



微嗜酸寡养单胞菌中磷酸吡哆胺氧化酶基因 *pnpox* 生物学功能研究

陶宇¹, 叶婷¹, 费晴如¹, 付晓杰¹, 周育^{1,2*}

1 安徽农业大学茶与食品科技学院, 安徽 合肥 230036

2 安徽农业大学茶树生物学与资源利用国家重点实验室, 安徽 合肥 230036

陶宇, 叶婷, 费晴如, 付晓杰, 周育. 微嗜酸寡养单胞菌中磷酸吡哆胺氧化酶基因 *pnpox* 生物学功能研究[J]. 微生物学报, 2023, 63(8): 3096-3109.

TAO Yu, YE Ting, FEI Qingru, FU Xiaojie, ZHOU Yu. Role of phosphopyridoxamine oxidase gene *pnpox* in *Stenotrophomonas acidaminiphila*[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2023, 63(8): 3096-3109.

摘要:【目的】研究微嗜酸寡养单胞菌(*Stenotrophomonas acidaminiphila*) CW117 中磷酸吡哆胺氧化酶基因 *pnpox* (phosphopyridoxamine oxidase, *pnpox*) 在维生素 B₆ (VB₆) 合成中的贡献及对黄曲霉毒素 B1 (aflatoxin B1, AFB1) 的降解活性。【方法】采用基因插入突变方式, 对菌株 CW117 中磷酸吡哆胺氧化酶基因 *pnpox* 进行突变, 得到突变菌株。通过高效液相色谱法(high performance liquid chromatography, HPLC)检测突变株对 AFB1 的降解活性, 以及突变株中吡哆醇和吡哆醛的合成情况, 确定基因 *pnpox* 在寡养单胞菌体内 VB₆ 合成中的贡献和黄曲霉毒素降解代谢作用。【结果】成功构建了磷酸吡哆胺氧化酶基因突变子 *pnpox::pK19mobΩ2HMB*, 突变子吡哆醛的合成量较野生型菌株显著减少, 吡哆醇合成量与野生型菌株无显著性差异; 同时, 突变子与野生型株 CW117 对 AFB1 的降解活性未发现显著性差异。【结论】菌株 CW117 中磷酸吡哆胺氧化酶在吡哆醛合成的过程中起着重要作用, 该基因突变会导致 VB₆ 的严重缺乏, 影响寡养单胞菌正常生长, 但该基因对 CW117 降解黄曲霉毒素无显著性贡献。

关键词: 维生素 B₆; 寡养单胞菌; 磷酸吡哆胺氧化酶; 曲霉毒素

资助项目: 国家自然科学基金(32172319, U22A20442)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (32172319, U22A20442).

*Corresponding author. Tel: +86-551-65786701, E-mail: zhouyu121121@hotmail.com, microbes@ahau.edu.cn

Received: 2022-11-23; Accepted: 2023-02-27; Published online: 2023-03-17

Role of phosphopyridoxamine oxidase gene *pnpox* in *Stenotrophomonas acidaminiphila*

TAO Yu¹, YE Ting¹, FEI Qingru¹, FU Xiaojie¹, ZHOU Yu^{1,2*}

1 School of Tea and Food Science & Technology, Anhui Agricultural University, Hefei 230036, Anhui, China

2 State Key Laboratory of Tea Plant Biology and Utilization, Anhui Agricultural University, Hefei 230036, Anhui, China

Abstract: [Objective] To reveal the role of the phosphopyridoxamine oxidase gene *pnpox* in vitamin B₆ (VB₆) synthesis and aflatoxin B1 (AFB1) degradation in *Stenotrophomonas acidaminiphila* CW117. [Methods] The phosphopyridoxamine oxidase gene was mutated in strain *Stenotrophomonas acidaminiphila* CW117 by the recombinant plasmid pK19mobΩ2HMB/P-*pnpox*, and thus the mutant *pnpox::pK19mobΩ2HMB* was constructed. The vitamin B₆ (i.e., pyridoxine and pyridoxal) synthesis and AFB1 degradation activities of the mutant and the wild-type strain CW117 were detected by high performance liquid chromatography (HPLC). The determination results were compared to reveal the role of *pnpox* in VB₆ synthesis and AFB1 degradation. [Results] The mutant *pnpox::pK19mobΩ2HMB* was successfully constructed. It had significantly lower yield of pyridoxal than the wild-type strain CW117, while no significant difference was observed in the yield of pyridoxine between the mutant and CW117. Meanwhile, the mutant showed no significant difference in AFB1 degradation from CW117. [Conclusion] Phosphopyridoxamine oxidase plays an important role in the pyridoxal synthesis of CW117. The mutation of *pnpox* reduced the VB₆ production and thus seriously delayed the growth of the strain, while the gene showed no significant contribution to AFB1 degradation in strain CW117.

Keywords: vitamin B₆; *Stenotrophomonas acidaminiphila*; phosphopyridoxamine oxidase; aflatoxin B1

黄曲霉毒素主要是由黄曲霉和寄生曲霉等产毒真菌合成的一类次生代谢产物,其主要化学结构为二氢呋喃氧杂萘邻酮衍生物^[1]。在全球范围内,尤其在欠发达国家和地区的人口,长期受黄曲霉毒素暴露与危害^[2]。世界卫生组织肿瘤研究机构(International Agency for Research on Cancer, IARC)将黄曲霉毒素认定为 I 类致癌物质,是人类已知的具有强毒性和致癌性的食品污染物之一^[3]。目前,黄曲霉毒素的脱毒方法主要有物理脱毒法、化学脱毒法和生物脱毒法^[4],每种方各自具有一定的优缺点^[5]。大多数物理和化

学解毒方法可能会影响食品原料和饲料的营养特性,或造成二次污染等,在实际应用中仍有较多技术难题亟待解决^[6]。生物解毒方法是近年来兴起,并得到快速发展的解毒方法;研究显示,一些细菌或真菌菌株可以通过解毒酶或小分子物质对黄曲霉毒素进行降解代谢,如寡养单胞菌(*Stenotrophomonas*)^[1]、铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)^[7]和溶杆菌(*Lysophilus*)^[8]等。

已报道的黄曲霉毒素降解细菌有较多来自于棒状杆菌亚目的放线菌,例如诺卡氏菌^[9]、分枝杆菌等^[10]。Taylor 等^[11]获得了 1 株耻垢分枝杆

菌, 该菌株具有高效黄曲霉毒素降解代谢能力, 并从该菌株中分离出的9种 $F_{420}H_2$ 依赖性还原酶($F_{420}H_2$ dependent reductases, FDRs), 对其黄曲霉毒素降解活性进行了系统的研究, 发现FDRs利用脱氮黄素辅因子 $F_{420}H_2$ 催化黄曲霉毒素 α, β -不饱和酯部分的还原, 激活毒素分子进行自发水解。其中的 F_{420} 是一种天然存在的脱氮黄素衍生物, 与NAD(P)一样, F_{420} 作为细胞氢化物载体发挥作用^[12]。FDRs属于 $F_{420}H_2$ 依赖性氧化还原酶, 主要分为FDR-A和FDR-B两个家族, 与黄素单核苷酸(flavin mononucleotides, FMN)依赖性吡哆胺5-磷酸氧化酶(FMN-dependent pyridoxamine 5'-phosphate oxidase, PNPOx)有较高的亲缘关系。来自FDR家族酶蛋白的晶体结构与PNPOx一样, 均采用一种分裂桶式蛋白质折叠方式和一个扩展的高电荷 $F_{420}H_2$ 结合槽。PNPOx广泛存在于放线菌、古细菌和一些变形杆菌纲的细菌中。Lapalikar等^[13]的研究显示, 黄曲霉毒素和植物呋喃香豆素可能是大多数FDRs或类似酶PNPOx的合适底物, 这给变形杆菌门细菌黄曲霉毒素降解代谢研究提供了线索。

