

分子酶工程学研究进展

周亚凤¹ 张先恩^{1*} Anthony E. G. Cass²

¹(中国科学院武汉病毒研究所, 武汉 430071)

²(Biochemistry Department, Imperial College of Science, Technology & Medicine, London, SW72AY, UK)

摘要 酶工程的研究已经发展到分子水平, 通过基因操作, 已实现了许多酶的克隆和表达。定点突变成为研究酶结构与功能的常规手段, 并被广泛用于改善酶的性能。体外分子进化方法则大幅提高了酶分子的进化效率, 并有可能发展新功能酶。融合蛋白技术的发展使构建新型多功能融合酶成为可能。这里对分子酶工程学的研究与发展情况进行了综述。

关键词 分子酶工程, 基因工程, 定点突变, 体外分子定向进化, 融合酶

中图分类号 TQ931 文献标识码 C 文章编号 1000-3061(2002)04-0401-06

酶, 由于其特异和高效的催化作用, 在生命活动中扮演重要的角色。其中, 尤其是源于微生物的酶, 很早就被广泛开发服务于人类的各种需求, 如酿造、酶法转化、疾病诊断与治疗、药物生产、环境污染去除, 等等。然而, 天然酶常常十分昂贵, 且大多数酶由于非常“娇嫩”而难以实际应用。近年来, 结构生物学和基因操作技术的发展使得科学家能够对酶分子进行有效地改造, 甚至开始为“目的”而设计, 从而导致了分子酶工程学 (Molecular enzyme engineering) 的发展。概括地说, 分子酶工程学就是采用基因工程和蛋白质工程的方法和技术, 研究酶基因的克隆和表达、酶蛋白的结构与功能的关系以及对酶进行再设计和定向加工, 以发展性能更加优良的酶或新功能酶。当前的研究热点可以概括为 3 个方面: 一是利用基因工程技术大量生产酶制剂; 二是通过基因定点突变 (Site directed mutagenesis) 和体外分子定向进化 (In vitro molecular directed evolution) 对天然酶蛋白进行改造; 三是通过基因和基因片段的融合构建双功能融合酶 (Fusion enzyme)。

1 酶的基因克隆和异源表达

目前已鉴定的酶有 3 000 多种, 其中有商品供应的常规酶约有 500 种, 限制酶和 DNA 甲基转移酶有 350 余种, 多酶混合物约 100 种^[1]。天然酶在生物体中含量一般较低, 难以提取和大量制备, 限制了它的推广应用。重组 DNA 技术的建立, 使人们可以较容易地克隆各种各样天然的酶基因, 并将其在微生物或其它生物系统中高效表达, 从而在很大程度上摆脱对天然酶源的依赖。这一原理已成功应用于酶制剂的工业生产。目前, 世界上最大的工业酶制剂生产厂商

丹麦 Novozymes 公司生产的酶制剂 80% 为基因工程产品^[2]。反之, 也可通过转基因手段将微生物的酶基因或酶的抑制剂基因转入动植物细胞中, 使之产生抗菌菌、抗虫等能力。总之, 酶异源表达的应用范围非常广泛, 已遍及工业、医药、农业、化学分析、环境保护、能源开发和生命科学研究等各个领域。表 1 列出了部分酶异源表达方面的研究成果。

尽管报道成功地从克隆化基因表达出功能酶蛋白的文献不断出现, 但每一种新基因都有不同的表达难度。基因工程菌在培养过程中, 常易出现质粒变异和缺失现象, 从而严重影响重组酶的产率。其原因主要是产生了质粒的“分离不稳定性” (Segregational instability) 和“结构不稳定性” (Structural instability)。前者可采用抗生素选择压法解决, 后者则较复杂, 有人报道可通过控制培养条件、调整菌体的生长速度加以解决。基因表达产物合成后, 或停留在细胞质中, 或结合于质膜上, 组成细胞内酶; 或穿过质膜外输到细胞周质或培养基中成为细胞外酶。从生产角度而言, 外泌显然更为有利。要使表达产物能够外泌, 通常要在产物的 N-末端添加一段有 10 个左右亲水氨基酸和相继 20~30 个疏水氨基酸组成的信号肽。对于大肠杆菌表达系统, 可在目的基因的 N-末端接上一段青霉素酶、磷酸酯酶或外膜蛋白的信号肽序列; 对于枯草杆菌表达系统, 则往往接上一段 α -淀粉酶或地衣芽孢杆菌的青霉素酶基因的信号肽序列。此外, 重组酶蛋白在宿主细胞中的稳定性问题对酶制剂的生产也至关重要。外源基因表达产物作为异体蛋白将面临可能会被宿主细胞的蛋白酶分解的问题。解决这一问题可从三方面着手: 一是选择蛋白酶基因缺失的变异株作为受体细胞, 如 *lon⁻* 变异

