

现代生命科学基础丛书

11

分子酶学工程 导论

张 今 曹淑桂 罗贵民 张学忠 李正强 等 编著



科学出版社

www.sciencep.com

现代生命科学基础丛书

分子酶学工程导论

张 今 曹淑桂 罗贵民 张学忠 李正强 等 编著

科学出版社

北 京

内 容 简 介

本书较为全面地介绍了分子酶学工程的原理、策略、方法、应用及发展趋势。主要内容包括引论,蛋白质工程酶,进化工程酶,核酶和脱氧核酶,模拟酶,抗体酶,有机溶剂中酶的结构和性质,酶催化在精细化工中的应用,有机溶剂中肽的酶促合成,酶快速反应动力学,光谱方法在酶结构研究中的应用等。

本书可供从事生物化学、分子生物学、生物工程学、化学和药学等相关专业的科研人员和教学工作者参考,也适用于综合性大学、医学和农业院校相关学科的高年级本科生和研究生阅读。

图书在版编目(CIP)数据

分子酶学工程导论/张令等编著. —北京:科学出版社,2003

(现代生命科学基础丛书)

ISBN 7-03-011211-3

I. 分… II. 张… III. 酶学—高等学校 教材 IV. Q55

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2003)第 011823 号

策划编辑:马学海 / 文案编辑:邱璐、贾学文 / 责任校对:柏连海

责任印制:刘士平 / 封面设计:黄华斌

科学出版社 出版

北京东黄城根北街16号

邮政编码:100717

<http://www.sciencep.com>

新蕾印刷厂 印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2003年8月第 版 开本:787×1092 1/16

2003年8月第一次印刷 印张:20 1/2

印数:1—2 500 字数:464 000

定价:48.00 元

(如有印装质量问题,我社负责调换〈新欣〉)

《现代生命科学基础丛书》编委会

主 编：许根俊

副主编：沈倍奋 乔守怡 马克平 王克夷

编 委：(按汉语拼音排序)

敖世洲	昌增益	陈润生	戴灼华	丁明孝
杜生明	段恩奎	方荣祥	傅继梁	龚非力
顾红雅	何大澄	胡志红	黄伟达	金冬雁
李 博	李 林	曲音波	沈 萍	施苏华
寿天德	谭仁祥	王金发	武维华	薛勇彪
药立波	查锡良	张大勇	张知彬	左建儒

序

分子酶学工程旨在对酶结构与功能了解及分析的基础上,完善天然酶某些方面的性质,构建新的、更加实用的酶,以扩展它在实际方面的应用。它是在酶工程和蛋白质工程等基础上发展起来的一个新兴技术领域,对化学、制药和食品等工业有着深刻的影响。近10年,国际上分子酶学工程飞跃发展,各种工程酶不断涌现,应用范围不断扩大。

由于酶工程覆盖的范围很广,不同的人会有不同的着重点。张今教授等编著的《分子酶学工程导论》一书对分子酶学工程的理论基础、研究策略和方法、现状和发展趋势进行了比较系统、全面的介绍。他们在广泛收集国内外资料的基础上,结合自己的实践经验,使本书内容具有新颖性和实用性,对读者颇有参考价值和启迪作用。

无可讳言,我国的分子酶学工程虽然已取得了长足的进步,但在许多方面与国际先进水平还有相当的差距。只要我们努力,我们一定能够不断地缩小这个差距。我相信本书的出版将会进一步推动我国分子酶学工程的发展。



2002年7月6日

前 言

新技术科学的出现往往是各种科学思想和多种技术集成、融合的结果,其发展主要取决于各相关学科知识的进步程度和相关科学家的水平。20 世纪 60~70 年代的 X 射线蛋白质结晶学、80 年代的重组 DNA 技术和 90 年代的克隆技术等变革了蛋白质工程与酶工程,改进、模拟和设计新酶成为生物催化剂和生物转化研究与开发的主流,从而诞生了分子酶学工程。

