

植物乳杆菌 *Lactobacillus plantarum* Y1 菌株 胆盐水解酶基因 (*bsh*) 的克隆及重组表达

黄茜, 黄璐, 潘道东, 杨瑶

(国家乳制品加工技术研发分中心, 南京师范大学食品科学与营养系, 江苏 南京 210097)

[摘要] 经同源蛋白比对分析设计引物, PCR 扩增获得植物乳杆菌 Y1 菌株 *bsh* 基因 (975 bp), 首先克隆至表达载体 pET-28a 转化 *E. coli* BL21(DE3) 菌株, IPTG 诱导表达, SDS-PAGE 分析结果显示表达的重组蛋白为包涵体. 选择能为大肠杆菌稀有密码子提供额外 tRNA 的 *E. coli* Rosetta(DE3) 作为宿主菌, 仍旧没有改善表达产物的可溶性. 但是, 选择含 IF2 融合蛋白标签的 pLS- IF2 质粒构建表达载体, SDS- PAGE 分析及 Western blot 鉴定结果显示表达的融合重组蛋白 IF2- BSH 具有可溶性. 该结果为进一步研究乳酸菌胆盐水解酶的生物活性, 结构功能关系的研究奠定了基础.

[关键词] 植物乳杆菌, 胆盐水解酶, 原核表达, 融合标签技术

[中图分类号] TS201.3 [文献标识码] A [文章编号] 1001-4616(2010)03-0091-06

Molecular Cloning and Expression of the Bile Salt Hydrolase Gene (*bsh*) From *Lactobacillus plantarum* Y1

Huang Qian, Huang Lu, Pan Daodong, Yang Yao

(Branch Center of National Dairy Products Processing Technology Development Department of Food Science and Nutrition
Nanjing Normal University Nanjing 210097, China)

Abstract Based on the homologous protein BLAST result, the *bsh* gene of *Lactobacillus plantarum* Y1 (975 bp) was amplified by PCR and subcloned into expression vector pET-28a. The constructed recombinant plasmid pET-28a-BSH was transformed to *Escherichia coli* BL21(DE3) for expression under induction of IPTG. SDS-PAGE profile indicated that the expressed protein mainly existed in a form of inclusion body. The solubility of the expressed protein was not improved when choosing *E. coli* Rosetta(DE3) as the expression host that could supply additional tRNA for rare codons. However, when pLS-IF2 was chosen to construct the expression plasmid that contained the fusion protein tag "IF2", SDS-PAGE profile and Western blot results showed that the expressed product IF2-BSH junction to improve the solubility efficiency, respectively. Therefore, on basis of the fusion tags technology, the *bsh* gene of *L. plantarum* Y1 was successfully cloned and expressed in *E. coli*, which laid a foundation of study on bioactivity and relation between structure and functions of Bile Salt Hydrolase from *Lactobacillus p.*

Key words *Lactobacillus plantarum*, Bile salt hydrolase, prokaryotic expression, fusion tags technology

血清中高胆固醇含量被认为是诱发高血压、冠心病等众多心血管疾病的重要因素. 1984 年 Gilliland 等报道, 从猪粪便分离的嗜酸乳杆菌 *Lactobacillus acidophilus* RP32 在实验条件下生长能够吸收培养基中的胆固醇^[1], 此后, 一些具有降低血清中的胆固醇功能的乳酸菌陆续被报道. 胆盐水解酶 (Bile Salt Hydrolase, BSH, EC 3. 5. 1. 24), 在肝肠循环中它可水解结合胆盐 (主要是甘氨酸胆盐和牛磺胆盐) 为游离胆盐. 由于没有胆盐水解酶活性的菌不能明显脱除胆固醇, 所以胆盐水解酶 (BSH) 活性测定被普遍认为是筛选降低胆固醇功能的益生菌的一个条件^[2].

目前, 已有一些 BSH 酶从多种微生物中得以纯化和鉴定^[3-5]. 近几年, 一些菌种的 BSH 酶基因被克隆

收稿日期: 2010-05-12

基金项目: 江苏省高校自然科学基金 (09KJB550003).

