

DOI:10.13364/j.issn.1672-6510.20230116

数字出版日期: 2024-01-23; 数字出版网址: <http://link.cnki.net/urlid/12.1355.N.20240122.1733.002>

甲醛对甲醛裂合酶结构的修饰作用研究

韩庚^{1,2,3}, 张翠英¹, 朱蕾蕾³

(1. 天津科技大学生物工程学院, 天津 300457; 2. 合成生物学海河实验室, 天津 300308;
3. 中国科学院天津工业生物技术研究所, 低碳合成工程生物学重点实验室, 天津 300308)

摘要: 为了探究甲醛对甲醛裂合酶的影响及导致该酶失活的原因, 将甲醛裂合酶与不同浓度甲醛溶液 (300 mmol/L 和 1 mol/L) 孵育不同时间 (1 h、2 h 和 3 h) 后检测该酶的活性, 再将孵育后的甲醛裂合酶进行液相色谱-串联质谱 (LC-MS/MS) 检测, 分析甲醛对该酶的修饰/交联位点。结果表明: 在甲醛溶液中孵育后的甲醛裂合酶存在明显的交联和结构修饰现象, 且甲醛浓度越高孵育时间越长, 酶的交联程度越高; 使用 LC-MS/MS 分析确定了甲醛裂合酶 N186、K228 两个甲醛修饰位点以及潜在的甲醛交联片段。甲醛分子通过与天冬酰胺、赖氨酸等氨基酸发生交联反应, 破坏其局部结构并改变整体的聚集状态, 从而使其失活。本研究为提高甲醛裂合酶的甲醛耐受性提供了潜在半理性设计的改造位点和思路。

关键词: 甲醛; 甲醛裂合酶; 甲醛耐受性; 液相色谱-串联质谱

中图分类号: Q814

文献标志码: A

文章编号: 1672-6510(2024)03-0009-06

Investigation of the Effect of Formaldehyde on the Structure of Formolase

HAN Geng^{1,2,3}, ZHANG Cuiying¹, ZHU Leilei³

(1. College of Biotechnology, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China;

2. Haihe Laboratory of Synthetic Biology, Tianjin 300308, China; 3. Key Laboratory of Low Carbon Synthetic Engineering Biology, Tianjin Institute of Industrial Biotechnology, Chinese Academy of Sciences, Tianjin 300308, China)

Abstract: To investigate the effect of formaldehyde on formolase and the cause of its inactivation, in our present study formolase was incubated with different concentrations of formaldehyde (300 mmol/L, 1 mol/L) for different time (1 hour, 2 hours and 3 hours). Subsequently, the residual activity of formolase was detected and the modified and cross-linked sites of formolase were detected by liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). The results showed that there was a significant cross-linking and modification phenomenon of formolase after incubation with formaldehyde, and the higher of the formaldehyde concentration and the longer the incubation time, the higher degree of cross-linking of formolase. Two formaldehyde modification sites (N186 and K228) of formolase and potential formaldehyde cross-linked fragments were identified with LC-MS/MS. Through the cross-linking reaction with such amino acids as asparagine and lysine, formaldehyde destroyed its local structure and changed the overall aggregation state, thus making it inactive. This finding might be also beneficial for providing semi-rational design sites for improving formaldehyde tolerance of formolase.

Key words: formaldehyde; formolase; formaldehyde resistance; LC-MS/MS

引文格式:

韩庚, 张翠英, 朱蕾蕾. 甲醛对甲醛裂合酶结构的修饰作用研究[J]. 天津科技大学学报, 2024, 39(3): 9-14.

HAN G, ZHANG C Y, ZHU L L. Investigation of the effect of formaldehyde on the structure of formolase[J]. Journal of Tianjin university of science & technology, 2024, 39(3): 9-14.

收稿日期: 2023-05-25; 修回日期: 2023-09-20

基金项目: 国家重点研发计划项目 (2022YFC2106000)

作者简介: 韩庚 (1996—), 男, 河北省保定人, 硕士研究生; 通信作者: 朱蕾蕾, 研究员, zhu_ll@tib.cas.cn

甲醛作为最小的醛类物质^[1],化学性质活泼,能够依靠唯一的活性基团与多种氨基酸发生反应。甲醛作为一种常用的羟基交联剂,具有广泛的应用范围,在蛋白质-蛋白质和蛋白质-核酸之间均可形成共价键^[2-3]。甲醛作为一种零臂长的强力交联剂应用于化学交联中,主要有两方面的优势:一方面,甲醛相对分子质量很小,可以快速穿透细胞膜和核膜^[4],在生理条件下稳定瞬时的、微弱的蛋白质相互作用,也可以用于染色体免疫共沉淀中固定蛋白质-DNA 的相互作用^[1];另一方面,甲醛交联反应可在 95 ℃、酸性条件下实现可逆交联^[5-6]。