本书的意图是向读者提供分子酶学工程的概况,包括工程酶(engineering enzyme)的理论、策略、方法、应用及发展趋势。另外,如同其他快速发展的科学技术领域一样,需要描述许多已经创造出来的新概念。这些描述中表现出技术方面的多样性,也反映出分子酶学工程专家掌握几种交叉科学领域知识的必要性,分子酶学工程至少在各种各样的组合中才有今天的进步。本书在哲理方面立足于分子水平上认识酶、改进酶、模拟酶和设计新酶,包括非蛋白质酶(如核酶、脱氧核酶等),创造出经济实用的酶,面向经济建设和科学技术的发展。

本书编写有两个指导原则,一个是讨论一般原理和采用特殊工程酶作为实例的原则;另一个是讨论学科交叉和技术集成在分子酶学工程领域的目前状况。每章末所列参考文献尽量选择最近的评论和能提供更广泛的文献目录的文献,所列的原始文献是为了从历史的观点来看分子酶学工程的发展。

应该强调的是,参与本书编写的各位教授都工作在第一线,在承担繁重的科研和教学工作的同时,挤出时间收集资料,综合、整理完成了书稿的撰写工作。成稿后,由张今统编,由苟小军博士、王智博士和李爽博士完成了书稿的电脑输入、图表制作和文稿校对,并编写了缩略语表。因此,本书是集体创作的成果。由于是多作者,所研究的内容又不同,因此带来文字风格、表达方式和简繁尺度不一致等问题,有待今后改进。又由于时间紧、学术水平有限,书中不妥或错误之处,诚恳地希望广大读者批评指正。

中国生物化学与分子生物学学会理事长许根俊院士为本书作序,并对“引论”做了部分修改,在此表示衷心的感谢!

张 今

于吉林大学分子酶学工程教育部重点实验室

2002 年 5 月 28 日

缩 略 语 表

5-HT	5-hydroxytryptamine	5-羟色胺
ACP	acyl carrier protein	酰基载体蛋白
AT	acyltransferase	酰基转移酶
CBDs	carbohydrate-binding domain	结合碳水化合物的结构域
CD	cyclodextrin	环糊精
CTAB	cetyltrimethylammonium bromide	十六烷基三甲基溴化铵
DD	dehydratase	脱水酶
DNAzyme	deoxyribozyme	脱氧核酶
ee	enantiomeric excess	对映体过量值
EPR	electron paramagnetic resonance	电子顺磁共振
ER	enoyl reductase	烯酰基还原酶
FT-IR	Fourier transform infrared spectroscopy	傅里叶变换红外光谱
GPX	glutathione peroxidase	谷胱甘肽过氧化物酶
GSH	glutathione	谷胱甘肽
HDV	hepatitis D virus	丁型肝炎病毒
HEB	ethyl-3-hydroxybutyrate	3-羟基丁酸乙酯
HRP	horseradish peroxidase	辣根过氧化物酶
IGPS	indole-3-glycerol phosphate synthase	吲哚-3-甘油磷酸合酶
IGS	internal guide sequence	内部指导顺序
ITCHY	incremental truncation for the creation of hybrid enzyme	产生杂合酶的增长截短法
KDPG	D-2-keto-3-deoxy-6-phosphogluconate	D-2-酮基-3-脱氧-6-磷酸葡萄糖酯
KR	ketoreductase	酮基还原酶
KS	ketosynthase	酮基合酶
LDH	lactate dehydrogenase	乳酸脱氢酶
NAG	N-acetylglucosamine	N-乙酰葡萄糖胺
NMR	nuclear magnetic resonance	核磁共振
NRPS	non-ribosomal peptide synthetase	非核糖体肽合成酶
OPRTase	orotate phosphoribosyltransferase	乳清酸磷酸核糖转移酶
PCR	polymerase chain reaction	聚合酶链反应
PEG	polyethylene glycol	聚乙二醇
PKS	polyketide synthetase	聚酮合成酶

PMSF	phenylmethylsulfonyl fluoride	苯甲基磺酰氟
PNPA	<i>p</i> -nitrophenyl acetate	对硝基苯乙酸酯
PPL	porcine pancreatic lipase	猪胰脂肪酶
PRAI	<i>N</i> -(5'phosphoribosyl)antranilate isomerase	<i>N</i> -(5'-磷酸核糖)邻氨基苯甲酸异构酶
REM	random and extensive mutagenesis	随机广泛突变
RPR	random-priming <i>in vitro</i> recombination	体外随机引发重组
SDM	site-directed mutagenesis	定位突变
SOD	superoxide dismutase	超氧化物歧化酶
SSITKA	steady-state isotopic transient kinetic analysis	稳态同位素瞬变动力学分析
StEP	stagger extension process	交错延伸过程
TSA	transition state analog	过渡态类似物

