



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 112760302 B

(45) 授权公告日 2022. 08. 26

(21) 申请号 202011548177.7
 (22) 申请日 2020.12.24
 (65) 同一申请的已公布的文献号
 申请公布号 CN 112760302 A
 (43) 申请公布日 2021.05.07
 (66) 本国优先权数据
 202011531963.6 2020.12.23 CN
 (73) 专利权人 中化健康产业发展有限公司
 地址 266071 山东省青岛市延安三路234号
 1号楼海航万邦中心
 专利权人 天津大学
 (72) 发明人 马媛媛 汪振洋 来庆英 宋浩
 魏晓珍
 (74) 专利代理机构 江苏瑞途律师事务所 32346
 专利代理师 王琳琳 陈彬

(51) Int. Cl.
 C12N 9/10 (2006.01)
 C12N 15/54 (2006.01)
 C12N 15/70 (2006.01)
 C12N 1/21 (2006.01)
 C12P 19/56 (2006.01)
 C12R 1/19 (2006.01)
 (56) 对比文件
 CN 110734944 A, 2020.01.31
 CN 110846363 A, 2020.02.28
 审查员 王晶晶

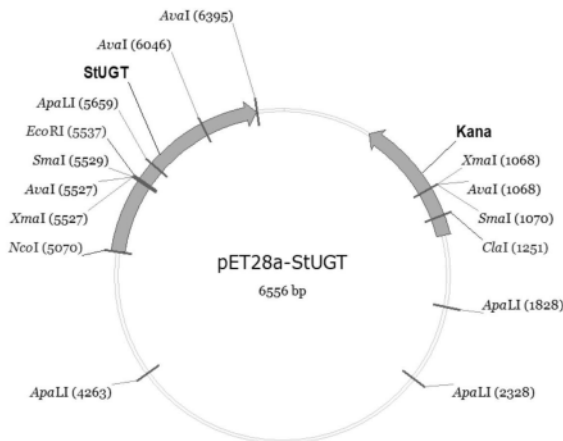
权利要求书1页 说明书8页
 序列表3页 附图4页

(54) 发明名称

一种能够催化莱鲍迪昔A生成莱鲍迪昔D的糖基转移酶StUGT

(57) 摘要

本发明属于生物工程领域,提供了编码糖基转移酶StUGT的核酸序列在制备能够催化莱鲍迪昔A生成莱鲍迪昔D的重组蛋白中的应用,所述核酸序列为:a) SEQ ID NO.1所示的核苷酸序列;或与a)的核苷酸序列不同,能够编码SEQ ID NO.2所示氨基酸序列的核苷酸序列。将糖基转移酶StUGT的基因连接至表达载体后,转入宿主细胞,获得重组菌。所述重组蛋白以UDPG为糖基供体,催化底物莱鲍迪昔A生成莱鲍迪昔D,能够实现高效的催化效率。



1. 一种编码糖基转移酶StUGT的核酸序列在制备能够催化莱鲍迪昔A生成莱鲍迪昔D的重组蛋白中的应用,其特征在于,所述核酸序列为SEQ ID NO.1所示的核苷酸序列,所述应用包括如下步骤:

S1:重组菌的构建,对核苷酸序列进行密码子优化,并将优化后的合成基因通过酶切位点Nco1和Xho1连接至载体pET28a(+),得到质粒pET28a(+)-StUGT,将所得质粒pET28a-StUGT转化至E.coli BL21感受态细胞中,采用含有50 μ g/ml卡那霉素的LB固体平板进行筛选,LB组分:1%蛋白胨,0.5%酵母粉,1%NaCl,1.6%琼脂粉,将筛选出的单克隆转化子进行菌落PCR鉴定,得到重组菌株E.coli BL21;

S2:粗酶液的制备,将S1中重组菌株E.coli BL21在含有50 μ g/ml卡那霉素的LB液体培养基于37 $^{\circ}$ C、220rpm条件下预培养至OD600在0.4~1.2,LB组分:1%蛋白胨,0.5%酵母粉,0.5%NaCl,加入IPTG使菌液终浓度为1mM,在18 $^{\circ}$ C的温度条件下诱导表达17h,得到诱导表达的培养物;将诱导后培养物离心,离心条件为12000rpm、4 $^{\circ}$ C、10min,收集菌体,将收集的菌体用pH7.2的10mM PBS洗涤1次除净菌体上残留的培养基;按原菌液体积1/20的比例用pH7.2的10mM PBS重悬菌体,在冰浴中超声破胞,条件:300W,工作5s,间歇5s,全程10min;将破胞菌液12000g、4 $^{\circ}$ C、10min离心收集上清得到糖基转移酶StUGT的粗酶液;

S3:糖基化反应:将S2中粗酶液加入含有1g/L Reb A、1mM UDPG和3mM Mg²⁺的0.5mL反应混合物中,糖基化反应的温度为30 $^{\circ}$ C,糖基化反应时间为6~48h,糖基化反应体系的pH为pH6.5~9.0。

一种能够催化莱鲍迪苷A生成莱鲍迪苷D的糖基转移酶StUGT

技术领域

[0001] 本发明属于生物工程领域,具体涉及一种糖基转移酶及其该糖基转移酶的编码基因,以及重组菌株在糖苷类化合物生产中的应用。

背景技术

[0002] 莱鲍迪苷D(Rebaudioside D, RebD)是一种从甜叶菊中提取的天然无热量甜味剂,甜度是蔗糖的350倍。与大多数其他甜菊醇糖苷(SGS)相比,它的口感要更好一些,后苦味要短得多。然而纯莱鲍迪苷D水溶性较差,叶片中莱鲍迪苷D含量很低,在甜菊中仅含约0.5%,通过甜菊叶中提取的方法无法满足市场对莱鲍迪苷D的需求,因此利用生物催化法获得充足的莱鲍迪苷D已引起了广泛的关注。

[0003] 糖基转移酶是自然界中广泛存在的一大类酶,能够催化活化的糖连接到不同的受体分子上,如寡糖、蛋白、核酸、脂类和小分子上。目前报道,生物催化法可以有效的利用糖基转移酶的重组菌株直接催化莱鲍迪苷A生成莱鲍迪苷D,而且其工艺流程相对简单、成本较低。因此筛选具有催化功能的糖基转移酶成为了工业生产莱鲍迪苷D的重中之重。

