

分类号_____

密 级_____

U D C_____

单位代码 10435

青島農業大學

硕 士 专 业 学 位 论 文

肉碱在需盐色盐杆菌 DSM 3043 及其突变株适应盐胁迫和
温度胁迫中的作用

Role of carnitine in adaptation of *Chromohalobacter*
sallexigens DSM 3043 and its mutants to osmotic and
temperature stress

姓 名： 孟祥麟

指导教师： 郭立忠 教授

卢伟东 副教授

第二导师： 高霞 高级农艺师

学位类别： 工程硕士

专业领域： 生物工程

中国·青岛
二〇二二年六月

Qingdao Agricultural University
The Thesis of Professional Master

Role of carnitine in adaptation of *Chromohalobacter*
salexigens DSM 3043 and its mutants to osmotic and
temperature stress

Graduate with Professional Master Degree:

Meng Xianglin

Mentor:Guo Lizhong

Lu Weidong

Second Mentor:Gao Xia

Type of Professional Degree: Master of Engineering

Academic field: Biological Engineering

Qingdao. China
June, 2022

独 创 性 声 明

本人声明所呈交的论文是我个人在导师指导下进行的研究工作及取得的研究成果。尽我所知，除了文中特别加以标注和致谢的地方外，论文中不包含其他人已经发表或撰写过的研究成果，也不包含为获得青岛农业大学或其他教育机构的学位或证书而使用过的材料。与我一同工作的人员对本研究所做的任何贡献均已在论文中作了明确的说明并表示了谢意。

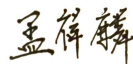
研究生签名： 

时间： 2022 年 6 月 14 日

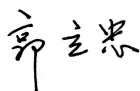
关于论文使用授权的说明

本人完全了解青岛农业大学有关保留、使用学位论文的规定，即：学校有权保留送交论文的复印件和磁盘，允许论文被查阅和借阅，可以采用影印、缩印或扫描等复制手段保存、汇编学位论文。同意青岛农业大学可以用不同方式在不同媒体上发表、传播学位论文的全部或部分内容。

(保密的学位论文在解密后应遵守此协议)

研究生签名： 

时间： 2022 年 6 月 14 日

导师签名： 

时间： 2022 年 6 月 14 日

肉碱在需盐色盐杆菌 DSM 3043 及其突变株适应盐胁迫和温度胁迫中的作用

摘 要

需盐色盐杆菌 DSM 3043 是一种中度嗜盐菌, 具有宽广的耐盐范围, 且它的全基因组已被测序, 是研究原核生物渗透调控的模式菌株。肉碱是一种相容性溶质, 在自然界中广泛存在。然而, 有关肉碱在中度嗜盐菌中的代谢途径和生理功能的报道却很少。在本研究中, 生物信息学分析发现需盐色盐杆菌 DSM 3043 基因组中的 *csal_3172*、*csal_3173* 和 *csal_3174* 基因与已经报道的铜绿假单胞菌中肉碱代谢为甘氨酸甜菜碱的 L-肉碱脱氢酶、脱氢肉碱裂解酶 (BKACE) 和甜菜碱酰-CoA 硫解酶的基因具有同源性, 因此利用同源重组的手段对 *csal_3172*、*csal_3173* 和 *csal_3174* 基因进行敲除, 通过获得基因敲除突变株来解析需盐色盐杆菌 DSM 3043 中的肉碱代谢途径。本研究从以下两个方面对需盐色盐杆菌 DSM 3043 中肉碱代谢为甘氨酸甜菜碱的途径进行了研究:

1. 利用两亲本接合的敲除体系构建了 $\Delta csal_3172$ 、 $\Delta csal_3173$ 、 $\Delta csal_3174$ 三个单基因和一个 $\Delta csal_7234$ 三基因敲除突变株, 通过在 S-M63 限定性固体培养基上检测了野生型菌株和突变株对肉碱作为碳氮源的利用情况, 发现野生型菌株可以在以葡萄糖为碳源、L-肉碱为氮源的条件下生长, $\Delta csal_3172$ 的生长受到抑制, $\Delta csal_3173$ 、 $\Delta csal_3174$ 和 $\Delta csal_7234$ 不生长, 说明 *csal_3172*、*csal_3173*、*csal_3174* 这三个基因均参与到需盐色盐杆菌 DSM 3043 中 L-肉碱代谢为甘氨酸甜菜碱的过程。

2. 肉碱不仅可以作为营养物质, 还可以作为渗透保护剂和温度保护剂。当在 37°C 的高盐条件下生长时, 需盐色盐杆菌 DSM 3043 通过一系列反应将肉碱转化为甘氨酸甜菜碱来行使渗透保护作用。在低温 (15°C) 和高温 (45°C) 条件下生长时, 肉碱及甘氨酸甜菜碱同时在细胞内积累, 共同起到渗透保护和温度保护的作用。研究了盐度和温度对需盐色盐杆菌 DSM 3043 野生型菌株和突变株生长速率和细胞积累相容性溶质的影响。¹³C-NMR 结果显示, 在添加 DL-肉碱的 S-M63 培养基中, 三基因敲除突变株 $\Delta csal_7234$ 内积累甘氨酸甜菜碱, 而添加 L-肉碱时, 突变株 $\Delta csal_7234$ 内不积累甘氨酸甜菜碱, 表明需盐色盐杆菌 DSM 3043 中存在一条未知的 D-肉碱降解为甘氨酸甜菜碱的途径。本研究揭示了细胞在限定性培养基中同时积累甘氨酸甜菜碱和肉碱后两种化合物在细胞内的生理作用。

综上所述, 本研究结果拓展了对单一或多个环境非生物胁迫下需盐色盐杆菌中肉碱代谢及其生理功能的认识。

关键词：需盐色盐杆菌；肉碱；甘氨酸甜菜碱；相容性溶质

Abstract

Chromohalobacter salexigens DSM 3043 is a moderate halophilic strain, which has a wide range of salt tolerance, and its entire genome has been sequenced. It is a model strain for the study of prokaryotes osmotic regulation. Carnitine is a compatible solute that is widely found in nature. However, there are few reports on its metabolic and physiological functions in moderately halophilic bacteria. In this study, bioinformatics analysis found that the *csal_3172*, *csal_3173* and *csal_3174* genes have homology with the genes reported L-carnitine dehydrogenase, dehydrocarnitine lyase (BKACE) and betainyl-CoA thiolase that metabolize carnitine to glycine betaine in *Pseudomonas aeruginosa*. Therefore, we knocked out *csal_3172*, *csal_3173* and *csal_3174* genes by means of homologous recombination and obtained gene knockout mutant strains. We studied the pathway of carnitine metabolism into glycine betaine in *Chromohalobacter salexigens* DSM 3043 from the following two aspects:

1. Three single-gene knockout mutants $\Delta csal_3172$, $\Delta csal_3173$, $\Delta csal_3174$ and one triple-gene knockout mutant $\Delta csal_7234$ were constructed using the knockout system of two-parent conjugation. Utilization of carnitine as carbon and nitrogen source, it was found that the wild-type strain could grow under the conditions of glucose as carbon source and L-carnitine as nitrogen source, the growth of $\Delta csal_3172$ was inhibited, and $\Delta csal_3173$, $\Delta csal_3174$ and $\Delta csal_7234$ did not grow, indicating that *csal_3172*, *csal_3173* and *csal_3174* were all involved in the process of metabolizing L-carnitine to Glycine betaine in *Chromohalobacter salexigens* DSM 3043.

2. Carnitine not only acts as a nutrient, but also acts as an osmoprotectant and a temperature protector. When grown at 37°C under high salt conditions, the strain uses carnitine as an osmotic protective agent and converts it into GB through a series of reactions. When growing at low temperature (15°C) and high temperature (45°C), carnitine and glycine betaine accumulated in the cells at the same time, which together played the role of osmotic protection and temperature protection. The effects of salinity and temperature on the growth rate and cell accumulation of compatible solutes of wild-type and mutant strains of *Chromohalobacter salexigens* were studied.¹³C-NMR showed that glycine betaine was accumulated in the triple knockout mutant $\Delta csal_7234$ with addition of DL-carnitine, but not in the triple knockout mutant $\Delta csal_7234$ with addition of L-carnitine. This suggests that there is an unknown D- carnitine degradation pathway in *Chromohalobacter salexigens* DSM 3043. For the first time, the intracellular physiological

effects of glycine betaine and carnitine were revealed in cells after simultaneous accumulation of glycine betaine and carnitine in a defined medium.

Taken together, the data provided in this study extend our knowledge of carnitine metabolism and its physiological functions in *Chromohalobacter salexigens* under single or multiple environmental abiotic stresses.

Key words: *Chromohalobacter salexigens*; Carnitine; Glycine betaine; Compatible solute

目 录

第一章 前言 1

1.1 嗜盐微生物的研究概况 1

1.2 中度嗜盐菌的研究概况 2

1.3 中度嗜盐菌的耐盐机制 2

1.4 相容性溶质的种类性质 3

1.5 肉碱代谢途径 4

1.6 需盐色盐杆菌 DSM 3043 的研究概况 6

1.7 核磁共振技术 7

1.8 研究的目的及意义 7

第二章 肉碱代谢相关基因敲除突变株的构建和生理验证 8

2.1 前言 8

2.2 实验材料 8

2.2.1 实验用菌株与质粒 8

2.2.2 培养基种类及配方 9

2.2.3 实验药品及实验试剂 10

2.2.4 实验仪器 10

2.3 实验方法 11

2.3.1 敲除载体的构建 11

2.3.2 转化 14

2.3.3 双亲接合 14

2.4 实验结果 16

2.4.1 ZW4-1 基因组提取验证 16

2.4.2 上下游同源臂和 *cat* 的 PCR 扩增验证 17

2.4.3 载体构建验证 18

2.4.4 第一次同源重组验证结果 18

2.4.5 第二次同源重组验证结果 20

2.4.6 生理实验验证 23

2.5 本章小结	24
第三章 肉碱在盐胁迫和温度胁迫下对细胞生长的影响及代谢关键基因的表达和酶学性质验证	25
3.1 前言	25
3.2 实验材料	25
3.2.1 菌株和质粒	25
3.2.2 实验用试剂	25
3.2.3 实验用仪器	26
3.3 实验方法	26
3.3.1 相容性溶质的提取	26
3.3.2 薄层层析	26
3.3.3 异源蛋白诱导表达	27
3.3.4 酶学性质验证	27
3.3.5 基因的回补	28
3.4 实验结果	29
3.4.1 添加 DL-肉碱对 ZW4-1 生长的影响	29
3.4.2 突变株添加 DL-肉碱或 L-肉碱的 ^{13}C -NMR 检测	30
3.4.3 ZW4-1 和突变株在不同盐浓度下添加 DL-肉碱对细胞生长的影响	33
3.4.4 蛋白纯化及酶活验证	33
3.4.5 低温低盐条件下的生长曲线和 ^{13}C -NMR 检测	35
3.4.6 TLC 验证结果	36
3.4.7 低温高盐条件下的生长曲线和 ^{13}C -NMR 检测	37
3.4.8 高温低盐条件下的生长曲线和 ^{13}C -NMR 检测	39
3.4.9 高温高盐条件下的生长曲线和 ^{13}C -NMR 检测	40
3.4.10 ZW4-1 添加外源 D-肉碱的 ^{13}C -NMR 检测	42
3.4.11 回补菌株生长曲线的测定	43
3.5 本章小结	43
第四章 结论与展望	45
4.1 结论	45
4.2 展望	46

参考文献	47
附录表 缩写词说明	51
致 谢	53
作者简介	54

Contents

Chapter 1 Preface.....	1
1.1 Research overview of halophilic microorganisms.....	1
1.2 Research overview of moderately halophilic bacteria.....	2
1.3 Salt tolerance mechanism of moderately halophilic bacteria.....	2
1.4 Types of compatible solutes.....	3
1.5 Carnitine metabolism pathway.....	4
1.6 Research overview of <i>Chromohalobacter salexigens</i> DSM 3043.....	6
1.7 Nuclear Magnetic Resonance Technology.....	7
1.8 Purpose and significance of the research.....	7
Chapter 2 Construction and Physiological Validation of Carnitine Metabolism-related Gene Knockout Mutants.....	8
2.1 Preface.....	8
2.2 Experimental materials.....	8
2.2.1 Experimental strains and plasmids.....	8
2.2.2 Types and formulas of culture medium.....	9
2.2.3 Experimental drugs and experimental reagents.....	10
2.2.4 Experimental apparatus.....	10
2.3 Experimental method.....	11
2.3.1 Construction of knockout vector.....	11
2.3.2 Convert.....	14
2.3.3 Parental bonding.....	14
2.4 Experimental results.....	16
2.4.1 ZW4-1 genome extraction verification.....	16
2.4.2 Validation of upstream and downstream homology arms PCR amplification.....	17
2.4.3 Validation of Vector Construction.....	18
2.4.4 The results of the first homologous recombination verification.....	18
2.4.5 The results of the second homologous recombination verification.....	20

2.4.6 Physiological experimental verification.....	23
2.5 Chapter summary.....	24
Chapter 3 Effects of carnitine on cell growth under salt stress and temperature stress, expression of key genes in carnitine metabolism and verification of enzymatic properties.....	25
3.1 Preface.....	25
3.2 Experimental Materials.....	25
3.2.1 Strains and Plasmids.....	25
3.2.2 Experimental reagents.....	25
3.2.3 Experimental instruments.....	26
3.3 Experimental method.....	26
3.3.1 Extraction of Compatible Solutes.....	26
3.3.2 TLC.....	27
3.3.3 Inducible expression of heterologous proteins.....	27
3.3.4 Validation of enzymatic properties.....	27
3.3.5 Complement of genes.....	28
3.4 Experimental results.....	29
3.4.1 Growth curves of ZW4-1 with and without carnitine at different salt concentrations.....	29
3.4.2 ¹³ C-NMR detection of mutant strains supplemented with DL-carnitine or L-carnitine.....	30
3.4.3 Growth curve determination of ZW4-1 and mutant strains supplemented with DL-carnitine at different salt concentrations.....	33
3.4.4 SDS-PAGE results.....	33
3.4.5 Growth curve and ¹³ C-NMR measurement under low temperature and low salt conditions.....	35
3.4.6 TLC verification results.....	36
3.4.7 Growth curve and ¹³ C-NMR detection under low temperature and high salt conditions.....	37
3.4.8 Growth curve and ¹³ C-NMR detection under high temperature and low salt conditions.....	39
3.4.9 Growth curve and ¹³ C-NMR detection under high temperature and high salt conditions.....	40
3.4.10 ¹³ C-NMR detection of ZW4-1 supplemented with exogenous D-carnitine.....	42
3.4.11 Determination of Growth Curve of Complementary Strain.....	43

3.5 Chapter summary.....	43
Chapter 4 Conclusion and Outlook.....	45
4.1 Conclusion.....	45
4.2 Outlook.....	46
References.....	47
Appendix Table·Description of Abbreviations.....	51
Thanks.....	53
About the Author.....	54

第一章 前言

1.1 嗜盐微生物的研究概况

嗜盐微生物（halophilic microorganisms）属于极端微生物的范畴，在盐湖、死海、盐场等盐浓度很高的环境中广泛存在，并且它们通常对赖以生存的生态系统产生强烈影响（Oren et al., 2006）。嗜盐微生物通过胞内 K⁺的积累、Na⁺的排放、胞内小分子相容性溶质的积累等渗透压调节机制，应对外界环境的渗透胁迫，其特殊的生理结构和代谢机制使嗜盐微生物能够在盐浓度很高的环境中生存下来（王伟伟等，2015）。随着科学技术的发展，嗜盐微生物被越来越多的应用在生物技术领域。近年来，其潜在的生物应用价值吸引了众多的国内外学者的深入研究。根据生长最适盐浓度的不同，Kushner 对嗜盐菌进行了分类（Kushner et al., 1978）。

表 1.1 嗜盐微生物根据最适盐浓度的分类

Table 1.1 Classification of halophilic microorganisms according to optimum salt concentration

分类	最适盐浓度	微生物举例
非嗜盐菌 (Non-halophilic bacteria)	<0.2 M	大多数淡水微生物和普通真细菌
轻度嗜盐菌 (Slight-halophilic bacteria)	0.2-0.5 M	大多数海洋微生物
中度嗜盐菌 (Moderately halophilic bacteria)	0.5-2.5 M	<i>Vibriocosticola</i> <i>Pseudomonas species</i> <i>Paracoccus halodenitrificans</i>
边缘极端嗜盐菌 (Extreme edge halophilic bacteria)	1.5-4.0 M	<i>Extothiorhodospira halophila</i> <i>Actinopolyspora halophila</i>
极端嗜盐菌 (Extreme halophilic bacteria)	2.5-5.2 M	<i>Halobacterium salinarium</i> <i>Halococcus morrhuae</i>
耐盐菌 (Halotolerant bacteria)	能够耐高盐浓度，>2.5 M 为极端耐盐微生物	<i>Staphylococcus epidermidies</i> <i>Solute-tolerant yeasts</i> <i>fungi</i>

1.2 中度嗜盐菌的研究概况

中度嗜盐菌属于嗜盐微生物的范畴，但不是一个分类学上的名词，是一大类生长离不开 NaCl、最适生长盐浓度在 5~15% (w/v) 之间的生理类群(任培根和周培瑾, 2003)。中度嗜盐菌的耐盐范围极广，能够在 0.1~32.5% (w/v) NaCl 的条件下生长(Kaasen et al., 1992)。开展中度嗜盐菌的研究工作，对于了解微生物耐盐机理有着重要的意义。在高盐环境下，中度嗜盐菌细胞内积累相容性溶质的浓度往往高于其它嗜(耐)盐微生物，甘氨酸甜菜碱和四氢嘧啶是高盐条件下细胞内积累的主要相容性溶质，它们在细胞内的浓度与细胞外渗透压成正相关。中度嗜盐菌与极端嗜盐菌相比，中度嗜盐菌可以适应外界盐浓度在更宽范围内的波动和变化，而极端嗜盐菌在外界盐浓度低于 9% (w/v) NaCl 条件时，细胞就会发生破裂。此外，由于中度嗜盐菌细胞内的离子浓度更接近其他不耐盐微生物胞内的离子浓度，因此对中度嗜盐菌的研究更有利于今后对提高其它微生物对盐胁迫的耐受性的研究。

1.3 中度嗜盐菌的耐盐机制

中度嗜盐菌存在于盐浓度很高的环境中，如盐湖、盐场中(Ventosa et al., 1998)。为了适应外界的高盐环境和渗透压力，嗜盐微生物在漫长的进化中具备了一整套完善的渗透响应体系和耐盐机制。据目前的研究报道，发现其主要采用两种手段来应对外界渗透压的波动(Brown, 1976)。第一种策略是“内盐渗透调控模式”。当细胞外界环境的渗透压变高时，细胞除了会被动地排出胞内水分外，还会通过选择性地积累细胞外的 K^+ 和 Cl^- ，以此来维持细胞内、外环境渗透压的平衡。另外，适量的 Na^+ 可以维持细胞膜结构完整，同时保证细胞功能正常。但是胞内 Na^+ 浓度过高对于细胞有毒害作用，需要 Na^+ 排出系统来维持胞内稳定适宜的 Na^+ 浓度。尽管细胞内、外环境的盐浓度大致相同，但是内外环境的盐离子组成却有所差异。细胞结构组分和酶蛋白等大分子物质不仅要适应高浓度的盐离子，而且还依赖高盐浓度的存在(Grammann et al., 2002)，这是细胞渗透响应的第一种策略，多数的极端嗜盐菌采用这种策略来应对渗透胁迫。第二种策略是“外盐渗透调控模式”。大多数的轻度嗜盐菌和中度嗜盐菌都采用这种方式应对高盐胁迫对细胞正常生理活动带来的毒害作用。细胞可以通过自身代谢或从外界环境中摄取从而积累相容性溶质，这些小分子物质高度可溶，既能提高胞内水活度，又不影响细胞正常代谢。结果使得水分子能够再次进入细胞(Ventosa, 1998)。在高盐环境下，中度嗜盐菌细胞内积累相容性溶质的浓度往往高于其它嗜(耐)盐微生物，GB 和四氢嘧啶是

高盐条件下细胞内积累的主要相容性溶质，它们在细胞内的浓度与细胞外渗透压成正相关（García-Esteva et al., 2006）。中度嗜盐菌主要通过积累相容性溶质来应对外界渗透压变化，从而使细胞膜内外环境的渗透压保持平衡（Kaasen et al., 1992; Matthew et al., 2008）。

