

链球菌噬菌体裂解酶在大肠杆菌中的表达、纯化及活性检测

陈蔚青¹, 王晓枫², 王普², 张德勇¹, 陈虹¹, 柯薇¹, 陆胤¹, 张建芬¹

1 浙江树人大学生物与环境工程学院, 杭州 310015

2 浙江工业大学药学院, 杭州 310032

摘要: 噬菌体裂解酶是噬菌体产生的细胞壁水解酶, 通过水解宿主菌细胞壁使子代噬菌体释放, 在体外能高效且特异性地杀死细菌。本研究旨在克隆和表达链球菌噬菌体裂解酶 PlyC, 并测定其生物学活性。利用 PCR 方法扩增 PlyC 的 2 条肽链 PlyCA 和 PlyCB, 构建表达载体 pET-32a(+)-PlyCA 和 pET-32a(+)-PlyCB, 分别转化至大肠杆菌 BL21(DE3) 中, 以 0.7 mmol/L IPTG 在 30 °C 诱导 7 h 实现了高效表达, SDS-PAGE 分析表明 PlyCA 和 PlyCB 表达量均可达菌体总蛋白的 30% 以上。采用 Ni²⁺-NTA 亲和层析法纯化目的蛋白, 其纯度大于 95%。用透析复性方法得到目的产物重组链球菌噬菌体裂解酶 PlyC, 以浊度法和平板计数法检测其体外抗菌效果, 扫描电子显微镜观察裂解酶作用前后细菌细胞形态变化。结果表明重组 PlyC 能特异性裂解化脓性链球菌(A 组β-溶血性链球菌), 以 4 μg/mL 浓度作用于 OD₆₀₀ 为 0.56 的菌液 60 min 后杀菌率达 99.6%, 扫描电镜观察结果显示该酶作用于菌体后, 链球菌细胞裂解, 呈碎片状态。本研究为开发一种新型、高效的链球菌感染疾病治疗药物打下了基础。

关键词: 噬菌体裂解酶, 链球菌, 表达, 纯化, 活性

Expression, purification and characterization of bacteriophage lysin of *Streptococcus* in *Escherichia coli*

Wei Qing Chen¹, Xiao Feng Wang², Pu Wang², Deyong Zhang¹, Hong Chen¹, Wei Ke¹, Yin Lu¹, and Jianfen Zhang¹

1 College of Biological and Environmental Engineering, Zhejiang Shuren University, Hangzhou 310015, China

2 College of Pharmaceutical Science, Zhejiang University of Technology, Hangzhou 310032, China

Abstract: Lysins are murein hydrolases produced by bacteriophage that act on the cell wall of host bacteria to release progeny phages. Research indicated that lysins could kill bacteria effectively and specifically *in vitro*. To prepare recombinant bacteriophage lysin of *Streptococcus* (PlyC) and analyze its biological activity, we obtained two genes of PlyC named PlyCA and PlyCB by PCR amplification and inserted them into pET-32a(+), then transformed the recombinant expression vectors pET-32a(+)-PlyCA and pET-32a(+)-PlyCB into *E. coli* BL21(DE3) respectively. After induction with 0.7 mmol/L IPTG at 30 °C for 7 h, PlyCA and PlyCB were successfully expressed, SDS-PAGE analysis determined that they all constituted above 30% of the total cell proteins. After

Received: May 19, 2009; **Accepted:** June 26, 2009

Supported by: Science and Technology Planning Project of Zhejiang Province, China (No. 2007C33002).

Corresponding author: Pu Wang. Tel: +86-571-88320389; E-mail: wangpu@zjut.edu.cn

Wei Qing Chen. Tel: +86-571-88296952; Fax: +86-571-88297097; E-mail: cwq135790@sina.com

浙江省科技计划项目(No. 2007C33002)资助。

Ni²⁺-NTA affinity chromatography, the purity was more than 95%. With the denaturation and protein refolding, we gained the recombinant PlyC. To determine its biological activity, we adopted turbidimetry and plate count method. Before and after lysis treatment, the cell morphology was studied by scanning electron microscopy (SEM). The results showed that the recombinant PlyC could specifically cleavage *Streptococcus pyogenes* (group A β -hemolytic streptococci). Under the incubation time of 60 min with 4 μ g/mL PlyC in *Streptococcus pyogenes* dilution which OD_{600} was 0.56, the germicidal effect was up to 99.6%, while SEM observations showed that cell wall cracked and presented cell debris. This finding laid the foundation for the further study and achieving an effective treatment for streptococcal infection.

