

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
50(8):1104-1108; 4 August 2010
ISSN 0001-6209; CN 11-1995/Q
<http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>

利用山梨糖脱氢酶活性筛选氧化葡萄糖杆菌 PQQ 合成基因簇

高书颖^{1,2#}, 熊向华^{1#}, 汪建华¹, 张惟材^{1*}

(¹ 军事医学科学院生物工程研究所, 北京 100071)

(² 汕头大学医学院, 汕头 515041)

摘要:【目的】利用山梨糖脱氢酶活性从氧化葡萄糖杆菌 H24 中分离 PQQ 生物合成基因簇。【方法】利用 *ptsG* 位点整合 *sdh* 基因的大肠杆菌 JM109 作为宿主菌构建了氧化葡萄糖杆菌 H24 的基因组 DNA 文库。通过山梨糖脱氢酶活性检测, 从文库中筛选具有 PQQ 合成能力的单菌落并进行亚克隆。【结果】从氧化葡萄糖杆菌 H24 的基因组文库中筛选得到一株具有山梨糖脱氢酶活性的单菌落, 亚克隆后序列分析显示插入片段全长 5400 bp, 对应 5 个编码框 (*pqqABCDE*), 与其他细菌 PQQ 生物合成基因簇有很高的序列同源性。【结论】利用山梨糖脱氢酶活性成功从氧化葡萄糖杆菌 H24 中分离克隆得到了 PQQ 生物合成基因簇 *pqqABCDE*。

关键词: 山梨糖脱氢酶; 吡咯喹啉醌; 氧化葡萄糖杆菌 H24; 基因簇

中图分类号: Q933 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2010) 08-05-1104

吡咯喹啉醌 (pyrroloquinoline quinone, PQQ) 是 20 世纪 70 年代末发现的一种氧化还原酶的辅酶, 以 PQQ 及其结构类似物为辅酶的氧化还原酶统称为醌酶^[1]。PQQ 广泛分布于革兰氏阴性菌中, 其生物合成涉及到 4-7 个基因, 这些基因一般都成簇排列^[2-7]。氧化葡萄糖杆菌是一种专性需氧的革兰氏阴性细菌, 能够合成不完全氧化产物醇、糖和酸, 因而广泛应用于工业生产中。在维生素 C 工业制备中, 氧化葡萄糖杆菌 H24 (*Gluconobacter oxydans* H24) 用于山梨糖的生产。我们实验室发现氧化葡萄糖杆菌 H24 能够合成 PQQ, 因而推测其基因组内部含有 PQQ 生物合成基因。山梨糖脱氢酶基因 (*sorbose dehydrogenase*, *sdh*) 是我们实验室最早从酮古龙酸菌 SCB329 中分离得到的一种醌酶^[8]。我们将 *sdh* 基因整合到大肠杆菌 JM109 的 *ptsG* 位点, 构建了重组菌株 JM109s, 以它为宿主菌构建了氧化葡萄糖杆菌 H24 的基因组 DNA 文库, 利用脱辅基山梨糖脱氢酶

结合 PQQ 形成全酶后能恢复醌酶活性的原理, 通过活性电泳筛选文库中能够合成 PQQ 的单克隆。最终我们筛选到一株阳性克隆并分离得到了氧化葡萄糖杆菌 H24 的 PQQ 合成基因簇。

1 材料和方法

1.1 实验材料

JM109s (JM109, Tn5 (Cm^r) *ptsG::sdh*) 为本室构建。氧化葡萄糖杆菌 H24、黏粒 pKC505、pUC18 为本室保存。纯化的山梨糖脱氢酶为本室冻干保存, λ 噬菌体包装蛋白为 Promega 公司产品。限制性内切酶 *Sau3A* I、*Hpa* I、*BamH* I、碱性磷酸酶 CIAP、T4 DNA 连接酶等为宝生物工程 (大连) 有限公司产品。

1.2 培养基和培养条件

氧化葡萄糖杆菌 H24 于 50 μg/mL 红霉素的 YBY 培养基 (0.7% 酵母粉, 1.0% D-山梨醇, 0.3% 碳酸

基金项目: 国家“863 计划” (2006AA020303); 国家科技支撑计划项目 (2007BAI46B01)

