

学校编码: 10384

分类号 \_\_\_\_\_ 密级 \_\_\_\_\_

学号: 19120051403098

UDC \_\_\_\_\_

厦 门 大 学

博 士 学 位 论 文

利用核磁共振技术研究酶催化下的磷酸基转移  
机理

Investigation of the mechanism of phosphoryl group transfer by  
phosphoryl transfer enzymes using NMR

留筱厦

指导教师姓名: 赵玉芬 院士

Jon P Waltho 教授

专 业 名 称: 化学生物学

论文提交日期:

论文答辩时间:

学位授予日期:

答辩委员会主席: \_\_\_\_\_

评 阅 人: \_\_\_\_\_

2010 年 11 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):

年 月 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)：

年    月    日

## 摘要

酶催化磷酸基转移是体现酶高效性的经典范例之一。研究磷酸转移酶的催化机理，最关键的问题是了解磷酸基转移酶如何稳定磷酸基转移反应的过渡态。一种可行的方法是利用三氟化镁 ( $\text{MgF}_3^-$ ) 或四氟化铝 ( $\text{AlF}_4^-$ ) 模拟过渡态的磷酸基团 ( $\text{PO}_3^-$ )，同磷酸转移酶形成稳定的，可供观测的，酶的金属氟化物过渡态类似物 (TSA)。运用  $^{19}\text{F}$  NMR 对金属氟化物过渡态类似物进行观测，可从原子层面了解磷酸转移酶催化位点过渡态的信息。

本博士论文的主要工作是研究 p38 MAPK 信号传导通路中的磷酸基转移机理。利用  $^{19}\text{F}$  NMR，直接观测到了 MEK6DD 催化 p38 MAPK 磷酸化位点 Tyr182 磷酸化反应的金属氟化物过渡态类似物复合物 (MEK6DD-ADP- $\text{AlF}_4^-$ -p38-TSA)。通过氟谱的化学位移与溶剂诱导效应的化学位移变化，确定了  $\text{AlF}_4^-$  中有两个络合态氟原子同催化金属  $\text{Mg}^{2+}$  络合，而另外两个氟原子则与激酶催化位点中的氨基酸残基络合。p38 MAPK 上的另外一个磷酸化位点 Thr180 只当在 Tyr182 被突变成 Phe 后，才会参与形成氟化铝过渡态类似物复合物。无论是与哪个磷酸化位点形成过渡态类似物复合物，MEK6DD 总是选择四方平面的  $\text{AlF}_4^-$  来模拟过渡态中被转移的磷酸基团，而非之前报导的 PKA 过渡态类似物 (PKA-ADP- $\text{AlF}_3^0$ -SP20) 中的三角平面  $\text{AlF}_3^0$ 。这证明了激酶在催化磷酸基转移的过渡态中始终保持催化区域的“电荷平衡”。该观点在含双催化镁离子的蛋白中是首次被论证。此外，p38 MAPK 磷酸化位点之一被磷酸化后，对另一个磷酸化位点形成金属氟化物过渡态类似物复合物的影响也在本文中被考察。核磁研究结果说明了底物的任一磷酸化位点被磷酸化后，其负电荷的增加，并不能促使 MEK6DD 活性位点的结构发生明显的变化，但是一定程度上降低了 MEK6DD 对底物 p38 MAPK 的亲和力。

通过与家鼠 p38 MAPK Trosy HSQC 的比对，归属指认了人源 p38 MAPK 的 161 个酰胺键 (47%)，及其激活态的 102 个酰胺键 (30%)。通过对激活态 p38\*MAPK 与小肽底物相互作用的研究，认识到含磷酸化位点的单条短肽并不能诱导 p38\*MAPK 催化域的结构发生足够的改变以适应形成稳定的氟化铝过渡态类似物，即使在另一条对接短肽的帮助下也无法。MEK6DD 与含 Thr180、Tyr182 的 p38 短肽也无法形成稳定的氟化铝过渡态类似物，该实验也同样支持以上结

