



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 116144615 A

(43) 申请公布日 2023. 05. 23

(21) 申请号 202310085247.7

(22) 申请日 2023.01.16

(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 刘明欣 何鑫 汪声晨 陈海林
杨艳青

(74) 专利代理机构 上海弼兴律师事务所 31283
专利代理师 黄益澍

(51) Int. Cl .
C12N 9/02 (2006.01)
C12N 15/53 (2006.01)
C12P 7/26 (2006.01)

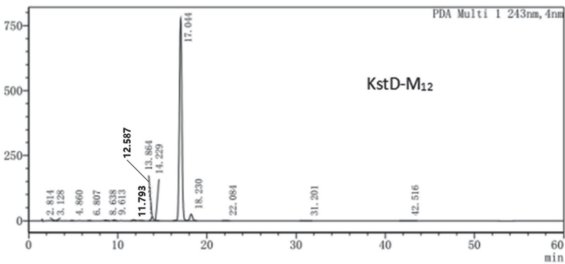
权利要求书1页 说明书8页
序列表（电子公布） 附图6页

(54) 发明名称

一种脱氢酶突变体及利用其制备甲泼尼龙
脱氢物的方法

(57) 摘要

本发明公开了一种脱氢酶突变体及利用其制备甲泼尼龙脱氢物的方法。所述脱氢酶的氨基酸序列如SEQ ID NO:2所示；所述脱氢酶突变体为在如SEQ ID NO:2所示的氨基酸序列上具有选自以下一个或多个位点的氨基酸残基的差异：第315位、第330位或第452-463位。利用所述脱氢酶突变体制备甲泼尼龙脱氢物的方法包括以下一种或多种步骤：将包含所述脱氢酶突变体的酶液或纯酶与甲泼尼龙格氏物混合；pH 7.5, 35℃中反应，并搅拌。本发明提供的方法具有反应体系简单，转化周期短，副反应少，成本低等优点。



1. 一种脱氢酶突变体, 其特征在于, 所述脱氢酶的氨基酸序列如SEQ ID NO:2所示; 所述脱氢酶突变体为在如SEQ ID NO:2所示的氨基酸序列上具有选自以下一个或多个位点的氨基酸残基的差异:

第315位、第330位或第452-463位。

2. 如权利要求1所述的脱氢酶突变体, 其特征在于, 所述脱氢酶突变体在如SEQ ID NO:2所示的氨基酸序列上具有选自以下一个或多个位点的氨基酸残基的差异:

所述第315位的氨基酸残基由F突变为A、G、V或S, 所述第330位的氨基酸序列残基由L突变为A、G、V或S, 和/或删去所述第452位-第463位的氨基酸残基。

3. 如权利要求1所述的脱氢酶突变体, 其特征在于, 所述脱氢酶突变体的氨基酸序列如SEQ ID NO:4或SEQ ID NO:5所示, 优选为SEQ ID NO:5。

4. 一种分离的核酸, 其中所述核酸编码如权利要求1-3中任一项所述的脱氢酶突变体。

5. 一种重组表达载体, 其中所述重组表达载体包含如权利要求4所述的核酸; 优选地, 所述重组表达载体的骨架质粒为pET26b(+)或pET28a(+)。

6. 一种转化体, 其中所述转化体包含如权利要求5所述的重组表达载体; 优选地, 所述转化体的底盘菌为大肠杆菌, 例如大肠杆菌BL21(DE3)。

7. 一种制备如权利要求1-3中任一项所述的脱氢酶突变体的方法, 其特征在于, 所述方法包括将所述转化体在适合的培养基中生长, 以产生所述脱氢酶突变体; 优选地, 所述方法包括:

(1) 将包含如权利要求6所述的转化体的种子液接种至LB液体培养基中, 37℃震荡培养;

(2) OD₆₀₀约为0.6-0.8时添加IPTG;

(3) 25℃震荡培养;

(4) 收集、破碎菌体;

(5) 收集上清液, 即得。

8. 如权利要求7所述的方法, 其特征在于, 所述方法中:

(1) 所述转化体的接种量为1%;

(2) 所述IPTG的终浓度为0.1~0.2mM;

(3) 震荡培养18-24小时;

(4) 离心收集菌体, 使用PBS重悬菌体, pH为7~7.5。

9. 一种制备甲泼尼龙脱氢物的方法, 其特征在于, 利用如权利要求1-3所述的脱氢酶突变体催化底物生成甲泼尼龙脱氢物; 优选地, 所述方法包括以下一种或多种步骤:

(1) 将包含所述脱氢酶突变体的酶液或纯酶与甲泼尼龙格氏物混合;

(2) pH 7.5, 35℃中反应, 并搅拌。

10. 如权利要求9所述的方法, 其特征在于, 所述方法包括加入助溶剂使甲泼尼龙格氏物增溶, 其中所述助溶剂选自DMSO、Triton-X100、吐温80和PEG-200中的一种或多种;

优选地, 所述助溶剂为Triton-X100和/或DMSO。

11. 如权利要求1-3中所述的脱氢酶突变体在制备甲泼尼龙脱氢物中的应用; 其中所述脱氢酶突变体序列为SEQ ID NO:4或SEQ ID NO:5, 优选为SEQ ID NO:5。

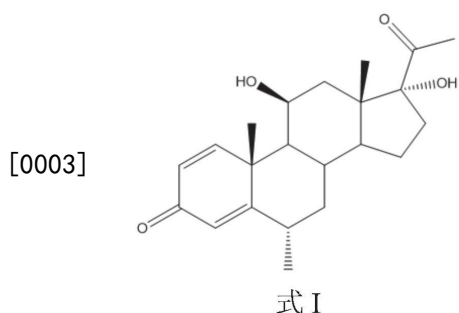
一种脱氢酶突变体及利用其制备甲泼尼龙脱氢物的方法

技术领域

[0001] 本发明属于生物工程领域,涉及一种脱氢酶突变体及利用其制备甲泼尼龙脱氢物的方法。

背景技术

[0002] 甲泼尼龙(如式I所示)是一种皮质激素类药物,具有较强的抗炎作用,其抗炎作用为可的松的7倍。用于危重疾病的急救,还可用于内分泌失调、风湿性疾病、胶原性病、皮肤疾病、过敏反应、眼科疾病、胃肠道疾病、血液疾病、白血病、休克、脑水肿、多发性神经炎、脊髓炎及防止癌症化疗引起的呕吐等。目前临床上主要用于脏器移植。