目 录

序(许根俊)

前言

缩略语表

1 引论	(1)
1.1 分子酶学工程的概念	(1)
1.2 分子酶学工程的基本策略和方法	(3)
1.3 分子酶学工程的现状和展望	(6)
参考文献	(10)
2 蛋白质工程酶	(12)
2.1 定位-随机突变	(12)
2.2 二级结构工程	(19)
2.3 活性部位工程	(21)
2.4 结构域工程	(27)
2.5 从头设计酶	(29)
参考文献	(34)
3 进化工程酶	(37)
3.1 分子育种	(37)
3.2 酶的体外定向进化	(38)
3.3 模块酶	(50)
3.4 杂合酶	(57)
3.5 酶的最佳化	(61)
参考文献	(65)
4 核酶和脱氧核酶	(72)
4.1 核酶	(72)
4.2 脱氧核酶	(85)
4.3 核酶和脱氧核酶体外选择	(89)
4.4 核酶/脱氧核酶的催化潜能和进化策略	(91)
参考文献	(95)
5 模拟酶	(97)
5.1 模拟酶的概念	(97)
5.2 合成酶的理论基础	(97)
5.3 合成酶的分类	(98)

5.4	分子印迹技术·····	(108)
5.5	生物印迹酶·····	(114)
5.6	人工模拟酶的研究现状及展望·····	(117)
	参考文献·····	(118)
6	抗体酶 ·····	(120)
6.1	产生抗体酶的策略·····	(121)
6.2	用于产生抗体酶的抗体库技术·····	(127)
6.3	抗体酶活性部位的修饰·····	(129)
6.4	抗体酶的晶体结构·····	(131)
6.5	抗体酶的应用前景·····	(133)
6.6	抗体酶研究进展·····	(137)
	参考文献·····	(143)
7	有机溶剂中酶的结构与性质 ·····	(146)
7.1	有机溶剂中酶的结构·····	(146)
7.2	有机溶剂中酶的性质·····	(150)
7.3	有机溶剂中酶催化活性和选择性的调控·····	(154)
7.4	有机溶剂中酶催化动力学·····	(176)
	参考文献·····	(185)
8	酶催化在精细化工中的应用 ·····	(192)
8.1	用于生产精细化工产品的酶(生物催化剂)·····	(192)
8.2	有工业应用潜力的生物转化用酶·····	(196)
8.3	光学活性化合物的制备·····	(198)
8.4	糖和类固醇的选择性酰化·····	(208)
8.5	功能高分子的合成·····	(209)
8.6	组合生物催化·····	(215)
	参考文献·····	(220)
9	有机介质中肽的酶促合成 ·····	(227)
9.1	肽合成的一般情况·····	(227)
9.2	热力学控制下的肽合成·····	(228)
9.3	动力学控制下的肽合成·····	(233)
9.4	从头合成肽键的新策略·····	(238)
9.5	展望·····	(239)
	参考文献·····	(239)
10	酶快速反应动力学 ·····	(242)
10.1	酶反应的稳态动力学和瞬变动力学·····	(242)
10.2	溶液中快速反应动力学的测量方法·····	(245)
10.3	酶快速反应的分析·····	(253)
10.4	快速酶反应分析的例子·····	(262)

参考文献.....	(268)
11 光谱方法在酶的结构研究中的应用.....	(269)
11.1 紫外-可见差光谱.....	(269)
11.2 荧光光谱.....	(276)
11.3 红外光谱.....	(285)
11.4 拉曼光谱.....	(294)
参考文献.....	(313)

