

酶分子体外定向进化的研究方法*

刘卫晓 钱世钧

(中国科学院微生物研究所 北京 100080)

摘要: 酶分子体外定向进化不仅可大幅度提高酶分子的进化效率, 短期内在实验室完成自然状态下需要千百万年的进化过程, 还可使酶分子按照人们期望的特定目标进化, 因此对酶工程今后的发展非常重要。本文对酶分子体外定向进化的研究方法进行了归纳总结。

关键词: 酶分子, 体外进化, 定向筛选

中图分类号: Q93 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2004) 02-0100-05

METHODS OF THE DIRECTED MOLECULAR EVOLUTION OF ENZYME *IN VITRO*

LIU Wei-Xiao QIAN Shi-Jun

(Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080)

Abstract: The directed molecular evolution of enzyme *in vitro* can not only improve the efficiency of evolution, but also evolve enzyme according to the investigator's desire. This review summed up the feasible methods of this novel technique.

Key words: Enzyme molecule, Evolution *in vitro*, Directed screen

酶分子由于其高效专一的催化特性, 被广泛应用于医药、食品、化学工业、新能源开发及环境保护等领域。但大多数天然酶的活力较低, 而且催化特性也往往不能满足人们的需求, 因此对酶分子进行改造具有十分重要的意义。几十年来对酶分子的改造工作可以归纳为以下几个方面: 酶的化学修饰、定点突变、杂合进化和定向进化等。

酶分子的定向进化是指不需事先了解酶的空间结构和催化机制, 而是人为地创造特殊的进化条件, 模拟自然进化机制, 在体外对酶基因进行改造, 并定向筛选、获得具有某些预期特征的进化酶。

1 酶分子体外定向进化的方法

1.1 易错 PCR (Error-prone PCR)

易错 PCR 是指通过改变 PCR 的反应条件^[1], 如: 调整反应体系中 4 种 dNTP 的浓度、增加 Mg^{2+} 的浓度、加入 Mn^{2+} 或使用低保真度的 *Taq* 酶等, 使碱基在一定程度上随机错配而引入多点突变, 构建突变库, 筛选出所需的突变体。在该方法中, 遗传变化只发生在单一分子内部, 所以属于无性进化。由于它较为费力、耗时, 一般多用于较小基因片段 (<800bp) 的改造。在通常情况下, 经一轮的易错 PCR、定向筛选, 很难获得令人满意的结果。所以由此发展出了连续易错 PCR (Sequential error-prone PCR), 该方法是将一次 PCR 扩增得到的有益突变基因作为下一次 PCR 扩增的模板, 连续反复进行随机诱变, 使得每一次获得的少量突变累积而产生重要的有益突变。

* 国家高技术研究发展计划项目 (“863” 项目) (No.2001AA214161)

收稿日期: 2003-05-12, 修回日期: 2003-06-30

枯草杆菌蛋白酶是一种广泛应用于洗涤剂合成、鞣革和医药领域的重要工业酶制剂。Chen 和 Arnold^[2,3] 采用易错 PCR 对该酶进行了体外进化研究。他们通过降低反应体系中 dATP 的浓度, 对编码该酶从第 49 位氨基酸到 C 端的 DNA 片段进行易错 PCR, 经筛选得到的几个突变株在高浓度的二甲基甲酰胺 (DMF) 中酶活性明显提高, 其中突变体 PC3 在 60% 的 DMF 中, 酶活力是野生型的 256 倍。将 PC3 再进行两个循环的定向进化, 得到的突变体 13M 酶活力比 PC3 还要高 3 倍。

