

研究报告

# 基于易错 PCR 的假密环菌 *Armillariella tabescens* MAN47 $\beta$ -甘露聚糖酶耐高温定向进化

吕晓慧, 胡亚冬, 胡凤娟, 刘大岭, 姚冬生

暨南大学微生物技术研究所, 广州 510632

**摘要:** 本研究利用易错 PCR 技术突变假密环菌 *Armillariella tabescens* MAN47  $\beta$ -甘露聚糖酶野生型基因, PCR 产物与大肠杆菌-酿酒酵母穿梭表达载体 pYC $\alpha$  上连接, 在大肠杆菌 DH5 $\alpha$  中扩增后电转入酿酒酵母 *Saccharomyces cerevisiae*, 构建了库容为  $10^4$  的初级突变体库, 筛选得到耐高温最佳突变株 M262。DNS 法测得 80°C 处理 30 min 后最大酶活力为 25 U/mL, 较之野生型最适条件酶活力提高了 4.3 倍。序列分析表明, 突变体有 3 个碱基发生了突变: T343A/ C827T/ T1139C, 相应的氨基酸改变为 Ser115Thr/Thr276Met/Val380Ala, 利用 SWISS-MODEL 数据库同源建模显示, 这 3 个突变氨基酸分别位于第 4 个  $\beta$  折叠的第 6 个氨基酸、第 6 个  $\alpha$  螺旋的第 1 个氨基酸、第 10 个  $\alpha$  螺旋和第 11 个  $\beta$  折叠之间的转角。

**关键词:** 定向进化,  $\beta$ -甘露聚糖酶, 易错 PCR, 热稳定性

## Directed evolution by error-prone PCR of *Armillariella tabescens* MAN47 $\beta$ -mannanase gene toward enhanced thermal resistance

Xiaohui Lü, Yadong Hu, Fengjuan Hu, Daling Liu, and Dongsheng Yao

Institute of Microbial Biotechnology, Jinan University, Guangzhou 510632, China

**Abstract:** Firstly, We used error-prone PCR to induce mutations on *Armillariella tabescens* MAN47  $\beta$ -mannanase gene, Secondly, we cloned the mutated fragments into secreted expression vector pYC $\alpha$ , Then the recombinant plasmids were transformed into *Saccharomyces cerevisiae* BJ5465 after amplified and extracted in DH5 $\alpha$  cells. Through three cycles of error-prone PCR we built a mutant database, Then we screened one optimum (named M262) from about 104 mutants. The evolved MAN47  $\beta$ -mannanase displayed both higher thermal stability and activity than wide type. The evolved enzyme M262 retained high activity after treatment at 80°C for 30 min, whereas, the wild type nearly lost activity under this condition. Meanwhile, the activity of M262 can reach to 25 U/mL, which is 4.3 times as wide type under optimum temperature. In addition, pH stability and pH range of evolved enzyme M262 were both improved compared with wild-type enzyme. The optimum pH was estimated to be similar to that of wild-type enzyme. The sequence comparison illustrated that there were three nucleotide substitutions (T343A/C827T/T1139C) which carried corresponding amino acid changes (Ser115Thr/Thr276Met/Val380Ala). According to homologous modeling by SWISS-MODEL Repository, three mutated amino acids located at the sixth amino acid of the fourth  $\beta$ -sheet, the first amino acid of the sixth  $\alpha$ -helix, the turn between the tenth and eleventh  $\beta$ -sheet, respectively.

**Received:** October 7, 2009; **Accepted:** October 30, 2009

**Supported by:** Scientific and Technological Project of Guangdong Province (No. 2005B20601004).

**Corresponding author:** Dongsheng Yao. Tel: +86-20-85228422; Fax: +86-20-85228422-804; E-mail: tdsyao@jnu.edu.cn

广东省科技攻关项目(No. 2005B20601004)资助。

**Keywords:** directed evolution,  $\beta$ -mannanase, error-prone PCR, thermal stability

$\beta$ -甘露聚糖酶(EC 3.2.1.78)是一类能够水解含  $\beta$ -1,4-D-甘露糖苷键的内切水解酶,属于半纤维素酶类。水解的底物有半乳甘露聚糖、葡萄甘露聚糖、半乳葡萄甘露聚糖和甘露聚糖,产物有少量的单糖和 2~10 个单糖分子构成的寡糖。

$\beta$ -甘露聚糖酶的研制是生物技术领域内的重要课题;它可广泛应用于食品、医药、造纸、饲料、石油开采及精细化工等行业,对于自然资源的高附加值开发、发展生物技术改造化学工业,满足资源、环境、能源、医药等领域内的需求具有重要意义。

酶分子定向进化是定向改造酶结构和功能的新策略和有效的技术手段。它模拟酶自然进化的过程,选择适当载体和表达系统,利用基因突变和重组,构建突变文库,辅以高通量筛选方案,以获得具有预期新功能的突变体。该技术不需要深入了解目标蛋白的结构信息,可简单快速实现对目标蛋白的定向进化。

