



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102605025 A

(43) 申请公布日 2012. 07. 25

(21) 申请号 201110021049. 1

C12R 1/19 (2006. 01)

(22) 申请日 2011. 01. 19

(83) 生物保藏信息

CGMCC No :4428 2010. 12. 08

(71) 申请人 中国科学院生物物理研究所

地址 100101 北京市朝阳区大屯路 15 号

申请人 开平牵牛生化制药有限公司

(72) 发明人 郑春杨 王永宏 刘桂祯 王琳

(51) Int. Cl.

C12P 19/30 (2006. 01)

C12N 1/21 (2006. 01)

C12N 9/10 (2006. 01)

C12N 15/54 (2006. 01)

C12N 15/70 (2006. 01)

C12N 15/11 (2006. 01)

权利要求书 2 页 说明书 3 页

序列表 2 页 附图 1 页

(54) 发明名称

一种用于合成胞二磷胆碱的生物工程方法

(57) 摘要

本发明提供一种用于合成胞二磷胆碱的生物工程方法,该方法包括以下步骤:用基因工程方法重组构建含有磷酸胆碱胞苷转移酶的大肠杆菌工程菌株;利用该工程菌株进行大规模高密度培养并分离纯化,得到高纯度、高活性的磷酸胆碱胞苷转移酶;利用磷酸胆碱胞苷转移酶在合适的条件下进行酶法催化合成,得到胞二磷胆碱;在酶法催化合成胞二磷胆碱的体系中加入阳离子交换树脂,使得胞二磷胆碱在合成的过程中不断地被吸附在树脂上,实现胞二磷胆碱反应与分离的耦合。该方法具有底物利用率高、产物回收率高、反应条件温和、反应时间短、对环境污染小、成本低等优点,适合工业化大规模生产。

1. 一种用于合成胞二磷胆碱的生物工程方法,其特征在于:

用基因工程方法重组构建含有编码磷酸胆碱胞苷转移酶核苷酸序列的大肠杆菌工程菌株;

利用该工程菌株进行大规模高密度培养,并分离纯化,得到高纯度、高活性的磷酸胆碱胞苷转移酶;

利用磷酸胆碱胞苷转移酶在合适的条件下进行酶法催化合成,得到胞二磷胆碱;

利用分离与反应耦合的工艺设计,磷酸胆碱胞苷转移酶在具有离子交换树脂的条件下进行酶法催化合成,反应获得的胞二磷胆碱被吸附在离子交换树脂上,并可在反应完成后使用具有一定离子强度的缓冲液将其从树脂上洗脱下来,实现胞二磷胆碱反应与分离的耦合。

2. 根据权利要求1所述的生物工程方法,其特征在于:

所述大肠杆菌工程菌株是含有编码磷酸胆碱胞苷转移酶核苷酸序列的工程菌株,该磷酸胆碱胞苷转移酶的核苷酸序列来源于肺炎链球菌 (*Streptococcus pneumoniae*),该基因工程菌株已于2010年12月08日保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心,保藏中心地址:北京市朝阳区大屯路,中国科学院微生物研究所,邮政编码:100101。建议的分类命名为大肠埃希氏菌 (*Escherichia coli*),保藏号为CGMCC NO:4428。

3. 根据权利要求1所述的生物工程方法,其特征在于:

所述大肠杆菌工程菌株中包含一种含有磷酸胆碱胞苷转移酶基因序列的原核表达载体 pET28a-CCT。

4. 根据权利要求3所述的生物工程方法,其特征在于:

所述的该原核表达载体 pET28a-CCT 中含有编码磷酸胆碱胞苷转移酶蛋白的一段基因序列 (SEQ1)。

5. 根据权利要求4中所述的生物工程方法,其特征在于:

所述基因序列 (SEQ1),其序列信息见说明书。

6. 一对引物 (primer1 and primer2),用于扩增权利要求5中所述基因序列的引物,其序列信息:

上游引物序列:5' -ctGAATTCATATG aaagcca tcatcttag-3' ;

下游引物序列:5' -GtCGTCGACTCGAG attttcgtttttaagaatttc-3' 。

7. 根据权利要求1所述的生物工程方法,其特征在于:

所述高纯度、高活性的磷酸胆碱胞苷转移酶是通过在改良的培养基中对权利要求1和2中所述的工程菌株进行大规模高密度培养、并分离和纯化得到的。

8. 根据权利要求7所述的生物工程方法,其特征在于:

所述培养基包括胰蛋白胨 5-15g/L、酵母抽提物 5-15g/L、 $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ 10-30g/L、 $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$ 5-20g/L、以及消泡剂 0.05% -0.2%。

9. 根据权利要求7所述的生物工程方法,其特征在于:

在接种前还在所述培养基中加入卡那霉素至最终浓度 20-100mg/L、无菌 $MgSO_4$ 至终浓度 0.5-1.5g/L、无菌葡萄糖至终浓度 2-10g/L,并将 pH 值调节至 6.0-7.0。

10. 根据权利要求7所述的生物工程方法,其特征在于所述高密度培养的方法包括以下步骤:

在发酵罐中进行补料分批高密度发酵,将 pH 值控制在 6.0-7.0、温度控制在 25℃ -37℃、用于菌体富集的培养时间控制在 2-8 小时、IPTG 诱导的工作浓度控制在 0.05-1mM,并将诱导时间控制在 10-30 小时。

11. 根据权利要求 1 所述的生物工程方法,其特征在于所述酶法催化合成的方法包括以下步骤:

以磷酸胆碱、三磷酸胞苷 (CTP) 为原料,添加镁离子和磷酸胆碱胞苷转移酶,以 Tris-HCl 作为缓冲体系,在一定 pH 值、温度和时间范围内进行反应,并在反应体系中加入阳离子交换树脂。

12. 根据权利要求 11 所述的生物工程方法,其特征在于:反应液中 CTP 浓度控制在 10-50mM,磷酸胆碱浓度控制在 ATP 浓度的 2-5 倍,氯化镁浓度控制在 10-50mM,Tris-HCl 浓度控制在 50-100mM,磷酸胆碱胞苷转移酶的加入量控制在 10-200mg/L,阳离子交换树脂的加入量控制在 50-200ml/L,pH 值控制在 6-8,反应温度控制在 20℃ -50℃,反应时间控制在 1-5 小时。

一种用于合成胞二磷胆碱的生物工程方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种磷酸胆碱胞苷转移酶的制备方法,并通过此酶在体外催化合成胞二磷胆碱,同时实现反应与分离耦合的生物工程方法。该方法可用于胞二磷胆碱的大规模生产制备。

背景技术

[0002] 胞二磷胆碱又称胞磷胆碱钠(cytidine diphosphate choline,简称 CDP-Choline, CDP-C),其分子式为 $C_{14}H_{25}N_4NaO_{11}P_2$,分子量为 510.31,呈白色晶体状,并极易溶于水。它是核苷衍生物,是磷脂类磷脂酰胆碱的前体物质,为卵磷脂合成的主要前体。胞二磷胆碱改善脑功能的作用可能与促进卵磷脂的生物合成有关。其药理作用主要有以下几个方面:①能增强脑干网状结构上行激活系统的功能,增强锥体系和抑制锥体外系的作用,促进觉醒和抑制募集反应;②改善脑血管张力,降低脑血管阻力,增加脑血流量,改善脑血液循环;③增加脑细胞氧耗,改善脑组织代谢,脑能量代谢等。此外,胞二磷胆碱尚有降低高血脂和血小板粘滞度,促进糖代谢和预防黑质内多巴胺生成障碍的作用。

[0003] 目前制备胞二磷胆碱的方法有:①化学合成法,以 CMP、磷酸胆碱(CP)为底物,用对甲苯磺酰氯为缩合剂,在 N-二甲基甲酰胺(DMF)环境中,化学合成胞二磷胆碱;②酶促合成,提取细胞液中的磷酸胆碱胞苷转移酶,并利用三磷酸胞苷和磷酸胆碱合成胞二磷胆碱。但抽提酶液收率低、成本高;③游离酵母合成胞二磷胆碱,此法需要大量游离酵母,且产物回收率较低,不适合工业化生产。

发明内容

[0004] 本发明的目的在于提供了一种用于合成胞二磷胆碱的生物工程方法,旨在解决化学合成和生物提取酶法合成胞二磷胆碱的种种缺陷,使得胞二磷胆碱的制备过程更易进行,产品的收率更高。

[0005] 为了解决上述问题,本发明通过以下步骤实现:用基因工程方法重组构建含有编码磷酸胆碱胞苷转移酶核苷酸序列的大肠杆菌工程菌株;利用该工程菌株进行大规模高密度培养,并分离纯化得到高活性的磷酸胆碱胞苷转移酶;利用磷酸胆碱胞苷转移酶在合适的条件下进行酶法催化合成,得到胞二磷胆碱;更进一步地在酶法催化合成胞二磷胆碱的体系中加入阳离子交换树脂,使得胞二磷胆碱在合成的过程中不断地被吸附在树脂上,实现胞二磷胆碱反应与分离的耦合。

