

海洋链霉菌 KR 结构域基因的克隆与分析

薛永常, 刘永亮, 许佳, 刘长斌*

(大连工业大学生物工程学院, 辽宁大连 116034)

摘要: 酮还原酶 (Ketoreductase, KR) 是聚酮合酶 (Polyketide Synthase, PKS) 重要的组分, 可催化 β -酮基的还原, 是手性药物合成的重要手段, 并在聚酮化合物合成中起着关键性作用。该研究从海洋链霉菌 *Streptomyces* sp. X-66 基因组 DNA 扩增出一条 1 331 bp 的 KR 结构域基因, 并进行生物信息学分析。Blast 结果显示该序列包括了 FAS KR 和 PKS KR 两部分, 核心功能区域集中于 PKS KR 基因部分序列; 最大 ORF 区域拟编码 333 个氨基酸, 理论等电点为 4.80, 分子式为 $C_{1500}H_{2419}N_{433}O_{463}S_6$, 不稳定指数为 24.85, 为酸性稳定蛋白, 并有较低亲水性, 不含信号肽和跨膜结构, 二级结构以 α -螺旋和无规卷曲为主, SDS-PAGE 显示其相对分子质量约为 70 ku。通过氨基酸多序列比对, 表明蛋白 KR3 属于 B1 型 KR; 以蛋白 KR3 氨基酸序列预测并检验其三级结构模型, 利用分子对接和可视化分析预测蛋白 KR3 与配体结合的关键残基为 ^{204}Thr 、 ^{206}Thr 和 ^{207}Leu , 依据相关研究分析蛋白 KR3 引导底物进入活性中心的结合模式与 B 型 KR 较为符合, 为进一步研究 KR3 的功能及新型手性药物和聚酮化合物的合成提供科学依据。

关键词: 链霉菌; KR 结构域; 基因克隆; 分子对接; 生物信息学

文章编号: 1673-9078(2023)10-97-103

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2023.10.1348

Cloning and Bioinformatics Analysis of a KR Domain Gene of Marine *Streptomyces*

XUE Yongchang, LIU Yongliang, XU Jia, LIU Changbin*

(School of Biological Engineering, Dalian Polytechnic University, Dalian 116034, China)

Abstract: Ketoreductase (KR) is an important component of polyketide synthase (PKS) that can catalyze the reduction of β -keto groups and is employed in synthesizing chiral drugs. In addition, it plays a key role in the synthesis of polyketide compounds. A 1,331 bp KR domain gene was amplified from *Streptomyces* sp. X-66 genomic DNA and subjected to bioinformatics analysis herein. BLAST alignment results showed that the sequence consisted of FAS KR and PKS KR, and its core functional region was concentrated in a region of the PKS KR gene sequence. The maximum ORF region was estimated to encode 333 amino acids, with a theoretical isoelectric point of 4.80, and a molecular formula of $C_{1500}H_{2419}N_{433}O_{463}S_6$. The instability index was 24.85. It is speculated that the coding product is an acidic stable protein with low hydrophilicity, without signal peptides or transmembrane structures. The secondary structure was primarily comprised of α -helices and random coils. SDS-PAGE results suggested that its relative molecular weight was ~70 ku. Amino acid multiple sequence alignment revealed that the KR3 protein belongs to the B1-type KR. Subsequently, the amino acid sequence of KR3 was used to predict and test its tertiary structure model. According to molecular docking and visualization analysis, the key residues involved in the binding of KR3 protein to its ligand were predicted to be ^{204}Thr , ^{206}Thr , and ^{207}Leu . According to relevant studies, the binding mode in which KR3 protein guides the substrates into the active center is consistent with B-type KR. These findings provide a scientific basis for further investigation into the functions of KR3 and the synthesis of new chiral drugs and polyketides.

引文格式:

薛永常,刘永亮,许佳,等.海洋链霉菌 KR 结构域基因的克隆与分析[J].现代食品科技,2023,39(10):97-103

XUE Yongchang, LIU Yongliang, XU Jia, et al. Cloning and bioinformatics analysis of a KR domain gene of marine *Streptomyces* [J]. Modern Food Science and Technology, 2023, 39(10): 97-103

收稿日期: 2022-10-24

基金项目: 辽宁省教育厅高校基本科研课题 (LJKMZ20220899); 辽宁省自然科学基金项目 (20180550858)

作者简介: 薛永常 (1966-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 植物及微生物分子生物学, E-mail: xueych@dlpu.edu.cn; 共同第一作者: 刘永亮 (1998-), 男, 硕士研究生, 研究方向: 微生物分子生物学, E-mail: 920770270@qq.com

通讯作者: 刘长斌 (1982-), 男, 博士, 工程师, 研究方向: 微藻分子生物学, E-mail: liucb@dlpu.edu.cn

Key words: *Streptomyces*; KR domain; gene cloning; molecular docking; bioinformatics

