



评述与展望

Review and Perspective

蛋白质定向进化及其在微生物代谢调控中的应用

陈丽芳[✉], 丁洁女[✉], 柳志强[✉], 郑裕国[✉]

浙江工业大学生物工程研究所, 杭州, 310014

✉ 通讯作者: zhengyg@zjut.edu.cn ✉ 作者

基因组学与生物技术, 2012 年, 第 1 卷, 第 1 篇 doi: 10.5376/gb.cn.2012.01.0001

收稿日期: 2012 年 02 月 19 日

接受日期: 2012 年 05 月 15 日

发表日期: 2012 年 05 月 17 日

本文首次发表在《基因组学与应用生物学》2012 年第 31 卷第 1 期上。现依据版权所有人授权的许可协议, 采用 Creative Commons Attribution License 对其进行授权, 再次发表与传播。只要对原作有恰当的引用, 版权所有人允许并同意第三方无条件的使用与传播。

建议最佳引用格式:

引用格式(中文):

陈丽芳等, 2012, 蛋白质定向进化及其在微生物代谢调控中的应用, 基因组学与生物技术(online) Vol.1 No.1 pp.1-8 (doi: 10.5376/gb.cn.2012.01.0001)

引用格式(英文):

Chen et al., 2012, Directed Protein Evolution and Its Applications to Metabolic Regulation in Microbes, Jiyinzuxue Yu Shengwujishu (online) Vol.1 No.1 pp.1-8 (doi: 10.5376/gb.cn.2012.01.0001)

摘要 蛋白质定向进化是非理性改造蛋白质的一种有效方法。利用蛋白质定向进化技术可以改变代谢流, 扩展或构建新的代谢途径, 弱化或消除不必要或有害的代谢途径, 从而达到提高某种代谢产物产率或降解有害物质的目的。蛋白质定向进化技术在代谢调控中的应用有效拓宽了代谢工程的应用范围。本文介绍了主要的蛋白质定向进化技术如易错 PCR 技术、DNA 改组技术、交错延伸技术和临时模板随机嵌合技术等, 评述了蛋白质定向进化技术对微生物细胞代谢中的关键蛋白进行定向改造, 从而改善其代谢能力, 调控微生物代谢等的应用。

关键词 蛋白质; 蛋白质定向进化; 代谢调控; 微生物

Directed Protein Evolution and Its Applications to Metabolic Regulation in Microbes

Chen Lifang[✉], Ding Jienv[✉], Liu Zhiqiang[✉], Zheng Yuguo[✉]

Institute of Bioengineering, Zhejiang University of Technology, Hangzhou, 310014

✉ Corresponding author, zhengyg@zjut.edu.cn ✉ Authors

Abstract Directed protein evolution is an effective and powerful irrational approach for protein engineering. The use of directed protein evolution technology can change the protein metabolic flow, expand or build a new metabolic pathway as well as weaken or eliminate unnecessary or harmful metabolites so as to meet the purposes of increasing the yield of metabolites or degrading harmful substances. The technology of directed protein evolution applied in the metabolic regulations would effectively broaden the ranges of metabolic engineering applications. In this review we introduced the main methods of directed protein evolution such as error-prone PCR, DNA shuffling, Stagger Extension Process (StEP), Random Chimeragenesis on Transient Templates (RACHITT) and so on. And also we reviewed the applications of directed protein evolution in metabolic regulation to modify the key proteins for improving its metabolic ability and metabolite properties.

Keywords Protein; Directed protein evolution; Metabolic regulation; Microbes

研究背景

天然蛋白质作为生物大分子具有很多生理学功能, 如催化、调节、转运和贮存等等, 但这些蛋白质只能适应生物自身的需要, 不能广泛用于产业化开发, 因而需要加以改造。1983 年, Ulmer 在《Protein Engineering》中, 首次提出了蛋白质工程这个名词, 它是指按照人们某些特定的需要, 分析

蛋白质的结构与功能, 进而对蛋白质进行分子设计和改造。自此以后, 蛋白质的改造技术发展极为迅速, 并取得了一系列重要成果。然而, 这些成果多数是采用“理性设计”的方法, 需要事先分析蛋白质的结构, 预测和构建三维结构, 然后采用定点诱变的方法, 插入、删除或置换相应的密码子, 或对编码蛋白质的基因进行改组, 从而获得具有新功能



的蛋白质。由于这类方法只适用于结构与功能之间的关系已经比较清楚的蛋白质, 对于分子结构不明确的蛋白则很难改造(Chen and Arnold, 1993)。在情况之下, 一种非理性的方法——蛋白质定向进化(directed protein evolution)应运而生。

蛋白质定向进化, 又称为蛋白质的体外进化, 是 20 世纪新兴起的一种有效改造蛋白质的分子生物学手段, 属于分子进化的一个分支。蛋白质定向进化能在实验室条件下, 模拟达尔文优胜劣汰的进化过程, 利用高通量筛选方法在较大的突变文库中获得目的突变体, 再将这些筛选出来的突变体作为模板基因进行下一轮的进化, 在短时间内创造出在自然界并不存在或需经过几百年进化才能得到的蛋白质, 具有简便、快速和高效等特点。

