

利用定点突变分析海藻糖合酶的功能

王宇凡¹ 朱玥明¹ 魏东盛¹ 张峻² 邢来君¹ 李明春^{1*}

(1. 南开大学微生物学系 分子微生物学与技术教育部重点实验室 天津 300071)

(2. 天津市林业果树研究所 天津 300112)

摘要: 我们通过对来自红色亚栖热菌(*Meiothermus ruber*) CBS-01 中的海藻糖合酶(Trehalose synthase)序列比对及三维模型构建, 我们构建了 D200G/H165R, R227C, R392A 三个定点突变体, 检测其对麦芽糖及海藻糖的转化能力。结果发现: 在 50°C 时, D200G/H165R、R392A 基本失去其原有活性, 而 R227C 产生海藻糖的能力降低。37°C 时, D200G/H165R 失去转化能力, 而 R392A 及 R227C 保有部分能力。因此我们推测, R392 位点可能是维持酶的结构及热稳定性的关键位点, 而 D200 位点在反应过程中也起重要作用。

关键词: 海藻糖合酶, 定点突变, 序列比对, 三维模型构建

Functional Analysis of Trehalose Synthase in *Meiothermus ruber* CBS-01 by Site-directed Mutation

WANG Yu-Fan¹ ZHU Yue-Ming¹ WEI Dong-Sheng¹ ZHANG Jun²
XING Lai-Jun¹ LI Ming-Chun^{1*}

(1. Key Laboratory of Molecular Microbiology and Technology, Ministry of Education, Department of Microbiology, Nankai University, Tianjin 300071, China)

(2. Tianjin Institute of Forest and Pomology, Tianjin 300112, China)

Abstract: After constructed a 3D-Model and make the multiple sequence alignment of amino acid sequences of trehalose synthase from *Meiothermus ruber* CBS-01, we performed site-directed mutagenesis of D200G/H165R, R227C, R392A. And the ability of conversion was detected. D200G/H165R and R392A lost their activities basically, while the ability of conversion of R227C declined at 50°C. When reacted at 37°C, D200G/H165R lost its activity, while R392A and R227C dropped their ability. At last, we found that R392 and D200 had important role on activity of enzyme, while R227 had little affection.

Keywords: Trehalose synthase, Site-directed mutagenesis, Multiple sequence alignment, 3D-Model

海藻糖(Trehalose)是由两个葡萄糖分子通过 α, α -1,1 糖苷键连接而成的非还原性双糖, 广泛存在于微生物、无脊椎动物和植物体内, 特别是在那些能抗脱水作用的生物中起着重要作用。而利用海藻糖合酶(Trehalose synthase)生产海藻糖由于仅需要

一种酶制剂, 反应体系粘度低, 产物组成简单, 原料易得, 因此很具有吸引力。海藻糖合酶属于 α -淀粉酶家族(α -amylase family), 是生物体内通过TreS途径生成海藻糖的一种酶类。该酶可利用麦芽糖(Maltose)为底物, 将 α, α -1,4 糖苷键连接的麦芽糖转

基金项目: 天津市应用基础研究计划重点项目(No. 06YFJZJC02100)

* 通讯作者: Tel: 86-22-23508506; Fax: 86-22-23508800; E-mail: nklimingchun@yalco.com.cn 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

收稿日期: 2008-10-11; 接受日期: 2009-01-23

化为 α,α -1,1 糖苷键连接的海藻糖，也可将海藻糖转化为麦芽糖，进行可逆反应^[1]。

美国学者从耻垢分枝杆菌(*Mycobacterium smegmatis*)中分离得到一种活性状态为六聚体的海藻糖合酶，经试验证实其对于麦芽糖和海藻糖存在不同的结合域，并推测其可能还含有葡萄糖结合域^[2]，但没有有力的证明。可这也为我们在没有晶体结构的情况下，对海藻糖合酶的改造提供了一个思路：寻找海藻糖合酶的活性中心，并对其进行突变研究其可能的作用机理。

近来研究发现，来自嗜热栖热菌(*Thermus thermophilus*)的海藻糖合酶的N端 500 个左右的氨基酸其主要催化效力，而C端约 400 个氨基酸残基对酶的热稳定性具有重要作用^[3]。将C端 400 个氨基酸序列克隆至非耐热的耐辐射球菌(*Deinococcus radiodurans*)中的海藻糖合酶基因进行表达后，酶的热稳定性有所提高。而且截短的*T. thermophilus*的海藻糖合酶热稳定性降低，并且产生较多的副产物

葡萄糖。

此外人们对海藻糖合酶重要的氨基酸残基也有所研究，将来自嗜苦古菌(*Picrophilus torridus*)的海藻糖合酶基因中的His、Asp、Glu突变成为Ala后，其活性均大幅下降^[4]。