1 引 论

1.1 分子酶学工程的概念

酶的许多性质对化学、制药和食品等工业极具应用价值。酶是高效催化剂,典型的表观二级速率常数(k_{cat}/K_m)为 $10^6 \sim 10^8 \text{ L}/(\text{mol} \cdot \text{s})$,它能在温和条件下有效地催化很难、甚至不可能的化学转化, $k_{\text{cat}}/k_{\text{uncat}}$ 可达 10^{17} 。酶是有高度选择性的催化剂,酶的对映体选择性日益强劲地用于手性药物生产中。酶促反应副产物少,条件温和。一般来讲,在应用酶促反应的诸多参数中,比活性(以 k_{cat} 表示)、特异性(由 k_{cat}/K_m 确定)和酶的稳定性是最重要的。此外,底物或产物的抑制程度(由它们对酶的亲和性决定)也会直接影响反应结果(图 1.1)^[1]。一个理想的方案是所用的酶比活性和稳定性都高,底物和产物抑制程度最小。底物特异性决定酶的应用范围,立体专一性对合成化学来讲是最重要的参数之一。

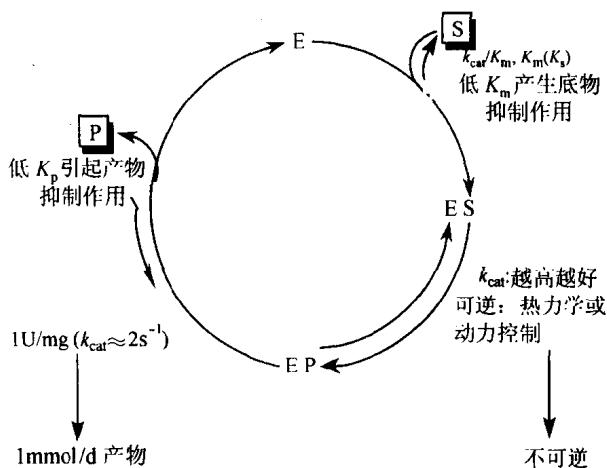


图 1.1 酶促反应的实用参数
ES: 酶-底物复合物; EP: 酶-产物复合物

目前已鉴定的酶有 3000 多种,随着基因组和蛋白质组研究的深入,对酶的认识也将随之提高。天然酶往往不完全具备应用所要求的特性。例如,较高的操作稳定性、非水相催化、所要求的立体选择性和专一性,以及对非天然底物的新的活性等。理论上,天然酶存在着很大的可变性,即存在着改进的潜力。例如,一个由 100 个氨基酸组成的酶,拥有 20^{100} 不同序列的可能性,显然自然界是不可能存在所有序列相应的酶。同时,与如此庞大的序列上的差异相对应,必然会产生性质不同于现存的酶,也必然会存在某些方面的性质优越于天然酶的新酶,这种序列上的可变性必然会体现在结构和功能上。在了解催化机制的基础上人为地提高酶的催化效率是分子酶学工程的主要目标,并由此创造出高催化效率、经济实用的酶。酶的催化反应由于极大地简化了化学反应的条件,因而使化学试剂的应用和副产物大量减少,从而在很大程度上减少了对环境的污染。由于日益增加的环境和经济压力,生物催化剂得到了迅速发展。在研究和开发生物催化剂过程中,需要依靠许多学科的发展。蛋白质工程(包括分子进化)和酶工程,这两个方面技术的发展在分子酶学工程的发展过程中起着极为重要的作用。前者提供改变结构、功能和选择性的酶;后者选择酶作用的微环境(特别是非水微环境)及处理酶(固相酶)与产物的分离。根据某种需要,运用这两个方面的技术在分子水平上改进、模拟和设计新酶已成为生物催化剂研

究和开发的主流。在一定意义上说,分子酶学工程可以看做是蛋白质工程(包括分子进化)和酶工程相融合所产生的一门科学技术。

任何科学技术的产生都离不开科学背景,都离不开基础研究。基础研究正以一种不可预测的、缓慢的方式导致新技术的出现。分子酶学工程的诞生也不例外。在某种意义上讲,分子酶学工程是分子酶学在工程方面的表现。酶的结构(包括动态结构)、结构与功能(包括空间结构与功能)关系,功能酶学和蛋白质组研究的任何成果都将给分子酶学工程以深刻的影响^[2]。在对酶作用机制深入了解的基础上,改进、模拟和设计新酶的研究必将有很大的发展。

