

蛋白质定向进化的研究技术及应用*

谢晚彬** 谢和芳

(西南农业大学 重庆 402460)

摘要 蛋白质定向进化是在人类改造蛋白质的过程中产生的。蛋白质定向进化通常分三步进行,即随机诱变、体外重组和筛选。每一步都有多种研究技术。蛋白质定向进化大大加速了人类改造蛋白质的步伐,在实际应用研究和基础理论研究中都具有重要意义。

关键词 蛋白质工程 蛋白质定向进化 易错 PCR DNA 改组技术 筛选

20 世纪 80 年代初期,蛋白质工程诞生,标志着人类改造蛋白质的开始。近年发展起来的蛋白质定向进化技术大大加速了人类改造蛋白质的进程。

1 蛋白质定向进化的产生背景

经过漫长的自然选择过程,自然界产生的无数蛋白质表现出非常理想的生物学功能。例如生物体内的酶具有极高的催化效率、高度的专一性和可调控性,这是大多数传统工业催化剂无法与之相比的。因而,酶在各个领域得到广泛的应用。但在实践应用过程中,生物工艺通常需要下列类型的酶:长时间内保持活性稳定的酶,在极端环境中保持高活性的酶或可接受不同底物(包括自然界不存在的底物)的酶等^[1]。因此,需要对天然酶或蛋白质进行改造。

大量定点基因突变实验(site-directed mutagenesis)表明,蛋白质功能和性质的改变来自于许多小的内部修饰的积累,这些小的修饰或突变分布于较大的序列空间。基于这一认识,20 世纪 80 年代初期,蛋白质工程技术应运而生。其基本思路是首先分析研究蛋白质的三维空间结构,搞清结构与功能之间的关系,然后采用定点突变改变蛋白质分子中个别氨基酸残基,产生新性状的蛋白质。因而,这种尝试被称为理性设计(rational design)。然而,这类方法虽取得了一定进展,但仅适用于蛋白质三维结构已弄清,并且对结构与功能的关系比较

清楚的蛋白质^[2]。事实上,蛋白质的结构以及其结构与功能的关系非常复杂。更何况,对于大多数要改造的蛋白质来说,我们并不清楚其三维结构,不能进行理性设计。因而,蛋白质定向进化技术(directed evolution)在近年来得以产生和发展,它不需要事先了解蛋白质的三维结构及作用机制,而是在体外模拟自然进化的过程(随机突变、重组和选择),使基因发生大量变异,并定向选择出所需性质或功能的蛋白质,从而在几天或几周内实现自然界需要几百万年才能完成的事情^[3]。

2 蛋白质定向进化的研究技术

在蛋白质定向进化的 3 个步骤中,每一步都可以有多种研究技术。下面依次加以阐述,并重点阐述随机诱变步骤中的易错 PCR、体外重组步骤中的 DNA 改组技术、筛选步骤中可见信号的肉眼筛选。

2.1 随机诱变

2.1.1 易错 PCR 易错 PCR(error-prone PCR)^[4]是一种简便快速地在 DNA 序列中随机制造突变的方法。其基本原理是通过改变传统 PCR 反应体系中某些组分的浓度(如 Mg^{2+} 的浓度),或使用低保真度的 DNA 聚合酶等,使碱基在一定程度上随机错误引入而创造序列多样性文库。易错 PCR 的关键在于选择适当的突变频率,一般有益突变的频率很低,绝大多数突变是有害的或中性的。当突变频率太高时,几乎无法筛选到有益突变;当突变频率太低,则未发生任何突变的野生型在突变群体中将占优势,也很难筛选到理想的突变体。一般目标基因内有 1.5~5 个碱基发生碱基替换时,诱变结果最理想^[2]。它一般适用于片段小于 1000bp 的基因。

收稿日期:2004-08-30 修回日期:2004-12-30

* 国家自然科学基金资助项目(30270323)

** 电子信箱:wanbinxie@163.com

2.1.2 其它随机诱变技术 化学诱变剂介导可产生随机诱变。如在 65℃ 下直接用羟胺处理带有目的基因片段的质粒,用限制性内切酶切下突变了基因片段,再克隆到表达载体中进行功能筛选^[5]。

