

酶的定向进化及其应用进展

许勇 (安徽省医学科学研究所, 安徽合肥 230061)

摘要 酶的定向进化是用于改良酶特性的一种策略, 主要包括构建酶突变文库和高通量筛选。目前, 突变文库的构建手段主要有随机突变、半理性设计和 DNA 改组; 高通量筛选方法主要分为体内筛选和体外筛选。该文介绍易错 PCR、半理性设计、DNA 改组、表面展示、核糖体展示和差示荧光扫描等相关技术及其应用情况。

关键词 定向进化; 易错 PCR; DNA 改组; 高通量筛选

中图分类号 Q814 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2018)23-0012-03

Direct Evolution of Enzyme and Its Application Progress

XU Yong (Anhui Academy of Medical Science, Hefei, Anhui 230061)

Abstract Direct evolution of enzyme, a strategy to improve the characteristic of enzyme, mainly included constructing enzyme mutagenesis library and high-throughput screening. At present, the main methods of constructing enzyme mutagenesis library were random mutation, semi-rational design and DNA shuffling; high-throughput screening can be divided into *in vivo* screening and *in vitro* screening. In this study, the related techniques and their application situation, including error-prone PCR, semi-rational design, DNA shuffling, surface display, ribosome display and differential scanning fluorimetry, were introduced.

Key words Direct evolution; Error-prone PCR; DNA shuffling; High-throughput screening

酶是生物体内一种重要的催化剂, 目前已发现的大多数酶的化学本质为蛋白质。由于酶在体外温和水条件下依然具有较强的催化活性, 其在医药、农业、食品、化工、环境保护等领域得到广泛使用^[1]。酶在实践中得到了广泛应用, 但同时具有不稳定、底物单一、反应条件苛刻等缺陷, 而这些主要决定于其结构和动力学等因素影响^[2]。如北美萤火虫荧光素酶, 其最适反应温度为 23 °C, 最适反应 pH 为 7.8^[3], 这不利于其长期保存与运输, 大大限制了荧光素酶在微生物快速检测领域的应用^[4]。定向进化是达尔文选择进化过程在分子水平的再现, 主要通过巧妙的技术手段建立蛋白质的突变库, 并从中筛选出具备改良特性的蛋白质^[5]。

1 酶突变文库的构建手段

突变文库的构建手段主要有随机突变、半理性设计和 DNA 改组 3 类。

1.1 随机突变 随机突变是通过技术手段诱导目的基因发生碱基缺失、增添、替换等突变的方法构建突变文库。易错 PCR 是目前最常用的目的基因随机突变技术。易错 PCR 是通过利用低保真度 TaqDNA 聚合酶和改变 PCR 反应条件, 如加入 Mn、改变循环次数和 dNTP 浓度等, 降低 DNA 复制的保真度, 在新 DNA 链合成过程中增加碱基错配, 从而使扩增产物出现较多点突变的一种体外诱导 DNA 序列变异的方法^[6]。刘韩等^[7]利用易错 PCR 技术向羧酸酯酶基因中随机引入突变, 建立酶基因突变文库, 筛选出的突变菌株 65 产生的酶在 90 °C 的半衰期提高 1.2 h。Mikhail 等^[8]经过 4 轮易错 PCR 获得了突变酶 4TS 在 37 °C 时的半衰期提高了 158 倍, 但是随着温度升高这种差距明显缩小^[8]。通过调整离子浓度或循环次数可以控制突变率, 为防止对酶活造成破坏以

