

阚延泽, 孙文秀, 李 伟. 黄鳝醛酮还原酶的定点突变及其酶活性的影响[J]. 江苏农业学报, 2018, 34(3) : 617-622.
doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2018.03.020

黄鳝醛酮还原酶的定点突变及其酶活性的影响

阚延泽, 孙文秀, 李 伟

(长江大学生命科学学院, 湖北 荆州 434025)

摘要: 为分析催化四联体中关键氨基酸突变对黄鳝醛酮还原酶活性的影响, 本研究利用重叠 PCR 技术对黄鳝 *Eakr* 基因进行了 *A81K* 定点突变, 将突变基因亚克隆至 pET-28a (+) 构建了重组表达载体。重组载体转化 BL21 (DE3) 菌株后经 IPTG 诱导, 镍离子柱亲和层析获得了突变型蛋白 (*Eakr*^{A81K}); 以 *NADPH* 为辅酶, 分析了突变型蛋白 *Eakr*^{A81K} 的底物谱, 并比较了野生型 (*Eakr*) 和突变型蛋白 (*Eakr*^{A81K}) 对不同底物的还原活性; 最后, 以甲醛为底物比较了野生型和突变型蛋白的最适反应温度和最适 pH。结果表明: *Eakr*^{A81K} 对醛类物质以及中长链酮类物质具有较高的还原活性, 而对醇、糖、酸类物质没有明显活性; *A81K* 位点特异突变使得黄鳝醛酮还原酶和底物之间的亲和力显著增加, 并提高了酶对大部分底物的还原活性; 突变稍降低了黄鳝醛酮还原酶的酸度耐受能力但提升了该酶的温度耐受能力。这暗示着黄鳝醛酮还原酶 *Eakr* 的 81 位氨基酸在底物识别上具有重要作用。

关键词: 醛酮还原酶; 定点突变; 催化四联体; 底物识别

中图分类号: Q554 文献标识码: A 文章编号: 1000-4440(2018)03-0617-06

Site-directed mutagenesis and effects on enzymatic activity of swamp eel aldo-keto reductase, *Eakr*

KAN Yan-ze, SUN Wen-xiu, LI Wei

(College of Life Science, Yangtze University, Jingzhou 434025, China)

Abstract: In order to probe the effects of mutation of the key amino acid in the catalytic tetrad on enzymatic activity of *Eakr*, SOE PCR was performed to clone and introduce an *A81K* mutation into the aldo-keto reductase *Eakr* gene. Subsequently, recombinant mutants were constructed and verified. The constructed recombinant plasmid pET-28a-*Eakr*^{A81K} was transformed to *Escherichia coli* BL21 (DE3) and induced with IPTG, the expressed protein was purified by nickel ion affinity chromatography. Aldehydes and ketones were chosen to determine the substrate specificity of *Eakr*^{A81K}, *NADPH* was utilized as a cofactor. Moreover, the enzymatic activities between *Eakr* and *Eakr*^{A81K} were compared. In addition, the optimal reaction temperature and pH of the two proteins were also analyzed. The results showed that *Eakr*^{A81K} displayed efficient activities to aldehydes and medium long chain ketones. Moreover, *A81K* mutation resulted in higher affinity between substrates and the enzyme. The acidity tolerance ability of swamp eel aldo-keto reductase was reduced, and temperature tolerance ability of the enzyme was improved. All above results suggest that *Eakr* amino acid at position 81 plays important roles in substrate recognition.