本实验室曾在 2006 年从 *Armillariella tabescens* MAN47 中克隆出了  $\beta$ -甘露聚糖酶 MAN47 的全长 cDNA,构建到 pPICZ $\alpha$ A 载体上,并在毕赤酵母成功表达,对其理化性质进行了较全面的探讨<sup>[1]</sup>。但该酶还存在一些缺陷,如耐高温和热稳定性不够优秀,对于某些特殊要求还不能适用。本研究旨在利用 EP-PCR 等体外分子定向进化技术<sup>[2-5]</sup>,对 *A. tabescens* MAN47  $\beta$ -甘露聚糖酶进行分子改良,筛选耐高温的稳定突变体,使其能够应用于生产实际。同时通过分析所获得的突变序列和结构,了解  $\beta$ -甘露聚糖酶结构与功能的关系。

## 1 材料和方法

### 1.1 菌株和质粒

大肠杆菌(*Escherichia coli*)DH5 $\alpha$  菌株由本室保存,酿酒酵母 *Saccharomyces cerevisiae* BJ5465 购自 ATCC 公司,大肠杆菌-酿酒酵母穿梭分泌表达质粒 pYES2/CT/ $\alpha$ -factor(简称为 pYCa)系本所自行构建。

### 1.2 酶和试剂

PCR 所用试剂为 NEB 公司产品,限制内切酶 *Xho* I 和 *Not* I 为 Toyoto 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 Tigen 公司,PCR 引物合成和 DNA 测序委托北京奥科生物技术公司,槐豆胶 G-0753 和甘露糖 M-6020 均购自 Sigma 公司,其他化学试剂为国产或进口分析纯。

### 1.3 培养基

培养基 LB、YPD、YPG、SC-U-D、SC-U-G-曲利本兰平板均按 Invitrogen 公司操作手册推荐方法配制。

### 1.4 易错 PCR 突变文库建立

#### 1.4.1 易错 PCR 引物设计

根据 *A. tabescens* MAN47 $\beta$ -甘露聚糖酶基因序列,使用 Primer Premier5.0 软件设计 error-prone PCR 引物。在引物的末端分别引入限制内切酶酶切位点 *Xho* I (TCGAG)和 *Not* I (GCGGCCGC),并分别在 5 端增加 3~5 个保护碱基,以便后期的克隆与表达。

上游引物 P9A1: 5'-CCTCGAGTCGAGTCGAGTCGAGTTCGAGAAAAGAGGCTGAAGCTATGGCCACCA CAACTGTCC-3'; 下游引物 P9A2: 5'-AGGAAAAA GCGGCCGCCGCCGCCGCCGCCGCCGCCGCCGCCGCCGCT TACAATCGTCTCTCAATGAAACTTTC-3'。

#### 1.4.2 易错 PCR 反应体系

20  $\mu$ L 反应体系: 10  $\times$  PCR 缓冲液 2  $\mu$ L, dATP(10 mmol/L)和 dGTP(10 mmol/L)各 0.4  $\mu$ L, dCTP(10 mmol/L)和 dTTP(10 mmol/L)各 2  $\mu$ L, 模板 0.6  $\mu$ L (6 pmol/ $\mu$ L), 上下游引物(10  $\mu$ mol/L)各 0.6  $\mu$ L, MgCl<sub>2</sub>(25 mmol/L)4.2  $\mu$ L, MnCl<sub>2</sub>(2 mmol/L) 0、0.1、0.5、1、1.5、2  $\mu$ L, *Taq* 酶 0.2  $\mu$ L, ddH<sub>2</sub>O 7、6.9、6.5、6、5.5、5  $\mu$ L。易错 PCR 循环程序: 降落 PCR, 94 $^{\circ}$ C 5 min; 5cycles: 94 $^{\circ}$ C 30 s, (65-1) $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 105 s; 25cycles: 94 $^{\circ}$ C 30 s, 60 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 105 s; 72 $^{\circ}$ C 10 min。(为设置不同 MnCl<sub>2</sub> 浓度的 PCR 反应体系,分别加入 0、0.1、0.5、1、1.5、2  $\mu$ L MnCl<sub>2</sub>,使其终浓度分别为 0、0.02、0.05、0.10、0.15、0.20 mmol/L)。

#### 1.4.3 易错 PCR 突变文库的构建

大肠杆菌 DH5 $\alpha$  感受态细胞制备: 挑取 DH5 $\alpha$  单克隆于 2 mL LB 液体培养基中, 37 $^{\circ}$ C 振荡培养过夜; 以 1%接种量转接入 50 mL LB 液体培养基中, 37 $^{\circ}$ C 振荡培养至 OD<sub>600</sub> 约为 0.4; 菌液转入 50 mL 无菌离心管中, 冰浴 10 min, 4000 r/min、4 $^{\circ}$ C 离心

