

利用雨生红球藻表达系统高通量筛选活力提高的阿特拉津氯水解酶突变子

王绘砖, 陈喜文, 郝晓华, 陈德富

南开大学生命科学学院 分子遗传学实验室, 天津 300071

摘要: 阿特拉津氯水解酶定向改造的关键是开发一种廉价的、表型改变明显的高通量筛选方法。利用高错误倾向 PCR 和 DNA 洗牌相结合的突变方法, 对来源于假单胞菌 ADP 和节杆菌 AD1 的阿特拉津氯水解酶基因进行随机突变, 以雨生红球藻为受体、以阿特拉津为选择压力对突变文库进行高通量筛选。筛选到的 12 个突变子序列分析显示, 突变均为点替换, 位点分散在全基因上, 是在高错误倾向 PCR 及 DNA 洗牌过程中逐渐累积形成的。酶活力分析显示, 突变子的酶活力均高于野生株, 在添加 1.0 mg/L 阿特拉津培养液中的活力是野生株的 1.9~3.6 倍, 在添加 2.0 mg/L 阿特拉津培养液中的活力是野生株的 1.7~2.6 倍, 粗酶提取物的活力是野生株的 1.7~2.7 倍。上述结果表明, 雨生红球藻表达系统是定向改造阿特拉津氯水解酶的高通量筛选平台。

关键词: 阿特拉津氯水解酶, 定向进化, 雨生红球藻, 高通量筛选, 酶活性

High throughput screening atrazine chlorohydrolase mutants with enhanced activity through *Haematococcus pluvialis* expression system

Huizhuan Wang, Xiwen Chen, Xiaohua Hao, and Defu Chen

Laboratory of Molecular Genetics, College of Life Sciences, Nankai University, Tianjin 300071, China

Abstract: Developing a high-throughput screening method is of great importance for directed evolution of atrazine chlorohydrolase. A mutagenesis library of *atzA* from *Pseudomonas* sp. ADP and *Arthrobacter* sp. AD1 was constructed using error-prone PCR and DNA shuffling. Candidate mutants were screened through *Haematococcus pluvialis* expression system, using atrazine as selection pressure. Sequence analysis showed that mutations in the obtained 12 mutants with enhanced activity were all point-substitutions and scattered throughout the gene. Enzymatic activity analysis showed that the mutants all had higher activities than that of the wild type. The activities were 1.8–3.6 fold of the wild-type enzyme when cultured in BBM medium with 1 mg/L atrazine, whereas 1.8–2.6 fold with 2 mg/L atrazine. These results indicated that *Haematococcus pluvialis* expression system is an ideal high throughput screening

Received: July 19, 2010; **Accepted:** October 12, 2010

Supported by: Research and Development Special Projects for Public Welfare Industry of State Oceanic Administration People's Republic of China (No. 200805044), National Natural Science Foundation of China (No. 31070717).

Corresponding author: Defu Chen. Tel/Fax: +86-22-23500133; E-mail: chendefu@nankai.edu.cn

海洋公益性行业科研专项 (No. 200805044), 国家自然科学基金 (No. 31070717) 资助。

system for directed evolution of atrazine chlorohydrolase.

Keywords: atrazine chlorohydrolase, directed evolution, *Haematococcus pluvialis*, high throughput screening, enzyme activity

阿特拉津 (Atrazine) 是一种世界范围内广泛使用了 50 多年的、廉价的、适合于玉米高粱果园和林地等杂草防除的“选择性内吸传导型”苗前/苗后除草剂, 在有效控制杂草、显著提高作物产量与品质方面发挥重要作用^[1]。然而, 阿特拉津在土壤中的残留期长 (4~57 周)、不易流失, 因此在为农业生产发挥重要作用的同时, 也严重污染了农业和人居环境^[2], 已引起世界各国广泛关注 (如欧盟规定饮用水的最大允许浓度为 0.1 $\mu\text{g/L}$ 、美国为 3 $\mu\text{g/L}$ 、加拿大为 5 $\mu\text{g/L}$), 并将其列为当前“亟需解决的实际问题”^[3-4]。

利用抗性基因解毒机制, 构建高效去除污染物的转基因植物, 是 20 世纪 90 年代以来环境修复研究的重要方向^[5]。阿特拉津化学名称为 2-氯-4-乙氨基-6-异丙氨基-1,3,5-三氮苯 (2-chloro-4-ethylamino-6-isopropylamino-1,3,5-triazine)。一旦 2-位上的氯原子被水解掉, 即变成无毒的羟基阿特拉津^[6]。因此, 寻找合适的阿特拉津氯水解酶基因是利用植物修复阿特拉津污染环境的关键。1995 年, Mandelbaum 等^[7]克隆到降解阿特拉津的阿特拉津氯水解酶 (Atrazine chlorohydrolase, AtzA, EC.3.8.1.8) 基因 (*atzA*)。但随后的植物转基因研究显示, 苜蓿、水稻、烟草等转基因株的降解阿特拉津能力仍需提高^[8-10]。

自 1995 年来, 多个实验室从其他菌株中也克隆到 *atzA*。序列比对和功能分析发现, 不同来源的阿特拉津氯水解酶不仅氨基酸序列高度同源, 而且比活力无明显差异^[11-13]。如假单胞菌 *Pseudomonas* sp. ADP 菌株来源的 AtzA 与节杆菌 *Arthrobacter* AD1 菌株来源的 AtzA, 仅在 278 位上有一个对阿特拉津脱氯活性无影响的氨基酸残基的差异^[14]。AtzA 序列的高度同源及功能的一致特性, 表明 AtzA 结构保守、进化缓慢, 要想从自然界中寻找高活性的 *atzA* 基因可能并非易事。

