

mRNA 翻译起始区二级结构优化提高(R)-羰基还原酶的表达及催化效率

王珊珊, 张荣珍, 耿亚维, 沈伟, 谭念江, 王磊, 徐岩

江南大学酿酒科学与酶技术中心 教育部工业生物技术重点实验室, 无锡 214122

摘要: 为了提高近平滑假丝酵母(*Candida parapsilosis* CCTCC M203011)的(R)-羰基还原酶在大肠杆菌中的表达水平及催化效率, 对酶编码基因 mRNA 翻译起始区中+1~+78 区进行二级结构的优化, 并构建了相应的突变体。优化后 mRNA 翻译起始区的发夹结构明显减少, 自由能显著下降(由原始的-9.5 kcal/mol 降至-5.0 kcal/mol), 使酶蛋白的表达水平及粗酶比活力分别比优化前提高了 4~5 倍和 61.9%。在高底物浓度(5.0 g/L 2-羟基苯乙酮)下, 优化突变株不对称转化效率较高, 产物(R)-苯基乙二醇的光学纯度和产率分别为 93.1% *e.e.*和 81.8%, 比优化前提高了 27.5%和 40.5%。研究表明: 优化 mRNA 翻译起始区的二级结构, 克服蛋白翻译启动的空间位阻, 不仅能促进翻译的顺利进行, 使目标蛋白得到高效表达, 而且有利于蛋白空间结构的正确折叠, 有效提高酶蛋白活力及生物催化功能。

关键词: (R)-羰基还原酶, 翻译起始区, mRNA 二级结构, 优化, (R)-苯基乙二醇

Improved expression and catalytic efficiency of (R)-carbonyl reductase in *Escherichia coli* by secondary structure optimization of mRNA translation initiation region

Shanshan Wang, Rongzhen Zhang, Yawei Geng, Wei Shen, Nianjiang Tan, Lei Wang, and Yan Xu

Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Center for Brewing Science and Enzyme Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China

Abstract: To improve the expression level and catalytic efficiency of (R)-carbonyl reductase from *Candida parapsilosis* in *Escherichia coli*, we optimized the mRNA secondary structure of (R)-carbonyl reductase gene in translation initiation region (from +1 to +78), and constructed the corresponding variant. The formation of hairpin structure was significantly reduced and the Gibbs free energy was dramatically decreased from -9.5 kcal/mol to -5.0 kcal/mol after optimization. As a result, the expression level of (R)-carbonyl reductase in the variant was increased by 4-5 times and its specific activity in cell-free extract was enhanced by 61.9% compared to the wild-type strain. When using the whole cells as catalyst and 2-hydroxyacetophenone as substrate with a high concentration of 5.0 g/L, the variant showed excellent performance to give (R)-1-phenyl-1, 2-ethanediol with optical purity of 93.1%

Received: September 25, 2009; **Accepted:** November 6, 2009

Supported by: National Basic Research Program of China (973 Program) (No. 2009CB724706), National High Technology Research and Development Program of China (863 Program) (No. 2007AA02Z226), National Natural Science Foundation of China (No. 20676071), Program for Changjiang Scholars and Innovative Research Team in University (No. IRT0532).

Corresponding author: Yan Xu. Tel: +86-510-85918201; Fax: +86-510-85864112; E-mail: biosean@yahoo.com.cn

国家重点基础研究发展计划(973 计划) (No. 2009CB724706), 国家高技术研究发展计划(863 计划) (No. 2007AA02Z226), 国家自然科学基金(No. 20676071), 长江学者和创新团队发展计划(No. IRT0532)资助。

enantiomeric excess and a yield of 81.8%, which were increased by 27.5% and 40.5% respectively than those of the wild-type. In conclusion, the optimization of mRNA secondary structure in translation initiation region can overcome the steric hindrance of translation startup, promote translation smoothly to acquire high expression of target protein, and favor protein folding correctly to efficiently improve the enzyme specific activity and biotransformation function.

