

催化吲哚生成靛蓝的细胞色素 P450BM-3 定向进化研究*

李红梅¹⁾ 梅乐和^{1)**} URLACHER VLADA²⁾ SCHMID ROLF D²⁾

(¹⁾浙江大学化学工程与生物工程系, 杭州 310027;

²⁾Institute of Technical Biochemistry University of Stuttgart, Stuttgart, Germany)

摘要 以催化吲哚产生的靛蓝在 630 nm 处具有特殊的吸收峰为高通量筛选指标, 将来源于 *Bacillus megaterium* 的细胞色素 P450BM-3 单加氧酶的基因序列用易错聚合酶链式反应进行定向进化, 通过多轮突变, 在原有的能产靛蓝的高活力突变酶的基础上成功获得了三个高于亲本酶的突变酶, 突变酶的酶活分别是亲本酶的 6.6 倍(hml001), 9.6 倍(hml002)和 5.3 倍(hml003), 并对突变酶的动力学参数进行了分析. 突变酶 DNA 测序的结果表明, hml001 含有一个有义氨基酸置换 I39V, hml002 含有三个有义氨基酸置换 D168N, A225V, K440N, hml003 含有一个有义氨基酸置换 E435D, 这些突变位点有些远离底物结合部位, 有些位于底物结合部位.

关键词 细胞色素 P450BM-3, 定向进化, 靛蓝, 易错聚合酶链式反应, 催化活性

学科分类号 Q7

靛蓝(indigo)是一种颜色鲜艳而又耐久的蓝色染料,是最早发现的天然染料之一.全球对染料的总体需求是 800 000 t,靛蓝就占据了 80 000 t.古代靛蓝的生产主要是从含有靛蓝的植物中提取.1897 年德国 BASF 生产的合成靛蓝问世,并以生产简便,原料充足,纯度高,使用方便等优点迅速普及,从而使得具有几千年历史的植物靛蓝黯然失色.20 世纪 60 年代之后,天然靛蓝终于销声匿迹,退出了历史舞台.进入 20 世纪 80 年代之后,环境保护和劳动保护意识逐渐普及,人们开始认识到了合成化学工业的有损健康、污染环境等弊病,如合成靛蓝中使用的苯胺和邻苯二甲酸酐能导致人体急性和慢性中毒,对呼吸道和中枢神经及肝脏均有一定损害.到了本世纪,生物转化合成天然靛蓝开始引起了科学工作者的注意.生物转化生产靛蓝产生的有害废物比化学方法少,既节能又廉价,对保护自然环境、维持生态平衡等方面无疑都是具有重要意义的.在生物转化合成靛蓝的酶中,以单加氧酶或双加氧酶报道的最多^[1,2],但研究大都处于萌芽阶段,产量也不尽人意.1999 年, Schmid 领导的科研小组利用定点突变技术定向进化来自于 *Bacillus megaterium* 的细胞色素 P450BM-3 获得具有三个突变位点的突变酶 P450BM-3 (A74G, F87V, L188Q),并且意外地发现该突变酶竟能催化吲哚生成靛蓝,这一惊人的发现使得定向进化技术在改

造酶功能特性和创造新的酶催化剂方面显现出巨大的魅力^[3].

定向进化技术是通过人为创造特殊的进化条件,模拟天然进化机制,在体外对基因进行随机突变,从一个或多个个人工突变酶库中通过一定筛选或选择方法最终获得预先期望的具有某些特性的进化酶.与自然进化相比,酶分子的定向进化过程完全是在人为控制下进化的,使酶分子朝向人们期望的特定目标进行.在目前大量蛋白质结构和功能信息缺乏的情况下,定向进化是不需要了解蛋白质的空间结构和功能的关系,适合一切蛋白质的改造,大大拓宽了蛋白质工程学的研究和应用范围.

鉴于定向进化在改造酶功能特性和创造新的酶催化剂方面具有巨大潜力,在本研究中拟采用细胞色素 P450BM-3 (A74G, F87V, L188Q)为亲本酶,通过易错聚合酶链式反应体外定向进化技术,期望获得合适的具有更高活力突变株.