10 min, 弃上清; 取 10 mL 冰浴无菌 0.15 mmol/L  $\text{CaCl}_2$  悬浮菌体, 冰浴 20 min; 4000 r/min、4°C 离心 10 min, 弃上清; 加入 4 mL 冰浴的无菌  $\text{CaCl}_2$  悬浮菌体, 分装。

*S. cerevisiae* BJ5465 感受态细胞制备: 挑取 *S. cerevisiae* BJ5465 单克隆于 5 mL YPD 液体培养基中, 30°C、250 r/min 振荡培养过夜; 以 1% 接种量转入 50 mL YPD 液体培养基中, 30°C、250 r/min 培养至  $OD_{600}$  约为 1.3~1.5。收集菌液至 50 mL 离心管中, 4000 r/min 离心 10 min, 弃上清。溶液 I (0.1 mol/L LiAc+0.01 mol/L DTT+1 mol/L TE) 重悬沉淀, 冰浴 1 h, 4000 r/min 离心 10 min 弃上清, 25 mL 冰浴无菌水重悬, 4000 r/min 离心 10 min 弃上清, 重复操作一次。5 mL 冰浴的溶液 II (1 mol/L 山梨醇) 重悬沉淀, 4000 r/min 离心 10 min 弃上清。加入 200  $\mu\text{L}$  冰浴的溶液 II, 悬浮菌体, 分装。

重组质粒构建及转化: 将 PCR 产物经琼脂凝胶电泳纯化回收, 命名为  $\text{MAN}^{\text{mut}}$ 。Xho I、Not I 双酶切, 与同样双酶切的穿梭分泌表达载体 pYCa 相连接, T4 DNA 连接酶 4°C 过夜连接。连接产物与大肠杆菌 DH5 $\alpha$  感受态细胞 42°C 热激 90 s, 涂布含 Amp 的 LB 平板, 37°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°C、200 r/min 培养过夜。抽取 DH5 $\alpha$  中重组质粒, 电转入 *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°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, 抽取质粒, 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 pYCa- $\text{MAN}^{\text{mut}}$  是否构建成功。

### 1.5 易错 PCR 突变文库筛选

#### 1.5.1 突变 $\beta$ -甘露聚糖酶的定性检测

挑取 1.4.3 中转化平板的单菌落, 点植于含有 0.5% 魔芋精粉的 SC-U-Gal-曲利本兰平板, 30°C 诱导培养 96 h, 挑选出菌落周围有水解圈的克隆。

#### 1.5.2 $\beta$ -甘露聚糖酶的活性测定

将 1.5.1 中挑选出的克隆接种到 YPG 液体培养基的 96 孔板中进行诱导培养, 30°C 摇床培养 72 h 后取上清液。甘露聚糖酶活性的测定采用 DNS 法<sup>[6]</sup>:

取 0.5% 的槐豆胶溶液 (用 pH 6.0, 0.04 mol/L  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ -0.02 mol/L 柠檬酸配制) 70  $\mu\text{L}$ , 加入 10  $\mu\text{L}$  经高温 80°C 处理 30 min 的酶液, 振荡混匀, 10  $\mu\text{L}$  灭活酶液为对照, 40°C 反应 15 min 后, 加入 120  $\mu\text{L}$  DNS 终止反应, 100°C 显色 10 min, 于 540 nm 处测定  $OD_{540}$  值。酶活定义: 在 pH 6.0、40°C 试验条件下, 以每分钟水解底物产生 1  $\mu\text{mol}$  相当于 D-甘露糖的还原糖的酶量定义为 1 个甘露聚糖酶单位 (U/mL)。

### 1.6 蛋白质表达和耐高温甘露聚糖酶酶学性质研究

#### 1.6.1 蛋白质的表达

将筛选获得的 *S. cerevisiae* BJ5465 耐高温进化菌株接种于含 20% 半乳糖的 YPG 培养基, 诱导表达进化甘露聚糖酶, 取上清液, Bradford 法测定其蛋白质的含量<sup>[7]</sup>。

#### 1.6.2 SDS-PAGE 电泳

取上述上清液, 进行 SDS-PAGE 电泳, 分析进化酶蛋白表达情况。

#### 1.6.3 温度和 pH 对耐高温甘露聚糖酶活性的影响

在不同温度 (30°C、40°C、50°C、60°C、70°C、80°C) 下按 DNS 法测定酶活力, 以未处理的野生型酶液活力为 100%, 计算各组酶的相对活力。在不同 pH (3.0、4.0、5.0、5.5、6.0、7.0、8.0) 缓冲液 (0.04 mol/L  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ -0.02 mol/L 柠檬酸) 配置的底物下, DNS 法测定酶活力, 以未处理的酶液活力为 100%, 计算各组酶的相对活力。

