

吡咯喹啉醌高通量检测方法的建立与优化

夏雨^{1,2}, 周景文^{1,2}, 陈坚^{*1,2}

(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)

摘要: 吡咯喹啉醌(Pyrroloquinoline quinone, PQQ)是一种新型辅酶,具有广阔的应用前景。传统PQQ检测方法在检测发酵液中PQQ浓度时都存在一定的缺陷,且检测效率偏低。本研究在大肠杆菌(*Escherichia coli* BL21(DE3))中表达*E. coli* K-12来源的葡萄糖脱氢酶(PQQGDH),并通过亲和层析分离纯化PQQGDH,得到了高浓度、高纯度的PQQGDH。通过酶液和PQQ样品用量的双因素正交实验对传统重组酶法的反应体系加以改进,得到适用于96孔板高通量检测的反应体系。结果表明30 μ L纯化后酶液、2 μ L PQQ样品配合1.2 mL的显色剂组成的显色体系检测效果最佳。该方法线性范围大且具有较高的精确度和重现性。本研究中利用高浓度、高纯度的PQQGDH配合96孔板和酶标仪,所建立的PQQ高通量检测方法,不仅降低了实验误差,而且大幅提高了PQQ发酵液样品的检测效率。

关键词: 吡咯喹啉醌;葡萄糖脱氢酶;亲和纯化;重组酶法检测;高通量检测

中图分类号:Q 814 文献标志码:A 文章编号:1673-1689(2017)02-0122-07

Establishment and Optimization of the High-Throughput Measurement of Pyrroloquinoline Quinone

XIA Yu^{1,2}, ZHOU Jingwen^{1,2}, CHEN Jian^{*1,2}

(1. Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, China;
2. School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: Pyrroloquinoline quinone (PQQ) is a new coenzyme that has broad application prospect. Previous methods used for measuring PQQ in fermentation broth are defective and low-efficient. In this study, D-glucose dehydrogenase (PQQGDH) from *Escherichia coli* K-12 was expressed in *E. coli* BL21 and then purified by the nickel-affinity chromatography column. For the high-throughput measurement of PQQ the optimal reaction system was found by orthogonal experiment to contain 30 μ L PQQGDH, 2 μ L PQQ sample and 1.2 mL chromogenic reagent. The method was linear within a wide range and had high precision and good reproducibility. Compared with traditional methods, the high-throughput measurement of PQQ using purified PQQGDH, 96-well plate and microplate reader are herein more accurate and efficient.

收稿日期: 2015-03-22

基金项目: 国家 863 计划项目(2012AA022103)。

* 通信作者: 陈坚(1965—),男,江苏扬州人,工学博士,教授,博士研究生导师,国家杰出青年基金获得者,主要从食品生物技术及生物工程研究。E-mail:jchen@jiangnan.edu.cn

引用本文: 夏雨,周景文,陈坚. 吡咯喹啉醌高通量检测方法的建立与优化[J]. 食品与生物技术学报, 2017, 36(02): 122-128.

Keywords: pyrroloquinoline quinone, D-glucose dehydrogenase, affinity purification, enzymatic measurement, high-throughput measurement

吡咯喹啉醌(Pyrroloquinoline quinone, PQQ)是一种有别于吡啶核苷酸(NAD、NADP)和核黄素(FMN、FAD)的第三类辅酶,广泛存在于革兰氏阴性菌中^[1]。PQQ是大量膜结合脱氢酶的辅酶,例如普通生酮基古龙酸菌(*Ketogulonicigenium vulgare*)中的L-山梨糖脱氢酶与L-山梨酮脱氢酶、氧化葡萄糖酸杆菌(*Gluconobacter oxydans*)中的D-山梨醇脱氢酶和大肠杆菌(*Escherichia coli*)中的葡萄糖脱氢酶(PQQGDH)等都以PQQ为辅酶^[2-3]。PQQ不仅是一种辅酶,它还具有许多生物活性,应用前景广阔。例如抗氧化及加速某些动植物生长等^[4-5]。此外,实验表明PQQ可以通过氧化还原反应激活表皮生长因子受体,从而起到促进上皮细胞增殖的作用^[6]。人体实验表明,服用PQQ后人体内一些线粒体代谢相关的指标会发生明显改变^[7]。PQQ应用前景广阔,但发酵液中PQQ浓度的检测方法还不完善。

