



(12) 发明专利申请



(10) 申请公布号 CN 115851565 A

(43) 申请公布日 2023. 03. 28

(21) 申请号 202211352442.3

C12R 1/19 (2006.01)

(22) 申请日 2022.10.31

(71) 申请人 湖北葛店人福药业有限责任公司

地址 436032 湖北省鄂州市葛店经济技术
开发区聚贤路25号

(72) 发明人 汪声晨 何鑫 陈海林 杨艳青
郑承刚

(74) 专利代理机构 上海弼兴律师事务所 31283
专利代理师 陈卓

(51) Int. Cl.

C12N 1/21 (2006.01)

C12N 15/53 (2006.01)

C12N 9/04 (2006.01)

C12N 15/70 (2006.01)

C12P 33/08 (2006.01)

权利要求书2页 说明书4页
序列表 (电子公布)

(54) 发明名称

一种表达11 β -HSD1酶突变体的大肠杆菌基
因工程菌及其应用

(57) 摘要

本发明公开了一种表达11 β -HSD1酶突变体的大肠杆菌基因工程菌及其应用。其中,所述11 β -HSD1酶突变体的核苷酸序列如SEQ ID NO:2所示。本发明公开了一种利用11 β -HSD1酶突变体制备醋酸氢化可的松的方法。本发明通过定向进化得到11 β -HSD1酶突变体,用于制备醋酸氢化可的松时活性好,产物产量较高,达到88.2%。

1. 一种基于大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 的基因工程菌, 其特征在于, 所述的基因工程菌包含表达编码11 β -HSD1酶突变体的基因, 所述基因的核苷酸序列如SEQ ID NO:2所示。

2. 如权利要求1所述的基因工程菌, 其特征在于, 所述基因位于重组表达载体中; 优选地, 制备所述重组表达载体所用的骨架质粒为pRSFDuet1。

3. 如权利要求1所述的基因工程菌, 其特征在于, 所述基因工程菌的宿主细胞为大肠杆菌BL21。

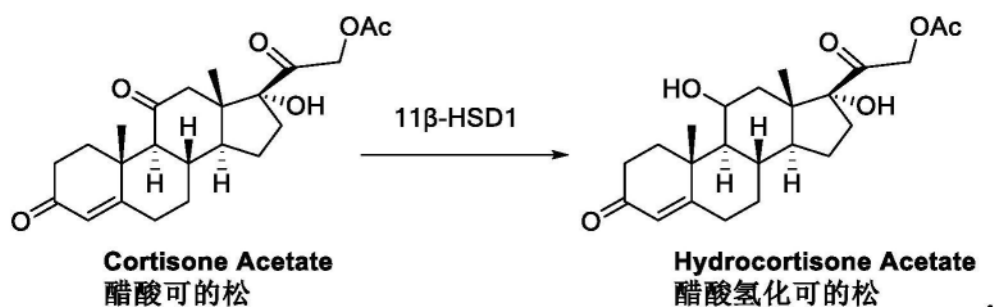
4. 一种生产11 β -HSD1酶突变体的方法, 其特征在于, 通过培养如权利要求1-3任一项所述的基因工程菌, 使其发酵, 即得所述11 β -HSD1酶突变体。

5. 如权利要求4所述的生产11 β -HSD1酶突变体的方法, 其特征在于, 所述发酵包括如下条件中的一种或多种:

- (1) 培养基为2 \times YT固体选择培养基;
- (2) 加入种子液的浓度为1%;
- (3) 发酵条件为37 $^{\circ}$ C, 200rpm振荡培养0.5~2天;

较佳地, 所述11 β -HSD1酶突变体存在于基因工程菌悬浊液中, 所述基因工程菌悬浊液的制备优选包括以下步骤: 离心收集所述基因工程菌, 洗涤后重悬于PBS缓冲液中; 更佳地, 所述PBS缓冲液的浓度为0.1M。

6. 一种醋酸氢化可的松的制备方法, 其特征在于, 其包括如下步骤: 在如权利要求4或5所述的方法生产的11 β -HSD1酶突变体的存在下, 将醋酸可的松进行如下所示的还原反应:



即得所述醋酸氢化可的松。

7. 如权利要求6所述的醋酸氢化可的松的制备方法, 其特征在于, 所述的还原反应还包括溶剂; 优选地, 所述溶剂为PBS缓冲液; 更优选地, 所述PBS缓冲液的浓度为0.1M;

所述醋酸可的松与所述溶剂的质量体积比为150~800mg/L, 例如150mg/L、300mg/L、600mg/L或800mg/L, 优选为150mg/L;

和/或, 所述还原反应的时间为1~2天;

和/或, 所述还原反应以振荡方式进行; 优选地, 所述振荡的频率为200rpm;

和/或, 所述还原反应结束后, 还包括继续进行萃取的步骤。

8. 如权利要求7所述的醋酸氢化可的松的制备方法, 其特征在于, 所述的萃取包括以下步骤中的一种或多种: 在反应液中加入萃取剂、取有机层、离心和干燥;

所述萃取剂与所述反应液的体积比为1:1;

和/或, 所述萃取剂为醇类溶剂和/或含氯有机溶剂, 优选为醇类溶剂和含氯有机溶剂的混合溶剂。

9. 如权利要求8所述的醋酸氢化可的松的制备方法, 其特征在于, 所述醇类溶剂为甲

醇;所述含氯有机溶剂为氯仿;

和/或,所述醇类溶剂与所述含氯有机溶剂的体积比为1:9。

10.一种如权利要求1-3任一项所述的基因工程菌在制备醋酸氢化可的松中的应用。

一种表达11 β -HSD1酶突变体的大肠杆菌基因工程菌及其应用

技术领域

[0001] 本发明涉及化学物质和生物转化领域,具体涉及一种表达11 β -HSD1酶突变体的大肠杆菌基因工程菌、利用其制备醋酸氢化可的松的方法以及所述基因工程菌的应用。

背景技术

[0002] 11 β -HSD1为11 β -羟基类固醇脱氢酶1型,也称为可的松还原酶,是可的松转化为功能性糖皮质激素皮质醇的关键酶。这种激活与几种人类疾病有关,尤其是代谢综合征,其中11 β -HSD1已被确定为潜在治疗药物的新靶点。

[0003] 根据文献报道,目前合成可的松系列甾体药物(氢化可的松、醋酸氢化可的松、泼尼松龙等)的方法有:全化学合成法、半合成法及全生物合成的方法。但是全化学合成法工艺复杂,总收率低,而无工业生产价值;全生物合成法也因为合成途径复杂,产物得率较低也并没有实现工业化生产。因此半合成法成为国内外合成可的松系列甾体药物的主流方法。

[0004] 本发明挖掘得到一种11 β -HSD1酶突变体可用于醋酸氢化可的松的合成。

发明内容

[0005] 本发明所要解决的技术问题是工业化生产醋酸氢化可的松时工艺复杂或总收率低。为此,本发明提供了一种表达11 β -HSD1酶突变体的大肠杆菌基因工程菌、利用其制备醋酸氢化可的松的方法以及所述基因工程菌的应用。本发明通过定向进化得到11 β -HSD1酶突变体,用于制备醋酸氢化可的松时活性好,产物产量较高,达到88.2%。

[0006] 本发明第一方面提供了一种基于大肠杆菌(*Escherichia coli*)的基因工程菌,其中,所述的基因工程菌包含表达编码11 β -HSD1酶突变体的基因,所述基因的核苷酸序列如SEQ ID NO:2所示。

[0007] 在某一方案中,所述基因位于重组表达载体中;优选地,制备所述重组表达载体所用的骨架质粒为pRSFDuet1。

[0008] 在某一方案中,所述基因工程菌的宿主细胞优选为大肠杆菌BL21。

[0009] 在本发明的某一方面中,还包括构建所述基因工程菌的方法。

[0010] 所述的方法包括如下步骤:将合成的含11 β -HSD1酶突变体基因的重组表达载体,通过转化例如化学转化的方法(例如氯化钙法)转入宿主细胞例如大肠杆菌BL21,即可。

