

全细胞高通量筛选 α -氨基酸酯水解酶突变体的方法

叶丽娟^{1,2} 王佳珉² 王轲^{1,2} 曹毅^{1*}

(1. 四川大学 生命科学院 四川 成都 610064)

(2. 中国医药集团总公司 四川抗菌素工业研究所 四川 成都 610052)

摘要: 【目的】建立高效敏感的高通量筛选方法,用于筛选头孢克洛合成活性提高或热稳定性提高的 α -氨基酸酯水解酶。【方法】根据头孢克洛在碱性条件下水解生成的衍生物在 340 nm 处有特征吸收峰的原理,制作出标准曲线。采用全细胞 96 孔板紫外分光光度法高通量测定 α -氨基酸酯水解酶突变体的头孢克洛合成活性。【结果】头孢克洛含量与 $\Delta A_{340-405}$ 在 $(0.1-0.6) \times 10^{-3}$ mol/L 浓度范围内有良好的线性关系,服从朗伯-比尔定律,平均回收率为 99.8%–101.3%。一轮定点饱和突变产生的 2 300 个克隆经该方法的筛选,获得 3 株 k_{cat} 提高 40% 以上,4 株半失活温度较野生型提高 5 °C 以上的突变体酶。【结论】该方法准确可靠,每天筛选量可达到 2 000 个反应,达到高通量筛选的要求。

关键词: α -氨基酸酯水解酶, 头孢克洛, 紫外分光光度法, 全细胞高通量筛选, 定向进化

Cell-based high throughput screening of α -amino acid ester hydrolase variants

YE Li-Juan^{1,2} WANG Jia-Min² WANG Lu^{1,2} CAO Yi^{1*}

(1. College of Bioscience, Sichuan University, Chengdu, Sichuan 610064, China)

(2. China National Pharmaceutical Group Sichuan Industrial Institute of Antibiotics, Chengdu, Sichuan 610052, China)

基金项目: “十二五”重大新药创制科技重大专项项目(No. 2011ZX09401-403); 四川省国际科技合作与交流研究计划项目(No. 2010HH0036); 成都市科技计划项目(No. 10GGYB297SW-182)

*通讯作者: Tel: 86-28-85412842; 邮箱: caoyi_01@163.com

收稿日期: 2011-08-20; 接受日期: 2011-11-21

Abstract: [Objective] The study aimed to develop an efficient and sensitive high-throughput method to obtain alpha-amino acid ester hydrolase (AEH) with improved activity or thermostability. **[Methods]** Standard curve was made based on the fact that hydrolysis of cefaclor in alkaline buffer yields a derivate which has specific absorbance at 340 nm. Whole cell-based ultra-violet spectrophotometric method was applied to screen the cefaclor synthesis activity of AEH variants at a high-throughput scale. **[Results]** Beer's Law is obeyed in the range of $(0.1-0.6) \times 10^{-3}$ mol/L cefaclor. The average recovery is 99.8%–101.3%. 2 300 Clones obtained by one round of site-directed saturated mutagenesis were screened by this method. Three variants with more than 1.4-fold k_{cat} and 4 variants with T_{50} 5 °C more than wild type were obtained. **[Conclusion]** The screening method was precise and reliable. The screen capacity can be up to 2 000 samples per day, which was in the scale of high-throughput screening.

Keywords: Alpha-amino acid ester hydrolase, Cefaclor, Ultra-violet spectrophotometry, Cell-based high throughput screening, Directed evolution

β -内酰胺类抗生素(包括青霉素类和头孢霉素类抗生素)是抗微生物感染的主要用药,是全球医药领域销售额最大的品种之一。2009 年年产量超过 30 000 t, 占全部抗生素的 60%^[1]。大部分 β -内酰胺抗生素都是通过取代几种天然抗生素如: 青霉素 G、青霉素 V、头孢菌素 C 的酰基侧链衍生而成。反应最初通过化学法实现, 酶法生产 β -内酰胺中间体及抗生素具有更高的能效和更低的碳排放量, 因此越来越受到重视。

