

极端嗜热菌 *Thermus thermophilus* HB8 中天冬氨酸转氨酶在大肠杆菌中的表达、纯化及酶学性质研究

Expression , Purification and Enzymatic Characterization of *Thermus thermophilus* HB8 Aspartate Aminotransferase in *Escherichia coli*

周 华 , 洪 媛 , 严 明 , 许 琳 *

ZHOU Hua , HONG Yuan , YAN Ming and XU Lin *

南京工业大学制药与生命科学学院 , 南京 210009

College of Life Science and Pharmacy , Nanjing University of Technology , Nanjing 210009 , China

摘 要 为获得具有热稳定性的天冬氨酸转氨酶 , 从极端嗜热细菌 *Thermus thermophilus* HB8 中克隆得到天冬氨酸转氨酶基因 *aspC* , 并在大肠杆菌 BL21(DE3) 和 Rosetta(DE3) 中进行表达 , 发现在 Rosetta(DE3) 中具有较高的表达量。重组酶的最适反应 pH 是 7.0 , 37 °C 下在 pH8 ~ 10 的缓冲液中保温 1 h 酶活几乎不改变。重组酶反应的最适温度为 75 °C , 酶活稳定的温度范围为 25 ~ 55 °C。重组酶在 65 °C 时半衰期为 3.5 h , 75 °C 时为 2.5 h。重组酶的 K_m^{KG} 为 7.559 mmol/L , V_{max}^{KG} 为 0.086 mmol(L · min) , K_m^{Asp} 为 2.031 mmol/L , V_{max}^{Asp} 为 0.024 mmol(L · min)。 Ca^{2+} 、 Fe^{3+} 、 Mn^{2+} 等金属离子对酶活性有微弱抑制作用。

关键词 天冬氨酸转氨酶 , *Thermus thermophilus* HB8 , 表达 , 纯化 , 酶学性质

中图分类号 Q814 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2007)02-0278-06

Abstract To obtain thermostable aspartate aminotransferase , the gene *aspC* from an extremely thermophilic bacterium , *Thermus thermophilus* HB8 was cloned , and its product was overexpressed in *Escherichia coli* BL21(DE3) and Rosetta(DE3). The expression in Rosetta(DE3) was more efficient. The optimum reactive pH was 7 , and the recombinant enzyme activity changed little when incubated in the buffer of pH8 ~ 10 on 37 °C for 1 h. The optimum reactive temprature was 75 °C , and the recombinant enzyme was more stable on the temperature of 25 ~ 55 °C . The half life of recombinant enzyme on 65 °C was 3.5 h , on 75 °C was 2.5 h. K_m^{KG} was 7.559 mmol/L , V_{max}^{KG} was 0.086 mmol(L · min) , K_m^{Asp} was 2.031 mmol/L , V_{max}^{Asp} was 0.024 mmol(L · min) . Ca^{2+} , Fe^{3+} , Mn^{2+} inhibited enzyme activity softly.

Key words aspartate aminotransferase , *Thermus thermophilus* HB8 , expression , purification , characterization

天冬氨酸转氨酶(aspartate aminotransferase , E. C. 2.6.1.1 , 以下简称 AspAT) 又称谷草转氨酶 , 广泛存在于动物、植物和微生物体内 , 在细胞的氮、碳代谢

过程中起到非常重要的催化作用。它以磷酸吡哆醛(pyridoxal phosphate , PLP) 为辅酶 , 催化双羧氨基酸和 α -酮酸两者间的可逆反应^[1]。目前 , 原核和真核

Received : October 13 , 2006 ; Accepted : November 15 , 2006 .

This work was supported by the grants from the National Basic Research Program(No.2003CB716004) and the National Natural Science Foundation of China (No.20336010) .

