

## 米曲霉木聚糖酶 N 端引入二硫键对其热稳定性的影响

陈忠法<sup>1</sup>, 唐存多<sup>1</sup>, 汪俊卿<sup>1</sup>, 吴静<sup>2</sup>, 邬敏辰<sup>\*2</sup>

(1. 江南大学 生物工程学院, 江苏 无锡 214122; 2. 江南大学 无锡医学院, 江苏 无锡 214122)

**摘要:** 为提高源自米曲霉 *Aspergillus oryzae* 11 家族木聚糖酶(AoXyn11A)的热稳定性,对其相关的氨基酸残基进行定点突变改造。通过对野生型酶 AoXyn11A 和一种超耐热酶 *EvXyn11<sup>TS</sup>* 的 N 端氨基酸残基序列进行同源比较,在野生型酶 N 端引入一个二硫键,获得突变酶 AoXyn11A<sup>M</sup>。野生型酶和突变酶的热稳定性通过同源建模和分子动力学模拟分析评估后,其基因分别在毕赤酵母 GS115 中进行表达并分析温度对表达产物酶活性的影响。结果表明:突变酶的最适温度由野生型酶的 55 °C 提高至 60 °C;在 50 °C 和 55 °C 保温 30 min,突变酶保留 94% 和 45% 保温处理前的酶活性,分别较野生型酶(62.5% 和 1.4%) 有大幅度的提高。突变酶在保留了野生酶其它优良性质的基础上,提高了热稳定性,具有潜在的工业应用价值。

**关键词:** 米曲霉;木聚糖酶;二硫键;热稳定性;定点突变

中图分类号:Q 814 文献标志码:A 文章编号:1673—1689(2013)07—0686—06

## Effect of Engineering a Disulfide Bridge into the N-terminal Region of *Aspergillus oryzae* Xylanase on its Thermostability

CHEN Zhong-fa<sup>1</sup>, TANG Cun-duo<sup>1</sup>, WANG Jun-qing<sup>1</sup>, WU Jing<sup>2</sup>, WU Min-chen<sup>\*2</sup>

(1. School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. Wuxi Medical School, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

**Abstract:** Site-directed mutageneses had been done in this work with the consideration of increasing the thermostability of a family 11 xylanase (AoXyn11A) from *Aspergillus oryzae*. The mutant, AoXyn11A<sup>M</sup>, was obtained by introducing a disulfide bridge into the N-terminal region of AoXyn11A after N-terminal amino acid homology alignment of AoXyn11A with a thermostable family 11 xylanase, *EvXyn11<sup>TS</sup>*. The thermostability of the wild-type enzyme and mutant were analyzed by homology modeling, and assessed by molecular dynamics (MD) simulations. The genes, AoXyn11A and AoXyn11A<sup>M</sup>, were expressed in *Pichia pastoris* GS115, respectively. And the effects of temperatures on the thermostability of the expressed AoXyn11A and AoXyn11A<sup>M</sup> were analyzed. The results showed the optimal temperature of AoXyn11A<sup>M</sup> was raised to 60 °C from 55 °C of AoXyn11A; after incubated at 50 °C and 55 °C for 30 min, respectively, the mutant retained 94% and 45% of its original activity while the wild-type enzyme retained 62.5% and 1.4% of its original

收稿日期: 2013-03-04

基金项目: 国家自然科学基金项目(31101229)。

\* 通信作者: 邬敏辰(1962—), 男, 江苏无锡人, 理学博士, 教授, 博士研究生导师, 主要从事酶工程与基因工程研究。

E-mail: biowmc@126.com

activity. The mutant not only preserved the major excellent properties of the wild-type enzyme, but also enhanced the thermostability which is potentially useful in industrial applications.