Keywords: (*R*)-carbonyl reductase, translation initiation region, mRNA secondary structure, optimization, (*R*)-1-phenyl-1,2-ethanediol

手性醇具有特殊的光电磁性能和生理活性,是非常理想的手性药物中间体和液晶材料添加剂^[1-2]。特别是光学纯苯基乙二醇(1-phenyl-1, 2-ethanediol, PED),更是医药、农药和化工材料中一种重要的手性模块化合物^[3]。为了满足市场的广泛需求,利用立体选择性氧化还原酶高效不对称还原潜手性酮的优势来制备光学手性醇^[4-5],尤其是随着分子重组技术的发展,以过量表达的重组酶进行催化反应,已成为当今工业上生产手性醇的主要发展趋势^[6-7]。

然而,任何目标蛋白在不同宿主中的表达都是不可预测和具有挑战性的。目标基因与表达系统的特性、mRNA非编码区的稳定性、靶蛋白的特性、外源基因与系统间的相互作用等都可能影响目标蛋白的表达^[8-9]。其中,mRNA二级结构的稳定性对翻译起始效率更是起着至关重要的作用^[10]。研究表明,目标基因mRNA翻译起始区(Translation initiation region, TIR)二级结构的稳定性,以及核糖体30S亚基与起始密码子的结合都与蛋白翻译的起始进程密切相关^[11]。据统计,TIR内吉布斯自由能(G)绝对值每增加1.4 kcal/mol,翻译起始效率将降低10倍^[10]。Wu等以TIR二级结构自由能为优化指标,对来源于海栖热孢菌 *Thermotoga maritima* 的木聚糖酶基因mRNA TIR进行了优化,实现了木聚糖酶在大肠杆菌中的过量表达^[12]。刘礼兵等通过优化粗糙脉孢菌 *Neurospora crassa* 基因组中奎尼酸脱氢酶基因的密码子,减少mRNA两端二级结构的形成,使奎尼酸脱氢酶在大肠杆菌中获得了功能性表达^[13]。

前期研究表明,近平滑假丝酵母 *Candida parapsilosis* CCTCC M203011 能将混旋的苯基乙二醇去消旋化,生成具有光学活性的(*S*)-苯基乙二醇,参与反应的两个关键酶分别是(*R*)-羰基还原酶和(*S*)-羰基还原酶。前者催化(*R*)-苯基乙二醇与2-羟基苯乙酮之间的可逆反应;后者以中间体2-羟基苯乙酮为底物,得到(*S*)-苯基乙二醇(图1)^[14];同时由于(*R*)-羰

基还原酶的表达水平和催化效率远低于(*S*)-羰基还原酶,从而导致了近平滑假丝酵母只能合成(*S*)-苯基乙二醇^[15]。本研究尝试选取(*R*)-羰基还原酶编码基因的mRNA翻译起始区中+1~+78区作为优化对象,对多个核苷酸位点实施定点突变,并构建相应的优化突变体,旨在实现(*R*)-羰基还原酶的高效表达,提高酶活力及生物转化效率,从而高效制备光学纯(*R*)-苯基乙二醇。

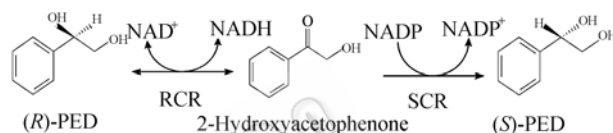


图1 两种羰基还原酶的催化反应

Fig. 1 Reaction catalyzed by two different carbonyl reductases. RCR: (*R*)-carbonyl reductase; SCR: (*S*)-carbonyl reductase; (*R*)-PED: (*R*)-1-phenyl-1,2-ethanediol; (*S*)-PED: (*S*)-1-phenyl-1,2-ethanediol.

1 材料与amp;方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒

本研究所用菌株和质粒见表1。

表1 菌株和质粒

Table 1 Strains and plasmids

Strains/plasmids	Characteristics	Sources
Strains		
<i>C. parapsilosis</i>	Source of <i>rer</i> gene	This lab
<i>E. coli</i> DH5 α	Host of T- <i>rer</i> and T- <i>mrcr</i>	This study
<i>E. coli</i> BL21(DE3)	Host of pET32a- <i>rer</i> and pET32a- <i>mrcr</i>	This study
Plasmids		
pMD19-T	Amp ^r *, 2692 bp	TaKaRa Co.
T- <i>rer</i>	1.0 kb DNA fragment with <i>rer</i> gene in pMD19-T, 3.7 kb	This study
T- <i>mrcr</i>	1.0 kb DNA fragment with <i>mrcr</i> gene in pMD19-T, 3.7 kb	This study
pET32a	Amp ^r , 5900 bp	Novagen Co.
pET32a- <i>rer</i>	1.0 kb DNA fragment with <i>rer</i> gene in pET32a, 6.9 kb	This study
pET32a- <i>mrcr</i>	1.0 kb DNA fragment with <i>mrcr</i> gene in pET32a, 6.9 kb	This study

*Amp^r 50 mg/L.

