

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2019.03.001

· 基础研究 ·

N-脱氧核糖转移酶 II 催化合成克拉屈滨及其定向进化*

李京美 李骥璇 余磊 郑桂兰 王洪钟[△]

(清华大学生命科学学院 北京 100084)

摘要 目的: 使用表达 N-脱氧核糖转移酶 II (Nucleoside deoxyribose transferase, NDT) 的大肠杆菌重组工程菌 *E.coli* BL21/pET-NDT, 作为催化剂, 合成克拉屈滨 (Cladribine)。同时构建高通量的酶活筛选体系, 利用其改造 NDT, 以期提高克拉屈滨的合成效率。**方法:** 首先用野生型 NDT 催化克拉屈滨的合成。接着以黄嘌呤氧化酶和辣根过氧化物酶联合作用来检测 NDT 酶活。最后构建 NDT 随机突变体库, 并筛选出突变体。**结果:** 在 10% DMSO 的体系中, 野生型 NDT 催化 2-氯腺嘌呤合成克拉屈滨的转化率达到 93%。同时使用构建的筛选体系在突变体库中筛选到了酶活发生改变的突变体。**结论:** 本研究使用 NDT 作为催化剂, 成功地一步合成了克拉屈滨。同时本研究构建的高通量筛选方法成功应用于改造 NDT 的酶学性质, 为拓展 NDT 合成核苷类似物的能力提供了一种新的方法。

关键词: N-脱氧核糖转移酶; 克拉屈滨; 高通量筛选

中图分类号: Q-33; Q78; Q814.9 **文献标识码:** A **文章编号:** 1673-6273(2019)03-401-05

Synthesis of Cladribine by N-deoxyribosyltransferase II and Directed Evolution of the Enzyme*

Li Jing-mei, Li Ji-xuan, Yu Lei, Zheng Gui-lan, Wang Hong-zhong[△]

(School of Life Sciences, Tsinghua University, Beijing, 100084, China)

ABSTRACT Objective: N-deoxyribosyltransferase II (NDT) was produced by recombinant strain *E.coli* BL21/pET-NDT. This recombinant strain was used as catalysis to synthesize cladribine. High-throughput screening system was established to engineer NDT, in order to increase the yield of cladribine. **Methods:** First, synthesize cladribine with wild NDT. Then combine Xanthine Oxidase with Horseradish Peroxidase to assay the activity of NDT in a high-throughput manner. Finally, construct a random mutant library of NDT, and screen the mutants of interest. **Results:** In the reaction mixture of 10 % DMSO, wild NDT catalysed the synthesis of cladribine, and the yield was 93%. The constructed random library was screened, and a mutant with altered activity was found. **Conclusion:** In this study, NDT was employed as a catalyst, and cladribine was synthesized successfully in one step. And the high-throughput screening system constructed in this study was successfully applied to the alternation of the NDT activity, which offers a new way to expand the ability of NDT in preparation of unnatural nucleoside analogs.

Key words: N-deoxyribosyl transferase; Cladribine; High-throughput screening

Chinese Library Classification(CLC): Q-33; Q78; Q814.9 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2019)03-401-05

前言

克拉屈滨 (Cladribine, 2-chloro-2'-deoxy-adenosine, 2-CdA) 是一种拥有非天然碱基的核苷类似物, 最初是用于治疗恶性血液病^[1]。如今, 它被用于治疗一系列疾病, 包括毛细胞性白血病、低度 B 细胞淋巴瘤、朗格罕细胞组织细胞增生症、急性髓性白血病、难治性乳糜泻和多发性硬化^[2]。

克拉屈滨的合成方法主要有化学法和酶法^[3]。其中化学法普遍存在反应步骤多, 需要进行保护和脱保护等过程, 而且收率不高, 存在污染环境等问题。如国内夏然等人尝试用廉价易

得的 6-氯嘌呤经过四步反应, 高选择性合成克拉屈滨, 收率仅为 43.5%^[4]。而目前酶法合成克拉屈滨时主要使用核苷磷酸化酶, 相对而言步骤少, 收率较高, 光学纯度高, 然而能用做催化剂的酶来源较少, 不够稳定, 且尚处于实验室研究阶段, 离工业化生产还有一段距离^[5]。N-脱氧核糖转移酶 II (NDT) 能够催化嘧啶之间以及嘧啶与嘌呤之间互相转换。除了催化天然核苷^[6], NDT 也能催化非天然核苷的核糖转移^[6], 然而鲜有使用其催化合成克拉屈滨的报道。国际上已经有研究将 NDT 进行突变改造, 提高其对含有非天然核糖的核苷类似物的利用率^[7,8]。但尚未有针对含非天然碱基类似物而改造 NDT 的研究。

