

文章编号: 100025013(2010)010058207

# 采用易错 PCR 对粘质沙雷氏菌 几丁质酶 C 进行定向进化

刘治江, 贺淹才, 李红然, 刘 嘉, 施腾鑫

( 华侨大学 工业生物技术福建省高等学校重点实验室, 福建 泉州 362021 )

**摘要:** 以重组 *E. coli* BL21(DE3) pLysS / pET 22b Chi C 为亲本, 采用易错聚合酶链反应(PCR)技术, 对粘质沙雷氏菌几丁质酶 C 基因(Chi C)进行定向进化研究。经过两轮易错 PCR 后, 建立突变体文库, 进行平板初筛、包涵体复性及酶活检测复筛, 获得一酶活较高的突变酶(Mu2Chi C), 其催化活性为亲本重组酶的 1.9 倍, 比活力为出发菌酶活的 3.3 倍。对突变酶的酶学性质进行初步研究, 其最适 pH 值为 5.0, 最适温度为 60 °C, 而出发菌酶的最适温度为 40 °C。进化酶基因经 DNA 测序并通过软件与亲本型酶基因进行分析比对, 表明突变酶 Mu2Chi C 基因发生点突变, 使 4 处氨基酸被取代, 且均为有义突变。

**关键词:** 粘质沙雷氏菌; 几丁质酶 C; 分子定向进化; 易错聚合酶链反应; 包涵体

**中图分类号:** Q 786; Q 550.3

**文献标识码:** A

到目前为止, 人们已经分离和克隆了大量的微生物几丁质酶及其基因。从天然菌株获得的酶常具有活性较低、底物专一性低等缺点, 使其在实际应用中受到一定的制约<sup>[1]</sup>。近年来, 以连续易错聚合酶链反应(Error-Prone Polymerase Chain Reaction, 简称 ER-PCR)和 DNA 改组为基础的体外分子定向进化策略, 为蛋白质工程的发展, 特别是对酶分子的定向改造提供了一个颇具前景的新方法<sup>[24]</sup>。研究者已运用该法进化了各种各样的酶特征, 找到并发现许多合理设计所不能预测到的突变<sup>[26]</sup>。大肠杆菌表达系统是目前最常用的外源蛋白表达系统, 其重组蛋白的表达量可达细胞蛋白的 50%, 但重组蛋白的高表达往往导致形成不溶的、没有生物活性的包涵体<sup>[28]</sup>。本文对粘质沙雷氏菌几丁质酶 C 基因采用易错 PCR 进行定向进化研究, 并对其表达产物进行可溶性分析。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

(1) 带有粘质沙雷氏菌(*Serratia marcescens* ATCC 14041)几丁质酶基因 Chi C 的重组菌 *E. coli* BL21 pET22b(+)-2Chi C, 受体菌 *E. coli* BL21, 载体 pET22b(+), 分别由华侨大学工业生物技术福建省高等学校重点实验室构建并保藏。

(2) LB(Luria Bertani)培养基参照文[829]配制, 使用前加入氨苄青霉素(Amp), 使 Amp 终浓度为 100 mg # L<sup>-1</sup>, 固体培养基添加 1.5% 琼脂。Taq DNA polymerase, dNTP, Hind III, Xho I 限制酶, T4 DNA 连接酶, 均为辽宁大连宝生物公司产品。PCR 引物由北京奥科公司合成, DNA 测序由上海生物工程公司完成。DNA 胶回收试剂盒购自上海生工生物工程有限公司, 其他试剂均为国产分析纯试剂。

### 1.2 方法

1.2.1 易错 PCR 扩增 Chi C 基因片段 在引物 P1: 5'-GCC GAA GCT TGC CAC CAT GAG CAC AAA TAA CA23. (划线部分是 Hind III 的酶切位点) 和引物 P2: 5'-CCG CTC GAG GAT GAG CTG

收稿日期: 20080625

通信作者: 贺淹才(1949), 男, 教授, 主要从事物化学与分子生物学的研究。E-mail: yche@hqu.edu.cn.

基金项目: 福建省自然科学基金资助项目(C04010011)

CCA CAG GGT GAA G23. (划线部分是 Xho  $\bar{N}$  的酶切位点) 引导下进行易错 PCR 扩增. 易错 PCR 反应体系(20 LL): 10 @Taq DNA 聚合酶缓冲液 2 LL, 0.2 mmol# L<sup>-1</sup> dATP 和 dGTP, 1 mmol# L<sup>-1</sup> dCTP 和 dTTP, 3~ 7 mmol# L<sup>-1</sup> Mg<sup>2+</sup>, 0.3~ 0.6 mmol# L<sup>-1</sup> Mn<sup>2+</sup>, 上、下游引物各 0.5 LL, 质粒 DNA 模板 1 LL, Taq DNA 聚合酶 16.67 nkat. 其中, 调整 Mg<sup>2+</sup> 和 Mn<sup>2+</sup> 的浓度, 可以得到不同突变频率的文库. 易错 PCR 反应参数: 94 e, 30 s; 55 e, 30 s; 72 e, 60 s; 重复 30 个循环后, 于 72 e 下继续延伸 10 min, 用 1% 的琼脂糖凝胶电泳鉴定 PCR 产物.