模拟生物自然进化过程的定向进化技术是蛋白

质的非理性设计^[15], 其策略非常适合于结构不清楚的 AtzA 的改造。由于 AtzA 介导的酶促反应无特异性的颜色改变, 大肠杆菌本身又可耐受一定浓度的阿特拉津, 因此定向改造 AtzA 的关键是开发一种廉价的、表型改变明显的高通量筛选方法。为此, 本文利用雨生红球藻 *Haematococcus pluvialis* 表达体系建立了一种稳定高效的高通量筛选 AtzA 酶活力提高的突变子方法。

1 材料与方法

1.1 菌株与载体

雨生红球藻藻种“H1”购自中盐制盐工程技术研究院。大肠杆菌 DH5 α -FT、质粒 pCAMBIA1301、pET21b-*atzA*-NK (含节杆菌 AD1 来源的 *atzA*-AD1 基因, 基因注册号为 AF543694) 均为本实验室保存。质粒 pMD4 (含假单胞菌 ADP 来源的 *atzA*-ADP 基因, 基因注册号为 U55933) 为美国 Minnesota 大学 Michael Sadowsky 教授惠赠。

1.2 方法

1.2.1 制备雨生红球藻感受态细胞

参照 Brown 等^[16]的方法并稍做修改。雨生红球藻接种于 BBM 培养基^[17]中, 于 (25 \pm 3) $^{\circ}\text{C}$ 、50~60 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$ 光照 12 h/黑暗 12 h 条件下不定期振荡 (1 次以上/d) 培养。3 000 r/min 离心 5 min 收集对数生长期细胞 (约 1×10^6 个), 所得沉淀悬浮于电击缓冲液 (含 500 mmol/L NaCl、5 mmol/L KCl、5 mmol/L CaCl₂、20 mmol/L Hepes、200 mmol/L 甘露醇和 200 mmol/L 山梨醇) 中, 反复悬浮离心 2 次所得藻体最终用电击缓冲液调整密度至 1×10^7 个细胞/mL, 分装成 40 μL /管备用。

1.2.2 确定抑制雨生红球藻生长的阿特拉津临界浓度

取 1 mL 对数生长期雨生红球藻分别转至 20 mL 含 0、0.05、0.1、0.2、0.5、1.0 mg/L 阿特拉津的 BBM 培养液中, 21 d 后镜检统计绿色的、结构完整

的细胞数, 以此确定雨生红球藻忍耐阿特拉津的临界浓度。

1.2.3 *atzA* 双元载体的构建及雨生红球藻的遗传转化

根据基因 *atzA*-ADP 和 *atzA*-AD1 序列及质粒 pCAMBIA1301 多克隆位点序列, 设计 PCR 引物, 上游为 *atzA*-S-F (5'-CCGAGCTCATGCAAACGC TCAGCATCC-3', 下划线为 *Sac* I 酶切位点), 下游为 *atzA*-X-R (5'-AATCTAGACTAGAGGCTGCGCCA AGC-3', 下划线为 *Xba* I 酶切位点)。以质粒 pMD4 或 pET21b-*atzA*-NK 为模板, 以 *atzA*-S-F/*atzA*-X-R 为引物进行高保真扩增, PCR 方法参见文献[18]。扩增产物用 *Sac* I 和 *Xba* I 消化后, 与经同样限制性内切酶消化的植物双元载体 pCAMBIA1301 连接, 并转化至大肠杆菌中。筛选序列未突变的转化子扩大培养以提取其重组的双元质粒 pCAMBIA1301-*atzA*。

取 1 μ L 携带有 0.4 μ g 的双元质粒 pCAMBIA1301-*atzA* 加入到雨生红球藻感受态细胞中, 混匀后冰浴静置 10 min, 再转入预冷的 0.1 cm Bio-Rad 电转化杯中。电击 3 次 (间隔 10 s, 试验电击强度为 3~8 kV/cm) 后冰浴静置 5 min, 再转入 BBM 液体培养基中静置培养 24 h, 然后平铺到含阿特拉津的 BBM 固体培养基上, 倒置光照培养至单藻落出现。

1.2.4 *atzA* 突变文库的构建

以质粒 pMD4 或 pET21b-*atzA*-NK 为模板, 以 *atzA*-S-F/*atzA*-X-R 为引物进行易错 PCR (Error-prone PCR, EP-PCR)。EP-PCR 体系为: 0.2 mmol/L dATP、0.2 mmol/L dGTP、1.0 mmol/L dCTP、1.0 mmol/L dTTP、0.1 mmol/L dITP、每种引物 0.3 μ mol/L、7.5 mmol/L MgCl₂、0.01% Triton X-100、1.0 μ mol/L NaNO₂ (或 37.5 μ mol/L CoCl₂)、0.05 U/ μ L *rTaq* DNA 聚合酶及 0.01 ng/ μ L *atzA*-ADP (或 *atzA*-AD1)。扩增条件为: 95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 94 $^{\circ}$ C 40 s, 58 $^{\circ}$ C 32 s, 72 $^{\circ}$ C 110 s, 循环 50 次; 72 $^{\circ}$ C 延伸 7 min。随后经 0.7% 琼脂糖凝胶电泳分离 EP-PCR 产物, 分别命名为 ADP-*atzA*-NO₂⁻、ADP-*atzA*-Co、

