

基于易错 PCR 的黄曲霉毒素解毒酶体外分子定向进化

张赛^{1,2}, 邢克克^{1,2}, 胡亚冬¹, 谢春芳^{1,2}, 刘大岭^{1,2}, 姚冬生^{1,3}

1 暨南大学 微生物技术研究所, 广州 510632

2 广东省生物工程药物重点实验室, 广州 510632

3 基因工程药物国家工程研究中心, 广州 510632

摘要: 运用定向进化-易错 PCR 方法, 提高黄曲霉毒素解毒酶的活力及稳定性, 并结合辣根过氧化物酶 (HRP)-隐性亮绿 (RBG) 快速高通量筛选系统, 构建了库容约为 10^4 的突变体库。经过两轮易错 PCR, 最终分别获得了耐高温 70 °C 突变酶 A1773、pH 4.0 稳定性的突变酶 A1476, pH 4.0 和 pH 7.5 均表现稳定性的突变酶 A2863, 其酶活力比野生酶分别提高了 6.5 倍、21 倍和 12.6 倍。经序列分析表明, 发现突变酶 A1773 发生了 Glu¹²⁷Lys 和 Gln⁶¹³Arg 突变; 突变酶 A2863 发生了 Gly⁷³Ser、Ile³⁰⁷Leu、Val⁵⁹⁶Ala、Gln⁶¹³Arg 突变; 突变酶 A1476 发生了 Ser⁴⁶Pro、Lys²²¹Gln、Ile³⁰⁷Leu 和 Asn⁴⁷¹Ile 突变。结果为进一步了解黄曲霉毒素解毒酶的结构与功能之间的关系提供了参考。

关键词: 黄曲霉毒素解毒酶, 稳定性, 定向进化, 易错 PCR

Directed evolution of aflatoxin detoxifzyme *in vitro* by error-prone PCR

Sai Zhang^{1,2}, Keke Xing^{1,2}, Yadong Hu¹, Chunfang Xie^{1,2}, Daling Liu^{1,2}, and Dongsheng Yao^{1,3}

1 Institute of Microbial Technology, Jinan University, Guangzhou 510632, China

2 Guangdong Provincial Key Laboratory of Bioengineering Medicine, Guangzhou 510632, China

3 National Engineering Research Center of Genetic Medicine, Guangzhou 510632, China

Abstract: The experiment was conducted by directed evolution strategy (error-prone PCR) to improve the activity of aflatoxin detoxifzyme with the high-throughput horse radish peroxidase and recessive brilliant green (HRP-RBG) screening system. We built up a mutant library to the order of 10^4 . Two rounds of EP-PCR and HRP-RBG screening were used to obtain three optimum mutant strains A1773, A1476 and A2863. We found that mutant A1773 had upper temperature tolerance of 70 °C and that its enzyme activity was 6.5 times higher than that of the parent strain. Mutant strains A1476 worked well at pH 4.0 and its enzyme activity was 21 times higher than that of the parent strain. Mutant A2863 worked well at pH 4.0 and

Received: December 8, 2010; **Accepted:** April 11, 2011

Supported by: National High Technology Research and Development Program of China (863 Program) (No. 2007AA100605), Scientific and Technological Project of Guangdong Province (No. 2009B020301001), 211 Project of Jinan University.

Corresponding author: Dongsheng Yao. Tel/Fax: +86-20-85228422; E-mail: tdsyao@jnu.edu.cn

国家高技术研究发展计划 (863 计划) (No. 2007AA100605), 广东省科技攻关计划 (No. 2009B020301001), 暨南大学“211 工程”经费资助。

pH 7.5, and its enzyme activity was 12.6 times higher than that of the parent strain. With DNA sequencing we found that mutant A1773 revealed two amino acid substitutions, Glu¹²⁷Lys and Gln⁶¹³Arg. Mutant A1476 revealed four amino acid substitutions: Ser⁴⁶Pro, Lys²²¹Gln, Ile³⁰⁷Leu and Asn⁴⁷¹Ile. Mutant A2863 revealed four amino acid substitutions: Gly⁷³Ser, Ile³⁰⁷Leu, Val⁵⁹⁶Ala and Gln⁶¹³Arg. The results provided a useful illustration for the deep understanding of the relationship between the function and structure of *aflatoxin detoxifzyme*.

