

# 谷氨酸棒杆菌 (*Corynebacterium glutamicum*) 海藻糖合成酶的定点突变及其酶学性质研究

## Study on Site-directed Mutagenesis and the Enzyme Properties of Trehalose Synthase from *Corynebacterium glutamicum*

朱绮霞<sup>1</sup>, 陈发忠<sup>2</sup>, 罗兆飞<sup>2</sup>, 韦宇拓<sup>3</sup>, 杜丽琴<sup>3</sup>, 王青艳<sup>1</sup>, 黄日波<sup>1,3\*</sup>

ZHU Qi-xia<sup>1</sup>, CHEN Fa-zhong<sup>2</sup>, LUO Zhao-fei<sup>2</sup>, WEI Yu-tuo<sup>3</sup>, DU Li-qin<sup>3</sup>, WANG Qing-yan<sup>1</sup>, HUANG Ri-bo<sup>1,3</sup>

(1. 广西科学院国家非粮生物质能源工程技术研究中心, 广西南宁 530007; 2. 南宁中诺生物工程有限责任公司, 广西南宁 530007; 3. 广西大学生命科学与技术学院, 广西南宁 530004)

(1. National Engineering Research Center for Non-food Biofinery, Guangxi Academy of Science, Nanning, Guangxi 530007, China; 2. Nanning Sinozyme Biotechnology Coporation Limited, Nanning, Guangxi 530007, China; 3. College of Life Sciences and Technology, Guangxi University, Nanning, Guangxi, 530004, China)

**摘要:** 以已知晶体结构的 *Pseudomonas mesoacidophila* MX-45 菌株海藻酮糖合成酶( MutB) 的晶体结构为模板, 在 SWISS-MODEL 模建立谷氨酸棒杆菌( *Corynebacterium glutamicum*) 海藻糖合成酶的立体结构, 并对初始结构作能量优化, 通过氨基酸序列比对, 选择 TreS-glu 保守区内的氨基酸 R245、D247、E289、F244 和保守区外的氨基酸 A288 进行定点突变, 并对突变酶 F244C、F244L、F244W、F244Y、A288G、R245X、E289X、D247N、D247E 进行纯化和酶学性质研究, 比较突变子对酶活性和热稳定性的影响。结果表明, R245、E289 突变为其它的 19 个氨基酸后酶活力全部丧失, D247E 和 D247N 也丧失酶活, F244C、F244L、F244W、F244Y 和 A288G 的比活力分别降低到 TreS-glu 的 38%、24%、62%、64% 和 35%, A288 突变成 T288 后没有酶活。与 TreS-glu 相比, F244C、F244W、A288G 的  $K_m$  值基本不变, F244L、F244Y 对底物麦芽糖的亲和力降低, F244Y 的最适反应温度和 TreS-glu 相同, 均为 27℃, 而 F244C、F244L、F244W 和 A288G 的最适温度提高到 32℃。与 TreS-glu 相比, 突变酶的最适反应 pH 值均有所下降, 其中 F244C、F244Y 和 A288G 的为 7.5, 比 TreS-glu 的 8.0 均下降了约 0.5 个单位, 而 F244L 和 F244W 的为 6.5, 比 TreS-glu 的 8.0 均下降了近 1.5 个单位。与 TreS-glu 相比, 突变酶的热稳定性均有不同程度提高, 其中 F244Y、F244W 和 A288G 的  $T_m$  值比 TreS-glu 的提高约 1℃, F244L 提高约 2℃, F244C 提高了近 4℃。

**关键词:** 海藻糖合成酶 谷氨酸棒杆菌 定点突变 酶学性质

中图分类号: Q55 文献标识码: A 文章编号: 1005-9164(2012)02-0169-05

**Abstract:** A three-dimensional model of trehalose synthase from *Corynebacterium glutamicum* was constructed based on the crystal structure of trehalulose synthase MutB from *Pseudomonas mesoacidophila* MX-45 on the SWISS-MODEL and the energy of its primal structure was optimized. Combined with analyzing the conserved region of trehalose synthase genes from different origin, mutagenesis was performed on the amino acids in TreS-glu's conserved region (R245, D247, E289, F244) and out of the conserved region (A288). The mutants F244C, F244L, F244W, F244Y, A288G, R245X, E289X,

