

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
51(4):532-537; 4 April 2011
ISSN 0001-6209; CN 11-1995/Q
<http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>

基因局部改组技术在 *ubiA* 基因突变中的应用

顾超, 傅楠, 叶江, 张惠展*

华东理工大学生物工程学院, 国家生物反应器工程重点实验室, 上海 200237

摘要:辅酶 Q (coenzyme Q, CoQ) 作为线粒体呼吸链中的递氢体具有较高的学术及应用价值。由 *ubiA* 基因编码的 4-羟苯甲酸聚异戊二烯转移酶 (UbiA) 是大肠杆菌 CoQ 生物合成途径的限速步骤, 但通过系统突变对其结构进行研究鲜有报道。【目的】应用化学合成的随机序列寡核苷酸, 对 *ubiA* 基因编码活性区域的 DNA 序列进行随机突变。【方法】以大肠杆菌 MC4100 的 *ubiA* 基因插入灭活突变株为受体, 将化学合成的随机序列替换目标区域序列, 进行 *ubiA* 基因的局部改组; 最终对所得突变株的 *ubiA* 改组基因的突变序列及其功能进行对应分析。【结果】*ubiA* 基因局部改组后经过两轮筛选, 得到 CoQ 产量发生不同程度变化的 7 株 *ubiA* 基因突变株, 与野生型 *ubiA* 相比改组型 *ubiA* 的编码序列呈显著变化, 其测序结果从一个侧面证实了文献报道的 3 个天冬氨酸位点与 *ubiA* 基因所编码蛋白的催化活性之间的关系。【结论】本文建立的基因局部改组技术是可行的; 利用该技术初步揭示了 UbiA 中对其活性具有重要贡献的部分氨基酸位点。

关键词: *ubiA* 基因, 辅酶 Q, 基因局部改组, 温敏质粒

中图分类号: Q93-3 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2011)04-0532-06

在大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 中, 由 *ubiA* 基因编码的 4-羟苯甲酸聚异戊二烯转移酶 (UbiA) 催化 4-羟基苯甲酸 (4-hydroxybenzoate, PHB) 与聚异戊二烯焦磷酸 (polyprenyl phosphate, PPP) 的缩合^[1-2]。松田英幸等人的研究证明^[3], UbiA 是 CoQ 生物合成途径中的限速酶。前期的研究表明, *ubiC* 和 *ubiA* 的强化表达可以显著提高大肠杆菌 CoQ 的合成能力^[4-5]。Bräuer^[6]等人将来自不同微生物的 4-羟苯甲酸聚异戊二烯转移酶进行比对, 推断 PPP 和 PHB 可能结合在酶的 N 端附近。他们还发现, UbiA 由第 59—81 位氨基酸及第 183—205 位氨基酸构成的两个 xDxxDD 序列在进化中高度保守, 其中 Asp68、Asp71、Asp75、Asp191 以及 Asp195 被认为是催化功能的关键位点。本文将这两个区域称为 D1 和 D2。

1994 年 Stemmer 首先提出了 DNA 改组的概念, 通过将一组序列相关的 DNA 序列处理成随机小片段后在无引物条件下采用有性 PCR (Sexual PCR) 获得大量 DNA 不同区域随机重新组合的新 DNA 突变体^[7]。不久, Stemmer 又通过在经过 DNase I 处理的片段中加入人工合成的寡核苷酸的方法获得了优于单纯用 DNase I 处理的改组效果^[8]。在此之后, Jirholt、Zha D、Ness 等人都在各自的改组方案中使用了合成的寡核苷酸, 其中包括了只借助合成的寡核苷酸的方法^[9-11]。这些方案的共同特点是借助已有的研究成果, 强化了改组的针对性, 并大大提高了获得有益突变的几率。本文将这一技术应用于 *ubiA* 基因的 DNA 改组, 建立了针对 *ubiA* 基因内编码活性区域 D1 的改组技

