

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
51(6):789-795; 4 June 2011
ISSN 0001-6209; CN 11-1995/Q
<http://journals.im.ac.cn/actamicroen>

(R)-、(S)-羰基还原酶在酿酒酵母中的表达和亚细胞定位

张荣珍, 徐岩*, 王珊珊, 张波涛, 耿亚维

(江南大学生物工程学院, 教育部工业生物技术重点实验室, 无锡 214122)

摘要:【目的】将增强型荧光蛋白标记的(R)-和(S)-羰基还原酶于酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae* W303-1A)细胞中表达, 分析荧光蛋白表达谱, 确定两种酶在细胞中的功能分布和亚细胞定位。【方法】采用 SOE-PCR 法克隆出增强型荧光蛋白与(R)-和(S)-羰基还原酶的融合基因, 构建到真核表达载体 pYX212 中, 电击转化酵母细胞, 以荧光蛋白为筛选标志, 观察两种酶在酵母细胞中的表达和分布。【结果】激光扫描共聚焦显微观察表明(R)-和(S)-羰基还原酶多定位于细胞内膜和细胞质中稳定表达, 少数成点状分布于细胞中央。根据荧光强度可知(S)-羰基还原酶的表达水平明显高于(R)-羰基还原酶。生物转化结果显示融合型(R)-和(S)-羰基还原酶催化底物 2-羟基苯乙酮, 分别获得(R)-和(S)-苯基乙二醇, 前者产物的光学纯度和产率为 86.6% 和 70.4%, 后者产物的光学纯度和产率分别为 92.3% 和 81.8%。【讨论】荧光蛋白与酶的融合没有改变靶蛋白的分子构象与生物活性, 酿酒酵母工程菌较重组大肠杆菌具有更明显的生物功能优势, 该研究为羰基还原酶蛋白的功能表达调控与亚细胞定位的可视化研究奠定了坚实的基础。

关键词: 羰基还原酶, 酿酒酵母, 荧光蛋白表达谱, 亚细胞定位, 苯基乙二醇

中图分类号: Q814 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2011) 01-0789-07

羰基还原酶广泛分布于从低等到高等的多种生物体内, 是一种具有高度化学、区域和立体选择性的生物催化剂, 常用于制备具有光学活性的手性醇化合物^[1-2]。手性醇是一种具有特殊的光电磁性能和生理活性的旋光性模块化合物, 是合成许多光学活性药物和农药的重要手性中间体^[3]。在众多的微生物氧化还原酶源中, 来源于近平滑假丝酵母(*Candida parapsilosis*) CCTCC M203011 的(R)-和(S)-羰基还原酶能催化 2-羟基苯乙酮产生不同立体构型的苯基乙二醇^[4-5], 两种酶在大肠杆菌中均能表达, 但酶蛋白表达水平较低或催化功能不稳

定^[3,6]。

与大肠杆菌相比, 酵母是一种安全的低等真核生物, 具有更完善的基因表达调控机制, 能够实现蛋白质的正确折叠、加工和修饰, 逐渐成为最具潜力的基因表达宿主^[4-5]。绿色荧光蛋白(Green Fluorescent Protein, GFP)的发现为异源蛋白的表达研究提供了极大的便利, 研究者只需对荧光蛋白表达谱进行分析, 即可非常直观地获知目标蛋白在细胞中的分布与表达, 为进一步研究蛋白在活细胞中的生理功能提供理论依据^[7-8]。如 Kwak 等通过共聚焦显微技术研究了哺乳动物甲硫氨酸还原酶在酿酒

基金项目: 国家“973 项目”(2003CB716008); 国家“863 计划”(2007AA02Z226, 2006AA020104); 国家自然科学基金(20776060, 31070059); 新世纪优秀人才支持计划(NCET-04-0498)

* 通信作者。Tel: +86-510-85918201; Fax: +86-510-85864112; E-mail: biosean@yahoo.com.cn

作者简介: 张荣珍(1973-), 女, 江西奉新人, 博士, 主要从事分子生物学和生物催化研究。E-mail: rzzhang666@yahoo.com.cn

收稿日期: 2010-12-19; **修回日期:** 2011-01-25

酵母的活性表达,发现绝大多数酶蛋白定位于线粒体,极少数分布于细胞质中^[5]。本研究将增强型荧光蛋白(Enhanced Green Fluorescent Protein, EGFP)和6×Histidine 标签合理引入(R)-和(S)-羧基还原酶的N端,于酿酒酵母细胞中进行表达,利用激光共聚焦显微技术观察了两种羧基还原酶的亚细胞分布,分析了羧基还原酶荧光融合蛋白的生物催化功

