



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101407780 B

(45) 授权公告日 2010.08.25

(21) 申请号 200810195613.X

(22) 申请日 2008.08.30

(83) 生物保藏信息

CCTCC NO:M208079 2008.05.29

(73) 专利权人 江南大学

地址 214122 江苏省无锡市蠡湖大道 1800 号江南大学生物工程学院

(72) 发明人 张荣珍 徐岩

(74) 专利代理机构 无锡市大为专利商标事务所 32104

代理人 时旭丹 刘品超

(51) Int. Cl.

C12N 1/21 (2006.01)

C12P 7/22 (2006.01)

C12N 9/02 (2006.01)

C12N 15/53 (2006.01)

C12N 15/70 (2006.01)

C12R 1/19 (2006.01)

(56) 对比文件

CN 101230363 A, 2008.07.30,

聂尧等. 重组大肠杆菌不对称还原 2-羟基苯乙酮合成 (R)- 苯基乙二醇. 化工进展. 2006, 25(10), 1231-1236.

LU T 等. Promotion effect of xylose co-substrate on stability of catalytic system for asymmetric redox of (R,S)-1-phenyl-1,2-ethanediol to its (S)-enantiomer by Candida parapsilosis. Chinese journal of catalysis. 2007, 28(5), 446-450.

Y Nie 等. Purification, characterization, gene cloning and expression of a novel alcohol dehydrogenase with anti-prelog stereospecificity from Candida parapsilosis. Applied and environmental microbiology. 2007, 73(11), 3759-3764.

审查员 张丽华

权利要求书 2 页 说明书 9 页

(54) 发明名称

利用定点突变改变辅酶特异性和立体选择性制备 (R)- 苯基乙二醇的方法

(57) 摘要

利用定点突变改变辅酶特异性和立体选择性制备 (R)- 苯基乙二醇的方法, 属于生物催化不对称转化技术领域。本发明提供了一株重组大肠杆菌 BL21/pETSCR6768, 保藏编号 CCTCC NO: M208079; 及其不对称转化制备 (R)- 苯基乙二醇的方法。本发明将 (S)- 专一性羰基还原酶的第 67 位的 Ser 和 68 位的 His 均突变为 Asp, 构建重组质粒 pETSCR6768, 转化入大肠杆菌获得重组菌株 E. coli BL21/pETSCR6768。该重组菌株使 (S)- 专一性羰基还原酶的辅酶特异性由 NADPH 改变为 NADH; 另一方面改变了产物的空间选择性, 由 (S)- 苯基乙二醇改变为 (R)- 苯基乙二醇; 为高效、低成本制备 (R)- 苯基乙二醇提供了有效途径, 从分子和蛋白水平上认识功能性酶蛋白的立体选择性具有重要的意义。

CN 101407780 B

1. 一株不对称转化制备 (R)- 苯基乙二醇的重组菌, 其分类命名为大肠杆菌 BL21/pETSCR6768 (*Escherichia coli* BL21/pETSCR6768), 已保藏于中国典型培养物保藏中心, 保藏编号 :CCTCC NO :M208079。

2. 利用定点突变后构建的重组菌 CCTCC NO :M208079 不对称转化制备 (R)- 苯基乙二醇的方法, 其特征是以 2- 羟基苯乙酮为底物, 进行不对称转化反应 : 在 1mL 0.1mol/L pH 4.5 ~ 6.5 的醋酸缓冲液, 或 1mL 0.1mol/L pH 6.0 ~ 7.0 的磷酸缓冲液, 或 1mL 0.1mol/L pH 8.0 ~ 9.0 的 Tris-HCl 缓冲液中, 2- 羟基苯乙酮底物浓度为 5g/L, 反应温度 30°C ;

采用重组菌全细胞生物转化 : 重组菌细胞浓度为 0.1 ~ 0.2g/mL, 反应时间为 48h, 反应前不需要加入辅酶, 产物为 (R)- 苯基乙二醇 ;

或采用重组菌的蛋白细胞破碎后经纯化后的重组蛋白生物转化 : 重组蛋白浓度为 1 ~ 2 μ g/mL, 反应时间为 8h, 反应前加 5mmol/L 辅酶 NADH, 产物为 (R)- 苯基乙二醇。

3. 根据权利要求 2 所述的方法, 其特征是重组菌的培养方法为 :

LB 培养基以 g/L 计 : 胰蛋白胨 10, 酵母提取物 5, NaCl 10, pH 7.0 ; 固体培养基添加琼脂粉 1.5% ;

培养条件 : 挑取重组菌株 CCTCC NO :M208079 的单菌落接种于 3mL 含 100 μ g/mL 氨苄青霉素的 LB 液体培养基中, 于 37°C, 200rpm 振荡培养过夜, 取 1mL 培养液转接于 50mL 含 100 μ g/mL 氨苄青霉素的 LB 液体培养基中, 于 37°C, 200rpm 振荡培养至 OD₆₀₀ 为 0.6 后, 培养物中加入诱导物异丙基 -B-D- 硫代半乳糖苷 1mmol/L, 诱导培养温度 30°C, 诱导培养过夜, 10,000rpm 离心 10min, 用生理盐水洗涤两次, 收集得到重组菌全细胞。

4. 根据权利要求 2 所述的方法, 其特征是重组蛋白的纯化方法为 :

菌体收集 : 将收集的重组菌全细胞用 MCAC-0 缓冲液重悬, 超声破碎 : 工作时间 4s, 间歇时间 6s, 共 20min ; 破碎液 16,000rpm 离心 40min ; 弃沉淀, 取上清进行后续的蛋白纯化工作 ;