Key words: aldo-keto reductase; site-directed mutagenesis; catalytic tetrad; substrate recognition

收稿日期: 2017-10-10

基金项目: 湿地生态与农业利用教育部工程研究中心开放课题 (KF2015016); 湖北省教育厅基金项目 (Q20131206)

作者简介: 阚延泽 (1993-), 男, 江苏徐州人, 硕士研究生, 主要从事生化与分子生物学研究。 (Tel) 13545817727; (E-mail) 378053841@qq.com

通讯作者: 李 伟, (E-mail) wetli@yangtzeu.edu.cn

醛酮还原酶(*AKR*)是一类依赖 *NADH/NADPH* 作

为辅酶将醛酮类物质还原为相应醇类物质的氧化还原酶^[1-2]。它们在生物界广泛分布,植物、动物和微生物中均有报道^[3]。已知的醛酮还原酶数量众多,包括 16 个家族近 200 个成员^[4]。序列比对分析发现醛酮还原酶之间具有一定的序列同源性,都具有一个典型的 $(\alpha/\beta)_8$ 桶状结构^[5]。其中,醛酮还原酶负责底物催化的关键氨基酸一般由相对保守的催化四联体(D-Y-K-H)组成^[6-7]。醛酮还原酶底物广泛,包括醛酮类化合物、芳香类化合物、醛糖和类固醇等^[3-4]。每个醛酮还原酶家族都有其特异性底物,同时在机体内行使独特的生物学功能,例如 AKR7 家族可以降解致癌羰基化合物,在生物体内参与机体的保护和防御^[8]; AKR1C 亚家族具有代谢人体性激素的能力,参与人体激素代谢和调节^[9-10];醛糖还原酶(AR)通过将葡萄糖催化还原成山梨醇,同时减轻果糖和山梨醇在周围组织细胞中的过多积累,从而达到抑制糖尿病的功能^[11-12]。代海艳等^[13]重组表达了黄鳝醛酮还原酶基因 *Eakr*,发现含该重组基因的菌株比野生菌株抗羰基化合物胁迫的能力增强。除此之外,国内外对鱼类醛酮还原酶基因及功能的研究相对匮乏。仅有少数罗非鱼醛酮还原酶 AKR1A1 羰基解毒作用的报道^[14]。黄鳝醛酮还原酶 *Eakr* 的氨基酸序列与已报道的所有醛酮还原酶家族成员同源性均小于 25%,且其催化四联体氨基酸为 D-Y-A-H,这与其他已知醛酮还原酶的催化四联体存在一个氨基酸的差别。本研究拟通过将黄鳝 *Eakr* 第 81 位丙氨酸(A)进行定点突变为赖氨酸(K),分析突变蛋白 *Eakr*^{A81K} 的底物谱,比较野生型(*Eakr*)和突变型蛋白(*Eakr*^{A81K})对不同代谢底物的活性变化,为深入了解黄鳝醛酮还原酶 *Eakr* 的功能及其催化四联体在底物识别上的作用提供重要的参考资料。

1 材料与方法

1.1 试验材料与试剂

BL21(DE3)菌株购于北京全式金生物技术有限公司。含 pET-28a-*Eakr* 的 BL21(DE3)菌株,含 pET-28a(+)空白质粒的 BL21(DE3)菌株,均由本实验室构建并保存于长江大学生物医药研究所。Ni 离子亲和层析柱购于上海七海复泰生物技术有限公司。质粒提取试剂盒购自北京天根生化有限公司。DNA 凝胶回收试剂盒、*Pfu* DNA 聚合酶购自北京全式金生物技术有限公司。酶反应底物丙酮醛、苯甲

