

耐有机溶剂果糖苷酶的胞外表达、纯化和结晶

苏汇¹ 陈琼珍² 何冰芳^{1*}

(1. 南京工业大学 药学院 江苏 南京 218000)

(2. 南京农业大学 生命科学学院 江苏 南京 218000)

摘要:【目的】克隆表达一种 *Arthrobacter arilaitensis* NJEM01 来源的耐有机溶剂 β -呋喃果糖苷酶(β -FFase), 纯化并进行结晶条件的研究。【方法】构建 *pelB* 信号肽与 β -FFase 融合表达质粒 pET22b-*pelB-bff*, 将其导入 *Escherichia coli* BL21(DE3)中诱导表达, 硫酸铵沉淀、DEAE 阴离子交换色谱两步纯化重组蛋白, 采用坐滴式气相扩散法对 β -FFase 进行结晶条件筛选和优化。【结果】构建重组质粒 pET22b-*pelB-bff*, 通过优化诱导表达条件, IPTG 浓度 0.1 mmol/L, 诱导温度 30 °C, 诱导时间 10 h, 比活力高达 108 U/mg, 实现了果糖苷酶的胞外可溶性表达, 纯化获得达到结晶纯度的 β -FFase。结晶条件初筛和优化后获得可培养 β -FFase 晶体的条件为 0.15 mol/L 氯化钙, 0.1 mol/L HEPES pH 6.7, 26%聚乙二醇 400。晶体衍射分辨率可以达到 2.1 Å。【结论】高糖苷合成能力 β -FFase 表达纯化体系的构建和结晶条件的初步研究, 为从结构生物学角度进一步研究果糖苷酶结构与功能的关系, 定向进化提高糖苷酶转糖基活性奠定了基础。

关键词: 果糖苷酶, *pelB* 信号肽, 胞外表达, 蛋白纯化, 结晶

Expression, purification, and crystallization of an organic solvent-tolerant β -fructofuranosidase

SU Hui¹ CHEN Qiong-Zhen² HE Bing-Fang^{1*}

(1. College of Pharmaceutical Sciences, Nanjing University of Technology, Nanjing, Jiangsu 218000, China)

(2. College of Life Sciences, Nanjing Agricultural University, Nanjing, Jiangsu 218000, China)

Abstract: [Objective] This study aims to clone, express and purify an organic solvent-tolerant β -fructofuranosidase (β -FFase). [Methods] The recombination plasmid pET22b-*pelB-bff* by fusing the signal peptide gene *pelB* with *bff* was expressed in *Escherichia coli* BL21(DE3), encoding β -FFase from *Arthrobacter arilaitensis* NJEM01. Ammonium sulfate precipitation and DEAE anion exchange chromatography were used to purify β -FFase. Crystallization condition was determined using the sitting drop diffusion technique. [Results] Plasmid pET22b-*pelB-bff* was constructed. Under the optimal induction condition as 0.1 mmol/L IPTG at 30 °C for 10 h, β -FFase with the specific activity of 108 U/mg was expressed in the culture medium, which was further purified to the crystalline purity. The single crystal of β -FFase could be diffracted up to 2.1 Å resolution at the optimal culture condition

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 21376119); 国家 863 计划项目(No. 2012AA022200)

*通讯作者: Tel: 86-25-58139902; 信箱: bingfanghe@njtech.edu.cn

收稿日期: 2015-01-12; 接受日期: 2015-05-15; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2015-06-26

consisting of 0.15 mol/L calcium chloride dehydrate, 0.1 mol/L HEPES (pH 6.7) and 26% (V/V) polyethylene glycol 400. **[Conclusion]** β -FFase has been successfully expressed, purified and crystallized with an efficient transfructosylation activity, which lays a foundation for the investigation on the structure-function relationship and improvement of β -FFase catalytic efficiency by directed evolution of gene manipulation in the future.

