



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108018252 A

(43)申请公布日 2018.05.11

(21)申请号 201711317401.X

C12R 1/19(2006.01)

(22)申请日 2017.12.12

(83)生物保藏信息

CCTCC No:M 2017060 2017.02.23

(71)申请人 山东格得生物科技有限公司

地址 274400 山东省菏泽市曹县兴达路1号

(72)发明人 李保山 李海存 王洪钟 黄爱清
宋长红

(74)专利代理机构 济南泉城专利商标事务所
37218

代理人 张贵宾

(51)Int.Cl.

C12N 1/21(2006.01)

C12N 9/10(2006.01)

C12P 19/40(2006.01)

权利要求书1页 说明书6页
序列表2页

(54)发明名称

一种中间体2'-脱氧鸟苷的制备方法

(57)摘要

本发明公开了一种中间体2'-脱氧鸟苷的制备方法,构建新颖的N-核苷脱氧核糖转移酶的重组菌株,经自诱导表达合成重组N-核苷脱氧核糖转移酶,并采用干粉投料方式加入底物通过生物催化法高效制备2'-脱氧鸟苷,制得的2'-脱氧鸟苷产率高,成本低。

1. 一种重组N-核苷脱氧核糖转移酶的工程菌株, 重组N-核苷脱氧核糖转移酶的工程菌株大肠杆菌 DNTase-1已保藏于中国典型培养物保藏中心, 保藏号为 CCTCC No:M 2017060, 保藏时间为2017年2月23号, 保藏地址为中国武汉, 武汉大学, 邮编430072。

2. 一种重组N-核苷脱氧核糖转移酶的制备方法, 其特征在于: 将重组N-核苷脱氧核糖转移酶的工程菌株大肠杆菌 DNTase-1接入培养基进行诱导培养, 从而获得重组表达的N-核苷脱氧核糖转移酶。

3. 根据权利要求2所述的一种重组N-核苷脱氧核糖转移酶的制备方法, 其特征在于: 所述培养基为自诱导培养基: 酵母浸粉 20g/L, 鱼蛋白胨12.5g/L, 磷酸氢二钾 2.5g/L, 氯化钠 5.0g/L, 七水合硫酸镁 1.0g/L, 乳糖 3.2g/L, 甘油 5.5g/L, pH 6.5; 培养条件为: 培养温度32℃, 时间24h。

4. 一种中间体2'-脱氧鸟苷的制备方法, 其特征在于: 重组N-核苷脱氧核糖转移酶的大肠杆菌工程菌株发酵培养完毕后, 将发酵液转入生物催化反应器中, 按照生物催化反应条件, 加入生物催化反应底物进行生物催化制备2'-脱氧鸟苷。

5. 根据权利要求4所述的一种中间体2'-脱氧鸟苷的制备方法, 其特征在于: 所述生物催化反应底物为脱氧核糖供体与受体的组合, 包括2'-脱氧尿苷与鸟嘌呤、2'-脱氧腺苷与鸟嘌呤、2'-脱氧胞苷与鸟嘌呤、β-胸苷与鸟嘌呤。

6. 根据权利要求5所述的一种中间体2'-脱氧鸟苷的制备方法, 其特征在于: 所述生物催化反应底物为β-胸苷与鸟嘌呤。

7. 根据权利要求5或6所述的一种中间体2'-脱氧鸟苷的制备方法, 其特征在于: 生物催化反应体系中糖基供体浓度为50-300mM, 糖基受体浓度为50-300mM; 生物催化反应体系中温度为25-45℃, pH值3.0-9.0, 生物催化时间为2-6h。

8. 根据权利要求7所述的一种中间体2'-脱氧鸟苷的制备方法, 其特征在于: 生物催化反应体系中糖基供体浓度为200mM和糖基受体浓度为250mM。

9. 根据权利要求7所述的一种中间体2'-脱氧鸟苷的制备方法, 其特征在于: 生物催化反应体系中温度为30-35℃, pH值4.0-5.0, 生物催化时间为3-4h。

