

基于荧光激活细胞分选技术的超高通量酶活性筛选方法及其应用*

马富强^{1, 2)} 冯雁^{1, 2)} 杨广宇^{1)**}

(¹⁾上海交通大学生命科学技术学院, 上海 200240; (²⁾吉林大学生命科学学院, 长春 130012)

摘要 基于荧光激活细胞分选(FACS)技术的超高通量酶活性筛选方法是新出现的一类高通量筛选技术。它利用流式细胞仪高灵敏度、高通量的特点,能以极高的速度($> 10^8$ /天)对大容量酶基因文库进行筛选。FACS 筛选技术的出现突破了常规筛选方法低效、耗时、费力等瓶颈问题,极大地提升了人类对大容量基因文库的探索能力,因此在新酶基因筛选、酶活性检测、酶定向进化等领域有广泛的应用潜力。综述了 FACS 超高通量酶活性筛选方法的最新研究进展,着重介绍了其在酶定向进化中的应用。

关键词 荧光激活细胞分选, 高通量筛选, 酶, 定向进化
学科分类号 Q503/Q789/Q814

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2011.00281

酶是高效、高选择性、环境友好的生物催化剂。用酶代替化学催化剂进行生物转化、环境处理、化工品及药物生产,日渐成为食品、环境、能源、医药等多种工业领域不可或缺的组成部分。近年来,随着实际应用对酶种类和性质的要求越来越多样化,酶工程领域也相应迅猛发展。目前对新功能酶源的开发逐渐从常规陆地环境转向海洋及各类极端环境,从可培养微生物转向非培养微生物的宏基因组,从被动筛选天然酶转向对酶进行人工设计与进化^[1-4]。这些研究极大地丰富了人类所掌握酶资源库的多样性,但也对高通量筛选方法提出了更高的要求。经典的平板筛选方法及微孔板(如 96 孔板或 384 孔板)筛选方法由于对人力依赖重、筛选通量低,日益成为新酶开发流程的瓶颈。核糖体展示、mRNA 展示、噬菌体表面展示、遗传选择系统等新型高通量筛选方法可以极大地加快筛选的速度^[5],但此类方法通常都基于定性分析,对酶基因进行“全或无”的筛选,应用范围有限。

为弥补现有筛选方法的不足,基于流式细胞仪的荧光激活细胞分选(FACS)筛选方法应运而生。流式细胞仪是专门用于单颗粒(如细胞、微球、液滴等)高效检测的仪器^[6],可以定量地提供单个颗粒大小、结构、荧光强度等信息,并能够从大量样

品中分选出具有特定性质的群体。流式细胞仪具有极快的检测速度,在一个项目周期内可处理的样品数可达 10^{10} 个,因此也被称为“超高通量筛选方法(ultrahigh-throughput screening method)^[7]”。另外,使用 FACS 筛选仅需极微量的底物,极大降低了筛选所需的试剂成本。近年来,FACS 筛选方法被广泛应用于大容量基因库的筛选,迅速受到相关领域研究者的广泛关注。本文将就 FACS 酶活性筛选方法的原理及最新进展进行介绍,着重关注了 FACS 筛选在酶定向进化领域的应用。

1 FACS 筛选原理

流式细胞仪通过极细的工作液流将单细胞(或其他微粒)排成一列,依次高速通过激光聚焦监测点,根据每个细胞经过监测点时光信号的变化来判断该细胞的大小、形态以及荧光强度,并可以根据细胞的性质,瞬间给目标个体加上相应的电荷,使

* 国家重点基础研究发展计划(973)(2011CBA00800)和国家自然科学基金(30970632, 31070056, 30821005)资助项目。

** 通讯联系人。

Tel: 021-34207248, E-mail: yanggy@sju.edu.cn

收稿日期: 2011-06-20, 接受日期: 2011-09-29

其在经过高压静电场时被分选入收集管中. 高速的液流系统、高效的信号采集处理及反馈体系、高频的静电场分选装置使得 FACS 方法能够以高达 10⁷/h 的速率进行样品检测及分选.

要使用 FACS 对酶活性进行筛选, 首先必须建立酶活性表现型与其编码基因的偶联, 即将酶活性转化为可检测的荧光信号, 并与酶所在的细胞构建某种物理联系. 因此, 怎样将易扩散的荧光产物偶联在细胞(或酶基因)上, 是建立 FACS 酶活性筛选方法的核心问题. 根据荧光产物与酶及其编码基因偶联形式的不同, 现有的 FACS 酶活性筛选体系可大致分为 5 种类型^[7]: 细胞膜荧光吸附、胞内荧光产物富集、荧光蛋白表达活性报告、基于细胞理化性质的荧光探针活性报告、体外区室化(*in vitro compartmentalization*).

2 细胞膜荧光吸附

细胞膜荧光吸附是最先出现的 FACS 酶活性筛选策略. 它利用酶反应产物特殊的物理化学性质(如电荷、化学反应性等)与细胞膜结合, 从而实现酶活性与细胞荧光强度的偶联(图 1a). 该策略需要使用表面展示体系使酶分子展示在宿主细胞表面, 从而使酶催化及产物偶联的过程都在细胞膜上进行.