D247N and D247E were purified and their impacts on enzyme activity and thermal stability were analyzed. The results showed that the activity was lost after R245 and E289 were converted to other 19 kinds of amino acids. The mutants D247E and D247N revealed also no activity. The specific activity of the mutants F244C,

收稿日期: 2012-01-07

作者简介: 朱绮霞(1977-), 女, 工程师, 主要从事微生物技术的研究。

\* 通讯作者: 黄日波(1958-), 男, 教授, 博士生导师, 主要从事酶工程研究。Email: rbhuang@gxas.cn。

F244L, F244W, F244Y and A288G were decreased to 38%, 24%, 62%, 64% and 35% of the wild-type (TreS-gluhis), respectively. The mutant A288T showed its activity to be disrupted completely. Compared with the wild-type, the *km* of F244C, F244W, A288G was not significantly altered, but the affinity of F244L and F244Y enzymes was decreased for the maltose substrate. The optimum temperature of the mutant F244Y was 27°C that was the same as the TreS-glu, while the mutants F244C, F244L, F244W and A288G enhanced their optimum temperature to 32°C. The optimum pH value of all the mutants was decreased in comparison with that of the wild type. The optimum pH of F244C, F244Y and A288G dropped 0.5 pH value units and reached to 7.5, and that of F244L and F244W decreased 1.5 units. The thermostability of all the mutants increased in various degree, about one degree in the F244Y, F244W and A288G, two degrees in the F244L and four degrees in the F244C than that of the wild type.

**Key words:** trehalose synthase, *Corynebacterium glutamicum*, site-mutagenesis, enzyme properties

海藻糖是由 2 个葡萄糖分子通过  $\alpha, \alpha$ -1,1 糖苷键连接而成的非还原性二糖, 在多种生物, 如真菌、酵母菌、昆虫等一些植物和动物体内广泛存在<sup>[1]</sup>。海藻糖具有耐热性和耐酸性, 能够保护一些植物和动物细胞及一些活性物质如生物膜、蛋白质和核酸等免受干燥和低温冷冻的伤害, 此外, 海藻糖还具有低吸湿性、保湿性、低甜度等特点。Schick 等<sup>[2]</sup>还将海藻糖用于器官的活体保藏。这些独特的生物学功能, 使得海藻糖被广泛应用于食品、化妆品、农业、医药和生物制品等领域<sup>[3-6]</sup>。

海藻糖合成酶 (TreS) 能催化麦芽糖生成海藻糖。海藻糖合成酶是工业上以淀粉为原料生产海藻糖的关键酶。迄今为止已经克隆的海藻糖合成酶存在有一些缺陷, 比如: 转化率较低 (最高只有 50% ~ 60%)、热稳定性不够高等。有必要利用定向进化的方法对已有的海藻糖合成酶进行改造, 使其工业性能有所改善, 同时也能为研究其结构与功能的关系打下坚实的基础。本研究在已经获得的谷氨酸棒杆菌 (*Corynebacterium glutamicum*) 海藻糖合成酶 (TreS-glu) 基因序列所推导的氨基酸序列的基础上, 通过计算机辅助设计, 模拟蛋白质的空间结构, 并进行能量优化, 结合分析其与 TreS-glu 同源性较高的氨基酸序列<sup>[7]</sup>, 选择 TreS-glu 保守区内的氨基酸 R245、D247、E289、F244 和保守区外的氨基酸 A288 进行定点突变, 并对突变酶进行纯化和酶学性质研究, 比较突变子对酶活性、热稳定性的影响, 以期海藻糖合成酶的分子结构与功能关系的深入研究提供理论依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

快速定点突变试剂盒购自 Stratagene 公司, 各种限制性内切酶、PrimeSTAR HS DNA 聚合酶、T4 连接酶均购自 TaKaRa 公司, *DpnI* 是 Promega 产品, 异丙

