

文章编号: 1004-0374(2009)03-0388-06

糖基转移酶定向进化研究进展

吴佳茜¹, 王 旻^{1*}, 陈代杰², 朱 丽³

(1 中国药科大学生命科学与技术学院, 南京 210009; 2 上海医药工业研究院, 上海 200040;
3 上海来益生物药物研究开发中心有限责任公司, 上海 200240)

摘要: 糖基转移酶在改造含糖活性化合物以获得结构多样性过程中起着重要作用, 定向进化不仅能够提高其对底物的宽泛性, 同时也能够提高其催化活性。定向进化的成功与否取决于突变体库的多样性及筛选方法的可靠性和效率。本文简要综述了糖基转移酶随机突变方法及高通量筛选正突变体的策略, 包括基于细胞的筛选法、基于荧光受体高通量筛选和 pH 值指示剂高通量筛选。

关键词: 糖基转移酶; 定向进化; 高通量筛选

中图分类号: Q 5 5 **文献标识码:** A

Research advances in directed evolution of glycosyltransferase

WU Jia-qian¹, WANG Min^{1*}, CHEN Dai-jie², ZHU Li³

(1 School of Life Science and Technology, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China;
2 Shanghai Institute of Pharmaceutical Industry, Shanghai 200040, China;
3 Shanghai Health Creation Center for Biopharmaceutical R&D, Shanghai 200240, China)

Abstract: Glycosyltransferase plays an essential role in modifying bioactive compounds containing sugars. Directed evolution is one of the new strategies not only for improving catalytic activity but also expanding its promiscuity. The successful directed evolution depends on the diversity of mutant library and the high efficacy of screening method. This review briefly introduces the random mutation strategy, and the high-throughput screening (HTS) for the selection of positive mutants. The methods include a cell-based screening system, fluorescence-based acceptor HTS and pH-indicator HTS.

Key words: glycosyltransferase; directed evolution; high-throughput screening

在自然界中存在的许多含糖小分子物质(糖苷类化合物)具有生物活性, 在目前临床应用的药物中, 很多都来自这类小分子物质。而这些小分子结构中的糖基的多样性和在分子中的不同位置, 往往对这类化合物的生物活性是至关重要的。改造糖分子的结构, 使其具有生物活性、药用价值, 这为含糖药物筛选工作提供了一条重要途径。

糖基转移酶(glycosyltransferase, GTs)参与糖苷类化合物生物合成, 是对糖分子进行生物学方法改造的重要对象^[1](表1)。GTs催化不同的糖基与特定的受体分子结合, 从而产生大量的寡糖、多聚糖和其他结构多样性的糖苷类化合物。但是, 由于糖基转移酶独特的结构和作用机制, 决定了该酶具有高

度的底物特异性而限制了多样性糖基的转移, 以致难以获得结构多样性的糖苷类化合物。因此, 提高糖基转移酶催化底物的宽泛性, 使它能够将更多种类的糖基引入多种具有重要价值的小分子中, 丰富糖苷类药物的多样性, 成为研究的重点。

酶的体外定向进化是蛋白质工程的新策略, 它主要包含两个基本步骤(1)建立目的基因的突变体库;(2)对不同突变基因表达的蛋白进行筛选, 找到有益突变体。

收稿日期: 2008-12-25; 修回日期: 2009-01-21

基金项目: 国家自然科学基金(30672558)

*通讯作者: Tel: 025-83271395; E-mail: minwang@cpu.edu.cn

表1 部分参与天然产物合成的糖基转移酶^[1]

