



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 106636019 B

(45)授权公告日 2019.12.10

(21)申请号 201611250627.8

C12R 1/19(2006.01)

(22)申请日 2016.12.30

(56)对比文件

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 106636019 A

CN 101717745 A,2010.06.02,

CN 104726355 A,2015.06.24,

CN 106191015 A,2016.12.07,

(43)申请公布日 2017.05.10

CN 101993828 A,2011.03.30,

(73)专利权人 江南大学

CN 101469318 A,2009.07.01,

地址 214122 江苏省无锡市蠡湖大道1800号

CN 101368168 A,2009.02.18,

Yao Nie et al.Novel anti-Prelog

(72)发明人 张荣珍 徐岩

stereospecific carbonyl reductases from

Candida parapsilosis for asymmetric

(74)专利代理机构 哈尔滨市阳光惠远知识产权代理有限公司 23211

reduction of prochiral ketones.《Organic &

Biomolecular Chemistry》.2011,第9卷(第11

代理人 彭素琴

期),第4070-4078页.

(51)Int.Cl.

谭祥龙等.转肽酶 Sortase A 在蛋白质修

C12N 9/02(2006.01)

饰中的应用.《化学进展》.2014,第26卷(第10

C12N 9/04(2006.01)

期),第1741-1751页.

C12N 9/64(2006.01)

审查员 申延昊

C12N 15/70(2006.01)

C12N 1/21(2006.01)

权利要求书1页 说明书7页

C12P 7/22(2006.01)

序列表4页

(54)发明名称

基乙二醇提供了有效途径,为蛋白质改造领域提供了新的方向。

Sortase A介导的(S)-羰基还原酶寡聚体高效催化(S)-苯基乙二醇的合成

(57)摘要

本发明公开了Sortase A介导的(S)-羰基还原酶寡聚体高效催化(S)-苯基乙二醇的合成,属于生物催化不对称转化技术领域。本发明将引入SrtA识别序列的(S)-羰基还原酶进行纯化,同时纯化得到SrtA纯酶,利用SrtA介导的连接反应,得到(S)-羰基还原酶寡聚体;以分离得到的寡聚体为催化剂,2-羟基苯乙酮为底物,反应时间3小时,产物(S)-苯基乙二醇光学纯度达到100% e.e.,产率为99%;相比于原始酶,寡聚体的酶活提高了6倍,催化转化(S)-苯基乙二醇的时间缩短了16倍,热稳定性提高了10℃。本发明利用SrtA介导的蛋白质连接解决了羰基还原酶催化效率低,热稳定性差的缺陷,为高效制备(S)-苯

1. 一种氧化还原酶寡聚体,其特征在于,所述氧化还原酶寡聚体是先制备在C末端添加了sortase A识别序列的氧化还原酶,然后使该氧化还原酶发生通过转肽酶SrtA介导的连接反应而得到氧化还原酶寡聚体;所述氧化还原酶为氨基酸序列如SEQ ID NO:1所示的(S)-羧基还原酶;所述sortase A识别序列为LPETG。

2. 根据权利要求1所述的氧化还原酶寡聚体,其特征在于,所述氧化还原酶寡聚体为羧基还原酶寡聚体。

3. 根据权利要求1所述的氧化还原酶寡聚体,其特征在于,所述连接反应是在Ca²⁺存在的条件下进行。

4. 根据权利要求1所述的氧化还原酶寡聚体,其特征在于,所述转肽酶SrtA是来源于金黄色葡萄球菌的SrtA。

5. 一种重组菌,其特征在于,所述重组菌表达在C末端添加了sortase A识别序列的氧化还原酶;所述氧化还原酶为氨基酸序列如SEQ ID NO:1所示的(S)-羧基还原酶;所述sortase A识别序列为LPETG。

6. 一种催化不对称转化制备(S)-苯基乙二醇的方法,所述方法是以(S)-羧基还原酶寡聚体作为催化剂;所述(S)-羧基还原酶寡聚体是先制备在C末端添加了sortase A识别序列的(S)-羧基还原酶,然后使酶发生通过转肽酶SrtA介导的连接反应而得到氧化还原酶寡聚体;所述氧化还原酶为氨基酸序列如SEQ ID NO:1所示的(S)-羧基还原酶;所述sortase A识别序列为LPETG。