* Corresponding author. Tel : + 86-25-83587694 ; E-mail : xulin@njut.edu.cn

国家 973 项目(No.2003CB716004) 和 国家 自然科学基金 重点 基金 项目(No.20336010) 资助。

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

细胞内的 AspAT 得到了广泛研究,其中研究最为彻底的是大肠杆菌体内的 AspAT,已得到了完整的酶蛋白氨基酸序列和晶体结构^[2,3]。

极端嗜热菌 *Thermus thermophilus* HB8 (*T. thermophilus* HB8) 为革兰氏阴性棒状细菌,能在 50~82℃ 下需氧生长,最适生长温度为 75℃^[5]。*T. thermophilus* HB8 中的 AspAT 与来源于 *Bacillus* sp. YM-2^[6,7]、*Sulfolobus solfataricus*^[8-11] 和 *Rhizobium meliloti* 等嗜热菌的 AspAT 同属于转氨酶家族的 subgroup Ib^[5-11]。已报道的嗜热菌中的 AspAT 都对高温有较好的耐受能力,能在 70℃ 以上的高温下保持一定的稳定性及活性。此外,这一类酶对酸碱环境的耐受性也较好,在较大 pH 范围内 (pH6~11) 都具有较高的酶活力^[6]。

国内利用大肠杆菌 AspAT 开展了酶法制备具有较高经济价值氨基酸(如 L-苯丙氨酸等)的研究,显示了良好的工业应用前景^[4]。为进一步提高底物的转化能力,人们希望通过提高反应温度来加快反应速度或提高难溶底物的浓度,而大肠杆菌 AspAT 的热稳定性不足以满足上述要求。目前提高酶的热稳定性的方法主要为利用酶工程技术对酶进行改造,或利用基因工程技术从嗜热菌中获得目的基因^[14,15]。嗜热菌来源的 AspAT 凭借其热稳定性上的优势,有望成为工业生产中的主要酶源。Okamoto 等^[5,12,13] 曾对 *T. thermophilus* HB8 中的 *aspC* 进行克隆和表达,但表达量不高,而国内对嗜热天冬氨酸转氨酶的研究尚未见报道。为了获得高产且具有较高热稳定性的 AspAT,本文对 *T. thermophilus* HB8 中的 *aspC* 进行了克隆,采用带有 T7 强启动子的 pET 系列表达载体,在大肠杆菌宿主菌 Rosetta(DE3) 中实现了高效表达,并对重组酶进行了纯化以及酶学性质方面的研究。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种和质粒: *T. thermophilus* HB8 购自德国生物材料资源中心,编号 DSMZ579。大肠杆菌 Rosetta(DE3)、BL21(DE3) 和 DH5 α 为本实验室保存。质粒 T-vector 购自 Promega 公司,pET22b(+) 购自 Novagen 公司。

1.1.2 主要试剂: 限制性内切酶 *Nco* I、*Not* I 和 *Nde* I 购自 NEB 公司,*Xho* I 购自宝灵曼公司,PCR 反应试剂盒购自 BD Biosciences Clontech 公司,T4 DNA 连接酶试剂盒购自 Promega 公司,DNA marker、

胶回收试剂盒、DNA 片段回收试剂盒购自 TaKaRa 公司,质粒提取试剂盒购自上海申能博采生物有限公司,Protein Marker 购自晶美生物工程有限公司。其他生化试剂均为国产分析纯。

1.1.3 培养基: LB 培养基(1% NaCl,1% 蛋白胨,0.5% 酵母膏)。氨苄青霉素和氯霉素终浓度均为 100mmol/L。

1.2 方法

1.2.1 基因组 DNA 的提取: 采用上海华舜生物工程有限公司的基因组提取试剂盒提取 *T. thermophilus* HB8 的基因组。

1.2.2 *aspC* 基因的扩增: 参照由 GenBank 数据库中查到的基因序列,设计如下 PCR 引物:

正向 5'-CCCGCGTATACTTAGGCCATGCGCGGC C-3'

反向 5'-CCAGGAAAACCCCGGCTAGGCGCGCC-3'

