

分段 DNA shuffling: 一种大分子海藻糖合酶有效的定向进化方法

刘艳超^{1Δ} 王宇凡^{1Δ} 钱柯帆¹ 张峻² 肖辰鹏² 邢来君¹ 李明春^{1*}

(1. 南开大学 微生物学系 分子微生物学与技术教育部重点实验室 天津 300071)

(2. 天津市林业果树研究所 天津 300112)

摘要: 【目的】红色亚栖热菌(*Meiothermus ruber*)海藻糖合酶(Trehalose synthase, M-TreS)将麦芽糖转化生成海藻糖只需一步反应,且具有很好的热稳定性及 pH 耐受性,是潜在的工业生产海藻糖的酶源。为了提高该酶的性能,有必要对其进行定向进化。【方法】M-TreS 基因(*M-treS*)大小为 2 889 bp。该蛋白质分子本身具有很大的进化空间,但是却不宜进行全长基因 Shuffling。分段 DNA shuffling 是为大分子蛋白质(基因 $\geq 2\ 000$ bp)的进化而设计的一种方法。该方法分为三步:(1)用两对引物分别扩增目的基因的上游片段和下游片段;(2)上下游片段各自进行 Shuffling;(3)利用重叠延伸 PCR 连接上下游突变群,建立完整基因的突变文库。【结果】结合易错 PCR,通过该方法经一轮进化获得一株酶活力是野生型 1.6 倍、催化效率是野生型 2 倍的突变株。序列分析表明,该突变株共有 6 个位点发生了氨基酸的替代,其中一个来自易错突变,2 个来自同源重组,3 个为随机突变。【结论】分段 DNA shuffling 是进化大分子蛋白质的有效方法。

关键词: 红色亚栖热菌,海藻糖合酶,定向进化,易错 PCR,分段 DNA shuffling

基金项目:天津市应用基础及前沿技术研究计划(No. 10JCYBJC09600, 10JCYBJC05000);国家自然科学基金项目(No. 21076162)

*通讯作者: Tel: 86-22-23508506; 信箱: nklimingchun@yahoo.com.cn

Δ 对本文贡献相同

收稿日期: 2012-04-05; 接受日期: 2012-05-29

The sectionalized DNA shuffling: an effective tool for molecular directed evolution of *Meiothermus ruber* TreS

LIU Yan-Chao^{1Δ} WANG Yu-Fan^{1Δ} QIAN Ke-Fan¹ ZHANG Jun²
XIAO Chen-Peng² XING Lai-Jun¹ LI Ming-Chun^{1*}

(1. Key Laboratory of Molecular Microbiology and Technology, Ministry of Education, Department of Microbiology, Nankai University, Tianjin 300071, China)
(2. Tianjin Institute of Forest and Pomology, Tianjin 300112, China)

Abstract: [Objective] The gene *M-treS* from *Meiothermus ruber* CBS-01 encodes a trehalose synthase of 962 amino acids, named M-TreS. To improve its catalytic activity, we constructed a method of molecular directed evolution, the sectionalized DNA shuffling. **[Methods]** Through two PCR steps with two pairs of partially complementary primers, the *M-treS* gene was parted into two sections. After the two sections shuffled respectively, a whole gene was obtained through the complementarity of the primers. This method was more feasible, with higher mutability than normal DNA shuffling. **[Results]** Mutants were obtained after one round of the sectionalized DNA shuffling, in combination with error-prone PCR. The best mutant enzyme contained 6 amino acid substitutions, whose catalytic activity and efficiency were 1.6-fold and 2-fold of that of the wild type, respectively. In the 6 amino acid substitutions, 5 were caused by homologous recombination, and one by error-prone PCR. **[Conclusion]** This study indicates that the sectionalized DNA shuffling is an effective tool for molecular directed evolution of macromolecular proteins.

Keywords: *Meiothermus ruber*, TreS, Molecular directed evolution, Error-prone PCR, Sectionalized DNA shuffling

在生物产业中,为了提高产量,降低成本,节约能源等,一些酶的性能亟待优化。而酶分子定向进化技术则成为满足这种要求的重要工具^[1]。这些技术分为点突变^[2-5]、同源重组突变^[6]、非同源重组突变^[7]、密码子的随机插入和缺失^[8]、以及外显子或者区域重排等技术^[9]。近二十年来,该技术的迅速发展已经产生许多成功改造蛋白质的例子。这些改造包括提高酶的催化活性^[10]、提高热稳定性^[11]及改变底物特异性^[5,12-13]等。这些对于酶类任何一种性能的优化都会给人类带来前所未有的利益。然而,随着产业的进步以及

人们期望的提高,这些分子定向进化技术正在不断地受到挑战。所以,寻找到一种适合目的蛋白质的有效分子定向进化策略是蛋白质改造过程的首要条件。

进化策略的选择需要考虑的因素有以下几种:(1) 确定优先进化的特性;(2) 进化空间的大小;(3) 相关结构及机制的研究状况;(4) 是否能够获得同源基因;(5) 实验室条件;(6) 进化策略的效率^[14]。本文研究的海藻糖合酶 M-TreS,来自嗜热菌株红色亚栖热菌(*Meiothermus ruber*) CBS-01^[15],最适反应温度为 50 °C,有催化活性

