

doi:10.3969/j.issn.1672-5565.2013.02.09

枯草杆菌蛋白耐热性改造区域的识别

丁程, 李晓琴*

(北京工业大学生命科学与生物工程学院, 北京 100124)

摘要:热稳定性相关区域的识别是蛋白耐热性改造的关键问题之一。本文以枯草杆菌蛋白(SUBTILISIN BPN)为研究对象,通过枯草杆菌蛋白同源家族序列的统计耦联分析,提取枯草杆菌蛋白中的保守残基和强耦联残基,并运用分子动力学模拟方法,提取枯草杆菌蛋白表面候选突变残基,综合上述结果,提出了枯草杆菌蛋白表面耐热性改造关键区域的识别方法,并利用该方法确定了枯草杆菌蛋白表面的10个耐热性改造关键区域。将该结果与已有的耐热性突变实验资料进行了对比,发现其中的7个预测区域与实验结果吻合。结果验证了该方法可以较好地识别蛋白耐热性改造关键区域。

关键词:蛋白耐热性;统计耦联分析;保守残基;高耦联残基;分子动力学模拟

中图分类号:Q61 **文献标识码:**B **文章编号:**1672-5565(2013)-02-124-06

The Method of Identify SUBTILISIN BPN Protein Key Region of Thermostable Transformation on Surface

DING Cheng, LI Xiao-qin *

(School of Life Science and Bioengineering, Beijing University of Technology, Beijing 100124, China)

Abstract: The identification of the relevant thermostable region is one of the key issues in protein thermostability transformation. In this paper, we used SUBTILISIN BPN as our research object, and the conservative and strong coupling residues were extracted by the statistical coupling analysis (SCA) of homologous sequences of SUBTILISIN BPN family. We also extracted SUBTILISIN BPN surface candidate mutant residues by the way of molecular dynamics simulation. Combination of the above results, the recognition method of critical regions of the thermostability transformation on SUBTILISIN BPN surface was proposed. This method determined the SUBTILISIN BPN of 10 critical areas on surface about the thermostability transformation, and compared the results with existing experimental data of thermostable mutations, found that 7 of the forecast areas coincided with the experimental results. The results verified that our method can recognise the protein thermostable transformation critical areas well.

Keywords: Protein Thermostability; Statistical Coupling Analysis (SCA); Conservative Residues; Strong Coupling Residues; Molecular Dynamics Simulation

1 引言

蛋白耐热性改造在理论和工业上都有重要意义。一方面,由于蛋白酶催化效率高、对底物具有立体选择性,被越来越多地应用于化学反应中。但是

天然蛋白酶对盐、PH、温度的耐受性低,这大大限制了它们的应用。因此设计更高耐受性的蛋白酶将会促进其在工业领域的应用^[1-2];另一方面,蛋白的结构与功能密切相关,蛋白的耐热性机理的研究,可以反过来促进对蛋白结构和功能关系的理解^[3];再之,天然耐热蛋白大都来源于古细菌,古细菌赖以生存的高温,高盐,强酸碱等极端生态环境与地球早期

收稿日期:2012-11-30;修回日期:2012-12-14.

基金项目:北京市自然科学基金(4112010, KM201110005027)资助项目。

作者简介:丁程,男,硕士研究生,主要研究方向:生物信息学。E-mail: dingcheng.1986@163.com.

* 通讯作者:李晓琴,女,教授。E-mail: lxq0811@bjut.edu.cn; Tel: +86-10-67391610; Fax: +86-10-67392001.

