



关于酶工程酶分子定向进化

酶分子定向进化

- 酶分子定向进化又称为酶分子体外进化，属于蛋白质的非理性设计，是蛋白质工程的新策略，是在试管中模拟达尔文进化的过程，利用分子生物学手段在分子水平创造分子的多样性，结合灵敏的筛选技术，迅速得到理想的突变体。与传统的理性设计相比，它不需事先了解蛋白质的空间结构、活性位点、催化机制等因素，而是人为地创造特殊的进化条件，模拟自然进化机制（随机突变、基因重组和自然选择），在体外改造酶基因，产生基因多样性，并结合定向筛选（或选择）技术，获得具有某些预期特征的改构酶。



生物的自然进化

➤ 进化过程：

突变→自然选择→遗传后代

➤ 进化结果：

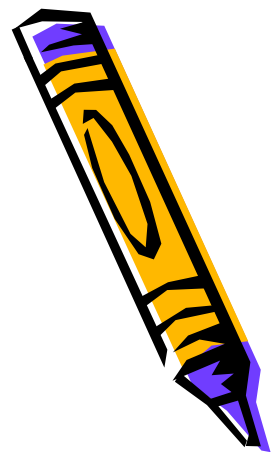
基因多样性：为完成同一功能所表现出的
多个 基因或同一个基因

(同源性)

代谢途径的多样性：同样产物，多条途径

代谢产物的多样性：同一底物，不同产物

生物多样性：整个生态系统中的生物

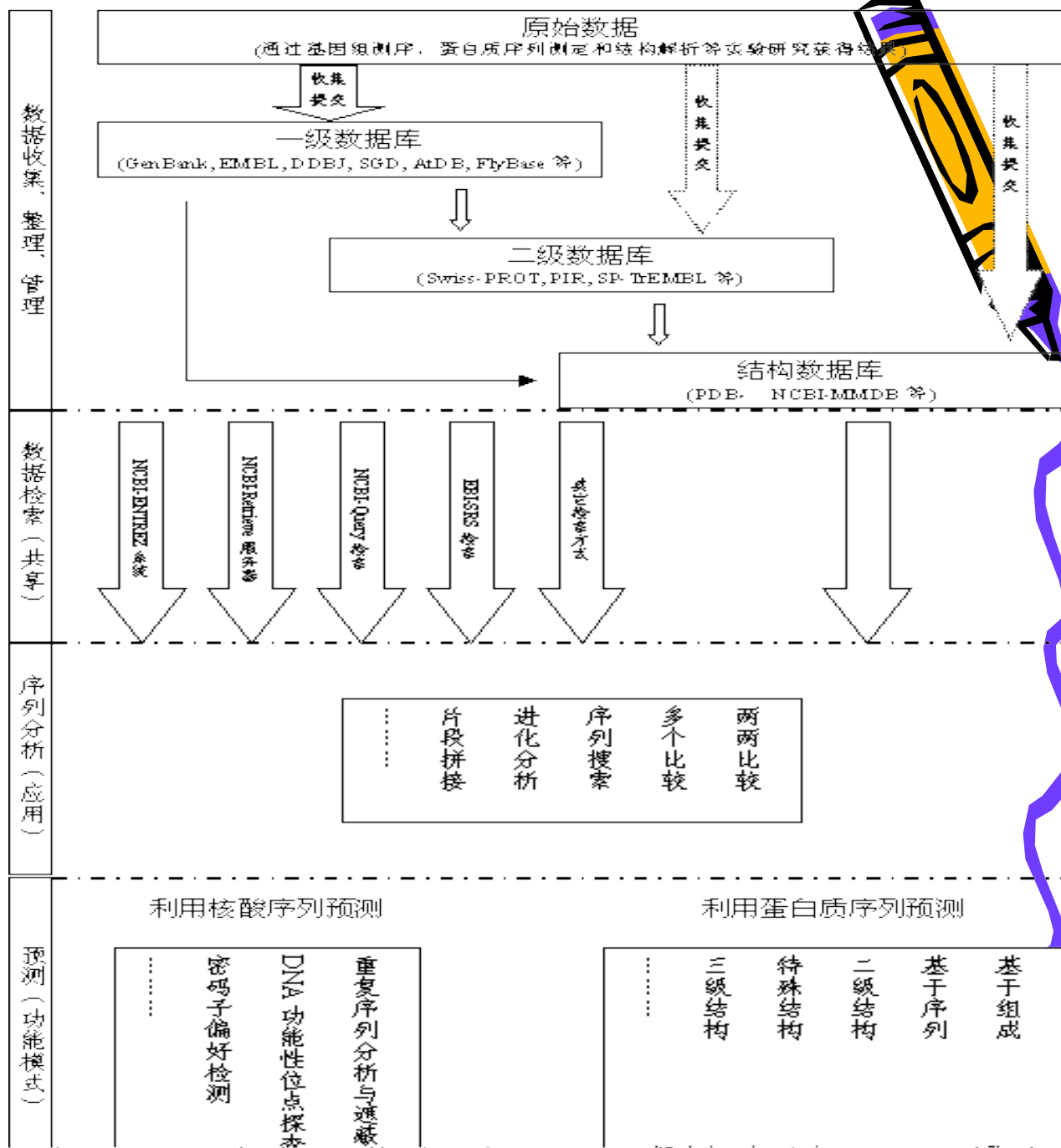


酶的定向进化

- 酶分子的合理设计 (rational design)
- 酶分子的定向进化 (directed evolution)



酶的合理设计



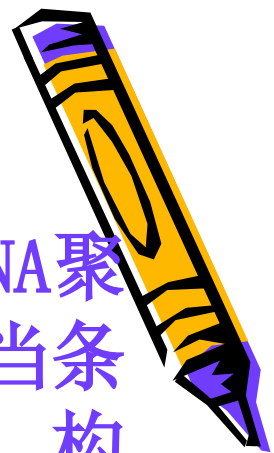
体外定向进化的意义



- 理论上，蛋白质分子蕴藏着很大的进化潜力，很多功能有待于开发，这是酶的体外定向进化的基本先决条件。
- 所谓酶的体外定向进化，又称实验分子进化，属于蛋白质的非合理设计，它不需事先了解酶的空间结构和催化机制，通过人为地创造特殊的条件，模拟自然进化机制(随机突变、重组和自然选择)，在体外改造酶基因，并定向选择出所需性质的突变酶。
- 酶的体外定向进化技术极大地拓展了蛋白质工程学的研究和应用范围，特别是能够解决合理设计所不能解决的问题，为酶的结构与功能研究开辟了崭新的途径，并且正在工业、农业和医药等领域逐渐显示其生命力。



定向进化的原理



- 在待进化酶基因的PCR扩增反应中，利用Taq DNA聚合酶不具有3' → 5' 校对功能的性质，配合适当条件，以很低的比率向目的基因中随机引入突变，构建突变库，凭借定向的选择方法，选出所需性质的优化酶(或蛋白质)，从而排除其他突变体。
- 定向进化的基本规则是“获取你所筛选的突变体”。
- 定向进化=随机突变+选择。前者是人为引发的，后者虽相当于环境，但只作用于突变后的分子群，起着选择某一方向的进化而排除其他方向突变的作用，整个进化过程完全是在人为控制下进行的



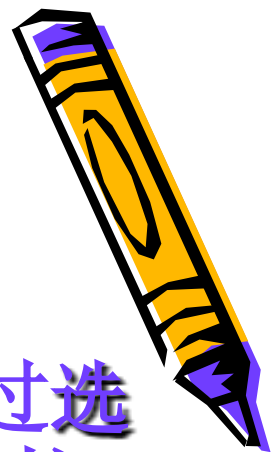
DNA改组和外显子改组

DNA改组 (DNA shuffling) 又称有性PCR (sexual PCR), 原理。该策略的目的是创造将亲本基因群中的突变尽可能组合的机会, 导致更大的变异, 最终获取最佳突变组合的酶。通过DNA改组, 不仅可加速积累有益突变, 而且可使酶的2个或更多的已优化性质合为一体。

