研究论文

DOI:10.3969/j.issn. 1673–1689.2018.02.004

绿豆环氧化物水解酶基因的克隆、分析及表达

姚 瑶[1]， 胡 蝶[2]， 邬敏辰[*3]， 叶慧华[1]

(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：环氧化物水解酶可催化制备高光学纯度的环氧化物及邻二醇等高价值手性药物中间体。本研究采用 RT–PCR 和 THSO–PCR 扩增侧翼未知 DNA 序列技术从绿豆（*Vigna radiata*）中克隆了一种新型环氧化物水解酶 VrEH3 的基因 *Vreh3*,*Vreh3* 编码区 DNA 序列长度为 1 178 bp,包含 2 个 142 bp 和 79 bp 的内含子,以及 957 bp 的开放阅读框,编码 318 个氨基酸。VrEH3 的理论相对分子质量和等电点分别为 36.2×10^3 和 5.59;保守的催化三联体为 Asp^{101}–Asp^{262}–His^{297}。将 *Vreh3* 与表达载体 pET–28a(+) 连接,转化大肠杆菌 BL21(DE3) 获得重组 VrEH3。该酶可对映归一性水解外消旋环氧苯乙烷((*R*,*S*)–SO) 产生(*R*)–苯基乙二醇,得率高达 79.4%,对映体过量值(e.e.值) 为 94.7%。

关键词：绿豆;环氧化物水解酶;基因克隆;对映归一性水解;(*R*)–苯基乙二醇

中图分类号:Q78　　**文献标志码**:A　　**文章编号**:1673—1689(2018)02—0138—08

Cloning, Analysis and Expression of a Novel Epoxide Hydrolase Gene (*Vreh3*) from *Vigna radiata*

YAO Yao[1]， *HU Die*[2]， *WU Minchen*[*3]， *YE Huihua*[1]

(1. School of Pharmaceutical Science, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 3. Wuxi Medical School, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: Epoxide hydrolase can be effectively used in the preparation of optically active epoxides and vicinal diols, which are versatile intermediates for the preparation of highly value-added bioactive compounds such as pharmaceuticals. In this study, a gene encoding a novel epoxide hydrolase (VrEH3) was successfully cloned from *Vigna radiata* by RT-PCR and T-hairpin structure-mediated PCR amplification (THSO-PCR) techniques. The cloned coding region DNA sequence of *Vreh3* is 1 178 bp in length, harboring two introns with sizes of 142 bp and 79 bp and a 957 bp open reading frame that encodes a 318-aa VrEH3. The theoretical molecular weight and calculated pI of VrEH3 were 36.2×10^3 and 5.59, respectively. The catalytic active center was

收稿日期：2015–09–16

基金项目：国家自然科学基金项目(21676117);江苏省研究生培养创新工程项目(KYLX15_1190,KYLX15_1151)。

***通信作者**：邬敏辰(1962—),男,江苏无锡人,理学博士,教授,博士研究生导师,主要从事酶工程与基因工程研究。

E–mail:bioch@163.com

引用本文：姚 瑶,胡 蝶,邬敏辰,等. 绿豆环氧化物水解酶基因的克隆、分析及表达[J]. 食品与生物技术学报,2018,37(2):138–145.

constituted by a strictly conserved catalytic triad of Asp^{101}-Asp^{262}-His^{297}. Subsequently, the expression plasmid pET-28a (+)-*Vreh3* was constructed by ligated *Vreh3* with pET-28a (+) and transformed into *Escherichia coli* BL21 (DE3), forming a recombination strain *E. coli*/*Vreh3*. Using the *E. coli*/*Vreh3* as the catalysis, the (*R*)-1-phenyl-1,2-ethanediol was obtained with a yield of 79.4% and an enantiomeric excess value of 94.7% by enantioconvergent hydrolysis of(*R*,*S*)-styrene oxide.

