

酶定向进化技术及其在化学品生物转化中的应用

庄 园¹, 余劲聪¹, 方柏山²

(1. 华侨大学化工学院, 福建 厦门 361021;
2. 厦门大学化学化工学院, 福建 厦门 361005)

摘 要: 定向进化可有目的地按照需要改造蛋白质分子中的氨基酸残基或结构域, 从而定向改造蛋白质的性质, 使其成为具有人们预期功能的新型蛋白质, 应用于不同化学品生物转化反应中。本文简要介绍了酶定向进化技术及其在化学品生物转化中的应用。

关键词: 定向进化; 生物转化; 易错PCR; DNA改组; 高通量筛选

微生物通过一步或一系列的酶促反应来分解、合成或修饰某些化合物的过程称之为生物转化 (biotransformations)^[1]。化学品的生物转化以其一般化学催化法难以比拟的高效性、高选择性和环境友好性得到了社会的青睐, 并在现代生物技术的推动下迅速发展, 新的催化剂和催化途径层出不穷, 创造了较为可观的社会效益。同时, 作为生物转化基础的生物技术, 其重要组成——酶的定向进化技术也取得了从无到有, 由发展缓慢到突飞猛进的进展, 迅速成为近年化学品生物转化的发展重点之一。该技术最大的优势是, 在实验室中模拟自然选择过程来进化人工环境中的酶^[2], 使其在自然界需要几百万年才能完成的进化过程缩短到几年、几个月甚至更短, 加速了选择所需性能的酶的进化过程, 而且通常不需要事先了解酶的空间结构和催化机制, 理论上适用于任何蛋白质分子。基因突变文库的构建——库容量大小及突变质量等是蛋白质定向进化的基础, 高效筛选方法的确立——高灵敏度、低筛选成本、相对较少工作量等是定向进化成功与否的关键。目前, 该技术已在化学品生物转化中应用于提高酶的活性、专一性和稳定性等方面, 并已取得了一定的成果。本文将结合酶定向进化的各种方法, 对该技术在化学品生物转化中的应用, 主要是生物转化过程中重要酶的性质变化做简要介绍。

1 基因突变文库的构建

1.1 易错PCR

易错 PCR (error-prone PCR)^[3,4]是指在扩增目的基因的同时引入碱基错配, 导致目的基因随机突变。由此基础发展出的连续易错 PCR (Sequential error-prone PCR) 是以前一轮易错 PCR 产物为模板, 进入下一轮循环, 从而提高突变发生几率的方法。在该方法中, 遗传变化只发生在单一分子内部, 属于无性进化 (asexual evolution)。

1.2 DNA 改组

DNA 改组^[5,6] (DNA shuffling) 又称有性 PCR (sexual PCR)。首先对经随机诱变得到的的一组有益突变体, 或天然存在的基因家族的一组序列相关的 DNA 序列进行 DNA 酶 I (DNase I) 消化产生一系列随机切割的 DNA 片段, 然后无引物 PCR 合成。重复循环, PCR 产物将越来越接近切割前的目的基因的长度, 最后有引物合成全长基因, 增加错配几率, 构建基因突变文库。

1.3 饱和突变

位点专一饱和突变 (site specific saturation mutagenesis)^[1,7]是通过定制简并寡核苷酸, 在一个特定位点引入所有可能的密码子, 生成全部 19 种氨基酸进行替换, 这种简并的寡核苷酸引物通过 PCR 反应整合到目的基因中去。该方法可扩展到整个基因序列, 从而生成完全饱和基因文库。

基金资助: 国家自然科学基金资助项目 (20676048)、国家“863”计划项目 (2006AA020103)。

1.4 交错延伸

交错延伸(Stagger extension process, StEP)^[8]是在PCR反应中把常规的退火和延伸合并为一步, 缩短其反应时间, 合成短的新生链, 经变性的新生链再作为引物与体系内同时存在的不同模板退火而继续延伸, 此过程反复进行, 直到产生完整的基因长度的方法。

除以上方法外, 基因突变文库构建方法还有: 体外随机引发重组^[9]、随机插入-删除链交换突变(random insertional-deletional strand exchange mutagenesis, RAISE)、基于 Y 连接的构件改组(Y-ligation based block shuffling, YLBS)、随机引物体外重组(random priming *in vitro* recombination, RPIR)、临时模板随机嵌合生长(random chimeragenesis on transient templates, RACHITT)、设计的寡核苷酸装配(assembly of designed oligonucleotides, ADO)、合成改组(synthetic shuffling)、单向重组(mutagenic and unidirectional reassembly, MURA)、非同源随机重组(nonhomologous random recombination, NRR)以及用于产生杂合酶的递增截短(incremental truncation for creation of hybrid enzymes, ITCHY)等^[10]方法。

