

学校编码: 10384

分类号 _____ 密级 _____

学号: 20620101151507

UDC _____

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

NADH 氧化酶密码子优化及其与甘油脱氢酶的基因融合

Codon optimization of NADH Oxidase and gene fusion with glycerol dehydrogenase

周 强

指导教师姓名: 方柏山 教授

专业名称: 生 物 化 工

论文提交日期: 2 0 1 3 年 0 5 月

论文答辩日期: 2 0 1 3 年 0 6 月

学位授予日期: 2 0 1 3 年 月

答辩委员会主席: _____

评 阅 人: _____

2013 年 月

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为()课题(组)的研究成果,获得()课题(组)经费或实验室的资助,在()实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名): 周 强

2013年 6月 9日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

1.经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，
于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。

2.不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：周强

2013 年 6 月 9 日

摘 要

NADH 氧化酶 (NOX) 是一类催化 NADH 氧化为 NAD^+ , 并消耗 O_2 的氧化还原酶。由于其在维持生物体内 NAD^+/NADH 平衡、辅因子再生和抵抗氧毒害等方面发挥着重要作用, 因此受到越来越广泛关注。

本研究克隆出短乳杆菌 *Lactobacillus brevis* ATCC 367 基因组中的 NADH 氧化酶基因 *nox*, 实现了在 *E. coli* BL21(DE3) 中的有效表达。在克隆表达的基础上, 为了进一步提高 NADH 氧化酶活性, 本文还对 *nox* 进行密码子优化, 并建立了密码子优化平台。最后, 构建了 NADH 氧化酶与甘油脱氢酶 (GDH) 的融合蛋白 (GDH-NOX), 进一步探讨此酶在生物催化中的应用。本研究主要包括的内容和结果如下:

一、在 *E. coli* BL21(DE3) 实现了 NADH 氧化酶的异源表达。以 *Lactobacillus brevis* ATCC 367 中相应基因为模板, 通过 PCR 扩增目的基因 *nox*, 构建重组表达菌株 BL21-pET32a-*nox*。NOX 酶活性最适 pH 为 7.0, 最适温度为 37 °C。测得细胞抽提液中 NOX 比活性为 28.9 U/mg, 动力学参数 K_m 和 V_{max} 分别为 62.6 μM 、5.99 $\mu\text{M}/\text{min}$ 。

二、对 NOX 基因进行密码子优化, 提高蛋白表达量。为了提高 NOX 在 *E. coli* BL21(DE3) 中的蛋白表达量, 在不改变氨基酸序列的情况下, 本文从两个方面对 *nox* 进行优化。一方面, 利用定点突变技术, 提高基因起始密码子下游 2—6 位密码子 AT 含量, 从而提高目标蛋白的表达量, 这可能是由于更易形成结构松散的 mRNA, 提高翻译起始复合物形成效率。另一方面, 从全局出发对整个基因序列进行重新排列, 以使得密码子使用频率与 *E. coli* BL21(DE3) 基因组密码子使用频率保持一致, 从而提高目的蛋白的表达量。实验结果表明, 利用定点突变技术局部优化基因结构, 细胞抽提液中 NOX 比活性提高至 59.9 U/mg, 而全序列优化后, 细胞抽提液中 NOX 比活性提高至 73.3 U/mg。利用制备型液相色谱对细胞抽提液进行纯化, 纯化后 NOX 比活性可达 213.8 U/mg。

三、构建了 NADH 氧化酶与甘油脱氢酶的融合蛋白 (GDH-NOX)。运用 SOE-PCR 方法, 将甘油脱氢酶基因 *gdh* 与 NADH 氧化酶基因 *nox* 融合成一个开