Keywords: *Vigna radiata*, epoxide hydrolase, gene cloning, enantioconvergent hydrolysis, (*R*)-1-phenyl-1,2-ethanediol

手性环氧化物和邻二醇是一类合成手性化合物的重要砌块，被广泛应用于医药、农药、精细化工材料等的合成，如β-3 肾上腺素受体激动剂、南部松小蠹诱剂和α-甜没药醇等的合成[1]。环氧化物水解酶（epoxide hydrolase，EH，EC 3.3.2.3）能选择性水解环氧化物生成相应的邻二醇[2]，例如，其水解外消旋环氧苯乙烷((*R*,*S*)-SO）可产生(*R*)-或(*S*)-苯基乙二醇(PED)，该产物是液晶材料中不可缺少的手性添加剂，也是合成许多光学活性药物和农药的重要手性中间体。已发现的一些来源于动物、植物和微生物的 EHs 具有良好的对映选择性和区域选择性[3-4]。目前，对 EH 的研究主要集中在动力学拆分消旋体环氧化物制备手性环氧化物和邻二醇，但其生成 1,2-二醇的对映体过量值(e.e.值）普遍较低，且最大理论产率为 50%。如 *Aspergillus niger* LCP 52 ANEH 和 *Cupriavidus metallidurans*-CH34 CMEH 动力学拆分外消旋(*R*,*S*)-SO 获得(R)-PED 的 e.e.值分别为 56%和 51%[5-6]。

对映体会聚（enantioconvergence）是指将 2 种构型的外消旋底物同时转化成一种构型的产物，发生对映体会聚的水解反应[7]，其产物的最大理论产率为 100%。许建和课题组从绿豆(*Vigna radiata*）中成功克隆出 2 种 EHs 基因 *Vreh1*[8]和 *Vreh2*[9]，并实现其在大肠杆菌（*Escherichia coli*）中的异源表达，获得的重组酶均能对映归一性水解对硝基苯基环氧乙烷生成（*R*)-对硝基苯基乙二醇，当转化率为 100%时，产物对映体过量 e.e. 值分别为 70%和 84.8%。本研究中通过对植物来源的 EH 进行基因多序列比对，设计 2 条简并引物，采用 RT-PCR 和作者所在研究室建立的侧翼未知 DNA 序列扩增技术 THSO-PCR，克隆了一种新型绿豆 EH 的基因(*Vreh3*)，并将其在 *E. coli* BL21(DE3）中表达，利用该酶水解(*R*,*S*)-SO 制备(*R*)-PED。

1 材料与方法

1.1 菌株、质粒和培养基

E. coli JM109、BL21（DE3）和表达质粒 pET-28a(+) 购自 Novagen 公司；克隆质粒 pUCm-T 购自上海 Sangon 公司；LB 培养基：0.5 g/dL 酵母提取物、1 g/dL 蛋白胨和 1 g/dL NaCl(固体培养基添加 2 g/dL 琼脂粉)，pH 7.2。

1.2 主要试剂和仪器

绿豆，购自超市；UNIQ-10 柱式 Trizol 总 RNA 抽提试剂盒和 DNA 胶回收试剂盒，购自上海 Sangon 公司；*Ex Taq* 和 *rTaq* DNA 聚合酶、限制性内切酶、T4 DNA 连接酶和 RNA PCR Kit（AMV）Ver. 3.0 试剂盒，均购自大连 TaKaRa 公司；(*R*,*S*)-SO 和(*S*)-PED，购自上海萨恩化学技术有限公司。气相色谱仪 GC-2010，购自日本 Shimadzu 公司产品；手性气相色谱柱 CYCLOSIL-B（30 m × 0.25 mm × 0.25 μm)，购自美国 Agilent 科技公司产品。

1.3 绿豆总 RNA 及基因组 DNA 提取

选取饱满的绿豆种子置于培养皿中，加入少许去离子水覆盖培养皿底层，于 37 ℃培养箱中孵育 12 h，取发芽绿豆胚芽，使用 UNIQ-10 柱式 Trizol 总 RNA 抽提试剂盒提取绿豆总 RNA。采用简化 CTAB 法[10]提取绿豆基因组 DNA。

1.4 PCR 引物的设计

将 *Vigna radiata*（ADP68585）、*Glycine max*（NP_001238563）和 *Phaseolus vulgaris*（XP_007147002）等 21 条来源于植物的 EH 氨基酸序列进行比对，在近 N 端和 C 端区域各选取一段保守序列(MHVAEKG）和(AHFNNQ)，分别对应其设计简并引物 VrEH-F1 和 VrEH-R1，用于 *Vreh3* 基因部分

cDNA 序列的扩增;根据上述引物扩增获得的 cDNA 序列,在近其 N 端和 C 端非保守区分别设计特异下游引物 VrEH-R2 和特异上游引物 VrEH-F2, 用于 *Vreh3* 基因 5′端 DNA 和 3′端 cDNA 序列的扩增。根据获得的 *Vreh3* 基因 3′端 cDNA 和 5′端 DNA 序列,设计上下游引物 VrEH-F 和 VrEH-R,用于克隆 *Vreh3* 基因编码区 DNA 和 cDNA 序列。T-发卡结构序列 HSO-T 和引物 HSO-F 参照胡蝶[11]等所述方法合成。除试剂盒内引物,其余引物和 HSO-T 均由上海 Sangon 公司合成,见表 1。