* 基金项目: 国家自然科学基金项目 (21476124)

作者简介: 李京美 (1994-), 硕士研究生, 研究方向: 生物转化及生物催化, E-mail: 18611623720@163.com

△ 通讯作者: 王洪钟 (1965-), 博士, 副教授, 研究方向: 生物转化及生物催化, 电话: 010-62795632, E-mail: hzwang@mail.tsinghua.edu.cn

(收稿日期: 2018-09-13 接受日期: 2018-10-10)

本研究尝试使用 NDT 一步催化合成克拉屈滨,同时构建一种高通量的 NDT 酶活筛选方法用于改造 NDT,以期合成克拉屈滨提供一种更适合工业化而且环保的生物酶法,并启发更多的关于合成其他含非天然碱基的核苷类似物的研究。

1 材料与方法

1.1 材料

含有来源于瑞士乳杆菌(*L.helveticus*)的野生型 NDT 重组工程菌由本实验室构建并保存^[9];克拉屈滨、2-氯腺嘌呤、脱氧肌苷、胸苷、胞嘧啶等均购自上海笛柏;各种酶制剂购自北京索莱宝。

1.2 方法

1.2.1 工程菌培养 将 *E.coli* BL21/pET-NDT 接种于含卡那霉素的 LB 培养基中,在 37 °C,转速 200 r/min 的摇床中培养 8 小时,以 2% 的接种量接种到自诱导培养基,37 °C 过夜培养。之后收菌并洗涤三次。

1.2.2 合成克拉屈滨 将 2-氯腺嘌呤溶解于 DMSO,配置成 5 mM 的储存液。将上述 2-氯腺嘌呤储存液加入到 pH 7.0 的磷酸缓冲液中,使其终浓度为 0.5 mM,DMSO 终浓度为 10%,同时加入终浓度为 1.5 mM 的脱氧胸苷和 1 mg/mL 的野生型 NDT 重组工程菌 *E.coli* BL21/pET-NDT,在 37 °C 恒温摇床中反应 0.5 h。反应结束后将反应液煮沸 5 min,再用流动相稀释 20 倍,用针头过滤器过滤后,进行 HPLC 检测。

1.2.3 NDT 随机突变体库的构建和筛选 使用质粒提取试剂盒从 *E.coli* BL21/pET-NDT 提取含有野生型 NDT 的质粒作为模板。使用易错 PCR 体系引入突变,反应体系为 0.2 ng/μL 质粒,0.2 mM 的 dATP 和 dGTP,1 mM 的 dCTP 和 dTTP,0.4 μM 的引物(上游引物 5'-CGCGGATCCATGAACAAGAAAAA-GAC-3',划线部分为酶切位点 *Bam*HI。下游引物为 5'-CG-GCTCGAGTTAATATACAGTCCG-3',划线部分为酶切位点 *Xho*I),5 mM 的 MgCl₂,0.3 mM 的 MnCl₂,2.5 U 的 Taq 酶。PCR 条件为 94 °C 预变性 2 min;94 °C 变性 30 s,55 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 1 min,30 个循环;72 °C 保温 10 min。之后将 PCR 产物纯化后使用限制性内切酶 *Bam*HI 和 *Xho*I 处理后纯化,再连接到经过同样双酶切处理的质粒 pET-28A 上,最后转化到大肠杆菌感受态 BL21(DE3)中。将突变体加入到含有脱氧肌苷和 2-氯腺嘌呤的反应液中反应后煮沸停止反应。然后使用在李忠琴的黄嘌呤氧化酶检测方法基础上改造而成的 NDT 酶活检测方法^[9],冷却至室温后加入 300 U/L 的黄嘌呤氧化酶和辣根过氧化物酶以及 2.5 mM 的 ABTS 反应 20 min 后检测 405 nm 下的吸光度。原理如图 1,2-脱氧肌苷的核糖被 NDT 转移到碱基上,因此产生的次黄嘌呤在黄嘌呤氧化酶的催化下被氧化成双氧水。之后辣根过氧化物酶催化双氧水将无色的还原态 ABTS 氧化成绿色的氧化态 ABTS,通过检测氧化态 ABTS 在特征波长下的吸收值便可知 NDT 的酶活。之后将筛选到的突变体使用 HPLC 复筛检测其活性,并送测序。