*国家自然科学基金资助项目(20176050), CSC-DAAD 国家留学基金中德合作科技人员交流 PPP 项目,浙江省科技计划项目(2004c33036)和国家教育部留学回国人员基金和浙江省留学回国人员基金.

** 通讯联系人.

Tel: 0571-87953161, E-mail: meilh@che.zju.edu.cn

收稿日期: 2005-01-17, 接受日期: 2005-02-28

1 材料与方法

1.1 材料

限制性内切酶 *Bam*H I、*Nhe* I、*Eco*R I 购自于 Fluka (Neu-Ulm, Germany); T4DNA 连接酶、TaqDNA 聚合酶、PCR 产物回收试剂盒、酶解产物回收试剂盒、质粒快速提取试剂盒购自 Sigma 公司 (Deisenhofen, Germany); 菌种 *E.coli* DH5 α , 购自 Clontech 公司 (Heidelberg, Germany); *E.coli* BL21 (DE3), 质粒 pET28 α (+) 购自 Novagen 公司 (Wisconsin, USA).

1.2 定点突变

1.2.1 定点突变引物的设计.上游引物 B1, 5' TGTGCTATACGGATCCGAATATGGGAACAGC 3', 下游引物 B2, 5' TGTTCCATATTGGATCCGTATAGCACCAAGC 3' (下划线表示 *Bam*H I 酶切位点). 设计一对突变引物 B1 和 B2, 这两对突变引物涉及了 P450BM-3 基因第 1 469 位的 A 替换为 C 和 1 472 位的 T 替换为 A 两个定点突变位点, 这一替换属于沉默突变, 以 pET28 α (+)P450BM-3 为模板, 用 QuikChang™ 定点突变扩增的方法向 P450BM-3 基因引入点突变.

1.2.2 定点突变 PCR 反应.向 500 μ l 的 Eppendorf 管中加入 25 pmol dNTPs, 各 10 pmol 上游引物和下游引物, 大约 1 ng 质粒 pET28 α (+)P450BM3 作为模板 DNA, 2.5 U *pfu*DNA 聚合酶, 5 μ l 25 mmol/L MgCl₂ 的 PCR 缓冲液, 然后用无菌的蒸馏水加至总体积 50 μ l. PCR 反应参数是通过 95°C 变性 1 min 后, 在 95°C 30 s, 55°C 1 min, 每一循环温度上升 0.7°C, 72°C 16 min, 总共 14 个循环, 然后 72°C 延伸 30 s. 产物用 1 μ l *Dpn* I (10 U/ μ l) 消化 2 h 后转化到 *E.coli* DH5 α 中, 并涂布到终浓度为 30 mg/L 卡那霉素的 LB 琼脂平板上, 37°C 过夜培养. 大约挑选 12 个克隆接种到 5 ml 含有 30 mg/L 卡那霉素 LB 液体培养基中, 37°C 过夜培养以扩增质粒, 用 QIA 质粒快速提取试剂盒提取质粒并用 *Bam*H I 和 *Eco*R I 在 37°C 酶解后, 利用 DNA 电泳和全自动 DNA 测序检测期望的突变位点是否引入.

1.3 易错 PCR 定向进化

1.3.1 易错 PCR 引物的设计.根据 P450 BM-3 cDNA 的单加氧酶编码区设计的, 为了方便以后的操作, 在引物的 5' 端分别引入 *Bam*H I 和 *Nhe* I 位点. 上游引物, 5' CTAGCTAGCATGACAATTAAAG 3' (下划线表示 *Nhe* I 酶切位点), 下游引

物, 5' CATATTGGATCCGTATAGCACAAC 3' (下划线表示 *Bam*H I 酶切位点).