来源于大肠杆菌的青霉素酰化酶(EC 3.5.1.11)是酶法生产 β -内酰胺抗生素的先驱^[2]。它能催化青霉素 G 水解, 得到苯乙酸侧链和母核 6-氨基青霉烷酸(6-Aminopenicillanic acid, 6-APA), 也能催化酰基侧链连接到 6-APA 或其他母核上。然而, 产物苯乙酸强烈抑制青霉素酰化酶的活性^[3], 因此在催化合成衍生 β -内酰胺抗生素之前, 需要添加一步去除 6-APA 中残留苯乙酸的工艺。另外, 青霉素酰化酶的最适催化 pH 偏碱性, 在此 pH 范围内, β -内酰胺母核不稳定, 易分解。

α -氨基酸酯水解酶(α -Amino acid ester hydrolase, 简称 AEH, EC 3.1.1.43)相比青霉素酰化酶而言, 具有诸多优点: 和酰胺的亲合力低, 底

物水解少; 不受苯甘氨酸的抑制; 对 D 型苯甘氨酸甲酯有构象选择性, 工业上可以直接使用消旋混合物, 而不必先进行拆分; 其最适反应 pH 比青霉素酰化酶低, 也使反应体系中的底物和产物更稳定^[4]。长期以来, α -氨基酸酯水解酶的研究受到生物学家和药学家的重视, 有关 α -氨基酸酯水解酶产酶菌株的分离、酶基因及蛋白晶体结构的研究^[5-6]为该酶的进一步生产优化奠定了基础。

为了进一步改善酶的性质以适应工业化生产需要, 本实验室采用定向进化提高酶热稳定性及头孢克洛合成活性。有效的高通量筛选阳性克隆的方法是定向进化成功的重要环节。目前, 头孢克洛的测定通常有两种方法: 一是高效液相色谱, 该方法准确, 灵敏度高, 但样品分析时间长, 无法达到高通量筛选的要求; 二是紫外分光光度法^[7], 利用头孢克洛在碱性环境下发生分子内亲核攻击, 生成一种在 340 nm 有最大吸收峰的哌嗪衍生物的原理。该方法常用于成品药中有效成分浓度的测定, 或药代动力学测定。由于头孢克洛的底物之一, 3-氯-7-氨基去乙酰氧基头孢烷酸(7-ACCA)碱性条件下的衍生物在 300–360 nm

有吸收峰,而另一底物苯甘氨酸甲酯盐酸盐(PGM-HCl)则无干扰吸收。本方法对头孢克洛的经典紫外分光光度法进行了优化。分析了头孢克洛及其底物 7-ACCA 的衍生物紫外吸收波谱,采用双波长消去法可排除底物的干扰。采用优化后的紫光分光光度法,样品无须分离,分析时间大大缩短,每天可检测 2 000 个反应,达到高通量筛选要求,另外,本方法基于全细胞筛选,省略了繁琐的细胞裂解和酶提取步骤,解决了该酶定向进化文库筛选大量突变体的瓶颈问题。

1 材料与方法

1.1 主要仪器和试剂

紫外-可见光酶标仪(Bio-Tek ELx800 UV); 96 孔板离心机(Beckman-Coulter Avanti J-26xp); 高压液相色谱仪(SHIMADZU LC-2010A); 标准品: 头孢克洛(Cefaclor)为华北制药集团产品; 3-氯-7-氨基去乙酰氧基头孢烷酸(7-ACCA)为南京康满林化工实业有限公司产品; 苯甘氨酸甲酯盐酸盐(PGM-HCl)为上海邦成化工有限公司产品; 其他试剂均为国产分析纯。

1.2 实验方法

1.2.1 空白溶液配制: 以 0.05 mol/L pH 6.2 的 NaH_2PO_4 缓冲液制备 7-ACCA 和 PGM-HCl 的底物混合溶液,使终浓度都为 3.2×10^{-3} mol/L。

