

技术与方法

筛选在非生长条件下突变体酶的新方法\*

肖志壮 王婷 王攀 曲音波 高培基

(山东大学微生物技术国家重点实验室 济南 250100)

摘要: 利用双层平板筛选由定向进化方法产生的瑞氏木霉内切葡聚糖酶 III (EG III) 突变体文库, 根据水解圈在平板上形成的速度判断酶活高低。采用这种方法在不同的筛选条件下分别筛选得到了几株在低温或碱性条件下高活性的 EG III 突变体。比色法测定的酶活性与平板筛选结果一致。该方法的建立将使通过定向进化方法改造现有蛋白质, 获得具有新的优良性状的工业用酶的途径得到更加广泛的应用。

关键词: 双层平板, 筛选, 水解圈形成速度, 内切葡聚糖酶 III

中图分类号: Q933 文献标识码: A 文章编号: 0253-2654 (2001) 05-0074-04

A NOVEL STRATEGY FOR SCREENING MUTANT ENZYMES UNDER NON-GROWTH CONDITIONS

XIAO Zhi-Zhuang WANG Ting WANG Pan QU Yin-Bo GAO Pei-Ji

(State Key Laboratory of Microbial Technology, Shandong University, Jinan, 250100)

Abstract: The technique of double-layered plate was developed for screening the library of mutant endoglucanase III from Trichoderma reesei generated by the method of directed evolution. The enzyme activity was determined according to the velocity of the formation of halos on the plates. Several mutants with higher activity than the wild type at low temperature or alkaline pH were obtained by using this strategy under different screening conditions. Further results of spectrophotometric determination of the activities of these mutants were consistent with the results of plate screening. The establishment of such strategy will broaden the applications of the directed evolution methods for improving the existing proteins to obtain useful enzymes with new properties for industrial applications.

Key words: Double-layered plate, Screening, Halo-forming velocity, Endoglucanase III

定向进化是近几年新兴起的改造蛋白质的新策略。它在实验室中模仿自然进化的关键步骤——突变、重组和筛选或选择, 在较短的时间内完成自然条件下需要千百年的进化过程, 从而有效地改造蛋白质, 使之适于人类生产生活的需要。目前, 定向进化产生突变体文库的方法主要有易错 PCR 产生的随机突变和 DNA 改组 (DNA shuffling) 等<sup>[1,2]</sup>。由于筛选或选择的条件确定了蛋白质预期特征的进化方向, 因此, 在确定了合理的方法产生突变体文库之后, 建立有效的方法搜索蛋白质文库得到预期的性状是决定定向进化成功与否的最关键因素。虽然选择 (selection) 是一种非常有效的搜

\* 国家自然科学基金项目 (No. 39970392)

Project Granted by Chinese National Natural Science Fund (No. 39970392)

收稿日期: 2000-08-22, 修回日期: 2000-11-10

索机制,但只有在突变体酶可赋予宿主细胞生长或存活的优势时才能使用选择机制,因此,突变体文库通常需要筛选(screening)而非选择。当我们感兴趣的功能可产生可见的信号时,简便的肉眼可见的平板筛选方法被广泛地应用。例如,菌落分泌出的蛋白酶可在含酪蛋白的琼脂平板上产生清晰的水解圈<sup>[3]</sup>。纤维素酶产生菌可分解固体培养基中的羧甲基纤维素钠,经刚果红染色后产生清晰可见的透明圈<sup>[4]</sup>等。

因预期突变体的性状不同而需要使用与之相应的筛选条件。定向进化研究往往希望能选育在非生长条件下(高温、低温、酸性和碱性等)表现高活性的酶。常规的生长状态下的平板筛选法不能用于这类筛选工作。本文提出了一种新的平板筛选策略,首先用定向进化的方法建立瑞氏木霉(*Trichoderma reesei*)内切葡聚糖酶III(EG III)突变体文库,在最适生长条件下培养之后,覆盖上能反映酶解反应的上层(羧甲基纤维素钠,CMC-Na),在需要的非生长条件下进行反应,然后根据水解圈产生速度来判断EG III突变体酶活性,筛选耐碱性或低温酶突变体。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌株、试剂和培养基

