

大豆过氧化物酶基因随机突变文库的构建

曾家豫¹, 郑群¹, 廖世奇², 王黎², 袁红霞², 杨海棠¹, 张丽琼³, 张宁³

(1. 西北师范大学生命科学学院, 甘肃兰州 730070; 2. 甘肃省医学科学研究院, 甘肃兰州 730050; 3. 兰州理工大学生命科学与工程学院, 甘肃兰州 730050)

摘要:为提高大豆过氧化物酶(soybean peroxidase, SBP)的活性及研究该酶一级结构与酶活性间的关系, 采用连续易错 PCR 方法对大豆过氧化物酶基因(*sbp*)进行了2轮随机突变, 将第二轮易错 PCR 产物与质粒载体 pPICZ α -A 分别进行双酶切, 经 T₄ DNA 连接酶催化连接后, CaCl₂ 法转化重组质粒 pPICZ α -A-*sbp* 至大肠杆菌 DH5 α 中, 成功构建出 *sbp* 随机突变文库, 库容量约为 1.77×10^6 cfu。

关键词:大豆过氧化物酶; 易错 PCR; 基因文库; 随机突变; 酶定向进化

中图分类号: S565.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-9841(2011)05-0731-07

Construction of Soybean Peroxidase Gene Random Mutation Library

ZENG Jia-yu¹, ZHENG Qun¹, LIAO Shi-qi², WANG Li², YUAN Hong-xia², YANG Hai-tang¹, ZHANG Li-qiong³, ZHANG Ning³

(1. College of Life Science, Northwest Normal University, Lanzhou 730070; 2. Gansu Province Institute of Medical Sciences, Lanzhou 730050; 3. School of Life Science and Engineering, Lanzhou University of Technology, Lanzhou 730050, Gansu, China)

Abstract: In order to improve enzymatic activity of soybean peroxidase (SBP) and study the correlation between its primary structure and enzymatic activity, sequential error-prone PCR method was used on soybean peroxidase genes (*sbp*) for two times random mutation. The second round error-prone PCR products and plasmid vectors pPICZ α -A were digested by double enzymes. After the PCR products ligated into the vectors by T₄ DNA ligase, recombinant plasmids pPICZ α -A-*sbp* were transformed into *Escherichia coli* DH5 α through calcium chlorid method. A random mutation library was constructed, and the capacity was about 1.77×10^6 cfu.

Key words: Soybean peroxidase; Error-prone PCR; Gene library; Random mutation; Directed evolution of enzymes

大豆过氧化物酶属于Ⅲ类过氧化物酶(EC1.11.117), 与同类过氧化物酶相比具有底物作用范围广、耐热性能高、酸碱稳定性好、无污染、安全系数高等优点^[1], 在免疫测定技术、电泳技术和酶联反应等生物学研究及生物传感器、木素降解、工业“三废”处理等方面有着广泛的应用前景^[2]。

同时, 作为天然酶蛋白, 其催化效率、底物亲合性、稳定性等酶学性质均有待进一步提高。利用分子进化的手段对大豆过氧化物酶基因(*sbp*)进行改造, 改善其酶学性质, 可以更好地适应工业应用要求。易错 PCR 以其操作简便、有效性高等优点成为目前应用最为广泛的进化手段之一。该试验采用易错 PCR 方法对大豆过氧化物酶基因进行了2轮随机突变, 并在大肠杆菌 DH5 α 中建立随机突变文库, 为进行体外分子进化筛选及研究大豆过氧化物

酶分子结构与功能奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 供试材料

1.1.1 菌株和质粒 *E. coli* 菌株 DH5 α (Amp⁻、R⁻、M⁻) 为实验室(甘肃省医学科学研究院医学分子生物学研究中心)保存; pPICZ α -A 购于 Invitrogen 公司。

1.1.2 工具酶和主要试剂 Taq DNA 聚合酶购于上海生物工程有限公司; 限制性内切酶 *Xho* I、*Xba* I 购自北京赛百盛公司; DNA ladder Marker、T₄ DNA 连接酶、pfu 酶购自 TaKaRa 生物技术有限公司; 抗生素 ZeocinTM 购自 Invitrogen 公司; 酵母提取物和胰蛋白胨购自英国 Oxoid 公司; 其它试剂均为进口或国产分析纯产品。

收稿日期: 2011-06-06

基金项目: 甘肃省教育厅资助项目(0601-28, 0501B-16); 甘肃省自然科学基金资助项目(096RJZA035); 甘肃省高分子材料重点实验室开放课题资助项目(KF-06-01)。

第一作者简介: 曾家豫(1963-), 男, 副教授, 博士, 研究方向为分子酶学与酶催化。E-mail: uuuuuuuu@163.com。

通讯作者: 廖世奇(1962-), 男, 研究员, 博士, 研究方向为生物化学与分子生物学。E-mail: uuuuuuuu@163.com。

1.1.3 培养基 SOC 培养基(100 mL):胰蛋白胨 2 g,酵母提取物 0.5 g,NaCl 0.05 g,用三蒸水溶解后,加入 KCl 溶液($250 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$,pH 7.0)1 mL,高压灭菌 20 min,待温度降至 55°C 以下,加入经滤菌的葡萄糖溶液($1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$)2 mL 和 MgCl_2 ($2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$)溶液 0.5 mL。