及突变文库过大难以筛选, 突变率不宜太高(改变 1~5 个碱基或 1~3 个氨基酸)^[5]。

理论上说, 随机突变应当是目的蛋白质的所有氨基酸位点都有同样可能被替换为其他 19 种氨基酸。但实际上, 由于遗传密码的简并性、中性突变以及相邻碱基同时突变概率较低等原因, 易错 PCR 很难做到理想化的随机突变。饱和诱变可以将蛋白质中任意位点的氨基酸诱变为其他 19 种氨基酸, 构建突变文库。Wong 等^[9]于 2004 年首次提出序列饱和和突变法(SeSaM), 这是一种针对单链 DNA 进行突变的新技术, 基本原理是在 PCR 扩增中, 在正常 dNTP 中混入易被水解的 α -硫代核苷酸, 得到长度不同的 DNA 片段库, 再利用 DNA 末端转移酶在片段的 3'-末端引入通用次黄嘌呤核苷酸, 最后通过片段延长、正常碱基替换构建目的基因突变文库。该法可以实现目的基因任意位点的随机突变, 但在试验过程使用了多种碱基类似物和生物素化引物, 并且操作过程繁琐耗时(一次完整试验需 2~3 d)^[1,9]。2008 年, Wong 等^[10]在原有序列饱和和突变法基础上, 通过 dNTP α S、dPTP、dKTP 和 dITP 等控制突变倾向, 设计出了高颠换型序列饱和和突变法(SeSaM-Tv+)。Acevedo 等^[11]利用易错 PCR 和饱和诱变联用的方式将一种冷活性木聚酶的 T5015 提高了 4.3 °C。

1.2 半理性设计 随机突变虽然效果不错, 但依然存在突变文库较大、有益突变率低、筛选压力大等缺点。半理性设计是首先通过对蛋白结构信息进行分析确定影响特性的关键位点或区域, 而后利用随机突变或定点饱和和突变的手段改造这一关键位点或区域, 从而获得有益突变株^[12]。

Wang 等^[13]首先在野生型热稳定性醛酮还原酶 Tm1743 催化机制的基础上, 通过分子模拟手段建立其与 NADPH、2-氧代-4-苯基丁酸乙酯的结合模型, 确定影响其对映选择性的 3 个关键位点 Trp118、Trp86 和 Trp21, 之后再对这 3 个位点分别进行饱和诱变发现 Trp86 和 Trp21 2 个位点突变体的对映选择性变化较大, 并最终筛选出产(R)-和(S)-EHPB

基金项目 安徽省“十三五”医疗卫生重点专科“病原微生物实验室”(皖卫科教[2017]30号); 2018年度安徽省卫生计生委科研计划项目“虫荧光素酶的定向进化研究”(2018YK006)。

作者简介 许勇(1984—), 男, 安徽合肥人, 助理研究员, 硕士, 从事微生物学和基因工程研究。

收稿日期 2018-06-14

的最优双位点突变体 W21S/W86E 和 W21L/W118H, 其对映体过量值 (ee value) 分别为 99.4% 和 99.6%。

Reetz 等设计的迭代饱和突变 (Iterative saturation mutagenesis, ISM), 依据待提高的酶学活性, 选择关键的突变点或区域, 进行反复饱和和突变, 最终筛选出目的突变株^[1]。钮成拓^[14]根据分子动力学模拟和定点突变结果, 采用迭代饱和和突变对芽孢杆菌属来源 β -葡聚糖酶中 40 位、43 位、46 位和 205 位氨基酸进行改造, 通过四轮定点饱和和突变, 构建了 7 个饱和突变体文库, 从中筛选得到突变体 VII (E46P/S43E/H205P/S40E), 其在 70 °C 处理 1 h 后仍能保持 59.4% 的剩余酶活, 是野生酶经过相同处理剩余酶活的 9.43 倍。Reetz 等^[15]于 2005 年提出的组合活性中心饱和试验 (combinatorial active-site saturation test, CAST) 包括 2 个步骤: 一是在酶的活性中心部位寻找一系列在空间位置上相互接近的并且在侧链基团取向上具有潜在的构象协同作用的 2 个氨基酸对作为突变位点。如果选择的氨基酸对应的位置是 n , 则第 2 个氨基酸与其空间关系上遵循以下的原则: 如果第 n 个氨基酸在环上, 则另一个氨基酸选择第 $n+1$ 位; 若在 β 折叠上, 则选择第 $n+2$ 位, 若在 310 螺旋上, 则选择第 $n+3$ 位; 若在 α 螺旋上, 则选择第 $n+4$ 位。对选取的一对氨基酸进行饱和随机突变, 即这一对氨基酸要突变成 20 种氨基酸的任何一种。以 NNK (N 代表任何一种核苷酸, K 代表是 G 或 T) 作为突变的碱基形式, 则有 $(4 \times 4 \times 2)^2 = 1\,024$ 种不同的组合, 而氨基酸则可突变成 $20^2 = 400$ 种不同的组合。该法在特定位点上综合了理性设计和氨基酸组合随机突变的特点, 产生相对较小的突变文库, 减轻了筛选压力^[15]。Maddock 等^[16]以甘油脱水酶 KpGDHt 的 α 和 β 亚基融合结构为对象, 应用 CAST 突变和保守引导突变联用的方法, 从 5 500 多个突变体中筛选出目标突变体 T200S。

