

专论与综述

蛋白质工程及其在酶学研究中的应用

施 建 平

(中国科学院上海生物化学研究所)

蛋白质工程是生物技术中正在开发的一个新领域。这是一门从改变基因入手,定做新的蛋白质的技术^[1]。

一、生物工程的新领域

长期以来,人们一直希望能制造出比天然蛋白质性能更为优越的新的蛋白质,现在这一希望正在变为现实。怎样制造定做的蛋白质呢,采用经典的多肽合成方法从头合成蛋白质,虽然有几个成功的例子,然而作为一种普遍的方法,它有很多局限性。对于大的蛋白质更是力难胜任。而且合成的蛋白质并不一定折迭成它们天然的构象。因此解决合成新蛋白质的合理途径应是从 DNA 的水平上入手。DNA 能在体外突变与重组,从而产生新的基因,然后可以用基因工程的技术,得到所需的蛋白质。这种对天然存在的结构进行有针对性的突变而产生的活性的过程,叫寡核苷酸诱导的定点突变(oligonucleotide-directed mutagenesis 或 site-directed mutagenesis),简称定点突变^[2,3]。

这样的设想早在 25 年前就有人提出^[4]。进入 70 年代以后,实现这一设想的方法逐渐具体化。1973 年有人根据 fd 病毒编码的外壳蛋白的一段氨基酸顺序,将其中色氨酸残基的密码子改为终止密码子,并据此合成了 4 个寡核苷酸片段,准备开展定点突变的研究^[5]。1978 年 F. Sanger 的实验室完成了 $\phi \times 174$ 病毒全部 DNA 顺序的测定,为定点突变付诸实践创造了条件^[6]。同年,有两家实验室报道了以该病毒为模板,所进行的定点突变的研究^[7,8]。

1982 年,定点突变用于酶学研究取得了突破。这一年有三篇文章分别报道了酪氨酰 tRNA 合成酶^[9]、二氢叶酸还原酶^[10]和 β -内酰胺酶^[11],用定点突变方法改变酶分子特定部位的氨基酸残基后,对酶的结构与功能的关系所作的研究。虽然当时只是初步的结果,但却是很令人鼓舞的。它开辟了酶学研究的一个新的途径,即在沿用的化学修饰、X 射线晶体衍射分析和酶作用动力学等方法的基础上,引入了基因水平定点改变酶分子结构的方法,并与上述沿用的方法相结合,进一步分析酶的结构与功能的关系。近二、三年来,有越来越多的酶的研究开始采用了这样的方法。

另一方面,定点突变正在广泛地用于除了酶以外的各种类型的蛋白质(例如 DNA 结合蛋白等)的结构与功能的研究,从而形成了生物工程中一个新兴的领域——蛋白质工程。它是在基因工程的基础上发展起来的,而且仍然需要运用基因工程的全套技术。所不同的是,基因工程要解决的问题是把天然存在的蛋白质通过克隆其基因大量地生产出来;而蛋白质工程则致力于对天然蛋白质进行改造,制备各种定做的新蛋白质。

