

文章编号 1000-5013(2005)02-0113-04

# 酶体外定向进化( ) 文库筛选的方法及其应用

方柏山 洪 燕 夏启容

(华侨大学材料科学与工程学院, 福建 泉州 362021)

**摘要** 定向进化是改造蛋白质分子的一种有效的新策略,但其构建的文库非常大,待筛选的克隆常常多达  $10^5 \sim 10^{10}$ . 同时在目的酶筛选中,至关重要的是找到高灵敏度、高选择性和高通量的筛选方法. 居于此,文中综合评述在突变株分离、酶检测和信号探测等方面,目前的一些常用技术及其最新进展.

**关键词** 酶, 筛选, 定向进化

**中图分类号** Q 349+.5; Q 785; Q55

**文献标识码** A

突变基因文库构建之后,文库筛选方法的确定决定了酶体外定向进化的方向和成功与否. 据此, You 和 Arnold 称之为定向进化的第一定律<sup>[1]</sup>. 由于突变基因文库往往被亚克隆并在微生物中表达,因此对大量微生物细胞的筛选首先要用物理手段分离各个细胞,以便有效地检测到单个细胞或单个细胞的克隆. 然后,用酶检测技术或其他信号探测技术进行检测. 筛选的有效性在很大程度上,取决于酶检测技术的水平和各种信号探测技术的应用. 在前文阐述基因文库构建技术及其新进展的基础上<sup>[2]</sup>,本文仅就突变体分离、酶检测和信号探测 3 方面,综述文库筛选的方法及其应用.

## 1 突变体分离

由于大多数酶检测方法还不能对群体细胞分别予以逐一分析,所以挑选含有突变体的群体细胞尤为重要. 它关系到筛选的规模 and 效果. 目前见报道的突变体分离方法主要有琼脂板涂布法、微孔板悬浮法、微球细胞固定化法和流式细胞计数仪法等.

### 1.1 琼脂板涂布法

琼脂平板法是一种传统的筛选方法,是在特殊条件下(如利用营养缺陷型或添加抗生素的培养基、高温、酸碱性环境等)培养突变菌. 通过宿主菌的生长与不生长、培养基颜色变化、特定反应的出现等,判断是否具有目的基因. 例如, Bornscheuer 等人<sup>[3]</sup>在酯酶的定向进化过程中,采用在琼脂平板中加入中性红或结晶紫指示剂的方法进行筛选. 但有时由于产物扩散会导致信号减弱,从而影响检测与分离. 为了克服这一问题,可使用可溶性底物生成带有颜色或者荧光的不溶性产物. 最近 Loo 等人<sup>[4]</sup>提出一种对环氧化物水解酶平板筛选的新方法. 由于 *E. coli* 中环氧化物水解后得到的二醇具有氧化能力,而被氧化的 NADH 的释放通过呼吸链使得膜电势升高,产生强质子流,增强了细胞对番红 O 的摄入,并使得番红 O 在细胞内聚集. 具有环氧化物水解酶活力的克隆显示均匀的桃红色,而无活力的克隆则有一个透明圈. 通过这种琼脂平板涂布, Loo 等人对环氧化物水解酶的高对映选择性进行了定向进化.

### 1.2 微孔板悬浮法

微孔板悬浮法也被广泛使用<sup>[5]</sup>,并且已经从 96 孔发展到 384 孔甚至更多. 徐卉芳等人<sup>[6]</sup>利用 96 孔板对高活性的大肠杆菌碱性磷酸酶进行了筛选. 他们通过在含生色底物平板上培养,挑取具有活性的

**收稿日期** 2004-09-30

**作者简介** 方柏山(1957-),男,教授,博士,主要从事生物反应工程和酶工程的研究. E-mail:fangbs@hqu.edu.cn

**基金项目** 国家自然科学基金资助项目(20276026, 20446004);福建省科技计划重点课题基金资助项目(2003J020)

克隆接种到 96 孔板中检测 595 nm 处吸光度. 然后, 检测对硝基苯磷酸(pNPP)去磷酸后生成的对硝基苯(pNP)在 405 nm 处的吸光度. 建立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, 有效地扩大筛选库容量, 降低筛选强度. 但微孔板法也存在种种问题. 例如, 目前流体分配技术的限制, 在开放体系中随着比表面积的增高导致蒸发作用显著, 毛细现象的出现等. 现已开发出微流芯片的新高通量筛选技术<sup>[7]</sup>.