Keywords: bacteriophage lysis, *Streptococcus*, expression, purification, activity

链球菌属(*Streptococcus* sp.)细菌为革兰氏阳性菌,广泛分布于自然界,其中使人致病的链球菌主要为A组 β -溶血性链球菌(group A β -hemolytic streptococci),又称为化脓性链球菌(*Streptococcus pyogenes*),可引起败血症、咽峡炎、猩红热、肾小球肾炎和心内膜炎等临床疾病^[1]。虽然抗生素的应用使该类疾病得到了有效的控制,但随着抗菌药物的广泛应用,耐药性细菌大量出现。细菌的耐药性已成为现代医学中的一个非常严峻的问题^[2-3]。

近年来,噬菌体裂解酶(Bacteriophage lysis)作为一种新的治疗手段开始受到人们关注^[4-5]。裂解酶是噬菌体在感染细菌后期表达的一类细胞壁水解酶,该酶通过水解细菌细胞壁肽聚糖上糖与肽间的酰胺键或肽内氨基酸残基间的连接键而使细菌裂解,从而释放出子代噬菌体用于感染其他细菌^[6-7]。噬菌体裂解酶具有较高的特异性,仅攻击特定细菌,因此该酶不影响无害或有益的人体寄生菌,也不影响其他细胞。裂解酶作为新型抗菌药物具有一定的优势^[8]。

本研究在大肠杆菌 BL21(DE3)中分别高效表达了构成链球菌噬菌体裂解酶 PlyC 的 2 条肽链 PlyCA 和 PlyCB,表达产物经 Ni²⁺-NTA 亲和层析纯化、透析复性后得到能特异性裂解具有强致病力的化脓性链球菌的重组 PlyC,为进一步研究并得到一种新型、高效的链球菌感染疾病治疗药物奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 主要实验材料

1.1.1 质粒及菌株

大肠杆菌 BL21(DE3) (*Escherichia coli* BL21 (DE3)), 大肠杆菌 DH5 α (*Escherichia coli*(DH5 α)), 普通变形杆菌(*Proteus vulgaris*)、蜡状芽孢杆菌(*Bacillus cereus*)、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)、C

组链球菌(group C streptococci)C1 以及 C1 链球菌噬菌体、质粒 pET-32a(+)为本室保存。化脓性链球菌(*Streptococcus pyogenes*)由浙江省疾控中心惠赠。

1.1.2 酶、载体、引物和主要试剂

扩增组成链球菌噬菌体裂解酶 PlyC 两条肽链 PlyCA 和 PlyCB 基因的引物(表 1)由上海生工生物工程技术服务有限公司合成,其上下游引物分别加入 *Nde* I 和 *Xho* I 酶切位点(下划线标示)。限制性内切酶、T4 DNA 连接酶、*Taq* 酶等分子生物学工具酶购自北京博大泰克生物基因技术有限责任公司。PCR 产物纯化试剂盒、IPTG、X-gal、低分子量标准蛋白、氧化型谷胱甘肽和还原型谷胱甘肽等购自上海泽衡生物技术有限公司。Ni²⁺-NTA 亲和层析柱购自 GenScript 公司。其他化学试剂均为进口或国产分析纯试剂。

表 1 克隆目的基因 *PlyCA* 和 *PlyCB* 的引物

Table 1 primers for cloning of target genes

Genes	Primers	Primer sequences (5'-3')
<i>PlyCA</i>	Forward	GGAATTCCATATGAGTAAGAAGTATACA CAACAAC
	Reverse	CCGCTCGAGTCATTTAAATGTTATCAAAC CAGTTAGT
<i>PlyCB</i>	Forward	GGAATTCCATATGATGAGCAAGATTAATG TAAACGTAG
	Reverse	CCGCTCGAGTCACCTTTTCATAGCCTTTC TGATAGCC

1.2 方法

1.2.1 链球菌噬菌体裂解酶基因的克隆及表达载体的构建

提取链球菌噬菌体基因组,以基因组为模板扩增链球菌噬菌体裂解酶基因。PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳鉴定、回收、纯化后用 *Nde* I 和 *Xho* I 双酶切修饰,用 T4 DNA 连接酶连接到同样经过 *Nde* I 和 *Xho* I 双酶切的 pET-32a(+)质粒上,构建重组表达载体 pET-32a(+)-PlyCA 和 pET-32a(+)-PlyCB。转化后