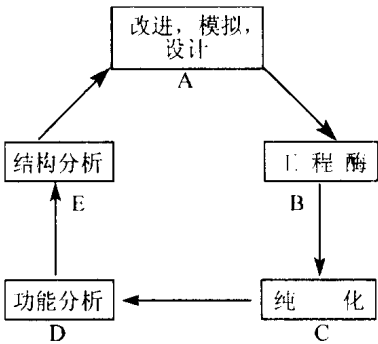


图 1.2 分子酶学工程的基本流程图

分子酶学工程是酶工程在分子水平上的体现。它既不同于酶工程,也不能简单地理解为蛋白质工程在酶学方面的应用。任何一门科学技术的诞生都有其技术背景。分子酶学工程的技术支柱是化学工程、基因工程、蛋白质工程(包括分子进化)和酶工程,因此,分子酶学工程的诞生可以认为是学科整合和技术集成的结晶。

分子酶学工程包括在分子水平认识酶的基础上改进酶、模拟酶和全新设计酶。分子酶学工程的内涵应该以天然酶的结构与功能为基础,以酶分子工程为核心,研究工程酶的理论、策略和方法,工程酶的催化效率和机制,开发酶的新功能、新性质,发现和创造经济实用的新型生物催化剂,面向经济建设和科学技术的发展。分子酶学工程的基本流程如图 1.2 所示。

分子酶学工程的范围不仅涉及工程蛋白质酶(proteinous enzyme),而且也包括非蛋白质酶,如核酶、脱氧核酶、模拟酶等。工程酶的显著特点是分子多样性,这一特点是由工程的策略和方法决定的。工程酶另一显著特点是自身的分子类型,它们由氨基酸、核苷酸、脱氧核苷酸或其他有机分子组成。不管是何种类型,都是生物催化剂,其表征相同或相似,但催化机制可能不同。根据工程酶的策略、方法及自身的分子类型,可以把工程酶总结于图 1.3 中。

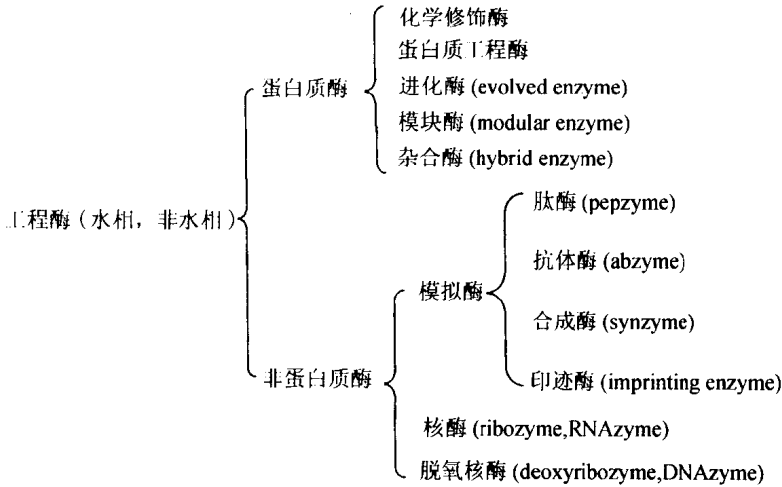


图 1.3 工程酶的可能类型

分子酶学工程的诞生表明科学家已经能够按照自己的意图来改进、模拟和设计新酶,并且正在卓有成效地把工程酶应用于经济建设和科学技术中去。分子酶学工程已经有独立的理论体系和技术体系、有明确的研究领域和目标。分子酶学工程作为一门独立的学科正在发展。

1.2 分子酶学工程的基本策略和方法

研究策略、研究方法和实验技术的改进和创新有力地推动了分子酶学工程的发展。

从第十一届至第十六届国际酶工程会议的主要议题可以看出,分子酶学工程研究主要涉及三个相互关联的内容:一是发展构建工程酶的理论、策略和方法;二是在考察和研究生物多样性的基础上发现新的酶及其工程化;三是扩大工程酶的应用领域。这主要表现在:①在对酶结构与功能分析的基础上,应用基因工程、蛋白质工程(包括分子进化)技术改变或完善天然酶某些性质并构建出更加实用的新酶,如进化酶、模块酶和杂合酶等;②在分子免疫学、有机化学和分子酶学基础上,应用细胞工程、抗体工程及分子印迹等技术从理论和实际两个方面研究抗体酶、合成酶、印迹酶和酶的化学修饰;③非水相分子酶学工程的研究打破了酶只能在水相中催化的传统观念,不仅开辟了分子酶学工程新领域,而且为酶在化学、材料科学、医药科学及生物检测中的应用展示了广阔的前景,同时也可能成为发展和实现未来“绿色化学”的一个关键的突破点;④核酶和脱氧核酶也成为分子酶学工程的一个新领域,别构核酶和脱氧核酶的设计和应用将可能成为纳米技术中的重要内容;⑤生物传感器是分子酶学工程不可分割的组成部分,它正向生物芯片、生物计算机方向发展;⑥组合生物催化(combinatorial biocatalysis)可以高效率产生新型化合物库,为酶的抑制剂和酶标药物的设计开辟一条新途径。基因组学与蛋白质组学的进展将会推动和帮助新酶的发现。