一种中间体2'-脱氧鸟苷的制备方法

技术领域

[0001] 本发明涉及微生物领域,具体涉及一种中间体2'-脱氧鸟苷的制备方法。

背景技术

[0002] 2'-脱氧鸟苷是一种天然的脱氧核苷,可直接用于制备组合脱氧核苷药物或者作为化学试剂用于生化研究,也可对其分子结构进行适当修饰来合成分子标记物(如8-溴-2'-脱氧鸟苷、8-羟基-2'-脱氧鸟苷、N7-鸟嘌呤烷化物)和抗肿瘤衍生物(如2'-脱氧鸟苷6-甲氧基或6-氨基-衍生物)。

[0003] 目前商业化生产2'-脱氧鸟苷主要采用化学合成,由于化学合成步骤长、副产物多、总收率偏低等种种不足,所以,研究人员开始着手于采用生物法来制备2'-脱氧鸟苷。采用生物法制备2'-脱氧鸟苷主要有两种方式来实现,所对应使用的酶分别是核苷磷酸化酶和N-脱氧核苷核糖转移酶,一般以胸苷为脱氧糖基供体,以鸟嘌呤为脱氧糖基受体,在一定条件下,在酶的催化作用下进行糖基交换反应生成脱氧鸟苷。由于鸟嘌呤在反应体系中溶解度极低,从而导致了极低的转化率和脱氧鸟苷产率。

[0004] 为了提高脱氧鸟苷产率,可以通过添加助溶剂来增加鸟嘌呤在反应体系的溶解度,或者使用溶解度比鸟嘌呤大的前体物来替代鸟嘌呤。中国专利申请号201510140553.1公开了采用双水相体系提高鸟嘌呤的溶解度,大大提高了转化率和脱氧鸟苷产率;中国专利申请号201010611733公开了采用鸟苷酸为鸟嘌呤的前体物,采用乙酰短杆菌的核苷磷酸化酶和磷酸单酯酶双酶作用下催化合成2'-脱氧鸟苷;中国专利申请号200510137532公开了先将鸟嘌呤与乙二醛进行反应生成乙二醛-鸟嘌呤衍生物来提高鸟嘌呤的溶解度,转化完后再经碱解脱去乙二醛基团生成2'-脱氧鸟苷;欧洲专利EP1457568、美国专利US20050170470A1、美国专利US6197552、世界专利W02003057895A1以及文献(Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic,2000,10:207-213)报道采用鸟苷酸、2-氨基-6-氯嘌呤或者2,6-二氨基嘌呤作为糖基受体来制备2'-脱氧鸟苷前体物(如5'-单磷酸2'-脱氧鸟苷、2-氨基-6-氯-2'-脱氧核苷、2,6-二氨基-2'-脱氧核苷),然后再经酶处理得到脱氧鸟苷。

[0005] 虽然上述报道中所采用措施对提高鸟嘌呤溶解度或者脱氧鸟苷产率方面取得一定成效,但还存在一些不足之处,如双水相体系不利于后续纯化、鸟嘌呤前体物方面还需额外通过化学法脱保护基团或酶法脱氨或脱氯转化、以及生物催化所用酶活力不高等。因此,提高鸟嘌呤溶解度和构建高活力的产酶菌株是提高脱氧鸟苷产率的有效措施。

发明内容

[0006] 为弥补现有技术的不足,本发明提供一种中间体2'-脱氧鸟苷的制备方法,通过分子克隆手段,构建新颖的N-核苷脱氧核糖转移酶的重组菌株,经自诱导表达合成重组N-核苷脱氧核糖转移酶,并采用干粉投料方式加入底物通过生物催化法高效制备2'-脱氧鸟苷。

[0007] 本发明是通过如下技术方案实现的:

一种重组N-核苷脱氧核糖转移酶的工程菌株,重组N-核苷脱氧核糖转移酶的工程菌株-大肠杆菌 DNTase-1 *Escherichia coli* DNTase-1已保藏于中国典型培养物保藏中心,保藏号为 CCTCC No:M 2017060,保藏时间为2017年2月23号,保藏地址为中国武汉,武汉大学,邮编430072。

[0008] 重组N-核苷脱氧核糖转移酶的工程菌株-大肠杆菌 DNTase-1 *Escherichia coli* DNTase-1氨基酸人工序列为:

```
MNKKKTLYFG AGWFNEKQNK AYKEAMAALK ENPTVDLENS YVPLENQYKG IRIDEHPEYL 60
HNIEWASATY HNDLVGIKTS DVMLGVYLPE EEDVGLGMEL GYALSQGKYI LLVIPDEDYG 120
KPINLMSWGV CDNAIKISEL KDFDFNKPRY NFYDGAUV 158。
```