二、蛋白质工程的基本步骤

蛋白质工程的基本做法是这样的:以天然基因的编码链为模板,另合成一定长度的寡核苷酸为引物,其中除准备诱变的特定部位与模

本文根据 1985 年 10 月第三次全国酶结构与功能学术讨论会上的发言稿整理而成。

板不配对外,其余顺序均与模板互补。经体外复制后,转入受体菌扩增,从子代DNA中筛选、鉴定和纯化突变的基因,然后经表达后,分离提纯突变的酶(见图1)。

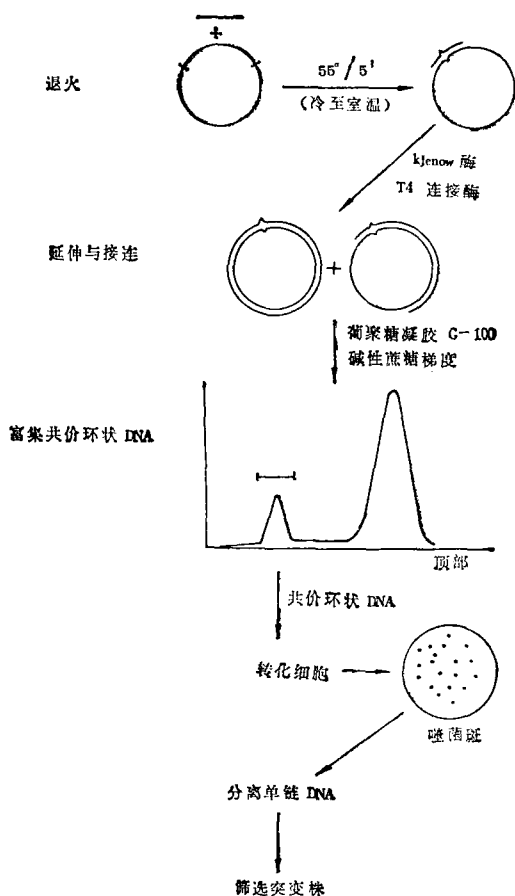


图1 定点突变基本过程示意图

现将整个过程分成6个步骤,分别作些具体说明:

(1) 提出诱变的方案。由于蛋白质晶体学、化学修饰和其他物理有机化学技术以及酶作用动力学的应用,使人们对不少酶的作用机理、酶的化学结构、立体结构与功能的关系等都有了相当的了解,从而为设计突变的方案提供了丰富的信息和依据。例如通过改变底物结合部位的氨基酸残基,观察酶的专一性的变化;或是改变在催化中起重要作用的基团,观察酶活力的变化等。也可根据对于某种功能的要求,例如为了提高酶的稳定性,设法在酶分子中引入

二硫键等。总之,视不同的目的与要求,提出对酶分子某些特定部位进行改造的方案。

(2) 酶基因的克隆、表达及顺序分析。这是对某一具体对象进行蛋白质工程的基础。目前较多的例子是将酶的基因(包括结构基因和启动基因)克隆到M13上,也有克隆到质粒上的。用M13做载体的优点是:突变效率高;病毒容易分离和鉴定;做顺序分析较方便。缺点是:有的DNA片段在M13中不稳定;不能插入大于5kb的片段;有的突变的DNA序列不能在M13中表达。此外,如果突变的结果需将目的DNA引入质粒来观察时,也应考虑用质粒。下文着重介绍以M13为载体的情况^[3]。

(3) 化学合成寡核苷酸。前已提及,寡核苷酸的顺序除准备突变的部位外,其余均与模板互补(图2),图2中有星号处是为将半胱氨酸残基改变为甘氨酸残基而设计的。前者的密码子是TGC,后者是GGC,即有一个T→G的变异。因此在引物的相应部位应将A→C,使之与模板形成C:T错误配对,从而引导生成所要的变异基因。

除了诱导转换或倒换的点突变外,也可通过引物的诱导删除或插入一段基因(图3)。图3(A)中,引物的3'端一半和5'端一半分别与模板上间隔一定距离的两段顺序互补,得到的突变基因中间一段就被删除了。例如曾用一个18个核苷酸的寡聚体诱变,除去一段长1143核苷酸片段^[12]。

图3(b)是通过诱变插入一段核苷酸顺序。一般插入的核苷酸数目受到引物长度的限制。曾报道用33个核苷酸的寡聚体为引物获得插入9个碱基的突变基因^[13]。

在决定寡核苷酸引物的长度时,要考虑两方面的因素。一是合成的顺序是否与模板其他部位的顺序也发生较大范围的互补,这可通过计算机回答。若有,则要增加引物长度,以减少其与非预定部位退火的可能。二是要考虑生物体内存在的核酸外切酶对错误配对进行的校正作用。应该使错误配对的核苷酸位于引物中间,两边都有若干正确配对的核苷酸保护着,至

