

韦阳道, 易 弋, 石征宇, 等. 基于分子动力学模拟研究定点突变对葡聚糖酶热稳定性的影响[J]. 江苏农业科学, 2017, 45(20): 54–58.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2017.20.011

基于分子动力学模拟研究定点突变对 葡聚糖酶热稳定性的影响

韦阳道^{1,2,3}, 易 弋^{1,2,3}, 石征宇^{1,2,3}, 李家杰^{1,2,3}, 苏家敏^{1,2,3}, 伍时华^{1,2,3}, 黎 娅^{1,2,3}

(1. 广西科技大学生物与化学工程学院, 广西柳州 545006; 2. 广西科技大学广西糖资源绿色加工重点实验室, 广西柳州 545006;
3. 广西科技大学广西高校糖资源加工重点实验室, 广西柳州 545006)

摘要:为提高葡聚糖酶的热稳定性,对葡聚糖酶的三维结构进行模拟分析,获得 2 个突变体 R226A、G224A,用分子动力学的方法从原子水平上研究突变体与野生型的耐热性。结果显示,突变体 R226A、G224A 的均方根偏差,回旋半径和静电势能等参数值要低于野生型蛋白,表明突变体的热稳定性较野生型明显上升,更有利于在高温环境下发挥其生物活性。通过计算机模拟分析的方法研究定点突变对野生型酶的热稳定性的影响,可大大节省试验时间,同时可为阐明葡聚糖酶耐热性机制提供理论依据。

关键词:分子动力学;定点突变;葡聚糖酶;热稳定性

中图分类号: S188 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2017)20-0054-05

β -葡聚糖酶是专一作用于 β -葡聚糖的 1,3-及 1,4-糖苷键,可产生 3~5 个葡聚糖单位的低聚糖及葡萄糖^[1]。由于 β -葡聚糖广泛存在于植物性饲料中而不能被动物所利用,进而造成饲料的饲用价值降低。此外,含有较多 β -葡聚糖的饲料被动物食用后,会影响动物内源性消化酶与营养物质的接触,导致动物的消化率下降^[2]。因此,在饲料的加工过程中添加 β -葡聚糖酶将有效降低 β -葡聚糖的不良影响,提高动物的消化率、饲料的利用率^[3]。近年来,由于饲料加工过程中须经历高温高压的剧烈条件等原因,人们对嗜热 β -葡聚糖酶的研究越来越关注。

计算机分子模拟是以计算机及计算技术为工具和手段,运用计算数学的方法,解决复杂物理、化学、生物等问题的应用科学^[4],特别是随着近年来计算机技术的飞速发展,该手段发展越来越完善,其模拟试验所得结果与真实试验结果极为相似,因此可以辅助真实试验^[5],这样可以大大节省试验成本和人力。由于这些优点,计算机分子模拟技术被广泛应用,在生物学体系的研究中,该手段被用于解释核酸与蛋白质之间的相互作用^[6]、蛋白质与蛋白质之间相互作用^[7]、药物与抗原的作用机制^[8]等,已经成为世界研究前沿的领域。

本研究在已筛选出产嗜热葡聚糖酶的嗜热脱氮芽孢杆菌并获得该酶基因序列的基础上,进一步利用分子动力学模拟的方法从原子水平上研究定点突变对蛋白质耐热性的影响,以期获得耐热性更高的突变体。但目前由于尚未有对该酶结

构分子的研究,本研究中的部分氨基酸残基在该酶耐热性中的作用机制,可以为以后对该酶进行技术改造奠定理论基础。

1 材料与方法

1.1 研究对象

使用引自地衣芽孢杆菌(*Bacillus licheniformis*) SR01 的葡聚糖酶基因序列(登录号:YP_006712752.1),在前期研究中,该基因表达的葡聚糖酶具有较高的热稳定性,其最适温度为 55℃,并在 90℃下 2 h 仍保持 80%左右的生物活性^[9];通过 I-TASSER (<http://zhanglab.cmb.med.umich.edu/I-TASSER/>)网站同源建模预测其三维结构,建模所得模型 C 端结构缺少 22 个氨基酸残基,但是由于它距离该酶的活性部位较远,故本研究将所得该结构模型直接作为试验模型,详见图 1。该模型包含 223 个残基,1 808 个原子,15 个 β 折叠,3 个 α 螺旋,其结构类似于三明治结构。同源结构的模板为 1oq1.C,分辨率为 1.70Å,序列相似性为 65.44%。

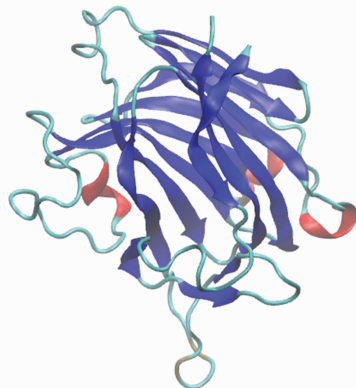


图1 葡聚糖酶的三维结构

1.2 分子动力学模拟

通过同源序列分析,以及氨基酸疏水性(<http://pic>.)