醛、反式丁烯醛购自上海阿拉丁生化技术股份有限公司。3-戊酮、2,3-戊二酮、2,4-戊二酮购自上海麦克林生化技术有限公司,其他试剂均为国产分析纯。

1.2 黄鳝 *Eakr* 基因 A81K 位点的定点突变

用快速质粒 DNA 中量提取试剂盒,从含 pET-28a-*Eakr* 质粒的 BL21(DE3)菌中提取质粒 DNA。用突变引物对 F1: 5'-GCCGAATTCATGCTGTGCT-TCCCAAAG-3' 和 Rm: 5'-TCTGCACAGCTGCTGCCT-TATCTCCAGAGGACT-3' 扩增突变位点及上游片段;用突变引物对 Fm: 5'-AAGTCCTCTGGAGAT AAG GCACCAGCTGTGCAGAG-3' 和 R1: 5'-CCGAAGCTTT-TAGCTCCTGTACTATCGC-3' 扩增突变位点及下游片段。引物中突变位点碱基用斜体标出,酶切位点用下划线标出。将第 1 次 PCR 扩增产物回收、纯化后等量混匀,利用 F1 和 R1 引物进行重叠 PCR 扩增。每次 PCR 扩增均采用 Tran Start Fast *Pfu* DNA Polymerase 高保真 DNA 聚合酶以降低错义突变。扩增产物经回收、纯化后连接 T 载体后转入大肠杆菌 DH5 α 中,送上海铂尚生物技术公司进行序列测定。

1.3 表达载体构建及重组蛋白表达及纯化

提取经测序验证过的质粒 DNA,采用限制内切酶 *EcoR* I、*Hind* III 进行双酶切。酶切产物经电泳、回收后纯化,并连接到同样双酶切的 pET-28a(+)中。将连接产物转化到 *E. coli* BL21(DE3)感受态细胞中,经卡那霉素抗性筛选、菌落 PCR 验证及 SDS-PAGE 电泳检测获得阳性表达菌株。

将野生型和突变型阳性重组菌按 1:50 分别接种到 200 ml 新鲜 LB 培养基,200 r/min 培养至 OD_{600} 约为 0.6 时,加入终浓度为 0.1 mmol/L 的 IPTG 诱导,37 °C 诱导培养 4 h,将诱导表达完成后的菌液在 4 °C 10 000 r/min 条件下离心 15 min,弃上清液,收集菌体加入 PBS(pH 8.5)洗涤菌体,重悬后,用超声波破碎菌体细胞(工作 5 s,间隔 15 s,工作 80 次);将细胞破碎液在 4 °C、10 000 r/min 离心 15 min,弃上清液,收集沉淀,加入适量 PBS 缓冲液(pH=8.5, 50 mmol/L,含 6 mol/L 盐酸胍)重悬,于 4 °C 中静置 1 h 以上去除包涵体,再次离心,收集上清液经 0.45 μ m 滤膜过滤后加入镍离子亲和层析柱中结合 12 h,用不同咪唑浓度(20 mmol/L, 100 mmol/L, 200 mmol/L, 300 mmol/L)的 PBS 缓冲液进行梯度洗脱,洗脱液收集装入透析袋中,密封后于 4 °C 透析过夜,收集透析后进行 12% 的 SDS-PAGE 电泳检测。

1.4 Eakr^{A81K} 酶活性检测及底物特异性分析

利用普析通用公司 TU-1900 紫外分光光度计测定还原型辅酶 *NADPH* 在 340 nm 处吸光值的变化来评价 *Eakr* 和 *Eakr^{A81K}* 的活性。酶活性单位定义为:醛酮还原酶在最适条件下 1 min 消耗 1 μmol 的 *NADPH* 为 1 个酶活性单位(U)。取比色皿,依次加入 1 000 μl 50.0 mmol/L PBS (pH = 5.0), 50 μl 酶液, 850 μl 底物(约 10.0 mmol/L), 80 μl 甲醇, 37 $^{\circ}\text{C}$ 保温 10 min 后,加入 20 μl 0.1 mmol/L *NADPH*, 总体积为 2 ml, 将比色皿放入紫外分光光度计中,测定 340 nm 处吸光值的变化并记录,每个底物重复 3 次。酶活性计算按照 Chen 等^[15]报道的方法进行,米氏常数(*K_m*)和催化常数(*k_{cat}*)参照文献[16]计算。

按照上述方法,分别测量 *Eakr* 和 *Eakr^{A81K}* 重组蛋白对苯甲醛、邻苯二甲醛、甲醛、戊二醛、反式丁烯醛、甘油醛、2,3-丁二酮、丙酮、醋酸甲羟孕酮、蒽酮、黄体酮、甲睾酮、甲酸、戊酸雌二醇、2-戊酮、3-戊酮、2,3-戊二酮、2,4-戊二酮、葡萄糖等底物的酶活性。