通讯联系人: 杨瑶, 博士, 讲师, 研究方向: 功能乳酸菌的筛选及分子生物学. E-mail: cranny_yang@hotmail.com

表达, 包括产气荚膜梭菌 *Clostridium perfringens*、植物乳杆菌 *L. plantarum*、约氏乳杆菌 *L. johnsonii* 长双歧杆菌 *B. longum* 和单核增生性李斯特菌 *Listeria monocytogenes* 但是, 报道的重组 BSH 酶在其基因结构、蛋白组成和底物特异性等方面都有很多不同。目前, 乳杆菌 *Lactobacillus* sp. 具有降胆固醇功能被报道最多, 其降胆固醇的水平也较高, 但是只有几个乳杆菌属菌株的 BSH 酶基因被克隆表达, 分别是: 植物乳杆菌 *L. plantarum* 80^[6]、植物乳杆菌 *L. plantarum* WCFS1^[7-8]、约氏乳杆菌 *L. johnsonii* 100-100^[9] 和嗜酸乳杆菌 *L. acidophilus* PFO1^[10], 因此, 越来越多的乳杆菌的 BSH 酶有待通过基因克隆与功能表达得到鉴定。

国内关于益生菌降胆固醇功能的研究起步较晚, 虽然已有一些具有降胆固醇能力的菌株被相继报道, 但至今尚无关于 BSH 酶基因成功克隆表达及对蛋白功能的研究报道。2009 年 ZHANG W Y 等人克隆了干酪乳杆菌 *L. casei* Zhang 的 *bsh* 基因, 并分析了该基因的结构及翻译的蛋白序列^[11]; 2009 年战媛媛等人报道了植物乳杆菌胆盐水解酶基因的原核表达, 研究表明重组蛋白主要以包涵体形式存在^[12]。可见, 乳酸菌胆盐水解酶的克隆及可溶性蛋白的表达是研究胆盐水解酶结构与功能的技术瓶颈。因此, 本研究选择植物乳杆菌为研究对象, 采用融合标签技术进行胆盐水解酶的克隆与重组表达研究, 为乳酸菌胆盐水解酶及其降胆固醇功能的研究提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 菌株及质粒

植物乳杆菌 *L. plantarum* Y1、*Escherichia coli* 10B、*E. coli* BL21(DE3)、*E. coli* Rosetta(DE3) 菌株及表达载体 pET-28a 和 pLS-IF2^[13] 均为实验室保藏菌种及质粒; pMD18-T 载体购自宝生物工程(大连)有限公司。

1.2 主要试剂

TaqDNA 聚合酶、BamHI、SalI 等限制性内切酶、T4 DNA 连接酶、DNA marker DL2000 及质粒提取试剂盒和 DNA 凝胶回收纯化试剂盒均购自宝生物工程(大连)有限公司; 氨苄西林和卡那霉素购自上海生工生物工程有限公司; 抗 HisTag 分子抗体购自 NOVAGEN 公司; PVDF 膜购自 Millipore 公司; 其它试剂均为国产分析纯。

1.3 *bsh* 基因的克隆及测序

参照 GenBank 中登录的胆盐水解酶基因序列 (EU 477374), 利用 Primer 5 软件设计 1 对扩增 BSH 酶编码区序列的特异性引物, 序列如下: 上游引物: 5'-GGG GGATCCATGTGTA CTGCCATAACTTATG-3' (引入 BamHI 酶切位点); 下游引物: 5'-GGG CTCGAGGTTAACTGCATAGTATTGTGC-3' (引入 XhoI 酶切位点), 引物由宝生物工程(大连)有限公司合成。参照文献^[14] 方法。提取植物乳杆菌基因组 DNA, 以其为模板, PCR 扩增 BSH 基因, 反应体系: 2.5 μL 10×PCR buffer, 2 μL dNTPs, 1 μL 模板, 0.5 μL 引物, 0.2 μL TaqDNA 聚合酶, 加 ddH₂O 补足体积至 25 μL。反应条件: 95℃预变性 5 min, 94℃变性 50 s, 60℃退火 50 s, 72℃延伸 1 min, 共 30 个循环; 72℃再延伸 10 min^[14]。PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳进行鉴定。用凝胶回收试剂盒回收特异性目的基因片段, 与 pMD18-T 载体于 16℃连接过夜, 转化感受态 *E. coli* 10B, 经蓝白斑筛选阳性重组子, 小量提取质粒, 进行 PCR 及双酶切鉴定, 阳性质粒送上海生工生物工程技术有限公司测序。