* 通信作者。Tel: +86-10-66948857; E-mail: zhangweicai@hotmail.net

作者简介: #并列第一作者。高书颖 (1970-), 女, 河南唐河人, 博士, E-mail: shuyinggao@163.com; 熊向华 (1977-), 男, 博士, E-mail: xiongxianghua@hotmail.com

收稿日期: 2010-03-15; 修回日期: 2010-05-05

钙, pH 5.0) 中 30℃ 培养, 大肠杆菌 JM109s 于 34 μg/mL 氯霉素的 LB 培养基 (0.5% 酵母粉, 1.0% 蛋白胨和 1.0% 氯化钠) 中 37℃ 培养。

1.3 PQQ 的提取

氧化葡萄糖杆菌 H24 在 YBY 培养基中 37℃ 培养 36 h。100 mL 培养液 4℃、8000 × g 离心 10 min。取离心上清, 加入 1 mol/L 盐酸 100 mL、巯基乙醇 1 mL、10% 铁氰化钾溶液 2.5 mL 混合, 再加入 n-丁醇 40 mL 剧烈摇晃后 4℃、8000 × g 离心 10 min (YBY 培养液作为空白对照)。小心吸取有机溶剂层到另一离心管, 加入 1 mL 蒸馏水、1 mL 嘧啶、0.1 g 氯化钠。剧烈摇晃后再次离心, 水层 (下层) 为 PQQ 提取物, 吸出备用。

1.4 SDH 活性电泳

从培养 24 h 的双抗 LB 平板上挑取大肠杆菌 JM109s 转化子到 LB 液体培养基中 37℃、200 r/min 培养到对数生长晚期, 4℃、4000 × g 离心 5 min 收集菌体。菌体细胞用蒸馏水清洗 2 遍, 用 50 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0) 重悬 (1 g 湿重/10 mL) 后超声裂解。4℃、12000 × g 离心 10 min 后上清进行 SDH 活性电泳。电泳后剥取下层胶在含有 PMS、NBT 和山梨糖的 TMB 溶液 (25 mmol/L, pH 8.0) 中染色 10 min。紫黑色条带显示 SDH 结合 PQQ 后具有山梨糖脱氢酶活性。

1.5 基因文库构建、筛选与亚克隆

氧化葡萄糖杆菌 H24 的基因组 DNA 采用 CTAB/NaCl 法提取, 经 *Sau3A* I 部分酶切后回收约 30 kb 大小片段, 与经 *Bam*H I、*Hpa* I 酶切、CIAP 去磷酸化处理后回收的 pKC505 黏粒载体连接。连接产物用 λ 噬菌体包装蛋白进行体外包装后转染 JM109s 感受态, 在双抗 (50 mg/L 安普霉素和 34 mg/L 氯霉素) LB 平板上培养。挑取转化子在 LB 液体双抗培养基中培养, 通过 SDH 活性电泳筛选得到阳性克隆。提取阳性克隆的质粒经 *Eco*R I 酶切, 回收后与同样经 *Eco*R I 酶切并去磷酸化处理的 pUC18 质粒连接, 连接产物转化 JM109s 感受态, 构建亚克隆文库。亚克隆文库转化子再次经 SDH 活性电泳筛选, 阳性菌株送奥科公司进行测序。

1.6 序列分析软件

蛋白和核酸序列的比对采用 DNAMAN 软件。基因的预测使用软件 GeneMark (GeneMark. hmm prokaryotic, 版本 2.6r)。启动子的分析使用 BPROM 软件 (细菌 sigma70 启动子识别程序, <http://www.softberry.com/berry.phtml>)。终止序列

和茎环结构的分析使用 FindTerm 软件 (<http://www.softberry.com/berry.phtml>)。

2 结果

2.1 从氧化葡萄糖杆菌 H24 中提取得到 PQQ

如图 1 所示, 氧化葡萄糖杆菌 H24 培养上清提取物和纯化的 SDH 结合后能够检测到山梨糖脱氢酶活性, 说明氧化葡萄糖杆菌 H24 能够合成 PQQ, 基因组内部具有 PQQ 生物合成基因。