1.1.2 主要试剂

Taq DNA 聚合酶、T4 DNA 连接酶、限制性内切酶 *Nco* 和 *Xho*、IPTG 购于大连(宝)生物工程有限公司, DNA Marker 购于上海博彩生物科技有限公司, 质粒提取试剂盒购于 OMEGA BIO-TEK, 胶回收试剂盒购于北京博大泰克生物基因技术有限公司, 2-羟基苯乙酮购于 TCI(上海)化成工业发展有限公司, 引物由上海赛百盛基因技术有限公司(SBS)合成。其余试剂均为国产分析纯。

1.2 菌体培养

酵母培养基及 LB 培养基的配制参照文献[14]。将 *C. parapsilosis* 菌种接种于装有 50 mL 酵母培养基的 250 mL 摇瓶中, 30°C、150 r/min 振荡培养 48 h。重组菌株在培养过程中添加氨苄青霉素的浓度为 50 mg/L。

1.3 基因组 DNA 和质粒的提取

C. parapsilosis 基因组 DNA 的提取参考王海燕等的方法^[16], 质粒的提取参照试剂盒说明书。

1.4 基因克隆与 mRNA 翻译起始区二级结构的优化

根据已报道 *C. parapsilosis* 中(R)-羰基还原酶(RCR)的基因序列(GenBank Accession No. DQ675534)^[17], 以 DNAMAN 软件设计引物 RCR_F 和 RCR_R(表 2)。并利用 MFOLD 软件对 RCR 编码基因 *rcr* 的 mRNA 翻译起始区(TIR)二级结构和自由能(ΔG)进行分析和预测(<http://www.bioinfo.rpi.edu/applications/mfold/rna/form1-2.3.cgi>)^[18], 同时根据大肠杆菌密码子的简并性, 设计引物 MRCCR_F 和 MRCCR_R, 在基因 *rcr* 的关键位点引入多个同义突变, 获得优化突变基因 *mrcr*(表 2, 下划线标记处为酶切位点)。

表 2 基因克隆的引物

Table 2 Primers for genes cloning

Primers	Primer sequences (5'-3')
RCR_F	ATCCCACCCCATGGATGTCAATTCATCAAGC CAG (<i>Nco</i>)
RCR_R	TGACTCTCGAGTGGATTAATAAACAACCTTACC TTC (<i>Xho</i>)
MRCCR_F	GACCATGGGATCAATACCATCATCACAATACGG ATTCGTATTCAATAAGCAATCAGGATTAATAACT ACGTAACGATTTG (<i>Nco</i>)
MRCCR_R	TGACTCTCGAGTGGATTAATAAACAACCTTACC TTCATAAGCATTGTT (<i>Xho</i>)

采用 PCR 方法进行目标基因的扩增。PCR 反应采用 50 μ L 体系; PCR 反应条件: 95°C 5 min; 94°C 1 min, 57°C 1 min, 72°C 1 min, 30 个循环; 72°C 10 min。

PCR 产物 *rcr* 和 *mrcr* 经纯化后分别与 pMD19-T 连接, 连接产物转化 *E. coli* DH5 α 感受态细胞, 经蓝白斑及抗性筛选和酶切鉴定, 获得重组质粒 T-*rcr* 和 T-*mrcr*。基因测序由上海生工生物工程技术服务有限公司完成。

1.5 表达载体的构建与鉴定

用限制性内切酶 *Nco* I/*Xho* I 分别对载体 pET32a 和质粒 T-*rcr* 及 T-*mrcr* 进行酶切, 回收的 DNA 片段通过粘性末端连接后, 转化感受态细胞 *E. coli* BL21(DE3), 涂布氨苄青霉素(50 mg/L)抗性平板, 经 PCR、双酶切及 DNA 测序鉴定, 获得重组质粒 pET32a-*rcr* 和 pET32a-*mrcr*。

1.6 目标蛋白的诱导表达

挑取重组菌单菌落接种于相同抗性的 LB 培养基中, 当菌体 OD_{600} 值达到 0.6~0.8 时添加 1 mmol/L IPTG, 37°C 诱导 8 h。SDS-PAGE 检测目的蛋白的表达^[19], 凝胶定量软件(Quantity One)分析表达条带。

1.7 重组蛋白的酶活测定

培养后的重组菌细胞经生理盐水洗涤 3 次后, 称取 0.1 g 湿菌体, 悬浮于 20 mmol/L 磷酸钾缓冲液(pH 7.0), 加入 0.3 g 玻璃珠, 珠磨破碎 3 min(每处理 1 min, 冰上放置 2 min), 12 000 r/min 离心 3 min 取上清液作为粗酶液。酶活测定的具体方法及计算公式参照聂尧等的方法^[15]。