1.4 重组蛋白 BSH 表达质粒的构建

用 BamHI 和 XhoI 分别双酶切阳性重组质粒 pMD18-BSH 和表达载体 pET-28a 纯化回收目的基因片段和载体片段, 用 T4 DNA 连接酶连接, 转化感受态 *E. coli* 10B, 提取质粒, 双酶切鉴定, 阳性重组表达质粒命名为 pET-28a-BSH。

1.5 重组融合蛋白 IF2-BSH 蛋白表达质粒的构建

用 BamHI /XhoI 限制性内切酶从阳性 TA 克隆载体上切下 *bsh* 基因序列并胶回收, 与同样酶切的含 His-tag 和 IF2 融合蛋白标签的 pLS-IF2 表达载体 16℃连接反应 2 h, 将 *bsh* 基因插入 pLS-IF2 表达载体启动子下游, 构建融合蛋白表达质粒 pLS-IF2-BSH, 转化 *E. coli* 10B 感受态, 涂布于含 30 μg/mL 卡那霉素的 LB 平板上, 挑选菌落、质粒抽提并经酶切鉴定筛选阳性单克隆。阳性克隆送上海生工生物工程技术有限公司测序。

1.6 *bsh*基因的诱导表达

将重组表达质粒转化感受态 *E. coli* BL21 (DE3)或 *E. coli* Rosetta (DE3)菌株, 挑取单个菌落, 接种于 3 mL 含 30 μg/mL 卡那霉素的 LB 培养基中, 37℃ 振荡培养过夜, 再以 2: 100 的比例转种于 5 mL 含 30 μg/mL 卡那霉素的 LB 培养基中, 培养至 A_{600} 值为 0.6~0.8 时, 加入 IPTG 至终浓度为 1 mmol/L, 37℃ 振荡培养 3 h, 离心收集细菌沉淀, 按 10: 1 的比例加入 20 mmol/L Tris•HCl 缓冲液, 超声破碎细菌, SDS-PAGE 电泳分析蛋白表达情况. 取诱导表达 3 h 的细菌沉淀超声破碎产物 4℃ 下 12 000 × g 离心 15 min, 分别收集上清和沉淀, 加入 SDS-PAGE 电泳上样缓冲液, 检测上清和沉淀中重组蛋白的表达.

1.7 重组蛋白的 Western blot 分析

蛋白样品经 SDS-PAGE 分离后转 PVDF 膜 (MILLIPORE Immobilon-P). 转膜缓冲液成分是浓度为 25 mmol/L Tris, 190 mmol/L 甘氨酸, 20% (V/V) 甲醇, 转膜时间 70 min, 电场强度 0.9 mA/cm². Western blot 的抗体是 HisTag Monoclonal Antibody (NOVAGEN).

2 结果

2.1 *bsh*基因的克隆

运用 Mega 3.1 软件对已报道的植物乳杆菌 *L. plantarum* 不同菌株的 BSH 蛋白氨基酸序列进行相似性分析, 见表 1, 结果显示植物乳杆菌 *L. plantarum* 不同菌株的 BSH 蛋白相似性非常高 (98%~100%). 故参照 GenBank 中登录的胆盐水解酶基因序列 (EU477374), 设计特异性引物扩增植物乳杆菌 *L. plantarum* Y1 菌株的 *bsh* 基因.