Keywords: Fructofuranosidase, *pelB* signal peptide, Excretion, Protein purification, Crystallization

β -呋喃果糖苷酶 (Beta-Fructofuranosidase, β -FFase, EC3.1.2.26) 具有糖基水解和转移能力, 能催化水解蔗糖 α -(1 \rightarrow 2)糖苷键, 生成 α -葡萄糖和 β -果糖, 后者能够转移到其他底物上^[1]。当以乳糖和蔗糖作为原料时, 生成低聚乳糖^[1-2]; 当反应体系中仅存在蔗糖时, 主要生成低聚果糖和果聚糖^[3]。低聚乳糖和低聚果糖都是优良的功能性低聚糖, 在食品及医药行业有着广泛的应用前景^[4-5]。本实验室自行筛选得到耐有机溶剂糖苷酶产生菌 *Arthrobacter arilaitensis* NJEM01 (CCTCC M2012155)^[6], 并克隆了菌株 NJEM01 的 β -呋喃果糖苷酶^[7]。该酶在非水相中能高效催化黄酮类化合物的糖基化^[8-9], 同时又有高效的低聚果糖合成能力^[10], 显示了其独特的底物多样性和高效的糖苷合成能力^[8-10]。

前期研究还表明在非水相中该酶对黄酮类糖苷产物的水解能力较弱^[8-9], 通常糖苷酶对糖苷产物的水解能力较强, 已成为酶法合成糖苷产物的关键缺陷^[11]。Withers 研究室采用点突变技术将糖苷酶催化中心的第 358 位亲核体谷氨酸突变为非亲核体丙氨酸, Withers 等将其称为糖苷合成酶^[12]。但突变酶 Glu358Ala 失去了寡糖水解活性, 不能用寡糖作为供体, 需要加入人工合成的氟代糖为底物, 介于本实验室发现的糖苷酶的高合成能力, 其晶体结构的解析将为其相关催化特性的分析奠定基础, 并可望^[8-9]推动高效糖苷合成酶的分子定向进化研究。

本研究以 β -呋喃果糖苷酶为研究对象, 构建了信号肽 *pelB* 与果糖苷酶融合表达质粒 pET22b-*pelB-bff*, 并导入 *Escherichia coli* BL21 (DE3) 中获得重组菌, 优化诱导表达条件后实现了胞外可溶性表达。经硫酸铵沉淀和离子交换两步纯化, 得

到了高纯度的蛋白, 为进一步获得 β -呋喃果糖苷酶的晶体结构、解析酶的催化机制和酶催化定向改造奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒: β -呋喃果糖苷酶产生菌株 *Arthrobacter arilaitensis* NJEM01 为中国典型培养物保藏中心保存 (CCTCC M2012155)^[6], *bff* 基因序列参考本实验室已获授权专利^[6-7]。

1.1.2 试剂或仪器: *Pfu* 酶、T4 DNA 连接酶和 Premixed Protein Marker (Low) (0.6 g/L) 购自 TaKaRa 公司; 限制性内切酶 (*Nco* I/*Hind* III) 购自 New England Biolabs (北京) 有限公司; DNA 回收试剂盒和质粒制备试剂盒购自上海捷瑞公司; 蛋白胨和酵母提取物购自美国 Invitrogen 公司; Bradford 蛋白浓度测定试剂盒购自 GENEray 生物技术公司; 异丙基- β -D-硫代吡喃半乳糖苷 (IPTG)、羟乙基哌嗪乙磺酸缓冲液 (HEPES)、氯化钙和聚乙二醇 400 购自美国 Sigma 公司; 蛋白浓缩管购自美国 Millipore 公司; 结晶试剂盒购自美国 Hampton Research 公司; 阴离子柱由 30 mL DEAE Sepharose Fast Flow (美国 GE healthcare 公司产品) 树脂填充在 30 cm \times 3 cm 玻璃柱中; 生物传感仪 SBA-40C 型购自山东科学院; 引物合成和测序由苏州金唯智生物公司完成。

1.2 方法

1.2.1 β -FFase 的胞外可溶性表达: 为了使 β -FFase 实现胞外可溶性表达以便于纯化和结晶, 将 *Arthrobacter arilaitensis* NJEM01 来源的果糖苷酶成熟肽基因 *bff* 按照文献 [10] 中的方法构建

pET22b-*pelB-bff* 质粒。即设计 *pelB* 和 *bff* 的重叠引物, 采用 Overlap PCR 扩增得到 *pelB-bff*。再利用带酶切位点的 *pelB* 正向引物和 *bff* 的反向引物扩增 *pelB-bff*。经双酶切后插入到同样酶切后的 pET22b 载体中得到 pET22b-*pelB-bff*, 并导入 *E. coli* BL21(DE3) 重组表达。重组菌培养方法参考文献[7], 并对诱导温度、IPTG 浓度、诱导时间等因素进行优化。

