DOI:10.3969/j.issn. 1673-1689.2017.08.011

N-端置换提高木聚糖酶 AoXyn11A 的耐热性

何 瑶[1]，吴 芹[1]，殷 欣[1]，胡 蝶[1]，邬敏辰[*2]

（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：为提高米曲霉(*Aspergillus oryzae*)糖苷水解酶家族(GHF) 11 木聚糖酶 AoXyn11A 的耐热性，将其 N-端置换为来源于嗜热裂孢菌 (*Thermobifida fusca*) 的同一家族耐热木聚糖酶 pXYL11 的对应区域。基于木聚糖酶耐热性的理性设计，采用大引物 PCR 技术将 AoXyn11A 基因(*Aoxyn11A*) 的 5′-端 DNA 片段置换为 pXYL11 人工合成基因(*xyn11PM*) 的对应片段，构建出杂合木聚糖酶 ATX11A 基因(*ATx11A*)。分别将 *Aoxyn11A* 和 *ATx11A* 在毕赤酵母 GS115 中进行了表达，并分析了重组表达产物 AoXyn11A 和 ATX11A 的温度特性。结果表明：ATX11A 的最适温度 T_{opt} 由 AoXyn11A 的 50 ℃提升至 65 ℃，在 60 ℃的半衰期 $t_{1/2}^{60}$ 为 55 min，较 AoXyn11A 延长了 41.3 倍；ATX11A 在 55 ℃处理 3 h 保留 60%以上的酶活性，而 AoXyn11A 处理 15 min 酶活性完全丧失。本研究通过 N-端置换显著改善了 AoXyn11A 的温度特性。

关键词：木聚糖酶；N-端置换；耐热性；分子动力学模拟；理性设计

中图分类号：Q 936　　**文献标志码：**A　　**文章编号：**1673—1689(2017)08—0855—07

Enhancement in the Thermotolerance of Xylanase(AoXyn11A) by N-Terminus Replacement

HE Yao[1]，*WU Qin*[1]，*YIN Xin*[1]，*HU Die*[1]，*WU Minchen*[*2]

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

Abstract: To enhance the thermotolerance of AoXyn11A, a glycoside hydrolase family (GHF) 11 mesophilic xylanase from *Aspergillus oryzae*, its N-terminal region was substituted with the corresponding one of the same family thermostable xylanase pXYL11 from *Thermobifida fusca* NTU22. Based on the rational design of xylanase thermotolerance, an ATX11A-encoding gene (*ATx11A*) was constructed by replacing the 5′-end DNA fragment of AoXyn11A gene(*Aoxyn11A*) with the corresponding one of the synthesized pXYL11 gene (*xyn11PM*) using the megaprimer PCR technique. *Aoxyn11A* and *ATx11A* were expressed in *Pichia pastoris* GS115, respectively, and the temperature characteristics of the expressed recombinant products, AoXyn11A and ATX11A, were analyzed. The results indicated that the temperature optimum (T_{opt}) of hybrid xylanase ATX11A was 65 ℃, which was 15 ℃ higher than that of AoXyn11A. Its half-life at 60 ℃ ($t_{1/2}^{60}$) was 55 min, which

收稿日期：2015-05-08

基金项目：国家自然科学基金项目(31271811)。

*** 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:bioch@163.com

引用本文：何瑶，吴芹，殷欣，等. N-端置换提高木聚糖酶 AoXyn11A 的耐热性[J]. 食品与生物技术学报，2017，36(08)：855-861.

was 41.3-fold longer than that of AoXyn11A. When incubated at 55 ℃, ATX11A retained more than 60% of its original activity for 3 h, while AoXyn11A entirely lost its activity only for 15 min. In this work, the temperature characteristics of AoXyn11A were significantly improved by N-terminus replacement.

