

# 利用 DNA 改组技术改造 *aacC1* 基因启动子活性的研究

沈国妙<sup>1,2</sup> 姚泉洪<sup>2\*</sup> 张 铭<sup>1</sup> 彭日荷<sup>2</sup> 熊爱生<sup>2</sup>

(<sup>1</sup> 浙江大学生命科学院 杭州 310012)

(<sup>2</sup> 上海市农业遗传育种重点实验室 上海市农业科学院生物中心 上海 201106)

**摘 要** 从表达质粒 pYPX251( GenBank 登陆号 :AY178046)中获得 *aacC1* 基因启动子,采用 DNA 改组(DNA shuffling)技术在体外获得突变体。以 *lacZ* 作为报告基因,筛选获得活性明显改变的启动子。经过验证,对其中活性变化明显的 7 个启动子用邻硝基苯基- $\beta$ -半乳糖苷(ONPG)作为底物进行表达活性测定。结果表明,获得的强启动子比原来的提高了 3~8 倍,而弱启动子则活性下降明显,其中 3 个几乎无活性。进一步对这 7 个启动子进行了序列分析。

**关键词** DNA 改组技术, *aacC1* 基因启动子, 突变

中图分类号 :Q78 文献标识码 :A 文章编号 :0001-6209(2004)01-0058-04

DNA 改组是由 Stemmer 于 1994 年首次提出的,是一种基于 PCR 突变的重组技术,可用于核酸、蛋白的体外快速进化<sup>[1]</sup>。已利用该方法成功改造了一系列蛋白质、酶、抗体和代谢途径等<sup>[2]</sup>。但迄今为止,还没有该技术在启动子应用上的报道。

*aacC1* 基因编码庆大霉素氨基乙酰转移酶(EC 2.3.1.60),最初从转座子 Tn1696 中分离得到,能使宿主产生对庆大霉素的抗性<sup>[3]</sup>。其启动子(以下简称 Gm 启动子)长度约为 260bp,有典型的原核生物启动子保守序列:-35 为 TTGACA 及 -10 为 TA-AACT。临床分离实验中也发现,启动子的改变,可增强抗性基因的表达,导致菌株耐药性的增加<sup>[4]</sup>。为了进一步了解该启动子对基因的调控机制,更好地将该启动子应用于基因工程,本实验利用 DNA 改组技术对这个启动子进行了体外改造。通过检测编码半乳糖苷酶报告基因的活性,筛选到一些与原启动子活性明显不同的上调和下调启动子。这些获得的启动子不仅可应用于构建不同目的的载体,同时也说明 DNA 改组技术可应用于启动子的改造,为研究更加复杂的真核启动子结构和功能提供了一种新方法。

## 1 材料和方法

### 1.1 质粒和菌株

带报告基因 *lacZ* 的质粒 pYF5428、pYPX251、缺失半乳糖苷酶基因的菌株 *E. coli* EG48( $\Delta lacZ$  *recA1*

*endA1* *gyrA96* *thi-1* *hsdR17* *supE44* *relA1*)由上海农业科学院生物中心构建并保存。

### 1.2 主要试剂

限制性内切酶、T4 DNA 连接酶、DNase I、*Taq* DNA Polymerase、DL2000 Marker、X-gal 购自日本 TaKaRa 公司,ABI PRISM BIGDYE Terminator DNA 测序盒为瑞典 Pharmacia 公司产品。邻硝基苯基- $\beta$ -半乳糖苷(ONPG)和胶回收试剂盒为上海生工生物工程技术有限公司产品。其它化学试剂均为美国 Sigma 公司或国产 AR 级试剂。

### 1.3 引物设计

引物由上海 Sangon 公司合成。按照已发表的 DNA 序列合成 Gm 启动子的引物。prime1:5'-GAAGTCGAGCGTGGAAACGGATGAAG-3'含 *Xho* I 切点;下游引物为 prime2:5'-CATCTAGAGGATCCGATGC-3'含 *Bam*H I 切点,PCR 扩增的片段约为 260bp。

### 1.4 分子生物学操作

分子生物学的常规操作均参照文献[5]进行。

### 1.5 DNA 改组程序

**1.5.1 PCR 扩增 Gm 启动子和回收** 以 pYPX251 质粒为模板,94℃ 10min,94℃ 30s,64℃ 30s,72℃ 30s,共 30 个循环,72℃ 延伸 10min。1.0% Agrose 电泳,透吸袋法回收 260bp 的 DNA 片段。

