



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 118406666 A

(43) 申请公布日 2024. 07. 30

(21) 申请号 202410675690.4

C12N 1/21 (2006.01)

(22) 申请日 2024.05.28

C12P 17/10 (2006.01)

(71) 申请人 黄冈人福药业有限责任公司

C12Q 1/26 (2006.01)

地址 438000 湖北省黄冈市黄州区火车站  
经济开发区知青路一号

C12R 1/19 (2006.01)

(72) 发明人 何鑫 汪声晨 陈海林 熊天涵  
许檬丹 刘明欣 赵静 刘林  
左权

(74) 专利代理机构 武汉天领众智专利代理事务  
所(普通合伙) 42300

专利代理师 严志加

(51) Int. Cl.

C12N 9/04 (2006.01)

C12N 15/53 (2006.01)

C12N 15/70 (2006.01)

权利要求书1页 说明书9页  
序列表(电子公布)

(54) 发明名称

酮基还原酶突变体、编码基因、载体及应用

(57) 摘要

本发明公开了酮基还原酶突变体、编码基因、载体及应用,所述酮基还原酶突变体的氨基酸序列如SEQ ID NO:2所示,该突变体应用于酶催化制备艾司利卡西平能够解决有机溶剂耐受性差、活性低的缺陷,推广了酶催化制备艾司利卡西平的工业应用。

1. 氨基酸序列如SEQ ID NO:2所示的酮基还原酶突变体。
2. 编码权利要求1所述酮基还原酶突变体的基因。
3. 表达载体,其特征在於,含有权利要求2所述的基因。
4. 一种菌株,其特征在於,包含有权利要求3所述的表达载体。
5. 根据权利要求4所述的菌株,其特征在於,所述菌株为大肠杆菌。
6. 酮基还原酶突变体的生产方法,其特征在於,步骤包括:以权利要求4所述菌株进行培养,收集培养物得到酮基还原酶突变体。
7. 权利要求1所述酮基还原酶突变体在催化酮基还原反应中的应用。
8. 根据权利要求7所述的应用,其特征在於,所述催化酮基还原反应以奥卡西平为底物,进行还原反应制备得到艾司利卡西平。
9. 艾司利卡西平的制备方法,其特征在於,步骤包括:向奥卡西平溶液中加入葡萄糖、葡萄糖脱氢酶、还原性辅酶、助溶剂及权利要求1所述的酮基还原酶突变体进行混合,反应得到艾司利卡西平;所述奥卡西平溶液包括异丙醇溶剂及缓冲溶液。
10. 根据权利要求9所述的制备方法,其特征在於,所述奥卡西平的浓度为5-50g/L;  
和/或,所述酮基还原酶与奥卡西平的质量比为1:(10-100);  
和/或,所述葡萄糖与所述奥卡西平的质量比为1:(1-2);  
和/或,所述葡萄糖脱氢酶与所述奥卡西平的质量比为1:(10-1000);  
和/或,所述还原性辅酶与所述奥卡西平的质量比为1:(10-1000);  
和/或,所述奥卡西平溶液中异丙醇的体积百分比为5-50%;  
和/或,所述缓冲溶液为磷酸盐缓冲溶液,pH值为6.0-8.0;  
和/或,所述反应温度为20-40°C,pH为6.0-8.0;  
和/或,所述助溶剂包括DMSO、吐温60、吐温80和曲拉通X-100中的一种或多种;所述助溶剂体积用量与反应体系总体积之比为1:(10-100)。
11. 权利要求1所述酮基还原酶突变体的活性检测方法,其特征在於,步骤包括:
  - S1. 还原体系的构建:向奥卡西平溶液中加入缓冲溶液、NADPH及权利要求1所述酮基还原酶突变体;
  - S2. 酶活测定:根据不同浓度NADPH构建在340nm处吸光值的标准曲线,根据公式测算酮基还原酶酶活,公式如下:

$$\text{酮基还原酶液酶活} = \frac{K \times N \times V_0}{A \times V_1 \times C},$$

其中K为吸光值变化斜率,根据还原体系不同时间时在340nm处的吸光值构建曲线得到;A为标准曲线的斜率,N为酮基还原酶液稀释倍数,V<sub>0</sub>为还原反应体系的体积,V<sub>1</sub>为酮基还原酶液体积,C为酮基还原酶液配置浓度。