蛋白纯化 : 先将上清挂 Pharmacia 公司的 Ni 柱两遍, 用 MCAC-50 缓冲液洗脱杂蛋白, 用 MCAC-200 缓冲液洗脱目的蛋白 ; 再用 Pharmacia 公司的 Hitrap 柱蛋白脱盐, 利用 Pharmacia 公司的 ÄKTA 蛋白纯化系统将蛋白溶液换为无盐的缓冲液 ; 接着用 Pharmacia 公司的 Resource Q 阴离子交换柱, 1×1cm, 进行蛋白纯化 ; 最后用 Pharmacia 公司的 Superdex 200, HiLoad 26/60, 进行蛋白纯化 ; 经 SDS-PAGE 检测目的蛋白纯度达到 90% 以上。

5. 权利要求 1 所述重组菌的构建方法, 其特征是将突变基因片断 scr6768 插入载体 pET21c 构建重组质粒 pETSCR6768, 重组质粒转化大肠杆菌 *E. coli* BL21 (DE3) 感受态细胞, 通过含有 100 μ g/mL 氨苄青霉素的 LB 平板筛选, 获得目的重组菌株 *E. coli* BL21/pETSCR6768。

6. 根据权利要求 5 所述的构建方法, 其特征是重组质粒 pETSCR6768 的构建 : 利用限制性内切酶 BamHI 和 XhoI 对目的基因片断 scr6768 和载体 pET21c 分别进行双酶切处理, 处理后 DNA 片断通过粘性末端连接, 获得带有目的基因片断的重组质粒 pETSCR6768。

7. 根据权利要求 5 所述的构建方法, 其特征是突变基因片断 scr6768 的获得 : 以含有 (S)- 专一性羰基还原酶的重组质粒 pETCPADH 作为 PCR 扩增反应模板, 利用含有 BamHI 限制性酶切位点的引物 1, 含有 XhoI 限制性酶切位点的引物 2, 中间两段引物 3 和引物 4,

引物 1 :5' -ATC GGATCC GATGGGCGAAATCGAATCTTATTG-3',

引物 2 :5' -TGACTCTCGAGTGGACACGTGTATCCACCGTC-3',

引物 3 :5' -CCATTTGGTACAACGATGATCCAGC-3',

引物 4 :5' -CTCATCAGCTGGATCATCGTTGTAC-3',

通过 SOE-PCR 反应扩增, 获得 scr6768 基因, 其全长为 837bp ;

上游 cDNA 片段及下游 cDNA 片段的获得 :以重组质粒 pETCPADH 为模板, 分别以引物 1 和 4, 引物 2 和 3 进行 PCR 反应, PCR 反应体系 :ddH₂O 37 μ L, 10×Reaction Buffer 5 μ L, 25mmol/L dNTP 0.5 μ L, 50pmol/μ L 的引物 1 和 4, 或引物 2 和 3 各引物 1 μ L, 重组质粒 pETCPADH 1 μ L, 5U/μ L Taq DNA polymerase 0.5 μ L ;

PCR 反应条件 :94°C 预变性 5min ;94°C 1min, 57°C 1min, 72°C 1min, 进行 30 个循环 ; 72°C 延伸 10min ;获得上游 cDNA 片段及下游 cDNA 片段 ;

将上、下游 cDNA 片段经退火重叠连接, 两端单链于 72°C 用 Taq DNAPolymerase 延伸 10min 补成双链, 作下一次的 PCR 模板, PCR 反应条件 :94°C 3min ;94°C 1min, 55°C 1min, 72°C 1min, 30 个循环 ;72°C 10min, 即获得 scr6768 基因, 该基因编码将 (S)- 专一性羰基还原酶蛋白序列中的第 67 位的 Ser 和第 68 位 His 均突变为 Asp。

利用定点突变改变辅酶特异性和立体选择性制备 (R)- 苯基乙二醇的方法

技术领域

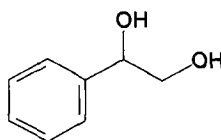
[0001] 利用定点突变改变辅酶特异性和立体选择性制备 (R)- 苯基乙二醇的方法, 本发明涉及利用蛋白质工程技术改造酶蛋白结构中关键位点的氨基酸, 通过基因工程手段构建重组菌株, 高效制备 (R)- 苯基乙二醇的方法及其应用, 属于生物催化不对称转化技术领域。

背景技术

[0002] 手性化合物在药物、农业、工业和生活中的重要作用越来越受到人们的重视, 由于两种对映体在药理、毒理及功能作用等各方面均有所不同, 因此, 制备光学纯的手性模块化合物具有重要的意义。

[0003] 苯基乙二醇的化学结构为:

[0004]



[0005] 光学纯 (R)- 苯基乙二醇不仅是液晶材料中不可缺少的重要手性添加剂, 而且已成为制备具有光学活性的医药、农药和功能材料的重要中间体, 开展苯基乙二醇拆分方法的研究极有意义。在拆分外消旋化合物常见方法 (化学拆分法, 色谱拆分法, 液体膜拆分法或手性固体膜拆分的膜拆分法和生物法) 中, 生物法反应条件温和, 产物单一, 立体选择性、区域选择性和化学选择性较高, 并能完成一些化学合成难以进行的反应等。

[0006] 生物法转化制备光学纯的 (R)- 苯基乙二醇, 通常采用微生物全细胞或酶作为催化剂, 主要包括 Bakers' 酵母不对称还原 2- 羟基苯乙酮法, 利用环氧化物水解酶催化水解外消旋苯乙烯氧化物法, 或者利用萘双氧化酶 (NDO) 选择性氧化苯乙烯法等, 上述方法都有产品光学纯度较低, 底物浓度不够高, 或反应过程需要消耗昂贵的 NADPH 作为辅酶来优化反应条件等缺点。本实验室已经利用重组菌株催化不对称转化制备 (S)- 苯基乙二醇, 在此基础上, 采用蛋白质工程技术改造蛋白结构中关键位点的氨基酸来改变辅酶特异性和产物空间选择性。被改造之前原来的羧基还原酶 SCR, 辅酶的依赖性为 NADPH, 催化还原 2- 羟基苯乙酮的反应产物为 (S)- 苯基乙二醇。经过对 SCR 中的两个氨基酸进行定点改造后, 其辅酶的依赖性由原来的 NADPH 改变为 NADH, 而且以 2- 羟基苯乙酮为底物时, 产物由原来的 (S)- 苯基乙二醇改变为 (R)- 苯基乙二醇。

