

文章编号 1000-5013(2005)04-0333-05

酶体外定向进化() 展示技术及其应用

夏启容 方柏山 洪 燕

(华侨大学材料科学与工程学院, 福建 泉州 362021)

摘要 利用展示技术构建的蛋白质/多肽的突变体库,可以通过高通量进行高效地分析和筛选,因此特别适用于改造蛋白质.文中综述噬菌体、细胞表面、核糖体、mRNA 等展示技术的原理和方法,以及其在酶定向进化中的应用.

关键词 展示技术, 酶, 定向进化, 噬菌体, 细胞表面, 核糖体, mRNA

中图分类号 Q 349+.5; Q 785; Q 55

文献标识码 A

随着定向进化的不断发展和广泛应用,研究者们改进和创造了许多获得突变体^[1]、筛选或选择的新方法^[2],极大地提高了实验效率,扩大了研究范围,成功地进化了很多以前无法克隆表达的目标物质.获得具有优良性质的基因或蛋白,已不再是阻碍基因进化速度的关键,而如何快速地从庞大的突变库中筛选出人们需要的目的产物,才是至关重要的.因此,定向进化技术把筛选放在首位——寻找灵敏度高、快速、简便的筛选方法.目前,各种展示技术由于特别适用于高通量筛选,已经在药物筛选方面得到了广泛应用,而实际上它在改造酶方面也有巨大的应用空间.常规的利用活体表达外源基因的方法,在很大程度上限制了突变库容及筛选能达到的通量.新发展起来的噬菌体、细胞表面、核糖体和 mRNA 展示技术克服了这些缺点,在酶定向进化上有广阔的应用前景.

1 噬菌体展示技术

1982 年, Dulbecco 首次提出在病毒表面展示外源抗原决定簇或肽的这一概念. Smith^[3]第一次证实,丝状噬菌体 M13 的 fd 基因组能通过基因工程手段,将外源抗原决定簇与其次要外壳蛋白融合并展示在噬菌体表面.几年后 Smith^[4]又证明,被表达在噬菌体外壳上的抗原决定簇能够被特异性抗体所识别.其原理是,将编码外源肽或抗体的可变区 DNA 片段整合到噬菌体或噬菌粒的基因组中,以融合形式与噬菌体的表面蛋白共同表达于噬菌体表面,以利于配体的识别和结合.插入的 DNA 片段对噬菌体的生物学特性无大的影响,经过“吸附-洗脱-扩增”过程筛选,富集外源肽或特异性抗体,从而筛选出人们所需的目的片段.噬菌体展示系统有噬粒、噬菌体、T4 噬菌体、T7 噬菌体,以及一些真核病毒,最常用的还是 M13 噬菌体.插入 M13 噬菌体 fd 基因中进行噬菌体展示的最大酶是青霉素酰化酶(86 kDa),每个噬菌体上一个拷贝^[5].而较小的 DNA 片段(30 kDa)在一个噬菌体上可以有 3,4 个拷贝^[6].在 M13 噬菌体展示系统中,大分子肽因危及壳蛋白的功能,不能被有效展示,使这个系统的应用受到很大的限制.噬粒展示系统的发展解决了这个问题.它利用辅助噬菌体的表面衣壳蛋白,大大减弱了由融合蛋白带来的影响,允许展示一些在单一噬菌体系统中不能展示的多肽^[7].目前已经证明,在噬粒系统中, M13 的 5 个外壳蛋白(g3p, g6p, g7p, g8p, g9p)均可展示功能多肽^[8],但报道的大部分酶都用 g3p 进行

收稿日期 2005-05-09

作者简介 夏启容(1980-),女,硕士研究生,主要从事生物反应工程和酶工程的研究.方柏山(联系人),男,教授, 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基金资助项目(2003I020)

展示.而且,目前已设计成功模拟天然 M13 噬菌体衣壳蛋白功能的人工衣壳蛋白,为此项技术增加了新的功能,如外源蛋白在噬菌体蛋白 C 端的融合表达^[9].考虑到一些胞内酶和较大的蛋白质难以穿过细胞膜,可以将其克隆到裂解性的噬菌体中,如 噬菌体、T4 噬菌体.