目前, 通过定向进化对蛋白质进行改造, 在工业、农业和药业等领域已经有了广泛的应用。Schmidt 等(2006)用易错 PCR 对酯酶进行改造, 改造后的酶显示出很高的对映体选择性(E=96)及活性(2 min 底物转化达到 50%); Zhang 等(2006)对纤维素酶进行改造后, 大大改善了酶的活性、稳定性和最适催化条件等; Raviprakash 等(2006)用 DNA 改组方法改造登革热 DNA 疫苗, 使其嵌合 DNA 同时具有 3 种甚至全部(4 种)登革热抗原决定簇; Luginb 侯 hl 等(2006)用易错 PCR 及 DNA 改组方法对抗疯牛病 PrP 抗体进行改造, 得到了 BoPrP (90-105)亲和力最强(达到 1 pM)的 seFv 片段。随着生物技术的不断发展, 改造后的蛋白质将在各领域发挥越来越重要的作用。1991 年, Bailey (1991)、Stephanopoulos 和 Vallino(1999)分别提出了代谢工程的概念, 强调了 DNA 重组技术在细胞代谢网络中的重要作用: 通过定向改造细胞中的酶, 改善细胞的代谢途径, 从而优化整个代谢网络。这一理念的提出, 开辟了蛋白质定向进化在微生物代谢调控中的应用。微生物在自然界中分布广, 种类多, 与人类的关系密切相关。通过微生物代谢, 可以降解一些有毒有害物质或合成一些重要的物质, 其体内的酶能够实现生物纺织和造纸等很多重要的绿色工艺, 因而如何改善微生物代谢, 使其更好地为人类服务成了工业生物技术的核心。

本文介绍了蛋白质定向进化的主要关键技术, 评述了其在微生物代谢调控中的应用: 利用蛋白质定向进化手段对微生物细胞代谢中的关键酶、转运蛋白和调控蛋白等进行分子改造, 构建具有高生产

能力的工程菌, 改善其代谢能力, 提高代谢产物的性能, 为定向进化技术在微生物代谢中的应用奠定基础。

1 蛋白质定向进化技术

从 1981 年首次报道的利用寡核苷酸定点突变来研究蛋白质功能以来(Wallace et al., 1981), 蛋白质的突变技术已经发生了较大的变化, 特别是随着分子生物技术的突飞猛进, 已经涌现出了一系列蛋白质定向进化方法, 以下列举了几种在蛋白质定向进化技术发展过程中具有较大意义且应用较为广泛的改造方法。

1.1 易错PCR 技术(error-prone PCR)

易错PCR (Gram et al., 1992)是一种在目的基因中随机引入突变, 进而获得蛋白质分子随机突变体的方法。它通过改变传统PCR 的反应条件, 如提高 Mg^{2+} 浓度、改变体系中 4 种 dNTP 的浓度比例或使用低保真度的 *Taq* 酶等, 在扩增过程中随机引入突变而创造序列多样性文库(Ling and Robinson, 1997)。选择合适的突变频率是此方法的关键之处, 频率太高会使有害突变体增多, 太低又不能达到突变的果, 很难获得理想的突变体。一般情况下, 只经一轮PCR很难得到理想的结果, 因而采用多轮易错PCR 策略, 进行连续反复的随机诱变, 使有益突变不断积累, 最终得到所需的突变体。这种方法虽然简单快速, 但是应用范围较有限, 一般要求一个序列只有 2~3 个碱基突变或 1 个氨基酸残基突变(Arnold et al., 2001)。另外, 该方法只能发生点突变而不能将不同序列来源的有益突变结合到目标序列中, 因此易错PCR 也被称为蛋白定向进化的“无性”进化方法。

尽管新的定向方法不断出现, 但易错PCR 作为传统的进化手段, 仍被广泛应用。Stephens 等(2009)将易错PCR 产物克隆到大肠杆菌中构建含有 960 个突变株的基因文库, 并用含木聚糖的琼脂板筛选。突变后的酶具有良好的热稳定性和耐碱性, 并可经DNA改组后产生适用于工业化的木聚糖酶。Liao等(2010)为提高植酸酶活性, 利用易错PCR 对植酸酶突变体基因进行修饰。他们将突变后的线性基因插入到质粒载体pPIC9K, 通过电击方法转到毕赤酵母GS115 中, 并从 5 500 个转化子中筛选出了酶活性最强的转化子 PP-NP_{ep}-6A。与出发菌 PP-NP_m-8 相比, 突变体产生的酶的比活力增强了



61%，催化效率提高了84%。张赛等(2011)对黄曲毒素解毒酶基因经过两轮易错PCR，分别得到突变酶A1773、A1476和A2863，与野生酶相比，其酶活分别提高了6.5倍、21倍和12.6倍。

