

# 基于易错 PCR 技术的短小芽孢杆菌 YZ02 脂肪酶基因 BpL 的定向进化

黄瑛, 蔡勇, 杨江科, 闫云君

分子生物物理教育部重点实验室, 华中科技大学生命科学与技术学院, 武汉 430074

**摘要:** 利用易错 PCR 技术对短小芽孢杆菌(*Bacillus pumilus*)YZ02 脂肪酶基因 BpL 进行两轮定向进化研究, 分别获得最佳突变株 BpL1-7 和 BpL2-1369, 其脂肪酶活力比出发酶分别提高了 2 倍和 6 倍。序列分析表明, 突变体 BpL2-1369 有 4 个碱基发生了突变: T61C/C147T/A334G/T371A, 其中有 3 个碱基突变导致了氨基酸的改变。通过 SWISS-MODEL 数据库模拟脂肪酶的结构显示, 3 个突变氨基酸分别位于第 1 个 $\alpha$ 螺旋的第 3 个氨基酸、第 4 和第 5 个 $\beta$ 折叠之间的转角以及第 5 个 $\beta$ 折叠的第 1 个氨基酸位置。将野生型脂肪酶基因 BpL 和进化后的基因 BpL2-1369 的高效表达产物经 Ni-Agarose 柱和 Sephadex-G75 纯化后, 酶学性质测定表明: 突变脂肪酶的比活力比野生型脂肪酶提高了 1.31 倍,  $K_m$  值由 8.24 mmol/L 降低至 7.17 mmol/L; 在 pH>8.0 时的稳定性较野生型脂肪酶有所提高。

**关键词:** 短小芽孢杆菌, 脂肪酶, 定向进化, 易错 PCR

## Directed Evolution of Lipase of *Bacillus pumilus* YZ02 by Error-prone PCR

Ying Huang, Yong Cai, Jiangke Yang, and Yunjun Yan

Key Laboratory of Molecular Bio-physics, College of Life Science and Technology, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430074, China

**Abstract:** Random mutagenesis on *Bacillus pumilus* lipase YZ02 gene was conducted by using error-prone PCR strategy. Through two cycles of directed evolution, two optimum mutants BpL1-7 and BpL2-1369 with lipase activity improved 2 folds and 6 folds respectively were screened. The sequence of BpL2-1369 lipase gene showed that four nucleotides substitution, T61C, C147T, A334G and T371A have occurred, and three of them caused amino acid changes. Thus, amine acid Ser21 was changed into Pro21, Arg112 to Gly112, and Leu124 to His124. According to the 3D structure of *Bacillus pumilus* lipase mimicked by SWISS-MODEL Repository, three mutated amino acids were located at the third amino acid of the first  $\alpha$ -helix, the turn between the fourth and fifth  $\beta$  fold, and the first amino acid of the fifth  $\beta$  fold, respectively. The BpL and BpL2-1369 genes were ligated into pET28a vector, and transferred into *E. coli* BL21 (DE3). After induced by IPTG, the lipases were purified and characterized. The results showed that the specific activity of the evolved lipase was 1.31-fold than that of the wild lipase, and the  $K_m$  decreased from 8.24 mmol/L to 7.17 mmol/L. The pH stability of the evolved lipase was better than wild lipase when pH>8.0.

**Keywords:** *Bacillus pumilus*, lipase, directed evolution, error-prone PCR

Received: July 6, 2007; Accepted: September 5, 2007

Supported by: the National High Tech Program (No. 2006AA020203, No. 2007AA05Z417) and Key Project of Wuhan (No. 200720422138).

Corresponding author: Ying Huang and Yunjun Yan. Tel: +86-27-87792214; Fax: +86-27-87792213; E-mail: huangyin588@sina.com.cn; yanyunjun@tom.com

国家十一五“863”计划(No. 2006AA020203, No. 2007AA05Z417)和武汉市政关计划(No. 200720422138)资助。

脂肪酶(EC 3.1.1.3)是一类在食品、医药、制革、有机合成和生物能源等领域有着广泛的用途的工业用酶。芽胞杆菌脂肪酶具有分子量小、表达分泌能力强、非水相体系酶学性质突出等的优点,是当前脂肪酶研究领域的热点之一<sup>[1-3]</sup>。同时,作为天然酶蛋白,其稳定性、底物亲合性等酶学性质均有待进一步提高。因此,利用分子进化的手段对脂肪酶分子进行改造,改善其酶学性质,就显得越发重要。定向进化属于蛋白质的非理性设计,不需事先了解蛋白质的结构、活性位点以及催化机制等,而是通过模拟自然进化机制,在体外对酶基因进行广泛的突变,产生基因多样性,再结合定向筛选(或选择),获得具有某些预期特征的进化酶。易错 PCR 以其操作简便、有效等优点成为目前应用最为广泛的进化手段之一<sup>[4,5]</sup>。