本实验室前期已克隆得到来自 *Meiothermus ruber* CBS-01 的海藻糖合酶基因^[5]，并实现在大肠杆菌中的异源表达。该基因长度为 2889 bp，编码 962 个氨基酸，蛋白质分子量约为 110 kD，属于 α -淀粉酶家族。本实验主要利用三维模型模拟及序列比对的方法，研究海藻糖合酶重要的氨基酸位点，并在 D200、R227、R392 进行定点突变，深入研究其影响。

1 材料与方法

1.1 实验菌株、质粒和引物

实验所用菌株、质粒及所构建质粒见表 1。实验所用引物见表 2。

| 表 1 本实验所用的菌株和质粒 Table 1 Strains and plasmids used in this work | | |
|---|---|---------------------------------|
| Strains/Plasmids | Genotypes | Conserverd in this lab |
| <i>E. coli</i> DH5 α | <i>SupE44 hsdR17 recA1 endA1gyrA96 thi-1 recA1</i> | Conserverd in this lab |
| Rosetta-gami(DE3) | $\Delta ara-leu7697 \Delta lacX74 \Delta phoAPvuII phoR$ <i>araD139 ahpC galE galK rpsL</i> <i>F'[lac+(lacIq)pro] gor522 ::Tn10 (TcR) trxB::kan</i> (DE3) pRARE6 (CmR) | Provided by Professor Shen Ping |
| pET-21a | Conserverd in <i>E. coli</i> . Amp ^r | Conserverd in this lab |
| pET-21a Ts2.9 | Conserverd in <i>E. coli</i> . Amp ^r , contains <i>treS</i> gene | Construction in this work |
| pET-21a D200G | Conserverd in <i>E. coli</i> . Amp ^r , contains <i>treS</i> gene with mutation at D200 | |
| pET-21a R227C | Conserverd in <i>E. coli</i> . Amp ^r , contains <i>treS</i> gene with mutation at R227 | |
| pET-21a R392A | Conserverd in <i>E. coli</i> . Amp ^r , contains <i>treS</i> gene with mutation at R392 | |

| 表 2 本实验所用的引物 Table 2 The primers used in this work | | |
|---|---|------------------------------------|
| Name | Primer sequence(5'-3') | Usage |
| pET-21a Ts2.9F | CTTGAATTCATGGGTGTGGATCCTCTTTGG TACAAGG | Amplify <i>treS</i> gene |
| pET-21a Ts2.9R | GTTTAGTCGACCTAGCGGGCCCCGTTCCTTC | |
| D200G 1 | GTGCCCTCCCCTCGTACAGGTAAGGGATGGC GCCCA | |
| D200G 2 | GGGCTGACCTGGGGGTGGACGGCTCCGGCTG GGCGC | |
| R392A 1 | TTGCGGTCGGCGTACCACTGCATGGGGGT TGCCACC | Primers for site-directed mutation |
| R392A 2 | GACAACCCCTTCTAGGGGACCGCAACGGGGT GCAAC | |
| R227C 1 | TTTCCCGGGCCGTAGCGCTTCTCCAGGGCGGC GCA CAG | |
| R227C 2 | TCCCGGAGACCATCGCCGCGGTAAGCGCCTGT TGCGC | |
| P1 | AGCCCCCTTACCCCATGACCCTGGGC | Primers for test |
| E4 | ATCGAGTTTGGTGTTCAGCTGGAGG | |

Note: The digestion site is bold; The mutation bases are bold and underlined.

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

1.2 主要试剂

DNA 快速纯化回收试剂盒、IPTG、dNTP、核酸分子量 Marker、蛋白分子量 Marker、氨苄青霉素、卡那霉素、四环素、氯霉素等主要购于北京鼎国生物技术有限责任公司; 常用限制性内切酶及 T4 DNA 连接酶等购于宝生物生物工程有限公司, Long Taq DNA 聚合酶购于北京天根生化科技有限公司。海藻糖、麦芽糖购于 Sigma 公司。其余试剂均为国产分析纯或色谱纯。

1.3 模型构建

根据本实验室克隆得到的来自 *Meiothermus ruber* CBS-01 的海藻糖合酶基因^[5]表达后的氨基酸序列, 利用 Swiss-Model 进行三维结构预测, 并根据序列比对、以及基于氨基酸序列突变位点的预测算法^[6], 分析可能发生点突变的位置。

1.4 重叠延伸 PCR(over-lap PCR)法定点突变

根据已知序列, 设计含有突变位点的引物(见表 2)。以 *M. ruber* 海藻糖合酶基因为模板, 分别用 pET-21a Ts2.9F、D200G 1 和 pET-21a Ts2.9R、D200G 2, 以 Long Taq DNA 聚合酶扩增出两条片段。经 DNA 回收纯化试剂盒回收后, 以这两条片段为模板(比例为 1:3)混合, 以 pET-21a Ts2.9F 与 pET-21a Ts2.9R 为引物, 扩增得到含有 D200G 突变的海藻糖合酶基因全长 2.9 kb 左右的片段。R227C 与 R392A 的突变过程与 D200G 类似。

