



杨美英, 卢冬雪, 孙合美, 等. *Serratia* sp. NDW3 GADH 小亚基基因 *ga2dh* 的克隆及表达分析[J]. 华南农业大学学报, 2017, 38(2): 69-74.

Serratia sp. NDW3 GADH 小亚基基因 *ga2dh* 的克隆及表达分析

杨美英¹, 卢冬雪¹, 孙合美¹, 武志海², 岳胜天¹, 付 丽¹

(1 吉林农业大学 生命科学学院, 吉林 长春 130118; 2 吉林农业大学 农学院, 吉林 长春 130118)

摘要:【目的】克隆葡萄糖酸脱氢酶(GADH)小亚基基因 *ga2dh* 并进行鉴定。【方法】研究水稻根际细菌 *Serratia* sp. NDW3 溶磷过程中菌株溶磷量、GADH 活性与 *ga2dh* 基因表达量的变化,对 *ga2dh* 基因进行克隆和生物信息学分析,并检测 *ga2dh* 基因在大肠埃希菌 BL21 中的表达。【结果】*Serratia* sp. NDW3 溶磷过程中 *ga2dh* 基因的相对表达量在 12 h 最大,GADH 活性在 24 h 达到最大值,NDW3 溶磷量在 36 h 后趋于稳定。从 *Serratia* sp. NDW3 菌株中克隆获得了 781 bp 的 *ga2dh* 基因序列,生物信息学分析发现该序列与 *Serratia* sp. SCBI 菌株的基因相似性为 99.62%,编码的蛋白属于葡萄糖酸脱氢酶亚基 3 超家族,主要由 3 个 α -螺旋构成,且氨基酸序列中包含有位于胞内、胞外和跨膜的区域。*ga2dh* 基因在大肠埃希菌 BL21 体内表达,能够使得菌体 GADH 的活性显著增加。【结论】*Serratia* sp. NDW3 菌株溶磷的主要机制依赖于直接氧化途径,*ga2dh* 基因编码的小亚基不仅对 GADH 活性起重要作用,也是介导 GADH 跨膜结构的重要组成部分。

关键词:水稻; 溶磷菌; GADH; *ga2dh*; 基因表达; 酶活性
中图分类号:S565.101 **文献标志码:**A **文章编号:**1001-411X(2017)02-0069-06

Cloning and expression analysis of GADH small subunit gene *ga2dh* from *Serratia* sp. NDW3

YANG Meiyong¹, LU Dongxue¹, SUN Hemei¹, WU Zhihai², YUE Shengtian¹, FU Li¹
(1 College of Life Science, Jilin Agricultural University, Changchun, 130118 China;
2 Faculty of Agronomy, Jilin Agricultural University, Changchun, 130118 China)

Abstract:【Objective】To clone and identify GADH small subunit gene *ga2dh*. 【Method】Changes in soluble phosphorus content, GADH activity and *ga2dh* gene expression level during the phosphate solubilizing process of *Serratia* sp. NDW3 from rice rhizosphere were studied. The *ga2dh* gene was cloned and expressed in *Escherichia coli* BL21, and bioinformatic analysis was performed. 【Result】The relative expression of *ga2dh* gene in the process of phosphate solubilizing by *Serratia* sp. NDW3 reached maximum at 12 h, GADH activity reached maximum at 24 h, and the soluble phosphorus content stabilized after 36 h. The *ga2dh* gene sequence of 781 bp was obtained from *Serratia* sp. NDW3 by cloning. The similarity between *ga2dh* gene and *Serratia* sp. SCBI sequences was 99.62% based on bioinformatic analysis. The protein encoded by *ga2dh* belonged to the superfamily of gluconate dehydrogenase subunit 3 and was composed of three α -helices. The amino acid sequence was consisted of intracellular, extracellular and transmembrane regions. The expression of *ga2dh* gene in *E. coli* BL21 significantly increased GADH activity. 【Conclusion】The main mechanism of phosphate solubilizing by *Serratia* sp. NDW3 is through the direct oxidation pathway. The small subunit encoded by *ga2dh* gene not only plays an impor-

tant role in GADH activation, but also is part of the transmembrane structure of GADH.

