

文章编号: 1673-1689(2011)02-0267-06

大肠杆菌苹果酸脱氢酶基因 *mdh* 的克隆、 高效表达及酶学性质

李倩^{1,2}, 徐美娟^{1,2}, 夏海锋^{1,2}, 饶志明*^{1,2}

(1. 江南大学 工业生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214122; 2. 江南大学 生物工程学院, 江苏 无锡 214122)

摘要: 以大肠杆菌基因组 DNA 为模板, 扩增得到苹果酸脱氢酶(*mdh*) 编码基因 *mdh*, 构建了重组菌 pET-28a/*mdh*/BL21 并成功表达了 *mdh*, 大小约 36 000。选用 Ni 柱亲和层析法纯化具有活性的苹果酸脱氢酶(*mdh*), 纯化后比酶活达到 112.5 U/mg, 纯化倍数达 2.62 倍, 回收率为 59%。并对该酶的酶学性质进行了初步研究, 其中反应最适 pH 值为 6.0, 在 pH 值 2.0~6.0 范围内稳定; 反应最适温度为 37 °C, 在 42 °C 以下酶的稳定性较好。K⁺ 对酶有明显的激活作用, Cu²⁺ 对酶有抑制作用, Hg²⁺ 和 Zn²⁺ 对酶有很强的抑制作用。醇类对酶活力影响不大, 丙三醇可显著提高酶的热稳定性。酶动力学参数以草酰乙酸为底物的 K_m 为 0.235 mmol/L, V_{max} 为 0.47 μmol/(L·min)。

关键词: 大肠杆菌; 克隆表达; 苹果酸脱氢酶; 纯化; 酶学性质

中图分类号: Q 814

文献标识码: A

Cloning, Expression, and Characterization of a Malate Dehydrogenase Gene from *Escherichia coli*

LI Qian^{1,2}, XU Meijuan^{1,2}, XIA Haifeng^{1,2}, RAO Zhiming*^{1,2}

(1. Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: Malate dehydrogenase (MDH) gene was amplified via PCR from the chromosome of *Escherichia coli* in this manuscript. The PCR product was cloned into the expression vector pET-28a(+). The resulted recombinant plasmid was transformed into *E. coli* BL21(DE3). Induced by 0.5 mmol/L IPTG, MDH, a 36KDa protein, was successfully expressed in *E. coli* BL21(DE3). An active MDH was purified by Ni-NTA column affinity Chromatography, with the specific activity of 112.5 U/mg, the purification multiple of 2.62, and the recovery rate of 59%. In a preliminary study, the enzymatic properties of the purified His-tagged enzyme were characterized. It was found to have pH and temperature optima of 6.0 and 37 °C, respectively. The enzyme was stable when pH and temperature kept in the range of 2.0 to 6.0 and below 42 °C, respectively. Its activity was activated by K⁺ dramatically, inhibited by Cu²⁺, seriously inhibited

收稿日期: 2010-06-22

基金项目: 国家 863 计划项目(2006AA020103, 2007AA02Z207); 国家自然科学基金项目(20676053, 30970056); 中央高校基本科研业务费专项资金项目(JUSRP31001)。

* 通信作者: 饶志明(1975-), 男, 江西抚州人, 农学博士, 教授, 博士研究生导师, 主要从事微生物育种与发酵工程方面的研究。Email: raozm@yahoo.com.cn

by Zn^{2+} and Hg^{2+} . Although alcohols have little effect on this enzyme, glycerol could dramatically improve the thermal stability of MDH. When oxaloacetic acid was used as substrate, the enzyme kinetic constants of K_m and V_{max} was 0.235 mmol/L and 0.47 μ mol/(L · min), respectively.