7. 权利要求1~4任一所述的氧化还原酶寡聚体在制备手性化合物方面的应用。

8. 权利要求1~4任一所述的氧化还原酶寡聚体在制备药物领域的应用。

9. 权利要求1~4任一所述的氧化还原酶寡聚体在制备农药领域的应用。

10. 权利要求1~4任一所述的氧化还原酶寡聚体在制备激素领域的应用。

11. 权利要求1~4任一所述的氧化还原酶寡聚体在制备食品添加剂领域的应用。

Sortase A介导的(S)-羰基还原酶寡聚体高效催化(S)-苯基乙二醇的合成

技术领域

[0001] 本发明涉及Sortase A介导的(S)-羰基还原酶寡聚体高效催化(S)-苯基乙二醇的合成,属于生物催化不对称转化技术领域。

背景技术

[0002] 手性化合物在医药、农药、激素、食品添加剂等精细化工品的生产上得到了越来越广泛的应用,如光学纯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,而且是制备具有光学活性的医药、农药和功能材料的重要中间体。

[0003] 氧化还原酶是一种具有高度立体选择性的生物催化剂,常用于生物转化光学活性的手性化合物。在众多的微生物氧化还原酶源中,来源于近平滑假丝酵母(*Candida parapsilosis*) CCTCC M203011的(S)-羰基还原酶SCR11催化2-羟基苯乙酮的还原反应,产生(S)-苯基乙二醇。然而该酶在催化不对称反应时存在时间周期长,效率低的缺点。虽然酿酒酵母和毕赤酵母都曾用于其同工酶的表达宿主,效果仍是不佳。最近,发明人实现了该酶在近平滑假丝酵母(*C.parapsilosis*) CCTCC M203011中进行就地表达,并将其活性提高了2倍,产物光学纯度和产率均超过99%,但整个转化过程却需要24小时。因此,有必要寻求利用蛋白质工程对(S)-羰基还原酶SCR11进行改造,获得功能加强的氧化还原酶。

[0004] 近几年来,蛋白质连接在生物化学领域得到越来越多的应用,人们可以将多肽类似物,小分子探针等等特异性地添加到蛋白质的末端,给蛋白质赋予了特定的功能。目前常用的方法是来自金黄色葡萄球菌*Staphylococcus aureus*中的sortase A(SrtA)介导的蛋白质连接,该方法具有温和性、特异性、高效性等优点。通过识别特定的信号序列LPXTG(X可以为任何氨基酸),并切开苏氨酸与甘氨酸之间的酰胺键,形成一个硫酯中间体,接下来由一个寡聚甘氨酸序列作为亲核试剂来进攻这个硫酯中间体,最终完成寡聚甘氨酸与蛋白质之间的连接。如果将寡聚甘氨酸添加至荧光素、生物素等一些小分子探针上,就能够实现蛋白质的定点标记。

发明内容

[0005] 为了解决上述问题,本发明已经利用(S)-专一性羰基还原酶的重组菌株催化不对称转化制备(S)-苯基乙二醇,在此基础上,从金黄色葡萄球菌(*S.aureus*)中克隆出sortase A基因srtA,将其在大肠杆菌宿主中进行表达。同时,利用基因工程技术在SCR11的C末端添加信号序列LPETG,其N末端原本存在的甘氨酸作为亲核试剂,在sortase A的介导下成功实现了SCR11寡聚化。生成的寡聚体,克服了SCR11本身的空间位阻效应,相比于原始酶SCR11在热稳定性和催化效率方面均有比较大的提高,并且在3小时内的转化率和得率均达到了99%,相对于原始酶时间缩短了16倍。此外,发明人将该方法应用于其它几种氧化还原酶如羰基还原酶2(CR2,基因编号AB183149)、羰基还原酶4(CR4,基因编号E59061)、(S)-羰基还原酶(SCR,基因编号FJ939565)、(S)-羰基还原酶3(SCR3,基因编号FJ939564)等,酶活和热

稳定性都有显著提高,说明本发明方法有利于强化氧化还原酶的强化酶学性质、提高催化效率。

[0006] 本发明的第一个目的是提供一种氧化还原酶寡聚体,所述氧化还原酶寡聚体是先制备在C末端添加了sortase A识别序列的氧化还原酶,然后使该氧化还原酶发生通过转肽酶SrtA介导的连接反应而得到氧化还原酶寡聚体。

[0007] 在一种实施方式中,所述连接反应是在Ca²⁺存在的条件下进行。

[0008] 在一种实施方式中,所述连接反应是在含有Ca²⁺的缓冲体系中加入转肽酶SrtA和C末端添加了sortase A识别序列的氧化还原酶,反应一段时间即得到氧化还原酶寡聚体。

