

生长素结合蛋白 AtTIR1 和 IAA28 的原核表达及纯化

赵欣, 刘会珍, 罗为桂, 苏益, 蔺万煌*

(湖南农业大学植物激素与生长发育湖南省重点实验室, 湖南 长沙 410128)

摘要:以 pGEX-KG 为骨架, 运用分子克隆方法构建了生长素结合蛋白 AtTIR1 和 IAA28 的原核表达载体, 通过转化不同表达菌株探索了 2 种蛋白的诱导表达条件。结果表明:在 0.4 mmol/L IPTG 诱导下, GST-IAA28 融合蛋白在表达菌株 Tuner 中的表达量最高, 其适宜诱导温度为 16 °C; 在 0.6 mmol/L IPTG 诱导下, BL21(DE3) 中 GST-IAA28 的表达量最高; 在各种浓度的 IPTG 诱导下, Rosetta 中的 GST-IAA28 的产量均不高; 在 25 °C 和 0.4 mmol/L IPTG 诱导条件下, Rosetta 中的 GST-AtTIR1 表达总量最高, 每克细菌可诱导出约 0.2 mg 的目标蛋白, 但 BL21(DE3) 菌种中的 GST-AtTIR1 表达量很低。利用 GST Sefirose™ resin 亲和树脂对表达的蛋白进行纯化, 获得了较纯的 AtTIR1 和 IAA28 蛋白。

关键词:生长素结合蛋白; *AtTIR1* 基因; *IAA28* 基因; 原核表达; 蛋白质纯化

中图分类号: Q786; Q949.748.3 文献标志码: A 文章编号: 1007-1032(2013)06-0609-06

Prokaryotic expression and purification of the auxin-binding protein AtTIR1 and IAA28

ZHAO Xin, LIU Hui-zhen, LUO Wei-gui, SU Yi, LIN Wan-huang*

(Hunan Provincial Key Laboratory of Phytohormones and Growth Development, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China)

Abstract: Prokaryotic expression vector of auxin-binding protein AtTIR1 and IAA28 were constructed by gene cloning based on pGEX-KG. The expression induction conditions of two kinds of different expression strains after transfected with the recombined expression vectors were investigated. The results showed that the GST-IAA28 had the highest yields in Tuner under 0.4 mmol/L IPTG and the highest yields in BL21(DE3) at 0.6 mmol/L IPTG, with 16 °C the suitable inducing temperature, while the protein yields were low in Rosetta under every concentration of IPTG. GST-AtTIR1 expressed highly in Rosetta at the optimal induced condition of 0.4 mmol/L IPTG and 25 °C, and about 0.2 mg GST-AtTIR1 was produced in 1g bacteria. But GST-AtTIR1 expressed lowly in BL21. Meanwhile, relatively purified GST-AtTIR1 and GST-IAA28 had been obtained through GST Sefirose™ resin.

Key words: auxin-binding protein; *AtTIR1*; *IAA28*; prokaryotic expression; protein purification

生长素于 20 世纪 30 年代得到分离并鉴定, 具有促进生长与生根、维持顶端优势的作用, 生长素的分布在不同组织间存在敏感性差异^[1-4]。随着对生长素生物合成途径的深入研究^[5], 生长素 IAA(吲哚乙酸)的外运蛋白(PINs)^[6-7]、IAA 内运蛋白

(AUX1/LAX)^[8-9]、生长素结合蛋白(ABPs)^[3,10]、IAA 受体 TIR1 和 AFBs^[5,11]、生长素响应因子(ARFs)及其抑制蛋白(AUX/IAAs)^[12-17]先后被鉴定。AtTIR1 是 TIR1 蛋白家族的一种能够与 IAA 结合的蛋白, 能够与 AUX/IAAs 蛋白相互靠近形成共受体, 从而

收稿日期: 2013-03-18

基金项目: 国家自然科学基金重大研究计划项目(91317312); 湖南省高校创新平台开放基金项目(11K032; 13K065)

