

大肠杆菌碱性磷酸酶的体外定向进化研究

徐卉芳^{1,2)} 张先恩²⁾* 张治平²⁾ 张用梅²⁾

(¹⁾中国科学院微生物研究所, 北京 100080; ²⁾中国科学院武汉病毒研究所, 武汉 430071)

A. E. G. CASS

(Biochemistry Department, Imperial College of Science, Technology and Medicine, South Kensington, London SW7 2A Y, UK)

摘要 大肠杆菌碱性磷酸酶 (*E. coli* alkaline phosphatase, EAP, EC 3.1.3.1) 是一个非特异性二聚体磷酸单酯酶。采用易错聚合酶链反应 (error prone PCR) 的方法, 在原有高活力突变株的基础上, 对 EAP 远离活性中心催化三联体的区域进行定向进化, 经两轮 error prone PCR, 获得催化活力较亲本 D101S 突变株提高 3 倍、较野生型酶提高 35 倍的进化酶 4-186, 并对该酶的催化动力学特征进行了分析。进化酶基因的 DNA 测序表明 4-186 含两个有义氨基酸置换: K167R 和 S374C, 二者既不位于底物结合位点, 也不位于酶的金属离子结合位点。

关键词 定向进化, 易错聚合酶链反应, 大肠杆菌碱性磷酸酶, 催化活力

学科分类号 Q58, Q81

近年来, 以连续易错聚合酶链反应 (error prone PCR) 和 DNA 改组 (DNA shuffling) 为基础的体外分子定向进化策略, 为蛋白质工程的发展提供了一个颇具前景的新方法^[1-3]。该法无需事先了解蛋白质的三维结构信息, 而是在实验室模拟自然进化的过程 (突变、重组和筛选), 配合适当的选择压, 使基因发生适应性突变, 在短时间内完成目的特性或功能的进化。迄今为止, 研究者们已用该法进化了各种各样的酶特征, 找到并发现了许多合理设计 (rational design) 所不能预测到的突变^[2-5]。

大肠杆菌碱性磷酸酶 (EAP) 是一个非特异性磷酸单酯酶, 催化磷酸单酯水解生成无机磷酸和相应的醇、酚或糖类化合物。当有磷酸受体 (如: Tris 或二乙醇胺) 存在时, 它还可以催化磷酸基团的转移反应^[6,7]。EAP 是一个同源二聚体金属酶, 每个单体由 449 个氨基酸、两个 Zn²⁺ 和一个 Mg²⁺ 组成。分别位于两个单体上的两个活性中心相距 3 nm, 可以看作是由 Asp101-Ser102-Ala103 催化三联体、3 个金属离子和它们的配体、一些水分子以及 Arg166 组成^[6]。作为所有碱性磷酸酶的模式, EAP 是研究最透彻的碱性磷酸酶, 大量点突变阐明了许多氨基酸的结构功能^[7]。与哺乳动物碱性磷酸酶相比, EAP 具有很高的热稳定性, 但相对活力较低。以往定点突变研究表明: D101S 是活性最高的突变株之一^[8-10], 我们以前的研究结果也证明, 在最适反应条件下该突变株的活力是野生型的

9~10 倍^[10]。

经对不同来源、不同催化活力的 AP 氨基酸序列比较表明^[6]: 它们的活性中心序列是高度保守的, 特别是 Asp101-Ser102-Ala103 催化三联体。因此, 探讨非活性三联体区域的氨基酸突变是否会提高 EAP 催化活力是令人感兴趣的。在本研究中, 我们以 D101S 为亲本, 试图采用体外分子定向进化的策略来提高其催化活力。通过两轮 error prone PCR 随机突变, 结合双重筛选方法, 成功地获得了活力提高的变异株。对它们催化动力学的分析, 为进一步了解 EAP 的反应机理提供了新的线索。

