

# 亲和标签调节的 (S)-羰基还原酶 2 催化 2-羟基苯乙酮的酶学性质

李尧慧, 张荣珍, 徐岩

江南大学 生物工程学院 酿造微生物与应用酶学实验室, 江苏 无锡 214122

李尧慧, 张荣珍, 徐岩. 亲和标签调节的 (S)-羰基还原酶 2 催化 2-羟基苯乙酮的酶学性质. 生物工程学报, 2021, 37(12): 4277-4292.

Li YH, Zhang RZ, Xu Y. Characterization of the affinity-tags-regulated (S)-carbonyl reductase 2 towards 2-hydroxyacetophenone reduction. Chin J Biotech, 2021, 37(12): 4277-4292.

**摘要:** 不同类型的亲和标签会影响酶的催化功能和酶学性质。近平滑假丝酵母 *Candida parapsilosis* 来源的(S)-羰基还原酶 2 ((S)-carbonyl reductase 2, SCR2) 能催化 2-羟基苯乙酮。文中在 SCR2 的 N 端添加不同类型的亲和标签, 在大肠杆菌 *Escherichia coli* 中异源表达并纯化重组蛋白 his<sub>6</sub>-SCR2、strep-SCR2 和 MBP-SCR2, 研究了重组蛋白催化 2-羟基苯乙酮的酶学性质。结果表明, 不同类型的亲和标签对 SCR2 的酶学性质有一定的影响。其中, 不同类型的亲和标签对重组蛋白稳定性影响较大: 1) 在 pH 6.0、30 °C 条件下保温 13 h 后, 重组蛋白 his<sub>6</sub>-SCR2 和 strep-SCR2 的剩余酶活力是无融合标签 SCR2 的 90.0%–95.2%, 而 MBP-SCR2 的剩余酶活力是无融合标签 SCR2 的 1.25 倍。2) MBP-SCR2 在 50 °C 的半衰期比 strep-SCR2、his<sub>6</sub>-SCR2 和无融合标签 SCR2 长 26.6%–48.8%。3) MBP-SCR2 在 -80 °C 存储 60 d 后, 其酶动力学参数  $k_{cat}$  比 his<sub>6</sub>-SCR2、strep-SCR2 和无融合标签 SCR2 高 1.25–1.45 倍。根据三级结构分析推出重组蛋白 MBP-SCR2 中 MBP 的 C 末端的  $\alpha$  螺旋具有稳定 SCR2 的 N 端无规则卷曲的作用, 从而提高酶的稳定性。圆二色谱检测结果表明 MBP 标签对蛋白 SCR2 的二级结构有一定的影响, 且解折叠温度 ( $T_m$ ) 分析证明, MBP-SCR2 的  $T_m$  比无融合标签 SCR2 提高近 5 °C。研究结果不仅为羰基还原酶家族增添了一种 2-羟基苯乙酮的稳定高效催化剂 MBP-SCR2, 同时为其他短链醇脱氢酶的标签设计提供了借鉴和依据。

**关键词:** (S)-羰基还原酶 2, 亲和标签, 酶学性质, 生物催化

**Received:** January 28, 2021; **Accepted:** May 6, 2021

**Supported by:** National Key Research and Development Program of China (No. 2018YFA0900302), Research and Innovation Program for Graduate Students of Jiangsu Province, China (No. KYLX15-1148).

**Corresponding authors:** Yan Xu. Tel: +86-510-85197760; Fax: +86-510-85864112; E-mail: yxu@jiangnan.edu.cn

Rongzhen Zhang. Tel: +86-510-85197760; Fax: +86-510-85864112; E-mail: rzzhang@jiangnan.edu.cn

国家重点研发计划 (No. 2018YFA0900302), 江苏省研究生创新计划 (No. KYLX15-1148) 资助。

网络出版时间: 2021-06-29

网络出版地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1998.q.20210628.1040.001.html>

# Characterization of the affinity-tags-regulated (S)-carbonyl reductase 2 towards 2-hydroxyacetophenone reduction

Yaohui Li, Rongzhen Zhang, and Yan Xu

Jiangnan University Lab of Brewing Microbiology and Applied Enzymology, School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China

**Abstract:** The influence of different affinity tags on enzyme characteristics varies. The (S)-carbonyl reductase 2 (SCR2) from *Candida parapsilosis* can reduce 2-hydroxyacetophenone, which is a valuable prochiral ketones. Different affinity tags, i.e. his-tag, strep-tag and MBP-tag, were attached to the N terminus of SCR2. These tagged SCR2 enzymes, i.e. his<sub>6</sub>-SCR2, strep-SCR2 and MBP-SCR2, were heterologously expressed in *Escherichia coli* and purified to study their characteristics towards 2-hydroxyacetophenone reduction. Affinity tags did affect the characteristics of the recombinant SCR2 enzymes. Specifically, affinity tags affect the stability of recombinant SCR2 enzymes: 1) At pH 6.0, the remaining enzyme activities of his<sub>6</sub>-SCR2 and strep-SCR2 were only 95.2% and 90.0% of the untagged SCR2, while that of MBP-SCR2 was 1.2 times of the untagged SCR2 after incubating for 13 h at 30 °C. 2) The half-life of MBP-SCR2 at 50 °C was 26.6%–48.8% longer than those of strep-SCR2, his<sub>6</sub>-SCR2 and untagged SCR2. 3) The  $k_{\text{cat}}$  of MBP-SCR2 was about 1.25–1.45 times of that of small affinity-tagged and untagged SCR2 after storing at –80 °C for 60 d. Structural informatics indicated that the  $\alpha$ -helices at the C terminus of MBP-SCR2 contributed to the stability of the N terminus of fusion protein of SCR2. Data from circular dichroism showed that the MBP-tag has some influence on the secondary structure of SCR2, while melting temperature analysis demonstrated that the  $T_m$  of the recombinant MBP-SCR2 was about 5 °C higher than that of the untagged SCR2. This study obtained an efficient and stable recombinant SCR2, i.e. the MBP-SCR2. Moreover, this study could serve as a reference for other researchers to evaluate and select appropriate affinity tags for their research.

**Keywords:** (S)-carbonyl reductase 2, affinity tags, enzyme characteristics, biocatalysis

羰基还原酶 (EC 1.1.1.184) 来源广泛, 能利用辅酶 NAD(P)H 还原潜手性酮, 其中, 多数潜手性酮及其产物可以作为合成药物和农药中间体的原料<sup>[1]</sup>。目前, 国外通过异源表达已经将部分羰基还原酶, 包括来自 IEP GmbH 的酮还原酶和 Merck 公司的重组酮还原酶等, 成功应用于市场生产 (S)-2-丁醇<sup>[2]</sup>和趋化性因子受体抑制剂<sup>[3]</sup>等。虽然国内利用生物催化法合成手性药物起步较晚, 但近几年郑裕国教授团队和许建和教授团队等在合成他汀中间体方面的研究有较大进展<sup>[4-5]</sup>。因此, 研究羰基还原酶的异源表达及其生物催化具有较大的医药和工业应用价值。

在异源表达目的蛋白时, 为了提高目的蛋白的纯化效率或可溶性表达量, 通常采用分子生物学的方法, 在编码基因中添加不同的亲和标签。目前常用的亲和标签有组氨酸 (His) 标签、链球

菌抗生物素蛋白 (Strep) 标签、麦芽糖结合蛋白 (Maltose binding protein, MBP) 标签和谷胱甘肽巯基转移酶 (Glutathione S-transferase, GST) 标签等<sup>[6-8]</sup>。由于在大肠杆菌中异源表达的常用载体, 如 pET 系列表达载体, 带有组氨酸 (His) 标签基因序列, 因此, 大部分在大肠杆菌中异源表达的重组蛋白都以组氨酸标签来纯化目的蛋白。然而, 不同种类的亲和标签具有不同的纯化效率<sup>[9]</sup>, 并且有可能影响蛋白的催化功能<sup>[10-11]</sup>。Majorek 等<sup>[10]</sup>发现 His 标签可以通过影响 Gcn5 (The general control non-repressed protein 5) 相关的 N-乙酰基转移酶的构象, 进而影响它的生物催化功能。Bräuer 等<sup>[12]</sup>认为亲和标签可能会和蛋白发生相互作用, 从而影响蛋白的功能。因此, 研究不同种类的亲和标签对同一种蛋白的表达、催化功能及其酶学性质, 具有重要的意义。

目前已经报道的大肠杆菌异源表达的重组型羰基还原酶大多以 pET 系列载体进行构建<sup>[13-14]</sup>。因此,针对不同的亲和标签可能对羰基还原酶功能存在的影响,目前鲜有报道。笔者实验室前期挖掘了近平滑假丝酵母 *Candida parapsilosis* 来源的 (S)-羰基还原酶 2 ((S)-carbonyl reductase 2, SCR2) 的基因信息,并发现该酶具有较广泛的潜手性酮类底物谱<sup>[11]</sup>。SCR2 属于短链脱氢酶家族成员,具有典型的 Rossmann 折叠域及保守的催化三联体<sup>[15-16]</sup>。由于该酶系的潜手性酮类底物谱广泛,因此具有较大的研究价值<sup>[17]</sup>。

本研究以近平滑假丝酵母 SCR2 为研究对象,通过在 N-末端添加不同种类的亲和标签,包括 His 标签、Strep 标签以及 MBP 标签,构建具有不同亲和标签的重组蛋白 his<sub>6</sub>-SCR2、strep-SCR2 和 MBP-SCR2,研究并比较了它们的催化功能和酶学性质,并从二级结构和三级结构上分析了这些性质差异的原因。该研究旨在为羰基还原酶的亲和标签种类选择提供参考,并通过标签的优化改善 SCR2 酶的催化性能。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 菌株与质粒