1.2.2 PCR 产物的回收纯化 经 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测后, 利用胶回收试剂盒回收 PCR 产物, 并于 -20 e 保存.

1.2.3 突变库的构建 纯化后的 Chi C 基因于 37 e 下用 Hind  $\bar{O}$  和 Xho  $\bar{N}$  酶解 3 h, 用 DNA 回收试剂盒回收 1 500 bp 的 DNA 片段; pET222b(+) 质粒同样在 37 e 下用 Hind  $\bar{O}$  和 Xho  $\bar{N}$  酶解 3 h, 用 DNA 回收试剂盒回收. 回收的目的片段和载体 pET222b(+) 质粒连接, 构建突变重组质粒 pET222b2 Chi C.

1.2.4 突变重组质粒转化和鉴定 将突变重组质粒库转化至宿主 E. coli BL21(DE3)pLysS 中, E. coli BL21(DE3)pLysS 感受态细胞制作及转化参照文[10]的方法. 转化的受体菌涂布到含氨苄青霉素平板上, 于 30 e 培养 24 h, 随机挑取 LB 固体培养基平板上生长的白色单菌落置于含 100 mg# L<sup>-1</sup> 氨苄青霉素的 LB 液体培养基中培养, 收集菌体进行复筛鉴定. 按文[11]的方法抽提重组质粒, 以抽提的重组质粒为模板, 在引物 P1, P2 的引发下进行 PCR 扩增. PCR 反应参数: 94 e, 5 min; 94 e, 50 s; 55 e, 1 min; 72 e, 2 min; 30 个循环后, 于 72 e 延伸 10 min, 用 1% 糖琼脂凝胶电泳鉴定 PCR 产物.

### 1.3 诱导表达及包涵体的透析复性

挑取阳性克隆单菌落, 接种于 5 mL 含有 100 mg# L<sup>-1</sup> 氨苄青霉素的 LB 液体培养基中, 于 220 r# min<sup>-1</sup>, 30 e 下振荡过夜. 取 1 mL 培养物, 转接于 50 mL 含有 100 mg# L<sup>-1</sup> 氨苄青霉素的 LB 液体培养基, 于 220 r# min<sup>-1</sup>, 30 e 下振荡至菌体浓度的光密度值 D(600) 约为 0.8 左右; 向培养物中加入异丙基 2BD2 硫代半乳糖苷(IPTG)至终浓度为 20 mol# L<sup>-1</sup>, 诱导培养 4 h. 然后, 于 4 e, 5 000 r# min<sup>-1</sup> 下离心收集菌体. 用 4~ 5 倍体积的 20 mmol# L<sup>-1</sup> 磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤菌体, 于 4 e, 8 000 r# min<sup>-1</sup> 下离心, 重复一次. 沉淀加入 3 mL PBS(预冷), 充分混匀, 悬浮沉淀, 加入溶菌酶至终质量浓度为 1 g# L<sup>-1</sup> 室温下静置 20 min, 超声破碎, 于 4 e, 5 000 r# min<sup>-1</sup> 下离心并收集包涵体<sup>[12]</sup>. 将沉淀重悬于 9 倍体积(含 0.5% Triton2100, 1 mmol# L<sup>-1</sup> EDTA, 20 mmol# L<sup>-1</sup> Tris2HCl, pH= 7.5)的工作缓冲液中, 室温保育 5 min, 并于 4 e, 10 000 r# min<sup>-1</sup> 下离心.

每克包涵体湿质量加入 20 mL 包涵体溶解液(含 20 mmol# L<sup>-1</sup> Tris2HCl, 8 mol# L<sup>-1</sup> 尿素, pH= 7.5), 悬涡震荡, 使包涵体充分溶解; 于 12 000 r# min<sup>-1</sup> 下离心 5 min, 取上清备用. 所得上清加至截流相对分子质量为 8 000~ 10 000 的透析袋中, 分别用复性中间液  $\bar{N}$  (6 mol# L<sup>-1</sup> 尿素, 50 mmol# L<sup>-1</sup> 三(羟甲基) 甲基甘氨酸(Tricine), 1 mmol# L<sup>-1</sup> 二硫苏糖醇(DTT), pH= 7.5)、复性中间液  $\bar{O}$  (4 mol# L<sup>-1</sup> 尿素, 50 mmol# L<sup>-1</sup> Tricine, 1 mmol# L<sup>-1</sup> DTT, pH= 7.5) 和复性中间液  $\bar{O}$  (2 mol# L<sup>-1</sup> 尿素, 50 mmol# L<sup>-1</sup> Tricine, 1 mmol# L<sup>-1</sup> DTT, pH= 7.5) 于 4 e 各透析 2 h. 然后, 用复性液(50 mmol# L<sup>-1</sup> 4-羟乙基哌嗪乙磺酸(Hepes), 0.2 mol# L<sup>-1</sup> NaCl, 10 mmol# L<sup>-1</sup> CaCl<sub>2</sub>, 20 Lmol# L<sup>-1</sup> ZnSO<sub>4</sub>, 0.05% Brij235, pH= 7.5), 于 4 e 下透析 16 h. 取出透析袋内溶液, 经聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS2PAGE)检测<sup>[12][14]</sup>. 所有含尿素的溶液均现用现配, 操作在室温下进行.

