

串联亲和纯化原核表达载体的构建

魏波^{1,2#}, 廖翔^{2#}, 周围², 高原², 王羽^{1,2}, 冉金宝^{1,2}, 梁龙^{2*}, 岳俊杰^{2*},
呼和巴特尔^{1*}

¹ 内蒙古农业大学兽医学院, 呼和浩特 010018

² 军事医学科学院生物工程研究所, 北京 100071

摘要: 【目的】构建串联亲和纯化原核表达载体,用于研究细菌中(生理状态或接近生理条件下的)蛋白-蛋白相互作用。【方法】设计并合成两条串联亲和标签序列,分别可以在靶蛋白 N 端和 C 端融合 Protein G 和链亲和素结合肽(Streptavidin binding peptide, SBP) 标签;以 pUC18 载体为骨架,去除原有的阻遏蛋白基因,构建组成型表达载体 pNTAP 和 pCTAP。【结果】成功构建 N 端和 C 端标签表达载体 pNTAP 和 pCTAP,它们在大肠杆菌(*Escherichia coli*) BL21(DE3)、肠出血性大肠杆菌 O157:H7 和痢疾杆菌福氏 5 型 M90T 菌株中都可以实现表达。【结论】本实验构建的两个串联亲和纯化表达载体可以在部分革兰氏阴性细菌中表达,为研究细菌内蛋白-蛋白相互作用及致病菌毒力蛋白的作用机制奠定了基础。

关键词: 原核表达载体, 串联亲和纯化, 蛋白相互作用

中图分类号: Q93-3 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209 (2012) 03-0374-07

研究蛋白质间的相互作用是解释细胞中各种生命活动的重要手段,通过深入理解蛋白质相互作用来研究蛋白质组相互作用网络是揭示生命活动奥秘的前提。随着蛋白质组学研究技术的发展,串联亲和纯化技术(Tandem affinity purification, TAP)在蛋白质相互作用研究领域的应用也日益广泛。此种方法的优点体现在^[1-2]: (1) 两步洗脱的条件都是温和的,减少了与诱饵蛋白相互作用分子损失; (2) 通过基因水平的操作,可以在生理状态或接近生理状态表达融合蛋白,从而研究诱饵蛋白在生理条件下的相互作用; (3) 经过两步充分的洗脱,得到的融合蛋白与其相互作用分子背景低,假阳性低。串联亲和纯化技术作为一个高效的蛋白-蛋白相互作用研究技

术,在多个生物体系中得到了成功的应用,例如研究内源性抗肿瘤药物多蛋白复合体纯化^[3];还有在拟南芥中利用 TAP 研究蛋白-蛋白相互作用^[4]及在恶性疟原虫中利用 TAP 研究翻译延伸因子复合物^[5]等等。尽管串联亲和纯化在多个生物体系中得到了成功的应用,但在原核中的研究较少^[6]或只在某种细菌菌株中应用^[7]。因此,本实验主要目的是构建可以广泛应用在原核生物中的串联亲和纯化表达载体,为研究细菌内蛋白-蛋白相互作用奠定基础。

串联亲和纯化是将两个标签串联与靶蛋白融合进行亲和纯化的过程。常用的串联标签包括 Protein G(即 ProtG) 标签、Protein A 标签、6 X His 标签、Flag 标签、StrepII 标签、SBP 标签等等^[8]。本课题设计的

基金项目: 国家自然科学基金(30970122)

* 通信作者。Tel: +86-10-66948874; Fax: +86-10-66948844; E-mail: yue_junjie@126.com, LL@bmi.ac.cn, hhbte@yahoo.com.cn

作者简介: #对本文有同等贡献。魏波(1984-),女,山东章丘人,在读博士研究生,研究方向是病原微生物蛋白质组学, E-mail: weiboweibo000000@163.com; 廖翔(1974-),男,江西定南人,助理研究员,博士,研究方向是微生物蛋白质组学, E-mail: liaox@nic.bmi.ac.cn