大肠杆菌 *Escherichia coli* BL21(DE3) 由本实验室保存;近平滑假丝酵母 *Candida parapsilosis* 基因 *scr2* (GenBank 登录号: FJ939563) 来源于本实验室保存的 pCP-SCR2 质粒<sup>[18]</sup>;质粒 pET21b 购自 Novagen 公司;带有 MBP 亲和标签的质粒 pET-MBP 和 TEV 蛋白酶表达质粒均由美国罗格斯大学 Montelione 教授实验室馈赠。研究涉及的质粒和重组菌见表 1。

#### 1.1.2 主要试剂和培养基

限制性内切酶、DNA 标准分子及蛋白标准分子等购自宝生物工程(大连)有限公司。重组质粒构建所需的引物合成由生工生物工程(上海)

股份有限公司完成。细菌质粒提取试剂盒,胶回收试剂盒以及柱纯化试剂盒等均购自 Omega Bio-tek 公司;酵母膏和蛋白胨购自 Oxford 公司。其余常用试剂均为分析纯,购自国药集团化学试剂有限公司。大肠杆菌采用 LB 培养基:0.5%酵母膏,1%蛋白胨,1%氯化钠,必要时添加 100 μg/mL 氨苄青霉素钠或者 50 μg/mL 卡那霉素(固体培养基再添加 1.5%的琼脂粉)。

### 1.2 实验方法

#### 1.2.1 表达载体和菌株的构建

以实验室保存的 pCP-SCR2 为模板,利用引物 His-F1 和 His-R1 PCR 扩增带组氨酸标签的 *scr2* 基因片段 his<sub>6</sub>-SCR2。接着,将扩增片段 his<sub>6</sub>-SCR2 和载体 pET21b 质粒<sup>[17]</sup>分别用 *Bam*H I 和 *Xho* I 双酶切,分别胶回收后,利用 T4 DNA 连接酶于 16 °C 连接过夜,涂布 100 μg/mL 氨苄青霉素钠平板,于 37 °C 过夜培养。挑取单克隆接种于含有 100 μg/mL 氨苄青霉素的 LB 液体培养基中,37 °C 培养过夜。提取质粒进行 PCR 和酶切验证,阳性克隆 *E. coli* JM109/pET-his<sub>6</sub>-SCR2 送生工生物工程(上海)股份有限公司测序。以 Strep-F1 和 Strep-R1 为引物,用同样的方法构建重组菌 *E. coli* JM109/pET-strep-SCR2。以 MBP-F1 和 MBP-R1 为引物,用同样的方法构建重组菌 *E. coli* JM109/pET-MBP-SCR2。所有质粒和引物见表 1。

#### 1.2.2 蛋白的表达与纯化

将测序正确的质粒 pET-his<sub>6</sub>-SCR2、pET-strep-SCR2、pET-MBP-SCR2、pET-MBP 和 TEV 转化至感受态细胞 *E. coli* BL21(DE3) 后,涂布于含相应抗性的固体 LB 平板,于 37 °C 倒置培养过夜。挑取单菌落至 5 mL 的 LB 液体培养基中培养 7-8 h,按 1%的接种量转接于 500 mL 的 LB 培养基中,于 37 °C、200 r/min 摇床培养至 *OD*<sub>600</sub> 值为 0.6-0.8,加入终浓度为 0.1 mmol/L 的诱导剂 IPTG,接着在 25 °C、200 r/min 培养 12 h<sup>[19]</sup>。

表 1 本论文所用的菌株、质粒和引物

Table 1 Strains, plasmids and primers used in this paper

Strains and plasmids	Characteristics	Source
Strains		
<i>E. coli</i> JM109/pCP-SCR2	<i>E. coli</i> JM109 harboring pCP-SCR2	This lab
<i>E. coli</i> JM109/pET21-his <sub>6</sub> -SCR2	<i>E. coli</i> JM109 harboring pET21-his <sub>6</sub> -SCR2	This work
<i>E. coli</i> JM109/pET21-strep-SCR2	<i>E. coli</i> JM109 harboring pET21-strep-SCR2	This work
<i>E. coli</i> JM109/pET-MBP-SCR2	<i>E. coli</i> JM109 harboring pET-MBP-SCR2	This work
<i>E. coli</i> BL21/pET21-his <sub>6</sub> -SCR2	<i>E. coli</i> BL21(DE3) harboring pET21-his <sub>6</sub> -SCR2	This work
<i>E. coli</i> BL21/pET21-strep-SCR2	<i>E. coli</i> BL21(DE3) harboring pET21-strep-SCR2	This work
<i>E. coli</i> BL21/pET-MBP-SCR2	<i>E. coli</i> BL21(DE3) harboring pET-MBP-SCR2	This work
Plasmids		
pET21b	5.4 kb, Amp <sup>r</sup>	Novagen
pET-MBP	The expression vector containing gene his <sub>8</sub> -MBP, 6.8 kb, Amp <sup>r</sup>	Rutgers university
pET21-his <sub>6</sub> -SCR2	The expression vector containing gene his <sub>6</sub> -SCR2, and a TEV cleavage site between His-tag and SCR2, 6.2 kb, Amp <sup>r</sup>	This work
pET21-strep-SCR2	The expression vector containing gene strep-SCR2, and a TEV cleavage site between Strep-tag and SCR2, 6.2 kb, Amp <sup>r</sup>	This work
pET-MBP-SCR2	The expression vector containing gene MBP-SCR2, and a TEV cleavage site between MBP-tag and SCR2, 7.6 kb, Amp <sup>r</sup>	This work
TEV	6.5 kb, Kana <sup>r</sup>	Rutgers university
Primers	Sequence (5'-3')	Size (bp)
MBP-F	ccc <u>gctc</u> gagctatggacaggtgaatccaccatc	34
MBP-R	act <u>ctc</u> gagctatggacaagtgaaccaccat	32
His-F	atcgatccgcatcatcatcatcatgaaaatttatattccagagtatggcgaaatcgaatctta	69
His-R	tgact <u>ctc</u> gagctatggacacgtgtatccacc	32
Strep-F	atcgatccgtggtctcatctcaattgaaaaggaaaatttatattccagagtatggcgaaatcgaatctta	75
Strep-R	tgact <u>ctc</u> gagctatggacacgtgtatccacc	32

Note: underlined bases represent restriction enzyme site.

含组氨酸标签的重组蛋白 SCR2、蛋白 MBP 和蛋白酶 TEV 的纯化参照文献[20]。含有 Strep 标签重组蛋白的纯化过程包括两个步骤：Strep-Tactin 亲和层析和 Superdex 200 Increase 10/300 GE 凝胶层析<sup>[20]</sup>。该过程中所用的缓冲液包括缓冲液 A (40 mmol/L Tris、150 mmol/L NaCl、pH 8.0)、缓冲液 B (40 mmol/L Tris、150 mmol/L NaCl、2.5 mmol/L D-脱硫生物素，pH 8.0)、缓冲液 C (50 mmol/L Tris、150 mmol/L NaCl、pH 8.0)。将离心收集的菌体，用缓冲液 A 重悬，超声破碎后，于 4 °C、12 000 r/min 离心 40 min 后收集上清。随后分步骤利用 Strep-Tactin 亲和层析和 Superdex 200 Increase 10/300 GE 凝胶层析获得纯化的蛋白。

将纯化后的蛋白 his<sub>6</sub>-SCR2，用 TEV 蛋白酶酶切<sup>[21]</sup>，可以获得无融合标签的 SCR2 蛋白。具

体步骤如下所述：将纯化后的 his<sub>6</sub>-SCR2 和 TEV 蛋白酶以摩尔比为 1 : 10 的比例，在添加 1 mmol/L 的还原剂 TCEP 的条件下，于 4 °C 孵育过夜 (约 12 h)。第 2 天，将经孵育的混合液流经 Ni-NTA 除去组氨酸标签和 TEV 蛋白酶。最后，将洗脱液浓缩并流经经缓冲液 C 平衡的 Superdex 200 Increase 10/300 GE 凝胶柱，收集凝胶层析洗脱液用于后续研究。重组蛋白 MBP-SCR2 和 strep-SCR2 在标签和 SCR2 基因之间添加了 TEV 蛋白酶酶切位点，因此也可以应用上述方法切除相应的标签。

### 1.2.3 酶活力和酶活动力学测定

酶活力测定方法、酶活力的定义以及酶活力的计算等参考文献[17]，略作改动。酶活力测定体系为 250 μL：0.1 mol/L 磷酸钠缓冲液 (pH 6.0)，5 mmol/L 底物 2-羟基苯乙酮

(2-hydroxyacetophenone, 2-HAP), 0.5 mmol/L NADPH。反应前加入适量酶液吹吸混匀后, 于 30 °C、340 nm 处扫描吸光度的变化。由于羧基还原酶的 pH 依赖性较强, 为了避免由于底物浓度不足而造成的酶活力测定差异, 因此在 pH 稳定性测定时, 提高底物浓度为 10 mmol/L, 其他条件保持不变。

酶活的计算公式:

$$\text{酶活 (U)} = EW \times V / (6\ 220 \times 0.639\ 9)$$

其中,  $EW$ : 1 min 内 340 nm 处吸光度的变化;  $V$ : 反应液的体积 (L); 6 220: NADPH 在 340 nm 下的摩尔消光系数 (L/(mol·cm)); 0.639 9: 光程距离 (cm)。本研究中 U 的单位为  $\mu\text{mol}/\text{min}$ , 而比酶活的单位为  $\text{U}/\mu\text{mol}$ 。