Key words: *Escherichia coli*, cloning and expression, malate dehydrogenase (MDH), purification, enzymatic properties

苹果酸脱氢酶(EC 1.1.1.37, *mdh*)广泛分布在动物组织、微生物和植物中^[1]。它是一种活性较强的酶,存在于乙醛酸体、线粒体、过氧化物体、叶绿体、细胞浆、以及锥虫甘油体内。*mdh*为多聚体酶,是由相同或相似亚基组成的二聚体或四聚体,亚基的相对分子质量为30 000~35 000,催化草酰乙酸盐与苹果酸盐进行相互转化时,苹果酸脱氢酶可以NAD或NADH为辅因子^[2-3]。

苹果酸脱氢酶不仅是一种重要的糖代谢酶,而且具有较高医学诊断价值和理论研究价值。苹果酸脱氢酶在临床诊断中用于多酶分析及疾病的早期诊断,例如用于诊断DIC(弥散性血管内凝血),心肌梗塞,急慢性肝炎等。利用*mdh*底物专一性,还可将其用于拆分D、L-苹果酸^[4],也可以用于食品中有机酸含量的测定^[5],如L-苹果酸、醋酸、柠檬酸等物质的测定,具有广泛的应用前景。目前国内关于动物、植物中苹果酸脱氢酶的相关研究较多^[5-9],在微生物领域的报道较少。

作者克隆了来自大肠杆菌的苹果酸脱氢酶基因,构建重组表达载体pET-28a(+)-*mdh*,成功构建了基因工程菌pET-28a*mdh*/BL21,并利用镍柱亲和和层析法对表达的*mdh*进行了纯化,得到了较纯的酶液,并对该酶的酶学性质进行了研究。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株与载体 大肠杆菌(*Escherichia coli*) BL21(DE3):由作者所在实验室保藏;克隆载体pMD18T:购自Takara公司;质粒pET-28a(+):购自Novagen公司。

1.1.2 培养基及培养条件 LB培养基,培养温度37℃,摇床转速150 r/min,卡那霉素质量浓度为50 μ g/mL, IPTG终浓度为0.5 mmol/L。

1.1.3 工具酶及其他试剂 质粒小量抽提试剂盒、胶回收试剂盒:购自北京博大泰克生物基因技术有限公司;T₄DNA连接酶、Taq DNA聚合酶、dNTPs、DNA限制性内切酶、IPTG:购自TaKaRa

公司;Tris、SDS:购自Sigma公司;还原型酰胺腺嘌呤二核苷酸(NADH),咪唑和卡那霉素:购自上海Sangon公司;丙烯酰胺、甲叉双丙烯酰胺:购自American Promega Corporation;PCR引物:由上海赛百盛基因技术有限公司合成;广范围蛋白质相对分子质量标准:购自Fermentas和Takara公司;其他试剂均为国产分析纯试剂。

1.2 方法

1.2.1 苹果酸脱氢酶基因*mdh*的克隆 根据NCBI大肠杆菌的全基因组核酸序列中*mdh*基因序列,设计苹果酸脱氢酶的PCR引物。

P1: CCGGAATTCATGAAAGTCGAGTCC TCG (*EcoRI*)

P2: CCGCTCGAGTTACTTATTAACGAAC TC (*XhoI*)

从大肠杆菌中抽提染色体DNA作为模板^[6],进行PCR扩增。PCR扩增体系:模板大肠杆菌的染色体DNA 2 μ L,上下游引物各1 μ L, dNTP MIX 4 μ L, 10 \times Buffer 5 μ L, 灭菌的双蒸水 36.5 μ L, Ex-taq 酶0.5 μ L。PCR扩增条件为:95℃变性5 min, 94℃ 90 s, 58℃ 90 s, 72℃ 90 s, 共35个循环,最后72℃延伸10 min。

1.2.2 PCR产物与表达载体pET-28a的连接 质粒pET-28a和纯化的PCR产物分别用*EcoRI*和*XhoI*双酶切。50 μ L反应体系如下:PCR产物(pET-28a) 25 μ L, Buffer 5 μ L, 限制性内切酶各3 μ L, 用灭菌的双蒸水补齐, 37℃酶切4 h。电泳检验酶切产物,并用凝胶回收试剂盒对酶切产物进行纯化和回收。连接产物于16℃水浴连接过夜。转化*E. coli* BL21(DE3)的感受态细胞,提取质粒,经酶切验证后,-70℃甘油冻管保存。

