



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102071174 B

(45) 授权公告日 2012.12.05

(21) 申请号 201010564858.2

(22) 申请日 2010.11.24

(73) 专利权人 天津工业生物技术研究所

地址 300308 天津市空港物流加工区西七道

(72) 发明人 于波 孙际宾 曾安平

(74) 专利代理机构 北京尚诚知识产权代理有限公司

公司 11322

代理人 鲁兵

(51) Int. Cl.

C12N 9/04 (2006.01)

C12N 15/53 (2006.01)

C12N 15/63 (2006.01)

C12N 15/70 (2006.01)

C12N 1/21 (2006.01)

C12P 7/18 (2006.01)

C12P 7/26 (2006.01)

C12R 1/19 (2006.01)

(56) 对比文件

CN 101565685 A, 2009.10.28, 全文.

CN 101235383 A, 2008.08.06, 全文.

Eva Gonzaacute

lez et al. Characterization of a (2R, 3R)-2, 3-Butanediol Dehydrogenase as the *Saccharomyces cerevisiae* YAL060W Gene Product. 《THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY》. 2000, 第 275 卷 (第 46 期), 35876 - 35885.

Wayne L. Nicholson. The *Bacillus subtilis* ydjL (bdhA) Gene Encodes Acetoin Reductase/2, 3-Butanediol Dehydrogenase. 《APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY》. 2008, 第 74 卷 (第 22 期), 6832 - 6838.

审查员 马俊凯

权利要求书 2 页 说明书 8 页

序列表 3 页 附图 1 页

(54) 发明名称

(2R, 3R)-2, 3-丁二醇脱氢酶及其编码基因与应用

(57) 摘要

本发明公开了一个来源于多粘类芽孢杆菌 (*Paenibacillus polymyxa* ATCC12321) 的 (2R, 3R)-2, 3-丁二醇脱氢酶及其编码基因与应用。通过酶学验证, 证实该酶具有崭新的特性, 以 NAD⁺ 为辅酶, 催化 (2R, 3R)-2, 3-丁二醇生成 (R)-乙偶姻, 催化内消旋型 meso-2, 3-丁二醇生成 (S)-乙偶姻; 以 NADH 为辅酶, 催化 (R)-乙偶姻生成 (2R, 3R)-2, 3-丁二醇, 催化 (S)-乙偶姻生成内消旋型的 meso-2, 3-丁二醇, 催化丁二酮, 生成 (R)-乙偶姻。此外, 该酶底物特异性高, 工业应用前景广阔。

CN 102071174 B

1. (2R,3R)-2,3-丁二醇脱氢酶,其氨基酸残基序列由序列表中的 SEQ ID NO:1 表示。
2. 编码权利要求 1 所述 (2R,3R)-2,3-丁二醇脱氢酶的基因。
3. 根据权利要求 2 所述基因,其核苷酸序列由序列表中 SEQ ID NO:2 表示。
4. 含有权利要求 2 或 3 所述基因的表达载体、转基因细胞系或宿主菌。
5. 一种表达权利要求 1 所述 (2R,3R)-2,3-丁二醇脱氢酶的方法,是将含有权利要求 2 或 3 所述 (2R,3R)-2,3-丁二醇脱氢酶基因的重组表达载体导入宿主细胞,表达得到 (2R,3R)-2,3-丁二醇脱氢酶。
6. 根据权利要求 5 所述的表达方法,其特征在于:用于构建含有权利要求 2 或 3 所述 (2R,3R)-2,3-丁二醇脱氢酶基因的重组大肠杆菌表达载体的出发载体为 pET-22b、pET28、pET32、pQE-30、pGEX-4T-2、pBR322 或 pUC18。
7. 根据权利要求 6 所述的表达方法,其特征在于:以 pET-22b 为出发载体,构建的含有所述 (2R,3R)-2,3-丁二醇脱氢酶基因的重组大肠杆菌表达载体为 pET22b-2R3R。
8. 一种生产 (2R,3R)-2,3-丁二醇的方法,具体包括以下步骤:
 - 1) 将权利要求 7 所述 (2R,3R)-2,3-丁二醇脱氢酶基因的重组表达载体 pET22b-2R3R 导入大肠杆菌 *E. coli* BL21 (DE3) pLysS 后,获得重组大肠杆菌 *E. coli* RBDH;
 - 2) 将 *E. coli* RBDH 单菌落转接到 LB 液体培养基中,在 37°C、1mM IPTG 条件下诱导蛋白表达,得到具有 (2R,3R)-2,3-丁二醇脱氢酶活力的细胞作为生物催化剂;
 - 3) 利用步骤 2) 获得的生物催化剂,添加 (3R)-乙偶姻作为底物,37°C 下反应 12 个小时,得到 (2R,3R)-2,3-丁二醇。
9. 一种生产 (2R,3R)-2,3-丁二醇的方法,具体包括:利用权利要求 1 所述的 (2R,3R)-2,3-丁二醇脱氢酶,添加 (3R)-乙偶姻作为底物和辅酶 NADH,在 pH 8.0 的磷酸盐缓冲液体系中,70°C 反应 4 个小时,得到 (2R,3R)-2,3-丁二醇。
10. (2R,3R)-2,3-丁二醇脱氢酶的应用,为下述反应之一:
 - a) 以 NAD⁺ 为辅酶,用权利要求 1 所述 (2R,3R)-2,3-丁二醇脱氢酶 70°C, pH 11.0 下催化 (2R,3R)-2,3-丁二醇制备 (R)-乙偶姻;
 - b) 以 NADH 为辅酶,用权利要求 1 所述 (2R,3R)-2,3-丁二醇脱氢酶 70°C, pH 11.0 催化丁二酮制备 (R)-乙偶姻;
 - c) 以 NAD⁺ 为辅酶,用权利要求 1 所述 (2R,3R)-2,3-丁二醇脱氢酶 70°C, pH 11.0 催化内消旋型 meso-2,3-丁二醇制备 (S)-乙偶姻;
 - d) 以 NADH 为辅酶,用权利要求 1 所述 (2R,3R)-2,3-丁二醇脱氢酶 70°C, pH 8.0 催化内消旋型 (S)-乙偶姻制备内消旋型 meso-2,3-丁二醇。
11. 生产 (3R)-乙偶姻的方法,其特征在于,利用权利要求 1 所述 (2R,3R)-2,3-丁二醇脱氢酶进行以下之一的操作:
 - a) 在 100mM 的 pH 11.0 的磷酸盐缓冲液体系中,添加 2mM 的 NADH 为辅酶,100mM 丁二酮作为底物,70°C 反应 4 个小时,得到 (3R)-乙偶姻;
 - b) 在 100mM 的 pH 11.0 的磷酸盐缓冲液体系中,添加 4mM 的 NAD⁺ 为辅酶,100mM (2R,3R)-2,3-丁二醇为底物,70°C 反应 4 个小时,得到 (3R)-乙偶姻。
12. 生产 (3S)-乙偶姻的方法,其特征在于,利用权利要求 1 所述 (2R,3R)-2,3-丁二醇脱氢酶,在 100mM 的 pH 11.0 的磷酸盐缓冲液体系中,添加 4mM 的 NAD⁺ 为辅酶,100mM 的

