

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
54(1):97-103; 4 January 2014
ISSN 0001-6209; CN 11-1995/Q
http://journals.im.ac.cn/actamicrocn
doi: 10.13343/j.cnki.wsxb.2014.01.012

一种降低 dATP 用量的简单易错 PCR 方法

高义平^{1,2}, 赵和¹, 吕孟雨¹, 孙果忠¹, 杨学举^{2*}, 王海波^{1*}

¹河北省农林科学院遗传生理研究所, 河北省植物转基因中心, 河北 石家庄 050051;

²河北农业大学农学院, 河北 保定 071000

摘要: 易错 PCR 是基因体外诱变的主要方法之一, 是通过在 PCR 体系中添加 Mn^{2+} 、提高 Mg^{2+} 浓度和 dCTP/dTTP 浓度等措施达到基因诱变的目的。【目的和方法】本研究在不添加 Mn^{2+} 、不调整其它任何 PCR 成分的情况下, 通过降低 dATP 浓度的底物不平衡作用, 对洋葱抗菌蛋白基因 *Ace-AMPI* 和苏云金芽胞杆菌毒蛋白 (*Bt*) 基因 *cryIA(c)* 进行了 PCR 诱变。【结果】结果表明: 随着 dATP 浓度的降低, 序列变异率和碱基突变率均呈升高趋势。当 dTTP/dCTP/dGTP:dATP 在 20:1-40:1 时, 碱基突变率介于 1.4% - 1.8% 之间, 序列变异率介于 77.8% - 100% 之间。【讨论和结论】该方法简化了常规易错 PCR 诱变中的条件优化过程, 简单实用。降低 dATP 浓度的诱变方法主要引起 AT→GC 的变异, 适用于提高靶基因 GC 含量的体外诱变。本研究降低单一底物浓度的诱变方法可以提高诱变基因的 AT 或 GC 含量, 是对易错 PCR 诱变方法的拓展。

关键词: 易错 PCR, 体外诱变, 碱基突变, 序列变异, 洋葱抗菌蛋白基因, *Bt* 基因

中图分类号: Q93-3 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209(2014)01-0097-07

易错 PCR (error-prone PCR, epPCR) 作为一种简单、实用的基因体外诱变方法^[1], 是农业、工业和生物制药等领域获得优异基因的重要手段^[2-5]。易错 PCR 是通过在 PCR 体系中添加诱变介质, 降低 DNA 聚合酶的保真性, 来提高 PCR 产物的碱基错配率, 实现诱变目的^[6-7]。实验常用的诱变介质为 $MnCl_2$ 。 Mn^{2+} 是很多 DNA 聚合酶的诱变因子, 加入 Mn^{2+} 可以降低聚合酶对模板的特异性, 提高 PCR 产物错配率^[8-10]。醇的疏水性也是影响聚合酶构象的重要因素, 以醇为诱变介质, 在 PCR 体系中添加异丙醇、丙醇或丁醇, 也可以提高碱基的错配率^[11]。

尽管易错 PCR 技术已经较成熟, 但应用时需要

进行 Mn^{2+} 、 Mg^{2+} 、dNTPs、*Taq* DNA 聚合酶、模板、延伸时间、循环次数等多个条件的优化, 费时费力。dNTPs 浓度不平衡是影响 DNA 复制精确性的重要因素^[12-15]。本研究建立了一种只降低 dATP 浓度而不添加诱变介质、不改变其它任何 PCR 成分和条件的简单易错 PCR 诱变方法。该方法对洋葱抗菌蛋白基因 *Ace-AMPI* 和苏云金芽胞杆菌毒蛋白 (*Bt*) 基因 *cryIA(c)* 具有很好的诱变作用。

1 材料和方法

1.1 材料

含有 *Ace-AMPI* 基因的质粒 pAce 和含有 *cryIA(c)* 抗虫基因的质粒 pUCBt201 由本实验室保存。4

基金项目: 国家自然科学基金项目 (30270855)

* 通信作者。Tel: +86-311-87652006; E-mail: nkywanghb@163.com; E-mail: shmyxj@hebau.edu.cn

