



## (12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102994470 A

(43) 申请公布日 2013.03.27

(21) 申请号 201210562633.2

(22) 申请日 2012.12.24

(71) 申请人 江南大学

地址 214122 江苏省无锡市蠡湖大道 1800 号

(72) 发明人 李剑芳 胡蝶 王春娟 朱天地  
郭敏辰

(51) Int. Cl.

*C12N 9/14* (2006.01)

*C12N 15/55* (2006.01)

*C12N 15/10* (2006.01)

*C12N 15/70* (2006.01)

*C12R 1/66* (2006.01)

权利要求书 1 页 说明书 4 页

序列表 3 页 附图 1 页

### (54) 发明名称

一种环氧化物水解酶基因 (EH-B) 原核表达及手性环氧氯丙烷的制备

### (57) 摘要

本发明提出一种源于 *Aspergillus usamii* E001 的新型 B 类环氧化物水解酶基因成熟肽 cDNA 序列的克隆及原核表达方法,其核苷酸序列为 SEQ ID NO:1,相应的氨基酸序列为 SEQ ID NO:2,相应的基因命名为 Aus EH-B。手性气相柱分析 rEH 对 (R)-环氧氯丙烷具有良好的立体选择性,生产 (S)-环氧氯丙烷对映体过量值达 99%。为该环氧化物水解酶的产业化生产奠定基础,对 EH 酶动力学拆分法研究为生物催化技术产业化制备手性环氧氯丙烷提供基础。

1. 一种来源于 *Aspergillus usamii* E001 的新型 B 类环氧化物水解酶, 其 cDNA 序列和氨基酸序列分别为 SEQ IDNO :1 和 SEQ IDNO :2。

2. *A. usamii* E001 新型环氧化物水解酶 B 基因序列克隆及表达的方法:

(1) 从已克隆的 *A. usamii* E001 基因 cDNA 序列, 然后对该序列进行开放读码框分析和信号肽预测, 根据预测的结果设计一对特异性引物, 引物序列如下:

AuEHB-F :5' -GAATTCATGGCACTCGCTTACAGCAA-3' , 含 EcoR I 酶切位点;

AuEHB-R :5' -GCGGCCGCTCATTCTTCTACCAGCCCATAC-3' , 含 Not I 酶切位点;

提取 *A. usamii* E001 的总 RNA, 按照 TaKaRa 生产的 RNA PCR Kit (AMV) Ver. 3.0 中的说明书进行 RT-PCR: 以 Oligo dT-Adaptor Primer 为引物进行反转录合成 cDNA 的第一条链; 以 M13Primer M4 和 AuEHB-F 为引物进行第一轮 PCR (94°C, 2min ;94°C, 30s, 51°C, 30s, 72°C, 80s, 30 个循环 ;72°C, 10min) ; 以第一轮 PCR 产物为模板、AuEHB-F 和 AuEHB-R 为引物进行第二轮 PCR (94°C, 2min ;94°C, 30s, 55°C, 30s, 72°C, 70s, 30 个循环 ;72°C, 10min) ; 将两轮 PCR 产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳分析, 250bp DNA LadderMarker 做对照, 将目的条带割胶回收并与 pUCm-T 连接, 转化 JM109 获重组质粒 pUCm-T-AusEH-B, 经酶切鉴定后送上海生工进行序列测定, 得到 Aus EH-B 成熟肽 cDNA 序列;

(2) 将测序结果正确的 pUCm-T-AusEH-B 与 pEH-28-a-c(+) 质粒均用 EcoR I 和 Not I 进行双酶切, 割胶回收的酶切产物在 T4DNA 连接酶的作用下进行连接, 得到重组质粒 pEH-28-a-AusEH-B, 并对重组质粒进行序列测定;