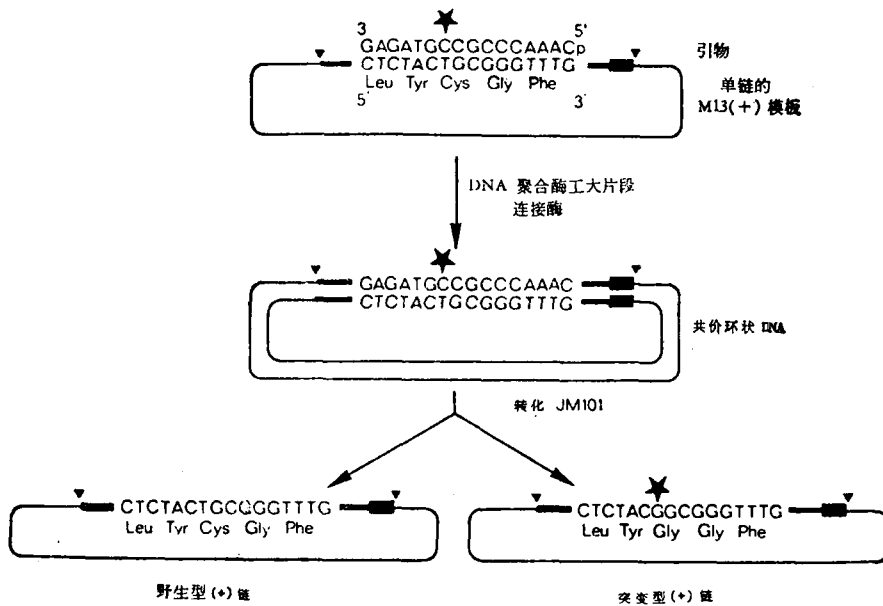


图2 寡核苷酸引物诱导的体外突变示意图

少要有4个,这样可免受校正系统的作用。

(4) 体外诱变: 将引物与模板退火,加入 DNA 聚合酶(一般用大肠杆菌聚合酶 I 的大片段,也称 Klenow 酶), T₄ DNA 连接酶和 4 种 dNTP, 使引物延伸并连接封口, 经蔗糖密度梯度离心分离共价闭环 DNA(ccc DNA), 转染受体菌, 使病毒 (M13) DNA 扩增。

(5) 筛选和鉴定突变基因: 从得到的噬菌斑分离单链病毒, 将它们点到硝酸纤维素薄膜上进行印迹杂交。用 5'-³²P 标记的诱导物作探针。此时探针与突变基因是完全互补的, 而与野生型基因间则存在着错误配对。因此可通过提高洗涤温度选择性地使探针从野生型基因上洗下来, 而继续结合着的便是突变基因(图 4)。洗涤温度可按引物与模板间每一 dA:dT 对需 2℃, dG:dC 对需 4℃ 计算, 然后再增加 2℃ 求得。以图为例, 在 37℃ 杂交的 19 个克隆, 经过 23℃、50℃、62℃ 三个温度的洗涤, 筛选出 13 个突变株。

筛选得到的变种, 需再经过一次纯化, 然后测定其 DNA 顺序, 以便证实是否是所需变种。

(6) 将含变种的 M13 转染适当的受体菌,

然后从受体菌中分离提纯所需的突变酶。这样得到的菌株是高产株, 溶菌后可溶性蛋白中所含突变酶的含量相当高, 因此大大简化了分离提纯的手续。

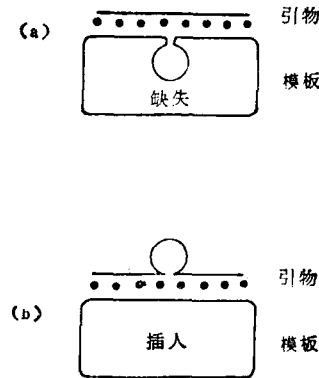


图3 寡核苷酸引物诱导的缺失和插入突变

- a. 寡核苷酸诱导的缺失变异
- b. 寡核苷酸诱导的插入变异

作为一门技术, 定点突变的方法在这二、三年来不断在发展和完善, 其中较大改进有以下几点:

(1) 双引物系统^[4]。一个是诱变引物, 另一个是 M13 顺序分析用的标准引物。该改进

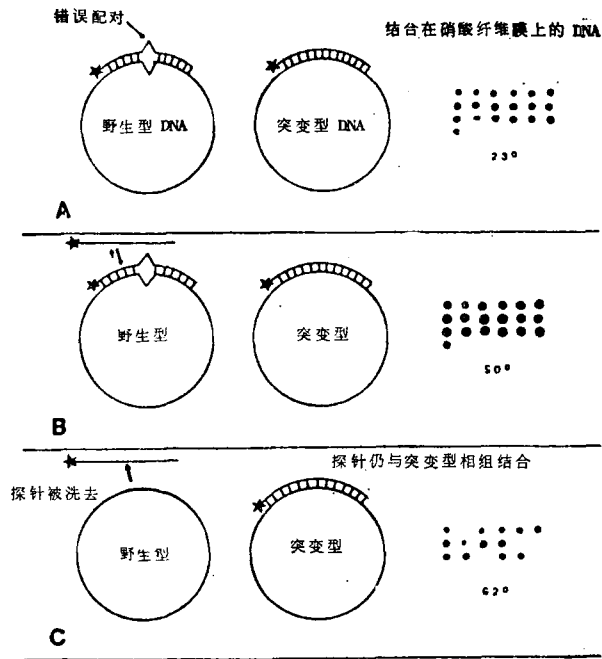


图4 用诱变引物作探针筛选突变型 DNA

19 个克隆在 37℃ 印迹杂交, 然后分别在 23℃, 50℃ 和 62℃ 洗涤, 共筛选到 13 个突变型 DNA

的优点是不必分离共价环状 DNA, 比单引物系统简便、快速而具有同样的突变效率。

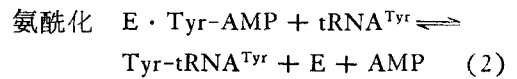
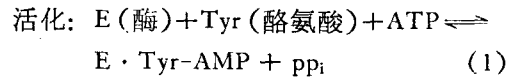
(2) 偶联引物系统^[15], 是双引物系统的发展(图 5)。将顺序分析用的标准引物改为带有某种限制-修饰标记的引物, 并用缺乏校正作用(修复缺陷)而又对模板所带标记有限制-修饰作用的细菌作为受体菌, 经转化后, 原来模板上的标记被限制, 而转变成引物所带的标记(见图 5, EcoK → EcoB), 从而又可进行第二次诱变, 转化对 EcoB 限制-修饰的受体菌, 又可回复原来标记。此法优点是能在两种标记间往返互换, 每次都引入一个新的突变, 通过多次往返就可引入多个突变。

(3) 用质粒做载体的系统也有不少改进。如缺口双链法^[16]以及直接用共价闭环(ccc)质粒为模板的^[17]。

三、蛋白质工程用于酶学研究

应用蛋白质工程研究酶的结构与功能的一个比较成功的例子是嗜热脂肪芽孢杆菌 (*Bacillus stearothermophilus*) 酪氨酰-tRNA 合成

酶^[18]。这个酶催化的反应包括氨基酸的活化和 tRNA 的氨酰化两步:



这个酶的基因已经克隆。一级结构和立体结构均已阐明。特别是酶与底物络合物的立体结构也已测定, 从而为开展蛋白质工程提供了很好的基础。通过蛋白质工程获得了该酶的结构与功能关系的许多新的信息。下面简略地介绍其中一些主要的结果。

(1) 氢键在酶催化中的作用。通过蛋白质工程, 系统地改变该酶分子中与底物形成氢键的基团, 然后测定突变酶的动力学常数, 进而计算结合能的变化。研究表明, 由带电基团间形成的氢键对于结合能的贡献比不带电基团间的氢键的贡献要来得大^[9]。根据结合能的变化还得知, 当底物处于过渡态时, ATP 更易与该酶分子中的有关基团形成合适的氢键^[20]。

(2) 获得了一种高亲和力的突变酶^[21]。将野生型酶第 51 位苏氨酸残基改为脯氨酸后, 其表观二级反应速度常数 (k_{cat}/K_m) 提高了 25 倍。这一结果颇令人鼓舞, 它展示了蛋白质工程在改造酶分子、提高酶活性方面的光明前景, 特别在考虑改进工业用酶的性能时很有吸引力。

(3) 采用双突变法, 探测酶的活性部位的结构变化^[22]。其原理是通过引入第二个突变来帮助了解第一个突变是如何影响酶对底物的亲和力的。如果两个突变对酶或酶底物络合物的构象都不引起大的变化, 那么它们所产生的影响是独立的, 即在图 6 中应有 $\Delta G_1 = \Delta G'_1$ 和 $\Delta G_2 = \Delta G'_2$ 。反之, 若某一氨基酸侧链被取代后, 伴随有酶或酶底物络合物构象的较大变化, 则第一个突变所引起的酶与过渡态底物相互作用的能量变化将会因引入第二个突变而改变。此时, $\Delta G_1 \neq \Delta G'_1$ 和 $\Delta G_2 \neq \Delta G'_2$, 即如图 6 所示。

应用这一方法比较了野生型酶(图 6, His 48, Thr 51) 单突变酶 (Pro 51 或 Gly 48) 和双突变酶 (Gly 48, Pro 51), 发现 Pro 51 对底物亲和力的影响取决于第 48 位咪唑环的存在, 当将 His 48 改变为 Gly 48 后, Pro 51 的这一效应就消失了。从而提示了 51 位 Thr 变为 Pro 后, 使该处 α -螺旋发生形变, 影响 His 48 侧链的位置, 使之更易与底物相互作用。

