

• 生物育种与工艺优化 •

固定化尿苷-胞苷激酶和聚磷酸激酶偶联催化制备 5'-胞苷酸

吴思佳, 李杰, 胡晨龙, 田俊宇, 张通, 陈宁, 范晓光

天津科技大学 生物工程学院, 天津 300457

吴思佳, 李杰, 胡晨龙, 等. 固定化尿苷-胞苷激酶和聚磷酸激酶偶联催化制备 5'-胞苷酸. 生物工程学报, 2020, 36(5): 1002-1011.

Wu SJ, Li J, Hu CL, et al. Concomitant use of immobilized uridine-cytidine kinase and polyphosphate kinase for 5'-cytidine monophosphate production. Chin J Biotech, 2020, 36(5): 1002-1011.

摘要: 尿苷-胞苷激酶作为生物体核苷酸代谢补偿途径中的重要催化剂, 可以催化胞苷的磷酸化反应合成 5'-胞苷酸 (简称胞苷酸), 但需要 NTP 作为磷酸供体。为了提高胞苷酸的生产效率, 文中首先使用大肠杆菌分别异源表达来源于嗜热栖热菌 *Thermus thermophilus* HB8 的尿苷-胞苷激酶和来源于类球红细菌 *Rhodobacter sphaeroides* 的聚磷酸激酶, 其中尿苷-胞苷激酶用于催化胞苷和 ATP 形成胞苷酸, 聚磷酸激酶则用于 ATP 的循环再生。然后, 使用 D403 金属螯合树脂吸附 Ni^{2+} 形成固定化载体, 再利用固定化载体特异性吸附重组酶形成固定化酶。最后, 单因素优化实验确定固定化酶的催化反应条件, 在 30 °C、pH 8.0 的条件下, 以 60 mmol/L 胞苷和 0.5 mmol/L ATP 为底物, 可实现 5 批次的高效连续催化反应, 胞苷酸平均摩尔得率达到 91.2%。上述制备方法反应成本低, 产物得率高, 酶利用率高, 在工业生产中具有较好的应用潜力。

关键词: 5'-胞苷酸, 尿苷-胞苷激酶, 聚磷酸激酶, 固定化酶

Concomitant use of immobilized uridine-cytidine kinase and polyphosphate kinase for 5'-cytidine monophosphate production

Sijia Wu, Jie Li, Chenlong Hu, Junyu Tian, Tong Zhang, Ning Chen, and Xiaoguang Fan

College of Biotechnology, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China

Abstract: Uridine-cytidine kinase, an important catalyst in the compensation pathway of nucleotide metabolism, can catalyze the phosphorylation reaction of cytidine to 5'-cytidine monophosphate (CMP), but the reaction needs NTP as the phosphate donor. To increase the production efficiency of CMP, uridine-cytidine kinase gene from *Thermus thermophilus* HB8 and polyphosphate kinase gene from *Rhodobacter sphaeroides* were cloned and expressed in *Escherichia coli* BL21(DE3).

Received: August 8, 2019; **Accepted:** October 24, 2019

Supported by: National Natural Science Foundation of China (No. 31700037), Tianjin Natural Science Foundation (No. 18JCQNJC79200), China Postdoctoral Science Foundation (No. 2018M631747).

Corresponding author: Xiaoguang Fan. Tel: +86-22-64431557; E-mail: xiaoguangfan@tust.edu.cn

国家自然科学基金 (No. 31700037), 天津市自然科学基金 (No. 18JCQNJC79200), 中国博士后科学基金 (No. 2018M631747) 资助。

网络出版时间: 2019-11-27

网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1998.Q.20191127.0951.002.html>

Uridine-cytidine kinase was used for the generation of CMP from cytidine and ATP, and polyphosphate kinase was used for the regeneration of ATP. Then, the D403 metal chelate resin was used to adsorb Ni^{2+} to form an immobilized carrier, and the immobilized carrier was specifically combined with the recombinant enzymes to form the immobilized enzymes. Finally, single-factor optimization experiment was carried out to determine the reaction conditions of the immobilized enzyme. At 30 °C and pH 8.0, 60 mmol/L cytidine and 0.5 mmol/L ATP were used as substrates to achieve 5 batches of high-efficiency continuous catalytic reaction, and the average molar yield of CMP reached 91.2%. The above method has the advantages of low reaction cost, high product yield and high enzyme utilization rate, and has good applied value for industrial production.

Keywords: 5'-cytidine monophosphate, uridine-cytidine kinase, polyphosphate kinase, immobilized enzyme

5'-胞苷酸 (简称胞苷酸) 是一种重要的核苷酸产品, 可作为食品添加剂、药品以及药物前体应用于不同领域^[1]。胞苷酸是制备核苷酸衍生物的重要中间体, 可作为原材料生产胞苷三磷酸、阿糖胞苷酸、胞二磷胆碱和聚肌胞苷酸等^[2]。胞苷酸在成年人、婴幼儿和哺乳动物的免疫系统中发挥着重要作用^[3-5], 含有胞苷酸的婴幼儿奶粉功效更接近于母乳, 能显著提高婴幼儿免疫力^[6-7]。

工业上常用核酸水解法生产胞苷酸, 通常是提取酵母细胞中的核糖核酸, 经核酸酶水解得到 4 种核苷单磷酸 (腺苷酸、鸟苷酸、胞苷酸和尿苷酸) 混合物后, 再经过离子交换法分离精制得到胞苷酸^[8-9]。核酸水解法具有原料来源广泛和反应条件温和的优点, 但是生产周期较长、分离精制工序复杂且加工成本较高。化学法生产胞苷酸^[10-11], 通常是用磷酸或者焦磷酸的活性衍生物与核苷进行磷酸化反应, 反应步骤繁琐、所用试剂昂贵且含有毒试剂, 因此只适用于小规模生产且产品无法在食品领域中应用。