表 1 PCR 扩增引物和 T-发卡结构序列

Table 1 Primers and T-hairpin structure sequences for PCR amplification

引物	序列 (5′-3′) [a]
VrEH-F1	ATGTXGCXGARAAAGGHRARC
VrEH-R1	GYYTCTTGRTTRTTRAARTGAG
Oligo dT-AP	GTTTTCCCAGTCACGAC-Oligo dT
M13 Primer M4	GTTTTCCCAGTCACGAC
HSO-T	GACTACTGGCATGGGCGGATTACCGCCCATGCCAGTAGTCT
HSO-F	ACTCGCCCATGCCAGTAGTC
VrEH-R2	TCTGTCGGGGCGAAACGTGC
VrEH-F2	GGAGGAAAAATTCAAGTGCC
VrEH-F	CATATGGAAGGCGTAGAACACAG
VrEH-R	CTCGAGTTAAAACTTCTTGATAAAATCGTAAATATGA

注:a:X=A/T,Y=T/C,H=A/T/C,R=A/G. VrEH-F 和 VrEH-R 引物序列中下划线部分分别为 *Nde* I 和 *Xho* I 限制性酶切位点

1.5 *Vreh3* 基因序列的扩增

1.5.1 *Vreh3* 基因 3′端 cDNA 序列的扩增 以绿豆总 RNA 为模板,Oligo dT-AP 为引物,按照 TaKaRa RNA PCR Kit (Ver.3.0) 说明书进行反转录合成 cDNA 的第一链。以该链为模板,VrEH-F1 和 M13 Primer M4 为引物进行第一轮 PCR 扩增。以第一轮 PCR 产物为模板,VrEH-F1 和 VrEH-R1 为引物进行第二轮 PCR 扩增获得 *Vreh3* 基因部分 cDNA 片段,PCR 扩增产物经琼脂糖凝胶电泳, 割胶回收目的条带,连接 pUCm-T 载体,转化 *E. coli* JM109,经蓝白斑筛选后,送上海 Sangon 测序。然后,以第一轮 PCR 产物为模板,VrEH-F2 和 M13 Primer M4 为引物进行第二轮 PCR 扩增,获得部分 cDNA 片段。合并 2 次第二轮 PCR 扩增的 cDNA 片段获得 *Vreh3* 基因 3′端 cDNA 序列。

1.5.2 *Vreh3* 基因 5′端 DNA 序列的扩增 参考胡蝶[11]等的 THSO-PCR 技术扩增 *Vreh3* 基因 5′端 DNA。以 HSO-T 发夹结构与酶切修饰后绿豆基因组 DNA 的连接产物为模板,HSO-F 与 VrEH-R2 为引物进行 PCR 扩增获得 *Vreh3* 基因 5′端 DNA 序列。

1.5.3 *Vreh3* 编码区 DNA 和 cDNA 序列的扩增 以绿豆基因组 DNA 为模板,VrEH-R 和 VrEH-F 为引物进行 PCR 扩增获得 *Vreh3* 基因编码区 DNA 序列。以逆转录合成 cDNA 第一链为模板,以 VrEH-F 和 M13 Primer M4 为引物进行第一轮 PCR;以第一轮 PCR 产物为模板,VrEH-F 和 VrEH-R 为引物进行第二轮 PCR:94 ℃ 3 min,30 个循环(94 ℃ 30 s,55 ℃ 30 s,72 ℃ 70 s),72 ℃ 10 min,获得 *Vreh3* 基因编码区 cDNA 序列,PCR 产物回收后与 pUCm-T 连接,转化 *E. coli* JM109,测序正确的重组质粒命名为 pUCm-T-*Vreh3*。

1.6 生物信息学分析

利用 NCBI ORF Finder (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html) 分析 *Vreh3* 开放阅读框;BDGP(http://www.fruitfly.org/index.html)预测转录起始位点;PLACE (http://www.dna.affrc.go.jp/PLACE/signalscan.html) 预测顺式调控作用元件;ProtParam (http://web.expasy.org/protparam/) 工具分析 VrEH3 理化性质;DNAMAN 6.0 和 ClustalW2 软件用于蛋白质一级结构的分析。