[0011] 所述的方法中,培养所述基因工程菌的条件优选为:37℃,培养36h以上。

[0012] 本发明第二方面提供了一种生产11 β -HSD1酶突变体的方法,其中,通过培养如本发明第一方面所述的基因工程菌,使其发酵,即得所述11 β -HSD1酶突变体。

[0013] 在某一方案中,所述发酵包括如下条件的一种或多种:

[0014] (1) 培养基为2 \times YT固体选择培养基;

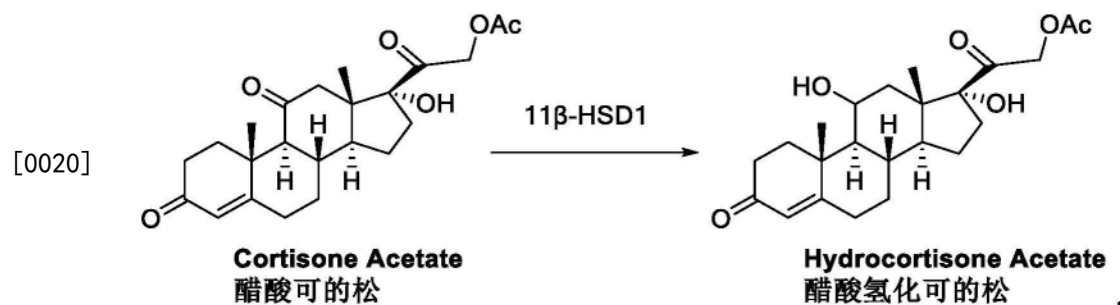
[0015] (2) 加入种子液的浓度为1%;

[0016] (3) 发酵条件为37℃,200rpm振荡培养0.5~2天;

[0017] 较佳地,所述11 β -HSD1酶突变体存在于基因工程菌悬浊液中,所述基因工程菌悬浊液的制备优选包括以下步骤:离心收集所述基因工程菌,洗涤后重悬于PBS缓冲液中;更佳地,所述PBS缓冲液的浓度为0.1M。

[0018] 其中,所述的2 \times YT固体选择培养基的配方为16g/L蛋白胨,10g/L酵母粉,5g/L氯化钠,20g/L琼脂;所述的2 \times YT液体选择培养基的配方为16g/L蛋白胨,10g/L酵母粉,5g/L氯化钠。

[0019] 本发明第三方面提供了一种醋酸氢化可的松的制备方法,其包括如下步骤:在本发明第二方面生产的11 β -HSD1酶突变体存在下,将醋酸可的松进行如下所示的还原反应:



[0021] 即得所述醋酸氢化可的松。

[0022] 所述的还原反应还包括溶剂。

[0023] 所述的溶剂可以为常规溶剂,优选为PBS缓冲液。所述PBS缓冲液的浓度优选为0.1M。

[0024] 所述的醋酸可的松与所述的溶剂的质量体积比可以为150~800mg/L,例如150mg/L、300mg/L、600mg/L或800mg/L,优选为150mg/L。

[0025] 所述的还原反应的温度优选为37℃。

[0026] 所述的还原反应的进程可以采用本领域常规的方式进行监测(例如TLC、HPLC),一般以醋酸可的松消失或者不再反应作为反应的终点。所述的还原反应的时间优选为1~2天。

[0027] 所述的还原反应优选以振荡方式进行。所述的振荡的频率优选为200rpm。

[0028] 所述的还原反应所用的仪器优选为250mL三角瓶。

[0029] 所述的还原反应结束后,还包括继续进行萃取的步骤。

[0030] 所述的萃取包括以下步骤中的一种或多种:在反应液中加入萃取剂、取有机层、离心和干燥。

[0031] 所述的萃取剂和所述的反应液的体积比可为常规体积比,优选为1:1。

[0032] 所述的萃取剂为常规萃取溶剂,可以为醇类溶剂和/或含氯有机溶剂,优选为醇类溶剂和含氯有机溶剂的混合溶剂。

[0033] 所述的醇类溶剂优选为甲醇。所述的含氯有机溶剂优选为氯仿。

[0034] 所述的醇类溶剂和含氯有机溶剂的体积比优选为1:9。

[0035] 所述的产物萃取后,还进行如下操作:将萃取产物用有机溶剂复溶,离心取上清,过滤,进行HPLC检测。

[0036] 所述的复溶的有机溶剂可为本领域常规溶剂,优选为甲醇。所述的复溶的有机溶剂的体积优选为1mL。所述的过滤,优选为使用0.22 μ m孔径的有机滤膜过滤。