尿苷-胞苷激酶 (Uridine-cytidine kinase, UCK) 是一种嘧啶核糖核苷激酶, 广泛存在于微生物、动物体和人体内, 是核苷酸代谢补偿途径中一种重要的催化剂^[12-15]。UCK 可以催化尿苷和胞苷磷酸化成为尿苷酸和胞苷酸^[16], 但需要 NTP 作为磷酸供体。已有研究发现大肠杆菌、保加利亚乳杆菌、枯草芽孢杆菌来源的 UCK 均需要以 GTP 作为磷酸供体, 但由于 GTP 原料成本过高, 难以工业化放大^[17-18]。

嗜热栖热菌 *Thermus thermophilus* HB8 来源

的尿苷-胞苷激酶具有对胞苷的高度专一性, 其 K_m 值为 72 $\mu\text{mol/L}$, 只能催化胞苷到胞苷酸的反应^[19]。我们对其进行了生物信息学分析发现其蛋白质保守结构域中含有 3 个 ATP 结合位点、6 个嘧啶碱基特异性位点和 3 个核糖特异性位点, 因此推测其能够以 ATP 作为磷酸供体完成催化反应。为了降低反应中 ATP 的消耗量, 我们使用类球红细菌 *Rhodobacter sphaeroides* 来源的聚磷酸激酶 (Polyphosphate kinase, PPK) 以 ADP 和六偏磷酸钠为底物催化生成 ATP^[20], 从而实现 ATP 的循环再生。为了增加酶的利用率, 我们根据亲和层析的原理, 使用 D403 金属螯合树脂吸附 Ni^{2+} 形成固定化载体, 由于 Ni^{2+} 能与重组蛋白携带的组氨酸标签进行配位结合^[21], 因此固定化载体能够选择性地吸附重组蛋白, 从而在纯化重组蛋白的同时将其固定于树脂表面。使用上述固定化酶用于胞苷酸的制备, 并对反应条件进行了系统优化, 为大规模生产胞苷酸提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

1.1.1 菌株和质粒

大肠杆菌 *Escherichia coli* DH5 α 、BL21(DE3) 以及质粒 pET-28a 均由本实验室保藏。

1.1.2 培养基

LB (Luria-Bertani) 培养基: 蛋白胨 10 g/L, 酵母提取物 5 g/L, NaCl 10 g/L, pH 7.0–7.2, 121 °C 灭菌 20 min。

TB (Terrific 肉汤) 培养基: 蛋白胨 10 g/L, 酵

母提取物 5 g/L, 甘油 4 mL/L, KH_2PO_4 2.31 g/L, K_2HPO_4 12.54 g/L, pH 7.0–7.2, KH_2PO_4 和 K_2HPO_4 与其他成分分开灭菌, 121 °C 灭菌 20 min。

1.1.3 试剂

限制性内切酶、T4 DNA 连接酶、Ex Taq DNA 聚合酶均购自 TaKaRa 公司; PCR 产物回收及质粒提取试剂盒购自北京博大泰克生物基因有限责任公司; BCA 蛋白浓度测定试剂盒购自北京索莱宝科技有限公司; 胞苷标品、CMP 标品、ATP 购于美国 Sigma 公司; 其他试剂均为国产分析纯。

1.2 UCK 蛋白的生物信息学分析

使用 ExPASy 服务器 (<http://web.expasy.org/protparam/>) 的 ProtParam 分析 UCK 蛋白的理化性质。使用 NCBI CD search (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cdd/>) 分析 UCK 蛋白的保守结构域。使用在线程序 ProtScale (<https://web.expasy.org/protscale/>)、TMHMM (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>) 和 SignalP4.1 服务器 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) 分析 UCK 蛋白的亲疏水性、跨膜区、信号肽等功能区。

1.3 重组菌株的构建及重组酶的制备

1.3.1 质粒 pET-28a-uck 的构建

根据 UCK 蛋白的编码基因序列 (GenBank 登录号 3168643), 对其进行密码子优化, 以大肠杆菌常见密码子替换其稀有密码子, 使其可在大肠杆菌中高效表达, 将优化后的序列送至金唯智公司进行合成, 获得携带 UCK 编码基因的重组质粒 pUC57-uck。使用限制性内切酶 *EcoR* I 和 *Hind* III 双酶切 pET-28a 质粒载体以及 pUC57-uck。获得线性化的 pET-28a 载体和 *uck* 基因片段, 在 T4 DNA

连接酶的作用下连接载体与片段, 将其转化至 *E. coli* DH5 α , 再使用质粒提取试剂盒提取质粒, 获得 pET-28a-uck 质粒。

1.3.2 质粒 pET-28a-ppk 的构建

以 *Rhodobacter sphaeroides* 基因组为模板, 根据 PPK 蛋白的编码基因序列 (GenBank 登录号 3720266, 设计带有酶切位点 *EcoR* I 和 *Hind* III 的上下游引物。使用引物及 Ex-Taq PCR 试剂盒扩增得到聚磷酸激酶编码基因 *ppk*。使用限制性内切酶 *EcoR* I 和 *Hind* III 对 pET-28a 质粒载体以及 *ppk* 基因片段进行消化, 在 T4 DNA 连接酶的作用下连接载体与片段, 将其转化至 *E. coli* DH5 α , 再使用质粒提取试剂盒提取质粒, 获得 pET-28a-*ppk* 质粒。引物序列如表 1 所示。

