

# 类弹性蛋白多肽的从头设计、非色谱纯化及盐效应

黄凯宗, 李晶晶, 李巍, 葛慧华, 王文研, 张光亚

华侨大学生物工程与技术系, 厦门 361021

**摘要:** 旨在克隆、表达与纯化类弹性蛋白多肽, 并测定类弹性蛋白的相变温度对不同的盐敏感程度。从头设计了类弹性蛋白多肽的序列并人工合成其编码基因片段, 克隆至改造后的表达载体 pET-22b(+) 中, 构建重组表达载体, 转化至大肠杆菌 BL21(DE3) 中并诱导表达, 采用可逆相变循环经高速离心对其进行纯化, 并考察了盐类型及浓度对类弹性蛋白相变温度的影响。结果表明: 0.4 mmol/L 的  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  能使 25  $\mu\text{mol/L}$  类弹性蛋白多肽 [KV<sub>8</sub>F-20] 相变温度降低至 19 °C, 此类弹性蛋白多肽序列有望开发成一新型纯化标签, 为今后重组蛋白的非色谱分离纯化奠定基础。

**关键词:** 类弹性蛋白多肽, 非色谱法纯化, 可逆相变循环, 相变温度, 纯化标签

## *De novo* design, non-chromatographic purification and salt-effect of elastin-like polypeptides

Kaizong Huang, Jingjing Li, Wei Li, Huihua Ge, Wenyan Wang, and Guangya Zhang

Department of Bioengineering and Biotechnology, Huaqiao University, Xiamen 362021, China

**Abstract:** Elastin-like polypeptides (ELPs) are temperature sensitive biopolymers composed of a Val-Pro-Gly-Xaa-Gly pentapeptide repeat that derived from a structural motif found in mammalian elastin. It was a promising tag for recombinant protein purification. Here, we *de novo* designed a novel ELPs gene and cloned it into the modified expression vector pET-22b(+). Then, we transformed the recombinant expression vector pET-22b-ELPs into *Escherichia coli* BL21(DE3). Upon induction by Isopropyl  $\beta$ -D-Thiogalactoside (IPTG), ELPs was expressed and purified by a non-chromatographic purification method named inverse temperature cycling. The influences of salts types and concentrations on ELPs were also determined. The results showed that the transition temperature of the [KV<sub>8</sub>F-20] decreased to 19 °C by 0.4 mmol/L  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ . Due to its small molecular weight and sensitivity to salt, the ELPs might be a useful purification tag, which can provide a reliable and simple non-chromatographic method for purification of the recombinant protein by inverse transition cycling.

**Keywords:** elastin-like polypeptides, non-chromatographic purification, inverse transition cycling, transition temperature, purification tag

**Received:** June 13, 2010; **Accepted:** October 20, 2010

**Supported by:** National Natural Science Foundation of China (No. 20806031), Natural Science Foundation of Fujian Province (No. 2009J01030), Research Foundation for Advanced Talents of Huaqiao University (No. 10BS220).

**Corresponding author:** Guangya Zhang. Tel: +86-595-22690290; E-mail: zhgyghh@hqu.edu.cn

国家自然科学基金 (No. 20806031), 福建省自然科学基金 (No. 2009J01030), 华侨大学高层次人才科研启动项目 (No. 10BS220) 资助。

蛋白质分子大规模分离纯化是当前生物工程中的关键技术问题, 纯化过程所需成本约占总成本的60%~70%, 色谱法为目前分离蛋白较成熟的方法。融合标签技术极大地简化了重组蛋白质的纯化过程, 它通过融合一段特定的多肽 (如组氨酸标签) 进行融合表达, 并通过适当的亲和力或者对配体有高专异性, 融合蛋白可以与固相基质上的特异配基结合, 从而使重组蛋白质得以纯化<sup>[1]</sup>。但在实际应用中, 亲和色谱法成本很高, 不仅需要特殊设备, 须对固相基质进行定制, 难以放大到工业规模, 且纯化效率低<sup>[2]</sup>。