**Keywords:** *Aspergillus oryzae*, xylanase, disulfide bridge, thermostability, site-directed mutagenesis

木聚糖是植物细胞壁的主要结构多糖物质之一,在自然界中含量极为丰富。木聚糖酶是可将木聚糖降解成低聚木糖和木糖的一类酶的总称,能从木聚糖分子主链的内部水解 $\beta$ -1,4糖苷键,产物为不同长度的木寡糖和少量木糖,为木聚糖降解酶系中最关键的酶<sup>[1]</sup>。通过酶分子一级结构的序列比对和疏水簇分析,大多数木聚糖酶属于糖苷水解酶 10 和 11 家族<sup>[2]</sup>。木聚糖酶在造纸、食品、能源、饲料以及环境等领域里都有着重要的应用价值,但由于一些工艺过程如食品、饲料制粒加工等需要较高工作温度<sup>[1]</sup>,而天然酶往往难以满足其生产要求,因此,如何提高木聚糖酶的热稳定性已成为广泛关注的焦点。

影响木聚糖酶热稳定性的因素很多,主要有疏水作用、氢键、离子键、二硫键、包装效应、螺旋结构等多种因素<sup>[3]</sup>。目前对于 11 家族木聚糖酶热稳定性提高的报道有很多是关于酶的 N 端的改造,例如, Duman 等对一种 11 家族木聚糖酶的 N 端进行了 7 个定点突变,突变酶比野生酶的  $T_m$  值提高了约 25 °C<sup>[4]</sup>; Xiong 等在一种里氏木霉木聚糖酶的 N 端和中部 $\beta$ 折叠处引入二硫键,突变酶 DB1 比野生酶在 65 °C 时的半衰期提高约 112 倍<sup>[5]</sup>;高树娟等把一种超耐热木聚糖酶 N 端前 42 个氨基酸替代了一种米曲霉木聚糖酶前 37 个氨基酸,突变酶比野生酶在 70 °C 时的半衰期提高约 197 倍<sup>[6]</sup>。

作者已克隆和表达了一个来自 *Aspergillus oryzae* 的 11 家族常温木聚糖酶基因 *Aoxyn11A*,该酶在常温条件下酶活性比较高,但温度大于 50 °C 时热稳定性差<sup>[7]</sup>,存在应用上的不足。通过同源建模和分子动力学模拟分析评估的基础上,采用定点突变技术,期望获得一株表达高热稳定性木聚糖酶的工程菌。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌株、质粒和培养基

含有原始基因的重组质粒 pUCm-T-*Aoxyn11A*, pPIC9K<sup>M</sup>-*Aoxyn11A* 由作者所在实验室

构建和保存; *Escherichia coli* DH5 $\alpha$ 、*Pichia pastoris* GS115 和表达质粒 pPIC9K<sup>M</sup> 由作者所在实验室保藏; pUCm-T 质粒:购自上海 Sangon 公司; LB、YPD、MD、BMGY 和 BMMY 培养基参见 Multi-Copy *Pichia* Expression Kit (Invitrogen 公司)操作手册。

### 1.2 主要试剂

*rTaq* 酶、T4 DNA 连接酶、各种限制性内切酶、250 bp DNA Ladder Marker 和低相对分子质量蛋白质 Marker: 购于大连 TaKaRa 公司; Tryptone、Yeast Extract、YNB、G418 和 EZ-10 Spin Column Plasmid Mini-Preps Kit: 购自上海 Sangon 公司; 标准木糖、桦木木聚糖、桦木木聚糖和考马斯亮蓝 R-250: Sigma 公司产品; 其它试剂均为国产或进口分析纯。

