

· 生物育种与工艺优化 ·

## 高产吡咯喹啉醌扭脱甲基杆菌的高通量选育

李红月<sup>1,2</sup>, 曾伟主<sup>1,2</sup>, 周景文<sup>1,2</sup>

1 江南大学 工业生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214122

2 江南大学 生物工程学院, 江苏 无锡 214122

李红月, 曾伟主, 周景文. 高产吡咯喹啉醌扭脱甲基杆菌的高通量选育. 生物工程学报, 2018, 34(5): 794–802.

Li HY, Zeng WZ, Zhou JW. High-throughput screening of *Methylobacterium extorquens* for high production of pyrroloquinoline quinone. Chin J Biotech, 2018, 34(5): 794–802.

**摘要:** 吡咯喹啉醌 (PQQ) 是一种细菌脱氢酶的辅酶, 具有促进机体生长、调节机体自由基水平等功能, 应用于食品、医药等领域。由于化学合成法成本较高, 微生物发酵法生产 PQQ 受到关注。目前, 发酵法生产 PQQ 产量较低, 限制了其工业应用。然而, 由于对 PQQ 菌株的合成与调控机制尚缺乏深入理解, 以及对野生型菌株缺乏必要的基因工程改造手段, 目前采用代谢工程强化 PQQ 合成菌株还缺乏相关基础。因此, 本研究以扭脱甲基杆菌 *Methylobacterium extorquens* I-F2 为研究对象, 整合常压室温等离子体诱变、流式细胞术分选和高通量筛选策略, 对样品制备和流式分选过程进行优化, 最终筛选出一株 PQQ 高产突变菌株 I-C6, PQQ 产量比出发菌株 I-F2 提高 98.02%。本文所述的流式细胞术结合高通量筛选方法能简单、快速地获得高产突变菌株, 相比于基因工程改造和传统筛选方法, 具有提升效果明显且易于实施等优势。

**关键词:** 吡咯喹啉醌, 高通量筛选, 流式细胞术, 常压室温等离子体诱变, 碘化丙啶

## High-throughput screening of *Methylobacterium extorquens* for high production of pyrroloquinoline quinone

Hongyue Li<sup>1,2</sup>, Weizhu Zeng<sup>1,2</sup>, and Jingwen Zhou<sup>1,2</sup>

1 Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China

2 School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China

**Abstract:** Pyrroloquinoline quinone (PQQ) is a bacterial dehydrogenase coenzyme. PQQ can promote body growth and regulate the function of free radical level of the body. It could be applied in food, medicine and other fields. Due to the extremely high cost of chemical synthesis, the production of PQQ by microbial fermentation attracted more and more attention. At present, the production titer of PQQ by fermentation method is too low to achieve industrial application. Due to the lack of a thorough understanding of the PQQ biosynthesis and its regulation mechanisms, and the lack of necessary genetic

**Received:** November 12, 2017; **Accepted:** January 25, 2018

**Supported by:** National Natural Science Foundation of China (No. 21390204).

**Corresponding author:** Jingwen Zhou. Tel: +86-510-85918312; E-mail: zhoujw1982@jiangnan.edu.cn

国家自然科学基金 (No. 21390204) 资助。

网络出版时间: 2018-03-06

网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1998.Q.20180306.1121.002.html>

engineering modification methods for wild type strains, metabolic engineering of microorganisms to enhance PQQ production still lacks essential requirements. In this study, a PQQ-producing bacterium, *Methylobacterium extorquens* I-F2, was employed as a model strain. By integration of Atmospheric and room temperature plasma (ARTP) mutagenesis, flow cytometry sorting and high-throughput screening strategies, optimization of sample preparation and flow sorting process, a high-titer PQQ mutant strain was obtained. The titer of PQQ was increased by 98.02% compared with that of *M. extorquens* I-F2. The process described here showed that the combination of the flow cytometry with high-throughput screening method can be used to obtain high-titer mutants more simply and rapidly, compared with genetic engineering and traditional screening methods.