### 1.4 几丁质酶活力及蛋白含量的测定

在 2 mL 的 Eppendorf 管中加入 0.25 mL 待测液, 0.25 mL 胶体几丁质, 0.5 mL 缓冲液, 37 e 反应 1 h. 煮沸 10 min, 将管置于冷水冷却, 加入 0.75 mL 3, 5, 2-二硝基水杨酸(DNS), 煮沸 10 min; 冷却后, 于室温, 4 000 r# min<sup>-1</sup> 下离心 10 min, 取上清于分光光度计中测定 540 nm 下吸光度值(D). 以已知浓度的 N2 乙酰氨基葡萄糖(NAG)做标准对照<sup>[15]</sup>, 测定酶活力. 酶活力单位(kat)定义为: 在上述条件下, 每小时产生相当于 1 Lmol N2 乙酰氨基葡萄糖的还原糖量所需的酶量. 蛋白含量按 Bradford 法测定<sup>[16]</sup>.

### 1.5 最适 pH 值和温度的测定

分别在 pH= 3~ 8 条件下进行催化反应, 测定不同 pH 值条件下的酶活力. 在最适 pH 条件下, 分别

在不同温度条件下进行催化反应, 测定不同温度条件下的酶活力.

1.6 突变基因序列测定

在筛选到的阳性克隆中, 挑选酶活力高的突变体, 提取质粒送上海生工生物公司进行测序.

1.7 野生型酶与进化酶基因序列分析对比

利用软件 DNAMAN 对测序结果进行分析, 并根据基因序列推测氨基酸序列; 然后, 经 Clustal X 软件对野生型酶蛋白质序列与进化酶蛋白质序列进行对比.

2 结果与分析

2.1 易错 PCR 条件的确定

调整易错 PCR 反应体系中  $Mg^{2+}$  和  $Mn^{2+}$  的浓度, 可以得到不同突变频率的片段多样性文库. 实验初始, 选择  $Mg^{2+}$  浓度为  $4.0 \sim 7.0 \text{ mmol} \# \text{ L}^{-1}$ ,  $Mn^{2+}$  浓度为  $0.2 \sim 0.6 \text{ mmol} \# \text{ L}^{-1}$  进行易错 PCR, 检测目的条带的扩增特异性, 如图 1 所示. 图 1 中: Mr 为相对分子质量标记( Wide Range DNA Marker ); 图 1(a) 中的 1~ 4 泳道,  $Mg^{2+}$  的浓度分别为  $4.0, 5.0, 6.0, 7.0 \text{ mmol} \# \text{ L}^{-1}$ ; 图 1(b) 中的 1~ 5 泳道,  $Mn^{2+}$  的浓度分别为  $0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6 \text{ mmol} \# \text{ L}^{-1}$  根据目的条带的扩增特异性, 最终将 PCR 条件确立  $Mn^{2+}$  浓度为  $0.5 \text{ mmol} \# \text{ L}^{-1}$ ,  $Mg^{2+}$  浓度为  $7.0 \text{ mmol} \# \text{ L}^{-1}$ .

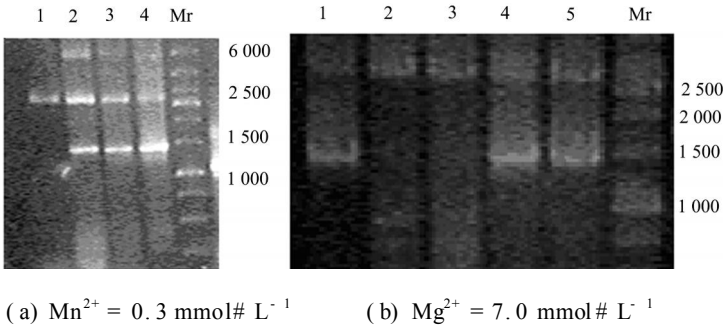


图 1 琼脂糖凝胶分析

Fig. 1 Analysis by agarose gel electrophoresis

2.2 易错 PCR 突变文库的构建及平板初筛

在优化易错 PCR 条件下, 以第 1 次易错 PCR 的产物作为模板进行第 2 轮易错 PCR 反应1 产物经 Hind Ⅲ 和 Xho Ⅰ 双酶切后, 和载体 pET222b(+ ) 质粒连接, 转化 E. coli BL21 构建突变文库. 在含氨苄青霉素的初筛平板上得到约 1 000 个阳性克隆1 随机对 20 个阳性克隆进行复筛鉴定, 其中 5 个作为潜在地高活力突变株选出. 对这 5 株菌进行包涵体复性和酶活检测, 最终得到一株活力最高的突变株.