### 1.3 野生型酶 *Aoxyn11A* 和超耐热木聚糖酶 *EvXyn11<sup>TS</sup>* 序列的对比

超耐热酶 *EvXyn11<sup>TS</sup>* 是属于木聚糖酶 11 家族中热稳定性最高的酶之一<sup>[4]</sup>。作者所在实验室登录 NCBI 将其进行密码子优化,选择 *Pichia pastoris* GS115 偏爱型的密码子,然后人工合成了这段序列 (*Syxyn11*, GenBank accession No. JX459567),该优化基因在 *Pichia pastoris* GS115 中表达,测其最适温度在反应时间为 15 min 时为 85 °C,其最高酶活达到 17.74 U/mL;在 80 °C 保温 60 min 后,保留未热处理原酶 85.9% 的活性,进一步证实了该酶有很高的热稳定性<sup>[8]</sup>。本研究拟采用 DNAMAN 程序对木聚糖酶 *Aoxyn11A* (GenBank accession No. JQ326257) 和超耐热酶 *EvXyn11<sup>TS</sup>* 进行 N 端氨基酸序列同源比对,希望找出与酶分子热稳定性相关的氨基酸残基。

### 1.4 计算机同源建模和分子动力学模拟

在 Protein Data Bank 数据库中进行同源搜索,寻找到 3 个与 *Aoxyn11A* 一级结构同源性较高的、分别来源于绳状青霉菌 *Penicillium funiculosum* (1TE1)、*E. coli* (2VUL) 和红褐肉座菌 *Hypocrea jecorina* (1ENX) 的 11 家族木聚糖酶晶体结构,作为同源建模的模板。同源建模在蛋白质结构服务器 (<http://swissmodel.expasy.org/>) 和程序 MODELLER 9.9 (<http://salilab.org/modeller/>) 上完成<sup>[9]</sup>。

分子动力学(MD)模拟使用 GROMACS 4.0 软件,采用 GROMOS96 力场,该力场中蛋白的立场参数数据均给予实验值拟合模拟温度为 500 K,溶剂采用 TIP3P 水模型。对于每个模拟体系,均在溶质外围加上 1.5 nm 的水分子层。MD 模拟之前,对体系分别进行了两次能量优化,首先约束溶质,用最陡下降法优化 800 步,再用共轭梯度法优化 1 200 步。然后去约束后再进行 800 步最陡下降法优化,

1200 步共轭梯度法优化。MD 模拟分为两步:首先进行 20 ps 的约束溶质分子的 MD 模拟,此时温度从 0 K 逐步升高到 500 K;接着进行 500 ps 的无约束恒温 MD 模拟,最后分别得到野生型酶和突变酶的均方根偏差(RMSD)值。

### 1.5 定点突变引入 N 端二硫键

**1.5.1 引物的突变** 根据木聚糖酶基因 *Aoxyn11A* 和目的突变位点设计引物(表 1)。

表 1 引入二硫键的引物

Table 1 Oligonucleotide primers for the introduction of a disulfide bridge

名称	序列	酶切位点
Xyn11-F	5'-CTCGAGAAAAAGAAACGCTCAAACCTGTTCCACACCCAGTAGCACGG-3'	<i>Xho</i> I
Xyn11-R <sub>m</sub>	5'-GTATGAACCGCCGTTGCCGTTACAGTAAGTCACATCAC-3'	
Xyn11-R	5'-GCCGCCGCTCAATAAACAGTGATAGCAG-3'	<i>Not</i> I

注:下划线为引入的酶切位点,黑体为引入的突变碱基。

**1.5.2 定点突变程序** (1) 大引物 PCR 程序按照相关文献<sup>[10]</sup>的步骤操作。(2) 两步 PCR 程序,第一步 PCR:质粒 pUCm-T-*Aoxyn11A* 为 PCR 模板,用引物 Xyn11-F 和 Xyn11-R<sub>m</sub> 进行扩增,扩增条件:94 °C 预变性 5 min;94 °C 变性 30 s,55 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 30 s,30 个循环;72 °C 延伸 10 min,产物为含突变位点的 N 端前 108 个碱基。第二步 PCR:取以上 PCR 产物,以割胶回收物为 N 端大引物,Xyn11-R 为 C 端引物进行扩增。扩增条件:94 °C 预变性 5 min;94 °C 变性 30 s,45 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 60 s;72 °C 延伸 10 min。回收目的基因,连接到 pUCm-T 载体上,获得重组质粒 pUCm-T-*Aoxyn11A*<sup>M</sup>,对其进行测序验证。

