

基因体外诱变的一种新方法

马向东^{1,2} 柯 涛² 黄春华¹ 周俊初^{1*}

(¹ 华中农业大学农业微生物学国家重点实验室 武汉 430070)

(² 河南农业大学生物技术与食品科学学院 郑州 450002)

摘 要 在 PCR 的过程中,采用 5-溴脱氧尿苷三磷酸(BrdUTP)部分取代脱氧胸苷三磷酸(dTTP)的方法,对克隆的野油菜黄单胞菌的 α -淀粉酶基因进行了体外诱变。结果表明,BrdUTP 浓度越高,诱变越强;浓度越低,诱变越弱。当 BrdUTP 浓度为 dTTP 的 0.1% 时,可以得到最多的正诱变结果。用 LBSP 鉴别培养基初筛,然后用 Yoo 改良法测定酶活,仅一轮诱变就获得了其表达产物 α -淀粉酶的酶活分别降低了 5 倍和提高了 20 倍的两个突变基因。再以后者为 PCR 模板进行第二轮诱变,从而筛选到了 α -淀粉酶的酶活提高 40 倍的突变体。此诱变方法克服了用碱基类似物在体内诱变由于核酸复制酶等的校正作用而造成诱变无效的难题,并为基因的体外诱变找到了一条新途径。

关键词 PCR,体外诱变,5-溴脱氧尿苷三磷酸(BrdUTP), α -淀粉酶基因

中图分类号:Q78 文献标识码:A 文章编号:0001-6209(2004)03-0378-04

遗传学家早期研究的突变材料仅限于基因偶然发生的自发突变。随着本世纪 30 年代发现 X-射线和 40 年代发现一些化学物质能提高突变率,使研究方法从自发突变一跃为诱发突变。80 年代以来发展的基因体外诱变技术为基因的突变提供了一条更有利的途径。

基因体外诱变技术目前可分为两大类^[1]。第一类为不依赖 PCR 的体外诱变,由于操作繁琐,现已很少被人采用。第二类是依赖 PCR 的体外诱变,包括依赖于 PCR 的定点诱变^[2]、倾向错误的 PCR 诱变(Error-prone PCR)^[3]、DNA shuffling^[4]和交错延伸 PCR 技术^[5]等。依赖于 PCR 的定点诱变需要合成不同突变位点引物,经 PCR 得到全基因,然后检测突变位点的功能,一次只能检测一个位点的功能,要想得到目的突变子要花大量的时间。倾向错误的 PCR 技术由 Leung 等发明,通过改变 PCR 反应体系中的 Mg^{2+} 和 dNTPs 浓度便可控制这一技术所引导的点突变率,使每一次获得的小突变累积而产生重要的有益突变。但该方法较为费力、耗时,一般适用于较小的基因片段(小于 800 bp)。新近出现的 DNA shuffling 和交错延伸 PCR 技术,尽管这两种诱变方法均能得到所需突变基因,从这些方法得到的最后结果来分析,也是点突变的积累,但操作都比较繁琐。为了解决这个问题,我们找到了一个更加简单

的方法,用 5-溴脱氧尿苷三磷酸替代脱氧胸苷三磷酸,借助 PCR 在体外对基因进行诱变。

1 材料和方法

1.1 菌株和质粒

含 α -淀粉酶基因的 pHN8004、pHNL001、pHNM002 和 pHNH003 质粒由本研究克隆构建。表达载体 pBluescript KS 和大肠杆菌(*Escherichia coli*) DH5 α 本实验室保存。野油菜黄单胞菌(*Xanthomonas campestris* pv. *campestris*) 8004 由广西农业大学冯家勋教授提供。

1.2 鉴别和初筛培养基

LBSP 培养基,在 LB 培养基的基础上添加 0.5% 的淀粉和 0.05% 的锥虫蓝^[6]。

1.3 生化试剂

各种限制性内切酶、*Taq* DNA 聚合酶、dNTPs 等均购自华美生物工程公司, $CaCl_2$ 、KCl、NaCl、 $MgCl_2$ 、 $MnCl_2$ 均为国产分析纯。Pipes、DMSO、Peptone、Yeast-extract、Agrose、5-bromo-2'-deoxyuridine-5'-triphosphate (BrdUTP) 购自 Sigma 公司。