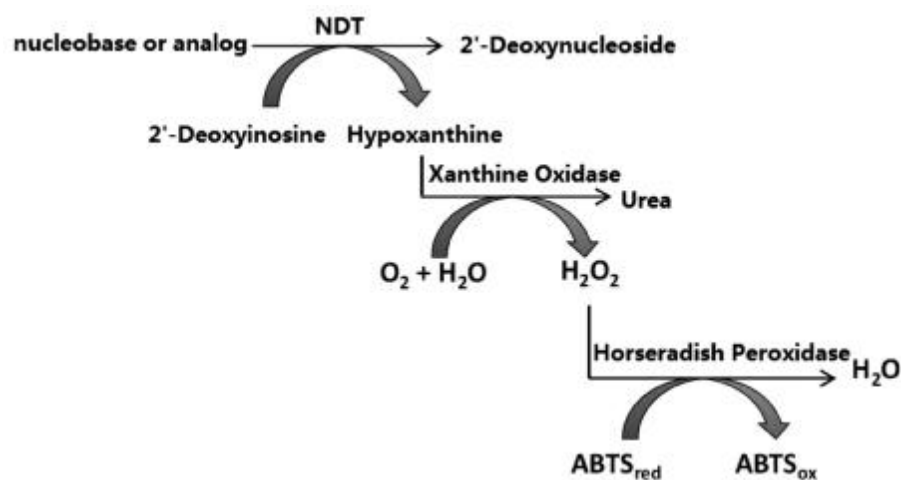


图 1 偶联两种工具酶筛选 NDT 突变体的原理

Fig. 1 mechanism of screening NDT mutants by coupling two tool enzymes

1.2.4 HPLC 检测条件 色谱柱:Diamondsil C18 柱,5 μm (φ250×4.6 mm)。检测波长为 254 nm。流动相为 20% 的甲醇,流速 0.8 mL/min,进样量 10 μL,柱温为 30 °C。

1.3 统计学分析

用 SPSS10.0 进行统计分析,每个实验重复三次,使用 t 检验分析数据的统计学差异,*表示 $P < 0.05$,即有显著差异。

2 结果

2.1 野生型 NDT 合成克拉屈滨

野生型 NDT 工程菌催化脱氧胸苷和 2-氯腺嘌呤反应的 HPLC 结果如图 2。色谱图中除了有脱氧胸苷和 2-氯腺嘌呤两

个底物峰,还有胸腺嘧啶和克拉屈滨两个产物峰。胸腺嘧啶是由脱氧胸苷被 NDT 脱去脱氧核糖产生,之后 NDT 将脱氧核糖转移到 2-氯腺嘌呤上,产生了克拉屈滨。

2.2 突变体库的初筛

将随机突变体库从平板挑入 96 孔板诱导表达,加入筛选反应液后使用酶标仪初筛,挑出了 6 株酶活和野生型相近的克隆,以及一株酶活低于野生型的克隆。将此 7 个突变体提取质粒并 PCR 验证,如图 3,PCR 产物大小约为 500 bp 左右,与报道的 NDT 分子量一致。将酶活降低的突变体送测序,发现其为 Asn124Ala,即第 124 位氨基酸由天冬酰胺突变为丙氨酸。