海洋生物总量占地球生物圈的 87%，其独特的生态条件赋予了海洋微生物种类、遗传和生态功能的多样性，从而生产出众多的结构多样的次生代谢物，如脂肪酸(Fatty Acids, FAs)和聚酮类化合物(Polyketides, PKs)等^[1]。而 PKs 是一类由聚酮合酶(Polyketide Synthase, PKS)催化产生的大型次生天然化合物家族，通过酰基辅酶 A 活化的底物之间的重复脱羧缩合而合成，具有抗肿瘤、抗病毒、抗感染和免疫控制等多种药理活性^[2,3]，PKS 是由酮合成酶(Ketosynthase, KS)、酰基载体蛋白(Acyl Carrier Protein, ACP)和酰基转移酶(Acyltransferase, AT)以及其他修饰结构域组成^[4]，其中酮还原酶(Ketoreductase, KR)负责特异性还原聚酮链上的酮基，产生具有特定构型的羟基，是合成 PKs 的重要修饰结构域。

在 PKs 合成过程中，KR 依赖 NADPH 供氢和质子的传递参与底物 β -酮基的还原^[5]，能够立体特异性地还原中间体的 β -酮基为 β -羟基，生成手性醇，是参与手性药物合成的重要生物元件；同时还可以控制相邻 α -取代基的立体结构^[6]，在医药领域有着重要的应用价值。根据产物中 α -取代基和 β -羟基的构型不同，KR 可分为 A1、A2、B1、B2 和 C1、C2 六种类型，其中只有 A 型、B 型 KR 具有还原能力，分别产生 L- β -OH 和 D- β -OH^[7]，并且多种类型的 KR 可以对同一个聚酮底物的不同位点进行修饰，通过替换模块中的 KR 结构域以改变 β -羟基以及 α -甲基的构型，为定向合成新型活性物质提供了理论依据^[8]。Erin 等^[9]通过残基的靶向突变改变 KR 结构域的特异性，减少了结构域的替换对蛋白质结构的整体破坏。Xie 等^[10]发现 PKS KR 结构域的异构酶和还原酶共用同一对催化残基，这些残基也可能充当 KR 与其他结构域相互作用的媒介^[11]。而徐徐等^[12]通过共价交联成功捕获 KR 与 ACP 的瞬时复合物。目前 KR 结构域的改造已应用于药物研究^[13]，且可作为独立酶通过分解外消旋物生成至少有两个手性中心的手性化合物，这种生物催化不对称还原也是生产手性醇最经济有效的途径之一^[14]。本研究则通过从实验室保存的有抑菌作用的海洋链霉菌基因组 DNA 中扩增 KR 结构域基因，并进行生物信息学分析，为后续深入研究其结构与功能以及对抑菌活性物质产生的影响提供参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 菌株与质粒

实验所用菌株 *Streptomyces* sp. X-66 由实验室分离鉴定并保藏。大肠杆菌 DH5 α 、大肠杆菌 Rosetta-gami (DE3) pLysS, pET-32a(+)质粒均为实验室保存。

1.1.2 试剂与仪器

细菌基因组 DNA 提取试剂盒、柱式 DNA 胶回收试剂盒购自上海生工生物工程有限公司；FastPure 质粒提取试剂盒、180 ku Prestained Protein Marker、Phanta Max Super-Fidelity DNA Polymerase，购自南京诺唯赞生物科技有限公司；EasyTaq DNA Polymerase，购自北京全式金生物技术股份有限公司；DNA Marker IV、DNA Marker D2000，购自北京天根生化科技有限公司；QuickCutTMEcoR I (15 U/ μ L)、QuickCutTMHind III (15 U/ μ L)、pMDTM19-T 载体，购自宝生物工程(大连)有限公司；PCR Thermal Cycler Dice TP610，购自日本 TaKaRa 公司。

1.2 试验方法

1.2.1 引物设计

根据 GenBank 数据库中 *Streptomyces albidoflavus* strain W68 (登录号: CP064783.1) PKS 中 KR 结构域基因序列，利用 Primer Premier 5.0 软件设计引物。上游引物 KR3-F 为 5'-TGCTCAAGCCCGGAACC-3'，下游引物 KR3-R 为 5'-GACCAGGCCCGCATG-3'。

1.2.2 KR 结构域基因的克隆及蛋白表达

以 *Streptomyces* sp. X-66 基因组 DNA 为模板，KR3-F、KR3-R 为引物进行扩增，PCR 产物经纯化后 3'端加 A，纯化产物与 pMDTM19-T 载体连接，转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞，阳性转化子经验证后进行测序鉴定。

利用 EcoR I 和 Hind III 双酶切阳性重组质粒和 pET-32a(+), 将目的基因片段和酶切后的 pET-32a(+) 大片段回收后连接，转化大肠杆菌 Rosetta-gami(DE3) pLysS 感受态细胞。挑选含有重组子 pET-32a(+)-kr3 的单菌落于 LB 培养基中，培养至 OD₆₀₀ 为 0.6，加入终浓度为 0.3 mmol/L 的 IPTG，16 °C 诱导 14 h 后进行 SDS-PAGE 分析。

