

分子进化工程

Molecular Evolution Engineering

李满文 贺福初

(军事医学科学院放射医学研究所 北京 100850)

分子进化工程是继蛋白质工程之后的第三代基因工程。它通过在试管里对以核酸为主的多分子体系施以选择压力,模拟自然界中生物的进化历程,以达到创造新的基因、新的蛋白质的目的。

达尔文用“适者生存、不适者被淘汰”的自然选择学说阐述了生物进化的原因。本世纪60年代以来,实验表明,这种生物自然种群层次式的进化机理可在试管里分子层次上模拟。实现达尔文式进化的必备条件是增殖、突变和选择。任何具备前两者的实体不论在整体层次还是在分子层次,只要有选择作用,其群体必定产生达尔文式进化并最终出现最适应所处环境的类型。

一、试管进化体系的建立

1967年,米尔斯(Mills)等首次在试管里实现了达尔文式分子进化。他们曾研究一种称为Q β 的RNA噬菌体,建立了含有Q β RNA、Q β RNA复制酶及四种合成RNA的底物核苷三磷酸的多分子体系。由于复制酶时很容易产生差错,因此复制中总伴有突变发生。米尔斯的办法是,每当Q β RNA在试管里复制到20分钟时,就取出一定量反应混合物转移到另一试管中,再补充酶和底物后,继续复制,如此往复,以求试管里多分子体系不会因扩增而不稳定。另外,通过缩短复制时间作为选择压力,使产生的RNA分子越变越短。到第74次复制时,它的链长仅为原来的17%,只剩下RNA两端,以作为复制酶识别并控制起始复制所必需的序列,同时其复制速率提高了15倍。从对实验全过程的跟踪分析中发现,变异型的产生过程与达尔文强调的由于选择保存和积累有利变异而引起的渐进适应过程相符,因此称之为“试管里的达尔文式分子进化”。该实验启迪人们借改变多分子体系的条件来设计不同的选择作用,以获得具有预期功能的变异型,从而使试管进化不仅提供了分子进化机理的模型,而且由于是在事先不必知道任何结构和功能关系的基础上

就获得目标分子,因此也成为生物工程的一种全新技术。

实现试管里的达尔文式进化需要三个连续往复的化学过程:扩增、突变和选择。扩增可产生携带有遗传信息的分子的众多拷贝;突变是在基因型水平上引进变异,这种变异为选择提供原材料;选择是在表型水平上通过适者生存、不适者淘汰的方式固定变异。这三个过程必须紧密相联,以便使那些被选择的分子得以扩增,并不断引进新的变异,进而进行新的选择。

试管进化体系的建立包括两个阶段:选择与扩增的结合和扩增与突变的结合。1987年,奥利芳特(Oliphant)和斯特拉尔(Struhl)认为,在试管里将选择与扩增相结合会极大地加强选择的分离和富集作用。索斯达克(Szostak)估计,有可能从 10^{15} 个不同分子中选出一个目标分子。1980年,金斯勒(Kinzel)和沃格尔斯坦(Vogelstein)首次实现了这一设想。1990年,他们又用此法确定了人类GLI蛋白质在DNA顺序上的结合部位。1990年,埃林顿(Ellington)等对含化学合成的 10^{15} 种随机顺序的分子群进行了五轮选择与扩增,得到了与几种有机染料专一性结合的RNA,并确定了RNA顺序上与有机染料专一结合的部位。1992年,乔伊斯(Joyce)等借改变反应条件使PCR伴有突变发生,不仅使试管中选择与扩增相结合,而且使扩增与突变相结合。由此他们建立了四膜虫ribozyme(L-21型)的试管里进化体系,并称之为“试管里的定向进化”。

这种在1987~1992年间建立起来的“试管里的定向进化”的基本方法是:

1. 用化学方法合成含诸核苷酸序列变异体的分子库,分子库越大(所含分子数受目前实验条件限制仅为 10^{13}),涉及功能的序列变异越多样则越理想;
2. 给分子库施加压力,以选择出功能符合实验者要求的分子;
3. 对选择出来的数量极微的顺序进行扩增,其

中 DNA 通过 PCR 扩增, RNA 通过由 cDNA 而来的 dsDNA 的转录而扩增。这些扩增方法适用于任何顺序, 而米尔斯等建立的体系中, 用 Q β RNA 复制酶受顺序特点的限制。因此, 新体系使试管进化的研究和应用范围大为扩大。

二、试管进化研究的现状

美国国家航空和航天局在星际探险和搜索生命时对生命所下的定义是: 生命是能够经历达尔文式进化的一种自我维持的化学系统。在生命的化学系统中起决定作用的是四种生物大分子: 核酸、蛋白质、多糖和脂类。生命体系的自复制、自组装和自调节无不与之相关。试管里的定向进化, 即分子进化工程就是模拟这些生物大分子的进化历程, 以获得新型的催化剂、酶和新药。近年来的研究主要限于核酸, 尤其是 ribozyme。