* 通信作者。Tel: +86-21-64252515; Fax: +86-20-64252507; E-mail: huizhzh@ecust.edu.cn

作者简介: 顾超 (1984 -), 男, 上海人, 硕士研究生, 主要从事分子生物学和途径工程研究。E-mail: guchao_sh@yahoo.com.cn

收稿日期: 2010-10-12; 修回日期: 2011-12-31

术,对 *UbiA* 催化活性具有重要贡献的部分氨基酸位点进行了调查。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒:大肠杆菌 MC4100 株 ($\Delta(\argF-lac)$, *U169*, *rpsL*, *thiA*, *relA*, *araD*)、表达质粒 pTrc-99a (*Ap^r*, *pTrc*) 为本实验室保存、重组质粒 pCA (*ubiC-ubiA- Δ pIsB*) 为本实验室构建 (详见 1.2 及文献 [5])、温敏质粒 pMAK705 (*Cm^r*, 温度敏感型复制子) 为 James laboratory 赠与。pMD18-T 载体购自 TaKaRa 公司。

1.1.2 培养基:全部使用 LB 培养基。

1.1.3 主要试剂和仪器:硫酸卡那霉素 (Km)、氨苄西林钠 (*Ap*)、氯霉素 (*Cm*) 的使用终浓度分别为 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。限制性内切酶 *NgoMIV* 由 NEB 生产,其它限制性内切酶、Taq DNA

聚合酶及 T4 DNA 连接酶购自 TaKaRa 公司。DNA Marker (0.5 kb、1.1 kb、1.6 kb、2.6 kb、3.1 kb、4.1 kb、5.4 kb、9.34 kb、17 kb) 由本实验室制备; DNA Ladder-II (100 bp、250 bp、500 bp、750 bp、1.2 kb、2.0 kb) 由上海杰瑞生物工程有限公司生产。其它化学试剂均为分析纯。随机序列片段由赛百盛公司合成。PCR 仪为 Eppendorf 公司生产。HPLC 及化学工作站为 Agilent 公司生产。

1.1.4 HPLC 条件:色谱柱: ZORBAX Eclipse XDB-C₁₈ 柱 (250 mm \times 4.6 mm); 流动相: 无水乙醇; 流速: 1.0 mL/min; 检测波长: 275 nm; 柱温: 30 $^{\circ}\text{C}$; 进样量: 20 μL 。

1.1.5 引物:本文所使用的引物序列汇总于表 1 中。*ubiA-4* 位于 *ubiA* 基因上游 *ubiC* 的 5' 端; *ubiA-5*、*ubiA-6* 分别位于 *ubiA* 两端; *ubiA-S1*、*ubiA-S2E52* 分别位于 D1 编码序列两侧; pMAK-1 为特异性结合温敏质粒 pMAK-705 及其衍生质粒的引物。

表 1 实验中使用的 PCR 反应引物

Table 1 PCR primers in this study

primer	sequence(5'→3')	target	restriction site
<i>ubiA-4</i> (sense)	CTTTTCTGCGATACAATGCC	<i>ubiC</i>	
<i>ubiA-5</i> (sense)	AAACCATGGAGTGGAGTCTG		<i>Nco</i> I
<i>ubiA-6</i> (anti - sense)	CATCAAGCTTTTTTACATCATC		
<i>ubiA-S1</i> (anti - sense)	AGACGCCGGCGACAAACACT	<i>ubiA</i>	<i>NgoMIV</i>
<i>ubiA-S2E52</i> (sense)	GGCGAACCGCGCGTTCCCGAG		<i>Eco52</i> I
pMAK-1 (sense)	AGCCCAGTAGTAGGTTGAGG	pMAK705	