外显子改组 (exon shuffling) 类似于DNA改组, 两者都是在各自含突变的片段间进行交换, 前者尤其适用于真核生物。在自然界中, 不同分子的内含子间发生同源重组, 导致不同外显子的结合, 是产生新蛋白质的有效途径之一。与DNA改组不同, 外显子改组是靠同一种分子间内含子的同源性带动, 而DNA改组不受任何限制, 发生在整个基因片段上。



定向进化的选择策略



1、定向进化中，突变具有随机性，但通过选择特定方向的突变限定了进化趋势，加之控制实验条件，限定突变种类，降低突变率，缩小突变库的容量，这不仅减少了工作量，更重要的是加快了酶在某一方向的进化速度。

2、通常，筛选方法必须灵敏，至少与目的性质相关。另有一些其他的筛选方法，如加入能产生可见光信号的底物或利用绿色荧光蛋白的荧光性质等。

高通量的筛选体系



酶的体外定向进化应用实例

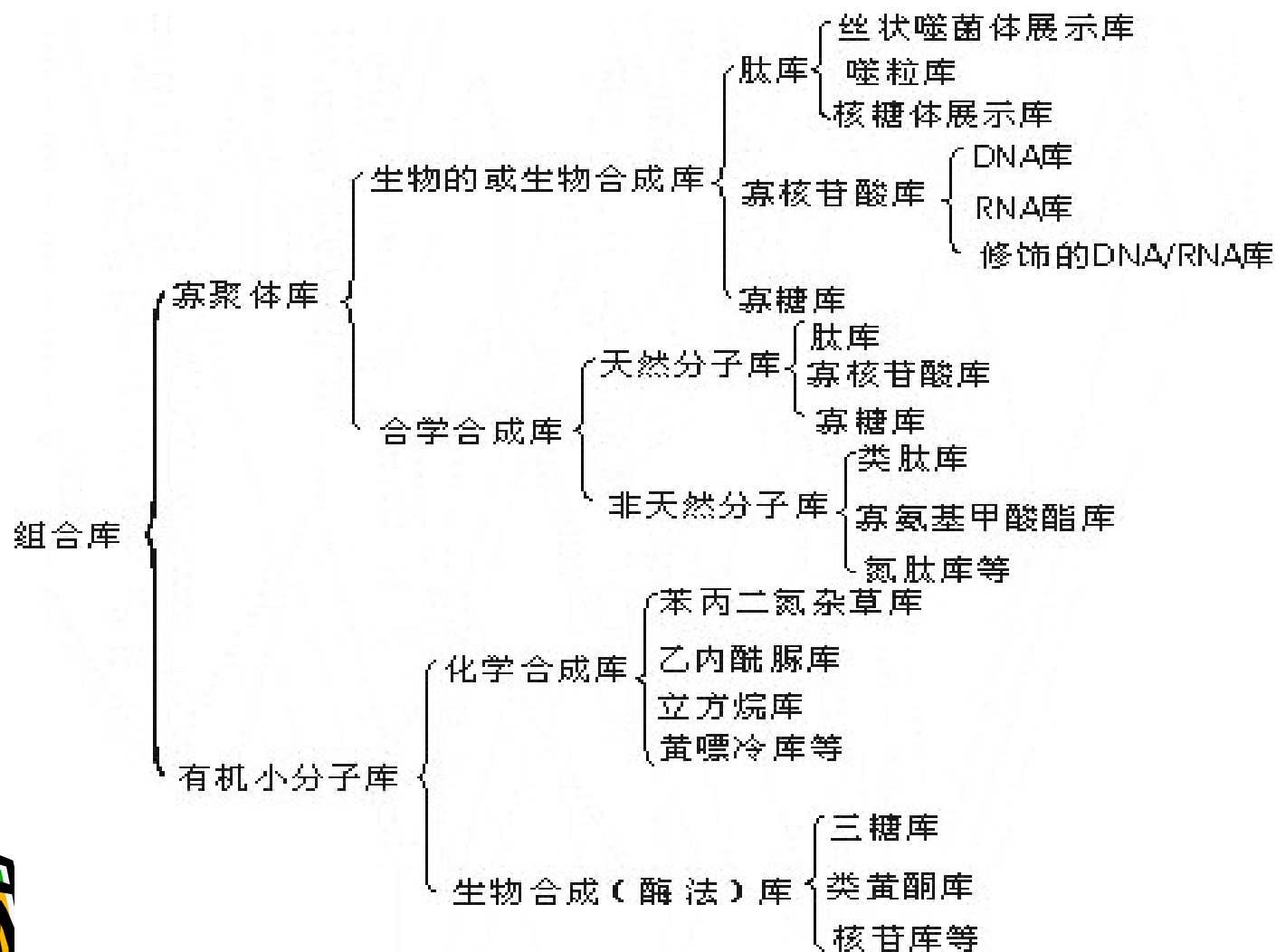


酶	性质	突变方法	
枯草杆菌蛋白酶E	有机相活性/稳定性	易错PCR	
β -内酰胺酶	总活力/底物专一性	DNA改组	
枯草杆菌蛋白酶BPN'	稳定性	盒式诱变	
对硝基苯酯酶	底物专一性/有机相活性	易错PCR/DNA改组	
胸腺嘧啶核苷激酶	底物专一性	盒式诱变	
β -半乳糖苷酶	底物专一性	DNA改组	
绿色荧光蛋白	荧光	DNA改组	
核酶	底物专一性	易错PCR/DNA改组	
天冬氨酸酶	活性与稳定性	随机/定位诱变	
抗体和疫苗	活性/专一性/最佳表达	DNA改组	



回本章目录

分子进化工程的种类



组合库的种类

人工获取新基因的方法

➤ 常规的基因工程方法

生物功能 \longleftrightarrow 蛋白质 \longrightarrow 基因

➤ 新基因的理性设计和人工合成

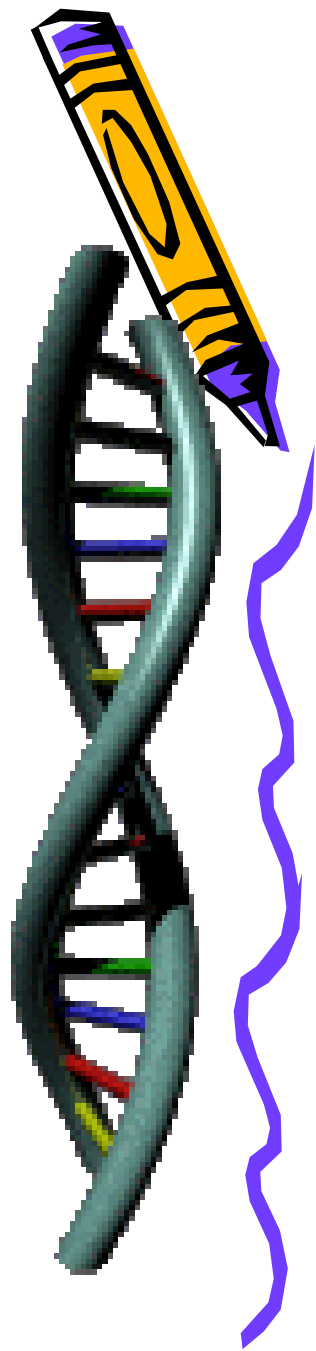
根据已有基因的序列和功能进行设计

➤ 基因的直接进化 (directed evolution)