区域(主要位于 N 端)和维持结构稳定的区域(主要位于 C 端)两个区域^[16]。目前该酶结晶结构尚未获得,而已知的是该酶 N 端属于 α -淀粉酶家族(α -Amylase family),具有 α -淀粉酶家族的 4 个保守区,因此推测 II 和 III 区可能为催化活性中心^[15]。来源于嗜热栖热菌(*Thermus thermophilus*)的海藻糖合酶(T-TreS)与 M-TreS 具有 76% 的同源性^[16]。其基因大小为 2 898 bp,与 *M-treS* 大小相似;且其催化性和稳定性也与 M-TreS 相似,可以作为 M-TreS 有性进化的亲本。所以对于 M-TreS 的进化,关键是要建立一个有效的有性进化方法。然而,在该蛋白质进行全长基因的 DNA shuffling 中存在瓶颈,即由于基因过长,基因碎片很难重组出目的基因,而通常能重组出 2 kb 左右的基因片段。所以,将 3 kb 的基因变为小于 2 kb 的片段进行操作则成为克服以上瓶颈的关键。分段 DNA shuffling 巧妙的将大基因重组过程转变成小基因重组过程,因此成为我们对 M-TreS 改造的有力手段。同时,我们将该酶分为 N 端和 C 端两个区域分别进化,不但实现了进化方法的可行性,而且还能够调控不同区域的进化速度。

定向进化策略偏重于几种定向进化方法的结合使用^[14],尤其是与 DNA shuffling 技术的结合,如 Zhang Z. G 等通过易错 PCR 与 DNA shuffling 及定点突变的 3 种方法的结合使得木聚糖酶的热稳定性提高了 52 倍^[11]。另外,蛋白质的三维结晶结构或者模型指导的理性或者半理性的进化^[17],新的定向进化方法的不断发明^[18]以及对于即有的定向进化方法的灵活应用^[12,19]等,这些都为我们建立一种合适的进化策略提供了参考。本文中对于 M-TreS 的进化主要是结合了易错 PCR 和分段 DNA shuffling 两种方法。我们只经过两轮进化便获得一个催化效率是野生型 2 倍的突变子,说明了这种进化方法的有效性。

1 材料与方法

1.1 实验材料

海藻糖合酶生产菌株(*M. ruber*) CBS-01,天津园艺所提供;嗜热栖热菌(*T. thermophilus*) HB8 购自 ATCC; *Escherichia coli* BL21(DE3) (*F ompThsdSB (Rb⁻Mb⁻) gal dcmI*) (DE3),本实验室保存,用于海藻糖合酶基因的表达;质粒 pET-21a(+)购自 Novagen; pUC-6-4 质粒、pUC 18 衍生、含有 *M-treS*, 实验室构建; pET-32M 质粒含 T-TreS 基因(*T-treS*), 实验室构建; Long Taq DNA 聚合酶购自天根公司; Easy Taq DNA 聚合酶购自全式金有限公司; DNase I 和限制性内切酶购自大连宝生物有限责任公司; 色谱级乙腈购自天津广达试剂有限公司; 超滤管购自厚普生物有限公司; 小片段 DNA 回收试剂盒购于柏莱斯特生物有限公司。

1.2 易错 PCR 方法的建立及突变文库的构建

方法参照 Clontech 公司的 Diversify[®] PCR Radom Mutagenesis Kit 使用手册。一共建立了 6 个易错 PCR 体系,每个体系中添加的 $MnSO_4$ 浓度分别为 0.16、0.24、0.32、0.40、0.16 (同时添加 0.4 mmol/L 的 dGTP) 和 0 mmol/L。将这 6 个体系混合产生的平均突变率为每 3 000 bp 产生 2–3 个碱基的突变。使用 Easy Taq DNA 聚合酶进行扩增,回收, *EcoR* I 和 *Sal* I 过夜双酶切,与同样双酶切消化 4 h 的 pET-21a(+) 连接形成 pET-21a-*treS*, 转化大肠杆菌 *E. coli* BL21(DE3), 固体 LB 平板培养, 建立突变文库。

1.3 *M-treS* 分段 DNA shuffling 分子方法的建立及突变文库的构建

1.3.1 模板分段: 设计引物 2.9F、P2 和 P1、2.9R (引物序列见表 1), 以 pUC-6-4 为模板分别扩增 *M-treS* 的上游 1 731 bp (*M.t-1.7*) 和下游 1 189 bp (*M.t-1.2*), P1 与 P2 间共有 32 个连续互补碱基。

扩增 *M.t-1.7* 的 PCR 程序为: 95 °C 5 min; 94 °C 30 s, 62 °C 45 s, 72 °C 2 min, 共 30 个循环; 72 °C 10 min。扩增 *M.t-1.2* 的 PCR 程序为: 95 °C 5 min; 94 °C 30 s, 64 °C 45 s, 72 °C 2 min, 共 30 个循环; 72 °C 10 min。

设计引物 T.tF、T.tR, 以 pET-32M 质粒为模板用 Long Taq DNA 聚合酶扩增 *T-treS*, 扩增程序为: 95 °C 5 min; 94 °C 30 s, 64 °C 45 s, 72 °C 3 min, 共 30 个循环; 72 °C 10 min。*Drd* I 酶切 1 h, 得到上游 1 741 bp (*T.t-1.7*)和下游 1 157 bp (*T.t-1.2*)并分别回收。

1.3.2 碎片化: 用 150 mmol/L 的 NaCl 溶液将 DNase I 稀释至 0.02 U/ μ L, 于 50 μ L 体系中加入 PCR 产物 2–6 μ g 及 1 μ L 稀释的 DNase I, 分别在 16 °C 消化 *T.t-1.7*、*T.t-1.2*、*M.t-1.7* 和 *M.t-1.2*, 15 min, 沸水煮 8 min 终止反应。消化产物用 2% 的琼脂糖凝胶电泳鉴定大小, 切胶回收 50–200 bp 的小片段。

1.3.3 分段重组: 将 *M.t-1.7* 和 *T.t-1.7* 碎片作为混合模板进行 Shuffling, 无引物 PCR 程序为: 95 °C 5 min; 94 °C 30 s, 56 °C 45 s, 72 °C 2 min, 共 5 个循环; 94 °C 30 s, 59 °C 45 s, 72 °C 2 min, 共 5 个循环; 94 °C 30 s, 64 °C 45 s, 72 °C 2 min, 共 20 个循环; 72 °C 10 min。将上述无引物 PCR 的产物稀释 50 倍作为标准 PCR 的模板, 加入引物 2.9F、P1

