

文章编号 1000-5013(2004)04-0337-06

酶体外定向进化() 突变基因文库构建技术及其新进展

方柏山 郑媛媛

(华侨大学材料科学与工程学院, 福建 泉州 362021)

摘要 介绍在酶体外定向进化研究中,几种常用基因文库构建技术及其应用方面的最新进展.同时介绍近年来,一些新开发的基因文库的构建技术及其应用情况.对目前几种主要方法的特色和缺陷进行讨论.

关键词 酶,定向进化,基因文库

中图分类号 Q 349+.5 Q 785 Q 55

文献标识码 A

一个具有 N 个氨基酸残基的酶分子可能产生 20^N 种重组,而自然界用了 40 亿 a 的时间,实际发生的重组也只是其中微乎其微的一部分.在工业生产中,天然酶分子通常不能满足实际需要,所以需要人们对其进行改造或设计新的酶分子以满足工业需求.酶的体外定向进化(简称定向进化)是近些年兴起的改造酶分子的新策略.它是根据达尔文进化论,在人为创造的进化条件下,在试管中模拟自然进化机制(随机突变、基因重组和自然选择),定向选择出所需性质酶分子的一系列操作.它不需要事先了解酶的空间结构和催化机制^[1],适合于任何酶的改造.其应用的领域也随着定向进化新技术的发展逐渐扩大,现已涉及基因治疗、疫苗、食品、轻工业、农业和环境治理等方面.定向进化是以相当低的比率在编码待进化酶的基因中随机引入突变,构建突变库;利用人为创造的筛选压力,快速地排除不利的突变体,从而选出所需性质的进化酶^[2].也就是说,它是由两个相互独立的关键技术组成.一个是随机基因文库的构建,另一个是特定酶(特别是增加催化活性、增强选择性或稳定性)的筛选策略^[3].其情形大致如图 1 所示^[4].本文首先介绍定向进化的第一个关键技术——基因文库构建技术及其新进展.

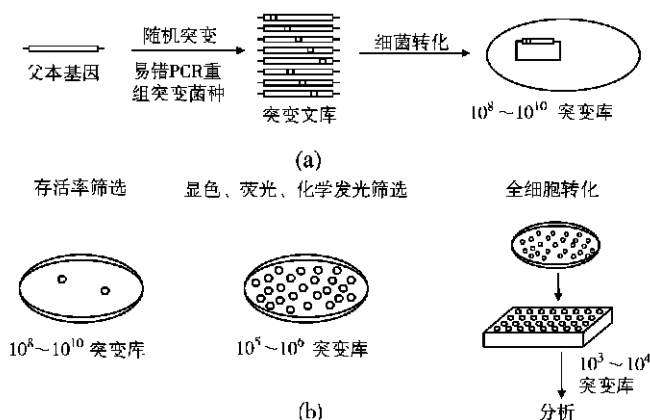


图 1 酶定向进化的策略

(a) 多样性基因文库的构建; (b) 用不同的分析方法对文库进行高通量筛选

1 基因文库构建及其新进展

1.1 易错 PCR(Error-Prone PCR)

易错 PCR 可说是定向进化研究最早采用的一种构建基因文库的方法.首次提出易错 PCR 是 Leung 等人^[5],后经 Cadwell 和 Joyce^[6]改良用于每个 PCR 循环的随机点突变.其原理是在体外扩增基因时使用适当条件,使扩增的基因出现少量碱基误配而引起突变.早期成功地用此策略的例子是 Chen 和 Arnold^[7,8],在非水相溶液二甲基甲酰胺(DMF)中定向进化枯草杆菌蛋白酶.他们所得的突变体 PC3 在

收稿日期 2004-03-22

作者简介 方柏山(1957-),男,教授,主要从事生物反应工程和酶工程的研究. E-mail: fangbs@hqu.edu.cn

基金项目 国家自然科学基金资助项目(20276026);福建省自然科学基金重点基金资助项目(D01012);福建省科技计划重点基金资助项目(2003J020)