国外在芽胞杆菌脂肪酶基因的克隆、基因工程菌的构建及体外进化等方面均取得了较大的进展<sup>[2,3]</sup>。国内在产脂肪酶菌株的分离、芽胞杆菌脂肪酶的纯化、酶学性质以及基因克隆、表达等方面的研究取得了一定的进展,但在短小芽胞杆菌脂肪酶的研究方面报道较少,且未见该酶用于工业化生产的报道<sup>[6]</sup>。本研究拟通过易错 PCR 技术对短小芽胞杆菌脂肪酶进行体外定向进化,以期获得比酶活大幅提高、酶活性质有所改善的突变酶,为该酶的规模化生产奠定基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 菌株和质粒

质粒 pMD18-T 购自大连宝生物公司,质粒 pET28a 和宿主菌 *E. coli* BL21(DE3) 购自 Novagen 公司(Wisconsin, USA),质粒 pUC18、*E. coli* DH5 $\alpha$  和短小芽胞杆菌脂肪酶基因 BpL(GenBank 登录号: DQ339137)为本实验室克隆。

#### 1.1.2 培养基

LB 培养基, M<sub>9</sub> 营养缺陷型培养基(加入 4% 的橄榄油乳化液), SOB 和 SOC 培养基的配方参见文献<sup>[7]</sup>。RB 培养基(1000 mL LB 培养基中加入 20 mL 0.2%(W/V) 罗丹明 B 和 40 mL 橄榄油乳化液, pH 自然)用于突变株的初步筛选。

#### 1.1.3 酶和试剂

限制性内切酶、T4 DNA 连接酶、Taq DNA 聚

合酶、Ni-NTA agarose、Sephadex G-75、DL-3000 和 DL-5000 DNA marker 购自大连宝生物公司; PCR 纯化试剂盒及质粒纯化试剂盒购自 QIAGEN 公司; 其他试剂均为国产分析纯。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 易错 PCR 扩增与突变文库的构建

根据已知的短小芽胞杆菌 YZ02 的脂肪酶基因 BpL 设计引物 plsb(5'-CTT GAA TTC GAT TAG AGT CGT ATA AGA TG-3', *EcoR* I) 和 plab (5'-CTT GGT ACC TTA ATT CGT ATT CTG TCC TC-3', *Kpn* I)。所扩增的片段为 BpL 全长(690 bp, 含启动子)。

以含 BpL 基因的质粒 DNA 作为模板, 进行易错 PCR 扩增。每 100  $\mu$ L 反应体系为: 10  $\mu$ L 10 $\times$ 易错 PCR 缓冲液(500 mmol/L KCl, 70 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 100 mmol/L Tris-HCl pH8.3, 0.1%(W/V) 明胶); 10  $\mu$ L 10 $\times$  dNTP 混合物(2 mmol/L dGTP, 2 mmol/L dATP, 10 mmol/L dCTP 和 10 mmol/L dTTP); 引物 plsa 和 plsb 各 30 pmol; 10  $\mu$ L 的 5 mmol/L MnCl<sub>2</sub>; 质粒 DNA 模板 20 pmol; Taq DNA 聚合酶为 5 u, 再加入灭菌的超纯水至总体积为 100  $\mu$ L。PCR 程序为: 95 $^{\circ}$ C 5 min; 94 $^{\circ}$ C 30 s, 52 $^{\circ}$ C 1 min, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10 min。

将 PCR 产物以 0.8%(W/V) 的琼脂糖凝胶电泳, 用 PCR 纯化回收试剂盒进行纯化回收。纯化后的易错 PCR 产物与 pMD18-T 载体连接, 转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$  超级感受态细胞, 涂布 LB(含 100  $\mu$ g/mL 的 Amp) 平板, 挑选具有插入片段的克隆, 组成突变文库。

#### 1.2.2 阳性克隆的筛选和鉴定

将所有转化子挑取至 RB 平板, 于 37 $^{\circ}$ C 培养 24 h 后, 选取有变色现象的转化子。分别接种到 3 mL LB 培养基(含 100  $\mu$ g/mL 氨苄青霉素), 37 $^{\circ}$ C 剧烈振荡至 OD<sub>600</sub> 约 0.6, 各吸取 3  $\mu$ L 菌液滴至罗丹明 B 平板, 37 $^{\circ}$ C 培养 12~24 h 后可见明显变色现象。选取变色快和变色圈大的克隆与原始菌株进行 M<sub>9</sub> 培养基液体发酵, 在 25 $^{\circ}$ C 下发酵 72 h 后超声波破碎细胞, 离心收集发酵上清液, 用 pNPP 法<sup>[8]</sup>测定脂肪酶活力, 比较酶活力高低。高酶活力突变株经过酶切及 PCR 验证后由上海英骏公司进行序列测定。