1.4 相容性溶质的种类性质

1972 年，Brown 等人首次提出了相容性溶质的概念（Brown et al., 1972）。当外界环境渗透压较高时，细胞内会被动的排出一些水分，这时微生物通过在胞内积累有限的几种小分子溶质，如糖类、多元醇、甜菜碱、氨基酸及其衍生物等以提高细胞内水活度，应对外界高盐环境下的渗透压力，对细胞结构和蛋白质结构起到一定的保护作用（Galinski and Trüper., 1994; 王颖群和陶涛, 1994; 戴秀玉等, 1994; Rafaeli-Eshkol and Avi-Dor., 1968）。由于这类溶质的高浓度积累可使细胞内外渗透压达到平衡，并且不妨碍细胞正常的代谢活动，因而被称为“相容性溶质”（Measure, 1975）。除了渗透保护的功能外，相容性溶质还可以保护细胞免受额外的压力来源，如高压、低温等外界压力。另外，某些相容性溶质可以作为一种碳源或者氮源，作为能源物质为细胞生理代谢提供能量（Matthew et al., 2008; Kuhlmann et al., 2008; Le Rudulier et al., 1984; 赵百锁等, 2005）。微生物除了自身合成相容性溶质以外，还通过膜转运系统来吸收或者释放相容性溶质，以达到调节细胞内外渗透压平衡的目的。如果细胞外介质中存在相容性溶质，细胞主要依靠转运系统从外界吸收相容性溶质，而不是采用自身合成的方式，这一点从生物能量角度来看是合理的。大多数嗜（耐）盐微生物具有两种不同的相容性溶质转运系统：依赖结合蛋白的 ABC（ATP-binding cassette）转运系统（如大肠杆菌 ProU）和由单一跨膜蛋白组成的次级转运系统（Tibbetts and Appling, 2010）。

中度嗜盐菌在不同的条件下积累相容性溶质有两种可能：一是不同的细菌在相同的环境中可能会积累不同的相容性溶质，二是相同的细菌在不同的环境下可能会积累不同的相容性溶质（杨霆, 2019）。目前已知在中度嗜盐菌中积累的相容性溶质主要有海藻糖、甘氨酸甜菜碱、肉碱、二甲基甘氨酸、羟化四氢嘧啶、四氢嘧啶等。（Weisser et al., 1985）

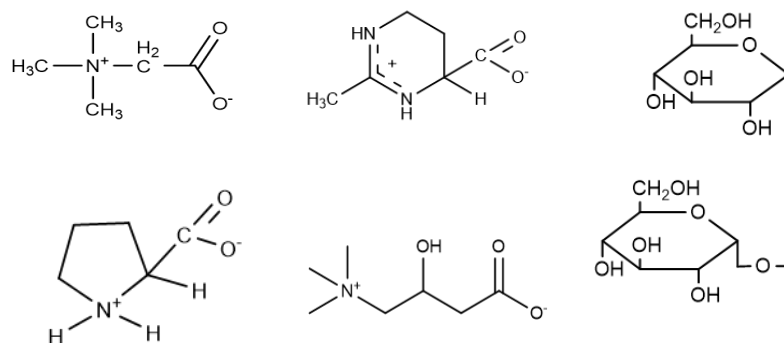


图 1.1 几种常见的相容性溶质

Fig 1.1 Several common compatible solutes

1.5 肉碱代谢途径

肉碱是一种季胺类化合物，在自然界中广泛存在，主要存在于动物的肌肉组织中，对脂肪酸运输到线粒体中有重大贡献（Fraenkel, 1953; Kappes, 1998; Jung et al., 1993; Jacques et al., 2018）。研究发现在土壤和水域中也含有丰富的肉碱，这证明除了在动物中，微生物和植物也会产生肉碱（Meadows and Wargo, 2015）。在动植物中，L-肉碱是由蛋氨酸和赖氨酸合成的（Jung et al., 1993; Strijbis et al., 2010; Rippa et al., 2012），在一些真核微生物中，如白色念珠菌（Strijbis et al., 2009），粗糙脉孢菌（Kaufman and Broquist, 1977），可以从 N^ε-三甲基赖氨酸内源合成 L-肉碱，其合成过程与动物和高等植物的合成过程相似（Strijbis et al., 2010）。在微生物中，肉碱可以从环境中直接摄取，也可以通过肉碱的前提物分解代谢生成，肉碱除了可以作为一种相容性溶质维持细胞内外环境渗透压平衡外，还可以作为一种碳源或氮源，为细胞的生理代谢提供能量。原核微生物不像动物那样具有肉碱的合成途径，但一些细菌可以通过γ-丁基甜菜碱羟化酶直接羟基化γ-丁基甜菜碱生成肉碱（Rüetschi et al., 1993）。微生物可以通过三种不同的途径降解 L-肉碱，其中甘氨酸甜菜碱（GB）、TMA 和γ-butyrobetaine 分别代表这三种不同途径的产物（图 1.2）。第一条途径存在于埃希氏菌属、沙门氏菌属和变形杆菌属中，在其他碳源和氮源存在的厌氧条件下，催化左旋肉碱转化生成以巴豆甜菜碱为中间体的γ-丁基甜菜碱。由于左旋肉碱的碳氮骨架不被细胞同化，γ-丁基甜菜碱被发现作为最终代谢产物在培养基中积累。在需氧条件下，埃希氏菌属和变形杆菌属的一些菌株也能够利用该途径分解左旋肉碱，而其他菌株如弗

氏柠檬酸杆菌和普罗维登斯菌则不能 (Elßner et al., 1999)。在大肠杆菌中, 参与左旋肉碱降解的基因位于两个不同的 *caiTABCDE* 和 *fixABCX* 操纵子中, 左旋肉碱的存在诱导这些基因的转录 (Buchet et al., 1998)。然而, 该途径在这些细菌中的确切代谢作用仍有待阐明。第二种途径已在农杆菌属、产碱菌属、节杆菌属、假单胞菌属、中华根瘤菌属和黄单胞菌属的成员中发现, 它们能够有氧降解左旋肉碱, 同化分子骨架中的碳和氮 (Wargo and Hogan, 2009)。肉碱在细胞内可以通过以下系列酶促反应生成甘氨酸甜菜碱, 可以作为相容性溶质积累以响应非生物胁迫, 甘氨酸甜菜碱也可以依次去甲基化形成二甲基甘氨酸、肌氨酸和甘氨酸。第三种途径发生在醋酸钙不动杆菌 (Miura-Fraboni et al., 1982)、粘质沙雷氏菌中 (Unemoto et al., 1966) 和恶臭假单胞菌中 (Miura-Fraboni et al., 1982), 它们将左旋肉碱的 C-N 键分开以产生 TMA 和四碳 (C4) 单元。生成的 C4 单元随后被用作碳源, 而三甲胺不能进一步代谢并释放到环境中。据研究报道, 来自鲍曼不动杆菌 ATCC 19606 的双组分 Rieske 型单加氧酶 (CntAB) 被证明可作用于肉碱及其衍生物 γ -丁基甜菜碱, 并催化左旋肉碱依赖氧裂解为 TMA 和苹果酸半醛。后者被苹果酸半醛脱氢酶进一步氧化为苹果酸, 苹果酸是三羧酸循环的中间体 (Zhu et al., 2014)。根据目前的研究发现, 肉碱在微生物中的代谢途径如图 1.2 所示:

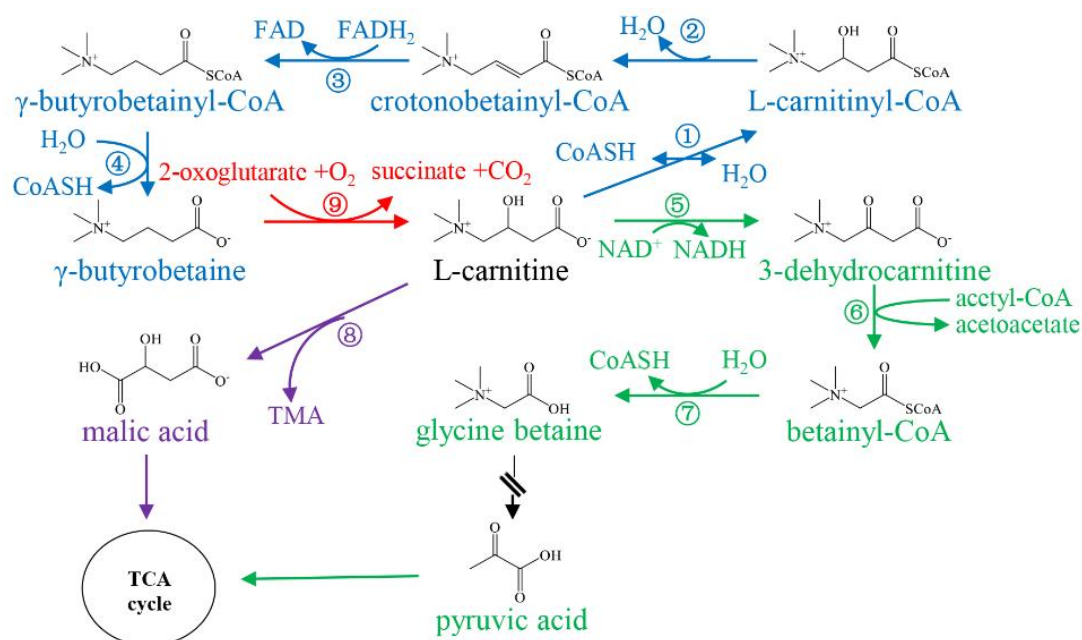


图 1.2 肉碱在细菌中的代谢途径

Fig 1.2 Metabolic pathways of carnitine in bacteria

肉碱是具有两种不同手型的化合物,既有 L-肉碱存在,又有 D-肉碱的存在,但目前还没有关于微生物可以利用 D-肉碱的报道,并且 D-肉碱的人工合成过程也较为繁琐。除了渗透保护的功能外,肉碱的积累还可以帮助细胞应对一些其他的外界压力,如高压,低温等。在肉碱被发现 50 年后,研究发现各种各样的革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌可以在有氧或无氧环境中利用肉碱实现各种细胞功能,包括作为电子受体,作为一种相容性溶质在环境中生存,或作为单一的碳源、氮源和能源。研究报道在李斯特菌(Lucchesi et al., 1995)、枯草芽孢杆菌(Kappes and Bremer, 1998)和胚芽乳杆菌(Kets et al., 1994)中,肉碱及其相关代谢产物巴豆甜菜碱和 γ -丁基甜菜碱已被证明可以通过 OpuC 转运体摄取来抵御冷应激和热应激(Kappes et al., 1998)。肉碱作为低温和高温保护剂的作用可能不仅限于李斯特菌和芽孢杆菌,这一作用也可能出现在其他微生物中,这些研究发现都需要进一步验证探索。

1.6 需盐色盐杆菌 DSM 3043 的研究概况

需盐色盐杆菌(*Chromohalobacter salexigens*) DSM 3043。最初分离自博内尔岛,是属于中度嗜盐菌的一种,它具有很宽的耐盐范围,能在 0.15 M-5.5 M NaCl 浓度的丰富培养基上生长,在 0.5 M-3 M NaCl 浓度的寡营养培养基上生长(Cánovas et al., 1996),其全基因组的测序和注释工作均已由美国能源部基因联合研究所完成,是研究中度嗜盐菌“相容性溶质渗透调控策略”的模式菌株。开展中度嗜盐菌的研究工作,对于了解微生物耐盐机理有着重要的意义。目前的研究工作主要集中在细胞如何通过合成或者转运的方式在细胞内积累高浓度的相容性溶质。“当外界渗透压降低时,细胞将相容性溶质释放到细胞外;当渗透压升高时,再次将它们转运到细胞内”的观点已被学者们普遍认同。随着研究的不断发现,需盐色盐杆菌 DSM 3043 在工业上的应用也引起了人们的重视。嗜盐菌可以用来提取一些酶、相容性溶质、生物表面活性物质以及其他在生物技术领域有益的物质,具有广阔的研究价值和应用前景(Vargas and Nieto, 2004; Ventosa and Nieto., 1995)。嗜盐菌对营养的需求很简单,实验室环境可以很容易的满足其生长需求,这增加了嗜盐菌细胞工厂生物工艺降低能源和减少淡水消耗的优势(Gay et al., 1985)。

从基因层面解析相容性溶质代谢途径是研究其耐盐机制最直接的方法,构建基因敲除突变株是研究细胞内积累相容性溶质的关键手段,实验室前期建立了需盐色盐杆菌 DSM 3043 的无痕敲除手段,为开展接下来的研究提供了良好的研究手段。

1.7 核磁共振技术

核磁共振波谱 (Nuclear Magnetic Resonance, NMR) 是指核磁矩不为零的原子核, 在外磁场的作用下, 吸收射频辐射而产生能级跃迁的谱学技术 (Hills, 2006)。主要有碳谱 (^{13}C -NMR) 给出小分子化合物的碳的比例和个数和氢谱 (^1H -NMR) 给出小分子化合物中氢的比例和个数 (Viereck, 2006)。由于其操作简单, 不破坏化合物的结构, 样品不需要过多的提前处理, 所需的样品量小等优点, 被广泛应用于小分子化合物的鉴定, 核磁共振技术在小分子鉴定方面具有广阔前景, 被广泛应用于天然药物化学, 蛋白质结构, 石油化学等领域。本研究通过在不同培养条件下培养需盐色盐杆菌, 提取相容性溶质后 ^{13}C -NMR 核磁共振检测, 分析比较细胞在不同环境下积累的相容性溶质的差异。

1.8 研究的目及意义

作为地球上的边缘生命现象, 极端微生物经过长期进化已具备了适应极端环境所需的特殊结构和遗传基础, 研究其特殊代谢途径及其代谢产物不仅在生物技术和工业生产领域具有极大的潜在应用价值, 而且对于揭示生命起源、系统进化等方面具有重要的理论意义。挖掘耐盐生物种质资源, 深入研究嗜盐微生物独特的耐盐调控机制, 通过基因工程的手段打破物种限制, 将嗜盐菌的耐盐基因及其调控因子转移到植物或其它微生物基因组中, 对于提高工、农业生产用微生物菌种、农作物的抗逆性以及盐碱地的利用效率等方面具有广阔的应用前景。

需盐色盐杆菌 DSM 3043 是中度嗜盐菌的一种, 可以在盐浓度很宽的范围内生 长 (Nieto Gutiérrez et al., 1999)。这些特性使其成为研究原核生物渗透响应机制的模式菌株。细胞内相容性溶质的积累对于需盐色盐杆菌适应渗透胁迫和温度胁迫至关重要 (Vargas et al., 2008), 然而人们对肉碱在中度嗜盐菌中的代谢机制和生理作用知之甚少。实验前期, 通过生物信息学初步分析结果显示, 在需盐色盐杆菌 DSM 3043 的基因组中存在一个参与 L-肉碱代谢相关的基因簇, 这表明该菌株在自然环境中可以获得 L-肉碱。本研究通过外源肉碱在渗透胁迫、温度胁迫以及两种极端条件下对野生型菌株及其突变体细胞生长和细胞积累相容性溶质的影响, 首次揭示了肉碱的积累和代谢与需盐色盐杆菌对渗透胁迫和温度胁迫的适应之间的关系。

第二章 肉碱代谢相关基因敲除突变株的构建和生理验证

2.1 前言

据报道,铜绿假单胞菌 PAO1 和苜蓿根瘤菌 RM2011 可以利用 L-肉碱作为唯一的碳氮源,在有氧条件下将 L-肉碱转化为 GB。在这两株菌株中,参与 L-肉碱降解为 GB 的基因已被鉴定(Wargo and Hogan, 2009; Bazire et al., 2019),并且在苜蓿根瘤菌 RM2011 中相关基因产物的功能已被验证(Bazire et al., 2019)。本研究前期经过生物信息学比对发现 *csal_3173* 与铜绿假单胞菌 PAO1 中编码 L-肉碱脱氢酶的基因具有 71%的氨基酸序列相似性、*csal_3174* 与脱氢肉碱裂解酶(BKACE)具有 69%的相似性,*csal_3172* 与甜菜碱酰-CoA 硫解酶具有 57%相似性,推测他们在需盐色盐杆菌中依次催化 L-肉碱降解为甘氨酸甜菜碱的三步反应。对需盐色盐杆菌 DSM 3043 进行目的基因的敲除,从而获得基因敲除突变株来验证基因功能是研究中嗜盐菌渗透响应体系和耐盐机制的最佳手段。实验室前期使用双亲接合、等位基因互换的方法构建了需盐色盐杆菌无痕敲除体系,在这个基因敲除体系中,先将扩增片段连入 pK18mobsacB 质粒中(Weisser and Truper, 1985),然后转化到 DH5 α 感受态细胞中,验证成功后,将构建好的敲除载体转化到 S17-1 感受态细胞中,通过与 ZW4-1 菌株双亲接合而进行单交换,单交换验证成功后进行第二次同源重组,通过在培养基中增加抗生素来进行筛选,筛选出疑似菌株进行 PCR 验证。

肉碱在自然界中广泛存在。L-肉碱是一种三甲胺化合物,主要因其对脂肪酸运输到线粒体的贡献而闻名。在细菌中,它是由 4-丁基甜菜碱(GBB)合成的,可以用作碳源。L-肉碱可以通过 GBB 羟基化直接生成或通过类似脂肪酸降解的生物合成途径合成。然而,这种多步骤途径还没有实验证明。在本研究中,通过基因背景分析,鉴定了一组与 L-肉碱分解代谢相关的基因(Wargo and Hogan, 2009; Bazire et al., 2019)。L-肉碱代谢基因在不同细菌分类中的保存强调了 L-肉碱作为一种普遍存在的营养物质的作用。

2.2 实验材料

2.2.1 实验用菌株与质粒

本实验用到的菌株和质粒如表 2.1 所示：

表 2.1 菌株和质粒

Table 2.1 strains and plasmids

名称	来源
需盐色盐杆菌 DSM 3043	德国微生物和细胞培养收集中心
需盐色盐杆菌 ZW4-1 菌株	DSM 3043 紫外诱变抗利福平菌株
<i>Δcsal_3172</i>	本实验构建
<i>Δcsal_3173</i>	本实验构建
<i>Δcsal_3174</i>	本实验构建
<i>Δcsal_7234</i>	本实验构建
<i>E. coli</i> DH5α	本实验室保存
<i>E. coli</i> S17-1	本实验室保存
pACYCDuet-1	本实验室保存
pK18mobsacB	本实验室保存
pBBR1MCS-2	本实验室保存

2.2.2 培养基种类及配方

LB 培养基：NaCl, 10 g; Tryptone, 10 g; Yeast Extract, 5 g。pH 调至 7.0。琼脂 18 g, 定容至 1 L。121℃高温灭菌, 20 min。

改良 LB 培养基：NaCl, 30 g; MgSO₄·7H₂O, 3 g; Tryptone, 10 g; Yeast Extract, 5 g; pH 调至 7.2-7.5; 琼脂粉 18 g; 定容至 1 L。121℃高温灭菌, 20 min。

DSMZ-755 固体培养基：NaCl, 50 g; MgSO₄·7H₂O, 5 g; Tryptone, 5 g; Yeast Extract, 3 g。pH 调至 7.2-7.5。琼脂 18 g, 定容至 1 L。121℃高温灭菌, 20 min。

D6 固体培养基：NaCl, 60 g; MgSO₄, 2.5 g; Tryptone, 5 g; Yeast Extract, 5 g。pH 调至 7.2-7.5。琼脂 18 g, 定容至 1 L。121℃高温灭菌, 20 min。

S-M63 培养基 (Yang et al., 2020) : (NH₄)₂SO₄ (20 mM) ; KH₂PO₄, 13.6 g; NaCl, 6 g; KOH, 4.2 g, pH 调至 7.2-7.5, 定容至 1 L。121℃高温灭菌, 20 min。接种前加入用 0.22 μm 孔径的无菌滤膜过滤除菌的终浓度为 20 mM 的葡萄糖、1 mM 的 MgSO₄、4 mg/L 的 FeSO₄·7H₂O。本实验使用的 NaCl 浓度通常为 1 M、2 M、3 M。

2.2.3 实验药品及实验试剂

甘油、三氯甲烷、NaH₂PO₄、NaH₂PO₄、KH₂PO₄、(NH₄)₂SO₄、NaOH、KOH（均来自莱阳康德化工有限公司），NaCl、MgSO₄、MgSO₄·7H₂O（均来自天津市巴斯夫化工有限公司），卡那霉素、goldview I 核酸染料、琼脂粉、DL-肉碱盐酸盐（≥98%）、Tryptone、Yeast Extract（均来自生工生物工程（上海）有限公司），葡萄糖（天津博迪化工股份有限公司），FeSO₄·7H₂O（天津市北方天医化学试剂厂），CaCl₂（天津博迪化工股份有限公司），L-肉碱盐酸盐（≥98%，默克公司（中国上海）），L-肉碱（≥98%，默克公司（中国上海）），D-肉碱（≥98%，Dayman Chem），利福平（麦克林），氯霉素（BBI Life of Sciences），琼脂糖（Bio FRoxx），无水乙醇（天津市光复发展有限公司），TLC silica gel 60 plate (precoated aluminum sheets, 5 × 10 cm, Merck, Germany)

FastPure Bacteria DNA Isolation Mini Kit, FastPure® Plasmid Mini Kit, FastPure® Gel DNA Extraction Mini Kit, One Step Cloning Kit C115（Vazyme），2 × Phanta Max Master Mix (Dye Plus)

PCR 引物合成、测序由擎科梓熙生物科技有限公司完成。

卡那霉素溶液（50 mg/mL）：将卡那霉素溶解于蒸馏水中，充分溶解后，在超净工作台中用 0.22 um 微孔滤器过滤除菌，分装后-40℃保存备用，工作浓度为 50 ug/mL。

