

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
50(10):1380-1384; 4 October 2010
ISSN 0001-6209; CN 11-1995/Q
<http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>

大肠杆菌 *pqqL* 基因敲除与功能分析

熊向华[#], 杨璐[#], 韩晓东, 汪建华, 张惟材^{*}

(军事医学科学院生物工程研究所, 北京 100071)

摘要:【目的】通过构建大肠杆菌 *pqqL* 基因缺陷突变株, 研究大肠杆菌 *pqqL* 基因的功能。【方法】首先通过 PCR 扩增得到 *pqqL* 基因和 *kan* 抗性基因, 在体外构建线性打靶片段 *pqqL-kan-pqqL*。然后通过 Red 同源重组敲除大肠杆菌的 *pqqL* 基因, 构建大肠杆菌缺失突变体 DH5 α Δ *pqqL*。在此基础上通过 DCIP 法检测山梨糖脱氢酶活性来比较大肠杆菌突变株与亲本株中 PQQ 合成的情况。【结果】成功敲除了大肠杆菌的 *pqqL* 基因, DCIP 法检测结果显示大肠杆菌 pBCP162/DH5 α Δ *pqqL* 和 pMD19T Simple-*pqqABCDE*/DH5 α 能够合成 PQQ, 而大肠杆菌 pMD19T Simple-*pqqABCDE*/DH5 α Δ *pqqL* 不能合成 PQQ。【结论】大肠杆菌 *pqqL* 基因和 *pqqF* 基因具有同样的功能。

关键词: 吡咯喹啉醌; Red 同源重组; 基因敲除

中图分类号: **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2010)10-1380-05

吡咯喹啉醌 (Pyrroloquinoline quinone, PQQ) 是一种较新近发现的不同于吡啶核苷酸和黄素辅酶的氧化还原酶的第三类辅酶, 具有刺激某些微生物和动植物生长、防治肝损伤、促进神经生长因子生成、调节体内自由基水平和调节免疫等功能, 可能用于阿尔茨海默氏症、心血管疾病和糖尿病等疾病的防治, 显示了良好的药用前景^[1-4]。

目前已知能够进行 PQQ 从头合成的生物均为革兰氏阴性细菌, 其中甲基营养菌的 PQQ 产量一般较高^[5]。已分离得到一些微生物的 PQQ 合成相关基因, 其生物合成基因往往以基因簇的形式存在, 不同来源的 *pqq* 基因数目不同, 一般在 4-7 个之间^[6-8]。以 PQQ 为辅酶的氧化还原酶称为醌酶, 严格依赖 PQQ 的醌酶可以用于 PQQ 的检测。普通酮古龙酸菌的山梨糖脱氢酶 (SDH) 和大肠杆菌的葡萄糖脱氢酶 (GDH) 都是严格依赖 PQQ 的醌酶。

大肠杆菌自身虽不能合成 PQQ^[9], 但将含有外源 PQQ 合成基因的质粒导入大肠杆菌能够在大肠杆菌中指导 PQQ 合成。目前已知的 PQQ 合成基因的功能尚不足以构成完整的 PQQ 合成途径^[10], 而且大肠杆菌基因组内保留了醌酶 GDH 基因, 因而有人推测大肠杆菌中可能存在不完整的 PQQ 合成途径。Turpin 等发现将大肠杆菌自身的一段 7361 bp 的序列转入 *pqqE* 和 *pqqF* 缺陷的甲基营养菌, 可恢复甲基营养菌的 PQQ 合成, 氨基酸序列分析发现其中一个编码框 (*pqqL*) 编码蛋白序列与肺炎克雷伯氏菌的 *pqqF* 编码蛋白序列具有同源性, 说明大肠杆菌的 *pqqL* 基因可能与 PQQ 的生物合成有关^[11]。本研究采用 Red 重组技术构建了大肠杆菌 *pqqL* 基因缺陷突变株, 利用 DCIP 法研究了克雷伯氏肺炎球菌 *pqqABCDEF* 基因在大肠杆菌中指导 PQQ 合成情况, 结果显示大肠杆菌 *pqqL* 基因具有与 *pqqF* 基因相同

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.com

作者简介: [#]并列第一作者。熊向华 (1977-), 男, 湖南人, 博士, 研究方向为微生物代谢工程, E-mail: xionglianghua@sina.com; 杨璐 (1983-), 男, 山东人, 硕士, E-mail: yanglu1220@hotmail.com