### 1.3 微球细胞固定化法

Freeman 等人<sup>[8]</sup>设计的微珠固定化方法, 通过物理手段使单个细胞附着在单个固体珠上, 只需一轮就能对达百万个突变体进行分离和筛选. 这种方法能被任何只有普通实验条件的实验室所用, 普遍使用的底物和生成可溶性产物也同样能获得好的筛选结果, 并且能与数字成像系统结合使用.

### 1.4 流式细胞计数法

流式细胞计数(Flow Cytometry)法是一种快速分离细胞的方法. 通过流式细胞计数仪(又称荧光激活细胞分离器, Fluorescence Activated Cell Sorter, FACS), 能够在一天之内对高达  $10^9$  的突变文库进行筛选. FACS 主要原理是细胞经荧光染色后, 通过高速流动系统, 细胞排成单行, 逐个流经检测区进行测定. 用 FACS 分离细胞准确快速, 能保持细胞活力, 并可在无菌条件下进行, 目前已有较多的使用.

## 2 酶检测

在大多数筛选中, 酶的浓度低, 反应能力相对很弱, 所以最好通过其特异的酶促反应进行检验. 通过观察酶促反应时的现象或检测释放的能量、中间产物、抑制剂等, 可以用来筛选高活力的目的酶.

### 2.1 通过酶促反应的特征

当突变体酶可赋予宿主细胞或菌落易观察的表型时, 很容易对含有  $10^6$  个以上的蛋白质突变体的文库进行筛选. 例如, 苏氨酸醛缩酶能催化苏氨酸分解成乙醛和氨基乙酸, 根据乙醛对细胞有毒性, Lee 等人<sup>[9]</sup>对 *L*-苏氨酸醛缩酶进行定向进化. 菌落分泌出有活性的蛋白酶, 可在含有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. 碘-淀粉法是筛选产淀粉酶菌株的常规方法, 具有方便直观的特点. 直接供试平板倒碘液来筛选产生菌, 虽然操作简单, 但对供试菌的生理特性有一定影响. 例如, 菌体容易死亡, 不能继续培养, 且易造成污染. 锥虫兰鉴别培养基可克服以上缺点, 对淀粉酶及其产生菌无任何不良影响, 透明圈非常明显<sup>[10]</sup>.

### 2.2 加入底物显色

在无标记底物条件下, 普遍使用通过酶促反应产生颜色变化或荧光变化的高通量筛选方法, 因为所需的费用较低. 典型的方法是加入生色的 pH 指示剂, 如甲酚红或溴甲酚紫等<sup>[5, 11]</sup>. 在标记底物方面, 由硝基苯酚生成的酯类和醚类化合物、伞形花内酯, 由硝基苯胺或氨基香豆素生成的酰胺类化合物, 都是较常见的生色或荧光底物. 它们通常用于检测糖苷酶、脂肪酶、酯酶和蛋白酶等. 最近有通过  $\gamma$ -消除反应, 释放荧光性的伞形花内酯报告分子, 从而检测乙醇脱氢酶的报道<sup>[12]</sup>.

### 2.3 荧光共振能量转移

相对上述直接激发荧光团来讲, 较温和的方法是荧光共振能量转移(FRET). 它的最大优势是在活细胞生理条件下, 实时地对细胞内蛋白质-蛋白质相互作用进行动态研究. 利用 FRET 底物是探测裂解反应的最有效的手段之一. FRET 底物通常由荧光团和猝灭剂这两个部分构成. 由于酶键的断裂导致荧光团-猝灭剂或荧光团-荧光团对的分开, 释放荧光或在波长上有变化从而进行检测. Georgiou 等人<sup>[13]</sup>利用 FRET 对 Omp T 蛋白酶活性进行了定向进化. 其 FRET 底物由 Tetramethylrhodamine (Q) 和 BIODIPY (FI) 构成. 当底物与蛋白酶结合后, FI 被 Q 猝灭, 从而释放出红色荧光; 当蛋白酶酶键断裂时, FI 与 Q 分离, 释放出绿色荧光. 用这种方法得到了活性提高了约 60 倍的突变体. 最近有人用光子交叉相关和 FRET 分析, 进行磷脂酶活性的检测<sup>[14]</sup>.