甲醛交联机制如图 1 所示,甲醛与蛋白质的交联一般分两步进行^[1]:第一步,甲醛与蛋白质中较强的亲核基团(常见的是赖氨酸氨基)发生反应,形成一种甲基中间体(羟甲基加合物),这一中间体经过部分脱水产生不稳定的席夫碱;第二步,席夫碱与氨基酸残基的亲核基团形成交联,产生交联产物。Li 等^[7]将甲醛与天然肽段孵育并进行了甲醛交联分子机制的研究。甲醛与氨基酸残基是否发生交联,除了与氨基酸残基的种类有关,同时还与两个氨基酸残基之间的距离有关。甲醛能够交联一定范围内的两个性质较活泼的氨基酸残基,在不同距离上,甲醛也倾向于与不同氨基酸残基发生交联。Metz 等^[8]基于甲醛交联的

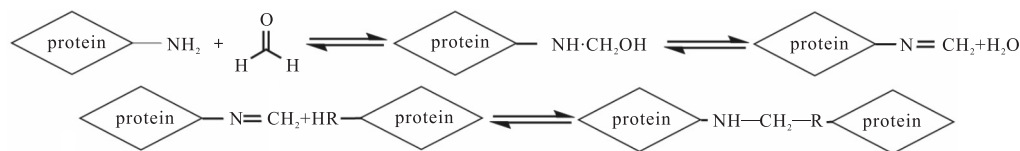


图 1 甲醛交联机制

Fig. 1 Mechanism of formaldehyde cross-linking

本文研究了甲醛对甲醛裂合酶的修饰和破坏作用,利用液相色谱-串联质谱(LC-MS/MS)检测,分析了甲醛对甲醛裂合酶的修饰位点,旨在为提高甲醛裂合酶的催化活性及甲醛耐受性提供新思路。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器

甲醛裂合酶,本课题组提供; NH_4HCO_3 、碘乙酰胺, Sigma 公司; Na_2HPO_4 、 NaH_2PO_4 、36% 甲醛溶液、 NaCl , 上海阿拉丁生化科技股份有限公司; 咪唑, 北京索莱宝科技有限公司; 乙腈, Merck 公司; 二硫苏糖醇(DTT)、BCA 蛋白定量检测试剂盒, 生工生物工程(上海)股份有限公司; 胰蛋白酶, Promega 公司; 甲酸, Fluka 公司。

原理,对白喉毒素的甲醛修饰位点进行了分析,并解释了甲醛灭活病毒的分子机理,在研究中发现白喉毒素结合腔以及受体结合部位都发生了甲醛的分子内交联或者修饰,同时 A 片段和 B 片段之间也发生了交联,在这些位点发生的变化均促使了白喉毒素的失活。Michiels 等^[9]探究了甲醛对赖氨酸残基的修饰作用,并将得到的甲醛交联或修饰特性应用于疫苗研发。

甲醛裂合酶^[10-11]是经人工理性和半理性设计的酶,通过对活性中心附近的氨基酸残基进行改造,从而改变其活性口袋的大小,使其具有了能够催化三分子非天然底物甲醛生成 1,3-二羟基丙酮的新活性。一碳化合物的转化利用是当今研究的热点,将甲醛裂合酶和其他酶进行酶联反应或者化学酶联反应,实现了甲醛的综合转化利用,生成大宗化学品前体物质、高附加值糖^[12-15],甚至实现了二氧化碳到淀粉的人工合成^[16]。但是,在反应过程中,由于甲醛既是甲醛裂合酶的底物,同时又是一种常用的化学交联剂,甲醛能够使该酶的氨基酸残基发生化学修饰,在氨基酸残基之间发生交联反应,所以导致了酶的结构被破坏和酶活性的损失。已报道的甲醛裂合酶的甲醛耐受性均不理想,因此亟须研究甲醛对甲醛裂合酶结构的修饰和破坏机理。

TripleTOF 5600 型纳升级超高效液相色谱-质谱联用仪, ABSciex 公司; AKTA go 型蛋白质纯化仪, Cytiva 公司; JN-3000plus 型高压均质机, 基因有限公司。

