

# VD<sub>3</sub> 羟化酶体外催化体系构建研究

张 扬, 杨儒洁, 罗金琪, 陆 群, 李遂焰\*

西南交通大学生命科学与工程学院, 成都 610036

**摘要:** VD<sub>3</sub> 羟化酶 (VD<sub>3</sub> hydroxylase, Vdh) 是合成活性维生素 D<sub>3</sub> 的关键酶, 其羟化反应需要铁氧化还原蛋白 (ferredoxin, Fdx) 和铁氧化还原蛋白还原酶 (ferredoxin reductase, Fdr) 两个电子传递链蛋白, 因此构建 VD<sub>3</sub> 羟化酶的高效催化体系是实现活性维生素 D<sub>3</sub> 工业化生物合成的关键。本研究分别以自养假诺卡氏菌 (*Pseudonocardia autotrophica* CGMCC-5098) 基因组 DNA 与菠菜基因组 DNA 为模板, PCR 扩增出 Vdh 基因与 Fdx-Fdr 融合基因的部分片段。将 2 个基因或片段分别构建 pET28a-Vdh 和 pET28a-Fdx-Fdr 重组质粒, 转化大肠杆菌 BL21 (DE3), 分别获得含有 Vdh 基因的重组菌与含有 Fdx-Fdr 融合基因的重组菌。随后, 重组菌经 IPTG 诱导与冷冻干燥后, 与葡萄糖脱氢酶 (GDH)-葡萄糖的辅酶再生系统偶联, 形成完整的 Vdh 催化体系。该催化体系的最佳反应条件为: Vdh (0.05 g)、Fdx-Fdr (0.05 g)、GDH (0.05 g)、葡萄糖 (0.1 g)、DNAP (50 μL, 50 mM)、VD<sub>3</sub> (100 μmol/L)。在最佳反应条件下, 该体系能够高效催化 VD<sub>3</sub> 和帕立骨化醇中间体的羟化反应, 反应 12 h 后, VD<sub>3</sub> 的转化率为 40.10%, 相较于假诺卡氏菌 (*P. autotrophica*), 转化时间仅需 16.7%, 效率大为提高。本研究所获成果为今后进一步高效制备骨化醇类药物奠定了基础。

**关键词:** 体外催化; 电子传递链; 融合蛋白; 骨化醇

中图分类号: Q789

文献标识码: A

文章编号: 1001-6880(2021) Suppl-0001-07

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2021.S.001

## Study on the construction of VD<sub>3</sub> hydroxylase catalytic system *in vitro*

ZHANG Yang, YANG Ru-jie, LUO Jin-qi, LU Qun, LI Sui-yan\*

School of Life science and Engineering, Southwest Jiaotong University, Chengdu 610036, China

**Abstract:** VD<sub>3</sub> hydroxylase (Vdh) is a key enzyme for the synthesis of active vitamin D<sub>3</sub>. Two electron transfer chain proteins: ferredoxin (Fdx) and ferredoxin reductase (Fdr) are required in the hydroxylation reaction of Vdh. Therefore, constructing an efficient catalytic system of VD<sub>3</sub> hydroxylase is the key for the industrial biosynthesis of active vitamin D<sub>3</sub>. In this study, *Pseudonocardia autotrophica* CGMCC-5098 genomic DNA and *Spinach* genomic DNA were used as templates to amplify the fragments of the Vdh gene and Fdx-Fdr fusion gene by PCR. The recombinant plasmid pET28a-Vdh and pET28a-Fdx-Fdr was constructed, and then transformed into *E. coli* BL21 (DE3) to obtain recombinant bacteria containing Vdh gene and Fdx-Fdr fusion gene, respectively. Subsequently, the recombinant bacteria were induced by IPTG and freeze-dried, and then coupled with glucose dehydrogenase (GDH)-glucose coenzyme regeneration system to form a complete Vdh catalytic system. The optimal reaction conditions for this catalytic system are: Vdh (0.05 g), Fdx-Fdr (0.05 g), GDH (0.05 g), glucose (0.1 g), DNAP (50 μL, 50 mM), VD<sub>3</sub> (100 μmol/L). Under the optimal reaction conditions, the system can efficiently catalyze the biosynthesis of VD<sub>3</sub> and its paricalcitol intermediates. After 12 h of reaction, the conversion rate of VD<sub>3</sub> is 40.10%, which is much higher than the 16.7% efficiency of *P. autotrophica*. The results of this study lay a foundation for the further efficient preparation of calcitriol drugs in the future.