1.1.6 编码 D1 的随机序列的制备:合成序列如下的两条全长 90bp 的 Oligo DNA: 5'-CCGGCGTC-TGGCTGN...NGCGAACC-3'; 5'-GGCCGGTTCGCN...NCAGCCAGACG-3' 其两端分别为 *NgoMIV* 和 *Eco52* I 型粘性末端, N...N 为 69bp 的随机序列。以 STE Buffer 将 Oligo DNA 分别溶解, 终浓度为 1.25 OD₂₆₀/100 μL (5 pmol/ μL)。取等体积上游及下游片段溶液合并至一个 Eppendorf 管中, 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 10 min 后冷却至室温, 得到浓度约为 0.2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 的双链 DNA 溶液。

1.2 大肠杆菌 MC4100 株 *ubiA* 基因的插入突变

重组质粒 pCA 是本实验室将带有自身启动子的 *ubiC* 和 *ubiA* 基因接入 pSP72 载体质粒 T7 启动子下游而构建得到的一个 *ubiC* + *ubiA* 基因表达质粒。pCA 经 *Ssp* I 不完全酶切, 回收 4.7 kb 片段, 将其与 1.3 kb 平末端的 Km 抗性基因连接, 得到重组质粒 pKm- Δ *ubiA*。将 pKm- Δ *ubiA* 用 *Xba* I / *Sma* I 酶切得

到的 2.8 kb 的片段, 与经 *Xba* I / *Hinc* II 酶切的 pMAK705 片段连接, 得重组质粒 pMAK- Δ *ubiA*。将其导入 MC4100, 经过二次同源重组^[12] 筛选得到 *ubiA* 基因插入突变株 pMAK-*ubiA*/MDA12。以引物 *ubiA-4*/*ubiA-6* 通过菌落 PCR 进行鉴定。

1.3 重组菌 pTrc-*ubiA*/MDA12 的构建

以引物 *ubiA-5*/*ubiA-6* 扩增得到野生型 *ubiA* 基因并将之克隆至 T 载体上, 得到质粒 pT-*ubiA* (*Tre*)。将其用 *Nco* I / *Hind* III 酶切后得到 900bp 片段, 与经 *Nco* I / *Hind* III 酶切的 pTrc-99a 片段连接, 得到质粒 pTrc-*ubiA*。

将 pTrc-*ubiA* 转化 pMAK-*ubiA*/MDA12, 得到双质粒系统 pTrc-*ubiA* + pMAK-*ubiA*/MDA12, 将其接种于含 *Ap* 和 *Km* 的液体培养基中 44 $^{\circ}\text{C}$ 培养, 重复多轮后分离单菌落并检测其对 *Ap*、*Km* 及 *Cm* 的抗性, 将表现 *Ap^rKm^rCm^s* 性状的保种, 命名为 pTrc-*ubiA*/MDA12。

1.4 缺失 D1 编码区的 *ubiA* 表达质粒 pTrc-*ubiA* ΔD1 的构建

分别用引物 *ubiA*-5/*ubiA*-S1、*ubiA*-S2E52/*ubiA*-6 扩增得到 D1 编码区两侧的片段并将之分别克隆至 T 载体上,所得质粒分别命名为 pMD-*ubiA* (S1)、pMD-*ubiA* (S2E52)。

pMD-*ubiA* (S1) 用 *Nco* I/*Eco*R I 酶切后得到 200bp 片段,与经 *Nco* I/*Eco*R I 酶切的 pTrc-99a 片段连接,得到质粒 pTrc-*ubiA* (S1),再经 *Pst* I/*Hind* III 酶切,与 pMD-*ubiA* (S2E52) 经相同酶切后得到的 650bp 片段连接,得到质粒 pTrc-*ubiA*ΔD1。

1.5 *ubiA* 基因 D1 编码区的局部改组及突变株的筛选

将经过 *Ngo*M IV 和 *Eco*52 I 酶切的 pTrc-*ubiA*ΔD1 片段与随机序列片段连接并导入 pMAK-*ubiA*/MDA12,44°C 培养。所得的单菌落编号后分别提取其质粒并转化 pMAK-*ubiA*/MDA12 感受态细胞(原因详见 2.3)。每个编号的菌株经过两轮 37°C 无 Cm 液体培养后于含 Ap 和 Km 的固体培养基上分离单菌落并检测其 Ap、Km 和 Cm 的抗性,将表现出 Ap^rKm^rCm^s 的菌株保种。