1 材料与方法

1.1 菌株、质粒及主要试剂

大肠杆菌 SM547 (Δ (*phoA-proC*), *phoR*, *tsx*: : Tn5, Δ *lac*, *galK*, *leu*, Str^r) 和质粒 pEK48 (含野生型 EAP 基因 *phoA*) 系 Kantrowitz 教授惠赠, 质粒 pEK48/D101S (含 D101S 突变酶基因) 系本实验室构建^[10]。限制性内切酶、Taq DNA 聚合酶和 T4 DNA 连接酶购自 Takara 公司; 生色底物 5-溴-4-氯-3-吡啶磷酸盐 (BCIP)、对硝基酚磷酸二钠盐 (pNPP) 和荧光底物 4-甲基伞形酮磷酸 (4-methylumbelliferyl phosphate, 4-MUP) 购自 Sigma 公司。Q-SepharoseTM Fast Flow 阴离子交换柱购自

* 通讯联系人。

Tel: 027-87641492, E-mail: x.zhang@pentium.whiof.ac.cn

收稿日期: 2002-06-07, 接受日期: 2002-06-28

Pharmacia 公司. PCR 引物由上海生工公司合成. DNA 测序由上海博亚生物工程公司完成.

1.2 方法

1.2.1 Error prone PCR 扩增 *phoA* 基因片段: 选取质粒 pEK48/D101S 的 *phoA* 基因中 700 ~ 1 830 bp 片段, 进行 error prone PCR 介导的定向进化实验, 该 1.13 kb 片段编码 EAP 第 119 位氨基酸至 C 端的序列, 远离活性中心 Asp101-Ser102-Ala103 的编码区. 在限制性酶切位点 *Bss*H II 和 *Bst*E II 两端设计引物, 上游引物: 5'-AACCTA-TAACGCGCGCTGG-3', 下游引物: 5'-CAGGAGGTCATACGCTGTTG-3'. Error prone PCR 反应体系: 50 μ l 体系中含 1 \times Taq DNA 聚合酶缓冲液、0.2 mmol/L dATP 和 dGTP、1 mmol/L dCTP 和 dTTP、3~7 mmol/L Mg^{2+} 、0.05~0.15 mmol/L Mn^{2+} 、上下游引物各 0.75 μ l、质粒 DNA 模板 0.2 μ l、Taq DNA 聚合酶 0.3 μ l. 其中 Mg^{2+} 和 Mn^{2+} 的浓度被调整, 可以得到不同突变频率的文库, 选取底物平板上活性突变子占文库 70% 左右的突变频率. Error prone PCR 循环条件: 94 $^{\circ}$ C 1 min, 56 $^{\circ}$ C 1 min, 72 $^{\circ}$ C 1.5 min, 25 个循环; 72 $^{\circ}$ C 7 min.

1.2.2 突变文库的构建和筛选: 上述 error prone PCR 产物纯化后, 经 *Bss*H II-*Bst*E II 双酶切, 与同样双酶切的质粒载体 pEK48/D101S 相连接, 转化大肠杆菌 SM547 细胞. 文库成员在 LB+ Amp+ BCIP 平板上生长 16~18 h 后, 能够表达活性 EAP 的突变子将呈现蓝色. 选择蓝色克隆, 接种到每孔含 200 μ l LB+ Amp 液体培养基的 96 孔板中, 每孔对应于每一特定转化子. 37 $^{\circ}$ C, 摇床培养约 20 h 后, 每孔各取 15 μ l 等份, 加入另一含 100 μ l 1.0 mol/L (pH 10.0) Tris-HCl 缓冲液的新鲜 96 孔板的对应孔中, 在自动微量酶标分析仪 (TECAN Sunrise, Austria) 上测 595 nm 处吸光度, 作为细胞密度值. 然后每孔加入 100 μ l 5~10 mmol/L 的底物 pNPP 溶液, 检测 405 nm 处产物 pNP 的吸光度值, 反应一般进行 3~5 min, 反应过程中记录 5 个数据点, 每隔 40 s 记录一次. 对每个突变子, 比较它们的 A_{405}/A_{595} 比率, 找出那些具有最高活力/细胞密度比值的克隆子, 对这些克隆子再进行至少 3 次类似的筛选实验, 最后得出的潜在阳性克隆最终在蛋白质水平上进行比较验证.