60 %和 85 %的 DMF 中,催化效率 k_{cat}/K_m 分别是天然酶的 256 和 131 倍,比活性提高 157 倍.在该方法中,遗传变化只发生在单一分子内部,较为费力、耗时,一般适用于较小的基因片段(< 800 bp).此外,使用该方法易出现同型碱基转换^[9].尽管如此,它仍然不失为一种构建基因文库的常用方法.例如, Komeda 等人^[10]用易错 PCR 和相应的筛选方法,提高了来自 *Ochrobactrum anthropi* SV3 的 D-氨基酸酰胺酶的热稳定性和催化活性.结果是最适温度比野生型酶高 58 °C, V_{max} 提高了 3 倍,而 K_m 不变. Wada 等人^[11]用易错 PCR 产生突变,提高对 L 型底物(包括 N-乙酰基-L-甘露糖胺和 L-树胶醛糖)的活性. 2004 年, Nakaniwa 等人^[12]发表的论文《用易错 PCR 体外评价果胶酸裂解酶》,用的还是单一的易错 PCR.

1.2 DNA 重排(DNA Shuffling)

1994 年, Stemmer 等人首先使用 DNA 重排完成蛋白质的体外重组^[13,14],并且以此为基础申请了一系列专利和发表一系列论文^[15~19]. 他们还于 1997 年成立了 Maxygen 公司(<http://www.maxygen.com>). DNA 重排的基本操作是把正突变基因库中分离出来的 DNA 片段,用脱氧核糖核酸酶 I 随机切割,得到的随机片段(50 ~ 200 bp). 经过不加引物的多次 PCR 循环,在 PCR 循环过程中,片段之间互为模板和引物进行随机扩增,直至获得全长的基因.从而,实现来自不同基因的片段之间重组.借助于 DNA 重排, Oh 等人^[20]同时提高了来自根癌农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*) N-氨基甲酰-D-氨基酸酰胺水解酶的氧化稳定性和热稳定性.与其他突变体相比,他们得到的最佳突变体不但提高了热稳定性,而且不易被过氧化氢失活.之后的研究发现其中 4 个突变有助于增加氧化稳定性和热稳定性,另外 2 个突变只对增加氧化稳定性起作用.最近, Williams 等人^[21]利用 DNA 重排,改变由 1,6-二磷酸己酮糖醛缩酶催化形成 C-C 键合成的立体化学.进而得到的醛缩酶以非天然的 1,6-二磷酸果糖为底物时, k_{cat}/K_m 值提高 80 倍,立体定向性提高了 100 倍.当 DNA 重排的方法被用来重组来源于进化上相关的一套基因时,被称为 DNA 家族重排^[22]. Zhou 等人^[23]对青霉素 G 酰基转移酶进行家族重排,突变体的酶活比野生型提高了 40 %.此外,人们常把 DNA 重排与易错 PCR 结合,用于基因文库的构建.例如, Zhang 等人^[24]用此方法构建了一个随机突变文库 gp120-801,使其蛋白的表达量从 1 % ~ 2 % 增加到 15 %. Yano 等人^[25]用该方法进化天冬氨酸转氨酶,结果对 L-支链氧化氨基酸活力提高了 105 倍. Zhao 和 Arnold^[26]也用该法,使枯草杆菌蛋白酶 E 的最适温度提高了 17 °C,同时提高了各个温度下的稳定性.野生型脂肪酶对甲基取代脂具有 S 选择倾向. Zha 等人^[27]用此法,得到一个 11 个氨基酸发生替代、对 R 的选择性系数为 30 的突变体,实现了对映体选择性的转换.

1.3 交错延伸法(Staggered Extension Process, StEP)

1998 年, Zhao 等人^[28]开发了交错延伸过程(图 2).在用 PCR 同时扩增多个拟重组的模板序列时,在热循环中把常规的退火和延伸合并为一步,大大缩短了退火与聚合酶催化延伸的时间.在每一循环中,不断延长的片段根据序列的互补性与不同模板退火,并进一步延伸,反复重复直到全长序列形成.此法是以单链的 DNA 父本基因为模板,单引物进行延伸,有别于其它突变方法.它所产生的含不同模板序列的新 DNA 分子中,含有大量的突变组合.