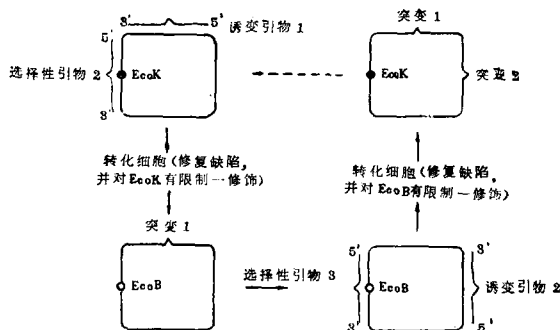


图5 偶联引物系统中选择标记往返互换示意图

(4) 用缺失突变法研究酶分子结构域的分布^[23]。在该酶的结构基因上除去C-端结构域(约占整个分子的三分之一), 得到的缺失酶仍能活化酪氨酸(反应式(1))且动力学常数亦未变化, 但不能催化反应式(2), 即tRNA不能被氨酰化。这一结果表明, 该酶分子中N-端三分之二是与氨基酸的活化有关的结构域, 而C-端三分之一则是与氨酰化tRNA有关的结构域。

在对各种酶中进行蛋白质工程的报道, 其中涉及到酶的性质改变大致包括以下几方面。

(1) 改变酶的催化活性。凡是催化活性所必需的氨基酸残基被改变后, 绝大多数情况下都导致酶活性的下降, 从而进一步证明了被改变的残基在催化中的重要性。但也有突变后酶活性增高的例子。如上述 (Pro 51) 酪氨酰-tRNA合成酶以及枯草杆菌蛋白酶 Met222 $\rightarrow$ Cys 后其催化活性变高了。

(2) 改变酶的底物专一性。胰蛋白酶底物结合部位的 Gly216 和 Gly226 改为 Ala 后, 提

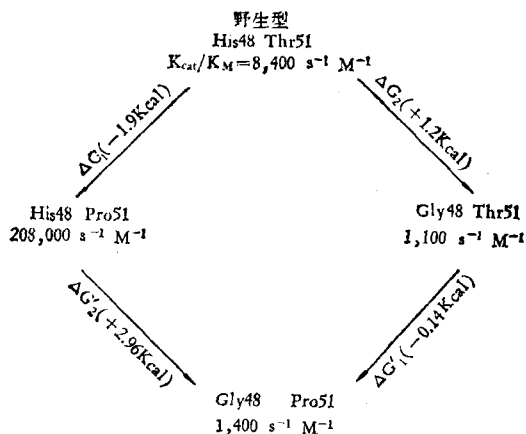


图6 用双突变法探测结构变化

突变的残基用斜体表示。单突变酶 Pro51 所具有的高的反应速度常数 ($k_{cat}/K_m = 208,000 s^{-1} M^{-1}$), 要求在酶分子中 His48 与 Pro51 同时存在。若先将 His48 突变为 Gly48 (图右部), 再将 Thr51 $\rightarrow$ Pro 这样得到的双突变酶(图底部)其反应速度常数几乎没有什么变化。

高了酶对底物的选择性。其中突变酶 Ala-216 对含精氨酸底物的 (k_{cat}/K_m) 提高, 而突变酶 Ala-226 则对含赖氨酸底物的 (k_{cat}/K_m) 有提高^[24]。

(3) 提高酶的稳定性。T₄ 溶菌酶 Ile-3 改为 Cys, 经氧化, 与 Cys-97 形成了二硫键后, 仍有活性且对热更加稳定。 β -内酰胺酶 Ser70 改为 Cys 后, 使其抵御胰蛋白酶水解的性能提高了 3 倍^[25]。

(4) 改变酶的最适 pH。枯草杆菌蛋白酶 Met-222 改为 Lys 后, 酶的最适 pH 由原来的 8.6 位移至 9.6。

(5) 改变酶的别构调节功能。天冬氨酸氨甲酰基转换酶是一个研究得比较清楚的别构酶, 将 Tyr165 改为 Ser 后, 酶就失去了别构调节的性质^[26]。

(6) 改变酶对辅酶的要求。二氢叶酸还原酶的双突变体 (Arg44 $\rightarrow$ Thr, Ser63 $\rightarrow$ Glu) 对辅酶的要求更倾向于 NADH 而不是 NADPH。