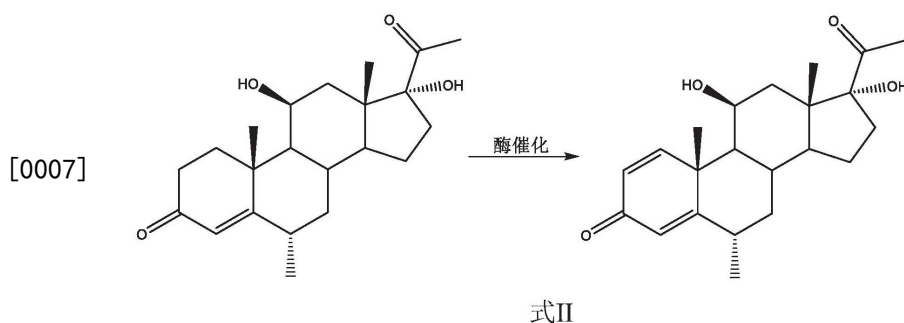


[0004] 以往的甾体C1,2脱氢化学生产是采用 SeO_2 脱氢,但是 SeO_2 是剧毒物质,且转化率很低。后来逐渐被生物法所代替,如利用简单节杆菌、分枝杆菌及简单诺卡氏菌等,利用细胞发酵进行C1,2位脱氢反应。如专利《6- α 甲基泼尼松龙中间体的生物脱氢制备方法》(参见CN101760495A),《一种甲基泼尼松龙脱氢物的生产方法》(参见CN112608970A)等采用细胞发酵的方法生产甲泼尼龙脱氢物。但是细胞发酵周期较长,发酵时间一般在2~3天左右,前期种子液的培养以及培养基的配置和灭菌过程繁琐,且发酵过程的需严格控制发酵参数及染菌情况。

[0005] 目前亟需转化率高且生产流程简易的制备甲泼尼龙脱氢物的方法。

发明内容

[0006] 为了解决现有技术中缺乏转化率高且生产流程简易的制备甲泼尼龙脱氢物的方法的问题,本发明提供了一种脱氢酶突变体及其应用,及利用其制备甲泼尼龙脱氢物的方法,其制备过程如式II所示:



[0008] 本发明提供的利用所述脱氢酶突变体制备甲泼尼龙脱氢物的方法,相较于传统细胞发酵方法,转化率高且生产流程简易。

[0009] 本发明第一方面提供了一种脱氢酶突变体,所述脱氢酶的氨基酸序列如SEQ ID NO:2所示;所述脱氢酶突变体为在如SEQ ID NO:2所示的氨基酸序列上具有选自以下一个或多个位点的氨基酸残基的差异:

[0010] 第315位、第330位或第452-463位。

[0011] 本发明一些实施方案中,所述脱氢酶突变体在如SEQ ID NO:2所示的氨基酸序列上具有选自以下一个或多个位点的氨基酸残基的差异:

[0012] 所述第315位的氨基酸残基由F突变为A、G、V或S,所述第330位的氨基酸序列残基由L突变为A、G、V或S,和/或删去所述第452位-第463位的氨基酸残基。

[0013] 本发明一些实施方案中,所述脱氢酶突变体序列为SEQ ID NO:4或SEQ ID NO:5。

[0014] 本发明一些具体的实施方案中,所述脱氢酶突变体序列为SEQ ID NO:5。

[0015] 本发明第二方面提供了一种分离的核酸,其中所述核酸编码如第一方面所述的脱氢酶突变体。

[0016] 本发明第三方面提供了一种重组表达载体,其中所述重组表达载体包含如第二方面所述的核酸。

[0017] 本发明一些实施方案中,所述重组表达载体的骨架质粒为pET26b(+)或pET28a(+).

[0018] 本发明第四方面提供了一种转化体,其中所述转化体包含如第三方面所述的重组表达载体。

[0019] 本发明一些实施方案中,所述转化体的底盘菌为大肠杆菌,例如大肠杆菌BL21(DE3)。

[0020] 本发明第五方面提供了一种制备如第一方面所述的脱氢酶突变体的方法,所述方法包括将所述转化体在适合的培养基中生长,以产生所述脱氢酶突变体。

[0021] 本发明一些实施方案中,所述方法包括:

[0022] (1) 将包含如第四方面所述的转化体的种子液接种至LB液体培养基中,37℃震荡培养;

[0023] (2) OD_{600} 约为0.6-0.8时添加IPTG;

[0024] (3) 25℃震荡培养;

[0025] (4) 收集、破碎菌体;

[0026] (5) 收集上清液,即得。

[0027] 本发明一些实施方案中,所述方法中:

[0028] (1) 所述转化体的接种量为1%;

[0029] (2) 所述IPTG的终浓度为0.1-0.2mM;

[0030] (3) 震荡培养18-24小时;

[0031] (4) 离心收集菌体,使用PBS重悬菌体,pH为7-7.5。

[0032] 本发明第六方面提供了一种制备甲泼尼龙脱氢物的方法,所述方法利用如第一方面所述的脱氢酶突变体制备甲泼尼龙脱氢物。

[0033] 本发明一些实施方案中,所述方法包括以下一种或多种步骤:

- [0034] (1)将包含所述脱氢酶突变体的酶液或纯酶与甲泼尼龙格氏物混合；
- [0035] (2)pH 7.5, 35℃中反应,并搅拌。
- [0036] 本发明一些实施方案中,所述方法包括加入助溶剂使甲泼尼龙格氏物增溶,其中所述助溶剂选自DMSO、Triton-X100、吐温80和/或PEG-200中的一种或多种。
- [0037] 本发明一些具体的实施方案中,所述助溶剂为Triton-X100和/或DMSO。
- [0038] 本发明第七方面提供了第一方面所述的脱氢酶突变体在制备甲泼尼龙脱氢物中的应用;其中所述脱氢酶突变体序列为SEQ ID NO:4或SEQ ID NO:5。
- [0039] 本发明一些实施方案中,其中所述脱氢酶突变体序列为SEQ ID NO:5。
- [0040] 在符合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。
- [0041] 本发明所用试剂和原料均市售可得。
- [0042] 本发明的积极进步效果在于:
- [0043] 本发明提供了一种脱氢酶突变体及其应用,及利用其制备甲泼尼龙脱氢物的方法。相较于传统的细胞发酵生产甲泼尼龙脱氢物,本发明提供的方法具有反应体系简单,转化周期短,副反应少,成本低等优点。