PQQ传统的定量检测方法包括高效液相色谱法、非酶法(NBT-Gly法)、紫外吸收光谱法以及重组酶法,各个方法适用范围不同且各有优缺点。高效液相色谱法专一性强、可重复性强;但衍生化操作复杂,尤其是发酵液需要处理后才能经HPLC检测PQQ,且对PQQ的纯度要求很高、灵敏度低^[8]。NBT-Gly法操作快速简便、适用于大量检测样品;但硝基四唑兰(NBT)暴露在空气中很快即被氧化,所以此方法准确度不高且重复性也不佳^[9]。紫外吸收光谱法无需要复杂的试剂和昂贵仪器;但如果培养基颜色较深就会影响吸光值测定的准确度^[10]。重组酶法是所有方法中灵敏度最高的,且专一性强;但该方法中所用脱辅酶的葡萄糖脱氢酶(PQQGDH)来自野生菌膜组分,膜组分制备操作复杂,且得到膜组分中PQQGDH纯度和浓度都很低,一次实验能检测样品数较少^[11-12]。

综合以上PQQ检测方法的优缺点,发现重组酶法灵敏度、高专一性强且受干扰因素最少,最适于发酵液中PQQ浓度的测定。传统重组酶法所用酶液中PQQGDH浓度和纯度较低,且膜组分制备复杂,不利于PQQ样品的大量检测,因此制备高纯度的

PQQGDH是改进该方法关键。本研究中高效表达了PQQGDH,并分离纯化得到了高浓度、高纯度的PQQGDH。利用高浓度、高纯度的PQQGDH优化了重组酶法反应体系,引入96孔板和酶标仪,建立了PQQ高通量检测方法,不仅降低了实验误差而且能高通量对发酵液样品进行检测,大幅提高检测效率。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒 *G. oxydans* WSH-003,购自江苏江山制药有限公司;用于载体构建的*E. coli* JM109,用于扩增葡萄糖脱氢酶序列的*E. coli* K-12,用于表达葡萄糖脱氢酶的*E. coli* BL21(DE3)以及表达载体pET-28a,购自Novagen公司。用于载体构建的pMD19-T Simple,购自宝生物工程(大连)有限公司。

1.1.2 培养基及培养条件

1) LB培养基:蛋白胨 10 g/L,酵母粉 5 g/L,氯化钠 10 g/L; TB培养基:蛋白胨 12 g/L,酵母粉 24 g/L,甘油 4 mg/L, KH_2PO_4 2.31 g/L, K_2HPO_4 12.54 g/L; 山梨醇培养基:山梨醇 150 g/L,酵母粉 10 g/L; 发酵培养基:山梨醇 150 g/L,酵母浸膏 20 g/L。固体培养基则在液体培养基基础上加入 20 g/L 琼脂。

2) *E. coli* JM109 培养条件:从 LB 固体平板上划线得到 *E. coli* JM109 单菌落,挑取单菌落于加有 25 mL LB 培养基的 250 mL 摇瓶中,放置于 37 ℃、220 r/min 摇床上培养。

3) *E. coli* BL21(DE3) 诱导表达条件:从甘油管取 100 μL *E. coli* BL21(DE3) 接种于 25 mL LB 培养基,37 ℃、220 r/min 过夜培养;取 5 mL 转接于 500 mL TB 培养基中,30 ℃、220 r/min 培养 4 h 至 OD 为 1.0;加异丙基硫代半乳糖苷(IPTG)至终摩尔浓度 400 $\mu\text{mol/L}$,25 ℃、220 r/min 过夜培养。

4) *G. oxydans* 培养条件:从山梨醇固体平板上划线得到 *G. oxydans* 单菌落,挑取单菌落接种至加有 25 mL 山梨醇培养基的 250 mL 的摇瓶中,放置于 30 ℃、220 r/min 摇床上培养 36 h,按体积分数