的环境相似^[4],因此,对耐热蛋白的研究,有助于对生物进化与地球演化的研究。

已经存在多种确定蛋白稳定性改造区域或位点的方法,实验上如指定区域随机突变^[5]、定点突变^[6],理论上如神经网络^[7]、支持向量机^[8]、构象采样^[9]、线性相互作用能^[10]等。实验突变的方法准确、直接,但是具有周期长、耗费大的不足。Emidio Capriotti 等人用基于神经网络的方法从 ProTherm 数据库中共提取来源于 42 个不同蛋白序列的 1 615 个蛋白单突变信息(S1615),提取的蛋白必须满足自由能($\Delta\Delta G$)已知、空间结构已知、单点突变^[7]。把 S1615 作为训练集,在这 1 615 条蛋白序列中选取温度范围在 20~40℃、pH 值在 6~8 之间的序列(共 388 条)作为检验集,通过前向神经网络和反向传播算法对蛋白的突变前后的稳定性做了预测,预测精度达到 81%。Jianlin Cheng 等人用支持向量机的方法对该 S1615 数据集进行了交叉确认,在只考虑耐热性的前提下,预测方法取得了 84% 的精度^[8]。构象采样和线性相互作用能在分析蛋白突变位点上也取得了较好的结果,Elizabeth H. Kellogg 等人基于多种组合策略的构象采样方法,这些策略包括蛋白侧链重新包裹的范围、重新包裹时使用的能量函数、最小化范围、最小化过程中是否应用约束条件、最小化使用的能量函数,从 ProTherm 数据库中得到的 1 210 个单突变样本进行自由能的计算,并与实验上的数据进行了对比,两者之间的相关系数是 0.69^[9]。Lauren Wickstrom 等人基于线性相互作用能来预测单点突变后的蛋白稳定性的变化,该方法应用到来源于 10 个蛋白的 822 个突变位点的 $\Delta\Delta G$ 的计算,计算结果与实验结果的平均差是 0.82 Kcal/mol,相关系数是 0.72,该方法在小样本的双突变预测上也有很好的表现^[10]。

上述理论是基于统计的机器学习和能量函数的方法,样本来源都是单点突变,没有综合考虑整个蛋白的相互作用。实际上,蛋白序列中各个位点之间的关联对于蛋白的热稳定性有重要影响,如 Eijsink 等发现在蛋白内部存在的协同作用网络对蛋白热稳定性有重要作用^[11];Unsworth 等发现蛋白热稳定性需要通过一种精细平衡才能达到,这说明蛋白热稳定性与蛋白序列中不同位点之间的关联密切相关^[12]。结合对枯草杆菌蛋白家族同源序列统计耦联分析的结果以及枯草杆菌蛋白分子动力学模拟的结果,提出了一种寻找蛋白耐热性改造起关键作用区域的方法。该方法综合考虑了蛋白序列的耦联信息和高温去折叠动力学模拟过程中的残基空间结构信息,预测出的关键区域与实验结果能较好吻合。

2 材料

枯草杆菌蛋白广泛应用于洗衣、餐具洗涤、化妆品、食品加工、护肤软膏等工业领域,有大量的研究结果及丰富的突变资料可供参考,同时从数据库中可以得到枯草杆菌蛋白晶体结构数据和大量的同源蛋白序列,以便开展后续的研究工作^[13]。

枯草杆菌蛋白属于丝氨酸蛋白酶家族,共 275 个残基,29% 的残基(82 个)形成 α 螺旋,21% 的残基(58 个)形成 β 折叠(见图 1)。图中箭头代表 β 折叠,拱环代表 β 转角,三角代表 β 桥,螺旋代表 α 螺旋。位于内部的 β 折叠片形成疏水核心, α 螺旋分布于疏水核心周围,整体呈现一个球状(见图 2)。图中条带代表 β 折叠片,桶状代表 α 螺旋,小球代表催化三联体残基。它是非特异性酶,催化活性依赖催化活性中心的催化三联体(32 位的 Asp、64 位的 His 和 221 位的 Ser),功能是断裂大分子蛋白中的肽键^[14],催化活性在碱性条件下能够保持较高水平。

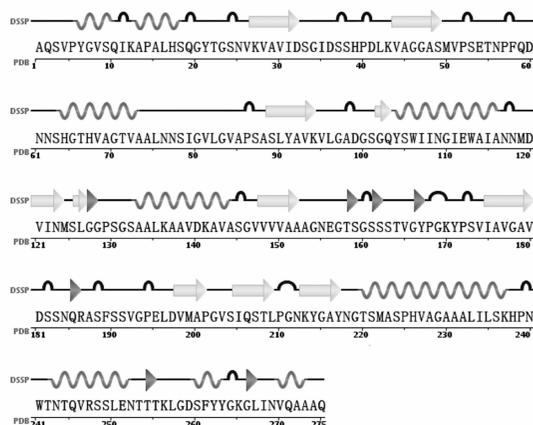


图 1 枯草杆菌蛋白氨基酸序列及二级结构信息

Fig. 1 Information for Secondary structure and amino acid sequence of SUBTILISIN BPN