作者简介: 高义平 (1968-), 女, 河北高阳人, 主要从事植物转基因工作。E-mail: hebgyp@163.com

收稿日期: 2013-04-29; 修回日期: 2013-07-01

种分装的 dNTP 购自赛百盛生化试剂公司, 常规 PCR 试剂购自 TaKaRa 公司。克隆载体 pEASY-T1、感受态的大肠杆菌菌株 DH5 α 和 PCR 产物纯化试剂盒购自 TransGen 生物公司。引物合成与 PCR 产物测序由 invitrogen 公司完成。

1.2 降低 dATP 或 dCTP 浓度对 *Ace-AMP1* 基因的诱变

按常规 PCR 操作用量加入 10 \times buffer、*Taq* 酶、dCTP、dGTP、dTTP、模板质粒 pAce 和引物, 以及不同浓度的 dATP 对 *Ace-AMP1* 基因进行体外扩增。dCTP/dTTP/dGTP: dATP 按 1: 1、5: 1、10: 1、20: 1、40: 1 和 80: 1 的比例设置 6 个处理, 以水做为空模板对照 (CK) (表 1)。

降低 dCTP 浓度的 PCR 实验设计与之相同。变动之处在于, dATP、dGTP、dTTP 按常规用量加入, dCTP 按不同降低比例加入。

Ace-AMP1 基因片段的理论扩增长度为 411 bp,

表 1. 降低 dATP 浓度诱变 *Ace-AMP1* 基因的 PCR 体系 (μ L)

Table 1. The PCR ingredients for mutagenesis of *Ace-AMP1* gene through dATP reduction (μ L)

PCR ingredients	dATP reduction						CK
	A1	A2	A3	A4	A5	A6	
dCTP/dTTP/dGTP : dATP	1: 1	4: 1	10: 1	20: 1	40: 1	80: 1	1: 1
10 \times buffer	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0
primer (25 μ mol/L each)	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8
dCTP/dTTP/dGTP (5 mmol/L each)	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0
<i>Taq</i> (5 U/ μ L)	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4
pAce (5 pg/ μ L)	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	0
dATP (0.25 mmol/L)	40.0	10.0	4.0	2.0	1.0	0.5	40.0
ddH ₂ O	0	30.0	34.0	38.0	39.0	39.5	1.0
total	50.0	50.0	50.0	50.0	50.0	50.0	50.0

1.3 降低 dATP 浓度和常规 epPCR 对 *cryIA(c)* 基因的诱变

为了检测降低 dATP 浓度对长 DNA 片段的诱变效果, 对全长 1848 bp 的 *cryIA(c)* 基因进行了 PCR 诱变。PCR 上游引物 BtAcF: 5'-GGATCGA TGGACAACAACCC-3', 下游引物 BtAcR: 5'-CCGAAT TCTCATTGAGCCTC-3'。在 PCR 反应体系中, 含有 *cryIA(c)* 基因的 pUCBt201 质粒的模板浓度采用 50 pg/ μ L, 其它试剂用量同 *Ace-AMP1* 基因诱变处理。

常规 epPCR 的反应体系如下: 5 μ L 10 \times *Taq* buffer (不含 Mg²⁺); 14 μ L 25 mmol/L MgCl₂; 5 μ L 易错 dNTP 混合物 (2 mmol/L dGTP, 2 mmol/L

上游引物 Ace1F: 5'-TAAGGTACCATGGTTCCG GTTGTATC-3', 下游引物 Ace1R: 5'-CCGCATTGGA TCCCTTCATTGCTCAG-3'。PCR 程序如下: 94 $^{\circ}$ C 预变性 4 min; 94 $^{\circ}$ C 30 s, 58 $^{\circ}$ C 45 s, 72 $^{\circ}$ C 45 s, 30 个循环后, 72 $^{\circ}$ C 10 min, 4 $^{\circ}$ C 保存。

PCR 诱变分两轮完成。第一轮 PCR 用于基因的诱变, 第二轮 PCR 以第一轮 PCR 纯化产物作为模板进行正常 dNTP (平衡) 浓度的扩增, 用于诱变产物的富集。第二轮 PCR 结束后, 用 PCR 产物纯化试剂盒纯化扩增产物, 并连接到质粒 pEASY-T1 上, 转化大肠杆菌 DH5 α , 涂平板, 挑取阳性的白色单菌落进行测序。通过 DNAMAN 软件进行序列比对, 分析降低 dATP 浓度和降低 dCTP 浓度诱变的碱基和序列变异情况。碱基突变率 = (变异总碱基数/测序总碱基数) \times 100%; 序列变异率 = (变异序列数/测序序列数) \times 100%。

dATP, 10 mmol/L dCTP, 10 mmol/L dTTP); 0.8 μ L 25 μ mol/L BtAcF 和 BtAcR 的引物混合物; 2 μ L 50 pg/ μ L 质粒模板; 0.4 μ L 5U/ μ L *Taq* DNA 聚合酶; 0.5 μ L 10 mmol/L MnCl₂, 以 ddH₂O 将总体积补至 50 μ L。