**1.5.2 DNase I 降解 DNA 和小片段回收** 取 4 $\mu$ g 回收的 DNA 用 DNase I buffer 溶解后,加入 0.001U 的

基金项目:上海市局管项目资助(94JG03-04)

\* 通讯作者。Tel 86-21-62208660 转 3207 Fax 86-21-62209988 E-mail :yaoquanhong@yahoo.com

作者简介:沈国妙(1977-),男,浙江省萧山人,硕士,研究方向分子遗传学。

收稿日期:2003-05-06,修回日期:2003-09-08

DNase I 15℃处理 15min 90℃10min 使 DNase I 失活。15%聚丙烯酰胺电泳后回收 30bp 以下的小片段。

**1.5.3 Primerless PCR** :取 500ng 左右降解回收的小片段 进行不加引物的 PCR 反应。反应体系 :500ng 小片段 DNA + 0.8mmol/L dNTPs + 3mmol/L MgCl<sub>2</sub> + 50mmol/L KCl + 10mmol/L Tris·HCl (pH9.0) + *Taq* 酶 1μL + 0.1% TritonX-100 补充 ddH<sub>2</sub>O 到 50μL ;反应程序为 :94℃ 30s ,40℃ 30s ,72℃ 30s ,共 40 次循环 ;72℃延伸 10min。2% Agrose 电泳检测结果。

**1.5.4 Primer PCR** :取 Primerless PCR 扩增后的产物 5μL 加入引物 ,常规 PCR 反应体系扩增。反应程序为 94℃ 30s ,64℃ 30s ,72℃ 30s ,共 30 个循环 ,72℃延伸 10min。1.5% Agrose 检测 ,试剂盒回收基因片段。

**1.6 Gm 启动子突变库的构建和筛选**

将经过改组的 DNA 片段用 *Xho* I、*Bam*H I 双酶切消化后 ,克隆入带有半乳糖苷酶报告基因的表达式载体 pYF5428 ,连接产物电击转化 *E. coli* EG48 ,获得了启动子突变库。将库涂布在含有 40μL 母液为 80mg/mL X-gal 的平板上初步筛选活性弱的启动子 ,涂布在含 40μL 母液为 10mg/mL X-gal 的平板上初步筛选活性强的启动子。进一步通过重转、重连来鉴定启动子表型的稳定性。

**1.7 半乳糖苷酶活性测定**

对表型稳定的克隆进行酶活的测定 ,比较与野生型的差别。测活方法参照 Miller<sup>[6]</sup>的方法 ,每一样品至少重复 3 次。按照公式 Miller 活性单位 = 1000 × [(OD<sub>420</sub> - 1.75 × OD<sub>550</sub>) / (T × V × OD<sub>600</sub>)] 来计算活性单位数。其中 OD<sub>420</sub> 与 OD<sub>550</sub> 从反应混合物中读取 ,OD<sub>600</sub> 表示菌的细胞密度 ,T 表示反应时间 ,V 表示反应体系中所用的菌体积数。

**1.8 序列分析**

采用双脱氧核苷酸链终止法进行序列分析。用 BioEdit 软件与野生型进行序列比较。

**2 结果**

**2.1 由 Gm 启动含报告基因——半乳糖苷酶基因的原核表达载体的构建**

从 pYPX251 中用高保真 *Taq* 酶通过 PCR 扩增出专一片段 ,凝胶回收后 ,*Bam*H I、*Xho* I 酶切克隆到 pYF5428 表达式载体 ,此为未经突变的野生型 Gm 启动子。酶切鉴定插入片段大小正确 ,在含有 X-gal 的培养板上可显色 ,说明该启动子能够启动报告基因 *lacZ* 的表达。序列分析与已知的完全一致 ,质粒