[0004] 经检索,现有技术已有相关的申请案公开,如中国专利申请号为2017108751977,公开日为2017年12月8日的申请案公开了重组大肠杆菌及其在合成莱鲍迪苷D中的用途,该申请案的方法将eugt11基因引入大肠杆菌中诱导表达,得到重组蛋白酶,可用于催化RA转化成RD,为RD的生产提供了一条新途径。此外,该申请案还采用重组大肠杆菌全细胞高效催化合成RD,为RD及更多天然化合物通过大肠杆菌全细胞转化法大规模生产奠定了基础。然而,该重组蛋白催化莱鲍迪苷A生成莱鲍迪苷D的催化效率不高。

[0005] 基于现有技术的缺陷,亟需发明一种新的重组菌,以高效的催化莱鲍迪苷A生成莱鲍迪苷D。

发明内容

[0006] 1. 要解决的技术问题

[0007] 针对现有技术中能够催化莱鲍迪苷A生成莱鲍迪苷D的酶液的催化效率不佳的问题,本发明提供了一种新型的含有编码糖基转移酶基因StUGT的重组菌株,并对该重组菌进行诱导表达,得到的粗酶液或纯化后的酶蛋白,所述粗酶液或纯化后的酶蛋白均可用于高效催化莱鲍迪苷A生成莱鲍迪苷D。

[0008] 2. 技术方案

[0009] 为了解决上述技术问题,本发明的技术方案如下:

[0010] 本发明提供了一种编码糖基转移酶StUGT的核酸序列在制备能够催化莱鲍迪苷A生成莱鲍迪苷D的重组蛋白中的应用,所述核酸序列为:

[0011] a) SEQ ID NO.1所示的核苷酸序列;或

[0012] b) 与a)的核苷酸序列不同,能够编码SEQ ID NO.2所示氨基酸序列的核苷酸序列。

[0013] 在一些实施方案中,本发明提供了一种重组载体,所述重组载体中含有:

[0014] a) SEQ ID NO.1所示的核苷酸序列;或

[0015] b) 与a)的核苷酸序列不同,能够编码SEQ ID NO.2所示氨基酸序列的核苷酸序列。

[0016] 在一些实施方案中,所述重组载体包括pPICZ α -A/B/C、pPIC9K、pPIC9、pPink α -HC、pYES2、YCplac33、YEplac195、pHT01、pHT08、pHT43、pET系列载体、pMAL、pCOLD系列载体和pBAD系列载体中的任意一种。

[0017] 当宿主细胞为巴斯德毕赤酵母时,重组载体可以为pPIC9K、pPIC9和pPink α -HC中的任意一种。

[0018] 当宿主细胞为酿酒酵母,选用表达载体可以为pYES2、YCplac33和YEplac195中的任意一种;

[0019] 当宿主细胞为枯草芽孢杆菌时,选用表达载体可以为pHT01、pHT08和pHT43中的任意一种。

[0020] 在一些实施方案中,本发明提供了一种重组菌,该重组菌中含有能够编码糖基转移酶StUGT的核酸序列,所述核酸序列为:

[0021] a) 如SEQ ID NO.1所示的核苷酸序列;或

[0022] b) 与a)的核苷酸序列不同,能够编码SEQ ID NO.2所示氨基酸序列的核苷酸序列。

[0023] 在一些实施方案中,重组菌的重组宿主包括埃希氏菌属、巴斯德毕赤酵母菌、酿酒酵母、枯草芽孢杆菌中的任意一种。

[0024] 在一些实施方案中,所述埃希氏菌属包括E.coli BL21 (DE3)、BL21star (DE3)、Tuner (DE3)、T7Express和BL21-A1中的任意一种。

[0025] 在一些实施方案中,所述的重组菌的制备方法,是将糖基转移酶StUGT的基因连接至重组载体后,转入宿主细胞,获得重组菌。

[0026] 在一些实施方案中,将SEQ ID NO.1所示的核苷酸序列;或与SEQ ID NO.1所示的核苷酸序列不同,能够编码SEQ ID NO.2所示氨基酸序列的核苷酸序列进行密码子优化,并将优化后的合成基因通过酶切位点Nco1和Xho1连接至载体pET28a(+),得到质粒pET28a(+)-StUGT。再将pET28a(+)-StUGT转入宿主细胞,获得重组菌。

[0027] 在一些实施方案中,本发明提供了一种多肽,所述多肽包含SEQ ID NO:2所示氨基酸序列。

[0028] 在一些实施方案中,所述多肽包含与SEQ ID NO:2具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少97%、至少98%或至少99%的序列同一性的氨基酸序列。

[0029] 在一些实施方案中,所述多肽,由上述任一的重组菌制备。

[0030] 在一些实施方案中,所述多肽的制备方法,将含有能够编码糖基转移酶StUGT的核酸序列的重组菌在LB培养基中培养一段时间,加入异丙基- β -D-硫代半乳糖苷诱导表达。

[0031] 在一些实施方案中,所述的重组菌在LB或TB培养基中培养至OD₆₀₀=0.4-1.2时加入异丙基- β -D-硫代半乳糖苷,所述异丙基- β -D-硫代半乳糖苷浓度为0.1-1.2M。

[0032] 在一些实施方案中,所述诱导表达的温度在18-30 $^{\circ}$ C,诱导表达时间5-17h。

[0033] 在一些实施方案中,所述诱导表达的温度在18 $^{\circ}$ C。

[0034] 在一些实施方案中,将重组菌株在含有卡那霉素的LB液体培养基预培养至OD₆₀₀在0.4-1.2,加入IPTG使菌液终浓度为1mM,然后在18 $^{\circ}$ C的温度条件下诱导表达17h,从诱导

表达的培养物制取粗酶液。

[0035] 在一些实施方案中,所述方法还包括以下步骤:将诱导后菌液离心,收集菌体,破胞后离心得到多肽。

[0036] 在一些实施方案中,本发明提供了上述任一的重组载体或重组菌在制备能够催化底物莱鲍迪苷A生成莱鲍迪苷D的多肽中的应用。

[0037] 在一些实施方案中,所述多肽以UDPG为糖基供体,催化底物莱鲍迪苷A生成莱鲍迪苷D。

[0038] 在一些实施方案中,以莱鲍迪苷A、UDPG、 Mg^{2+} 和所述多肽,构建糖基化反应体系,进行糖基化反应。

[0039] 在一些实施方案中,以莱鲍迪苷A、蔗糖合酶、蔗糖底物、UDP、 Mg^{2+} 和所述多肽,构建糖基化反应体系,进行糖基化反应。

[0040] 为了节约UDGT的成本,可以通过添加蔗糖合酶+蔗糖底物+UDP的方式实现UDPG的添加,利用蔗糖合酶将蔗糖分解成为葡萄糖和果糖,葡萄糖与UDP结合,形成UDPG。