以植物乳杆菌 *L. plantarum* Y1 菌株基因组为模板, PCR 扩增可能的 *bsh* 基因 (见图 1), 连接到载体 pMD18-T 上, 经双酶切验证, 测序, 所获得的 *bsh* 基因序列递交 Genbank 登陆号 HM163165

扩增的基因全长 975 bp, 编码 324 个氨基酸, 计算其蛋白的相对分子质量为 37 040.68

2.2 BSH 蛋白的重组表达

首先选择 *E. coli* BL21 (DE3) 作为宿主菌进行 *bsh* 基因的重组表达. 按方法 1.4 叙述, 获得的重组表达质粒 pET-28a-BSH 电转化 *E. coli* BL21 (DE3), 得到重组菌 *E. coli* BL21 (DE3) [pET-28a-BSH]. 诱导表达培养后, 对重组菌细胞提取液进行 SDS-PAGE 分析, 结果显示全蛋白

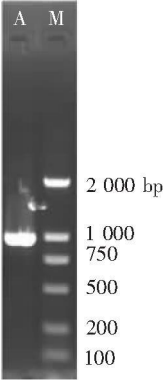
样品中在相对分子质量约 37 000 处可见特异的蛋白表达条带, 大小与预期相符, 但细胞上清液样品中未出现特异的蛋白表达条带, SDS-PAGE 图未列出. 该结果说明蛋白表达主要以包涵体形式存在, 这与战媛媛等人报道的植物乳杆菌 *bsh* 基因表达是包涵体的结果相同^[12]. 改变不同诱导表达条件 (37℃ 诱导 2~8 h, 30℃ 诱导 2~12 h 和 16℃ 诱导 12~36 h, IPTG 诱导浓度梯度 0.1~1 mmol/L) 后, 细胞上清液样品中均未检测到可溶性蛋白表达条带.

采用 MorrisM aduio 开发的 “*E. coli* Codon Usage Analysis 2.0” 分析软件 (<http://www.lifesci.ucsb.edu/maduio/codonusage/usage2.0c.htm>) 对植物乳杆菌 *L. plantarum* Y1 菌株 *bsh* 基因序列进行详尽分析发现, *bsh* 基因中含有 6.5% 的稀有密码子 (甘氨酸密码子 GGA、GGG, 脯氨酸密码子 CCC, 亮氨酸密码子 TTG、CTA, 精氨酸密码子 AGG、AGA). 这一结果表明, 较多稀有密码子的存在导致重组蛋白表达的困难, 必需选择能够为上述稀有密码子 (AUA, AGG, AGA, CUA, CCC, GGA) 提供额外 tRNA 的菌株作为表达宿

表 1 植物乳杆菌 *L. plantarum* 不同菌株的 BSH 蛋白氨基酸序列相似性分析/%

Table 1 Identities analysis based on the amino acid sequence of BSH proteins from different *L. plantarum* strains/%

植物乳杆菌	2	3	4
1 <i>L. plantarum</i> 80 CABH (AAA25233.1)	100	99.4	98.5
2 <i>L. plantarum</i> DSM 4229 CABH (Q06115.4)		99.4	98.5
3 <i>L. plantarum</i> WFGS1 BSH1 (CAD65617.1)			99.1
4 <i>L. plantarum</i> b529 BSH (ACL93397.1)			



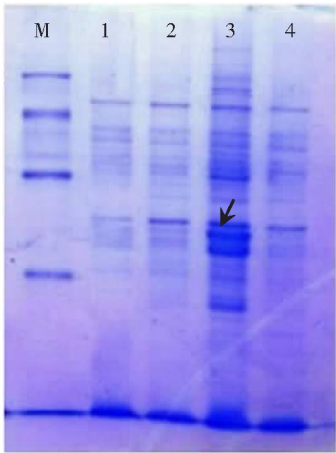
M, DL2000; A, 扩增的 *bsh* 基因 975 bp

图 1 *bsh* 基因 PCR 扩增产物电泳图

Fig.1 Electrophoretic profile of PCR product of *bsh* gene

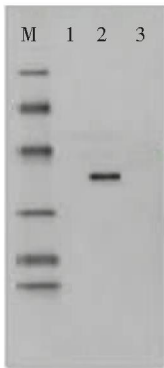
主,才有可能提高目标蛋白表达水平及生物活性. *E. coli* Rosetta(DE3)作为 BL21的突变株,能够为上述稀有密码子提供额外 rRNA,将其作为 *bsh* 基因的表达菌株可能提高蛋白的表达水平.