附图说明

- [0044] 图1为简单脂肪肝菌转化甲泼尼龙格氏物为甲泼尼龙脱氢物的发酵液液相检测结果,其中底物甲泼尼龙格氏物的出峰时间为18.193min,产物甲泼尼龙脱氢物的出峰时间为17.004min。
- [0045] 图2为提取简单脂肪肝菌基因组DNA的电泳图,四个泳道均为同时提取的平行组。
- [0046] 图3为对简单脂肪肝菌基因组DNA中KstD基因扩增电泳图,目的基因大小为1659bp,四个泳道均为平行操作。
- [0047] 图4为对构建的克隆菌株菌落PCR电泳图,五个泳道为不同的单菌落PCR结果。
- [0048] 图5为KstD酶的催化结果,底物浓度2mg/mL,转化时间24h。
- [0049] 图6为产物甲泼尼龙脱氢物的液相图谱。
- [0050] 图7为底物甲泼尼龙格氏物的液相图谱。
- [0051] 图8为KstD及其突变体KstD-M₆和突变体KstD-M₁₂的单边电泳图,其中泳道1为突变体KstD-M₁₂,泳道2为突变体KstD-M₆,泳道3,4为野生型KstD蛋白。
- [0052] 图9A-9D为KstD-WT, KstD-M₆和KstD-M₁₂催化转化结果液相图。其中图9A为KstD-WT、KstD-M₆和KstD-M₁₂分别对底物的转化TLC薄层色谱分析结果;图9B结果显示产物峰占比28%;图9C结果显示产物峰占比75%;图9D结果显示产物峰占比97%。

具体实施方式

- [0053] 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。
- [0054] 实施例1简单脂肪肝菌对甲泼尼龙格氏物的转化
- [0055] 本发明对实验室已有的简单脂肪肝菌进行了全基因组测序及转录组测序,根据转

全基因组序列及转录组测序结果中筛选出一种具有脱氢功能的基因,具体方法如下:

[0056] 将实验室已有的简单脂肪肝菌进行转录组测序,分别将底物诱导前和底物诱导后的菌株提取总RNA,送测序公司进行转录组测序,以全基因组测序结果为参照,进行测序结果的拼接。

[0057] 对测序结果进行数据库注释后,根据测序结果筛选出诱导前后表达量提高的基因,并根据基因功能注释,选定出具有潜在脱氢功能的目的基因。根据目的基因序列设计基因上下游引物,并在5'添加NdeI酶切位点,3'添加HindIII酶切位点,利用PCR扩增出目的基因。

[0058] 构建含有目的基因的表达质粒pET26b(+),验证质粒正确后转化到表达菌株BL21(DE3)中。对构建好的表达菌株分别进行诱导表达,离心收集诱导后的菌株,用pH 7的PBS重悬菌液,超声破碎,离心收集上清酶液;将收集到的酶液与底物甲泼尼龙格氏物进行反应,反应过夜后对转化液进行液相检测,液相结果显示,序列SEQ ID NO:1表达的蛋白(氨基酸序列如SEQ ID NO:2所示)对底物甲泼尼龙格氏物具有转化效果。

[0059] 由于密码子具有偏好性,选择将SEQ ID NO:1基因优化为大肠杆菌偏好的密码子,优化后的DNA序列为SEQ ID NO:3。

[0060] 菌株的活化:

[0061] 斜面培养基的组分为:1.2%葡萄糖,1.2%酵母浸粉,1.5%琼脂糖,添加蒸馏水至1000mL后,115℃,灭菌20min。倒入到斜面中,待斜面凝固后接菌,用接种环蘸取少量菌液,在超净台中均匀划线在斜面培养上,将斜面置于30℃恒温培养箱中培养2-3天。

[0062] 种子液的培养:

[0063] 种子培养基的成分为:1%胰蛋白胨,0.5%酵母提取物,1%NaCl,添加蒸馏水至1000mL后,115℃,灭菌20min。待上述斜面长出均匀的菌落后,用接种环刮取一环菌体,接于20mL种子培养基中,将种子培养基置于32℃摇床中,震荡培养20-24h,取少量菌液测量OD₆₀₀约为6-7。

[0064] 发酵培养基培养:

[0065] 发酵培养基的组分为:1%葡萄糖,1%玉米浆,0.3%蛋白胨,0.1%酵母浸粉,0.25%KH₂PO₄,0.5%吐温80,用NaOH调整pH为7.0-7.2。按照10%的转接量,吸取上述种子培养基的菌液5mL转接到50mL发酵培养基中,32℃震荡培养18-24h后,投入底物甲泼尼龙格氏物500mg,32℃震荡培养,转化时间为60-72h,转化完成后取样液相送检,转化率大于95%,液相结果见图1和表1。

[0066] 表1简单脂肪肝菌对甲泼尼龙格氏物转化的液相数据统计

[0067]

峰号	保留时间	相对保留时间	面积	面积%	高度	理论塔板数(USP)	分离度(USP)
1	2.275	0.125	1827	0.032	196	1056	--
2	2.899	0.159	2580	0.046	357	3312	2.590
3	3.944	0.217	2241	0.040	312	6097	5.180
4	8.695	0.478	8231	0.146	671	10565	17.581
5	9.658	0.531	11594	0.206	911	12805	2.833
6	11.802	0.648	22510	0.400	1163	8501	5.026
7	13.910	0.764	28505	0.506	1678	14852	4.354
8	17.016	0.935	5431119	96.454	273258	16682	6.315
9	18.201	1.000	122199	2.170	5729	16713	2.173
总计			5630807	100.000	284275		

[0068] 实施例2PCR扩增C1,2脱氢基因

[0069] 利用细菌基因组DNA提取的方法提取简单脂肪杆菌的基因组DNA,所用试剂购于生工生物工程(上海)股份有限公司,细菌基因组DNA快速抽提试剂盒。对提取的基因组DNA进行琼脂糖核酸凝胶电泳验证,见附图2。根据Seq ID NO:1的DNA序列设计上下游引物,引物名称和序列分别为:

[0070] KstD正向引物(SEQ ID NO:6):GGAATTCCATATGTCCGACACCACC

[0071] KstD反向引物(SEQ ID NO:7):CCCAAGCTTTCAGGCGGTGGCCGC

[0072] 利用PCR技术扩增C1,2脱氢基因,PCR反应体系见表1:

[0073] 表2扩增C1,2脱氢基因的PCR反应体系

[0074]

试剂	体积
Ex Taq	0.5 μ L
dNTP Mix	0.5 μ L
10 \times Ex Taq Buffer	3 μ L
基因组 DNA	0.5 μ L
KstD-F	0.5 μ L
KstD-R	0.5 μ L
H ₂ O	24.5 μ L

[0075] PCR扩增条件为:98 $^{\circ}$ C预变性5min,95 $^{\circ}$ C变性20s,55 $^{\circ}$ C退火15s,72 $^{\circ}$ C延伸30s,变性-退火-延伸进行30个循环。PCR结束后对PCR反应液进行琼脂糖凝胶电泳,KstD基因大小为1659bp,结果见图3。