1.2.3 苹果酸脱氢酶的诱导表达及检测 重组菌37℃振荡培养过夜,转接至37℃培养至OD₆₀₀约为0.6~0.8,加入IPTG至终浓度为0.5 mmol/L^[4,6],30℃诱导过夜,取诱导的菌液200 μ L, 8 000 r离心1 min后收集菌体。SDS-PAGE验证表达结果,以含空载体质粒的pET-28a的*E. coli*

BL21 作为对照^[9-10]。

1.2.4 苹果酸脱氢酶的纯化 将过夜诱导的菌液于 4 ℃, 8 000 r/min, 离心 15 min, 用 pH 7.4 的 PBS 缓冲液洗两次, 用提取缓冲液^[6] (50 mmol/L Tris-HCl, pH 6.0, 0.5 mol/L NaCl, 1% TritonX-100, 30 μmol/L DTT) 洗一次, 超声波破碎菌体, 14 000 r/min 离心 30 min, 取上清液经 Ni-NTA 柱纯化后得到纯的 *mdh*。

1.2.5 苹果酸脱氢酶活力的测定 *mdh* 在催化草酰乙酸转化为苹果酸的同时, 将 NADH 氧化为 NAD, NADH 在 340 nm 处有最大吸收峰, 连续测定酶反应过程中 340 nm 处吸光度的变化即可算出酶活^[6-8]。酶活力单位(U)定义为: 在 25 ℃、pH 6.0 下, 每分钟氧化 1 μmol 的 NADH 所需的酶量。

1.2.6 蛋白质质量分数的测定 粗酶液蛋白质质量分数采用 Bradford^[5] 法测定, 以 BSA 为标准蛋白质。

1.2.7 苹果酸脱氢酶酶学性质的研究

1) 最适 pH 值及 pH 值稳定性^[11-17]: 配制 pH 2.0~12.0 的反应缓冲液, 37 ℃ 下将酶液分别与不同 pH 值的缓冲液混合反应, 测 *mdh* 在不同缓冲液中反应时的酶活, 观察酶反应的最适 pH 值。

将一定量的酶液加入到上面不同 pH 值的缓冲液(不含底物和辅酶)中, 在 37 ℃ 中保温 1 h, 测剩余酶活力, 观察 *mdh* 在不同 pH 值下的稳定性。

2) 最适温度和热稳定性^[11-17]: 采用 pH 值为 6.0 的反应体系, 分别在 25~80 ℃ 下测酶活, 观察不同温度对酶促反应的影响。将一定量的酶液置于以上不同的温度下保温 1 h, 测定剩余酶活, 观察 *mdh* 在不同温度下的稳定性。

3) 不同金属离子对酶活的影响^[11-17]: 选择酶的最适温度和 pH 值的条件下, 在反应体系中分别加入终浓度为 2.0 mmol/L 的 K⁺、Na⁺、Mg²⁺、Cu²⁺、Ni²⁺、Co²⁺、Ba²⁺、Zn²⁺、Hg²⁺、Fe³⁺ 后测定 *mdh* 的酶活, 以不加上述离子的酶活为对照, 测定不同金属离子对酶促反应的影响。

4) 不同醇类对酶活力的影响^[11-17]: 选择酶的最适温度和 pH 值条件下, 在反应体系中分别加入体积分数 2% 的乙二醇、丙二醇、丙三醇、甘露醇、山梨醇、聚乙二醇, 测定 *mdh* 的酶活, 以不加醇类的初始酶液的酶活为对照, 测定不同醇类对酶促反应的影响。

5) 不同醇类对酶热稳定性的影响^[11-17]: 将酶液置于以上 6 种醇类中于 42 ℃ 保温 1 h, 测定保温后的剩余酶活。观察不同醇类对 *mdh* 稳定性的影响。以初始酶液的酶活为 100%, 以不加保护剂的酶液经同样热处理为对照。

6) K_m 值及 V_{max} 的测定^[11-17]: 配制 50、100、150、200、300、400、600 μmol/L 的不同浓度的草酰乙酸的底物溶液, 分别与酶液反应, 采用双倒数作图法确定 *mdh* 的 K_m 及 V_{max} 。