1.2.3 KR 结构域基因生物信息学分析

利用 NCBI 网站的 Nucleotide Blast 对测序结果进行比对；通过 ORF Finder 获得其拟编码的氨基酸序列；使用 ExPASyProtParam 和 ProtScale 对拟编码的氨基酸序列的理化性质及亲/疏水性分析；Cell-PLoc 2.0

预测蛋白质在生物体中的亚细胞定位,采用 TMHMM 2.0 Server、SignalP 6.0 Server 在线工具对蛋白的跨膜结构域、信号肽进行预测;采用 SOPMA 预测其二级结构,利用 AlphaFold 构建三级结构模型,并使用 Autodock 1.5.6 与配体进行分子对接,模拟配体与拟表达蛋白结合的位点。Protein Blast 搜索 KR 结构域的同源蛋白,利用 DNAMAN 软件与蛋白质数据库中不同类型的 KR 蛋白进行氨基酸序列比对分析;使用 MEGA X 软件构建 KR 结构域蛋白系统发育进化树。

2 结果与讨论

2.1 KR 结构域基因序列分析

以 *Streptomyces* sp. X-66 基因组 DNA 为模板, KR3-F、KR3-R 为引物扩增目的基因。当退火温度为 56 °C 时能够扩增出一条约 1 500 bp 的清晰条带(图 1),与预扩增目的片段大小相符,将该序列命名为 *kr3*。

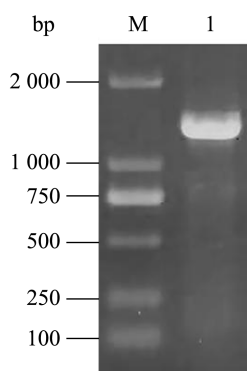


图 1 目的基因扩增电泳图

Fig.1 Agarose gel electrophoresis of the amplified gene fragment

目的片段回收后 3'端加 A,与 pMDTM19-T 载体连接,转化至大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞中,阳性转

化子电泳显示,在 2 000 bp 和 3 500 bp 之间有一明亮条带,与重组质粒的大小基本一致(图 2)。

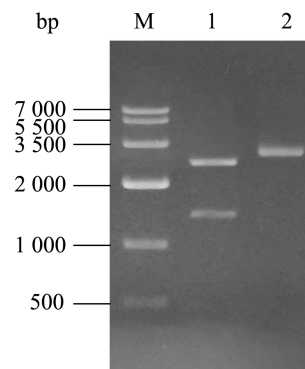


图 2 重组质粒电泳图

Fig.2 Agarose gel electrophoresis of recombinant plasmid

*Eco*R I 和 *Hind* III 双酶切结果显示在 1 000~2 000 bp、2 000~3 500 bp 间各有一明亮条带,与目的基因片段和 pMDTM19-T 载体长度相符,初步证明重组质粒 pMDTM19-T-*kr3* 构建成功,并将其送至上海生物工程股份有限公司测序鉴定。

测序结果得知 *kr3* 全长 1 331 bp,拟表达蛋白 KR3 由 443 个氨基酸组成,Blast 比对(图 3)显示其与 *Streptomyces albidoflavus* strain W68 中的 KR 结构域基因序列相似度达 99%,属于脂肪酸合酶亚组 3 的 KR,并包含有相同功能区域的 I 型 PKS KR。氨基酸结构域分析显示该序列具有两个子域:N-末端子域具有截断的结构为“ β - α - β - α - β ”模式的 Rossmann 折叠结构域^[5],其功能是用于稳定催化子域;C-末端子域负责催化 PKs 的 β -羰基 NADPH 依赖性还原为羟基。证明我们所克隆的基因序列为 PKS 中的 KR 基因,负责参与酮底物的还原。将该 *kr3* 序列登录 GenBank,登录号为 OP377077。

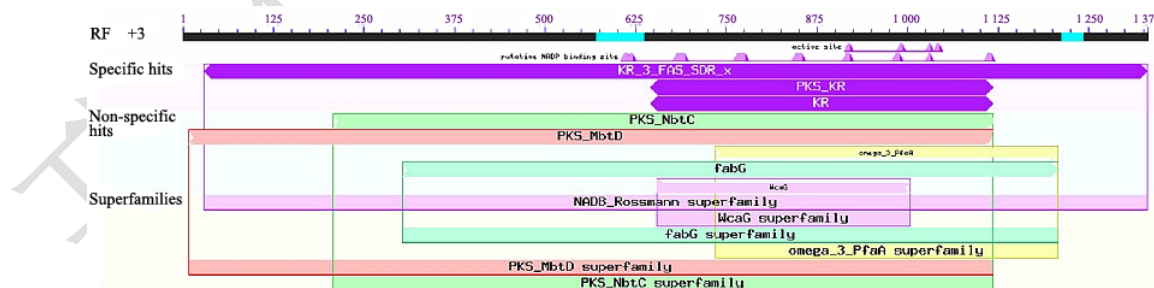


图 3 氨基酸结构域分析

Fig.3 Amino acid domain analysis

2.2 KR 结构域基因生物信息学分析

2.2.1 理化性质分析

利用 ORF Finder 发现该序列最大 ORF 区域可表达 333 个氨基酸,编码 PKS KR 区域。通过 ProtParam 对氨基酸序列分析,*KR* 基因拟表达蛋白理论等电点