以 2-羟基苯乙酮为底物的酶活动力学的测定方法如下: 在 NADPH 为 0.5 mmol/L 的条件下, 测定蛋白在不同底物浓度下 (0.5–30 mmol/L) 的酶活力。根据在不同浓度的底物条件下测定的初始酶活力, 利用 GraphPad Prism 8 拟合相关数据。所用的公式为米氏方程 (1)。每个数据均至少测定 3 次后取平均值。

$$Y = V_{\max} \times X / (K_m + X) \quad (1)$$

蛋白含量用 Nanodrop 测定, 酶的消光系数通过 ExPASy 网 (<https://web.expasy.org/protparam/>) 求得。

#### 1.2.4 酶的最适温度和最适 pH 的测定

酶的最适温度测定如下: 在 0.1 mol/L 磷酸钠缓冲液 (pH 6.0) 条件下, 测定纯酶在不同温度 (30 °C、35 °C、40 °C 和 45 °C) 条件下的酶活力。每个数据均至少测定 3 次后取平均值。

酶活力的最适 pH 测定如下: 在温度为 30 °C 的条件下, 测定纯酶在不同 pH (4.0、5.0、6.0、7.0 和 8.0) 条件下的酶活力。每个数据均至少测定 3 次后取平均值。

#### 1.2.5 酶的温度和 pH 稳定性的测定

酶活力的温度稳定性测定如下: 将纯酶在不同的温度 (0–60 °C) 下温育 1 h 后, 在冰上放置

10 min, 随后检测它们的酶活力, 并定义在 0 °C 温育 1 h 后的酶活力为 100%, 计算其他温度下温育 1 h 后的相对酶活力。每个数据均至少测定 3 次后取平均值。

酶活力的半衰期测定方法如下: 在 50 °C 孵育温度下, 测定不同保温时间下酶的残余活力, 定义保温前测定的酶活力为 100%。当酶残余活力降低为 50% 时, 其对应的时间为酶在 50 °C 下的半衰期。

酶活力的 pH 稳定性测定如下: 将纯酶在不同的 pH (4.0–8.0) 下, 于 30 °C 温育 0 h 和 13 h 后, 检测它们在 30 °C 条件下的酶活力, 计算温育 13 h 后相对于 0 h 的酶活力。每个数据均至少测定 3 次后取平均值。

#### 1.2.6 带有不同亲和标签的 SCR2 的同源建模和序列比对

利用 Robetta comparative modeling<sup>[22]</sup> 预测 SCR2、his<sub>6</sub>-SCR2、strep-SCR2 以及 MBP-SCR2 的三维结构, 并分析 N 端结构差异对 SCR2 的影响。利用 PyMOL 计算经历 5 轮异常值剔除后的均方根偏差 (Root-mean-square deviation, RMSD)。利用 ESPript 3.0 在线网站进行序列比对<sup>[23]</sup>。

#### 1.2.7 带有不同亲和标签的重组型 SCR2 的圆二色谱和解折叠温度分析

圆二色谱测定蛋白二级结构: 将过凝胶层析后的蛋白样品浓度调节至 3  $\mu\text{mol}/\text{L}$ , 取 300  $\mu\text{L}$  于 190–260 nm 进行全波长扫描。圆二色谱数据分析利用 SELCON3 算法<sup>[24]</sup>。蛋白解折叠温度的测定: 取 220 nm 作为热变吸光值的测定, 热变温度范围为 20–80 °C, 升梯温度为 3 °C/min。

## 2 结果与分析

### 2.1 带有不同亲和标签的重组蛋白 SCR2 的构建及表达

以载体 pCP-SCR2 为模板, 构建 SCR2 带有不同亲和标签的重组蛋白表达基因 his<sub>6</sub>-SCR2、strep-SCR2 和 MBP-SCR2 (图 1A)。经 PCR 和双

酶切验证后, 将筛选得到的阳性克隆 *E. coli* JM09/pET-his<sub>6</sub>-SCR2、*E. coli* JM09/pET-strep-SCR2 和 *E. coli* JM09/pET-MBP-SCR2 进行测序验证, 并将测序正确的菌株保存用于后续研究。

提取质粒转化 *E. coli* BL21(DE3) 感受态细胞, 并将 3 种重组菌株 *E. coli* BL21/pET-his<sub>6</sub>-SCR2、*E. coli* BL21/pET-strep-SCR2 和 *E. coli* BL21/pET-MBP-SCR2 经诱导剂 IPTG 诱导表达, 收集细胞破碎上清液进行 SDS-PAGE 分析。结果发现 3 种重组蛋白在大肠杆菌中都过量表达, 并且在细胞上清液中有大量的可溶性蛋白 (图 1B)。

## 2.2 重组蛋白的纯化及酶活力的比较

为了研究亲和标签种类对酶学性质的影响, 纯化 SCR2 三种重组蛋白及其无融合标签蛋白, 结果如图 1C 所示。三种重组蛋白以及无融合标签 SCR2 催化 5 mmol/L 2-羟基苯乙酮的酶活有差异 (表 2)。在 1 min 内, MBP-SCR2 的比酶活力最高, 比 his<sub>6</sub>-SCR2 和 strep-SCR2 的比酶活力高约 19.1% 和 8.7%, 比无融合标签 SCR2 的比酶活力高约 4.9%。由于不同亲和标签对酶的比酶活力有一定的影响, 因此对于亲和标签的选择具有重要意义。

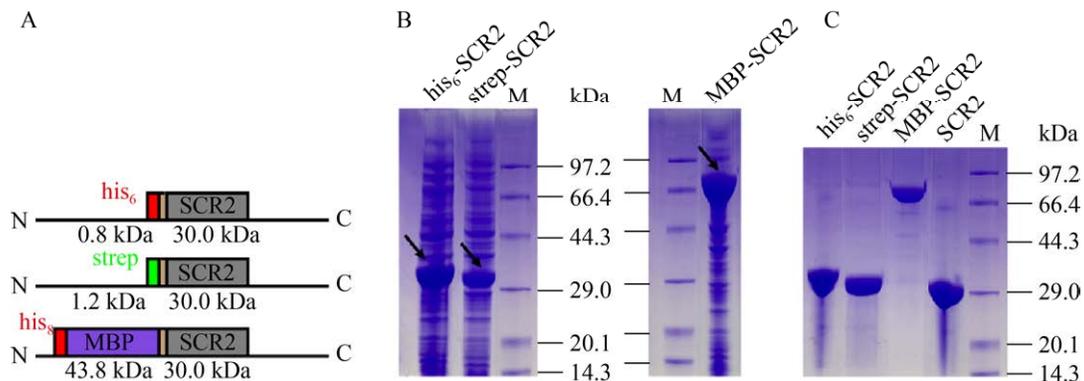


图 1 带有不同亲和标签的重组蛋白 SCR2 的构建、表达和纯化

Fig. 1 Construction, expression and purification of recombinant SCR2 enzymes with different affinity tags in *E. coli*. Construction scheme (A), SDS-PAGE analysis of the cell-free extracts (B) and purified recombinant SCR2 enzymes (C) were shown.

表 2 羧基还原酶催化 2-羟基苯乙酮还原酶学性质的比较

Table 2 Comparison of characteristics of carbonyl reductases towards 2-hydroxyacetophenone reduction

Enzymes	Expression systems	Specific enzyme activities (U/ $\mu$ mol)	pH (relative enzyme activities > 75%)	Temperature (relative enzyme activities > 90%)	References
his <sub>6</sub> -SCR2	<i>E. coli</i> BL21(DE3)	2 318.22 $\pm$ 203.11	4.0–6.0	30–35 °C	This work
strep-SCR2	<i>E. coli</i> BL21(DE3)	2 539.98 $\pm$ 228.31	4.0–7.0	30–40 °C	This work
MBP-SCR2	<i>E. coli</i> BL21(DE3)	2 760.75 $\pm$ 89.14	5.0–6.0	30–45 °C	This work
SCR2	–	2 632.35 $\pm$ 106.44	4.0–6.0	30–35 °C	This work
his <sub>6</sub> -YacR II	<i>E. coli</i> BL21(DE3)	290.45	5.0–6.0	35–55 °C	[25]
CMCR	<i>Candida magnolia</i>	106.50	–	–	[26,51]
SSCR	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	10.50	5.5–6.5	–	[26–27]
Ymr226c	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	26.84	–	–	[26]

Notes: reaction velocity was determined at pH 6.0, 30 °C, 5 mmol/L 2-hydroxyacetophenone and 0.5 mmol/L NADPH.