利福平溶液（50 mg/mL）：将利福平溶解于二甲基亚砷中，充分溶解后静置一段时间后分装，用锡箔纸包好避光放置，-40℃保存备用，工作浓度为 50 μg/mL。

氯霉素溶液（35 mg/mL）：将氯霉素溶解于无水乙醇中，配制好后静置一段时间后分装，-40℃保存备用，工作浓度为 70 μg/mL。

2.2.4 实验仪器

表 2.2 本研究所用的主要实验仪器

Table 2.2 The experimental apparatus for the institute		
仪器名称	型号	厂家
核磁共振仪	AVIIIHD50003030709	Bruker
PCR 仪	846-X-070-301	Biometra
超微量紫外分光光度计	NDone	Thermo
紫外可见分光光度计	UV-2102PC	尤尼克（上海）仪器有限公司

高速冷冻离心机	TGL20M	长沙湘智离心机仪器有限公司
双人单面净化工作台	SW-CJ-2FD	苏州净化设备有限公司
全自动高压灭菌锅	DZ47-63	LEAD-tech
电热恒温培养箱	LRH-250A	广州市医疗器械厂
震荡培养箱	ZQZY-A8	上海知楚仪器有限公司
磁力加热搅拌器	79-1 型	常州国华电器有限公司
电子天平	AR1140	Ohaus Corp.pine Brook,NJ,USA
双人单面净化工作台	SW-CJ-2FD	苏州净化设备有限公司
琼脂糖水平电泳槽	DYCP-31BN	北京六一仪器厂
微型旋涡混合仪	SW-80A	上海泸西分析仪器厂有限公司
制冰机	SIM-F124	Sanyoelectric Co.ltd.
超声波清洗器	KQ5200E	昆山市超声仪器有限公司
超声破碎仪	JY92-2D	宁波新芝生物科技股份有限公司

2.3 实验方法

2.3.1 敲除载体的构建

1) 引物设计

使用 Snapgene 和 CE Design 软件进行引物设计，设计敲除基因的上游同源臂（UHR）、下游同源臂（DHR）的扩增引物，*csal_3172*、*csal_3173*、*csal_3174*、*csal_3172csal_3173csal_3174* 基因的上下游同源臂的扩增片段分别记为 *csal_3172U*、*csal_3172D*；*csal_3172U*、*csal_3173D*；*csal_3174U*、*csal_3174D*；*csal_7234U*、*csal_7234D*，以 ZW4-1 的基因组为模板进行扩增，得到各个扩增片段的大小分别为 939 bp、926 bp；968 bp、990 bp；964 bp、959 bp；973 bp、980 bp。设计 pACYCDuet-1 质粒中氯霉素乙酰基转移酶(*cat*)的扩增引物，扩增 *cat* 片段，作为氯霉素抗性筛选标记，连接在上下游同源臂之间，*cat* 扩增片段大小为 1 018bp。引物序列如表 2.3 所示：

表 2.3 构建突变株所用引物

Table 2.3 Primers used to construct mutant strains

引物名称	引物序列 (5'—3')
3172UF	ctatgacatgattacgaattcGATCGGCAATGGCTGGATC
3172UR	caaaagcaccgccggacaGTCTGGTGTCCGGCTCATCA
3172DF	tggcagggcggggcgtaaGGCATCGACATCGAAAGCG
3172DR	caggtcgactctagaggatccGGTGAGGCTACGCAATCTGC
3172- <i>cat</i> -F	atgagccggacaccagacTGTCCGGCGGTGCTTTTGCC
3172- <i>cat</i> -R	cgctttcgatgtcgatgccTTACGCCCCGCCCTGCCACT
3173UF	ctatgacatgattacgaattcCTTACCTGTGCCATCACC GG
3173UR	caaaagcaccgccggacaGATCCAGCCATTGCCGATC
3173DF	tggcagggcggggcgtaaTGATGAGCCGGACACCAGAC
3173DR	caggtcgactctagaggatccGAACATTTGCGACGCTCAC
3173- <i>cat</i> -F	atcggcaatggctggatcTGTCCGGCGGTGCTTTTGCC
3173- <i>cat</i> -R	ctggtgtccggctcatcaTTACGCCCCGCCCTGCCACT
3174UF	ctatgacatgattacgaattcGACGTTCCCGATTTCGTTGC
3174UR	caaaagcaccgccggacaTCGATTCATGGTGGCGTCC
3174DF	tggcagggcggggcgtaaCCGTGAGCGACAAGGAGAAG
3174DR	caggtcgactctagaggatccCAGCAGCTCGGTAAGGAAGG
3174- <i>cat</i> -F	gacgccaccatgaatcgaTGTCCGGCGGTGCTTTTGCC
3174- <i>cat</i> -R	tctcctgtcgtcacggTTACGCCCCGCCCTGCCACT
7234UF	ctatgacatgattacgaattcGAGCGTGACGTTCCCGATTTC
7234UR	caaaagcaccgccggacaGTTTCGATTCATGGTGGCGTC
7234DF	tggcagggcggggcgtaaATACCGCGTCGCTGAGCA
7234DR	caggtcgactctagaggatccCAACCTGGACACGCCAGAAG
7234- <i>cat</i> -F	gccaccatgaatcgaacTGTCCGGCGGTGCTTTTGCC
7234- <i>cat</i> -R	tgctcagcgacgcggtatTTACGCCCCGCCCTGCCACT

注：小写字母为引物的同源序列，大写字母为引物的扩增序列。

2) ZW4-1 菌株基因组的提取

提取步骤见 FastPure Bacteria DNA Isolation Mini Kit 说明书。

3) DNA 琼脂糖凝胶电泳

4) 上下游同源臂和 *cat* 片段的扩增

表 2.4 PCR 扩增反应体系

Table 2.4 PCR reaction system

药品名称	体积
双蒸水	19 μ L
2 $\times$ Phanta Max Master	25 μ L

Mix(Dye Plus)	
F	2 μ L
R	2 μ L
模板 DNA	2 μ L

反应程序为：95°C，3 min；95°C，15 sec；60°C，15 sec；72°C，45 sec，反应 30 个循环，72°C，5 min；4°C 保存。F 为引物 3172UF、3172DF、3172-cat-F、3174UF、3174DF、3174-cat-F、7234UF、7234DF、7234-cat-F，R 为引物 3172UR、3172DR、3172-cat-R、3173UR、3173DR、3173-cat-R、3174UR、3174DR、3174-cat-R、7234UR、7234DR、7234-cat-R。

5) pK18mobsacB 质粒双酶切

双酶切体系如表 2.5 所示：

表 2.5 质粒双酶切体系

Table 2.5 Double enzyme digestion system of plasmid	
药品名称	体积
双蒸水	Up to 20 μ L
10 $\times$ Buffer K	2 μ L
pK18mobsacB	4 μ L
<i>EcoR</i> I	1 μ L
<i>BamH</i> I	1 μ L

酶切温度为 37°C，酶切时间为 3 h，琼脂糖凝胶电泳后回收酶切片段。

6) 胶回收

回收步骤见 FastPure® Gel DNA Extraction Mini Kit 说明书。

7) 同源重组

将敲除基因的上下游同源臂和氯霉素抗性片段（*cat*）连接到双酶切后的 pK18mobsacB 质粒上。利用 One Step Cloning Kit C115 进行同源重组，重组反应体系如表 2.6 所示：

表 2.6 重组反应体系

Table 2.6 recombination reaction system

药品名称	用量
2 × ClonExpress Mix	5 μ L
线型 pK18mobsacB	120 ng
上游同源臂	20 ng
下游同源臂	20 ng
双蒸水	Up to 10 μ L

在冰上配置表 2.6 反应体系，体系配制完成后，于 PCR 仪中 50℃反应 30 min。反应完成立即将离心管置于冰上或置于-20℃，待需要转化时再解冻。

8) 将重组产物转化到大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞

参照于 Trelief DH5 α Chemically Competent Cell 说明书。

9) 菌落 PCR 验证

挑取转化子，扩增培养，进行 PCR 验证。

10) 提质粒

验证成功后，使用 FastPure® Plasmid Mini Kit 提取质粒，步骤详见说明书。

2.3.2 转化

将构建好的质粒转化到 S17-1 感受态细胞中，转化步骤同上。

2.3.3 双亲接合

将 *csal_3172*、*csal_3173*、*csal_3174*、*csal_3172csal_3173csal_3174* 基因的上游同源臂、氯霉素筛选标记 *cat* 片段和下游同源臂连接到质粒 pK18mobsacB 上，*cat* 片段连接在上、下游同源臂之间，构建好的载体分别命名为 pK18mobsacBcat-*csal_3172*UD、pK18mobsacBcat-*csal_3173*UD、pK18mobsacBcat-*csal_3174*UD、pK18mobsacBcat-*csal_7234*UD，将构建好的载体转化到 DH5a 感受态细胞中，PCR 验证成功提取质粒后再转化到 S17-1 感受态细胞中，

(1) 第一次双亲接合

a. 将供体菌 *E. coli* S17-1(pK18mobsacBcat-UD)在 LB 固体培养基(含 50 μ g/mL 卡那霉素和 70 μ g/mL 氯霉素)上活化,37℃,培养 24 h,将单菌落接种到的 LB(含 50 μ g/mL Kan)液体培养基中培养 12 h,测量 OD₆₀₀ 检测菌株生长情况。

b. 将受体菌 ZW4-1 在 DSMZ-755 固体培养基(含 50 $\mu\text{g/mL}$ 利福平)上活化, 37°C, 培养 48 h, 将单菌落接种到 DSMZ-755 液体培养基(含 50 $\mu\text{g/mL}$ 利福平)中培养 12 h, 测量 OD₆₀₀ 检测菌株生长情况。

c. 收集菌体 *E. coli* S17-1 和 ZW4-1, 按 2:1 的比例分别取到离心管中, 10000 rpm 离心 2 min, 弃上清, 收集菌体, 用 10 mM MgSO₄ 分别洗涤菌体 2-3 次, 然后再次悬浮。

d. 将悬浮后的 *E. coli* S17-1 和 ZW4-1 混合, 将 0.45 μm 硝酸纤维素膜放置在改良的 LB 培养基固体平板上, 将菌液置于 0.45 μm 硝酸纤维素膜上, 在 37°C 正置培养 12 h。

e. 将 0.45 μm 硝酸纤维素膜取下, 用 500 μL 的 10 mM MgSO₄ 洗下菌体。

f. 取洗下的菌液 50 μL , 涂布于 DSMZ-755 固体培养基上(含 70 $\mu\text{g/mL}$ 氯霉素、50 $\mu\text{g/mL}$ 卡那霉素和利福平), 37°C 恒温培养箱避光培养 2-3 d。

g. 挑取单菌落在 DSMZ-755 固体培养基上(含 70 $\mu\text{g/mL}$ 氯霉素、50 $\mu\text{g/mL}$ 卡那霉素和利福平)上扩繁。

h. 等菌株长出后以 *sacB*-F 和 *sacB*-R 为引物, 接合子的 DNA 为模板, 验证载体是否已整合到基因组上。验证引物见表 2.7

表 2.7 *sacB* 引物

Table 2.7 The primers for *sacB*

引物名称	引物序列 (5'—3')
<i>sacB</i> -F	CGACAACCATACGCTGAGAG
<i>sacB</i> -R	CGAAGCCCAACCTTTCATA

(2) 蔗糖复筛

a. 挑取几株验证好的单交换菌株, 分区划线在含 10% 蔗糖的 DSMZ 固体培养基(含 70 $\mu\text{g/mL}$ 氯霉素、50 $\mu\text{g/mL}$ 利福平)上, 37°C 培养 3 d, 等培养基上长出单菌落后, 转接到 DSMZ(含 70 $\mu\text{g/mL}$ 氯霉素、50 $\mu\text{g/mL}$ 利福平)固体培养基上扩繁。

c. 将长好的菌株用灭好菌的牙签分别对应接到 DSMZ 固体培养基(含 70 $\mu\text{g/mL}$ 氯霉素、50 $\mu\text{g/mL}$ 利福平)和 DSMZ 固体培养基(含 70 $\mu\text{g/mL}$ 氯霉素、50 $\mu\text{g/mL}$ 利福平和卡那霉素)上, 37°C 倒置培养 48 h, 观察生长情况。

d. 选取在 DSMZ 固体培养基(含 70 $\mu\text{g/mL}$ 氯霉素、50 $\mu\text{g/mL}$ 利福平和卡那霉素)上不生长而在 DSMZ 固体培养基(含 70 $\mu\text{g/mL}$ 氯霉素、50 $\mu\text{g/mL}$ 利福平)生长的菌株, 进行 PCR。验证其是否丢失 *sacB* 片段, 目的片段是否被敲除, 敲除的位点是否是在靶基因位点。以 *sacB*-F 和 *sacB*-R 为引物, 以接合子的 DNA 为模板, 验证 *sacB* 片段

是否丢失。以 *cat*-F、*cat*-R 为引物，以接合子的 DNA 为模板，验证筛选菌株中是否存在 *cat* 片段。以 test-F 和 test-R 为引物，以接合子的 DNA 为模板，验证目的基因的缺失，靶基因位置是否正确。双交换菌株验证引物如表 2.8 所示：

表 2.8 突变株的验证引物

Table 2.8 Validation primers for mutant strains	
引物名称	引物序列（5'—3'）
3172-test-F	CGTGTTTCGCTACCAATGCTC
3172-test-R	GACGACAGCACCGTCAATCC
3173-test-F	CTTACCTGTGCCATCACC GG
3173-test-R	GAACATTTTCGCGACGCTCAC
3174-test-F	GACGTTCCCGATTTCGTTGC
3174-test-R	CAGCAGCTCGGTAAGGAAGG
7234-test-F	GAGCGTGACGTTCCCGATTTC
7234-test-R	CAACCTGGACACGCCAGAAG

2.4 实验结果

2.4.1 ZW4-1 基因组提取验证

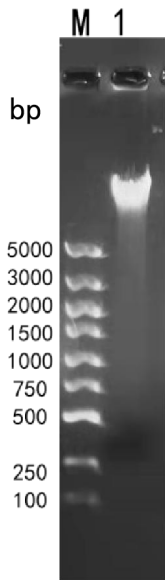
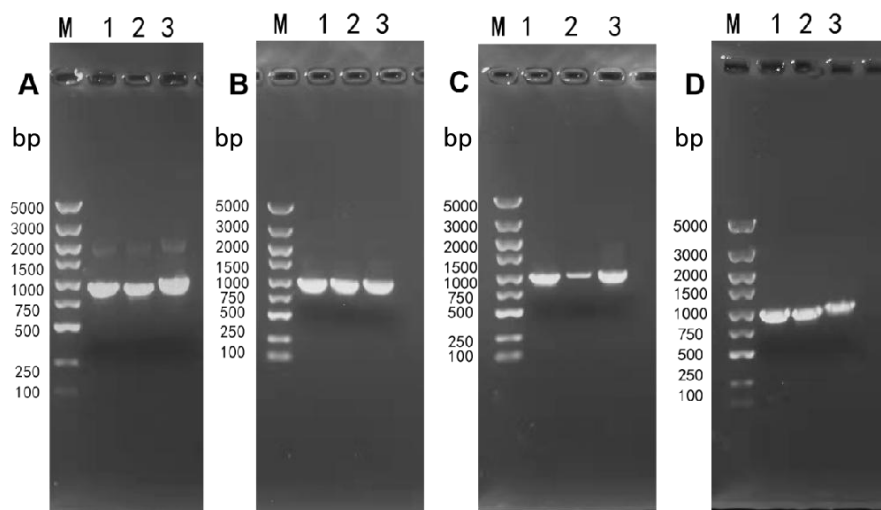


图 2.1 ZW4-1 基因组的验证

Fig 2.1 Validation of the ZW4-1 genome

注：M：Marker
1：ZW4-1 基因组

2.4.2 上下游同源臂和 *cat* 的 PCR 扩增验证图 2.2 UHR、DHR 和 *cat* 扩增的验证Fig 2.2 Validation of Amplification of UHR、DHR and *cat*

注：图 A 为 *csal_3172U*、*csal_3172D*、*csal_3172cat* PCR 验证

图 B 为 *csal_3173U*、*csal_3173D*、*csal_3173cat* PCR 验证

图 C 为 *csal_3174U*、*csal_3174D*、*csal_3174cat* PCR 验证

图 D 为 *csal_7234U*、*csal_7234D*、*csal_7234cat* PCR 验证

M: DL5000 DNA Marker (生工)

1: 上游同源臂 PCR 扩增验证

2: 下游同源臂 PCR 扩增验证

3: *cat* 片段 PCR 扩增验证

根据前期引物的设计，各敲除目的基因上、下游同源臂 PCR 扩增片段大小分别为：*csal_3172U* 为 939 bp、*csal_3172D* 为 926 bp、*csal_3173U* 为 968 bp、*csal_3173D* 为 990 bp、*csal_3174U* 为 964 bp、*csal_3174D* 为 959 bp、*csal_7234U* 为 973 bp、*csal_7234D* 为 980 bp。氯霉素乙酰基转移酶 *cat* 扩增片段大小为 1 018 bp。据图 2.2 验证结果，扩增条带大小均符合前期设计大小。

2.4.3 载体构建验证

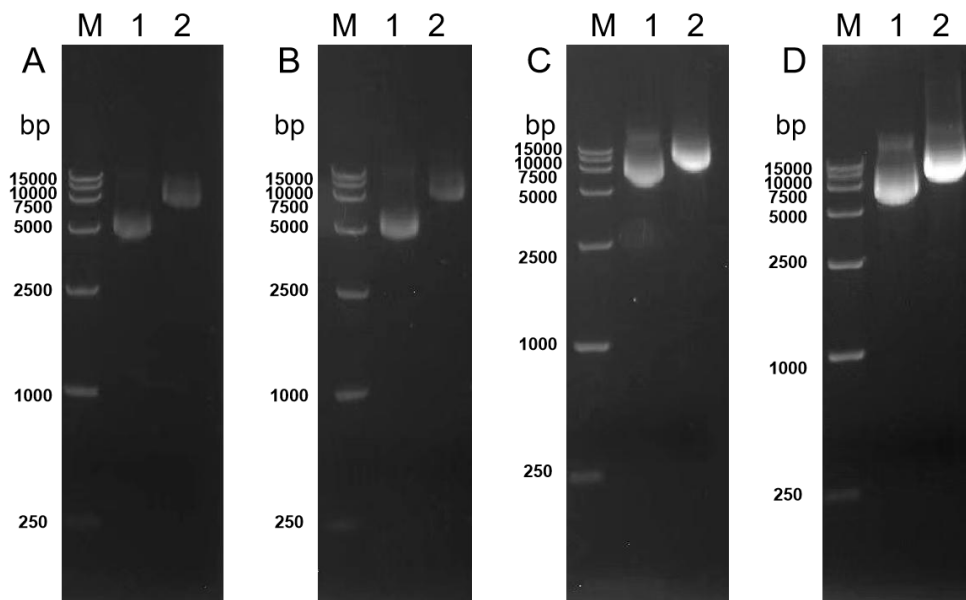


图 2.3 载体构建验证

Fig 2.3 Validation of vector construction

注：图 A 为 pK18mobsacBcat-*csal*_3172UD 的验证

图 B 为 pK18mobsacBcat-*csal*_3173UD 的验证

图 C 为 pK18mobsacBcat-*csal*_3174UD 的验证

图 D 为 pK18mobsacBcat-*csal*_7234UD 的验证

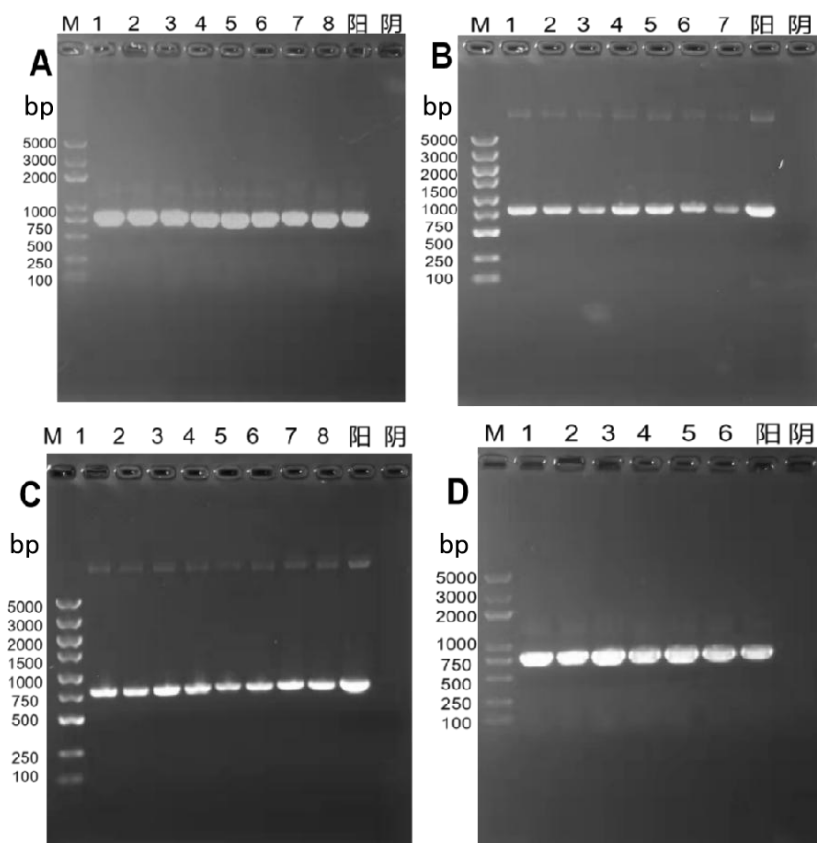
M: DL 15000 DNA Marker

1: pK18mobsacB 的验证

2: 构建后的载体验证

根据扩增片段大小和 pK18mobsacB 大小,将 pK18mobsacB 与构建好的载体对比后,大小正确,说明质粒构建成功。

2.4.4 第一次同源重组验证结果

图 2.4 单交换菌株的 *SacB* 验证Fig 2.4 *sacB* validation of single exchange strains

注：（A）*csal_3172* 基因缺失突变株第一次同源重组 *sacB* 的验证
 （B）*csal_3173* 基因缺失突变株第一次同源重组 *sacB* 的验证
 （C）*csal_3174* 基因缺失突变株第一次同源重组 *sacB* 的验证
 （D）*csal_3172csal_3173csal_3174* 基因缺失突变株第一次同源重组 *sacB* 的验证

