

# 催化合成 *R* 型托伐普坦的新型羰基还原酶

刘亚辉<sup>1</sup>, 王旭明<sup>1</sup>, 马硕<sup>1</sup>, 刘柯雨<sup>1</sup>, 李玮<sup>1</sup>, 张路路<sup>2</sup>, 杜洁<sup>1\*</sup>, 张红蕾<sup>1\*</sup>

1 河北大学 化学与材料科学学院 药物化学与分子诊断教育部重点实验室, 河北 保定 071002

2 河北牧群生物科技有限公司, 河北 保定 071001

刘亚辉, 王旭明, 马硕, 刘柯雨, 李玮, 张路路, 杜洁, 张红蕾. 催化合成 *R* 型托伐普坦的新型羰基还原酶[J]. 生物工程学报, 2025, 41(1): 321-332.

LIU Yahui, WANG Xuming, MA Shuo, LIU Keyu, LI Wei, ZHANG Lulu, DU Jie, ZHANG Honglei. A novel carbonyl reductase for the synthesis of (*R*)-tolvaptan[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2025, 41(1): 321-332.

**摘要:** 筛选具有催化还原复杂羰基化合物能力的羰基还原酶对于 *R* 型托伐普坦(*R*-tolvaptan, *R*-TVP)的生物合成具有重要意义。本研究分别采用硫酸铵盐析、葡聚糖分子排阻、离子交换层析、亲和层析以及蛋白质质谱的方法对兔肝脏粗酶中的目标羰基还原酶进行分离纯化和鉴定。以兔肝脏基因组为模板, PCR 扩增得到羰基还原酶 *rlsr5* 的基因片段, 并成功构建重组表达菌株。对诱导表达的 RLSR5 进行亲和层析纯化后, 表征其酶学性质。研究表明, *rlsr5* 基因序列为 972 bp, 编码蛋白的分子量为 40 kDa, 属于二聚体蛋白, 每个单体由( $\alpha/\beta$ )<sub>8</sub>-桶结构组成。RLSR5 可以不对称还原前手性酮 7-氯-1-[2-甲基-4-[(2-甲基苯甲酰基)氨基]苯甲酰基]-5-氧代-2,3,4,5-四氢-1H-1-苯氮革 (prochiral ketone, PK)合成 *R*-TVP。该酶的比活为 36.64 U/mg, 产物的光学纯度 *e.e.*值为 99%。该酶反应最适 pH 值为 6.0, 最适温度为 30 °C。该酶不是金属离子依赖性的酶, Mn<sup>2+</sup>对酶活力有促进作用。本研究为光学纯托伐普坦的生物催化合成奠定了基础。

**关键词:** 兔肝脏; 蛋白纯化; 羰基还原酶; 不对称还原; 托伐普坦

资助项目: 国家自然科学基金(3210120332); 河北大学研究生创新基金(HBU2023SS013); 保定市创新能力提升专项(2394G010); 河北省创新创业教育教学改革研究与实践项目(2023xcyc010)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (3210120332), the Post-graduate's Innovation Fund of Hebei University (HBU2023SS013), the Special Project for Enhancing Innovation Capability of Baoding (2394G010), and the Teaching Research and Practice Project of Innovation and Entrepreneurship Education in Hebei Province (2023xcyc010).

\*Corresponding authors. E-mail: ZHANG Honglei, zhanghonglei@hbu.edu.cn; DU Jie, dujie2008@126.com

Received: 2024-03-18; Accepted: 2024-05-30; Published online: 2024-06-05

## A novel carbonyl reductase for the synthesis of (*R*)-tolvaptan

LIU Yahui<sup>1</sup>, WANG Xuming<sup>1</sup>, MA Shuo<sup>1</sup>, LIU Keyu<sup>1</sup>, LI Wei<sup>1</sup>, ZHANG Lulu<sup>2</sup>, DU Jie<sup>1\*</sup>, ZHANG Honglei<sup>1\*</sup>

1 Key Laboratory of Medicinal Chemistry and Molecular Diagnosis of the Ministry of Education, College of Chemistry and Materials Sciences, Hebei University, Baoding 071002, Hebei, China

2 Hebei MuQun Biotechnology Co., Ltd., Baoding 071001, Hebei, China

**Abstract:** Screening carbonyl reductases with the ability to catalyze the reduction of complex carbonyl compounds is of great significance for the biosynthesis of *R*-tolvaptan(*R*-TVP). In this study, the target carbonyl reductase in the crude enzyme extract of rabbit liver was separated, purified, and identified by ammonium sulfate precipitation, gel-filtration chromatography, ion exchange chromatography, affinity chromatography, and protein mass spectrometry. With the rabbit liver genome as the template, the gene encoding the carbonyl reductase *rlsr5* was amplified by PCR and the recombinant strain was successfully constructed. After RLSR5 was purified by affinity chromatography, its enzymatic properties were characterized. The results indicated that the gene sequence of *rlsr5* was 972 bp, encoding a protein with a molecular weight of 40 kDa. RLSR5 was a dimeric protein, and each monomer was composed of a ( $\alpha/\beta$ )<sub>8</sub>-barrel structure. RLSR5 could asymmetrically reduce 7-chloro-1-[2-methyl-4-[(2-methylbenzoyl)amino]benzoyl]-5-oxo-2,3,4,5-tetrahydro-1H-1-benzazepine (prochiral ketone, PK) to synthesize *R*-TVP. The specific activity of the enzyme was 36.64 U/mg, and the optical purity of the product was 99%. This enzyme showcased the optimal performance at pH 6.0 and 30 °C. It was independent of metal ions, with the activity enhanced by Mn<sup>2+</sup>. This study lays a foundation for the biosynthesis of tolvaptan of optical grade.

**Keywords:** rabbit liver; protein purification; carbonyl reductase; asymmetric reduction; tolvaptan

设计可持续和环境友好的催化模型是实现绿色制造目标的关键。生物催化的反应条件温和, 具有高效的底物选择性、绿色可持续性和环保的优势, 并且与化学合成方法相比, 生物催化不需要使用大量的有机溶剂和高温、高压等条件, 因此可以降低能源消耗。生物催化已被证明是一种有效的工业生产策略<sup>[1]</sup>。托伐普坦(tolvaptan, TVP)是一种高效、高选择性和口服有效的非肽类加压素 V2 受体拮抗剂, 用于治疗因心力衰竭而引发的低钠血症, 而光学纯托伐普坦对人体毒副作用更小, 代谢稳定性更高, 受到了越来越多的关注。*S*型 TVP 或 *R*型 TVP 在常染色体显性多囊肾病的治疗中具有比

外消旋型托伐普坦更高的代谢稳定性和吸收率<sup>[2]</sup>。给哺乳动物注射光学的托伐普坦后, 药物在体内的半衰期变长, 并且在小鼠体内 *R*型 TVP 的代谢稳定性高<sup>[3]</sup>。因此, 不对称合成光学纯托伐普坦异构体对进一步阐明其作用机制和药理特性具有重要意义。