糖基转移酶	菌种	用途	参考文献
AknK	<i>S. galilaeus</i>	参与阿克拉霉素 A 的生物合成	[2]
AknS			
Asm25	<i>Actinosynnema pretiosum</i> <i>subsp. auranticum</i>	功能未知	[3]
AveBI	<i>S. avermitilis</i> MA-4680	参与阿维菌素的生物合成	[4]
ChaGT	<i>S. chartreusis</i>	参与教酒菌素生物合成	[5]
CouM	<i>S. rishiriensis</i> DSM 40489	参与香豆霉素生物合成	[6]
CosG	<i>S. olindensis</i>	参与宇宙霉素生物合成	[7]
CosK			
EryBV	<i>Saccharopolyspora erythraea</i>	参与红霉素的生物合成	[8]
GilGT	<i>S. griseoflavus</i> G63 592	参与褐黄瘤菌素生物合成	[9]
LanGT4	<i>S. cyanogenus</i> S136	参与竹桃霉素生物合成	[10]
MegDI	<i>Micromonospora megalomicea</i>	参与巨霉素生物合成	[11]
MegBV			
MegC III			
NcsC6	<i>S. carzinostaticus</i> ATCC 15944	参与新抑癌蛋白生物合成	[12]
Neo8	<i>S. fradiae</i> NCIB 8233	参与新霉素生物合成	[13]
NovM	<i>S. spheroides</i> NCIMB 11891	参与新生霉素生物合成	[14]
PlaA6	<i>S. sp.</i> TŪ6 071	参与phenalinolactones生物合成	[15]
StfG	<i>S. steffisburgensis</i> NRRL 3193	参与司替霉素生物合成	[16]

在体外改造酶基因, 定向选择有价值的非天然酶, 这在短期内可以在试管中完成, 而在自然界需要几百万年的进化过程, 因此, 可能是发现新型酶和新的生理生化反应的重要途径。

1 GTs的结构及作用机制

尽管GT的序列千差万别, 但出人意料的是如此众多的家族却只采用了两种相类似的折叠方式——Rossmann卷曲, 形成GT-A和GT-B两大超家族。GT-A家族中的蛋白由两个紧密相邻的 $\beta/\alpha/\beta$ 折叠构成, 而GT-B家族中的蛋白由两个 $\beta/\alpha/\beta$ 结构域彼此相对且自由连接。与GT-A超家族不同的是GT-B超家族中没有“DXD”功能域, “DXD”是一种具有高度保守性的模体, 它的作用是将糖基与另外的糖基、磷酸盐和蛋白结合。先进的分子生物学手段使得越来越多的折叠形式被我们所知, 第三种折叠方式GT-C就是通过BLAST等迭代序列查找技术而发现的^[17], 其跨膜蛋白的拓扑学结构还没有通过实验来证明。

根据异头碳的立体构型, 糖基转移酶分为构型翻转型(inverting)和构型保持型(retaining)。构型翻转型糖基转移酶是通过酶催化激活路易斯酸, 使之脱去一份磷酸盐, 完成一个类似SN2亲核取代反应。构型保持型糖基转移酶, 被认为符合由Breton等^[18]

提出的双置换机理, 即首先产生糖基-酶中间复合物, 接着再与受体完成第二步取代反应, 但由于一直无法找到对应的糖基-酶中间复合物, 所以其反应机制目前尚属推测。

2 GTs的定向进化

体外定向进化是改造酶的一种有效的新策略, 主要是模拟自然进化进程, 在一种酶的特定位置引入随机变异, 再经由DNA改组、交错延伸过程、随机引导重组等进行突变基因的体外重组, 最终经筛选获得所需活性的酶。

2.1 突变库的构建

定向进化首先需要构建包含大量突变的基因文库, 通常采用随机突变和基因重组的方式进行。随机突变包括易错PCR(epPCR)和饱和突变(saturation mutation)等; 基因重组包括DNA重组(DNA Shuffling)、渐进式切割产生杂合酶(incremental truncation for the creation of hybrid enzymes, ITCHY)、交错延伸法(staggered extension process, StEP)、随机引物体外重组(random-priming *in vitro* recombination, RPR)、临时模板随机嵌合生长(random chimera genesis on transient templates, RACHITT)、外显子改组(exon shuffling)和酵母增强组合文库(combinatorial libraries enhanced by recombination in yeast, CLKRY),

以及随机片段交换法(random insertional-deletional strand exchange mutagenesis, RAISE)^[19]等9种方法。构建糖基转移酶突变库最为常用的是易错 PCR、饱和突变和 DNA 重组等 3 种方法(表 2)。