3 方法

3.1 统计耦联分析(SCA)方法提取保守残基和强耦联残基

3.1.1 枯草杆菌蛋白同源序列集构建

利用 BLAST 算法从 NCBI 蛋白数据库中提取枯草杆菌蛋白同源序列,共得到 1 136 条两两序列相似度小于 45% 的集合。使用 CLASTALX2.1 软件对该集合进行多序列比对,并提取比对结果中枯草杆菌蛋白 1~275 位残基所在列信息,形成 2 751 136 同源多序列比对集,记作 MSA。

3.1.2 利用能量耦联分析方法提取保守残基

统计耦联分析(SCA)方法由 Ranganathan 小组最先提出来^[15],并经过徐海松等的改进^[16]。SCA方法给出的保守能量定义为:

$$\Delta G_i^{stat} = kT \times \sqrt{\sum \left[\ln \frac{P_i^x}{P_{ref}^x} \right]^2} \quad (1)$$

ΔG_i^{stat} 是无量纲量,式中 P_i^x 的表达式参考徐海松等的工作^[16],其它参数的详细信息参考 Ranganathan 小组的相关工作(公式2类同)^[15]。

在蛋白同源序列集中,保守能量 ΔG_i^{stat} 是 i 位点每种氨基酸的频率相对于该种氨基酸在所有同源序列中分布频率的偏差的总和,反应的是该位点的保守性。利用 MSA 数据集,依据公式(1)计算枯草杆菌蛋白任一位置残基位点的保守能量,利用位点保守能量的取值提取枯草杆菌蛋白的保守位点。

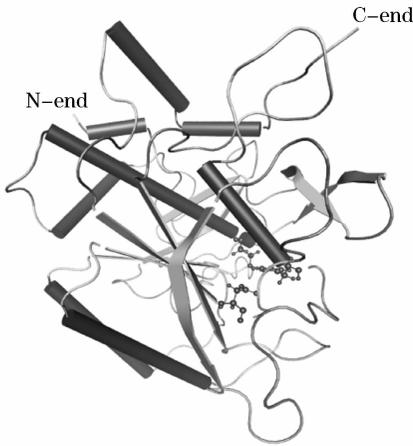


图2 枯草杆菌蛋白空间结构

Fig.2 3D structure of SUBTILISIN BPN

3.1.3 统计耦联分析(SCA)方法提取强耦联残基

SCA方法给出的统计耦联能量的定义式是:

$$\Delta \Delta G_{i,j}^{stat} = kT \sqrt{\sum_x \left(\ln \frac{P_{i|\delta_j}^x}{P_{ref|\delta_j}^x} - \ln \frac{P_i^x}{P_{ref}^x} \right)^2} \quad (2)$$

耦联能量被定义为同源序列集中的两个位点,改变其中一个位点的氨基酸频率对另一个位点氨基酸频率产生的影响(即扰动),扰动的具体做法是把原集合中的位点上的某种氨基酸频数大于某个阈值的条数抽提出来形成一个新集合。耦联能量反应的是两两残基之间的协同进化程度(即耦联)的大小。

为保证被统计序列(扰动前和扰动后)都有充分的采样,设定扰动后序列不少于200条(同源数据集中共有1136条)。设满足条件的扰动次数为 N 。计算任意一次扰动枯草杆菌蛋白同源数据集不同位点的耦联能量值,并将相同位点 N 次扰动的耦联能量进行平均,得到枯草杆菌蛋白所有位点的平

均耦联能量,利用该能量提取强耦联残基。

3.2 应用分子动力学模拟确定候选突变残基

分子动力学模拟使用 NAMD 软件,CHARMM27 全原子力场。从 PDB 数据库中下载解析度为 1.8 Å 的枯草杆菌蛋白晶体结构(PDB 编码是 2SIC | E)。删掉晶体中的氢原子,使用 VMD 自带的 psfgen 软件包给枯草杆菌蛋白主链补足氢原子,测得该晶体结构的净电荷为零。之后给该蛋白添加一个 10 Å 厚的 TIP3P 型的水分子层,最终得到的水盒子的尺寸是 64 Å × 66 Å × 67 Å。