以上所述不过是分子酶学工程研究和开发的几个基本策略。今后的任务不仅在于积累材料、分析归纳、找出工程酶的普遍规律,在更加坚实的理论指导下扩大酶的应用范围和完善应用的方法,以指导工程酶的研究和开发,而且还需要不断地加入新概念、新思想,发展新方法,不断地丰富分子酶学工程的内容。

分子酶学工程的基本目标就是完善新酶的设计(包括改进、模拟和从头设计),满足人们的需要。所谓设计就是提供工程酶的方案、新策略和方法。设计可分为基于结构的合理设计和基于功能的非合理(实验筛选)设计,两者组合可有力地推进新酶的产生^[3]。

目前已经比较普遍采用的方法有以下几种。

(1) 定位突变

定位突变(site-directed mutagenesis)已成为工程天然酶广泛采用的有效技术。它是根据酶的结构、功能和作用机制的信息,在基因水平上精确改变酶分子中的氨基酸残基,在不改变酶分子构象的情况下,以期使酶的性质最佳化,便于应用。它不仅加深人们对酶的认识,而且也为新酶功能的预测提供了有效的信息。然而,目前对一些酶的定位突变并没有取得预期的结果,甚至遭到失败。究其原因,可能是对酶的结构、功能和作用机制不完全了解,仅仅把氨基酸序列的同源性作为氨基酸残基取代的标准,往往导致保守氨基酸刚性取代,因而得不到所希望的酶;或者因为被工程的酶抗突变能力较差。所谓抗突变能

力是指多个氨基酸残基突变尚能保持整体构象。由于残基的取代伴随着酶构象的改变,致使酶失活。

定位突变费时耗资。每轮突变都要通过顺序分析来确定,工程酶的性质表征需要将酶纯化后进行。对于多轮突变更是如此。另外,定位突变对结构和功能关系及机制不清的酶是不适用的。

(2) 体外定向进化

体外定向进化(directed evolution *in vitro*)不需要酶的结构、功能关系和催化机制方面的信息。它采用随机过程,用易错 PCR (error-prone PCR)产生基因突变库,继之用遗传选择或高通量筛选来鉴定有益突变体。为了增加有益突变,可进一步循环突变和筛选。体外重组或 DNA 改组(DNA shuffling)促进了定向进化发展^[4]。这些方法迅速地组合了有益突变并拓展了顺序的多样性。1991 年起,我们先后对 L-天冬氨酸酶、天冬氨酰二肽酶、海藻糖合成酶系^[5-12]进行定向进化,取得了较为满意的结果,获得的天冬氨酸酶进化酶的活力比天然酶高 28 倍;天冬氨酰二肽酶进化酶的活力比天然酶提高 47 倍;海藻糖 6-磷酸合成酶/磷酸酶的操纵子的定向进化,建立了 shuffling-PCR 方法,使海藻糖的产量提高 12.3 倍。虽然用定向进化工程酶是成功的,但工程酶的专一性似乎是更大的挑战。在一些情况下,进化酶催化活性低,底物专一性不高。酶族的进化分析表明,酶功能的激烈改变可能需要多肽骨架的改变,这种改变大概在体外进化过程中很少发生,主要还是通过点突变改进酶的性质,这样就限制了广谱取代。定向进化另一个限制是它以筛选大量的潜在突变体的敏感和有效方法为前提,建立敏感和有效的筛选方法是酶体外定向进化成功的关键。