#### 1.6.4 耐高温甘露聚糖酶的温度稳定性和 pH 稳定性

在 pH 6.0 条件下, 将酶液在不同的温度 (30°C、40°C、50°C、60°C、70°C、80°C) 下保温 30 min, 按 DNS 法测定酶活力, 以未处理的野生型酶液活力为 100%, 计算各组酶的相对活力。酶液与上述不同 pH (3.0、4.0、5.0、6.0、7.0、8.0) 缓冲液于 40°C 保温 30 min, DNS 法测定活性, 以未处理的酶液活力为 100%。计算各组酶的相对活力。

### 1.7 耐高温甘露聚糖酶突变位点分析和结构预测

耐高温突变体由北京奥科公司进行序列测定。与野生型酶基因进行比对, 同时在 NCBI 数据库

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)中查找同源序列并进行比对, 根据比对结果选择结构模拟的模板, SWISS-MODEL(<http://swissmodel.expasy.org/>) 数据库中输入目的蛋白的氨基酸序列和模板的 PDB 编号, 生成模拟结构<sup>[8-10]</sup>。根据预测的结构信息, 分析其位点突变效应。

## 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(图 1)。

#### 2.1.2 易错 PCR 突变库构建

易错 PCR 产物克隆到大肠杆菌-酿酒酵母穿梭

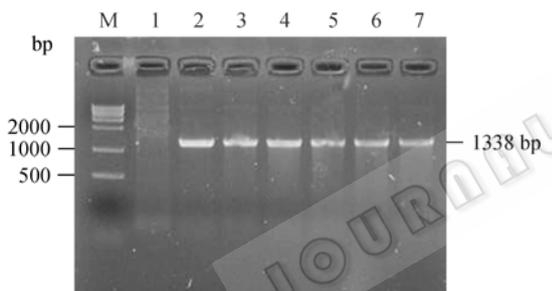


图1 不同  $Mn^{2+}$  浓度下的易错 PCR

Fig. 1 Error-prone PCR conducted with different  $Mn^{2+}$  concentrations. M: DNA marker; 1: negative control; 2-7: 0.00 mmol/L, 0.02 mmol/L, 0.05 mmol/L, 0.10 mmol/L, 0.15 mmol, 0.20 mmol/L  $Mn^{2+}$ .

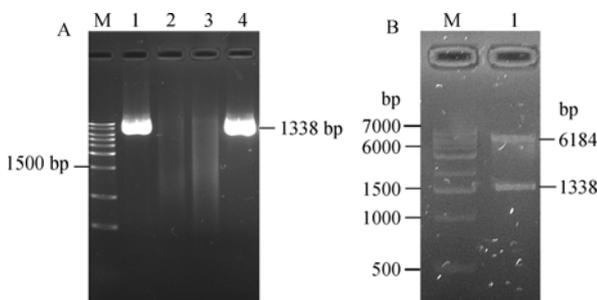


图2 PCR(A)及酶切(B)鉴定重组质粒

Fig. 2 Identification of recombinant plasmid by PCR(A) and enzyme digestion(B). (A) M: DNA marker; 1: M262; 2: PCR control; 3: pYC $\alpha$ ; 4: PCR products. (B) M: DNA marker; 1: recombinant plasmid digested with *Xho* I and *Not* I.

表达载体 pYC $\alpha$  上, 重组质粒在大肠杆菌 DH5 $\alpha$  中扩增后转入酿酒酵母 *S. cerevisiae*, 构建了库容为约  $10^4$  的初级突变体库。