发明内容

[0007] (1) 要解决的技术问题

[0008] 本发明的目的是提供一种蛋白质工程技术改造酶的催化功能, 利用重组菌株 (菌种保藏号: CCTCC M 208079) 不对称转化制备 (R)- 苯基乙二醇的方法。本发明目的在于根

据已经解析出来的蛋白结构,利用定点突变技术,基因工程法构建重组菌,改变该酶的辅酶特异性和产物空间选择性。该重组菌不对称还原 2-羟基苯乙酮制备光学活性 (R)-苯基乙二醇,产物光学纯度为 100%。对羧基还原酶 SCR 进行定点突变后,开发了该酶的新催化功能,获得立体选择性完全不同的产物,进而探索立体选择性氧化还原酶选择底物特异性的分子催化机理。

[0009] (2) 技术方案

[0010] 1、一株不对称转化制备 (R)-苯基乙二醇的重组菌,其分类命名为大肠杆菌 BL21/pETSCR6768 (*Escherichia coli* BL21/pETSCR6768),已保藏于中国典型培养物保藏中心,保藏编号:CCTCC NO:M208079。

[0011] 2、利用定点突变后构建的重组菌 CCTCC NO:M208079 不对称转化制备 (R)-苯基乙二醇的方法,以 2-羟基苯乙酮为底物,进行不对称转化反应:在 1mL 0.1mol/L pH4.5~6.5 的醋酸缓冲液,或 1mL 0.1mol/L pH6.0~7.0 的磷酸缓冲液,或 1mL 0.1mol/L pH8.0~9.0 的 Tris-HCl 缓冲液中,重组菌细胞或重组纯蛋白,2-羟基苯乙酮底物浓度为 5g/L,反应温度 30℃;

[0012] 采用重组菌全细胞生物转化:重组菌细胞浓度为 0.1~0.2g/mL,反应时间为 48h,反应前不需要加入辅酶,产物为 (R)-苯基乙二醇;

[0013] 或采用重组菌的蛋白细胞破碎后经纯化后的重组蛋白生物转化:重组蛋白浓度为 1~2μg/mL,反应时间为 8h,反应前加 5mmol/L 辅酶 NADH,产物为 (R)-苯基乙二醇。

[0014] 3、所述重组菌的培养

[0015] LB 培养基以 g/L 计:胰蛋白胨 10,酵母提取物 5,NaCl 10,pH7.0;固体培养基添加琼脂粉 1.5%;

[0016] 培养条件:挑取重组菌株 CCTCC NO:M208079 的单菌落接种于 3mL 含 100μg/mL 氨苄青霉素的 LB 液体培养基中,于 37℃,200rpm 振荡培养过夜,取 1mL 培养液转接于 50mL 含 100μg/mL 氨苄青霉素的 LB 液体培养基中,于 37℃,200rpm 振荡培养至 OD₆₀₀ 为 0.6 后,培养物中加入诱导物异丙基-β-D-硫代半乳糖苷 1mmol/L,诱导培养温度 30℃,诱导培养过夜,10,000rpm 离心 10min,用生理盐水洗涤两次,收集得到重组菌全细胞。

[0017] 4、所述重组蛋白的纯化

[0018] 菌体破碎:将收集的重组菌全细胞用 MCAC-0 缓冲液重悬,超声破碎:工作时间 4s,间歇时间 6s,共 20min;破碎液 16,000rpm 离心 40min;弃沉淀,取上清进行后续的蛋白纯化工作;

[0019] 蛋白纯化:先将上清挂 Pharmacia 公司的 Ni 柱两遍,用 MCAC-50 缓冲液洗脱杂蛋白,用 MCAC-200 缓冲液洗脱目的蛋白;再用 Pharmacia 公司的 HiTrap 柱蛋白脱盐,利用 Pharmacia 公司的 ÄKTA 蛋白纯化系统将蛋白溶液换为无盐的缓冲液;接着用 Pharmacia 公司的 Resource Q 阴离子交换柱,1×1cm,进行蛋白纯化;最后用 Pharmacia 公司的 Superdex200,HiLoad26/60,进行蛋白纯化;经 SDS-PAGE 检测目的蛋白纯度达到 90% 以上。

[0020] 5、所述重组突变菌株 CCTCC NO:M208079 的构建方法,将突变基因片断 scr6768 插入载体 pET21c 构建重组质粒 pETSCR6768,重组质粒转化大肠杆菌 *E. coli* BL21 (DE3) 感受态细胞,通过含有 100μg/mL 氨苄青霉素的 LB 平板筛选,获得目的重组菌株 *E. coli* BL21/pETSCR6768。

[0021] 6、所述的重组质粒 pETSCR6768 的构建：利用限制性内切酶 BamHI 和 XhoI 对目的基因片断 scr6768 和载体 pET21c 分别进行双酶切处理，处理后 DNA 片断通过粘性末端连接，获得带有目的基因片断的重组质粒 pETSCR6768。

[0022] 7、所述的突变基因片断 scr6768 的获得：以含有 (S)-专一性羧基还原酶的重组质粒 pETCPADH 作为 PCR 扩增反应模板，利用含有 BamHI 限制性酶切位点的引物 1，含有 XhoI 限制性酶切位点的引物 2，中间两段引物 3 和引物 4，