放阅读框 (ORF), 构建了重组表达质粒 pET32a-*gdh-nox*, 并实现了融合酶 GDH-NOX 在大肠杆菌的成功表达。测得融合酶细胞抽提液对底物甘油和 NADH 动力学参数分别为: $V_{max(Gly)}$ 为 20 $\mu\text{M}/\text{min}$, 米氏常数 $Km_{(Gly)}$ 19.4 mM, $V_{max(NADH)}$ 为 12.5 $\mu\text{M}/\text{min}$, 米氏常数 $Km_{(NADH)}$ 为 51.3 μM 。为了进一步探讨 NOX 在生物催化中的应用, 分别用大肠杆菌 BL21, NOX 重组表达菌 BL21-pET32a-*nox*, GDH 重组表达菌 BL21-pET32a-*gdh*, GDH-NOX 重组表达菌 BL21-pET32a-*gdh-nox* 的各细胞抽提液对甘油进行生物转化, 结果显示, BL21-pET32a-*gdh* 细胞抽提液催化甘油产 DHA, DHA 浓度可达 172.2 mg/L。而含融合酶 GDH-NOX 细胞抽提液催化甘油产 DHA, DHA 浓度可达 40.1 mg/L, 这可能是由于融合蛋白对底物具有空间位阻作用。利用 BL21-pET32a-*nox* 和 BL21 细胞抽提液进行催化时, 产物浓度均低于 25 mg/L。

关键词: NADH 氧化酶; 甘油脱氢酶; 异源表达; 密码子优化; 基因融合

Abstract

NADH Oxidase (NOX, EC1.6.99) is a kind of oxidoreductase that catalyzes the oxidation of NADH by oxygen to yield H₂O and NAD⁺. Since NOX can be used to the regeneration of NAD and it is also a part of the oxygen defense system of facultative anaerobes such as *Lactobacillus*. In the past, lots of works have been done to uncover the essence of NOX.

In our research, the gene *nox* from *Lactobacillus brevis* ATCC 367 encoding NOX was engineered and expressed in *Escherichia coli* BL21(DE3). On the basis of cloning and expression, silent mutations were introduced into codons immediately downstream of the initiation codon. Furthermore, the *nox* was de novo synthesized by chemical methods according to *Escherichia coli* codon usage and the codon adaptation index (CAI) value was improved from 0.39 to 0.53. The last, we constructed the glycerol dehydrogenase and NOX fusion protein by SOE-PCR to further explore the application of NOX in biocatalysis. Major works were listed as follow:

We transformed the newly constructed plasmid pET32a-*nox* into the *Escherichia coli* BL21(DE3) strain. The NOX favorite environment for enzyme activity was at 37 °C and pH 7.0, and the specific activity was up to 28.9 U/mg of extracts. The kinetic parameters K_m , V_{max} were 62.6 μM and 5.99 μM/min respectively.

We take two strategies to improve NADH oxidase expression. The research indicates that the high AT-content in the region adjacent to the initiation codon and codon usage of the whole gene sequence consistent with the host have enhancing effect on translation. Based on the findings in this paper and others reported, we propose that making codon usage of gene identical to the host and AT-rich content immediately downstream of initiation codon may be generally methods for heterologous expression in *E.coli*. The NOX specific activity of the gene with high AT-content in the region adjacent to the initiation codon was 59.9 U/mg, it's two times of the wild

type. Furthermore, the specific activity was upto 73.3 U/mg when the gene sequence consistent with the host, which almost 2.5-fold higher than the wild type. Then his-tagged enzyme was purified by using Ni-IDA column and the specific activity was up to 213.8 U/mg after purification.

We have engineered fusion enzyme (GDH-NOX) of glycerol dehydrogenase and NADH oxidase. The fusion enzyme was successfully expressed in *Escherichia coli* and characterized. The kinetic parameters for two substrates were $V_{max(Gly)}$ 20 μ M/min, $K_{m(Gly)}$ 19.4 mM, $V_{max(NADH)}$ 12.5 μ M/min, $K_{m(NADH)}$ 为 51.3 μ M. To further explore the application of NOX in biocatalysis, we used the cell extracts of BL21, BL21-pET32a-*nox*, BL21-pET32a-*gdh*, BL21-pET32a-*gdh-nox* to catalytic glycerol respectively. The results show that DHA concentration were 172.2 mg/L and 40.1 mg/L with extract of BL21-pET32a-*gdh* and BL21-pET32a-*gdh-nox* respectively. While the DHA concentrations were less than 25 mg/L when used extracts of BL21-pET32a-*nox* and BL21 as the catalysts. We speculate the fusion protein may having a steric hindrance of substrate according to the data.