维生素 B_6 (vitamin B_6 , VB_6)主要以磷酸酯形式存在于生物体, 在酸性环境下稳定^[14]。 VB_6 是一类水溶性维生素的统称, 包括吡哆胺、吡哆醇和吡哆醛以及它们各自的磷酸酯, 即吡哆胺5'-磷酸盐(pyridoxamine 5'-phosphate, PMP)、吡哆醇5'-磷酸盐(pyridoxine 5'-phosphate, PNP)和吡哆醛5'-磷酸盐(pyridoxal 5'-phosphate, PLP)。其中, PLP是最重要的 VB_6 组分, 是许多生物酶的辅助因子^[15]。吡哆醛5'-磷酸盐是 VB_6 的活性形式, 它能够与氨基酸、酮酸或胺等底物发生反应^[16]。磷酸吡哆胺氧化酶(PNPOx)在5'-磷酸吡哆醛(pyridoxal 5'-phosphate)从头合成途径和补救途径中均发挥重要作用。在辅酶黄素单核苷酸(FMN)和 O_2 存在条件下, PNPOx可以氧化底

物磷酸吡哆胺(pyridoxamine 5'-phosphate)生成PLP。

微嗜酸寡养单胞菌CW117为本实验室前期筛选的1株具有黄曲霉毒素等多种真菌毒素降解能力的菌株, 分类学上隶属于变形菌门。菌株CW117对黄曲霉毒素的降解代谢作用方式主要为氧化转化作用, 各类氧化还原酶可能对黄曲霉毒素的降解代谢具有重要贡献^[1,17]。但是, 作为一类与黄曲霉毒素解毒酶FDR亲缘关系较近的氧化还原酶, 寡养单胞菌中的PNPOx对黄曲霉毒素降解活性尚未有相关探索。本研究根据以上研究结果^[10,12], 以菌株CW117中的磷酸吡哆胺氧化酶基因为研究对象, 进行基因插入突变, 验证氧化还原酶PNPOx对黄曲霉毒素B1(aflatoxin B1, AFB1)的降解代谢活性。同时, 还验证了PNPOx在微嗜酸寡养单胞菌中的5'-磷酸吡哆醛合成活性, 评估该氧化酶基因的正常表达对菌株正常生长的重要性。

1 材料与方法

1.1 材料

寡养单胞菌(*Stenotrophomonas acidaminiphila*) CW117、毕赤酵母(*Pichia pastoris*) SMD1168均为本实验室保存。用于质粒富集和测序的菌株*Escherichia coli* Trans1-T1购自北京全氏金生物技术有限公司。基因突变株构建质粒pK19mob Ω 2HMB由上海大学生命科学院馈赠。AFB1标准品购自青岛普瑞邦生物工程有限公司。限制性核酸内切酶(*Hind* III和*Eco*R I)、DNA marker等分子生物学工具酶和核酸标记购自宝日医生物技术(北京)有限公司。2×Es Taq MasterMix (Dye)购自北京康为世纪生物科技有限公司。蜗牛酶、卡那霉素、甲醇、辛烷磺酸钠($C_8H_{17}NaO_3S$)、冰乙酸($C_2H_4O_2$)、三乙胺($C_6H_{15}N$)、盐酸吡哆醇($C_8H_{12}ClNO_3$)、盐酸吡哆醛

(C₈H₁₀ClNO₃)购自生工生物工程(上海)股份有限公司。培养细菌的营养肉汤(nutrient broth, NB)及营养琼脂培养基, 培养毕赤酵母 SMD1168 使用的酵母浸出粉胨葡萄糖培养基(yeast peptone dextrose, YPD)为青岛海博生物技术有限公司产品。

1.2 菌株 CW117 基因组中 *pnpx* 基因插入突变

基因 *pnpx* 插入突变重组质粒构建、插入突变遗传操作步骤, 如遗传操作示意图如图 1 所示, 基因插入突变分为 3 步进行, 第一步构建突变重组质粒 pK19*mob*Ω2*HMB*/P-*pnpx*, 第二步将重组质粒导入野生型菌株 CW117 发生基因重组突变, 第三步利用卡那霉素抗性筛选已经正确插入相应位置(目的基因)的基因突变子^[1,18]。

1.2.1 目的基因中间序列 P-*pnpx* 的 PCR 扩增

首先选取 *pnpx* 基因序列中的合适位置(28–345 bp), 设计插入突变所需的同源片段

P-*pnpx* 的上游引物 ins-F 和下游引物 ins-R。引物设计时, 于上游和下游引物的 5'端分别引入酶切位点 *Hind* III 和 *Eco*R I, 详见表 1 下划线标注部分。以 CW117 为出发菌株, 采用聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)方法扩增 *pnpx* 基因位于中间的部分片段(P-*pnpx*)。首先在 37 °C 下培养菌株 CW117, 挑取单菌落于 1.5 mL 无菌离心管中, 加入 100 μL 无菌去离子水混匀, 100 °C 裂解 10 min, 冷却至室温后作为 PCR 模板。PCR 反应体系为: 模板 1 μL, EasyTaq 酶混合物 25 μL, 上下游引物 ins-F 和 ins-R 各 1 μL, 补充去离子水至 50 μL。PCR 反应程序如下: 94 °C 预变性 5 min; 94 °C 变性 30 s, 60 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 30 s, 32 个循环; 16 °C 保温 10 min。配置 1% 的琼脂糖凝胶在 85 V 电压下进行电泳检测, 将目的条带按照 DNA 胶回收试剂盒说明书操作步骤进行胶回收的纯化处理。

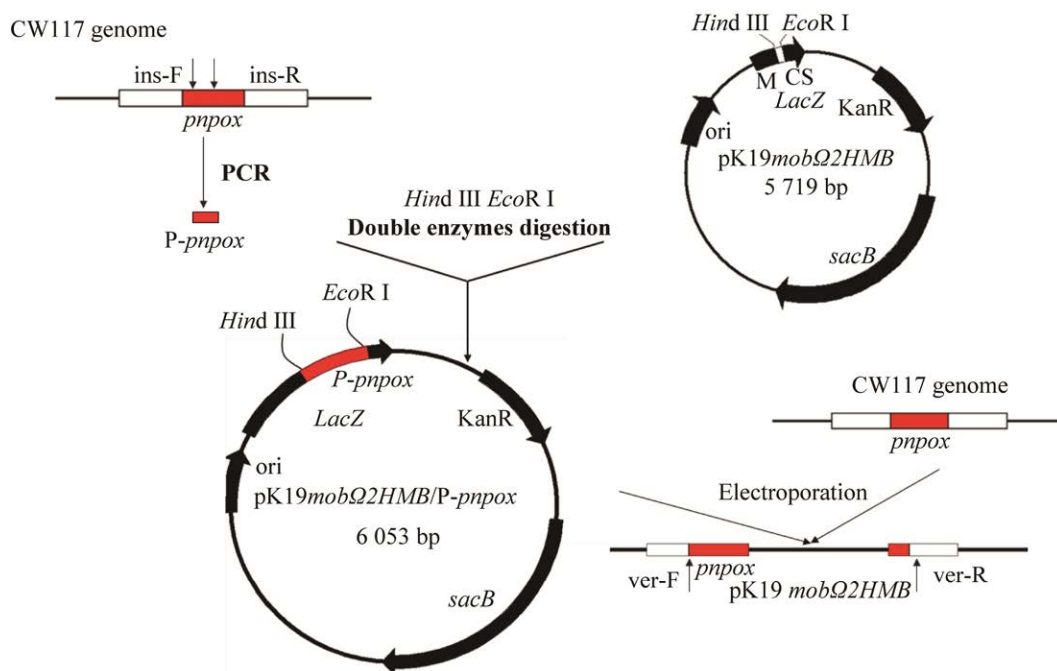


图 1 重组质粒 pK19*mob*Ω2*HMB*/P-*pnpx* 构建及插入突变遗传操作示意图

Figure 1 Schematic descriptions of recombinant plasmid pK19*mob*Ω2*HMB*/P-*pnpx* construction and gene mutant screening.