10%接种量转接至加有 50 mL 发酵培养基的 500 mL 的摇瓶中,放置于 30 ℃、220 r/min 摇床上培养 48 h。

培养过程中抗生素用量为卡那霉素 50 μg/mL 或氨苄青霉素 100 μg/mL。

1.1.3 主要试剂和仪器 *E. coli* JM109 高效感受态细胞制备试剂盒, Ezup 柱式细菌基因组 DNA 抽提试剂盒和 SanPrep 柱式质粒 DNA 小量抽提试剂盒, 购自生工生物工程(上海)股份有限公司;用于 DNA 片段的回收和纯化的 GeneJET Gel Extraction Kit, 购自 Thermo 公司;限制性内切酶, 连接酶, DNA 聚合酶, 2,6-二氯酚(DCIP)和硫酸甲酯吩嗪(PMS)等, 购买自宝生物工程(大连)有限公司;PQQ 标准品, 购自 sigma 公司;Bio-Rad C1000 Touch Thermal Cycler 型 PCR 仪, Gene Pulser Xcell™ 型 Bio-Rad 电转仪, 美国伯乐公司 (BIO-BAD) 产品;Thermo Multiskan FC 型酶标仪, 美国赛默飞世尔科技公司产品。

1.2 方法

1.2.1 pET-28a-gcd 表达载体的构建 提取 *E. coli* K-12 的基因组, 用 gcd-F 和 gcd-R 引物 PCR 扩增葡萄糖脱氢酶基因 *gcd* (见表 1)。将 *gcd* 基因连接 pMD19-T Simple 载体, 转化 *E. coli* JM109 并涂布含卡那霉素的 LB 平板, 菌落 PCR 并挑选正确的转化子送生工生物工程(上海)股份有限公司测序。提取测序正确转化子中的质粒, 用限制性内切酶 *Bam*HI 和 *Hind*III 酶切提取的质粒得到正确的 *gcd* 基因片段, 同时用 *Bam*HI 和 *Hind* III 双酶切 pET-28a 表达载体。将酶切后的 *gcd* 基因与 pET-28a 载体按体积比 4:1 进行连接, 得到 pET-28a-gcd, 并转化预先制备的 *E. coli* BL21(DE3)感受态细胞, 得到 *E. coli* BL21(DE3)/pET-28a-gcd 重组菌株。

表 1 实验所用引物

Table 1 Primers used in this study

引物	序列(5'~3')	限制性内切酶
gcd-F	CGCGGATCCATGGCAATTAACAAT-ACAGGC	<i>Bam</i> HI
gcd-R	CCCAAGCTTTTACTTCACATCATCCGGC	<i>Hind</i> III

注:“下划线所示区域为限制性内切酶的酶切位点。”

1.2.2 PQQGDH 的诱导表达 从 LB 平板挑取 *E. coli* BL21 (DE3)/pET-28a-gcd 单菌落接种于 25 mL LB 培养基, 37 ℃、220 r/min 过夜培养。取 5 mL 转接于

500 mL TB 培养基, 30 ℃、220 r/min 培养 4 h 至 OD₆₀₀ 为 1.0, 加 IPTG 至终浓度 400 μmol/L, 25 ℃、220 r/min 过夜培养。将培养液转至离心杯, 4 000 r/min 离心 10 min, 弃上清液。加 50 mmol/L pH 7.0 的磷酸盐缓冲液(PBS)重悬菌体, 超声波破碎 20 min, 破碎液 10 000 r/min 离心 30 min, 弃上清液。加 50 mmol/L PBS 溶液(pH 7.0)重悬沉淀, 得到 PQQGDH 的粗酶液。*E. coli* BL21(DE3)/pET-28a-gcd 诱导表达后的全细胞液, *E. coli* BL21(DE3)/pET-28a-gcd 未经诱导的全细胞液, *E. coli* BL21(DE3)/pET-28a-gcd 菌诱导表达后的破碎上清液分别加上样缓冲液并煮沸 10 min 后进行 SDS-PAGE 分析。用 NuPAGE® 预制凝胶系统 (Life Technologies 公司) 进行 SDS-PAGE 电泳, 电压 200 V, 电流 100 mA, MOPS 缓冲液 (母液为 20× MOPS 缓冲液), 上样量为 10 μL。电泳完毕后, 用考马斯亮蓝染色 2 h 后脱色。

1.2.3 PQQGDH 的分离纯化 利用 AKTA 纯化系统与 Ni-NTA 亲和层析柱(QIAGEN)提纯葡萄糖脱氢酶^[13]。将纯化后的 PQQGDH 按进行蛋白质电泳分析。蛋白质浓度测定采用考马斯亮蓝法 (Bradford 法)^[14], 以牛血清蛋白(BSA)为标准蛋白质。