带有酵母表达质粒 pAJ401-eg3 (7.1kb, 含有 *T. reesei* EG III 基因) 的酿酒酵母 H158 (eg3) 宿主菌, 选择性培养基为 SC-Ura<sup>[5]</sup>。酵母氮碱 (Difco)、氨基酸 (Wako)、CMC-Na (Sigma) 为进口试剂, 其他试剂均为国产分析纯。

### 1.2 方法

**1.2.1 耐碱高活性突变体酶的筛选:** 将野生型 EG III 表达菌 H158 (eg3) 或 EG III 突变体文库稀释至适当浓度涂 SC-Ura 平板, 30℃ 培养 3d。取 5mL CMC-Na 半固体 (0.5% CMC-Na, 0.8% 琼脂, 50~200mmol/L 不同 pH 的磷酸或乙酸缓冲液) 倒上层, 凝固后置 50℃ 保温适当时间。加 0.1% 刚果红染色, 用 1mol/L NaCl 脱色, 观察透明圈的大小及有无。

**1.2.2 低温酶突变体的筛选:** 步骤 1 同 1.2.1。上层倒 5mL CMC-Na 半固体 (0.5% CMC-Na, 0.8% 琼脂, 50~200mmol/L 乙酸缓冲液, pH5.0), 凝固后加 0.1% 刚果红, 置 15℃ 保温不同时间。用 1mol/L NaCl 脱色, 观察透明圈的大小及有无。

**1.2.3 比色法测定酶活:** 参照 Somogyi 方法。酶活以葡萄糖表示, 单位为  $\mu\text{g} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

## 2 结果与讨论

### 2.1 离子强度对 EG III 酶活性影响

采用酵母菌作为 EG III 的表达系统, 酵母菌培养基的 pH 值为 5.6~6。当要筛选碱性条件下高活性突变体时, 采用 pH 值差异较大的双层平板, 使菌体生长及酶的表达与突变体的筛选过程分开。用于培养菌体的底层平板为酸性, 而含有底物 CMC 的碱性上层半固体为突变体酶的筛选提供了适宜的环境。当碱性上层铺于酸性底层之后, 两者将发生中和作用, 使上层 pH 值降低。为了最大限度地减小筛选上层 pH 值降低的幅度, 需要尽可能使用浓度较高的大缓冲容量的缓冲液配制上层。为此, 首先研究了缓冲溶液的离子强度(浓度)对 EG III 酶活性的影响。

采用与瑞氏木霉 EG III 的最适 pH 值相同并且与酵母培养基 pH 接近的乙酸缓冲液

(pH5.0), 以 50mmol/L、100mmol/L 和 200mmol/L 配制含有 0.5% CMC-Na 半固体上层基质, 表达野生型 EG III 的酵母平板于 30℃ 培养 3d 后, 倒上层, 50℃ 保温 60min, 经刚果红染色、脱色观察, 水解圈的直径分别为  $10.9 \pm 0.2\text{mm}$ 、 $10.8 \pm 0.2\text{mm}$  和  $10.9 \pm 0.2\text{mm}$ 。统计分析结果表明, 缓冲液的离子强度对 EG III 酶活性影响无显著差异。

## 2.2 pH 对水解圈大小的影响

确定了缓冲液的离子强度对 EG III 酶活性没有影响之后, 使用 200mmol/L pH5 ~ 9 的乙酸或磷酸缓冲液配制半固体 CMC-Na。上层平板凝固后, 置于 50℃ 保温 60min, 经刚果红染色、脱色观察 pH 值对野生型 EG III 在 CMC 平板上产生水解圈的大小的影响, 确定筛选耐碱突变体的上层平板需用的 pH 值。pH5 时水解圈为  $10.9 \pm 0.2\text{mm}$ , 随着 pH 的逐渐升高, 水解圈显著减小。虽然在 pH8.0 和 9.0 时水解圈刚刚大于菌落直径 ( $2.2 \pm 0.1\text{mm}$ ), 但仍然清楚可见。