选择 *E. coli* Rosetta(DE3)菌株作为宿主菌进行 *bsh* 基因的重组表达,构建重组菌 *E. coli* Rosetta [pET-28a-BSH]. 诱导表达培养后,对重组菌细胞提取液进行 SDS-PAGE 分析,如图 2所示, *bsh* 基因在宿主 *E. coli* Rosetta(DE3)菌株中的表达与在宿主 *E. coli* BL21(DE3)菌株中的表达情况相似,全蛋白样品中在相对分子质量约 37 000处可见特异的蛋白表达条带,但细胞上清液样品中未出现特异的蛋白表达条带.采用抗 HisTag 抗体进行 Western-blot检测,在全蛋白样品栏中出现一条清晰的相对分子质量约 37 000 的条带,与计算的 BSH 相对分子质量相对应,而细胞上清液样品和未诱导表达的对照样品均没有出现条带(图 3).



M.蛋白质 marker;1.空载质粒对照;2.未诱导的重组表达菌;
3.诱导的重组表达菌全蛋白;4.诱导的重组表达菌破菌上清
图 2 重组菌 *E. coli* Rosetta [pET-28a-BSH]表达产物的
SDS-PAGE 分析

Fig.2 SDS-PAGE profile of expressed product form *E. coli* Rosetta [pET-28a-BSH]



M.蛋白预染 marker;1.未诱导的重组表达菌;2.诱导的
重组表达菌全蛋白;3.诱导的重组表达菌破菌上清
图 3 重组菌 *E. coli* Rosetta[pET-28a-BSH]表达产物的
Western-blot 鉴定

Fig.3 Western-blot profile of expressed product form *E. coli* Rosetta [pET-28a-BSH]

2. 3 BSH-IF2 融合蛋白的重组表达

采用含 His-tag和 IF2融合蛋白标签的 pLS-IF2表达载体,按方法 1. 5构建融合蛋白表达质粒 pLS-IF2-BSH,质粒图谱如图 4 其中,融合蛋白标签 IF2由 158 个氨基酸编码,计算其蛋白相对分子质量为 17 752. 67,因此,BSH-IF2融合蛋白的大小计算值约为 55 000

将 pLS-IF2-BSH 电转化 *E. coli* Rosetta(DE3),得到重组菌 *E. coli* Rosetta [pLS-IF2-BSH]. 诱导表达培养后,对重组菌细胞提取液进行 SDS-PAGE 分析,见图 5 结果显示全蛋白样品中在相对分子质量约 55 000处可见特异的蛋白表达条带,大小与预期的融合蛋白大小相同.值得注意的是细胞上清液样品中相同位置也出现特异的蛋白表达条带.该结果说明 IF2-BSH 融合重组蛋白可溶性表达.采用抗 HisTag 抗体进行 Western- blot检测,在全蛋白和细胞上清液样品栏中均出现清晰的相对分子质量约 55 000的条带,大小与计算的融合蛋白 IF2-BSH 相对分子质量相对应,而未诱导表达的对照样品均没有出现条带(图 6).

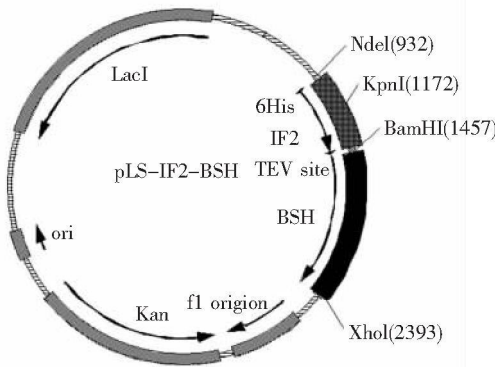
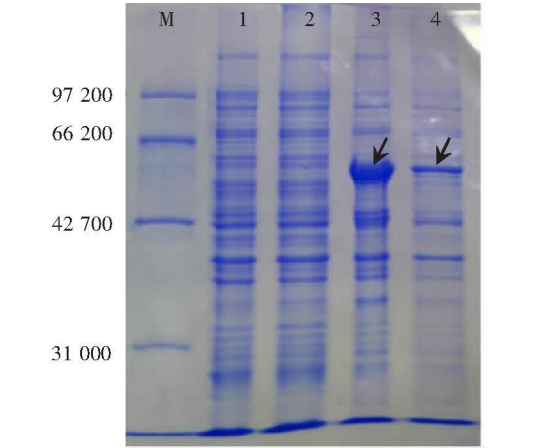