2.3 突变体 PCR 鉴定结果

随机挑取单菌落突变株在液体培养基中进行培养, 然后抽提重组质粒, 以重组质粒为模板, 进行 PCR 扩增, 鉴定重组质粒的构建情况, 如图 2 所示. 由图 2 可以看出, 利用 PCR 方法, 以从突变体中抽提的重组质粒 pET 22b2Chi C 为模板, 扩增到了预期的 1.44 kb 左右的条带; 而利用空载体质粒 pET 22b 为模板, 在相同条件下进行扩增不能获得任何产物. 这表明, 重组质粒构建成功并已转入宿主细胞 E. coli BL21(DE3)pLysS 中.

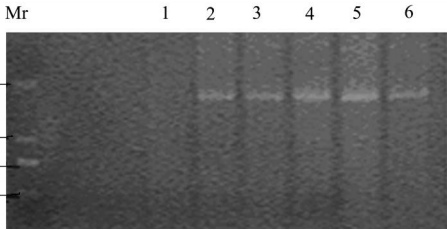


图 2 突变体的 PCR 验证

Fig. 2 Identification of positive mutant by PCR method

2.4 表达产物包涵体的洗涤鉴定

因为包涵体中包含重组蛋白之外其他杂和成分, 故在溶解包涵体前需用中等浓度的变性剂洗涤以去除脂类、脂多糖、核酸和杂蛋白等杂物. 常用的洗涤剂有尿素、Triton X2100 和 EDTA 等. 洗涤后的包涵体中主要成分为聚合态重组蛋白.

采用  $20 \text{ mmol} \# \text{ L}^{-1}$  PBS 及  $20 \text{ mmol} \# \text{ L}^{-1}$  Tris2HCl,  $0.5\%$  TritonX2100,  $1 \text{ mmol} \# \text{ L}^{-1}$  EDTA,  $\text{pH} = 7.5$  的洗涤液, 对 Chi C 包涵体进行洗涤, 结果如图 3 所示. 由图 3 可以看出, 野生菌与进化菌均在约 52 ku 处有目的蛋白 Chi C 的表达条带, 并且进化菌蛋白的表达大量明显高于野生菌.

2.5 包涵体的溶解及透析复性

在体外复性过程中, 变性的蛋白质要经过一系列的折叠中间体, 最后形成蛋白的天然构象. 在蛋白折叠过程中, 部分折叠的中间体的疏水簇外露, 分子间的疏水相互作用引起蛋白聚集. 由于聚集是分子

间的现象, 聚集反应是二级(或高级)反应, 而正确折叠却是一级反应, 所以, 聚集反应更依赖于高蛋白浓度. 减少聚集最直接的方法就是降低蛋白浓度.

将待复性样品用稀释液稀释到  $100\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ . 分别对复性中间液  $\tilde{N}$ ,  $\tilde{O}$ ,  $\tilde{O}$  透析 2 h, 逐渐降低变性剂尿素的浓度, 最后在不含尿素的复性液中透析 16 h, 复性的蛋白溶液始终无可见沉淀. 1 将透析复性后的样品进行 SDS-PAGE 检测和酶活力测定, 所有样品均成功测到几丁质酶活性. 1 这说明, 所有包涵体均成功复性, 而其中活性最高菌株的酶活力达  $40.51\text{ Lkat}\cdot\text{L}^{-1}$ . 选取该菌株为实验样本进行酶活力性质研究.

2.6 最适 pH 值和温度及酶活力对比

为了检测溶液 pH 值对酶活力的影响, 测定不同 pH 值条件下酶活力变化情况, 结果如图 4(a) 所示. 从图 4(a) 可知, 在 pH 值为 3~8 的条件下, 野生型酶 (E. coli BL21(DE3) pLysS/pET22b2Chi C) 与进化酶 (Mut2Chi C) 都具有降解几丁质的能力, 野生型酶与进化酶的最适 pH 值均为 5.0. 但在 pH 值为 4~8 的范围内, 进化酶的活性比野生型均有提高. 1 说明, 经过两轮易错改造后, Chi C 的催化活性发生了改变.

在 pH=5.0 的测活体系中, 改变酶反应温度, 测定不同温度下的酶活力, 结果如图 4(b) 所示. 从图 4(b) 可知, 野生型酶的最适反应温度为 40 °C, 而进化酶的最适反应温度为 60 °C. 说明, 经过改造后酶的最适反应温度发生了改变.