meso-2,3-丁二醇作为底物,70℃反应4个小时,得到(3S)-乙偶姻。

(2R, 3R)-2, 3- 丁二醇脱氢酶及其编码基因与应用

技术领域

[0001] 本发明涉及酶及其编码基因与应用,特别是涉及一个来源于多粘类芽孢杆菌 (*Paenibacillus polymyxa* ATCC12321) 的 (2R, 3R)-2, 3- 丁二醇脱氢酶及其编码基因与应用。

背景技术

[0002] 2, 3- 丁二醇 (2, 3-butanediol, BD) 广泛用于化工、食品、航空航天燃料等领域。其脱水产物甲乙酮可作树脂、油漆等的溶剂;酯化后的脱水产物 1, 3- 丁二烯可用于合成橡胶、聚酯和聚亚胺酯;热值较高 (27, 200kJ/kg) 可作为燃料添加剂;与甲乙酮脱氢形成辛烷异构体可生产高级航空用油;BD 还可制备油墨、香水、熏蒸剂、增湿剂、软化剂、增塑剂、炸药及药物手性载体等。BD 化学合成成本高且过程繁琐,工业化生产较困难。生物法制备 BD 目的是避免化学合成的困难,实现由传统的石油冶炼向可再生资源为原料的生物炼制转型。

[0003] 而作为手性中间体的 (2R, 3R)-2, 3- 丁二醇主要用于高附加值的药物中间体和液晶材料等精细化学品,其价格是内消旋型 2, 3- 丁二醇的 1000 倍以上,虽然其市场需求不大,但是利润惊人。相对于内消旋型 2, 3- 丁二醇,手性纯 (2R, 3R)-2, 3- 丁二醇的研究还比较少,对其基因和酶学的研究更是少见。现唯一报道过的 (2R, 3R)-2, 3- 丁二醇脱氢酶仅有从酿酒酵母中分离获得的菌株,但是该菌株并不适宜用于工业生产丁二醇,产量极低 (1mM 左右),该酶仅是维持酵母菌自身生理功能所需,没有实际工业应用价值【*J. Bio. Chem.*, 275 (46), 35876-35885 (2000)】。

发明内容

[0004] 本发明提供了一种工业应用价值较高的 (2R, 3R)-2, 3- 丁二醇脱氢酶。

[0005] 本发明所提供的 (2R, 3R)-2, 3- 丁二醇脱氢酶来源于多粘类芽孢杆菌 (*Paenibacillus polymyxa* ATCC12321), 购自美国生物资源保藏中心 (<http://www.atcc.org/>), 是下述氨基酸残基序列之一:

[0006] 1) 序列表中的 SEQ ID NO: 1;

[0007] 2) 将序列表中 SEQ ID NO: 1 的氨基酸残基序列经过氨基酸残基的取代、缺失或添加且具有 (2R, 3R)-2, 3- 丁二醇脱氢酶或乙偶姻还原酶作用的蛋白质, 新蛋白质与 SEQ ID NO: 1 同源性达到 80% 或更高。。

[0008] 序列表中的 SEQ ID NO: 1 由 350 个氨基酸残基组成。

[0009] 编码上述 (2R, 3R)-2, 3- 丁二醇脱氢酶的基因, 是下述核苷酸序列之一:

[0010] 1) 序列表中 SEQ ID NO: 2 的 DNA 序列;

[0011] 2) 编码序列表中 SEQ ID NO: 1 的 DNA 序列;

[0012] 3) 所编码的序列 80% 或以上同源于序列表中 SEQ ID NO: 1 且具有 (2R, 3R)-2, 3- 丁二醇脱氢酶或乙偶姻还原酶作用的核苷酸序列;

[0013] 4) 在高严谨条件下可与序列表中的 SEQ ID NO :2 限定的 DNA 序列杂交的核苷酸序列。

[0014] 所述高严谨条件为杂交后用含 $0.1 \times \text{SSPE}$ (或 $0.1 \times \text{SSC}$)、 0.1% SDS 的溶液在 65°C 下洗膜。

[0015] 序列表中的 SEQ ID NO :2 由 1050 个碱基组成,其编码序列为自 5' 端第 1-1050 位碱基,具有序列表中 SEQ ID NO :1 的氨基酸残基序列的蛋白质。