1.2.2 标准曲线: 以 0.05 mol/L pH 6.2 的 NaH_2PO_4 缓冲液配制浓度为 4×10^{-3} mol/L 的头孢克洛贮存液。用移液管精确量取不同体积的空白溶液与头孢克洛贮存液,使头孢克洛系列稀释液浓度分别达到 1.6、1.4、1.2、1.0、0.8、0.6、0.4、0.2、 0.1×10^{-3} mol/L (以 0.05 mol/L pH 6.2 的 NaH_2PO_4 缓冲液补足体积)。其中两种底物的浓度变为 1.6×10^{-3} mol/L。分别向 96 孔板中加入 100 μL 上述溶液/孔,再以 100 μL 1 mol/L NaOH 等体积稀释,30 °C 温育 30 min 后测定 $\Delta A_{340-405}$ 。

1.2.3 方法稳定性: 取标准曲线项下不同浓度的混合溶液分别加 NaOH, 30 °C 温育 30、60、90 min 后测定吸光值,观察吸光值的变化。

1.2.4 方法的回收率和精密度: 在空白样品中添加一定量头孢克洛标准溶液,测定 $\Delta A_{340-405}$,代入方程计算浓度。

1.2.5 与 HPLC 方法的比较: 分别采用紫外分光光度法和 HPLC 方法^[8]对线性范围内不同浓度头孢克洛溶液进行含量分析,比较结果的一致性。

1.2.6 α -氨基酸酯水解酶重组子的构建及定向进化: 采用 PCR 的方法从红纹黄单胞菌(*Xanthomonas rubrilineans* CPCC 140817)的全基因组中分离到 *aeh* 基因。引物序列如下: 正向: 5'-CGGAATTCATGCGCCGCATCGCTCCCTGCCTGC-3'; 反向: 5'-CCGCTCGAGTCAATGTACCGGCAGCTGATGAAAC-3' (下划线为限制性酶切位点)。PCR 反应程序如下: 94 °C 3 min; 98 °C 30 s, 58 °C 1 min, 72 °C 1.5 min, 30 个循环; 72 °C 10 min。PCR 产物克隆到 pGEM-T 载体中,测序验证后,将 pGEM-T-*aeh* 和 pET28 载体经 *EcoR* I 和 *Xho* I 酶切后回收,相连并转化感受态大肠杆菌 BL21(DE3)。以重组质粒 pET28-*aeh* 为模板,对距离活性中心氨基酸 10 Å 以内的氨基酸残基进行定点饱和突变。采用 KOD plus 突变试剂盒。引物设计及操作参考试剂盒说明书。

1.2.7 筛选样品的对照: 阴性对照: pET28 载体转化的大肠杆菌 JM109。培养及转化反应条件与筛选样品相同。阳性对照: 野生型酶的宿主大肠杆菌 BL21(DE3)含质粒 pET28-*aeh*。培养及转化反应条件与测定样品相同。

1.2.8 筛选实例: (1) 筛选头孢克洛合成活性提高的 AEH 突变体。用牙签挑取平皿上的转化菌落,接入含有培养基的 2 mL 96 孔深孔板中,培养基组成: 0.1%乳糖, 1.0%胰蛋白胨, 0.5%酵母提

取物, 1.0% NaCl, 30 mg/L 卡那霉素。深孔板置 30 °C、200 r/min 培养 24 h 后收获菌体。为排除培养基成分的干扰, 离心后倾去上清液, 重悬于 1.6×10^{-3} mol/L 7-ACCA 和 1.6×10^{-3} mol/L PGM·HCl 底物混合溶液中, 30 °C 孵育 30 min 进行催化反应, 再次离心, 取上清液 100 μ L 至微孔板中, 加入 100 μ L 1 mol/L NaOH, 30 °C 孵育 30 min 后测定 $\Delta A_{340-405}$, 并计算菌体转化生成的头孢克洛的量。由于催化反应时间统一为 30 min, 生成的头孢克洛的量反应了酶突变体的催化能力。所得阳性突变株在 750 mL 摇瓶中, 25 °C、200 r/min 下培养 24 h, 培养基同上。参照方法[9]分离纯化获得电泳纯的突变体酶。