预平衡过程选用 NPT 系综。在 1 大气压,290K 温度下,使用 SHAKE 算法约束氢键键长,应用周期性边界条件,PME 计算长程静电力,非键相互作用在 14 Å 处截断,非键范德华和静电作用从 10 Å 平滑过渡到 12 Å,时间步长是 2fs/step。把水盒子中的蛋白进行固定,让水分子进行 12 000 步的能量最小化和 100 000 步的动力学模拟。接下来放开蛋白,让蛋白和水分子同时进行了 100 000 步的能量最小化过程。之后选用 NVT 系综,设定初始温度为 290K,使用 reassign 控温方法,每 2 000 步升高 10K,直到升到 800K。

将枯草杆菌蛋白在 800K 温度下进行 500ps 的动力学模拟,时间步长是 2fs/step,每 1 000 步输出一帧,共获得 250 帧枯草杆菌蛋白模拟结构。将第 j ($j=1 \cdots 250$) 帧模拟结构与初始帧(第 0 帧)进行叠合(即要求两主链 RMSD 值最小),并计算第 j 帧中第 i ($i=1 \cdots 275$) 位残基与初始帧中第 i 位残基的欧式距离,记做 $S_{i,j}$,蛋白 i 位点不稳定性参数 S_i 定义为: $S_i = \sum_j S_{i,j}$, S_i 值越大表示 i 位点残基越不稳定。

对枯草杆菌蛋白重复多次如上所述动力学模拟,每次提取模拟结果中不稳定性参数 S_i 取值排在前列的残基并统计这些残基位点在多次模拟中出现的频次 n_i ,当 i 位点残基出现的频次 n_i 大于某一阈值时,则把 i 位点残基作为候选突变残基。

3.3 蛋白耐热性改造区域的确定原则

蛋白耐热性改造关键区域的确定原则:

(1)应用统计耦联分析方法确定的保守和高耦联残基不能进行突变。因为这些残基对于蛋白的结构和功能起到重要的作用,对这些残基的突变可能会影响到整个蛋白功能的行使。

(2)催化活性位点附近的残基不能进行突变。蛋白催化功能的行使依赖于具有催化活性的疏水口袋的立体结构,对这个关键区域的残基的突变可能会影响到疏水口袋的形状,从而影响到蛋白的催化活性和最适底物。

(3)满足前两个原则的候选突变残基,且至少

连续2个出现在氨基酸序列紧邻位置,则将该位置对应区域作为耐热性改造关键区域。如某关键区域是无规卷曲的一部分,则将该关键区域延伸至整个无规卷曲所在区域直至遇到保守或高耦联或位于催化活性位点附近残基为止。

4 结果分析

4.1 保守和高耦联残基

依照前述方法提取枯草杆菌蛋白同源序列并进行多序列比对,之后使用我们实验室自己编写的脚本,计算了枯草杆菌蛋白每个残基的保守能量(见图3)。

将保守能量值大于700的残基作为保守残基,其对应的位点见表1。64%的保守残基是处于蛋白内部的核心片段上,催化三联体也位列其中。ROLAND J. SIEZEN 和 JACK A. M. LEUNISSEN 对枯草杆菌蛋白给出20个最保守的残基,其中的17个在我们给出的保守残基范围内,这些保守能量值很高的位点对该蛋白结构的稳定和功能的发挥有重要的意义^[17]。

