

СТАБИЛЬНОСТЬ САХАРСВЯЗЫВАЮЩИХ БЕЛКОВ:

D-ГАЛАКТОЗА(Д-ГЛЮКОЗА)-СВЯЗЫВАЮЩЕГО БЕЛКА ИЗ *ESCHERICHIA COLI* И ТРЕГАЛОЗА(МАЛЬТОЗА)-СВЯЗЫВАЮЩЕГО БЕЛКА ИЗ *THERMOCOCCUS LITORALIS*

© Ольга В. Степаненко,¹ О. И. Поварова,¹ А. В. Фонин,^{1, 2} Олеся В. Степаненко¹

¹ Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург,
и ² С.-Петербургский государственный политехнический университет;
¹ электронный адрес: sov@mail.cytspb.rssi.ru

Исследовали структуру и стабильность сахарсвязывающих белков из мезофильных и термофильных организмов, которые потенциально могут быть использованы в качестве чувствительных элементов биосенсоров для непрерывного определения глюкозы в крови. Полученные данные свидетельствуют о стабилизирующей роли лигандов на структуру D-галактоза(Д-глюкоза)-связывающего белка (GGBP) из *Escherichia coli* и трегалоза(мальтоза)-связывающего белка (TMBP) из термофильной бактерии *Thermococcus litoralis*. Показано, что TMBP является гипертермофильным белком, который не разворачивается даже при нагревании до 95 °C.

Ключевые слова: трегалоза(мальтоза)-связывающий белок, D-галактоза(Д-глюкоза)-связывающий белок, стабильность белков, биосенсор.

Принятые сокращения: TMBP — трегалоза(мальтоза)-связывающий белок из термофильной бактерии *Thermococcus litoralis*, GGBP — D-галактоза(Д-глюкоза)-связывающий белок из *Escherichia coli*, TMBP/Glc и GGBP/Glc — комплекс TMBP и GGBP с D-глюкозой соответственно, GGBP-Ca и GGBP-Ca/Glc — GGBP и GGBP/Glc с отщепленным ионом Ca^{2+} соответственно, GdnHCl — гуанидин-гидрохлорид, КД — круговой дихроизм.

Разработка высокочувствительных систем для экспресс-обнаружения и количественного определения широкого круга разнообразных веществ необходима для медицины, ветеринарии, создания систем контроля за биотехнологическими процессами, экологического мониторинга, для разработки систем безопасности, направленных на предотвращение терактов и контрабанды наркотиков (Ligler et al., 2007; Singh, 2007; Palchetti, Mascini, 2008; Palchetti et al., 2009). Практически для любого соединения, представляющего интерес для тестирования, можно найти белок, специфически с ним взаимодействующий. Лигандсвязывающие белки специфически связываются с конкретными веществами — лигандами (Dwyer, Hellinga, 2004): например, одорант-связывающие белки могут быть использованы для обнаружения ядов, взрывчатых веществ, наркотиков и т. п., глутаминсвязывающий белок — для определения уровня глутамина в клеточных культурах и т. д. Антидота можно создать практически для любого низкомолекулярного соединения, а также для белков и пептидов (Tomizaki et al., 2005). Ферменты (Turner, 2000), катализирующие химическую реакцию с участием тестируемого вещества (аналита), можно модифицировать таким образом, чтобы они обратимо связывали, но не изменяли тестируемое вещество (Verkman et al., 1989; Spicher-Keller, 1998). Регистрация акта связывания белок — тестируемое вещество может осуществляться с помощью различных физико-химических методов, среди которых особое место занимает флуоресцентный метод

(использующий собственную флуоресценцию или флуоресценцию присоединенного к белку красителя). При этом можно регистрировать различные флуоресцентные параметры — интенсивные, характеризующие взаимодействие белок-тестируемое вещество качественно, и экстенсивные, позволяющие характеризовать количество тестируемого вещества в пробе. Перспективным является подход, связанный с посадкой на белок двух флуоресцентных красителей, составляющих донорно-акцепторную пару, и использование для определения анализа явления ферстеровского безызлучательного переноса энергии возбуждения. В качестве донорно-акцепторной пары могут выступать либо два флуоресцентных белка, образующих белок слияния с лигандсвязывающим белком, либо более оптимальная, на наш взгляд, пара флуоресцентный белок-флуоресцентный краситель. Одним из перспективных методов регистрации взаимодействия белка с анализом может быть метод, основанный на использовании явления поверхностного плазмонного резонанса (Boozer et al., 2006; Piliarik et al., 2009).