Keywords: xylanase, N-terminus replacement, thermotolerance, molecular dynamic simulation, rational design

木聚糖酶（endo-β-1,4-D-xylanases, EC 3.2.1.8）从木聚糖分子主链的内部水解β-1,4糖苷键产生不同聚合度的木寡糖，是木聚糖降解酶系的关键组分。基于一级结构的同源性比对和疏水簇分析，大多数木聚糖酶归属糖苷水解酶家族（GHF）10和11[1]。GHF11木聚糖酶具有底物特异性高、相对分子质量低（<30×10³）和单一催化结构域等特征，其三维结构呈现右手半握形状，主要由1个短的α-螺旋和2个β-折叠片A和B构成[2]。木聚糖酶尤其是耐热酶应用广泛，如在饲料造粒和纸浆漂白等工艺过程中均需要木聚糖酶具备耐高温的特性[3]。目前，除了从极端环境中筛选产耐热木聚糖酶的微生物菌株外，另一种有效的方法是采用基因工程技术对酶学特性优良的中温酶实施耐热性改造[4]。Zhang等[5]用极端耐热木聚糖酶 *Ev*Xyn11^{TS} 的N-端置换 *Aspergillus usamii* 木聚糖酶AuXyn11A的对应区域，构建出最适温度和耐热性均大幅度提高的杂合木聚糖酶AEXynM。

作者所在实验室已从 *A. oryzae* CICC40186中克隆出了中温酶AoXyn11A的基因，并将其在 *Pichia pastoris* GS115中进行了表达，该酶活性高，pH范围广，但热稳定性较差[6]。pXYL11（GenBank: AAV64879）是一种源自嗜热裂孢菌（*Thermobifida fusca*）NTU22的GHF11耐热木聚糖酶[7]。作者所在实验室根据毕赤酵母的密码子偏好性对该酶的编码基因进行优化和人工合成，并命名为 *xyn11PM*（GenBank:KP119614）。为改善中温酶AoXyn11A的温度特性，本文作者基于木聚糖酶一级结构比对、三维结构同源建模和分子动力学模拟的理性设计，采用大引物PCR技术将中温酶基因 *Aoxyn11A* 的5′-端DNA片段置换为耐热酶基因 *xyn11PM* 的对应片段，构建杂合酶基因 *ATx11A*。将 *Aoxyn11A* 和 *ATx11A* 分别在毕赤酵母GS115中表达，分析和比较重组表达产物AoXyn11A和ATX11A的温度特性。

1 材料与方法

1.1 菌株、质粒和培养基

大肠杆菌（*Escherichia coli*）DH5α和JM109菌株、毕赤酵母（*Pichia pastoris*）GS115菌株和表达质粒pPIC9K，由作者所在实验室保藏；克隆质粒pUCm-T，购自上海Sangon公司；重组质粒pUCm-T-*xyn11PM* 和pPIC9K-*Aoxyn11A*，由本实验室构建和保藏；LB、YPD、YPD-G418、MD、BMGY和BMMY培养基的配制，参照Multi-Copy Pichia Expression Kit（Invitrogen公司）操作手册。

1.2 主要试剂

限制性内切酶、*rTaq* DNA聚合酶、T_4 DNA连接酶、DNA Marker和蛋白质Marker，均购自大连TaKaRa公司；Geneticin G418和EZ-10柱式DNA胶回收试剂盒，购自上海Sangon公司；桦木木聚糖、D-木糖和考马斯亮蓝R-250，Sigma公司产品；Sephadex G-50，Amersham Pharmacia Biotech公司产品；其它试剂均为国产或进口分析纯。

1.3 木聚糖酶一级和三维结构的分析

采用DNAMAN 6.0软件和NetNGlyc 1.0程序（http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/）对木聚糖酶一级结构进行同源性比对和N-糖基化位点分析。在PDB数据库（http://www.rcsb/org/）寻找一种与AoXyn11A序列同源性较高的GHF11木聚糖酶晶体结构，作为木聚糖酶同源建模的模板，运用MODELLER 9.9程序（http://salilab.org/modeller/）进行三维结构建模[8]。

采用GROMACS 4.5程序包（http://www.gromacs.org/）对木聚糖酶三维结构进行分子动力学（molecular dynamic, MD）模拟，其模拟体系选用GROMOS 96力场，溶质分子被1.5 nm的SPC/E水分子层包裹。MD模拟之前，分别对受约束和去约束的溶质分子体系进行两次能量优化，即先采用最陡