收稿日期:2016-04-25

基金项目:广西自然科学基金(编号:2014GXNSFAA118086、2015GXNSFBA139068)。

作者简介:韦阳道(1989—),男,安徽阜阳人,硕士,研究方向为微生物分子生物学。Tel:(0772)2687033;E-mail:wyangdao@outlook.com。

通信作者:黎 娅,硕士,助理研究员,研究方向为微生物学。Tel:(0772)2687033;E-mail:liya0807@163.com。

mbu.iisc.ernet.in/index.html)、氨基酸深度和活性位点(<http://mspc.bii.a-star.edu.sg/tankp/intro.html>) 预测分析,笔者得出 R226、G224 氨基酸残基位于该结构模型的内部,且 2 个氨基酸周围存在大量的疏水性氨基酸,因此笔者认为, R226、G224 可能不利于该酶的热稳定性。为了验证分析结果,本试验使用 Deepview 软件对建模结构进行定点突变,得到 R226A、G224A 突变体模型;采用 Groamcs 软件^[10]进行分子动力学模拟,力场选择 OPLS-AA/L 全原子力场^[11],水分子选用 SPCE 模型^[12],为了模拟真实环境,将蛋白质置于立方体盒子中,蛋白质距离盒子边缘 1.0 nm,采用周期边界条件,盒子周围被相同的盒子包围,以消除边界效应,盒子内填充 spc216.gro 模型水分子,添加离子使得整个系统的电荷为 0,处于中性的环境中。在能量优化后,使用约束动力学的方法,进行 800 ps 的约束动力学模拟,通过逐步升温的方法将体系的温度从 50 K 升到模拟需要的温度(324、344、364 K)。之后,采用弱耦合的方法保持体系中温度、压强

(100 kPa)的稳定,温度和压强的耦合时间常数均为 0.1 ps^[13],范德华和库伦作用的截断半径均为 1.4 nm^[14],静电相互作用使用 PME 方法计算^[15],模拟步长为 2 fs,对 3 个体系进行 20 ns 的自由动力学模拟,每 2 ps 采集 1 次构象。

2 结果与分析

2.1 葡聚糖酶结构的总体特征

根据建模所得的模型,笔者分析了该模型的结构合理性,通过网络服务器(<http://services.mbi.ucla.edu/SAVES/>)进行分析。如图 2 所示,该模型的各个氨基酸残基的平均 3D-ID 值都在 0 以上,并且有 96.86% 氨基酸残基的 3D-ID 值 ≥ 0.2 (蛋白质的总氨基酸至少有 80% ≥ 0.2),这说明其三维结构建模所用的模板序列兼容性较好。此外,葡聚糖酶主链二面角的 99.4% $\Phi-\Psi$ 角落在 Ramachandran 图的核心区和允许区,这也表明蛋白质主链结构具有合理性。