AD1-*atzA*-NO₂⁻、AD1-*atzA*-Co。15 $^{\circ}$ C 下 0.1 U/ μ L DNase I 消化 EP-PCR 产物 5~15 min 后, 85 $^{\circ}$ C 保温 20 min, 再添加 5% (V/V) 预冷缓冲液 A [含 50 mmol/L EDTA 和 30% (V/V) 甘油] 终止反应。回收经 0.7% 琼脂糖凝胶电泳分离的约 100 bp DNA 片段后, 等摩尔比混合进行无引物重排反应。无引物重排反应条件同 EP-PCR, 但不加引物, 100 bp 左右 DNA 混合片段的浓度为 20~80 ng/ μ L, 循环数为 25。

0.7% 琼脂糖凝胶电泳回收无引物重排反应产生的 1.2~1.5 kb 条带, 再进行有引物 PCR。扩增体系为: 0.2 mmol/L dNTPs、每种引物 0.3 μ mol/L、0.05 U/ μ L *rTaq* DNA 聚合酶及适量 (5~20 ng/ μ L) 无引物重排 DNA。有引物 PCR 条件同无引物重排反应。产物回收后用 *Sac* I 和 *Xba* I 消化, 并与经同样限制性内切酶消化的 pCAMBIA1301 载体连接, 然后电转化至大肠杆菌 DH5 α -FT, 计算库容。

1.2.5 *AtzA* 突变子的筛选

回收突变文库全部菌落, 提取其质粒 DNA, 按 1.2.3 建立的遗传转化方法将 *atzA* 突变质粒电转化进雨生红球藻细胞, 然后平铺在含 0.5 mg/L (5 倍临界浓度) 阿特拉津的 BBM 固体培养基上, 倒置光照培养至单藻落出现。挑选生长明显的单藻落逐级转接至阿特拉津浓度为 0.5 mg/L、1 mg/L 和 2 mg/L 的 BBM 培养液中, 3 周后提取仍生长良好的雨生红球藻转化株的基因组 DNA, 以 *atzA*-S-F/*atzA*-X-R 为引物通过 *Ex Taq* DNA 聚合酶进行 PCR 和 RT-PCR 检测。PCR 和 RT-PCR 方法参见文献[18]。回收 PCR 条带与 pMD19-T Simple Vector (TaKaRa) 连接后送上海生工生物工程技术服务有限公司测序。

1.2.6 *AtzA* 突变酶活力分析

取 1 mL 对数生长期 *AtzA* 转化株, 4 $^{\circ}$ C、5 000 r/min 离心收集所得藻体转至 4 mL 含 1 mg/L 或 2 mg/L 阿特拉津的 BBM 培养液中, 第 0、1、7、14、21 天取样测定培养液中的阿特拉津残留量, 以确定酶活测定时间。

不同突变株培养 21 d 后取样测定培养液上清中的阿特拉津残留量, 以降解 1 μ g 阿特拉津对应的

培养液体积 (mL) 为 1 个 AtzA 酶活力单位, 以此比较不同突变子的活力差异。相同转化株的酶活力取 3 次重复试验的平均值, 处理间差异经新复极差检测。

取 20 mL 对数生长期转化株, 4 °C、5 000 r/min 离心 10 min 收集藻体, 液氮研磨后迅速加入 600 μ L 预冷植物蛋白提取缓冲液 (150 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0), 25% 甘油, 2% PVP40), 冰上静置 3~4 h 后, 4 °C、12 000 r/min 离心 20 min, 上清即为酶粗提取液。粗酶提取液的蛋白含量测定按照 Bradford 法^[19]进行。取 3 mg 蛋白量对应的粗酶提取液, 添加 0.6 mg 阿特拉津后 25 °C 保温 16 h, 再测其阿特拉津残留量, 以降解 1 mg 阿特拉津所需粗酶提取液量 (mg 蛋白) 为 1 个 AtzA 酶活力单位, 以此比较不同突变子的活力差异。相同转化株的酶活力取 3 次重复试验的平均值, 处理间差异经新复极差检测。

1.2.7 阿特拉津残留量的高压液相法测定

在培养液上清或粗酶提取液中加入等体积的二氯甲烷, 混匀后 25 °C、200 r/min 下振荡 1 h, 再经 12 000 r/min 离心 15 min, 取下层 (二氯甲烷层) 10 μ L 进行高压液相分析^[20]。高压液相检测仪为美国 CoMetro 公司的 CoM 6000 HPLC Pressure Liquid Delivery System, 色谱柱为 Comatex C18 (5 μ m, Φ 4.6 \times 250 mm), 检测波长为 228 nm, 阿特拉津保留时间为 20.925 min。流动相为乙腈和水混合物, 0~6 min, 乙腈由 10% 升到 25%, 水由 90% 降到 75%; 6~21 min, 乙腈由 25% 升到 65%, 水由 75% 降到 35%; 21~23 min, 乙腈由 65% 升到 100%, 水由 35% 降到 0; 23~25 min, 乙腈保持 100%。

2 结果与分析

2.1 转化雨生红球藻表达 *atzA* 体系的建立

雨生红球藻对阿特拉津的耐受力测试显示, 0.1 mg/L 阿特拉津即可完全抑制其生长 (表 1), 因此, 确定该浓度为阿特拉津抑制雨生红球藻生长的临界浓度。

表 1 雨生红球藻对阿特拉津的耐受力测试

Table 1 Tolerance test of *Haematococcus pluvialis* to atrazine

| Concentration of atrazine (mg/L) | Number of green cells |
|----------------------------------|-----------------------|
| 0.00 | ++++ |
| 0.05 | + |
| 0.10 | - |
| 0.20 | - |
| 0.50 | - |
| 1.00 | - |

+: green cells survived, the number of "+" indicated the frequency of cells survived; -: no green cells survived.