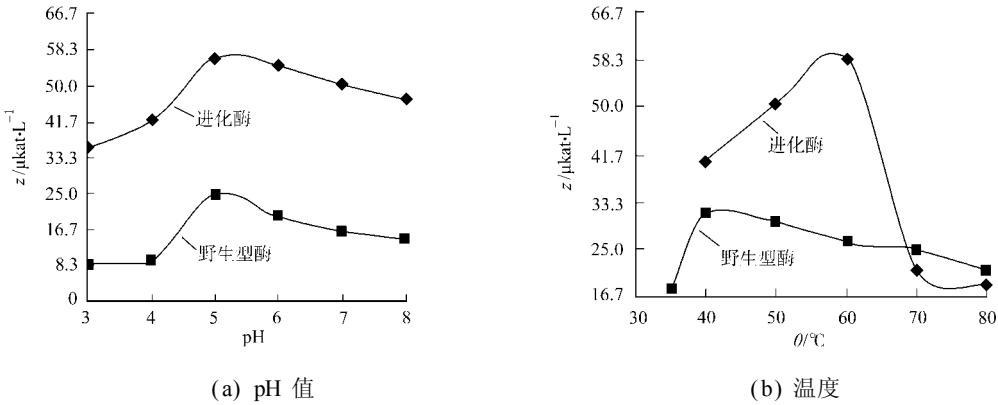


图 4 野生型酶和进化酶的酶活力对比  
Fig. 4 Determination of activity of wild type and evolved enzymy at different pH

分别在最适 pH 值和最适温度条件下测定野生型与进化酶酶活力, 结果如表 1 所示. 1 由表 1 可见, Chi C 酶经过两轮易错改造后, 酶活力 (z) 比野生型酶提高了约 1.9 倍, 比活力 (R) 提高了约 3.3 倍.

表 1 野生型酶与进化酶酶活力与比活力

Tab. 1 Determination of activities and specific activities of wild type and evolved enzyme

株系/ 质粒	z / $\text{Lkat}\cdot\text{L}^{-1}$	R / $\text{Lkat}\cdot\text{g}^{-1}$
E. coli BL21(DE3) pLysS	0	0
E. coli BL21(DE3) pLysS /pET22b2Chi C	0	0
E. coli BL21(DE3) pLysS/ pET22b2Chi C2IPTG	31. 51	20. 17
Mut2Chi C	58. 18	66. 18

2.8 进化酶与野生型酶序列比较结果

突变后的基因测序委托上海生工生物公司完成. 利用软件对野生型与突变体酶基因序列进行比对分析, 突变体基因碱基及氨基酸变化情况, 如表 2 所示. 结果表明, 利用易错 PCR 方法, 成功地向 Chi C 基因引入了突变, 在其 1 443 个碱基中共有 4 个碱基发生了突变, 突变率为 0. 28%. 根据基因序列推测氨基酸序列并经 ClustalX 软件比对后, 发现进化酶的酶蛋白上有 4 个位点的氨基酸残基发生了取代.

进化菌与原始菌 Chi C 基因序列的比对结果, 如图 5 所示. 1 图 5 中的 4 处碱基突变用下划线标出.

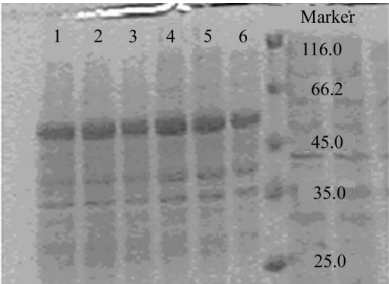


图 3 包涵体的洗涤鉴定  
Fig. 3 The identification of the inclusion bodies

表 2 碱基及氨基酸的变化

Tab2. Base and amino acid substitution in Mu2Chi C mutants

碱基位置	碱基变化	氨基酸变化	碱基位置	碱基变化	氨基酸变化
433	A y G	Iy V	484	Gy A	Ey K
488	Ay C	Ey D	1 126	Gy A	Gy S