1.5 酶切连接及大肠杆菌的 CaCl₂ 转化

将扩增得到的全长片段用 *EcoR* I 与 *Sal* I 酶切, 回收后与用 *EcoR* I 和 *Sal* I 双酶切的 pET-21a 片段连接, 转化入大肠杆菌 DH5 α , 筛选正确的转化子, 送北京诺赛公司测序验证。再转化入 Rosetta-gami (DE3) 中进行表达。具体方法参见文献[7]。

1.6 重组酶的诱导和表达

将表达野生型与突变型的 Rosetta-gami(DE3) 于 LB(含有 34 mg/L Cm, 15 mg/L Kan, 12.5 mg/L Tc, 100 mg/L Amp) 37°C 培养, 当 $OD_{600} \approx 0.7$ 时, 加入 IPTG 至终浓度为 0.5 mmol/L, 20°C 诱导过夜。离心收集菌体, 用 50 mmol/L 磷酸钾缓冲液洗涤, 超声破碎。60°C 孵育 1 h 后, 12000 r/min 4°C 离心 15 min, 所得上清即为粗酶。蛋白浓度用 Bradford 法测定^[8], 并根据 SDS-PAGE 观测表达情况。

1.7 酶活测定

将 0.5 mL 粗酶液与 0.5 mL 5% 的底物混合, 50°C

或 37°C 反应 12 h, 100°C 水浴 5 min 灭活。将混合液进行 HPLC 检测。以 80% 乙腈为流动相, 经 Hypersil NH₂ 柱(柱号分别为 E1822859 和 1522024), 通过示差折光检测器检测产物生成。

2 结果与讨论

2.1 海藻糖合酶三维模型的构建与活性区域分析

我们通过 Swiss Pdbviewer 软件及 Swiss-Model 对本实验中所研究的的海藻糖合酶基因(GenBank No.EU443098)表达后的氨基酸序列进行了三维结构预测(从第 6 至第 541 位氨基酸), 发现该蛋白结构存在一个凹陷区域, 此处区域有可能是催化活性位点。该区域包含了从 D26 至 R392 中的 53 个氨基酸, 其中 134、217、218、372 和 373 位于该区域结构表面, 而 R392 即位于该凹陷区内(如图 1 所示)。

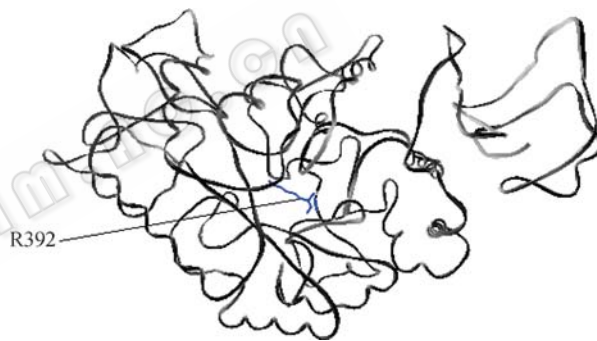


图 1 *M. ruber* 的海藻糖合酶三维结构模型

Fig.1 3D Model of TreS of *M. ruber*

此外, 将不同氨基酸的疏水值转化成一个时间序列; 将此序列按照不同级别进行分段, 然后分别计算各级内相邻段与段之间的信息波动率, 通过捕捉突变前后的信息波动差异, 确定统计数据; 并据此量化突变后蛋白质功能发生变化的可能性, 得出 R392 是与通过信号处理相吻合的氨基酸残基, 因此推测其可能是功能突变的敏感位点^[6]。

同时我们还对海藻糖合酶所属的 α -淀粉酶超家族进行了序列比对, 发现其存在 4 个保守区, 分别是 I XDXXXNH、II GXRDXZZ、III XXX(G/A)EZZZ、IV XXBBHD(X 为疏水性氨基酸残基, B 为亲水性氨基酸残基, Z 为影响酶反应特异性的氨基酸残基)(如图 2a 所示)。因此我们选取了其中 II 区中的 D200 作为一个研究位点。