2 突变体库的筛选方法

2.1 琼脂板涂布法

琼脂平板法是一种传统的筛选方法, 利用营养缺陷型或添加抗生素的培养基、高温、酸碱性环境等特殊条件培养突变菌。通过宿主菌的生长与不生长、培养基颜色变化、特定反应的出现等, 判断是否具有目的基因。

2.2 微孔板悬浮法

微孔板悬浮法也被广泛使用于突变体筛选, 并且已从96孔发展到384孔甚至更多, 此方法挑取具有活性的克隆接种于微孔板, 加入对pH指示剂、对硝基苯酚或伞形酮衍生物等显色底物, 用普通或荧光酶标仪进行检测。

2.3 流式细胞计数法

流式细胞计数法^[11]是将细胞荧光染色, 通过高速流动系统, 排成单行的细胞逐个流经检测区进行测定。通过流式细胞计数仪, 能够在一天之内对高达 10^9 的突变文库进行筛选, 并且可以对选择的阈值和富集进行精细的调节同时施加阳性选择压力, 准确快速、保持细胞活力和可在无菌条件下进行。

2.4 展示技术

展示技术是将目的基因克隆到特定表达载体中, 使其表达产物多肽片段或蛋白质, 并以融合蛋白的形式将肽段和蛋白质展示于活的噬菌体或细胞表面, 进而通过亲和富集法筛选表达有特异肽或蛋白质的个体, 从而将含有所需性质的多肽的个体从大量突变体中分离出来的筛选技术。展示技术包括噬菌体、细胞表面和 mRNA 展示技术^[12,13]等。

各种展示技术由于适用于高通量筛选, 已经在药物筛选尤其是单克隆抗体确定抗原表位及新型疫苗的研究方面得到了广泛应用, 其在化学品生物转化中具有巨大的应用潜力。

3 酶定向进化技术在化学品生物转化中的应用

Reetz 等^[14]利用易错 PCR, 极大地提高了绿假单胞菌脂肪酶对映体的选择性。最后得到立体选择性显著提高的突变体, 对(S)-2-甲基癸酸的对映体选择值 E 从 1.1 提高到 >51。同时也筛选到立体选择性完全相反的突变体, R-型的立体选择性($E=30$), 以提高绿假单胞菌脂肪酶的立体专一性, 提高了对应化学品(S)-2-甲基癸酸或(R)-2-甲基癸酸的生物转化效率。

孔荣等^[15]用易错 PCR 法提高了 D-海因酶催化底物海因水解的活性为亲本重组酶的 1.3 倍, 催化底物对羟基苯海因水解的活性为亲本重组酶的 2.4 倍, 为定向进化通过增加酶活, 促进化学品生物转化的实例。

Kikuchi 等^[16]借助 DNA 改组方法提高了根癌农杆菌 N-氨基甲酰-D-氨基酸酰胺水解酶的氧化稳定性和热稳定性, 使 N-氨基甲酰-D-氨基酸酰胺水解这一生物转化过程更易应用于工业环境。

Williams 等^[17]用 DNA 改组方法改变了由 1,6-二磷酸己酮糖缩酶催化形成 C-C 键合成的立体化学。得到的醛缩酶在以非天然的 1,6-二磷酸果糖为底物时立体定向性提高了 100 倍。

Stephens 等^[18]运用易错 PCR 改善来自嗜热真菌的木聚糖酶(XynA)的碱性和热稳定性。筛选得到最耐热变异 G41 在 80 摄氏度 90 分钟后保留 75%的活性。最佳碱稳定的变异 G53 在 pH 10 保留 93%的活性。为了便于 N-一甲酰-D-氨基酸酰胺水解酶(DCase)生物转化法生产化学品 D-氨基酸, Yu 等^[19]使用 DNA 改组提高了可溶性 DCase 酶 7 摄氏度的热稳定性。同时其动力性能和高溶解度并没有受到影响。Zhang 等^[20]提出了整个基因组的改组方法并利用其提高了乳酸菌(*lactobacillus*)的耐酸性。以上三例是以定向进化改进酶稳定性, 进而