1.2.4 PQQ 高通量检测反应体系的确定 将 0.005 8 g DCIP、0.061 2 g PMS、0.36 g 葡萄糖和 0.004 8 g MgSO₄ 溶解于 100 mL 50 mmol/L 的 PBS 溶液(pH 7.0)中, 制成酶活检测所需显色剂。分别取四组 5、10、30 μL 和 50 μL 纯化后酶液于 96 深孔板中, 每组分别加入 2、20、50 μL 和 100 μL 发酵 48 h 后的 *G. oxydans* WSH-003(PQQ 生产菌)发酵液上清液, 于 30 ℃温育 10 min。然后往每个孔中加入 1.2 mL 制好的显色剂, 混匀后吸取 200 μL 加入 96 孔板, 立即放入酶标仪, 在 OD₆₂₀ 滤镜下每 20 s 检测一次反应液褪色情况, 检测 10 min。确定最佳的酶液和 PQQ 样品用量。

1.2.5 PQQ 标准曲线的测定 根据 1.2.4 实验确定的酶液和 PQQ 样品用量, 将酶液和不同质量浓度的 PQQ 标准品加入 96 深孔板, 于 30 ℃温育 10 min 后, 加入 1.2 mL 制好的显色剂, 混匀后吸取 200 μL 加入 96 孔板, 立即放入酶标仪, 在 OD₆₂₀ 滤镜下每 20 s 检测一次反应液褪色情况, 检测 10 min。计算 DCIP 褪色速率, 根据标样的 PQQ 质量浓度和 DCIP

褪色速率的关系绘制标准曲线,并根据标准曲线确定 *G. oxydans* 胞外的 PQQ 质量浓度。

检测细胞胞内 PQQ 质量浓度时,取 1 mL 发酵液于 12 000 r/min 离心 1 min,弃上清液并加等体积的 50 mmol/L PBS 缓冲液 (pH 7.0) 重悬菌体,超声波破碎 5 min。破碎液于 12 000 r/min 离心 2 min,弃上清液,加入 1 mL 50 mmol/L PBS 缓冲液 (pH 7.0) 得到 *G. oxydans* 的胞内破碎液,用于检测 *G. oxydans* 胞内的 PQQ 质量浓度。

2 结果与讨论

2.1 PQQGDH 的诱导表达与分离纯化

将测序验证正确的重组质粒 pET-28a-gcd 转化进入 *E. coli* BL21 得到重组菌并诱导表达 PQQGDH。*E. coli* BL21(DE3) 所表达 PQQGDH 为胞浆蛋白。如图 1 所示,经过诱导表达后,对照菌株在 87×10^3 处未见明显条带 (泳道 2),而重组菌株在 87×10^3 处有明显蛋白质条带 (泳道 1),表明 PQQGDH 得到了高效表达。随后破碎重组菌株的细胞,利用 AKTA 纯化系统与 Ni-NTA 亲和层析柱 (QIAGEN) 提纯,如泳道 4 所示,得到较高纯度 PQQGDH 蛋白质,并用此蛋白质进行蛋白质质量浓度测定,纯化后酶液的蛋白质浓度为 266.4 mg/L。

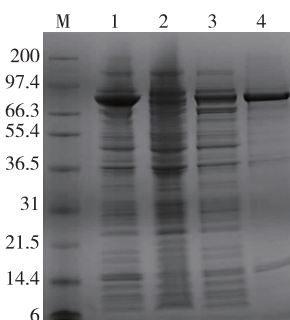


图 1 葡萄糖脱氢酶表达后 SDS-PAGE 电泳检测

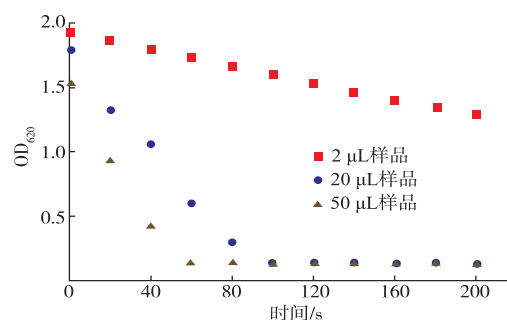
Fig. 1 SDS-PAGE analysis of PQQGDH from *E. coli* BL21(DE3)