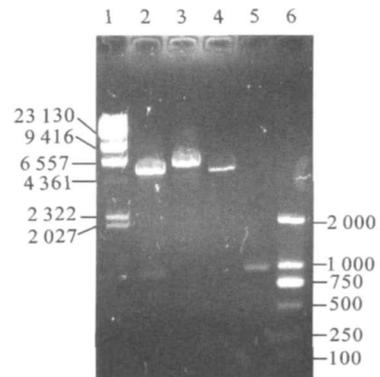
2 结果与讨论

2.1 苹果酸脱氢酶基因 *mdh* 的克隆及分析

提取大肠杆菌的基因组 DNA, 用 P1, P2 引物进行扩增, 得到长度为 939 bp 的基因内部片段并测序。测得扩增获得的基因 *mdh* 核苷酸序列与 GenBank 中公布的 *Escherichia coli* DH1 的全基因组核苷酸序列中 *mdh* 基因序列同源性为 100%。

2.2 重组大肠杆菌表达载体的构建

将 T-*mdh* 用 EcoRI 和 XhoI 进行双酶切, 胶回收 *mdh* 片段, 将其与经相同酶切线性化的 pET-28a(+) 载体连接, 酶切验证, 重组质粒经 EcoRI 和 XhoI 进行双酶切, 释放 5 369 bp 和 939 bp 大小的片段, 分别对应于 pET-28a(+) 和 *mdh* 的大小, 结果见图 1。表明重组质粒构建成功, 将其命名为 pET-28a(+)-*mdh*。



1: DNA Marker: λDNA/Hind III; 2: pET-28a/mdh/XhoI+EcoRI; 3: pET-28a/mdh/EcoRI; 4: pET-28a/EcoRI; 5: *mdh* gene; 6: DNA Marker: DE-2000

图 1 质粒 pET 28a(+)-*mdh* 的酶切验证

Fig. 1 Enzyme analysis of recombinant plasmid pET 28a(+)-*mdh*

2.3 MDH 在 *E. coli* BL21(DE3) 中的表达及重组蛋白质的纯化

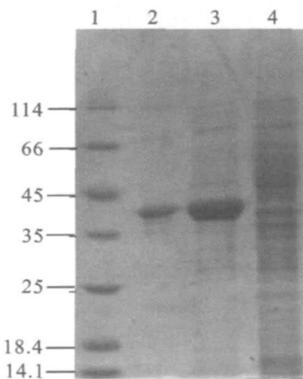
重组菌 pET-28a(+)-*mdh*/BL21(DE3) 经 IPTG 诱导后的菌液经超声波破碎细胞, 取上清液进行 SDS-PAGE 电泳分析, 得到一条特异性条带。MDH 大小约 36 000, 6 个组氨酸标签大小约 4 000, 所以本研究表达的蛋白质大小约 40 000, 与文献报道基本一致。粗酶液比酶活为 43 U/mg, 这表明基因已经在 大肠杆菌 中成功表达, 并且该酶具有生物

学活性。经 Ni-NTA 纯化后的 MDH 进行 SDS-PAGE 电泳分析,结果见图 2。条带相对单一,基本上可认为已经得到较纯的 MDH,比酶活可达到 112.5 U/mg,是纯化前粗酶液酶活的 2.62 倍,回收率达到 59%,结果见表 1。

表 1 重组蛋白 MDH 纯化表

Tab. 1 Purification of recombinant MDH

纯化步骤	总蛋白质质量/mg	总酶活力/U	比酶活/(U/mg)	回收率/%	纯化倍数
粗酶液	39.3	1689.9	43	100	1
Ni 亲和层析	8.86	996.8	112.5	59	2.62



1: Protein markers (KDa); 2: purified *mdh*; 3: supernatant of *E. coli* BL21 with recombinant plasmid pET 28a (+)-*mdh*; 4: supernatant of *E. coli* BL21 with plasmid pET-28a (+)