能。该实验系统不仅为工业上手性醇的制备提供了更安全、更高效的途径,而且为羧基还原酶蛋白在活细胞内表达调控的可视化研究奠定了基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌种与质粒:如表1所示。

表1 本研究所用菌株和质粒

Table 1 Strains and plasmids used in this study

Strains and plasmids	Characteristics	Source
Stains		
<i>C. parapsilosis</i> CCTCC M203011		Our lab
<i>Escherichia coli</i> DH5 α	F ⁻ mcrA Δ (mrr-hsdRMS-mcrBC) j80 lacZ Δ M15 Δ lac X74 recA1 deoR araD139 Δ	Invitrogen
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> W303-1A	MAT α , leu2-3, ura3-1, trp1-1, his3-11, ade2-1, can1-100	Novagen
Plasmids		
pEGFP-N1	Amp ^r , the source of EGFP gene	Invitrogen
pYX212	Amp ^r	Invitrogen
pYX212 - <i>egfp</i> - <i>rcr</i>	Amp ^r , the gene <i>EGFP</i> in pYX212	This study
pYX212 - <i>egfp</i> - <i>scr</i>	Amp ^r , the gene <i>EGFP</i> in pYX212	This study

1.1.2 主要试剂和仪器: Taq DNA Polymerase、T4 DNA Ligase、限制性内切酶、IPTG、基因组DNA提取试剂盒、质粒提取和DNA回收试剂盒均购于TaKaRa生物有限公司。引物由上海赛百盛基因技术有限公司(SBS)合成。2-羟基苯乙酮按照Liese等方法合成^[9],其余试剂均为国产分析纯。

MicroPulser electroporator, Machine Olympus confocal FV500 Olympus 和球磨破碎仪分别购于美国BIO-RAD公司、日本的公司和美国Sonic Materials公司。

1.2 菌体培养

酵母培养基(g/L): 葡萄糖 40, 酵母膏 5, (NH₄)₂HPO₄ 13, KH₂PO₄ 7, ZnSO₄·7H₂O 0.3, NaCl 0.1, pH 7.0; YPD 液体培养基(g/L): 葡萄糖 20, 蛋白胨 10, 酵母膏 5; LB 培养基(g/L): 胰蛋白胨 10, 酵母提取物 5, NaCl 10, pH 7.0; 使用前加入氨苄青霉素(50 mg/L)。固体培养基添加1.5%琼脂粉。

将 *C. parapsilosis* 菌种接种于装有 50 mL 酵母培养基的 250 mL 摇瓶中, 30℃、150 r/min 振荡培养 48 h。

1.3 基因组DNA的提取

将培养后的 *C. parapsilosis* 于 8000 × g 离心 20 min, 用生理盐水洗涤 2 次后进行菌体收集, 用基

因组DNA提取试剂盒提取基因组。

1.4 *rcr* 和 *scr* 与荧光蛋白融合基因的克隆

根据 *C. parapsilosis* 的 *rcr* 和 *scr* 基因序列 (Accession No. DQ675534 和 DQ295067)^[10-11] 以及 (R)-羧基还原酶(RCR)基因和增强型荧光蛋白(EGFP)基因的序列, 选择EGFP-Linker-RCR的拼接方式, 设计合理引物(下划线部分为限制性酶切位点), 见表2。采用SOE-PCR^[12]方法获得融合基因序列 *egfp-rcr* 和 *egfp-scr*。

表2 本研究所用的引物

Table 2 The primers used in this study

Primers	Sequences(5'→3')
EGFP _{RCR} _F1	ATCGAGAATTCATGTCAATTCATCAAGCCAGTAC (<i>Eco</i> RI)
EGFP _{RCR} _R1	CGAGCCGCCACCGCCCTTGTACAGCTCGTCC
EGFP _{RCR} _F2	GGCGGCTCG GGT GGC ATGTCAATTCAT
EGFP _{RCR} _R2	TGACTCCC GGG GCTATGGATTA AAAA CAACTCTA CTTCT (<i>Sma</i> I)
EGFP _{SCR} _F1	ATCCCACCGGATCCATGGTGAAGCAAGGGCGAG (<i>Bam</i> HI)
EGFP _{SCR} _R1	CGAGCCGCCACCGCCCTTGTACAGCTCGTC
EGFP _{SCR} _F2	GGTGGCGGCTCGGGTGGCATGGGCGAAATC GAATC
EGFP _{SCR} _R2	CGCCCGGGCTATGGACACGTGTATCCAC (<i>Sma</i> I)