株 二是同时克隆蛋白酶抑制基因,例如 T4 的 *Pin* 基因;三是促进基因表达产物的加速分泌。

表 1 部分酶的异源表达及应用(参考文献略)

Table 1 Some of studies on enzyme expression

酶	供体	受体	应用
<i>Taq</i> DNA 聚合酶	<i>Thermus aquaticus</i>	大肠杆菌	分子生物学工具酶
T4 DNA 连接酶	噬菌体	大肠杆菌	分子生物学工具酶
青霉素酰化酶	巨大芽孢杆菌	毕赤酵母、枯草杆菌	抗生素的合成
尿激酶	人	大肠杆菌	临床治疗血栓性疾病
溶血纤酶原激活剂	动物组织	大肠杆菌	治疗血栓性疾病
葡萄糖氧化酶	黑曲霉	酵母、大肠杆菌	葡萄糖定量分析
溶葡萄球菌酶	——	小鼠	抵抗金黄色葡萄球菌的感染
植酸酶	黑曲霉	毕赤酵母	农业饲料用酶
耐高温 α -淀粉酶	嗜热脂肪芽孢杆菌	枯草杆菌	食品工业
碱性蛋白酶	假单胞菌	大肠杆菌	洗涤及制革工业
纤维素酶	李氏木霉	酵母、大肠杆菌	造纸工业及环保
脂酶	嗜热解脂芽孢杆菌	<i>Bacillus brevis</i>	洗涤、造纸等工业
聚羟基烷酸合成酶	产碱杆菌	欧文氏菌	降解塑料,解决白色污染问题
氯霉素乙酰转移酶	重组噬菌体	蚕	医药用酶
葡萄糖异构酶	地衣芽孢杆菌、嗜热高温菌	大肠杆菌	生产高果糖浆
有机磷降解酶	假单胞菌、黄杆菌	大肠杆菌	有机磷农药的降解
溶菌酶	人	昆虫细胞、大肠杆菌	食品和医药领域
糖化酶	泡盛酒曲酶、黑曲霉	酿酒酵母	酒精生产
凝乳酶	牛	酵母	生产乳酪

2 酶分子的定向改造和进化

酶分子本身蕴藏着很大的进化潜力,许多功能有待于开发。分子酶工程设计可以采用定点突变(Site directed mutagenesis)和体外分子定向进化(*In vitro* molecular directed evolution)两种方式对天然酶分子进行改造^[3]。定点突变需要知道酶蛋白的一级结构及编码序列,并根据蛋白质空间结构知识来设计突变位点。体外定向进化是近几年新兴起来的一种蛋白质改造新策略,它可以在尚不知道蛋白质的空间结构,或者根据现有的蛋白质结构知识尚不能进行有效的定点突变时,借鉴实验室手段在体外模拟自然进化的过程(随机突变、重组和选择),使基因发生大量变异,并定向选择出所需性质或功能,从而使几百万年的自然进化过程在短期内得以实现。

2.1 定点突变

定点突变技术可以随心所欲地在已知 DNA 序列中取代、插入或缺失一定长度的核苷酸片段。该方法与使用化学因素、自然因素导致突变的方法相比,具有突变率高、简单易行、重复性好的特点。图 1 为 Over-lap extension PCR 介导定点突变的基本过程,其中 C 和 D 是相互匹配,并含有特定突变点的一对引物。利用定点突变技术对天然酶蛋白的催化性质、底物特异性和热稳定性等进行改造已有很多成功的实例^[4-11]。葡萄糖异构酶(Glucose isomerase)是工业上大规模以淀粉制备高果糖浆的关键酶,也是国际上公认的研究酶催化机制及建立蛋白质工程技术最好的模型之一。为提高葡萄糖异构酶的热稳定性,朱国萍等人^[4]用双引物法对葡萄糖异构酶基因进行了体外定点诱变,以 Pro138 替代 Gly138,在