### 1.6 突变酶基因表达质粒的构建

pPIC9K 载体在毕赤酵母表达时,许多情况下 *Stel13* 切割 Glu-Ala 重复片段效率不高,Glu-Ala 重复序列就留在了表达目的蛋白的 N 端,作者采用 pPIC9K<sup>M</sup>(专利号 201110410391.0)载体,在其 N 端引入 *Kex2* 裂解位点,以保证表达目的蛋白具有天然 N 端<sup>[11]</sup>。将质粒 pUCm-T-*Aoxyn11A* 用 *Xho*I 和 *Not*I 进行双酶切,回收目的片段,与经同样双酶切的质粒 pPIC9K<sup>M</sup> 连接,转化 *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  感受态细胞,经通用引物 PCR 验证后,测序正确的重组质粒命名为 pPIC9K<sup>M</sup>-*Aoxyn11A*。

### 1.7 野生型酶和突变酶基因在 *Pichia pastoris* 中的表达

将质粒 pPIC9K<sup>M</sup>-*Aoxyn11A* 和 pPIC9K<sup>M</sup>-

*Aoxyn11A*<sup>M</sup> 用 *Sac*I 线性化后,电击转化毕赤酵母,挑取阳性转化子。电转化及筛选方法参见 Invitrogen 公司的操作手册。重组酵母的培养、诱导表达和检测的具体方法见文献。

### 1.8 木聚糖酶的活性测定

采用改进的 DNS 法测定木聚糖酶活性。2.4 mL 质量分数 0.5% 榉木木聚糖溶液 (pH 5.5) 加入 0.1 mL 适当稀释的酶液,50 °C 下反应 10 min 后,加入 2.5 mL DNS 试剂,沸水中显色 7 min,定容后测定  $A_{540\text{nm}}$ 。在上述反应条件下,每分钟产生 1  $\mu\text{mol}$  还原糖所需的酶量定义为一个酶活性单位 (U)。

### 1.9 酶学性质分析

**1.9.1 酶的最适反应温度和热稳定性** 取适当稀释酶液于 40~75 °C 水浴条件下进行酶解反应,每隔 5 °C 测定酶活性,以最高者为 100%,作温度-相对酶活性曲线;将酶液于不同温度下保温 30 min 后,按常规方法测定残余酶活性,以未保温处理酶液的活性定义为 100%,作温度-相对酶活性曲线。反应所用的缓冲液为 0.1 mol/L 柠檬酸-磷酸缓冲液 (pH 5.5)。

**1.9.2 酶的最适 pH 和 pH 稳定性** 取适当稀释酶液,温度为最适反应温度,在 pH 3.0~8.5 的条件下进行酶解反应,每隔 0.5 个 pH 单位测定酶活性,以最高者为 100%,作 pH-相对酶活性曲线;将酶在不同的 pH 值条件下于 40 °C 保温 1 h,再分别测定残留酶活性,以最高者为 100%,作 pH-相对酶活性曲线。反应所用的缓冲液为:0.1 mol/L 柠檬酸-磷酸缓

冲液(pH 3.5~8.0)和 0.05 mol/L 甘氨酸-氢氧化钠缓冲液(pH 8.5)。

**1.9.3 酶动力学参数的测定** 底物为不同浓度的桦木木聚糖溶液 (0.1 mol/L 柠檬酸-磷酸缓冲液配置,pH 5.5), 在酶的最适温度下测定其活性,按 Lineweaver-Burk 法作图,求出酶的  $K_m$  和  $V_{max}$  值。

