

蛋白质人为进化的研究进展

戴明华 朱颖旻 姜卫红 赵国屏

(中国科学院上海植物生理研究所, 上海 200032)

摘要 蛋白质人为进化是目前蛋白质工程研究的热点之一. 易错 PCR、DNA shuffling 及高突变菌株的应用, 使许多蛋白质在功能上大幅度改善.

关键词 易错 PCR, DNA shuffling, 高突变菌株, 人为进化

学科分类号 Q51

蛋白质工程作为独立的新兴学科是在 20 世纪 80 年代才出现的. 它是基因工程、蛋白质结构和计算技术互补发展和渗透的结果. 它标志着人类可以按照自己的意愿和需要改造蛋白质, 甚至设计出自然界中原来不存在的全新蛋白质. 在目前蛋白质人为改造还不很成熟的情况下, 通过定点突变改造蛋白质, 特别是对酶的改造, 取得了相当大的成绩. 但总的来说我们的能力并未达到对复杂的生物体系进行有效的人为改造的水平. 近年来易错 PCR、DNA shuffling 和高突变菌株的应用, 在对目的基因表型有高效检测筛选系统的条件下, 尽管不清楚蛋白质的结构, 仍能获得具有预期特性的新蛋白质, 基本实现了蛋白质的人为快速进化. 近年来在许多文献^[1~5]中均提出了“人为进化”或“定向进化”的观点.

1 易错 PCR

易错 PCR 是一种简单、快速、廉价的随机突变方法. 它通过改变 PCR 的条件, 通常降低一种 dNTP 的量 (降至 5%~10%)^[6], 使 PCR 易于出错, 达到随机突变的目的. 还可以加入 dITP 来代替被减少的 dNTP, dITP 的导入, 又会使下一轮 PCR 循环中出现更多的错误^[7]. 在 PCR 缓冲液中另加 0.5 mmol/L Mn^{2+} , 亦有利于提高突变率^[8].

Arnold 对枯草杆菌蛋白酶 E 进行了研究. 他在 dGTP, dCTP, dTTP 为 1 mmol/L 的情况下把 dATP 的浓度降到 0.2 mmol/L, 对该酶 49 位氨基酸到 C 端基因的 DNA 片段进行易错 PCR, 经筛选得到几个在高浓度的二甲基酰胺 (DMF) 中酶活力得到提高的突变株. 其中三点突变体 D60N + Q103R + N218S 酶活力提高了 38 倍^[9].

用易错 PCR 法进行定向改造关键在于突变率的控制. 一般而言, 有意义的突变只占极少数, 而有

意义的突变如果和不利的突变组合在一起又将使酶失活. 因此, 突变率太高不利于发现有用的突变株, 太低则出现的大多是野生型. 一般认为, 理想的突变率为每个目的基因的碱基替代在 1.5 到 5 个左右.

2 DNA shuffling

DNA shuffling 即将 DNA 拆散后重排. 它是 Stemmer^[10]建立的模仿自然进化的一种 DNA 体外随机突变方法. 这种方法不仅可以对一种基因人为进化, 而且可以将具有结构同源性的几种基因进行重组, 共同进化出一种新的蛋白质. DNA shuffling 基本过程包括四个步骤: a. 目的基因片段的准备: 根据不同的需要选择一个基因或其片段, 也可以是几个序列上具有较高同源性的基因; b. DNase I 酶切: 将基因随机切割成约 10~50 bp 或 300 bp 左右的小片段; c. 不加引物的 PCR: 在 Taq 酶的作用下将切割后的 DNA 重叠小片段重新连接起来, 在这个过程中可能发生许多突变和重组; d. 加引物的 PCR: 加入目的基因片段两端的引物, 使连接好的 DNA 得到扩增, 筛选正突变. 得到的正突变子又可以重复进行 shuffling, 使性状进一步提高.

Shuffling 可以大幅度地提高酶的活性. 如广泛用作报告基因的绿色荧光蛋白 (GFP), 经过三个循环后其荧光强度超过野生型的 45 倍^[11]. Shuffling 不仅可以改变一个酶基因, 对于执行某类功能的不同酶的基因可以一起 shuffling, 从而得到原先在自然界中并不存在的酶. 如源于四种菌 *Citrobacter freundii*, *Enterobacter cloacae*, *Yersinia enterocolitica* 和 *Klebsiella pneumoniae* 的头孢菌素酶, 它们的同源性在 58%~82% 之间, Stemmer

Tel: (021) 64042090-4705, E-mail: wjiang@iris.sipp.ac.cn

收稿日期: 1999-06-28, 修回日期: 1999-10-28

对它们的基因进行 shuffling. 结果, 单基因进行的 shuffling 产生的突变体对 moxalactam 的抗性增加了 8 倍, 而多基因共同 shuffling 得到的突变体抗性可以增加 270~540 倍. 对于后者的研究表明, 102 个氨基酸来自 *Citrobacter*, 142 个氨基酸来自 *Enterobacter*, 181 个氨基酸来自 *Klebsiella*, 另 196 个氨基酸来自 *Yersinia*^[12]. 由此可见, 对于具有同源性的一类酶进行多基因的 shuffling 可以加速酶的人为进化.