基  $\beta$ -D-硫代牛乳糖苷 (IPTG) 购自 Calbiochem 公司, 蛋白胨和酵母粉是 OXIOD 公司产品, 其他试剂为国产分析纯试剂。菌株 *Escherichia coli* BL21 和 JM109 是广西亚热带生物资源保护利用重点实验室保存的菌种; 表达质粒 pSE380 购自 Invitrogen 公司, 重组表达质粒 pSE380-*tresgluHis* 是广西亚热带生物资源保护利用重点实验室构建。

培养基为 LB 培养基: 1% (m/V) tryptone, 0.5% (m/V) yeast extract, 1% (m/V) NaCl。引物序列是根据突变氨基酸相应位点及其两侧的碱基序列, 用计算机软件 Vector NTI Suite10 设计。饱和突变引物的设计根据突变位点序列并考虑密码子的偏爱性设计互补的引物, 将位点 R245 和 E289 分别突变为其它的 19 种氨基酸, 为了便于鉴定, 通过沉默突变引入酶切位点, 其中位点 R245 突变引物引入 *XbaI* 酶切位点, 位点 E289 突变引物引入 *EcoRI* 酶切位点。定点突变引物设计将位点 F244 的 Phe 分别突变为 Cys (F244C)、Tyr (F244Y)、Trp (F244W) 和 Leu (F244L), 位点 D247 的 Asp 分别突变为 Glu (D247E) 和 Asn (D247N), A288 的 Ala 突变为 Gly (A288G), 根据突变位点序列并考虑密码子的偏爱性设计完全互补的引物。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 突变位点选择、DNA 操作和 PCR 介导的定点饱和突变

通过氨基酸序列比对, 选择 TreS-glu 保守区内的氨基酸 R245、D247、E289、F244 和保守区外的氨基酸 A288 进行定点突变。质粒 DNA 提取、纯化、酶切、连接及转化参照文献 [8] 进行。PCR 介导的饱和突变以野生型的重组表达质粒 pSE380-*tres-gluhis* 为模板进行 PCR 反应, 扩增含突变位点 R245、E289 的全长基因。PCR 介导饱和突变的反应体系为: 5×PS buffer with  $MgCl_2$ , 10.0  $\mu$ l; 2.5 mmol/L dNTP, 4.0  $\mu$ l; 10  $\mu$ mol/L Primer, 各 1.0  $\mu$ l; 重组质粒 pSE380-*tres-*

gluhis 模板 5 ~ 10 ng; PrimeSTAR™ HS DNA Polymerase 1.25U; 加超纯水至反应总体积为 50.0 μl。PCR 介导饱和突变的扩增程序条件为: 首先 95℃ 2min, 然后 94℃ 30s, 65℃ 30s, 72℃ 6min, 25 个循环, 随后 72℃ 10min; PCR 扩增产物各取 2.5 μl 在 0.8% 琼脂糖上电泳检查; PCR 产物用 *DpnI* (识别序列为 5'-G<sup>m</sup>ATC-3') 消化后, 胶回收试剂盒纯化, 直接转化到 *E. coli* XL10-GOLD 感受态细胞中。PCR 介导定点突变的反应体系与饱和突变的反应体系相同, 反应条件为: 94℃ 30s, 62℃ 30s, 72℃ 6min, 25 个循环; 反应结束后用 *DpnI* (识别序列为 5'-G<sup>m</sup>ATC-3') 消化 PCR 产物中的模板, 1% 琼脂糖凝胶回收目的片段, 取 10 μl PCR 产物转化到 *E. coli* XL10-GOLD 感受态细胞中。

### 1.2.2 突变体鉴定、酶表达和产物纯化

对突变体的质粒 DNA 上包含突变位点的片段进行序列测定, 所有突变体都进行 2 次测序确认。经测序证明为突变子后, 转化到 *E. coli* BL21 宿主中进行表达。序列测定由鼎安测序公司完成。