为 4.80,分子式为 C₁₅₀₀H₂₄₁₉N₄₃₃O₄₆₃S₆,不稳定指数为 24.85 小于 40,为酸性稳定蛋白。

2.2.2 亲/疏水性分析及亚细胞定位

利用 ProtScale 在线软件预测该 PKS KR 蛋白的亲/疏水性,分析其多肽链第 73 和 74 位有最小值-2.422,为亲水性氨基酸;而第 156 位有最大值 2.278,为疏水

性(图4)。整条多肽链表现为亲水性,表明该KR蛋白为可溶性蛋白。

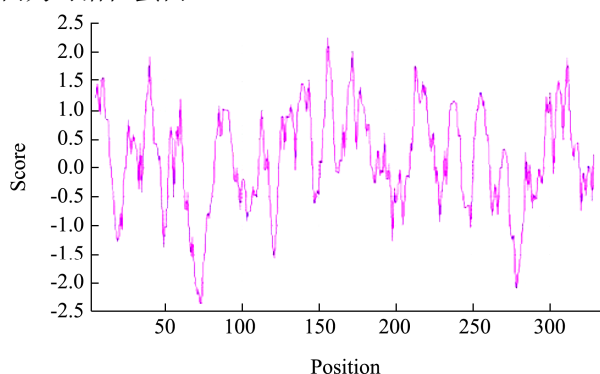


图4 亲/疏水性预测

Fig.4 Prediction of hydrophobicity/hydrophilicity

通过 Cell-PLoc 2.0 预测蛋白在放线菌中的亚细胞定位,发现该蛋白主要存在于细胞质中,不属于分泌蛋白。

2.2.3 跨膜结构及信号肽分析

蛋白的跨膜区域一般由强疏水性氨基酸组成,表现为疏水性。而2.2.2已证明该PKS KR蛋白为亲水性,故该蛋白不存在跨膜区。利用 TMHMM 和 Signal P 预测该蛋白的跨膜区和信号肽,发现并没有发现跨膜信号波动和信号肽,这与之前预测的结果一致,故判断该蛋白为非跨膜类蛋白质。

2.2.4 二级结构及域界面分析

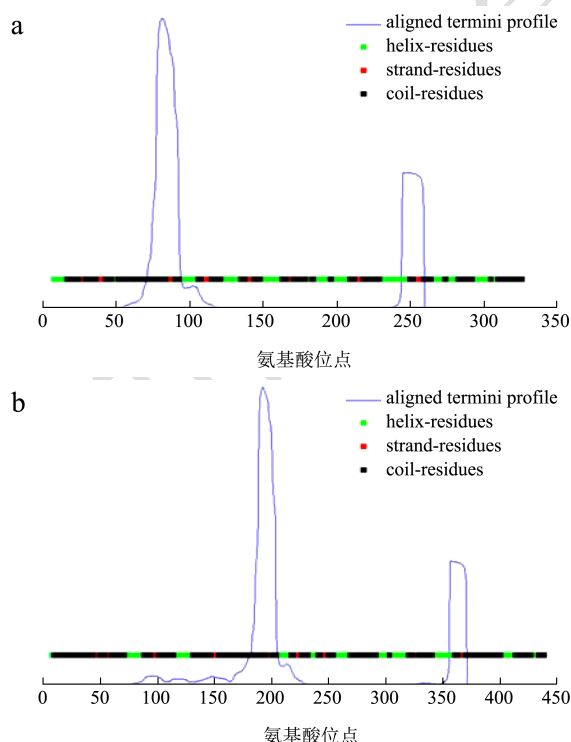


图5 PKS KR、FAS KR 域界面分析

Fig.5 Interface analysis of PKS KR and FAS KR domains

注: a: PKS KR 域界面分析; b: FAS KR 域界面分析。

利用 SOPMA 预测蛋白 KR3 的二级结构,发现主要以 α 螺旋为主,其核心区域都集中在 PKS KR 中。有研究表明 B 型 PKS KR 往往和 FAS KR 同时存在^[4],为了更好的分析蛋白质三级结构,利用 PSIPRED 软件分别对 PKS KR 和 FAS KR 的二级结构进行域界面分析(图5),横坐标代表氨基酸位点,在域界面处曲线会出现大幅度变化。