2.2 筛选技术

定向进化的基本规则：“所筛即所得。”定向进化的成功与否就在于筛选庞大的突变体文库。对于糖基转移酶来说，虽然我们掌握了大量糖基转移酶的结构以及生物化学信息，但是主要因为糖基转移酶在催化糖基形成糖苷键的过程中，没有产生一个明显的、可供筛选的信号，例如吸光度和荧光

吸收，所以仍然缺乏合适的筛选手段。表 3 列举了糖基转移酶常用的筛选手段，但由于存在明显的缺点，极少符合高通量筛选。针对以上筛选手段的不足之处，目前针对糖基转移酶设计的高通量筛选手段主要利用定向进化的酶各自特有的性质作为筛选依据发展起来的。

2.2.1 基于细胞的筛选法(a cell-based screening system)

Aharoni 等^[20]首先通过易错 PCR 得到约 10⁶Cst II 突变库，然后利用一种基于细胞的筛选技术来定点进化一种唾液酸转移酶(sialyltransferase, STs)Cst II。他们利用监测细胞中带荧光标记的反

表2 常见糖基转移酶突变库构建方法

方法	原理	优点	缺点
易错 PCR	通过改变 PCR 的条件，通常降低一种 dNTP 的量，使 PCR 易于出错，达到随机突变的目的。	对父本基因的限制条件不多；全部操作简便；周期短；而且可以和其他突变方法搭配使用；可以说易错 PCR 是最基础的方法。	相当慢；仅引入点突变；涉及的基因片段太短(少于 800 碱基对)。
饱和突变	通过对目的蛋白的编码基因进行改造，短时间内获取靶位点氨基酸分别被其他 19 种天然氨基酸所替代的突变子。	可以用来鉴定蛋白质功能位点，提高酶比活力，改善酶热稳定性、底物结合特异性及立体异构特异性等多方面性质。	饱和突变的关键问题在于活性部位的选择，这主要依赖蛋白质的结构信息，包括实验测定的三维结构和计算机模拟的同源模型。以磁共振或 X-射线晶体衍射测定的结构为基础来确定的靶位点，但多数 GT 的结构尚未测定，应用上有一定的限制。
DNA 重组	将 DNA 拆散后重排，它是模仿自然进化的一种 DNA 体外随机突变方法。这种方法不仅可以对一种基因人为进化，而且可以将具有结构同源性的几种基因进行重组，共同进化出一种新的蛋白质。	可以在无同源性或低同源性的两个基因间产生重组；引入了重组、缺失、重复等多种突变类型；可以迅速积累有益突变，使表达蛋白的平均活性明显提高；加速积累有益突变；可实现目的蛋白多种特性的共进化。	重组一定是在两个不同的亲本之间产生；亲本基因序列的同源性要求较高，常常不小于 90%；子代中功能杂合子的比率很低。

表3 常用筛选方法优、缺点总结

方法	优点	缺点
化学发色及荧光测定法	灵敏度高。	难于自动化操作，供体需要放射性标记。
免疫学法	高灵敏性，识别不同的反应产物。	需要昂贵的特异性抗体及外源凝集素，不适用于大多数酶的检测。
分光光度计法	通过检测反应产物 UDP 和糖基转移酶作用，并同时需要 NADH/NAD 辅助因子参与酶促反应，这个方法已经用于微量滴定板。	不能筛选细胞粗提物，因为这会干扰 NADH 的氧化作用。
色谱法	将产物鉴定和酶鉴定两者结合。	底物需要荧光标记。
质谱-光谱联用法	速度快，准确度高。	所需设备昂贵。

应产物来筛选 Cst II 突变体库。这种检测的原理是: 生理条件下, 唾液酸是唯一带电的糖, 带荧光基团标记的受体, 由于带中性电荷, 可以自由地出入细胞。当带负电荷的唾液酸与受体结合时, 形成带电荷的产物, 只能留在细胞内, 这样细胞就被带上了荧光标记, 通过荧光激活细胞分类技术 (FACS) 就可以进行细胞筛选。FACS 的原理是: 待测样本的细胞悬液, 在鞘液的包围和约束下, 细胞排成单列高速由流动室喷嘴喷出, 形成细胞液柱。当液柱通过检测区, 在入射的激光束照射下产生前向散射光 (FSC) 和侧向散射光 (SSC), 它们分别反映细胞大小和颗粒度, 根据这些特性可以将细胞分类。如今的荧光激活细胞分类仪器能在一个小时中分选 10^7 个细胞。