[0023] 引物 1 :5' -ATC GGATCC GATGGGCGAAATCGAATCTTATTG-3'，

[0024] 引物 2 :5' -TGACTCTCGAGTGGACACGTGTATCCACCGTC-3'，

[0025] 引物 3 :5' -CCATTTGGTACAACGATGATCCAGC-3'，

[0026] 引物 4 :5' -CTCATCAGCTGGATCATCGTTGTAC-3'，

[0027] 通过 SOE-PCR 反应扩增，获得 scr6768 基因，其全长为 837bp；

[0028] 上游 cDNA 片段及下游 cDNA 片段的获得：以重组质粒 pETCPADH 为模板，分别以引物 1 和 4，引物 2 和 3 进行 PCR 反应，PCR 反应体系：ddH₂O37 μL，10×Reaction Buffer5 μL，25mmol/L dNTP0.5 μL，50pmol/μL 的引物 1 和 4 或引物 2 和 3 各引物 1 μL，重组质粒 pETCPADH1 μL，5U/μL Taq DNA polymerase0.5 μL；PCR 反应条件：94℃ 预变性 5min；94℃ 1min，57℃ 1min，72℃ 1min，进行 30 个循环；72℃ 延伸 10min；获得上游 cDNA 片段及下游 cDNA 片段；利用 3S Spin Agarose Gel DNA Purification Kit(上海申能博彩生物科技有限公司) 纯化 DNA 片断。

[0029] 将上、下游 cDNA 片段经退火重叠连接，两端单链于 72℃ 用 Taq DNAPolymerase 延伸 10min 补成双链，作下一次的 PCR 模板，PCR 反应条件：94℃ 3min；94℃ 1min，55℃ 1min，72℃ 1min，30 个循环；72℃ 10min，即获得 scr6768 基因，该基因编码将 (S)-专一性羧基还原酶蛋白序列中的第 67 位的 Ser 和第 68 位 His 均突变为 Asp，scr6768 基因全长为 837bp。利用 3S Spin AgaroseGel DNA Purification Kit(上海申能博彩生物科技有限公司) 纯化 DNA 片断。

[0030] DNA 溶液中加入 1/10 体积的乙酸钠溶液 (3mol/L, pH5.2) 和 2 倍体积无水乙醇，-20℃ 沉淀 1h。12,000rpm 于 4℃ 离心 30min。加入 75% 乙醇 500 μL 洗涤，12,000rpm 于 4℃ 离心 30min，无菌操作台吹干后溶于适量 TE 缓冲液中，立即使用或 -20℃ 保存。

[0031] 操作如下

[0032] 一、含有 (S)-专一性羧基还原酶的重组质粒 pETCPADH 的获得

[0033] 本实验室前期已经成功构建了重组菌 E.coli/pETCPADH，(APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, June2007, p. 3759—3764) 利用质粒提取试剂盒 Mini-Plasmid Rapid Isolation Kit(北京博大泰克生物基因技术有限公司) 提取质粒 pETCPADH。

[0034] 二、突变基因 scr6768 全长的获得

[0035] 合成两端引物 1 :5' -ATCGGATCCGATGGGCGAAATCGAATCTTATTG-3' (BamH I)，引物 2 :5' -TGACTCTCGAGTGGACACGTGTATCCACCGTC-3' (XhoI)。引物 1 含有 BamH I，引物 2 含有 Xho I 限制性酶切位点。

[0036] 合成中间引物 3 :5' -CTCATCAGCTGG ATCATCGTTGTAC-3'，

[0037] 引物 4 :5' -CCATTTGGTACAACGATGAT CCAGC-3'。采用 SOE-PCR 的方法，将突变位

点引入：

[0038] 上游 cDNA 片段及下游 cDNA 片段的获得：

[0039] 以重组质粒 pETCPADH 为模板，分别以引物 1 和 4，引物 2 和 3 进行 PCR 反应，PCR 反应体系：ddH₂O 37 μL，10×Reaction Buffer 5 μL，dNTP (25mmol/L) 0.5 μL，引物 1 和 4、或引物 2 和 3 (50pmol/μL) 各引物 1 μL，重组质粒 pETCPADH 1 μL，Taq DNA polymerase (5U/μL) 0.5 μL。PCR 反应条件：94℃ 预变性 5min；94℃ 1min，57℃ 1min，72℃ 1min，进行 30 个循环；72℃ 延伸 10min。分别获得上游 cDNA 片段及下游 cDNA 片段。利用 3S Spin Agarose Gel DNAPurification Kit (上海申能博彩生物科技有限公司) 纯化 DNA 片断。

[0040] scr6768 全长基因的获得：

[0041] 模板的获得：将上、下游 cDNA 片段经退火重叠连接，两端单链于 72℃ 用 Taq DNA Polymerase 延伸 10min 补成双链，作下一次的 PCR 模板。

[0042] PCR 反应条件：94℃ 3min；94℃ 1min、55℃ 1min、72℃ 1min，30 个循环；72℃ 10min 进行反应，即获得 scr6768 全长基因，基因全长为 837bp。利用 3S Spin Agarose Gel DNA Purification Kit (上海申能博彩生物科技有限公司) 纯化 DNA 片断。

[0043] DNA 溶液中加入 1/10 体积的乙酸钠溶液 (3mol/L，pH5.2) 和 2 倍体积无水乙醇，-20℃ 沉淀 1h。12,000rpm 于 4℃ 离心 30min。加入 75% 乙醇 500 μL 洗涤，12,000rpm 于 4℃ 离心 30min，无菌操作台吹干后溶于适量 TE 缓冲液中，立即使用或 -20℃ 保存。

[0044] 三、含突变基因 scr6768 重组大肠杆菌的构建

[0045] 目的基因及质粒 pET21c 的酶切

[0046] 利用质粒提取试剂盒 Mini-Plasmid Rapid Isolation Kit (北京博大泰克生物基因技术有限公司) 提取质粒 pET21c。

[0047] 分别按照水、缓冲液、基因 scr6768 和酶的顺序，及水、缓冲液、质粒 pET21c 和酶的顺序加到 Eppendorf 管中，盖好管盖，振荡使液体充分混匀，置于离心机内离心 2s 使液体集中于管底，37℃ 水浴 3h，在管中加入 1/10 的 Loading Buffer 或将管置于 65℃ 保温 10min，终止酶切反应。酶切产物进行琼脂糖凝胶电泳分析并切胶回收目的片段，浓缩。

