

马克斯克鲁维酵母羧基还原酶基因的克隆与表达

应国清¹ 杨岳微¹ 梅建凤¹ 易喻¹ 金志华^{2*}

(1. 浙江工业大学 药学院 浙江 杭州 310014)

(2. 浙江大学宁波理工学院 生物与化学工程学院 浙江 宁波 315100)

摘要: 【目的】研究羧基还原酶基因的克隆、表达及其在不对称生物催化中的应用。【方法】对羧基还原酶氨基酸序列进行 BLAST 推导出核苷酸序列, 设计引物, 以马克斯克鲁维酵母(*Kluyveromyces marxianus*) CGMCC 2.1977 全基因组为模板, 通过 PCR 扩增目的片段, 与载体 pET-28a 连接, 转化大肠杆菌获得重组菌 BL21(DE3)-(pET28a-cMCR)和 Rosetta(DE3)-(pET28a-cMCR)。【结果】扩增的序列与已报道的 *mer* 序列有 100% 同源性, 全长 1 038 bp, 共编码 345 个氨基酸。目的蛋白在 Rosetta(DE3)-(pET28a-cMCR)得到了高效表达, 大小为 42 kD。该酶最适反应温度为 40 °C, 最适反应 pH 是 8, 热稳定性与 pH 稳定性较差。Ca²⁺对酶活具有明显的激活作用, 且浓度为 0.5 mmol/L 时效果最好。重组菌可还原 4-氯乙酰乙酸乙酯(COBE)为(S)-4-氯-3-羟基丁酸乙酯[(S)-CHBE], 光学纯度为 100%, 转化率为 81.0%。重组菌在制备度洛西汀关键中间体(S)-氮, 氮-二甲基-3-羟基-(2-噻吩)-1-丙胺[(S)-DHTP]中也得到初步应用。【结论】从菌株马克斯克鲁维酵母(*Kluyveromyces marxianus*) CGMCC 2.1977 中克隆获得了羧基还原酶基因, 在大肠杆菌中成功表达, 并可应用于不对称还原。

关键词: 羧基还原酶, 马克斯克鲁维酵母, 不对称还原

*通讯作者: Tel: 86-574-88229556; ✉: zhking@nit.zju.edu.cn

收稿日期: 2012-10-28; 接受日期: 2012-12-25

Cloning and expression of *Kluyveromyce marxianus* gene encoding carbonyl reductase in *Escherichia coli*

YING Guo-Qing¹ YANG Yue-Wei¹ MEI Jian-Feng¹ YI Yu¹ JIN Zhi-Hua^{2*}

(1. College of Pharmaceutical Science, Zhejiang University of Technology, Hangzhou, Zhejiang 310014, China)

(2. Department of Biological and Chemical Engineering, Ningbo Institute of Technology, Zhejiang University, Ningbo, Zhejiang 315100, China)

Abstract: [Objective] The gene encoding carbonyl reductase was cloned and expressed for the synthesis of the chiral drug intermediates. **[Methods]** Based on the N-terminal amino acid sequence of carbonyl reductase from GenBank, *cmcr* was cloned from *Kluyveromyce marxianus* CGMCC 2.1977 and sequenced, an expression vector, pET28a-cMCR containing the full length of *cmcr* was constructed and introduced into *Escherichia coli* BL21(DE3) and Rosetta(DE3) to express the enzyme separately. **[Results]** This gene showing 100% similarity to reported *mer* contains an open reading frame of 1 038 bp encoding 345 amino acid residues. CMCR was overexpressed in Rosetta(DE3) with a protein molecular weight of 42 kD. The optimal temperature was 40 °C and pH 8. The enzyme has low thermal and pH stability. Ca²⁺ activates the enzyme activity, especially when its concentration is 0.5 mmol/L. The asymmetric reduction of 4-chloro-3-oxobutanoate ethyl ester to (S)-4-chloro-3-hydroxyl butanoate ethyl ester (CHBE) with Rosetta(pET28a-cMCR) cells, in which *cmcr* was expressed, as a catalyst was investigated (100% e.e., 81.0% yield). The application of the cells to the asymmetric reduction of N,N-dimethyl-3-keto-3-(2-thienyl)-1-propanamine(DKTP) to (S)-N,N-dimethyl-3-hydroxy-(2-thienyl)-1-propanamine [(S)-DHTP] was also attempted. **[Conclusion]** The gene encoding carbonyl reductase was cloned and expressed successfully in *E. coli* form *Kluyveromyce marxianus* CGMCC 2.1977 and can be applied to asymmetric reduction.