1.7 *Vreh3* 在 *E. coli* BL21(DE3) 中的表达

以 cDNA 第一链为模板, 以 VrEH-F 和 M13 Primer M4 为引物进行第一轮 PCR; 以该轮 PCR 产物为模板,VrEH-F 和 VrEH-R 为引物进行第二轮

PCR 获得 *Vreh3* 基因编码区 cDNA 序列,产物回收后与 pUCm-T 连接,转化 *E. coli* JM109,测序正确的重组质粒命名为 pUCm-T-*Vreh3*。

用 *Nde* I 和 *Xho* I 双酶切 pUCm-T-*Vreh3*,割胶回收目的基因 *Vreh3*,与经同样双酶切的 pET-28a(+)连接,获得重组表达质粒 pET-28a(+)-*Vreh3*,转化 *E. coli* BL21(DE3),获得工程菌命名为 *E. coli* BL21/pET-28a(+)-*Vreh3*。在 IPTG 终浓度 0.15 mmol/L,16 ℃诱导表达重组 VrEH3。100 mL 诱导发酵液经 8 000 r/min 离心收集菌体,用 5 mL 磷酸钾缓冲液(100 mmol/L,pH 7.0)悬浮,用于 SDS-PAGE 分析及活性测定。不含目的基因的 pET-28a(+)转化 *E. coli* BL21(DE3)作为空白对照,命名为 *E. coli*/pET-28a(+)。

1.8 气相色谱分析及计算

样品分析采用气相色谱仪 GC-2010、手性气相色谱柱 CYCLOSIL-B 和氢火焰离子化检测器。进样口和检测器温度均为 250 ℃;初始柱温 100 ℃,以 5 ℃/min 升温至 210 ℃;载气为氮气,流速 3.0 mL/min,分流比 1:50。在此检测条件下,正己醇、(*R*)-SO、(*S*)-SO、(*S*)-PED 和(*R*)-PED 的保留时间分别为 3.738、6.368、6.492、17.437 min 和 17.574 min。(*R*)-PED 摩尔产率 =(S/RS$_0$) × 100%,e.e. =[(S-R)/(S+R)] × 100%;其中:S 和 R 分别代表(*S*)-和(*R*)-PED 的最终摩尔浓度,RS$_0$ 代表(*R*,*S*)-SO 的初始摩尔浓度。

1.9 EH 活性的测定

在 2 mL EP 管中加入 800 μL 菌液和 150 μL 磷酸钾缓冲液(100 mmol/L,pH 7.0),25 ℃预热 5 min;加入 50 μL(*R*,*S*)-SO(200 mmol/L),25 ℃反应 3.5 h 后 8 000 r/min 离心 2 min,取 100 μL 上清液于 1 mL 乙酸乙酯(含 1 mmol/L 的正己醇作为内标),激烈震荡,8 000 r/min 离心 2 min,吸取上层有机相,经无水硫酸镁干燥,过 0.22 μm 有机膜,按 1.8 方法进行气相色谱分析。

2 结果与分析

2.1 *Vreh3* 基因序列的扩增

2.1.1 *Vreh3* 基因 3′端 cDNA 序列的扩增 据 1.5 所述,以 VrEH-F1 和 M13 Primer M4 为引物进行 PCR 获得约 1 800 bp 的条带(图 1(a) 泳道 1);以 VrEH-F1 和 VrEH-R1 为引物,第二轮 PCR 产物获得约 850 bp 条带(图 1(a) 泳道 2);以 VrEH-F2 和 M13 Primer M4 为引物,第二轮 PCR 产物获得约 400 bp、500 bp 2 条清晰的条带(图 1(a) 泳道 3),测序结果显示约 500 bp 处条带为 *Vreh3* 基因序列。合并 2 次第二轮 PCR 产物获得的序列,获得的 *Vreh3* 基因 3′端 cDNA 序列长 1 080 bp。

2.1.2 *Vreh3* 基因 5′端 DNA 序列的扩增 不同限制性内切酶酶切基因组构建了 3 个 PCR 模板库,以 HSO-F 和 VrEH-R2 为引物分别进行 PCR 扩增,获得约 2 100 bp、220 bp 和 220 bp 的条带(图 1(b))。测序结果显示 3 个条带均为 *Vreh3* 基因 5′端 DNA 序列。