常规 PCR 反应体系如下: 5 μ L 10 \times *Taq* PCR buffer (含 Mg²⁺); 4 μ L 2.5 mmol/L dNTP 混合物; 0.8 μ L 25 μ mol (BtAcF、BtAcR) 引物混合物; 2 μ L 50 pg/ μ L 质粒模板; 0.4 μ L 5U/ μ L *Taq* DNA 聚合酶, 以 ddH₂O 将总体积补至 50 μ L。

上述 3 个反应体系的 PCR 程序均为: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 94 $^{\circ}$ C 45 s, 58 $^{\circ}$ C 45 s, 72 $^{\circ}$ C 2 min, 30 个循环后, 72 $^{\circ}$ C 10 min, 4 $^{\circ}$ C 保存。

2 结果和分析

2.1 降低 dATP 浓度对 *Ace-AMPI* 基因 PCR 扩增的影响

本研究表明,随着 dCTP/dTTP/dGTP : dATP 比值的升高,PCR 产物量逐渐降低;A1 的 PCR 产物量最高,A4 的扩增产物在琼脂糖凝胶电泳中已难以分辨(图 1-A)。以第一轮 PCR 各处理的纯化产物连接载体、转化大肠杆菌,在蓝白斑筛选时 A4、A5、A6 处理的白斑很少,且难以检测到阳性克隆。虽然 A1、A2、A3、A4 处理在第一轮 PCR 中的产物量差异很大,但其第二轮 PCR 的产物量很相近。第二轮 PCR 的 A5、A6 产物量较小,但也达到了克隆筛选的需要量(图 1-B)。

2.2 降低 dATP 浓度可以提高 *Ace-AMPI* 碱基和序列变异率

随着 dATP 浓度的降低,碱基突变率和序列变异率都呈升高的趋势(表 2,图 2)。其中,A5 和 A6 两个处理的碱基突变率分别为 1.76% 和 1.94%,序列变异率均达到 100%。A4 处理的碱基突变率显

著高于 A3,表明 dCTP/dTTP/dGTP : dATP ≥ 20 : 1 时,诱变效果较好。A4 平均每个单克隆有 5.9 个碱基突变,4.2 个氨基酸变异;A5 平均每个单克隆有 6.5 个碱基突变,4.4 个氨基酸变异;A6 平均每个单克隆有 7.2 个碱基突变,5.8 个氨基酸变异(图 2)。

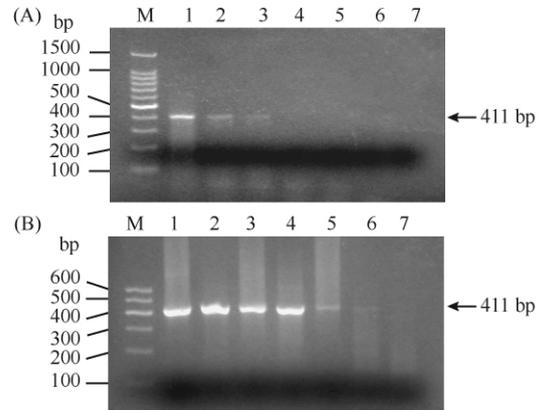


图 1. 降低 dATP 浓度的第一轮 PCR (A) 和第二轮 PCR (B) 扩增结果

Figure 1. Amplification of the 1st PCR (A) and the 2nd PCR (B) with reducing dATP concentrations. M: DNA marker; lane 1-7: A1, A2, A3, A4, A5, A6, CK.