酶比活相近的情况下,突变型葡萄糖异构酶的热半衰期比野生型长一倍,最适反应温度提高 10~12℃。据分析,可能由于 Pro138 替代 Gly138 引入的一个吡咯环刚好能够填充 Gly138 附近的空洞,使突变蛋白的空间结构更具刚性,从而提高了酶的热稳定性。

然而,定点突变技术只能对天然酶蛋白中少数的氨基酸残基进行替换,酶蛋白的高级结构基本维持不变,因而对酶功能的改造较为有限。同时,由于已有的结构与功能相互关系的信息远远不能满足当今人们对蛋白质新功能的要求,因此目前采用体外分子定向进化的方法来改造酶蛋白的研究越来越多,并已在短短几年内取得了令人瞩目的成就。

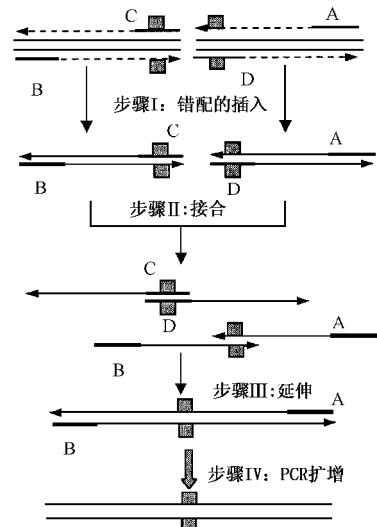


图 1 Over-lap extension PCR 介导的定点突变

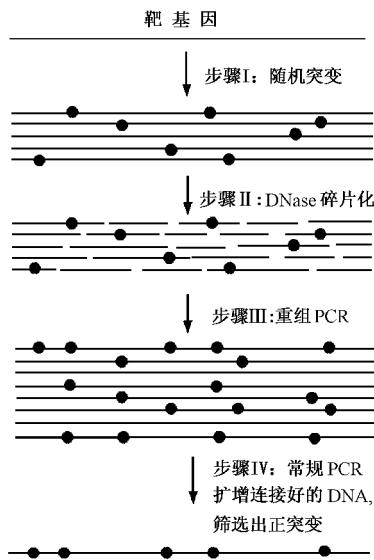


图 2 DNA shuffling 介导的随机突变

Fig.2 DNA shuffling procedure

2.2 易错 PCR (Error prone PCR)

易错 PCR 是一种相对简单、快速、廉价的随机突变方法。它通过改变 PCR 反应条件,如降低一种 dNTP 的量(降至 5%~10%)以 dITP 来代替被减少的 dNTP,增加 Mn^{2+} 和 Mg^{2+} 的浓度或使用低保真度的 DNA 聚合酶等,使碱基在一定程度上随机错配而引入多点突变。枯草杆菌蛋白酶 (Subtilisin) 是一种重要的工业用酶,广泛应用于合成洗涤剂、鞣革和医药行业。Arnold 等通过易错 PCR 对枯草杆菌蛋白酶 E 进行了系列体外进化研究。在 dGTP、dCTP、dTTP 浓度为 1mmol/L 的情况下,将 dATP 的浓度降至 0.1mmol/L,对编码该酶从 49 位氨基酸到 C 端的 DNA 片段进行易错 PCR,经筛选得到几个在高浓度的二甲基甲酰胺 (Dimethylformamide, DMF) 中酶活力明显提高的突变株。其中三点突变体 D60N + Q103R + N218S 在 85% DMF 条件下的酶活力是野生型的 38 倍^[12];十突变体 D60N + D97G + Q103R + G131D + E156G + N181S + S182G + S188P + N218S + T255A 在 60% DMF 中的酶活力提高了 256 倍^[13]。