2.1.3 *Vreh3* 基因编码区 DNA 和 cDNA 序列的扩增 用 DNAMAM 软件分析 3′端 cDNA 序列确定终止子为 TAA,设计特异性下游引物 VrEH-R;用 BestORF 分析 5′端 DNA 序列确定起始密码子 ATG 的位置,设计特异性上游引物 VrEH-F。以绿豆总 RNA 逆转录合成 cDNA 第一链为模板,VrEH-F 和 VrEH-R 为引物,经二轮 PCR 扩增获得 *Vreh3* 基因的编码区 cDNA 长约 960 bp(图 1(c)泳道 1)。以绿豆基因组 DNA 为模板,VrEH-F 和 VrEH-R 为引物,经 PCR 扩增获得 *Vreh3* 基因的编码区 DNA 长约 1 200 bp 的序列(图 1(c) 泳道 2)。测序获得编码区 cDNA 序列为 957 bp(GenBank 登录号为 KR013755),编码区 DNA 序列为 1 178 bp。

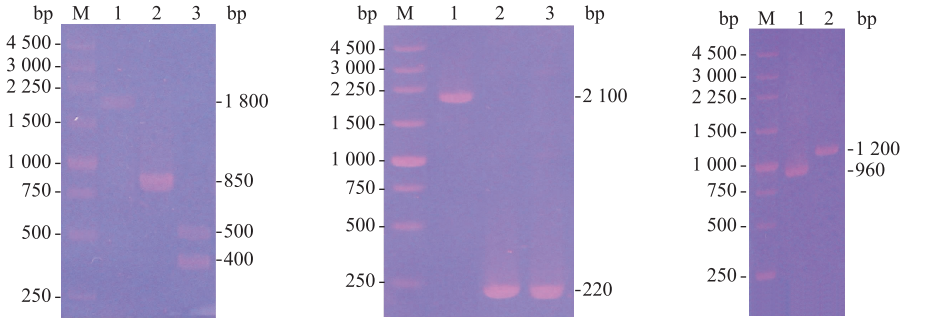
2.2 *Vreh3* 的核酸序列分析

用 DNAMAN 合并扩增获得 *Vreh3* 序列,编码区 DNA 序列包含 2 个 142 bp 和 79 bp 的内含子和 957 bp 的开放阅读框,编码 318 个氨基酸。利用 BDGP 预测,位于起始密码子 ATG 上游的 94 bp 处的鸟嘌呤(G)为转录起始位点;利用 PLACE 分析在转录起始位点上游 22 bp 处发现真核生物中典型的 TATA-box,在终止密码子下游 360 bp 处发现 AATAATA 的多聚腺苷酸加尾信号,分析结果表明 *Vreh3* 的 5′-非翻译区和 3′非编码区长分别为 94 bp 和 446 bp(图 2)。

2.3 VrEH3 氨基酸序列分析

利用 ProtParam 分析 VrEH3 的理论相对分子质量和等电点分别为 36.2×10^3 和 5.59。通过将 VrEH3 与不同来源的 5 种 EH 进行氨基酸序列比对,发现 VrEH3 与来源于 *Glycine max*(NP_001238563)、*Glycine max*(NP_001240943)、*Vigna radiata*(ADP685

85,VrEH1)[8]、*Phaseolus vulgaris*（XP_007147002）和*Solanum lycopersicum*（XP_004230258）的EH氨基酸序列同源性分别为80.8%、73.9%、72.4%、71.6%和66.0%(图3)。根据文献报道分析,VrEH3保守的Asp^{101}、Asp^{262}和His^{297}组成催化三联体,Tyr^{150}和Tyr^{232}为质子供体。



(a) 3′端cDNA序列扩增　(b) 5′端DNA序列扩增　(c) 编码区cDNA和DNA序列扩增

注:M:DNA Marker;(a) 1:以VrEH-F1和M13 Primer M4为引物第一轮PCR产物,2:以VrEH-F1和VrEH-R1为引物第二轮PCR产物,3:VrEH-F2和M13 Primer M4为引物第二轮PCR产物;(b) 1-3:分别为用*Bgl* II和*Sal* I、*Bgl* II和*Xba* I、*Xba* I和*Pst* I酶切基因组DNA构建模板,扩增的5′端DNA序列的PCR产物;(c) 1:编码区cDNA序列的PCR产物,2:编码区DNA序列的PCR产物