1.4 增加平截杂和酶法(Incremental Truncation for the Creation of Hybrid Enzymes, ITCHY)

Ostermeier 等人^[29,30]引入了一种不依赖于 DNA 间同源性,即可得到有功能的种间杂和体的新方法,如图 3 右侧所示.与图 3 左侧的 DNA 重排相比, DNA 重排发生多重杂交.但由于受同源性的限制,主要集中在氨基端,且拼接产物的大小接近亲本基因. ITCHY 产生的杂和基因库,是由基因 A 的氨基端和基因 B 的羧基端单杂交而成,没有任何区域偏好.并且,文库片段大小从 0 到亲本基因长度总和(Q_{A+B})不等.

1.5 外显子重排(Exon Shuffling)

首批被发现具有外显子重排现象的是脂蛋白受体^[31]. Patthy^[32]通过系统地考察蛋白数据库后发现外显子重排存在于许多脊椎动物和无脊椎动物生物体基因中.由外显子重排产生的新基因也在植物中被发现,如马铃薯^[33].由于一个外显子编码一个折叠结构域,因此利用内含子间的重组,可以使独立的外显子组装成编码新蛋白质的基因.据此, Kolkman 和 Stemmer^[34]开发了体外形式的外显子重排技术,并把该技术应用于人类药物蛋白质定向进化的基因文库构建.

1.6 退火低核苷酸基因重排(Degenerate Oligonucleotide Gene Shuffling, DOGS)

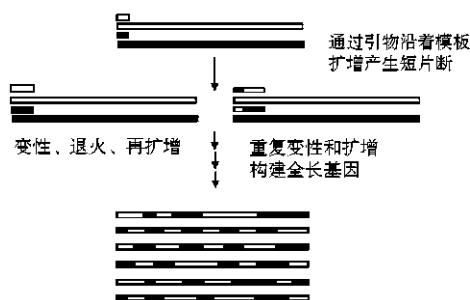


图2 交错延伸法

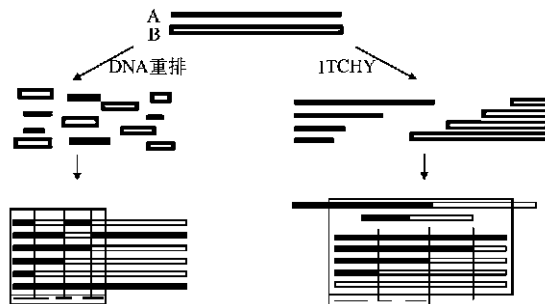


图3 DNA重排和ITCHY理论示意图

Gibbs 等人^[35]利用 DNA 重排和错配突变,提高酶的生物化学特性.重排技术可以用于相同基因的突变库搜集,或者用于重排基因相关家族以产生编码镶嵌的(Chimeric)基因产物的突变.目前的难题就是在突变库中未经重排(即亲本基因)的片段在重排过程中的优势.此法用退化的引物可以控制已经重排基因间的相对重组水平,并且减少未经重排的亲本基因的再生.其优点是避免在重排之前用核酸内切酶将基因切割,同时避免使用所选基因片断的随机突变体.

1.7 瞬间模板随机镶嵌源(Random Chimeragenesis on Transient Templates, RACHITT)

Coco 等人^[36]声称他们最近新发明的 RACHITT,克服了一些以前重排方法的缺陷.在该方法中一个父本基因作为另一父本退火时的临时互补模板.未配对的片段末端被补齐,空隙也被酶法填平.该拼接反应可以减少重排片断的大小,并增加每个基因的重组机率.他们认为单链支架(Scaffold)能防止父本序列的扩增,然而支架的选择可能影响实验的结果.这是因为和它相似的序列很可能会和它配对形成镶嵌体(Chimeras).重排两种细菌的单(加)氧酶时,RACHITT 对每个基因平均产生 14 次杂交,比其它已报道的体外重组方法杂交次数多.但是,高杂交率的优点还有待证明.

1.8 酵母细胞中重组增强的组合文库(Combinatorial Libraries Enhanced by Recombination in Yeast, 简称为 CLERY)

CLERY 是一种将体外 DNA 重排和酵母体内重排相结合的新方法^[37].该方法用于两个人细胞色素 P450 酶的重排,平均杂交次数大约是 4.4,而文库仅含有 14 % 的非镶嵌体(亲本)序列.此方法需要两个宿主细胞,最适合不能在细菌中表达的真核基因的重排.体外重排产生的高突变率减少了部分功能克隆(12 %).该论文阐述了一种有效的探针杂交方法,可用于表征镶嵌体文库中的大量序列.