1.3.3 重组菌株的构建

取适宜浓度的质粒 pET-28a-uck 和 pET-28a-*ppk* 分别转化至 *E. coli* BL21(DE3) 感受态细胞中, 在 SOC 培养基中活化后涂布于含硫酸卡那霉素 (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 的 LB 固体培养基上, 37 °C 倒置培养 12 h。挑取单菌落经菌落 PCR 筛选出符合要求的阳性克隆菌株, 将阳性菌株接入含有硫酸卡那霉素 (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 的 LB 液体培养基中, 经 37 °C 振荡培养 12 h 后, 保存至甘油管保菌管中, 于 -80 °C 冰箱保藏。

1.3.4 重组酶的制备

将重组菌株从甘油保菌管中以 1% (V/V) 的接种量接种至 5 mL 含有硫酸卡那霉素 (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 的 LB 液体培养基摇管中, 于 37 °C、200 r/min 活化培养 12 h; 以 1% (V/V) 接种量转接至 30 mL 含有硫酸卡那霉素 (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 的 LB 液体培养基的

表 1 *ppk* 基因扩增引物

Table 1 Primers for *ppk* gene amplification

Primer name	Primer sequence (5'-3')	Size (bp)
PPK-S	CGGAATTCATGGGTAAGAATCCAGTAGTCATTG	33
PPK-A	CCAAGCTTTGCTATGGTATTACAAAATCGCG	31

250 mL 三角瓶中, 37 °C、200 r/min 培养 10 h, 再按 2% (V/V) 接种量转接至 100 mL 含有硫酸卡那霉素 (50 μg/mL) 的 TB 液体培养基的 500 mL 三角瓶中, 37 °C、200 r/min 继续培养; 培养至 OD_{600} 达到 1.8–2.4 时添加终浓度为 0.2 mmol/L 的异丙基-β-D-硫代半乳糖苷 (IPTG), 25 °C、200 r/min 过夜培养诱导表达蛋白。培养结束后, 将发酵液于 4 °C、8 000 r/min 离心 10 min 收集菌体。使用 PBS 缓冲液 (pH 7.4) 或生理盐水重悬清洗菌体细胞 2–3 次, 再用 30 mL 裂解缓冲液 (50 mmol/L Na_2HPO_4 、300 mmol/L NaCl, 用 NaOH 调 pH 至 8.0) 重悬均匀后, 使用高压匀浆细胞破碎仪 (上海永联生物) 破碎细胞, 6 °C、80 MPa 破碎 5 min, 细胞破碎液经 13 000 r/min 离心 20 min 后取上清液, 即为含有重组酶的粗酶液。

1.4 固定化载体的制备

1.4.1 树脂活化

取适量 D403 金属螯合树脂 (江苏苏青), 用去离子水冲洗后浸泡 20 min, 重复 5 次, 清洗干净后填入亲和层析柱。用 4% HCl 溶液过柱活化树脂直至流出液 pH 至 1–2, 静置浸泡 6 h, 再用去离子水洗至中性。用 4% NaOH 溶液过柱活化树脂直至流出液 pH 至 13–14, 静置浸泡 6 h, 再用去离子水洗至中性待用。

1.4.2 固定化载体的制备

将 100 mmol/L 的硫酸镍溶液泵入到层析柱中, 流速为 1 mL/min, 使镍离子吸附在树脂上。流出液可以循环泵入到层析柱中, 吸附 2 h 后用去离子水清洗树脂, 即制成镍离子型金属螯合树脂, 即固定化载体。

1.4.3 制备固定化酶

取制备好的固定化载体填于 2 根层析柱中, 每根填量 20 g, 用裂解缓冲液平衡固定化载体。将提前准备好的 UCK 粗酶液和 PPK 粗酶液分别泵入到 2 根层析柱中, 流速为 1 mL/min。重组蛋白携带的组氨酸标签与镍离子进行配位结合从而特异性吸

附在固定化载体上。将流出液循环泵入到层析柱中, 循环吸附 3 次, 即制得固定化酶。

1.5 固定化酶催化反应体系

使用 50 mmol/L、Tris-HCl 缓冲液 (pH 8.0) 为溶剂, 准确称取不同浓度的胞苷和六偏磷酸钠, 40 mmol/L $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 和 0.5 mmol/L ATP 充分溶解, 加入 1% (V/V) 的溴麝香草酚蓝指示剂, 用 NaOH 溶液调节初始 pH 值后用容量瓶定容至 200 mL。

取 20 mL 配制好的反应液于 100 mL 三角瓶中, 加入固定化 UCK 的湿树脂 6 g、固定化 PPK 的湿树脂 4 g, 在 200 r/min 的恒温水浴摇床中反应 6 h, 反应过程中根据反应液颜色变化调节 pH 值保持恒定。

酶活力单位定义: 在标准酶活测定条件下, 1 min 催化底物胞苷生成 1 μmol/L 胞苷酸所需的酶量定义为一个酶活力单位, 即 1 U。

1.6 分析检测方法

使用高效液相色谱 (HPLC) 检测反应液中的胞苷和胞苷酸。色谱柱为 SepaxHP-C18 (4.6 mm × 250 mm, 直径 5 μm), 紫外检测器, 检测波长为 280 nm, 流动相为 0.6% 磷酸 (用三乙胺调 pH 6.6), 柱温 30 °C, 流速 1 mL/min。如图 1 所示, 胞苷的保留时间为 20.9 min, 胞苷酸的保留时间为 17.4 min。按公式 1 计算胞苷酸的摩尔得率, 按公式 2 计算固定化载体对蛋白的负载量。