[0016] 含有本发明基因的表达载体、转基因细胞系及宿主菌均属于本发明的保护范围。

[0017] 扩增 (2R, 3R)-2, 3- 丁二醇脱氢酶基因中任一片段的引物对也在本发明的保护范围之内。

[0018] 本发明的另一个目的是提供一种表达上述 (2R, 3R)-2, 3- 丁二醇脱氢酶的方法。

[0019] 本发明所提供的表达上述 (2R, 3R)-2, 3- 丁二醇脱氢酶的方法,是将含有上述 (2R, 3R)-2, 3- 丁二醇脱氢酶基因的重组表达载体导入宿主细胞,表达得到 (2R, 3R)-2, 3- 丁二醇脱氢酶。

[0020] 所述宿主为任一可表达外源基因的原核或真核细胞。

[0021] 所述原核细胞可为大肠杆菌,如 *E. coli* BL21、*E. coli* M15、*E. coli* JM109、*E. coli* DH5 α 或 *E. coli* LG90 等;也可为枯草芽孢杆菌 *Bacillus subtilis* 或多粘类芽孢杆菌 *Paenibacillus polymyxa*。

[0022] 所述真核细胞可为哺乳动物细胞、酵母细胞和植物细胞等。包括 COS-7、CHO、BHK-21、NIH3T3、*Pichia pastoris* 或 TBY2 等。

[0023] 用于构建含有 (2R, 3R)-2, 3- 丁二醇脱氢酶基因的重组大肠杆菌表达载体的出发载体可为 pET-22b、pET28、pET32、pQE-30、pGEX-4T-2、pBR322 或 pUC18 等。

[0024] 以 pET-22b 为出发载体构建的含有所述 (2R, 3R)-2, 3- 丁二醇脱氢酶基因的大肠杆菌分泌表达载体命名为 pET22b-2R3R。

[0025] 上述重组表达载体均可按照常规方法构建。

[0026] 当所述宿主为大肠杆菌时,需加入 IPTG 进行诱导表达,所加入 IPTG 的浓度为 0.01mM - 5mM ,优选为 1mM 。

[0027] 培养含有本发明的 (2R, 3R)-2, 3- 丁二醇脱氢酶基因的宿主细胞的培养基和培养条件,均可为培养出发宿主的培养基和培养条件。

[0028] 本发明的应用,包括直接利用 (2R, 3R)-2, 3- 丁二醇脱氢酶,或者利用 (2R, 3R)-2, 3- 丁二醇脱氢酶基因宿主细胞进行 (2R, 3R)-2, 3- 丁二醇的生产或乙偶姻的生产。

[0029] 本发明所提供的利用含有 (2R, 3R)-2, 3- 丁二醇脱氢酶基因的细胞生产 (2R, 3R)-2, 3- 丁二醇的方法,具体包括以下步骤:

[0030] 1) 将 (2R, 3R)-2, 3- 丁二醇脱氢酶基因的重组表达载体 pET22b-2R3R 导入大肠杆菌 *E. coli* BL21(DE3)pLysS 后,获得重组大肠杆菌 *E. coli* RBDH;

[0031] 2) 将 *E. coli* RBDH 单菌落转接到 LB 液体培养基中,在 37°C 、 1mM IPTG 条件下诱导蛋白表达,得到所述具有 (2R, 3R)-2, 3- 丁二醇脱氢酶活力的细胞作为生物催化剂;

[0032] 3) 利用步骤 2) 获得的生物催化剂,添加 (3R)- 乙偶姻作为底物, 37°C 下反应 12 个小时,得到目标产物 (2R, 3R)-2, 3- 丁二醇。底物添加量为 1000mM 时,检测得到目标产物 871mM 。

[0033] 在上述生产 (2R, 3R)-2, 3- 丁二醇方法中, 所述步骤 2) 中具有 (2R, 3R)-2, 3- 丁二醇脱氢酶活力的细胞的表达方法具体为: 从平板上随机挑选一个 *E. coli* RBDH 单菌落转接到 5mL 含有 100 μ g/mL 氨苄西林和 34 μ g/mL 氯霉素的 LB 液体培养基中, 37 $^{\circ}$ C 培养 12 小时, 然后按 1% 比例转接至新鲜的含有 100 μ g/mL 氨苄西林和 34 μ g/mL 氯霉素的 LB 液体培养基中, 37 $^{\circ}$ C 培养至菌体 OD₆₀₀ 值达到 0.6, 然后加入 1mM 的 IPTG 诱导蛋白表达 5 小时, 收集菌体重悬于 200mM 的磷酸盐缓冲液中, 调节菌体 OD₆₀₀ 值为 20, 获得所述具有 (2R, 3R)-2, 3- 丁二醇脱氢酶活力的细胞。

[0034] 本发明所提供的利用 (2R, 3R)-2, 3- 丁二醇脱氢酶生产 (2R, 3R)-2, 3- 丁二醇的方法, 是利用所述 (2R, 3R)-2, 3- 丁二醇脱氢酶, 添加 (3R)- 乙偶姻作为底物和辅酶 NADH, 在 pH 8.0 的磷酸盐缓冲液体系中, 70 $^{\circ}$ C 反应 4 个小时, 得到 (2R, 3R)-2, 3- 丁二醇。

[0035] 本发明 (2R, 3R)-2, 3- 丁二醇脱氢酶的应用, 还进一步包括:

[0036] a) 以 NAD⁺ 为辅酶, 用 (2R, 3R)-2, 3- 丁二醇脱氢酶, 以 (2R, 3R)-2, 3- 丁二醇为底物 70 $^{\circ}$ C, pH 11.0 制备 (R)- 乙偶姻。

[0037] b) 以 NADH 为辅酶, 用 (2R, 3R)-2, 3- 丁二醇脱氢酶, 以丁二酮为底物 70 $^{\circ}$ C, pH 11.0 制备 (R)- 乙偶姻。

[0038] c) 以 NAD⁺ 为辅酶, 用 (2R, 3R)-2, 3- 丁二醇脱氢酶, 以消旋型 meso-2, 3- 丁二醇为底物 70 $^{\circ}$ C, pH 11.0 制备 (S)- 乙偶姻;