1.8 重组菌的生物转化

在 5 mL 反应体系中, Tris-HCl 缓冲液(0.1 mol/L, pH 8.5), 底物 2-羟基苯乙酮 5 g/L, 湿菌体 0.1 g/mL, 混匀后于 30°C 摇床反应 48 h, 离心取上清反应液用 2 倍体积乙酸乙酯萃取, 萃取液经手性柱 HPLC 进行分析, 根据峰面积计算产物(R)-苯基乙二醇的光学纯度(*e.e.*值)及产率^[20]。

2 结果与讨论

2.1 mRNA 翻译起始区二级结构的优化

根据 MFOLD 软件算法, 对(R)-羰基还原酶编码基因 *rcr* 的 mRNA 翻译起始区(TIR)中部分核苷酸

(+1 nt~+78 nt)进行分析。以降低二级结构的稳定性或自由能(ΔG)为依据,对 13 个核苷酸进行了定点突变(图 2A 和 2B)。通过对 mRNA TIR 二级结构的分析及 ΔG 的计算,结果显示:突变前,TIR 呈现较复杂的发夹结构, ΔG 高达 -9.5 kcal/mol(图 2C);而突变后,TIR 的发夹结构明显简化, ΔG 显著下降为 -5.0 kcal/mol(图 2D),比优化前降低了近 1 倍。由此说明:通过对 mRNA TIR 进行优化后,大大降低了其二级结构的稳定性,理论上可较好地避免核糖体 30S 亚基与 mRNA 的结合受阻,顺利启动转录后翻译,提高目标蛋白的表达水平。

2.2 密码子优化型基因的克隆及重组质粒的构建

以 *C. parapsilosis* 基因组 DNA 为模板,以 RCR_F 和 RCR_R 为引物,采用 PCR 的方法扩增 (R)-羧基还原酶基因 *rcr*;同时以 mRNA 二级结构的优化引物 MRCCR_F 和 MRCCR_R 扩增突变基因 *mrcr*。经 1% 琼脂糖凝胶电泳分析, *rcr* 和 *mrcr* 的 PCR 产物都只有单一条带,大小均为 1.0 kb 左右(图 3 泳道 1~2)。纯化后的 PCR 产物分别与 pMD19-T 载体连接,经酶切验证获得阳性质粒 T-*rcr* 和 T-*mrcr*。对 T-*rcr* 和 T-*mrcr* 分别双酶切后,插入载体 pET32a 中

的相应位点,经 PCR 及酶切鉴定,获得表达质粒 pET32a-*rcr* 和 pET32a-*mrcr*(图 3 泳道 3~10)。同时, DNA 测序结果表明,基因 *rcr* 与已报道 *C. parapsilosis* 的 (R)-羧基还原酶基因 (Gene ID: DQ675534) 序列完全一致^[17];突变基因 *mrcr* 在翻译起始区的相应位点成功引入了 13 个同义点突变。

2.3 mRNA 二级结构的优化显著提高目标蛋白的表达水平

将表达质粒 pET32a-*rcr* 和 pET32a-*mrcr* 分别转化 *E. coli* BL21(DE3) 感受态细胞,经 DNA 测序验证获得非突变株 *E. coli* BL21/pET32a-*rcr* 和优化突变株 *E. coli* BL21/pET32a-*mrcr*。SDS-PAGE 结果显示:两菌株均有分子大小约为 57 kD 的目标蛋白表达条带(图 4),但优化突变株 *E. coli* BL21/pET32a-*mrcr* 的蛋白表达量具有明显优势。经凝胶定量分析显示,优化后目标蛋白的表达水平比优化前提高了 4~5 倍。此外,由于表达载体 pET32a 自身具有的融合标签(如 Trx-Tag、His-Tag 和 S-Tag 等)分子大小约为 20 kD,故使表达后的重组 (R)-羧基还原酶分子大小由原始的 37 kD^[15] 增加为 57 kD。上述结果表明,通过 mRNA TIR 二级结构的优化大幅度提高了目标蛋白的表达水平。

