

研究报告

菜豆环氧化物水解酶的表达及其催化特性研究

石小玲¹ 阚婷婷¹ 李闯² 宗迅成² 邬敏辰^{3*}

(1. 江南大学药学院 江苏 无锡 214122)

(2. 江南大学生物工程学院 江苏 无锡 214122)

(3. 江南大学无锡医学院 江苏 无锡 214122)

摘要:【背景】光学纯环氧化物及邻二醇是一类多功能手性砌块。与化学合成法相比,环氧化物水解酶(EHs)介导的生物转化法因环境友好而成为当前的研究热点。【目的】从菜豆(*Phaseolus vulgaris*)中克隆一种EH基因并进行原核表达,研究重组酶催化环氧苯乙烯(Styrene oxide, SO)的水解特性。【方法】通过计算机辅助分析EHs的一级结构,推测一种菜豆来源的未知功能蛋白(PvEH4)可能具有EH活性。利用RT-PCR技术,以菜豆总RNA为模板,扩增编码PvEH4的基因

veh4

,并实现其在*Escherichia coli* BL21(DE3)中的表达。利用重组菌*E. coli/pveh4*全细胞催化SO水解,分析PvEH4的对映选择性和区域选择性。【结果】一级结构分析表明,PvEH4具有 $\alpha\beta$ 折叠型EH特有的保守区域。SDS-PAGE结果显示PvEH4的表观分子量为39.4 kD。PvEH4针对SO的对映选择率(*E*值)为10.1,区域选择性系数 α_S 和 β_R 分别为99.5%和82.5%。当外消旋SO转化率达到68.1%时,可同时获得99.9% *ee*_S的(*R*)-SO和92.3% *ee*_P的(*R*)-苯乙二醇(Phenyl-1,2-ethanediol, PED),两者的产率分别为31.9%和65.6%。【结论】PvEH4的挖掘不仅增加了植物类EHs的数量,同时也为EHs的蛋白分子改造提供参考。

关键词: 菜豆, 环氧化物水解酶, 对映选择性, 区域选择性, 不对称水解

Expression and characterization of *Phaseolus vulgaris* epoxide hydrolase

SHI Xiao-Ling¹ KAN Ting-Ting¹ LI Chuang² ZONG Xun-Cheng² WU Min-Chen^{3*}

(1. School of Pharmaceutical Sciences, Jiangnan University, Wuxi, Jiangsu 214122, China)

(2. School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi, Jiangsu 214122, China)

(3. Wuxi Medical School, Jiangnan University, Wuxi, Jiangsu 214122, China)

Abstract: [Background] Optically pure epoxides and vicinal diols are versatile chiral building blocks. Compared with chemical synthesis, biotransformation mediated by epoxide hydrolases (EHs), an environmental-friendly way, has become the current research focus. [Objective] A gene encoding EH

Foundation items: National Natural Science Foundation of China (21676117); Graduate Student Research and Innovation Program of Jiangsu Province (SJZZ16_0217, KYLX16_0804)

*Corresponding author: E-mail: biowmc@126.com

Received: June 14, 2017; **Accepted:** August 11, 2017; **Published online** (www.cnki.net): August 30, 2017

基金项目: 国家自然科学基金(21676117); 江苏省普通高校研究生科研创新计划项目(SJZZ16_0217, KYLX16_0804)

*通信作者: E-mail: biowmc@126.com

收稿日期: 2017-06-14; 接受日期: 2017-08-11; 网络首发日期(www.cnki.net): 2017-08-30

was cloned from *Phaseolus vulgaris* and heterologously expressed in *Escherichia coli*. The catalytic characteristics of recombinant EH towards SO were studied. **[Methods]** By means of computer-aided analysis of EH primary structure, a hypothetical protein from *Phaseolus vulgaris* (PvEH4) was predicted to have EH activity. Using *P. vulgaris* total RNA as the templet, the PvEH4-encoding gene, *pveh4*, was amplified by RT-PCR technique and expressed in *E. coli* BL21(DE3). To assay catalytic characteristics of PvEH4, asymmetric hydrolysis of styrene oxide (SO) was conducted by *E. coli/pveh4* whole cells. **[Results]** The primary structure analysis showed that PvEH4 has the typical characteristics of conserved α/β fold EH motifs. SDS-PAGE analysis displayed that the apparent molecular weight of PvEH4 was 39.4 kD. The enantioselectivity (E value) of PvEH4 towards SO was 10.1, while regioselectivity coefficients, α_S and β_R were 99.5% and 82.5%, respectively. As the conversion ratio reached 68.1%, (R)-SO with 99.9% ee_s and 31.9% yield as well as (R)-PED with 92.3% ee_p and 65.6% yield were simultaneously obtained. **[Conclusion]** The excavated PvEH4 not only increases the number of plant EHs, but also provides a good reference for EH modification.