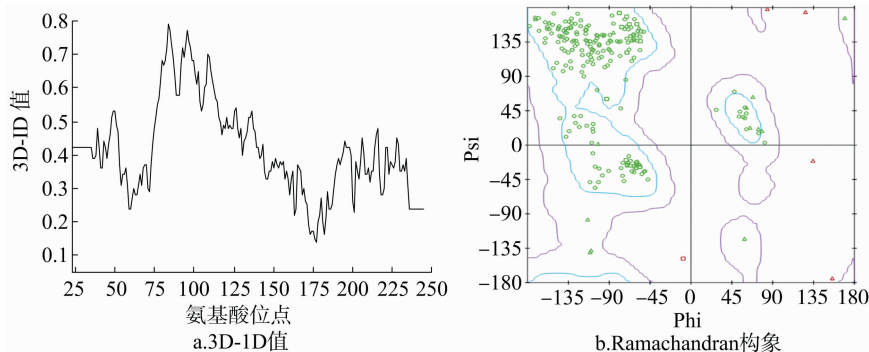


图2 葡聚糖酶 3D-ID 值与 Ramachandran 构象

2.2 均方根偏差分析

采用计算蛋白质分子均方根偏差 (root mean squared deviation, 简称 RMSD) 的方法来分析模拟过程中 3 个体系偏离初始位置的大小^[16]。在整个模拟过程中,初始结构的蛋白质骨架 RMSD 可以作为衡量蛋白质结构稳定的标准。在不同的温度下,野生蛋白与突变体 R226A、G224A 的 RMSD 变化如图 3 所示。可以看出,在 324 K 的温度下,3 个体系均较快达到平衡,在 10 ns 后,突变体 R226A 的 RMSD 明显低于野生型蛋白,而 G224A 的 RMSD 整体略低于野生型蛋白。在 344 K 的温度下,起始在 0~5 ns 之间,3 个体系的 RMSD 呈上升趋势,在 10~20 ns 之间呈平衡的趋势,这说明温度的增

加对体系的影响较大。R226A 突变体的 RMSD 变化较小,约为 0.16 nm, G224A 与野生型蛋白的 RMSD 相差无几。在 364 K 的温度下,突变体体系在后 10 ns 内,其 RMSD 都低于野生蛋白。整体来看,突变体 R226A 在 324、344 K 温度下,其结构偏离较小,而在 364 K 温度下,相比初始结构,其偏离较大,约为 0.2 nm;突变体 G224A 整体相比初始位置偏离较小,约为 0.18 nm。这说明与野生型蛋白相比,突变体 R226A、G224A 的热稳定性得以提高,更有利于适应高温环境。

2.3 蛋白质的均方根涨落 (root mean square fluctuation, 简称 RMSF) 分析

随着温度的升高,蛋白质的空间结构也会有相应的变化,

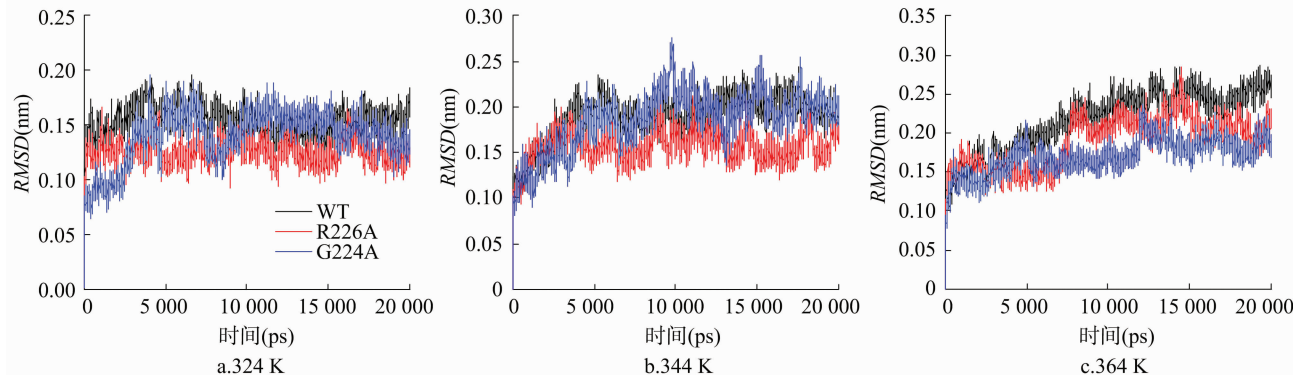


图3 突变体 R226A、G224A 与野生型的 RMSD 值

在较高的温度下,会使蛋白质失去一些力的作用,例如氢键,通过 *RMSF* 值主要是分析蛋白质构象的柔性^[17]。由图 4 可以看出,温度对不同位置的残基影响不一样,其中在 β 折叠(73~82,86~96,99~109,184~199aa)内的氨基酸残基受温度影响波动较小,其 *RMSF* 在 0.15 nm 以下波动,在 loop 环(61~72,110~126,209~220aa)和 α 螺旋(148~152aa)内的氨基酸残基受温度影响较大,最大 *RMSF* 可达到 0.4 nm;在

