

杨永坛研究员主持“粮油污染物检测及控制”专栏文章之三

DOI: 10.16210/j.cnki.1007-7561.2023.05.021

汪洋, 赵冬蕾, 王楠希, 等. PQQ 依赖性呕吐毒素脱氢酶的鉴定与性能表征[J]. 粮油食品科技, 2023, 31(5): 179-187.

WANG Y, ZHAO D L, WANG N X, et al. Identification and biochemical characterization of a PQQ-dependent deoxynivalenol (DON) dehydrogenase[J]. Science and Technology of Cereals, Oils and Foods, 2023, 31(5): 179-187.

# PQQ 依赖性呕吐毒素脱氢酶的 鉴定与性能表征

汪 洋<sup>1</sup>, 赵冬蕾<sup>1,2</sup>, 王楠希<sup>1</sup>, 杨永坛<sup>1</sup>, 郭宝元<sup>1</sup>✉

(1. 国家粮食和物资储备局科学研究院 粮油质量安全研究所, 北京 100037;

2. 上海理工大学 健康科学与工程学院, 上海 200093)

**摘要:** 谷物及其制品中呕吐毒素 (DON) 的污染给人类健康造成了潜在威胁。利用生物酶将真菌毒素转化为低毒产物的生物脱毒技术是一种环保且高效的脱毒方法。本研究基于同源比对方法, 从呕吐毒素脱毒菌株德沃斯氏菌 *Devosia* sp. FJ2-5-3 的基因组中挖掘鉴定了 1 个呕吐毒素 (DON) 脱毒酶编码基因 *adh2*, 对该基因进行克隆、表达并进一步对其编码酶的酶学性质进行了表征。结果表明: *adh2* 基因长度 1 770 bp, 其编码的 ADH2 酶原由 589 个氨基酸组成, N 端前 1~24 个氨基酸为信号肽, 属于 I 型吡咯喹啉醌 (Pyrroloquinoline quinone, PQQ) 依赖性醇脱氢酶。该酶最适反应 pH=9, 最适反应温度为 35 °C, 在 65 °C 孵育 4 h 后仍保留 50% 以上的酶活, 显示了较好的热稳定性; 另外, Ca<sup>2+</sup> 是其必须辅因子, 而 1% 的乙醇和异丙醇均对其活性有明显抑制作用。ADH2 对 DON 的 *K<sub>m</sub>* 和 *K<sub>cat</sub>* 值分别为 (708.00±47.01) μg/mL 和 (3.37±0.11) S<sup>-1</sup>, 该研究结果可为 PQQ 依赖性呕吐毒素脱氢酶后续工业化应用提供参考。

**关键词:** 呕吐毒素; 生物脱毒; PQQ 依赖性醇脱氢酶; 酶学性质表征

中图分类号: TS207; Q93 文献标识码: A 文章编号: 1007-7561(2023)05-0179-09

网络首发时间: 2023-09-11 09:47:30

网络首发地址: <https://link.cnki.net/urlid/11.3863.TS.20230908.1010.007>

## Identification and Biochemical Characterization of a PQQ-dependent Deoxynivalenol (DON) Dehydrogenase

WANG Yang<sup>1</sup>, ZHAO Dong-lei<sup>1,2</sup>, WANG Nan-xi<sup>1</sup>, YANG Yong-tan<sup>1</sup>, GUO Bao-yuan<sup>1</sup>✉

(1. Institute of Grain and Oil Quality and Safety, Academy of National Food and Strategic Reserves Administration, Beijing 100037, China; 2. School of Health Science and Engineering, University of Shanghai for Science and Technology, Shanghai 200093, China)

收稿日期: 2023-04-29

基金项目: 国家自然科学基金 (31972605); 宁夏回族自治区重点研发计划 (2022BBF03031)

Supported by: National Natural Science Foundation of China (No.31972605); Key Research and Development Program of Ningxia Hui Autonomous Region (No. 2022BBF03031)

作者简介: 汪洋, 男, 1981 年出生, 硕士, 副研究员, 研究方向为污染粮食无害化处理。E-mail: wy@ags.ac.cn

通讯作者: 郭宝元, 男, 1976 年出生, 博士, 研究员, 副所长, 研究方向为粮食质量安全。E-mail: gby@ags.ac.cn

**Abstract:** Deoxynivalenol (DON) contamination in cereals and cereal products has the potential to pose a threat to human health. The biotransformation technique, which uses biological enzymes to transform mycotoxins into less toxic product, is an environmentally friendly and highly effective approach to detoxifying mycotoxins. In this study, a gene designated *adh2*, encoding DON detoxifying enzyme, was identified by homology search from the genome sequence of DON-detoxifying strain *Devosia* sp. FJ2-5-3. Subsequently, the *adh2* gene was cloned and expressed. Then, the enzymatic properties of its encoding enzyme was further characterized. The results showed that the length of the *adh2* gene in *Devosia* sp. FJ2-5-3 was 1770 bp and the encoded ADH2 enzyme consisted of 589 amino acids, with a signal peptide of 24 amino acids length present at the N-terminus and belonging to type I of the PQQ-dependent alcohol dehydrogenase family (Type I PQQ-ADH). The enzyme exhibited the optimal activity at pH 9 and a temperature of 35 °C, and it retained over 50% of enzyme activity after incubation at 65 °C for 4 hours, indicating its good thermal stability. In addition, Ca<sup>2+</sup> was found to be an essential cofactor for ADH2, while both 1% of ethanol and isopropanol showed significant inhibitory effects on its activity. The  $K_m$  and  $K_{cat}$  values of ADH2 for DON were 708.00±47.01 μg/mL and 3.37±0.11 S<sup>-1</sup>, respectively. These results could provide reference information for the subsequent industrial application of DON detoxification enzymes.