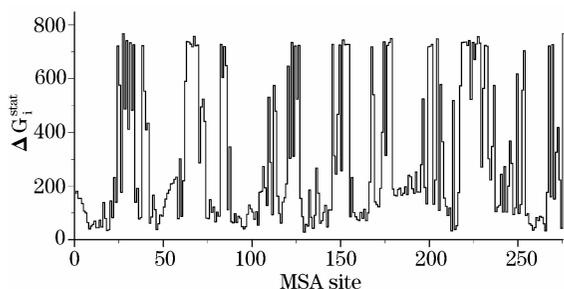


图3 MSA位点残基的保守能量值

Fig. 3 The conservative energies of sites in MSA

表1 保守残基的位点信息

Table 1 Site information of conservative residues

Energy interval	Sites
700 ~ 720	254, 67, 200, 168, 85, 233, 201, 268, 125, 25, 69, 39, 127, 232, 222,
720 ~ 740	177, 70, 150, 34, 153, 270, 146, 155, 202, 154, 83, 66, 227, 229, 32, 219, 178, 123, 225, 220, 221, 65, 175, 64
> 740	30, 223, 152, 205, 179, 228, 68, 28

运用前述统计耦联分析方法,计算枯草杆菌蛋白同源数据集各位点不同扰动对应的耦联能量。为保证被统计序列(扰动前和扰动后)都有充分的采样,设定扰动后序列不少于200这个标准(同源数据集中共有1136条),符合这个标准的扰动位点有

189个。对这189次扰动的每个残基耦联能量求平均值,得到了每个残基的平均耦联能量(见图4)。

设定平均耦联能量大于130的残基为强耦联残基,其对应的位点见表2。这些残基几乎均匀的分布于整个蛋白,这种分布形式可能对于蛋白的功能行使是必要的。

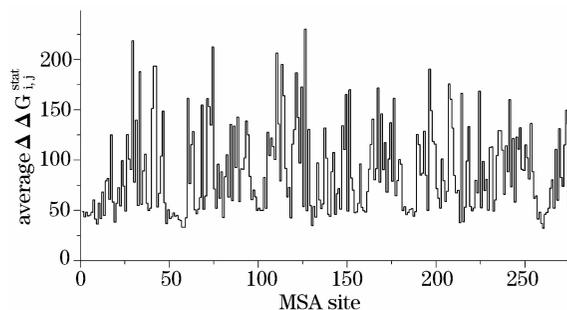


图4 MSA位点残基的平均耦联能量值

Fig. 4 The average coupling energies of sites in MSA

表2 强耦联残基的位点信息

Table 2 Site information of strong coupling residues

Energy interval	Sites
130 ~ 150	120, 128, 269, 209, 137, 247, 218, 86, 147, 73, 84, 274, 111, 253, 174, 93, 164, 122, 88, 197, 273
150 ~ 170	72, 241, 208, 176, 149, 214, 224, 151
> 170	167, 124, 207, 121, 196, 113, 110, 74, 126

4.2 候选突变残基

在800K下对枯草杆菌蛋白进行500ps的动力学模拟,共重复10次,把不稳定参数 S_i 排在前50位的频数 n_i 大于等于4次的残基作为候选突变残基,对应的位点信息见表3。

表3 候选突变残基的位点信息

Table 3 Site information of candidate mutated residues

Frequency	Sites
4	51, 130, 134, 136, 164, 183, 188, 191, 241, 257, 263, 274
5	1, 55, 97, 103, 129, 131, 155, 187, 208, 217
6	52, 53, 54, 102, 104, 156, 185, 210, 239, 258
7	132, 157, 162, 189, 260, 262
8	98, 133, 182, 186, 240
9	160, 211, 212, 259, 275
10	99, 100, 101, 158, 159, 161, 184, 213, 214, 261

4.3 蛋白耐热性改造的关键区域

把位于疏水口袋附近的残基的标准设定为距离催化关键残基64-His的 α 碳原子 12\AA 范围内的残基,应用VMD软件,最终得到的位于疏水口袋附近

的残基依次是 62、63、67、68、96、99、100、101、125、126、127、152、217、218、219、220、222、223、224、225 号残基。在这 20 个残基中,有 13 个残基根据前面统计的结果属于保守或高耦联残基。

综合统计耦联分析、动力学模拟结果及催化活性附近残基结果,依照 3.3 提出的原则,枯草杆菌蛋白耐热性改造关键区域为 49~61、102~104、129~134、156~163、165~166、168~173、181~195、210~213、238~240、254~267。