酶表达是从 LB 氨苄平板上挑取单菌落, 接种到 5ml 含氨苄青霉素钠 (100 μg/ml) 的 LB 培养基中, 37℃ 220r/min 培养过夜。将上述种子液按照 1 : 100 比例接种至 100ml LB 培养基, 37℃ 220r/min 培养至  $OD_{600}$  为 0.6 左右, 加入 IPTG 使其终浓度为 1mmol/L 进行诱导表达, 继续培养 14h 后离心收集菌体。每 10g 菌体重悬于 50ml 破胞缓冲液: 50mmol/L pH 值 7.5 的磷酸钠缓冲液 (PBS), 超声波破胞, 4℃ 离心弃沉淀, 上清即为粗酶液, 测定其酶活力。粗酶液用镍柱亲和层析纯化 (除非特别标示, 所有的纯化步骤均在 4℃ 条件下进行), 镍柱用 10mmol/L 咪唑缓冲液平衡, 粗酶液上柱后用 100mmol/L 咪唑缓冲液洗涤去掉杂蛋白, 再用 250mmol/L 咪唑缓冲液洗脱 1 次, 收集酶蛋白峰。酶蛋白液浓缩后再过预先用 50mmol/L (pH 值 7.5) 的 PBS 平衡的 SephacrylS-300 凝胶柱去除咪唑, 用 250mmol/L (pH 值 7.5) 的 PBS 洗脱, 收集蛋白峰。将蛋白峰收集液进行 SDS-PAGE 电泳分析和酶活力测定。

### 1.2.3 海藻糖合成酶的酶活力测定和酶学性质研究

TreS 的酶活力测定参照文献 [9] 进行。在不同温度 (10℃, 16℃, 22℃, 27℃, 32℃, 37℃, 42℃, 46℃, 50℃, 55℃), 以及 30℃ 下不同 pH 值 (5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0, 8.5, 9.0) 50 mmol/L PBS 条件下, 将 TreS-glu, F244C, F242Y, F244L, F244W 和 A288G 分别与等体积含 5% 麦芽糖反应 30min, 100℃ 煮沸 5min 终止酶反应。麦芽糖的减少量通过 3, 5-

二硝基水杨酸法 (DNS) 测定, 把酶与底物反应混合物稀释适当倍数, 取 500 μl 稀释液与 375 μl 的 DNS 在沸水浴煮 5min, 冷却后加水 5.375ml 测定其吸光值  $OD_{520}$ 。空白对照以灭活的酶液与底物反应混合物。酶活力的测定重复 3 次, 取 3 次实验数据的平均值。酶活力定义为上述条件下 1min 转化一定量麦芽糖生成 1 μg 海藻糖所需酶量为 1U。

TreS 的  $K_m$  值测定参照文献 [10] 进行, 热稳定性 ( $T_m$ ) 测定的具体方法是将 TreS-glu, F244C, F242Y, F244L, F244W 和 A288G 在不同的温度 (30℃, 37℃, 42℃, 46℃, 50℃ 和 55℃) 下保温 30min 后冷却, 再在最适的温度下反应测定其残存活性 (以 4℃ 时的酶活力为 100%), 然后作温度活性曲线。蛋白质浓度的测定使用 Bradford 法 [11], 以牛血清白蛋白 (BSA) 为标准进行测定。

## 2 结果与分析

### 2.1 突变型海藻糖合成酶基因表达载体的构建

利用设计的突变引物, 以 pSE380-tres-gluhis 为模板, 反向 PCR 扩增, PCR 产物在 1.0% 的琼脂糖凝胶电泳分析结果 (图 1) 表明, 扩增片段约为 6.0kb, 与预期的结果相符。将突变子表达质粒直接转化到 *E. coli* XL10-GOLD 感受态细胞中, 经 IPTG 诱导后破胞测定酶活力。突变体序列测定证实得到的突变体与预期的结果相符, 并获得 9 个突变型海藻糖合成酶, 分别将其命名为: F244C, F244L, F244W, F244Y, A288G, R245X, E289X, D247N, D247E, 其中 5 个是有酶活的突变体, 分别是: F244C, F242Y, F244L, F244W 和 A288G。

