

◇基础医学研究◇

羧基还原酶 ChKRED20 可溶性表达的提升及酶学性质研究

沈悦, 郑红, 范新炯

(安徽医科大学基础医学院干细胞与组织研究中心, 合肥 230032)

摘要 目的 探究提升羧基还原酶 ChKRED20 可溶性的方法并测定其酶学性质。方法 合成 ChKRED20 基因并转化至大肠杆菌 BL21 (DE3) 中进行异源表达, 通过增减和改变 His-tag 位置、改变发酵条件等研究蛋白可溶性, 并进一步优化诱导时间、温度及 IPTG 浓度等以提升重组蛋白的表达, 随后研究重组酶的酶学性质。结果 利用 ChKRED20 原核表达菌株, 在大肠杆菌表达体系内去除 His-tag 并进行发酵条件优化, 以获得最优可溶蛋白表达; 无 His-tag ChKRED20 比携带 N 端和 C 端 His-tag 的蛋白酶活性分别提高了 0.77 和 1.28 倍; 最适温度为 55 °C, 最适 pH 为 8.0; 且该酶在较高温度下、碱性环境中仍具有较好的适应性。结论 去除 His-tag 及优化发酵条件可以大大提升 ChKRED20 在大肠杆菌中的可溶性。

关键词 羧基还原酶; ChKRED20; His-tag; 酶学性质; 大肠杆菌; 蛋白可溶性

中图分类号 R34

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2025)08-1365-08

doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2025.08.001

ChKRED20 是一种源自 *Chryseobacterium* sp. CA49 的羧基还原酶, 天然状态下不含 His-tag 标签。该酶可以高立体选择性 (>99% ee) 地催化替格瑞洛中间体——(1S)-2-氯-1-(3,4-二氟苯基)乙醇 [(S)-CFPL] 前体酮还原^[1], 并可通过反 Prelog 还原特定酮类底物, 生成阿瑞匹坦关键中间体^[2-3], 在药物合成领域展现出巨大潜力。大肠杆菌由于其清晰的遗传背景、简便的转化操作, 成为生产外源蛋白常用的原核表达宿主之一。目前, ChKRED20 已在大肠杆菌体系中成功表达^[4], 但重组蛋白低下的表达量和较差的可溶性增加了其使用成本, 限制了大规模生产应用。这一问题可能归因于: 大肠杆菌非该蛋白的天然宿主, 异源表达可能导致缺乏适当的环境与辅助因子, 影响蛋白质的正确折叠, 使其以包涵体形式存在; 融合标签的表达可能会干扰蛋白的正常折叠; 发酵条件也可能对蛋白表达产生影响。因此, 该研究旨在通过调整 His-tag 的位置或去除 His-tag, 并优化发酵条件来提高 ChKRED20 的表达效

率, 同时测定其酶学性质。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 化学品与材料 β -烟酰胺腺嘌呤二核苷酸 (NAD⁺)、硫酸卡那霉素 (Kana) 购于上海阿拉丁公司; 引物合成及基因结果测序由上海生工生物工程股份有限公司提供; Yeast Extract 以及 Tryptone 购于英国 OXOID 公司; PrimeSTAR DNA 聚合酶、DNA Ligation Kit、限制性核酸内切酶和 Primixed Protein Marker (Low) 购于日本 TaKaRa 公司; SPARKeasy Mini Plasmid Ultra-Fast Kit 购于山东思科捷生物技术有限公司; 除特别说明外, 其他化学品和试剂均为分析纯级别, 并从商业渠道购买。

1.1.2 培养基的制备 ① LB 培养基 (g/L): 称取酵母提取物 5.0 g、胰蛋白胨 10.0 g、氯化钠 10.0 g, 加入适量超纯水将 pH 调至 7.0, 再加入超纯水定容至体积为 1.0 L, 121 °C 高压灭菌 30 min。② LB 固体培养基 (g/L): 将 LB 液体培养基以每 400.0 mL 规格分装至容积为 500.0 mL 的锥形瓶内, 每瓶内加入 1.5% ~ 2.0% 的琼脂粉, 121 °C 高压灭菌 30 min。③ SOC 培养基: 称取胰蛋白胨 20.0 g、酵母提取物 5.0 g、葡萄糖 3.6 g、氯化钠 0.5 g、氯化镁 0.95 g、氯化钾 0.186 g, 加入 800.0 mL 蒸馏水搅拌至完全溶解, 再加入蒸馏水定容至 1.0 L, 115 °C 高压灭菌 30 min。

2025-03-27 接收

基金项目: 国家自然科学基金项目 (编号: 82173725、31400680); 高校
中青年教师培养行动项目 (编号: DTR2024005)

作者简介: 沈悦, 女, 硕士研究生;

郑红, 女, 博士, 教授, 博士生导师, 通信作者, E-mail:
zhenghong@ahmu.edu.cn;