可使已有基因获得新的特性

可获得自然界中不存在的基因

可解决许多新的理论和应用问题



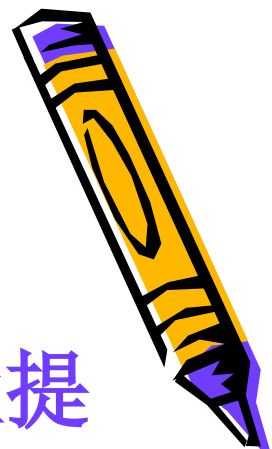
基因直接进化的用途



- 提高酶活性——天门冬氨酸氨基转移酶活性提高30倍
- 改变底物特异性和对映异构体选择性——
 - 酯酶可水解非天然酯类
- 改善酶的工艺性——冷适应和热适应酶
- 改变酶的拓扑结构——二体酶变为单体酶
- 获取许多新的理论知识



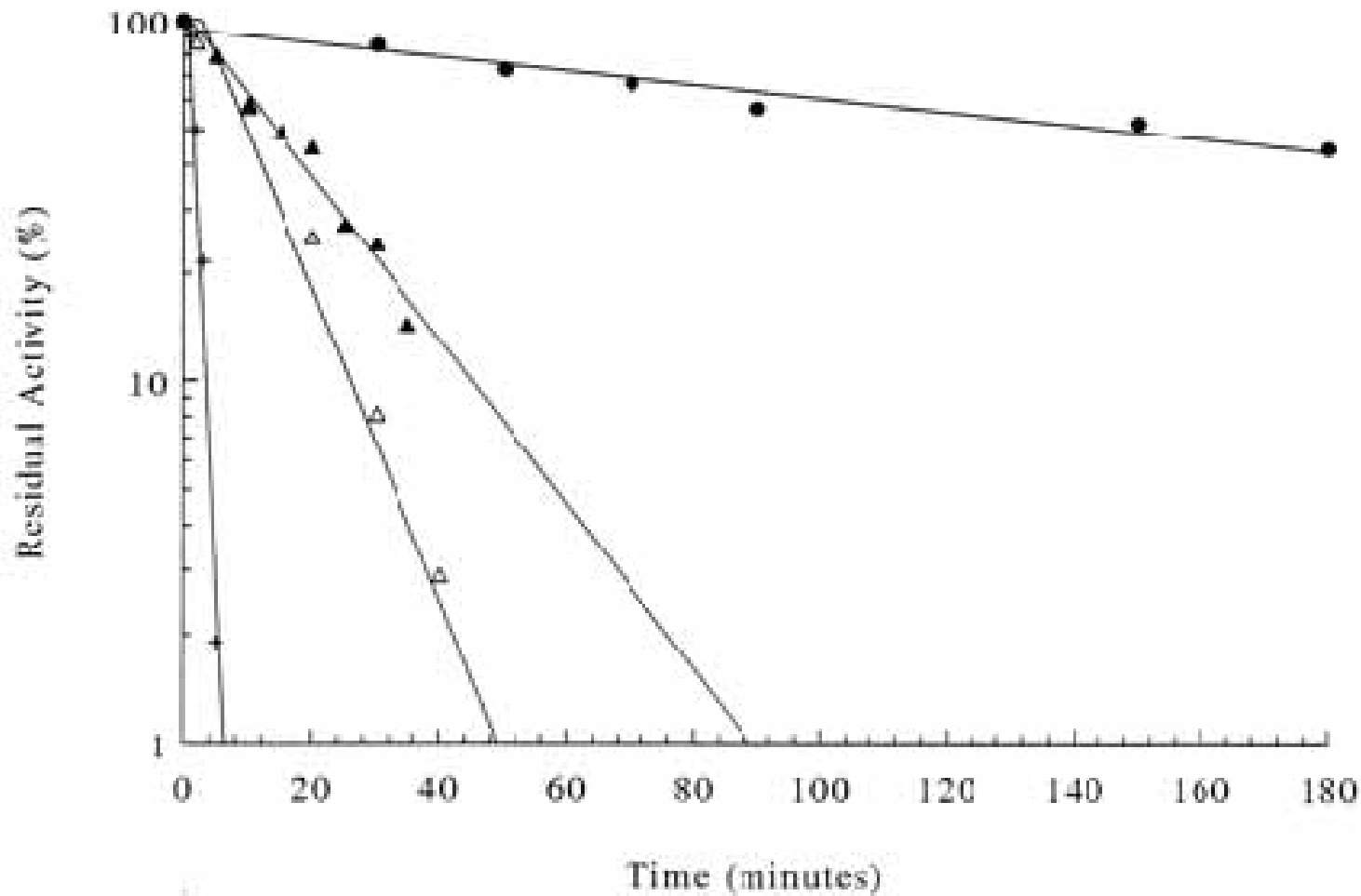
基因直接进化的用途



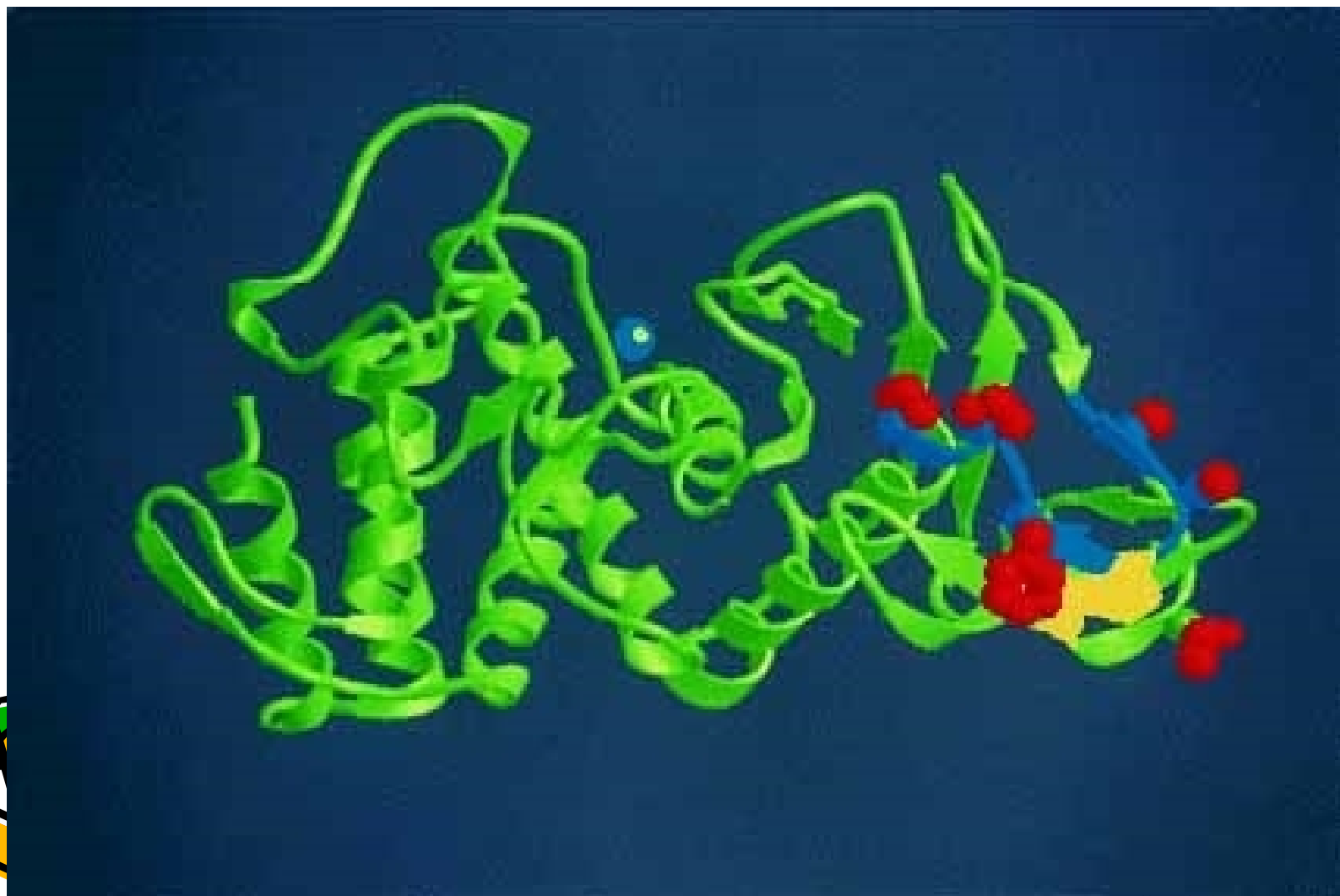
- 提改变酶的特性-----多功能或单功能酶
- 高酶活性---天门冬氨酸氨基转移酶活性提高30倍
- 改变底物特异性和对映异构体选择性-----酯酶可水解非天然酯类
- 改变酶的工艺性-----冷适应和热适应酶
- 改善酶的稳定性-----二体酶变为单体酶或单体酶变为二体酶
- 获取许多新的理论知识



