

酶的分子设计、改造与工程应用

朱俊晨^{1, 2*} 王小菁²

(1 深圳职业技术学院生物工程系 深圳 518055 2 华南师范大学生命科学院 广州 510641)

摘要 酶工程的研究已经发展到分子水平,在体外通过基因工程、化学、物理等手段改造酶分子结构与功能,大幅提高了酶分子的进化效率和催化效率,生产有价值的非天然酶。对酶工程学若干“热点”和前沿课题的研究、应用进行了概述,分析了国际上酶工程研究及应用技术、手段、方法,包括体外分子进化、核酶和抗体酶的设计、酶分子的定向固定化技术、酶蛋白分子的化学修饰、融合酶、人工合成及模拟酶等技术,并展望了酶工程的技术进步和应用的新进展。

关键词 酶工程 蛋白质工程 分子设计

酶,一大类以蛋白质为主体的生物催化剂,具有在常温常压和近中性 pH 等温和条件下,高效率地进行区域或对映体选择性催化的特点。迄今,从生物界已发现和定性了近 3000 种酶,分属氧化还原、转移、水解、裂合、异构、连接六大酶类,对许多酶的纯化、结构、功能、动力学性质获得了深入了解。随着对其不断深入的认识和社会发展的实际需求,酶的应用范围已遍及食品工业、农业、医药卫生行业、环保、能源开发和生命科学等各个方面。但在粗放的工业条件下,例如高温、高压、重金属离子、氧化剂、极端 pH 等,天然酶常常会遭到破坏,从而使酶的生产和使用受到极大限制。目前工业上直接利用酶制剂时还存在一些缺点,如稳定性差、使用效率低,不能在有机溶剂中使用,寿命不长等,造成了使用酶的成本升高。近年来,特别是随着蛋白质工程的(protein engineering)应用,即把分子生物学、结构生物学、计算生物化学结合起来,根据蛋白质结构与功能关系的知识,经过计算机辅助的分子设计,按照人类的需要,产生性能优良的酶分子,本文根据国际酶工程研究和国内外酶工程产业的现状、发展趋势,结合现今国际上相关的工作进展,从酶分子设计改造、人工合成与工程应用的角度,进行分析、总结、展望,旨在为酶工程的研究及应用提供一些技术思路、模式和策略。

1 酶分子的定向改造和进化

酶分子设计可以采用定点突变(sited directed muta genesis)和体外分子定向进化(*in vitro* molecular directed evolution)两种方式对天然酶分子进行改造^[1]。定点突变需要知道酶蛋白的一级结构及编码序列,并根据蛋白质空间结构知识来设计突变位点。体外定向进化是近几年新兴起来的一种蛋白质改造新策略,它可以在尚不知道蛋白质的空间结构,或者根据现有的蛋白质结构知识尚不能进行有效的定点突变时,借鉴实验室手段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,从而使几百万年的自然进化过程在短期内得以实现。

1.1 定点突变

定点突变技术可以随心所欲地在已知 DNA 序列中取代、插入或缺失一定长度的核苷酸片段。该方法与使用化学因素、自然因素导致突变的方法相比,具有突变率高、简单易行、重复性好的特点。图 1 为 overlap extension PCR 介导定点突变的基本过程,其中 C 和 D 是相互匹配、并含有特定突变点的一对引物。利用定点突变技术对天然酶蛋白的催化性质、底物特异性和热稳定性等进行改造已有很多成功的实例^[2-9],酶性质随着经定点突变而改变如表 1 所示,然而,定点突变技术只能对天然酶蛋白中少数的氨基酸残基进行替换,酶蛋白的高级结构基本维持不变,因而对酶功能的改造较为有限。

收稿日期:2003-10-14 修回日期:2004-05-24

* 电子信箱:ectec@sina.com

同时, 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要求, 因此目前采用体外分子定向进化的方法来改造酶蛋白的研究越来越多, 并已在短短几年内取得了令人瞩目的成就。