**Keywords:** pyrroloquinoline quinone, high-throughput screening, flow cytometry, ARTP, PI

吡咯喹啉醌 (Pyrroloquinoline quinone, PQQ) 是许多细菌中脱氢酶 (包括甲醇脱氢酶、葡萄糖脱氢酶和甘油脱氢酶等) 的辅酶<sup>[1-2]</sup>。研究发现能合成 PQQ 的菌株中绝大部分是革兰氏阴性菌<sup>[3]</sup>, 如肺炎克雷伯氏菌 *Klebsiella pneumoniae*、扭脱甲基杆菌 *Methylobacterium extorquens*<sup>[4]</sup>、氧化葡萄糖杆菌 *Gluconobacter oxydans*<sup>[5]</sup>、甲基营养菌 *Methylotrophic bacteria*<sup>[6]</sup> 等。甲醇脱氢酶中的 PQQ 接受来自甲醇的自由电子转变为 PQQH<sub>2</sub>, 之后再电子传递至细胞色素 *c*, 此时 PQQH<sub>2</sub> 又被氧化成 PQQ<sup>[7-8]</sup>。PQQ 具有提高细菌对毒性和辐射等极端条件耐受性<sup>[9-10]</sup>、防护肝损伤、促进机体生长<sup>[11-14]</sup>、调节机体自由基水平<sup>[15-16]</sup>、促进神经生长因子合成<sup>[17]</sup> 等重要的生理功能。目前 PQQ 生产以化学法为主, 由于化学法合成步骤复杂、提纯步骤多, 导致成本较高。发酵法由于培养基成分简单、利于产物提取、反应温和、能降低成本等优点, 因此有很大的产业化前景。目前为止, PQQ 整个生物合成途径及其调控机制仍未完全阐明。研究发现, 在 *M. extorquens* AM1 中 PQQ 的合成需要 *pqqA-G* 7 个基因<sup>[18]</sup>。敲除 *pqqA* 基因导致 PQQ 的合成量大幅度降低但依然有合成<sup>[19]</sup>。Postma 等将 *K. pneumoniae* 的 PQQ 基因簇与高拷贝载体 pUC19 构建质粒, 转化大肠杆菌 *Escherichia coli* 后只能产微量的 PQQ<sup>[20]</sup>。王朝绚等将 PQQ 合成基因和信号肽基因 *pelB* 在大肠杆菌 *Escherichia coli* BL21 (DE3) 中融合表达, PQQ 的产量与不加信号肽的对照菌相比提高了 24%<sup>[21]</sup>。

高通量筛选可通过单细胞研究快速获得有关克隆相关性、克隆内差异和延续突变的信息<sup>[22]</sup>。此前, 获得状态良好的单细胞比较困难, 而流式细胞仪的发展和运用能解决这一问题<sup>[23-24]</sup>。流式细胞术 (Flow cytometry, FCM) 可以从细胞群中高速分选出被指定的细胞并将其分选至试管或细胞培养板中, 分选时间短, 分选到的细胞活性良好, 方便后续实验<sup>[25-26]</sup>。MoFlo XDP 分选型流式细胞仪是目前高端流式细胞仪之一, 具有高度一体化的电子系统、高速的电子系统计算速度及上样分选速度、自动调节和优化液滴成像、自动调节分选参数维持分选、完全程序化控制的上样系统、高度智能的分选模式。本文采用常压室温等离子体诱变 (Atmospheric and room temperature plasma, 简称 ARTP) 以及流式细胞术分选单细胞的高通量筛选方法获得高产 PQQ 的 *M. extorquens* 菌株, 并通过传代检测突变菌株遗传稳定性。目前, 将流式细胞术与高通量筛选结合起来提高 PQQ 产量的方法还没有相关报道。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

#### 1.1.1 菌 种

*M. extorquens* I-F2 由本研究室诱变筛选得到。

#### 1.1.2 培 养 基

固体培养基: 酵母抽提物 4.5 g/L, 蛋白胨 5 g/L, 玉米浆干粉 0.75 g/L, CoCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O 5 mg/L, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.1 g/L, CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O 10 mg/L,

FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 10 mg/L, MnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.5 mg/L, Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O 0.5 mg/L, 固体培养基添加 2% 琼脂粉, pH 调至 7.0, 121 °C 灭菌 15 min。

筛选培养基: 甲醇 30 mL/L, 硫酸铵 3 g/L, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.0 g/L, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 2.12 g/L, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.1 g/L, CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O 10 mg/L, FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 10 mg/L, MnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.5 mg/L, Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O 0.5 mg/L, pH 调至 7.0, 121 °C 灭菌 15 min。

### 1.1.3 主要试剂和仪器

酵母抽提物和蛋白胨, 购自 Oxoid 公司; PQQ, 购自 Sigma-Aldrich 公司; 其余化学试剂, 购自国药集团化学试剂有限公司。常压室温等离子体诱变育种仪, 购自无锡思清源生物科技有限公司; FE20K pH 计, 购自瑞士 Mettler-Toledo 公司; FREEDOM EVO 移液工作站, 购自瑞士 Tecan 公司; MoFlo XDP 流式细胞仪, 购自美国 Beckman 公司; Cytation3 酶标仪, 购自美国 BioTek 公司; Eppendorf 5424 高速离心机, 购自美国 Eppendorf 公司。

### 1.1.4 摇瓶培养条件

种子液的制备: 将保藏于 -80 °C 条件下的甘油管中的菌液接种在固体培养基平板上, 30 °C 恒温培养箱中培养 4 d 使其活化后, 从平板上刮取单菌落接种于含有 25 mL 筛选培养基的 250 mL 锥形瓶中, 在 30 °C、220 r/min 条件下培养 72 h, 即为种子液。

## 1.2 方法

### 1.2.1 制备荧光标记样品

本研究采用碘化丙啶 (Propidium iodide, 简称 PI) 作为样品的荧光标记染料。确定 PI 浓度: 将 0.5 mL 已制备好的菌悬液分别与 0.5 mL 10、20、50 μg/mL 的 PI 混合, 避光 4 °C 染色 10 min, 过滤转移至试管中, 上机检测。确定染色的温度: 将 0.5 mL 已制备好的菌悬液与 0.5 mL PI (20 μg/mL) 混合, 分别避光在 4 °C、室温、30 °C 下染色 10 min, 过滤转移至试管中, 上机检测。确定染色时间: 将