表 1 基因 *pnpoX* 插入突变及突变子验证 PCR 引物
Table 1 Primers of mutant construction and PCR verify

Primer names	Primer sequences (5'→3')	Enzyme cutting site/Sequence length
ins-F	CCCA <u>AAGCTT</u> CGACCTTCGCCGACTTG	<i>Hind</i> III
ins-R	CCGGAATTCGCGCCGATCTGGCTCAT	<i>Eco</i> R I
ver1-F	GTGCGGAACGGACGACA	4307 ^a /976 ^b
ver1-R	TGTTCCACGGGTGATGC	

The underlined nucleotides are the restriction site; ^a: The size of PCR fragment for *pnpoX* mutant; ^b: The size of PCR fragment for wild-type strain CW117.

1.2.2 插入突变重组质粒的构建与验证

将胶回收纯化后的 PCR 片段 P-*pnpoX* 及质粒 pK19mobΩ2HMB 分别在 37 °C 条件下孵育 3 h 完成双酶切反应。酶切体系为: *Hind* III 和 *Eco*R I 各 1 μL, P-*pnpoX* 片段或质粒 15 μL, 10×M Buffer 5 μL, 补充去离子水加至 50 μL。酶切产物用 0.8% 琼脂糖凝胶在 85 V 电压下进行电泳检测, 对酶切成功的产物进行胶回收纯化。将纯化后的 P-*pnpoX* 片段和线性化的 pK19mobΩ2HMB 进行酶连, 选用 Solution I 连接酶将目的片段和质粒进行连接。连接体系为: Solution I 连接酶 6 μL, DNA 酶切产物 4 μL, pK19mobΩ2HMB 酶切产物 2 μL。酶连反应条件为 16 °C 连接 1 h。

将构建的重组质粒 pK19mobΩ2HMB/P-*pnpoX* 进行热激转化, 转至 *E. coli* Trans1-1 感受态细胞中。将 *E. coli* Trans1-1 转化株涂布在含有卡那霉素抗性的营养琼脂平板上于 37 °C 倒置培养 12 h。待菌体长好后, 以 ins-F/R 为引物, 进行菌落 PCR, 验证是否成功构建重组质粒。采用质粒小提试剂盒提取插入突变重组质粒, 并进行双酶切验证。酶切体系为: *Hind* III 和 *Eco*R I 各 0.5 μL, 重组质粒 8 μL, 10 mol/L Buffer 2.5 μL, 添加去离子水加至 25 μL。将验证无误的重组质粒保存于 -20 °C 备用。

1.2.3 重组质粒电击转化

将营养琼脂上新长出的野生型菌株 CW117 转接至 100 mL 的 NB 培养基, 于 37 °C、180 r/min

条件下, 振荡培养至 OD_{600} 值为 0.6。取 25 mL 新鲜菌液, 8 000×g 条件下冷冻离心 10 min 获得菌体, 用 10 mL 的 10% 无菌甘油清洗菌体细胞 4 次, 最后用 1 mL 的 10% 无菌甘油重悬菌体, 以每管 200 μL 量分装菌悬液。取 5 μL 插入突变重组质粒(对照组不加质粒)与 200 μL 菌悬液混合均匀, 缓慢加入到已用 75% 乙醇和去离子水清洗过的电击杯中, 在 2.5 kV、5 ms 条件下电击。电击转化后, 立即向电击杯中再加入 1.0 mL 无抗的无菌 NB 培养基, 于 37 °C、180 r/min 条件下振荡培养 3 h 后, 于 8 000×g 条件下离心 2 min, 弃上清收集菌体。用 100 μL 的营养肉汤培养基重悬, 涂布在含有卡那霉素抗性(50 μg/mL)的营养琼脂平板上, 37 °C 条件下倒置培养。

1.2.4 插入突变菌株的筛选

挑取阳性克隆候选菌株, 以上下游引物 ver1-F/R (表 1) 进行 PCR 鉴定, 筛选阳性突变株。PCR 反应体系为: Cwbio™ EsTaq Master Mix 酶混合液 25 μL, 引物 ver1-F 和 ver1-R 各 2 μL, 添加去离子水至 50 μL。PCR 反应程序为: 94 °C 预变性 5 min; 94 °C 变性 30 s, 60 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 3 min, 32 个循环; 16 °C 保温 10 min。PCR 反应结束后, 配置 1% 的琼脂糖凝胶, 在 85 V 电压下进行电泳检测后, 将正确的电泳条带纯化后送去公司测序, 鉴定插入突变菌株的成功与否。将成功构建的 *pnpoX* 突变株标记突变菌株为 *pnpoX*::pK19mobΩ2HMB。

1.3 黄曲霉毒素 B1 的降解测定

1.3.1 AFB1 降解试验与样品预处理

将野生型菌株 CW117 和变菌株 *pnpox::pK19mobQ2HMB* 接种至营养琼脂上进行活化, 挑取单菌落在 5 mL 的营养肉汤试管中, 于 37 °C、180 r/min 条件下培养至 OD_{600} 值达到 0.6。将菌液以 1% 接种量分别接种于 100 mL 含有 20 $\mu\text{g/L}$ 浓度 AFB1 的营养肉汤培养基中。AFB1 降解实验在 37 °C、180 r/min 振荡培养下持续进行 72 h; 同时, 设置不接菌的营养肉汤培养基作为空白对照组。分别在 0、12、24、36、48、60、72 h 取样。AFB1 的测定参照 Cai 等^[17]使用的方法, 稍作改动。将所取样品在 12 000 $\times g$ 、4 °C 条件下离心 10 min, 取 400 μL 上清与 1.2 mL 乙腈充分振荡萃取 15 min, 使溶液中的蛋白质充分变性, 12 000 $\times g$ 条件下离心 15 min, 取上清 1 mL 经 0.22 μm 有机系滤膜的微孔过滤器过滤后, 采用高效液相色谱法外标法测定 AFB1 残留量。

1.3.2 AFB1 液相色谱检测

AFB1 残留量仪器检测方法为高效液相色谱荧光检测法(high performance liquid chromatography-fluorescence detection, HPLC-FLD)。液相色谱检测条件: 色谱柱型号为 Waters Symmetry C₁₈ 柱 (250 mm \times 4.6 mm, 5 μm 粒径); 荧光检测器 (fluorescence detector, FLD) 的激发波长为 360 nm; 发射波长为 440 nm; 流动相为甲醇-水 (45:55, 体积比), 进样量为 5 μL , 柱温为 40 °C, 流速为 0.8 mL/min。通过待测样本中 AFB1 峰面积与 AFB1 标准绘制的标准曲线计算样品中 AFB1 浓度。

1.4 维生素 B₆ 检测

细菌培养液中 VB₆ 检测方法在食品中 VB₆ 测定国家标准方法 (GB5009.154—2016) 基础上稍作改进以适应菌液样本^[19]。经预处理后的样品, 以高效液相色谱外标法定量测定 VB₆ (含磷

酸吡哆醇和磷酸吡哆醛) 的含量。

1.4.1 VB₆ 标准曲线绘制

吸取吡哆醇、吡哆醛的标准液各 1.0 mL 于容量瓶中, 用 0.1 mol/L 盐酸溶液稀释, 并定容为 50 mL, 配制成 VB₆ 混合标准储备液 (20 $\mu\text{g/mL}$)。继续吸取 VB₆ 混合标准储备液 0.025、0.050、0.375、0.500、1.000 mL, 分别用无菌去离子水定容为 100 mL。该系列标准工作液中吡哆醇和吡哆醛各自浓度分别为 0.005、0.010、0.075、0.100、0.200 $\mu\text{g/mL}$ 。将 VB₆ 系列混合标准工作液在 HPLC 中进行检测, 测定各组分 (吡哆醇和吡哆醛) 的峰面积, 以标准工作液的浓度为横坐标, 以峰面积为纵坐标, 绘制标准曲线。

