

吡咯喹啉醌产生菌筛选方法建立及菌种筛选

王 歆^{1,2,3} 汪建华¹ 刘党生² 张惟材^{1*}

(¹军事医学科学院 生物工程研究所 北京 100071)

(²沈阳药科大学 生命科学与生物制药学院 沈阳 110016) (³黑龙江大学 生命科学学院 哈尔滨 150080)

摘 要 吡咯喹啉醌(PQQ)是一种氧化还原酶的辅酶,具有多种生理功能。扩增得到大肠杆菌葡萄糖脱氢酶(GDH)基因,并利用表达载体 pET28a 在 *E. coli* BL21(DE3) 中进行了表达。纯化了可溶性表达产物,并建立了基于 GDH 的重组酶法分析 PQQ 的方法。确定了甲基营养菌筛选模型,从 2000 余份土样中分离得到一株 PQQ 高产生菌 MP606,在未经培养条件优化及诱变选育的条件下 PQQ 产量达 113mg/L。从该菌培养液中制备得到了产物的结晶, HPLC 分析、特征光谱分析以及酶法分析均证实该产物为 PQQ。扩增并分析了 MP606 的 16S rDNA 序列,结果显示该菌 16S rDNA 序列与 12 种甲基营养菌都具有 95% 以上同源性,其中与食甲基菌属两菌株的 16S rDNA 序列同源性达 99%。

关键词: 吡咯喹啉醌; 葡萄糖脱氢酶; 酶法分析; 菌种筛选; 16S rDNA

中图分类号: Q935 文献标识码: A 文章编号: 1001-6209(2007)06-0982-05

吡咯喹啉醌(PQQ)是 20 世纪 70 年代发现的一种不同于烟酰胺嘌呤核苷酸和黄素核苷酸的第三类氧化还原酶的辅酶^[1,2],具有促进动植物和微生物细胞生长、防治肝损伤、促进神经生长因子合成、调解机体自由基水平、提高细菌对毒性和辐射等极端条件耐受性等多种生理功能^[3~6],有很好的药用开发前景。目前 PQQ 造价十分昂贵,化学合成方法生产 PQQ 步骤多,产率低,污染严重,一般认为生物合成方法最有实际产业化意义。迄今发现产生 PQQ 的生物仅限于某些革兰氏阴性细菌,其中以甲基营养菌的 PQQ 生产水平最高^[8]。

依赖 PQQ 及其类似物为辅酶的氧化还原酶统称为醌酶或醌蛋白^[8,9]。许多含有醌酶的革兰氏阴性菌能够合成 PQQ,而有些细菌如大肠杆菌和沙门氏菌虽能产生醌酶但自身却不能合成 PQQ^[10,11]。这类微生物产生的醌酶不具有生物活性,称为脱辅基蛋白,在添加 PQQ 之后能够重组为具有活性的全酶。利用这个特点可以通过所谓重组酶法对 PQQ 进行定性和定量分析。

大肠杆菌产生的葡萄糖脱氢酶(GDH)是目前研究较多的一种醌酶,本研究建立了基于该酶的重组酶法分析 PQQ 方法,并建立了甲基营养菌的富集和分离方法,筛选得到一株 PQQ 高产菌 MP606,现报道于下。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌种和质粒: PQQ 产生菌 MP606 为本研究获得,大肠杆菌(*Escherichia coli*) BL21(DE3)和 DH5 α 感受态细胞购自全式金生物技术公司;表达载体 pET28a 购自 Novagen 公司;克隆载体 pGEM-TEasy 购自 Promega 公司。

1.1.2 主要试剂和仪器: PQQ 标准品系 Sigma 公司产品(>98%)、2,6-dichlorophenolindophenol(DCIP)和 Phenazine Methosulfate(PMS)为 Sigma 公司产品,其它试剂均为市售生化试剂。AKTA Purifier 100 蛋白纯化系统系通用电气公司产品,高效液相色谱仪采用 Waters 600,检测器为 PDAD 2996,色谱柱为 Waters Symmetry300 C₁₈ 反向柱。

1.1.3 PCR 引物 P₁: 5'-CTAGCTAGCATGGCAATTA ATACAGGC-3'、P₂: 5'-CGCGGATCCACCGAAAGAACAT GCTTATAT-3'、P₃: 5'-TTAACACATGCAAGTCGAA-3'、P₄: 5'-TCCACGATTACTAGCGATT-3'。其中 P₁、P₂ 用于扩增大肠杆菌葡萄糖脱氢酶基因, P₃、P₄ 用于扩增甲基营养菌 16S rDNA 序列。