#### 1.2.3 脂肪酶的诱导表达和分离纯化

以野生型菌株和高酶活力突变株质粒 DNA 为

模板, 以 plsa(5'-CA CAT ATG AAA GTG ATG TTT GTT AAG-3', *Nde* I)和 plaa(5'-CTT GAA TTC TTA ATT CGT ATT CTG TCC TC-3', *Eco*R I)为引物扩增不含启动子的野生脂肪酶和突变脂肪酶基因。将扩增产物与经 *Nde* I 和 *Eco*R I 双酶切的质粒 pET28-a 连接并转化 *E. coli* BL21。低温下经 IPTG 诱导表达后超声波破碎细胞, 离心收集上清液, 用 Ni-NTA agarose 柱和 Sephadex G-750 柱纯化。

#### 1.2.4 蛋白质含量测定及脂肪酶酶学性质的研究

蛋白质的含量采用 Bradford 法<sup>[9]</sup>进行测定。纯化后的脂肪酶用于  $K_m$  值测定及 pH 和热稳定性研究,  $K_m$  值的测定采用双倒数作图法<sup>[11]</sup>进行。

#### 1.2.5 短小芽孢杆菌脂肪酶的结构预测和突变位点分析

在脂肪酶工程数据库 (<http://www.led.uni-stuttgart.de>) 查找短小芽孢杆菌脂肪酶的同源序列并进行比对; 根据比对结果选择脂肪酶结构模拟的模板; 在 SWISS-MODEL 数据库 (<http://swissmodel.expasy.org/repository>) 输入目的蛋白的氨基酸序列和模板的编号, 生成模拟结构图<sup>[10]</sup>。根据预测的结构信息, 分析其位点突变效应<sup>[10]</sup>。

## 2 结果

### 2.1 易错 PCR 条件的确定

由于  $Mg^{2+}$  在 PCR 过程中可以稳定非互补的碱基对;  $Mn^{2+}$  能够降低聚合酶对模板的特异性, 因而调整两种离子的浓度, 可以获得不同突变频率的多样性文库。本研究选择  $Mg^{2+}$  浓度为 1、3、5、7 mmol/L,  $Mn^{2+}$  浓度为 0、0.5、1 mmol/L 作为梯度进行易错 PCR 实验。PCR 结果如图 1 所示。

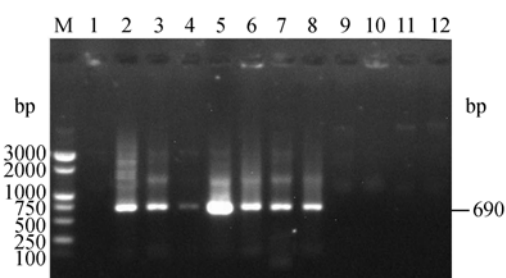


图 1 不同离子浓度下的易错 PCR

Fig. 1 Error-prone PCR conducted with different ion concentration

M: DNA marker; Lane 1~4: 1 mmol/L, 3 mmol/L, 5 mmol/L, 7 mmol/L  $Mg^{2+}$ , no  $Mn^{2+}$ ; Lane 5~8: 1 mmol/L, 3 mmol/L, 5 mmol/L, 7 mmol/L  $Mg^{2+}$ , 0.5 mmol/L  $Mn^{2+}$ ; Lane 9~12: 1 mmol/L, 3 mmol/L, 5 mmol/L, 7 mmol/L  $Mg^{2+}$ , 1 mmol/L  $Mn^{2+}$

从图 1 可知,  $Mn^{2+}$  最适浓度为 0.5 mmol/L。在最适  $Mn^{2+}$  浓度下, 不同  $Mg^{2+}$  浓度均能有效扩增目的基因。考虑到  $Mg^{2+}$  浓度较低时, 突变率也较低。因而选择较高的  $Mg^{2+}$  浓度 7 mmol/L。

### 2.2 基因扩增和突变体文库的构建及突变株的筛选和鉴定

在确定的易错 PCR 条件下扩增脂肪酶基因, 产物经纯化后连接到 pMD18-T 载体上, 转化 *E. coli* DH5 $\alpha$  超级感受态细胞(图 2)。本研究每轮定向突变获得到转化子 5000~6000 株, 所有转化子构成突变体文库。随机挑取 10 个克隆进行序列分析, 表明在该条件下, 碱基的突变率为 4.82%, 达到构建突变体库的频率要求。