图1　*Vreh3*序列扩增的PCR产物

Fig. 1　PCR products of the amplification of *Vreh3*

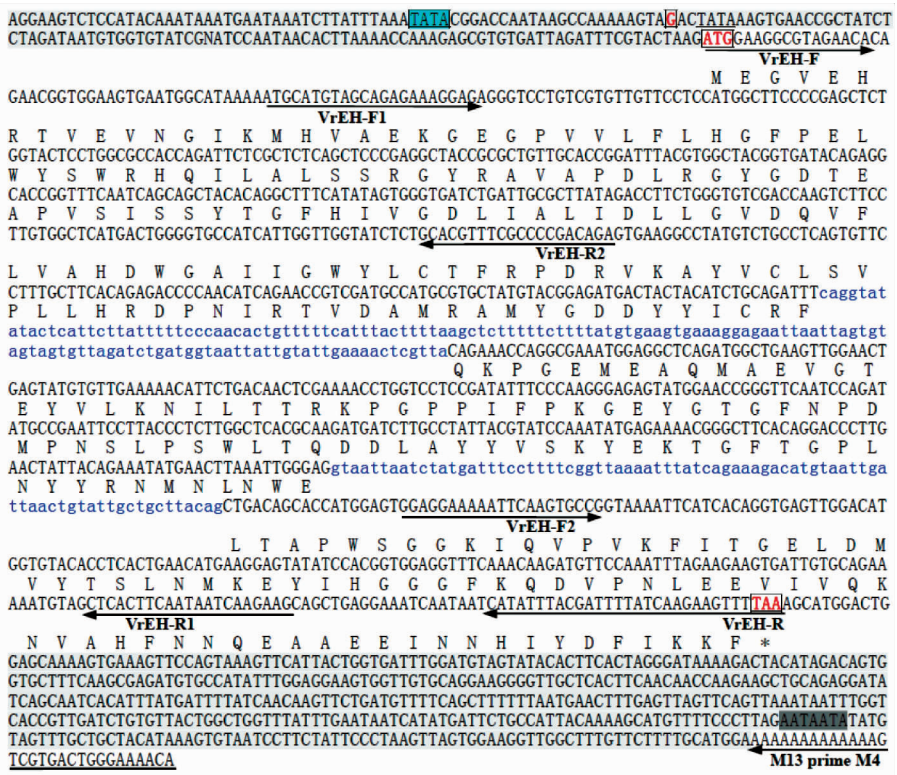


图2　*Vreh3*的核酸序列分析

Fig. 2　Analysis of nucleotide sequence of *Vreh3*



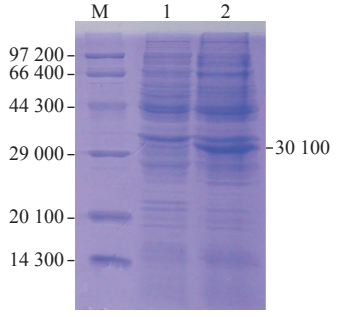
注：Vra3：*Vigna radiata*（AKJ75505）；Gma1：*Glycine max*（NP_001238563）；Gma2：*Glycine max*（NP_001240943）；Vra1：*Vigna radiata*（ADP68585）；Pvu：*Phaseolus vulgaris*（XP_007147002）；Sly：*Solanum lycopersicum*（XP_004230258）

图 3 VrEH3 与其它 5 种植物 EH 的氨基酸序列比对

Fig. 3 Alignment of the amino acid sequences of VrEH3 and other EHs from plants

2.4 *Vreh3* 在 *E. coli* 中的表达

构建的重组菌 VrEH3 按 1.7 方法进行诱导表达。SDS-PAGE 分析结果显示，VrEH3 全细胞在约 30.1×10^3 处有特异性目的条带（图 4，泳道 2），小于 VrEH1（约 41.0×10^3）[8]和 VrEH2（约 36.0×10^3）[9]的相对分子量；*E. coli*/pET-28a（+）在该处无特异性条带（图 4 泳道 1），表明 VrEH3 成功在 *E. coli* BL21（DE3）中表达。



