

体外催化花生四烯酸生产前列腺素 F_{2α}

范 潇,何国威,黄 薇,童建华,卢向阳,田 云,刘虎虎

(湖南农业大学 生物科学技术学院,长沙 410128)

摘要:前列腺素 F_{2α} (PGF_{2α}) 具有广泛的生理活性,是一种重要的脂质介质。为了实现 PGF_{2α} 的绿色生物合成,构建了 pET30a - *TbPGFS*、pET30a - *MmPGHS*、pET30a - *GvPGHS* 载体并在大肠杆菌 BL21 (DE3) 中分别表达,同时对异丙基 - β - D - 硫代半乳糖苷 (IPTG) 诱导表达条件进行了优化以提高重组蛋白在大肠杆菌中的表达量。另外,以最佳诱导表达条件下得到的重组蛋白为催化剂,催化花生四烯酸合成 PGF_{2α}。结果表明:*MmPGHS* 蛋白在大肠杆菌中没有表达;*GvPGHS* 蛋白的最佳诱导表达条件为诱导剂 IPTG 浓度 0.2 mmol/L、诱导温度 30 °C、诱导时间 2 h,*TbPGFS* 蛋白的最佳诱导表达条件为诱导剂 IPTG 浓度 0.2 mmol/L、诱导温度 30 °C、诱导时间 6 h;在最佳诱导表达条件下,由 *GvPGHS* 和 *TbPGFS* 的粗酶液构成的双酶催化未能检测到产物 PGF_{2α},而在酶偶联化学催化时,*GvPGHS* 能将花生四烯酸转化为 PGH₂,PGH₂ 被 SnCl₂ 进一步还原为 PGF_{2α}。综上,通过体外酶促反应结合化学法可高效转化花生四烯酸生产 PGF_{2α}。

关键词:花生四烯酸;前列腺素 F_{2α};体外催化;前列腺素 H 合成酶

中图分类号:Q782;TQ645.63 文献标识码:A 文章编号:1003-7969(2024)01-0114-06

In vitro catalytic production of prostaglandin F_{2α} using arachidonic acid

FAN Xiao, HE Guowei, HUANG Wei, TONG Jianhua, LU Xiangyang,
TIAN Yun, LIU Huhu

(College of Bioscience and Biotechnology, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China)

Abstract: As the important lipid mediators, prostaglandin F_{2α} (PGF_{2α}) performs a wide range of physiological activities. To achieve the green biosynthesis of PGF_{2α}, pET30a - *TbPGFS*, pET30a - *MmPGHS* and pET30a - *GvPGHS* vectors were constructed and expressed in *Escherichia coli* BL21 (DE3), respectively, and the induction expression conditions of isopropyl - β - D - thiogalactopyranoside (IPTG) were optimized to improve the expression of the recombinant protein in *E. coli*. In addition, the recombinant protein obtained under the optimal conditions were used as a catalyst to catalyze the synthesis of PGF_{2α} from arachidonic acid. The results showed that *MmPGHS* protein was not expressed in *E. coli*. However, *GvPGHS* protein performed the optimized expression under the conditions of IPTG concentration 0.2 mmol/L, induction temperature 30 °C and induction time 2 h, the *TbPGFS* protein performed the optimized expression under the conditions of IPTG concentration 0.2 mmol/L, induction temperature 30 °C and induction time 6 h. Under the above optimized conditions, PGF_{2α} was not detected by the two - enzyme coupled catalysis system composed of crude extract of *GvPGHS* and

TbPGFS. However, arachidonic acid was converted into PGH₂ by *GvPGHS*, which was further reduced to PGF_{2α} by SnCl₂ under the enzyme - coupled chemical catalysis. In conclusion, *In vitro* enzymatic reaction combined with chemical method can efficiently convert arachidonic acid to produce PGF_{2α}.