的标准 PCR 程序为: 95 °C 5 min; 94 °C 30 s, 65 °C 45 s, 72 °C 2 min, 共 30 个循环; 72 °C 10 min。扩增出 1 731 bp 的上游突变群命名为 shu-MF。

将 *M.t-1.2* 和 *T.t-1.2* 碎片作为混合模板进行 Shuffling, 无引物 PCR 程序为: 95 °C 5 min; 94 °C 30 s, 66 °C 45 s, 72 °C 3 min, 共 30 个循环; 72 °C 10 min。加入引物 P2、2.9R 的标准 PCR 程序为: 95 °C 5 min; 94 °C 30 s, 68 °C 45 s, 72 °C 3 min, 共 30 个循环; 72 °C 10 min。扩增出 1 189 bp 的下游突变群命名为 shu-MR。

1.3.4 重叠延伸 PCR 扩增全长片段: shu-MF 和 shu-MR 进行重叠延伸 PCR, 程序为: 95 °C 5 min; 94 °C 30 s, 60 °C 45 s, 72 °C 3 min, 共 30 个循环; 72 °C 10 min。扩增出全长 *M-treS* 的突变群, 将该突变群回收后建立突变文库, 方法同易错 PCR。

以上 PCR 程序除特别说明均使用 Easy Taq DNA 聚合酶。

1.4 海藻糖合酶活性突变体的初筛

挑取突变文库中单菌落及含野生型 M-TreS 的对照菌株于 800 μ L 的氨苄 LB 培养基(100 mg/L, Amp)中 180 r/min 活化 4–5 h; 取 10 μ L 菌液转接于新鲜的 1 mL 氨苄 LB 培养基中, 培养菌液 OD_{600} 达到 0.6–0.8 之间; 加入 IPTG 并使其浓度为 0.5 mmol/L, 20 °C、120 r/min 过夜诱导; 向菌液中加入 2% 甲苯, 37 °C 振荡 30–60 min 透性

表 1 本实验中所使用的引物
Table 1 The primers used in this work

引物名称 Primers name	引物序列 Primers sequence (5'→3')	内切酶位点 Retriiction sites
2.9F	CTTGAATTCATGGGTGTGGATCCTCTTTGGTACAAGG	<i>Eco</i> RI
2.9R	GTTTAGATCGACGCGGGCCCGTTCCTTC	<i>Sal</i> I
P1	ATGGAGGAAGGCCTCGAGTCCCTCTTCGTGGAGAG	
P2	CATGGTCTCCACGAAGAGGGACTCGAGGCCTTCCT	
T.t F	CTGAATTCGTGGACCCCTCTGGTAC	
T.t R	CTGTGACACTAGGCTTTCCGGCCTTG	

化细胞; 60 °C 热处理 1 h 弱化细胞中杂酶活性; 收集菌体, 用 500 μL 的磷酸钾(10 mmol/L, pH 6.5)缓冲液洗涤后, 再用 100 μL 重悬菌体, 加入终浓度为 20 g/L 的海藻糖作为底物, 50 °C 反应 1 h; 反应后, 加 100 μL DNS 试剂混匀, 沸水煮 5 min, 还原性糖(产物麦芽糖)可与 DNS 试剂发生红色反应。通过与对照株的颜色比较, 挑选出活性高的突变体进行进一步活性测定。

1.5 粗酶液海藻糖合酶活力单位数测定

这一步也可以称作是复筛过程。分别培养并诱导表达 50 mL 突变子菌株和对照菌株, 收集菌体, 50 mL 磷酸钾缓冲液洗涤 2 次, 菌体用 8 mL 的磷酸钾缓冲液充分悬浮, 超声破碎(破碎 2 s, 间隔 4 s, 10 min)。12 000 r/min 离心 10 min, 得上清液为粗酶液。

考马斯亮蓝法测定粗酶液中的蛋白质含量。取相同蛋白质含量的突变体和对照株粗酶液, 60 °C 保温 1 h 后, 分别加入到 500 μL 含 2% (W/V)的麦芽糖的磷酸钾缓冲液中, 50 °C 反应 30 min。HPLC (80%乙腈为流动相; Hypersil NH2 柱, 柱号为 E1822859; 示差折光检测器)测定生成的海藻糖含量。酶活力单位定义为: 在上述反应条件下, 每分钟形成 1 μmol 海藻糖所需的酶量为 1 个单位。比较粗酶的活力单位数, 选取酶活力高的突变株进行蛋白纯化并验证其纯酶的活性及动力学常数。

1.6 海藻糖合酶的纯化

为了便于纯化, M-TreS 经大肠杆菌中异源表达后带有 6 个组氨酸的 His 标签。所以, 用 NTA-Ni 树脂层析柱进行纯化。结合缓冲液(磷酸钠 20 mmol/L, NaCl 0.5 mol/L, 咪唑 5 mmol/L, 浓盐酸调 pH 7.4)平衡柱体; 将粗酶液经 0.45 μm 滤膜过滤后, 加到 NTA-Ni 层析柱中进行挂柱吸附; 结合缓冲液洗掉杂蛋白质分子; 洗脱缓冲液(磷酸钠 20 mmol/L, NaCl 0.5 mol/L, 咪唑

100 mmol/L, 浓盐酸调 pH 7.4)洗脱, 收集约 3 mL 洗脱液于超滤离心管中, 浓缩除盐, 获得纯海藻糖合酶^[20]。

1.7 海藻糖合酶活性及动力学常数的测定

取 5 μg 海藻糖合酶加入到 500 μL 含 2% (W/V)的麦芽糖的磷酸钾缓冲液中, 混匀后于 50 °C 保温 30 min, 100 °C 加热 8 min 终止反应。HPLC 测定海藻糖的转化率并计算酶活性。