#### 2.2.1 初筛

突变体库的转化子经 PA 瓶培养后, 相同 OD 值的等量菌体滴至罗丹明 B 平板, 37°C 培养约 24 h 后出现明显变色荧光圈(图 2)。根据荧光圈的大小和荧光的强弱, 初步筛选出酶活有较大幅度提高的突变株(图中箭头所指部位)。

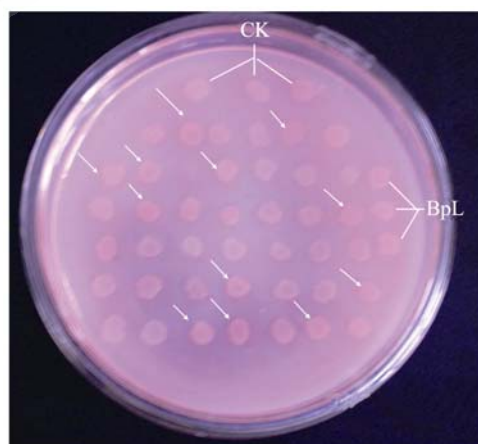


图 2 罗丹明 B 平板初筛结果

Fig. 2 The screening result in Rhodamine B plates

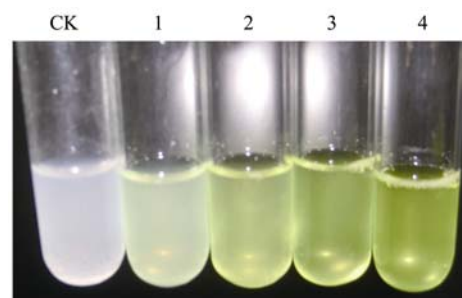


图 3 野生酶和进化酶的酶活测定

Fig. 3 Activity of wild and evolved enzymes

1: BpL; 2: BpL1-7; 3~4: BpL2-1369

### 2.2.2 复筛

将初筛获得的克隆子 1%接种量接种于 M<sub>9</sub> 培养基(含 100 μg/mL 氨基青霉素和 4%橄榄油乳化液), 于 25°C 振荡培养 72 h, 超声破碎菌体并离心收集上清液。以 pNPP 为水解底物, 于 45°C 测定脂肪酶水解活力。经第一轮进化后, 获得最佳突变体 BpL1-7, 其脂肪酶水解活力为 21.5 IU/mL, 相比野生型脂肪酶的 10.5 IU/mL 提高了 2.0 倍。以该突变体 BpL1-7 为模板进行第二轮进化, 通过初筛行复筛后, 获得最佳突变体 BpL2-1369, 脂肪酶水解活力为 63.5 IU/mL 比野生型脂肪酶提高了 6.0 倍(图 3)。

### 2.2.3 突变基因的序列分析

突变基因的序列分析表明, BpL2-1369 基因共有 4 个碱基发生了突变, 其中有 3 个是转换, 只有 1 个是颠换; 3 个转换中有 2 个发生在 T、C 之间, 1 个发生在 A、G 之间(表 1)。

表 1 突变体的测序结果

Table 1 Sequencing results of the mutants

Mutants	Mutated nucleotide bases	Mutated amino acids
BpL1-7	C147T/T371A	Same sense mutation /Leu124His
BpL2-1369	T61C/C147T/A334G/T371A	Ser21Pro/same sense mutation/Arg112 Gly/Leu124His

### 2.4 脂肪酶的诱导表达和分离纯化

以 p<sub>lsa</sub> 和 p<sub>laa</sub> 为引物扩增不含启动子的脂肪酶基因(长度为 648 bp), 用限制性内切酶 *Nde* I 和 *Eco*R I 双酶切基因片段和 pET28a 载体, 连接并获得 pET28a-BpL 和 pET28a-2-1369 重组质粒。转化 *E. coli* 并经 IPTG 诱导, 脂肪酶基因得到了高效表达。诱导产物经 Ni-NTA Agarose 初步纯化, 并经透析脱盐后再经 Sephadex G-75 凝胶柱分离纯化获得脂肪酶纯酶(图 4 和表 2)。从表 2 可见, 进化酶的比活力比野生酶提高了 1.31 倍。随后的  $K_m$  值测定显示, 突变酶对于底物的亲和性增强了。

### 2.5 脂肪酶的酶学性质分析

#### 2.5.1 酶动力学分析

野生型脂肪酶 BpL 和突变脂肪酶 BpL2-1369 酶学动力学参数( $K_m$ )见图 5。由图可见, 脂肪酶 BpL 和脂肪酶 BpL2-1369 的  $K_m$  值分别为 8.24 mmol/(min·mg) 和 7.17 mmol/(min·mg)。表明突变脂肪酶对底物的亲和力增强, 比活力提高。