[0048] 反应体系组成：10×H Buffer 4 μL，DNA 10 μL，BamH I 2 μL，XhoI 2 μL，ddH₂O 将体系补足 40 μL。

[0049] 目的基因与质粒 pET21c 的连接

[0050] 将目的基因与质粒 pET21c 连接，反应体系组成如下：质粒 pET21c 0.8 μL，目的基因 4.2 μL，Ligation Solution 5 μL。混合连接液，将其置于 16℃ 培养箱中连接 12-16h。

[0051] 重组质粒转化大肠杆菌

[0052] 在每管的 100 μL E. coli BL21 (DE3) 感受态细胞悬液中加入 10 μL 连接产物，轻轻混匀，冰浴中静置 30min。转入 42℃ 水浴中，热击 90s。快速转移至冰浴中，冷却 2min。每管中加入 700 μL LB 液体培养基，37℃ 100rpm 摇床温育培养 1h。培养后菌液 3,000rpm 离心 2min，弃上清 600 μL，剩余菌液混匀后涂布到含有 100 μg/mL 氨苄青霉素的 LB 平板上，37℃ 倒置培养过夜。

[0053] 诱导表达培养

[0054] LB 培养基：胰蛋白胨 1%，酵母提取物 0.5%，NaCl 1%，pH7.0。需要时使用前加入氨苄青霉素 (100 μg/mL)，固体培养基添加 1.5% 琼脂粉。

[0055] 挑取阳性克隆单菌落接种于 10mL 含 100 μ g/mL 氨苄青霉素的 LB 液体培养基中, 于 37 $^{\circ}$ C, 200rpm 振荡培养过夜。取 10mL 培养液转接于 1L 含 100 μ g/mL 氨苄青霉素的 LB 液体培养基中, 于 37 $^{\circ}$ C, 200rpm 振荡培养至 OD₆₀₀ 约为 0.6。向培养物中加入诱导物异丙基 -B-D- 硫代半乳糖苷至终浓度 1mmol/L, 在培养温度 30 $^{\circ}$ C 下进行诱导培养 10h。

[0056] 四、重组蛋白的纯化

[0057] MCAC-0 的缓冲液: 20mmol/L Tris/HCl, 500mmol/L NaCl, 10% (V/V) 甘油, pH8.0。

[0058] MCAC-1000 的缓冲液: 在 MCAC-0 的缓冲液的基础上增加 1mol/L 的咪唑, pH8.0。

[0059] MCAC-50 的缓冲液: 在 MCAC-0 的缓冲液的基础上增加 50mmol/L 的咪唑, pH8.0。

[0060] 收集菌体, 5000rpm 30min, 用 MCAC-0 缓冲液重悬, 超声破碎共 20min, 工作时间 4s, 间歇时间 6s。于 16,000rpm 离心 40min。弃沉淀, 取上清进行蛋白纯化工作。

[0061] 蛋白纯化: 分为四个步骤:

[0062] 第一步将上清挂 Ni 柱 (His-Trap Kit, Pharmacia) 两次, 用 MCAC-50 的缓冲液洗脱杂蛋白, 用 MCAC-200 的缓冲液洗脱含有目的蛋白的溶液。

[0063] 第二步用 Hitrap (Pharmacia) 柱蛋白脱盐, 缓冲液 A: 20mmol/L Tris/HCl, 500mmol/L NaCl, pH8.0。缓冲液 B: 20mmol/L Tris/HCl, pH8.0。利用 **AKTA** 蛋白纯化系统 (Pharmacia, Uppsala, Sweden), 将蛋白溶液由 A 缓冲液换为 B 缓冲液。

[0064] 第三步用 Resource Q 阴离子交换柱 (1 \times 1cm, Pharmacia) 进行蛋白纯化。缓冲液 A: 20mmol/L Tris/HCl, pH8.0。缓冲液 B: 20mmol/L Tris/HCl, 1mol/L NaCl, pH8.0。利用 **AKTA** 蛋白纯化系统 (Pharmacia, Uppsala, Sweden), 收集含有目的蛋白的溶液。

[0065] 第四步用 Superdex200 (HiLoad26/60, Pharmacia) 进行蛋白纯化。缓冲液: 20mmol/L Tris/HCl, 150mmol/L NaCl, pH8.0。利用 **AKTA** 蛋白纯化系统 (Pharmacia, Uppsala, Sweden), 最终收集目的蛋白。

[0066] 经过以上四个步骤的纯化工作, 蛋白液经 SDS-PAGE 检测为单一条带, 纯度可达 90% 以上。

[0067] 五、重组菌株催化不对称转化制备 (R)- 苯基乙二醇

[0068] 利用重组大肠杆菌催化不对称还原反应。

[0069] LB 培养基: 胰蛋白胨 1%, 酵母提取物 0.5%, NaCl 1%, pH7.0。需要时使用前加入氨苄青霉素 (100 μ g/mL), 固体培养基添加 1.5% 琼脂粉。

[0070] 挑取阳性克隆单菌落接种于 3mL 含 100 μ g/mL 氨苄青霉素的 LB 液体培养基中, 于 37 $^{\circ}$ C, 200rpm 振荡培养过夜。取 1mL 培养液转接于 50mL 含 100 μ g/mL 氨苄青霉素的 LB 液体培养基中, 于 30 $^{\circ}$ C, 200rpm 振荡培养 10h。