LLB(+ Zeocin) 培养基(100 mL):胰蛋白胨 1 g,酵母提取物 0.5 g,NaCl 0.5 g,加入 100 mL 三蒸水搅拌溶解后,高压灭菌 20 min,待温度降到 55°C 以下,加入抗生素 Zeocin 至终浓度为 $25 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。若制平板,则另加入琼脂粉 1.5 g。

1.2 试验方法

1.2.1 大豆过氧化物酶基因的易错 PCR 突变 根据 Chen 等^[3]在 NCBI 核酸数据库报道的 *sbp* 基因 [U51191 (*GmEpa1*)] 序列,使用 Primer Premier 5.0 软件设计易错 PCR 引物。在引物的末端分别引入限制性内切酶 *Xho* I (C/TCGAG) 和 *Xba* I (T/CTAGA) 酶切位点,并分别在 5' 端增加 3~5 个保护碱基,2 段引物之间为 *sbp* 的完整序列。

上游引物 P1:5' CCG CTCGAG ACTCAAGCT-TCTAGGATTTGTGCC3';

下游引物 P2:5'GC TCTAGATTACCACTTATTC-CATCGCACATACAAC3'。(下划线分别为 *Xho* I、*Xba* I 酶切位点,斜体为终止密码子)。

易错 PCR 条件的优化: Mg^{2+} 在 PCR 过程中可以稳定非互补的碱基对,有利于突变, Mn^{2+} 能够降低 Taq 聚合酶对模板的特异性,调整 2 种离子的浓度可以获得不同突变频率的多样性文库。该试验首先选择不同浓度的 Mg^{2+} 进行易错 PCR,反应体系为:10 × 易错 PCR 缓冲液(不含 Mg^{2+})5 μL ,10 × dNTP 混合物(dGTP 和 dATP $2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, dCTP 和 dTTP $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)1.2 μL ,P1 (20 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)0.5 μL ,P2 (20 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)0.5 μL ,Taq DNA 聚合酶($5 \text{ U} \cdot \mu\text{L}^{-1}$)0.5 μL ,*sbp* (10 ng $\cdot \mu\text{L}^{-1}$)2.5 μL ,分别向上述体系中加入 4,6,8,10 μL MgCl_2 ($25 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$),用三蒸水将体系补至 50 μL ,使 Mg^{2+} 终浓度分别达到 2.0,3.0,4.0,5.0 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。反应程序为 95°C 预变性 5 min; 95°C 变性 1 min, 57°C 退火 1 min, 72°C 延伸 1.5 min,共 18 个循环; 72°C 延伸 7 min。以常规 PCR 作为对照,反应体系为:10 × PCR 缓冲液(含 $1.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{Mg}^{2+}$)5 μL ,10 × dNTP 混合物(dGTP 、 dATP 、 dCTP 、 dTTP 各 10 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)1.2 μL ,P1 (20 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)0.5 μL ,P2 (20 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)0.5 μL ,pfu 酶($5 \text{ U} \cdot \mu\text{L}^{-1}$)0.5 μL ,*sbp* (10 ng $\cdot \mu\text{L}^{-1}$)2.5 μL ,三蒸水 39.8 μL 。反应程序同上。根据目的条带的扩增丰度和特异性确定易

错 PCR 体系中的最优 Mg^{2+} 浓度后,向体系中引入浓度为 0.05,0.10,0.15,0.20 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 Mn^{2+} ,确定体系的最优 Mn^{2+} 浓度。在优化的 PCR 条件下进行第一轮易错 PCR,并以第一轮易错 PCR 产物为模板进行第二轮易错 PCR。

第一轮易错 PCR 反应:用实验室已扩增的 *sbp* 为模板,依次加入下列反应组分:10 × 易错 PCR 缓冲液(不含 Mg^{2+})5 μL , MgCl_2 ($25 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)6 μL , MnCl_2 ($5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)1.5 μL ,10 × dNTP 混合物(dGTP 和 dATP $2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, dCTP 和 dTTP $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)1.2 μL ,P1 (20 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)0.5 μL ,P2 (20 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)0.5 μL ,Taq DNA 聚合酶($5 \text{ U} \cdot \mu\text{L}^{-1}$)0.5 μL ,*sbp* (10 ng $\cdot \mu\text{L}^{-1}$)2.5 μL ,三蒸水 32.3 μL 。反应程序同上。得到的 PCR 产物经 1.0% 的琼脂糖凝胶电泳鉴定后纯化回收,作为第二轮易错 PCR 反应的模板,紫外分光光度法测定纯化后的产物浓度。

第二轮易错 PCR 反应:将第一轮易错 PCR 反应得到的产物作为模板,反应体系同上,反应程序为 95°C 预变性 5 min; 95°C 变性 1 min, 57°C 退火 1 min, 72°C 延伸 1.5 min,共 21 个循环; 72°C 延伸 7 min。得到的目的基因即第二轮易错 PCR 产物经 1.0% 的琼脂糖凝胶电泳鉴定后用试剂盒纯化回收,紫外分光光度法测定纯化后的产物浓度。