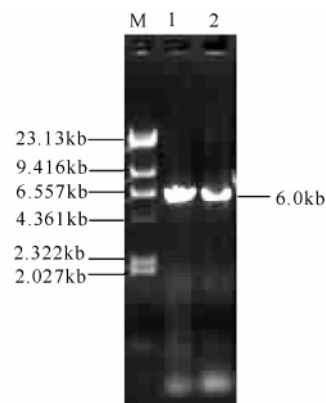


图 1 PCR 产物的琼脂糖凝胶电泳结果

Fig. 1 Agarose electrophoresis of amplifying the whole length of PCR products

M. DNA 标记, 1, 2. PCR 扩增产物。M. DNA marker, 1 and 2. Product of PCR amplification.

## 2.2 突变型海藻糖合成酶的表达和纯化

蒋获得有酶活的 5 个突变体 F244C、F242Y、F244L、F244W、A288G 转化到 *E. coli* BL21 进行表达。突变体酶粗酶液经镍柱亲和层析和 Sephacryl-300 柱层析纯化后,收集的酶蛋白的 SDS-PAGE 电泳结果显示单一条带(图 2),说明已经纯化到 1 条分子量约为 66kD 的均一目的蛋白条带,可以用于酶学性质研究。

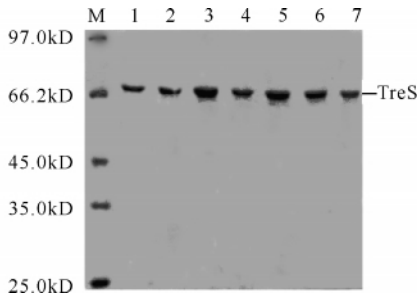


图 2 海藻糖合成酶与突变型海藻糖合成酶的 SDS-PAGE 电泳结果

Fig. 2 SDS-PAGE of purified enzyme of TreS-glu and mutants

M. 蛋白质分子量标记, 1. TreS-glu, 2. F244C, 3. F244Y, 4. F244L, 5. F244W, 6. A288G, 7. Sephacryl-300 柱层析纯化重组酶。M. Protein weight marker, 1. TreS-glu, 2. F244C, 3. F244Y, 4. F244L, 5. F244W, 6. A288G, 7. Recombinant enzyme purified on Sephacryl-300.

## 2.3 突变型海藻糖合成酶的酶学性质

### 2.3.1 酶活力和 $K_m$ 值

表 1 结果显示, R245、E289 突变为其它的 19 个氨基酸后, 酶活力全部丧失; D247 变为性质相似的谷氨酸和天冬酰胺后也丧失酶活力; F244 突变成 C244、L244、W244、Y244 后酶的比活力分别降低到 TreS-glu 的 2.6 倍、4.1 倍、1.6 倍、1.55 倍; A288 突变成 G288 后酶的比活力降低到 TreS-glu 的 2.8 倍; A288 变成 T288 则没有酶活力。与 TreS-glu 相比, 突变型海藻糖合成酶 F244C、F244W、A288G 的  $K_m$  值基本不变, F244L、F244Y 的  $K_m$  值提高了近 1 倍。

### 2.3.2 最适反应温度和最适反应 pH 值

与海藻糖合成酶相比, 突变型海藻糖合成酶 F244Y 的最适温度基本不变, 均为 27℃, 而 F244C、F244L、F244W 和 A288G 的最适温度提高到 32℃(图 3); 突变型海藻糖合成酶的最适 pH 值均有所下降, F244C、F244Y 和 A288G 的最适反应 pH 值为 7.5, 比海藻糖合成酶的 8.0 均下降了约 0.5 个单位, 而 F244L、F244W 的最适反应 pH 值为 6.5, 比海藻糖合成酶的 8.0 均下降了近 1.5 个单位(图 4)。

表 1 海藻糖合成酶与突变型海藻糖合成酶的酶学性质比较

Table 1 Comparison of the properties of trehalose synthase between TreS-glu and mutants

酶 Enzyme	粗酶酶活力 (U/ml) Activity of crude extract	纯化后比活力 Specific activity of purified enzyme (U/mg)	$K_m$ (mmol/L)
TreS-glu	783.47	80.87	19.77
F244C	785.85	30.66	15.70
F244L	377.49	19.61	34.05
F244W	308.64	50.48	24.17
F244Y	800.09	52.05	35.67
A288G	811.97	28.10	16.90
R245X	0	-	-
E289X	0	-	-
D247N	0	-	-
D247E	0	-	-