2.2 高通量检测体系的建立

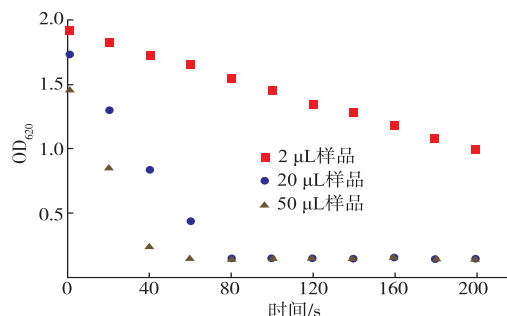
为了建立最佳检测发酵液中 PQQ 质量浓度的高通量检测体系,本实验中选用 *G. oxydans* 发酵液上清液作为 PQQ 样品进行显示反应,更真实地模拟实际检测条件。为了确定反应体系中酶液和 PQQ 样品的最佳用量,分别以 5、10、30 μ L 和 50 μ L 酶液 (蛋白质质量浓度 266.4 mg/L) 用量条件与 2、20、50 μ L 和 100 μ L PQQ 样品 (*G. oxydans* 发酵液上清液) 用

量条件设计正交实验。实验过程中发现,所有用 5 μ L 和 10 μ L 酶液进行的显色反应,DCIP 褪色不明显,不利于 DCIP 褪色速率的计算;所有用 100 μ L 发酵液上清液进行的显色反应,加入显色剂后体系褪色极快,无法计算 DCIP 的褪色速率。

在用 50 μ L 酶液进行显色反应中,用 50 μ L 发酵液上清液进行显色反应时,DCIP 在 40 s 褪色变缓,只得到 3 个时间点的有效 OD 值数据,不利于 DCIP 褪色速率的准确计算;用 20 μ L 发酵上清液进行显色反应时,DCIP 在 80 s 褪色结束,得到的有效数据也较少。用 2 μ L 发酵上清液进行显色反应时,DCIP 在 6 min 后不再褪色,可以得到较多时间点的数据,且 DCIP 吸光度与时间呈很好的线性关系 (见图 2(a))。在用 30 μ L 酶液进行显色反应中,用 50 μ L 发酵上清液进行显色反应时,DCIP 在 60 s 后不再褪色,无法得到足够的点计算 DCIP 褪色速率;用 20 μ L 发酵上清液进行显色反应时,DCIP 在 100 s 后褪色结束,数据较少不利于 DCIP 褪色速率的准确计算。在用 2 μ L 发酵上清液进行显色反应时,DCIP 在 8 min 后不再褪色,可以得到较多时间点的 OD 数据,且 DCIP 吸光度与时间呈很好的线性关系 (见图 2(b))。



(a) 酶液用量为 30 μ L 时 DCIP 的褪色速率



(b) 酶液用量为 30 μ L 时 DCIP 的褪色速率

图 2 不同 PQQ 样品用量对 DCIP 褪色速率的影响

Fig. 2 Effect of different volumes of PQQ on the fading rate of DCIP

以上结果表明, PQQ 样品用量为 2 μL 、酶液用量 30 μL 或 50 μL 时, 可以得到较好的吸光值随时间变化数据, 有利于准确计算 DCIP 褪色速率, 从而更准确地测定 PQQ 质量浓度。最终选择 30 μL 酶液、2 μL PQQ 样品用量的反应体系。根据酶液的蛋白质质量浓度可知 30 μL 酶液中蛋白质质量为 7.99 μg 。500 mL TB 培养基发酵工程菌可以得到 50 mL 酶液(蛋白质质量浓度 266.4 mg/L), 每个反应体系仅需 30 μL 纯化后的酶液, 一次纯化得到的 PQQGDH 可用于 1 600 多个样品的检测。

2.3 PQQ 标准曲线及 *G. oxydans* 胞内外 PQQ 质量浓度的测定

为了测定 *G. oxydans* 胞内外 PQQ 质量浓度, 首先制作 PQQ 标准曲线。将 30 μL 酶液和 2 μL PQQ 标样(20、40、60、80 $\mu\text{g/L}$ 和 100 $\mu\text{g/L}$)于 30 $^{\circ}\text{C}$ 温育 10 min 后, 加入 1.2 mL 制好的显色剂, 混匀后吸取 200 μL 加入 96 孔板, 立即放入酶标仪, 在 OD₆₂₀ 滤镜下每 20 s 检测一次反应液褪色情况, 检测 10 min。计算不同质量浓度 PQQ 标样的 DCIP 褪色速率, 根据 PQQ 质量浓度和 DCIP 褪色速率的关系绘制标准曲线, 得到重复性较高的 PQQ 质量浓度和 DCIP 褪色速率的线性方程 ($y=6.11\times 10^{-5}x+8.34\times 10^{-5}$, $R^2=0.9981$)(见图 3)。