1.3.2 突变文库的构建和筛选.向 500 μ l Eppendorf 管中加入 100 pmol 的 dNTPs, 各 20 pmol 的上游引物和下游引物, 大约 1 ng pET28 α (+) P450BM-3 作为模板 DNA, 以及最终浓度范围为 0 ~ 0.20 mmol/L MnCl₂, 2.5 U Taq DNA 聚合酶, 5 μ l PCR 缓冲液, 12.5 μ l 25 mmol/L 的 MgCl₂, 然后用无菌蒸馏水加至总体积 50 μ l. 反应参数是通过 95°C 变性 3 min 后, 在 95°C 1 min, 47°C 2 min, 72°C 2 min, 经过 25 个循环, 然后 72°C 延伸 2 min. 易错 PCR 扩增产物经 *Nhe* I -*Bam*H I 双酶切后插入到用同样的双酶切后的线性质粒 pET28 α (+), 然后转化到 *E.coli* DH5 α , 涂布到含有 30 mg/L 卡那霉素的 LB 琼脂平板上, 37°C 过夜培养. 在上述得到克隆的平板上加 2 ml LB 液体培养基, 用刮布器轻轻地刮取并收集细胞, 然后提取质粒并转化 *E.coli* BL21, 涂布到含有 30 mg/L 卡那霉素的 LB 琼脂平板上, 37°C 过夜培养. 从平板上挑取蓝色的克隆, 并接种到 200 μ l 含有 30 mg/L 卡那霉素的 LB 液体培养基的 96 微孔板中, 37°C 过夜培养, 取 20 μ l 过夜培养液, 加入到一个新的 200 μ l 含有 30 mg/L 卡那霉素 LB 液体培养基的 96 微孔板中, 在 37°C 培养至 A_{600} 为 0.5~0.7 时, 加入 IPTG (终浓度 0.5 mmol/L) 诱导并在 30°C 继续培养 48 h, 得到蓝色的细胞, 用 DMSO 提取该蓝色物质^[1], 在 630 nm 处测定其吸收值, 将吸收值高于亲本的菌株挑选出来并进行 5 ml 到 100 ml 规模的培养, 最后通过测定其酶反应动力学曲线^[9]. 将活力高于亲本酶的菌株挑选出来并提取质粒进行全自动 DNA 测序.

1.4 P450BM-3 的提取和纯化

P450BM-3 的纯化采用金属螯合亲和层析 (IMAC), 其中金属螯合介质为 Ni-NTA 介质, 蛋白质的纯度用 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳检测^[4].

1.5 P450BM-3 含量的测定

采用 CO-差示光谱分析, 按参考文献[5]进行.

1.6 酶活力及酶催化吡啶的动力学参数

P450BM3 催化活力的测定参照文献[3]和[6]进行. 用 12-pNCA 表征的酶活定义为: 25°C 时, 每分钟催化底物生成 1 nmol 对硝基苯酚所需的酶量为 1 U ($\epsilon=13\ 200\ \text{mol}^{-1}\cdot\text{L}\cdot\text{cm}^{-1}$). 用吡啶表征的酶活定义为: 25°C 时, 每分钟催化底物生成 1 pmol 靛蓝所需的酶量为 1 U ($\epsilon=3\ 900\ \text{mol}^{-1}\cdot\text{L}\cdot\text{cm}^{-1}$)^[7].

2 结果与讨论

2.1 定点突变

图 1 为经过定点突变的质粒用 *Bam*H I 和 *Eco*R I 双酶切的琼脂糖电泳图谱。

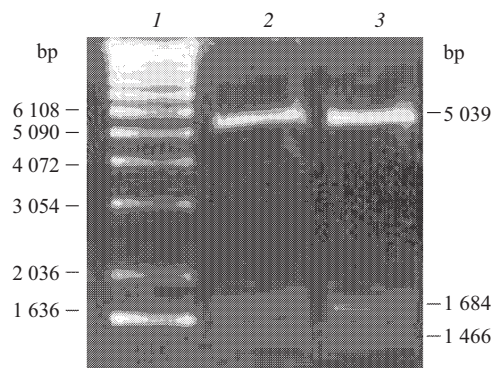


Fig.1 DNA electrophoresis analysis of pET28 α (+) p450BM-3 digested with *Bam*H I and *Eco*R I by site-directed evolution

I: 1 kb DNA marker; 2,3: DNA fractions of mutants digested by *Bam*H I and *Eco*R I the 1 466 bp and 1 684 bp bands corresponding to the PCR products of the p450BM-3 monooxygenase and FAD/FMN-containing reductase domain gene fragmentation, respectively.