收稿日期: 2011-09-29; 修回日期: 2011-12-20

两个串联标签组成:ProG + SBP 标签;两标签中间用烟草花叶病毒蛋白酶切割位点 (TEV cleavage site, TEV) 连接。ProG 标签蛋白与 IgG 琼脂糖珠结合通过 TEV 酶的切割洗脱诱饵蛋白,SBP 标签蛋白与链亲和素琼脂糖珠结合通过生物素的竞争性结合洗脱纯化产物。另外,在串联标签的下游加了绿色荧光标签 GFPuv,作为检测融合蛋白是否成功表达的标志物。考虑到亲和标签可能会影响靶蛋白的天然结构,本文设计构建两个表达载体 pNTAP 和 pCTAP,将亲和标签分别置于靶蛋白的 N 末端与 C 末端。pNTAP 和 pCTAP 在大肠杆菌 (*Escherichia coli*) BL21 (DE3)、肠出血性大肠杆菌 (*Enterohemorrhagic Escherichia coli*, EHEC) O157:H7 菌株和痢疾杆菌 (*Shigella flexneri*) 福氏 5 型 M90T 菌株中均可以表达。串联亲和纯化表达载体可以为进一步通过研究致病菌中毒力蛋白的相互作用,进而为诠释致病菌的致病机制奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒:大肠杆菌 DH5 α 、BL21 (DE3) 感受态细胞购自天根生物技术公司。肠出血性大肠杆菌 O157:H7 菌株及痢疾杆菌福氏 5 型 M90T 菌株本实验室保存。质粒 pUC18 及 pMDTM18-T 载体购自 TaKaRa 公司。

1.1.2 培养基及培养条件:LB 培养基配方参考文献 [9]。固体和液体在需要时加入氨苄青霉素至 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。37 $^{\circ}\text{C}$ 摇床 200 r/min 培养。

1.1.3 主要试剂和仪器:T4 DNA 连接酶购自 New England Biolabs 公司;限制性内切酶、*Taq* DNA 聚合酶、LA *Taq* DNA 聚合酶购自 TaKaRa 公司。普通质粒小提试剂盒、琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒、普通 DNA 纯化试剂盒购自天根生化科技有限公司。生化药品为进口分析试剂纯。Western 试剂:彩色预染蛋白 Marker 购自 New England Biolabs 公司;Anti-GFPuv 单克隆抗体购自 R&D 公司;辣根酶标记兔抗山羊 IgG 购自中衫金桥公司。荧光显微镜;荧光共聚焦显微镜;生物安全柜;PCR 扩增仪 9700 型;BIO-RAD 公司电转仪。

1.2 pCTAP 与 pNTAP 表达载体的构建

1.2.1 pCTAP 与 pNTAP 表达载体的设计:串联亲

和标签由下述肽段组成:两个蛋白 G (Prot G)、两个 TEV 酶切位点、链亲和素结合肽 (SBP) 和绿色荧光蛋白 (GFPuv)。Prot G 能高效结合免疫球蛋白 IgG 进行特异性的亲和纯化,SBP 能高效结合链亲和素进行亲和纯化,GFP 作为鉴定和监测蛋白表达的标记。考虑到亲和标签可能会破坏靶蛋白的天然结构,本文设计构建两个表达载体,将亲和标签置于靶蛋白的 N 末端与 C 末端,分别命名为 pNTAP 及 pCTAP 表达载体。载体构建示意图见图 1。以 pUC18 为载体骨架,用 *Afl* III 与 *Nar* I 酶切去除 LacZ、多克隆位点及 Lac 启动子区,只留下氨苄青霉素抗性基因和复制原点。将启动子 *Tac*、多克隆位点 (MCS,包括 *Eco*R I、*Kpn* I、*Xba* I、*Pst* I、*Sph* I) 及 *Afl* III 与 *Nar* I 酶切位点整合到标签序列,通过全基因从头合成获得。将 pUC18 载体与合成的标签序列分别经过 *Afl* III 与 *Nar* I 双酶切,回收目的片段,连接后转化大肠杆菌,得到含 pNTAP 和 pCTAP 表达载体的转化子。

1.2.2 合成序列的密码子优化:Prot G 与 SBP 的基因序列引自克隆载体 PMK33-NTAP (GS)/CTAP (SG)^[10]; *Tac* 启动子的 SD 序列引自载体 pGEX-2TK;GFPuv 标签序列引自克隆载体 pGFPuv;合成融合序列全长为 1410 bp。合成序列用 JCat Codon Adaptation Tool 软件进行密码子优化,应用在原核细胞中的优势密码子,减少稀有密码子造成的外源蛋白低表达甚至不表达的发生,包括标签序列中的多克隆位点序列也用同义密码子替换。