论。

MEK6DD 骨架酰胺键 Trosy HSQC 谱峰的归属也在本论文中开展。但是由于 MEK6DD 的巨大分子量，对现有的高场核磁共振技术仍然是一个挑战。本论文完成了其核磁条件的初步优化工作，包括核磁采样温度，缓冲液盐浓度及 pH 值。这为进一步的优化工作奠定了基础。

本论文也利用了  $\text{AlF}_4^-$  TSA 来研究碱性磷酸酶(AP)催化的磷酸基转移反应。在 AP 的催化位点中，有三个与催化功能密切相关的金属离子： $\text{Zn}_I^{2+}$ 、 $\text{Zn}_{II}^{2+}$  和  $\text{Mg}_{III}^{2+}$ 。AP 催化磷酸单酯水解的过程经历了两个过渡态。利用  $^{19}\text{F}$  NMR 观测到了其第二过渡态类似物，水分子进攻磷酸化 Ser102。这说明在微碱性的水溶液条件下，AP 催化磷酸单酯水解的第二过渡态类似物要比第一过渡态类似物(Ser102 进攻磷酸化底物)稳定的多。对 AP- $\text{AlF}_x$ -TSA 的  $^{19}\text{F}$  NMR 研究，填补了氟谱在三金属催化蛋白酶中应用的空白，扩充了我们利用氟谱解决磷酸基转移问题的经验。

综上，通过运用核磁共振对 MEK6DD, p38 MAPK 以及 AP 催化下的磷酸基转移反应的金属氟化物过渡态类似物的研究，使我们更深入的了解酶催化下的磷酸基转移机理。

此外，本博士学位论文还做了其它研究工作。在第五章中，利用 HSQC 研究 CD2d1CC 蛋白与氧分子的相互作用，观测到文献报导的氧分子敏感残基 Trp32, Cys18 和 Cys78 并无参与结合底物氧分子，这使我们进一步认识抗体催化还原氧分子的机理。在第六章中，利用统计学方法研究全基因组下氨基酸与密码子的共进化。统计分析了涵盖古菌，细菌，真核生物的 549 种物种的氨基酸使用情况，发现氨基酸在这三界物种中以独立方式分别进化的，但是某些氨基酸之间的亲缘性即便跨界也是保守的，如 (A, G, H, L, P, Q, R, W) 与 (F, I, K, N, S, Y)；发现了缺乏 GC 的密码子所编码的氨基酸 (F, Y, N, K, I, M) 的使用频率在进化上不断减少，而富含 GC 的密码子所编码的氨基酸 (P, A, G, W) 的使用频率却增加。这些观察都支持氨基酸与密码子共进化的理论。此外，提出了新的氨基酸进化时间顺序 (L, A, V/E/G, S, I, K, T, R/D, P, N, F, Q, Y, M, H, W, C) 和两条氨基酸进化的保守途径： $\text{A} \rightarrow \text{G} \rightarrow \text{R} \rightarrow \text{P}$  和  $\text{K} \rightarrow \text{Y}$ 。综上，我们的研究说明，运用统计学的方法分析全基因组中氨基酸的含量是全面认

识物种的生理功能，揭秘全基因组编码奥秘的一种可行的途径。

关键词：磷酰基转移；过渡态；核磁共振

厦门大学博硕士论文摘要库

## Abstract

Catalysis of phosphoryl transfer reactions involves some of the largest enzymatic rate accelerations in biology. A substantial step forward in understanding the fundamental mechanism of phosphoryl group transfer by enzymes came through the use of  $\text{MgF}_3^-$  and  $\text{AlF}_4^-$  as transition state analogs (TSAs) of the planar  $\text{PO}_3^-$  group. The metal fluoride TSA complexes are particularly informative because  $^{19}\text{F}$  NMR can be used to report on the local electrostatic and protonic environments in the vicinity of the transferring phosphoryl group.

My PhD study focuses primarily on the phosphoryl transfer mechanism involving two proteins in the p38 MAPK signal pathway, which plays an important role in embryogenesis and development and is a potential drug target against cancer and inflammation.