[0009] 重组N-核苷脱氧核糖转移酶的工程菌株大肠杆菌 DNTase-1 *Escherichia coli* DNTase-1的核酸人工序列为:

```
cttgtcataa acttctttta aaaccaaate ttgettaatt tgatctgtta caaaaactgc 60
atctggggca aaaaaatttt cagtattagt cattgaattt taccttccat tatggaatta 120
ctattttttag cgtaagttaa caagacgttt ttttcaatcg aaaatatgtt aaagttaatt 180
cgtcagcaat ttttatgggg agaaaattat gaacaagaaa aagactttat attttggtgc 240
cggttggttt aatgaaaagc aaaacaaagc ttacaaagaa gcaatggcag ctttaaaaga 300
aaatccaaca gttgatttag aaaatagtta tgtgccccctt gaaaaccaat acaagggtat 360
tcgcattgat gaacatccag aatacttgca caacattgaa tgggcttctg caacctacca 420
caatgattta gtaggaatta agacttctga tgtcatgctt ggcgtatatt tgccagaaga 480
agaagacgtc ggcttaggca tggaactggg ctacgcatta tctcaaggaa aatatatttt 540
attggttata ccagatgaag attacggcaa gccaatcaac ttaatgagct ggggcgtttg 600
tgacaatgcc atcaagatca gtgaattaaa agacttcgac ttaacaagc ctcgctacaa 660
tttctacgac ggagctgtat attaaaaaat aagcaaacta aatgacctat cgcttaaaaa 720
ttgcgatagg tcatttttta atattatctg tcatgtataa aatctttctt aataaatata 780
ctccaagtga ttttccaaaa aaattattat tctataccca cttcatatgg aagtccgagt 840
cacttatgta aatcatatat cacttgcat attatcttac tactaagttg ttatttagct 900
ttcaatgccc attggtatca caagcctttc tttatatctg actaactaca ctaactatgt 960
cattggcctc accttttctt tttaatatta tttcttaatt tttttact cataatatag 1020
cacatttctc ccaaaaagtaa aagcgttac attaaaataa agattaattt ttctttgact 1080
actatccttt tagcataatt gcacaaaaag ttaagatttt ttcgctataa tatatggtaa 1140
caagttttat taggaagaaa gcaatatgac acaaaatcaa atagaaagac atcaattagg 1200
tcaactcatc ggtgcgaata aacgtgatca ttactatgaa cttcactatt ctaccggaga 1260
agttgctcgt ctttatattt tagggg 1286。
```

[0010] 一种重组N-核苷脱氧核糖转移酶的制备方法,其特征在于:将重组N-核苷脱氧核糖转移酶的工程菌株大肠杆菌 DNTase-1 *Escherichia coli* DNTase-1接入培养基进行诱导培养,从而获得重组表达的N-核苷脱氧核糖转移酶。其中所述重组菌株的培养基以及培养条件可采用本领域任一可使重组菌株生长良好并且能产生本发明中所述的N-核苷脱氧核糖转移酶的培养基及培养条件。

[0011] 作为优选方案,一种重组N-核苷脱氧核糖转移酶的制备方法,所述培养基为自诱

导培养基:酵母浸粉 20g/L,鱼蛋白胨12.5g/L,磷酸氢二钾 2.5g/L,氯化钠 5.0g/L,七水合硫酸镁 1.0g/L,乳糖 3.2g/L,甘油 5.5g/L,pH 6.5;培养条件为:培养温度32℃,时间24h。

[0012] 一种中间体2'-脱氧鸟苷的制备方法,采用以下步骤:重组N-核苷脱氧核糖转移酶的大肠杆菌工程菌株发酵培养完毕后,将发酵液转入生物催化反应器中,按照生物催化反应条件,加入生物催化反应底物进行生物催化制备2'-脱氧鸟苷。

[0013] 本发明的中间体2'-脱氧鸟苷的制备方法,所述生物催化反应底物为脱氧核糖供体与受体的组合,包括2'-脱氧尿苷与鸟嘌呤、2'-脱氧腺苷与鸟嘌呤、2'-脱氧胞苷与鸟嘌呤或β-胸苷与鸟嘌呤。