1.2 DNA 改组技术(DNA shuffling)

继寡核苷酸定点突变和易错PCR后，Stemmer(1994)提出了另一种实现体外分子进化的方法——DNA改组。其基本原理是：先用DNase I或超声波将目的基因随机切成许多小片段；然后自发引发PCR，利用PCR将这些小片段重新组装；然后再用基因外引物扩增全长基因。DNA改组能将有益突变直接重组，从而克服了传统定点突变成功率低的缺陷，也克服了易错PCR只能发生点突变而不能进行序列小片段之间交换的缺点。DNA改组能在短时间内创造出大量的突变体，缩短了漫长的进化过程，大大提高了进化效率。

传统的DNA改组技术虽然能达到蛋白质分子改造的目的，但仍存在很多缺点，如有益突变频率低、筛选工作艰巨、进展缓慢等。Cramer等(1998)提出了DNA家族改组技术，并利用该方法对4个不同来源的具有一定同源性(58%~82%)的头孢菌素C酶基因进行了改造，结果发现经该法得到的菌株对头孢菌素C的抗性提高了270~540倍，进化速率比采用单个基因改组方法高了34~58倍。由此可见，DNA家族改组具有有益突变交换快速和积累的特性，使得突变率大大提高。

随后，DNA改组技术也不断地在改进，Kikuchi等(1999)提出了限制性内切酶代替DNase I的Family Shuffling方法。他们用限制性内切酶切割一组同源基因，避免了由DNase I随机切割DNA带来的亲代同源片段基因自身随机拼接问题，大大提高了同源基因间的同源片段重组效率。另外，他们还发现使用单链DNA为模板，可以克服双链DNA的自身退火现象，提高嵌合体的形成率，因而提出了单链模板的家族改组(Kikuchi et al., 2000)。他们以单链DNA为模板改组儿茶酚双加氧酶，嵌合基因高达14%，远远高于以双链DNA为模板的1%的嵌合基因，得到的嵌合基因编码的儿茶酚双加氧酶也远比亲本酶XylE和NahH稳定。

1.3 交错延伸技术(stagger extension process, StEP)

Zhao等(1998)以枯草芽孢杆菌蛋白酶E基因为对象，首次提出了交错延伸技术重组方法。该方法

将带有不同突变的同源性基因混合，进行多轮PCR扩增反应，在每一轮PCR循环中，缩短退火和延伸时间，使那些部分延伸的片段与含不同突变的模板随机杂交后继续延伸。由于模板的转换，最终形成的大多数产物序列中包含了不同亲本的序列信息。该法对最初的DNA改组进行了一定的创新，省去了DNA酶切步骤，减少了实验环节，有效缩短了实验周期并降低了操作难度。试验中，他们以筛选到的5个在65℃半衰期为野生型3~8倍的突变体为模板进行等量混合，经改组后得到了一系列在75℃下稳定的突变体，其中最稳定的突变体在65℃时半衰期为野生型的50倍。

1.4 临时模板随机嵌合技术(random chimeragenesis on transient templates, RACHITT)

临时模板随机嵌合技术(Pelletier, 2001)是指在两个相同家族亲本基因之间，将一个亲本基因随机切割成DNA片段并以另一个亲本DNA为临时模板进行杂交，再经修剪、延伸、连接，形成完整的DNA新链，最后以新链替代原来的临时模板合成子链，形成高度重组的多样性文库。与DNA改组技术相比，它的优越性主要体现在不需要经过热循环、模板转换等步骤就能获得诱变基因文库，还能得到小基因(小于5 bp)重组片段。在微生物脱硫途径中，由dszC基因编码的二苯并噻吩单加氧酶(DBT-MO)是催化该途径的第一个限速酶。该基因可从红平红球菌IGTS8(Piddington et al., 1995)和诺卡氏菌A3H1(Coco et al., 2001)中获得，其中从A3H1中表达的DBT-MO对底物具有较高的亲和力和较广的适用范围，而从IGTS8中表达的DBT-MO对一些稀少的烷基化二苯并噻吩具有很高的比反应速率。Coco等(2001)利用RACHITT方法重组了这两个同源性基因，得到的dszC基因长1.25 kb、相似度高达89.9%。

1.5 渐增切割法产生杂和酶技术(Incremental truncation for the creation of hybrid enzymes, ITCHY)

以上几种重组技术都是建立在同源性基础之上，要求序列的同源性在70%或90%以上，而自然界中很少有序列能够满足这个要求的，应用受到了一定的限制。为突破该瓶颈，Ostermeier等(1999)建立了渐进切割产生杂合酶技术，是通过构建携带不同基因的两种重组噬菌体质粒并进行渐进切割、重组来构建杂合突变文库的技术。该技术可在没有