收稿日期: 2010-04-09; **修回日期:** 2010-04-30

的功能。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒:质粒 pKD46(温敏型复制子, 含有受阿拉伯糖启动子调控的 *exo*、*bet*、*gam* 基因, Amp^r)由美国 Purdue 大学 Wanner 教授惠赠;质粒 pBCP162(Amp^r, 含有克雷伯氏菌 PQQ 合成基因 *pqqABCDE*)由荷兰阿姆斯特丹大学 Postma 教授惠赠;pUCK18(kan^r)由本室构建;pMD19T Simple 载体购自 TaKaRa 公司;大肠杆菌 DH5 α 由本室保存。

1.1.2 试剂和溶液:各种限制性内切酶、Ex Taq DNA 聚合酶、T4 DNA 连接酶、IPTG、X-gal 均购自 TaKaRa 公司;DNA 凝胶回收试剂盒购自北京天根生化科技有限公司;氨苄青霉素(Amp)、氯霉素(Cm)、卡那霉素(Kan)、DCIP、丙烯酰胺和甲叉双丙烯酰胺购自 Sigma 公司;PQQ 标准品为 Sigma 公司产品保存,PQQ 含量为 98%;L-阿拉伯糖为 Fluka 公司产品,蛋白胨和酵母粉为英国 Oxford 公司产品;过硫酸铵、TEMED、甘氨酸、PMS、NBT、TMB、RNase A 购自 Amresco 公司。

1.1.3 引物:根据大肠杆菌基因组序列,设计引物 P1 和 P2 用于扩增 *pqqL* 基因打靶片段;引物 P1 和 P3 用于鉴定 *pqqL* 突变株;引物 K4 和 K5 用于扩增 Kan 基因;引物 A6 和 E7 用于扩增 *pqqABCDE* 基因;本研究中所用引物和测序工作由北京奥科公司完成。

表 1 本研究中使用的引物

Table1 Primers used in this study

Primer	Sequence(5'→3')
P1	CCGGTTTTCGCATGGAG
P2	CAACGATGTGTTGACGG
P3	CTTGCGTGCTGGTAAGGT
K4	GAAGATCTACAAAGCCACGTT (<i>Bgl</i> II)
K5	AGCGCGCATATGAGTAAACTT (<i>Bss</i> H II)
A6	GTGAATTCGAGCTCGGTAC
E7	CCCAAGCTTCATTACAGGTCCCGGTTTG

1.2 线性打靶 *pqqL-kan-pqqL* 片段的制备

以大肠杆菌 DH5 α 基因组 DNA 为模板,P1 和 P2 为正反向引物 PCR 扩增 *pqqL* 基因,扩增产物连接到 pMD19T Simple 载体。构建载体 pMD19T Simple-*pqqL* 与以 pUCK18 质粒为模板,引物 K4 和 K5 扩增得到的 Kan 抗性基因同样经 *Bgl*II 和 *Bss*H II 双酶切后回收连接,构建得到 pMD19T Simple-*pqqL-kan-pqqL* 载体。以之为模板,P1 和 P2 为正反向引物 PCR 扩增,最终得到线性打靶 *pqqL-kan-pqqL*

片段。

1.3 大肠杆菌 *pqqL* 基因的敲除

大肠杆菌 *pqqL* 基因的敲除参考文献[11]。

1.4 pMD19T Simple-*pqqABCDE* 质粒的构建

根据 *K. pneumoniae pqq* 基因簇序列设计扩增引物 A6 和 E7,以 pBCP162 质粒为模板,用 Ex Taq 聚合酶扩增 *pqqABCDE* 基因序列。回收产物与载体 pMD19T Simple 连接,化学转化至 DH5 α ,涂于 LB (Amp 100 μ g/mL) 平板,37 $^{\circ}$ C 培养过夜,筛选阳性克隆,得到 pMD19T Simple-*pqqABCDE*/DH5 α 。