1.2 甲醛裂合酶的表达与纯化

将表达甲醛裂合酶(benzoylformate decarboxylase, BFD)^[12]的菌株在含有 50 $\mu\text{g/mL}$ 硫酸卡那霉素的 LB 固体培养基上划线, 37 ℃ 过夜培养并挑取单克隆接种到 20 mL 含有 50 $\mu\text{g/mL}$ 硫酸卡那霉素的新鲜 LB 培养基中, 37 ℃、220 r/min 过夜培养。按 1% 的比例将种子液转接到 600 mL 新鲜 LB-Kan 培养基中, 37 ℃ 培养至吸光度为 0.6 ~ 0.8, 加入 0.1 mmol/L 异丙基硫代半乳糖苷(isopropyl β -D-thiogalactoside, IPTG), 30 ℃ 诱导表达 24 h。培养结束后收集菌体, 用磷酸钠缓冲液(50 mmol/L Na_2HPO_4 、50 mmol/L

NaH_2PO_4 、5 mmol/L MgSO_4) 将菌体重悬并用高压均质机破碎细胞, 细胞破碎上清液用带有 Ni^{2+} 亲和层析柱的蛋白质纯化仪对胞内酶进行蛋白质纯化及脱盐。

1.3 甲醛裂合酶的甲醛溶液孵育

使用 BCA 蛋白定量检测试剂盒对 BFD 进行定量, 并用 pH 7.4 的磷酸钠缓冲液稀释至 3 mg/mL。3 mg/mL 甲醛裂合酶与等体积的甲醛溶液 (600 mmol/L、2 mol/L) 在 30 °C、1 000 r/min 条件下振荡孵育 (1 h、2 h、3 h), 其中以不加甲醛溶液为对照。甲醛裂合酶与甲醛溶液孵育结束后进行 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 检测。

1.4 BFD 活性检测

BFD 活性采用酶联反应的方法进行检测。半乳糖氧化酶能够催化 1, 3-二羟基丙酮产生过氧化氢, 与辣根过氧化物酶进行酶联反应, 催化 ABTS 和过氧化氢生成 ABTS^+ 和水, ABTS^+ 为绿色化合物, 在 410 nm 波长处有最大吸光度。绘制 410 nm 条件下不同浓度的 1, 3-二羟基丙酮的动力学曲线并计算斜率得到标准曲线。将与甲醛孵育后的 BFD 超滤, 去除甲醛溶液, 定量为 3 mg/mL, 再分别与 300 mmol/L 甲醛溶液和 1 mol/L 甲醛溶液反应 1、2、3 h, 以上述方法检测 1, 3-二羟基丙酮的产量。

1.5 甲醛修饰位点的确定

1.5.1 样品的制备

设置 2 组实验, 将 BFD 分别与 300 mmol/L 甲醛溶液、不含甲醛的磷酸钠缓冲液孵育 3 h 后进行 SDS-PAGE 分析。为了分析甲醛对 BFD 活性的影响, 切下蛋白胶中相对分子质量为 $4.8 \times 10^4 \sim 6.3 \times 10^4$ 的蛋白质条带进行 LC-MS/MS 分析。

将蛋白胶切成小块置于 EP 管中, 加入脱色液对胶进行脱色, 用乙腈干燥胶块, 重复以上两个步骤 2 ~ 3 次; 加入 25 mmol/L DTT 溶液 (含 50 mmol/L NH_4HCO_3), 97 °C 加热 10 min, 用乙腈清洗、脱水 2 次; 加入 55 mmol/L 碘乙酰胺溶液, 常温反应 40 min, 用乙腈清洗、脱水 2 次; 加入胰蛋白酶, 37 °C 孵育 12 ~ 16 h。

1.5.2 LC-MS/MS 分析

纳升级超高效液相色谱-质谱联用仪检测部分由中国科学院天津工业生物技术研究所系统生物学中心完成, 具体检测方法参考文献[17]。

1.5.3 pLink 数据分析

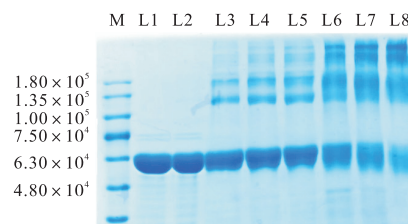
pLink 是用于交联肽的蛋白质组学鉴定的具有系统评价性的高速搜索引擎^[18]。在 pLink 交联剂数据库中, 根据文献中提到的甲醛交联机制^[7-9], 新建 4 种甲醛交联剂 FA (K-W)、FA (K-K)、FA (K-R)、FA (K-