2.3 DNA shuffling

DNA shuffling 于 1994 年由美国的 Stemmer 提出^[14]。这种方法不仅可以对从随机突变文库中筛选出来一组突变基因为进化,还可以将具有结构同源性的几种基因进行体外重组,共同进化出一种新的蛋白质。DNA shuffling 的基本过程如图 2 所示。通过这种方法产生的多样性文库,可以有效积累有益突变,排除有害突变和中性突变,同时也可实现目的蛋白质多种特性的共进化^[15-18]。 β -内酰胺酶是一种水解头孢类抗生素的微生物酶。Stemmer^[19]等运用 DNA shuffling 对 β -内酰胺酶进行了体外分子进化。经过三轮 DNA shuffling 循环,获得了一个赋予宿主细胞对头孢霉素抗性性能提高 16 000 倍的突变体。D-乙内酰脲酶 (D-hydantoinase, HYD) 和 N-羧基酰酶 (N-carbamylase, CAB) 是合成 D-氨基酸的两种酶。

Kim 等^[20]构建了具有双酶活力的 N-羧基酰酶/D-乙内酰脲酶融合蛋白。为改善该融合蛋白的稳定性,他们采用 DNA shuffling 的方法对其进行了体外指导进化。经过多轮 DNA shuffling 操作,筛选出稳定性有明显改善的融合蛋白 F11。与原融合蛋白相比, F11 有 19 个突变碱基,导致 11 个氨基酸发生变化。在生产条件下(45℃, pH 7.0), 18h 后 F11 可保留 50% 以上的羧基酰酶和 85% 以上的乙内酰脲酶活力,而原融合蛋白在 5 h 后就失去了一半的羧基酰酶,7 h 后失去一半的乙内酰脲酶活力。突变蛋白稳定性的改善,有效地提高了 D-氨基酸的合成效率,在相同的条件下, F11 合成 D-氨基酸的效率是原融合蛋白的 6 倍。

当 DNA shuffling 用来重组一系列进化上相关的基因时,就称为 Family shuffling。一个突出的例子是,当将 4 种头孢菌素酶基因进行 Family shuffling 时,酶活最高可增加 540 倍,而单基因 shuffling 只增加 8 倍^[21]。此外,最近两年在 DNA shuffling 的基础上又延伸出了 StEP (Staggered extension process) 重组^[22]、随机引物体外重组 (Random-priming *in vitro* recombination, RPR)^[23]、临时模板随机嵌合生长 (Random chimeragenesis on transient templates, RACHITT)^[24] 等定向进化方法。StEP 重组是一种简化的 DNA shuffling 方法。它不是由短片段组装全长基因,而是在 PCR 反应中,将含不同点突变的模板混合,随之进行多轮变性、短暂复性及延伸反应,在每一轮中,那些部分延伸的片段可以随机地杂交到含不同突变的模板上继续延伸,由于模板转换而实现不同模板间的重组,如此重复直至获得全长基因片段。RPR 法是用一套随机序列引物,产生互补于模板不同位点的短 DNA 片段库(由于碱基错配,这些短 DNA 片段含有少量的点突变),然后进行类似于 DNA 改组的全长基因装配反应,获得突变文库。RPR 法的特点是可用单链 DNA 或 mRNA 作模板、不受模板长度限制、无序列偏爱性等。RACHITT 技术是与 DNA shuffling 概念上明显不同的、改进的基因家族改组技术。它不包括热循环、链转移或交错延伸反应,而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。其中的悬垂切割步骤可使比 DNase 消化片段更短的短片段得以重组,明显提高重组的频率和密度。

3 融合蛋白与融合酶

蛋白质的结构常常可以允许某个结构域的插入与融合^[25]。DNA 重组技术的发展与应用使不同基因或基因片段的融合可以方便地进行,融合蛋白经合适的表达系统表达后,即可获得由不同功能蛋白拼合在一起而形成的新型多功能蛋白。目前,融合蛋白技术已被广泛应用于多功能工程酶的构建与研究中,并已显示出较高的理论及应用价值。

3.1 融合蛋白与酶的表达和纯化

融合蛋白技术的应用可以使酶的表达与纯化方便地进行。一般来说,与酶融合的小分子蛋白或短肽具有识别特异性结构分子的特征。将酶基因与一段被称为“亲和尾 (Affinity tag)”的编码序列相连接,这段“亲和尾”可以与亲和层析

柱上的配基特异地结合,使目标蛋白可以用亲和层析的方法快速而简便地纯化出来。目前,许多这样的融合蛋白表达与

纯化系统已经商业化,其基本特征也有详细的报道^[26]。

表 2 商业化融合蛋白表达和纯化系统

Table 2 Examples of commercial systems used in the production of recombinant proteins fused to affinity tails^a