此外对不同种属间海藻糖合酶的比对显示(如图 2b), R227 同样位于一个可能存在的海藻糖合酶

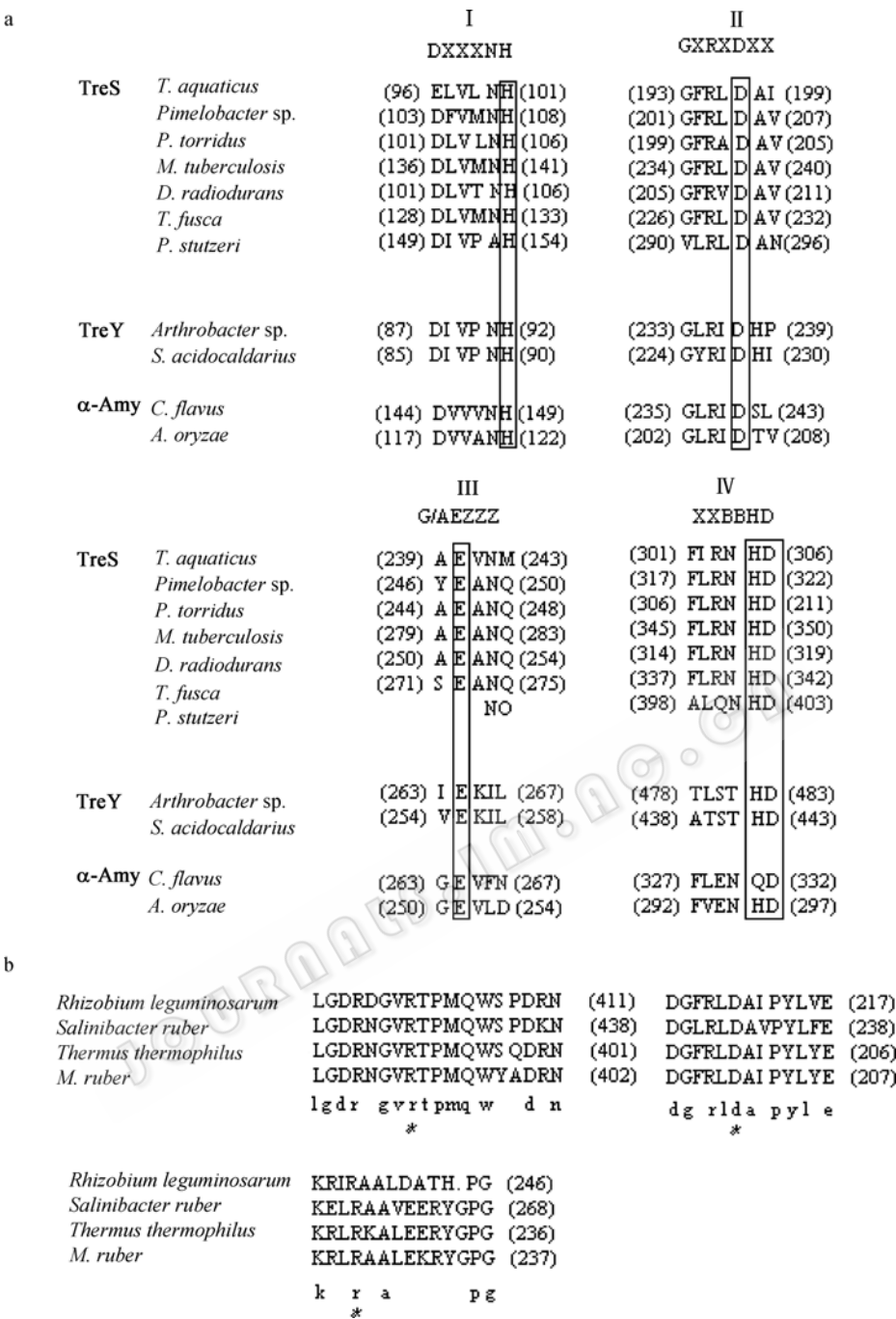


图 2 海藻糖合酶部分序列比对

Fig. 2 Comparison of the deduced amino sequence of TreS

注: a: 海藻糖合酶和某些 α -淀粉酶家族酶类所具有的 4 个保守区及其催化时和底物结合位点^[9]; b: *M. ruber* 中的海藻糖合酶与其它种属海藻糖合酶部分比对。

Note: a: Four conserved amino acid sequences of trehalose synthase and some α -amylase family enzymes and their putative catalytic site^[9]. The catalytic residues are in box; b: Comparison of the deduced amino acid sequence of *treS* gene from *M. ruber* with other closely related TreS. The conserved active sites deduced are denoted by asterisks. The alignment includes amino acid sequences from *Rhizobium leguminosarum* (Accession No. YP 765212), *Salinibacter ruber* (Accession No. YP444982), *Thermus thermophilus* (Accession No. AAQ16097).

序列保守区, 所以也选取了 R227 进行研究。

通过以上一系列分析, 最终我们对 D200、R227、R392 三个推测的活性位点进行了研究。

2.2 突变体的构建

我们利用重叠延伸 PCR 的方法, 设计含有在目的位点产生突变的引物, 进行两轮 PCR, 扩增出含

有产生突变的全长基因(如图 3)。D200G 的上下游片段分别为 600 bp、2289 bp, 突变后全长为 2889 bp(如图 3a); R227C 上下游片段分别为 681 bp、2208 bp, 突变后全长为 2889 bp(如图 3b); R392A 上下游片段分别为 1076 bp、1813 bp, 全长为 2889 bp(如图 3c)。

将突变后的全长片段经 *Sal* I 与 *Eco*R I 酶切后, 与表达载体 pET-21a 连接, 筛选出阳性转化子, 进行巢氏 PCR 检测, 正确的转化子应有 300 bp 左右的条带(如图 3d), 而后将正确的转化子送交北京诺赛基因公司测序, 其中 D200G 除预测突变外, 还产生了 H165R 突变, 推测是在 PCR 过程中错配产生。