在不同电压条件下, 将重组质粒 pCambia1301-*atzA* 电转化进雨生红球藻细胞, 对获得的单藻落进行 PCR 抽检。结果显示 (表 2), 随着电击强度的增大, 获得的单藻落数随之减少, 当电击强度达到 8 kV/cm 时, 培养基表面发白, 无明显单藻落, 表明雨生红球藻细胞被电击致死。PCR 抽检显示, 电击强度在 7 kV/cm 以下, 阳性率随电压增强而提高。根据单藻落数和抽检阳性率计算阳性单藻落数, 显示 6 kV/cm 最多, 为 *atzA* 转化雨生红球藻最适电击强度。

表 2 不同电压对雨生红球藻转化率的影响

Table 2 Effect of voltage on transformation efficiency of *Haematococcus pluvialis*

| Electroporation voltage (kV/cm) | Number of visible colonies | Percentage of PCR ⁺ a | Number of PCR ⁺ colonies |
|---------------------------------|----------------------------|----------------------------------|-------------------------------------|
| 3 | 640 | 10 | 64 |
| 4 | 624 | 24 | 150 |
| 5 | 603 | 44 | 265 |
| 6 | 560 | 80 | 448 |
| 7 | 82 | 90 | 74 |
| 8 | 0 | 0 | 0 |

a: fifty colonies from each treatment were used for PCR analysis.

2.2 *atzA* 突变文库的构建

分别以质粒 pMD4 和 pET21b-*atzA*-NK 为模板, 以 *atzA*-S-F/*atzA*-X-R 为引物, 以 NaNO₂ 或 CoCl₂ 为诱变剂进行 EP-PCR。图 1 显示, 目的条带 (1.4 kb) 清晰。电泳切胶回收该目的条带后用 DNase I 消化, 结果如图 2 所示, 随消化时间延长, 片段变短, 当消化 15 min 时, 片段集中在 100 bp 左右。

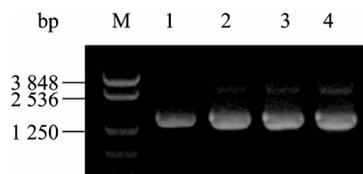


图1 *atzA* 的 EP-PCR 电泳图谱

Fig. 1 Electrophoresis pattern of *atzA* after EP-PCR. M: marker NTKV-3 (bp); 1: ADP-*atzA*-NO₂⁻; 2: ADP-*atzA*-Co; 3: AD1-*atzA*-NO₂⁻; 4: AD1-*atzA*-Co.

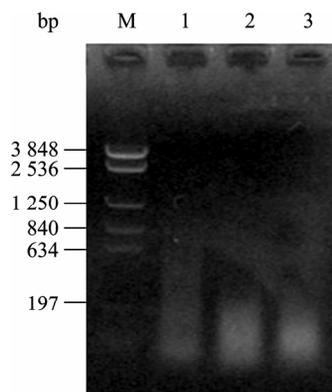


图2 *atzA* 的 DNase I 消化电泳图谱

Fig. 2 Electrophoresis pattern of *atzA* restricted with DNase I. M: marker NTKV-3 (bp); 1-3: treated time was 5 min, 10 min, and 15 min, respectively.

切胶回收 100 bp 左右条带进行无引物重排, 电泳显示在 1.4 kb 处有一明显亮带 (图3), 表明 DNase I 消化的短片段重新组装成了全长片段。当模板浓度为 80 ng/μL 时, 无引物重排的条带最亮。切胶回收该重排条带进行有引物 PCR, 发现模板浓度为 10~20 ng/μL 时, 能有效扩增出 1.4 kb 条带 (图4)。

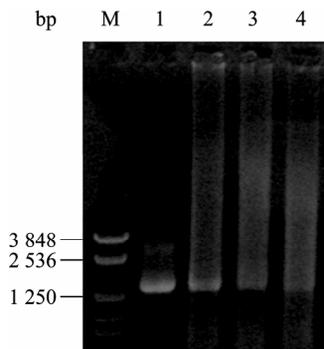


图3 *atzA* 片段的无引物重排

Fig. 3 Reassembly of the restricted *atzA* fragments. M: marker NTKV-3 (bp); 1: full-length of the *atzA* fragment; 2-4: the amount of the digested fragments were 80 ng/μL, 40 ng/μL and 20 ng/μL, respectively.

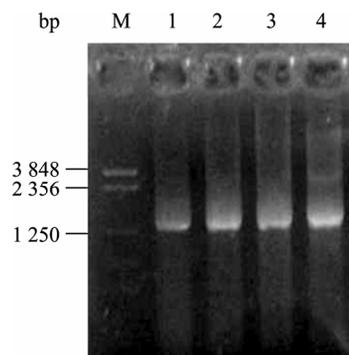


图4 *atzA* 重排产物的有引物 PCR

Fig. 4 Amplification profile with primers using different amount of reassembled fragments as template. M: marker NTKV-3 (bp); 1-3: the amount of the reassembled fragments were 5, 10 and 20 ng/μL, respectively; 4: full-length *atzA* fragment.