1.9 非同源性序列蛋白重组(Sequence Homology Independent Protein Recombination, SHIPREC)

为使序列特征低的两个同源基因重组产生的文库功能性杂交最大化,需选择大小适当的镶嵌体以保持父本基因的长度.为此,Sieber 等人^[38]创建了 SHIPREC 法.该方法的操作流程,如图 4 所示.图中,在基因上显示的数字表示基因长度的百分比.出发基因是一个二聚体基因,它包含 3 个部分(从 5 到 3 端).蛋白 1 基因(1A2),含有有用的限制性位点的连接序列以及蛋白 2 基因(BM3).接着进行如下工作流程.(1)二聚体的片断化(如在 Mn^{2+} 存在的情况下用 DNase I 酶消化),然后产生平末端(如用 S1 核酸酶或 T4 聚合酶).(2)从琼脂糖凝胶电泳等操作中分离出单一基因长度的片断(加上连接序列的长度).(3)单一基因长度的片断通过分子内平末端的连接而成环状.(4)通过在连接区域的限制性消化使得环状的 DNA 线性化,从而产生一个嵌合基因库.该嵌合基因库包含一个蛋白 2 的 N 末端和蛋白 1 的 C 末端两个部分.交叉分布于整条基因中.(5)嵌合基因被直接克隆成一个表达载体,或来自双亲的一端引物通过 PCR 扩增.此法在两个亲本基因间只能建立发生一次杂交的文库,可用于产生杂合体.

1.10 截断状模板重组延伸(Recombined Extension on Truncated Templates, RETT)

Lee 等人^[39]建立的 RETT 方法是以单向单链 DNA(ssDNA)片断为模板,通过由引物开始单向生成多(聚)核苷酸的模板转换来产生随机重组基因库.该法建立在两个关键的步骤上.(1)制备用于重组目标基因单向 ssDNA 片断和以 ssDNA 为模板,通过 PCR 重组合成全长基因,如图 5(a),(b)所示.(2)利用在 PCR 中单向延长的特定引物的模板变换,制得随机重组的目标基因.图 5(a)以两个同源基因来简化模型.在随机引物存在的情况下,体外转录的目标 RNA 通过反转录而获得 ssDNA.开始重组合成反应.(i)特定引物结合到 ssDNA 片断上.(ii)特定引物在一个 PCR 循环中延伸.(iii)从引物延伸而来的短的片

断在另一个 PCR 循环中,通过模板变换结合到另外的 ssDNA 片断上,然后再延伸。(iv) 同(iii)。(v) 重复以上步骤,直至获得全长 ssDNA 基因。图 5(b) 由核酸外切酶 连续切割而获得 ssDNA 片断,重组合成反