图 2 重组菌全细胞蛋白质及 MDH 纯化后 SDS PAGE 电泳

Fig. 2 SDS-PAGE analysis of proteins in whole cells and MDH purification

2.4 苹果酸脱氢酶的酶学性质

2.4.1 最适 pH 值及 pH 值稳定性 将 MDH 在反应体系的 pH 值为 2.0~12.0 范围内反应,测定该酶的酶活^[5-7],结果见图 3。

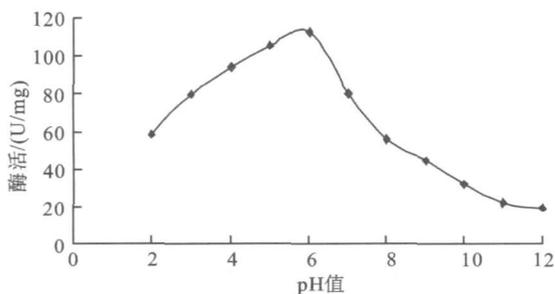


图 3 苹果酸脱氢酶的最适 pH 范围

Fig. 3 Optimal pH of MDH

由图 3 可见,MDH 在 pH 值为 6.0 时酶活达到最高,最高酶活为 112.5 U/mg,可以确定该酶反应的最适 pH 值是 6.0。再将 MDH 在不同 pH 值

2.0~12.0 的反应体系中 37 °C 保温 1 h,1 h 后测其酶活,结果见图 4,MDH 在 pH 值 2.0~6.0 范围内保温 1 h 后,剩余酶活仍在 70% 以上,说明 MDH 在酸性条件下较稳定。

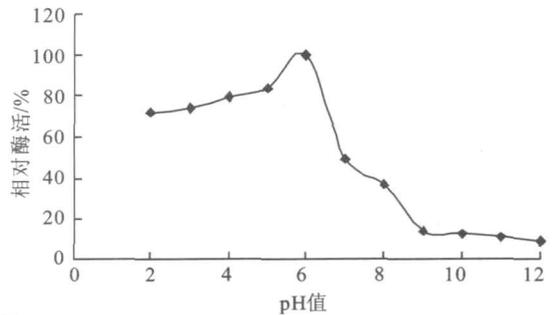


图 4 苹果酸脱氢酶在不同 pH 值下的稳定性

Fig. 4 Stability of MDH on different pH

2.4.2 最适温度和热稳定性 MDH 在 25~80 °C 范围内进行酶促反应,测的酶活^[5-7]见图 5。由图 5 可知,MDH 的最适反应温度为 37 °C。在热稳定性,结果见图 6。MDH 在 42 °C 以下较稳定,水浴保温 1 h 后酶活能保留 50% 以上,温度继续升高,酶的活力继续丧失,到 65 °C 以后酶迅速变性成白色絮状,酶的活力基本上没有。

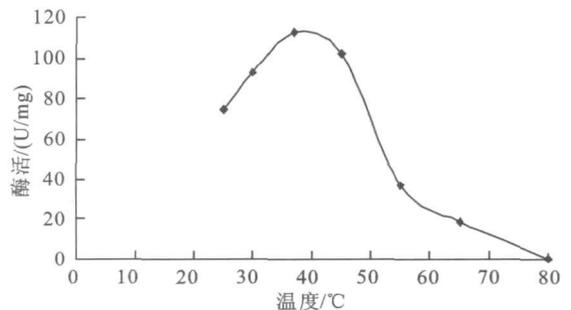


图 5 苹果酸脱氢酶的最适反应温度

Fig. 5 Optimal temperature of MDH

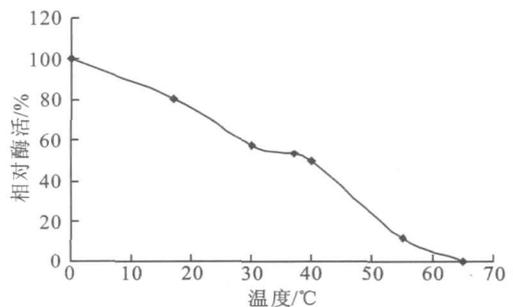


图 6 苹果酸脱氢酶的热稳定性

Fig. 6 Stability of MDH on different temperature

2.4.3 不同金属离子对酶活力的影响 金属离子经常可以作为酶促反应的辅助因子,因此在酶促反应中经常添加某些金属离子来促进酶促反应的进行^[5-7]。MDH 在反应中以 NADH 为辅酶,在 MDH