目前有报道称, 从毕赤酵母中分离的乙醇脱氢酶(alcohol dehydrogenase form *Pichia Pastoris* carbonyl compounds, PsADH)可以催化合成得到 *S*型 TVP<sup>[4]</sup>。将 PsADH 和用于辅酶再生的甲酸脱氢酶(formate dehydrogenase from *Candida Parapsilosi*, CpFDH)同时表达于工程大肠杆菌中, 利用该工程菌的全细胞可以催化

前手性酮 7-氯-1-[2-甲基-4-[(2-甲基苯甲酰基)氨基]苯甲酰基]-5-氧代-2,3,4,5-四氢-1H-1-苯氮草(prochiral ketone, PK)合成 S 型 TVP, 光学纯度为 99.5%, 收率为 85.7%<sup>[5]</sup>。然而, 目前尚未见对 R 型 TVP 进行生物催化合成的研究, 普遍仍采用传统的化学方法合成<sup>[6-7]</sup>。化学合成具有手性试剂合成复杂、合成成本高、有环境毒性等缺点<sup>[8]</sup>。因此, 筛选具有高底物转化效率、产物光学纯度优异的生物酶用于催化合成 R 型 TVP 具有实际价值和意义。

本研究旨在从动物肝脏中筛选具有合成 R 型 TVP 的还原酶类。首先分别比较了鸡肝脏、猪肝脏和兔肝脏这 3 种粗酶液不对称还原 PK 生成 R 型 TVP 的能力; 选择活性最好的肝脏原材料, 综合采用硫酸铵盐析法、葡聚糖分子排阻、DEAE 离子交换法、SDS-PAGE 等方法对肝脏中有活性的羧基还原酶进行分离纯化; 并将目标羧基还原酶基因片段插入到 pET28a 载体并转化大肠杆菌, 构建含有目的基因的工程菌株并进行诱导表达; 之后对重组蛋白进行纯化以及酶学性质表征, 分别从辅酶依赖、反应温度、反应 pH、金属离子、温度稳定性和 pH 稳定性等方面对该羧基还原酶催化反应的影响进行了探索, 研究最佳的酶促反应条件。本研究为 R 型 TVP 的生物催化合成路线的建立提供了理论基础。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材料

大肠杆菌(*Escherichia coli*) BL21(DE3)和 pET28a 质粒由本实验室保存; 本实验室根据 Matsubara 等<sup>[9]</sup>的方法合成了前手性酮 PK; NADH 和 NADPH 均购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司; 限制性内切酶购自宝日生物技术(北京)有限公司; 鸡肝、猪肝和中国大白兔肝均购自农贸市场; DNA 凝胶快速纯化试

剂盒, 反转录试剂盒均购自北京全式金生物技术股份有限公司; RNA 分离试剂盒购自生工生物工程(上海)股份有限公司; BCA 蛋白定量试剂盒购自上海泰坦科技股份有限公司。所有商用化学品均为分析级。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 不同动物肝脏粗酶液不对称催化合成 R-TVP 的评价

将新鲜的鸡肝、猪肝和兔肝加入预冷的 0.1 mol/L PBS 缓冲液(pH 7.4)中, 搅拌混合, 得到匀浆粗酶液(75 mg/mL)。分别对不同动物肝脏的粗酶液催化转化前手性酮 PK 的能力进行测定。酶促反应体系(500  $\mu$ L)由 0.1 mmol/L 磷酸钾缓冲液(pH 7.4)、1.11 mmol/L PK、13 mmol/L NADPH 和 80  $\mu$ L 粗酶溶液组成。反应体系置于恒温摇床中 37  $^{\circ}$ C、130 r/min 振荡 12 h, 反应完毕后, 12 000 r/min 离心 15 min。取 100  $\mu$ L 上清液溶于 900  $\mu$ L 甲醇中, 使用高效液相色谱(HPLC)进行分析。

#### 1.2.2 兔肝脏中目标羧基还原酶的分离纯化

取 75 mg/mL 兔肝酶粗溶液 1.5 mL, 加入 PBS 缓冲液稀释至 6 mL, 用 50%硫酸铵进行盐析处理。将沉淀物重悬于 PBS 缓冲液中。混悬液采用 AKTA Pure 和 His Trap<sup>TM</sup> DEAE 预装柱进行纯化, 以流速 1 mL/min 通过预装柱。280 nm 下检测各蛋白的紫外吸收及出峰情况, 收集紫外吸收值最大时的蛋白质溶液。然后用 His Trap Sephadex 6B 分子排阻层析法再次对上述蛋白溶液进行纯化, 以 0.5 mL/min 流速洗脱, 每 15 min 收集一次洗脱液, 并在 280 nm 紫外波长下检测吸光度值, 收集紫外吸收较高的蛋白质。将上述收集的蛋白质溶液加入到截流规格为 50 kDa 的超速离心管中, 用于蛋白浓缩和杂蛋白分离。4  $^{\circ}$ C、12 000 r/min 离心 30 min 后, 将上层的液体收集起来, 利用 SDS-PAGE

对蛋白纯化情况进行分析。选取 PAGE 胶中可能为羧基还原酶的条带进行切割,并将切割条带单独放在无菌离心管中,由深圳华大基因股份有限公司对蛋白质进行质谱检测和分析。

### 1.2.3 兔肝羧基还原酶的克隆及活性筛选

取购自农贸市场的兔肝脏,立即浸入 10 mL RNAlater 中。将肝脏切成 0.5 cm<sup>3</sup> 的小块,放入经 DEPC 水处理过的研钵中,加入液氮进行研磨。取少量粉末使用 RNA 分离试剂盒提取 RNA。以提取的 RNA 作为模板,使用反转录试剂盒合成第 1 条 cDNA。以 cDNA 为模板,采用表 1 中的引物进行 PCR 扩增。PCR 产物于 1% 琼脂糖凝胶电泳进行检测,用 DNA 快速凝胶提取试剂盒对电泳得到的目标条带进行纯化。纯化产物送深圳华大基因股份有限公司测序。将测序正确的纯化片段亚克隆到载体 pET28a 的 *EcoR* I/*Xho* I 酶切位点处,并将重组质粒转化至 *E. coli* BL21(DE3)。

重组菌株接种至含有 50 mg/L 卡那霉素的 LB 培养基中,37 °C、150 r/min 培养至 *OD*<sub>600</sub> 为 0.6–0.8 时,加入 IPTG 至终浓度为 0.5 mmol/L。16 °C 下继续培养 20 h 后离心收集菌体。取出 2 g 湿菌体,加入 8 mL PBS 缓冲溶液重悬菌体,加入底物 PK (1.12 mmol/L) 和辅酶 NADPH (13 mmol/L)。130 r/min、37 °C 反应 22 h 后,进行 HPLC 分析。