范新炯, 女, 博士, 教授, 硕士生导师, 通信作者, E-mail:
fanxinjiong@126.com

1.2.5.3 温度稳定性 将适量 ChKRED20 在 30、40、50、60、65、70 °C 下水浴孵育,特定时间取样。取样后与 pH 6.8 的底物 - 辅因子工作液混合为 300.0 μ L 反应体系,340 nm 处测定 OD 值,评估酶剩余活性。将未经热处理的原始酶活性定义为 100%,经热处理后的剩余酶活性按照相对酶活性百分比计算。

1.2.5.4 pH 稳定性 采用浓缩菌体超声破碎法降低缓冲液本身对 pH 的影响。适量且等量的 ChKRED20 在不同 pH 的 Britton-Robinson 缓冲液中, 37 °C 水浴孵育, 定时取样; 与底物 - 辅因子工作液混合后在 340 nm 处测定其 OD 值, 以评估酶的剩余活性。将未经处理的酶活性定义为 100%, 对比不同 pH 条件处理后的酶活性, 计算剩余活性的相对百分比。

1.2.5.5 金属离子对 ChKRED20(无 His-tag) 的影响 在酶液中加入终浓度为 1.0 mmol/L 的金属离子及其螯合剂 (K^+ 、 Co^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Cr^{3+} 、 Al^{3+} 、EDTA) 和终浓度为 1% (V/V) 的表面活性剂 (Tween-80、Triton X-100)。30 °C、200 r/min 振荡 24 h 后与工作液定量混合, 反应液在 340 nm 处测定 OD 值并确定剩余酶活性。将未经处理的酶活性定义为 100%, 计算不同离子处理后的剩余酶活性的相对酶活性百分比。

1.2.5.6 有机试剂对 ChKRED20(无 His-tag) 的影响 在酶液中加入体积分数为 30% 的有机试剂 (甲醇、乙醇、异丙醇、丙酮、二甲基亚砜、乙酸乙酯、二氯甲烷、甲苯、正己烷、正庚烷、石油醚、三氯甲烷)。30 °C、200 r/min 振荡 24 h 后与工作液定量混合, 反应液在 340 nm 处测定 OD 值, 测定剩余酶活性。将未经有机试剂处理的酶活性定义为 100%, 经不同有机试剂处理后的剩余酶活性按照相对酶活性百分比计算。

1.2.6 ChKRED20(无 His-tag) 发酵条件优化

1.2.6.1 不同温度诱导对 ChKRED20(无 His-tag) 的影响 在转接后 OD_{600} 值介于 0.4 ~ 0.6 的菌液中加入终浓度 0.1 mmol/L 的 IPTG, 分别在 16、20、25、30、37 °C 下 200 r/min 振荡培养 12 h 诱导目的蛋白表达, 在 600 nm 处测定菌液 OD 值。收集菌体后加入缓冲液超声破碎, 进行 SDS-PAGE 分析和酶活性测定, 将最优诱导温度下的酶活性定义为 100%, 其余各温度下的酶活性按照相对酶活性百分比计算。

1.2.6.2 不同 IPTG 浓度对 ChKRED20(无 His-tag) 的影响 配置不同浓度 IPTG (终浓度为 0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8 mmol/L)。摇菌活化的菌液 OD_{600} 为 0.4 ~ 0.6 时, 加入不同浓度的 IPTG 于 25 °C、200 r/min 振荡培养 12 h 诱导目的蛋白表达。收集 4.0 mL 体加入缓冲液超声破碎, 进行 SDS-PAGE 分析和酶活性测定, 将最优诱导剂浓度下的酶活性定义为 100%, 其余各诱导剂酶活性按照相对酶活性百分比计算。

1.2.6.3 不同诱导时间对 ChKRED20(无 His-tag) 的影响 摇菌活化后的菌液 OD_{600} 为 0.4 ~ 0.6 时, 加入终浓度为 0.4 mmol/L 的 IPTG, 于 25 °C、200 r/min 振荡培养不同时间 (1、2、5、7、10、12、16、20、24 h), 定时于超净台内取样后测定菌液在 600 nm 处的 OD 值, 收集菌体超声破碎后进行 SDS-PAGE 分析及酶活性测定, 将最优诱导时间下酶活性定义为 100%, 其余各诱导时间酶活性按照相对酶活性百分比计算。

2 结果

2.1 羧基还原酶基因的克隆、表达及酶活性 重组菌活化表达后得到相应蛋白, SDS-PAGE 分析显示 (图 1), 携带 N 端、C 端 His-tag 及无 His-tag 的目的蛋白相对分子质量分别为 32.78、29.59、28.82 ku, 与预期大小一致。泳道 3、5、7 分别代表无 His-tag、携带 C 端 His-tag、携带 N 端 His-tag 的 ChKRED20 全细胞液。泳道 3 比泳道 5、7 更粗, 表明目的蛋白的总表达量更高; 泳道 4、6、8 分别为以上全细胞液离心得到的上清液, 代表可溶性蛋白情况。泳道 4 中, 目的蛋白的条带明显比泳道 6、8 中的条带粗, 这说明去除 His-tag 可以明显提高目的蛋白的可溶性。