作者简介: 赵欣(1988—), 女, 湖南永州人, 硕士研究生, 主要从事植物生理和分子生物学研究, 605302717@qq.com; *通信作者, linwhat@163.com

提高对 IAA 的亲力和结合特异性^[18]。*AtTIR1* 基因大小为 1 785 bp, 编码 594 个氨基酸残基, 蛋白质相对分子质量为 66 798.80, 等电点为 7.1^[11]。IAA28 是 IAA 受体的一种, *IAA28* 基因大小为 528 bp, 编码 175 个氨基酸残基, 蛋白质相对分子质量为 20 205.86, 等电点为 9.07^[13]。本研究拟通过构建含 *AtTIR1* 和 *IAA28* 基因的原核表达载体, 体外表达 *AtTIR1* 和 *IAA28* 蛋白, 并利用 GST 标签对其进行纯化, 旨在为 2 种蛋白的后续研究打下基础。

1 材料与方 法

1.1 材料与主要试剂

供试菌株: 大肠杆菌(*E.coli*)表达菌株 Tuner、Rosetta、BL21(DE3)、pGEX-KG; 大肠杆菌克隆菌株 DH5 α 。

供试植株: 拟南芥(*Arabidopsis thaliana* L.)生态型 Columbia(Col-0), 由湖南农业大学植物激素与生长发育湖南省重点实验室保存。

试剂: *Bam*H I 和 *Eco*R I 限制性内切酶和 *T*₄ DNA 连接酶等均购自 TaKaRa(大连)公司; *Pfu* DNA 聚合酶、pEASY-T1 试剂盒、凝胶回收纯化试剂盒、Trans2K Plus DNA Marker 和蛋白 Marker Protein Ruler II 均购自北京全式金生物技术有限公司。

1.2 方 法

1.2.1 引物设计

根据 GenBank 数据库中公布的 *AtTIR1* 和 *IAA28* 的 cDNA 序列以及质粒 pGEX-KG 图谱, 用 Lasergene 7.0 工具包和 Primer5.0 软件分析设计 PCR 引物。扩增 *AtTIR1* 的上游引物 *AtTIR1* Fp 的序列为 5'-ggatccATGCAGAAGCGAATAGCCTTG-3', 小写字母表示酶切位点 *Bam*H I; 下游引物 *AtTIR1* Rp 的序列为 5'-gaattcTTATAATCCGTTAGTAGTAATG-3', 小写字母表示酶切位点 *Eco*R I。扩增 *IAA28* 的上游引物 *IAA28* Fp 的序列为 5'-ggatccATGGAAGAAGA AAAGAGATTGG-3', 小写字母表示酶切位点 *Bam*H I; 下游引物 *IAA28* Rp 的序列为 5'-gaattcCTATTCCT

TGCCATGTTTTTC TAG-3', 小写字母表示酶切位点 *Eco*R I。引物由华大基因公司合成。

1.2.2 原核表达载体构建及转化

采用 Trizol(Invitrogen) 试剂提取拟南芥总 RNA, 反转录获得 cDNA, 以 cDNA 为模板扩增 *AtTIR1* 和 *IAA28* 基因, 扩增体系为: ddH₂O 6.2 μ L, 10 \times PCR Buffer 1 μ L, dNTP(2 mmol/L) 1 μ L, 上游引物(5 μ mol/L) 0.5 μ L, 下游引物(5 μ mol/L) 0.5 μ L, cDNA 0.5 μ L, *Pfu* DNA 聚合酶 0.3 μ L, 总体体系为 10 μ L。PCR 反应条件为: 95 $^{\circ}$ C 充分预变性 5 min; 95 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 54 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 4 min, 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 总延伸 7 min。

