

D-泛解酸内酯水解酶的定向进化

Directed Evolution of D-lactonohydrolase by Error Prone PCR and DNA Shuffling

柳志强¹, 孙志浩^{1,2*}, 郑璞¹, 冷泳¹, 钱嘉南¹

LIU Zhi-Qiang¹, SUN Zhi-Hao^{1,2*}, ZHENG Pu¹, LENG Yong¹ and QIAN Jia-Nan¹

1. 江南大学生物工程学院生物催化研究室, 无锡 214036

2. 工业生物技术教育部重点实验室, 无锡 214036

1. Laboratory of Biocatalysis, School of Biotechnology, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China

2. The Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Wuxi 214036, China

摘要 易错 PCR 结合 DNA 改组方法向 D-泛解酸内酯水解酶基因中引入突变, 并构建突变体库。利用酶的催化特点和产物特性建立了基于平板初筛和高效液相复筛的两步法 D-泛解酸内酯水解酶活性筛选系统。用该筛选系统以酶活力和 pH 稳定性为指标对突变体库进行筛选, 最终获得一株酶活力高且在低 pH 条件下稳定性好的突变体 Mut E-861。该突变体的酶活力是野生型酶的 5.5 倍。对突变体和野生型酶在 pH 6.0 和 pH 5.0 条件下的残余酶活进行对比, 在这两种 pH 条件下, 突变体酶的酶活残留分别为 75% 和 50%, 而野生型酶只能保持原来的 40% 和 20%。通过软件对突变体 Mut E-861 酶基因和野生型酶基因进行分析对比, 发现突变体 Mut E-861 酶基因发生了三处点突变, 其中突变使两处氨基酸取代, 另一处为沉默突变, 未引起氨基酸的变化。

关键词 串珠镰孢霉菌, D-泛解酸内酯水解酶, 易错 PCR, DNA 改组, 筛选, 定向进化

中图分类号 Q939 文献标识码 A 文章编号 1000-306X(2005)05-0773-09

Abstract D-lactonohydrolase is useful in the procedure of resolution of racemic pantolactone to produce D-pantolactone, but the activity and stability under low pH of the wild type enzyme is not satisfactory enough to be applied to industrial production. The expected properties of wild type enzyme were enhanced by directed evolution. According to the formation of products and pH indicators, a screening system was designed. After three sequential error prone PCR and one round DNA shuffling followed by screening, Mut E-861, the best mutant with improved activity and stability under low pH situation was obtained. Gene analysis of the Mut E-861 mutant indicated that the mutant enzyme had A352C, G721A mutations and a silent mutation of position 1038. Moreover, the activity and stability of Mut E-861 were determined. The results showed that the activity of this mutant was 5.5-fold higher than that of wild type, and the stability under low pH was improved at no expense of D-lactonohydrolase activity. After incubated at pH 6.0 and pH 5.0 the activity of D-lactonohydrolase could be retained 75% to 50%, however, compared with 40% to 20% for wild type.

Key words *Fusarium moniliforme* CGMCC 0536, D-lactonohydrolase, error prone PCR, DNA shuffling, screening, directed evolution

Received: April 11, 2005; Accepted: May 25, 2005.

This work was supported by the grants from the State Major Basic Research and Development Program of China (No. 2003CB716008) and the National Natural Science Foundation of China (No. 20476039).

* Corresponding Author. Tel/Fax: 86-510-5808498; E-mail: sunw@public1.wx.js.cn

国家重点基础研究发展规划(973)项目(No.2003CB716008)国家自然科学基金项目(No.20476039)资助

编辑部 http://journals.im.ac.cn

D-泛解酸内酯水解酶具有高度的立体选择性,可立体专一拆分 DL-泛解酸内酯,生成 D-泛解酸^[1-4]。本实验室对保存的菌种进行筛选并经诱变,得到一株具有很高 D-泛解酸内酯水解酶活力的串珠镰孢霉菌(*Fusarium moniliforme*) CGMCC 0536,并对该菌株的产酶条件和酶法拆分泛解酸内酯的过程以及酶的固定化进行了深入的研究^[1,2,5],目前该菌株已成功应用于工业化生产并取得了很好的综合效益。最近我们又克隆到了串珠镰孢霉菌(*Fusarium moniliforme*) CGMCC 0536 的 D-泛解酸内酯水解酶 cDNA,并分别在大肠杆菌和酿酒酵母中进行了活性表达^[6-8]。

在实际工业应用中发现,随着催化反应的进行,反应体系中中性的 D-泛解酸内酯被 D-泛解酸内酯水解酶水解成酸性的 D-泛解酸,反应体系中的酸性增强,pH 下降。随着催化反应的继续,反应体系的 pH 下降迅速。由于野生型的 D-泛解酸内酯水解酶最适催化 pH 为 7.0,对低 pH 耐受能力差,因此随着体系 pH 的降低,酶的催化活力也随之下降,为了使酶促反应能够顺利进行,必须向反应体系中持续地流加氨水,以使反应体系的 pH 维持在酶的最适催化 pH 范围内。如果酶长时间存在于该低 pH 体系中,酶即发生变性,絮凝,进而丧失活力。另外,正常催化条件下,野生型 D-泛解酸内酯水解酶的酶活力也需进一步提高^[9]。