**Key words:** *in vitro* catalysis; electron transfer chain; fusion protein; calcidol

活性维生素 D 参与了钙磷代谢, 能够促进小肠对钙磷的吸收、抗炎、调节免疫反应, 甚至对细胞增

殖分化, 抗癌都有一定调控和作用<sup>[1-4]</sup>, 骨化醇类化合物具有与活性维生素 D 相似的结构, 包括骨化二醇 (25-OH-VD<sub>3</sub>) 及帕立骨化醇 (19-Nor-1α, 25-dihydroxyvitamin D<sub>2</sub>) 等。骨化醇类化合物经 25 位羟化后得到活性成分, 可用于骨质疏松等疾病治疗。

收稿日期: 2020-06-15 接受日期: 2020-08-31

基金项目: 四川省科技支撑计划 (2010SZ0124)

\* 通信作者 Tel: 86-28-87603201; E-mail: lisuiyan@swjtu.edu.cn

目前骨化醇类化合物多采用多步化学反应进行合成,但是经济成本高,产率低,步骤复杂<sup>[5]</sup>。而微生物转化法则具有生产成本低,反应高度特异性等优点。早如 Sasaki 等<sup>[6]</sup>利用多种诺卡氏菌属(*Nocardia autotrophica*)成功将维生素 D 转化为 25-OH-VD<sub>3</sub>,但野生菌催化体系存在 P450 酶及电子传递链蛋白表达量低,稳定性差,副产物多等问题。近年来随着基因工程技术在生物转化中的应用,P450 酶及人工电子传递链异源表达的催化体系不断被优化。Yasuda 等<sup>[7]</sup>在酵母中表达人源 CYP2R1 将 VD<sub>2</sub> 催化成 25-OH-VD<sub>2</sub>,转化效率达到了 8.7%,同时产生 1 $\alpha$ -OH-VD<sub>2</sub>。Sawadaden 等<sup>[8]</sup>在大肠杆菌中表达 P450SU-1 与商业菠菜电子传递链蛋白 Fdx 及 Fdr 联用成功催化 VD<sub>3</sub>。Fujii 等<sup>[9]</sup>在红平球菌中表达来自假诺卡氏菌的 Vdh 催化 VD<sub>3</sub> 时,对比了来源于不动杆菌(*Acinetobacter sp.*)的 AciB/C<sup>[10]</sup>,以及来源于红球菌(*Rhodococcus erythropolis*) NI86/21 的 TheC/D<sup>[11]</sup>作为电子传递链,后者内源性 TheC/D 电子传递链效率更高,转化率约 20%,但转化周期较长。Ke 等<sup>[12]</sup>表达来自自养无枝酸菌(*Pseudonocardia autotrophica*) VD<sub>3</sub> 羟化酶并分别构建了不动杆菌(*Acinetobacter sp.* OC4)的铁氧还蛋白 Fdx 及铁氧还蛋白还原酶 Fdr 参与催化 VD<sub>3</sub> (100  $\mu$ mol/L)产生骨化二醇,转化率最高为 19.65%。Bao 等<sup>[13]</sup>构建了自养假诺卡氏菌(*Pseudonocardia autotrophica*)的 VD<sub>3</sub> 羟化酶,且将来源于鲍曼不动杆菌(*Acinetobacter sp.*)的铁氧化还原蛋白(ferredoxin, FDX)和铁氧化还原蛋白还原酶(ferredoxin reductase, FDR)串联表达,作为电子传递链催化阿法骨化醇和艾地骨化醇中间体(AD-M07)分别转化成骨化三醇(0.5 mmol/L)和艾地骨化醇中间体(AD-M08,0.5 mmol/L),转化率分别为 36.10%和 22.87%。以上方法构建的催化体系或转化周期长,或产物不专一,或转化效率还有待提高。

此文将自主筛选保存在中国菌种保藏中心的假诺卡氏菌 *Pseudonocardia autotrophica* CGMCC-5098<sup>[14]</sup>菌株中 P450 羟化酶(Vdh, EC 1.14.13.159)克隆表达,该 Vdh 序列与 Fujii<sup>[9]</sup>报道的 Vdh 序列相比有两个碱基突变,催化的区域选择性高<sup>[15]</sup>。利用繁殖周期短的大肠杆菌 BL21(DE3)为宿主菌,同时将在前期 VD 体外催化试验中表现出良好催化活性<sup>[15,16]</sup>的菠菜中铁氧还原蛋白(Fdx),铁氧还原蛋白还原酶(Fdr)进行融合表达,减少反应组分,增

加电子传递效率,并利用葡萄糖脱氢酶(GDH)-葡萄糖实现 NADPH 辅酶再生循环<sup>[17]</sup>,建立以 VD<sub>3</sub> 和帕立骨化醇中间体(1 $\alpha$ -羟基-19-去甲维生素 D<sub>2</sub>)为底物催化转化成骨化二醇和帕立骨化醇的体外催化合成体系,并对催化体系进行优化。该体系产物专一,缩短转化周期,提高转化率。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌株,质粒及试剂