2.3 海藻糖合酶表达与活性检测

对诱导之后的菌体进行离心收集, 用 50 mmol/L

磷酸钾缓冲液洗涤, 超声破碎。60°C 孵育 1 h 后, 12000 r/min 4°C 离心 15 min, 所得上清即为粗酶。对该粗酶液进行了 SDS-PAGE 检测, 可见与预期大小相符的目的条带, 约为 110 kD(如图 4), 而阴性对照无该目的条带, 说明蛋白表达正常。

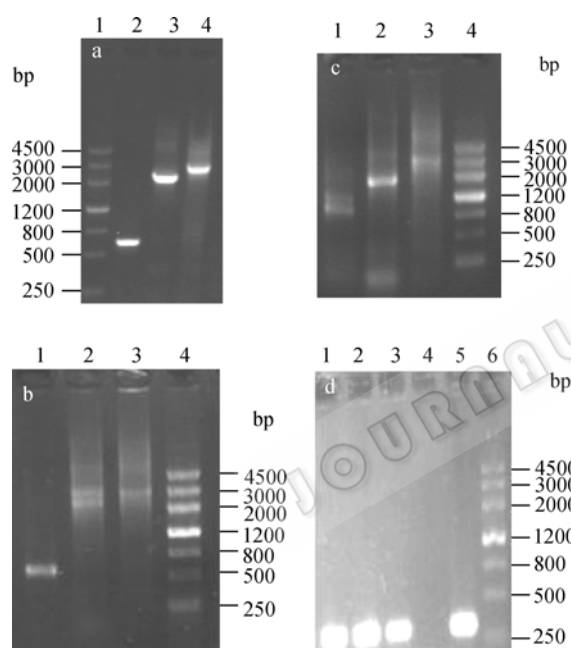


图 3 重叠延伸 PCR 构建定点突变体及检测结果

Fig. 3 Construction of site-directed mutagenesis by Overlap PCR and the result of test

注: a: 1:MarkerIII, 2: D200G 上游片段, 3: D200G 下游片段, 4: D200G 全长片段; b: 1: R227C 上游片段, 2: R227C 下游片段, 3: R227C 全长片段, 4: MarkerIII; c: 1: R392A 上游片段, 2: R392A 下游片段, 3: R392A 全长片段, 4: MarkerIII; d: 巢氏 PCR 检测 1、2、3、5 分别为: pET-21a R227C、pET-21a R392A、pET-21a D200G 及 pET-21a Ts2.9, 4: pET-21a 阴性对照, 6: MarkerIII。

Note: a: 1: MarkerIII, 2: D200G 5'-end segment, 3: D200G 3'-end segment, 4: D200G integrate segment; b: 1: R227C 5'-end segment, 2: R227C 3'-end segment, 3: R227C integrate segment, 4: MarkerIII; c: 1: R392A 5'-end segment, 2: R392A 3'-end segment, 3: R392A integrate segment, 4: MarkerIII; d: Nested PCR test 1、2、3、5: pET-21a R227C、pET-21a R392A、pET-21a D200G and pET-21a Ts2.9, 4: pET-21a, 6: MarkerIII.

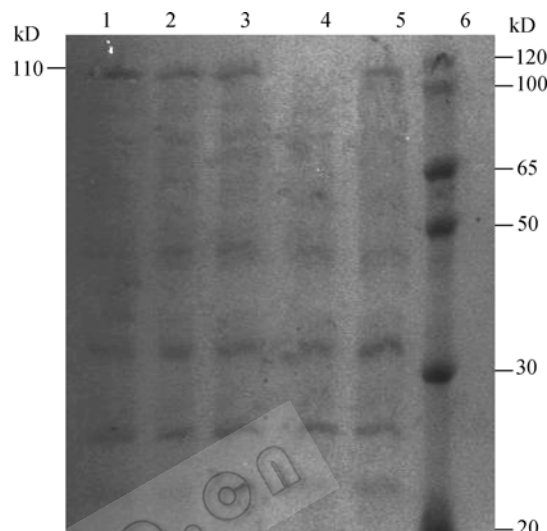


图 4 突变型及野生型重组蛋白的 SDS-PAGE 检测

Fig. 4 SDS-PAGE analysis of wild-type and mutant of TreS

注: 1: R392A 突变体提取的粗酶液; 2: R227C 突变体提取的粗酶液; 3: D200G 突变体提取的粗酶液; 4: 含有 pET-21a 空载体的表达菌株提取的粗酶液; 5: 含有 pET-21a Ts2.9 的表达菌株提取的粗酶液; 6: ProteinRulerIII。

Note: 1: Cell-free extracts from Rosetta-gami(DE3) transformed with pET-21a R392A; 2: Cell-free extracts from Rosetta-gami(DE3) transformed with pET-21a R227C; 3: Cell-free extracts from Rosetta-gami(DE3) transformed with pET-21a D200G; 4: Cell-free extracts from Rosetta-gami(DE3) transformed with pET-21a; 5: Cell-free extracts from Rosetta-gami(DE3) transformed with pET-21a Ts2.9; 6: ProteinRulerIII; The line shows the trehalose synthase expressed.