1.5 表达载体的构建

利用限制性内切酶 *Eco*R I 和 *Sma*I 对纯化后

的 *egfp-rcr* 和 pYX212 分别进行酶切,酶切后回收的 DNA 片段通过粘性末端连接,获得带有目的基因的重组质粒 pYX212-*egfp-rcr*。同样的方法利用限制性内切酶 *Bam*H I 和 *Sma*I 对基因 *egfp-scr* 和 pYX212 分别进行酶切处理,构建重组质粒 pYX212-*egfp-scr*。重组质粒经北京赛百盛公司测序验证。

1.6 酿酒酵母电击转化方法和转化子的筛选

将活化的酿酒酵母 W303 接种于 25 mL YPD 液体培养基中,30℃、200 r/min 振荡培养过夜;取 2 mL 上述培养液转入装有 100 mL YPD 的 500 mL 三角瓶中,30℃、200 r/min 振荡培养至对数后期,4℃、8000 × g 离心收集菌体。用 40 mL 预冷的无菌纯水悬浮细胞,在冰水中放置 10 min,无菌纯水洗涤菌体 2 次;洗涤离心后的菌体细胞用 300 μL 预冷的 1 mol/L 山梨醇溶液悬浮;加入 10 μL 线性化重组质粒 (>1 μg),在冰水中混匀;转入冰预冷的无菌电转化杯 (cuvette, 0.2 cm) 中,在 1500 V 电击;加入 1 mL 冰预冷的山梨醇溶液;取上述电击转化液涂布酵母氮源基础培养基 (YNB) 平板;30℃ 倒置培养,挑选白色菌落。转化子分离纯化后通过酵母菌落 PCR 的方法鉴定转化子^[13],电泳鉴定 PCR 结果,共选取 20 个转化子。

1.7 融合蛋白的表达

将重组酿酒酵母用 20 mL YPD 液体培养基培养过夜,离心收集的菌体转入 200 mL YPD 培养基中,培养 48 h 后进行蛋白表达分析。在整个菌体的培养过程中,加入了 2 mmol/L ZnCl₂ 到培养基中来维持目标蛋白的稳定蛋白表达和酶活性^[14-15]。将菌体进行收集进行 SDS-PAGE 分析^[16]和酶活力的测定^[17]。

1.8 重组蛋白的纯化

离心收集的重组菌溶于 pH 8.0 的 Tris-HCl 缓冲液中,超声破碎后,离心取上清液,即为粗酶液。粗酶液按美国通用公司的 HisTrap HP affinity column 亲和层析方法进行纯化,利用 ÄKTA-purifier 蛋白纯化系统,经过三个蛋白纯化步骤: Ni²⁺ 亲和层析、Resource Q (1 × 1 cm) 阴离子层析和 Superdex™ 200 (10/300 GL) 凝胶过滤^[18],所有上述操作均在 4℃ 下进行。纯酶液超滤浓缩后用于后续实验。

1.9 重组菌生物转化反应

在 1 mL 0.1 mol/L 磷酸盐缓冲液 (pH 6.5) 中,加入 5 g/L 2-羟基苯乙酮、0.1 g 湿菌体,混匀后于

30℃ 摇床反应 48 h;离心取上清反应液,用 2 mL 乙酸乙酯萃取;萃取液在 Chiralcel OB-H 柱上通过手性固定相高效液相色谱 (HPLC) 进行分析,根据峰面积计算得到产物 (S)-苯乙二醇光学纯度 % e. e. 值及产率。(R)-和 (S)-苯乙二醇的出峰时间分别为 13.9 min 和 16.9 min。

1.10 共聚焦显微观察

将每个样品收集 1×10^4 个细胞进行激光共聚焦显微镜观察。将转化 pYX212, pYX212-*egfp-rcr* 或 pYX212-*egfp-scr* 的 W303 细胞在 24 孔板中培养 24 h 后,离心收集细胞,将细胞封于载玻片上,以激光共聚焦显微镜进行活细胞观察,激发光的波长为 488 nm。将细胞产生的荧光以冷 CCD 成像,并以伪彩色 (绿色) 显示荧光。数据用 Fluoview version 3.0 软件进行分析。