## 2 结果与分析

**2.1 米曲霉木聚糖酶和超耐热酶氨基酸序列的比对**  
图 1 序列比对显示它们的 N 端氨基酸残基序

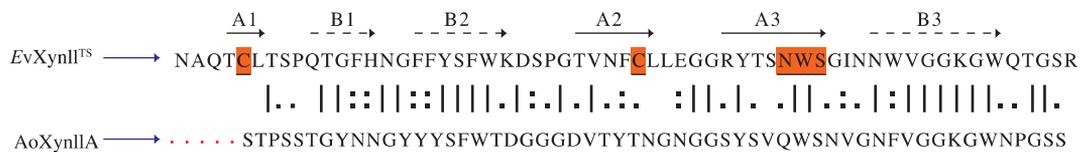


图 1 AoXyn11A 和 EvXyn11<sup>TS</sup> 的 N 端同源序列比对

Fig. 1 N-terminal amino acid homology alignment of AoXyn11A with EvXyn11<sup>TS</sup>

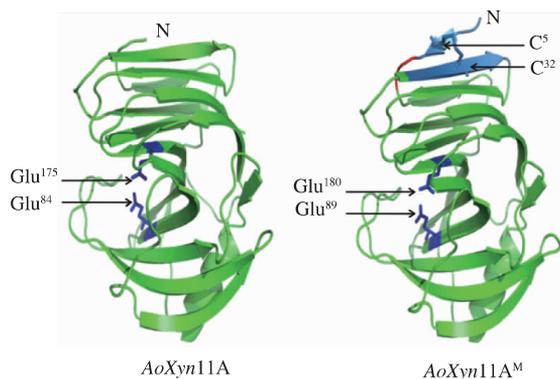


图 2 通过同源建模预测的 AoXyn11A 和 AoXyn11A<sup>M</sup> 分子结构

Fig. 2 Predicted molecular structures of AoXyn11A and AoXyn11A<sup>M</sup> by homology modeling

分子动力学模拟显示(图 3),随着模拟高温时间的延长,突变酶的 RMSD 值在各个时间点都低于野生型酶,预示着突变酶在模拟高温环境中变形小于野生型酶,具有更好的热稳定性。

### 2.2 原基因的定点突变

以原基因为模板,N 端引物 Xyn11-F、C 端引物 Xyn11-R<sub>m</sub> 经大引物 PCR 法扩增获得含有突变位点(Cys<sup>5</sup>-Cys<sup>32</sup>)的片段,该片段和理论长度(120 bp,图 4a)相符。以该片段为 N 端引物,C 端引物为 Xyn11-R 进行 PCR,获得目的片段 Ao<sub>oxyn</sub>11A<sup>M</sup> 与理论长度(602 bp,图 4b)相符。把目的片段克隆进 pUCm-T

列相似性为 43.5%,EvXyn11<sup>TS</sup> 含有二硫键和糖基化位点(见图 1),而后面的氨基酸残基序列的相似性在 70%以上。作者拟以 AoXyn11A 为母本,在对应于 EvXyn11<sup>TS</sup> 的位置上对这两个基因进行同源建模和分子动力学模拟分析

图 2 显示突变酶 AoXyn11A<sup>M</sup> 和野生型酶 AoXyn11A 相比较,其 N 端增加一个二硫键(C<sup>5</sup>和 C<sup>32</sup>,蓝色标识),但是它的三维结构和活性中心并没有受到影响。