收稿日期:2022-09-30;修回日期:2023-10-07

基金项目:国家自然科学基金(21808052);湖南农业大学“双一流”建设项目(SYL201802002);长沙市杰出创新青年培养计划(kq2106049)

作者简介:范 潇(1998),男,硕士研究生,研究方向为微生物代谢工程(E-mail)fx@stu.hunau.edu.cn。

通信作者:刘虎虎,副教授(E-mail)liuhuhu@hunau.edu.cn。

Key words: arachidonic acid; prostaglandin $F_{2\alpha}$; *in vitro* catalysis; prostaglandin H synthase

前列腺素是多种二十烷酸化合物的统称,是人类和动物中重要的分泌性脂质介质^[1]。前列腺素分为前列环戊烷和血栓烷两大类,其中前列环戊烷根据其环戊烷环的结构和碳氢结构中的双键数量进行分类,而血栓烷由 TXA 和 TXB 组成^[2]。前列腺素 $F_{2\alpha}$ (PGF_{2 α}) 属于前列腺素中的前列环戊烷类,其分子由一个五元脂肪环和两条侧链组成^[3]。PGF_{2 α} 及其衍生物具有广泛的生理活性,是一类重要的临床医学药物^[4-6]。此外,PGF_{2 α} 还被广泛应用于奶牛等家禽的催产和引产^[7-8]。

目前,商业化的 PGF_{2 α} 主要通过化学合成法获得。早在 1969 年,Corey 等^[9] 采用 20 步化学反应首次实现了 PGF_{2 α} 的合成,也因此获得了诺贝尔化学奖;在此基础上,Coulthard 等^[10] 通过改进合成路线,采用 7 步化学反应实现了 PGF_{2 α} 的合成;Zhang 等^[11] 以不对称烯炔环异构化反应为关键步骤构建手性环戊烷骨架,进而实现了 PGF_{2 α} 的不对称合成。尽管如此,化学合成法仍存在合成反应路线复杂、环境不友好等问题。相比之下,酶催化合成 PGF_{2 α} 具有反应条件温和、副产物少等优点。2009 年, Mohamed 等^[12] 通过在酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 中导入来源于家鼠 (*Mus musculus*) 的前列腺素 H 合成酶 (Prostaglandin H synthase, PGHS) 和来源于布氏锥虫 (*Trypanosoma brucei*) 的前列腺素 F 合成酶 (Prostaglandin F synthase, PGFS), 在外源添加花生四烯酸的情况下成功地合成了 PGF_{2 α} 。另外,研究人员在大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 中表达了来源于真江蓠 (*Gracilaria vermiculophylla*) 的 PGHS, 通过全细胞催化花生四烯酸生成 PGH₂, 进一步使用 SnCl₂ 将 PGH₂ 化学还原为 PGF_{2 α} ^[13-14]。然而,目前关于通过体外酶促反应催化花生四烯酸生产 PGF_{2 α} 的研究较少。

本研究构建了 pET30a - *MmPGHS*、pET30a - *GvPGHS*、pET30a - *TbPGFS* 载体,并在大肠杆菌 BL21 (DE3) 中诱导表达,进一步对诱导条件进行优化以提高重组蛋白在大肠杆菌中的表达量;最后成功通过体外酶促反应催化花生四烯酸转化生成 PGF_{2 α} , 为后续通过体外酶促反应高效转化花生四烯酸生产 PGF_{2 α} 提供了借鉴。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 菌株和质粒

克隆质粒 pUC19, 表达质粒 pET30a; 大肠杆菌 DH5 α , 大肠杆菌 BL21 (DE3), 均为实验室保藏。

1.1.2 主要试剂

蛋白质 Marker、T₄ DNA 连接酶, 天根生化科技 (北京) 有限公司; 限制性核酸内切酶, 宝日医生物技术 (北京) 有限公司; 质粒提取试剂盒、DNA 凝胶回收试剂盒, 北京百泰克生物技术有限公司; 高保真聚合酶, 南京诺唯赞生物科技股份有限公司; PGF_{2 α} 酶联免疫试剂盒, Cayman Chemical 公司; 异丙基 - β - D - 硫代半乳糖苷 (IPTG), 北京索莱宝科技有限公司; 其余化学试剂均为国产分析纯。

1.1.3 培养基

LB 液体培养基: 组成为 5 g/L 酵母提取物、10 g/L NaCl、10 g/L 胰蛋白胨, 于 121 $^{\circ}$ C 灭菌 20 min 后, 冷却至室温备用。LB 固体培养基: 在 LB 液体培养基中加入 2% 琼脂。LB 抗性培养基: 在 LB 液体培养基中添加氨苄青霉素或卡那霉素至终质量浓度分别为 100 μ g/mL 或 50 μ g/mL。