下降法优化 800 步,再采用共轭梯度法优化 1 200 步。将模拟温度在 300 K,模拟时间为 5 ns 下的模拟结果导入 PDB 文件中,利用 B-FITTER 软件从 PDB 文件中提取每个氨基酸的 B-factor 值;另外,在温度为 500 K,时间为 5 ns 条件下进行 MD 模拟,模拟结束后,用程序包中的 g_rms 软件计算出均方根偏差(RMSD)值。比较 AoXyn11A 和 pXYL11 的 B-factor 值,选定 N-端置换的区域;分析 AoXyn11A 和 ATX11A 的根均方偏差 (root mean square deviation,RMSD) 值,预测杂合酶 ATX11A 的耐热性。

1.4 *ATx11A* 重组表达质粒的构建

基于 GHF11 木聚糖酶序列同源性比对和 MD 模拟,用 pXYL11 N 端 42 个氨基酸残基置换 AoXyn11A 对应的 41 个残基。根据 *xyn11PM* 和 *Aoxyn11A* 核苷酸序列设计 PCR 引物,由上海 Sangon 公司合成(表 1)。以 pUCm-T-*xyn11PM* 为模板、Xyn-F 和 Tf-R 为引物,PCR 扩增基因片段 Tf;以 pPIC9K-*Aoxyn11A* 为模板、Tf 和 Aox-R 为引物,采用大引物 PCR 技术[9]扩增杂合酶基因 *ATx11A*。将 PCR 产物与 pUCm-T 连接,转化 *E. coli* JM109,经蓝白斑筛选、酶切鉴定,阳性转化子送上海 Sangon 公司测序。将测序正确的重组质粒 pUCm-T-*ATx11A* 经 *Eco*R Ⅰ和 *Not* Ⅰ双酶切,回收目的条带,与经同样双酶切的表达质粒 pPIC9K 连接,获重组表达质粒 pPIC9K-*ATx11A*,转化 *E. coli* DH5α,DNA 测序验证。

表 1 扩增杂合酶基因 *ATx11A* 的 PCR 引物

Table 1 PCR primers for the amplification of hybrid enzyme gene *ATx11A*

引物名称	引物序列 (5′-3′)	酶切位点
Xyn-F	GAATTCGCTGTTACCTCCAACGAGACCG	*Eco*R Ⅰ
Tf-R	CCGACGAAGTTGCCAGTGTTTCTCCAGG	
Aox-R	GCGGCCGCTCAATAAACAGTGATAGCAG	*Not* Ⅰ

1.5 木聚糖酶的表达和纯化

将 pPIC9K-*Aoxyn11A* 和 pPIC9K-*ATx11A* 分别用 *Sal* Ⅰ线性化,电转化 *P. pastoris* GS115。重组毕赤酵母的鉴定和多拷贝筛选参照 Multi-Copy *Pichia* Expression Kit 操作手册。重组子经体积分数 1.0% 甲醇诱导表达 72 h,上清液用 75%饱和度的 $(NH_4)_2SO_4$ 盐析、离心,沉淀溶于 20 mmol/L 柠檬酸-Na_2HPO_4 缓冲液(pH 5.5)。粗酶液经透析、超滤浓缩(膜截留相对分子质量为 10×10^3,Millipore 公司)至 1 mL,上样 Sephadex G-50 层析柱(1.6 cm×80 cm)进行纯化。采用 SDS-PAGE 分析重组表达产物;Bradford 法测定蛋白质含量。

1.6 木聚糖酶活性的测定

酶活性测定参见文献[10]并略作改动。2.4 mL 质量浓度 0.5 g/dL 桦木木聚糖溶液(用 pH 5.5、50 mmol/L 柠檬酸-Na_2HPO_4 缓冲液配制)中加入 0.1 mL 适当稀释的酶液,50 ℃反应 15 min,加入 2.5 mL DNS 试剂,在沸水浴中显色 7 min,测定 OD_{540}。在上述反应条件下,每分钟产生 1 μmol 还原糖(以 D-木糖计)所需的酶量定义为 1 个木聚糖酶活性单位(U)。

1.7 温度对木聚糖酶活性的影响

在 40~75 ℃下,按 1.6 的方法测定木聚糖酶活性。最适温度 T_{opt} 定义为最高酶活性(100%相对酶活性)所对应的温度。将酶液置于 50~65 ℃处理不同时间,按 1.6 的方法测定残余酶活性,未处理酶液的酶活性以 100%计。酶的半衰期 $t_{1/2}^{60}$ 定义为经 60 ℃处理残余酶活性为 50%时所对应的时间。