1.2 GDH 活性分析

将 10 μ L GDH 与 5 μ mol PQQ 及 MgSO₄ 溶液(终浓度 5mmol/L)混合,室温放置 20min。取 1mL 该混

基金项目: 国家“863 计划”项目(2006AA020303)、国家自然科学基金项目(30470058)

* 通讯作者。Tel: 86-10-66948826; E-mail: drzhangwc@163.com

作者简介: 王歆(1979-)男,硕士研究生,主要从事微生物与生化药学研究。E-mail: tianronghaise@126.com

收稿日期: 2007-04-20,接受日期: 2007-05-08,修回日期: 2007-06-18

合溶液加入 2mL 检测反应液,测定单位时间内 DCIP 在 600nm 处吸光度的变化。在 pH 7.0 条件下 DCIP 的吸光系数按 14.5(mmol·cm)计算,规定 1min 内转化 1 μ mol 底物的酶量为 1 个酶活力单位(U)。

1.3 蛋白含量测定

按 Lowry 法进行^[13]。

1.4 PQQ 的酶法分析

PQQ 的酶法快速检测:取 20 μ L 重组酶溶液加入 96 孔板中,再加 180 μ L 检测反应液开始反应,根据反应液的褪色时间可以快速估测样品中 PQQ 的含量水平。PQQ 的酶法测定:将 1mL 重组酶溶液放置于比色杯中,加入 2mL 检测反应液,通过测定 600nm 处溶液吸光度的变化速率定量分析样品中 PQQ 的含量。检测时以标准品为阳性对照,以不加 PQQ 的反应液为空白对照。

1.5 PQQ 的 HPLC 分析

用 Symmetry300 色谱柱以水和甲醇为流动相通过 HPLC 分离分析产物,采用梯度洗脱方法及 254nm 波长检测,利用二极管阵列检测器(PDAD)检测各组分的吸收光谱图。

DNA 的提取、酶切、纯化、连接、PCR 扩增、核酸电泳以及转化等分子生物学常规操作均参照文献[13]进行。测序及引物合成由奥科生物公司完成。

2 结果

2.1 E. coli gdh 基因的扩增和表达质粒构建

根据 E. coli 的 gdh 基因序列^[14,15]设计引物 P₁、P₂ 在 5'端和 3'端分别引入 Nde I 和 BamH I 酶切位点。以 E. coli DH5 α 基因组为模板,通过 PCR 扩增得大小为 2674bp 的目的片段。PCR 条件为:94℃ 4min,94℃ 30s,55℃ 30s,72℃ 3min,30 个循环后于 72℃ 继续延伸 5min,用 1.0% 琼脂糖凝胶电泳鉴定 PCR 产物。产物鉴定正确,经回收并用 Nde I 和 BamH I 酶切,与 pET28a 表达载体连接,连接产物转化感受态细胞 DH5 α ,挑选阳性克隆提取质粒进行酶切鉴定,再测序分析。测序结果表明扩增得到的序列与文献报道的 gdh 基因序列完全一致,表明 pET28a-GDH 质粒构建成功。

2.2 E. coli 的 GDH 表达纯化

将构建的表达质粒转化至 BL21(DE3),挑取阳性克隆的单菌落接至 5mL 含卡那霉素的 LB 培养基,37℃ 振荡培养过夜,全部接入 500mL 含卡那霉素 LB 培养基中,37℃ 振荡培养至 OD 值为 0.6 左右,加入 IPTG 至终浓度为 1.0mmol/L,37℃ 诱导培养 4h。于

10℃ 5000r/min 离心 10min 收集菌体。用 20mmol/L pH 7.0 的磷酸盐缓冲溶液洗涤菌体 2 次,悬浮至 20mL 同样缓冲液,超声破菌。破菌液经离心,通过 DEAE-Sepharose 离子交换柱从上清液中纯化目的蛋白。层析柱经平衡后以 1mol/L 的 NaCl 梯度洗脱并收集各洗脱峰组份。经检测具有酶活的组分经疏水柱脱盐。SDS-PAGE 检测分析,表达产物及纯化蛋白的分子量约为 87kDa(图 1),与文献^[16]报道一致。