类弹性蛋白多肽 (Elastin-like polypeptides, ELPs) 是一种具有弹性功能且对环境温度非常敏感的人造基因工程蛋白质聚合物。其结构主要由五肽重复序列单元构成, 即 (Val-Pro-Gly-Xaa-Gly, VPGXG), 源自于弹性蛋白的疏水区域, 其中 Xaa 可以是除 Pro 以外任一氨基酸。ELPs 有一个可逆相变过程, 称之为反转变温度 (Inverse temperature transition, ITT), 若环境温度低于该相变温度 (Transition temperature), 该多肽在水溶液中为高度可溶, 聚合物链保持无序结构, 且相当伸展。相反, 当温度高于该温度时, 该含水的多肽链结构就瓦解, 并开始聚集, 形成一个富含 ELPs 的聚集物, 由于 ELPs 具有这种特殊性质, 已广泛应用于蛋白质纯化与质粒 DNA 分离<sup>[3-8]</sup>。本研究设计了一新型 ELPs (即 ELP[KV<sub>8</sub>F-20]), 人工合成其基因, 成功在宿主菌表达并纯化, 同时测定其对盐的敏感程度, 为下一步纯化重组蛋白提供了理论与实验依据, 报道如下。

## 1 材料与方法

### 1.1 ELPs 的命名

ELP[X<sub>i</sub>Y<sub>j</sub>Z<sub>k</sub>-n] 代表整个 ELPs 序列中有 *n* 个五肽, 五肽中第 4 个氨基酸残基组成比例为 X:Y:Z=i:j:k<sup>[2]</sup>。如 ELP[KV<sub>8</sub>F-20], 是一个包含 20 个 VPGXG 五肽单元序列, 五肽单元第 4 个氨基酸残基组成为 K、V、F, 且五肽单元第 4 个残基中含 2 个 K, 16

个 V, 2 个 F, 比例为 1:8:1。

### 1.2 菌株、质粒与培养基

表达宿主菌 *E. coli* BL21 (DE3) 与 pUC-19-ELPs 及修饰后的 pET-22b(+) 为本实验室保存, 表达载体 pET-22b(+) 为上海捷瑞生物工程有限公司惠赠。pET-22b(+) 的修饰过程为用 **CATATC**AGCAAA GGG**CCGGGCT**TGGCCGTGATAA**GAATTC** 替换原始 pET-22b(+) 的 *Nde* I 与 *Eco*R I 酶切位点之间的序列。

### 1.3 主要工具酶及试剂

限制性内切酶 *Pf*IM I、*Bgl* I、*Nde* I、*Eco*R I 与 *Sfi* I 购自上海捷瑞生物工程有限公司, 蛋白质 Maker SM1861 为 Fermentas 公司产品, SDS-PAGE 凝胶配制试剂盒购于碧云天生物技术研究所, 聚乙烯亚胺购于 Sigma 公司, 透析袋为美国联合碳化公司产品, 其他化学试剂均为分析纯。

### 1.4 ELPs 的原核表达载体构建

本文所涉及到的分子生物学技术, 如感受态细胞的制备、转化、质粒的提取和酶切等方法均参考文献[9]。用 *Pf*IM I 与 *Bgl* I 双酶切 pUC-19-ELPs, 获得 ELPs 片段基因, 将此片段基因插入到经 *Sfi* I 酶切后 pET-22b(+) 修饰表达载体。重组质粒命名为 pET-22b-ELPs, 测序鉴定由上海捷瑞生物工程有限公司完成。

### 1.5 ELP[KV<sub>8</sub>F-20] 表达与纯化

含有 pET-22b-ELPs 重组质粒的 BL21 工程菌按 1:100 的接种量接种到含 100 μg/mL 氨苄青霉素的 TB 培养基中 (每升 TB 培养基中含 12 g 蛋白胨, 24 g 酵母浸提物, 2.31 g 磷酸氢二钾, 12.54 g 磷酸二氢钾, 4 mL 甘油), 37 °C、250 r/min 培养至 *OD*<sub>600</sub> 为 0.8 时, 加入 IPTG 诱导 (终浓度为 1 mmol/L), 诱导 3 h, 4 °C、4 000 r/min 离心 15 min, 收获菌体, 用预冷的 PBS 缓冲液 (137 mmol/L NaCl, 2.7 mmol/L KCl, 4.2 mmol/L NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1.4 mmol/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 为 7.3) 重悬菌体, 然后置冰浴中超声破碎 (超声 2 s, 间隔 2 s, 共 4 min)。