### 2.4 同位素标记底物

酶检测中存在的问题之一是如何提高对具有高对映选择性克隆的筛选能力. Reetz 等人<sup>[15]</sup>提出多种基于同位素标记底物的解决办法. 但是它们需要昂贵的同位素标记试剂, 从而限制了它的使用.

### 2.5 通过检测底物消耗或产物生成进行终点检测

此外,还可以通过检测底物消耗量或者酶促反应中,生成的功能性基团的方法达到检测酶活的目的。例如, Henke 等人<sup>[16]</sup>利用荧光胺试剂检测产物中的胺,从而检测酰胺酶的活性。Tsotsou 等人<sup>[17]</sup>设计出一种通过检测 NAD(P)H 氧化反应的次级产物的方法,进行高通量筛选。Jestin 等人<sup>[18]</sup>对这类方法进行详尽的综述,并且对体外筛选和体内筛选进行比较。

### 3 信号探测

信号探测是对此轮筛选中较理想的突变体进行分析和处理,为下一轮筛选做准备。很多信号都可以通过分光光度、气相色谱、高效液相色谱、质谱、核磁共振等常用手段或者几种方法偶联而探测得到。当很多活跃的克隆距离较近,或者整个群体活性都较高的情况下,定量分析特定克隆的活性尤为重要。为了克服这一困难,发展了很多种数字成像系统。成像系统与显微镜的结合,还可以在相对较小的区域检测大数量的克隆(每平方厘米数百个)<sup>[19]</sup>。

#### 3.1 分光光度计和荧光酶标仪

常见的吸光度变化、颜色或荧光信号等,可以通过分光光度计、荧光酶标仪等设备进行检测。为了满足高通量甚至超高通量筛选的要求,它们也需要微型化,并同时保持高灵敏度。应用微孔板分光光度计进行酶分子定向进化的例子已有很多<sup>[20]</sup>。

#### 3.2 气相色谱和高效液相色谱

根据气相色谱、高效液相色谱对于性质极为相似的组分,如有机化合物的同分异构体、顺反异构体、旋光异构体等具有较强的分离和定量分析的能力,利用这些仪器可以对酶分子的立体选择性和对映选择性进行筛选。Liebeton 等人<sup>[21]</sup>利用气相色谱对具有高对映选择性的脂肪酶进行筛选。他们将表达脂肪酶的细胞,用吸液管移入两个分别含有 *R*-对映体和 *S*-对映体的微量滴定板的微孔中。通过光度计检测后,选出表现出高对映选择性的克隆。先消旋底物,再用手性气相色谱对反应产物进行分析。

#### 3.3 质谱和核磁共振

质谱、蛋白质印记(Western Blot), ELISA(酶联免疫吸附测定法)和定量 PCR 等方法,能够高度灵敏地对酶分子表达量进行检测。有一些酶不易通过酶促反应进行筛选,也不适合通过生色或荧光检测。当对筛选的速度具有高要求时,可以利用质谱和核磁共振设备进行快速筛选<sup>[22]</sup>。

### 4 结束语

随着定向进化技术的发展,如何快速从突变体库中筛选出我们所需要的基因是最关键的问题。因此,定向进化技术把筛选方法放在首位。从选择突变方法到构建突变文库、加入底物培养反应、根据信号分析处理、选择最接近于理想状态的突变体进行下一轮突变和筛选,直到最后获得具有新性能或功能的基因和酶,这是一个系统工程。每一步的选择都会对后续工作产生影响。所以在实验之前,应该考虑到酶的类型、性能、产物类型、操作条件甚至胞内物质以及所加介质对过程的影响。从而,制定有效且灵敏的筛选手段和设备。

### 参 考 文 献

- 1 You Lingchong, Arnold F H. Directed evolution of subtilisin E in *Bacillus subtilis* to enhance total activity in aqueous dimethylformamide[J]. Protein. Eng., 1996, 9:77~83
- 2 方柏山,郑媛媛. 酶体外定向进化( )——突变基因文库构建技术及其新进展[J]. 华侨大学学报(自然科学版), 2004, 25(4):337~342
- 3 Bornscheuer U T, Altenbuchner J, Meyer H H. Directed evolution of an esterase: Screening of enzyme libraries based on pH-indicators and a growth assay[J]. Bioorganic & Medicinal Chemistry, 1999, 7:2 169~2 173
- 4 Loo V B, Harald J, Spelberg L. Directed evolution of epoxide hydrolase from *A. radiobacter* toward higher enantioselectivity by Error-prone PCR and DNA Shuffling[J]. Chemistry & Biology, 2004, 11:981~990
- 5 Knaust R K C, Nordlund P. Screening for soluble expression of recombinant proteins in a 96-well format[J]. Analytical Biochemistry, 2001, 297:79~85