噬菌体展示技术实现了物质的遗传型和表现型之间的转化,使人们容易对其进行一系列的生化 and 遗传操作,如噬菌体-酶可以利用聚乙二醇,简便地从受感染的大肠杆菌培养液中分离出来.它具备库容量大、表达无偏差、筛选简便等优点,在生物学的许多领域得到广泛应用,如筛选酶抑制剂、构建噬菌体抗体库、构建 cDNA 文库、对蛋白质功能性表位的图谱分析及酶进化研究.1991 年,McCafferty^[10]就成功展示了碱性磷酸酶,证明了可以在噬菌体表面展示有活性的酶.此后,陆续有一些成功的例子报道,如 -内酰胺酶、谷胱甘肽转移酶、溶菌酶、核苷酸转移酶,以及抗体酶等. Sumilion^[11]等将枯草杆菌蛋白酶 309 展示在丝状噬菌体 fd 表面,合成抑制剂类似物进行亲和筛选,得到了底物特异性改变的酶.

2 细胞表面展示技术

细胞表面展示技术是将目的蛋白基因与细胞表面结构蛋白融合,使目的蛋白活性表达并锚定于细胞表面的一项技术.该技术主要用来研究细胞表面结构、细胞表面蛋白的识别和相互作用.现在已经用于外源蛋白展示的体系,有大肠杆菌中的多种外膜蛋白、鞭毛蛋白、菌毛蛋白、脂蛋白等.在葡萄球菌表达系统中,借助葡萄球菌蛋白 A (SpA) 的信号肽和细胞表面结合区,可将外源肽输送到细胞表面的外侧.链球菌系统中的原纤维 M 蛋白的类似区域,也可使重组受体暴露在细胞表面. M6 蛋白也被尝试用于乳酸菌的展示表达,作为外源蛋白载体的,还有冰成核蛋白(丁香假单胞菌的外膜蛋白, IPN). 酵母表达体系中,将目的蛋白与 α 凝集素融合可表达细胞表面,芽胞杆菌也可作宿主细胞. -内酰胺酶、果聚糖蔗糖酶、脂肪酶、葡糖淀粉酶、纤维素酶等,都被成功地展示在细胞表面.

Georgiou 等^[12]对大肠杆菌表面展示系统作了改进.他们将大肠杆菌主要脂蛋白导肽的最初 9 个氨基酸作为导向序列,与外膜蛋白 A (Opm A) 跨膜结构域(氨基酸 46 ~ 159, 相当于 B2 链 B3 ~ B7) 及外源蛋白组成三元融合蛋白.该融合蛋白可将外源蛋白携带至外膜,至于外源蛋白能否展示则与其本身性质有关.用此方法,可使 -内酰胺酶(B1a)、单链抗体(scFv) 和外切葡聚糖酶(*Exoglucanase*) 在细菌表面得到展示.外切葡聚糖酶的分子量达 54 kD.但是更大的二聚体蛋白,如碱性磷酸酯酶 Pho A (86 kD) 则未被展示.

展示在微生物细胞表面的酶,可以通过加入荧光性底物,采用流式细胞仪进行高通量筛选,其速度可达 3×10^6 细胞 $\cdot s^{-1}$, 该技术大大加快了酶定向进化的效率^[13]. 另外,还有一种很有潜力的筛选方法——酪胺结合物法^[14]. 只有经山葵过氧化物酶修饰的且具有水解酶活性的大肠杆菌,才能裂解酪胺酯,从而使生物素聚集、荧光染色.该方法已经被应用到酯酶的高通量筛选中^[15], 它也是筛选利用细胞表面展示的水解酶、蛋白酶、磷酸酯酶的较好方法.然而,由于大肠杆菌等原核细菌缺乏在内质网内对蛋白质有效折叠所需的折叠酶和分子伴侣,因此噬菌体和原核细胞表面展示技术对于真核蛋白质的表达存在不可预测的表达偏差.另外,它只能通过亲和力来筛选克隆,故其应用受到一定的限制.