上述的基因工程菌株已于 2010 年 12 月 08 日保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心,保藏中心地址:北京市朝阳区大屯路,中国科学院微生物研究所,邮政编码:100101。建议的分类命名为大肠埃希氏菌(*Escherichia coli*),保藏号为 CGMCC NO: 4428。

[0006] 本发明采用胞二磷胆碱反应与分离耦合的方法,明显提高了反应和纯化过程的可控性,使得本发明适合工业化生产。

[0007] 下面结合具体实施例,进一步阐述本发明。

附图说明

[0008] 图 1 是生物催化合成反应前的图;图 2 是生物催化合成反应后的图。其中图 1 保留时间为 17.952min 的峰为 CTP;图 2 所示,其中保留时间为 7.150min 的峰为胞二磷胆碱,保留时间为 18.049min 的峰为 CTP,由此可推算出反应的 CTP 转化率为 68%。

具体实施方式

[0009] 实施例 1

[0010] 采用常规方法提取肺炎链球菌样品 RNA,反转录获得肺炎链球菌 cDNA。以权利要求 6 中所述引物为引物,采用 PCR 方法从肺炎链球菌 cDNA 中钓取 CCT 基因。具体 PCR 条件为:

[0011] 95°C, 5min;

[0012]

95°C, 30s	} 25 个循环
55°C, 30s	
72°C, 1min	

[0013] 72°C, 10min

[0014] 产物经琼脂糖凝胶电泳检测,大小为 690bp,与预计一致。用限制型内切酶 NdeI 和 XhoI 将上述 CCT 基因酶切,回收后与经 NdeI 及 XhoI 酶切过的载体 pET28a 连接,转化大肠杆菌,筛选具有卡那霉素抗性的转化子。经质粒提取,酶切鉴定后,证明重组蛋白 CCT 基因已克隆 pET28a 中。

[0015] 用 CaCl₂ 法将 pET28a-CCT 转化 BL21 (DE3),在含有卡那霉素的 LB 平板上筛选转化子,经质粒检测获得含有 pET28a-CCT 的重组转化子 BL21 (DE3)/pET28a-CCT。

[0016] 实施例 2

[0017] 在实施例 1 中所得的重组工程菌按照 2% 接种量接入培养基(含有胰蛋白胨 10g/L,酵母抽提物 10g/L, K₂HPO₄·3H₂O 15g/L, NaH₂PO₄·2H₂O 10g/L, 1ml 消泡剂。121°C 灭菌 20 分钟,接种前加入卡那霉素至最终浓度 50mg/L,无菌 MgSO₄ 至终浓度 0.8g/L,无菌葡萄糖至终浓度 2g/L,无菌微量元素浓缩液 10ml/L, pH 值调节至 6.55) 在 5L 发酵罐中进行补料分批高密度发酵, pH 值控制在 6.55±0.05, 37°C 培养 5 小时后, IPTG 诱导的工作浓度为 0.1mM, 诱导 20 小时后,离心收集菌体,放入 -20°C 冰箱保存,备用。

[0018] 实施例 3

[0019] 称取实施例 2 中所得的菌体 10g,使用磷酸盐缓冲液稀释至 100g/L,置于冰水浴中,使用超声细胞破碎仪,设置超声波功率 30%,工作 4 秒停 6 秒,循环 1 小时,得到 100ml 破菌液。将其于 4°C、12000rpm 离心 1 小时,收集离心上清液。上样至已用 50mM 磷酸缓冲液平衡好的镍亲和层析柱(2.6/10cm),用同样的缓冲液将层析柱平衡后,用含有 20mM 咪唑的缓冲液洗脱柱上的杂蛋白,最后用含有 300mM 咪唑的缓冲液洗脱柱上的目的蛋白,收集洗脱液,并使用 20mM 的磷酸盐缓冲液将其透析,冻干,得到重组磷酸胆碱胞苷转移酶制剂。测定酶制剂的浓度和比活力,放入 -20°C 冰箱保存,备用。

[0020] 实施例 4

[0021] 在 1 升反应体系中进行酶催化合成, 反应液含有: 20mM CTP, 40mM 磷酸胆碱, 20mM 氯化镁, 50mM Tris-HCl, pH 值调节至 7.5, 加入实施例 3 中得到的磷酸胆碱胞苷转移酶 50mg, 30°C 反应 2 小时, 反应产率一般可达到 65% -70%。