[0076] 实施例3表达C1,2脱氢基因的工程菌株构建

[0077] 对实施例2中的PCR产物电泳胶进行回收,所用试剂盒购于生工生物工程(上海)股份有限公司,DiaSpin柱式DNA胶回收试剂盒,NdeI、HindIII和10 \times Buffer均为商品化试剂,购自NEW England BioLabs公司。将回收的PCR产物用NdeI和HindIII限制性内切酶进行酶切,酶切体系见表2。

[0078] 表3 C1,2脱氢基因PCR产物的酶切体系

	试剂	体积
[0079]	KstD DNA (50 µg/µL)	20 µL
	NdeI	1 µL
	HindIII	1 µL
	10×Buffer	5 µL
	H ₂ O	23 µL

[0080] 质粒载体用同样的限制性内切酶进行酶切,其中T4 DNALigase,10×T4 DNA Ligase Buffer均购自NEW England BioLabs。酶切后的反应液进行核酸凝胶电泳分离,回收目的条带,将酶切后的目的基因和质粒载体pET26b(+)用T4 DNA连接酶酶连,酶连体系见表3。

[0081] 表4 C1,2脱氢基因和质粒载体的酶连体系

	试剂	体积
[0082]	pET26b (+) (30 µg/µL)	1 µL
	基因 DNA 基因(30µg/µL)	4 µL
	T4 DNA Ligase	1 µL
	10×T4 DNA Ligase Buffer	1 µL
	H ₂ O	3 µL

[0083] 将连接反应液转化到大肠杆菌DH5α感受态细胞中,转化完成后将菌液涂布到含有50µg/mL卡那霉素的LB固体培养基平板中,37℃倒置培养过夜。第二天对生长的单菌落进行菌落PCR验证,菌落PCR反应体系见表4。其中2×Rapid Taq Master Mix购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司,通用引物由北京擎科生物科技有限公司武汉分公司,其序列:

[0084] pET26b通用上游引物(SEQ ID NO:8):TGCTAGTTATTGCTCAGCGG;

[0085] pET26b通用下游引物(SEQ ID NO:9):TAATACGACTCACTATAGGG。

[0086] 表5菌落PCR反应体系

	试剂	体积
[0087]	2×Rapid Taq Master Mix	5 µL
	pET26b 通用引物-R	0.5 µL
	pET26b 通用引物-F	0.5 µL
	菌落	/
	H ₂ O	4 µL

[0088] 菌落PCR程序为:98℃预变性5min,95℃变性15s,55℃退火15s,72℃延伸15s,变性-退火-延伸进行28个循环,PCR产物进行凝胶电泳验证,电泳结果见图4,目的基因大小为2000bp。

[0089] 挑选菌落PCR正确的单菌落,接菌于5mL含有50µg/mL的LB液体培养基中,37℃振荡培养过夜,收集菌液,提取质粒,所用到的试剂盒购于诺唯赞,FastPure Plasmid Mini Kit,对质粒中的KstD基因进行测序鉴定,将正确的质粒转化到大肠杆菌表达菌株BL21(DE3)感受态细胞中,将转化得到的单菌落进行菌落PCR验证,正确的菌落即为所需的表达菌株。

[0090] 实施例4C1,2脱氢功能基因验证

[0091] 将上述验证正确的表达菌株接于含有50 μ g/mL卡那霉素的LB液体培养基中,37 $^{\circ}$ C震荡培养过夜,第二天按照1%的转接量转接到50mL含有卡那霉素的LB液体培养基中,37 $^{\circ}$ C振荡培养2.5-3h,取样测定菌液的OD₆₀₀约为0.6-0.8后,添加异丙基- β -D-硫代半乳糖苷(IPTG)至终浓度为0.1mM,25 $^{\circ}$ C震荡培养18h后,5000r/min离心5min收集菌体,收集的菌体用20mL pH 7的PBS缓冲液重悬混匀,重悬液用超声破碎20min,12000r/min离心10min收集上清酶液,将收集到的酶液投入到酶催化反应中,反应体系见表6。其中甲萘醌购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司,在脱氢反应中作为电子受体。

[0092] 表6酶催化反应体系

	试剂	体积
[0093]	KstD 酶液 (10 mg/mL)	2 mL
	底物 (甲泼尼龙格氏物)	10 mg
	PBS (pH 7.5)	2.5 mL
[0094]	甲萘醌	2 mg
	DMSO	0.5 mL

[0095] 用NaOH调整体系的pH为7.5,将反应置于35 $^{\circ}$ C水浴锅中,磁力搅拌反应过夜,第二天取样液相送检,检测结果见图5和表7,底物标准品图谱为图6,产物标准品图谱为图7,对液相结果分析可知,上述酶催化体系中有产物甲泼尼龙脱氢物的生成,验证了KstD酶具有转化甲泼尼龙格氏物的活性。

[0096] 表7 KstD酶转化甲泼尼龙格氏物的液相数据统计

	峰号	保留时间	相对保留时间	面积	面积%	高度	理论塔板数 (USP)	分离度 (USP)
[0097]	1	2.841	0.158	11685	0.052	953	1027	--
	2	3.133	0.174	8422	0.038	635	754	0.721
	3	6.741	0.375	7879	0.035	434	3646	7.992
	4	8.507	0.473	48784	0.219	2256	3476	3.450
	5	9.483	0.527	47611	0.214	1977	3679	1.623
	6	11.614	0.646	69782	0.313	2562	4111	3.157
	7	12.409	0.690	15778	0.071	483	2601	0.936
	8	13.684	0.761	288239	1.293	8924	4312	1.412
	9	14.748	0.820	8894	0.040	419	5462	1.304
	10	16.777	0.933	19870369	89.151	548761	4999	2.322
	11	17.986	1.000	1882771	8.447	48581	4867	1.220
	12	21.744	1.209	14726	0.066	352	7947	3.745
	13	30.966	1.722	13386	0.060	225	9199	8.135
	总计			22288325	100.000	616560		

[0098] 实施例5大肠杆菌表达密码子优化后的KstD蛋白

[0099] 在验证了该KstD蛋白具有转化效果后,由于密码子的偏好性,对SEQ ID NO:1基因进行大肠杆菌表达宿主的密码子优化,优化后的DNA序列为SEQ ID NO:3,并进行DNA的人工合成:5' 添加NdeI酶切位点,3' 添加HindIII酶切位点。将合成后的基因通过上述方法,克隆到pET26b(+)表达载体中,并将该表达载体转化到大肠杆菌表达菌株BL21 (DE3)中用于蛋白