1.2.3 标签序列的合成及表达载体的构建:分别将 N 端和 C 端标签序列的正反链拆分为 24 对部分重叠互补的 60 nt 寡核苷酸片段进行合成,由聚合酶循环组装反应拼接成全长模板,再通过 PCR 扩增得到 1410 bp 的目的片段。各引物序列见表 1。

琼脂糖凝胶电泳回收 PCR 产物与 pMDTM18-T 载体连接后转化大肠杆菌,挑取克隆进行测序分析,从测序正确的克隆中提取质粒用 *Afl* III 与 *Nar* I 进行双酶切,琼脂糖凝胶电泳回收标签序列,与经过相同酶切处理的 pUC18 质粒载体骨架连接,转化大肠杆菌 DH5 α 。对转化子进行测序鉴定,选取得到含正确序列 pNTAP 与 pCTAP 表达载体的转化子。

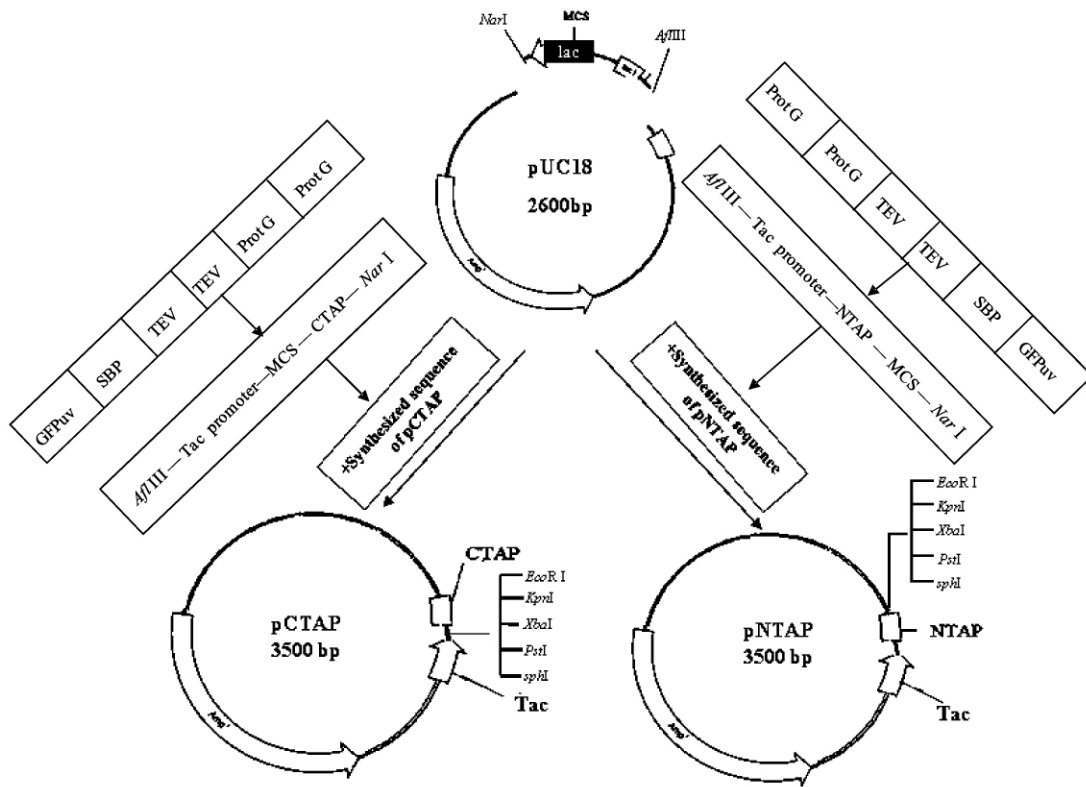


图1 TAP 表达载体串联标签设计及载体构建图; NTAP 与 CTAP 标签的设计图; pNTAP 与 pCTAP 中的合成序列;载体 pNTAP 与 pCTAP 的构建示意图

Fig.1 Tandem tags design of NTAP and CTAP , construction map of expression vectors pNTAP and pCTAP.