1.4 引物设计

α -淀粉酶基因引物由上海生工生物工程技术有限公司合成。其中上游引物 A 为 5'-AAAAGG-TACCTGCTGGACGTCACGGCATC-3',下游引物 B 为:

基金项目:国家自然科学基金(39970022)、国家'973'计划(001CB1089)

* 通讯作者。Tel 86-27-87281685; E-mail: zjc42926@public.wh.hb.cn

作者简介:马向东(1961-),男,湖北省仙桃人,副教授,博士,从事微生物学及分子生物学教研工作。E-mail: mabo1978@163.com

收稿日期:2003-07-24,修回日期:2003-12-15

5'-TATAGGATCCGCTGATGTTACCTAG-3', 上游引物的酶切位点为 *Kpn* I, 下游引物的酶切位点为 *Bam* H I。

1.5 感受态细胞的制备

常规感受态细胞制备参照 Cohen 等^[7]的方法, 高效感受态细胞制备参照 Inoue 等^[8]的方法。

1.6 总 DNA 的抽提、质粒抽提、酶切、酶连和转化筛选

具体操作采用文献 [9] 介绍的方法。

1.7 PCR 产物、质粒和酶切等产物的回收

采用加拿大 Biostar 公司玻璃奶回收试剂盒回收。

1.8 PCR 反应

参照文献 [10], 常规 PCR 法为在 25 μ L 反应体系中加入: 10 $\times$ Buffer 2.5 μ L, 平衡 dNTPs 0.1 mol/L, 模板质粒为 1 ng, 每种引物 0.1 μ mol/L, 2.5 U *Taq* DNA 聚合酶。反应条件: 94 $^{\circ}$ C 4 min, 94 $^{\circ}$ C 40 s, 55 $^{\circ}$ C 1 min, 72 $^{\circ}$ C 2 min, 循环 30 次, 72 $^{\circ}$ C 10 min。冷却到 4 $^{\circ}$ C 后取样电泳, 诱变方法是在常规 PCR 条件下用不同浓度的 5-溴脱氧尿苷三磷酸部分替代脱氧胸苷三磷酸进行 PCR。

1.9 酶活测定:

采用 Yoo 改良法^[11]。

2 结果和分析

2.1 8004 菌株 α -淀粉酶基因的克隆和重组质粒 pHN8004 的构建

用提取的野油菜黄单胞菌 8004 总 DNA 为模板, 以合成的 A 和 B 为引物, 采用常规 PCR 方法, 扩增得到了 1.8 kb 左右 DNA 的片段, 然后用玻璃奶回收试剂盒回收, 经 *Kpn* I 和 *Bam* H I 双酶切后与用相同酶切的 pBluescript KS 质粒连接, 转化高效感受态细胞 DH5 α 后, 在 LBSP 鉴别培养基上筛选到有 α -淀粉酶活性的阳性克隆子。经对转化子的酶活性、质粒大小和 PCR 验证, 确证已克隆到 α -淀粉酶基因, 测序并提交 GenBank, 登记号为 AF482991, 并将克隆有 α -淀粉酶基因的 pBluescript KS 质粒命名为 pHN8004。

2.2 5-溴脱氧尿苷三磷酸体内诱变野油菜黄单胞菌的 α -淀粉酶基因

将含有 pHN8004 质粒的大肠杆菌接种在装有 50 mL 液体培养基的 150 mL 的三角瓶中, 振荡培养 16 h, 然后以 1% 的量接到装有 1 mL 液体培养基的试管中, 每试管分别加入 0.01、0.05、0.10、0.50 和

1 mol/L 的 5-溴脱氧尿苷三磷酸, 每个重复 3 次, 振荡培养 3 h, 让质粒复制足够的代数, 以便 5-溴脱氧尿苷三磷酸掺入 DNA 并造成突变。做系列稀释, 涂皿培养, 选每皿菌落数 300 左右的稀释液大量涂皿, 结果观察到变异幅度很小。可能原因是 5-溴脱氧尿苷三磷酸不易进入细胞; 如果进入了细胞, 由于 DNA 复制酶的校正功能, 5-溴脱氧尿苷三磷酸不能掺入 DNA 或掺入后被校正, 因此 5-溴脱氧尿苷三磷酸在体内诱变效果不好。结果说明只有排除体内的校正系统的作用才能进行有效诱变, 我们选择了用 PCR 进行体外诱变的方法。