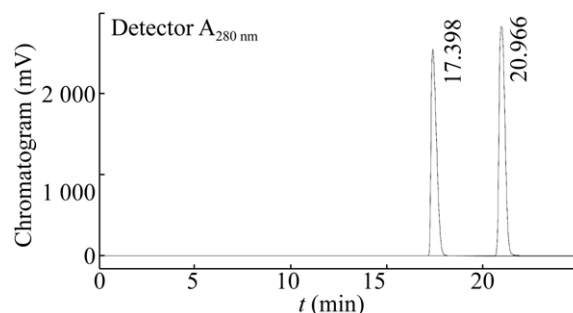


图 1 胞苷和胞苷酸标品液相色谱图

Fig. 1 High performance liquid chromatography of cytidine and CMP standards.

$$\text{胞苷酸摩尔得率} = \frac{\text{生成的胞苷酸摩尔浓度}}{\text{总的胞苷酸摩尔浓度}} \times 100\% \quad (1)$$

$$\text{负载量}(\mu\text{g}/\text{g}) = \frac{\text{初始上样总蛋白量} - \text{流穿液总蛋白量} - \text{水洗流出液总蛋白量}}{\text{固定化载体用量}} \quad (2)$$

2 结果与分析

2.1 UCK 蛋白的生物信息学分析

使用 ExPASy Protomics Server 提供的在线工具 ProtParam 对 UCK 蛋白的理化性质进行分析预测。推测分子式为 $\text{C}_{1066}\text{H}_{1720}\text{N}_{302}\text{O}_{292}\text{S}_7$ ，相对分子质量 26.6 kDa，理论等电点 (pI) 为 9.30，负电荷氨基酸残基 (Asp 和 Glu) 总数为 26，正电荷氨基酸残基 (Arg 和 Lys) 总数为 30。不稳定指数为 47.73 (>40)，表明 UCK 蛋白为不稳定蛋白，亲水性总平均指数为 -0.086 (<0)，表明 UCK 蛋白为亲水性蛋白。

利用 NCBI CD search 分析 UCK 蛋白质序列保守结构域。UCK 蛋白属于 NK 超家族，PRK05480 家族，无多重结构域，含有 3 个 ATP 结合位点，6 个嘧啶碱基特异性位点和 3 个核糖特异性位点。SignalP 4.1 server 预测 UCK 蛋白不含信号肽，为非分泌型蛋白。TMHMM server 预测该蛋白不含跨

膜区，为非跨膜蛋白。ProtScale 预测 UCK 蛋白的亲疏水性，结果表明肽链中的第 112 位氨基酸疏水性最强，第 95 位氨基酸亲水性最强，整条肽链中疏水性氨基酸总数少于亲水性氨基酸总数，进一步证明该蛋白为可溶性亲水蛋白。

2.2 UCK 蛋白的重组表达及酶学性质初探

为了获得更多的 UCK 蛋白，我们使用大肠杆菌蛋白表达系统，以 pET-28a 质粒作为表达载体。根据 GenBank 中的 UCK 蛋白编码基因序列，经密码子优化和人工合成后连接到 pET-28a 质粒上，获得重组质粒 pET-28a-uck。对重组质粒进行酶切验证，如图 2A 所示。以限制性内切酶 *EcoR* I 单酶切重组质粒，在 6 000 bp 左右出现与预期大小一致的条带。以 *EcoR* I 和 *Hind* III 双酶切重组质粒，分别在 5 300 bp 和 700 bp 附近出现与空质粒和目的基因大小一致的条带，证明重组质粒构建成功。

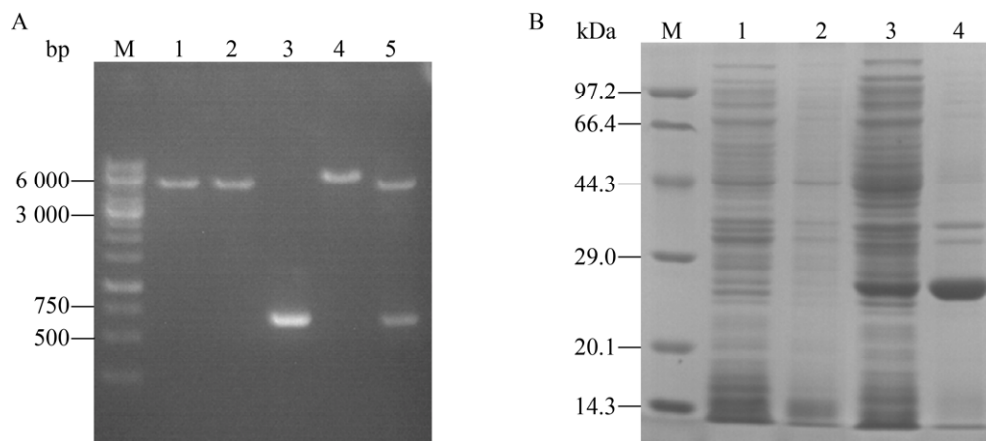


图 2 UCK 蛋白的重组表达验证

Fig. 2 Recombinant expression validation of protein UCK. (A) Restriction map of the recombinant plasmid. M: DNA marker; 1: *EcoR* I single enzyme digestion of pET-28a; 2: *EcoR* I and *Hind* III double enzyme digestion of pET-28a; 3: target gene fragment; 4: *EcoR* I single enzyme digestion of pET-28a-uck; 5: *EcoR* I and *Hind* III double enzyme digestion of pET-28a-uck. (B) SDS-PAGE analysis of recombinant proteins. M: protein marker; 1: supernatant samples in the cell lysates of *E. coli* pET-28a; 2: precipitation samples in the cell lysates of *E. coli* pET-28a; 3: supernatant samples in the cell lysates of *E. coli* pET-28a-uck; 4: precipitation in the cell lysates of *E. coli* pET-28a-uck.