#### 2.1.3 重组质粒酶切, PCR 验证

PCR 和双酶切结果证实重组子 pYC $\alpha$ -man<sup>mut</sup> 构建成功(图 2)。

### 2.2 易错 PCR 突变库的筛选<sup>[11-12]</sup>

图 3 是突变体文库的筛选方案, 利用底物活性曲利本兰平板定性初筛(图 4)。获得的产透明圈克隆再进行 96 孔深孔板微量培养复筛, DNS 法测活。

将突变体高温下酶活力和常规酶活力分别与野生型酶比较作图<sup>[13]</sup>。筛选结果表明, 大多数克隆的

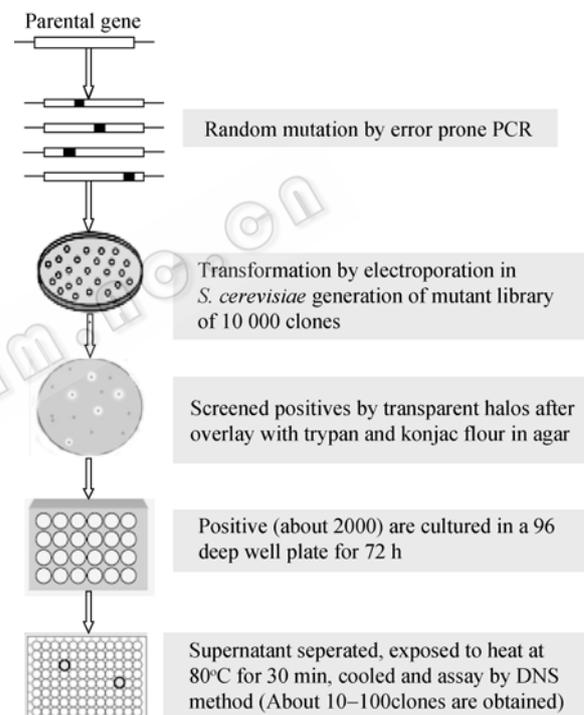


图3 易错 PCR 库建立和筛选流程图

Fig. 3 Scheme of EP-PCR database construction and screen.

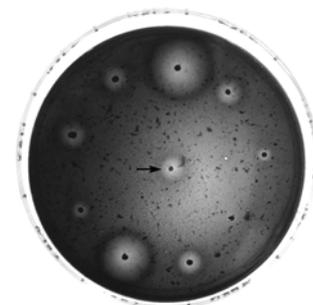


图4 易错PCR突变体透明圈

Fig. 4 EP-PCR variant transparent circle relative to wild-type  $\beta$ -mannanase( $\rightarrow$ ).

酶活力和对高温的耐受力与野生型相差无几，约2%的克隆常规条件下酶活力较野生型有所提高，最高可达到野生型的5.7倍，但是这些克隆并没有具备耐高温特性；还有约1%的克隆具备耐高温特性，但是酶活力没有显著增加，综合酶活力和耐高温两方面的特性筛选出耐高温同时酶活力有所提高的克隆，命名为M262，其在80℃处理30min后酶活力达到25 U/mL，是野生型甘露聚糖酶基因在最适条件下酶活力的4.3倍(图5)。

**2.3 进化酶 M262 蛋白诱导表达和 SDS-PAGE**

测得 M262 蛋白质浓度为 0.447 mg/mL，电泳结果显示表达产物的分子量约为 47 kD，未添加半乳糖诱导时，目的蛋白几乎不表达(图 6)。

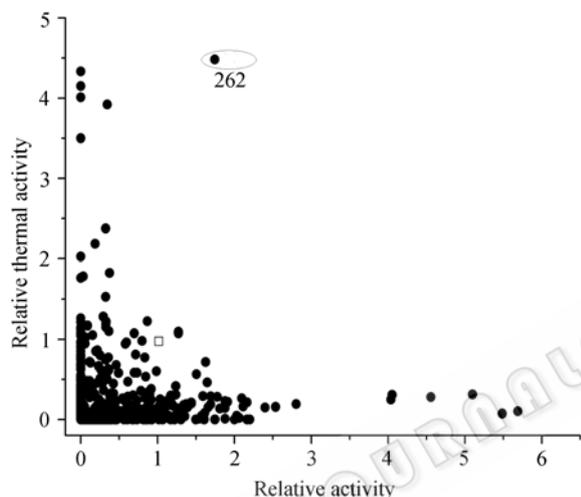


图5 易错PCR库筛选耐高温突变体  
Fig. 5 Relative thermal activity of mannanase variants derived from error prone PCR libraries(●), relative to wild-type β-mannanase (□).

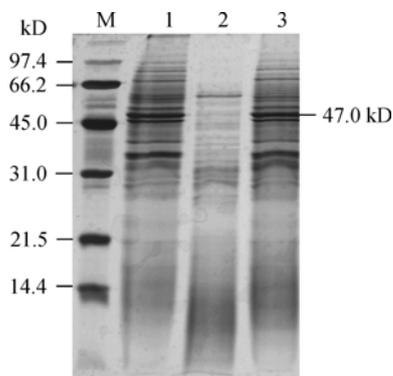


图 6 野生型酶和进化酶 M262 诱导表达和 SDS-PAGE  
Fig. 6 Induced expression and SDS-PAGE of wide and evolved β-mannanase M262. M: protein marker; 1: induced evolved β-mannanase M262; 2: uninduced evolved β-mannanase M262; 3: wide type β-mannanase.