新鲜菠菜(*Spinach*)购自菜市场;自养假诺卡氏菌(*Pseudonocardia autotrophica* CGMCC-5098)菌株与葡萄糖脱氢酶 GDH 由实验室保藏;感受态细胞 BL21 及表达载体 pET-28a(Novagen);G<sup>+</sup>细菌基因组 DNA 小量提取试剂盒(北京庄盟国际生物基因科技有限公司);PCR 产物纯化试剂盒、质粒提取试剂盒、无缝克隆试剂盒、一步法反转录试剂盒及限制性内切酶 *Nde* I、*Xho* I(上海生工生物工程有限公司);引物及基因 Gene 4852、Gene 4833 和 Gene 5562, Gene 5561 合成及基因测序均由上海生工生物工程有限公司完成;VD<sub>3</sub>(Sigma);帕里骨化醇中间体由实验室自制。

### 1.2 实验方法

#### 1.2.1 引物设计

根据 VD<sub>3</sub> 羟化酶 Vdh 基因(GeneBank: KX786150),铁氧化还原蛋白 Fdx 基因(GeneBank: XM\_022011295)和铁氧化还原蛋白还原酶 Fdr 基因(GeneBank: XM\_022006538)序列分别设计引物,在 Vdh 引物上下游分别引入酶切位点 *Nde* I 和 *Xho* I, Fdx 及 Fdr 引物使用无缝克隆引物,酶切位点为 *Bam*H I 和 *Sac* I,同时在 Fdx 后引物, Fdr 前引物中加入 Linker: GGCGGCGGCGGAGC GGAGGAGGAGGAAGC GGCGGAGCGGAAGC,并通过 Over Lap PCR 进行融合。

#### 1.2.2 PCR 扩增及产物鉴定

使用 G<sup>+</sup>细菌基因组 DNA 小量提取试剂盒提取的 CGMCC-5098 菌 DNA 为模板,通过表 1 中的引物扩增 Vdh 基因,PCR 体系(25  $\mu$ L):基因组 DNA 1  $\mu$ L, Vdh 基因上下游引物(10  $\mu$ mol/L)各 1  $\mu$ L, 2  $\times$  Prime STAR Max DNA 聚合酶 12.5  $\mu$ L, 灭菌双蒸水 9.5  $\mu$ L。PCR 扩增条件:94  $^{\circ}$ C 5 min, 94  $^{\circ}$ C 30 s, 66  $^{\circ}$ C 1 min, 72  $^{\circ}$ C 30 s, 30 个循环, 72  $^{\circ}$ C 5 min; Fdx-Fdr 基因以新鲜菠菜用 Trizol 法提取 RNA,并用一步法反转录试剂盒得到的 cDNA 为模板,使用表 1 引物,采用 Over Lap PCR 的方法,扩增体系与条件同上,

表 1 引物及序列  
Table 1 Primer and sequence

引物名称 Primer	序列 Sequence
Vdh-F	5'-CAGAACATATGGCGCTGACCACCACCGGCACCGAGCA-3'
Vdh-R	5'-GACACCTCGAGTCAGGCGCTGCGCGGCCCA-3'
Fdx-F	5'-ACAGCAAATGGTTCGCGCAATGGCTGCCTACAAGGTAACCTTGGTAAACCC-3'
Fdx-R	5'-GCTTCCTCCTCCTCCGCTGCGCGCCGCGCCGGCAGTAAGCTCCTCCTTCCTG-3'
Fdr-F	5'-GGAGGAGGAGGAAGCGCGGAGGCGGAAGCCAGATCGCCTCTGATGTGGAGG-3'
Fdr-R	5'-GCAAGCTTGTGCGACGGAGCTTTACTAGACTTCAACGTTCCATTGTTCTGC-3'

得到产物使用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测。

### 1.2.3 Vdh 及 Fdx-Fdr 原核表达质粒的构建

质粒双酶切体系: pET28a (+) 质粒 10  $\mu$ L, *Nde* I 和 *Xho* I 酶各 1  $\mu$ L, 10  $\times$  H Buffer 2.5  $\mu$ L, 灭菌双蒸水 10.5  $\mu$ L。配置好体系后, 使其在 37  $^{\circ}$ C 温育 3 h, 65  $^{\circ}$ C 水浴 15 min 灭活限制性内切酶。以相同体系对纯化后的 Vdh 扩增产物进行酶切。

取两管双酶切产物配制连接体系: pET28a (+) 线性片段 5  $\mu$ L, Vdh 基因片段 7  $\mu$ L, 10  $\times$  T4