从图 1 我们可以看到, 用荧光标记的受体糖基可以自由的进出细胞, 如果突变体酶能够催化唾液酸与受体结合, 那么细胞就获得了荧光(上); 如果突变体酶的催化效率低, 那么就不能获得荧光(下)。最后根据每个细胞的光散射和荧光特征, 就可以将特定的细胞从细胞群体中分选出来^[21]。

Withers 等发现一种新的唾液酸转移酶突变体 F91Y。F91Y 可以提高对糖供体 CMP-KDN 的转化效率; 将荧光探针 BODIPY 标记的乳糖、半乳糖、

3H-乳糖作为受体, F91Y 与野生型酶催化活性相比较, 分别提高了 153、367、407 倍。更重要的是, 他们还发现这个酶可以合成含寡糖的唾液酸, 能够抑制糖苷酶的硫连接, 这是在先前的实验中从未发现的性质。

细胞筛选法的局限性在于它只能分析那些在细胞中能形成含有唾液酸产物的糖基转移酶, 比如说唾液酸转移酶和半乳糖转移酶。而对于其他更多的酶, 还需要通过其他的手段来实现高通量筛选。

2.2.2 基于荧光受体的高通量筛选 (fluorescence-based acceptor HTS) 竹桃霉素糖基转移酶 (oleandomycin GT, OleD) 可以催化一些小分子的酚类化合物。Williams 等^[22] 首先将野生型的 OleD 通过易错 PCR 突变 1—2 个氨基酸, 得到约 1 000 个突变体, 然后找到其中一种荧光香豆素 (4-甲基-7-羟基香豆素) 作为受体, 可以通过遮蔽其 7 位的羟基来淬灭荧光, 从而根据荧光的减少量来筛选突变体库。反应式见图 2。

通过定向进化的突变体酶转化效率明显高于野生型酶: 三突变体 P67T/S132F/A242V 对底物 7/UDP-Glc 的催化效率提高了 60 倍; 不仅如此, 对底物的宽泛性也大大增强。在 22 个供体底物中这个三突变酶可以结合其中 15 个, 而其中的 12 个供体不能作为野生型酶的底物被检测。在这些被成功筛

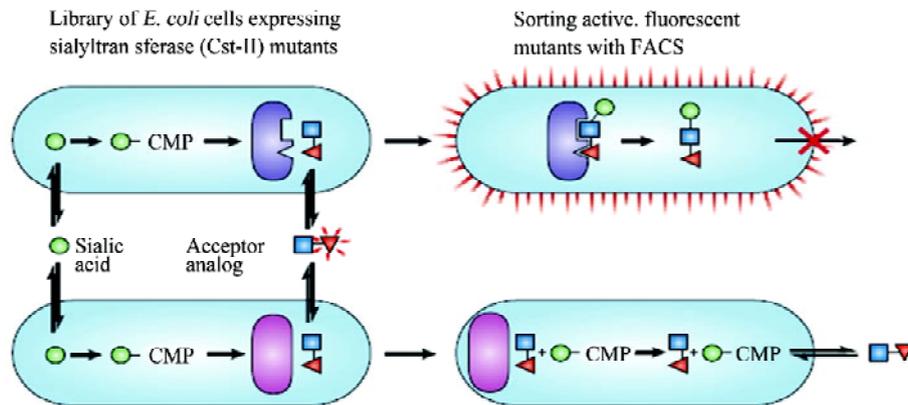
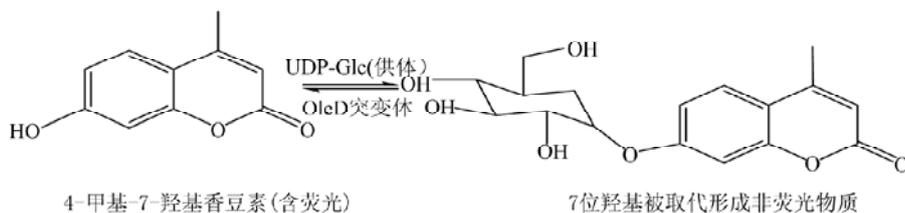