**Key words:** deoxynivalenol; biotransformation; PQQ-dependent alcohol dehydrogenase; enzymatic property characterization

脱氧雪腐镰刀菌烯醇 (deoxynivalenol, DON), 又名呕吐毒素, 是一种在小麦、玉米和大麦等小粒谷物及其制品中检出率高、污染水平高的镰刀菌毒素<sup>[1]</sup>。低剂量暴露会导致肠道屏障受损和免疫刺激效应, 而高剂量暴露则会导致呕吐和免疫抑制<sup>[2]</sup>。呕吐毒素作为一种田间毒素, 采取良好的农业操作规范, 如施用抗真菌农药和实行轮作农业种植方式, 以及种植抗病转基因作物, 在一定程度上可以减少毒素污染, 但无法完全避免毒素的产生。呕吐毒素具有良好的热稳定性和化学稳定性, 这使得传统物理和化学方法 (如加热或臭氧处理) 的毒素消减效率低下。此外, 这些物理和化学方法还可能导致物料营养成分损失以及产生毒副产物等额外问题。鉴于此, 如何安全高效地消减染毒粮食和饲料中的毒素就显得尤为重要与迫切。利用微生物或生物酶对真菌毒素进行生物转化以达到毒素消减目的的生物脱毒技术不仅回避了上述物理化学脱毒的缺点, 还具有环境友好、高效和专一等特点, 呈现出良好的应用前景。

DON 生物脱毒的研究始于二十世纪八十年代。迄今为止, 已成功从小麦叶、小麦穗、土壤、湖水、海水、各种动物肠消化道和人乳等多种样品中分离出 *Agrobacterium-Rhizobium* E3-39<sup>[3]</sup>、

*Eubacterium* sp. BBSH 797<sup>[4]</sup>、*Devosia mutans* 17-2-E-8<sup>[5]</sup>、*Sphingomonas* sp. S3-4<sup>[6]</sup>、*Paradevosia shaoguanensis* DDB001<sup>[7]</sup>、*Slackia* sp. D-G6<sup>[8]</sup>、*Desulfitobacterium* sp. PGC-3-9<sup>[9]</sup>、*Lactobacillus rhamnosus* SHA113<sup>[10]</sup>、*Sphingomonas* sp. KSM1<sup>[11]</sup>、*Marmoricola* sp. MIM116<sup>[12]</sup>、*Bacillus* sp. N22 和 *Bacillus* sp. HN117<sup>[13]</sup>等多种 DON 降解微生物。然而, 这些微生物多以 3-keto-DON、3-epi-DON 和 de-epoxy-DON (DOM-1) 为降解产物, 新型低毒降解产物极少。虽然已分离了多达几十种的呕吐毒素脱毒菌株, 但由于其脱毒方式缺乏多样性, 以及脱毒酶分离鉴定研究方法和技术的局限, 成功鉴定的呕吐毒素脱毒酶类型却非常有限。目前已报道的 DON 脱毒酶 (见图 1) 主要包括氧化 DON 的 C3 位羟基生成 3-keto-DON 的 NADP-依赖性醛酮还原酶 (NADP-dependent aldo-keto reductase) AKR18A1<sup>[6]</sup>或吡咯喹啉醌 (Pyrroloquinidine quinone, PQQ) 依赖性醇脱氢酶 (PQQ-dependent alcohol dehydrogenase) DepA<sup>[14]</sup>; 立体选择性还原 3-keto-DON 的 C3 位羰基生成 3-epi-DON 的 NADPH 依赖性醛酮还原酶 (NADPH-dependent aldo-keto reductase) AKR6D1<sup>[15]</sup>或 DepB<sup>[16]</sup>; 羟基化 DON 的 C16 位的 DdnA-Kdx-KdR 三组份细胞色

素 P450 系统<sup>[11]</sup>；异构化 (Isomerization) DON 为 iso-DON 的特殊乙二醛酶 I (specialized glyoxalase I, SPG)<sup>[17]</sup>。此外，乙酰基转移酶 (trichothecene-3-O-acetyltransferase)<sup>[18]</sup>和 UDP-葡萄糖基转移酶 (UDP-glycosyltransferase)<sup>[19]</sup> 分别可将 DON 结构上的 C3 位的羟基乙酰化和糖苷化，但乙酰基化 DON 和葡萄糖苷化 DON 均能在动物和人类的消化道内重新水解为母体 DON<sup>[20-21]</sup>，因此不是严格意义上的生物脱毒方式。

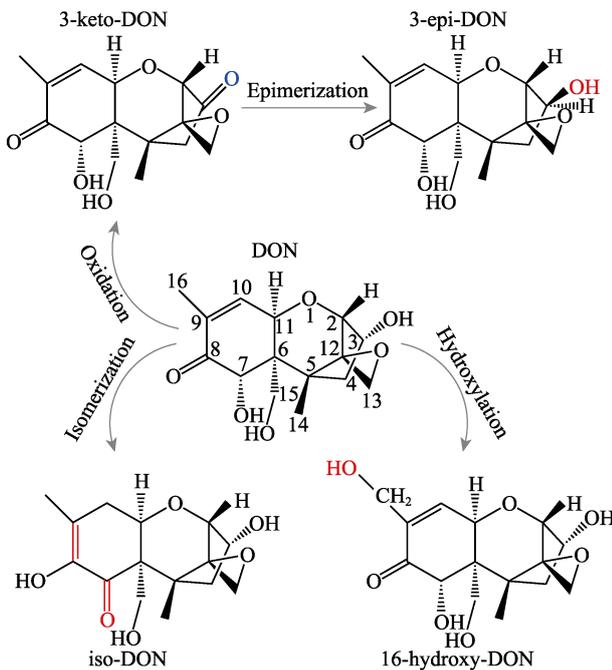


图 1 呕吐毒素脱毒酶及其脱毒方式示意图  
Fig.1 Schematic diagram of DON detoxification enzymes and their catalytic way

PQQ 依赖性醇脱氢酶是一类以吡咯喹啉醌作为辅因子的醇脱氢酶，主要存在于  $\alpha$ 、 $\beta$  和  $\gamma$ -变形菌中，参与催化醇氧化成醛或酮的氧化反应。根据 PQQ 依赖性醇脱氢酶的存在位置和结构特征将其分为三类：Type I ADH 通常位于细胞周质，其高级结构含有一个  $\text{Ca}^{2+}$ -PQQ 结合结构域；Type II ADH 也位于细胞周质，含有一个  $\text{Ca}^{2+}$ -PQQ 结合结构域和一个血红素 c (heme c) 结合结构域；Type III ADH 则位于细胞膜，由 2 或 3 个亚基复合体组成，并含有一个  $\text{Ca}^{2+}$ -PQQ 结合结构域和四个血红素 c 结合结构域<sup>[22]</sup>。近年来，一些研究发现，来自 *D. mutans* 17-2-E-8 菌株中的 PQQ 依赖性醇脱氢酶 DepA，具有将 DON 的 C3 羟基氧