[0041] 在一些实施方案中,所述糖基化反应的温度为所述糖基化反应的温度为 $18^{\circ}C$ - $40^{\circ}C$,糖基化反应时间为6~48h,和/或糖基化反应体系的pH为pH6.5-9.0。

[0042] 在一些实施方案中,所述糖基化反应体系中多肽(StUGT)的催化温度为 $40^{\circ}C$ 。

[0043] 在一些实施方案中,所述糖基化反应体系中多肽(StUGT)的催化pH为8.0-8.5。

[0044] 在一些实施方案中,所述S13中,所述粗酶液采用Merk公司的Ni-NTA His.Bind树脂对进行纯化。

[0045] 3.有益效果

[0046] 本发明将编码糖基转移酶StUGT的核酸序列用于制备能够催化莱鲍迪苷A生成莱鲍迪苷D的重组蛋白,制备出的重组蛋白能够以UDPG为糖基供体,使莱鲍迪苷A为底物发生糖基化反应生成莱鲍迪苷D。利用该重组蛋白构建糖基化反应体系后,在 $18^{\circ}C$ 的条件下分别静置6h、12h、24h、36h、48h进行糖基化反应,结果表明:Reb A的转化率分别为27%、51%、77%、90%、93%,Reb D的收率分别为26%、51%、94%、107%、105%,实现了高效的催化率。

附图说明

[0047] 图1为实施例1中得到的质粒pET28a(+)-StUGT的图谱;

[0048] 图2为实施例2中得到重组菌StUGT粗酶液的SDS-PAGE凝胶蛋白电泳图谱;

[0049] 图3为实施例3中重组菌StUGT糖基化反应前后的液相分析色谱图;

[0050] 图4为实施例4中不同诱导条件下的重组菌StUGT粗酶液的SDS-PAGE和蛋白浓度测定的结果;

[0051] 图5为实施例5中不同诱导条件下的重组菌StUGT粗酶液的催化活性图;

[0052] 图6为实施例6中不同糖基化反应时间下的重组菌StUGT粗酶液的催化活性图;

[0053] 图7为实施例7中蛋白纯化结果的SDS-PAGE凝胶蛋白电泳图谱。

具体实施方式

[0054] 需要说明的是,本说明书中所引用的如“上”、“下”、“左”、“右”、“中间”等用语,亦

仅为便于叙述的明了,而非用以限定可实施的范围,其相对关系的改变或调整,在无实质变更技术内容下,当亦视为本发明可实施的范畴。

[0055] 除非另有定义,本文所使用的所有的技术和科学术语与属于本发明的技术领域的技术人员通常理解的含义相同;本文所使用的术语“和/或”包括一个或多个相关的所列项目的任意的和所有的组合。

[0056] 实施例中未注明具体条件者,按照常规条件或制造商建议的条件进行。所用试剂或仪器未注明生产厂商者,均为可以通过市售购买获得的常规产品。

[0057] 如本文所使用,术语“约”用于提供与给定术语、度量或值相关联的灵活性和不精确性。本领域技术人员可以容易地确定具体变量的灵活性程度。

[0058] 如本文所使用,术语“.....中的至少一个”旨在与“.....中的一个或多个”同义。例如,“A、B和C中的至少一个”明确包括仅A、仅B、仅C以及它们各自的组合。

[0059] 浓度、量和其他数值数据可以在本文中以范围格式呈现。应当理解,这样的范围格式仅是为了方便和简洁而使用,并且应当灵活地解释为不仅包括明确叙述为范围极限的数值,而且还包括涵盖在所述范围内的所有单独的数值或子范围,就如同每个数值和子范围都被明确叙述一样。例如,约1至约4.5的数值范围应当被解释为不仅包括明确叙述的1至约4.5的极限值,而且还包括单独的数字(诸如2、3、4)和子范围(诸如1至3、2至4等)。相同的原理适用于仅叙述一个数值的范围,诸如“小于约4.5”,应当将其解释为包括所有上述的值和范围。此外,无论所描述的范围或特征的广度如何,都应当适用这种解释。

[0060] 任何方法或过程权利要求中所述的任何步骤可以以任何顺序执行,并且不限于权利要求中提出的顺序。

[0061] 本文中所使用的简称如下:

[0062] 莱鲍迪昔A和莱鲍迪昔D分别简称为Reb A和Reb D。

[0063] 二磷酸尿苷葡萄糖简称为UDPG;

[0064] 二磷酸尿苷简称为UDP;

[0065] 异丙基- β -D-硫代半乳糖苷简称为IPTG;

[0066] 实施例1

[0067] 糖基转移酶StUGT基因的获取及重组菌株的构建

[0068] 从GenBank中下载马铃薯(*Solanum tuberosum*)糖基转移酶氨基酸序列(GenBank:XP_006367681.1;SEQ ID NO:2)及核酸序列(GenBank:XM_006367619.1;SEQ ID NO:1)。相应的序列参见表1,由GenScript公司对核酸序列进行密码子优化,并将优化后的合成基因通过酶切位点Nco1和Xho1连接至载体pET28a(+),得到质粒pET28a(+)-StUGT,质粒图谱见图1。

[0069] 将所得质粒pET28a-StUGT转化至*E. coli* BL21感受态细胞中,采用含有50 μ g/ml卡那霉素的LB(1%蛋白胨,0.5%酵母粉,1%NaCl,1.6%琼脂粉)固体平板进行筛选,将筛选出的单克隆转化子进行菌落PCR鉴定,得到重组菌株*E. coli* BL21(pET28a-StUGT)。

[0070] 上述重组质粒也可转化至*E. coli* Tuner(DE3)、BL21star(DE3)和T7Express和BL21-A1等感受态细胞,并获得相应的重组菌株。

[0071] 表1

[0072]

	序列
SEQ ID NO: 1 糖基转移酶 StUGT 核酸序列	atggctactttgagggtactcatgtttccatggtggcttatggacacat tttccatttctaaacatagccaagcaactcgacagagaggattcttga ttaccctctgttctacgctaataatcaatcgaatccatcatcaagaaaatc