1.2.3 EAP 的提取和纯化: 酶的提取纯化参照文献 [11]. 蛋白质浓度测定用 Bio-Rad 方法 [12], 以

牛血清白蛋白做标准曲线.

1.2.4 酶活力及酶催化 pNPP 水解的动力学参数: EAP 催化活力的测定参照文献 [13]. 以 pNPP 做底物, 检测产物 pNP 在 405 nm 处的吸光度. 在 0.05 mol/L Tris-HCl 缓冲液中测定 EAP 的水解酶活力, 在 1.0 mol/L Tris-HCl 缓冲液中测水解和转移酶活力的总和. 酶活力单位 (1 U) 定义为 25 $^{\circ}$ C 下, 每分钟催化产生 1 μ mol pNP 所需的酶量.

1.2.5 酶对荧光底物的活性: EAP 对荧光底物 4-MUP 的催化反应在自动微量荧光分析仪 SpectraFluor (TECAN, Austria) 上检测. 反应体系: 1.0 mol/L pH 10.05 的 Tris-HCl 缓冲液 100 μ l 含 1 mmol/L 底物, 加入 2~4 μ l 待测酶液后, 震动混匀, 于激发波长 360 nm, 发射波长 465 nm 条件下检测产物 4-MU 的荧光发射强度. 催化活力以每微克酶蛋白每秒钟水解产生的 4-MU 相对荧光单位数 (RFU) 表示.

1.2.6 野生型和突变型 EAP 的热稳定性: 参照文献 [14] 方法.

1.2.7 溶液 pH 对酶活力的影响: 25 $^{\circ}$ C 条件下, 分别在不同 pH 的 1.0 mol/L Tris-HCl (含 2 mmol/L $MgCl_2$) 缓冲液和不同 pH 的 0.05 mol/L Tris-HCl (含 2 mmol/L $MgCl_2$) 缓冲液中测定酶催化 pNPP 水解的活力.

1.2.8 金属离子对酶活力的影响: 待测酶液对 pH 7.4, 0.01 mol/L Tris-HCl 缓冲液透析, 除去酶溶液中游离金属离子. 然后, 在测活体系中加入不同浓度的金属离子溶液, 分析它们对酶活力的效应.

2 结果与分析

2.1 Error prone PCR 条件的确定

调整 error prone PCR 反应体系中 Mg^{2+} 和 Mn^{2+} 的浓度, 可以得到不同突变频率的片段多样性文库, 我们选择 Mg^{2+} 浓度为 3~7 mmol/L、 Mn^{2+} 浓度为 0.05~0.15 mmol/L 进行实验, 检测转化平板上能表达活性 EAP 的克隆子 (蓝色克隆) 所占比例, 选取该比率在 70% 左右的 error prone PCR 条件作为接下来进化实验的建库条件, 因为这个活性克隆比例大致相当于每个基因 2~3 个碱基替换 (相应于 1~2 个氨基酸置换) 的突变频率 [15]. 本研究所得适宜随机突变条件为: Mg^{2+} 浓度为 7 mmol/L, Mn^{2+} 浓度为 0.05 mmol/L. Error prone PCR 的电泳结果如图 1 所示.

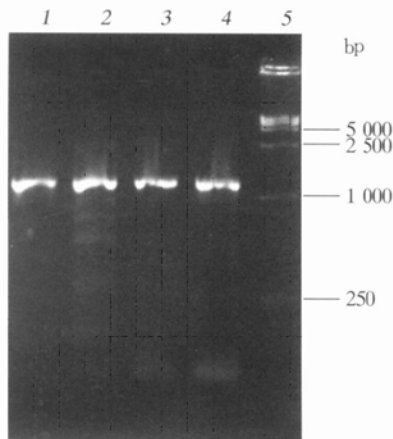


Fig. 1 Error prone PCR to amplify the 1.13 kb *phoA* fragment of plasmid pEK48/D101S

1: standard PCR control; 2: error prone PCR with 7 mmol/L Mg^{2+} and 0.1 mmol/L Mn^{2+} ; 3: error prone PCR with 7 mmol/L Mg^{2+} and 0.05 mmol/L Mn^{2+} ; 4: error prone PCR with 5 mmol/L Mg^{2+} and 0.15 mmol/L Mn^{2+} ; 5: DL 5 000 marker.