表 1 本研究所用引物

Table 1 Primers used in this study

Primer name	Primer sequence (5'→3')
RLSR1 F	ATGGATCTCAAACATCACTATCTGG
RLSR1 R	TTAATATTCATCAGAAAATGGATGG
RLSR2 F	ATGGATCCCAAGCATCAGCGTATGG
RLSR2 R	TCAATATTCATCAGAAAATGGGTAA
RLSR3 F	ATGGATCCTAAACATCAGCGAGCGG
RLSR3 R	TCAATATTCATCAGAAAATGGGTAA
RLSR4 F	ATGGCAGACTTACCTACCCCACTCA
RLSR4 R	ATGGCGGCGCGCGCGGCTTCGGGCG
RLSR5 F	ATGGATCCCAAATATCAGCGTGTGG
RLSR5 R	TTAATATTCATCAGAAAATGGGTAA

### 1.2.4 目标羧基还原酶的纯化及浓度测定

在 LB 培养基中培养具有催化活性的重组菌 *E. coli* BL21(DE3)/pET28a-*rlsr5*, 培养方法同 1.2.3。菌株经过诱导、表达后,菌体细胞被破碎,13 000 r/min 离心 15 min,收集上清粗酶液。采用 AKTA Pure 蛋白纯化系统与 His Trap<sup>TM</sup> HP 亲和柱进行重组菌蛋白的纯化<sup>[10]</sup>。先用 HEPES 缓冲液平衡系统,等基线稳定后,将蛋白沉淀悬浮液经过 0.22 μm 滤膜过滤后上样,以 1 mL/min 流速通过预装柱,基线再次平衡时加入洗脱 Buffer (HEPES、NaCl、咪唑)将目的蛋白从亲和柱上洗脱,洗脱液用 SDS-PAGE 分析纯化情况。

使用 BCA 法测定纯化后的蛋白浓度。首先,在洁净的管中按照 0、25、75、125、250、500、750、1 000 μg/mL 稀释 BSA 标准蛋白,然后与 BCA 工作液结合,形成颜色深浅不同的蓝紫色复合物,用酶标仪测各样品的 *A*<sub>562</sub> 值。以蛋白浓度为横坐标, *A*<sub>562</sub> 值为纵坐标,绘制标准曲线。纯化的蛋白浓度根据拟合线性方程计算。

### 1.2.5 羧基还原酶的酶活测定

通过测定 340 nm 处 NADH/NADPH 吸光度的增加来测定羧基还原酶的活性<sup>[11]</sup>。标准酶活反应液为 0.1 mol/L PBS 缓冲液 (pH 7.4) 100 μL、89 μmol/L 的 PK、479 μmol/L 的 NAD(P)H,再加入适量酶溶液,反应体系的终体积为 250 μL。反应体系在 30 °C 孵育 5 min 后,立即使用酶标仪检测 340 nm 处吸光值的变化。反应体系在 30 °C 孵育 5 min 后,立即使用酶标仪检测 340 nm 处吸光值的变化。羧基还原酶活性单位定义为:在 30 °C 下每 min 释放 1 μmol NAD(P)H 所需的酶量。所有实验重复 3 次。

羧基还原酶的辅酶依赖性测定,以 PK 为底物,分别以 NADH 和 NADPH 为辅酶进行测

试。反应体系(250  $\mu\text{L}$ )包括: 89  $\mu\text{mol/L}$  PK, 0.1 mol/L Tris-HCl 185  $\mu\text{L}$ , 239  $\mu\text{mol/L}$  NADPH/NADH, 37  $^{\circ}\text{C}$  孵育 1 min, 然后加入适量纯酶液, 立即使用酶标仪检测 340 nm 处吸光值变化, 测试 10 min, 每 min 检测 1 次。

对纯化的羰基还原酶进行最佳反应 pH 的测定, 所用缓冲溶液为 0.1 mol/L 乙酸-乙酸钠缓冲溶液(pH 3.0–5.0), 0.1 mol/L 磷酸氢二钠-磷酸二氢钠缓冲溶液(pH 6.0–7.0), 0.1 mol/L Tris-HCl 缓冲溶液 pH 8.0。在标准酶活反应液体体系下, 设定 20–60  $^{\circ}\text{C}$  的温度区间进行测试, 测定最佳反应温度。RLSR5 的相对活性在最佳 pH 和温度下均定义为 100%。

为了保持 pH 稳定性, 酶在上述缓冲液中 25  $^{\circ}\text{C}$  孵育 12 h, 并在标准测定条件下测定残留活性。在 HEPES 缓冲液(30 mmol/L, pH 7.0)中, 20–60  $^{\circ}\text{C}$  孵育 10 min 来探究酶的温度稳定性, 并在标准酶活反应液体体系下测量残留活性。

将酶液添加至 0.1 mol/L PBS 缓冲液(pH 7.4)中, 配制含有 2 mmol/L EDTA、 $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Zn}^{2+}$ 、 $\text{Mn}^{2+}$ 、 $\text{Na}^{+}$ 、 $\text{K}^{+}$  和  $\text{Mg}^{2+}$  的最佳缓冲溶液。测定不同金属离子对酶活性的影响, 将酶与每种金属离子在 30  $^{\circ}\text{C}$  下孵育 10 min, 并测量剩余活性。

为了测定 PK 为底物的酶动力学常数, 将底物浓度分别设置为 1、5、10、50、100 和 200  $\mu\text{mol/L}$ , 再加入 0.1 mol/L PBS 缓冲液(pH 7.4)、479  $\mu\text{mol/L}$  的 NAD(P)H 和适量的纯酶液, 反应体系为 250  $\mu\text{L}$ 。测定并记录反应 1 min 后的吸光值, 以上数据重复 3 次取平均值。利用下述公式(1)对测定的数据进行拟合, 由公式(2)计算  $k_{\text{cat}}$  值。

$$V = \frac{V_{\text{max}}[S]}{K_{\text{m}} + [S]} \quad (1)$$

$$k_{\text{cat}} = \frac{V_{\text{max}}}{[E]} \quad (2)$$

## 1.2.6 HPLC 分析方法

采用 Agilent 1260 HPLC, 使用 Agilent Extent C18 分析柱, 检测底物和产物的含量变化, 流动相为 60%乙腈和 40%的 0.05%三氟乙酸水溶液, 时间为 30 min, 流速 1 mL/min, UV 检测波长为 254 nm, 柱温 30  $^{\circ}\text{C}$ ; 使用手性柱 CHIRALPAK OD-RH (4.6 mm $\times$ 250 mm, 5  $\mu\text{m}$ ) 进行产物构型的确定, 流动相为 40%的 0.05%三氟乙酸水溶液和 60%的 0.05%三氟乙酸乙腈溶液, 时间为 20 min, UV 检测波长为 254 nm, 进样量 5  $\mu\text{L}$ , 流速 1 mL/min, 柱温 30  $^{\circ}\text{C}$ 。