1.2.2 β -FFase 的分离纯化: 结晶所需的蛋白质纯度较高(95%以上, 点样量 20 μ g 时电泳为单一条带)^[13]。纯化过程参考文献[10]中的策略采用硫酸铵分级沉淀和阴离子交换两步纯化。点样量 20 μ g 时聚丙烯酰胺凝胶电泳验证蛋白纯度, 采用超速离心管 4 000 r/min 离心 30 min 将蛋白浓缩至 20 g/L。采用考马斯亮蓝法测定蛋白质浓度。

1.2.3 酶活测定^[2]: 酶活力定义为在 30 $^{\circ}$ C 条件下, 每分钟水解蔗糖产生 1 μ mol 葡萄糖所需酶量定义为一个酶活单位[U, 即 μ mol/(mL·min)]。

1.2.4 β -FFase 的结晶条件初筛与优化: 将纯化浓缩后的 β -FFase 配制成不同浓度的酶液, 选取商品化的结晶筛选试剂盒对 β -FFase 的结晶条件进行筛选, 包括 Hampton Research 公司的 HR2-126/098/110/112/128/122。初筛使用 48 孔板和坐滴式气相扩散法, 槽液 75 μ L, 蛋白浓度分别为 10 g/L 和 20 g/L, 坐滴为 1 μ L 蛋白加 1 μ L 槽液, 胶带塑封后置于 20 $^{\circ}$ C 静置培养^[14-16]。对于 48 孔结晶板中有结晶迹象的条件, 参考文献[17-18]中的策略优化。

1.2.5 β -FFase 晶体的衍射数据收集和处理: 将质量较优、体积较大的 β -FFase 单晶捞出, 置于冷冻保护剂下数秒至数分钟, 随即保存于液氮环境(-173 $^{\circ}$ C)中。将 β -FFase 晶体于上海光源同步辐射系统进行衍射, 衍射温度为-173 $^{\circ}$ C, 晶体到探测器(ADSC Q315r)距离为 300 mm, 曝光时间为 0.4 s, 每 1 $^{\circ}$ 拍摄一张, 共拍摄 180 张。

2 结果与分析

2.1 β -FFase 的胞外可溶性表达

2.1.1 构建 pET22b-*pelB-bff* 重组质粒: 重组菌经

诱导表达后, 测序结果与授权专利中 *Arthrobacter arilaitensis* NJEM01 来源的果糖苷酶 *bff* 序列一致^[7]。NCBI 搜索后发现与其相似性最高为 85% 的是来自 *Arthrobacter globiformis* 的果糖苷酶, 与 *Arthrobacter* sp. K-1 来源的(ArFFase)果糖苷酶相似性为 78%, 与其他来源的 GH68 家族糖苷酶同源性均小于 55%。重组菌诱导表达上清中能够测到酶活, 凝胶电泳图也表明构建的重组菌实现了 β -FFase 的胞外可溶性表达(图 1A)。

2.1.2 诱导温度对 β -FFase 表达的影响: 如图 1B 所示, 诱导温度为 30 $^{\circ}$ C 时可溶性蛋白表达量最高。起初, 随着诱导温度升高, 大肠杆菌的比生长速率和反应速率加快, 提高了蛋白合成速率, 使之与蛋白折叠速率相配, 形成更多可溶性蛋白。当诱导温度超过 30 $^{\circ}$ C 时, 高拷贝数和高表达导致胞内有部分包涵体形成, 如图 1A 所示, 蛋白来不及正确折叠, 可溶性蛋白量减少。

2.1.3 IPTG 浓度对 β -FFase 表达的影响: 由图 2 可知, 该表达体系几乎没有背景表达, IPTG 的加入能够快速诱导 β -FFase 的产生。随着 IPTG 的加入, 当高于 0.1 mmol/L 时, 酶活反而下降, 且胞内有包涵体出现(此处数据未显示), 可能是较高浓度的 IPTG 诱导 β -FFase 快速表达反而影响了正确折叠, 形成没有活性的包涵体和沉淀, 因此最适 IPTG 浓度为 0.1 mmol/L。

2.1.4 诱导时间对 β -FFase 表达的影响: 如图 3 所示, 在 2-6 h 内酶活随着诱导时间的延长而升高。随着诱导时间的继续延长, 酶活不再增加, 10 h 时为酶活最大值。当时间继续增长, 酶活反而下降, 这可能是大肠杆菌代谢产生的副产物积累对自身系统产生不利影响及酶的失活所致。