Keywords: *Phaseolus vulgaris*, Epoxide hydrolase, Enantioselectivity, Regioselectivity, Asymmetric hydrolysis

环氧化物水解酶(Epoxide hydrolases, EHs, EC 3.3.2.x)能够催化外消旋环氧化物进行手性拆分或对映归一性水解,最终获得手性纯环氧化物和/或邻二醇。这些多功能的手性合成子在医药和精细化工等领域中具有很高的应用价值,如(R)-环氧苯乙烷(Styrene oxide, SO)可作为抗抑郁药物氟西汀的起始原料^[1], (R)-苯乙二醇(Phenyl-1,2-ethanediol, PED)可用于合成 NK-1 受体拮抗剂和抗病毒活性的核苷类似物^[2]。

EHs 分布广泛,其催化反应条件温和且无需辅助因子,被认为是一种极具有应用前景的生物催化剂。新型 EHs 的挖掘工作已成为近年来的研究热点。Zhu 等从绿豆(*Vigna radiata*)中扩增出 2 种编码 EHs 的基因,并将其分别转入大肠杆菌(*Escherichia coli*)内进行异源表达,所获重组酶 VrEH1^[3]和 VrEH2^[4]均能进行单独归一性水解对硝基环氧苯乙烷,得到产物(R)-对硝基苯乙二醇的对映体过量(Enantiomeric excess ee)值分别为 70.0%和 84.8%。归一性水解的理论产率为 100%,打破了动力学拆分的 50%理论产率的限制^[5],但其需要高且互补的区域选择性的酶才能得到高 ee_p 的产物。相比之下,高 E 值的 EHs 经动力学拆分反应可制备得到更高应用价值的手性环氧化物,如 Grogan 等^[6]利用来源于 *Beauveria densa* CMC 3240 的 EH 拆分 rac -SO

时, (R)-SO 的 ee_s 和产率分别为 95%和 18%,但 (R)-PED 的 ee_p 和产率分别为 78%和 34%。大多数情况下动力学拆分途径中水解产物邻二醇因 ee_p 较低而导致浪费,为了提高底物及产物的利用率仍需挖掘新型 EHs。

本研究以菜豆 EH (PvEH1) 的一级结构(GenBank 登录号 AKJ75509)为模板,利用蛋白质序列的在线搜索和比对程序,选定一种来自于菜豆的未知功能蛋白质(PvEH4),借助分子生物学手段实现 PvEH4 在 *E. coli* 中的异源表达。利用 PvEH4 催化 rac -SO 的不对称水解,测定其针对 SO 的对映选择性和区域选择性。采用生物信息学软件对 PvEH4 的三维结构进行单模板同源建模和分析。

1 材料与amp;方法

1.1 菌株、质粒和培养基

大肠杆菌(*E. coli*) JM109 和 BL21(DE3), 本实验室保藏;克隆质粒 pUCm-T, 生工生物工程(上海)股份有限公司;表达质粒 pET-28a(+), 美国 Novagen 公司;LB 液体培养基参照文献[7], LB 固体培养基在液体培养基基础上添加琼脂粉含量为 18 g/L。

1.2 主要试剂和仪器

UNIQ-10 柱式 Trizol 总 RNA 抽提试剂盒和 SanPrep 柱式 DNA 胶回收试剂盒, 生工生物工程

(上海)股份有限公司; RNA PCR 试剂盒、*ExTaqHs/ExTaq/rTaq* DNA 聚合酶、DNA Marker、限制性内切酶、T4 DNA 连接酶和蛋白质 Marker, 大连 TaKaRa 公司; *rac*-SO, 上海 TCI 公司; (*S*)-和(*R*)-SO、(*S*)-和(*R*)-PED, 上海安耐吉公司; 其他试剂均为国产分析纯。全温摇瓶柜, 江苏太仓实验设备厂; 高速冷冻离心机, 德国 Eppendorf 公司; 气相色谱仪, 日本 SHIMADZU 公司; 手性气相色谱柱 CycloSil-B (30 m×0.25 mm×0.25 μm), 美国 Agilent 科技公司。

1.3 方法

1.3.1 EH 的数据库挖掘和一级结构分析

利用 NCBI 网站(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)的 BLASTp 服务器, 以菜豆来源的 *PvEH1* (GenBank 登录号 AKJ75509)为模板, 在 GenBank 数据库中查找和比对 EHs 的一级序列, 最终搜索得到与其一级结构相似性大于 65%、功能未知的氨基酸序列(XP_007144960), 推测其可能具有 EH 活性, 因此将其命名为菜豆环氧化物水解酶(*PvEH4*)。

在 Swiss-Prot 数据库(<http://www.ebi.ac.uk/swissprot/>)中搜集与 *PvEH4* 相似性大于 50% 的植物类 EHs 序列, 运用 ClustalW2 程序(<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>)和 ESPript 3.0 软件(<http://esprict.ibcp.fr/>)进行多序列比对及保守区域分析。

1.3.2 *PvEH4* 编码基因的克隆

将编码 *PvEH4* 的基因命名为 *pveh4*, 根据其对应的核苷酸序列(XM_007144898), 使用 Oligo 7 设计特异引物 *pveh4*-F (5'-GAATTCATGGAGAACA TACTTCACAGAAT-3', 含 *EcoR* I 酶切位点)和 *pveh4*-R (5'-CTCGAGTCAGAACTGCTTAATGAA GTCATAAATGT-3', 含 *Xho* I 酶切位点), 由生工生物工程(上海)股份有限公司合成, 用于 *pveh4* 的克隆。

选取籽粒饱满的菜豆种子(购自本地超市), 于 30 °C 浸泡 8 h、培育 20 h, 称取 100 mg 胚芽提取总 RNA。以菜豆总 RNA 为模板、Oligo dT-Adaptor 为引物, 逆转录合成 cDNA 第一条链, 以该链为模板, 进行第一轮 PCR, 反应体系为: 5×PCR buffer