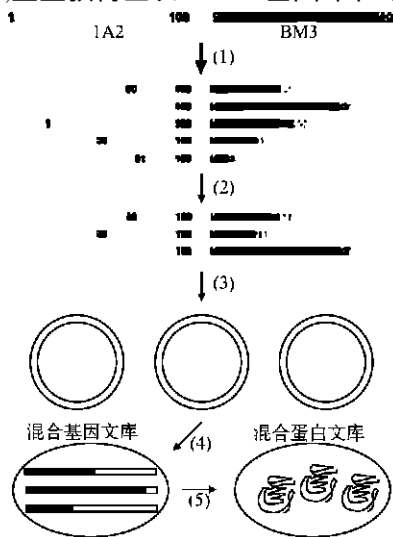


图 4 SHIPREC 流程图

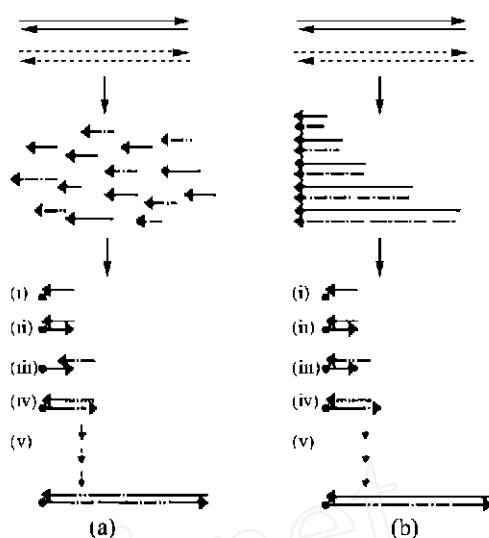


图 5 RETT 示意图

应,通过步骤(i)~(v)产生。Lee 等人^[39]应用 RETT 于重组,来源于 *S. marcescens* ATCC 21074 和 *S. liquefaciens* GM1403 的两个同源的几丁质酶(序列同源性为 83%)。通过对重组基因进行严格的图谱和序列分析,发现形成的重组基因有高达 70% 的重组率。每个镶嵌体基因的杂交次数从 1 到 4 不等,重组位点随机分布在整个 DNA 序列上。

2 讨论

基因文库的构建是酶体外定向进化的基础。在众多基因文库构建技术中,易错 PCR 可以说是最古老的一种。虽然随后产生了各种各样的新技术,但时至今日人们还常用它构建基因文库,而且许多新方法的产生或是以其为基础,或是对其改良。但每种方法都不是万能的,否则就不可能多种方法并存,也不可能新的方法产生。如 DNA 重排已成为一种产生杂合酶的有效方法,然而该方法对同源性低的不合适。外显子重排、ITCHY 和 SHIPREC 能使低同源性或没有同源性的基因发生重组,但它们只能重组两个亲本基因,而且只限于产生单杂交文库。在 DNA 重排和 RACHITT 方法中, DNA 片段化可能不是随机的。因为 DNase I 水解 DNA 时更适合临近嘧啶核苷的位点,以便引入序列偏好于重组文库中。StEP 法仅依赖 PCR 的不同的体外重组,但 PCR 的条件必须严格控制。通过缩减聚合时间和较低的反应温度,以实现引物的交错延伸。如果在 StEP 的 PCR 程序中没能得到适当的温度范围(如温度过低),就会导致非特异性退火,形成并非我们想要的重组文库。相对于其它的体外重组技术,RETT 与用酶裂解(大部分为 DNase I 消化)来产生重组片断的 DNA 重组和 RACHITT 相似,RETT 能增加重组的随机性。因为随机引物的合成和核酸外切酶的消化,不会在产生单向 ssDNA 片断的过程中引起序列偏好。在 RETT 过程中,不断延长的引物的重组合成和模板变换,是在一般 PCR 的退火条件和 DNA 延长下产生的。但是,这种 DNA 延长与 StEP 不同,后者是将退火和 DNA 的延伸合成一步。RETT 比 StEP 能产生更多的随机文库,因为 RETT 不象 StEP 过程遇到有 DNA 聚合酶的特定序列中止位点时而受影响。

3 展望

酶体外定向进化技术的产生和发展,是酶工程和蛋白质工程研究和应用的一次飞跃。该技术以基因重组技术为表现形式,所依据的进化思想对于酶和蛋白质的改造都具有里程碑式的意义。基因文库构建的方法形形色色。正是由于每种方法都存在一些缺陷,才激励人们对其不断改进,以便构建更有效的基因文库。也正是有由于种种新方法的产生,才使得基因文库的构建丰富多彩。同时,也使定向进化在很短的时间内,在提高野生酶的活性、稳定性和选择性等方面发挥重要作用,并已创造出和将开发出众多能

够用于非天然底物和极端的条件下催化的新酶。据此,我们把定向进化技术应用于1,3-丙二醇生产的关键酶进化,对源于 *Klebsiella pneumoniae* 的1,3-丙二醇调节子的 dha T 基因进行克隆和序列分析^[40,41]。所得结果,已在 GenBank 上发表^[40,41],并进一步构建其基因文库,为1,3-丙二醇进化菌的筛选和开发奠定基础。