由于对 D-泛解酸内酯水解酶的三维结构以及催化机制等信息了解得还不够充分,对其进行理性设计存在很大难度,因此不可能利用传统的蛋白质工程方法对 D-泛解酸内酯水解酶进行改造;而酶的定向进化是在 20 世纪 80 年代末 90 年代初迅速兴起的一种在生物体体外(试管中)模拟达尔文进化的、快速的、具有一定目的性的改造酶的方法^[10],在不需事先了解酶的空间结构和催化机制的条件下,通过各种突变方法向编码生物催化剂的基因中引入突变,突变的基因可以通过重组如 DNA 改组等方法进行重新组装。这些被改造的基因可以在合适的微生物宿主中进行表达,以生产性能得以提高的生物催化剂,利用筛选或选择的方法在较大的文库中获得具有目的性能的突变株。因此,利用酶的定向进化方法对 D-泛解酸内酯水解酶进行改造,在外加压力的作用下进行筛选,是目前提高 D-泛解酸内酯水解酶活力及工业化应用性能的最佳途径。

酶的定向进化关键在于筛选模型的建立,能否建立快速、灵敏、高效的筛选模型是定向进化研究成

败的关键^[10]。我们根据生物催化的特点,结合产物的性质,建立了两步法(two-step method)筛选系统,该系统利用加 pH 指示剂的琼脂平板进行初筛,获得具有活性的突变体,利用高效液相色谱进行复筛,以确定性能得到提高的突变体。该筛选系统的建立大大减小了定向进化过程的工作量,降低了劳动强度,并取得了很好的筛选结果。利用易错 PCR(error prone PCR)和 DNA 改组(DNA shuffling)方法并结合筛选,最终获得一株 D-泛解酸内酯水解酶活力较高和在低 pH 条件下稳定的突变体。

1 材料与方法

1.1 菌株与质粒

大肠杆菌 BLR(DE3)_{pLysS}[*F-ompT hsdSB (rB-mB-)* gal dcmΔ(*srl-recA*)_{306::Tn10}(DE3)_{pLysS}] 表达载体 pET20b,该质粒具有与大肠杆菌 DE3 相配套的信号肽,外源蛋白表达后,可被信号肽引导至大肠杆菌周质空间。菌株及质粒均由南京师范大学生命科学学院邵蔚蓝教授惠赠。

1.2 培养基、酶及试剂

大肠杆菌的 LB 培养基配制参照文献^[11],需要时使用前加入 34μg/mL 氯霉素、12.5μg/mL 四环素、100μg/mL 青霉素,固体培养基添加 1.5% 琼脂。Taq DNA polymerase、高保真 Pyrobest™ DNA polymerase、dNTPs、DNase I、EcoR I、Sal I 限制酶、T4 DNA 连接酶均为大连宝生物公司产品;DNA 纯化试剂盒、胶回收试剂盒购自上海华舜生物工程有限公司。D-泛解酸内酯由浙江鑫富股份有限公司提供。其它试剂均为国产分析纯试剂。

1.3 定向进化方法

1.3.1 筛选模型的建立:利用 D-泛解酸自身的特性,即可以使一些酸碱指示剂在一定的 pH 范围内变色,而 D-泛解酸内酯对指示剂的变色范围没有干扰,进行以下实验:

D-泛解酸内酯晶体紫外灯下照射灭菌,然后以不同的比例添加到 LB 培养基中,同时培养基中分别添加适量的 pH 指示剂并调节培养基的 pH 值。将一定量的菌体接到无菌水中,混匀后涂布平板,在 30℃ 下培养菌体 24~48h 后观察平板的变色情况及菌落的生长情况。

1.3.2 D-泛解酸内酯水解酶编码基因的易错 PCR 扩增:

(1) 易错 PCR 扩增:在引物 P1 CCGGAATTCGCTAA GCTTCCTTCATACGGC(划线区域为 *EcoR*I 酶切位点)

和引物 P2 ATTCCGGTCCGACCTAATCATAGAGCTTGG (划线区域为 *Sal* I 酶切位点)引导下进行易错 PCR 扩增。易错 PCR 反应参数为 :94℃ 30s ,56℃ 60s ,68℃ 90s ,重复 30 个循环后 72℃ 继续延伸 10min。用 1% 的琼脂糖凝胶电泳鉴定 PCR 产物。

(2) PCR 产物的回收纯化 :1% 琼脂糖凝胶电泳检测后利用胶回收试剂盒回收 PCR 产物 , -20℃ 保存。方法参见 DNA 胶回收试剂盒说明书。

(3) 突变重组质粒库的构建 :纯化后的 D-泛解内酯水解酶 cDNA 结构基因用 *Eco*R I 和 *Sal* I 37℃ 酶解 3h ,用 DNA 回收试剂盒回收 1146bp 的 DNA 片段。pET20b 质粒用 *Eco*R I 和 *Sal* I 37℃ 酶解 3h ,用 DNA 回收试剂盒回收。回收的目的片段和载体质粒连接 ,构建表达载体 pET20b-LAC-mut-ep 质粒库。

1.3.3 D-泛解内酯水解酶的 DNA 改组 :

(1) 基因随机片段化处理 :利用易错 PCR 获得的 4 种正向突变体基因作为 DNA 改组的材料。取一定量的 PCR 产物于 50 μ L 含 500mmol/L Tris-HCl、100mmol/L MgCl₂ (或 MnCl₂) 及 0.025u DNase I 的反应体系中 ,pH 7.4 ,15℃ 反应 10min ,20min ,30min ,40min ,50min ,60min ,100℃ 水浴加热 10min 使 DNase I 失活 ,用 2% 的琼脂糖凝胶电泳检测酶切的结果。如果已获得 100bp 左右的片段 ,则用低熔点琼脂糖回收 DNA 片段。

(2) 无引物的 PCR 扩增 :得到的小片段产物溶于适量水中 ,于 50 μ L 反应体系中 ,利用 Pyrobest™ DNA polymerase 进行无引物的 PCR 扩增 ,无引物的 PCR 反应参数为 :94℃ 40s ,58℃ 1min ,54℃ 1min ,50℃ 1min ,46℃ 1min ,72℃ 5min 重复 55 个循环后 72℃ 继续延伸 10min。取适量 PCR 产物 ,用 1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定 PCR 产物。