Fusion partner	Size	Ligand	Elution condition	Supplier(s)
ZZ ^b	14kD	IgG	Low pH	Pharmacia, Sweden
His tail	6-10aa	Ni ²⁺	Imidazole	Novagen, USA; Invitrogen, USA; Qiagen, USA
Strep-tag	10aa	Streptavidin	Iminobiotin	Biometra, Germany
PinPoint TM	13kD ^c	Streptavidin ^d	Biotin	Promega, USA
MBP	40 kD	Amylose	Maltose	New England Biolabs, USA
GST	25 kD	Glutathione	Reducing agent	Pharmacia, Sweden
Flag TM peptide	8aa	Specific mAb	Low calcium	IBI Kodak, USA

^a Abbreviations: aa, amino acids; His, histidine; GST, glutathione-S-transferase; MBP, maltose binding protein.

^b IgG binding domain of staphylococcal protein A.

^c Encodes a domain biotinylated *in vivo* in *Escherichia coli*.

^d Monomeric streptavidin

3.2 研究酶的定位及移动

绿色荧光蛋白(Green fluorescent protein, GFP)是一类存在于包括水母、水螅和珊瑚等腔肠动物体内的生物发光蛋白。其内源发光基团在受到紫外或蓝光激发时,可高效发射绿光,且无需底物和辅因子^[27]。GFP可融合于酶蛋白的N端或C端,也可插入其内部,作为一种“荧光标签”被用来研究目标蛋白的定位及移动情况。Gordon等^[28]构建了糖化酶(Glucoamylase, GA)-GFP融合蛋白,利用GFP作为信号蛋白,来研究黑曲霉体内GA分泌的动态过程,确定GA在黑曲霉胞内及胞外的分布情况。有机磷水解酶(Organophosphorus hydrolase, OPH)能够降解许多种有机磷农药。将GFP基因与OPH基因的5'端融合,构建GFP-OPH融合基因,并将其在大肠杆菌中表达^[29]。经IPTG诱导后,绿色荧光直接可见,融合蛋白同时保持了OPH和GFP的生物活性。此外,由于GFP的荧光强度与OPH活力成正比,还可通过荧光强度的检测对OPH进行定量分析。

3.3 控制酶固定的空间取向

固定化酶具有稳定性高、回收方便、易于控制和可反复使用等特点,在药物生产、临床诊断、发酵及食品工程、分析生物技术等领域应用十分广泛。然而,酶固定化过程中酶分子的活性中心对于构象的微小改变非常敏感。常用的固定方法如化学交联或共价连接,通常导致酶活的大幅度降低。研究表明,酶固定过程中空间取向的控制是制备高质量固定化酶的前提^[30]。近年来,人们在酶固定空间沉积方向的控制上做了大量工作。融合蛋白技术的发展为酶固定空间取向的控制提供了新的方法。FMN:NAD(P)H氧化还原酶(FMN:NAD(P)H oxidoreductase)和荧光素酶(Luciferase)是催化细菌生物发光的两种酶。Min等^[31]将生物素羧化载体蛋白(Biotin carboxy carrier protein, BCCP)分别融合在荧光素酶和FMN:NAD(P)H氧化还原酶的N-末端,通过生物素(Biotin)和亲和素(Avidin)的相互作用,将这两个体内生物素化的

融合蛋白定向固定在亲和素包被的琼脂糖颗粒上,在低酶和高NADH浓度的条件下,定向共固定酶的生物发光能力是游离酶的8倍,同时,其稳定性也大大提高。Hengsakul等^[32]在大肠杆菌碱性磷酸酶的C末端融合了一个含有10个氨基酸的短肽——链霉结合肽(Streptag),获得EAP-Streptag融合蛋白。通过链霉结合肽和链霉亲和素(Streptavidin)的特异结合,使酶分子按一定的空间取向固定在链霉亲和素包被的羧甲基葡聚糖(Carboxymethylated dextran, CMD)上。为最大限度地保持固定化酶的活性构型,我们又通过基因操纵,在链霉结合肽与酶分子之间插入一小段亲水肽作为连接臂(Linker)以增加酶分子与载体间的距离,减少空间位阻。固定后,该融合蛋白的回收活力是不加连接臂同样酶蛋白的8.4倍^[33]。