2 结果和分析

2.1 融合基因 *egfp-rcr* 和 *egfp-scr* 的克隆

以 pEGFP-N1 质粒为模板,PCR 方法扩增出增强型荧光蛋白 (EGFP) 的基因 *egfp*,以近平滑假丝酵母 CCTCC M203011 基因组 DNA 为模板,分别钓取 (R)-和 (S)-羧基还原酶基因。然后利用 SOE-PCR 反应方法将 *egfp* 分别与两种羧基还原酶基因 *rcr* 和 *scr* 进行拼接^[12]。凝胶电泳分析结果表明两种拼接产物的大小约为 1.7 kb 和 1.5 kb (图 1),大小与融合基因 *egfp-rcr* 和 *egfp-scr* 一致。

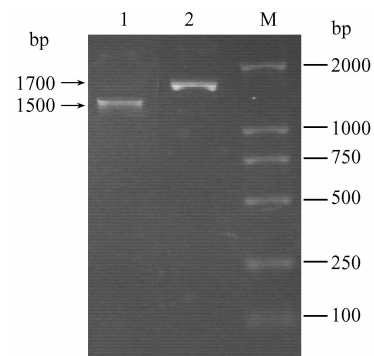


图 1 融合基因 *egfp-rcr* 和 *egfp-scr* 的克隆

Fig. 1 Agarose gel electrophoresis of *egfp-rcr* and *egfp-scr*. 1. *egfp-rcr*; 2. *egfp-scr*; M. DL2000 DNA Marker.

2.2 表达质粒的构建

用限制性内切酶 *Eco*R I 和 *Sma*I 分别进行酶切拼接产物 *egfp-rcr* 和 pYX212 表达载体,回收后用

T4 连接酶将两者通过粘性末端进行连接。转化大肠杆菌的感受态细胞 *E. coli* DH5 α , 经酶切验证, 获得阳性质粒 pYX212-*egfp-rcr* (图 2)。同法构建重组质粒 pYX212-*egfp-scr*, 经 *Bam*H I 和 *Sma*I 酶切验证, 酶切结果表明 *egfp-scr* 已成功插入表达载体 pYX212 中 (图 2)。同时测序结果进一步证实了融合基因 *egfp-rcr* 和 *egfp-scr* 的序列与预期设计的序列同源性均为 100%。

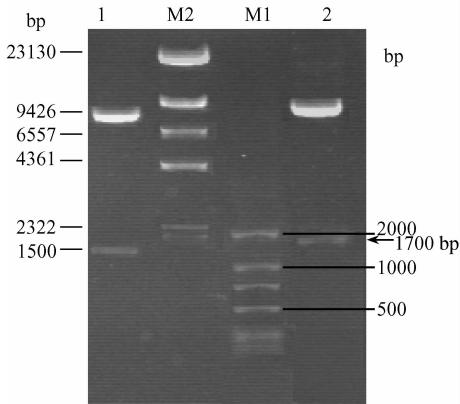


图 2 重组质粒酶切电泳图

Fig. 2 Agarose gel electrophoresis of pYX212-EGFP-RCR and pYX212-EGFP-SCR treated with restriction endonuclease. 1. pYX212-EGFP-RCR/*Bam*HI and *Sma*I; 2. pYX212-EGFP-RCR/*Eco*RI and *Sma*I; M1. DL2000 DNA Marker; M2. λ DNA/*Eco*RI and *Hind* III DNA Marker.

2.3 羧基还原酶在酿酒酵母中的表达

采用电击转化的方法, 将重组质粒 pYX212-*egfp-rcr* 和 pYX212-*egfp-scr* 分别转化酿酒酵母菌株 W303 的感受态细胞。用 Amp^r 抗性平板进行筛选, 获得重组酿酒酵母菌株 W303/pYX212-*egfp-rcr* 和 W303/pYX212-*egfp-scr*。将培养菌体离心收集, 转入新鲜的 YPD 培养基中, 30 $^{\circ}$ C 下培养 48 h, 检测 (*R*)-羧基还原酶在酿酒细胞中是否表达。SDS-PAGE 分析结果显示: 与质粒 pYX212 转化后的酿酒酵母培养菌比较, W303/pYX212-*egfp-rcr* 和 W303/pYX212-*egfp-scr* 中有分别有一条明显的蛋白表达条带, 它们的相对分子质量大小约为 62 kDa 和 55 kDa (图 3), 与增强型绿色荧光蛋白 (EGFP, 分子量为 24.6 kDa) 融合后的 (*R*)-羧基还原酶 (RCR, 36 kDa) 和 (*S*)-羧基还原酶 (SCR, 30 kDa) 分子大小相吻合。