(7) 改变含金属的酶的氧化还原能力。细胞色素 c 的 Phe87 改为 Ser 或 Gly 后, 其还原电位下降 50mV, 反映了传递电子性质的改变。

此外, 一些在工业上广泛应用的酶, 如葡萄糖异构酶、 α -淀粉酶、凝乳酶等的蛋白质工程, 国外的一些生物工程公司看来已在进行了, 其

RNA 自我剪接机制

——生物体中无酶催化的奇特反应

文 重 乔 英

(北京大学化学系)

生物体内的一切反应都是在酶作用下进行的。今天对于这一观念,出现了一个反例,1982 年 Thoms R. Cech 和他的同事在 Colorado 大学的一个发现^[1]: 原生动物四膜虫 (*Tetrahymena*) 的核糖体 RNA 前体的编码基因插入序列的剪接无需其它酶类的存在就可以完成。这一发现的意义在于它改变了生物催化的一贯观

目的显然是要获得更适合工业生产条件的、稳定的酶制剂。

随着蛋白质工程的进一步开展,将有更多的酶和蛋白质,从各个不同的方面运用这一技术进行研究,我们对酶的结构与功能的关系就会有更多、更深入的了解,从而有可能从中总结出一些带规律性的东西,进而制定出一套用蛋白质工程改造酶的结构与性质的详细的规则。到那时,人们就可以按照不同的要求来定做各种具有特定性质的新的酶了。

念——具有蛋白质本质的酶促反应。这一发现同时还对生命进化的某些假说以支持,给人们以新的启示。California 大学的 Harry Noller 把 Cech 的工作称作是“十年来最令人激动的发现之一”。

四膜虫嗜热菌大核 rRNA 的自动剪接过程是这样的^[2]: 一个有 413 个 bp (碱基对, base

75, 4268, 1978.

参 考 文 献

- [1] Ulmer, K. M.: *Biotechnology and Biological Frontiers* (ed. by P. H. Abelson) p. 100, The American Association for the Advancement of Science, 1984.
- [2] Smith, M.: *Trends in Biochemical Science*, 440, 1982.
- [3] Zoller, M. J. et al.: *Methods in Enzymol.*, 100, 468, 1983.
- [4] Lederberg, J.: *Science*, 131, 269, 1960.
- [5] Schott, H. et al.: *J. Amer. Chem. Soc.*, 95, 3378, 1973.
- [6] Sanger, F. et al.: *J. Mol. Biol.*, 125, 225, 1978.
- [7] Hutchinson, C. A. et al.: *J. Biol. Chem.*, 253, 6551, 1978.
- [8] Razin, A. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*,

- [9] Winter, G. et al.: *Nature*, 299, 756, 1982.
- [10] Sigal, I. S. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 79, 7175, 1982.
- [11] Dalbadie-McFarland, G. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 79, 6409, 1982.
- [12] Osinga, K. A. et al.: *Nucleic Acids Res.*, 11, 8595, 1983.
- [13] Carter, P. et al.: *Oligonucleotide Site-directed Mutagenesis in M13*, p. 8, Anglian Biotechnology Ltd. UK, 1984.
- [14] Zoller, M. J. et al.: *DNA*, 3, 479, 1984.
- [15] Carter, P. et al.: *Nucleic Acids, Res.*, 13, 4431, 1985.
- [16] Kramer, W. et al.: *Nucleic Acids Res.*, 12, 441, 1984.
- [17] Schold, M. et al.: *DNA*, 3, 469, 1984.
- [18] Fersht, A. R. et al.: *Angew. Chem. Inter. Ed. Engl.*, 23, 467, 1984.
- [19] Fersht, A. R. et al.: *Nature*, 314, 253, 1985.
- [20] Wells, T. N. C. et al.: *Nature*, 316, 656, 1985.
- [21] Wilkinson, A. J. et al.: *Nature*, 307, 187, 1984.
- [22] Carter, P. et al.: *Cell*, 38, 835, 1984.
- [23] Winter, G. et al.: *Biochemical Soc. Transactions*, 12, 224, 1984.
- [24] Craik, C. S. et al.: *Science* (in press).
- [25] Sigal, J. S. et al.: *J. Biol. Chem.*, 259, 5327, 1984.
- [26] Robey, E. A. et al.: *J. Biol. Chem.*, 259, 11180, 1984.

[本文于 1985 年 11 月 23 日收到]