催化的反应中添加不同的金属离子, 观察不同金属离子对酶促反应的影响。以不加金属离子的反应液中 MDH 的酶活力为对照。各种金属离子对 MDH 的酶活的影响见表 2。可以看出, K^+ 对酶有明显的激活作用, Cu^{2+} 对酶有抑制作用, Hg^{2+} 和 Zn^{2+} 对酶有很强的抑制作用。

表 2 金属离子对 MDH 酶活力的影响

Tab. 2 Effect of metal ions on the activity of MDH

离子	相对酶活/ %
K^+	120.0
Na^+	100.0
Mg^{2+}	97.1
Cu^{2+}	60.4
Ni^{2+}	104.3
Co^{2+}	102.1
Ba^{2+}	92.4
Ca^{2+}	96.3
Zn^{2+}	20.7
Hg^{2+}	0.0
Fe^{3+}	101.7

2.4.4 不同醇类对酶活力的影响 醇类对酶活有一定的保护作用^[6], 为了研究不同的醇类对酶稳定性的影响, 必须先对不同醇类对酶活力的影响进行研究。在反应体系中分别加入体积分数 2% 的乙二醇、丙二醇、丙三醇、甘露醇、山梨醇、聚乙二醇, 37 °C 下测定 *mdh* 的酶活。以不加醇类的初始酶液的酶活为 100%, 测定不同醇类对酶促反应的影响。结果见表 3。可以看出, 不同醇类对酶活影响不大。

表 3 不同醇类对酶活力的影响

Tab. 3 Effect of alcohols on the activity of MDH

名称	添加体积分数/ %	相对活性/ %
乙二醇	2	97
丙二醇	2	95
丙三醇	2	100
甘露醇	2	96
山梨醇	2	98
聚乙二醇	2	93

2.4.5 不同醇类对酶热稳定性的影响 由以上通过对苹果酸脱氢酶热稳定性的研究可知: 苹果酸脱氢酶的热稳定性较差。由文献[5]可知, 醇类对提高酶的稳定性有一定效果, 结果见表 4。可见醇类对提高 MDH 的热稳定性有一定的作用, 其中丙三醇对提高酶的热稳定性的效果最好。可能是醇类的羟基基团与酶分子作用, 也可能是醇类减少了介电常数, 从而加强了酶分子的疏水作用, 醇类与水

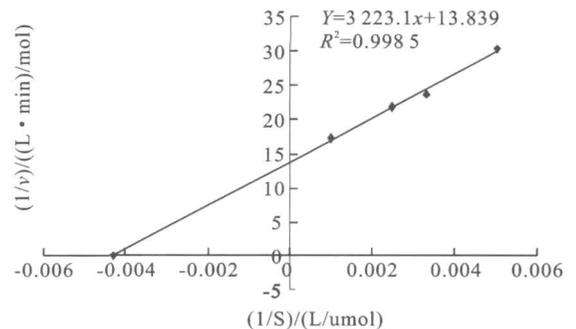
分子结合, 降低水的活度, 使酶蛋白受水分子影响减少。

表 4 不同醇类对酶热稳定性的影响

Tab. 4 Effect of alcohols on the thermal stability of MDH

名称	添加体积分数/ %	相对活力/ %
丙三醇	2	94.8
乙二醇	2	72.55
丙二醇	2	70.3
山梨醇	2	66.7
甘露醇	2	64.7
聚乙二醇	2	60.7

2.4.6 动力学常数 K_m 值及 V_{max} 在 pH 值 6.0, 37 °C 下, 采用双倒数法测 MDH 对草酰乙酸的 K_m 和 V_{max} ^[5-7], 结果见图 7。 K_m 为 0.235 mmol/L, V_{max} 为 0.47 μ mol/(L·min)。