1.3 DNA 改组 DNA 改组是通过同源重组或非同源重组实现基因片段的交换重排, 构建嵌合后代文库。利用不同亲本基因之间的重排将不同酶或突变酶的优良特性进行整合, 获得在某一特性上的再优化或多种优良特性组合的突变酶, 是一种有性改组。该法可以使多基因的有益突变进行整合构建有益突变率较高的突变库, 减小了筛选压力。根据序列特点, 可以分为同源依赖型和非同源依赖型。

同源依赖型 DNA 改组是将具有同源区段的多个亲本基因用 DNase I 处理成许多短小片段, 再通过无引物 PCR 将片段延伸至完整基因长度, 该法利用同源区段在退火过程中的互补结合。来自同一基因家族的基因一般都具有同源区段, 以相同基因家族的不同基因 (一般要求同源度 > 60%) 为亲本基因进行 DNA 改组是常用的方法^[5]。Rigouin 等^[17]在易错 PCR 和 CAST 突变技术都失败的情况下, 以相同基因家族的 *hASNase1* 基因和 *gpASNase1* 基因 (同源度: 75%) 作为亲本基因进行 DNA 改组并筛选出 4 种 K_m 较低的突变体, 氨基酸序列分析发现重组主要发生在 N-末端结构域 (即催化结构域), 其中有一种突变体是在催化结构域之前引入终止密码子。

易错 PCR 多用于高频率诱变单个基因, 与 DNA 改组技术联合应用可以集二者的优点, 这样不仅可以对单一基因进行易错 PCR 随机诱变, 创造新的基因, 还可以将易错 PCR 获得的有益基因改组, 进行序列间的重新编排, 从而获得不同种、属基因家族里基因序列变异为更广、功能更强的基因。一般做法是先用易错 PCR 引入点突变, 构建起始基因文库, 筛选出所有良性克隆, 再以此作为亲本基因进行 DNA 改组, 使得有益突变迅速积累, 基因功能明显提高。而且这样所建的突变体库小, 定向进化效果显著。也可以进行多轮改组, 得到更好的结果^[18]。Luo 等^[19]利用易错 PCR 和 DNA 改组联用的方法对磷酸三酯酶进行定向进化, 获得的最优突变酶活性提高了 25 倍, T5015 达到 67.6。张凯^[20]通过 1 轮易错 PCR 和 2 种 DNA 改组方法联用, 经过两轮高通量筛选, 最终得到酶活提高 2 倍的突变株。因此, 易错 PCR 与 DNA 改组联合应用逐渐成为基因诱变的主要方法之一。

2 高通量筛选方法

定向进化手段改造编码酶的基因必然会有数量庞大的突变库, 通过合适的筛选系统快速地从突变体文库中筛选出符合目标的蛋白质成为关键^[21]。目前, 采用的高通量筛选方法主要可以分为体内筛选和体外筛选 2 种类型^[5]。体内筛选方法依赖完整的细胞结构, 具有代表性的是表面展示技术, 而体外筛选方法则是于胞外完成 (也可利用细胞组成成分), 主要包括核糖体展示技术、差示荧光扫描等。

2.1 表面展示技术 表面展示技术, 是运用基因工程手段将目的基因到宿主基因组中, 是目的蛋白表达并展示于宿主表面, 通过亲和筛选开展综合性功能鉴定。目前常用的表面展示技术有噬菌体表面展示技术和酵母细胞表面展示技术。

2.2 核糖体展示技术 核糖体展示技术的本质是利用形成的 mRNA-核糖体-蛋白质三聚体复合物, 通过核糖体把新生蛋白和其 mRNA 联系起来, 通过删除 PCR 片段的终止密码子产生真核 PRM 复合物, 产生的 PRM 复合物随后通过抗原包被的磁珠进行捕获, mRNA 通过 RT-PCR 无需解离核糖体复合物就可得到相应的 DNA^[22]。Skirgaila 等^[23]运用体外区划技术 (in vitro compartmentalization, IVC) 对核糖体展示技术进行改进, 提出了区划核糖体展示技术 (compartmentalized ribosome display, CRD)。研究者们以油包水乳液的方式对单个三聚体复合物进行区划, 实现单酶分子水平的筛选, 最终筛选的突变型的 M-MuLV 反转录酶在 53~58 °C 依然可以催化合成完整长度的 cDNA 片段 (野生型酶在 48 °C 以上即无法完成)。