## 酮基还原酶突变体、编码基因、载体及应用

### 技术领域

[0001] 本发明涉及酶改造技术领域,具体为酮基还原酶突变体、编码基因、载体及应用。

### 背景技术

[0002] 醋酸艾司利卡西平是一种新型抗癫痫药物,是S-利卡西平醋酸酯前药,作用机理是通过阻断动作电位的传导,以抑制脑神经元的反复异常放电,控制癫痫发作。该药长期给药耐受性好,疗效和安全性较高。

[0003] 目前合成醋酸艾司利卡西平主要起始原料是奥卡西平,奥卡西平还原生成艾司利卡西平,后续酯化得到成品。

[0004] 艾司利卡西平的制备方法分为化学法和生物法,化学法合成艾司利卡西平反应过程中副反应多,且需要用到大量有机溶剂和贵重的化学催化剂,成本高且效率低,难以工业化生产。

[0005] 而生物法主要通过酶催化反应制备艾司利卡西平,相较于化学法,酶催化的反应具有高度专一、反应速度快、反应条件温和等优点。但是奥卡西平不易溶解,需用到有机溶剂,且现有的酮基还原酶有机溶剂耐受性差、活性低。因此,筛选改造获得有机溶剂耐受性好、催化活性高的突变体对艾司利卡西平的生产具有重要意义。

### 发明内容

[0006] 本发明提供了酮基还原酶突变体、编码基因、载体及应用,所述酮基还原酶突变体应用于酶催化制备艾司利卡西平能够解决有机溶剂耐受性差、活性低的缺陷,推广了酶催化制备艾司利卡西平的工业应用。

[0007] 有鉴于此,本发明的方案为:

[0008] 本发明的第一个方面,提出氨基酸序列如SEQ ID NO:2所示的酮基还原酶突变体。

[0009] 本发明的第二个方面,提出编码上述第一个方面所述酮基还原酶突变体的基因。

[0010] 本发明的第三个方面,提出表达载体,该表达载体含有第二个方面所述的基因。

[0011] 本发明的第四个方面,提出一种菌株,包含有第三个方面所述的表达载体。

[0012] 进一步地,所述菌株为大肠杆菌。

[0013] 本发明的第五个方面,提出酮基还原酶突变体的生产方法,步骤包括:以第四个方面所述菌株进行培养,收集培养物得到酮基还原酶突变体。

[0014] 本发明的第六个方面,提出第一个方面所述酮基还原酶突变体在催化酮基还原反应中的应用。

[0015] 进一步地,所述催化酮基还原反应以奥卡西平为底物,进行还原反应制备得到艾司利卡西平。

[0016] 本发明的第七个方面,提出艾司利卡西平的制备方法,步骤包括:向奥卡西平溶液中加入葡萄糖、葡萄糖脱氢酶、还原性辅酶、助溶剂及第一个方面所述的酮基还原酶突变体进行混合,反应得到艾司利卡西平;所述奥卡西平溶液包括异丙醇溶剂及缓冲溶液。

[0017] 进一步地,所述奥卡西平的浓度为5-50g/L;例如5g/L、10g/L、15g/L、20g/L、25g/L、30g/L、35g/L、40g/L、45g/L或50g/L,优选为10g/L。

[0018] 进一步地,所述酮基还原酶与奥卡西平的质量比为1:(10-100);优选为1:20。

[0019] 进一步地,所述葡萄糖与所述奥卡西平的质量比为1:(1-2);优选为1:1.5。

[0020] 进一步地,所述葡萄糖脱氢酶与所述奥卡西平的质量比为1:(10-1000);优选为1:100。

[0021] 进一步地,所述还原性辅酶优选为还原型辅酶Ⅱ,与所述奥卡西平的质量比为1:(10-1000),优选为1:200。

[0022] 进一步地,所述奥卡西平溶液中异丙醇的体积百分比为5-50%;优选为5-20%,例如5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、20%;更优选10%。