编号为 pGm0 (图 1)。

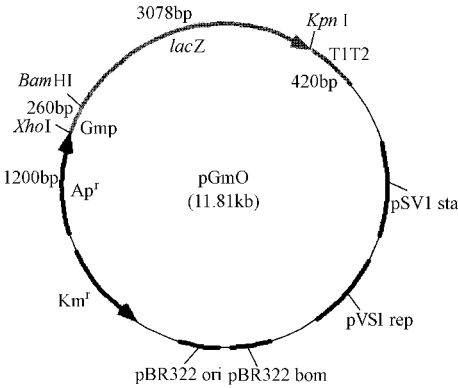


图 1 pGm0 质粒示意图

Fig.1 The sketch map of plasmid pGm0

**2.2 DNA 改组**

从质粒 pGm0 中用普通 *Taq* 酶扩增出 260bp 的 DNA 片段 (图 2-A) ,透析袋法回收后溶解于 DNase I Buffer 中 ,0.001U DNase I 处理后 ,降解为小片段 ,呈现一片弥散状 (图 2-B) 。压碎浸泡法回收约 30bp 以下的小片段 ,沉淀用 ddH<sub>2</sub>O 溶解。取小片段进行 Primerless PCR 扩增后用 2.0% 的 Agrose 电泳 ,可看到模糊状的条带 ,是 PCR 重组配对的结果 (图 2-C) 。取该产物为模板 ,加入引物后进行常规 PCR 反应 ,可获得较专一性的条带 ,是为重排的 Gm 启动子 (图 2-D) 。将改组后得到的 DNA 片段建库。

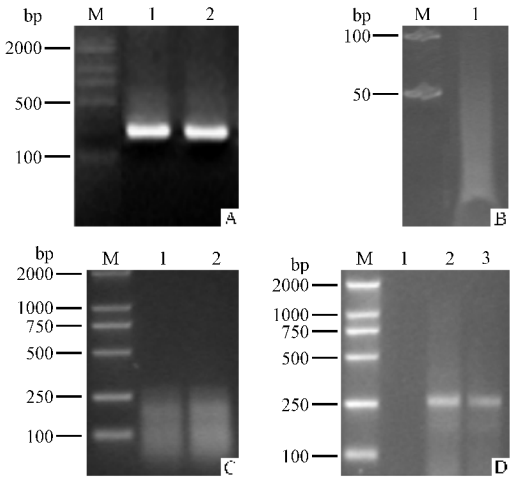


图 2 (A) 从 pGm0 中扩增 PCR 产物 (B) DNase I 降解 ; (C) 无引物 PCR (D) 加引物 PCR

Fig.2 (A) Amplification gene from pGm0 (B) DNase I digestion ; (C) Primerless PCR (D) Primer PCR

**2.3 突变库的构建和筛选**

将改组过后的产物用 *Xho* I、*Bam*H I 双酶切后 ,插入经过同样双酶切 ,带半乳糖苷酶的原核表达

载体 pYF5428。连接产物经过纯化后电击建库,库容量为  $2.4 \times 10^6$ 。酶切分析其中大概有 86.7% 的片段插入正确。将库菌涂布在含较高浓度 X-gal 的 2YT + Amp 培养基上初步筛选共获得 50 个表型比 Gm0 弱的启动子,分别编号 Gw1 ~ 50,涂布在含较低浓度 X-gal 的 2YT + Amp 培养基上,筛选表型比野生型强的启动子,共获得 17 个阳性克隆,分别编号 Gs1 ~ 17。挑取这些阳性克隆,抽提质粒,重新转化,分别淘汰表型与原来不一致的克隆。再将这部分克隆重新酶切、连接,验证是否确实是由启动子引起的表型变化。筛选过程见表 1,其中 Gw 代表弱启动子,Gs 代表强启动子。选取表型最明确的 Gw2、Gw7、Gw19、Gw44 以及 Gw1、Gw3、Gw11 做进一步分析。

表 2 半乳糖苷酶活性的测定及与野生型比较结果  
Table 2 Galactosidase activity assay and compared with the wild type

	pGm0	Strong promoters			Weak promoters			
		Gs1	Gs3	Gs11	Gw2	Gw7	Gw19	Gw44
Average activity unit/x	61.3	225.17	555.79	369.78	0.47	19.5	1.63	0.93
Variability/s	3.07	9.87	30.27	50.21	0.4	1.98	0.91	0.31
Compared with wild type*		2.7 ↑	8.1 ↑	5.0 ↑	130 ↓	3.1 ↓	37.6 ↓	65.9 ↓

\* ↓ Represents decreasing fold ; ↑ Represents increasing fold.