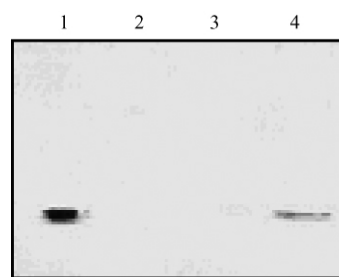


图 1 SDH 活性染色检测氧化葡萄糖杆菌 H24 培养上清提取物中的 PQQ

Fig. 1 PQQ detection of *Gluconobacter oxydans* H24 culture supernatant by SDH active staining. 1. SDH + PQQ; 2. SDH; 3. SDH + extraction of YBY culture; 4. SDH + extraction of H24 culture supernatant.

2.2 大肠杆菌 JM109s 的 SDH 活性电泳检测

如图 2 所示, 大肠杆菌 JM109s 裂解液在加入 PQQ 的条件下活性电泳检测呈阳性, 说明大肠杆菌 JM109s 能够正常表达 *sdh* 基因, 也说明大肠杆菌 JM109s 能够作为宿主菌构建基因组文库从而筛选 PQQ 合成基因。

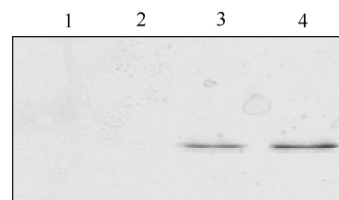


图 2 SDH 活性电泳检测 JM109s 中 *sdh* 基因的表达

Fig. 2 Detection of *sdh* gene expression in JM109s by SDH active staining. 1. JM109; 2. JM109s; 3-4. JM109s + PQQ.

2.3 氧化葡萄糖杆菌 H24 基因组文库阳性克隆的分离

通过 SDH 活性染色的方法对氧化葡萄糖杆菌 H24 基因组文库进行筛选, 从 4000 余个转化子筛选到一个阳性克隆。提取质粒进行亚克隆, 从亚克隆文库中筛选到 95 号 SDH 活性染色呈阳性 (图 3)。

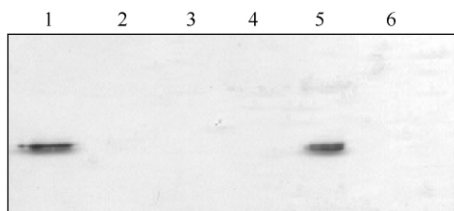


图3 亚克隆文库的SDH活性电泳筛选

Fig. 3 Screen of subclone library by SDH active staining. 1. SDH + PQQ; 2 - 6. transformants 92-97.

2.4 氧化葡萄糖杆菌 H24 PQQ 基因簇的的测序与分析

亚克隆 95 号阳性菌落质粒插入序列已递交 NCBI (序列号 FJ769772)。如图 4 所示,以氧化葡萄糖杆菌 621H (基因组序列号 NC006677) 为参照,经 GeneMark 软件分析发现在 5400 bp 长的插入序列上有 5 个开放阅读框 (open reading frame, ORF)。

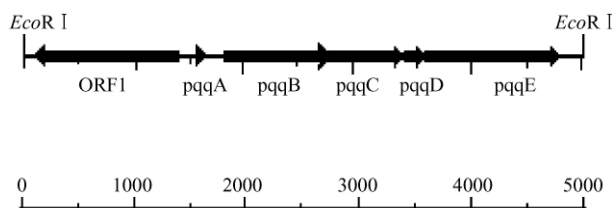


图4 95号亚克隆插入序列假定编码框的分析

Fig. 4 Analysis of the putative coding regions in the inserted fragment of subclone 95.

第一个 ORF 编码方向与其他 4 个 ORF 相反, BLAST 比对结果显示与氧化葡萄糖杆菌 621H 中的一个假想跨膜蛋白同源。其他 4 个 ORF 显示与已知的 PQQ 生物合成基因有很高的同源性,因而将之命名为 *pqqBCDE* (表 1)。这 4 个 ORF 编码方向相同,编码序列相邻,上游 ORF 的终止密码子 TGA 与下游 ORF 的起始密码 ATG 子相重叠,组成一个操纵子 (operon)。每一个 ORF 编码序列的上游都有一个潜在的核糖体结合位点。在 *pqqBCDE* 操纵子的上游发现一个 26 个密码子组成的 ORF, 此 ORF 编码的蛋白与氧化葡萄糖杆菌 621H *pqqA* 基因编码蛋白序列完全相同 (表 1)。