(3) *E. coli* Rosetta (DE3)/EH-B 的构建、表达、产物纯化及活性测定: 将 pEH-28-a-AusEH-B 转化 *E. coli* Rosetta (DE3), 在含有氯霉素及 Kna 抗性平板上筛选转化子; 重组质粒 EcoR I 和 Not I 酶切验证; 挑去阳性转化子于 2mL 含 Kna/ 氯霉素抗性的 LB 培养基中, 37°C 振荡培养过夜, 以 1% 的接种量转接到 30mL 相同培养基中, 37°C 振荡培养至对数生长中期 (OD600 为 0.6 ~ 0.8), 加入 IPTG 至终浓度为 0.5mmol/L, 诱导过夜; 同时以未诱导工程菌及含空质粒的菌株为阴性对照; 诱导结束后, 收集菌体并冷冻干燥, 测定手性气相色谱环氧化物水解酶活性。

## 一种环氧化物水解酶基因 (EH-B) 原核表达及手性环氧氯丙烷的制备

### 技术领域

[0001] 本发明涉及来源于宇佐美曲霉 (*Aspergillus usamii*)E001 菌株的一种新型 B 型环氧化物水解酶 (Aus EH-B) 基因成熟肽 cDNA 序列的克隆及原核表达,利用生物手性拆分制备手性环氧苯乙烯的方法,属于生物工程技术领域。

### 背景技术

[0002] 手性化合物是重要的手性配体,广泛用于各类不对称反应中,特别是在药物合成领域的应用更为广泛。手性环氧氯丙烷是一种重要的有机合成关键中间体,用以制备多种高光学纯度药物中间体和天然产物,如芳氧丙醇胺类药物、环戊酮的衍生物、抗真菌药 (S)- 霉康灵、阿伐他汀、L- 肉碱等。目前,外消旋的环氧氯丙烷价廉易得,而手性环氧氯丙烷的价格昂贵,后者的报价基本在前者 6 倍以上,因此通过拆分外消旋环氧氯丙烷制备其手性单体具有很大的工业化应用前景。其拆分副产物 3- 氯 -1,2- 丙二也是一种重要的手性合成原料。拆分外消旋环氧氯丙烷的方法可分为化学法和生物法两类:化学法通常使用昂贵的  $S_{len-Co}$  催化剂,可获得 ee 达到 99% 的 (S)- 环氧氯丙烷收率可达 30%,其缺点是成本高而且环境污染严重。

[0003] 环氧化物水解酶 (Epoxide hydrolase, EC, 3. 3. 2. -) 又称环氧化物水合酶或环氧水化酶,是一类催化水分子立体选择性的加成环氧化物水解为相应 1,2- 二醇的水解酶类。在化学法和生物法制备手性纯环氧化物的方法中,酶动力学拆分法由于其高的对映体选择一直受成为广大研究者的重视。该酶广泛存在于植物、昆虫、哺乳动物及微生物体内。环氧化物水解酶是一种不依赖辅因子的酶,其来源广泛,底物谱宽广,对映体选择性高,具有很高的工业化应用前景,对其研究已成为当前研究的热点。

[0004] 环氧化物水解酶微生物来源广泛,但具有良好手性拆分作用的环氧化物水解酶较少, Botes 等以 1,2- 环氧辛烷为底物从 187 个菌株中筛选出 25 个不同属的酵母具有环氧化物水解酶活性的菌株, Yeates 等以硝基环氧苯乙烯为底物从 409 个菌株中筛选出 45 个不同属的酵母具有水解底物活性,但只有 3 个担子菌属菌株酵母的环氧化物水解酶选择性较高,即毛孢子菌属 (*Trichosporon*)、红冬孢子属 (*Rhodospiridium*) 和红酵母属 (*Rhodotorula*)。Furstoss 和 Archelas 等从众多菌株中筛选一株 *Aspergillus niger* LCP 521 进行环氧化物的不对称水解,合成了 6,7- 双羟基香叶醇。目前对于环氧化物水解酶的研究,主要集中于对原始菌株培养条件的优化以增加产酶量或者是提高酶活,也有一部分研究者采用基因工程技术和蛋白质工程技术来提高环氧化物水解酶的立体选择性。