Olsen 等^[8]报道了一种基于细胞膜荧光吸附的 FACS 超高通量筛选方法, 可用于大肠杆菌外膜蛋白酶 OmpT 的筛选. 研究者设计了特殊的荧光共振能量转移(fluorescence resonance energy transfer, FRET)小肽底物, 使酶反应释放出的荧光产物带有 3 个正电荷, 因此能与呈负电的细胞膜结合(图 2), 使细胞带有荧光信号. 应用这种方法, Varadarajan

等应用定向进化成功地提高了 OmpT 对非天然底物的活性, 并进一步通过引入“反向选择”底物提高了其底物选择性^[9-10]. 该方法还被用于筛选专一性识别含有硫化酪氨酸的蛋白酶突变体^[11], 有潜力用于蛋白质翻译后硫化修饰的检测.

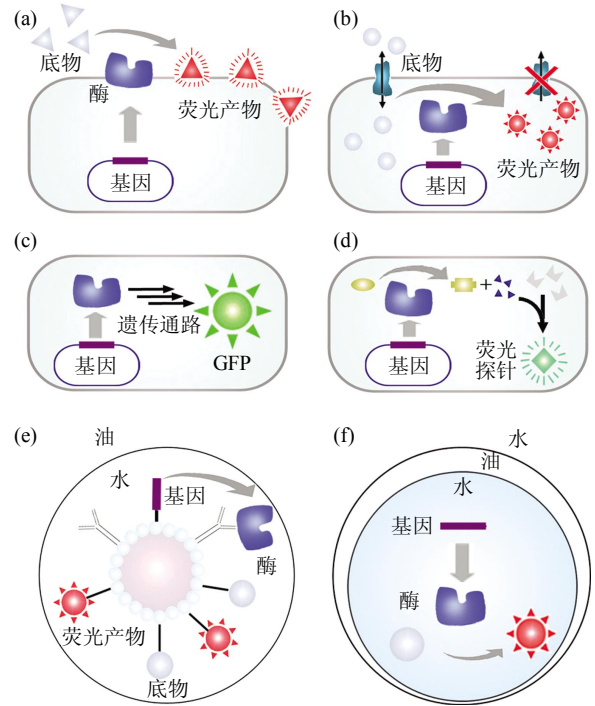


Fig. 1 Genotype-phenotype coupling methods

图 1 常用的基因型-表现型的偶联形式

(a) 细胞膜荧光吸附. 荧光产物通过物理或化学作用结合在细胞膜上. (b) 胞内荧光产物富集. 荧光产物由于大小、电荷等原因滞留在胞内. (c) 荧光蛋白表达活性报告. 通过胞内遗传通路将酶活性转化为荧光蛋白的合成或降解. (d) 基于细胞理化性质的荧光探针活性报告. 利用荧光探针检测由酶活性导致的胞内 pH、活性氧等环境变化. (e) 微珠介导的体外区室化. 将基因、酶、底物及荧光产物连接到同一个微珠上. (f) 二级液滴酶微反应器介导的体外区室化体系. 在“水-油-水”二级液滴内进行酶的表达与反应.

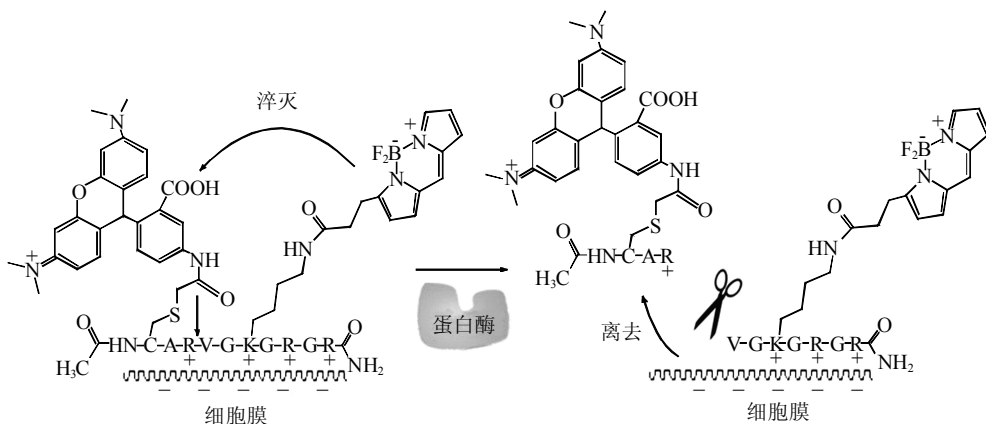


Fig. 2 FRET substrate for surface-displayed protease and its mechanism for fluorescence emission

图 2 细胞表面蛋白酶的 FRET 底物及其作用机制

在蛋白酶的作用下, FRET 底物荧光猝灭基团离去, 而荧光产物由于带有 3 个正电荷而保留在呈负电的细胞膜上.

尽管上述方法可有效筛选 OmpT 蛋白酶, 但其基因型和表现型的偶联是通过静电相互作用来实现的, 因此, 不同细胞个体之间有可能相互干扰. 有研究者将酶反应产物与细胞膜进行共价连接, 以避免这种现象. 他们开发了针对辣根过氧化物酶 (HRP) 的筛选方法^[12], 通过设计含有活泼酪胺基团的底物分子, 使酶产物可自发连接到细胞膜蛋白的酪氨酸残基上, 从而完成基因型和表现型的偶联(图 3). Becker 和 Kolmar 在此基础上又提出了

被称作 ESCAPED (enzyme screening by covalent attachment of products *via* enzyme display) 的水解酶筛选方法. ESCAPED 将目标酶与 HRP 同时展示在细胞表面, 并设计特殊的荧光底物, 将酪胺基团的酚羟基通过相应的化学键(酯键、糖苷键等)封闭, 只有底物被酶水解后才释放出活性酚羟基, 并通过 HRP 将荧光信号固定在细胞膜上, 这种方法被用于筛选酯酶 EstA 的立体选择性^[13].