[0009] 在一种实施方式中,所述连接反应是在10°C-35°C下反应12h-36h。

[0010] 在一种实施方式中,所述连接反应是在25°C下反应36h。

[0011] 在一种实施方式中,所述氧化还原酶寡聚体为羧基还原酶寡聚体。

[0012] 在一种实施方式中,所述羧基还原酶寡聚体为(S)-羧基还原酶II寡聚体、羧基还原酶II寡聚体、羧基还原酶IV寡聚体、(S)-羧基还原酶寡聚体、(S)-羧基还原酶III寡聚体。

[0013] 在一种实施方式中,所述氧化还原酶为氨基酸序列如SEQ ID NO:1所示的(S)-羧基还原酶,或者NCBI上gene ID为AB183149的CR2、gene ID为E59061的CR4、gene ID为FJ939565的SCR、gene ID为FJ939564的SCR3等。

[0014] 在一种实施方式中,所述sortase A识别序列为LPXTG(如SEQ ID NO:2所示),其中X为任意一种氨基酸。

[0015] 在一种实施方式中,所述sortase A识别序列与氧化还原酶之间通过柔性连接肽连接。

[0016] 在一种实施方式中,所述柔性连接肽为GGGGS(如SEQ ID NO:9所示)。

[0017] 在一种实施方式中,所述sortase A识别序列为LPETG(如SEQ ID NO:3所示)。

[0018] 在一种实施方式中,所述转肽酶SrtA是来源于金黄色葡萄球菌的SrtA。

[0019] 在一种实施方式中,所述转肽酶SrtA的氨基酸序列如SEQ ID NO:4所示。

[0020] 在一种实施方式中,所述氧化还原酶寡聚体的制备,是先在氧化还原酶的C端添加sortase A识别序列,然后分别表达并纯化C端添加了sortase A识别序列的氧化还原酶和转肽酶SrtA,再在Ca⁺存在的条件下加入C端添加了sortase A识别序列的氧化还原酶和转肽酶SrtA,使氧化还原酶发生连接反应,得到氧化还原酶寡聚体。

[0021] 本发明的第二个目的是提供一种重组菌,所述重组菌表达在C末端添加了sortase A识别序列的氧化还原酶。

[0022] 在一种实施方式中,所述羧基还原酶寡聚体为(S)-羧基还原酶II寡聚体、羧基还原酶II寡聚体、羧基还原酶IV寡聚体、(S)-羧基还原酶寡聚体、(S)-羧基还原酶III寡聚体。

[0023] 在一种实施方式中,所述氧化还原酶为氨基酸序列如SEQ ID NO:1所示的(S)-羧基还原酶II。

[0024] 在一种实施方式中,所述sortase A识别序列为LPXTG,其中X为任意一种氨基酸。

[0025] 本发明的第三个目的是提供一种催化不对称转化制备(S)-苯基乙二醇的方法,所述方法是以本发明的(S)-羧基还原酶寡聚体作为催化剂。

[0026] 在一种实施方式中,所述方法是以2-HAP为底物制备(S)-苯基乙二醇。

[0027] 在一种实施方式中,所述方法具体是:用SCR II寡聚体转化2-HAP;反应体系:100mM

磷酸钾缓冲液 (pH 6.0), 5g/L 2-HAP和等摩尔的NADPH, 适量的SCR11寡聚体纯酶液; 反应在35°C、200r/min的条件下反应3h。

[0028] 本发明的第四个目的是提供所述氧化还原酶寡聚体在制备手性化合物方面的应用。

[0029] 本发明的第五个目的是提供所述氧化还原酶寡聚体在医药、农药、激素、食品添加剂等领域的应用。

[0030] 本发明的优点和效果:

[0031] (1) 本发明成功建立了一种获得氧化还原酶寡聚体的方法, 相比于原始酶, 通过这种方法连接的寡聚体具有显著提高的催化活性和热稳定性; 用该寡聚体催化不对称转化反应, 反应时间3小时, 产物(S)-苯基乙二醇光学纯度达到100% e.e., 产率为99%; 相比于原始酶, 寡聚体的催化效率提高了6倍, 热稳定性提高了10°C。

[0032] (2) 本发明从*S. aureus*中克隆出SrtA, 实现在大肠杆菌中的高效表达, 同时, 通过基因工程手段在SCR11的C末端添加SrtA的识别序列, 构建SCR11-mtf, 然后分别纯化得到SrtA和SCR11-mtf的纯酶, 在Ca²⁺存在的条件下进行连接反应, 得到SCR11-mtf寡聚体。