Строгий контроль за уровнем сахара в крови пациентов, больных диабетом, является единственным средством предотвращения неблагоприятных последствий повышения уровня сахара в крови выше допустимого уровня, а также предотвращения инсулинового шока, обусловленного чрезмерным употреблением лекарственных средств и нередко приводящего к коме и даже к летальному исходу. Для того чтобы осуществлять такой

контроль, необходимо ежедневное многократное измерение уровня сахара в крови пациента, взятой из пальца (Ervin, Kiser, 1999). Данная процедура является болезненной. Создание биосенсора для непрерывного определения уровня глюкозы в крови может решить эту проблему. Чувствительными элементами биосенсорных систем могут выступать белки, способные взаимодействовать с глюкозой. Перспективным для создания сенсоров глюкозы является использование в качестве чувствительного элемента лигандсвязывающих белков, в частности D-глактоза(D-глюкоза)-связывающего белка (GGBP) из *Escherichia coli* (Salins et al., 2001). Это обусловлено тем, что связывание глюкозы приводит к конформационным изменениям третичной структуры белка (Shilton et al., 1996). Однако следует учитывать, что константа связывания сахара с GGBP очень высока (константа диссоциации составляет 1 мкМ; Tolosa et al., 1999). Для того чтобы «настроить» чувствительный элемент биосенсорной системы на регистрацию содержания глюкозы в крови, превышающего допустимый уровень, можно ввести в активный центр связывания сахара такие аминокислотные замены, которые существенно уменьшили бы константу связывания GGBP с глюкозой. Трегалоза(мальтоза)-связывающий белок (TMBP) из термофильной бактерии *Thermococcus litoralis* способен связывать глюкозу и имеет большую константу диссоциации, чем GGBP (3—8 мМ; Herman et al., 2007). Данное значение соответствует концентрации глюкозы в крови здорового человека. Таким образом, этот белок обладает существенным преимуществом по сравнению с GGBP — он не требует введения аминокислотных замен в сайт связывания сахаров с целью уменьшения константы связывания. Кроме того, белки, полученные из термофильных организмов, стабильны при комнатной температуре и являются хорошей альтернативой мезофильным белкам, теряющим свою стабильность при комнатной температуре.

Очевидно, что белок, используемый в биосенсорной системе, должен обладать высоким уровнем стабильности. Поэтому целью данной работы явилось изучение физико-химических свойств и стабильности GGBP из *E. coli* и TMBP из *Th. litoralis* для дальнейшего использования этих белков в качестве чувствительного элемента биосенсорной системы для непрерывного определения уровня глюкозы в крови пациентов, больных диабетом.

Материал и методика

Препараты TMBP и GGBP были получены и очищены согласно известным методикам (Tolosa et al., 1999; Herman et al., 2006). Препараты D-глюкозы (Sigma, США) и гуанидингидрохlorida (GdnHCl; Nacalai Tesque, Япония) использовали без дополнительной очистки. Концентрацию GdnHCl определяли с помощью рефрактометра Аббе (ЛОМО, Россия). Концентрация белков составляла 0.1—0.5 мг/мл. Для образования комплекса белок-лиганд в раствор белка добавляли D-глюкозу в концентрации 10 мМ. Ион кальция отцепляли в растворе 1 мМ ЭДТА (Fluka, Швейцария). Измерения проводили в буферном растворе Трис-НСl: 10 мМ (pH 7.4) в случае GGBP и 20 мМ (pH 7.5) в случае TMBP.