用 *Bam*H I 和 *Eco*R I 双酶切 *AtTIR1* 和 *IAA28* 的 PCR 产物及载体 pGEX-KG, 回收酶切产物, 按 *T*₄ DNA 连接酶说明书将 *AtTIR1* 和 *IAA28* 分别连入 pGEX-KG 中, 采用热激法转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞, 挑取单菌落进行 PCR 鉴定, 再提取质粒进行酶切鉴定, 将鉴定为正确的质粒送华大基因公司测序。将测序正确的载体分别命名为 pGEX-KG-*AtTIR1* 和 pGEX-KG-*IAA28*, 将 2 种重组表达载体分别转化到表达菌株 Tuner、Rosetta 及 BL21(DE3)的感受态细胞中, 提取抗性平板上生长良好的菌落的质粒, 进行 *Bam*H I 和 *Eco*R I 双酶切鉴定, 含有正确质粒的重组表达菌落用于蛋白表达与纯化。

1.2.3 GST 融合蛋白质的表达和小规模纯化

蛋白质诱导表达: 将 3 种重组菌株接种于 10 mL LB 液体培养基(含 100 mg/L 氨苄青霉素)中, 37 $^{\circ}$ C、180 r/min 振荡培养至菌液 OD_{600 nm} 约为 0.6; 取 5 mL 菌液接种于 50 mL 新鲜 LB 培养基(含 100 mg/L 氨苄青霉素)中, 37 $^{\circ}$ C、200 r/min 振荡培养至菌液 OD_{600 nm} 约为 0.6(约 2 h)。设 3 个诱导剂 IPTG 浓度 0.2、0.4、0.6 mmol/L(终浓度), 摇床设置为 200 r/min, 各菌株分别于 16 $^{\circ}$ C 诱导 8 h, 25 $^{\circ}$ C 诱导 5 h, 37 $^{\circ}$ C 诱导 4 h。将诱导好的菌液用 50 mL 离心管收集, 4 $^{\circ}$ C、7 500 g 离心 10 min, 弃培养基, 用 30 mL PBS(pH7.4)重悬细菌, 4 $^{\circ}$ C、7 500 g 离心 10

min 并吸干上清, 置 -20°C 冰箱储存, 备用。

蛋白质小规模纯化: 称取各处理的细菌约 0.01 g, 加入 1 mL 预冷的 PBS(pH7.4)重悬, 超声波破碎细胞后 4°C 、12 000 r/min 离心 15 min。取 40 μL 上清液, 加入 40 μL $2\times$ 上样缓冲液, 即为上清样。取剩余的上清于新的 EP 管, 加入 25 μL 预处理后的 GST SefiroseTM Resin 树脂, 冰浴并置脱色摇床低速摇 1 h 后, 4°C 、12 000 r/min 离心 10 min, 弃上清, 加入 500 μL 预冷的 PBS 重悬沉淀, 4°C 、12 000 r/min 离心 5 min, 弃上清, 重复 3 次, 向 GST Sefirose 中加入 40 μL $2\times$ 上样缓冲液, 即为结合样(小规模纯化样品)。向细胞碎片沉淀里加入 40 μL $2\times$ 上样缓冲液, 即为沉淀样。

电泳分析: 配制 0.25、0.5、1 mg/mL 的 BSA 溶液作为质量标准进行表达的目的蛋白质的定量, 蛋白质样品在 12% 的 SDS-PAGE 胶中进行电泳分析。

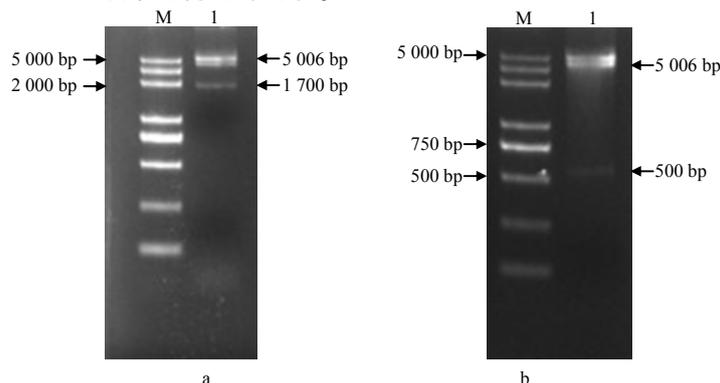


图 1 重组表达载体的双酶切鉴定结果
a 中 M 为 Trans2K Plus DNA Marker, I 为 pGEX-KG-AtTIR1 的酶切产物 b 中 M 为 Trans2K Plus DNA Marker, I 为 pGEX-KG-IAA28 的酶切产物。