1.6 *ubiA* 基因 D1 编码区局部改组突变株 CoQ 合成能力的鉴定

将 1.5 最后得到的菌株及 pTrc-*ubiA*/MDA12 分

别接种于含 Ap 的液体培养基中,37°C 过夜培养。按 1% 的接种量将培养液接种于 100mL 含 Ap 的液体培养基中,37°C 培养 10.5 h,4290 × g 离心 10min 收集菌体并以无菌重蒸水洗涤 1 次。醇碱皂化法提取 CoQ 参考文献 [13]。所得 CoQ 粗提物进行 HPLC 检测。

2 结果

2.1 大肠杆菌 MC4100 基因组 *ubiA* 基因的敲除

ubiA 基因的敲除原理见图 1-A。利用 pMAK705 的 Cm 抗性基因及 44°C 下该质粒无法复制的特性,经过二次同源重组后得到 pMAK-*ubiA*/MDA12。以引物 *ubiA*-4/*ubiA*-6 对其基因组 DNA 进行 PCR 鉴定,扩增得到 2.8 kb 的片段(图 1-B)由此确认基因组上的 *ubiA* 基因内部已经插入 Km 抗性基因。

pMAK-*ubiA*/MDA12 仍然含有携带野生型 *ubiA* 基因的温敏质粒 pMAK-*ubiA*。我们发现,如果没有其它 *ubiA* 补救途径存在,pMAK-*ubiA* 无法丢失。这种情况下若进行 44°C 培养,该菌株便无法生长。而当将 pTrc-*ubiA* 转化入 pMAK-*ubiA*/MDA12 后,重组菌才能在 44°C 下正常生长,挑选其中表现出 Cm^s 的样本抽提质粒,以引物 pMAK-1/*ubiA*-6 进行 PCR 鉴定,并以 Cm^r 样本作为对照,结果只有对照扩增出 1.3kb 的片段,表明 pMAK-*ubiA* 已经丢失(图 1-C)。

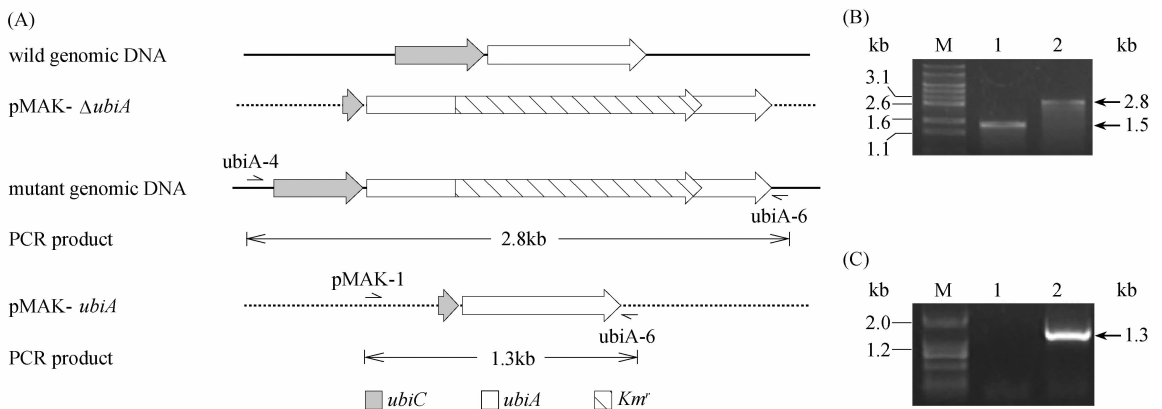


图 1 温敏质粒灭活 *ubiA* 基因原理及其鉴定

Fig. 1 General strategy for the *ubiA* gene deletion and identification of the deletion. A: General strategy for the *ubiA* gene deletion. B: Identification of *ubiA* gene deletion by colony PCR. The fragments were amplified with primers *ubiA*-4 and *ubiA*-6 from MC4100 colony (1) and *ubiA* gene mutant pMAK-*ubiA*/MDA12 (2); M: DNA molecular weight marker. C: Identification of the inexistence of pMAK-*ubiA* The fragments were amplified with primers pMAK-1 and *ubiA*-6 from Cm^s colony (1) and pMAK-*ubiA*/MDA12 Cm^r colony (2). M: DNA Ladder-II