应用于化学品生物转化的实例。

Lin 等^[21]利用定向进化技术的易错 PCR 和 DNA 改组, 筛选枯草芽孢杆菌内切 β -1,4-葡聚糖酶 (Cel5A) 突变体库, 改善了一些 Cel5A 变种的催化活性。其中, 突变酶 (M44-11, S75 和 S78) 显示出 2.03 至 2.68 倍对于羧甲基纤维素钠 (CMC) 的酶活增加, 而 M44-11 表现出更广泛的 pH 值和较高的热稳定性。

May 等^[22]运用易错 PCR 技术并结合饱和突变, 将节杆菌 D-海因酶的对映体选择性反转为 L-选择型, 将筛到的突变酶的相应基因和 L-N-氨甲酰水解酶基因、海因消旋酶基因在大肠杆菌中共表达, 作用于 D, L-5-(2-甲硫基乙基) 海因, 90% 的底物得以转化生成 L-Met, 大幅度地提高了化学品 L-Met 的产量, 是定向进化技术在化学品生物转化领域的又一突破。

为了实现酶法生产可以作为单体来生产聚酯、聚醚、聚氨酯等聚合物的一种具有双官能团的化学品 1,3-丙二醇 (1,3-PD), 我们利用易错 PCR 技术突变源于 *Klebsiella pneumoniae* 编码 1,3-丙二醇氧化还原酶 (PDOR) 的 *dhaT* 基因, 获得了比基因工程菌 *E. coli* BL21(DE3)/PET-15b-*dhaT* 所得酶活高约 5 倍的进化菌 *E. coli* BL21(DE3)/PET-15b-*dhaT*⁻²⁴^[23]。

4 小结

上世纪 90 年代初, 美国科学家 Arnold 发明了试管内对目的酶基因进行快速改造的方法, 称之为随机突变 (Random Mutagenesis)^[24]。在接下来的 20 年间, 定向进化技术在基因突变文库的建立和突变体筛选方法方面均获得了日新月异的发展。除了基因突变文库的随机突变方法——易错 PCR, DNA 改组, 饱和突变等以外, 基于蛋白质三维结构信息及计算机模拟的理性和半理性设计也被应用于基因突变文库的构建。另外, 突变体筛选方法的突变体展示技术——噬菌体、细胞表面、核糖体和 mRNA 展示技术等由于可实现突变体的高通量筛选, 在酶定向进化上有着非常广阔的应用前景。

目前, 酶的定向进化作为改造蛋白质的有效手段已被广泛应用于提高酶的活性、专一性和稳定性改造等方面, 并迅速成为化学品生物转化的常用工具之一, 其对工业、农业、环境保护、药物研制等方面也产生了重要影响。而突变体库的筛选是定向进化技术的重点, 目标在于找到一种能够将稀少的有益突变体从巨大的突变库中挑选出来的有效的

筛选方法, 关键是将基因的表型和能通过定量表征的筛选手段紧密联系, 即在保证基因突变文库的容量和质量基础上, 对应反应特征确定快速、简便、灵敏度高的筛选方法。如能突破瓶颈, 在酶的高通量筛选方法方面有新的新展, 此项技术将更加完善, 将对化学品的生物转化做出更大贡献。

参考文献

- [1] 欧阳平凯, 林章凛译. 工业生物转化过程[M]. 北京: 化学工业出版社, 2008;
- [2] 孙志浩, 许建和译. 生物催化——基础与应用 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2006;
- [3] Leung DW, Chen E, Goeddel DV. A method for random mutagenesis of a defined DNA segment using a modified polymerase chain reaction [J]. *Technique*, 1989, 1(1): 11-15.
- [4] Cadwell RC, Joyce GF. Mutagenic PCR [M]. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1994.
- [5] Stemmer WPC. DNA shuffling by random fragmentation and reassembly *in vitro* recombination for molecular evolution [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1994, 91: 10747-10751.
- [6] Stemmer WPC. Rapid evolution of a protein *in vitro* by DNA shuffling [J]. *Nature*, 1994, 370: 389-391.
- [7] Miyazaki K, Arnold FH. Exploring nonnatural evolutionary pathways by saturation mutagenesis: rapid improvement of protein function [J]. *J Mol Evolution*, 1999, 49: 716-720.
- [8] Zhao H, Giver L, Shao Z, *et al.* Molecular evolution by staggered extension process (StEP) *in vitro* recombination [J]. *Nat Biotechnol*, 1998, 16: 258-261.
- [9] Hu WS, Bowman EH, Delviks KA. Homologous recombination occurs in a distinct retroviral subpopulation and exhibits high negative interference [J]. *J Virol*, 1997, 71: 6028-6036.
- [10] Yuan L, Kurek I, English J, *et al.* Laboratory-directed protein evolution [J]. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2005, 69(3): 373-392.
- [11] Becker S, Schmoldt HU, Adams TM, *et al.* Ultra-high-throughput screening based on