[0023] 进一步地,所述缓冲溶液为磷酸盐缓冲溶液,pH值为6.0-8.0;优选pH值为7.0。

[0024] 进一步地,所述反应温度为20-40℃,反应时间18-24h;反应体系pH为6.0-8.0,优选pH值为7.0。

[0025] 进一步地,所述助溶剂包括DMSO、吐温60、吐温80和曲拉通X-100中的一种或多种;所述助溶剂体积用量与反应体系总体积之比为1:(10-100),优选为1:20。

[0026] 本发明第八个方面,还提供酮基还原酶突变体的活性检测方法,步骤包括:

[0027] S1.还原体系的构建:向奥卡西平溶液中加入缓冲溶液、NADPH及酮基还原酶;酮基还原酶可以为野生型,或任意突变改造得到的酮基还原酶突变体,优选第一个方面的酮基还原酶突变体;

[0028] S2.酶活测定:根据不同浓度NADPH构建在340nm处吸光值的标准曲线,根据公式测算酮基还原酶酶活,公式如下:

[0029] 
$$\text{酮基还原酶液酶活} = \frac{K \times N \times V_0}{A \times V_1 \times C},$$
 其中K为吸光值变化斜率,根据还原体系不同时间时在340nm处的吸光值构建曲线得到;A为标准曲线的斜率,N为酮基还原酶液稀释倍数,V0为还原反应体系的体积,V1为酮基还原酶液体积,C为酮基还原酶液配置浓度。

同时时间时在340nm处的吸光值构建曲线得到;A为标准曲线的斜率,N为酮基还原酶液稀释倍数,V0为还原反应体系的体积,V1为酮基还原酶液体积,C为酮基还原酶液配置浓度。

[0030] 与现有技术相比,本发明具备以下有益效果:

[0031] 本发明所述酮基还原酶突变体催化活性高,有机溶剂耐受性强,应用于酶催化制备艾司利卡西平能够提高生产效率,推广了酶催化制备艾司利卡西平的工业应用。

## 具体实施方式

[0032] 下面将结合优选的实施例对本发明的技术方案进行清楚、完整地描述,显然,所描述的实施例仅仅是本发明一部分实施例,而不是全部的实施例。基于本发明中的实施例,本领域普通技术人员在没有做出创造性劳动前提下所获得的所有其他实施例,都属于本发明保护的范围。

[0033] 下述实施例中所用的材料、试剂等,如无特殊说明,均可从商业途径得到。

[0034] 实施例1酮基还原酶基因KRED\_Lb合成

[0035] KRED\_Lb酮基还原酶基因(来源于Lactobacillus\_bifermentans)通过基因合成手段合成(武汉擎科生物技术有限公司合成),相关核苷酸序列和氨基酸序列如下:

- [0036] SEQ ID NO:1
- [0037] MSHRLDGKVAIVTGGTFGIGFAIAQKFVAEGAKVVITGRHADVGEAA
- [0038] AQKIGGPDVIRYIKHDASDEAGWTALFDEAEKSYGPVSTLVNNAGVGWTA
- [0039] SIEDTTTEMWHDLLAINLDGVFYGTRLAIQRMKNKHLGASIIINMSSIEGFIG
- [0040] DPNLGAYNASKGAVRLMSKSAAVDCALKDYGVRVNTVHPGYIKTPLVDKI
- [0041] PGAEAQMSDRKTPMGHLGEPDDIAWICVYLASNESKFATGSEFVVDGGY
- [0042] TAQ
- [0043] 核苷酸序列如序列表SEQ ID NO:2所示。
- [0044] 实施例2酮基还原酶基因KRED\_Lb突变体的构建
- [0045] 基于KRED\_Lb,通过稳定性预测软件计算底物结合口袋位点上残基的虚拟饱和突变的结合自由能,找到可能会影响KRED\_Lb结构和功能的关键位点,改造的酮基还原酶突变体KRED\_Lb\_1~KRED\_Lb\_10如表1所示。
- [0046] 表1:酮基还原酶突变体序列