2.5 克隆片段的 DNA 序列测定

对上述 7 个克隆进行了序列测定。测定结果用 BioEdit 软件与野生型序列进行比对。结果如表 3 所示,表中数字代表突变发生的核苷酸位置,+ 号代表插入核苷酸,- 号表示转换/颠换或缺失核苷酸。

表 3 7 个克隆的测序结果

Table 3 The results of nucleotide sequences of seven clones

Plasmid code	Mutations *
Gw2	<sup>67</sup> T - C <sup>226</sup> GTCGATGTTT - GAACCCAGTT
Gw7	<sup>38</sup> G - C <sup>52</sup> + TG <sup>244</sup> - G
Gw19	<sup>41</sup> G - A <sup>49</sup> + A
Gw44	<sup>38</sup> G - T <sup>41</sup> G - A <sup>43</sup> C - A
Gs1	<sup>100</sup> G - T <sup>167</sup> T - G <sup>229</sup> + G
Gs3	<sup>64</sup> A - T <sup>155</sup> T - A
Gs11	<sup>26</sup> G - T <sup>165</sup> G - C <sup>216</sup> T - C

\* Numbers present the position where mutations took place ;

+ Presents that nucleotides inserted ;

- Presents that nucleotides transitioned / transversioned or deleted.

从以上结果中不难看出,DNA 改组技术所引起的突变类型是多样的。有碱基替换、颠换、插入、缺失等。计算其所有测序碱基的突变率  $18/257 \times 7 = 1.00\%$ (一个插入片段计为一个突变点)。同时也发现,筛选得到的有些突变发生在保守区(41、43、64、67 位)和二者的间隔区(49、52 位)。

表 1 突变库的筛选过程

Table 1 Process of screening the mutant library

		Numbers of screened	Positive numbers
The first cycle of screening *	Gw	$1 \times 10^6$	50
	Gs	$1 \times 10^6$	17
The second cycle of screening	Gw	50	39
	Gs	17	13
The third cycle of screening	Gw	5	4
	Gs	5	3

\* Gw presents weak promoters ;Gs presents strong promoters.

2.4 半乳糖苷酶活性的测定

参照 Miller<sup>[6]</sup>的方法作适当调整对上述 7 个克隆进行半乳糖苷酶活性的测定。从表 2 中我们可以看出 3 个筛选到的强启动子活性分别增加了 2.7、8.1、5.0 倍,而 4 个弱启动子中,除了 Gw7 活性下降 3 倍左右外,其他 3 个活性下降明显,几乎测不到活性。

3 讨论

DNA 改组技术作为分子进化的一个有效手段,在重组的过程中存在着不精确性,会引起各种突变。这种方法产生的突变形式多样,突变的频率则可以通过缓冲溶液的组成、DNA 随机片段的大小,DNA 聚合酶的选择等方法来控制<sup>[7]</sup>。本文利用了常规 PCR 反应所要避免的突变,以 Gm 启动子为材料,通过 DNA 改组程序,获得了突变库。测序结果证实确实发生了多种类型的突变。所得突变频率比文献报道的要高<sup>[1]</sup>,是因为在改组过程中应用了无纠错功能的普通 Taq 酶,在 PCR 反应中使用了较高的  $Mg^{2+}$  浓度,以及改组所用的随机片段较小。

在原核生物中,启动子是指与 DNA 依赖的 RNA 聚合酶相结合的一段 DNA 序列,其大小在 20 ~ 300bp 碱基长度范围内。分析原核生物启动子,发现其通常具有一些特定的保守序列如 - 35 和 - 10 保守序列<sup>[8]</sup>。这些保守序列区域的碱基变化可以控制转录水平的高低,进而影响靶基因的表达。此外,保守区间隔及其它序列,由于在转录的效率、mRNA 的稳定性、以及翻译的起始效率上起重要的作用,因此也可影响到靶基因的表达<sup>[9,10]</sup>。将测序结果和酶活结果比较,发现一些在保守区发生突变的克隆

(Gw2、Gw19、Gw44 及 Gs3), 确实导致了酶活性的下降和上升, 可以认为是启动子转录效率的改变而导致报告基因活性水平的改变。Gw7 启动子则可能是因为在保守间隔区存在插入, 而引起活性的改变。Gs1 与 Gs11 则没有一定的规律可寻, 可能是转录水平和翻译水平互作的结果, 也可能是本次实验用了 *lacZ* 作为报道基因研究启动子的局限所在。如果需要, 我们可以应用定点突变、缺失突变、S1 酶切作图、体外转录等方法进一步分析启动子的结构和功能。但用 DNA 改组技术获得的突变启动子仍不妨碍其在基因工程载体构建上的应用。事实上本实验室已利用筛选到的弱启动子 Gw2 和 Gw44 来构建表达载体, 以降低基因的本底表达, 更方便地筛选活性表达提高的其它功能基因。