图1 基于细胞的筛选法检测唾液酸转移酶^[21]



4-甲基-7-羟基香豆素(含荧光)

7位羟基被取代形成非荧光物质

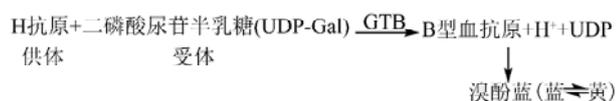
图2 利用 4-甲基-7-羟基香豆素定向进化竹桃霉素糖基转移酶^[23]

选出的受体中不乏有可以作为药物的前体, 譬如: 大环内酯类、黄酮类、异黄酮类、蒽醌类、吡啶类、聚烯类、甾类、内酰胺类、生物碱类等。

这项技术的不足之处在于筛选过程需要依靠含有荧光团的底物。为了能改进这个缺点, Williams 等^[24]首先利用荧光受体高通量筛选新生霉素(非荧光团底物), 找到了关键氨基酸的热点(hot spots)即功能性残基, 这些突变点一般发生在受体结合位点的“茎”的 N3 处和焦磷酸结合点, 然后饱和突变三个氨基酸(Pro67、Ile112、Ala242), 所得到的新的突变体, 就可以用低通量筛选得到。结果表明: 在糖基化过程中, 这些突变株结合新生霉素的能力提高了 200—300 倍, 更可喜的是, 由于扩大了底物的宽泛性, 从而形成了 8 个新的含新生霉素的天然糖基化产物, 这对于化学合成天然糖基化产物也是强有力的补充。

2.2.3 pH 值指示高通量筛选(pH-indicator HTS) 这种检测方法是利用糖供体在转移一部分糖基到受体时, 由于质子的释放而引起 pH 指示剂颜色的改变。原理见下图 3。

Persson 和 Palcic^[25]对 α -(1,3)-半乳糖转移酶(GTB)的热点 M214 进行饱和突变后, 得到 350 个候选突变体。这些突变体催化受体二磷酸尿苷半乳糖(UDP-Gal)和供体 H 抗原时释放出 H^+ , 使得 pH 指示剂溴酚蓝的颜色发生改变。反应式见下:

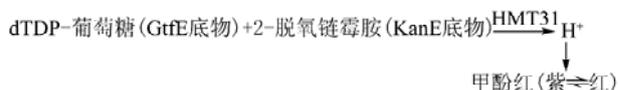


(溴酚蓝的 pKa 等于 7.1, pH 6.0—7.6 时, 从蓝色变为黄色)

以 UDP-Gal 作为供体, 墨角藻糖基乳糖作为受体。具有活性的酶, 其指示剂颜色从绿色变成了黄色; 活性低的酶为绿色; 而没有活性的突变体酶仍然为蓝色。

Park 等^[26]利用渐进式切割法(Incremental truncation method), 即外切核酸酶 III 对万古霉素糖基转移酶基因(*gtfE*)和卡那霉素糖基转移酶基因(*kanE*)分别

进行酶切, 获得依次相差一个碱基的 DNA 片段库, 随后将 *gtfE* 的 N 端与 *kanE* 的 C 端连接, 建立杂合酶突变体文库。通过 pH 指示剂法筛选到其中一种杂合酶 HMT31(N-KanF-669bp 和 756bp-C-GtfE), 其催化效率可达每分钟 163mmol/L。



(甲酚红 pKa 等于 8.32, pH 7.2—8.8 时, 从紫色变成黄色)

分别用 GtfE、KanE、HMT31 作底物宽泛性实验, 以 2-脱氧链霉素(2-DOS)作为受体, 9 个 NDP-糖基作为供体。其中 GtfE 对 2-DOS 没有任何催化活性, 对不同的供体 dTDP-D-葡萄糖、GDP-D-甘露糖、UDP-D-果糖、HMT31 的催化活性分别是 KanE 的 16、7、3 倍。

pH 指示剂法的优势: (1) 灵敏度很高, 两个新发现的突变酶的 kcat 仅为野生型酶的两倍; (2) 不需要与之共反应的酶及标记过的底物, 具有发色团及荧光的底物可能会因为大量的发色团引入反应后, 导致底物活性及特异性发生巨大改变, 从而造成错误结果; (3) 由于糖基转移酶发生催化反应时都伴随着 H^+ 的释放, pH 指示剂分析法具有广阔的应用前景。