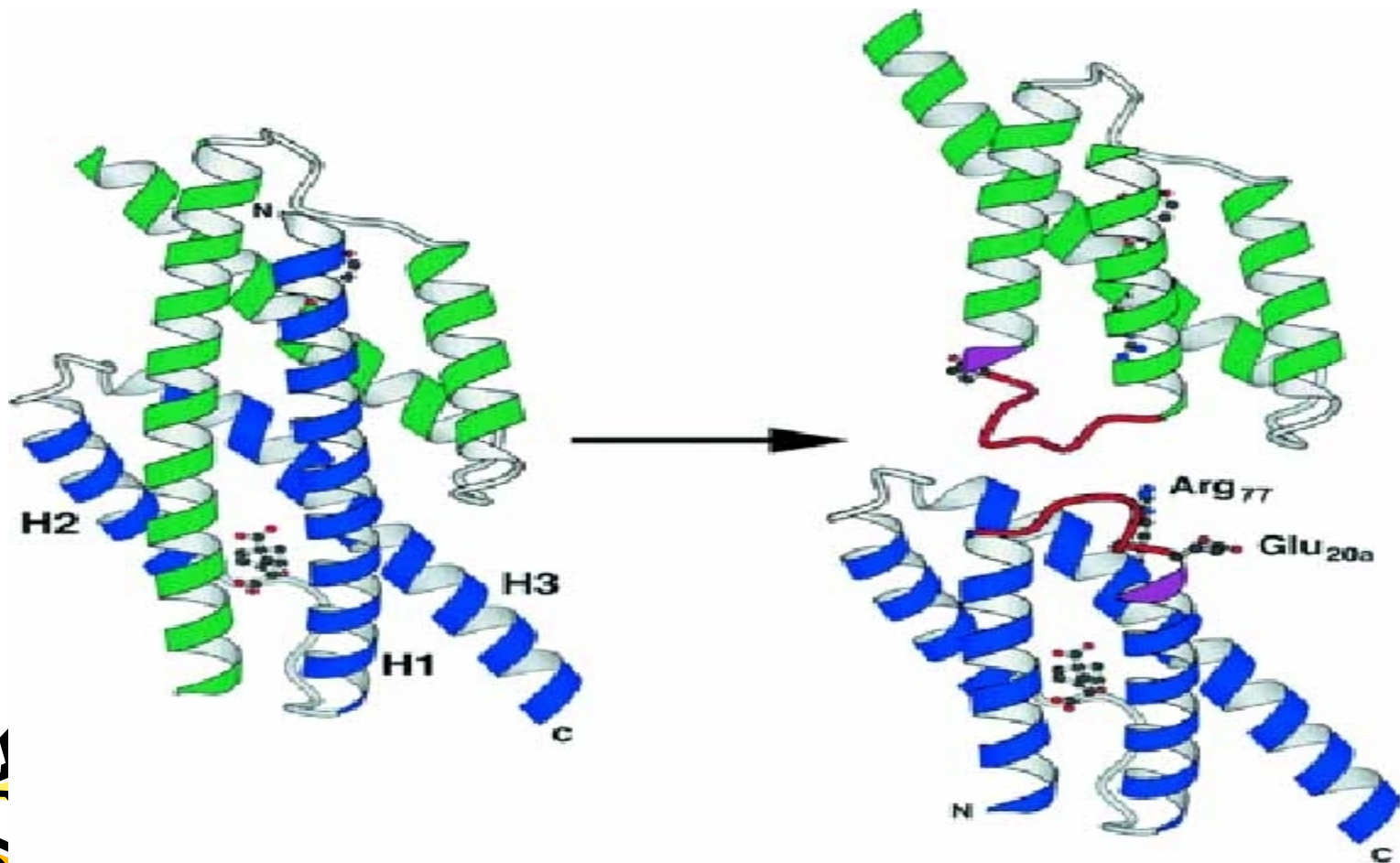
TLPs 的失活曲线



TLP-*ste*突变蛋白的三维结构



酶拓扑结构的变化



蛋白质的耐热机制

- 天然耐热蛋白质特性:

减少内腔体积; 引入盐桥束; 减少表面积/体积比; 除去氧化还原活性基; 埋藏暴露的疏水基; 除去 α -支链氨基酸; 除去能脱氨基的氨基酸。

所有耐热蛋白质的氨基酸同源性低至36%，最高不超过75%。

- 分子进化耐热蛋白质特性:

邻-硝基苯酯酶 (p-nitrobenzyl esterase) 突变体8g8的了稳定性提高了17°C, 但突变的氨基酸数仅有13个, 与天然酯酶同源性高达97%。



基因直接进化的步骤



- 突变

基因突变库的建立

- 筛选

基因突变库的活体或离体筛选

- 基因复制与遗传



建立基因突变库的方法

➤ 定向诱变:

点突变——**碱基**删除、增补和替换

➤ 随机诱变:

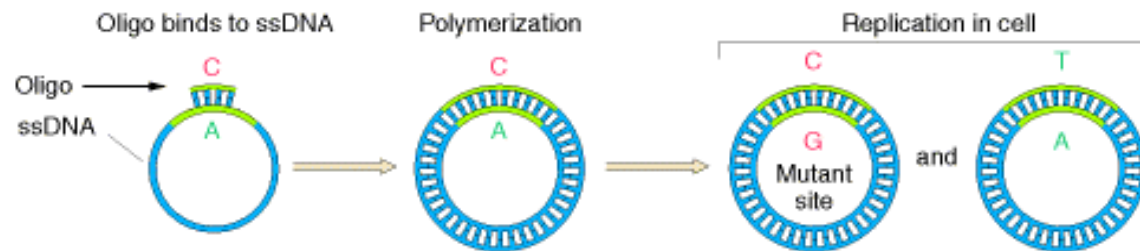
易错PCR法(Error-prone PCR)——

- ❖ 降低一种dNTP的量（降至5%-10%）
- ❖ 加入dITP来代替被减少的dNTP
- ❖ 缓冲液中另加0.5mmol/L Mn^{2+}

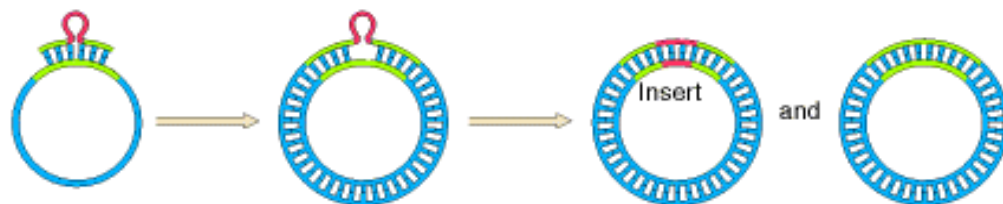


(a) Oligonucleotide-directed mutagenesis

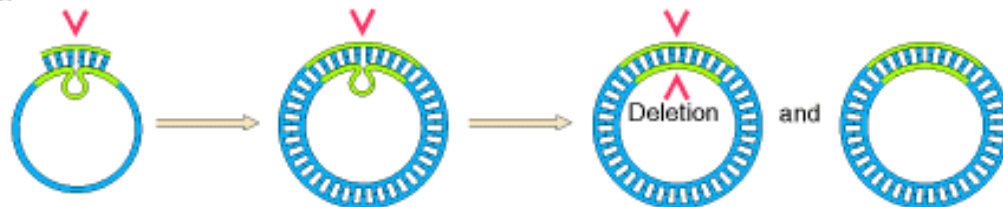
(i) Base-pair substitution



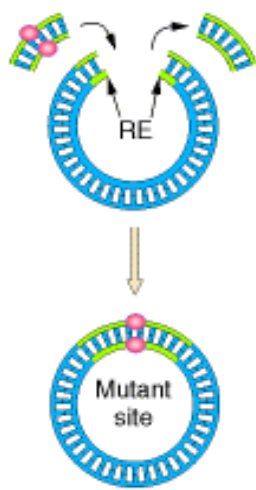
(ii) Insertion



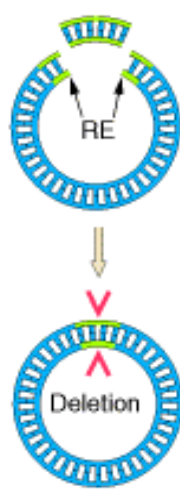
(iii) Deletion



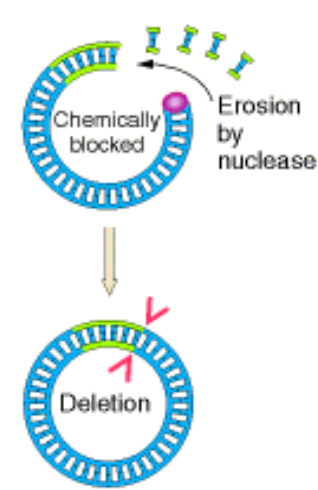
(b) Cassette replacement



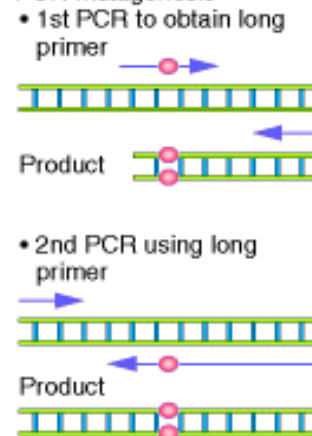
(c) Deletion



(d) Sets of deletions



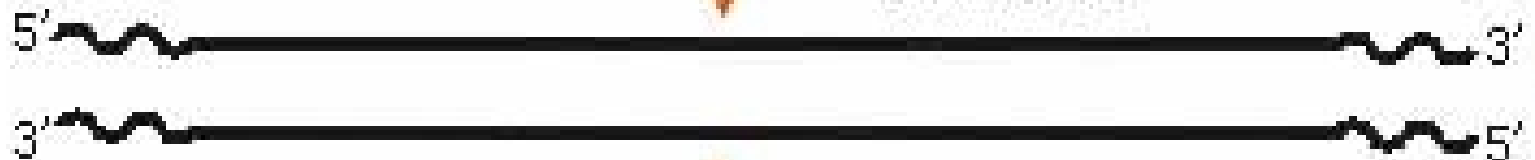
(e) PCR mutagenesis



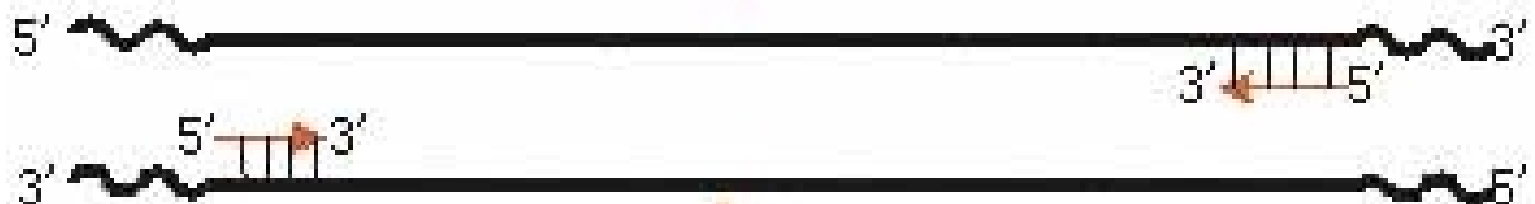
易错PCR



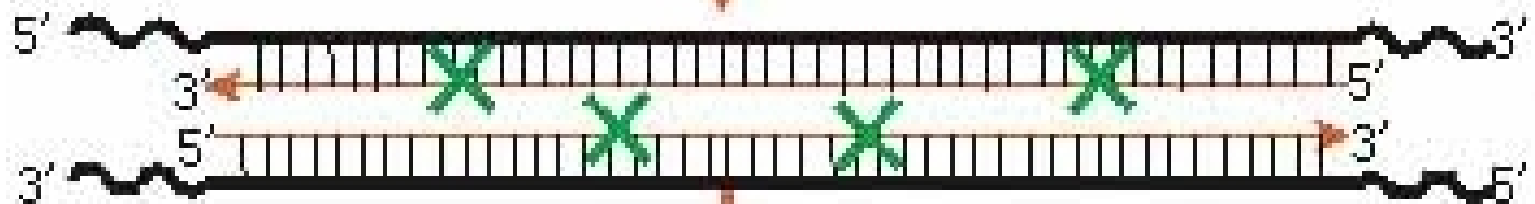
90°C 变性解链



与引物退火, 50°C



引物及延伸, 75°C



90°C 变性解链

进入第二次循环

第一次循环





➤ 同序法 (consensus approach)