1.5 大肠杆菌 PQQ 合成的 DCIP 脱色法检测

按 1% 接菌量分别转接活化的大肠杆菌至 5 mL LB(加入相应抗生素)液体试管,37 $^{\circ}$ C、200 r/min 培养 6 h。吸取 1 mL 菌液至 1.5 mL EP 管,12396 \times g 离心 2 min,收集上清。取菌液上清 900 μ L,加入 50 μ L SDH 及 20 μ L MgSO₄ (100 mmol/L) 溶液混合均匀,室温放置 20 min。将样品与 SDH-MgSO₄ 混合溶液放置于比色杯中,加入 2 mL 检测反应溶液,分别以 PQQ 标准品、LB 培养基、ddH₂O 等为对照,30 $^{\circ}$ C 温箱温育反应 20 min。观察反应液颜色变化情况并照相。

2 结果

2.1 线性打靶基因片段 *pqqL-kan-pqqL* 的构建

以大肠杆菌 DH5 α 基因组 DNA 为模板,P1 和 P2 为正反向引物,PCR 扩增得到了 3013 bp 长的 *pqqL* 基因(图 1-A)。以质粒 pUCK18 为模板,K4 和 K5 为正反向引物,PCR 扩增得到了 1042 bp 的 Kan 抗性基因(图 1-B)。*pqqL* 基因与 pMD19T Simple 质粒连接构建得到 pMD19T-*pqqL* 载体,再与 Kan 抗性基因经 *Bgl*II 和 *Bss*H II 双酶切后连接得到 pMD19T Simple-*pqqL-kan-pqqL* 载体。以之为模板,P1 和 P2 为引物,PCR 扩增得到了 2210 bp 长的 *pqqL-kan-pqqL* 线性打靶基因片段(图 1-C 和图 2)。

2.2 大肠杆菌 *pqqL* 基因的敲除

以经抗性筛选得到的没有 Amp 抗性而有 Kan 抗性的转化子为模板,以正常大肠杆菌 DH5 α 为对照,经引物 P1 和 P3 扩增进行 PCR 鉴定。大肠杆菌 *pqqL* 基因缺陷株 PCR 产物大小为 2210 bp,比 3013 bp 的正常大肠杆菌 DH5 α 扩增产物小 1000 bp 左右,与预期结果相符(图 3)。大肠杆菌 *pqqL* 基因缺陷株 PCR 产物连接 pMD19T Simple 质粒后经酶切鉴定后送测序,分析结果表明其与打靶片段序列完全一致,证明大肠杆菌 *pqqL* 基因已经成功敲除。

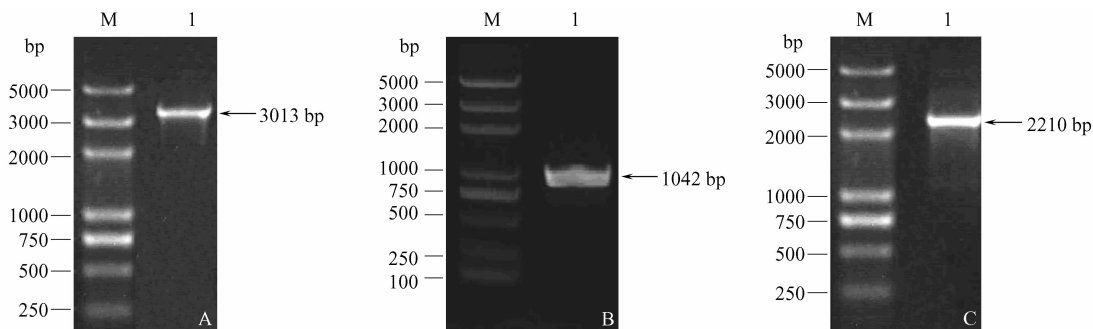


图1 基因的PCR扩增(A: *pqqL* 基因; B: *Kan* 基因; C: *pqqL-kan-pqqL* 线性打靶基因片段)

Fig. 1 PCR amplification of *pqqL* gene (A), *Kan* gene (B) and *pqqL-kan-pqqL* linear targeting fragment (C). M: DL5000.

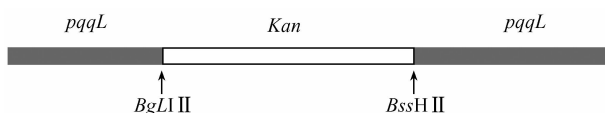


图2 *pqqL-kan-pqqL* 线性打靶片段结构示意图

Fig. 2 Schematic overview of *pqqL-kan-pqqL* linear targeting fragment.