酵母表面展示系统是最常用的真核展示系统.虽然其转化效率比较低,但它能展示较大蛋白质,且能对蛋白质进行翻译后加工和修饰.第一个通过此系统表达的异源蛋白是 -半乳糖苷酶. Kieke^[16,17], Holler^[18]和 Shusta^[19]等利用此技术,对 TCR(T 细胞受体)进行了直接的体外进化,分别得到了亲和力和热稳定性均高于天然 TCR 的突变体. TCR 的结构与抗体相似.但是,用其他展示系统对其进行的定向进化,一直没有成功.

还有一个例子^[20]就是,利用该系统构建了一种脂肪酶表达活性中心的基因突变库,获得了底物特异性改变的突变体.其成功之处在于,在脂肪酶基因和 -凝集素 C 端插入一段丝氨酸/甘氨酸的重复序列,使融合蛋白中的脂肪酶活性中心能够更好地与底物作用,增强了脂肪酶的水解活性.展示在酵母表面的蛋白质的位置、成分及结构等,对酵母的影响也很大,有时会导致其生理生化特性发生变化.这不仅增加了突变库的多样性,又提供了新的筛选表型.例如,用 *n*-壬烷可以筛选出了一种能耐有机溶剂的酵母^[21].

细胞表面展示表达体系,可以看作是能自我增殖的蛋白质/酶固定化的载体,可用来开发基因工程

疫苗、全细胞固定化酶、生物传感器、组织再生生物吸附系统和选择性离子结合介质等。除了能表达蛋白外,还可用细胞表面展示技术表达多糖等其他大分子,细菌表面的糖蛋白可用作外源多糖表面表达的载体。虽然,近年来细胞表面展示表达体系发展很快,但也存在一些问题。(1)表达体系仅能表达单链多肽,对多个亚单位的蛋白不适合。(2)融合目的蛋白常伴随着细胞表面变化,从而导致生长缺陷。(3)外源蛋白对于细胞表面天然蛋白功能的作用,以及其可接近性的情况还知之甚少。

3 核糖体展示技术与 mRNA 展示技术

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,用 mRNA 的可复制性,使靶基因(蛋白)得到有效富集,不受细胞转化效率的限制。它大大提高了文库容量和筛选通量($10^{12} \sim 10^{14}$),而且能够增加表达的蛋白质溶解度。这两种技术的一般步骤,如图 1 所示。