(2) 筛选热稳定性提高的 AEH 突变体。96 孔深孔板中培养 24 h, 转移到新的 96 孔板中, 为使温度快速平衡, 96 孔板在 37 °C 预热 15 min, 再于 50 °C 烘箱中放置 15 min。按照方法 1.2.8 (1) 测定头孢克洛合成活性, 热处理后的活性除以热处理前的活性所得百分比见实验结果中表 6 (仅显示了活性保留 50% 以上的突变体)。参照方法[9]将热处理后活性保留 50% 以上的突变体培养后分离纯化至电泳纯。

1.2.9 阳性突变体酶动力学参数 k_{cat} 及热稳定性参数 T_{50} (半失活温度)测定: 根据文献[4]测定头孢克洛合成活性提高的 AEH 突变体的 k_{cat} 。根据文献[10]测定热稳定性提高的 AEH 突变体的 T_{50} 。

2 结果

2.1 吸收光谱和测定波长的选择

分别取 1.6×10^{-3} mol/L 头孢克洛和 1.6×10^{-3} mol/L 7-ACCA 的标准溶液, 等体积加入 1 mol/L NaOH 显色 30 min, 以磷酸缓冲液为参比, 在 200–600 nm 波长范围内扫描, 吸收图

谱见图 1。可见, 头孢克洛显色反应后最大吸收波长为 340 nm, 选 405 nm 为参比波长, 以消除 7-ACCA 的干扰。

2.2 标准曲线

按实验方法配制一系列标准溶液, 分别测定标准溶液及空白溶液的吸收值。得到 $\Delta A_{340-405}$ 与 C_{cef} ($\times 10^{-3}$ mol/L) 的线性回归方程为 $\Delta A_{340-405} = 2.913 1C + 0.007 3$, $R^2 = 0.999 9$, 图 2 显示, 头孢克洛浓度与 $\Delta A_{340-405}$ 在 $(0.1-0.6) \times 10^{-3}$ mol/L 浓度范围内有良好的线性关系。为验证线性关系, 随机挑取 5 个克隆, 进行头孢克洛合成反应, 根据标准曲线计算所得的头孢克洛浓度见表 1。

回归系数的 t 检验 $P < 0.0001$, 表明随机样品的 $\Delta A_{340-405}$ 与生成的头孢克洛浓度有显著的线性关系。

2.3 稳定性试验

3 个浓度的混合溶液加 NaOH 分别显色 30、60、90 min 的吸光值见表 2, 表明 90 min 内样品吸光值稳定。由于样品通过 96 孔板-酶标仪测量, 测量时间短, 90 min 内的样品吸光值稳定, 符合实验要求。

2.4 回收率及精密度

表 3 为测得的回收率和精密度数据, 回收率和精密度结果满意。

2.5 紫外分光光度法与 HPLC 方法的比较

两种方法对头孢克洛进行含量分析的结果见表 4, 紫外分光光度法和 HPLC 方法对相同的样品进行含量分析, 差异不显著。

2.6 高通量筛选实例

在转化平板上随机挑取 2 300 个克隆。经 96 孔板检测菌体转化 7-ACCA 和 PGM 生成头孢克洛的量。以野生型酶为对照, 共获得 11 株阳性克隆。分别纯化至电泳纯, 验证酶液 k_{cat} , 结果见表 5。其中 3 株头孢克洛合成 k_{cat} 的提高大于 40%。