2.2 缺失 D1 编码区的 *ubiA* 表达质粒 pTrc-*ubiA*ΔD1 的构建

pTrc-*ubiA*ΔD1 经 *Nco* I / *Hind* III 双酶切得到 4.1kb 和 900bp 的条带, 而分别经 *Ngo*M IV 或 *Eco*52 I 单酶切后则能得到 5.0kb 的片段, 证明 pTrc-*ubiA*ΔD1 构建成功(图 2-A)。

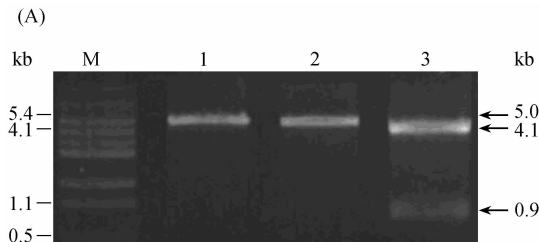


图 2 pTrc-*ubiA*ΔD1 酶切鉴定电泳及 *ubiA* 基因 D1 改组原理

Fig. 2 Identification of pTrc-*ubiA*ΔD1 and general strategy for the *ubiA* gene D1 shuffling. A: Identification of pTrc-*ubiA*ΔD1. M. DNA Marker; 1. pTrc-*ubiA*ΔD1 *Eco*52 I; 2. pTrc-*ubiA*ΔD1 *Ngo*M IV; 3. pTrc-*ubiA*ΔD1 *Nco* I / *Hind* III. B: General strategy for the *ubiA* gene D1 shuffling. Grey region: new restriction sites created by primer *ubiA*-S1 and *ubiA*-S2E52.

2.3 *ubiA* 基因 D1 编码区的局部改组及突变株的筛选

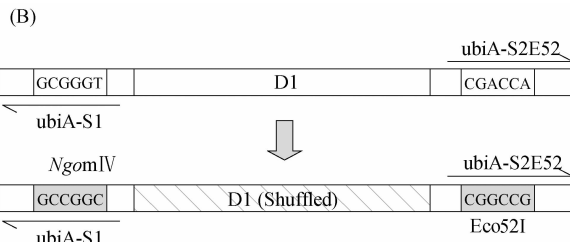
由于 pMAK-*ubiA*/MDA12 必须有 *ubiA* 基因补救途径才能存活, 而其携带的有野生型 *ubiA* 基因的 pMAK-*ubiA* 在 44°C 下又无法复制, 因此经 *Ngo*M IV 和 *Eco*52 I 酶切的 pTrc-*ubiA*ΔD1 片段与随机序列片段的连接产物导入 pMAK-*ubiA*/MDA12 并经过 44°C 培养后生长出的单菌落都含有至少能行使维持菌体生长所需最小限度功能的 *ubiA* 基因。

为了进一步鉴定上述改组的 *ubiA* 突变基因的活性变化, 我们将所得菌株编号后提取质粒 DNA 并再次将其转化入 pMAK-*ubiA*/MDA12 中, 经过两轮 37°C、无 Cm 培养后分离单菌落并对其进行 Ap、Km、Cm 的抗性检测, 结果 10[#]、19[#]、30[#]、34[#]、51[#]、54[#]、56[#] 表现 Ap^rKm^rCm^s 性状, 提示其中 pMAK-*ubiA* 可能已丢失。以引物 pMAK-1/*ubiA*-6 对这些菌株的菌体悬浮液进行 PCR 鉴定 (Cm^r 性状的菌株为对照), 结果只有对照组扩增出了 1.3kb 条带, 说明 Cm^s 的单菌落中的 pMAK-*ubiA* 确实丢失了, 即这些菌株中 *ubiA* 基因确实能正常行使功能。