M: DL5000 DNA Marker（生工）

阳：以 pK18mobsacB 为模板进行扩增

阴：以 ddH₂O 为模板进行扩增

（A）1-8 第一次同源重组菌株的验证（B）1-7 第一次同源重组菌株的验证

（C）1-6 第一次同源重组菌株的验证（D）1-8 第一次同源重组菌株的验证

由图 2.4 可知，在进行第一次同源重组后，以单交换菌落基因组为模板，以 *sacB*-F，*sacB*-R 为扩增引物，扩增后的片段大小与设计引物的 *sacB* 片段大小的 818 bp 相符，因此证明 pK18mobsacBcat-*csal_3172*UD、pK18mobsacBcat-*csal_3173*UD、pK18mobsacBcat-*csal_3174*UD、pK18mobsacBcat-*csal_7234*UD 均已整合到 ZW4-1 的基因组上，单交换菌株筛选成功。

2.4.5 第二次同源重组验证结果

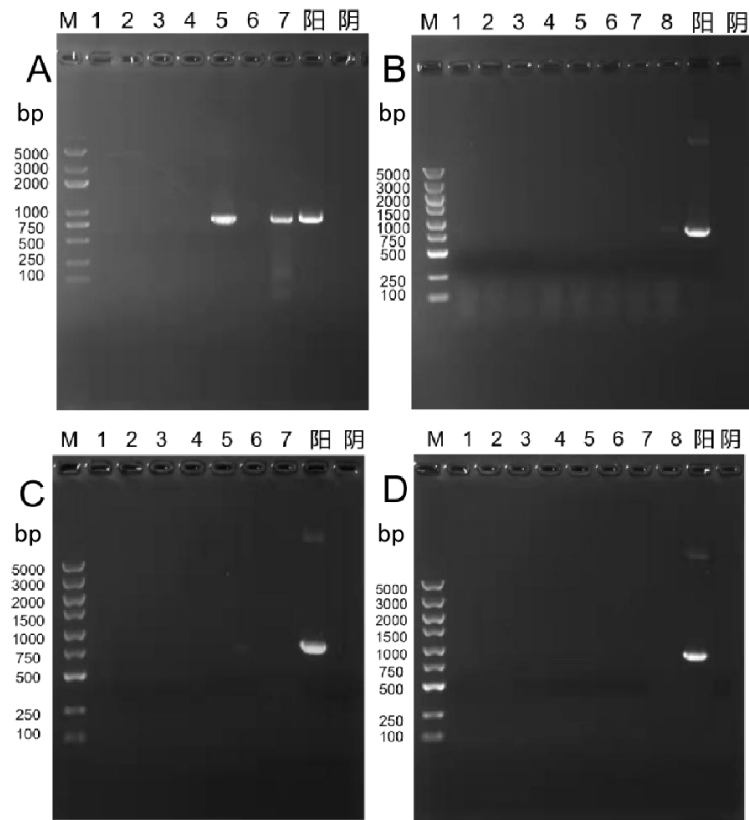


图 2.5 双交换菌株的 *sacB* 验证

Fig 2.5 *sacB* validation of dual-exchange strains

注：（A）*csal_3172* 基因缺失突变株第二次同源重组菌株 *sacB* 的验证
（B）*csal_3173* 基因缺失突变株第二次同源重组菌株 *sacB* 的验证
（C）*csal_3174* 基因缺失突变株第二次同源重组菌株 *sacB* 的验证
（D）*csal_3172csal_3173csal_3174* 基因缺失突变株第二次同源重组菌株 *sacB* 的验证

M：DL5000 DNA Marker（生工）
阳：以 pK18mobsacB 为模板进行扩增
阴：以 ddH₂O 为模板进行扩增

（A）1-7 第二次同源重组菌株 *sacB* 的验证 （B）1-8 第二次同源重组菌株 *sacB* 的验证
（C）1-7 第二次同源重组菌株 *sacB* 的验证 （D）1-8 第二次同源重组菌株 *sacB* 的验证

由图 2.5 可知，在进行第二次同源重组后，以第二次同源重组菌株的基因组为模板，以 *sacB*-F、*sacB*-R 为引物，凝胶电泳结果中仍有 *sacB* 扩增条带存在，部分菌株的质粒仍整合在基因组上，说明第二次同源重组后仍有单交换菌株生长，这可能是由于 *sacB* 片段失效导致，但大部分的筛选菌株扩增后无 *sacB* 条带，说明质粒已不在基因组上，*sacB* 验证成功。

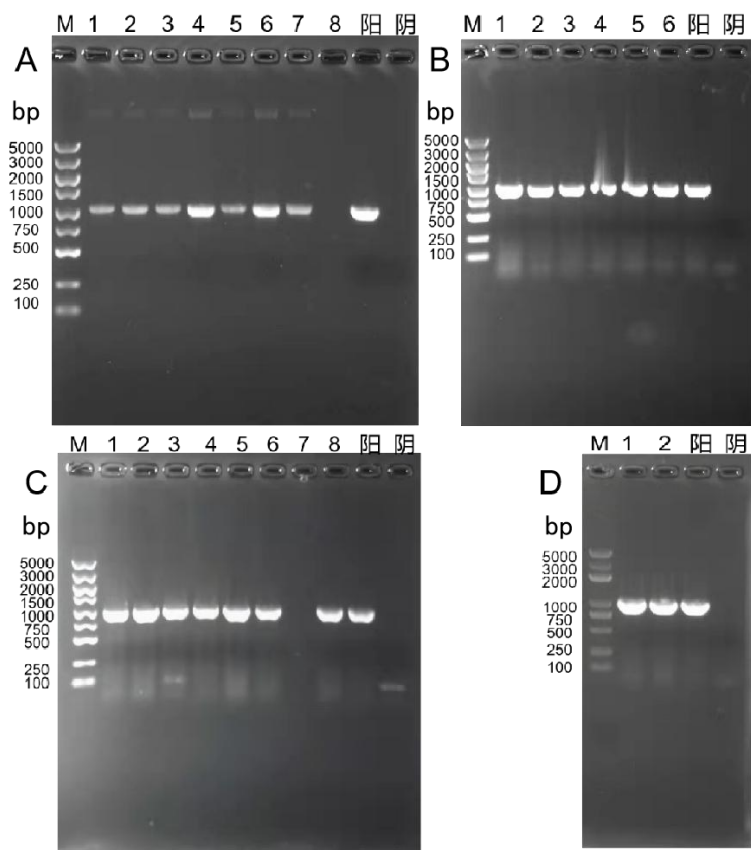


图 2.6 双交换菌株的 *cat* 基因的 PCR 验证

Fig 2.6 PCR verification of *cat* of double-crossover strains

注：（A）*csal_3172* 基因缺失突变株第二次同源重组 *cat* 的验证
（B）*csal_3173* 基因缺失突变株第二次同源重组 *cat* 的验证
（C）*csal_3174* 基因缺失突变株第二次同源重组 *cat* 的验证
（D）*csal_3172csal_3173csal_3174* 基因缺失突变株第二次同源重组 *cat* 的验证
M：DL5000 DNA Marker（生工）
阳：以 pACYCDuet-1 为模板进行扩增
阴：以 ddH₂O 为模板进行扩增
（A）1-8 第二次同源重组菌株 *cat* 验证（B）1-6 第二次同源重组菌株 *cat* 验证
（C）1-8 第二次同源重组菌株 *cat* 验证（D）1-2 第二次同源重组菌株 *cat* 验证

由图 2.6 可知，以第二次同源重组菌株的基因组为模板，以 3172-cat-F、3172-cat-R、3173-cat-F、3173-cat-R、3174-cat-F、3174-cat-R、7234-cat-F、7234-cat-R 为引物，扩增片段大小约为 1000 bp，与前期引物设计的 *cat* 片段 1 018 bp 大小相符，因此，双交换菌株的 *cat* 抗性基因的 PCR 验证成功。

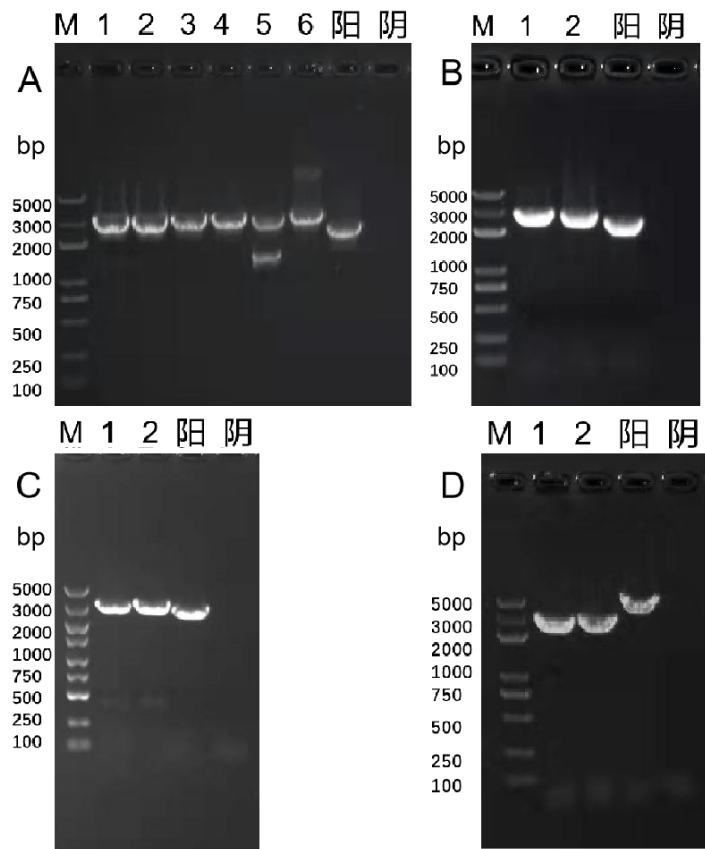


图 2.7 双交换菌株的 Test 验证

Fig 2.7 Test verification of dual-exchange strains

注：（A）*csal_3172* 基因缺失突变株第二次同源重组 Test 引物验证
（B）*csal_3173* 基因缺失突变株第二次同源重组 Test 引物验证
（C）*csal_3174* 基因缺失突变株第二次同源重组 Test 引物验证
（D）*csal_3172csal_3173csal_3174* 基因缺失突变株第二次同源重组 Test 引物验证

M: DL5000 DNA Marker（生工）
阳：以 ZW4-1 基因组为模板进行扩增
阴：以 ddH₂O 为模板进行扩增

(A) 1-6 第二次同源重组菌株 Test 引物验证 (B) 1-2 第二次同源重组菌株 Test 引物验证

(C) 1-2 第二次同源重组菌株 Test 引物验证 (D) 1-2 第二次同源重组菌株 Test 引物验证

由图 2.7 可知, 以第二次同源重组菌株的基因组为模板, 以 3172Test-F, 3172Test-R; 3173Test-F, 3173Test-R; 3174Test-F, 3174Test-R; 7234Test-F, 7234Test-R 为扩增引物, 预测 *csal_3172* 基因缺失菌株扩增片段大小为 3436bp、*csal_3173* 基因缺失菌株扩增片段大小为 2976bp、*csal_3174* 基因缺失菌株扩增片段大小为 2940bp、*csal_3172csal_3173csal_3174* 基因缺失菌株扩增片段大小为 2971bp。以 ZW4-1 基因组为模板, 以 3172Test-F, 3172Test-R; 3173Test-F, 3173Test-R; 3174Test-F, 3174Test-R; 7234Test-F, 7234Test-R 为引物, 预测片段大小分别为 2754bp、2858bp、2790bp、4300bp。设计 test 引物扩增后, ZW4-1 菌株和突变株的扩增条带与预测大小相同, 说明目的基因已被敲除, 突变株构建成功。将扩增片段送擎科梓熙生物科技有限公司测序, 测序结果经 BLAST 比对, 显示目的基因已被敲除。

2.4.6 生理实验验证

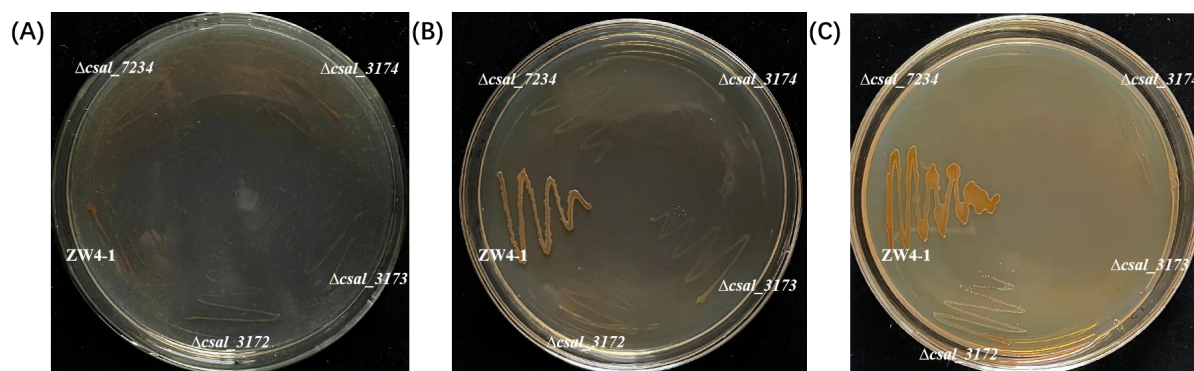


图 2.8 ZW4-1 和 4 个突变株在不同碳氮源的 S-M63 培养基上的生长状况

Fig 2.8 Growth status of ZW4-1 and 4 mutants on S-M63 medium with different carbon and nitrogen sources

注: 图 A 为 S-M63 以 DL-肉碱作为唯一碳源, 以硫酸铵作为唯一氮源

图 B 为 S-M63 以葡萄糖作为唯一碳源, 以 DL-肉碱作为唯一氮源

图 C 为 S-M63 以葡萄糖作为唯一碳源, 以 L-肉碱作为唯一氮源

在 S-M63 固体平板上分别接种 ZW4-1、 $\Delta csal_3172$ 、 $\Delta csal_3173$ 、 $\Delta csal_3174$ 、 $\Delta csal_7234$ ，当以 DL-肉碱为唯一碳源，硫酸铵为唯一氮源时，野生型和突变株的长势较差，但在固体培养基上都有生长迹象，说明野生型菌株和突变株都可以以 DL-肉碱为唯一碳源生长；当以葡萄糖为唯一碳源，DL-肉碱为唯一氮源时，只有 ZW4-1 长势良好， $\Delta csal_3172$ 、 $\Delta csal_3173$ 、 $\Delta csal_3174$ 、 $\Delta csal_7234$ 的生长都受到抑制。当以葡萄糖作为唯一碳源，以 L-肉碱作为唯一氮源时，ZW4-1 长势良好， $\Delta csal_3172$ 的生长受到抑制， $\Delta csal_3173$ 、 $\Delta csal_3174$ 和 $\Delta csal_7234$ 完全不生长。

2.5 本章小结

经过前期生物信息学比对发现 *csal_3173*、*csal_3174* 和 *csal_3172* 基因很可能分别编码 L-肉碱脱氢酶、脱氢肉碱裂解酶（BKACE）和甜菜碱酰-CoA 硫解酶，在需盐色盐杆菌中依次催化 L-肉碱降解成甘氨酸甜菜碱的三步反应。本实验通过接合转移的基因敲除手段对需盐色盐杆菌基因组中 *csal_3172*、*csal_3173*、*csal_3174* 三个单基因和 *csal_3172csal_3173csal_3174* 一个三基因进行敲除，最终通过分子验证和碳氮源生理验证，成功构建了 $\Delta csal_3172$ 、 $\Delta csal_3173$ 、 $\Delta csal_3174$ 三个单基因敲除突变株和 $\Delta csal_7234$ 一个三基因敲除突变株，通过对最后基因敲除突变株的碳氮源生理实验验证的结果说明，在对应基因敲除成功的情况下， $\Delta csal_3172$ 、 $\Delta csal_3173$ 、 $\Delta csal_3174$ 、 $\Delta csal_7234$ 突变株在以葡萄糖作为碳源、L-肉碱作为氮源的培养基中的生长受到抑制，而需盐色盐杆菌 ZW4-1 菌株正常生长，说明相关基因被敲除后，突变株的 L-肉碱代谢途径被阻断，通过 S-M63 固体培养基的碳氮源生理实验结果，充分说明生物信息学分析 *csal_3172*、*csal_3173*、*csal_3174* 基因参与到肉碱代谢为甘氨酸甜菜碱过程中的可靠性。

第三章 肉碱在盐胁迫和温度胁迫下对细胞生长的影响及代谢关键基因的表达和酶学性质验证

3.1 前言

通过前期实验获得了 $\Delta csal_3172$ 、 $\Delta csal_3173$ 、 $\Delta csal_3174$ 三个单基因和 $\Delta csal_7234$ 一个三基因敲除突变株，从碳氮源实验初步得知 $\Delta csal_3172$ 、 $\Delta csal_3173$ 、 $\Delta csal_3174$ 和 $\Delta csal_7234$ 四个基因敲除突变株都与肉碱代谢为甘氨酸甜菜碱有关，将三个基因敲除后，相关代谢路径被阻断，为了进一步验证突变株及野生型菌株在不同条件下细胞内相容性溶质的积累情况，利用 ^{13}C -NMR核磁检测野生型及突变株在高温、低温、高盐、低盐等不同极端条件下的相容性溶质的积累情况。细胞在不同生长条件下会积累不同的相容性溶质，测定细胞在不同生长条件下的生长曲线，进一步说明不同相容性溶质对细胞渗透调节和对外部压力的作用。由于需盐色盐杆菌 DSM 3043 在丰富培养基中的生长温度范围为 $15^{\circ}\text{C}\sim 45^{\circ}\text{C}$ ，最适生长温度为 37°C ，当在 $0.75\sim 3\text{ M NaCl}$ 的限制性培养基中时， 45°C 可以生长（Arahal et al., 2001; García-Esteva et al., 2006）。因此本研究选用需盐色盐杆菌能够生存的极端环境，低温选用 15°C 、高温选用 45°C 、低盐选用 1 M 、中盐选用 2 M 、高盐选用 3 M ，以此验证细胞在不同外界条件下积累的相容性溶质种类。

据研究报道，肉碱也可作为相容性溶质的一种对细胞起到渗透保护作用，但不知肉碱是否在需盐色盐杆菌 DSM 3043 中也可以作为相容性溶质，而且据相关报道，肉碱在其他菌中除了有渗透保护作用，还对细胞对外界压力的抵抗能力有所帮助，如耐压、耐低温等（Franken et al., 2008）。本研究对需盐色盐杆菌 ZW4-1 菌株和四个突变株进行不同盐浓度和不同培养温度的核磁共振检测和生长曲线测定，来进一步验证培养基中外源添加肉碱对细胞积累相容性溶质和细胞生长的影响。

3.2 实验材料

3.2.1 菌株和质粒

实验用菌株和质粒同 2.1。

3.2.2 实验用试剂

实验用试剂同 2.2.3。

3.2.3 实验用仪器

实验用仪器同 2.2.4。

3.3 实验方法

3.3.1 相容性溶质的提取 (GarcíaEstepa et al., 2006)

- a. 将 ZW4-1 及其突变体在 D6 固体培养基（含 50 mg/L 利福平）上活化。
- b. 将活化后的菌株接种到液体 D6 液体培养基中（含 50 mg/L 利福平），37°C，120 rpm 过夜培养。
- c. 取适量种子液 8 000 rpm 离心 5 min，再用 6% NaCl 溶液洗涤细胞 3 次。
- d. 在 S-M63 培养基中加入葡萄糖（20 mM）、Mg²⁺、Fe²⁺，将洗菌 3 次的菌液接种到 S-M63 培养基中。
- e. 待培养到对数生长期后期后 8 000 rpm，5 min 收集菌体，用 6% NaCl 溶液洗涤细胞 3 次。
- f. 将收集好的菌体放入-40°C冰箱中，反复冻融 3 次。
- g. 加 80%乙醇 8 mL 悬浮菌体，80°C水浴加热 30 min，8 000 rpm 离心 8 min。
- h. 收集上清。在菌体中再加入 5 mL，80%乙醇，80°C水浴加热 30 min，8000 rpm 离心 8 min。
- i. 收集上清。加入等体积三氯甲烷，充分震荡后 8 000 rpm 离心 10 min，用移液枪小心吸取上清，放入 50°C烘箱中烘干。
- j. 将烘干的提取物溶解在 0.6 mL 重水中，¹³C-NMR 检测。