- 对一组同源蛋白质的氨基酸序列进行比较，以一定的标准程序计算出各氨基酸序列的共有序列；
- 人工合成同序基因后重组表达。

Martin Lehmann等（2000~2002）把这种方法应用在真菌植酸酶家族设计合成了同序植酸酶基因，并表达出具热稳定性的同序植酸酶。

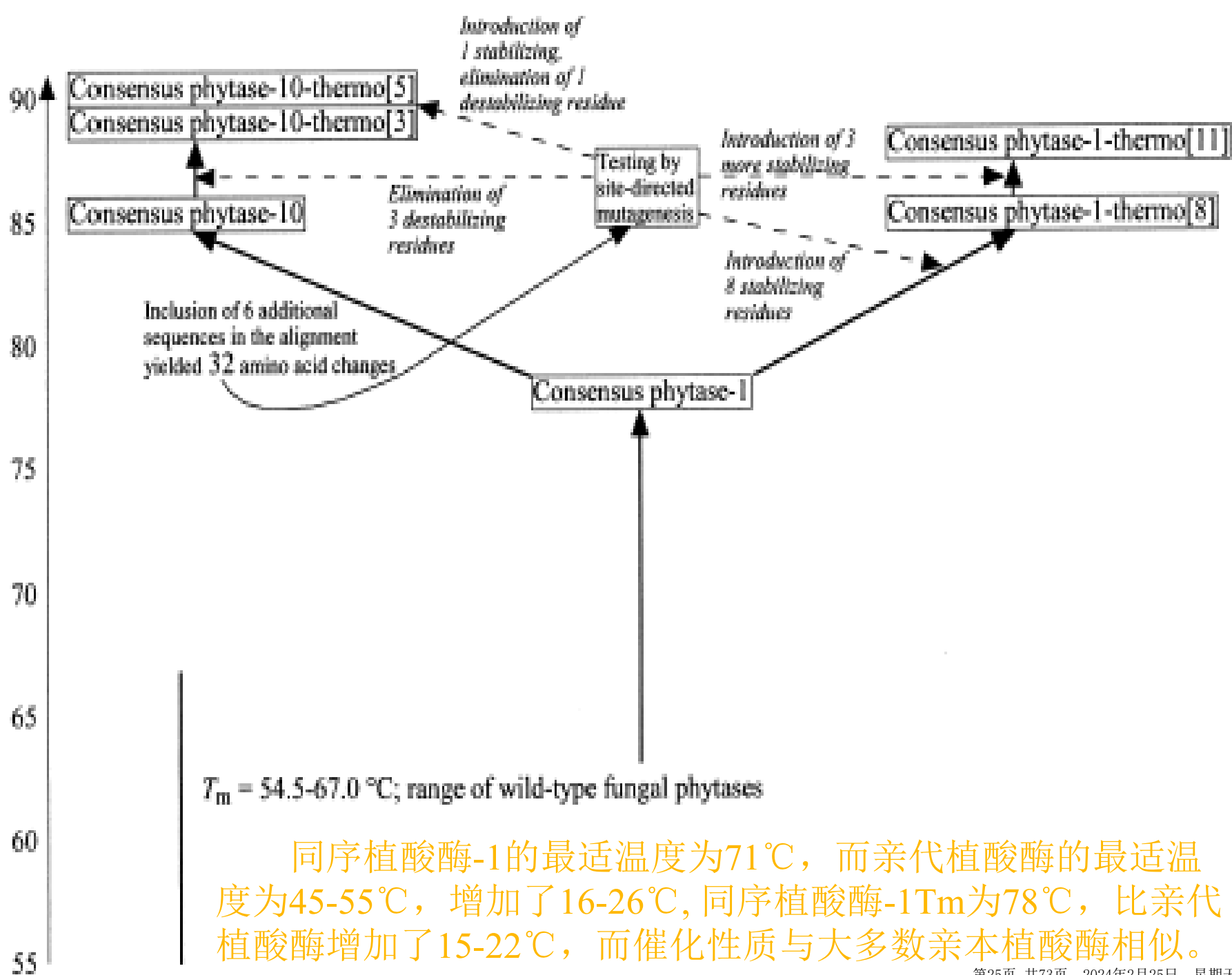


1. <i>Aspergillus terreus</i> 9A-1	QVLARHGARS	PTHSKTKAYA	ATIAAIQKSA	TAFPGKYAFL	QSYNYSLDSE
2. <i>Aspergillus terreus</i> cbs	QVLARHGARS	PTDSKTKAYA	ATIAAIQKNA	TALPGKYAFL	KSYNYSMGSE
3. <i>Aspergillus niger</i> var. <i>swamori</i>	QVLSRHGARY	PTESKGGKYS	ALIEEIQQNV	TTFDGKYAFL	KTYNYSLGAD
4. <i>Aspergillus niger</i> T213	QVLSRHGARY	PTESKGGKYS	ALIEEIQQNV	TTFDGKYAFL	KTYNYSLGAD
5. <i>Aspergillus niger</i> NRRL3135	QVLSRHGARY	PTDSKGGKYS	ALIEEIQQNA	TTFDGKYAFL	KTYNYSLGAD
6. <i>Aspergillus fumigatus</i> 13073	QVLSRHGARY	PTSSKSKKYK	KLVTAIQANA	TDFKGGKFAFL	KTYNYTLGAD
7. <i>Aspergillus fumigatus</i> 32722	QVLSRHGARY	PTSSKSKKYK	KLVTAIQANA	TDFKGGKFAFL	KTYNYTLGAD
8. <i>Aspergillus fumigatus</i> 58128	QVLSRHGARY	PTSSKSKKYK	KLVTAIQANA	TDFKGGKFAFL	KTYNYTLGAD
9. <i>Aspergillus fumigatus</i> 26906	QVLSRHGARY	PTSSKSKKYK	KLVTAIQANA	TDFKGGKFAFL	KTYNYTLGAD
10. <i>Aspergillus fumigatus</i> 32239	QVLSRHGARY	PTASKSKKYK	KLVTAIQKNA	TEFKGGKFAFL	ETNYNYTLGAD
11. <i>Emericella nidulans</i>	QVLSRHGARY	PTESKSKAYS	GLIEAIQKNA	TSPWQQYAFI	ESYNYTLGAD
12. <i>Talaromyces thermophilus</i>	QLLSRHGARY	PTSSKTELYS	QLISRIQKTA	TAYKGYAFL	KDYRYQLGAN
13. <i>Myceliophthora thermophila</i>	QVLSRHGARA	PTLKRAASYV	DLIDRIHGA	ISYGPGEYFL	RTYDYTLGAD
Consensus	QVLSRHGARY	PTSSK-KAYS	ALIEAIQKNA	T-FKGGKYAFL	KTYNYTLGAD
Consensus phytase-1	QVLSRHGARY	PTSSKSKAYS	ALIEAIQKNA	TAFKGGKYAFL	KTYNYTLGAD
14. <i>Thermomyces lanuginosus</i>	QVLSRHGARY	PTAHKSEVYA	ELLQRIQDTA	TEFKGDFAFI	RDYAYHLGAD
15. <i>Paxillus involutus</i> (phyA1)	NIIQRHGARF	PTSGATTRIK	AGLTKLQGVQ	NFTDAKFNFI	KSFKYDLGNS
16. <i>Paxillus involutus</i> (phyA2)	NIIQRHGARF	PTSGAATRIK	AGLSKLQSVQ	NFTDPKFDPI	KSFTYDLGTS
17. <i>Trametes pubescens</i>	HIIQRHGARF	PTSGAAKRIQ	TAVAKLKAAS	NYTDPLLAPV	TNYTYSLGQD
18. <i>Agrocybe pediades</i>	NIIQRHGARF	PTSGAGTRIQ	AAVKKLQSAK	TYTDPRLDFI	TNYTYTLGHD
19. <i>Peniophora lycii</i>	NLIQRHGARW	PTSGARSRQV	AAVAKIQMAR	PFTDPKYEFL	NDFVYKFGVA
20. <i>Conbasidio phytase</i>	NIIQRHGARF	PTSGAATRIQ	AAVAKLQSA-	--TDPKLDLFI	-N-TY-LG-D
Consensus	QVLSRHGARY	PTSSKSKKYS	ALI-AIQKNA	T-FKGGKYAFL	KTYNYTLGAD
Consensus phytase-10	QVLSRHGARY	PTSSKSKKYS	ALIEAIQKNA	TAFKGGKYAFL	KTYNYTLGAD
Consensus phytase-11	QVLSRHGARY	PTSSKSKKYS	ALIERIQKNA	T-FKGGKYAFL	KTYNYTLGAD



真菌植酸酶aa序列的同序比较

Unfolding temperature (T_m) determined by DSC





➤ DNA Shuffling:

- ❖ 外显子、单基因和基因家族的重组装
- ❖ 随机引物延伸法
- ❖ 交错延伸法

➤ 随机片段活体突变:

线状基因和随机片段共转化酵母细胞



基因突变库的筛选方法

Screening the Library and Selecting the Right Clone



➤ 平板分析

- 😊 使抗生素失效的酶类(如头孢菌素酶, β -乳糖酶)
- 😊 提高耐热性
- 😊 易于观察的菌落表型 (如菌落颜色等)
- 😊 营养缺陷型的辅助筛选





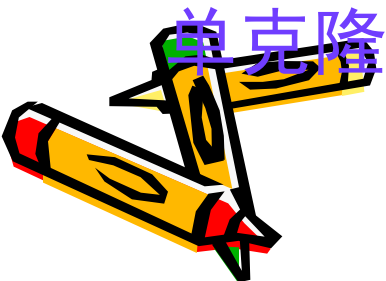
- 噬菌体展示、细胞表面展示

根据所需要的特性，对经Shuffling后的DNA文库在噬菌体或细菌细胞表面（细菌、纤毛虫细胞表面）的表现特征进行筛选，获得提高目的底物亲和力的突变子。

- 减少筛选工作量

突变文库→大的突变子库→小的突变子库→

单克隆



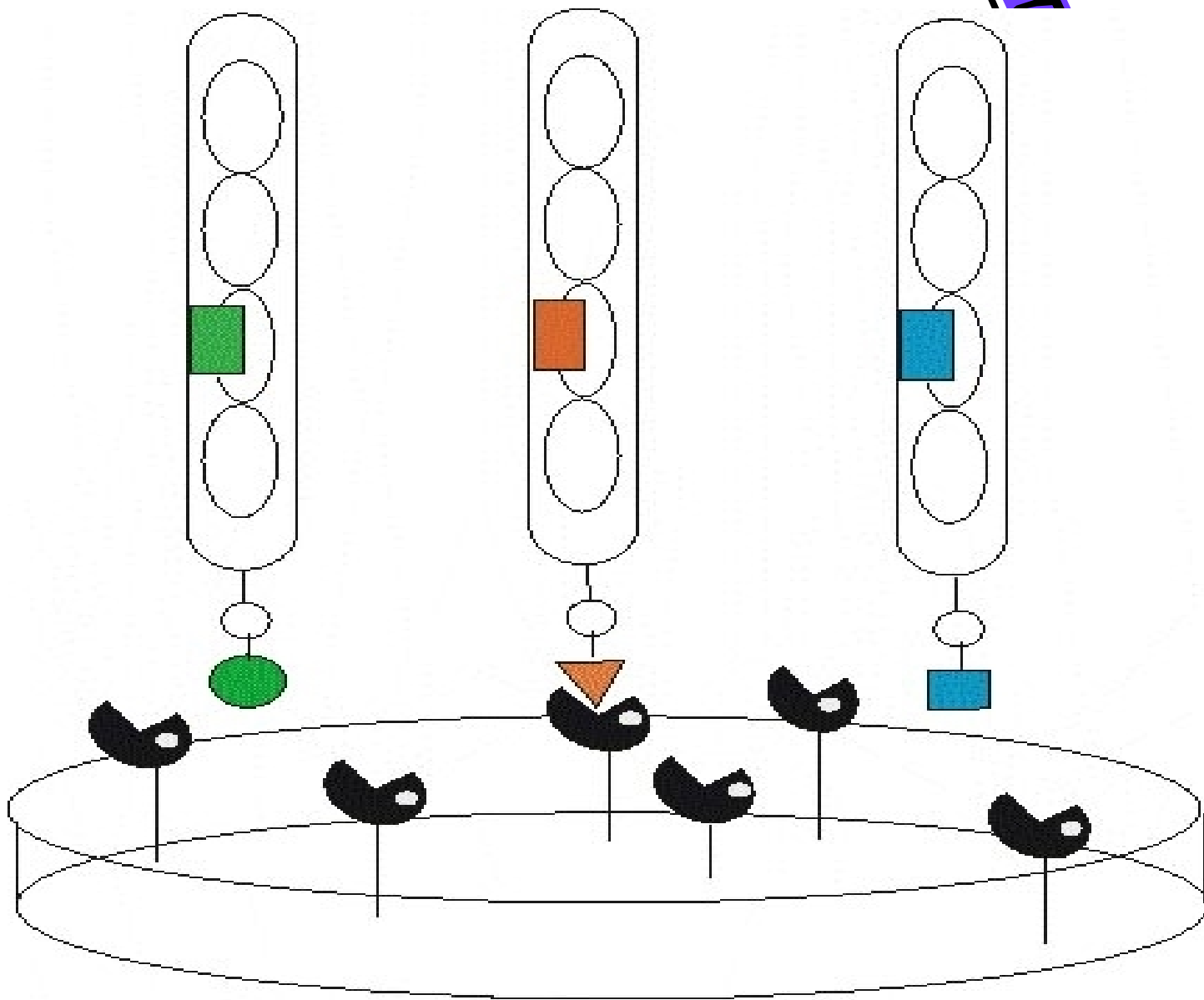
噬菌体表面展示(phage surface display)



将外源基因或随机序列的DNA分子群与噬菌体外壳蛋白基因相连接，使外源DNA所编码的蛋白质以融合蛋白形式表达在噬菌体外壳表面的方法。易于用免疫反应或配体特异性结合等方法筛得目的克隆。



噬菌体展示筛选模式



靶分子固定在塑料平皿的筛选模式
(引自Smith, 1993)



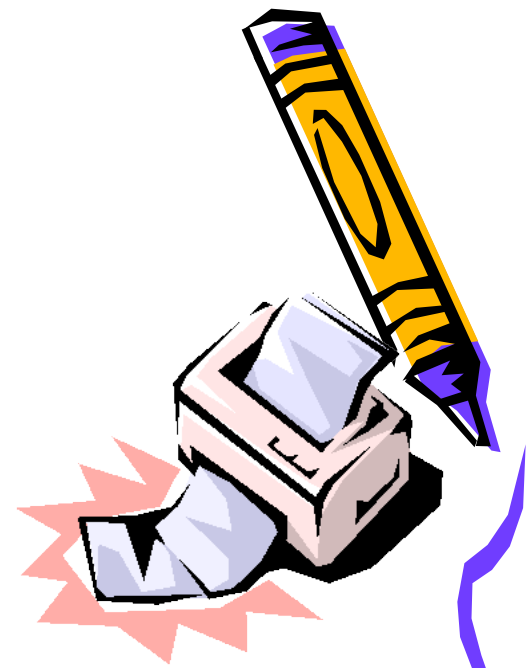
DNA Shuffling技术

DNA Shuffling

DNA改组

DNA洗牌

DNA搅乱重排



1994年，Stemmer等，用DNA Shuffling技术体外快速进化蛋白——有性PCR法

1997年，France Aronld研究组将DNA Shuffling技术做了改进——交错延伸法



DNA Shuffling的内涵



What is DNA shuffling?

- Darwinian Evolution
- Natural selection of existing mutations
- **crossovers,**
 - deletions,
 - insertions,
 - inversions,
 - **point mutations**

Directed Evolution
Targeted selection
of created mutations

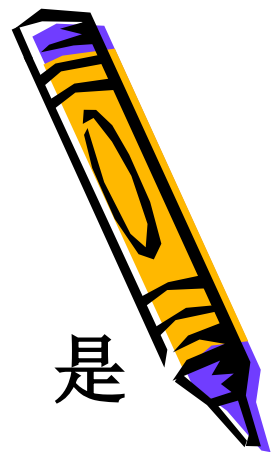
What happens after DNA shuffling

- Generation of a large library of novel genes (chimeras)
- Selection for improved/desired bio-functions