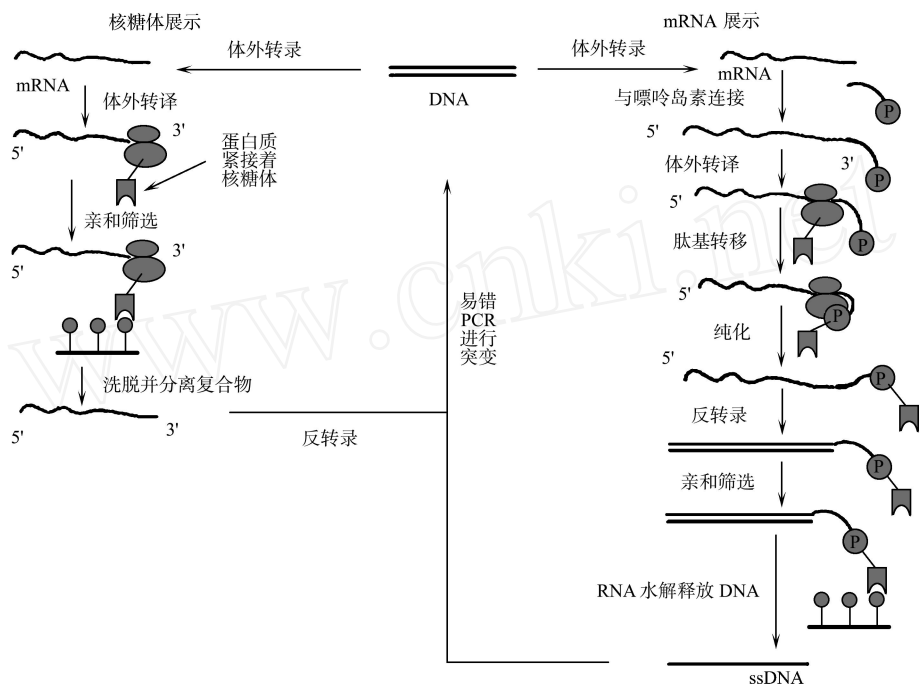


图 1 核糖体展示与 mRNA 展示步骤^[22]

3.1 核糖体展示技术

核糖体展示技术的原理很简单,即用一定量的核糖体翻译没有终止子的 mRNA 文库,在肽段已经翻译出来并折叠成三级结构,但末端还在核糖体中。即最后一个氨基酸还与肽酰-tRNA 连接着,可对蛋白质-核糖体-mRNA 复合体进行分析或筛选。在合适的条件下,该复合体的稳定性能保持 10 d 以上^[23]。核糖体展示技术最早于 1994 年被 Mattheakis^[24]用来筛选能与单克隆抗体 D32.39(能与一种具有 13 个残基的鸦片样物质——强啡肽 B 结合)的肽段。从含 10^{12} 个 DNA 分子的突变文库中,筛选出的肽段与该抗体的亲和能力由原来的 0.29 nM 提高到 7.2~140 nM,且这些肽段与强啡肽 B 的氨基酸序列和亲和力都不同。由于在短肽中采用 PCR 技术获得的开放阅读框中的突变体数量太少,限制了核糖体展示技术在筛选中的广泛应用。大部分不能用体内展示的序列,都可以利用核糖体展示技术进行筛选。该技术被广泛用于筛选多肽、蛋白质、疫苗、抗体等,值得注意的是,它还可以用于合成表面具有多结合位点的蛋白质^[25,26]。由于设计时不含半胱氨酸,故这种大分子还可能适用于胞内或蛋白质组学的研究。

在体外进行的以酶活性作为筛选依据的第一个成功例子就是用核糖体展示的,即应用合成的-内酰胺酶的不可逆抑制剂——生物素-氨基青霉素-砒进行酶活性选择,一轮后可使有益突变体有效富集(100-1)^[27]。Takahashi^[28]等用一种无细胞的麦牙蛋白合成系统,将二氢叶酸还原酶基因展示在核糖体上,并用固定在琼脂糖珠上的二氢叶酸还原酶的底物类似物甲氨蝶呤进行亲和筛选。经过 3 轮筛选后,得到了 4 个酶活与野生型一样的突变株。核糖体展示技术为直接依据酶活性进行体外定向进化,提供了新方法。

3.2 mRNA 展示技术

和核糖体展示相似,mRNA 展示技术也是以 mRNA 和多肽复合体作为筛选的基本单元.区别之处在于,复合体中 mRNA 与蛋白质通过一个小分子衔接子共价连接,如嘌呤霉素.且该复合体的产生完全在体外,因此很容易构建大型突变文库(含 $10^{12} \sim 10^{13}$ 个独立序列).另外,利用 mRNA 展示技术,还可分析鉴定蛋白质功能及小分子药物.应用 mRNA 展示的多肽大部分都是 10~110 个氨基酸残基,较大的蛋白如分子量为 24 kDa 的 蛋白磷酸酶也有研究,但活性比较低^[29].尽管如此,应用 mRNA 展示技术的文献比核糖体展示技术的少,开发出来的筛选系统也比较少.这两种体外展示技术的应用取得了很多成果,但它们都需要大量核糖体来翻译蛋白质.然而,核糖体能将蛋白质完全翻译并正确折叠的机率很小.在 mRNA 展示技术中,由于翻译完的蛋白质折叠成球状在核糖体通道的一端,嘌呤霉素-DNA/mRNA 却在另一端,这就需要将蛋白质-嘌呤霉素-DNA/mRNA 与核糖体分离.然而,现在还没有任何依据能判断分离何时发生,因此这个问题很难解决.