[0033] (3) 羧基还原酶SCR11特异性催化转化底物2-羟基苯乙酮为(S)-苯基乙二醇, 但酶活较低。通过SrtA介导的连接反应, 构建了其寡聚体, 酶活检测结果显示, 相比于原始酶酶活提高了6倍, 同时热稳定性也有了较大提高, 在50°C条件下孵育一小时, 酶活仍保持原来的90%以上; 另外, 在相同底物浓度的情况下, 不对称转化反应时间缩短了16倍。这些工作很好地解决了羧基还原酶催化活性低和热稳定性差的缺陷, 为高效制备苯基乙二醇提供了有效途径, 为蛋白质改造提供了一个新的应用方向。

[0034] (4) 本发明方法应用于其他氧化还原酶(比如SCR、SCR3、CR2、CR4等), 都具有显著的提高催化效率的效果。

具体实施方案

[0035] 下面是对本发明进行具体描述。

[0036] 实施例1: 金黄色葡萄球菌*S. aureus*基因组的获得

[0037] LB培养基(g/L): 胰蛋白胨10, 酵母提取物5, NaCl 10, pH 7.0。固体培养基添加1.5%琼脂粉。将*S. aureus*菌种接种于装有5mL LB液体培养基(无抗)和5mL LB液体培养基(50μg/mL卡那霉素)的试管中, 37°C、200r/min振荡培养10h。培养结束后, 将菌体于6,000rpm、20min下离心, 用生理盐水洗涤两次后收集细胞, 利用基因组DNA提取试剂盒Genomic DNA Extraction Miniprep System(VIOGENE公司)提取基因组。

[0038] 实施例2: Sortase A基因的获得

[0039] 合成扩增Sortase A基因srtA的两端引物(如SEQ ID NO:5-SEQ ID NO:6所示):

[0040] srtA_F CGCCATATGCAAGCTAAACCTCAAATTC

[0041] srtA_R CCGCTCGAGTTTGACTTCTGTAGCTAC

[0042] PCR反应体系: ddH₂O 37μL, 10×Reaction Buffer 5μL, dNTP (25mmol/L) 0.5μL, 引物(50pmol/μL) 1μL, 基因组DNA 5μL, Taq DNA polymerase (5U/μL) 0.5μL。

[0043] PCR条件为: 98°C 1min; 98°C 30s, 55°C 30s, 72°C 30s, 30次循环; 72°C 10min。以实施例1获得的*S. aureus*基因组为模板, PCR扩增srtA基因(氨基酸序列如SEQ ID NO:4所示)。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。

[0044] 实施例3:含srtA基因的重组大肠杆菌的构建

[0045] (1) 基因srtA及质粒pET21a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pET21a。

[0047] 按照水、缓冲液、基因或质粒DNA、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,切胶回收并浓缩。

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

[0049] (2) 基因srtA与质粒pET21a的连接

[0050] 反应体系组成如下:质粒pET21a 0.8μL,基因srtA 4.2μL,Ligation Solution 5μL,将混合连接液置于16℃培养箱中连接12-16h。

[0051] (3) 重组质粒转化大肠杆菌E.coli JM109

[0052] 在每管的100μL E.coli JM109感受态细胞悬液中加入10μL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700μL 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600μL,剩余菌液混匀后涂布到含有100μg/mL氨苄青霉素的LB平板上,37℃倒置培养过夜。

[0053] 阳性克隆的选择

[0054] 挑取4个克隆,转接入装有3mL的含有100μg/mL氨苄青霉素的LB培养基中,37℃培养12h,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。用以下反应体系进行酶切验证:10×Buffer H 2μL,DNA 5μL,Nde I 0.5μL,XhoI 0.5μL,ddH₂O将体系补足20μL。获得阳性质粒pET21a-srtA。

[0055] (4) 重组质粒转化大肠杆菌E.coli BL21 (DE3)

[0056] 在E.coli BL21 (DE3) 感受态细胞悬液中加入重组质粒,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700μL 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600μL,剩余菌液混匀后涂布到含有100μg/mL氨苄青霉素的LB平板上,37℃倒置培养过夜。经测序(上海生物工程股份有限公司)后获得阳性克隆E.coli BL21/pET21a-srtA。

[0057] 实施例4:SCR_{II}-GGGSLPETGG(简称SCR_{II}-mtf)基因的获得

[0058] 合成SCR_{II}-mtf两端引物(如SEQ ID NO:7-SEQ ID NO:8所示)