Keywords: aflatoxin detoxifzyme, stability, directed evolution, error-prone PCR

黄曲霉毒素 (*Aflatoxin*, AFT) 是由黄曲霉、寄生曲霉、集峰曲霉和溜曲霉等多种真菌产生的次级代谢产物^[1-2], 其中黄曲霉毒素 B1 (AFB1) 分布范围最广且化学性质最稳定^[3], 具有很强的致癌性、致突变性和致畸性。文献报道氧化还原酶是一类对 AFB1 有分解转化作用的酶。Doyle 等^[4]报道寄生曲霉 *Aspergillus parasiticus* 能够产生降解 AFB1 的过氧化物酶 (Peroxidase), 过氧化物酶的量与 AFB₁ 被降解的量之间存在着直接的关系。Ueng 等^[5]报道细菌重组表达的人细胞色素 P450 酶 (Bacterial recombinant human cytochrome P450) 1A2 转化黄曲霉毒素 B1 所形成的产物的基因毒性比 P450 酶 3A4 低。Das 等^[6-7]报道辣根过氧化物酶 (Horse radish peroxidase) 在 20 °C、pH 6.0 处理黄曲霉毒素 B1 60 min, 转化黄曲霉毒素 B1 的效率达到 38%。Alberts 等^[8]报道变色栓菌 *Trametes versicolor* 的真菌漆酶 (Fungal laccase) 在 30 °C、pH 6.5 处理 1.4 µg/mL 的黄曲霉毒素 B1, 72 h 后的降解率可达 87.34%。黄曲霉毒素解毒酶 (Aflatoxin detoxifzyme, ADTZ) 是一种来自发光假蜜环菌 *Armillariella tabescens* E-20, 能够在体外直接降解黄曲霉毒素, 使其特征荧光吸收明显减弱的氧化酶。但是该酶在高温和极端 pH 条件下稳定性差, 易丧失活性^[9], 限制了其在工业上的应用。为了获得更高催化效率的酶, 加速其在工业生产上的应用进程, 采用定向进化 (易错 PCR) 的方法, 向该酶中随机引入突变, 建立黄曲霉毒素解毒酶基因突变文库, 再结合 HRP-RBG 快速高通量筛选系统筛选的方法, 获得了催化效率提高的黄曲霉毒素解毒酶突变株。

酶的改造可以分为理性设计和非理性设计, 前者通过分析蛋白质三维结构, 确定结构与功能之间的关系, 再通过定点诱变改变蛋白质中个别氨基酸, 产生新性状的蛋白质; 后者不需要了解蛋白质结构和功能关系, 在实验室中模仿自然进化的过程——随机突变、重组和选择, 在较短时间内完成漫长的自然进化过程, 有效地改造蛋白质^[10]。利用易错 PCR (Error prone PCR) 或 DNA 改组 (DNA shuffling) 对酶分子编码基因进行定向进化, 可获得催化效率提高的酶蛋白, 并改善酶的一系列性质, 如稳定性^[11-12]、底物特异性^[13]等, 是蛋白质工程的重要研究工具。由于对黄曲霉毒素解毒酶的空间结构与功能的关系尚不了解, 所以采用非理性的方法 (易错 PCR 技术) 进行改造。利用黄曲霉毒素解毒酶催化黄曲霉毒素 B1 时产生的 H₂O₂^[14]与辣根过氧化物酶 (HRP)-隐性亮绿 (Recessive brilliant green, RBG) 系统关联, 使隐性亮绿 (RGB) 转化成亮绿 (Brilliant green, BG), 通过简单检测反应物吸光值变化对突变体进行鉴定, 并用实验室构建的酿酒酵母附加型分泌表达载体构成了一个突变酶的快速筛选系统, 实现了对所建的突变库进行高通量筛选, 解决了筛选时大量检测黄曲霉毒素繁杂耗时和高成本的问题, 并达到了良好的筛选目的。

1 材料与方法

1.1 菌株和质粒

宿主菌酿酒酵母 *Saccharomyces cerevisiae* BJ5465 购自 Invitrogen 公司; 大肠杆菌 DH5α 由本研究室保存; 大肠杆菌-酿酒酵母穿梭分泌表达质粒

pYES2/CT/ α -factor (简称为 pYC α) 系本实验室自行构建^[15]; pKLAC₁-*adtz* 重组质粒为本研究室保存。

1.2 酶和试剂

PCR 所用试剂为 NEB 公司产品; 限制内切酶酶 *Xho* I 和 *Not* I 为 TOYOBO 公司产品; 小量质粒抽提试剂盒和 PCR 产物快速胶回收试剂盒购自 TIANGEN 公司; 酵母质粒抽提试剂盒购自 Biomega 公司; PCR 引物合成和 DNA 测序委托北京奥科生物技术公司; 辣根过氧化酶和亮绿购自上海生工生物工程技术有限公司; AFB1 和二甲基亚砷 (DMSO) 购自 Sigma 公司; 其他试剂为国产分析纯。

1.3 培养基

培养基 LB、YPD、YPGal、SC-U-D 均按《Invitrogen 公司操作手册》推荐方法配制。

1.4 易错 PCR 的扩增与突变文库的建立

1.4.1 易错 PCR 引物设计

根据已知 *adtz* 基因序列, 使用 Primer Premier 5.0 软件设计 error-prone PCR 引物。在引物的末端分别引入限制内切酶 *Xho* I 和 *Not* I 的酶切位点 (下划线所示), 并分别在 5' 端增加 3~5 个保护碱基。上游引物 P9A1: 5'-CCCTCGAGAAAAGAGAGGCTGAAGC TATGGCCACCACAACGTGCC-3'; 下游引物 P9A2: 5'-AAGGAAAAAAGCGGCCGCTTACAATCGTCTC TCAATGAACTTTC-3'。