Флуоресцентные измерения выполнены с использованием спектрофлуориметрических установок собственного изготовления (Туроверов и др., 1998) и микрочувствительными элементами (101.016-QS 5×5 мм; Hellma, Германия). Спектры

флуоресценции измеряли при возбуждении светом с длинами волн 280 и 297 нм. Значения параметра $A = I_{320}/I_{365}$, характеризующего положение спектров флуоресценции (I_{320} и I_{365} — интенсивности флуоресценции при длинах волн регистрации 320 и 365 нм соответственно; см.: Туроверов, Кузнецова, 2003), и спектры флуоресценции корректировали на спектральную чувствительность установки.

Равновесные зависимости различных флуоресцентных характеристик белков от концентрации GdnHCl измеряли после инкубации белка в растворах GdnHCl соответствующей концентрации при 4 °C в течение 24 ч. Измерения выполнены при 23 °C. Равновесные зависимости интенсивности флуоресценции анализировали с помощью метода, основанного на параметрическом представлении двух независимых экстенсивных характеристик системы (Kuznetsova et al., 2004). Термодинамические характеристики рассчитаны согласно Нолтингу (Nolting, 1999).

Регистрацию спектров кругового дихромата (КД) в дальней УФ-области проводили на спектрополяриметре J-810 (Jasco, Япония). Измерения выполнены в диапазоне 260—190 нм с шагом 0.1 нм с использованием кварцевых кювет (1 мм). Для улучшения соотношения сигнал/шум каждый спектр регистрировали 3—5 раз и полученные данные усредняли. Спектры КД белков построены с учетом КД соответствующего буферного раствора.

Результаты и обсуждение

Оба сахарсвязывающих белка (TMBP и GGBP) относятся к широкому классу лигандсвязывающих белков периплазмы бактерий. Белки данного класса переносят различные вещества (углеводы, аминокислоты, пептиды и пр.) через внутриклеточную мембрану. Несмотря на значительные различия по размеру и аминокислотной последовательности, лигандсвязывающие белки имеют сходную пространственную структуру: два глобуллярных домена связаны шарнирной областью, образованной двумя или тремя пептидными сегментами, в щели между доменами расположен лигандсвязывающий центр (Vyas et al., 1991; Diez et al., 2001). Пространственная структура TMBP в отличие от GGBP в апо-форме не определена, однако предполагается что, как и в случае других белков этого класса, освобождение лиганда приводит к частичному раскрытию щели (Shilton et al., 1996). Молекула GGBP имеет в своем составе дополнительный лиганд — один ион кальция, локализованный в петле C-концевого домена (остатки 134—142) и образующий координационную связь с атомами кислорода каждого второго остатка этой петли и остатка Glu 205. Структура кальцийсвязывающего сайта этого белка напоминает структуру мотива «EF-руки», распространенного во внутриклеточных кальцийсвязывающих белках (Vyas et al., 1988; Borrok et al., 2007).

Для оценки стабильности GGBP и TMBP и комплексов белков с D-глюкозой исследовали конформационные изменения белка при денатурации под действием GdnHCl методами собственной флуоресценции белков и КД в дальней УФ-области (рис. 1, 2).

Характер равновесных зависимостей различных флуоресцентных характеристик (интенсивности флуоресценции, параметра A и анизотропии флуоресценции) и эллип-