## 2.3 酶的作用时间对水解圈产生的影响

由于上层平板的 pH 值大于 9 时凝固性差, 难于通过进一步提高 pH 值来加强选择性。采用缩短酶对底物水解时间的方法, 根据水解圈产生的速度判断酶活高低。影响平板上水解圈大小的因素很多, 特别是在较长的培养过程中, 细胞分泌的酶已在菌落周围扩散, 后加上去的上层基质上的水解圈大小更多地反映的是酶的分泌量。显然, 为了得到高活性低温或耐碱酶突变体, 不能直接根据水解圈的大小来准确判断, 而需要依据酶水解底物的速度来反映这些酶性质的变化。即根据在所需条件下平板上水解圈产生的速度判断酶的性质是否发生变化。产生水解圈所需的时间越短, 酶在该条件下的活性越高。

为缩短酶对底物的水解时间, 将染色和水解同时进行, 不同时间后观察水解圈的出现情况。结果显示, 在 pH 9.0 时水解 15min 后平板上有的菌落周围产生水解圈, 有的则没有; 而当水解时间缩短至 14min 时平板上完全没有水解圈。

同样, 采用 50mmol/L 乙酸缓冲液制备上层平板, 观察低温下水解时间对水解圈产生的影响, 然后确定筛选低温酶的最适条件。结果表明, 缩短水解、染色时间至 20min 时, 才能没有水解圈出现。

## 2.4 突变体的筛选

分别以 50mmol/L 乙酸缓冲液 (pH 5.0) 制备上层平板, 15℃ 水解 20min 筛选低温下高活性突变体, 或以 200mmol/L 磷酸缓冲液 (pH 9.0) 制备上层平板, 50℃ 水解 14min 筛选碱性条件下高活性突变体。在上述条件下, 野生型对照酶在平板上不产生可见的水解圈。而突变体文库中得到 2 株低温下产生清晰水解圈的突变体; 碱性平板上出现了 6 个产生水解圈的菌落。突变体经液体培养, 用比色法测定酶活。表 1 和 2 中液体比色法测活结果与平板检测结果相符。酶活高的突变体在较短时间内出现水解圈, 证实了依据水解圈在平板上产生的速度筛选高活性突变体策略的可靠性。

表 1 低温酶突变体与野生型的酶活性比较

菌株	对照	C-8	C-16
水解圈	-	++	++
30℃	8.6	47.7	41.5
50℃	34.8	53.3	57.8
酶活比值	0.25	0.89	0.72

注: 酶活比值 = 30℃ 时酶活 / 50℃ 时酶活

表 2 耐碱性突变体酶和野生型酶的活性比较

菌株	对照	A-18	A-20	A-21	A-23	A-24	A-27
水解圈	-	+	+	++	+	+	+
pH 7.0	5.3	26.3	23.6	36.8	18.0	19.9	21.0
pH 5.0	14.7	70.5	74.7	97.4	51.8	55.3	54.5
酶活比值	0.22	0.37	0.32	0.38	0.35	0.36	0.39

注：酶活比值 = pH 7.0 时酶活 / pH 5.0 时酶活

采用双层平板检测碱性或低温条件下的酶活性，使酶的表达与其水解作用环境分开。通过控制对照酶的作用温度、时间及上层底物的 pH 值，根据水解圈在平板上的产生速度判断突变体酶活高低。这一策略成功地用于瑞氏木霉 EG III 突变体文库的高效筛选，得到了几株低温或碱性条件下的高活性突变体。尽管这样选出的突变体仍有部分菌株是由产酶量提高造成的假象，但选到酶性质变化的突变株的几率大大提高了。

另外，采用双层平板还可以固定底层平板上的菌落，便于直接从平板上挑选突变体，显著降低了筛选工作量。这一策略也可以在平板上直接筛选热稳定性高的酶、酸性条件下活性高的酶或可作用于非天然底物的酶等，从而使定向进化的方法改造蛋白质的应用更加广泛。

### 参 考 文 献

- [1] Moore Jeffrey C, Arnold Frances H. *Nature Biotechnology*, 1996, 14: 458 ~ 467.
- [2] Stemmer W P C. *Nature*, 1994, 370: 389 ~ 391.
- [3] Zhao Huimin, Arnold Frances. *Current Opinion in Structural Biology*, 1997, 7: 480 ~ 485.
- [4] Toyama H, Toyama N. *Microbios*, 1999, 100: 7 ~ 18.
- [5] Johnston J R. In: *Molecular Genetics of Yeast, A Practical Approach*. Oxford University Press, 1994.