将重组质粒转化至宿主菌 *E. coli* BL21 (DE3) 感受态细胞后, 接种于含有硫酸卡那霉素的 TB 培养基中, 通过 IPTG 诱导表达目的蛋白。收集菌体细胞进行高压匀浆破碎, 对破碎后的上清液和沉淀分别进行 SDS-PAGE 分析, 结果如图 2B 所示。上清液在 27 kDa 附近出现明显的条带, 与 UCK 蛋白的相对分子质量一致, 说明该蛋白能够在大肠杆菌中可溶性表达。

为了验证 UCK 的催化效果, 配制催化反应体系, 加入总蛋白浓度 1.9 mg/mL 的 UCK 粗酶液、30 mmol/L 胞苷、30 mmol/L 六偏磷酸钠以及 30 mmol/L ATP, 在 pH 8.0、30 °C 的条件下反应 6 h, 使用 HPLC 检测发现有胞苷酸的特征峰, 说明 UCK 能够以 ATP 作为磷酸供体催化胞苷到胞苷酸的反应。

2.3 PPK 蛋白的重组表达及酶学性质初探

用于 ATP 再生的酶主要为激酶, 通常这类酶的作用是将 ATP 或其他核苷酸上的 γ -磷酸基团转移至受体分子。该过程的逆反应常被用于将 ADP 复磷酸化为 ATP。激酶是否适用于 ATP 再生系统的主要影响因素在于成本和稳定性。近年

来应用和研究最多的磷酸转移酶是 PPK, 该酶能够催化 γ -磷酸盐从 ATP 转移到无机多聚磷酸 (PolyP) 的可逆反应。由于 PolyP 低廉的价格, 不同微生物来源的 PPK 在 ATP 再生反应中有着巨大的潜力^[22-23]。

根据 GenBank 上的 PPK 蛋白编码基因序列, 经基因组扩增后连接到 pET-28a 质粒上, 获得重组质粒 pET-28a-ppk。对重组质粒进行酶切验证, 如图 3A 所示。以限制性内切酶 *EcoR* I 单酶切重组质粒, 在 6 300 bp 左右出现与预期大小一致的条带。以 *EcoR* I 和 *Hind* III 双酶切重组质粒, 分别在 5 300 bp 和 1 000 bp 附近出现与空质粒和目的基因大小一致的条带, 证明重组质粒构建成功。

将重组质粒转化至宿主菌 *E. coli* BL21 (DE3) 感受态细胞后, 接种于含有硫酸卡那霉素的 TB 培养基中, 通过 IPTG 诱导表达目的蛋白。收集菌体细胞进行高压匀浆破碎, 对破碎后的上清液和沉淀分别进行 SDS-PAGE 分析, 结果如图 3A 所示。上清液在 44 kDa 附近出现明显的条带, 与 PPK 蛋白的相对分子质量一致, 说明该蛋白能够在大肠杆菌中可溶性表达。

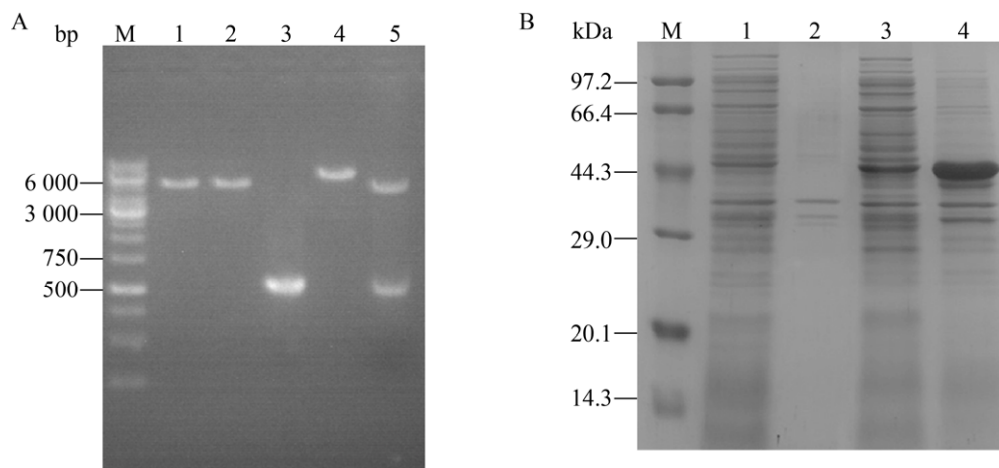


图 3 PPK 蛋白的重组表达验证

Fig. 3 Recombinant expression validation of protein PPK. (A) Restriction map of the recombinant plasmid. M: DNA marker; 1: *EcoR* I single enzyme digestion of pET-28a; 2: *EcoR* I and *Hind* III double enzyme digestion of pET-28a; 3: target gene fragment; 4: *EcoR* I single enzyme digestion of pET-28a-ppk; 5: *EcoR* I and *Hind* III double enzyme digestion of pET-28a-ppk. (B) SDS-PAGE analysis of recombinant proteins. M: protein marker; 1: supernatant samples in the cell lysates of *E. coli* pET-28a; 2: precipitation samples in the cell lysates of *E. coli* pET-28a; 3: supernatant samples in the cell lysates of *E. coli* pET-28a-ppk; 4: precipitation in the cell lysates of *E. coli* pET-28a-ppk.