(3) 加入引物的 PCR 扩增 :取 1 μ L 1.3.3 中(2) 得到的无引物 PCR 产物于 50 μ L PCR 反应体系中 ,再加入 200 μ mol/L 的四种 dNTPs、50 pmol/L 的两种引物和 5u Pyrobest™ DNA 聚合酶 ,覆盖 50 μ L 矿物油进行 PCR 反应。PCR 反应参数为 :94℃ 40s ,56℃ 60s ,72℃ 90s ,重复 35 个循环后 72℃ 继续延伸 10min。取 5 μ L PCR 产物 ,用 1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定 PCR 产物。如无目的条带 ,则取 5 μ L 此产物为模板 ,按上述相同 PCR 条件再进行一次反应。经琼脂糖凝胶电泳检测到特异性目的条带后 ,回收 PCR 产物 , -20℃ 保存。

(4) 突变重组质粒库的构建 :方法同 1.3.2 中

(3) 构建表达载体 pET20b-LAC-mut-sh 质粒库。

1.3.4 突变重组质粒库转化大肠杆菌 :利用电转化将突变重组质粒库转化至宿主大肠杆菌 BLR(DE3) pLysS 中 ,大肠杆菌 BLR(DE3)pLysS 感受态细胞制作及电转化参照文献 [11] 的方法。

1.3.5 正向突变体的筛选 :转化的受体菌涂布到筛选平板上 ,30℃ 培养 24h 后置于 4℃ 低温处理 4h ,挑选菌落周围变黄且变色圈变色较早、较大的重组菌 ,正向转化子置于含 34 μ g/mL 氯霉素、12.5 μ g/mL 四环素、100 μ g/mL 青霉素 4mL LB 液体培养基中培养、诱导后收集菌体进行复筛鉴定。

1.3.6 阳性转化子的鉴定 :按文献 [11] 的方法抽提正向重组质粒。以抽提的正向重组质粒为模板 ,在引物 P1、P2 的引发下进行 PCR 扩增。PCR 反应参数为 :94℃ 40s ,56℃ 60s ,72℃ 90s ,重复 30 个循环后 72℃ 继续延伸 10min。取 5 μ L PCR 产物 ,用 1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定 PCR 产物。

1.4 诱导表达

挑取阳性克隆单菌落并接种于 4mL 含有浓度为 34 μ g/mL 氯霉素、12.5 μ g/mL 四环素、100 μ g/mL 青霉素的 LB 液体培养基中 ,于 37℃、250r/min 振荡过夜。取 1mL 培养物 ,转接于 50mL 含有浓度为 34 μ g/mL 氯霉素、12.5 μ g/mL 四环素、100 μ g/mL 青霉素的 LB 液体培养基中 37℃、250r/min 振荡至菌体浓度 OD_{600} 约为 0.8 左右。向培养物中加入 IPTG 至终浓度为 1mmol/L 诱导培养。收集菌体进行酶活力测定。

1.5 酶活力测定

具体方法参照文献 [1]

1.6 菌体蛋白含量的测定

按 Bradford 法测定^[12]。

1.7 突变基因序列测定

筛选到的阳性克隆 ,进行培养复筛 ,挑选酶活力高且酶在低 pH 条件下相对稳定的突变体提取质粒并用自动序列仪进行测序(由大连宝生物公司完成)。

1.8 最适 pH 的测定

取一定量的菌泥 ,分别在不同的 pH (3 ~ 7.5) 条件下进行催化反应 ,按 1.5 的方法测定不同 pH 条件下的酶活力。

1.9 pH 耐受性实验

取一定量的菌泥 ,分别在不同的 pH (3 ~ 7.5) 缓冲液中浸泡 30min ,然后离心(5 000 \times g、10min) ,按 1.5 酶活力测定方法测定酶活力。

分析对比

利用软件 DNAMAN 对测序结果进行分析,并根据基因序列推测氨基酸序列,然后经 Clustal X 软件对野生型 D-泛解酸内酯水解酶蛋白质序列与进化酶蛋白质序列进行对比。

2 结果

2.1 D-泛解酸内酯水解酶筛选模型的确定

根据中性的 D-泛解酸内酯在 D-泛解酸内酯水解酶的作用下生成酸性的 D-泛解酸的性质,可以利用酸碱指示剂指示底物的水解和酸性产物的生成。由于指示的 pH 范围略有差别,因此我们对溴甲酚紫、溴百里香酚蓝及中性红等 pH 指示剂分别进行试验。试验证明,溴甲酚紫平板能很好地检测 D-泛解酸内酯水解生成 D-泛解酸的反应结果。

对不同组分的筛选平板进行考察,发现影响平板变色的因素主要是培养基 pH, D-泛解酸内酯的添加量与 pH 指示剂的含量。通过实验,确定初筛平板组分为:10g/L 蛋白胨,5g/L 酵母膏,5g/L NaCl,1mmol/L IPTG,34 μ g/mL 氯霉素、12.5 μ g/mL 四环素、100 μ g/mL 青霉素、1%(W/V) D-泛解酸内酯以及 0.01%(W/V) 溴甲酚紫和 1.5%(W/V) 琼脂粉,培养基 pH 7.0。

2.2 基因随机突变

2.2.1 易错 PCR:在高离子浓度如 Mg^{2+} 或 Mn^{2+} 存在的条件下, Taq DNA 聚合酶的保真性大大降低,在延伸的过程中,一些碱基被错误地引入到基因中,从而使基因发生突变^[13-15]。从图 1(A)可以看出,通过控制 Mg^{2+} 或 Mn^{2+} 的离子浓度来控制突变率,成功扩增出了 D-泛解酸内酯水解酶突变基因,由于扩增体系中离子浓度的改变,对 Taq DNA 聚合酶的扩增效率和保真性都产生了影响,利用琼脂糖凝胶回收试剂盒去除 PCR 产物中的非特异扩增条带,并对胶回收产物进行浓缩,提高 PCR 产物的浓度,以利于后续的操作。