10 μL, dNTPs (各 2.5 mmol/L) 3 μL, cDNA 2 μL, 特异性引物 *pveh4*-F 及通用引物 M13 Primer M4 (10 pmol/L)各 0.5 μL, *ExTaqHs* DNA 聚合酶(5 U/μL) 0.25 μL, 添加双蒸水至 50 μL。反应条件为: 94 °C 2 min; 94 °C 30 s, 50 °C 30 s, 72 °C 60 s, 30 个循环; 72 °C 延伸 10 min。以第一轮 PCR 产物为模板, 进行第二轮 PCR, 反应体系为: 10×*ExTaq* buffer 5 μL, dNTPs (各 2.5 mmol/L) 3 μL, 第一轮 PCR 产物 2 μL, 引物 *pveh4*-F 与 *pveh4*-R (10 pmol/L)各 1 μL, *ExTaq* DNA 聚合酶(5 U/μL) 0.5 μL, 添加双蒸水至 50 μL。反应条件为: 94 °C 2 min; 94 °C 30 s, 52 °C 30 s, 72 °C 60 s, 30 个循环; 72 °C 10 min。扩增产物通过琼脂糖凝胶电泳检测、纯化回收, 连接 pUCm-T, 转化 *E. coli* JM109, 筛选阳性克隆子送至生工生物工程(上海)股份有限公司进行 DNA 测序, 将结果正确的质粒命名为 pUCm-T-*pveh4*。

1.3.3 *PvEH4* 在 *E. coli* 中的表达及蛋白质分析

将 pUCm-T-*pveh4* 和表达载体 pET-28a(+)分别双酶切后连接、转化 *E. coli* BL21(DE3), 将经卡那霉素抗性筛选、验证并且测序正确的重组菌株命名为 *E. coli/pveh4*。分别挑取 *E. coli/pveh4* 和 *E. coli/pET-28a* 单菌落接种于 2 mL LB (含 100 μg/mL 卡那霉素)中, 于 37 °C、220 r/min 培养过夜, 按 2% 体积比的接种量转接于 50 mL 相同培养基中, 37 °C、220 r/min 振荡培养至 OD_{600} 达到 0.6–0.8 时, 加入 IPTG 至 0.3 mmol/L, 16 °C 诱导 10 h 后将菌液于 4 °C、8 000 r/min 离心 5 min, 收集菌体。

所得 *E. coli/pveh4* 湿菌体经适量稀释后进行 SDS-PAGE 分析, *E. coli/pET-28a* 作为阴性对照。使用 Quantity One 软件分析 SDS-PAGE 结果, 计算目的蛋白的表观分子量。借助 ExPASy (<http://www.expasy.org/>)在线工具 ProtParam 分析 *PvEH4* 的理化性质。

1.3.4 气相色谱分析条件

样品分析采用气相色谱仪、手性气相色谱柱和氢火焰离子化检测器。分析条件为: 进样口和检测器温度 250 °C; 初始柱温 100 °C, 以 5 °C/min

升温至 195 °C；载气为氮气，流速 3.0 mL/min，分流比 1:50。正己醇、(R)-SO、(S)-SO、(S)-PED 和 (R)-PED 的保留时间分别为 3.177、5.530、5.614、16.048 和 16.144 min。

计算公式 $ee_s = [(R-S)/(R+S)] \times 100\%$; $ee_p = [(R_d - S_d)/(R_d + S_d)] \times 100\%$; $E = \ln[(1-c) \times (1-ee_s)] / \ln[(1-c) \times (1+ee_s)]$; (R)-SO 产率 = $R/(R_0 + S_0) \times 100\%$, (R)-PED 产率 = $R_d/(R_0 + S_0) \times 100\%$ 。其中：R 和 S 表示(R)-和(S)-SO 浓度， R_d 和 S_d 表示(R)-和(S)-PED 浓度， R_0 和 S_0 表示(R)-和(S)-SO 初始浓度，c 表示 rac-SO 的转化率。区域选择性系数 $\alpha_s = [R_d^S / (R_d^S + S_d^S)] \times 100\%$; $\beta_R = [R_d^R / (R_d^R + S_d^R)] \times 100\%$ 。其中： R_d^S 和 S_d^S 表示由(S)-SO 转化的(R)-和(S)-PED 浓度， R_d^R 和 S_d^R 表示由(R)-SO 转化的(R)-和(S)-PED 浓度。

1.3.5 PvEH4 催化特性的测定

每克湿菌体用 5 mL 的 K_2HPO_4/KH_2PO_4 缓冲液(100 mmol/L，pH 7.0，KPB)悬浮，用于测定 PvEH4 的 E 值和区域选择性系数(α_s 和 β_R)。以 *E. coli*/pET-28a 菌悬液为对照，在 2 mL EP 管中加入 1 455 μ L 菌悬液，于 25 °C 保温 5 min，加入 45 μ L rac-SO 使其终浓度为 6 mmol/L，于相同条件下反应，定时取样 100 μ L 至 1 mL 乙酸乙酯(含 1 mmol/L 正己醇作为内标)中萃取底物和产物，上层有机相按照 1.3.4 方法进行气相色谱分析，绘制 PvEH4 催化 rac-SO 水解的反应进程曲线。