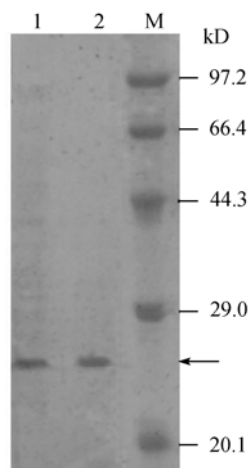


图 4 纯化后的脂肪酶 BpL 和 BpL2-1369 的 SDS-PAGE 分析

Fig. 4 SDS-PAGE of purified lipases BpL and BpL2-1369  
1: BpL; 2: BpL2-1369

表 2 进化脂肪酶和野生脂肪酶的纯化效率

Table 2 Purification of evolved lipase and wild lipase

Steps	Total protein /mg	Total activity /u	Activity /u/mg	Recovery ratio /%	Purified ration
BpL2-1369					
Crude enzyme	433.5	81240.6	187.41	100	1
Ni-NTA agarose	2.64	26053.9	9868.90	32.07	52.66
Sephadex G-75	1.83	22755.5	12434.70	28.01	66.35
BpL					
Crude enzyme	347.1	78256.6	225.46	100	1
Ni-NTA agarose	2.11	18545.1	8789.15	23.70	38.98
Sephadex G-75	1.78	16912.2	9501.24	21.61	42.14

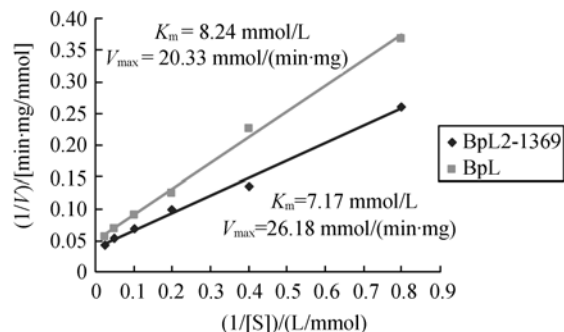


图 5 BpL2-1369 脂肪酶和 BpL 脂肪酶的  $K_m$  值

Fig. 5 The  $K_m$  value of BpL2-1369 and BpL

#### 2.5.2 最适温度及温度稳定性

突变脂肪酶 BpL2-1369 和野生型脂肪酶 BpL 的最适反应温度和温度稳定性见图 6 和图 7。

从图 6 可见, 突变酶 BpL2-1369 的最适反应温度为 45°C, 野生酶的最适温度为 40°C; 在 35~45°C 温度范围内, 脂肪酶的相对酶活均维持在 80% 以上。由图 7 可见, 两者在温度稳定性方面没有明显变化。

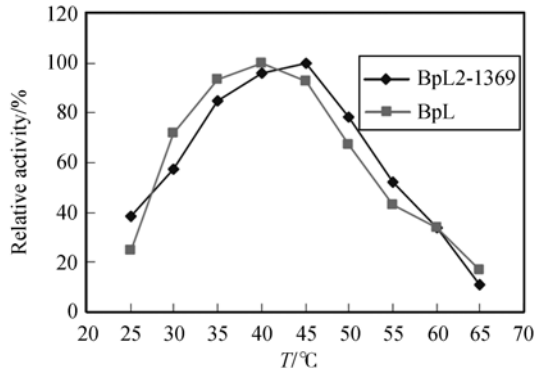


图 6 BpL2-1369 和 BpL 的最适温度

Fig. 6 The optimum temperature of BpL2-1369 and BpL

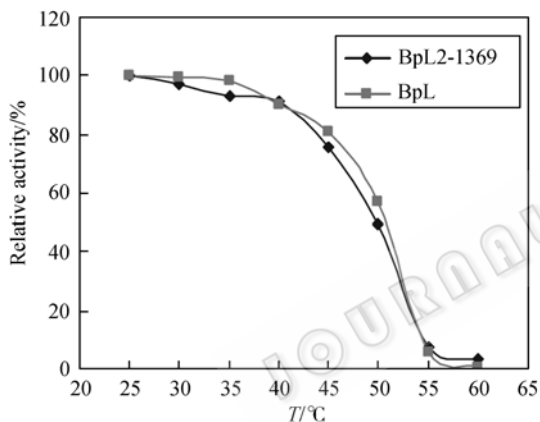


图 7 BpL2-1369 和 BpL 的温度稳定性

Fig. 7 The stability of BpL2-1369 and BpL over temperature

### 2.5.3 最适 pH 及 pH 稳定性

突变脂肪酶 BpL2-1369 和野生型脂肪酶 BpL 最适 pH 和 pH 稳定性见图 8 和图 9。由图 8 可知, 两者的最适 pH 没有明显差异, 均为 pH8.5; 由图 9 可见, 在 pH>8.0 时, 突变酶 BpL2-1369 的 pH 稳定性高于野生酶 BpL; 但在 pH<8.0 时, 突变酶 BpL2-1369 的 pH 稳定性则低于野生酶 BpL。