的表达。将验证正确的单菌落接种到5mL含有卡那霉素的LB培养基中,37℃震荡培养过夜,第二天按照1%的接种量,将菌液转接到300mL含有卡那霉素的LB液体培养基中,37℃震荡培养2.5-3h,测量OD₆₀₀约为0.6-0.8时添加IPTG至终浓度为0.2mM。25℃震荡培养20h后,5000r/min离心5min收集菌体,收集的菌体用50mL、pH为7.5的PBS缓冲液冲重悬菌体,超声破碎仪破碎细胞20min,12000r/min离心10min收集上清液。吸取上清酶液30μL加到1.5mL EP管中,添加10μL 4×Protein Loading Buffer,用移液枪吹吸混匀后置于金属浴中98℃处理5min。吸取10μL上样进行SDS-PAGE蛋白电泳,电泳结果见图8,目的蛋白大小为60KD。

[0100] 实施例6基于KstD的蛋白三维结构优化KstD酶活性

[0101] 根据KstD酶的氨基酸序列预测蛋白的三级结构,并对该蛋白与底物配体甲泼尼龙格氏物进行分子对接,根据对接结果,针对该酶对于底物C1,2位的脱氢原理进行解释。由于Tyr-514和Gly-517结合底物中的3-酮基,促使底物中3-酮基发生酮-烯醇互变,增加了C2氢原子的不稳定性,随后烯醇化物可在C2处通过Tyr514与溶剂进行氢交换。当物种的负电荷迁移到C1原子并在C1-C2原子之间形成双键。其中Phe315和Leu330侧链的大氨基酸残基基团阻碍了底物配体C17位的侧链,影响了底物配体在活性空腔中的构型,不利于底物结合。因而需要对Phe315和Leu330进行改造,将Phe315突变为Ala、Gly、Val或Ser,将Leu330突变为Ala、Gly、Val或Ser等氨基酸后,扩大了活性空腔,增加了底物在活性空腔中构象的稳定性,减小C17位的侧链基团对脱氢反应的影响,进而提高了C1,2位脱氢活性。优化后的KstD-Mutation6(简称KstD-M₆)突变体氨基酸序列为SEQ ID NO:4。并且通过对接结果分析可知,其中452-463位氨基酸为冗余的Loop结构,阻碍了底物配体中C17位侧链基团进入活性口袋,故对其进行了删除,删除后的氨基酸序列为SEQ ID NO:5(即KstD-M₁₂)。

[0102] 实施例7 KstD突变体的构建及大肠杆菌表达突变体蛋白

[0103] 确定突变体序列后,设计引物,利用重叠延伸PCR的方法构建突变体,通过该方法构建KstD-M₆和KstD-M₁₂突变体,然后利用酶切酶连,构建pET26b(+)的表达载体,将含有KstD突变体的表达质粒转化到大肠杆菌表达菌株BL21(DE3)感受态细胞中。验证正确的突变体单克隆后,将正确的单菌落接种于含有卡那霉素抗性的LB液体培养基中,根据上述的蛋白表达流程,表达KstD-M₆和KstD-M₁₂突变体蛋白。将表达的蛋白进行蛋白电泳,结果如图8所示。

[0104] 实施例8KstD突变体催化甲泼尼龙格氏物生成甲泼脱氢物反应

[0105] 按照如下体系投入酶催化反应中:分别将KstD-WT,KstD-M₆和KstD-M₁₂的酶液用pH 7.5的PBS(0.1mM的K₂HPO₄和KH₂PO₄)稀释到10mg/mL,取45mL稀释后的酶液,添加1g底物甲泼尼龙格氏物(溶解于5mLDMSO中),添加1.5mL Triton-X100,用NaOH调整体系pH为7.5,将反应置于35℃水浴锅中,用磁力搅拌器搅拌过夜反应。第二天用移液枪吸取0.5mL反应液,加0.5mL乙酸乙酯萃取,涡旋振荡后12000r/min离心1min,取上层有机层进行TLC点板分析,并取样送HPLC分析,结果见图9。

[0106] TLC展开剂比例为二氯甲烷:石油醚=3:1,添加5滴甲醇,液相色谱条件为:流动相为乙腈:水:三氟乙酸=32:68:0.1,等度洗脱。根据液相结果可知,在底物浓度为20g/L,转化时间18h时,KstD-WT酶催化转化率28%,KstD-M₆转化率为75%,KstD-M₁₂转化率为97%,突变体KstD-M₁₂相较于野生型,活性提高了350%。