0.5 mL 已制备好的菌悬液与 0.5 mL PI (20 μg/mL) 混合, 分别避光 4 °C 静置 10 min、30 min、2 h 染色, 过滤转移至试管中, 上机检测。

### 1.2.2 ARTP 诱变

本研究采用常压室温等离子体诱变对 *M. extorquens* I-F2 进行处理, 将菌株进行活化并制备得到种子液 ( $OD_{600}$  约为 3)。取 1 mL 菌悬液于 1.5 mL EP 管中, 8 000 r/min 离心 3 min, 弃去上清液。用 PBS 溶液洗涤 2 次后, 稀释制成菌体浓度在  $10^6$ – $10^7$  之间的菌悬液, 取 10 μL 菌悬液均匀涂布于无菌的载片表面。然后将载片置于 ARTP 诱变育种系统的载台上, 在入射功率为 100 W、氦气流量为 10 SLM 条件下, 分别照射 15、30、45、60、75、90、105、120 s。样品处理完毕, 用镊子将载片转移到装有 1 mL 5% 甘油的 EP 管中, 持续充分振荡 1 min, 将附着在载片上的菌体充分洗脱形成菌悬液, 对照组为同样的条件照射 0 s 后, 将载片转移至装有 1 mL 5% 甘油的 EP 管中, 持续充分振荡 1 min 制备成菌悬液。

### 1.2.3 流式细胞仪分选

首先进行光路调节, 先粗调液流, 再精确校准, 优化所有信号, 自动优化断点并确定液滴延迟, 调节分选参数。对 *M. extorquens* 细胞进行染色, PI 不能穿透完整细胞膜, 但能穿透凋亡晚期细胞和死细胞的破损细胞膜, 嵌入双链 DNA 后使细胞核染色产生荧光, 通过流式细胞仪可以分析计数死细胞或活细胞占有所有细胞的比例, 分选活细胞至 96 孔板中, 其中致死率方程:

$$\text{致死率} = S/A \times 100\%$$

S 是 ARTP 处理后流式细胞检测出的有荧光细胞数即死细胞数, A 是流式细胞检测出的所有细胞数。

### 1.2.4 高通量筛选

将活细胞分选于含有 100 μL 固体培养基的 96 孔深孔板中, 30 °C 条件下培养 4 d 后, 加入 800 μL 液体筛选培养基在 30 °C、900 r/min 条件

下培养 3 d, 以 10% 的接种量转接于含有 2 mL 液体筛选培养基的 48 孔深孔板中, 在 30 °C、900 r/min 条件下培养 5 d 4 000 r/min 离心 15 min, 取 200  $\mu$ L 上清液至 96 孔浅孔板中, 用酶标仪检测 249 nm 处的吸光值, PQQ 含量越高吸光值越高, 复筛验证, 将筛选到的菌株再次进行 ARTP 诱变, 分选于多孔板中初筛、复筛验证, 连续多次传代检测突变菌株的遗传稳定性。

### 1.2.5 PQQ 含量检测

光谱法检测 PQQ 含量是将样品转移至 96 孔浅孔板中用酶标仪检测  $OD_{326}$  与  $OD_{400}$  的差值, 同时将筛选培养基以同样的条件处理和检测, 从而扣除培养基吸光值<sup>[27]</sup>。计算结果取 3 个平行发酵实验的平均值。

## 2 结果与分析

### 2.1 样品染色条件的优化

流式细胞术是通过激光激发高速流动的细胞或微粒所携带的荧光染料或荧光素, 并检测由此产生的微粒的各种光信号, 如散射光、自发荧光、特异性荧光的强弱, 来反映各项待检测指标<sup>[28]</sup>。染色分选后, 30 °C 培养 5 d 至能清晰看见孔内的单菌落, 生长状态良好, 计数每块孔板中分选的单细胞克隆形成个数即克隆形成率。对染色条件进行优化, 结果如表 1 所示。随着 PI 浓度增大, 克隆形成率降低, 可能由于 PI 本身具有猝灭作用的缔合分子或产生内滤光效应, 说明合适的染料浓度才能保证染色做到染料分子数与被染的某种参量成一定的量效关系。短时存放 (10 min、30 min) 的克隆形成率高于长时存放 (2 h), 说明

样品染色后应尽快上机检测。染色时温度对克隆形成率有影响, 温度升高可造成溶液粘滞性增加, 溶剂和 PI 分子动力加大, 使荧光猝灭可能性加大, 荧光量减弱, 所以应保持较低温度。流式细胞术检测样品时染色相对较好的条件是 PI 浓度为 10  $\mu$ g/mL、避光在室温条件下放置 30 min。

### 2.2 流式细胞仪分选参数调校

样品制备后, MoFlo XDP 流式细胞仪检测, PI 染色, 在 488 nm 激发光、620 nm 发射光条件下进行优化, 获得最佳调校值参数为: 液流在光路中央且聚焦清楚, 液流打入废液收集管正中央, 光斑位于孔中央且最亮, 液流分叉稳定, 喷嘴型号为 100  $\mu$ m, 鞘液压力为 30.00 psi, Drop Delay 值为 40.00, 分选模式为 Purify mode。在此条件下, 目的细胞群如 R6 区域所示 (图 1A)。对于未进行热处理的样品, PI 无法对细菌染色, 细菌的荧光信号全部处于阴性区间, 结果如图 1B 所示; 而经过热处理 (100 °C 沸水浴 10 min) 的样品, PI 能穿过破损的细胞膜染色 DNA, 细菌的荧光信号均显示为阳性, 结果如图 1C 所示。参数调校以单细胞得率高、损伤少为目的, 要避免出现鞘液压力太大、不合适的鞘液或培养基、分选时间太长以及高电压等情况<sup>[29]</sup>。