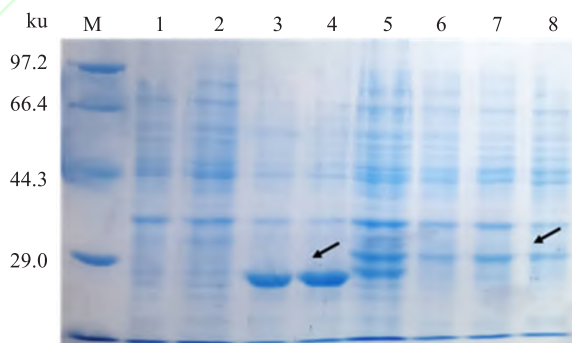


图 1 不同标记的重组蛋白 ChKRED20 的 SDS-PAGE 分析

Fig. 1 SDS-PAGE of carbonyl reductase ChKRED20 with different tags

Arrow: ChKRED20; M: Protein molecular weight marker; Lanes 1, 3, 5, 7: Whole-cell lysates of *E. coli* corresponding to Control pET-28a (+) empty vector, Non-His-tagged ChKRED20, ChKRED20 with a C-terminal His-tag, ChKRED20 with an N-terminal His-tag; Lanes 2, 4, 6, 8: Supernatant fractions (post-lysis and centrifugation) corresponding to Control pET-28a (+) empty vector, Non-His-tagged ChKRED20, ChKRED20 with a C-terminal His-tag, ChKRED20 with an N-terminal His-tag.

将超声破碎后的酶液与异丙醇、 NAD^+ 工作液混合反应, 并通过测定 OD_{340} 处得到酶活性。结果如

表 1 所示,以无 His-tag 的 ChKRED20 酶活性为 100%,携带 N 端和 C 端标签的酶催化底物分别提高了 0.77 和 1.28 倍。综上,去除 His-tag 可提高其表达量和可溶性。去除标签后表达水平和酶活性测定的结果表明,所选用的表达体系是有效的,说明标签去除过程未损害 ChKRED20 的催化功能。

表 1 羧基还原酶 ChKRED20 的酶活测定
Tab.1 Enzymatic activity of carbonyl reductase

Enzyme	Structural characteristics	Relative enzyme activity (%)
ChKRED20	fused with N-terminal His-tags	56.3 ± 1.03
ChKRED20	fused with C-terminal His-tags	43.7 ± 0.03
ChKRED20	without His-tag	100 ± 0.92

2.2 ChKRED20(无 His-tag)的发酵条件优化

2.2.1 不同诱导温度对 ChKRED20(无 His-tag)的影响 0.1 mmol/L IPTG、16 ~ 37 ℃ 下以 200 r/min 诱导菌液 12 h 后进行测定,菌液生长量如图 3A 所示,随温度升高,菌液 OD 值随之增加,说明菌量随温度升高而升高。SDS-PAGE 结果如图 2 所示,16 ~ 25 ℃ 诱导时随温度升高,酶蛋白表达量逐步增高。25 ℃ 以上温度诱导时蛋白表达量稳定在高水平,超过 25 ℃ 诱导后,SDS-PAGE 所示蛋白表达量略降,但相对酶活性仍保持在 80% 以上。与图 3B 酶活性测定结果一致,当诱导温度控制在 25 ℃ 时,诱导的酶活性最好,酶蛋白表达最优。

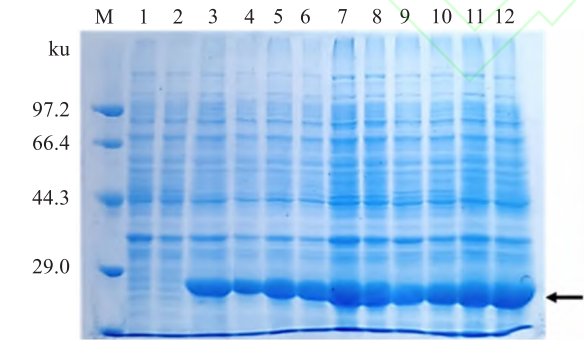


图 2 不同温度对目的蛋白表达的影响
Fig.2 The effects of different temperatures on the expression of the target protein

Arrow: ChKRED20 bands under different temperature induction conditions; M:Protein molecular weight marker; Lane 1: Whole-cell lysate of control pET-28a(+) empty vector; Lane 2: Supernatant of control pET-28a(+) empty vector; Lanes 3, 5, 7, 9, 11: Whole-cell lysates of ChKRED20 induced at 16, 20, 25, 30, 37 ℃; Lanes 4, 6, 8, 10, 12: Supernatants corresponding to lanes 3, 5, 7, 9, and 11 after cell lysis and centrifugation.