Keywords: Carbonyl reductase, *Kluyveromyce marxianus*, Asymmetric reduction

羧基还原酶(EC 1.1.1.184)是一种以 NADPH 或者 NADH 为辅酶, 催化羧基的不对称还原、产生光学活性醇的短链脱氢/还原酶。光学活性醇是合成手性药物的重要中间体^[1-2], 是目前生物催化与生物转化研究的一个重要目标产物。由于羧基还原酶在催化不对称还原时具有效率高、反应条件温和、反应选择性好、污染小等优点^[3], 羧基还原酶在手性医药中间体的合成中具有重要

价值^[4]。羧基还原酶广泛分布于细菌、放线菌、酵母和霉菌等多种微生物, 但是不同微生物中的羧基还原酶在催化活性、催化选择性等方面存在较大差异, 因此在自然界中筛选催化活性高、催化选择性强的羧基还原酶, 并进行酶的高效重组表达, 已成为手性中间体不对称还原研究的一个重要内容。Richte 等^[5]从 *Neurospora crassa* 克隆并表达以 DADPH 为辅酶的羧基还原酶, 经优化

制备(S)-4-氯-3-羟基丁酸乙酯, 光学纯度达到98%, 产率可达 1.8 mmol/L。Wada 等^[6]从 *Exiguobacterium* sp. F42 克隆出一种新型的短链脱氢酶基因, 重组菌生物催化 3-氧代-3-(2-噻吩)丙酸乙酯为(S)-3-羟基-3-(2-噻吩)丙酸乙酯, 产率80%, 光学纯度>98%。Nie 等^[7]从平滑假丝酵母(*Candida parapsilosis*)克隆并表达羧基还原酶, 应用于不对称还原潜手性酮化合物。

本文筛选了一株能够催化羧基的不对称还原反应的马克斯克鲁维酵母(*Kluyveromyces marxianus*) CGMCC 2.1977, 并克隆出一个编码羧基还原酶的基因(*cmcr*), 该基因与 Kataoka 等^[8]2006 年从 *Candida macedoniensis* AKU4588 克隆出的 *mer* (GenBank 登录号: AB183149) 具有 100% 的同源性。在进行重组表达时发现, *cmcr* 在大肠杆菌 BL21(DE3) 中表达水平较低, 其原因可能与稀有密码子的存在有关; 而以大肠杆菌 Rosetta(DE3) 为表达宿主时, 可以显著提高该基因的表达水平。利用所表达的重组羧基还原酶进行两种手性药物中间体的催化, 获得了较为满意的结果。本研究不仅为手性中间体的合成提供了一种高效的催化酶, 也为真核生物的羧基还原酶基因在大肠杆菌中的高效表达提供了指导。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒: 马克斯克鲁维酵母(*Kluyveromyces marxianus*) CGMCC 2.1977 购自中国普通微生物菌种保藏中心; 大肠杆菌表达质粒 pET-28a、宿主菌 *E. coli* BL21(DE3) 和 *E. coli* DH5 α 为浙江大学宁波理工学院生物工程研究所保藏; *E. coli* Rosetta(DE3) 感受态细胞购自百泰克生物公司; pMD19-T Vector 购自 TaKaRa Biotech 公司。

1.1.2 培养基: PYD 培养基(1%酵母膏, 2%蛋白

胨, 1%葡萄糖)用于培养马克斯克鲁维酵母细胞; LB 培养基(1%胰蛋白胨, 1% NaCl, 5%酵母提取物, pH 7.0)用于培养大肠杆菌。以上培养基均在 1×10^5 Pa 灭菌 20 min。

1.1.3 工具酶及其他试剂: 酵母基因组提取试剂盒, *Taq* DNA Polymerase, Protein Marker, IPTG, X-Gal, 氨苄青霉素, 氯霉素和卡那霉素均购自上海生工公司; T4 DNA Ligase, *EcoR* I, *Bam*H I 限制性内切酶, DNA Marker 和 dNTPs 购于大连 TaKaRa 公司; 4-氯乙酰乙酸乙酯(COBE), (S)-4-氯-3-羟基丁酸乙酯[(S)-CHBE]和(R)-CHBE 购自 Sigma 公司; N,N-二甲基-3-氧基-(2-噻吩)-1-丙胺盐酸盐(DKTP), (S)-N,N-二甲基-3-羟基-(2-噻吩)-1-丙胺[(S)-DHTP]和(R)-DHTP 购自湖州恒源生物化学技术有限公司; 其余试剂均为国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 *cmcr* 的克隆: 按照酵母基因组提取试剂盒的说明书提取马克斯克鲁维酵母的全基因组, 根据已经报道的马克斯克鲁维酵母羧基还原酶基因设计引物, 在设计上下游引物时, 分别在正义链、反义链引入 *EcoR* I、*Bam*H I 酶切位点及保护碱基序列, 引物序列如下:

正义链: 5'-cggggatccatgacatttacagtgtgtac-3';

反义链: 5'-cgggaattcttaccacggtacgcgcccac-3'。

PCR 反应条件: 94 °C 4 min; 94 °C 1 min, 52 °C 40 s, 72 °C 2 min, 共 30 个循环; 72 °C 10 min。

1.2.2 克隆质粒 pMD19-cMCR 的构建: PCR 产物的纯化和连接按照 pMD19-T Vector 使用说明书进行, 连接产物转化到 *E. coli* DH5 α 感受态细胞, 蓝白斑筛选得阳性克隆, 采用 M13-F 和 M13-R 通用引物由上海生工公司完成测序。