同源性限制条件下, 产生突变文库。大肠杆菌甘氨酸核糖核苷酸转甲酰酶(PurN)和人的甘氨酸核糖核苷酸转甲酰酶(Hgart)基因同源性只有 50%, Ostermeier 等(1999)人分别采用 ITCHY 和 DNA 改组对上述两种酶的基因进行突变文库构建, 比较两个突变文库发现 ITCHY 的有效融合位点更多, 活性也更强。但该方法缺点是操作较为繁琐, 需要制备一系列只缺失一个碱基的 DNA 片段, 然后再将一个基因的 5' 与另一个基因的 3' 端相连产生杂合基因库。Lutz 等(2001)提出了 Thio-ITCHY 方法: 在同一载体上串联两基因, 经 PCR 延伸、酶切、连接后即可获得突变文库, 运用该方法, Lutz 等(2001)人得到了 PurN 的 N 端与 hGART 的 C 端相连的杂合基因, 该基因在大肠杆菌宿主中得到成功表达, 除此之外还获得了多个杂合酶。

1.6 不依赖于同源性的蛋白质重组技术(sequence homology-independent protein recombination, SHIPREC)

ITCHY 虽能实现不依赖于同源性序列重组, 但只有当融合发生在结构相似的部位时才能获得高比例的功能性杂合子, 即重组发生的前提是两基因片段有足够的相似性。针对这个问题, Sieber 等(2001)提出了不依赖于同源性的蛋白质重组技术。其步骤是: (1)用含有多个限制性酶切位点的人工接头将两个相关性较远或无相关性的基因相连; (2)用 DNase I 对连接物进行随机化片段处理; (3)琼脂凝胶电泳回收片段; (4)用连接酶进行环化处理; (5)用限制性内切酶消化环状 DNA 分子, 得杂合基因突变库; (6)转入合适的宿主菌中表达, 获得突变的蛋白质文库。他们已经利用该方法来成功生产与膜相关的人类细胞色素 P450 (1A2)和可溶性细菌色素 P450, 这些蛋白质仅有 16%的氨基酸序列相同。

2010 年, Villiers 等(2010)在此基础上又提出了一种近似不依赖于同源性构建基因文库的方法——易于操作的 DNA 重组技术(USER friendly DNA recombination, USERec)。这种方法主要有以下几个优点: (1)与 ITCHY 和 SHIPREC 相比, 利用这种方法构建的基因文库多样性高, 移码频率低; (2)与交错延伸 PCR 相比, 这种方法的实验步骤大大减少。基于它的简单灵活, 可以构建大量高质量的重组基因文库, 这种方法可以替代基因片段重组, 并很好的应用于基因文库构建中。

1.7 其它方法

随着体外定向技术不断发展, 构建多样性文库的方法也不断涌现, 如合成改组(synthetic shuffling) (Ness et al., 2002)、突变和单方向的重新装配(mutagenic and unidirectional reassembly, MURA) (Song et al., 2002)、基于结构的重组蛋白质工程(SCOPE) (O' Maille et al., 2002)、以寡核苷酸为基础的最大随机化过程(MAX randomization) (Hughes et al., 2003)、设计寡核苷酸的组装(assembly of designed oligonucleotides, ADO) (Zha et al., 2003)等等。近几年又出现了许多有应用价值的方法, 例如随机插入删除链交换突变(random insertional and deletional strand exchange mutagenesis, RAISE) (Fujii et al., 2006)、噬菌体辅助连续进化(phage-assisted continuous evolution, PACE) (Esvelt et al., 2011)等。这些新方法的出现, 为蛋白质定向改造的深入研究提供了坚实的技术基础。

2 蛋白质定向进化在微生物代谢调控中的应用

代谢工程(Nielsen, 2001)是一种运用重组 DNA 技术, 定向引入遗传突变, 优化代谢调控网络的重要方法, 是分子生物学与生物过程系统工程的结合。由于微生物代谢的多样性, 且与动植物的代谢途径相比, 微生物的代谢途径相对简单, 与人类日常生活关系密切, 因此对微生物代谢调控的研究一直备受关注。

利用定向进化手段对细胞代谢中的关键酶、转运蛋白和调控蛋白等进行分子改造, 构建具有高生产能力的工程菌来满足人类对生物的特定需求, 在代谢工程中具有重要的意义。利用 DNA 重组技术修饰特定的生化反应途径或引进新的生化反应途径, 对代谢途径中相应的基因或酶进行扩增、删除、转移, 来解除对其它相关基因或酶的调节, 可以达到改善代谢产物性能或微生物自身性能的目的。与随机诱变育种相比, 这种定性构建基因改造物种的方法更具有针对性。

在传统的微生物工业化发酵生产中, 提高代谢产物性能的基本思路为: 从自然界中筛选微生物并通过各种诱变技术改善其代谢能力, 从而达到改善代谢产物性能的目的。例如提高代谢产物的产量、降低副产物的合成以及合成新的代谢产物等等。提高代谢产物的性能一直是科学研究、工业化生产追求的目标。