进化 原始	-----T T T T A C A A A G G C C G T C G C C G C C G A I G A C G C G G C C A I T A I G C C A I C T A T G A G C A C A A A A T A C A I T A T T A A I G C C G T C G C C G C C G A I G A C G C G G C C A I T A I G C C A I C T *****
进化 原始	A T C G C C A A T A A A A A G A T C C T G A T G G G T T T C T G G C A C A A C T G G G C C G C C G G C C C A G T G A C A T C G C C A A T A A A A A G A T C C T G A T G G G T T T C T G G C A C A A C T G G G C C G C C G G C C C A G T G A C *****
进化 原始	G G T T A T C A A C A A G G C C A G T T C G C C A A T A T G A A T C T G A C C G A C A T T C C C G C C G A G T A C A A C G G T T A T C A A C A A G G C C A G T T C G C C A A T A T G A A T C T G A C C G A C A T T C C C G C C G A G T A C A A C *****
进化 原始	G T A G T G G C C G T C G C C T T T A T G A A A G G C C A G G G C A T C C C G A C C T T C A A A C C T T A C A A C C T G T A G T G G C C G T C G C C T T T A T G A A A G G C C A G G G C A T C C C G A C C T T C A A A C C T T A C A A C C T G *****
进化 原始	T C C G A C G C C G A G T T T C G C C G C C A G G T A G G C G T G C T G A A C A G C C A G G G C C C G C G G T G C T G T C C G A C G C C G A G T T T C G C C G C C A G G T A G G C G T G C T G A A C A G C C A G G G C C C G C G G T G C T G *****
进化 原始	A T C T C C C T C G G C G G C G A G A C G C G C A T A T C G A G C T G A A G A C C G G C G A C A A G A C A A G C T G A T C T C C C T C G G C G G C G A G A C G C G C A T A T C G A G C T G A A G A C C G G C G A C A A G A C A A G C T G *****
进化 原始	A A A G A C G A G A T A T T C G C C T G G T G G A A G T C A T G G C T T C G A C G G C C T G G A T A T C G A T C T G A A A G A C G A G A T A T T C G C C T G G T G G A A G T C A T G G C T T C G A C G G C C T G G A T A T C G A T C T G *****
进化 原始	G A A C A G G C G G C G T C G G C G C C G C C A A T A A A A C C G T C T T G C C T G C G G C A T T G A A A A A A G A A C A G G C G G C G T C G G C G C C G C C A A T A A A A A C C G T C T T G C C T G C G G C A T T G A A A A A A *****
进化 原始	G T A A A A G A C C A T T A C G C C G C G A G G G G A A A A A C T T A T T A T C A G A T T G C G C C G G A A T T C T A G A A G A A C A I T A C G C C G C G A G G G G A A A A A C T T A I T A I A C A G A T T G C G C C G G A A I T C *****
进化 原始	C C G T A T T T G C G C A C C A C G G C A C C T A T C T G G A T T A T A C A A C G C C C T T G A A G G C T A T T A C C C G T A T T T G C G C A C C A C G G C A C C T A T C T G G A T T A T A I A C A A C G C C C T T G A A G G C T A T T A C *****
进化 原始	G A C T T T A T T G C G C C G C A A T A T T A C A A C C A G G G C G G C A C G G T A T T T G G G T G G A T G A A C T C G A C T T A T T G C G C C G C A A T A T T A C A A C C A G G G C G G C A C G G T A T T T G G G T G G A T G A A C T C *****
进化 原始	A A C G C C T G G A T C A C G C A G A A T A A C G A C G C C A T G A A A G A G G A C T T C C T C T A C T A T C T G A C G A A C G C C T G G A T C A C G C A G A A T A A C G A C G C C A T G A A A G A G G A C T T C C T C T A C T A T C T G A C G *****
进化 原始	G A A A G C C T G G T A C C G G C A C C C A C G G C T A T G C G A A A A T C C C G G C G G C G A A A T T C G T C A T C G A A A G C C T G G T A C C G G C A C C C A C G G C T A T G C G A A A A T C C C G G C G G C G A A A T T C G T C A T C *****
进化 原始	G G C C T G C C G A G C A A C A C G A T G C C G C C G C A C C G G C T A C G T G A T C G A C A A A C A G G C G G T G G G C C T G C C G A G C A A C A C G A T G C C G C C G C A C C G G C T A C G T G A T C G A C A A A C A G G C G G T G *****
进化 原始	T A T A A C G C C T T C G C G C G T C T T G A C G C C A A A A A C C T G T C G A T C A A G G G C C T G A T G A C C T G G T A T A A C G C C T T C G C G C G T C T T G A C G C C A A A A A C C T G T C G A T C A A G G G C C T G A T G A C C T G G *****
进化 原始	T C G A T C A A C T G G G A C A A C G G C A A G A G C A A A G C C G G C G T G G C C T A C A A C T G G G A A T T C A A A T C G A T C A A C T G G G A C A A C G G C A A G A G C A A A G C C G G C G T G G C C T A C A A C T G G G A A T T C A A A *****
进化 原始	A C C C G C T A T G C G C C G T G A T T C A G G G C G G C G T A C C C C G C C G C C G G A A A G C C T A A T G C G A C C C G C T A T G C G C C G T G A T T C A G G G C G G C G T A C C C C G C C G C C G G A A A G C C T A A T G C G *****
进化 原始	C C G A C G G C G C T G A C G G T C G C C G A G C T G G G C G C C A C C T C G C T G A A A C T G A G C T G G G C C G C C C C G A C G G C G C T G A C G G T C G C C G A G C T G G G C G C C A C C T C G C T G A A A C T G A G C T G G G C C G C C *****
进化 原始	G C C A C G G C G C G T T A C C G A T C G C C A G C T A C A C C G T C T A C C G C A A C A G C A A C C C G A T C G G C G C C A C G G C G C G T T A C C G A T C G C C A G C T A C A C C G T C T A C C G C A A C A G C A A C C C G A T C G G C *****
进化 原始	C A G A C C G C C G G C T G T C G C T G A C C G A C A G C G G C T G A C C C C G G C C A C C C A G T A C A G C T A C C A G A C C G C C G G C T G T C G C T G A C C G A C A G C G G C T G A C C C C G G C C A C C C A G T A C A G C T A C *****
进化 原始	T T C G T T A C C G C A A C C G A C G C C A G G G C A A T A C C T C G C T G C C G A G C A G C G C G T G G C G G T C T T C G T T A C C G C A A C C G A C G C C A G G G C A A T A C C T C G C T G C C G A G C A G C G C G T G G C G G T C *****
进化 原始	A A A A C C G C C A A C G A C G G C A C G C C C C G A T C C G G G T G C G C C C G A G T G G C A G A A C A A C C A C A A A A C C G C C A A C G A C G G C A C G C C C C G A T C C G G G T G C G C C C G A G T G G C A G A A C A A C C A C *****
进化 原始	A G C T A C A A A G C C G G C A C G T G G T G A G C T A T A A A G G C A A G A A A T A C A C C T G T A T C C A G G C G A G C T A C A A A G C C G G C A C G T G G T G A G C T A T A A A G G C A A G A A A T A C A C C T G T A T C C A G G C G *****
进化 原始	C A C A C T T C C A A C G C C G G C T G - A C G C C G G A C G C C C C G G T----- C A C A C T T C C A A C G C C G G C T G G A C G C C G G A C G C C C C T T C A C C C T G T G G C A G C T A I T C G C C *****
进化 原始	----- T A A