PKS KR 和 FAS KR 都存在两个域界面:编码 PKS KR 蛋白的多肽链上为第 81 位缬氨酸和第 245 位谷酰胺,编码 FAS KR 蛋白的多肽链上为第 192 位缬氨酸和第 357 位组氨酸。PKS KR 和 FAS KR 除了二级结构组成之外没有太大的差别,两个域界面更是将整条链分为三个域,这使得 NAD(P) 结合区域和活性中心共处于一个域内,共同参与 KR 对底物的还原,这为三级结构模型的预测以及分子对接结果分析提供重要依据。

2.2.5 三级结构分析

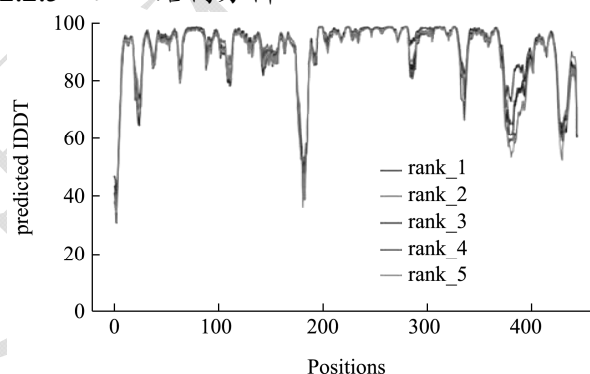


图6 KR3 的 IDDT 分析

Fig.6 IDDT Analysis of KR3

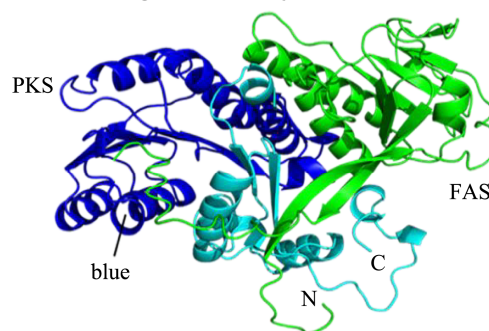


图7 KR3 蛋白三级结构图

Fig.7 Tertiary structure of KR3 protein

基于 AlphaFold2 的 AI 算法对蛋白 KR3 进行三维建模,共模拟出 5 个蛋白模型,通过局部距离差检验^[15](Local Distance Difference Test, IDDT)指标评估每个氨基酸位置的原子局部距离偏差(图6)。发现在全序列的第 200 位和第 400 位氨基酸左右出现较高偏差,通过分析发现这两处区域与 FAS KR 域界面分析得到的结果相符,在空间位置上与 PKS KR 的域界

面一致。可能是由于在域界面处原子不稳定导致预测的评分较差,但域界面不处于功能区域内,故不影响后续对蛋白 KR3 功能性质的研究。

利用 VERIFY3D 对第一个模型质量进行可视化分析,判断模型与氨基酸序列之间的兼容性。发现有 98.65% 的氨基酸残基平均得分大于 0.2,说明该模型属于高质量模型结构,可以用于后续分子对接模拟以及功能区域分析。依据域界面分析的结果,使用 Pymol 处理得到 KR3 的三级结构(图 7),蓝色表示为 FAS KR 和 PKS KR 共有的功能区域,包含底物和 NADP⁺ 结合区域,在 N 末端子域还可以观察到“ β - α - β - α ”基序组成的 Rossmann 折叠结构域,这与氨基酸结构域分析得到的结果一致。

2.2.6 氨基酸序列比对

使用 DNAMAN 将蛋白 KR3 与蛋白质数据库中部分已知的 A 型 KR (PBD ID: 4DIF、4L4X、3MJS、

4HXY、Q9ZGI3.1) 和 B 型 KR (PBD ID: Q9ZGI5.1、2Z5L、2FR1) 序列进行多重序列比对(图 8)。蛋白 KR3(图中 KR)包含有 NAD(P)结合基序 GGxGxxG、活性位点基序 YxxxN 以及上游的丝氨酸残基,这些都是 KR 重要的催化残基。

结合不同类型 KR 的关键残基^[16,17],发现蛋白 KR3 拥有 B 型 KR 特有的 LDD 基序,在 YxxxN 上游有 B1 型 KR 常见的谷氨酰胺残基,没有 A 型 KR 特有的色氨酸残基,因此判断蛋白 KR3 属于 B1 型 KR,能够催化产生“R”立体化学的 β -羟基,但对 α -甲基没有差向异构化作用。此外,在靠近 C 末端区域有一“盖螺旋”^[18],由一个 α 螺旋和无规则卷曲组成的盖状结构,是所有类型 KR 共有的特征,对底物结合有着至关重要的作用,所以这部分区域序列较不保守,需要通过计算机模拟来预测参与底物结合的辅助作用机制。