图 1 重组表达载体的双酶切鉴定结果
Fig.1 Identification of recombinant expression vector by double digestion

2.2 GST-IAA28 融合蛋白的诱导表达条件优化

GST 的相对分子质量约为 26 000, IAA28 的相对分子质量约为 20 000, 因此, GST-IAA28 融合蛋白的相对分子质量约为 46 000。由图 2-a 和图 2-c 可以看出: 无论在何种浓度的 IPTG 诱导下, IAA28 在 Tuner 和 BL21 中的表达都比在 Rosetta 中好, 能满足后续纯化的需要。重组菌 pGEX-KG-IAA28-BL21 在 0.6 mmol/L IPTG 诱导下, IAA28 表达效果最好; 重组菌 pGEX-KG-IAA28-Tuner 在 0.4 mmol/L

2 结果与分析

2.1 AtTIR1 基因和 IAA28 基因表达载体的构建及鉴定

AtTIR1 和 IAA28 分别连入 pGEX-KG 后, 转化 DH5 α , 菌落 PCR 初步筛选阳性转化子, 提取质粒后用 BamHI 和 EcoRI 双酶切进行鉴定, 结果如图 1 所示, 重组质粒均能酶切出预期的条带。将酶切鉴定正确的质粒送测序, 将测序正确的, 即重组表达载体, 分别命名为 pGEX-KG-AtTIR1 和 pGEX-KG-IAA28。将 2 种重组载体分别转入表达菌 Tuner、Rosetta、BL21(DE3), 将 6 个重组菌分别命名为 pGEX-KG-AtTIR1-Tuner、pGEX-KG-AtTIR1-Rosetta、pGEX-KG-AtTIR1-BL21、pGEX-KG-IAA28-Tuner、pGEX-KG-IAA28-Rosetta、pGEX-KG-IAA28-BL21, 用于蛋白表达与纯化。

IPTG 诱导下, IAA28 产量最高。由于在重组菌 pGEX-KG-IAA28-Tuner 中诱导表达的 IAA28 杂蛋白更少、更纯, 因此, 选择在重组菌 pGEX-KG-IAA28-Tuner 中表达 IAA28 更有利于后续研究。

由图 2-b 可知, 温度对 IAA28 表达的影响不大, IAA28 在不同温度条件下都能大量表达, 但在 37、16 $^{\circ}\text{C}$ 表达更好, 而考虑到高温对蛋白质活性的影响, 在 16 $^{\circ}\text{C}$ 表达生产蛋白更为合适。