经提取质粒、PCR 和双酶切鉴定, 筛选阳性克隆进行序列分析。

1.2.2 重组蛋白 *PlyCA* 和 *PlyCB* 在大肠杆菌 BL21(DE3) 中的表达及条件优化

将重组质粒转化到 BL21(DE3) 感受态细菌中。转化的 BL21(DE3) 在 LB 培养基中活化过夜后, 接种至含有 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 氨苄青霉素的培养基中, 对诱导条件进行优化, 考察不同诱导剂量、诱导温度、诱导时间、诱导时机及培养基对目的蛋白表达量的影响, 每个条件做 3 次平行重复。经 12% SDS-PAGE 和光密度扫描检测, 确定最适诱导条件。

1.2.3 重组蛋白的纯化和复性

取 IPTG 诱导产物 300 mL, 4 $^{\circ}\text{C}$ 离心收集菌体, 在冰浴中超声破菌, 镜检检验重组蛋白的表达形式。采用 GenScript 公司的 Ni^{2+} -NTA 蛋白质纯化柱纯化目的蛋白, 选择不同浓度的咪唑(50~250 mmol/L)梯度洗脱, 具体操作参照其说明书并参考文献[9], 纯化后的蛋白进行 12% SDS-PAGE 分析, 测定纯化效率, 确定洗脱液的最佳咪唑浓度。

将纯化后的 *PlyCA* 和 *PlyCB* 在低于 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 浓度下以 1:8 的比例混合^[10](Bradford 法^[11]测定蛋白质含量)。在起始透析液(100 mL, 5 mmol/L PB, 1 mmol/L EDTA, 8 mol/L 尿素, 2 mmol/L 还原型谷胱甘肽, 0.2 mmol/L 氧化型谷胱甘肽, pH 6.1)中进行缓慢透析复性, 以 1 滴/s 的速度滴加复性液(2 mmol/L 还原型谷胱甘肽, 0.2 mmol/L 氧化型谷胱甘肽, 5 mmol/L PB, 1 mmol/L EDTA, pH 6.1)至 1L, 4 $^{\circ}\text{C}$ 搅拌透析过夜, 尿素降至 0.8 mol/L。

1.2.4 *PlyC* 的活性检测

将在血琼脂培养基上划线培养 2 d 的化脓性链球菌菌苔用 5 mmol/L PB(pH 6.1)洗脱, 调整其浊度, 测定初始 OD_{600} 后等体积分装, 加入诱导表达后用镍柱亲和层析方法纯化并经过复性处理的重组 *PlyC* 至其浓度为 2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴孵育 1 h, 定时测定菌液 OD_{600} , 检测对化脓性链球菌的裂解情况。同时观测 *PlyC* 对 C1 链球菌、枯草芽孢杆菌、蜡状芽孢杆菌、大肠杆菌等的裂解作用。同法测定 20、10、4、1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 等不同作用浓度 *PlyC* 对化脓性链球菌的裂解情况。当检测发现 OD_{600} 数值不再下降时, 将

样品稀释涂布于血琼脂平板上, 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 2 d, 观察菌落生长情况, 以仅加 PB 缓冲液的菌液作为对照。每个样品设 3 个平行组, 重复试验 2 次, 结果取平均值, 计算杀菌率。

将载有裂解酶作用前后的化脓性链球菌样品用 2.5%戊二醛 4 $^{\circ}\text{C}$ 固定过夜, 0.1 mol/L PB(pH 7.0)漂洗样品 3 次, 每次 15 min, 然后用 1%锇酸固定 2 h, 再依次用 50%、70%、80%、90%和 95%浓度的乙醇进行梯度脱水, 在临界点干燥, 真空镀膜制样, 在 Philips XL30 ESEM 扫描电子显微镜下观察作用前后细菌细胞形态变化。

2 结果

2.1 链球菌噬菌体裂解酶基因的克隆及表达载体的构建

用 PCR 方法以链球菌噬菌体基因组为模板分别扩增组成 *PlyC* 的 2 条多肽链 *PlyCA* 和 *PlyCB* 的基因。产物经 1.2%琼脂糖凝胶电泳检测, 可见分别在 1422 bp 和 243 bp 附近的扩增产物(图 1), 大小与预期相符; 纯化后的 PCR 产物和 pET-32a(+)用 *Nde* I/*Xho* I 双酶切后连接, 得到重组质粒 pET-32a(+)-*PlyCA* 和 pET-32a(+)-*PlyCB*, 酶切鉴定表明重组载体构建成功(图 2)。测序结果表明两者均与 GenBank 登记序列相一致。