**2.3.1 野生型酶和进化酶 M262 的最适温度和温度稳定性**

野生型酶的最适温度为 60℃，进化酶的最适温度为 40℃，同时进化酶在 80℃ 时的相对酶活力依旧维持在 50%~60%，而野生型酶在该温度下基本丧失活性(图 7)。野生型酶在 30℃~60℃ 稳定性较好，进化酶在 60℃~90℃ 稳定性较好，且 90℃ 时相对酶活力仍能保持 50%，但在相对较低的温度下，进化酶的稳定性要稍差于野生型酶(图 8)。

**2.3.2 野生型酶和进化酶 M262 的最适 pH 和 pH 稳定性**

野生型酶和进化酶的最适 pH 均为 5.0(图 9)，但进化酶最适 pH 下的相对酶活力显著高于野生型酶。野生型酶在 pH 5.0~6.0 稳定性较好，进化酶在 pH 4.0~7.0

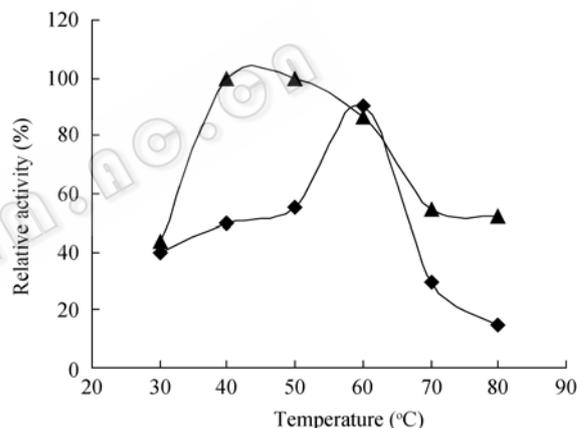


图 7 温度对野生型酶和进化酶 M262 活性影响  
Fig. 7 Effect of pH on the activity of wide(■) and evolved β-mannanase M262 (▲).

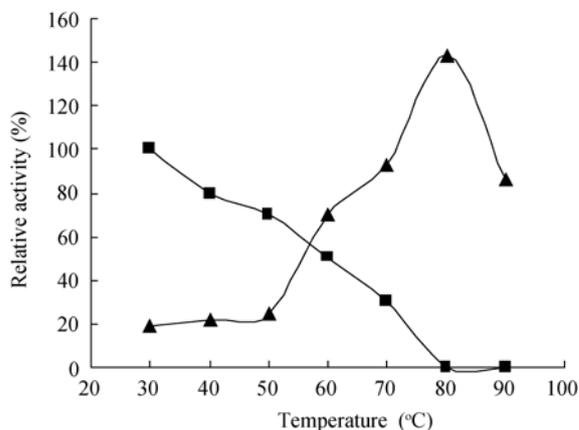


图 8 野生型酶和进化酶 M262 温度稳定性。  
Fig. 8 Thermal stability of wide (■) and evolved β-mannanase M262 (▲).

稳定性较好。同时, 进化酶的 pH 范围稍宽于野生型酶, 在 pH 8.0 时野生型酶丧失活性, 进化酶相对酶活力还维持在 50%, 无论是 pH 范围还是 pH 稳定性, 进化酶都优于野生型酶(图 10)。

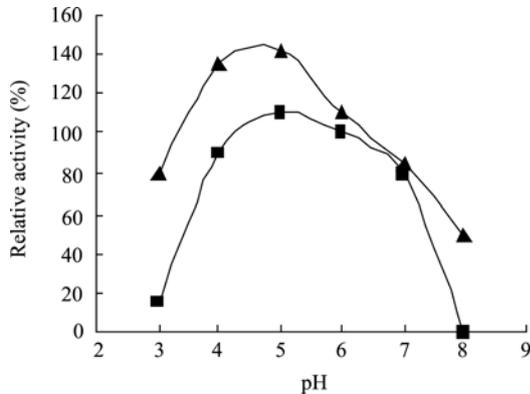


图 9 野生型酶和进化酶 M262 的最适 pH

Fig. 9 Effect of temperature on the activity of wide(■)and evolved  $\beta$ -mannanase M262 (▲).

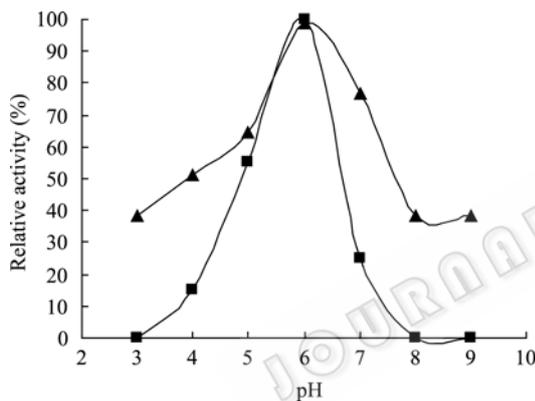


图 10 野生型酶和进化酶 M262 pH 稳定性

Fig. 10 pH stability of wide (■) and evolved  $\beta$ -mannanase M262 (▲).