2.2.2 不同 IPTG 浓度诱导对 ChKRED20(无 His-tag)的影响 菌液加入不同浓度 IPTG,25 ℃、200 r/min 培养 12 h 后的蛋白电泳图如图 4 所示,在 IPTG 浓度为 0.1 ~ 0.4 mmol/L 时,蛋白表达量随诱导剂浓度增高而增高;与图 5 相对酶活性结果一致,在 IPTG 浓度于 0.1 ~ 0.4 mmol/L 之间时,酶活性和表达水平与 IPTG 浓度呈正相关性,当 IPTG 浓度超 0.4 mmol/L 时,ChKRED20 酶活性下降,说明 ChKRED20 最优 IPTG 浓度为 0.4 mmol/L。

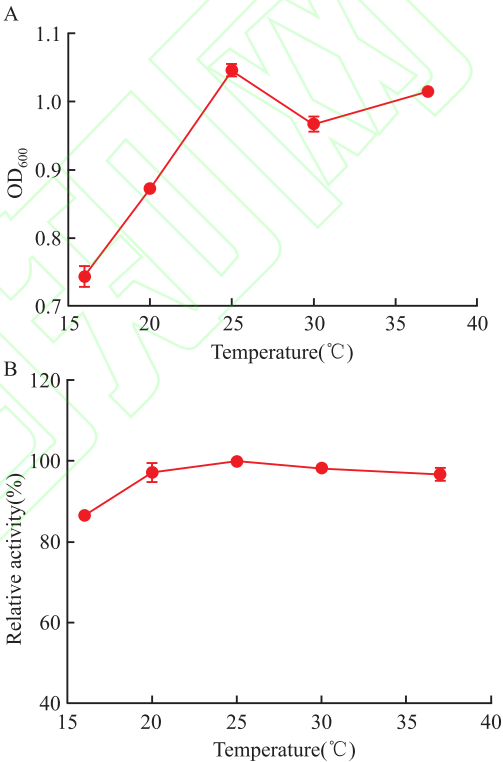


图 3 不同温度对菌体密度(A)和酶活性(B)的影响
Fig.3 The effects of different temperatures on cell density(A) and enzyme activity(B)

2.2.3 诱导不同时间对 ChKRED20(无 His-tag)的影响 在转接后 OD 为 0.4 ~ 0.6 的菌液内加入 0.4 mmol/L IPTG 于 25 ℃、200 r/min 振荡培养不同时间,离心收集后超声破碎,SDS-PAGE 分析显示酶蛋白表达量与菌液 OD 值测定结果相符(图 6)。将菌液超净台取样后 600 nm 波长处测定菌液 OD 值,结果如图 7A 所示,随诱导时间增加,菌液量逐渐增多。如图 7B 所示,在诱导时间 1 ~ 7 h 的范围内,酶活性与诱导时间长短成正比;在诱导时间 7 ~ 16 h 区间内,虽酶活性略有下降,但相对酶活性仍可保持 80% 以上,表明该酶最优诱导时间为 7 h,在 7 ~ 16 h 的诱导时间内酶活性仍较好。

2.3 ChKRED20(无 His-tag)的酶学性质表征

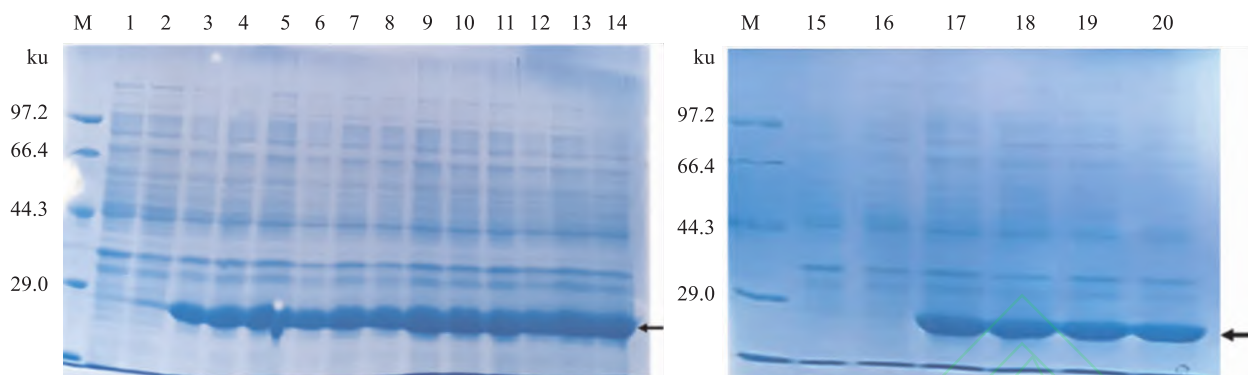


图4 不同诱导剂浓度对目的蛋白表达的影响

Fig.4 The effects of different IPTG concentrations on the expression of the target protein

Arrow: ChKRED20 bands under different concentration of IPTG induction conditions; M:Protein molecular weight marker; Lane 1, 15: Whole-cell lysate of control pET-28a(+) empty vector; Lane 2, 16: Supernatant of control pET-28a(+) empty vector; Lanes 3, 5, 7, 9, 11, 13, 17, 19: Whole-cell lysates of ChKRED20 induced with 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8 mmol/L IPTG; Lanes 4, 6, 8, 10, 12, 14, 18, 20: Supernatants of ChKRED20 induced with 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8 mmol/L IPTG.