1.4.2 VB₆ 样品制备和预处理

将突变菌株 *pnpox::pK19mobQ2HMB* 和野生型菌株 CW117 分别接种于营养琼脂平板上, 均倒置于 37 °C 培养。挑取突变株或野生型的单菌落于营养肉汤液体培养基中, 于 37 °C、180 r/min 条件下振荡培养直至 OD_{600} 值达到 0.8, 取样备用。将毕赤酵母 SMD1168 接种于 YPD 平板, 于 30 °C 培养, 挑取单菌落至无菌的 YPD 液体培养基中, 30 °C、180 r/min 振荡培养直至 OD_{600} 值达到 0.8, 取样备用。

取上述野生型 CW117 和突变株 *pnpox::pK19mobQ2HMB* 菌液各 40 mL, 分别对菌液进行超声破碎。超声破碎条件为: 超声波功率 200 W, 破碎 2 s 间隔 3 s, 持续破碎 10–20 min, 直至破碎液体澄清。毕赤酵母菌液在细胞破碎前, 先在 4 °C、8 000 $\times g$ 条件下离心后, 将菌体与培养上清分离, 培养上清置于 4 °C 避光保存。将收集到的菌体在 SED 缓冲液 (sorbitol-EDTA-dithiothreitol buffer solution, SED) 中用蜗牛酶 37 °C 过夜酶解。SED 缓冲液配置方法为 19 mL SE 缓冲液 (sorbitol-EDTA buffer solution, SE) 加入 1 mL 二硫苏糖醇 (dithiothreitol, DTT)。过夜酶

解处理后,在 4 °C、8 000×g 条件下离心,弃上清,用 1×PBS 冲洗菌体 2–3 次^[20]。将预处理后的菌体细胞再次悬浮于上述培养上清中,按细菌同样的条件进行细胞破碎。

用盐酸溶液调节破碎后样品 pH 至 1.7±0.1,室温下放置 1 min,再用 NaOH 溶液调节样品 pH 至 4.5±0.1,超声清洗器中超声 10 min 混匀。转移样品至 50 mL 容量瓶,用去离子水清洗原锥形瓶,合并洗液,以去离子水定容。另取 100 mL 锥形瓶,以定性滤纸自然过滤样品,滤液再经 0.22 μm 微孔水系滤膜过滤后,用液相色谱仪检测。

1.4.3 VB₆液相色谱检测条件

液相色谱检测条件: Waters Symmetry C₁₈ 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为甲醇 50 mL, 辛烷磺酸钠 2.0 g, 三乙胺 2.5 mL, 水溶解并定容到 1 000 mL 后用冰乙酸调 pH 至 3.0±0.1, 过 0.22 μm 微孔水系滤膜过滤; 流速为 1 mL/min; 柱温 30 °C; 荧光检测器检测波长为激发波长 293 nm, 发射波长 395 nm; 进样体积为 10 μL。

1.5 数据分析

所有试验设置 3 个生物学重复,结果以平均值±标准偏差(mean±SD)表示。使用 Graphpad Prism 8.0 进行统计分析,并通过单因素方差分析(*t*-test)确定各组间的差异, $P<0.05$ 时差异显著。

2 结果与分析

2.1 寡养单胞菌 *pnpox* 基因突变子构建与筛选

在基因 *pnpox* 突变实验过程中发现,重组质粒经电击转化后 CW117 的突变菌株生长受阻,生长速度变得非常缓慢,需要添加适量的 VB₆ 混合标准品至培养基中才能够使基因突变体生

长速度恢复正常水平。因此,在该基因突变子筛选的卡那霉素抗性平板中添加适量的混合 VB₆ 有效地提高突变子筛选效率。

以 *ins*-F/R 为 PCR 引物和野生型菌株 CW117 基因组为 DNA 模板,成功扩增出预期的 *P-pnpox* 基因片段,大小为 334 bp (图 2A),以此为基因插入同源重组片段。通过限制性内切酶 *Eco*R I 和 *Hind* III,将基因片段 *P-pnpox* 与质粒 pK19*mob*Ω2*HMB* 分别进行双酶切反应,获得酶切后 *P-pnpox* 基因片段(334 bp)和线性质粒 pK19*mob*Ω2*HMB* (5 719 bp) (图 2B)。在此基础上,将酶切后的基因片段 *P-pnpox* 与线性化的 pK19*mob*Ω2*HMB* 通过 Solution I 连接后,转入 *E. coli* Trans1-T1 经 PCR 验证正确后(图 2C),提取重组质粒 pK19*mob*Ω2*HMB*/*P-pnpox*,重组质粒经过双酶切和 PCR 测序验证(图 2D)。PCR 产物测序结果表明,重组质粒 pK19*mob*Ω2*HMB*/*P-pnpox* 构建成功。

将重组质粒 pK19*mob*Ω2*HMB*/*P-pnpox* 经电击转化后,转化株涂布于含有卡那霉素抗性 & VB₆ 的营养琼脂,在含 VB₆ 的抗性平板中长出的菌落为突变子候选菌株。在抗性平板上挑取候选单菌落,以 *ver*1-F/R 为引物对进行 PCR 验证,筛选阳性突变株 *pnpox*::pK19*mob*Ω2*HMB*。若重组质粒正确插入预期位置,则突变子的 PCR 产物预期大小为 4 307 bp;若插入位置不正确或插入失败,候选菌株的 PCR 产物为 976 bp。候选突变子和野生型菌株 PCR 验证结果如图 3 所示,泳道 1 为 *pnpox*::pK19*mob*Ω2*HMB* 候选突变菌株,泳道 2 为野生型 CW117 出发菌株,PCR 结果初步表明泳道 1 的突变子构建成功。通过 PCR 产物纯化、测序和序列比对,结果表明插入突变成功,泳道 1 所代表的菌落是阳性突变体 *pnpox*::pK19*mob*Ω2*HMB*。