为了验证双酶偶联的催化效果,配置催化反应体系,加入总蛋白浓度 1.9 mg/mL UCK 粗酶液和总蛋白浓度 1.3 mg/mL PPK 粗酶液,30 mmol/L 胞苷、30 mmol/L 六偏磷酸钠以及 0.5 mmol/L ATP,在 pH 8.0、30 °C 的条件下反应 6 h,使用 HPLC 检测发现有胞苷酸的特征峰,说明 *Rhodobacter sphaeroides* 来源的 PPK 能够有效催化 ATP 的再生反应,显著降低 ATP 的使用量。

2.4 固定化酶的制备及催化反应条件的优化

2.4.1 固定化酶的制备原理

使用 pET-28a 质粒表达蛋白时,会在蛋白表面携带 6 个组氨酸分子组成的标签。由于组氨酸含有的咪唑基团可以提供电子与金属离子进行配位结合,因此含有这些氨基酸残基的蛋白会特异性吸附在含有金属离子的固定化载体上。D403 金属螯合树脂是在大孔隙交联结构的聚苯乙烯共聚球体上引入亚胺基二乙酸螯合基团形成的离子交换树脂,可以选择性地交换吸附二价金属离子。如图 4 所示,使用 D403 树脂吸附 Ni^{2+} 形成固定化载体,再用于重组蛋白的特异性吸附,即可实现从粗酶液中原位纯化固定化重组蛋白。将固定化酶用于胞苷酸的催化合成反应,对反应条件进行单因素优化实验。

根据公式 2 计算固定化载体对蛋白的负载量,经计算得固定化载体对 UCK 的负载量为 330 $\mu\text{g/g}$,

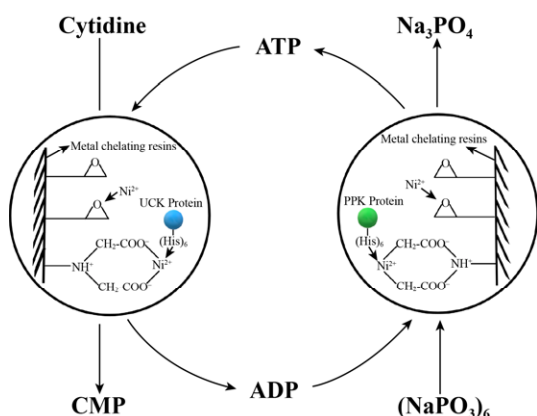


图 4 固定化酶催化反应示意图

Fig. 4 Schematic diagram of catalytic reaction of immobilized enzymes.

固定化载体对 PPK 的负载量为 210 $\mu\text{g/g}$ 。固定化前后 UCK 的酶活损失为 3%,PPK 的酶活损失为 5%。

2.4.2 pH 值对固定化酶催化反应的影响

按照 1.5 的方法配制催化反应体系,考察底物胞苷和六偏磷酸钠的加入量分别为 30 mmol/L 和 15 mmol/L,用 NaOH 调节反应过程中的 pH 值,考察 pH 值对固定化酶催化反应的影响。如图 5 所示,当 pH 值在 6.0–10.0 范围内变化时,产物胞苷酸浓度呈现先升高后降低的趋势,当 pH 值为 8.0 时,胞苷酸浓度达到最大,胞苷到胞苷酸的摩尔得率为 96%。结果表明,碱性条件下两种固定化酶的催化活力明显高于酸性条件。

2.4.3 温度对固定化酶催化反应的影响

按照 1.5 的方法配制催化反应体系,底物胞苷和六偏磷酸钠的加入量分别为 30 mmol/L 和 15 mmol/L,调节不同的反应温度,考察温度对固定化酶催化反应的影响。如图 6 所示,当温度在 25–37 °C 范围内变化时,产物胞苷酸浓度呈现先升高后降低的趋势,当温度为 30 °C 时,胞苷酸浓度达到最大,胞苷到胞苷酸的摩尔得率为 95%。虽然 UCK 来源于 *Thermus thermophilus* HB8,可以在高温下保持酶的活力,但反应中另一种酶 PPK 来源于 *Rhodobacter sphaeroides*,当温度超过 30 °C 时,

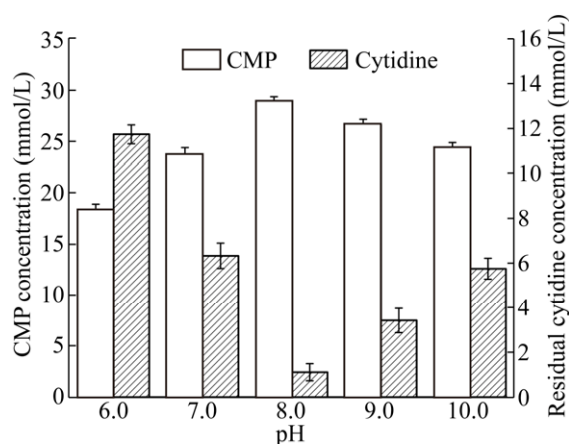


图 5 pH 值对固定化酶催化反应的影响

Fig. 5 Effect of pH value on the catalytic reaction of immobilized enzymes.

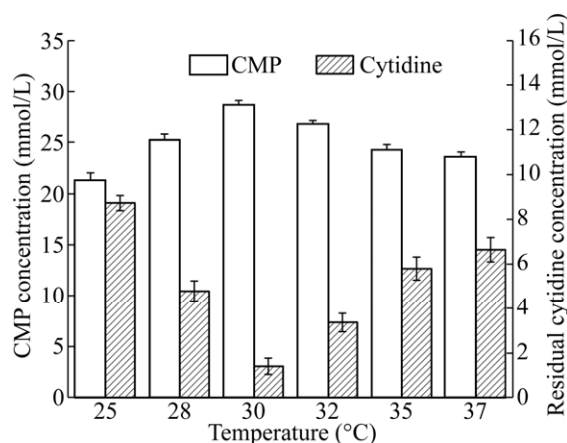


图6 温度对固定化酶催化反应的影响

Fig. 6 Effect of temperature on the catalytic reaction of immobilized enzymes.