[0047]

突变位点 (突变体)	氨基酸序列	氨基酸序 列编号 SEQ ID NO	核苷酸序 列编号 SEQ ID NO
E45Y (KRED_Lb_1)	MSHRLDGKVAIVTGGTFGIGFAIAQKFVAEGAKV VITGRHADVGAAAQKIGGPDVIRYIKHDASDEA GWTALFDEAEKSYGPVSTLVNNAGVGWTASIED TTTEMWHDLLAINLDGVFYGTRLAIQRMKNKHL GASIIINMSSIEGFIGDPNLGAYNASKGAVRLMSKS AAVDCALKDYGVRVNTVHPGYIKTPLVDKIPGA EAQMSDRTKTPMGHLGEPDDIAWICVYLASNES KFATGSEFVVDGGYTAQ	3	13
G154A (KRED_Lb_2)	MSHRLDGKVAIVTGGTFGIGFAIAQKFVAEGAKVVITGRHA DVGEAAAQKIGGPDVIRYIKHDASDEAGWTALFDEAEKSYG PVSTLVNNAGVGWTASIEDTTTEMWHDLLAINLDGVFYGT RLAIQRMKNKHLGASIIINMSSIEGFIGDPNLAAYNASKGAVR LMSKSAAVDCALKDYGVRVNTVHPGYIKTPLVDKIPGA EAQMSDRTKTPMGHLGEPDDIAWICVYLASNESKFATGSEFVVD GGYTAQ	4	14
K198Q (KRED_Lb_3)	MSHRLDGKVAIVTGGTFGIGFAIAQKFVAEGAKVVITGRHA DVGEAAAQKIGGPDVIRYIKHDASDEAGWTALFDEAEKSYG PVSTLVNNAGVGWTASIEDTTTEMWHDLLAINLDGVFYGT RLAIQRMKNKHLGASIIINMSSIEGFIGDPNLGAYNASKGAVR LMSKSAAVDCALKDYGVRVNTVHPGYIKTPLVDQIPGA EAQMSDRTKTPMGHLGEPDDIAWICVYLASNESKFATGSEFVVD GGYTAQ	5	15
Q205I (KRED_Lb_4)	MSHRLDGKVAIVTGGTFGIGFAIAQKFVAEGAKV VITGRHADVGAAAQKIGGPDVIRYIKHDASDEA GWTALFDEAEKSYGPVSTLVNNAGVGWTASIED TTTEMWHDLLAINLDGVFYGTRLAIQRMKNKHL GASIIINMSSIEGFIGDPNLGAYNASKGAVRLMSKS AAVDCALKDYGVRVNTVHPGYIKTPLVDKIPGA EAIMSDRTKTPMGHLGEPDDIAWICVYLASNESK FATGSEFVVDGGYTAQ	6	16
T210E (KRED_Lb_5)	MSHRLDGKVAIVTGGTFGIGFAIAQKFVAEGAKV VITGRHADVGAAAQKIGGPDVIRYIKHDASDEA GWTALFDEAEKSYGPVSTLVNNAGVGWTASIED TTTEMWHDLLAINLDGVFYGTRLAIQRMKNKHL GASIIINMSSIEGFIGDPNLGAYNASKGAVRLMSKS AAVDCALKDYGVRVNTVHPGYIKTPLVDKIPGA EAQMSDREKTPMGHLGEPDDIAWICVYLASNES KFATGSEFVVDGGYTAQ	7	17
T212F (KRED_Lb_6)	MSHRLDGKVAIVTGGTFGIGFAIAQKFVAEGAKVVITGRHA DVGEAAAQKIGGPDVIRYIKHDASDEAGWTALFDEAEKSYG PVSTLVNNAGVGWTASIEDTTTEMWHDLLAINLDGVFYGT RLAIQRMKNKHLGASIIINMSSIEGFIGDPNLGAYNASKGAVR LMSKSAAVDCALKDYGVRVNTVHPGYIKTPLVDKIPGA EAQMSDRTKTPMGHLGEPDDIAWICVYLASNESKFATGSEFVVD GGYTAQ	8	18