载体,挑选阳性克隆子经测序验证,证明重组质粒 pUCm-T-Ao<sub>oxyn</sub>11A<sup>M</sup> 含有目的基因。

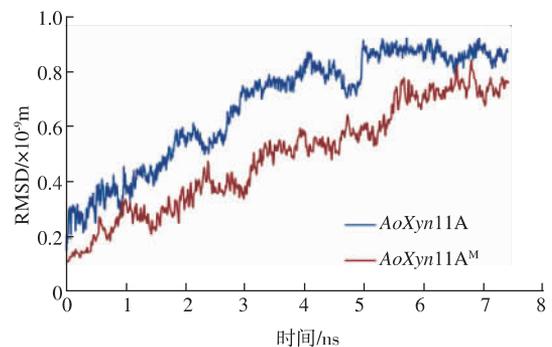
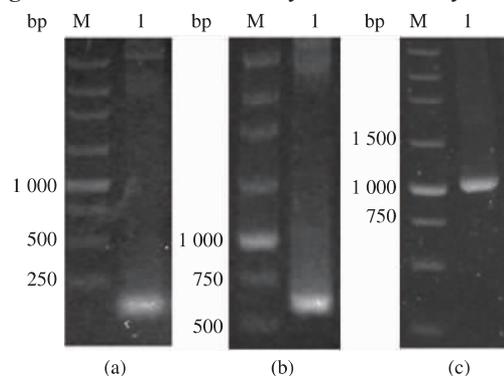


图 3 AoXyn11A 和 AoXyn11A<sup>M</sup> 的 RMSD

Fig. 3 RMSD values of AoXyn11A and AoXyn11A<sup>M</sup>



(a) 含有突变位点的大引物片段  
(b) 含有突变位点的目的基因  
(c) 通用引物扩增的目的基因, M 为标准核酸

图 4 定点突变过程

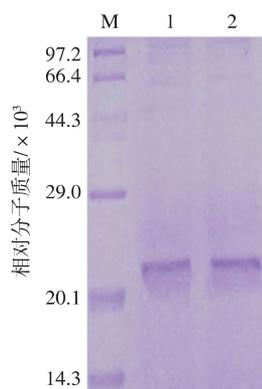
Fig. 4 Process of site-directed mutagenesis

### 2.3 重组表达质粒 pPIC9K<sup>M</sup>-Aoxyn11A<sup>M</sup> 的构建

按照 1.6 的方法构建重组表达质粒,经通用引物 PCR 扩增,目的条带与理论长度(1 076 bp,图 4c)相符,测序正确的重组质粒命名为 pPIC9K<sup>M</sup>-Aoxyn11A<sup>M</sup>。

### 2.4 野生型酶和突变酶基因在 *Pichia pastoris* 中的表达

野生型酶和突变酶的理论相对分子质量分别为 20 700 和 21 200,与图 5 显示的蛋白质相对分子质量大致相符,表明野生型酶和突变酶基因在毕赤酵母中得到了精确的表达。



M: 标准蛋白, 1、2分别为AoXyn11A和AoXyn11A<sup>M</sup>

图 5 *AoXyn11A* 和 *AoXyn11A<sup>M</sup>* 在毕赤酵母中表达后的 SDS-PAGE 分析

Fig. 5 SDS-PAGE analysis of *AoXyn11A* and *AoXyn11A<sup>M</sup>* expressed in *Pichia pastoris* GS115

### 2.5 重组木聚糖酶酶学性质

**2.5.1 最适反应温度与热稳定性** 在 1.9 描述的方法和条件下,反应时间为 10 min 时,图 6 显示野生型酶的最适反应温度为 55 °C,此时该酶的最大酶活性为 333 U/mL;突变酶的最适反应温度为 60 °C,此时该酶的最大酶活性为 250 U/mL。随着温度升高,高温使酶蛋白逐渐变性而失活,引起酶反应速率下降,在 55~75 °C 这一区间,由于 N 端引入了二硫键,其形成对构象起稳定作用,使突变酶表现出较好的稳定性,其变性慢于野生型酶,因而表现出相对较高的相对酶活性,这一结果和分子模拟比对是一致的。

把这两种酶置于不同的温度中保温 30 min 后,由图 7 显示,随着温度的升高,突变酶的相对酶活性一直高于野生型酶,表明该二硫键使突变酶具有更好的热稳定性。

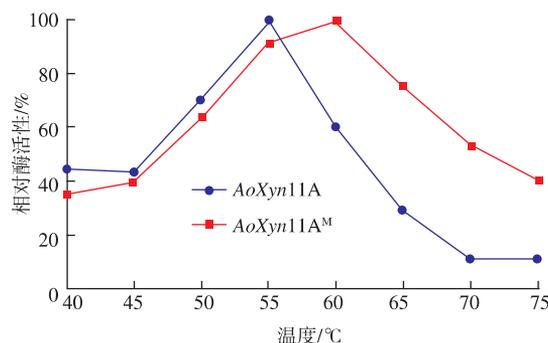


图 6 温度对 *AoXyn11A* 和 *AoXyn11A<sup>M</sup>* 活性的影响  
Fig. 6 Effects of temperatures on the activities of *AoXyn11A* and *AoXyn11A<sup>M</sup>*