[0039] d) 以 NADH 为辅酶, 用 (2R, 3R)-2, 3- 丁二醇脱氢酶, 以内消旋型 (S)- 乙偶姻为底物 70 $^{\circ}$ C, pH 8.0 制备内消旋型 meso-2, 3- 丁二醇。

[0040] 具体的, 本发明提供生产 (3R)- 乙偶姻的方法, 用所述 (2R, 3R)-2, 3- 丁二醇脱氢酶进行以下之一的操作:

[0041] a) 在 100mM 的磷酸盐缓冲液 (pH 11.0) 体系中, 添加 2mM 的 NADH 为辅酶, 100mM 丁二酮作为底物, 70 $^{\circ}$ C 反应 4 个小时, 得到 (3R)- 乙偶姻 (3R)- 乙偶姻;

[0042] b) 在 100mM 的磷酸盐缓冲液 (pH 11.0) 体系中, 添加 4mM 的 NAD⁺ 为辅酶, 100mM (2R, 3R)-2, 3- 丁二醇为底物, 70 $^{\circ}$ C 反应 4 个小时, 得到 (3R)- 乙偶姻 (3R)- 乙偶姻。

[0043] 具体的, 本发明提供生产 (3S)- 乙偶姻的方法, 利用所述 (2R, 3R)-2, 3- 丁二醇脱氢酶, 在 100mM 的磷酸盐缓冲液 (pH 11.0) 体系中, 添加 4mM 的 NAD⁺ 为辅酶, 100mM 的 meso-2, 3- 丁二醇作为底物, 70 $^{\circ}$ C 反应 4 个小时, 得到 (3S)- 乙偶姻。

[0044] 在本发明所述全部应用中, (2R, 3R)-2, 3- 丁二醇脱氢酶的最适反应温度为 70 $^{\circ}$ C; 所述 (2R, 3R)-2, 3- 丁二醇脱氢酶参与二醇氧化反应的最适 pH 值为 11.0, 参与酮还原反应的最适 pH 值为 8.0。

[0045] 本发明提供了一个来源于多粘类芽孢杆菌 (*Paenibacillus polymyxa* ATCC12321) 的 (2R, 3R)-2, 3- 丁二醇脱氢酶及其编码基因。通过酶学验证, 证实该酶具有崭新的特性, 以 NAD⁺ 为辅酶, 催化 (2R, 3R)-2, 3- 丁二醇生成 (R)- 乙偶姻, 催化内消旋型 meso-2, 3- 丁二醇生成 (S)- 乙偶姻; 以 NADH 为辅酶, 催化 (R)- 乙偶姻生成 (2R, 3R)-2, 3- 丁二醇, 催化 (S)- 乙偶姻生成内消旋型的 meso-2, 3- 丁二醇, 催化丁二酮, 只生成 (R)- 乙偶姻。此外, 该酶底物特异性高, 工业应用前景广阔。

[0046] 下面结合具体实施例对本发明做进一步详细说明。

附图说明

[0047] 图 1 为 SDS-PAGE (A) 和 native-PAGE (B) 检测纯化蛋白的分子量大小

[0048] 图 2 为 (2R, 3R)-2, 3- 丁二醇脱氢酶最适反应 pH 值测定结果

具体实施方式

[0049] 实施例在以本发明技术方案为前提下进行实施, 给出了详细的实施方式和具体的操作过程, 但本发明的保护范围不限于下述的实施例。

[0050] 下述实施例中所用方法如无特别说明均为常规方法。

[0051] 实施例 1、(2R, 3R)-2, 3- 丁二醇脱氢酶基因的获得及其原核表达载体的构建

[0052] 来自多粘类芽孢杆菌 (*Paenibacillus polymyxa* ATCC12321) 的 (2R, 3R)-2, 3- 丁二醇脱氢酶基因是通过全基因组测序、注释分析后, 通过 PCR 手段从 *Paenibacillus polymyxa* ATCC12321 基因组扩增获得的。其中 *Paenibacillus polymyxa* ATCC12321 菌株购自美国生物资源保藏中心 (<http://www.atcc.org/>), 公众可以直接从美国生物资源保藏中心自由购买。

[0053] 该基因的克隆过程及其原核表达载体的构建过程包括以下步骤:

[0054] 一、(2R, 3R)-2, 3- 丁二醇脱氢酶基因的克隆

[0055] 经过全基因组测序, 并注释基因组信息后, 获得了一个可能编码丁二醇脱氢酶的基因, 根据基因序列设计如下引物: P1 : 5' -CGCATATGCAAGCATTGAGATGGCATGG-3' (设计的酶切位点为 NdeI) 和 P2 : 5' -ATCTCGAGGGCTTTCGGAGATACCAGGAT-3' (设计的酶切位点为 XhoI), 以提取的 *Paenibacillus polymyxa* ATCC12321 总基因为模板, 以 P1 和 P2 为引物, 通过 PCR 的方式扩增得到该基因片段。对克隆的 (2R, 3R)-2, 3- 丁二醇脱氢酶基因进行核苷酸序列测定, 序列测定结果表明该基因具有序列表中 SEQ ID NO : 2 的核苷酸序列, 由 1050 个碱基组成, 自 5' 端第 1- 第 1050 位碱基编码序列表中 SEQ ID NO : 1 的氨基酸残基序列的蛋白质。在氨基酸水平上进行了序列比较, 该 (2R, 3R)-2, 3- 丁二醇脱氢酶与来自一株枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) 的 2, 3 丁二醇脱氢酶【*Appl. Environ. Microbiol.*, 74(22), 6832-6838 (2008)】氨基酸相似水平仅 67%, 与来自酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 的 (2R, 3R)-2, 3 丁二醇脱氢酶【*J. Bio. Chem.*, 275(46), 35876-35885 (2000)】氨基酸相似度只有 35%, 与来自 *Thermoanaerobacter brockii* 和 *Clostridium beijerinckii* 醇脱氢酶【*Org. Biomol. Chem.*, 7, 3914-3917 (2009)】的氨基酸相似水平低于 22%, 与来自克雷伯氏菌 (*Klebsiella pneumoniae*) 的 2, 3- 丁二醇脱氢酶【*J. Ferment. Bioeng.* 83 : 32-37 (1997)】没有同源性。