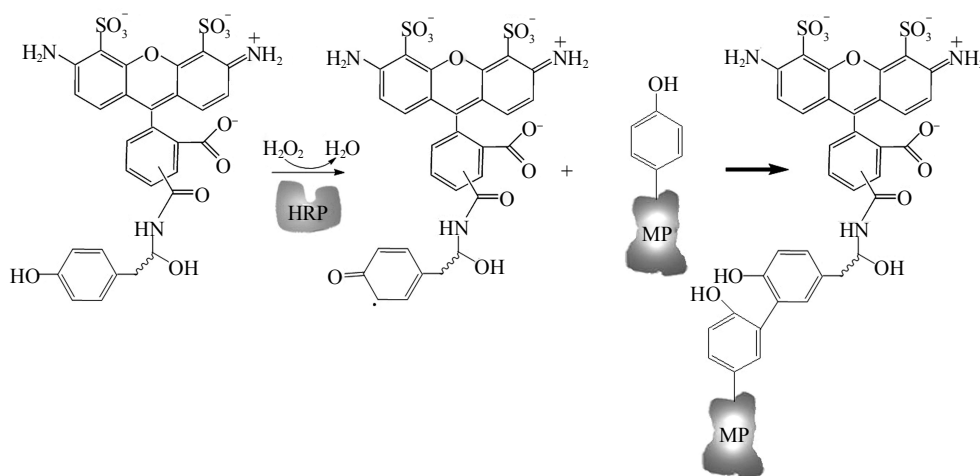


Fig. 3 HRP-catalyzed covalent linkage between tyramine substrate and membrane protein

图 3 辣根过氧化物酶催化的酪胺底物与膜蛋白共价连接

辣根过氧化物酶将酪胺氧化成类醌结构, 并与膜蛋白上的酪氨酸残基反应, 使产物共价连接到细胞膜上.

3 胞内荧光产物富集

胞内荧光产物富集利用底物与产物分子性质的不同, 使得可自由穿透细胞膜的底物被酶转化为荧光产物后滞留在胞内, 从而完成酶活性与细胞荧光强度的偶联(图 1b). 胞内荧光产物富集操作简便、灵敏度高, 是较为常见的一种 FACS 酶活性筛选策略, 但其难点是需对底物分子的结构和性质进行精细的设计.

利用底物与产物分子不同的细胞膜通透性实现胞内荧光产物富集是一种有效的策略. 如唾液酸转移酶的底物乳糖可以通过大肠杆菌表面的半乳糖透性酶自由进出细胞膜, 但由于其产物不再被半乳糖透性酶识别, 使得反应产物大量滞留在细胞内. 据此原理, Aharoni 等^[14]开发了唾液酸转移酶的 FACS 筛选方法, 并通过定向进化获得了活性提高 400 倍的突变体. 本文作者在此基础上, 将这一方法的应用范围扩展到了更具普遍意义的中性糖基转

移酶, 并证明了使用两种荧光底物可以有效消除筛选中的假阳性^[15]. Eklund 等^[16]应用类似的策略开发了谷胱甘肽转移酶(GST)的 FACS 筛选方法. 在对 GST 随机突变库的筛选及重组嵌合体库的筛选中获得了催化效率提高达 20 000 倍的突变体^[17-19]. Liu 等^[20]报道了一种 2'-脱氧核苷激酶活性的 FACS 筛选方法, 用来筛选正交核苷类似物激酶, 在治疗病毒感染和肿瘤重要药物前体的合成中有重要的意义.

另一种实现胞内荧光产物富集的方法是通过酶反应将可溶性底物转化为不可扩散的荧光产物保留在细胞中. 如 ELF-97-N-乙酰-β-D-氨基葡萄糖、ELF-97-磷酸酯被酶水解后生成具有强烈荧光、但不溶于水的 ELF-97 沉淀, 可用来检测细菌中的壳多糖酶^[21]和磷脂酶^[22]活性. Shim 等^[23]针对醛缩酶开发了产荧光的羟醛底物, 经过级联的 retro-aldol-retro-Michael 反应, 释放出带有活泼基团的荧光产物, 并能与胞内的亲核基团共价连接,

而将荧光信号保留在胞内. Kwan 等^[24]利用类似的原理设计了带有氟甲基的荧光底物, 经酶反应后产物也能与胞内的亲核物质共价连接.

除了酶定向进化外, 胞内荧光产物富集还可用于动植物细胞中酶活性的检测, 具有广泛的研究及应用价值. 如 Kaneski 等^[25]用丽丝胺若丹明三己糖酰基鞘氨醇作为底物进行人类细胞中 α -半乳糖苷酶活性检测, 用以诊断法布里病(酰基鞘氨醇己三糖苷酶缺乏症), Witte 等^[26]设计了用于胞内检测疾病相关的葡萄糖脑苷脂酶活性的荧光底物, 甲基伞形酮乙酸酯(MUA)可用于植物细胞中水解酶活力的 FACS 检测^[27]等.

4 荧光蛋白表达活性报告

荧光蛋白是进行 FACS 分析的理想工具, 通过人工设计的胞内遗传通路将荧光蛋白的表达、降解等过程与目标酶的活性进行偶联(图 1c), 是另一种 FACS 酶活性筛选的有效策略.