表 2. 降低 dATP 浓度处理的碱基突变率和序列变异情况

Table 2. The rate of base mutation and sequence variation with different dATP concentrations

treatment	nucleotides sequenced /bp	base mutation rate /%	sequence variation rate /%	A•T→G•C	transitions
				G•C→A•T	transversions
A1	5535	0.11 ± 0.05	20.0	3.0	5.0
A2	5166	0.52 ± 0.15	85.71 ± 13.23	5.5	8.7
A3	5166	0.54 ± 0.19	78.57 ± 20.21	26.0	27.0
A4	5166	1.63 ± 0.36	92.86 ± 14.43	19.8	11.7
A5	2952	1.76 ± 0.26	100	21.5	7.5
A6	2583	1.94 ± 0.35	100	47.0	9.0

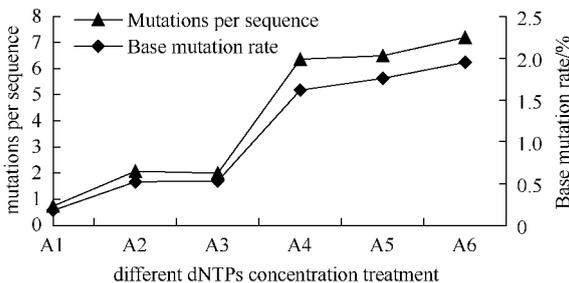


图 2. 不同 dATP 浓度处理的碱基突变和单序列碱基变异趋势

Figure 2. The tendency of base mutation and mutations per sequence with different dATP concentrations.

如表 3 所示,降低 dATP 浓度主要引起碱基 AT 向 GC 的转换突变,转换与颠换的比值高达 27.0 (表 2)。A→G 和 T→C 之和占全部总变异的 86.05%。

2.3 降低 dCTP 浓度与降低 dATP 浓度对 *Ace-AMPI* 基因的诱变效果比较

为了与 dATP 比较,对降低 dCTP 浓度的诱变效果也进行了分析。结果表明,随着 dCTP 浓度不断降低,序列变异率和碱基突变率都呈上升趋势(表 4)。但降低 dCTP 浓度的碱基诱变率显著低于降低 dATP 浓度诱变的碱基突变率(表 2,表 4)。

对降低 dCTP 浓度诱变的总的变异碱基进行分

析,结果表明,A•T→G•C/G•C→A•T 比值为1: 24。其中,G→A、C→T、G→T、A→G、C→A 突变分别占总突变数的 53.85%、30.77%、7.69%、3.85% 和

3.85%,即在全部突变中,G•C→A•T 为主要突变类型,占总变异的 84.62%。与降低 dATP 浓度引起的 A•T→G•C 碱基突变方向恰好相反。

表 3. 碱基变异趋势

Table 3. The trend of base mutations

direction of base mutations	A→G	T→C	A→X	T→X	G→X	C→X
proportion of Base mutation (%)	45.35	40.70	50.00	44.96	0.78	4.26

表 4. 不同 dCTP 浓度处理的碱基突变率和序列变异率

Table 4. The rate of base mutation and sequence variation with different dCTP concentrations

treatment	dATP/dTTP/dGTP: dCTP	nucleotides sequenced/bp	base mutation rate/%	sequence variation rate/%
C1	1:1	3339	0.03 ± 0.05	11.11 ± 14.43
C2	4:1	3710	0.05 ± 0.04	20.00 ± 17.35
C3	10:1	3710	0.16 ± 0.06	40.00 ± 9.6
C4	20:1	3339	0.27 ± 0.13	77.78 ± 19.25
C5	40:1	2968	0.54 ± 0.09	75.00 ± 19.25
C6	80:1	2968	0.67 ± 0.14	75.00 ± 25.47

2.4 降低 dATP 浓度对 *cryIA(c)* 基因的诱变效果及与常规 epPCR 的比较

为了进一步验证降低 dATP 浓度对长片段基因的诱变效果,我们以苏云金杆菌的 *cryIA(c)* 基因为靶序列进行了分析。实验结果表明,随着 dATP 浓度的降低,*cryIA(c)* 基因的 PCR 产物量逐渐降低(图 3)。测序结果分析显示,降低 dATP 浓度对 *cryIA(c)* 基因的诱变,随着 dATP 浓度的降低,碱基突变率和序列变异率呈升高趋势,序列变异率接近 100%,碱基突变率接近 2%(表 5)。B1 至 B6 六个

处理的单克隆碱基突变数分别为 0.55、9.98、20.70、24.95、30.31 和 37.70 个。降低 dATP 浓度对 *cryIA(c)* 基因诱变的序列变异率、碱基突变率和碱基突变方向与对 *Ace-AMPI* 的诱变结果一致。