2.3 使用 HPLC 对突变体进行复筛

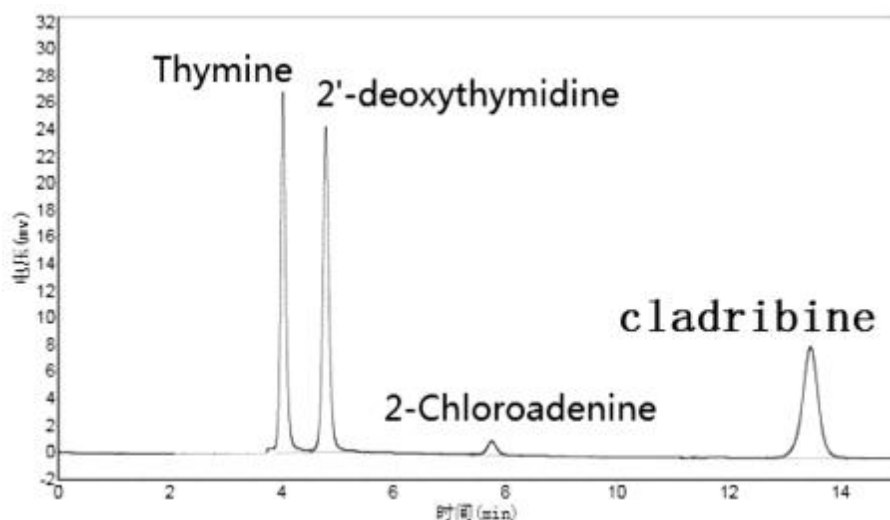


图 2 野生型 NDT 催化合成克拉屈滨的反应液 HPLC 图谱

Fig.2 HPLC analysis of synthesis of cladribine catalysed by wild NDT

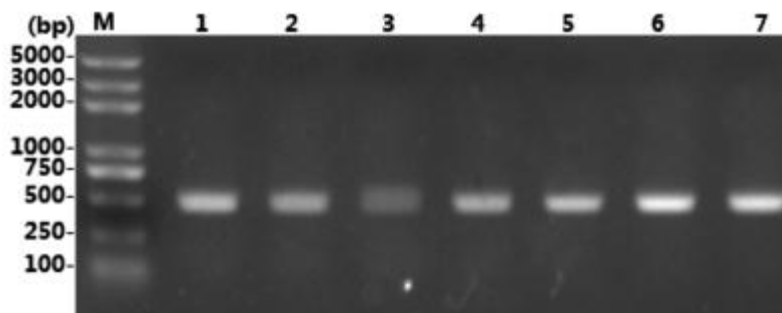


图 3 筛选得到的 7 个克隆的 PCR 产物电泳图

Fig. 3 Electropherogram of PCR product of seven clones after screening

注: M: DNA marker; 1-7: PCR 产物

Note: M: DNA marker; 1-7: PCR product

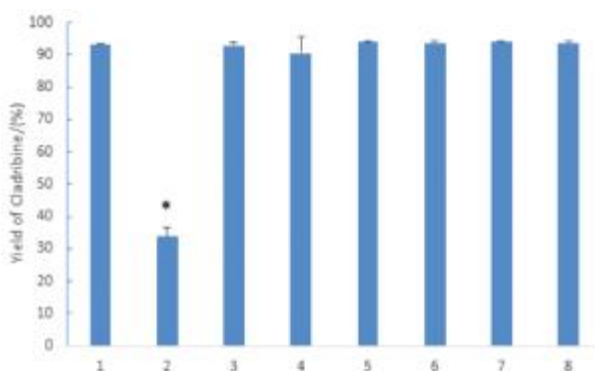


图 4 野生型 NDT 以及突变体的克拉屈滨产率

Fig. 4 Yield of cladribine catalysed by wild NDT and mutants

*: $P < 0.05$ compared with the control

注: 1: 野生型 NDT; 2: ASN124A; 3-8: 其他突变体

Note: 1: wild NDT; 2: ASN124A; 3-8: other mutants

为了精确分析突变体与野生型的差异,使用 HPLC 测定上述初筛得到的突变体和野生型合成克拉屈滨的产率。结果如图 4, 有 6 个突变体的产率与野生型没有明显差异, 都是 93% 左右。而 ASN124A 的克拉屈滨产率比野生型少了一半以上, 为 33.7%。本研究中的 NDT 来源于结构未报道的瑞士乳杆菌, 与