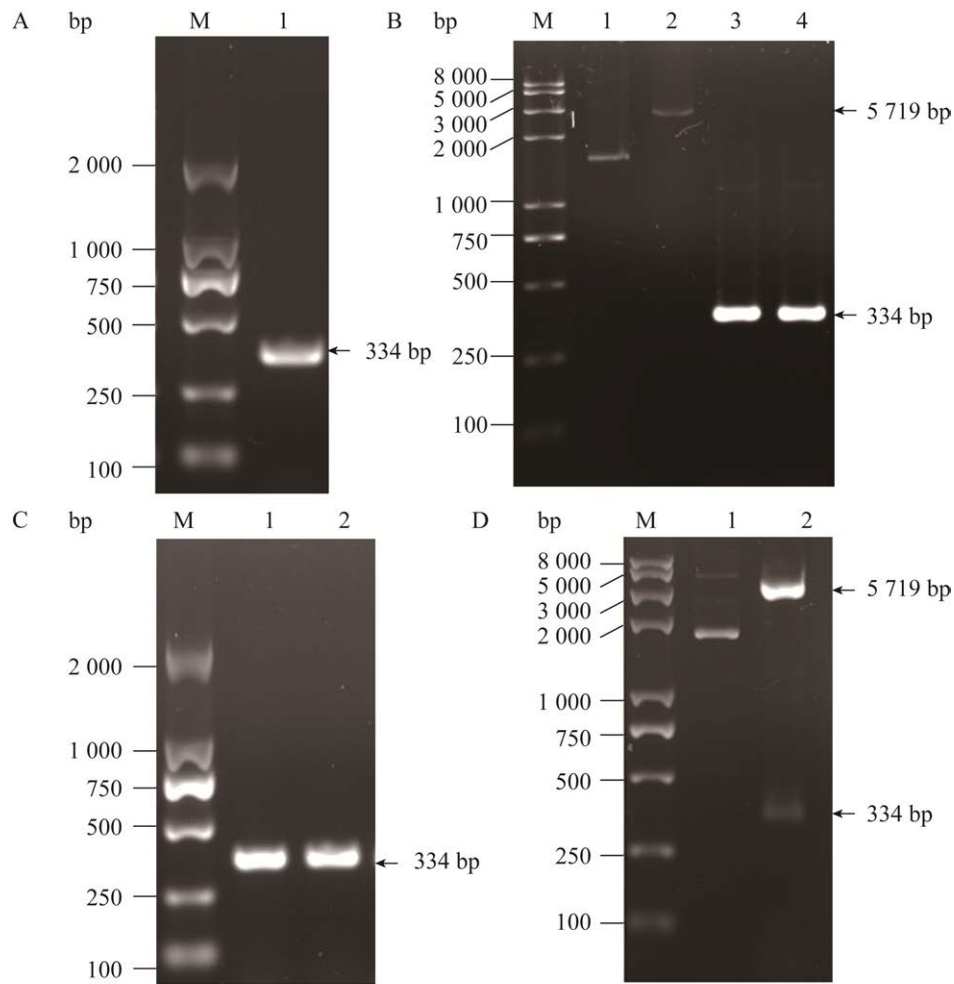


图 2 重组质粒 pK19mobΩ2HMB/P-pnpox 的构建

Figure 2 Construction of recombinant plasmid pK19mobΩ2HMB/P-pnpox. A: P-pnpox PCR product. B: pK19mobΩ2HMB and P-pnpox double enzymes digestion (M: DNA marker; Lane 1: Circular pK19mobΩ2HMB; Lane 2: pK19mobΩ2HMB double enzymes digested product; Lane 3: P-pnpox; Lane 4: Double enzymes digested P-pnpox). C: PCR products of P-pnpox on plasmid pK19mobΩ2HMB/P-pnpox from *E. coli* Trans1-T1 (M: DNA marker; Lane 1 and 2: P-pnpox). D: Double enzymes digestion verify on recombinant plasmid pK19mobΩ2HMB/P-pnpox (M: DNA marker; Lane 1: Circular pK19mobΩ2HMB/P-pnpox; Lane 2: Double enzymes digested pK19mobΩ2HMB/P-pnpox).

在突变株 *pnpox::pK19mobΩ2HMB* 培养过程中发现, 在不添加 VB₆ 的条件下, 转化株在营养琼脂上生长速度非常缓慢。野生型 CW117 在营养琼脂上培养 24 h 可以长出完整的单菌落(图 4C), 同样条件下, 突变株 *pnpox::pK19mobΩ2HMB* 在营养琼脂中, 培养至第 11 天时才长出细小单菌落(图 3A)。因此, 从菌株生长表型上来看,

当基因 *pnpox* 突变后, 菌体细胞内可能因 VB₆ 合成速度变慢, 已经严重影响了突变子的正常生长活性。同时, 在营养琼脂中加入 25 ng/mL 的 VB₆, 以消除维生素缺乏的压力后, 发现突变菌株生长速度状态恢复正常, 甚至比野生型菌株长得更快, 可以在 24 h 后长出完整的、菌落直径更大的单菌落(图 3B)。

2.2 维生素 B₆ 含量检测

2.2.1 标准曲线

根据维生素 B₆ 国家标准的检测方法 (GB5009.154—2016)^[19], VB₆ 混合标准化合物在 HPLC 色谱柱中可以得到很好的分离, 吡哆醛 (pyridox, PL) 保留时间为 19.9 min, 吡哆醇 (pyridoxine, PN) 的保留时间为 29.0 min, 2 个化合物峰型对称, 分离效果良好(图 5)。配制 6 个系列浓度的 VB₆ 混合标准工作液, HPLC 检测后, 分别以标准品浓度为横坐标、峰面积为纵坐标构建回归方程, 回归方程的相关系数 R^2 分别为 0.999 8 (PL)、0.999 9 (PN), 线性关系良好, 说明在 0.005–0.200 $\mu\text{g/mL}$ 浓度范围内, 采用该标准曲线计算检测样品中 PL 与 PN 的含量是可靠的(图 6)。

2.2.2 样品含量测定

在各类群微生物中, 毕赤酵母蛋白表达量高, 已成为一个成功的蛋白质生产平台, 特别是在工业酶和生物制药行业; 此外, 毕赤酵母的 VB₆ 自身合成含量也显著高于其他类别的微生物^[21]。因此, 本研究选取毕赤酵母 SMD1168 作为 VB₆ 合成的阳性对照菌株。待野生型

CW117、突变株 *pnpox::pK19mob Ω 2HMB*、毕赤酵母 SMD1168 三个菌株的菌体生长浓度达到紫外光 600 nm 处的光密度值(OD_{600})为 0.8 时, 检测 PL 和 PN 的含量。

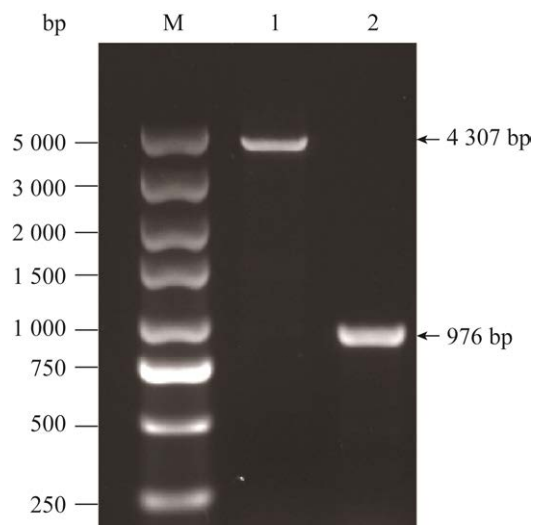


图 3 突变菌株 *pnpox::pK19mob Ω 2HMB* 的构建与筛选

Figure 3 Construction and screening of mutant *pnpox::pK19mob Ω 2HMB*. M: DNA marker; Lane 1: The PCR product from the mutant *pnpox::pK19mob Ω 2HMB*; Lane 2: The PCR product from wild-type strain CW117.

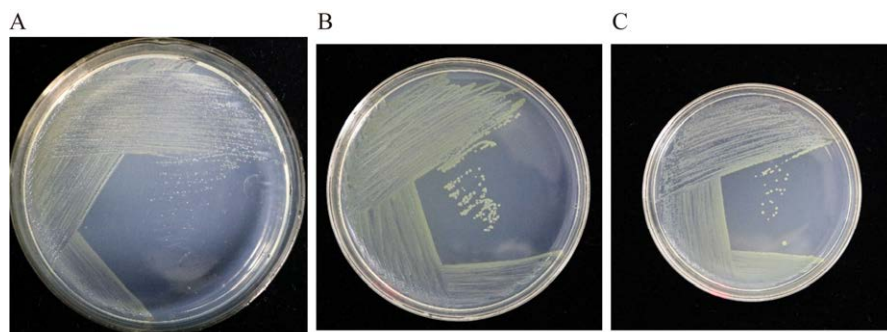


图 4 野生型菌株和 *pnpox* 突变子在不同培养基中生长情况

Figure 4 Growth state of wild-type CW117 and gene mutant in different culture media. A: Mutant *pnpox::pK19mob Ω 2HMB* grown on nutrient agar for 11 d. B: Mutant *pnpox::pK19mob Ω 2HMB* grown on nutrient agar supplemented with 25 ng/mL VB₆ for 24 h. C: Wild-type CW117 grown on nutrient agar for 24 h.

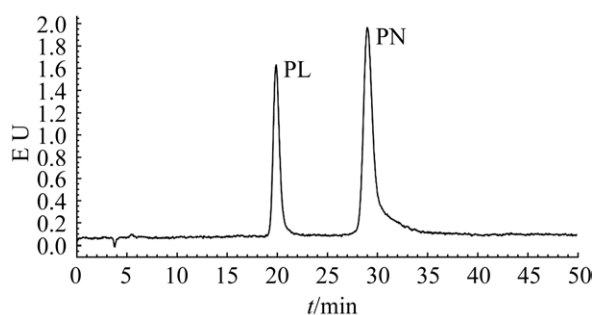


图5 维生素 B₆ 混合标准品液相色谱图

Figure 5 HPLC chromatogram of vitamin B₆ mixed standard.