目前研究表明, 要想得到较多的阳性突变体, 并非突变率越高越好. 在实验过程中每一步都要考虑怎样把点突变降低到较低值, 最好在 0.05%~0.7% 左右. 在 DNase I 处理时应用 Mn^{2+} 代替 Mg^{2+} , 因为用 Mg^{2+} 时, DNase I 会在 DNA 链上产生缺刻, 当用小于 50 bp 的片段进行无引物 PCR 时, 会由于单链 DNA 太小而不能延伸, 从而产生较多的差错; 而 Mn^{2+} 介导的 DNase I 酶切是把 DNA 双链一起切断, 从而避免了这一现象; DNA Taq 酶应该用高保真的 Pfu 或 Pwo 酶; 在第二步加引物的 PCR 中, 应尽量减少循环次数等等均可降低出错^[13].

3 高突变菌株的应用

对 *E. coli* 的研究表明, 在野生型的菌株中自发突变率约为每世代每细胞中 10^{10} bp 基因上有一个突变. Greener 等^[6]构建了一株新的菌株, 命名为 XL1-Red. 它由 XL1-MRA (Stratagene, Lajolla, CA) 衍生而来, 在错配修复 (mutS), $ox\sigma$ dGTP 修复 (mutT) 和 DNA 聚合酶 III β -5' 外切酶活性亚基上发生突变, 因此它的自发突变率比野生型高 5 000 倍. 在培养 30 代后, XL1-Red 的自发突变率可达到 1/1kb. 这种突变可以是转换、颠换或 1 bp 的插入.

Bornscheuer 等^[14]利用 *E. coli* XL1-Red 对 *Pseudomonas fluorescens* 的酯酶 (PFE) 进行了随机突变. 野生型的酯酶基因的质粒被转化到 *E. coli* XL1-Red 中, 每培养 24 h 取少量接种到新鲜的培养基上, 同时提取质粒, 7 d 为一突变周期. 把每次抽提的质粒转化 *E. coli* DH5 α , 然后筛选阳性克隆. 这一轮得到的阳性克隆再进入下一轮循环, 得到的突变体改变了酯酶的立体专一性, 步骤如图 1. 这种方法的优点在于, 它是用整个质粒一起进行突变不需要连接. 因而每一步的转化效率得到保证, 同时操作简便、经济.

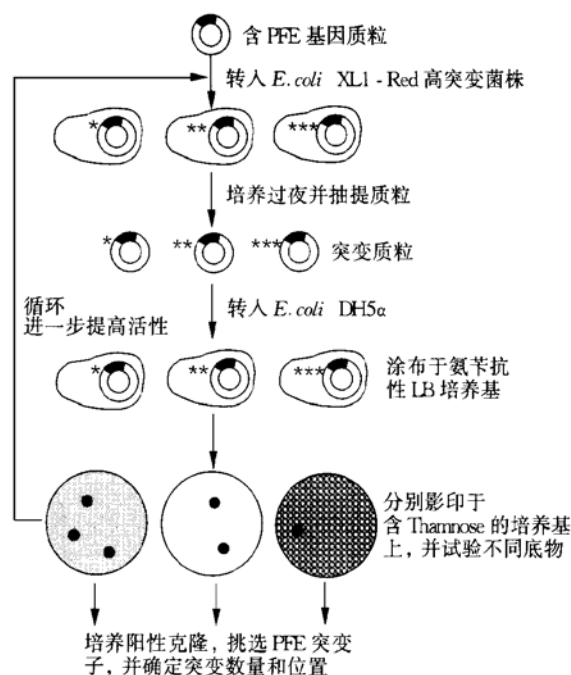


图 1 利用 *E. coli* XL1-Red 对酯酶 (PFE) 进行随机突变

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需求, 因此目前用随机突变或者说人为进化的方法来改造蛋白质的研究越来越多. 在人为进化的很多例子中, 氨基酸的改变部位离肽或抗生素的底物结合部位都很远, 却往往有新的功能产生. 这说明改造蛋白质不能只按目前的仅有的知识来设计, 并且在突变时不能对选择部位有太大的偏向, 特别是在结构和功能关系未搞清楚之前. 我们相信, 随着研究的深入人为进化蛋白质将不断出现, 从而为人类提供更多的结构与功能关系的信息, 在理论指导下的蛋白质人为改造一定会越来越成功.