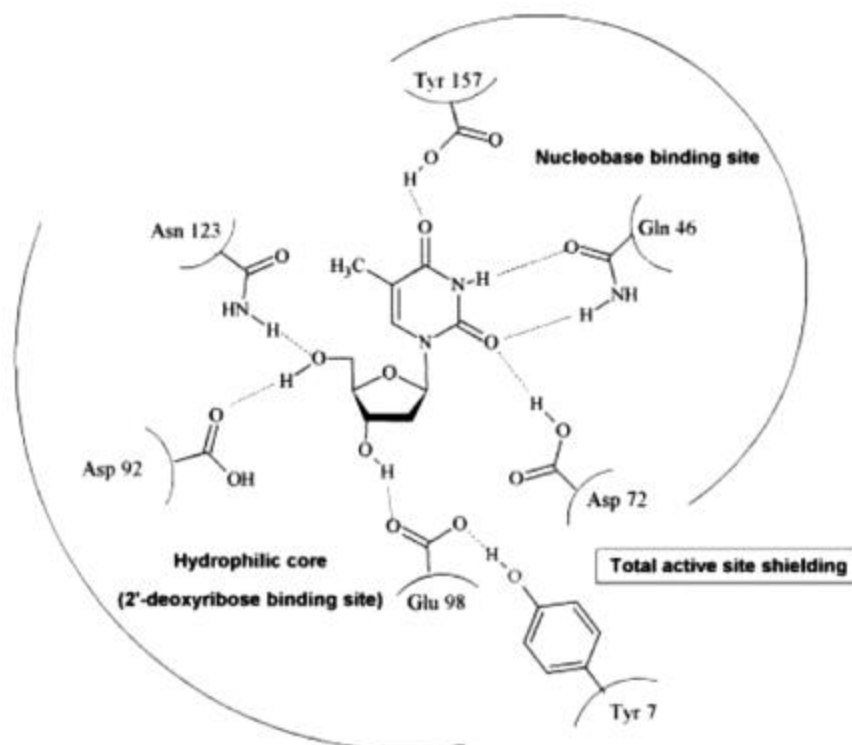
结构已报道的莱曼氏乳杆菌序列相似性达 81%, 瑞士乳杆菌 ASN124 和莱曼氏乳杆菌 ASN123 相对应^[11]。莱曼氏乳杆菌的活性位点如图 5, ASN123 为核糖结合位点。因此推断本研究中的瑞士乳杆菌 NDT 的突变体 ASN124A 活性下降是因为活性位点处关键氨基酸发生改变导致。

3 讨论

核苷及其衍生物参与了很多包括遗传信息的储存以及转移等不同的生化过程。抑制核苷酸的复制过程的能力赋予了核苷类似物抗病毒和抗肿瘤的活性^[11]。因此化学修饰过的非天然核苷具有抗病毒和抗肿瘤的活性, 其意义重大^[1,12-14]。

传统上核苷类似物是由步骤繁琐的化学法来合成。一般都需要对杂环碱基或核糖进行多步保护和脱保护反应。如李立威等人以 2-氯-6-氨基嘌呤和 2-脱氧-D-核糖为原料使用化学法合成克拉屈滨时, 需要经过 6 步反应才能得到目标产物, 收率只有 30.2%, 而且会产生和克拉屈滨性质相似的核苷类似物, 因此很难从反应液中分离^[3]。

和具有上述各种问题的化学合成法相比, 酶法具有反应条件温和, 较少的反应步骤, 高立体选择性和高区域选择性等优势^[15,16]。因此近年来, 糖苷转移酶逐渐成为一大系列天然和非天

图5 来源于莱曼氏乳杆菌的 NDT 的活性位点^[11]Fig.5 active site of NDT from *L.leichmannii*

然糖苷合成的首选催化剂^[5,17]。而使用核苷磷酸化酶和 N-脱氧核糖转移酶 II 来酶法合成核苷类似物,已经展现出代替步骤繁琐的传统化学合成法的能力^[6,7,18]。

例如, S. A. Taran 等人^[5] 使用大肠杆菌重组表达来源于 *Geobacillus stearothermophilus* B-2194 的嘌呤核苷磷酸化酶 II 和嘧啶核苷磷酸化酶,经过热处理纯化蛋白并固定化后催化合成克拉屈滨,转化率为 86%。此反应由两步组成,首先脱氧胸苷被嘧啶核苷磷酸化酶磷酸化,产生核糖-1-磷酸和胸腺嘧啶。然后核糖-1-磷酸和 2-氯腺嘌呤在嘌呤核苷磷酸化酶催化下合成了克拉屈滨。这种双酶法比起上述的化学法优势在于转化率很高,而且步骤也少了很多,只需要两步。不过, S. A. Taran 的方法必须使用两种酶,因为嘌呤核苷磷酸化酶只识别嘌呤碱基,而不能识别嘧啶碱基,嘧啶核苷磷酸化酶则相反^[11]。在实际工业应用中,需要将酶固定化以便重复利用,从而降低成本^[19]。然而,同时固定化两种性质不同的酶会导致固定化后酶的回收率降低,从而提高了成本^[11]。而本研究中的 NDT 因为能识别嘌呤和嘧啶,因此只使用 NDT 一种酶,即可一步反应合成克拉屈滨,而且转化率达到 93%,为国内首次报道。因此,无论是固定化的成本还是转化率,本研究比 S. A. Taran 的方法更具有工业化意义。而同时,本研究中使用的是含有酶的全细胞作为催化剂,无需纯化蛋白和固定化便重复使用^[20]。因此总体成本相比使用固定化后的两种核苷磷酸化酶具有很大的优势。