2.2 Error prone PCR 突变文库的构建及筛选

在优化的 error prone PCR 条件下, 以 D101S 为亲本产生第一代随机突变文库. 对其中约 3 000 个预选择的活性转化子进行活力/细胞密度筛选实验. 其中 8 个被作为潜在的高活力突变株选出, 重复筛选验证后, 得到活力最高的 2-834 突变子, 其 A_{405}/A_{595} 的平均约是亲本 D101S 的 2 倍. 这个细胞被用来作为下一轮 error prone PCR 进化的亲本.

在第二代随机突变文库中, 约 4 500 个预选择的活性转化子被筛选, 其中有 78 个高 A_{405}/A_{595} 比率的克隆子被获得, 对这些克隆子进行重复筛选, 获得了 4 个稳定的高活性克隆子, 其中, 4-186 活力最高, A_{405}/A_{595} 的平均是亲本 D101S 的 4.5 倍.

2.3 高活力进化酶基因的测序

为了确定进化酶基因中的突变情况, 我们对筛选到的两个高活力酶变异株进行了 DNA 测序. 结果表明: 2-834 中新增突变为 t1468a, 对应于氨基酸置换 S374C; 4-186 中新增突变为: t1468a, a848g 和 g1170t, 所对应的氨基酸置换为 S374C 和 K167R (g1170t 为无义突变). 可见, 两个进化酶中的氨基酸置换都是由单碱基替代造成的.

2.4 野生型和突变型 EAP 的提取和纯化

EAP 纯化采用 Q-Sepharose Fast Flow 阴离子交换层析. 经调整洗脱盐梯度为野生型酶 0~0.1 mol/L NaCl、突变酶为 0~0.15 mol/L NaCl 和

洗脱液流速为 1.2 ml/min, 各酶均得到理想的纯化效果 (图 2).

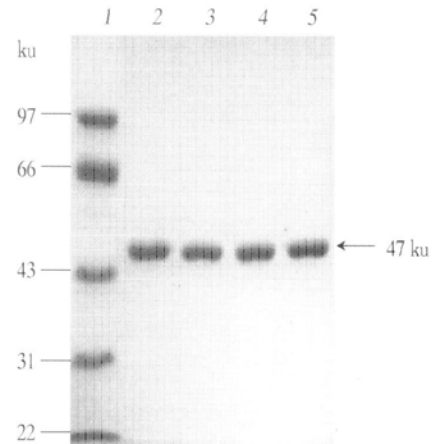


Fig. 2 SDS PAGE analysis of the purified enzymes

1: low molecular mass protein marker; 2: wild-type enzyme; 3: D101S enzyme; 4: 2-834 enzyme; 5: 4-186 enzyme.

2.5 酶催化 pNPP 水解的动力学特征

表 1 总结了野生型 EAP 和突变酶的催化动力学参数. 在以 pNPP 为底物且有磷酸受体存在的条件下 (1.0 mol/L Tris-HCl), 4-186 进化酶的比活是 1 302.1 U/mg, 比亲本 D101S 提高了 3 倍, 比野生型 EAP 提高了约 35 倍. 从表 1 还可以看出: 与亲本 D101S 相比, 进化酶变异株均有一个低的 K_m 值, 表明它们具有较高的底物亲和力. 这个结果是可以预料的, 因为突变文库的筛选被设计在较低的底物浓度 (5~10 mmol/L) 条件下进行, 因此赋予 EAP 一个通过提高底物亲和力来提高其催化活性的机会. 事实上, 在 D101S 突变酶中, 尽管它的 k_{cat} 值提高了 11 倍, 但由于其 K_m 值显著升高, 该酶的催化效率 (或 k_{cat}/K_m 比率) 与野生型相比实际上降低了 3.3 倍. 而进化酶 4-186 的催化效率则比亲本 D101S 提高了 4.2 倍, 也是野生型酶的 1.3 倍.