化成酮基而生成 3-keto-DON 的能力<sup>[14]</sup>。根据 MTT 和 BrdU 两种不同的评测方法，它的  $\text{IC}_{50}$  值分别是 DON 的 3.03 倍和 4.54 倍<sup>[5]</sup>。这表明，与 DON 相比，3-keto-DON 是一种低毒的 DON 降解产物。

PQQ 依赖性醇脱氢酶作为一种新型呕吐毒素脱毒酶，具有较高的研究价值和应用前景。然而，关于此类呕吐毒素脱毒酶研究较少。因此，进一步挖掘和研究新的 PQQ 依赖性呕吐毒素脱氢酶资源，并对其酶学性质进行表征，将有助于我们更好地理解 PQQ 依赖性呕吐毒素脱氢酶的功能和作用机制，并为其在工业化应用提供重要的理论依据。本研究以具有将 DON 氧化为 3-keto-DON 的德沃斯氏菌 *Devosia* sp. FJ2-5-3 为研究对象，采用生物信息技术从其基因组中成功挖掘到 1 个编码 PQQ 依赖性醇脱氢酶基因，对其进行克隆、表达，并对其编码酶的生物信息学和生化性质进行表征，旨在为呕吐毒素酶促降解研究提供参考。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验材料

具有 DON 生物脱毒作用且已完成全基因组测序的德沃斯氏菌 *Devosia* sp. FJ2-5-3 由本实验室分离并保存；克隆宿主大肠杆菌 *E. coli* Top10、表达质粒 pET28a 和表达宿主大肠杆菌 *E. coli* BL21(DE3)：Novagen 公司；T5 exonuclease 和 Q5<sup>®</sup> High-Fidelity DNA Polymerase：美国 NEB 公司；DON 标准品 (纯度>98%)：青岛普瑞邦生物工程有限公司；3-keto-DON (纯度>98%)：加拿大 TripleBond 公司；PQQ 和吩嗪硫酸甲酯 (phenazine methosulfate, PMS)：上海源叶生物科技有限公司。

### 1.2 仪器设备

PowerCycler Gradient SL 梯度 PCR 仪：德国耶拿分析仪器有限公司；NanoDrop 2000C 超微量分光光度计、Ultimate 3000 超高效液相色谱系统：美国赛默飞世尔科技有限公司；Gel Doc XR+凝胶成像系统：伯乐生命医学产品 (上海) 有限公司；Scientz-950E 超声细胞破碎仪：宁波新芝生物科技股份有限公司。

### 1.3 实验方法

#### 1.3.1 候选 DON 脱毒酶编码基因的搜寻

以已报道的具有将 DON 氧化为 3-keto-DON

的 PQQ 依赖性醇脱氢酶 DepA ( GenBank accession no. KFL25551.1 ) 为检索序列, FJ2-5-3 全基因组序列为数据库, 使用 TBtools 中 Blast Zone 模块中 tblastn 进行搜索比对分析 ( E-value=1e<sup>-5</sup> ), 搜寻 FJ2-5-3 基因组中潜在的 DON 脱毒酶编码基因。

### 1.3.2 候选 DON 脱毒酶编码基因的克隆、表达及活性验证

#### 1.3.2.1 候选 DON 脱毒酶编码基因的克隆

参照细菌基因组 DNA 快速抽提试剂盒产品说明书提取 DON 脱毒菌株 FJ2-5-3 基因组 DNA。为克隆候选 DON 脱毒酶编码基因, 基于 T5 核酸外切酶依赖组装策略 ( T5 exonuclease-dependent assembly,

TEDA )<sup>[23]</sup>, 首先分别以基因组 DNA 和表达载体 pET28a 为模板, 使用 Q5<sup>®</sup> High-Fidelity DNA Polymerase 和如下引物 ( 见表 1 ) 扩增候选脱毒酶编码基因 ( 98 °C/2 min; 35× ( 98 °C/10 s, 68 °C/30 s, 72 °C/60 s ); 72 °C/2 min ) 和线性化表达载体 pET28a ( 98 °C/2 min; 35× ( 98 °C/10 s, 68 °C/30 s, 72 °C/180 s ); 72 °C/4 min ), 然后按照 DiaSpin 柱式 DNA 胶回收试剂盒操作说明和 TEDA 技术相关文献<sup>[23]</sup>进行纯化和连接操作, 最后连接液转化克隆宿主 Top10, 挑取转化子并提取重组质粒, 重组质粒经酶切和 DNA 测序以验证克隆的正确性。

表 1 用以扩增 3 个候选脱毒酶编码基因和线性化载体的引物序列

Table 1 Primer sequences for amplifying three candidate detoxifying enzyme coding genes and linearized vector

扩增子	引物	序列 (5'→3')
<i>adh1</i>	1F	<u>AGGAGATATACCATGGGACCTGCTGGAGA</u> ACATGT
	1R	GTGGTGGTGGTGGTGT <u>TCTGCGGAAGGGCGAAAACG</u>
<i>adh2</i>	2F	<u>AGGAGATATACCATGCAGTCGGACCTGCTGGAGA</u>
	2R	GTGGTGGTGGTGGTGT <u>TCTGTTGTCGTCAGGGCGT</u>
<i>adh3</i>	3F	<u>AGGAGATATACCATGCAGGGCGTGCGCG</u>
	3R	GTGGTGGTGGTGGTGT <u>GCTTGGGCAGCTTGTAACG</u>
Linearized pET28a(+)	28aF	CATGGTATATCTCCTTCTTAAAGTTAAACAAATTATTTCTAGAGG
	28aR	CACCACCACCACCACCACT

注: 下划线标注的 15 个寡聚核苷酸序列表示与载体 pET28a (+) 同源。

Note: The underlined sequence highlight the 15 bases of homology to the entry vector of pET28a(+).