在两支 2 mL EP 管中加入 496 μ L 菌悬液，于 25 °C 保温 5 min，分别加入 4 μ L (R)-和(S)-SO 使其终浓度为 4 mmol/L，于 25 °C、220 r/min 反应 3 h 后进行萃取、气相色谱检测，计算 PvEH4 的区域选择性系数。

1.3.6 PvEH4 三维结构的建模及分析

在 PDB 数据库(<http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>)中搜索与 PvEH4 同源性最高且晶体结构已知的 EH，利用 SWISS-MODEL 网站(<https://www.swissmodel.expasy.org/>)和 PyMOL 软件对 PvEH4 的三维结构进行同源建模和分析。使用 SAVES 网站(<http://services.mbi.ucla.edu/SAVES/>)的在线工具

PROCHECK 及 Verify_3D 对建模结果进行评估，验证其可靠性。

2 结果与讨论

2.1 EHs 一级结构的分析

在 NCBI 数据库中选取 8 种与 PvEH4 相似性大于 50% 的植物类 EHs 进行多序列比对(图 1)：VrEH1 (*V. radiata*, ADP68585), PvEH1 (*P. vulgaris*, AKJ75509), NBEH (*N. benthamiana*, ACE82565), MtEH (*M. truncatula*, XP_003604118), GsEH (*G. soja*, KHN20253), VrEH2 (*V. radiata*, AIJ27456), StEH (*S. tuberosum*, AAA81891), CcEH (*C. cajan*, KYP74390)。分析结果表明，PvEH4 含有典型的 α/β 折叠水解酶超家族的保守区域 HGXP、GXSmXS/T 和 SmXNuXSmSm (X、Sm 和 Nu 分别代表任意氨基酸、侧链基团较小的和侧链为亲和基团的氨基酸)，其催化三联体为 Asp¹⁰¹-His³⁰¹-Asp²⁶⁶，两个保守质子供体为 Tyr¹⁵³ 和 Tyr²³⁵。由此推测 PvEH4 可能具有 EH 的催化活性。

2.2 PvEH4 基因的克隆

以菜豆总 RNA 为模板，按照 1.3.2 所述方法进行 RT-PCR 扩增及琼脂糖凝胶电泳检测，获得长度约为 1 000 bp 的目的条带，图略，与 *pveh4* 大小相符。将扩增产物连接至 pUCm-T 载体上构建 pUCm-T-*pveh4*。基因测序结果显示，*pveh4* 开放阅读框长 969 bp，编码 322 个氨基酸。

2.3 PvEH4 的异源表达及蛋白质分析

按照 1.3.3 的方法分别诱导 *E. coli*/pET-28a 和 *E. coli*/*pveh4*。SDS-PAGE 结果显示，*E. coli*/*pveh4* 诱导全细胞约在相对分子质量 36.5 kD 处有目的蛋白条带(图 2)，表明 PvEH4 在 *E. coli* 胞内实现了异源表达。Quantity One 软件分析表明此目的蛋白条带的表观分子量为 39.4 kD。唐威华等^[8]研究表明，组氨酸标签带有较强正电荷，降低了蛋白在 SDS-PAGE 中的迁移速率，导致表观分子量变大。理化性质分析结果显示，PvEH4 等电点为 5.7，疏水性系数为 -0.174，表明其为亲水性蛋白。