引物由上海博亚公司合成。以基因组 DNA 为模板,PCR 扩增天冬氨酸转氨酶基因 *aspC*。PCR 循环参数为:94℃ 3min;94℃ 30s 70℃ 2.5min (30cycle) 68℃ 7min 4℃ ∞ 。将 PCR 产物回收后连接到 T-easy vector 上,构建质粒 T-easy-*aspC*。连接液转化 DH5 α 细胞,用限制性内切酶 *Nco* I 对阳性克隆进行酶切鉴定。质粒送上海博亚公司测序。

1.2.3 重组表达载体的构建: 设计带有酶切位点的引物,从质粒 T-easy-*aspC* 上 PCR 扩增 *aspC* 基因,用限制性内切酶 *Nde* I 和 *Not* I 对 PCR 产物及载体 pET22b(+) 进行双酶切,对酶切产物分别回收后进行连接,构建 pET22b-*aspC* 重组质粒。连接液转化 DH5 α 细胞,用限制性内切酶 *Xho* I 对阳性克隆进行酶切鉴定。

1.2.4 重组天冬氨酸转氨酶在大肠杆菌中的诱导表达: 考虑到 *T. thermophilus* HB8 的基因序列含有较多稀有密码子,故同时在常用宿主大肠杆菌 BL21(DE3) 和可表达多种稀有密码子 tRNA 的宿主菌 Rosetta(DE3) 中进行表达。

将隔夜培养的菌种以 2% 的接种量接入新鲜 LB 液体培养基中,37℃ 200r/min 培养至 OD_{600} 达到 0.6 左右。加入 IPTG 至终浓度为 1.0mmol/L,30℃、200 r/min 诱导培养 6 h。

1.2.5 粗酶液的制备: 将菌泥用 Tris-HCl 缓冲液 (50mmol/L Tris,pH8.0) 清洗后离心,去上清后将菌泥重新悬浮于缓冲液 (50mmol/L Tris,50mmol/L 葡萄糖,10mmol/L EDTA,pH8.0) 中进行超声破碎。破碎条件为 3s/5s (超声时间/间歇时间),超声全程时间至溶液变澄清。离心,将上清(粗酶液)与沉淀

分离,分别进行 SDS-PAGE 分析。将粗酶液在 70 °C 下加热 20min 后进行酶活测定,以消除宿主菌中 AspAT 对酶活测定的影响。

1.2.6 重组天冬氨酸转氨酶的纯化:将粗酶液在 80 °C 下加热 20min,离心去除大部分杂蛋白。用 Tris-HCl 缓冲液(50mmol/L Tris, pH8.0)平衡 Source 15Q 强阴离子柱(AKTA FPLC)后进样,洗脱缓冲液含 0.5mol/L NaCl,50mmol/L Tris-HCl, pH8.0。流速为 1mL/min,洗脱梯度为 75min 内从 0% 到 30%。纯化后的样品经脱盐后置于 -20 °C 冷冻保存备用。

1.2.7 重组天冬氨酸转氨酶的酶学性质研究:酶学性质研究中所用酶液均为纯化后的酶液,所涉及反应液的成分均为:200mmol/L L-天冬氨酸(L-Asp), 20mmol/L α -酮戊二酸(α -KG), 0.1mmol/L PLP, 1mmol/L EDTA, 50mmol/L Tris·HCl 和氨水调至所需 pH。

(1)最适 pH 及 pH 稳定性:配制 pH5 ~ 10 的反应液,37 °C 下将酶液分别与不同 pH 的反应液混合,测定重组酶在不同 pH 反应体系中的活力,观察 pH 对酶反应的影响。参考文献[6]配制 pH3 ~ 12 缓冲液,在不同 pH 缓冲液中加入一定量的酶液,37 °C 下保温 1h,测定剩余酶活,观察该酶在不同 pH 条件下的稳定性。

(2)最适温度及温度稳定性:采用 pH7.0 反应液,在不同温度下测定酶活,研究温度对酶反应的影响。将酶液置于不同温度下保温 1h,测定剩余酶活,研究该酶在不同温度下的稳定性。