DNA Ligase Buffer 2  $\mu$ L, T4 Ligase 1  $\mu$ L, 灭菌双蒸水 5  $\mu$ L。将连接体系置于 16  $^{\circ}$ C 水浴 2 h, 得到 pET28a-Vdh。

无缝克隆连接体系: 无缝克隆 pET-28a 线性化载体 2  $\mu$ L, 纯化后的 Fdx-Fdr 扩增产物 3  $\mu$ L, 2  $\times$  Seamless Cloning Mix 10  $\mu$ L, Nucleuse free water 5  $\mu$ L。配置好体系后, 使其在 50  $^{\circ}$ C 温育 20 min, 得到 pET28a-Fdx-Fdr。构建的两个质粒如图 1, 待转化后通过菌落 PCR 及菌液测序验证是否构建成功。

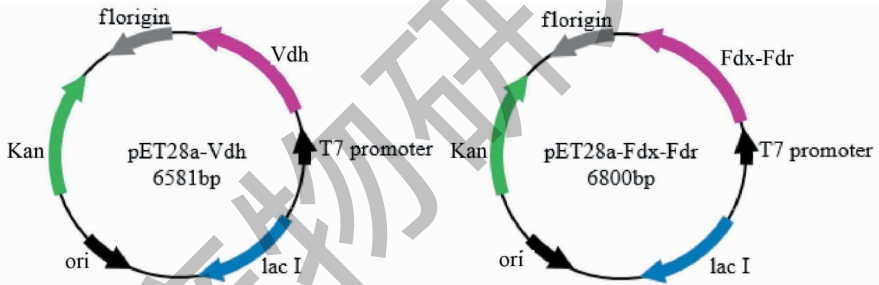


图 1 质粒 pET28a-Vdh 和 pET28a-Fdx-Fdr 图谱

Fig. 1 Structure diagram of pET28a-Vdh and pET28a-Fdx-Fdr

### 1.2.4 重组质粒转化大肠杆菌

利用热激法将 pET28a-Vdh 及 pET28a-Fdx-Fdr 分别转入大肠杆菌 BL21 (DE3) 中。取少量涂布在含 50  $\mu$ g/mL 卡那霉素的 LB 平板上, 37  $^{\circ}$ C 过夜培养。挑取形态良好的单菌落, 使用挑取的单菌落为模板, 利用质粒 pET28a 通用引物 T7 及 T7-ter 进行扩增, 产物进行电泳鉴定, 同时接种于含卡那霉素 50  $\mu$ g/mL 的 LB 液体培养基中, 置于恒温摇床, 37  $^{\circ}$ C, 200 rpm, 培养 6 h 后分管于 -80  $^{\circ}$ C 保存, 并取部分菌液委托上海生工生物工程有限公司测序。

### 1.2.5 重组大肠杆菌的诱导表达

取冻存的重组大肠杆菌接种于新鲜的液体 LB 培养基中, 过夜培养。取 1 mL 活化菌接种于 50 mL LB 液体培养基中, 培养基中加入终浓度为 50  $\mu$ g/

mL 卡那霉素。当菌液 A600 达到 0.6 ~ 0.8 之间, 加入终浓度 0.5 mmol/L 的 IPTG, 于 30  $^{\circ}$ C, 200 rpm 继续培养 12 h, 同时将不加入 IPTG 的重组大肠杆菌同条件培养, 作为空白对照。

取菌液于 8 000 g 离心 10 min, 倒掉上清培养基, 以相同条件的 10 mmol/L Tris-HCl (pH7.0) 重悬菌体, 8 000 g 离心 10 min, 重复 3 次。用 20 mL Tris-HCl (pH7.0) 重悬菌体沉淀, 混匀后进行超声破碎, 功率 500 W, 工作 5s, 间隔 5 s, 循环 60 次。破碎菌体以后, 将溶液在 8 000 g 离心 10 min, 取全菌, 上清与沉淀分别保存。利用 12% SDS-PAGE 检验蛋白大小及其可溶性。

### 1.2.6 Fdx-Fdr 蛋白活性检测

电子链蛋白活性检测采用细胞色素 C 来检测

Fdx-Fdr 的电子传递活性<sup>[12]</sup>。将 60  $\mu\text{L}$  Fdx-Fdr (5 mg/mL), 2.7 mL PBS (100 mM 磷酸盐缓冲液, pH7.0) 和 NADH 150  $\mu\text{L}$  (50 mM) 及细胞色素 C 90  $\mu\text{L}$  (50 mM), 混合反应。空白组不加 NADH, 在 3 min 内每隔 30 s 测量了 550 nm 吸收波长中的吸收值的变化。