4 结束语

组合生物工程学是以分子展示技术为基础的新方法,它的快速发展,大大加快了酶定向进化的研究,开发了很多新功能酶.但相对酶可产生的突变体库来说还远远不够,找到快速高效的筛选/选择的策略才是酶定向进化的关键问题.通过酶活性进行筛选/选择,显然比利用酶与靶物质之间的亲和力来进行筛选困难得多.因此,建立一种能与酶活性相关联的亲筛选方法非常重要.目前,一般是选用抑制剂、底物、产物或酶促反应中间过度态类似物作为靶物质^[30].存在的问题是有些有高的亲和力,酶活却不高.另外,对一些无明显可借鉴表型的突变体如何进行筛选,也是今后生物学家们需要研究的方向.

参 考 文 献

- 1 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
- 2 方柏山,洪 燕,夏启容. 酶体外定向进化()——文库筛选的方法及其应用[J]. 华侨大学学报(自然科学版), 2005, 26(2): 113~116
- 3 Smith G P. Filamentous fusion phage: Novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface[J]. Science, 1985, 228(4 705): 1 315~1 317
- 4 Parmley S F, Smith G P. Antibody-selectable filamentous phage vectors: Affinity purification of target genes[J]. Gene, 1988, 73(2): 305~318
- 5 Verhaert R M D, Duin J V, Quax W J. Processing and functional display of the 86 kDa heterodimeric penicillin Gacylase on the surface of phage fd[J]. Biochem J, 1999, 342 (2): 415~422
- 6 Widersten M, Mannervik B. Glutathione transferases with novel active sites isolated by phage display from a library of random mutants[J]. Mol Biol, 1995, 250(2): 115~122
- 7 Bass S, Greene R, Wells J A. Hormone phage: An enrichment method for variant proteins with altered binding properties[J]. Proteins: Struct Funct Genet, 1990, 8(4): 309~314
- 8 Fuh G, Pisabarro M T, Li Y, et al. Analysis of PDZ domain-ligand interactions using carboxyl-terminal phage display[J]. J Biol Chem, 2000, 275(28): 21 486~21 491
- 9 Sidhu S S. Engineering M13 for phage display[J]. Biomol Eng, 2001, 18(2): 57~63
- 10 McCafferty J, Jackson R H, Chiswell D J. Phage-enzymes: Expression and affinity chromatography of functional alkaline phosphatase on the surface of bacteriophage[J]. Protein Eng, 1991, 4(8): 955~961
- 11 Legendre D, Laraki N, Graslund T, et al. Display of active subtilisin 309 on phage: Analysis of parameters influencing the selection of subtilisin variants with changed substrate specificity from libraries using phosphorylating inhibitors[J]. J Mol Biol, 2000, 296(1): 87~102
- 12 Gergiou G, Stathopoulos C, Daugherty P, et al. Display of heterologous proteins on the surface of microorganisms: From the screening of combinatorial libraries to live recombinant vaccines[J]. Nature Biotechnol Research, 1997, 15(1): 29~34
- 13 Becker S, Schmoldt H U, Adams T M, et al. Ultra-high-throughput screening based on cell-surface display and flu-