Key words: rice; phosphate solubilizing bacteria; GADH; *ga2dh*; gene expression; enzyme activity

磷是继氮之后作物所需的第2大营养元素,在作物光合作用、能量转移、信号转导及大分子物质的生物合成中都起着关键的作用^[1]。但根据资料调查显示,我国有74%的耕地土壤缺磷^[2]。可溶性磷肥施入农田后,由于土壤的固定作用,大部分迅速转变为作物难以吸收的无效磷,无法被植物直接吸收利用,导致作物对磷肥的当季利用率不超过30%^[3]。土壤中溶磷微生物能依靠自身的代谢或其它生物协同作用^[4],将不溶性磷转变成植物可吸收利用的磷。

溶磷菌可明显促进作物的株高、干质量^[5]及产量的增加^[6],也可以促进作物对磷素的吸收^[7],增加土壤生物量。因此,越来越多的溶磷菌被分离,主要集中在假单胞菌属 *Pseudomonas*、埃希氏菌属 *Escherichia*、肠细菌属 *Enterbacter* 等^[8]。不同的溶磷菌溶磷的形式不同。微生物分泌的有机酸可作为 Ca^{2+} 的螯合剂,从而使磷从不溶性磷酸盐中释放出来。其中葡萄糖酮酸在土壤磷酸盐的风化和溶解过程中起着重要作用^[9]。Arvind 等^[10]提出,参与直接氧化途径的葡萄糖脱氢酶(GDH)和葡萄糖酸脱氢酶(GADH)都定位在溶磷微生物的细胞膜外侧^[8],当葡萄糖扩散至质膜时,在GDH的作用下被氧化成葡萄糖酸,葡萄糖酸进一步在GADH的作用下被直接氧化形成酸性特别强的葡萄糖酮酸^[11],然后被分泌到细胞壁和细胞膜之间,使胞外处于酸性极高的环境,从而溶解不溶性磷酸钙^[12]。

FAD(黄素腺嘌呤二核苷酸)-GADH由FAD-脱氢酶大亚基、含有血红素C的中间亚单位和1个小亚基组成,大亚基和中间亚单位的功能主要是参与氢及电子的传递,小亚基功能未知^[13]。本研究以水稻根际土壤分离到的溶磷细菌—*Serratia* sp. NDW3为研究对象,对菌株NDW3 GADH小亚基基因*ga2dh*进行克隆与分析,旨在明确该基因的性质以及在菌株NDW3溶磷过程中的作用特点,进一步揭示溶磷菌的溶磷机制,为溶磷菌在农业生产上的应用提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

菌株 *Serratia* sp. NDW3 为吉林农业大学作物营养代谢与调控实验室于2014年分离于吉林农业大学水稻试验田、具有较好溶磷能力的溶磷菌。大肠

埃希菌菌株 DH5 α 、BL21(DE3)及载体 pET28a(+)均为该实验室保存。pMD18-T 载体试剂盒、琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒及限制性内切酶、Ex-Taq 酶、T4 DNA 连接酶、DNA Marker、蛋白质分子量标准均购于 TaKaRa 公司。细菌 RNA 提取试剂盒为天根生化科技(北京)有限公司产品,Easy Script TMFirst-strand cDNA Synthesis Super Mix 反转录试剂盒为北京全式金生物技术有限公司产品,其它试剂均为国产分析纯。

NBRIP(National botanical research institute's phosphate)培养基及 LB 培养基的配制参照文献[14]。

1.2 菌株 NDW3 溶磷量的测定

采用钼蓝比色法测定菌株的溶磷量^[15],以 NBRIP 为基础培养基, $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 为唯一磷源,接种等量灭活菌液为对照。菌株 NDW3 接种在 LB 培养基中,当培养液细胞浓度为 $D_{600\text{nm}}=0.6$ 时,菌液以 φ 为1%的接种量接入装有50 mL 液体培养基的150 mL 三角瓶中,30℃,150 r·min⁻¹ 进行培养,重复3次。每隔12 h 取样1次,将2 mL 发酵液,10 000 r·min⁻¹ 离心5 min,取1 mL 上清液加水至3 mL,加入3 mL 定磷试剂,测定上清液的含磷量,计算供试菌株的溶磷量;菌体用于 RNA 的提取。