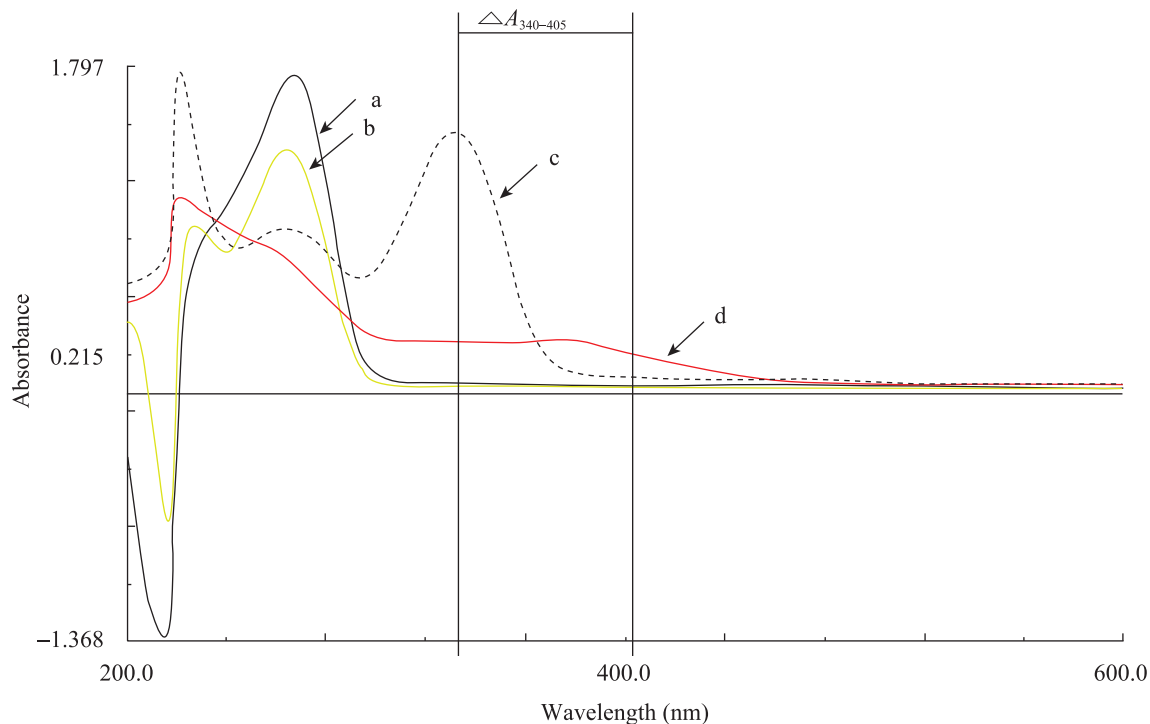


图 1 头孢克洛和 7-ACCA 及其衍生物的紫外吸收光谱

Fig. 1 Absorption spectrum of cefaclor and 7-ACCA before and after adding NaOH

注: a: 0.8×10^{-4} mol/L 头孢克洛溶于 NaH_2PO_4 缓冲液; b: 0.8×10^{-4} mol/L 7-ACCA 溶于 NaH_2PO_4 缓冲液; c: 0.8×10^{-4} mol/L 头孢克洛溶于 1 mol/L NaOH; d: 0.8×10^{-4} mol/L 7-ACCA 溶于 1 mol/L NaOH.

Note: a: 0.8×10^{-4} mol/L cefaclor in phosphate buffer; b: 0.8×10^{-4} mol/L 7-ACCA in phosphate buffer; c: 0.8×10^{-4} mol/L cefaclor in 1 mol/L NaOH; d: 0.8×10^{-4} mol/L 7-ACCA in 1 mol/L NaOH.