1.8 木聚糖酶动力学常数的测定

以不同质量浓度(1.0~10.0 mg/mL)的桦木木聚糖溶液(用 pH 5.5、50 mmol/L 柠檬酸-Na_2HPO_4 缓冲液配制)为底物,在木聚糖酶各自的最适温度 T_{opt} 下按 1.6 的方法测定酶活性,并采用 Origin 8.0 软件进行非线性拟合,计算各自的 K_m 和 V_{max} 值。

2 结果与分析

2.1 木聚糖酶一级和三维结构的分析

中温酶 AoXyn11A 与耐热酶 pXYL11 一级结构的比对结果表明,两者整体的同源性较高(63.5%),但它们在 N-端区域的同源性却较低,其中 AoXyn11A N-端 41 个氨基酸残基与 pXYL11 对应的 42 个残基的同源性为 50.0%;另外,在耐热酶 pXYL11 的 N-端区域 (A^1~T^{42}) 内含有 2 个 N-糖基化位点 N^5-E-T^7 和 N^{34}-Y-S^{36}(黄色背景),如图 1(a)所示。上述分析结果在一定程度上说明 pXYL11 的 N-端可能对其耐热性贡献较大。由如图 1(b)可见,AoXyn11A 三维结构的催化活性中心 (Glu^{84} 和 Glu^{175}) 远离其 N-端区域,由此推测 N-端置换对 AoXyn11A 的催化活性影响不大。

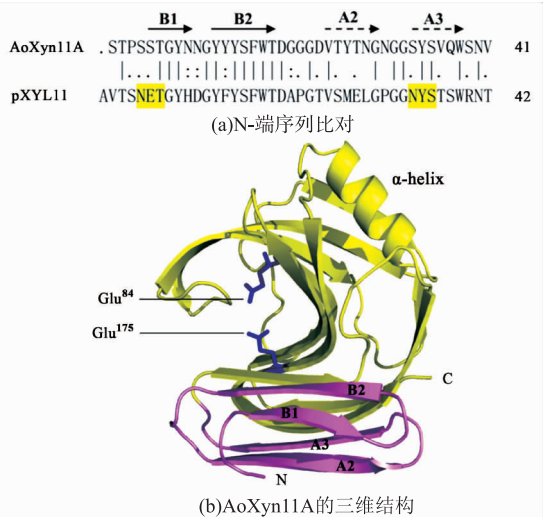


图 1 AoXyn11A 和 pXYL11 N-端序列的同源性比对及 AoXyn11A 的三维结构

Fig. 1 N-Terminal sequence alignment of AoXyn11A and pXYL11 and the three-dimensional structure of AoXyn11A

2.2 同源建模及分子动力学模拟

选择与 pXYL11 序列完全一致、且与 AoXyn11A 同源性较高的嗜热裂孢菌（*T. fusca*）木聚糖酶晶体结构（PDB:3ZSE）为模板，对 AoXyn11A 和 ATX11A 进行同源建模和 MD 模拟。有研究表明酶蛋白中氨基酸残基的灵活度与其 B-factor 值成正相关[11]。通过比较 AoXyn11A 和 pXYL11 的 B-factor 值发现，AoXyn11A N-端（S^1~V^{41}）氨基酸的 B-factor 值大多数大于 pXYL11 对应区域的 B-factor 值（图 2），表明 AoXyn11A N-端刚性较弱。因此，拟将 AoXyn11A N-端置换为 pXYL11 的对应区域（A^1~T^{42}），获得杂合酶 ATX11A。

RMSD 值是指在模拟高温下某一时刻的蛋白质构象与其初始构象之间各个原子的根均方偏差值，可作为评价蛋白质/酶分子耐热性的重要指标。RMSD 值越小，则蛋白质/酶分子中各个原子在高温下的运动幅度越小，即蛋白质/酶的耐热性越高[12]。