动力学常数的测定具体方法为: 在磷酸钾缓冲液配制的不同浓度(5, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 90, 120 mmol/L)的麦芽糖溶液中, 加入 5 μL 纯酶液, 于 50 °C 下反应 60 min。用 HPLC 测不同底物浓度下产物的含量, 参照 Lineweaver-Burk 作图法, 求出海藻糖合酶以麦芽糖为底物时的 K_m 和 v_{\max} , 并推算 K_{cat} 等值。

1.8 序列及三维模型分析

通过 DNA 测序分析突变株氨基酸的突变位点(北京奥科鼎盛生物科技有限公司)。将氨基酸序列提交 Swiss Pdbviewer 网站模拟突变株与野生型 M-TreS 的三维结构(<http://swissmodel.expasy.org/>), 并使用 VMD 软件分析两者间的结构差异^[21]。

2 结果与分析

2.1 M9 突变株活性检验

实验前期从约 1 000 株易错 PCR 突变株中筛选, 获得一株粗酶液中海藻糖合酶的活力单位数为野生型 1.5 倍的突变株 M9, 如表 2 所示。

为了验证这种酶活力单位数提高的原因是表达量的提高还是酶活力提高, 需要对这个突变株的纯酶进行活性测定。纯酶的验证结果表明, 野生型 M-TreS 的比活力为 80.3 U/mg, M9 的比活力为 79.8 U/mg, 两者无明显差别。另外, 对于野生型和 M9 的动力学常数的测定表明, 两者间的差异也并不明显。所以, 粗酶液中 M9 酶活力单位

数的提高可能是表达量提高造成的。序列分析表明该突变株的突变位点为 F497L、A810T。说明, 这两个氨基酸的替换可能更有利于海藻糖合酶的异源表达。

2.2 *M-treS* 分段 DNA shuffling 方法的构建

该方法的核心是利用引物间的互补性, 将重

排后的上下游片段通过重叠延伸 PCR 扩增出完整的片段。可分为分段、碎片化、重排和重叠延伸 PCR 4 个步骤, 如图 1 所示。以易错 PCR 中筛选的突变株 M9 和 *T-treS* 为分段 DNA shuffling 的亲本继续进化, 如此可反复进行多轮进化, 直到获得理想的突变体。

表 2 M9 与野生型粗酶液中海藻糖合酶活力单位数比较

Table 2 Crude enzyme activity unit for wild-type and M9

海藻糖合酶 TreS	总蛋白质质量 Total protein (μg)	海藻糖转化率 Yield of trehalose (%)	酶活力单位数 Enzyme activity units (U)	倍数 Multiple
WT	100	32.3	0.42	1.0
M9	100	44.0	0.60	1.5

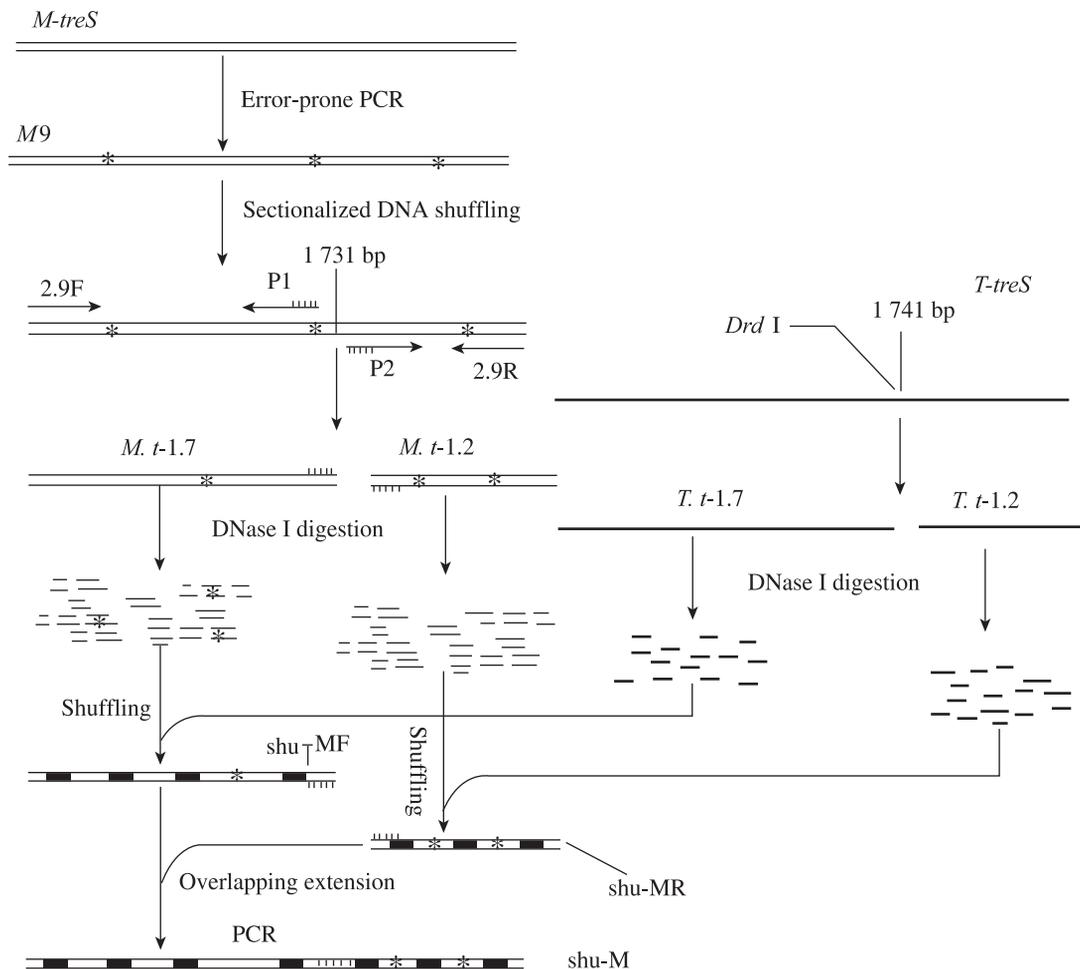


图 1 *M-treS* 分段 DNA shuffling 方法构建流程图

Fig. 1 The principle and procedure of the sectionalized DNA shuffling

M9 分段 DNA shuffling 的琼脂糖凝胶电泳结果如图 2 所示。经过 PCR 可以得到 *M-treS* 上游 1.7 kb 和下游 1.2 kb 片段(图 2A), 同时, *T-treS* 经 *Drd I* 酶切得到 1.7 kb 与 1.2 kb 片段(图 2B)。将这些基因片段经 DNase I 消化后产生 50–200 bp 碎片(图 2C), 回收上下游碎片进行 DNA 重排(图 2D); 将上下游突变基因混合, 重叠延伸 PCR 扩增出 2 889 bp 的突变基因群 shu-M (图 2E)。构建库容约为 10^4 左右的初级突变文库。