2.2 β -FFase 蛋白的纯化

通过硫酸铵沉淀、DEAE 阴离子层析纯化后, 得到了均一度很高的蛋白。将分离纯化后获得的酶液进行聚丙烯酰胺凝胶电泳分析, 电泳图谱如图 4 所示, 为单一条带。纯化后经测序与 β -FFase 成熟肽 N 端一致。

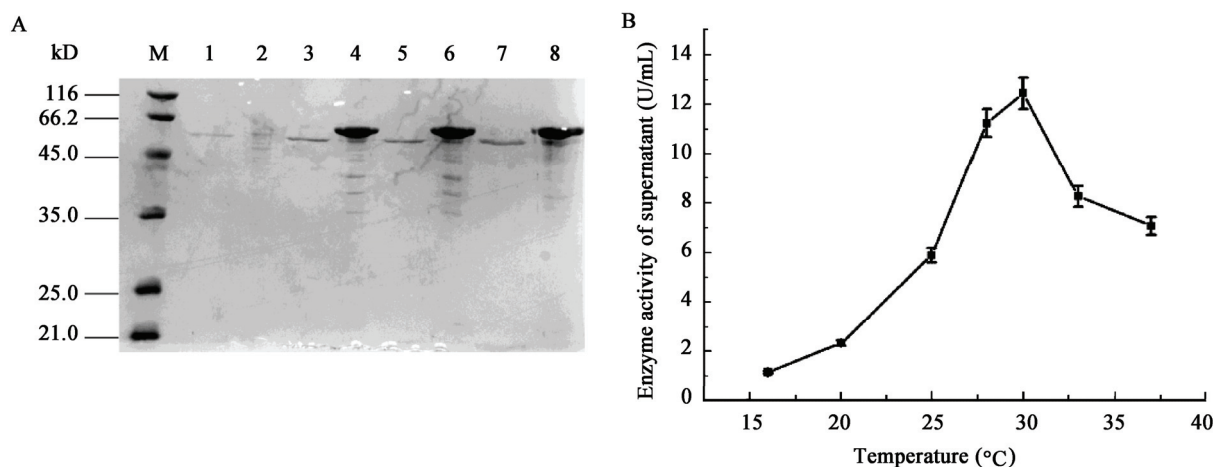


图 1 诱导温度对 β -FFase 表达的影响

Figure 1 Effect of induction temperature on expression of β -FFase

注: A: 不同诱导温度下 β -FFase 电泳图. M: 标准蛋白 Marker; 1: 25 °C 诱导后发酵液上清; 2: 25 °C 诱导后超声破碎沉淀; 3: 30 °C 诱导后发酵液上清; 4: 30 °C 诱导后超声破碎沉淀; 5: 33 °C 诱导后发酵液上清; 6: 33 °C 诱导后超声破碎沉淀; 7: 37 °C 诱导后发酵液上清; 8: 37 °C 诱导后超声破碎沉淀. B: 不同诱导温度下发酵液上清酶活.

Note: A: SDS-PAGE analysis of β -FFase under different induction temperature. M: Standard protein marker; 1: Fermentation supernatant by induced at 25 °C; 2: Precipitant after sonication by induced at 25 °C; 3: Fermentation supernatant by induced at 30 °C; 4: Precipitant after sonication by induced at 30 °C; 5: Fermentation supernatant by induced at 33 °C; 6: Precipitant after sonication by induced at 33 °C; 7: Fermentation supernatant by induced at 37 °C; 8: Precipitant after sonication by induced at 37 °C. B: Enzyme activity of fermentation supernatant under different induction temperature.