图 7 双倒数法测 MDH 的 K_{mOAA} Fig. 7 Double reciprocal plot for K_{mOAA}

3 结 语

作者成功构建了重组菌 pET-28 α *mdh*/BL21 (DE3), 经 IPTG 诱导后 SDS-PAGE 分析, 出现 36 000 目标蛋白质条带, 成功表达了苹果酸脱氢酶。据报道大肠杆菌菌株粗酶液比酶活为 15.1 U/mg^[18], 作者构建的重组大肠杆菌 BL21 比酶活提高了 1.85 倍为 43 U/mg。用 Ni-NTA 柱亲和层析法纯化 MDH 后比酶活达到 112.5 U/mg, 与粗酶液相比, 比酶活提高 2.62 倍, 可见表达量和比酶活均较高。初步研究了 MDH 酶学性质, 结果表明: MDH 的最适温度是 37 °C, 42 °C 以下较稳定; 热稳定性较差, 丙三醇对提高酶的热稳定性有一定的促进作用。最适 pH 为 6.0, 而真核生物 MDH 最适 pH 8.0^[5], 说明该酶在弱酸性的 pH 值条件下仍可保持较高的活性。 K^+ 对酶促反应有一定的激活作用, Cu^{2+} 对酶有抑制作用, Hg^{2+} 和 Zn^{2+} 对酶有很强的抑制作用。这与文献[5]中报道的基本相符。酶动力学参数以草酰乙酸为底物的 K_m 为 0.235

mmol/L, V_{\max} 为 $0.47 \mu\text{mol}/(\text{L} \cdot \text{min})$ 。

MDH 催化草酰乙酸与 L-苹果酸的相互转化过程是可逆的, 利用基因工程技术表达苹果酸脱氢酶

并对其相关性质进行研究, 为实现从苹果酸到草酰乙酸的转化, 即用相对廉价原料生产高附加值的草酰乙酸奠定了一定的理论基础。

参考文献(References):