而在蛋白结晶等情况下,除了需要维持酶的天然活性结构,还要考虑酶结晶的可行性。在蛋白结晶过程中,由于亲和标签可能影响蛋白柔性进而影响蛋白结晶,因此通常考虑将其切除<sup>[28-29]</sup>。重组蛋白的标签大小直接影响酶切后蛋白的回收率。本研究通过计算获得重组蛋白 MBP-SCR2 的回收率只有约 20%,而 his<sub>6</sub>-SCR2 和 strep-SCR2 的回收率接近 80%。因此,在这种情况下,偏向于选择小分子亲和标签进行研究。

### 2.3 重组蛋白 SCR2 的最适反应温度和最适 pH 的分析

温度不仅影响酶分子和底物分子在溶液中的运动速率,而且影响酶分子中氨基酸侧链的解离状态,从而影响酶分子催化反应的速率<sup>[30]</sup>,因此有必要确定带有不同类型亲和标签的重组蛋白 SCR2 酶分子催化反应的最适温度,为重组蛋白的后续应用做铺垫。如图 2A 所示,带有不同亲和标签的重组蛋白 SCR2 以及无融合标签 SCR2 的最适反应温度均为 35 °C,因此,His 标签、Strep 标签以及 MBP 标签均不影响 SCR2 酶分子的最适

反应温度。尽管如此,带有不同亲和标签的重组蛋白 SCR2 能进行高效催化反应的温度范围不同(表 2)。其中,MBP-SCR2 在 30–45 °C 均具有较高的比酶活力,而带有小分子类亲和标签的重组蛋白 SCR2 和无融合标签 SCR2,在温度高于 35 °C 时,酶催化反应的速率显著下降。在 40 °C 的反应条件下,MBP-SCR2 的相对酶活力比无融合标签 SCR2 高约 9.8%。这可能与 MBP 融合标签具有稳定 SCR2 结构的潜力有关<sup>[31]</sup>。

缓冲液 pH 影响酶分子表面的带电状态,包括蛋白活性口袋的氨基酸的带电状态,进而影响酶分子催化反应的速率<sup>[32]</sup>,因此有必要研究带有不同类型亲和标签的重组蛋白 SCR2 催化反应的最适 pH,为其后续应用作参考。如图 2B 所示, his<sub>6</sub>-SCR2、strep-SCR2、MBP-SCR2 和 SCR2 催化 2-羟基苯乙酮的最适 pH 均为 6.0。如表 2 所述,进一步比较重组蛋白 SCR2 的相对酶活力随着 pH 的改变发现,带有小分子类亲和标签的重组蛋白 SCR2 和无融合标签 SCR2 在偏酸性条件下 (pH 4.0–6.0) 的相对酶活力较高,在 pH 5.0,其相对

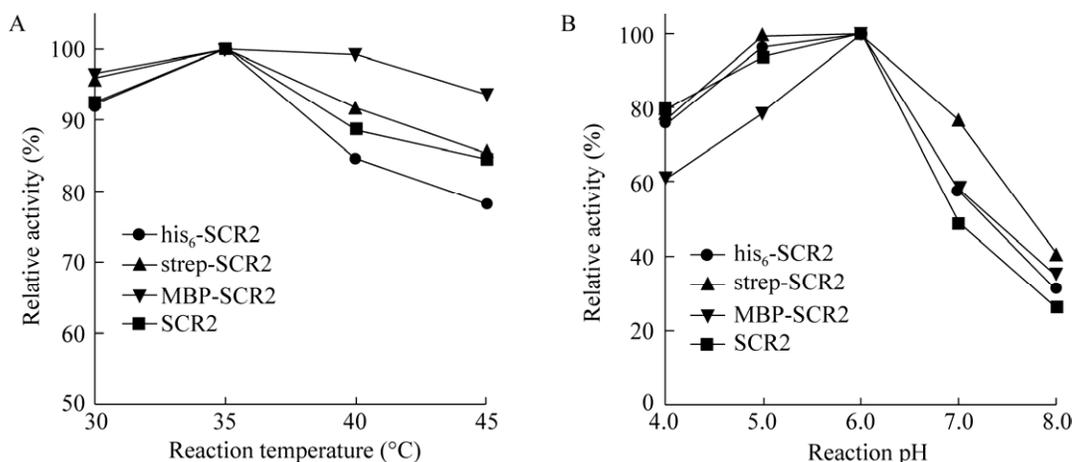


图 2 带有不同亲和标签的重组蛋白 SCR2 的最适温度 (A) 和最适 pH 值 (B)

Fig. 2 Determination of optimal reaction temperature (A) and optimal pH (B) for recombinant SCR2 enzymes with different affinity tags. The enzyme activities of SCR2 enzymes were measured at pH 6.0 during determination of optimal reaction temperature, while the enzyme activities of SCR2 enzymes were measured at 30 °C during determination of optimal pH.

酶活力维持在 95.0%以上。而带有大分子标签的重组蛋白 MBP-SCR2, 在 pH 5.0, 其相对酶活力约为 78.4%。因此, MBP-SCR2 相对具有较强的 pH 依赖性, 偏离最适 pH 6.0, 其酶活力显著下降。

#### 2.4 重组蛋白 SCR2 的温度和 pH 稳定性

不同于化学催化法, 在酶催化反应过程中, 由于酶本身不会被消耗, 因此, 若酶的稳定性较高, 可以持续进行催化反应。温度和 pH 对酶的稳定性影响较大, 因此考察 SCR2 酶分子在不同的反应温度和 pH 下的稳定性, 从而为后续选取合适的温度和 pH 进行催化反应, 具有非常重要的意义<sup>[33]</sup>。如图 3A 所示, 在不同温度下保温 1 h 后, 带有不同亲和标签的重组蛋白 SCR2 和无融合标签 SCR2 的酶活力相对于各自保温前的酶活力的比值几乎一致。当温度小于或等于 30 °C 时, 重组蛋白 SCR2 和无融合标签 SCR2 在该温度下保温 1 h, 酶活力损失均小于 20.0%。尽管带有不同亲和标签的重组蛋白 SCR2 和无融合标签 SCR2 在不同温度下保温 1 h 后的相对酶活力的变化趋势一致, 但它们在 50 °C 保温不同时间后的相对酶活力有一定的差异。如图 3B 所示, 可以观测到 MBP-SCR2 在 50 °C 的半衰期约为 11.9 min, 比 strep-SCR2 (约 8.0 min)、his<sub>6</sub>-SCR2 (约 9.0 min) 和无融合标签 SCR2 (约 9.4 min) 长 26.6%–48.8%。因此, MBP-SCR2 的热稳定性相对较高, 在工业应用中有一定的优势。

此外, 重组蛋白 SCR2 在不同的 pH 缓冲液中, 其稳定性也具有差异。如图 3C 所示, 重组蛋白 his<sub>6</sub>-SCR2、MBP-SCR2 和无融合标签 SCR2 在 pH 5.0 保温 13 h 后, 相对酶活力为 100%, 而 strep-SCR2 在 pH 5.0 保温 13 h 后, 相对酶活力仅剩 79.3%。因此可知, 重组蛋白 his<sub>6</sub>-SCR2、MBP-SCR2 以及无融合标签 SCR2 在 pH 5.0 的稳定性显著高于 strep-SCR2。因此推出, His 标签和 MBP 标签并不影响 SCR2 的 pH 稳定性, 而 Strep 标签显著降低了 SCR2 在 pH 5.0 的稳定性。然而

在其他 pH 条件下, 各个重组蛋白的 pH 稳定性几乎保持一致。尽管 MBP-SCR2 的 pH 稳定性与无融合标签 SCR2 和带有小分子类亲和标签的重组蛋白 SCR2 保持一致, 但其在 pH 6.0 处的剩余酶活力相对较高, 是无融合标签 SCR2 的 1.25 倍 (图 3D)。该优势可能和 MBP-SCR2 具有较强的 pH 6.0 依赖性有关 (图 2B)。

#### 2.5 重组蛋白 SCR2 的酶活动力学分析揭示其在低温下的存储稳定性

酶活动力学分析反映了不同亲和标签对重组蛋白 SCR2 的催化常数以及米氏常数的影响。根据酶活动力学的测定可知 (表 3), 3 种重组蛋白 his<sub>6</sub>-SCR2、strep-SCR2 和 MBP-SCR2 的催化常数和无融合标签 SCR2 的催化常数保持一致, 因此可知 His 标签、Strep 标签以及 MBP 标签不影响 SCR2 酶分子的催化常数。然而, 不同的重组蛋白 SCR2 的米氏常数有所差异, 因此它们的  $k_{cat}/K_m$  也有差异, 其中 MBP-SCR2 的  $k_{cat}/K_m$  约为无融合标签 SCR2 的 1.5 倍。

对于商业化工业用酶, 其存储稳定性和反应稳定性一样, 也非常重要<sup>[35]</sup>。因此, 我们研究了重组蛋白 SCR2 的存储稳定性 (表 3)。在 -80 °C 存储 60 d 后, his<sub>6</sub>-SCR2、strep-SCR2、MBP-SCR2 和 SCR2 的酶活动力学参数均有所下降。其中 his<sub>6</sub>-SCR2、strep-SCR2 和 SCR2 的  $k_{cat}$  比初始值降低了 27.4%–42.2%, 而 MBP-SCR2 仅下降了 15.6%。在 -80 °C 存储 60 d 后 MBP-SCR2 的酶活动力学参数  $k_{cat}$  比无融合标签 SCR2 的  $k_{cat}$  高 24.9%。此外, 酶活动力学数据表明新鲜酶和冷冻储存 60 d 后的酶的  $K_m$  有明显的差异, 且重组蛋白 SCR2 对底物的亲和力都显著增强。由于重组蛋白 SCR2 是液氮速冻后置于 -80 °C 存储, 因此, 理论上最有可能和酶分子发生相互作用而改变酶性能的是酶的结合水分子<sup>[36]</sup>。根据报道, 水分子可以通过和酶分子的底物结合口袋中的氨基酸或者底物形成氢键, 进而影响酶分子的催化过