## 1.2.7 羰基还原酶的催化机理分析

通过对羰基还原酶序列进行同源建模与分子对接探索其催化机理。基于前列腺素-E29-还原酶(PDB ID: 1q5m.1)的晶体结构, 使用 SWISS-MODEL (<http://swissmodel.expasy.org/SWISS-MODEL.html>)生成 RLSR5 的同源建模模型。并使用 PyMOL 进行可视化研究<sup>[12]</sup>。以 RLSR5 蛋白为受体, 底物 PK 作为配体, 利用 AutoDock 4.0 对其进行分子对接模拟。对接盒子参考文献<sup>[13]</sup>进行设定。

# 2 结果与分析

## 2.1 不同动物肝脏粗酶液对托伐托伐普坦前手性酮的转化

肝脏中酶的组成复杂、种类较多, 含有多种水解酶、脱氢酶和还原酶等<sup>[14]</sup>。为了得到具有催化托伐普坦前手性酮 PK 的羰基还原酶, 以鸡肝脏、猪肝脏和兔肝脏为来源进行酶的筛选。首先, 利用 3 种肝脏的匀浆液对 PK 进行了催化测试, 以确定具有催化活性的肝脏来源。HPLC 分析结果表明, 只有兔肝脏粗酶液的活性较高, 在 5.235 min 时出现紫外吸收较高的产物峰, 转化率为 78%。而鸡肝脏、猪肝

脏参与的催化反应没有 *R*-TVP 的生成, 证明其中不存在具有转化 PK 活性的酶。因此选取兔肝脏为研究对象, 对其 PK 不对称还原酶类进行研究。

## 2.2 目标羰基还原酶的分离纯化结果

为了挖掘具有催化活性的羰基还原酶, 先后采用硫酸铵盐析、DEAE 阴离子交换法、His Trap Sephadex 6B 分子排阻色谱层析、超滤管分离对兔肝脏匀浆的目标羰基还原酶进行纯化<sup>[15]</sup>。纯化前后的酶液分别进行了 SDS-PAGE 分析及 HPLC 蛋白活性分析。从图 1A 和图 1B 中可观察到纯化前蛋白质的分子量主要分布在 14.4–97.4 kDa 范围内, 纯化后, 去除了大部分分子量较大的蛋白质, 剩余有活性的酶的分子量主要分布在 23–53 kDa 范围内(红色方框标记)。将红框内的蛋白条带进行切割并进行质谱检测。将质谱检测出的氨基酸序列在 NCBI 蛋白数据库中进行序列同源比对(BLAST)。根据蛋白名称(protein name)、种类描述(description)和蛋白分子量(mass)对比对结果进行筛选, 共筛选出 7 种匹配度较高的还原酶类<sup>[16]</sup>。如表 2 所示, 同源性最高的 7 种蛋白分别属于羟基类

固醇脱氢酶、类醌二氢蝶啶还原酶和脱氢酶/还原酶 SDR 家族, 蛋白序列覆盖率为 55%–86%, 分子量为 26.175–54.933 kDa 不等。上述蛋白质谱结果为后续羰基还原酶的克隆提供了参考。

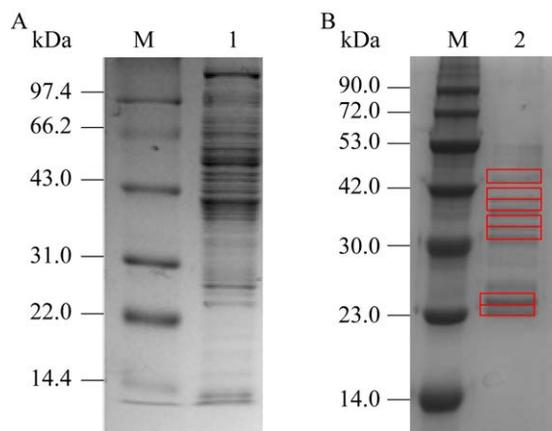


图 1 兔肝脏粗酶液纯化前(A)后(B)蛋白的 SDS-PAGE 分析 泳道 M: 蛋白 marker; 泳道 1: 未纯化的兔肝脏粗酶液; 泳道 2: 纯化后的兔肝脏粗酶液。

Figure 1 SDS-PAGE analysis of rabbit liver crude enzyme fluid before (A) and after (B) purification. Lane M: Protein marker; Lane 1: Unpurified rabbit liver crude enzyme liquid; Lane 2: Purified rabbit liver crude enzyme liquid.

表 2 筛选出的 7 种羰基还原酶信息

Table 2 Seven kinds of carbonyl reductases information were selected

Protein name	Description	Mass (Da)	Coverage (%)
AKR1C33	Naloxone reductase 2 OS=Oryctolagus cuniculus OX=9986 GN=AKR1C33 PE=2 SV=1	37 451	69
AKR1C29	3-hydroxyhexobarbital dehydrogenase OS=Oryctolagus cuniculus OX=9986 GN=AKR1C29 PE=2 SV=1	37 278	83
PGER6	3alpha(17beta)-hydroxysteroid dehydrogenase OS=Oryctolagus cuniculus OX=9986 GN=PGER6 PE=2 SV=1	37 029	55
ALDH1A1	Retinal dehydrogenase 1 OS=Oryctolagus cuniculus OX=9986 GN=ALDH1A1 PE=1 SV=1	54 933	75
PGER5	3alpha/17beta/20alpha-hydroxysteroid dehydrogenase OS=Oryctolagus cuniculus OX=9986 GN=PGER5 PE=2 SV=1	36 966	86
QDPR	Quinoid dihydropteridine reductase OS=Oryctolagus cuniculus OX=9986 GN=QDPR PE=2 SV=2	26 175	56
DHRS4	Dehydrogenase/reductase SDR family member 4 (fragment) OS=Oryctolagus cuniculus OX=9986 GN=DHRS4 PE=1 SV=1	27 641	55

### 2.3 羰基还原酶基因的克隆

以兔肝脏 RNA 为模板, 利用反转录试剂盒获得兔肝脏的 cDNA。以其为模板, 进行羰基还原酶基因的克隆。PCR 产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳分析, 从图 2 可以看出, 仅有 4 对引物可从兔肝基因组中 PCR 扩增出条带, 泳道 1 扩增得到的片段 *rlsr5* 大约为 900 bp, 片段长度与 PGER5 蛋白的基因 (GenBank 登录号: NW\_026259278.1, 片段大小为 972 bp) 相同。泳道 2 中的 *rlsr1* 约在 750 bp 处出现一条很明显的条带, 引物特异性良好, 但是与 AKR1C33 蛋白的基因 (GenBank 登录号: BAN84253.1, 片段大小为 969 bp) 长度相差较大, 可能由于电压不稳, 导致片段前移, 不影响进行后续研究。泳道 3 中的 *rlsr2* 约在 1 000 bp 处出现单一条带, 片段长度与 AKR1C29 蛋白的基因 (GenBank 登录号: BAN20006.1, 片段大小为 972 bp) 相同, 泳道 4 中的 *rlsr3* 约在 900 bp 处出现单一条带, 片段长度与 PGER6 蛋白的基因 (GenBank 登录号: NW\_026259195.1, 片段大小为 972 bp) 相同。上述条带经测序后结