对降低 dATP 浓度的诱变效果与常规 epPCR 进行比较,结果如表 5 所示,常规的 epPCR 的序列变异率和碱基突变率较降低 dATP 浓度引起的变异低,介于 B2 和 B3 之间。而且降低 dATP 浓度诱变的碱基突变具有 A•T→G•C 倾向。

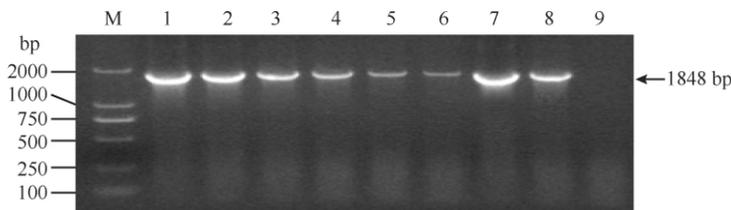


图 3. 不同 dATP 浓度处理和常规 epPCR 对 *cryIA(c)* 基因的扩增结果

Figure 3. Amplification of *cryIA(c)* gene with different dATP concentrations and compare with epPCR. M: DNA marker, lane 1-6: B1, B2, B3, B4, B5, B6, lane 7: general PCR, lane 8: epPCR, lane 9: negative CK of epPCR.

3 讨论

3.1 降低 dATP 浓度较常规 epPCR 诱变方法操作简单

本文明确了在其它条件不变的情况下,通过降低一种 dNTP 浓度,可以实现高频率的序列和碱基变异,尤其是降低 dATP 浓度,可以实现 2.0% 左右

的碱基诱变率、100% 的序列变异率,其中 A2、A3、A4、A5、B2、B3、B4、B5 处理的碱基突变率介于 0.52% - 1.76%,符合一般诱变有 1 - 5 个碱基突变的要求^[16],可以作为基因体外诱变方法使用。

与常规 epPCR 相比,降低 dATP 或 dCTP 浓度诱变操作简单,不需对 Mn^{2+} 、 Mg^{2+} 、*Taq* 酶等多种 PCR 成分进行优化,即可实现较理想的序列变异和碱基突变率,属首次报导。并且该方法避免了常规

epPCR 扩增大片段时(1000 bp 以上), 由于 Mg^{2+} 浓度提高, 引物与模板结合的严格性降低, 从而形成一些与目标片段不同长度的非特异扩增的情况^[17]。

表 5. 不同 dATP 浓度对 *cryIA(c)* 基因的诱变结果
Table 5. Mutagenesis of *cryIA(c)* gene with different dATP concentrations

treatment	dATP/dTTP/dGTP:	nucleotides sequenced/	base mutation	sequence variation	A•T→G•C
	dCTP	bp	rate/%	rate/%	G•C→A•T
B1	1:1	18, 480	0.03 ± 0.01	20.00 ± 17.35	4.0
B2	4:1	18, 480	0.54 ± 0.08	50.00 ± 16.67	9.0
B3	10:1	18, 480	1.12 ± 0.12	70.00 ± 4.8	23.0
B4	20:1	16, 632	1.35 ± 0.28	77.78 ± 19.25	12.7
B5	40:1	16, 632	1.64 ± 0.20	88.89 ± 19.25	26.0
B6	80:1	14, 784	2.04 ± 0.23	100.00	49
CK	-	16, 632	0.02 ± 0.02	11.11 ± 19.25	1.0
epPCR	-	18, 480	1.07 ± 0.24	60.00 ± 9.6	1.2

3.2 降低单一 dNTP 浓度的诱变方法适用于目标基因碱基含量的改造

目前常规的易错 PCR 方法, 以及试剂盒诱导的碱基变异基本没有变异偏好, 即 A•T→G•C 和 G•C→A•T 的变异比例相近。但有些时候, 我们恰恰需要特殊变异偏好的变异。在基因工程研究中, 当欲改造的目的基因与转化受体在碱基含量差异较大时, 本文的诱变方法就非常适宜。而采用常规的易错 PCR 可能会增加很大的筛库工作量。