1.3 GADH 活性的测定

GADH 活性测定参照 Yang 等^[16]方法:通过铁氰化钾作为电子受体,取780 μL McIlvaine 缓冲液放入25 mL 离心管中,然后加入0.1 mol·L⁻¹ 铁氰化钾和1 mol·L⁻¹ 葡萄糖酸钠各100 μL ,混匀后加入20~200 μL 提取的粗酶液,再加入500 μL 铁-Dupanol 溶液终止反应,25℃温育20 min 进行显色,最后加入3.5 mL 去离子水,在波长为660 nm 条件下测定光密度值,空白对照用去离子水代替酶液。GADH 酶活力单位被定义为每分钟内催化1 μmol 葡萄糖酸钠所需的酶量(4.0 个光密度等于氧化1 μmol 的葡萄糖酸),酶活性用每毫克蛋白的酶活力单位数表示。

1.4 荧光定量 PCR

根据细菌总 RNA 试剂盒方法提取菌株 NDW3 的 RNA,采用 Easy Script TMFirst-strand cDNA Synthesis Super Mix 反转录试剂盒合成 cDNA。实时荧光定

量 PCR 采用定量试剂 SYBR Premix ExTaq™ 进行扩增反应,用 Primer 5.0 软件设计目的基因引物,GA2DH-F: 5'-CATCGTTTACAGCGTGGACTAC-3',GA2DH-R: 5'-TCCAGGTGTAGCGGTGAAATG-3',内参基因为 16S rRNA,引物 16S-F: 5'-CCAACCGAC-CTTTTTCACCC-3', 16S-R: 5'-TACGGCGTGTTCAT-CTGGC-3'。反应体系为 20 μL,包括 SYBR Premix ExTaq™ II (2 ×) 10 μL,上下游引物各 0.8 μL,ROX Reference Dye (50 ×) 0.4 μL,cDNA 模板 1.0 μL,ddH₂O 6.0 μL。PCR 反应条件为:95 ℃ 预变性 10 min;95 ℃ 变性 15 s,60 ℃ 复性 30 s,40 个循环。每个反应设置 3 次重复。利用 Step One 生物软件和 Microsoft Excel 分析处理试验结果,参照 ABI 公司提供的 $\Delta\Delta C_t$ 计算方法计算基因相对表达量。

1.5 *ga2dh* 基因的克隆与序列分析

从 GenBank 上检索序列,根据同属菌 *ga2dh* 基因的序列设计引物。以菌株 NDW3 的基因组 DNA 为模板,分别以 *ga2dh*-F: 5'-GACTATCTTTGGATG-GAATGTG-3' 和 *ga2dh*-R: 5'-GCGTCTACTTTTTCA-TTACCG-3' 为引物进行 PCR 扩增。PCR 产物经 10 g · L⁻¹ 琼脂糖凝胶电泳检测,检测正确的 DNA 片段经凝胶试剂盒回收与 pMD18-T 载体连接,转化大肠埃希菌 DH5α。经酶切及 PCR 验证为阳性的克隆送上海生工生物工程公司测序。将核苷酸序列转化成氨基酸序列后进行 BLAST 分析 (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>),并利用 SWISS-MODLE 网站进行结构预测,TMHMM-2.0 软件进行蛋白质跨膜区域的预测。

1.6 原核表达载体 pET-28a-*ga2dh* 的构建与鉴定

以测序为阳性的重组质粒 pMD18-T-*ga2dh* 为模板,两端具有 *EcoR* I/*Xho*I 酶切位点的引物 Ga2dh-F: 5'-CCGGAATTCGACTATCTTTGGATGGAATGTG-3' 和 Ga2dh-R: 5'-CCGCTCGAGGCGTCTACTTTTTTCAT-TACCG-3' (下滑线部分为酶切位点) 进行 PCR,获得两端分别带有 *EcoR* I 和 *Xho*I 酶切位点的目的片段。*EcoR* I 和 *Xho* I 双酶切目的片段和 pET28a(+) ,凝胶回收并于 16 ℃ 金属浴内连接 12 h。连接产物 42 ℃ 热激转化大肠埃希菌 BL21 (DE3) 感受态细胞。