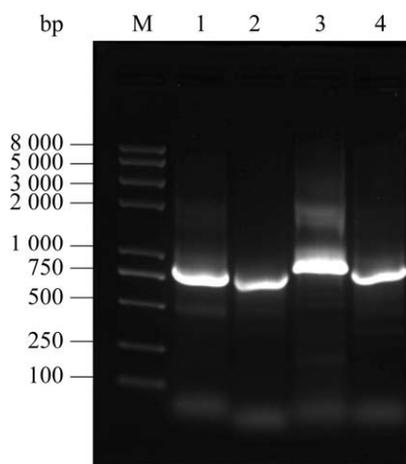


图 2 PCR 产物琼脂糖凝胶电泳图 泳道 M: DNA marker; 泳道 1: *rlsr5*; 泳道 2: *rlsr1*; 泳道 3: *rlsr2*; 泳道 4: *rlsr3*。

Figure 2 Agarose gel electrophoresis of PCR product. Lane M: DNA marker; Lane 1: *rlsr5*; Lane 2: *rlsr1*; Lane 3: *rlsr2*; Lane 4: *rlsr3*.

果与参照基因的片段一致, 表明根据质谱分析结果设计的引物可从兔肝 cDNA 中成功扩增得到相应条带大小的基因片段。将 *rlsr5* 的核苷酸序列上传至 GenBank, 登录号为 OP779194。

将 PCR 获得的目的片段与载体 pET28a 连接后, 转化至 *E. coli* DH5 $\alpha$  感受态细胞中, 成功构建了 3 个重组菌株 BL21(DE3)/pET28a-*rlsr1*、BL21(DE3)/pET28a-*rlsr3* 和 BL21(DE3)/pET28a-*rlsr5*。以 PK 为底物对上述重组菌株全细胞催化能力进行了测试 (图 3A)。通过手性柱, 对 R、S 构型的托伐普坦标准品及全细胞转化的产物分别进行了 HPLC 分析。如图 3B 所示, 底物 PK、S 型和 R 型托伐普坦的标准品在色谱

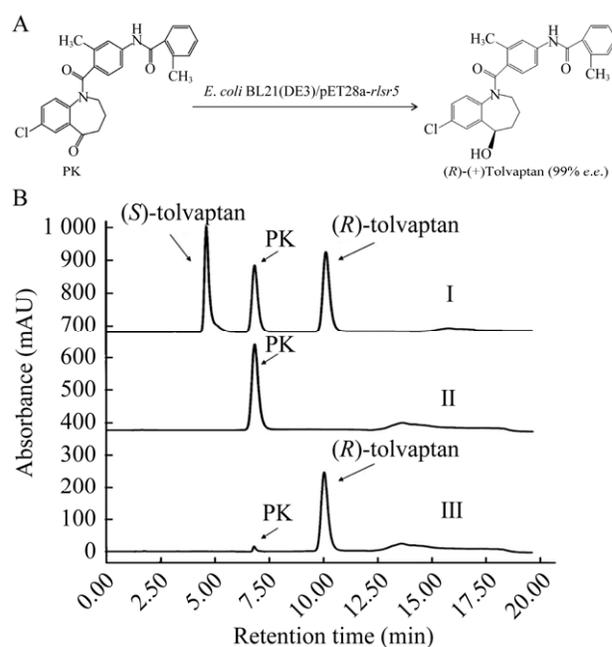


图 3 重组菌株 *E. coli* BL21(DE3)/pET28a-*rlsr5* 转化 PK 的反应方程式及 HPLC 图

Figure 3 The reaction equation for converting PK by recombinant strain *E. coli* BL21(DE3)/pET28a-*rlsr5* and HPLC analysis. A: The reaction equation for converting PK. B: HPLC analysis of transformation of PK by recombinant *E. coli* BL21(DE3)/pET28a-*rlsr5*. I: (*R*)-tolvaptan, PK, and (*S*)-tolvaptan standards; II: Transformation system without strain; III: Transformation system with *E. coli* BL21(DE3)/pET28a-*rlsr5* strain.

图上的保留时间分别为 6.875、4.910、10.300 min。三种重组全细胞转化结果显示, 只有重组菌株 BL21(DE3)/pET28a-*rlsr5* 具有催化能力, 全细胞的转化产物和标准品的保留时间对比发现, 该转化产物为 *R* 构型托伐普坦。经峰面积计算得到, 该转化产物的 *e.e.* 值为 99.0%, 转化率达 91.18%。说明此工程菌所含的 *rlsr5* 基因表达的酶具有较好的羰基还原活性。

经测序得到 *rlsr5* 基因全长 972 bp, 可编码

324 个氨基酸, 与 GenBank 数据库中 RLSR5 (NM\_001287557.1) 的羰基还原酶基因序列一致性为 77.67%。蛋白质序列比对表明, 该酶与羰基还原酶里的短链脱氢酶 (short-chain dehydrogenase/reductases, SDRs) 和中链脱氢酶/还原酶 (medium-chain dehydrogenases/reductases, MDRs) 的相似性极低 (<2%)。而与羰基还原酶中的醛酮还原酶家族 1 高度相似<sup>[17]</sup>, 同源率为 91%–99% (图 4), 且具有一些共同的保守位