[0073]

	cctgaaaaactctgaatcaatcgtttgtcgaactcacttacctga attgcctgaacttctctcattaccatactaccaatggtctcccacccc atctcaatcacacccttcataagccctgaaaatgccaaccaaacttc tccaaaactctgcaaaactgaaacctgattgggtatttacgacatatt gcagccgtgggctgaacatgtcgtaaatgaacagaacattccagcagtca agatcctaacttcgggtgcagctctgtttcgtatttttcaacttcta aagaatccaggggtgaattccctttccctgctatttatctcccgaagt tgagcaagtaaagatgagagaaatgttcgagaaagaacctaataagagg atcgtctagctgaggaaatatgcaaatcatgtgatgtgtacgtctaga actatcgaggccaacttagattattgcactgaattaagcaattgga agttgtccagttggccaccattccaagatccaatcactaatgacgtgg acgatatggagctcattgattggctaggaacaaaagatgagaattcaact gtttttgtctgctttggaagtgaglatttcttcaagagaagatatgga agaagtagcttfcgggtggagtaagtaagttaatttcataatgggttg caagattccgaaaggtgaagagcaaatctgaagatgtattgccaaaa ggttttctgaaagaattggagaaggggaaagattttggacaaattgac accacaaccaagaattctaaatcatccgagtaccggaggattataagtc attgtggatggaattcagtaaatgaaagtttagattttggggttcctata atagcaatgcctatgcataatgatcaaccaataaatgctaagttgatagt tgaattgggagtcgcaatggaaattgtagagatgatgatgggaatattc acagaggagaaattacggaaactttaaagatgcataaacaggggaaaca ggggaattttgagggcacaagtgagagatatcagcaagaattgaaatc tataagagaggagagatgaatgctgctgctgaagagctaattcaacttt gtaggaatagtaataagtacaataa
SEQ ID NO: 2 糖基转移酶 StUGT 氨基酸序列	MATLRVLMFPWLAYGHISPFLNIAKQLADRGFLLIYLCS TLINLESIIKKIPEKYSSESIRFVELHLPELPELPPHYHTTN GLPPLNHTLHKALKMSKPNFSKILQNLKPDLYIYDILQ PWAHEHVNEQNIPAVKILTSGAALFSYFFNFKLKNPGVE FPFPAIYLPKVEQVKMREMEFEKPNEDRLAEGNMQIM LMCTSRTIEAKYLDYCTELSNWKVVVPGPPFQDPITND VDDMELIDWLGTKDENSTVFVFCGSEYFLSREDMEEV AFGLELSNVNFIWVARFPKGEEQNLEDVLPKGFLERIG ERGRVLDKFAPQPRILNHPSTGGFISHCGWNSVMESLD FGVPIIAMPMHNDQPINAKLIVELGVAMEIVRDDDGNL

[0074]	<p>HRGEITETLKDVTGETGEILRGKVRDISKNLKSIREEEM NAAAEEELIQLCRNSNKYK</p>
--------	--

[0075] 实施例2

[0076] 重组菌株的诱导表达及粗酶液的制备

[0077] 以重组菌株BL21 (DE3) (pET28a-StUGT) 为例,说明糖基转移酶基因StUGT在大肠杆菌中的表达方式。

[0078] 菌株BL21 (DE3) (pET28a-StUGT) 在含有50 μ g/ml卡那霉素的LB液体培养基(1%蛋白胨,0.5%酵母粉,0.5%NaCl) 中于37 $^{\circ}$ C、220rpm条件下培养至OD₆₀₀在0.4-1.2,加入异丙基- β -D-硫代半乳糖苷(IPTG),使菌液终浓度为0.1-1mM,在18 $^{\circ}$ C-30 $^{\circ}$ C条件下诱导表达5-17h。

[0079] 将诱导表达的培养物离心(12000rpm、4 $^{\circ}$ C、10min),弃去上清液,收集菌体沉淀。再将收集的菌体用10mM PBS (pH7.2) 洗涤1次除净菌体上残留的培养基;按原菌液体积1/20的比例用10mM PBS (pH7.2) 重悬菌体,在冰浴中超声破胞,条件:300W,工作5s,间歇5s,全程10min。然后将破胞菌液离心(12000g、4 $^{\circ}$ C、10min)收集上清,上清即为糖基转移酶StUGT的粗酶液。

[0080] 取20 μ L粗酶液,加入5 μ L 5 \times 蛋白上样loading buffer,混匀后,100 $^{\circ}$ C高温条件下进行10min的变性失活处理,然后离心(12000g、4 $^{\circ}$ C、2min),上清用于10%SDS-PAGE凝胶蛋白电泳,结果见图2,从图2可知在54kDa处有一条明显的条带与预估的目的蛋白的大小基本一致,说明成功的制备出了重组菌株StUGT的粗酶液。

[0081] 实施例3

[0082] StUGT催化莱鲍迪昔A生成莱胞迪昔D的糖基化反应

[0083] 以莱鲍迪昔A为底物、StUGT催化其生成莱胞迪昔D的反应体系如下:加入终浓度为1-100g/L的RebA、终浓度为1-3mM的尿苷二磷酸葡萄糖(UDPG),终浓度为3mM的Mg²⁺(氯化镁),加入实施例2中所获得重组菌StUGT的粗酶液。

[0084] 糖基化反应体系配好后,18-45 $^{\circ}$ C静置反应6-48h。反应完成后,加入500 μ L 60%(v/v)乙腈,振荡混匀后,室温下12000rpm离心10min,上清液过0.2 μ m有机膜再进HPLC液相分析。HPLC采用Luna C18反相键合硅胶分离柱(4.6mm \times 250mm,5 μ m),流动相采用乙腈:磷酸钠缓冲溶液(pH 2.6)=32:68,流速1mL/min,柱温40 $^{\circ}$ C,采用紫外检测器VWD,VWD检测器波长210nm,RID检测器光学单元温度40 $^{\circ}$ C,进样量50 μ L。

[0085] 通过液相分析可得知底物Reb A和产物Reb D的浓度变化。如图3所示,糖基化反应前(图3a)反应体系中含有底物Reb A,糖基化反应后(图3b)底物Reb A有明显消耗并生成了产物Reb D,说明糖基转移酶StUGT能够以UDPG为糖基供体、莱鲍迪昔A为底物发生糖基化反应生成莱胞迪昔D。本实施例将该糖基转移酶进行体外表达并证明其具有能够催化Reb A生成Reb D的催化活性。

[0086] 实施例4

[0087] 不同诱导条件对重组菌StUGT蛋白表达的影响

[0088] 将菌株BL21 (DE3) (pET28a-StUGT) 在含有50 μ g/ml卡那霉素的LB液体培养基(1%蛋白胨,0.5%酵母粉,0.5%NaCl) 中于37 $^{\circ}$ C、220rpm条件下培养至OD₆₀₀在0.4-1.2,加入IPTG使菌液终浓度为1mM,然后分别在18 $^{\circ}$ C、25 $^{\circ}$ C、30 $^{\circ}$ C的温度条件下诱导表达5h、12h、17h。

分别将不同诱导条件所诱导表达的培养物按照实施例2中的方法制取粗酶液。获得的粗酶液用考马斯亮蓝G-250的方法测定蛋白浓度,取10微升的粗酶液,加入200微升的考马斯亮蓝G-250染色剂,再加入790微升的超纯水混匀,混匀后的蛋白样品用分光光度计在波长为595nm的条件下检测其吸光值,并利用蛋白标准曲线换算出相应的蛋白浓度。