[0056] 二、(2R, 3R)-2, 3- 丁二醇脱氢酶基因原核表达载体的构建

[0057] 将步骤一经 PCR 获得的基因片段用 NdeI 和 XhoI 双酶切后, 连接到经同样酶双酶切处理的表达载体 pET22b 中, 将含有 (2R, 3R)-2, 3- 丁二醇脱氢酶基因的连接产物转化大肠杆菌 *E. coli* BL21 (DE3) pLysS, 经 PCR 和酶切鉴定后将含有 (2R, 3R)-2, 3- 丁二醇脱氢酶基因的阳性克隆质粒命名为 pET22b-2R3R, 可用其进行 (2R, 3R)-2, 3- 丁二醇脱氢酶的表达。

[0058] 实施例 2、(2R, 3R)-2, 3- 丁二醇脱氢酶在原核系统的表达、纯化

[0059] 将实施例 1 获得的含有 (2R, 3R)-2, 3- 丁二醇脱氢酶基因的原核表达载体

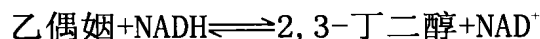
pET22b-2R3R 转化大肠杆菌 *E. coli* BL21 (DE3) pLysS, 挑选阳性单克隆在 37℃ 下摇菌至 OD600 为 0.6 后, 加入 1mM IPTG 诱导, 5 小时后离心收集菌体, 反复冻融后重悬于超声缓冲液 (含 20mM 磷酸盐缓冲液, 300mM NaCl, 10mM 咪唑, pH 7.4) 中, 超声破碎细胞, 分别收集上清及沉淀, 进行 SDS-PAGE 电泳分析, 结果表明携带目的基因的原核表达载体在大肠杆菌 *E. coli* BL21 (DE3) pLysS 中获得大量表达, 表达的重组蛋白的单亚基分子量为 38kDa, 与预期结果相符。

[0060] 通过 His-tag 标签进行蛋白纯化, 具体方法为: 经超声波破碎获得上清液, 与 Ni-NTA 凝胶结合, 含有 His-tag 标签的蛋白将结合到 Ni-NTA 凝胶上, 然后用清洗缓冲液 (20mM 磷酸盐缓冲液, 300mM NaCl, 50mM 咪唑, pH 7.4) 洗涤非特异性结合的杂蛋白, 最后用洗脱缓冲液 (20mM 磷酸盐缓冲液, 300mM NaCl, 500mM 咪唑, pH 7.4) 将目的蛋白洗脱, 即得到纯化后的 (2R, 3R)-2, 3-丁二醇脱氢酶, 然后使用分子筛凝胶柱更换缓冲液为 200mM 磷酸盐缓冲液 (pH 8.0), 获得酶液为最终的 (2R, 3R)-2, 3-丁二醇脱氢酶。纯化结果如图 1A 所示 (泳道 M 为蛋白分子量标准, 泳道 1 为纯化蛋白), SDS-PAGE 的结果显示纯化获得蛋白单亚基分子量为 38kDa, 进一步通过 Native-PAGE 检测纯化蛋白在活性状态下的分子量大小 (图 1B, 泳道 3 所示), 该蛋白在活性状态下的分子量大小为 76kDa, 表明该蛋白的活性状态是一个二聚体蛋白。

[0061] 实施例 3、酶学特性鉴定

[0062] 用下述反应进行酶学特性鉴定:

[0063]



[0064] 该反应为可逆反应, 以 NADH 的变化做为酶活测定的依据 (获得的重组蛋白只能利用 NAD⁺/NADH 为辅酶, 不能利用 NADP⁺/NADPH 为辅酶)。

[0065] 以 NAD⁺ 为辅酶, 催化 (2R, 3R)-2, 3-丁二醇生成 (R)-乙偶姻 (在 70℃、pH 11.0 条件下, 以 100mM 的 (2R, 3R)-2, 3-丁二醇为底物, 4mM 的 NAD⁺ 为辅酶), 结果只生成 (R)-乙偶姻; 催化内消旋型 meso-2, 3-丁二醇生成 (S)-乙偶姻 (在 70℃、pH 11.0 条件下, 以 100mM 的内消旋型 meso-2, 3-丁二醇为底物, 4mM 的 NAD⁺ 为辅酶), 结果只生成 (S)-乙偶姻。

[0066] 以 NADH 为辅酶, 催化 (R)-乙偶姻生成 (2R, 3R)-2, 3-丁二醇 (在 70℃、pH 8.0 条件下, 以 10mM 的 (R)-乙偶姻为底物, 0.2mM 的 NADH 为辅酶), 结果只生成 (2R, 3R)-2, 3-丁二醇; 催化 (S)-乙偶姻生成内消旋型的 meso-2, 3-丁二醇 (在 70℃、pH 8.0 条件下, 以 10mM 的 (S)-乙偶姻为底物, 0.2mM 的 NADH 为辅酶), 结果只生成 meso-2, 3-丁二醇; 催化丁二酮 (在 70℃、pH 8.0 条件下, 以 10mM 的丁二酮为底物, 0.2mM 的 NADH 为辅酶), 结果只生成 (R)-乙偶姻。

[0067] 该蛋白对 (2S, 3S)-2, 3-丁二醇没有任何活性 (在 70℃、pH 11.0 条件下, 以 100mM 的 (2R, 3R)-2, 3-丁二醇为底物, 4mM 的 NAD⁺ 为辅酶, 结果无任何产物检测到, 也无 NADH 的生成)。