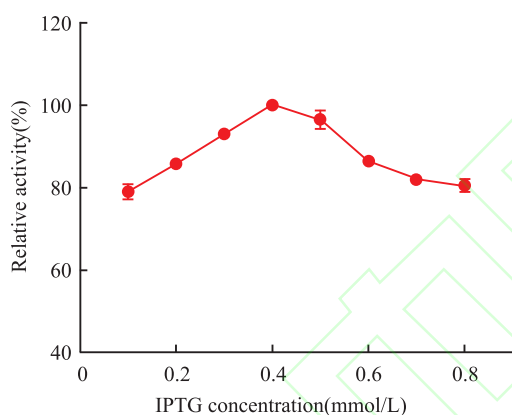


图5 不同浓度诱导剂诱导下 ChKRED20(无 His-tag)的酶活性

Fig.5 The effects of induction with different concentrations of IPTG on the enzyme activity of ChKRED20 (without His-tag)

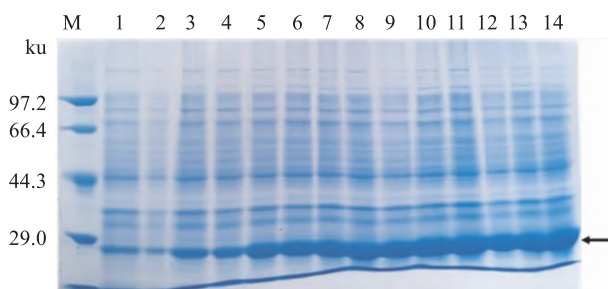


图6 不同诱导时间对目的蛋白表达的影响

Fig.6 The effects of different induction durations on the expression of the target protein

Arrow: ChKRED20 bands after different time induction conditions; M:Protein molecular weight marker; Lanes 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13: Whole-cell lysates of ChKRED20 induced after 1, 2, 5, 7, 9, 12, 16 hours; Lanes 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14: Supernatants corresponding to lanes 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13 after cell lysis and centrifugation.

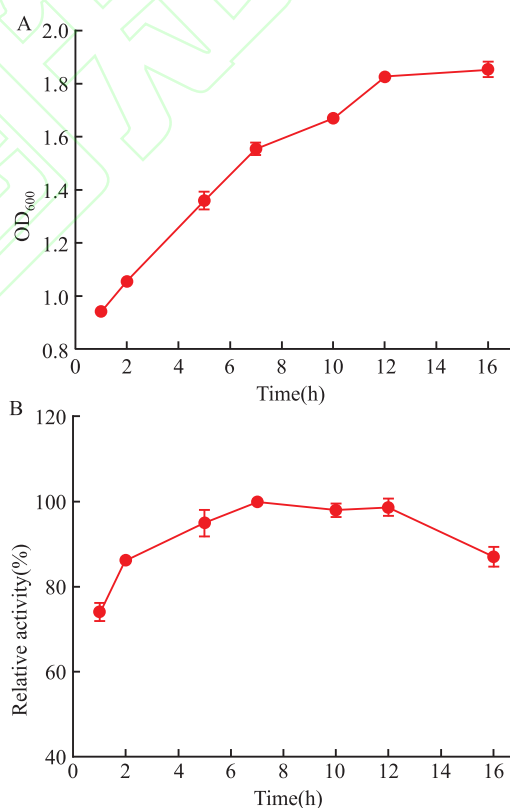


图7 不同诱导时间对菌体密度(A)和酶活性(B)的影响

Fig.7 The effects of different induction durations on cell density (A) and enzyme activity (B)

如图8A所示,无 His-tag 的 ChKRED20 最适温度为 55 ℃。该酶在 30 ~ 70 ℃ 的温度范围内相对活性较高,均超过 70% 以上,说明该酶在此温度区间具备很好的温度适应性。如图 8B 所示,无 His-tag 的 ChKRED20 最适 pH 为 8.0,在 pH 7.0 ~ 8.5 的范围

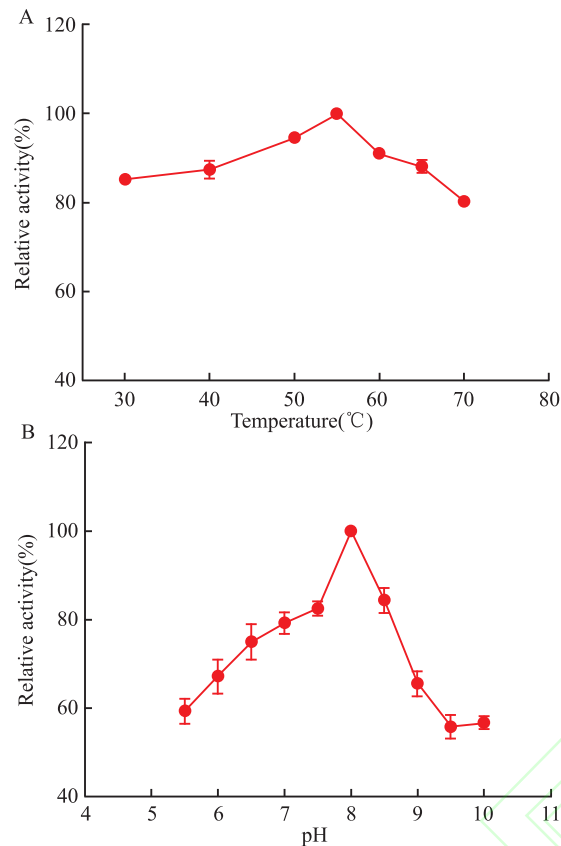


图8 温度(A)和pH(B)对ChKRED20(无His-tag)活性的影响
Fig.8 The effects of temperature (A) and pH (B) on the activity of ChKRED20 (without His-tag)