不过 NDT 的应用范围仍然不过广泛。核苷磷酸化酶虽然对碱基的识别特异,但对核糖的特异性却较低,核糖, 2'-脱氧核糖, 2'3'-双脱氧核糖,甚至阿拉伯糖都可能识别^[11]。相比之下, NDT 却基本只能识别 2'-脱氧核糖,只有少数来源的 NDT 能够识别其他类型的核糖^[9],这严重限制了它的应用范围。因此改造

并扩大 NDT 的底物谱非常重要。然而因为 NDT 的晶体结构的报道较少,通过理性设计来改造 NDT 比较困难。因此通过非理性设计的方式,即使用一个合适的筛选方法,从大量的突变体中筛选出想要的突变体更有可行性。然而筛选 NDT 的方法很少。据我们所知,目前只有 Kaminski 等人^[8]通过构建营养缺陷型大肠杆菌的方法,成功改造了来自 *Lactobacillus leichmannii* 和 *Lactobacillus fermentum* 的 NDT,催化了 2'3'-双脱氧核苷的合成。然而这种筛选方法也有局限性,只能用于改造 NDT 对 2'3'-双脱氧核苷的特异性,不能用于改造对其他非天然核糖或碱基的底物特异性。而本研究联合使用两种工具酶来检测次黄嘌呤的产生从而检测 NDT 酶活是一种新的筛选方法。从理论上来说,只要找到合适的底物能让 NDT 能够产生次黄嘌呤,便可以用于上述三种改造 NDT 的目标,因此应用范围较广。

4 结论

本文成功使用 NDT 一步催化合成了克拉屈滨。同时构建了一种筛选 NDT 酶活的方法,并用此方法筛选到了一株合成克拉屈滨活性降低的突变体 ASN124A,使用 HPLC 复筛确认了其合成活性降低至 33.7%。虽然未筛选到克拉屈滨产率比野生型提高的突变体,这有很大的原因是因为野生型的产率已经很高,达到 93%。然而复筛确认了初筛到的突变体产率下降的结果,证明了此筛选方法适用于改造 NDT 对非天然碱基的底物特异性。此方法有望帮助改造 NDT 合成其他更难以合成的非天然核苷。

参考文献(References)

- [1] Jordheim L P, Durantel D, Zoulim F, et al. Advances in the development of nucleoside and nucleotide analogues for cancer and