1.1.4 仪器与设备

双人双面净化工作台, 苏州净化设备有限公司; 电热恒温干燥鼓风烘箱, 上海精宏实验设备有限公司; 五段程控金属浴、紫外凝胶成像系统, 天根生化科技 (北京) 有限公司; 高速冷冻离心机, 赛默飞世尔科技 (上海) 公司; 高压蒸汽灭菌锅, SANYO (日本) 公司; 恒温振荡培养箱, 上海知楚仪器有限公司; 梯度 PCR 扩增仪, 德国艾本德股份公司; 电泳仪, 北京六一生物技术有限公司; 超声破碎仪, 宁波新芝生物科技股份有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 *MmPGHS*、*GvPGHS*、*TbPGFS* 基因合成与扩增

通过 NCBI 数据库, 分别从 *M. musculus* 和 *G. vermiculophylla* 的基因编码序列中获得 PGHS 编码基因的 cDNA 文库 (BC005573, KJ415281), 从 *T. brucei* 基因编码序列中获得 PGFS 编码基因 cDNA 文库 (AB034727)。使用大肠杆菌 DH5 α 对 *MmPGHS*、*GvPGHS*、*TbPGFS* 基因进行密码子优化, 并送至公司合成。再使用质粒提取试剂盒提取质粒

pUC19 - *MmPGHS*、pUC19 - *GvPGHS*、pUC19 - *TbPGFS*，分别以其为模板 PCR 扩增回收目的基因 *MmPGHS*、*GvPGHS*、*TbPGFS*。不同元件的扩增条件如下(引物见表 1):*MmPGHS* 长度为 1 809 bp,95 °C 预变性 5 min,95 °C 变性 30 s,60 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 55 s,30 个循环,72 °C 延伸 10 min;*GvPGHS* 长度为 1 689 bp,95 °C 预变性 5 min,95 °C 变性 30 s,60 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 51 s,30 个循环,72 °C 延伸 10 min;*TbPGFS* 长度为 831 bp,95 °C 预变性 5 min,95 °C 变性 30 s,60 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 25 s,30 个循环,72 °C 延伸 10 min。

表 1 基因元件扩增引物

引物	序列(5' - 3')
<i>E. coli</i> - <i>TbPGFS</i> - F	CGCGGATCCATGGCGCTGACCCAG
<i>E. coli</i> - <i>TbPGFS</i> - R	CCCAAGCTTTTAAAAATCGTTCATG AAAACCTCCGGGT
<i>E. coli</i> - <i>MmPGHS</i> - F	CGCGGATCCATGAGCCGTCGTAGC
<i>E. coli</i> - <i>MmPGHS</i> - R	CCCAAGCTTTTACAGTTCGGTGCCT
<i>E. coli</i> - <i>GvPGHS</i> - F	CGCGGATCCATGCTGTTC AAC AACTTTCGT
<i>E. coli</i> - <i>GvPGHS</i> - R	CCCAAGCTTTTAAACCGGGTTG TTCTTCGG

1.2.2 *MmPGHS*、*GvPGHS*、*TbPGFS* 基因表达载体的构建与转化

使用 *BamH* I 酶和 *Hind* III 酶对 pUC19 - *TbPGFS*、pUC19 - *MmPGHS*、pUC19 - *GvPGHS* 进行酶切获得带黏性末端的的目的基因 *TbPGFS*、*MmPGHS*、*GvPGHS*。同时,表达质粒 pET30a 经 *BamH* I 酶和 *Hind* III 酶切后得到线性化质粒。将获得的线性化质粒分别与酶切获得的的目的基因 *TbPGFS*、*MmPGHS*、*GvPGHS* 使用 T₄ DNA 连接酶连接,构建重组质粒 pET30a - *TbPGFS*、pET30a - *MmPGHS*、pET30a - *GvPGHS*。将上述 3 种重组质粒转化至大肠杆菌 BL21(DE3)感受态细胞中,在含 50 μg/mL 卡那霉素的 LB 固体培养基上过夜培养,挑取转化子进行菌落 PCR 验证并测序验证质粒序列,将验证正确的大肠杆菌工程菌依次命名为 DC - 1、DC - 2、DC - 3。

1.2.3 *MmPGHS*、*GvPGHS*、*TbPGFS* 重组蛋白在大肠杆菌 BL21(DE3)的诱导表达

将工程菌 DC - 1、DC - 2、DC - 3 和空载体菌 BL21 - pET30a 在 LB 固体培养基上划线并过夜培养。第二天挑取单菌落接种于 10 mL 含有 50 μg/mL 卡那霉素的 LB 液体培养基中,在 37 °C、200 r/min 下培养 12 h。取培养的菌液,按体积比 1:100 转接到