- [1] Christopher Goward, Avid J. Nicholls. Malate dehydrogenase: A model for structure, evolution and catalysis[J]. **Protein Science**, 1994, 3: 1883– 1888.
- [2] Karl Fickenscher, Renate Scheibe, Frank Marcus. Amino acid sequence similarity between malate dehydrogenase(NAD) and pea chloroplast malate dehydrogenase (NADP) European[J]. **Journal of Biochemistry**, 1987, 3: 653– 658.
- [3] W Atzpodien, J M Gancedo, W Duntze, et al. Isoenzymes of malate dehydrogenase in *Saccharomyce scerevisiae*[J]. **European Journal of Biochemistry**, 1968, 1: 58– 62.
- [4] 杨柳青, 李萍, 何南, 等. 苹果酸脱氢酶的克隆表达与生物活性研究[J]. 药物生物技术, 2003, 10(2): 77– 83.
YANG Lirqing, LI Ping, HE Nan, et al. Cloning and expression of malate dehydrogenase gene in *E. coli*[J]. **Pharmaceutical Biotechnology**, 2003, 10(2): 77– 83. (in Chinese)
- [5] 龚韧, 张大伟, 江龙法, 等. 猪心苹果酸脱氢酶酶学性质及稳定性研究[J]. 河南工业大学学报, 2007, 28(5): 42– 45.
GONG Ren, ZHANG Da wei, JIANG Long fa, et al. Enzymatic properties and stability of malate dehydrogenase from porcine heart[J]. **Journal of Henan University of Technology**, 2007, 28(5): 42– 45. (in Chinese)
- [6] 姚玉新, 郝玉金, 李明, 等. 苹果细胞质苹果酸脱氢酶基因的克隆、表达及酶活性分析[J]. 园艺学报, 2008, 35(2): 181– 188.
YAO Yuxin, HAO Yujin, LI Ming, et al. Gene cloning, expression and enzyme activity assay of a cytosolic malate dehydrogenase from apple fruits[J]. **Acta Horticulturae Sinica**, 2008, 35(2): 181– 188. (in Chinese)
- [7] 徐美娟, 杨套伟, 饶志明, 等. 克雷伯氏菌甘油脱氢酶 *dhaD* 的克隆表达、纯化及酶学性质研究[J]. 中国生物工程杂志, 2008, 28(12): 30– 35.
XU Meijuan, Yang Taowei, RAO Zhiming, et al. Expression, purification and enzymatic characterization of *Klebsiella sp.* glycerol dehydrogenase in *E. coli*[J]. **China Biotechnology**, 2008, 28(12): 30– 35. (in Chinese)
- [8] Gerald Hahn, Bjorn Kaup, Stephanie Bringer Meyer, et al. A zinc containing mannitol 2 dehydrogenase from *Leuconostoc pseudomesenteroides* ATCC 12291: purification of the enzyme and cloning of the gene[J]. **Arch Microbiol**, 2003, 179: 101– 107.
- [9] 张静, 王洁, 王淑静, 等. 细粒棘球蚴中国大陆株线粒体苹果酸脱氢酶重组蛋白的表达、纯化及免疫特性分析[J]. 中国病原生物学杂志, 2006, 1(4): 249– 252.
ZHANG Jing, WANG Jie, WANG Shujing, et al. Expression, purification and immunogenicity analysis on mMDH recombinant protein of *Echinococcus granulosus* (Chinese mainland strain)[J]. **Journal of Pathogen Biology**, 2006, 1(4): 249– 252. (in Chinese)
- [10] 徐劲, 郑南才, 黄宝明, 等. 华支睾吸虫胞浆苹果酸脱氢酶活性位点氨基酸点突变对酶活性和热稳定性影响[J]. 中国人兽共患病杂志, 2006, 22(6): 575– 579.
ZHENG Nancai, HUANG Baoming, XU Jin, et al. Effect of amino acid site mutagenesis on the activity and heat stability of *Clonorchis sinensis* malate dehydrogenase[J]. **Chinese Journal of Zoonoses**, 2006, 22(6): 575– 579. (in Chinese)
- [11] Jelena Zaitseva, Kathleen M, Meneely, et al. Structure of *Escherichia coli* malate dehydrogenase at 1.45 Å resolution[J]. **Acta Crystallographica Section F Structural Biology and Crystallization Communications**, 2009, 65: 866– 869.
- [12] Tormo JR, Gonzalez MC, Cortes D, et al. Kinetic characterization of mitochondrial malate dehydrogenase from dictyosporium discoideum[J]. **Journal of General Microbiology**, 1982, 128: 1767– 1771.
- [13] Steven CHand, Mary M Becker, Frank P Conte. Purification and properties of cytoplasmic malate dehydrogenase isolated from alarval crustacean, *Artemia salina*[J]. **Journal of Experimental Zoology**, 1981, 2: 199– 2126.
- [14] 汪新颖, 王波, 侯松涛, 等. 苹果酸脱氢酶的结构及功能[J]. 生物学杂志, 2009, 26(4): 69– 72.
WANG Xinying, WANG Bo, HOU Songtao, et al. Structure and function of malate dehydrogenase[J]. **Journal of Biology**, 2009, 26(4): 69– 72. (in Chinese)
- [15] 李洪山, 张晓岚, 周培之. 旱生植物梭梭苹果酸脱氢酶的纯化及其酶学性质研究[J]. 新疆大学学报, 1994, 11(1): 72– 76.
Li Hongshan, Zhang Xiaolan, Zhou Peizhi, Study on NAD malate dehydrogenase from haloxylon ammodendron[J]. **Journal of Xinjiang University**, 1994, 11(1): 72– 76. (in Chinese)
- [16] 龚韧, 孙艳, 王静, 等. 猪心肌苹果酸脱氢酶的制备及应用[J]. 食品与生物技术学报, 2007, 28(5): 57– 61.
GONG Ren, SUN Yan, WANG Jing, et al. Enzymatic properties and stability of malate dehydrogenase from porcine heart[J]. **Journal of Henan University of Technology**, 2007, 28(5): 57– 61. (in Chinese)
- [17] 张大伟, 杨海麟, 王武. 猪心苹果酸脱氢酶的分离纯化及性质[J]. 食品与生物技术学报, 2007, 26(6): 91– 94.
ZHANG Da wei, YANG Hailin, WANG Wu. Preparation and characterization of malate dehydrogenase from swine heart[J]. **Journal of Henan University of Technology**, 2007, 26(6): 91– 94. (in Chinese)
- [18] Deborah R Breiter, Ernesto Resnik, Leonardj Banaszak. Engineering the quaternary structure of an enzyme: construction and analysis of a monomeric form of malate dehydrogenase from *Escherichia coli*[J]. **Protein Science**, 1994, 3: 2023– 2032.