Key words: NADH oxidase; Glycerol dehydrogenase; Heterologous expression; Codon optimization; Gene fusion

目录

第一章 文献综述	1
1.1 NADH 氧化酶概况	1
1.1.1 NADH 氧化酶分类、来源与应用	1
1.1.2 NADH 氧化酶结构与生理功能	2
1.1.3 NADH 氧化酶催化机理	5
1.2 密码子优化意义	6
1.2.1 密码子偏爱性衡量方法	7
1.2.2 密码子优化的应用	8
1.3 融合酶的研究和应用	11
1.4 课题由来及研究意义	13
第二章 重组表达菌株的构建	15
2.1 实验材料	15
2.1.1 菌种及质粒载体	15
2.1.2 主要试剂	16
2.1.3 主要仪器设备	17
2.1.4 主要分子操作试剂	17
2.1.5 所用溶液、缓冲液及其配制	18
2.1.6 培养基配方	19
2.2 实验方法	19
2.2.1 引物设计	19
2.2.2 基因组 DNA 的提取	19
2.2.3 NADH 氧化酶基因 PCR 扩增	20
2.2.4 感受态细胞制备及转化	21
2.2.5 质粒提取	21
2.2.6 酶切鉴定及测序	22
2.2.7 重组表达质粒及表达菌株的构建	22
2.2.8 重组表达菌株诱导表达	23

2.2.9	蛋白标准曲线的绘制	23
2.2.10	无细胞抽提液制备	24
2.2.11	NOX 酶活性测定	24
2.2.12	NOX 动力学参数测定	25
2.2.13	NOX 纯化	25
2.2.14	蛋白质 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳	25
2.3	实验结果	26
2.3.1	克隆载体及表达载体的选择	26
2.3.2	目的基因 <i>nox</i> 克隆及重组表达菌株的构建	27
2.3.3	NOX 活性及动力学参数测定	29
2.3.4	SDS-PAGE 电泳结果及分析	31
2.4	小结	33
第三章 NADH 氧化酶基因的密码子优化设计		34
3.1	实验材料	34
3.1.1	菌种及质粒来源	34
3.1.2	主要设备仪器	34
3.1.3	工具酶与试剂盒	34
3.2	实验方法	35
3.2.1	基于定点突变的密码子优化	35
3.2.2	密码子优化与基因的重新设计	36
3.2.3	NOX 活性检测	38
3.2.4	NOX 纯化及 SDS-PAGE	38
3.3	实验结果	38
3.3.1	突变 PCR 产物琼脂糖凝胶电泳	39
3.3.2	突变表达菌株的构建	39
3.3.3	全序列优化基因合成	40
3.3.4	酶活性检测及 SDS-PAGE	41
3.4	小结	45
第四章 NADH 氧化酶与甘油脱氢酶融合酶构建		47
4.1	实验材料	47
4.1.1	菌种及质粒来源	47

4.1.2 主要设备仪器	47
4.1.3 工具酶与试剂盒	47
4.2 实验方法	47
4.2.1 引物设计	47
4.2.2 融合酶基因构建	48
4.2.3 融合酶 SDS-PAGE.....	49
4.2.4 融合酶活性检测	49
4.2.5 融合酶动力学参数	50
4.2.6 甘油和二羟基丙酮含量检测	50
4.2.7 粗酶液催化甘油产二羟基丙酮	51
4.3 实验结果	52
4.3.1 GDH-NOX 基因构建.....	52
4.3.2 细胞抽提液 SDS-PAGE.....	54
4.3.3 GDH-NOX 活性检测.....	54
4.3.4 动力学参数测定	55
4.3.5 细胞抽提液催化反应	56
4.4 小结	59
第五章 总结与展望	60
5.1 总结	60
5.2 展望	61
参考文献	62
附录 I	67
附录 II	68
硕士在读期间研究成果	70
致谢	71