1.2 DNA shuffling

DNA shuffling 又称为有性 PCR (Sexual PCR), 其目的是创造将亲本基因群中的突变尽可能组合的机会, 以导致更大的变异, 最终获得具有最佳突变组合的酶。其基本操作过程如下^[4]: 靶基因经随机突变产生含不同突变类型的亲本基因群, 用 DNase I 随机切割; 得到的片段经过不加引物的多次 PCR 循环, 在该过程中, 这些片段之间互为引物和模板进行扩增, 直至获得全长基因; 再加入基因的末端引物进行常规 PCR, 最终获得发生改组的基因库 (图 1)。该技术不仅可加速积累有益突变, 而且可实现目的蛋白多种特性的共进化^[5,6], 所以无论在理论上, 还是在实际应用中, 均优于连续易错 PCR。

β -内酰胺酶是一种水解头孢类抗生素的微生物酶, Stemmer 等运用 DNA shuffling^[7] 技术成功地实现了对该酶的定向进化。他们从对头孢类抗生素具有较弱抗性的 β -内酰胺酶基因出发, 经随机突变、DNA 改组和定向筛选, 得到上百个对头孢类抗生素抗性较大的克隆, 以这些克隆携带的酶基因作为下一步 DNA 改组的起始基因库, 经 3 个循环的改组和筛选, 最终获得了一个使宿主细胞对头孢类抗生素抗性性能提高 16,000 倍的进化酶。

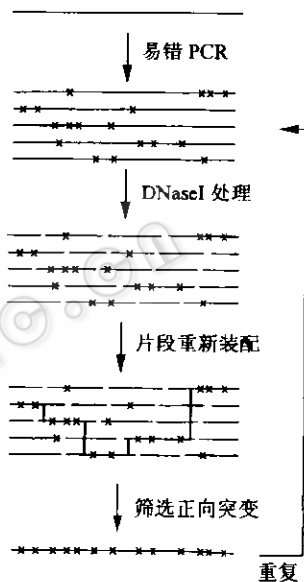


图 1 DNA 改组原理

1.3 Family shuffling

Family shuffling 指用 DNA shuffling 技术, 改组进化上相关的一系列基因。

当以单一的酶分子基因进行定向进化时, 基因的多样化起源于易错 PCR 等反应中产生的随机突变, 所以采用这种过程累积有益突变的速度比较慢。当从自然界中存在的基因家族出发, 利用它们之间的同源序列进行 DNA 改组。由于每一个天然酶的基因都经过千百万年的进化, 并且基因之间存在比较显著的差异, 所以获得的重组基因库充分体现了基因的多样化。

Stemmer 等^[8] 从不同种微生物中选择编码头孢菌素酶的 4 个同源基因, 对它们进行单独进化和同源重组进化, 来对这两种进化模式进行比较。在对单基因进化得到的突变酶中, 对头孢羟羧氧胺的抗性最高的增加了 8 倍, 而采用 Family shuffling 的方法使抗性与其中两种微生物来源的天然酶提高 270 倍, 比另两种酶提高了 540 倍。

近年来, Kikuchi 等^[9,10] 提出了对 Family shuffling 技术的两种改进方案: ①首先将制备的亲本基因单链化, 用 DNase I 随机切割这些单链 DNA 后进行常规的多基因改组; ②用限制性内切酶代替常规 Family shuffling 技术中的 DNase I (图 2A)。这两种改进的多基因改组方案都能使改组基因库中的基因多样性增强, 从而使酶的定向进化更易于取得

成功。他们从儿茶酚2,3-双加氧酶的2个同源基因出发,采用这3种改组方法对其进行体外定向进化的研究,并比较了这3种改组方法产生的改组基因多样性^[11](图2B),最终筛选到的进化酶在50℃的半衰期分别比两种天然酶延长12和26倍。