The direct observation of a TSA complex for tyrosine phosphorylation by a signaling kinase has been achieved using  $^{19}\text{F}$  NMR analysis of MEK6DD in complex with tetrafluoroaluminate ( $\text{AlF}_4^-$ ), ADP, and p38 MAPK (acceptor residue: Tyr182). Solvent-induced isotope shifts and chemical shifts for the  $\text{AlF}_4^-$  moiety indicate that two fluoride atoms are coordinated by the two catalytic magnesium ions of the kinase active site, while the two remaining fluorides are liganded by protein residues only. An equivalent, yet distinct,  $\text{AlF}_4^-$  complex involving the alternative acceptor residue in p38 (Thr180) is only observed when the Tyr182 is mutated to phenylalanine. The formation of square planar  $\text{AlF}_4^-$  species for both acceptor residues, rather than the trigonal  $\text{AlF}_3^0$  previously reported for a PKA TSA complex (PKA-ADP- $\text{AlF}_3^0$ -SP20), shows the requirement of MEK6 for a TSA that is isoelectronic with the migrating phosphoryl group. This requirement has hitherto only been demonstrated for proteins having a single catalytic magnesium ion.

The anionic charge induced by partial phosphorylation of p38 $\alpha$  was also studied. The MEK6DD active site structure is unperturbed by the introduction of an anionic charge by mutation of the adjacent substrate sidechain (Thr180Asp), although there are changes in affinity for the mutant p38 $\alpha$  substrate.

The NMR backbone assignments of native human p38 $\alpha$ MAPK and its activation form

were completed with 161 (47%) amide resonances assigned for native form and 102 (30%) amide resonances assigned for the activated form. Also, screening of substrate peptides for activated p38 MAPK suggested that a short peptide containing the phosphorylation sites is not enough to induce a conformational change in p38 to form a TSA complex. This is also supported by the failure to observe any TSA complexes for MEK6DD and short peptide segments of p38 containing both T180 and Y182.

A pilot study, carried out to ascertain the feasibility of determining the NMR backbone assignment of MEK6, concluded that it would be very challenging because of its high apparent molecular weight. The optimization of acquisition temperature, buffer salt concentration, and pH was completed, but more effort is needed in the future.

In addition, the nature of fluoroaluminate complexes of alkaline phosphatase were investigated. There are three catalytic metals ( $Zn_I^{2+}$ ,  $Zn_{II}^{2+}$  and  $Mg_{III}^{2+}$ ) in the active site of this enzyme and two transition states in the hydrolysis process of phosphomonoesters. The second TSA, with water attacking the phosphorylated Ser102, was observed using  $^{19}F$  NMR, as it is more stable than the first TSA (where the hydroxyl group of Ser102 attacks the phosphate substrate). It is the first time that  $^{19}F$  NMR has been used to investigate phosphoryl transfer catalyzed by an enzyme that utilizes three metals.

Furthermore, this thesis covers two other projects. Firstly, an investigation of the interaction between CD2d1CC and oxygen was carried out using  $^1H,^{15}N$ -HSQC, which indicated that the oxygen sensor (Trp32, Cys18 and Cys78) did not bind with the substrate as previously proposed from X-ray crystallography studies. Secondly, in a genome wide exploration of the origin and evolution of amino acids using statistical methods, a new chronological order for the appearance of amino acids was proposed (namely, from early to late: L, A, V/E/G, S, I, K, T, R/D, P, N, F, Q, Y, M, H, W, C), and two conserved evolutionary paths of amino acids were also suggested (namely,  $A \rightarrow G \rightarrow R \rightarrow P$  and  $K \rightarrow Y$ ).