1.4.2 易错 PCR 反应体系

20 μ L 反应体系为: 10 \times PCR 缓冲液 2 μ L, dATP (10 mmol/L) 和 dGTP (10 mmol/L) 各 0.4 μ L, dCTP (10 mmol/L) 和 dTTP (10 mmol/L) 各 2 μ L, 模板 pKLAC₁-*adtz* 0.2 μ L, 上下游引物 (10 μ mol/L) 各 0.6 μ L, MgCl₂ (25 mmol/L) 4.4 μ L, MnCl₂ (2 mmol/L) 0、0.8、2、4、6、8 μ L, *Taq* DNA 聚合酶 0.2 μ L, ddH₂O 8、6、4、2、0.8、0 μ L。易错 PCR 循环程序: 降落 PCR, 94 $^{\circ}$ C 5 min 5 个循环; 94 $^{\circ}$ C 30 s、65 $^{\circ}$ C 30 s、72 $^{\circ}$ C 1 min 45 s, 每个循环退火温度降低 1 $^{\circ}$ C, 共 25 个循环; 94 $^{\circ}$ C 30 s、60 $^{\circ}$ C 30 s、72 $^{\circ}$ C 1 min 45 s, 72 $^{\circ}$ C 10 min。

1.4.3 易错 PCR 突变文库的建立

S. cerevisiae BJ5465 感受态细胞的制备: 挑取 *S. cerevisiae* BJ5465 单克隆于 5 mL YPD 液体培养基中, 30 $^{\circ}$ C、250 r/min 振荡培养过夜; 以 1% 接种量转入 50 mL YPD 液体培养基, 30 $^{\circ}$ C、250 r/min 培养至 OD₆₀₀ 约为 1.0~1.5。收集菌液至 50 mL 离心管中, 4 000 r/min 离心 10 min, 弃上清。用溶液 I (0.1 mol/L 醋酸锂+0.01 mol/L 二硫苏糖醇+1 mol/L TE) 重悬沉淀, 冰浴 1 h, 4 000 r/min 离心 10 min 弃上清, 25 mL 冰浴无菌水重悬, 4 000 r/min 离心 10 min 弃上清, 重复操作一次。用 5 mL 冰浴的溶液 II (1 mol/L 山梨醇) 重悬沉淀, 4 000 r/min 离心 10 min 弃上清。加入 200 μ L 冰浴的溶液 II, 悬浮菌体, 分装^[16]。

重组质粒的构建及转化: 将 PCR 产物以 1.2% 琼脂糖凝胶电泳纯化回收, 命名为 *adtz*^{mut}。用 *Xho* I、*Not* I 限制性内切酶纯化 PCR 产物, 纯化后的易错 PCR 产物与同样双酶切的穿梭分泌表达载体 pYC α 混匀, 用 T4 DNA 连接酶 4 $^{\circ}$ C 过夜连接。连接产物热激转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞, 涂布在含 Amp 的 LB 平板, 37 $^{\circ}$ C 培养 16 h 后将平板上所有克隆转入含有 Amp 的液体 LB 培养基中, 37 $^{\circ}$ C、200 r/min 培养过夜。提取大肠杆菌 DH5 α 中重组质粒, 采用电转化的方式^[17-18], 转入 *S. cerevisiae* BJ5465 感受态细胞后迅速加入预冷 1 mol/L 山梨醇, 涂布在 SC-U-D 平板上, 30 $^{\circ}$ C 培养 48 h。

1.4.4 重组子的鉴定

挑取 1.4.3 中平板上单克隆, 提取质粒, 用限制性内切酶 *Xho* I、*Not* I 双酶切和 PCR 鉴定含有突变基因的重组子 pYC α -*adtz*^{mut} 是否构建成功。

1.5 易错 PCR 突变文库的筛选

1.5.1 突变酶 ADTZ 的初筛

挑取单克隆接种到 YPGal 液体培养基的 96 孔板中进行诱导培养, 30 $^{\circ}$ C 摇床培养 72 h 后取上清液。酶活力的检测^[14-19]: 实验组 (总体系 200 μ L)——取 20 μ L 培养上清粗酶液加入到含有 AFB1 4 μ L、

pH 5.8 0.02 mol/L Na_2HPO_4 -0.01 mol/L 柠檬酸缓冲液 131 μL 、5 μL HRP (2.5×10^{-4} mol/L) 和 40 μL 的隐性亮绿 (1.0×10^{-4} mol/L) 的酶标板中; 对照组——把 4 μL AFB₁ 替换成 4 μL 甲醇, 其他成分与实验组相同。加入酶液后立即测量 630 nm 波长的吸光值, 然后在 30 °C 温育 30 min 再次检测 630 nm 波长的吸光值, 用 ΔOD_{630} 表示相对酶活力的高低。为了排除 HRP 也能降解 AFB₁ 的干扰, 分别以含有 pYCa 空质粒和携带野生型 *adtz* 基因的 *S. cerevisiae* BJ5465 作为阴性对照和阳性对照, 对文库进行定性筛选, ΔOD_{630} 高于野生型的克隆将进入下一轮筛选。

高温 (70 °C) 处理: 取上清粗酶液, 在 70 °C 水浴 30 min 后, 然后取处理过的酶液进行酶活的测定。酶活测定的条件是在 30 °C、pH 6.0、0.04 mol/L 磷酸氢二钠-0.02 mol/L 柠檬酸缓冲液环境下进行。酸 (pH 4.0) 处理: 取上清粗酶液和 pH 2.5 缓冲液混合后, 使最终体系的 pH 为 4.0, 在 25 °C 水浴 30 min 后, 再测定相对酶活力。碱 (pH 7.5) 处理: 取上清粗酶液和 pH 7.5 缓冲液混合后, 使最终体系的 pH 为 7.5, 在 25 °C 水浴 30 min 后, 再测定相对酶活力。酶活力定义: 一个单位 (U) 定义为在 30 °C, pH 6.0 的反应条件下, 每分钟将 AFB₁ 转化释放 1 pmol H_2O_2 所需要的酶量。