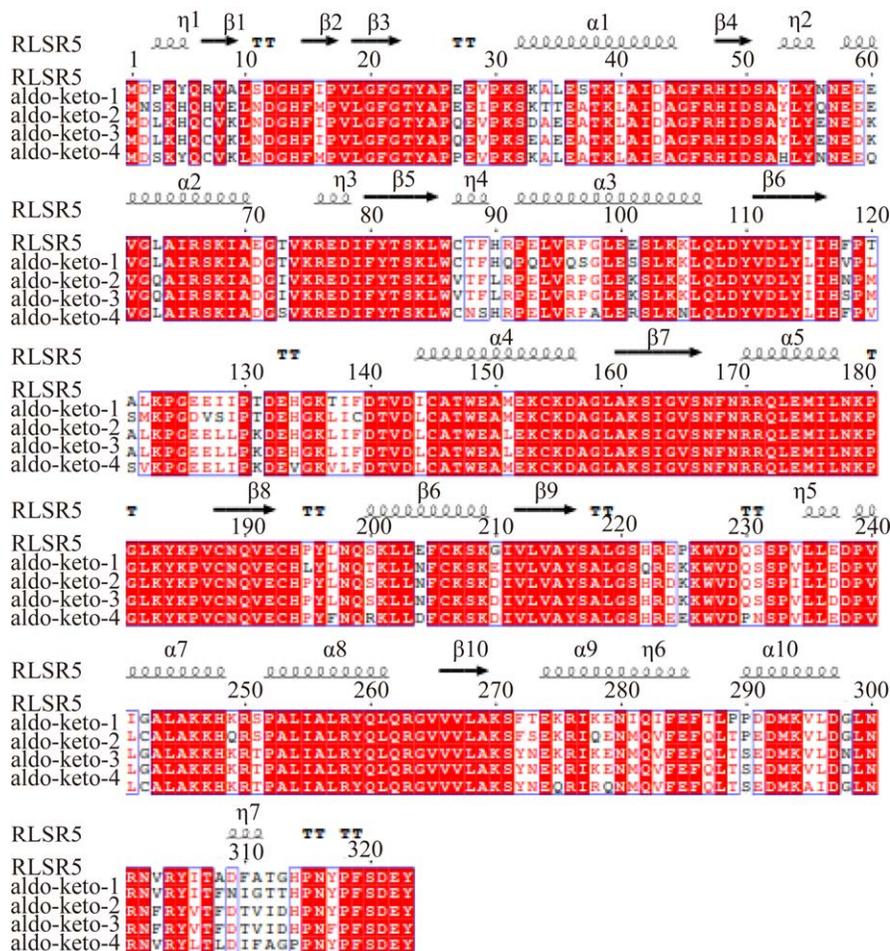


图 4 RLSR5 的序列比对

Figure 4 Sequence alignment of the RLSR5 with aldoketo reductases. The secondary structure of RLSR5 is presented on the top: helices with squiggles, beta strands with arrows, turns with TT letters. Aldoketo reductase-1 represents the aldoketo reductase family 1 member C4 from *Fukomys damarensis* (GenBank accession number: 010613010.1:1-323); Aldoketo reductase-2 represents the aldoketo reductase family 1 member C1-like isoform X1 from *Loxodonta africana* (GenBank accession number: 003410652.2:1-323); Aldoketo reductase-3 represents the aldoketo reductase family 1 member C1-like isoform X2 from *Elephas maximus indicus* (GenBank accession number: 049738027.1:1-323); Aldoketo reductase-4 represents the aldoketo reductase family 1 member C1 isoform X1 from *Pan paniscus* (GenBank accession number: 063463300.1:52-374).

点, 包括 Ala41、Ala52、Arg76、Leu103、Gly158、Gly164、Asn167 和 Ala245。尽管醛酮还原酶 1 (aldehyde reductase, EC 1.1.1.2) 已被报道能催化各种醛基的还原, 如糖醛酸, 然而, 蛋白相似性较高的 PGER5 还从未被用于催化羰基化合物。根据前列腺素 -E29- 还原酶 (PDB ID: 1q5m.1) 的晶体为模板进行蛋白结构同源性建模, 结果表明 RLSR5 为二聚体蛋白, 每个单体由  $(\alpha/\beta)_8$  桶组成。活性位点由  $\beta$ -链的羧基端组成, 通过不同长度的环连接到  $\alpha$ -螺旋的氨基端。参与底物结合和催化作用的残基主要在 A-、B-和 C-环上, 并且都位于  $\beta$ -链的 C 端(图 5A)。蛋白质的 N 端含有 1 个 LxxxGxxxPxxGxG 的酶结合域, 活性中心为 GxxxxDxAxxY。分子对接结果表明, 辅酶 NADPH 烟酰胺环 C 上的 H 进攻底物羰基时遵循反 Prelog 催化规则<sup>[18]</sup>。烟酰胺 C 上的 H 与底物羰基之间的距离为 6.2 Å, 有利于催化反应(图 5B)。

## 2.4 测定目标羰基还原酶的浓度

对重组大肠杆菌 BL21(DE3)/pET28a-*rlsr5* 表达的羰基还原酶 RLSR5 进行了分离纯化。蛋白纯化 SDS-PAGE 分析结果如图 6 所示。工程菌株诱导前没有明显的表达, IPTG 诱导后在 40 kDa 处有明显的目的条带。经过 Ni-NTA 柱蛋白纯化后得到分子量为 40 kDa 的蛋白条带, 与预测计算结果相同。利用 BCA 试剂盒对纯化蛋白的浓度进行了测定。经过检测牛血清标准蛋白在 0、25、75、125、250、500、750、1 000  $\mu\text{g/mL}$  时 562 nm 处的吸收值, 绘制 BCA 标准曲线。拟合线性关系为  $y=0.0014x+0.1321$ ,  $R^2=0.9992$ 。根据标准曲线计算得出纯化的羰基还原酶浓度为 0.704 mg/mL。

## 2.5 测定羰基还原酶的酶活性

对上述纯化得到的羰基还原酶 RLSR5 进行酶学性质的评价, 发现该酶是 NADPH 依赖性羰基还原酶。结果表明, 该酶活性为 2.12 U, 比

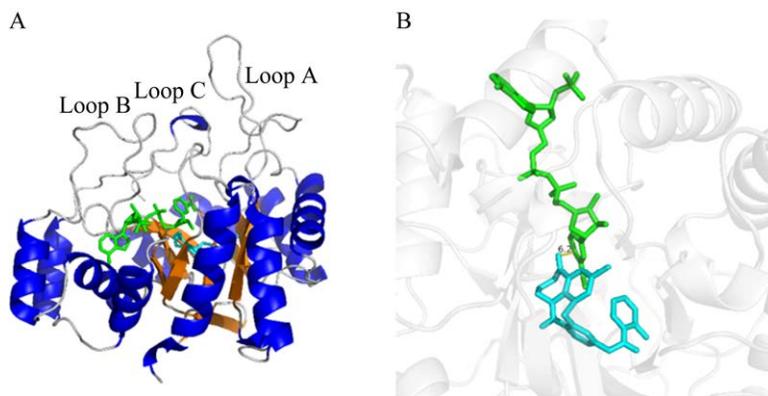


图 5 蛋白质结构同源建模与分子对接 A: 以 1q5m 为模板对蛋白质单体结构进行同源建模。 $\alpha$ -螺旋、 $\beta$ -折叠和 loop 环分别用深蓝色、橙色和灰色表示。B: 分子对接显示的酶 RLSR5、底物 PK 和辅酶 NADPH 的空间结构。PK 和 NADPH 分别以浅蓝色和绿色表示。

Figure 5 Protein structure homology modelling and molecular docking. A: Homologous modelling of protein monomer structure using 1q5m as template.  $\alpha$ -helix,  $\beta$ -folds, and loop rings are colored in dark blue, orange, and grey, respectively. B: The spatial structure of enzyme RLSR5, substrate PK, and coenzyme NADPH displayed by molecular docking. PK and NADPH are expressed in light blue and green, respectively.