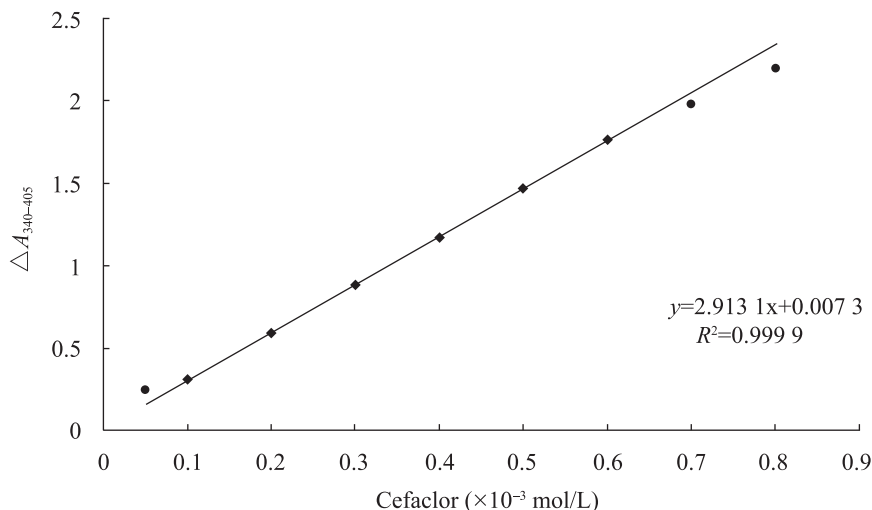


图 2 头孢克洛浓度与 $\Delta A_{340-405}$ 的标准曲线

Fig. 2 Standard curve of $\Delta A_{340-405}$ against the concentration of cefaclor

表 1 线性关系验证($n=8$)
Table 1 Test of linear regression ($n=8$)

克隆株序号 Number of clones	头孢克洛浓度 Concentration of cefaclor (10^{-3} mol/L)	相对标准偏差 RSD (%)
1	0.134 \pm 0.013	1.1
2	0.417 \pm 0.014	3.5
3	0.118 \pm 0.009	1.7
4	0.175 \pm 0.006	2.9
5	0.226 \pm 0.011	3.8

表 2 不同浓度头孢克洛溶液碱显色后的吸光值($n=8$)
Table 2 The absorption of cefaclor derivative after different reaction time ($n=8$)

头孢克洛浓度 Concentration of cefaclor (10^{-3} mol/L)	显色反应时间 Time of coloration (min)			相对标准偏差 RSD (%)
	30	60	90	
0.1	0.290 \pm 0.09	0.299 \pm 0.08	0.293 \pm 0.06	1.5
0.3	0.869 \pm 0.10	0.905 \pm 0.07	0.874 \pm 0.14	2.2
0.6	1.815 \pm 0.11	1.756 \pm 0.17	1.729 \pm 0.08	2.4

表 3 样品中头孢克洛回收率及精密度试验($n=8$)
Table 3 The recovery and precision of cefaclor ($n=8$)

精密度实验 Precision test			回收率实验 Recovery test		
加入值 Added (10^{-3} mol/L)	测量值 Measured (10^{-3} mol/L)	相对标准偏差 RSD (%)	加入值 Added (10^{-3} mol/L)	测量值 Measured (10^{-3} mol/L)	回收率 Recovery (%)
0.1	0.104 \pm 0.016	3.8	0.1	0.104	103.7
0.3	0.300 \pm 0.013	0.9	0.3	0.300	100
0.6	0.598 \pm 0.005	0.4	0.6	0.598	99.7

表 4 紫外分光光度法和高压液相色谱法检测头孢克洛浓度($n=8$)
Table 4 The analytical results of cefaclor by UV Spectrophotometry and HPLC ($n=8$)

紫外分光光度法 UV Spectrophotometry (10^{-3} mol/L)	相对标准偏差 RSD (%)	高压液相色谱法 HPLC (10^{-3} mol/L)
0.104 \pm 0.016	2.2	0.107 \pm 0.065
0.300 \pm 0.013	1.7	0.294 \pm 0.052
0.598 \pm 0.005	3.5	0.602 \pm 0.074

注: 以 3 个样品的平均值进行 t 检验, $t=1.0874$ ($P>0.05$) 表明两种方法无显著差异。

Note: The average value of three samples were used for t statistics test, $t=1.0874$ ($P>0.05$) shows no significant difference.