324,344 K 温度下,突变体 G224A 与野生型蛋白的 *RMSF* 较突变体 R226A 大,说明 G224A 与野生型的柔性高于 R226A,在 364K 温度下,G224A 整体柔性低于 R226A 和野生型,这与上文中蛋白质分子均方根偏差的研究结果一致。此外,在突变位点处的 *RMSF* 与野生型相差不大,这也说明本研究所选用的位点残基突变不会影响蛋白质的三级结构,且该突变点附近构象的异质性较小。

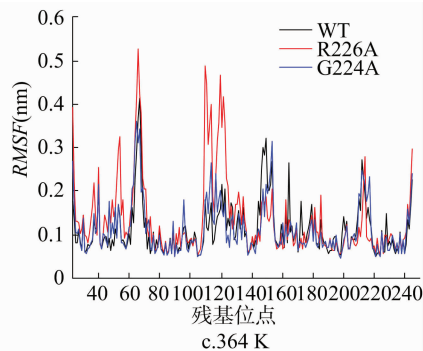
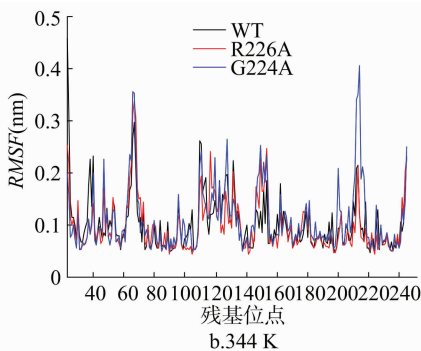
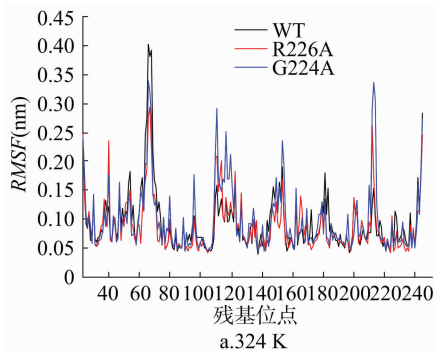


图4 突变体与野生蛋白的 *RMSF* 值

2.4 回旋半径分析

体系的回旋半径(R_g)是指体系中每个粒子离体系质心距离的几何平均值。其计算公式如下: $R_g = \sqrt{\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n r_i^2}$ 。式中: n 表示体系中粒子数; r_i 表示体系内粒子离体系质量中心的距离。对于相同粒子数的体系, R_g 反映了体系的紧密程度; R_g 越大,说明体系越膨胀,结构越松散^[18]。为了考察 3 个体系在不同温度下的形态变化,本研究分别计算了其回旋半径分布函数。由图 5 可知,在 324 K 下,突变体 R226A 的回旋半径分布在 1.675~1.720 nm 范围内,其构象集中在 1.690 nm 附近;野生型蛋白回旋半径分布在 1.690~1.730 nm 范围内,其构象集中在 1.710 nm 附近;G224A 的回旋半径分布在 1.690~1.720 nm 范围内,其构象集中在

1.705 nm 附近;在 344 K 下,野生型蛋白构象集中在 1.715 nm 附近,R226A 构象集中在 1.700 nm 附近,G224A 构象集中在 1.710 nm 附近;在 364K 温度下,野生型蛋白构象集中在 1.720 nm 附近,R226A 构象集中在 1.705 nm 附近,而 G224A 构象集中在 1.685 nm 附近。整体来看,R226A、G224A 的回旋半径都低于野生型蛋白,这说明突变体体系比野生型更加紧密。在不同温度下,随着温度的增加,R226A 与野生型蛋白的 R_g 值呈现上升的趋势,这说明温度的增加破坏了部分相互作用,使得整个体系变得膨胀,而 G224A 在 364 K 下比 324 K 的 R_g 值小,这可能是由于温度的增加破坏了一部分互相作用,同时也形成了新的相互作用,使得整个体系变得紧密,更能抵抗高温环境。