在植物转基因中, GC 含量对于目标基因在受体植物中的 mRNA 稳定性^[18-19] 和基因表达量^[20-22] 有重要作用。例如, 在 Bt 基因早期的抗虫性改造过程中, 其 GC 含量由野生型的 37% 提高到 49% 时, 适应了植物偏爱高 GC 密码子含量的要求, 使改造后的基因在植物体内的蛋白表达量提高了 10-100 倍^[23]。本研究降低 dATP 浓度的诱变方法, 可显著提高了 DNA 的 GC 含量, 适用于诱变 GC 含量低的目标基因, 尤其可为植物基因工程研究中目标基因(如微生物来源的基因等)的定向改造提供参考; 降低 dCTP 浓度的诱变方法具有 G•C→A•T 的碱基变异特点, 当目标基因较转化受体 AT 含量低的时候, 可采用降低 dCTP 的方法进行诱变。

3.3 降低 dATP 浓度与常规 epPCR 诱变原理的比较

降低 dATP 单一底物浓度与常规 epPCR 的碱基错配率都在 2.0% 左右^[24], 形成这种情况的主要原因, 一是, epPCR 诱变作用是多个因素小作用的叠加效果, 降低 dATP 单一底物浓度通过提高 dNTP 的浓度差异, 能够放大底物浓度不平衡的作用效果, 增

加了不稳定 G•T 碱基对的几率^[14,25]。二是, 常规 epPCR 采用的 dNTP 浓度较高。一般为 1.0 mmol/L 的 dCTP/dTTP 和 0.2 mmol/L 的 dGTP/dATP。而本研究在 0.2 mmol/L 的常规 dNTP 用量的基础上降低了 dATP 用量。由于 PCR 体系中 dNTP 用量的降低, 在经过几个循环的 PCR 反应之后, dNTP 之间的浓度差异就会更大, 从而进一步放大了诱变作用, 引起碱基突变率提高。

3.4 降低 dATP 浓度与降低 dCTP 浓度诱变率存在差异的原因

降低 dATP 浓度诱变的碱基诱变率明显高于降低 dCTP 浓度的碱基诱变率, 这可能是由于四种碱基发生酮式、烯醇式或氨基式、亚胺式异构体的比例不同造成。在自然界发生的变异中, DNA 结构中的 4 个碱基, 也是以 A 发生变异的几率最高^[26]。

另外, 降低 dATP 导致大多数变异为 A•T→G•C 变异、降低 dCTP 导致大多数变异为 G•C→A•T 变异, 这一结论并不意味着降低 dATP 或 dTTP 都会导致 A•T→G•C 变异比率偏高、降低 dCTP 或 dGTP 都会导致 G•C→A•T 变异比率偏高。有研究显示, 在添加 Mn^{2+} 、提高 Mg^{2+} 浓度等条件下, dATP、dTTP、dCTP 浓度全部为 1.0 mmol/L, dGTP 浓度为 0.2 mmol/L 时, 产生了 A•T→G•C 的碱基变异偏好^[24]。

综上所述, 降低单一底物浓度 PCR 是一个较好的基因体外诱变方法, 是对 epPCR 诱变方法的拓展。在基因诱变实践中, 应根据不同诱变目的, 采用不同诱变方法。以碱基变异多样性的建库为目标的诱变宜采用经典易错 PCR 方法; 以提高 GC 含量或提高 AT 含量为目标的诱变, 可以采用降低 dATP 或