### 1.2.7 体系催化活性验证及优化

将诱导后的重组菌冷冻干燥后, 在 10 mL 磷酸缓冲液 (0.1 M, pH7.0) 中加入 Vdh 及 Fdx-Fdr 粉碎后的粗酶粉各 0.05 g, GDH 破碎后的粗酶粉 (葡萄糖脱氢酶) 0.05 g, 葡萄糖 0.1 g, DNAP (50 mM) 50  $\mu\text{L}$ , 帕立骨化醇中间体<sup>[18]</sup> (1 $\alpha$ -羟基-19-去甲维生素 D<sub>2</sub>) 或 VD<sub>3</sub> 100  $\mu\text{mol/L}$ , 30  $^{\circ}\text{C}$ , 反应 12 h。TLC 检测反应完毕后, 将转化产物通过硅胶色谱柱分纯后, 进行核磁共振氢谱和质谱分析鉴定及高效液相色谱法

分析, HPLC 结果分析高效液相色谱法的条件为: 正相柱, 流动相为异丙醇: 正己烷 = 15: 85 (V/V), 柱温室温, 检测波长 265 nm, 色谱柱 Waters SiO<sub>2</sub> (3.9 mm  $\times$  300 mm), 流速为 1.0 mL/min。

电子传递链与 Vdh 催化作用条件优化: 考虑到电子传递链是羟化反应的限速步骤, 在其他条件不变的情况下, 我们探究 Vdh 与 Fdx-Fdr 比例对反应的影响, 共 0.1 g (酶粉比例为 Vdh: Fdx-Fdr = 1: 8, 1: 4, 1: 2, 1: 1, 2: 1, 4: 1)。

## 2 结果

### 2.1 PCR 扩增及产物鉴定

如图 2 所示, A、B、C、D 分别为 Vdh 基因 (1 212 bp)、Fdx 基因 (294 bp)、Fdr 基因 (945 bp)、Fdx-Fdr (1 431 bp) PCR 产物图, 与理论大小相符。

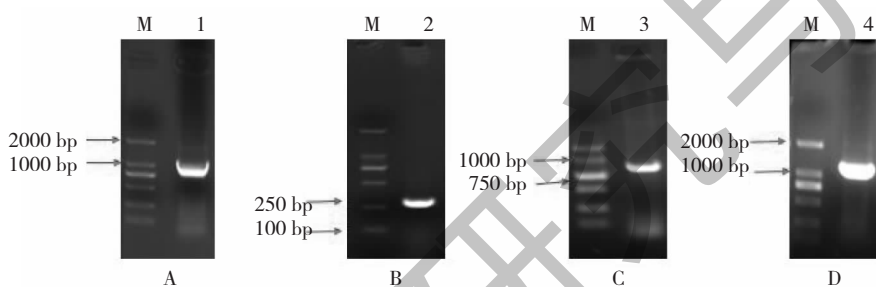


图 2 PCR 产物电泳图

Fig. 2 Agarose gel electrophoresis of PCR amplification products

注: M: DNA Marker; 1: Vdh PCR 产物; 2: Fdx PCR 产物; 3: Fdr PCR 产物; 4: Fdx-Fdr Over Lap PCR 产物。Note: M: DNA marker; 1: PCR product of Vdh; 2: PCR product of Fdx; 3: PCR product of Fdr; 4: Over Lap PCR product of Fdx-Fdr.

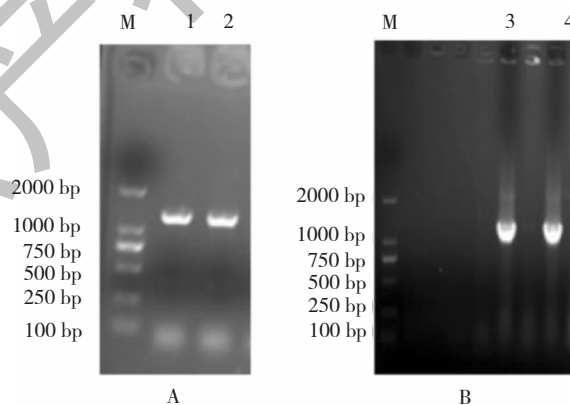


图 3 PCR 菌落验证重组质粒 pET28a-Vdh (A) 和 pET28a-Fdx-Fdr (B)

Fig. 3 PCR colony verification of recombinant plasmids pET28a-Vdh (A) and pET28a-Fdx-Fdr (B)

注: M: DNA Marker; 1, 2: Vdh 菌落 PCR 产物; 3, 4: Fdx-Fdr 菌落 PCR 产物。Note: M: DNA Marker; 1, 2: PCR amplification of Vdh in recombinant plasmid of pET28a-Vdh; 3, 4: PCR amplification of Fdx-Fdr in recombinant plasmid of pET28a-Fdx-Fdr.