[0014] 作为优选方案,本发明的中间体2'-脱氧鸟苷的制备方法,所述生物催化反应底物为β-胸苷与鸟嘌呤。

[0015] 本发明的中间体2'-脱氧鸟苷的制备方法,生物催化反应体系中糖基供体浓度为50-300mM,糖基受体浓度为50-300mM;生物催化反应体系中温度为25-45℃,pH值3.0-9.0,生物催化时间为2-6h。

[0016] 作为优选方案,本发明的中间体2'-脱氧鸟苷的制备方法,生物催化反应体系中糖基供体浓度为200mM和糖基受体浓度为250mM;温度为30-35℃,pH值4.0-5.0,生物催化时间为3-4h。

[0017] 本发明的有益效果是:本发明以N-核苷脱氧核糖转移酶的重组工程菌株——大肠杆菌 DNTase-1 *Escherichia coli* DNTase-1(保藏于中国典型培养物保藏中心,保藏号为 CCTCC No:M 2017060)经自诱导培养表达N-核苷脱氧核糖转移酶,以含该酶的发酵液为生物催化剂,以底物干粉方式进行投料转化通过生物催化法高效制备2'-脱氧鸟苷达18.21g/L,产率高,成本低。

具体实施方式

[0018] 下面结合具体实施方式对本发明作进一步详细的说明,以帮助本领域的技术人员对本发明的发明构思、技术方案有更完整、准确和深入的理解,本发明的保护范围包括但不限于以下实施例,在不偏离本申请的精神和范围的前提下任何对本发明的技术方案的细节和形式所做出的修改均落入本发明的保护范围内。

[0019] 实施例1

(1) 重组N-核苷脱氧核糖转移酶的工程菌株大肠杆菌 DNTase-1 *Escherichia coli* DNTase-1,保藏于中国典型培养物保藏中心,保藏号为 CCTCC No:M 2017060,保藏时间为2017年2月23号,保藏地址为中国武汉,武汉大学,邮编430072。

[0020] (2) 重组N-核苷脱氧核糖转移酶的制备:

将获得的重组N-核苷脱氧核糖转移酶的大肠杆菌工程菌株 DNTase-1 (保藏于中国典型培养物保藏中心,保藏号为 CCTCC No:M 2017060)在无菌条件下接入装有100ml诱导培养基的500ml三角瓶中,其诱导培养基组成为:酵母浸粉 20g/L,鱼蛋白胨12.5g/L,磷酸氢二钾 2.5g/L,氯化钠 5.0g/L,七水合硫酸镁 1.0g/L,乳糖 3.2g/L,甘油 5.5g/L,pH 6.5。然后在温度32℃,转速为200转/分条件下进行振荡培养24小时,所得发酵液即为含重组表达的N-核苷脱氧核糖转移酶的生物催化剂。

[0021] (3) 2'-脱氧鸟苷的制备:

取50ml步骤(2)获得的含重组N-核苷脱氧核糖转移酶的发酵液,然后加入100mM鸟嘌呤和100mM脱氧核糖基供体(脱氧核糖基供体为2'-脱氧腺苷、2'-脱氧尿苷、2'-脱氧胞苷、 β -胸苷中的一种),再将转化体系pH值调至5.0,在35℃恒温环境中转化2小时制备2'-脱氧鸟苷。

[0022] 实施例2

实施例1步骤(3)转化终止时,取1ml转化液,用10%甲醇溶液稀释至100倍,然后经12000转/分离心3分钟,离心上清液经0.45 μ m过滤器过滤,所得滤液进行高效液相色谱分析测定2'-脱氧鸟苷。测定方法采用高效液相色谱法(HPLC),其检测方法如下所示:

色谱柱:Diamonsil C₁₈,5 μ m,150 x 4.6mm;流动相:乙腈:甲醇:10mM磷酸二氢铵=1:4:100;流速:0.8ml/min;检测波长:254nm。

[0023] HPLC分析结果显示如下表:

序号	脱氧核糖基供体	2'-脱氧鸟苷浓度(g/L)
1	2'-脱氧腺苷	3.85
2	2'-脱氧尿苷	4.62
3	2'-脱氧胞苷	4.71
4	β -胸苷	5.89