含有 50 μg/mL 卡那霉素的 LB 液体培养基中,在 37 °C、200 r/min 下培养至 OD₆₀₀ 为 0.6 ~ 0.8 时,添加 IPTG 至终浓度为 0.2 mmol/L,在一定温度下诱导一定时间,在 4 °C、10 000 r/min 下离心 10 min,收集菌体沉淀,用 Tris - HCl 缓冲液洗涤 2 次后复悬,再使用超声波进行破碎(超声条件:超声仪探头置于菌液面下 1 cm,功率 455 W,超声 4 s,间隔 4 s,总时间 30 min,温度 0 ~ 4 °C)。超声结束后,于 4 °C、5 000 r/min 条件下离心 15 min,收集上清液(粗酶液)。

1.2.4 SDS - PAGE 分析

对粗酶液进行 SDS - PAGE 分析,分析方法见文献[13]。

1.2.5 体外催化 PGF_{2α} 的合成

双酶催化:取 200 μL PGHS 粗酶液,加入 0.2 mL 100 mmol/L PBS 缓冲液(pH 7.0),于 25 °C 避光孵育 5 min。再加入终浓度至 100 μmol/L 的花生四烯酸,于 25 °C 下反应 7 min 后加入 0.2 mL 100 mmol/L PBS 缓冲液(pH 7.0)和 200 μL PGFS 粗酶液,于 37 °C 孵育 3 min 后,用 1 mol/L 盐酸调节 pH 至 3.0,再用 2 倍体积预冷的乙酸乙酯萃取样品,氮吹至干,得到产物。

酶偶联化学催化:取 200 μL PGHS 粗酶液,加入 0.2 mL 100 mmol/L PBS 缓冲液(pH 7.0),再加入血红素至终浓度为 1 μmol/L。将混合物在 20 °C 避光孵育 5 min,然后加入花生四烯酸至终浓度为 200 μmol/L,于 20 °C 避光孵育 30 min,加入 SnCl₂ 至终浓度为 100 mmol/L 终止反应,用 1 mol/L 盐酸调节 pH 至 3.0,使用 2 倍体积预冷的乙酸乙酯萃取,氮吹至干,得到产物。

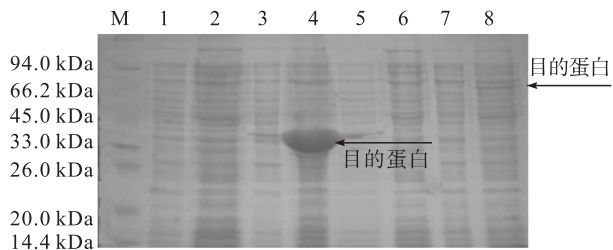
1.2.6 PGF_{2α} 含量的测定

采用 PGF_{2α} 酶联免疫试剂盒测定 PGF_{2α} 含量,同时采用液相色谱 - 质谱(LC - MS)联用技术^[13]进行验证。

2 结果与讨论

2.1 *MmPGHS*、*GvPGHS*、*TbPGFS* 重组蛋白在大肠杆菌 BL21(DE3)的诱导表达

通过在线软件 NovoPro 预测出 pET30a - *TbPGFS*、pET30a - *MmPGHS*、pET30a - *GvPGHS* 表达的蛋白质分子质量分别为 36.40、74.45、70.10 kDa。为了确认 *MmPGHS*、*GvPGHS*、*TbPGFS* 蛋白是否在大肠杆菌中表达,对空载体菌 BL21 - pET30a、工程菌 DC - 1、工程菌 DC - 2、工程菌 DC - 3 诱导前后(诱导温度为 37 °C,诱导时间 4 h)得到的粗酶液进行 SDS - PAGE 分析,结果如图 1 所示。