1.2.3 表达载体 pET28a-cMCR 的构建: 对 DH5 α -(pMD19-cMCR) 菌株提取的质粒和载体

pET28a 进行 *EcoR* I 和 *Bam*H I 双酶切, 纯化回收目的片段后用 T4 DNA Ligase 进行连接(16 °C 过夜)。

1.2.4 cmcr 重组蛋白的诱导表达: 分别将重组质粒 pET28a-cMCR 利用 CaCl_2 法转化至 BL21(DE3)和 Rosetta(DE3)感受态细胞中, 得到两个重组表达菌株 BL21(pET28a-cMCR)和 Rosetta(pET28a-cMCR)。分别在仅含有 30 mg/L 卡那霉素和同时含有 30 mg/L 卡那霉素与 28 mg/L 氯霉素的两种平板上涂布这两个菌株, 过夜培养后挑取单菌落提取质粒并进行双酶切, 以筛选出含有目的载体的转化子。将转化子转接到含对应抗生素的 LB 培养基中, 37 °C 振荡培养过夜, 再以 1%的接种量接到新鲜的 LB 培养基中, 37 °C 振荡培养 3 h, 加入 IPTG 至终浓度为 0.3 mmol/L, 32 °C 继续培养 9 h。4 000 r/min 离心 15 min, 收集菌体用生理盐水淋洗 2 次, 加入原体积 1/10 的破胞液(50 mmol/L 磷酸盐缓冲液, 1 mmol/L PMSF, 300 mmol/L NaCl, 10 mmol/L 咪唑, pH 8.0)重悬菌体, 反复冻融后进行超声破胞, 离心后分别收集上清液及菌体用于 SDS-PAGE 电泳检测。

1.2.5 两种重组菌粗酶活的比较: 酶活测定参考文献[9]的方法。

1.2.6 羧基还原酶辅酶的专一性及底物特异性: 反应体系中分别选用 NADPH 和 NADH 作为辅酶以考察酶的辅酶选择性, 并测定酶对不同底物(5 $\mu\text{mol/L}$)的催化活力。

1.2.7 酶反应最适温度及温度稳定性: 反应体系不变, 选择不同温度进行反应, 以确定最适温度。然后, 分别在不同温度对酶进行孵育 1 h, 在最适温度下测定酶的催化活力, 以考察酶的温度稳定性。

1.2.8 酶反应最适 pH 及 pH 的稳定性: 反应体系不变, 在最适温度下, 改变反应体系的 pH, 测

定酶的最适 pH。然后将重组酶在不同 pH 的缓冲液中进行孵育 24 h, 在最适条件下测定酶的催化活力, 以考察酶的 pH 稳定性。

1.2.9 金属离子及浓度对酶催化活力的影响: 在反应体系中加入 0.5 mmol/L 的不同金属离子, 以最适条件下测定酶的催化活力, 以了解金属离子对酶催化活力的影响。然后考察在反应体系中添加不同浓度的 Ca^{2+} 对重组表达酶催化活力的影响。

1.2.10 重组菌全细胞催化不对称还原反应性能考察: 取诱导表达羧基还原酶的重组菌(菌量为 4 g DCW/L)进行 COBE (4.0 g/L)的不对称还原。反应条件为: 30 °C、200 r/min 振荡反应 24 h。反应结束后, 用乙酸乙酯萃取产物, 在萃取产物中加入二甲基亚砷作为内标物, 采用气相色谱检测产物浓度以计算产率; 为测定产物的光学纯度, 取乙酸乙酯萃取液, 经旋蒸去除乙酸乙酯, 然后用无水乙醇溶解固体产物, 采用正相液相色谱检测产物中 S 型和 R 型产物的含量, 并计算产物的光学纯度(e.e 值)。重组菌对 3.3 g/L DKTP 进行生物催化, 干菌体密度值为 4 g/L。反应条件与生物催化 COBE 相同, 反应 48 h 后, 调节 pH 至 12 左右, 用乙酸乙酯萃取, 旋蒸去除溶剂后用异丙醇溶解产物, 采用液相色谱测定产物中 S 型和 R 型产物的含量。

CHBE 气相色谱法检测条件: 采用 1970F 气相色谱仪, 毛细管柱 SE-30; 载气为氮气; 1 μL 进样量; 氢离子火焰检测器。内标物出峰时间为 3.219 min, 产物出峰时间为 3.946 min。

标准曲线制作: 配置不同浓度的 CHBE, 加 5 μL 二甲基亚砷内标物, 根据两物质峰面积和含量比值做标准曲线, 曲线函数为 $y=2.213\ 3x-0.201\ 4$, $R^2=0.996\ 8$ 。其中 y 代表产物与内标物含量比值, x 代表产物与内标物峰面积比值。

DKTP 转化率的液相色谱法检测条件: 采用 SinoChrom ODS-BP (200 mm \times 4.6 mm, 5 μm , 大

连依利特)色谱柱; 检测波长 254 nm; 流动相为乙腈:pH 2.5 KH_2PO_4 :三乙胺=40:60:0.1 (V/V/V); 流速: 1.0 mL/min; 柱温: 25 °C; 进样 20 μL 。DKTP 的保留时间为 5.554 min, DHTP 的保留时间为 4.773 min。