2.3 shM9 酶活性的检验

2.3.1 shM9 粗酶液中海藻糖合酶的酶活力单位数的测定: 粗酶液的总蛋白质质量为 100 μg , 所含的海藻糖合酶的活力单位数 shM9 为 0.64 U, 而野生型的为 0.41 U。shM9 的粗酶液中的海藻糖合酶的活力单位数为野生型的 1.6 倍, 如表 3

所示。

2.3.2 shM9 纯酶的海藻糖合酶的活力测定: 如表 4 所示, 5 μg 的纯酶中野生型的酶活力为 0.46 U, shM9 为 0.75 U, 相应的比活力野生型为 80.3 U/mg, shM9 为 130.0 U/mg, 经计算得出 shM9 的比活力是野生型的 1.6 倍。所以, 以上结果表明, 突变株 shM9 的活性比起野生型提高了 1.6 倍。

2.4 shM9 动力学常数的测定

如表 5 所示, shM9 对于麦芽糖的 K_m 值约为野生型的一半, K_{cat}/K_m 值是野生型的 2 倍。 K_{cat}/K_m 反映的是催化效率的大小, 也就是说以麦芽糖为底物时 shM9 的催化效率是野生型的 2 倍。结果还表明, 可能是 shM9 对麦芽糖的亲合力的提高导致了其转化效率的提高。

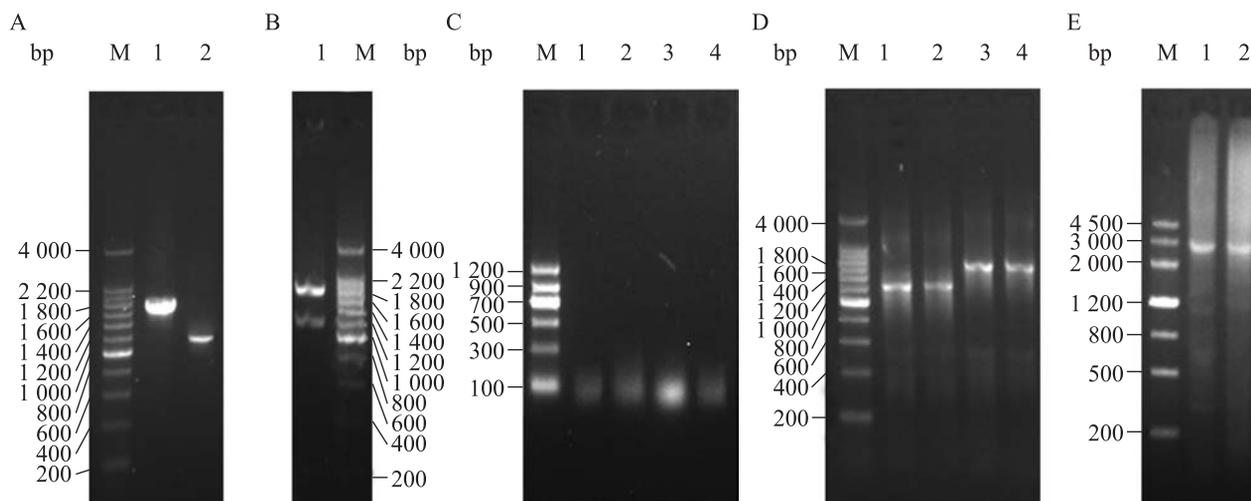


图 2 *M-treS* 分段 DNA shuffling 的琼脂糖凝胶电泳验证结果

Fig. 2 Electrophoresis result of the *M-treS* Sectionalized DNA shuffling

注: A: *M-treS* 分段克隆结果, M: 200 bp DNA ladder; 1: *M.t-1.7*; 2: *M.t-1.2*. B: *T-treS* *Drd I* 酶切结果, M: 200 bp DNA ladder; 1: *T.t-1.7* 和 *T.t-1.2*. C: 4 条片段分别经 DNase I 消化结果; 1、2、3、4 分别表示 *M.t-1.7*、*M.t-1.2*、*T.t-1.7*、*T.t-1.2*; 碎片大小主要集中于 100 bp 左右. D: *M.t-1.7* 与 *T.t-1.7*、*M.t-1.2* 与 *T.t-1.2* 的 Shuffling 结果; 1、2: shu-MR; 3、4: shu-MF. E: shu-MF 与 shu-MR 突变群的重叠延伸 PCR 结果, M: DNA marker III; 1、2: shu-M 突变群, 片段大小为 2 889 bp.

Note: A: Electrophoresis results of *M.t-1.7* and *M.t-1.2* PCR product, M: 200 bp DNA ladder; 1: *M.t-1.7*; 2: *M.t-1.2*. B: Restriction endonuclease *Drd I* digestion of *T-treS*, M: 200 bp DNA ladder; 1: *T.t-1.7* and *T.t-1.2*. C: 1, 2, 3, 4: 50–300 bp fragments of *M.t-1.7*, *M.t-1.2*, *T.t-1.7* and *T.t-1.2*. D: Electrophoresis results of the sectionalized DNA shuffling, 1, 2: shu-MR; 3, 4: shu-MF. E: Electrophoresis results of the shu-M; M: DNA marker III; 1, 2: shu-M, 2 889 bp.