ELPs 纯化采用 ITC (Inverse transition cycling, 可逆相变循环), 即在大肠杆菌破碎液, 向其加入聚乙烯亚胺 (终浓度为 0.5%) 以去除核酸; 4 °C、13 000 r/min 离心 15 min, 取上清; 向上清液中添加 NaCl 至终浓度为 2 mol/L, 37 °C 水浴 15 min 后, 13 000 r/min 离心 15 min, 去上清; 向沉淀中加入预冷的 PBS 溶解沉淀, 冰浴 15 min 后, 4 °C、13 000 r/min 离心 15 min; 向上清液中再添加 NaCl 至终浓度为 2 mol/L, 37 °C 水浴 15 min 后, 13 000 r/min 离心 15 min, 去上清; 向沉淀中加入预冷的 PBS 溶解沉淀, 冰浴 15 min, 4 °C、13 000 r/min 离心 15 min, 收集上清液, 以上过程为两轮 ITC。ELPs 的纯度与分子量通过 SDS-PAGE 验证。

### 1.6 ELP[KV<sub>8</sub>F-20] 的定量

采用紫外分光光计测定 Trp 在 280 nm 处的消光系数, 建立标准曲线。测定 ELP[KV<sub>8</sub>F-20] 在 280 nm 的消光系数, 并与标准曲线进行比对, 从而可以对 ELPs 浓度进行定量<sup>[10]</sup>。

### 1.7 ELP[KV<sub>8</sub>F-20] 相变温度测定及盐对其相变温度影响的测定

测定 ELP[KV<sub>8</sub>F-20] 相变温度参考文献[2], 即: 测定 10 °C~95 °C ELPs 的 PBS 溶液 (ELPs 终浓度为 25 μmol/L) 在波长为 350 nm 处的浊度, 升温速率为 1 °C/min。

盐对 ELP[KV<sub>8</sub>F-20] 相变温度影响的测定参考文献[11], 即将盐溶解在 10 mmol/L 的磷酸盐缓冲溶液 (pH 6.9), 配制各种盐的浓度梯度。将冷冻干燥后的 ELPs 溶解于盐浓度中, ELPs 的终浓度为 25 μmol/L, 并测定其在波长为 350 nm 处不同温度下的浊度。

### 1.8 相变温度定义

相变温度为 OD<sub>350</sub> 最大值的一半时所对应的温度<sup>[2]</sup>。

## 2 结果与分析

### 2.1 PUC-19-ELPs 的酶切及 ELPs 基因片段回收

依据 ELP[KV<sub>8</sub>F-20] 的氨基酸序列 (100 个氨基

酸), 考虑大肠杆菌的密码子使用情况, 从头设计其基因序列 (300 bp), 将其连入克隆载体 pUC-19, 经测序列, pUC-19-ELPs 质粒构建正确。利用 *pfl*M I 与 *Bgl* I 对 ELP[KV<sub>8</sub>F-20] 基因片段回收, 回收结果如图 1 所示, 可见线性克隆载体片段与大小为 300 bp 的基因片段, 符合预期大小; 再将此基因导入到用 *Sfi* I 酶切修饰后的 pET-22 b(+) 表达载体中<sup>[2]</sup>, 构建 pET-22 b(+)-ELPs 表达载体, 使用 *Nde* I 与 *Eco*R I 对该表达载体进行双酶切鉴定, 结果如图 2 所示, 可见线性表达载体片段和大小为 332 bp 的基因片段, 与预期结果一致; 结合测序结果, 表明表达载体构建正确。之后, 将该 pET-22 b(+)-ELPs 导入到 *E. coli* BL21 (DE3) 宿主菌中, 构建工程菌。

### 2.2 ELPs 的诱导表达与纯化

含有 pET-22b(+)-ELPs 重组质粒的 BL21 工程菌, 经 IPTG 诱导后, 收集菌体, 并细胞破碎后, 采

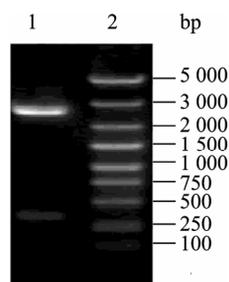


图 1 *pfl*M I 与 *Bgl* I 酶切回收 ELP 基因

Fig. 1 Recovery ELP gene with digestion by *pfl*M I and *Bgl* I. 1: pET-22(b)-ELP digested by *pfl*M I and *Bgl* I; 2: DNA marker.