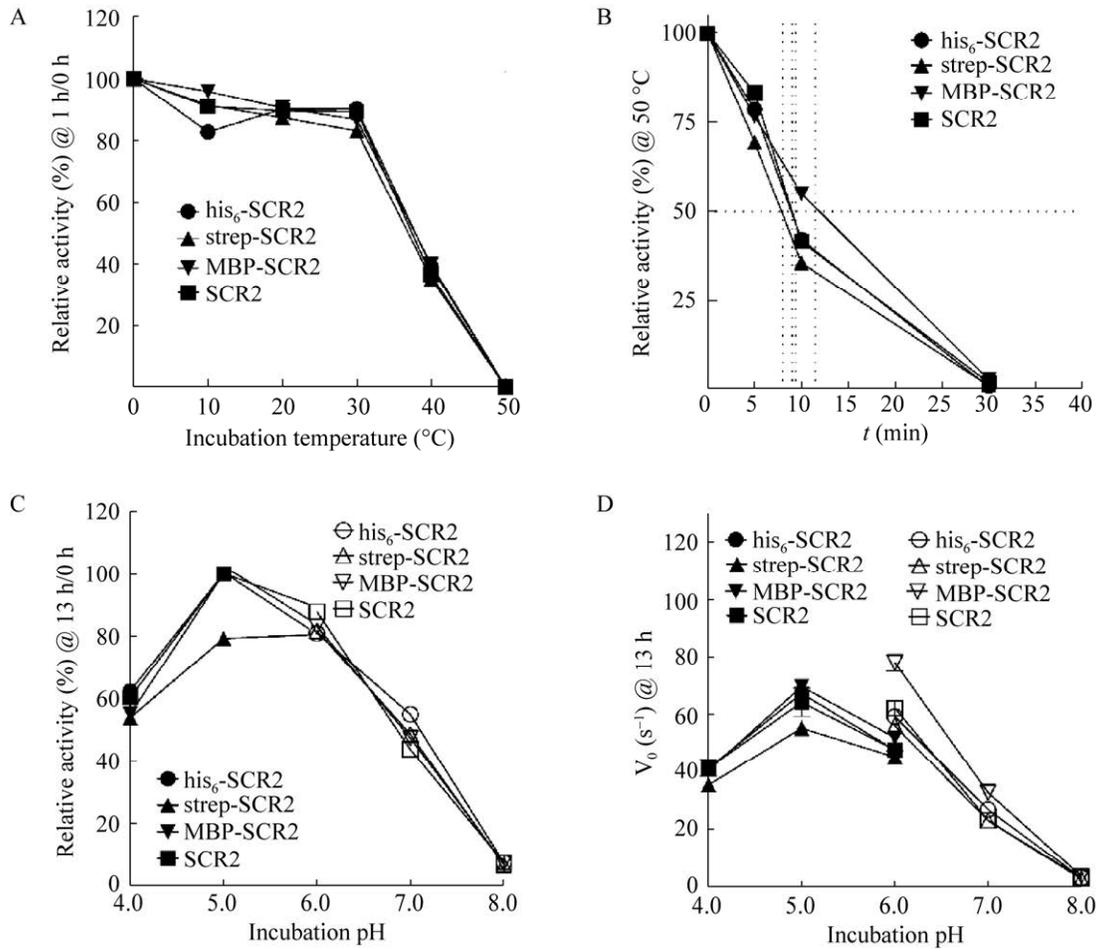


图 3 带不同亲和标签的重组蛋白 SCR2 的温度和 pH 稳定性

Fig. 3 Determination of temperature and pH tolerance of SCR2 with different affinity tags using tag-free SCR2 as their control. (A) The relative activities of SCR2 enzymes measured at 30 °C after incubating at different temperatures for 1 h. Their remaining activities were measured at pH 6.0, 30 °C and 5 mmol/L 2-hydroxyacetophenone. (B) The relative activities of SCR2 enzymes measured at 50 °C after incubating for different time. Their remaining activities were measured at pH 6.0, 50 °C and 5 mmol/L 2-hydroxyacetophenone. (C) The relative activities of SCR2 enzymes measured at 30 °C after incubating at different pHs for 13 h. (D) Initial velocities of SCR2 enzymes after incubating at different pHs for 13 h. Their remaining activities were measured at pH 6.0, 30 °C and 10 mmol/L 2-hydroxyacetophenone.

表 3 羧基还原酶催化 2-羟基苯乙酮还原的动力学分析

Table 3 Kinetics of carbonyl reductases towards 2-hydroxyacetophenone reduction

Enzymes	Fresh			Stored in -80 °C for 60 d			References
	$k_{cat}$ (s <sup>-1</sup> )	$K_m$ (mmol/L)	$k_{cat}/K_m$ (L/(mmol·s))	$k_{cat}$ (s <sup>-1</sup> )	$K_m$ (mmol/L)	$k_{cat}/K_m$ (L/(mmol·s))	
his <sub>6</sub> -SCR2	103.20±4.67	10.20±1.24	10.12	74.90±3.07	5.85±0.61	12.80	This work
strep-SCR2	101.30±2.62	5.13±0.26	19.75	58.47±0.91	3.26±0.16	17.93	This work
MBP-SCR2	100.20±7.22	5.80±1.09	17.28	84.54±3.77	3.06±0.42	27.62	This work
SCR2	101.30±4.26	8.75±0.86	11.58	67.67±1.76	3.52±0.27	19.22	This work
Polyol dehydrogenase	0.50	0.80	0.63	—	—	—	[34]
2,3-butanediol dehydrogenase	1.30	1.0	1.30	—	—	—	[34]

Notes: reaction velocity was determined at pH 6.0, 30 °C and 0.5 mmol/L NADPH.

程<sup>[37]</sup>。液态水分子和固态水分子的物理化学特性有较大差异<sup>[38]</sup>。因此,在-80 °C 存储过程中固态结合水分子和底物结合口袋的长期相互作用可能改变了底物结合口袋中的物理化学环境,间接影响了后期底物进入酶分子活性口袋后的结合能力。根据表 3 数据可知,MBP-SCR2 的存储稳定性优于无融合标签 SCR2,具有较好的商业化价值。

## 2.6 结构生物信息学分析重组蛋白 SCR2 的酶活力稳定性差异的原因

MBP 标签融合蛋白 MBP-SCR2 相比于 his<sub>6</sub>-SCR2、strep-SCR2 和 SCR2 表现出较高的酶活力稳定性。为了分析 MBP-SCR2 具有较高酶活力稳定性的原因,利用 Robetta 同源建模 his<sub>6</sub>-SCR2、strep-SCR2、MBP-SCR2 以及 SCR2,并进行结构分析比较。Robetta 同源建模获得 SCR2、his<sub>6</sub>-SCR2 和 strep-SCR2 结构模型(图 4A),且各模型比对的 RMSD 的值均小于 0.3(图 4B)。各个重组蛋白 SCR2 的结构模型均保留典型的 Rossmann 折叠域,为酶催化提供必要的活性口袋结构(图 4A)。由于 MBP-SCR2 由 MBP 蛋白和 SCR2 蛋白两个结构域组成,因此较难通过同源建模获得合理的结构模型。因此,图 4C 展示了 MBP-SCR2 的概念图,表明该融合蛋白由 MBP 蛋白和 SCR2 蛋白两个结构域组成,两个结构域之间由连接子连接。尽管通过连接子连接在一起的融合蛋白的结构可能会有变化,但 MBP 标签对融合蛋白中另一个蛋白结构的影响通常较小<sup>[39]</sup>。比较 SCR2 和 MBP-SCR2 的结构(图 4A 和图 4C)可知,两者 N 端柔性环区域的灵活性有显著差异。SCR2 N 端的 31 个氨基酸(M1-F31)游离在 Rossmann 折叠域之外,呈无规则卷曲,剪剪性强,而 MBP-SCR2 的 N 端除了一段无规则卷曲外,在无规则卷曲的另一端连接了结构稳定的  $\alpha$  螺旋,因此在一定程度上对于 SCR2 蛋白的 N 端具有稳定作用。

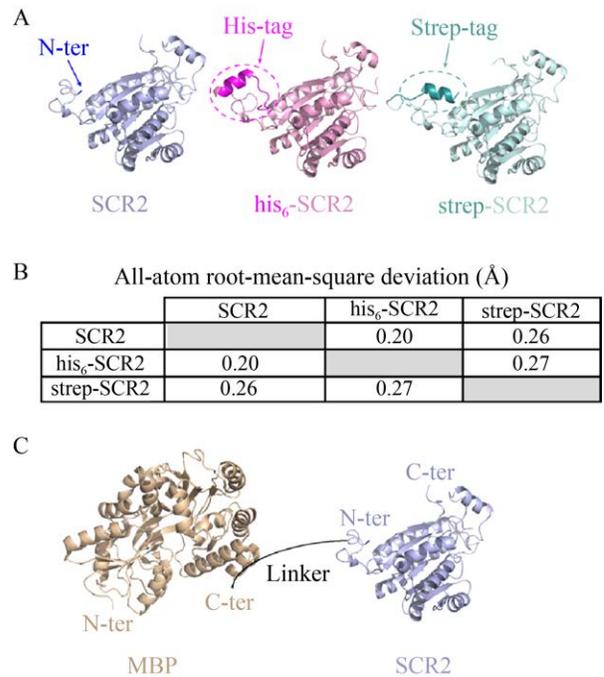


图 4 带不同亲和标签的重组蛋白 SCR2 的三级结构的比较

Fig. 4 Tertiary structure comparison of SCR2 with different affinity tags using crystal structure of SCR2 (PDB ID 3CTM) as their searching model performed on Robetta server<sup>[22]</sup>. (A) Homology modeling of SCR2 with different affinity tags. (B) All-atom root-mean-square deviations for superposed structures from homology modeling of SCR2 with different affinity tags calculated by PyMOL. (C) Concept map of fusion protein of MBP-SCR2 presented with tertiary structures of MBP and SCR2 connected by a linker.