[0048]

K236I (KRED_Lb_7)	MSHRLDGKVAIVTGGTFGIGFAIAQKFVAEGAKVVITGRHADVGEAAAQKIGGPDVIRYIKHDASDEAGWTALFDEAEKSYG PVSTLVNNAGVGWTSIEDTTTEMWHDLLAINLDGVFYGT RLAIQRMKNKHLGASIINMSSIEGFIDPNLGAYNASKGAVR LMSKSAAVDCALKDYGVRVNTVHPGYIKTPLVDKIPGAEAQ MSDRTKTPMGHLGEPDDIAWICVYLASNESIFATGSEFVVD GGYTAQ	9	19
T103L (KRED_Lb_8)	MSHRLDGKVAIVTGGTFGIGFAIAQKFVAEGAKVVITGRHADVGEAAAQKIGGPDVIRYIKHDASDEAGWTALFDEAEKSYG PVSTLVNNAGVGWTSIEDTLTEMWHDLLAINLDGVFYGT RLAIQRMKNKHLGASIINMSSIEGFIDPNLGAYNASKGAVRLMSKS AAVDCALKDYGVRVNTVHPGYIKTPLVDKIPGA EAQMSDRTKTPMGHLGEPDDIAWICVYLASNES KFATGSEFVVDGGYTAQ	10	20
T104P (KRED_Lb_9)	MSHRLDGKVAIVTGGTFGIGFAIAQKFVAEGAKVVITGRHADVGEAAAQKIGGPDVIRYIKHDASDEAGWTALFDEAEKSYG PVSTLVNNAGVGWTSIEDTTPEMWHDLAINLDGVFYGT RLAIQRMKNKHLGASIINMSSIEGFIDPNLGAYNASKGAVRLMSKS AAVDCALKDYGVRVNTVHPGYIKTPLVDKIPGA EAQMSDRTKTPMGHLGEPDDIAWICVYLASNES KFATGSEFVVDGGYTAQ	11	21
A97K (KRED_Lb_10)	MSHRLDGKVAIVTGGTFGIGFAIAQKFVAEGAKVVITGRHADVGEAAAQKIGGPDVIRYIKHDASDEAGWTALFDEAEKSYG PVSTLVNNAGVGWTSIEDTTTEMWHDLLAINLDGVFYGT RLAIQRMKNKHLGASIINMSSIEGFIDPNLGAYNASKGAVR LMSKSAAVDCALKDYGVRVNTVHPGYIKTPLVDKIPGAEAQ MSDRTKTPMGHLGEPDDIAWICVYLASNESKFATGSEFVVD GGYTAQ	12	22

[0049] 对应编码上述酮基还原酶突变体KRED\_Lb\_1 ~ KRED\_Lb\_10的核苷酸序列如SEQ ID NO:13 ~ 22所示。

[0050] 基于突变位点设计的上、下游引物如表2所示。

[0051] 表2:突变位点上、下游引物

[0052]

位点	引物	SEQ ID NO
E45Y-F (KRED_Lb_1)	GTAGGTTACGCCGCTGCTCAGAAA	23
E45Y-R (KRED_Lb_1)	GCGGCGTAACCTACATCCGCATGACGA	24
G154A-F (KRED_Lb_2)	CTAACCTGGCTGCTTACAACGCAT	25
G154A-R (KRED_Lb_2)	GTAAGCAGCCAGGTTAGGATCACCGA	26
K198Q-F (KRED_Lb_3)	GTGGATCAGATCCCGGGTGC	27