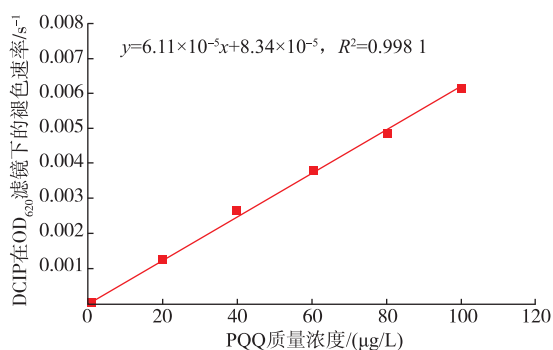


图3 PQQ 检测的标准曲线(0~100 $\mu\text{g/L}$)

Fig. 3 Standard curve for determination of PQQ (0~100 $\mu\text{g/L}$)

为验证本方法测定发酵液中 PQQ 质量浓度的可靠性, 选取 *G. oxydans* 作为研究对象, 测定其胞内外 PQQ 质量浓度。将 *G. oxydans* WSH-003 按 1.1.2 所示方法培养, 测定 *G. oxydans* 胞外 PQQ 浓度为 (48.8 ± 2.4) $\mu\text{g/L}$; 将细胞破碎后用 PBS 缓冲液重悬, 测定 *G. oxydans* 胞内 PQQ 质量浓度为 (8.1 ± 1.3) $\mu\text{g/L}$ 。与文献报道的 *G. oxydans* 胞外 PQQ 质量浓度

(44.6 ± 7.9) $\mu\text{g/L}$, 胞内浓度是胞外的 20% 相吻合^[15]。

2.4 PQQ 高通量检测法精确度、重现性和线性范围的测定

分别配制 6 个浓度为 100 $\mu\text{g/L}$ 的 PQQ 标准品, 测定 DCIP 褪色速率分别为 0.006 11、0.006 23、0.006 31、0.006 09、0.006 18 s^{-1} 和 0.006 28 s^{-1} , 标准偏差(RSD)为 1.44%。测定同一摇瓶内 *G. oxydans* 发酵上清液 6 次, 所得 PQQ 质量浓度分别为 42.3、43.3、44.2、42.6、42.1 $\mu\text{g/L}$ 和 43.3 $\mu\text{g/L}$, RSD 为 1.82%。这表明利用表达纯化后的 PQQGDH 建立的 PQQ 高通量检测方法有较高的精确度和重现性。图 3 所做标准曲线测量范围较小(0~100 $\mu\text{g/L}$), 为了确定该检测方法的线性范围, 进一步选取 0、100、500、1 000、1 500、2 000、3 000 $\mu\text{g/L}$ 和 5 000 $\mu\text{g/L}$ 的 PQQ 标准品测定标准曲线。PQQ 质量浓度在 0~2 000 $\mu\text{g/L}$ 范围内, PQQ 质量浓度与 DCIP 褪色速率呈线性关系 ($y=6.31\times 10^{-5}x-3.01\times 10^{-4}$, $R^2=0.9974$)(见图 4)。在用 3 000 $\mu\text{g/L}$ 和 5 000 $\mu\text{g/L}$ 的 PQQ 标准品进行重组酶法检测时, DCIP 褪色过快, 无法准确测定 DCIP 褪色速率。因此, 用文中所配制显色剂检测 PQQ 的线性范围为 0~2 000 $\mu\text{g/L}$ 。如需测定 PQQ 质量浓度高于 2 000 $\mu\text{g/L}$ 的样品, 应增加显色剂中 DCIP 和 PMS 的用量, 以便准确测定 DCIP 褪色速率。