Y)。K-W、K-Y 两种交联形式交联后, 相对分子质量增加 12.000; K-K、K-R 两种交联形式交联后, 相对分子质量增加 24.000; 4 种交联剂若发生 mono-link, 相对分子质量增加 12.000 (等同于席夫碱修饰)。在 pLink 数据库中新建甲醛修饰选项, 其中羟甲基修饰的相对分子质量是 30.011, 可修饰位点为 K、Q、H、W、N 的 5 个氨基酸残基。更新搜索引擎数据库后, 将 LC-MS/MS 得到的 mgf 文件提交到 pLink 中, 然后在 UniProt 数据库 (<https://www.uniprot.org/>) 中搜索大肠杆菌 (*E. coli*) BL21 的蛋白质组, 并将 BFD 氨基酸序列加到蛋白质组中。将 fasta 文件提交到 pLink 中, 选择胰蛋白酶进行酶切, 修饰类型为脲甲基 (Carbamidomethyl 半胱氨酸)、乙酰基 (Acetyl 蛋白 N 末端)、氧化 (Oxidation 甲硫氨酸) 以及羟甲基修饰, 提交相关参数后, 使用 pLink 搜索引擎自动搜索交联位点以及修饰位点。

2 结果与分析

2.1 BFD 的纯化

收集表达 BFD 的菌体并用蛋白质纯化仪进行镍柱亲和纯化, 纯化后使用 BCA 蛋白定量检测试剂盒将蛋白质量浓度定为 3 mg/mL, 用 SDS-PAGE 检测酶的纯度, 如图 (2) 所示。BFD 的理论相对分子质量为 5.6×10^4 , SDS-PAGE 显示条带正确, 杂蛋白含量低。纯化蛋白将用于甲醛孵育实验及确定甲醛的交联或修饰位点。



M. marker; L1. BFD 纯酶; L2. BFD 纯酶 30 °C 振荡 3 h; L3. 300 mmol/L 甲醛孵育 1 h; L4. 300 mmol/L 甲醛孵育 2 h; L5. 300 mmol/L 甲醛孵育 3 h; L6. 1 mol/L 甲醛孵育 1 h; L7. 1 mol/L 甲醛孵育 2 h; L8. 1 mol/L 甲醛孵育 3 h。

图 2 BFD 的甲醛孵育

Fig. 2 Incubation of BFD with formaldehyde

2.2 甲醛溶液孵育对 BFD 的影响

将 BFD 与不同浓度甲醛孵育 (30 °C、1 000 r/min 振荡 3 h) 后, 从 SDS-PAGE 图 (图 2) 中可以看出, 无甲醛的对照组 L2 与 L1 相比没有发生变化, 而在甲醛溶液中孵育的 BFD 的相对分子质量明显变大。相对分子质量大于 1×10^5 , 推断可能形成二聚体、三聚

体甚至更大的聚体,这说明甲醛分子使一部分 BFD 分子之间发生了交联。BFD 与甲醛溶液孵育后,单体的条带变得更加弥散,说明甲醛分子与 BFD 发生了分子内交联或羟甲基和席夫碱修饰。同时,BFD 与更高浓度甲醛孵育后,相对分子质量更大的蛋白质的条带更浓,说明交联程度更高;孵育时间越长,BFD 的交联程度越高。

高反应活性的甲醛对 BFD 有较强的修饰或交联作用,在 BFD 以甲醛为底物进行缩聚反应生成二碳产物和三碳产物时,甲醛还能够使蛋白质和蛋白质间发生交联,破坏其原有的三级结构和四级结构^[19]。

2.3 甲醛孵育对 BFD 活性的影响

观察到甲醛溶液孵育能够使 BFD 发生交联后,测定了甲醛溶液中孵育过的 BFD 的活性。比较了 BFD 与不同浓度甲醛孵育不同时间后与孵育之前酶活性的变化,结果如图 3 和图 4 所示,其中对照组为未与甲醛溶液孵育的 BFD 活性。