表 3 shM9 与野生型粗酶液中海藻糖合酶活力单位数比较

Table 3 Crude enzyme activity unit for wild-type and shM9

海藻糖合酶 TreS	总蛋白质质量 Total protein (μg)	海藻糖转化率 Yield of trehalose (%)	酶活力单位数 Enzyme activity units (U)	倍数 Multiple
WT	100	31.8	0.41	1.0
shM9	100	45.0	0.64	1.6

表 4 shM9 与野生型纯酶活力比较

Table 4 Enzyme activity for wild-type and shM9

海藻糖合酶 TreS	纯酶量 Total protein (μg)	海藻糖转化率 Yield of trehalose (%)	酶活力单位数 Enzyme activity units (U)	比活性 Specific activity (U/mg)	倍数 Multiple
WT	5	33.0	0.46	80.3	1.0
shM9	5	52.8	0.75	130.0	1.6

表 5 shM9 对于底物麦芽糖的 K_m 值 K_{cat} 值与野生型的比较

Table 5 Comparison of kinetics of wild-type and shM9 for the hydrolysis of maltose

TreS	K_m (mmol/L)	v_{max} [$\mu\text{mol}/(\text{L}\cdot\text{min})$]	K_{cat} (s^{-1})	K_{cat}/K_m [$\text{mol}/(\text{L}\cdot\text{s})$]
WT	121.9 \pm 2.6	816.5 \pm 23.3	151.2 \pm 1.5	1252.5 \pm 12.0
shM9	65.5 \pm 1.8	887.6 \pm 14.1	164.4 \pm 3.0	2510.6 \pm 7.8

2.5 shM9 突变位点分析

DNA 测序结果表明, shM9 的基因序列中共发生 12 个点突变。相应的产生了 6 个氨基酸的突变, 分别为 R445Q、P527S、V548I、V557P、T558A 和 A810T。其中, A810T 来自易错突变株 M9; V557P 和 T558A 来自 *T-treS* 的同源重组; R445Q、P527S 和 V548I 属于随机自发突变。如图 3 所示, 图中比较了 shM9 与野生型 M-TreS、M9 以及 T-treS 基因序列的差异。其中, 用灰色标记了所有突变的碱基位点, 用方框标记 M9 与 *T-treS* 发生同源重组的区域。而 A1056G、T1656C、A1665G、A1680G 和 C2868A 产生的是同义突变, 其中 C2868A 来自 M9。

2.6 shM9 与野生型三维模型比较

通过提交 SwissPdbviewer 网站模拟 shM9 与野生型 N 端(从第 2 位到第 541 位氨基酸)的三维结构。位于模型中的 R445Q、P527S 在分子的表面, 而不是在 II 和 III 区内。推测可能是这两个突变位点与 V548I、V557P、T558A、和 A810T 共

同使 M-TreS 的二级结构产生了轻微的变化, 从而使底物分子更容易接近催化位点, 提高了催化效率, 如图 4 所示。

3 讨论

目前本实验室对于红色亚栖热菌的海藻糖合酶各方面性能的优化已经取得了一些成果。通过定点突变改造 *M-treS* 的 5'端提高 M-TreS 的异源表达产量^[22]; 同时通过三维结构模型及定点突变预测出 M-TreS 的催化位点^[23]; 通过 M-treS 的 C 端与 T-treS 的 N 端融合获得热稳定性及催化活性均有所提高的重组酶^[16]。然而, 要使 M-TreS 达到工业生产酶的要求, 以上改造还远远不够。所以, 建立一种切实可行的快速有效的定向进化方法是非常有必要的。

本实验室在前期已经建立了 M-TreS 的易错 PCR 方法。该方法能够随机的在目的基因中引入点突变。但是, 欲使该酶达到工业生产的要求, 仅依靠这个无性进化技术, 无疑需要经过漫长的

进化过程。分段 DNA shuffling 是 Stemmer 方法^[6]的一种灵活应用，为长基因的有性分子定向进化提供了新的思路。我们可以通过该方法灵活的控制上、下游片段的突变率，从而有针对性的进行进化。根据 Stemmer 方法^[6]，为了进一步提高 N 端的突变率，我们可以提高上游片段的碎片化程度。而为了使结构能够很好的维持稳定，我们可

以降低下游片段的碎片化程度，甚至保持下游为野生型。例如，我们在只对上游片段进行 Shuffling 而保持下游为野生的情况下发现，在 50 °C 中只有约 10% 还保留海藻糖合酶的活性，而筛选出的活性突变株中 90% 以上都具有与野生型相当的酶活。这说明，保持结构的稳定性是提高酶在 50 °C 中催化活性的前提。