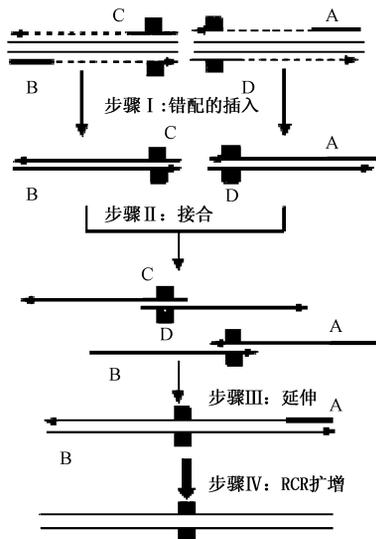


图 1 overlap extension PCR 介导定点突变

表 1 酶性质随着定点突变而改变

Table 1 Enzyme characteristic change following by sited directed muta genesis

酶	修饰		酶性质的改变
	修饰部位	原氨基酸残基-新氨基酸残基	
酪氨酰 TRNA 合成酶	51	苏 → 丙	对底物 ATP 的新合力
	51	苏 → 脯	提高 100 倍
β-内酰胺酶	70~ 71	丝, 苏 → 苏, 丝	完全失活
	70~ 71	苏, 丝 → 丝, 丝	恢复活性
二氢叶酸还原酶	27	天冬 → 天胺	活性降低为正常酶的 0. 1%

1.2 DNA shuffling

DNA shuffling 方法不仅可以对从随机突变文库中筛选出来一组突变基因人为进化, 还可以将具有结构同源性的几种基因进行体外重组, 共同进化出一种新的蛋白质。DNA shuffling 的基本过程如图 2 所示。通过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质多种特性的共进化^[7- 11]。β-内酰胺酶是一种水解头孢类抗生素的微生物酶。Stemmer 等运用 DNA shuffling 对 β-内酰胺酶进行了体外分子进化。经过 3 轮 DNA shuffling 循环, 获得

了一个赋予宿主细胞对头孢霉素抗性性能提高 16 000 倍的突变体。近年来, 在 DNA shuffling 的基础上又延伸出了以下新技术:

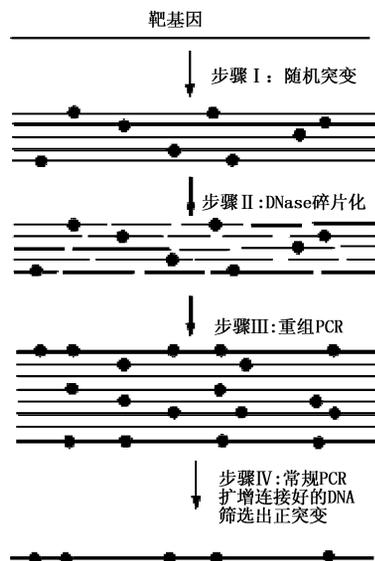


图 2 DNA shuffling 介导的随机突变
Fig. 2 DNA shuffling procedure

(1) Family shuffling 当 DNA shuffling 用来重组一系列进化上相关的基因时, 就称为 Family shuffling。一个突出的例子是, 当将 4 种头孢菌素酶基因进行 Family shuffling 时, 酶活最高可增加 540 倍, 而单基因 shuffling 只增加 8 倍。

(2) STEP (staggered extension process) 重组^[12]。STEP 重组是一种简化的 DNA shuffling 方法。它不是由短片段组装全长基因, 而是在 PCR 反应中, 将含不同点突变的模板混合, 随之进行多轮变性、短暂复性及延伸反应, 在每一轮中, 那些部分延伸的片段可以随机地杂交到含不同突变的模板上继续延伸, 由于模板转换而实现不同模板间的重组, 如此重复直至获得全长基因片段。