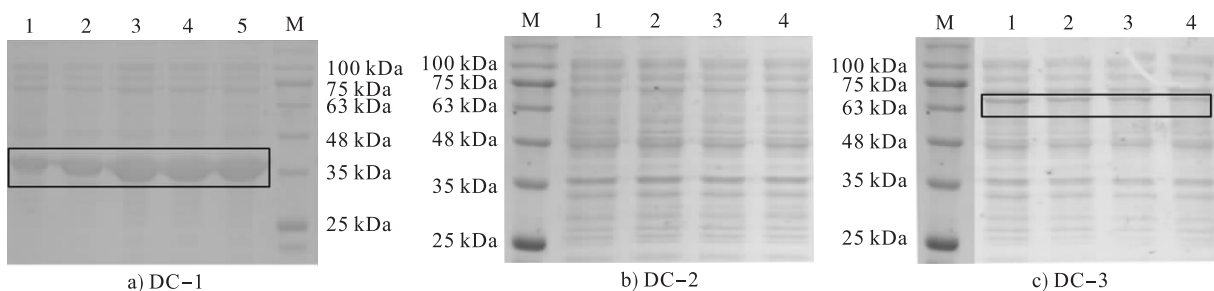
注: M. Marker; 1. 空载体菌无诱导; 2. 空载体菌诱导; 3. DC-1 无诱导; 4. DC-1 诱导; 5. DC-2 无诱导; 6. DC-2 诱导; 7. DC-3 无诱导; 8. DC-3 诱导

图1 不同菌株诱导表达前后的 SDS-PAGE 图谱

由图1可知,与空载相比,DC-1在约36.40 kDa位置有明显的蛋白质条带,DC-2在74.45 kDa位置没有明显的蛋白质条带,DC-3在约70.10 kDa位置有明显的蛋白质条带,说明TbPGFS、GvPGHS蛋白在大肠杆菌中有可溶性表达,MmPGHS在大肠杆菌中没有可溶性表达。有研究表明,重组哺乳动物PGHS可以在昆虫或酵母宿主中表达,但在细菌宿主中不表达,因为它们缺乏活性酶的翻译后修饰所需的糖基化系统^[15-16]。本研究中MmPGHS基因来源于家鼠,因此推测MmPGHS蛋白的表达需要糖基化修饰才能进行。

2.2 诱导条件优化

大肠杆菌表达系统是最常用的重组蛋白表达系统,其易于操作,可低成本大量表达重组蛋白^[17-18],但是其蛋白表达容易发生错误折叠或者形成包涵体^[19]。通过控制诱导温度和诱导时间可以改善蛋白在大肠杆菌中的表达情况^[20]。



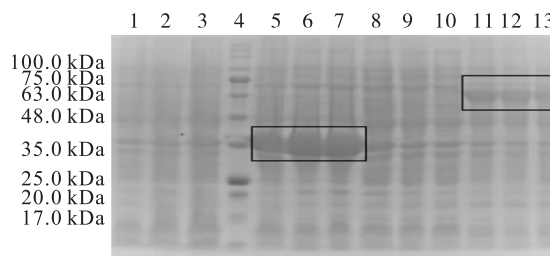
注: M. Marker; a 图中1~5分别为诱导2、4、6、8、10 h; b、c 图中1~4分别为诱导2、4、6、8 h

图3 不同诱导时间下菌株的 SDS-PAGE 图谱

由图3可知,在诱导时间6 h时,TbPGFS蛋白的表达量达到最大值,MmPGHS蛋白在大肠杆菌中未发现可溶性表达,而GvPGHS蛋白的表达量在诱导时间2 h时达到最大值,继续延长诱导时间对GvPGHS蛋白表达量没有影响。诱导时间过短可能会使重组蛋白无法大量表达,诱导时间过长则可能会因为菌株衰亡释放有毒物质而导致蛋白质降解或活性降低^[22]。张煜彬等^[23]在大肠杆菌中表达单链

2.2.1 诱导温度的优化

培养温度较高时利于大肠杆菌的生长,而较低的温度一般有利于提高蛋白的稳定性和可溶性,因此选择合适的诱导温度能够提高重组蛋白的表达量^[21]。保持诱导时间(4 h)不变,调节诱导温度分别为37、30、25℃,对菌株进行诱导表达,考察诱导温度对蛋白质表达的影响,结果如图2所示。



注: 1~3. 分别为空载体菌在37、30、25℃下诱导; 4. 预染的蛋白质Marker; 5~7. 分别为DC-1在37、30、25℃下诱导; 8~10. 分别为DC-2在37、30、25℃下诱导; 11~13. 分别为DC-3在37、30、25℃下诱导

图2 不同诱导温度下菌株的 SDS-PAGE 图谱

由图2可知: 诱导温度在25、30℃时,对TbPGFS蛋白表达影响不大,而诱导温度为37℃时TbPGFS蛋白表达量明显降低;MmPGHS蛋白在大肠杆菌中没有可溶性表达;诱导温度不影响GvPGHS蛋白的表达。因此,本研究选择30℃为TbPGFS、GvPGHS蛋白的最佳诱导温度。