2.6 进化酶对荧光底物的活性

为了检查 EAP 变异株对其他磷酸单酯底物的活性, 我们选择了较为常用的荧光底物 4-MUP 作为检测对象. 结果表明, 所有 EAP 变异株对该底物都有较强的催化活性 (表 1). 进化酶对 4-MUP 的活力也显著高于野生型和 D101S 亲本酶. 其中 4-186 的活力分别是野生型和 D101S 的 41.6 和 2.4 倍.

Table 1 Kinetic parameters of the wild-type and mutant enzymes

Enzyme	Specific activity		$K_m/\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	k_{cat}/s^{-1}	k_{cat}/K_m $/\text{s}^{-1}\cdot\mu\text{mol}^{-1}\cdot\text{L}$
	pNPP/ $\text{U}\cdot\text{mg}^{-1}$	4-MUP/ $\text{RFU}\times 10^3\cdot\mu\text{g}^{-1}$			
wild-type	37.5±2.1	4.9	66.5±8.6	29.4±1.6	0.442
D101S	415.8±76.9	86.2	2383.9±102.6	325.4±60.2	0.136
2-834	539.4±46.3	144.2	2103.4±51.3	422.1±36.2	0.201
4-186	1302.1±36.3	203.8	1769.7±210.6	1018.8±28.4	0.576

All reactions are performed in pH 10.05, 1.0 mol/L Tris-HCl buffer at 25 °C. RFU: relative fluorescence unit.

2.7 野生型和突变酶的热稳定性

各待测酶液稀释至 10 mg/L, 分别于 25 °C、70 °C、75 °C、80 °C、85 °C、90 °C、95 °C、98 °C 下温育 25 min, 然后取样置于冰上 25 min, 取一定量酶测酶活性 (图 3)。从图 3 中可以得出野生型酶的 T_{50} 值为 95 °C, 突变酶 D101S、2-834 和 4-186 的 T_{50} 值分别为 82 °C、78 °C 和 78 °C。与亲本 D101S 相比, 进化酶变异株 2-834 和 4-186 的热稳定性稍有降低, 但它们仍然具有比普通嗜中温微生物所要求的热稳定性高得多。另外, 2-834 与 4-186 的 T_{50} 值差异不明显, 鉴于 2-834 中唯一多出的氨基酸置换是 S374C, 所以推测此氨基酸置换是导致进化酶热稳定性有所下降的主要原因。

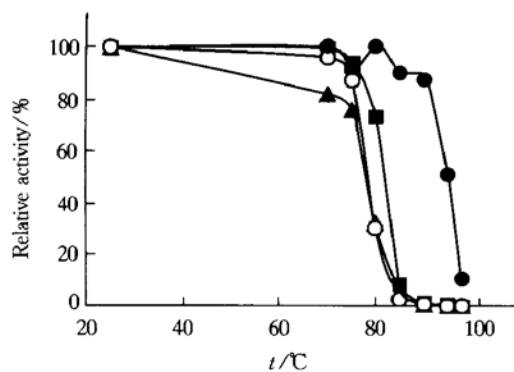


Fig. 3 Thermostabilities of wild-type EAP and mutant enzymes

●—●: wild-type; ■—■: D101S; ▲—▲: 2-834; ○—○: 4-186.

2.8 pH 对酶活力的影响

为了检测溶液 pH 对酶活力的影响, 我们分别测定了不同 pH 条件下, 酶在 0.05 mol/L Tris-HCl 缓冲液和 1.0 mol/L Tris-HCl 缓冲液中的活力变化情况。结果见图 4。从图 4a 中可以看出: 所有突变酶均在 pH 10.0 附近表现最大水解酶活力, 而野生型酶在 pH 8.5 附近有最大活力。进化酶中, 4-186