参 考 文 献

- 1 Harayame S. Artificial evolution by DNA shuffling. *Tibtech*, 1998, **16** (2): 76~82
- 2 Kuchner O, Arnold F H. Directed evolution of enzyme catalysts. *Tibtech*, 1997, **15** (12): 523~530
- 3 Rubingh D N. Protein engineering from a bioindustrial point of view. *Current Opinion in Biotechnology*, 1997, **8** (4): 417~422
- 4 Shao Z X, Arnold F H. Engineering new functions and altering existing functions. *Current Opinion in Structural Biology*, 1996, **6** (4): 513~518
- 5 Patten P A, Howard R J, Stemmer W P C. Applications of DNA shuffling to pharmaceuticals and vaccines. *Current Opinion in Biotechnology*, 1997, **8** (7): 724~733
- 6 Greener A, Callahan M, Jerpseth B. An efficient random mutagenesis technique using an *E. coli* mutator strain. In: Trower M K ed. *Methods in Molecular Biology*. New Jersey: Jumana Press, 1996. 375~385
- 7 Spee J H, M de Vos W, Kuipers O P, et al. Efficient random

- mutagenesis method with adjustable mutation frequency by use of PCR and dITP. *Nucleic Acids Res*, 1993, **21** (3): 777~ 778
- 8 Chen K, 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 USA*, 1993, **90** (2): 5618~ 5622
- 9 Chen K, Arnold F H. Enzyme engineering for nonaqueous solvents: random mutagenesis to enhance activity of subtilisin E in polar organic media. *Biotechnology*, 1991, **9** (11): 1073~ 1077
- 10 Stemmer W P C. DNA shuffling by random fragmentation and reassembly: *In vitro* recombination for molecular evolution. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, **91** (22): 10747~ 10751
- 11 Cramer A. Improved green fluorescent protein by molecular evolution use DNA shuffling. *Nature Biotechnology*, 1997, **15** (5): 426~ 438
- 12 Cramer A, Raillard S A, Bermudez E, *et al.* DNA shuffling of a family of genes from diverse species accelerates directed evolution. *Nature*, 1998, **391** (3): 288~ 291
- 13 Zhao H M, Arnold F H. Optimization of DNA shuffling for high fidelity recombination. *Nucleic Acids Research*, 1997, **25** (6): 1307~ 1308
- 14 Bornscheuer U T, Altenbuchner J, Meyer H H. Directed evolution of an Esterase for the stereoselective resolution of a key

intermediate in the synthesis of Epothilones. *Biotechnology and Bioengineer*, 1998, **58** (5): 554~ 559

Progress in Artificial Evolution of Protein. DAI Ming-Hua, ZHU Ying-Min, JIANG Wei-Hong, ZHAO Guo-Ping (*Shanghai Institute of Plant Physiology, The Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200032, China*).

Abstract Artificial evolution has emerged in the past few years as a powerful alternative to rational approaches for engineering protein. *In vitro* evolution of enzymes use error-prone PCR, DNA shuffling and mutator stains. Many useful enzymes have been isolated following the artificial evolution.

Key words error-prone PCR, DNA shuffling, mutator stains, artificial evolution

克隆差异表达基因的新策略

崔大祥 闫小君 王 枫 苏成芝

(第四军医大学全军基因诊断技术研究所, 西安 710032)

摘要 基因表达的变化有两种, 即新出现的基因表达与表达量差异的基因表达。表达量差异的基因克隆技术主要有 mRNA 差异展示, 此技术是目前筛选差异表达基因最有效的方法之一, 但主要存在假阳性率高的不足, 针对此缺点, 近几年提出了新的策略与方法, 如差异消减展示、基于 PCR 和减法杂交基础上的差异表达基因克隆技术, 这些技术具有显著优势。

关键词 基因表达, 克隆, 策略

学科分类号 Q52

基因表达的变化处于控制生物学调节机制的中心位置, 分离并克隆差异表达基因不仅有助于揭示生命的奥秘, 而且还能为基因诊断与治疗提供重要的理论依据。基因表达的变化有两种, 即新出现的基因表达与表达量差异的基因表达, 以前过多强调克隆新出现的表达基因, 忽略表达量差异的基因。目前研究认为表达量差异的基因表达对信号转导调控的意义更大, 分离并克隆表达量差异的基因对揭示生命的奥秘更具有意义。消减杂交、代表性差示分析、抑制性扣除杂交、Order 差示分析等在分离克隆新出现的表达基因方面具有明显优势, 而且所获基因在 RNA 印迹上重现性好, 假阳性少, 缺点是所需起始材料较多。这些技术比较成熟, 近几年无明显改进; 表达量差异的基因克隆技术主要有

mRNA 差异展示, 此技术是目前筛选差异表达基因最有效的方法之一, 但存在不足, 针对这些缺点, 近几年出现了较大改进, 并提出了新的策略及方法。现将此进展作一综述。

1 mRNA 差异展示存在问题及改进

mRNA 差异展示 (mRNA differential display, DDRT-PCR) 是目前筛选差异表达基因最有效的方法。自 1992 年 Liang 和 Pardee^[1] 建立此技术以来, 5' 端随机引物、3' 端锚定引物、循环参数都有了较大改进, 其主要目的是消除假阳性, 增强重复性与敏感性。1994 年 Liang 等^[2] 把 3' 端 12 条引物改为

Tel: (029) 3374771, E-mail: cuidx@igd.edu.cn

收稿日期: 1999-06-28, 修回日期: 1999-11-01