3.4 构建具有双催化活性的融合酶

生化反应常常需要多酶顺序催化来进行,称为顺序酶反应(Sequence enzyme reaction)。大量的研究表明,通过基因融合构建具有双酶活力的融合蛋白,可有效提高顺序酶反应的总转化效率^[34-37]。D-氨基酸的合成需要D-乙内酰胺脲酶(D-hydantoinase, HYD)和N-羧基酰酶(N-carbamylase, CAB)的顺序催化作用,是顺序酶反应的典型应用。Kim^[34]等将两种不同来源的D-乙内酰胺脲酶(HYD来源于*B. shearothermophilus* SD1, HYD1来源于*B. thermocatenulatus* GH2)分别与N-羧基酰酶融合,构建CAB-HYD和CAB-HYD1两种融合蛋白。CAB-HYD和CAB-HYD1都同时具有D-乙内酰胺脲酶和N-羧基酰酶活力,但CAB-HYD1的性能优于CAB-HYD。与原多酶反应相比,两融合酶具有更高的将乙内酰胺脲衍生物转化成相应氨基酸的能力。值得注意的是,在已报道的生物传感器中,大约30%的酶传感器属顺序酶反应催化。由于酶与酶之间被固定能力的不同,与单酶传感器相比,顺序酶传感器的酶膜稳定性和互换性普遍较差。针对这一难题,我们以麦芽糖传感器为研究对象,建立了双功能融合酶制备顺序酶传感器

的模式方法^[37]。将黑曲霉葡萄糖氧化酶(Glucose oxidase, GOD)基因、连接肽编码序列(Linker)和黑曲霉糖化酶(Glucoamylase, GA)cDNA 片段依次拼接,得到 GOD-Linker-GA 融合基因。连接肽的插入是为增加两酶之间的分子距离,减小它们的空间位阻,使融合蛋白最大限度地保持其原有生物学活性。将融合基因转入毕赤酵母后,其表达产物为一分子量高达 430 kD 的杂合蛋白,一分子的融合蛋白含有一分子的二聚体 GOD 和两分子的单体 GA。动力学性质分析表明,该融合蛋白保留了 GA 和 GOD 的原本活力,且与游离 GA 和 GOD 具有相似的催化动力学性质。应用该融合蛋白制备麦芽糖传感器,实现了 GA 和 GOD 控制的共固定化(固定后两酶比例一定,距离一定),从而有效地提高了酶膜活力及均一性,使传感器的信号强度、响应线性范围及酶膜的互换性得到明显改善。

4 展望

随着基因组、后基因组时代的到来和重组酶生产技术的开发,必将会有大量的、新的酶蛋白被人类发现,一个重要的表现是从极端环境微生物或不可培养微生物获得酶的努力正在迅速增长。而体外指导进化与高效筛选方法的结合,则大幅度提高了酶分子的进化效率,加速了人类改造蛋白质旧功能和开发新功能的步伐。当然,分子酶工程学的进一步发展还要依赖于各种酶分子结构生物学数据的完善以及蛋白质空间结构预测和蛋白质结构和功能关系的深入研究。近来国际上又提出蛋白质全新设计(Protein *de novo* design)的概念^[38],这一新技术可以用于组建自然界原先并不存在的、结构和功能全新的酶蛋白。尽管目前对蛋白质全新设计的理论基础的认识还不够深入,蛋白质全新设计还处在探索阶段。然而,我们相信,即使无法准确地从蛋白质序列预测蛋白质的结构及功能,对蛋白质折叠规律的不断了解及酶蛋白设计经验的不断积累必将使蛋白质全新设计的成功率不断提高。

REFERENCES(参考文献)