2.1 提高代谢产物的产量

随着全球的能源危机及环境问题的加剧, 生物燃料作为一种清洁可再生能源越来越受到人们的青睐。近来, Atsumi 等(2008)发现了一种产高级醇的新途径: 对产甲烷球菌(*Methanococcus jannaschii*)中的柠檬酸合成酶(CimA)进行定向进化, 利用改造后的 CimA 可以在大肠杆菌中以葡萄糖为底物生成 1-丙醇和 1-丁醇。实验中, 他们以 pSA63 为模板, 利用易错 PCR 建立 CimA 突变体的质粒文库, 再以这些质粒为模板, 利用 DNA shuffling 技术进行再次突变, 经两轮筛选后得到 5 株 CimA 突变体。对这 5 株突变体的 1-丙醇和 1-丁醇产量进行检测, 结果显示, 这两种产物的产量分别是野生型菌株的 9 倍和 22 倍。

目前, 阿弗麦菌素类似物抗寄生虫药多拉克汀(CHC-B1)已成为一种商业化药物, 可由链霉菌合成得到。在其合成途径中, *aveC* 基因编码的水合酶是控制整个途径的关键酶, 用于合成两种相关联的化合物 CHC-B1 (环己基-B1)和 CHC-B2 (环己基-B2)。为提高目的产物 CHC-B1 的含量, 减少副产物 CHC-B2 的量, Stutzman-Engwall 等(2005)利用 DNA 重组技术(DNA shuffling)对 *aveC* 基因进行改组, 将改组后的 *aveC* 基因导入到阿维链霉菌中, 得到了一些改良后的 *aveC* 突变体, 其中最好的突变体中有 10 个氨基酸发生了突变, 产 CHC-B2 和 CHC-B1 的比为 0.07:1, 比野生型菌株提高了 23 倍。

2.2 提高酶蛋白的底物特异性

头孢菌素类化合物是一类具有 β -内酰胺特征的抗生素, 可由丝状菌、放线菌、革兰氏阴性细菌等多种微生物合成, 目前, 由链霉菌和支顶包菌合成头孢菌素的生物途径已经被广泛研究。在链霉菌生物合成途径中, 底物青霉素经扩环和羟化后可得到产物去乙酰头孢素 C (DAC), 其中, 扩环酶(DAOCs)和羟化酶(DACS)是该途径中两个关键酶, 分别由 *cefE* 基因和 *cefF* 基因编码; 在 *A. chrysogenum* 中, 含有直接催化青霉素 N 生成 DAC 的酶, 由 *cefEF* 基因编码。为提高对底物青霉素 G 的特异性, Hsu 等(2004)分别从 *S. clavuligerus* (ATCC 27064)、*N. lactamdurans* (ATCC 27382)和 *S. jumonjinensis* (ATCC 29864)中提取 *cefE* 基因, 从 *S. clavuligerus* 中提取 *cefF* 基因, 从 *A. chrysogenum* (ATCC11550)中提取 *cefEF* 基因, 将这些基因与新

克隆的基因一起经 PCR 扩增、DNase I 酶切后, 得到一些大约 100 bp 长度的片段, 再将这些片段在聚合酶作用下随机组合, 最后在 Tuner (DE3)中得到表达。结果显示, 定向改造后的酶对底物青霉素 G 的 *Kcat/Km* 值相比与野生型提高了 118 倍。

2.3 提高菌体的底物耐受性

金黄色葡萄球菌基因中有一段与硝酸盐代谢相关的序列, 含有 *arsC*、*arsB* 和 *arsR* 三个基因, 其中 *arsC* 编码硝酸盐还原酶, 可将硝酸盐还原为亚硝酸盐, *arsB* 编码泵硝酸盐膜蛋白, 形成硝酸盐膜通道; *arsR* 编码调节整个抗硝酸盐操纵子转录和表达的蛋白。Cramer 等(1997)从大肠杆菌中提取带有这 3 个基因的质粒 pI258, 用 DNase I 对其进行随机切割成大小片段作为 PCR 模板, 利用自发引发的 PCR 将这些片段进行重聚, 得到全长基因。含有这种突变基因的大肠杆菌能在浓度为 500 mmol/L 的硝酸盐环境中生长, 与原始菌株相比, 对硝酸盐的耐受性提高了 40 倍。

2.4 解除代谢产物抑制

在芳香族氨基酸生物合成途径中, 催化赤藓糖-4-磷酸和磷酸烯醇式丙酮酸合成 3-脱氧-D-阿拉伯庚酮糖-7 磷酸(DAHP)的 DAHP 合成酶是该途径中的限速酶, 在大肠杆菌中含有分别由 *aroG* (Phe)、*aroH* (Trp)、*aroF* (Tyr)基因编码的 3 种同工酶, 分别受 Phe、Trp 和 Tyr 的抑制(Nimmo and Coggins, 1981a; 1981b; Hofmann et al., 1972)。为解除代谢产物对关键酶的抑制作用, 提高 Phe 的产量, 李晓萍等(2010)以野生型大肠杆菌中的 *aroG*、*aroH*、*aroF* 基因为模板, 利用 DNA 改组方法对 *aroG* 基因进行突变, 将突变后的基因连接到 pET-30a 载体上建立突变文库, 经筛选后得到两个 *aroG* 克隆, 在一定程度上有效解除了氟苯丙氨酸对关键酶的抑制作用。