表 1 引物序列及所加入的酶切位点

Table 1 Primer sequence and restriction site

Gene	Size /bp	Oriteiation	Primer Sequence(5'→3')	Restriction site
pCTAP synthesized Sequence	1410	+	<u>ACATGTATGCATTTGACAATTAATCATCG</u>	Afl III
		-	CTAGGGGGCGCCGTTGTATTATTATTAT	Nar I
pNTAP synthesized Sequence	1410	+	<u>ACATGTATGCATTTGACAATTAATCATCGG</u>	Afl III
		-	TCATGGGGCGCCCTCATCATCAGCATGCCTG	Nar I

“+” indicated the upstream primers, “-” indicated the downstream primers , letters with underlined indicated the restriction site

1.2.4 转化 BL21 (DE3)、EHEC (O157:H7) 及 *Shigella flexneri* 感受态细胞:从 DH5 α 转化子中提取 pCTAP 与 pNTAP 质粒,分别用 CaCl₂ 法转化大肠杆菌 BL21 (DE3),用电击法转化^[11] 肠出血性大肠杆菌(EHEC) O157:H7 和痢疾杆菌野生株 M90T(电击参数:BioRad 预设程序,Bacteria 1,1.8 kV,约 5 ms)。

1.3 绿色荧光蛋白的显微镜检测

用荧光显微镜检测转化子是否表达绿色荧光蛋白,以此鉴定串联亲和表达载体能否正常表达。绿色荧光蛋白 GFPuv 的最大激发波长为 395 nm,最大发射波长 509 nm。用倒置荧光显微镜的紫外光激

发,观察是否发出绿色荧光。对荧光较弱的 pCTAP 载体用荧光共聚焦显微镜进行加强激发,观察荧光。

1.4 Western 印迹鉴定串联亲和和标签蛋白的表达

1.4.1 蛋白样品制备:将过夜培养的菌按 1:100 转接至 5 mL LB(氨苄抗性),37 $^{\circ}$ C、200 r/min 培养。收集 1 mL 菌液菌体制备全菌样品(WC, whole cell lysate)。利用超声破菌(超 2 s 停 2 s,功率 30%,有效超声时间 5 min)分别收集上清样品(SN, supernatant)和沉淀样品(P, pellet)。

1.4.2 Western 印迹分析^[9]:一抗为山羊抗 GFPuv 单克隆抗体,二抗为辣根过氧化物酶偶联兔抗山羊 IgG,利用化学发光法显色,压片显影。

2 结果

2.1 N 端和 C 端标签序列的从头合成

利用聚合酶循环组装反应拼接成全长模板,再通过 PCR 扩增得到 1410 bp 的目的片段。琼脂糖凝胶电泳回收片段与 pMDTM18-T 载体连接后转化大肠杆菌,挑取克隆进行测序分析,结果表明 1410 bp 的标签序列与理论序列完全一致。

将含标签序列的质粒与 pUC18 质粒分别用 *Afl* III 与 *Nar* I 进行双酶切,琼脂糖凝胶电泳分别回收标签序列和载体骨架序列片段,连接后转化大肠杆菌 DH5 α 。提取质粒进行测序表明序列完全正确(图略)。将含 N 端和 C 端串联亲和纯化表达载体分别命名为 pNTAP 和 pCTAP。

2.2 TAP 表达载体可以在大肠杆菌 BL21 (DE3) 细菌中表达

将质粒 pNTAP 和 pCTAP 转化大肠杆菌工程菌株 BL21 (DE3),挑取转化子培养至对数中期收集菌体,通过在荧光共聚焦显微镜下紫外光激发观察是否有绿色荧光,检测 TAP 表达载体是否可以在大肠杆菌中表达。从图 2 可见,pNTAP/BL21 (DE3) 紫外光激发下能观察到绿色荧光,表明含 N 端标签的

TAP 表达载体可以在大肠杆菌中正常表达。pCTAP/BL21 (DE3) 在正常激发强度下没有绿色荧光,而在加强激发强度能观察到微弱的绿色荧光,表明含 C 端标签的 TAP 表达载体在大肠杆菌中只有微弱的表达。这可能是由于 pCTAP 载体中标签序列的起始密码子与控制翻译起始的 SD 序列相隔几十个核苷酸,不能有效的起始翻译表达蛋白,只是很低水平的渗漏型表达;只有将靶蛋白基因序列插入 SD 序列下游、标签序列上游适当位置,才能实现靶蛋白与串联亲和标签的正常表达。但是观察 pCTAP-CesT/BL21 (DE3) 的绿色荧光,我们得出 pCTAP 在融合目的蛋白后是可以正常表达的。以上结果表明 N 端和 C 端串联亲和标签表达载体均可在大肠杆菌中表达。