2.3 差示荧光扫描 (differential scanning fluorimetry, DSF) 差示荧光扫描作为一种分析蛋白质热稳定性的分析手段, 其方法简单, 效率高。其原理是通过对样品进行缓慢地加热, 在加热的过程中, 检测荧光物质与结构发生改变的蛋白相结合的量, 来研究蛋白质的热稳定性。朱磊^[24]利用 DSF 法发现经过酶切破坏糖基化修饰以后, 在更低的温度下就能使 CTLA4. Ig 的结构发生改变。DSF 可以帮助评估突变蛋白的结构热稳定性, 如果活性热稳定性好的蛋白, 结构热

稳定也好,则可以推测这种突变是通过稳定结构来提高酶的热稳定性的。

3 结论与展望

定向进化是一项体外改造酶的较为成熟的技术,已被成功用于改造酶的活性、热稳定性、底物专一性和对映选择性等^[5]。构建突变文库和高通量筛选是酶定向进化不可或缺的组成部分。在构建突变文库方面还存在对突变率和突变位点的控制不足的问题,碱基偏爱性的问题依然存在,因此探索可控性更强的突变文库构建方法将是研究热点。高通量筛选方面,目前并没有一种通用的筛选方法适用于所有的改组蛋白,所以需要设计针对目的改造特征的筛选方法。要想将基因与酶的产物之间建立起直接的联系依然需要针对不同酶、不同反应和不同底物进行设计^[25]。荧光激活细胞分选技术(fluorescence-activated cell sorting, FACS)近年来发展迅速,具有快速和高通量的特点,是最具潜力的高通量筛选手段之一。

参考文献

- [1] 李珍华,章志量,方秀娟,等. 酶定向进化技术研究进展[J]. 杭州师范大学学报(自然科学版), 2013, 12(6): 550-554.
- [2] HIBBERT E G, DALBY P A. Directed evolution strategies for improved enzymatic performance[J]. Microbial cell factories, 2005, 4(1): 1-6.
- [3] 杨颖,张逢春. 荧光素酶的分类、结构与应用[J]. 北华大学学报(自然科学版), 2006, 7(5): 411-415.
- [4] 于浩然. 理性设计改造荧光素酶的热稳定性[D]. 天津: 天津大学, 2014.
- [5] MCLACHLAN M J, SULLIVAN R P, ZHAO H M. Directed enzyme evolution and high-throughput screening[M]//TAO J H, LIN G Q, LIESE A. Biocatalysis for the pharmaceutical industry: Discovery, development, and manufacturing. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd, 2009: 45-64.
- [6] BAHMANI P, HOSSEINKHANI S. Increase of segmental mobility through insertion of a flexible linker in split point of firefly luciferase[J]. International journal of biological macromolecules, 2016, 94: 762-770.
- [7] 刘韩,吴丽云,高贺,等. 易错 PCR 法提高土芽孢杆菌 ZHI 羧酸酯酶的热稳定性[J]. 微生物学报, 2015, 55(8): 1060-1067.
- [8] MIYAZAKI K, TAKENOUCHI M, KONDO H, et al. Thermal stabilization of *Bacillus subtilis* family-11 xylanase by directed evolution[J]. Journal of biological chemistry, 2006, 281(15): 10236-10242.
- [9] WONG T S, TEE K L, HAUER B, et al. Sequence saturation mutagenesis