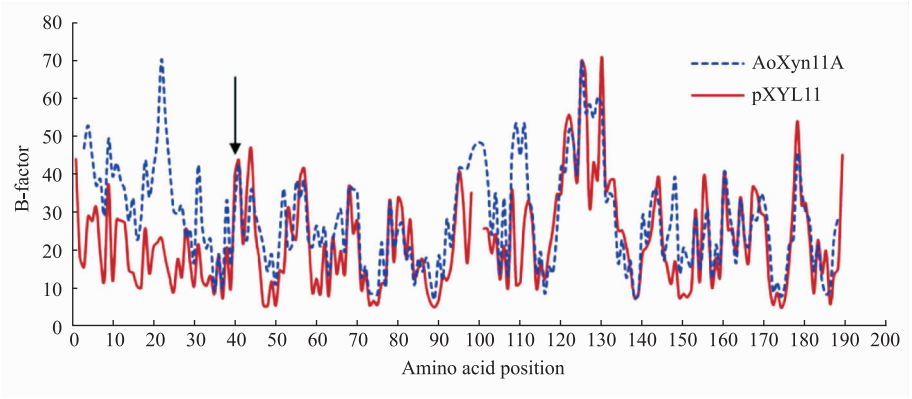


图 2 AoXyn11A 和 pXYL11 氨基酸残基的 B-factor 值

Fig. 2 B-factor values of amino acids of AoXyn11A and pXYL11

由图 3 可见，ATX11A 的 RMSD 值较 AoXyn11A 的小，由此推测 ATX11A 的耐热性高于 AoXyn11A。

2.3 重组表达质粒 pPIC9K-ATx11A 的构建

将 *Aoxyn11A* 5′-端的 123 bp 置换为 *xyn11PM* 5′-端的 126 bp。以 pUCm-T-*xyn11PM* 为模板，第一轮 PCR 扩增获得长度约为 150 bp 的基因片段 Tf（图 4 泳道 1）；再以 pPIC9K-*Aoxyn11A* 为模板，第二轮 PCR 扩增获得长度约为 580 bp 的杂合酶基因 *ATx11A*（图 4 泳道 2）。测序结果表明，*ATx11A* 全长 570 bp，包含 126 bp 的 *xyn11PM* 5′-端片段和 444 bp *Aoxyn11A* 3′-端片段，编码 189 个氨基酸，与预期的完全一致。将 *ATx11A* 克隆至 pPIC9K，获重组表达质粒 pPIC9K-*ATx11A*。

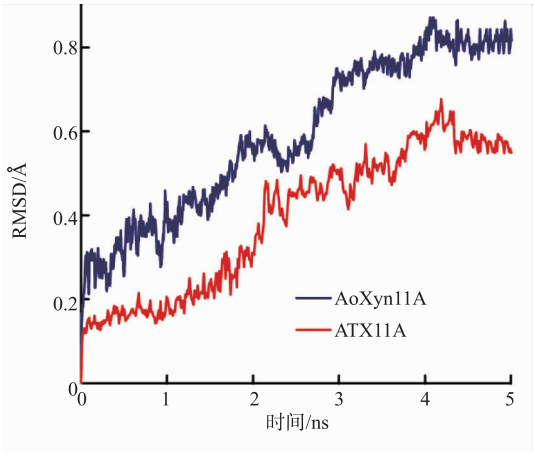
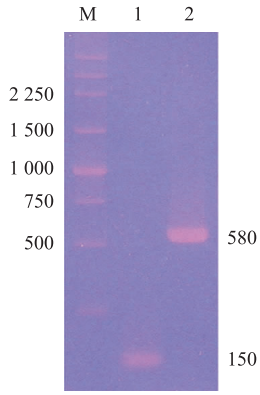


图 3 AoXyn11A 和 ATX11ARMSD 值的进程曲线

Fig. 3 Curves of RMSD values of AoXyn11A and ATX11A



M：DNA Marker；1：基因片段 Tf；2：杂合酶基因 *ATx11A*

图 4　PCR 产物的琼脂糖凝胶电泳分析

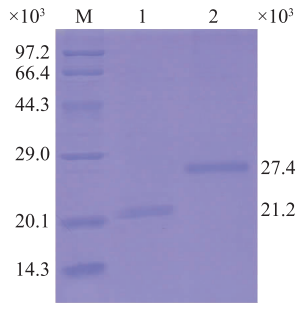
Fig. 4　Analysis of PCR products by agarose gel electrophoresis