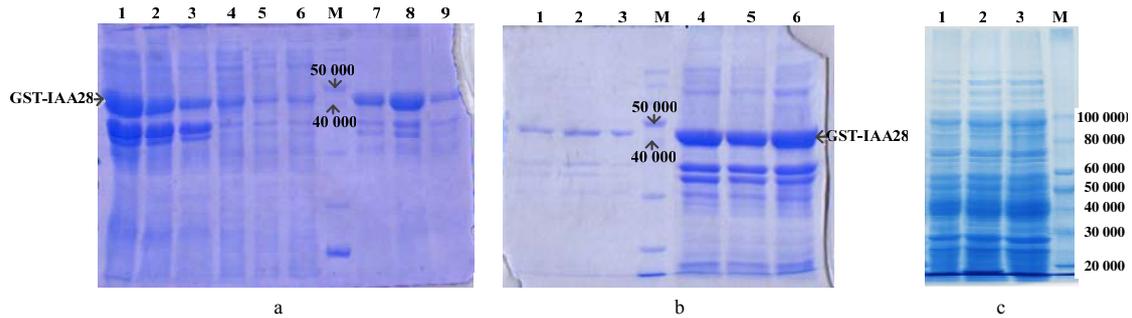


图 2 GST-IAA28 融合蛋白的诱导表达条件优化
a 中 1~3 为重组菌 pGEX-KG-IAA28-BL21 中分别加入 0.6、0.4、0.2 mmol/L IPTG 的诱导表达结果, 4~6 为重组菌 pGEX-KG-IAA28-Rosetta 中分别加入 0.6、0.4、0.2 mmol/L IPTG 的诱导表达结果, M 为 ProteinRuler II, 7~9 为重组菌 pGEX-KG-IAA28-Tuner 中分别加入 0.6、0.4、0.2 mmol/L IPTG 的诱导表达结果, 1~9 均为 25 °C 表达的结合同; b 中 1~3 为重组菌 pGEX-KG-IAA28-Tuner 中加入 0.4 mmol/L IPTG, 表达温度分别为 16、25、37 °C 时的诱导表达结果, 均为结合同, M 为 ProteinRuler II, 4~6 为重组菌 pGEX-KG-IAA28-Tuner 中加入 0.4 mmol/L IPTG, 表达温度分别为 16、25、37 °C 的结果, 均为上清样; c 中 1~3 分别为未转入质粒的 BL21、Rosetta 和 Tuner 在 0.4 mmol/L IPTG、25 °C 时诱导表达的蛋白谱。

图 2 GST-IAA28 融合蛋白的诱导表达条件优化

Fig.2 Optimization of expression condition for the fusion protein GST-IAA28

2.3 GST-AtTIR1 融合蛋白的表达分析

AtTIR1 的相对分子质量约为 66 800, 因此, GST-AtTIR1 融合蛋白的相对分子质量约为 92 800。由图 3 和图 2-c 可见, GST-AtTIR1 融合蛋白只能在重组菌 pGEX-KG-AtTIR1-Rosetta 中大量表达, 而在其他 2 个重组菌中 GST-AtTIR1 的表达量不能满足纯化需要。由图 4 可知, 在 0.4 mmol/L IPTG 诱导条件下, GST-AtTIR1 融合蛋白的表达量较高。

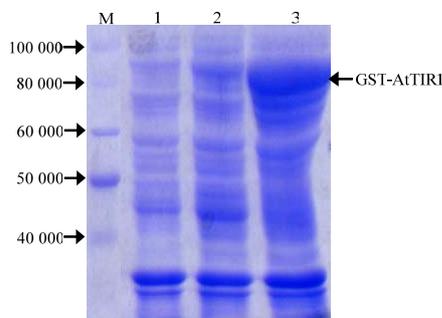


图 3 GST-AtTIR1 在不同菌株中的表达
M 为 ProteinRuler II; 1~3 为 0.4 mmol/L IPTG, 25 °C 诱导表达的结果, 1、2、3 分别为用重组菌 pGEX-KG-AtTIR1-Tuner、pGEX-KG-AtTIR1-BL21、pGEX-KG-AtTIR1-Rosetta 诱导表达的样品, 均为上清样。

图 3 GST-AtTIR1 在不同菌株中的表达

Fig.3 Expression of GST-AtTIR1 in different *E.coli*

选用 0.4 mmol/L 浓度的 IPTG 诱导重组菌 pGEX-KG-AtTIR1-Rosetta, 结果如图 5 所示。37 °C 和 16 °C 诱导温度下, GST-AtTIR1 表达总量相当, 其蛋白浓度与标准样品 BSA 的浓度(0.25 mg/mL)接近; 在 25 °C 诱导时, GST-AtTIR1 融合蛋白表达总量最高, 其浓度接近 0.5 mg/mL BSA 样品的浓度。经初步估算每克细菌在 37 °C 和 16 °C 诱导下可表达