为了提高易错 PCR 突变的频率和有效性, 仅在 P450BM-3 的单加氧酶基因区域进行易错是很有意义的. 但在设计引物的过程中在此基因区域找不到单一的酶切位点, 因此试图通过定点突变获得 *Bam*H I 的酶切位点. 根据这一思路在设计定点突变的引物时我们引进了 *Bam*H I 的酶切位点, 在基因序列为 1 469 碱基位点引入了 A-T 的突变, 在 1 472 碱基位点引入了 C-A 的突变, 同时这两个点突变在氨基酸水平上没有发生改变属于沉默突变, 不会影响到酶活性. 从双酶切的电泳图中可以看出有 3 个电泳条带出现, 通过与 DNA 标准电泳条带比较. 这 3 个条带的碱基大小分别是 5 369 bp、1 466 bp、1 684 bp. 这一结果初步表明, 通过定点突变获得了的 *Bam*H I 限制性酶切位点. 进一步用全自动 DNA 测序的结果也表明, 在目标基因的第 1 469 和 1 472 碱基处成功引入了点突变并获得了 *Bam*H I 限制性酶切位点.

2.2 $MnCl_2$ 浓度对易错 PCR 扩增的影响

图 2 为不同 $MnCl_2$ 浓度下得到的 PCR 产物的琼脂糖电泳图谱。

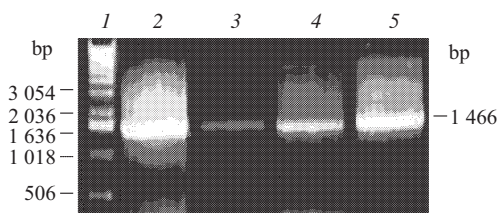


Fig.2 Error prone PCR to amplify the 1 466 bp band corresponding to the PCR products of the pET28 α /p450BM-3 (A74G, F87V, L188Q) monooxygenase gene fragment

I: 1 kb DNA marker; 2: error prone PCR with 0 mmol/L $MnCl_2$; 3: error prone PCR with 0.2 mmol/L $MnCl_2$; 4: error prone PCR with 0.15 mmol/L $MnCl_2$; 5: error prone PCR with 0.10 mmol/L $MnCl_2$; 6: error prone PCR with 0.05 mmol/L $MnCl_2$.

图 2 表明, 在 PCR 反应体系中 $MnCl_2$ 的浓度越高, 得到 PCR 产物的量就越少, 这是因为 Mn^{2+} 同 Mg^{2+} 相互竞争与 TaqDNA 聚合酶结合影响了 TaqDNA 聚合酶的活性. 正常情况下是 Mg^{2+} 同 TaqDNA 聚合酶结合. 当 Mn^{2+} 与 TaqDNA 聚合酶结合时, 使 TaqDNA 聚合酶保真度大大降低导致易错产生突变.

2.3 易错突变文库的构建和筛选

对每个平板的蓝色克隆计数结果表明, $MnCl_2$ 的浓度越低得到的阳性克隆越多. 在没有 $MnCl_2$ 的条件下, 能得到 60%~70% 的蓝色克隆, 当 $MnCl_2$ 的浓度达到 0.2 mmol/L 时在平板上是得不到蓝色克隆的. 这一结果表明, 当 $MnCl_2$ 的浓度过高使得 DNA 的突变频率太高, 产生的绝大多数酶将失去活性, 如果突变频率太低, 野生型的背景太高, 样品的多样性则较少, 因此在用易错 PCR 进行定向进化时创建合适的突变频率是相当重要的. 图 3 示从突变文库中挑选蓝色克隆进行 96 微孔板培养的结果.