[0089] 根据对比不同诱导条件下的StUGT重组菌粗酶液的SDS-PAGE(图4a)和蛋白浓度测定的结果可知(图4b),重组菌StUGT在18℃诱导17h的条件下目蛋白的表达量最高。

[0090] 实施例5

[0091] 不同诱导温度和培养时间对重组菌StUGT的催化活性的影响

[0092] 将甘油管菌株BL21(DE3)(pET28a-StUGT)在含有50μg/ml卡那霉素的LB液体培养基预培养至OD600在0.4-1.2,加入IPTG使菌液终浓度为1mM,然后分别在18℃-30℃的温度条件下诱导表达5-17h,将诱导表达的培养物按照实施例2中的方法制取粗酶液。

[0093] 制取好的粗酶液加入含有1g/L Reb A、1mM尿苷二磷酸葡萄糖(UDPG)和3mM Mg²⁺(氯化镁)的0.5mL反应混合物中。在30℃的条件下静置24h进行糖基化反应,反应后按照实施例3中的方法进行液相色谱分析。

[0094] 根据液相分析可得知反应前后底物Reb A的浓度变化并计算出Reb A转化率即酶的催化活性,Reb A转化率=(反应前底物浓度-反应后底物浓度)/(反应前底物浓度-反应后底物浓度)。在诱导温度为18℃的条件下分别诱导5h、12和17h的粗酶液的Reb A转化率分别为78.16%、83.23%、94.34%,在诱导温度为25℃的条件下分别诱导5h、12和17h的粗酶液的Reb A转化率分别为67.20%、68.23%、87.92%,在诱导温度为30℃的条件下分别诱导5h、12和17h的粗酶液的Reb A转化率分别为32.15%、11.24%、6.37%。由图5可知,在诱导温度为18℃的条件下17h的StUGT粗酶液的催化活性最高。

[0095] 实施例6

[0096] 不同糖基化反应时间对StUGT重组菌的粗酶液活性的影响

[0097] 将甘油管菌株BL21(DE3)(pET28a-StUGT)在含有50μg/ml卡那霉素的LB液体培养基预培养至OD600在0.4-1.2,加入IPTG使菌液终浓度为1mM,然后分别在18℃的温度条件下诱导表达17h,将诱导表达的培养物按照实施例2中的方法制取粗酶液。制取好的粗酶液加入含有1g/L Reb A、1mM尿苷二磷酸葡萄糖(UDPG)和3mM Mg²⁺(氯化镁)的0.5mL反应混合物中。在30℃的条件下分别静置6h、12h、24h、36h、48h进行糖基化反应,反应后按照实施例3中的方法进行液相色谱分析。

[0098] 通过液相分析可知,在30℃的条件下分别静置6h、12h、24h、36h、48h的糖基化反应中Reb A的转化率分别为27%、51%、77%、90%、93%,Reb D的收率分别为26%、51%、94%、107%、105%,由图6可知StUGT重组菌的粗酶液在反应36h和48h的催化活性几乎一致且为最高。

[0099] 实施例7

[0100] 重组菌株StUGT粗酶液的纯化

[0101] 采用Merk公司的Ni-NTA His.Bind树脂对进行纯化。取150mL培养物按照实施例2中的方法制取7.5mL StUGT重组菌株的粗酶液,上清液用0.45μm滤膜抽滤,再加入15μL的咪唑(1mol/L)。取2mL 50%Ni-NTA His·Bind树脂(Novagen,139311725)加入重力柱(Biorad,732-1010)中,加入7.5mL咪唑浓度为2mM的粗酶液,轻柔摇动混匀结合。收集流出

液,加入20mL漂洗缓冲液(50mmol/L NaH_2PO_4 ,300mmol/L NaCl,10mmol/L咪唑)漂洗1次;5mL洗脱缓冲液(50mmol/L NaH_2PO_4 ,300mmol/L NaCl,200mmol/L咪唑)洗脱目的蛋白。

[0102] 用3.5mL 10mmol/L磷酸缓冲液清洗平衡脱盐层析柱(GE,PD-10,Sephadex G-25填料),将上述洗脱出的目的蛋白加入到平衡好的脱盐层析柱中,弃去流出液,用3.5mL 10mmol/L磷酸缓冲液洗脱目的蛋白,得到去咪唑的纯化蛋白。纯化后的纯酶有明显的目的条带且大小一致,说明糖基转移酶StUGT成功的被分离纯化出来(图7)。

[0103] 实施例8

[0104] 催化RA生成RD的糖基转移酶StUGT的生化特性检测

[0105] 将甘油管菌株BL21 (DE3) (pET28a-StUGT) 在含有50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 卡那霉素的LB液体培养基预培养至OD600在0.4-1.2,加入IPTG使菌液终浓度为1mM,然后在18 $^{\circ}\text{C}$ 的温度条件下诱导表达17h,将诱导表达的培养物按照实施例2中的方法制取粗酶液。收获的粗酶液按照实施例7中的方法制备StUGT纯化酶用于催化实验:将纯化酶加入含有1g/L Reb A、1mM尿苷二磷酸葡萄糖(UDPG)和3mM Mg^{2+} (氯化镁)的0.5mL反应混合物中,分别在pH=5.0-10.50、反应温度25-50 $^{\circ}\text{C}$ 的条件下反应24h。反应后按照实施例3中的方法进行液相色谱分析。

[0106] 在25-50 $^{\circ}\text{C}$ 的磷酸二氢钾缓冲液(pH7.2)中测定重组菌中StUGT的活性,以确定最适温度。再分别用柠檬酸缓冲液(pH5.0-6.0)、磷酸钾缓冲液(pH6.0-8.0)、Tris-HCl缓冲液(pH8.0-9.0)和甘氨酸缓冲液(pH9.0-10.5)测定重组菌中StUGT在pH5.0-10.5范围内的活性,以确定最适pH。

[0107] 根据液相分析可知,StUGT在40 $^{\circ}\text{C}$ 时催化活性最高,在pH8.0-8.5时催化活性最高。结果表明,催化RA生成RD的酶促反应中StUGT的最适pH为8.0-8.5,最适温度为40 $^{\circ}\text{C}$ 。