- orescence-activated cell sorting for the identification of novel biocatalysts[J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2004, 15(4): 323 ~ 329
- 14 Hunyady B, Krempels K, Harta G, et al. Immunohistochemical signal amplification by catalyzed reporter deposition and its application in double immunostaining[J]. *J Histochem Cytochem*, 1996, 44(12): 1353 ~ 1362
- 15 Wilhelm S, Tommassen J, Jaeger K E. A novel lipolytic enzyme located in the outer membrane of *Pseudomonas aeruginosa*[J]. *J Bacteriol*, 1999, 181(22): 6977 ~ 6986
- 16 Kieke M C, Shusta E V, Boder E T, et al. Selection of functional T-cell receptor mutants from a yeast surface-display library[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96(10): 5651 ~ 5656
- 17 Shusta E V, Kieke M C, Parke E, et al. Yeast polypeptide fusion surface display levels predict thermal stability and soluble secretion efficiency[J]. *J Mol Biol*, 1999, 292(5): 949 ~ 956
- 18 Holler P D, Holman P O, Shusta E V, et al. In vitro evolution of a T cell receptor with high affinity for peptide/MHC[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97(10): 5387 ~ 5392
- 19 Shusta E V, Holler P D, Kieke M C, et al. Directed evolution of a stable scaffold for T-cell receptor engineering[J]. *Nat Biotechnol*, 2000, 18(7): 754 ~ 759
- 20 Shiraga S, Ueda M, Takahashi S, et al. Construction of the combinatorial library of *Rhizopus oryzae* lipase mutated in the lid domain by displaying on yeast cell surface[J]. *J Mol Catal*, 2002, 17(3): 167 ~ 173
- 21 Zou W, Ueda M, Tanaka A. Screening of a molecule endowing *saccharomyces cerevisiae* with n-nonane-tolerance from a combinatorial random protein library[J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2002, 58(6): 806 ~ 812
- 22 Lipovsek D, Plückthun A. In-vitro protein evolution by ribosome display and mRNA display[J]. *Journal of Immunological Methods*, 2004, 290: 51 ~ 67
- 23 Jermutus L, Honegger A, Schwesinger F, et al. Tailoring in vitro evolution for protein affinity or stability[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98(1): 75 ~ 80
- 24 Mattheakis L C, Bhatt R R, Dower W J. An in vitro polysome display system for identifying ligands from very large peptide libraries[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, 91(19): 9022 ~ 9026
- 25 Binz H K, Stumpp M T, Forrer P, et al. Designing repeat proteins: Well-expressed, soluble and stable proteins from combinatorial libraries of consensus ankyrin repeat proteins[J]. *J Mol Biol*, 2003, 332(2): 489 ~ 503
- 26 Binz H K, Amstutz P, Kohl A, et al. High-affinity binders selected from designed ankyrin repeat protein libraries[J]. *Nat Biotechnol*, 2004, 22(5): 575 ~ 582
- 27 Amstutz P, Pelletier J N, Guggisberg A, et al. In vitro selection for catalytic activity with ribosome display[J]. *J Am Chem Soc*, 2002, 124(32): 9396 ~ 9403
- 28 Takahashi F, Ebihara T, Mie M, et al. Ribosome display for selection of active dihydrofolate reductase mutants using immobilized methotrexate on agarose beads[J]. *FEBS Lett*, 2002, 514(1): 106 ~ 110
- 29 Wilson N J, Moss S T, Csar X F, et al. Protein phosphatase 2A is expressed in response to colony-stimulating factor 1 in macrophages and is required for cell cycle progression independently of extracellular signal-regulated protein kinase activity[J]. *Biochem J*, 1999, 339(3): 517 ~ 524
- 30 Fernandez Gacio A, Uguen M, Fastrez J. Phage display as a tool for the directed evolution of enzymes[J]. *Trends in Biotechnology*, 2003, 21(9): 408 ~ 414

Directed Evolution of Enzymes in Vitro ()

Display Technology and Its Application

Xia Qirong Fang Baishan Hong Yan

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

Abstract With the ability of conveniently assaying and analyzing a large number of mutated proteins in a high-throughput way, display systems of libraries of mutated proteins or peptides on phage or some biological resources have been used to improve proteins and enzymes. In this article, we review recent studies on display technology, which include not only the principles and methods of phage display, cell-surface display, ribosome display and mRNA display, but also their application in aspect of directed evolution of enzymes.

Keywords display technology, enzyme, directed evolution, phage, cell surface, ribosome, mRNA