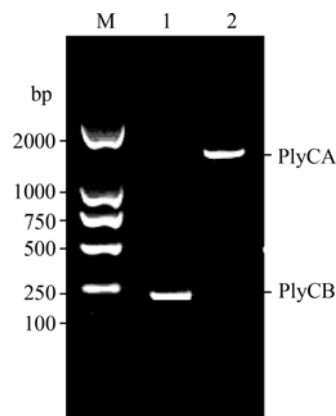


图 1 *PlyCA* 和 *PlyCB* 的 PCR 扩增

Fig. 1 PCR amplification of *PlyCA* and *PlyCB*. M: DNA marker; 1: PCR product of *PlyCB*; 2: PCR product of *PlyCA*.

2.2 重组蛋白 *PlyCA* 和 *PlyCB* 在大肠杆菌 BL21(DE3) 中的表达及条件优化

将重组质粒 pET-32a(+)-*PlyCA* 和 pET-32a(+)-

PlyCB 分别转化至 BL21(DE3)后, 经 IPTG 诱导表达, SDS-PAGE 分析, 可见分别在相对分子量约 50 kD 和 8 kD 处有明显的蛋白条带, 与预期相符。表明重组菌 BL21(DE3)/ pET-32a(+)-PlyCA 和 BL21(DE3)/ pET-32a(+)-PlyCB 构建成功。对表达条件的诱导剂量、诱导温度、诱导时间、诱导时机、培养基等进行优化实验分析, 结果显示: 重组菌 BL21(DE3)/pET-32a(+)-PlyCA 和 BL21(DE3)/pET-32a(+)-PlyCB 在 2×YT 培养基中培养至对数生长前期时加入 0.7 mmol/L IPTG 最佳。温度实验结果如图 3 所示。重组蛋白 PlyCA 和 PlyCB 在优化后表达量均可达到菌体总蛋白的 30%以上(图 4)。

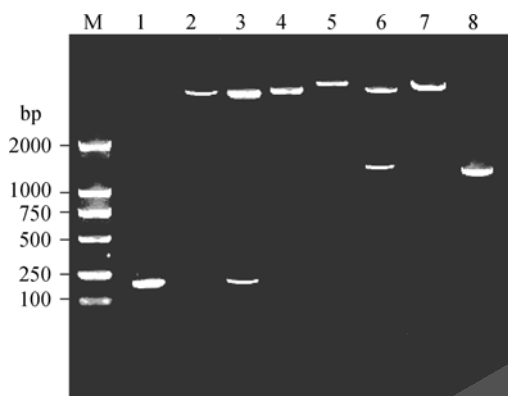


图 2 重组质粒 pET-32a(+)-PlyCA 和 pET-32a(+)-PlyCB 的酶切鉴定

Fig. 2 Identification analysis of recombinant plasmid pET-32a(+)-PlyCA and pET-32a(+)-PlyCB by enzyme digestion. M: DNA marker; 1: PCR product of *PlyCB*; 2, 7: pET-32a(+)digested with *Xho* I; 3: pET-32a(+)-PlyCB digested with *Xho* I and *Nde* I; 4: pET-32a(+)-PlyCB digested with *Xho* I; 5: pET-32a(+)-PlyCA digested with *Xho* I; 6: pET-32a(+)-PlyCA digested with *Xho* I and *Nde* I; 8: PCR product of *PlyCA*.

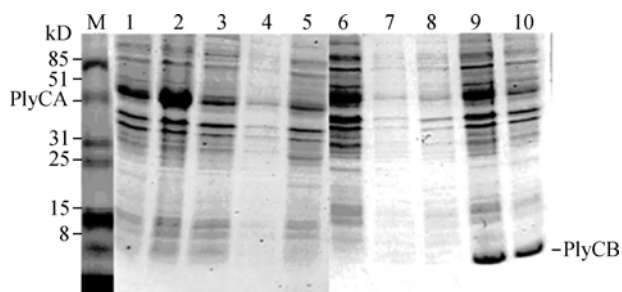


图 3 温度对 PlyCA 和 PlyCB 蛋白表达量的影响

Fig. 3 Effect of temperatures on the expression of PlyCA and PlyCB. M: protein marker; 5, 6: uninduced sample; 4, 7: 10 °C; 3, 8: 20 °C; 2, 9: 30 °C; 1, 10: 37 °C (1–4: induced sample of PlyCA; 7–10: induced sample of PlyCB).