[0068] 上述试验结果表明表达的目的蛋白确实为 (2R, 3R)-2, 3-丁二醇脱氢酶。

[0069] 试验一、(2R, 3R)-2, 3-丁二醇脱氢酶的最适反应 pH 值确定

[0070] 在酮还原反应, 即从乙偶姻生成 2, 3-丁二醇反应方向, 在 25℃ 条件下, 以 10mM (R/S)-乙偶姻为底物, 0.2mM 的 NADH 为辅酶, 测定了该酶从 pH4.0 到 9.0 的范围内, 酶活性的变

化情况。结果显示(如图 2(a) 幅),该酶的酮还原反应的最适 pH 为 8.0。缓冲体系:100mM 柠檬酸缓冲体系(pH 4 到 6)、100mM 的磷酸盐缓冲体系(pH 5 到 8)和 100mM 的 Tris-HCl 缓冲体系(pH 8 到 9)。

[0071] 在二醇氧化反应,即从 2,3-丁二醇到乙偶姻反应方向,在 25℃ 条件下,以 100mM 的 (2R,3R)-2,3-丁二醇为底物,4mM 的 NAD⁺ 为辅酶,测定了该酶从 pH6.0 到 12.0 的范围内,酶活性的变化情况。结果显示(如图 2(b) 幅),该酶的二醇氧化反应最适 pH 为 11.0。缓冲体系:100mM 的磷酸盐缓冲体系(pH 6 到 8)、100mM 的 Tris-HCl 缓冲体系(pH 8 到 9)、100mM 的碳酸氢钠缓冲体系(pH 9 到 11)和 100mM 的甘氨酸-氢氧化钠缓冲体系(pH 11-12)。

[0072] 试验二、(2R,3R)-2,3-丁二醇脱氢酶的最适反应温度确定

[0073] 酶活的测定方法是在 340nm 紫外波长下测定 NADH 的变化,一个单位酶活定义为每分钟氧化 1 μmol 的 NADH。(2R,3R)-2,3-丁二醇脱氢酶最适反应温度的测定条件如下:在酮还原反应体系,10mM 的 (R/S)-乙偶姻为底物,0.2mM 的 NADH 为辅酶,100mM 的磷酸盐缓冲液(pH 8.0)体系;二醇氧化反应体系,以 100mM 的 (2R,3R)-2,3-丁二醇为底物,4mM 的 NAD⁺ 为辅酶,100mM 的碳酸氢钠缓冲液(pH 11.0)体系。酮还原反应和二醇氧化反应都分别测定了从 40℃ 到 80℃ 的酶活力。结果显示,在酮还原反应和二醇氧化反应,该酶的最适反应温度都是 70℃。

[0074] 试验三、(2R,3R)-2,3-丁二醇脱氢酶的底物特异性测定

[0075] 在该酶的最适反应条件下,分别测定了该酶在二醇氧化反应和酮还原反应中的底物特异性。具体方法如下:

[0076] 1、二醇氧化反应中,底物添加浓度为 100mM,4mM NAD⁺ 为辅酶,100mM 碳酸氢钠缓冲体系(pH 11.0),反应温度 70℃。对 (2R,3R)-2,3-丁二醇的活力设定为 100%,其它化合物的相对活力值如表 1 所示。

[0077] 表 1 二醇氧化反应中 (2R,3R)-2,3-丁二醇脱氢酶的底物特异性测定结果

	底物	活力%
	(2R, 3R)-2, 3-丁二醇	100 ± 2
	meso-2, 3-丁二醇	72 ± 4
	(2S, 3S)-2, 3-丁二醇	0 ± 0
	乙醇	5 ± 3
	甘油	25 ± 1
[0078]	1-丙醇	5 ± 1
	2-丙醇	15 ± 1
	1-丁醇	6 ± 2
	1, 2-丙二醇	51 ± 5
	1, 3-丙二醇	5 ± 2
	1, 2-戊二醇	65 ± 5
	1, 5-戊二醇	7 ± 5

[0079] “±”代表三次平行试验的标准差值

[0080] 上述试验结果表明,在二醇氧化反应中该酶的最佳反应底物是 (2R,3R)-2,3-丁

二醇,其次是内消旋型 meso-2,3- 丁二醇,对 (2S,3S)-2,3- 丁二醇没有任何活力。

[0081] 2、酮还原反应中,底物添加浓度为 10mM,0.2mM NADH 为辅酶,100mM 磷酸盐缓冲体系 (pH 8.0),反应温度 70°C。对 (3R/3S)- 乙偶姻的活力设定为 100%,其它测试化学品的相对活力值如表 2 所示。

[0082] 表 2 酮还原反应中 (2R,3R)-2,3- 丁二醇脱氢酶的底物特异性测定结果

	底物	活力%
	(3R/3S)-乙偶姻	100 ± 1
[0083]	丁二酮	91 ± 1
	3-磷酸甘油醛	12 ± 2
	磷酸二羟基丙酮	0 ± 2

[0084] “±”代表三次平行试验的标准差值

[0085] 上述试验结果表明,在酮还原反应中该酶的最佳底物是 (3R/3S)- 乙偶姻,其次是丁二酮,对磷酸二羟基丙酮没有活力。

[0086] 实施例 4、利用本发明 (2R,3R)-2,3- 丁二醇脱氢酶生产 (2R,3R)-2,3- 丁二醇

[0087] 按实施例 2 的方法得到纯化后的 (2R,3R)-2,3- 丁二醇脱氢酶,然后使用分子筛凝胶柱更换缓冲液为 200mM 磷酸盐缓冲液 (pH 8.0),获得 (2R,3R)-2,3- 丁二醇脱氢酶酶液。