2.2.2 DNA 改组^[16,17]:

(1)目的性状的确立和模板的来源:利用易错 PCR 向 D-泛解酸内酯水解酶基因中引入突变,并构建突变文库,对突变文库进行筛选,挑选酶活力有明显提高的突变体基因作为 DNA 改组过程的初始材料,这不仅可以满足 DNA 改组对改组材料同源性的要求,而且提高了有益突变发生重组的几率。

(2)随机片段化处理 经试验表明, DNA 在 15 $^{\circ}$ C

经 DNase I 处理 20min 后,可以获得所需的 100bp 左右的小片段。由于 DNase I 酶切条件较难掌握和控制,另外短时间酶切反应不容易操作和控制,因此我们选择了降低酶量和延长时间来获得我们所需的目的产物。酶切结果见图 1(B),用低熔点胶回收 100bp 左右的片段,溶于适量的 ddH₂O 中,备用。

(3)无引物的 PCR 扩增:为了重新组合正向突变,采用具有一定同源性的片段自身重聚的方法来加以实现。在 Taq DNA 聚合酶的作用下,小片段互为引物,经过 60 个左右的循环,获得了在电泳图上呈现弥散的扩增产物,结果见图 1(C),该图表明经过数轮的循环,小片段进行了有效的重组。

(4)加入引物的 PCR 扩增:利用无引物 PCR 产物为模板,在引物 3、引物 4 的引发下,进行 PCR 扩增,从图 1(D)中可以看出,在约 1.1kb 处有一明显的 DNA 条带。这表明,利用该过程,扩增到了我们所需要的基因片段。

2.3 突变体的筛选

2.3.1 突变体的初选:对易错 PCR 和 DNA 改组的产物进行纯化,并用 Eco R I 和 Sal I 进行酶切,酶切产物与用相同内切酶处理的质粒 pET20b 进行连接,构建突变质粒库。连接产物电转化至大肠杆菌 BLR (DE3) $pLysS$ 感受态细胞中,构建突变体库。转化后的大肠杆菌培养液涂布于筛选平板上,在 30 $^{\circ}$ C 下培养约 48h,对突变体进行筛选。具有 D-泛解酸内酯水解酶活力的正向突变体菌落周围由紫色变成黄色,酶活力越高变色圈越大、变色时间越早;而不具有 D-泛解酸内酯水解酶活力的负突变体菌落周围颜色则不发生改变,具体见图 2(a)。以上结果表明,本研究构建的平板筛选模型适合 D-泛解酸内酯水解酶定向进化过程中对突变体库的筛选。

将筛选到的不同酶活力的突变菌株以及反向突变株在同一个筛选平板上划线,并进行培养对比。划线培养结果进一步证明正向突变株可以使紫色的平板变黄,而反向突变株则不能。而且在相同的培养条件下,酶活力不同的突变体使平板变黄的能力也不同,酶活力高平板变黄的时间早。培养相同时间,酶活力高的突变体使平板变黄的范围大,而酶活力低的则正相反,划线培养结果见图 2(b)。选择酶活力高,并且在低 pH 环境中稳定的突变体酶基因作为下一轮进化的出发材料,进行新一轮的定向进化实验,直至突变体酶的性质达到要求。

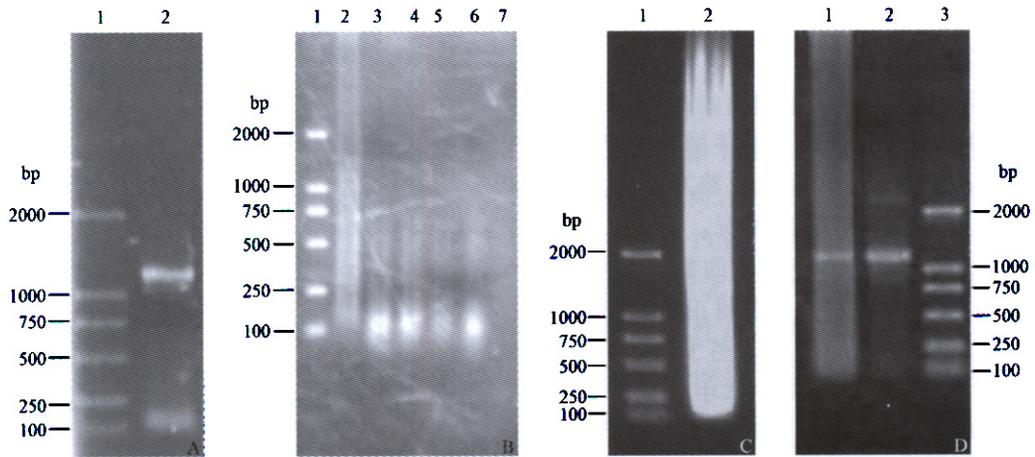


图1 易错 PCR 及 DNA 改组结果图

Fig. 1 The results of error prone PCR and DNA shuffling

- (A) Error prone PCR products of D-lactonohydrolase gene. 1: DNA ladder DL-2000; 2: products of Error prone PCR.
 (B) Product of DNase I digestion. 1: DNA ladder DL-2000; 2, 3, 4, 5, 6, 7: the product of DNase I digestion with different time.
 (C) Detection of self-reassembly PCR. 1: DNA ladder DL-2000; 2: the product of self-reassembly PCR (after 60 cycles).
 (D) Detection of PCR with primers. 1, 2: the products of high-fidelity PCR; 3: DNA ladder DL-2000.