1.2.2 目的基因与 pPICZ α -A 的双酶切 纯化的目的基因(第二轮易错 PCR 产物,12 ng $\cdot \mu\text{L}^{-1}$)10 μL ,限制性内切酶 *Xho* I ($10 \text{ U} \cdot \mu\text{L}^{-1}$)、*Xba* I ($15 \text{ U} \cdot \mu\text{L}^{-1}$)各 1 μL ,10 × M 缓冲液 2 μL ,三蒸水 6 μL , 37°C 反应 4 h。10% 聚丙烯酰胺凝胶电泳检测双酶切产物,紫外分光光度法测定纯化后的产物浓度。

pPICZ α -A 的双酶切: pPICZ α -A 载体 (120 ng $\cdot \mu\text{L}^{-1}$)2 μL ,限制性内切酶 *Xho* I ($10 \text{ U} \cdot \mu\text{L}^{-1}$)、*Xba* I ($15 \text{ U} \cdot \mu\text{L}^{-1}$)各 1 μL ,10 × M 缓冲液 2 μL ,三蒸水 14 μL , 37°C 反应 5 h。1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测双酶切产物,紫外分光光度法测定纯化后的产物浓度。

1.2.3 目的基因与 pPICZ α -A 的连接反应 连接反应体系为 2 μL 酶切 pPICZ α -A ($100 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$),4.5 μL 酶切目的基因 (20 ng $\cdot \mu\text{L}^{-1}$),1 μL T_4 DNA 连接酶 ($350 \text{ U} \cdot \mu\text{L}^{-1}$),2.5 μL 10 × T_4 DNA 连接缓冲液,15 μL 三蒸水。连接反应条件为: 16°C 连接过夜(约 16 h), 65°C 温育 15 min 终止反应。

连接产物采用交错 PCR 法进行检测。由于 *sbp* 的基因序列约为 1 000 bp,质粒 5' AOX I 引物和 3' AOX I 引物之间有 590 bp,检测目的基因与质粒载

体的连接时,若用测序引物需要扩增 1 600 bp 长度的片段,比较困难且耗费时间,故去除引物 P1 和 P2 的酶切位点、保护碱基和终止密码子,以其反向互补序列作为引物 P3 和 P4 来检测目的基因与质粒的连接。引物序列显示如下:

P3:5'GGCACA AATCCTAGAAGCTTGAGT 3';

P4:5'GTTGTATGTGCG ATGGAATAAGTGG 3'。

5'AOX I 引物:5'GACTGGTTCCAATTGACAAGC 3';

3'AOX I 引物:5'GCAAATGGCATTCTGACATCC 3'。

以上引物由上海生物工程有限公司合成,经 PAGE 纯化,合成后加去离子水溶解至终浓度 $20 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

5'AOX I 和 P3 交错 PCR 反应体系:10 × PCR 缓冲液 (Mg^{2+}) 5 μL , dNTP 混合物 ($100 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 0.4 μL , 连接产物 1 μL , 5'AOX I ($20 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 0.5 μL , P3 ($20 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 0.5 μL , pfu 酶 ($5 \text{ U} \cdot \mu\text{L}^{-1}$) 0.5 μL , 三蒸水 42.1 μL 。3'AOX I 和 P4 交错 PCR 体系:10 × PCR 缓冲液 (Mg^{2+}) 5 μL , dNTP 混合物 ($100 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 0.4 μL , 连接产物 1 μL , 3'AOX I ($20 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 0.5 μL , P4 ($20 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 0.5 μL , pfu 酶 ($5 \text{ U} \cdot \mu\text{L}^{-1}$) 0.5 μL , 三蒸水 42.1 μL 。反应程序为:95℃, 5 min; 95℃, 30 s; 55℃, 30 s; 72℃, 40 s; 25 个循环后, 72℃ 延伸 7 min, 1.0% 糖琼脂凝胶电泳鉴定 10、15、20、25 个循环的 PCR 产物。

1.2.4 pPICZ α -A-*sbp* 重组质粒转化 *E. coli* DH5 α CaCl₂ 法制备感受态 *E. coli* DH5 α ^[4]。将 200 μL *E. coli* DH5 α 感受态细胞悬液与 10 μL 连接产物混匀后冰上放置 30 min, 42℃ 水浴中热击 100 s, 立即转移至冰上使细胞冷却 1 ~ 2 min。加入 800 μL SOC 培养基, 37℃ 摇床中温育 1.5 h。将 200 μL 温育后的菌液均匀涂布在含抗生素 Zeocin 的 LLB 固体培养基上, 另涂布 200 μL *E. coli* DH5 α 感受态细胞悬液作为阴性对照, 37℃ 恒温培养箱中培养 12 ~ 16 h。将其余温育后的菌液转移至含抗生素 Zeocin 的 LLB 液体培养基中, 37℃、150 r · min⁻¹ 振荡培养过夜(约 14 ~ 16 h), 获得 *sbp* 随机突变文库, 保存转化菌液并提取其中的质粒备用。

1.2.5 *E. coli* DH5 α 阳性转化子中 pPICZ α -A-*sbp* 重组质粒的鉴定 在长有阳性克隆的 LLB 平板上随机挑取 11 个单菌落进行菌落 PCR 鉴定并抽提其质粒进行双酶切分析。菌落 PCR 反应体系为:10 × PCR 缓冲液 (Mg^{2+}) 5 μL , 单菌落的 LLB 培养液 (+ Zeocin) 1 μL , dNTP 混合物 ($100 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 0.4 μL , P1 ($20 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 0.5 μL , P2 ($20 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 0.5 μL , pfu 酶 ($5 \text{ U} \cdot \mu\text{L}^{-1}$) 0.5 μL , 三蒸水