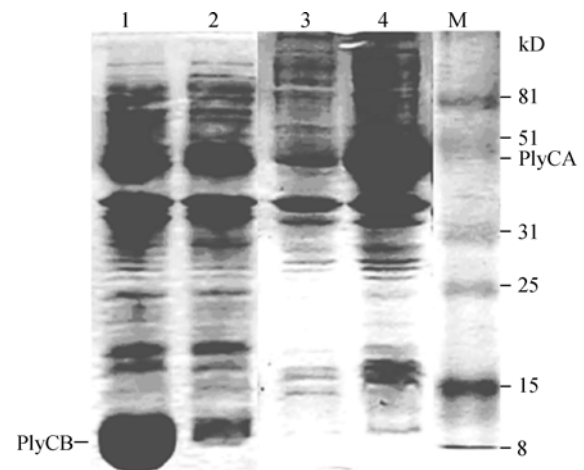


图 4 PlyCA 和 PlyCB 蛋白表达的 SDS-PAGE 分析

Fig. 4 SDS-PAGE analysis of the PlyCA and PlyCB expression. M: protein marker; 1: protein of BL 21(DE3)/pET-32a(+)-PlyCB after induced with IPTG; 2, 3: uninduced sample; 4: protein of BL21(DE3)/pET-32a(+)-PlyCA after induced with IPTG.

2.3 包涵体的分离和 Ni²⁺-NTA 亲和层析纯化

对菌体超声破碎后, 用相差显微镜镜检, 发现细胞破碎完全, 分别对破碎上清和沉淀进行 12% SDS-PAGE 电泳, 结果表明重组蛋白主要以包涵体的形式存在于沉淀中。蛋白质经尿素溶解变性、亲和层析柱纯化后, 其 12% SDS-PAGE 电泳结果如图 5 所示。结果表明: 在约 50 kD 和 8 kD 处分别可见特异条带, 目的蛋白主要集中在咪唑浓度为 100 mmol/L 和 150 mol/L 时的收集管中, 经 SDS-PAGE 薄层扫描分析, 其纯度大于 95%。



图 5 PlyCA 和 PlyCB 纯化后蛋白的 SDS-PAGE 凝胶电泳

Fig. 5 SDS-PAGE analysis of purified PlyCA and PlyCB. 1–2: purified PlyCA; 3–8: purified PlyCB; M: protein marker.

2.4 PlyC 的活性检测

对不同菌株的裂解活性检测结果如表 2 所示, 表明重组的链球菌噬菌体裂解酶 PlyC 对化脓性链

表 2 链球菌噬菌体裂解酶 PlyC 的特异性

Table 2 Specificity to *Streptococcus* of bacteriophage lysin PlyC

No.	Bacteria	Starting OD_{600}	Ending OD_{600} after adding the lysin	Ending OD_{600} without adding the lysin	Lysin activity
1	<i>E. coli</i>	0.581	0.603	0.568	-
2	<i>P. vulgaris</i>	0.531	0.552	0.535	-
3	<i>B. cereus</i>	0.536	0.591	0.599	-
4	<i>B. subtilis</i>	0.712	0.734	0.716	-
5	C1 streptococci	0.538	0.139	0.544	+
6	<i>S. pyogenes</i>	0.565	0.121	0.580	+

球菌有明显裂解作用, 与对 C1 链球菌裂解作用效果一致; 对枯草杆菌、大肠杆菌等菌株无任何裂解活性; 这表明 PlyC 裂解作用有较强的特异性。图 6 表明, PlyC 作用于相近起始 OD_{600} 值的化脓性链球菌液时, 随着酶液作用浓度的增加, OD_{600} 下降速度加快, 但最终 OD_{600} 下降率基本一致。血琼脂平板涂布样品经 37 °C 培养 2 d 后观察, 根据平板菌落计数结果, 发现终浓度为 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的酶液作用于菌液 60 min 后, 可使化脓性链球菌裂解率达 99.6%, 酶液终浓度为 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 与 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 样品裂解率可达 99.9% 以上。图 7 为扫描电子显微镜下观察结果, 显示 PlyC 作用后的化脓性链球菌其形态有明显改变。正常化脓性链球菌表面光滑, 呈球形至卵圆形(图 7a); PlyC 作用 60 min 后, 细胞大部分被裂解为碎片结构, 菌体数量明显减少, 且残存菌体表面粗糙, 原有形态改变(图 7b), 这进一步表明 PlyC 对化脓性链球菌的高效裂解活性。

