

一个简便的 DNA 改组 (DNA shuffling) 操作程序

周佳海 陈海宝¹⁾

(中国科学院上海有机化学研究所, 生命有机化学国家重点实验室, 上海 200032)

摘要 介绍了一个简便的 DNA 改组操作程序. 首先利用 PCR 扩增了两段具有高度序列同源性的 1 700 bp 左右的基因片段, 两者相比较同源性大于 93%. 然后将其等量混合后, 在 Mg^{2+} 存在的条件下, 用 DNase I 切割成 10~50 bp 的小片段. 这些小片段在不外加引物的前提下, 利用 PCR 反应进行重聚, 再将重聚物经过两轮正常的 PCR 扩增, 获得了与原来片段大小相当的基因片段. 这一技术有利于从一组序列同源性程度较高的基因库构建随机嵌合基因.

关键词 DNA 改组, 重聚 PCR, 定向进化

学科分类号 Q58.1055

蛋白质分子蕴藏着很大的进化潜力, 许多功能有待于开发, 通过体外定向进化实现对蛋白质的改造一直是遗传学家和生物学家们所希冀的. 获得体外定向进化的途径有多种, 与传统的易错 PCR (error prone PCR)、重复寡聚核苷酸引导的诱变相比, DNA 改组 (DNA shuffling) 不仅可加速积累有益突变, 而且可使酶的两个或多个已优化性质合为一体^[1]. DNA 改组技术于 1994 年由美国的 Stemmer^[2] 提出, 其基本原理如图 1 所示, 即首先利用 PCR 或酶切的手段获得基因库里的一组同源基因或突变体基因片段 (A), 然后用化学 (DNase I) 或物理 (超声波) 的手段将其随机切断成一定长度范围内的小片段 (B). 由于这些小片段之间具有一定的同源性可相互为引物, 通过重聚 PCR (Re-assembly via PCR) 的途径延伸为具有全长的基因片段 (D, 图 1 中只列出了一种组合结果, 实际上应有多种组合可能性的片段). 当来自一种基因拷贝的小片段与另一种拷贝的小片段相互为引物时, 即可发生模板的移位. 这种方法可创造将亲本基因群中的突变尽可能组合的机会, 获得导致更大变异的突变体.

目前, 随着多次成功地利用这一技术实现了对一些工程酶的改造^[3-5], 国际上愈来愈多的学者正在被吸引进这一领域, 这方面的专利与文章已逐渐增多, 而国内到 1999 年才有一篇这方面的综述^[1]. 技术方面的原因也可能影响了它的应用, 通过介绍我们实验室摸索出的简便 DNA 改组操作程序, 希望能吸引更多的国内同仁加入这一领域, 利用这一技术去改造一些重要的工程酶或者从事一

些重要的蛋白质工程基础研究. 本文将仅就图 1 所示的基因片段的获得、碎片化反应及利用 PCR 方法进行片段的重组等三个过程进行详细的介绍.

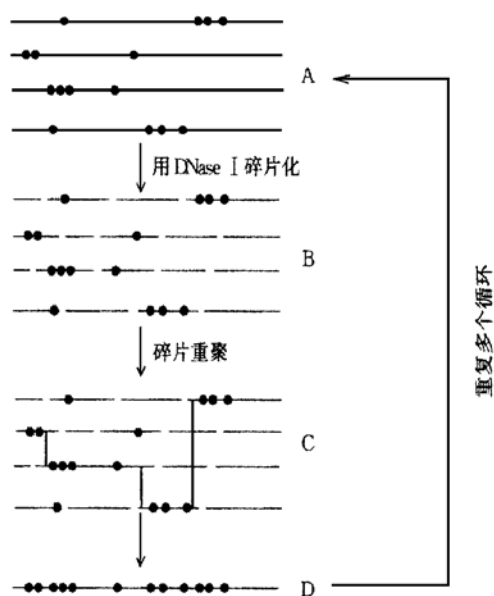


图 1 应用 DNA 改组方法从一组高同源性基因获取随机嵌合基因库

1 材料与方法

1.1 材料

DNase I (12.02 g/L, 约 208 U/μl) 购自 Gibco BRL 公司, Taq DNA 聚合酶购自华美生物工程公司, 质粒 pANK1m (含巨球藻 Rubisco 大小亚

¹⁾ 通讯联系人.