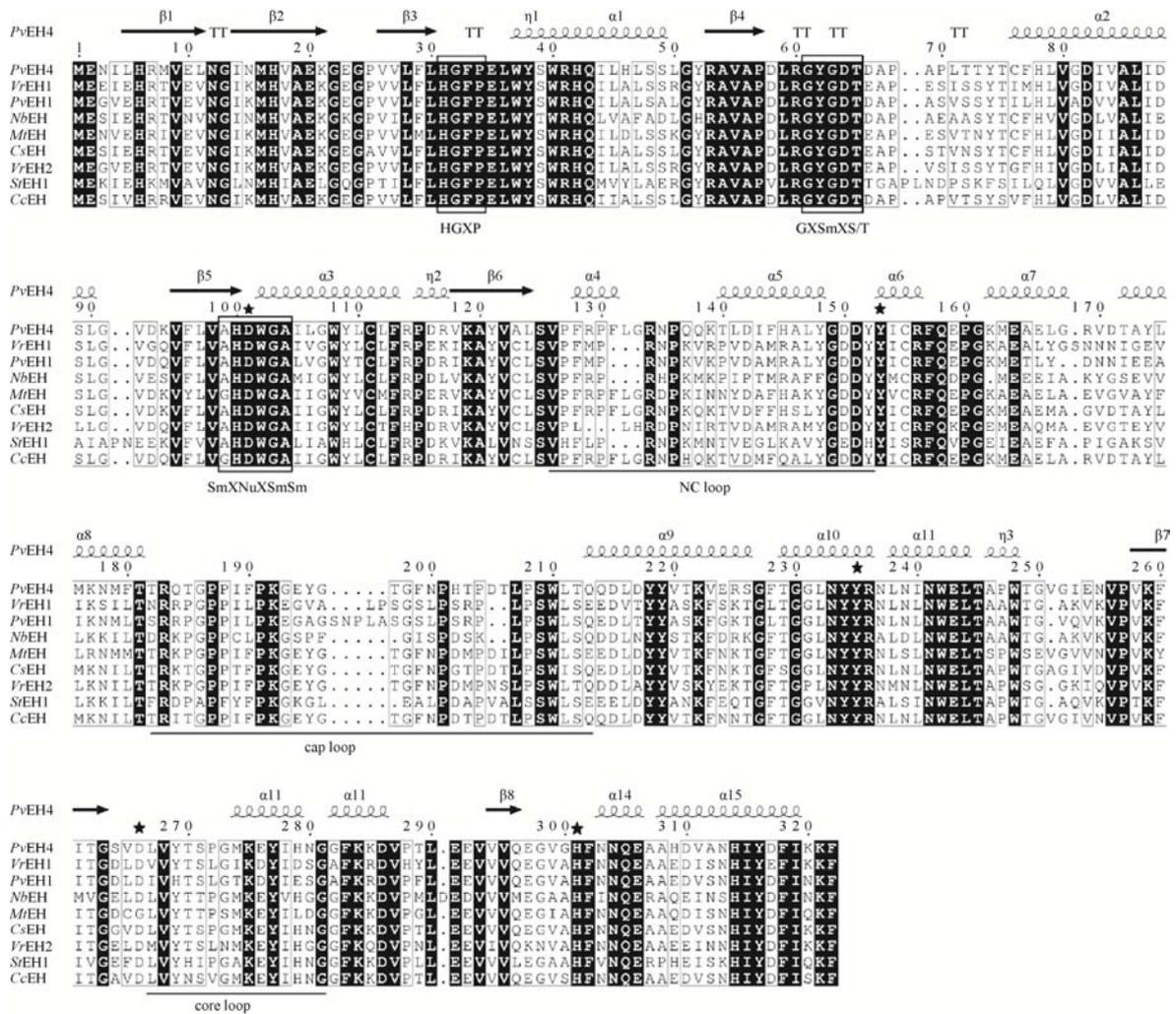


图 1 *PvEH4* 与 8 种植物类 EHs 的多序列比对
 Figure 1 The multiple sequence alignment of *PvEH4* with eight plant EHs

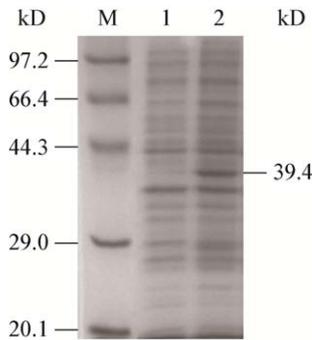


图 2 重组 *E. coli* 全细胞的 SDS-PAGE 分析
 Figure 2 SDS-PAGE analysis of the recombinant *E. coli* whole cells
 注: M: 标准分子量蛋白 Marker; 1: *E. coli*/pET-28a; 2: *E. coli*/pveh4.
 Note: M: Protein marker; 1: *E. coli*/pET-28a; 2: *E. coli*/pveh4.

2.4 *PvEH4* 不对称催化水解 *rac*-SO

利用 *E. coli*/pveh4 全细胞催化 *rac*-SO 不对称水解的反应进程曲线如图 3A 所示。*PvEH4* 与同为植物来源的 *PvEH1*^[7]、mbEH A、mbEH B^[9](又分别称为 *VrEH1* 和 *VrEH2*)、*SsEH*^[10] 的对映体偏好性相同, 均优先水解(S)-SO。在 0-3 h 内, (S)-SO 被迅速水解, 此时 (R)-SO 的 *ee_s* 值迅速上升; 当 *c* 为 52.3% 时, *E* 值为 10.1; 反应进行至 4 h 时, (S)-SO 基本水解完全(图 3B), 此时 *c* 达到 68.1%, 可获得 99.9% *ee_s* 的(R)-SO 和 92.3% *ee_p* 的(R)-PED, 其产率分别为 31.9% 和 65.6%。其中, (R)-SO 的 *ee_s* 高于 *SsEH* 的 94%。但随着反应继续进行至 6 h,

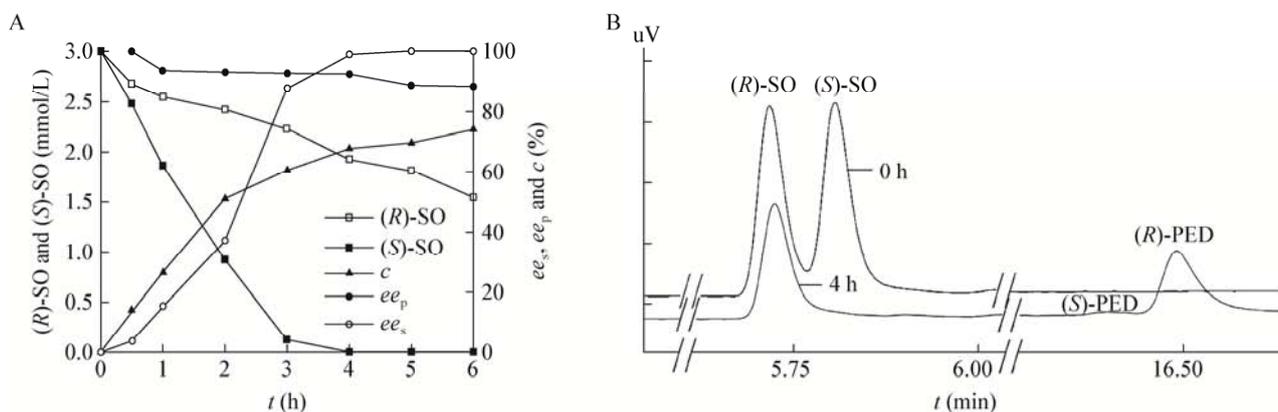


图3 *PvEH4* 催化 *rac*-SO 水解的进程曲线及其 0 h 与 4 h 的气相色谱分析

Figure 3 The hydrolytic course curve of *rac*-SO catalyzed by *PvEH4* and its GC analysis at 0 h and 4 h