3.3.2 薄层层析

- a. 将核磁检测的样品稀释 5 倍，用甘氨酸甜菜碱（50 µg/µL）、DL-肉碱（50 µg/µL）作为对照，每个样品各取 2 µL，点样在 TLC（silica gel 60 plate precoated aluminum sheets, 5 × 10 cm, Merck, Germany）上。
- b. 以 90%苯酚作为展开剂，等展开剂到达 TLC 板上沿后拿出，室温干燥 2 d。
- c. 用 0.1%溴甲酚绿（无水乙醇溶解）喷涂 TLC 板，直到显色为止。

3.3.3 异源蛋白诱导表达

首先设计 *csal_3173* 基因表达引物，如表 3.2 所示，以需盐色盐杆菌 ZW4-1 的基因组为模板，以 *csal_3173* 表达-F、*csal_3173* 表达-R 为扩增引物，PCR 扩增后得到目的片段。以同源重组的方式将扩增片段和双酶切后的 pET28a 进行连接，构建表达载体，并命名为 pET N3173。以其中 6-His 标签编码序列融合到 *csal_3173* 基因的 N 端。对 pET N3173 中的插入片段进行测序以确认在 PCR 扩增过程中没有引入点突变后，将重组质粒转化到大肠杆菌 BL21（DE3）中。将阳性转化体单菌落接种到含卡那霉素的 LB 液体培养基中，37℃ 恒温振荡培养箱中培养至 600 nm 处的光密度达到 0.4-0.6 之间，然后加入 0.05 mM 的 IPTG 诱导蛋白表达。在 20℃ 振荡培养 24 h 后，离心收集菌体，用缓冲液 A（20 mM Tris-HCl，pH 8.0）洗涤菌体两次，再次将菌体重悬于 20mL 缓冲液 A 中，在冰浴中通过超声破碎细胞，并通过离心去除细胞碎片。上清液中的重组蛋白（His6-*csal_3173*）用在缓冲液 A 中预平衡的 Ni-NTA 纯化。用含有 50 mM 咪唑的缓冲液 A 洗涤杂蛋白后，再使用含有 200 mM 咪唑的缓冲液 A 洗脱目的蛋白。再用超滤管离心 2 次洗去缓冲液中含有的咪唑，防止蛋白变性。通过十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳（SDS-PAGE）检查蛋白质纯度。

表 3.2. 构建 pET N3173 表达载体所用引物

Table 3.2. Primers used to construct pET N3173 expression vector

引物名称	引物序列（5'—3'）
<i>csal_3173</i> 表达-F	gtgccgcgcggcagccatatgCCCGCGCGGGTTCGCCGTC
<i>csal_3173</i> 表达-R	ttgtcgacggagctcgaattcTCAGATGCGCCCCTCGAGCC

注：小写字母为引物的同源序列，大写字母为引物的扩增序列。

3.3.4 酶学性质验证

对纯化后的蛋白进行酶活验证，验证体系见表 3.3。验证酶的最适 pH 值，缓冲液见表 3.4。

表 3.3. 酶活验证体系

Table 3.3. Enzyme activity verification system

名称	含量
50 mM 缓冲液	650 mL
50 mM L-肉碱	200 mL

5 mM NAD ⁺	100 mL
酶	50 μL

表 3.4. 不同 pH 缓冲液

Table 3.4. Buffers with different pH	
名称	pH 值
醋酸-醋酸钠缓冲液	4-6
PBS	6-8
Tris-HCl	8-9
Glycine-NaOH	9-11

3.3.5 基因的回补

设计引物(表 3.5), PCR 扩增需盐色盐杆菌 DSM 3043 基因组的 3537464—3540112 (片段包括了三基因的共同启动子), 然后将该片段连接到 pBBR1MCS-2 质粒的多克隆位点当中(*EcoR* V 酶切), 构建重组质粒。将重组质粒导入到 S17-1 感受态细胞中, 将该细胞与三基因突变株($\Delta csal_7234$)进行两亲本结合, 分别在含有利福平、氯霉素的 D6 固体培养基和卡那霉素的 D6 固体培养基上筛选含有重组质粒的回补菌株。在已 L-肉碱为氮源的 S-M63 液体培养基中同时接种三基因突变株(对照)和含有重组质粒的三基因突变株细胞, 37℃培养, 测定生长曲线。

表 3.5. 构建回补菌株所用引物

Table 3.5. Primers used to construct apopliteal strains	
引物名称	引物序列 (5'—3')
7234 回补-F	ggtatcgataagcttgatatacCAATGCGTCGACGCCCTC
7234 回补-R	gggctgcaggaattcgatatacGTTTCATCGCCAACGCCTTC

注: 小写字母为引物的同源序列, 大写字母为引物的扩增序列。

3.4 实验结果

3.4.1 添加 DL-肉碱对 ZW4-1 生长的影响

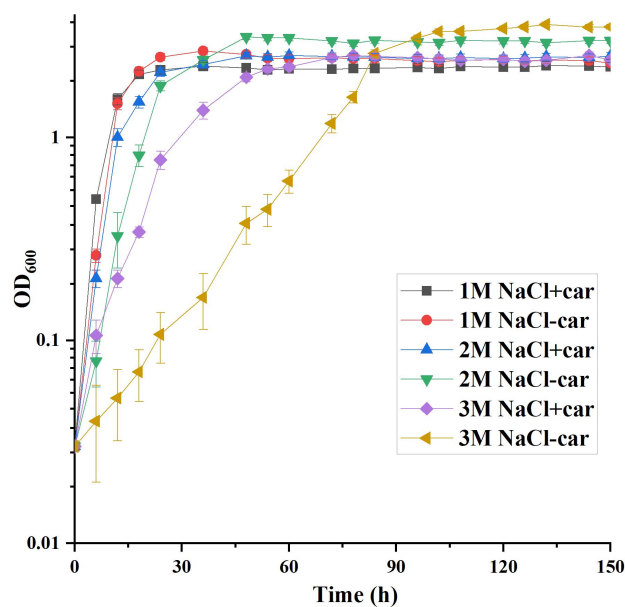


图 3.1 ZW4-1 在不同盐浓度中添加和不添加 DL-肉碱的生长曲线

Fig 3.1 Growth curves of ZW4-1 with and without DL-carnitine in different salt concentrations

注：细胞在含有 1、2 和 3 M NaCl 的 S-M63 液体培养基中有氧生长，同时存在（'+ car'）或不存在（'-car'）5 mM DL-肉碱，通过测量 OD₆₀₀ 来监测生长情况。

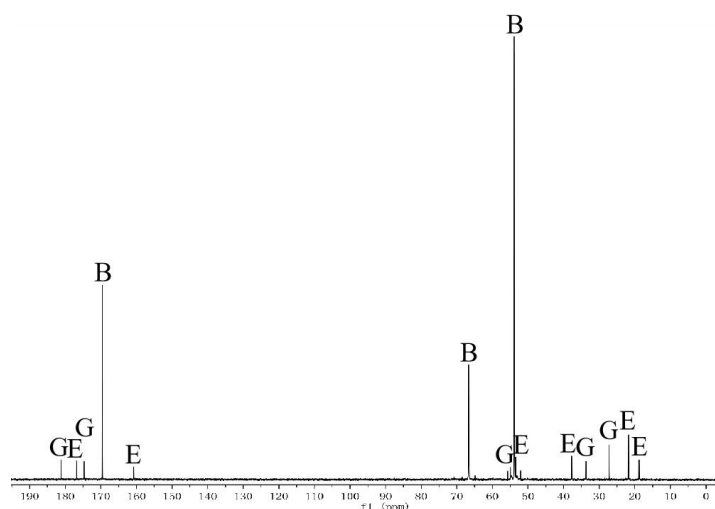


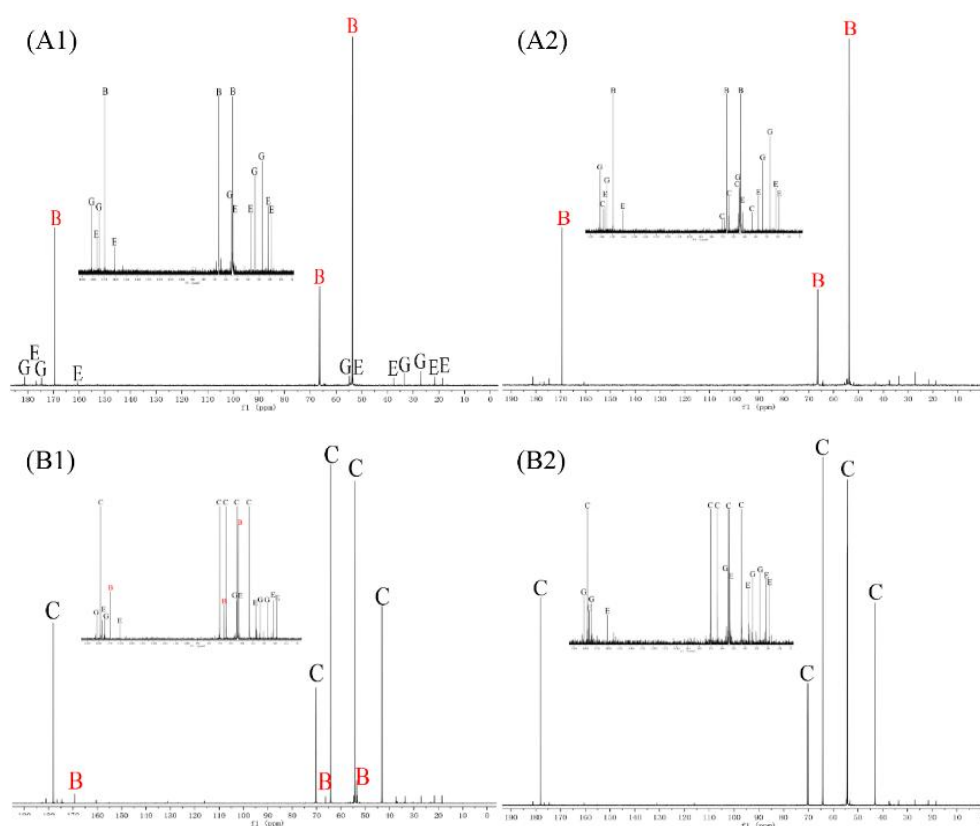
图 3.2 ZW4-1 在 37°C、2 M 盐浓度中添加 DL-肉碱的 ¹³C-NMR 结果

Fig 3.2 ¹³C-NMR results of DL-carnitine added to ZW4-1 at 37°C and 2 M salt concentration

注：B：甘氨酸甜菜碱信号；E：四氢嘧啶信号；G：谷氨酸盐信号。

如图 3.1 所示，ZW4-1 在不同盐浓度（1、2 或 3 M NaCl）的 S-M63 培养基中分别添加或不添加 5 mM 的 DL-肉碱。与不添加 DL-肉碱相比，添加 5mM DL-肉碱能促进中、高盐度下细胞的比生长速率。培养基中的盐度越高，DL-肉碱对需盐色盐杆菌的比生长速率促进作用越明显，说明 DL-肉碱可以作为需盐色盐杆菌 DSM 3043 的有效渗透保护物。在所有测试盐度下（1 M、2 M、3 M），添加 DL-肉碱的菌体量都低于不添加 DL-肉碱的菌体量。为了进一步验证其促进生长的作用是否来自于细胞内肉碱的积累，用 ^{13}C -NMR 检测了在含有 DL-肉碱的 2 M 盐浓度 S-M63 培养基中相容性溶质的积累情况（图 3.2）。在与已知的标准品对比后发现，细胞内积累的主要相容性溶质是甘氨酸甜菜碱而不是肉碱，也观察到了来自四氢嘧啶和谷氨酸盐的次要峰。这些数据表明，DL-肉碱对需盐色盐杆菌 ZW4-1 生长的渗透保护作用是间接的，并且依赖于肉碱转化为甘氨酸甜菜碱的酶促作用。

3.4.2 突变株添加 DL-肉碱或 L-肉碱的 ^{13}C -NMR 检测



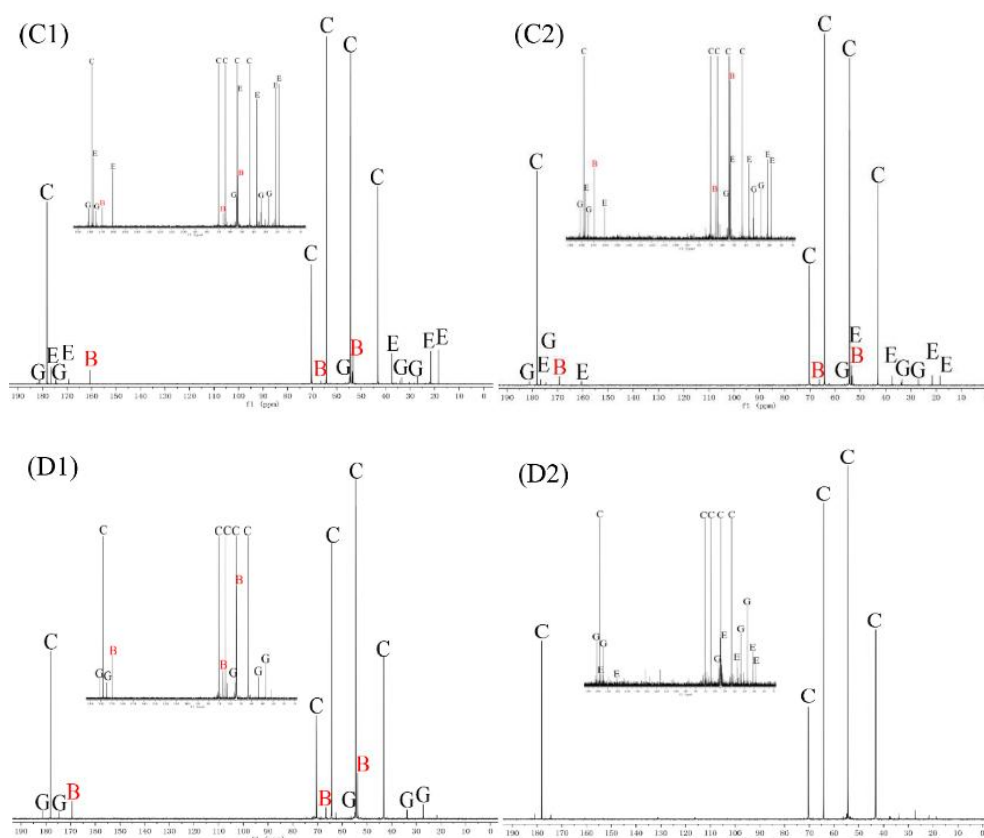


图 3.3 突变株在 37°C、2 M 盐浓度中添加 DL-肉碱或 L-肉碱的 ^{13}C -NMR 结果

Fig 3.3 ^{13}C -NMR results of mutant strains supplemented with DL-carnitine or L-carnitine in 2 M salt concentration at 37°C

注: $\Delta csal_3172$ (A), $\Delta csal_3173$ (B), $\Delta csal_3174$ (C)和 $\Delta csal_7234$ (D)在中等盐度 S-M63 中 37°C 有氧生长, 添加 5 mM DL-肉碱(A1, B1, C1 和 D1)或 5 mM L-肉碱(A2, B2, C2 和 D2)。插图是对同一频谱中的微弱信号进行放大的结果。

B: 甘氨酸甜菜碱信号; C: 肉碱信号; E: 四氢嘧啶信号; G: 谷氨酸盐信号。

为了研究 $\Delta csal_3172$ 、 $\Delta csal_3173$ 、 $\Delta csal_3174$ 和 $\Delta csal_7234$ 这 4 株突变株是否能够在细胞内积累肉碱, 将这 4 株突变体分别接种到 2 M 盐浓度的 S-M63 培养基(添加 5 mM DL-肉碱或 5 mM L-肉碱)中, 培养到对数生长期后期后收菌, 用等浓度的 NaCl 溶液洗涤菌体 3 次后, 提取相容性溶质进行 ^{13}C -NMR 核磁共振检测。 ^{13}C -NMR 结果显示, 在所有添加 DL-肉碱的突变株的提取物中都存在甘氨酸甜菜碱的信号(图 3.3)。而如果加入 L-肉碱而不加入 DL-肉碱, $\Delta csal_3172$ 仍然积累甘氨酸甜菜碱(图 3.3A2), 结果说明 $\Delta csal_3172$ 的基因产物可能不参与 D-或 L-肉碱向甘氨酸甜菜碱的转化, 或者在需盐色盐杆菌中有其他跟 $csal_3172$ 功能相似的基因替代了 $csal_3172$ 的作用。此外, 在

L-肉碱存在的情况下， $\Delta csal_3174$ 的提取物（图 3.3C2）中仍能检测到甘氨酸甜菜碱信号，但 $\Delta csal_3173$ 的提取物（图 3.3B2）中检测不到甘氨酸甜菜碱信号，但这两个菌株都积累了肉碱作为主要相容性溶质（图 3.3B, 3.3C）。这些结果表明， $\Delta csal_3173$ 基因的缺失完全阻断了需盐色盐杆菌 DSM 3043 中 L-肉碱到甘氨酸甜菜碱的降解途径，而 $\Delta csal_3174$ 基因的缺失显著降低了 L-肉碱向甘氨酸甜菜碱的转化，但并没有完全阻断这一过程。此外，在含 DL-肉碱而不含 L-肉碱的 2 M 盐度 S-M63 中生长的 $\Delta csal_7234$ 细胞的提取物中也检测到甘氨酸甜菜碱信号（图 3.3D），表明需盐色盐杆菌 DSM 3043 中存在一条迄今未知未被发现的 D-肉碱代谢途径，该途径不依赖于这三个基因，但可以将 D-肉碱转化为甘氨酸甜菜碱。

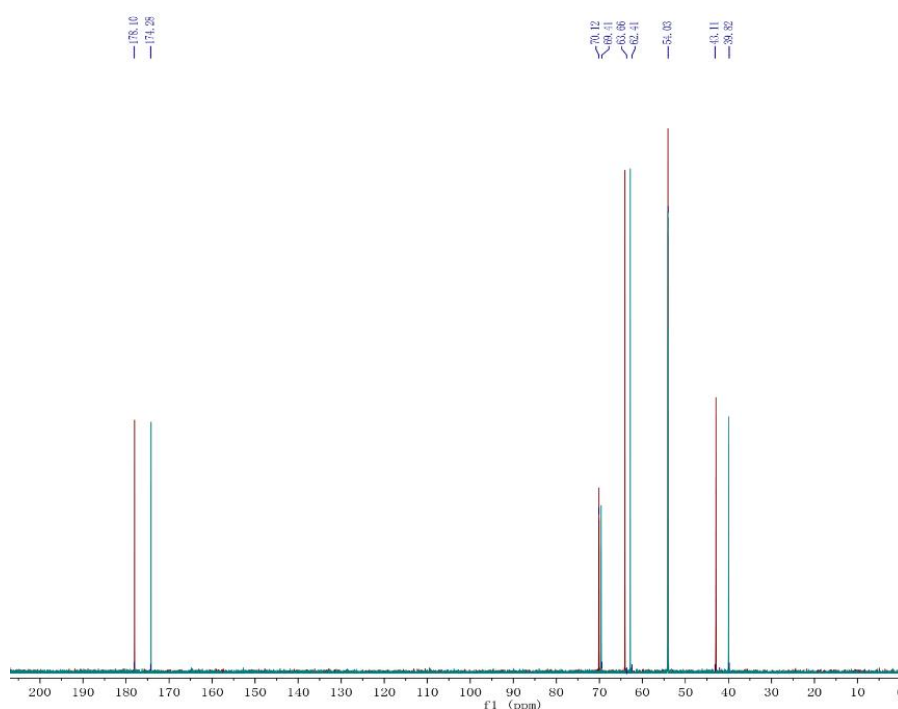


图 3.4 L-肉碱和 L-肉碱盐酸盐的 ^{13}C -NMR 位移比较

Fig 3.4 Comparison of ^{13}C -NMR shifts of L-carnitine and L-carnitine hydrochloride

注：红色为 L-肉碱的核磁位移值，蓝色为 L-肉碱盐酸盐的核磁位移值

本研究发现需盐色盐杆菌 DSM 3043 中积累的肉碱的核磁峰位移与 D-或 L-肉碱的峰位移完全一致，而与 DL-肉碱盐酸盐或 L-肉碱盐酸盐的化学位移不一致（图 3.4），表明外源 DL-肉碱盐酸盐在需盐色盐杆菌中是以肉碱形式积累的，而不是以盐酸盐形式积累的。