(3) 随机引物体外重组 (random priming *in vitro* recombination RPIR)^[13]。RPIR 法是用一套随机序列引物, 产生互补于模板不同位点的短 DNA 片段库 (由于碱基错配, 这些短 DNA 片段含有少量的点突变), 然后进行类似于 DNA 改组的全长基因装配反应, 获得突变文库。RPIR 法的特点是可用单链 DNA 或 mRNA 作模板, 不受模板长度限制, 无序列偏爱性等。

(4) 临时模板随机嵌合生长 (random chimeragenesis on transient templates, RACHITT)^[14]。

RACHITT 技术是与 DNA shuffling 概念上明显不同的、改进的基因家族改组技术。它不包括热循环、链转移或交错延伸反应,而是将随机切割的基因片段杂交到一个临时 DNA 模板上进行排序、修剪、空隙填补和连接的过程。其中的悬垂切割步骤可使比 DNase 消化片段更短的短片段得以重组,明显提高重组的频率和密度。

2 核酶和抗体酶的设计

2.1 核酶的设计

不但 RNA 分子具有催化功能,包括近年发现的某些 DNA 分子也具有催化功能,将其统称为核酶 (ribozyme),进一步的研究发现核酶的一种多功能的生物催化剂,不仅可以作用于 RNA 和 DNA,而且还可以作用于多糖、氨基酸酯等底物,核酶还可以同时具用信使编码功能和催化功能,实现遗传信息的复制、转录和翻译,是生命化过程中最简单、最经济、最原始的、催化核酸自身复制和加工的方式。可以根据核酶核酸序列的高度特异性,通过生化或基因技术人工设计合成催化其自我切割和断裂的核酸组成,根据病毒基因的全部序列,设计并合成出防治有这些病毒引起的人、畜和植物病毒病的核酶,如能够防治流感、肝炎、艾滋病和烟草花叶病等,核酶也可以用来治疗某些遗传病和癌病,还可以用作研究核酸图谱和基因表达的工具^[15]。

2.2 抗体酶的设计

利用抗原抗体相互作用的原理来模拟酶的催化作用,以一些底物过渡态中间物的类似物作为半抗原,诱导合成与其构象互补的相应的抗体,从而得到能够催化上述物质进行活性反应的酶。人们将这种具有催化活性的抗体称为抗体酶 (abzyme) 又称催化抗体 (catalytic antibody)。抗体酶在本质上是免疫球蛋白,不同的是在其易变区人工赋予了酶的催化活性,抗体是目前已知的最大的多样性体系,有极高的亲和力,与抗原结合的结合部位和酶的结合部位相似,但无催化活性。制备抗体酶的方法主要有诱导法、拷贝法、插入法、化学修饰法和基因工程法。抗体酶的催化效率远比模拟酶高。从原理上讲,只要能找到合适的过渡态类似物,几乎可以为任何化学反应提供全新的蛋白质催化剂——抗体酶,这为人工合成酶和模拟酶开创了一条崭新的途径,目前抗体酶催化合成反应、交换反应、闭环反应、异构化反应、氧化还原反应等。此外,与

模拟酶相比,抗体酶已经用于酶作用机理的研究,手性药物的合成和拆分,抗癌药物的制备。目前人们正致力于进一步提高抗体酶的催化效率,期望在深入了解酶的作用机理,以及抗体和酶的结构和功能的基础上,能够真正按照人们的意愿,构建出具有特定催化活性和专一性的、催化效率高的、能满足各种用途需要的抗体酶。

3 酶分子的定向固定化技术

固定化酶因其优越性而在药物生产、临床诊断、发酵及食品工程、分析生物技术等领域应用十分广泛。但是,在大多数情况下,酶固定化以后由于酶蛋白通过几种氨基酸残基在固定化载体上的附着 (attachment) 造成活性部分或全部失去,引起了固定化酶蛋白无序的定向和结构变形的增加 (图 3a)。现在的新技术已经寻找到几条不同的途径应用于酶蛋白的固定化,使酶蛋白能够以有序方式附着在载体的表面,实现酶的定向固定化而使酶活性的损失降低到最小程度 (图 3b),涉及的定向固定化方法有如下几种: (1) 借助化学方法的位点专一性固定化; (2) 磷蛋白的位点专一性固定化; (3) 糖蛋白的位点专一性固定化; (4) 抗体 (免疫球蛋白) 的位点专一固定化。