- viral diseases [J]. Nature Reviews Drug Discovery, 2013, 12 (6): 447-464
- [2] Jacobs B M, Ammoscato F, Giovannoni G, et al. Cladribine: mechanisms and mysteries in multiple sclerosis [J]. Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry, 2018, 0: 1-6
- [3] 李立威, 古冬云, 程志刚, 等. 克拉屈滨的合成工艺改进及其主要杂质研究[J]. 中国新药杂志, 2015, 24(05): 565-569
- [4] 夏然, 孙莉萍, 渠桂荣, 等. 抗白血病药物克拉屈滨的合成 [J]. 应用化学, 2016, 33(11): 1274-1278
- [5] Taran S A, Verevkina K N, Feofanov S A, et al. Enzymatic transglycosylation of natural and modified nucleosides by immobilized thermostable nucleoside phosphorylases from *Geobacillus stearothermophilus* [J]. Bioorg Khim, 2009, 35 (6): 822-829
- [6] Fernandez-Lucas J, Acebal C, Sinisterra J V, et al. *Lactobacillus reuteri* 2'-deoxyribosyltransferase, a novel biocatalyst for tailoring of nucleosides [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2010, 76 (5): 1462-1470
- [7] Kaminski P A, Labesse G. Phosphodeoxyribosyltransferases, designed enzymes for deoxyribonucleotides synthesis [J]. Journal of Biological Chemistry, 2013, 288(9): 6534-6541
- [8] Kaminski P A, Dacher P, Dugué L, et al. In vivo reshaping the catalytic site of nucleoside 2'-deoxyribosyltransferase for dideoxy and didehydronucleosides via a single amino acid substitution [J]. Journal of Biological Chemistry, 2008, 283(29): 20053-20059
- [9] 王玺, 段胜林, 熊舒莉, 等. 自诱导系统在酶促合成 2'-脱氧胞苷中的应用[J]. 生物技术通报, 2014, (11): 225-232
- [10] 李忠琴, 许小平, 杨海麟, 等. 辣根过氧化物酶分光光度法测定黄嘌呤氧化酶的活性[J]. 分析化学, 2006, 34(06): 821-824
- [11] Fresco-Taboada A, de la Mata I, Arroyo M, et al. New insights on nucleoside 2'-deoxyribosyltransferases: a versatile Biocatalyst for one-pot one-step synthesis of nucleoside analogs [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2013, 97(9): 3773-3785
- [12] Sarkisjan D, Julsing J R, Smid K, et al. The cytidine analog fluorocyclopentenylcytosine (RX-3117) is activated by uridine-cytidine kinase 2[J]. PLOS ONE, 2016, 11(9): e162901
- [13] Muthu P, Chen H X, Lutz S. Redesigning human 2'-deoxycytidine kinase enantioselectivity for L²nucleoside analogues as reporters in positron emission tomography [J]. ACS Chemical Biology, 2014, 9 (10): 2326-2333
- [14] Muthu P, Lutz S. Quantitative detection of nucleoside analogues by multi-enzyme biosensors using time-resolved kinetic measurements [J]. ChemMedChem, 2016, 11(7): 660-666
- [15] Li Y, Ding Q, Ou L, et al. One-pot process of 2'-deoxyguanylic acid catalyzed by a multi-enzyme system [J]. Biotechnology and Bioprocess Engineering, 2015, 20(1): 37-43
- [16] Liang C, Zhang Y, Jia Y, et al. Engineering a carbohydrate-processing transglycosidase into glycosyltransferase for natural product glycodiversification [J]. Scientific Reports, 2016, (6): 21051
- [17] Crespo N, Sánchez-Murcia P A, Gago F, et al. 2'-Deoxyribosyltransferase from *Leishmania mexicana*, an efficient biocatalyst for one-pot, one-step synthesis of nucleosides from poorly soluble purine bases [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2017, 101(19): 7187-7200
- [18] Arco J D, Fernandez-Lucas J. Purine and pyrimidine phosphoribosyltransferases: A versatile tool for enzymatic synthesis of nucleoside-5'-monophosphates[J]. Current Pharmaceutical Design, 2018, 23(45): 6898-6912
- [19] 王洁, 余磊, 杨东, 等. 基于酵母表面展示技术的胸苷磷酸化酶全细胞催化剂的构建[J]. 生物技术通报, 2016, 32(1): 201-206
- [20] 余磊, 李骥璇, 王忆茗, 等. 蔗糖磷酸化酶全细胞催化 AA-2G 的条件优化[J]. 现代生物医学进展, 2017, 17(14): 2601-2605

(上接第 415 页)

- [27] Sun L, Kanwar YS. Relevance of TNF- α in the context of other inflammatory cytokines in the progression of diabetic nephropathy[J]. Kidney Int, 2015, 88(4): 662-665
- [28] Hong YA, Yang KJ, Jung SY, et al. Paricalcitol attenuates lipopolysaccharide-induced inflammation and apoptosis in proximal tubular cells through the prostaglandin E2 receptor EP4 [J]. Kidney Res Clin Pract, 2017, 36(2): 145-158
- [29] Mohamed FE, Al-Jehani RM, Minogue SS, et al. Effect of toll-like receptor 7 and 9 targeted therapy to prevent the development of hepatocellular carcinoma[J]. Liver Int, 2015, 35(3): 1063-1076
- [30] Zhou ZX, Sun L. Immune effects of R848: evidences that suggest an essential role of TLR7/8-induced, Myd88- and NF- κ B-dependent signaling in the antiviral immunity of Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*)[J]. Dev Comp Immunol, 2015, 49(1): 113-120