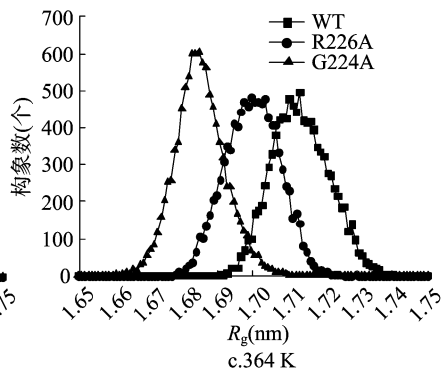
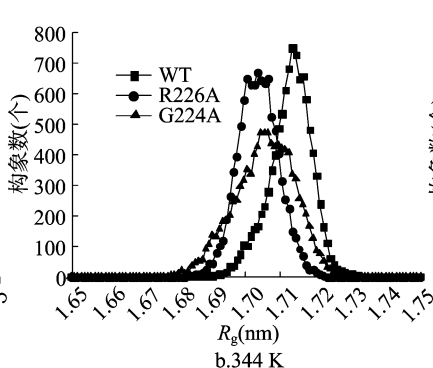
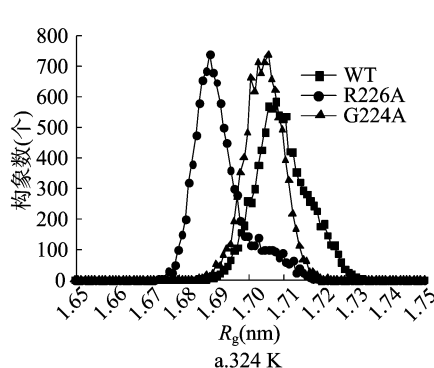


图5 突变体 R226A、G224A 与野生型蛋白回旋半径

2.5 疏水性分析

疏水相互作用是指非极性基团即疏水基团为了避开水相而聚集在一起的作用力。一般来说,疏水性残基被包埋在蛋白质结构的内部,对蛋白质结构稳定起到重要的作用^[19]。本试验通过研究不同温度下的疏水溶剂可及表面的大小来衡量蛋白质解折叠的程度,进而判断蛋白质结构的稳定性^[20],模拟试验结果如图 6 所示。可以看出,在 324 K 下,野生型蛋白质的疏水溶剂可及表面的分布范围为 53~61 nm²,其构象集中在

58 nm² 附近;R226A 的疏水溶剂可及表面的主要分布范围为 52~62 nm²,其构象集中在 57 nm² 附近;G224A 的疏水溶剂可及表面主要分布在 53~61 nm²,构象集中在 55~57 nm² 附近;在 344,364 K 下,野生型蛋白的疏水溶剂可及表面变化较小,主要分布在 53~62 nm²;R226A 体系疏水溶剂可及表面呈随温度增加而增加的趋势,主要分布在 53~63 nm²,其构象分别集中于 57,58 nm² 附近;而 G224A 体系随着温度的增加,其疏水溶剂可及表面呈下降趋势,其构象分别主要集中在

59、56 nm² 附近,这说明温度的增加使得该体系的结构变得更紧密,以抵抗高温环境,与以上研究中 G224A 回旋半径变小一致,进一步可以说明,疏水性大小对蛋白质的热稳定性起着重要作用。整体来看,R226A、G224A 在 324、364 K 下,其疏水溶剂可及表面都低于野生型,这可能是由突变后的氨基酸

造成的。Arg226、Gly224 氨基酸残基是极性氨基酸,具有亲水性,并位于蛋白质结构的疏水内核,不利于蛋白质结构的稳定,而突变为 Ala226、Ala224 氨基酸残基后,由于它实际上并非极性氨基酸,具有疏水性,有利于蛋白质疏水内核更好地折叠,因此可以推测,突变体系的热稳定性要高于野生型。