2.3 AtzA 突变库的筛选及序列分析

回收有引物 PCR 产物, *Sac* I/*Xba* I 双酶切后与经同样酶酶切的 pCAMBIA1301 片段连接, 电转化进 DH5α-FT, 得库容为 1.5×10^5 的突变文库。收集全部转化子, 提取重组质粒, 然后电转化雨生红球藻, 再平铺于含 0.5 mg/L 或 1.0 mg/L 阿特拉津的 BBM 固体培养基上, 倒置光照培养至单藻落出现 (图5)。

分析不同转化批次所得的 12 株 AtzA 突变子序列(表3)发现, 突变子 10-7 和 10-15、22-4 和 22-11、40-8 和 48-6/49-10 的氨基酸突变位点完全相同, 表明不同转化批次转化子可筛选出相同的 AtzA 突变子, 暗示以雨生红球藻为平台能稳定筛选出活力提高的 AtzA 突变子。

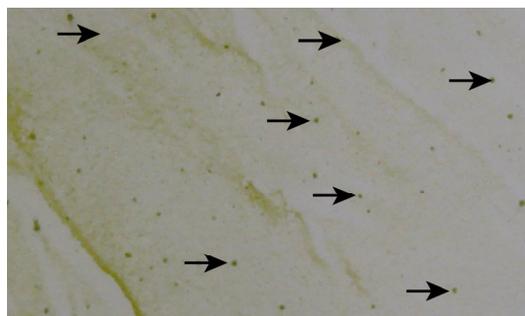


图5 可能携带 AtzA 进化酶的雨生红球藻单藻落

Fig. 5 *Haematococcus pluvialis* single colony which may carry evolved AtzA.

表 3 获得的 12 个酶活力提高的 *AtzA* 进化子的序列分析Table 3 Sequence analysis of the obtained 12 improved *AtzA* mutants

| Amino acid site | 12 | 30 | 58 | 71 | 80 | 121 | 195 | 226 | 278 | 315 | 337 | 389 | 395 | 399 | 429 | 439 | 466 |
|-----------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| AtzA-ADP | Val | Asp | Val | Gln | His | Thr | Thr | Met | Met | Met | Met | Arg | Leu | His | Asn | Phe | Val |
| AtzA-AD1 | | | | | | | | | Val | | | | | | | | |
| 10-7 | | | | | | | | | Val | | | | | | | | |
| 10-15 | Ala | | | | | | | | Val | | | | | | | | |
| 22-4 | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 22-11 | | | | | | | | Val | Ala | | | | | | | | |
| 21-1 | | | | | | | | | Val | | | | Pro | | | | |
| 16-1 | | | Ala | | Arg | Ala | | | Val | | | | | | | | |
| 15-1 | | | | | | | Ala | | Val | | Thr | | | | | Leu | |
| 7-10 | | | | | | | | | Val | Ile | | | | Gln | Ser | | Ala |
| 40-8 | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 48-6 | | Gly | | | | | | | Val | Ile | | Cys | | Gln | Ser | | Ala |
| 49-10 | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 32-2 | | Gly | | Arg | | | | | Val | Ile | | Cys | | Gln | Ser | | Ala |

The first column shows the amino acid sequence of the wild-type enzyme. Mutants were numbered according to the batch number of transformation and the serial number of colonies.

对比表 3 突变序列发现, *AtzA* 突变均为点替换, 位点分散在全基因上, 突变子 10-7 (V12A) 和 21-1 (L395P) 为单点替换; 22-4 (M226V、V/M278A) 为双点替换; 15-1 (T195A、M337T、F439L) 和 16-1 (V58A、H80R、T121A) 为三点替换; 7-10 (M315I、H399Q、N429S、V466A) 为四点替换; 48-6 (A30G、M315I、R389C、H399Q、N429S、V466A) 为六点替换; 32-2 (A30G、Q71R、M315I、R389C、H399Q、N429S、V466A) 为七点替换。7-10、32-2 和 48-6 (40-8/49-10) 均在 315 位、399 位、429 位和 466 位上发生了点替换, 48-6 (40-8/49-10) 在上述 4 个位点基础上又在 30 位和 389 位上发生了点替换, 32-2 比 48-6 (40-8/49-10) 在 71 位多一个点替换, 表明位点突变是在 EP-PCR 及 DNA 洗牌过程中逐渐累积形成的。

2.4 *AtzA* 突变酶活力分析

选取突变序列完全不同的 3 株突变株 15-1、16-1 和 48-6, 接种到含 2 mg/L 阿特拉津的 BBM 培养液中, 第 0、1、7、14、21 天取样分析其阿特拉津降解率与时间的关系 (图 6), 显示未含 *atzA* 的雨生红球藻仅降解很少的阿特拉津 (约 2%~5%), 且随时间延长, 降解率无明显提高; 3 株突变株的阿

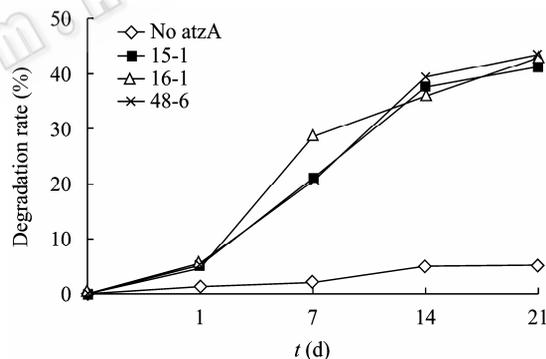
图 6 不同 *AtzA* 突变株不同时间的阿特拉津降解率

Fig. 6 Atrazine degradation rate of *Haematococcus pluvialis* with mutated *atzA* at different times.