## 2.2 重组质粒 pET28a-Vdh 及 pET28a-Fdx-Fdr 验证

菌落 PCR 产物电泳结果如图 3, 其中 A 为重组

质粒 pET28a-Vdh 的菌落 PCR 凝胶电泳图, 图中 B 为重组质粒 pET28a-Fdx-Fdr 的菌落 PCR 凝胶电泳图, Vdh 基因大小 1 212 bp, Fdx-Fdr 基因大小 1 431

bp, 菌落 PCR 大小符合预期, 且测序结果与目标序列相似度 100%。

### 2.3 重组大肠杆菌的诱导表达

如图 4 所示, A 图中相对分子量 45 kDa 附近诱导出明显的蛋白与羟化酶蛋白预期大小吻合, 1 和 2

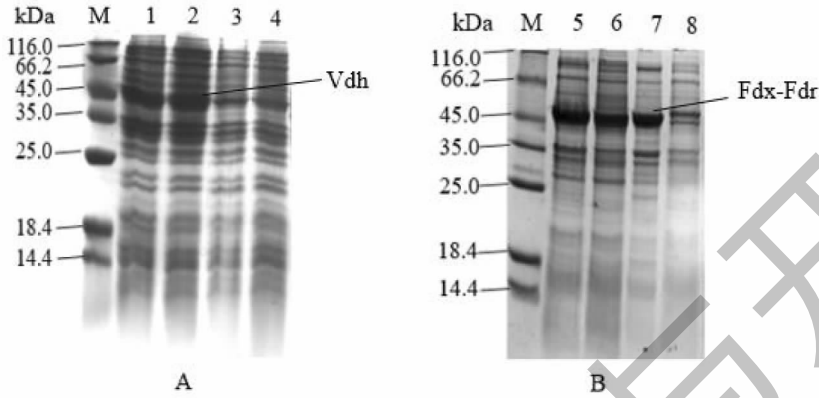


图 4 pET28a-Vdh(A)/pET28a-Fdx-Fdr(B) 蛋白诱导表达 SDS-PAGE 分析

Fig. 4 SDS-PAGE analysis of pET28a-Vdh(A)/pET28a-Fdx-Fdr(B) Recombinant protein expression

注: M: Protein marker; 1, 2: pET28a-Vdh 诱导后; 3, 4: pET28a-Vdh 诱导前; 5, 6, 7: pET28a-Fdx-Fdr 诱导后; 8: pET28a-Fdx-Fdr 诱导前。Note: M: Protein marker; 1, 2: *E. coli* BL21 transformed by pET28a-Vdh plasmids after induced; 3, 4: *E. coli* BL21 transformed by pET28a-Vdh plasmids before induced; 5, 6, 7: *E. coli* BL21 transformed by pET28a-Fdx-Fdr plasmids after induced; 8: *E. coli* BL21 transformed by pET28a-Fdx-Fdr plasmids before induced.

### 2.4 Fdx-Fdr 蛋白活性检测

由图 5 可知, 相较于空白对照组, 三个平行实验组加入 NADH 后, 在 550 nm 处吸光值显著升高(图

5), 以上结果证实细胞色素 C 接受了由 Fdx-Fdr 融合蛋白介导的电子, 从而证实体外可溶表达的 Fdx-Fdr 融合蛋白具有生理活性。

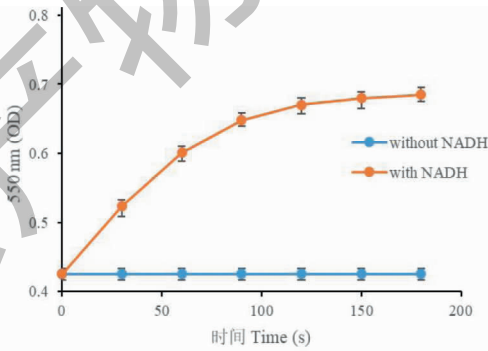


图 5 细胞色素 C 评价 Fdx-Fdr 活性

Fig. 5 Cytochrome C evaluation of Fdx-Fdr activity

### 2.5 体系催化活性验证及优化

帕立骨化醇中间体(1 $\alpha$ -羟基-19-去甲维生素 D<sub>2</sub>)转化产物通过碳谱, 氢谱, 质谱验证为帕立骨化醇, 表征数据与文献报道一致<sup>[18]</sup>。

VD<sub>3</sub> 转化产物质谱氢谱及 HPLC 分析。分子质量 ESI-MS:  $m/z$  401.0 [M + H]<sup>+</sup>, 比底物分子 VD<sub>3</sub> 分子质量大 16(则为 25-OH-VD<sub>3</sub>)。核磁共振氢谱