- [0001] 序列表
- [0002] <110> 中化健康产业发展有限公司
- [0003] 天津大学
- [0004] <120> 一种能够催化莱鲍迪苷A生成莱鲍迪苷D的糖基转移酶StUGT
- [0005] <150> 2020115319636
- [0006] <151> 2020-12-23
- [0007] <160> 2
- [0008] <170> SIPOSequenceListing 1.0
- [0009] <210> 1
- [0010] <211> 1326
- [0011] <212> DNA
- [0012] <213> 糖基转移酶 (Solanum tuberosum)
- [0013] <400> 1
- [0014] atggctactt tgagggtact catgtttcca tggttggctt atggacacat ttctccattt 60
- [0015] ctaaacatag ccaagcaact cgcagacaga ggattcttga tttaccttg ttctacgcta 120
- [0016] atcaatctcg aatccatcat caagaaaatc cctgaaaaat actctgaatc aattcgtttt 180
- [0017] gtcgaacttc acttacctga attgacctgaa ctctctctc attaccatac taccaatggt 240
- [0018] ctcccacccc atctcaatca cacccttcat aaggccctga aaatgtccaa accaaacttc 300
- [0019] tccaaaatct tgcaaaaatct gaaacctgat ttggtgattt acgacatatt gcagccgtgg 360
- [0020] gctgaacatg tcgtaaatga acagaacatt ccagcagtc agatcctaac ttcgggtgca 420
- [0021] gctctgtttt cgtatttttt caactttcta aagaatccag gggttgaatt ccctttccct 480
- [0022] gctattttatc tcccgaagt tgagcaagta aagatgagag aaatgttcga gaaagaacct 540
- [0023] aatgaagagg atcgtctagc tgagggaaat atgcaaatca tgttgatgtg tacgtctaga 600
- [0024] actatcgagg ccaataactt agattattgc actgaattaa gcaattggaa agttgttcca 660
- [0025] gttggtccac cattccaaga tccaatcact aatgacgtgg acgatatgga gctcattgat 720
- [0026] tggctaggaa caaaagatga gaattcaact gttttgtct gctttggaag tgagtatttc 780
- [0027] ttgtcaagag aagatatgga agaagtagct ttcgggttg agttaagtaa tgttaatttc 840
- [0028] atatgggttg caagatttcc gaaagtgaa gagcaaatc ttgaagatgt attgcaaaa 900
- [0029] ggttttcttg aaagaattgg agaaagggga agagttttgg acaaatgtc accacaacca 960
- [0030] agaattctaa atcatccgag taccggagga tttataagtc attgtggatg gaattcagta 1020
- [0031] atgaaagtt tagattttgg gtttctata atagcaatgc ctatgcataa tgatcaacca 1080
- [0032] ataaatgcta agttgatagt tgaattggga gtcgcaatgg aaattgtag agatgatgat 1140
- [0033] gggaatattc acagaggaga aattacgaa actcttaaag atgtcataac aggggaaaca 1200
- [0034] ggggaaatth tgaggggcaa agtgagagat atcagcaaga atttgaaatc tataagagag 1260
- [0035] gaagagatga atgctgctgc tgaagagcta attcaacttt gtaggaatag taataagtac 1320
- [0036] aaataa 1326
- [0037] <210> 2
- [0038] <211> 441
- [0039] <212> PRT
- [0040] <213> 糖基转移酶 (Solanum tuberosum)
- [0041] <400> 2

[0042]	Met Ala Thr Leu Arg Val Leu Met Phe Pro Trp Leu Ala Tyr Gly His
[0043]	1 5 10 15
[0044]	Ile Ser Pro Phe Leu Asn Ile Ala Lys Gln Leu Ala Asp Arg Gly Phe
[0045]	20 25 30
[0046]	Leu Ile Tyr Leu Cys Ser Thr Leu Ile Asn Leu Glu Ser Ile Ile Lys
[0047]	35 40 45
[0048]	Lys Ile Pro Glu Lys Tyr Ser Glu Ser Ile Arg Phe Val Glu Leu His
[0049]	50 55 60
[0050]	Leu Pro Glu Leu Pro Glu Leu Pro Pro His Tyr His Thr Thr Asn Gly
[0051]	65 70 75 80
[0052]	Leu Pro Pro His Leu Asn His Thr Leu His Lys Ala Leu Lys Met Ser
[0053]	85 90 95
[0054]	Lys Pro Asn Phe Ser Lys Ile Leu Gln Asn Leu Lys Pro Asp Leu Val
[0055]	100 105 110
[0056]	Ile Tyr Asp Ile Leu Gln Pro Trp Ala Glu His Val Val Asn Glu Gln
[0057]	115 120 125
[0058]	Asn Ile Pro Ala Val Lys Ile Leu Thr Ser Gly Ala Ala Leu Phe Ser
[0059]	130 135 140
[0060]	Tyr Phe Phe Asn Phe Leu Lys Asn Pro Gly Val Glu Phe Pro Phe Pro
[0061]	145 150 155 160
[0062]	Ala Ile Tyr Leu Pro Lys Val Glu Gln Val Lys Met Arg Glu Met Phe
[0063]	165 170 175
[0064]	Glu Lys Glu Pro Asn Glu Glu Asp Arg Leu Ala Glu Gly Asn Met Gln
[0065]	180 185 190
[0066]	Ile Met Leu Met Cys Thr Ser Arg Thr Ile Glu Ala Lys Tyr Leu Asp
[0067]	195 200 205
[0068]	Tyr Cys Thr Glu Leu Ser Asn Trp Lys Val Val Pro Val Gly Pro Pro
[0069]	210 215 220
[0070]	Phe Gln Asp Pro Ile Thr Asn Asp Val Asp Asp Met Glu Leu Ile Asp
[0071]	225 230 235 240
[0072]	Trp Leu Gly Thr Lys Asp Glu Asn Ser Thr Val Phe Val Cys Phe Gly
[0073]	245 250 255
[0074]	Ser Glu Tyr Phe Leu Ser Arg Glu Asp Met Glu Glu Val Ala Phe Gly
[0075]	260 265 270
[0076]	Leu Glu Leu Ser Asn Val Asn Phe Ile Trp Val Ala Arg Phe Pro Lys
[0077]	275 280 285
[0078]	Gly Glu Glu Gln Asn Leu Glu Asp Val Leu Pro Lys Gly Phe Leu Glu
[0079]	290 295 300
[0080]	Arg Ile Gly Glu Arg Gly Arg Val Leu Asp Lys Phe Ala Pro Gln Pro
[0081]	305 310 315 320
[0082]	Arg Ile Leu Asn His Pro Ser Thr Gly Gly Phe Ile Ser His Cys Gly
[0083]	325 330 335