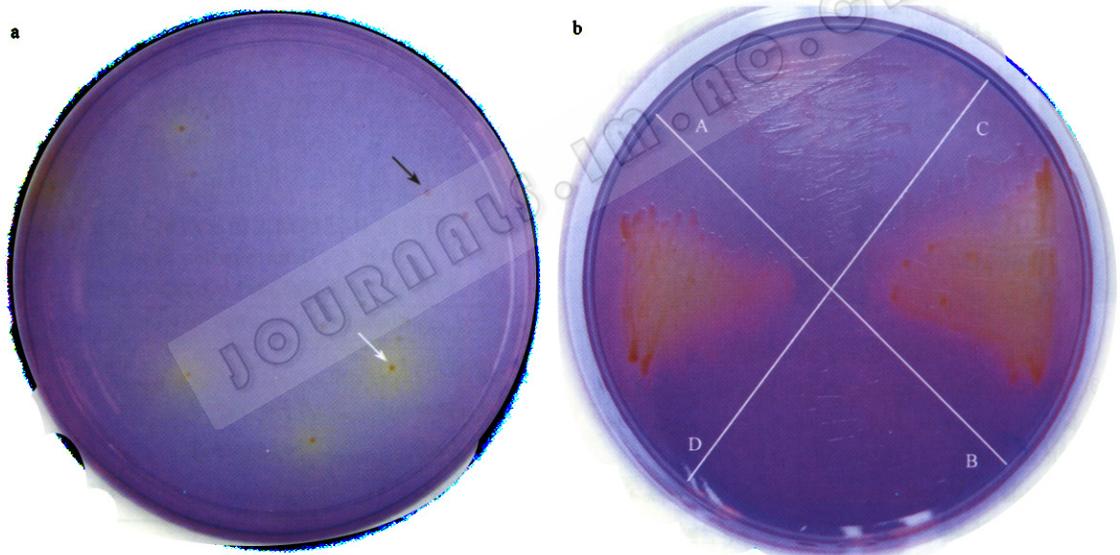


图2 突变体的筛选

Fig. 2 Screening for mutants on the screening plate

- a: Single positive mutant marked by white arrow and negative mutant marked by black arrow on the screening plate;
 b: Comparisons of negative mutants(A and B) with positive mutants(C and D).
 D-lactonohydrolase of the mutant on region C is higher than that of on region D.

在三轮易错 PCR 向 D-泛解酸内酯水解酶基因中引入突变的定向进化过程中,我们利用筛选平板对大约 50 000 个突变体进行了初筛,获得具有 D-泛解酸内酯水解酶活力的突变体 16 株。而在利用 DNA 改组方法对 D-泛解酸内酯水解酶进行定向进化过程中,我们对大约 20 000 株突变体进行了初筛,筛选到具有 D-泛解酸内酯水解酶活力的突变体 27 株。

2.3.2 突变体的复选:利用复筛方法即高效液相色谱分别对以易错 PCR 方法和 DNA 改组方法在定向进化过程中获得的 43 株突变体进行复筛,其中用易错 PCR 方法有 4 株突变体的酶活力和低 pH 条件下的稳定性较野生型 D-泛解酸内酯水解酶高。而用 DNA 改组方法获得的 27 株突变体的活力和在低 pH 条件下的稳定性都高于野生型酶,其酶活力和稳定性也高于易错 PCR 方法获得的突变株。最终获得

一株酶活力和低 pH 条件下稳定性最好的突变株, 其编号为 Mut E-861。

2.4 突变体 PCR 鉴定结果

产生黄色变色圈的突变株在液体培养基中进行培养, 然后抽提重组质粒。以重组质粒为模板, 进行 PCR 扩增, 鉴定重组质粒的构建情况。图 3(A) 为用易错 PCR 方法获得的正向突变体的鉴定结果, 而图 3(B) 则是对用 DNA 改组方法获得正向突变体进行 PCR 鉴定的结果。由图 3(A) 及图 3(B) 可以看出, 利用 PCR 方法, 以从正向突变体中抽提的重组质粒 pET20b-LAC-mut 为模板, 扩增到了预期的 1.1kb 左右的条带, 而利用空载体质粒 pET20b 为模板, 在相同条件下进行扩增不能获得任何产物。这表明重组质粒构建成功并已转入宿主细胞 BLR(DE3) pLysS 中。

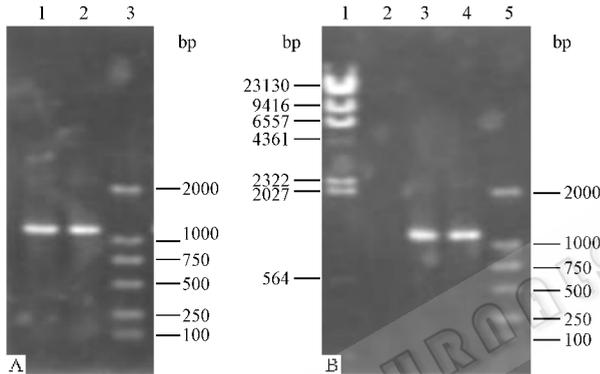


图 3 正向突变体的 PCR 鉴定

Fig. 3 Identification of positive mutant by PCR method

A. 1: sample 1 of products by PCR amplification; 2: sample 2 of products by PCR amplification; 3: DL2000 DNA marker.

B. 1: λ DNA/Hind III DNA marker; 2: control sample; 3: sample 1 of products by PCR amplification; 4: sample 2 of products by PCR amplification; 5: DL2000 DNA marker.