3 展望

随着基因工程技术的迅速发展, 利用蛋白质定向进化改变代谢流, 扩展或构建我们感兴趣的生物代谢途径, 极大地改善微生物及其代谢物的性能等, 已取得显著的成果。在对胞内代谢网络的诸多特征进行精确定量分析的基础上, 利用蛋白质定向进化技术, 可以优化和完善代谢调控网络。微生物代谢主要由负责细胞生命活动的蛋白质和蛋白质机器、还有相应的代谢调控网络组成。但目前蛋白质定向进化技术在微生物代谢调控中的应用



还仅仅局限在某些已知代谢通路中的个别蛋白质上, 还未能实现对整条代谢通路甚至整个代谢网络的蛋白质定向进化研究。

基因组测序技术的出现在一定程度上扩展了蛋白质定向进化技术的应用范围。在已知基因序列的基础上, 对代谢途径中的某个或某几个蛋白进行定向进化, 可以降低微生物代谢工程的盲目性, 但目前这种方法仅应用于个别代谢途径。如何在微生物整体代谢水平上进行蛋白质定向进化是研究的难点, 也是今后蛋白质定向进化的研究方向, 它不再只是蛋白质定向进化技术和代谢工程的结合, 更需要基因组学、功能基因组学以及系统生物学等技术平台的支持。

作者贡献

陈丽芳和丁洁女负责文章数据的收集、整理, 论文的撰写及修改; 柳志强负责文章构思与设计, 指导文章的起草; 郑裕国为通讯作者, 负责文章的审定。

参考文献

- Arnold F.H., Wintrode P.L., Miyazaki K., and Gershenson A., 2001, How enzymes adapt: lessons from directed evolution, *Trends in Biochemical Sciences*, 26(2): 100-106 [http://dx.doi.org/10.1016/S0968-0004\(00\)01755-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0968-0004(00)01755-2)
- Atsumi S., and Liao J.C., 2008, Directed evolution of *Methanococcus jannaschii* citramalate synthase for biosynthesis of 1-propanol and 1-butanol by *Escherichia coli*, *Applied and Environmental Microbiology*, 74(24): 7802-7808 <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.02046-08> PMID: 18952866 PMCID:2607174
- Bailey J.E., 1991, Toward a science of metabolic engineering, *Science*, 252(5013): 1668-1675 <http://dx.doi.org/10.1126/science.2047876> PMID:2047876
- Chen K., and Arnold F.H., 1993, Tuning the activity of an enzyme for unusual environments: sequential random mutagenesis of subtilisin E for catalysis in dimethylformamide, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90(12): 5618-5622 <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.90.12.5618>
- Coco W.M., Levinson W.E., Crist M.J., Hektor H.J., Darzins A., Pienkos P.T., Squires C.H., and Monticello D.J., 2001, DNA shuffling method for generating highly recombined genes and evolved enzymes, *Nature Biotechnology*, 19(4): 354-359 <http://dx.doi.org/10.1038/86744> PMID:11283594

- Cramer A., Dawes G., Rodriguez E., Silver S., Stemmer W.P.C., 1997, Molecular evolution of an arsenate detoxification pathway by DNA shuffling, *Nature Biotechnology*, 15(5): 436-438 <http://dx.doi.org/10.1038/nbt0597-436> PMID: 9131621
- Cramer A., Raillard S.A., Bermudez E., and Stemmer W.P.C., 1998, DNA shuffling of a family of genes from diverse species accelerates directed evolution, *Nature*, 391(6664): 288-291 <http://dx.doi.org/10.1038/34663> PMID:9440693
- Esvelt K.M., Carlson J.C., and Liu D.R., 2011, A system for the continuous directed evolution of biomolecules, *Nature*, 472(7344): 499-503 <http://dx.doi.org/10.1038/nature09929> PMID:21478873
- Fujii R., Kitaoka M., and Hayashi K., 2006, RAISE: A simple and novel method of generating random insertion and deletion mutations, *Nucleic Acids Research*, 34(4): e30 <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gnj032> PMID:16493137
- Gram H., Marconi L.A., Barbas C.F., Collet T.A., Lerner R.A., and Kang A.S., 1992, In vitro selection and affinity maturation of antibodies from a naive combinatorial immunoglobulin library, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89(8): 3576-3580 <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.89.8.3576>
- Hofmann P.J., Doy C.H., and Catcheside D.E., 1972, The separation of three allosterically inhibitable 3-deoxy-D-arabino-heptulosonate 7-phosphate synthases from extracts of *Neurospora crassa* and the purification of the tyrosine inhibitable isoenzyme, *Biochimica et Biophysica Acta*, 268(2): 550-561 PMID:4260319
- Hsu J.S., Yang Y.B., Deng C.H., Wei C.L., Liaw S.H., and Tsai Y.C., 2004, Family shuffling of expandase genes to enhance substrate specificity for penicillin G, *Applied and Environmental Microbiology*, 70(10): 6257-6263 <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.70.10.6257-6263.2004> PMID: 15466573 PMCID:522083
- Hughes M.D., Nagel D.A., Santos A.F., Sutherland A.J., and Hine A.V., 2003, Removing the redundancy from randomised gene libraries, *Journal of Molecular Biology*, 331(5): 973-979 [http://dx.doi.org/10.1016/S0022-2836\(03\)00833-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0022-2836(03)00833-7)
- Kikuchi M., Ohnishi K., and Harayama S., 1999, Novel family shuffling methods for the in vitro evolution of enzymes, *Gene*, 236(1): 159-167 [http://dx.doi.org/10.1016/S0378-1119\(99\)00240-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0378-1119(99)00240-1)
- Kikuchi M., Ohnishi K., and Harayama S., 2000, An effective family shuffling method using single-stranded DNA, *Gene*, 243(1-2): 133-137 [http://dx.doi.org/10.1016/S0378-1119\(99\)00547-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0378-1119(99)00547-8)
- Li X.P., Bian Y.N., Hao R.X., Jiang P.H., and Huang W.D.,