2.3 5-溴脱氧尿苷三磷酸替代脱氧胸苷三磷酸进行 PCR 体外诱变浓度的确定

以 pHN8004 上克隆的 α -淀粉酶基因为模板 DNA, 用碱基类似物 5-溴脱氧尿苷三磷酸 (BrdUTP) 取代脱氧胸苷三磷酸 (dTTP) 的比例分别设定为 100%、10%、1%、0.1% 和 0.01%, 作常规 PCR, 其反应体系除 dNTPs 不同外, 其它条件同常规 PCR。除 dTTP 完全被 BrdUTP 取代的没有获得预期的特征性扩增条带以外, 其余处理均获得了 1.8 kb 的特征性扩增条带 (图 1)。

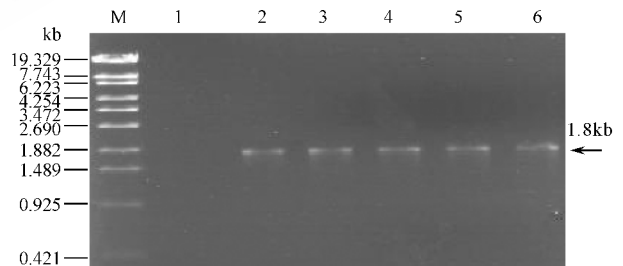


图 1 用 BrdUTP 部分取代 dTTP 的 PCR 结果

Fig. 1 PCR results with dTTP being partially replaced by BrdUTP

M. λ DNA/EcoRT14 Markers; 1. 100% 2. 10% 3. 1% 4. 0.1% 5. 0.01% 6. CK.

2.4 5-溴脱氧尿苷三磷酸的体外诱变效应

用玻璃奶分别回收上述 10%、1%、0.1% 和 0.01% 处理和 CK 的 PCR 扩增产物, 经 *Kpn* I 和 *Bam* H I 双酶切后酶连到经相同双酶切的载体 pBluescript KS 上, 转化大肠杆菌 DH5 α 高效感受态细胞后, 涂 LBSP 筛选平板各 10 皿, 酶连和转化均控制同样的质粒浓度。结果显示: 5-溴脱氧尿苷三磷酸取代的浓度越高, 体外诱变越强, 当代替浓度为 10% 时, 由于诱变强度太大, 平均每皿能存活的转化子数只有 14.6 个。原因可能是掺入的 BrdUTP 量太大导致大部分质粒不能正常复制, 因此能表达抗性存活的转化子数很少。当代替浓度降到 1% 时, 转

化子数明显增加,平均每皿达到 57 个,但有酶活的转化子数并不多,表明诱变还是太强,虽没明显影响质粒复制,但可能因突变位点太多,使绝大多数 α -淀粉酶没有出现酶活性,有酶活性的转化子仅占 4.9%。当取代浓度降到 0.1% 时,每皿有酶活性的转化子数增加到 13.8 个,并且出现 1.8 个酶活性较强的菌落,还有一部分没有酶活性的转化子,表明此诱变剂量适当,出现最大的变异幅度,有利于筛选 α -淀粉酶高活性基因。当浓度降低到 0.01% 时,虽然转化子数和有酶活性的转化子数均高,但没有发现高酶活性的菌落,说明诱变剂量偏小,诱变作用较弱。本结果表明按 0.1% 的量用 BrdUTP 取代 dTTP,是对 α -淀粉酶基因进行体外诱变得到最大变异幅度的适宜浓度。

本研究用 0.1% BrdUTP 部分取代 dTTP 进行第一轮体外诱变就筛选到了高酶活、低酶活和无酶活 (pHNM002) 的突变子,通过测定得到了酶活降低了 5 倍 (pHNL001) 和提高了 20 倍的阳性克隆,图 2 示野生型菌株与酶活提高 20 倍的突变菌株酶活对比结果,大水解圈为突变菌株,小水解圈为野生型菌株。