2.4 *ubiA* 基因 D1 编码序列局部改组突变株 CoQ 合成能力的鉴定及 D1 编码区序列分析

以 pTrc-*ubiA*/MDA12 为对照组, 与 2.3 所得的菌株进行同步培养并以醇碱皂化法提取 CoQ, HPLC 分析突变株的 CoQ 产量相对对照组产量的相对变

在构建 pTrc-*ubiA*ΔD1 的过程中, 利用引物 *ubiA*-S1 和 *ubiA*-S2E52 在不改变氨基酸序列的前提下于 D1 编码序列两侧分别引入了 *Ngo*M IV 和 *Eco*52 I 的酶切位点。该质粒经过 *Ngo*M IV 和 *Eco*52 I 酶切并接入随机序列片段后便形成一个完整的、D1 编码序列由各种随机序列构成的 *ubiA* 基因(图 2-B)。



化, CoQ 产量的相对变化 = | 突变株 CoQ 产量 - 对照组 CoQ 产量 | / 对照组 CoQ 产量 × 100%, 结果见图 3。本实验室醇碱皂化法提取 CoQ 其数据重现性的最大误差为 6.3%, 而 10[#]、51[#]、54[#]、56[#] 的变化由于接近该范围故归为 CoQ 的产量没有明显变化。

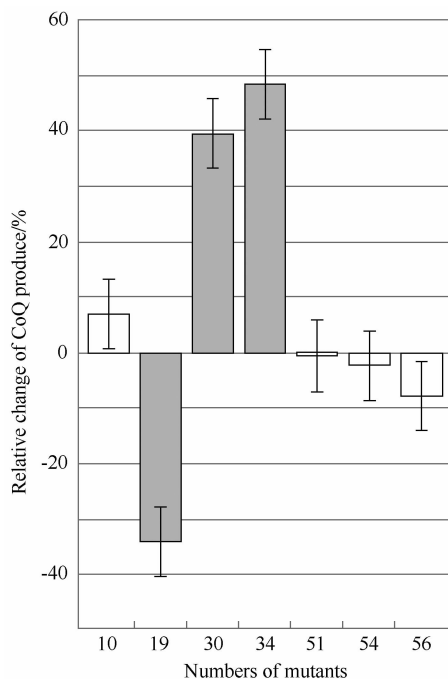


图 3 突变株 CoQ 产量相对对照组的变化 (N = 3)

Fig. 3 Relative change of CoQ produce of mutants (N = 3). Grey column: Strains which CoQ produce showed obvious change.

同时,提取各突变株及对照组的质粒并测序,其 D1 的氨基酸序列汇总于表 2 中。

表 2 DNA 改组所得有活突变株 D1 氨基酸序列与野生型的比较

Table 2 Alignments of D1 obtained by shuffling with wild type

No.	D1 amino acid sequence and their number of position in the whole UbiA amino acid sequence																						
	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81
UbiA	M	R	A	A	G	C	V	V	N	D	Y	A	D	R	K	F	D	G	H	V	K	R	T
10	M	R	S	A	G	S	G	W	N	D	C	A	E	P	W	F	D	E	S	V	S	L	T
51	M	R	A	A	G	C	V	V	N	D	Y	A	D	R	K	F	D	G	H	V	K	R	T
54	L	Q	D	A	G	C	V	V	N	D	Y	A	D	R	K	F	D	G	H	V	K	R	T
56	M	R	A	A	G	C	V	V	N	D	Y	A	D	R	K	F	D	G	H	V	K	R	T
19	M	R	A	A	L	W	W	A	H	A	E	A	C	P	R	R	E	G	H	V	L	F	G
30	M	L	A	G	G	S	A	L	W	D	Y	G	P	F	G	V	D	G	P	V	K	R	T
34	M	Y	A	S	E	W	V	P	C	D	D	A	H	P	W	L	D	G	D	V	N	N	S

Underlined bold number: Strains which CoQ produce increased; Underlined number: Strain which CoQ produce decreased; Gray region: Mutant site.