Cre 重组酶能够识别双链 DNA 上的特异性位点 loxP, 并在两个 loxP 位点之间催化重组交换. Santoro 等^[28]开发了一种可筛选 Cre 重组酶 loxP 序列识别特异性的 FACS 筛选方法, 有望扩展 Cre 重组酶在基因组改造中的应用. 在该体系中, 只有能够识别非天然 loxP 位点的突变体才会将 GFP 基因重组到启动子下游进行表达, 使细胞产生绿色荧光(图 4), 从而实现 Cre 重组酶活性与细胞荧光强度的偶联. 研究者还利用类似的方法, 结合定向进化改变了氨酰基 tRNA 合成酶的底物特异性^[29], 使其能够将琥珀终止密码子(UAG)编码为非天然氨基酸.

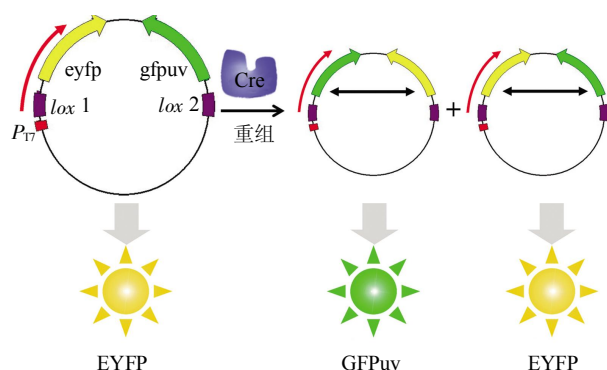


Fig. 4 The recombinase activity reporting system

图 4 重组酶活性报告系统

重组酶 Cre 催化两个 loxP 位点间基因可逆重组, 导致有 Cre 活性的细胞同时表达黄色及绿色两种荧光蛋白, 而无重组酶活性的细胞仅表达 EYFP 一种黄色荧光蛋白.

Kostallas 等^[30]利用大肠杆菌胞质中 ClpXP 复合体 -ssrA 信号肽介导的蛋白质降解途径, 开发了胞内蛋白酶的 FACS 筛选体系. 他们将 GFP 和 ssrA 基因通过特定肽段连接, 产生的融合蛋白在正常情况下将在胞内被 ClpXP 复合体降解, 但如果胞内含有能识别该肽段的蛋白酶, 则可改变 GFP 被水解的命运, 从而在胞内产生荧光信号, 用该方法可以筛选具有特定底物识别能力的蛋白酶, 也可用于蛋白酶抑制剂的筛选.

根据微生物中很多代谢酶的表达都受到外源底物分子诱导的原理, Uchiyama 等^[31]建立了底物诱导基因表达方法(substrate-induced gene expression, SIGEX)从宏基因组中筛选新酶基因. SIGEX 方法将宏基因组片段插入到 GFP 基因上游, 并用特定的底物分子进行诱导, 当插入片段含有相应的操纵子时则会导致荧光蛋白的表达, 通过 FACS 实验能有效地获得新酶及其他功能性蛋白基因^[32-33]. 通过对该方法进行改进, 研究者又建立了产物诱导基因表达(product-induced gene expression, PIGEX)体系, 该体系利用了苯甲酸对 BenR 启动子的诱导作用, 将 BenR 启动子直接与 GFP 基因连接, 当工程菌中的酰胺酶水解苯甲酰胺时, 便会通过产物诱导荧光蛋白的表达. 利用该方法作者成功地从宏基因组库中筛选获得了 11 株新型酰胺酶基因^[34].

除筛选新功能基因外, SIGEX/PIGEX 方法还可以用于对酶及代谢通路进行定向进化. Lindsay 等^[35]开发了针对 N-酰基高丝氨酸内酯酶的筛选体系, 根据底物 N-酰基高丝氨酸内酯诱导 LuxR 启动子表达的原理, 将酶活性与 GFP 的表达量偶联, 成功地对 N-酰基高丝氨酸内酯酶进行了定向进化^[36-37]. 与之类似, Schirmer 等^[38]利用 AlkR 转录因子受烷烃分子诱导的特性, 开发出利用荧光信号检测工程菌合成烷烃能力的方法, 有潜力用于多酶合成代谢途径的整体定向进化.

5 基于细胞理化性质的荧光探针活性报告

许多酶发挥活性会导致细胞生理与生化指标的变化, 荧光探针可通过这些指标的变化反映出细胞内的酶活性情况(图 1d). 此类方法不需要设计复杂的荧光底物, 且某些特定探针可以对多种酶活进行检测. 随着越来越多的荧光探针出现, 该类方法将逐渐成为重要的 FACS 酶活性检测技术.

pH 敏感的 GFP 突变体 pHluorin 可随着体系 pH 改变其发射光波长^[39], 为水解酶的活性检测带

来了新的思路. 由于水解酶反应通常会产生质子, 从而导致体系 pH 的降低, 因此, 通过共表达水解酶和 pHluorin 的细胞在 488 nm 和 405 nm 下的荧光信号比, 则可灵敏地评价细胞内的水解酶活性^[40]. 除此之外, 一些小分子染料也可用于水解酶的检测. 如 Wieder 等^[41]应用 carboxy-SNARF 系列 pH 敏感荧光染料进行胞内水解酶活性的检测; Johnson 等^[42]用 pH 敏感的羧基荧光素衍生物 BCECF-AM 来筛选肿瘤靶标 V-ATP 水解酶的抑制剂.

除了 pH 变化之外, 研究者还开发了针对其他细胞指标的荧光探针, 可监测细胞内活性氧、细胞膜流动性、镁离子浓度、钙离子浓度等生理特性变化^[43-45], 有潜力用于检测能引起各种细胞指标变化的酶活性. 如目前已有数种活性氧荧光探针可检测胞内氧化还原酶活性^[46]等. 但总体而言, 目前可供选择的种类仍较少, 而且酶活性与细胞生理状态之间的关系是否稳定仍是需要研究的课题.