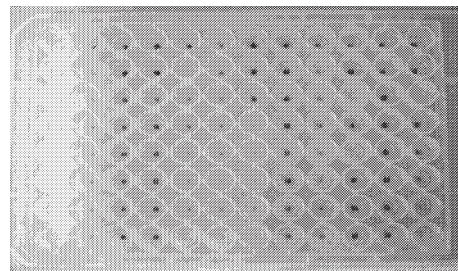


Fig.3 Blue active colonies incubated at 96 well plate

通过多次 96 微孔板筛选,发现大约有 20 个克隆产生的靛蓝在 630 nm 处的吸收值是高于亲本克隆的.因此,将这 20 个可能具有前途的突变菌株用于 5 ml 规模的培养,同样的条件下,测定其在 630 nm 靛蓝的吸收值,结果显示只有 7 个菌株产生的蓝色物质明显高于亲本菌株的.为了避免可能产生的误筛,实验中进行了 100 ml 规模的培养表达,通过测定酶活的方法进行更加精确的筛选.同时,在相同条件下测定催化吲哚的动力学曲线(图 4),结果显示有 5 个样品具有高于亲本酶催化活性的趋势.

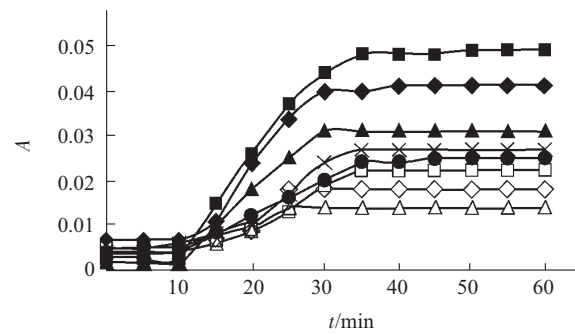


Fig.4 Kinetic curve of P450BM-3 hydroxylating indole into indigo from the 7 colonies
●—●: hml005; ▲—▲:hml001; ■—■: hml002; △—△: hml006;
□—□: pt; ◇—◇: hml007; ◆—◆: hml003; ×—×: hml004.

2.4 高活力进化酶基因的测序以及与亲本酶酶活性的比较

将这 5 个样品通过全自动 DNA 测序,并将其序列翻译到氨基酸水平,有 3 个克隆显示出了具有有义突变位点(I39V; D168N, A225V, K440N; E435D).从而在基因水平上表征了突变酶的获得,进一步用蛋白质模拟技术对新突变位点在蛋白质三级结构中的位置进行模拟,发现突变位点具有无规性,有些突变是位于活性中心空穴内,有些突变是远离活性中心.

Table 1 Amnio acid substitutions in P450BM-3 mutants			
	Base shift	Amino acid substitution	Location
hml001	A118G	I39V	Sheet A
hml002	G505A	D168N	β-Turns
	C677T	A225V	Helices H
	A1323T	K440N	Strand D
hml003	A1308T	E435D	β-Turns

2.5 亲本型和突变型 P450BM-3 的提取和纯化

由于在 P450BM-3 C 端构建了 6 个组氨酸,因此可以用 Ni²⁺-NTA 介质亲和层析纯化 P450BM-3.采用阶跃洗脱,洗脱液分别是 pH 7.5 0.05 mol/L 磷酸盐缓冲液 (其中含有 0.5 mol/L NaCl, 0.1 mol/L 咪唑) 和 pH 7.5 0.05 mol/L 磷酸盐缓冲液 (其中含有 0.5 mol/L NaCl, 0.4 mol/L 咪唑),流速为 2 ml/min.将纯化后的酶进行 SDS- 聚丙烯酰胺凝胶 (SDS-PAGE) 电泳,如图 5 所示,各酶的纯化效果几乎相同.

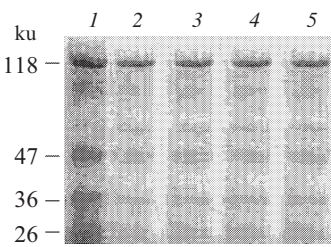


Fig.5 SDS-PAGE of purified enzyme
1: molecular mass marker; 2: parent type enzyme; 3: hml001: MutantI39V enzyme; 4: hml002: mutantD168N, A225V, K440N enzyme; 5: hml003: mutantE435D enzyme.