#### 1.3.2.2 候选脱毒酶的异源表达及活性检测

将验证正确的重组质粒 pET28a::*adh1*、pET28a::*adh2*、pET28a::*adh3* 和空载质粒 pET28a 分别转化至表达宿主 *E. coli* BL21(DE3), 获得相应转化子 *E. coli* BL21(DE3)/pET28a::*adh1*、*E. coli* BL21(DE3)/pET28a::*adh2*、*E. coli* BL21(DE3)/pET28a::*adh3* 和 *E. coli* BL21(DE3)/pET28a。分别挑取生长在 LB+Km 100 μg/mL 平板上的各种转化子于 5 mL LB+Km 100 μg/mL, 37 °C, 培养过夜。按照 1% 接种量将新鲜培养物接种至 250 mL 装量 LB+Km 100 μg/mL 液体培养基中, 37 °C, 180 rpm, 培养 1.5~2 h 至 OD<sub>600</sub>=0.6~0.8; 加入终浓度为 0.2 mmol/L 异丙基-β-D- 硫代半乳糖苷 ( Isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside, IPTG ) 后在 180 rpm, 18 °C 诱导表达 24 h; 6 000 rpm, 10 min 收集菌体, SDS-PAGE 分析蛋白表达是否成功。菌体经 50 mL 的 pH8.0 的 50 mmol/L Tris-HCl+250 mmol/L

NaCl+10 mmol/L 咪唑进行重悬; 在 150 w, φ2 振幅杆, 开 5 s 停 10 s 的超声条件下进行细胞破碎, 12 000 rpm, 离心 20 min, 该裂解上清液使用 Ni-NTA 重力预装柱, 按照其产品说明书进行蛋白纯化。各个咪唑浓度洗脱液经过 30 kDa 超滤管进行浓缩除盐后, 再进行 SDS-PAGE 分析。采用后续 1.3.4 方法中所描述的 DON 脱毒酶活性测定方法, 以确定三种纯酶液是否具有 DON 脱毒活性。

### 1.3.3 DON 脱毒酶生物信息学分析及三维高级结构预测

DON 脱毒酶的信号肽预测通过 SignalP 6.0 ( <https://services.healthtech.dtu.dk/services/SignalP-6.0/> ) 实现, 其氨基酸序列相似性分析通过 Jalview 来实现; 其亚细胞定位预测通过 LocTree3 ( <https://roslab.org/services/loctree3/> ) 实现; 其理论分子量 ( Mw ) 和等电点 ( pI ) 预测通过 ExPASy Proteomics Server ( <https://web.expasy.org/protparam/> )

实现；其跨膜结构域预测通过 DeepTMHMM (<https://dtu.biolib.com/DeepTMHMM>) 实现；其高级结构预测通过 Robetta (<https://robetta.bakerlab.org/>) 实现。

#### 1.3.4 DON 脱毒酶学性质表征

DON 脱毒酶活测定方法：190  $\mu\text{L}$  的 25 mmol/L pH 8.0 的 Tris-HCl 缓冲液中，分别加入 2  $\mu\text{L}$  的 5  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  DON，2  $\mu\text{L}$  的 10 mmol/L PQQ，2  $\mu\text{L}$  的 100 mmol/L  $\text{CaCl}_2$  和 2  $\mu\text{L}$  的 40 mmol/L PMS 及适量纯酶，在 35  $^\circ\text{C}$  条件下反应 30 min 后，加入 200  $\mu\text{L}$  甲醇以终止反应，然后经离心和膜过滤处理，滤液通过 UPLC 检测其残留 DON 含量。残留 DON 的检测在装配 Acquity<sup>®</sup> BEH C18 柱（100 mm $\times$ 2.1 mm，1.7  $\mu\text{m}$  粒径）的赛默飞 UltiMate 3000 系统上进行，相关参数如下：样品注入体积为 2  $\mu\text{L}$ 、流速 0.2 mL/min、检测波长 220 nm、检测时间 18 min、洗脱程序（0~6 min，5~25%乙腈；6~12 min，25%乙腈；12~13 min，25~5%乙腈；13~18 min，5%乙腈）。

1.3.4.1 DON 脱毒酶的最适 pH 值和 pH 稳定性测定 最适 pH 的测定：根据上述 DON 脱毒酶活性测定方法，分别检测 DON 脱毒酶在 pH 4~10 的缓冲液中的酶活，相对酶活最高的 pH 为 DON 脱毒酶的最适 pH。在 4  $^\circ\text{C}$  下，将纯酶分别在不同 pH 的缓冲液中孵育 10 h，测定其残余活力并进行 pH 稳定性分析。

1.3.4.2 DON 脱毒酶的最适反应温度和热稳定性测定 根据上述 DON 脱毒酶活性测定方法，分别检测 DON 脱毒酶在 4、15、25、35、45、55、65  $^\circ\text{C}$  下的酶活，相对酶活最高温度为 DON 脱毒酶最适反应温度。将纯酶分别在不同温度孵育 4 h 后，在 pH 8.0 的缓冲液中测定其残余活力并进行热稳定性分析。

1.3.4.3 金属离子对 DON 脱毒酶活的影响 在标准反应体系中分别添加浓度为 2 mmol/L 的金属离子  $\text{Mn}^{2+}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$ 、 $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Cu}^{2+}$ 、 $\text{Zn}^{2+}$ 、 $\text{Fe}^{2+}$ ，在 pH 8.0 和 35  $^\circ\text{C}$  条件下测定其酶活力，分析金属离子对酶活力的影响。

1.3.4.4 有机溶剂对 DON 脱毒酶活性的影响 在标准反应体系中分别添加 1% 的有机溶剂甲醇、

乙醇、丙酮、乙腈、二甲基亚砜和异丙醇，在 pH 8.0 和 35  $^\circ\text{C}$  条件下测定其酶活力，分析不同种类的有机溶剂对酶活力的影响。

1.3.4.5 酶促反应催化参数  $K_m$  和  $V_{\max}$  的测定 在最适酶反应条件下，测定酶在以不同浓度的 DON（10~2 000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）为底物时的酶活力，绘制酶反应动力学曲线，用非线性拟合得出动力学参数  $K_m$  和  $V_{\max}$ ，计算出  $K_{\text{cat}}$ 。

#### 1.3.5 DNA 数据的获取信息

DON 脱毒菌株 FJ2-5-3 全基因组数据库（GenBank accession no. CP104007），三个 PQQ 依赖性醇脱氢酶 ADH1（GenBank accession no. WEJ57925）、ADH2（GenBank accession no. WEJ57924）和 ADH3（GenBank accession no. WEJ56774）。