(*R*)-SO 逐渐被消耗, 导致其产率不断下降。同时, (*R*)-PED 的 ee_p 值缓慢降低至 88.1%, 此现象可能与 *PvEH4* 对(*R*)-SO 的区域选择性有关。

2.5 *PvEH4* 的区域选择性分析

为进一步了解 *PvEH4* 催化 SO 水解的反应特性, 利用 1.3.5 方法测定了 *PvEH4* 的区域选择性系数。针对 SO 的 2 种构型, *PvEH4* 表现出互补的区域选择性(图 4): *PvEH4* 主要攻击(*S*)-SO 含氧三元环中位阻较大的 α 碳原子($\alpha_S=99.5\%$), 产物构型发生翻转, 生成(*R*)-PED; 而对于(*R*)-SO, *PvEH4* 则主要攻击其三元环中位阻较小的 β 碳原子($\beta_R=82.5\%$), 产物构型维持不变, 仍得到(*R*)-PED。*PvEH4* 对于(*S*)-和(*R*)-SO 的区域选择性均优于 *PvEH1* ($\alpha_S=91.1\%$, $\beta_R=53.3\%$)^[7]、*mbEH A* ($\alpha_S=83\%$, $\beta_R=68\%$)及 *mbEH B* ($\alpha_S=84\%$, $\beta_R=68\%$)^[9]。

2.6 *PvEH4* 三维结构的模拟与分析

PDB 数据库的搜索结果显示, 马铃薯 EH (*StEH*, PDB: 2CJP) 与 *PvEH4* 的相似性最高, 为 58%。以 *StEH* 的晶体结构为模板, 对 *PvEH4* 的三维结构进行同源建模, 并基于 *StEH* 晶体的研究^[11], 使用 PyMOL 软件分析 *PvEH4* 的三维结构。*PvEH4* 可分为中心结构域(Core domain)及盖子结构域(Lid domain)两部分(图 5A)。Core loop 位于中心结构域内, Cap loop 位于盖子域, NC loop 连接中心域及盖子域。研究表明^[12-13], EHs 的催化位点高度

保守, 活性中心由亲核试剂 Asp、碱性氨基酸 His 及电荷供体 Asp (或 Glu)组成(图 5B)。两个 Tyr 残基的羟基基团通过氢键连接环氧化物的氧原子, 辅助 Asp 残基亲核攻击环氧碳原子使其开环, 形成共价结合的酯中间体; His 残基在电荷供体 Asp 残基的辅助下从水分子中提取质子, 水解酯中间体并释放产物。Glu 可辅助质子从活性中心转移至水中, 稳定与环氧化物发生亲核加成反应的水分子^[14]。

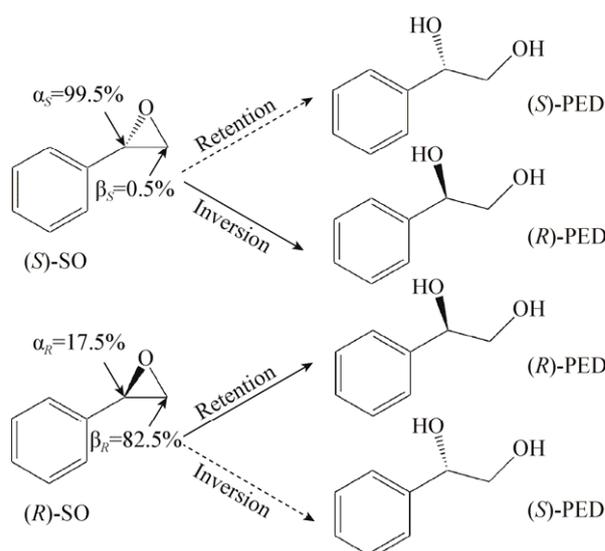


图4 *PvEH4* 催化(*R*)-SO 和(*S*)-SO 水解的区域选择性
Figure 4 Regioselectivity of *PvEH4* catalyzing (*R*)-SO and (*S*)-SO