特拉津降解率随时间延长, 降解率明显提高, 第 21 天时降解率最高 (15-1 为 41.3%, 16-1 为 42.9%, 48-6 为 43.6%)。

为比较不同突变子的阿特拉津降解活力, 将含 *atzA* 突变基因的雨生红球藻培养在含 1 mg/L 或 2 mg/L 阿特拉津的 BBM 培养液中, 21 d 后测定不同突变子的酶活力; 同时, 提取突变株对数生长期粗酶提取液测定其酶活力 (表 4), 结果显示, 所有突变株的上清酶活力或粗酶提取液酶活力都明显高于野生株 *AtzA*-ADP。以 *AtzA*-ADP 酶活力为 1, 得

各突变子的相对酶活力,可以看出,培养液中添加 1 mg/L 阿特拉津时,22-4 活力最高,为 3.6;10-7 次之,为 3.2;21-1 再次之,为 3.1;其余突变株介于 1.8~2.3 之间。培养液中添加 2 mg/L 阿特拉津时,22-4 活力最高,为 2.6;48-6 次之,为 2.4;10-7 和 32-2 再次之,为 2.3;其余突变株介于 1.7~2.2 之间。粗酶提取液相对酶活力比较发现,10-7、21-1 和 32-2 最高,为 2.7;16-1、22-4 和 48-6 次之,分别为 2.6、

2.5 和 2.3;7-10 和 15-1 最低,为 1.7 和 1.9。结合突变位点信息,发现 12 位 (10-7)、226 位 (22-4) 和 395 位 (21-1) 氨基酸残基的改变对酶活力影响较大,可能是重要的酶活力位点。由于突变株 7-10 的酶活力提高最小,而与 7-10 具有相同突变位点的 32-2 和 48-6 又有较高的相对活力,暗示 30 位、71 位和 389 位可能是重要的酶活力位点,315 位、399 位、429 位和 466 位可能不是重要的酶活力位点。

表 4 不同 AtzA 突变酶的阿特拉津降解活力分析

Table 4 Analysis of the atrazine degradation activity among the evolved AtzA mutants

| Mutants | Supernatant of liquid medium | | | | Crude enzyme extract | |
|----------|------------------------------|---------------------|-----------------|---------------------|----------------------|---------------------|
| | 1 mg/L atrazine | | 2 mg/L atrazine | | Activity (U) | Normalized activity |
| | Activity (U) | Normalized activity | Activity (U) | Normalized activity | | |
| AtzA-ADP | 0.18±0.01 C | 1.0±0.02 C | 0.40±0.09 C | 1.0±0.03 D | 34.84±0.40 D | 1.0±0.02 E |
| 7-10 | 0.33±0.00 B | 1.9±0.01 B | 0.70±0.05 B | 1.7±0.13 C | 60.34±3.70 C | 1.7±0.11 D |
| 10-7 | 0.56±0.03 A | 3.2±0.18 A | 0.93±0.01 A | 2.3±0.02 AB | 94.07±2.85 AB | 2.7±0.08 A |
| 15-1 | 0.32±0.02 B | 1.8±0.13 B | 0.73±0.00 B | 1.8±0.01 C | 86.75±1.30 B | 1.9±0.04 C |
| 16-1 | 0.39±0.06 B | 2.2±0.36 B | 0.86±0.04 AB | 2.2±0.09 B | 90.81±3.31 AB | 2.6±0.10 A |
| 21-1 | 0.55±0.01 A | 3.1±0.04 A | 0.87±0.02 AB | 2.2±0.05 B | 94.53±1.50 A | 2.7±0.04 A |
| 22-4 | 0.64±0.01 A | 3.6±0.05 A | 1.03±0.05 A | 2.6±0.13 A | 64.52±1.98 C | 2.5±0.06 B |
| 32-2 | 0.41±0.03 B | 2.3±0.15 B | 0.92±0.09 A | 2.3±0.21 AB | 95.01±0.39 A | 2.7±0.01 A |
| 48-6 | 0.36±0.03 B | 2.1±0.18 B | 0.97±0.01 A | 2.4±0.02 AB | 80.51±3.06 B | 2.3±0.09 C |

Data are shown as $\bar{x} \pm s$, $n=3$. Differences between A, B, C, D or E is significant in 0.01 level. Difference between data with the same letters is not statistically significant.

3 讨论

阿特拉津作为世界范围内广泛使用的除草剂,在为农业生产发挥积极作用的同时,也给环境带来严重的污染。对阿特拉津污染环境的治理和修复已成为目前急需解决的实际问题, *atzA* 的分离为该问题的解决提供了帮助,但目前分离得到的 *atzA* 具有很高的同源性,编码的 AtzA 功能无差异^[11-13],因此限制了该酶的综合利用。对 AtzA 进行改造以提高酶活力,将会大大促进该酶的应用,为阿特拉津污染环境修复奠定基础的同时也会推动对该酶结构功能关系的研究。2001 年 Seffernick 等^[21]对 *atzA* 的 DNA 洗牌研究和 2009 年 Scott 等^[22]对 *atzA* 的有限点饱和突变研究,均获得了 AtzA 酶活力提高的突变子。Seffernick 等的筛选方法是气相色谱法,气相色谱法

显然不是高通量筛选方法,费时费力、成本高,因此筛选规模仅在 1 600 突变株水平,且仅筛选出 1 个酶活力提高 1.4 倍的突变酶,效果很不理想。Scott 等^[22]的筛选方法是降解圈大小的比较,降解圈大小的比较虽然是高通量筛选方法,但降解圈通常不清晰、时隐时现,其大小判定人为影响很大,且与菌落生长状况密切相关,难以重复,因此以其来判定突变子优劣缺乏足够的科学性和准确性。所以,建立稳定的、简单易行的高通量筛选方法是 AtzA 大规模定向改造的关键。