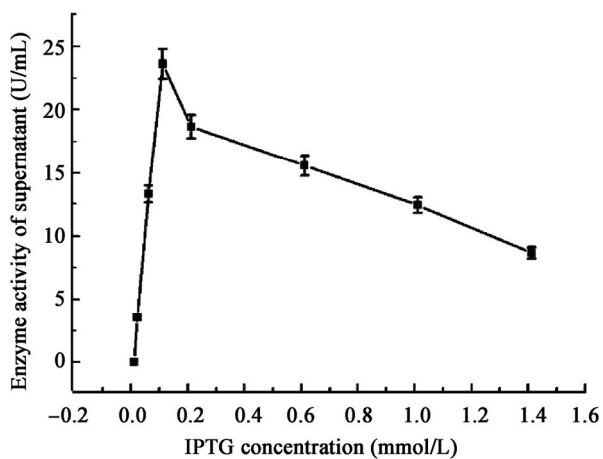


图 2 IPTG 浓度对 β -FFase 表达的影响

Figure 2 Effect of IPTG concentration on expression of β -FFase

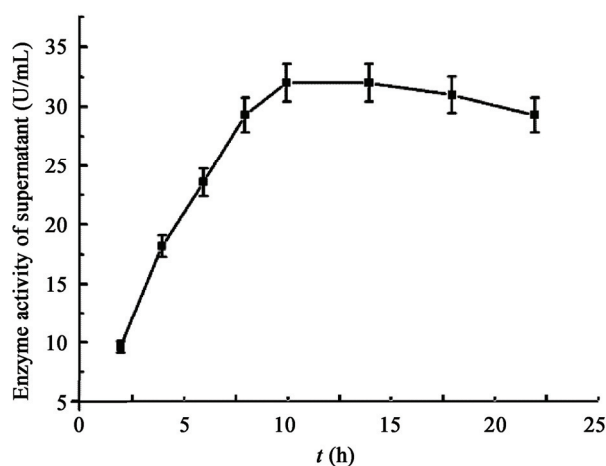


图 3 诱导时间对 β -FFase 表达的影响

Figure 3 Effect of induction time on expression of β -FFase

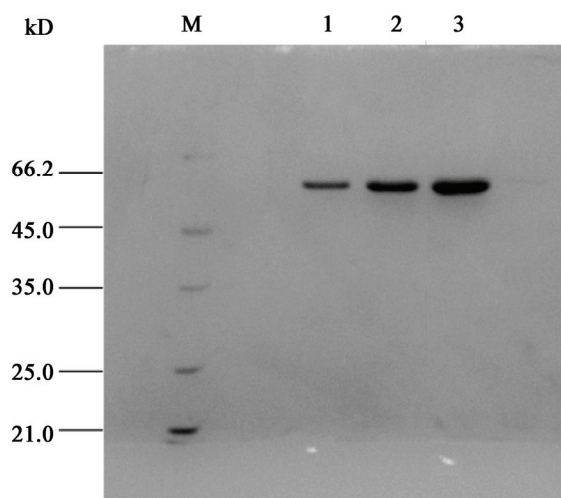


图4 纯化后 β -FFase 电泳图

Figure 4 SDS-PAGE analysis of β -FFase after purification

注: M: 标准蛋白 Marker (4.8 μ g); 1: 5 μ g 纯化后 β -FFase; 2: 10 μ g 纯化后 β -FFase; 3: 20 μ g 纯化后 β -FFase.

Note: M: Standard protein marker (4.8 μ g); 1: 5 μ g purified β -FFase; 2: 10 μ g purified β -FFase; 3: 20 μ g purified β -FFase

2.3 β -FFase 结晶条件的筛选及优化

点样 4 d 后, 在 6 个试剂盒中的多个条件下观察蛋白质结晶迹象, 晶体多为梭状、针状, 仅 4 个条件出现长方形或柱状单晶(图 5)。依据筛选结果对沉淀剂种类、浓度, 缓冲液种类、pH, 盐的种类等因素进行了 β -FFase 结晶条件的优化。最后在 0.15 mol/L 氯化钙, 0.1 mol/L HEPES (pH 6.7), 26% 聚乙二醇 400 条件下得到了较大的棱柱状晶体, 数量较少且较大(图 6A)。在 0.2 mol/L 氯化钙, 0.1 mol/L 柠檬酸钠 pH 5.6, 13% (质量体积比)聚乙二醇 4000 条件下则可获得另一种长方体晶型(图 6B)。

2.4 β -FFase 单晶衍射数据的处理与分析

利用上海光源同步辐射生物大分子 BL17-U1 线站对 β -FFase 单晶(图 6)进行了衍射, 成功获得了分辨率 2.1 \AA (图 7)的衍射数据, 数据表明 β -FFase 晶体遵循 $P6_1$ 空间群, 晶胞参数为 $a=63.7 \text{\AA}$, $b=131.3 \text{\AA}$, $c=111.1 \text{\AA}$ 。