的 pH-活力曲线形状与 D101S 的相似, 即在所有测试 pH 范围内, 其水解酶活力都明显高于亲本 D101S 的对应值; 而 2-834 进化酶的 pH-活力曲线在 pH 7.0~8.5 范围内时上升缓慢, 当 pH > 8.5 后, 活力线呈陡峭上升。图 4b 代表了各 EAP 水解酶和转移酶活力的总和随 pH 变化的趋势。由图 4b 可知, 野生型酶最大活力表现仍在 pH 8.5 附近。而 4-186 酶在 pH < 8.5 时, 活力提高的幅度较小, pH > 8.5 后, 活力提高幅度明显上升, pH 10 左右达最大值。在所有两种情况下, 第一代变异株 2-834 在 pH < 9.0 时, 活力都与 D101S 相差无几, 随着 pH 的升高其活力提高的程度才明显表现出来。分析以上结果, 与我们设定的筛选条件是在

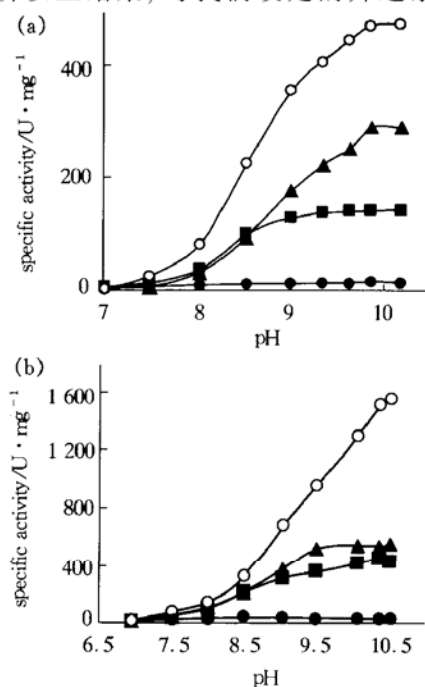


Fig. 4 The effect of pH on the activity of wild-type EAP and mutant enzymes

(a) the activity in 0.05 mol/L Tris-HCl buffer; (b) the activity in 1.0 mol/L Tris-HCl buffer. ●—●: wild-type; ■—■: D101S; ▲—▲: 2-834; ○—○: 4-186.

pH 10.0 条件下进行有关. 同时也说明, 定向进化能够产生确切匹配于实验所设定的选择压改进性突变.

2.9 金属离子对酶活力的影响

由于 EAP 为含 Zn^{2+} 和 Mg^{2+} 的金属酶, 我们也检测了添加这两种离子对野生型和突变酶活力的影响. 结果表明: Zn^{2+} 对酶有抑制效应, 当 Zn^{2+} 浓度为 0~ 0.5 mmol/L 时, 对野生型 EAP 的抑制程度为 10%, 对 2-834 为 27%, 而 D101S 和 4-186 在这个浓度范围内无明显激活或抑制效应. Mg^{2+} 对酶有轻微激活效应, 当 Mg^{2+} 浓度为 5 mmol/L 时, 对各酶株的激活程度依次为: 野生型 23%, D101S 28%, 2-834 17%, 4-186 4%. 浓度继续提高, 激活作用基本保持恒定.

3 讨 论

3.1 定向进化实验设计和突变文库的构建

定向进化能够快速鉴定适应性突变, 以最小的序列变化产生大的表型差异, 从而使氨基酸序列差异与蛋白质功能差异之间的真正相互关系变得明朗, 相当大地简化了序列比较、分析工作. 本研究采取合理设计和定向进化相结合的方法, 在已有高活力突变株的基础上, 进一步改进 EAP 催化活力, 成功地获得了若干高活力突变株.

在随机突变实验中, 一个要考虑的重要因素是突变频率. 对定向进化来说, 合适的突变频率是每个基因 2~ 5 个碱基替换^[1]. 我们选用的 error prone PCR 程序, 简单、快速, 而且最重要的是其突变频率可被确切控制^[6]. Zhao 等^[15]曾提出一个简单而有意义的评估文库总突变率的方法, 即检测文库群体中活性克隆所占组分, 他们对枯草杆菌蛋白酶 error prone PCR 文库的调查发现: 65% 的活性克隆相应于 0.2% 的突变频率. 尽管不同的酶对不同的突变频率有着不同的活力分布谱, 但检查文库中活性克隆的组分仍不失为一个方便的突变频率高低的指征. 本研究通过调整 PCR 反应体系中 Mn^{2+} 和 Mg^{2+} 的浓度, 选择活性克隆子占突变文库约 70% 时的反应条件, 有效地筛选到了高活力目标突变子.