- [1] White J S, White D C. *Source book of enzymes*. CRC Press, Boca Raton, New York, 1997
- [2] JU N H(居乃琥). The new trend in the studies of enzyme engineering in 21th century. *Industrial Microbiology(工业微生物)*, 2001, **31**(1): 37 ~ 45
- [3] ZHANG X E(张先恩). Molecular control of enzyme used in analysis. *Journal of Wuxi University of Light Industry(无锡轻工大学学报)*, 1999, **18**(5): 118 ~ 121
- [4] ZHU G P(朱国萍), TENG M K(滕脉坤) *et al.* Mutation of G138P enhanced the thermostability of D-glucose isomerase. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica(生物化学与生物物理学报)*, 1998, **30**(6): 607 ~ 610
- [5] Ma Y F, Evans D E *et al.* Mutations of barley beta-amylase that improve substrate-binding affinity and thermostability. *Mol Genet Genomics*, 2001, **266**(3): 345 ~ 352
- [6] Huang C Y, Chang A K *et al.* Site-directed mutagenesis of the ionizable groups in the active site of *Zymomonas mobilis* pyruvate decarboxylase: effect on activity and pH dependence. *Eur J Biochem*, 2001, **268**(12): 3558 ~ 3565
- [7] Wang S X, Dunphy W G. Activation of *Xenopus* Chk1 by mutagenesis of threonine-377. *FEBS Lett*, 2000, **487**(2): 277 ~ 281
- [8] Zhou H, Wang H W *et al.* The multiple roles of conserved arginine 286 of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase. Coenzyme binding, substrate binding, and beyond. *Plant Physiol*, 1999, **121**(3): 913 ~ 919
- [9] Amidon W J, Pfeil J E *et al.* Modification of luciferase to be a substrate for plant aspartic proteinase. *Biochem J*, 1999, **343** Pt 2: 425 ~ 433
- [10] Tigue N J, Kay J. Active site mutants of human herpesvirus-6 proteinase. *FEBS Lett*, 1998, **441**(3): 467 ~ 469
- [11] Aikawa J, Park Y N *et al.* Replacements of amino acid residues at subsites and their effects on the catalytic properties of *Rhizomucor pusillus* pepsin, an aspartic proteinase from *Rhizomucor pusillus*. *J Biochem(Tokyo)*, 2001, **129**(5): 791 ~ 794
- [12] Chen K Q, Arnold F H. Enzyme engineering for nonaqueous solvents: random mutagenesis to enhance activity of subtilisin E in polar organic media. *Biotechnology(NY)*, 1991, **9**(11): 1073 ~ 1077
- [13] Chen K Q, Arnold F H. Tuning the activity of an enzyme for unusual environments: sequential random mutagenesis of subtilisin E for catalysis in dimethylformamide. *Proc Natl Acad Sci*, 1993, **90**(12): 5618 ~ 5622
- [14] Stemmer W P C. DNA shuffling by random fragmentation and reassembly: *In vitro* recombination for molecular evolution. *Proc Natl Acad Sci*, 1994, **91**(22): 10747 ~ 10751
- [15] Moore J C, Jin H M *et al.* Strategies for the *in vitro* evolution of protein function: enzyme evolution by random recombination of improved sequences. *J Mol Biol*, 1997, **272**: 336 ~ 347
- [16] Lorimer I A L, Pastan I. Random recombination of antibody single chain Fv sequence after fragmentation with DNase I in the presence of Mn^{2+} . *Nucleic Acids Res*, 1995, **23**: 3067 ~ 3068
- [17] Zhao H, Arnold F H. Optimization of DNA shuffling for high fidelity recombination. *Nucleic Acids Res*, 1997, **25**: 1307 ~ 1308
- [18] Zhao H, Arnold F H. Functional and non-functional mutations distinguished by random recombination of homologous genes. *Proc Natl Acad Sci*, 1997, **94**: 7997 ~ 8000
- [19] Stemmer W P C. Rapid evolution of a protein *in vitro* by DNA shuffling. *Nature*, 1994, **370**: 389 ~ 391
- [20] Kim G J, Cheon Y H *et al.* Directed evolution of a novel N-Carbamylase/D-Hydantoinase fusion enzyme for functional expression with enhanced stability. *Biotech & Bioeng*, 2000, **68**(2): 211 ~ 217
- [21] Cramer A, Raillard S A *et al.* DNA Shuffling of a family of genes from diverse species accelerates evolution. *Nature*, 1998, **391**: 288 ~ 291
- [22] Zhao H, Giver L *et al.* Molecular evolution by staggered extension process(StEP) *in vitro* recombination. *Nat Biotechnol*, 1998, **16**: 258 ~ 261