Tel: (021) 64163300-1429, E-mail: hbchen@pub.sioc.ac.cn

收稿日期: 1999-11-19, 修回日期: 2000-03-27

基结构基因) 及 pC1ch2LsS (含巨球藻、水稻 Rubisco 大亚基嵌合结构基因及巨球藻 Rubisco 小亚基结构基因) 均系本实验室构建, PCR 引物由本实验室合成纯化. 5'-引物: CTTGGGCCCGCC-CCACGGTATCCAAGTCGA; 3'-引物: TTTC-CCAGTCACGACGTTGT.

1.2 方法

1.2.1 基因片段的获得: 分别以经 *Nde* I 单酶切的质粒 pANK1m、pC1ch2LsS 为模板, 100 μ l 反应体系中含有 50 mmol/L KCl, 10 mmol/L Tris-HCl, pH 9.0, 1.5 mmol/L MgCl₂, 200 μ mol/L 四种 dNTP, 10 ng 模板和 20 pmol 两种引物, 100 $^{\circ}$ C 变性 5 min 后加入 3 U Taq DNA 聚合酶, 再覆盖 100 μ l 液体石蜡, 依下列条件在 Perkin-Elmer 公司的 PCR 仪上进行反应: 94 $^{\circ}$ C (1 min) \rightarrow 46 $^{\circ}$ C (1 min) \rightarrow 72 $^{\circ}$ C (1 min), 30 个循环后, 72 $^{\circ}$ C 保温 10 min. 将 PCR 产物经 1% 低熔点琼脂糖凝胶电泳 (LMP-AGE) 分离后, 酚抽提、氯仿抽提, 酒精沉淀, 减压抽干后溶于适量水中备用.

1.2.2 碎片化反应: 取等量的两种 PCR 产物 (各约 2~3 μ g) 于 100 μ l 反应体系中含 50 mmol/L Tris-HCl, pH 7.4, 1 mmol/L MgCl₂ 和 0.3 U DNase I (2 U/ μ l, 需使用时稀释), 25~30 $^{\circ}$ C 反应 15 min, 100 $^{\circ}$ C 水浴加热 10 min 使 DNase I 失活, 2% LMP-AGE 回收分离所需的 10~50 bp 的小片段.

1.2.3 重聚 PCR 反应: 将得到的小片段产物溶于适量水中, 于 20 μ l 体系中含 50 mmol/L KCl, 10 mmol/L Tris-HCl, pH 9.0, 1.5 mmol/L MgCl₂, 200 μ mol/L 四种 dNTP 和 3 U Taq DNA 聚合酶, 不加入引物, 再覆盖 100 μ l 液体石蜡, 按下列条件直接进行 PCR: 94 $^{\circ}$ C (3 min); 94 $^{\circ}$ C (30 s) \rightarrow 42 $^{\circ}$ C (30 s) \rightarrow 72 $^{\circ}$ C (30 s), 55 个循环后, 72 $^{\circ}$ C 保温 10 min. 得到的 PCR 产物经吸去上层的液体石蜡后, 取 5 μ l 于 50 μ l 上述相同的体系中, 加入 200 μ mol/L 四种 dNTP, 30 pmol 的两种引物和 3 U Taq DNA 聚合酶, 再覆盖 100 μ l 液体石蜡, 按下列条件进行 PCR 反应: 94 $^{\circ}$ C (3 min); 94 $^{\circ}$ C (1 min) \rightarrow 46 $^{\circ}$ C (1 min) \rightarrow 72 $^{\circ}$ C (1 min), 30~35 个循环后, 72 $^{\circ}$ C 保温 10 min. 1% AGE 检测, 如无目的条带, 则取 5 μ l 此产物为模板, 按上述相同 PCR 条件再进行一次反应.