[0059] scr_{II}-mtf_F:CCCATGGGCGAAATCGAATC

[0060] scr_{II}-mtf_R:CCCTCGAGGCCGCGGTTTCCGGAAGGCTGCCACCGCCACCTGGAC

[0061] AAGTGTAACCACCATC

[0062] PCR反应体系:ddH₂O 37μL,10×Reaction Buffer 5μL,dNTP(25mmol/L) 0.5μL,引物(50pmol/μL) 1μL,基因组DNA 5μL,Taq DNA polymerase(5U/μL) 0.5μL。

[0063] PCR条件为:98℃1min;98℃30s,55℃30s,72℃30s,30次循环;72℃10min。以实验

室之前构建的含有scrII基因的pET-SCR II质粒为模板,PCR扩增scrII基因,条件为:98℃ 1min;98℃30s,55℃30s,72℃45s,30次循环;72℃10min。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。

[0064] 实施例5:含scrII-mtf基因的重组大肠杆菌的构建

[0065] (1) 基因scrII-mtf及质粒pET28a的酶切

[0066] 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pET28a。

[0067] 按照水、缓冲液、基因或质粒DNA、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,切胶回收并浓缩。

[0068] 反应体系组成:10×Buffer H 4μL,DNA 10μL,NcoI 2μL,XhoI 2μL,ddH₂O将体系补足40μL。

[0069] (2) 基因scrII与质粒pET28a的连接

[0070] 反应体系组成如下:质粒pET28a 0.8μL,基因srtA 4.2μL,Ligation Solution 5μL,将混合连接液置于16℃培养箱中连接12-16h。

[0071] (3) 重组质粒转化大肠杆菌E.coli JM109

[0072] 在每管的100μL E.coli JM109感受态细胞悬液中加入10μL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700μL 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600μL,剩余菌液混匀后涂布到含有100μg/mL氨苄青霉素的LB平板上,37℃倒置培养过夜。

[0073] 阳性克隆的选择

[0074] 挑取4个克隆,转接入装有3mL的含有100μg/mL氨苄青霉素的LB培养基中,37℃培养12h,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。用以下反应体系进行酶切验证:10×Buffer H 2μL,DNA 5μL,Nco I 0.5μL,Xho I 0.5μL,ddH₂O将体系补足20μL。获得阳性质粒pET28a-scrII-mtf。

[0075] (4) 重组质粒转化大肠杆菌E.coli BL21 (DE3)

[0076] 在每管100μL E.coli BL21 (DE3) 感受态细胞悬液中加入1 M 1重组质粒,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700μL 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600μL,剩余菌液混匀后涂布到含有100μg/mL氨苄青霉素的LB平板上,37℃倒置培养过夜。经测序(上海生工生物工程股份有限公司)后获得阳性克隆E.coli BL21/pET28a-scrII-mtf。其中scrII的氨基酸序列如SEQ ID NO:1所示,其C端添加的信号序列mtf的氨基酸序列如SEQ ID NO:3所示。

[0077] 实施例6:重组菌的诱导表达培养

[0078] 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(100μg/mL)和卡那霉素(50μg/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10mL含100μg/mL氨苄青霉素和50μg/mL卡那霉素的LB液体培养基中,于37℃,200rpm振荡培养过夜。取10mL培养液转接于1L含100μg/mL氨苄青霉素和50μg/mL卡那霉

素的LB液体培养基中,于37℃,200rpm振荡培养至OD₆₀₀约为0.6。向培养物中加入终浓度为0.1mM诱导物异丙基-B-D-硫代半乳糖苷,在培养温度30℃下进行诱导培养10h。

[0079] 实施例7:SrtA和SCR_{II}-mtf的纯化

[0080] 将诱导表达后的菌液离心,收集菌体,用生理盐水洗涤3次后重悬于20mM Tris-HCl缓冲液(pH 8.0),超声破碎。12,000r/min,4℃离心收集上清液,经0.22μm滤膜过滤后的滤液即为粗酶液。纯化方法的原理是利用Ni离子与组氨酸特异性吸附的特点使目的蛋白与杂蛋白得到分离,在低温条件下,先后用5个柱体积的超纯水和5个柱体积的Binding buffer(20mM Tris-HCl、150mM NaCl、pH 8.0)冲洗和平衡Ni柱,然后将粗酶液缓慢通过柱子,以线性洗脱的方式流加Elution buffer(20mM Tris-HCl、150mM NaCl、1M咪唑,pH 8.0),收集目标蛋白,经超滤浓缩后,所得蛋白经SDS-PAGE检验其纯度。