的归属信号为<sup>1</sup>H NMR(400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ (ppm): 10.21(d,  $J$  = 6.8 Hz, 1H), 7.70(d,  $J$  = 7.6 Hz, 2H), 7.44(d,  $J$  = 8.8 Hz, 2H), 6.65(d,  $J$  = 6.8 Hz, 1H)。HPLC 检测分析图(图 6), 样品和标准品在相同的保留时间处有强烈紫外吸收, 说明 VD<sub>3</sub> 成功转化为骨化二醇。考虑到电子传递链是该反应的关键限速步骤, 我们在进行体外催化 VD<sub>3</sub> 时考察了

Vdh 与 Fdx-Fdr 比例对底物转化的影响(表 2),当二者比例达到 1:4 时,产物骨化二醇转化率最高约有 40.10%。

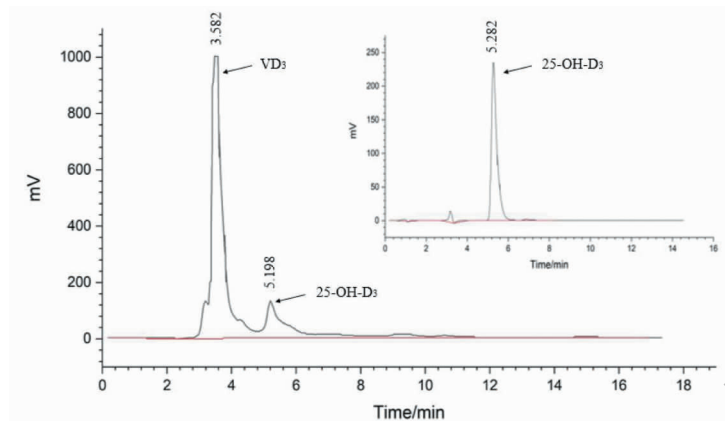


图 6 HPLC 检测分析图

Fig. 6 HPLC analysis chart

表 2 不同比例的羟化反应体系底物转化率

Table 2 Conversion ratios of substrates in different hydroxylation reaction systems

Vdh: Fdx-Fdr	底物浓度 Substrate concentration( $\mu\text{mol/L}$ )	转化率 Conversion rate( % )
1:8	100	32.37
1:4	100	40.10
1:2	100	14.43
1:1	100	9.51
2:1	100	4.32
4:1	100	11.74

### 3 讨论

活性维生素 D(骨化醇类药物)在骨质疏松、抗炎免疫等方面具有疗效,但化学法合成成本高,产率低,因此生物转化合成骨化醇类类似物具有重要意义。研究发现,多种放线菌都具有转化骨化醇类药物的作用,但通常需要 72 h,且产物难以分离<sup>[6,16]</sup>。相比之下,利用基因工程技术,克隆具有高选择性、高活力的羟化酶,并在重组细胞中实现活性表达,能够有效提高反应体系的转化率并显著降低反应时间,降低成本。在使用基因工程技术,利用重组大肠杆菌构建羟化反应体系的研究中,将来自不动杆菌的电子传递链蛋白串联表达,构建的催化体系转化率达到 19.65%<sup>[12]</sup>,而将羟化酶与不动杆菌电子传递链蛋白导入同一细胞进行催化的转化率达到 36.10%<sup>[13]</sup>。该研究将来自菠菜的电子传递链蛋白融合表达,减少反应组分,增加电子传递效率,与更

具活性选择性的羟化酶联用,并利用葡萄糖脱氢酶-葡萄糖实现 NADPH 辅酶再生循环,构建了体外催化氧化体系,提高转化效率,能够催化帕立骨化醇中间体和 VD<sub>3</sub> 转化成帕立骨化醇和骨化二醇,骨化二醇转化率达到为 40.10%,转化时间为 12 h,仅为自养假诺卡氏菌转化时间 16.7%。该研究显著降低转化时间,降低成本,操作简单,同时提高了转化效率,为转化骨化醇类药物侧链氧化的工业应用提供了一种更加高效的方法。

### 参考文献

- 1 Noboru K. A new look at the most successful prodrugs for active vitamin D(D hormone): alfacalcidol and doxercalciferol [J]. *Molecules*, 2009, 14: 3869-3880.
- 2 Jones G, Strugnell SA, Deluca HF. Current understanding of the molecular actions of vitamin D [J]. *Physiol Rev*, 1998, 78: 1193-1231.