[0088] 利用上面获得 (2R,3R)-2,3- 丁二醇脱氢酶,添加 100mM 的 (3R)- 乙偶姻和 100mM 的 NADH 作为底物,在 100mM 的磷酸盐缓冲液 (pH 8.0) 体系中,70°C 反应 4 个小时,检测得到 69mM 的 (2R,3R)-2,3- 丁二醇,远高于酵母菌报道的 1mM 的产量。

[0089] 实施例 5、利用含有本发明 (2R,3R)-2,3- 丁二醇脱氢酶的细胞生产 (2R,3R)-2,3- 丁二醇

[0090] 将携带 (2R,3R)-2,3- 丁二醇脱氢酶基因的原核表达载体 pET22b-2R3R 转化大肠杆菌 E. coli BL21 (DE3) pLysS 后,获得重组大肠杆菌 E. coli RBDH,经过 PCR 和表达验证,证明该菌株具有 (2R,3R)-2,3- 丁二醇脱氢酶活力。

[0091] 从平板上随机挑选一个 E. coli RBDH 单菌落转接到 5mL 含有 100 μg/mL 氨苄西林和 34 μg/mL 氯霉素的 LB 液体培养基中,37°C 培养 12 小时,然后 1% 转接至新鲜的含有 100 μg/mL 氨苄西林和 34 μg/mL 氯霉素的 LB 液体培养基中,37°C 培养至菌体 OD₆₀₀ 值达到 0.6,然后加入 1mM 的 IPTG 诱导蛋白表达 5 小时,收集菌体重悬于 200mM 的磷酸盐缓冲液中,调节菌体 OD₆₀₀ 值为 20,获得具有 (2R,3R)-2,3- 丁二醇脱氢酶活力的细胞作为生物催化剂。

[0092] 利用上面获得的生物催化剂,通过添加 1000mM 的 (3R)- 乙偶姻作为底物,37°C 条件下反应 12 个小时,可以检测得到 871mM 的 (2R,3R)-2,3- 丁二醇,远高于酵母菌报道的 1mM 的产量。

[0093] 实施例 6、利用 (2R,3R)-2,3- 丁二醇脱氢酶生产乙偶姻

[0094] 用与实施例 2 相同的方法获得 (2R,3R)-2,3- 丁二醇脱氢酶,然后利用该酶进行以下反应:

[0095] a) 在 100mM 的磷酸盐缓冲液 (pH 11.0) 体系中,添加 2mM 的 NADH 为辅酶,100mM 丁二酮作为底物,70°C 反应 4 个小时,得到 (3R)- 乙偶姻 (3R)- 乙偶姻 83mM。

[0096] b) 在 100mM 的磷酸盐缓冲液 (pH 11.0) 体系中, 添加 4mM 的 NAD⁺ 为辅酶, 100mM (2R, 3R)-2, 3- 丁二醇为底物, 70 °C 反应 4 个小时, 得到 (3R)- 乙偶姻 (3R)- 乙偶姻 76mM。

[0097] c) 在 100mM 的磷酸盐缓冲液 (pH 11.0) 体系中, 添加 4mM 的 NAD⁺ 为辅酶, 100mM 的 meso-2, 3- 丁二醇作为底物, 70 °C 反应 4 个小时, 得到 (3S)- 乙偶姻 56mM。

[0001]

序列表

<110> 天津工业生物技术研究所

<120> (2R, 3R)-2, 3-丁二醇脱氢酶及其编码基因与应用

<130> CGCNB105136W

<160> 2

<210> 1

<211> 350

<212> PRT

<213> 多粘类芽孢杆菌 (*Paenibacillus polymyxa*)

<400> 1

```

Met Gln Ala Leu Arg Trp His Gly Val Lys Asp Leu Arg Leu Glu Asn
1           5           10           15
Ile Glu Gln Pro Ala Ala Leu Pro Gly Lys Val Lys Ile Lys Val Glu
           20           25           30
Trp Cys Gly Ile Cys Gly Ser Asp Leu His Glu Tyr Val Ala Gly Pro
           35           40           45
Ile Phe Ile Pro Glu Asn Ala Gln His Pro Leu Thr Gly Glu Lys Ala
           50           55           60
Pro Ile Val Met Gly His Glu Phe Ser Gly Gln Val Val Glu Ile Gly
65           70           75           80
Glu Gly Val Thr Lys Ile Gln Val Gly Asp Arg Val Val Val Glu Pro
           85           90           95
Val Phe Ala Cys Gly Glu Cys Asp Ala Cys Arg Gln Gly Lys Tyr Asn
           100          105          110
Leu Cys Asp Lys Met Gly Phe Leu Gly Leu Ala Gly Gly Gly Gly Gly
           115          120          125

```

[0002]

Phe Ser Glu Tyr Val Ala Ala Asp Glu His Met Val His Lys Ile Pro
 130 135 140
 Glu Ser Val Ser Phe Glu Gln Gly Ala Leu Val Glu Pro Ser Ala Val
 145 150 155 160
 Ala Leu Tyr Ala Val Arg Gln Ser Gln Leu Lys Val Gly Asp Lys Ala
 165 170 175
 Val Val Phe Gly Ala Gly Pro Ile Gly Leu Leu Val Ile Glu Ala Leu
 180 185 190
 Lys Ala Ser Gly Ala Ser Glu Ile Tyr Ala Val Glu Leu Ser Glu Glu
 195 200 205
 Arg Lys Ala Lys Ala Glu Glu Leu Gly Ala Ile Val Leu Asp Pro Lys
 210 215 220
 Thr Tyr Asp Val Val Glu Glu Leu His Lys Arg Thr Asn Gly Gly Val
 225 230 235 240
 Asp Val Ala Tyr Glu Val Thr Gly Val Pro Pro Val Leu Thr Gln Ala
 245 250 255
 Ile Glu Ser Thr Lys Ile Ser Gly Gln Ile Met Ile Val Ser Ile Phe
 260 265 270
 Glu Lys Glu Ala Pro Ile Lys Pro Asn Asn Ile Val Met Lys Glu Arg
 275 280 285
 Asn Leu Thr Gly Ile Ile Gly Tyr Arg Asp Val Phe Pro Ala Val Ile
 290 295 300
 Ser Leu Met Glu Lys Gly Tyr Phe Pro Ala Asp Lys Leu Val Thr Lys
 305 310 315 320
 Arg Ile Lys Leu Glu Glu Val Ile Glu Gln Gly Phe Glu Gly Leu Leu
 325 330 335
 Lys Glu Lys Asn Gln Val Lys Ile Leu Val Ser Pro Lys Ala
 340 345 350