[0084]	Trp Asn Ser Val Met Glu Ser Leu Asp Phe Gly Val Pro Ile Ile Ala
[0085]	340 345 350
[0086]	Met Pro Met His Asn Asp Gln Pro Ile Asn Ala Lys Leu Ile Val Glu
[0087]	355 360 365
[0088]	Leu Gly Val Ala Met Glu Ile Val Arg Asp Asp Asp Gly Asn Ile His
[0089]	370 375 380
[0090]	Arg Gly Glu Ile Thr Glu Thr Leu Lys Asp Val Ile Thr Gly Glu Thr
[0091]	385 390 395 400
[0092]	Gly Glu Ile Leu Arg Gly Lys Val Arg Asp Ile Ser Lys Asn Leu Lys
[0093]	405 410 415
[0094]	Ser Ile Arg Glu Glu Glu Met Asn Ala Ala Ala Glu Glu Leu Ile Gln
[0095]	420 425 430
[0096]	Leu Cys Arg Asn Ser Asn Lys Tyr Lys
[0097]	435 440

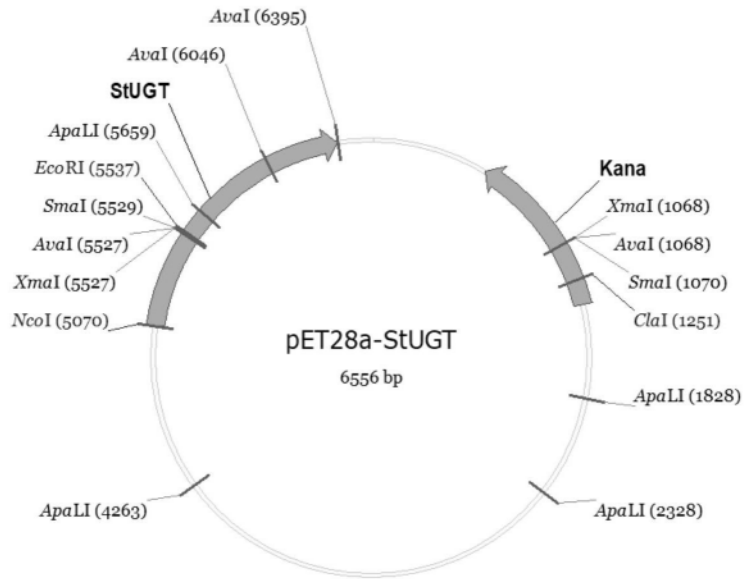


图1

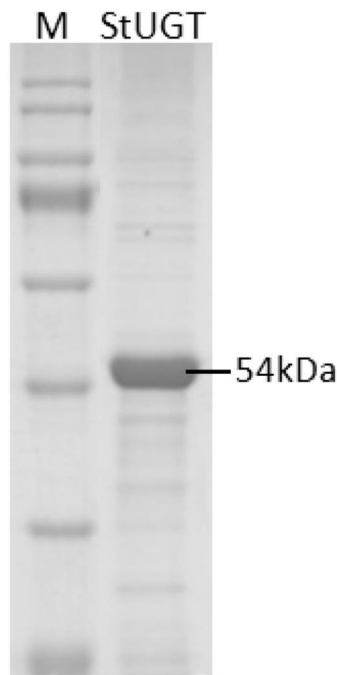


图2

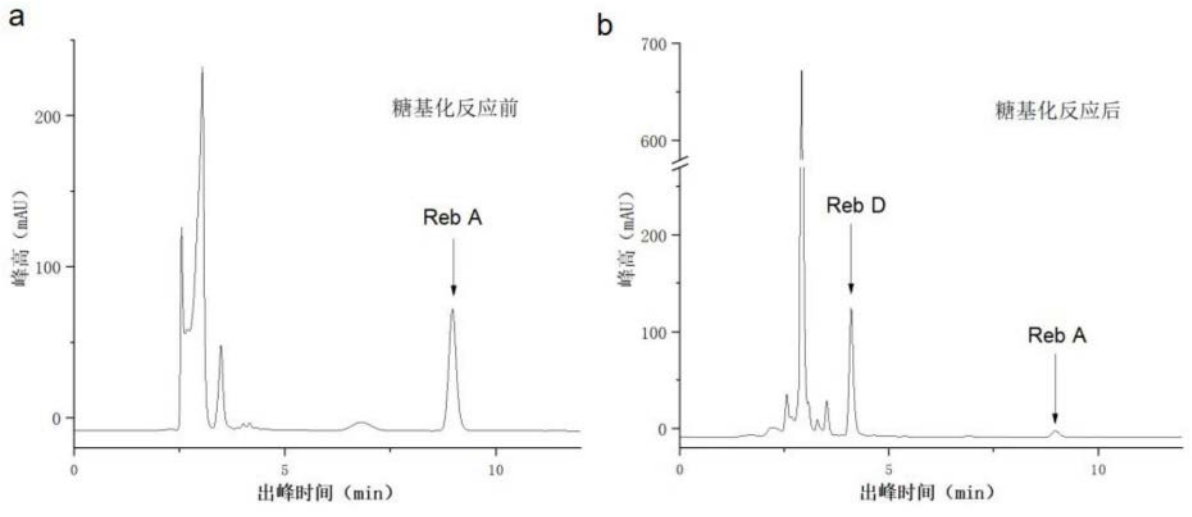


图3

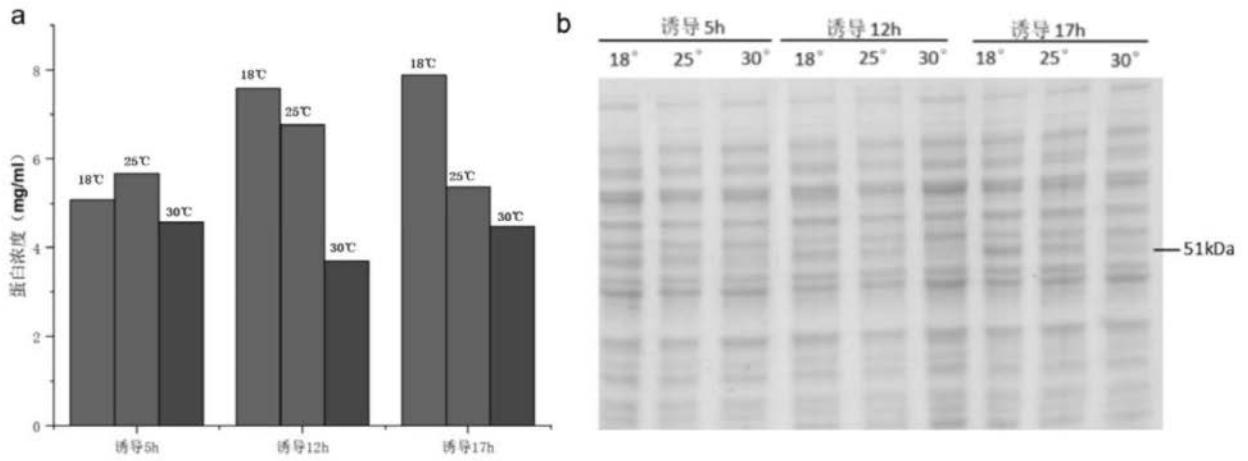


图4

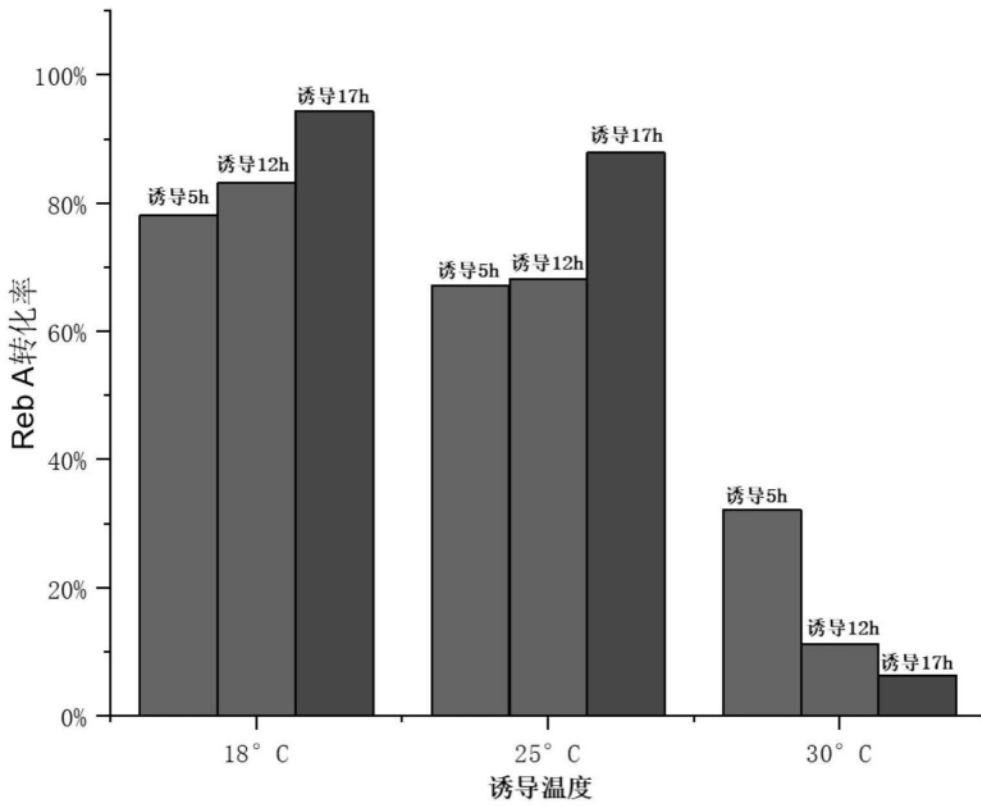


图5

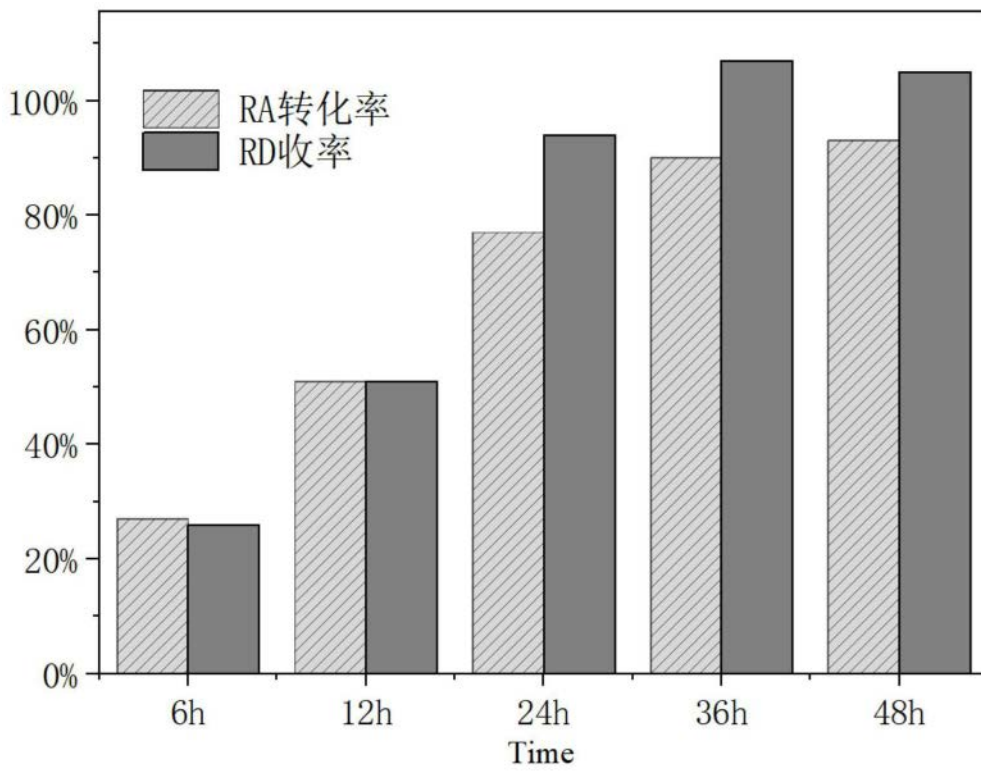


图6

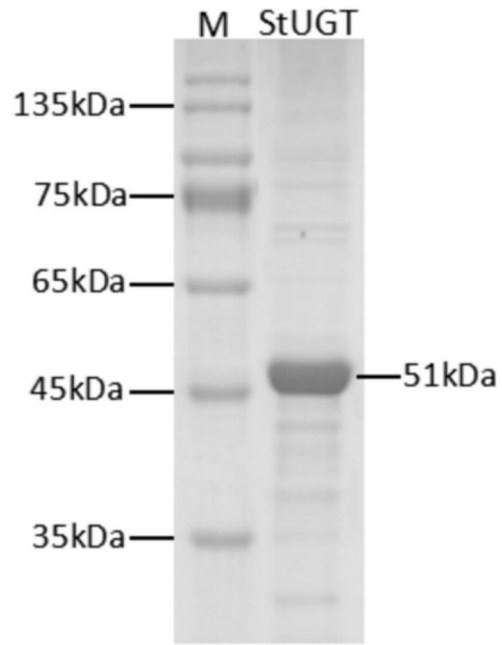


图7