- 6 徐卉芳,张先恩,张治平等. 大肠杆菌碱性磷酸酶的体外定向进化研究[J]. 生物化学与生物物理进展, 2003, 30(1): 89~94
- 7 Gibbons I. Microfluidic assays for high-throughput submicroliter assays using capillary electrophoresis[J]. Drug Discov. Today, 2000, (1): 33
- 8 Freeman A, Cohen-Hadar N, Abramov S, et al. Screening of large protein libraries by the 'cell immobilized on adsorbed bead' approach[J]. Biotechnology and Bioengineering, 2004, 86: 196~200
- 9 Lee S J, Kang H Y, Lee Y H. High-throughput screening methods for selecting *L*-threonine aldolases with improved activity[J]. Journal of Molecular Catalysis (B), 2003, 26: 265~272
- 10 姜世民. 体外定向进化大肠杆菌  $\alpha$ -半乳糖苷酶和农杆菌介导 DREB1A 基因转化苹果的研究[D]: [学位论文]. 南京农业大学材料学院, 2003. 6~9
- 11 May O, Nguyen P T, Arnold F H. Inverting enantioselectivity by directed evolution of hydantoinase for improved production of *L*-methionine[J]. Nature Biotechnology, 2000, 18: 317~320
- 12 Gao Wenzhong, Xing Bengang, Tsien R Y, et al. Novel fluorogenic substrates for imaging  $\beta$ -lactamase gene expression[J]. Am. Chem. Soc., 2003, 37: 11 146~1 1147
- 13 Olsen M J, Stephens D, Griffiths D, et al. Function-based isolation of novel enzymes from a large library[J]. Nat. Biotechnol., 2000, 18: 1 071~1 074
- 14 Kohl T G, Heinze K, Kuhleemann R, et al. A protease assay for two-photon crosscorrelation and FRET analysis based solely on fluorescent proteins[J]. Proc. Natl. Acad. Sci., 2002, 99: 12 161~12 166
- 15 Tielmann P, Boese M, Luft M, et al. A practical high throughput screening system for enantioselectivity by using FT-IR spectroscopy[J]. Chemistry, 2003, 9: 3 882~3 887
- 16 Henke E, Bornscheuer U T. Fluorophoric assay for the high-throughput determination of amidase activity[J]. Anal. Chem., 2003, 75: 255~260
- 17 Tsotsou G E, Edward A, Cass G, et al. High throughput assay for cytochrome P450 BM3 for screening libraries of substrates and combinatorial mutants[J]. Biosensors & Bioelectronics, 2002, 17: 119~131
- 18 Jestin J L, Kaminski P A. Directed enzyme evolution and selections for catalysis based on product formation[J]. Journal of Biotechnology, 2004, 113: 85~103
- 19 Bylina E J, Coleman W J, Dilworth M R, et al. Solid-phase enzyme screening[J]. ASM News, 2000, 66: 211~217
- 20 Rowe L A, Melissa L G, Omar B A, et al. A comparison of directed evolution approaches using the  $\beta$ -Glucuronidase model system[J]. Journal of Molecular Biology, 2003, 332: 851~860
- 21 Liebeton K, Zonta A, Schimossek K, et al. Directed evolution of an enantioselective lipase[J]. Chemistry & Biology, 2000, 7: 709~718
- 22 Turner N J. Directed evolution of enzymes for applied biocatalysis[J]. Trends in Biotechnology, 2003, 21: 474~478

## Directed Evolution of Enzymes in Vitro ( ) Methods of Enzyme-Library Screening and Its Application

Fang Baishan   Hong Yan   Xia Qirong

(College of Material Science and Engineering, Huaqiao University, 362021, Quanzhou, China)

**Abstract** Directed evolution is an effective new strategy for remoulding molecules of protein, but a very large library is required to be constructed and the clones so much as  $10^5 \sim 10^{10}$  are required to be screened. Moreover, it is vital for screening object enzymes to find the method of screening with high sensitivity, high selectivity and high throughput. In view of these, the authors give here a comprehensive commentary on some common techniques in mutant isolation, enzyme assay and signal detection and their progress recently.

**Keywords** enzyme, screening, directed evolution or orthogenesis