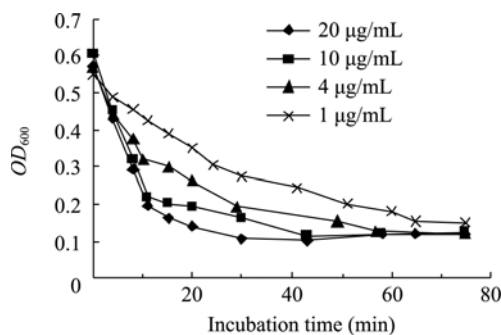


图 6 不同浓度链球菌噬菌体裂解酶的活性测定

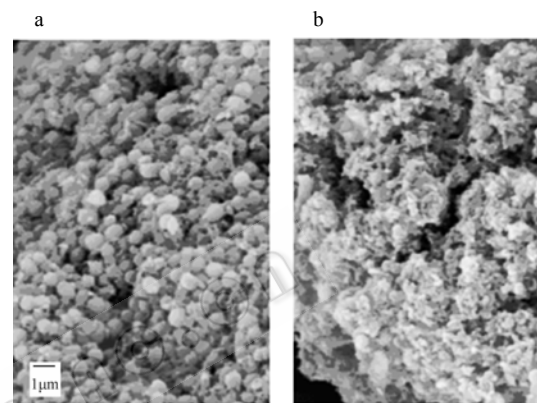
Fig. 6 Activity analysis of different concentrations of the bacteriophage lysin of *Streptococcus*.

图 7 化脓性链球菌的扫描电镜图

Fig. 7 Scanning electron micrographs of *Streptococcus pyogenes* (10 000 \times). (a) Before incubation with PlyC. (b) After incubation with PlyC for 60 min.

3 讨论

采用常规的方法制备噬菌体裂解酶不仅价格高、工序复杂, 而且还存在安全方面的问题, 不适宜大规模生产。为实现高效制备噬菌体裂解酶的目的, 本研究利用基因重组技术, 在基因工程菌中表达外源目的蛋白, 这也是目前大量、经济获得目的蛋白的主要方法^[12-13]。

大肠杆菌表达系统的产量高, 成本低, 易操作, 并可通过发酵进行大规模生产^[14]。本实验选用 pET-32a(+) 表达载体, 以大肠杆菌 BL21(DE3) 为宿主菌构建表达系统分别对链球菌噬菌体裂解酶 PlyC 的 2 个亚基 PlyCA 和 PlyCB 进行表达。诱导表达后的菌体经破碎离心后, 取上清和沉淀分别进行 SDS-PAGE 电泳, 结果显示重组蛋白均以包涵体形式存在。

以包涵体形式表达通常含有较高浓度的目的蛋白,易于与其他细胞成分分离,并且可避免蛋白酶对目的蛋白的降解,杂蛋白含量低^[15],更容易得到大量高纯度的目的蛋白。包涵体表达的蛋白虽然具有正确的氨基酸序列,但是空间结构往往是错误的,因而不具有生物学活性,所以必须用变性剂溶解包涵体并对蛋白适当复性处理,才可能获得正确折叠的活性蛋白^[16]。本实验采用缓慢透析方法复性,蛋白质在低浓度下通过缓慢去除变性剂避免了蛋白质的沉淀。并在透析液中加入氧化型/还原型谷胱甘肽提高了二硫键的正确配对和产率,这种方法应用于由多亚基组成的蛋白质的复性更具有有一定优势。

本实验将构成链球菌噬菌体裂解酶 PlyC 的 2 条肽链分别表达后再经变性、复性等步骤获得产物。经条件优化得到最佳表达条件为:重组菌在 2×YT 培养基中培养至对数生长期加入 IPTG 至浓度为 0.7 mmol/L, 30°C 诱导 7 h。产物经纯化复性得到了较高纯度的裂解酶 PlyC,体外实验表明该重组酶可特异性裂解致病性的β-溶血性链球菌,具有较高催化活性,为下一步研究工作奠定了基础。