Contents

Chapter 1 Introduction.....	1
1.1 NADH oxidase history.....	1
1.1.1 Categories and sources of NADH Oxidase.....	1
1.1.2 Structure and physiological fuction of NADH Oxidase	2
1.1.3 Catalytic mechanism of NADH Oxidase.....	5
1.2 Codon optimization significance	6
1.2.1 Codon bias metrics.....	7
1.2.2 Codon optimization applications	8
1.3 Fusion enzyme research and application	11
1.4 The subject origin and significance.....	13
Chapter 2 Construction of the recombinant expression strain	15
2.1 Experimental materials.....	15
2.1.1 Strains and plasmid vectors	15
2.1.2 Main reagents.....	16
2.1.3 Main instruments	17
2.1.4 Molecular biology operation reagents	17
2.1.5 Solution and buffer	18
2.1.6 Medium formula	19
2.2 Experimental methods	19
2.2.1 Primer design	19
2.2.2 Genomic DNA extraction	19
2.2.3 PCR amplification of NADH oxidase gene.....	20
2.2.4 Preparation of competent cells.....	21
2.2.5 Plasmid extraction.....	21
2.2.6 Restriction endonuclease and sequence	22
2.2.7 Construction of recombinant plasmid and expression strain	22
2.2.8 Recombinant expression strain inducing	23

2.2.9 Protein standard curve drawing	23
2.2.10 Preparation of cell-free extracts	24
2.2.11 Detection of NOX activity	24
2.2.12 NOX kinetic parameters	25
2.2.13 NOX purification	25
2.2.14 SDS-PAGE of NOX.....	25
2.3 Experimental results	26
2.3.1 The choice of plasmid vector	26
2.3.2 NOX gene cloning	27
2.3.3 NOX activity and kinetic parameters.....	29
2.3.4 SDS-PAGE of NOX.....	31
2.4 Conclusion and discussion	33
Chapter 3 Codon optimization design of NADH Oxidase gene	34
3.1 Experimental materials.....	34
3.1.1 Source of strains and plasmids.....	34
3.1.2 Main instruments	34
3.1.3 Tools enzymes and kits	34
3.2 Experimental methods	35
3.2.1 Codon optimization based on site-directed mutagenesis	35
3.2.2 Codon optimization and gene redesign.....	36
3.2.3 NOX activity detection	38
3.2.4 NOX purification and SDS-PAGE.....	38
3.3 Experimental results	38
3.3.1 Mutant PCR product by agarose gel electrophoresis	39
3.3.2 Construction of mutation expression strains.....	39
3.3.3 The whole sequence optimization of gene synthesis	40
3.3.4 Enzyme activity detection and SDS-PAGE	41
3.4 Conclusion and discussion	45
Chapter 4 Construction of fusion protein of GDH and NOX.....	47
4.1 Experimental materials.....	47
4.1.1 Source of strains and plasmids.....	47

4.1.2 Main instruments	47
4.1.3 Tools enzymes and kits	47
4.2 Experimental methods	47
4.2.1 Primer design	47
4.2.2 Construction of fusion gene	48
4.2.3 Fusion protein SDS-PAGE.....	49
4.2.4 Activity detection of fusion protein	49
4.2.5 Fusion protein kinetic parameters	50
4.2.6 Detection of glycerol and dihydroxyacetone	50
4.2.7 Catalysis glycerol to dihydroxyacetone with crude enzyme.....	51
4.3 Experimental results	52
4.3.1 Construction of GDH-NOX gene	52
4.3.2 SDS-PAGE of crude enzyme	54
4.3.3 Activity detection of GDH-NOX	54
4.3.4 Fusion protein kinetic parameters.....	55
4.3.5 Catalytic reaction of the cell extract	56
4.4 Conclusion and discussion	59
Chapter 5 Conclutions and prospects	60
5.1 Summary	60
5.2 Prospects.....	61
References	62
Appendix I	67
Appendix II.....	68
Publications	70
Acknowledgements	71