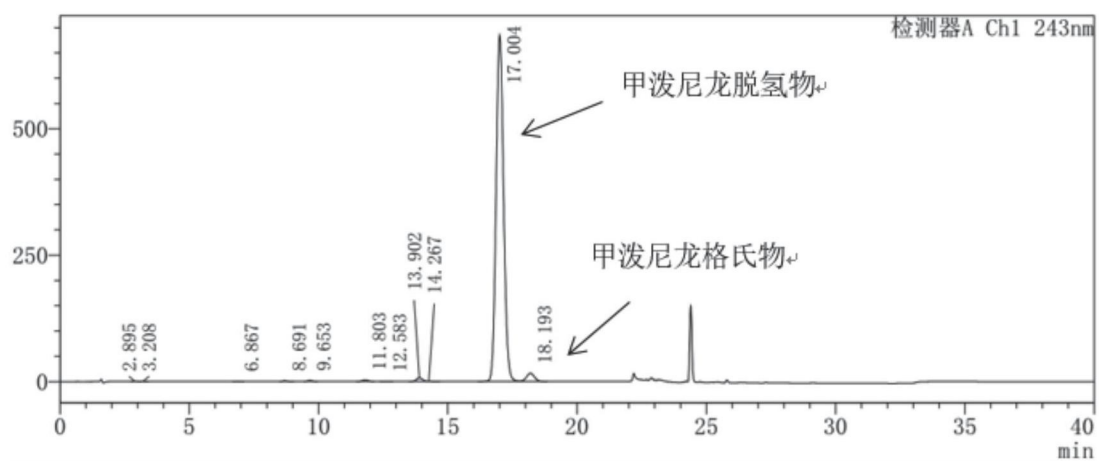


图1

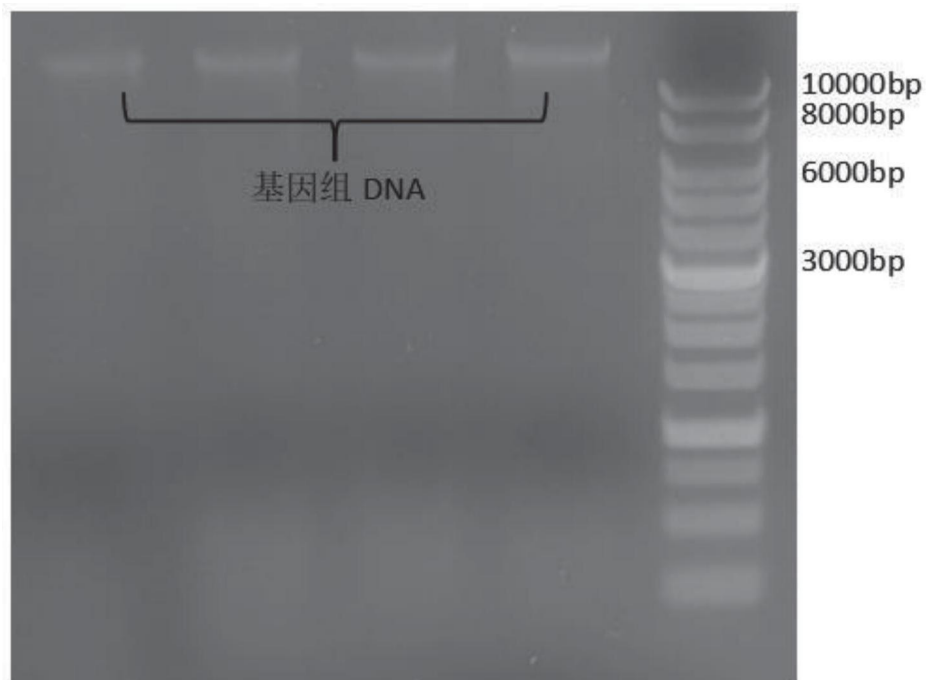


图2

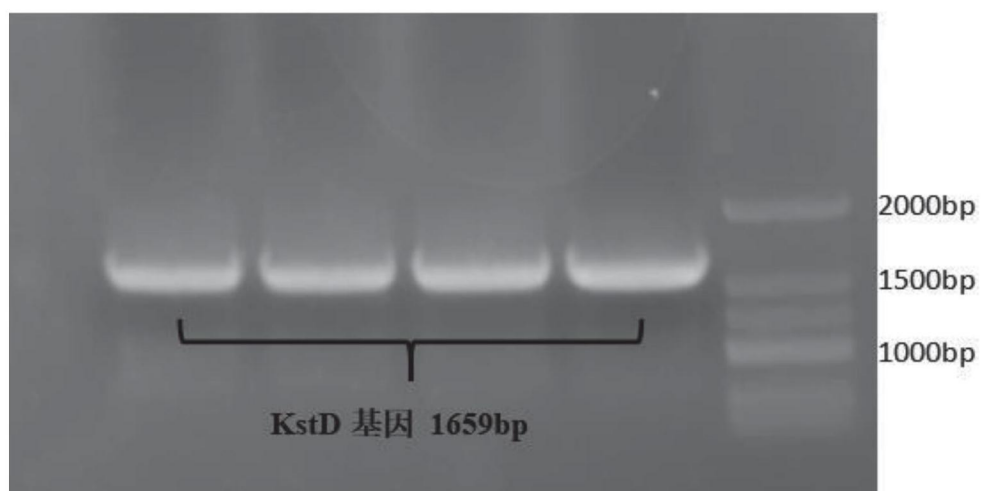


图3

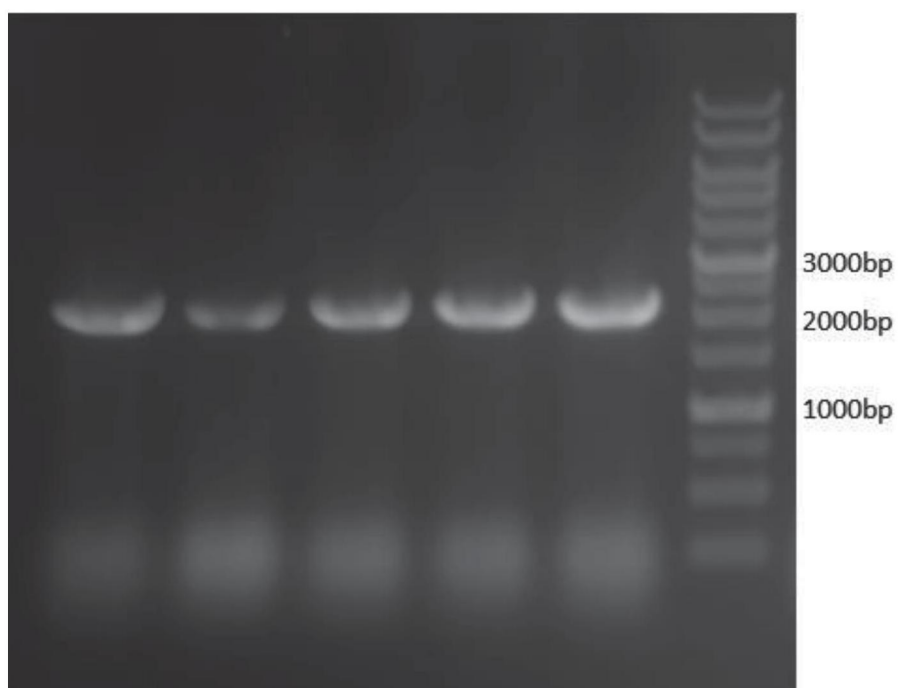


图4