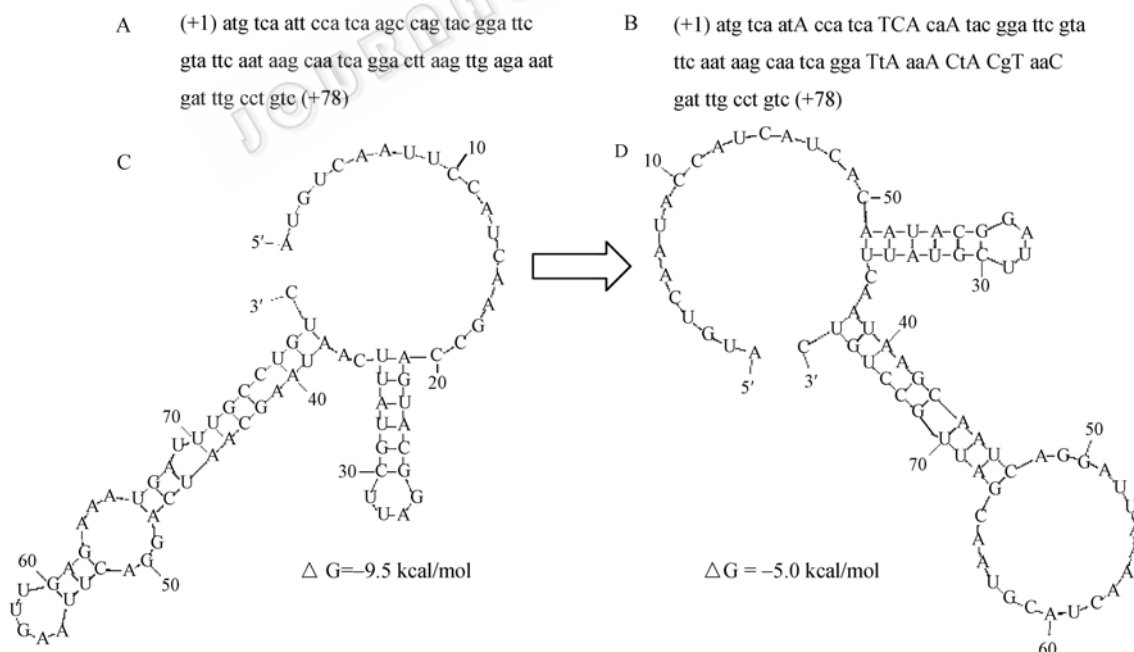


图 2 优化前后核苷酸序列及翻译起始区二级结构的预测

Fig. 2 Nucleotide sequences and the prediction of secondary structure of TIR. (A) The nucleotide sequences of *rcr* (from +1 nt to +78 nt) before optimization. (B) The nucleotide sequences of *mrcr* after optimization (the optimized sites were marked with capital letters). (C) The predicted secondary structure of the 78 nt of TIR of *rcr* before optimization by MFOLD algorithm by Zuker *et al.* (D) The predicted secondary structure of the 78 nt of TIR of *mrcr* after optimization.

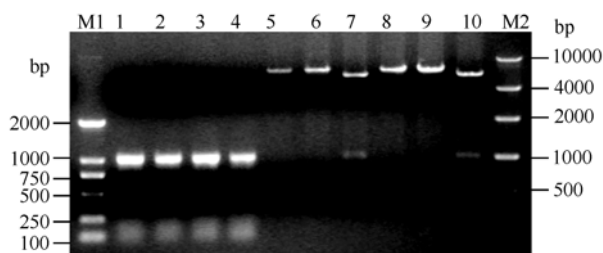


图3 PCR 扩增产物及重组质粒的鉴定

Fig. 3 Agarose gel electrophoresis of PCR products and identification of recombinant plasmids. M1: DL2000 DNA marker; 1: *rcr*; 2: *mrcr*; 3: PCR with pET32a-*rcr* as template; 4: PCR with pET32a-*mrcr* as template; 5: pET32a-*rcr* digested with *Nco* I; 6: pET32a-*rcr* digested with *Xho* I; 7: pET32a-*rcr* digested with *Nco* I/ *Xho* I; 8: pET32a-*mrcr* digested with *Nco* I; 9: pET32a-*mrcr* digested with *Xho* I; 10: pET32a-*mrcr* digested with *Nco* I/ *Xho* I; M2: E10000 DNA marker.

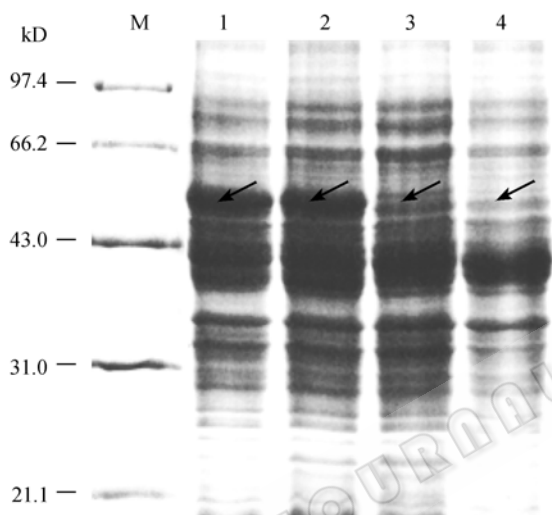


图4 重组菌 *E. coli* BL21/pET32a-*mrcr* 和 *E. coli* BL21/pET32a-*rcr* 表达产物的 SDS-PAGE 分析