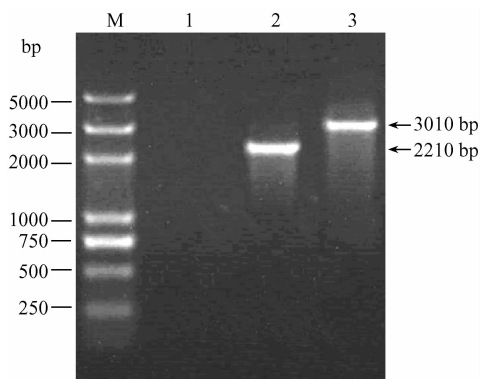


图3 大肠杆菌突变体 *pqqL* 基因 PCR 分析

Fig. 3 PCR analysis of *pqqL* gene in *Escherichia coli* mutant. M: DL5000; 1: blank control; 2: *DH5αΔpqqL*; 3: *DH5α*.

2.3 pMD19T Simple-pqqABCDE 质粒的构建

以 A6 和 E7 为引物, pBCP162 质粒为模板, PCR 扩增得到 4177 bp 大小的 *pqqABCDE* 基因 (图 4)。回收产物与载体 pMD19T Simple 连接构建 pMD19T

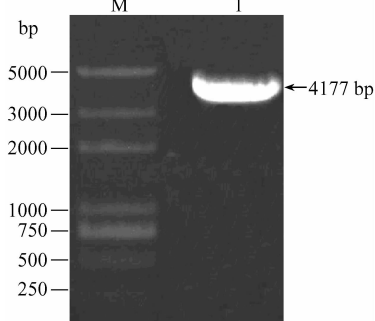


图4 *pqqABCDE* 的 PCR 扩增

Fig. 4 PCR amplification of *pqqABCDE*. M: DL5000; 1: *pqqABCDE* gene.

Simple-*pqqABCDE* 载体, 测序分析结果显示与预期序列完全一致 (测序结果略)。

2.4 大肠杆菌 pqqL 基因与 PQQ 合成的关系

将 pBCP162 质粒和 pMD19T Simple-*pqqABCDE* 质粒分别转化至大肠杆菌 *DH5α* 和大肠杆菌 *DH5αΔpqqL* 突变株。分别培养各重组菌株, 取培养液上清通过 DCIP 脱色法检测各自 PQQ 合成情况。如图 6 所示, DCIP 脱色法分析结果显示 pBCP162 质粒转入至大肠杆菌 *DH5α* 能够检测到 PQQ 的合成, 而且单独缺失 *pqqF* 和 *pqqL* 基因时都能合成 PQQ, 只有当两者同时缺失时才检测不到 PQQ 的合成。这一定程度上说明 *pqqF* 和 *pqqL* 基因在 PQQ 生物合成过程中的功能不可或缺而且两者相似, 可以相互代替。由缺失 *pqqF* 显色不如缺失 *pqqL* 显色深的结果来分析, *pqqL* 功能不如 *pqqF* 强。

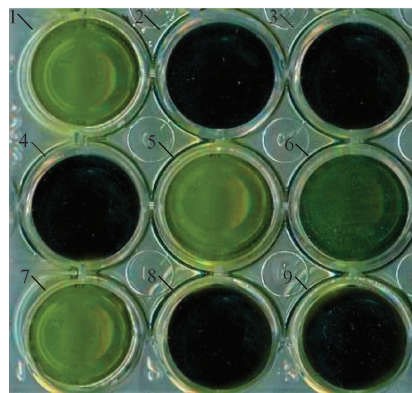


图5 DCIP 法检测 PQQ 合成

Fig. 5 Detection of PQQ biosynthesis by DCIP method. 1: PQQ + SDH; 2: PQQ; 3: *DH5αΔpqqL* supernatant + SDH; 4: *DH5αΔpqqL* supernatant; 5: pBCP162/*DH5α* supernatant + SDH; 6: pMD19T Simple-*pqqABCDE*/*DH5α* supernatant + SDH; 7: pBCP162/*DH5αΔpqqL* supernatant + SDH; 8: pMD19T Simple-*pqqABCDE*/*DH5αΔpqqL* supernatant + SDH; 9: SDH