GST-AtTIR1 融合蛋白 0.1 mg, 而在 25 °C 诱导下约 0.2 mg。各种温度条件下的蛋白表达量都可以满足后续大量纯化的要求。

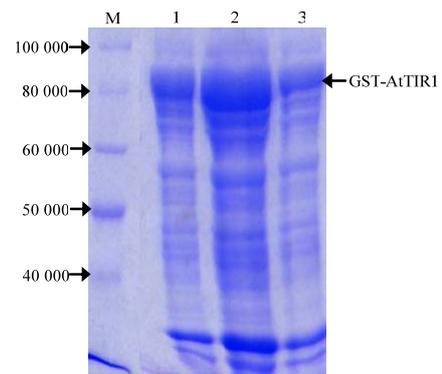


图 4 不同 IPTG 浓度诱导 GST-AtTIR1 表达结果
M 为 ProteinRuler II; 1~3 为重组菌 pGEX-KG-AtTIR1-Rosetta 在 25 °C, IPTG 浓度分别为 0.2、0.4、0.6 mmol/L 下的诱导表达结果, 均为上清样。

图 4 不同 IPTG 浓度诱导 GST-AtTIR1 表达结果

Fig.4 Expression of GST-AtTIR1 in different concentrations of IPTG

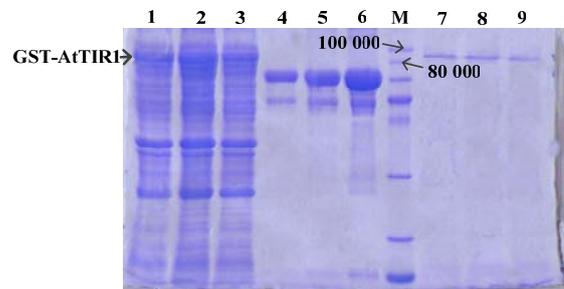


图 5 不同温度诱导 GST-AtTIR1 表达结果
1~3 为重组菌 pGEX-KG-AtTIR1-Rosetta 在 0.4 mmol/L IPTG 诱导下, 分别于 37、25、16 °C 的表达样品, 均为沉淀样; 4~6 分别为 0.25、0.5、1 mg/mL 的 BSA 样品; M 为 ProteinRuler II; 7~9 分别为 37、25 和 16 °C 条件下诱导表达的样品的结合同。

图 5 不同温度诱导 GST-AtTIR1 表达结果

Fig.5 Expression of GST-AtTIR1 under different temperatures

3 讨论

目前,蛋白质组学研究突飞猛进,其中在蛋白质功能研究,特别是体外功能研究中普遍使用到真核表达和原核表达,其目的是要得到大量高纯度的活性蛋白质进行生化研究^[19-20]。影响蛋白质在大肠杆菌中的表达量的因素有载体(启动子、质粒拷贝数、质粒稳定性),IPTG 浓度,诱导温度,诱导时间和菌株等,其中,诱导剂 IPTG 的浓度一般集中在 0.1~30.6 mmol/L。最佳的诱导温度不能过低,也不能过高。诱导温度过低(10℃以下)会造成细菌生长缓慢,产量不足;温度过高(30~34℃)则细菌生长过快,从而降低质粒的拷贝数量,造成蛋白质表达量减少^[21]。原核表达的最佳诱导温度与具体的蛋白质性质直接相关,有的学者^[22]认为 25℃最好,有的认为 28℃^[23]或 31℃^[24]表达量最高。本研究构建的重组表达菌在 37、25、16℃均能表达,由于需要活性高的 AtTIR1 和 IAA28,因此选择较低的温度(16℃)诱导蛋白的表达。菌株也是影响蛋白质表达的重要因素,不同的表达菌株有不同的修饰,因此,重组质粒在不同的菌株中的拷贝数可能不同,蛋白质对不同菌株的毒性也会不同。Tuner、Rosetta、BL21(DE3)大肠杆菌都可用于目的蛋白表达,其中 BL21(DE3)是目前应用最广泛的原核表达菌株。本研究中 IAA28 在 3 种菌株中表达都比较好,而 AtTIR1 只在 Rosetta 表达。