[0037] 所述的还原反应后,所述的产物萃取后,所述的HPLC检测的色谱柱优选为J-01-02Inertsil ODS-2HP 5 μ m,2.1*150mm (UP)。所述的HPLC检测的流动相为常规有机溶剂,优选为53%乙腈。所述的HPLC检测的检测波长优选为254nm。

[0038] 本发明第四方面提供了一种如本发明第一方面所述的基因工程菌在制备醋酸氢化可的松中的应用。

[0039] 在不违背本领域常识的基础上,上述各优选条件,可任意组合,即得本发明各较佳实例。

[0040] 本发明所用试剂和原料均市售可得。

[0041] 本发明的积极进步效果在于:本发明通过定向进化得到11 β -HSD1酶突变体,用于制备醋酸氢化可的松时活性好,产物产量较高。

具体实施方式

[0042] 下面通过实施例的方式进一步说明本发明,但并不因此将本发明限制在所述的实施例范围之中。下列实施例中未注明具体条件的实验方法,按照常规方法和条件,或按照商品说明书选择。

[0043] 实施例1:11 β -HSD1酶基因合成

[0044] 11 β -HSD1酶基因通过基因合成手段合成(南京金斯瑞公司合成),相关核苷酸序列和氨基酸序列如序列表所示。

[0045] 11 β -HSD1-HV278氨基酸序列(SEQ ID NO:1):

[0046] MNEEFRPEMLQGKKVIVTGASKGIGREMAHLAKMGAVVVVTARSKETLQKVVSHCLELGAASAHYIA GTMEDMTFAEQFVAQAGKLMGGLDMLILNHITNTSLNLFHDDIHHVRKSMEVNFLSYVVLTVAAALPMLKQSNQSIV VVSSLAGKVAYPMVAAYSASKFALDGGFFSSIRKEYSVSRVNVSITLCVLGLIDTETAMKAVSGIVHMQAAPKEECA LEIIKGGALRQEEVYYDSSLWTTLLIRNPCRKILEELYSTSYNMDRFINK*

[0047] 11 β -HSD1-HV278核苷酸序列(SEQ ID NO:2):

[0048] ATGAACGAGGAATTCAGACCAGAGATGCTCCAAGGAAAGAAAGTGATTGTCACAGGGGCCAGCAAAGGG ATCGGAAGAGAGATGGCTTATCATCTGGCGAAGATGGGAGCCCATGTGGTGGTGACAGCGAGGTCAAAAGAACTCT ACAGAAGGTGGTATCCCACTGCCTGGAGCTTGGAGCAGCCTCAGCACACTACATTGCTGGCACCATGGAAGACATGA CCTTCGCAGAGCAATTTGTTGCCAAGCAGGAAAGCTCATGGGAGGACTAGACATGCTCATTCTCAACCACATCACC AACACTTCTTTGAATCTTTTCATGATGATATTCACCATGTGCGCAAAAGCATGGAAGTCAACTTCCTCAGTTACGT GGTCTGACTGTAGCTGCCTTGCCCATGCTGAAGCAGAGCAATGGAAGCATTGTTGTCGTCTCCTCTCTGGCTGGGA AAGTGGCTTATCCAATGGTTGCTGCCTATTCTGCAAGCAAGTTTGCTTTGGATGGGTTCTTCTCCTCCATCAGAAAG GAATATTCAGTGTCCAGGGTCAATGTATCAATCACTCTCTGTGTTCTTGGCCTCATAGACACAGAAACAGCCATGAA GGCAGTTTCTGGGATAGTCCATATGCAAGCAGCTCCAAAGGAGGAATGTGCCCTGGAGATCATCAAAGGGGGAGCTC TGCGCCAAGAAGAAGTGATTATGACAGCTCACTCTGGACCACTTCTGATCAGAAATCCATGCAGGAAGATCCTG GAAGAACTCTACTCAACGAGCTATAATATGGACAGATTCATAAACAAGTAG