1.5 野生型与突变型蛋白的温度及 pH 耐受性分析

在标准反应体系中,取等量野生型与突变型蛋白分别与甲醛(10 mmol/L)混匀后在不同温度(10 $^{\circ}\text{C}$, 20 $^{\circ}\text{C}$, 30 $^{\circ}\text{C}$, 35 $^{\circ}\text{C}$, 37 $^{\circ}\text{C}$, 40 $^{\circ}\text{C}$, 50 $^{\circ}\text{C}$)静置 3

min 或在不同 pH(3.0、3.5、4.0、4.5、5.0、5.5、6.0、6.5)的 PBS 缓冲溶液中静置 3 min 测定其相对酶活性,以其最适反应温度或最适 pH 下的相对酶活性为 100%,每个处理重复 3 次。

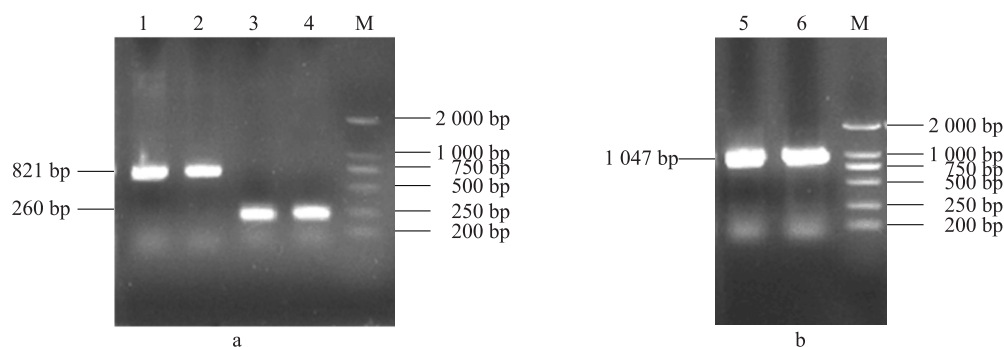
1.6 数据处理及分析

用 SPSS20.0 进行统计学分析,酶比活性和相对酶活性用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用方差分析进行组间比较,当 $P < 0.01$ 时为差异极显著,当 $P < 0.05$ 时为差异显著。

2 结果与分析

2.1 黄鳍鲷酮还原酶基因的定点突变

通过引物对 Fm 和 R1 及引物对 F1 和 Rm PCR 扩增后分别得到了 1 条约 750 bp 的条带和 1 条约 250 bp 的条带,大小与预期相符(图 1a);将上述 PCR 片段回收纯化后等量混合进行重叠 PCR 反应,得到了 1 条特异的分子量约 1 000 bp 的条带(图 1b),证明重叠 PCR 已经成功实现了上下游基因片段的融合。将上述重叠 PCR 片段经过回收、纯化克隆测序后得知,黄鳍 *Eakr* 基因的第 81 号位氨基酸对应的碱基已经由原来的 GCT 突变成了 AAG,其对应氨基酸也已由丙氨酸(A)突变成赖氨酸(K);除此以外,测序结果表明,该突变基因没有产生其他错义突变。



泳道 1~2:扩增的下游片段;3~4:扩增的上游片段;5~6:扩增的重叠片段;M:DNA 分子量标准。

图 1 重叠 PCR 扩增突变基因电泳

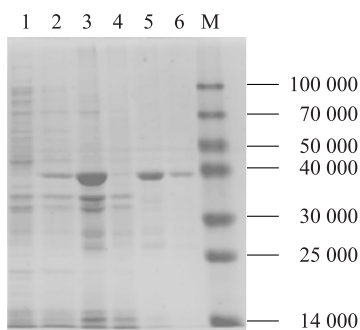
Fig.1 Electrophoresis of the gene mutation products from SOE-PCR amplification