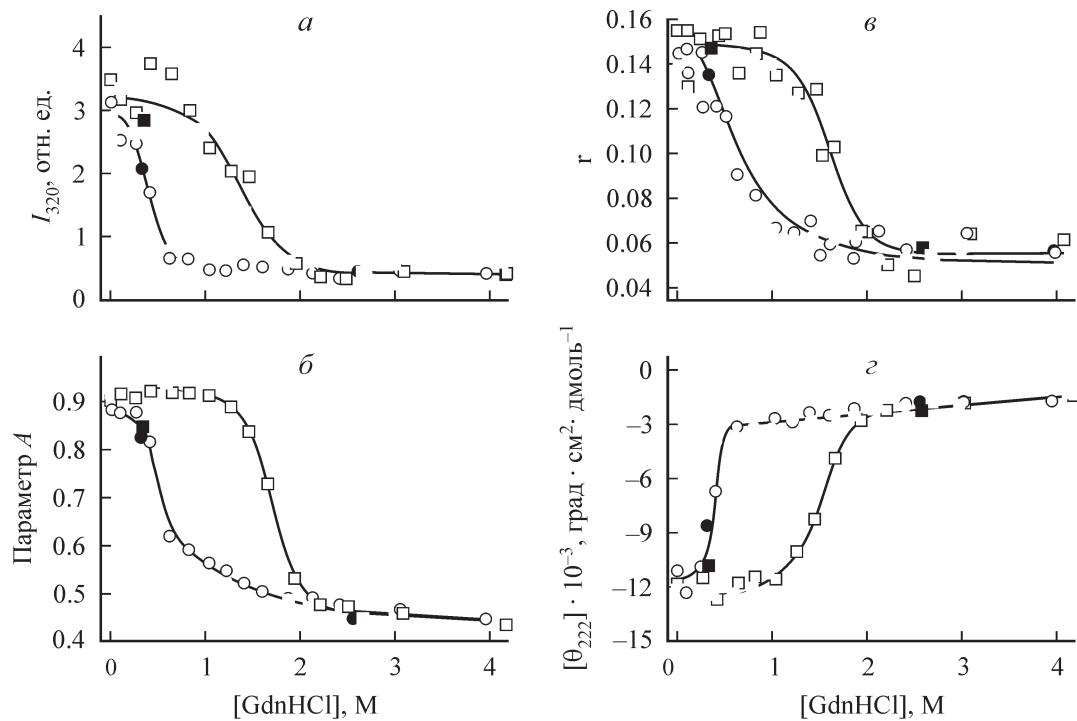


Рис. 1. Конформационные изменения GGBP и GGBP-Ca (черные и серые кружки соответственно) и GGBP/Glc и GGBP/Glc-Ca (черные и серые квадраты соответственно) под действием GdnHCl.

а — изменение интенсивности флуоресценции при длине волн регистрации 320 нм; *б* — изменение параметра *A*; *в* — изменение анизотропии флуоресценции (Γ), длина волны возбуждения 297 нм; *г* — изменение эллиптичности при 222 нм ($[\theta_{222}]$). Открытые символы характеризуют процесс разворачивания, закрытые — сворачивание.

тичности при 222 нм GGBP и его комплекса с D-глюкозой (GGBP/Glc) от концентрации GdnHCl говорит об одностадийном разворачивании как белка, так и комплекса (рис. 1). Об этом же свидетельствует линейный вид параметрических зависимостей для GGBP и комплекса GGBP/Glc, построенных на основании зависимостей интенсивности триптофановой флуоресценции при длинах волн регистрации 320 и 365 нм. Середина перехода от нативного к развернутому белку при разворачивании под действием GdnHCl для GGBP/Glc (1.34 М GdnHCl) сдвинута в область больших концентраций GdnHCl по сравнению с GGBP (0.36 М GdnHCl; рис. 1). Эти данные свидетельствуют о стабилизирующем влиянии лиганда на структуру белка. Процесс денатурации GGBP под действием GdnHCl является полностью обратимым, о чем свидетельствует совпадение равновесных зависимостей различных флуоресцентных характеристик и КД в дальней УФ-области процессов денатурации и ренатурации из полностью развернутого состояния (рис. 1); кроме того, уже при 0.5 М GdnHCl восстанавливается способность GGBP связывать лиганд, что подтверждается увеличением параметров собственной флуоресценции белка, ренатурацию которого проводили в присутствии D-глюкозы, до уровня нативного комплекса GGBP с лигандом.