2.4 重组羧基还原酶的纯化

由于在构建表达系统 W303/pYX212-*egfp-rcr* 和 W303/pYX212-*egfp-scr* 时, 在靶蛋白的 N 末端合理

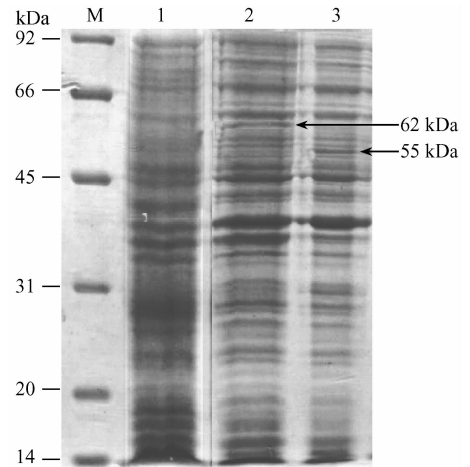


图 3 重组菌 W303 表达产物的 SDS-PAGE

Fig. 3 SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of cell-free extracts in W303 transformants. Lanes 1, W303 bearing pYX212; Lanes 2, W303 bearing pYX212-*egfp-rcr*; 3, W303 bearing pYX212-*egfp-scr*; Lane M, molecular mass markers. The target proteins were marked with arrows.

引入了 6 \times histine 的标签, 因而利用 ÄKTA-purifier 蛋白纯化系统, 经过三个蛋白纯化步骤: Ni²⁺ 亲和和层析、Resource Q (1 \times 1 cm) 阴离子层析和 SuperdexTM 200 (10/300 GL) 凝胶过滤, 纯化后的蛋白经 SDS-PAGE 分析 (图 4), 结果表明在 W303/pYX212-*egfp-rcr* 和 W303/pYX212-*egfp-scr* 中有分别只有一条明显的蛋白条带, 该蛋白大小约为 62 kDa 和 55 kDa, 与来源于 *C. parapsilosis* 的野生型酶和增强型荧光蛋白融合后的蛋白大小一致^[10-11]。考马斯亮兰染色结果表明所获得的重组蛋白的纯度均在 90% 以上。

2.5 重组细胞高效催化不对称转化反应

当目标酶纯化工作结束后, 以 2-羟基苯乙酮为底物, 分别取适量的 (*R*)-和 (*S*)-羧基还原酶进行酶活测定。(*R*)-和 (*S*)-羧基还原酶的比活为 16.8 U/mg 和 124.7 U/mg (表 3), 分别比相应野生型的纯酶比活提高了大约 20% 和 25%^[17-18]。生物转化实验结果 (表 3) 表明两种羧基还原酶具有不对称转化 2-羟基苯乙酮, 产生不同立体选择性的苯基乙二醇的生物功能。重组菌 W303/pYX212-*egfp-rcr* 催化底物获得 (*R*)-苯基乙二醇, 产物的光学纯度和产率分别为 86.6% 和 70.4%。而重组菌 W303/pYX212-*egfp-scr* 催化 2-羟基苯乙酮, 产生 (*S*)-苯基乙二醇, 产物光学纯度和产率分别为 92.3% 和 81.8%。酿酒酵母仅有少量羧基还原酶酶活, 导致

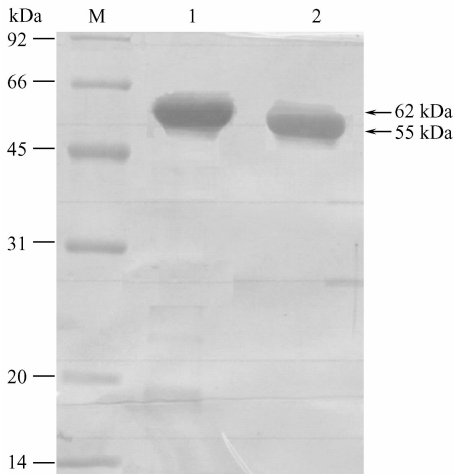


图4 纯酶的 SDS-PAGE 分析

Fig. 4 SDS-PAGE of purified enzymes. Lanes: 1, *egfp-rcr*; 2, *egfp-scr*; M, Low molecular weight protein markers. Proteins were visualized with Coomassie Brilliant Blue R-250 and destained in a 50% (v/v) methanol/10% (v/v) acetic acid solution.