该酶的催化活力会有所下降,从而导致固定化酶催化反应效率的降低。

2.4.4 底物浓度对固定化酶催化反应的影响

按照 1.5 的方法配制催化反应体系,考察底物胞苷和六偏磷酸钠的加入量对固定化酶催化反应的影响。如表 2 所示,考察底物胞苷浓度在 30–150 mmol/L 范围内固定化酶的催化效率。从表中可以看出当底物胞苷浓度在 30–60 mmol/L 之间时,胞苷酸的摩尔得率维持在 96% 的水平,当底物胞苷浓度超过 60 mmol/L 时,固定化酶催化反应的产物摩尔得率逐渐下降。此外,提升六偏磷酸钠的浓度对固定化酶催化反应影响不大。

2.5 利用固定化酶多批次催化制备胞苷酸

使用优化后的反应条件,进行多批次催化反应制备胞苷酸。如表 3 所示,随着反应次数的增多,固定化酶的催化反应效率逐渐降低。前 5 批次反应胞苷酸的摩尔得率能够维持在 80% 以上,平均摩尔得率为 91.2%,第 6 批次反应胞苷酸的摩尔得率降至 52%。通过 BCA 蛋白浓度测定试剂盒检测反应液中游离蛋白的浓度变化发现,在反应过程中,部分重组酶会从固定化载体上脱落,从而导致固定化载体上的载酶量逐渐下降。这一方面是由于反应过程中其他离子会竞争性地替换 Ni^{2+} ,另一方面则

表 2 底物浓度对固定化酶催化反应的影响

Table 2 Effect of substrate concentration on the catalytic reaction of immobilized enzymes

Cytidine concentration (mmol/L)	$(\text{NaPO}_3)_6$ concentration (mmol/L)	CMP concentration (mmol/L)	Molar yield of CMP (%)
30	15	28.8±0.3	96
30	30	28.7±0.4	96
60	30	57.6±0.5	96
60	60	57.7±0.4	96
90	45	78.3±0.6	87
90	90	79.2±0.5	88
120	60	94.8±0.6	79
120	120	93.6±0.5	78
150	75	93.2±0.7	62
150	150	96.1±0.6	64

表 3 利用固定化酶多批次催化反应制备胞苷酸

Table 3 Production of CMP by multiple batch reaction using immobilized enzymes

Reaction batch	Reaction time (h)	CMP concentration (mmol/L)	Molar yield of CMP (%)
1	6	57.6±0.4	96
2	6	56.5±0.5	94
3	6	55.7±0.4	93
4	6	53.4±0.5	89
5	6	50.4±0.4	84
6	6	31.2±0.3	52

是由于反应过程中树脂之间或树脂与瓶壁之间的摩擦引起的固定化载体破碎。

3 结论

胞苷酸是一种重要的核苷酸产品,可作为食品添加剂、药品以及药物前体应用于不同领域。现有的胞苷酸生产方法主要包括核酸水解法和化学合成法,但生产过程繁琐且非环境友好。酶催化法具有反应条件温和、底物特异性强的优势,已逐步取代传统方法用于胞苷酸的制备。已有研究表明,核苷酸代谢补偿途径中存在的 UCK 可以催化尿苷和胞苷磷酸化成为尿苷酸和胞苷酸,但反应过程需要 NTP 作为磷酸供体。Qian 等^[17-18]研究发现,大肠杆菌和保加利亚乳杆菌来源的 UCK 催化胞苷酸合

成时需要使用 GTP 作为磷酸供体,为了降低 GTP 的使用量,可以使用乙酸激酶催化乙酰磷酸和 GDP 生成 GTP。使用上述体系反应 6 h 可以催化 30 mmol/L 的胞苷和 0.5 mmol/L 的 GTP 生成 29.1 mmol/L 的胞苷酸,摩尔转化率达到 97%。但上述偶联反应中用于 GTP 再生的乙酰磷酸属于极易分解的化合物,难以长时间贮存且使用量大(与胞苷的摩尔比为 1.5:1),严重影响大规模生产的稳定性。

本研究使用 *Thermus thermophilus* HB8 来源的 UCK 用于胞苷酸的催化合成,证实了该酶可以以 ATP 作为磷酸供体,与 GTP 相比更为廉价。使用 *Rhodobacter sphaeroides* 来源的 PPK 催化六偏磷酸钠和 ADP 生成 ATP,证实了该酶可以高效保障偶联反应中 ATP 的循环再生。六偏磷酸钠是常见的磷酸盐,稳定性强且使用量较少(与胞苷的摩尔比为 0.5:1)。

为了增加酶的重复利用率,本研究利用亲和层析的原理,使用 Ni²⁺活化的金属螯合树脂为固定化载体特异性吸附重组蛋白,在纯化重组蛋白的同时实现了固定化,与常规的海藻酸钙包埋法相比,操作更为简单且固定化酶的比活力更高。在优化的反应条件下,使用固定化酶以 60 mmol/L 胞苷和 0.5 mmol/L ATP 为底物,可实现 5 批次的高效连续催化反应,胞苷酸平均摩尔得率达到 91.2%。为了进一步提高固定化酶的使用率,后期可以选择其他类别的金属螯合树脂或者金属离子,也可以调整重组蛋白上携带的标签数量,提升固定化载体与重组蛋白结合的牢固程度。与现有技术相比,本研究开发的固定化酶制备胞苷酸的方法具有反应成本低、操作性强、反应周期短、环境友好等特点,具有较好的工业应用潜质。