这种分析方法的缺点是不适用于酶比活性的测定, 那是因为测定所用的溶液的缓冲能力较低, 当酶加入到反应混合液中, 很难准确测定吸光度, 从而其初反应率也相应难得到。当反应开始后, 指示剂的吸光度也会相应发生改变。所以通过适当的改变反应条件, 选择一个恰当的 pH 指示剂和缓冲液, 并且考虑酶的最佳反应 pH, 成为指示剂高通量筛选是否成功的重要因素。

3 结语及展望

定向进化对于糖基转移酶的改造是一种非常有效的策略, 不仅可以改变糖单元和配基的底物特异性, 扩大底物及受体的宽泛性, 还可以大大提高糖苷类化合物的结构多样性, 为筛选到新活性糖苷类化合物奠定基础。

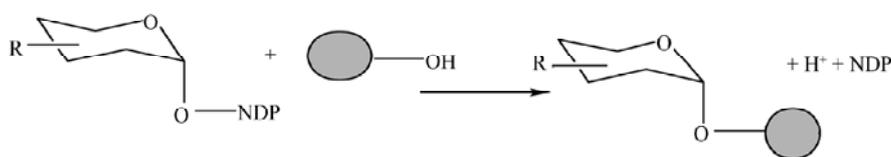


图 3 pH 值指示高通量筛选原理

糖基转移酶定向进化应该分两步走: 第一步, 提高酶突变体库的容量和质量, 就目前来说, 有各种无性突变、有性重组手段增强酶的优化潜力; 第二步, 也是薄弱环节, 就是在保证突变体质量的条件下, 缩小突变体库或者采用高通量筛选手段, 这是糖基转移酶定向进化中的重点发展方向, 随着酶高级结构进一步的阐明, 可以利用新发现酶的特性来设计筛选方案。

我们相信, 随着基因工程技术、蛋白质工程技术以及高通量筛选技术的迅速发展, 定向进化技术将成为获得新酶的一个有效快捷的手段, 这将为工业生产提供更多性能优良的酶制剂。

[参 考 文 献]