(3)动力学常数的测定:配制不同浓度的底物溶液(pH 7.0),分别与酶液在 37 °C 下反应,采用双倒数作图法确定 K_m 及 V_{max} 的值。

(4)不同金属离子对酶活性的影响:在反应液中分别加入终浓度为 2mmol/L 的 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Fe^{2+} 、 Fe^{3+} 、 Li^{2+} 、 Co^{2+} 、 Cr^{2+} 、 Ni^{2+} , 37 °C 下测定酶活,研究不同金属离子对酶活性的影响。

1.2.8 酶活测定方法:采用偶联苹果酸脱氢酶的双酶偶联方法,通过测定 340nm 下反应体系中吸光度的减少来测定反应体系中 NADH 的减少速率^[16]。

将酶液与 165u/mL 苹果酸脱氢酶、26mmol/L NADH 以体积比为 8:1:1 的比例混合制成混合酶液,取 10 μ L 混合酶液与 100 μ L 反应液在 96 孔微孔板上混匀后反应 4min,用 BIO-TEK PowerWave XS 酶标仪测定 340nm 下吸光度的变化。

在最适温度与温度稳定性的实验中,考虑到温度对反应体系中苹果酸脱氢酶的影响,对测定方法

进行修改。将重组酶液与反应液混合后放入不同温度中分别反应 0min、2min、4min,迅速冰浴终止反应。分别取 108 μ L 反应产物溶液与 1 μ L 苹果酸脱氢酶和 1 μ L NADH 混合,37 °C 下于酶标仪中测定吸光度的变化,以不同时间内 NADH 浓度的差值计算酶活。

酶活定义为每分钟内消耗 1 μ mol NADH 所需要的酶量。

1.2.9 蛋白浓度测定方法:采用 Bradford 法,以 BSA (小牛血清白蛋白)为标准^[17]。

2 结果与分析

2.1 *aspC* 基因的扩增、测序与重组表达载体的构建

通过 PCR 方法从 *T. thermophilus* HB8 基因组中扩增得到了大小约为 1.2kb 的基因片段(见图 1)。经测序,该片段序列与文献报道的 *aspC* 基因序列一致,全长为 1158bp。

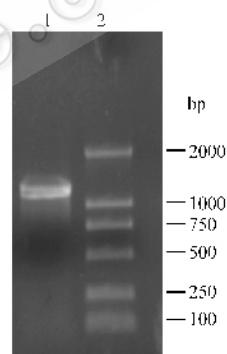


图 1 *aspC* 的 PCR 扩增结果

Fig. 1 PCR product

1: *aspC* gene; 2: Δ L 2000.

构建得到的重组质粒经限制性内切酶 *Xho* I 酶切后得到了大小约为 600bp 的小片段,说明目的基因已成功连接在载体上。重组质粒 pET22b-*aspC* 构建图参见图 2。

2.2 *aspC* 基因在不同宿主菌中的表达

将重组质粒 pET22b-*aspC* 分别转化 BL21(DE3) 和 Rosetta(DE3),重组菌 *aspC*-BL21 和 *aspC*-Rosetta 在同样条件下进行诱导表达。实验表明,重组酶 tAspAT 在两种宿主中均得到了表达。根据 SDS-PAGE 的结果(图 3)估计目的蛋白的分子量约 42 kD,与文献报道一致。从图中也可以看出目的蛋白在两种宿主中的表达量差异明显,在 Rosetta 中的表达量明显多于在 BL21 中的表达量。