2.4　重组木聚糖酶的表达和纯化

选取若干在 YPD-G418（4.0 mg/mL）平板上生长良好的单菌落，按照 Multi-Copy *Pichia* Expression Kit 操作手册进行诱导表达（30 ℃培养 72 h，每隔 24 h 添加终体积分数为 1.0%的甲醇），按 1.6 的方法测定上清液酶活性，筛选到 2 个分别产重组 AoXyn11A 和 ATX11A 活性最高的重组毕赤酵母 GS115/*Aoxyn11A* 和 GS115/*ATx11A*，它们的酶活性分别为 210.8 U/mL 和 148.1 U/mL，而在空白对照 GS115/pPIC9K 的上清液中未检测到木聚糖酶活性。分别取 GS115/*Aoxyn11A* 和 GS115/*ATx11A* 的诱导表达上清液，采用 $(NH_4)_2SO_4$ 盐析、超滤浓缩和 Sephadex G-50 凝胶层析进行纯化。SDS-PAGE 分析显示，纯化的重组 AoXyn11A 约在 21.2×10^3（表观相对分子质量）处呈现单一条带（图 5 泳道 1），与其理论相对分子质量 20.0×10^3 接近。由于在 ATX11A 序列中含有 2 个 N-糖基化位点（N^5-E-T^7 和 N^{34}-Y-S^{36}），使得理论相对分子质量 20.2×10^3 的重组 ATX11A 的表观相对分子质量达到 27.4×10^3（图 5 泳道 2）。

2.5　重组木聚糖酶的温度特性

按 1.7 的方法分析了温度对重组 AoXyn11A 和 ATX11A 的影响（图 6 和图 7）。由图 6 可见，ATX11A 的最适温度 T_{opt} 为 65 ℃，较 AoXyn11A 的 50 ℃提升了 15 ℃。Sun 等 [13] 用褐色热单胞菌（*Thermomonospora fusca*）耐热木聚糖酶 N-端的 43 个氨基酸残基置换 *Aspergillus niger* 木聚糖酶相应的 36 个残基，所获杂合酶 Atx 的最适温度提高了



M：蛋白质 Marker；1：重组 AoXyn11A；2：重组ATX11A

图 5　纯化的重组 AoXyn11A 和 ATX11A 的SDS-PAGE 分析

Fig. 5　SDS-PAGE analysis of the purified recombinant AoXyn11A and ATX11A

10 ℃，低于本研究的结果。由图 7 可见，ATX11A 在 60 ℃的半衰期 $t_{1/2}^{60}$ 为 55 min，较 AoXyn11A（$t_{1/2}^{60}$= 1.3 min）延长了 41.3 倍；且 ATX11A 在 55 ℃处理 180 min 仍保留 60%以上的酶活性，而 AoXyn11A 在同一温度下处理 15 min 酶活性完全丧失。上述分析结果表明，通过 N-端置换显著提高了 AoXyn11A 的最适温度和耐热性。

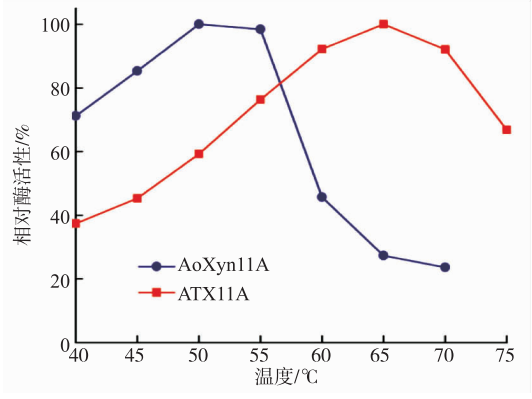
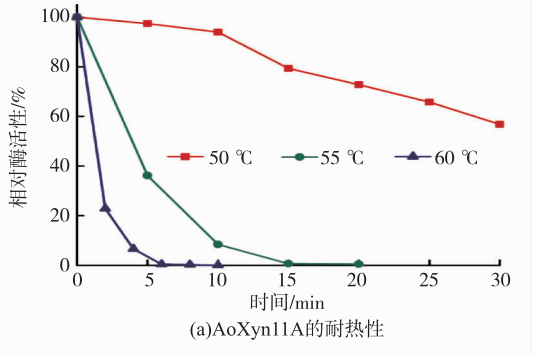