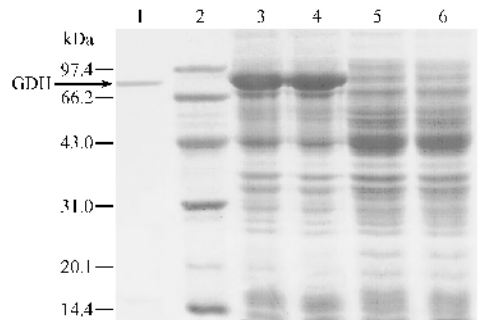


图 1 表达和纯化产物 SDS-PAGE 分析

Fig. 1 SDS-PAGE analysis of expressed and purified product. 1. Purified product; 2. Protein Marker; 3. Total bacterial proteins of E. coli BL21(DE3)/pET28a-*gdh* after induced 4h by 1mmol/L IPTG; 4. The supernatant of E. coli BL21(DE3)/pET28a-*gdh* after induced 4h by 1mmol/L IPTG; 5. Total bacterial proteins of E. coli BL21(DE3); 6. Total bacterial proteins of E. coli BL21(DE3)/pET28a.

2.3 PQQ 产生菌筛选

将采集土样加适当无菌水混悬后静置,取上清加至富集培养基,30℃ 厌氧培养 5d,培养物离心取上清,用 PQQ 的快速检测方法初筛。图 2 显示了初筛的部分结果。在分离培养基平板上分离初筛培养物中的单菌落,再接种至含富集培养基的摇瓶,30℃ 振荡培养 5d,通过酶法测定精确分析培养物中 PQQ 含量。经过数轮初筛和复筛分离 PQQ 高产菌株。结果从 2000 余份土样中分离得到一株高产菌,我们命名为 MP606。经多次摇瓶培养试验分析,该菌 PQQ 产量可达 113mg/L。

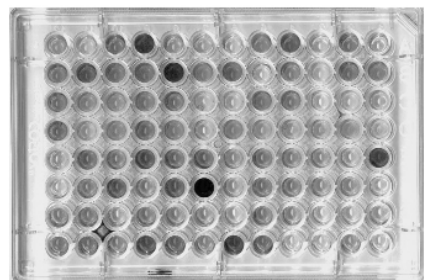


图 2 部分初筛结果

Fig.2 Partial results of strain screening.

2.4 MP606 的 16S rDNA 序列分析

根据甲基营养菌的 16S rDNA 保守序列设计并

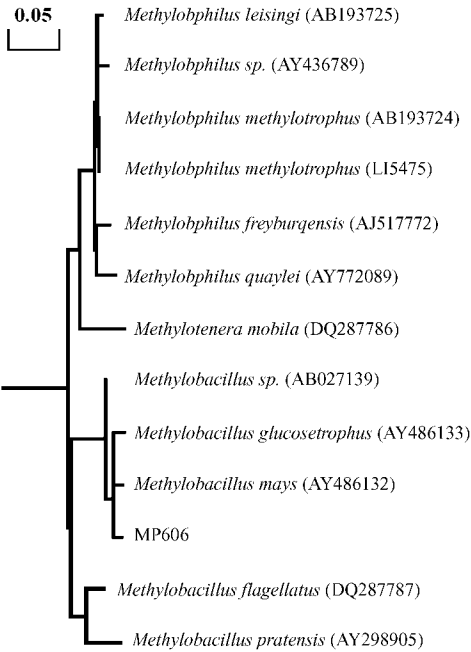


图3 以 16S rDNA 序列为基础的 MP606 菌系统发育树
Fig.3 Phylogenetic tree of the strain MP606 based on 16S rDNA sequence. Numbers in parentheses represent the sequences' accession number in GenBank.

合成引物 P3、P4 ,以 MP606 菌基因组 DNA 为模板 ,通过 PCR 反应扩增该菌的部分 16S rDNA 序列。PCR 条件为 :94℃ 4min 变性进入循环 ;94℃ 30s , 55℃ 30s ,72℃ 3min , 30 个循环后 72℃ 继续延伸 5min。1.0% 琼脂糖凝胶电泳鉴定 PCR 产物 ,将扩增片段连接到 pGEM-TEasy 载体测序 ,测定了长度为 1415bp 的扩增序列。将所得序列在 GenBank 中进行