Равновесные зависимости интенсивности флуоресценции GGBP и GGBP/Glc, а также их форм с отщепленным ионом Ca^{2+} (GGBP-Ca и GGBP/Glc-Ca, соответственно) от концентрации GdnHCl использовали для расчета свободной энергии Гиббса ΔG^0 . Надежно определить величину ΔG^0 для бескальциевой формы GGBP-Ca не удается, поскольку невозможно оценить интенсивность флуоресценции для нативного состояния белка (рис. 1, *a*). Можно считать, что для этой формы величина ΔG^0 близка

к нулю. Полученные данные свидетельствуют о существенной роли иона Ca^{2+} в стабилизации структуры молекулы GGBP. Комплексообразование с глюкозой приводит к существенной стабилизации макромолекул GGBP, в том числе ее бескальциевой формы (значения ΔG^0 GGBP, GGBP/Glc и GGBP/Glc-Ca составляют 8.0, 14.2 и 14.2 кДж/моль соответственно).

Зависимости интенсивности флуоресценции и эллиптичности от концентрации GdnHCl, имеющие сигмоидальный характер, а также линейный вид параметрических зависимостей интенсивности флуоресценции при двух длинах волн регистрации для TMBP и комплекса белка с D-глюкозой (TMBP/Glc), казалось бы, свидетельствуют о том, что разворачивание этого белка и его комплекса с глюкозой осуществляется по принципу «все или ничего» (рис. 2, *а*, *б*). Наличие максимума на кривых зависимости степени поляризации TMBP и TMBP/Glc от концентрации GdnHCl позволяет предположить существование промежуточного состояния, в котором степень поляризации выше, чем в нативном и развернутом состояниях (рис. 2, *а*). Необходимо отметить, что степень поляризации флуоресценции P для TMBP в нативном состоянии имеет очень низкое (0.08) значение. Одной из возможных причин этого может быть безызлучательный перенос энергии возбуждения практически между всеми 12 триптофановыми остатками белка. Возможно, специфическое взаимодействие GdnHCl с белком вызывает небольшие локальные изменения структуры белка и приводит к уменьшению эффективности переноса энергии, что и является, по-видимому, причиной увеличения степени поляризации белка в области пред-денатурационных концентраций GdnHCl. Рассчитанная на основании зависимостей интенсивности флуоресценции от концентрации