2.2.2 诱导时间的优化

保持诱导温度(30℃)不变,调节诱导时间,考察诱导时间对蛋白质表达的影响,结果如图3所示。

抗体PD0721时发现,在诱导时间12 h时PD0721的表达量最大,诱导时间超过或短于12 h均不利于PD0721的表达。因此,确定TbPGFS蛋白表达的最佳诱导时间为6 h,GvPGHS蛋白表达的最佳诱导时间为2 h。

综上,得到TbPGFS蛋白最佳诱导条件为诱导温度30℃、诱导时间6 h,GvPGHS蛋白最佳诱导表达条件为诱导温度30℃、诱导时间2 h。

2.3 体外催化 $\text{PGF}_{2\alpha}$ 的合成

按 1.2.5 方法,分别采用双酶催化和酶偶联化学催化合成 $\text{PGF}_{2\alpha}$,并采用 $\text{PGF}_{2\alpha}$ 酶联试剂盒对产物进行检测,结果发现,双酶催化没有产生 $\text{PGF}_{2\alpha}$,而酶偶联化学催化 $\text{PGF}_{2\alpha}$ 产量为 101 ng/mL。LC-MS 进一步验证了酶偶联化学催化成功合成了 $\text{PGF}_{2\alpha}$ (见图 4)。

本研究中使用 TbPGFS 和 GvPGHS 粗酶液催化

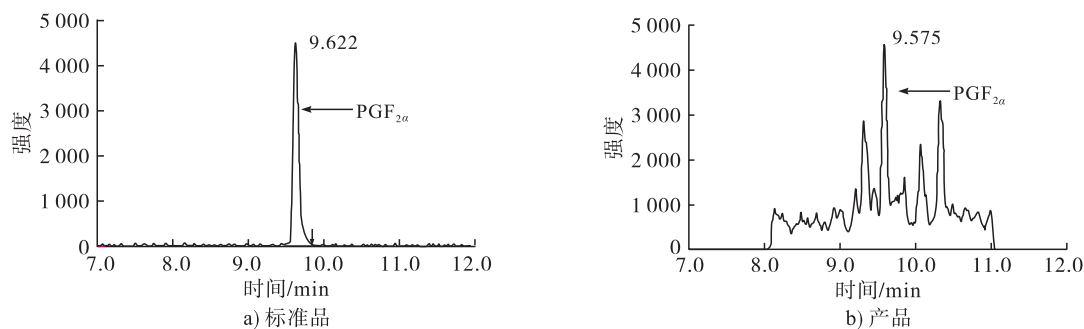


图 4 $\text{PGF}_{2\alpha}$ 的 LC-MS 图谱

3 结论

本研究分别将 TbPGFS 、 MmPGHS 、 GvPGHS 基因的重组质粒导入大肠杆菌 BL21 (DE3) 获得大肠杆菌工程菌 DC-1、DC-2、DC-3。 GvPGHS 和 TbPGFS 蛋白在大肠杆菌中有可溶性表达,在 25 ~ 37 °C 范围内, GvPGHS 蛋白的诱导表达对温度不敏感,加入 IPTG 诱导 2 h 其表达量达到最大值; TbPGFS 蛋白在 25 ~ 30 °C 表达量高于 37 °C 下的,加入 IPTG 诱导 6 h 其表达量达到最大值。使用大肠杆菌体外催化花生四烯酸合成 $\text{PGF}_{2\alpha}$ 时,由 GvPGHS 和 TbPGFS 的粗酶液构成的双酶催化未能检测到产物 $\text{PGF}_{2\alpha}$,而在酶偶联化学催化时, GvPGHS 能将花生四烯酸转化为 PGH_2 ,在反应液中添加 SnCl_2 可以进一步将 PGH_2 还原为 $\text{PGF}_{2\alpha}$ 。本研究展示了一种在大肠杆菌中表达 GvPGHS 蛋白,并通过体外酶偶联化学催化花生四烯酸生产 $\text{PGF}_{2\alpha}$ 的可行性。

参考文献:

- [1] FUNK C D. Prostaglandins and leukotrienes: Advances in eicosanoid biology[J]. Science, 2001, 294(5548): 1871 - 1875.
- [2] SEO M J, OH D K. Prostaglandin synthases: Molecular characterization and involvement in prostaglandin biosynthesis[J]. Prog Lipid Res, 2017, 66: 50 - 68.
- [3] BUCZYNSKI M W, DURLAO D S, DENNIS E A. Thematic review series: Proteomics. An integrated omics analysis of eicosanoid biology[J]. J Lipid Res, 2009, 50(6): 1015 - 1038.
- [4] 李锐, 袁慧敏, 刘钊臣, 等. 复明片联合拉坦前列素治
- 花 生 四 烯 酸 反 应 没 有 产 生 $\text{PGF}_{2\alpha}$ 。Varvas 等^[24] 研究表明, GvPGHS 与 动 物 PGHS 仅 共 享 约 20% 的 氨 基 酸 序 列,但 能 够 催 化 花 生 四 烯 酸 转 化 为 前 列 腺 素 内 过 氧 化 物、 PGG_2 和 PGH_2 。本 研 究 中 酶 偶 联 化 学 催 化 合 成 $\text{PGF}_{2\alpha}$ 的 原 理 为 先 使 用 GvPGHS 催 化 将 花 生 四 烯 酸 合 成 PGH_2 , PGH_2 再 进 一 步 被 SnCl_2 还 原 成 $\text{PGF}_{2\alpha}$ 。
- 疗 难 治 性 青 光 眼 的 疗 效 观 察[J]. 现 代 药 物 与 临 床, 2020, 35(1): 127 - 132.
- [5] SHARIF N A. Therapeutic drugs and devices for tackling ocular hypertension and glaucoma, and need for neuroprotection and cytoprotective therapies [J/OL]. Front Pharmacol, 2021, 12: 729249 [2023 - 09 - 30]. <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.729249>.
- [6] WANG J L, YANG H L. Effect of carboprost tromethamine injection combined with modified B - lynch suture and carboprost methylate suppositories in parturients with placenta previa [J]. Am J Transl Res, 2021, 13(7): 7812 - 7818.
- [7] LUCY M C. Selection for fertility in the modern dairy cow: Current status and future direction for genetic selection[J]. J Dairy Sci, 2019, 102(4): 3706 - 3721.
- [8] 袁 富 威, 班 赞, 叶 文 初, 等. 氨 基 丁 三 醇 前 列 腺 素 $\text{F}_{2\alpha}$ 在 奶 牛 体 内 的 药 代 动 力 学 研 究[J]. 中 国 兽 医 学 报, 2017, 37(5): 883 - 887.
- [9] COREY E J, WEINSHENKER N M, SCHAAF T K, et al. Stereo - controlled synthesis of prostaglandins $\text{F}_{2\alpha}$ and E - 2 (dl)[J]. J Am Chem Soc, 1969, 91(20): 5675 - 5677.
- [10] COULTHARD G, ERB W, AGGARWAL V K. Stereocontrolled organocatalytic synthesis of prostaglandin $\text{PGF}_{2\alpha}$ in seven steps[J]. Nature, 2012, 489(7415): 278 - 281.
- [11] ZHANG F H, ZENG J W, GAO M H, et al. Concise, scalable and enantioselective total synthesis of prostaglandins[J]. Nat Chem, 2021, 13(7): 692 - 697.
- [12] MOHAMED M E, LAZARUS C M. Prostanoid production