40.6 μL 。反应程序同 1.2.1 第一轮易错 PCR。双酶切重组质粒的方法同 1.2.2, 用 *Xba* I 单酶切重组质粒作为对照。

初步鉴定为阳性的重组质粒由上海生物工程有限公司进行自动化测序, 测序引物为 5'AOX I 和 3'AOX I。

1.2.6 *sbp* 随机突变文库的鉴定 获得 *sbp* 随机突变文库后, 提取转化菌液中的所有质粒, 用限制性内切酶 *Xho* I、*Xba* I 进行双酶切, 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测。

统计 pPICZ α -A-*sbp* 重组质粒转化 *E. coli* DH5 α 的抗性平板上的菌落数, 计算重组率、转化率和库容量, 公式如下:

重组率(%) = (阳性克隆数/总克隆数) × 100;

转化率(%) = (克隆数/获得此克隆所用 DNA 质量) × 100;

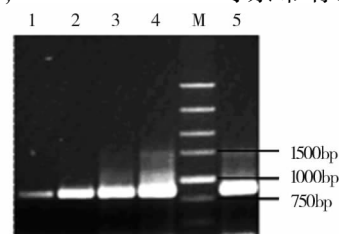
库容量 = 转化率 × 所用 DNA 质量 × 转化次数^[5]。

结合阳性克隆的测序结果分析整个文库的库容与质量。

2 结果与分析

2.1 *sbp* 的易错 PCR

2.1.1 易错 PCR 条件的优化 如图 1 所示, Mg^{2+} 浓度为 $2.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时条带较淡, 扩增产物丰度较低, 随 Mg^{2+} 浓度增加条带逐渐变亮, 但浓度为 4.0 和 $5.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时条带有不同程度的弥散现象, 目的条带扩增特异性降低, 故将易错 PCR 体系中 Mg^{2+} 终浓度确定为 $3.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, 并且与标准 PCR 产物相比, 易错 PCR 体系的扩增效率低于标准 PCR 反应。图 2 中, 电泳条带均很明亮, 但 Mn^{2+} 浓度为 $0.05, 0.10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时条带有弥散现象, 根



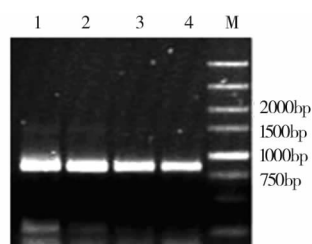
M: DNA ladder Marker; 1 ~ 4 分别是 Mg^{2+} 浓度为 $2.0, 3.0, 4.0, 5.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 PCR 产物; 5. 标准 PCR 产物

M: DNA ladder Marker; 1 ~ 4: Products of error-prone PCR with $2.0, 3.0, 4.0, 5.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ Mg}^{2+}$, respectively; 5. Standard PCR products

图 1 不同 Mg^{2+} 浓度下的易错 PCR 产物

Fig. 1 Products of error-prone PCR with different Mg^{2+} concentrations

据目的条带的扩增丰度和特异性,将 PCR 条件中 Mn^{2+} 终浓度确定为 $0.15 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。



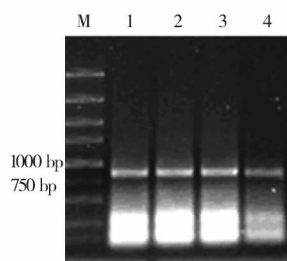
M: DNA ladder Marker; 1 ~ 4 分别是 Mn^{2+} 浓度为 0.05 、 0.10 、 0.15 、 $0.20 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 PCR 产物

M: DNA ladder Marker; 1 ~ 4: Products of error-prone PCR with 0.05 , 0.10 , 0.15 , $0.20 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ Mn}^{2+}$, respectively.

图2 不同 Mn^{2+} 浓度下的易错 PCR 产物

Fig.2 Products of error-prone PCR with different Mn^{2+} concentrations

2.1.2 第一轮易错 PCR 反应 在优化的 PCR 条件下进行第一轮易错 PCR,如图3所示,PCR 产物均在约 1000 bp 处出现了明亮条带,与 *sbp* 大小一致。经蛋白核酸定量仪测定纯化后的第一轮易错 PCR 产物浓度为 $15 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 。



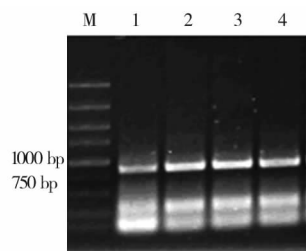
M: DNA ladder Marker; 1 ~ 4 均为 *sbp* 的第一轮易错 PCR 产物

M: DNA ladder Marker; 1 ~ 4: The first round products of error-prone PCR on *sbp*

图3 第一轮易错 PCR 产物

Fig.3 The first round products of error-prone PCR

2.1.3 第二轮易错 PCR 反应 将第一轮易错 PCR 得到的产物稀释 10 倍作为模板进行第二轮易错 PCR 反应,结果均在约 1000 bp 处出现了明亮泳