### 2.6 短小芽孢杆菌脂肪酶的结构预测和突变位点分析

通过同源序列比对, 在脂肪酶工程数据库 (Lipase Engineering Database) 选择与短小芽孢杆菌脂肪酶(AAR84668)氨基酸同源性的为 81% 的枯草芽孢杆菌脂肪酶(116WB)作为同源模板, 通过 SWISS-MODEL REPOSITORY 进行结构预测, 生成模拟二

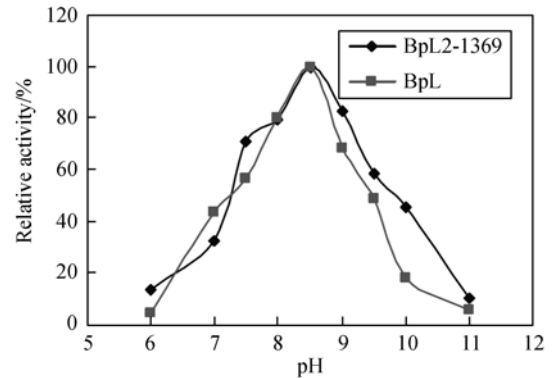


图 8 BpL2-1369 和 BpL 的最适 pH

Fig. 8 The optimum pH of BpL2-1369 and BpL

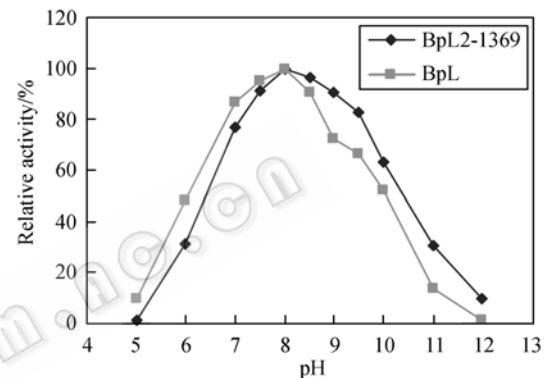


图 9 BpL2-1369 和 BpL 的 pH 稳定性

Fig. 9 The stability of BpL2-1369 and BpL over pH

级结构(图 10)和三级结构模式图(图 11)。

由模拟的结构信息可知, 短小芽孢杆菌脂肪酶的二级结构由 5 个  $\alpha$  螺旋和 6 个  $\beta$  折叠构成, 与枯草芽孢杆菌脂肪酶二级结构基本相同。

3 个改变的氨基酸中, Ser21 在空间结构上靠近由 10~15aa 和 131~137aa 组成的两个环状结构所形成的活性中心<sup>[2]</sup>, 这一位置的氨基酸由亲水的 Ser 突变为疏水的 Pro, 可能造成了该位点对油脂底物的结合能力增强。Leu124 则与催化三联体的 Asp133 在空间结构上邻近, 均位于第 5 个  $\beta$  折叠, 我们推测, 该位点的氨基酸突变为带正电的 His 后, 与底物  $\alpha$ -COOH 的羰基氧作用, 一方面进一步提高了酶与底物的亲和力, 另一方面更加稳定了底物的负电状态, 从而引起了进化酶  $K_m$  值的下降。Arg112 突变为 Gly 则可能与该酶 pH 稳定性的变化有关: Arg 具有一条长的侧链, 具有一定的柔性, 而这种柔性会带来一定的熵效应, 突变为 Gly 后, 这种熵效应消失。我们推测这种变化可能是造成进化酶 pH 稳定性改变的原因。