Fig. 4 SDS-PAGE analysis of cell-extracts of *E. coli* BL21/pET32a-*mrcr* and *E. coli* BL21/pET32a-*rcr*. M: protein marker; 1: *E. coli* BL21 bearing pET32a-*mrcr* without IPTG; 2: *E. coli* BL21 bearing pET32a-*mrcr* with 1 mmol/L IPTG; 3: *E. coli* BL21 bearing pET32a-*rcr* without IPTG; 4: *E. coli* BL21 bearing pET32a-*rcr* with 1 mmol/L IPTG. The target protein was marked with arrows.

2.4 优化前后酶蛋白还原活力的比较

对非突变株 *E. coli* BL21/pET32a-*rcr* 和优化突变株 *E. coli* BL21/pET32a-*mrcr* 菌体上清液的还原酶活力进行测定。结果表明: 不经 IPTG 诱导时, 突变株的粗酶液比活达 0.68 U/mg, 比突变前提高了 61.9%(表 3)。说明对 mRNA TIR 的二级结构进行优化后, 大大降低了自由能 G , 减少了翻译起始克服空间位阻所需的能量, 使核糖体较易定位于起始密

码子上启动翻译, 不但实现了酶蛋白的高效表达, 并且较好促进蛋白空间结构的正确折叠^[21], 有效提高了酶的催化活性。

表3 粗酶液还原活力的测定及重组菌生物转化结果

Table 3 Reductive activity in cell-free extracts and asymmetric reduction by recombinant strains

Plasmids	IPTG (mmol/L)	Specific activity (U/mg)	Optical purity of (R)-PED (% e.e.)	Yield of (R)-PED (%)
pET32a	0	0.02 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
pET32a- <i>rcr</i>	0	0.42 ± 0.03	73.0 ± 0.05	58.2 ± 0.04
	1	0.33 ± 0.02	63.4 ± 0.04	40.3 ± 0.03
pET32a- <i>mrcr</i>	0	0.68 ± 0.04	93.1 ± 0.07	81.8 ± 0.06
	1	0.57 ± 0.02	85.2 ± 0.05	70.5 ± 0.04

The reported values represent the average of at least three independent measurements. All relative standard deviations of fits were less than 10%.

值得关注的是, 通常 pET 表达载体与宿主菌 *E. coli* BL21(DE3) 系统在不经 IPTG 诱导时, 不会启动蛋白的转录和翻译, 但并非所有的重组蛋白都遵循这一原则。如 Kataoka 等发现在无 IPTG 诱导时, 重组聚酮还原酶的表达量及酶活力均明显高于诱导后的情况^[22]。Kuramitsu 等在对来源于模式生物 *Thermus thermophilus* HB8 的多种蛋白的研究中也发现了类似的现象^[23]。本研究构建的优化突变株 *E. coli* BL21/pET32a-*mrcr* 在未经 IPTG 诱导时, (R)-羰基还原酶同样获得了大量表达, 且表达水平与诱导后几乎相似(图 4); 进一步酶活力数据(表 3)表明, 未经 IPTG 诱导的粗酶比活要高于诱导后的比活。这一现象的产生可能是由于某种渗漏机制启动了转录; 或诱导物 IPTG 抑制了细胞生长, 减少了细胞总量; 也可能是转录的迅速启动, 使大量蛋白来不及正确折叠而形成无活性的包涵体^[22-24]。虽然其中具体的原因目前尚无定论, 但这种不需诱导即可大量表达目标蛋白的方式更便捷、更经济, 非常有利于工业化生产。

2.5 重组菌不对称生物转化

在 5 mL 体系中, 以 0.1 g/mL 湿菌体为生物催化剂进行全细胞生物转化反应。转化结果显示: 优化突变株可在高底物浓度 (5.0 g/L 2-羟基苯乙酮) 下, 不对称还原生成 (R)-苯基乙二醇, 产物光学纯度和产率为 93.1% e.e. 和 81.8%, 比优化前分别提高了

27.5%和 40.5%(表 3)。此外, 不经 IPTG 诱导时转化效率比诱导后高, 这与酶活测定结果相吻合。

据报道, 目前 TIR 具体的起止范围尚无明确的界定, 一般是指起始密码子 ATG 上下游 70 nt 左右的序列^[25]。虽然不同表达载体与不同外源基因之间的 TIR 并非绝对一致, 但有关 mRNA TIR 二级结构优化的研究大多是基于 ATG 上下游-35~+35 左右的范围^[12, 26]。而本研究尝试性地选取目标基因 mRNA TIR 中的+1~+78 区作为优化对象, 所构建的优化突变株不仅较好地实现了目标蛋白的过量表达, 且有效提高了不对称还原活力及生物转化效率, 充分发挥了(R)-羰基还原酶的催化功能, 不对称还原 2-羟基苯乙酮得到具有光学活性的(R)-苯基乙二醇。