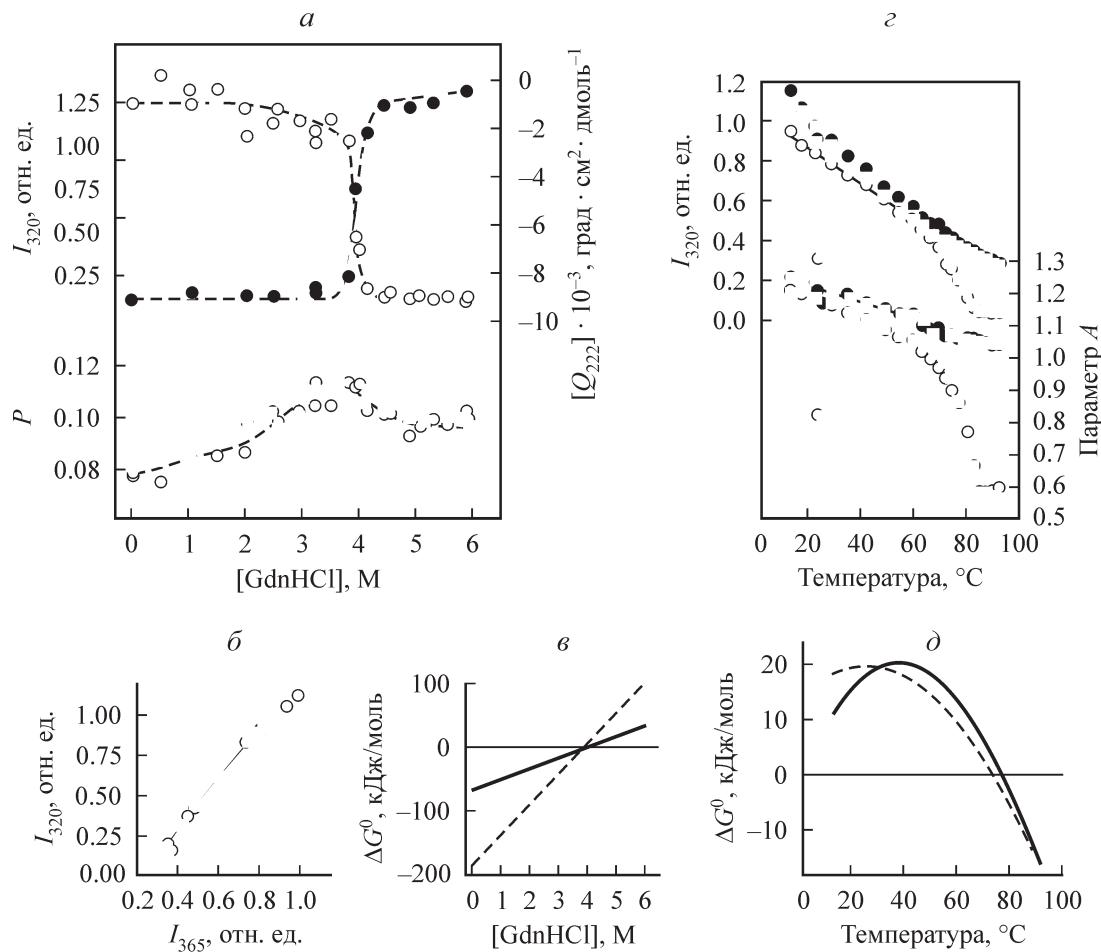


Рис. 2. Денатурация TMBP (черные кружки) и TMBP/Glc (серые квадраты) под действием GdnHCl при комнатной температуре (левая панель) и при нагревании до 95 °С (правая панель).

a — I_{320} (открытые символы), эллиптичность при 222 нм ($[\theta]_{222}$, закрытые символы) и поляризация флуоресценции TMBP и TMBP/Glc, измеренные после инкубации белка в растворах GdnHCl соответствующей концентрации в течение 24 ч; *б* — параметрические зависимости между I_{320} и I_{365} , характеризующие разворачивание TMBP и TMBP/Glc под действием GdnHCl; *в* — изменение свободной энергии Гиббса ΔG^0 TMBP и TMBP/Glc при разворачивании под действием GdnHCl; *г* — изменение I_{320} и параметра A при тепловой денатурации TMBP и TMBP/Glc. Закрытые символы соответствуют изменению флуоресцентных характеристик TMBP и TMBP/Glc в отсутствие GdnHCl, открытые символы — в присутствии 2.8 М GdnHCl; *д* — стабильность TMBP и TMBP/Glc в присутствии 2.8 М GdnHCl при разных температурах.

GdnHCl разница свободной энергии Гиббса ΔG^0 TMBP и TMBP/Glc оказалась в несколько раз выше соответствующих значений, рассчитанных для белков из мезофильных организмов, в частности для GGBP и GGBP/Glc (рис. 2, *в*).

Эксперименты по тепловой денатурации TMBP показали, что белок не разворачивается полностью даже при нагревании практически до 100 °С, поэтому для расчета изменения свободной энергии Гиббса прогревали до 95 °С растворы белка и его комплекса с D-глюкозой, содержащие GdnHCl (рис. 2, *г*). Полученные данные свидетельствуют о том, что комплекс TMBP/Glc более устойчив к нагреванию по сравнению с TMBP (рис. 2, *д*). Следует отметить, что при температуре ниже 30 °С TMBP более стабилен, чем TMBP/Glc. Этот факт согласуется с данными, полученными при изучении денатурации белка под действием GdnHCl при комнатной температуре.