2.3 pNTAP 表达载体在大肠杆菌 O157:H7 细菌中也可以正常表达

将 pNTAP、pCTAP 质粒转化肠出血性大肠杆菌野生株 O157:H7,用荧光显微镜观察转化子是否表达绿色荧光蛋白。结果表明(图 3),pNTAP/O157:H7 大量表达绿色荧光蛋白,pCTAP/O157:H7 的 GFPuv 标签蛋白由于表达量较低而检测不到明显的绿色荧光。这个结果表明 N 端串联亲和标签表达载体在大肠杆菌 O157:H7 野生株中能正常表达。

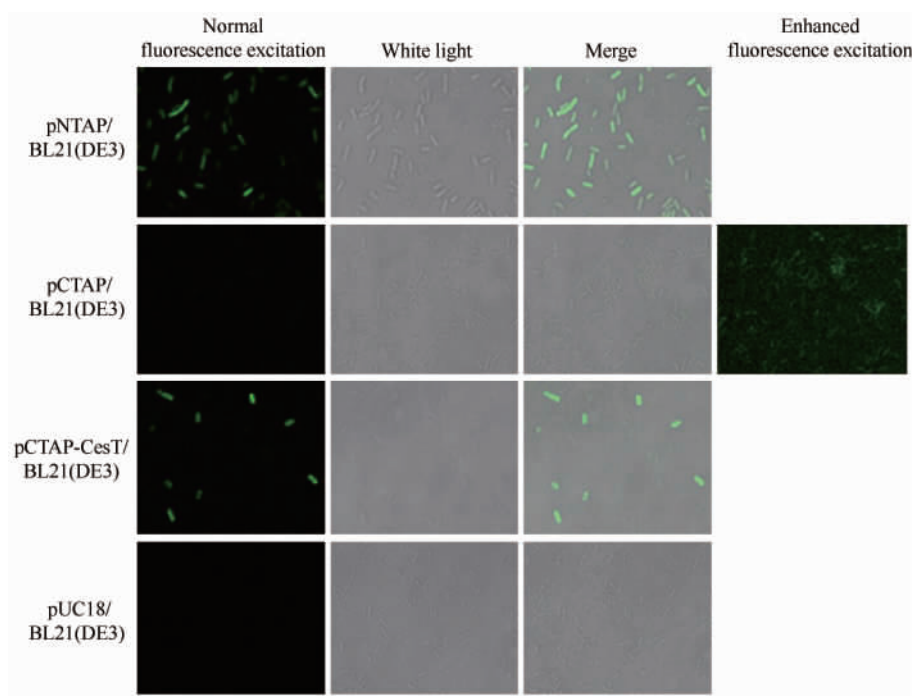


图 2 pNTAP 及 pCTAP 质粒中 GFPuv 在大肠杆菌 BL21 (DE3) 菌株中表达的荧光观察

Fig. 2 Detection of green fluorescence of GFPuv in pNTAP/BL21 (DE3) and pCTAP/BL21 (DE3) by fluorescence confocal microscopy.

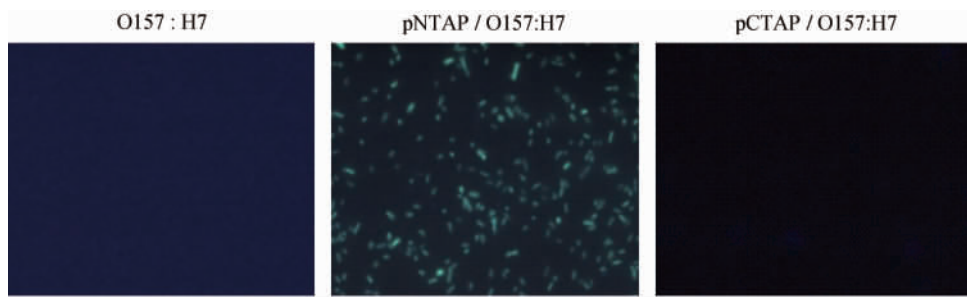


图3 pNTAP 及 pCTAP 质粒中 GFPuv 在大肠杆菌 O157:H7 菌株中表达的荧光观察

Fig. 3 Detection of green fluorescence of GFPuv in pNTAP/O157:H7 and pCTAP/O157:H7 by fluorescence microscope.