M: DNA ladder Marker; 1 ~ 4 均为第二轮易错 PCR 产物

M: DNA ladder Marker; 1 ~ 4: The second round products of error-prone PCR

图4 第二轮易错 PCR 产物

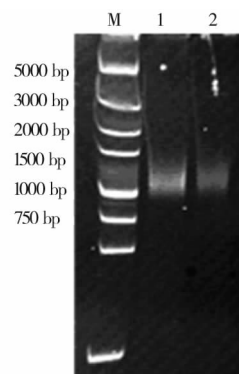
Fig.4 The second round products of error-prone PCR

带,与 *sbp* 大小一致(图4)。经蛋白核酸定量仪测定纯化后的产物浓度为 $12 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 。

2.2 目的基因与 pPICZα-A 的双酶切

如图5所示,泳道1中的条带位置略低于泳道2,说明目的基因经双酶切后碱基数减少,基因片段被成功切成粘末端。经蛋白核酸定量仪测定纯化后的双酶切目的基因浓度为 $20 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 。

取 $5 \mu\text{L}$ 双酶切后的质粒进行琼脂糖凝胶电泳。质粒 pPICZα-A 在酶切之前呈超螺旋结构,经 *Xho* I 和 *Xba* I 双酶切后,超螺旋结构被破坏成线性双链,进行琼脂糖凝胶电泳时泳动速度减慢,故在 3600 bp 处出现1条亮带(图6),与 pPICZα-A 质粒大小一致。经蛋白核酸定量仪测定纯化后的双酶切质粒浓度为 $100 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 。

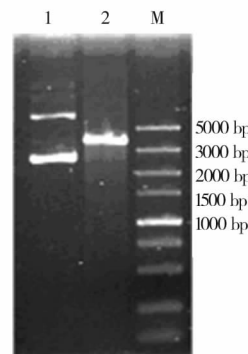


M: DNA ladder Marker; 1: 双酶切后的目的基因; 2: 未经双酶切的目的基因

M: DNA ladder Marker; 1: The double-digested target genes; 2: The target genes without being double-digested

图5 目的基因的双酶切

Fig.5 Double digestion of the target genes



M: DNA ladder Marker; 1: 未经双酶切的 pPICZα-A 质粒; 2: 双酶切后的 pPICZα-A 质粒

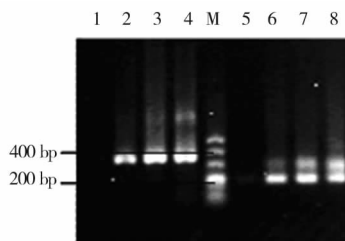
M: DNA ladder Marker; 1: Plasmids pPICZα-A without being double-digested; 2: Double-digested plasmids pPICZα-A

图6 质粒 pPICZα-A 的双酶切

Fig.6 Double digestion of plasmids pPICZα-A

2.3 目的基因与 pPICZ α -A 的连接反应

为检验目的基因与 pPICZ α -A 的连接,将质粒上的一对测序引物 5'AOX I 和 3'AOX I 分别与插入片段两端的引物 P3 和 P4 交错进行 PCR。如图 7 所示,1~4 泳道为 5'AOX I 与 P3 的 PCR 结果,从 15 循环开始出现 394 bp 的条带,随循环数增加,条带逐渐变亮。5~8 泳道为 3'AOX I 与 P4 的 PCR 结果,从 15 循环开始出现 197 bp 的条带,随循环数增加,条带逐渐变亮,并伴随出现了大约 300 bp 的非目的条带(推测与循环次数过多有关)。电泳结果证明目的基因与 pPICZ α -A 连接成功且连接率较高,与预期结果相符。



M:DNA ladder Marker;1~4 分别是 5'AOX I 与 P3 在 10、15、20、25 循环处的 PCR 产物;5~8 分别是 3'AOX I 与 P4 在 10、15、20、25 循环处的 PCR 产物

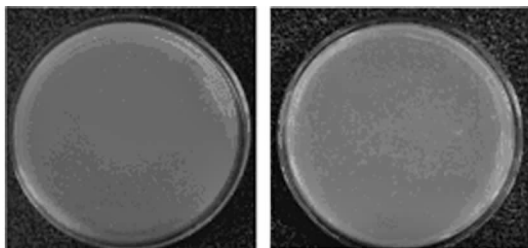
M.:DNA ladder Marker;1~4: Interlaced PCR products of 10,15,20,25 cycles with 5'AOX I and P3 ;5~8: Interlaced PCR products of 10,15,20,25 cycles with 3'AOX I and P4

图 7 交错 PCR 检测目的基因与 pPICZ α -A 质粒的连接

Fig.7 Interlaced PCR detecting the target genes ligated into plasmids pPICZ α -A

2.4 pPICZ α -A-sbp 重组质粒转化 *E. coli* DH5 α

如图 8 所示,平板 B 为涂布了转化菌液的 LLB 固体培养基(+Zeocin),经统计,约长出阳性克隆 354 个,平板 A 为阴性对照,无阳性克隆长出。



A:阴性对照;B;*E. coli* DH5 α 阳性转化子

A: Negative control;B;*E. coli* DH5 α positive transformants

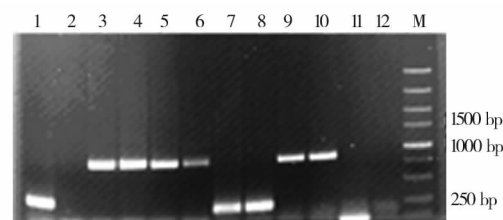
图 8 pPICZ α -A-sbp 重组质粒转化 *E. coli* DH5 α 的 LLB 平板