### 2.3 ARTP 诱变致死率曲线

ARTP 诱变通过控制等离子体强度破坏其 DNA 结构, 进而改变其生物特性, 较高的致死率能获得有效的突变率, 研究表明致死率 90% 以上效果更佳<sup>[30]</sup>。ARTP 处理 30 s 后, I-F2 菌体致死率达到 93% 以上, 但随后 45 s 后的处理时间出

表 1 样品染色条件优化

Table 1 Optimization of sample dyeing conditions

PI ( $\mu$ g/mL)	Clone formation rate (%)	Temperature	Clone formation rate (%)	Time	Clone formation rate (%)
10	76.25 $\pm$ 1.85	4 °C	76.17 $\pm$ 2.16	10 min	75.87 $\pm$ 0.68
20	75.48 $\pm$ 0.38	Room temperature	77.12 $\pm$ 0.63	30 min	76.54 $\pm$ 1.32
50	24.71 $\pm$ 0.87	30 °C	67.01 $\pm$ 1.93	2 h	45.24 $\pm$ 1.51

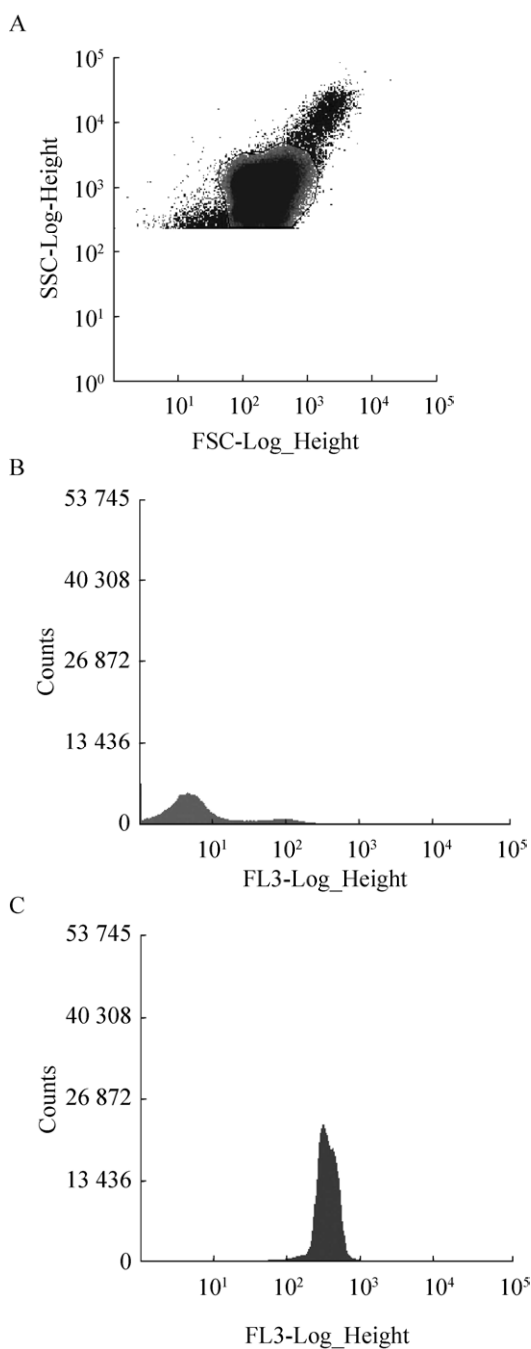


图1 流式分选 (A: 目标细胞群; B: 阴性; C: 阳性)  
Fig. 1 Flow sorting. (A) Target cell population. (B) Negative. (C) Positive.

现致死率下降的现象,在 45–90 s 这段处理时间内虽然致死率呈上升趋势,但均低于 90%,直到处理时间为 105 s 时致死率达到 95% (图 2)。ARTP 诱变对微生物细胞和 DNA 具有显著的影响,细

胞暴露在大量高活性等离子体下会导致细胞普遍死亡,但同时过程中会有少量细胞通过自我修复形成新的突变存活下来,分析出现致死率曲线折点的原因可能是菌株自身存在的修复机制产生回复突变,使存活的菌株增加,所以本研究将诱变时间选在 100–110 s。