[0005] 本发明来源于宇佐美曲霉 (*Aspergillus usamii*)E001 菌株具有环氧化物水解酶活性,提供一种新型 B 型环氧化物水解酶 (Aus EH-B) 基因成熟肽 cDNA 序列的克隆及原核表达。基因工程环氧化物水解酶纯度高、不含其他蛋白酶,立体选择性更强;大肠杆菌表达系统具有高效胞内表达重组蛋白,成本低廉、生产率高、操作简单等优势;且由于一般底物为有机溶剂,酶分子受底物浓度抑制作用,胞内表达宿主菌包膜形成天然保护屏障,更有

利于在高底物浓度下进行生物催化,适应工业化生产要求;本发明利用重组环氧化物水解酶制备手性环氧苯乙烯的研究未见报道。

### 发明内容

[0006] 本发明的目的是提供一种源于 *Aspergillus usamii* E001 的新型 B 类环氧化物水解酶基因成熟肽 cDNA 序列的克隆及原核表达,利用重组环氧化物水解酶制备手性环氧苯乙烯的方法,为该环氧化物水解酶的产业化生产奠定基础。根据酶的亚细胞定位及底物的特异性将 EH 分为可溶性环氧化物水解酶 (sEH)、微粒体环氧化物水解酶 (mEH),保幼激素环氧化物水解酶 (JhEH),胆固醇环氧化物水解酶 (ChEH),羟环氧烯酸水解酶 (hepoxilinhydrolase),白三烯 A4 水解酶 (LAH) 以及柠檬烯水解酶 (LEH) 七个亚家族。生物信息学分析表明,来源于宇佐美曲霉 E001 菌株的一种新型环氧化物水解酶属于微粒体环氧化物水解酶 (mEH) 类,属于曲霉 EH 中一类新型环氧化物水解酶。由于与研究较多 *A. Niger* LCP521EH 同源性仅为 56%,将该酶命名为 Aus EH-B,其相应的基因命名为 Aus EH-B。Aus EH-B 具有较高的催化活性和手性选择性,在手性环氧化物生产中有较大的工业化生产和应用潜力及经济价值。

[0007] *A. usamii* E001 菌株由江南大学筛选和保藏,已于 2005 年在《食品与发酵工业》杂志的 Vol. 31, No. 4, Pg. 50 公开,本发明人承诺该菌株在 20 年内向公众发放。

[0008] 本发明的技术方案:一种源自 *A. usamii* E001 的新的 B 类环氧化物水解酶 (Aus EH-B),其基因 (Aus EH-B) 成熟肽 cDNA 核苷酸序列为 SEQ ID NO:1。

[0009] 所述的由成熟肽 cDNA 序列所推导的 Aus EH-B 氨基酸序列为 SEQ ID NO:2。

[0010] 所述的重组 Aus EH-B 的活性测定方法:

[0011] 在 1.5mL EPP 管中各加入 0.85mL 磷酸钾缓冲液 (pH7.0) 稀释适当重组酶菌液,在 30°C 下预温 5min,然后各加入 150  $\mu$ L 200mM 环氧氯丙烷立即计时反应 20min 后。取 1mL 转化液加适量无水硫酸钠,振荡后离心 (12000r/min, 5min),取上清液进行手性气相分析。酶活单位定义:30°C 下,每分钟催化 1  $\mu$ mol 外消旋环氧氯丙烷所需的酶量定义为一个酶活力单位 (U),环氧化物水解酶酶活力以每毫克干菌体所含有的酶活力单位表示 (U/mg)。

[0012] 所述的 Aus EH-B 成熟肽 cDNA 序列的克隆和表达的方法如下:

[0013] (1) 从已克隆的 *A. usamii* E001 基因 cDNA 序列,然后对该序列进行开放读码框分析和信号肽预测,根据预测的结果设计一对特异性引物,引物序列如下:

[0014] AuEHB-F :5' -GAATTCATGGCACTCGCTTACAGCAA-3', 含 EcoR I 酶切位点;

[0015] AuEHB-R :5' -GCGGCCGCTCATTTTCTACCAGCCATAC-3', 含 Not I 酶切位点;