重组酶 tAspAT 的酶活测定结果同时说明 *aspC* 在 Rosetta 中的表达情况较好,粗酶液中的比

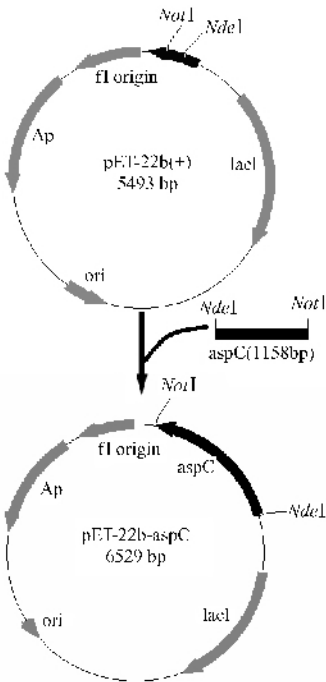


图 2 重组质粒 pET22b-*aspC* 的构建图谱

Fig.2 Physical map of recombinant plasmid pET22b-*aspC*

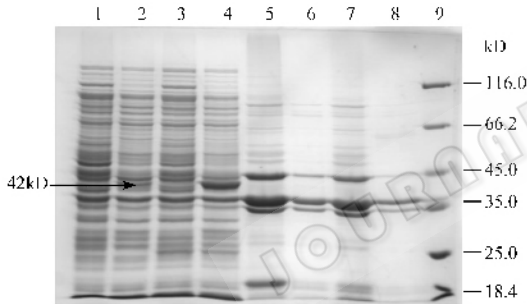


图 3 *E. coli* BL21(DE3)和 Rosetta(DE3)
中 tAspAT 表达结果的 SDS-PAGE 分析

Fig.3 SDS-PAGE analysis of tAspAT expressed in
E. coli BL21(DE3) and Rosetta(DE3)

1 ~ 4 :supernatant of BL21(DE3),*aspC*-BL21 ,Rosetta(DE3),*aspC*-
Rosetta ,respectively ; 5 ~ 8 :precipitation of BL21(DE3) ,*aspC*-BL21 ,
Rosetta(DE3) ,*aspC*-Rosetta , respectively ; 9 :protein marker .

酶活可达到 72.4u/mg ,为 BL21 中所表达重组酶的 2.6 倍。由于 Rosetta(DE3)中的表达效果较好 ,因此之后的纯化及酶学性质研究均采用 Rosetta(DE3)为宿主菌进行表达。

2.3 重组天冬氨酸转氨酶的纯化

纯化后的重组酶 tAspAT 的 SDS-PAGE 分析结果见图 4 ,可看出经过两步纯化之后已得到电泳纯的重组酶。

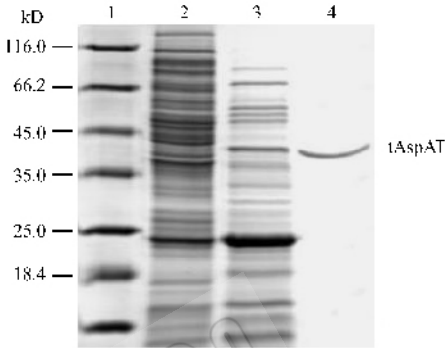


图 4 tAspAT 纯化结果的 SDS-PAGE 分析

Fig.4 SDS-PAGE analysis of tAspAT purification

1 :protein marker ; 2 : crude extract ; 3 : after heated treatment ; 4 :after
source 15Q .

纯化步骤及纯化效率的计算结果见表 1。纯化后酶液比酶活达到 810.6u/mg ,而文献中仅有 112.1u/mg ,说明在 Rosetta(DE3)中实现了 tAspAT 的高效表达。

2.4 重组天冬氨酸转氨酶的酶学性质

2.4.1 最适 pH 及 pH 稳定性 :重组酶在 pH7 的条件下反应活性最高(图 5)。酶对 pH 的耐受范围较广 ,在 pH3 ~ 12 的环境中均能保持 50% 以上的酶活力 ,在 pH9 的缓冲液中较稳定 ,保温 1h 后仍能保有 96% 的酶活力(以保温前测得的比酶活为对照) (图 6)。

表 1 tAspAT 的纯化

Table 1 Purification of recombinant tAspAT

Step	Total protein/mg	Total activity/u	Specific activity/(u/mg)	Yield/ %	Purification(fold)
Crude extract	57.1	1819.0	31.8	100	1
Heat treatment	6.6	1535.1	231.2	84	7
Source 15Q	1.7	1399.1	810.6	77	25