1.5.2 突变酶 ADTZ 的复筛

将 1.5.1 筛选到的优秀克隆再在同样条件处理后, 以 AFB₁ 为底物, 用 HPLC 测定样品反应组和样品空白组中所残留的 AFB₁ 计算突变体的酶活力。酶活力定义: 一个单位 (U) 定义为在 30 °C, pH 6.0 的反应条件下, 1 分钟降解 1 pmol AFB₁ 所需的酶量。

1.6 酶的诱导表达

将经初筛和复筛获得的优良性质的 *S. cerevisiae* BJ5465 重组子接种于含 2% 半乳糖的 YPGal 培养基扩大培养, 诱导表达突变酶, 取上清液, 按 Bradford 法测定^[20]其蛋白质的含量并进行酶学性质的初步分析。

1.7 酶学性质分析

1.7.1 温度和 pH 对酶活性的影响

将突变克隆培养酶液分别在 20 °C、30 °C、40 °C、50 °C、60 °C、70 °C、80 °C 温度下, 通过外标法定量检测得到样品反应组和样品空白组中所残留的 AFB₁, 两者比较计算出酶活力。在不同的 pH (3.0、4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0) 的缓冲液 (0.04 mol/L Na_2HPO_4 -0.02 mol/L 柠檬酸) 下, 通过外标法定量检测得到样品反应组和样品空白组中所残留的 AFB₁, 两者比较计算出酶活力, 以突变酶的最高酶活力为 100%, 计算各组酶的相对活力。

1.7.2 热稳定性和 pH 稳定性

将突变克隆培养酶液分别在 20 °C、30 °C、40 °C、50 °C、60 °C、70 °C、80 °C 温度下保温 30 min, 然后在 pH 6.0 的缓冲液下用外标法定量检测得到样品反应组和样品空白组中所残留的 AFB₁, 两者比较计算出酶活力, 以突变酶的最高酶活力为 100%, 计算各组酶的相对活力。将突变克隆培养酶液分别在 pH 3.0、4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0 的缓冲液中于 25 °C 保温 30 min, 然后在 pH 6.0 的 0.04 mol/L Na_2HPO_4 -0.02 mol/L 柠檬酸缓冲液下用外标法定量检测得到样品反应组和样品空白组中所残留的 AFB₁, 两者比较计算出酶活力, 以突变酶的最高酶活力为 100%, 计算各组酶的相对活力。

1.8 突变酶突变位点分析

将筛选获得的优良性状突变体, 进行测序 (由北京奥科生物公司完成), 并对其关键氨基酸进行分析。

2 结果

2.1 易错 PCR 突变库的建立

2.1.1 易错 PCR 条件的确立

在易错 PCR 反应体系中分别加入不同体积的 MnCl_2 , 形成 0、0.02、0.05、0.10、0.15、0.20 mmol/L 的浓度梯度; 同时 MgCl_2 浓度增加到 7 mmol/L 以稳定非互补的碱基对, dCTP 和 dTTP 的浓度增加到

1 mmol/L 以促进碱基错配的倾向性, 其中 Mg^{2+} 和 Mn^{2+} 的浓度被调整, 可以得到不同突变频率的文库。从突变库中随机挑取 10 个克隆进行测序, 碱基的突变频率为 4.64%, 符合 EP-PCR 文库突变原则。

2.1.2 易错 PCR 突变库的建立

将易错 PCR 产物克隆到大肠杆菌-酿酒酵母穿梭表达载体 pYCa 上, 重组质粒在大肠杆菌 DH5 α 中扩增后转入酿酒酵母 *S. cerevisiae*, 结果所构建的突变克隆库库容约为 1.0×10^4 。

2.2 易错 PCR 突变文库的筛选

所建立的 EP-PCR 文库按图 1 的流程进行初筛和复筛。

2.2.1 初筛

用 HRP 测活方法对黄曲霉毒素解毒酶 EP-PCR 突变文库 (约 10^4) 克隆进行初步筛选。ADTZ 催化 AFB1 产生的 H_2O_2 能使无色的 RGB 转化成 BG, 其直观的颜色变化见图 2, 筛选得到的阳性克隆见图中标记的。

筛选得到酶活力高于野生型约的突变体 5 000 个。将这 5 000 个克隆分别在 70 °C、pH 4.0、pH 7.5 的环境中处理 30 min 后测定其酶活, 结果见图 3。

2.2.2 复筛

对通过选择压力初筛得到的约 500 个突变体克隆进行复筛, 用 HPLC 检测底物减少量的图谱见图 4。突变酶 A1476 经 pH 4.0、30 min 处理后测活,

酶活力是野生型的 21 倍, 突变酶 A1773 经 pH 7.5、30 min 处理后测活, 酶活力比野生型提高了 6.5 倍, 突变酶 A2863 经 70 °C 30 min 处理后测活, 酶活力比野生型提高了 12.6 倍 (表 1)。

表 1 突变酶在各自的选择压力下对底物 AFB1 的酶活力测定结果

Table 1 The results of mutants specific activity with AFB1 in the pressure of their choice

