

微生物酶的分子改性和人工进化的研究进展

王正祥 刘吉泉 诸葛健

(无锡轻工大学生物工程学院工业微生物研究中心 无锡 214036)

摘 要 运用分子生物学技术对微生物来源的酶进行分子改性和人工进化在过去几年中取得了令人瞩目的进展。本文综述了用于酶分子改性和人工进化的主要分子生物学方法,如易错 PCR 技术、DNA 体外随机拼接技术等及其在酶的分子进化和改性中应用成就。

关键词 酶,人工进化,DNA 体外随机拼接

中图分类号 Q814.9 文献标识码 C 文章编号 1000-3061(2000)03-0301-03

微生物来源的酶已在大量工业过程中得到成功应用,通常,工业应用的微生物酶制剂主要通过微生物的分离培养和筛选来获得。通过筛选还获得了能够在一些特殊工业过程如高温、高盐、有毒介质、非水相等中应用的若干微生物酶。由于在自然界中大量存在的微生物至今并未获得成功的分离培养,因此,人类所发现的微生物来源的酶的种类和数量是极其有限的。通过分子生物学技术改造现有酶(蛋白质工程)或对未知微生物所产生的微生物的酶进行筛选将成为微生物酶研制和开发的热点。

蛋白质工程技术包括通过对已知酶分子一级结构的改变来创造新的蛋白质。蛋白质工程技术之所以得以实现,依附于两大技术的发明,一是定点诱变技术,另一是蛋白质分子的三维立体结构的计算机辅助分析。但这一技术一般仅适用于对那些结构已被解析的蛋白质家族的蛋白质,并且由于对蛋白质一级结构的改变,往往同时带来对靶酶的结构和功能的负面影响。事实上,通过不同方法对酶分子的修饰所导致的特定区域氨基酸残基组成的改变而导致的蛋白质构象改变往往不能通过计算机辅助分析进行预测。酶分子编码基因的随机拼接技术(DNA shuffling)以及运用分子生物学技术对未知微生物的酶基因的克隆和筛选已为新酶的发现带来新的机遇和新的途径。

1 真核细胞通过外显子随机拼接获得蛋白质进化

与原核细胞基因不同,真核细胞基因中含有大量的内含子,一个基因的编码序列往往被大量内含子分隔开。真核细胞通过对转录产物 mRNA 的剪切和拼接过程将内含子切除。编码序列(外显子)通过拼接成为一完整的编码序列,即成熟 mRNA。在大多数基因中,一个外显子通常编码某个蛋白质的某一功能区。因此,通过内含子间的重组过程有可能将相互独立的不同外显子拼接入某个基因中并形成全新的蛋白质,从而导致蛋白质分子的快速进化。若干大分子的进化过程已证实了这一点,如血凝蛋白的分子进化、人类主要组织相容性抗原系统的多样性、免疫球蛋白超家族及其多样

性等。因此,通过模拟真核细胞中 DNA 随机拼接这一蛋白质进化过程便有可能创造新的酶分子。

2 酶分子改性和人工进化的常用技术

2.1 通过基因嵌合获得改性的嵌合酶(融合酶)

通过对一蛋白质家族的氨基酸组成序列进行比较,不难发现特定氨基酸残基或某一肽链区为不同蛋白质功能所必需。通过对其基因的突变可以证实对某一蛋白质不同的结构-功能区的序列组合的预测,通过对这些功能区的交换而形成的嵌合基因是确定某一特定结构-功能区的有效方法之一。当然,嵌合酶技术多可用于创造具有新功能的改性的酶。乙酰乙酰载体蛋白去饱和酶能够在特定链长的脂肪酸的特定位置点上引入双键。植物油中之所以含有高比例的不饱和脂肪酸,主要是因为其含有一组具有不同底物特异性的乙酰乙酰载体蛋白去饱和酶。通过基因嵌合技术已确定了多个决定底物特异性的乙酰乙酰载体蛋白去饱和酶的功能区和结构基础^[1]。同样,运用基因嵌合技术已确定了 *Pseudomonas pseudoalcaligenes* KF707 和 *Burkholderia cepacia* LB400 的二苯双氧酶的底物特异性功能区并组建具有更宽底物特异性的嵌合酶^[2]。有趣的是,*Pseudomonas putida* 的 *xyIE* 和 *nahH* 基因编码的儿茶酚 2,3-双加氧酶在氨基酸组成和序列上具有 84% 的同源性,通过基因嵌合技术获得的儿茶酚 2,3-双加氧酶不但具有与原酶相同的催化活性和特异性,而且在高温下更稳定^[3]。这一结果显示,通过基因嵌合技术还可以对酶的其他生化性质进行改进。另外,人类重要的 3 个糖蛋白激素 hCG、FSH、hTSH 皆由 α 亚单位和 β 亚单位组成并且三者的氨基酸组成具有高度同源性但与 G-蛋白耦合受体结合时则显示完全不同的高度特异性。通过对决定其受体结合特异性的 α 亚单位的 C-末端置换,含有 hFSH 这段区域的 hCG 嵌合蛋白显示出 hFSH 活性^[4]。由此可以看出,通过用相关蛋白的特定区域替换某一蛋白的特定区域的蛋白质人工进化的巨大潜力。通过相关蛋白质分子的氨基酸序列的随机拼接有可能成为创造具有崭新活性的