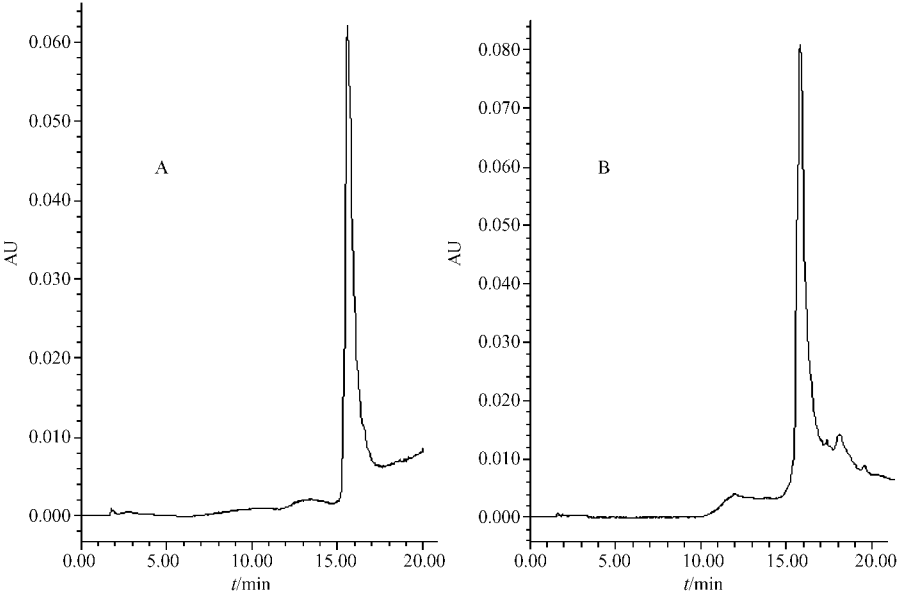


图5 产物的 HPLC 分析结果

Fig.5 High-performance liquid chromatography of product. A : PQQ standard ; B : product.

BLAST 分析 ,对与该序列同源性在 95 % 以上的 12 株模式菌构建了系统发育树(图 3)。从图中看到 MP606 与食甲基菌属的两株菌(*Methylovorus mays* C 和 *Methylovorus glucosetrophus* 6B1)16S rDNA 同源性高达 99 %。

2.5 产物的制备

将 MP606 接种至富集培养基 ,30℃ 振荡培养 5d 培养物 10℃ 8000 r/min 离心 10min ,上清液经弱碱性阴离子交换层析柱 Amberlyst A21 吸附 ,以 20mmol/L 的 Tris-HCl(pH 8.0)缓冲溶液平衡 ,再以 1mol/L NaCl 进行梯度洗脱。收集的洗脱成分再以 Seppak C18 反向层析柱吸附 ,以甲醇洗脱 ,洗脱液浓缩后使其自然结晶 ,结果浓缩液中长出产物的针状晶体(图 4)。



图4 产物的针状结晶(100 ×)

Fig.4 The crystal of the product(100 ×).

2.6 产物的分析

将获得的产物晶体重新溶解 ,进行 HPLC 分析 ,样品色谱峰的保留时间与标准品相同(图 5)。同时

以光二极管阵列检测器(PDAD)分析色谱峰220~400nm之间的吸收光谱,结果显示二者特征吸收曲

线几乎完全一致(图6),并具有PQQ的典型光谱特征^[11]。

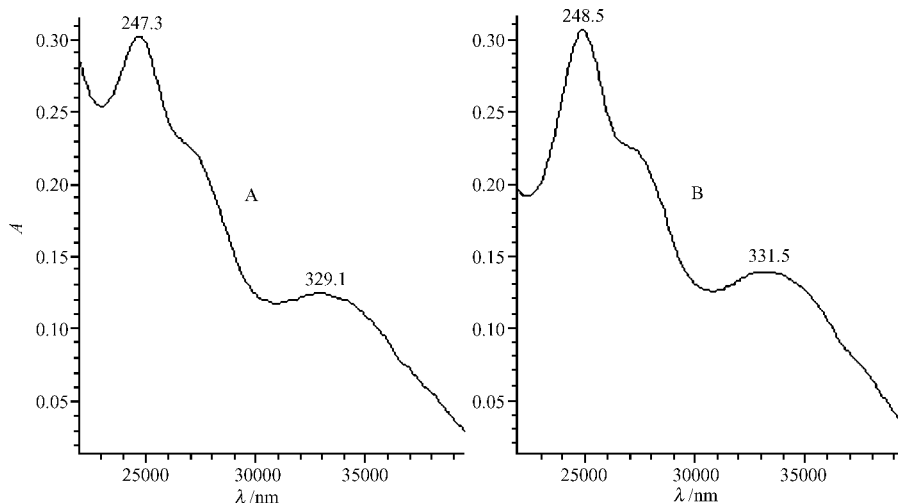


图6 产物的吸收光谱

Fig.6 Absorption spectra of product. A: PQQ standard; B: product.