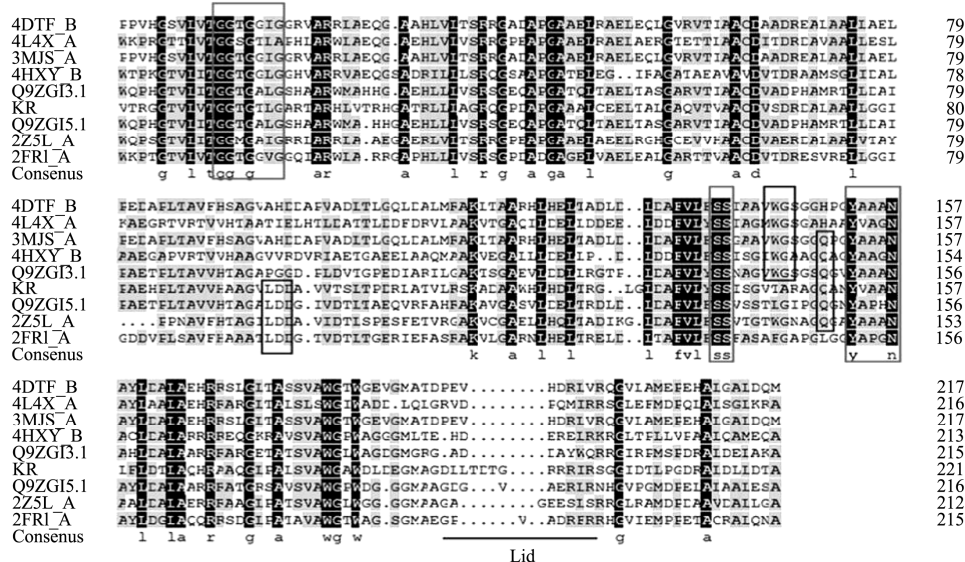


图 8 氨基酸多序列比对

Fig.8 Alignment of the predicted KR amino acid sequences

2.2.7 系统进化树分析

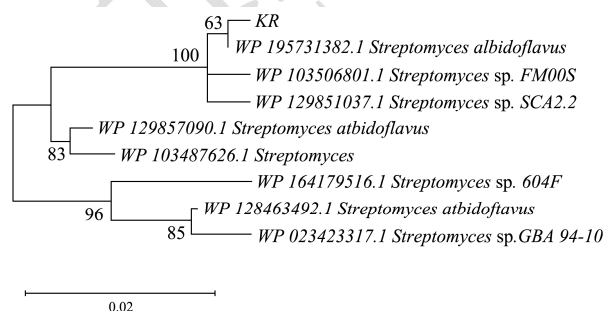


图 9 KR3 蛋白进化树分析

Fig.9 Phylogenetic tree of KR3 protein

从 GenPept 数据库中选取了 8 个序列相似性较高的氨基酸序列,利用 MEGA X 构建 KR3 结构域蛋白

的系统发育进化树(图 9)。该拟表达蛋白 KR3(图中 KR)与 *Streptomyces albidoflavus* (WP_195731382.1) 的 KR 蛋白属同一进化分支,二者亲缘关系最近。

2.2.8 分子对接模拟

由于 NAD(P) 结合基序区域的催化残基相对保守,故 NADPH 都以相同的方向与不同类型的蛋白 KR 结合^[17]。利用 Autodock 选择拉马克遗传算法作为对接算法,将构建好的蛋白模型与配体 NADP⁺ 进行分子对接,能更好的预测蛋白与底物发生作用的区域,较为直观的分析与底物结合的方式(图 10)。从图中可以看到, NADPH 上两个磷酸基团的酯基与 ²⁰⁴Thr 的 O 原子形成氢键、氨基上的 H 原子与 ²⁰⁶Thr 的 O 原子形成氢键、配体上和吡啶环相邻的羰基与 ²⁰⁷Leu 的 H

原子形成氢键, ^{236}Gly 、 ^{285}Gly 、 ^{283}Ala 同样对 NADP^+ 有辅助结合的氢键相互作用。这些残基的相互作用, 使得氢化物从 NADPH 转移到酮底物后, 仍然维持配体的相对稳定, 这为酪氨酸提供质子后进行的质子传递起到了重要作用^[5]。

尽管目前还不清楚底物与酮还原酶相互作用的机制, 但本文 KR3 的分子对接模拟 (图 11) 与 Li 等^[19] 通过计算机模拟提出的一种假设相一致: 在活性位点区域的上方, 盖螺旋与 LDD 基序形成一个封闭的环, 阻碍了底物从中间进入活性中心, LDD 基序引导底物从结合口袋的右侧 (东南方向) 进入; A 型 KR 特有的 W 基序能够引导底物从结合口袋的左侧 (西北方向) 进入活性中心, 由此产生不同的构象。这一结果也表明本文预测的三级结构模型与 B 型 KR 蛋白较为符合, 为进一步研究蛋白 KR3 与底物相互作用的机制提供科学依据。