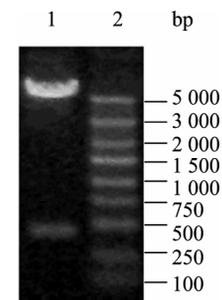


图 2 重组 pET-22(b)-ELPs 的酶切鉴定

Fig. 2 Identification of pET-22(b)-ELPs with digestion by *Nde* I and *Eco*R I. 1: pET-22(b)-ELPs digested by *Nde* I and *Eco*R I; 2: DNA marker.

用 ITC 纯化, 纯化结果表明在 11 kDa 处有一条带, 比 ELP[KV<sub>8</sub>F-20] 理论分子量大 20%, 与相关的 ELPs 报道吻合<sup>[10,12]</sup>。

图 3 结果表明, 两轮 ITC 之后, 与细胞破碎液相比, 目的蛋白质在纯化的过程中并没有太大损失, 因而可认为 ITC 可以保证目的蛋白回收率。由图 4 可知, 经两轮 ITC 之后, 在 11 kDa 处有单一条带, 已达到纯化目的, 此外, ITC 过程也是一个蛋白浓缩的过程。

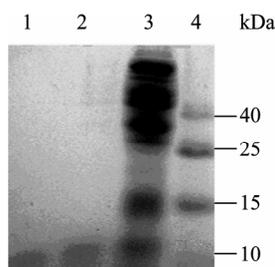


图 3 表达纯化的 ELPs

Fig. 3 Expression and purification of the ELPs. 1: the purified ELPs after two rounds ITC; 2: the purified ELPs after one rounds ITC; 3: total proteins after induction; 4: protein marker.

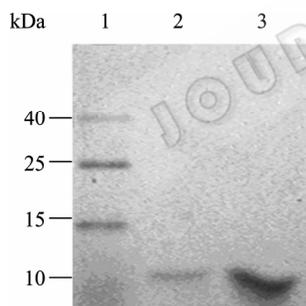


图 4 使用足量与少量 PBS 溶解纯化后 ELPs 沉淀

Fig. 4 ELPs dissolved in adequate and small amount of PBS. 1: protein marker; 2: purified ELPs were dissolved in adequate amount of PBS; 3: purified ELPs were dissolved in small amount of PBS.

### 2.3 ELPs 相变温度的测定及盐对其相变温度的影响

由图 5 可知, 在 ELPs 的相变发生阶段, 温度上升 2 °C~3 °C 时, 导致 ELPs 混浊度急剧的增加, 关于 ELPs 相变机理, 目前处于争论阶段, 有一种观点认为温度升高, 会破坏水分子与 ELPs 之间的水合作用, 导致 ELPs 溶解度骤变<sup>[11]</sup>。图 6 表明 ELPs

的相变温度与 ELPs 的浓度呈反比关系, 故 ELPs 表达量越大, ELPs 浓度越高, 相变温度越低, 越有利于 ELPs 的纯化。此外, ELPs 的相变温度与 ELPs 五肽重复序列单元中第 4 个残基 (Xaa) 的种类、ELPs 序列长度、ELPs 的分子量相关<sup>[13]</sup>。

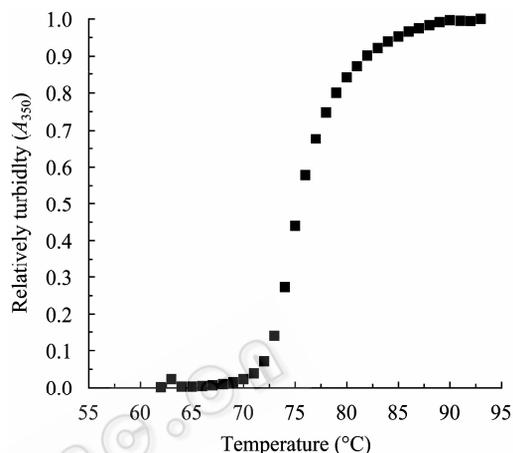


图 5 含 100 μmol/L 的 ELP[KV<sub>8</sub>F-20] PBS 溶液的混浊度与温度关系

Fig. 5 Turbidity profiles for 100 μmol/L ELP[KV<sub>8</sub>F-20] concentration in PBS.