Таким образом, можно заключить, что каждый из исследованных сахарсвязывающих белков (GGBP и TMBP) обладает определенными преимуществами и недостатками при его использовании в качестве чувствительного элемента биосенсорной системы на глюкозу. Несомненными достоинствами использования для этих целей

TMBP являются высокая стабильность его структуры к различным денатурирующим воздействиям, а также более высокая константа диссоциации глюкозы, значение которой соответствует уровню концентрации сахара в крови здоровых людей и больных диабетом. С другой стороны, хотя GGBP обладает несколько меньшим уровнем стабильности по сравнению с TMBP и для возможности его практического использования требуется направленное уменьшение константы связывания глюкозы, существование расшифрованной пространственной структуры этого белка как в отсутствие, так и в присутствии лиганда позволяет проводить анализ структуры белка с целью выбора мест посадки (введения) флуоресцентного красителя или донорно-акцепторной пары двух флуоресцентных красителей (либо более оптимальной, на наш взгляд, пары флуоресцентный белок—флуоресцентный краситель).

Работа выполнена при финансовой поддержке Госконтрактов с ФАНИ (02.512.11.2277 и 02.740.11.5141) и ФАО (Р1198), программы МКБ РАН и гранта президента РФ (МК-1181.2010.4).

Список литературы

- Туроверов К. К., Бикташев А. Г., Дорофеюк А. В., Кузнецова И. М. 1998. Комплекс аппаратных и программных средств для измерения спектральных, поляризационных и кинетических характеристик флуоресценции в растворе. Цитология. 40 (8/9) : 806—817.
- Boozer C., Kim G., Cong S., Guan H., Londergan T. 2006. Looking towards label-free biomolecular interaction analysis in a high-throughput format: a review of new surface plasmon resonance technologies. *Curr. Opin. Biotechnol.* 17 : 400—405.
- Borrok M. J., Kiessling L. L., Forest K. T. 2007. Conformational changes of D-glucose/D-galactose binding protein illuminated by apo and ultrahigh resolution ligand-bound structures. *Prot. Sci.* 16 : 1032—1041.
- Diez J., Diederichs K., Greller G., Horlacher R., Boos W., Welte W. 2001. The crystal structure of a liganded trehalose/maltose-binding protein from the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus litoralis* at 1,85 Å. *J. Mol. Biol.* 305 : 905—915.
- Dwyer M. A., Hellings H. W. 2004. Periplasmic binding proteins: a versatile superfamily for protein engineering. *Curr. Opin. Plant Biol.* 14 : 495—504.
- Ervin K. R., Kiser E. J. 1999. Issues and implications in the selection of blood glucose monitoring techniques. *Diabetes Technol. Ther.* 1 : 3—11.
- Herman P., Barvik I. Jr., Staiano M., Vitale A., Vecer J., Rossi M., D'Auria S. 2007. Temperature modulates binding specificity and affinity of the D-trehalose/D-maltose binding protein from the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus litoralis*. *Biochim. biophys. acta.* 1774 : 540—544.
- Herman P., Staiano M., Marabotti A., Varriale A., Scire A., Tanfan F., Vecer J., Rossi M., D'Auria S. 2006. D-trehalose/D-maltose binding protein from the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus litoralis*: the binding of trehalose and maltose results in different conformational states. *Proteins.* 63 : 754—767.
- Kuznetsova I. M., Turoverov K. K., Uversky V. N. 2004. Use of the phase diagram method to analyze the protein unfolding-refolding reactions: fishing out the «invisible» intermediates. *J. Proteome Res.* 3 : 485—494.
- Ligler F. S., Sapsford K. E., Golden J. P., Shriner-Lake L. C., Taitt C. R., Dyer M. A., Barone S., Myatt C. J. 2007. The array biosensor: portable, automated systems. *Anal. Sci.* 23 : 5—10.