2.4 TAP 标签在大肠杆菌和痢疾杆菌中主要表达为可溶性蛋白

将 pNTAP、pCTAP 质粒转化痢疾杆菌野生株 M90T, 得到转化子 pNTAP/M90T 和 pCTAP/M90T。通过 Anti-GFPuv 单克隆抗体进行 Western 印迹检测标签蛋白在 M90T 中是否表达。结果表明(图 4), N

端和 C 端标签蛋白在 M90T 中均可以表达, 并且主要存在于可溶性的上清中。标签蛋白在 BL21 (DE3) 和 O157:H7 中也是表达为可溶性蛋白。与荧光实验结果一致的是: N 端标签为正常表达, C 端标签为渗漏型表达。沉淀样品中检测到微量标签蛋白可能是由于未完全破碎的菌体导致, 不是标签蛋白本身不可溶。这些结果表明, N 端和 C 端串联亲和标签蛋白在 3 种细菌中均可以表达, 而且表达为可溶性蛋白。另外, 构建的伴侣蛋白表达载体 pNTAP-GroEL 和 pCTAP-GroEL 的融合表达蛋白在 O157:H7 中也是可以表达, 并且为可溶性表达。

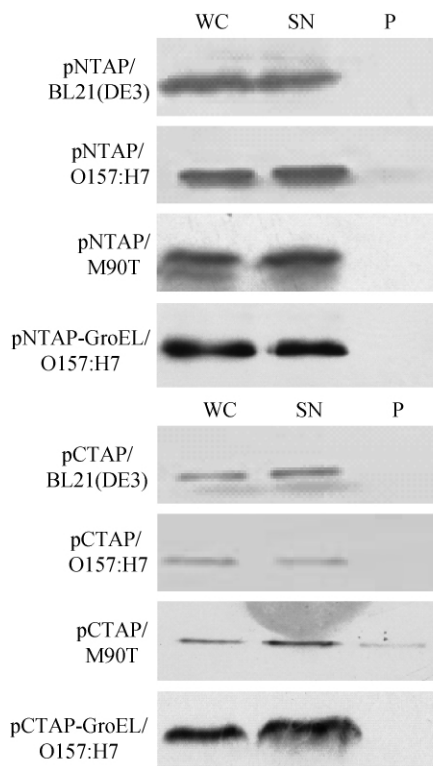


图4 pNTAP 及 pCTAP 质粒中 GFPuv 在大肠杆菌 BL21 (DE3)、O157:H7 和痢疾杆菌福氏 5 型菌株中表达的免疫印迹分析

Fig. 4 Western blotting of expressed GFPuv tag proteins from pNTAP and pCTAP in different bacterias. 'WC' represents whole cell lysate; 'SN' represents supernatant; 'P' represents precipitate; Anti-GFPuv were used for detection of GFPuv tag.

3 讨论

串联亲和纯化技术是由 Rigaut 等人建立的, 依靠分子克隆技术在体内表达含有串联标签的融合蛋白, 通过亲和标签与相应亲和珠的相互作用进行诱饵蛋白的分离纯化^[12]。由于串联亲和纯化过程中两步洗脱条件温和及可以在生理状态或接近生理状态表达融合蛋白等优点, 已经广泛地应用于蛋白质-蛋白质相互作用的研究, 尤其是复合体的研究。为了利用串联亲和纯化方法研究致病细菌内致病相关蛋白的复合物, 我们构建了可以在部分革兰阴性菌中表达的串联亲和纯化表达载体。

为了提高 TAP 纯化产物的量和特异性, 我们选择 Prot G 与 SBP 两个标签蛋白进行串联, 并且在两个标签蛋白中间加了两个 TEV 酶切位点以提高 TEV 酶的切割效率。另外, 我们在串联标签的下游加了绿色荧光标签 GFPuv, 用途有两个: 第一, 通过检测绿色荧光定性的鉴定表达载体是否表达; 第二, 用 Anti-GFPuv 抗体初步定量检测靶蛋白的表达。考虑到减少标签蛋白对靶蛋白表达的影响, 我们分