- (SeSaM): A novel method for directed evolution[J]. Nucleic acids research, 2004, 32(3): 2-8.
- [10] WONG T S, ROCCATANO D, LOAKES D, et al. Transversion-enriched sequence saturation mutagenesis (SeSaM-Tv+): A random mutagenesis method with consecutive nucleotide exchanges that complements the bias of error-prone PCR. [J]. Biotechnology journal, 2010, 3(1): 74-82.
- [11] ACEVEDO J P, REETZ M T, ASENJO J A, et al. One-step combined focused epPCR and saturation mutagenesis for thermostability evolution of a new cold-active xylanase[J]. Enzyme & microbial technology, 2017, 100: 60-70.
- [12] 于浩然. 理性设计改造荧光素酶的热稳定性[D]. 天津: 天津大学, 2014.
- [13] WANG Z G, ZHOU S, ZHANG S L, et al. Semi-rational engineering of a thermostable aldo-keto reductase from *Thermotoga maritima* for synthesis of enantiopure ethyl-2-hydroxy-4-phenylbutyrate (EHPB) [J]. Scientific reports, 2017, 7(1): 4007.
- [14] 钮成拓. 芽孢杆菌属来源 1,3-1,4-β-葡聚糖酶的热稳定性研究[D]. 无锡: 江南大学, 2017.
- [15] REETZ M T, BOCOLA M, CARBALLEIRA J D, et al. Expanding the range of substrate acceptance of enzymes: Combinatorial active-site Saturation test [J]. Angew Chem Int Ed Engl, 2005, 44(27): 4192-4196.
- [16] MADDOCK D J, GERTH M L, PATRICK W M. An engineered glycerol dehydratase with improved activity for the conversion of *meso*-2,3-butane-diol to butanone[J]. Biotechnology journal, 2017, 12(12): 1-9.
- [17] RIGOUIN C, NGUYEN H A, SCHALK A M, et al. Discovery of human-like L-asparaginases with potential clinical use by directed evolution[J]. Scientific reports, 2017, 7(1): 1-13.
- [18] 高义平,赵和,吕孟雨,等. 易错 PCR 研究进展及应用[J]. 核农学报, 2013, 27(5): 607-612.
- [19] LUO X J, ZHAO J, LI C X, et al. Combinatorial evolution of phosphotriesterase toward a robust malathion degrader by hierarchical iteration mutagenesis[J]. Biotechnol Bioeng, 2016, 113(11): 2350-2357.
- [20] 张凯. 基于易错 PCR 和 DNA 改组技术定向改造赖氨酸脱羧酶[D]. 南京: 南京工业大学, 2014.
- [21] 黄春晓,段学军. 蛋白质定向进化的高通量筛选方法[J]. 山东农业大学学报(自然科学版), 2008, 39(4): 653-656.
- [22] 郭园. 核糖体展示研究进展[J]. 生物技术通报, 2016, 32(8): 22-27.
- [23] SKIRGAILA R, PUDZAITIS V, PALIKSA S, et al. Compartmentalization of destabilized enzyme-mRNA-ribosome complexes generated by ribosome display: A novel tool for the directed evolution of enzymes[J]. Protein engineering design & selection, 2013, 26(7): 453-461.
- [24] 朱磊. 重组 CTLA4-Ig 融合蛋白的糖基化修饰分析及其对稳定性和功能影响的研究[D]. 上海: 第二军医大学, 2016.
- [25] 黄春晓,段学军. 蛋白质定向进化的高通量筛选方法[J]. 山东农业大学学报(自然科学版), 2008, 39(4): 653-656.

科技论文写作规范——标点符号

标点符号按照 GB/T 15834—2011 执行,每个标点占 1 格(破折号占 2 格)。外文中的标点符号按照外文的规范和习惯。注意破折号“——”、一字线“—”(浪纹线“~”)和短横线“-”的不同用法。破折号又称两字线或双连划,占 2 个字身位置;一字线占 1 个字身位置,短横线又称半字线或对开划,占半个字身位置。破折号可作文中的补充性说明(如注释、插入语等),或用于公式或图表的说明文字中。一字线“—”(浪纹线“~”)用于表示标示相关项目(如时间、地域等)的起止。例如 1949—1986 年,北京—上海特别旅客快车。参考文献范围用“-”。短横线用于连接词组,或用于连接化合物名称与其前面的符号或位序,或用于公式、表格、插图、插图、型号、样本等的编号。外文中的破折号(Dash)的字身与 m 宽,俗称 m Dash,其用法与中文中的破折号相当。外文的连接符俗称哈芬(hyphen)。其中,对开哈芬的字身为 m 字身的一半,相当于中文中范围号的用法;三开哈芬的字身为 m 字母的 1/3,相当于中文中的短横线的用法。