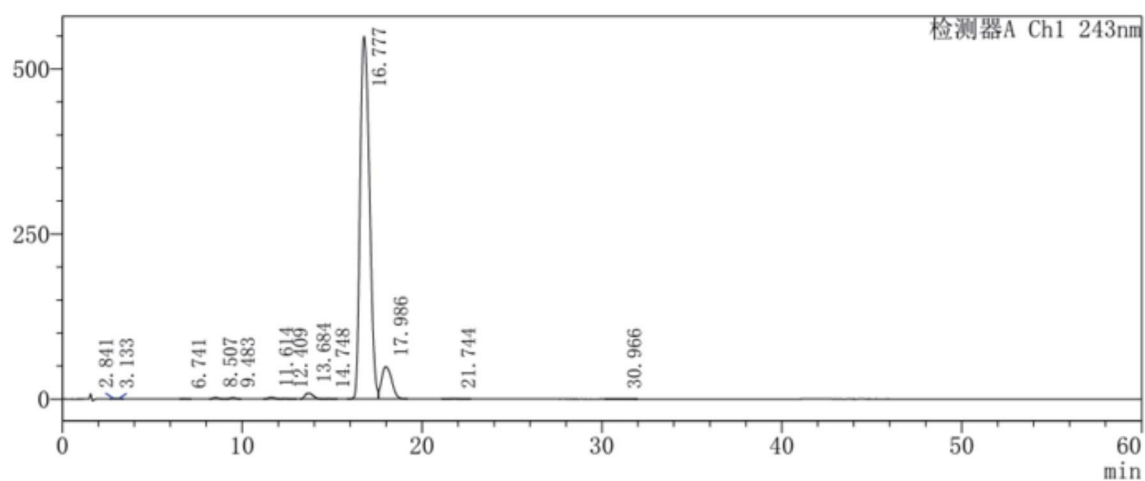


图5

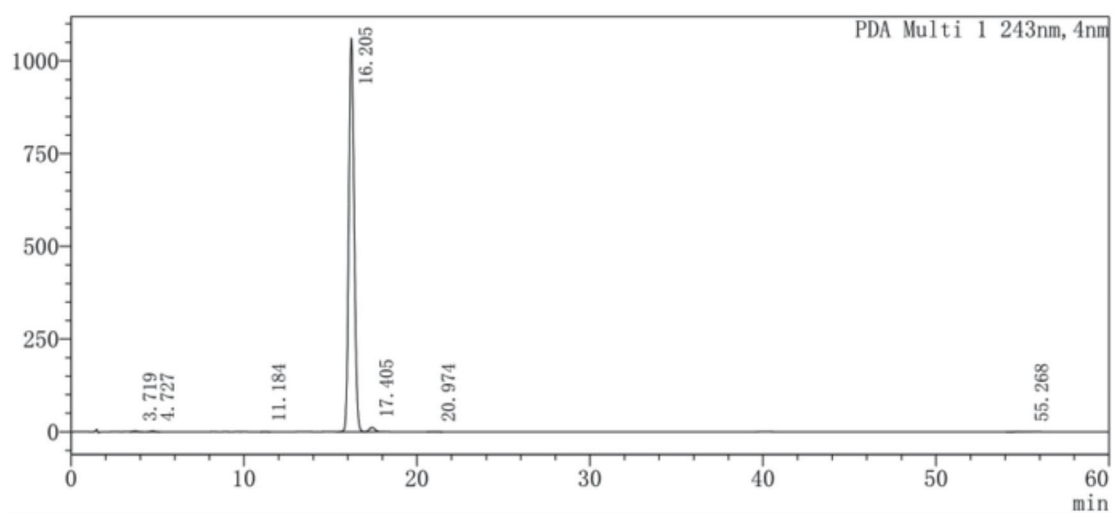


图6

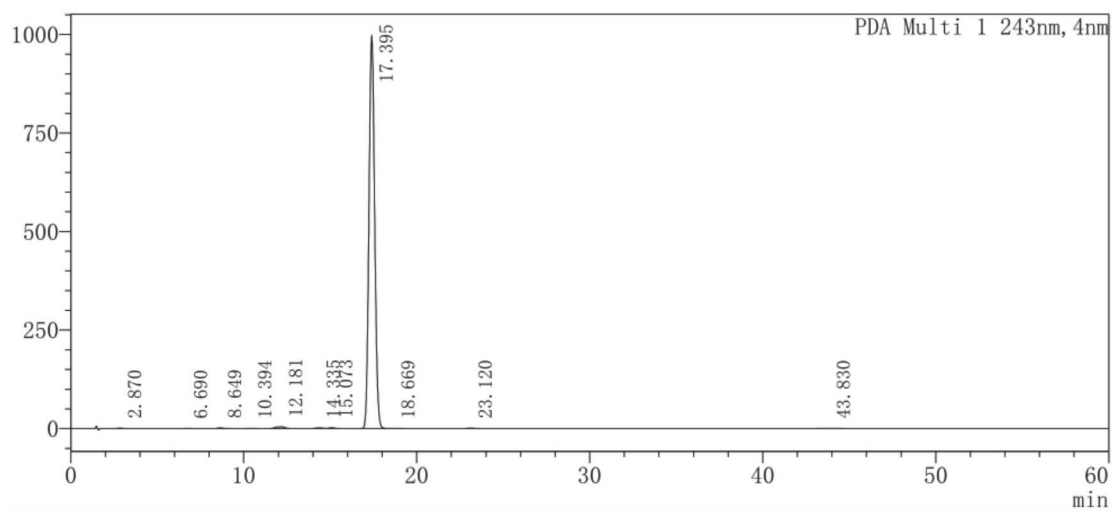


图7

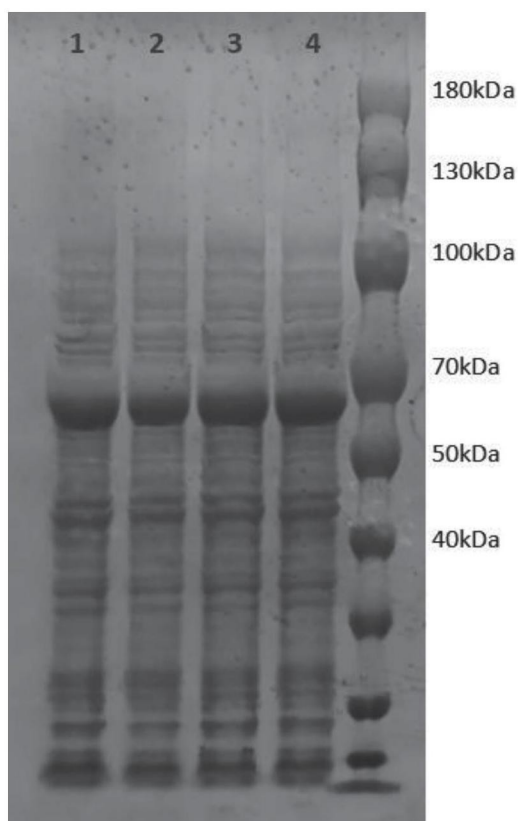


图8