## 2.4 进化酶 M262 结构预测和突变位点分析

进化酶基因与野生型基因进行 Blast 序列比对, 有 3 个碱基发生了改变, 同时导致相应的氨基酸也发生了改变(表 1)。采取 PHD 方法<sup>[14]</sup>进行二级结构预测, 进化酶的  $\alpha$ 螺旋比例没有变化,  $\beta$ 折叠比例降低, 无规则卷曲的比例增大(表 2)。

通过同源序列比对, 在 NCBI 数据库选择与 *A. tabescens* MAN47  $\beta$ -甘露聚糖酶氨基酸序列同源性 40%的木霉属  $\beta$ -甘露聚糖酶作为同源模板, 通过 SWISS-MODEL REPOSITORY 进行结构预测, 得到进化酶 M262 的模拟三级结构图(图 11)。从三维结

表 1 突变体碱基和氨基酸变化

Table 1 Nucleotide substitution and amino acid change of mutant

	Nucleotide substitution	Amino acid change
Wide→M262	T <sup>343</sup> →A <sup>343</sup>	Ser <sup>115</sup> →Thr <sup>115</sup>
	C <sup>827</sup> →T <sup>827</sup>	Thr <sup>276</sup> →Met <sup>276</sup>
	T <sup>1139</sup> →C <sup>1139</sup>	Val <sup>380</sup> →Ala <sup>380</sup>

表 2 PHD 法预测进化酶 M262 二级结构的改变

Table 2 Predicting second structure changes in evolved  $\beta$ -mannanase M262 by PHD strategy

	Alpha helix	Extended strand	Random coil
Wide	25.84%	26.07%	48.09%
M262	25.84%	23.82%	50.34%

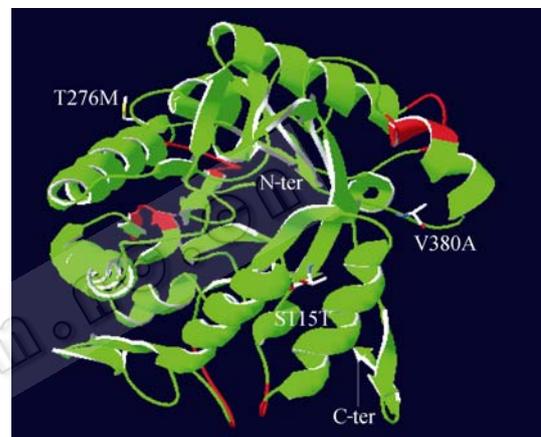


图 11 进化酶 M262 模拟三维结构指示突变位点的位置

Fig. 11 3D structure of simulated evolved  $\beta$ -mannanase M262 indicating the position of each mutation.

构上可以看出, M262 具备甘露聚糖酶典型的 $(\beta/\alpha)_8$ 桶状结构<sup>[15]</sup>, 但与木霉属  $\beta$ -甘露聚糖酶三维结构有所区别, 图中红色区域代表木霉属  $\beta$ -甘露聚糖酶不具备的结构。用 DEEP VIEWER 软件分析表明, 3 个突变氨基酸分别位于第 4 个  $\beta$  折叠的第 6 个氨基酸、第 6 个  $\alpha$  螺旋的第 1 个氨基酸、第 10 个  $\alpha$  螺旋和第 11 个  $\beta$  折叠之间的转角。但具体的突变带来的效应机制还需要进一步深入研究和探讨。

## 3 讨论

体外定向进化是进行酶结构和功能改造的有力工具, 它成功的关键在于基因多样性突变库的建立和高效的筛选方法。本研究设置不同浓度的  $Mn^{2+}$  进行易错 PCR, 同时控制  $Mg^{2+}$  的浓度, 得到不同突变

频率的多样性文库。在酿酒酵母表达系统进行真核来源蛋白的体外分子进化, 要将外源基因引入酵母中需要经过多次的基因操作, 而且酵母转化效率低也是限制库容量的因素之一。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<sup>[17,20]</sup>。但是若对成千上万的重组菌株, 用逐一提取酶分别测量 2 个条件下活力筛选, 在实际操作中很难实现。因此, 首先构建了分泌表达载体, 使目的蛋白能够分泌到培养基中, 不用破碎菌体和提纯酶, 即可测定突变菌株的表观酶活, 大大减轻了工作强度。同时在筛选过程中, 采用曲利本兰平板定性初筛, 底物活性微孔平板定量初筛和大体积液体测活复筛相结合, 确保筛选结果的准确性。

本研究筛选到的这个突变株, 它的耐高温特性是野生型酶所不具备的, 在 80°C 处理 30 min 后酶活力为 25 U/mL, 是野生型酶的 4.3 倍, 在 40°C 下酶活力最高, 是野生型酶活力的 1.4 倍, 同时它的 pH 范围和 pH 稳定性都显著高于野生型酶。但是该酶在 40°C 下稳定性不强, 并且它的酶活力还需要进一步提高。