蛋白质的一项极有效的技术。

2.2 用易错 PCR 技术进行随机突变获得蛋白质人工进化

酶分子改性的另一项实用技术是通过向相应编码基因的 DNA 分子中随机引入碱基,再经筛选获得所需的突变株。这一技术所依附的实验技术是易错多聚酶链反应,通过易错 PCR 可以获得蛋白质分子的随机突变体。

枯草芽孢杆菌蛋白酶 E 是一类丝氨酸蛋白酶,除具有典型的蛋白酶活性外,在有机溶剂中还具有催化肽键形成的催化活性。运用易错 PCR 技术获得了一个枯草芽孢杆菌蛋白酶 E 突变体,其氨基酸组成中有 10 个氨基酸残基被替换,在有机溶剂中催化肽键形成的催化活性提高 150 倍以上。需要指出的是,此法在进行相应基因的体外突变时,往往出现有益突变远较有害突变少,如此,一个基因突变体中如出现大量有害突变和少量有益突变,则一般仅能形成无活性酶分子,同样,如果突变位点过少,则野生型序列在整个体系中占绝对优势,此将不利于后续的筛选和鉴定工作^[5]。易错 PCR 技术由 Leung 等发明,改变反应体系中的 Mg^{2+} 和 dNTPs 浓度便可有效地控制这一技术所引导的点突变率^[6]。

上述方法的局限性是显而易见的。因此,根据外显子随机拼接、基因嵌合及易错 PCR 的通用原理建立起来的 DNA 随机拼接技术(DNA shuffling)^[7]将使酶分子体外人工进化更为快捷和便利。

2.3 DNA 体外随机拼接技术

根据分子生物学的基本原理可知, DNA 分子是由两条互补的双链组成, DNA 合成时需要在 5' 端有一互补的引物,才能引导 DNA 复制。在 PCR 技术中,这一引物经人工设计与合成。通过获得的特定引物,经 PCR 后可对经引物限定的一段 DNA 序列进行体外扩增。DNA 体外随机拼接技术依赖 PCR, 又不完全等同于传统的 PCR 技术,所以, DNA 体外随机拼接又称为有性 PCR。此法的一般过程为:将一组不同来源的基因 DNA 或来自同一基因的具有不同突变部位的突变体 DNA 用 DNA 酶 I 进行随机切割,形成较小的 DNA 片段以获得 DNA 分子的随机切割片段混合物,以此混合物在不加引物的情况下直接进行 PCR。DNA 酶 I 切割的 DNA 片段通过相互间的同源性进行随机互补并以此为引物,经 PCR 扩增,获得 DNA 分子的复制,由此获得大量 DNA 不同区域间的随机重新组合的新 DNA 突变体,完成这一 PCR 随机扩增后,再加入特定引物进行最后的 PCR 扩增,便可获得全长基因的 PCR 产物。将 PCR 产物在一定寄主细胞中表达并筛选出希望突变体,如此进行多次循环^[7]。

β -内酰胺酶是一种水解头孢类抗生素的微生物酶, Stemmer^[8,9]等运用 DNA 体外随机拼接技术对 β -内酰胺酶进行改造,每次循环后,从中筛选出数百个酶活提高的突变体 DNA 序列用于下次循环。经过 3 次循环获得一个赋予宿主细胞对头孢霉素抗性性能提高 16000 倍的突变体。为了减少非必需突变,将野生型 DNA 和突变体 DNA 混合进行 DNA 体外随机拼接(形象地称之为“回交”PCR)循环,使突变体中减少了 4 个沉默突变并获得 2 个新的突变体。同样,这一技术已在改进鲸鱼绿色荧光蛋白的荧光信号强度中获得理想结果,荧光信号强度提高了 45 倍。此外,通过此技术