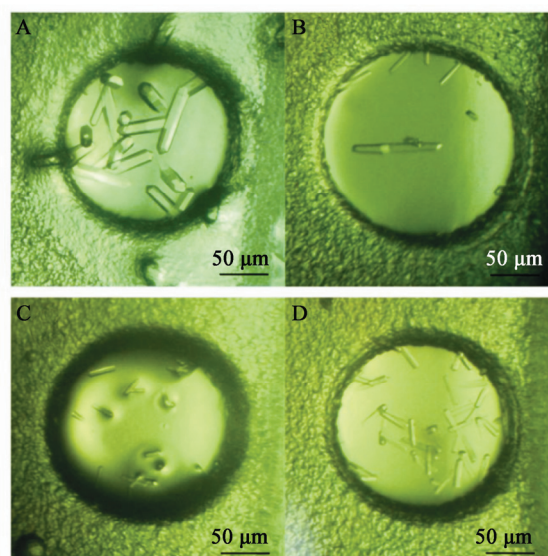


图5 初筛得到的 β -FFase 晶体

Figure 5 Crystals of β -FFase screened by crystal kits

注: A: 培养条件是 0.2 mol/L 氯化钙, 0.1 mol/L pH 7.5 HEPES, 28% 聚乙二醇 400; B: 培养条件是 0.1 mol/L pH 5.6 柠檬酸钠, 10% 2-丙醇, 10% 聚乙二醇 4000; C: 培养条件是 4% pH 5.0 草酸钠, 12% 聚乙二醇 3550; D: 0.1 mol/L 甲酸镁。

Note: A: 0.2 mol/L calcium chloride dehydrate, 0.1 mol/L pH 7.5 HEPES, 28% (V/V) polyethylene glycol 400; B: 0.1 mol/L sodium citrate tribasic dehydrate pH 5.6, 10% (V/V) 2-propanol, 10% (W/V) polyethylene glycol 4000; C: 4% (V/V) tacsimate pH 5.0, 12% (W/V) polyethylene glycol 3350; D: 0.1 mol/L magnesium formate dehydrate.

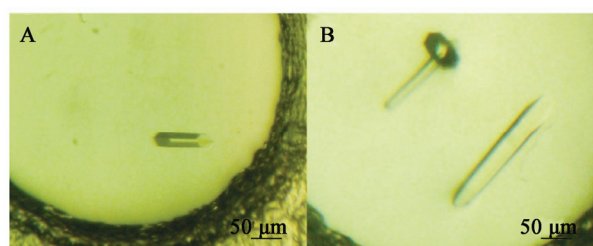


图6 β -FFase 的优质单晶图

Figure 6 The high quality single crystals of β -FFase

注: A: 单晶培养条件是 0.15 mol/L 氯化钙, 0.1 mol/L HEPES pH 6.7, 26% 聚乙二醇 400; B: 单晶培养条件是 0.1 mol/L pH 5.6 柠檬酸钠, 0.2 mol/L 氯化钙, 13% 聚乙二醇 4000。

Note: A: Single crystal grow in 0.15 mol/L calcium chloride dehydrate, 0.1 mol/L pH 6.7 HEPES, 26% (V/V) polyethylene glycol 400; B: Single crystal grow in 0.2 mol/L calcium chloride dehydrate, 0.1 mol/L sodium citrate tribasic dehydrate pH 5.6, 13% (W/V) polyethylene glycol 4000.

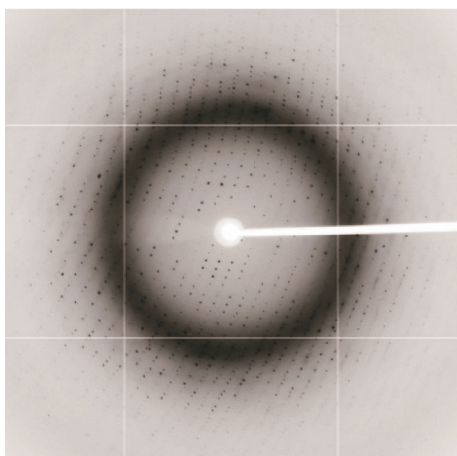


图 7 上海光源 BL17-U1 线站上采集到的 β -FFase 单晶衍射图像

Figure 7 The diffraction image of β -FFase single crystal obtained at beamline BL17-U1 of SSRF