Method	Mutants	Specific activity (U/mg)	Folds
pH 4.0	Wild type	1.05	1.0
pH 4.0	A1476	22.01	21.0
70 °C	Wild type	7.10	1.0
70 °C	A1773	46.24	6.5
pH 7.5, pH 4.0	Wild type	1.96	1.0
pH 7.5, pH 4.0	A2863	24.69	12.6

2.3 突变酶的酶学性质分析

2.3.1 突变酶的最适温度和最适 pH 值

突变酶 A1476 和 A1773 在 50 °C 和 pH 4.0 条件下表现最佳酶活, 最适反应温度比野生型提高了 10 °C, 最适 pH 由野生型的 pH 6.0 降低到了 pH 4.0, 而 A1476 比 A1773 有较宽的反应温度范围, A1476 残留活性在 60% 以上的酶促反应温度范围为 30 °C~65 °C, 而 A1773 残留活性在 60% 以上的酶促反应温度范围为 35 °C~55 °C; 突变酶 A2863 的最适 pH 范围扩大到 pH 4.0~7.0, 而野生型的最适 pH 只在 pH 5.5~6.5 狭窄的范围 (图 5~6)。

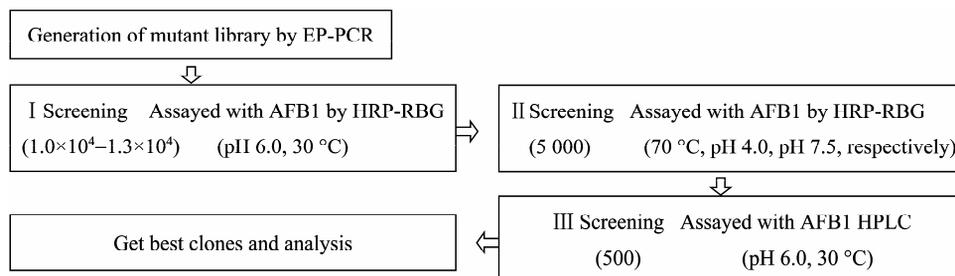


图 1 易错 PCR 文库的筛选流程图

Fig. 1 Scheme of screening EP-PCR libraries.

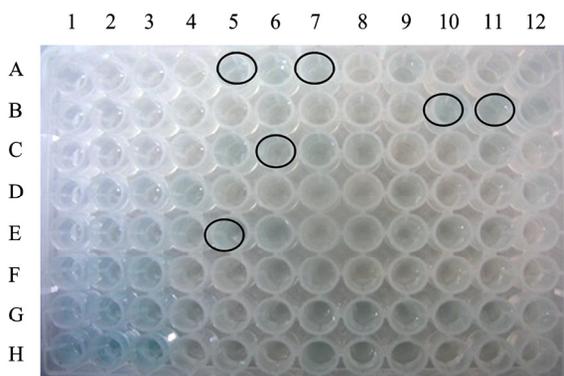


图 2 HRP-RBG 系统对 ADTZ 突变体的初筛结果
 Fig. 2 Results of HRP-RBG screening. The areas of A₁-H₁, A₂-H₂ and A₃-H₃ are standard curve, the areas of ellipse are positive clones.

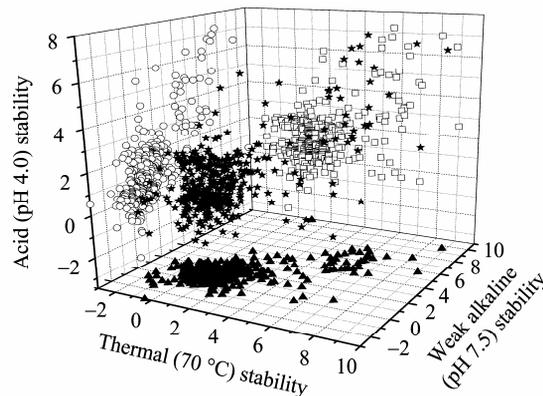


图 3 EP-PCR 突变库筛选结果
 Fig. 3 Results of EP-PCR screening mutants. X: thermal (70 °C) stability; Y: weak alkaline (pH 7.5) stability; Z: acid (pH 4.0) stability. ★: XYZ; ▲: XY; □: ZX; ○: YZ.

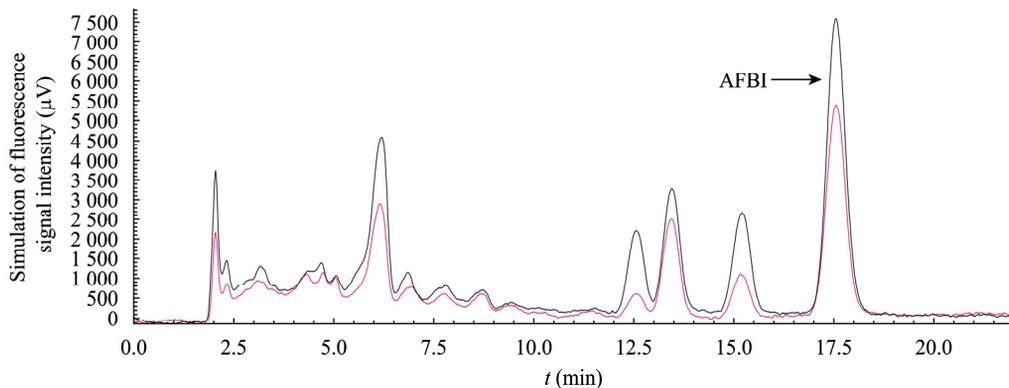


图 4 HPLC 检测 AFBI 的图谱
 Fig. 4 Map of AFBI detected by HPLC. The black line is the control group; The red line is the experimental group.