Key Words: phosphoryl transfer; transition state; NMR



## 英文缩写

缩写	全称	中文含义
A 或 Ala	Alanine	丙氨酸
AGC family	containing PKA, PKC and PKG family	含 PKA, PKC 和 PKG 的激酶家族
Am	Apis mellifera	蜜蜂
AP	Alkaline Phosphatase	碱性磷酸酶
APS	Ammonium persulfate	过硫酸铵
At	Abrabidopsis thaliana	拟南菜
ATP	adenosine-triphosphate	腺嘌呤核苷三磷酸
BPG	1,3-bisphosphoglycerate	1,3 二磷酸甘油酸
C 或 Cys	Cysteine	半胱氨酸
CAMK family	Ca <sup>2+</sup> /calmodulin-dependent protein kinases family	钙调蛋白依赖的蛋白激酶家族
Ce	Caenorhaditis elegans	线虫
CK1 family	Casein kinase 1 family	Casein kinase 1 家族
CMGC family	containing CDK, MAPK, GSK3 and CLK kinases family	含 CDK, MAPK, GSK3 和 CLK 激酶家族
D 或 Asp	Aspartic acid	天冬氨酸
Da	Dalton	分子量单位
Dm)	Drosophila melanogaster	果蝇
Dr	Danio rerio	斑马鱼
DTT	Dithiothreitol	二硫苏糖醇
E 或 Glu	Glutamic acid	谷氨酸
E.coli	Escherichia coli	大肠杆菌
EDTA	Ethylenediaminetetra-acetic acid	乙二胺四乙酸

缩写	全称	中文含义
F 或 Phe	Phenylalanine	苯丙氨酸
G 或 Gly	Glycine	甘氨酸
Gg	Gullus gallus	红眼鸡
GPCR	G protein-coupled receptor	
GSA	Ground state analogy	基态类似物
H 或 His	Histidine	组氨酸
HPLC	High performance liquid chromatography	高效液相色谱
Hs	Homo sapiens	人
HSQC	Heteronuclear single quantum coherence	异核单量子相关
I 或 Ile	Isoleucine	异亮氨酸
Ig	immunoglobulin	免疫球蛋白
IgSF	immunoglobulin superfamily	免疫球蛋白超级家族
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-galactosidase	异丙基- $\beta$ -D-硫代吡喃半乳糖苷
JNK	c-Jun N-terminal kinase	-
K 或 Lys	Lysine	赖氨酸
K <sub>m</sub>	-	米氏常数
L 或 Leu	Leucine	亮氨酸
M 或 Met	Methionine	蛋氨酸
MAPK	mitogen-activated protein kinase	丝裂原蛋白激酶
MAPKK	mitogen-activated protein kinase kinase	丝裂原蛋白激酶激酶
MAPKKK	mitogen-activated protein kinase kinase kinase	丝裂原蛋白激酶激酶激酶
MEF2A	myocyte enhancer factor-2	P38 的下游底物之一

缩写	全称	中文含义
MEK6DD	MEK6S207DT211D	MEK6 突变体的一种
Mm	Mus musculus	鼠
MOPS	3-(N-morpholino)propanesulfonic acid	缓冲液的一种
N 或 Asn	Asparagine	天冬酰胺
NMR	Nuclear magnetic resonance	核磁共振
P 或 Pro	Proline	脯氨酸
PAGE	Polyacrylamide gel electrophoresis	聚丙烯酰胺凝胶电泳
PCR	Polymerase chain reaction	聚合酶链式反应
PDB	Protein Data Bank	蛋白数据库
PGK	phosphoglycerate kinase	磷酸甘油酸激酶
PKA	Protein Kinase A	蛋白激酶 A
PNP	p-nitrophenol	对硝基苯酚
PNPP	p-nitrophenyl phosphate	对硝基苯磷酸
ppm	Parts per million	核磁共振化学位移单位
PSP	Phosphoserine phosphatase	磷酸丝氨酸磷酸酶
Pt	Pan troglodytes	大猩猩
Q 或 Gln	Glutamine	谷氨酰胺
R 或 Arg	Arginine	精氨酸
rpm	Revolutions per minute	每分钟转速
S 或 Ser	Serine	丝氨酸
Sc	Saccharomyces cerevisiae	酵母
SDS	Sodium dodecyl sulphate	十二烷基磺酸钠