参 考 文 献

- 1 Rubingh D N. Protein engineering from a bioindustrial point of view[J]. Curr. Opin. Biotech., 1997, 8(4): 417 ~ 422
- 2 You Lingchong, Arnold F H. Directed evolution of subtilisin E in *Bacillus subtilis* to enhance total activity in aqueous dimethylformamide[J]. Protein. Eng., 1996, 9(8): 77 ~ 83
- 3 Arnold F H, Georgiou G. Directed enzyme evolution: Screening and selection methods (methods in molecular biology) [M]. Totowa: Humana Press, 2003. 1 ~ 2
- 4 Turner-Nicholas J. Directed evolution of enzymes for applied biocatalysis[J]. Trends in Biotechnology, 2003, 21(11): 474 ~ 478
- 5 Leung D W, Chen E, Gieddel D V. A method for random mutagenesis of a defined DNA segment using a modified polymerase chain reaction[J]. Technique, 1989, 1(1): 11 ~ 15
- 6 Cadwell R C, Joyce G F. Randomization of genes by PCR mutagenesis[J]. PCR Methods Appl., 1992, 2(1): 28 ~ 33
- 7 Chen Keqin, Arnold F H. Enzyme engineering for nonaqueous solvents: Random mutagenesis to enhance activity of subtilisin E in polar organic media[J]. Bio/ Technology, 1991, (9): 1 073 ~ 1 077
- 8 Chen Keqin, Arnold F H. Tuning the activity of an enzyme for unusual environments: Sequential random mutagenesis of subtilisin E for catalysis in dimethylformamide[J]. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1993, 90(12): 5 618 ~ 5 622
- 9 张红缨, 孔祥, 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): 1 121 ~ 1 127
- 10 Komeda H, Ishikawa N, Asano Y. Enhancement of the thermostability and catalytic activity of *D*-stereospecific amino acid amidase from *Ochrobactrum anthropi* SV3 by directed evolution[J]. J. Mol. Catal. B: Enz., 2003, 21(4): 283 ~ 290
- 11 Wada M, Hsu C C, Franke D, et al. Directed evolution of *N*-acetylneuraminic acid aldolase to catalyze enantiomeric aldol reactions[J]. Bioorg. Med. Chem., 2003, 11(9): 2 091 ~ 2 098
- 12 Tetsuko Nakaniwa, Toshiji Tada, Makoto Takao, et al. An in vitro evaluation of a thermostable pectate lyase by using error-prone PCR[J]. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 2004, 27(2-3): 127 ~ 131
- 13 Stemmer W P C. DNA shuffling by random fragmentation and reassembly: In vitro recombination for molecular evolution[J]. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1994, 91(22): 10 747 ~ 10 751
- 14 Stemmer W P C. Rapid evolution of a protein in vitro by DNA shuffling[J]. Nature, 1994, 370(6488): 389 ~ 391
- 15 Stemmer W P C. Methods for in vitro recombination[P]. US Patent, 5 605 793. 1997-02-25
- 16 Cramer A, Cwirla S, Stemmer W P. Construction and evolution of antibody-phage libraries by DNA shuffling[J]. Nat. Med., 1996, 2(1): 100
- 17 Zhang Jihu, Dawes G, Stemmer W P. Directed evolution of a fucosidase from a galactosidase by DNA shuffling and screening[J]. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1997, 94(9): 4 504 ~ 4 509
- 18 Stemmer W P C. Molecular breeding of genes, pathways and genomes by DNA shuffling[J]. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 2002, 19 ~ 20: 3 ~ 12
- 19 Zhang Yingxin, Perry K, Vinci V A, et al. Genome shuffling leads to rapid phenotypic improvement in bacteria[J]. Nature, 2002, 415(6 872): 644 ~ 646
- 20 Ki-Hoon Oh, Sing-Hun Nam, Hak-Sung Kim, et al. Improvement of oxidative and thermostability of *N*-carbamyl-*D*-amino acid amidohydrolase by directed evolution[J]. Protein. Eng., 2002, 15(8): 689 ~ 695
- 21 Williams G J, Domann S, Nelson A, et al. Modifying the stereochemistry of an enzyme-catalyzed reaction by directed evolution[J]. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2003, 100(6): 3 143 ~ 3 148
- 22 Kikuchi M, Ohnishi K, Harayama S. Novel family shuffling methods for in vitro evolution of enzymes[J]. Gene, 1999, 236(1): 159 ~ 167
- 23 Zhou Zheng, Zhang Aihui, Wang Jingru, et al. Improving the specific synthetic activity of a penicillin G acylase using DNA family shuffling[J]. Acta Biochimica et Biophysica Sinica, 2003, 35(6): 573 ~ 579
- 24 Zhang Yongshu, Zhao Zhihu, Li Fangguang. High-level expression of a polypeptides encoded by a large segment of the envelope gene of HIV-1 in *E. coli* by directed evolution[J]. Biotechnology Letters, 2000, 22(11): 947 ~ 950
- 25 Yano T, Oue S, Kagamiyama H. Directed evolution of an aspartate aminotransferase with new substrate specificities[J]. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1998, 95(10): 5 511 ~ 5 515