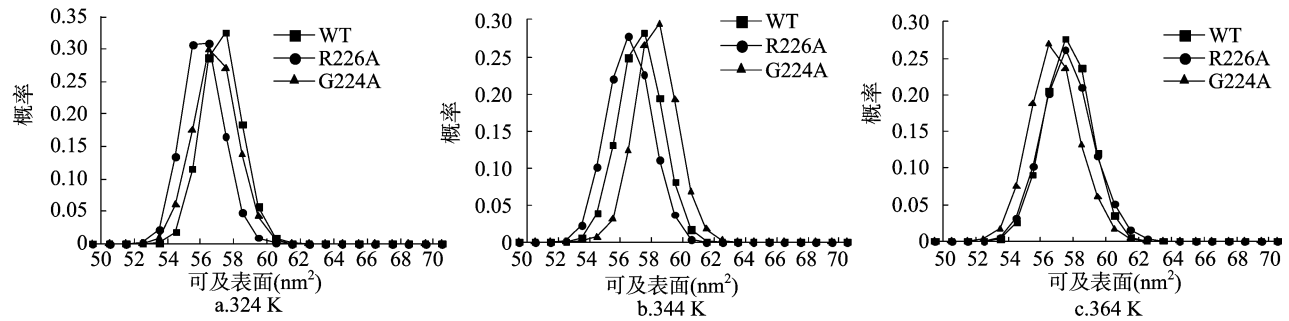


图6 R226A、G224A 与野生型蛋白疏水溶剂可及表面

2.6 其他参数分析

影响蛋白质结构稳定性的因素有很多,例如氢键、盐键和分子静电势能等^[21],本研究分别考察了突变体与野生型蛋白的氢键数、盐键数和分子静电势能,进一步研究温度对突变体系、野生型体系的影响。由表 1 可以看出,随着温度升高,突变体与野生型蛋白形成的盐桥数量增加,在相同的温度下,突变体的盐桥数略高于野生型。由于盐桥可以增强蛋白质分子的刚性,维持蛋白质高级结构的稳定性,因此认为,在高温环境下,嗜热酶可能会形成更多的盐桥来维持自身结构的稳定^[22]。在不同的温度下,突变体和野生型分子间、蛋白质与水分子间的氢键数随温度上升有下降趋势,因此可认为,温度升高破坏了部分氢键,使得蛋白质分子结构间的作用力下降,造成结构松散,抵抗高温环境能力变差;在相同的温度下,野生型蛋白与突变体蛋白相比氢键数相差不大,而野生型蛋白质与水分子之间的氢键数高于突变体系,这也可能与野生型可及溶剂表面高于突变体系,可以与水分子形成更多的氢键有关。蛋白质分子静电势能是衡量蛋白质结构分子是否稳定的重要参数,其值越小,说明该结构越稳定。在相同温度下,突变体体系与野生型分子静电势能相差较大,突变体体系之间静电势能相差无几;而随着温度的升高,野生型与突变体体系的分子静电势能出现明显增加的趋势,这说明温度的升高使 3 个体系的蛋白质结构变得不稳定。整体来看,温度破坏了分子结构的各种作用力,并且重新形成了新的作用力,因此评价蛋白质结构是否稳定,需要综合各种参数作出正确的判断。

3 结论与讨论

目前,嗜热蛋白以其自身独特的优越性被广泛关注,已成为研究的热门。有研究表明,增加蛋白质中的氢键^[23]、盐键^[24]和二硫键^[25]有利于提高酶的稳定性。也有研究表明,增加精氨酸(Arg)、脯氨酸(Pro)、丙氨酸(Ala)的含量,降低谷氨酰胺(Gln)、天冬酰胺(Asn)的含量有助于提高酶的热稳定性,主要的原因是 Ala 利于螺旋结构的形成^[26];Pro 由于其结构熵相比其他氨基酸小而更易于发生折叠,折叠后的结构需要更高的能量才能使其去折叠,这样在不影响酶的高级结构的前提下,引入 Pro 有助于提高酶的热稳定性^[27];Arg 由于具有胍基和较大的侧链,可提高与其他氨基酸残基之间的疏

表 1 突变体与野生型蛋白在不同温度下各参数比较

| 温度 (K) | 来源 | 盐桥数 (个) | 氢键数(个) | | 静电势能 (kJ/mol) |
|-----------|-------|------------|------------|---------------|------------------|
| | | | 蛋白质 分子间 | 蛋白质分子 与水溶液 | |
| 324 | WT | 36 | 170.48 | 496.38 | -719 662 |
| | R226A | 34 | 167.72 | 488.80 | -777 139 |
| | G224A | 39 | 168.00 | 458.93 | -776 787 |
| 344 | WT | 38 | 170.43 | 490.63 | -701 350 |
| | R226A | 40 | 168.89 | 484.36 | -757 382 |
| | G224A | 40 | 166.08 | 448.08 | -757 021 |
| 364 | WT | 45 | 166.53 | 481.72 | -683 377 |
| | R226A | 53 | 161.56 | 467.78 | -737 808 |
| | G224A | 56 | 167.66 | 431.08 | -737 454 |

水作用和离子间的作用力,有助于提高蛋白质的热稳定性^[28];而 Asn 和 Gln 由于在高温条件下易发生脱氨作用,造成酶部分失活,因此不利于提高酶的热稳定性^[29]。

