅助因子来促进其生存与增殖<sup>[28]</sup>。嘧啶代谢属于复杂生物化学反应,需多种酶催化及多种代谢途径协同。不同的代谢产物和中间产物在代谢过程中发挥着不同的作用,以保证嘧啶核苷酸的正常合成和代谢<sup>[29]</sup>。当核苷酸不再需要时,它又会被降解为嘌呤或嘧啶碱基、核糖-1-磷酸以及二氧化碳等产物。这一降解过程主要是由核苷酸酶,核苷酸磷酸化酶和其它酶催化来实现。核苷酸类似物是指与核苷酸结构相似但不是核酸的基本组成单位的化合物,如嘌呤类似物、嘧啶类似物、叶酸类似物等,这些类似物可通过竞争抑制及其他途径干扰核苷酸合成与代谢。本研究中甲基化转移酶突变株副干酪乳酪杆菌 Zhang  $\Delta$ 2054 与野生型副干酪乳酪杆菌 Zhang 相

比,在对数生长后期差异显著下调代谢物大部分富集到核苷、核苷酸和类似物包括有5'-脱氧腺苷、二磷酸腺苷、*N*、*N*-二甲基鸟苷、琥珀酰拉地诺辛、脱氧腺苷、胸苷、虫草素、2'-脱氧鸟苷。因为所用的培养基中添加了核苷、核苷酸和类似物物质,推测突变菌株能迅速而有效地调运环境中营养物质促进菌株生长,所以甲基化转移酶突变菌株比野生菌株对数生长期增长更快。

氨基酸是细菌碳、氮代谢的关键物质,参与细菌的多种生理过程,对细菌的生存和生长至关重要<sup>[30]</sup>。研究发现,菌株在生长过程中,氨基酸的消耗和产生同时发生,处于动态平衡。氨基酸的生物合成代谢<sup>[31]</sup>。氨基酸的合成主要包括氨基的转移和碳架的构建两个步骤,氨基主要通过转氨作用转运现有氨基酸上的氨基,碳架则来源于不同的途径,如糖酵解、磷酸戊糖途径、三羧酸循环和乙醇酸途径等<sup>[32]</sup>。甲基化转移酶突变株副干酪乳酪杆菌 Zhang Δ2054 与野生型副干酪乳酪杆菌 Zhang 差异代谢物中发现一些参与氨基酸酸代谢的物质,对数生长后期差异显著的氨基酸酸及其衍生物主要包括 *N*-乙酰基-*DL*-亮氨酸、精氨酸、蛋氨酸、*N*-乙酰缬氨酸、*N*-甲基缬氨酸、*N*-琥珀酰基-2-氨基-6-酮咪酸酯、丝氨酸羟脯氨酸等。推测甲基化转移酶基因在对数生长期可能影响菌株对氨基酸的代谢和合成,该基因的缺失导致菌株的生长速度加快。

细菌葡萄糖代谢成葡萄糖酸的过程通常是通过糖酵解途径进行。首先葡萄糖在细胞中被磷酸化,由葡萄糖-6-磷酸激酶催化,生成葡萄糖-6-磷酸。然后葡萄糖-6-磷酸由葡萄糖-6-磷酸氧化酶催化被氧化成葡萄糖酸内酯,最后葡萄糖酸内酯水解由葡萄糖酸内酯酶催化生成葡萄糖酸和甲酸,整个代谢过程均可产生的能量用于维持细胞的正常功能<sup>[33]</sup>。核黄素代谢通路中主要富集到5-氨基-6-核糖基氨基尿嘧啶,该物质是核黄素的前体分子,在人体中它可以与活性羰基物种乙二醛和甲基乙二醛发生缩合反应后产生的代谢抗原,可促进该T细胞体内扩增,介导宿主对微生物感染的免疫<sup>[34]</sup>。

在对差异代谢物的分析中发现了参与丙酸代谢的物质,在细菌生长过程中,营养物质的快速消耗并不利于菌株在营养物质有限的环境中存活,

产酸的加快也会对菌体细胞的生存造成酸胁迫,故而甲基化转移酶的存在对于菌株的持续性生长及存活有积极作用<sup>[35]</sup>。在此前的研究中,另外一个拷贝的甲基化转移酶 *pglX* 基因失活主要影响碳水化合物代谢相关基因的表达<sup>[36]</sup>。在环境胁迫下,副干酪乳酪杆菌 Zhang 可以通过增强碳水化合物代谢来实现能量代谢最大化<sup>[37-38]</sup>,这种调节可能通过调节空间基因组组织结构来实现<sup>[39]</sup>。*LCAZH-2054* 基因并不是甲基化表型的控制基因,可能在细菌甲基化过程中发挥辅助调节作用<sup>[19,36]</sup>。