REFERENCES

- [1] Fujio T, Maruyama A. Enzymatic production of pyrimidine nucleotides using *Corynebacterium ammoniagenes* cells and recombinant *Escherichia coli* cells: enzymatic production of CDP-choline from orotic acid and choline chloride (Part I). *Biosci Biotechnol Biochem*, 1997, 61(6): 956–959.
- [2] Ying GQ, Shi LE, Tang ZX. The application of mononucleotides. *Guangzhou Food Sci Technol*, 2004, 20(2): 126–128, 125 (in Chinese).
应国清, 石陆娥, 唐振兴. 核苷酸类物质的应用研究进展. *广州食品工业科技*, 2004, 20(2): 126–128, 125.
- [3] Hawkes JS, Gibson RA, Robertson D, et al. Effect of dietary nucleotide supplementation on growth and immune function in term infants: a randomized controlled trial. *Eur J Clin Nutr*, 2006, 60(2): 254–264.
- [4] Katoh K, Yoshioka K, Hayashi H, et al. Effects of 5'-uridylic acid feeding on postprandial plasma concentrations of GH, insulin and metabolites in young calves. *J Endocrinol*, 2005, 186(1): 157–163.
- [5] Lecca D, Ceruti S. Uracil nucleotides: from metabolic intermediates to neuroprotection and neuroinflammation. *Biochem Pharmacol*, 2008, 75(10): 1869–1881.
- [6] Leach JL, Baxter JH, Molitor BE, et al. Total potentially available nucleosides of human milk by stage of lactation. *Am J Clin Nutr*, 1995, 61(6): 1224–1230.
- [7] Aggett P, Leach JL, Rueda R, et al. Innovation in infant formula development: a reassessment of ribonucleotides in 2002. *Nutrition*, 2003, 19(4): 375–384.
- [8] Deoda AJ, Singhal RS. 5'-Phosphodiesterase (5'-PDE) from germinated barley for hydrolysis of RNA to produce flavour nucleotides. *Bioresour Technol*, 2003, 88(3): 245–250.
- [9] Lotsch B, Millange F, Walton RI, et al. Separation of nucleoside monophosphates using preferential anion exchange intercalation in layered double hydroxides. *Solid State Sci*, 2001, 3(8): 883–886.
- [10] Yoshikawa M, Kato T. Studies of phosphorylation. I. Phosphorylation of 2',3'-o-isopropylidene nucleoside by phosphoryl chloride. *Bull Chem Soc Jpn*, 1967, 40(12): 2849–2853.
- [11] Masaharu Y, Tetsuya K, Tadao T. Studies of phosphorylation. III. Selective phosphorylation of unprotected nucleosides. *Bull Chem Soc Jpn*, 1969,

- 42(12): 3505–3508.
- [12] Hammer-Jespersen K, Munch-Petersen A. Mutants of *Escherichia coli* unable to metabolize cytidine: Isolation and characterization. *Mol Gen Genet*, 1973, 126(2): 177–186.
- [13] Lee T, Karon M, Momparler RL. Kinetic studies on phosphorylation of 5-azacytidine with the purified uridine-cytidine kinase from calf thymus. *Cancer Res*, 1974, 34(10): 2482–2488.
- [14] Payne RC, Cheng N, Traut TW. Uridine kinase from Ehrlich ascites carcinoma. Purification and properties of homogeneous enzyme. *J Biol Chem*, 1985, 260(18): 10242–10247.
- [15] Ropp PA, Traut TW. Cloning and expression of a cDNA encoding uridine kinase from mouse brain. *Arch Biochem Biophys*, 1996, 336(1): 105–112.
- [16] Van Rompay AR, Norda A, Lindén K, et al. Phosphorylation of uridine and cytidine nucleoside analogs by two human uridine-cytidine kinases. *Mol Pharmacol*, 2001, 59(5): 1181–1186.
- [17] Qian YH, Ding QB, Li YY, et al. Phosphorylation of uridine and cytidine by uridine-cytidine kinase. *J Biotechnol*, 2014, 188: 81–87.
- [18] Qian YH. Enzymatic synthesis of pyrimidine nucleotides[D]. Shanghai: East China University of Science and Technology, 2015 (in Chinese).
- 钱亚浚. 酶法合成嘧啶类核苷酸[D]. 上海: 华东理工大学, 2015.
- [19] Tomoike F, Nakagawa N, Kuramitsu S, et al. A single amino acid limits the substrate specificity of *Thermus thermophilus* uridine-cytidine kinase to cytidine. *Biochemistry*, 2011, 50(21): 4597–4607.
- [20] Li Y, Liu S, Zhu J. Construction of recombinant strains co-expressing PPK and GMAS for the synthesis of L-theanine. *Chin J Biotech*, 2016, 32(12): 1745–1749 (in Chinese).
- 李元, 刘珊, 祝俊. PPK 和 GMAS 共表达重组菌株的构建及其在 L-茶氨酸合成中的应用. *生物工程学报*, 2016(12):1745-1749.
- [21] Mateo C, Fernández-Lorente G, Cortés E, et al. One-step purification, covalent immobilization, and additional stabilization of poly-His-tagged proteins using novel heterofunctional chelate-epoxy supports. *Biotechnol Bioeng*, 2001, 76(3): 269–276.
- [22] Akiyama M, Crooke E, Kornberg A. The polyphosphate kinase gene of *Escherichia coli*. Isolation and sequence of the ppk gene and membrane location of the protein. *J Biol Chem*, 1992, 267(31): 22556–22561.
- [23] Zhang HY, Ishige K, Kornberg A. A polyphosphate kinase (PPK2) widely conserved in bacteria. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99(26): 16678–16683.

(本文责编 陈宏宇)