M：蛋白 Marker；1：*E. coli*/pET-28a（+）菌体；2：*E. coli*/*Vreh3* 菌体

图 4 重组大肠杆菌表达产物的 SDS-PAGE 分析

Fig. 4 SDS-PAGE analysis of the expressed products by recombinant *E. coli*

2.5 VrEH3 对映归一性水解（*R*，*S*）-SO

按 1.9 所述方法，诱导后的工程菌 *E. coli*/*Vreh3* 对 10 mmol/L（*R*，*S*）-SO 进行水解反应，反应进程如图 5。结果表明，VrEH3 优先水解（*S*）-SO，而对（*R*）-SO 反应较慢。在 0~2 h 内，（*S*）-SO 的摩尔浓度迅速降低，（*R*）-SO 的 e.e.值迅速上升，同时产物 e.e. 值一直保持在 95%以上。当反应 3.5 h 时，（*S*）-SO 全部水解，（*R*）-SO 的 e.e. 值>99%，得率为 20.6%；产物（*R*）-PED 的 e.e.值为 94.7%，得率为 79.4%，高于绿豆粉水解（*R*，*S*）-SO 生成（*R*）-PED 的最大 e.e.值（82.7%）和最高得率（48.2%）[12]。目前，大部分报道的重组表达 EHs，如 *A. niger* ANEH[5]，*Sphingomonas* sp. HXN-200 SpEH [13] 和 *Agrobacterium radiobacter* AD1[14] EchA 等均具有较高的对映选择性，通过酶动力学拆分的制备（*R*）-或（*S*）-SO，其 e.e.值>99%，得率<50%，但（*R*）-或（*S*）-PED 的 e.e. 值并不高。少部分 EHs，如 *Caulobacte crescentus* CcEH[15]，*Solanum tuberosum* StEH[16]和绿豆 VrEH1[8]和 VrEH2[9]等具有对映体归一性，其中 CcEH 和 StEH 归一性水解（*R*，*S*）-SO 生成（*R*）-PED 的 e.e. 值分别为 90%和 86%，均小于 VrEH3 获得（*R*）-PED 的 e.e.值（94.7%）。该结果说明 VrEH3 不

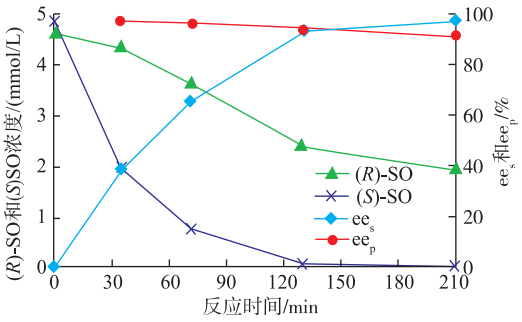


图 5 对映归一性水解(*R*,*S*)–SO 的时间进程

Fig. 5 Time course of enantioconvergent hydrolysis of(*R*, *S*)–SO

仅具有较好的对映选择性,且具有良好的对映体归一性(如图 6),有着广阔的应用前景。

3 结 语

本研究运用不同 PCR 技术,从绿豆中获得了一种新型环氧化物水解酶基因 *Vreh3*, 并成功实现了在 *E. coli* 中的异源表达。初步测定重组 VrEH3 活性,发现 VrEH3 对映归一性水解(*R*,*S*)–SO 可同时获得高对映体纯的(*R*)–SO(e.e.值>99%) 和(*R*)–PED(e.e.值为 94.7%)。VrEH3 可作为一个良好的生物催化剂,对于制备高纯度的手性环氧化物或邻二醇具有巨大的潜在应用价值,其催化机理及应用需进一步研究。

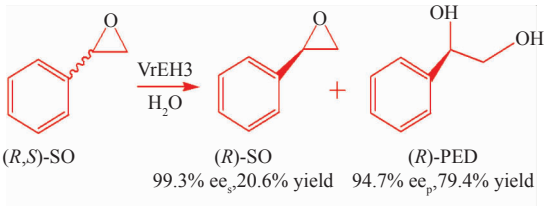


图 6 VrEH3 催化水解(*R*,*S*)–SO 的反应

Fig. 6 Catalytic hydrolysis reaction of (*R*,*S*) –SO by VrEH3

参考文献:

[1] SOLARES L F,MATEO C. Improvement of the epoxide hydrolase properties for the enantioselective hydrolysis of epoxides[J]. **Current Organic Chemistry**,2013,17(7):744-755.

[2] 李从发. 新型环氧化物水解酶筛选及其在手性合成中的应用[D]. 济南:山东大学,2003.