2.2 重组蛋白 Eakr^{A81K} 的纯化

将含有 pET-*Eakr^{A81K}* 的重组菌株经过 0.1 mmol/L IPTG 诱导后,表达了 1 条分子量约 38 000 的蛋白,这表明阳性重组子成功实现了融合表达;*Eakr^{A81K}* 蛋白约占大肠杆菌总蛋白的 40%以上,通过 Ni 离子亲和层析,实现了突变体蛋白 *Eakr^{A81K}* 的纯化(图 2)。

2.3 重组蛋白 Eakr^{A81K} 的底物特异性及酶动力学常数

以 *NADPH* 为辅酶,检测重组蛋白 *Eakr^{A81K}* 对醛、酮类物质的还原活性。结果表明:该重组蛋白对所测醛类物质及中长链酮类物质具有良好的还原活性,但对醇、糖、酸类物质酶活性极低或未检测到(表 1)。其中,对 3-戊酮活性最高,其酶比活力约 0.882 U/mg。在所测底物中,重组蛋白 *Eakr^{A81K}* 与醛类物质



1:空白质粒菌株;2:诱导前的含 pET-28-*Eakr^{A81K}* 菌株;3:诱导后的含 pET-28-*Eakr^{A81K}* 菌株;4:20 mmol 咪唑洗脱后蛋白;5:100 mmol 咪唑洗脱蛋白;6:200 mmol 咪唑洗脱蛋白;M:蛋白质分子量标准。

图2 重组 *Eakr^{A81K}* 蛋白的 SDS-PAGE 电泳

Fig.2 SDS-PAGE electrophoresis of *Eakr^{A81K}* protein

的米氏常数 (K_m) 均低于酮类物质,说明该酶和醛类物质的亲和力更高。甲醛的米氏常数最低 (2.957 mmol/L),说明所测底物中甲醛和 *Eakr^{A81K}* 结合效率最高。同时,随着底物碳原子数目的增加,底物的米氏常数值也随之升高,结合效率降低(表1)。

表1 *Eakr^{A81K}* 底物谱及酶动力学常数

Table 1 Substrate spectrum and constants of *Eakr^{A81K}* enzyme

底物名称	酶比活性 (U/mg)	米氏常数 (mmol/L)	催化常数 (min)	米氏常数与催化常数比值
3-戊酮	0.882±0.142	12.257	59.308	4.839
甲醛	0.533±0.036	2.957	58.258	19.702
2-戊酮	0.519±0.151	9.136	32.576	3.566
甘油醛	0.481±0.054	11.893	32.561	2.738
2,4-戊二酮	0.445±0.114	5.929	26.545	4.477
反式丁烯醛	0.418±0.122	11.613	56.687	4.881
2,3-戊二酮	0.415±0.106	8.507	29.367	3.452
邻苯二甲醛	0.396±0.030	57.759	21.705	0.376
2,3-丁二酮	0.361±0.091	6.621	25.004	3.776
戊二醛	0.340±0.069	5.804	42.733	7.363
黄体酮	0.139±0.016	6.738	9.650	1.432
苯甲醛	0.098±0.032	5.928	9.926	1.674
蒽酮	0.096±0.009	10.084	7.900	0.783
甲睾酮	0.075±0.009	12.123	7.178	0.592
丙酮	0.074±0.011	11.068	5.302	0.479
戊酸雌二醇	-			
甲酸	-			
醋酸甲羟孕酮葡萄糖	-			