6 体外区室化(*in vitro* compartmentalization, IVC)

自然界中的细胞通过质膜包裹其基因组及其 RNA 和蛋白质, 以此建立基因型和表现型的偶联. 受这种启发, 体外区室化(IVC)体系通过形成“油-水”(water in oil)或“水-油-水”(water in oil in water)的微液滴来模拟天然细胞的结构^[47-48], 将编码酶的基因和无细胞蛋白质表达体系^[49](或整个细胞), 以及酶底物、产物全部包裹在同一微液滴中, 从而建立基因型和表现型的偶联(图 1e, 1f). IVC 产生液滴的直径可小至 1 μm , 在 1 ml 的油相中即可轻易制备超过 10^{10} 个微液滴, 而且能够在较高温度下保持很长时间, 这使得 IVC 成为高通量筛选的理想手段.

6.1 IVC 体系生成技术

最早建立的 IVC 生成技术是 Tawfik 和 Griffiths^[50]于 1998 年开发的机械分散法, 利用匀浆仪或磁力搅拌器高速旋转产生的剪切力对液滴进行乳化, 从而生成各类微乳浊液滴. 该方法由于液滴生成效率高、操作简便而被大量采用^[51]. 但由于无法精确控制液滴生成的过程, 导致生成液滴的大小分散度很大, 严重降低了筛选的效率和准确性. 我们最近发现, 采用药剂学中常用的脂质体挤出仪进行微液滴的生成, 能更好地控制液滴的均一度, 并提供更好的单细胞包裹效率, 有望替代匀浆法进行液滴的生

成(相关成果未发表).

微流控芯片又称芯片实验室(lab-on-a-chip), 是把生物和化学等领域所涉及的样品制备、生物与化学反应分离与检测等基本操作单元集成到一块几平方厘米的芯片上, 以完成不同的生物或化学反应过程, 并对其产物进行分析的一种技术. 通过设计流动聚焦^[52]的孔道结构, 微流控芯片可以每秒生成几千个大小高度均一的液滴(分散度 < 3%). 微流控还可以通过特殊的孔道设计实现液滴分裂、融合、孵育、检测、分选^[53]、多重液滴的形成^[54-55]等灵活的操纵, 在酶活性高通量筛选领域具有极大的应用潜力.

6.2 由微珠介导的 IVC-FACS 筛选体系

由于连续相为油相的“油-水”微液滴无法直接进行 FACS 实验, 因此, 人们采用抗生蛋白链菌素包被的微珠将生物素标记的基因、抗体-酶复合体以及产物结合在表面, 并用荧光标记的产物抗体进行显色, 从而在液滴中实现基因型和表现型的偶联(图 1e). 微球介导的偶联比较牢固, 可以携带基因型和表现型在不同的反应条件下进行转换, 从而满足转录翻译及酶反应对不同条件的要求. 同时, 该方法完全是在体外进行的, 特别适合有细胞毒性或受细胞生理活动干扰的酶活力检测. Griffiths 和 Tawfik^[56]利用这种方法进行了磷酸三酯酶活性的定向进化, 在 3.4×10^7 个突变体中筛选获得了比野生型酶活力提高 63 倍的突变体. Stapleton 等^[57]将微流控芯片引入该系统, 以生成大小均一的液滴, 极大地提高了 IVC-FACS 筛选二价铁氢化酶活力的精确度, 并应用定向进化提高了该酶的氧耐受性.

6.3 二级液滴酶微反应器介导的 IVC-FACS 筛选体系

为了进一步提高 IVC-FACS 筛选体系的通用性, 2005 年, Griffiths 和 Tawfik 分别在原有“油-水”一级微液滴的基础上开发了“水-油-水”(water in oil in water)二级微液滴酶微反应器体系(图 1f). 由于二级液滴外层即是水相, 可直接进行 FACS 分选. 更重要的是, 由于不需要将酶、底物及产物进行复杂的修饰和偶联, 基于二级液滴的 IVC-FACS 筛选体系具有极强的通用性, 理论上可用于任何能产生荧光信号的酶反应.

Mastrobattista 等^[58]采用该体系对大肠杆菌 Ebg 蛋白的 β -半乳糖苷酶活性进行定向进化, 获得了活性提高 300 倍以上的突变体. Aharoni 等^[59]用类似方法将表达血清对氧磷酶 PON1 的大肠杆菌细胞

包裹在液滴中,通过对 10^7 个PON1突变体进行FACS筛选,得到了对非天然底物同型半胱氨酸硫代内酯(HcyT)活性提高100倍以上的突变体。Gupta等^[60]对PON1进行了定向进化,使该酶对神经毒剂环沙林S型异构体的水解活性提高了 10^5 倍,催化效率达到 $10^7 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{min}^{-1}$ 以上。该体系还被成功地用于蛋白酶^[61]、葡萄糖氧化酶^[62]等重要酶类的FACS筛选体系中。

6.4 其他IVC-FACS筛选体系

随着微流控芯片技术的快速发展,其强大的液滴操作功能逐渐被应用到酶活性筛选中。Agresti等^[63]开发了第一套完全基于微流控芯片的酶活性筛选系统,该系统在微流控芯片上整合了液滴生成、反应、分析、分选等FACS筛选所需的全部功能,不需要流式细胞仪等其他设备即可独立完成酶活性筛选,极大地降低了筛选的仪器成本。研究者使用该系统对辣根过氧化物酶进行了定向进化,通过筛选 10^7 个突变体,将其催化活性提高了12倍。Eun等^[64]提出了用琼脂糖微球方法实现IVC-FACS筛选的新思路,用微流控生成的大小均一的琼脂糖微球可以包裹反应体系,并可以直接进行FACS实验。由于操作简单、稳定性和生物相容性好而具有很大的应用潜力。