- 2010, Using DNA shuffling to construct the aroG mutant relieved the feedback-inhibition of para-fluorophenylalanine, *Fudan Xuebao (Ziran Kexue Ban) (Journal of Fudan University (Natural Science))*, (5): 568-574 (李晓萍, 边英男, 郝瑞昕, 江培翊, 黄伟达, 2010, 利用 DNA shuffling 构建部分解除对氟苯丙氨酸反馈抑制的 aroG, *复旦学报(自然科学版)*, (5): 568-574)
- Liao Y., Zeng M., Wu Z.F., Chen H., Wang H.N., Wu Q., Shan Z., and Han X.Y., 2010, Improving phytase enzyme activity in a recombinant phyA mutant phytase from N25 by error-prone PCR, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, DOI: 10.1007/s12010-011-9447-0 <http://dx.doi.org/10.1007/s12010-011-9447-0> PMID:22101445
- Ling M.M., and Robinson B.H., 1997, Approaches to DNA mutagenesis: An overview, *Analytical Biochemistry*, 254(2): 157-178 <http://dx.doi.org/10.1006/abio.1997.2428> PMID:9417773
- Luginbühl B., Kanyo Z., Jones R.M., Fletterick R.J., Prusiner S.B., Cohen F.E., Williamson R.A., Burton D.R., and Plückthun A., 2006, Directed evolution of an anti-prion protein scFv fragment to an affinity of 1 pM and its structural interpretation, *Journal of Molecular Biology*, 363(1): 75-97 <http://dx.doi.org/10.1016/j.jmb.2006.07.027> PMID:16962610
- Lutz S., Ostermeier M., and Benkovic S.J., 2001, Rapid generation of incremental truncation libraries for protein engineering using alpha-phosphothioate nucleotides, *Nucleic Acids Research*, 29(4): e16 <http://dx.doi.org/10.1093/nar/29.4.e16>
- Ness J.E., Kim S., Gottman A., Pak R., Krebber A., Borchert T.V., Govindarajan S., Mundorff E.C., and Minshull J., 2002, Synthetic shuffling expands functional protein diversity by allowing amino acids to recombine independently, *Nature Biotechnology*, 20(12): 1251-1255 <http://dx.doi.org/10.1038/nbt754> PMID:12426575
- Nielsen J., 2001, Metabolic engineering, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 55(3): 263-283 <http://dx.doi.org/10.1007/s002530000511> PMID:11341306
- Nimmo G.A., and Coggins J.R., 1981a, Some kinetic properties of the tryptophan-sensitive 3-deoxy-D-arabino-heptulosonate 7-phosphate synthase from *Neurospora crassa*, *The Biochemical Journal*, 199(3): 657-665 PMID:6122442 PMCid:1163422
- Nimmo G.A., and Coggins J.R., 1981b, The purification and molecular properties of the tryptophan-sensitive 3-deoxy-D-arabino-heptulosonate 7-phosphate synthase from *Neurospora crassa*, *The Biochemical Journal*, 197(2): 427-436 PMID:6119978 PMCid:1163143
- O'Maille P.E., Bakhtina M., and Tsai M.D., 2002, Structure-based combinatorial protein engineering (SCOPE), *Journal of Molecular Biology*, 321(4): 677-691 [http://dx.doi.org/10.1016/S0022-2836\(02\)00675-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0022-2836(02)00675-7)
- Ostermeier M., Shim J.H., and Benkovic S.J., 1999, A combinatorial approach to hybrid enzymes independent of DNA homology, *Nature Biotechnology*, 17(12): 1205-1209 <http://dx.doi.org/10.1038/70754> PMID:10585719
- Pelletier J.N., 2001, A RACHITT for our toolbox, *Nature Biotechnology*, 19(4): 314-315 <http://dx.doi.org/10.1038/86681> PMID:11283580
- Piddington C.S., Kovacevich B.R., and Rambosek J., 1995, Sequence and molecular characterization of a DNA region encoding the dibenzothiophene desulfurization operon of *Rhodococcus* sp. strain IGTS8, *Applied and Environmental Microbiology*, 61(2): 468-475 PMID:7574582 PMCid:167304
- Raviprakash K., Apt D., Brinkman A., Skinner C., Yang S., Dawes G., Ewing D., Wu S.J., Bass S., Punnonen J., and Porter K., 2006, A chimeric tetravalent dengue DNA vaccine elicits neutralizing antibody to all four virus serotypes in rhesus macaques, *Virology*, 353(1): 166-173 <http://dx.doi.org/10.1016/j.virol.2006.05.005> PMID:16814355
- Schmidt M., Hasenpusch D., Kähler M., Kirchner U., Wiggenhorn K., Langel W., and Bornscheuer U.T., 2006, Directed evolution of an esterase from *Pseudomonas fluorescens* yields a mutant with excellent enantioselectivity and activity for the kinetic resolution of a chiral building block, *ChemBioChem.*, 7(5): 805-809 <http://dx.doi.org/10.1002/cbic.200500546> PMID:16575940
- Sieber V., Martinez C.A., and Arnold F.H., 2001, Libraries of hybrid proteins from distantly related sequences, *Nature Biotechnology*, 19(5): 456-460 <http://dx.doi.org/10.1038/88129> PMID:11329016
- Song J.K., Chung B., Oh Y.H., and Rhee J.S., 2002, Construction of DNA-Shuffled and incrementally truncated libraries by a mutagenic and unidirectional reassembly method: Changing from a substrate specificity of phospholipase to that of lipase, *Applied and Environmental Microbiology*, 68(12): 6146-6151 <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.68.12.6146-6151.2002> PMID:12450839 PMCid:134436
- Stemmer W.P.C., 1994, Rapid evolution of a protein in vitro by DNA shuffling, *Nature*, 370(6488): 389-391 <http://dx.doi.org/10.1038/370389a0> PMID:8047147
- Stephanopoulos G., and Vallino J.J., 1999, Network rigidity and metabolic engineering in metabolite overproduction, *Science*, 284(5413): 1675-1681