- cell-surface display and fluorescence-activated cell sorting for the identification of novel biocatalysts [J]. *Curr Opin Biotechnol*, 2004, 15(4): 323-329.
- [12] 罗巖辉, 方柏山. 酶定向进化的研究进展[J]. 生物加工过程, 2006; 4(1): 9-15.
- [13] 夏启容, 方柏山, 洪燕. 酶体外定向进化(III) 展示技术及其应用[J]. 华侨大学学报(自然科学版), 2005: 26(4): 334-337.
- [14] Reetz MT, Zonta A, Schimossek K, *et al.* Creation of enantioselective biocatalysts for organic chemistry by *in vitro* evolution [J]. *Angew Chem Int Ed*, 1997, 36 (24): 2830-2832.
- [15] 孔荣, 钮利喜, 袁静明. 易错 PCR 法定向进化 D-海因酶的初步研究[J]. 山西大学学报(自然科学版), 2006; 29(4): 425-427.
- [16] Kikuchi M, Ohnishi K, Harayama S. Novel family shuffling methods for *in vitro* evolution of enzymes [J]. *Gene*, 1999, 236(1): 159-167.
- [17] Williams GJ, Domann S, Nelson A, *et al.* Modifying the stereochemistry of an enzyme-catalyzed reaction by directed evolution [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003, 100(6): 3143-3148.
- [18] Stephens DE, Singh S, Permaul K. Error-prone PCR of a fungal xylanase for improvement of its alkaline and thermal stability. *FEMS Microbiol Lett*. 2009 Apr; 293(1):42-47.
- [19] Yu H, Li J, Zhang D, Yang Y, Jiang W, Yang S. Improving the thermostability of N-carbamyl-D-amino acid amidohydrolase by error-prone PCR. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2009 Feb; 82(2):279-85.
- [20] Zhang YX, Perry K, Vinci VA, *et al.* Genome shuffling leads to rapid phenotypic improvement in bacteria [J]. *Nature*, 2002, 415(6872): 644-646.
- [21] Lin L, Meng X, Liu P, Hong Y, Wu G, Huang X, Li C, Dong J, Xiao L, Liu Z. Improved catalytic efficiency of endo-beta-1,4-glucanase from *Bacillus subtilis* BME-15 by directed evolution. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2009 Mar; 82(4): 671- 679.
- [22] May O, Nguyen PT, Arnold FH. Inverting enantioselectivity by directed evolution of hydantoinase for improved production of l-methionine [J]. *Nat Biotechnol*, 2000, 18 (3): 317-320.
- [23] 庄园. 1,3-丙二醇氧化还原酶的定向进化. 华侨大学硕士论文 2009
- [24] Chen K, Arnold FH. Enzyme Engineering for Nonaqueous Solvents: Random Mutagenesis to Enhance Activity of Subtilisin E in Polar Organic Media. *Biotechnology (NY)*, 1991, 9(11): 1073-1077.

高效节能 HWV 旋风磨

国家重点高新技术浙江丰利粉碎设备有限公司开发成功的省级新产品。整机及其耐磨装置已获国家知识产权保护(专利号: ZL 01 2 21204.0)。

该机拥有独特的不拆机可调间隙功能, 粉碎区产生的强烈涡流有着惊人的粉碎效果和干燥效果。不拆机即可调节粒度和产量; 设备处理风量大, 分散效果好。该机的开发成功, 解决了热敏性、纤维性物料在常温下的超微粉碎同时进行干燥操作、表面改性的难题, 其主要性能指标处于国内领先, 国际先进水平; 可替代进口, 而价格只要进口设备的 1/8; 可广泛适用于化工、染料、塑料、非金属矿、医药、饲料、食品等行业, 是目前性能好、效率高、噪声低的环保节能型理想微粉设备。

销售热线: 0575-83105888、83185888、83100888

中文搜索: 浙江丰利

网址: www.zjfengli.com