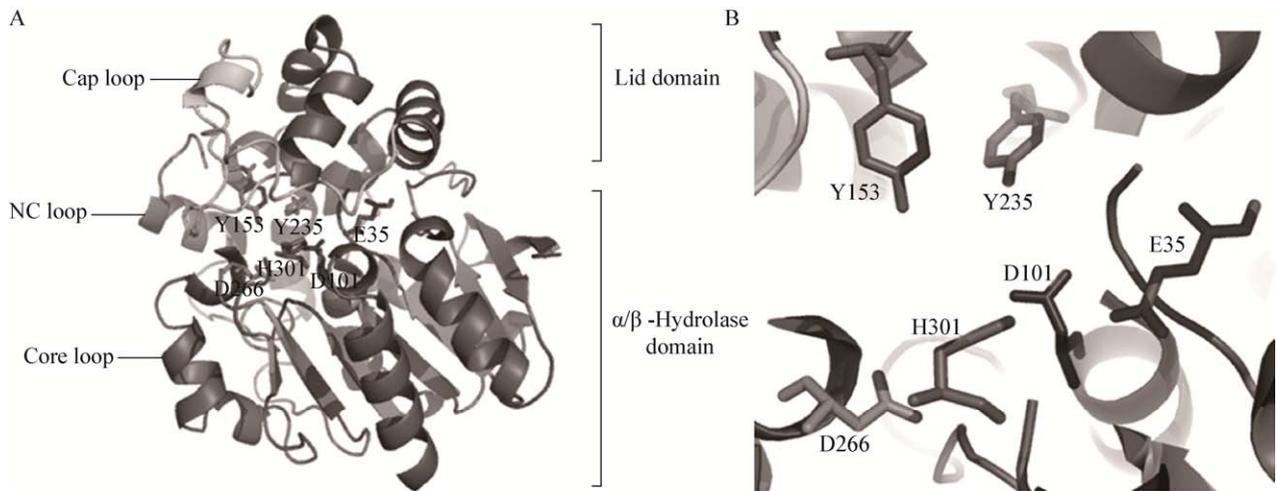


图5 *PvEH4* 的三维结构(A)和活性中心(B)
Figure 5 Three-dimensional structure (A) and active center (B) of *PvEH4*

通过在线工具 PROCHECK 分析 *PvEH4* 的三维结构并得到 Ramachandran 图(图 6)。由图可知, 91.0%的氨基酸位于核心允许区内, 7.5%位于一般允许区, 0.7%位于最大允许区, 3 个区域之和超过 95%, 表明模拟构建的 *PvEH4* 三维结构模型具有一定的可靠性。Verify_3D 结果表明 96.25%的残基的相容性分值 >0.2, 说明此模型通过了 Verify_3D 检测, 证实了其模型的合理性。

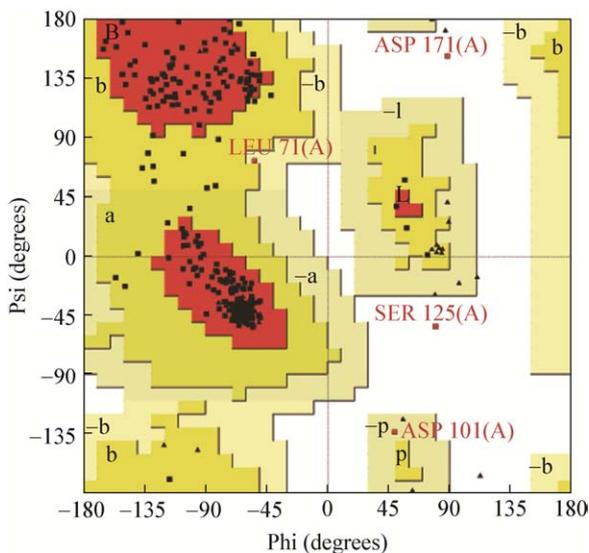


图6 *PvEH4* 三维结构的 PROCHECK 评价
Figure 6 PROCHECK analysis of three-dimensional structure of *PvEH4*

3 结论

本研究借助生物信息学的方法从菜豆中发掘到一种新型 EH——*PvEH4*。采用 RT-PCR 技术从菜豆中克隆了其编码基因 *pveh4*, 并实现该基因在 *E. coli* BL21(DE3)中的表达。利用重组 *E. coli* 全细胞研究了 *PvEH4* 催化 *rac*-SO 的水解特性, 结果表明, *PvEH4* 优先水解(S)-SO, *E* 值为 10.1 (25 °C), 并且针对于 SO 的两种构型, *PvEH4* 表现出互补的区域选择性。经由 *PvEH4* 的不对称水解反应, 可同时获得手性纯度较高的(R)-SO 和(R)-PED, 提高了底物的利用率。*PvEH4* 优良的催化特性使其在不对称水解 SO 的反应中具有潜在的应用价值。

REFERENCES

- [1] Mitchell D, Koenig TM. Synthesis of *R*- and *S*-fluoxetine, norfluoxetine and related compounds from styrene oxide[J]. Synthetic Communications, 1995, 25(8): 1231-1238
- [2] Jia X, Xu Y, Li Z. Regio- and stereoselective concurrent oxidations with whole cell biocatalyst: simple and green syntheses of enantiopure 1,2-diols via oxidative kinetic resolution[J]. ACS Catalysis, 2011, 1(1): 591-596
- [3] Zhu QQ, He WH, Kong XD, et al. Heterologous overexpression of *Vigna radiata* epoxide hydrolase in *Escherichia coli* and its catalytic performance in enantioconvergent hydrolysis of *p*-nitrostyrene oxide into (*R*)-*p*-nitrophenyl glycol[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2014, 98(1): 207-218
- [4] Wu YW, Kong XD, Zhu QQ, et al. Chemoenzymatic enantioconvergent hydrolysis of *p*-nitrostyrene oxide into (*R*)-*p*-nitrophenyl glycol by a newly cloned epoxide hydrolase