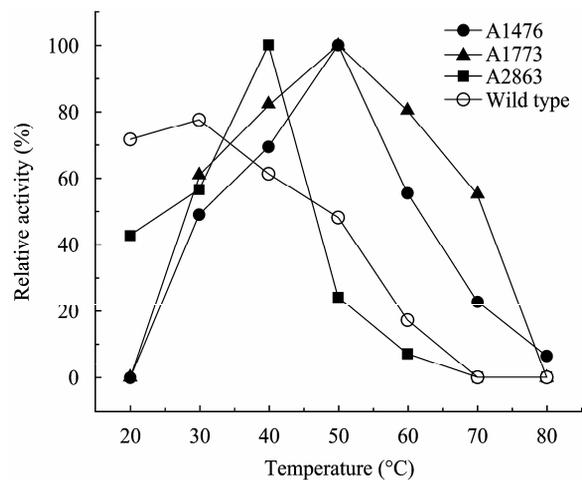


图 5 温度对突变酶的酶活力影响
 Fig. 5 Effect of temperature on the activity of evolved enzymes.

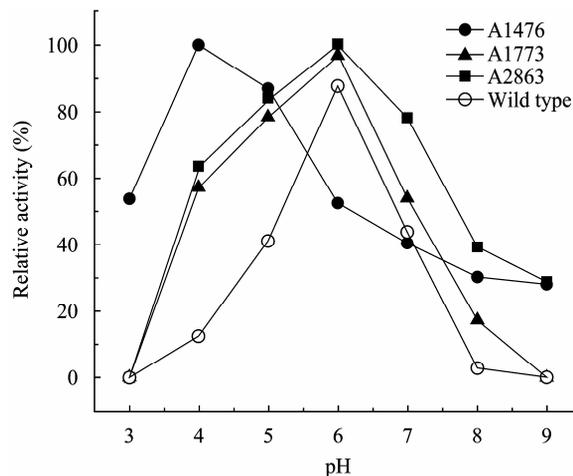


图 6 pH 对突变酶的酶活力影响
 Fig. 6 Effect of pH on the activity of evolved enzymes.

2.3.2 突变酶的热稳定性和pH稳定性

突变酶 A1773 在 50 °C~70 °C 有较好的稳定性, 突变酶 A1773 在 70 °C 温浴 30 min, 残留酶活力仍达到 90%, 而野生型酶在 40 °C 以上酶活力丧失超过了 50%。野生型的酶在 pH 6.0 和 30 °C 表现出最好的稳定性, 而在其他环境下, 酶活力下降得很快。A1476 和 A2863 在酸性环境有较好稳定性, 经 pH 4.0 处理 30 min, 残留酶活力仍达 80% 以上; A2863 经 pH 7.5 处理 30 min, 残留活力仍达 80%, pH 稳定性扩大到 pH 7.5 (图 7~8)。

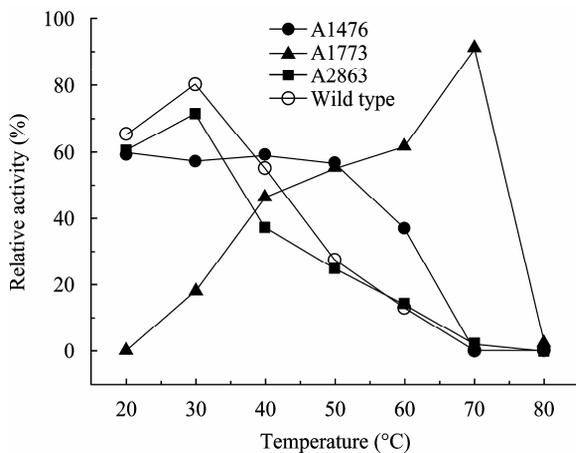


图 7 突变酶的温度稳定性

Fig. 7 Thermal stability of evolved enzymes.

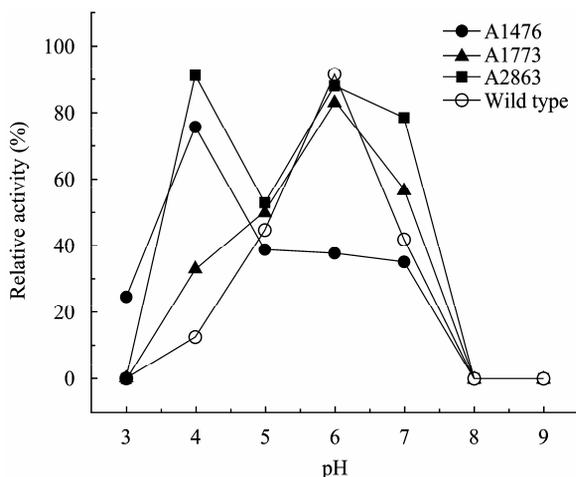


图 8 突变酶的 pH 稳定性

Fig. 8 pH stability of evolved enzymes.