为了研究葡聚糖酶的热稳定性机制,本研究通过使用分子模拟的方法,从原子水平分析了突变体 R226A、G224A 和野生型蛋白的热力学特性。相关试验数据显示,在相同温度下,突变体 R226A、G224A 的 *RMSD* 要低于野生型,在不同温度下,突变体与野生型蛋白的 *RMSD* 均升高,这表明突变体由于一级结构发生变化进而使得高级结构发生变化,使其与野生型相比,热稳定性提高;同时也可以得出,温度可以破坏蛋白质结构内部的作用力,造成结构的不稳定;通过对突变体与野生型蛋白的均方根涨落分析可以得出,氨基酸片段突变体较野生型的无规则卷曲和 α 螺旋部分波动大,而 β 折叠部分波动较小,且突变体 R226A 的柔性总体要低于野生型, α 螺旋柔性较大可能与其所处的位置及氨基酸的组成、数量有关。在不同温度下,随着温度的升高,部分氨基酸残基的柔性有增加的趋势,然而也有部分氨基酸残基的柔性降低,这可能是与其他氨基酸残基形成新的作用力造成的。回旋半径表示的一个体系的膨胀程度,回旋半径越小,说明该体系结合越紧密,分子间的作用力越强,蛋白质分子的耐热性越好。在相同的温度下,可以得出,突变体 R226A、G224A 的回旋半径比野生型小,这说明突变体的热稳定性较野生型强,可能是与突变后的氨基酸有关;然而在不同的温度下,突变体与野生型的回旋半径变化略微增大,这可能与本研究所使用的温度不足以

使得蛋白质发生去折叠有关。疏水作用在蛋白质结构与功能方面有着重要的作用,本研究通过分析突变体与野生型蛋白的疏水溶剂可及表面得出,突变体 R226A 的疏水溶剂可及表面积比野生型蛋白小,由此可以推测,突变体 R226A 主要是由于突变后的 A226 是疏水氨基酸,改变了蛋白质的疏水环境,导致蛋白质结构发生变化,使得内部疏水内核进一步折叠,增强了该突变体的热稳定性。本研究同时分析了不同温度下 3 个体系的其他参数,试验数据表明:随着温度的升高,突变体与野生型蛋白的分子势能明显升高,蛋白质间与蛋白质与水之间的氢键数下降,而盐桥数有上升的趋势,这与 Thomas 等研究盐键在 100 ℃ 下比 25 ℃ 下的作用力大幅度增强,并对于体系温度的增加具有一定弹性一致^[22]。由此,笔者通过结合以上研究结果,认为 R226A、G224A 有助于提高葡聚糖酶的热稳定性。本研究首次从原子水平上探讨葡聚糖酶的耐热机制,对今后提高葡聚糖酶热稳定性提供了理论指导意义。

参考文献:

- [1] Gohl B, Alden S, Elwinger K, et al. Influence of β -glucanase on feeding value of barley for poultry and moisture content of excreta [J]. *British Poultry Science*, 1978, 19(1): 41–47.
- [2] 张洁, 蔡敬民, 吴克, 等. β -葡聚糖酶的研究与应用前景 [J]. *安徽农业科学*, 2003, 31(5): 895–896.
- [3] 郭小权, 胡国良, 刘妹. β -葡聚糖的抗营养作用及 β -葡聚糖酶在饲料中的应用 [J]. *江西饲料*, 2001, 2(2): 11–13.
- [4] 唐赞, 李卫华, 盛亚运. 计算机分子模拟——2013 年诺贝尔化学奖简介 [J]. *自然杂志*, 2013, 35(6): 408–415.
- [5] 詹冬玲, 高楠, 韩葳葳, 等. 分子对接和动力学模拟提高嗜热蛋白 PspI 的活力 [J]. *高等学校化学学报*, 2013, 34(3): 628–633.
- [6] Matsushita Y, Murakawa T, Shimamura K, et al. Change in specific interactions between lactose repressor protein and DNA induced by ligand binding: molecular dynamics and molecular orbital calculations [J]. *Molecular Simulation*, 2016, 42(3): 242–256.
- [7] Blaszczyk M, Kurcinski M, Kouza M, et al. Modeling of protein-peptide interactions using the CABS-dock web server for binding site search and flexible docking [J]. *Methods*, 2016, 93: 72–83.
- [8] Cole D J, Tirado-Rives J, Jorgensen W L. Molecular dynamics and Monte Carlo simulations for protein-ligand binding and inhibitor design [J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2015, 1850(5): 966–971.
- [9] 邓春, 易弋, 韦阳道, 等. 嗜热地衣芽孢杆菌 SR01 葡聚糖酶基因的原核表达及酶学性质研究 [J]. *粮食与饲料工业*, 2016, 2(2): 60–64.
- [10] Berendsen H J C, van der Spoel D, van Drunen R, et al. GROMACS: a message-passing parallel molecular dynamics implementation [J]. *Computer Physics Communications*, 1995, 91(1/2/3): 43–56.
- [11] Kaminski G A, Friesner R A, Tirado-Rives J, et al. Evaluation and reparametrization of the OPLS-AA force field for proteins via comparison with accurate quantum chemical calculations on peptides [J]. *The Journal of Physical Chemistry. B*, 2001, 105(28): 6474–6487.
- [12] Zielkiewicz J. Structural properties of water: comparison of the SPC, SPCE, TIP4P, and TIP5P models of water [J]. *The Journal of*