[0081] 实施例8:SrtA介导SCR_{II}-mtf寡聚化

[0082] (1) SCR_{II}寡聚体制备:

[0083] 向连接体系(50mM Tris-HCl,150mM NaCl,10mM CaCl₂,pH 7.5)中加入SrtA(25μmol/L)和SCR_{II}-mtf(30μmol/L)分别在10℃、15℃、20℃、25℃、30℃、35℃的条件下进行反应,同时,在相同的体系中加入同等量的SrtA和SCR_{II}作为对照,反应时间为8h。连接产物经SDS-PAGE分析后确定最佳连接温度为25℃。然后在25℃下将反应进行12h,24h和36h,观察连接产物产量的变化,最终确定36h时产物的量最多,因此,确定反应时间为36h。

[0084] (2) SCR_{II}寡聚体的分离:

[0085] 连接反应结束后,将连接体系超滤浓缩至500μL,用50mM Tris-HCl、150mM NaCl、pH8.0的缓冲平衡凝胶柱Superdex 200,接下来将浓缩后的样品过柱,根据分子筛效应分离得到SCR_{II}寡聚体,SDS-PAGE鉴定纯度。

[0086] 实施例9:酶活测定体系

[0087] 100μL体系中含有100mM磷酸钾缓冲液(pH 6.0),0.5mM NADPH,5mM 2-HAP,35℃恒温3min,加入适量酶液混匀后,酶标仪扫描340nm处的吸光值变化。酶活测定实验重复3次,取平均值。定义1个酶活单位(U)为每分钟催化氧化1μmol辅酶NADPH的酶量。蛋白含量的测定:采用Bradford法测定,以BSA为标准蛋白。比活计算公式:比活(U/mg) = 酶活(U) / 蛋白量(mg)。

[0088] 测定SCR_{II}和SCR_{II}-mtf和SCR_{II}寡聚体对底物2-HAP的比酶活。三种酶的活性在同一条件下进行测定,SCR_{II}对2-羟基苯乙酮的比活为6.3U/mg,与之前文献当中报道的结果基本一致;而在C端添加了GGGSLPETGG序列的SCR_{II}-mtf的比活较之有所增加,为8.7U/mg;SCR_{II}寡聚体对2-羟基苯乙酮的活性比较高,为38.5U/mg,与SCR_{II}相比提高了6倍。

[0089] 实施例10:

[0090] 分别在不同温度梯度(20-70℃)和pH梯度(4.0-9.0)下测定SCR_{II}、SCR_{II}-mtf及SCR_{II}寡聚体的酶活,确定三者的最适pH和最适温度。将三种酶置于不同温度(10-60℃)下1h后进行酶活的测定,评估温度稳定性。在4℃条件下将三种酶放置在不同pH梯度(4.0-9.0)的缓冲溶液中,24h后测定酶活,确定三者的pH耐受性。

[0091] 酶最适温度的测定结果显示,SCR_{II}和SCR_{II}-mtf的趋势基本一致,随着温度的升高,活性逐渐增加,在35℃时达到最大,随后温度升高,活性迅速降低;SCR_{II}寡聚体在20-60℃,相对酶活都比较接近,随着温度升高,相对酶活有所增加,并在50℃时达到最大值,高于

60℃时活性迅速降低。酶最适pH的测定在4.0-9.0的范围内,三种酶几乎有相同的趋势,SCRII和SCRII-mtf在pH为6.0时活性最高,而SCRII寡聚体在pH为6.0和6.5同时具有最大活性。

[0092] 温度稳定性测定结果显示,SCRII和SCRII-mtf在40℃放置1h后,活性保留原来的80%,而在50℃时则迅速降低,活性不足20%,SCRII寡聚体在10-50℃放置1h,活性仍旧维持在90%以上。三种酶的pH耐受性结果区别不大,在pH5.0-9.0的范围内活性都在75%以上。

[0093] 实施例11:动力学参数测定

[0094] 测定SCRII和SCRII-mtf和SCRII寡聚体对底物2-HAP的动力学参数,测定体系:100mM磷酸钾缓冲液(pH 6.0),5mM NADPH,0.5-20mM 2-HAP以及适量的纯酶液,总体积100μL。每个测定实验重复3次取平均值,利用Michaelis-Menten和Lineweaver-Burk方程求出动力学参数。SCRII、SCRII-mtf和SCRII寡聚体的 K_m (mmol/L)分别为4.52、3.98和1.40,与原始酶SCRII相比,SCRII寡聚体的变化比较明显,在数值上降低了3.3倍; V_{max} 值的测定结果显示,SCRII-mtf与SCRII的最大反应速率非常接近,分别为32.17U/mg和33.00U/mg,因此相应的 k_{cat} 值也很相近,而SCRII寡聚体相比前两者有所提高,达到了42.72U/mg。动力学参数测定结果表明SCRII寡聚体有着更低的 K_m 值和更高的 k_{cat} 值。