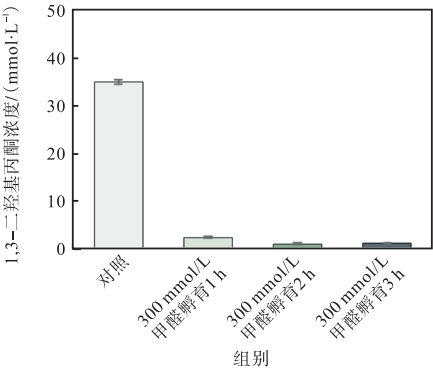


图 3 BFD 在 300 mmol/L 甲醛条件下孵育不同时间后的剩余酶活性

Fig. 3 Residual activity of BFD after incubation with 300 mmol/L formaldehyde for different time

从图 3 可以看出,BFD 与 300 mmol/L 甲醛孵育后,1,3-二羟基丙酮的产量从 35 mmol/L(未孵育的样品)急剧下降到 5 mmol/L 以下,酶活性显著下降。BFD 与甲醛孵育 1 h 后 1,3-二羟基丙酮的产量仅剩 5%左右;酶与甲醛孵育 2 h 和 3 h 后,1,3-二羟基丙酮产量则更低,仅剩 3%和 2%左右。BFD 与 1 mol/L 甲醛孵育后,1,3-二羟基丙酮的产量同样有断崖式的下跌(图 4),酶与 1 mol/L 甲醛孵育 1 h 后 1,3-二羟基丙酮产量为原来的 14%,孵育 2 h 和 3 h 后甲醛裂合酶的 1,3-二羟基丙酮产量降低到 13%和 12%。

从图 3 和图 4 可以看出,以 300 mmol/L 甲醛为底物时 1,3-二羟基丙酮的产量低于以 1 mol/L 甲醛为底物时的产量。300 mmol/L 甲醛处理不同时间后

产量降低趋势比 1 mol/L 甲醛处理后明显。这可能与甲醛的浓度有关,底物甲醛浓度越高,1,3-二羟基丙酮的产量越高;也可能是由于 1 mol/L 甲醛对酶的破坏作用发生得更快。因此,将甲醛裂合酶处理 1 h、2 h 和 3 h 后,1,3-二羟基丙酮产量降低的趋势变化不明显。

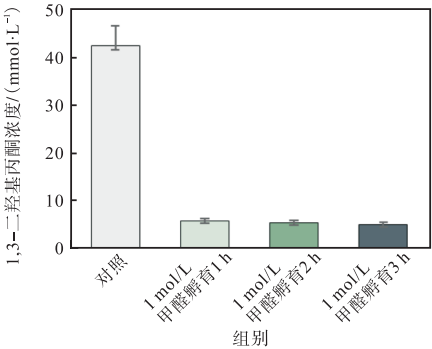


图 4 BFD 在 1 mol/L 甲醛条件下孵育不同时间后的剩余酶活性

Fig. 4 Residual activity of BFD after incubation with 1 mol/L formaldehyde for different time

综上所述,BFD 与甲醛溶液孵育后,酶活性大幅下降。汪世华等^[20]研究了甲醛对枯草芽孢杆菌溶菌酶活性的影响,5%的甲醛溶液能够使 62%的酶活性丧失。林建城等^[21]发现 1 mol/L 甲醛能够使中国鲎 N-乙酰-β-D-氨基葡萄糖苷酶(NAGase)82%的活性丧失。以上结果均与本研究结果相似。造成酶活性的大幅下降有可能是由于甲醛使酶的功能氨基酸残基的氨基发生了化学修饰或交联^[21]。

2.4 LC-MS/MS 检测甲醛对甲醛裂合酶 BFD 的交联作用

为了发现甲醛在 BFD 结构上交联的确切位点,将在甲醛溶液中孵育后的(实验组)和未孵育的(对照组)BFD 进行 SDS-PAGE 分离,并将目的条带切下进行胶内酶解,最后对从蛋白胶中抽提出的肽段进行 LC-MS/MS 分析。潜在甲醛修饰或交联肽段见表 1。

表 1 潜在甲醛修饰或交联肽段

Tab.1 Potential formaldehyde modified or cross-linked fragments

序列	对照组检测到的次数	实验组检测到的次数
ALNSASNPAIVLGPDVD	20	8
AANANADCVMLAER		
AMIGVEASETNVDAANLPR	9	2
AMIGVEASETNVDAANLPRPLVK	70	47
KPAFINLHSAAGTGNAMGALSNAER	36	15
TSHSPLIVTAGQQTR	19	7
WSYEPASAAEVPHAMSR	11	4