蛋白质的纯化方法非常多,但是对于真核或原核表达的蛋白质,最常用、最有效的还是亲和层析方法,亲和层析常用的标签有 Arg-tag^[25]、His^[26]、FLAG-tag^[27]、Strep-tag^[28]、CBDs^[29]、MBP^[30]、GST-tag^[31]等,其中 GST 基因融合表达系统广泛用于各种融合蛋白的表达^[32,33]。本研究利用 GST 标签纯化获得了较纯的 AtTIR1 和 IAA28,为后续研究这 2 种蛋白与生长素的亲和性做好了准备。

参考文献:

- [1] Mary W . The story of auxin[J] . The Plant Cell , 2011 , 6 : 1-9 .
- [2] Charles D . The power of movement in plants[M] . London : Appleton and Company , 1881 : 418-448 .
- [3] Frits W . Auxin , the plant growth-hormone[J] . Bot Rev , 1935 , 1 : 162-182 .
- [4] Kenneth V T . Hormones and the analysis of growth[J] . Plant Physiol , 1938 , 13 : 437-449 .
- [5] Zhao Y D , Sioux C , Christian F , et al . A role for flavin monooxygenase-like enzymes in auxin biosynthesis[J] . Science , 2001 , 291(5502) : 306-309 .
- [6] Parvel K , Petr S , Jiří L , et al . The PIN-FORMED(PIN) protein family of auxin transporters[J] . Genome Biol , 2009 , 10 : 249-260 .
- [7] Michel R R , Elke B , Jürgen K . Cellular auxin homeostasis : Gatekeeping is housekeeping[J] . Mol Plant , 2012 , 5(4) : 772-786 .
- [8] Hélène R , Jiří F . Auxin and other signals on the move in plants[J] . Nat Chem Biol , 2009 , 5(5) : 325-332 .
- [9] Chris L , Demosthenis C , Charlotte K , et al . The novel cyst nematode effector protein 19C07 interacts with the *Arabidopsis* auxin influx transporter LAX3 to control feeding site development[J] . Plant Physiol , 2011 , 155 : 866-880 .
- [10] Xu C , Satoshi N , Stéphanie R , et al . ABP1 and ROP6 GTPase signaling regulate clathrin-mediated endocytosis in *Arabidopsis* roots[J] . Curr Biol , 2012 , 22(14) : 1326-1332 .
- [11] Richard N , Karine D , Catherine P R . A short story of auxin-binding proteins[J] . Plant Mol Biol , 2002 , 49 : 339-348 .
- [12] Keithanne M , Mark E . Auxin receptors and plant development : A new signaling paradigm[J] . Ann Rev Cell Dev Biol , 2008 , 24 : 55-80 .
- [13] Kate A D , Jessica B , Robert E S , et al . The *Arabidopsis* Aux/IAA protein family has diversified in degradation and auxin responsiveness[J] . The Plant Cell , 2006 , 18 : 699-714 .
- [14] William M G , Stefan K , Dean R , et al . Auxin regulates SCFTIR1-dependent degradation of AUX/IAA proteins [J] . Nature , 2001 , 414(6861) : 271-276 .
- [15] Tatsuaki G , Hiroyuki K , Tetsuro M , et al . Multiple AUX/IAA-ARF modules regulate lateral root formation : The role of *Arabidopsis* SHY2/IAA3-mediated auxin signaling[J] . Philosophical Transactions of the Royal Society B , 2012 , 367 : 1461-1468 .
- [16] Felipe S M , Johan M , Remko O . Auxin-induced , CFTIR1-mediated poly-ubiquitination marks AUX/ IAA proteins for degradation[J] . The Plant J , 2009 , 59 : 100-109 .
- [17] Naomi N , R chard S S , Therese M , et al . Mechanical regulation of auxin-mediated growth[J] . Curr Biol , 2012 , 22 : 1-9 .