此外,融合蛋白技术的发展也为酶固定空间取向的控制提供了新的方法。FMN:NAD(P)H 氧化还原酶 (FMN:NAD(P)H oxidoreductase) 和荧光素酶 (luciferase) 是催化细菌生物发光的两种酶。Min 等^[16]将生物素羧化载体蛋白 (biotin carboxy carrier protein, BCCP) 分别融合在荧光素酶和 FMN:NAD(P)H 氧化还原酶的 N 末端,通过生物素 (biotin) 和亲和素 (avidin) 的相互作用,将这两个体内生物素化的融合蛋白定向固定在亲和素包被的琼脂糖颗粒上,在低酶和高 NADH 浓度的条件下,定向共固定酶的生物发光能力是游离酶的 8 倍,其稳定性也大大提高。Hengsakul 等^[17]在大肠杆菌碱性磷酸酶的 C 末端融合了一个含有 10 个氨基酸的短肽——链霉结合肽 (streptag), 获得 EAP streptag 融合蛋白。通过链霉结合肽和链霉亲和素 (streptavidin) 的特异结合,使酶分子按一定的空间取向固定在链霉亲和素包被的羧甲基葡聚糖 (carboxymethylated dextran, CMD) 上。为最大限度地保持固定化酶的活性构型,还可以通过基因操纵,在链霉结合肽与酶分子之间插入一小段亲水肽作为连接臂 (linker), 以增

加酶分子与载体间的距离, 减少空间位阻。固定后, 该融合蛋白的回收活力是不加连接臂同样酶蛋白的 8.4 倍。这种酶固定过程中空间取向的控制是制备高质量固定化酶的前提^[18], 还具有以下一些优点: (1) 每一个酶蛋白分子通过其一个特定的位点以可重复的方式进行固定化; (2) 蛋白质的定向固定化技术有利于进一步研究蛋白质结构; (3) 这种固定化技术可以借助一个与酶蛋白的酶活性无关或影响很小的氨基酸来实现。这种有序的、定向固定技术在生物芯片、生物传感器、生物反应器、临床诊断、药物设计等方面都有应用。

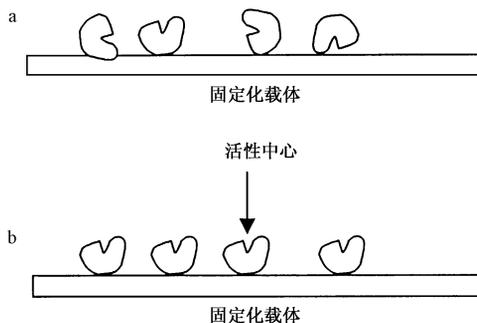


图 3 酶蛋白的固定化

Fig. 3 Enzyme immobilization

a: 无序固定化; b: 定向固定化

4 酶分子的化学修饰

在应用过程中, 有时会因酶的稳定性差、活力不够理想及具有抗原性等缺点而使其应用受到一定的限制, 为此常需对酶进行适当再修饰加工, 以改善酶的性能。酶的修饰可分为化学修饰和选择性遗传修饰两类, 遗传修饰已在上文定点突变中有详细的叙述。对自然酶的化学结构进行修饰以改善酶的性能的方法很多。例如, α -淀粉酶一般有 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Zn^{2+} 等金属离子, 属于杂离子型, 若通过离子置换法将其他离子都换成 Ca^{2+} , 则酶的活性提高 3 倍, 稳定性也大大增加; 胰凝乳蛋白酶与水溶性大分子化合物右旋糖酐结合, 酶的空间结构发生某些细微改变, 使其催化活力提高 4 倍; 还有对抗白血病药物——天冬酰胺酶的游离氨基进行修饰后, 该酶在血浆中的稳定性也得到很大的提高。