[0049] 实施例2:大肠杆菌工程菌HCA11的构建

[0050] 合成的含11 β -HSD1酶基因的表达式质粒pRSFDuet1-HCA11,通过化学转化的方法转入大肠杆菌BL21 (DE3),筛选培养的条件为:37 $^{\circ}$ C,培养36h以上。PCR鉴定出正确的阳性克隆,随机挑选五个克隆,分别命名为菌株HCA11-1、HCA11-2、HCA11-3、HCA11-4、HCA11-5。

[0051] 实施例3:大肠杆菌工程菌HCA11-1~HCA11-5催化合成醋酸氢化可的松

[0052] 摇瓶发酵细胞催化:在2×YT固体选择培养基(配方16g/L蛋白胨,10g/L酵母粉,5g/L氯化钠,20g/L琼脂)中活化HCA11-1~HCA11-5大肠杆菌菌株,于2×YT液体选择培养基(配方:16g/L蛋白胨,10g/L酵母粉,5g/L氯化钠)中制备种子液(37℃,200rpm,16h),以1mL的接种量分别接种于3瓶含100mL 2×YT液体培养基的500mL三角瓶中,37℃,200rpm振荡培养2天,4000-5000rpm离心5min,收集大肠杆菌细胞,并用PBS缓冲液洗涤最终重悬于含有30mL 0.1M浓度的PBS的250mL三角瓶中,加入终浓度分别为150mg/L的底物醋酸可的松(CA),进行催化反应,37℃,200rpm振荡培养1~2天。

[0053] 产物萃取:取5mL的催化反应液于分液漏斗中,加入等体积的萃取剂(甲醇:氯仿=1:9,体积比),取下层有机相4mL,装入10mL离心管中干燥,用1mL甲醇进行复溶,离心取上清过0.22μm孔径的有机滤膜,进行HPLC检测(色谱柱:J-01-02Inertsil ODS-2HP 5μm,2.1*150mm(UP);流动相:53%乙腈;检测波长:254nm),检测发现有醋酸氢化可的松产物生成,其中HCA11-1菌株进行细胞转化时,HCA产量最大为88.2%。

[0054] 实施例4:不同浓度底物条件下大肠杆菌工程菌HCA11催化合成醋酸氢化可的松的能力

[0055] 摇瓶发酵细胞催化:在2×YT固体选择培养基中活化HCA11-1大肠杆菌菌株,于2×YT液体选择培养基中制备种子液(37℃,200rpm,16h),以1mL的接种量接种于含100mL 2×YT液体培养基的500mL三角瓶中,37℃,200rpm振荡培养2天,4000-5000rpm离心5min,收集大肠杆菌细胞,并用PBS缓冲液洗涤最终重悬于含有30mL 0.1M浓度的PBS的250mL三角瓶中,加入终浓度分别为150mg/L、300mg/L、600mg/L、800mg/L的底物醋酸可的松(CA),进行催化反应,37℃,200rpm振荡培养1~2天。

[0056] 产物萃取:取5mL的催化反应液于分液漏斗中,加入等体积的萃取剂(甲醇:氯仿=1:9,体积比),取下层有机相4mL,装入10mL离心管中干燥,用1mL甲醇进行复溶,离心取上清过0.22μm孔径的有机滤膜,进行HPLC检测(色谱柱:J-01-02Inertsil ODS-2HP 5μm,2.1*150mm(UP);流动相:53%乙腈;检测波长:254nm),检测发现有醋酸氢化可的松产物生成,四种底物浓度条件下,HCA产量分别为87.6%、76.9%、64.1%、59.7%。