可以看到,除了 51[#]、54[#]、56[#]外,其它的突变株其 D1 序列都发生了较大面积的突变,且其中有不少位点的氨基酸性质发生了较大的变化。特别是靠近文献报道可能是关键催化位点的附近,在 CoQ 产量变化较明显的菌株中都有不同程度的突变。可见,这种模型在 *ubiA* 基因的改组中的应用是可行且有效的,同时也暗示,除了 Asp68、Asp71 和 Asp75 外,其邻近某些位点的氨基酸对 CoQ 产量也有一定的影响。

3 讨论

使用人工合成的 DNA 小片段进行基因乃至基因组的大规模突变或定向进化在近年来已经逐渐成为常见的且有效的方法。最近 Harris H 等报道了通过一个由数千条 90 碱基长的单链 DNA 片段构成的化学合成的 DNA 复合池对大肠杆菌 DXP 途径中的 24 个基因组份进行同时修饰,短时间内实现了对该途径的显著优化^[14]。

传统的基因改组需要通过物理或化学方法将目的基因处理成随机小片段,这样在之后的操作中这些小片段或多或少都会出现按原来野生型基因上的顺序排列的趋势,从而造成突变规模不理想。使用合成的随机序列片段对基因的局部区域进行改组则大大增加了序列的多样性,为更大规模的有义突变创造了条件,同时对局部区域的改组有着更强的针对性,避免了将此要区域纳入改组范围中所造成的无义突变,更有利于优势突变株的筛选。

值得注意的是,虽然许多文献都显示 Asp68、Asp71、Asp75 高度保守,但本实验的结果显示,Asp71 的保守度可能没有另两个位点那么高。鉴于 CoQ 合

成上升的菌株其 Asp71 都发生了较明显的突变,甚至可以说该位点的突变对催化活性的提高可能是有益的;而 CoQ 合成减少的突变株这三个位点都发生了突变从一个侧面证明这些位点很可能确实与 *ubiA* 编码蛋白的催化活性有关。当然,鉴于本文所得的突变株数量较少,缺少能够说明其它突变氨基酸位点与催化活性间关系的结果,故这些氨基酸位点与催化活性的关系还有待进一步的实验来解析。

参考文献

- [1] Siebert M, Bechthold A, Melzer M, May U, Berger U, Schröder G, Schröder J, Severin K, Heide L. Ubiquinone biosynthesis: cloning of the genes coding for chorismate pyruvate-lyase and 4-hydroxybenzoate octaprenyl transferase from *Escherichia coli*. *FEBS Letters*, 1992, 307: 347-350.
- [2] Wu Guanghui, Williams Huw D, Gibson Frank, Poole RK. Mutants of *Escherichia coli* affected in respiration: the cloning and nucleotide sequence of *ubiA*, encoding the membrane-bound p-hydroxybenzoate: octaprenyltransferase. *Microbiology*, 1993, 139: 1795-1805.
- [3] 松田英幸,川向诚,中川强. ユビキノン生合成鍵酵素 *ubiA* 遺伝子. 日本: 特開平 6-189775, 1994 年 7 月 12 日
- [4] Kwon O, Druce-Hoffman M, Meganathan R. Regulation of the ubiquinone (coenzyme Q) biosynthetic genes *ubiCA* in *Escherichia coli*. *Current microbiology*, 2005, 50: 180-189.
- [5] 叶江,马林,吴海珍,刘欣毅,张惠展. *ubiCA* 基因的强化表达及对大肠杆菌辅酶 Q 生物合成的影响. 华东理工大学学报(自然科学版)(*Journal of East China University of Science and Technology*), 2006, 32: 269-