CHBE 与 DHTP 光学纯度的液相色谱法检测条件: 采用 Sino-Chiral OD0B03013-C (200 mm×4.6 mm, 5 μm , 大连依利特)色谱柱, 流速: 1.0 mL/min, 柱温: 40 °C, 进样 5 μL 。CHBE 检测条件: 检测波长 217 nm; 流动相为正己烷:异丙醇:三氟乙酸=90:10:0.1 (V/V/V), S 型保留时间为 5.196 min, R 型保留时间为 6.369 min; DHTP 光学纯度检测条件: 检测波长 203 nm, 流动相为正己烷:乙醇:三氟乙酸=95:5:0.1 (V/V/V), S 型保留时间为 30.353 min, R 型保留时间为 24.987 min。

2 结果与分析

2.1 *cmcr* 的克隆

采用所设计的引物, 以 *K. marxianus* CGMCC 2.1977 基因组为模板, 按照设计的条件进行 PCR, 获得了长度为 1 000 bp 左右的特异性条带(图 1)。由于该扩增片段长度与 *cmcr* 的大小相符, 因此推测扩增获得的片段很可能就是目的基因。通过

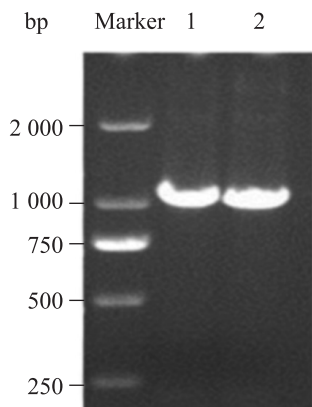


图 1 PCR 产物电泳结果

Fig. 1 Agrose electrophoresis of PCR fragment

注: 1, 2: *cmcr* PCR 电泳结果。

Note: 1, 2: Agrose electrophoresis of *cmcr* PCR fragment.

TA 克隆方法, 将该扩增片段和 pMD19-T 相连接, 获得了 pMD19-*cmcr* 重组载体, 并转化 *E. coli* DH5 α , 挑取阳性克隆。

2.2 *cmcr* 全基因序列的测定结果

从挑取的阳性克隆中提取质粒, 并分别以 M13-F 和 M13-R 通用引物对进行序列测定。结果发现, 所导入的 PCR 扩增片段是一个全长为 1 038 bp 的开放阅读框, 并且其序列与 GenBank 数据库中登录号为 AB183149 的羧基还原酶基因具有 100%的同源性。该基因序列翻译得到的多肽有 345 个氨基酸残基, 文献报道该酶分子量大小为 42 kD^[8]。

2.3 表达载体的构建

为了表达 *cmcr*, 利用 pET28a 构建了重组表达质粒 pET28a-*cmcr*, 如图 2 所示, 重组质粒大小为 6 407 bp。然后将重组质粒分别转化 *E. coli* BL21 和 *E. coli* Rosetta 获得阳性克隆 BL21(pET28a-*cmcr*)和 Rosetta(pET28a-*cmcr*)。

2.4 重组菌 BL21(pET28a-*cmcr*)和 Rosetta (pET28a-*cmcr*)蛋白的诱导表达

分别从 BL21(pET28a-*cmcr*) 和 Rosetta (pET28a-*cmcr*) 中提取质粒, 并用 *EcoR* I 和 *Bam*H I 进行双酶切鉴定。结果表明, 酶切产物的大小为 1 038 bp (图 3), 说明所构建的两个重组表达菌株中含有携带目的基因的重组质粒。

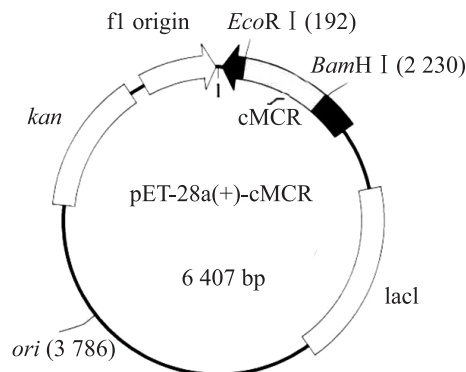


图 2 表达载体 pET28a-*cmcr* 构建图谱

Fig. 2 Construction of pET28a-*cmcr*

将两种重组菌破胞后取上清液和沉淀分别与4×样品缓冲液混合煮沸10 min, 做SDS-PAGE电泳分析, 如图4和图5所示。发现与不加IPTG诱导的两种重组菌比较, 诱导后的Rosetta(pET28a-cMCR)重组菌蛋白表达量明显高于BL21(pET28a-cMCR), 而诱导的BL21(pET28a-cMCR)与未诱导的重组菌相比, 蛋白表达不是很明显, 但后续工作中验证了BL21(pET28a-MCR)重组蛋白也有活性。

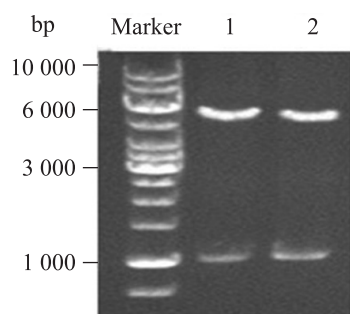


图3 表达载体酶切电泳图

Fig. 3 Expression vector digested by restrict enzymes

Note: 1: BL21(pET28a-cMCR); 2: Rosetta(pET28a-cMCR).