## 2.4 高通量检测方法

目前, PQQ 检测方法包括高效液相色谱法、重组酶法及非酶法 (氧化还原法)。高效液相色谱法检测精准性高、范围广,但并不适用于高通量筛选检测。重组酶法和非酶法都适于大量样品的检测,但重组酶法中的 DCIP (2,6-二氯酚钠) 和 PMS (吩嗪硫酸甲脂) 配成检测溶液后会产生颜色变化影响吸光值的检测,非酶法中的 NBT (四唑硝基蓝) 是一种极易被氧化的物质,暴露在空气中很短时间即可被氧化,影响吸光值的测定,所以重组酶法和非酶法这两种检测方法存在准确度不高和重复性较差的问题。PQQ 分别在 250 nm 和 330 nm 左右有特征吸收峰,光谱扫描结果见图 3A。本研究采用光谱法检测 PQQ,用酶标仪检测  $OD_{249}$  值,如图 3B 所示, PQQ 浓度与  $OD_{249}$  关系为  $y=32.34x-7.99$  ( $R^2=0.997$ )。

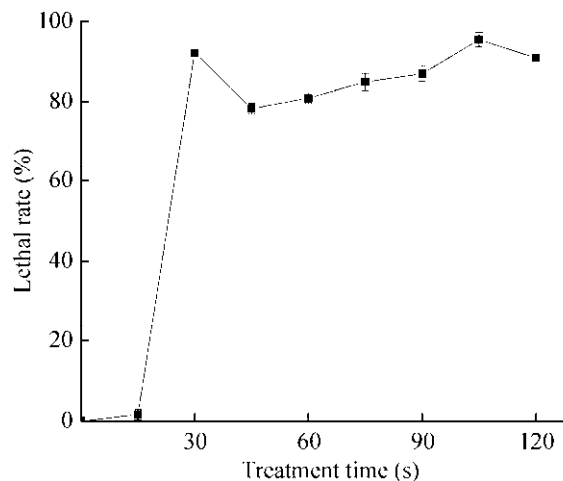


图2 致死率曲线

Fig. 2 The lethality curve.

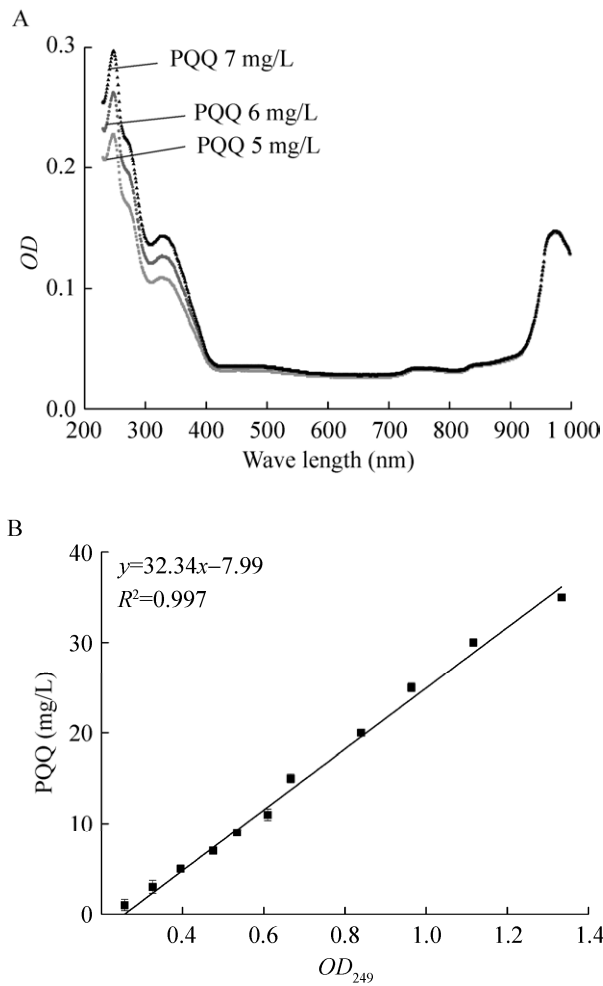


图3 高通量筛选方法建立  
Fig. 3 High-throughput screening method.

## 2.5 高通量筛选

流式分选和移液工作站应用于高通量筛选策略可实现高效率的大批量转移,具有准确、快速、灵敏、高通量和多参数同时分析等优点。本研究通过 ARTP 诱变处理菌株后将筛选到的菌株再次进行 ARTP 诱变处理共 4 次,用 PI 染色后结合流式细胞仪分选出 9 677 株活细胞,最后采用建立的高通量检测方法检测 9 677 株诱变菌株 PQQ 产量。结果如图 4A 所示,294 株菌株的  $OD_{249}$  比出发菌株高。对这 294 株菌摇瓶发酵来进行复筛,以 10% 接种量转接至含有 20 mL 筛选培养基的

250 mL 锥形瓶中,30 °C、220 r/min 条件下培养 180 h 后检测 PQQ 产量。如图 4B 所示,复筛中有 7 株 PQQ 产量提升较高的菌株,分别是 3-B9、2-B3、3-H8、3-A9、1-C6、2-D3、8-D9,它们的 PQQ 产量较出发菌株提高了 80.09%、85.2%、73.3%、74.9%、98.02%、90.11%、94.19%。对这 7 株菌进行传代培养 6 代,检测 PQQ 产量,如表 2 所示,其中 6 株菌株 2-B3、3-H8、3-A9、1-C6、2-D3、8-D9 基本保持稳定,而菌株 3-B9 则明显降低。