[0016] 提取 *A. usamii* E001 的总 RNA,按照 TaKaRa 生产的 RNA PCR Kit (AMV) Ver. 3.0 中的说明书进行 RT-PCR:以 Oligo dT-Adaptor Primer 为引物进行反转录合成 cDNA 的第一条链;以 M13Primer M4 和 AuEHB-F 为引物进行第一轮 PCR (94°C, 2min; 94°C, 30s, 51°C, 30s, 72°C, 80s, 30 个循环; 72°C, 10min);以第一轮 PCR 产物为模板、AuEHB-F 和 AuEHB-R 为引物进行第二轮 PCR (94°C, 2min; 94°C, 30s, 55°C, 30s, 72°C, 70s, 30 个循环; 72°C, 10min);将两轮 PCR 产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳分析,250bp DNA Ladder Marker 做对照,将目的条带胶回收并与 pUCm-T 连接,转化 JM109 获重组质粒 pUCm-T-AusEH-B,经酶切鉴定后送上海生工进行序列测定,得到 Aus EH-B 成熟肽 cDNA 序列。

[0017] (2) 将测序结果正确的 pUCm-T-AusEH-B 与 pET-28-a-c(+) 质粒均用 EcoR I 和 Not I 进行双酶切, 割胶回收的酶切产物在 T4DNA 连接酶的作用下进行连接, 得到重组质粒 pET-28a-AusEH-B, 并对重组质粒进行序列测定。

[0018] (3) E. coli Rosetta(DE3)/EH-B 的构建、表达、产物纯化及活性测定: 将 pET-28-a-AusEH-B 转化 E. coli Rosetta(DE3), 在含有氯霉素及 Kna 抗性平板上筛选转化子。重组质粒 EcoR I 和 Not I 酶切验证。挑去阳性转化子于 2mL 含 Kna/ 氯霉素抗性的 LB 培养基中, 37°C 振荡培养过夜, 以 1% 的接种量转接到 30mL 相同培养基中, 37°C 振荡培养至对数生长中期 (OD600 为 0.6 ~ 0.8), 加入 IPTG 至终浓度为 0.5mmol/L, 诱导过夜。同时以未诱导工程菌及含空质粒的菌株为阴性对照。诱导结束后, 收集菌体并冷冻干燥, 利用手性气相色谱测定环氧化物水解酶活性。

[0019] 本发明的有益效果: 本发明的目的是提供一种源于 *Aspergillus usamii* E001 的新型 B 类环氧化物水解酶基因成熟肽 cDNA 序列的克隆及原核表达, 利用重组环氧化物水解酶制备手性环氧苯乙烯的方法。生物信息学分析表明该环氧化物水解酶属于此类酶的 B 类, 所以命名为 Aus EH-B, 其相应的基因命名为 Aus EH-B。产环氧化物水解酶重组菌的成功构建, 经气相结果检测显示了较高的酶活性质以及对映体选择性。因此, 在环氧氯丙烷的手性拆分动力学研究中起到重要作用。本发明为该酶的产业化生产奠定了理论基础, 有较大的工业化生产和应用潜力及经济价值, 也为其他菌株新型环氧化物水解酶的研究奠定了理论基础。