如图 5 所示, BPROM 软件分析发现在氧化葡萄糖杆菌 H24 的 *pqqA* 基因上游有一个假定的核糖体结合位点和一个潜在的强启动子 (启动子预测得分 2.90), 在 *pqqB* 基因上游没有发现类似启动子的序列; FindTerm 软件分析发现在 *pqqA* 基因终止密码子的下游有一个潜在的 *rho*-independent 细菌终止子序列, 在两个茎环结构后面有 4 个连续的碱基 U (最小自由能 = -7.9 和 -22.6 kcal/mol)。氧化葡萄糖杆

表 1 氧化葡萄糖杆菌 H24 Pqq 蛋白的同源分析

Table 1 Homologous analysis of *Gluconobacter oxydans*

H24 Pqq protein			
Acc num (GI)	Protein, organism	Length /Aa	Identities /%
	PqqA, <i>Gluconobacter oxydans</i> H24	26	
58039451	PqqA, <i>Gluconobacter oxydans</i> 621H	26	100
7362943	PqqA, <i>Gluconobacter oxydans</i> ATCC 9937	26	100
27381846	PqqA, <i>Bradyrhizobium japonicum</i> USDA 110	30	53
240008369	PqqA, <i>Methylobacterium extorquens</i> AM1	30	42
58039450	PqqB, <i>Gluconobacter oxydans</i> H24	304	
	PqqB, <i>Gluconobacter oxydans</i> 621H	304	83
7362944	PqqB, <i>Gluconobacter oxydans</i> ATCC 9937	304	82
27381847	PqqB, <i>Bradyrhizobium japonicum</i> USDA 110	309	48
240008368	PqqB, <i>Methylobacterium extorquens</i> AM1	300	47
43906	PqqB, <i>Klebsiella pneumoniae</i>	308	40
30841332	PqqB, <i>Enterobacter intermedius</i>	307	37
38742	V protein, <i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	303	34
	PqqC, <i>Gluconobacter oxydans</i> H24	239	
58039449	PqqC, <i>Gluconobacter oxydans</i> 621H	239	93
7362945	PqqC, <i>Gluconobacter oxydans</i> ATCC 9937	239	92
240008367	PqqC/D, <i>Methylobacterium extorquens</i> AM1	372	66
27381848	PqqC, <i>Bradyrhizobium japonicum</i> USDA 110	259	62
30841333	PqqC, <i>Enterobacter intermedius</i>	251	46
50085585	PqqC, <i>Acinetobacter oxydans</i> ADPI	255	44
43907	PqqC, <i>Klebsiella pneumoniae</i>	251	45
	PqqD, <i>Gluconobacter oxydans</i> H24	91	
58039448	PqqD, <i>Gluconobacter oxydans</i> 621H	96	65
7362946	PqqD, <i>Gluconobacter oxydans</i> ATCC 9937	96	65
27381849	PqqD, <i>Bradyrhizobium japonicum</i> USDA 110	103	39
240008367	PqqC/D, <i>Methylobacterium extorquens</i> AM1	263	38
43908	pqqD, <i>Klebsiella pneumoniae</i>	92	35
30841334	PqqD, <i>Enterobacter intermedius</i>	92	32
50085586	PqqD, <i>Acinetobacter oxydans</i> ADPI	99	32
	PqqE, <i>Gluconobacter oxydans</i> H24	355	
58039447	PqqE, <i>Gluconobacter oxydans</i> 621H	358	83
7362947	PqqE, <i>Gluconobacter oxydans</i> ATCC 9937	359	82
240008366	PqqE, <i>Methylobacterium extorquens</i> AM1	384	57
27381850	PqqE, <i>Bradyrhizobium japonicum</i> USDA 110	399	57
809708	PqqE, <i>Klebsiella pneumoniae</i>	380	52
38745	III protein, <i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	384	50
30841335	PqqE, <i>Enterobacter intermedius</i>	374	46