- 3 Deeb KK, Trump DL, Johnson CS. Vitamin D signalling pathways in cancer; Potential for anticancer therapeutics [J]. *Nat Rev Cancer*, 2007, 7:684-700.
- 4 Tsuprykov O, Chen X, Hoche CF, et al. Why should we measure free 25 (OH) vitamin D? [J]. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2018, 180:87-104.
- 5 Chen YS, Ren L, Zhai CY. Synthesis of alfalcidol [J]. *Chin New Drugs J* (中国新药杂志), 2005, 14:1441-1443.
- 6 Sasaki J, Mikami A, Mizoue K, et al. Transformation of 25- and 1 $\alpha$ -hydroxyvitamin D<sub>3</sub> to 1 $\alpha$ , 25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> by using *Streptomyces* sp. strains [J]. *Appl Environ Microbiol*, 1991, 57:2841-2846.
- 7 Yasuda K, Endo M, Ikushiro S, et al. UV-dependent production of 25-hydroxyvitamin D<sub>2</sub> in the recombinant yeast cells expressing human CYP2R1 [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2013, 434:311-315.
- 8 Sawada N, Sakaki T, Yoneda S, et al. Conversion of vitamin D<sub>3</sub> to 1 $\alpha$ , 25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> by *Streptomyces griseolus* cytochrome P450SU-1 [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004, 320(1):156-164.
- 9 Fujii Y, Kabumoto H, Nishimura K, et al. Purification, characterization, and directed evolution study of a vitamin D<sub>3</sub> hydroxylase from *Pseudonocardia autotrophica* [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2009, 385:170-175.
- 10 Fujii T, Fujii Y, Machida K, et al. Efficient biotransformations using *Escherichia coli* with mutations expressing cytochrome P450 genes [J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2014, 73:805-810.
- 11 Imoto N, Nishioka T, Tamura T. Permeabilization induced by lipid ii-targeting lantibiotic nisin and its effect on the bioconversion of vitamin D<sub>3</sub> to 25-hydroxyvitamin D<sub>3</sub> by *Rhodococcus erythropolis* [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2011, 405:393-398.
- 12 Ke X, Ding GJ, Sun J, et al. Vitamin D<sub>3</sub> hydroxylase and its electronic transfer chain in vitro construction and activity analysis [J]. *China Biotechnol* (中国生物工程杂志), 2016, 36(5):89-96.
- 13 Bao ZJ, Chen XD, Wang H, et al. Construction of recombinant *Escherichia coli* with hydroxylase system activity [J]. *Pharm Biotechnol* (药物生物技术), 2019, 26(2):95-99.
- 14 Fen HT, Lu LX, Wen P, et al. Advances in research of preparing active vitamin D<sub>3</sub> by microbial transformation [J]. *Bio-technol Bull* (生物技术通报), 2010(4):55-58.
- 15 Luo JQ. Sequence analysis, modeling and cloning, expression of hydroxylase gene from CGMCC5098 [D]. Chengdu: Southwest Jiaotong University (西南交通大学), 2017.
- 16 Luo JQ, Jiang F, Fang WJ, et al. Optimization of bioconversion conditions for vitamin D<sub>3</sub> to 25-hydroxyvitamin D using *pseudonocardia autotrophica* CGMCC-5098 [J]. *Biocatal Bi-transport*, 2016, 35(1):11-18.
- 17 Jiang JP. Strategy to solve cofactor issues in oxidoreductase catalyzed biocatalytic applications [J]. *Chin J Biotechnol* (生物工程学报), 2012, 28:410-419.
- 18 Wan Y, Wen P, Zhang P, et al. Novel synthesis of paricalcitol by chem-biotransformation [J]. *Chin J Org Chem* (有机化学), 2012, 32:1988-1992.
- 24 Sakhivel N, Amudha R, Muthukrishnan S. Production of phytotoxic metabolites by *Sarocladium oryzae* [J]. *Mycol Res*, 2002, 106:609-614.
- 25 Côrtes MVCB, Silva-Lobo VL, Filippi MCC, et al. Potential for using crude extract of *Sarocladium oryzae* for suppression of rice blast [J]. *Trop Plant Pathol*, 2014, 39(1):28-34.
- 26 Wang CX, Peng F, Jiang HL, et al. Nucleoside metabolites produced by *Streptomyces* FIM-080014 [J]. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2012, 24:143-146.
- 27 Yang Y, Luo X, Mayila YS, et al. Ergosterol peroxide from *Pleurotus ferulae* inhibits gastrointestinal tumor cell growth through induction of apoptosis via reactive oxygen species and endoplasmic reticulum stress [J]. *Food Funct*, 2020, 11:4171-4184.
- 28 Zhao JL, Mou Y, Shan TJ, et al. Antimicrobial metabolites from the endophytic fungus *Pichia guilliermondii* isolated from *Paris polyphylla* var. *yunnanensis* [J]. *Molecules*, 2010, 15:7961-7970.