3 讨论

本研究从大量样品中筛选到一株产量高达113mg/L的PQQ产生菌,这一结果是野生菌未经诱变选育且未进行发酵条件优化而得到的。一般情况下,野生菌的PQQ产量多为2~3mg/L左右^[17],有报道称以发酵罐培养生丝微菌,并对培养条件进行了优化,产量只有26.63mg/L^[18]。另外,PQQ的产量受培养条件的影响很大^[7,17],如某些微量元素和甲醇的含量等对PQQ生物合成具有显著影响。可以期望,发酵条件经适当条件优化该菌的PQQ产量应有一定程度的提高。同时也可能利用基因工程技术对野生菌进行改造,使PQQ产量得到进一步提高。

PQQ的分析主要有HPLC法、重组酶活性检测法和非酶系统氧化还原法。HPLC法定量比较准确,但仪器设备要求高,测定耗时长,不适用大量样品的分析,且在培养基的杂质与PQQ成分分离不好时也会影响分析结果。非酶系统氧化还原法是基于其氧化还原性质,但PQQ的氧化还原性较弱,易受到其它氧化、还原因素干扰。重组酶法是常用的一种PQQ的分析方法,该方法是建立在PQQ作为醌酶的辅酶这一本质特征基础上,因而结果比较可靠,可以用于定量及定性分析。但重组酶法需要获得适当的脱辅基醌酶蛋白,涉及基因克隆、表达和酶的纯化等一系列工作。另外需要对酶进行适当保藏,尽量保证脱辅基醌酶蛋白的稳定,即使如此也需在每次分析时用标准品进行标定。尽管如此重组酶法仍不失

为一种首选的方法。以PQQ为辅酶的醌酶有多种,包括乙醇脱氢酶、甲醇脱氢酶、葡萄糖脱氢酶等。*E. coli*的GDH比较适合于PQQ的重组酶法分析,有关该酶的性质和特点研究得比较清楚,用大肠杆菌表达系统表达得到的酶为脱辅基蛋白,在高效表达时呈可溶状态。值得注意的是,并非所有醌酶都适合于这种酶法分析,因为有些醌酶可能并不是仅以PQQ为辅酶。

MP606的16S rDNA序列分析结果显示,该菌与噬甲基菌属最为接近,属于甲基营养类细菌。甲基营养菌并不是一个系统分类名称,一般指利用甲基化合物(如甲醇、甲基胺、三甲胺等)为主要碳源的一类细菌的统称,包括甲基菌属、甲基杆菌属、噬甲基菌属、食甲基菌属等。PQQ高产菌多为甲基营养菌,代谢甲基化合物的酶(甲醇脱氢酶、甲胺脱氢酶等)为依赖PQQ的醌酶。对MP606菌的分类位置进行系统鉴定尚待进行。

参 考 文 献

- [1] Duine JA, Vander Neer RA, Groen BW. The cofactor pyrroloquinoline quinone. *Annu Rev Nutr* 1990; **10**: 297-318.
- [2] Duine JA. The PQQ Story. *J Biosci Bioeng*, 1999, **88**(3): 231-236.
- [3] Matsushita M, Toyama H, Yamada M, et al. Quinoproteins: structure, function and biotechnological. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2002; **58**: 13-22.
- [4] Smidt CR, Steinberg FM, Rucker RB. Physiologic importance of pyrroloquinoline quinone. *Pro Soc Exp Biol Med*, 1991, **197**(1): 19