VB₆ 检测结果显示在各菌株的对数生长期, 野生型菌株 CW117 与突变株 *pnpox::pK19mobΩ2HMB*, 以及野生型菌株 CW117 与毕赤酵母之间的 PL 含量均有显著性差异 ($P < 0.001$) (图 7A)。首先, 毕赤酵母 SMD1168 的 PL 合成量显著高于野生型寡养单胞菌 CW117, 说明毕赤酵母对 PL 的合成能力显著高于细菌寡养单胞菌, 选择毕赤酵母为阳性对照菌株是比较合适的选择。此外, 突变株 *pnpox::pK19mobΩ2HMB* 的 PL 合成量显著低于野生型菌株 CW117 (图 7A), 说明基因 *pnpox* 的突变显著降低了寡养单胞菌中 PL 的合成; 从生长表型上看, 基因 *pnpox* 的突变严重延迟了突变株在营养琼脂上的生长, 且生长的

菌落非常的细小, 菌落更偏黄色(图 4A)。

VB₆ 中的 PN 检测结果如图 7B 所示, 野生型 CW117 与突变株 *pnpox::pK19mobΩ2HMB* 之间的 PN 含量无显著性差异, 但毕赤酵母 SMD1168 的 PN 合成量显著高于野生型 CW117 ($P < 0.001$), 进一步证明毕赤酵母的 VB₆ 合成活性显著高于寡养单胞菌, 但是基因 *pnpox* 的突变, 对 PN 的合成无显著性影响(图 7B)。

2.3 突变菌株 *pnpox::pK19mobΩ2HMB* 对 AFB1 的降解

野生型株 CW117 和突变株 *pnpox::pK19mobΩ2HMB* 分别与 AFB1 共孵育后, 在不同时间点取样, 经 HPLC 检测分析各菌株降解活性。降解测试结果显示, 2 个菌株在 0–72 h 多个时间点对 AFB1 的降解率, 经 *t*-test 分析未发现显著性差异。在菌株降解实验中, 野生型和突变株在 36 h 时已基本完成了 AFB1 的降解, 且两者变化幅度基本相同, 表明基因 *pnpox* 并不是 AFB1 的关键降解基因, 故菌株 CW117 中还有其他对 AFB1 具有降解活性的解毒酶基因。虽然 *pnpox* 基因家族在耻垢分枝杆菌等放线菌中对黄曲霉毒素降解具有显著贡献, 但在革兰氏阴性黄单胞目菌株中, 该类基因对黄曲霉毒素的降解转化未发现显著性贡献^[9–11,13]。

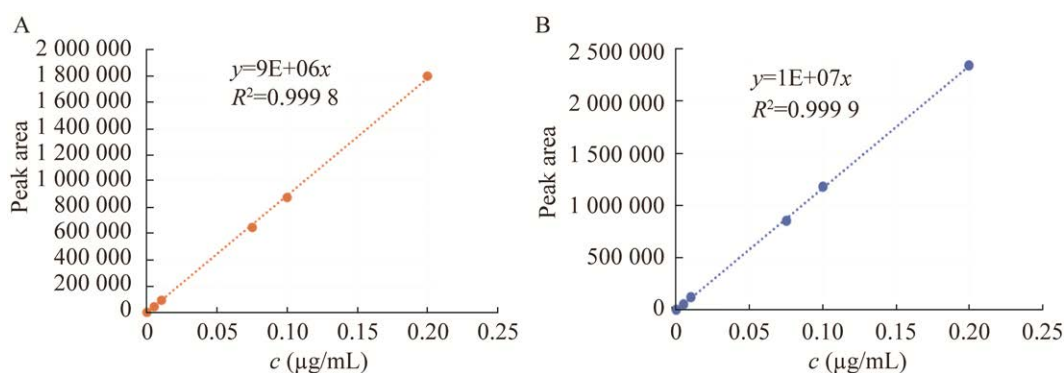


图6 混合维生素 B₆ 标准曲线

Figure 6 Regression equation of mixed vitamin B₆. A: The regression equation of pyridoxal (PL). B: The regression equation of pyridoxine (PN).

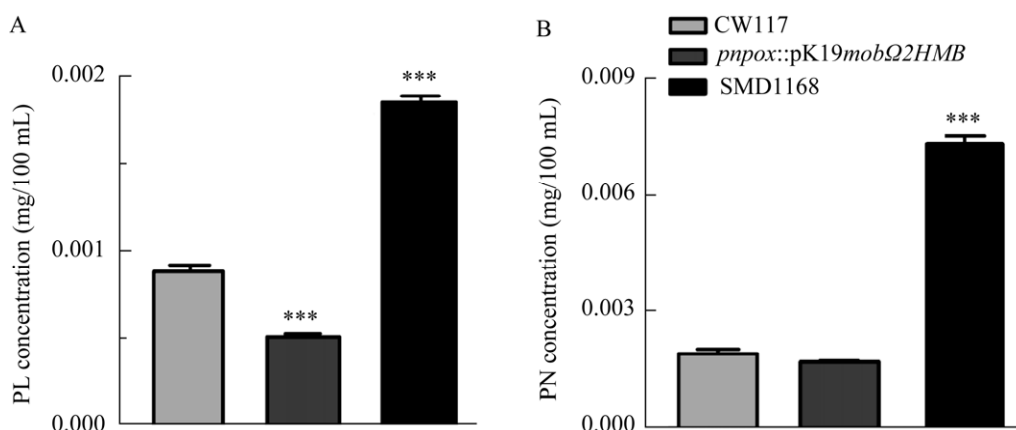


图 7 野生型及突变子维生素 B₆ 的合成量

Figure 7 Vitamin B₆ synthesis activities by wild-type CW117 and gene mutant. A: Pyridoxal synthesis activity. B: Pyridoxine synthesis activity. The cell optical density for VB₆ determination was 0.8 ($OD=0.8$) for each microbial strain. Data represent the means \pm SD ($n=3$). ***: $P<0.001$ (t -test), compared with the control (wild-type CW117).

3 讨论与结论

维生素 B₆ 以多种形式存在于生物体内, 不仅在高等生物有重要生理学作用, 对细菌的生长发育也必不可少。在细菌生长过程中, 很多生物酶需要 VB₆ 作为辅助因子来正常行使酶学活性。VB₆ 由 6 种化学结构近似的化合物组成, 它们都含有一个吡啶环作为核心; 在吡啶环 4' 位上连接不同基团而呈不同形式, 可以是氨基甲基(吡哆胺 PM)、羟基甲基(吡多醇 PN)或醛(吡哆醛 PL)^[22]。其中, 5'-磷酸吡哆醛(PLP)是 VB₆ 的催化活性形式, 常作为辅酶因子在代谢中起着关键作用。吡哆醇或吡哆胺磷酸氧化酶在辅酶黄素单核苷酸(FMN)配合下, 氧化转化吡哆醇(PNP)或 5'-磷酸吡哆胺(PMP)为 5'-磷酸吡哆醛(PLP)^[23]。在大肠杆菌中, 磷酸吡哆醛(PLP)是数十种酶的辅助因子, 这些酶在氨基酸及其他多种代谢途径中具有重要作用^[24]。

微生物可以通过多种生物途径合成不同形式 VB₆。其中, 脱氧木酮糖-5-磷酸(1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate, DXP)途径为 PLP 的从头合