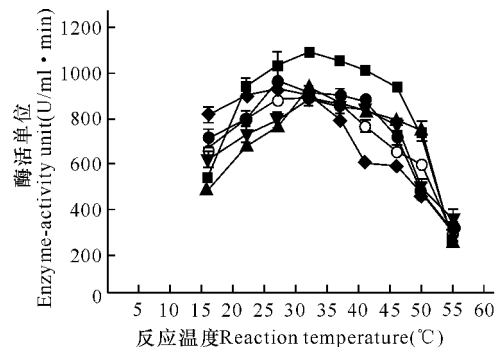


图 3 海藻糖合成酶与突变型海藻糖合成酶的最适反应温度

Fig. 3 Comparison of optimum temperature between TreS-glu and mutants

●: TreS-glu, ■: F244W, ▲: F244L, ▼: F244C, ◆: A288G, ○: F244Y.

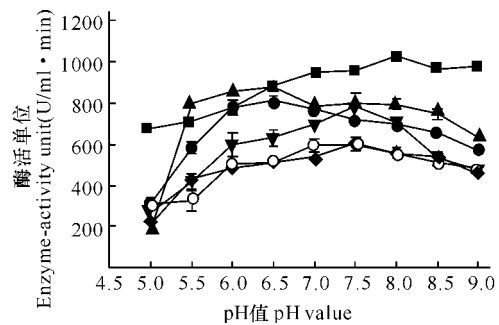


图 4 海藻糖合成酶与突变型海藻糖合成酶的最适反应 pH 值

Fig. 4 Comparison of optimum pH value between TreS-glu and mutants

●: F244L, ■: TreS-glu, ▲: F244W, ▼: A288G, ◆: F244Y, ○: F244C.

### 2.3.3 热稳定性

图 5 结果表明, 与海藻糖合成酶相比, 突变型海藻糖合成酶的热稳定性均有不同程度的提高, 其中 F244Y、F244W 和 A288G 的  $T_m$  值均为 47℃, 比海藻糖合成酶的提高约 1℃; F244L 为 48℃, 比海藻糖合成酶的提高约 2℃, 而 F244C 热稳定性提高了近 4℃。

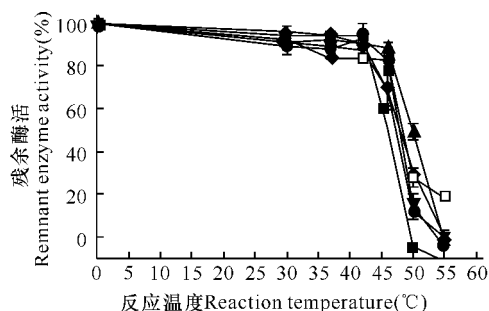


图5 海藻糖合成酶与突变型海藻糖合成酶的热稳定性比较

Fig. 5 Comparison of thermostability between TreS-glu and mutants

—●—: F244L, —■—: TreS-glu, —▲—: F244C, —▼—: F244W, —◆—: A288G, —□—: F244Y.