<210> 2

<211> 1050

<212> DNA

[0003]

<213> 多粘类芽孢杆菌 (*Paenibacillus polymyxa*)

<400> 2

atgcaagcat tgagatggca tggagtaaaa gatttacgtt tggaaaacat tgagcaacce	60
gctgctcttc caggaaaagt aaaaatcaaa gtagaatggt gtggcatttg cggaaagtgat	120
cttcacgaat atgtagcagg accgatcttc attcctgaaa acgctcagca tccactgact	180
ggcgaaaaag ctccgattgt gatgggacat gaattttctg gacaagtcgt tgaaatcgg	240
gaagggtgaa ctaaaattca ggttggcgac cgtgtagtcg tagaaccggt ttttgcattg	300
ggagaatgtg atgcatgtag acaaggcaaa tataaccttt gcgataaaaat gggcttcctc	360
ggtttggcag gcggcggcgg tggallttct gaatatgtcg cagctgacga gcacatggtt	420
cacaaaaattc cagaaagcgt atccttcgag caaggcgtt tggtagagcc ttcggccgtt	480
gctttgtacg ctgtacgtca aagccaactg aaagtcggcg acaaagctgt cgtgtttggc	540
gctggtccta tcggattgct ggttattgaa gcgttgaaag cttcgggcgc atctgagatt	600
tatgcagtag agctttccga ggagcgtaaa gctaaagctg aagagctggg tgctattgtg	660
cttgatccta aaacttatga tgttgtggaa gaactgcaca aacggaccaa cggtggcgta	720
gatgtagcct atgaagtcac tggagtacct cctgtgctga ctcaagcgat tgaatcact	780
aaaattagcg gacaaateat gatcgtcagc atttttgaaa aagaagctcc aatcaaaccg	840
aacaatatcg ttatgaagga acgcaalctg actggtatta tcggctaccg tgatgtattc	900
ccggcigtca tcagcttgat ggaaaaaggg tatttccctg ctgacaagct tgtgacccaa	960
cgtattaagc tcgaagaagt aatcgagcaa ggttttgaag gtctcctgaa agaaaaaaat	1020
caggttaaaa tcctggtatc tccgaaagcc	1050

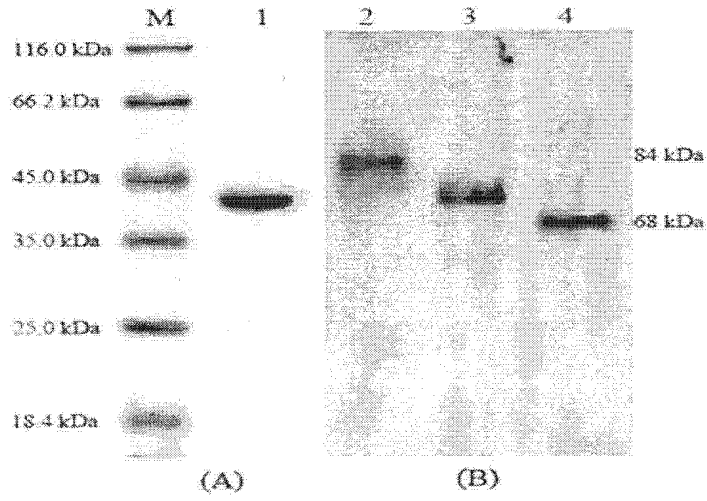


图 1

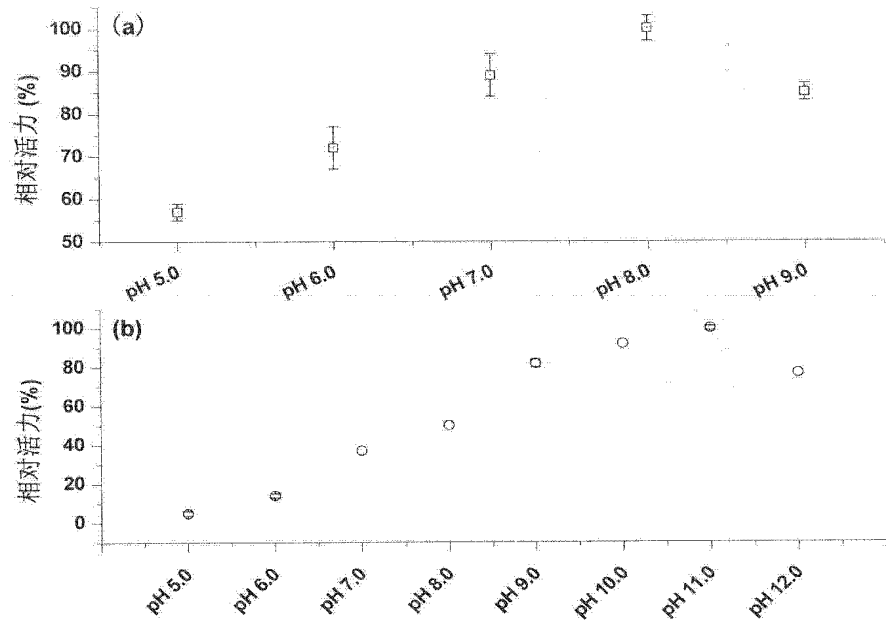


图 2