本文开发的雨生红球藻筛选系统是以 *atzA* 为标记基因、以阿特拉津为筛选压力对突变酶进行筛选,完全基于培养基自动筛选机制,因此是一种典型的正向高通量筛选方法——无或低 AtzA 活性藻株在高浓度阿特拉津培养基中生长受到抑制,难以形成

单藻落;高 *AtzA* 活性藻株因生长不受影响而迅速发育成单藻落。所以,通过阿特拉津选择压力的人为调节,从 *atzA* 突变文库中可有效获取高活性突变子。本文选择雨生红球藻为受体系统,是因为其是一种具有双鞭毛的淡水单细胞绿藻^[23],繁殖速度快(几个小时可繁殖一代)、培养方式简单(可在固体培养基上生成单藻落)、对阿特拉津敏感(致死浓度为 0.1 mg/L),且通过操作简单、转化率高的电击转化方法可大量获取单藻落,因此可实现 *AtzA* 突变子的大规模筛选。本文得到的 12 个突变子的 *AtzA* 活力明显改善这一结果,表明该筛选手段非常有效。由于阿特拉津筛选压力仅人为调节,因此筛选工作也非常简单。

本文结果虽证实该高通量筛选系统简单有效,但其自身也存在瑕疵。外源 *atzA* 在雨生红球藻基因组中的重组是基于 Ti 载体插入原理,而 Ti 载体插入具一定随意性^[24],使得突变酶活力除序列相关外,还与插入位置有关。本实验在 5 倍阿特拉津临界浓度筛选压力下得到了 1 株阳性转化子,但测序显示其序列与野生型 *atzA*-ADP 序列完全相同,显示插入随意性对定向筛选的干扰。依此推测,某些有益突变子也可能因插入位点不合适而被遗漏掉。为避免此干扰,可将突变的 *atzA* 基因定点插入到雨生红球藻特定藻基因组中进行筛选,但遗憾的是,目前植物同源重组频率尚很低(最高为 10^{-3} ~ 10^{-4})^[25],无法保证筛选规模。此外,细菌来源的 *atzA* 基因在雨生红球藻中的表达还可能因密码子偏好性问题而出现干扰,比如细菌 *atzA* 基因突变为雨生红球藻偏好密码子而出现高表达,或突变为雨生红球藻稀有密码子而出现低表达或不表达,都将导致假阳性或假阴性干扰。在序列分析时发现,实验过程中确实存在基因序列发生突变但氨基酸序列未发生改变的突变子。为避免密码子偏好性干扰,可将筛选到的突变基因再转化进大肠杆菌表达系统,以准确阐明对其结构-功能关系。

本文结果显示,雨生红球藻在阿特拉津浓度低于 0.1 mg/L 的 BBM 培养基中能缓慢生长,表明雨

生红球藻自身对阿特拉津有一定耐受性。该耐受性不仅影响高通量筛选,还影响突变酶活性分析。为此,筛选中务必增加突变子序列分析过程,同时对突变酶进行活性分析时还应排除雨生红球藻自身对阿特拉津的吸收。本文所得突变子的酶活力均扣除了未转化 *atzA* 雨生红球藻对阿特拉津的吸收,所得酶活力比较准确地反映了其真实活力变化。

本文构建的 *atzA* 突变文库为 EP-PCR 与 DNA 洗牌相结合的随机突变文库,库容虽仅 10^5 水平,但突变种类是丰富的。在文库筛选前,随机测定了 5 个突变子的序列,发现其中 4 个突变子为多点替换突变,另 1 个突变子除缺失 1 061 bp 片段外还增加了非同源的 183 bp 片段,显示突变文库除点突变外,还有缺失和插入突变。但 5 倍阿特拉津筛选压力筛选到的 7 个突变子(7-10、15-1、16-1、21-1、40-8、48-6 和 49-10),10 倍筛选压力筛选到的 5 个突变子(10-7、10-15、22-4、22-11 和 32-2)序列分析发现,突变均为点突变,不存在缺失或插入突变类型,表明 *AtzA* 高度保守,不允许氨基酸残基数目发生改变。在筛选到的 12 个突变子中,17%的突变子(10-7 和 10-15)在 12 位上发生突变(V12A),17%的突变子(22-4 和 22-11)在 226 位上发生突变(M226V),25%的突变子(40-8、48-6 和 49-10)在 30、315、389、399、429 和 466 位上共同突变(A30G、M315I、R389C、H399Q、N429S、V466A),表明其中的某些突变位点可能与酶活性有关,但其结构-功能关系尚需更多数据支持。

REFERENCES

- [1] Wang HM, Zhang ZM. A New Pesticide Manual. Beijing: China Agriculture Press, 1989.
王焕民,张子明.新编农药手册.北京:中国农业出版社,1989.
- [2] Sheets TJ. Persistence of triazine herbicides in soils. Residue Rev, 1970, 32: 287-310.
- [3] Martin M, Hagege A, Brunette JP, et al. Use of synergistic extraction for the study of atrazine/metal interactions. Anal Chim Acta, 1998, 373(2/3): 161-165.
- [4] Lu K, E XL, Chen YY. The standards of drinking water in