[0071] 培养后的重组菌 10,000rpm 离心 10min, 用生理盐水洗涤三次后收集。在以下体系中进行检测: 1mL 0.1mol/L 醋酸缓冲液 (pH4.5 ~ 6.5), 1mL 0.1mol/L 磷酸缓冲液 (pH7.0 ~ 8.0) 或 Tris-HCl 缓冲液 (pH8.0 ~ 9.0) 中, 加入 5g/L 底物 2-羟基苯乙酮, 0.1 ~ 0.2g/mL 重组大肠杆菌湿菌体, 混匀后在 30 $^{\circ}$ C 恒温摇床上振荡反应 48h。

[0072] 反应结束后, 将反应混合物离心除去菌体, 上清液加入 2 倍体积乙酸乙酯萃取, 有机相用于分析。产物通过手性固定相高效液相色谱 (Agilent HP1100) 进行分析, 条件为 Chiralcel OB-H 柱 (4.6mm \times 25cm; Daicel Chemical Ind., Ltd., Japan), 流动相为正己烷

/ 异丙醇 (9/1, V/V), 流速 0.5 mL/min, 检测波长为 215 nm。产物的光学纯度通过对映过量值来衡量。

[0073] 产物 (R)- 苯基乙二醇对映过量值的计算: 对映过量值 (e. e. %) = $[(C_R - C_S) / (C_R + C_S)] \times 100\%$

[0074] 产物 (R)- 苯基乙二醇产率的计算: 产率 (%) = $C_R / C_0 \times 100\%$

[0075] 式中 C_R 为反应后 (R)- 对映体的浓度, C_S 为反应后 (S)- 对映体的浓度, C_0 为反应前底物 2- 羟基苯乙酮的浓度。

[0076] 以全细胞为催化剂, 不对称生物转化反应后, 产物均为 (R)- 苯基乙二醇。六、用重组纯蛋白催化不对称转化制备 (R)- 苯基乙二醇

[0077] 反应体系: 1 mL 0.1 mol/L 醋酸缓冲液 (pH 4.5 ~ 6.5), 1 mL 0.1 mol/L 磷酸缓冲液 (pH 6.0 ~ 8.0) 或 1 mL 0.1 mol/L Tris-HCl 缓冲液 (pH 8.0 ~ 9.0) 中, 分别加入 5 g/L 底物 2- 羟基苯乙酮和 5 mmol/L NADH 或者 NADPH, 适量的纯蛋白, 混匀后在 30 °C 恒温摇床上振荡反应 8 h。

[0078] 反应结束后, 将反应混合物离心, 上清液加入 2 倍体积乙酸乙酯萃取, 有机相用于分析。产物通过手性固定相高效液相色谱 (Agilent HP1100) 进行分析, 条件为 Chiralcel OB-H 柱 (4.6 mm × 25 cm; Daicel Chemical Ind., Ltd., Japan), 流动相为正己烷 / 异丙醇 (9/1, V/V), 流速 0.5 mL/min, 检测波长为 215 nm。产物的光学纯度通过对映过量值来衡量。

[0079] 产物 (R)- 苯基乙二醇对映过量值的计算: 对映过量值 (e. e. %) = $[(C_R - C_S) / (C_R + C_S)] \times 100\%$

[0080] 产物 (R)- 苯基乙二醇产率的计算: 产率 (%) = $C_R / C_0 \times 100\%$

[0081] 式中 C_R 为反应后 (R)- 对映体的浓度, C_S 为反应后 (S)- 对映体的浓度, C_0 为反应前底物 2- 羟基苯乙酮的浓度。

[0082] 用 NADH 或者 NADPH 作辅酶进行转化后均得到产物 (R)- 苯基乙二醇。

[0083] (3) 有益效果

[0084] 成功改造 (S)- 专一性羧基还原酶 (编码基因 scr 的 GenBank 登记号 DQ675534) 的第 67 位丝氨酸和 68 位的组氨酸为天冬氨酸, 其编码基因全长 837 bp, 编码 279 个氨基酸。

[0085] 将改造后的基因 scr6768 插入表达载体 pET21c 中, 转化入相应表达宿主 E. coli BL21 (DE3) 中, 成功构建带有目的基因的重组菌株 E. coli BL21 (DE3) / pETSCR6768。

[0086] 通过优化反应条件, 在 pH 6.0 的醋酸缓冲液中, 利用 0.2 g/mL 重组细胞对 5 g/L 底物 2- 羟基苯乙酮催化转化 48 h, 最终产物 (R)- 苯基乙二醇的光学纯度为 100% e. e., 产率为 92.6%。

[0087] 通过优化反应条件, 在 pH 6.0 的醋酸缓冲液中, 利用约 2 μg 的重组纯蛋白对 5 g/L 底物 2- 羟基苯乙酮催化转化 8 h, 最终产物 (R)- 苯基乙二醇的光学纯度为 100% e. e., 产率为 96.4%。这些工作不仅为 (R)- 苯基乙二醇的获得提供了有效途径, 而且有助于从蛋白质结构水平上认识功能性酶蛋白的立体选择性, 对于今后手性转化用生物催化剂的开发具有较为重要的意义。

[0088] 生物材料样品保藏

[0089] 重组菌 Escherichia coli BL21/pETSCR6768, 保藏日期: 2008 年 5 月 29 日, 保藏单位: 中国典型培养物保藏中心 CCTCC, 保藏编号: CCTCC NO: M208079。

具体实施方式

[0090] 实施例 1

[0091] 重组菌 *E. coli*/pETCPADH 的培养:重组菌 *E. coli*/pETCPADH 已在 [Applied and Environmental Microbiology 200773(11):3759-3764] 上公开。采用 LB 培养基,其组成成分为:胰蛋白胨 1%,酵母提取物 0.5%,NaCl 1%,pH 7.0。培养时加入氨苄青霉素 (100 μ g/mL)。固体培养基添加 1.5%琼脂粉。挑取阳性克隆单菌落接种于 3mL 含 100 μ g/mL 氨苄青霉素的 LB 液体培养基中,于 37 $^{\circ}$ C, 200rpm 振荡培养过夜。次日取 1mL 培养液转接于 50mL 含有 100 μ g/mL 氨苄青霉素的 LB 液体培养基中,于 37 $^{\circ}$ C, 200rpm 振荡培养约 12h,至 OD₆₀₀ 为 0.6。