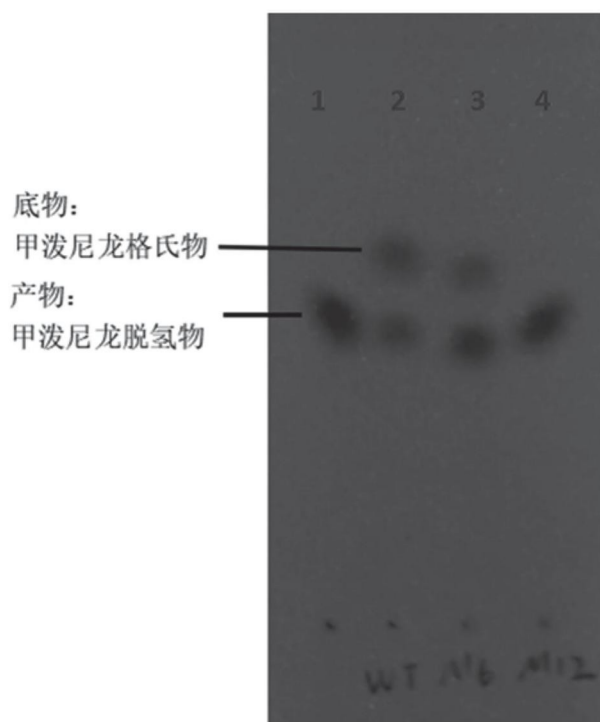


图9A

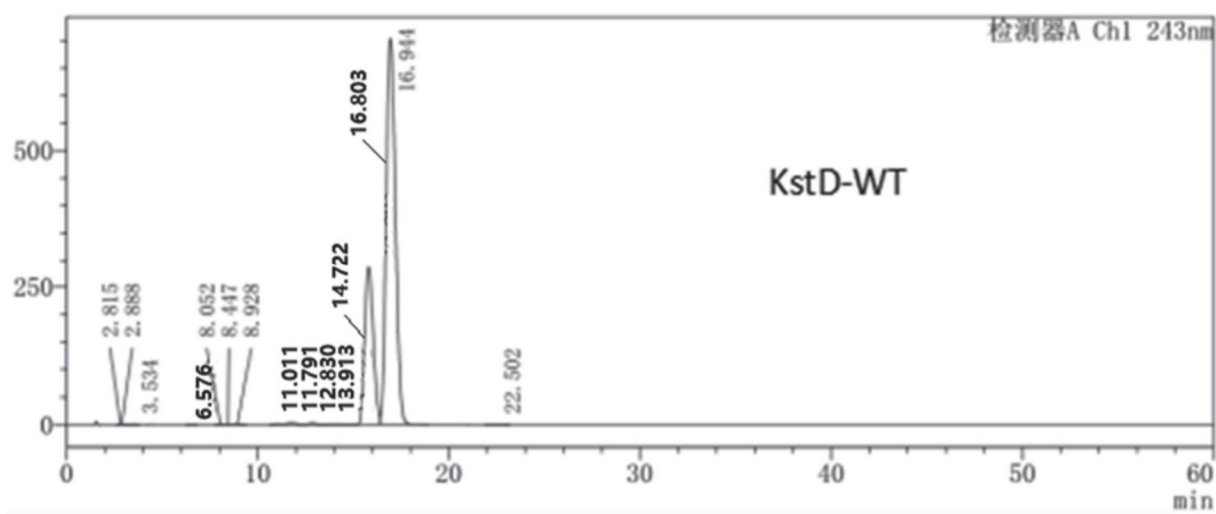


图9B

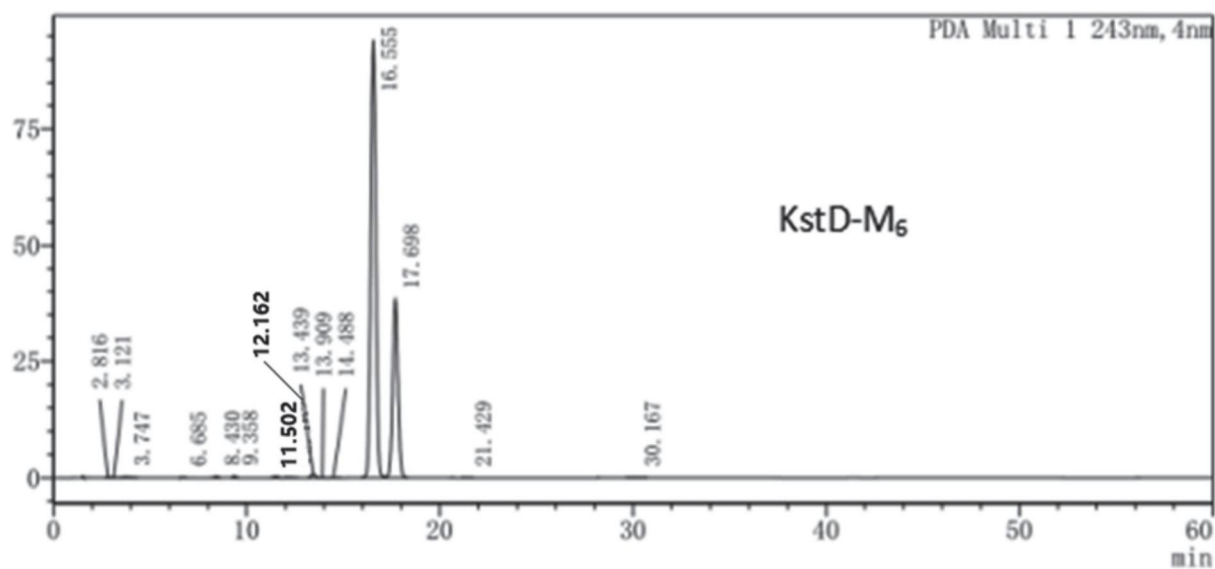


图9C

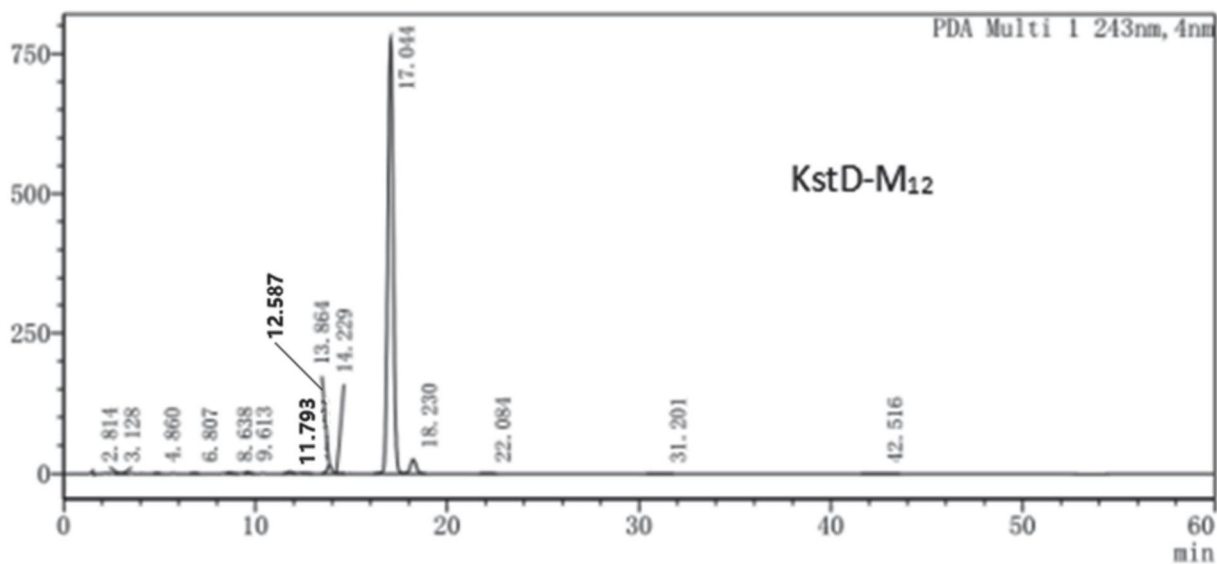


图9D