由致突变菌株(mutator strain)也可产生随机突变。美国 Stratagene 公司成功地进行了这方面的实验^[6]。

Murakami 等^[7]提出 1 种新的突变库建立方法,称为 RID 突变(random insertion/deletion mutagenesis)。这种方法是通过模拟自然界中的 1 种重要进化过程——随机插入和缺失,在目的基因上随机引入密码子突变。

最近, Misa 等^[8]提出 SSG 和 RDL 突变(site-specific genomic mutagenesis and random domain-localized mutagenesis)。Tuck 等^[9]提出 SeSaM 突变(sequence saturation mutagenesis)。

2.2 体外重组

2.2.1 DNA 改组技术 DNA 改组技术(DNA shuffling)由美国人 Stemmer 于 1994 年首次提出^[10],是指通过对目的基因酶切成随机片段,然后进行 PCR 重聚,由于同源重组而产生基因突变的方法。因为该方法在 DNA 片段组装过程中也可能引入点突变,所以它对从单一序列指导进化蛋白质也是有效的。其基本原理如图 1 所示。这种方法产生的多样性文库,可以有效积累有益突变,排除有害突变和中性突变,同时也可实现目的蛋白多种特性的共进化^[3]。

通过单一序列的改组定向进化蛋白质有很多成功的实例,但有时效果不理想。Cramer^[11]等改进了 DNA 改组技术,提出基因家族改组技术(DNA family shuffling),基因家族改组技术与基因改组技术最大的区别在于出发序列的同源性。Cramer 等在实验中选用了 4 个 1.6kb 来自不同菌属,但同样编码头孢菌素 C 酶的基因,它们之间具有 58 ~ 82% 的同源性。此 4 个基因共同作为出发序列进行 DNA 改组,酶活性增加了 270 ~ 540 倍,而单基因改组只增加了 8 倍。

2.2.2 其它体外重组技术 Arnold^[12]于 1998 年提出了 1 种有效的新方法——随机引导重组 RPR(random-priming recombination)。Arnold 等^[13]又建立了交错延伸技术 StEP(staggered extension process)。Coco 等^[14]创建了过渡模板随机嵌合生长技术 RACHITT(random chimeragenesis on transient

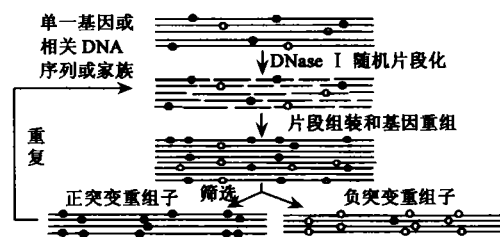


图 1 DNA shuffling 原理

○:负突变表型;●:正突变表型

Fig. 1 DNA shuffling procedure

templates)。Ostermeier 等^[15]也引入了一种新方法,叫增加平截法(Incremental truncation)等。

需要说明的是,以上提及的体外重组技术,任何一种都不是万能的。在实际应用中,应针对具体问题,选择合适的技术或技术组合,以达到事半功倍的效果。

2.3 筛选

由于筛选的条件确定了蛋白质预期特性的进化方向,因此,在确定了合理的方法产生突变体文库之后,建立有效的方法搜索蛋白质文库得到预期的性状是决定定向进化成功与否的关键。虽然选择(selection)是 1 种非常有效的搜索机制,但只有在突变体蛋白质或酶可赋予宿主细胞生长或存活的优势时才能使用选择机制。因此,突变体文库通常需要筛选(screening)而非选择。

当我们感兴趣的功能可产生可见信号时,简单的肉眼可见的筛选方法(如易被观察的菌落表型)被广泛地应用。例如,菌落分泌的蛋白酶可在含酪蛋白的琼脂平板上产生清晰的水解圈,其大小与水解活性成正比。又如,采用在高温并有蓝色木聚糖底物存在的条件下,根据菌落周围底物的颜色变化这一肉眼可见的简单信号来筛选耐高温的木聚糖酶。

近几年,与创建多样性突变体文库的发展相适应,在高流通量和超高流通量筛选技术方面也取得了令人瞩目的成就^[16~18]。其中核糖体展示技术与 mRNA 展示技术,由于在体外无细胞翻译体系中进行,不受细胞转化效率的限制,大大提高了文库容量和筛选通量($10^{12} \sim 10^{14}$)。其它高通量筛选方法还有细胞表面展示技术和噬菌体表面展示技术;将靶活力与转录信号相偶联的三杂交体系;以发光信号为指示的反射增进系统等等。