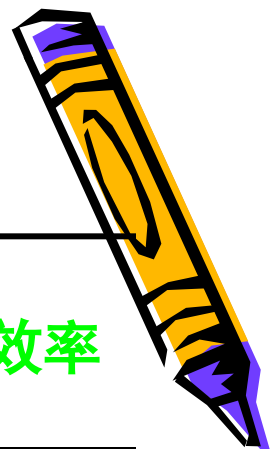


DNA Shuffling的内涵

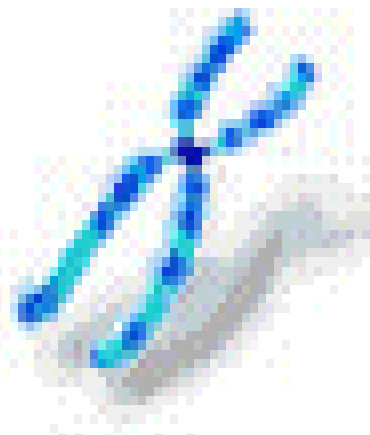
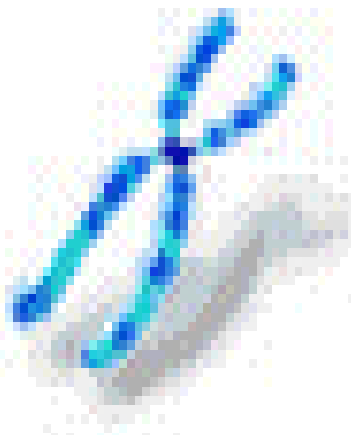
DNA Shuffling: 指DNA分子的体外重组，是基因在分子水平上进行有性重组 (Sexual Recombination)。通过改变单个基因 (或基因家族, gene family) 原有的核苷酸序列，创造新基因，并赋予表达产物以新功能。



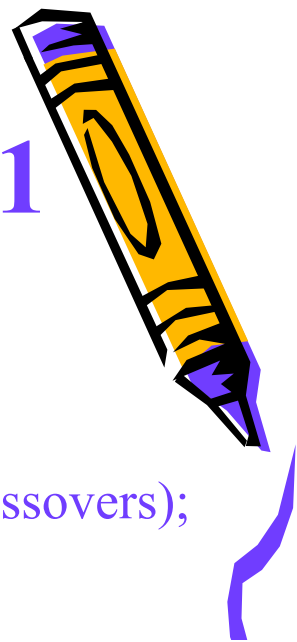
DNA Shuffling与常规定向进化的比较



项目	进化速度	进化对象	进化周期	影响对象	突变效率
常规定向进化	缓慢进化	整个基因组	多年	完整基因组	高
DNA Shuffling	快速进化	特定基因/ 操纵子/病毒	几天	部分基因组	低

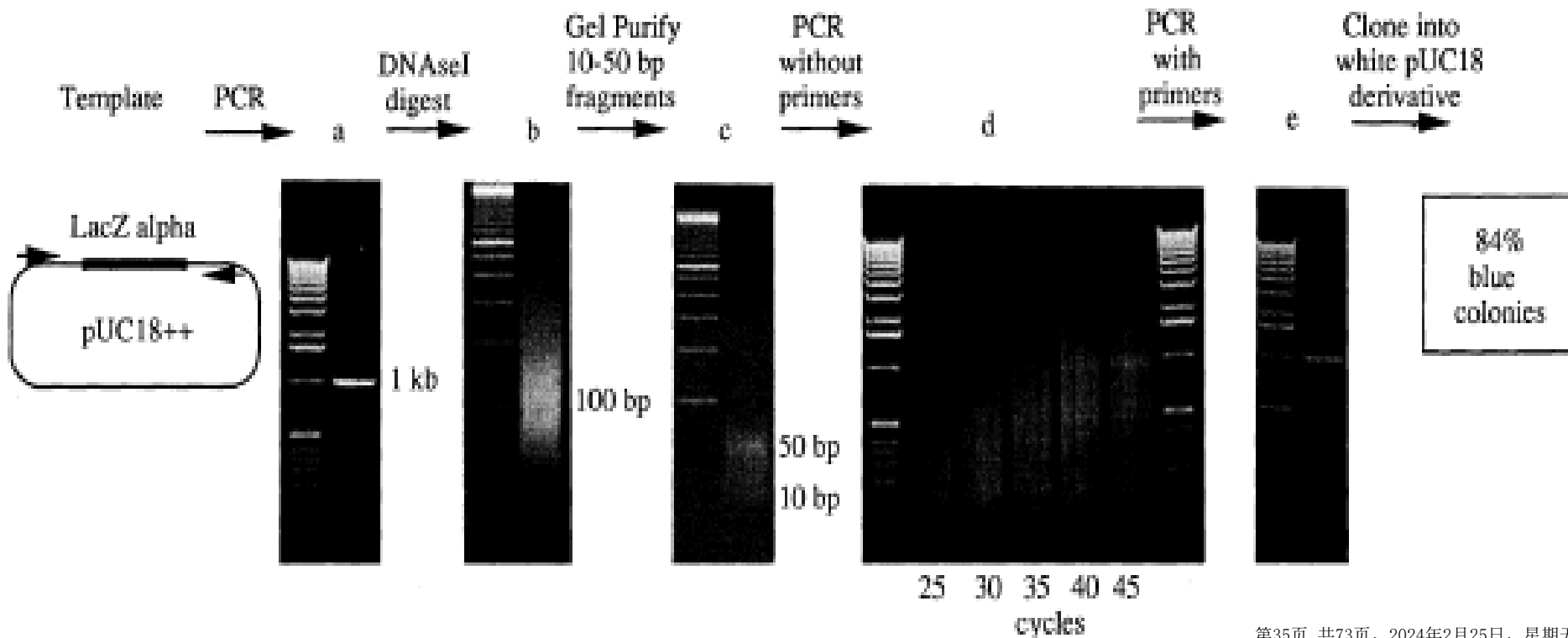


How DNA shuffling works - 1

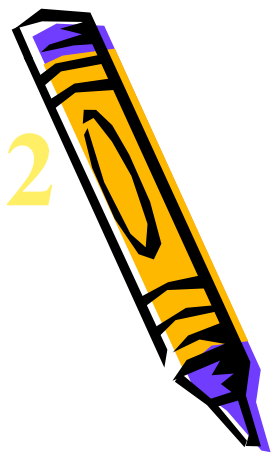


How DNA shuffling is done in the tube

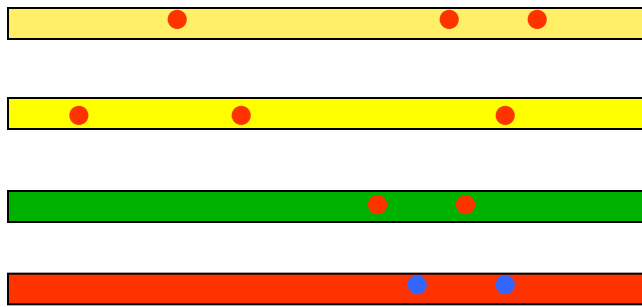
- Random fragmentation of a pool of related genes;
- Self-priming polymerase reaction and template switching (causing crossovers);
- PCR amplification with primers of reassembled products



How DNA shuffling works - 2



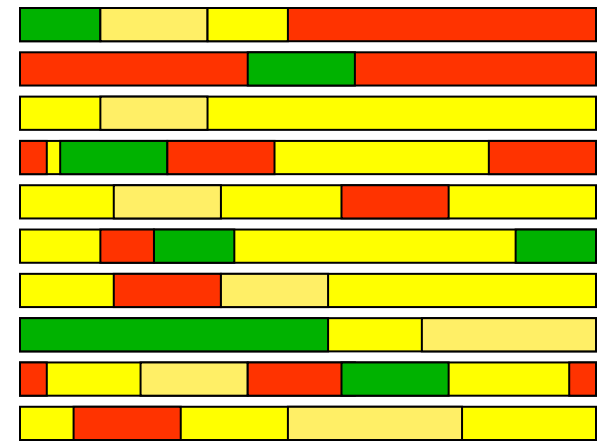
Single gene shuffling
library of point mutants



Similar mutants generated by
error-prone PCR, random and
site-directed mutagenesis



Family gene shuffling
library of chimeras



Generating chimeras with
crossovers of large blocks
of sequences

以上内容仅为本文档的试下载部分，为可阅读页数的一半内容。如要下载或阅读全文，请访问：<https://d.book118.com/628140016045006052>