#### 附图说明

[0020] 图 1: 重组质粒 pET-28a-AusEH-B 的构建示意图

[0021] 图 2: 重组 E. coli Rosetta(DE3)/Aus EH-B 的 SDS-PAGE 电泳图

#### 具体实施方式

[0022] 以下结合具体实施例, 进一步阐述本发明的操作方法。但是这些实施例仅用于详细说明本发明, 而不用于限制本发明的范围。

[0023] 实施例 1 *A. usamii* E001EH-B 成熟肽 cDNA 序列的克隆

[0024] 提取 *A. usamii* E001 的总 RNA, 按照 TaKaRa 生产的 RNA PCR Kit (AMV) Ver. 3.0 中的说明书进行 RT-PCR: 以 Oligo dT-Adaptor Primer 为引物进行反转录合成 cDNA 的第一条链; 以 M13Primer M4 和 AuEHB-F 为引物进行第一轮 PCR (94°C, 2min; 94°C, 30s, 51°C, 30s, 72°C, 80s, 30 个循环; 72°C, 10min); 以第一轮 PCR 产物为模板、AuEHB-F 和 AuEHB-R 为引物进行第二轮 PCR (94°C, 2min; 94°C, 30s, 55°C, 30s, 72°C, 70s, 30 个循环; 72°C, 10min); 将两轮 PCR 产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳分析, 250bp DNA LadderMarker 做对照, 将目的条带割胶回收并与 pUCm-T 连接, 转化 JM109 获重组质粒 pUCm-T-AusEH-B, 经酶切鉴定后送上海生工进行序列测定, 得到 Aus EH-B 成熟肽 cDNA 序列。

[0025] 实施例 2 Aus EH-B 成熟肽基因在中 E. coli Rosetta(DE3) 的表达

[0026] 将测序结果正确的 pUCm-T-AusEH-B 与 pET-28-a-c(+) 质粒均用 EcoR I 和 Not I 进行双酶切, 割胶回收的酶切产物在 T4DNA 连接酶的作用下进行连接, 得到重组质粒 pET-28a-AusEH-B, 并对重组质粒进行序列测定。

[0027] E. coli Rosetta(DE3)/EH-B 的构建、表达、产物纯化及活性测定：将 pET-28-a-AusEH-B 转化 E. coli Rosetta(DE3)，在含有氯霉素及 Kna 抗性平板上筛选转化子。重组质粒 EcoR I 和 NotI 酶切验证。挑去阳性转化子于 2mL 含 Kna/ 氯霉素抗性的 LB 培养基中，37℃ 振荡培养过夜，以 1% 的接种量转接到 30mL 相同培养基中，37℃ 振荡培养至对数生长中期 (OD600 为 0.6 ~ 0.8)，加入 IPTG 至终浓度为 0.5mmol/L，诱导过夜。同时以未诱导工程菌及含空质粒的菌株为阴性对照。诱导结束后，收集菌体并冷冻干燥。经 SDS-PAGE 电泳显示重组 Aus EH-B 的分子量为 43kDa；测定环氧化物水解酶活性达 750U/mg，手性气相柱分析 rEH 对 (R)-环氧氯丙烷具有良好的立体选择性，生产 (S)-环氧氯丙烷对映体过量值达 99%，产率为 19.8%。

[0001]

## 序 列 表

- <110> 江南大学  
 <120> 一种环氧化物水解酶基因 (*EH-B*) 原核表达及手性环氧苯乙烯的制备

- <210> SEQ ID NO: 1  
 <211> 1188  
 <212> cDNA  
 <213> 宇佐美曲霉 (*Aspergillus usamii*) E001

- <220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)...(1185)

- <220>  
 <221> mat\_peptide  
 <222> (1)...(1185)