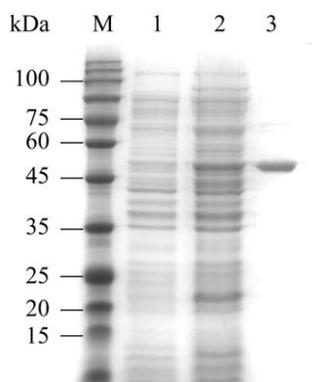


图6 SDS-PAGE分析诱导前后重组大肠杆菌和经Ni-NTA纯化后的目的蛋白。泳道M: 蛋白marker; 泳道1: 未加入IPTG诱导的重组*E. coli* BL21(DE3)/pET28a-*rlsr5*; 泳道2: 加入IPTG诱导的重组*E. coli* BL21(DE3)/pET28a-*rlsr5*的破碎上清; 泳道3: 纯化后目的蛋白。

Figure 6 SDS-PAGE analysis of recombinant *E. coli* before and after induction and the target protein purified by Ni-NTA. Lane M: Protein marker; Lane 1: Recombinant *E. coli* BL21(DE3)/pET28a-*rlsr5* without IPTG induction; Lane 2: Crushed supernatant of recombinant *E. coli* BL21(DE3)/pET28a-*rlsr5* induced by IPTG was added; Lane 3: Purified target protein.

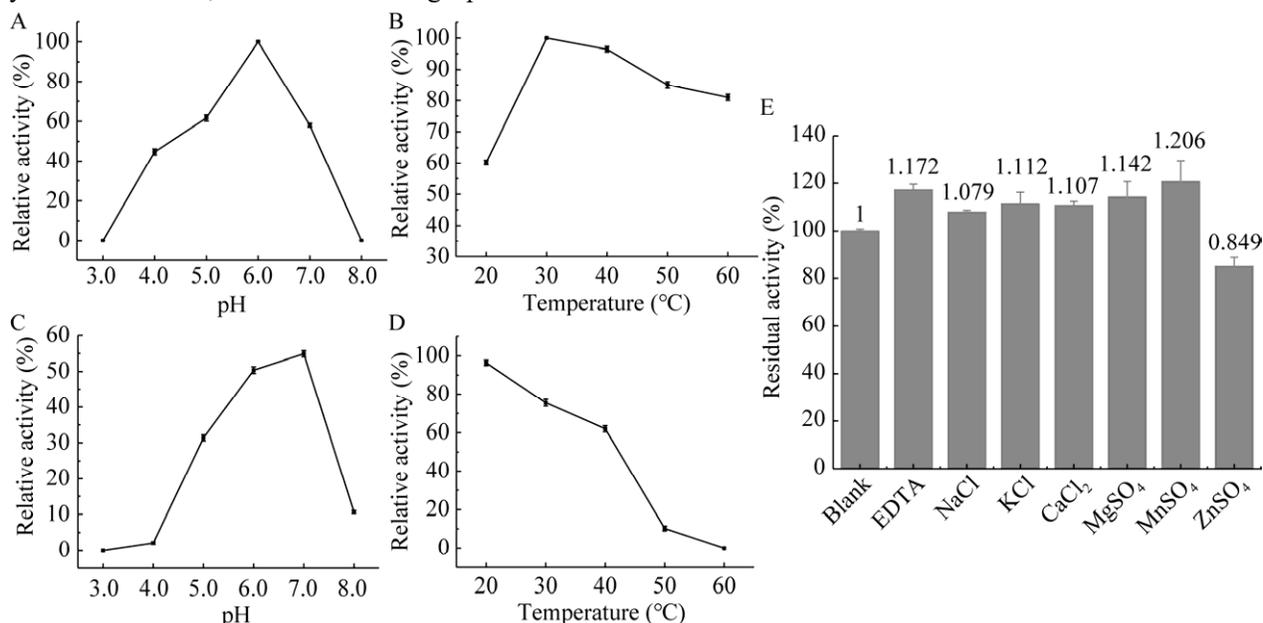


图7 RLSR5酶活测试结果。A: pH对酶活力的影响; B: 温度对酶活的影响; C: pH对酶稳定性的影响; D: 温度对酶稳定性的影响; E: 金属离子对酶活力的影响。

Figure 7 Enzyme activity test results of free RLSR5. A: Effect of pH on the activity of free RLSR5; B: Effect of temperature on the activity of free RLSR5; C: Effect of pH on the stability of free RLSR5; D: Effect of temperature on the stability of free RLSR5; E: Effect of metal ions on the activity of free RLSR5.

酶活性为 36.64 U/mg。并对该酶的催化反应条件进行探索, 结果如图 7 所示, 酶的最佳反应 pH 为 6.0, 最佳反应温度为 30 °C。该酶在 pH 7.0 的缓冲液中保持最大活性, 在 20–40 °C 的温度范围内具有较好的催化活性。另外, EDTA 的加入未影响 RLSR5 的活性, 这表明 RLSR5 不是依赖金属离子的酶, 其活性不受金属离子浓度的影响。金属离子 Na<sup>+</sup>、K<sup>+</sup>、Ca<sup>2+</sup>和 Mg<sup>2+</sup>对酶活性几乎没有影响, 而 Mn<sup>2+</sup>的添加促进了酶活。相反, Zn<sup>2+</sup>抑制了催化反应, 虽然 Zn<sup>2+</sup>是某些生物酶的重要组成部分, 但是过量的 Zn<sup>2+</sup>可以与生物酶中的蛋白质结合位点结合, 导致蛋白质失活或功能障碍, 从而降低酶的活性。推测本研究中 Zn<sup>2+</sup>对酶的影响可能与 Zn<sup>2+</sup>的浓度有关, 说明该浓度的 Zn<sup>2+</sup>是过量的, 因此酶的活性降低。另外, 根据公式(1)拟合得到 RLSR5 的  $K_m$  为 (76±16) μmol/L, 进一步计算得到  $k_{cat}$  为 (268±24)/min。由此也说明不同种类碳

基还原酶的酶学性质存在一定差异, 可以进一步研究催化其他羰基底物的特性以及该酶的固定化酶催化情况。

### 3 讨论与结论

本研究以 PK 为底物, 以不同动物肝脏粗酶液为生物催化剂, 筛选出可生物催化合成 R-TVP 的兔肝粗酶液。通过蛋白质纯化技术和基因工程的方法, 成功筛选到具有催化活性的羰基还原酶并利用其编码基因构建了重组大肠杆菌 BL21(DE3)/pET28a-*rlsr5*。经过对重组菌株的诱导、表达, 并利用亲和层析手段纯化可获得高纯度的羰基还原酶 RLSR5。该羰基还原酶属于醛酮还原酶家族成员, 为 NADPH 辅酶依赖型。RLSR5 可以高效催化底物 PK 生成 R 型托伐普坦, 酶活力为 2.12 U, 比酶活为 36.64 U/mg, 产物 *e.e.* 值高达 99%, 说明该酶具有较高的酶活力和立体选择性, 催化过程遵循反 Prelog 规则。RLSR5 酶学性质研究表明该酶的最适反应温度为 30 °C, 最适反应 pH 为 6.0, 该酶不是金属离子依赖性的酶, 其活性不受金属离子浓度的影响,  $Mn^{2+}$  的添加促进了酶的活性, 而高浓度的  $Zn^{2+}$  却抑制了催化反应。经过对 RLSR5 的 pH 和温度耐受性研究发现, 该酶在 20 °C 时保持最大活性, pH 为 7.0 的缓冲体系中稳定性最好, 说明该酶在较低温度和中性 pH 范围内稳定性良好。为使该酶能更好地在工业环境下(高温或高底物浓度)发挥催化作用, 下一步将重点对该酶进行适应性改造, 如理性或半理性设计、定向进化等研究。此外, 本研究还在 1 mL 体系下进行纯酶的催化反应, 催化效率仍能保持较高, 底物 PK 的转化率可达 90.4%, 证明该酶的放大生产具有可行性。目前也正在研究该酶的固定化酶催化以提高酶的稳定性以及重复使用率。鉴于 RLSR5 优异的酶学特性, 也会对