粗酶液与底物反应后, 利用 HPLC 检测产物生成情况(图 5a 为标准品)。可看出仅含有 pET-21a 空载体的表达菌与麦芽糖反应后无海藻糖或葡萄糖生成(如图 5b)(以海藻糖为底物结果类似), 而 pET-21a Ts2.9 可产生相应产物(如图 5c), 即说明经过处理所得的粗酶液中对麦芽糖与海藻糖之间的相互转换结果可靠, 粗酶中的其它成分对反应产物基本无影响, 因此可利用粗酶观测突变体对麦芽糖利用的影响, 在此研究中不需要进行进一步纯化。

对各突变体的检测则发现, D200G/H165R、R392A 在 50°C 时基本失去酶活力, 与麦芽糖反应 12 h 后无可测产物生成, 与海藻糖反应 12 h 同样无产物生成; R227C 在 50°C 时与野生型相比, 对麦芽

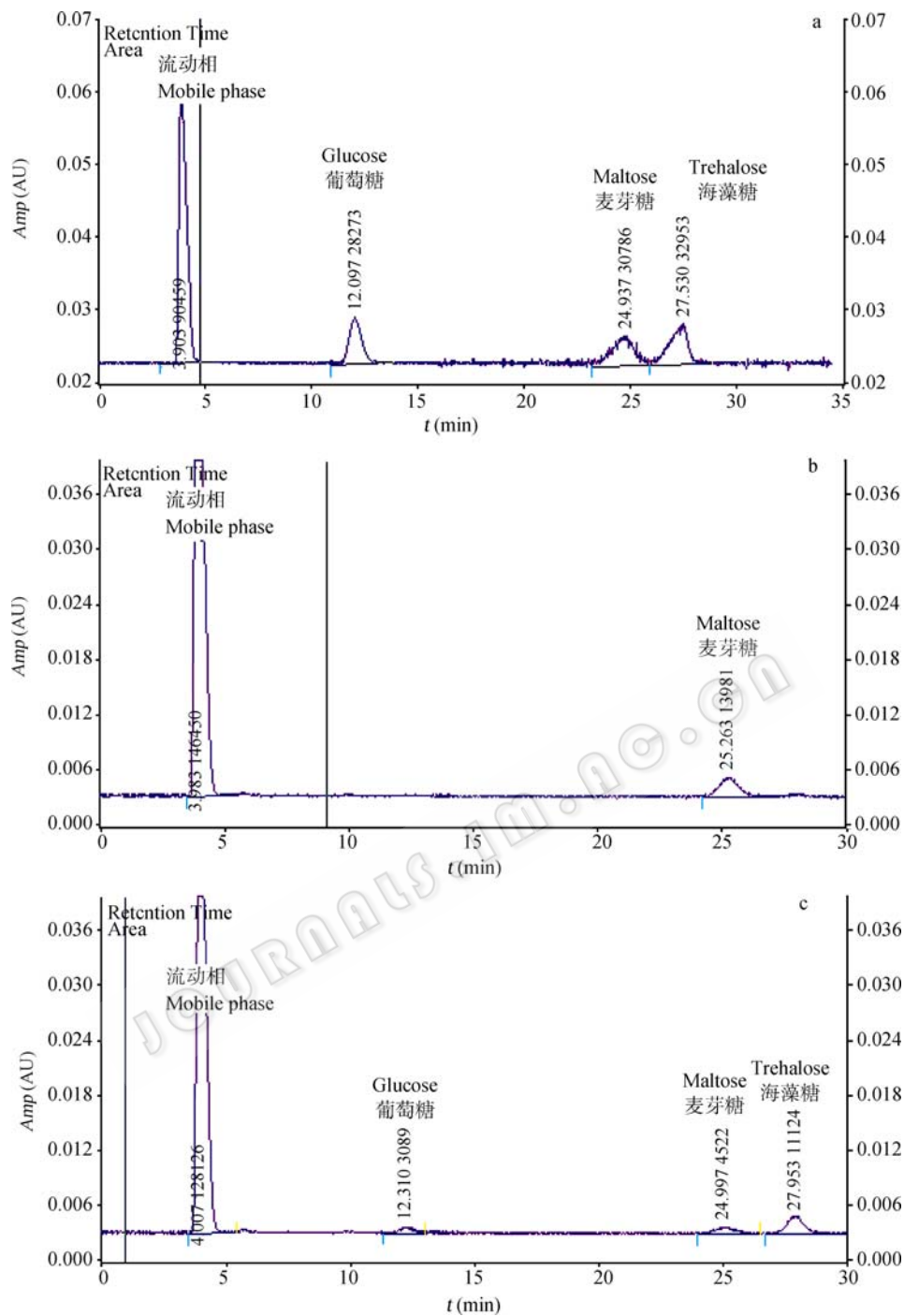


图 5 HPLC 检测反应产物

Fig. 5 Analysis of the products of the TreS-catalyzed reaction by HPLC

注: a: 葡萄糖、麦芽糖、海藻糖标准品各 5%(W/V); b: pET-21a 与 5%麦芽糖反应产物; c: pET-21a Ts.2.9 与 5%麦芽糖反应产物.