1. RNA 的定向进化

实现 RNA 定向进化首先要解决 RNA 的增殖问题。目前通用的方法是建立逆转录—转录系统, 该系统涉及两种酶, 即逆转录酶和 RNA 聚合酶。需要有一对引物, 其中一个引物附加有转录启动子; 另外还要加入合成 RNA 的四种 NTP 和合成 DNA 的四种 dNTP。这种定向进化系统一开始就要有足够的异质性, 并且在增殖中不断引进变异, 否则选择就无对象。建立异质性群体目前有三种方法:

(1) 鸟枪法, 使大分子的所有位点发生变异, 适用于寻找新的特性分子, 但要选择的分子库往往过大。

(2) 覆盖法, 使随机变异仅发生在所选定的区域内, 此法需对大分子结构与功能有较多了解, 其选择目的要十分明确。

(3) 集中法, 当希望获得已知大分子的某种改进性能时, 可用这种分子的一组突变体, 该方法最为常用。

改变实验条件使增殖中总伴有变异发生。由于新的变异是在原有经选择的基础上发生的, 因而具有倾向性。重复随机突变是在实验体系内实现达尔文式进化的关键。增殖和突变方法在建立后就可利用多种选择方法来研究 RNA 的定向进化。

1992 年, 乔伊斯的实验室建立了四膜虫 ribozyme(L-21 型) 的进化体系。乔伊斯等以其 10^{13} 个变异株为起始群体, 通过与 DNA 靶序列接触, 获得能与其结合的 RNA 分子, 经过选择性扩增, 并且改变正常的反应条件以在扩增中引入新的变异、产生具有更强结合和分解能力的分子。进化九代后, 就从原来仅在 50℃ 对 DNA 有极微弱剪切作用的 ribozyme 中, 得到在 37℃ 对 DNA 有剪切作用, 其活性提高 30 倍的 ribozyme 变异体。随后研究表明,

该 ribozyme 进化十代后, 裂解 DNA 的能力提高了 100 倍; 进化 27 代后, 提高了 10 万倍。乔伊斯等还使从四膜虫 ribozyme(L-21 型) 进化到第九代所得到的 RNA 变异型的模板在大肠杆菌中表达, 结果发现能抗 M13 病毒的入侵。此外, 该酶作用的底物由 RNA 变为 DNA 具有重大的医疗价值。例如, 用它来切除入侵病毒中的有害 DNA, 达到彻底消灭入侵病毒的目的。1993 年, 乔伊斯等还用同样方法获得了底物不变, 但反应条件改变的 ribozyme 变异型。他们得到的 ribozyme 由原来催化反应必需有 Mg^{2+} 和 Mn^{2+} , 变为只要有 Ca^{2+} 而无 Mg^{2+} 和 Mn^{2+} 均可。

ribozyme 一直是试管进化研究的热点。1992 年, 格林(Green)和索斯达克(Szostak)用试管进化方法改善了 Suny ribozyme 缺失型的功能。他们用的 Suny ribozyme 来自一种自我切割的 RNA I 型内含子。这种 ribozyme 分子量很小, 虽然可进一步缺失非必需区域, 但片段缺失后酶活性严重下降。他们用试管进化方法得到了分子量更小的突变体, 这些突变体比原来的 ribozyme 在 RNA 多聚酶活性和自我复制速率方面都有很大提高。随后索斯达克等又从 RNA 碎片组成的巨大分子库中分离出一种新的 ribozyme。这种酶通过催化结合在模板上的两个 RNA 分子的 3'-羟基和 5'-磷酸根反应, 而把两个 RNA 分子连接起来, 就象我们所熟知的蛋白类酶催化 RNA 的合成一样。该酶还可以催化 3'-5' 双磷酸键的形成。实验表明, 这种新 ribozyme 的催化效率比未经进化的 ribozyme 提高了 700 万倍。目前普遍认为, 索斯达克等用试管进化方法获得具有模板和复制酶功能的 RNA 分子的工作, 对生命起源的“原基因说”和吉尔伯特(Gilbert)的“RNA 世界说”将是极大的支持。

达尔文的重复选择、增殖和突变的法则已成为科学家手中的有力工具。包括索斯达克在内的一些学者正利用它重建分子进化的过程。人们推测, 在几十亿年的进化历程中, RNA 曾具有过一些酶的性质, 如 DNA 酶活性、RNA 多聚酶活性、ATP 酶活性等, 后来丢失了。现在人们正通过分子进化工程方法重新使其获得这些性质, 希望以此产生更多新的有益性状, 并真正重视生命起源与生物进化的分子里程。

2. DNA 的定向进化

PCR 是目前生物技术中应用最广的 DNA 体外扩增技术, 人们已将其用于 DNA 的定向进化, 从中选出有特殊性能的 DNA 分子。

目前虽有一些能溶解血栓的蛋白质药物, 可用来治疗心肌梗塞、脑血栓等疾病, 但是蛋白质药物易使这类病人产生过敏反应, 因而其使用受到限制。于是人们设想利用不易产生过敏反应的 DNA