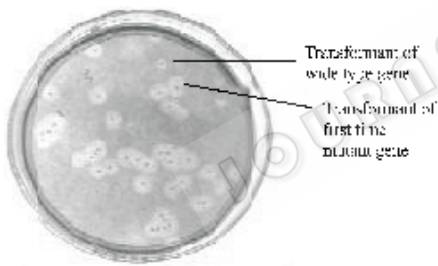


图 2 野生型菌株与一次诱变后酶活提高 20 倍的突变菌株水解圈比较

Fig. 2 20 times higher α -amylase activity of gene products compared with that of wild gene products after first round mutagenesis

2.5 第二轮诱变筛选结果

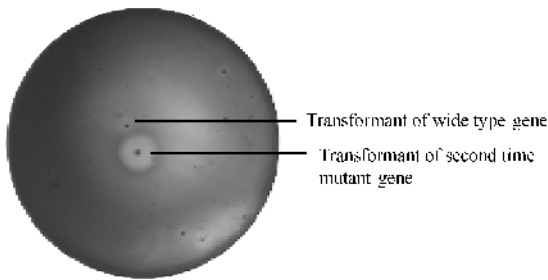


图 3 野生型菌株与二次诱变后酶活提高 40 倍的突变菌株水解圈比较

Fig.3 40 times higher α -amylase activity of gene products compared with that of wild gene products after second round mutagenesis

以筛选到的基因产物 α -淀粉酶酶活提高了 20 倍的重组质粒为出发材料。按上述方法进行第二次诱变和筛选。最终得到了基因产物酶活提高 40 倍的突变体(图 3) 编号 pHNH003。

2.6 突变基因产物的酶活测定结果分析

从表 1 可以看出 1 号为出发菌株,酶活为 21.27 U/mL,2 号为酶活降低了 5 倍的菌株 (pHNL001),7 号的酶活比出发菌株提高了 20 倍,以 7 号为出发菌株又得到了提高接近其两倍的菌株 10 号 (pHNH003)。将这些基因测序后提交到 GenBank 得到的编号 pHNL001 为 AY167890、pHNH003 为 AY167892 和 pHNM002 为 AY165038。

表 1 诱变基因表达产物的酶活与差异显著性分析

Table 1 Activities of α -amylase and the analysis on significance of difference

Numbers of strains	Activities of α -amylase(U/mL)					
	1	2	3	mean	SSR _{0.05}	SSR _{0.01}
1	20.5	22.4	20.9	21.27	g	G
2	3.3	4.2	5.0	4.17	i	H
3	7.0	8.0	7.6	7.53	hi	H
4	9.0	9.7	8.7	9.13	h	H
5	332.7	340.2	329.6	334.17	f	F
6	390.7	387.1	392.9	390.23	e	E
7	433.7	435.2	437.6	435.50	d	D
8	407.1	408.5	410.1	408.57	c	C
9	813.6	810.7	809.2	811.17	b	B
10	821.7	819.6	822.1	821.13	a	A

Number 1 is the strain of wild type gene transformant.

3 讨论

5-溴脱氧尿苷三磷酸是脱氧胸苷三磷酸的类似物,因 5-溴尿嘧啶以酮式状态存在时与腺嘌呤配对、以烯醇式状态存在时则与鸟嘌呤配对而造成突变,可引起 GC $\rightarrow$ AT 的掺入错误和 AT $\rightarrow$ GC 的复制错误,但在体内进行诱变时,由于 DNA 复制酶等的校正作用诱变效果不佳;本实验也证实了这一点。改用 PCR 反应体系中加入一定比例的 5-溴脱氧尿苷三磷酸,通过产生掺入错误和复制错误而造成了较大范围的基因突变。当诱变剂量大时,大量的含有外源基因片段的转化子都无酶活,说明 BrdUTP 的掺入导致了大量核苷酸的突变。本研究用 0.1% 的 5-溴脱氧尿苷三磷酸部分代替脱氧胸苷三磷酸时,获得最大变异幅度,成功地从 PCR 扩增产物的大量突变子中筛选到高酶活的 α -淀粉酶基因突变体。