2.6 亲本型和突变型 P450BM-3 催化吲哚的动力学特征

表 2 总结了亲本酶和突变酶的催化动力学参数.在 2 ml pH 8.2 的 Tris-HCl 缓冲反应液中加入 20 μl 100 mmol/L 吲哚,再加入 2.4 nmol 酶,室温下培育 9 min,加入 20 μl 5 g/L NADPH,启动反应立即监控其在 670 nm 的吸光度升高.从表 2 可以看出, hml001, hml002, hml003 进化酶的比活比亲本酶分别提高了 6.6, 9.6, 5.3 倍.与亲本酶相比,进化酶均有一个低的 K_m 值,表明它们具有较高的底物亲和力,同时 3 个突变酶的 k_{cat}/K_m 值都高于亲本酶.为了检查 P450BM-3 突变酶对其天然底物的活性,我们选择了较为常用的显色底物 12-pNCA 作为检测对象.结果表明,只有 hml002 变异株对该底物有较强的催化活性(表 2),对 12-pNCA 的活力高于亲本酶,其余的突变酶对 pNCA 的活力均低于亲本酶.

2.7 亲本型和突变型 P450BM-3 底物结合区域光谱比较

图 6 显示了亲本型和突变型在 370~500 nm 光谱范围内变化情况.从图 6 中我们可以发现突变酶与亲本酶底物结合区域的最大吸收峰都发生了不同

位置的偏移. 亲本酶的最大吸收峰在 425 nm 处, 而 hml001, hml002, hml003 最大吸收峰分别在 416 nm, 417 nm, 422 nm, 显然这些突变位点从

整体上改变了 P450BM-3 的立体结构, 从而影响了底物结合部位的空间结构.

Table 2 Kinetic parameters of the parent enzyme and mutant enzymes

Enzyme	Specific activity		$K_m/(\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1})$	$k_{\text{cat}}/\text{s}^{-1}$	$(k_{\text{cat}}/\text{s}^{-1})/[K_m/(\text{mol} \cdot \text{L}^{-1})]$
	$c(\text{pNCA})/(\text{U} \cdot \text{nmol}^{-1})$	$E(\text{indole})/(\text{U} \cdot \text{nmol}^{-1})$			
parent enzyme	81.62	64.1	2.2	2.86	1 300
hml001	42.24	423	1.8	2.98	1 655
hml002	115.5	615.4	1.5	3.12	2 080
hml003	36.53	339.7	1.9	2.90	1 526

All reactions are performed in pH 8.0, 0.1mol/L Tris-HCl buffer at 25°C.

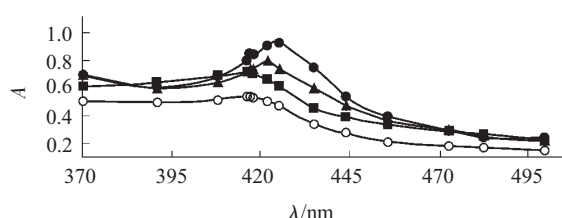


Fig.6 Absorption spectra showing substrate binding by the characteristic blue shift in the Soret band

●—●: parent type; ▲—▲: hml001; ■—■: hml002; ○—○: hml003. 0.2 nmol · ml⁻¹ enzyme in 2.5 ml of 50 mmol/L potassium phosphate buffer (pH 7.5) and 25 μl of 10 mmol/L indole in dimethylsulfoxide (DMSO) and 2.5 ml of 50 mmol/L potassium phosphate buffer as a reference.

3 结 论

本研究中采用易错 PCR 定向进化技术, 在已有高活力突变菌株的基础上进一步提高了 P450BM-3 催化吲哚的活力, 成功获得了三个突变高活力菌株. 从基因测序的结果我们发现 Glu436Asp 的突变体中有 5 个碱基发生了突变只有一个碱基是有义突变, 其余的都是沉默突变. 这是因为编码氨基酸密码子的退化使得每个氨基酸的突变并不在同一水平上, 因此用易错 PCR 将近三分之一的密码子替换不会产生氨基酸的改变. 同时在定向进化时, 合适的突变频率是快速获得活性克隆的重要条件. 在本研究中发现 Mn²⁺ 的浓度直接影响到活性克隆的获得. 本研究得到的高活性的克隆来自于 Mn²⁺ 终浓度为 0 和 0.05 mmol/L PCR 反应体系. 因此在进行易错 PCR 时优化 Mn²⁺ 的浓度是相当重要的.