- [5] Stites TE , Mitchell AE , Rucker RB. Physiological importance of quinoenzymes and the o-quinone family of cofactors. *J Nutr* ,2000 , **130**(4) : 719 – 727 .
- [6] Stites T , Storms D , Bauerly K , *et al.* Pyrroloquinoline quinone modulates mitochondrial quantity and function in mice. *J Nutr* , 2006 , **136** : 390 – 396 .
- [7] Teizi Urakami , Kazuya Yashima , Hisao Kobayashi , *et al.* Production of pyrroloquinoline quinone by using methanol -utilizing bacteria. *Appl Environ Microbiol* ,1992 **58** (12) : 3970 – 3976 .
- [8] Klinman JP , David Mu. Quinoenzymes in biology. *Annu Rev Biochem* ,1994 **63** : 299 – 344 .
- [9] McIntire WS. Quinoproteins. *FASEB J* ,1994 **8** : 513 – 521 .
- [10] Anthony C. Pyrroloquinoline quinone (PQQ) and quinoprotein enzymes. *Antioxid Redox Signal* 2001 **3** (3) : 757 – 774 .
- [11] Rinaldi AC , Rescigno A , Rinaldi A , *et al.* Modeling novel quincofactors : an overview. *Bioorganic chemistry* ,1999 **27** : 253 – 288 .
- [12] Sambrook J , Russell DW. 分子克隆实验指南. 黄培堂等译. 第三版. 北京 : 科学出版社 ,2002 .
- [13] Dully JR , Grieve PA. A simple technique for eliminating interference by detergents in the lowry method of protein determination. *Anal biochem* ,1975 **64** : 136 – 141 .
- [14] Yamada M , Asaoka S , Saier MH , *et al.* Characterization of the *gcd* gene from *Escherichia coli* K-12 W3110 and regulation of expression. *J Bacteriol* ,1993 **175** (2) : 568 – 571 .
- [15] Cleton-Jansen AM , Goosen N , Fayet O , *et al.* Cloning , mapping and sequencing of the gene encoding *Escherichia coli* quinoprotein glucose dehydrogenase. *J Bacteriol* ,1990 **172** (11) : 6308 – 6315 .
- [16] Cozier GE , Anthony C. Structure of the quinoprotein glucose dehydrogenase of *Escherichia coli* modelled on that of methanol dehydrogenase from *Methylobacterium extorquens*. *J Biochem* ,1995 , **312** : 679 – 685 .
- [17] van Kleef MAG , Duine JA. Factors relevant in bacterial pyrroloquinoline quinone production. *Appl Environ Microbiol* ,1989 , **55** (5) : 1209 – 1213 .

Establishment of the screening method and isolation of PQQ producing strains

WANG Xin^{1,2,3} , WANG Jian-hua¹ , LIU Dang-sheng² , ZHANG Wei-cai^{1*}

(¹ Beijing Institute of Biotechnology , Beijing 100071 , China)

(² Institute of Life Sciences and Biological pharmacy , Shenyang Pharmaceutical University , Shenyang 110016 , China)

(³ Institute of Life Sciences , Heilongjiang University , Harbin 150080 , China)

Abstract Pyrroloquinoline quinone (PQQ) is a cofactor of some oxido-reductases with many important physiological effects and potential pharmaceutical applications. The glucose dehydrogenase of *Escherichia coli* , being a candidate for enzymic detection of PQQ , is known to be a quinoprotein which is obligately dependant on PQQ as cofactor. The *gdh* gene of *E. coli* was amplified and cloned into plasmid pET28a. The recombinant GDH was overexpressed in soluble form in *E. coli* BL21(DE3). A bioassay method was established for determination of PQQ by the purified GDH. A screening model was set up for the enrichment of methylotrophic bacteria. Together with the above bioassay method , over 2000 soil samples were screened for the isolation of high-yielding PQQ producing strains. A methylotrophic strain , named MP606 , was thus isolated. The PQQ production of MP606 is determined to be 113mg/L without conditional optimization and genetic breeding. The PQQ crystal was obtained from the culture supernatant which has been identified by HPLC , absorption spectra assay , and enzymatic analysis. The 16S rDNA of MP606 was amplified and sequenced. According to the comparison of 16S rDNA sequences , overall similarity value between strain MP606 and 12 typical methylotrophic bacteria is above 95% . The highest value is with two strains of *Methylovorus* , which reached at 99% .

Keywords : Pyrroloquinoline quinone ; glucose dehydrogenase ; enzymic analysis ; screening ; 16S rDNA

Foundation items : National Natural Science Foundation of China(30470058) ; National Programs for High Technology Research and Development of China (2006AA020303) .

* Corresponding author. Tel : 86-10-66948826 ; E-mail : drzhangwc@163.com

Received : 20 April 2007 / Accepted : 8 May 2007 / Revised : 18 June 2007 © 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>