- <http://dx.doi.org/10.1126/science.1904627> PMID:1904627
- Stephens D.E., Singh S., and Permaul K., 2009, Error-prone PCR of a fungal xylanase for improvement of its alkaline and thermal stability, *FEMS Microbiology Letters*, 293(1): 42-47 <http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-6968.2009.01519.x> PMID:19220468
- Stutzman-Engwall K., Conlon S., Fedechko R., McArthur H., Pekrun K., Chen Y., Jenne S., La C., Trinh N., Kim S., Zhang Y.X., Fox R., Gustafsson C., and Krebber A., 2005, Semi-synthetic DNA shuffling of *aveC* leads to improved industrial scale production of doramectin by *Streptomyces avermitilis*, *Metabolic Engineering*, 7(1): 27-37 <http://dx.doi.org/10.1016/j.ymben.2004.07.003> PMID:15721808
- Villiers B.R.M., Stein V., and Hollfelder F., 2010, USER friendly DNA recombination (USERec): A simple and flexible near homology-independent method for gene library construction, *Protein Engineering Design & Selection*, 23(1): 1-8 <http://dx.doi.org/10.1093/protein/gzp063> PMID:19897542
- Wallace R.B., Schold M., Johnson M.J., Dembek P., and Itakura K., 1981, Oligonucleotide directed mutagenesis of the human beta-globin gene: A general method for producing specific point mutations in cloned DNA, *Nucleic Acids Research*, 9(15): 3647-3656 <http://dx.doi.org/10.1093/nar/9.15.3647>
- Zha D.X., Eipper A., and Reetz M.T., 2003, Assembly of designed oligonucleotides as an efficient method for gene recombination: A new tool in directed evolution, *ChemBioChem.*, 4(1): 34-39 <http://dx.doi.org/10.1002/cbic.200390011> PMID:12512074
- Zhang P.Y.H., Himmel M.E., and Mielenz J.R., 2006, Outlook for cellulase improvement: Screening and selection strategies, *Biotechnology Advances*, 24(5): 452-481 <http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2006.03.003> PMID:16690241
- Zhang S., Xing K.K., Hu Y.D., Xie C.F., Liu D.L., and Yao D.S., 2011, Directed evolution of aflatoxin detoxifzyme in vitro by error-prone PCR, *Shengwu Gongcheng Xuebao (Chinese Journal of Biotechnology)*, (7): 1100-1108 (张赛, 邢克克, 胡亚冬, 谢春芳, 刘大岭, 姚冬生, 2011, 基于易错 PCR 的黄曲霉毒素解毒酶体外分子定向进化, *生物工程学报*, (7): 1100-1108)
- Zhao H.M., Giver L., Shao Z.X., Affholter J.A., and Arnold F.H., 1998, Molecular evolution by staggered extension process (StEP) in vitro recombination, *Nature Biotechnology*, 16(3): 258-261 <http://dx.doi.org/10.1038/nbt0398-258> PMID:9528005