- [18] Calderón V L , Lee S , De O C , et al . A combinatorial TIR1/AFB–Aux/IAA co–receptor system for differential sensing of auxin[J] . Nat Chem Biol , 2012 , 8 : 477–485 .
- [19] Huang S , Robinson R C , Gao L Y , et al . *Arabidopsis* VILLIN1 generates actin filament cables that are resistant to depolymerization[J] . The Plant Cell , 2005 , 17(2) : 486–501 .
- [20] Michelot A , Guerin C , Huang S , et al . The FORMIN HOMOLOGY 1 domain modulates the actin nucleation and bundling activity of *Arabidopsis* FORMIN1[J] . The Plant Cell , 2005 , 17 : 2296–2313 .
- [21] 张毅 , 屈贤铭 . 乳糖作为诱导剂对重组目的蛋白表达的影响[J] . 生物工程学报 , 2000 , 16 (4) : 464–468 .
- [22] 罗惠霞 , 李敏 , 王玉炯等 . 运用均匀设计法优化 rPA(K) 在原核系统中的表达条件[J] . 中国生物工程杂志 , 2007 , 27(7) : 94–99 .
- [23] 罗孟军 , 陈放 , 颜钊 , 等 . 麻疯树核糖体失活蛋白 curcin 在大肠杆菌中高效表达条件的研究[J] . 中国中药 , 2009 , 34(6) : 656–659 .
- [24] 王江 , 罗冬娇 , 孙爱华 , 等 . 基于响应面分析方法的钩端螺旋体三联属特异性蛋白抗原原核表达条件的优化[J] . 微生物学报 , 2008 , 48(7) : 893–899 .
- [25] Sassenfeld H M , Brewer S J . A polypeptide fusion designed for purification of recombinant proteins[J] . Bio–Technology , 1984 , 2 : 76–81 .
- [26] Hochuli E , Dbeli H , Schacher A . New metal chelate adsorbent selective for proteins and peptide containing neighbouring histidine residues[J] . J Chromatogr , 1987 , 411 : 177–184 .
- [27] Einhauer A , Schuster M , Wasserbauer E , et al . Expression and purification of homogenous proteins in *Saccharomyces cerevisiae* based on ubiquitin–FLAG fusion[J] . Protein Expr Purif , 2002 , 24 : 497–504 .
- [28] Schmidt T G M , Skerra A . The random peptide libraryassisted engineering of a C–terminal affinity peptide , useful for the detection and purification of a functional Ig Fv fragment[J] . Protein Eng , 1993 , 6 : 109–122 .
- [29] Xu Z , Bae W , Mulchandani A , et al . Heavy metal removal by novel CBD–EC20 sorbents immobilized on cellulose[J] . Biomacromolecules , 2002 , 3 : 462–465 .
- [30] Duplay P , Bedouelle H , Fowler A , et al . Sequence of male gene and of its product , the maltose–binding protein of *Escherichia coli* K12[J] . J Biol Chem , 1988 , 259 : 10606–10613 .
- [31] John D H , David J P . The glutathione–Transferase supergene family : Regulation of GST and the contribution of the Isoenzymes to cancer chemoprotection and drug resistance Part II[J] . Crit Rev Biochem Mol , 1995 , 30(6) : 521–600 .
- [32] Christoph S , Volker S , Konrad B . An automated method for high–throughput protein purification applied to a comparison of His–tag and GST–tag affinity chromatography[J] . BMC Biotechnol , 2003 , 3 : 1–8 .
- [33] Wu X , Oppermann U . High–level expression and rapid purification of rare–codon genes from hyperthermophilic archaea by the GST gene fusion system[J] . J Chromatogr B , 2003 , 786(1) : 177–185 .

责任编辑: 罗 维

英文编辑: 罗 维