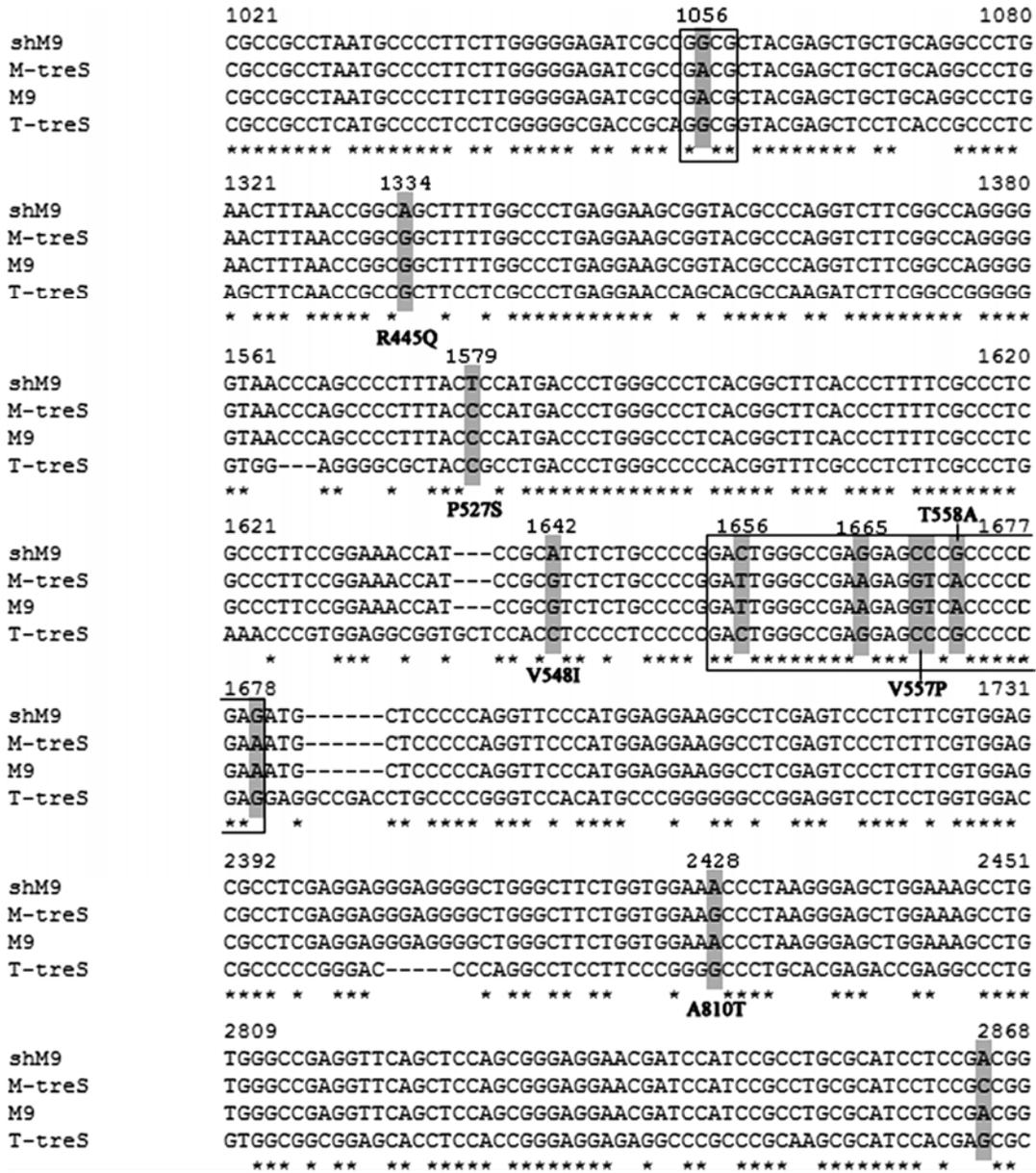


图 3 shM9 与野生型 DNA 序列比对

Fig. 3 DNA sequence alignment of the wild-type and shM9

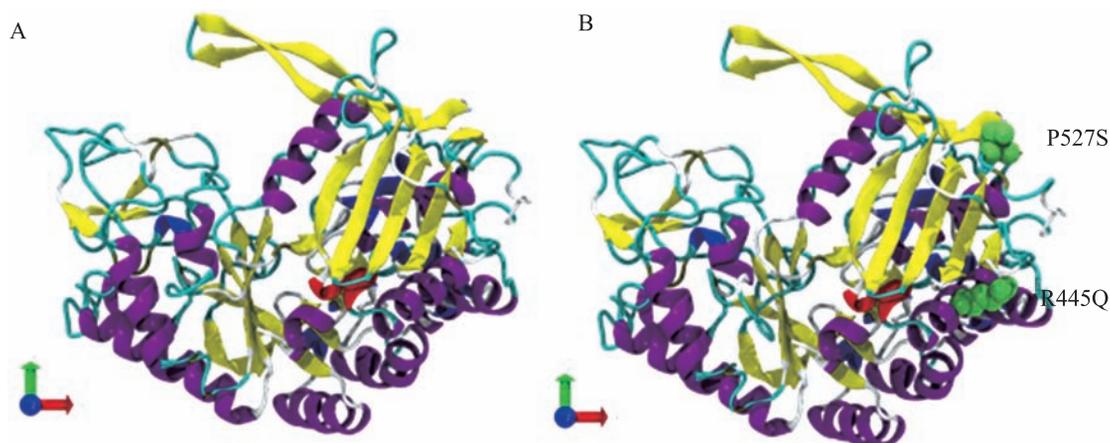


图 4 M-TreS N 端三维结构模型

Fig. 4 3D Model of the TreS N-terminal domain

注: A: 野生型; B: shM9.

Note: A: Wild-type; B: shM9.

本文所获得 shM9 突变株共包含 6 个突变位点, 而这些突变位点都位于 C 端附近。模型分析表明离催化中心最近的两个点突变 R445Q 和 P527S 位于结构的表面。因此我们推测这两个位点与其他的 4 个只是轻微改变了蛋白质的二级结构, 使得底物分子能够更容易进入催化中心。所以, 今后我们将以 shM9 为模板结合定点突变, 着重改造 II 区和 III 区。另外, 对于该酶而言, 葡萄糖是海藻糖的竞争性抑制剂。据报道, 司徒假单胞菌的海藻糖合酶不存在 III 区, 而该酶在反应过程中不会形成副产物葡萄糖^[24], 所以对于 III 区的改造可以作为对 M-TreS 定向进化的一个重要方面。

分段 DNA shuffling 方法的建立为 M-TreS 的定向进化开启了新的篇章。对 shM9 的序列分析发现, 由于在多次 PCR 过程中均使用不具备 3'-5' 外切酶活性的 DNA 聚合酶, 因而提高了目的基因自发突变的频率。另外, 在 12 个碱基的突变位点中有 5 个为同义突变, 这些同义突变有随机突变产生的, 也有同源重组产生的。也就是说, 本文建立的方法可以有效地提高目标基因的突变频率。若要排除目标基因的随机突变, 可以在体