Fig.8 Colonies of *E. coli* DH5 α containing recombinant plasmids pPICZ α -A-sbp on LLB plates

2.5 *E. coli* DH5 α 阳性转化子中 pPICZ α -A-sbp 重组质粒的鉴定

在长有阳性克隆的 LLB 平板上随机挑取 11 个单菌落在含抗生素的 LLB 液体培养基中培养,然后

进行菌落 PCR,1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测。如图 9 所示,泳道 3、4、5、6、9、10 均出现约为 1 000 bp 的单一亮带,其大小与 *sbp* 的 PCR 结果一致,表明所挑取的菌落为阳性转化子;而 1、7、8 和 11 号菌落出现约 250 bp 的条带,2 号菌落未出现条带,均为假阳性转化子。抽提 3、4、5、6、9、10 号菌落的重组质粒,任选其中之一用 *Xho* I、*Xba* I 进行双酶切。如图 10 所示,经双酶切后,在泳道 2 出现了 3 600 和 1 000 bp 左右的 2 条亮带,分别与 pPICZ α -A 载体和 *sbp* 大小一致。将上述 6 个阳性克隆的重组质粒送上海生物工程有限公司进行自动化测序,利用 Blast 软件对测序结果进行比对分析,3、4、5、6、9、10 号阳性克隆的随机突变基因序列与实验室保存的 *sbp* 同源性均达到 99% 以上。以上结果表明,pPICZ α -A-*sbp* 重组质粒构建成功并已转入宿主细胞 *E. coli* DH5 α 中。

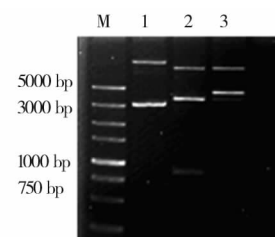


M:DNA ladder Marker;1~11 为 11 个单菌落的 PCR 产物;12. 阴性对照

M:DNA ladder Marker;1-11:PCR products of 11 single colonies;12:Negative control

图 9 重组质粒 pPICZ α -A-sbp 的菌落 PCR

Fig.9 Colony PCR of recombinant plasmids pPICZ α -A-sbp



M:DNA ladder Marker;1:重组质粒 pPICZ α -A-sbp;2:双酶切后的重组质粒;3:单酶切后的重组质粒

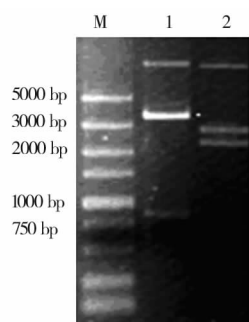
M:DNA ladder Marker;1:Recombinant plasmids pPICZ α -A-sbp;2:Recombinant plasmids pPICZ α -A-sbp digested by *Xho* I and *Xba* I;3:Recombinant plasmids pPICZ α -A-sbp digested by *Xba* I

图 10 重组质粒 pPICZ α -A-sbp 的双酶切

Fig.10 Double digestion of recombinant plasmids pPICZ α -A-sbp

2.6 随机突变文库的鉴定

用质粒抽提试剂盒提取转化菌液中的所有质粒,经限制性内切酶 *Xho* I、*Xba* I 双酶切后,1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测。结果如图 11 所示,提取的总质粒共出现 3 条亮带,5 000 bp 以上的条带为开



M: DNA ladder Marker; 1: 双酶切后的总质粒; 2: 总质粒

M: DNA ladder Marker; 1: Total plasmids digested by *Xho* I and *Xba* I; 2: Total plasmids

图 11 总质粒的双酶切

Fig. 11 Double digestion of total plasmids

环结构的质粒, 出现在 2 000 与 3 000 bp 间的 2 条带分别为超螺旋结构的重组质粒与空质粒; 泳道 1 显示经双酶切后, 总质粒依然出现 3 条亮带, 开环

结构无酶切位点仍在 5 000 bp 以上, 而另 2 条分别出现在 3 600 和约 1 000 bp 处, 与 pPICZ α -A 载体和 *sbp* 大小分别一致, 这进一步表明, SBP 随机突变基因已经成功连接到 pPICZ α -A 载体上, 随机突变文库构建成功。

将 200 μ L 转化菌液均匀涂布在含抗生素 Zeocin 的 LLB 固体培养基上, 获得阳性克隆 354 个, 阴性对照无阳性克隆。转化率为 9.316×10^4 cfu \cdot μ g $^{-1}$; 库容量为 1.77×10^6 cfu; 随机挑选 11 个单克隆进行菌落 PCR, 1.0% 琼脂糖凝胶电泳结果显示(图 9), 有 6 个克隆含有外源 DNA 片段, 重组率约为 55%。

用 DNAMAN 软件对 2.5 中 3、4、5、6、9、10 号阳性克隆的随机突变序列同实验室保存的 *sbp* 进行比对, 分析基因突变位点, 结果见表 1。