1.7 重组质粒 pET-28a-*ga2dh* 在大肠埃希菌体内的诱导表达

将鉴定为阳性的 BL21 (pET-28a-*ga2dh*) 挑取单菌落到含卡那霉素 (Kan) 的 LB 液体培养基中,37 ℃,160 r · min⁻¹,过夜培养。以 φ 为 1% 的接种量将

过夜培养的菌液转接到含有 Kan 抗性的 LB 液体培养基中,37 ℃,160 r · min⁻¹ 培养至 $D_{600\text{ nm}}=0.6$ 。加入 IPTG 使其终浓度为 1.0 mmol · L⁻¹,诱导 2 和 4 h,各取 1 mL 菌液,10 000 r · min⁻¹,离心 10 min 收集菌体。将收集到的菌体加入 100 μL 样品溶解液充分混匀。100 ℃ 处理 10 min,裂解菌体细胞。12 000 r · min⁻¹ 离心 10 min,收集上清,上样 20 μL,采用 12% 的分离胶和 5% 的浓缩胶进行 SDS-PAGE 电泳检测蛋白表达。

1.8 大肠埃希菌 GADH 活性的测定

菌体 BL21 (pET-28a-*ga2dh*) 及 BL21 (pET-28a) GADH 活性测定方法如下:将过夜培养的菌悬液,按 φ 为 0.5% 接种于 100 mL LB 培养基,当培养液细胞浓度 $D_{600\text{ nm}}=0.6$ 时,继续培养 4 h。每隔 1 h 取菌液 20 mL,4 ℃,10 000 r · min⁻¹ 离心 10 min 后,收集菌体。向菌体中加入含有 1 mmol · L⁻¹ β-巯基乙醇的 0.01 mol · L⁻¹ pH=6 的磷酸盐缓冲液 10 mL,超声破碎 20 min (功率 50%,10 s 工作,20 s 间歇),4 ℃ 浸提 3 h。4 ℃,12 000 r · min⁻¹ 离心 10 min,去上清,向其中加入含有 φ 为 1% 的 Triton-X 100 的 0.01 mol · L⁻¹ pH=6 的磷酸盐缓冲液 3 mL,0 ℃,80 r · min⁻¹ 3 h,之后 4 ℃ 浸提过夜,12 000 r · min⁻¹ 离心 10 min 后,上清即为粗酶液。酶活性的测定参照“1.3”,数据采用 Duncan's 新复极差法进行差异显著性分析。

2 结果与分析

2.1 NDW3 溶磷量、GADH 活性、*ga2dh* 基因表达

为了明确 GADH 小亚基基因 *ga2dh* 的表达与 GADH 活性及溶磷之间的关系,测定了菌株 NDW3 在 96 h 内溶磷量的变化及 GADH 的活性。如图 1 所示,随培养时间的延长,溶磷量在 36 h 之前表现出不断增加的趋势,36 ~ 96 h 内变化不明显。GADH 活性在 12 h 时较小,24 h 时达到峰值,然后逐渐降低。48 h 内 *ga2dh* 表达量随着时间的增加而下降,12 h 相对表达量远高于 48 h。

2.2 *ga2dh* 基因的克隆与鉴定

如图 2 所示,以 *Serratia* sp. NDW3 提取的基因组 DNA 为模板,PCR 扩增出约 780 bp 左右清晰的目的片段。利用 PCR 和双酶切验证目的片段与 pMD18-T 载体的连接,PCR 与酶切都获得清晰的目的条带,说明目的基因与载体连接成功。

2.3 *ga2dh* 基因序列分析

利用 BLAST 对 *ga2dh* 基因序列及 GenBank 核酸数据库进行分析。菌株 NDW3 的 *ga2dh* 基因序列 <http://xuebao.scau.edu.cn>