- 273.
- [6] Bräuer L, Brandt W, Wessjohann LA. Modeling the *E. coli* 4-hydroxybenzoic acid oligoprenyltransferase (*ubiA* transferase) and characterization of potential active sites. *Journal of Molecular Modeling*, 2004, 10: 317 - 327.
- [7] Stemmer WPC. Rapid evolution of a protein *in vitro* by DNA shuffling. *Nature*, 1994, 370: 389-391.
- [8] Stemmer WPC. DNA shuffling by random fragmentation and reassembly; *In vitro* recombination for molecular evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1994, 91(22): 10747-10751.
- [9] Jirholt P, Ohlin M, Borrebaeck CAK, Söderlind E. Exploiting sequence space: shuffling *in vivo* formed complementarity determining regions into a master framework. *Gene*, 1998, 215(2): 471-476.
- [10] Zha D, Eipper A, Reetz MT. Assembly of designed oligonucleotides as an efficient method for gene recombination: a new tool in directed evolution. *Chembiochem*, 2004, 4(1): 34-39.
- [11] Ness JE, Kim S, Gottman A, Pak R, Krebber A, Borchert TV, Govindarajan S, Mundorff EC, Minshull J. Synthetic shuffling expands functional protein diversity by allowing amino acids to recombine independently. *Nature Biotechnology*, 2002, 20(12): 1251-1255.
- [12] Hamilton CM, Aldea M, Washburn BK, Babitzke P, Kushner SR. New method for generating deletions and gene replacements in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 1989, 171(9): 4617-4622.
- [13] 郝苏丽, 吴越, 徐康森. 高效液相色谱法测定辅酶 Q₁₀ 含量的研究. 中国生化药物杂志 (*Chinese Journal of Biochemical Pharmaceutics*), 1998, 4: 167-171.
- [14] HH. Wang, FJ. Isaacs, PA. Carr, ZZ. Sun, G. Xu, CR. Forest, GM. Church. Programming cells by multiplex genome engineering and accelerated evolution. *Nature*, 2009, 460: 894-898.

Application of a model for gene local shuffling in *ubiA* mutation

Chao Gu, Nan Fu, Jiang Ye, Huizhan Zhang*

State Key Laboratory of Bioreactor Engineering, East China University of Science and Technology, School of Biotechnology, Shanghai 200237, China

Abstract: As a transhydrogen in the mitochondrial respiratory chain, Coenzyme Q (CoQ) has a critical role in the metabolism. 4-hydroxybenzoate polyprenyltransferase (UbiA), which coded by *ubiA* gene, is the rate-limiting enzyme in the CoQ biosynthesis progress. However, the relationship between structure and function remains unclear. [**Objective**] To set up a synthetic oligonucleotide-based shuffling model and apply in the random mutation of DNA sequence of *ubiA* gene which codes putative active site. [**Methods**] By using *ubiA* knockout mutant of *E. coli*. MC4100 as receptor, we set up a local Shuffling model by replacing target sequence with a random sequence fragment. Sequences of mutants and their function were analyzed. [**Results**] After local Shuffling and two cycle of screening, we gained seven mutants. Compared to the wild type, most of the mutant amino sequences showed obvious change, and had different change trend of CoQ production. Sequencing result showed that three aspartic acid sites may be highly related to UbiA catalyze activity. [**Conclusion**] The local Shuffling model we set up is feasible. By applying this model, we preliminary verified several location of key amino acid sites of UbiA.

Keywords: *ubiA* gene, Coenzyme Q, local DNA shuffling, temperature sensitive plasmid

(本文责编:王晋芳)

* Corresponding author. Tel: +86-21-64252515; Fax: +86-20-64252507; E-mail: huizhz@ecust.edu.cn

Received: 12 October 2010/ Revised: 31 December 2010