实施例3

不同脱氧核糖基供体浓度制备的2'-脱氧鸟苷:

取50ml实施例1步骤(2)中含重组N-核苷脱氧核糖转移酶的发酵液,然后加入100mM鸟嘌呤和按不同浓度加入 β -胸苷,再将转化体系pH值调至5.0,在35℃恒温环境中转化2小时。转化终止时,取1ml转化液,用10%甲醇溶液稀释至100倍,然后经12000转/分离心3分钟,离心上清液经0.45 μ m过滤器过滤,所得滤液进行高效液相色谱分析测定2'-脱氧鸟苷。

[0024] HPLC分析结果显示如下表:

序号	β -胸苷浓度(mM)	2'-脱氧鸟苷浓度(g/L)
1	50mM	3.12
2	100mM	4.85
3	200mM	6.24
4	300mM	5.37

实施例4

不同鸟嘌呤浓度制备的2'-脱氧鸟苷:

取50ml实施例1步骤(2)中含重组N-核苷脱氧核糖转移酶的发酵液,然后加入200mM β -胸苷和按不同浓度加入鸟嘌呤,再将转化体系pH值调至5.0,在35℃恒温环境中转化2小时。转化终止时,取1ml转化液,用10%甲醇溶液稀释至100倍,然后经12000转/分离心3分钟,离

心上清液经0.45 μ m过滤器过滤,所得滤液进行高效液相色谱分析测定2'-脱氧鸟苷。

[0025] HPLC分析结果显示如下表:

序号	鸟嘌呤浓度(mM)	2'-脱氧鸟苷浓度(g/L)
1	50mM	2.12
2	100mM	6.43
3	200mM	7.02
4	250mM	8.56
5	300mM	6.19

实施例5

不同生物催化反应体系温度下制备的2'-脱氧鸟苷:

取50ml实施例1步骤(2)中含重组N-核苷脱氧核糖转移酶的发酵液,然后加入200mM β -胸苷和250mM鸟嘌呤,再将转化体系pH值调至5.0,在不同温度下转化2小时。转化终止时,取1ml转化液,用10%甲醇溶液稀释至100倍,然后经12000转/分离心3分钟,离心上清液经0.45 μ m过滤器过滤,所得滤液进行高效液相色谱分析测定2'-脱氧鸟苷。

[0026] HPLC分析结果显示如下表:

序号	转化温度(°C)	2'-脱氧鸟苷浓度(g/L)
1	25	3.48
2	30	5.91
3	35	8.36
4	40	4.17
5	45	2.83

实施例6

不同生物催化反应体系pH值下制备的2'-脱氧鸟苷:

取50ml实施例步骤(2)1中含重组N-核苷脱氧核糖转移酶的发酵液,然后加入200mM β -胸苷和250mM鸟嘌呤,再将转化体系pH值调至不同pH值,在35 $^{\circ}$ C温度下转化2小时。转化终止时,取1ml转化液,用10%甲醇溶液稀释至100倍,然后经12000转/分离心3分钟,离心上清液经0.45 μ m过滤器过滤,所得滤液进行高效液相色谱分析测定2'-脱氧鸟苷。

[0027] HPLC分析结果显示如下表:

序号	转化温度 (°C)	2'-脱氧鸟苷浓度(g/L)
1	3.0	5.32
2	4.0	12.91
3	5.0	8.42
4	6.0	5.26
5	7.0	3.47
6	8.0	2.18
7	9.0	2.06

实施例7

不同生物催化反应时间制备的2'-脱氧鸟苷:

取50ml实施例1中含重组N-核苷脱氧核糖转移酶的发酵液,然后加入200mMβ-胸苷和250mM鸟嘌呤,再将转化体系pH值调至4.0,在35℃温度下转化不同时间取样测定脱氧鸟苷浓度。

[0028] HPLC分析结果显示如下表:

序号	转化时间 (h)	2'-脱氧鸟苷浓度(g/L)
1	1	5.25
2	2	12.87
3	3	18.21
4	4	15.18
5	5	11.41
6	6	8.30