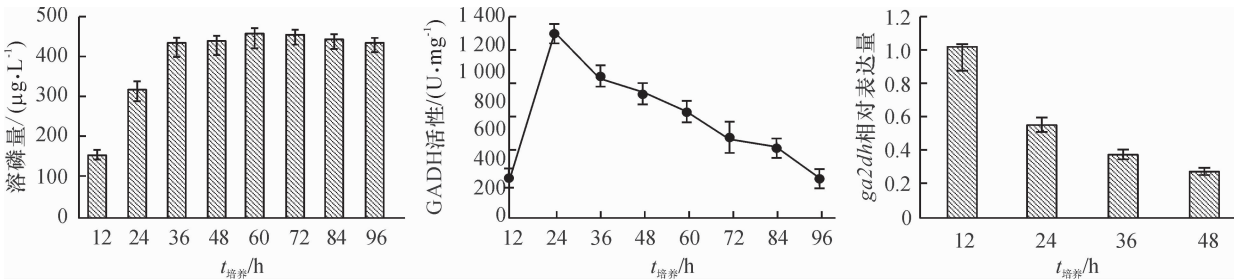
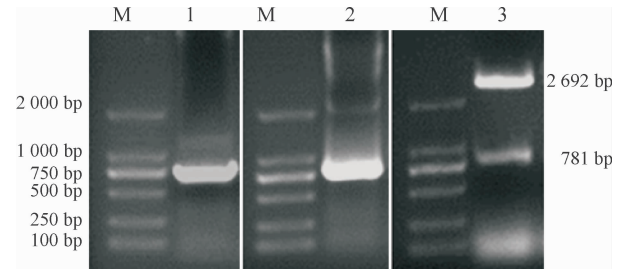


图 1 菌株 NDW3 溶磷量、GADH 活性及 $ga2dh$ 基因表达量的变化

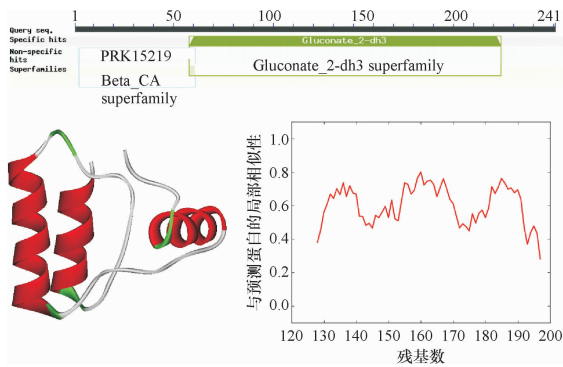
Fig. 1 Changes in soluble phosphorus content, GADH activity and $ga2dh$ gene expression level during phosphate solubilizing by strain NDW3



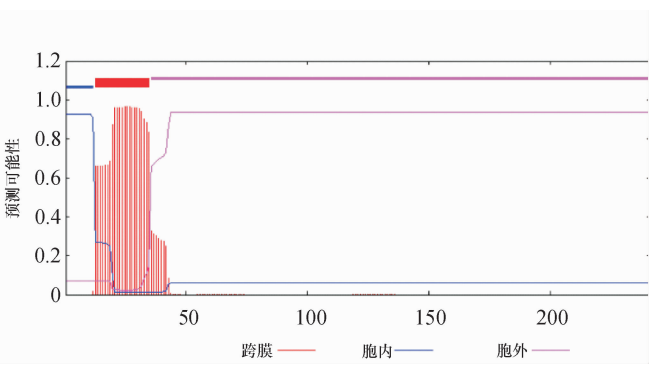
M: DL2000 Marker; 1:NDW3 PCR 扩增产物; 2:重组质粒的 PCR 鉴定; 3:重组质粒的酶切鉴定。