将 β -半乳糖苷酶的 p-硝基苯岩藻糖苷酶的活性提高了 60 倍。

通过 DNA 体外随机拼接技术还可将来自于不同序列的、相互独立的、更为优良的性能组合到一个新的酶分子中。这一技术已成功地将枯草芽孢杆菌蛋白酶对特定底物的专一和对过氧化氢稳定的性能组合到一个新突变酶分子中。

3 微生物酶分子的人工进化

3.1 热稳定性的人工进化

在一般工业过程中,高温可以提高底物的溶解度,降低反应基质的粘度,减少微生物污染以及提高伴随发生的非酶促反应的速率。因此,在微生物酶分子的改性和人工进化研究中,大量的研究目标是提高酶分子的热稳定性。一般而言,单一位点上的有益突变可以将酶分子的解链温度(T_m)提高 1~2℃。Pjura 等通过随机突变,向 T4 噬菌体溶菌酶中引入了 11 个点突变使其热稳定性提高 0.8~1.4℃^[10]。Haruki 等则在在大肠杆菌核酸酶 HI 的研究中发现,引入 7 个点突变后,其 T_m 提高 4.2℃,同时发现,对某一氨基酸残基进行点突变后, T_m 提高了 7.8℃^[11]。同样, Joyet 等通过随机突变将 α -淀粉酶的 T_m 提高了 11℃,在 90℃ 下的半衰期提高了近 10 倍^[12]。进一步对其氨基酸残基组成和顺序进行分析发现,改性的 α -淀粉酶中仅发生一个氨基酸残基的改变。在赋予卡那霉素抗性的卡那霉素核苷转移酶中引入 2 个点突变,则其 T_m 提高了 15℃。

3.2 适应人工环境的酶分子热稳定性或活性的人工进化

有机溶剂的使用可提高某些底物的溶解性或者增加底物间的相互反应速率。但在自然界存在的酶分子,通常在有机溶剂和水-有机混合溶液中失去原有的催化活性。提高随机突变和筛选从枯草芽孢杆菌蛋白酶 E 获得的一个突变株能够在 60% 二甲基甲酰胺溶液中保持与在水溶液中相等的酶活,同样,通过随机突变和基因重组将 p-硝基苯酯酶在 30% 二甲基甲酰胺水溶液中的酶活提高了 100 倍以上^[13,14]。某些酶在较低温度下保持较高的酶活同样为若干应用过程所必需。Kano 等通过人工进化方法从嗜中温枯草芽孢杆菌蛋白酶 BPN' 在 10℃ 时的酶活提高 10%,在 1℃ 时的酶活提高 30%,而更高温度下的酶活保持不变^[15]。

在洗涤剂用酶的研究和应用中,改变和消除酶活性和稳定性对金属离子的依赖性也极为重要,因为,几乎所有洗涤剂中都含有金属螯合剂。用于洗涤剂中的蛋白酶一般皆需要金属离子来维持其活性和稳定性。Bryan 等首先将枯草芽孢杆菌蛋白酶的钙离子结合区进行缺换突变,产生了高度不稳定的枯草芽孢杆菌蛋白酶突变体,再随机引入 10 个氨基酸残基到这一钙离子结合区获得新的突变体,在低浓度游离钙离子溶液中的酶活半衰期提高 12.5 倍,进一步进行随机突变和筛选,获得更为稳定的非钙离子依赖性枯草芽孢杆菌蛋白酶突变体。钙离子依赖性在 α -淀粉酶和糖化酶的活性和稳定性维持中也同样存在。运用人工进化方法已成功地将糖化酶的酶活和稳定性维持的钙离子依赖性消除并已成功开发出商业用酶。

3.3 底物特异性和通过对新底物催化活性的人工进化

在这类酶分子人工进化研究中,通过突变降低酶分子的

K_m 值一般皆可有效地提高酶的催化效率。Sidhu 和 Borgford 在研究中得到一个 *Streptomyces griseus* 蛋白酶 B 的突变体,其针对 P1 结合位点上带有蛋氨酸的多肽的活性明显提高而其催化常数不变^[16]。在对 T7 RNA 多聚酶向 DNA 多聚酶活性的人工进化研究中发现了相似的结果。同样,在改变腺苷酸环化酶的一级底物活性的研究中得到鸟苷酸环化酶活性提高 4.5 倍的突变体,而原有的腺苷酸环化酶的活性仅存 4%。在同一研究中还获得既保持原腺苷酸环化酶活力不变,又使鸟苷酸环化酶活力提高 3 倍的突变体,由此拓宽了酶的底物范围。Zhang 等运用 DNA 体外随机拼接技术对大肠杆菌 β -半乳糖苷酶的底物特异性进行人工进化,经过 7 个循环,获得更高果糖底物特异性酶活。进一步研究发现,突变体酶分子中的 6 个氨基酸残基被置换,其中 3 个位于底物结合口的功能区 3 内,另外 3 个则既不位于底物结合口也不位于酶活中心^[17]。