第一章 文献综述

1.1 NADH 氧化酶概况

NADH 氧化酶 (EC 1.6.99.3, 可简称为 NOX) 是一类能催化 O_2 和 NADH 直接进行氧化还原反应的酶类, 对维持微生物体内氧含量发挥着重要作用, 可避免微生物免遭氧毒害作用。同时, 实现了氧化型辅酶 NAD^+ 的再生, 调节细胞内 NADH/ NAD^+ 水平, 从而对细胞内代谢流向的控制与能量平衡发挥着不可替代的作用。近年来, NADH 氧化酶研究与应用越来越受到广泛关注。

1.1.1 NADH 氧化酶分类、来源与应用

经研究发现, 许多微生物中都存在 NADH 氧化酶。根据其产物的不同, 可将 NOX 分为两类: 一类为 NADH 过氧化酶 (或 H_2O_2 型 NADH 氧化酶, 简称为 NOX-1), 其产物为 H_2O_2 , 另一类就是通常所说的 NADH 氧化酶 (或 H_2O 型 NADH 氧化酶, 简称为 NOX-2), 其产物为 H_2O 。在生成 H_2O_2 和 H_2O 的过程中分别发生 2 个和 4 个电子转移^[1,2]。

Condon^[3]早在 1987 年就提出了乳酸菌中普遍存在 NOX, 并推测其在乳链球菌中扮演着氧代谢酶的作用。1992 年 Park 等^[4]报道了嗜热栖热菌 (*Thermus thermophilus*) 中存在 NOX-1 活性。Niimura 等^[5]于 1993 年报道发现了木聚糖双芽孢杆菌 (*Amphibacillus xylanus*) 中也具有 NOX-1 活性。表 1 为部分不同来源菌 NADH 氧化酶的主要基本信息。

表 1.1 不同菌中的 NADH 氧化酶
Tab 1.1 NADH Oxidase from different strains

来源菌	类型	亚基个数	辅基信息	分子量	参考文献
<i>Lactobacillus brevis</i>	NOX-2	2	2FAD	100 000	[6]
<i>Lactobacillus sanfranciscensis</i>	NOX-2	2	2FAD	约 9 5000	[7]
<i>Lactococcus lactis</i>	NOX-2	2	2FAD	10 6000	[8]
	NOX-1	1	1 FAD	5 5000	[9]
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	NOX-2	2	2FAD	10 4000	[10]
<i>Sporolactobacillus inulinus</i>	NOX-1	2	2FAD	10 6000	[11]

不同类型 NOX 有着不同程度的应用, 由于 NOX-1 氧化 NADH 的产物为 H_2O_2 , 容易使脱氢酶系失活, 若应用于“辅因子再生”工程, 则需在反应体系中额外加入过氧化氢酶, 从而使体系复杂化, 因此在工业应用上受到了一定的限制。

1.1.2 NADH 氧化酶结构与生理功能

NADH 氧化酶尽管来源广泛, 但在一级结构上表现出普遍的类似性, 具有 NADH 和 FAD 结合域。图 1.1 为不同来源菌 NOX 部分氨基酸序列比较^[12],