其催化的底物谱进行研究, 以扩大该酶的应用范围。本研究开发的生物催化合成单一异构体托伐普坦可以对光学纯托伐普坦的下游应用研究起到推动作用。

### REFERENCES

- [1] BREUKELAAR WB, POLIDORI N, SINGH A, DANIEL B, GLUECK SM, GRUBER K, KROUTIL W. Mechanistic insights into the ene-reductase-catalyzed promiscuous reduction of oximes to amines[J]. ACS Catalysis, 2023, 13(4): 2610-2618.
- [2] MIZUNO H, SEKINE A, SUWABE T, IKUMA D, YAMANOUCHI M, HASEGAWA E, SAWA N, UBARA Y, HOSHINO J. Potential effect of tolvaptan on polycystic liver disease for patients with ADPKD meeting the Japanese criteria of tolvaptan use[J]. PLoS One, 2022, 17(2): e0264065.
- [3] KANEKO D, MATSUDA T, MIYTA K, SUZUKI K, FUJIKI H, KINOSHITA S, OHMOTO K, AIHARA M. Injectable depot formulation comprising optically active tolvaptan and process of producing the same: US09597283B2[P]. 2013-12-27[2017-03-21].
- [4] 韩孟楠, 杜洁, 王旭明, 张芳华, 张超, 裴朝红, 张红蕾, 李玮. 树干毕赤酵母不对称还原合成光学纯托伐普坦[J]. 应用与环境生物学报, 2020, 26(1): 160-166.  
HAN MN, DU J, WANG XM, ZHANG FH, ZHANG C, PEI CH, ZHANG HL, LI W. Asymmetric reduction synthesis of optically pure tolvaptan by *Pichia stipites*[J]. Chinese Journal of Applied and Environmental Biology, 2020, 26(1): 160-166 (in Chinese).
- [5] ZHANG HL, ZHANG C, HAN MN, PEI CH, XU ZD, LI W. Efficient biosynthesis of enantiopure tolvaptan by utilizing alcohol dehydrogenase-catalyzed enantioselective reduction[J]. Green Chemistry, 2018, 20(6): 1224-1227.
- [6] YIN L, ZHENG YR, JIA X, LI XS, CHAN ASC. Efficient and promising asymmetric preparation of enantiopure tolvaptan via transfer hydrogenation with robust catalysts[J]. Tetrahedron: Asymmetry, 2010, 21(19): 2390-2393.
- [7] YAMASHITA H, OHTANI T, MORITA S, OTSUBO K, KAN K, MATSUBARA J, KITANO K, KAWANO Y, UCHIDA M, TABUSA F. Practical synthesis of both enantiomers of vasopressin V2 receptor antagonist OPC-41061 using the catalytic asymmetric hydrogenation[J]. Heterocycles, 2002, 56(1/2): 123.
- [8] WANG MY, ZHANG YX, LV LX, KONG DK, NIU GQ. Biosynthesis and chemical synthesis of albomycin nucleoside antibiotics[J]. Antibiotics, 2022, 11(4): 438.
- [9] MATSUBARA J, KITANO K, OTSUBO K, KAWANO Y, OHTANI T, BANDO M, KIDO M, UCHIDA M,

- TABUSA F. Enantioselective synthesis of the metabolites of vasopressin V2 receptor antagonist OPC-31260 *via* lipase-catalyzed transesterification[J]. *Tetrahedron*, 2000, 56(27): 4667-4682.
- [10] 张红蕾, 裴朝红, 张超, 韩孟楠, 徐志栋, 李玮. 解脂酵母羧基还原酶基因的克隆表达及酶学性质[J]. 河北大学学报(自然科学版), 2018, 38(2): 168-176. ZHANG HL, PEI CH, ZHANG C, HAN MN, XU ZD, LI W. Over-expression and characterization of a carbonyl reductase gene from *Yarrowia lipolytica*[J]. *Journal of Hebei University (Natural Science Edition)*, 2018, 38(2): 168-176 (in Chinese).
- [11] HAN MN, WANG XM, PEI CH, ZHANG C, XU ZD, ZHANG HL, LI W. Green and scalable synthesis of chiral aromatic alcohols through an efficient biocatalytic system[J]. *Microbial Biotechnology*, 2021, 14(2): 444-452.
- [12] SEELIGER D, De GROOT BL. Ligand docking and binding site analysis with PyMOL and Autodock/Vina[J]. *Journal of Computer-Aided Molecular Design*, 2010, 24(5): 417-422.
- [13] COUTURE JF, LEGRAND P, CANTIN L, LABRIE F, LUU-THE V, BRETON R. Loop relaxation, a mechanism that explains the reduced specificity of rabbit 20 $\alpha$ -hydroxysteroid dehydrogenase, a member of the aldo-keto reductase superfamily[J]. *Journal of Molecular Biology*, 2004, 339(1): 89-102.
- [14] 陈莹, 曹心德, 王晓蓉. 镧及其配合物对鱼体肝脏中酶活性的影响[J]. 环境化学, 2000, 19(1): 37-41. CHEN Y, CAO XD, WANG XR. The effects of lanthanum and its complex compound (la-edta) on enzymes activities in fish liver[J]. *Environmental Chemistry*, 2000, 19(1): 37-41 (in Chinese).
- [15] SAE-LEAW T, BENJAKUL S. Lipase from liver of seabass (*Lates calcarifer*): characteristics and the use for defatting of fish skin[J]. *Food Chemistry*, 2018, 240: 9-15.
- [16] LI H, WANG Z, CHAI SM, BAI X, DING GH, LI YY, LI JY, XIAO QY, MIAO BP, LIN WL, FENG J, HUANG MY, GAO C, LI B, HU W, LIN JJ, FU ZQ, XIE JY, LI YX. Genome assembly and transcriptome analysis provide insights into the antischistosome mechanism of *Microtus fortis*[J]. *Journal of Genetics and Genomics*, 2020, 47(12): 743-755.
- [17] PENNING TM. The aldo-keto reductases (AKRs): overview[J]. *Chemico Biological Interactions*, 2015, 234: 236-246.
- [18] CHEN R, LIU X, WANG JL, LIN JP, WEI DZ. Cloning expression, and characterization of an anti-Prelog stereospecific carbonyl reductase from *Gluconobacter oxydans* DSM2343[J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2015, 70: 18-27.