## 2.7 重组蛋白 SCR2 的二级结构及其解折叠温度的比较

根据 2.6 中结构信息学的分析,推测 MBP 标签可能具有稳定 SCR2 蛋白结构的作用,因此利用圆二色谱分析蛋白的二级结构及其解折叠温度。图 5 利用 Espright 3.0<sup>[23]</sup>比对了带有不同亲和标签的 SCR2 蛋白和 MBP 蛋白序列,其中 MBP 的二级结构信息来自其晶体结构(PDB ID: 5BJZ)<sup>[40]</sup>,故可以作为圆二色谱分析的参考。根据图 5 计算获得 MBP 结构中  $\alpha$  螺旋的比例约为 0.42,  $\beta$  折叠的比例约为 0.15,该数值和圆二色谱

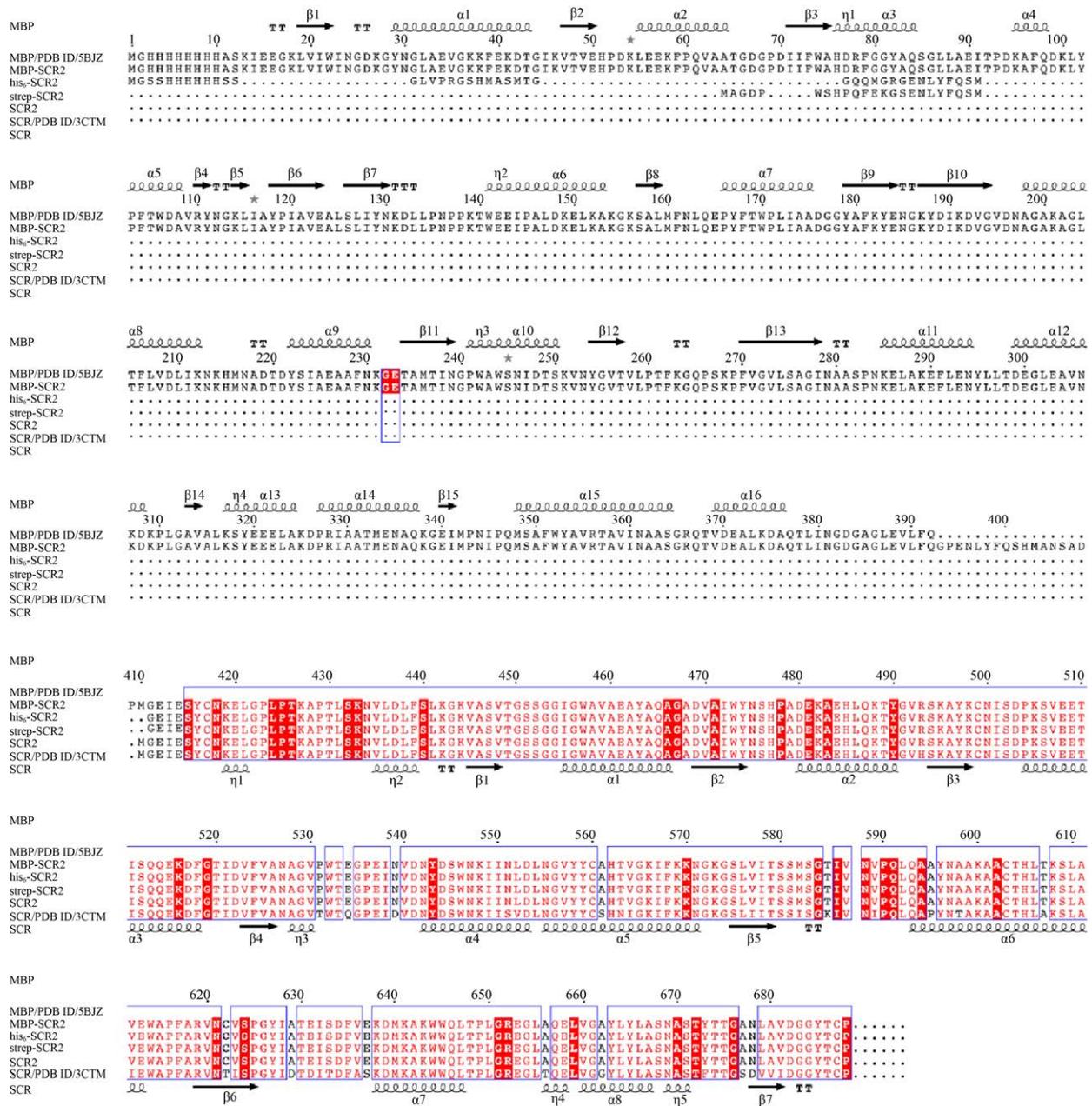


图5 重组蛋白 SCR2 的序列比对

Fig. 5 Sequence alignment of SCR2 enzymes with different affinity tags at its N-terminus with maltose binding protein (MBP).

测定的比值 (图 6A) 几乎保持一致。此外,如图 6B 所示, His 和 Strep 标签的 SCR2 的重组蛋白的二级结构与无融合标签 SCR2 的二级结构几乎一致,且带有小分子亲和标签的蛋白 his<sub>6</sub>-SCR2 和 strep-SCR2 与无融合标签 SCR2 的酶活数据相一

致 (表 2)。综上所述,推测圆二色谱测定的数值可以从一定程度上反映 SCR2 的二级结构的状态和重组蛋白 SCR2 酶活力之间的关系。而带有 MBP 标签的 SCR2 重组蛋白的二级结构分析需要同时结合无融合标签 SCR2 蛋白和 MBP 蛋白。如

图 6B 所示,计算在 193 nm、208 nm 以及 222 nm<sup>[41]</sup> 处的  $\alpha$  螺旋, 以及 195 nm 和 218 nm 处的  $\beta$  折叠的平均信号强度可知, 重组蛋白 MBP-SCR2 在 208 nm 处  $\alpha$  螺旋信号强度比 MBP 蛋白和无融合标签 SCR2 的  $\alpha$  螺旋信号强度之和低 6.56%, 而其他

波长下的信号强度几乎一致 (表 4)。研究人员报道, 每种蛋白都有自己的进化规律, 二级结构中  $\alpha$  螺旋和  $\beta$  折叠的比例与其结构稳定性有特殊的关系<sup>[42]</sup>。因此,  $\alpha$  螺旋比例的微小变化可能和 MBP-SCR2 表现出的酶活力和稳定性差异相关。

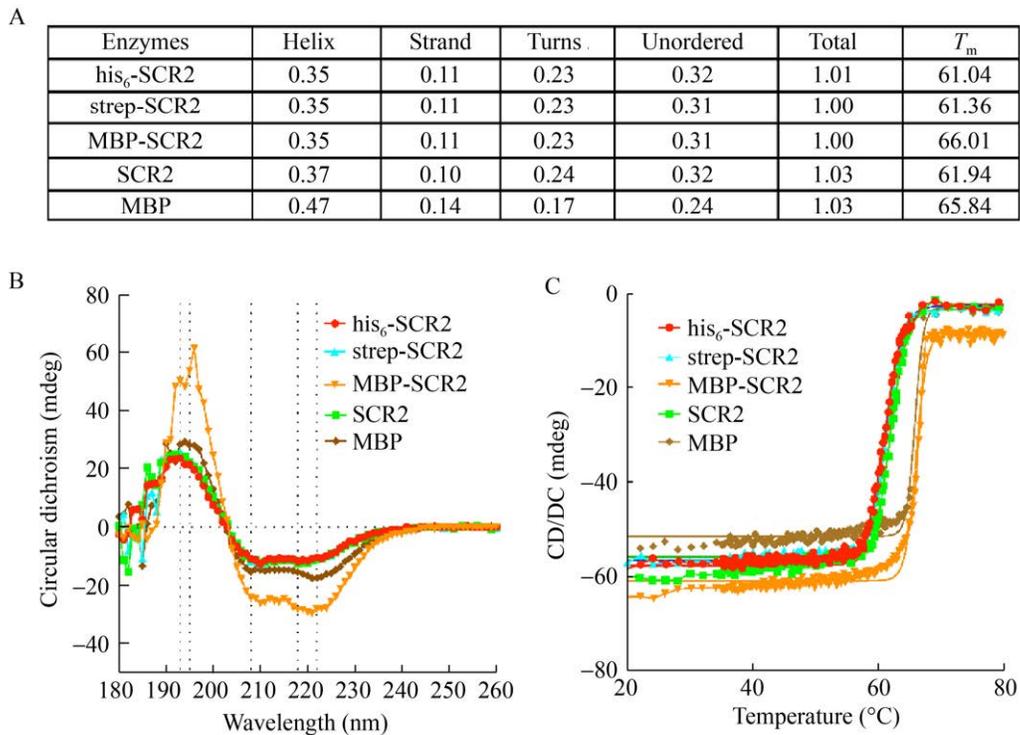


图 6 重组蛋白 SCR2 解折叠温度和二级结构的分析

Fig. 6 Analyses of melting temperatures and secondary structures of recombinant SCR2 enzymes and maltose binding protein (MBP). (A) Composition of secondary structures of SCR enzymes and MBP analyzed by SELCON3<sup>[24]</sup> with data from circular dichroism and their relative  $T_m$  values. (B) Analyses of protein circular dichroism for SCR2 enzymes and MBP. (C) Melting temperature analyses of SCR2 enzymes and MBP.