2.5 进化酶与野生型酶最适 pH 的测定及酶活力对比

酶反应水解液的 pH 值超过 7.5, 非酶催化反应明显, 影响产物的光学纯度, 因此实验室研究和实际工业化生产一般控制 pH 在 7.5 以下, 以降低副反应的影响, 获得光学纯度高的产物^[1,2,9]。

基于以上的考虑, 本研究在 pH 3.0 ~ 7.5 之间进行 pH 对酶的影响实验。试验结果表明(见图 4), 在 pH 4 ~ 7.5 之间野生型酶(*E. coli* BLR(DE3) pLysS/pET20b-LAC)与进化酶(Mut E-861)都具有 D-泛解酸内酯水解酶活力, 野生型 D-泛解酸内酯水解酶的最适 pH 值为 pH 7.5, 而进化酶的最适 pH 值则为 pH 7.0。这表明经过三轮易错 PCR 和一轮 DNA

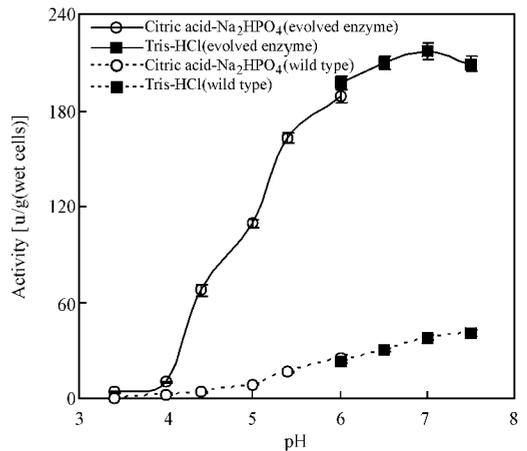


图 4 不同 pH 条件下野生型 D-泛解酸内酯水解酶和进化酶酶活力测定

Fig. 4 Determination of activity of wild-type and evolved D-pantono-hydrolyase at different pH

改组改造后, D-泛解酸内酯水解酶的最适催化 pH 发生了改变。

分别在最适 pH 条件下测定野生型与进化酶酶活力, 测定结果见表 1, 由表可知 D-泛解酸内酯水解酶经过定向进化改造后, 酶活力有了很大提高, 进化酶酶活力约是野生型酶酶活力的 5.5 倍。

表 1 野生型 D-泛解酸内酯水解酶与进化酶酶活力测定

Table 1 Determination of activities of wild type and evolved enzyme

Strains/plasmid	Activity[u/g wet cells]
<i>E. coli</i> BLR(DE3) pLysS	0
<i>E. coli</i> BLR(DE3) pLysS/pET20b-LAC	0
<i>E. coli</i> BLR(DE3) pLysS/pET20b-LAC-IPTG	39.5
Mut E-861	217.0

2.6 进化酶与野生型酶 pH 耐受性实验

分别将野生型 D-泛解酸内酯水解酶和进化酶置于不同 pH 缓冲液中处理 30min, 然后对酶的残余活力进行测定。野生型 D-泛解酸内酯水解酶和进化酶经各种 pH 缓冲液处理后, 活力都有明显下降, 进化酶在 pH 6.0 及 pH 5.0 缓冲液中处理后, 残余的酶活力分别是原来的 75% 和 50%, 而在相同条件下, 野生型酶只能保持原来酶活力的 40% 和 20%, 具体结果见图 5。这表明经过定向进化改造后, D-泛解酸内酯水解酶在低 pH 条件下稳定性得到了较大的提高。

2.7 进化酶与野生型酶序列比较结果

突变后的基因委托大连宝生物公司进行测序。

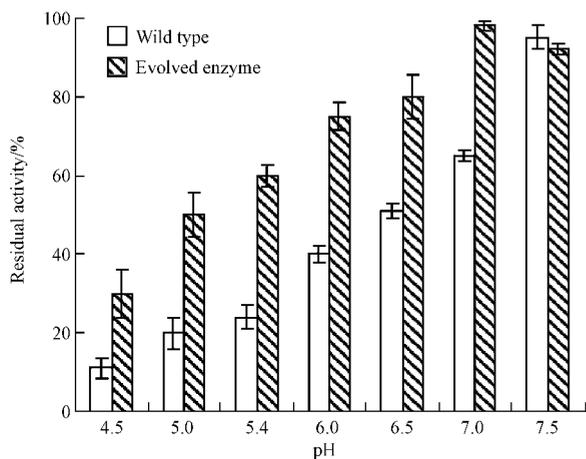


图5 不同 pH 条件下野生型 D-泛解酸内酯水解酶与进化酶残余酶活力对比

Fig. 5 Comparison of residual activity between wild type and evolved D-pantonohydrolase under different pH situation

将野生型与突变体酶基因序列进行对比,部分突变体基因碱基及氨基酸变化情况见表2。测序结果表明,利用易错 PCR 和 DNA 改组的方法,成功地向 D-泛解酸内酯水解酶基因引入了突变,其中酶活力最高、pH 稳定性最好的 Mut E-861 突变体酶基因有 3 个碱基发生了突变。

表2 部分突变体中碱基及氨基酸的变化

Table 2 Base and amino acid substitution

Strains	Base site	Base	Amino acid
Mut A-81	665	T changed to A	silent
	1038	T changed to G	silent
	352	A changed to C	K changed to Q
Mut C-437	1035	T changed to C	silent
	1038	T changed to G	silent
Mut C-1559	3	G changed to A	V changed to I
	1038	T changed to G	silent
	352	A changed to C	K changed to Q
Mut E-861	721	G changed to A	V changed to I
	1038	T changed to G	silent
Mut H-457	721	G changed to A	V changed to I
	1038	T changed to G	silent

根据基因序列推测氨基酸序列并经 Clustal X 软件比对后发现进化酶 Mut E-861 的酶蛋白上有两个位点的氨基酸残基发生了突变(即 118 位的 K-Q 和 241 位的 V-I),另外一个突变为沉默突变。