分子进化的一般过程是:从无机物到有机物,从有机物的小分子到大分子,从大分子物质到生命体。组成生命的基本有机物形成后,能够携带遗传信息的古核酸是怎样的呢?这些大分子物质的功能又是怎么分化的呢?我们推测核酸成为遗传信息的携带者出现时,其中除了 A、T、C、G 这 4 种碱基存在,可能还掺入有大量的带有修饰基团的碱基类似物。但这样的核酸片段,结构及功能都很不稳定,在被正常的脱氧核苷三磷酸取代时,可以快速分化成具有各种功能的基因。本实验用 5-溴脱氧尿苷三磷酸部分代替脱氧胸苷三磷酸进行 PCR 体外诱变,正是模拟这一自然进化机制,得到了大量不同变异幅度的突变基因。这一方法为基因分子进化研究及分子育种技术提供了又一种快捷有效的新的技术策略。

参 考 文 献

- [1] 马向东,黄春华,周俊初. 基因体外诱变. 微生物学通报, 2002, **29**: 70-73.
- [2] Landt O, Grunert H P, Hahn U. A general method for rapid site-directed mutagenesis using the polymerase chain reaction. *Gene*, 1990, **96**: 125-128.
- [3] Keohavong P, Thilly W G. Fidelity of DNA polymerases in DNA amplification. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1989, **86**: 9253-9257.
- [4] Stemmer W P C. Rapid evolution of a protein in vitro by DNA shuffling. *Nature*, 1994, **370**(4): 389-391.
- [5] Zhao H, Giver L, Shao Z, et al. Molecular evolution by staggered extension process (StEP) in vitro recombination. *Nat Biotechnol*, 1998, **16**(3): 258-261.
- [6] 马向东,马立新,薛征峰,等. 一种鉴定 α -淀粉酶及其产生菌的新方法. 华中农业大学学报, 2000, **19**(5): 456-460.
- [7] Cohen S N, Chang A C Y, Hsu L. Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: Genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA. *Proc Natl Acad Sci*, 1972, **69**: 2110-2114.
- [8] Inoue H, Nojima H, Okayama H. High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene*, 1990, **96**: 23-28.
- [9] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular cloning: A laboratory manual. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- [10] Dieffenbach C W, Dveksler G S. PCR 技术实验指南. 黄培堂, 等译. 北京: 科学出版社, 1998.
- [11] Hu N T, Hung M N, Hung A M. Molecular cloning, characterization and nucleotide sequence of the gene for secreted α -amylase from *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *J of General Microbiology*, 1992, **138**: 1647-1655.

A New Method for *in vitro* Mutagenesis——Deoxynucleotide Triphosphate Substitute Method

MA Xiang-Dong^{1,2} KE Tao² HUANG Chun-Hua¹ ZHOU Jun-Chu^{1*}

(¹ Key Laboratory of Agricultural Microbiology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China)

(² College of Biotechnology and Food Science, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China)

Abstract: Cloned α -amylase gene of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* 8004 was mutated *in vitro* using a PCR technique in which deoxythymidine triphosphate was partially replaced by 5-bromo-2'-deoxyuridine-5'-triphosphate. The results showed that the suitable ratio concentration for the 5-bromo-2'-deoxyuridine-5'-triphosphate and deoxythymidine triphosphate was 1:1000, LBSP selection medium was used to choose the transformants, the 20 times higher, 5 times lower and none α -amylase enzyme activity of gene products were got by only one round PCR. The mutant with 40 times higher activity was obtained by using primary PCR products as a template for a second PCR reaction. This inducing method resolved the problem of non-effective induction as in base analogue induction. And the method provides a new measure for molecular breeding.

Key words: α -amylase 5-bromo-2'-deoxyuridine-5'-triphosphate, Mutagenesis *in vitro*, PCR

Foundation item: Chinese National Natural Science Foundation (39970022); Key Project of Chinese National Programs for Fundamental and Development (001CB1089)

* Corresponding author. Tel 86-27-87281685 E-mail: zjc42926@public.wh.hb.cn

Received date: 07-24-2003