[0022] 实施例 5

[0023] 在 1L 反应体系中进行酶催化合成, 反应液含有: 20mM CTP, 40mM 磷酸胆碱, 20mM 氯化镁, 50mM Tris-HCl, 100ml 经过预处理的离子交换树脂, pH 值调节至 7.5, 加入实施例 3 中得到的磷酸胆碱胞苷转移酶 50mg, 30°C 反应 2 小时。通过过滤的方法将离子交换树脂收集, 使用 200ml 50mM Tris-HCl 缓冲液洗涤离子交换树脂两次, 再使用含有 500mM NaCl 的 50mM Tris-HCl 缓冲液将吸附在离子交换树脂的胞二磷胆碱洗涤下来, 通过紫外检测其含量, 并计算回收率。反应产率一般可达到 80% 以上, 胞二磷胆碱在离子交换树脂的吸附率可达到 80% 以上。

[0024] 应理解, 上述实施例仅用于说明本发明而不适用于限制本发明的范围。实施例中未注明具体条件的实验方法, 通常按照常规条件, 或按照制造厂商所建议的条件执行。除非另行定义, 文中所使用的所有专业与科学用语与本领域技术人员所熟悉的意义相同。此外, 任何与所记载内容相似或均等的方法及材料皆可用于本发明中。文中所述的较佳实施方法与材料仅作示范之用。

[0001]

核苷酸序列表

<110> ××有限公司

<120>一种用于合成胞二磷胆碱的生物工程方法

<160> 1

<210> 1

<211> 690

<212> DNA

<213> 肺炎链球菌 (*Streptococcus pneumoniae*)

<220>

<221> CDS

<222> (1)... (690)

<400> 1

```

TTA ATT TTC GTT TTT AAG AAT TTC TTC GAA TTT ACG ATA GTC TTG GAC ACT ATC GAT CTC   60
Leu Ile Phe Val Phe Lys Asn Phe Phe Glu Phe Thr Ile Val Leu Asp Thr Ile Asp Leu   20
 1           5           10           15           20
ATA AAT GCT ATT GCC TTC GAA TTC TTC AAC ATA GAC ATC GAG CTC TTT GAT ATT ATC CTT 120
Ile Asn Ala Ile Ala Phe Glu Phe Phe Asn Ile Asp Ile Glu Leu Phe Asp Ile Ile Leu   40
          25           30           35           40
AAC CAT ATT GTC CCA GTA GAG ATC AAC AAA TTC GCC ACT TGC ATA AGC CTT ATC GAT AAA 180
Asn His Ile Val Pro Val Glu Ile Asn Lys Phe Ala Thr Cys Ile Ser Leu Ile Asp Lys   60
          45           50           55           60
GCT GAC AAT CTT TTC TGC AGT TGG AGC ATC CCA GAA GGA TAC ACC ACT AAG GAT GCG ACC 240
Ala Asp Asn Leu Phe Cys Ser Trp Ser Ile Pro Glu Gly Tyr Thr Thr Lys Asp Ala Thr   80
          65           70           75           80
TGC CTT GCT ATC AAC AAT AAT GTC TTG AAC CTT GTA GTC ATC TCC ATA GAC CAA GAA CCA 300
Cys Leu Ala Ile Asn Asn Asn Val Leu Asn Leu Val Val Ile Ser Ile Asp Gln Glu Pro 100
          85           90           95           100
TTC GTT GGT ACA ATC TTC ACG ATA AAC ACT AAA ATA AGT CGA ACG AGT CAA ATC ATT GCG 360
Phe Val Gly Thr Ile Phe Thr Ile Asn Thr Lys Ile Ser Arg Thr Ser Gln Ile Ile Ala 120
          105          110          115          120
GAA CAT ATT TTT AAA GAG ATA GTT ATC TGC ATC AAT AAC ATA GCT GTT GGC CAA TTC TTC 420
Glu His Ile Phe Lys Glu Ile Val Ile Cys Ile Asn Asn Ile Ala Val Gly Gln Phe Phe 140
          125          130          135          140
TTT TAC AAG ATA GAG AGA GTA AAA GTT ATT GTA GTC AGC GTA TTT ATC ATT GAA AAC GAG 480
Phe Tyr Lys Ile Glu Arg Val Lys Val Ile Val Val Ser Val Phe Ile Ile Glu Asn Glu 160
          145          150          155          160
ACG AAC ACC GTA TTT CTC TTT CAA GTA ATC GAA TTG TTC TTT AAG ATA ACC AAC AAT GAT 540
Thr Asn Thr Val Phe Leu Phe Gln Val Ile Glu Leu Phe Phe Lys Ile Thr Asn Asn Asp 180