3.2 突变文库的筛选

突变文库构建好后, 是否有一个高效、灵敏的筛选方法将是定向进化实验成功与否的关键所在. 就这方面来说, 肉眼可见的生色反应是最佳的. 本研究中, 我们建立了底物平板活性预选择加微孔板

活力定量比较的双重筛选方法, 有效地扩大了筛选库容量, 降低了筛选强度. 同时, 由于是分别在两个不同的磷酸单酯底物上进行筛选, 也保证了 EAP 的底物非特异性. 如对荧光底物 4-MUP 的活力检测表明, 进化酶对它的催化活力也显著高于野生型和亲本酶. 这种双重筛选方法也可适用于其他具有生色底物的酶, 或能够在固体培养基上催化底物产生可见溶解环的酶, 如: 磷酸酯酶、蛋白酶、脂酶等. 总之, 筛选条件要能准确地反映所需目的性能.

3.3 氨基酸置换效应的分析

由热稳实验可知, S374C 突变是导致进化酶热稳定性降低的主要原因. 结构分析表明, Ser374 位于 EAP 的两亚基界面处. 可以推测, 该突变在引起活力提高的同时, 对二聚体酶分子结构的稳定性造成了一定的影响. 另外, Lys167 与 Arg166 相邻, 后者起着固定底物磷酸组分的作用. K167R 突变增加了该处正电的静电环境, 有利于底物连结和过渡态复合物的稳定, 便利底物水解. Sun 等^[17]报道, 活性中心周围正静电环境的增加有助于降低由 Zn1 所稳定的一个水分子的 pK_a 值, 这个水分子是作为亲核基团攻击共价 E-Pi 复合物的. 当其 pK_a 值降低时, 在碱性 pH 下, 就有更多的亲核羟基产生, 从而有利于其攻击共价 E-Pi 复合物形成非共价 E·Pi 复合物, 表现为水解酶活力的提高.

3.4 金属离子的影响

据报道 EAP 催化过程中, Mg^{2+} 起重要调节作用, Mg^{2+} 在 M3 金属结合位点的连结和其正八面体配位的几何形状, 对 EAP 催化活力的最大表现都是非常重要的^[18]. 我们的结果表明: 不同 EAP 变异株, 受 Mg^{2+} 激活的程度不同. 进化酶受激活的份数低于野生型酶和 D101S 亲本, 可能是由于进化酶中 Mg^{2+} 结合力有所增加, 内源 Mg^{2+} 含量较多. 至于每个酶分子平均结合几个 Mg^{2+} , 有待进一步研究探讨.

参 考 文 献

- 1 Arnold F H. Directed evolution: creating biocatalysts for the future. *Chem Eng Sci*, 1996, **51** (23): 5091~ 5102
- 2 徐卉芳, 张先恩, 张用梅, 等. 体外分子定向进化研究进展. *生物化学与生物物理进展*, 2002, **29** (4): 518~ 522
Xu H F, Zhang X E, Zhang Y M, *et al.* *Prog Biochem Biophys*, 2002, **29** (4): 518~ 522
- 3 Stemmer W P C. Rapid evolution of a protein *in vitro* by DNA shuffling. *Nature*, 1994, **370** (4): 389~ 391
- 4 Oue S, Okamoto A, Yano T, *et al.* Redesigning the substrate specificity of an enzyme by cumulative effects of the mutations of