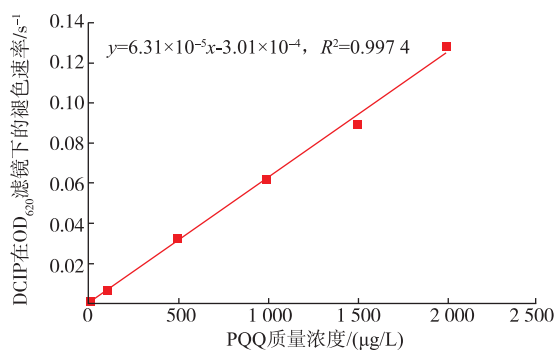


图4 PQQ 检测的标准曲线(0~2 000 $\mu\text{g/L}$)

Fig. 4 Standard curve for determination of PQQ (0~2 000 $\mu\text{g/L}$)

3 结 语

本研究中通过诱导表达和分离纯化, 得到了高浓度、高纯度的 PQQGDH, 建立了 PQQ 高通量检测方法, 降低实验误差的同时大幅提高了 PQQ 发酵液样品的检测效率。建立并优化后的 PQQ 高通量检测法具有 3 大优势。首先, 传统重组酶法的 PQQGDH

需要通过多次破碎和超速离心得到,野生菌中PQQGDH含量很低,而重组酶法又需要大量的PQQGDH,一次检测蛋白用量为1 mg/mL^[16]。利用重组菌发酵一次可以制备更多更纯的PQQGDH,500 mL TB培养基发酵工程菌得到的PQQGDH可用于1 600多个样品的检测。且纯化后的PQQGDH可于-20℃长期保存,无需每次检测前临时制备酶液。其次,传统重组酶法提到要用乙二胺四乙酸(EDTA)多次冲洗膜组分才能去除膜组分中PQQGDH活性的背景干扰^[17]。纯化后的PQQGDH无

需EDTA处理,纯化后酶液中杂蛋白质少,不会对显色体系造成干扰。最后,通过正交实验确定了PQQ高通量检测反应体系为30 μL酶液、2 μL PQQ标准品或样品以及1.2 mL显色剂,缩小了反应体系,配合96孔板和酶标仪实现了PQQ高通量检测,在得到更准确的DCIP褪色速率的同时大幅提高了PQQ检测效率。该方法线性范围大且具有较高的精确度和重现性。由此可见,利用成熟的生物技术和先进的科研仪器建立并优化后的PQQ高通量检测方法可以更加精确而高效地检测PQQ。

参考文献:

- [1] GOODWIN P M, ANTHONY C. The biochemistry, physiology and genetics of PQQ and PQQ-containing enzymes[J]. **Advances in Microbial Physiology**, 1998, 40: 1-80.
- [2] GAO L, DU G, ZHOU J, et al. Characterization of a group of pyrroloquinoline quinone-dependent dehydrogenases that are involved in the conversion of L-sorbose to 2-Keto-L-gulonic acid in *Ketogulonicigenium vulgare* WSH-001[J]. **Biotechnology Progress**, 2013, 29(6): 1398-1404.
- [3] GAO L, HU Y, LIU J, et al. Stepwise metabolic engineering of *Gluconobacter oxydans* WSH-003 for the direct production of 2-keto-L-gulonic acid from D-sorbitol[J]. **Metabolic Engineering**, 2014, 24: 30-37.
- [4] RUCKER R B, HARRIS C, CHOWANADISAI W, et al. Pyrroloquinoline quinone(PQQ) and indicators of antioxidant potential, inflammation and metabolism in humans[J]. **The FASEB Journal**, 2012, 26: 363.
- [5] MISRA H, RAJPUROHIT Y, KHAIRNAR N. Pyrroloquinoline-quinone and its versatile roles in biological processes[J]. **Journal of Biosciences**, 2012, 37(2): 313-325.
- [6] KIMURA K, TAKADA M, ISHII T, et al. Pyrroloquinoline quinone stimulates epithelial cell proliferation by activating epidermal growth factor receptor through redox cycling[J]. **Free Radical Biology and Medicine**, 2012, 53(6): 1239-1251.
- [7] HARRIS C B, CHOWANADISAI W, MISHCHUK D O, et al. Dietary pyrroloquinoline quinone (PQQ) alters indicators of inflammation and mitochondrial-related metabolism in human subjects[J]. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, 2013, 24(12): 2076-2084.
- [8] ZHANG Z, TILLEKERATNE L, KIRCHHOFF J R, et al. High-performance liquid chromatographic separation and pH-dependent electrochemical properties of pyrroloquinoline quinone and three closely related isomeric analogues[J]. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 1995, 212(1): 41-47.
- [9] ZHAO Yongfang, XU Ning, WANG Yingshan, et al. Determination of a new prothetic group pyrroloquinoline quinone (PQQ) using noenzymatic system[J]. **Journal of Wuhan University: Natural Science Edition**, 1995, 41(6): 777-780. (in Chinese)
- [10] YANG Yanxin, XIONG Xianghua, YOU Song, et al. Comparing three kinds of pyrroloquinoline quinone detection methods[J]. **Letters in Biotechnology**, 2011, 22(4): 544-547. (in Chinese)
- [11] MATSUSHITA K, ARENTS J, BADER R, et al. *Escherichia coli* is unable to produce pyrroloquinoline quinone (PQQ)[J]. **Microbiology**, 1997, 143(10): 3149-3156.
- [12] YANG X P, ZHONG G F, LIN J P, et al. Pyrroloquinoline quinone biosynthesis in *Escherichia coli* through expression of the *Gluconobacter oxydans* *pqqABCDE* gene cluster[J]. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, 2010, 37(6): 575-580.
- [13] MITCHELL D M, GENNIS R B. Rapid purification of wildtype and mutant cytochrome c oxidase from *Rhodobacter sphaeroides* by Ni²⁺-NTA affinity chromatography[J]. **FEBS Letters**, 1995, 368(1): 148-150.
- [14] BRADFORD M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding[J]. **Analytical Biochemistry**, 1976, 72(1): 248-254.