7 总结与展望

随着生物技术的快速发展,日益发展的酶工程领域对酶活性高通量筛选方法提出了更高的要求。FACS技术不仅可以对大容量样本进行超高通量的分析和筛选,而且能对样品的多项指标同时进行定量分析,因此,与传统筛选方法相比具有显著的优势,尤其在宏基因组新功能基因挖掘和酶定向进化领域有着重要应用潜力。目前FACS方法的发展主要受到仪器成本高、应用范围有限等制约。最近发展迅速的微流控芯片技术受到许多学者的关注。虽然其筛选速度比FACS筛选低约一个数量级,且具有体系组装复杂、稳定性较差等缺点,但由于其功能灵活多样、价格低廉,有潜力成为新一代酶活性筛选平台^[65]。近来合成生物学的发展,为建立标准化的生物传感器与荧光蛋白偶联体系奠定了基础,也为实现灵活、可控、通用性强的基因型和表现型偶联模式指出了方向^[65]。相信这两方面的逐渐完善,将促进FACS筛选方法的早日成熟,为酶工程领域的持续发展提供强大的推动力。

参 考 文 献

- [1] Gitig D. Marine metagenomic. *Biotechniques*, 2010, **48**(5): 361–365
- [2] Ferrer M, Martínez-Abarca F, Golyshtin P N. Mining genomes and 'metagenomes' for novel catalysts. *Curr Opin Biotechnol*, 2005, **16**(6): 588–593
- [3] Jiang L, Althoff E A, Clemente F R, *et al.* De novo computational design of retro-aldol enzymes. *Science*, 2008, **319**(5868): 1387–1391
- [4] Röthlisberger D, Khersonsky O, Wollacott A M, *et al.* Kemp elimination catalysts by computational enzyme design. *Nature*, 2008, **453**(7192): 190–195
- [5] Link A J, Jeong K J, Georgiou G. Beyond toothpicks: new methods for isolating mutant bacteria. *Nat Rev Microbiol*, 2007, **5**(9): 680–688
- [6] Steen H B, Lindmo T. Flow cytometry: A high-resolution instrument for everyone. *Science*, 1979, **204**(4391): 403–404
- [7] Yang G, Withers S G. Ultrahigh-throughput FACS-based screening for directed enzyme evolution. *Chembiochem*, 2009, **10**(17): 2704–2715
- [8] Olsen M J, Stephens D, Griffiths D, *et al.* Function-based isolation of novel enzymes from a large library. *Nat Biotechnol*, 2000, **18**(10): 1071–1074
- [9] Varadarajan N, Gam J, Olsen M J, *et al.* Engineering of protease variants exhibiting high catalytic activity and exquisite substrate selectivity. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, **102**(19): 6855–6860
- [10] Varadarajan N, Rodriguez S, Hwang B Y, *et al.* Highly active and selective endopeptidases with programmed substrate specificities. *Nat Chem Biol*, 2008, **4**(5): 290–294
- [11] Varadarajan N, Georgiou G, Iverson B L. An engineered protease that cleaves specifically after sulfated tyrosine. *Angew Chem Int Ed*, 2008, **47**(41): 7861–7863
- [12] Lipovsek D, Antipov E, Armstrong K A, *et al.* Selection of horseradish peroxidase variants with enhanced enantioselectivity by yeast surface display. *Chem Biol*, 2007, **14**(10): 1176–1185
- [13] Becker S, Höbenreich H, Vogel A, *et al.* Single-cell high-throughput screening to identify enantioselective hydrolytic enzymes. *Angew Chem Int Ed*, 2008, **47**(21): 5085–5088
- [14] Aharoni A, Thieme K, Chiu C P, *et al.* High-throughput screening methodology for the directed evolution of glycosyltransferases. *Nat Methods*, 2006, **3**(8): 609–614
- [15] Yang G, Rich J R, Gilbert M, *et al.* Fluorescence activated cell sorting as a general ultra-high-throughput screening method for directed evolution of glycosyltransferases. *J Am Chem Soc*, 2010, **132**(30): 10570–10577
- [16] Eklund B I, Edalat M, Stenberg G, *et al.* Screening for recombinant glutathione transferases active with monochlorobimane. *Anal Biochem*, 2002, **309**(1): 102–108
- [17] Kawarasaki Y, Griswold K E, Stevenson J D, *et al.* Enhanced crossover SCRATCHY: construction and high-throughput screening of a combinatorial library containing multiple non-homologous crossovers. *Nucl Acid Res*, 2003, **31**(21): 126e