3 讨论

3.1 D-泛解酸内酯水解酶进化策略

连续易错 PCR 可以使小的有益突变积累而产生较大的提高,因此我们采用了三次易错 PCR。但毕竟在易错 PCR 过程中,遗传变化只发生在单一分子内部,属于无性进化,完全依赖易错 PCR 实现酶性质的实质性提高有一定难度,因此我们把易错 PCR 和 DNA 改组结合起来对 D-泛解酸内酯水解酶进行改造。利用易错 PCR 向基因中随机引入突变,然后对突变体基因进行筛选,获得正向突变体,将这些正向突变体作为 DNA 改组的材料,进一步向基因中引入突变,以提高突变体酶的操作性能。在该策略中我们利用易错 PCR 不仅成功地向基因中引入了突变,而且有效地控制了突变率,合理地降低了突变体库的容量。同时,利用易错 PCR 技术为利用单一基因作为出发材料进行改造创造了条件,随机突变的引入,带来了基因的多样性,同时具有不同突变点的基因由于来源于同一个野生型基因,因此具有较高的同源性,这些都为 DNA 改组准备了条件,并为酶蛋白改造的有效性提供了保证。无性进化技术(易错 PCR)和有性进化技术(DNA 改组)的结合^[18],两者互相弥补,克服了单一方法存在的缺点,也是蛋白质定向进化技术的一个发展。

3.2 突变库的构建与筛选

为了使突变体酶能在平板上进行活性筛选,有必要提高酶和底物接触的几率,因此必须考虑底物进出细胞壁的难易程度,另外经诱导表达的外源蛋白应呈可溶的活性形式,并尽量被分泌到胞外,这样才有利于催化反应的发生和进行,使有 D-泛解酸内酯水解酶活力的菌株在筛选平板上能被有效地检测出来。基于以上考虑,我们选择了自身带有溶菌酶基因的大肠杆菌 BLR(DE3)_{pLysS} 作为构建突变体库的宿主,经 IPTG 的诱导,在 T7 强启动子的控制下,溶菌酶基因进行低水平表达^[19]。胞内表达的溶菌酶会对细胞壁进行降解,再经低温处理后,大肠杆菌细胞壁通透性增强,有利于底物 D-泛解酸内酯进入细胞内以及酶的渗出。由于溶菌酶基因进行的是低水平表达,而且大肠杆菌的分泌表达一般是将表达产物分泌到周质空间,因此不会对 D-泛解酸内酯水解酶基因的表达产生大的影响。细胞周质的环境

与细胞质不同, D-泛解酸内酯水解酶分泌到大肠杆菌的周质空间中有可能提高溶解性。此外表达产物分泌到周质空间还有以下优点: ①周质空间中蛋白水解酶的含量比细胞质中少, 有利于减少对目的酶的降解; ②有利于减少 D-泛解酸内酯水解酶高表达对宿主菌的毒性。因此, 我们选用了含有信号肽序列的质粒 pET20b 作为外源基因导入到大肠杆菌感受态细胞的载体, 大肠杆菌 DE3 具有该信号肽的识别系统, 当由信号肽引导的表达产物进入到周质空间后, 信号肽序列被从表达产物一端正确切下, 表达产物经重新折叠后, 形成有活性的酶。载体 pET20b 与宿主 BLR(DE3)pLysS 的配合使用, 可以使宿主菌产生的重组酶泄露到胞外, 进一步增加底物与酶接触的几率, 使利用平板进行活性筛选更加可行有效。

大肠杆菌的最佳生长温度是 37℃。但对于外源基因的表达产物而言, 30℃的表达产物比 37℃的表达产物明显稳定, 而且培养温度的改变会影响基因表达产物的表达方式, 在 25~30℃下进行诱导表达, 表达产物易以可溶的活性状态存在, 而在较高温度如 37℃进行培养表达时, 表达产物常会形成不可溶的包涵体^[20]。另外, 随着温度的降低, 重组菌的代谢速度明显下降, 外源基因的表达速度减慢, 这样就给表达产物的转运和正确折叠提供了条件, 一定程度上防止了包涵体的形成。在对 D-泛解酸内酯水解酶进行定向进化研究过程中, 要求进化酶必须以可溶的活性形式在宿主菌内进行表达, 因此在对突变体进行筛选时, 我们将培养温度控制在 25~30℃之间。

筛选方法在定向进化中显得极其重要。传统的随机筛选法工作量很大, 花费时间多, 随机性大, 费用也高, 成为定向进化进一步发展的瓶颈。运用已掌握的遗传学和生物化学方法及对酶蛋白和底物与产物的了解, 我们构建了一种简单、有效、经济的平板筛选方法, 利用产物形成, 并结合 pH 指示剂来对突变体库进行筛选。在筛选过程中发现, 菌落周围黄色变色圈变色的时间越早、变色圈也越大, 突变体的 D-泛解酸内酯水解酶的活力越高, 低 pH 条件下的稳定性越强。筛选结果表明, 该筛选方法直观、简单、高效, 具有一定的可操作性。利用筛选平板对突变体库进行筛选明显地降低了筛选过程的工作量。这一策略也可以用于在筛选平板上直接筛选热稳定