表 5 突变体酶动力学参数
Table 5 The kinetic parameters of variants

突变株名称 Name of variants	吸光值 $\Delta A_{340-405}$	头孢克洛浓度 Concentration of cefaclor (10^{-3} mol/L)	表观反应初速度 ^a $V_{0(\text{obs})}$ (10^{-4} mol/L·s)	转换数 ^b k_{cat} (s^{-1})
WT	0.75	0.255	1.42	82±2
SDM87-46	1.31	0.447	2.48	142±4
SDM132-59	1.09	0.372	2.06	119±3
SDM344-35	1.54	0.526	2.92	169±6

注: a: 表观反应初速度为采用全细胞在 96 孔板中测得的值, 不是纯酶的实际值, 故称表观值; b: 此为纯酶的实际转换数, 为 3 个平行样的平均值。

Note: a: $V_{0(\text{obs})}$ was determined using whole cells in 96-well plates, it is not the actual V_0 of purified enzyme; b: k_{cat} s in the table are the true turnover number of purified enzymes, and are averages of three parallel samples.

表 6 突变体酶热稳定性参数
Table 6 Thermal stability of variants

突变株名称 Name of variants	保留热处理前活性的百分比 ^a Percentage of activity after heat treatment against before (%)	半失活温度 ^b T_{50} (°C)
WT	14	44±0.5
SDM132-132	54	51±0.8
SDM178-5	61	49±0.3
SDM226-35	61	54±0.7
SDM466-77	68	55±0.7

注: a: 根据全细胞在 96 孔板中热处理后的活性除以热处理前的活性计算而得; b: 此为纯酶的半失活温度, 为 3 个平行样的平均值。

Note: a: Calculated as the ratio of activity after against before heat treatment using whole cells in 96-well plates; b: T_{50} s in the table are the temperature at which the purified enzymes lost their initial activities by 50%, and are averages of three parallel samples.

在定点饱和突变得到的 2 300 个克隆中, 选取头孢克洛合成活性相对野生型保留 80%活性的突变株 186 株, 进行热稳定性筛选。保留原活性 50%以上的 4 株突变株的 T_{50} 见表 6。

3 讨论

在 7-ACCA 和 PGM 经 AEH 催化转化生成头孢克洛的过程中, 底物与产物共存于反应体系中, PGM 与头孢克洛的吸收互不干扰, 而 7-ACCA 在头孢克洛最大吸收峰处有干扰吸收。如图 1 所示, 双波长消去法理想的参比波长应为 390 nm, 但由于所采用的酶标仪为非连续波长, 最接近的波长为 405 nm。回收率及与 HPLC 的比

较试验表明, 采用 405 nm 作为参比波长能够获得准确可靠的结果。

高通量筛选是定向进化中重要的一环, 筛选通量的大小决定了建库的规模, 从而决定了从众多突变体候选者中找到性能优良的酶的可能性^[11]。而高通量筛选中最为常用的能够定量的方法就是分光光度法(包括紫外和荧光), 其处理量为 10^3 – 10^4 样品数/d, HPLC 或质谱仪则最多只能达到几百个样品数/d。全细胞高通量筛选方法是其中更为简便的一种形式, 省略了费时费力的细胞裂解和酶的提取步骤。基于分光光度法的全细胞微孔板高通量筛选方法已有应用于环氧化物水解酶^[12]、羟化酶^[13]、酰胺酶^[14]的报道。当然, 全

细胞的筛选方法并不适用于其底物和产物不能透过细胞膜的酶。本论文的研究对象 AEH, 其底物及产物能渗透细胞膜; 其次, 突变体酶能够以全细胞的形式表现出显著差异, 故采用全细胞筛选方法, 避免了细胞裂解、重悬、离心等步骤, 操作时间大大缩短, 每天筛选量可达到 2 000 个反应, 达到高通量分析的要求。