成途径, 该过程中 2 个重要的中间产物 3-氨基-1-羟基丙酮-1-磷酸(3-amino-1-hydroxyacetone-1-phosphate)和 DXP 在吡哆醇 5'-磷酸合酶(pyridoxine 5'-phosphate synthase, PdxJ)酶的催化作用下发生缩合, 生成磷酸吡哆醇(pyridoxine 5'-phosphate, PNP)^[25-26]。此外, 大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 中以及大多数有机体中, PLP 也可以通过 PL、PN 和 PM 转化得到, 即补救途径, 在生长环境中吸收或从蛋白质周转中获得^[25-26], 此途径是在多种酶的作用下, 不同形式的维生素 B₆ 进行相互转换(图 8)。在 VB₆ 生物转化过程中, 存在 2 种具有磷酸化 VB₆ 的激酶。其中, 吡哆醛激酶 1 (pyridoxal kinase 1, PdxK) 在 ATP 参与下催化 PL、PN 和 PM 的磷酸化^[27]; 但是, 吡哆醛激酶 2 (pyridoxal kinase 2, PdxY) 仅对 PL 有特异性, 催化其磷酸化产生 PLP^[28]。此外, 由 *pdxI* 基因编码的 NADPH 依赖性 PL 还原酶(pyridoxine 4'-dehydrogenase), 属于醛酮还原酶家族, 其功能是将 PL 转化为 PN, 该生物过程是与本研究中的 PNPOx 酶功能相反^[29]。

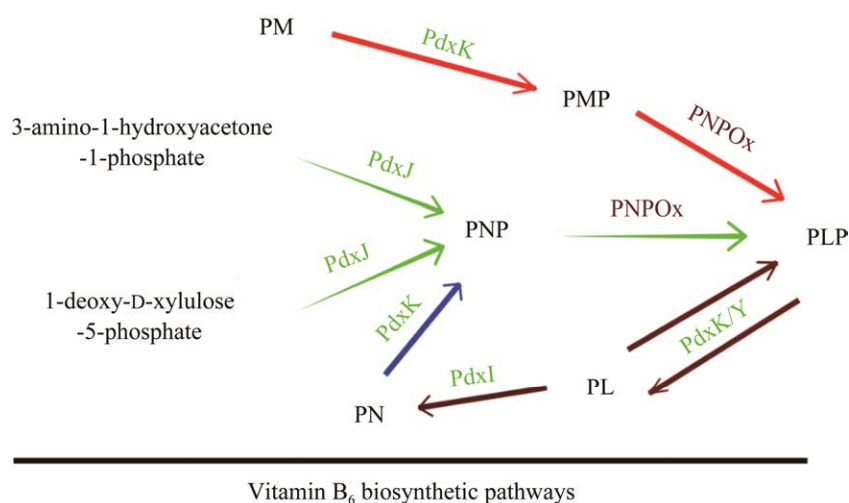


图 8 微生物体中维生素 B₆ 的合成代谢途径

Figure 8 Biosynthetic pathway of vitamin B₆ in microorganism.

产生基因突变体的方法有物理和化学诱变、同源重组、基因缺失以及插入突变等^[30]。其中，插入突变是指在目的基因中间插入一段已知的外源 DNA 片段，从而引起插入位点所在基因变化，影响其正常表达。本研究为探讨寡养单胞菌 CW117 中的磷酸吡哆胺氧化酶 (pyridoxamine 5'-phosphate oxidase, PNPOx) 生物学作用，通过基因插入突变方式，使菌株 CW117 中 PNPOx 的表达受阻，得到突变子 *pnpox::pK19mobQ2HMB*。实验过程中，突变重组质粒 *pK19mobQ2HMB/P-pnpox* 电击转化后发现，转化株生长速度明显变得缓慢(图 4A)，说明基因 *pnpox* 突变严重影响了寡养单胞菌 CW117 的生长；在营养琼脂中加入 25 ng/mL 的 VB₆，转化菌株即可恢复正常的生长速度(图 4B)，从突变菌株生长表型上初步验证了基因 *pnpox* 是影响了 VB₆ 的合成，进而影响了寡养单胞菌生长。

根据 CW117 中基因 *pnpox* 序列分析得知，*pnpox* 为吡哆胺(或磷酸吡哆胺)氧化酶基因，该基因的主要功能是氧化吡哆胺(或磷酸吡哆胺)

转化为吡哆醛(或磷酸吡哆醛)。吡哆胺在微生物体内不稳定，且含量很低，难以用液相色谱方法测出准确含量。但吡哆胺在 PNPOx 酶作用下，很快转化为 VB₆ 活性形式磷酸吡哆醛，发挥生物学功能。本研究结果证实了对 *pnpox* 基本生物学功能的分析假说，即 PNPOx 在磷酸吡哆醛 (pyridoxal 5'-phosphate, PLP) 的从头合成途径和补救途径中均发挥重要作用^[23-24]。同时，基因 *pnpox* 突变显著影响了 PL 的合成，但不影响 PN 的合成，也就是说该基因的突变影响了 VB₆ 家族中吡哆醛或 5'-磷酸吡哆醛的合成，进而影响了寡养单胞菌的生长，但不能完全让寡养单胞菌失去 VB₆ 合成能力而死亡^[22]。

根据放线菌耻垢分枝杆菌 (*Mycobacterium pubis*) 的研究结果，PNPOx 大家族中的脱氮黄素 F₄₂₀H₂ 依赖性氧化还原酶 FDRs (FDR-A 和 FDR-B) 对 B 族 (AFB1 和 AFB2) 和 G 族 (AFG1 和 AFG2) 黄曲霉毒素具有显著的降解转化作用，且 FDRs 酶与本研究中的磷酸吡哆胺氧化酶 PNPOx 具有相似的蛋白折叠方式和结构域；因此，在以上研究展望中推测变性菌门的细菌中 PNPOx 酶

也具有黄曲霉毒素降解活性^[11,13]。本研究中,野生株 CW117 和突变株 *pnpox::pK19mobΩ2HMB* 对 AFB1 的降解活性无显著性差异,表明寡养单胞菌 CW117 中的 *pnpox* 基因对 AFB1 的降解无显著性贡献,菌株 CW117 对 AFB1 起降解转化是其他氧化还原酶的作用,这与以前的文献降解结果不同。

综上所述,本研究通过插入突变方式验证了菌株 CW117 的磷酸吡哆胺氧化酶基因 *pnpox* 对 AFB1 的降解无显著性贡献,磷酸吡哆胺氧化酶 PNPOx 在寡养单胞菌 CW117 中主要生物学功能为吡哆醛和磷酸吡哆醛合成,以维持细菌的正常生长发育,基因 *pnpox* 的突变会使菌株 CW117 中 VB₆ 合成发生障碍,导致突变子 *pnpox::pK19mobΩ2HMB* 生长困难。