性高的酶、酸性条件下活性高的酶等改造蛋白质的定向进化。另外, 利用 HPLC 对初筛获得的正向突变体进行复筛, 提高了筛选结果的准确性和精确性。

3.3 突变体酶活及 pH 稳定性提高机理初探

筛选到的正向突变体进行测序分析, 发现在所有的正向突变体中第 1038 处的碱基都由 T 突变为 G, 但这一突变并没有引起组成 D-泛解酸内酯水解酶氨基酸的变化, 对该突变点进行回复突变, 酶活力也没有发生改变, 这表明该突变点对酶活力的提高没有贡献, 但它有可能对于 D-泛解酸内酯水解酶基因在 *E. coli* BLR(DE3)pLysS 中的表达有一定作用。通过对比还发现 A352C 突变、G721A 突变对酶活力的贡献最大。例如带有 A352C 突变的突变株 Mut C-437 和带有 G721A 突变的突变株 Mut H-457 酶活力分别比野生型 D-泛解酸内酯水解酶活力提高 2.4 倍和 2.7 倍。而带有 A352C 突变、G721A 突变以及 1038 处沉默突变的突变株 Mut E-861 的酶活力比野生型酶活力提高 5.5 倍, 同时其在低 pH 条件下的稳定性也有很大的提高, 据此我们也可以推断 A352C 突变和 G721A 突变对提高酶的稳定性有很大的作用。由于碱基的突变而使氨基酸发生取代, 改变了组成 D-泛解酸内酯水解酶的氨基酸原子间的相互作用, 也有可能使底物和酶催化位点更加“靠近”, 从而增强了酶的催化活力和稳定性。以上只是对酶活力和低 pH 环境下酶稳定性提高的初步探讨, 要对酶性能得以提高的原因作深入的认识和理解, 需对酶的高级结构进行进一步的研究。

致谢 感谢中国科学院上海生物化学与细胞生物学研究所袁中一教授、杨晟博士, 南京师范大学生命科学学院邵蔚蓝教授, 江南大学工业生物技术教育部重点实验室诸葛健教授、王正祥教授、金坚教授、许正宏博士、沈微博士在实验过程中给予的指导和帮助; 感谢美国 Illinois 大学 Zhao H 教授提供相关资料。

REFERENCES(参考文献)

- [1] Tang YX, Sun ZH, Hua L *et al.* Kinetic resolution of DL-pantolactone by immobilized *Fusarium moniliforme* SW-902. *Process Biochem*, 2002, **38**: 545-549
- [2] Hua L, Sun ZH, Zheng P *et al.* Biocatalytic resolution of DL-pantolactone by glutaraldehyde cross-linked cells of *Fusarium moniliforme* CGMCC 0536. *Enzyme Microb Technol*, 2004, **35**: 161

- [3] Kataoka M, Shimizu K, Sakamoto K *et al.* Lactonohydrolase-catalyzed optical resolution of pantoyl lactone : selection of a potent enzyme producer and optimization of culture and reaction conditions for practical resolution. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1995, **44** : 333 – 338
- [4] Lanzillotta RP, Bradley DG, Mcdonald KM. Microbial reduction of ketopantoyl lactone to pantoyl lactone. *Appl Microbiol*, 1974, **27** : 130 – 134
- [5] Sun ZH (孙志浩). Process for preparing D-pantoyl lactone by microbe enzyme method. Chinese Patent(中国专利) 01104070. X, 2001
- [6] Sun ZH(孙志浩), Liu ZQ(柳志强). Cloning, expression and application of D-lactonohydrolase cDNA. Chinese Patent(中国专利) 200410041614. 0, 2004
- [7] Liu ZQ, Sun ZH. Cloning and expression of D-lactonohydrolase cDNA from *Fusarium moniliforme* in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotech Lett*, 2004, **26** : 1861 – 1865
- [8] Liu ZQ(柳志强), Sun ZH(孙志浩). Cloning and expression of *Fusarium moniliforme* CGMCC 0536 D-lactonohydrolase gene in *Escherichia coli*. *Chinese Journal of Biotechnology(生物工程学报)*, 2005, **21** : 52 – 57
- [9] Tang YX(汤一新). Optical resolution of racemic pantolactone with a fungal enzyme, D-lactonohydrolase. Southern Yangtze University Master Degree Thesis(江南大学硕士学位论文), 2002
- [10] Kong XD, Liu YM, Gou XJ *et al.* Directed evolution of a-aspartyl dipeptidase from *Salmonella typhimurium*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2001, **289** : 137 – 142
- [11] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular cloning : A laboratory manual. 3rd ed. New York : Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001
- [12] Ausubel FM, Brent R, Kingston RE. Short Protocols in Molecular biology. 3rd ed. New York : John Wiley & Sons, Inc., 1995
- [13] Leung DW, Chen E, Goeddel DV. A method for random mutagenesis of a defined DNA segment using a modified polymerase chain reaction. *Technique*, 1989, **1** : 11 – 15
- [14] Caldwell RC, Joyce GF. Randomization of genes by PCR mutagenesis. *In PCR Methods Applic*, 1992, **2** : 28 – 33
- [15] Cadwell RC, Joyce GF. Mutagenic PCR. New York : Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1994
- [16] Stemmer WPC. DNA shuffling by random fragmentation and reassembly——*in vitro* recombination for molecular evolution. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, **91** : 10747 – 10751
- [17] Stemmer WPC. Rapid evolution of a protein *in vitro* by DNA shuffling. *Nature*, 1994, **370** : 389 – 391
- [18] Xu HF(徐卉芳), Zhang XE(张先恩), Zhang YM(张用梅) *et al.* Recent advances in *in vitro* molecular directed evolution. *Prog Biochem Biophys(生物化学与生物物理进展)*, 2002, **29** : 518 – 522
- [19] Studier FW. Use of bacteriophage T7 lysozyme to improve an inducible T7 expression system. *J Mol Biol*, 1991, **219** : 37 – 44
- [20] Chalmers JJ, Kim EK, Telford JN *et al.* Effects of temperature on *Escherichia coli* overproducing beta-lactamase or human epidermal growth factor. *Appl Environ Microbiol*, 1990, **56** : 104 – 111