“-”表示未检测到活性。

2.4 *A81K* 定点突变对酶活性的影响

表2表明,野生型黄鳝醛酮还原酶 *Eakr* 最适底物为 2,3-丁二酮。*Eakr* 对 2-戊酮的还原活性仅为对 2,3-丁二酮活性的 4.6%,而对 2,4-戊二酮的酶活性仅为对 2,3-丁二酮酶活性的 5.6%。但是,野生型蛋白对含有 3-位酮基团的 3-戊酮和 2,3-戊二酮的酶活性较高,分别为对 2,3-丁二酮酶活性的 73.0%和 84.5%。由此可知,*Eakr* 在底物选择上更倾向于 3-位酮基,当底物结构中存在与 3-位酮基相邻的 2-位酮基时还原活性更好。相比突变前,突变型重组蛋白 *Eakr^{A81K}* 对甲醛、2-戊酮、甘油醛、2,4-戊二酮和戊二醛等底物的活性显著升高(表2)。突变型蛋白 *Eakr^{A81K}* 最适底物为 3-戊酮 ($K_m=12.257$),对 2-戊酮 ($K_m=9.136$) 的还原活性为对 3-戊酮活性的 66.7%。分析其米氏常数,显然突变型蛋白对 2-戊酮的亲和力更高(表1)。

表2 野生型 *Eakr* 和突变型蛋白 *Eakr^{A81K}* 的酶比活力

Table 2 The enzyme activity of *Eakr* and *Eakr^{A81K}*

底物名称	<i>Eakr</i> 野生型酶比活力 (U/mg)	<i>Eakr^{A81K}</i> 酶比活力 (U/mg)	<i>P</i> 值
3-戊酮	0.551±0.185	0.882±0.142	0.014
甲醛	0.169±0.017	0.533±0.036	0
2-戊酮	0.035±0.026	0.519±0.151	0
甘油醛	0.078±0.013	0.481±0.054	0
2,4-戊二酮	0.042±0.015	0.445±0.115	0
2,3-戊二酮	0.638±0.143	0.415±0.106	0.005
邻苯二甲醛	0.268±0.121	0.396±0.031	0.008
2,3-丁二酮	0.755±0.092	0.361±0.091	0.006
戊二醛	0.046±0.014	0.340±0.040	0

$P<0.01$ 时表示差异极显著, $P<0.05$ 时表示差异显著。

2.5 温度和 pH 对 *Eakr* 以及 *Eakr^{A81K}* 蛋白的影响

使用甲醛作为底物,研究了 pH 和温度对 *Eakr* 以及 *Eakr^{A81K}* 蛋白酶活性的影响。结果表明,在 pH 为 4 时野生型蛋白 *Eakr* 活性最高,pH 为 4.5 时其依然保持 70%左右的酶活性,当 pH 继续升高后 *Eakr* 的活性急剧下降。相似地,突变型蛋白 *Eakr^{A81K}* 在 pH 4.5~5.5 时保持 70%以上的酶活性,在此 pH 范围之外,对甲醛的还原活性急剧下降(图3)。由此看出,*A81K* 位点突变稍降低了黄鳝醛酮还原酶的酸度耐受能力。

同样地,温度对野生型 *Eakr* 及突变型蛋白

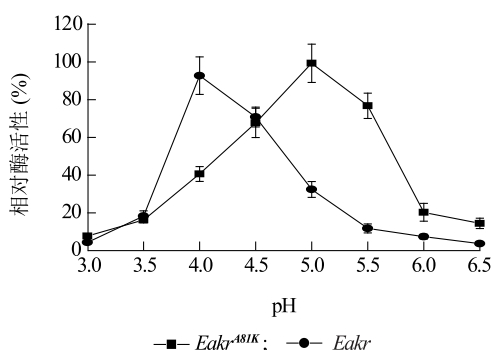


图3 不同pH条件下野生型 *Eakr* 及突变型蛋白 *Eakr*^{A81K} 的相对酶活性

Fig.3 The relative activity of *Eakr* and *Eakr*^{A81K} in different pH condition

Eakr^{A81K} 具有相似的影响。*Eakr* 在 35 °C 活性最高, 在 30~40 °C 可保持 50% 以上的酶活性; *Eakr*^{A81K} 最适反应温度为 37 °C, 在温度 35~40 °C 时保持 80% 以上的酶活性(图4)。从相对酶活性上分析, 突变型蛋白比野生型蛋白的温度耐受性略高。