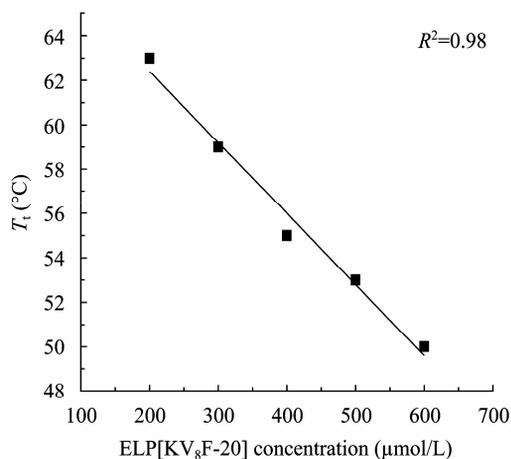


图 6 ELP[KV<sub>8</sub>F-20] T<sub>1</sub> 与浓度关系

Fig. 6 T<sub>1</sub> as a function of concentration for ELP[KV<sub>8</sub>F-20].

测定 5 种阴离子与 3 种阳离子对类弹性蛋白相变温度的影响, 依据霍夫迈斯特离子序<sup>[14]</sup> (Hofmeister series), 阴离子: CO<sub>3</sub><sup>2-</sup> > SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> > H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub><sup>2-</sup> > Cl<sup>-</sup> > NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, 阳离子: NH<sub>4</sub><sup>+</sup> > K<sup>+</sup> > Na<sup>+</sup>。本研究所考察 3 种阳离子 (即 NH<sub>4</sub><sup>+</sup>、K<sup>+</sup>、Na<sup>+</sup>) 及 5 种阴离子 (即 CO<sub>3</sub><sup>2-</sup>、SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>、H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub><sup>2-</sup>、Cl<sup>-</sup>、NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) 影响类弹性蛋白相变

温度顺序。图 8 结果表明, 5 种阴离子的钠盐影响类弹性蛋白相变温度顺序均与霍夫迈斯特离子序相符合 (铵盐与钾盐未列出, 其影响趋势与钠盐一致)。图 7 结果表明, 3 种阳离子的硫酸盐 (碳酸盐、磷酸二氢盐、氯化物、硝酸盐影响  $T_t$  趋势与硫酸盐一致) 对影响类弹性蛋白相变温度顺序却为  $\text{NH}_4^+ < \text{K}^+ < \text{Na}^+$ , 造成这种差异, 可能是本研究所设计的 ELPs 中含有苯丙氨酸残基 (F) 与赖氨酸残基 (K) 有关, 赖氨酸残基的存在会使多肽产生屏蔽效应 (Screening effects), 而 F 的存在会产生阳离子- $\pi$  相互作用<sup>[11]</sup>。

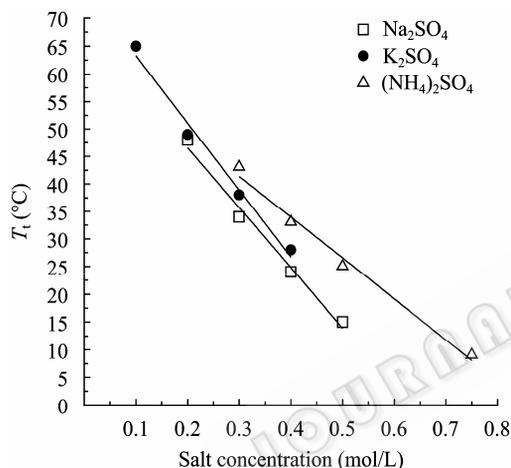


图 7 三种硫酸盐对 ELP[KV<sub>8</sub>F-20] 相变温度的影响

Fig. 7 Transition temperature vs salt concentration curves for three sulfates with ELP[KV<sub>8</sub>F-20].