[0095] 实施例12:不对称转化

[0096] 用SCRII、SCRII-mtf、SCRII寡聚体分别转化2-HAP,对比转化结果。反应体系:100mM磷酸钾缓冲液(pH 6.0),5g/L 2-HAP和等摩尔的NADPH,以及适量的纯酶液(约1mg蛋白),总体积2mL。反应在35℃、200r/min的条件下反应3h。每个实验重复三次取平均值。

[0097] 反应结束后,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 0B-H柱(4.6mm×25cm;Daicel Chemical Ind.,Ltd.,Japan),流动相为正己烷/异丙醇(9/1),流速0.5mL/min,检测波长为215nm。产物的光学纯度通过对映过量值来衡量。

[0098] 产物(S)-苯基乙二醇对映过量值的计算:对映过量值(e.e.%) = $[(C_S - C_R) / (C_S + C_R)] \times 100\%$

[0099] 产物(S)-苯基乙二醇产率的计算:产率(%) = $C_S / C_0 \times 100\%$

[0100] 式中 C_S 为反应后(S)-对映体的浓度, C_R 为反应后(R)-对映体的浓度, C_0 为反应前底物2-羟基苯乙酮的浓度。

[0101] 结果显示,SCRII转化(S)-苯基乙二醇的产率为43%,SCRII-mtf为45%,SCRII寡聚体的产率>99%。

[0102] 以SCRII-mtf和SCRII寡聚体为催化剂,不对称生物转化反应后,产物均为(S)-苯基乙二醇,且SCRII寡聚体相对于原始酶SCRII将反应时间缩短了16倍。

[0103] 虽然本发明已以较佳实施例公开如上,但其并非用以限定本发明,任何熟悉此技术的人,在不脱离本发明的精神和范围内,都可做各种的改动与修饰,因此本发明的保护范围应该以权利要求书所界定的为准。

[0001] 序列表
 [0002] <110> 江南大学
 [0003] <120> Sortase A介导的(S)-羰基还原酶寡聚体高效催化(S)-苯基乙二醇的合成
 [0004] <160> 9
 [0005] <170> PatentIn version 3.3
 [0006] <210> 1
 [0007] <211> 279
 [0008] <212> PRT
 [0009] <213> 人工序列
 [0010] <400> 1
 [0011] Met Gly Glu Ile Glu Ser Tyr Cys Asn Lys Glu Leu Gly Pro Leu Pro
 [0012] 1 5 10 15
 [0013] Thr Lys Ala Pro Thr Leu Ser Lys Asn Val Leu Asp Leu Phe Ser Leu
 [0014] 20 25 30
 [0015] Lys Gly Lys Val Ala Ser Val Thr Gly Ser Ser Gly Gly Ile Gly Trp
 [0016] 35 40 45
 [0017] Ala Val Ala Glu Ala Tyr Ala Gln Ala Gly Ala Asp Val Ala Ile Trp
 [0018] 50 55 60
 [0019] Tyr Asn Ser His Pro Ala Asp Glu Lys Ala Glu His Leu Gln Lys Thr
 [0020] 65 70 75 80
 [0021] Tyr Gly Val Arg Ser Lys Ala Tyr Lys Cys Asn Ile Ser Asp Pro Lys
 [0022] 85 90 95
 [0023] Ser Val Glu Glu Thr Ile Ser Gln Gln Glu Lys Asp Phe Gly Thr Ile
 [0024] 100 105 110
 [0025] Asp Val Phe Val Ala Asn Ala Gly Val Pro Trp Thr Glu Gly Pro Glu
 [0026] 115 120 125
 [0027] Ile Asn Val Asp Asn Tyr Asp Ser Trp Asn Lys Ile Ile Asn Leu Asp
 [0028] 130 135 140
 [0029] Leu Asn Gly Val Tyr Tyr Cys Ala His Thr Val Gly Lys Ile Phe Lys
 [0030] 145 150 155 160
 [0031] Lys Asn Gly Lys Gly Ser Leu Val Ile Thr Ser Ser Met Ser Gly Thr
 [0032] 165 170 175
 [0033] Ile Val Asn Val Pro Gln Leu Gln Ala Ala Tyr Asn Ala Ala Lys Ala
 [0034] 180 185 190
 [0035] Ala Cys Thr His Leu Thr Lys Ser Leu Ala Val Glu Trp Ala Pro Phe
 [0036] 195 200 205
 [0037] Ala Arg Val Asn Cys Val Ser Pro Gly Tyr Ile Ala Thr Glu Ile Ser
 [0038] 210 215 220