Chemical Physics, 2005, 123(10): 104501.

- [13] Berendsen H C, Postma J M, van Gunsteren W F, et al. Molecular dynamics with coupling to an external Bath [J]. *The Journal of Chemical Physics*, 1984, 81(8): 3684–3690.
- [14] Darden T, York D, Pedersen L, et al. Particle mesh Ewald: an $N \cdot \log(N)$ method for Ewald sums in large systems [J]. *The Journal of Chemical Physics*, 1993, 98(12): 10089–10092.
- [15] Wennberg C L, Murtola T, Páll S, et al. Direct-Space corrections enable fast and accurate Lorentz-Berthelot combination rule Lennard-Jones lattice summation [J]. *Journal of Chemical Theory and Computation*, 2015, 11(12): 5737–5746.
- [16] Maiorov V N, Crippen G M. Significance of root-mean-square deviation in comparing three-dimensional structures of globular proteins [J]. *Journal of Molecular Biology*, 1994, 235(2): 625–634.
- [17] Bahar I, Atilgan A R, Erman B. Direct evaluation of thermal fluctuations in proteins using a single-parameter harmonic potential [J]. *Folding & Design*, 1997, 2(3): 173–181.
- [18] Lobanov M Y, Bogatyreva N S, Galzitskaya O V. Radius of gyration as an indicator of protein structure compactness [J]. *Molecular Biology*, 2008, 42(4): 623–628.
- [19] Pace C N, Fu H, Fryar K L, et al. Contribution of hydrophobic interactions to protein stability [J]. *Journal of Molecular Biology*, 2011, 408(3): 514–528.
- [20] Gilis D, Rooman M. Predicting protein stability changes upon mutation using database-derived potentials: solvent accessibility determines the importance of local versus non-local interactions along the sequence [J]. *Journal of Molecular Biology*, 1997, 272(2): 276–290.
- [21] Vogt G, Woell S, Argos P. Protein thermal stability, hydrogen bonds, and ion pairs [J]. *Journal of Molecular Biology*, 1997, 269(4): 631–643.
- [22] Thomas A S, Elcock A H. Molecular simulations suggest protein salt bridges are uniquely suited to life at high temperatures [J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2004, 126(7): 2208–2214.
- [23] Kumar S, Tsai C J, Nussinov R. Factors enhancing protein thermostability [J]. *Protein Engineering*, 2000, 13(3): 179–191.
- [24] Kumar S, Ma B, Tsai C J, et al. Electrostatic strengths of salt bridges in thermophilic and mesophilic glutamate dehydrogenase monomers [J]. *Proteins-Structure Function and Bioinformatics*, 2000, 38(4): 368–383.
- [25] Beeby M, O'Connor B D, Ryttersgaard C, et al. The genomics of disulfide bonding and protein stabilization in thermophiles [J]. *PLoS Biology*, 2005, 3(9): e309.
- [26] Argos P, Rossmann M G, Grau U M, et al. Thermal stability and protein structure [J]. *Biochemistry*, 1979, 18(25): 5698–5703.
- [27] Sriprapundh D, Vieille C, Zeikus J G. Molecular determinants of xylose isomerase thermal stability and activity: analysis of thermozymes by site-directed mutagenesis [J]. *Protein Engineering*, 2000, 13(4): 259–265.
- [28] 卢柏松, 王国力, 黄培堂. 嗜热与嗜常温微生物的蛋白质氨基酸组成比较 [J]. *微生物学报*, 1998, 38(1): 20–25.
- [29] Ichikawa J K, Clarke S. A highly active protein repair enzyme from an extreme thermophile: the *L*-isoaspartyl methyltransferase from *Thermotoga maritima* [J]. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 1998, 358(2): 222–231.