- non-active site residues. *J Biol Chem*, 1999, **274** (4): 2344~2349
- 5 Miyazaki K, Wintrode P L, Grayling R A, *et al.* Directed evolution study of temperature adaption in a psychrophilic enzyme. *J Mol Biol*, 2000, **297** (4): 1015~ 1026
 - 6 Kim E E, Wyckoff H W. Structure and function of alkaline phosphatases: structure of alkaline phosphatase. *Clin Chim Acta*, 1989, **186** (1-2): 175~ 188
 - 7 Holtz K M, Kantrowitz E R. The mechanism of the alkaline phosphatase reaction: insights from NMR, crystallography and site-specific mutagenesis. *FEBS Letters*, 1999, **462** (1): 7~ 11
 - 8 Mandecki W, Shallcross M A, Sowadski J, *et al.* Mutagenesis of conserved residues within the active site of *Escherichia coli* alkaline phosphatase yields enzymes with increased k_{cat} . *Protein Eng*, 1991, **4** (7): 801~ 804
 - 9 Chen L, Neidhart D, Kohlbrenner W M, *et al.* 3-D structure of a mutant (Asp101→Ser) of *E. coli* alkaline phosphatase with higher catalytic activity. *Protein Eng*, 1992, **5** (7): 605~ 610
 - 10 Zhang X E, Zhou Y H, Zhang Z P, *et al.* Engineering *E. coli* alkaline phosphatase yields changes of catalytic activity, thermal stability and phosphate inhibition. *Biocataly Biotransform*, 2002, **20** (6): 381~ 389
 - 11 Chaidaroglou A, Brezinski D J, Middleton S A, *et al.* Function of Arginine-166 in the active site of *Escherichia coli* alkaline phosphatase. *Biochemistry*, 1988, **27** (22): 8338~ 8343
 - 12 Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 1976, **72** (1/2): 248~ 254
 - 13 Halford S E. *Escherichia coli* alkaline phosphatase: an analysis of transient kinetics. *Biochem J*, 1971, **125** (1): 319~ 327
 - 14 Janeway C M L, Xu X, Murphy J E, *et al.* Magnesium in the active site of *Escherichia coli* alkaline phosphatase is important for both structural stabilization and catalysis. *Biochemistry* 1993, **32** (6): 1601~ 1609
 - 15 Zhao H, Moore J C, Volkov A A, *et al.* Methods for optimizing industrial enzymes by directed evolution. In: *Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 2nd. Washington D C: ASM Press, 1998. 597~ 604
 - 16 Shafikhani S, Siegel R A, Ferrari E, *et al.* Generation of large libraries of random mutants in *Bacillus subtilis* by PCR-based plasmid multimerization. *Biotechniques*, 1997, **23** (2): 304~ 310
 - 17 Sun L, Martin D C, Kantrowitz E R. Rate-determining step of *Escherichia coli* alkaline phosphatase altered by the removal of a positive charge at the active center. *Biochemistry*, 1999, **38** (9): 2842~ 2848
 - 18 Stec B, Holtz K M, Kantrowitz E R. A revised mechanism for the alkaline phosphatase reaction involving three metal ions. *J Mol Biol*. 2000, **299** (5): 1303~ 1311

The *In vitro* Directed Evolution of *E. coli* Alkaline Phosphatase

XU Hui-Fang^{1,2)}, ZHANG Xian-En^{2)*}, ZHANG Zhi-Ping²⁾, ZHANG Yong-Mei²⁾

¹⁾Institute of Microbiology, The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080, China;

²⁾Wuhan Institute of Virology, The Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430071, China)

A. E. G. CASS

(Biochemistry Department, Imperial College of Science, Technology and Medicine, South Kensington, London SW7 2A Y, UK)

Abstract The evolution of *phoA* gene fragment distant from the Asp101-Ser102-Ala103 encoding region to increase the catalytic activity of EAP with a single mutant D101S as parent was directed. Through two cycles of error prone PCR, coupled with a sensitive screening method, an evolved variant 4-186 was obtained. Its catalytic activity was 3-fold higher than that of D101S parent and 35-fold more active than wild-type EAP. The kinetic analysis indicated that the evolved enzyme exhibits a higher substrate binding ability and a higher catalytic efficiency than the D101S parent enzyme. DNA sequence revealed that 4-186 contains two amino acid substitutions, K167R and S374C, both of which locate neither the substrate-binding sites nor the metal-binding sites of EAP.

Key words directed evolution, error prone PCR, *E. coli* alkaline phosphatase, catalytic activity

* Corresponding author. Tel: 86-27-87641492, E-mail: x.zhang@pentium.whiov.ac.cn

Received: June 7, 2002 Accepted: June 28, 2002