与原核启动子区相比, 真核基因启动子区往往较复杂, 研究其结构和功能相对较困难。DNA 改组技术在原核启动子改造上的成功, 以及许多衍生方法如 StEP 重组、随机引物体外重组、过渡模板随机嵌合生长、酵母增强组合文库等的出现<sup>[11]</sup>, 使我们相信这一方法能应用于真核启动子的改造, 为研究真核生物启动子的结构和功能提供了一条新途径。

## 参 考 文 献

- [ 1 ] Stemmer W P. DNA shuffling by random fragmentation and reassembly :in vitro recombination for molecular evolution. *Pro Natl Acad Sci*, 1994 **91**( 22 ) :10747 - 10751.
- [ 2 ] Zhao H, Chockalingam K, Chen Z. Directed evolution of enzymes and pathways for industrial biocatalysis. *Current opinion in biotechnology*, 2002 **3** :104 - 110.
- [ 3 ] Wohlleben W, Arnold W, Bissonette L, et al. On the evolution of Tn21-like multiresistance transposons :sequence analysis of the gene (*aacC1*) for gentamicin acetyltransferase-3-I, another member of the Tn21-based expression cassette. *Mol Gen Genet*, 1989, **217** :202 - 208.
- [ 4 ] Corvec S, Caroff N, Espaze E. -11 Mutation in the *ampC* promoter increasing resistance to  $\beta$ -lactams in a clinical *Escherichia coli* strain. *Antimicrob Agents Chemother* 2002 **46**( 10 ) 3265 - 3267.
- [ 5 ] Sambrook J, Frits E F, Mannsdes T. Molecular Cloning. 2<sup>nd</sup> ed. New York :Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- [ 6 ] Miller J H. A short course in bacterial genetics : laboratory manual. New York :Cold spring Harbour Laboratory Press, 1992.
- [ 7 ] Zhao H, Arnold F H. Optimization of DNA shuffling for high fidelity recombination. *Nucleic Acids Res*, 1997 **25**( 6 ) :1307 - 1308.
- [ 8 ] 李育阳. 基因表达技术. 北京 :科学出版社, 2001.
- [ 9 ] Harley C B, Eynlds R P. Analysis of *E. coli* promoter sequences. *Nucleic acids Res*, 1987 **15** :2343 - 2361.
- [ 10 ] Francois B. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *Current Opinion in Biotechnology*, 1999 **10** :411 - 421.
- [ 11 ] 徐卉芳, 张先恩, 张用梅, 等. 体外分子定向进化研究进展. 生物化学与生物物理进展, 2002 **29**( 4 ) :518 - 522.

## Study on DNA Shuffling Method for Changing the Promoter Activity of *aacC1* Gene

SHEN Guo-Miao<sup>1,2</sup> YAO Quan-Hong<sup>2\*</sup> ZHANG Ming<sup>1</sup> PENG Ri-He<sup>2</sup> XIONG Ai-Sheng<sup>2</sup>

(<sup>1</sup> College of Life Science, Zhejiang University, Hangzhou 310012, China)

(<sup>2</sup> Shanghai Key Lab of Agricultural Genetics and Breeding, Agro-biotech Research Center; Shanghai Academy of Agricultural Sciences, Shanghai 201106, China)

**Abstract** : DNA shuffling was a method for in vitro homologous recombination of related genes by random fragmentation and polymerase chain reaction reassembly. In this study, this method was used to change the promoter activity of aminoglycoside-3-O-acetyltransferase-I gene (*aacC1* gene), which encoded gentamicin resistance for the host. The promoter of *aacC1* gene was amplified from the plasmid pYPX251 (GenBank number :178046) constructed by this lab. After restriction enzyme digesting, the shuffling DNA were inserted into the prokaryotic expression vector pYF5428 and the recombinant plasmid library was constructed using *lacZ* as report gene. The library was primarily screened and some promoters with obviously changed activity were obtained. After recutting and recloning, seven promoters changed intensely had been detected the *lacZ* activity using o-nitrophenyl-beta-D-galactopyranoside (ONPG) as substrate. Results showed that the activity of strong promoters had been improved 3 ~ 8 fold while one weak promoter had been decreased 3 fold and three weak promoters showed almost no activity. Further nucleotide sequences analysis showed there were many types of mutations in these promoters, including transition, transversion, deletion and insertion.

**Key words** : DNA shuffling, The promoter of *aacC1* gene, Mutation

Foundation item : The Office Item of Shanghai City ( 94JG03-04 )

\* Corresponding author. Tel 86-21-62208660 Exe 3207 Fax 86-21-62209988 E-mail : yaquanhong@yahoo.com

Received date 05-06-2003