2.4.2 最适温度及温度稳定性 :酶反应的最适温度为 75 ℃ ,随着温度的升高 ,反应活性迅速下降(图 7)。重组酶在 25 ~ 55℃ 下较稳定 ,随着温度的升

高 ,稳定性逐渐下降 ,85℃ 以上酶迅速失活(图 8)。65℃ 下酶的半衰期为 3.5h ,75℃ 下酶的半衰期为 2.5h ,80℃ 下加热 40min 保有 80% 酶活。

2.4.3 动力学常数的测定 :37℃下,测得重组酶对α-KG 和 L-Asp 的 K_m 和 V_{max} 分别为: K_m^{KG} 为 7.559mmol/L, V_{max}^{KG} 为 0.086mmol(L·min), K_m^{Asp} 为 2.031mmol/L, V_{max}^{Asp} 为 0.024mmol(L·min)。可看出该酶对 L-Asp 的亲合力高于 α-KG ,这与文献报道一

致,但所得动力学常数与文献报道有差异^[5]。
2.4.4 金属离子对酶活性的影响 :反应体系中金属离子的存在对酶活性的影响见表 2 ,以不加离子的酶液为对照。可看出大多数金属离子对酶活影响不大, Ca^{2+} 、 Fe^{3+} 、 Mn^{2+} 对酶活有微弱抑制作用。