图 2 $ga2dh$ 基因的 PCR 扩增与鉴定

Fig. 2 PCR amplification and verification of $ga2dh$ gene



A: $ga2dh$ 蛋白保守结构域的三维结构模拟及可靠性检测



B: $ga2dh$ 蛋白跨膜区域预测

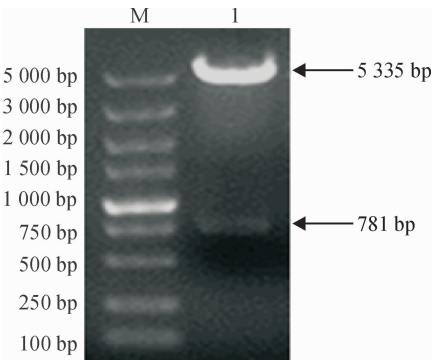
图 3 $ga2dh$ 基因序列的生物信息学分析

Fig. 3 Bioinformatic analysis of $ga2dh$ gene

2.4 $ga2dh$ 基因在大肠埃希菌中的表达

2.4.1 原核表达载体 pET-28a- $ga2dh$ 的构建 利用测序结果正确的 pMD18-T- $ga2dh$ 为模板进行 PCR, 获得两端带有 *EcoR* I 和 *Xho* I 酶切位点的目的片段, 利用双酶切与载体 pET-28a 进行连接, 并转化大肠埃希菌 BL21。阳性克隆提取质粒, 并进行双酶切验证。结果如图 4 所示, 酶切后的基因片段及载体大小分别与目的基因及 pET-28a 载体的大小一致, 说明原核表达载体 pET-28a- $ga2dh$ 构建成功。

2.4.2 原核表达载体在大肠埃希菌中的诱导表达 将 BL21 (pET-28a- $ga2dh$) 进行诱导表达, SDS-PAGE 电泳结果如图 5 所示, BL21 (pET-28a- $ga2dh$)

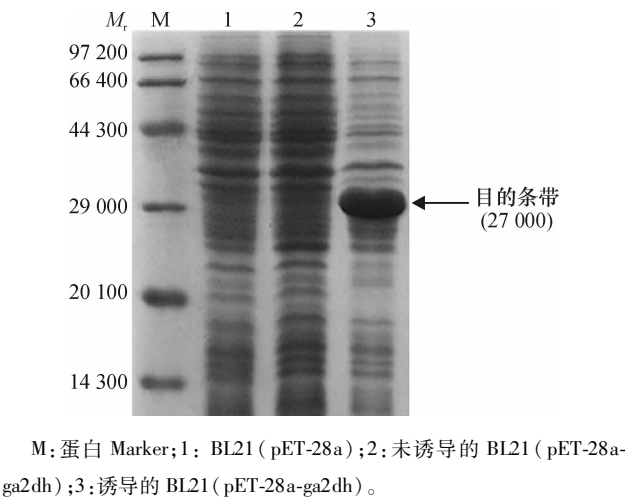


M: DL5000 Marker; I: 重组质粒的酶切片段。

图 4 重组质粒的酶切鉴定

Fig. 4 Restriction digestion analysis of recombinant plasmid

在相对分子质量约 27 000 处存在明显的蛋白表达条带,且含量远高于对照,说明该基因在大肠埃希菌 BL21 中可以表达。



M: 蛋白 Marker;1: BL21 (pET-28a);2: 未诱导的 BL21 (pET-28a-*ga2dh*);3: 诱导的 BL21 (pET-28a-*ga2dh*)。

图5 *ga2dh* 基因在 BL21 中的蛋白表达
Fig.5 Protein expression of *ga2dh* gene in bacterium BL21

2.4.3 大肠埃希菌 BL21 菌体 GADH 活性分析 利用 LB 培养基对带有不同质粒的 BL21 菌株进行培养,GADH 活性如表 1 所示。结果表明:BL21 (pET-28a-*ga2dh*) 菌株 GADH 活性随着培养时间增加而逐渐增强,在 4 h 时菌株的酶活性为 411.67 U·mg⁻¹,显著高于其他时间段 ($P < 0.05$)。BL21 (pET-28a) 菌株在 4 h 内 GADH 活性也随着时间的增加而增强,但同一时间内,酶活性都远低于 BL21 (pET-28a-*ga2dh*),且 4 h 时,酶活性仅为 BL21 (pET-28a-*ga2dh*) 体内酶活性的 20.65%。这说明 GADH 小亚基基因 *ga2dh* 的表达,能够使大肠埃希菌 BL21 GADH 的活性显著增加。