[0092] 实施例 2

[0093] 重组菌 *E. coli*/pETCPADH 中 pETCPADH 质粒的获得:将菌体培养液 5,000rpm 离心 10min,收集菌体,利用质粒提取试剂盒 Mini-Plasmid Rapid Isolation Kit(北京博大泰克生物基因技术有限公司)提取质粒 pETCPADH。

[0094] 实施例 3

[0095] 以含有 (S)-专一性羧基还原酶的重组质粒 pETCPADH 作为 PCR 扩增反应模板,利用含有 BamHI 限制性酶切位点的引物 1,含有 XhoI 限制性酶切位点的引物 2,中间两段引物 3 和引物 4,

[0096] 引物 1:5' -ATC GGATCC GATGGGCGAAATCGAATCTTATTG-3',

[0097] 引物 2:5' -TGACTCTCGAGTGGACACGTGTATCCACCGTC-3',

[0098] 引物 3:5' -CCATTTGGTACAACGATGATCCAGC-3',

[0099] 引物 4:5' -CTCATCAGCTGGATCATCGTTGTAC-3',

[0100] 通过 SOE-PCR 反应扩增,获得 scr6768 基因,其全长为 837bp;

[0101] 上游 cDNA 片段及下游 cDNA 片段的获得:以重组质粒 pETCPADH 为模板,分别以引物 1 和 4,及引物 2 和 3 进行 PCR 反应,PCR 反应体系:ddH₂O 37 μ L, 10 \times Reaction Buffer 5 μ L, 25mmol/L dNTP 0.5 μ L, 50pmol/ μ L 的引物 1 和 4、或引物 2 和 3 各引物 1 μ L, 重组质粒 pETCPADH 1 μ L, 5U/ μ L Taq DNA polymerase 0.5 μ L; PCR 反应条件:94 $^{\circ}$ C 预变性 5min; 94 $^{\circ}$ C 1min, 57 $^{\circ}$ C 1min, 72 $^{\circ}$ C 1min, 进行 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 10min; 获得上游 cDNA 片段及下游 cDNA 片段;

[0102] 将上、下游 cDNA 片段经退火重叠连接,两端单链于 72 $^{\circ}$ C 用 Taq DNA Polymerase 延伸 10min 补成双链,作下一次的 PCR 模板,PCR 反应条件:94 $^{\circ}$ C 3min; 94 $^{\circ}$ C 1min, 55 $^{\circ}$ C 1min, 72 $^{\circ}$ C 1min, 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10min, 即获得 scr6768 基因,该基因编码将 (S)-专一性羧基还原酶蛋白序列中的第 67 位的 Ser 和第 68 位 His 均突变为 Asp。

[0103] 实施例 4

[0104] 利用限制性内切酶 BamHI 和 XhoI 对目的基因片断 scr6768 和载体 pET21c 分别进行双酶切处理,处理后 DNA 片断通过粘性末端连接,获得带有目的基因片断的重组质粒 pETSCR6768。重组质粒 pETSCR6768 转化大肠杆菌 *E. coli* BL21(DE3) 感受态细胞,通过含有 100 μ g/mL 氨苄青霉素的 LB 平板筛选,获得目的重组菌株 *E. coli* BL21/pETSCR6768。该重组大肠杆菌送中国典型培养物保藏中心保藏,保藏编号:CCTCC NO:M208079。

[0105] 实施例 5

[0106] 诱导表达 :LB 培养基组成同实施例 1。挑取阳性克隆单菌落接种于 3mL 含 100 μ g/mL 氨苄青霉素的 LB 液体培养基中,于 37 $^{\circ}$ C,200rpm 振荡培养过夜。保藏甘油菌两支(每支含有 1mL 菌液,10%的甘油),同时取 1mL 培养液转接于 50mL 含 100 μ g/mL 氨苄青霉素的 LB 液体培养基中,于 37 $^{\circ}$ C,200rpm 振荡培养至 OD₆₀₀ 约为 0.6。向培养物中加入诱导物异丙基 -B-D- 硫代半乳糖苷 1mmol/L,在培养温度 30 $^{\circ}$ C 下进行诱导培养突变菌 E. coli BL21/pETSCR6768。收集菌体,溶解于 MCAC-0 缓冲液中,超声破碎 20min,工作时间 4s,间歇时间 6s。将破碎后的菌体破碎液 16,000rpm 离心 40min。分别取上清和沉淀,SDS-PAGE 检测蛋白表达。

[0107] 实施例 6

[0108] 诱导表达培养 :LB 培养基组成同实施例 1。用实施例 1 中所保藏的甘油菌以 1% 接种量种于 10mL 含 100 μ g/mL 氨苄青霉素的 LB 液体培养基中,于 37 $^{\circ}$ C,200rpm 振荡培养过夜。取 10mL 培养液转接于 1000mL 含 100 μ g/mL 氨苄青霉素的 LB 液体培养基中,于 37 $^{\circ}$ C,200rpm 振荡培养至 OD₆₀₀ 约为 0.6。向培养物中加入诱导物异丙基 -B-D- 硫代半乳糖苷 1mmol/L,在培养温度 30 $^{\circ}$ C 下进行诱导培养。将培养后的重组菌 10,000rpm 离心 10min,一部分菌体用生理盐水洗涤两至三次后收集进行生物转化试验,另一部分菌体溶解于 MCAC-0 溶液中,进行蛋白纯化试验。

[0109] 实施例 7

[0110] 用实施例 6 中所获得的菌体进行生物转化试验。在 1mL 0.1mol/L 醋酸缓冲液 (pH6.0) 中,分别加入 5g/L 底物 2-羟基苯乙酮,0.1g/mL 重组大肠杆菌 CCTCCNO:M208079 湿菌体,混匀后在 30 $^{\circ}$ C 恒温摇床上振荡反应 48h。反应后混合物离心,取上清液萃取,产物 (R)- 苯基乙二醇的光学纯度为 98.5% e. e.,产率为 89.1%。