- U.S.A. at present. Foreign Med Sci: Section of Hygiene, 2000, 27(2): 104–109.
- 路凯, 鄂学礼, 陈亚妍. 美国现行饮用水标准. 国外医学: 卫生学分册, 2000, 27(2): 104–109.
- [5] Padmavathiamma PK, Li LY. Phytoremediation technology: hyper-accumulation metals in plants. Water Air Soil Pollut, 2007, 184(1/4): 105–126.
- [6] Strong LC, McTavish H, Sadowsky MJ, et al. Field-scale remediation of atrazine-contaminated soil using recombinant *Escherichia coli* expressing atrazine chlorohydrolase. Environ Microbiol, 2000, 2(1): 91–98.
- [7] Mandelbaum RT, Allan DL, Wackett LP. Isolation and characterization of a *Pseudomonas* sp. that mineralizes the *s*-triazine herbicide atrazine. Appl Environ Microbiol, 1995, 61(4): 1451–1457.
- [8] Wackett LP, Sadowsky MJ, Vance CP, et al. Transgenic plants expressing bacterial atrazine degrading gene *atzA*: US, 6369299. 2002-04-09.
- [9] Wang SW, Shi LL, Sun ZX, et al. *Agrobacterium*-mediated transformation of rice with *atzA* gene. Sci Agric Sin, 2004, 37(8): 1093–1098.
- 王松文, 施利利, 孙宗修, 等. 农杆菌介导的细菌阿特拉津氯水解酶基因对水稻的遗传转化. 中国农业科学, 2004, 37(8): 1093–1098.
- [10] Wang L, Samac DA, Shapir N, et al. Biodegradation of atrazine in transgenic plants expressing a modified bacterial atrazine chlorohydrolase (*atzA*) gene. Plant Biotechnol J, 2005, 3(5): 475–486.
- [11] Vibber LL, Pressler MJ, Colores GM. Isolation and characterization of novel atrazine-degrading microorganisms from an agricultural soil. Appl Microbiol Biotechnol, 2007, 75(4): 921–928.
- [12] Iwasaki A, Takagi K, Yoshioka Y, et al. Isolation and characterization of a novel simazine-degrading β -proteobacterium and detection of genes encoding *s*-triazine-degrading enzymes. Pest Manag Sci, 2007, 63(3): 261–268.
- [13] Hernández M, Villalobos P, Morgante V, et al. Isolation and characterization of a novel simazine-degrading bacterium from agricultural soil of central Chile, *Pseudomonas* sp. MHP41. FEMS Microbiol Lett, 2008, 286(2): 184–190.
- [14] Chen DF, Chen XW, Cai BL. Site-directed mutagenesis of atrazine chlorohydrolase gene and detection of its activity. Acta Scientiarum Naturalium Univ Nankaiensis, 2004, 37(3): 109–114.
- 陈德富, 陈喜文, 蔡宝立. 阿特拉津氯水解酶基因的定点诱变和酶活力检测. 南开大学学报: 自然科学版, 2004, 37(3): 109–114.
- [15] Kolkman JA, Stemmer WPC. Directed evolution of proteins by exon shuffling. Nat Biotechnol, 2001, 19(5): 423–428.
- [16] Brown LE, Sprecher SL, Keller LR. Introduction of exogenous DNA into *Chlamydomonas reinhardtii* by electroporation. Mol Cell Biol, 1991, 11(4): 2328–2332.
- [17] Jin CY, Song LR, Liu YD, et al. Study on the media for *Haematococcus* sp. HB748. Chin J Appl Environ Boil, 1997, 3(2): 177–179.
- 金传荫, 宋立荣, 刘永定, 等. 红球藻水生 748 株 (*Haematococcus* sp. HB748) 培养基的选择与对维生素 B₁₂ 的需求. 应用与环境生物学报, 1997, 3(2): 177–179.
- [18] Wang HZ, Chen XW, Wang YQ, et al. Obtainment of *atzA*-transgenic tobacco plants and analysis of their phytoremediation capability. Acta Agron Sin, 2008, 34(5): 783–789.
- 王绘砖, 陈喜文, 王永芹, 等. 转阿特拉津氯水解酶基因烟草的获得及其生物降解能力分析. 作物学报, 2008, 34(5): 783–789.
- [19] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantization of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem, 1976, 72(7): 248–254.
- [20] De Souza ML, Sadowsky MJ, Wackett LP. Atrazine chlorohydrolase from *Pseudomonas* sp. strain ADP: gene sequence, enzyme purification, and protein characterization. J Bacteriol, 1996, 178(16): 4894–4900.
- [21] Seffernick JL, Wackett LP. Rapid evolution of bacterial catabolic enzymes: a case study with atrazine chlorohydrolase. Biochemistry, 2001, 40(43): 12747–12753.
- [22] Scott C, Jackson CJ, Coppin CW, et al. Catalytic improvement and evolution of atrazine chlorohydrolase. Appl Environ Microbiol, 2009, 75(7): 2184–2191.
- [23] Chen F, Chen H, Gong XD. Mixotrophic and heterotrophic growth of *Haematococcus lacustris* and rheological behaviour of the cell suspensions. Bioresour Technol, 1997, 62(1/2): 19–24.
- [24] Hoekema A, Hirsch PR, Hooykaas PJJ, et al. A binary plant vector strategy based on separation of *vir*- and T-region of the *Agrobacterium tumefaciens* Ti-plasmid. Nature, 1983, 303: 179–180.
- [25] Wright DA, Townsend JA, Winfrey RJ, et al. High-frequency homologous recombination in plants mediated by zinc-finger nucleases. Plant J, 2005, 44(4): 693–705.