表 1 GADH 活性分析
Tab.1 The activity analysis of GADH

$t_{培养}/h$	GADH 活性 ¹⁾ /(U·mg ⁻¹)	
	BL21 (pET-28a)	BL21 (pET-28a- <i>ga2dh</i>)
1	44.67 ± 2.52c	124.00 ± 16.09d
2	47.33 ± 2.53c	165.67 ± 21.00c
3	71.67 ± 5.69b	294.67 ± 24.44b
4	85.00 ± 3.06a	411.67 ± 24.18a

1) 同列数据后凡具有一个相同小写字母,表示酶活性差异不显著 ($P > 0.05$, Duncan's 法)。

3 讨论与结论

Serratia sp. 是 1 类具有溶磷能力的革兰阴性菌株, *Serratia marcescens* GPS 5^[17], *Serratia* sp. MSK1^[18] 等菌株已被分离并鉴定。本研究从水稻根

际土壤中也分离到 1 株溶磷能力较好的菌株 *Serratia* sp. NDW3。Goldstein 等^[19] 认为菌株溶磷的特性受无机磷酸盐浓度的影响。本试验以 NBRIP 为培养基,不溶性磷酸钙为唯一磷源时,随培养时间的延长,菌株 NDW3 溶磷量表现出先增加,36 h 后趋于稳定的趋势,这说明菌株 NDW3 溶磷可能同样受不溶性磷的调节,培养基中可溶性磷浓度达到一定值时,菌株溶磷特性受到抑制。

溶磷微生物的溶磷机理非常复杂, Sashidhar 等^[8] 认为葡萄糖直接氧化成葡萄糖酸是细菌溶磷的主要机制,革兰阴性细菌由于能分泌大量的有机酸进入外膜空间,其溶磷效果要好于革兰阳性菌。研究发现参与直接氧化途径的酶 GDH 和 GADH 都锚定在内膜上,但催化结构域却朝向细胞质膜的外表面,直接氧化途径产生的葡萄糖酸和 2-酮基葡萄糖酸被分泌到细胞壁和细胞膜之间,使胞外处于酸性极高的环境^[8]。*ga2dh* 基因编码 GADH 分子的 1 个小亚基,本试验发现 *ga2dh* 基因的相对表达量在 12 h 最大,GADH 活性在 24 h 达到最大值,而溶磷量在 36 h 后趋于稳定,这种规律可能是因为菌体内 *ga2dh* 基因表达后,GADH 蛋白的形成需要一定的时间,或在培养过程中随着时间的增加,pH 会抑制葡萄糖酮酸的产生,从而对酶产生了反馈抑制作用。*ga2dh* 基因表达量、酶活性与溶磷量三者表现出依次滞后的趋势与高度相关性,说明 *Serratia* sp. NDW3 菌株溶磷的主要机制可能仍是依赖于直接氧化途径。生物信息学分析发现 *ga2dh* 基因编码的蛋白质序列存在跨膜以及胞内和胞外的区域。在大肠埃希菌中表达该基因可以明显增加菌体 GADH 的活性。这说明 *ga2dh* 基因编码的小亚基不仅对 GADH 活性起重要作用,也是介导 GADH 的跨膜结构的重要组成部分。

参考文献:

[1] KHAN M S, ZAIDI A, AHMAD M, et al. Plant growth promotion by phosphate solubilizing fungi-current perspective[J]. Arch Agron Soil Sci, 2010, 56(1): 73-98.

[2] 史国英, 莫燕梅, 岑贞陆, 等. 1 株高效解无机磷细菌 BS06 的鉴定及其解磷能力分析[J]. 微生物学通报, 2015, 42(7): 1271-1278.