[0053]

K198Q-R (KRED_Lb_3)	CGGGATCTGATCCACCAGCGGGGT	28
Q205I-F (KRED_Lb_4)	GAAGCGATCATGTCTGATCGCA	29
Q205I-R (KRED_Lb_4)	CAGACATGATCGCTTCTGCA	30
T210E-F (KRED_Lb_5)	CTGATCGCGAAAAAACTCCTATGGGT	31
T210E-R (KRED_Lb_5)	GGAGTTTTTTTCGCGATCAGACATCT	32
T212F-F (KRED_Lb_6)	CACCAAATTCCCTATGGGTCACCT	33
T212F-R (KRED_Lb_6)	CCCATAGGGAATTTGGTGCGATCA	34
K236I-F (KRED_Lb_7)	CGAATCCATCTTCGCGACCGGCT	35
K236I-R (KRED_Lb_7)	CGCGAAGATGGATTCGTTAGA	36
T103L-F (KRED_Lb_8)	GACACCCTGACCGAAATGTGGCAT	37
T103L-R (KRED_Lb_8)	CATTTCGGTCAGGGTGTCTTCGAT	38
T104P-F (KRED_Lb_9)	CACCACCCCGGAAATGTGGCAT	39
T104P-R (KRED_Lb_9)	CATTTCGGGGTGGTGTCTT	40
A97K-F (KRED_Lb_10)	GTTGGACGAAAAGCATCGAAGA	41
A97K-R (KRED_Lb_10)	GATGCTTTTCGTCCAACCTACACCA	42

[0054] 以KRED\_Lb模板,以表中的上下游引物的进行PCR反应,反应程序如下:

[0055] (1) 预变性:98℃,2:00;

[0056] (2) 变性:95℃,0:20;

[0057] (3) 退火:55℃,0:20;

[0058] (4) 延伸:72℃,0:10;

[0059] (5) 循环:GOTO step 2,25×;

[0060] (6) 补齐延伸:72℃,5:00;

[0061] (7) 保存:4℃,∞。

[0062] PCR反应结束后,取少量PCR产物用1%琼脂糖凝胶电泳检测。检测结果显示PCR扩增产物为单一条带且bp数正确,将剩余的PCR产物回收纯化并使用DpnI处理以切除模板DNA。

[0063] 将构建好的KRED\_Lb突变体转入大肠杆菌BL21 (DE3) 感受态细胞中,涂布于含有50 μg/mL浓度卡那霉素抗性的LB固体选择培养基(配方:1%胰蛋白胨,0.5%酵母提取物,1%氯化钠,1.5%琼脂)平板上。



[0064] 在LB固体选择培养基平板上挑取转化子于LB液体培养基(配方:1%胰蛋白胨,0.5%酵母提取物,1%氯化钠)中,在32℃条件下培养16h后的菌液进行PCR鉴定及测序验证,测序结果正确的菌液用甘油冷冻管保藏,用于后续异源表达。

[0065] 实施例3酮基还原酶基因KRED\_Lb及其突变体在大肠杆菌BL21(DE3)中的异源表达

[0066] 将合成的含酮基还原酶基因KRED\_Lb的表达质粒pET-26b-KRED\_Lb转入大肠杆菌BL21(DE3)感受态细胞中,涂布于含有50μg/mL浓度卡那霉素抗性的LB固体选择培养基平板上。

[0067] 在LB固体选择培养基平板上挑取转化子BL21(DE3)-pET-26b-KRED\_Lb,于LB液体培养基中制备种子液(37℃,220rpm,16h),菌液以0.5mL的接种量转接于含50mL LB液体培养基的250mL锥形瓶中,在37℃,220rpm条件下振荡培养至菌液OD<sub>600</sub>=0.6-0.8,加入0.5mM IPTG,在18℃条件下诱导20h,取出诱导后的菌液,在8000g,4℃条件下离心15min,弃上清液,并加入0.1M PBS(pH7.0)缓冲液洗涤并重悬,然后进行超声波破碎,得到澄清透亮的全细胞裂解液,于12000rpm,4℃离心得到的上清液即为酮基还原酶粗酶液。酮基还原酶突变体的粗酶液按相同的方法获得。