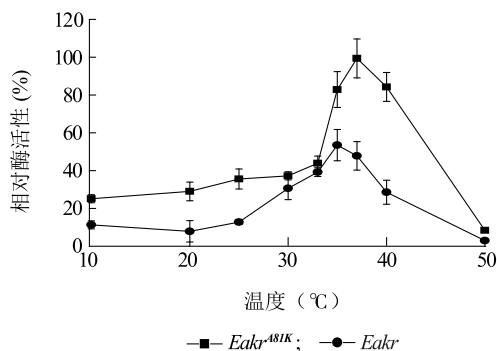


图4 不同温度下野生型 *Eakr* 及突变型蛋白 *Eakr*^{A81K} 的相对酶活性

Fig.4 The relative activity of *Eakr* and *Eakr*^{A81K} under different temperature

3 讨论

本研究通过重叠 PCR 技术将黄鳍醛酮还原酶 *Eakr* 催化四联体中 81 位氨基酸丙氨酸(A)突变为赖氨酸(K)后, 实现了突变蛋白 *Eakr*^{A81K} 的重组表达及纯化。根据已知的醛酮还原酶底物谱, 分析了突变型蛋白底物特异性。结果表明, 突变型蛋白 *Eakr*^{A81K} 对醛类物质以及中长链酮类物质具有较高的还原活性; 野生型醛酮还原酶 *Eakr* 及突变型 *Eakr*^{A81K} 蛋白均没有检测到对醇、糖、酸类物质的还

原活性, 这表明黄鳍醛酮还原酶可能不属于醛糖还原酶或醛醇还原酶家族的成员。突变型蛋白 *Eakr*^{A81K} 与醛类物质亲和力较好, 但随着底物碳原子数目的增加, 酶与底物亲和力下降, 这可能是碳原子数目增加导致底物与酶难以靠近造成的。Wang 等^[17] 对人的醛酮还原酶 *LEK* 底物谱的研究也发现了类似的现象, 随底物的碳原子数量增多, *LEK* 与底物亲和力降低, 还原活性下降。*A81K* 位点突变导致酶对大部分底物的活性显著提升, 这可能是因为赖氨酸(K)是一种具有较长侧链的碱性氨基酸, 它可以通过与底物形成氢键等方式帮助底物与酶分子结合进入活性中心完成还原反应。野生型 *Eakr* 蛋白在还原中长链酮类时选择 3-位酮基作为催化位点, 而 2-位酮基的存在对底物与酶的结合起到促进作用。类似试验结果也在氧化葡萄糖酸杆菌的醛酮还原酶 *AKR5C3* 的研究中报道过^[18]。突变型蛋白 *Eakr*^{A81K} 对含 3-位酮基的化合物表现良好的还原活性, 且对含 2-位酮基的底物还原活性大大增强。但当底物 2,3-位同时存在酮基时, *Eakr*^{A81K} 对其还原活性显著下降。推测, 底物 2-位酮基的存在对 3-位酮基的还原产生了非竞争性抑制是导致该酶对此类二酮类底物酶活性降低的主要原因。以上结果表明黄鳍醛酮还原酶 *Eakr* 第 81 位氨基酸在底物识别上具有重要作用。该研究为深入了解鱼类醛酮还原酶的生物学功能提供了方向和基础资料, 同时为研究 *Eakr* 底物结合位点, 拓宽底物谱以及酶改造提供了重要参考资料。

参考文献:

- [1] MINDNICH R D, PENNING T M. Aldo-keto reductase (AKR) superfamily: genomics and annotation [J]. Hum Genomics, 2009, 3 (4): 362-370.
- [2] 代海艳, 江 翔, 李 伟. 黄鳍醛酮还原酶的羰基解毒作用初探 [J]. 江苏农业科学, 2017, 45 (1): 150-152.
- [3] HYNDMAN D, BAUMAN D R, HEREDIA V V, et al. The aldoketo reductase superfamily homepage [J]. Chem Biol Interact, 2003, 143/144 (2): 621-631.
- [4] PENNING T M. The aldoketo reductases (AKRs): Overview [J]. Chem Biol Interact, 2015, 234: 236-246.
- [5] SCOBLE J, MCALISTER A D, FULTON Z, et al. Crystal structure and comparative functional analyses of a *Mycobacterium* aldoketo reductase [J]. Mol Biol, 2010, 398: 26-39.
- [6] SUN L, CHEN Y, RAJENDRAN C, et al. Crystal structure of perakine reductase, founding member of a novel aldoketo reduc-

- tase (AKR) subfamily that undergoes unique conformational changes during *NADPH* binding [J]. *J Biol Chem*, 2012, 287(14): 11213-11221.
- [7] KAMITORI S, IGUCHI A, OHTAKI A, et al. X-ray structures of *NADPH*-dependent carbonyl reductase from *Sporobolomyces salmonicolor* provide insights into stereoselective reductions of carbonyl compounds [J]. *J Mol Biol*, 2005, 352(3): 551-558.
- [8] LI D, ELLIS E M, FERRARI M. Human aldo-keto reductase *AKR7A2* protects against the cytotoxicity and mutagenicity of reactive aldehydes and lowers intracellular reactive oxygen species in hamster V79-4 cells [J]. *Chem Biol Interact*, 2012, 195(1): 25-34.
- [9] BERANIĆ N, BROŽIĆ P, BRUS B, et al. Expression of human aldo-keto reductase 1C2 in cell lines of peritoneal endometriosis; potential implications in metabolism of progesterone and dydrogesterone and inhibition by progestins [J]. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2012, 130(1/2): 16-25.
- [10] HEVIR N, VOUK K, SINKOVEC J, et al. Aldo-keto reductases *AKR1C1*, *AKR1C2* and *AKR1C3* may enhance progesterone metabolism in ovarian endometriosis [J]. *Chem Biol Interact*, 2011, 191(1): 217-226.
- [11] SINGH R, KISHORE L, KAUR N. Diabetic peripheral neuropathy: current perspective and future directions [J]. *Pharmacol Res*, 2014, 80: 21-35.
- [12] 李宏哲, 李才锐, 孙曙光. 醛糖还原酶在糖尿病视网膜病变中作用的研究进展 [J]. *国际眼科杂志*, 2015, 15(7): 1176-1178.
- [13] 代海艳, 江 翱, 李 伟. 黄鳝醛酮还原酶的羰基解毒作用初探 [J]. *江苏农业科学*, 2017, 45(1): 150-152.
- [14] OSORIO-YÁÑEZ C, LUIS GARCÍA-TAVERA J, TERESA PÉREZ-NÚÑEZ M, et al. Benzo (α) pyrene induces hepatic *AKR1A1* mRNA expression in tilapia fish (*Oreochromis niloticus*) [J]. *Toxicology Mechanisms and Methods*, 2012, 22(6): 438-444.
- [15] CHEN M, LIN J P, MA Y S, et al. Characterization of a novel *NADPH*-dependent oxidoreductase from *Gluconobacter oxydans* [J]. *Mol Biotechnol*, 2010, 46: 176-181.
- [16] HONG S, NAM H K, KIM K R, et al. Molecular characterization of an aldo-keto reductase from *Marivirga tractuosa* that converts retinal to retinol [J]. *J Biotechnol*, 2014, 169: 23-33.
- [17] WANG Q, YE T, MA Z, et al. Characterization and sitedirected mutation of a novel aldo-keto reductase from *Lodderomyces elongisporus* NRRL YB4239 with high production rate of ethyl (R) 4chloro3hydroxybutanoate [J]. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 2014, 41(11): 1609-1616.
- [18] 刘 旭. 基于结构解析的醛酮还原酶 *AKR5C3* 的底物选择性研究 [D]. 上海: 华东理工大学, 2011.

(责任编辑: 陈海霞)