- Nolting B. 1999. Protein folding kinetics. Biophysical methods. Berlin-Haidelberg: Springer-Verlag. 191 p.
- Palchetti I., Laschi S., Mascini M. 2009. Electrochemical biosensor technology: application to pesticide detection. *Methods Mol. Biol.* 504 : 115—126.
- Palchetti I., Mascini M. 2008. Nucleic acid biosensors for environmental pollution monitoring. *Analyst.* 133 : 846—854.
- Piliarik M., Vaisocherova H., Homola J. 2009. Surface plasmon resonance biosensing. *Methods Mol. Biol.* 503 : 65—88.
- Salins L. L., Ware R. A., Ensor C. M., Daunert S. 2001. A novel reagentless sensing system for measuring glucose based on the galactose/glucose-binding protein. *Anal. Biochem.* 294 : 19—26.
- Shilton B. H., Flocco M. M., Nilsson M., Mowbray S. L. 1996. Conformational changes of three periplasmic receptors for bacterial chemotaxis and transport: the maltose-, glucose/galactose- and ribose-binding proteins. *JMB.* 264 : 350—363.
- Singh S. 2007. Sensors — an effective approach for the detection of explosives. *J. Hazard Mater.* 144 : 15—28.
- Spichiger-Keller U. E. 1998. Chemical sensors and biosensors for medical and biological applications. New York: Wiley-VCH. 313 p.
- Tolosa L., Gryczynsky I., Eichhorn L. R., Dattelbaum J. D., Castellano F. N., Rao G., Lakowich J. R. 1999. Glucose sensor for low-cost life-time based sensing using a genetically engineered protein. *Anal. Biochem.* 267 : 114—120.
- Tomizaki K. Y., Usui K., Mihara H. 2005. Protein-detecting microarrays: current accomplishments and requirements. *Chem-biochem.* 6 : 782—799.
- Turner A. P. 2000. Biosensors — sense and sensitivity. *Science.* 290 : 1315—1317.
- Turoverov K. K., Kuznetsova I. M. 2003. Intrinsic fluorescence of actin. *J. Fluorescence.* 13 : 41—57.
- Verkman A. S., Sellers M. C., Chao A. C., Leung T., Ketcham R. 1989. Synthesis and characterization of improved chloride-sensitive fluorescent indicators for biological applications. *Anal. Biochem.* 178 : 355—361.
- Vyas N. K., Vyas M. N., Quiocho F. A. 1988. Sugar and signal-transducer binding sites of the *Escherichia coli* galactose chemoreceptor protein. *Science.* 242 : 1290—1295.
- Vyas N. K., Vyas M. N., Quiocho F. A. 1991. Comparison of the periplasmic receptors for L-arabinose, D-glucose/D-galactose, and D-ribose. *J. Biol. Chem.* 266 : 5226—5237.

Поступила 19 V 2010

STABILITY OF SUGAR-BINDING PROTEINS: D-GALACTOSE/D-GLUCOSE-BINDING PROTEIN FROM *ESCHERICHIA COLI* AND TREHALOSE/MALTOSE-BINDING PROTEIN FROM *THERMOCOCCUS LITORALIS*

Olga V. Stepanenko,¹ O. I. Povarova,¹ A. V. Fonin,^{1, 2} Olesya V. Stepanenko¹

¹ Institute of Cytology RAS, St. Petersburg,
and ² St. Petersburg State Polytechnical University;
¹ e-mail: sov@mail.cytspb.rssi.ru

In this work we studied the structure and stability of sugar-binding proteins from mesophilic and thermophilic organisms which are of great importance for their possible use as sensing probe of biosensors aimed to glucose detection in the blood. The data obtained revealed the stabilizing effect of ligands on the structures of D-galactose/D-glucose-binding protein (GGBP) from *Escherichia coli* and trehalose/maltose-binding protein from thermophilic bacterium *Thermococcus litoralis*. It was found that TMBP posses an increased stability as its structure remains native even under heating up to 95 °C.

Ключевые слова: trehalose/maltose-binding protein, D-galactose/D-glucose-binding protein, protein stability, biosensor.