菌 H24 的 *pqqABCDE* 基因簇的基因排列方式与氧化葡萄糖杆菌 621H 以及氧化葡萄糖杆菌 ATCC9937 (序列号 AJ277117) 相似, *pqqBCDE* 紧紧排列在带有自身启动子的 *pqqA* 基因后面, *pqqA-pqqB* 基因之间缺少启动子序列^[6, 7]。这意味着 *pqqA* 启动子是氧化葡萄糖杆菌 H24 *pqqABCDE* 基因簇唯一的启动子, *pqqBCDE* 基因和 *pqqA* 共转录。 *pqqA* 基因编码蛋白

的功能是作为 PQQ 合成的前体, 需要更高水平的表达, 其他基因编码蛋白作为生物合成酶类发挥作用。 *pqqA* 终止密码子下游的茎环结构弱化了 *pqqBCDE* 的表达, 使得 *pqqA* 和 *pqqBCDE* 的表达水平与各自功能角色相适应。但是也不能排除 *pqqA-pqqB* 基因之间存在未知启动子的可能性, 因为前面的结论是通过生物信息学工具预测得到的结果。



图5 *pqq* 基因簇序列假定调控元件

Fig. 5 Map of *pqq* gene cluster showing the putative regulatory elements. The putative -35 and -10 regions were bold and italicized. The ribosome binding site (RBS) sequences were italicized and underlined. Shadow sequences correspond to *pqqA* and *pqqB*. Stem-loop shows in bold. Consecutive T bases show in italic.

3 讨论

PQQ 合成基因簇常用的筛选方法是利用葡萄糖脱氢酶的醌酶活性, 其原理是脱辅基的葡萄糖脱氢酶结合 PQQ 后呈现醌酶活性, 能将葡萄糖转变成葡萄糖酸, 葡萄糖酸能溶解不溶的磷酸盐, 因而在含有不溶的磷酸盐的平板上呈现溶圈现象^[9]。这种策略存在一定的缺陷, 对于有的细菌并不适用, 因为某些细菌中能以葡萄糖作为底物催化生成葡萄糖酸的酶不仅一种, 这些酶也不都是以 PQQ 为辅酶的醌酶, 而且也不只是葡萄糖酸才能溶解不溶的磷酸盐, 因而容易出现假阴性; 另外在平板上溶圈容易相互交叉, 因而需要控制每块平板上生长的菌落个数。而山梨糖脱氢酶是严格依赖 PQQ 的醌酶, 只有与辅酶 PQQ 结合才具有醌酶活性。大肠杆菌自身不能合成 PQQ 或 SDH, *sdh* 基因整合到大肠杆菌染色体

上的整合子能够稳定表达 SDH, 因而可以用来筛选其它物种的 PQQ 合成基因。我们的研究结果显示通过大肠杆菌 *sdh* 基因整合子来筛选 PQQ 合成基因是一种有效的方法。相对于常用的葡萄糖脱氢酶, 利用山梨糖脱氢酶的醌酶活性来筛选 PQQ 合成基因簇的方法特异性更高, 筛选更为简便。

本研究我们筛选到能在大肠杆菌中合成 PQQ 需要的氧化葡萄糖杆菌 H24 基因数量为 5 个 (*pqqABCDE*), 同样是在大肠杆菌中合成 PQQ, 有的细菌如肺炎克雷伯氏菌 (*Klebsiella pneumoniae*) 的必需基因是 6 个 (*pqqABCDEF*)^[3], 扭脱甲基营养菌 AM1 (*Methylobacterium extorquens* AM1) 是 7 个 (*pqqABCDEFG*)^[5]。我们推测 *pqqF* 和 *pqqG* 能在大肠杆菌中找到同源的基因, 这些基因根据同源程度能够代替某些其他细菌 *pqqF* 和 *pqqG* 的功能, 辅助完成 PQQ 在大肠杆菌中的生物合成。