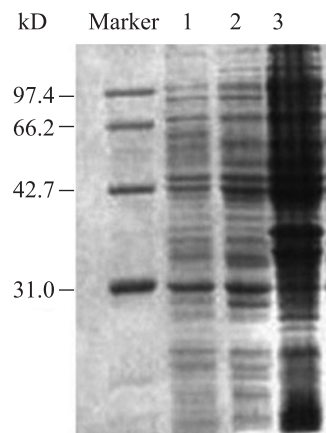


图4 BL21(pET28a-cMCR)重组蛋白 SDS-PAGE 结果

Fig. 4 SDS-PAGE of the expression of recombinant protein

注: 1: 未诱导的可溶蛋白; 2: IPTG 诱导的胞内可溶蛋白; 3: IPTG 诱导的胞内不溶蛋白。

Note: 1: Soluble protein without induction; 2: Intracellular soluble protein after IPTG induction; 3: Intracellular insoluble protein after IPTG induction.

cmcr 在 Rosetta 中的表达水平显著高于 BL21 的原因可能与该基因中存在大肠杆菌的稀有密码子有关。我们用 DNA 2.0 软件分析了 *cmcr* 中稀有密码子存在情况, 发现该基因中存在多个大肠杆菌的稀有密码子(图6, 下划线的3种密码子在大肠杆菌中丰度小于0.1)。而 Rosetta(DE3)中恰好补充了大肠杆菌缺乏的6种稀有密码子(AUA, AGG, AGA, CUA, CCC, GGA)对应的tRNA, 可以有效解决稀有密码子对蛋白质表达的影响, 使得 *cmcr* 这种克隆自真核生物的基因得以在大肠杆菌中有效表达。

2.5 重组羧基还原酶的专一性和底物的特异性

在羧基还原酶催化还原反应中, 还原型辅酶作为氢的供体。当体系中加入 NADPH 或者 NADH 均能检测到酶的活性, 以 NADPH 作为辅酶测得酶活设为100%, 以 NADH 作为辅酶测得相对酶活只有48%。表明该酶对两种还原型的辅酶虽然均有依赖性, 但是更倾向以 NADPH 作为辅酶。

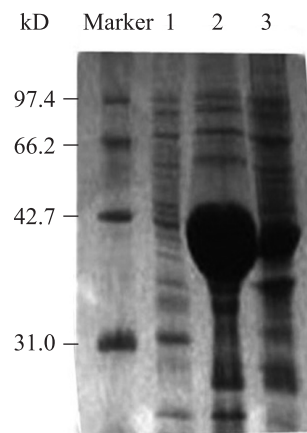


图5 Rosetta(pET28a-cMCR)重组蛋白 SDS-PAGE 结果

Fig. 5 SDS-PAGE of the expression of recombinant protein

注: 1: 未诱导的胞内的可溶蛋白; 2: 诱导的胞内的可溶蛋白; 3: 诱导的胞内的不溶蛋白。

Note: 1: Intracellular soluble protein without induction; 2: Intracellular soluble protein after IPTG induction; 3: Intracellular insoluble protein after IPTG induction.

ATGACATTTACAGTGGTGACAGGCGCAAATGGCTACATTGCCAAGCACATTCTTAAATCGTTA
TTAGAAGATGGTCATCGCGTAATTGGGACCGTGAGAAACAGCAAGAAGGCCGAGGAATTGA
AAAGGACTGTCAATGATGAGAATTTGATAGTGGAGTTGGTTCCCGACATGTTAGTGGAAAAC
GCATTTGACGAGTTGTTCAAGAAGTACAACACCCAAATCAAGTATGTGTTCCACACTGCGTC
CCCGTTCTCGAGACGTCAAAGGACTATGAGAAAAGCTTGATCGAGCCCGCGATTACCGGTG
CGAAGTCAATGGTGGAAAGCTATCAGGAAGTACTCATTGACATCGGTGAGCAGCATTTGTGTATA
CGTCATCGATTGCTGCCAGCTCGCTGGAATCTGAGTTTACCGATCCAACGCTCGTTGTCAGCG
AGGATAGTTGGAACCCACAAGGTTTGGAAAGAGGCAAAGACGGAGTTTTTACCGCTTACTC
GTACTCGAAGAAAATCGCCGAGAAGACGATGTGGGATTTTGTGAGGAATACAAGGGGACT
GAGCACGAAATAAGCTCACTACGGTCAACCCATGCTTCAACATTGGGCCCCAGGCGTACGA
GGCGGACGTTACCGAGACTATGAACCTCACGGCGGAGTTGATCAACCACGTTGTGGAAAGC
AAAGTGGGCGATCCGCTTCTCCAACGAGAATTGTGCCATACGTCGATGTCAGGGACACTGC
GAGAGCGCATGTGCGATGCGTTGAAGAACGAGAAGCTGGCATTCCAAAGACTGTTGGTGGTG
GGGCCCTTTTGTGCGAGCCAGCAGATCTACGATATTGTGAACGAGCGCTTCCCGCAATTGCGG
GGCAAGATCGCGCGGGGCGAGCCTGGCAGCGACAAGCTGGACCCTGCGAAGCTGGCCAAGT
TCGACCACGCCCCGACCACGCAAGCTCTCGGGTGGGAGTTCACGCCTATCGAGAAGGCTATA
GCTGACGAGGTGGCCAGATCCTCCGTGTGGGCGCGTACCGTGGGTAA