有 6 段氨基酸序列在对照组与实验组中检测到的次数有明显区别, 未在甲醛溶液中孵育的 BFD 对照组检测到的次数明显多于甲醛溶液孵育后实验组检测到的次数。这可能是由于这些氨基酸片段甲醛交联后形成了复杂的交联网络, 不易从蛋白胶中提取^[22], 导致实验组检测次数变少^[23], 因此推测这些片段发生了甲醛交联。

将 LC-MS/MS 检测数据提交到预设好甲醛交联以及修饰参数的 pLink 搜索引擎中, 对甲醛修饰或者交联位点进行搜索后, 发现 1 个甲醛交联位点 K228

(图 5)以及 1 个甲醛修饰位点 N186(图 6)。BFD 的 228 位赖氨酸残基与胞内杂蛋白的赖氨酸残基发生了交联, BFD 的 186 位天冬酰胺发生了羟甲基修饰。

通过在 BFD 三维结构中观察甲醛的交联位点, 发现甲醛的交联位点(K228)以及修饰位点(N186)位于 BFD 分子表面(图 7), 甲醛潜在的交联片段(粉色)则位于二聚体界面处, 且有些片段位于酶活性中心附近。这些现象表明甲醛的修饰和交联作用能影响/破坏活性中心附近的局部结构及其多聚体, 从而影响该酶的活性和稳定性。

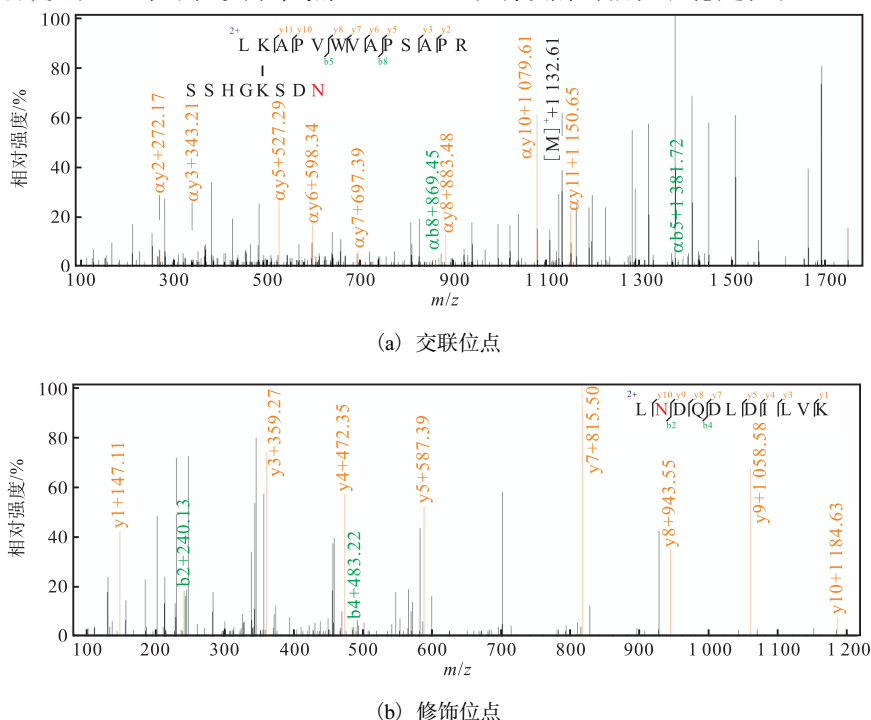


图 5 甲醛裂合酶甲醛交联和修饰位点

Fig. 5 Sites of formolase cross-linked and modified with formaldehyde

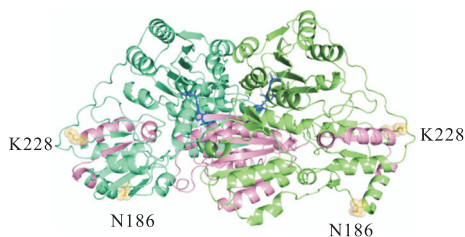


图 6 BFD 潜在的甲醛交联片段(粉色)以及甲醛交联和修饰位点(黄色)

Fig. 6 Potential formaldehyde modified fragments (pink) and sites (yellow) in structure of BFD