3 结论

外源蛋白在宿主大肠杆菌中的表达水平及催化效率受诸多因素的影响。由于翻译起始区中含有多个与翻译起始有关的顺式元件, 因而该区域的稳定性或二级结构复杂程度是导致蛋白表达差异的主要原因之一^[25]。本研究通过对(R)-羰基还原酶编码基因 mRNA 翻译起始区中+1~+78 区进行二级结构的优化, 大大减少了发夹结构的形成, 使自由能绝对值显著下降。SDS-PAGE 分析显示: 在无需添加 IPTG 诱导的条件下, 优化突变株 *E. coli* BL21/pET32a-*mrcr* 中目标蛋白的表达水平比优化前提高了 4~5 倍, 说明 TIR 二级结构稳定性的降低, 较好地克服了核糖体与起始密码子结合的空间位阻, 使其能顺利定位并启动翻译, 有效提高了目标蛋白的表达量。进一步功能验证显示: 优化突变株的粗酶液比活力较优化前提高了 61.9%, 且在高底物浓度(5.0 g/L 2-羟基苯乙酮)下, 全细胞不对称转化得到产物(R)-苯基乙二醇的光学纯度及摩尔产率高达 93.1% *e.e.*和 81.8%, 比优化前分别提高了 27.5%和 40.5%。上述研究结果表明, 通过对 mRNA 翻译起始区进行二级结构优化后, 不仅大幅度提高了靶酶的表达水平, 且较好促进了蛋白空间结构的正确折叠, 有效改善了酶的活力及其生物转化效率, 并为充分发挥靶蛋白的生物催化功能提供了新的研究思路与借鉴意义, 也为工业上高效制备光学纯(R)-苯基乙二醇奠定了研究基础。

REFERENCES

- [1] Schmid A, Dordick J, Hauer B, *et al.* Industrial biocatalysis today and tomorrow. *Nature*, 2001, **409**(6817): 258–268.
- [2] Liese A, Karutz M, Kamphuis J, *et al.* Enzymatic resolution of 1-phenyl-1,2-ethanediol by enantioselective oxidation: overcoming product inhibition by continuous extraction. *Biotechnol Bioeng*, 1996, **51**(5): 544–550.
- [3] Oda S, Kikuchi Y, Nanishi Y. Synthesis of optically active mandelic acid via microbial oxidation of racemic 1-phenyl-1, 2-ethanediol. *Biosci Biotechnol Biochem*, 1992, **56**(8): 1216–1220.
- [4] Panke S, Held M, Wubbolts M. Trends and innovations in industrial biocatalysis for the production of fine chemicals. *Curr Opin Biotechnol*, 2004, **15**(4): 272–279.
- [5] Schoemaker HE, Mink D, Wubbolts MG. Dispelling the myths-biocatalysis in industrial synthesis. *Science*, 2003, **299**(5613): 1694–1697.
- [6] Kataoka M, Kotaka A, Thiwthong R, *et al.* Cloning and overexpression of the old yellow enzyme gene of *Candida macedoniensis*, and its application to the production of a chiral compound. *J Biotechnol*, 2004, **114**(1/2): 1–9.
- [7] Kita K, Fukura T, Nakase K, *et al.* Cloning, overexpression, and mutagenesis of the *Sporobolomyces salmonicolor* AKU4429 gene encoding a new aldehyde reductase, which catalyzes the stereoselective reduction of ethyl 4-chloro-3-oxobutanoate to ethyl (S)-4-chloro-3-hydroxybutanoate. *Appl Environ Microb*, 1999, **65**(12): 5207–5211.
- [8] Hannig G, Makrides S. Strategies for optimizing heterologous protein expression in *Escherichia coli*. *Trends Biotechnol*, 1998, **16**(2): 54–60.
- [9] Jana S, Deb JK. Strategies for efficient production of heterologous proteins in *Escherichia coli*. *Appl Microbiol Biot*, 2005, **67**(3): 289–298.
- [10] Desmit MH, Vanduin J. Control of translation by mRNA secondary structure in *Escherichia coli*: a quantitative analysis of literature data. *J Mol Biol*, 1994, **244**(2): 144–150.
- [11] Rex G, Surin B, Besse G, *et al.* The mechanism of translational coupling in *Escherichia coli*. Higher order structure in the *atpHA* mRNA acts as a conformational switch regulating the access of *de novo* initiating ribosomes. *J Biol Chem*, 1994, **269**(27): 18118–18127.
- [12] Wu HW, Pei HJ, Wu GG, *et al.* Overexpression of GH10 endoxylanase XynB from *Thermotoga maritima* in *Escherichia coli* by a novel vector with potential for industrial application. *Enzyme Microb Tech*, 2008, **42**(3): 230–234.
- [13] Liu LB, Liu Y, He HQ, *et al.* The changes of rare codon and mRNA structure accelerate expression of *qa-3* in *Escherichia coli*. *Chin J Biotech*, 2006, **22**(2): 198–203. 刘礼兵, 刘云, 何华庆, 等. *qa-3* 稀有密码子和 mRNA 结构改造及其在大肠杆菌中的高效表达. *生物工程学报*, 2006, **22**(2): 198–203.
- [14] Zhang RZ, Xu Y, Sun Y, *et al.* Construction of an