## 2 结果分析

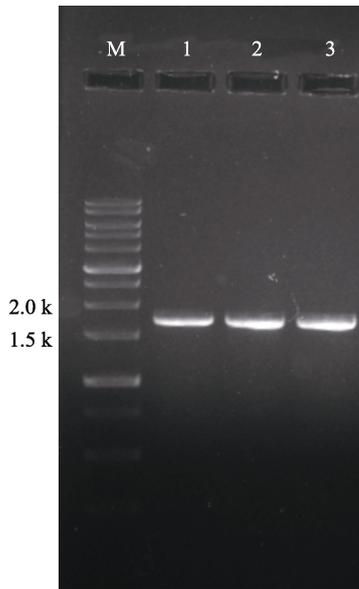
### 2.1 候选脱毒酶基因的搜寻

以具有将 DON 氧化生成 3-keto-DON 的德沃斯氏菌 FJ2-5-3 的全基因组序列为数据库，基于同源比对策略，以近缘菌株 *D. mutans* 17-2-E-8 中已知 DON 脱氢酶 DepA 作为探针序列，搜索 FJ2-5-3 菌株基因组数据库中可能的 PQQ 依赖性醇脱氢酶编码基因。根据搜索结果，在其基因组中发现了 3 个 CDS 编码区(coding sequence)，其大小分别为 1 773 bp (*adh1*)、1 770 bp (*adh2*) 和 1 761 bp (*adh3*)，编码酶原 (proenzyme) 的组成氨基酸数目分别为 590、589 和 586 个，SignalP 6.0 的信号肽预测结果显示，其 N 端 1~25、1~24 和 1~25 个氨基酸为信号肽，三个酶均属于 Quinoprotein alcohol dehydrogenase 超家族，成熟 ADH1、ADH2 和 ADH3 与成熟 DepA 的氨基酸序列相似性分别为 36.9%、37.4% 和 35.6%。

### 2.2 DON 脱毒酶编码基因的鉴定及活性验证

以菌株 FJ2-5-3 基因组和表 1 中相应寡聚核苷酸为模板和引物，分别 PCR 扩增去掉信号肽后三个成熟酶的编码基因 *adh1*~3，如图 2 所示，PCR 扩增产物大小均位于 1 500 bp 与 2 000 bp 之间，约 1 750 bp 左右，与预期结果相符。此三个候选脱毒酶基因和线性化表达载体 pET28a 的扩增

DNA 片段, 经 DNA 胶回收、TEDA 连接、遗传转化、重组质粒抽提、限制性酶切及 DNA 测序等一系列操作, 成功将三个阳性重组质粒 pET28a::adh 分别转化至表达大肠杆菌表达宿主 BL21 (DE3) 中, 为后续 DON 脱毒酶的表达提供菌株来源。



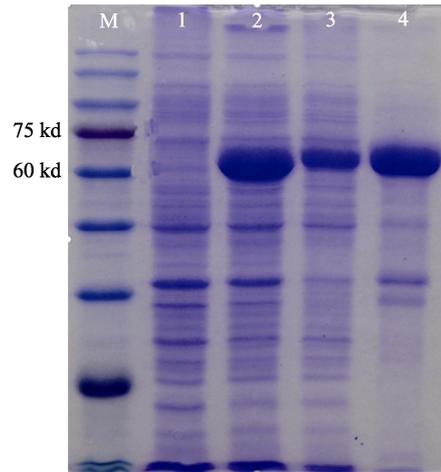
泳道 M: DNA marker (250~10 000 bp); 泳道 1: *adh1*;  
泳道 2: *adh2*; 泳道 3: *adh3*  
Lane M: DNA marker (250~10 000 bp); Lane 1: *adh1*;  
Lane 2: *adh2*; Lane 3: *adh3*

图 2 三个候选 DON 脱氢酶编码基因的 PCR 扩增  
Fig.2 PCR amplification of three candidate DON dehydrogenase encoding genes

如 SDS-PAGE 分析结果 (图 3) 所示, 重组酶 ADH1、ADH2 和 ADH3 均位于蛋白 Marker 的 60 kDa~75 kDa 之间, 与其预期分子量 62.4、62.6 和 61.1 kDa 基本相符。三种重组酶的脱毒活性检测结果如图 4 所示, 只有重组酶 ADH2 具有将 DON (保留时间 7.6 min 左右) 氧化为 3-keto-DON (保留时间 10.6 min 左右) 活性, 而对照、ADH1 和 ADH3 均无此活性, 表明 ADH2 为具有 DON 氧化作用的 PQQ 依赖性醇脱氢酶。

### 2.3 DON 脱毒酶 ADH2 的生物信息学特性

完整 ADH2 全长共由 589 个氨基酸组成, 其 N 端前 1~24 个氨基酸为信号肽, 成熟酶 ADH2 则含有 565 个氨基酸。成熟酶 ADH2 理论分子量为 62.6 kDa, 等电点 (pI) 为 4.44; 它与成熟 DepA 具有 37.4% 的氨基酸相似性。基于 Robetta 三维高



泳道 M: 蛋白质 marker; 泳道 1: *E. coli* BL21(DE3)/pET28a;  
泳道 2: *E. coli* BL21(DE3)/pET28a::adh2; 泳道 3: *E. coli* BL21(DE3)/pET28a::adh3; 泳道 4: *E. coli* BL21(DE3)/pET28a::adh1

Lane M: protein marker; Lane 1: *E. coli* BL21(DE3)/pET28a;  
Lane 2: *E. coli* BL21 (DE3)/pET28a::adh2; Lane 3: *E. coli* BL21 (DE3)/pET28a::adh3; Lane 4: *E. coli* BL21 (DE3)/pET28a::adh1

图 3 候选 DON 脱氢酶的表达及其 SDS-PAGE 分析  
Fig. 3 Expression of candidate DON dehydrogenase and its SDS-PAGE analysis

级结构预测结果 (图 5) 表明 ADH2 为单体, 具有典型的八叶  $\beta$  螺旋桨折叠 (8-bladed beta-propeller fold), 无 heme c 结构域; DeepTHMNM 预测结果该酶无跨膜结构域; 蛋白质亚细胞定位预测结果表明该酶可能位于细胞周质 (periplasm); 根据以上信息判定, ADH2 属于 I 型 PQQ 依赖性醇脱氢酶。

### 2.4 DON 脱毒酶的酶学性质表征

在 pH 4~10 范围内, 对重组酶 ADH2 的最适反应 pH 值进行了考察。以特定 pH 值下的最高酶活性值记作 100% 活性, 计算其它 pH 值条件下的酶活性与最高酶活性的比值, 绘制 pH 值-相对活性图。如图 6A 所示, ADH2 在 pH=9 的条件下具有最高酶活, 而在 pH=7~8 时, 保持 50% 以上的酶活性, 然而, 在 pH=4~6 偏酸性或者 pH=10 碱性条件下, 其酶活力表现出明显降低的现象。pH 值对重组 ADH2 稳定性的研究结果 (图 6B) 表明, ADH2 在 4 °C、pH=6~10 的条件下孵育 10 h, 仍保留 90% 以上的残留活性, 然而, 在 pH=4~5 的孵育条件下, 其残留活性基本完全丧失, 由此可知, 重组酶 ADH2 具有较好的碱稳定性和较差的酸稳定性。