REFERENCES

- [1] Köller T, Nelson D, Nakata M, *et al.* PlyC, a novel bacteriophage lysin for compartment-dependent proteomics of group A streptococci. *Proteomics*, 2008, **8**(1): 140–148.
- [2] Lopez R, Garcia E, Garcia P. Enzymes for anti-infective therapy: phage lysins. *Drug Discov Today: Therap Strat*, 2004, **1**(4): 469–474.
- [3] Schrag SJ, Mcgee L, Whitney CG, *et al.* Emergence of *Streptococcus pneumoniae* with very-high-level resistance to penicillin. *Antimicrob Agents Chemother*, 2004, **48**(8): 3016–3023.
- [4] Fischetti VA. Bacteriophage lytic enzyme: novel anti-infectives. *Trends Microbiol*, 2005, **13**(10): 491–496.
- [5] Nelson D, Loomis L, Fischetti VA. Prevention and elimination of upper respiratory colonization of mice by group A streptococci by using a bacteriophage lytic enzyme. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, **98**(7): 4107–4112.
- [6] Fischetti VA, Vincent, Loomis, *et al.* Throat lozenge for the treatment of *Streptococcus* group A: US patent, 7,232,576. 2007-06-19.
- [7] Jacobs MR. *Streptococcus pneumoniae*: epidemiology and patterns of resistance. *Am J Med*, 2004, **117**(3): 3–15.
- [8] Loeffler JM, Djurkovic S, Fischetti VA. Phage lytic enzyme Cpl-1 as a novel anti-microbial for pneumococcal bacteremia. *Infect Immun*, 2003, **71**(11): 6199–6204.
- [9] Chen CT, Huang CJ, Wang YH, *et al.* Two-step purification of *Bacillus circulans* chitinase A1 expressed in *Escherichia coli* periplasm. *Protein Expr Purif*, 2004, **37**(1): 27–31.
- [10] Nelson D, Schuch R, Chahales P, *et al.* PlyC: A multimeric bacteriophage lysine. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, **103**(28): 10765–10770.
- [11] Zhang LX, Zhang TF, Wang JZ. The Protein Protocols Handbook. Beijing: Science Press, 2000: 42–46. 张龙翔, 张庭芳, 汪家政. 蛋白质手册. 北京: 科学出版社, 2000: 42–46.
- [12] Li XJ, Zhang H, Fu XQ, *et al.* Expression and bioactive characterization of bacteriophage lysin gene of *Bacillus anthracis* in *Escherichia coli*. *Chin J Biotech*, 2005, **21**(2): 216–219. 李晓静, 张豪, 付学奇, 等. 炭疽杆菌噬菌体裂解酶基因在大肠杆菌中的表达及鉴定. 生物工程学报, 2005, **21**(2): 216–219.
- [13] Kikkawa H, Fujinami Y, Suzuki S, *et al.* Identification of the amino-acid residues critical for specific binding of the bacteriolytic enzyme of γ-phage, PlyG, to *Bacillus anthracis*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2007, **363**(3): 531–535.
- [14] Liu SA, Wang X, He YX, *et al.* The efficient expression of anti-HBsAg human Fd and L chain in *E. coli*. *Chin J Immunol*, 2001, **17**(6): 289–291. 刘顺爱, 王学, 何玉先, 等. 人源抗 HBsAg 抗体 Fd 段和 L 链高效表达菌株的筛选. 中国免疫学杂志, 2001, **17**(6): 289–291.
- [15] Ji JW, Dai LP, Duan GC, *et al.* Purification and characterization of recombinant HspA-UreB fusion. *J Jilin Univ (Med Ed)*, 2005, **31**(2): 256–258. 纪晋文, 代丽萍, 段广才, 等. 幽门螺杆菌 HspA-UreB 融合蛋白包涵体的纯化及活性鉴定. 吉林大学学报(医学版), 2005, **31**(2): 256–258.
- [16] Fang M, Huang HL. Advances *in vitro* refolding of inclusion body proteins. *Chin J Biotech*, 2001, **17**(6): 608–612. 方敏, 黄华梁. 包涵体蛋白体外复性的研究进展. 生物工程学报, 2001, **17**(6): 608–612.