2 结果与讨论

我们首先通过 PCR 方法获得了两个各约

1 700 bp 的基因片段 (PCR 产物的鉴定见图 2), 前者 (1 747 bp) 编码部分巨球藻 Rubisco 大亚基结构基因与巨球藻 Rubisco 小亚基结构基因, 后者 (1 726 bp) 编码部分巨球藻、水稻 Rubisco 大亚基嵌合结构基因及巨球藻 Rubisco 小亚基结构基因, 两者相比较同源性大于 93%, 即完全相同的基因片段为 1 299 bp, 其余的 448 bp 的基因其序列同源性达 75%. 然后在 Mg²⁺ 存在的条件下, 用 DNase I 将等量混合的两组基因切成 10~50 bp 大小的片段. 最后, 成功地利用 PCR 将这些小片段重聚为 1 730 bp 的基因片段, 图 3 显示经两次 PCR 反应后我们成功地获得了目的条带 (约 1 730 bp) 的重聚物. 与只利用其中的一个基因片段摸索 DNA 改

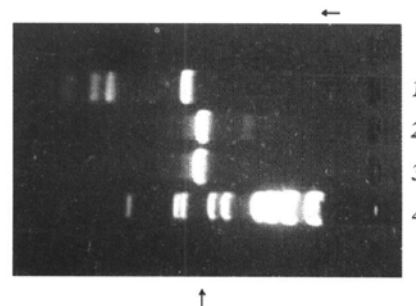


图 2 PCR 扩增产物的 1% 琼脂糖凝胶电泳分析
1: DNA 片段长度参照物 (pUC18 + *Hinf* I): 1 419、517、396 bp; 2: 以 pANK1m 为模板扩增得到的 PCR 产物 (1 747 bp); 3: 以 pC1ch2LsS 为模板扩增得到的 PCR 产物 (1 726 bp); 4: DNA 片段长度参照物 (λ DNA + *Bst*E II): 8 454、7 242、6 369、5 686、4 822、4 324、3 675、2 323、1 929、1 371、1 264、702 bp.

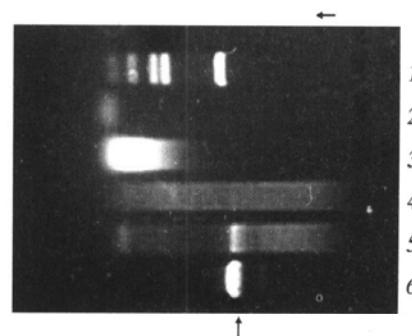


图 3 DNA 改组产物的 1% 琼脂糖凝胶电泳分析
1: DNA 片段长度参照物 (pUC18 + *Hinf* I): 1 419、517、396、214、75 bp; 2: 经 DNase I 碎片化而得到的 10 至 50 碱基的小片段; 3: 不加引物经重聚 PCR 而得到的产物; 4: 重聚产物经一轮 PCR 扩增 (引物量分别为 30 pmol); 5: 重聚产物经两轮 PCR 扩增 (引物量分别为 30 pmol); 6: 以 pC1ch2LsS 为模板扩增得到的 PCR 产物 (1 726 bp).

组条件时的模型反应相比较, 利用两组基因进行碎片化片段的重聚, 一方面增加了形成突变体的机会, 另一方面由于碎片化片段的种类增加导致重聚的困难, 但是应用本文所介绍的操作程序则可以比较顺利地获得重聚物。

在基因片段的获取过程中, 可以采用上述 PCR 方法, 也可以直接从质粒 DNA 中经酶切得到, 具体采用哪种方法依据实验的需要和方便而决定, 如果不希望引入其他的基因突变, 可以采用后一种方法, 或在前一种方法中改用忠实性高的 pfu DNA 聚合酶。值得一提的是, 获得的基因片段中必须除去多余的引物, 以防止在后面反应中的干扰作用。