图 5 进化菌与原始菌 Ch2C 基因序列的具体对比结果

Fig. 5 Comparison of the gene sequence between the wild type and the evolved bacteria

### 3 讨论

易错PCR是诸多体外定向进化方法中一种简便、易行的手段,其核心是在PCR系统中引入不同浓度的 $Mn^{2+}$ ,导致目的基因密码子的参入频率改变或相应的氨基酸残基变异<sup>[1]</sup>。其关键在于控制DNA的突变率<sup>[1]</sup>。一般情况下,有益突变率很低,而且绝大多数突变是有害的<sup>[10]</sup>。当突变频率太高时,几乎无法筛选到有益突变;但突变率也不能太低,否则未发生突变的野生型将占据突变群体的优势,也很难筛选到理想的突变体。

对于每一个DNA序列来说,合理的碱基突变数为1~3个<sup>[17]</sup>。但是,经过一次突变的基因很难获得满意的结果,由此发展出连续易错PCR策略。连续易错PCR可以使小的有益突变积累而产生较大的提高,且已有不少成功的例子<sup>[3]</sup>。选择 $Mn^{2+}$ 浓度为 $0.5\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ , $Mg^{2+}$ 浓度为 $7.0\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的条件,经二轮易错PCR,从重组菌落中筛选到一株酶活力较高的菌株,使其4个碱基发生了突变,突变率达到0.28%。

突变文库构建好后,是否有一个高效、灵敏的筛选方法,将是定向进化实验成功与否的关键所在。由于重组蛋白形成了包涵体,所以无法通过平板水解圈法进行高效筛选,只能用传统的平板初筛、包涵体复性及酶活测定进行复筛。为了对付酶分子定向进化过程出现重组蛋白形成包涵体的情况,就是要寻找并构建一种简单、直观、有效的筛选方法。包涵体的形成对于重组蛋白的生产提供了以下3个优势<sup>[18]</sup>:

(1) 蛋白以活性状态形成时,可能由于蛋白水解作用而在*E. coli*细胞质中不稳定,并且有可能对宿主细胞产生毒性;

(2) 在适宜条件下,包涵体形式的重组蛋白可占细胞总蛋白的50%或更多;

(3) 由于包涵体具有相对较高的密度,可以通过离心从细胞蛋白中分离出来<sup>[1]</sup>。

在合适条件下,纯化后的重组蛋白纯度可达90%。所以,以包涵体形式产生蛋白也是一个相对经济的下游操作过程。

包涵体的形成是由于重组蛋白在大肠杆菌中的高水平表达而导致不溶的,无活性聚集体,其体外复性被认为是一项异常艰巨的任务<sup>[13]</sup>。由于目的是为了筛选高酶活的重组蛋白,因此只对形成的包涵体进行简单的透析复性研究。为了使筛选得到的重组包涵体蛋白更好的复性,需要对不同的复性方法和条件进行研究。

酶制剂的生产和应用是高温和高湿的过程,绝大多数的生物酶热稳定性差,在高温下容易失活。对酶制剂的生产和应用,一般需要在较高温度下仍保持较高的催化活性<sup>[19]</sup>。对粘质沙雷氏菌几丁质酶C基因(Chi C)经二轮易错PCR后建立突变体文库,获得一酶活较高的突变酶(Mut2Chi C),其催化活性为亲本重组酶的1.9倍,比活力为出发菌酶活的3.3倍。该突变酶的最适温度为60℃,而出发菌该酶最适温度为40℃。这种较高最适反应温度的几丁质酶,可以使该酶在生产和应用中具有很好的应用价值,今后将对这一特性开发利用进行进一步研究。