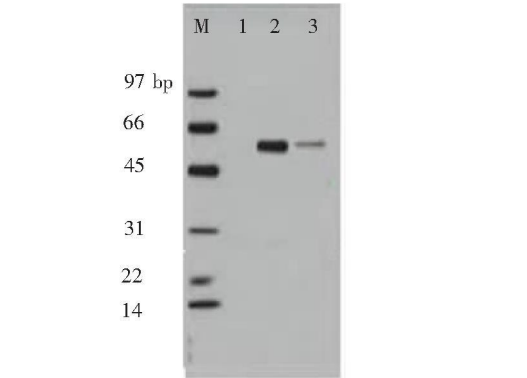
图 4 表达质粒 pLS-IF2-BSH 图谱
Fig.4 The map of the plasmid pLS-IF2-BSH



M.蛋白质 marker;1.空载质粒对照;2.未诱导的重组表达菌;
3.诱导的重组表达菌全蛋白;4.诱导的重组表达菌破菌上清

图 5 重组菌 *E. coli* Rosetta [pLS-IF2-BSH]表达产物
的 SDS-PAGE 分析

Fig.5 SDS-PAGE profile of expressed product form
E. coli Rosetta [pLS-IF2-BSH]



M.蛋白预染 marker;1.未诱导的重组表达菌;2.诱导的
重组表达菌全蛋白;3.诱导的重组表达菌破菌上清

图 6 重组菌 *E. coli* Rosetta [pLS-IF2-BSH]表达产物的
Western-blot 鉴定

Fig.6 Western-blot profile of expressed product form
E. coli Rosetta [pLS-IF2-BSH]

3 讨论

融合标签是一个广义的概念，根据其相对分子质量可以分为两大类：大的蛋白质分子（或蛋白质结构域及其衍生物）和小的多肽片段如最常见的 6×his 标签^[15]。迄今为止，已有很多文献较为详尽地报道了各种融合标签，其大小从几个氨基酸到整个蛋白质，相互作用类型包括了酶与底物、细菌受体与血清蛋白、聚组氨酸与金属离子、抗原与抗体等等^[16-18]。

本研究首先采用常规原核表达方法及选择带 6×his 融合标签的 pET28a 为表达载体，宿主菌 *E. coli* BL21(DE3) 表达结果显示全蛋白样品中出现预期条带但细胞上清液样品中未出现，说明蛋白表达主要以包涵体形式存在，这与战媛媛等人报道的植物乳杆菌 *bsh* 基因表达是包涵体的结果相同^[12]。根据稀有密码子分析，选择能为大肠杆菌稀有密码子提供额外 tRNA 的 *E. coli* Rosetta(DE3) 作为宿主菌，仍旧没有改善表达产物的可溶性。在大肠杆菌中外源基因表达目的产物的形式有可溶表达和包含体表达两种，以包含体形式表达的外源目的产物不具有物理活性，必须溶解包含体进行复性，且目的蛋白的复性至今没有通用的有效方法。由此可见，乳酸菌胆盐水解酶可溶性蛋白的表达是研究胆盐水解酶结构与功能的技术瓶颈，而这也可能是只有几个乳杆菌属菌株的 BSH 酶基因克隆表达研究报道的原因。

为提高重组蛋白的可溶性，本研究进而选择含 His-tag 和 IF2 融合蛋白标签的 pLS-IF2 表达载体，结果显示重组表达的融合蛋白 IF2-BSH 可溶性表达，这是融合标签技术在植物乳杆菌 *bsh* 基因重组表达研究中的成功应用，为检测重组蛋白生物活性提供可能。