3.4.3 ZW4-1 和突变株在不同盐浓度下添加 DL-肉碱对细胞生长的影响

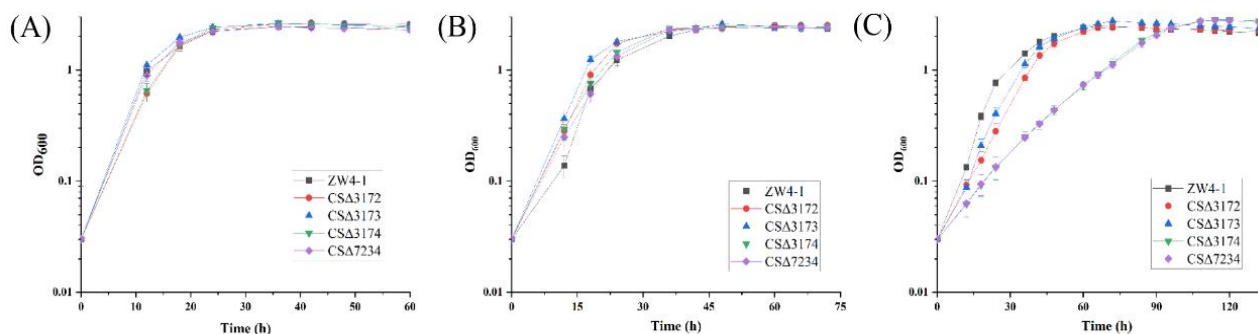


图 3.5 ZW4-1和突变株在37℃、不同盐浓度下添加DL-肉碱的生长曲线

Fig 3.5 Growth curves of ZW4-1 and mutant strains supplemented with DL-carnitine at 37°C with different salt concentrations

注：图A为低盐浓度（1 M NaCl）S-M63条件下有氧生长的测试结果

图B为中盐浓度（2 M NaCl）S-M63条件下有氧生长的测试结果

图C为高盐浓度（3 M NaCl）S-M63条件下有氧生长的测试结果

为进一步探讨 DL-肉碱对生长在最佳生长温度（37℃）下的野生型和突变株的渗透保护作用，将菌株 ZW4-1 和 $\Delta csal_3172$ 、 $\Delta csal_3173$ 、 $\Delta csal_3174$ 、和 $\Delta csal_7234$ 分别接种于添加 DL-肉碱的低、中、高盐 S-M63 培养基中，37℃培养。如图 3.5 所示，这些菌株在低盐和中盐 S-M63 培养基上的生长速率没有显著差异。在高盐条件下，菌株 $\Delta csal_3174$ 和 $\Delta csal_7234$ 的生长迟缓期明显长于其他 3 株菌株，其中 ZW4-1 生长最快，在此条件下 $\Delta csal_3172$ 和 $\Delta csal_3173$ 的生长速率和生长菌体的总量没有显著差异。

3.4.4 蛋白纯化及酶活验证

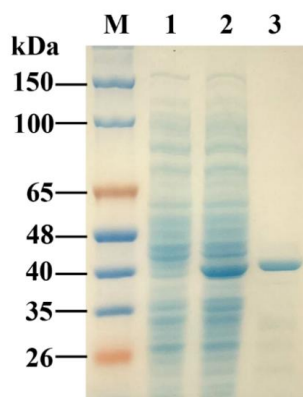


图 3.6 His6-Csal₃₁₇₃ 在大肠杆菌 *E. coli* BL21(DE3)中的 SDS-PAGE 结果

Fig. 3.6 SDS-PAGE of His₆-Csal₃₁₇₃ expressed in *E. coli* BL21(DE3)

注：M：Marker

- 1: pET28a 空质粒表达的可溶性蛋白
- 2: pET28a-*csal_3173* 表达可溶性蛋白
- 3: 纯化后的 pET28a-*csal_3173* 蛋白

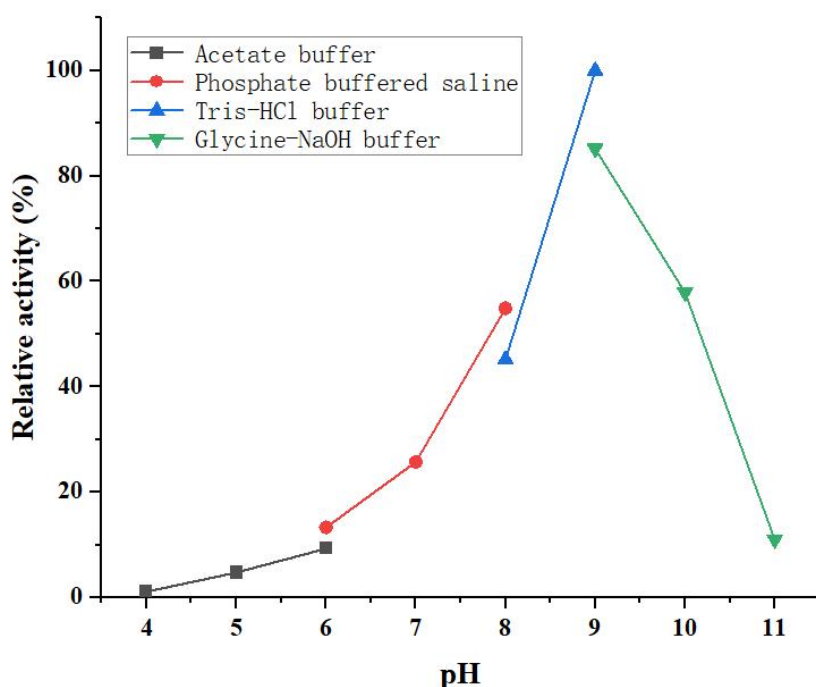


图 3.7 不同 pH 对 L-肉碱脱氢酶活力的影响

Fig. 3.7 Effects of different pH on the activity of L-carnitine dehydrogenase

到目前为止，还没有关于微生物中 D-肉碱脱氢酶基因或氨基酸序列的信息。需盐色盐杆菌 DSM3043 具有降解 L-和 D-肉碱为甘氨酸甜菜碱的能力，推测的 *csal_3173* 基因产物与其他微生物来源的 L-肉碱脱氢酶序列具有同源性，而本研究中的 *csal_3173* 是否编码一个能以 D-肉碱为底物的肉碱脱氢酶。为了达到这一目的，本研究在大肠杆菌 *E. coli* BL21 (DE3) 中用 N 端的组氨酸标签高效表达了 *csal_3173* 基因，并用 Ni 螯合亲和层析对其进行了纯化，结果表明，*csal_3173* 基因在大肠杆菌 BL21 (DE3) 中有较高的表达效率。SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳结果表明，纯化酶的分子量约为 40 kDa (图 3.6)，与预测的氨基酸序列计算值接近。此外，纯化后的酶经测定后具有 L-肉碱脱氢酶活性，最适 pH 为 9 (图 3.7)，与 L-肉碱的比酶活为 16.75 U/mg，但对 D-肉碱没有任何脱氢酶活性。

3.4.5 低温低盐条件下的生长曲线和 ¹³C-NMR 检测

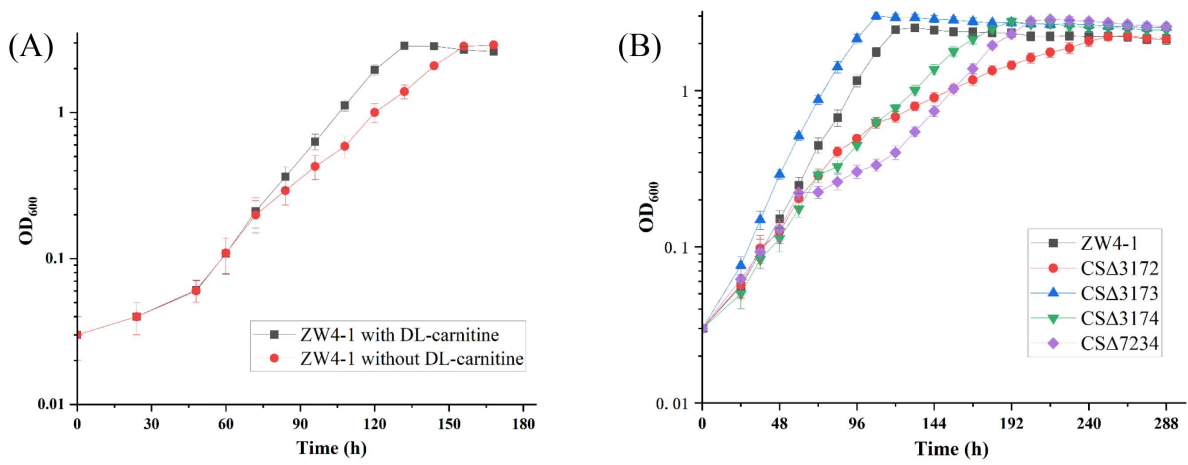


图 3.8 ZW4-1 及突变株在 15°C、1 M 盐浓度下添加 DL-肉碱的生长曲线

Fig 3.8 Growth curves of ZW4-1 and mutant strains supplemented with DL-carnitine at 15°C and 1 M salt concentration

注：(A)需盐色盐杆菌 ZW4-1 在添加或不添加 DL-肉碱（5 mM）条件下的生长情况。
(B)需盐色盐杆菌 ZW4-1 及其突变株在添加 DL-肉碱（5 mM）条件下的生长情况。

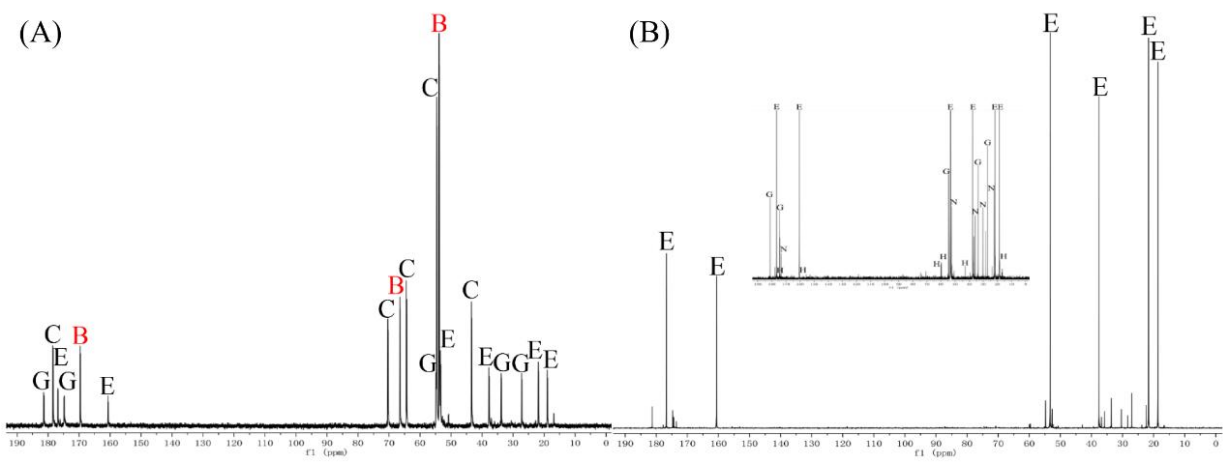


图 3.9 ZW4-1 在 15°C、1 M 盐浓度中添加或不添加 5 mM DL-肉碱的 ¹³C-NMR 结果

Fig 3.9 ¹³C-NMR results of ZW4-1 at 15°C with or without 5 mM DL-carnitine at 1 M salt concentration

注：A为在低温低盐条件下外源添加5 mM DL-肉碱的¹³C-NMR结果
B为在低温低盐条件下不添加5 mM DL-肉碱的¹³C-NMR结果

图3.9B中的插图是对同一频谱中的微弱信号进行放大的结果。

B: 甘氨酸甜菜碱信号; C: 肉碱信号; E: 四氢嘧啶信号; G: 谷氨酸信号; H: 羟外四氢嘧啶信号; N: N γ -乙酰二氨基丁酸信号。

据报道, 肉碱除了具有渗透保护功能外, 还能提高几种细菌的低温耐受性, 如单核细胞增多性李斯特菌 (Ko et al, 1994) 和小肠结肠炎耶尔森氏菌 (Park et al, 1995)。因此, 本研究验证了肉碱在需盐色盐杆菌中是否也可以提高细胞的低温耐受性。首先, 测定了菌株 ZW4-1 在低温 (15°C) 低盐浓度 (1M) 的 S-M63 培养基中添加或不添加 5 mM DL-肉碱后的生长曲线。与不添加 DL-肉碱的生长曲线结果相比, 外源添加 DL-肉碱提高了 ZW4-1 的比生长速率 (图 3.8A)。然后测定了 ZW4-1 和 4 株突变体在添加 DL-肉碱的 S-M63 中低温低盐浓度的生长曲线, 发现这些菌株的生长方式不同。在供试菌株中, $\Delta csal_3173$ 的生长速率最高, 甚至高于野生型菌株, 而 $\Delta csal_3172$ 的延滞期最长 (图 3.8B)。 ^{13}C -NMR 核磁共振结果表明, 在添加 DL-肉碱时, 肉碱和甘氨酸甜菜碱共同作为细胞积累的主要相容性溶质 (图 3.9A), 而在没有添加外源 DL-肉碱的情况下, 四氢嘧啶作为唯一的主要相容性溶质积累 (图 3.9B) 这些观察结果表明, 四氢嘧啶和羟化四氢嘧啶在冷应激和热应激中起重要作用保护, 这与之前的报告一致 (García-Estapa et al., 2006)。在 37°C 条件下生长的细胞中, 底物完全转化为甘氨酸甜菜碱, 而在低温条件下会积累肉碱, 这意味着低温条件会部分抑制肉碱向甘氨酸甜菜碱的转化, 并触发了肉碱在细胞内的积累。

3.4.6 TLC 验证结果



图 3.10 ZW4-1 在 15°C、1 M 盐浓度下添加 5 mM DL-肉碱时 TLC 的结果

Fig. 3.10 TLC results of ZW4-1 at 15°C and 1 M salt concentration with the addition of 5 mM DL-carnitine

注：平板在苯酚：水（90:10,v/v）的体系中运行，反应完成后喷洒 0.1%溴甲酚绿（w/v），溶解在纯乙醇中。每个样品点样 2 μ L。

第 1 道：ZW4-1 在添加 5 mM DL-肉碱的低盐低温条件下的细胞提取物

第 2 道：甘氨酸甜菜碱标准品（50 μ g/ μ L）

第 3 道：L-肉碱标准品（50 μ g/ μ L）

薄层色谱（TLC）实验进一步证实了需盐色盐杆菌 ZW4-1 细胞提取物中存在肉碱和甘氨酸甜菜碱（图 3.10）。

3.4.7 低温高盐条件下的生长曲线和 ^{13}C -NMR 检测

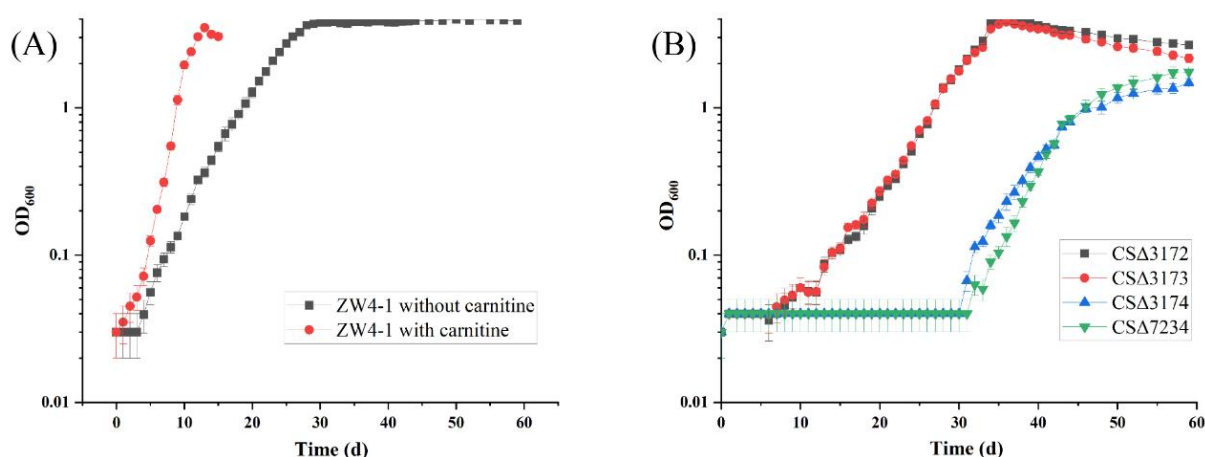


图 3.11 ZW4-1 及突变株在 15°C、3 M 盐浓度下添加 DL-肉碱的生长曲线

Fig 3.11 Growth curves of ZW4-1 and mutant strains supplemented with DL-carnitine at 15°C and 3 M salt concentration

注：(A)需盐色盐杆菌 ZW4-1 在添加和不添加 DL-肉碱（5 mM）条件下的生长情况。

(B)需盐色盐杆菌 4 株突变株在外源添加 DL-肉碱（5 mM）条件下的生长情况。

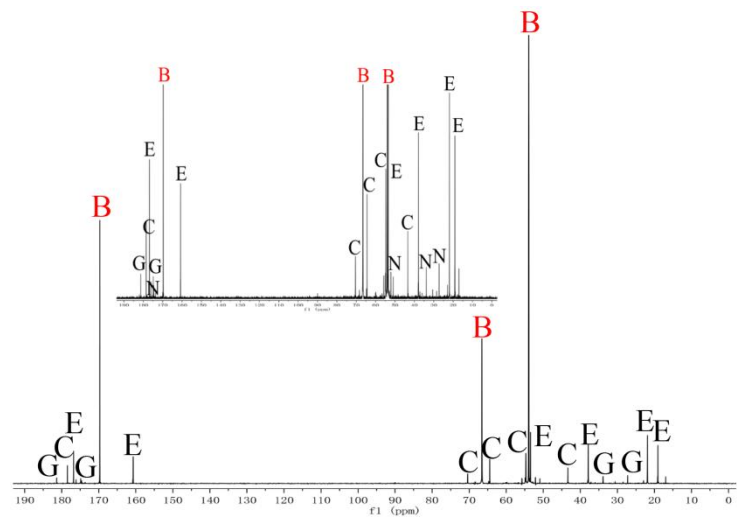


图 3.12 ZW4-1 在 15℃、3 M 盐浓度添加 5 mM DL-肉碱的条件下相容性溶质的 ¹³C-NMR 结果

Fig 3.12 ¹³C-NMR results of ZW4-1 at 15℃ with or without 5 mM DL-carnitine at 3 M salt concentration

注：插图是将同一频谱内的信号放大后的结果。

B：甘氨酸甜菜碱信号；C：肉碱信号；E：四氢嘧啶信号；G：谷氨酸信号；N：Nγ-乙酰二氨基丁酸信号。

为进一步研究肉碱对需盐色盐杆菌 ZW4-1 和 4 株突变株（ $\Delta csal_3172$ 、 $\Delta csal_3173$ 、 $\Delta csal_3174$ 和 $\Delta csal_7234$ ）在低温（15℃）和高盐（3M NaCl）条件下的渗透保护和低温保护作用，本研究测定了 ZW4-1 和突变株在高盐（3M NaCl）和低温（15℃）条件下的生长曲线，并用 ¹³C-NMR 分析了它们细胞内积累的渗透调节物质的类型。如图 3.11A 所示，相较于没有添加 DL-肉碱的 S-M63 培养基，外源添加 DL-肉碱能显著缩短 ZW4-1 的生长延滞期，提高其比生长速率。当外源 DL-肉碱存在时，培养物在 13 d 内达到最大生长值，而在没有外源 DL-肉碱的情况下，培养物需要 29 d 才能达到最大生长值。然而，添加 DL-肉碱的最终生长量（OD₆₀₀=3.49±0.12）低于不添加 DL-肉碱的培养最终生长量（OD₆₀₀=3.93±0.15）。在供试的突变体中， $\Delta csal_3174$ 和 $\Delta csal_7234$ 都表现出严重的生长缓慢表型，而 $\Delta csal_3172$ 和 $\Delta csal_3173$ 的生长特性彼此相似（图 3.11B）。此外，在这些条件下生长的 ZW4-1 细胞的提取物中检测到肉碱以及甘氨酸甜菜碱、四氢嘧啶和其他渗透调节物质（图 3.12）。