重组菌催化两种产物的 ee 值均很低。以纯酶为生物催化剂,生物转化产物的光学纯度和产率均比相应的重组细胞要高。纯酶 EGFP-RCR 和 EGFP-SCR 生物转化不同手性醇的产率分别为 72.5% 和 84.3%,产物光学纯度分别为 89.1% 和 94.7%。上述研究结果表明酿酒酵母工程菌较重组大肠杆菌具有更明显的生物功能优势^[17-18]。

2.6 两种羧基还原酶在酿酒酵母中的亚细胞定位

为了进一步分析(*R*)和(*S*)-羧基还原酶在酿酒酵母 W303 细胞的定位,将重组质粒 pYX212-*egfp-rcr* 和 pYX212-*egfp-scr* 分别转化 W303 感受态细胞,利用激光扫描共聚焦显微镜观察 EGFP 在细胞内的分布,检测两种特异性羧基还原酶在酿酒酵母的表达水平和亚细胞定位。研究结果表明对照(W303/pYX212)细胞内没有任何绿色荧光(图 5-A),而经 pYX212-*egfp-rcr* 和 pYX212-*egfp-scr* 转化的 W303 细胞,呈现明显的绿色荧光(图 5-B 和 5-C),且大部分

表3 羧基还原酶活性力及生物转化结果

Table 3 Reducing activity of carbonyl reductases and biotransformation results

Strains and Plasmids	Enzyme activities/ (U/mg)	PED ^a e. e. /%		Yield/%	
		Whole cell	Purified enzyme ^b	Whole cell	Purified enzyme ^b
W303/pYX212	0.01	4.8 ^S	6.1 ^S	2.3 ^S	4.6 ^S
W303/pYX212- <i>egfp-rcr</i>	16.8	86.6 ^R	89.1 ^R	70.4 ^R	72.5 ^R
W303/pYX212- <i>egfp-scr</i>	124.7	92.3 ^S	94.7 ^S	81.8 ^S	84.3 ^S

Notes: ^a PED: 1-phenyl-1,2-ethanediol; R: (*R*)-PED; S: (*S*)-PED;

^b The purified enzyme of W303/pYX212 means the cell-free extract from W303/pYX212.

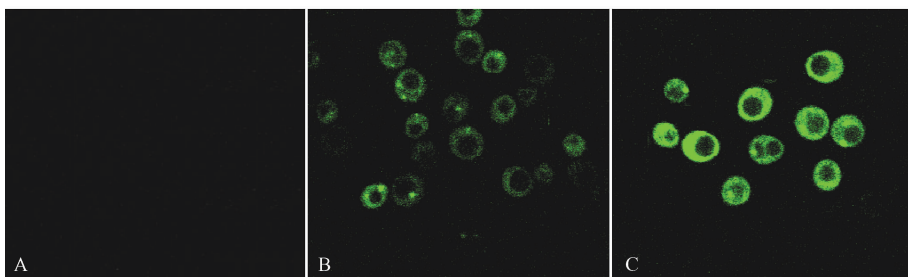


图5 重组质粒转化 W303 细胞中绿色荧光分布的激光共聚焦显微镜观察

Fig. 5 Observation of the green fluorescence distribution in pYX212-*egfp-rcr* and pYX212-W303/pYX212-*egfp-scr* transformed W303 cells under laser scanning confocal microscope ($\times 400$). A: Control, W303/pYX212; B: W303/pYX212-*egfp-rcr*; C: W303/pYX212-*egfp-scr*.

荧光呈环状分布于细胞膜内(可能为高尔基体等内膜体系)和胞质中,少量点状分布于细胞中央。同时共聚焦显微镜观察发现(*S*)-羧基还原酶融合蛋白的荧光强度高于(*R*)-羧基还原酶,说明(*S*)-羧基还原酶在酿酒酵母菌株 W303 中的表达水平明显高于(*R*)-羧基还原酶。

3 讨论

本研究在不改变(*R*)-和(*S*)-羧基还原酶蛋白分子构象和生物活性的前提下,采用中性 Linker 将增强型绿色荧光蛋白(EGFP)和靶酶蛋白进行连接,SOE-PCR 法克隆出 EGFP 基因和两种羧基还原