基因片段经碎片化反应被切割成大小不等的小片段, 对小片段长度的选择依赖于重聚物大小, 重聚物越大, 利用较小片段进行重聚越困难, 而另一方面, 小片段越长, 得到嵌合基因的几率越小, 这样将给筛选工作带来困难。在通常的文献报道中 (Volkov & Arnold FH, *Methods in Enzymology*, 印刷中), 一般 1 000 bp 以内的基因片段被切割成 50 bp 左右的小片段, 1 000 bp 以上的基因片段被切割成 200 bp 左右的小片段, 在本实验中我们发现可以通过 PCR 条件的选择来利用 50 bp 以内的小片段重聚成为 1 700 bp 左右的基因片段。在碎片化反应中, 酶的稀释很重要, 这样实验的重现性好。另外, 文献 (Volkov & Arnold FH, *Methods in Enzymology*, 印刷中) 中建议用 Mn^{2+} 取代 Mg^{2+} , 并用终止缓冲液 (3 × 终止缓冲液: 50 mmol/L EDTA 和 30% 甘油) 灭活 DNase I 来取代加热灭活的方法, 但我们在实验中尝试应用该终止缓冲液效果并不理想。

通过 PCR 进行小片段的重聚是 DNA 改组方法中的最为关键的一步, 在这里模板的浓度控制尤为重要, 过低的浓度难以进行重聚, 合适的模板浓度为 10 mg/L 以上。在不加引物的 PCR 反应中, 延伸时间、循环次数根据目的基因的大小而定, 复性温度比正常 PCR 反应条件略低即可。关于获得重聚后基因的克隆及嵌合体的筛选方面的工作, 我们将另文报道。

致谢 本工作是 (1986~ 1995) 国家高技术发展计划项目和 (1996~ 1998) 国家自然科学基金资助项目的继续。感谢 Caltech 的 Arnold 教授提供最新文献, 感谢本组鲍建绍老师合成寡聚核苷酸片段。

参 考 文 献

- 1 张红缨, 孔祥铎, 张 今. 蛋白质工程的新策略——酶的体外定向进化. *科学通报*, 1999, **44** (11): 1121~ 1127
Zhang H Y, Kong X D, Zhang J. *Chinese Science Bulletin*, 1999, **44** (11): 1121~ 1127
- 2 Stemmer W P C. DNA shuffling by random fragmentation and reassembly: *In vitro* recombination for molecular evolution. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, **91** (22): 10747~ 10751
- 3 Patten P A, Howard R J, Stemmer W P C. Applications of DNA shuffling to pharmaceuticals and vaccines. *Curr Opin Biotechnol*, 1997, **8** (6): 724~ 733
- 4 Giver L, Arnold F H. Combinatorial protein design by *in vitro* recombination. *Curr Opin Chem Biol*, 1998, **2** (3): 335~ 338
- 5 Arnold F H, Volkov A A. Directed evolution of biocatalysts. *Curr Opin Chem Biol*, 1999, **3** (1): 54~ 59

A Facile DNA Shuffling Protocol. ZHOU Jia-Hai, CHEN Hai-Bao (*State key Laboratory of Bio-organic and Natural Products Chemistry, Shanghai Institute of Organic Chemistry, The Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200032, China*).

Abstract A facile DNA shuffling protocol was introduced. Two genes of about 1 700 bp were obtained by PCR from two different individual templates, separately, which shared over 93% homology. After mixed with equimolar of each, these two genes were further cut randomly by DNase I into small fragments of 10~ 50 bp under the existence of Mg^{2+} . These small fragments were successfully re-assembled to form full genes with original size by one round of PCR without any external primers and two other rounds of normal PCR amplification. This shuffling protocol may help to construct chimera genes from a family of genes with high sequence homology.

Key words DNA shuffling, re-assembly via PCR, directed evolution