```

[0002]

	165	170	175	180	
GAT GAT GTC ATT GAT TCC TTT TTC TTT GAG AAA CTC AAT TTG GTA CTC AAT CAA AGG TTT	600				
Asp Asp Val Ile Asp Ser Phe Phe Phe Glu Lys Leu Asn Leu Val Leu Asn Gln Arg Phe	200				
	185	190	195	200	
TTG ATT AAC CTG AAC CAA GGC TTT AGG GGT ATT TTC AGT CAT AGG ACG CAA GCG AGT TCC	660				
Leu Ile Asn Leu Asn Gln Gly Phe Arg Gly Ile Phe Ser His Arg Thr Gln Ala Ser Ser	220				
	205	210	215	220	
CAA TCC CGC TGC GAA GAT GAT GGC TTT CAC TAG				690	
Gln Ser Arg Cys Glu Asp Asp Gly Phe His ***				230	
	225	230			

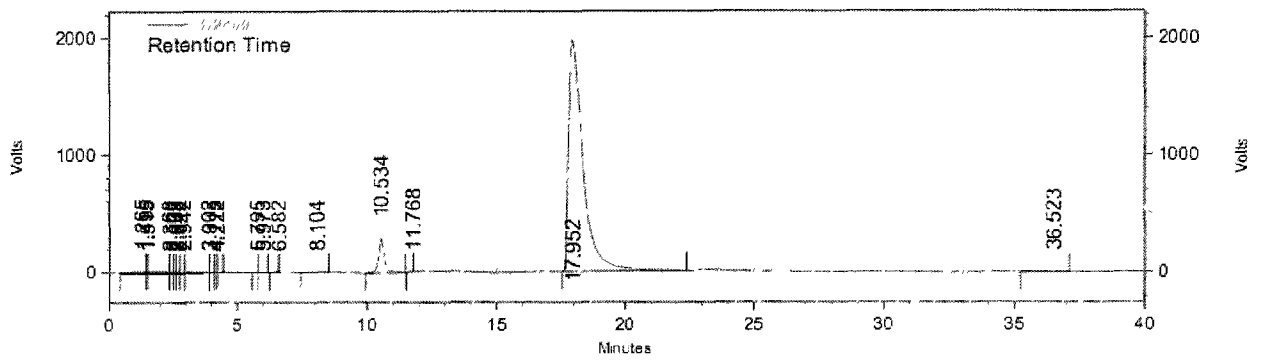


图 1

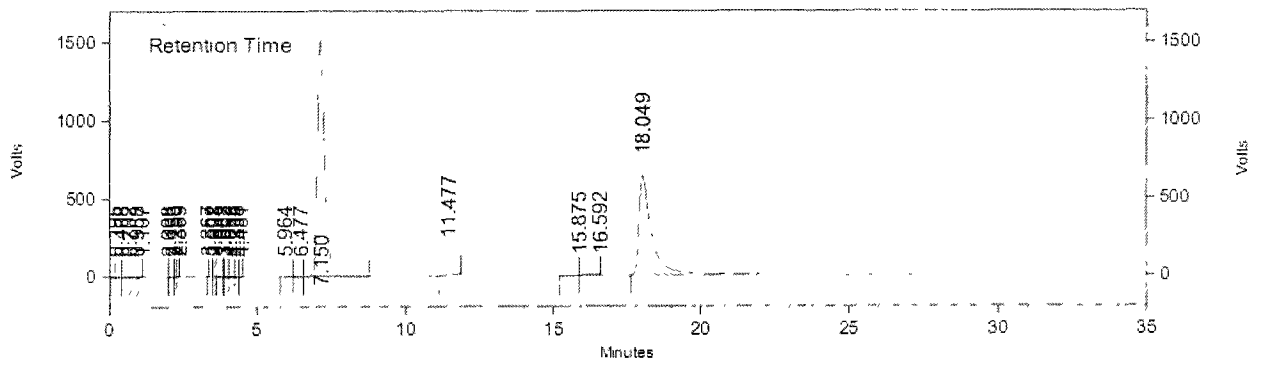


图 2