缩写	全称	中文含义
STE family	the homologs of yeast Sterile 7, Sterile 11, and Sterile 20 kinases family	含 Sterile 7, Sterile 11, 和 Sterile 20 的激酶家族
T 或 Thr	Threonine	苏氨酸
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine	N,N,N',N'- 四 甲 基 乙 二 胺
TK family	tyrosine kinase family	酪氨酸激酶家族
TKL family	tyrosine kinase-like family	类酪氨酸激酶家 族
TROSY	Transverse relaxation optimized spectroscopy	横向弛豫优化
TSA	Transition state analogy	过渡态类似物
TSP	2, 2, 3, 3- tetradeutero-3-trimethylsilylpropionic acid	核磁化学位移参 照物
V 或 Val	Valine	缬氨酸
W 或 Trp	Tryptophan	色氨酸
Y 或 Tyr	Tyrosine	酪氨酸
$\delta$	Chemical shift (ppm)	化学位移

<b>第 1 章：前言</b> .....	1
<b>1.1 酶催化的磷酰基转移反应</b> .....	1
1.1.1 蛋白的磷酸化.....	2
1.1.2 蛋白的去磷酸化.....	3
<b>1.2 激酶</b> .....	3
1.2.1 丝裂原蛋白激酶.....	5
1.2.2 p38 MAPK.....	7
1.2.3 p38 MAPK 的上游激酶.....	8
1.2.4 受 p38 MAPK 调控的下游.....	9
1.2.5 激活机理与单磷酸化的选择性.....	11
1.2.6 p38MAPK 的下调.....	15
1.2.7 p38 MAPK 信号传导通路：疾病的靶点.....	15
<b>1.3 碱性磷酸酶</b> .....	16
<b>1.4 磷酰基转移反应的金属氟化物类似物</b> .....	17
1.4.1 磷酰基转移反应的金属氟化物过渡态类似物与 $^{19}\text{F}$ NMR.....	17
1.4.2 磷酰基转移反应的氟化铍基态类似物及 $^{19}\text{F}$ NMR.....	19
<b>1.5 磷酰基转移反应中的电荷平衡</b> .....	21
<b>1.6 论文研究目标</b> .....	24
<b>第 2 章：材料与方法</b> .....	27
<b>2.1 实验材料</b> .....	27
<b>2.2 培养基</b> .....	27
2.2.1 Luria-Bertani (LB)培养液与琼脂平板.....	27
2.2.2 M9 培养液.....	28
2.2.3 抗生素.....	29
2.2.4 IPTG (Isopropyl- $\beta$ -D-galactosidase) .....	29
<b>2.3 DNA 处理与操作方法</b> .....	29
2.3.1 质粒 DNA 的制备.....	29
2.3.2 定点突变.....	30

2.3.3 DNA 限制性内切酶 .....	31
2.3.4 DNA 连接 .....	31
2.3.5 质粒来源及构建.....	31
2.3.6 感受态细胞.....	33
2.3.7 细菌转化.....	34
2.3.8 DNA 琼脂糖凝胶电泳 .....	34
2.3.9 DNA 测序 .....	36
<b>2.4 蛋白的表达与纯化 .....</b>	<b>36</b>
2.4.1 His-MEK6DD 的表达与纯化 .....	36
2.4.2 p38 $\alpha$ MAPK 的表达与纯化 .....	37
2.4.3 His-MEF2a 的表达与纯化.....	39
2.4.4 碱性磷酸酶的表达与纯化.....	40
<b>2.5 蛋白基本操作 .....</b>	<b>42</b>
2.5.1 电泳.....	42
2.5.2 蛋白的浓缩与缓冲液的交换.....	45
2.5.3 光谱实验.....	46
2.5.4 分析型尺寸排阻色谱.....	46
2.5.5 蛋白磷酸化和去磷酸化.....	47
2.5.6 $^{32}\text{P}$ 放射自显影实验 .....	48
<b>2.6 核磁共振实验 .....</b>	<b>48</b>
2.6.1 核磁样品的准备.....	48
2.6.2 谱图的采集和核磁参数设定.....	49
<b>2.7 分子制图 .....</b>	<b>51</b>
<b>第 3 章：p38 丝裂原激活蛋白激酶信号传导通路中的磷酸基转移 ...</b>	<b>52</b>
<b>3.1 p38 MAPK 信号传导通路中激酶的表达与纯化 .....</b>	<b>52</b>
3.1.1 MEK6DD, MEK6DD $\Delta$ N46 与 MEK6wt $\Delta$ N46 的构建、表达与纯化 .....	52
3.1.2 p38 MAPK 及其突变的构建表达与纯化.....	55
3.1.3 MEF2a 的构建、表达与纯化.....	59