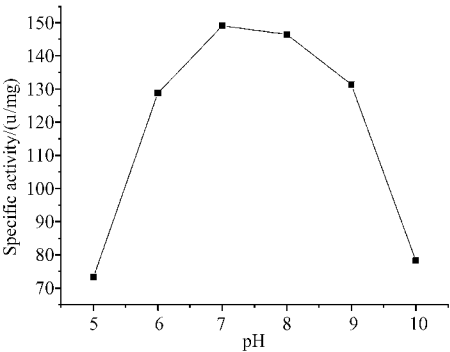


图 5 pH 对 tAspAT 酶活力的影响
Fig.5 Effect of pH on the activity of tAspAT

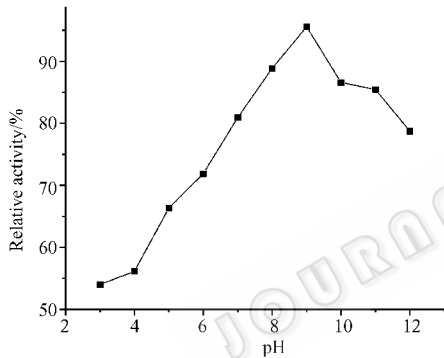


图 6 tAspAT 在不同 pH 下的稳定性
Fig.6 Stability of tAspAT on different pH

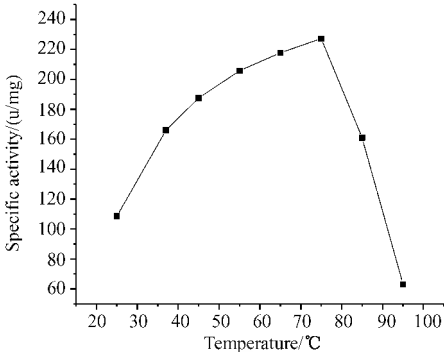


图 7 温度对 tAspAT 酶活力的影响
Fig.7 Effect of temperature on the activity of tAspAT

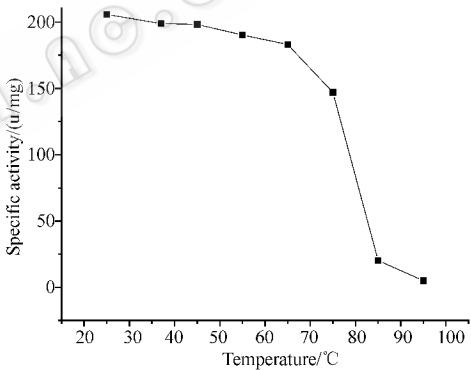


图 8 tAspAT 在不同温度下的稳定性
Fig.8 Stability of tAspAT on different temperature

表 2 金属离子对酶活性的影响

Table 2 Effect of metal ion on the activity of tAspAT												
Ion	Ca ²⁺	Fe ³⁺	Ni ²⁺	Cu ²⁺	Mg ²⁺	Mn ²⁺	Fe ²⁺	Zn ²⁺	Li ²⁺	Cr ²⁺	Co ²⁺	raw
Relative activity/%	74.3	82.9	97.1	100.0	91.4	80.0	88.6	94.3	97.1	100.0	97.1	100.0

3 讨论

本实验对 *T. thermophilus* HB8 中的天冬氨酸转氨酶基因 *aspC* 在宿主菌 Rosetta(DE3)中实现了高效表达,粗酶液比酶活为常用宿主 BL21(DE3)中所表达得到的重组酶的 2.6 倍。由于酶具有较好的热稳定性,本实验对纯化步骤进行了简化,通过热处理除去大量杂蛋白,仅通过一步离子交换即达到电泳纯,这对该酶的实际应用有一定的价值。

纯化后的 AspAT 比酶活达到 810.6u/mg,未见有

野生菌 *T. thermophilus* HB8 AspAT 酶活力的报道。有文献报道利用工程菌表达所得重组酶 AspAT 纯化后比酶活仅为 112.1u/mg^[5],而大肠杆菌中该酶的比酶活为 200.0u/mg^[19]。高表达带来的高活力使得在该酶的实际应用中,不需要大量培养菌体便可以获得较高的底物转化效率,反应时间也可以相应缩短,简化了生产过程。此外由于表达量高,稳定性好,可以一次获得大量目的蛋白,有效简化了纯化过程,使该酶在工业催化上具有较好的应用前景。

通过实验研究发现,AspAT 与其他嗜热酶一样,

在高温下可保持较好的稳定性,55℃下保温1h酶活无丧失,75℃时半衰期约2.5h。而大肠杆菌 AspAT 在49℃下已开始失活^[5],62℃下快速失活^[18]。tAspAT 的最适反应温度为75℃,与 *T. thermophilus* HB8 的最适生长温度一致。这一温度比大肠杆菌 AspAT 的最适温度高出约20℃^[18]。

tAspAT 在 pH3~12 的环境中保温1h 均能保持50%以上的酶活力,在 pH7~9 的范围内能表现出最大酶活,且稳定性高,比大肠杆菌 AspAT 的最适 pH 偏酸且范围宽。tAspAT 在偏碱性环境中酶活较高且稳定的性质有利于其实际应用,如转氨反应底物之一 L-Asp 溶解度偏低,偏碱性环境有利于提高其溶解度,这对加快反应速度来说是很有利的。此外,tAspAT 对多数金属离子不敏感,也有利于 tAspAT 在离子环境复杂的实际反应体系中的应用。故 tAspAT 有望替代大肠杆菌 AspAT 成为工业用酶的新来源。

REFERENCES(参考文献)