Note: a: 5%(W/V) of each standard glucose, maltose and trehalose; b: Reaction of 5% maltose and cell-free extracts of transformants with pET-21a as the expression plasmid; c: Reaction of 5% maltose and cell-free extracts of transformants with pET-21a Ts.2.9 as the expression plasmid.

糖或海藻糖的转化能力略有降低。而在 37°C 时, D200G/H165R 依旧没有生成任何产物, 但 R392A 有少量底物可被转化, 同样 R227C 与野生型相比依然维持了略低的转化能力。野生型与突变体反应后各

产物百分含量见表 3。

由实验结果我们可看出, 在 TreS 野生型的最适温度 50°C 时, D200G/H163R 与 R392A 的活性均有大幅度下降, 基本无产物检出; 而 R227C 仅有部分

表3 不同温度下突变体产生的产物百分含量(%)
Table 3 The percentage of the components of the mutants at the different temperature(%)

| | 50°C | | | | 37°C | | | |
|-----------|------------------|------------------------|------------------|------------------|------------------|------------------------|------------------|------------------|
| | pET-21a TS2.9 | PET-21a D200G/H165R | pET-21a R227C | pET-21a R392A | pET-21a TS2.9 | PET-21a D200G/H165R | pET-21a R227C | pET-21a R392A |
| Glucose | 18.1 | 0 | 7.0 | 0 | 8.6 | 0 | 2.0 | 0.4 |
| Maltose | 26.0 | 100 | 54.3 | 100 | 28.8 | 100 | 43.9 | 90.7 |
| Trehalose | 55.9 | 0 | 38.7 | 0 | 62.6 | 0 | 54.1 | 8.9 |

转化能力下降,由此我们可知 D200G/H163R 与 R392A 的突变对酶的能力产生重大影响。

由 TreS 三维模型可知, R392 位于预测蛋白模型的凹陷区域内,而 R392A 的突变改变了该处氨基酸残基表面电荷,使得酶转化能力降低,也证明了进行三维预测过程中的猜想,此凹陷结构对酶活性有重要作用。通过 37°C 的反应结果可知, R392A 在较低温度下还保留部分活性,因此我们推测 R392 在麦芽糖与海藻糖的相互转化过程中,不仅对酶的活性有所影响,而且是维持酶的结构以及热稳定性的关键氨基酸,这也扩大了以前所认为的 C 端 400 个氨基酸残基是影响海藻糖合酶热稳定性氨基酸的范围。

而 D200G/H165R 突变子在 50°C 及 37°C 活力均丧失,原因较为复杂。首先,同属于 α -淀粉酶家族的 MTHase 的晶体结构已经得到^[10],它可分为 A、C、E 三个主要的结构域和 B、D 两个亚结构域,其中 A 结构域中含有 α -淀粉酶超家族的常见催化区 $(\beta/\alpha)_8$ ^[11],保守氨基酸 D252 位于 A 结构域内,是亲核攻击试剂。我们通过比对发现本实验研究的来自 *M. ruber* 海藻糖合酶的 D200 相当于 MTHase 中的 D252,因此两者所起的作用应大致相同,均为 α -淀粉酶家族的保守氨基酸残基,作为亲核试剂,攻击糖底物的异头中心 C 原子,使 C1-O 键断裂^[12]。因此,该位氨基酸由酸性氨基酸 D 突变成为中性氨基酸 G,丧失了其所携带的电子,使酶在该位失去了亲核攻击的能力,不能攻击带正电荷的 C 原子,麦芽糖分子的 C1-O 键无法断裂,引起了酶功能的大幅变化,而 50°C 和 37°C 反应均无海藻糖生成的结果也验证了这一想法。由此可见,在 TreS 中的 D200 其功能相当于 MTHase 中的关键氨基酸 D252,同时也是 α -淀粉酶超家族中的保守氨基酸,起着在催化反应中进行亲核攻击的作用。但在构建突变体过程中, H165 也发生了突变,给实验结果带来了不确定因素。但其为 H

突变成 R,氨基酸残基表面电荷变化较小,再次它不是位于保守区域中的 His,因此认为该突变的影响可能较小,酶活性的降低基本是由 D200 所产生突变所引起。当然这需要进一步试验证明。

R227C 突变对酶的影响较小,说明该种突变对蛋白的作用可能不如 D200G/H165R 及 R392A 的作用如此明显。

3 小结

我们对蛋白三维结构的预测与比对,推测出几个可能的作用位点,并通过实验证明, D200 是酶与底物反应的关键氨基酸,并可能位于 α -淀粉酶超家族普遍存在的 $(\beta/\alpha)_8$ 催化区域中,携带电子起着亲核攻击试剂的作用。此外,通过蛋白的三维结构预测得到该蛋白可能存在一个凹陷区域,该区域可能结合麦芽糖或海藻糖,位于该区域表面的 R392 能够影响蛋白的结构及稳定性,下一步可通过研究该区内的其它氨基酸残基推测此凹陷区域具体作用。