5 构建具有双催化活性的融合酶

生化反应常常需要多酶顺序催化来进行, 称为

顺序酶反应(sequence enzyme reaction)。大量的研究表明, 通过基因融合构建具有双酶活力的融合蛋白, 可有效提高顺序酶反应的总转化效率^[19]。D-氨基酸的合成需要 D-乙内酰脲酶(D-hydantoinase, HYD)和 N-氨甲酰酶(N-carbamylase, CAB)的顺序催化作用, 是顺序酶反应的典型应用。Kim 等^[20]将两种不同来源的 D-乙内酰脲酶分别与 N-氨甲酰酶融合, 构建 CAB-HYD 和 CAB-HYD1 两种融合蛋白。CAB-HYD 和 CAB-HYD1 都同时具有 D-乙内酰脲酶和 N-氨甲酰酶活力, 但 CAB-HYD1 的性能优于 CAB-HYD。与原多酶反应相比, 两融合酶具有更高的将乙内酰脲衍生物转化成相应氨基酸的能力。一般情况下融合酶蛋白保留单酶的本质活力, 且与游离酶具有相似的催化动力学性质。在生物传感器中已成功地得到应用。

6 人工合成酶(synzymes)

通常, 将人工合成的具有类似酶活性的蛋白或高聚物称之为人工合成酶, 概括起来包括以下两大类:

6.1 人工设计合成酶蛋白

该方法关键在于找到组建蛋白质结构的方法, 获得自然界原先并不存在的、具有全新结构和功能的酶蛋白。全新设计的过程大致如图 4 所示: 在确定设计目标后, 先根据一定规则产生初始序列, 经过结构预测和构建模型, 对序列进行初步的修改, 然后进行多肽合成, 再经结构检测, 确定是否与原定目标相符, 并根据检测结果, 指导进一步的设计。通常, 要完成一个蛋白质的全新设计, 要经过反复多次设计 \rightarrow 合成 \rightarrow 检测 \rightarrow 再设计的过程。尽管目前对蛋白质全新设计的理论基础, 即蛋白质折叠规律的认识还不够深入, 酶蛋白全新设计还处在探索阶段, 但是, 其应用前景非常诱人, 值得深入探索和研究。

6.2 高分子聚合物材料模拟酶

人工合成高分子聚合物材料可模拟酶的功能, 即人工合成酶。它在结构上必须具有 2 个特殊部位, 即一个是底物结合位点, 一个是催化位点, 而构建底物结合位点比较容易, 构建催化位点却比较困难。如果在分子中设计一个一个反应过渡态的结合位点, 则该位点常常会同时具有结合位点和催化位点的功能, 从而提高催化效率。人工合成酶通常也遵循 Michaelis-Menten 方程。例如, 高分子聚合物

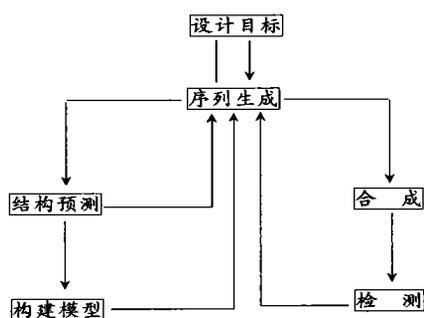


图4 蛋白质全新设计过程

Fig. 4 Procedure of protein design

聚4-乙烯基吡啶-烷化物等,具有糜蛋白酶的功能,具有氧化还原酶、参与光合作用的酶和各种水解酶等功能。近来,国际上又发展起一种分子压印(molecular imprinting),又称为生物压印(bioimprinting)技术。该技术可以借助模板在高分子物质上形成特异的识别位点和催化位点。目前,此项技术已经获得广泛的应用,例如分子压印的聚合物可用作生物传感器的识别单元等模拟酶可用于催化反应。抗体和受体结合位点的模拟物可用于识别和检测系统。