图 6　纯化的重组 AoXyn11A 和 ATX11A 的最适温度

Fig. 6　Temperature optima of the purified recombinant AoXyn11A and ATX11A



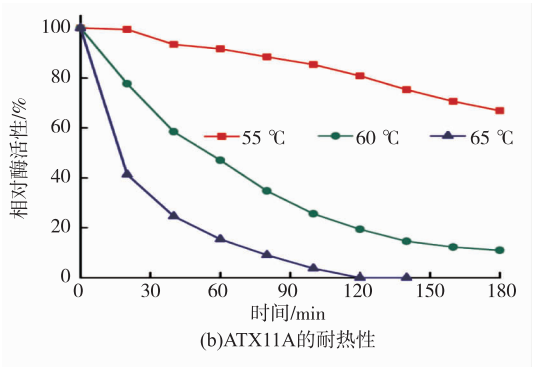


图 7　纯化的重组 AoXyn11A 和 ATX11A 的耐热性

Fig. 7　Thermostabilities of the purified recombinant AoXyn11A and ATX11A

运用 Protein Interactions Calculator（PIC）软件（http://pic.mbu.iisc.ernet.in/job.html）分析了ATX11A三维结构中氨基酸残基间的相互作用。结果显示，由于 N-端置换，引入了 2 个离子键 His^{10}–Asp^{11} 和 Asp^{11}–Lys^{49} 以及 5 个主链与支链之间的氢键，由此推测引入的离子键和氢键对重组 ATX11A 温度特性的改善起到一定的作用[14-15]。此外，重组 ATX11A 最适温度和耐热性的提高也可能与其在 *P. pastoris* GS115 表达的过程中发生了N-糖基化有关[16]。

2.6　酶动力学常数的测定

在重组 AoXyn11A 和 ATX11A 各自的最适温度（T_{opt}=50 ℃和 65 ℃）下，按 1.8 的方法测得 AoXyn11A 和 ATX11A 对桦木木聚糖的 K_m 值分别为 2.55 mg/mL 和 4.36 mg/mL，V_{max} 值分别为 3 917 U/mg 和 4 168 U/mg。

3　结　语

理性设计是基于数据库和文献中的相关信息和数据，通过计算机模拟和分析，为目的蛋白质/酶分子的定向改造提供可靠的预测模型和结果，生物信息学、数据库和计算机科学的快速发展使其优势日趋明显[4]。本研究以米曲霉 AoXyn11A 为对象，基于木聚糖酶一级结构比对、三维结构同源建模和分子动力学模拟的理性设计，采用大引物 PCR 技术将中温酶基因 *Aoxyn11A* 的 5′-端 DNA 片段置换为耐热酶基因 *xyn11PM* 的对应片段，构建出杂合酶基因 *ATx11A*。分别将 *Aoxyn11A* 和 *ATx11A* 在毕赤酵母 GS115 中进行了表达，并分析了重组表达产物 AoXyn11A 和 ATX11A 的温度特性。结果表明，通过 N-端置换显著提高了 AoXyn11A 的最适温度和耐热性。ATX11A 不仅保留了 AoXyn11A 优良的酶学性质，而且显著改善了其温度特性，使其在食品、饲料和造纸等工业领域有着巨大的应用前景。

参考文献：

[1] COLLINS T,GERDAY C,FELLER G. Xylanases,xylanase families and extremophilic xylanases [J]. **FEMS Microbiology Reviews**,2005,29(1):3-23.

[2] PASTOR F I J,GALLARDO O,SANZ A J,et al. Xylanases:molecular properties and applications[M]. In:Polaina J,MacCabe A P,editors. Industrial Enzymes. The Netherlands:Springer-Verlag Press,2007:65-82.

[3] POLIZELI M L T M,RIZZATTI A C S,MONTI R,et al. Xylanases from fungi:properties and industrial applications[J]. **Applied Microbiology and Biotechnology**,2005,67(5):577-591.