本研究针对突变体副干酪乳酪杆菌 Zhang Δ2054 与野生型副干酪乳酪杆菌 Zhang 对数生长期进行代谢组学分析。结合多元统计分析,共筛选出33个显著差异的代谢物,其中上调和下调的差异代谢物分别有10和23种,主要包括有嘌呤、嘧啶及其类似物,核苷、核苷酸和类似物,氨基酸及其衍生物、碳水化合物和碳水化合物结合物等。突变体在对数生长期可能会增加对嘌呤、嘧啶的利用,促进细胞存活和增殖,能够快速高效地转运环境中的营养物质用于菌株的生长,因此甲基化转移酶突变菌株在对数生长时期的生长速度要快于野生菌株,会提前进入平稳期。突变体副干酪乳酪杆菌 Zhang Δ2054 在限定成分培养基中可以反应更快且高效地利用环境中的营养物质用于自身生长,因此推测 *LCAZH\_2054* 基因虽然不是甲基化表型的控制基因<sup>[19]</sup>,但是对参与菌株新陈代谢过程中发挥着重要作用。

## 参 考 文 献

- [1] JELTSCH A. Beyond Watson and Crick: DNA methylation and molecular enzymology of DNA methyltransferases[J]. *Chembiochem*, 2002, 3(4): 274-293.
- [2] MOORE L D, LE T, FAN G. DNA methylation and its basic function[J]. *Neuropsychopharmacology*, 2012, 38(1): 23-38.
- [3] EDWARDS J R, YARYCHKIVSKA O, BOULARD M, et al. DNA methylation and DNA methyltransferases[J]. *Epigenetics & Chromatin*, 2017, 10(1): 23.
- [4] COUTURIER M, LINDÅS A C. The DNA methy-