筛选过程中得到的很多克隆其耐高温性能的提高伴随着酶活力的降低, 这种现象与文献报道的淀粉酶<sup>[13]</sup>和过氧化物酶<sup>[21]</sup>定向进化研究结果相类似, 并且之后 Cherry 研究组利用 DNA shuffling 技术获得了热稳定性和活性均提高 5~7 倍的过氧化物酶。该机制值得重视, 故此, 下一步可利用 DNA shuffling 等手段, 来获取更优秀的耐高温高酶活的甘露聚糖酶。同时筛选过程中获得的大量具备单一性状(耐高温或酶活力提高)的突变体也为定点突变等理性设计和改造酶的性质奠定基础。

## REFERENCES

- [1] Yao DS, Huang XK, Liu DL, *et al.* Inducement, purification and characterization of  $\beta$ -mannanase from *Armillariella tabescens* EJLY2098. *China Biotechnol*, 2006, **26**(7): 57–63. 姚冬生, 黄小葵, 刘大岭, 等. *Armillariella tabescens* EJLY2098 $\beta$ -甘露聚糖酶的诱导、纯化及酶学性质分析. *中国生物工程杂志*, 2006, **26**(7): 57–63.
- [2] Frances HA, George G. Directed Evolution Library Creation: Methods and Protocols. Clifton: Humana Press, 2003: 3–10.
- [3] Cadwell RC, Joyce GF. Randomization of genes by PCR mutagenesis. *PCR Methods Appl*, 1992, **2**(1): 28–33.
- [4] Phouthone K, William GT. Fidelity of DNA polymerases in DNA amplification. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1989, **86**(23): 9253–9257.
- [5] Shafikhani S, Siegel RA, Ferrari E, *et al.* Generation of large libraries of random mutants in *Bacillus subtilis* by PCR-based plasmid multimerization. *Biotechniques*, 1997, **23**(2): 304–310.
- [6] Akino T, Nakamura N, Horikosh K. Characterization of three  $\beta$ -mannanase of analklaophilic *Bacillus* sp.. *Aghe Biol Chem*, 1993, **191**(3): 1097–1104.
- [7] Yang AG, Mao JF, Yao LB. Biochemistry and Molecular Biology Protocol. Beijing: High Education Press, 2001: 255–257. 杨安钢, 毛积芳, 药立波. 生物化学与分子生物学实验技术. 北京: 高等教育出版社, 2001: 255–257.
- [8] Arnold K, Bordoli L, Kopp J, *et al.* The SWISS-MODEL workspace: a web-based environment for protein structure homology modelling. *Bioinformatics*, 2006, **22**(2): 195–201.
- [9] Schwede T, Kopp J, Guex N, *et al.* SWISS-MODEL: an automated protein homology-modeling server. *Nucleic Acids Res*, 2003, **31**(13): 3381–3385.
- [10] Guex N, Peitsch MC. SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: an environment for comparative protein modelling. *Electrophoresis*, 1997, **18**(15): 2714–2723.
- [11] Ahmad S, Kamal MZ, Sankaranarayanan R, *et al.* Thermostable *Bacillus subtilis* lipases: *in vitro* evolution and structural insight. *J Mol Biol*, 2008, **381**(2): 324–340.
- [12] Fong S, Machajewski TD, Mak CC, *et al.* Directed evolution of D-2-keto-3-deoxy-6-phosphogluconate aldolase to new variants for the efficient synthesis of D- and L-sugars. *Chem Biol*, 2000, **7**(11): 873–883.
- [13] Jones A, Lamsa M, Frandsen TP, *et al.* Directed evolution of a maltogenic alpha-amylase from *Bacillus* sp. TS-25. *J Biotechnol*, 2008, **134**(3/4): 325–333.
- [14] Rost B. PHD: predicting one-dimensional protein structure by profile-based neural networks. *Methods Enzymol*, 1996, **266**: 525–539.
- [15] Anna M L, Lars A, Bingze X, *et al.* Three-dimensional crystal structure and enzymic characterization of  $\beta$ -mannanase Man5A from blue mussel *mytilus edulis*. *Mol Biol*, 2006, **357**: 1500–1510.
- [16] Bourgault R, Oakley AJ, Bewley JD, *et al.* Three-dimensional structure of (1,4)-beta-D-mannan mannanohydrolase from tomato fruit. *Protein Sci*, 2005, **14**(5): 1231–1241.
- [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] Manivasakam P, Robert H. High efficiency transformation of *Saccharomyces cerevisiae* by electroporation. *Nucleic Acids Res*, 1993, **21**(18): 4414–4415.
- [19] Evelyne Delorme. Transformation of *Saccharomyces cerevisiae* by electroporation. *Appl Environ Microbiol*, 1989, **55**(9): 2242–2246.
- [20] Gietz RD, Schiestl RH. Quick and easy yeast transformation using the LiAc/SS carrier DNA/PEG method. *Nature*, 2007, **2**(1): 35–48.
- [21] Cherry JR, Lamsa MH, Schneider P, *et al.* Directed evolution of a fungal peroxidase. *Nat Biotechnol*, 1999, **17**(4): 379–384.