[0039] Asp Phe Val Glu Lys Asp Met Lys Ala Lys Trp Trp Gln Leu Thr Pro
 [0040] 225 230 235 240
 [0041] Leu Gly Arg Glu Gly Leu Ala Gln Glu Leu Val Gly Ala Tyr Leu Tyr
 [0042] 245 250 255
 [0043] Leu Ala Ser Asn Ala Ser Thr Tyr Thr Thr Gly Ala Asn Leu Ala Val
 [0044] 260 265 270
 [0045] Asp Gly Gly Tyr Thr Cys Pro
 [0046] 275
 [0047] <210> 2
 [0048] <211> 5
 [0049] <212> PRT
 [0050] <213> 人工序列
 [0051] <220>
 [0052] <221> misc_feature
 [0053] <222> (3) .. (3)
 [0054] <223> Xaa can be any naturally occurring amino acid
 [0055] <400> 2
 [0056] Leu Pro Xaa Thr Gly
 [0057] 1 5
 [0058] <210> 3
 [0059] <211> 5
 [0060] <212> PRT
 [0061] <213> 人工序列
 [0062] <400> 3
 [0063] Leu Pro Glu Thr Gly
 [0064] 1 5
 [0065] <210> 4
 [0066] <211> 148
 [0067] <212> PRT
 [0068] <213> 人工序列
 [0069] <400> 4
 [0070] Met Gln Ala Lys Pro Gln Ile Pro Lys Asp Lys Ser Lys Val Ala Gly
 [0071] 1 5 10 15
 [0072] Tyr Ile Glu Ile Pro Asp Ala Asp Ile Lys Glu Pro Val Tyr Pro Gly
 [0073] 20 25 30
 [0074] Pro Ala Thr Pro Glu Gln Leu Asn Arg Gly Val Ser Phe Ala Glu Glu
 [0075] 35 40 45
 [0076] Asn Glu Ser Leu Asp Asp Gln Asn Ile Ser Ile Ala Gly His Thr Phe
 [0077] 50 55 60

[0078] Ile Asp Arg Pro Asn Tyr Gln Phe Thr Asn Leu Lys Ala Ala Lys Lys
 [0079] 65 70 75 80
 [0080] Gly Ser Met Val Tyr Phe Lys Val Gly Asn Glu Thr Arg Lys Tyr Lys
 [0081] 85 90 95
 [0082] Met Thr Ser Ile Arg Asp Val Lys Pro Thr Asp Val Gly Val Leu Asp
 [0083] 100 105 110
 [0084] Glu Gln Lys Gly Lys Asp Lys Gln Leu Thr Leu Ile Thr Cys Asp Asp
 [0085] 115 120 125
 [0086] Tyr Asn Glu Lys Thr Gly Val Trp Glu Lys Arg Lys Ile Phe Val Ala
 [0087] 130 135 140
 [0088] Thr Glu Val Lys
 [0089] 145
 [0090] <210> 5
 [0091] <211> 28
 [0092] <212> DNA
 [0093] <213> 人工序列
 [0094] <400> 5
 [0095] cgccatatgc aagctaaacc tcaaattc 28
 [0096] <210> 6
 [0097] <211> 27
 [0098] <212> DNA
 [0099] <213> 人工序列
 [0100] <400> 6
 [0101] ccgctcgagt ttgacttctg tagctac 27
 [0102] <210> 7
 [0103] <211> 20
 [0104] <212> DNA
 [0105] <213> 人工序列
 [0106] <400> 7
 [0107] cccatgggcg aaatcgaatc 20
 [0108] <210> 8
 [0109] <211> 62
 [0110] <212> DNA
 [0111] <213> 人工序列
 [0112] <400> 8
 [0113] ccctcgagge cgccggtttc cggaaggctg ccaccgccac ctggacaagt gtaaccacca 60
 [0114] tc 62
 [0115] <210> 9
 [0116] <211> 5

-
- [0117] <212> PRT
[0118] <213> 人工序列
[0119] <400> 9
[0120] Gly Gly Gly Gly Ser
[0121] 1 5