- [18] Griswold K E, Kawarasaki Y, Ghoneim N, *et al.* Evolution of highly active enzymes by homology-independent recombination. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, **102**(29): 10082–10087
- [19] Griswold K E, Aiyappan N S, Iverson B L, *et al.* The evolution of catalytic efficiency and substrate promiscuity in human theta class 1-1 glutathione transferase. *J Mol Biol*, 2006, **364**(3): 400–410
- [20] Liu L, Li Y, Liotta D, *et al.* Directed evolution of an orthogonal nucleoside analog kinase *via* fluorescence-activated cell sorting. *Nucl Acid Res*, 2009, **37**(13): 4472–4481
- [21] Baty III A M, Eastburn C C, Diwu Z, *et al.* Differentiation of chitinase-active and non-chitinase-active subpopulations of a marine bacterium during chitin degradation. *Appl Environ Microbiol*, 2000, **66**(8): 3566–3573
- [22] Duhamel S, Gregori G, Van Wambeke F, *et al.* A method for analysing phosphatase activity in aquatic bacteria at the single cell level using flow cytometry. *J Microbiol Methods*, 2008, **75** (2): 269–278
- [23] Shim H, Karlström A, Touami S M, *et al.* Flow cytometric screening of aldolase catalytic antibodies. *Med Chem Lett*, 2004, **14**(15): 4065–4068
- [24] Kwan D H, Chen H M, Ratananikom K, *et al.* Self-immobilizing fluorogenic imaging agents of enzyme activity. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2011, **50**(1): 300–303
- [25] Kaneski C R, Schifmann R, Brady R O, *et al.* Use of lissamine rhodamine ceramide trihexoside as a functional assay for alphagalactosidase A in intact cells. *J Lipid Res*, 2010, **51** (9): 2808–2817
- [26] Witte M D, Kallemeijn W W, Aten J, *et al.* Ultrasensitive in situ visualization of active glucocerebrosidase molecules. *Nat Chem Biol*, 2010, **6**(12): 907–913
- [27] Cummins I, Steel P G, Edwards R. Identification of a carboxylesterase expressed in protoplasts using fluorescence-activated cell sorting. *Plant Biotechnol J*, 2007, **5**(2): 354–359
- [28] Santoro S W, Schultz P G. Directed evolution of the site specificity of Cre recombinase. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, **99** (7): 4185–4190
- [29] Santoro S W, Wang L, Herberich B, *et al.* An efficient system for the evolution of aminoacyl-tRNA synthetase specificity. *Nat Biotechnol*, 2002, **20**(10): 1044–1048
- [30] Kostallas G, Samuelson P. Novel fluorescence-assisted whole-cell assay for engineering and characterization of proteases and their substrates. *Appl Environ Microbiol*, 2010, **76**(22): 7500–7508
- [31] Uchiyama T, Watanabe K. The SIGEX scheme: High throughput screening of environmental metagenomes for the isolation of novel catabolic genes. *Biotechnol Genet Eng Rev*, 2007, **24**: 107–116
- [32] Uchiyama T, Abe T, Ikemura T, *et al.* Substrate-induced gene-expression screening of environmental metagenome libraries for isolation of catabolic genes. *Nat Biotechnol*, 2005, **23**(1): 88–93
- [33] Uchiyama T, Watanabe K. Substrate-induced gene expression (SIGEX) screening of metagenome libraries. *Nat Protoc*, 2008, **3**(7): 1202–1212
- [34] Uchiyama T, Miyazaki K. Product-induced gene expression, a product-responsive reporter assay used to screen metagenomic libraries for enzyme-encoding genes. *Appl Environ Microbiol*, 2010, **76**(21): 7029–7035
- [35] Lindsay A, Ahmer B M. Effect of sdiA on biosensors of N-acylhomoserine lactones. *J Bacteriol*, 2005, **187**(14): 5054–5058
- [36] Chow J Y, Wu L, Yew W S. Directed evolution of a quorum-quenching lactonase from *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis K-10 in the amidohydrolase superfamily. *Biochemistry*, 2009, **48**(20): 4344–4353
- [37] Chow J Y, Xue B, Lee K H, *et al.* Directed evolution of a thermostable quorum-quenching lactonase from the amidohydrolase superfamily. *J Biol Chem*, 2010, **285** (52): 40911–40920
- [38] Schirmer A, Hu Z, Da Costa B. Methods and compositions for identification of hydrocarbon response, transport and biosynthesis genes: USA, 20080293060. 2008-11-27
- [39] Olsen K N, Budde B B, Siegmundfeldt H, *et al.* Noninvasive measurement of bacterial intracellular pH on a single-cell level with green fluorescent protein and fluorescence ratio imaging microscopy. *Appl Environ Microbiol*, 2002, **68**(8): 4145–4147
- [40] Schuster S, Enzelberger M, Trauthwein H, *et al.* pHluorin-based *in vivo* assay for hydrolase screening. *Anal Chem*, 2005, **77** (9): 2727–2732
- [41] Wieder E D, Hang H, Fox M H. Measurement of intracellular pH using flow cytometry with carboxy-SNARF-1. *Cytometry*, 1993, **14**(8): 916–921
- [42] Johnson R M, Allen C, Melman S D, *et al.* Identification of inhibitors of vacuolar proton-translocating ATPase pumps in yeast by high-throughput screening flow cytometry. *Anal Biochem*, 2010, **398**(2): 203–211
- [43] Laroche C, Beney L, Marechal P A, *et al.* The effect of osmotic pressure on the membrane fluidity of *Saccharomyces cerevisiae* at different physiological temperatures. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2001, **56**(1–2): 249–254
- [44] Kolisek M, Zsurka G, Samaj J, *et al.* Mrs2p is an essential component of the major electrophoretic Mg²⁺ influx system in mitochondria. *EMBO J*, 2003, **22**(6): 1235–1244
- [45] Gangola P, Rosen B. Maintenance of intracellular calcium in *Escherichia coli*. *J Biol Chem*, 1987, **262**(26): 12570–12574
- [46] Halliwell B, Whiteman M. Measuring reactive species and oxidative damage *in vivo* and in cell culture: How should you do it and what do the results mean?. *Br J Pharmacol*, 2009, **142** (2): 231–255
- [47] Taly V, Kelly B T, Griffiths A D. Droplets as microreactors for high-throughput biology. *Chem Bio Chem*, 2007, **8**(3): 263–272
- [48] Griffiths A D, Tawfik D S. Miniaturising the laboratory in emulsion droplets. *Trends Biotechnol*, 2006, **24**(9): 395–402
- [49] 章杰, 刘琼明, 许丹科, 等. 无细胞系统原位制备蛋白质芯片及其应用. *生物化学与生物物理进展*, 2009, **36**(4): 391–397
Zhang J, Liu Q M, Xu D K, *et al.* *Prog Biochem Biophys*, 2009, **36**(4): 391–397
- [50] Tawfik D S, Griffiths A D. Man-made cell-like compartments for molecular evolution. *Nat Biotechnol*, 1998, **16**(7): 652–626
- [51] 杨根生, 戚映丹, 欧志敏, 等. 油包水微乳液中抗体酶催化布洛芬酯选择性水解的酶学特性. *生物化学与生物物理进展*, 2009,