- [1] Luzhetskyy A, Mendez C, Salas JA, et al. Glycosyltransferases, important tools for drug design. *Curr Top Med Chem*, 2008, 8: 680-709
- [2] Lu W, Leimkuhler C, Gatto GJ, Jr, et al. AkiT is an activating protein for the glycosyltransferase AkiS in L-aminodeoxysugar transfer to the aglycone of aclacinomycin A. *Chem Biol*, 2005, 12(5): 527-34
- [3] Luzhetskyy A, Weiss H, Charge A, et al. A strategy for cloning glycosyltransferase genes involved in natural product biosynthesis. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2007, 75(6): 1367-75
- [4] Zhang C, Albermann C, Fu X, et al. The *in vitro* characterization of the iterative avermectin glycosyltransferase AveBI reveals reaction reversibility and sugar nucleotide flexibility. *J Am Chem Soc*, 2006, 128(51): 16420-1
- [5] Xu Z, Jakobi K, Welzel K, et al. Biosynthesis of the antitumor agent chartreusin involves the oxidative rearrangement of an anthracyclic polyketide. *Chem Biol*, 2005, 12(5): 579-88
- [6] Freitag A, Mendez C, Salas JA, et al. Metabolic engineering of the heterologous production of clorobiocin derivatives and elloramycin in *Streptomyces coelicolor* M512. *Metab Eng*, 2006, 8(6): 653-61
- [7] Garrido LM, Lombo F, Baig I, et al. Insights in the glycosylation steps during biosynthesis of the antitumor anthracycline cosmomycin: characterization of two glycosyltransferase genes. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2006, 73(1): 122-31
- [8] Zhang C, Fu Q, Albermann C, et al. The *in vitro* characterization of the erythronolide mycarosyltransferase EryBV and its utility in macrolide diversification. *ChemBioChem*, 2007, 8(4): 385-90
- [9] Liu T, Kharel MK, Fischer C, et al. Inactivation of gilGT, encoding a C-glycosyltransferase, and gilOIII, encoding a P450 enzyme, allows the details of the late biosynthetic pathway to gilvocarcin V to be delineated. *ChemBioChem*, 2006, 7(7): 1070-7
- [10] Luzhetskyy A, Fedoryshyn M, Durr C, et al. Iteratively acting glycosyltransferases involved in the hexasaccharide biosynthesis of landomycin A. *Chem Biol*, 2005, 12(7): 725-9
- [11] Peiru S, Menzella HG, Rodriguez E, et al. Production of the potent antibacterial polyketide erythromycin C in *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol*, 2005, 71(5): 2539-47
- [12] Liu W, Nonaka K, Nie L, et al. The neocarzinostatin biosynthetic gene cluster from *Streptomyces carzinostaticus* ATCC 15944 involving two iterative type I polyketide synthases. *Chem Biol*, 2005, 12(3): 293-302
- [13] Li SM, Heide L. The biosynthetic gene clusters of aminocoumarin antibiotics. *Planta Med*, 2006, 72(12): 1093-9
- [14] Huang F, Haydock SF, Mironenko T, et al. The neomycin biosynthetic gene cluster of *Streptomyces fradiae* NCIMB 8233: characterisation of an aminotransferase involved in the formation of 2-deoxystreptamine. *Org Biomol Chem*, 2005, 3(8): 1410-8
- [15] Durr C, Schnell HJ, Luzhetskyy A, et al. Biosynthesis of the terpene phenalinolactone in *Streptomyces* sp. Tu6071: analysis of the gene cluster and generation of derivatives. *Chem Biol*, 2006, 13(4): 365-77
- [16] Gullon S, Olano C, Abdelfattah MS, et al. Isolation, characterization, and heterologous expression of the biosynthesis gene cluster for the antitumor anthracycline steffimycin. *Appl Environ Microbiol*, 2006, 72(6): 4172-83
- [17] Lairson LL, Henrissat B, Davies GJ, et al. Glycosyltransferases: structures, functions, and mechanisms. *Annu Rev Biochem*, 2008, 77: 521-55
- [18] Breton C, Snajdrova L, Jeanneau C, et al. Structures and mechanisms of glycosyltransferases. *Glycobiology*, 2006, 16(2): 29R-37R
- [19] 袁宁, 胡又佳, 朱春宝. 蛋白定向进化及应用进展. *中国生化药物杂志*, 2008, 29(1): 65-8
- [20] Aharoni A, Thieme K, Chiu CPC, et al. High-throughput screening methodology for the directed evolution of glycosyltransferases. *Nat Methods*, 2006, 3(8): 609-14
- [21] Wang PG. The charged sialic acid exhibits its power again: a new high-throughput screening technology. *Nat Methods*, 2006, 3(8): 589-90
- [22] Williams GJ, Zhang C, Thorson JS. Expanding the promiscuity of a natural-product glycosyltransferase by directed evolution. *Nat Chem Biol*, 2007, 3: 657-62
- [23] Williams GJ, Thorson JS. A high-throughput fluorescence-based glycosyltransferase screen and its application in directed evolution. *Nat Prot*, 2008, 3(3): 357-62
- [24] Williams GJ, Goff RD, Zhang CS, et al. Optimizing glycosyltransferase specificity via "Hot spot" saturation mutagenesis presents a catalyst for novobiocin glycorandomization. *Chem Biol*, 2008, 15(4): 393-401
- [25] Persson M, Palcic MM. A high-throughput pH indicator assay for screening glycosyltransferase saturation mutagenesis libraries. *Anal Biochem*, 2008, 378(1): 1-7
- [26] Park SH, Park HY, Sohng JK, et al. Expanding substrate specificity of GT-B fold glycosyltransferase via domain swapping and high-throughput screening. *Biotechnol Bioeng*, 2009, 102(4): 988-94