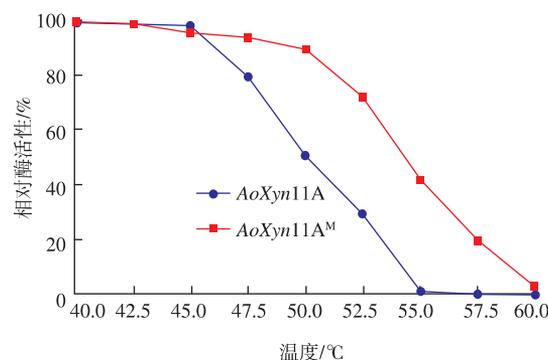


图 7 温度对 *AoXyn11A* 和 *AoXyn11A<sup>M</sup>* 热稳定性的影响  
Fig. 7 Effects of temperatures on the thermostability of *AoXyn11A* and *AoXyn11A<sup>M</sup>*

**2.5.2 酶的最适 pH 与 pH 稳定性** 图 8 显示这两种酶的最适 pH 集中在 pH 5~6 之间,pH 稳定性测试结果也大致相同,说明突变酶的酸碱耐受性变化不大。

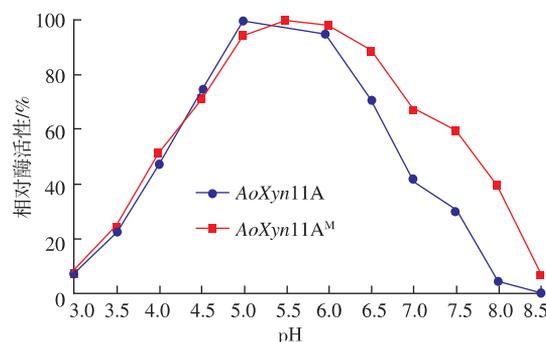


图 8 pH 对 *AoXyn11A* 和 *AoXyn11A<sup>M</sup>* 活性的影响  
Fig. 8 Effects of pH on the activities of *AoXyn11A* and *AoXyn11A<sup>M</sup>*

**2.5.3 酶的比酶活和  $K_m$**  在 1.9 的方法和条件下,测得野生型酶的比酶活为 3 490 U/mg, $K_m$  为 7.67 mg/mL;突变酶的比酶活为 2 480 U/mg, $K_m$  为 2.75 mg/mL。对这一现象的推测是由于突变酶引入了二

硫键而具有较好的稳定性,在适量的底物浓度时,和底物结合更加紧密和快速,表现出低的  $K_m$  值;当底物浓度超过一定量时,野生型酶由于整体柔性较好,能够随着底物量的增多而舒展结构,结合更多的底物并参加反应,表现出高的  $V_{max}$ 。

### 3 结 语

自然界酶的种类虽然比较多,但是全球飞速发展的经济对生物催化提出各不相同的要求。分析某个催化过程,利用基因工程手段对酶进行定点突变,从而改变酶的特定的酶学性质,使目的催化过程以最经济、最环保的方式完成,这对于我国加快经济结构转型,抢占技术至高点具有重要意义。通

过目的酶和耐热酶的序列比对能够有效的确定具有“热稳定效应”的氨基酸残基和相关的模式结构,提示了生物大分子对温度的进化适应,但是通常情况下只有一小部分的氨基酸的突变能够提高热稳定性,绝大部分的突变仅仅是“基因漂移”的结果。依靠计算机辅助设计,如同源建模、分子模拟等方法可以使我们的预测出与酶热稳定性相关的那部分氨基酸,从而使实验设计更具针对性。