3 结论

已经报道过的 β -呋喃果糖苷酶胞外表达量很低^[1,19], 而本课题筛选到的果糖苷酶能够利用 *pelB* 信号肽实现胞外可溶性表达。通过优化表达条件, 在 30 °C、0.1 mmol/L IPTG 下诱导表达 10 h, 蛋白总量为 446 mg/L, 酶活 32 U/mL, 比酶活 108 U/mg, 提高了重组菌的胞外表达量, 便于大规模纯化和结晶。

以往的研究均采用 Ni 柱纯化的方法获得高纯度的蛋白用于结晶^[20-23], 但是在末端加上 6 个亲和标签, 可能会对酶蛋白的结构产生一定的影响。本研究采用 *pelB* 信号肽与果糖苷酶融合表达, 成功地实现了胞外表达, 极大程度地简化了后续的分选步骤, 通过硫酸铵沉淀、DEAE 阴离子交换色谱两步纯化后, 蛋白纯度可达 95% 以上, 从而避免了亲和标签可能带来的结构上的影响。

X-射线单晶衍射技术是目前获得结构信息最主要的手段, 但如何筛选到好的结晶条件是制约结构生物学发展的主要瓶颈问题之一, 传统的方法是从众多的溶液中筛选出可结晶的条件, 但工作量大, 效率也不高。近年来在传统结晶方法和试剂基础上发展起来的一系列新的结晶技术和筛选试剂

盒加快了结构生物学的发展。

本研究采用气相扩散法和商业试剂盒筛选获得了 4 个可形成优质晶体的结晶条件。进一步通过对沉淀剂种类及浓度、缓冲液种类及 pH、盐离子浓度及小分子添加剂等因素对结晶条件进行优化后, 获得的棱柱状单晶的衍射分辨率达到 2.1 Å。然而影响蛋白质晶体生长的因素还有很多, 除上述条件外, 结晶方式的选择、蛋白储存缓冲液的种类、晶体生长环境等因素也会影响蛋白质晶体的生长。将这些因素进行优化, 获得更高分辨率的底物共结晶和产物共结晶晶体, 将为该酶的底物多样性和高效糖苷催化合成能力的解析提供更为准确的模型。

参考文献

- [1] Tetsuya I, Koki F, Kozo H, et al. Cloning and expression of β -fructofuranosidase gene from *Arthrobacter* sp. K-1[J]. Journal of Applied Glycoscience, 2002, 49(3): 291-296
- [2] Tonozuka T, Tamaki A, Yokoi G, et al. Crystal structure of a lactosucrose-producing enzyme, *Arthrobacter* sp. K-1 β -fructofuranosidase[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2012, 51(6/7): 359-365
- [3] Ozimek LK, Kralj S, van der Maarel MJEC, et al. The levansucrase and inulosucrase enzymes of *Lactobacillus reuteri* 121 catalyze processive and non-processive transglycosylation reactions[J]. Microbiology, 2006, 152(4): 1187-1196
- [4] Mu WM, Chen QM, Wang X, et al. Current studies on physiological functions and biological production of lactosucrose[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2013, 97(16): 7073-7080
- [5] de Vuyst L, Moens F, Selak M, et al. Summer meeting 2013: growth and physiology of bifidobacteria[J]. Journal of Applied Microbiology, 2014, 116(3): 477-491
- [6] He BF, Wu XM, Chu JL, et al. Glycosylation of flavonoid and the preparation methods and uses: China, CN102443027A[P]. 2012.05.09. <http://www.xjishu.com/zhuanti/63719.html> (in Chinese)
何冰芳, 吴薛明, 储建林, 等. 果糖基化葛根素及其制备方法与应用: 中国, CN102443027A[P]. 2012.05.09. <http://www.xjishu.com/zhuanti/63719.html>
- [7] He BF, Wang R, Wu XM, et al. The organic solvent-tolerant glucosidase Fru6 mutants and uses: China, CN102732456A[P]. 2012.10.17. <http://www.apchina.com/zhuanti/7893604> (in Chinese)
何冰芳, 王瑞, 吴薛明, 等. 耐有机溶剂糖苷酶 Fru6 及其突变体和应用: 中国, CN102732456A[P]. 2012.10.17. <http://www.apchina.com/zhuanti/7893604>
- [8] Wu XM, Chu JL, Wu B, et al. An efficient novel glycosylation of flavonoid by β -fructosidase resistant to hydrophilic organic solvents[J]. Bioresource Technology, 2013, 129: 659-662
- [9] Wu XM, Chu JL, Liang JY, et al. Efficient enzymatic synthesis of mangiferin glycosides in hydrophilic organic solvents[J]. RSC Advances, 2013, 3(41): 19027-19032
- [10] Chu JL, Wu XM, Wu B, et al. Characteristics of an organic solvent-tolerant β -fructofuranosidase from *Arthrobacter arilaitensis* NJEM01 and efficient synthesis of prebiotic kestose[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2014,