3 蛋白质定向进化的应用

蛋白质定向进化大大加速了人类改造蛋白质原有功能和开发新功能的步伐。其广泛应用在与工业相关的催化酶方面,主要体现在以下几方面:(1)提高酶的活性。如 van der Veen 等^[19]对淀粉蔗糖酶采用易错 PCR 和 DNA 改组技术相结合的方法,筛选得到了两个催化活性提高 32 倍的突变酶。(2)提高酶的热稳定性。本文作者对木聚糖酶进行体外定向进化,获得热稳定性显著提高的突变酶(待发表)。(3)改变酶的底物特异性。如大肠杆菌的 β -葡萄糖苷酸酶基因在经过 3 轮 DNA 改组技术后,得到了 1 个与野生型相比,对 β -半乳糖苷的催化降解能力提高 500 倍的新基因。

蛋白质定向进化在医药业、农业上也产生了巨大影响。重组蛋白质药物在药品中占有重要地位,其主要产品有细胞因子、生长因子和酶。通常情况下,许多这类产品有副作用,可以引起严重的并发症,或者使用时有条件限制,因而不利于广泛应用。用蛋白质定向进化技术可以选择性改造这些产品的基因,获取所需的性质,排除不利的活性。

蛋白质定向进化也非常适合于基础理论的研究。对蛋白质分子进化得到的突变体进行分析,为研究蛋白质结构与功能的关系提供新的工具,为蛋白质的理性设计提供理论依据。

参考文献

- [1] Arnold F H. In IBC Directed Enzyme Evolution. San Diego 1998
- [2] Harayama S. Trends Biotechnology, 1998, 16(2): 76 ~ 84
- [3] 徐卉芳,张先恩,等. 生物化学与生物物理进展,2002,29(4):519
- [4] Chen K and Arnold F H. Biology Technology, 1991, 9: 1073 ~ 1077
- [5] Seiichi Taguchi, Akiyoshi Ozaki, et al. Applied and Environment Microbiology, 1998, 64 (2): 492 ~ 495
- [6] Greener A, Callahan M. Perform Random Mutagenesis Strategies, 1994, 7: 32 ~ 34
- [7] Murakami H, Hohsaka T, et al. Nature Biotechnology, 2002, 20: 76 ~ 81
- [8] Misa Gray, Martin Kupiec, et al. BMC Biotechnology, 2004, 4:7
- [9] Tuck Seng Wong, Kang Lan Tee, et al. Nucleic Acids Research, 2004, 32(3): 26
- [10] Stemmer W P C. Nature, 1994, 370 (4): 389 ~ 391
- [11] Andreas, Cramer, et al. Nature, 1998, 391 (15): 288 ~ 291
- [12] Shao Zhixin, Zhao Huimin, et al. Nucleic Acids Research, 1998, 26 (2): 681 ~ 683
- [13] Zhao H, Giver L, et al. Nature Biotechnology, 1998,16(3):258 ~ 261
- [14] Coco W M, Levinson W E, et al. Nature Biotechnology,2001,19: 354 ~ 359
- [15] Ostermeier M, Nixon A E, et al. Proc Natl Acad Sci USA,1999, 96:3562 ~ 3567
- [16] Amstutz P, Forrer P, et al. Curr Opin Biotech, 2001, 12: 400 ~ 405
- [17] Soumillion P, Fastrez J. Curr Opin Biotech, 2001, 12: 387 ~ 394
- [18] Hertzberg R P, Pope A J. Curr Opin Chem Biol,2000,4:445 ~ 451
- [19] van der Veen, Gabrielle P V, et al. Federation of European Biochemical Societies, 2004, 560:91 ~ 97

The Study and Application on Directed Evolution of Proteins

XIE Wan-bin Xie He-fang

(Southwest Agricultural University Chongqing 402460, China)

Abstract Directed evolution of proteins occurs in the course of human being's engineering proteins. It is usually based on the combination of random mutagenesis, in vitro recombination and screening. There are many technologies in every step. Directed evolution of proteins greatly accelerates the process of engineering proteins and plays an important role in applied and theoretical study.

Key words Protein engineering Directed evolution of proteins Error-prone PCR DNA shuffling Screening