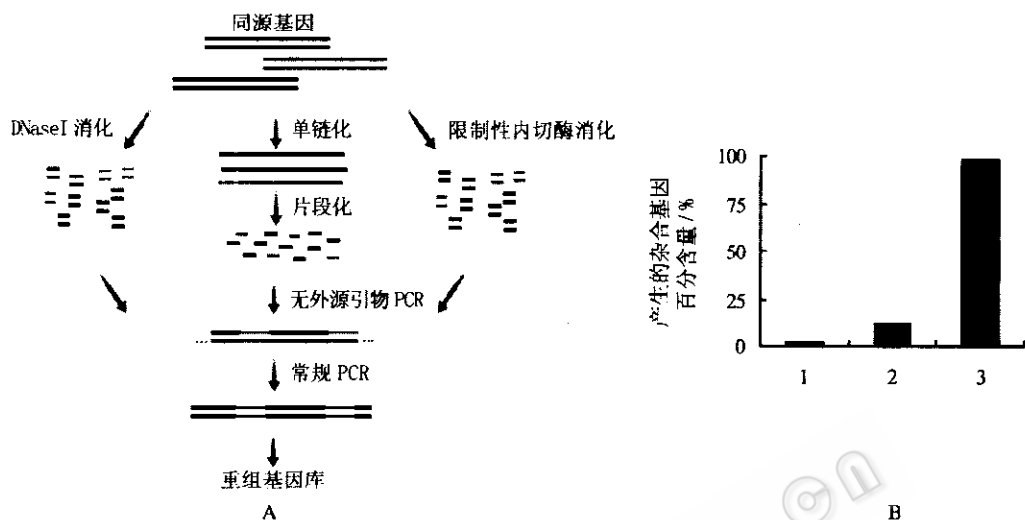


图2 (A) 3种基因家族改组方法原理图, (B) 3种基因家族改组方法获得的突变基因多样性比较

1 常规基因家族改组, 2 单链 DNA 介导的基因家族改组, 3 限制性内切酶介导的基因家族改组

1.4 交错延伸重组 (StEP: Stagger extension process)

交错延伸重组是在 PCR 反应中, 将含不同点突变的模板混合, 将常规的退火和延伸合并为一步, 并大大缩短其反应时间, 从而只能合成出非常短的新生链, 经变性的

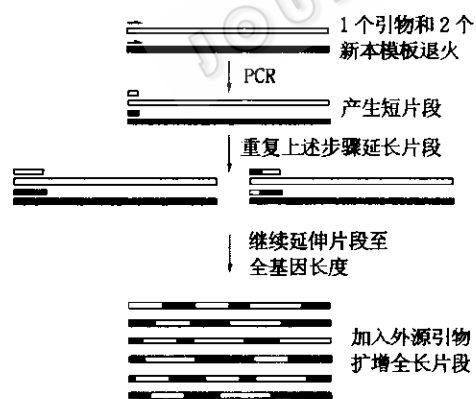


图3 交错延伸重组

新生链再作为引物随机地杂交到含不同突变的模板上继续延伸, 此过程反复进行直至获得全长基因。结果会产生间隔的含不同模板序列的新生 DNA 分子 (图3)。交错延伸重组在提高枯草杆菌蛋白酶的稳定性和酶活力方面, 取得了极大的成功。Zhao 等^[12] 利用连续易错 PCR 获得随机点突变, 并用交错延伸方法重组 DNA, 采用连续提高培养温度对突变体进行筛选最终获得一株突变体, 在酶的功能未发生任何变化的前提下, 不仅将该酶的最适温度提高了 17℃, 还使酶在 65℃ 的半衰期延长了 200 倍。漆酶是一种含铜多酚氧化酶, Bulter 等^[13]

通过易错 PCR、交错延伸重组等方法对真菌漆酶进行体外定向进化, 最终筛选得到的突变酶总活力比出发酶提高了 160 倍。

1.5 随机引物体外重组 (RPR: Random-priming in vitro recombination)