图 6 *cmcr* 稀有密码子分析Fig. 6 Rare codons analysis of *cmcr*

羰基还原酶的催化还原反应属于亲核反应, 其反应时受底物位阻及周围电荷诱导的影响。本实验以苯乙酮、4-氯乙酰乙酸乙酯、N,N-二甲基-3-氧基-(2-噻吩)-1-丙胺盐酸盐作为底物时测得酶活, 结果见表 1, 以 4-氯乙酰乙酸乙酯为底物时测得酶活最高, 从底物空间位阻分析, 苯乙酮和 N,N-二甲基-3-氧基-(2-噻吩)-1-丙胺盐酸盐作为底物, 分子结构中分别含有苯环和噻吩基, 极大阻碍了底物和酶的结构域结合, 说明位阻效应是影响生物催化的一个关键因素。

2.6 重组羰基还原酶的最适反应温度及其温度稳定性

温度是影响酶活一个关键因素, 如图 7 所示, 所表达的重组羰基还原酶的最适反应温度为 40 °C。酶在不同温度下的稳定性不同, 以 4 °C 的酶测得酶活为 100%, 从图 8 可以看出, 随着温度的上升, 酶的活力在下降, 当温度为 40 °C 时, 酶的活力可以保持原有的 71%, 当温度再升高, 蛋白酶由于变性活力迅速下降, 当在 60 °C 中保温 24 h 后酶活只有原酶活的 19.1%。

2.7 重组羰基还原酶的最适 pH 及其 pH 稳定性

在不同 pH 条件下测得酶的催化活力, 结果如图 9 所示, 随着 pH 的逐渐升高, 酶的活力逐渐

增大; 最适反应 pH 是 8。如图 10 所示, pH 对酶的稳定性的影响, 酶在 pH 7 时比较稳定, 而且 pH 稳定性的范围较窄, 在偏酸或偏碱的环境都会降低酶的活力。

表 1 重组羰基还原酶底物的特异性
Table 1 The substrate specificity of the carbonyl reductase

底物 Substrate	相对酶活 Relative activity (%)
Acetyl benzene	53.1
4-Chloro-3-oxobutanoate ethyl ester	100
N,N-dimethyl-3-keto-3-(2-thienyl)-1-prapanamine	60.0

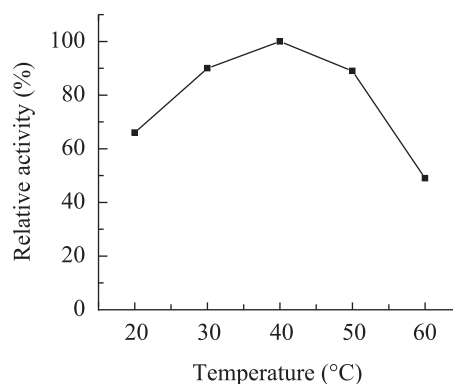


图 7 温度对重组羰基还原酶催化活力的影响

Fig. 7 Effect of temperature on enzyme activity

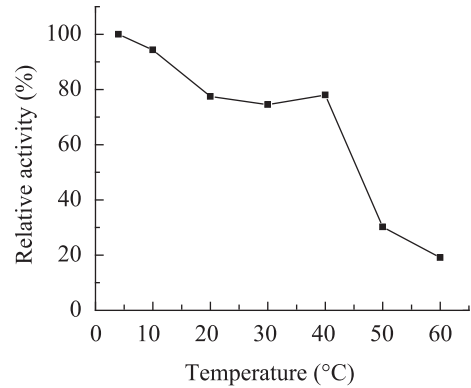


图 8 温度对重组羧基还原酶稳定性的影响
Fig. 8 Effect of temperature on the stabilities of enzyme activity

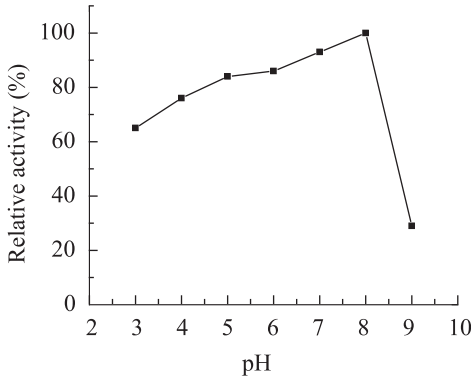


图 9 pH 对重组羧基还原酶催化活力的影响
Fig. 9 Effect of pH on enzyme activity

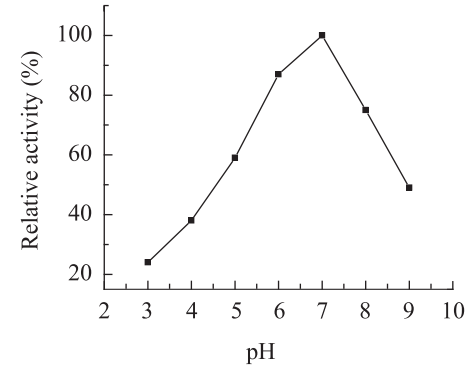


图 10 pH 对重组羧基还原酶稳定性的影响
Fig. 10 Effect of pH on the stability of enzyme

2.8 金属离子及浓度对重组羧基还原酶催化活力的影响

如表 2 所示, Fe^{2+} 、 Na^{+} 、 Zn^{2+} 、 Cu^{2+} 对酶有不同程度的抑制作用, 而 Mn^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 对酶有