[0111] 实施例 8

[0112] 用实施例 6 中所获得的菌体进行生物转化试验。在 1mL 0.1mol/L 醋酸缓冲液 (pH6.0) 中,分别加入 5g/L 底物 2-羟基苯乙酮,0.2g/mL 重组大肠杆菌 CCTCCNO:M208079 湿菌体,混匀后在 30 $^{\circ}$ C 恒温摇床上振荡反应 48h。反应后混合物离心,取上清液萃取,产物 (R)- 苯基乙二醇的光学纯度为 100% e. e.,产率为 92.6%。

[0113] 实施例 9

[0114] 用实施例 6 中所获得的菌体进行生物转化试验。在 1mL 0.1mol/L 磷酸缓冲液 (pH7.0) 中,分别加入 5g/L 底物 2-羟基苯乙酮,0.1g/mL 重组大肠杆菌 CCTCCNO:M208079 湿菌体,混匀后在 30 $^{\circ}$ C 恒温摇床上振荡反应 48h。反应后混合物离心,取上清液萃取,产物 (R)- 苯基乙二醇的光学纯度为 84.5% e. e.,产率为 75.2%。

[0115] 实施例 10

[0116] 用实施例 6 中所获得的菌体进行生物转化试验。在 1mL 0.1mol/L 磷酸缓冲液 (pH7.0) 中,分别加入 5g/L 底物 2-羟基苯乙酮,0.2g/mL 重组大肠杆菌 CCTCCNO:M208079 湿菌体,混匀后在 30 $^{\circ}$ C 恒温摇床上振荡反应 48h。反应后混合物离心,取上清液萃取,产物 (R)- 苯基乙二醇的光学纯度 86.8% e. e.,产率 77.4%。

[0117] 实施例 11

[0118] 用实施例 6 中所获得的菌体进行生物转化试验。在 1mL 0.1mol/L Tris-HCl 缓冲液

(pH8.0) 中,分别加入 5g/L 底物 2-羟基苯乙酮,0.1g/mL 重组大肠杆菌 CCTCC NO:M208079 湿菌体,混匀后在 30℃恒温摇床上振荡反应 48h。反应后混合物离心,取上清液萃取,产物 (R)-苯基乙二醇的光学纯度为 67.7% e. e.,产率为 51.8%。

[0119] 实施例 12

[0120] 用实施例 6 中所获得的菌体进行生物转化试验。在 1mL0.1mol/L Tris-HCl 缓冲液 (pH8.0) 中,分别加入 5g/L 底物 2-羟基苯乙酮,0.2g/mL 重组大肠杆菌 CCTCC NO:M208079 湿菌体,混匀后在 30℃恒温摇床上振荡反应 48h。反应后混合物离心,取上清液萃取,产物 (R)-苯基乙二醇的光学纯度为 70.1% e. e.,产率为 56.4%。

[0121] 实施例 13

[0122] 用实施例 6 中所获得的菌体重悬于 MCAC-0 缓冲液中,超声破碎共 20min,工作时间 4s,间歇时间 6s。于 16,000rpm 离心 40min,取上清用 **AKTA** 蛋白纯化系统进行蛋白纯化工作。该工作将菌体上清穿过 Ni 柱两次,用 MCAC-50 缓冲液洗脱杂蛋白,用 MCAC-200 缓冲液洗脱含有目的蛋白的溶液并浓缩;用 Hitrap (Pharmacia) 柱蛋白脱盐,缓冲液 A:20mmol/L Tris/HCl,500mmol/L NaCl,pH8.0。缓冲液 B:20mmol/L Tris/HCl,pH8.0。将蛋白溶液由 A 缓冲液换为 B 缓冲液。用 Resource Q 柱进行蛋白纯化工作,洗脱并收集目的蛋白溶液;用 Superdex200 进行最后的纯化工作,目的蛋白在 14mL 左右的位置出峰,为重组纯蛋白溶液,测重组纯蛋白含量。经过上述纯化步骤后,目的蛋白均一性非常好,SDS-PAGE 显示为一条蛋白条带。

[0123] 实施例 14

[0124] 用实施例 13 中所获得的纯蛋白进行生物转化实验。在 1mL0.1mol/L 醋酸缓冲液 (pH6.0) 中,分别加入 5g/L 底物 2-羟基苯乙酮,2 μ g 重组纯蛋白,混匀后在 30℃恒温摇床上振荡反应 8h。反应后混合物离心,取上清液萃取,产物为 (R)-苯基乙二醇的光学纯度为 100% e. e.,产率为 96.4%。

[0125] 实施例 15

[0126] 用实施例 13 中所获得的纯蛋白进行生物转化实验。在 1mL0.1mol/L 磷酸缓冲液 (pH7.0) 中,分别加入 5g/L 底物 2-羟基苯乙酮,2 μ g 干基计重组纯蛋白,加 5mmol/L 辅酶 NADH,混匀后在 30℃恒温摇床上振荡反应 8h。反应后混合物离心,取上清液萃取,产物 (R)-苯基乙二醇的光学纯度为 90.6% e. e.,产率为 82.0%。

[0127] 实施例 16

[0128] 用实施例 13 中所获得的纯蛋白进行生物转化实验。在 1mL0.1mol/L Tris-HCl 缓冲液 (pH8.0) 中,加入 5g/L 底物 2-羟基苯乙酮,2 μ g 干基计重组纯蛋白,加 5mmol/L 辅酶 NADH,混匀后在 30℃恒温摇床上振荡反应 8h。反应后混合物离心,取上清液萃取,产物 (R)-苯基乙二醇的光学纯度为 88.5% e. e.,产率为 71.3%。