表 4 SCR2 重组蛋白在特定波长下的圆二色谱数据的分析

Table 4 Analysis of the circular dichroism of recombinant SCR2 enzymes at certain wavelengths

Wavelength (nm)	Circular dichroism (mdeg)				
	SCR2	MBP	SCR2+MBP	MBP-SCR2	(MBP-SCR2)-(SCR2+MBP)
$\alpha$ -helix					
222	-11.753 9	-17.700 65	-29.454 55	-29.425 95	0.028 6
208	-11.548 9	-14.974 95	-26.523 85	-24.789 95	1.733 9
193	25.289 85	28.250 325	53.540 175	53.744 5	0.204 325
$\beta$ -sheet					
218	-12.362 3	-15.688 925	-28.051 225	-28.357 2	-0.305 975
195	23.953 95	30.339 05	54.293	54.174 95	-0.118 05

重组蛋白 SCR2 的解折叠温度分析揭示了重组型 MBP-SCR2 的解折叠温度比带有小分子类亲和标签的重组蛋白 SCR2 高约 5 °C (图 6C), 进而从结构上证明其具有较高的温度稳定性。这一数据从一定程度上解释了 MBP-SCR2 具有较高的存储稳定性的原因。蛋白在存储过程中, 其结构可能发生一定程度的解折叠变化, 而结构越稳定, 其发生解折叠变化的可能性相对较小。因此, 在低温下保存 60 d 后, MBP-SCR2 仍保留较高的酶活性。根据 MBP 具有较高的解折叠温度可知, MBP 在稳定 MBP-SCR2 结构中起了关键作用。

### 3 讨论

目前已经报道的羰基还原酶对于 2-羟基苯乙酮的催化活力普遍较低<sup>[25-27,34,43]</sup>。前期, 新型羰基还原酶的挖掘<sup>[44]</sup>以及在现有的羰基还原酶基础上的定点突变<sup>[45-46]</sup>, 为提高羰基还原酶催化 2-羟基苯乙酮的主要手段。标签作为重组蛋白的一部分, 可能对蛋白的折叠和空间结构有一定的影响。His 标签、Strep 标签和 MBP 标签分子量大小和氨基酸序列均有显著差异, 因此它们的物理和化学性质不同。本研究所用的 His 标签由 6 个组氨酸组成 (His<sub>6</sub>)。His<sub>6</sub> 仅 0.8 kDa, 其分子量较小, 不易影响蛋白质的结构<sup>[47]</sup>。Strep 标签又称生物素结合类标签, 通常包含 8 个氨基酸 (WSHPQFEK), 可以和链霉亲和素琼脂糖凝胶 (Strep-Tactin) 结合。Strep 标签仅 1.1 kDa, 其分子量小且和 Strep-Tactin 亲和效率高, 因此通过 Strep 标签一步法纯化后, 蛋白纯度通常较高<sup>[48]</sup>。MBP 是一种麦芽糖结合蛋白, 通常用来增加融合蛋白的表达量或者溶解度<sup>[49]</sup>。然而 MBP 作为亲和标签, 和直链淀粉树脂的亲和力一般<sup>[50]</sup>, 因此通常在 MBP 的 N 端再设计 8 个组氨酸标签, 利用组氨酸标签的特性纯化蛋白。本研究中重组蛋白 MBP-SCR2 的纯化利用了上述方法。MBP 标签约 45 kDa, 具有独立的结构域, 因此可能会影响融合蛋白的功

能<sup>[39]</sup>。本研究根据以上 3 种标签的特点, 分别构建带有这几种亲和标签的重组蛋白, 从而观察不同亲和标签对 SCR2 的功能造成的影响。

研究过程中证实了重组蛋白 SCR2 和无融合标签 SCR2 的酶学性质有一定的差异 (表 2)。酶活力数据表明小分子类亲和标签 His 和 Strep 对 SCR2 蛋白的酶活力影响较小, 而 MBP 亲和标签在一定程度上具有提高蛋白稳定性的作用。MBP-SCR2 在 pH 6.0、30 °C 条件下保温 13 h 后的剩余酶活力是无融合标签 SCR2 的 1.25 倍, 是重组蛋白 his<sub>6</sub>-SCR2 和 strep-SCR2 的 1.32–1.40 倍, 且 MBP-SCR2 在 50 °C 的半衰期比 strep-SCR2、his<sub>6</sub>-SCR2 和无融合标签 SCR2 长 26.6%–48.8%。结合结构信息学, 圆二色谱和解折叠温度分析, 从一定程度上解释了 MBP-SCR2 具有较高热稳定性的原因。MBP 中 C 末端的  $\alpha$  螺旋可能具有稳定 SCR2 的 N 端无规则卷曲的作用, 从而提高了 SCR2 的稳定性。这一解释和前期 Zhang 等阐述的 SCR 羰基还原酶的 N 端和蛋白结构稳定性及其酶活力相关的结论相吻合<sup>[43]</sup>。

研究中发现带有小分子类亲和标签的重组蛋白 SCR2 和无融合标签的 SCR2 的 pH 依赖性相对较小。在 2 个 pH 单位 (pH 4.0–6.0) 的范围内变化时, 这些重组蛋白的相对酶活力均高于 75%。而解脂耶氏酵母 *Yarrowia lipolytica* 和酿酒酵母 *Saccharomyces cerevisiae* 来源的羰基还原酶仅在 1 个 pH 单位的范围内变化时, 其相对酶活力高于 75%<sup>[25,27]</sup>。因此, 本研究构建的重组蛋白 SCR2 的 pH 耐受范围相对较宽。此外, 本研究中报道的 SCR2 催化还原 2-羟基苯乙酮的酶活力, 是目前所报道的其他来源的羰基还原酶如解脂耶氏酵母 *Yarrowia lipolytica*<sup>[25]</sup>、木兰假丝酵母 *Candida magnolia*<sup>[26,51]</sup> 和酿酒酵母 *Saccharomyces cerevisiae*<sup>[27]</sup> 的 10–100 倍 (表 2)。进一步的酶动力学分析证明, SCR2 催化 2-羟基苯乙酮的酶动力学催化常数约为 101.3 s<sup>-1</sup>, 为目前所报道

的最高催化常数, 如比多元醇脱氢酶和 2,3-丁二醇脱氢酶<sup>[34]</sup>分别高约 200 倍和 100 倍 (表 3)。因此本研究报告的 SCR2 具有较高的研究价值。

本研究通过构建带有不同亲和标签的 3 种重组蛋白 SCR2, 在大肠杆菌中实现异源表达, 纯化并研究其酶学性质。研究表明, 不同亲和标签对重组蛋白 SCR2 的酶学性质具有一定的影响。其中, 重组蛋白 MBP-SCR2 具有高效稳定催化 2-羟基苯乙酮的特点, 具有较强的 pH 依赖性、较宽泛的反应温度范围以及较高的存储稳定性。该研究不仅为羰基还原酶家族增添了一种 2-羟基苯乙酮的稳定高效催化剂 MBP-SCR2, 同时证明了羰基还原酶的功能和性质在一定程度上可以通过亲和标签进行调节。因此, 在本研究的基础上, 后续可以通过比较亲和标签对多种酶的表达和催化性质的影响, 从而总结亲和标签对酶的表达和催化性质等影响的规律, 进而指导其他种类的酶的亲和标签的选择。

## REFERENCES

- [1] Forrest GF, Gonzalez B. Carbonyl reductase. *Chem Biol Interact*, 2000, 129(1/2): 21-40.
- [2] Gupta A, Tschentscher A, Bobkova M. 2-butanol production method: CA, 2565675. 2005-04-29.
- [3] Desai AA. Sitagliptin manufacture: a compelling tale of green chemistry, process intensification, and industrial asymmetric catalysis. *Angew Chem Int Ed*, 2011, 50(9): 1974-1976.
- [4] Qiu S, Cheng F, Jin LJ, et al. Co-evolution of activity and thermostability of an aldo-keto reductase *KmAKR* for asymmetric synthesis of statin precursor dichiral diols. *Bioorg Chem*, 2020, 103: 104228.
- [5] Li M, Zhang ZJ, Kong XD, et al. Engineering *Streptomyces coelicolor* carbonyl reductase for efficient atorvastatin precursor synthesis. *Appl Environ Microbiol*, 2017, 83(12): e00603-17.
- [6] Link S, Engelmann K, Meierhoff K, et al. The atypical short-chain dehydrogenases HCF173 and HCF244 are jointly involved in translational initiation of the *psbA* mRNA of *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 2012, 160(4): 2202-2218.
- [7] Liu JS, Kuan YC, Tsou Y, et al. Structure-guided design of *Serratia marcescens* short-chain dehydrogenase/reductase for stereoselective synthesis of (*R*)-phenylephrine. *Sci Rep*, 2018, 8(1): 2316.
- [8] Moon HJ, Tiwari MK, Singh R, et al. Molecular determinants of the cofactor specificity of ribitol dehydrogenase, a short-chain dehydrogenase/reductase. *Appl Environ Microbiol*, 2012, 78(9): 3079-3086.
- [9] Zhao XY, Li GS, Liang SF. Several affinity tags commonly used in chromatographic purification. *J Anal Methods Chem*, 2013, 2013: 581093.
- [10] Majorek KA, Kuhn ML, Chruszcz M, et al. Double trouble-buffer selection and His-tag presence may be responsible for nonreproducibility of biomedical experiments. *Protein Sci*, 2014, 23(10): 1359-1368.
- [11] Panek A, Pietrow O, Filipkowski P, et al. Effects of the polyhistidine tag on kinetics and other properties of trehalose synthase from *Deinococcus geothermalis*. *Acta Biochim Pol*, 2013, 60(2): 163-166.
- [12] Bräuer M, Zich MT, Önder K, et al. The influence of commonly used tags on structural propensities and internal dynamics of peptides. *Monatsh Chem*, 2019, 150(5): 913-925.
- [13] Honda K, Ono T, Okano K, et al. Expression of engineered carbonyl reductase from *Ogataea minuta* in *Rhodococcus opacus* and its application to whole-cell bioconversion in anhydrous solvents. *J Biosci Bioeng*, 2019, 127(2): 145-149.
- [14] Liu ZQ, Wu L, Zheng L, et al. Biosynthesis of tert-butyl (3*R*,5*S*)-6-chloro-3,5-dihydroxyhexanoate by carbonyl reductase from *Rhodospiridium toruloides* in mono and biphasic media. *Bioresour Technol*, 2018, 249: 161-167.
- [15] Jörnvall H, Persson B, Krook M, et al. Short-chain dehydrogenases/reductases (SDR). *Biochemistry*, 1995, 34(18): 6003-6013.
- [16] Oppermann U, Filling C, Hult M, et al. Short-chain dehydrogenases/reductases (SDR): the 2002 update. *Chem Biol Interact*, 2003, 143-144: 247-253.
- [17] Nie Y, Xiao R, Xu Y, et al. Novel anti-prelog stereospecific carbonyl reductases from *Candida*