表2 天然酶和人工合成酶催化连续氧化还原反应的比较

Table 2 Comparison of nature enzyme and synzyme

	天然酶	人工合成酶
转换频率(TOF, min)	100~ 2000	1~ 10
总转换数(TTN, 对催化剂而言)	2×10^7	5×10^5
总转换数(对辅助因子而言)	6×10^5	—
空间时间产量[STY, kg/(L·d)]	0.05~ 0.5	0.5~ 1.0
对映体过剩(cc, %)	$\geq 99\%$	96%
溶剂	水	有机溶剂
底物范围	狭窄	宽广

迄今为止,天然酶的转换频率(turnover frequency TOF)仍然高于人工合成酶。随着辅助因子价格的降低和再生技术的改进,天然酶的辅助因子再生问题在某些情况下已经解决。而对人工合成酶而言,通常并不存在辅助因子的再生问题,但是,辅助底物的成本可能成为问题。天然酶可以利用非常廉价的氢源(氢气、甲酸、葡萄糖等),而人工合成酶常常要依靠更昂贵的氢源(如甲硼烷等)。人工合成酶的空间时间产率(space time yield, STY),可以大大高于天然酶催化的反应。这一结果的原因是,在膜反应器内,人工合成酶的“活性中心”的浓度能够达到非常之高。这样就可以补偿了

转换频率低的缺点。至于对映体过剩(enantiomeric excess),天然酶在大多数情况下,优于人工合成酶。而在使用有机溶剂和各种各样底物方面,人工合成酶要比天然酶优越得多,表2比较了人工合成酶与天然酶在连续氧化还原反应系统中的反应能力情况。

7 展望

相对于其它各种功能蛋白质,酶的结构与功能研究还处于幼年期,如何能够对酶蛋白实施分子改造,使它们的性能得到改善,是具有挑战性的课题。虽然分子酶工程学的进一步发展还要依赖于各种酶分子结构生物学数据的完善以及蛋白质空间结构预测和蛋白质结构和功能关系的深入研究,然而分子酶工程应用在生物技术领域尤其是生物分析技术上有广阔的技术发展空间,包括酶试剂盒、酶联免疫(ELISA)、酶标基因探针、酶传感器等,已经在临床诊断、生物工艺过程分析与监控、环境监测、检疫、生命科学研究等方面逐渐取代传统的技术方法,还有20世纪90年代建立的新构思——应用代谢工程,扩大宿主有机体的底物范围,使其在工业过程中能够更经济地利用原材料等。相信随着基因组、后基因组时代的到来和重组酶生产技术的开发,特别是随着从极端环境微生物或不可培养微生物获得新酶蛋白的开发,将加速人类改造酶蛋白旧功能和开发新功能的步伐,对于酶的应用必将产生重大而深远的意义。

参考文献

- [1] Zhang X, Molecular control of enzyme used in analysis molecular [J], Wuxi University of Light Industry, 1999, 18(5): 118~ 121
- [2] Ma YF, Evans DE. Mutations of barley beta amylase that improve substrate binding affinity and thermostability [J]. Mol Genet Genomics, 2001, 266(3): 345(352)
- [3] Huang CY, Chang AK. Site directed mutagenesis of the ionizable groups in the active site of *Zymomonas mobilis* pyruvate decarboxylase: effect on activity and pH dependence [J]. Eur J Biochem, 2001, 268(12): 3558~ 3565
- [4] Wang SX, Dunphy W G. Activation of *Xenopus* Chkl by mutagenesis of threonine 377 [J]. FEBS Lett, 2000, 487(2): 277~ 281
- [5] Chen KQ, Arnold IH. Enzyme engineering for nonaqueous solvents: random mutagenesis to enhance activity of subtilisin [J] Ein polar organic media. Biotechnology (NY), 1991, 9(11): 1073~ 1077
- [6] Chen KQ, Arnold FH. Tuning the activity of an enzyme for unusual environments: sequential random mutagenesis of subtilisin E for