3.4.8 高温低盐条件下的生长曲线和 ¹³C-NMR 检测

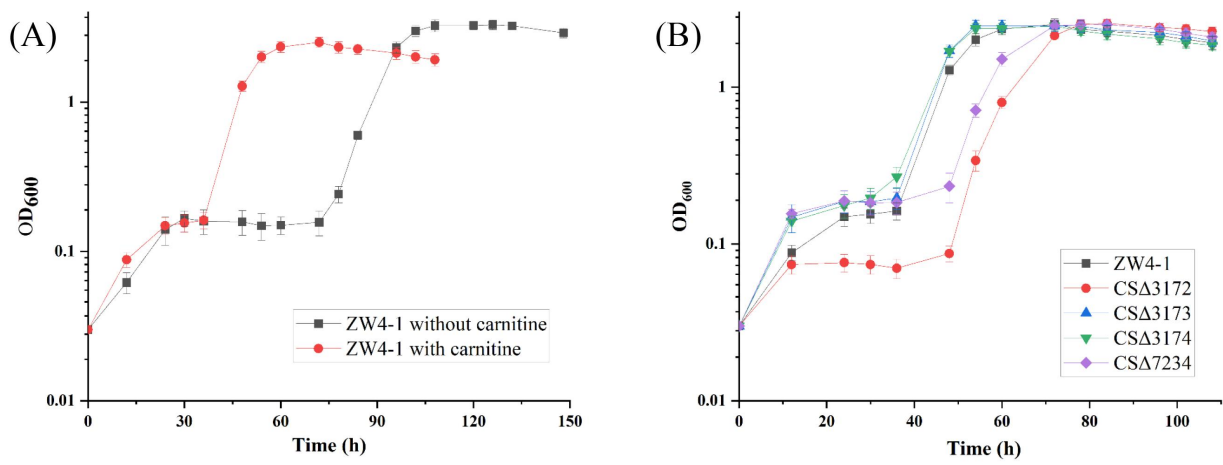


图 3.13 ZW4-1 及突变株在 45°C、1 M 盐浓度添加 DL-肉碱条件下的生长曲线

Fig 3.13 The effect of DL-carnitine on the growth of ZW4-1 and mutants at 45°C and 1 M salt concentration

注：（A）需盐色盐杆菌 ZW4-1 在添加或不添加 DL-肉碱的情况下的生长情况。
（B）需盐色盐杆菌 ZW4-1 和 4 株突变株在外源添加 DL-肉碱条件下的生长情况。

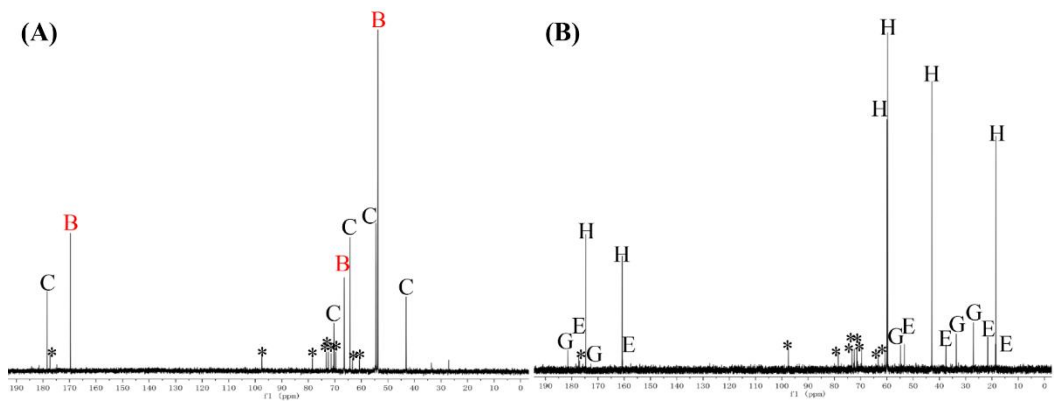


图 3.14 ZW4-1在45°C、1 M盐浓度添加5 mM DL-肉碱的条件下相容性溶质的¹³C-NMR结果

Fig 3.14 ¹³C-NMR results of compatible solutes of ZW4-1 at 45°C with 1 M salt concentration added with 5 mM DL-carnitine

注：(A)添加5 mM外源性DL-肉碱；(B)不添加5 mM外源性DL-肉碱。
B： 甘氨酸甜菜碱信号；C： 肉碱信号；E： 四氢嘧啶信号；H： 羟化四氢嘧啶信号；
G： 谷氨酸盐信号；*： 葡萄糖甘油酸信号。

根据前期实验可知低温诱导肉碱积累并赋予需盐色盐杆菌耐低温的特性，本研究提出肉碱是否也可以在高温条件下积累，并对这种需盐色盐杆菌起到高温条件下保护的作用。由于 45℃是需盐色盐杆菌 DSM 3043 生长的上限温度(Arahal et al, 2001)。本研究选用 45℃作为培养条件。生长曲线结果显示，在 45℃、1M 盐浓度的 S-M63 培养基中添加 DL-肉碱的延滞期明显缩短，且明显提高了比生长速率。但生长量低于不添加 DL-肉碱的生长量（图 3.13A）。在 4 个突变体中， $\Delta csal_3173$ 和 $\Delta csal_3174$ 表现出与 ZW4-1 相似的生长特性，而 $\Delta csal_3172$ 和 $\Delta csal_7234$ 具有比 ZW4-1 更长的延滞期和更低的比生长速率（图 3.13B）。¹³C-NMR 核磁共振检测结果表明，在添加 DL-肉碱的细胞中，肉碱和甘氨酸甜菜碱是主要的相容性溶质，但没有检测到四氢嘧啶和羟基四氢嘧啶的信号（图 3.14A），而在没有 DL-肉碱的细胞中，羟基四氢嘧啶是主要积累的相容性溶质（图 3.14B）。

3.4.9 高温高盐条件下的生长曲线和 ¹³C-NMR 检测

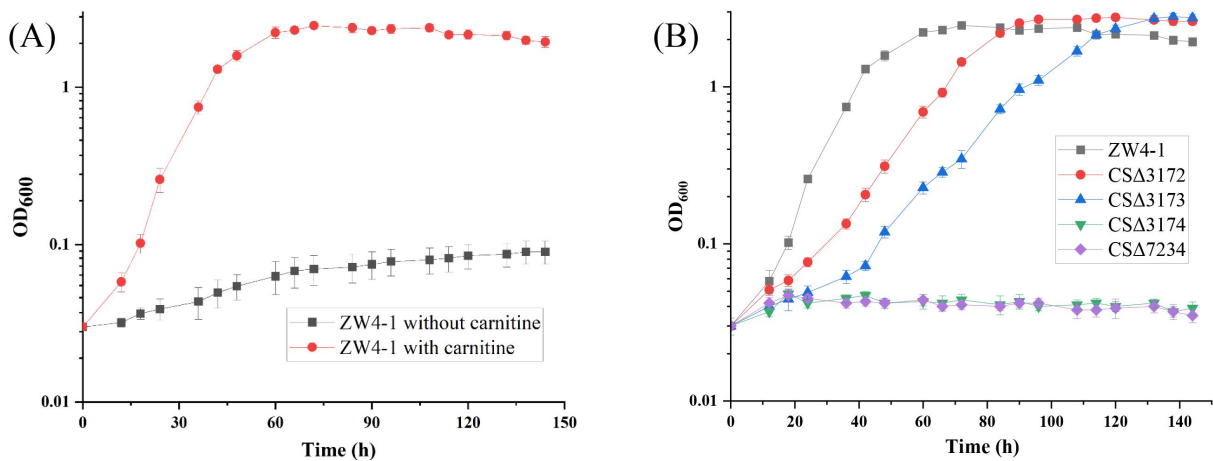


图 3.15 ZW4-1 在 45℃、3 M 盐浓度添加 5 mM DL-肉碱条件下的生长曲线

Fig 3.15 Growth curve of ZW4-1 at 45℃ with 3 M salt concentration supplemented with 5 mM DL-carnitine

注：（A）需盐色盐杆菌 ZW4-1 在添加或不添加 DL-肉碱条件下的生长情况。
（B）需盐色盐杆菌 4 个突变株在添加 DL-肉碱的条件下的生长情况。

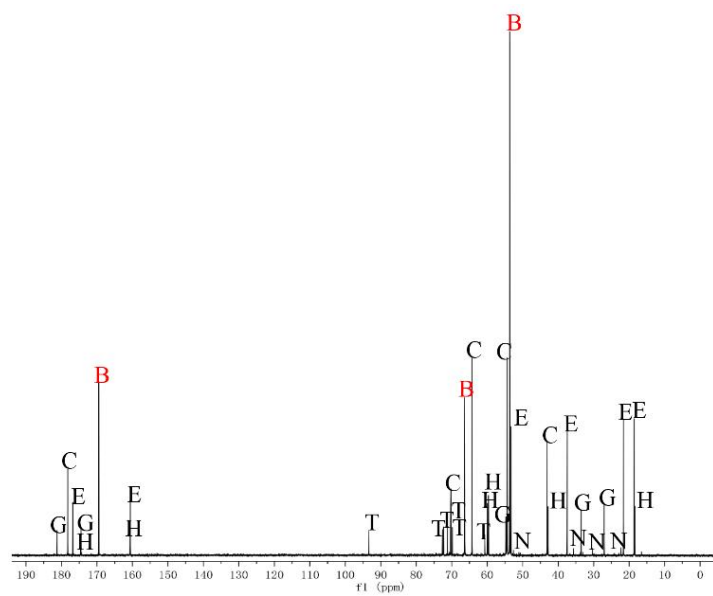


图 3.16 ZW4-1 在 45℃、3 M 盐浓度添加 5 mM DL-肉碱的条件下，相容性溶质的 ^{13}C -NMR 结果

Fig 3.16 ^{13}C -NMR results of compatible solutes of ZW4-1 at 45℃ with 3 M salt concentration added with 5 mM DL-carnitine

注：B：甘氨酸甜菜碱信号；C：肉碱信号；E：四氢嘧啶信号；H：羟化四氢嘧啶信号；G：谷氨酸信号；T：海藻糖信号；N：N- γ -乙酰二氨基丁酸信号。

参照于细胞在低温实验中的情况，本研究进一步探索了肉碱对在高盐和热应激条件下生长的细胞的应激保护作用。ZW4-1 菌株在不添加 DL-肉碱的高盐度 S-M63 培养基中，在 45℃ 培养条件下不生长。然而，添加 DL-肉碱的培养液的 OD₆₀₀ 值在 72 h 内达到最高值 2.5（图 3.15A），表明外源提供的 DL-肉碱增加了需盐色盐杆菌的耐盐性和耐热性上限。此外， ^{13}C -NMR 核磁共振分析表明，在此条件下检测到甘氨酸甜菜碱和肉碱，以及海藻糖、四氢嘧啶和 N- γ 乙酰二氨基丁酸（图 3.16）。在 4 株突变菌株中， $\Delta\text{csal_3172}$ 的比生长速率高于 $\Delta\text{csal_3173}$ ，但其生长量低于 $\Delta\text{csal_3173}$ ，而 $\Delta\text{csal_3174}$ 和 $\Delta\text{csal_7234}$ 的培养浊度在接种后 150h 内均无明显变化（图 3.15B）。由于 45℃ 时的水分蒸发速率远高于 37℃ 时的水分蒸发速率，导致培养 5d 后培养液体积明显减小，盐度明显升高，因此 $\Delta\text{csal_3174}$ 和 $\Delta\text{csal_7234}$ 在培养超过 150 h 后不再进行生长测定。

3.4.10 ZW4-1 添加外源 D-肉碱的 ^{13}C -NMR 检测

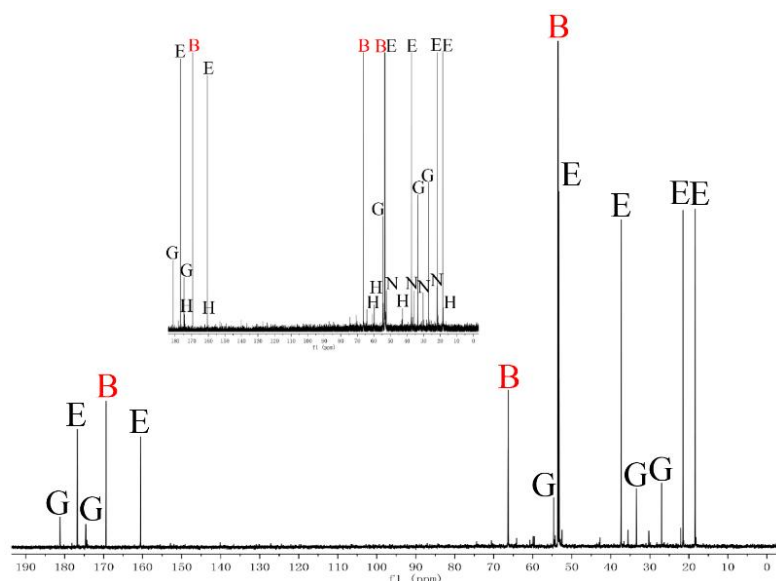


图 3.17 ZW4-1 在 37°C、2M 盐浓度添加 1 mM D-肉碱条件下的 ^{13}C -NMR 结果

Fig 3.17 ^{13}C -NMR results of ZW4-1 at 37°C, 2M salt concentration added with 1 mM D-carnitine

注：B：甘氨酸甜菜碱信号；E：四氢嘧啶信号；H：羟基四氢嘧啶信号；G：谷氨酸信号；N：N γ -乙酰二氨基丁酸信号。

Kleber 等人发现，当 L-肉碱存在于培养混合物中时，或者当细菌与 L-或 DL-肉碱预先培养时，醋酸钙不动杆菌（England et al, 1983）可以利用 D-肉碱作为营养物质，但没有观察到 D-肉碱作为唯一碳源的生长（Kleber et al, 1977）。为了检测 D-肉碱是以未经修饰的形式在细胞内积累还是转化为甘氨酸甜菜碱提供渗透保护作用，将菌株 ZW4-1 接种到添加 1 mM D-肉碱的中等盐度 S-M63 培养基中，在 37°C 恒温振荡培养箱振荡培养。提取相容性溶质后 ^{13}C -NMR 核磁分析结果表明，ZW4-1（图 3.17）提取物中的主要渗透保护物是甘氨酸甜菜碱和四氢嘧啶，这表明即使在没有 L-肉碱存在的情况下，需盐色盐杆菌也能将 D-肉碱转化为甘氨酸甜菜碱行使渗透保护作用。

3.4.11 回补菌株生长曲线的测定

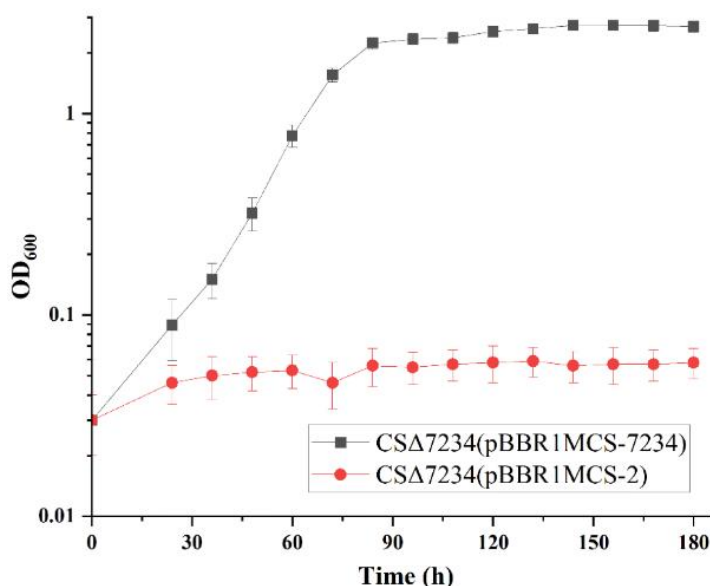


图 3.18 回补菌株在 37°C，葡萄糖作为碳源，L-肉碱作为氮源条件下的生长曲线

Fig 3.18 Growth curve of the apoplectic strain at 37° C with glucose as carbon source and L-carnitine as nitrogen source

在体外回补试验中，菌株 $\Delta csal_7234$ (pBBR1MCS-7234) 能够在以 L-肉碱为唯一氮源的 S-M63 中生长，而 $\Delta csal_7234$ (pBBR1MCS-2) 不能在以 L-肉碱为唯一氮源的 S-M63 中生长。证实了 $\Delta csal_7234$ 不能利用 L-肉碱作为唯一的氮源是这三个基因 (*csal_3172*、*csal_3173* 和 *csal_3174*) 被破坏的结果。

3.5 本章小结

为了进一步验证突变株及野生型菌株在不同条件下细胞内相容性溶质的积累，本研究利用 ^{13}C -NMR 核磁检测野生型及突变株在高温、低温、高盐、低盐等不同极端条件下的相容性溶质的积累，细胞在不同生长条件下会积累不同的相容性溶质，测定细胞在不同生长条件下的生长曲线，进一步说明不同相容性溶质对细胞渗透调节和对外部压力的作用。通过 ZW4-1 在不同盐浓度的，添加或不添加 DL-肉碱的 S-M63 培养基中的生长曲线和核磁结果发现，肉碱确可以提高细胞的渗透保护，但他的作用是间接通过转化为甘氨酸甜菜碱实现的，在需盐色盐杆菌中，侧面说明甘氨酸甜菜碱的渗透保护作用要

比肉碱好。通过 $\Delta csal_3172$, $\Delta csal_3173$, $\Delta csal_3174$ 和 $\Delta csal_7234$ 在中等盐浓度的 S-M63 培养基中添加 DL-肉碱或 L-肉碱的核磁结果说明, 肉碱可以作为一种相容性溶质在细胞内积累, 且 $csal_3173$ 的敲除完全阻断了 L-肉碱代谢为甘氨酸甜菜碱的途径, $csal_3174$ 基因的敲除部分阻断了 L-肉碱代谢为甘氨酸甜菜碱的途径, 而 ^{13}C -NMR 核磁共振结果显示 $csal_3172$ 基因的敲除对 L-肉碱代谢为甘氨酸甜菜碱没有影响, 分析可能是因为细胞内还有另外一种与 $csal_3172$ 功能相似的基因, 当 $csal_3172$ 基因的功能丧失后, 这个基因会代替 $csal_3172$ 基因行使部分功能。且通过核磁实验发现, 肉碱在细胞内是以没修饰过的形式存在的, 而不是以肉碱盐酸盐的形式存在。通过需盐色盐杆菌 ZW4-1 在低温低盐, 低温高盐; 高温低盐, 高温高盐条件下的生长曲线和核磁共振结果, 得知肉碱的存在不仅可以作为相容性溶质对细胞有渗透保护作用, 而且对外界环境的温度压力也有抗压作用。在培养基添加 D-肉碱作为外源添加物时, ^{13}C -NMR 核磁结果显示细胞内也积累甘氨酸甜菜碱, 说明细胞内还存在一条未被发现的 D-肉碱代谢为甘氨酸甜菜碱的代谢途径。

第四章 结论与展望

4.1 结论

实验前期预测 *csal_3172* 基因的敲除也可能会阻断需盐色盐杆菌中 L-肉碱的代谢, 但观察到 $\Delta csal_3172$ 保持了以 L-肉碱为唯一氮源的生长能力, 且在 L-肉碱作为外源添加物时, ^{13}C -NMR 仍检测到 GB。而 $\Delta csal_3173$ 完全丧失了以 L-肉碱为唯一氮源的生长能力, 在 L-肉碱作为外源添加物时, ^{13}C -NMR 结果显示没有 GB 存在。结合 *csal_3173* 基因的底物特异性结果表明, *csal_3173* 基因编码的肉碱脱氢酶催化 L-肉碱代谢途径的起始步骤产生脱氢肉碱, 而 D-肉碱分解代谢通过另一条未知途径进一步降解产生 GB, $\Delta csal_3174$ 完全丧失了以 L-肉碱为唯一氮源的生长能力, ^{13}C -NMR 仍检测到细胞主要积累肉碱, 同时也有少量的 GB 存在。说明可能有其他基因取代了 *csal_3172* 和 *csal_3174* 基因催化脱氢肉碱向 GB 的转化。由于在需盐色盐杆菌基因组中没有发现 *csal_3172* 或 *csal_3174* 基因的同源基因, 因此可以排除冗余基因存在的可能性。此外, 在外源 DL-肉碱存在的情况下, *csal_3172* 或 *csal_3173* 基因突变不影响两株突变体在 37°C 不同盐度条件下的生长, 但 *csal_3174* 基因突变显著降低了突变体在低温和高温条件下的比生长速率, $\Delta csal_7234$ 在低温和高温下的生长特性与 $\Delta csal_3174$ 的生长特性基本一致, 表明 *csal_3174* 基因是影响 $\Delta csal_7234$ 表型的重要基因。综上所述, DL-肉碱代谢为 GB 的分子机制以及肉碱在需盐色盐杆菌适应渗透胁迫和温度胁迫中的作用远比人们目前所理解的要复杂得多。

GB 是目前发现的在耐盐微生物和嗜盐微生物中对调节细胞渗透压最有效的相容性溶质之一, 在高盐度条件下, 需盐色盐杆菌可以通过从培养基中运输胆碱并将其氧化为 GB 来积累。在本研究中提出了另一种合成 GB 的替代途径, 即在温度胁迫和盐胁迫条件下, 转运的肉碱部分或全部转化为 GB。本研究结果表明, 肉碱的渗透保护作用是由于其转化为 GB 所致, 而 DL-肉碱的存在导致肉碱及其代谢中间体 GB 在低温和高温下同时在细胞内积累, 从而提高了高盐和温度胁迫下细胞的耐受上限。目前只有在 MRS 培养基中细胞同时积累甘氨酸甜菜碱和肉碱的报道, 但由于 MRS 培养基组分中含有大量的 GB 和肉碱, 所以很难区分和解释这两种化合物的生理功能, 而本研究首次揭示了细胞在限制性培养基中同时积累 GB 和肉碱后两种化合物在细胞内的生理作用。此外, 本研究还发现高盐和热胁迫细胞使含有肉碱、GB、四氢嘧啶和海藻糖的混合物, 这表明, 当细胞受到