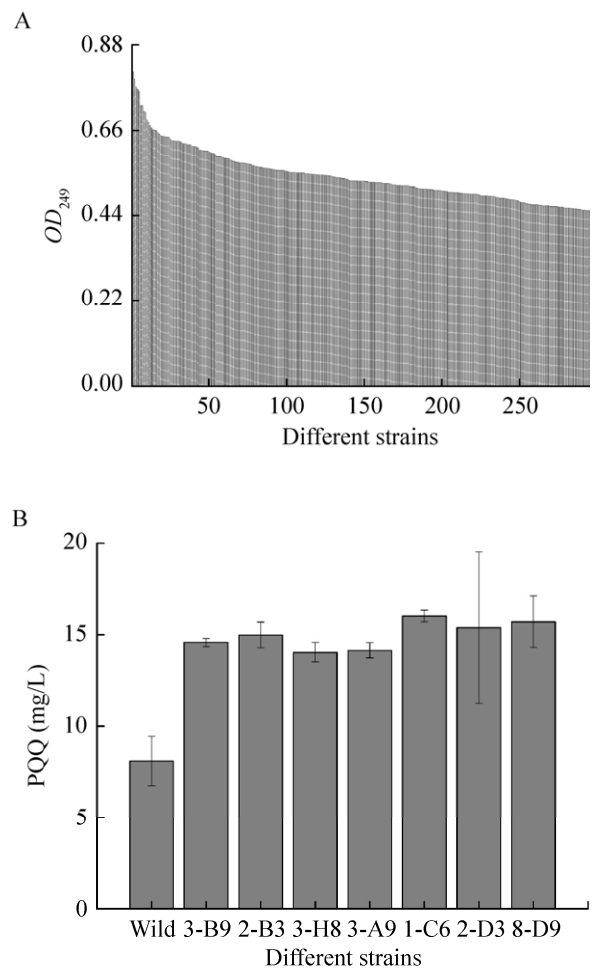


图4 高通量筛选结果 (A: 初筛; B: 复筛)  
Fig. 4 High-throughput screening results. (A) Primary screening. (B) Secondary screening.

表 2 突变菌株遗传稳定性

Table 2 The genetic stability of mutant strains

Strains	PQQ (mg/L)					
	The 1st subculture	The 2nd subculture	The 3rd subculture	The 4th subculture	The 5th subculture	The 6th subculture
Wild	8.60±0.25	8.92±0.51	7.94±0.58	8.80±0.67	8.24±0.20	7.80±0.49
3-B9	13.96±0.35	7.53±0.28	8.86±0.25	8.38±0.18	8.83±0.24	7.41±0.32
2-B3	11.55±0.26	11.72±0.40	10.15±0.84	11.56±0.67	10.63±0.34	9.53±0.17
3-H8	13.69±0.38	13.08±0.11	11.16±0.69	12.33±0.16	11.38±0.50	10.62±0.12
3-A9	15.80±0.30	14.08±0.12	12.09±0.73	14.52±0.16	13.51±0.40	12.38±0.09
1-C6	14.72±0.06	14.12±0.06	12.22±0.50	13.67±0.36	12.58±0.46	11.88±0.02
2-D3	15.88±0.32	15.39±0.47	13.80±0.51	14.48±0.61	13.78±0.03	12.96±0.03
8-D9	11.96±0.11	12.38±0.05	12.01±0.14	11.16±0.39	10.63±0.33	9.47±0.43

### 3 讨论

本研究从 9 677 株菌中复筛到 6 株 PQQ 产量提高的菌株 2-B3、3-H8、3-A9、1-C6、2-D3、8-D9，PQQ 产量分别较出发菌株提高了 85.2%、73.3%、74.9%、98.02%、90.11%、94.19%，其中 1-C6 突变株 PQQ 产量最高为 16.02 mg/L。目前野生菌 PQQ 产量最多为 2 mg/L 或更低<sup>[31]</sup>，Urakami 等筛选到一株生丝微菌 TK0441 (*Hyphomicrobium* sp. TK0441)，摇瓶水平 PQQ 产量为 0.3–0.9 mg/L<sup>[32]</sup>。尹芳等对生丝微菌 TH205 进行培养，10 L 罐上发酵后 PQQ 产量为 26.6 μg/mL<sup>[33]</sup>。为提高产量，诱变是比较常用的育种方法。钟杉杉等对假单胞菌 PS0813 (*Pseudomonas* sp. 0813) 进行多种诱变，获得 PM1、PM2 两株高产菌，产量与对照相比提高 1.63 倍和 1.56 倍<sup>[34]</sup>。王朝绚等对 *K. pneumonia* 进行紫外线和氯化锂诱变，得到 U2、L1 两株高产菌，产量与对照相比提高 6 倍和 5 倍<sup>[35]</sup>。韩月梅等对甲基营养菌 MP688 进行转座诱变，筛选到几乎不产 PQQ 的突变株，并对其进行了突变基因鉴定<sup>[36]</sup>。通过对诱变获得的 PQQ 缺陷型菌株进行分析，为从基因水平阐释 PQQ 生物合成过程提供了重要线索。由于目前 PQQ 生产菌株的筛选大多使用平板筛菌，人工挑选存在效率低、耗时长等