- in *Saccharomyces cerevisiae* provides a novel assay for nonsteroidal anti-inflammatory drugs [J]. *FEMS Yeast Res*, 2009, 9(3): 420–427.
- [13] KANAMOTO H, TAKEMURA M, OHYAMA K. Identification of a cyclooxygenase gene from the red alga *Gracilaria vermiculophylla* and bioconversion of arachidonic acid to PGF_{2α} in engineered *Escherichia coli* [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2011, 91(4): 1121–1129.
- [14] GUDER J C, BUCHHAUPT M, HUTH I, et al. Biotechnological approach towards a highly efficient production of natural prostaglandins [J]. *Biotechnol Lett*, 2014, 36(11): 2193–2198.
- [15] O'NEILL G P, MANCINI J A, KARGMAN S, et al. Overexpression of human prostaglandin G/H synthase-1 and -2 by recombinant vaccinia virus; Inhibition by nonsteroidal anti-inflammatory drugs and biosynthesis of 15-hydroxyeicosatetraenoic acid [J]. *Mol Pharmacol*, 1994, 45(2): 245–254.
- [16] TAI H H, ENSOR C M, TONG M, et al. Prostaglandin catabolizing enzymes [J]. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*, 2002, 68/69: 483–493.
- [17] 闫子祥, 杨然, 李秀婷. 微生物表达系统研究进展 [J]. *中国食品学报*, 2013, 13(10): 126–135.
- [18] 何东洋, 马超, 高振月, 等. 人源 CD137L 基因在不同表达系统中表达效率的比较 [J]. *生物技术通报*, 2014(9): 178–183.
- [19] 苏鹏, 龚国利. 优化大肠杆菌表达外源蛋白的研究进展 [J]. *生物技术通报*, 2017, 33(2): 16–23.
- [20] 许思远, 张永贵, 赵沛, 等. 产油核桃内生细菌乙酰辅酶 A 羧化酶 *acb* 基因克隆及优化表达 [J]. *中国油脂*, 2023, 48(4): 99–104.
- [21] 黄旭, 王振, 刘娟, 等. 玉米黄烷酮-3-羟化酶原核表达条件对香橙素生成量的影响 [J]. *食品与发酵工业*, 2022, 48(3): 38–43.
- [22] 林丹敏, 宋彩燕, 余林金, 等. 应用正交实验法优化大肠杆菌表达 CTB-PSMA624-632 蛋白的条件 [J]. *基因组学与应用生物学*, 2019, 38(2): 636–643.
- [23] 张煜彬, 叶路芬, 吴忠秀, 等. PD0721 单链抗体的体外原核表达条件优化及蛋白质鉴定 [J]. *食品与生物技术学报*, 2021, 40(7): 42–49.
- [24] VARVAS K, KASVANDIK S, HANSEN K, et al. Structural and catalytic insights into the algal prostaglandin H synthase reveal atypical features of the first non-animal cyclooxygenase [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2013, 1831(4): 863–871.
-
- (上接第 105 页)
- [43] NGAMSIRISOMSAKUL M, REUNGSANG A, LIAO Q, et al. Enhanced bio-ethanol production from *Chlorella* sp. biomass by hydrothermal pretreatment and enzymatic hydrolysis [J]. *Renew Energy*, 2019, 141: 482–492.
- [44] JAZRAWI C, BILLER P, ROSS A B, et al. Pilot plant testing of continuous hydrothermal liquefaction of microalgae [J]. *Algal Res*, 2013, 2(3): 268–277.
- [45] CHENG J, HUANG R, YU T, et al. Biodiesel production from lipids in wet microalgae with microwave irradiation and bio-crude production from algal residue through hydrothermal liquefaction [J]. *Bioresour Technol*, 2014, 151: 415–418.
- [46] TANG X, ZHANG C, YANG X. Optimizing process of hydrothermal liquefaction of microalgae via flash heating and isolating aqueous extract from bio-crude [J/OL]. *J Clean Prod*, 2020, 258: 120660 [2022-10-29]. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2020.120660>.
- [47] KUMAR K, GHOSH S, ANGELIDAKI I, et al. Recent developments on biofuels production from microalgae and macroalgae [J]. *Renew Sust Energ Rev*, 2016, 65: 235–249.
- [48] QIU Y, CHENG J, GUO H, et al. Mild hydrothermal treatment on microalgal biomass in batch reactors for lipids hydrolysis and solvent-free extraction to produce biodiesel [J/OL]. *Energy*, 2019, 189: 116308 [2022-10-29]. <https://doi.org/10.1016/j.energy.2019.116308>.
- [49] HUANG R, CHENG J, QIU Y, et al. Solvent-free lipid extraction from microalgal biomass with subcritical water in a continuous flow reactor for acid-catalyzed biodiesel production [J]. *Fuel*, 2019, 253: 90–94.
- [50] CHEN X, HU L, XING R, et al. Ionic liquid-assisted subcritical water promotes the extraction of lipids from wet microalgae *Scenedesmus* sp. [J]. *Eur J Lipid Sci Technol*, 2015, 117(8): 1192–1198.
- [51] MALEKGHASEMI S, KARIMINIA H R, PLECHKOVA N K, et al. Direct transesterification of wet microalgae to biodiesel using phosphonium carboxylate ionic liquid catalysts [J/OL]. *Biomass Bioenerg*, 2021, 150: 106126 [2022-10-29]. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2021.106126>.
- [52] CHEN Y, MU T. Application of deep eutectic solvents in biomass pretreatment and conversion [J]. *Green Energy Environ*, 2019, 4(2): 95–115.
- [53] KIM K H, DUTTA T, SUN J, et al. Biomass pretreatment using deep eutectic solvents from lignin derived phenols [J]. *Green Chem*, 2018, 20(4): 809–815.