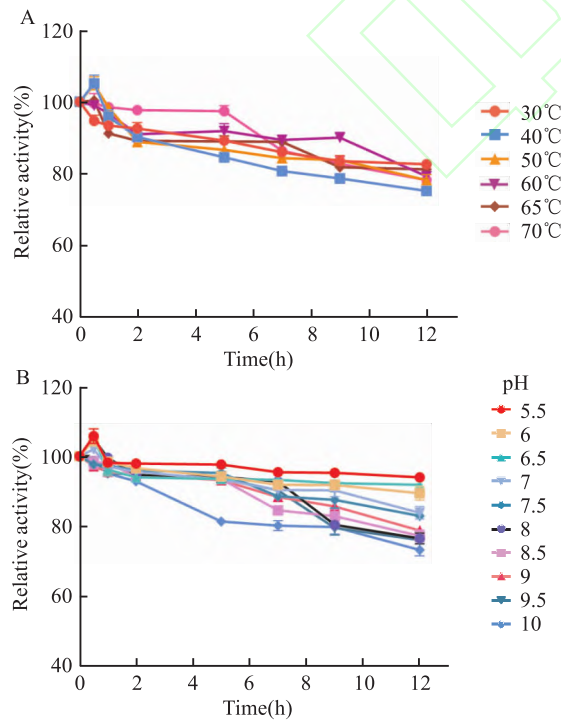


图9 温度(A)和pH(B)对ChKRED20(无His-tag)稳定性的影响
Fig.9 The effects of temperature (A) and pH (B) on the stability of ChKRED20 (without His-tag)

内,相对酶活性在80%以上,表明该酶在弱碱性至偏碱性的环境中有良好的适应性。该酶的热稳定性测定结果如图9A所示。该酶经各温度热处理12h后,均保持有75%以上的活性,说明该酶在较高温度下仍有良好的热稳定性。ChKRED20在不同pH(5.5~10.0)下的剩余酶活性测定结果如图9B所示。当pH为8.5时,孵育12h后酶活性仍在80%以上,当pH在9.0~10.0范围时,12h后仍保留70%以上的剩余酶活性。说明该酶可以适应在碱性环境中的pH变化,是一种耐碱性羧基还原酶。

2.3.1 金属离子对ChKRED20(无His-tag)的影响

酶的活性或稳定性在酶促反应中会受到金属离子的影响,许多酶需要金属离子作为辅助因子来维持其活性和稳定性,也可能由于金属离子对酶的活性中心或一些结构产生影响致酶活性降低。表2的结果显示,多数金属离子对ChKRED20呈现出不同程度的激活效果,Mn²⁺、Co²⁺、Mg²⁺、Ca²⁺、Al³⁺以及EDTA的相对酶活性分别为105.09%、110.02%、109.78%、102.05%和109.53%;而Tween-80和Triton X-100对酶活性有一定的抑制效果,相对酶活性分别为59.53%和84.67%。

表2 金属离子对目的蛋白活性的影响	
Tab.2 The effects of metal ions on the activity of the target protein	
Metal ions	Relative enzyme activity (%)
primitive enzyme (None)	100.00 ± 0.6
Mg ²⁺	105.09 ± 0.3
Ca ²⁺	110.02 ± 1.3
K ⁺	61.83 ± 1.7
Mn ²⁺	109.78 ± 1.5
Co ²⁺	102.52 ± 0.8
Al ³⁺	109.53 ± 0.9
EDTA	102.05 ± 0.9
Cr ³⁺	91.64 ± 0.6
Tween-80	59.53 ± 1.0
Triton X-100	84.67 ± 0.7

2.3.2 有机溶剂对ChKRED20(无His-tag)的影响

酶的反应速率会受到有机溶剂的影响,如表3所示,多数有机试剂对ChKRED20有不同程度的抑制作用,丙酮、DMSO、二氯甲烷、甲苯、正庚烷、石油醚以及三氯甲烷的相对酶活性分别为46.59%、65.49%、86.42%、89.58%、91.41%、89.31%以及87.87%,说明该酶受到有机溶剂的不利影响较大。

3 讨论

羧基还原酶 ChKRED20 在多领域发挥关键作

用,助力制备多种医药中间体和化工产品。SDS-PAGE分析显示,ChKRED20在大肠杆菌中表达时,

表3 有机溶剂对目的蛋白活性的影响

Tab.3 The effects of organic solvents on the activity of the target protein

Organic solvents	Relative enzyme activity (%)
primitive enzyme(None)	100.00 ± 0.6
methanol	101.12 ± 1.7
ethanol	101.84 ± 1.0
isopropyl alcohol	102.06 ± 0.9
acetone	46.59 ± 0.2
DMSO	65.49 ± 1.9
ethyl acetate	102.78 ± 1.5
dichloromethane	86.42 ± 0.8
toluene	89.58 ± 2.8
n-hexane	98.17 ± 1.2
n-heptane	91.41 ± 1.3
petroleum ether	89.31 ± 1.1
chloroform	87.87 ± 1.7