参考文献

- [1] Flores-Encarnación M, Sánchez - Cuevas M, Ortiz-Gutiérrez F. The PQQ-dehydrogenase. A novel example of bacterial quinoproteins. *Revista Latinoamericana de Microbiología*, 2004, 46(1-2):47-59.
- [2] Goosen N, Horsman HPA, Huinen RGM, Putte PVD. *Acinetobacter calcoaceticus* genes involved in biosynthesis of the coenzyme pyrroloquinoline quinone: nucleotide sequence and expression in *Escherichiacoli* K-12. *Journal of Bacteriology*, 1989, 171(1): 447 - 455.
- [3] Meulenber JJ, Sellink E, Riegman NH, Postma PW. Nucleotide sequence and structure of the *Klebsiella pneumoniae* *pqq* operon. *Molecular General Genetics*, 1992, 232:284-294.
- [4] Schnider U, Keel C, Voisard C, Defago G, Haas D. Tn5-directed cloning of *pqq* genes from *Pseudomonas fluorescens* CHA0: Mutational inactivation of the genes results in overproduction of the antibiotic pyoluteorin. *Applied and Environment Microbiology*, 1995, 61(11): 3856-3864.
- [5] Morris CJ, Biville F, Turlin E, Lee E, Ellermann K, Fan WH, Ramamoorthi R, Springer AL, Lidstrom ME. Isolation, phenotypic characterization and complementation analysis of mutants in *Methylobacterium extorquens* AM1 unable to synthesize pyrroloquinoline quinone and sequence of *pqqD*, *pqqG*, and *pqqC*. *Journal of Bacteriology*, 1994, 176(6): 1746-1755.
- [6] Marius F, Arun G, Verma V, Kumar A, Qazi GN, Cullum J. The pyrroloquinoline quinone synthesis genes of *Gluconobacter oxydans*. *FEMS Microbiology Letters*, 2000, 193(2): 231-236.
- [7] Tina H, Görisch H. Knockout and overexpression of pyrroloquinone quinone biosynthesis genes in *Gluconobacter oxydans* 621H. *Journal of Bacteriology*, 2006, 188(21):7668-76776.
- [8] Zhang WC, Wang JH, Yuan HJ, Xie L. A novel L-sorbose dehydrogenase gene and the coding protein. China Patent, CN03102060.7(2003).
- [9] Chul Hong Kim, Song Hee Han, Kil Yong Kim, Baik Ho Cho, Yong Hwan Kim, Bon Sung Koo, Young Cheol Kim. Cloning and Expression of Pyrroloquinoline Quinone (PQQ) Genes from a Phosphate-Solubilizing Bacterium *Enterobacter intermedium*. *Current microbiology*, 2003, 47: 457-461.

Isolation *pqq* biosynthesis gene cluster from *Gluconobacter oxydans* based on sorbose-dehydrogenase activity

Shuying Gao^{1 2#}, Xionghua Xiong^{1#}, Jianhua Wang¹, Weicai Zhang^{1*}

(¹Beijing Institute of Biotechnology, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100071, China)

(²College of Medicine, Shantou University, Shantou 515041, China)

Abstract: [**Objective**] To isolate PQQ biosynthesis gene cluster from *Gluconobacter oxydans* H24 based on sorbose-dehydrogenase activity. [**Methods**] A library of *Gluconobacter oxydans* H24 genomic DNA was constructed with host strains *Escherichia coli* JM109s, which was integrated of *sdh* gene at the *ptsG* site on the chromosome of JM109. By detecting sorbose-dehydrogenase activity, clone of PQQ biosynthesis was isolated and subcloned. [**Results**] A positive clone was isolated from *Gluconobacter oxydans* H24 genomic DNA library. Within the 5,400-base-pair DNA fragment five reading frames are presented, corresponding to five of the *pqq* genes (*pqqABCDE*). The nucleotide and amino acid sequence showed highly homology to *pqq* genes of other bacteria. [**Conclusion**] The *pqqABCDE* gene cluster was successfully isolated from *Gluconobacter oxydans* H24 by sorbose dehydrogenase activity.

Keywords: sorbose dehydrogenase; pyrroloquinoline quinone; *Gluconobacter oxydans* H24; gene cluster

(本文责编:张晓丽)

Supported by the National Programs for High Technology Research and Development of China (2006AA020303) and the National Key Technology Research and Development Program (2007BAI46B01)

* Corresponding author. Tel: +86-10-66948857; E-mail: zhangweicai@hotmail.com

These authors contributed equally to this work.

Received:15 March 2010/Revised:5 May 2010