别设计了 N 端 TAP 标签序列和 C 端 TAP 标签序列,并构建了相应的串联亲和纯化表达载体 pNTAP 与 pCTAP。本课题设计选择了 Tac 启动子,它可以应用在大多数原核生物表达体系中,是一组由 Lac 和 trp 启动子人工构建的杂合启动子,受阻遏蛋白的负调节,我们将原载体 pUC18 中的 LacZ 阻遏蛋白切除,目的是使靶蛋白组成型表达,而不是通过诱导进行过表达。通过荧光鉴定得出,pNTAP 空载体标签蛋白可以正常表达及 pCTAP 空载体标签蛋白表达量较低,而 pCTAP-CesT 可以正常观察到绿色荧光,表明我们设计的标签、启动子的组成是合理的;并且 Western 印迹结果表明 NTAP、CTAP 标签蛋白在 *E. coli* BL21 (DE3)、EHEC O157:H7、*Shigella flexneri* M90T 菌均以可溶形式表达,同时伴侣蛋白 GroEL 表达载体 pNTAP-GroEL 和 pCTAP-GroEL 的融合表达蛋白在 O157:H7 中也是可溶性表达。

目前,我们已将大肠杆菌 O157:H7 中分子伴侣蛋白基因 *cesT*、*cesD* 及 *groEL* 分别成功构建在串联亲和纯化表达载体 pNTAP 和 pCTAP 中,并且均可以在 *E. coli* BL21 (DE3)、EHEC O157:H7 中正常表达和以可溶形式表达。我们利用串联亲和纯化的实验方法得到了 pNTAP-GroEL 蛋白复合物,最终产物为高纯度的 GroEL-TAP 与天然 GroEL 形成的嵌合型多聚体复合物^[13]。以上研究工作为下一步寻找 EHEC O157:H7 中一些致病相关的蛋白复合物,从而为解释致病菌的致病机制奠定基础。

参考文献

- [1] Puig O, Caspary F, Rigaut G, Rutz B, Bouveret E, Bragado-Nilsson E, Wilm M, Seraphin B. The tandem affinity purification (TAP) method: a general procedure of protein complex purification. *Methods*, 2001, 24(3): 218-229.
- [2] 郭龙华,王建,杨晓明,贺福初. 串联亲和纯化技术在哺乳动物体系中的应用. *生命化学 (Chemistry of Life)*, 2005, 26(2): 175-178.
- [3] Rubio V, Shen Y, Saijo Y, Liu Y, Gusmaroli G, Dinesh-Kumar SP, Deng XW. An alternative tandem affinity purification strategy applied to Arabidopsis protein complex isolation. *The Plant Journal*, 2005, 41(5): 767-778.
- [4] Van Leene J, Stals H, Eeckhout D, Persiau G, Van De Slijke E, Van Isterdael G, De Clercq A, Bonnet E, Laukens K, Remmerie N, Henderickx K, De Vijlder T, Abdelkrim A, Pharazyn A, Van Onckelen H, Inze D, Witters E, De Jaeger G. A tandem affinity purification-based technology platform to study the cell cycle interactome in Arabidopsis thaliana. *Molecular & Cellular Proteomics*, 2007, 6(7): 1226-1238.
- [5] Takebe S, Witola WH, Schimanski B, Gunzl A, Ben Mamoun C. Purification of components of the translation elongation factor complex of Plasmodium falciparum by tandem affinity purification. *Eukaryotic Cell*, 2007, 6(4): 584-591.
- [6] Gully D, Moinier D, Loiseau L, Bouveret E. New partners of acyl carrier protein detected in *Escherichia coli* by tandem affinity purification. *FEBS Letters*, 2003, 548(1-3): 90-96.
- [7] Stingl K, Schauer K, Ecobichon C, Labigne A, Lenormand P, Rousselle J. C, Namane A, de Reuse H. In vivo interactome of Helicobacter pylori urease revealed by tandem affinity purification. *Molecular Cellular Proteomics*, 2008, 7(12): 2429-2441.
- [8] Xu X, Song Y, Li Y, Chang J, Zhang H, An L. The tandem affinity purification method: an efficient system for protein complex purification and protein interaction identification. *Protein Expression and Purification*, 2010, 72(2): 149-156.
- [9] Sambrook J, Russell DW. 分子克隆实验指南. 金冬雁,黎孟枫,等译. 第2版. 北京:科学出版社, 1998: 888-897.
- [10] Burckstummer T, Bennett KL, Preradovic A, Schutze G, Hantschel O, Superti-Furga G, Bauch A. An efficient tandem affinity purification procedure for interaction proteomics in mammalian cells. *Nature Methods*, 2006, 3(12): 1013-1019.
- [11] Liebl W, Bayerl A, Schleifer KH. High efficiency electroporation of intact Corynebacterium glutamicum cells. *FEMS Microbiology Letters*, 1989, 65(3): 299-304.
- [12] Rigaut G, Shevchenko A, Rutz B, Wilm M, Mann M, Seraphin B. A generic protein purification method for protein complex characterization and proteome exploration. *Nature Biotechnology*, 1999, 17(10): 1030-1032.
- [13] 魏波,廖翔,周围,王羽,李玉霞,高原,岳俊杰,梁龙,呼和巴特尔. 利用串联亲和纯化技术分离大肠杆菌 GroEL 蛋白复合物. *微生物学通报 (Microbiology China)*, 2011, 38(12): 1848-1854.