随机引物体外重组是用一套随机序列引物, 先产生大量互补于模板不同位点的短

DNA 片段, 由于碱基的错配, 这些短 DNA 片段中也会有少量的点突变。然后进行类似于 DNA 改组的全基因装配 (图 4)。与常规 DNA 改组相比, RPR 技术有如下优点: (1) 可利用单链 DNA 为模板, 故可直接用 mRNA 或 cDNA 为亲本进行进化。(2) 在该方法中, 随机片段不是由亲本基因切割获得, 故大大降低了亲本 DNA 的制备量。(3) 在 DNA 改组中, 片段重新装配前必须彻底去除 DNase I, 所以该方法更为简单。(4) 合成的随机引物具有同样长度, 无序列倾向性。在理论上, PCR 扩增时模板上每个碱基都应被复制或相似的频率发生突变。(5) 随机引发合成的 DNA 片段的大小, 不受 DNA 模板长度的限制。Shao 等^[14] 利用 RPR 方法成功地对枯草杆菌蛋白酶 E 进行定向进化。基因 RC1 和 RC2 分别编码两种耐热枯草杆菌蛋白酶 E, 经随机引物体外重组得到突变酶, 第 181 位氨基酸 Asn 突变为 Asp, 第 218 位氨基酸 Asn 变为 Ser, 其热稳定性比原始酶提高 8 倍。

1.6 临时模板随机嵌合生长 (RACHITT: Random chimeragenesis on transient templates)

临时模板随机嵌合生长是将随机切割的基因片段杂交到一个临时 DNA 模板上, 进行排序、修剪、空隙填补和连接的过程 (图 5)。临时模板是一条以一定间隔插入尿嘧啶的单链 DNA 分子, 其中的悬垂切割步骤可使比 DNase I 消化片段更短的片段得以重组, 明显提高重组的频率和密度。Coco 等^[15] 利用 RACHITT 技术对二苯并噻吩单加氧酶进行体外改造, 经筛选得到的突变酶不仅活力有所提高, 酶的作用底物范围也得到明显拓宽。

2 酶分子定向进化的筛选策略

与基因的定点突变不同, 在酶分子的定向进化中, 突变是随机发生的, 但通过筛选特定方向的突变, 便可限定进化的趋势, 再加上适当的控制实验条件, 不仅可大大的减少工作量, 还加快了酶某种特征的进化速度。

筛选方法在酶的定向进化中至关重要, 直接关系到定向进化的成败。通常, 采用的定向筛选方法必须灵敏, 且应与目的性质相关。常用的筛选方法有: 利用底物显色反应, 改变培养条件 (如逐步提高培养温度, 或改变培养基的 pH 等), 利用某些蛋白的固有性质, 如产生绿色荧光, 或高通量筛选 (HTS: High Throughput Screening), 该技术可以根据待测样品的合成路线分为液相和固相筛选, 也可以根据筛选目标物分为纯蛋白受体亲和性筛选, 酶活性筛选, 细胞活性筛选等。IITS 现有的方法有: 固相筛选、使用放射性染料筛选、荧光筛选、闪烁接近化验、ELISA、利用细胞的功能筛选和利用小鼠显型的表型遗传学筛选等等。

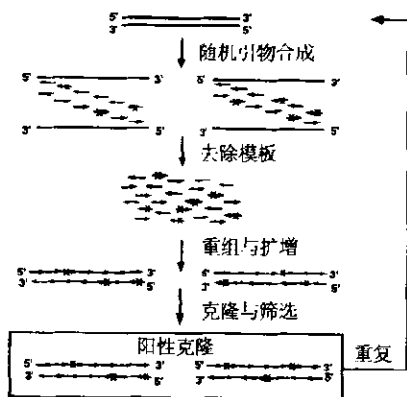


图 4 随机引物体外重组

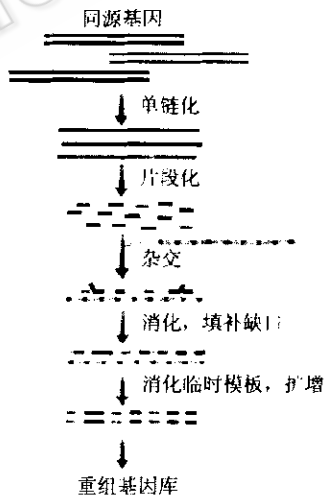


图 5 临时模板随机嵌合生长

3 总结与展望

目前,已经建立了一些酶的体外定向进化的有效方法(表1),但还应进一步探索定向进化的最佳途径和提高对突变的控制能力。同时要重视筛选方法的建立和完善,特别是对那些无明显可借鉴表型的突变体筛选,可能是该领域工作者今后的工作侧重点。