[3] PENG Huasong,ZONG Minhua,LOU Wenyong,et al. The application of microbial epoxide hydrolase in organic synthesis[J]. **Microbiology**,2003,30(2):92-97.(in Chinese)

[4] XU W,XU J H,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.

[5] KUMAR R,WANI S I,CHAUHAN N S,et al. Cloning and characterization of an epoxide hydrolase from *Cupriavidus metallidurans*-CH34[J]. **Protein Expression and Purification**,2011,79(1):49-59.

[6] PEDRAGOSAMOREAU S,ARCHELAS A,FURSTOSS R. Microbiological transformations. 28. Enantiocomplementary epoxide hydrolyzes as a preparative access to both enantiomers of styrene oxide. Journal of Organic Chemistry,1994,58(7):5533-5536.

[7] JU Xin,PAN Jiang,XU Jianhe. Enantioconvergent hydrolysis of p-nitrostyrene oxide catalyzed by Mung bean epoxide hydrolase [J]. **Chinese Journal of Catalysis**,2008,29(8):696-700.(in Chinese)

[8] ZHU Q Q,HE W H,KONG X D,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.

[9] YAN W W,XU D K,QING Q Z,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.

[10] ZHANG Xiaoxiang,WANG Ling,SHOU Lulu. A rapid modified CTAB method of extracting genomic DNA from wheat leaf[J]. **Chinese Agricultural Science Bulletin**,2012,28(36):46-49.(in Chinese)

[11] HU Die,ZHU Lijuan,WU Minchen,et al. Cloning and bioinformatics analysis of epoxide hydrolase gene from Aspergillus usamii [J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**,2013,32(12):1244-1252.(in Chinese)

[12] CHEN W J,LOU W Y,ZONG M H. Efficient asymmetric hydrolysis of styrene oxide catalyzed by mung bean epoxide hydrolases

in ionic liquid-based biphasic systems[J]. **Bioresource Technology**,2012,115(115):58-62.

[13] WU S,LI A,CHIN Y S,et al. Enantioselective hydrolysis of racemic and meso-epoxide with recombinant *Escherichia coli* expressing epoxide hydrolase from *Sphingomonas* sp. HXN-200:preparation of epoxides and vicinal diols in high ee and high concentration[J]. **ACS Catalysis**,2013,3(4):752-759.

[14] LOO B V,KINGMA J,HEYMAN G,et al. Improved enantioselective conversion of styrene epoxides and meso-epoxides through epoxide hydrolases with a mutated nucleophile-flanking residue[J]. **Enzyme and Microbial Technology**,2009,44(3):145-153.

[15] HWANG S,CHOI C Y,LEE Y E. Enantioconvergent bioconversion of *p*-chlorostyrene oxide to (*R*)-*p*-chlorophenyl-1,2-ethandiol by the bacterial epoxide hydrolase of *Caulobacter crescentus*[J]. **Biotechnology Letters**,2008,30(7):1219-1225.

[16] MONTERDE M I,LOMBARD M,ARCHELAS A,et al. Enzymatic transformations. Part 58:Enantioconvergent biohydrolysis of styrene oxide derivatives catalyzed by the *Solanum tuberosum* epoxide hydrolase[J]. **Tetrahedron:Asymmetry**,2004,15(18):2801-2805.

会 议 消 息

会议名称(中文):第五届生态毒理学学术研讨会

开始日期:2018-04-25　　结束日期:2018-04-28

所在城市:辽宁省　大连市

主办单位:大连理工大学、中国科学院大连化学物理研究所、中国科学院生态环境研究中心《生态毒理学报》编辑部

联系人:侯一宁、张慧　　联系电话:010-62941072

E-MAIL:stdlxb@rcees.ac.cn

会议网站:http://www.stdlxb.cn/ch/common_item.aspx?parent_id=20140101031232001&menu_id=20141114051939001&is_three_menu=0

会议背景介绍:2018年4月,“第五届生态毒理学学术研讨会”将在辽宁省大连市举行,本届会议由大连理工大学、中国科学院大连化学物理研究所和中国科学院生态环境研究中心《生态毒理学报》编辑部共同主办。本届会议主题是“化学品环境风险评价及防控新技术、新原理”,将根据本领域的最新进展设置多个议题展开讨论。如同往届会议,交流形式亦包括大会报告、分会主旨报告、口头报告和展板报告。会议计划依然由英国皇家化学会设立优秀口头报告奖和优秀墙报奖,并颁发获奖证书。