很明显的激活作用。其中, 效果最突出的是 Ca^{2+} , 0.5 mmol/L 的 Ca^{2+} 可以使酶的催化活力提高 1.12 倍(图 11)。

2.9 重组菌催化的不对称还原反应

重组菌全细胞转化 COBE, 结果见表 3, BL21-pET28a 菌株自身也存在与重组蛋白 *cmcr* 有类似作用的酶类, 但以此菌的菌液作为模板, 以正反义链作为引物 PCR, 未出现条带, 可见 *E. coli* BL21 菌株自带的酶与 *cmcr* 编码的酶只是同工酶。重组菌 Rosetta(pET28a-cMCR)的催化转化率是 BL21(pET28a-cMCR)的 2.5 倍, 但后者单位体积发酵液的酶活力仅是前者的 19.3%, 这可能是由于细胞对底物毒性耐受性及细胞内辅酶

表 2 金属离子对重组羧基还原酶酶活的影响 Table 2 Effect of various metal ions on enzyme activity	
金属离子 Metal ions	相对酶活 Relative activity (%)
Blank	100
Fe^{2+}	59
Na^{+}	60
Ca^{2+}	212
Cu^{2+}	70
Zn^{2+}	46
Mg^{2+}	193
Mn^{2+}	136

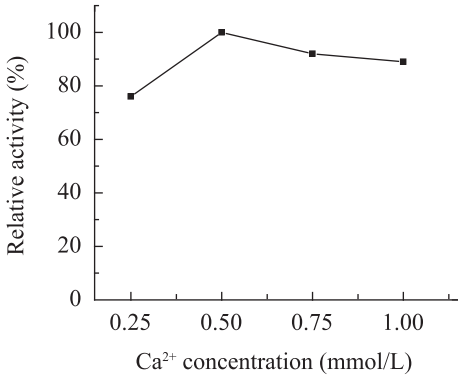


图 11 Ca^{2+} 浓度对重组羧基还原酶活的影响
Fig. 11 Effect of Ca^{2+} concentration on enzyme activity

表 3 重组菌生物合成(S)-CHBE			
Table 3 Bioconversion of COBE to (S)-CHBE with <i>E. coli</i> cells harboring pET28a-cMCR			
菌株	转化率	构型	对映体过量值
Bacterial strains	Conversion ratio (%)	Configuration	Enantiomeric excess (e.e., %)
BL21-pET28a	1.6	S	100
BL21(pET28a-cMCR)	32.8	S	100
Rosetta(pET28a-cMCR)	81.0	S	100

不同等因素，使两种细胞生物催化结果和粗酶活测定结果并不成正比例。当底物为 4.0 g/L、菌体生物量(干重)为 4.0 g/L 时，Rosetta(pET28a-cMCR) 重组菌转化 COBE，结果见图 12，产物为 S 型，光学纯度为 100% e.e，转化率为 81.0%。以 3.3 g/L DKTP 为底物，10 g/L 的葡萄糖作为共底物，Rosetta(pET28a-cMCR) 菌体生物量(干重) 4.0 g/L，转化 48 h 后，液相检测结果如图 13 所示，产物为 S 型，光学纯度为 97.5% e.e，转化率为 41.7%。重组菌对两种底物催化结果与酶对底物专一性的结果成正相关，说明位阻效应是影响生物催化的一个关键因素。

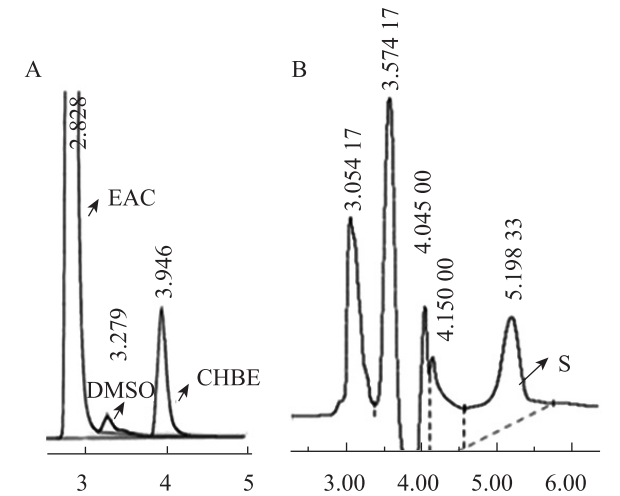


图 12 Rosetta(pET28a-cMCR)生物合成(S)-CHBE 的色谱图

Fig. 12 Bioconversion of COBE by whole cells of Rosetta(pET28a-cMCR)

注: A: CHBE 产率的气相色谱图; B: (S)-CHBE 构型及对映体过量值的液相色谱图。

Note: A: Yield of CHBE determined by GC; B: Configuration and enantiomeric excess of (S)-CHBE determined by HPLC.