FAD-binding 1	
<i>L. brevis</i>	-MKVTVVGGCTHAGTFAIKQILAEHPDA-EVTVYERNDVISFLSCGIALYLGGKVA--DPQ 56
<i>L. sanfranciscensis</i>	-MKVIVVGGCTHAGTFAVKQTIADHPDA-DVTAYEMNDNISFLSCGIALYLGKEIKNNDPR 58
<i>E. faecalis</i>	-MKVVVVGGCTHAGTSAVKSILANHPEA-EVTVYERNDNISFLS GIALYVGGVVK--NAA 56
<i>S. equi</i>	MSKIVVVGANHAGTACIKTMLTNYGDANEIVVFDQNSNISFLGCGMALWIGEQIS--GPE 58
<i>B. hyodysenteriae</i>	-MKVIVIGCNHAGTWAAKTLKATDPNC-QVVTYDRNDNISFLACGIALVWGGVVK--DPK 56 * : *
<i>L. brevis</i>	GLFYSSPEELQKLGANVQMNHNVLAIQDPDQKTVTVEDLTSHAQTTESYDKLVMTSGSWPI 116
<i>L. sanfranciscensis</i>	GLFYSSPEELSNLGNVQMRHQVTNVDPEKTIKVKDLITNEEKTEAYDKLIMTTGSKPT 118
<i>E. faecalis</i>	DLFYSNPEELASLGATVKMEHNVEEINVDKTVTAKNLQGTATETVSYDKLVMITGWSPI 116
<i>S. equi</i>	GLFYSNKEBEESLGAKVYMESPVQSIDYDAK--TVTALVDGKKEHVESYDKLIFATGSQPI 116
<i>B. hyodysenteriae</i>	GLFYASPESLRGEIDVYMGHDVTKIDWANKKLCVKELKTGKBEFEDTYDKLILATGSPV 116 .***:. *.* * * * * :. * . * :****:*** **
NAD-binding	
<i>L. brevis</i>	VKPIPGIDSD-----RVKLCNWAHAQALIEDA--KEAKRITVIGAGYIGAECLA 163
<i>L. sanfranciscensis</i>	VPIPIGIDSS-----RVYLCKNYNDACKLFEEA--PKAKTITTIIGSGYIGAECLA 165
<i>E. faecalis</i>	IPPIPGIDAE-----NILLCKNYSQANVIEKA--KDAKRVVVGGGYIGIELV 163
<i>S. equi</i>	LPPIKGAIEKESLEFEATLENLQFVKLYQNSADVISKLENKDIKRVAVVGGAGYIGVELA 176
<i>B. hyodysenteriae</i>	TPPIEGLKQEGTTYGLK--GIFFSKLYQQQEIIDEIAKPDVKKVMVVGAGYIGVELI 173 * * * . . : : * : .. :... . * : :*:**** **
<i>L. brevis</i>	EAYSTTGHDVTLIDAMDRVMPKYFDADFTDVI EQDYRDHGVQLALSETVESFTDSATGLT 223
<i>L. sanfranciscensis</i>	EAYSNQNYVNLIDGHERVLYKYFDKFTDILAKDYEAHGVNLVLGSKVAAFEVDEDEII 225
<i>E. faecalis</i>	EAFVESGKQVTLVDGLDRILNKYLDKPFDTVLEKELVDRGVNLALGENVQQFVADEQGV 223
<i>S. equi</i>	EAFQKRGKEVVLIDVADTCLAGYYDRDLTDVMSKNLEEHGIQLAFGETVQEVAG--DGKV 234
<i>B. hyodysenteriae</i>	EAFKNHGKEVILMEANPRVMANYFDKEITDEAEKRIKEAGIEMHLGETVKKFEG--DDR 231 **:. . :* **: : * * ;** : * : :...* .
FAD-binding 2	
<i>L. brevis</i>	IKT--DKNSYETDLAILCIGFRPNTDLLKGVDMAPNGAIITDDYMRSS-NPDIFAAGDS 280
<i>L. sanfranciscensis</i>	TKTL-DGKEIKSDIALCIGFRPNTPELLKGVAMLDNGAIITDEYMHSS-NRDIFAAGDS 283
<i>E. faecalis</i>	AKVITPSQEFVADVMVIMCVGFRPNTPELLKDKVDMLPNGAIEVNEYMQTS-NPDIFAAGDS 282
<i>S. equi</i>	EKLITDKNEYDVMVILAVGFRPNTALGAGKIELFRNGAFLVNHQETS-IPGIYAIGDC 293
<i>B. hyodysenteriae</i>	KKVVTDKGSYDVMVMSVGFPRPNELYKDYLETLPNGAIVVDTTMTTKDPDVFAIGDC 291

图 1.1 NOX 部分序列比较。(*) 相同, (:)高度相似, (.) 低相似性
Fig.1.1 Comparison of the primary structures of bacterial NOX. (*) identity, (:) high similarity, (.) low similarity

大部分 NOX 由两个相同亚基组成, 来自于 *L.brevis* 中 NOX-2 由两相同亚基组成的二重对称结构。每个亚基都具有三个基本结构区域, 分别为底物结合结构

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库