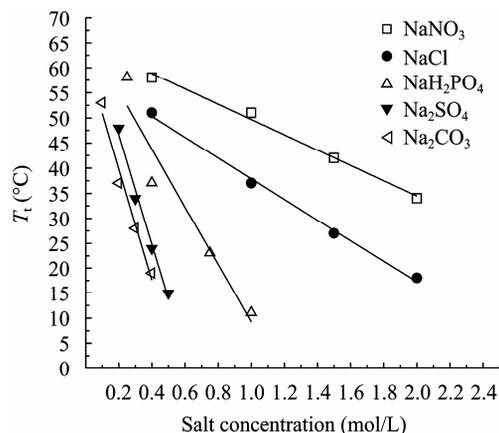


图 8 五种钠盐对 ELP[KV<sub>8</sub>F-20] 相变温度的影响

Fig. 8 Transition temperature vs salt concentration curves for five sodium salts with ELP[KV<sub>8</sub>F-20].

### 3 讨论

类弹性蛋白多肽是一种具有弹性功能且对环境非常敏感的生物高分子, 利用类弹性蛋白的可逆相变特性, 使其在蛋白纯化、作为药物载体、组织工程等方面得到广泛的应用<sup>[15]</sup>。

与类弹性蛋白进行融合表达的重组蛋白也具有可逆相变特性, 因而也可以采用 ITC 纯化重组蛋白<sup>[16]</sup>。采用 ITC 纯化蛋白有以下几个优势<sup>[17]</sup>: 1) 无需与色谱相关的色谱填料及设备, 纯化成本大幅度下降, 这种纯化方式可以规模化放大 (纯化的蛋白量可以达到千克级别); 2) ITC 的过程中分离与回收的条件较为温和, 只需适当改变温度与离子强度; 3) 采用 ITC 纯化蛋白这种纯化方式速度快, 方法简单, 只需几次离心步骤; 4) ITC 是很容易应用于到从不同的细胞发酵培养来纯化蛋白, 因为蛋白纯化是制约蛋白质结构/功能研究与药物筛选主要环节; 5) ITC 中的离心沉淀步骤也是一个蛋白浓缩富集过程, 无需干燥; 6) 目的蛋白回收率较高, 采用 ITC 纯化, 回收率可以达到 75%<sup>[18]</sup>。有研究者认为, 这种纯化方式将给重组蛋白的分离纯化带来革命性变化<sup>[16]</sup>。鉴于 ITC 纯化蛋白简单且快速性, 有理由相信这种蛋白纯化方式比较容易从实验室规模放大到工业规模。

本研究从头设计了一种新型的仅有 20 个五肽单元的 ELPs 序列, 通过考察不同盐对其相变温度影响, 发现能大幅度降低相变温度。虽然铵盐也能显著降低相变温度, 但是与钠盐相比, 铵盐加入会造成很多蛋白的盐析, 从而在目标蛋白中引入了更多的杂蛋白, 对后续的分离纯化不利<sup>[16]</sup>。与常规的 ELPs 相比 (如 ELP[V<sub>5</sub>], ELP[V<sub>5</sub>A<sub>2</sub>G<sub>3</sub>], ELP[V<sub>1</sub>A<sub>8</sub>G<sub>7</sub>]), 本研究所设计的 ELPs 蛋白质序列长度更短 (常规的 ELPs 序列一般至少需有 60 个以上五肽重复单元, 才具有较低的相变温度)<sup>[10]</sup>; 对盐浓度更为敏感; 且赖氨酸的相对含量更低, 这有助于提高蛋白质的表达量<sup>[18]</sup>并可能与 ELPs 产生的  $\Delta T_t$  (NaCl) 效应更低

有关<sup>[2]</sup>。通过对盐离子的进一步优化,此 ELPs 序列有望开发成一个新的重组蛋白纯化标签。

目前,国内鲜有 ELPs 的研究报道<sup>[20]</sup>,而国外则相对较深入<sup>[15]</sup>。本研究所设计的 ELPs 因其分子量较小,对钠盐非常敏感,产量较高,可望作为一种新型的纯化标签,为今后重组蛋白的分离纯化带来更多的选择,相关的研究仍在不断深入进行中。