酶基因的融合体,使其转录处于 pYX212 顺式作用元件(如启动子、增强子等)的调控之下,在酵母细胞相应组织中特异性地表达。以 EGFP 为筛选标志,通过激光共聚焦显微观察发现两种融合蛋白大部分在酿酒酵母细胞内膜和胞质中稳定表达,少数点状分布在细胞中央(可能内吞体和溶酶体等细胞器中)。从荧光强度可知(S)-羰基还原酶在酿酒酵母细胞中的表达水平明显高于(R)-羰基还原酶。两种融合蛋白均表现较高的酶活力,分别比相应野生型的纯酶比活提高了约 20% 和 25%。不对称转化实验结果表明(R)-和(S)-羰基还原酶均能催化底物 2-羟基苯乙酮,产生不同光学活性的苯基乙二醇,产物的光学纯度和产率均明显高于相对应的重组大肠杆菌^[17-18]。

绿色荧光蛋白是一种理想的新型生物分子标签,是目前最常用的细胞定位指示手段之一。GFP 与外源基因偶联时不影响外源蛋白的构象和功能。在活细胞长时间存在,荧光反映外源基因表达的蛋白强度,因此可通过激光扫描共聚焦显微观察蛋白在活细胞内的表达和定位,进一步为蛋白功能的发现提供线索^[5, 19]。如袁广胜等通过研究孤儿 G 蛋白偶联受体的亚细胞定位及组织分布,为了解该受体的蛋白功能,寻找内源性配基、揭示其生理功能及病理意义奠定了基础^[19];另外,墨蝶岭还原酶在大脑细胞中的定位为发现其生物新功能的提供了宝贵线索^[20]。增强型绿色荧光蛋白与(R)-或(S)-羰基还原酶融合后,不影响后者的正确折叠和胞内定位,对酶行使正常的生理催化功能无任何干扰,为进一步提高羰基还原酶蛋白表达水平、新功能的发现及手性醇的工业化生产奠定了较坚实的基础。

参考文献

- [1] Kroutil W, Mang H, Edegger K, Faber K. Recent advances in the biocatalytic reduction of ketones and oxidation of sec-alcohols. *Current Opinion in Chemical Biology*, 2004, 8 (2): 120-126.
- [2] Panke S, Held M and Wubbolts M. Trends and innovations in industrial biocatalysis for the production of fine chemicals. *Current Opinion in Biotechnology*, 2004, 15 (4): 272-279.
- [3] Schmid A, Dordick JS, Hauer B, Kiener A, Wubbolts M, Witholt B. Industrial biocatalysis today and tomorrow. *Nature*, 2001, 409 (1): 258-268.
- [4] Matsushika A, Watanabe S, Kodaki T, Makino K, Inoue H, Murakami K, Takimura O, Sawayama S. Expression of protein engineered NADP plus-dependent xylitol dehydrogenase increases ethanol production from xylose in recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2008, 81 (2): 243-255.
- [5] Kwak GH, Kim JR and Kim HY. Expression, subcellular localization, and antioxidant role of mammalian methionine sulfoxide reductases in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemistry and Molecular Biology Reports*, 2009, 42 (2): 113-118.
- [6] Schoemaker HE, Mink D, Wubbolts MG. Dispelling the myths-biocatalysis in industrial synthesis. *Science*, 2003, 29: 1694-1697.
- [7] Chalfie M, Green fluorescent protein. *Photochemistry and Photobiology*, 1995, 62 (4): 651-656.
- [8] Gerdes HH and Kaether C. Green fluorescent protein: Applications in cell biology. *Febs Letters*, 1996, 389 (1): 44-47.
- [9] Liese A, Karutz M, Kamphuis J, Wandrey C, Kragl U. Enzymatic resolution of 1-phenyl-1, 2-ethanediol by enantioselective oxidation: overcoming product inhibition by continuous extraction. *Biotechnology and Bioengineering*, 1996, 51 (5): 544-550.
- [10] Zhang RZ, Zhu GY, Zhang WC, Cao S, Ou XJ, Li XM, Mark Bartlam, Yan Xu, X. Cai Zhang, Zihao Rao, Crystal structure of a carbonyl reductase from *Candida parapsilosis* with anti-Prelog stereospecificity, *Protein Science*, 2008, 17(8): 1412-1423.
- [11] Zhang RZ, Geng YW, Xu Y, Sun Y, Xiao R, Improved production of (R)-1-phenyl-1, 2-ethanediol by a codon optimized R-specific carbonyl reductase from *Candida parapsilosis* in *Escherichia coli*, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2010, 160: 868-878.
- [12] Ho SN, Hunt HD, Horton RM, Pullen JK, Pease LR. Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction. *Gene*, 1989, 77 (1): 51-59.
- [13] Daniel A, Gottschling E, Kaiser C, Stearns T. 酵母遗传学方法实验指南, 北京: 北京科学出版社, 2000, 105.
- [14] 孙莹, 张荣珍, 徐岩, (R)-专一性羰基还原酶与甲酸脱氢酶基因在大肠杆菌中的共表达. *微生物学报 (Acta Microbiologica Sinica)*, 2008, 48 (12): 1629-1633.
- [15] 张荣珍, 徐岩, 孙莹, 耿亚维. (R)-与(S)-羰基还原酶偶联一步法制备(S)-苯乙二醇的研究. *微生物学报 (Acta Microbiologica Sinica)*, 2009, 49(2): 204-209.