[3] SHARMA S B, SAYYED R Z, TRIVEDI M H, et al. Phosphate solubilizing microbes: Sustainable approach for managing phosphorus deficiency in agricultural soils[J]. SpringerPlus, 2013, 2(1): 587-601.

[4] 刘聪, 林维, 孙珑, 等. 黑土区林地土壤高效解磷细菌的分离、筛选及其解磷效果[J]. 东北林业大学学报, <http://xuebao.scau.edu.cn>

- 2013, 41(11): 83-85.
- [5] VYAS P, GULATI A. Organic acid production in vitro and plant growth promotion in maize under controlled environment by phosphate-solubilizing fluorescent *Pseudomonas* [J]. BMC Microbiol, 2009, 9(1):174-189.
- [6] HAMEEDA B, REDDY Y H, RUPELA O P. Effect of carbon substrates on rock phosphate solubilization by bacteria from composts and macrofauna [J]. Curr Microbiol, 2006, 53(4): 298-302.
- [7] 张淑红. 兼溶5种难溶磷的溶磷细菌筛选及其对花生的促生作用[J]. 河南农业科学, 2015, 44(11):58-61.
- [8] SASHIDHAR B, PODILE A R. Mineral phosphate solubilization by rhizosphere bacteria and scope for manipulation of the direct oxidation pathway involving glucose dehydrogenase[J]. J Appl Microbiol, 2010, 109(1): 1-12.
- [9] DUFF R B, WEBLEY D M, SCOTT R O. Solubilization of minerals and related materials by 2-ketogluconic acid producing bacteria[J]. Soil Sci, 1963, 95(2):105-114.
- [10] KUMAR A, RAI L C. Proteomic and biochemical basis for enhanced growth yield of *Enterobacter* sp. LCR1 on insoluble phosphate medium[J]. Microbiol Res, 2015, 170: 195-204.
- [11] ANTHONY C. The quinoprotein dehydrogenases for methanol and glucose [J]. Arch Biochem Biophys, 2004, 428(1): 2-9.
- [12] KRISHNARAJ P U, GOLDSTEIN A H. Cloning of a *Serratia marcescens* DNA fragment that induces quinoprotein glucose dehydrogenase-mediated gluconic acid production in *Escherichia coli* in the presence of a stationary phase *Serratia marcescens*[J]. FEMS Microbiol Lett, 2001, 205(2): 215-220.
- [13] TOYAMA H, FURUYA N, SAICHANA I, et al. Membrane-bound, 2-keto-D-gluconate-yielding D-gluconate dehydrogenase from “*Gluconobacter dioxyaceticus*” IFO 3271: Molecular properties and gene disruption [J]. Appl Environ Microb, 2007, 73(20): 6551-6556.
- [14] 杨美英,王春红,武志海,等. 不同条件下2株溶磷菌溶磷量及葡萄糖脱氢酶基因表达与酶活分析[J]. 微生物学报, 2016, 56(4): 651-663.
- [15] 李兴霖,秦平,葛菁萍,等. 共培养提高解磷菌解无机磷能力及解无机磷基因(*pqqE*)的克隆[J]. 中国农学通报, 2015(23):47-52.
- [16] YANG G F, WEI Z, SUN W J, et al. Purification and enzymatic characterization of membrane-bound D-gluconate dehydrogenase from *Arthrobacter globiformis* [J]. J Mol Catal B-Enzym, 2015, 113:14-22.
- [17] TRIPURA C B, SASHIDHAR B, PODILE A R. Ethyl methanesulfonate mutagenesis enhanced mineral phosphate solubilization by groundnut-associated *Serratia marcescens* GPS-5[J]. Curr Microbiol, 2007, 54(2): 79-84.
- [18] SINGH M, TEJO PRAKASH N. Characterisation of phosphate solubilising bacteria in sandy loam soil under chickpea cropping system[J]. Indian J Microbiol, 2012, 52(2):167-173.
- [19] GOLDSTEIN A H, LIU S T. Molecular cloning and regulation of a mineral phosphate-solubilizing gene from *Erwinia herbicola*[J]. Nat Biotechnol, 1987, 5(1): 72-74.

【责任编辑 庄 延】