SEQUENCE LISTING

<110> 山东格得生物科技有限公司

<120> 一种中间体2'-脱氧鸟苷的制备方法

<130> 1

<160> 2

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 1286

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 1

```

cttgtcataa acttctttta aaaccaaate ttgettaatt tgatctgtta caaaaactgc 60
atctggggca aaaaaatttt cagtattagt cattgaattt taccttccat tatggaatta 120
ctattttttag cgtaagttaa caagacgttt ttttcaatcg aaaatatgtt aaagttaatt 180
cgtcagcaat ttttatgggg agaaaattat gaacaagaaa aagactttat attttggtgc 240
cggttggttt aatgaaaagc aaaacaaagc ttacaaagaa gcaatggcag ctttaaaaga 300
aaatccaaca gttgatttag aaaatagtta tgtgccctt gaaaaccaat acaagggtat 360
tcgcattgat gaacatccag aatacttgca caacattgaa tgggcttctg caacctacca 420
caatgattta gtaggaatta agacttctga tgtcatgctt ggcgtatatt tgccagaaga 480
agaagacgtc ggcttaggca tggaactggg ctacgcatta tctcaaggaa aatatatttt 540
attggttata ccagatgaag attacggcaa gccaatcaac ttaatgagct ggggcgtttg 600
tgacaatgcc atcaagatca gtgaattaaa agacttcgac ttaacaagc ctcgctacaa 660
tttctacgac ggagctgtat attaaaaaat aagcaaacta aatgacctat cgcttaaaaa 720
ttgcgatagg tcatttttta atattatctg tcatgtataa aatctttctt aataaatata 780
ctccaagtga ttttccaaaa aaattattat tctataccca cttcatatgg aagtccgagt 840
cacttatgta aatcatatat cacttggeat attatcttac tactaagttg ttatttagct 900
ttcaatgccc attggtatca caagccttct tttatatctg actaactaca ctaactatgt 960
cattggcctc accttttctt tttaatatta tttcttaatt tttttact cataatatag 1020
cacatttctc ccaaaagtaa aagcgttac attaaaataa agattaattt ttctttgact 1080
actatccttt tagcataatt gcacaaaaag ttaagatttt ttcgctataa tatatggtaa 1140
caagttttat taggaagaaa gcaatatgac acaaaatcaa atagaaagac atcaattagg 1200
tcaactcatc ggtgcgaata aacgtgatca ttactatgaa cttcactatt ctaccggaga 1260
agttgctcgt ctttatattt tagggg 1286

```

<210> 2

<211> 158

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 2

Met	Asn	Lys	Lys	Lys	Thr	Leu	Tyr	Phe	Gly	Ala	Gly	Trp	Phe	Asn	Glu
1				5					10					15	
Lys	Gln	Asn	Lys	Ala	Tyr	Lys	Glu	Ala	Met	Ala	Ala	Leu	Lys	Glu	Asn
			20					25					30		
Pro	Thr	Val	Asp	Leu	Glu	Asn	Ser	Tyr	Val	Pro	Leu	Glu	Asn	Gln	Tyr
		35					40					45			
Lys	Gly	Ile	Arg	Ile	Asp	Glu	His	Pro	Glu	Tyr	Leu	His	Asn	Ile	Glu
	50					55					60				
Trp	Ala	Ser	Ala	Thr	Tyr	His	Asn	Asp	Leu	Val	Gly	Ile	Lys	Thr	Ser
65					70				75					80	
Asp	Val	Met	Leu	Gly	Val	Tyr	Leu	Pro	Glu	Glu	Glu	Asp	Val	Gly	Leu
			85						90					95	
Gly	Met	Glu	Leu	Gly	Tyr	Ala	Leu	Ser	Gln	Gly	Lys	Tyr	Ile	Leu	Leu
			100					105					110		
Val	Ile	Pro	Asp	Glu	Asp	Tyr	Gly	Lys	Pro	Ile	Asn	Leu	Met	Ser	Trp
		115					120					125			
Gly	Val	Cys	Asp	Asn	Ala	Ile	Lys	Ile	Ser	Glu	Leu	Lys	Asp	Phe	Asp
	130					135					140				
Phe	Asn	Lys	Pro	Arg	Tyr	Asn	Phe	Tyr	Asp	Gly	Ala	Val	Tyr		
145					150					155					