3 结 语

通过 BFD 与甲醛孵育实验发现, 甲醛既是 BFD 的底物, 又能够对 BFD 的氨基酸残基进行席夫碱或

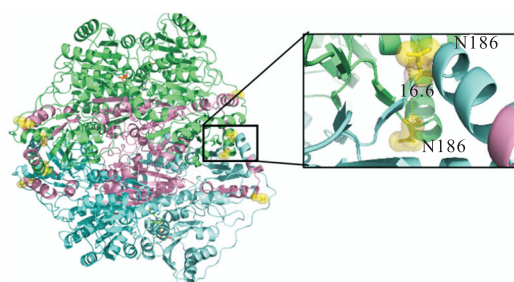


图 7 甲醛交联修饰位点在 BFD 多聚体中的位置

Fig. 7 Sites of the formaldehyde cross-linking modification in the multimeric BFD

羟甲基修饰或充当交联剂, 使其发生分子内或分子间交联, 从而对酶活性造成了很大的破坏。经过 LC-MS/MS 分析后, 发现了 1 个甲醛交联位点 K228 以及 1 个甲醛的羟甲基修饰位点 N186, 此外还发现了

两段潜在的甲醛交联片段。经过结构分析后发现,甲醛交联位点位于酶分子的表面,能够使酶分子间发生交联。甲醛的修饰位点位于四聚体的界面上,甲醛的交联作用可能会改变 BFD 原有的分子聚集状态,而潜在的交联片段则位于甲醛裂合酶二聚体界面,有些位点位于活性中心附近,甲醛交联能够导致活性中心附近结构发生改变,从而使酶活性大幅下降。

LC-MS/MS 能够准确分析 BFD 的交联位点以及修饰位点,甲醛交联分析为 BFD 的分子改造提供了新的改造方向,可对容易发生甲醛交联的区域或位点进行改造,从而减少甲醛与赖氨酸、精氨酸、酪氨酸等氨基酸残基发生交联反应,进而避免局部结构发生变化,提高 BFD 的甲醛耐受性或活性,为 BFD 的工业化应用奠定基础。

参考文献:

- [1] HOFFMAN E A, FREY B L, SMITH L M, et al. Formaldehyde crosslinking: a tool for the study of chromatin complexes[J]. *Journal of biological chemistry*, 2015, 290(44): 26404–26411.
- [2] STEIGENBERGER B, PIETERS R J, HECK A J R, et al. PhoX: an IMAC-enrichable cross-linking reagent[J]. *ACS Central science*, 2019, 5(9): 1514–1522.
- [3] SUCHANEK M, RADZIKOWSKA A, THIELE C. Photo-leucine and photo-methionine allow identification of protein-protein interactions in living cells[J]. *Nature methods*, 2005, 2(4): 261–267.
- [4] SUTHERLAND B W, TOEWS J, KAST J. Utility of formaldehyde cross-linking and mass spectrometry in the study of protein-protein interactions[J]. *Journal of mass spectrometry*, 2008, 43(6): 699–715.
- [5] NIRANJANAKUMARI S, LASDA E, BRAZAS R, et al. Reversible cross-linking combined with immunoprecipitation to study RNA-protein interactions in vivo[J]. *Methods*, 2002, 26(2): 182–190.
- [6] KENNEDY-DARLING J, SMITH L M. Measuring the formaldehyde protein-DNA cross-link reversal rate[J]. *Analytical chemistry*, 2014, 86(12): 5678–5681.
- [7] LI B, TANG H, TURLIK A, et al. Cooperative stapling of native peptides at lysine and tyrosine or arginine with formaldehyde[J]. *Angewandte chemie-international edition*, 2021, 60(12): 6646–6652.
- [8] METZ B, MICHIELS T, UITTENBOGAARD J, et al. Identification of formaldehyde-induced modifications in diphtheria toxin[J]. *Journal of pharmaceutical sciences*, 2020, 109(1): 543–557.
- [9] MICHIELS T J M, SCHONEICH C, HAMZINK M R J, et al. Novel formaldehyde-induced modifications of lysine residue pairs in peptides and proteins: identification and relevance to vaccine development[J]. *Molecular pharmaceutics*, 2020, 17(11): 4375–4385.
- [10] SIEGEL J B, SMITH A L, POUST S, et al. Computational protein design enables a novel one-carbon assimilation pathway[J]. *Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America*, 2015, 112(12): 3704–3709.
- [11] LU X Y, LIU Y W, YANG Y Q, et al. Constructing a synthetic pathway for acetylcoenzyme A from one-carbon through enzyme design[J]. *Nature communications*, 2019, 10(1): 1378.
- [12] LI T Z, TANG Z J, WEI H L, et al. Totally atom-economical synthesis of lactic acid from formaldehyde: combined bio-carboligation and chemo-rearrangement without the isolation of intermediates[J]. *Green chemistry*, 2020, 22(20): 6809–6814.
- [13] GUNER S, WEGAT V, PICK A, et al. Design of a synthetic enzyme cascade for the in vitro fixation of a C-1 carbon source to a functional C-4 sugar[J]. *Green chemistry*, 2021, 23(17): 6583–6590.
- [14] YANG J G, SUN S S, MEN Y, et al. Transformation of formaldehyde into functional sugars via multi-enzyme stepwise cascade catalysis[J]. *Catalysis science & technology*, 2017, 7(16): 3459–3463.
- [15] YANG J G, ZHU Y M, QU G, et al. Biosynthesis of dendroketose from different carbon sources using in vitro and in vivo metabolic engineering strategies[J]. *Bio-technology for biofuels*, 2018, 11(1): 290.
- [16] CAI T, SUN H B, QIAO J, et al. Cell-free chemo-enzymatic starch synthesis from carbon dioxide[J]. *Science*, 2021, 373(6562): 1523–1527.
- [17] TAYRI-WILK T, SLAVIN M, ZAMEL J, et al. Mass spectrometry reveals the chemistry of formaldehyde cross-linking in structured proteins[J]. *Nature communications*, 2020, 11(1): 3128.
- [18] CHEN Z L, MENG J M, CAO Y, et al. A high-speed search engine pLink 2 with systematic evaluation for proteome-scale identification of cross-linked peptides[J]. *Nature communications*, 2019, 10: 3404.