- 36(2): 182–189
 Yang G S, Qi Y D, Ou Z M, *et al.* Prog Biochem Biophys, 2009, 36(2): 182–189
- [52] Anna S L, Bontoux N, Stone H A. Formation of dispersions using "flow focusing" in microchannels. Appl Phys Lett, 2003, 82 (3): 364–366
- [53] 林秉承, 秦建华. 图解微流控实验室. 北京: 科学出版社, 2008: 247–273
 Lin B C, Qin J H. Illustrated Laboratory on a Microfluidic Chip Beijing: Science Press, 2008: 247–273
- [54] Saeki D, Sugiura S, Kanamori T, *et al.* Microfluidic preparation of water-in-oil-in-water emulsions with an ultra-thin oil phase layer. Lab Chip, 2010, 10(3): 357–362
- [55] Abate A R, Thiele J, Weitz D A. One-step formation of multiple emulsions in microfluidics. Lab Chip, 2011, 11(2): 253–258
- [56] Griffiths A D, Tawfik D S. Directed evolution of an extremely fast phosphotriesterase by *in vitro* compartmentalization. EMBO J, 2003, 22(1): 24–35
- [57] Stapleton J A, Swartz J R. Development of an *in vitro* compartmentalization screen for high-throughput directed evolution of [FeFe] hydrogenases. PLoS One, 2010, 5(12): e15275
- [58] Mastrobattista E, Taly V, Chanudet E, *et al.* High-throughput screening of enzyme libraries: *in vitro* evolution of a beta-galactosidase by fluorescence-activated sorting of double emulsions. Chem Biol, 2005, 12(12): 1291–1300
- [59] Aharoni A, Amitai G, Bernath K, *et al.* High-throughput screening of enzyme libraries: Thiolactonases evolved by fluorescence-activated sorting of single cells in emulsion compartments. Chem Biol, 2005, 12(12): 1281–1289
- [60] Gupta R D, Goldsmith M, Ashani Y, *et al.* Directed evolution of hydrolases for prevention of G-type nerve agent intoxication. Nat Chem Biol, 2011, 7(2): 120–125
- [61] Tu R, Martinez R, Prodanovic R, *et al.* A flow cytometry-based screening system for directed evolution of proteases. J Biomol Screen, 2011, 16(3): 285–294
- [62] Prodanovic R, Ostafe R, Scacioc A, *et al.* Ultrahigh-throughput screening system for directed glucose oxidase evolution in yeast cells. Comb Chem High Throughput Screen, 2011, 14(1): 55–60
- [63] Agresti J J, Antipov E, Abate A R, *et al.* Ultrahigh-throughput screening in drop-based microfluidics for directed evolution. Proc Natl Acad Sci USA, 2010, 107(9): 4004–4009
- [64] Eun Y J, Utada A S, Copeland M F, *et al.* Encapsulating bacteria in agarose microparticles using microfluidics for high-throughput cell analysis and isolation. ACS Chem Biol, 2011, 6(3): 260–266
- [65] Dietrich J A, McKee A E, Keasling J D. High-throughput metabolic engineering: advances in small-molecule screening and selection. Annu Rev Biochem, 2010, 79: 563–590

Ultrahigh-throughput Enzymatic Screening Method Based on Fluorescence-activated Cell Sorting and Its Applications*

MA Fu-Qiang^{1,2}, FENG Yan^{1,2}, YANG Guang-Yu¹**

⁽¹⁾ School of Life Sciences & Biotechnology, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200240, China;

⁽²⁾ College of Life Sciences, Jilin University, Changchun 130012, China)

Abstract Due to its super sensitivity and incomparable high throughput, fluorescence-activated cell sorting (FACS) based screening method is emerging as an important ultrahigh-throughput enzymatic screening technology recently. It could detect multiple fluorescent parameters simultaneously and screen enzyme libraries at an extremely high speed ($> 10^8/d$), thus possesses many advantages over the conventional technologies. FACS based screening method greatly improves our ability in handling large protein libraries and has tremendous potential in various fields such as metagenomics and directed evolution. Herein, recent progress of FACS based enzymatic screening method has been reviewed, with an emphasis on its applications in enzyme directed evolution.

Key words fluorescence-activated cell sorting, ultrahigh-throughput screening, enzyme, directed evolution

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2011.00281

* This work was supported by grants from National Basic Research Program of China (2011CBA00800) and The National Natural Science Foundation of China (30970632, 31070056, 30821005).

**Corresponding author.

Tel: 86-21-34207248, E-mail: yanggy@sjtu.edu.cn

Received: June 20, 2011 Accepted: September 29, 2011