## REFERENCES

- [1] Li YJ, Chen YY, Bi LJ. Fusion tags technology and their applications. *Chin J Biotech*, 2006, 22(4): 523–527.  
李永进, 陈媛媛, 毕利军. 融合标签技术及其应用. *生物工程学报*, 2006, 22(4): 523–527.
- [2] Lim DW, Trabbic-Carlson K, MacKay JA, et al. Improved non-chromatographic purification of a recombinant protein by cationic elastin-like polypeptides. *Biomacromolecules*, 2007, 8(5): 1417–1424.
- [3] Banki MR, Feng L, Wood DW. Simple bioseparations using self-cleaving elastin-like polypeptide tags. *Nat Methods*, 2005, 2(9): 659–661.
- [4] Kim JY, O'Malley S, Mulchandani A, et al. Genetically engineered elastin-protein fusion as a universal platform for homogeneous phase-separation immunoassay. *Anal Chem*, 2005, 77(8): 2318–2322.
- [5] Christensen T, Trabbic-Carlson K, Liu WG, et al. Purification of recombinant proteins from *Escherichia coli* at low expression levels by inverse transition cycling. *Anal Biochem*, 2007, 360(1): 166–168.
- [6] Lao UL, Kostal J, Mulchandani A, et al. Affinity purification of plasmid DNA by temperature-triggered precipitation. *Nat Protoco*, 2007, 2(5): 1263–1268.
- [7] Joensuu JJ, Brown KD, Conley AJ, et al. Expression and purification of an anti-Foot-and-mouth disease virus single chain variable antibody fragment in tobacco plants. *Transgenic Res*, 2009, 18(5): 685–696.
- [8] Floss DM, Sack M, Arcalis E, et al. Influence of elastin-like peptide fusions on the quantity and quality of a tobacco-derived human immunodeficiency virus-neutralizing antibody. *Plant Biotechnol J*, 2009, 7(9): 899–913.
- [9] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989: 16–66.
- [10] Meyer DE, Chilkoti A. Genetically encoded synthesis of protein-based polymers with precisely specified molecular weight and sequence by recursive directional ligation: examples from the elastin-like polypeptide system. *Biomacromolecules*, 2002, 3(2): 357–367.
- [11] Cho Y, Zhang YJ, Christensen T, et al. Effects of Hofmeister anions on the phase transition temperature of elastin-like polypeptides. *J Phys Chem B*, 2008, 112(44): 13765–13771.
- [12] McPherson DT, Morrow C, Minehan DS, et al. Production and purification of a recombinant elastomeric polypeptide, G-(VPGVG)<sub>19</sub>-VPGV, from *Escherichia coli*. *Biotechnol Prog*, 1992, 8(4): 347–352.
- [13] Meyer DE, Chilkoti A. Quantification of the effects of chain length and concentration on the thermal behavior of elastin-like polypeptides. *Biomacromolecules*, 2004, 5(3): 846–851.
- [14] Hofmeister F. Zur Lehre von der Wirkung der Salze. Zweite Mittheilung. *Arch Exp Pathol Pharmacol*, 1988, 24(4/5): 247–260.
- [15] Chow D, Nunalee ML, Lim DW, et al. Peptide-based biopolymers in biomedicine and biotechnology. *Mat Sci Eng R*, 2008, 62(4): 125–155.
- [16] Floss DM, Schallau K, Rose-John S, et al. Elastin-like polypeptides revolutionize recombinant protein expression and their biomedical application. *Trends Biotechnol*, 2010, 28(1): 37–45.
- [17] Meyer DE, Chilkoti A. Purification of recombinant proteins by fusion with thermally-responsive polypeptides. *Nat Biotechnol*, 1999, 17(11): 1112–1115.
- [18] Trabbic-Carlson K, Liu L, Kim B, et al. Expression and purification of recombinant proteins from *Escherichia coli*: comparison of an elastin-like polypeptide fusion with an oligohistidine fusion. *Protein Sci*, 2004, 13(12): 3274–3284.
- [19] Teulé F, Cooper AR, Furin WA, et al. A protocol for the production of recombinant spider silk-like proteins for artificial fiber spinning. *Nat Protoco*, 2009, 4(3): 341–355.
- [20] Hu F, Ke T, Li X, et al. Expression and purification of the antimicrobial polypeptide by fusion with elastin-like polypeptide. *Chin J Mol Cell Biol*, 2008, 41(3): 233–237.  
胡凡, 柯涛, 李鑫, 等. 类弹性蛋白 ELPs 融合表达在抗菌肽分离纯化中的应用. *分子细胞生物学报*, 2008, 41(3): 233–237