- VrEH2 from *Vigna radiata*[J]. Catalysis Communications, 2015, 58: 16-20
- [5] Hu D, Tang CD, Yang B, et al. Expression of a novel epoxide hydrolase of *Aspergillus usamii* E001 in *Escherichia coli* and its performance in resolution of racemic styrene oxide[J]. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 2015, 42(5): 671-680
- [6] Grogan G, Rippé C, Willetts A. Biohydrolysis of substituted styrene oxides by *Beauveria densa* CMC 3240[J]. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 1997, 3(5): 253-257
- [7] Ye HH, Hu D, Li C, et al. Expression of a novel epoxide hydrolase from *Phaseolus vulgaris* and its enantioconvergent catalytic performance[J]. China Biotechnology, 2016, 36(10): 21-27 (in Chinese)
叶慧华, 胡蝶, 李闯, 等. 新型菜豆环氧化物水解酶的异源表达及对映归一性催化特性[J]. 中国生物工程杂志, 2016, 36(10): 21-27
- [8] Tang WH, Zhang JL, Wang ZY, et al. The cause of deviation made in determining the molecular weight of His-tag fusion proteins by SDS-PAGE[J]. Plant Physiology Journal, 2000, 26(1): 64-68 (in Chinese)
唐威华, 张景六, 王宗阳, 等. SDS-PAGE 法测定 His-tag 融合蛋白分子量产生偏差的原因[J]. 植物生理学报, 2000, 26(1): 64-68
- [9] Xu W, Xu JH, Pan J, et al. Enantioconvergent hydrolysis of styrene epoxides by newly discovered epoxide hydrolases in mung bean[J]. Organic Letters, 2006, 8(8): 1737-1740
- [10] Monterde MI, Lombard M, Archelas A, et al. Enzymatic transformations. Part 58: Enantioconvergent biohydrolysis of styrene oxide derivatives catalysed by the *Solanum tuberosum* epoxide hydrolase[J]. Tetrahedron: Asymmetry, 2004, 15(18): 2801-2805
- [11] Mowbray SL, Elfström LT, Ahlgren KM, et al. X-ray structure of potato epoxide hydrolase sheds light on substrate specificity in plant enzymes[J]. Protein Science, 2006, 15(7): 1628-1637
- [12] Bala N, Chimni SS. Recent developments in the asymmetric hydrolytic ring opening of epoxides catalysed by microbial epoxide hydrolase[J]. Tetrahedron: Asymmetry, 2010, 21(24): 2879-2898
- [13] Widersten M, Gurell A, Lindberg D. Structure-function relationships of epoxide hydrolases and their potential use in biocatalysis[J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects, 2010, 1800(3): 316-326
- [14] He WH. Cloning, expression and characterization of a novel epoxide hydrolase from *Vigna radiata*[D]. Shanghai: Master's Thesis of East China University of Science and Technology, 2010 (in Chinese)
贺婉红. 绿豆环氧水解酶基因克隆、表达及酶学性质表征[D]. 上海: 华东理工大学硕士学位论文, 2010

~~~~~  
(上接 p.752)

## 征 稿 简 则

### 3.4 脚注(正文首页下方):

Foundation items:

\*Corresponding author: Tel: ; E-mail:

Received: January 01, 20xx; Accepted: March 01, 20xx; Published online (www.cnki.net): March 31, 20xx

基金项目: 基金项目(编号)

\*通信作者: Tel: ; E-mail:

收稿日期: 20xx-01-01; 接受日期: 20xx-03-01; 网络首发日期(www.cnki.net): 20xx-03-31

3.5 参考文献: 参考文献按文内引用的先后顺序排序编码, 未公开发表的资料请勿引用。我刊参考文献需要注明著者(文献作者不超过 3 人时全部列出, 多于 3 人时列出前 3 人, 后加“等”或“et al.”, 作者姓前、名后, 名字之间用逗号隔开)、文献名、刊名、年卷期及页码。国外期刊名必须写完整, 不用缩写, 不用斜体。参考文献数量不限。

参考文献格式举例:

- [1] Marcella C, Claudia E, Pier GR, et al. Oxidation of cystine to cysteic acid in proteins by peroxyacids as monitored by immobilized pH gradients[J]. Electrophoresis, 1991, 12(5): 376-377
- [2] Wang BJ, Liu SJ. Perspectives on the cultivability of environmental microorganisms[J]. Microbiology China, 2013, 40(1): 6-17 (in Chinese)  
王保军, 刘双江. 环境微生物培养新技术的研究进展[J]. 微生物学通报, 2013, 40(1): 6-17
- [3] Shen T, Wang JY. Biochemistry[M]. Beijing: Higher Education Press, 1990: 87 (in Chinese)  
沈同, 王镜岩. 生物化学[M]. 北京: 高等教育出版社, 1990: 87
- [4] Liu X. Diversity and temporal-spatial variability of sediment bacterial communities in Jiaozhou Bay[D]. Qingdao: Doctoral Dissertation of Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, 2010 (in Chinese)  
刘欣. 胶州湾沉积物细菌多样性及菌群时空分布规律[D]. 青岛: 中国科学院海洋研究所博士学位论文, 2010

(下转 p.847)