[0068] 实施例4酶活方法的建立与标准曲线

[0069] 200μL反应体系由以下组分组成:165μL PBS(100mM,pH=6.0)、10μL奥卡西平溶液(2.5mg/mL,溶于DMSO)、15μL NADPH(4mM)和10μL稀释后的酮基还原酶酶液。

[0070] 在30℃条件下,测定3min内340nm处吸光值的变化,利用Excel做标准曲线计算 $y = Kx + b$ ,y为吸光值A<sub>340</sub>,x为时间(min),计算3min内吸光值变化斜率K,即可测算酮基还原酶酶活,酮基还原酶酶活计算公式如下:

[0071] 酶液酶活  $(U/mg) = \frac{K \times N \times V_0}{A \times V_1 \times C}$ , 其中K为吸光值变化斜率,A为标曲斜率,N为酶

液稀释倍数,V<sub>0</sub>为反应体积(本方法中为200μL),V<sub>1</sub>为酶液体积(本方法中为10μL),C为酶液配置浓度(蛋白浓度)。蛋白浓度由考马斯亮蓝法测定。

[0072] 标准曲线制作方法如下:用100mM pH 7.0PBS稀释2mM NADPH储液至终浓度0.1mM、0.2mM、0.5mM、0.8mM、1mM,分别测定340nm处吸光值(用去离子水标注零点),利用Excel做标准曲线 $y = Ax + b$ ,y为吸光值A<sub>340</sub>,x为NADPH浓度(mM),A即为标曲斜率。

[0073] 实施例5酮基还原酶基因KRED\_Lb及其突变体的酶活测定

[0074] 基于实施例1~3的方法,合成、构建并表达了KRED\_Lb及其突变体,获得KRED\_Lb、KRED\_Lb\_1、KRED\_Lb\_2、KRED\_Lb\_3、KRED\_Lb\_4、KRED\_Lb\_5、KRED\_Lb\_6、KRED\_Lb\_7、KRED\_Lb\_8、KRED\_Lb\_9、KRED\_Lb\_10的粗酶液。

[0075] 基于实施例4中酮基还原酶酶活的检测方法进行酶活检测,结果如表2。从表2可以看出,比野生型酶活高的突变体有5个,包括KRED\_Lb\_1(191%),KRED\_Lb\_2(274%),KRED\_Lb\_3(139%),KRED\_Lb\_4(151%),KRED\_Lb\_6(103%),其中突变体KRED\_Lb\_2的相对酶活最高,为野生型AKRED\_Lb的2.74倍。

[0076] 表2KRED突变体酶活结果

[0077]

突变体	蛋白浓度(mg)	酶活(U/mg)
KRED_Lb	5.15	0.67

KRED_Lb_1	2.29	1.28
KRED_Lb_2	2.38	1.84
KRED_Lb_3	2.20	0.93
KRED_Lb_4	4.09	1.01
KRED_Lb_5	5.05	0.32
KRED_Lb_6	3.53	0.69
KRED_Lb_7	4.45	0.53
KRED_Lb_8	3.4	0.13
KRED_Lb_9	2.68	0.34
KRED_Lb_10	4.89	0.14

[0078] 实施例6酮基还原酶基因KRED\_Lb及其突变体的有机溶剂耐受性测定

[0079] 基于实施例1~3的方法,合成、构建并表达了KRED\_Lb及KRED\_Lb\_2,获得KRED\_Lb和KRED\_Lb\_2的粗酶液,在粗酶液中添加浓度为5%、10%、15%、20%的异丙醇,在30℃条件下孵育2h。根据实施例4中酮基还原酶酶活的检测方法进行酶活检测,结果如表3。从表3可以看出,KRED\_Lb\_2异丙醇耐受性远优于野生型KRED\_Lb,野生型在10%异丙醇中孵育2h后失去了活性,而KRED\_Lb\_2在20%异丙醇中孵育2h仍还有活性。