3.4 对映体立体选择性的人工进化

转氨酶已被成功用于从前体酮基化合物生产手性胺类化合物。转氨酶也用于拆分含有不正确的立体化学性质的

胺的消旋胺混合物。Matcham 和 Bowen 对一个催化 β -四酮转变成胺的转氨酶进行人工进化,从 10000 个克隆中筛选获得 10 个突变体,其对映体选择性从 65% 提高到 90% 以上^[18]。

4 结束语

通过随机引入点突变到某一 DNA 分子中的传统方法有化学诱变法、物理诱变法、致突变宿主细胞法、有毒核苷酸掺入法等,这些方法在特定情况下仍然是一些有用的技术。对于那些酶分子的三级结构已经比较清楚,通过寡核苷酸盒 PCR 技术对特定区域的核苷酸序列进行定点突变和一段序列的置换也是极有效的方法,如蛋白酶的抗氧化性能就是通过这一方法获得改性的。然而,所有这些人工进化方法都离不开对某一酶分子编码基因 DNA 的获得。因此,通过分子生物学技术对那些尚不能进行人工分离培养或尚未被人类所认识的、但在自然界中确实存在的微生物酶基因的直接筛选和克隆同样是十分重要和诱人的^[19,20]。

参 考 文 献

- [1] Cahoon E B , Lindqvist Y , Schneider G *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA* ,1997 ,**94** :4872~4877
- [2] Kimura N ,Nishi A ,Goto M *et al.* *J Bacteriol* ,1997 ,**179** :3936~3943
- [3] Cerdan P ,Rekik M ,Harayama S. *Eur J Biochem* ,1995 ,**229** :113~118
- [4] Campbell R K ,Bergert E R ,Wang Y *et al.* *Nat Biotechnol* ,1997 ,**15** :439~443
- [5] Chem K ,Arnold F H. *Proc Natl Acad Sci USA* ,1993 ,**90** :5618~5622
- [6] Leung D W ,Chen E ,Goeddel D V. *Technique* ,1989 ,**1** :11~15
- [7] Smith G P. *Nature* ,1994 ,**370** :324~325
- [8] Stemmer W P C. *Nature* ,1994 ,**370** :389~391
- [9] Stemmer W P C. *Proc Natl Acad Sci USA* ,1994 ,**91** :10747~10751
- [10] Pjura P ,Matsumura M ,Baase W A *et al.* *Protein Sci* ,1993 ,**2** :2217~2225
- [11] Haruki M. *Biol Chem* ,1994 ,**269** :904~911
- [12] Joyet P ,Declercq N ,Gaillardin C. *Biotechnology* ,1992 ,**10** :1579~1583
- [13] Moore J C ,Arnold F H. *Nat Biotechnol* ,1996 ,**14** :458~467
- [14] Moore J C ,Jin H M ,Kuchner O *et al.* *J Mol Biol* ,1997 ,**272** :336~347
- [15] Kano H ,Tauchi S ,Momose H. *Appl Microbiol Biotechnol* ,1997 ,**47** :46~51
- [16] Sidhu S S ,Borgford T J. *J Mol Biol* ,1996 ,**257** :233~245
- [17] Zhang J H ,Dawes G ,Stemmer W P C. *Proc Natl Acad Sci USA* ,1997 ,**94** :4504~4509
- [18] Matcham G W ,Bowen A R S. *Chem Today* ,1996 ,**14** :20~24
- [19] Hawksworth D L. *Mycol Res* ,1995 ,**99** :127~128
- [20] Dalboge H ,Lange L. *Trends Biotechnol* ,1998 ,**16** :265~272

Molecular Modification and Artificial Evolution of Microbial Enzymes

WANG Zheng-Xiang LIU Ji-Quan ZHUGE Jian

(*Research Center of Industrial Microorganisms , School of Biotechnology , Wuxi University of Light Industry , Wuxi 214036*)

Abstract There exists a remarkably progress in molecular modification and artificial evolution of microbial enzymes in recent years. Error-prone polymerase chain reaction and DNA shuffling have been developed and successfully applied and a lot of startling achievements have been obtained in artificial evolution of enzymes.

Key words Enzyme , artificial evolution , DNA shuffling