表 1 易错 PCR *sbp* 的基因突变位点分析

Table 1 Analysis of *sbp* gene mutation sites

突变体 Mutant	突变位点及突变碱基 Mutation sites and mutation bases	小计 Subtotal
EAP3	810 T→C→850 T→G→851 G→T	3
EAP4	110 G→C	1
EAP5	34 G→A→98 T→C→131 T→G→170 T→C→204 A→G→387 G→A	6
EAP6	209 T→C→211 A→G→263 T→C→270 T→C→279 C→G→350 G→T→414 A→G→874 T→C	8
EAP9	200 T→C→374 T→C→663 C→T	3
EAP10	795 C→A→812 A→T→822 G→T	3

由表 1 可知, 随机挑取的 6 个突变体均有碱基发生突变且没有重复突变, 表明突变文库质量较好, 其中, 6 号的突变碱基最多达到 8 个, 而 4 号突变碱基只有 1 个。对于研究蛋白质结构与功能关系的突变率一般应控制在 0.2% ~ 0.6% 左右, 即一轮易错 PCR 中 1 kb DNA 内有 2 ~ 3 个碱基发生碱基替换, 从已测得的序列可知, 6 个突变体的突变碱基达 24 个, 平均突变 4 个, 突变率为 0.47%, 达到了构建突变文库的突变频率要求。3 个碱基突变为 A, 突变率达到 12.5%; 5 个碱基突变为 T, 突变率达到 20.8%; 10 个碱基突变为 C, 突变率达到 41.7%; 6 个碱基突变为 G, 突变率达到 25.0%。突变的碱基中转换多于颠换, 表明在易错 PCR 过程中, 碱基的突变确实具有一定的偏向性; T、C 间的转换达到 10 个, 多于 A、G 间的转换, 这可能与易错 PCR 体系中 dCTP 和 dTTP 两种脱氧核苷酸的含量高于其它 2 种有关。

综上所述, 该试验构建的大豆过氧化物酶基因随机突变文库在一级结构上具有良好的随机性和多样性, 库容量达到 1.77×10^6 , 基本可满足体外分子进化研究的要求。

3 讨论

易错 PCR 具有简便快速和突变率可确切控制的特点, 通过易错 PCR 技术把随机突变引入目的基因产生基因多样性已成为最常用的文库构建方法。较低的突变率(每代每序列有 2 ~ 3 个碱基置换或 1 个氨基酸替代)可以积累大部分的有益突变, 而较高的错掺几率将产生中性突变或有害突变^[6], 所以这种方法的关键在于控制合适的突变频率。该试验通过调节 Mg $^{2+}$ 和 Mn $^{2+}$ 浓度合理地控制突变率, 使突变体达到了构建突变文库的突变频率要求。同时, 在通常情况下, 经一轮的易错 PCR、定向筛选, 很难获得令人满意的结果。该试验采用连续易错 PCR(Sequential error-prone PCR), 将一次 PCR 扩增得到的突变基因作为下一次 PCR 扩增的模板, 连续进行 2 轮随机诱变, 使得每一次获得的少量突变累积而产生重要的有益突变。此外, 应用易错 PCR 技术构建突变文库, 突变体的遗传变化只发生在单一分子内部, 使原始蛋白质中仅有很小的序列空间发生突变, 适合用于蛋白质结构与功能的研究。

另一方面, 突变基因文库构建得是否理想可用

一个量化的指标即文库的库容量来衡量,它是指构建出的原始突变基因文库中所包含的独立的重组子克隆数。该试验利用 CaCl_2 的化学方法进行转化,库容量达到 1.77×10^6 cfu,如采用电转法,建立高效的电转体系,转化率可望达到 $10^9 \sim 10^{10}$ [7],库容量会获得极大扩充,文库会更具代表性。

目前国内外研究较多的是与 SBP 同属 III 类过氧化物酶的辣根过氧化物酶 (Horseradish peroxidase, HRP), 二者结构和功能相似,但 SBP 较 HRP 具有来源容易、耐热性能高、酸碱稳定性好等优点,更符合工业应用要求。然而,迄今为止对 SBP 的研究主要集中在分离纯化层面上 [8],有关基因修饰与改造的研究报道很少。该研究旨在利用易错 PCR 等蛋白质工程技术对大豆过氧化物酶基因进行随机突变,提高酶的活性,获得催化效率提高的突变株应用于生产。大豆过氧化物酶基因随机突变文库的构建为进行体外分子进化筛选及研究大豆过氧化物酶分子结构与功能关系奠定了基础。