外扩增的过程中使用高保真的 DNA 聚合酶。对于同义突变, 可以用回交的方法排除^[6,25]。同时, 蛋白质的适应度景观学说揭示了: 在蛋白质的进化过程中, 由于存在上位作用, 可能会产生局部适应度^[26]。所以, 在对目的蛋白质的定向进化过程中为了协调好不同性质间的适应度, 建立一种有效的可控的进化策略是必需的。

参 考 文 献

- [1] 张红缨, 孔祥铎, 张今. 蛋白质工程的新策略——酶的体外定向进化[J]. 科学通报, 1999, 44(11): 1121-1127.
- [2] Chen K, Arnold FH. Tuning the activity of an enzyme for unusual environments: sequential random mutagenesis of subtilisin E for catalysis in dimethylformamide[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1993, 90(12): 5618-5622.
- [3] Wang W, Malcolm BA. Two-stage PCR protocol allowing introduction of multiple mutations, deletions and insertions using Quik ChangeTM Site-Directed Mutagenesis[J]. Biotechniques, 1999, 26(4): 680-682.
- [4] Brissos V, Eggert T, Cabral JMS, et al. Improving

- activity and stability of cutinase towards the anionic detergent AOT by complete saturation mutagenesis[J]. *Protein Engineering Design and Selection*, 2008, 21(6): 387–393.
- [5] Hibbert EG, Senussi T, Smith MEB, et al. Directed evolution of transketolase substrate specificity towards an aliphatic aldehyde[J]. *Journal of Biotechnology*, 2008, 134(3/4): 240–245.
- [6] Stemmer WPC. Rapid evolution of a protein in vitro by DNA shuffling[J]. *Nature*, 1994, 370(6488): 389–391.
- [7] Villiers BRM, Stein V, Hollfelder F. USER friendly DNA recombination (USERec): a simple and flexible near homology-independent method for gene library construction[J]. *Protein Engineering Design and Selection*, 2010, 23(1): 1–8.
- [8] Fujii R, Kitaoka M, Hayashi K. RAISE: a simple and novel method of generating random insertion and deletion mutations[J]. *Nucleic Acids Research*, 2006, 34(4): e30.
- [9] Kolkman JA, Stemmer WPC. Directed evolution of proteins by exon shuffling[J]. *Nature Biotechnology*, 2001, 19(5): 423–428.
- [10] Turner NJ. Directed evolution drives the next generation of biocatalysts[J]. *Nature Chemical Biology*, 2009, 5(8): 567–573.
- [11] Zhang ZG, Yi ZL, Pei XQ, et al. Improving the thermostability of *Geobacillus stearothermophilus* xylanase XT6 by directed evolution and site-directed mutagenesis[J]. *Bioresource Technology*, 2010, 101(23): 9272–9278.
- [12] Stutzman-Engwall K, Conlon S, Fedechko R, et al. Semi-synthetic DNA shuffling of *aveC* leads to improved industrial scale production of doramectin by *Streptomyces avermitilis*[J]. *Metabolic Engineering*, 2005, 7(1): 27–37.
- [13] Fasan R, Chen MM, Crook NC, et al. Engineered alkane-hydroxylating cytochrome P450BM3 exhibiting natively catalytic properties[J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2007, 46(44): 8414–8418.
- [14] Dalby PA. Strategy and success for the directed evolution of enzymes[J]. *Current Opinion in Structural Biology*, 2011, 21(4): 473–480.
- [15] Zhu YM, Zhang J, Wei D S, et al. Isolation and identification of a thermophilic strain producing trehalose synthase from geothermal water in China[J]. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 2008, 72(8): 2019–2024.
- [16] Wang YF, Zhang J, Wang WW, et al. Effects of the N-terminal and C-terminal domains of *Meiothermus ruber* CBS-01 trehalose synthase on thermostability and activity[J]. *Extremophiles*, 2012, 16(3): 377–385.
- [17] Okrasa K, Levy C, Wilding M, et al. Structure-guided directed evolution of alkenyl and arylmalonate decarboxylases[J]. *Angewandte Chemie*, 2009, 121(41): 7827–7830.
- [18] Esvelt KM, Carlson JC, Liu DR. A system for the continuous directed evolution of biomolecules[J]. *Nature*, 2011, 472(7344): 499–503.
- [19] Zhao HM, Giver L, Shao ZX, et al. Molecular evolution by staggered extension process (StEP) in vitro recombination[J]. *Nature Biotechnology*, 1998, 16(3): 258–261.
- [20] 朱玥明. 红色亚栖热菌海藻糖合成酶相关基因的克隆、表达以及海藻糖代谢途径的研究[D]. 天津: 南开大学博士学位论文, 2009.
- [21] Humphrey W, Dalke A, Schulten K. VMD: visual molecular dynamics[J]. *Journal of Molecular Graphics*, 1996, 14(1): 33–38.
- [22] Zhu YM, Wei DS, Zhang J, et al. Overexpression and characterization of a thermostable trehalose synthase from *Meiothermus ruber*[J]. *Extremophiles*, 2010, 14(1): 1–8.
- [23] 王宇凡, 朱玥明, 魏东盛, 等. 利用定点突变分析海藻糖合酶的功能[J]. *微生物学通报*, 2009(5): 658–669.
- [24] Lee JH, Lee KH, Kim CG, et al. Cloning and expression of a trehalose synthase from *Pseudomonas stutzeri* CJ38 in *Escherichia coli* for the production of trehalose[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2005, 68(2): 213–219.
- [25] Zhao HM, Arnold FH. Functional and nonfunctional mutations distinguished by random recombination of homologous genes[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1997, 94(15): 7997–8000.
- [26] Romero PA, Arnold FH. Exploring protein fitness landscapes by directed evolution[J]. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2009, 10(12): 866–876.