Construction of prokaryotic expression vectors for tandem affinity purification

Bo Wei^{1 2#}, Xiang Liao^{2#}, Wei Zhou², Yuan Gao², Yu Wang^{1 2}, Jinbao Ran^{1 2}, Long Liang^{2*}, Junjie Yue^{2*}, Bateer Huhe^{1*}

¹ College of Veterinary Medicine, Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot 010018, China

² Institute of Biotechnology, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100071, China

Abstract: [Objective] To construct prokaryotic expression vectors suitable for tandem affinity purification to study protein-protein interactions in bacteria. [Methods] Two tandem affinity tag sequences, including the coding sequences of Protein G and streptavidin binding protein (SBP), as the N- and C-terminus of fusion proteins were designed and de novo synthesized. Constitutive expression vectors pNTAP and pCTAP were constructed using pUC18 as the backbone deleted of the *lacI* gene. [Results] Two expression vectors pNTAP and pCTAP were successfully constructed. pNTAP showed substantial expression of the built-in tag protein GFPuv not only in *Escherichia coli* BL21 (DE3) but also in enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 and *Shigella flexneri* 5a. [Conclusion] Of the two recombinant expression vectors successfully constructed, pNTAP can express the model protein for tandem affinity purification and could be used for studies of protein-protein interactions in some gram-negative pathogenic bacteria such as *Escherichia coli* and *Shigella flexneri*.

Keywords: prokaryotic expression vector, tandem affinity purification, protein-protein interactions

(本文责编:王晋芳)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (30970122)

* Corresponding authors. Tel: +86-10-66948874; Fax: +86-10-66948844; E-mail: yue_junjie@126.com, LL@nic.bmi.ac.cn, hhbte@yahoo.com.cn

#These authors contributed equally to this work.

Received: 29 September 2011/Revised: 20 December 2011

《微生物学报》投稿方式

2012年3月修订

从2006年起,本刊采用“稿件远程处理系统”,全面实行网上投稿、网上审稿、网上查询等方式进行工作。欢迎广大作者通过登陆本刊网站进行投稿和查询。

- (1) 远程投稿:请先登陆本刊网站 <http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>, 点击“作者投稿”。如果您是第一次通过“远程”给本刊投稿,请先进行“注册”,注册成功后再进行投稿。如果曾在本刊网站投过稿,则可直接投稿。如果忘了用户名和密码,请联系本刊编辑部找回登录口令。
- (2) 收稿回执:编辑部看到远程投稿后,当日或者次日给作者发“收稿回执”,通知作者投稿成功。
- (3) 编辑部内审:编辑看到远程投稿后,还要对稿件进行内审。内审会有2个结果,直退或受理,请接到“受理通知”的作者再补交其它材料(纸样介绍信和稿件、受理费)。
- (4) 介绍信:为了保护知识产权,请作者提供“研究内容所属单位”出具的介绍信(请到本刊网页的“下载专区”中下载“介绍信”模板),要求责任作者(即通信作者)亲笔签名,并盖有公章。
- (5) 受理费:150元(2011年3月由原来的100元调为150元)。