- lome of the hyperthermoacidophilic *Crenarchaeon Sulfolobus acidocaldarius*[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2018, 9: 137.
- [5] NICHOLSON J K, CONNELLY J, LINDON J C, et al. Metabonomics: A platform for studying drug toxicity and gene function[J]. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2002, 1(2): 153–161.
- [6] DETTMER K, ARONOV P A, HAMMOCK B D. Mass spectrometry - based metabolomics[J]. *Mass Spectrometry Reviews*, 2006, 26(1): 51–78.
- [7] ZHOU J, HOU D, ZOU W, et al. Comparison of widely targeted metabolomics and untargeted metabolomics of wild *Ophiocordyceps sinensis* [J]. *Molecules*, 2022, 27(11): 3645.
- [8] 迟珺曦, 刘孝芳, 雷文平, 等. 干酪乳杆菌的益生特性及在食品中应用研究进展[J]. *农产品加工*, 2020(18): 70–74, 83.
- CHI J X, LIU X F, LEI W P, et al. Advances in probiotics and application of *Lactobacillus casei* in food[J]. *Farm Products Processing*, 2020(18): 70–74, 83.
- [9] ZHANG H, SUN J, LIU X, et al. *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* LC01 positively modulates intestinal microflora in healthy young adults[J]. *Journal of Microbiology*, 2013, 51(6): 777–782.
- [10] SHUKLA P, SAKURE A, PIPALIYA R, et al. Exploring the potential of *Lacticaseibacillus paracasei* M11 on antidiabetic, anti - inflammatory, and ACE inhibitory effects of fermented dromedary camel milk (*Camelus dromedaries*) and the release of antidiabetic and anti - hypertensive peptides[J]. *Journal of Food Biochemistry*, 2022, 46(12): e14449.
- [11] LIU T H, TSAI T Y, PAN T M. Isolation and identification of anti-periodontitis ingredients in *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* NTU 101-fermented skim milk *in vitro*[J]. *Journal of Functional Foods*, 2019, 60: 103449.
- [12] COLUCCI CANTE R, GALLO M, NIGRO F, et al. Lactic fermentation of cooked navy beans by *Lactobacillus paracasei* CBA L74 aimed at a potential production of functional legume - based foods[J]. *The Canadian Journal of Chemical Engineering*, 2020, 98(9): 1955–1961.
- [13] 孟和毕力格, 乌日娜, 王立平, 等. 不同地区酸马奶中乳杆菌的分离及其生物学特性的研究[J]. *中国乳品工业*, 2004(11): 6–11.
- MENGHE B L G, WU R N, WANG L P, et al. Isolation and identification of *Lactobacillus* from koumiss collected in Inner Mongolia and People' s Republic of Mongolia[J]. *China Dairy Industry*, 2004 (11): 6–11.
- [14] YA T, ZHANG Q, CHU F, et al. Immunological evaluation of *Lactobacillus casei* Zhang: A newly isolated strain from koumiss in Inner Mongolia, China[J]. *BMC Immunology*, 2008, 9(1): 68.
- [15] ZHANG Y, DU R, WANG L, et al. The antioxidative effects of probiotic *Lactobacillus casei* Zhang on the hyperlipidemic rats[J]. *European Food Research and Technology*, 2010, 231(1): 151–158.
- [16] ZHENG Y, LIU G, WANG W, et al. *Lactobacillus casei* Zhang counteracts blood-milk barrier disruption and moderates the inflammatory response in *Escherichia coli*-induced mastitis[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2021, 12: 675492.
- [17] ZENG R. Fc 083probiotic *L. Casei* Zhang slows the progression of acute and chronic kidney disease[J]. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 2021, 36(Supplement\_1): i57–i61.
- [18] ZHANG W, SUN Z, MENGHE B, et al. Short communication: Single molecule, real-time sequencing technology revealed species- and strain-specific methylation patterns of 2 *Lactobacillus* strains [J]. *Journal of Dairy Science*, 2015, 98(5): 3020–3024.
- [19] HUI W, ZHANG W, LI J, et al. Functional analysis of the second methyltransferase in the bacteriophage exclusion system of *Lactobacillus casei* Zhang [J]. *Journal of Dairy Science*, 2022, 105(3): 2049–2057.
- [20] 惠文彦. *Lactobacillus casei* Zhang BREX 系统鉴定及 DNA 甲基化与菌株生物学特性的相关性研究[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2020.
- HUI W Y. Identification of BREX System in *Lactobacillus casei* Zhang and correlation analysis between DNA methylation and biological characteristics [D]. Hohhot: Inner Mongolia Agricultural University, 2020.
- [21] XIAO L M, XIE Z M, ZHOU Y H, et al. Effects of Yinxing Yangnao Tablet in treatment of vascular dementia in rats based on UHPLC -QE -MS by serum metabolomics[J]. *Pharmacology and Clinics of Chinese Materia*, 2021, 37(6): 111–119.
- [22] 包秋华, 王丽娜, 张雨虹, 等. 益生菌干酪乳杆菌