<b>3.2 MEK6DD 的活性与 p38 MAPK 的激活</b> .....	62
3.2.1 非变性凝胶电泳检测激活产物.....	62
3.2.2 <sup>32</sup> P 放射性自显影检测 p38 MAPK 磷酸化后的活性 .....	62
3.2.3 <sup>31</sup> P NMR 检测 MEK6DD 催化磷酸化 p38 MAPK.....	63
<b>3.3 MEK6DD 与 p38 MAPK 形成的过渡态金属氟化物</b> .....	65
3.3.1 MEK6DD 与 p38 MAPK 不可形成的氟化镁过渡态类似物 .....	65
3.3.2 MEK6DD 与 p38 MAPK 的氟化铝过渡态类似物 .....	66
3.3.3 MEK6DD-p38wt-AlFx-ADP-TSA 的预饱和 <sup>19</sup> F NMR.....	68
3.3.4 Tyr182 比 Thr180 优先形成氟化铝过渡态类似物 .....	72
3.3.5 单磷酸化后对形成 TSA 的影响 .....	76
<b>3.4 MEK6DD 催化 p38MAPK 磷酸化的氟化铍基态类似物 (GSA)</b> .....	80
<b>3.5 p38* MAPK 与其下游底物相互作用的研究</b> .....	87
3.5.1 激活态 p38* MAPK 的 HSQC 初步归属 .....	87
3.5.2 p38* MAPK 与底物形成 TSA 的研究 .....	98
<b>3.6 MEK6DD 的 Trosy HSQC 条件优化</b> .....	102
3.6.1 核磁缓冲液 pH 值的选取.....	104
3.6.2 采样温度的优化.....	106
3.6.3 缓冲液中盐浓度的优化以及 Arg/Glu 缓冲液 .....	107
3.6.4 MEK6DDΔN46 与 MEK6wtΔN46 的 Trosy-HSQC.....	109
<b>3.7 本章小结与展望</b> .....	109
<b>第 4 章：碱性磷酸酶中的磷酰基转移</b> .....	112
<b>4.1 AP 的表达与纯化</b> .....	112
<b>4.2 利用 <sup>19</sup>F NMR 研究 AP 去磷酸化的机理</b> .....	115
4.2.1 中性条件下形成的金属氟化物过渡态类似物.....	115
4.2.2 微碱性条件下形成的金属氟化物过渡态类似物.....	119
4.2.3 不同苯酚衍生物存在下的 AP 过渡态类似物 .....	120
<b>4.3 本章小结</b> .....	122
<b>第 5 章：利用核磁共振研究 CD2d1 蛋白与氧分子的相互作用</b> .....	124

5.1 前言 .....	124
5.2 CD2d1 的表达与纯化 .....	126
5.3 蛋白核磁样品的制备与脱氧 .....	129
5.4 核磁参数 .....	129
5.5 实验结果与讨论 .....	130
5.6 本章小结与展望 .....	138
<b>第 6 章：全基因组范围下的氨基酸起源与进化的研究</b> .....	<b>140</b>
6.1 前言 .....	140
6.2 计算数据与方法 .....	141
6.2.1 数据.....	141
6.2.2 计算方法.....	141
6.3 实验结果与讨论 .....	142
6.3.1 氨基酸出现的时间顺序.....	142
6.3.2 氨基酸与密码子的共同进化.....	144
6.3.3 氨基酸之间的亲缘关系.....	148
6.4 本章小结 .....	153
<b>参考文献</b> .....	<b>154</b>
<b>博士期间发表的论文</b> .....	<b>166</b>
<b>致谢</b> .....	<b>168</b>
<b>附录</b> .....	<b>169</b>



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](mailto:etd@xmu.edu.cn) for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库