表 1 酶体外定向进化成功实例

酶	性质	突变方法
枯草杆菌蛋白酶 E	有机相活性/稳定性	易错 PCR
β -内酰胺酶	总活力/底物专一性	DNA 改组
对硝基苯酯酶	底物专一性/有机相活力	易错 PCR/ DNA 改组
β -半乳糖苷酶	底物专一性	DNA 改组
天冬氨酸转氨酶	催化特异性	DNA 改组
核酶	底物专一性	易错 PCR/DNA 改组
天冬氨酸酶	活性和稳定性	随机/定位诱变
谷胱甘肽转移酶	底物特异性	DNA 改组
过氧化物酶	热稳定性	易错 PCR/DNA 改组
头孢菌素酶	特异活性	Family shuffling

酶分子体外定向进化使在自然界中需要上千万年的进化过程,在实验室内在几个月或更短的时间内完成,这无疑是酶工程发展史上的又一里程碑。到目前为止,这些定向进化的方法不仅成功地应用于多种酶的改造,还成功地应用于 DNA 的进化,如 DNA 疫苗、疫苗载体、表达载体、及基因转移载体的构建;酶分子以外的蛋白质进化,如提高抗体的表达水平、改变抗体的亲和性、以及对细胞因子、生长因子的改造;和一些生物体的进化,如植物体、科研用生物体、疫苗有机体及环保用生物等。可见这些定向进化的方法几乎可以应用到生命科学研究的各个领域。我们深信随着这些定向进化方法的更广泛应用,以及更多、更有效的进化方法体系的建立,必将推动生命科学的诸多领域突飞猛进地向前发展,实现人类改造自然实践的一次又一次飞跃。

参考文献

[1] Leung D W, Chen E, Goeddel D V. *Technique*, 1989, **1**: 11 ~ 15.
[2] Chen K, Arnold F H. *Bio/Technol*, 1991, **9**: 1073 ~ 1077.
[3] Chen K, Arnold F H. *Proc Natl Acad Sci*, 1993, **90**: 5618 ~ 5622.
[4] Stemmer W P C. *Nature*, 1994, **370**: 389 ~ 391.
[5] Arnold F H. *Chemical Eng Sci*, 1996, **51**: 5091 ~ 5102.
[6] Zhao H M, Arnold F H. *Nucleic Acids Research*, 1995, **23**: 1307 ~ 1308.
[7] Stemmer W P C. *Proc Natl Acad Sci*, 1994, **91**: 10747 ~ 10751.
[8] Crameri A, Raillard S, Bermudez E, *et al.* *Nature*, 1998, **391**: 288 ~ 291.
[9] Kikuchi M, Ohnishi K, Harayama S. *Gene*, 1999, **236**: 159 ~ 167.
[10] Kikuchi M, Ohnishi K, Harayama S. *Gene*, 2000, **243**: 133 ~ 137.
[11] Miho K-N, Kagima O. www.mbio/kamashilab/research.
[12] Zhao H, Giver L, Shao Z, *et al.* *Nat Biotechnol*, 1998, **16**: 258 ~ 261.
[13] Bluster T, Alcalde M, Sieber V, *et al.* *Appl Environ Microbiol* 2003, **69**: 987 ~ 999.
[14] Shao Z, Zhao H, Giver L, *et al.* *Nucleic Acids Res*, 1998, **26**: 681 ~ 683.
[15] Coco W M, Levinson W E, Crist M J, *et al.* *Nat Biotech*, 2001, **19**: 354 ~ 359.