3 讨论

PQQ 作为一种重要的氧化还原酶的辅酶,其生物合成途径是一个基本的理论问题,对于高产菌株选育及菌种代谢工程改良也具有重要意义。目前 PQQ 合成的生化途径尚未完全阐明,已知的 PQQ 生物合成相关基因的功能尚不足以构成完整的 PQQ 合成途径^[10]。PQQ 生物合成相关基因簇的发现往往是通过在大肠杆菌中导入这些基因簇后能够赋予大肠杆菌 PQQ 生物合成的能力。业已证明,在大肠杆菌中导入含有 4-5 个读框的外源基因簇就能使其合成 PQQ。但从几个方面推测,这样 4-5 个基因似乎还不足以完成 PQQ 的合成。我们推测,在引入外源 PQQ 合成基因的大肠杆菌中,大肠杆菌自身编码的某些酶可能直接参与了 PQQ 的生物合成,但关于这个问题鲜有报道。Turlin 等发现将大肠杆菌自身的一段 7361 bp 的序列转入 *pqqE* 和 *pqqF* 缺陷的甲基营养菌后,可使甲基营养菌恢复 PQQ 的产生^[12]。氨基酸序列分析发现其中此段序列中 ORF 106 与肺炎克雷伯氏菌的 *pqqF* 基因编码蛋白质具有序列同源性,可能属于同一类含锌蛋白酶。本文通过 Red 同源重组将大肠杆菌 *pqqL* 基因(包含 ORF106 的 3 端 1440 bp 和 ORF107 的 5 端 383 bp)敲除,研究了克雷伯氏菌 PQQ 生物合成基因簇在大肠杆菌缺失突变体 DH5 α Δ *pqqL* 中指导 PQQ 合成的情况。研究结果表明大肠杆菌 *pqqL* 基因和与 PQQ 生物合成 *pqqF* 基因具有同样的功能,这些基因的功能对于 PQQ 的合成是必需的。本文结果支持了大肠杆菌自身拥有直接参与 PQQ 合成的酶类这样一种假设。

由于转入 PQQ 生物合成质粒 pBCP162 的大肠杆菌 PQQ 合成量很低,难以对产生的 PQQ 直接进行提取和分析,这为确定细胞中 PQQ 的存在及含量增加了难度。我们曾采用 SDH 重组酶活性电泳法来检测 PQQ 的合成情况(PQQ 检出下限约 60 ng),但是只有质粒 pBCP162 在正常大肠杆菌中的表达能呈现活性染色条带(接近检测下限),而缺失 *pqqL* 和 *pqqF* 基因的重组菌株因为 PQQ 合成水平下降检测不到活性条带。因此我们采用了灵敏度更高的 DCIP 法(PQQ 检出下限可达 10 ng)进行检测,通过严格设计对照建立了高效可靠的检测手段从而能够间接反映细胞内合成的痕量 PQQ。

参考文献

- [1] Takaoki K, Tadafumi K. A new redox-cofactor vitamin for mammals. *Nature*, 2003, 422(24): 832.
- [2] Misra HS, Khairnar NP, Barik A, Barikb A, Priyadarsinib KI, Mohanb H, Apte SK. Pyrroloquinoline-quinone: a reactive oxygen species scavenger in bacteria. *FEBS letters*, 2004, 578(1): 26-30.
- [3] Ikebukuro K, Kiyohara C, Sode K. Novel electrochemical sensor system for protein using the aptamers in sandwich manner. *Biosens Bioelectron*, 2005, 20(10): 2168-2172.
- [4] Katz E, Lioubasherski O, Willner I. Magnetic field effects on bioelectrocatalytic reactions of surface-confined enzyme systems: enhanced performance of biofuel cells. *Journal of the American Chemical Society*, 2005, 127(11): 3979-3988.
- [5] 王歆, 张惟材. 吡咯喹啉醌生物合成研究进展, 生物技术通讯(Letters in Biotechnology), 2007, 18(3): 534-538.
- [6] Holscher T, Gorisch H. Knockout and overexpression of pyrroloquinoline quinone biosynthetic genes in *Gluconobacter oxydans* 621H. *Journal of Bacteriology*, 2006, 188(21): 7668-7676.
- [7] 张惟材, 汪建华. 吡咯喹啉醌合成相关基因及编码蛋白. CN200510005637.4.
- [8] Meulenberg JJM, Sellink E, Loenen WAM, Riegman NH, Kleef MV, Postma PW. Cloning of *Klebsiella pneumoniae* *pqq* genes and PQQ biosynthesis in *Escherichia coli*. *FEMS microbiology letters*, 1990, 71(3): 337-343.
- [9] Matsushita K, Arents JC, Bader R, Yamada M, Adachi O, Postma PW. *Escherichia coli* is unable to produce pyrroloquinoline quinone (PQQ). *Microbiology*, 1997, 143(10): 3149-3156.
- [10] Puehringer S, Metlitzky M, Schwarzenbacher R. The pyrroloquinone quinone biosynthesis pathway revisited: a structural approach. *BMC Biochemistry*, 2008, 9: 8-18.
- [11] 韩冲, 张惟材, 游松, 黄留玉. 大肠杆菌 *ptsG* 基因敲除及其缺陷株生长特性研究. 生物工程学报(*Chinese Journal of Biotechnology*), 2004, 20(1): 16-20.
- [12] Turlin E, Gasser F, Biville F. Sequence and functional analysis of an *Escherichia coli* DNA fragment able to complement *pqqE* and *pqqF* mutants from *Methylobacterium organophilum*. *Biochimie*, 1996, 78(10): 822-831.