- [1] Christen P, Metzler DE. Transaminases. ed. New York: John Wiley & Sons, Inc, 1985.
- [2] Jaeger J, Moser M, Sauder U, et al. Crystal structures of *Escherichia coli* aspartate aminotransferase in two conformations. Comparison of an unliganded open and two liganded closed forms. *J Mol Biol*, 1994, **239**: 285–305.
- [3] Okamoto A, Higuchi T, Hirotsu K, et al. X-ray crystallographic study of pyridoxal-5-phosphatetype aspartate aminotransferases from *Escherichia coli* in open and closed form. *J Biochem*, 1994, **116**: 95–107.
- [4] Pan GL(潘光亮), Li YR(李越人), Ma WJ(马伟军), et al. Research on aspartate transaminase reaction and preparation of L-phenylalanine in BSTR and PFR reactors. *Journal of Nanjing University of Chemical Technology*(南京工业大学学报), 1996, **16**: 21–24.
- [5] Okamoto A, Kato R, Masui R, et al. An aspartate aminotransferase from an extremely thermophilic bacterium, *Thermus thermophilus* HB8. *J Biochem*, 1996, **119**: 135–144.
- [6] Moon-Hee Sung, Katsuyuki Tanizawa, Hidehiko Tanaka, et al. Purification and characterization of thermostable aspartate aminotransferase from a thermophilic *Bacillus* Species. *Journal of Bacteriology*, 1990, **172**(3): 1345–1351.
- [7] Moon-Hee Sung, Katsuyuki Tanizawa, Hidehiko Tanaka, et al. Thermostable aspartate aminotransferase from a thermophilic *Bacillus* species: Gene cloning, sequence determination, and preliminary X-ray characterization. *The Journal of Biological Chemistry*, 1991, **266**(4): 2567–2572.
- [8] Maria Vittoria Cubells, Carla Rozzo, Gianpaolo Nitti, et al. Cloning and sequencing of the gene coding for aspartate aminotransferase from the thermoacidophilic archaeobacterium *Sulfolobus solfataricus*. *Eur J Biochem*, 1989, **186**: 375–381.
- [9] Gennaro Marino, Gianpaolo Nitti, Maria Immacolata Amone, et al. Purification and characterization of aspartate aminotransferase from the thermoacidophilic archaeobacterium *Sulfolobus solfataricus*. *The Journal of Biological Chemistry*, 1988, **263**(25): 12305–12309.
- [10] Francesca Zappacosta, Giovanni Sannia, Luc-Alain Savoy, et al. Post-translational modifications in aspartate aminotransferase from *Sulfolobus solfataricus*. *Eur J Biochem*, 1994, **222**: 761–767.
- [11] Amone M J, Birolo L, Pascarella S, et al. Stability of aspartate aminotransferase from *Sulfolobus solfataricus*. *Protein Engineering*, 1997, **10**(3): 237–248.
- [12] Yuko Nobe, Shin-ichi Kawaguchi, Hideaki Ura, et al. The novel substrate recognition mechanism utilized by aspartate aminotransferase of the extreme thermophile *Thermus thermophilus* HB8. *The Journal of Biological Chemistry*, 1998, **273**(45): 29554–29564.
- [13] Tadashi Nakai, Kengo Okada, Shohei Akutsu, et al. Structure of *Thermus thermophilus* HB8 aspartate aminotransferase and its complex with maleate. *Biochemistry*, 1999, **38**: 2413–2424.
- [14] Wang B(王柏婧), Feng Y(冯雁), Wang SY(王师钰), et al. Characteristics and application of thermophilic enzymes. *Acta Microbiologica Sinica*(微生物学报), 2002, **42**(2): 259–262.
- [15] Li SX(李淑彬), Lu GX(陆广欣), Lin RM(林如妹), et al. Thermophiles bacteria as a source of novel enzymes for industrial application. *China Biotechnology*(中国生物工程杂志), 2003, **23**(7): 67–71.
- [16] Arthur Karmen, Felix Wroblewski, John S Ladue. A note on the spectrophotometric assay of glutamate-oxalacetate transaminase in human blood serum. *J Clin Invest*, 1955, **34**: 131–133.
- [17] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye-binding. *Anal Biochem*, 1976, **72**: 5848–5853.
- [18] Leila Birolo, Luisa Tutino M, Bianca Fontanella, et al. Aspartate aminotransferase from the Antarctic bacterium *Pseudoalteromonas haloplanktis* TAC 125. Cloning, expression, properties, and molecular modelling. *Eur J Biochem*, 2000, **267**: 2790–2802.
- [19] Yagi T, Kagamiyama H, Nozaki M. Glutamate-aspartate transaminase from microorganisms. *Methods Enzymol*, 1985, **113**: 83–90.