总而言之, 具有新功能和特性的酶可以通过从大量未知的自然种系中寻找以及对现有的天然酶进行改造, 而对于在自然进化过程中没有经过选择的特性和功能而言, 对现有的天然酶进行改造可能更加合适. 我们相信随着基因工程技术, 蛋白质工程技术以及高通量筛选技术的迅速发展, 定向进化技术将成为获得新酶的一个有效快捷的手段, 将为工业生产提供更多性能优良的酶制剂.

参 考 文 献

- 1 Elizabeth M, Gillam J, Lisa M N, *et al.* Oxidation of indole by cytochrome P450 enzymes. *Biochemistry*. 2000, **39**(45): 13817~13824
- 2 Meyer A, Wursten M, Schmid A, *et al.* Hydroxylation of indole by laboratory-evolved 2- hydroxybiphenyl 3-monooxygenase. *J Biol Chem*, 2002, **277** (37): 34161~34167
- 3 Li Q S, Schwaneberg U, Schmid R D, *et al.* Directed evolution of the fatty-acid hydroxylase P450 BM-3 into an indole-hydroxylating catalyst. *Chem Eur J*, 2000, **6** (9): 1531~1536
- 4 Budde M, Maurer S C, Schmid R D, *et al.* Cloning, expression and characterisation of CYP102A2, a self-sufficient P450 monooxygenase from *Bacillus subtilis*. *Applied Microbiology Biotechnology*, 2004, **66** (2): 180~186
- 5 Omura T, Sato R. The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes. *J Biol Chem*, 1964, **239** (7): 2370~2378
- 6 Schwaneberg U, Schmidt D C, Schmid R D, *et al.* A continuous spectrophotometric assay for P450 BM-3, a fatty acid hydroxylating enzyme, and its mutant F87A. *Analytical Biochemistry*, 1999, **404** (269): 359~366
- 7 徐卉芳, 张先恩, 张治平, 等. 大肠杆菌碱性磷酸酶的体外定向进化研究. *生物化学与生物物理进展*, 2003, **30** (1): 89~94
Xu H F, Zhang X E, Zhang Z P, *et al.* *Prog Biochem Biophys*, 2003, **30** (1): 89~94

Cytochrome P450BM-3 Mutants With Improved Catalytic Properties of Hydroxylating Indole to Indigo by Error-prone PCR*

LI Hong-Mei¹⁾, MEI Le-He^{1)**}, URLACHER VLADA²⁾, SCHMID ROLF D²⁾

¹⁾Department of Chemical and Biochemical Engineering, Zhejiang University, Hangzhou 310027, China;

²⁾Institute of Technical Biochemistry University of Stuttgart, Stuttgart, Germany)

Abstract Monooxygenase domain of cytochrome P450BM-3 from *Bacillus megaterium* was evolved by error-prone PCR. Three mutants (D168N, A225V, K440N; E435D; I39V) with higher hydroxylating activity than the parent type P450BM-3((A74G, F87V, L188Q)) were obtained, coupled with a sensitive screening method of absorption of hydroxylating indole to indigo at 630nm. The catalytic activities of three mutants were 6.6(hml001), 9.6(hml002), 5.3 (hml003) fold higher than that of the parent type P450BM-3 respectively. The kinetic analysis revealed that the mutant enzymes exhibit a higher substrate binding ability and catalytic efficiency than the parent enzyme. DNA sequence indicated that hml001 and hml003 cover one amino acid substitution (I39V and E435D, respectively), hml002 contains three amino acid substitutions (D168N, A225V, K440N).

Key words cytochrome P450BM-3, directed evolution, indigo, error-prone PCR, catalytic activity

*This work was supported by grants from The National Natural Sciences Foundation of China (20176050), CSC (China)-DAAD (Germany), The Science and Technology Project of Zhejiang Province (2004c33036), The National Science Fund and Zhejiang Province Science Fund for the Abroad Repatriated Scholars.

**Corresponding author . Tel: 86-571-87953161, E-mail: meilh@che.zju.edu.cn

Received: January 17, 2005 Accepted: February 28, 2005