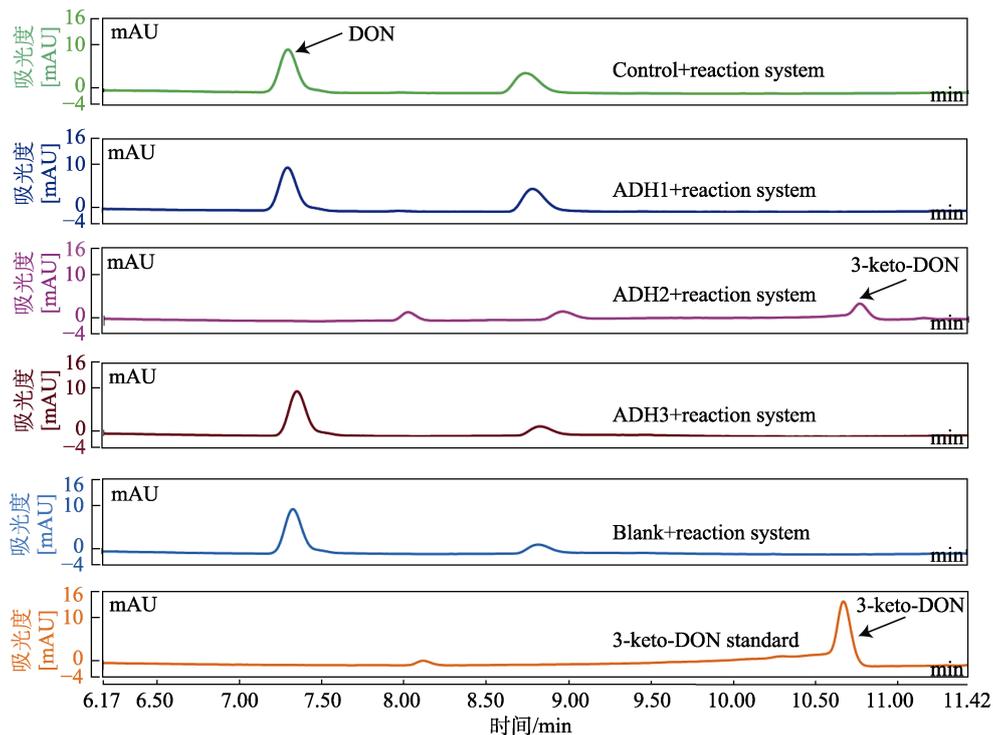
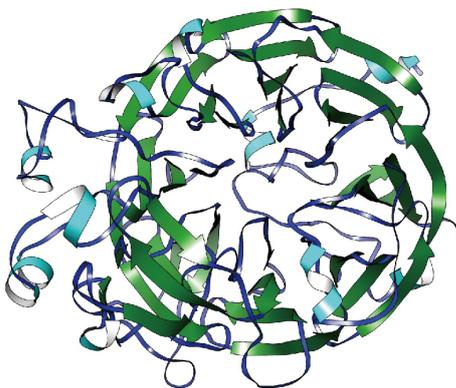


图 4 三个候选 DON 脱毒酶活性检测的 UPLC 图谱

Fig. 4 UPLC profiles for the detection of activity of three candidate DON detoxification enzymes



蓝色为 coli, 蓝绿色为 helix, 绿色为 strand

图 5 ADH2 的高级结构预测模型图

Fig.5 Predicted 3D structure model diagram of ADH2

在 4~65 °C 范围内, 对重组酶 ADH2 的最适反应温度进行了考察。以特定温度下的最高酶活性值记作 100% 活性, 计算其它温度条件下的酶活性与最高酶活性的比值, 绘制温度-相对活性图。如图 6C 所示, 重组 ADH2 在反应温度 35 °C 时表现出最高的酶活性, 其在 25~45 °C 温度范围内表现出 60% 以上最高酶活。此外, 在 4~25 °C 温度范围内, 酶活力随温度升高而增加; 而在高于 55 °C 时, 其催化活性基本消失。另外, 热稳定性研究结果 (图 6D) 显示, ADH2 纯酶在 4~35 °C 孵育 4 h 后, 其残留酶活基本不受影响。然而, 在 35~

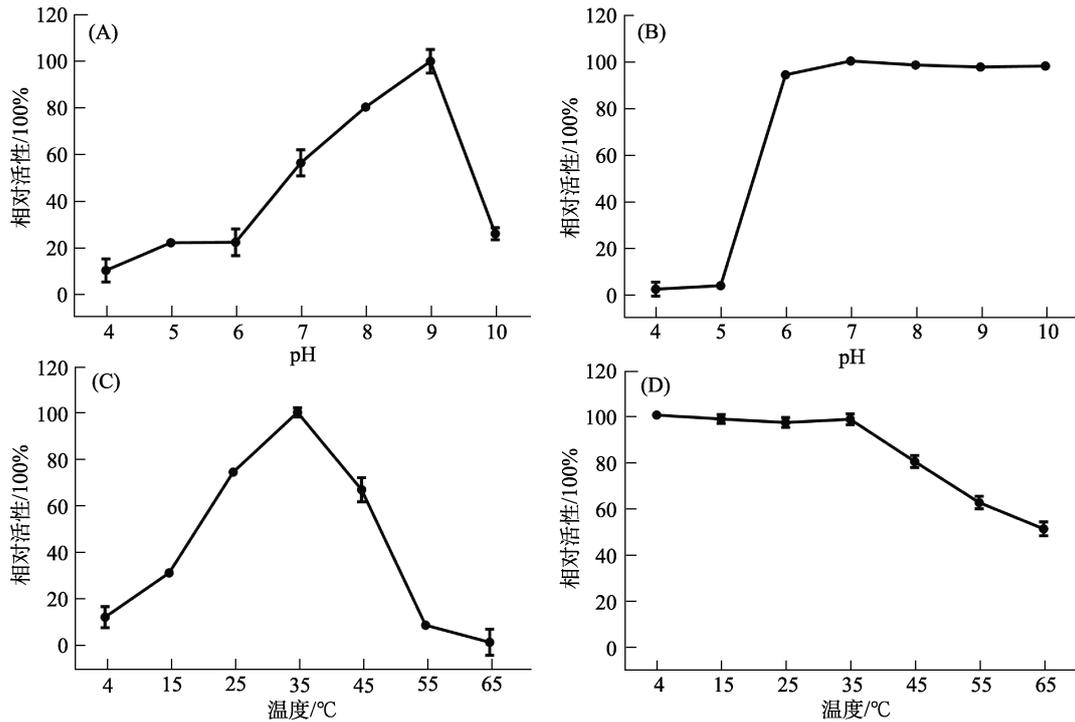
65 °C 的孵育条件下, 残留酶活性随温度的升高而迅速降低, 但仍保留 50% 以上最高酶活。由以上研究结果可知, ADH2 属于中温酶, 且具有一定的热稳定性。