- [15] HOLSCHER T, GORISCH H. Knockout and overexpression of pyrroloquinoline quinone biosynthetic genes in *Gluconobacter oxydans* 621H[J]. **Journal of Bacteriology**, 2006, 188(21):7668-7676.
- [16] GEIGER O, GORISCH H. Enzymatic determination of pyrroloquinoline quinone using crude membranes from *Escherichia coli* [J]. **Analytical Biochemistry**, 1987, 164(2):418-423.
- [17] AMEYAMA M, NONOBE M, SHINAGAWA E, et al. Method of enzymatic determination of pyrroloquinoline quinone [J]. **Analytical Biochemistry**, 1985, 151(2):263-267.

会 议 消 息

会议名称(中文):2017 年皇后镇分子生物学(上海)会议青年科学家论坛

所属学科:生物物理学、生物化学及分子生物学,生物医学工程学

开始日期:2017-03-16 结束日期:2017-03-17

所在城市:上海市 黄浦区

主办单位:国家新药筛选中心

摘要截稿日期:2017-02-20

联系人:臧奕

E-MAIL:yzang@simm.ac.cn

会议网站:<http://screen.org.cn/2637/55168/66256.shtml>

会议背景介绍:本次会议特设青年科学家论坛(Young Investigators Forum)和墙报展示(Poster Session),为在药物筛选及新药发现领域辛勤劳动的青年学者提供一个进行学术交流和研究切磋的国际平台。

会议名称(中文):第 21 届国际计算分子生物学研究会议

会议名称(英文):The 21st Annual International Conference on Research in Computational Molecular Biology

所属学科:生物物理学、生物化学及分子生物学,细胞生物学,生物技术与生物工程

开始日期:2017-05-03 结束日期:2017-05-07

所在城市:香港特别行政区 香港

主办单位:香港大学

会议网站:<http://groups.csail.mit.edu/cb/recomb2017/>

会议背景介绍:RECOMB 2017 is the 21st in a series of well-established scientific conferences bridging the areas of computational, mathematical, statistical and biological sciences. The conference features keynote talks by preeminent scientists in life sciences, proceeding presentations of peer-reviewed research papers in computational biology, and poster sessions on the latest research progress.

The conference series aims at attracting research contributions in all areas of computational molecular biology, including but not limited to: molecular sequence analysis; recognition of genes and regulatory elements; molecular evolution; protein structure; structural genomics; analysis of gene expression; biological networks; sequencing and genotyping technologies; drug design; probabilistic and combinatorial algorithms; systems biology; computational proteomics; structural and functional genomics; information systems for computational biology and imaging.

The origins of the conference are in the mathematical and computational side of the field, and there remains a certain focus on computational advances. However, effective applications of computational techniques to achieve biological innovation remain a central aspect of the conference.