2.4 突变酶的突变位点分析

经过测序结果, 分析突变位点发现: 2 个克隆均存在 Ile³⁰⁷Leu 的突变, 我们推测 307 位点与酸性稳定性有关; 推测第 127 位的 Lys 和第 613 位的 Arg 与热稳定有关, 推测第 73 位可能与碱性稳定性有关。

表 2 突变酶碱基和氨基酸变化

Table 2 Nucleotide substitution and amino acid change of mutants

Mutants	Mutated nucleotide bases	Mutated amino acids	Condition
A1773	C ¹⁵⁹ A	Ile ⁵³ Ile	70 °C
	G ³⁷⁹ A	Glu ¹²⁷ Lys	
	A ¹⁸³⁸ G	Gln ⁶¹³ Arg	
A1476	T ¹³⁶ C	Ser ⁴⁶ Pro	pH 4.0
	A ⁶⁶¹ C	Lys ²²¹ Gln	
	A ⁹¹⁹ C	Ile ³⁰⁷ Leu	
	A ¹⁴¹² T	Asn ⁴⁷¹ Ile	
A2863	A ²¹⁷ G	Gly ⁷³ Ser	pH 7.5 pH 4.0
	A ⁹¹⁹ C	Ile ³⁰⁷ Leu	
	T ¹⁷⁸⁷ C	Val ⁵⁹⁶ Ala	
	A ¹⁸³⁸ G	Gln ⁶¹³ Arg	

3 讨论

由于对黄曲霉毒素解毒酶的三维结构以及催化机制等信息了解得还不够充分, 对其进行理性设计存在很大难度, 因此不可能利用传统的蛋白质工程方法对黄曲霉毒素解毒酶进行改造。定向进化能够快速鉴定适应性突变, 以最小的序列变化产生大的表型差异, 从而使氨基酸序列差异与蛋白质功能差异之间的真正相互关系变得明朗, 相当大地简化了序列比较分析工作。在随机突变实验中, 要考虑的重要因素是突变频率。本研究设置不同浓度的 Mn²⁺ 进行易错 PCR, 同时控制 Mg²⁺ 的浓度, 得到不同突变频率的多样性文库, 一般为每个基因 1~5 个碱基, 对应的氨基酸突变数是 1~2 个, 控制合适的突变率为 0.5%~2% 之间。由于突变体的表达系统是分泌型酿酒酵母, 虽然解决了外源蛋白直接分泌到培养基中利于快速筛选, 但因酿酒酵母转化率低, 需要经过多次的基因操作来扩大库容。本实验从感受态的

制备和转化条件两方面优化, 摸索了 7 种条件, 最终确定醋酸锂法制备感受态和电转化结合的方案。AFB1 的检测不仅是一个耗时、高成本、而且是毒性危险性高的操作, 为了解决定向进化过程海量检测的问题, 根据前期研究的结果表明^[14]: 黄曲霉毒素解毒酶催化 AFB1 时会产生 H₂O₂, 本实验设计了以隐性亮绿 (RBG) 为检测系统易化筛选方法, 即: 以隐性亮绿 (RBG) 为底物, 在 pH 5.0~6.0 条件下经辣根过氧化物酶 (HRP) 催化 RBG 使其氧化为染料亮绿 (BG), 染料亮绿 (BG) 及酶催化反应产物的最大吸收峰均位于 630.6 nm 处, 可通过简单的测定 630 nm 处的吸光值变化来估算黄曲霉毒素解毒酶的活力。利用该系统大大地加快了筛选效率, 并收到了良好的效果。

本研究采取易错 PCR 对黄曲霉毒素解毒酶 *adtz* 基因进行定向进化, 建立了简单、快速的高通量筛选方法, 并且成功地获得了 pH 4.0 稳定和 pH 7.5 稳定性的突变酶 A1476、A2863, 其中 A2863 在 pH 4.0 稳定和 pH 7.5 均表现出较好的稳定性, 突变酶 A1773 在 70 °C 有较好的稳定性。从突变酶的序列分析可看出: A1476 和 A2863 均具有 pH 4.0 的稳定性的性质, 两个克隆均存在 Ile³⁰⁷Leu 的突变, 我们推测 307 位点与酸性稳定性有关。突变酶 A1773 存在 Glu¹²⁷Lys、Gln⁶¹³Arg 突变, 因此, 我们推测第 127 位的 Lys 和第 613 位的 Arg 与热稳定有关, A2863 出现 Gly⁷³Ser、Ile³⁰⁷Leu、Val⁵⁹⁶Ala 和 Gln⁶¹³Arg 的突变, 它存在 Gln⁶¹³Arg 位点的突变, 而没有出现热稳定的性质, 可能由于突变的位点比较多, 其他位点的突变导致丧失该性质。与其他突变体比较 A2863 出现 Gly⁷³Ser 位点的突变, 而具有 pH 7.5 的稳定性, 因此, 推测第 73 位可能与碱性稳定性有关。本实验为了便于筛选, 选择了酿酒酵母为宿主菌和采用附加型表达质粒, 目标蛋白的表达量偏低, 用培养基上清测定突变体酶活的比活仍较低, 在以后的研究中可通过将这些突变酶的基因转入毕赤酵母等高表达系统来提高目标蛋白的表达量。

致谢: 暨南大学再生医学教育部重点实验室蔡冬青老师实验室在本工作的完成过程中提供 Bio-Tek 多功能酶标仪给课题组使用, 使高通量筛选工作效率得到极大提高, 在此表示衷心地感谢。