- catalysis in dimethylformamide [J]. Proc Natl Acad Sci, 1993, 90 (12): 5618~ 5622
- [7] Moore JC, Jin H M et al. Strategies for the *in vitro* evolution of protein function: enzyme evolution by random recombination of improved sequences [J]. J Mol Biol, 1997, 272: 336~ 347
- [8] Zhao H, Arnold FH. Optimization of DNA shuffling for high fidelity recombination [J]. Nucleic Acids Res, 1997, 25: 1307~ 1308
- [9] Zhao H, Arnold FH. Functional and nonfunctional mutations distinguished by random recombination of homologous genes [J]. Proc Natl Acad Sci, 1997, 94: 7997~ 8000
- [10] Stemmer WPC. Rapid evolution of a protein *in vitro* by DNA shuffling [J]. Nature, 1994, 370: 389~ 391
- [11] Kim G J, Cheon YH. Directed evolution of a novel N-carbamylase- β -hydantoinase fusion enzyme for functional expression with enhanced stability [J]. Biotech & Bioeng, 2000, 68(2): 211~ 217
- [12] Zhao H, Giver L. Molecular evolution by staggered extension process *in vitro* recombination [J]. Nat Biotechnol, 1998, 16: 258~ 261
- [13] Shao Z, Zhao H, Arnold FH. Random priming *in vitro* recombination: an effective tool for directed evolution [J]. Nucleic Acid Res, 1998, 26: 681~ 683
- [14] Pelletier JN. A new twist on nDNA Shuffling increases recombination frequency and expands access to sequence space, facilitating the engineering of new protein activities [J]. Nat Biotechnol, 2001, 19: 314~ 315
- [15] 居乃琥. 酶工程研究和酶工程产业的新进展(I). 食品与发酵工业, 2000, Vol26 No3: 56~ 57
- [16] Min DJ, Andrade J D. Specific immobilization of *in vivo* biotinylated bacterial Luciferase and FMN: NAD(P)H oxidoreductase [J]. Analytical biochemistry, 1999, 270: 133~ 139
- [17] Hengsakul M, Cass AEG. Alkaline phosphatase Streptag fusion protein binding to streptavidin: resonant mirror studies [J]. J Mol Biol, 1997, 266: 621~ 632
- [18] Shaoh, Zhang X. Orientation control of immobilized enzyme [J]. Biotechnology Information, 2000, 3: 25~ 28
- [19] Kim Y H, Kwon T K. Trehalose synthesis by sequential reactions of recombinant maltotriose trehalose synthase and maltotriose trehalose trehalohydrolase from *Brevibacterium helvolum*. Appl Environ Microbiol, 2000, 66: 4620~ 4624
- [20] Kim GJ, Lee DE, et al. Construction and evaluation of a novel bifunctional N-carbamylase- β -hydantoinase fusion enzyme [J]. Appl Environ Microbiol, 2000, 66: 2133~ 2138

Current Researches and Applications of the Molecular Enzyme Engineering

ZHU Jun chen^{1,2} WANG Xiao jing²

(1 Department of Applied Biological Engineering, Shenzhen Polytechnic College, Shenzhen 518055, China)

(2 College of Life Science, South China Normal University, Guangzhou 510641, China)

Abstract *In vitro* enzyme structure and function can be reconstructed in molecule level by means of genetic engineering as well as method of chemie and physics to improve enzyme efficiency and make valuable enzyme for industry application. Recent researches together with development and application advances of the molecular enzyme engineering are reviewed and discussed in this article including the technology of *in vitro* molecular directed evolution, designation of ribozyme, abzyme, enzyme sited immobilization, fusion enzyme and synzymes etc. Further more the progress and application of enzyme engineering are also prospected.

Key words Enzyme engineering Protein engineering Molecular design