上清液表达量明显低于全细胞液,提示该酶在大肠杆菌表达时,其可溶性较差。课题组前期尝试将该蛋白与分子伴侣载体(pKJE7、pGro7、pTf16、pG-KJE8、pG-Tf2)共表达,改变发酵条件(发酵温度、时间、诱导剂浓度)、加入辅助离子等方法^[5-6]去优化蛋白表达,但结果均不理想(数据未给出)。

在蛋白质纯化过程中,His-tag 因其便捷的亲和纯化特性而被广泛应用^[7],但 His-tag 的存在也可能会影响到蛋白的可溶性^[8]。Zhu et al^[9]研究发现,Aeropyrum pernix K1 的尿苷磷酸化酶(UP)使用 His-tag 作为融合标签表达蛋白时,导致该蛋白形成不溶性的包涵体,这提示 His-tag 的存在影响了蛋白可溶性。该研究通过相关实验,探究去除 His-tag 对 ChKRED20 蛋白可溶性的影响:通过 SDS-PAGE 分析,去除 His-tag 后其可溶性蛋白表达量明显高于未去除组别。相对酶活性测定结果显示携带 N 端和 C 端 His-tag 的酶活性仅为去除的 56.3% 和 43.7%,表明去除该标签会提高蛋白可溶性。这可能是由于去除 His-tag 后,蛋白质的表面电荷分布发生改变,与其他分子间的相互作用减少,从而提高其特异性和亲和力^[9-10]。此外,His-tag 的位置也与酶的溶解性和功能性有关^[11-12],但将 His-tag 置于 N 段和 C 端后,其位置改变未对可溶性产生有利影响。

优化发酵条件可以提高目标产物的产量,满足大规模生产的需要,且合适的发酵条件能够使蛋白质正确的折叠,保证产物的质量。经发酵条件优化后发现,去除 His-tag 的蛋白催化异丙醇最优发酵条件为 25 ℃、IPTG 终浓度为 0.4 mmol/L、200 r/min

振荡培养 7 h 后获取目的蛋白酶。经酶学性质分析发现,无 His-tag 的 ChKRED20 的最适反应温度为 55 ℃,最适反应 pH 为 8.0,将酶置于 pH 9.0 ~ 10.0 环境时,12 h 后仍有 70% 以上的剩余酶活性。说明该酶在碱性条件下酶活性及稳定性较好,可以适应在碱性环境中的 pH 变化。该酶经不同温度热处理 12 h 后,均保持 75% 以上的活性,说明该酶具有较好的热稳定性。所测多数金属离子对该酶有不同程度激活作用,而该酶受到有机溶剂的不利影响较大。与携带 His-tag 的野生 ChKRED20^[13]相比,去除 His-tag 的 ChKRED20 的最适温度提高了 5 ℃,热稳定性和 pH 稳定性与携带 His-tag 的酶相比有所提高。

今后的研究可以进一步扩大反应体系,提高其催化效率和稳定性,实现 ChKRED20 在医药中间体及工业中的实际应用。此外,还需开展大规模的生产和应用研究,探索其在工业生产中的可行性和经济性。综上所述,该研究通过去除羰基还原酶 ChKRED20 的 His-tag,提升可溶性。同时,优化了去除 His-tag 后目的蛋白酶的表达条件,并对其酶学性质进行了分析,为推动该酶应用于工业和医药领域奠定了一定的基础。

参考文献

- [1] Zhao F J, Liu Y, Pei X Q, et al. Single mutations of ketoreductase ChKRED20 enhance the bioreductive production of (1S)-2-chloro-1-(3, 4-difluorophenyl) ethanol[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2017, 101(5): 1945–52. doi:10.1007/s00253–016–7947–0.
- [2] Zhao F J, Pei X Q, Ren Z Q, et al. Rapid asymmetric reduction of ethyl 4-chloro-3-oxobutanoate using a thermostabilized mutant of ketoreductase ChKRED20[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2016, 100(8): 3567–75. doi:10.1007/s00253–015–7200–2.
- [3] Liu Y, Tang T X, Pei X Q, et al. Identification of ketone reductase ChKRED20 from the genome of Chryseobacterium sp. CA49 for highly efficient anti-Prelog reduction of 3, 5-bis(trifluoromethyl)acetophenone[J]. J Mol Catal B Enzym, 2014, 102: 1–8. doi:10.1016/j.molcatb.2014.01.009.
- [4] Chen W, Sun L, Wu X, et al. Heterologous expression of ketoreductase Ch KRED20 mutant in Pichia pastoris and bioreductive production of (R)-1, 3-butanediol[J]. Molecules, 2024, 29(18): 4393. doi:10.3390/molecules29184393.
- [5] 刘里, 杨晓丽. 聚肌胞存在下利培酮与牛血清白蛋白的相互作用及金属离子的影响[J]. 安徽医科大学学报, 2020, 55(5): 671–6. doi:10.19405/j.cnki.issn1000–1492.2020.05.004.
- [5] Liu L, Yang X L. The interaction of risperidone with bovine serum albumin in presence of polyinosinic-polycytidylic acid and the effect of metal ions on the reaction[J]. Acta Univ Med Anhui,