5 讨论

结合枯草杆菌蛋白耐热性改造实验资料,发现本文预测的 10 个耐热性改造区域中,有 7 个区域内的位点在实验上进行过突变,且突变后蛋白的耐热性得到了增强,具体对比结果如下:

49~61、156~163、165~166、168~173 区域: Scott Braxton 和 James A. wells 通过对枯草杆菌蛋白逐渐升温的方法,得到枯草杆菌蛋白随着温度的升高最先去折叠残基分别是 48~49、163~164 位残基,通过对晶体 B 因子的分析,得到了相同的结果,这与我们的预测结果基本吻合^[18]。上文对枯草杆菌蛋白序列的 45~63 及 158~165 区域分别用同源嗜热蛋白 *Thermitase* 对应的序列取代,实验证明,序列 45~63 区域的取代取得了很好的效果,蛋白的耐热性有了较大提高,序列 158~165 区域的取代效果不令人满意,其中 164 位点残基为强耦联残基。但 Zhao Huiming 和 Frances H. Arnold 用随机突变的方法,将 161 位的 Ser 突变成 Cys,在活性没有降低的前提下,稳定性得到了提高,将 166 位的 Gly 突变成 Arg,也是取得了很好的稳定效果^[19]。此外, Pantoliano M. W. 等用疏水包埋的方法,将 169 位的 Gly 突变成 Ala,也增加了蛋白的耐热性^[20]。

181~195 区域, Andrea Sättler 等通过温度梯度凝胶电泳的方法,测定枯草杆菌蛋白 188 位的 Ser 突变成 Pro 的变体热稳定性,发现该位点的突变可以增加蛋白对热的稳定性^[21]。210~213 区域, Brian C. Cunningham 和 James A. Wells 通过随机突变,把 213 位的 Lys 突变成 Arg,蛋白的耐热性得到了提升^[22]。238~240 区域, Hiroshi Takagi, Yasushi Morinaga 等通过把 239 位的 Pro 突变成 Arg,发现突变体的热稳定性得到了增强^[23]。

实验上能够稳定枯草杆菌蛋白的有益突变位点还有 76^[24]、217、218 位点^[20],由于 217、218 位点位于催化疏水口袋附近,根据原则 2,这些残基被排除。对于 76 位点,根据我们的方法不能给出合理的

解释。

对于确立的第二条原则,即催化位点附近的残基不能进行突变。Sophie E. Jackson 和 Alan R. Fersht 对催化活性附近区域的 99 号残基进行了突变,分别用 Ser 和 Lys 替代 99 位的 Asp,并测量了突变体的催化常数(Kcat),结果表明突变体的催化活性都有不同程度的降低^[25]。在另一个工作中, Terumichi Tanaka 等对枯草杆菌蛋白的一种同源蛋白 Aqualysin I 第 100 位上的 Gly 进行了突变,分别突变成 Ala、Val、Leu,发现 Aqualysin I 蛋白对底物的偏好性和催化活性也都有了很大的改变^[26]。

本文提出的枯草杆菌蛋白表面耐热性改造关键区域识别方法,可以较好地识别蛋白耐热性改造关键区域,对研究蛋白的耐热突变有指导意义。

参考文献 (References)