参考文献

- [1] 姜宏, 杜郑君, 钱莺莺, 陈楠, 蔡梦宇, 费晴如, 陈静静, 周育. 微嗜酸寡养单胞菌中的漆酶对黄曲霉毒素 B1 降解脱毒的生物活性[J]. 微生物学报, 2021, 61(1): 127-140.
JIANG H, DU ZJ, QIAN YY, CHEN N, CAI MY, FEI QR, CHEN JJ, ZHOU Y. Characterization of the aflatoxin B1 degradation role of laccases in *Stenotrophomonas acidaminiphila*[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2021, 61(1): 127-140 (in Chinese).
- [2] HAMID AS, TEFAMARIAM IG, ZHANG YC, ZHANG ZG. Aflatoxin B1-induced hepatocellular carcinoma in developing countries: geographical distribution, mechanism of action and prevention[J]. *Oncology Letters*, 2013, 5(4): 1087-1092.
- [3] OSTRY V, MALIR F, TOMAN J, GROSSE Y. Mycotoxins as human carcinogens—the *IARC Monographs* classification[J]. *Mycotoxin Research*, 2017, 33(1): 65-73.
- [4] GUAN Y, CHEN J, NEPOVIMOVA E, LONG M, WU WD, KUCA K. Aflatoxin detoxification using microorganisms and enzymes[J]. *Toxins*, 2021, 13(1): 46.
- [5] JALLOW A, XIE HL, TANG XQ, QI Z, LI PW. Worldwide aflatoxin contamination of agricultural products and foods: from occurrence to control[J]. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 2021, 20(3): 2332-2381.
- [6] ISMAIL A, GONÇALVES BL, de NEEFF DV, PONZILACQUA B, COPPA CFSC, HINTZSCHE H, SAJID M, CRUZ AG, CORASSIN CH, OLIVEIRA CAF. Aflatoxin in foodstuffs: occurrence and recent advances in decontamination[J]. *Food Research International*, 2018, 113: 74-85.
- [7] SONG JJ, ZHANG SJ, XIE YL, LI Q. Purification and characteristics of an aflatoxin B1 degradation enzyme isolated from *Pseudomonas aeruginosa*[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2019, 366(5): fnz034.
- [8] WEI W, QIAN Y, WU Y, CHEN Y, PENG C, LUO M, XU J, ZHOU Y. Detoxification of ochratoxin A by *Lysobacter* sp. CW239 and characteristics of a novel degrading gene carboxypeptidase *cp4*[J]. *Environmental Pollution*, 2020, 258: 113677.
- [9] HORMISCH D, BROST I, KOHRING GW, GIFFHORN F, KROPPESTEDT RM, STACKEBRANDT E, FÄRBER P, HOLZAPFEL WH. *Mycobacterium fluoranthenorans* sp. nov., a fluoranthene and aflatoxin B1 degrading bacterium from contaminated soil of a former coal gas plant[J]. *Systematic and Applied Microbiology*, 2004, 27(6): 653-660.
- [10] TENIOLA O, ADDO P, BROST I, FARBER P, JANY K, ALBERTS J, VANZYL W, STEYN P, HOLZAPFEL W. Degradation of aflatoxin B1 by cell-free extracts of *Rhodococcus erythropolis* and *Mycobacterium fluoranthenorans* sp. nov. DSM 44556T[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2005, 105(2): 111-117.
- [11] TAYLOR MC, JACKSON CJ, TATTERSALL DB, FRENCH N, PEAT TS, NEWMAN J, BRIGGS LJ, LAPALIKAR GV, CAMPBELL PM, SCOTT C, RUSSELL RJ, OAKESHOTT JG. Identification and characterization of two families of F₄₂₀ H₂-dependent reductases from *Mycobacteria* that catalyse aflatoxin degradation[J]. *Molecular Microbiology*, 2010, 78(3): 561-575.
- [12] GRINTER R, GREENING C. Cofactor F₄₂₀: an expanded view of its distribution, biosynthesis and roles in bacteria and archaea[J]. *FEMS Microbiology Reviews*, 2021, 45(5): fuab021.
- [13] LAPALIKAR GV, TAYLOR MC, WARDEN AC, SCOTT C, RUSSELL RJ, OAKESHOTT JG. F₄₂₀H₂-dependent degradation of aflatoxin and other

- furancoumarins is widespread throughout the *Actinomycetales*[J]. PLoS One, 2012, 7(2): e30114.
- [14] 李全霞, 崔亚娟, 赵寅菲, 姜菲菲, 李东. 微生物法测定食品中水溶性维生素的原理及进展[J]. 食品科学, 2013, 34(13): 338-344.
LI QX, CUI YJ, ZHAO YF, JIANG FF, LI D. Principle and progress of microbiological assay for water-soluble vitamins in foods[J]. Food Science, 2013, 34(13): 338-344 (in Chinese).
- [15] ROSENBERG J, ISCHEBECK T, COMMICHAU FM. Vitamin B6 metabolism in microbes and approaches for fermentative production[J]. Biotechnology Advances, 2017, 35(1): 31-40.
- [16] HOFFARTH ER, ROTHCHILD KW, RYAN KS. Emergence of oxygen and pyridoxal phosphate-dependent reactions[J]. The FEBS Journal, 2020, 287(7): 1403-1428.
- [17] CAI MY, QIAN YY, CHEN N, LING TJ, WANG JJ, JIANG H, WANG X, QI KZ, ZHOU Y. Detoxification of aflatoxin B1 by *Stenotrophomonas* sp. CW117 and characterization the thermophilic degradation process[J]. Environmental Pollution (Barking, Essex: 1987), 2020, 261: 114178.
- [18] LUO L, YAO SY, BECKER A, RÜBERG S, YU GQ, ZHU JB, CHENG HP. Two new *Sinorhizobium meliloti* LysR-type transcriptional regulators required for nodulation[J]. Journal of Bacteriology, 2005, 187(13): 4562-4572.
- [19] 国家食品药品监督管理总局, 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会. 食品安全国家标准 食品中维生素 B6 的测定: GB5009.154—2016[S]. 北京: 中国标准出版社, 2017.
National Medical Products Administration, the Central People's Government of the People's Republic of China. National Food Safety Standards Determination of vitamin B6 in food: GB5009.154—2016[S]. Beijing: Standards Press of China, 2017 (in Chinese).
- [20] 安佳星, 伍时华, 黄嘉齐, 曾令杰, 黄锦翔, 丰丕雪, 易弋. 酵母破壁酶和蜗牛酶辅助 TRIzol 试剂法提取酿酒酵母总 RNA[J]. 中国酿造, 2020, 39(12): 46-50.
AN JX, WU SH, HUANG JQ, ZENG LJ, HUANG JX, FENG PX, YI Y. Total RNA extraction from *Saccharomyces cerevisiae* by yeast lyticase and snailase assisted TRIzol reagent method[J]. China Brewing, 2020, 39(12): 46-50 (in Chinese).
- [21] CAI P, DUAN XP, WU XY, GAO LH, YE M, ZHOU YJ. Recombination machinery engineering facilitates metabolic engineering of the industrial yeast *Pichia pastoris*[J]. Nucleic Acids Research, 2021, 49(13): 7791-7805.
- [22] PARRA M, STAHL S, HELLMANN H. Vitamin B₆ and its role in cell metabolism and physiology[J]. Cells, 2018, 7(7): 84.
- [23] ZHAO G, WINKLER ME. Kinetic limitation and cellular amount of pyridoxine (pyridoxamine) 5'-phosphate oxidase of *Escherichia coli* K-12[J]. Journal of Bacteriology, 1995, 177(4): 883-891.
- [24] ELIOT AC, KIRSCH JF. Pyridoxal phosphate enzymes: mechanistic, structural, and evolutionary considerations[J]. Annual Review of Biochemistry, 2004, 73: 383-415.
- [25] TRAMONTI A, NARDELLA C, Di SALVO ML, BARILE A, D'ALESSIO F, de CRÉCY-LAGARD V, CONTESTABILE R. Knowns and unknowns of vitamin B₆ metabolism in *Escherichia coli*[J]. EcoSal Plus, 2021, 9(2): 10.1128/ecosalplus.ESP-0004-2021.
- [26] ITO T, YAMAMOTO K, HORI R, YAMAUCHI A, DOWNS DM, HEMMI H, YOSHIMURA T. Conserved pyridoxal 5'-phosphate-binding protein YggS impacts amino acid metabolism through pyridoxine 5'-phosphate in *Escherichia coli*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2019, 85(11): e00430-19.
- [27] HUANG S, YANG H, YAO L, ZHANG J, HUANG L. Effect of exogenous hormones on transcription levels of pyridoxal 5'-phosphate biosynthetic enzymes in the silkworm (*Bombyx mori*)[J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology, 2016, 194: 20-24.
- [28] DISALVO ML, HUNT S, SCHIRCH V. Expression, purification, and kinetic constants for human and *Escherichia coli* pyridoxal kinases[J]. Protein Expression and Purification, 2004, 36(2): 300-306.
- [29] ITO T, DOWNS DM. Pyridoxal reductase, Pd₁, is critical for salvage of pyridoxal in *Escherichia coli*[J]. Journal of Bacteriology, 2020, 202(12): e00056-20.
- [30] 曾秀丽, 王志, 罗利, 王旭, 陈宣钦, 周育. 茶树内生草螺菌 ZXN111 生长素合成及其对云抗-10 号植物的促生功能[J]. 微生物学报, 2020, 60(10): 2198-2210.
ZENG XL, WANG Z, LUO L, WANG X, CHEN XQ, ZHOU Y. Auxin synthesis in tea plant endophytic *Herbaspirillum* sp. ZXN111 and the plant growth promotion on Yunkang-10[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2020, 60(10): 2198-2210 (in Chinese).