### 3 讨论

蛋白质的三维结构能为蛋白质的改造提供一个很好的基础。但是至今为止,我们并未知晓谷氨酸棒杆菌海藻糖合成酶(TreS-glu)的晶体结构。我们从本实验室构建的谷氨酸棒杆菌海藻糖合成酶的基因序列推出其氨基酸顺序,它与已知晶体结构的*Pseudomonas mesoacidophila* MX-45 菌株海藻酮糖合成酶(MutB)<sup>[12]</sup>的同源性为32.0%,符合同源建模的适用范围。因此,我们以MutB的晶体结构为模板,在SWISS-MODEL模建立TreS-glu的立体结构,并对其初始结构作能量优化。海藻酮糖合成酶是 $\alpha$ -淀粉酶家族13成员之一,具有典型的( $\beta/\alpha$ )<sub>8</sub>桶结构<sup>[13]</sup>。在所有的 $\alpha/\beta$ 桶结构中,活性部位均处于一个相似的位置,即位于由连接 $\beta$ 折叠链羧基端与 $\alpha$ 螺旋氨基端的8个环所构成的口袋底部中,而参与结合和催化的残基在这些环区(loop)中<sup>[14]</sup>。结合分析不同来源的TreS-glu保守区,我们选择2个保守位点的位点:R245、E289进行饱和突变,结果显示,它们分别突变成其它的19个氨基酸后全部均丧失了酶活力,说明这2个氨基酸残基是TreS-glu的关键性残基,这些氨基酸有可能参与了底物的结合或催化。从MutB的晶体结构中,D200、E254(TreS-glu对应的位点分别为D247、E289)是活性部位之一,R198(TreS-glu对应的位点为R245)决定着催化残基的方向和活性位点的稳定性<sup>[15]</sup>,这有可能是位点R245突变后酶活丧失的原因之一。后来,我们又选择了与其相邻的氨基酸F244、A288进行定点突变。结果表明,这些突变酶活力普遍下降,这可能是突变影响了酶活性中心局部的构象,使酶的活性发生了明显的改变。而突变体A288T丧失酶活性很可能是使非极性氨基酸变成极性氨基酸后,使蛋白质的疏水作用减弱,降低了酶的

稳定性,从而导致酶的活性丧失。因此,通过分析和研究这些突变酶的性质变化,可以为今后研究海藻糖合成酶的结构和功能的关系提供有用的数据和信息,为进一步对海藻糖合成酶的分子改造提供理论依据。

参考文献:

- [1] Elbein A D, Pan Y, Pastuszek I, et al. New insights on trehalose: a multifunctional molecule [J]. *Glycobiology*, 2003, 13(4): 17-27.
- [2] Koh S K, Shin H J, Kim J S, et al. Trehalose synthesis from maltose by a thermostable trehalose synthase from *Thermus caldophilus* [J]. *Biotechnology Letters*, 1998, 20(8): 757-761.
- [3] Roser B. Trehalose: a new approach to premium dried foods [J]. *Trends in Food Science & Technology*, 1991, 7(2): 166-169.
- [4] Maruta K, Nakada T, Kubota M, et al. Formation of trehalose from maltooligosaccharides by a novel enzymatic system [J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 1995, 59(10): 1829-1834.
- [5] Paiva C L, Panek A D. Biotechnological applications of the disaccharide trehalose [J]. *Biotechnol Annu Rev*, 1996(2): 293-314.
- [6] Guo N, Puhlev I, Brown D R, et al. Trehalose expression confers desiccation tolerance on human cells [J]. *Nat Biotechnol*, 2000, 18(2): 168-171.
- [7] 韦宇拓, 朱绮霞, 罗兆飞, 等. 谷氨酸棒杆菌海藻糖合成酶基因的克隆及功能鉴定 [J]. *工业微生物*, 2005, 35(2): 1-6.
- [8] 萨姆布鲁克 J, 弗里奇 E F, 曼尼阿蒂斯 T. 分子克隆实验指南 [M]. 第2版. 金冬雁, 译. 北京: 科学出版社, 2002: 1-296.
- [9] Miller G L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar [J]. *Anal Chem*, 1959, 31(3): 426-428.
- [10] 颜思旭, 蔡红玉. 酶催化动力学原理与方法 [M]. 厦门: 厦门大学出版社, 1987: 29-46.
- [11] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding [J]. *Anal Biochem*, 1976, 72(1-2): 248-254.
- [12] Ding D F, Tang H X, Zhang B H. Protein homology modeling system and its evaluation [J]. *Acta Biophysica Sinica*, 1995, 11: 416-428.
- [13] Feese M D, Kato Y, Tamada T, et al. Crystal structure of glycosyltrehalose trehalohydrolase from the hyperthermophilic archaeum *Sulfolobus solfataricus* [J]. *J Mol Biol*, 2000, 301(2): 451-464.
- [14] 卡尔·布兰登, 约翰·图兹. 蛋白质结构导论 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2005: 42-43.
- [15] Ravaut S, Robert X, Watzlawick H. Trehalulose synthase native and carbohydrate complexed structures provide insights into sucrose isomerization [J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2007, 282(38): 28126-28136.

(责任编辑: 邓大玉)