TARGET	2	EHNPVVMV HGIGG&SYNF FSIKSYLVGQ GWDRNQLYAI DFIDKTGMNR
li6wB	2	ehnpvvmv hgiggasfnf agiksyivsqs gwsrdklyav dfwdktgtnt
TARGET		sssss ss h hhhhhhhhhh sssss hh
li6wB		sssss ss h hhhhhhhhhh sssss hh
TARGET	50	MNGPRLSRFV KDVLDKTGAK KVDIV&HSMG GANTLYYIKN LDGGDKIENV
li6wB	50	nngpvlrsfv qkvldetgk kvdivahsmg gantlyyikn ldggnkvanv
TARGET		hhhhhhhhhh hhhhhhh ssssssh hhhhhhhhhh sss
li6wB		hhhhhhhhhh hhhhhhh ssssssh hhhhhhhhhh sss
TARGET	100	VTIGGANGLV SSRALPGTDP NQKILYTSVY SSADLIVVNS LSRLIGARNV
li6wB	100	vtlgganrlt tgkalpgtdp nqkilytsiy ssadmimny lsrlidgarnv
TARGET		ssss ssssss ss h hh sss
li6wB		ssss ssssss ss h hh sss
TARGET	150	LIHGVGHIGL LTSSQVKGVI KEGLNGGGQN TN
li6wB	150	qihgvghigl lyssqvnsli keglngggqn tn-
TARGET		ss hhhh hhhhhh hhhh
li6wB		ss hhhh hhhhhh hhhh

图 10 短小芽胞杆菌脂肪酶的模拟二级结构

Fig. 10 Secondary structure of simulated *Bacillus pumilus* lipase

图 11 短小芽胞杆菌脂肪酶的模拟三级结构

Fig. 11 3D structure of simulated *Bacillus pumilus* lipase

### 3 讨论

本实验室自主克隆到一株短小芽胞杆菌脂肪酶基因, 该基因开放阅读框为 648 bp, 成熟蛋白质仅 181 个氨基酸残基, 适合做易错 PCR 研究(<800 bp)<sup>[3]</sup>。本研究拟定的多轮(易错 PCR→筛选)<sub>n</sub>这一方案。易错 PCR 方法操作简单, 容易引入点突变, 突变频率高于传统的物理和化学诱变, 是目前定向进化领域最为常用的随机突变手段。本研究中, BpL 基因经两轮进化后, 共有 4 个碱基发生了突变, 其中转换多于颠换, 表明在易错 PCR 过程中, 碱基的突变确实具有一定的偏向性; T、C 间的转换多于 A、G 间的转换, 可能与易错 PCR 过程中 dCTP 和 dTTP 两种脱氧核苷酸的含量高于其他两种有关。

定向进化可行性的一个前提就是合理的控制突变文库的大小。易错 PCR 过程中突变率一般为 1.5~5

个碱基每个基因<sup>[4,5]</sup>, 对应的氨基酸突变数为 1~2 个。短小芽胞杆菌成熟脂肪酶仅含 181 个氨基酸残基。对于这样一个小的脂肪酶分子而言, 如果每轮仅 1 个氨基酸发生突变, 则突变文库量仅需要  $19 \times 181 = 3439$ , 如果每轮有 2 个氨基酸发生突变, 则文库量为  $19^2 \times 181 \times 180 = 1.18 \times 10^7$ 。Miyazaki 等<sup>[11]</sup>通过计算统计发现, 在易错 PCR 过程中, 平均只有 5.7 个氨基酸可能通过点突变产生, 因此所需文库量远小于理论值。本研究过程中, 每轮突变筛选文库量为 5000~6000, 从筛选到的 12 株突变体测序结果可知, 产生的氨基酸突变数多数(10 株)在 1 个以下, 只有少数突变体的氨基酸突变数在 2 个以上。点突变率比较合适, 文库量基本达到筛选要求。

本研究采用平板初筛与 pNPP 测酶活相结合的方法对高活力突变株定向选择。在罗丹明 B 平板上, 橄榄油水解产物可与罗丹明 B 结合成发橙色荧光的化合物, 在细胞周围形成变色圈, 变色的快慢和明显程度与产生脂肪酶的多少和活力高低呈一定的正相关。因此, 橄榄油-罗丹明 B 平板法具有高效快捷的特点, 适于高能量的筛选。另外, pNPP 法与分光光度计和酶标仪结合后可以批量的对各克隆子的酶活进行定量的比较测定, 且准确可靠。