降低 dCTP 的 PCR 方法。

参考文献

- [1] Labrou NE. Random Mutagenesis for in Vitro Directed Enzyme Evolution. *Current Protein and Peptide Science*, 2010, 11 (1): 91-100.
- [2] Yao YX, Li YF, Hou SQ, Li CM, Chen H, Liao Y. Directed Evolution of Neutral Endoglucanase Gene by Error-prone PCR. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 2011, 19 (6): 1136-1143. (in Chinese)
姚友旭, 李雨霏, 侯晟琦, 李春梅, 陈惠, 廖燕. 基于易错 PCR 技术的中性内切葡聚糖酶基因的定向进化. *农业生物技术学报*, 2011, 19 (6): 1136-1143.
- [3] Su J, Chen J, Tian D, Zhu Z, Wang F. A gene encodes 5-enol-pyruvylshikimate-3-phosphate mutagenized by error-prone PCR conferred rice with high glyphosate-tolerance. *Molecular Plant Breeding*, 2008, 6 (5): 830-836. (in Chinese)
苏军, 陈建民, 田大刚, 朱祯, 王锋. Error-prone PCR 获得 EPSP 酶突变基因提高水稻的草甘膦抗性. *分子植物育种*, 2008, 6 (5): 830-836.
- [4] Zhang S, Xing K, Hu Y, Xie C, Liu D, Yao D. Directed evolution of aflatoxin detoxifzyme in vitro by error-prone PCR. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2011, 27 (7): 1100-1108. (in Chinese)
张赛, 邢克克, 胡亚东, 谢春芳, 刘大岭, 姚冬生. 基于易错 PCR 的黄曲霉毒素解毒酶体外分子定向进化. *生物工程学报*, 2011, 27 (7): 1100-1108.
- [5] Li Y, Jia H, Yan Q, Jiang Z, Yang S. Improvement of catalytic capability of *Paecilomyces thermophila* J18 thermostable β -1, 3-1, 4-glucanase under acidic condition by directed evolution. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2011, 27 (12): 1797-1804. (in Chinese)
李一男, 贾会勇, 闫巧娟, 江正强, 杨绍青. 定向进化提高嗜热拟青霉 J18 耐热 β -1, 3-1, 4-葡聚糖酶在酸性条件下的催化能力. *生物工程学报*, 2011, 27 (12): 1797-1804.
- [6] Patrick CC, Kimberly MM, Daisuke U. Generating mutant libraries using error-prone PCR. *Methods in Molecular Biology*, 2003, 231: 1-3.
- [7] Leung DW, Chen E, Goeddel DV. A method for random mutagenesis of a defined DNA segment using a modified polymerase chain reaction. *Technique*, 1989, 1: 11-15.
- [8] Beckman RA, Mildvan AS, Loeb LA. On the fidelity of DNA replication: manganese mutagenesis in vitro. *Biochemistry*, 1985, 24: 5810-5817.
- [9] Chaput JC, Woodbury NW, Stearns L A, Williams BAR. Creating protein biocatalysts as tools for future industrial applications. *Expert Opinion on Biological Therapy*, 2008, 8: 1087-1098.
- [10] Bernstein C, Bernstein H, Mufti S, Barbara S. Stimulation of mutation in phage T4 by lesions in gene 32 and by thymidine imbalance. *Mutation Research*, 1972, 16 (2): 113-119.
- [11] Claveau S, Sasseville M, Beauregard M. Alcohol-mediated error-prone PCR. *DNA and Cell Biology*, 2004, 23 (11): 789-795.
- [12] Kunkel TA, Loeb LA. On the fidelity of DNA replication, Effect effect of divalent metal ion activators and deoxyribonucleoside triphosphate pools on *in vitro* mutagenesis. *The Journal of Biological Chemistry*, 1979, 254: 5718-5725.
- [13] Fersht AR. Fidelity of replication of phage ϕ X174 DNA by DNA polymerase III holoenzyme: Spontaneous mutation by misincorporation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1979, 76 (10): 4946-4950.
- [14] Hibner U, Alberts B. Fidelity of DNA replication catalysed *in vitro* on a natural DNA template by the T4 bacteriophage multi-enzyme complex. *Nature*, 1980, 285: 300-305.
- [15] Shafikhani S, Siegel RA, Ferrari E, Schellenberger V. Generation of large libraries of random mutants in *Bacillus subtilis* by PCR-based plasmid multimerization. *Bio Techniques*, 1997, 23: 304-310.
- [16] Arnold FH, Wintrode PL, Miyataki K, Gershenson A. How enzymes adapt: lessons from directed evolution. *Trends in Biochemical Sciences*, 2001, 26: 100.
- [17] Cadwell RC, Joyce GF. Mutagenic PCR. *Genome research*, 1994, 3 (6): S136-140.
- [18] Murray EE, Lotzer J, Eberle M. Codon usage in plant genes. *Nucleic Acids Research*, 1989, 17 (2): 477-498.
- [19] Vinogradov AE. DNA helix: the importance of being GC-rich. *Nucleic Acids Research*, 2003, 31: 1838-1844.
- [20] Jia Q, Wu HT, Zhou XJ, Gao J, Zhao W, Aziz JD, Wei JS, Hou LH, Wu SY, Zhang Y, Dong XF, Huang YM, Jin WY, Zhu HJ, Zhao XH, Huang CH, Xing LP, Li LW, Ma J, Liu XY, Tao R, Ye SD, Song YG, Song LL, Chen GP, Du CL, Zhang XT, Li B, Wang YT, Yang W, Rishton G, Teng YY, Leng GQ, Li LF, Liu WX, Chen LJ, Liang QB, Li ZW, Zhang XQ, Zuo YJ, Chen W, Li HC, Hui MZ. A "GC-rich" method for mammalian gene expression: a dominant role of non-coding DNA GC

content in regulation of mammalian gene expression. *Science China: Life Sciences*, 2010, 40 (2): 159-165. (in Chinese)