- tion: an effective tool for directed evolution. *Nucleic Acids Res*, 1998, **26**: 681 ~ 683
- [24] Pelletier J N. A RACHITT for our toolbox: a new twist on DNA Shuffling increases recombination frequency and expands access to sequence space, facilitating the engineering of new protein activities. *Nat Biotechnol*, 2001, **19**: 314 ~ 315
- [25] ZHANG Y (张毅), QU X M (屈贤铭) *et al.* Applications of genetic engineered fusion proteins. *Progress in Biotechnology* (生物工程进展), 2000, **20**(3): 13 ~ 18
- [26] Nygren P, Stahl S *et al.* Engineering proteins to facilitate bioprocessing. *Trends Biotechnol*, 1994, **12**: 184 ~ 188
- [27] Chalfie M, Tu Y *et al.* Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science*, 1994, **263**(5148): 802 ~ 805
- [28] Gordon C L, Khalaj V *et al.* Glucoamylase-green fluorescent protein fusions to monitor protein secretion in *Aspergillus niger*. *Microbiol*, 2000, **146**: 415 ~ 426
- [29] Wu C F, Cha H J *et al.* A green fluorescent protein fusion strategy for monitoring the expression, cellular location, and separation of biologically active organophosphorus hydrolase. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2000, **50**(1): 78 ~ 83
- [30] SHAO W H (邵文海), ZHANG X E (张先恩) *et al.* Orientation control of immobilized enzyme. *Biotechnology Information* (生物技术通报), 2000, **3**: 25 ~ 28
- [31] Min D J, Andrade J D *et al.* Specific immobilization of *in vivo* biotinylated bacterial luciferase and FMN:NAD(P)H oxidoreductase. *Analytical Biochemistry*, 1999, **270**: 133 ~ 139
- [32] Hengsakul M, Cass A E G. Alkaline phosphatase-Strep tag fusion protein binding to streptavidin: resonant mirror studies. *J Mol Biol*, 1997, **266**: 621 ~ 632
- [33] Shao W H, Zhang X E *et al.* An 'Anchor-Chain' molecular system for orientation control in enzyme immobilization. *Bioconjugate Chem*, 2000, **11**: 822 ~ 826
- [34] Kim G J, Lee D E *et al.* Construction and evaluation of a novel bifunctional N-Carbamylase-D-Hydantoinease fusion enzyme. *Appl Environ Microbiol*, 2000, **66**: 2133 ~ 2138
- [35] Gilbert M, Bayer R *et al.* The synthesis of sialylated oligosaccharides using a CMP-Neu5Ac synthetase/sialyltransferase fusion. *Nature Biotechnol*, 1998, **16**: 769 ~ 772
- [36] Kim Y H, Kwon T K *et al.* Trehalose synthesis by sequential reactions of recombinant maltotriose synthase and maltotriose-trehalose trehalohydrolase from *Brevibacterium helvolum*. *Appl Environ Microbiol*, 2000, **66**: 4620 ~ 4624
- [37] Zhou Y F, Zhang X E *et al.* Construction of a fusion enzyme system by gene splicing as a new molecular recognition element for sequence biosensor. *Bioconjugate Chem*, 2001, **12**: 924 ~ 931
- [38] CAO A N (曹傲能), LAI L H (来鲁华) *et al.* The current state and prospect of *de novo* protein design. *Progress in Biochemistry and Biophysics* (生物化学与生物物理进展), 1998, **25**(3): 197 ~ 200

Current Researches on Molecular Enzyme Engineering

ZHOU Ya-Feng¹ ZHANG Xian-En^{1*} Anthony E G Cass²

¹(Wuhan Institute of Virology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430071, China)

²(Biochemistry Department, Imperial College of Science, Technology & Medicine, London, SW72AY, UK)

Abstract The developments of recombinant DNA technology and structural biology make it possible to modify enzyme in molecular level. Scientists show growing interests in the evolution or functional fusion of enzymes. Recent advances and applications of the molecular enzyme engineering are reviewed and discussed in this article.

Key words molecular enzyme engineering, gene engineering, site directed mutagenesis, molecular directed evolution, fusion enzyme

Received: 02-10-2002

This work was supported by Grants from the National Natural Sciences Foundation of China (No.39870204) and Joint Project between Chinese Academy of Science and the Royal Society of United Kingdom.

* Corresponding author. Tel: 86-27-87641492; Fax: 86-27-87641492; E-mail: x.zhang@pentium.whiov.ac.cn

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>