但是，融合蛋白标签技术也存在不足之处，如靶蛋白质上引入的融合标签需要在融合蛋白纯化后通过一定方式切除。因此，接下来需要开展融合蛋白的纯化及融合标签的切除实验，进而开展对 BSH 酶功能鉴定的研究，这一部分的实验正在进行中。

[参考文献]

[1] Gilliland S E, Nelson C R, Maxwell C. Assimilation of cholesterol by *Lactobacillus acidophilus* [J]. Appl Environ Microbiol 1985, 49: 377-381.
[2] Máire B, Colin H, Comac G M. Bile salt hydrolase activity in probiotics [J]. Appl Environ Microbiol 2006, 72: 1729-1738.
[3] Dean M, Cervellati C, Casanova E, et al. Characterization of cholyglycine hydrolase from a bile-adapted strain of *Xanthomonas maltophilia* and its application for quantitative hydrolysis of conjugated bile salts [J]. Appl Environ Microbiol

- 2002, 68, 3: 126-3: 128.
- [4] Knarreborg A, Engberg R M, Jensen S K, et al. Quantitative determination of bile salt hydrolase activity in bacteria isolated from the small intestine of chickens[J]. *Appl Environ Microbiol*, 2002, 68: 6425-6428.
- [5] Stellwag E J, Hyslop P B. Purification and characterization of bile salt hydrolase from *Bacteroides fragilis* subsp. *fragilis* [J]. *Biochim Biophys Acta*, 1976, 452: 165-176.
- [6] Christaens H, Leer R J, Pouwels P H, et al. Cloning and expression of a conjugated bile acid hydrolase gene from *Lactobacillus plantarum* by using a direct plate assay[J]. *Appl Environ Microbiol*, 1992, 58: 3792-3798.
- [7] Kleerebezem M, Boekhorst J, Knaanburg R V, et al. Complete genome sequence of *Lactobacillus plantarum* WCFS1[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100: 1990-1995.
- [8] Lambert J M, Bongers R S, Kleerebezem M. Cre-lox-based system for multiple gene deletions and selectable marker removal in *Lactobacillus plantarum*[J]. *Appl Environ Microbiol*, 2007, 73: 1126-1135.
- [9] Elkins C A, Moser S A, Savage D C. Genes encoding bile salt hydrolases and conjugated bile salt transporters in *Lactobacillus johnsonii* 100-100 and other *Lactobacillus* species[J]. *Microbiology*, 2001, 147: 3403-3412.
- [10] Oh Hae-Keun, Lee J Y, et al. Molecular cloning and characterization of a bile salt hydrolase from *Lactobacillus acidophilus* PF01[J]. *J Microbiol*, 2008, 18: 449-456.
- [11] Zhang W Y, Wu R N, Sun Z H, et al. Molecular cloning and characterization of bile salt hydrolase in *Lactobacillus casei* Zhang[J]. *Annals of Microbiology*, 2009, 59(4): 721-726.
- [12] 战媛媛, 王长远, 于长青. 植物乳杆菌中胆盐水解酶基因的原核表达及纯化[J]. *中国生物制品学杂志*, 2009, 22(9): 876-879.
- [13] Sørensen H P, Petersen H U, Mortensen K K. A favorable solubility partner for the recombinant expression of streptavidin [J]. *Protein Express and Purif*, 2003, 32: 252-259.
- [14] 萨姆布鲁克 J, 拉 W. 分子克隆实验指南[M]. 2 版. 黄培堂, 译. 北京: 科学出版社, 1999.
- [15] 李永进, 陈媛媛, 毕利军. 融合标签技术及其应用[J]. *生物工程学报*, 2006, 22(4): 523-527.
- [16] Tepe K. Overview of tag protein fusions: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems[J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2003, 60: 523-533.
- [17] Hearn M T W, Acosta D. Applications of novel affinity cassette methods: use of peptide fusion handles for the purification of recombinant proteins[J]. *J Mol Recognit*, 2001, 14: 323-369.
- [18] Uhlen M, Forsberg G, Moks T, et al. Fusion proteins in biotechnology[J]. *Curr Opin Biotech*, 1992, 3(4): 363-369.

[责任编辑: 孙德泉]