- [1] Haki GD, Rakshit SK. Developments in industrially important thermostable enzymes: a review [J]. *Bioresource Technology*, 2003, 89(1): 17-34.
- [2] Polizzi KM, Bommarius AS, Broering JM, Chaparro-Riggers JF. Stability of biocatalysts [J]. *Current Opinion in Chemical Biology*, 2007, 11(2): 220-225.
- [3] Lehmann M, Pasamontes L, Lassen SF, Wyss M. The consensus concept for thermostability engineering of proteins [J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology*, 2000, 1543(2): 408-415.
- [4] Danson MJ, Hough DW. Structure, function and stability of enzymes from the Archaea [J]. *Trends in Microbiology*, 1998, 6(8): 307-314.
- [5] Martin A, Sieber V, Schmid FX. In-vitro selection of highly stabilized protein variants with optimized surface [J]. *Journal of molecular biology*, 2001, 309(3): 717-726.
- [6] Khurana J, Singh R, Kaur J. Engineering of Bacillus lipase by directed evolution for enhanced thermal stability: effect of isoleucine to threonine mutation at protein surface [J]. *Molecular Biology Reports*, 2011, 38(5): 2919-2926.
- [7] Capriotti E, Fariselli P, Casadio R. A neural-network-based method for predicting protein stability changes upon single point mutations [J]. *Bioinformatics*, 2004, 20(suppl 1): i63-i68.
- [8] Cheng J, Randall A, Baldi P. Prediction of protein stability changes for single-site mutations using support vector machines [J]. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 2006, 62(4): 1125-1132.
- [9] Kellogg EH, Leaver-Fay A, Baker D. Role of conformational sampling in computing mutation-induced changes in protein structure and stability [J]. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 2011, 79(3): 830-838.
- [10] Wickstrom L, Gallicchio E, Levy RM. The linear interaction energy method for the prediction of protein stability changes upon mutation [J]. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 2012, 80(1): 111-125.
- [11] Eijsink VGH, Gåseidnes S, Borchert TV, van den Burg B. Directed evolution of enzyme stability [J]. *Biomolecular Engineer-*

- ing, 2005, 22(1-3): 21-30.
- [12] Koutsopoulos S, van der Oost J, Norde W. Kinetically controlled refolding of a heat-denatured hyperthermostable protein [J]. FEBS Journal, 2007, 274(22): 5915-5923.
- [13] Gupta RG, Beg QB, Lorenz PL. Bacterial alkaline proteases: molecular approaches and industrial applications [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2002, 59(1): 15-32.
- [14] Carter P, Wells JA. Functional interaction among catalytic residues in subtilisin BPN' [J]. Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics, 1990, 7(4): 335-342.
- [15] Socolich M, Lockless SW, Russ WP, Lee H, Gardner KH, Ranganathan R. Evolutionary information for specifying a protein fold [J]. Nature, 2005, 437: 512-518.
- [16] 徐海松, 李晓琴, 曾毅. SH3 结构域序列集的统计耦联分析 [J]. 物理化学学报, 2011, 27(10): 2447-2456.
- [17] Siezen RJ, Leunissen JAM. Subtilases: The superfamily of subtilisin-like serine proteases [J]. Protein Science, 1997, 6(3): 501-523.
- [18] Braxton S, Wells JA. Incorporation of a stabilizing calcium-binding loop into subtilisin BPN' [J]. Biochemistry, 1992, 31(34): 7796-7801.
- [19] Zhao HM, Arnold FH. Directed evolution converts subtilisin E into a functional equivalent of thermitase [J]. Protein Engineering, 1999, 12(1): 47-53.
- [20] Pantoliano MW, Whitlow M, Wood JF, Dodd SW, Hardman KD, Rollence ML, Bryan PN. Large increases in general stability for subtilisin BPN' through incremental changes in the free energy of unfolding [J]. Biochemistry, 1989, 28(18): 7205-7213.
- [21] Sättler A, Kanka S, Maurer K, Riesner D. Thermostable variants of subtilisin selected by temperature-gradient gel electrophoresis [J]. ELECTROPHORESIS, 1996, 17(4): 784-792.
- [22] Cunningham BC, Wells JA. Improvement in the alkaline stability of subtilisin using an efficient random mutagenesis and screening procedure [J]. Protein Engineering, 1987, 1(4): 319-325.
- [23] Takagi H, Morinaga Y, Ikemura H, Inouye M. The Role of Pro-239 in the Catalysis and Heat Stability of Subtilisin E [J]. Journal of Biochemistry, 1989, 105(6): 953-956.
- [24] Fágúin C6. Understanding and increasing protein stability [J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) -Protein Structure and Molecular Enzymology, 1995, 1252(1): 1-14.
- [25] Jackson SE, Fersht AR. Contribution of long-range electrostatic interactions to the stabilization of the catalytic transition state of the serine protease subtilisin BPN' [J]. Biochemistry, 1993, 32(50): 13909-13916.
- [26] Tanaka T, Matsuzawa H, Ohta T. Engineering of S2 Site of Aqualysin I; Alteration of P2 Specificity by Excluding P2 Side Chain [J]. Biochemistry, 1998, 37(50): 17402-17407.