### REFERENCES

- [1] Zhang J, Guan R, Tan Z, *et al.* Purification and properties of

- lipases/esterases from a *Bacillus* strain for enantioselective resolution of (S)-Ketoprofen. *Artificial Cells, Blood Substitutes, and Biotechnology*, 2005, **33**(4): 435-445.
- [2] Rasool S, Johri S, Riyaz-ul-Hassan S, *et al.* Molecular cloning of enantioselective ester hydrolase from *Bacillus pumilus* DBRL-191. *FEMS Microbiology Letters*, 2005, **249**: 113-120.
- [3] van Pouderoyen G, Eggert T, Jaeger K-E, *et al.* The crystal structure of *Bacillus subtilis* lipase: a minimal  $\alpha/\beta$  hydrolase fold enzyme. *Journal of Molecular Biology*, 2001, **309**: 215-226.
- [4] Cadwell RC, Joyce GF. Mutagenic PCR. *PCR Methods Application*, 1994, **3**(6): S136-140.
- [5] Moore JC, Jin HM, Kuchner O, *et al.* Strategies for the *in vitro* evolution of protein function: enzyme evolution by random recombination of improved sequences. *Journal of Molecular Biology*, 1997, **272**(3): 336-347.
- [6] Yang JK, Shu ZY, Yan YJ. Cloning and expression of lipase gene from *Bacillus pumilus* YZ02. *Science Research Monthly*, 2006, **17**: 123-125.  
杨江科, 舒正玉, 闫云君. 短小芽孢杆菌 (*Bacillus pumilus*) YZ02 脂肪酶基因的克隆与表达. 科学研究月刊, 2006, **17**: 123-125
- [7] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd ed, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- [8] Frédéric B, Ali T, Claude R, *et al.* Methods for lipase detection and assay: a critical review. *Europren Journal of Lipid Science and Technology*, 2000, **2**:133-153.
- [9] Yang AG, Mao JF, Yao LB. *Biochemistry and Molecular Biology Protocol*. High Education Press, Beijing, 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. 高等教育出版社, 北京, 2001, 255-257.
- [10] Kopp J, Schwede T. The SWISS-MODEL repository of annotated three-dimensional protein structure homology models. *Nucleic Acids Research*, 2004, **32**: D230-234.
- [11] Miyazaki K, Arnold FH. Exploring nonnatural evolutionary pathways by saturation mutagenesis: rapid improvement of protein function. *Journal Molecular Evolution*, 1999, **49**: 716-720.

## 优于抗生素的新物质

抗生素是治疗某些致病菌引发疾病的有力工具。从发现青霉素已整整 80 年了, 距我国科学工作者获得青霉素并正式命名盘尼西林也已 64 年了, 那时樊庆笙与朱厥明两位先生一起研制了我国第一批 5 万单位盘尼西林制剂, 以中国名称“青霉素”一直沿用至今。随后抗生素的产业不断发展, 新抗生素不断诞生, 给医疗事业做出了重要贡献。在我国建立了专门抗生素研究所(中国医科院), 在研究过程中不断地有所发现与创新, 抗生素与新药物产业有了巨大的发展。如抗肿瘤抗生素的研制引起特别关注, 山东大学李越中教授课题组研发的 epothilone(见本刊 2004, 20(5): 689), 其抗癌效果与目前广为临床应用的紫杉醇(Taxol)的抗癌效果具有相似的作用机制, 具有广谱的抗癌效果。其实抗肿瘤药物不限于抗生素, 中国医学科学院肿瘤医院孙燕院士课题组首次在我国将重组人血管内皮抑制素开发成抗肿瘤新药, 命名为“恩度”。美国研究人员通过小鼠实验, 曾发现血管内皮抑制素(edostalin)的蛋白质, 可“饿死”肿瘤而不产生耐药性从而获得显著效果; 国产“恩度”应用于临床治肿瘤, 疗效确切, 靶向明确, 无耐药性和毒副作用, 对肿瘤患者可延长生存时间, 提高生活质量, 受到国外的关注。

由于抗生素或药物在治疗过程中因种种因素而使某些病原产生抗药性或耐药性, 甚至发展到赖药性, 医疗部门对此感到很“棘手”。为此, 研究人员一方面采取新的对策, 改造抗生素的结构以更有效控制病原体; 另一方面不断筛选新抗生素或药物及其应用, 这需要相当长的试验过程; 再就是运用“以毒攻毒”原理寻找新抗菌物质; 故新技术应用、重组抗病、抗癌药物研发大有潜力。国外的研究人员研究了指导合成癌细胞一种表面蛋白的基因, 利用这种基因片段合成新物质(即由 30 个氨基酸组成的肽)。经检测的结果发现: (1)将这种新物质注射到实验鼠(脚动脉血流不畅)体内, 4 周后病鼠恢复正常(血液流动); (2)将这种新物质注入到含有致病菌如葡萄球菌、绿脓杆菌的培养液中, 经培养之后, 杀菌效果比某些抗生素强 10~20 倍。由此可以看出, 癌症基因也可以利用, 使之“弃恶从善”, 利用它服务人类, 把“有害转化为有益”以造福于民, 这是一方面。从另一方面思考, 任何疾病包括癌症在内, 是外因与内因相结合作用的结果。要使其转危为安, 内因占主导地位, 即充分调动自身的免疫系统、抗癌系统和内分泌系统, 以共同面对疾病, 最终战胜之。

(柯为)