[4] LI Chunxiu,XU Jianhe. The digging and application of industrial enzyme resources in post genome era [J]. **Biotechnology and Business**,2011,1:40-49.(in Chinese)

[5] ZHANG H,LI J,WANG J,et al. Determinants for the improved thermostability of a mesophilic family 11 xylanase predicted by computational methods[J]. **Biotechnology for Biofuels**,2014,7:3.

[6] LI J F,GAO S J,LIU X T,et al. Modified pPIC9K vector-mediated expression of a family 11 xylanase gene,*Aoxyn11A*,from *Aspergillus oryzae* in *Pichia pastoris*[J]. **Annals of Microbiology**,2013,63(3):1109-1120.

[7] CHENG Y F,YANG C H,LIU W H. Cloning and expression of *Thermobifida* xylanase gene in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*[J]. **Enzyme and Microbial Technology**,2005,37(5):541-546.

[8] ESWAR N,ERAMIAN D,WEBB B,et al. Protein structure modeling with MODELLER [J]. **Methods in Molecular Biology**,2008,426:145-159.

[9] XIE Z H,SHI X J. Fast and almost 100% efficiency site-directed mutagenesis by the megaprimer PCR method [J]. **Progress in Biochemistry and Biophysics**,2009,36(11):1490-1494.

[10] WANG J，ZHANG H，WU M，et al. Cloning and sequence analysis of a novel xylanase gene，*Auxyn10A* ，from *Aspergillus usamii* [J]. **Biotechnology Letters**，2011，33(5)：1029-1038.
[11] REETZ M T，CARBALLEIRA J D. Iterative saturation mutagenesis （ISM）for rapid directed evolution of functional enzymes[J]. **Nature Protocols**，2007，2(4)：891-903.
[12] BADIEYAN S，BEVAN D R，ZHANG C. Study and design of stability in GH5 cellulases [J]. **Biotechnology and Bioengineering**，2012，109(1)：31-44.
[13] SUN J Y，LIU M Q，XU Y L，et al. Improvement of the thermostability and catalytic activity of a mesophilic family 11 xylanase by N-terminus replacement[J]. **Protein Expression and Purification**，2005，42(1)：122-130.
[14] KUMAR S，TSAI，C J，NUSSINOV R. Factors enhancing protein thermostability [J]. **Protein Engineering**，2000，13(3)：179-191.
[15] PATHAK A K. Effect of a buried ion pair in the hydrophobic core of a protein：an insight from constant pH molecular dynamics study[J]. **Biopolymers**，2015，103(3)：148-157.
[16] LEE J H，HE S Y，LEE J W，et al. Thermostability and xylan-hydrolyzing property of endoxylanase expressed in yeast *Saccharomyces cerevisiae*[J]. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**，2009，14(5)：639-644.

会　议　消　息

会议名称(中文)：第六届全国“跨学科蛋白质研究”学术讨论会

所属学科：生物物理学 、生物化学及分子生物学,细胞生物学,生物医学工程学
开始日期：2017-09-22
结束日期：2017-09-24
所在城市：广东省　广州市
具体地点：广州汇华希尔顿逸林酒店
主办单位：中国生物化学与分子生物学会蛋白质专业委员会
承办单位：中国科学院广州生物医药与健康研究院
会议主席：施一公
联系人：凌老师
联系电话：020-32015232
E-MAIL：ling_yixia@gibh.ac.cn
会议网站：http://cps2017.csp.escience.cn/dct/page/1

会议背景介绍：第六届全国“跨学科蛋白质研究”学术讨论会将于 2017 年 9 月 22 日-24 日在广东广州召开，此次会议由中国生物化学与分子生物学会蛋白质专业委员会举办，中国科学院广州生物医药与健康研究院承办。本次会议将邀请众多在蛋白质科学领域有重要影响力的科学家参加，不仅为本领域的中青年科学工作者提供学术交流的平台，也为近期回国或进入蛋白质科学领域的同行提供融入国内队伍的机会。此次学术会议的召开，将集中展示过去两年我国在蛋白质科学领域的辉煌成就，展现国内正在开展的令人激动的研究工作，展望未来我国在蛋白质科学领域的美好前景。此次会议将是我国蛋白质科学乃至学术界的又一次盛会。