- parapsilosis* for asymmetric reduction of prochiral ketones. *Org Biomol Chem*, 2011, 9: 4070-4078.
- [18] Li YH, Zhang RZ, Xu Y, et al. Efficient bioreduction of 2-hydroxyacetophenone to (*S*)-1-phenyl-1,2-ethanediol through homologous expression of (*S*)-carbonyl reductase II in *Candida parapsilosis* CCTCC M203011. *Process Biochem*, 2016, 51(9): 1175-1182.
- [19] Ritchie DW. Parametric protein shape recognition[D]. Aberdeen: University of Aberdeen, 1998.
- [20] Zhang R, Xu Y, Sun Y, et al. Crystallization and preliminary X-ray crystallographic analysis of a carbonyl reductase from *Candida parapsilosis*. *Acta Crystallogr Sect F*, 2008, 64(4): 252-254.
- [21] Shih YP, Wu HC, Hu SM, et al. Self-cleavage of fusion protein *in vivo* using TEV protease to yield native protein. *Protein Sci*, 2005, 14(4): 936-941.
- [22] Kim DE, Chivian D, Baker D. Protein structure prediction and analysis using the Robetta server. *Nucleic Acids Res*, 2004, 32(S2): W526-W531.
- [23] Gouet P, Robert X, Courcelle E. ESPript/ENDscript: extracting and rendering sequence and 3D information from atomic structures of proteins. *Nucleic Acids Res*, 2003, 31(13): 3320-3323.
- [24] Sreerama N, Woody RW. Estimation of protein secondary structure from circular dichroism spectra: comparison of CONTIN, SELCON, and CDSSTR methods with an expanded reference set. *Anal Biochem*, 2000, 287(2): 252-260.
- [25] 张红蕾, 裴朝红, 张超, 等. 解脂酵母羧基还原酶基因的克隆表达及酶学性质. *河北大学学报(自然科学版)*, 2018, 38(2): 168-176.  
Zhang HL, Pei CH, Zhang C, et al. Over-expression and characterization of a carbonyl reductase gene from *Yarrowia lipolytica*. *J Hebei Univ (Nat Sci Ed)*, 2018, 38(2): 168-176 (in Chinese).
- [26] Chen X, Mei T, Cui YF, et al. Highly efficient synthesis of optically pure (*S*)-1-phenyl-1,2-ethanediol by a self-sufficient whole cell biocatalyst. *Chemistry Open*, 2015, 4(4): 483-488.
- [27] Yamaguchi H, Nakajima N, Ishihara K. Purification and characterization of two  $\alpha$ -keto ester reductases from *Streptomyces thermocyanoviolaceus* IFO 14271. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2002, 66(3): 588-597.
- [28] Niedzialkowska E, Gasiorowska O, Handing KB, et al. Protein purification and crystallization artifacts: the tale usually not told. *Protein Sci*, 2016, 25(3): 720-733.
- [29] Bucher MH, Evdokimov AG, Waugh DS. Differential effects of short affinity tags on the crystallization of *Pyrococcus furiosus* maltodextrin-binding protein. *Acta Crystallogr Sect D*, 2002, D58(3): 392-397.
- [30] Aledo JC, Jiménez-Riveres S, Tena M. The effect of temperature on the enzyme-catalyzed reaction: insights from thermodynamics. *J Chem Educ*, 2010, 87(3): 296-298.
- [31] Kapust RB, Waugh DS. *Escherichia coli* maltose-binding protein is uncommonly effective at promoting the solubility of polypeptides to which it is fused. *Protein Sci*, 1999, 8(8): 1668-1674.
- [32] Bombarda E, Ullmann GM. pH-dependent  $pK_a$  values in proteins—a theoretical analysis of protonation energies with practical consequences for enzymatic reactions. *J Phys Chem B*, 2010, 114(5): 1994-2003.
- [33] Polizzi KM, Bommarius AS, Broering JM, et al. Stability of biocatalysts. *Curr Opin Chem Biol*, 2007, 11(2): 220-225.
- [34] Cui ZM, Zhang JD, Fan XJ, et al. Highly efficient bioreduction of 2-hydroxyacetophenone to (*S*)- and (*R*)-1-phenyl-1,2-ethanediol by two substrate tolerance carbonyl reductases with cofactor regeneration. *J Biotechnol*, 2017, 243: 1-9.
- [35] Ruiz SP, Miyoshi JH, Gimenez GG, et al. Biosynthesis of industrial enzymes by free and immobilized *Alicyclobacillus* spp. in different matrices and the use of ultrafiltration in the enzymes concentration. *Química Nova*, 2018, 40(9): 1058-1064.
- [36] Li YH, Zhang RZ, Xu Y. Structure-based mechanisms: on the way to apply alcohol dehydrogenases/reductases to organic-aqueous systems. *Int J Biol Macromol*, 2021, 168: 412-427.
- [37] Lin JP, Balabin IA, Beratan DN. The nature of aqueous tunneling pathways between electron-transfer proteins. *Science*, 2005, 310(5752): 1311-1313.
- [38] Brini E, Fennell CJ, Fernandez-Serra M, et al. How Water's properties are encoded in its molecular

- structure and energies. *Chem Rev*, 2017, 117(19): 12385-12414.
- [39] Waugh DS. Crystal structures of MBP fusion proteins. *Protein Sci*, 2016, 25(3): 559-571.
- [40] Mukherjee S, Griffin DH, Horn JR, et al. Engineered synthetic antibodies as probes to quantify the energetic contributions of ligand binding to conformational changes in proteins. *J Biol Chem*, 2018, 293(8): 2815-2828.
- [41] Holzwarth G, Doty P. The ultraviolet circular dichroism of polypeptides. *J Am Chem Soc*, 1965, 87(2): 218-228.
- [42] Burra PV, Zhang Y, Godzik A, et al. Global distribution of conformational states derived from redundant models in the PDB points to non-uniqueness of the protein structure. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, 106(30): 12560.
- [43] Zhang RZ, Zhu GY, Zhang WC, et al. Crystal structure of a carbonyl reductase from *Candida parapsilosis* with anti-prelog stereospecificity. *Protein Sci*, 2008, 17(8): 1412-1423.
- [44] Sudhakara S, Chadha A. A carbonyl reductase from *Candida parapsilosis* ATCC 7330: substrate selectivity and enantiospecificity. *Org Biomol Chem*, 2017, 15(19): 4165-4171.
- [45] Nie Y, Wang SS, Xu Y, et al. Enzyme engineering based on X-ray structures and kinetic profiling of substrate libraries: alcohol dehydrogenases for stereospecific synthesis of a broad range of chiral alcohols. *ACS Catal*, 2018, 8(6): 5145-5152.
- [46] Zhang RZ, Xu Y, Xiao R. Redesigning alcohol dehydrogenases/reductases for more efficient biosynthesis of enantiopure isomers. *Biotechnol Adv*, 2015, 33(8): 1671-1684.
- [47] Carson M, Johnson DH, McDonald H, et al. His-tag impact on structure. *Acta Crystallogr Sect D*, 2007, 63(3): 295-301.
- [48] Ivanov KI, Bašić M, Varjosalo M, et al. One-step purification of twin-strep-tagged proteins and their complexes on Strep-Tactin resin cross-linked with Bis(sulfosuccinimidyl) suberate (BS3). *J Vis Exp*, 2014, (86): 51536.
- [49] Costa S, Almeida A, Castro A, et al. Fusion tags for protein solubility, purification and immunogenicity in *Escherichia coli*: the novel Fh8 system. *Front Microbiol*, 2014, 5: 63.
- [50] Routzahn KM, Waugh DS. Differential effects of supplementary affinity tags on the solubility of MBP fusion proteins. *J Struct Funct Genomics*, 2002, 2(2): 83-92.
- [51] Yasohara Y, Kizaki N, Hasegawa J, et al. Molecular cloning and overexpression of the gene encoding an NADPH-dependent carbonyl reductase from *Candida magnoliae*, involved in stereoselective reduction of ethyl 4-chloro-3-oxobutanoate. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2000, 64(7): 1430-1436.

(本文责编 郝丽芳)