- 62(24): 5408-5411
- [11] Mackenzie LF, Wang QP, Warren RAJ, et al. Glycosynthases: mutant glycosidases for oligosaccharide synthesis[J]. *Journal of the American Chemistry Society*, 1998, 120(22): 5583-5584
- [12] Mayer C, Zechel DL, Reid SP, et al. The E358S mutant of *Agrobacterium* sp. β -glucosidase is a greatly improve glycosynthase[J]. *FEBS Letters*, 2000, 466(1): 40-44
- [13] Lu GY, Hua ZQ. Crystallization Basis of Biological Macromolecules[M]. Beijing: Peking University Press, 1994: 32 (in Chinese)
卢光莹, 华子千. 生物大分子晶体学基础[M]. 北京: 北京大学出版社, 1994: 32
- [14] Chayen NE, Saridakis E. Protein crystallization: from purified protein to diffraction-quality crystal[J]. *Nature Methods*, 2008, 5(2): 147-153
- [15] Luft JR, Collins RJ, Fehrman NA, et al. A deliberate approach to screening for initial crystallization conditions of biological macromolecules[J]. *Journal of Structural Biology*, 2003, 142(1): 170-179
- [16] Jancarik J, Kim SH. Sparse-matrix sampling: a screening method for crystallization of proteins[J]. *Journal of Applied Crystallography*, 1991, 24(4): 409-411
- [17] Page R, Stevens RC. Crystallization data mining in structural genomics: using positive and negative results to optimize protein crystallization screens[J]. *Methods*, 2004, 34(3): 373-389
- [18] Lu J, Wang XJ, Ching CB. Batch crystallization of soluble proteins: effect of precipitant, temperature and additive[J]. *Progress in Crystal Growth and Characterization of Materials*, 2002, 45(3): 201-217
- [19] Isono N, Tochiara T, Kusnadi Y, et al. Cloning and heterologous expression of a β -fructofuranosidase gene from *Arthrobacter globiformis* IFO 3062, and site-directed mutagenesis of the essential aspartic acid and glutamic acid of the active site[J]. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2004, 97(4): 244-249
- [20] Meng GY, Klaus F. Structural framework of fructosyl transfer in *Bacillus subtilis* levansucrase[J]. *Nature Structure Biology*, 2003, 10(11): 935-941
- [21] Strube CP, Homann A, Gamer M, et al. Polysaccharide synthesis of the levansucrase SacB from *Bacillus megaterium* is controlled by distinct surface motifs[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2011, 286(20): 17593-17600
- [22] Martínez-fleites C, Ortíz-lombardía M, Pons T, et al. Crystal structure of levansucrase from the Gram-negative bacterium *Gluconacetobacter diazotrophicus*[J]. *Biochemical Journal*, 2005, 390(1): 19-27
- [23] Pijning T, Anwar MA, Böger M, et al. Crystal structure of inulosucrase from *Lactobacillus*: insights into the substrate specificity and product specificity of GH68 fructansucrases[J]. *Journal of Molecular Biology*, 2011, 412(1): 80-93

稿件书写规范

论文中有关正、斜体的约定

物种的学名：菌株的属名、种名（包括亚种、变种）用拉丁文斜体。属的首字母大写，其余小写，属以上用拉丁文正体。病毒一律用正体，首字母大写。

限制性内切酶：前3个字母用斜体，后面的字母和编码正体平排，例如：*Bam*H I、*Hind*III、*Sau*3A I等。

氨基酸和碱基的缩写：氨基酸缩写用3个字母表示时，仅第一个字母大写，其余小写，正体。碱基缩写为大写正体。

基因符号用小写斜体，蛋白质符号首字母大写，用正体。