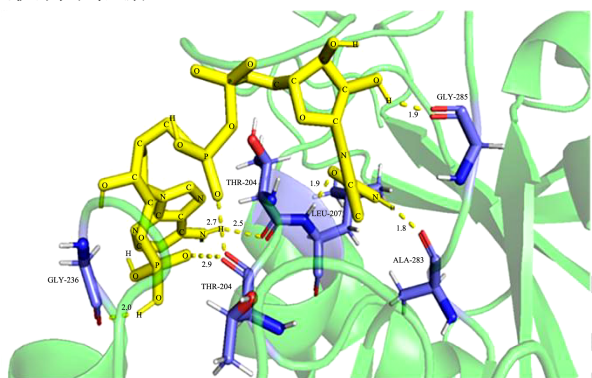


图 10 NADP^+ 与蛋白 KR3 结合图

Fig.10 Diagram of NADP^+ binding to KR3 protein

注: NADP^+ 的棒状形式用黄色表示; 与配体相互作用的残基用蓝色表示。

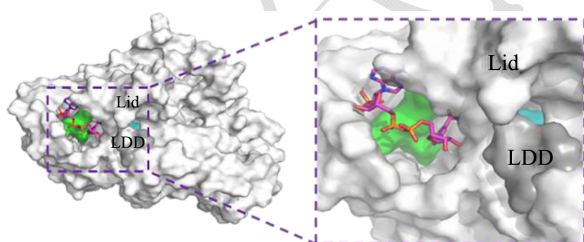


图 11 蛋白 KR3 表面图

Fig.11 Surface view of KR3 protein

注: 绿色表示为 NAD(P) 结合基序; 灰色表示为 LDD 基序; 青蓝色表示为活性位点区域; NADP^+ 以棒状形式显示。

2.3 KR 结构域基因的异源表达

挑取含有 pET-32a(+)-kr3 的阳性单克隆菌于 LB 培养基培养至 OD_{600} 为 0.6, 加入终浓度为 0.3 mmol/L 的 IPTG, 16 °C 诱导蛋白表达; 经沸水浴处理后的全菌蛋白样品用 SDS-PAGE 进行检测 (图 12)。结果显

示在 70 ku 左右出现明显表达条带, 这与 SnapGene 6.0.2 预测的理论大小 69.2 ku 相近, 说明蛋白 KR3 成功表达。

使用超声细胞破碎仪对菌液进行样品处理, 分别留取上清液和沉淀进行 SDS-PAGE 分析, 发现上清液中目的蛋白的含量较少, 大多数融合蛋白以包涵体形式存在于沉淀中, 与以往的研究结果一样^[20], 蛋白 KR 在异源表达过程中极易产生包涵体, 往往需要经过变性、复性处理来纯化蛋白。

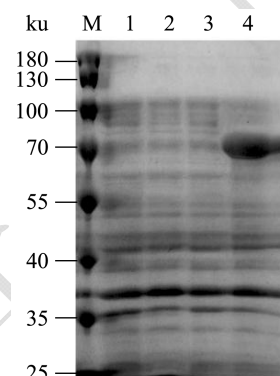


图 12 KR3 蛋白 SDS-PAGE 分析

Fig.12 SDS-PAGE analysis of KR3 protein

注: M 为蛋白 Marker; 1 为未经 IPTG 诱导的 pET-32a(+) 质粒; 2 为经 IPTG 诱导的 pET-32a(+) 质粒; 3 为未经 IPTG 诱导的重组质粒 pET-32a(+)-kr3 ; 4 为经 IPTG 诱导的重组质粒 pET-32a(+)-kr3 。

3 结论

本研究从海洋链霉菌 *Streptomyces* sp. X-66 的基因组中扩增得到 1 331 bp 的 FAS KR 结构域基因序列, 其中包含有共同功能区域的 PKS KR。编码 PKS KR 的区域可翻译 333 个氨基酸。PKS KR 的理化性质、信号肽、亲/疏水性以及跨膜结构和二级结构的分析表明, 该拟翻译 PKS KR 蛋白为酸性稳定非分泌型蛋白, 无信号肽和跨膜结构域, 具有酮还原酶特有的 NAD(P) 结合基序 GGxGxxG 和活性位点基序 YxxxN 。在 IPTG 诱导下, 目的基因可表达出分子量为 70 ku 左右的融合蛋白, 但大部分融合蛋白以包涵体形式存在。

通过与数据库中不同类型 KR 的氨基酸序列比对, 判断蛋白 KR3 为 B1 型 KR, 其中 FAS KR 与 PKS KR 有着相同的催化机制, 能够催化产生 D 构型的 β -羟基, 但对 α -甲基没有差向异构化作用; 通过 KR3 氨基酸序列预测三级结构模型, 利用分子对接将蛋白模型与配体 NADP^+ 结合并进行了可视化分析, 对接结果与 NADPH 供氢机制以及假设的 B 型 KR 蛋白结合模式较为符合, 为更好地分析蛋白 KR3 与底物的作用机制, 深入开展 KR 结构域蛋白功能研究以及新型手