<400> 1

```

atggcactcg cttacagcaa cattcccttg ggtgcgaccg tcatcccata cccctttcaa      60
gttcatattt cagacgagca aatcgaggag ctacagctat tggccaagct gtcgaagctc      120
gcgcctccta catacgaagg ccttcagcag gatcgtagat atggcataac caatgaatgg      180
cttgccaatg caaaggaagc ttggaagagc tttgactggc gccagcgga aagccgcatac      240
aacagcttcc ctcagttcac ctatgatata gagggcctga ctattcattt tgtggcgttg      300
ttttctgaga agaaggatgc aatccctata gttctctccc atggctggcc aggcagtttt      360
ctcgagtttc tccccgttct gacttcaatc cgggacaaat atagccctga aaccttgcca      420
taccatatag tggtccecgtc acttccggga tatacgttct cgtccggtec tccgctggat      480
gtcaacttca atggcgagga tacagcccgc gtcatacaaca aggtgatgct caatctcggg      540
ttcgaggatg gctatgtggc acaaggcgga gatattgggt caaagatcgg tcgcatactt      600
gcagttgatc atgatgcttg caaagccgtg catttgaatg cctgctatat gggcaagcca      660
tcgagcatac cagacacggc tattactgag gaagacaaac gcgcgctggc tcgtgcacag      720
tggtttgcta cctttggcag tggttatgct gtcgagcatg gtactcgacc cagcactatt      780
ggcaatgcgc tatccacaag tccagtgcct ctgctctcct ggatcggaga gaagttcctc      840
gattgggctg gtgaaaccat tcccttagag actatcctag aatctgtgac ttgtactgg      900
tttactgaga ccttcccccg gtctatctac cactatcggg agaacttccc gccgccaag      960
ctgagacata ccgaagacc cccgatggac attcgaagc cgtttggctt ttcataattat      1020
ccgatggagc ttgtaccac cccacgcgct tgggttgaga caacaggaaa cctggtgttc      1080
tggcaggctc acgagaaggg aggacathtt gcagcgtgg aaaggcccca ggattacctt      1140
gatgatttga cggcgttctg tgaacaagta tgggctggta gaaaatga      1188

```

[0002]

<110> 江南大学  
 <120> 一种环氧化物水解酶基因 (*EH-B*) 原核表达及手性环氧苯乙烯的制备

<210> SEQ ID NO: 2  
 <211> 395  
 <212> PRT  
 <213> 宇佐美曲霉 (*Aspergillus usamii*) E001

<400> 2

Met Ala Leu Ala Tyr	Ser Asn Ile Pro Leu	Gly Ala Thr Val Ile
5	10	15
Pro Ser Pro Phe Gln	Val His Ile Ser Asp	Glu Gln Ile Glu Glu
20	25	30
Leu Gln Leu Leu Val	Lys Leu Ser Lys Leu	Ala Pro Pro Thr Tyr
35	40	45
Glu Gly Leu Gln Gln	Asp Arg Arg Tyr Gly	Ile Thr Asn Glu Trp
50	55	60
Leu Ala Asn Ala Lys	Glu Ala Trp Lys Ser	Phe Asp Trp Arg Pro
65	70	75
Ala Glu Ser Arg Ile	Asn Ser Phe Pro Gln	Phe Thr Tyr Asp Ile
80	85	90
Glu Gly Leu Thr Ile	His Phe Val Ala Leu	Phe Ser Glu Lys Lys
95	100	105
Asp Ala Ile Pro Ile	Val Leu Leu His Gly	Trp Pro Gly Ser Phe
110	115	120
Leu Glu Phe Leu Pro	Val Leu Thr Ser Ile	Arg Asp Lys Tyr Ser
125	130	135
Pro Glu Thr Leu Pro	Tyr His Ile Val Val	Pro Ser Leu Pro Gly
140	145	150
Tyr Thr Phe Ser Ser	Gly Pro Pro Leu Asp	Val Asn Phe Asn Gly
155	160	165
Glu Asp Thr Ala Arg	Val Ile Asn Lys Val	Met Leu Asn Leu Gly
170	175	180
Phe Glu Asp Gly Tyr	Val Ala Gln Gly Gly	Asp Ile Gly Ser Lys
185	190	195
Ile Gly Arg Ile Leu	Ala Val Asp His Asp	Ala Cys Lys Ala Val
200	205	210
His Leu Asn Ala Cys	Tyr Met Gly Lys Pro	Ser Ser Ile Pro Asp
215	220	225
Thr Ala Ile Thr Glu	Glu Asp Lys Arg Ala	Leu Ala Arg Ala Gln
230	235	240
Trp Phe Ala Thr Phe	Gly Ser Gly Tyr Ala	Val Glu His Gly Thr

[0003]