贾茜, 吴洪涛, 周兴军, 高健, 赵伟, 阿奇思, 魏敬双, 候利华, 吴书音, 张莹, 董向锋, 黄艳敏, 金炜元, 朱红杰, 赵兴卉, 黄春华, 邢丽苹, 李丽文, 马骏, 刘西燕, 陶苒, 叶帅东, 宋义高, 宋玲玲, 陈冠平, 杜春玲, 张雪婷, 李博, 王延涛, 杨威, 吉尔伯特, 腾宇扬, 冷国庆, 李峦峰, 刘文献, 程立均, 梁秋波, 李郑武, 张秀芹, 左亚军, 陈薇, 李会成, 惠觅宙. 富含 GC 的 DNA 片段在哺乳动物细胞基因超高表达调控中的重要作用. *中国科学: 生命科学*, 2010, 40 (2): 159-165.

- [21] Bernardi G. Isochores and the evolutionary genomics of vertebrates. *Gene*, 2000, 241: 3-17.
- [22] Perlak FJ, Fuchs RL, Dean DA, McPherson SL, Fischhoff

DA. Modification of the coding sequence enhances plant expression of insect control protein genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1991, 88 (8): 3324-3328.

- [23] Guo SD. Engineering of insect-resistant plant with *Bacillus thuringiensis* crystal protein genes. *Scientia Agricultura Sinica*, 1995, 28 (5): 8-13. (in Chinese)
- 郭三堆. 植物 Bt 抗虫基因工程研究进展. *中国农业科学*, 1995, 28 (5): 8-13.
- [24] Cadwell C, Joyce GF. Randomization of genes by PCR mutagenesis. *Genome research*, 1992, 2: 28-33.
- [25] 沈同, 王镜岩. 生物化学. 第二版. (上册). 北京: 北京高等教育出版社, 2002: 337-338.
- [26] 柴建芳. 1B/1R 易位系小麦中 ω -黑麦碱基因的研究. 中国农业科学院博士学位论文, 2006, p31.

A simple error-prone PCR method through dATP reduction

Yiping Gao^{1, 2}, He Zhao¹, Mengyu Lv¹, Guozhong Sun¹, Xueju Yang^{2*}, Haibo Wang^{1*}

¹Plant Genetic Engineering Center of Hebei Province, Institute of Genetics and Physiology, Hebei Academy of Agricultural and Forestry Sciences, Shijiazhuang 050051, Hebei Province, China

²College of Agriculture, Agricultural University of Hebei, Baoding 071001, Hebei Province, China

Abstract: The error-prone PCR is one of the main methods for *in vitro* gene mutagenesis, usually through adding Mn^{2+} , increasing Mg^{2+} and dCTP/dTTP concentration. **[Objective and Methods]** In this study, both the antifungal protein gene *Ace-AMPI* from *Allium cepa* and the Bt toxin gene *cryIA (c)* from *Bacillus thuringiensis* were subjected to PCR mutagenesis through reducing the dATP concentration, but without adding Mn^{2+} or adjusting other PCR components.

[Results] The result showed that the rates of base mutation and sequence variation were increased along with the decrease of dATP concentrations. When dTTP/dCTP/dGTP:dATP equaled 20:1-40:1, the rate of base mutation was between 1.4% and 1.8%, and the rate of sequence variation was between 77.8% and 100%. **[Discussion and Conclusion]** This method is simple and practical, and enables the process optimization of several mutagenic factors in conventional error-prone PCR. Moreover, as the resulting base mutations were mainly A•T→G•C transition, the present method provides a new way to improve the GC content of gene by *in vitro* mutagenesis. The mutagenesis method of simply reducing single dNTP concentration could improve AT or GC content of the target gene, it is an expansion of error-prone PCR.

Keywords: Error-prone PCR, *In vitro* mutagenesis, Base mutation, Sequence variation, *Ace-AMPI*, *Bt*

(本文责编: 张晓丽)