以 1% 的添加量, 考察了不同有机溶剂种类对 ADH2 酶活性的影响。如图 7 所示, 与不添加有机溶剂的对照相比, 不同种类有机溶剂对酶活性均具有不同程度的抑制作用, 抑制程度排序为: 丙酮>异戊醇>二甲基亚砜>乙醇>甲醇≈乙腈。以 2 mmol/L 的添加浓度, 考察了 6 种二价金属离子 ( $Mn^{2+}$ 、 $Mg^{2+}$ 、 $Ca^{2+}$ 、 $Cu^{2+}$ 、 $Zn^{2+}$  和  $Fe^{2+}$ ) 对 ADH2 酶活性的影响。结果显示, 添加  $Ca^{2+}$  离子的 ADH2 表现出最高酶活, 而添加其它二价金属离子和不添加任何金属离子的 ADH2 的酶活性大大降低, 表明金属  $Ca^{2+}$  是 ADH2 的必须辅离子。

如图 8 所示, 利用软件 GraphPad Prism 9 进行非线性回归分析, 得出 ADH2 对 DON 的  $K_m$  和  $V_{max}$  分别为  $(708.00 \pm 47.01) \mu\text{g/mL}$  和  $(10.67 \pm 0.36) \mu\text{g}/(\text{min} \cdot \text{mL})$ ,  $K_{cat}$  值为  $(3.37 \pm 0.11) \text{S}^{-1}$ 。

### 3 结论

以已知 DON 脱氢酶 DepA 为探针序列, 基于同源比对策略, 从脱毒菌株 FJ2-5-3 基因组中搜寻



(A): pH 对重组酶 ADH2 活性的影响; (B): 重组酶 ADH2 的 pH 稳定性; (C): 温度对重组酶 ADH2 活性的影响; (D): 重组酶 ADH2 的热稳定性

(A): Effects of pH on the activity of ADH2; (B): Effects of pH on the stability of ADH2; (C): Effects of temperature on the activity of ADH2; (D): Effects of temperature on the stability of ADH2.

图 6 pH 和温度对重组酶 ADH2 酶活和稳定性的影响

Fig.6 Effect of pH and temperature on recombinant ADH2 activity

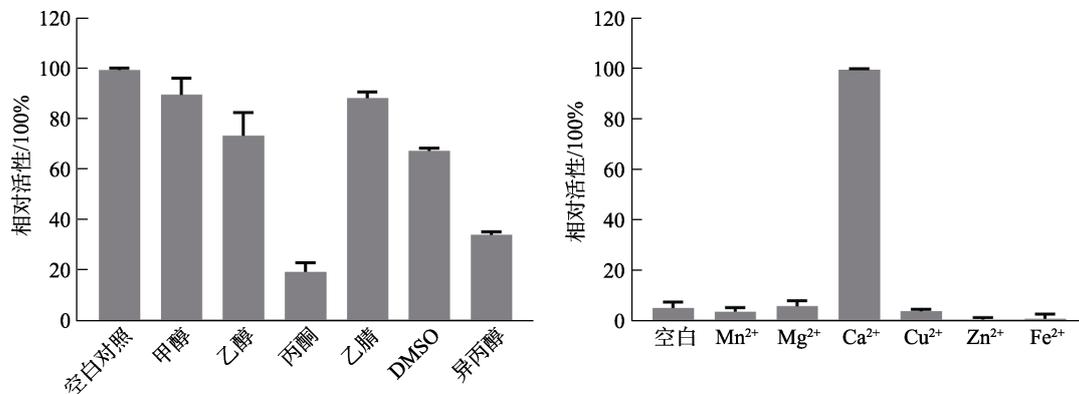


图 7 1% (v/v) 有机溶剂及 2 mmol/L 金属离子对重组酶 ADH2 活性的影响

Fig.7 Effect of 1% (v/v) organic solvents and 2 mmol/L metal ions on the activity of recombinant ADH2

获得 3 个编码 DON 脱毒酶的候选基因 *adh1*、*adh2* 和 *adh3*；蛋白表达及其脱毒活性检测结果表明，只有 ADH2 表现出将 DON 氧化为 3-keto-DON 的活性，而其它两个酶则无此活性。ADH2 全长由 589 个氨基酸组成，其中 N 端前 1~24 个氨基酸为信号肽。成熟酶 ADH2 含有 565 个氨基酸，理论分子量为 62.6 kDa，等电点为 4.44；与 DepA 相比，其氨基酸序列相似度为 37.4%；该酶可能位于周质空间，无跨膜结构域；基于

Robetta 三维高级结构预测结果表明，ADH2 为单体，具有典型的八叶  $\beta$  螺旋桨折叠，属于 I 型 PQQ 依赖性醇脱氢酶。ADH2 的最适反应 pH=9，最适反应温度为 35 °C，具有一定的碱稳定性和热稳定性。金属离子 Ca<sup>2+</sup> 是其必须辅因子，常规有机溶剂尤其是乙醇和异丙醇等醇类物质均对其 DON 催化活性有明显抑制作用。ADH2 对 DON 的  $K_m$  和  $K_{cat}$  值分别为 (708.00±47.01)  $\mu\text{g}/\text{mL}$  和 (3.37±0.11)  $\text{S}^{-1}$ 。