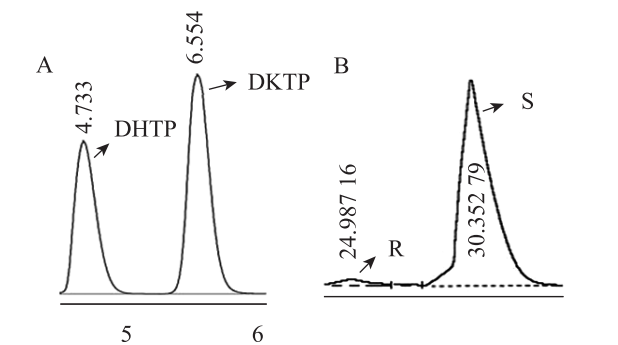


图 13 Rosetta(pET28a-cMCR)生物合成(S)-DHTP 的液相色谱图

Fig. 13 Bioconversion of DKTP by whole cells of Rosetta(pET28a-cMCR)

注: A: DKTP 转化率的液相色谱图; B: (S)-DHTP 构型及对映体过量值的液相色谱图。

Note: A: Conversion ratio of DKTP determined by HPLC; B: Configuration and enantiomeric excess of (S)-DHTP determined by HPLC.

3 讨论

从马克斯克鲁维酵母(*Kluyveromyce marxianus*) CGMCC 2.1977 克隆得到了以 NADPH 为辅酶的羧基还原酶基因(*cmcr*)。该基因在大肠杆菌 BL21 中的表达水平较低，且表达水平受温度、IPTG 浓度和诱导时间长短的影响；而换用 Rosetta(DE3)作为宿主后，该基因的表达水平得到了显著提高。导致两种宿主的表达水平存在显著差异的原因可能是 *cmcr* 基因中存在多个大肠杆菌的稀有密码子，影响了该基因在大肠杆菌中的翻译效率，降低了表达水平。解决稀有密码子的一个常规方法是进行密码子优化。但由于该基因中存在多个稀有密码子，采用密码子优化方法

需要进行多个碱基位点的突变,操作较为复杂,工作量大,周期长。本研究采用 Rosetta(DE3)作为宿主,利用该菌株具有编码多个稀有密码子对应 tRNA 的特点,简单却有效地提高了目的基因的表达水平。这不仅证明了影响马克斯克鲁维酵母的羧基还原酶基因在大肠杆菌中进行重组表达时的确存在稀有密码子的问题,而且也为其真核基因在大肠杆菌中高效表达提供了一种可参考的方法。此外,该羧基还原酶基因在大肠杆菌中的有效表达,也为利用羧基还原酶进行手性醇的工业化生产奠定了基础。

参考文献

- [1] Xu GF, Du YX, Chen B, et al. Investigation of the enantioseparation of basic drugs with erythromycin lactobionate as a chiral selector in CE[J]. *Chromatographia*, 2010, 72(3/4): 289–295.
- [2] Perrone MG, Santandrea E, Scilimati A, et al. Diastereo- and enantioselective bioreduction of ethyl-2-(4-chlorophenoxy)-3-oxobutanoate clofibrate analogues by *Kluyveromyces marxianus* and other whole cell biocatalysts[J]. *Asymmetry*, 2004, 15(22): 3511–3517.
- [3] Huisman GW, Liang J, Krebber A. Practical chiral alcohol manufacture using ketoreductases[J]. *Current Opinion in Chemical Biology*, 2010, 14(2): 122–129.
- [4] 张玉彬. 生物催化的手性合成[M]. 北京: 化学工业出版社, 2002: 10.
- [5] Richter N, Hummel W. Biochemical characterisation of a NADPH-dependent carbonyl reductase from *Neurospora crassa* reducing α - and β -keto esters[J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2011, 48(6/7): 472–479.
- [6] Wada M, Yoshizumi A, Furukawa Y, et al. Cloning and overexpression of the *Exiguobacterium* sp. F42 gene encoding a new short chain dehydrogenase, which catalyzes the stereoselective reduction of ethyl 3-oxo-3-(2-thienyl)propanoate to ethyl (S)-3-hydroxy-3-(2-thienyl)propanoate[J]. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 2004, 68(7): 1481–1488.
- [7] Nie Y, Xiao R, Xu Y, et al. Novel anti-Prelog stereospecific carbonyl reductases from *Candida parapsilosis* for asymmetric reduction of prochiral ketones[J]. *Organic & Biomolecular Chemistry*, 2011, 9(11): 4070–4078.
- [8] Kataoka M, Hoshino-Hasegawa A, Thiwthong R, et al. Gene cloning of an NADPH-dependent menadiene reductase from *Candida macedoniensis*, and its application to chiral alcohol production[J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2006, 38(7): 944–951.
- [9] 解晴, 吴坚平, 林立, 等. 拟热带假丝酵母中羧基还原酶的纯化及其酶学性质研究[J]. *高校化学工程学报*, 2009, 23(1): 92–98.