- 26 Zhao Huimin, Arnold F H. Directed evolution converts subtilisin E into a functional equivalent of thermitase[J]. *Protein. Eng.*, 1999, 12(1):47~53
- 27 Zha Dongxing, Wilensek S, Hermes M, et al. Complete reversal of enantioselectivity of an enzyme catalysed reaction by directed evolution[J]. *Chem. Commun.*, 2001, (1):2 664~2 665
- 28 Zhao Huimin, Gver L, Shao Z, et al. Molecular evolution by staggered extension process (STEP) in vitro recombination[J]. *Nat. Biotechnol.*, 1998, 16(3):258~261
- 29 Ostermeier M, Nixon A E, Benkovic S J. Incremental truncation as a strategy in the engineering of novel biocatalysts[J]. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 1999, (7):2 139~2 144
- 30 Ostermeier M, Nixon A E, Shim J H. et al. Combinatorial protein engineering by incremental truncation[J]. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1999, 96:3562~3567
- 31 Sudhof T C, Goldstein J L, Brown M S, et al. The LDL receptor gene: a mosaic of exons shared with different proteins[J]. *Science*, 1985, 85(228):815~822
- 32 Patthy L. Genome evolution and the evolution of exon-shuffling areview[J]. *Gene.*, 1999, 238(1):103~114
- 33 Long Manyuan, de Souza S J, Rosenberg C, et al. Exon shuffling and the origin of the mitochondrial targeting function in plant cytochrome C1 precursor[J]. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1996, 93(15):7 727~7 731
- 34 Kolkman J A, Stemmer W P C. Directed evolution of proteins by exon shuffling[J]. *Nature Biotechnology*, 2001, 19(5):423~428
- 35 Gibbs M D, Nevalainen K M, Bergquist P L. Degenerate oligonucleotide gene shuffling (DOGS): A method for enhancing the frequency of recombination with family shuffling[J]. *Gene.*, 2001, 271(1):13~20
- 36 Coco W M, Levinson W E, Crist M J, et al. DNA shuffling method for generating highly recombined genes and evolved enzymes[J]. *Nat. Biotechnol.*, 2001, 19(4):354~359
- 37 Abecassis V, Pompon D, Truan G. High efficiency family shuffling based on multi-step PCR and in vivo DNA recombination in yeast: Statistical and functional analysis of a combinatorial library between human cytochrome P450 1A1 and 1A2[J]. *Nucleic Acids Research*, 2000, 28:88~89
- 38 Sieber V, Martinez C A, Arnold F H. Libraries of hybrid proteins from distantly related sequences[J]. *Nat. Biotechnol.*, 2001, 19(5):456~460
- 39 Si-Hyoung Lee, Eon-Jung Ryu, Min-Jung Kang, et al. A new approach to directed gene evolution by recombined extension on truncated templates (RETT) [J]. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2003, 26(3-6):119~129
- 40 Zheng Yuanyuan, Cao Yang, Fang Baishan. Cloning and sequence analysis of the dha T gene of the 1,3-propanediol regulon from *Klebsiella pneumoniae*[J]. *Biotechnology Letters*, 2004, 26(3):251~255
- 41 Cao Yang, Zheng Yuanyuan, Fang Baishan. Optimization of polymerase chain reaction-amplified conditions using the uniform design method[J]. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 2004, 79:910~913

Directional Evolution of Enzymes in Vitro ()

Technique for Generating Mutator Libraries and Its New Progress

Fang Baishan Zheng Yuanyuan

(College of Mater. Sci. & Eng., Huaqiao Univ., 362021, Quanzhou, China)

Abstract Among the studies of directional evolution of enzymes in vitro, the authors provide information about the techniques in common use for generating gene libraries and the recent progress of their applications; and provide also information about techniques of new development for generating gene libraries and situation of their application. The characteristics and the limitation of several principal methods used at present are discussed.

Keywords enzyme, directional evolution, gene library