### 参考文献:

- [1] 蒋红彬,蒋千里,张 赢,等.几丁质酶的研究概况[J].山东科学,2000,13(4):41245.
- [2] ARNOLD F H. Directed evolution: Creating biocatalysts for the future[J]. Chem Eng Sci, 1996, 51(23): 50925102.
- [3] 徐卉芳,张先恩,张用梅,等.体外分子定向进化研究进展[J].生物化学与生物物理进展,2002,29(4):5182522.
- [4] STEMMER W P C. Rapid evolution of a protein in vitro by DNA shuffling[J]. Nature, 1994, 370(4): 382391.
- [5] OUE S, OKAMOTO A, YANO T, et al. Redesigning the substrate specificity of an enzyme by cumulative effects of the mutations of non2active site residues[J]. J Biol Chem, 1999, 274(4): 23422349.
- [6] MIYAZAKI K, WINTRODE P L, GRAYLING R A, et al. Directed evolution study of temperature adaption in a psychrophilic enzyme[J]. Mol Biol, 2000, 297(4): 101521026.
- [7] BANEYX F. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*[J]. Current Opinion in Biotechnology, 1999, 10(5): 442421.
- [8] MISAWA S, KUMAGAI I. Refolding of therapeutic proteins produced in *Escherichia coli* as inclusion bodies[J]. Biopolymers, 1999, 51(4): 292307.

- [9] 贺淹才, 刘爱花, 张荣奎, 等. 嗜麦芽窄食单胞菌产生的几丁质酶的特性[J]. 华侨大学学报: 自然科学版, 2008, 29(2): 242-249.
- [10] LEUNG D W, CHEN E, GOEDDEL D V. A Method for random mutagenesis of a defined DNA segment using a modified polymerase chain reaction[J]. Technique, 1989, 1: 112-115.
- [11] SAMBROOK J, FRITSCH E F, MANIATIS T. Molecular cloning: A laboratory manual[J]. 3rd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.
- [12] 龚平生, 罗贵民. 包涵体复性研究进展[J]. 中国生物工程杂志, 2003, 12(23): 732-77.
- [13] 朱希强, 袁勤生. 重组人 EC2SOD 包涵体的复性[J]. 食品与药品, 2005, 7(6): 282-30.
- [14] CLARK E D B. Refolding of recombinant proteins[J]. Curr Opin Biotechnol, 1998, 9(2): 152-163.
- [15] MONEAL J, REESE E T. The chitinase of *Serratia marcescens*[J]. Microbiol, 1969, 15(7): 689-696.
- [16] AUSUBEL F M, BRENT R, KINGSTON R E. Short protocols in molecular biology[M]. 3rd ed. New York: John Wiley & Sons Inc, 1995.
- [17] ZHAO H, MOORE J C, VOLKOV A A, et al. Methods for optimizing industrial enzymes by directed evolution[M]. Washington D C: ASM Press, 1998: 592-604.
- [18] FISCHER B, SUMNER I, GOODENOUGH P. Isolation and renaturation of bioactive proteins expressed in *Escherichia coli* as inclusion bodies[J]. Arheimmittelforschung, 1992, 42: 1512-1515.
- [19] ZHU Guoping, TENG Maikun, WU Chuanjin, et al. Mutation of G138P enhanced the thermostability of D-glucose isomerase[J]. Acta Biochimica et Biophysica Sinica, 1998, 30(6): 772-80.

## Directed Evolution of Chitinase C from *Serratia marcescens* by Error-Prone PCR

LIU Zhijiang, HE Yancai, LI Hongran,  
LIU Jia, SHI Tengxin

(Key Laboratory of Industrial Biotechnology of Fujian Province University, Huaqiao University, Quanzhou 362021, China)

**Abstract:** Molecular directed evolution to *Serratia marcescens* chitinase gene Chi C was conducted by error-prone polymerase chain reaction (PCR). After two sequential error-prone PCR, a mutagenesis gene library was generated, and then by plate screening, inclusion body renaturing, enzyme activity measuring and the repeat screening, one mutant (Mu2Chi C) with higher enzyme activity was obtained. Its enzyme activity was increased as 1.9 times higher than the original wild type, and the specific activity was found 3.3 times of the original. The enzymic characters of the Mu2Chi C were determined. The results showed that the optimal pH value and temperature of Mu2Chi C were 5.0 and 60 °C respectively, while the optimal temperature of the original wild type is 40 °C. This kind of chitinase that has a higher optimum temperature may have practical significance. The Mu2Chi C DNA was sequenced, and both the mutant gene analysis and the comparison with the wild type were determined by intent software, the results demonstrate that the mutant enzyme had four mutations, each has an amino acid substitution, and all are sense mutations.

**Keywords:** *Serratia marcescens*; chitinase C; molecular directed evolution; error-prone polymerase chain reaction; inclusion bodies

(责任编辑: 黄仲一      英文审校: 陈国华)