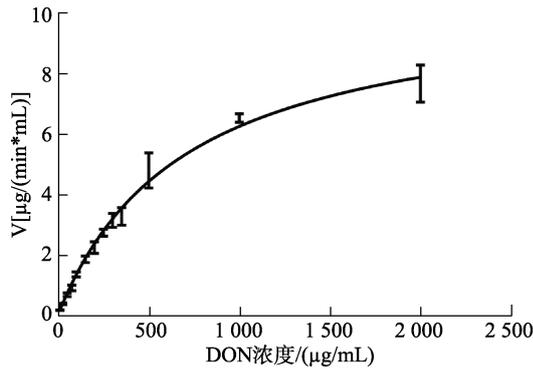


图8 重组ADH2催化动力学参数 $K_m$ 和 $V_{max}$ 的测定  
Fig.8 Determination of catalytic kinetic parameters  $K_m$  and  $V_{max}$  of recombinant ADH2

### 参考文献:

- [1] SOBROVA P, ADAM V, VASATKOVA A, et al. Deoxynivalenol and its toxicity[J]. Interdisciplinary Toxicology, 2010, 3(3): 94-99.
- [2] PINTO A C S M, DE PIERRI C R, EVANGELISTA A G, et al. Deoxynivalenol: Toxicology, degradation by bacteria, and phylogenetic analysis[J]. Toxins, 2022, 14(2): 90.
- [3] SHIMA J, TAKASE S, TAKAHASHI Y, et al. Novel detoxification of the trichothecene mycotoxin deoxynivalenol by a soil bacterium isolated by enrichment culture[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1997, 63(10): 3825-3830.
- [4] HE P, YOUNG L G, FORSBERG C. Microbial transformation of deoxynivalenol (vomitoxin)[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1992, 58(12): 3857-3863.
- [5] HE J W, BONDY G S, ZHOU T, et al. Toxicology of 3-epi-deoxynivalenol, a deoxynivalenol-transformation product by *Devosia mutans* 17-2-E-8[J]. Food and Chemical Toxicology, 2015, 84: 250-259.
- [6] HE W J, ZHANG L, YI S Y, et al. An aldo-keto reductase is responsible for Fusarium toxin-degrading activity in a soil *Sphingomonas* strain[J]. Scientific Reports, 2017, 7(1): 9549.
- [7] WANG Y, ZHANG H H, ZHAO C, et al. Isolation and characterization of a novel deoxynivalenol-transforming strain *Paradevosia shaoguanensis*DDB001 from wheat field soil[J]. Letters in Applied Microbiology, 2017, 65(5): 414-422.
- [8] GAO X J, MU P Q, ZHU X H, et al. Dual function of a novel bacterium, *Slackia* sp. D-G6: Detoxifying deoxynivalenol and producing the natural estrogen analogue, equol[J]. Toxins, 2020, 12(2): 85.
- [9] HE W J, SHI M M, YANG P, et al. Novel soil bacterium strain *Desulfotobacterium* sp. PGC-3-9 detoxifies trichothecene mycotoxins in wheat via de-epoxidation under aerobic and anaerobic conditions[J]. Toxins, 2020, 12(6): 363.
- [10] QU R, JIANG C, WU W, et al. Conversion of DON to 3-epi-DON in vitro and toxicity reduction of DON in vivo by *Lactobacillus rhamnosus*[J]. Food & Function, 2019, 10(5): 2785-2796.
- [11] ITO M, SATO I, ISHIZAKA M, et al. Bacterial cytochrome P450 system catabolizing the Fusarium toxin deoxynivalenol[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2013, 79(5): 1619-1628.
- [12] ITO M, SATO I, KOITABASHI M, et al. A novel actinomycete derived from wheat heads degrades deoxynivalenol in the grain of wheat and barley affected by Fusarium head blight[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2012, 96(4): 1059-1070.
- [13] LI B B, DUAN J Q, REN J, et al. Isolation and characterization of two new deoxynivalenol-degrading strains, *Bacillus* sp. HN117 and *Bacillus* sp. N22[J]. Toxins, 2022, 14(11): 781.
- [14] CARERE J, HASSAN Y I, LEPP D, et al. The enzymatic detoxification of the mycotoxin deoxynivalenol: identification of DepA from the DON epimerization pathway[J]. Microbial Biotechnology, 2017, 11(6): 1106-1111.
- [15] HE W J, SHI M M, YANG P, et al. A quinone-dependent dehydrogenase and two NADPH-dependent aldo/keto reductases detoxify deoxynivalenol in wheat via epimerization in a *Devosia* strain[J]. Food Chemistry, 2020, 321: 126703.
- [16] CARERE J, HASSAN Y I, LEPP D, et al. The Identification of DepB: An enzyme responsible for the final detoxification step in the deoxynivalenol epimerization pathway in *Devosia mutans* 17-2-E-8[J]. Frontiers in Microbiology, 2018, 9: 1573.
- [17] HU Y M, LI H, MIN J, et al. Crystal structure and biochemical analysis of the specialized deoxynivalenol-detoxifying glyoxalase SPG from *Gossypium hirsutum*[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2022, 200: 388-396.
- [18] KIMURA M, KANEKO I, KOMIYAMA M, et al. Trichothecene 3-O-acetyltransferase protects both the producing organism and transformed yeast from related mycotoxins: cloning and characterization of *Tri10I*[J]. The Journal of Biological Chemistry, 1998, 273(3): 1654-1661.
- [19] POPPENBERGER B, BERTHILLER F, LUCYSHYN D, et al. Detoxification of the Fusarium mycotoxin deoxynivalenol by a UDP-glucosyltransferase from *Arabidopsis thaliana*[J]. Journal of Biological Chemistry, 2003, 278(48): 47905-47914.
- [20] AJANDOUZ E, BERDAH S, MOUTARDIER V, et al. Hydrolytic fate of 3/15-acetyldeoxynivalenol in humans: Specific deacetylation by the small intestine and liver revealed using in vitro and ex vivo approaches[J]. Toxins, 2016, 8(8): 232.
- [21] BERTHILLER F, KRŠKA R, DOMIG K J, et al. Hydrolytic fate of deoxynivalenol-3-glucoside during digestion[J]. Toxicology Letters, 2011, 206(3): 264-267.
- [22] SARMIENTO-PAVÍA P D, SOSA-TORRES M E. Bioinorganic insights of the PQQ-dependent alcohol dehydrogenases[J]. JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry, 2021, 26: 177-203.
- [23] XIA Y Z, LI K, LI J J, et al. T5 exonuclease-dependent assembly offers a low-cost method for efficient cloning and site-directed mutagenesis[J]. Nucleic Acids Research, 2019, 47(3): e15.

备注: 本文的彩色图表可从本刊官网 (<http://lyspkj.ijournal.cn>)、中国知网、万方、维普、超星等数据库下载获取。