通过计算机分析为先导再开展实验,分析和实验结果的一致性表明了作者实验方法的有效性。突变酶比酶活虽有一定的下降,但是具有更高的热稳定性和较好的底物亲和力(低的  $K_m$  值),有很大的应用潜力。

### 参考文献:

- [1] Collins T, Gerday C, Feller G. Xylanases, xylanase families and extremophilic xylanases [J]. **FEMS Microbiol Rev**, 2005, 29: 3-23.
- [2] Polizeli M L T M, Rizzatti A C S, Monti R, et al. Xylanases from fungi: properties and industrial applications [J]. **Appl Microbiol Biotechnol**, 2005, 67: 577-591.
- [3] Kumar S, Tsai C J, Nussinov R. Factors enhancing protein thermostability[J]. **Protein Eng**, 2000, 13: 179-191.
- [4] Dumon C, Varvak A, Wall M A, et al. Engineering Hyperthermostability into a GH11 Xylanase Is Mediated by Subtle Changes to Protein Structure[J]. **Biol Chem**, 2008, 283: 22557-22564.
- [5] Xiong H R, Fenel F, Leisola M, et al. Engineering the thermostability of *Trichoderma reesei* endo-1,4- $\beta$ -xylanase II by combination of disulfide bridges[J]. **Extremophiles**, 2004, 8: 393-400.
- [6] Gao S J, Wang J Q, Wu M C, et al. Engineering hyperthermostability into a mesophilic family 11 xylanase from *Aspergillus oryzae* by in silico design of N-terminus[J]. **Biotechnol Bioeng**, 2013, 110: 1028-1038.
- [7] 高树娟,汪俊卿,邬敏辰,等. N端二硫键对11家族木聚糖酶热稳定性的影响[J]. 生物工程学报, 2012, 28: 1441-1449.  
GAO Shu-juan, WANG Jun-qing, WU Min-chen, et al. Effect of the N-terminal disulfide bridge on the thermostability of family 11 xylanases[J]. **Chin J Biotech**, 2012, 28: 1441-1449. (in Chinese)
- [8] 张慧敏,李剑芳,邬敏辰,等. 耐热木聚糖酶基因在毕赤酵母中的表达及酶学性质[J]. 食品与生物技术学报, 2013, 32: 124-128.  
ZHANG Hui-min, LI Jian-fang, WU Min-chen, et al. Expression of a thermostable xylanase gene in *Pichia pastoris* and its enzymatic characterization[J]. **J Food Sci Biotechnol**, 2013, 32: 124-128. (in Chinese)
- [9] Eswar N, Eramian D, Webb B, et al. Protein structure modeling with Modeller[J]. **Methods Mol Biol**, 2008, 426: 145-159.
- [10] 朱玉贤,李毅. 现代分子生物学(第二版)[M]. 北京:高等教育出版社,2006.
- [11] 申艳敏,魏建超,尚书文,等. 人源抗菌肽 LL-37 在毕赤酵母中的高效表达及其活性检测[J]. 微生物学通报, 2008, 35: 539-544.  
SHEN Yan-min, WEI Jian-chao, SHEN Shu-wen, et al. High expression of the human antibacterial peptide LL-37 in *Pichia pastoris* and the detection of its activity[J]. **Microbiology**, 2008, 35: 539-544. (in Chinese)
- [12] 王鹏,赵颖,朱平,等. 人  $\beta$ -分泌酶(BACE1)在毕赤酵母中分泌表达及纯化[J]. 生物工程学报, 2011, 27: 1655-1666.  
WANG Peng, ZHAO Yin, ZHU Pin, et al. Expression and purification of human  $\beta$ -secretase (BACE1) in *Pichia pastoris* [J]. **Chin J Biotech**, 2011, 27: 1655-1666. (in Chinese)