定位突变和定向进化两种方法各有优缺点(表 1.1、表 1.2),如果将两者组合,会出现优势互补。实验已证实,定向进化方法可以有效地扩大定位突变。定位突变可以把关键氨基酸或结构片段引入酶分子中,这是定向进化办不到的。反之,定向进化也可以为定位突变提供更多的信息,以此可以模拟顺序,或者指出定位突变的靶。我们把定位突变和随机突变结合起来,用定位限制随机,以减少筛选的库容;用随机扩大定位以增加突变位点。这一过程是通过控制合成的底物和浓度比例来实现碱基对的错配^[6-9]。

表 1.1 自然进化和定向进化的比较^[3]

	自然进化	定向进化
点突变	慢	快
缺失	常发生	少
插入	常发生	少
倒位	常发生	少
复制	常发生	少
融合	常发生	少
重组	有性	有性 PCR
选择	自然选择	选择,高通量筛选

表 1.2 合理设计和定向进化的比较^[3]

	合理设计	定向进化
酶的结构	需要	不需要
催化机制	需要	不需要
点突变倾向性	无	倾向转换
二级结构工程	可行	不可行
结构域工程	可行	不可行
选择方案	不需要	需要

通过定位突变和定向进化可以工程酶,使其某些性质最佳化。这取决于对改进性质的机制的了解和有效的选择方案。借助于迅速增长的蛋白质结构数据库和蛋白质模型化

的发展,定位突变成成为工程酶的有效方法;新的高通量筛选方法和增加顺序多样性方法的发展,甚至可能将定向进化延伸到基因组或蛋白质组。

虽然在实验室有许多方式进化一个酶,但它们都涉及两个主要步骤:一是建立突变库;二是由库中筛选或选择所希望的突变体。这个过程可以重复,经过几代,由小的改变积累成大的变化,最终获得所希望功能的突变体。这一策略已成功地用于一些酶的改进,特别是对那些很难基于结构设计的酶,如对映体选择性问题。Liebeton 等^[13]从几乎对外消旋 2-甲基癸酸酯的水解无选择性的天然脂肪酶出发进化出一种酶,对映体选择性达 90% 以上。May 等^[14]经过几代突变和筛选,使乙内酰脲酶的活性提高 5 倍,对映体选择性 L-5-(2-甲基硫代乙基)乙内酰脲超过 D-5-(2-甲基硫代乙基)乙内酰脲。含进化酶的细胞催化 L-蛋氨酸的生产已具有商业价值。

实验室的进化能有效地改变酶的其他性质,包括稳定性、非天然环境中的功能(如有机溶剂)、产物抑制、重组宿主中的表达和底物专一性等。对于实验室进化,一种有效操作是 DNA 族改组。Stemmer 等^[15]通过相关母体基因的同源重组建立杂合基因库。DNA 族改组广泛用于产生新酶。

(3) 分子育种^[16]

分子育种(molecular breeding)也称 DNA 族改组。它涉及多个 DNA 顺序的重组产生嵌合体库、从库中筛选出最佳突变体的问题。由于分子是在重组细胞中产生的,可以几天培育出一代分子,甚至可以通过改变筛选或选择的条件同时培育出多重品质的分子。该途径对工程酶特别有效。

分子育种的概念涉及许多相互作用的基因。例如,制造复杂化合物的多酶途径。微生物、植物和动物可以产生各种化合物,它们可以作为药物、染料、香料及化妆品等,但它们在自然界仅以微量存在,并且化学合成难,甚至不能合成。用快速生长的机体可以大规模生产上述化合物,而且分子育种可以使合成途径最佳化,甚至产生新的合成途径。例如, Schmidt-Dannert 等^[17]进化出合成类胡萝卜素色素的新途径,即细菌基因表达 β 胡萝卜素色素。途径工程和分子进化可以解决非常复杂的生物设计问题。新的有效途径可以制造天然和非天然产物,有力地拓展了酶在产生新的生物活性化合物的应用范围。

(4) 组合与计算^[18]

有的天然酶相对分子质量太大,不太适合作为进化的起点;其作为药物,既不能有效地传递,又易产生免疫原性;在有些情况下对应用来讲,生物途径太繁琐。最可能的路线是人工模拟酶(如抗体酶)。目前尚未见商业价值的抗体酶。工程酶的另一条途径是由原骨架进化出新酶^[19~21]。通过 α/β 的定向进化将吲哚-3-甘油磷酸合酶(IGPS)转为磷酸核糖邻氨基苯甲酸异构酶(PRAI)。用计算方法来鉴定进化的关键部位,以产生特异的靶库,并且大大减少了实验搜索。