性醇药物的开发提供参考。

参考文献

- [1] Moghaddam J A, Jautzus T, Alanjary M, et al. Recent highlights of biosynthetic studies on marine natural products [J]. *Organic & Biomolecular Chemistry*, 2021, 19(1): 123-140.
- [2] Long J X, Shu S Y, Wu Q Y, et al. Selective cyclohexanol production from the renewable lignin derived phenolic chemicals catalyzed by Ni/MgO [J]. *Energy Conversion and Management*, 2015, 105(15): 570-577.
- [3] Nivina A, Yuet K P, Hsu J, et al. Evolution and diversity of assembly-line polyketide synthases [J]. *Chemical Reviews*, 2019, 119(24): 12524-12547.
- [4] Herbst D A, Townsend C A, Maier T. The architectures of iterative type I PKS and FAS [J]. *Natural Product Reports*, 2018, 35(10): 1046-1069.
- [5] Korman T P, Hill J A, Vu T N, et al. Structural analysis of actinorhodin polyketide ketoreductase: Cofactor binding and substrate specificity [J]. *Biochemistry*, 2004, 43(46): 14529-14538.
- [6] Yin Z, Dickschat J S. Cis double bond formation in polyketide biosynthesis [J]. *Natural Product Reports*, 2021, 38(8): 1445-1468.
- [7] Drufva E E, Spengler N R, Hix E G, et al. Site directed mutagenesis of modular polyketide synthase ketoreductase domains for altered stereochemical control [J]. *Chemistry and Biochemistry*, 2021, 22(7): 1122-1150.
- [8] AnnaVal T, Paris C, Leadlay P F, et al. Evaluating ketoreductase exchanges as a means of rationally altering polyketide stereochemistry [J]. *Chemistry and Biochemistry*, 2015, 16(9): 1357-1364.
- [9] Drufva E E, Hix E G, Bailey C B. Site directed mutagenesis as a precision tool to enable synthetic biology with engineered modular polyketide synthases [J]. *Synthetic and Systems Biotechnology*, 2020, 5(2): 62-80.
- [10] Xie X, Garg A, Keatinge-Clay A T, et al. Epimerase and reductase activities of polyketide synthase ketoreductase domains utilize the same conserved tyrosine and serine residues [J]. *Biochemistry*, 2016, 55(8): 1179-1186.
- [11] Zheng J T, Piasecki S K, Keatinge-Clay A T. Structural studies of an A2-type modular polyketide synthase ketoreductase reveal features controlling α -substituent stereochemistry [J]. *ACS Chemical Biology*, 2013, 8(9): 1964-1971.
- [12] 徐徐, 郑舰艇. 共价交联捕获聚酮合成中的酮基还原酶和酰基载体蛋白结构域的瞬时复合物 [J]. *微生物学通报*, 2020, 47(7): 2082-2093.
- [13] Li Z, Yang H, Liu J, et al. Application of ketoreductase in asymmetric synthesis of pharmaceuticals and bioactive molecules: An update (2018-2020) [J]. *Chemical Record*, 2021, 21(7): 1611-1630.
- [14] Huang C, Liu J, Fang J, et al. Ketoreductase catalyzed (dynamic) kinetic resolution for biomanufacturing of chiral chemicals [J]. *Frontiers in Bioengineering Biotechnology*. 2022, 10: 929784.
- [15] Mariani V, Biasini M, Barbato A, et al. IDDT: a local superposition-free score for comparing protein structures and models using distance difference tests [J]. *Bioinformatics*, 2013, 29(21): 2722-2728.
- [16] Pait I G U, Kitani S, Roslan F W, et al. Discovery of a new diol-containing polyketide by heterologous expression of a silent biosynthetic gene cluster from *Streptomyces lavendulae* FRI-5 [J]. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 2018, 45(2): 77-87.
- [17] Zheng J, Taylor C A, Piasecki S K, et al. Structural and functional analysis of A-type ketoreductases from the amphotericin modular polyketide synthase [J]. *Structure*, 2010, 18(8): 913-922.
- [18] Keatinge-Clay A T. A tylosin ketoreductase reveals how chirality is determined in polyketides [J]. *Chemistry & Biology*, 2007, 14(8): 898-908.
- [19] Li Y, Fiers W D, Bernard S M, et al. Polyketide intermediate mimics as probes for revealing cryptic stereochemistry of ketoreductase domains [J]. *ACS Chemical Biology*, 2014, 9(12): 2914-2922.
- [20] Kaliaperumal T, Kumar S, Gummadi S N, et al. Asymmetric synthesis of (S)-ethyl-4-chloro-3-hydroxybutanoate using *Candida parapsilosis* ATCC 7330 [J]. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 2010, 37(2): 159-165.