来开发抗凝血药物。1992年,图尔(Toole)的实验室通过试管里的定向进化获得了能抑制凝血酶活性的DNA分子。他们构建了 10^{13} 条不同序列的单链DNA,并把这些DNA分子与固定于固体支持物表面的凝血酶相接触,其中绝大部分DNA未与凝血酶结合,而从支持物上被洗脱下来,只有极少数DNA分子能与凝血酶结合。将这部分DNA回收,并用PCR扩增,然后经固相化的凝血酶选择,如此重复5次,最终得到了高度富集的可结合凝血酶的DNA。经猴子和狒狒动物试验表明,这类DNA具有有效的抗凝血作用。

埃林顿和索斯达克则利用类似分离RNA“适体”(aptamers)的方法,从一个DNA的巨大分子库中,通过定向进化得到了能与配体结合的DNA(称为DNA适体)。配体与DNA的结合有赖于DNA分子适当折叠结构的形成。试验表明,有些配体不与RNA结合而只与DNA结合,同时DNA可用来催化某些化学反应。他们认为,与筛选催化性抗体方法相似,通过对过渡状态结合体的精心选择出来的DNA适体能够作为新型的催化剂。这类DNA适体在开发治疗用药物方面比RNA更有发展前途。

3. 蛋白质的定向进化

蛋白质是细胞主要的功能分子,它的定向进化有很大的理论与实用价值。然而,蛋白质的增殖和突变不是入选分子自身,而是它们的遗传基因。如何将两者统一呢?80年代末发展起来的噬菌体显示技术为此提供了思路。

fd和M13是一类含单链环状DNA的丝状噬菌体,基因Ⅲ编码吸附蛋白PⅢ,该蛋白C端附着于噬菌体末端,N端伸展在外。将外源基因重组插入到基因Ⅲ编码蛋白质的N端附近,表达产物成为融合蛋白,外源蛋白以独立的空间结构伸展在PⅢ的N端。如果将外源基因经诱变或随机合成构成一个突变或随机库,然后将所有此类基因插入噬菌体的基因Ⅲ位置,外源蛋白就在噬菌体末端被显示。利用亲和反应吸附噬菌体就可以选择出结合力强的外源蛋白及外源基因。

噬菌体显示技术已用于从肽库和突变库中选择多种蛋白质。利用该技术,并建立复杂的实验系统为每代提供变异,使选择、增殖和突变能沿一个方向不断进行下去,就可以在试管里实现蛋白质的定向进化。

1993年,美国两位科学家则用一种巧妙的方法解决了试管里的蛋白质进化的问题。他们把含有枯草杆菌蛋白酶信息的每一个基因变种插入到一种宿主菌体内,然后将进化出的枯草杆菌蛋白酶和这

种细菌群体分泌出的酶比较。为了对这种枯草杆菌蛋白酶变种的催化能力估计,他们将细菌菌体培养在琼脂培养基上,接着观察围绕它们形成的晕—活性蛋白质降解的标志。再将这些活性群体转移到含60%二甲基甲酰胺(DMF)的培皿中。最后,他们选出能形成最大晕的群体作为优胜者,扩增其基因并用于下一次选择。第二、三代逐步增加DMF浓度,结果进化出来的枯草杆菌蛋白酶在DMF中的活性比原先酶的活性提高了256倍。1994年,威廉(Willem)和斯泰姆(Stemmer)利用诱变的DNA杂混(mutagenic DNA shuffling)方法,进化得到了一种新的内酰胺酶。其他实验室也在努力寻找试管里进化蛋白质定向进化的方法。化学家们希望通过试管里进化研制出能够在大范围内使用的多功能酶,以便把它们用作工业上的催化剂。

三、分子进化工程展望

分子进化工程是通过模拟生物进化历程的定向进化技术,借以创造新的基因、蛋白质乃至新的物种。目前试管中进化方法不足之处是进化实体限于核酸,蛋白质的定向进化研究还刚刚起步。1992年,布伦纳(Brenner)和勒纳(Lerner)提出“编码组合法”,企图将其应用到任何种类的大分子。此外,在如何扩大分子群使所含分子数超过 10^{13} ;如何设计更严格的实验条件以加大选择强度;如何简化操作,缩短实验周期等方面也需改进。然而,它一经问世就受到了普遍的关注,因为分子进化工程突破了以往基因工程和蛋白质工程的主要局限,即必须知道产物基因序列或蛋白质序列及其结构与功能的相关性;其产品均为蛋白质,加工工艺复杂,成本昂贵,且由于蛋白质分子量大,对于某些类型的病人难以使用。

分子进化工程为我们开辟了广阔的前景。科学家们可以通过试管里分子进化获得新型的催化剂、酶和新药。化学家们希望通过试管进化研制出大范围使用的多功能酶,以作工业上的高效催化剂。利用分子进化工程还可以改良物种,培育出更多优良的微生物、农作物和饲养动物。此外,利用试管进化能在实验室里揭示生物分子的详细进化历程,对探讨生命起源及生命进化的分子机制有着十分重要的意义。

总之,以试管进化为基础的分子进化工程将为生物工程开辟一个崭新的、富有魅力的领域。

(责任编辑 肖庆山)