参考文献

- [1] Nissim M, Feis A, Smulevich G. Characterization of soybean seed coat peroxidase: resonance raman evidence for a structure-based classification of plant peroxidases [J]. *Bio-spectroscopy*, 1998, 4 (6): 355-364.
 - [2] 季钟煜, 费锦鑫. 辣根过氧化物酶及其同工酶 [J]. *生命的化学*, 1992, 12 (3): 30-32. (Ji Z Y, Fei J X. Horseradish peroxidase and its isozyme [J]. *Chemistry of Life*, 1992, 12 (3): 30-32.)
 - [3] Chen H, Vierling R A. Molecular cloning and characterization of soybean peroxidase gene families [J]. *Plant Science*, 1999, 150 (2): 129-137.
 - [4] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular cloning* [K]. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989: 55-56.
 - [5] 顾春华, 廖世奇. 抗菌肽 DCD-1L 的随机突变及在毕赤酵母中的表达 [J]. *食品与药品*, 2010, 12 (1): 24-27. (Gu C H, Liao S Q. Random mutation of antibacterial peptide DCD-1L and expression in *Pichia pastoris* [J]. *Food and Drug*, 2010, 12 (1): 24-27.)
 - [6] 苏怡丹, 伍宁丰, 刘国安. 蛋白质定向进化技术的研究进展 [J]. *生物技术通报*, 2009 (11): 43-47. (Su Y D, Wu N F, Liu G A. Research on directed evolution of protein [J]. *Biotechnology Bulletin*, 2009 (11): 43-47.)
 - [7] Dower W J, Miller J F. High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation [J]. *Nucleic Acids Research*, 1988, 16: 6127.
 - [8] 严群, 张建国, 徐芝勇. 大豆过氧化物酶研究进展 [J]. *中国粮油学报*, 2005, 20 (3): 51-53. (Yan Q, Zhang J G, Xu Z Y. The research progress of soybean peroxidase [J]. *Journal of the Chinese Cereals and Oils Association*, 2005, 20 (3): 51-53.)
 - [9] 黄瑛, 蔡勇, 杨江科, 等. 基于易错 PCR 技术的短小芽孢杆菌 YZ02 脂肪酶基因 *BpL* 的定向进化 [J]. *生物工程学报*, 2008, 24 (3): 445-451. (Huang Y, Cai Y, Yang J K, et al. Directed evolution of lipase of *Bacillus pumilus* YZ02 by error-prone PCR [J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2008, 24 (3): 445-451.)
 - [10] 杨锦, 冯红, 万民远, 等. 短小芽孢杆菌碱性蛋白酶基因的随机突变 [J]. *应用与环境生物学报*, 2010, 16 (1): 96-99. (Yang J, Feng H, Wan M Y, et al. Random mutation of alkaline protease gene in *Bacillus pumilus* [J]. *Chinese Journal of Applied and Environmental Biology*, 2010, 16 (1): 96-99.)
 - [11] 张少平, 崔堂兵, 陈亮, 等. 豆豉纤溶酶的定向进化 [J]. *华南理工大学学报 (自然科学版)*, 2010, 38 (9): 138-145. (Zhang S P, Cui T B, Chen L, et al. Directed evolution of Douchi fibrinolytic enzyme [J]. *Journal of South China University of Technology (Natural Science Edition)*, 2010, 38 (9): 138-145.)
 - [12] Zha D, Eipper A, Reetz M. Assembly of designed oligonucleotides as an efficient method for gene recombination: a new tool in directed evolution [J]. *ChemBioChem*, 2003, 4 (1): 34-39.
 - [13] 张赛, 邢克克, 胡亚冬, 等. 基于易错 PCR 的黄曲霉素解毒酶体外分子定向进化 [J]. *生物工程学报*, 2011, 27 (7): 1100 - 1108. (Zhang S, Xing K K, Hu Y D, et al. Directed evolution of aflatoxin detoxifzyme in vitro by error-prone PCR [J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2011, 27 (7): 1100 - 1108.)
 - [14] Tetsuko N, Toshiiji T, Makoto T, et al. An in vitro evaluation of a thermo stable pectate lyase by using error-prone PCR [J]. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2004, 27: 127-131.
 - [15] Li H M, Chen J, Li Y H. Enhanced activity of yqhD oxidoreductase in synthesis of 1,3-propanediol by error-prone PCR [J]. *Progress in Natural Science*, 2008, 18 (12): 1519-1524.
-
- (上接第 730 页)
- [10] 樊妙姬, 陈丽梅, 马庆生. 根瘤菌共生结瘤基因的分子遗传学研究进展 [J]. *遗传*, 1998, 20 (2): 43-48. (Fan M J, Chen L M, Ma Q S, et al. The advance in molecular genetic of rhizobium symbiotic nodulation genes [J]. *Hereditas*, 1998, 20 (2): 43-48.)
 - [11] 刘 昀, 李冉辉, 郑易之, 等. 大豆 PM2 蛋白及其结构域可提高烟草耐盐性 [J]. *深圳大学学报 (理工版)*, 2007, 24 (1): 95-101. (Liu J, Li R H, Zheng Y Y, et al. Soybean PM2 protein and its 22-mer region enhance salt tolerance of tobacco plants [J]. *Journal of Shenzhen University (Science & Engineering)*, 2007, 24 (1): 95-101.)
 - [12] Tang G Q, Novitzky W P, Carol G H, et al. Oleate desaturase enzymes of soybean: evidence of regulation through differential stability and phosphorylation [J]. *The Plant Journal*, 2005, 44 (3): 433-436.
 - [13] 王晓波, 蒋凌雪, 魏利, 等. 外源抗草甘膦 *EPSPs* 基因在大豆基因组中的整合与定位 [J]. *作物学报*, 2010, 36 (3): 365-375. (Wang X B, Jiang L X, Wei L, et al. Integration and insertion site of *EPSPs* gene on the soybean genome in genetically modified glyphosate-resistant soybean [J]. *Acta Agronomica Sinica*, 2010, 36 (3): 365-375.)
 - [14] Jeremy S, Steven B C, Jessica S, et al. Genome sequence of the palaeopolyploid soybean [J]. *Nature*, 2010, 463: 178-183.