理想的从头设计酶是纯粹从一级结构开始的。第一个从头设计的原酶——初生金属酶,通过计算设计把简单的铁和氧结合位点引入硫氧还蛋白中,它表现出在氧化过程中各种选择性^[22]。这样设计的位点适合作为进化的起点。今天,进化方法对开发新的商业酶似乎是最有效的,但是合理设计,特别是计算方法和从头设计也在不断地发展。计算和组合方法的结合将成为工程酶的重要策略。

(5) 抗体酶法

抗体酶法包括过渡态类似物(TSA)的合成、免疫作用、由杂交瘤分离单克隆抗体、筛选。总的来说,抗体酶的催化效率低于天然酶。

抗体酶的一个明显进展是利用亲核机制通过再活化免疫作用来选择,可以产生有效的催化剂^[23],不是基于 TSA 而是基于抑制剂的作用机制引出免疫反应,选择稳定的共价结合到自杀抑制剂上形成抗体。这个方法已用于 3-羟基丁醛缩合时亲核 Lys 抗体酶的选择,这个醛缩酶的效率证实是共价催化。理论上,能够选择高度特异的过渡态的催化基团和活性部位可能会产生更有效的催化剂。

(6) 全新设计初生酶^[23~26]

1) 合理计算设计法。

计算设计蛋白质^[26]从调整蛋白质主链开始,并且用力场确定氨基酸顺序和几何形状,使骨架的几何形状最佳化。用合理计算设计方法,在不活泼的硫氧还蛋白骨架上设计一个新的活性部位。这个原始酶(protozyme)或初生酶(nascent enzyme)能催化酯水解反应^[26,27]。合理计算设计方法也用于鉴定硫氧还蛋白中能够结合铁的一些活性部位。实验表明,这些设计的蛋白质能够结合铁,并催化各种反应。一些工作表明,把一个新功能工程到不活泼的蛋白质骨架上似乎需要多重的偶联突变,单独的突变可能没有作用。

最近,骨架柔性设计有了很大的进展,尤其在蛋白质核心设计方面进展更快^[28]。用骨架柔性的思想成功地设计了左手卷曲螺旋(coiled coil),提高了折叠速度,改进了热力学稳定性。

2) 合理同源性设计法。

合理同源设计的目标包括工程结合部位与各种底物的契合,以及构建新的催化残基以改变催化机制和功能。一般来讲,合理设计集中在改变与底物接触的残基上。例如,把一个催化三联体 Ser-His-Asp 工程到肽氨酰异构酶上,结果产生有明显活性的脯氨酸特异的内肽酶^[29]。根据 4-氯苯甲酰 CoA 去卤酶和巴豆酸酶的结构匹配,把酸碱催化的两个 Glu 及六个定位的残基工程到脱卤酶中,结果产生巴豆酸酶活性^[14]。合理同源设计与物理模型结合将会有力地促进酶的设计。

1.3 分子酶学工程的现状和展望

过去 20 年,用定位突变技术工程酶已经取得很大成绩,几乎所有结构与功能关系清楚的酶都被该技术改进了。近几年,酶的体外定向进化技术有力地拓展了工程酶的范围,因为它不需要事先知道酶的结构与功能关系的信息。目前进展表明,定向进化可以改变酶的底物特异性、对映体选择性、蛋白质拓扑性质、热稳定性和对有机溶剂的耐受性等。例如,进化的 *Pseudomonas aeruginosa* 的脂肪酶催化模型酯的水解大于 90% ee(enantiomeric excess)(野生酶仅 2% ee)^[30]。*P. putida* 细胞色素 P450 单加氧酶的进化酶催化萘的羟基化,比野生型酶活力高 20 倍^[31]。*E. coli* KDPG(D-2-酮基-3-脱氢-6-磷酸葡萄糖酯)醛缩酶高度依赖磷酸和 D-糖,其进化酶能够接受 D-底物和 L-底物(图 1.4)^[32],该进化酶不需要磷酸。