(下转第 63 页)

- on Artificial Intelligence, 2021, 35 (12) : 11106–11115.
- [16] HE K, ZHANG X, REN S, et al. Identity mappings in deep residual networks[C]//ECCV. Computer Vision-ECCV 2016; 14th European Conference. Berlin: Springer International Publishing, 2016: 630–645.
- [17] CHO K, VAN MERRIËNBOER B, GULCEHRE C, et al. Learning phrase representations using RNN encoder-decoder for statistical machine translation[EB/OL]. [2023-05-01]. <https://arxiv.org/pdf/1406.1078.pdf>.
- [18] KUMAR S, PARKER J, NADERIAN P. Adaptive transformers in RL[EB/OL]. [2023-05-01]. <https://doi.org/10.48550/arXiv.2004.03761>.
- [19] SUKHBAATAR S, GRAVE E, BOJANOWSKI P, et al. Adaptive attention span in transformers[EB/OL]. [2023-05-01]. <https://doi.org/10.48550/arXiv.1905.07799>.
- [20] BANINO A, BADIA A P, WALKER J, et al. CoBERL: contrastive BERT for reinforcement learning[EB/OL]. [2023-05-01]. <https://doi.org/10.48550/arXiv.2107.05431>.
- [21] LI S, JIN X, XUAN Y, et al. Enhancing the locality and breaking the memory bottleneck of transformer on time series forecasting[C]//ACM. Proceeding of the 33rd International Conference on Neural Information Processing Systems. New York: ACM, 2019: 5243–5253.
- [22] BELTAGY I, PETERS M E, COHAN A. Longformer: the long-document transformer[EB/OL]. [2023-05-01]. <https://doi.org/10.48550/arXiv.2004.05150>.

责任编辑: 郎婧

(上接第 14 页)

- [19] ZHU R, ZHANG G, JING M, et al. Genetically encoded formaldehyde sensors inspired by a protein intra-helical crosslinking reaction[J]. Nature communications, 2021, 12 (1) : 581.
- [20] 汪世华, 张晓鹏, 陈明, 等. 有机溶剂和变性剂对枯草芽孢杆菌溶栓酶活性的影响[J]. 应用与环境生物学报, 2008, 14 (6) : 825–829.
- [21] 林建城, 吴建洪, 林娟娟. 有机溶剂来源污染物对中国鲎 N-乙酰- β -D-氨基葡萄糖苷酶的影响[J]. 中国海洋大学学报(自然科学版), 2021, 51 (6) : 42–49.
- [22] OHS R, LEIPNITZ M, SCHÖPPING M, et al. Simultaneous identification of reaction and inactivation kinetics of an enzyme-catalyzed carboligation[J]. Biotechnology progress, 2018, 34 (5) : 1081–1092.
- [23] PETROTCHEIKO E V, SERPA J J, CABECINHA A N, et al. “Out-Gel” tryptic digestion procedure for chemical cross-linking studies with mass spectrometric detection[J]. Journal of proteome research, 2014, 13 (2) : 527–535.

责任编辑: 郎婧