Knockout and function analysis of *pqqL* gene in *Escherichia coli*

Xianghua Xiong[#], Lu Yang[#], Xiaodong Han, Jianhua Wang, Weicai Zhang^{*}

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

Abstract: [**Objective**] To confirm the involvement of *pqqL* gene of *Escherichia coli* in PQQ biosynthesis, a *pqqL* deletion mutant of *E. coli* DH5 α was constructed and investigated. [**Methods**] *pqqL* and *kan* gene were cloned and a linear targeting fragment *pqqL-kan-pqqL* was constructed *in vitro*. Then *pqqL* gene was knocked out and DH5 α Δ *pqqL* mutant was constructed by Red homologous recombination. The PQQ biosynthesis was compared between the mutant and its parental strain by detection of bio-activity of sorbose dehydrogenase with DCIP method. [**Results**] The DH5 α Δ *pqqL* deletion mutant was successfully constructed, and the result indicated that PQQ would be synthesized in pBCP162/DH5 α Δ *pqqL* and pMD19T Simple-*pqqABCDE*/DH5 α , but not in pMD19T Simple-*pqqABCDE*/DH5 α Δ *pqqL*. [**Conclusion**] The function of *pqqL* gene in *Escherichia coli* is the same to that of *pqqF* gene.

Keywords: pyrroloquinoline quinone; Red homologous recombination; gene knockout

(本文责编:王晋芳)

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

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

[#] These authors contributed equally to this work.

Received: 9 April 2010/Revised: 30 April 2010

科学出版社书讯 (2010 - 10)

中国至 2050 年人口健康科技发展路线图 (中、英版)

中国科学院人口健康领域战略研究组

中文版 978-7-03-024657-8 ¥55.00 2009 年 6 月 出版 英文版 978-7-03-025620-1 ¥88.00 2009 年 10 月 出版

人口健康直接影响到一个国家的经济发展和社会进步,并且是构建和谐社会的重要基础。我国人口健康领域一方面正在面临着重大的挑战,另一方面科学技术的迅速发展为其提供了重要的机遇。中国科学院人口健康领域战略研究组通过对我国人口健康领域的科技发展趋势和需求分析,提出了我国人口健康领域 2010~2050 年的科技战略发展路线图;其科技愿景是,建立一个让中国人民生活得更健康的普惠健康保障体系。这个科技战略发展路线图主要由八个部分组成:①生物医学创新体系;②人口控制与生殖健康;③营养、食品安全与健康;④慢性病防治与健康管理;⑤传染病防治;⑥认知神经科学与心理精神健康;⑦创新药物与生物医学工程;⑧再生医学。每个部分都包括了特定的发展目标、战略任务和关键技术。

本报告可作为政府部门、科研机构、大学、企业进行科技战略决策的重要参考,可供国内外专家、学者研究和参考。

欢迎各界人士邮购科学出版社各类图书(免邮费)

邮购地址:北京东黄城根北街 16 号 科学出版社 科学出版中心 生命科学分社 邮编:100717

联系人:李韶文(010-64000849) 周文宇(010-64031535)

网上订购: www.dangdang.com www.joy.com www.amazon.cn www.beifabook.com

更多精彩图书请登陆网站 <http://www.lifescience.com.cn>, 欢迎致电索要书目