Arg Pro Ser Thr Ile	245	Gly Asn Ala Leu Ser	250	Thr Ser Pro Val Ala	255
	260		265		270
Leu Leu Ser Trp Ile	275	Gly Glu Lys Phe Leu	280	Asp Trp Ala Gly Glu	285
Thr Ile Pro Leu Glu	290	Thr Ile Leu Glu Ser	295	Val Thr Leu Tyr Trp	300
Phe Thr Glu Thr Phe	305	Pro Arg Ser Ile Tyr	310	His Tyr Arg Glu Asn	315
Phe Pro Pro Pro Lys	320	Leu Arg His Thr Glu	325	Asp Pro Arg Trp Tyr	330
Ile Arg Lys Pro Phe	335	Gly Phe Ser Tyr Tyr	340	Pro Met Glu Leu Val	345
Pro Thr Pro Arg Ala	350	Trp Val Glu Thr Thr	355	Gly Asn Leu Val Phe	360
Trp Gln Ala His Glu	365	Lys Gly Gly His Phe	370	Ala Ala Leu Glu Arg	375
Pro Gln Asp Tyr Leu	380	Asp Asp Leu Thr Ala	385	Phe Cys Glu Gln Val	390
Trp Ala Gly Arg Lys	395				

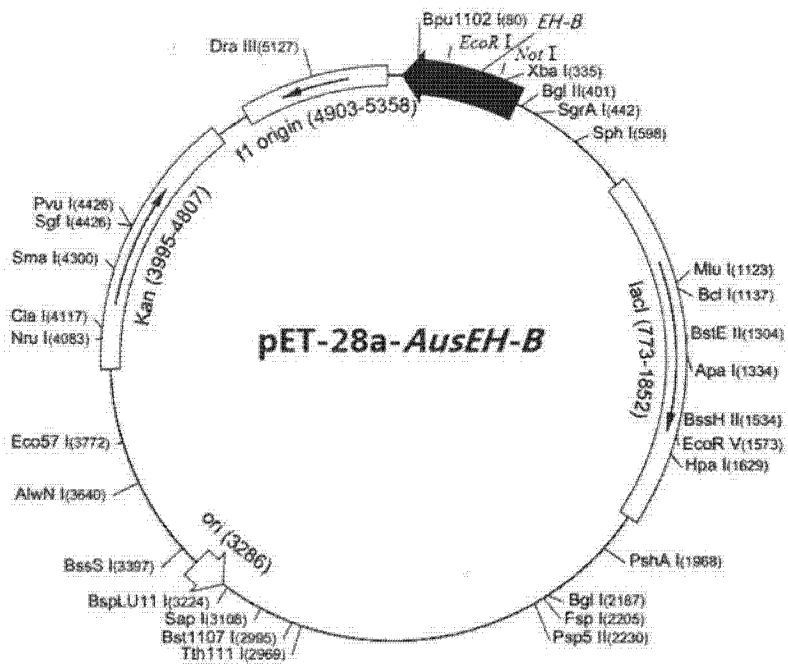


图 1

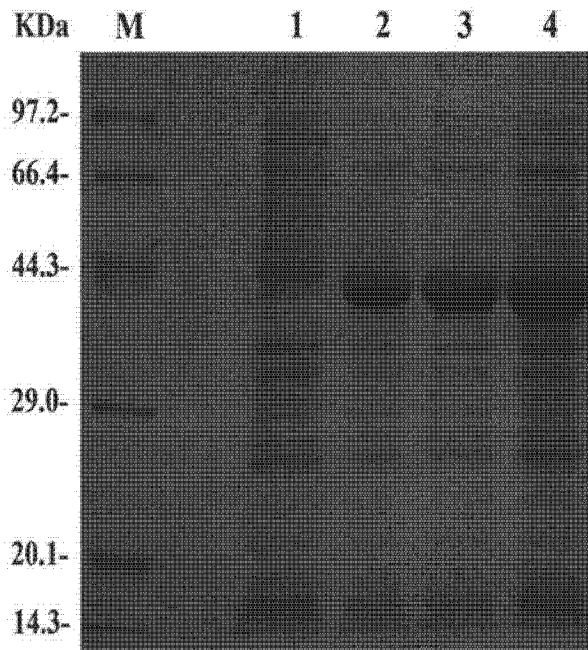


图 2