提高海藻糖合酶活性的关键是尽量减少副产物葡萄糖的生成。从表 3 可以看出,海藻糖合酶在低温下反应时生成的葡萄糖含量要少于高温反应,这可能是在低温下,分子热运动没有高温下剧烈,水分子不容易进入酶活中心,作为亲核试剂攻击 $\alpha, \alpha-1,1$ -糖苷键,从而形成葡萄糖。从图 2a 中可以看出,司徒假单胞菌的海藻糖合酶没有第三区,而该海藻糖合酶在反应过程中不会形成副产物葡萄糖^[13]。那么我们可以推测,由于第三区的缺失,司徒假单胞菌海藻糖合酶的三维结构不同于一般的海藻糖合酶,这使得酶活中心处于一种相对更深陷的凹陷处,可能使得水分子不能进入催化中心,从而无法形成葡萄糖。在今后的工作中,我们将尝试利用定点突变的方法改变红色亚栖热菌的第三区,使

其类似于司徒假单胞菌的海藻糖合酶,以期能够减少或抑制葡萄糖的生成,进一步提高海藻糖合酶的活性,为工业生产奠定基础。

致谢: 本研究中蛋白三维模型构建及氨基酸疏水值等的计算工作是南开大学生命科学学院张涛教授实验室帮助完成,在此表示衷心感谢!

参 考 文 献

- [1] Tsusaki K, Nishimoto T, Nakada T, *et al.* Cloning and sequencing of trehalose synthase gene from *Pimelobacter* sp. R48. *Biochim Biophys Acta*, 1996, **1290** (1): 1–3.
- [2] Pan YT, Koroth Edavana V, Jourdian WJ, *et al.* Trehalose synthase of *Mycobacterium smegmatis* purification, cloning, expression, and properties of the enzyme. *Eur J Biochem*, 2004, **271**(21): 4259–4269.
- [3] Jia-Hung Wang, Meng-Ying Tsai, Jei-Fu Shaw, *et al.* Role of the C-terminal domain of *Thermus thermophilus* trehalose synthase in the thermophilicity, thermostability, and efficient production of trehalose. *J Agric Food Chem*, 2007, **55**: 3435–3443.
- [4] Yi-Shan Chen, Guan-Chiun Lee, Jei-Fu Shaw, *et al.* Gene cloning, expression, and biochemical characterization of a recombinant trehalose synthase from *Picrophilus torridus* in *Escherichia coli*. *J Agric Food Chem*, 2006, **54**: 7098–7104.
- [5] Zhu YM, Zhang J, Li MC, *et al.* Isolation and identification of a thermophilic strain producing trehalose synthase from geothermal water in China. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2008, **72**(8): 2019–2024.
- [6] 宋 卓, 张 宁, 张 涛, 等. 基于氨基酸序列预测蛋白质功能性点突变位点. *生物物理学报*, 2007, **23**(2): 134–138.
- [7] Sambrook J, Russell DW. 分子克隆实验指南. 金东雁等译. 第二版. 北京: 科学出版社, 1993, pp.49–55.
- [8] 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**(1–2): 248–254.
- [9] 朱明明, 张 峻, 邢来君, 等. 海藻糖合酶的分子生物学研究进展. *微生物学报*, 2009, **49**(1): 6–12.
- [10] Feese MD, Kato Y, Kuroki R, *et al.* Crystal structure of glycosyltrehalase trehalohydrolase from the hyperthermophilic archaeum *Sulfolobus solfataricus*. *J Mol Biol*, 2000, **301**: 451–464.
- [11] E Ann MacGregor, Stefan Janecek, Birte Svensson. Relationship of sequence and structure to specificity in the α -amylase family of enzyme. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2001, **1546**: 1–20.
- [12] Koh S, Kim J, Lee DS, *et al.* Mechanistic study of the intramolecular conversion of maltose to trehalose by *Thermus caldophilus* GK24 trehalose synthase. *Carbohydr Res*, 2003, **338**: 1339–1343.
- [13] Jin-Ho Lee, Kwang-Ho Lee, Chang-Gyeom Kim, *et al.* Cloning and expression of a trehalose synthase from *Pseudomonas stutzeri* CJ38 in *Escherichia coli* for the production of trehalose. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2005, **68**: 213–219.

稿件书写规范

论文中阿拉伯数字的使用

凡是可以使用阿拉伯数字且很得体的地方均应使用阿拉伯数字。世纪、年代、年、月、日、时刻必须使用阿拉伯数字,年份必须用全称。对科技期刊来说,凡处在计量单位和计数单位前面的数字,包括9以下的各位数字,除个别特例外,均应使用阿拉伯数字。不是表示科学计量和有统计意义数字的一位数可以用汉字,例如:一本教材、两种商品等。