两个或多个因素的胁迫时，细胞内的肉碱和转化的 GB 不能提供足够的保护，从而导致四氢嘧啶和海藻糖的内源合成被上调，细胞同时积累更多类型的相容性溶质来应对多因素胁迫。对于给定的微生物，这种生理反应无疑提高了它对不同生态位和栖息地不同环境因素的适应性。

4.2 展望

我国有上亿亩盐碱化耕地，主要分布在东北、西北等沿海地区，这些地区多耕地且盐碱化严重，随着全球气候变暖，海平面上升，人为使用耕地不当等因素，盐碱化土地面积还在日益增加。耐盐微生物经过长期的发展进化，已经具备完善的渗透响应体系和耐盐机制，挖掘耐盐生物种质资源，深入研究嗜盐微生物独特的耐盐调控机制，通过基因工程的手段打破物种限制，将嗜盐菌的耐盐基因及其调控因子转移到植物或其它微生物基因组中，对于提高工农业生产用微生物菌种、农作物的抗逆性以及盐碱地的利用效率等方面具有广阔的应用前景。本研究表明，肉碱在盐胁迫条件下的积累和代谢具有重要的生理功能，并且肉碱在细菌适应外界胁迫条件中的作用更为广泛，他并不仅限于目前报道的对低温的保护，还有高温保护等作用。所以，肉碱在细菌中的作用是多元化，是极其丰富的，人们对嗜盐微生物的研究，对肉碱等相容性溶质的研究还需进一步深入探索。这不仅有揭示自然规律的理论研究意义，而且还具有很高的实际应用价值。

参考文献

- 陈志亮. 南极中度嗜盐菌盐单胞菌 Nj223 四氢嘧啶生物合成基因 *ectABC* 的克隆及其功能初步研究[D]. 厦门大学, 2007.
- 戴秀玉, 王忆琴, 周坚等. 大肠杆菌海藻糖的代谢调控[J]. 生物工程进展, 2000, (06): 26-29.
- 卢伟东. 革兰氏阳性中度嗜盐菌甘氨酸甜菜碱转运蛋白基因的克隆和功能分析[D]. 中国农业大学, 2004.
- 任培根, 周培瑾. 中度嗜盐菌的研究进展[J]. 微生物学报, 2003, (03): 427-431.
- 王伟伟, 唐鸿志, 许平. 嗜盐菌耐盐机制相关基因的研究进展[J]. 微生物学通报, 2015, 42(03): 550-558.
- 王颖群, 陶涛. 微生物渗透压调节过程中的相容性溶质[J]. 微生物学通报, 1994(05): 293-296.
- 杨霆. 需盐色盐杆菌 DSM 3043 二甲基甘氨酸降解途径的研究[D]. 山东: 青岛农业大学, 2019.
- 赵百锁. 达坂喜盐芽孢杆菌 D-8~T 四氢嘧啶合成基因的克隆、功能表达和谷氨酰胺转运蛋白基因的克隆[D]. 中国农业大学, 2005.
- Arahal D R, García M T, Vargas C, et al. *Chromohalobacter salexigens* sp. nov., a moderately halophilic species that includes *Halomonas elongata* DSM 3043 and ATCC 33174[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2001, 51(4): 1457-1462.
- Bastard K, Smith A A T, Vergne-Vaxelaire C, et al. Revealing the hidden functional diversity of an enzyme family[J]. Nature Chemical Biology, 2014, 10(1): 42-49.
- Bazire P, Perchat N, Darii E, et al. Characterization of L-carnitine metabolism in *Sinorhizobium meliloti*[J]. Journal of Bacteriology, 2019, 201(7): e00772-18.
- Brown A D, Simpson J R. Water relations of sugar-tolerant yeasts: the role of intracellular polyols[J]. Microbiology, 1972, 72(3): 589-591.
- Brown A D. Microbial water stress[J]. Bacteriological Reviews, 1976, 40(4): 803-846.
- Buchet A, Eichler K, Mandrand-Berthelot M A. Regulation of the carnitine pathway in *Escherichia coli*: investigation of the *cai-fix* divergent promoter region[J]. Journal of Bacteriology, 1998, 180(10): 2599-2608.
- Calderón MI, Vargas C, Rojo F, et al. Complex regulation of the synthesis of the compatible solute ectoine in the halophilic bacterium *Chromohalobacter salexigens* DSM 3043^T[J]. Microbiology, 2004, 150(9): 3051-3063.
- Cánovas D, Borges N, Vargas C, et al. Role of N γ -acetyldiaminobutyrate as an enzyme stabilizer and an intermediate in the biosynthesis of hydroxyectoine[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1999, 65(9): 3774-3779.
- Cánovas D, Vargas C, Csonka L N, et al. Osmoprotectants in *Halomonas elongata*: high-affinity betaine transport system and choline-betaine pathway[J]. Journal of Bacteriology, 1996, 178(24): 7221-7226.
- Cánovas D, Vargas C, Iglesias-Guerra F, et al. Isolation and characterization of salt-sensitive mutants of the moderate halophile *Halomonas elongata* and cloning of the ectoine synthesis genes[J]. Journal of Biological Chemistry, 1997, 272(41): 25794-25801.
- Choquet C G, Ahonkhai I, Klein M, et al. Formation and role of glycine betaine in the moderate halophile *Vibrio costicola*[J]. Archives of Microbiology, 1991, 155(2): 153-158.
- Datta A R, Ostroff R, MacQuillan A M. Genetic and physical characterization of *proBA* genes of the marine bacterium *Vibrio parahaemolyticus*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1987, 53(12): 2733-2738.
- Elßner T, Preußner A, Wagner U, et al. Metabolism of L (-)-carnitine by Enterobacteriaceae under aerobic conditions[J]. FEMS Microbiology Letters, 1999, 174(2): 295-301.
- Fraenkel G. Studies on the distribution of vitamin BT (carnitine)[J]. The Biological Bulletin, 1953, 104(3): 359-371.
- Franken J, Kroppenstedt S, Swiegers J H, et al. Carnitine and carnitine acetyltransferases in the yeast

- Saccharomyces cerevisiae*: a role for carnitine in stress protection[J]. *Current Genetics*, 2008, 53(6): 347-360.
- Galinski E A, Trüper H G. Microbial behaviour in salt-stressed ecosystems[J]. *FEMS Microbiology Reviews*, 1994, 15(2-3): 95-108.
- García-Esteva R, Argandona M, Reina-Bueno M, et al. The *ectD* gene, which is involved in the synthesis of the compatible solute hydroxyectoine, is essential for thermoprotection of the halophilic bacterium *Chromohalobacter salexigens*[J]. *Journal of Bacteriology*, 2006, 188(11): 3774-3784.
- Gay P, Le Coq D, Steinmetz M, et al. Positive selection procedure for entrapment of insertion sequence elements in gram-negative bacteria[J]. *Journal of Bacteriology*, 1985, 164(2): 918-921.
- Grammann K, Volke A, Kunte H J. New type of osmoregulated solute transporter identified in halophilic members of the *bacteria* domain: TRAP transporter TeaABC mediates uptake of ectoine and hydroxyectoine in *Halomonas elongata* DSM 2581T[J]. *Journal of Bacteriology*, 2002, 184(11): 3078-3085.
- Hills B. Applications of low-field NMR to food science [J]. *Annual Reports on NMR Spectroscopy*, 2006, 58: 177-230.
- Jacques F, Rippa S, Perrin Y. Physiology of L-carnitine in plants in light of the knowledge in animals and microorganisms[J]. *Plant Science*, 2018, 274: 432-440.
- Jebbar M, Champion C, Blanco C, et al. Carnitine acts as a compatible solute in *Brevibacterium linens*[J]. *Research in Microbiology*, 1998, 149(3): 211-219.
- Jung H, Jung K, Kleber H P. Synthesis of L-carnitine by microorganisms and isolated enzymes[J]. *Measurement and Control*, 1993: 21-44.
- Jung H, Kleber H P. Metabolism of D (+)-carnitine by *Escherichia coli*[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 1991, 35(3): 393-395.
- Kaasen I, Falkenberg P, Styrvoid O B, et al. Molecular cloning and physical mapping of the *otsBA* genes, which encode the osmoregulatory trehalose pathway of *Escherichia coli*: evidence that transcription is activated by *katF* (AppR)[J]. *Journal of Bacteriology*, 1992, 174(3): 889-898.
- Kappes R M, Bremer E. Response of *Bacillus subtilis* to high osmolarity: uptake of carnitine, crotonobetaine and γ -butyrobetaine via the ABC transport system OpuC[J]. *Microbiology*, 1998, 144(1): 83-90.
- Kaufman R A, Broquist H P. Biosynthesis of carnitine in *Neurospora crassa*[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1977, 252(21): 7437-7439.
- Kets E P W, Galinski E A, de Bont J A M. Carnitine: a novel compatible solute in *Lactobacillus plantarum*[J]. *Archives of Microbiology*, 1994, 162(4): 243-248.
- Kleber H P, Seim H, Aurich H, et al. Verwertung von Trimethylammoniumverbindungen durch *Acinetobacter calcoaceticus*[J]. *Archives of Microbiology*, 1977, 112(2): 201-206.
- Ko R, Smith L T, Smith G M. Glycine betaine confers enhanced osmotolerance and cryotolerance on *Listeria monocytogenes*[J]. *Journal of Bacteriology*, 1994, 176(2): 426-431.
- Kuhlmann A U, Bursy J, Gimpel S, et al. Synthesis of the compatible solute ectoine in *Virgibacillus pantothenicus* is triggered by high salinity and low growth temperature[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2008, 74(14): 4560-4563.
- Le Rudulier D, Strom A R, Dandekar A M, et al. Molecular biology of osmoregulation[J]. *Science*, 1984, 224(4653): 1064-1068.
- Lechtenfeld M, Heine J, Sameith J, et al. Glycine betaine metabolism in the acetogenic bacterium *Acetobacterium woodii*[J]. *Environmental Microbiology*, 2018, 20(12): 4512-4525.
- Lucchesi G I, Lisa T A, Casale C H, et al. Carnitine resembles choline in the induction of cholinesterase, acid phosphatase, and phospholipase C and in its action as an osmoprotectant in *Pseudomonas aeruginosa*[J]. *Current Microbiology*, 1995, 30(1): 55-60.

- Meadows J A, Wargo M J. Carnitine in Bacterial Physiology and Metabolism[J]. Microbiology, 2015, 161(Pt 6): 1161
- MEASURES J C. Role of amino acids in osmoregulation of non-halophilic bacteria[J]. Nature, 1975, 257(5525): 398-400.
- Miura-Fraboni J, Kleber H P, England S. Assimilation of γ -butyrobetaine, and D-and L-carnitine by resting cell suspensions of *Acinetobacter calcoaceticus* and *Pseudomonas putida*[J]. Archives of Microbiology, 1982, 133(3): 217-221.
- Miura-Fraboni J, Kleber H P, England S. Assimilation of γ -butyrobetaine, and D-and L-carnitine by resting cell suspensions of *Acinetobacter calcoaceticus* and *Pseudomonas putida*[J]. Archives of Microbiology, 1982, 133(3): 217-221.
- Oren A, Bardavid R E, Kandel N, et al. Glycine betaine is the main organic osmotic solute in a stratified microbial community in a hypersaline evaporitic gypsum crust[J]. Extremophiles, 2013, 17(3): 445-451.
- Oren A. Diversity of halophilic microorganisms: environments, phylogeny, physiology, and applications[J]. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 2002, 28(1): 56-63.
- Park S, Smith L T, Smith G M. Role of glycine betaine and related osmolytes in osmotic stress adaptation in *Yersinia enterocolitica* ATCC 9610[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1995, 61(12): 4378-4381.
- Mori N, Mitsuzumi H, Kitamoto Y. Purification and properties of carnitine dehydrogenase from *Pseudomonas* sp. YS-240[J]. Journal of Fermentation and Bioengineering, 1994, 78(5): 337-340.
- Rafaëli-Eshkol D, Avi-Dor Y. Studies on halotolerance in a moderately halophilic bacterium. Effect of betaine on salt resistance of the respiratory system[J]. Biochemical Journal, 1968, 109(4): 687-691.
- Rippa S, Zhao Y, Merlier F, et al. The carnitine biosynthetic pathway in *Arabidopsis thaliana* shares similar features with the pathway of mammals and fungi[J]. Plant Physiology and Biochemistry, 2012, 60: 109-114.
- Rüetschi U, Nordin I, Odelhög B, et al. γ -Butyrobetaine hydroxylase: Structural characterization of the *Pseudomonas* enzyme[J]. European Journal of Biochemistry, 1993, 213(3): 1075-1080.
- Russell N J. Adaptive modifications in membranes of halotolerant and halophilic microorganisms[J]. Journal of Bioenergetics and Biomembranes, 1989, 21(1): 93-113.
- Severin J, Wohlfarth A, Galinski E A. The predominant role of recently discovered tetrahydropyrimidines for the osmoadaptation of halophilic eubacteria[J]. Microbiology, 1992, 138(8): 1629-1638.
- Shao Y H, Guo L Z, Yu H, et al. Establishment of a markerless gene deletion system in *Chromohalobacter salexigens* DSM 3043[J]. Extremophiles, 2017, 21(5): 839-850.
- Shao Y H, Guo L Z, Zhang Y Q, et al. Glycine betaine monooxygenase, an unusual Rieske-type oxygenase system, catalyzes the oxidative *N*-demethylation of glycine betaine in *Chromohalobacter salexigens* DSM 3043[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2018, 84(13): e00377-18.
- Strijbis K, Van Roermund C W T, Hardy G P, et al. Identification and characterization of a complete carnitine biosynthesis pathway in *Candida albicans*[J]. The FASEB Journal, 2009, 23(8): 2349-2359.
- Strijbis K, Vaz F M, Distel B. Enzymology of the carnitine biosynthesis pathway[J]. IUBMB Life, 2010, 62(5): 357-362.
- Vargas C, Argandoña M, Reina-Bueno M, et al. Unravelling the adaptation responses to osmotic and temperature stress in *Chromohalobacter salexigens*, a bacterium with broad salinity tolerance[J]. Saline Systems, 2008, 4(1): 1-9.
- Vargas C, Nieto J J. Genetic tools for the manipulation of moderately halophilic bacteria of the family *Halomonadaceae*[J]. Recombinant Gene Expression: Reviews and Protocols, 2004: 183-208.
- Ventosa A, Nieto J J, Oren A. Biology of moderately halophilic aerobic bacteria[J]. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 1998, 62(2): 504-544.

- Ventosa A, Nieto J J. Biotechnological applications and potentialities of halophilic microorganisms[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 1995, 11(1): 85-94.
- Viereck N, Nørgaard L, Bro R, et al. Chemometric Analysis of NMR Data[J]. Modern Magnetic Resonance, 2006: 1833-1843.
- Vreeland R H, Litchfield C D, Martin E L, et al. *Halomonas elongata*, a new genus and species of extremely salt-tolerant bacteria[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 1980, 30(2): 485-495.
- Wargo M J, Hogan D A. Identification of genes required for *Pseudomonas aeruginosa* carnitine catabolism[J]. Microbiology, 2009, 155(Pt 7): 2411.
- Weisser J, Trüper H G. Osmoregulation in a new haloalkaliphilic *Bacillus* from the Wadi Natrun (Egypt)[J]. Systematic and Applied Microbiology, 1985, 6(1): 7-11.
- Yang T, Shao Y H, Guo L Z, et al. Role of *N*, *N*-dimethylglycine and its catabolism to sarcosine in *Chromohalobacter salexigens* DSM 3043[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2020, 86(17): e01186-20.
- Zhu Y, Jameson E, Crosatti M, et al. Carnitine metabolism to trimethylamine by an unusual Rieske-type oxygenase from human microbiota[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2014, 111(11): 4268-4273.

附录表 缩写词说明

缩写词	英文名称	中文名称
PCR	Polymerase Chain Reaction	聚合酶链反应
BKACE	β - keto acid cleavage enzyme	β -脱氢肉碱裂解酶
OD	Optical density	光密度
GG	Glucosylglycerate	葡萄糖基甘油酸酯
LB	Luria-Bertani Medium	LB 培养基
TLC	Thin-layer chromatography	薄层色谱
TMA	Trimethylamine	三甲胺
mg	Milligram	毫克
mL	Milliliter	毫升
μ L	Microlitre	微升
bp	base pair	碱基对
<i>cat</i>	Chloramphenicol Acetyltransferase	氯霉素乙酰基转移酶
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	大肠杆菌
DNA	Deoxyribonucleic Acid	脱氧核糖核酸
SDS	Sodium dodecyl sulfat	十二烷基磺酸钠
PAGE	Polyacrylamide gel electrophoresis	聚丙烯酰胺凝胶电泳
Da	Dalton	道尔顿
IPTG	Isopropyl- β -D-thilgalactoside	异丙基- β -D-硫代半乳糖
DMSO	Dimethylsulfoxide	二甲基亚砷

导师组意见

导师组已通过孟祥麟的论文审查，同意并推荐其参加硕士学位
论文答辩。

导 师： 郭立忠

导师组成员： 卢伟东 杨秀青
樊亚琴

2022 年 6 月 1 日

致 谢

我始终相信致谢会是我整篇论文中最温暖的部分，所以我一直舍不得下笔。但行文终有收笔时，文末搁笔，思绪万千，究其根底，还得从三年前的那个夏天说起。

饮水思其源，学成念吾师。三年前的夏天，我第一次见到了我的导师-郭立忠教授，感谢郭老师从众多候选人中选出了我，让我得以跟随郭老师学习严谨的科研态度，朴素的工作作风和温良俭让的抚世酬物。我打心底里敬佩我的导师，因为他说的话总是那么让人信服，我打心底里尊敬我的老师，因为他走遍全国多地指导食用菌种植，帮助农民以新技术脱贫致富，衷心祝愿郭老师身体健康，桃李满门。

谆谆如父语，殷殷似友亲。第一次与卢伟东老师见面，师徒二人相谈甚欢，不知不觉就聊到了深夜。那天我们聊了科研，也谈了人生，卢老师对科研的热情是我永远需要学习的对象，他谦和、沉稳、正直、细心，感谢卢老师对我实验上的指导，感谢在我实验不顺利时对我的安慰和鼓舞，祝卢老师生活美满，成果丰硕。同时也感谢于浩老师、樊亚琴老师、徐丽丽老师、李树文老师、杨秀青老师在生活和科研上给予我的帮助和建议。

独学而无友，孤陋而寡闻。感谢山东省农业应用真菌实验室的同窗，特别感谢赵书雪师姐，师姐于我亦师亦友，我将会永远记得师姐对我的帮助；感谢张美华师妹，你单纯、善良，往往在我实验不顺利时给予鼓励；感谢邵亚会师姐、杨霆师兄对我实验上的指导；感谢徐康，江春娇三年同窗的互相陪伴；感谢赵建俊师兄、吉建成师兄、王菲师姐、高杰师姐、李晓航、马志恒、邱田美、金晓璠、张晨晓对我实验和生活上的帮助与关心。

父母之爱子，则为之计深远。求学二十载，离家十一年，我很自豪有如此爱我的父母，从小到大我的父母都会无条件地支持我的选择，可能我们这一家三口都不擅于表达对彼此的爱，但生活的处处又都透露着深深的关切。感谢父母的养育之恩，而我想这种感情是无法用语言表达的，只希望我的父母身体健康就好。

感谢国家自然科学基金(31070047)和山东省重大农业应用技术创新项目(SD2019ZZ014)的资助。

人生本就是一场场有关离别的故事，而这场讲了三年的故事，也将以一句前程似锦结尾，而这时的我也终于明白，这句话的意思是离别。幸福是奋斗出来的，我也必将会带着祝福在即将展开的新的故事中努力奋斗！

作者简介

孟祥麟，男，山东潍坊人，中共党员，2019年9月至2022年6月，在青岛农业大学生命科学学院生物工程专业学习，所学课程：分子生物学及实验技术、高级生物化学、微生物生理学、微生物遗传育种学、微生物分类学、蛋白结构与功能、生物信息学基础等。主要从事需盐色盐杆菌耐盐机制研究、生物活性物质研究、基因的克隆和表达及酶学性质研究。在校3年担任班长和研究生会秘书长一职，获得过“优秀研究生干部”和“山东省优秀毕业生”荣誉称号。

主要成果：

1. **Meng XL**, Gao X, Si YM, Xu LL, Guo LZ, Lu WD. Role of carnitine in adaptation of *Chromohalobacter salexigens* DSM 3043 and its mutants to osmotic and temperature stress in define medium. *Extremophiles*. (Major revision)
2. Yang T, Shao YH, Guo LZ, **Meng XL**, Yu H, Lu WD. Role of N, N-dimethylglycine and its catabolism to sarcosine in *Chromohalobacter salexigens* DSM 3043[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2020, 86(17): e01186-20.
3. **孟祥麟**,赵书雪,徐丽丽,邱田美,李树文,郭立忠,于浩.羊肚菌的培养基和营养袋配方优化[J].*中国食用菌*,2022,41(03):25-29.