REFERENCES

- [1] Cotty PJ, Bhatnagar D. Variability among atoxigenic flavus strains in ability to prevent aflatoxin contamination and production of aflatoxin biosynthetic pathway enzymes. *Appl Environ Microbiol*, 1994, 60(7): 2248–2251.
- [2] Kurtzman CP, Horn BW, Hesseltine CW. *Aspergillus nomius*, a new producing species related to *Aspergillus flavus* and *Aspergillus tamaris*. *Leeuwenhoek*, 1987, 53(3): 147–158.
- [3] Massey TE, Stewart RK, Daniels JM, et al. Biochemical and molecular aspects of mammalian susceptibility to aflatoxin B₁ carcinogenicity. *Proc Soc Exp Biol Med*, 1995, 208(3): 213–227.
- [4] Doyle MP, Marth E Peroxidase activity in mycelia of *Aspergillus parasiticus* that degrades aflatoxin. *Eur J Appl Microbiol Biotechnol*, 1979, 7(2): 211–217.
- [5] Gillam EM, Guo Z, Ueng YF, et al. Expression of P450-3A5 in *Escherichia coli*: effects of 5' modification, purification, spectral characterization, reconstitution conditions, and catalytic activities. *Arch Biochem Biophys*, 1995, 317(2): 374–384.
- [6] Das C, Mishra H N. Effect of aflatoxin B₁ detoxification on the physicochemical properties and quality of ground nut meal. *Food Chem*, 2000, 70(4): 483–487.
- [7] Das C, Mishra H N. In vitro degradation of aflatoxin B₁ by horse radish peroxidase. *Food Chem*, 2000, 68(3): 309–313.
- [8] Alberts JF, Gelderblom WCA, Botha A, et al. Degradation of aflatoxin B₁ by fungal laccase enzymes. *Int J Food Microbiol*, 2009, 135(1): 47–52.
- [9] Liu DL, Yao DS, Liang YQ, et al. Production, purification and characterization of an intracellular aflatoxin-detoxifzyme from *Armillariella tabescens* (E-20). *Food Chem Toxicol*, 2001, 39(5):461–466.
刘大岭, 姚冬生, 梁郁强, 等. 从 *Armillariella tabescens* 中分离纯化胞内黄曲霉毒素解毒酶. *食品与化学毒理学*, 2001, 39(5): 461–466.

- [10] Kong XD, Liu YM, Gou XJ, et al. Directed evolution of a-aspartyl dipeptidase from *Salmonella typhimurium*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2001, 289(1): 137-142.
- [11] Eijssink VG, Gseidnes S, Borchert TV, et al. Directed evolution of enzyme stability. *Biomol Eng*, 2005, 22(1/3): 21-30.
- [12] Arnold FH, Wintrode PL, Miyazaki K, et al. How enzymes adapt: lessons from directed evolution. *Trends Biochem Sci*, 2001, 26(2): 100-106.
- [13] Turner NJ. Directed evolution of enzymes for applied biocatalysis. *Trends Biotechnol*, 2003, 21(11): 474-478.
- [14] Chen JH, Liu DL, Li SC, et al. Development of an amperometric enzyme electrode biosensor for sterigmatocystin detection. *Enzyme Microb Tech*, 2010, 47(4):119-126.
- [15] Hu YD, Yao DS. Construction and determination of episomal secreting expression vector: pYES2/CT/ α -factor for *Saccharomyces cerevisiae*. *China Biotechnol*, 2009, 29(12): 49-53.
胡亚冬, 姚冬生. 一种酿酒酵母附加型分泌表达载体 pYES2/CT/ α -factor 的构建及鉴定. *生物工程杂志*, 2009, 29(12): 49-53.
- [16] Arnold FH, Georgiou G. Directed Evolution Library Creation: Methods and Protocols. *Methods in Molecular Biology*. Totowa: Humana Press Inc, 2003.
- [17] Gietz RD, Schiestl RH. Large-scale high-efficiency yeast transformation using the LiAc/SS carrier DNA/PEG method. *Nature*, 2007, 2(1):38-41.
- [18] Gietz RD, Schiestl RH. Quick and easy yeast transformation using the LiAc/SS carrier DNA/PEG method. *Nature*, 2007, 2(1): 35-37.
- [19] Huang YP, Li Y, Chen BL, et al. Studies on the oxidation of recessive brilliant green by H₂O₂ catalyzed by horseradish peroxidase, *J Analytic Sci*, 2003, 19(2): 133-135.
黄应平, 李洋, 陈百玲, 等. 辣根过氧化物酶催化过氧化氢氧化隐性亮绿显色反应的研究. *分析科学学报*, 2003, 19(2): 133-135.
- [20] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 1976, 72: 248-254.



《生物工程学报》创刊以来全部论文数据库上网

为提高期刊的显示度, 加强对历史文档的整理、保护和利用, 更好地为科研人员提供信息服务, 《生物工程学报》对 1985 年创刊以来的全部论文进行了数字化制作, 建成了回溯文档全文数据库。检索或浏览我刊已发表的论文请从我刊首页 (<http://journals.im.ac.cn/cjbcn>) “过刊检索”进入, 可以按照题目、关键词、年卷期、作者、单位等信息检索, 欢迎浏览下载。