- Zhang VBNC 态和正常态的代谢组学研究[J]. 中国乳品工业, 2022, 50(6): 10–15.
- BAO Q H, WANG L N, ZHANG Y H, et al. Metabonomics study of probiotic *Lactobacillus casei* Zhang VBNC state and normal state[J]. China Dairy Industry, 2022, 50(6): 10–15.
- [23] GREENACRE M, GROENEN P J F, HASTIE T, et al. Principal component analysis [J]. Nature Reviews Methods Primers, 2022, 2: 100.
- [24] PANG Z, CHONG J, ZHOU G, et al. MetaboAnalyst 5.0: narrowing the gap between raw spectra and functional insights[J]. Nucleic Acids Research, 2021, 49(W1): W388–W396.
- [25] KANEHISA M. KEGG: Kyoto encyclopedia of genes and genomes[J]. Nucleic Acids Research, 2000, 28(1): 27–30.
- [26] KANEHISA M, SATO Y, KAWASHIMA M, et al. KEGG as a reference resource for gene and protein annotation[J]. Nucleic Acids Research, 2016, 44(D1): D457–D462.
- [27] 钟渊涵, 王玲珑, 邱自超, 等. 基于代谢组学的去芹糖桔梗皂苷 D 镇咳祛痰机制研究[J]. 药学报, 2022, 57(10): 3186–3194.
- ZHONG Y H, WANG L L, QIU Z C, et al. The antitussive and expectorant mechanisms of deapio-platycodin D as determined by metabolomics[J]. Acta Pharmaceutica Sinica, 2022, 57(10): 3186–3194.
- [28] PEDLEY A M, BENKOVIC S J. A new view into the regulation of purine metabolism: The purinosome [J]. Trends in Biochemical Sciences, 2017, 42(2): 141–154.
- [29] CHITRAKAR I, KIM –HOLZAPFEL D M, ZHOU W, et al. Higher order structures in purine and pyrimidine metabolism[J]. Journal of Structural Biology, 2017, 197(3): 354–364.
- [30] SHIMIZU K, MATSUOKA Y. Feedback regulation and coordination of the main metabolism for bacterial growth and metabolic engineering for amino acid fermentation[J]. Biotechnology Advances, 2022, 55: 107887.
- [31] MIYAMOTO T, HOMMA H. D –Amino acid metabolism in bacteria[J]. The Journal of Biochemistry, 2021, 170(1): 5–13.
- [32] GALILI G, AMIR R, FERNIE A R. The regulation of essential amino acid synthesis and accumulation in plants[J]. Annual Review of Plant Biology, 2016, 67(1): 153–178.
- [33] ITO T, MASAKI H, FUJITA K, et al. Identification of pathways for production of d-glucaric acid by *Pseudogluconobacter saccharoketogenes*[J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2024, 196(4): 1876–1895.
- [34] NELSON A G, WANG H, DEWAR P M, et al. Synthetic 5-amino-6-D-ribitylamino uracil paired with inflammatory stimuli facilitates MAIT cell expansion *in vivo*[J]. Frontiers in Immunology, 2023, 14: 1109759.
- [35] PINHAL S, ROPERS D, GEISELMANN J, et al. Acetate metabolism and the inhibition of bacterial growth by acetate[J]. Journal of Bacteriology, 2019, 201(13): e00147–19.
- [36] HUI W, ZHANG W, KWOK L Y, et al. A novel bacteriophage exclusion (BREX) system encoded by the *pglX* gene in *Lactobacillus casei* Zhang[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2019, 85(20): e01001–19.
- [37] YAN J, WU M, KWOK L Y, et al. Adenine DNA methylation is involved in regulating ethanol and osmotic stress responses in *Lactocaseibacillus paracasei* Zhang[J]. Food Frontiers, 2023, 4(3): 1347–1361.
- [38] 吴美灵, 张文羿. 副干酪乳酪杆菌甲基化转移酶突变体响应渗透胁迫的代谢组学研究[J]. 食品与发酵工业, 2023, 49(20): 17–22.
- WU M L, ZHANG W Y. Metabolomic study of methylated transferase mutants of *Lactocaseibacillus paracasei* in response to osmotic stress[J]. Food and Fermentation Industries, 2023, 49(20): 17–22.
- [39] ZHAO J, ZHANG M, HUI W, et al. Roles of adenine methylation in the physiology of *Lactocaseibacillus paracasei*[J]. Nature Communications, 2023, 14(1): 2635.

## Exploring the Functional Characteristics of Methyltransferase Gene Based on Metabolomics Technology

TIAN Qifang, ZHANG Wenyi\*

(Key Laboratory of Dairy Biotechnology and Engineering, Ministry of Education, Inner Mongolia Agricultural University,  
Hohhot 010018)

**Abstract** To investigate how DNA methylation affects the interaction between DNA sequences and proteins, as well as its influence on cellular functions. This study compared methyltransferase mutant *Lactocaseibacillus paracasei* Zhang  $\Delta 2054$  with wild-type *Lactocaseibacillus paracasei* Zhang by ultra-high performance liquid chromatography and mass spectrometry also conducted multivariate statistical analysis of the differential metabolites in the logarithmic growth period (12 h), combined with database search and mass spectral information matching, and obtained a total of 33 significantly different metabolites, of which 10 and 23 significantly different metabolites were up-regulated and down-regulated respectively, mainly including purine, pyrimidine and their analogues, nucleosides, nucleotides and analogues, amino acids and their derivatives, carbohydrates and carbohydrate conjugates, etc. It is also concentrated in purine metabolism, pyrimidine metabolism, lysine biosynthesis, riboflavin metabolism, propionic acid metabolism, phosphate pentose and other metabolic pathways. Although the *LCAZH\_2054* gene is not the control gene of methylation phenotype, it plays an important role in the metabolism of strains. In this study, through metabolomics analysis, to reveal the growth and metabolism differences between methyltransferase mutant *Lactocaseibacillus paracasei* Zhang  $\Delta 2054$  and wild type *Lactocaseibacillus paracasei* Zhang on chemically restricted medium. The effects of *LCAZH\_2054* gene on the utilization of nutrients and the production of metabolites during growth and metabolism were further discussed.

**Keywords** DNA methylation; *Lactocaseibacillus paracasei*; metabolomics