[0080] 表3突变体酶活结果

[0081]	突变体	有机溶剂	浓度	酶活（U/mg）
	KRED_ <i>Lb</i>	异丙醇	5 %	0.52
			10 %	0
			15 %	0
			20 %	0
	KRED_ <i>Lb</i> _2		5 %	1.49
			10 %	1.13
			15 %	0.69
20 %			0.24	

[0082] 制备例1

[0083] 250mL反应瓶中加入1.5g奥卡西平、2.25g葡萄糖、15mL异丙醇和7.5mL曲拉通X-100,用0.1M的PBS (pH 7.0) 补充体积至150mL,随后用1MNaOH和1M HCl调节pH至7.0,置于30℃水浴锅中,搅拌30min后加入15mg葡萄糖脱氢酶、7.5mg烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸(辅脱氢酶II)和150mg酮基还原酶(由KRED\_Lb\_2在大肠杆菌BL21 (DE3) 中表达获得),反应20h后,HPLC测定转化率为98.2%,将反应液在60℃条件下进行旋蒸,旋干反应液中的异丙醇,然后抽滤回收滤饼,进行水打浆(20V底物比例的水,30mL) 1h,抽滤,收集物料,置于60℃烘箱干燥,干燥至恒重,得到艾司利卡西平成品,纯度98.9%,收率86.3%。

[0084] 制备例2

[0085] 250mL反应瓶中加入1g奥卡西平、1.5g葡萄糖、10mL异丙醇和2mL吐温60,用0.1M的PBS (pH 7.0) 补充体积至150mL,随后用1M NaOH和1M HCl调节pH至7.0,置于30℃水浴锅中,

搅拌30min后加入10mg葡萄糖脱氢酶、5.0mg烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸(辅脱氢酶 II)和100mg酮基还原酶(由KRED\_Lb\_2在大肠杆菌BL21(DE3)中表达获得),反应18h后,HPLC测定转化率为99.1%,将反应液在60℃条件下进行旋蒸,旋干反应液中的异丙醇,然后抽滤回收滤饼,进行水打浆(20V底物比例的水,30mL)1h,抽滤,收集物料,置于60℃烘箱干燥,干燥至恒重,得到艾司利卡西平成品,纯度99.3%,收率88.2%。

[0086] 制备例3

[0087] 250mL反应瓶中加入2.0g奥卡西平、3.0g葡萄糖、22.5mL异丙醇和10mL吐温80,用0.1M的PBS(pH7.0)补充体积至150mL,随后用1M NaOH和1M HCl调节pH至7.0,置于30℃水浴锅中,搅拌30min后加入20mg葡萄糖脱氢酶、10.0mg烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸(辅脱氢酶 II)和200mg酮基还原酶(由KRED\_Lb\_2在大肠杆菌BL21(DE3)中表达获得),反应24h后,HPLC测定转化率为98.0%,将反应液在60℃条件下进行旋蒸,旋干反应液中的异丙醇,然后抽滤回收滤饼,进行水打浆(20V底物比例的水,30mL)1h,抽滤,收集物料,置于60℃烘箱干燥,干燥至恒重,得到艾司利卡西平成品,纯度98.3%,收率86.1%。

[0088] 由表3可知,在异丙醇浓度5%时突变体KRED\_Lb\_2酶活最高,制备例2异丙醇使用量相对较低的情况下,反应时间相对减少且转化率提高;制备例1、制备例3中异丙醇使用浓度为10%、15%,相对而言其反应时间延长,均与表3中验证的酶活的性质对应一致。

[0089] 尽管已经示出和描述了本发明的实施例,对于本领域的普通技术人员而言,可以理解在不脱离本发明的原理和精神的情况下可以对这些实施例进行多种变化、修改、替换和变型,本发明的范围由所附权利要求及其等同物限定。