问题。

本文提供了一种新的高通量筛选 PQQ 高产菌株的研究方法，流式细胞术结合高通量筛选的方法能更加简单、快速地获得高产突变菌株。相比于基因工程改造和传统筛选方法，具有提升效果明显、自动化、灵敏快速检测等优势，流式细胞仪、全自动移液工作站等的应用为高通量筛选开拓了新道路。

### REFERENCES

- [1] Duine JA, Jzn JF, van Zeeland JK. Glucose dehydrogenase from *Acinetobacter calcoaceticus*: A 'quinoprotein'. *Febs Lett*, 1979, 108(2): 443–446.
- [2] Salisbury SA, Forrest HS, Cruse WBT, et al. A novel coenzyme from bacterial primary alcohol dehydrogenases. *Nature*, 1979, 280(5725): 843–844.
- [3] Misra HS, Rajpurohit YS, Khairnar NP. Pyrroloquinoline-quinone and its versatile roles in biological processes. *Biosci*, 2012, 37(2): 313–325.
- [4] Li HZ, Kang Z, Li JH, et al. Mutagenesis of *Methylobacterium extorquens* AM1 for increasing pyrroloquinoline quinone production by atmospheric and room temperature plasma. *Chin J Biotech*, 2016, 32(8): 1145–1149 (in Chinese).  
李慧芝, 康振, 李江华, 等. 常压室温等离子体诱变扭脱甲基杆菌 AM1 高产吡咯喹啉醌. *生物工程学报*, 2016, 32(8): 1145–1149.

- [5] Hölscher T, Görisch H. Knockout and overexpression of pyrroloquinoline quinone biosynthetic genes in *Gluconobacter oxydans* 621H. *J Bacteriol*, 2006, 188(21): 7668–7676.
- [6] Wang WX, Ge X, Han YM, et al. Isolation and characterization of glucose dehydrogenase gene in *Methylovorus* sp. MP688. *Lett Biotechnol*, 2013, 24(6): 805–809 (in Chinese).  
王文溪, 葛欣, 韩月梅, 等. 甲基营养菌 MP688 葡萄糖脱氢酶基因分离鉴定及性质研究. *生物技术通讯*, 2013, 24(6): 805–809.
- [7] Brazeau BJ, Johnson BJ, Wilmot CM. Copper-containing amine oxidases. Biogenesis and catalysis; a structural perspective. *Arch Biochem Biophys*, 2004, 428(1): 22–31.
- [8] Davidson VL. Electron transfer in quinoproteins. *Arch Biochem Biophys*, 2004, 428(1): 32–40.
- [9] Johnson HA, Tebo BM. *In vitro* studies indicate a quinone is involved in bacterial Mn(II) oxidation. *Arch Microbiol*, 2008, 189(1): 59–69.
- [10] Trček J, Jernejc K, Matsushita K. The highly tolerant acetic acid bacterium *Gluconacetobacter europaeus* adapts to the presence of acetic acid by changes in lipid composition, morphological properties and PQQ-dependent ADH expression. *Extremophiles*, 2007, 11(4): 627–635.
- [11] Kim J, Kobayashi M, Fukuda M, et al. Pyrroloquinoline quinone inhibits the fibrillation of amyloid proteins. *Prion*, 2010, 4(1): 26–31.
- [12] Kobayashi M, Kim J, Kobayashi N, et al. Pyrroloquinoline quinone (PQQ) prevents fibril formation of alpha-synuclein. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006, 349(3): 1139–1144.
- [13] Scanlon JM, Aizenman E, Reynolds IJ. Effects of pyrroloquinoline quinone on glutamate-induced production of reactive oxygen species in neurons. *Eur J Pharmacol*, 1997, 326(1): 67–74.
- [14] Sode K, Sano H. Glu742 substitution to Lys enhances the EDTA tolerance of *Escherichia coli* PQQ glucose dehydrogenase. *Biotechnol Lett*, 1994, 16(5): 455–460.
- [15] He K, Nukada H, Urakami T, et al. Antioxidant and pro-oxidant properties of pyrroloquinoline quinone (PQQ): implications for its function in biological systems. *Biochem Pharmacol*, 2003, 65(1): 67–74.
- [16] Zhang Q, Ding M, Cao Z, et al. Pyrroloquinoline quinone protects rat brain cortex against acute glutamate-induced neurotoxicity. *Neurochem Res*, 2013, 38(8): 1661–1671.
- [17] Liu SQ, Li HH, Ouyang JP, et al. Enhanced rat sciatic nerve regeneration through silicon tubes filled with pyrroloquinoline quinone. *Microsurgery*, 2005, 25(4): 329–337.
- [18] Toyama H, Chistoserdova L, Lidstrom ME. Sequence analysis of *pqq* genes required for biosynthesis of pyrroloquinoline quinone in *Methylobacterium extorquens* AM1 and the purification of a biosynthetic intermediate. *Microbiology*, 1997, 143(2): 595–602.
- [19] Toyama H, Lidstrom ME. *pqqA* is not required for biosynthesis of pyrroloquinoline quinone in *Methylobacterium extorquens* AM1. *Microbiology*, 1998, 144(1): 183–191.
- [20] Meulenbergh JJM, Sellink E, Loenen WAM, et al. Cloning of *Klebsiella pneumoniae* *pqq* genes and PQQ biosynthesis in *Escherichia coli*. *Fems Microbiol Lett*, 1990, 71(3): 337–343.
- [21] Wang ZX, Ge XZ, Tian PF. Enhanced production of pyrroloquinoline quinone expressed from *Escherichia coli* via adding signal peptide. *J Beijing Univ Chem Technol: Nat Sci Ed*, 2013, 40(S1): 32–35 (in Chinese).  
王朝绚, 葛喜珍, 田平芳. 大肠杆菌中插入表达信号肽提高吡咯喹啉醌产量的研究. *北京化工大学学报: 自然科学版*, 2013, 40(S1): 32–35.
- [22] Rinke C, Lee J, Nath N, et al. Obtaining genomes from uncultivated environmental microorganisms using FACS-based single-cell genomics. *Nat Prot*, 2014, 9(5): 1038–1048.
- [23] Magbanua MJM, Park JW. Isolation of circulating tumor cells by immunomagnetic enrichment and fluorescence-activated cell sorting (IE/FACS) for molecular profiling. *Methods*, 2013, 64(2): 114–118.
- [24] Haroon MF, Skennerton CT, Steen JA, et al. In-solution fluorescence *in situ* hybridization and fluorescence-activated cell sorting for single cell and population genome recovery. *Methods Enzymol*, 2013, 531: 3–19.
- [25] Manome A, Zhang H, Tani Y, et al. Application of gel microdroplet and flow cytometry techniques to selective enrichment of non-growing bacterial cells. *FEMS Microbiol Lett*, 2001, 197(1): 29–33.
- [26] Morono Y, Terada T, Kallmeyer J, et al. An improved cell separation technique for marine subsurface