- 2020, 55(5): 671–6. doi:10.19405/j.cnki.issn1000–1492.2020.05.004.
- [6] 段绪果, 张玉华, 黄婷婷, 等. 化学分子伴侣及诱导条件协同强化 *Thermotoga maritima* α -葡聚糖磷酸化酶可溶性表达[J]. 生物技术通报, 2021, 37(8): 233–42. doi:10.13560/j.cnki.biotech.bull.1985.2020–1473.
- [6] Duan X G, Zhang Y H, Huang T T, et al. Synergetic enhancing the soluble expression of *Thermotoga maritima* α -glucan phosphorylase by chemical chaperones and induction condition optimization [J]. *Biotechnol Bull*, 2021, 37(8): 233–42. doi:10.13560/j.cnki.biotech.bull.1985.2020–1473.
- [7] Loughran S T, Bree R T, Walls D. Purification of polyhistidine-tagged proteins[J]. *Methods Mol Biol*, 2017, 1485: 275–303. doi:10.1007/978–1–4939–6412–3_14.
- [8] Flores S S, Clop P D, Barra J L, et al. His-tag β -galactosidase supramolecular performance [J]. *Biophys Chem*, 2022, 281: 106739. doi:10.1016/j.bpc.2021.106739.
- [9] Zhu S, Gong C, Ren L, et al. A simple and effective strategy for solving the problem of inclusion bodies in recombinant protein technology: his-tag deletions enhance soluble expression[J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2013, 97(2): 837–45. doi:10.1007/s00253–012–4630–y.
- [10] Zhao D, Huang Z. Effect of his-tag on expression, purification, and structure of zinc finger protein, ZNF191 (243–368) [J]. *Bioinorg Chem Appl*, 2016, 2016: 8206854. doi:10.1155/2016/8206854.
- [11] Alpdağtaş S, Çelik A, Ertan F, et al. DMSO tolerant NAD(P)H recycler enzyme from a pathogenic bacterium, *Burkholderia dolosa* PC543: effect of N–/ C-terminal His Tag extension on protein solubility and activity[J]. *Eng Life Sci*, 2018, 18(12): 893–903. doi:10.1002/elsc.201800036.
- [12] Czyrko-Horczak J, Nizio? M, Forlino A, et al. The highly efficient expression system of recombinant human prolidase and the effect of N-terminal his-tag on the enzyme activity [J]. *Cells*, 2022, 11(20): 3284. doi:10.3390/cells11203284.
- [13] Yang Y J, Pei X Q, Liu Y, et al. Thermostabilizing ketoreductase ChKRED20 by consensus mutagenesis at dimeric interfaces [J]. *Enzyme Microb Technol*, 2022, 158: 110052. doi:10.1016/j.enzmitec.2022.110052.

Enhancing solubility expression of carbonyl reductase ChKRED20 and characterization of its enzymatic properties

Shen Yue, Zheng Hong, Fan Xinjiang

(*Stem Cell and Tissue Research Center, School of Basic Medicine, Anhui Medical University, Hefei 230032*)

Abstract *Objective* To enhance the solubility expression of carbonyl reductase ChKRED20 and investigate its enzymatic properties. *Methods* The ChKRED20 gene was synthesized and transformed into *Escherichia coli* BL21 (DE3) for heterologous expression. The solubility of the protein was evaluated by adding or removing His-tag, changing its position, and adjusting the induction conditions. Further optimization was performed by varying the induction time, temperature and IPTG concentration. Subsequently, the enzymatic properties of the recombinant enzyme were examined. *Results* The ChKRED20 was cloned within the *Escherichia coli* system to achieve soluble protein expression. This was achieved by removing the His-tag and optimizing expression conditions. Compared to enzymes with the N-terminal and C-terminal His-tags, the enzyme activity of ChKRED20 without His-tag increased by 0.77 and 1.28 times, respectively. The optimal temperature and pH for enzyme activity were 55 °C and 8.0, respectively. Furthermore, the enzyme demonstrated good adaptability in higher temperature and alkaline environments. *Conclusion* The removal of the His-tag and the optimization of expression conditions can significantly improve the soluble expression of ChKRED20 in *Escherichia coli*.

Key words carbonyl reductase; ChKRED20; His-tag; enzymatic properties; *Escherichia coli*; protein solubility

Fund programs National Natural Science Foundation of China (Nos. 82173725, 31400680); Young and Middle-aged Teacher Develop Program in Colleges and Universities (No. DTR2024005)

Corresponding authors Zheng Hong, E-mail: zhenghong@ahmu.edu.cn; Fan Xinjiang, E-mail: fanxinjiang@126.com