本方法还具有一定普适性。头孢噻肟、头孢匹林、头孢呋新等化合物可被高锰酸钾氧化生成 610 nm 处有最大吸收的衍生物^[15]。头孢羟氨苄、头孢拉定、头孢哌酮等碱水解后与一种二唑化合物生成在 390 nm 处有最大吸收的硫化物^[16]。本方法对于筛选此类头孢类化合物合成酶具有一定的借鉴意义。

参 考 文 献

- [1] 侯仲轲. 医药中间体市场动态与发展趋势[J]. 精细化工中间体, 2006, 36(6): 5-10.
- [2] Hewitt L, Kasche V, Lummer K, et al. Structure of a slow processing precursor penicillin acylase from *Escherichia coli* reveals the linker peptide blocking the active-site cleft[J]. Journal of Molecular Biology, 2000, 302(4): 887-898.
- [3] Alkema WBL, Floris R, Janssen DB. The use of chromogenic reference substrates for the kinetic analysis of penicillin acylases[J]. Analytical Biochemistry, 1999, 275(1): 47-53.
- [4] Barends TRM, Polderman-Tijmes JJ, Jekel PA, et al. The sequence and crystal structure of the α -amino acid ester hydrolase from *Xanthomonas citri* define a new family of β -lactam antibiotic acylases[J]. The Journal of Biological Chemistry, 2003, 278(25): 23076-23084.
- [5] Polderman-Tijmes JJ, Jekel PA, Jeronimus-Stratingh CM, et al. Identification of the catalytic residues of α -amino acid ester hydrolase from *Acetobacter turbidans* by labeling and site-directed mutagenesis[J]. The Journal of Biological Chemistry, 2002, 277(32): 28474-28482.
- [6] Barends TRM, Polderman-Tijmes JJ, Jekel PA, et al. *Acetobacter turbidans* α -amino acid ester hydrolase[J]. The Journal of Biological Chemistry, 2006, 281(9): 5804-5810.
- [7] Ivama VM, Rodrigues LNC, Guaratini CCI, et al. Spectrophotometric determination of cefaclor in pharmaceutical preparations[J]. Química Nova, 1999, 22(2): 201-204.
- [8] 王晓波, 刘丹, 姚文, 等. 高效液相色谱法测定人血浆中的头孢克洛及在制剂生物等效性研究中的应用[J]. 中国医院药学杂志, 2009(20): 1727-1730.
- [9] 萨姆布鲁克 J, 拉塞尔 DW. 分子克隆实验指南[M]. 第 3 版. 北京: 科学出版社, 2002: 1252.
- [10] Reetz MT, Carballeira JD. Iterative saturation mutagenesis (ISM) for rapid directed evolution of functional enzymes[J]. Nature Protocols, 2007, 2(4): 891-903.
- [11] 博马留斯 AS, 里贝尔 BR. 生物催化——基础及应用[M]. 北京: 化学工业出版社, 2006: 253.
- [12] Kahakeaw D, Reetz MT. A cell-based adrenaline assay for automated high-throughput activity screening of epoxide hydrolases[J]. Chemistry-An Asian Journal, 2008, 3(2): 233-238.
- [13] Schwaneberg U, Otey C, Cirino PC, et al. Cost-effective whole-cell assay for laboratory evolution of hydroxylases in *Escherichia coli*[J]. Journal of Biomolecular Screening, 2001, 6(2): 111-117.
- [14] Sroga GE, Dordick JS. Periplasmic expression as a basis for whole cell kinetic screening of unnatural enzyme reactivities[J]. Methods in Enzymology, 2004, 388: 145-156.
- [15] Omar MA, Abdelmageed OH, Attia TZ. Kinetic spectrophotometric determination of certain cephalosporins in pharmaceutical formulations[J]. International Journal of Analytical Chemistry, 2009, 2009: 1-12.
- [16] Rageh AH, El-Shaboury SR, Saleh GA, et al. Spectrophotometric method for determination of certain cephalosporins using 4-chloro-7-nitrobenzo-2-oxa-1, 3-diazole (NBD-Cl)[J]. Natural Science, 2010, 2(8): 828-840.