- sediments: applications for high-throughput analysis using flow cytometry and cell sorting. *Environ Microbiol*, 2013, 15(10): 2841–2849.
- [27] Yang YX, Xiong XH, You S, et al. Comparing three kinds of pyrroloquinoline quinone detection methods. *Lett Biotechnol*, 2011, 22(4): 544–547 (in Chinese).  
杨延新, 熊向华, 游松, 等. 3种检测吡咯喹啉醌的方法比较. *生物技术通讯*, 2011, 22(4): 544–547.
- [28] Yang R, Zou MQ. New advances in developing flow cytometry. *J Instr Anal*, 2004, 23(6): 124–128.  
杨蕊, 邹明强. 流式细胞术的最新进展. *分析测试学报*, 2004, 23(6): 124–128 (in Chinese).
- [29] Zuo LF, Liu HX, Lin YZ, et al. A method for preparing the suspended cell sample of mono-spreading for flow cytometry. *J Hebei Med Univ*, 1987, 8(3): 139–143.  
左连富, 刘洪祥, 林元珠, 等. 流式细胞术单分散细胞悬液样品的制备方法. *河北医学院学报*, 1987, 8(3): 139–143 (in Chinese).
- [30] Schubert WW, Beaudet RA. Determination of lethality rate constants and D-values for heat-resistant *Bacillus* spores ATCC 29669 exposed to dry heat from 125 °C to 200 °C. *Astrobiology*, 2011, 11(3): 213–223.
- [31] Van Kleef MAG, Duine JA. Factors relevant in bacterial pyrroloquinoline quinone production. *Appl Environ Microbiol*, 1989, 55(5): 1209–1213.
- [32] Urakami T, Yashima K, Kobayashi H, et al. Production of pyrroloquinoline quinone by using methanol-utilizing bacteria. *Appl Environ Microbiol*, 1992, 58(12): 3970–3976.
- [33] Yin F, Lu B, Chen GH, et al. Study on the production of pyrroloquinoline quinone by using methanol-utilizing bacteria. *J East China Univ Sci Technol*, 2004, 30(2): 227–229, 233 (in Chinese).  
尹芳, 陆兵, 陈国豪, 等. 甲醇利用型细菌发酵生产吡咯喹啉醌的培养条件. *华东理工大学学报*, 2004, 30(2): 227–229, 233.
- [34] Zhong SS. Screening, mutant, fermentation and gene cloning of pyrroloquinoline quinone-producing strain[D]. Beijing: Beijing University of Chemical Technology, 2013 (in Chinese).  
钟杉杉. 吡咯喹啉醌高产菌的筛选、诱变、发酵及基因克隆[D]. 北京: 北京化工大学, 2013.
- [35] Wang ZX, Li HY, Wang S, et al. Mutation breeding of high pyrroloquinoline quinone-producing strain by UV and LiCl. *J Anhui Agricul Sci*, 2013, 41(34): 13103–13105, 13122 (in Chinese).  
王朝绚, 李会玉, 王爽, 等. 紫外线-氯化锂诱变选育吡咯喹啉醌高产菌. *安徽农业科学*, 2013, 41(34): 13103–13105, 13122.
- [36] Han YM, Ge X, Wang H, et al. Screening of PQQ-deficient mutants by transposition mutagenesis. *Lett Biotechnol*, 2014, 25(5): 628–631 (in Chinese).  
韩月梅, 葛欣, 王鹤, 等. 通过转座诱变筛选甲基营养菌吡咯喹啉醌合成缺陷突变株. *生物技术通讯*, 2014, 25(5): 628–631.

(本文责编 郝丽芳)