- enzyme-coupled system consisting of (*R*)- and (*S*)-specific carbonyl reductases for one-step preparation of (*S*)-1-phenyl-1, 2-ethanediol. *Acta Microbiol Sin*, 2009, **49**(2): 204–209.
- 张荣珍, 徐岩, 孙莹, 等. (*R*)与(*S*)-羧基还原酶偶联一步法制备(*S*)-苯基乙二醇. *微生物学报*, 2009, **49**(2): 204–209.
- [15] Nie Y, Xu Y, Wang HY, *et al.* Complementary selectivity to (*S*)-1-phenyl-1,2-ethanediol-forming *Candida parapsilosis* by expressing its carbonyl reductase in *Escherichia coli* for (*R*)-specific reduction of 2-hydroxyacetophenone. *Biocatal Biotrans*, 2008, **26**(3): 210–219.
- [16] Wang HY, Zhang XJ, Zhao LP, *et al.* Analysis and comparison of the bacterial community in fermented grains during the fermentation for two different styles of Chinese liquor. *J Ind Microbiol Biot*, 2008, **35**(6): 603–609.
- [17] Nie Y, Xu Y, Mu XQ, *et al.* Purification, characterization, gene cloning, and expression of a novel alcohol dehydrogenase with anti-prelog stereospecificity from *Candida parapsilosis*. *Appl Environ Microb*, 2007, **73**(11): 3759–3764.
- [18] Zuker M. Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic Acids Res*, 2003, **31**(13): 3406–3415.
- [19] Laemmli U. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 1970, **227**(5259): 680–685.
- [20] Nie Y, Xu Y, Mu XQ. Highly enantioselective conversion of racemic 1-phenyl-1,2-ethanediol by stereoinversion involving a novel cofactor-dependent oxidoreduction system of *Candida parapsilosis* CCTCC M203011. *Org Proc Res Dev*, 2004, **8**(2): 246–251.
- [21] Baneyx F, Mujacic M. Recombinant protein folding and misfolding in *Escherichia coli*. *Nat Biotechnol*, 2004, **22**(11): 1399–1408.
- [22] Kataoka M, Delacruz-Hidalgo A, Akond M, *et al.* Gene cloning and overexpression of two conjugated polyketone reductases, novel aldo-keto reductase family enzymes, of *Candida parapsilosis*. *Appl Microbiol Biot*, 2004, **64**(3): 359–366.
- [23] Kuramitsu S, Yokoyama S, Miki K. Structurome research (Structural and functional whole-cell project for a model organism, *Thermus thermophilus* HB8). *Riken Annu Rep Res Activ*, 2003: 1418–1443.
- [24] Sevastyanovich Y, Alfasi S, Overton T, *et al.* Exploitation of GFP fusion proteins and stress avoidance as a generic strategy for the production of high-quality recombinant proteins. *FEMS Microbiol Lett*, 2009, **299**(1): 86–94.
- [25] Ganoza MC, Kofoid EC, Marliere P, *et al.* Potential secondary structure at translation-initiation sites. *Nucleic Acids Res*, 1987, **15**(1): 345–360.
- [26] Zhang SH, Xing JL, Yao XY, *et al.* Non-fused expression of HAb18GEF by reducing stability of translational initiation region in mRNA. *Chin J Biotech*, 2004, **20**(2): 175–180.
- 张思河, 邢金良, 姚西英, 等. 降低 mRNA 翻译起始区的稳定性原核非融合表达 HAb18GEF. *生物工程学报*, 2004, **20**(2): 175–180.