- [16] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 1976, 72 (1): 248 - 254.
- [17] Nie Y, Xu Y, Wang HY, Xu N, Xiao R, Sun ZH. 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. *Biocatalysis and Biotransformation*, 2008, 26 (3): 210-219.
- [18] Zhang RZ, Xu Y, Sun Y, Zhang WC, Xiao R. Ser67Asp and His68Asp substitutions in *Candida parapsilosis* carbonyl reductase alter the coenzyme specificity and enantioselectivity of ketone reduction. *Applied and Environmental Microbiology*, 2009 (75): 2176-2183.
- [19] 袁广胜,潘光堂,吴芳明,韩春光,黄火高,胡明,盛莉,陈静,刘永学. 孤儿 G 蛋白偶联受体 hGPCRc 的亚细胞定位及组织分布. 生物工程学报 (*Chinese Journal of Biotechnology*), 2005, 21 (3): 365-369.
- [20] Ikemoto K, Suzuki T, Ichinose H, Ohye T, Nishimura A, Nishi K, Nagatsu I, Nagatsu T. Localization of sepiapterin reductase in the human brain. *Brain Research*, 2002 (954): 237-246.

Expression and subcellular localization of (R)- and (S)-specific carbonyl reductases from *Candida parapsilosis* in *Saccharomyces cerevisia*

Rongzhen Zhang, Yan Xu^{*}, Shanshan Wang, Botao Zhang, Yawei Geng

(Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: [**Objective**] The (R)- and (S)- specific carbonyl reductases (RCR and SCR) with enhanced green fluorescence protein (EGFP) were expressed in *Saccharomyces cerevisiae* W303-1A. By analysis of EGFP expression spectrum, the protein distribution and subcellular localization of two enzymes were determined. [**Methods**] By SOE-PCR method, the fused genes of RCR and SCR with EGFP were cloned and constructed on an eukaryotic expression vector pYX212, and transformed into *S. cerevisiae* by electroporation. With fluorescent protein as selection marker, the expression and distribution of RCR and SCR were observed. [**Results**] The EGFP expression in *S. cerevisiae* cells was observed under the laser scanning confocal microscopy. It was showed that the two enzymes expressed stably in *S. cerevisiae* and mainly distributed in the intracellular membrane and cytoplasm, while minority were dotted in the center of cells. According to the fluorescent intensity, the expression level of SCR was much higher than that of RCR in *S. cerevisiae*. The biotransformation results showed that the fused proteins EGFP-RCR and EGFP-SCR reduced 2-hydroxyacetophenone to give (R)- and (S)-1-phenyl-1,2-ethanediol (PED) respectively, with the optical purity of 86.6% in a yield of 70.4% for the former enzyme and with the optical purity of 92.3% in a yield of 81.8% for the latter one. [**Discussion**] The fusion of RCR or SCR with EGFP showed no effect in protein conformation and biological activity. When compared with the recombinant *Escherichia coli* harboring RCR or SCR, the genetically engineered *S. cerevisiae* had obvious advantages in the biological function. The study provided the solid foundations for visible research of functional expression controlling and subcellular localization of carbonyl reductases.

Keywords: carbonyl reductase (CR), *saccharomyces cerevisia*, fluorescence protein expression spectrum, subcellular localization, 1-phenyl-1,2-ethanediol

(本文责编:张晓丽)

Supported by the Key Project of Chinese National Programs for Fundamental Research and Development (2003CB716008), by the National Programs for High Technology Research and Development of China (2007AA02Z226, 2006AA020104), by the National Natural Science Foundation of China (20776060, 31070059) and by the Program for New Century Excellent Talents in University (NCET-04-0498)

^{*} Corresponding author. Tel: +86-510-85918201; Fax: +86-510-85864112; E-mail: biosean@yahoo.com.cn

Received: 19 December 2010 / Revised: 25 January 2011