

# 重组大肠杆菌单链结合蛋白性质表征及其在提高焦磷酸测序准确性中的应用

王建平<sup>1,2</sup>, 邹秉杰<sup>1,2</sup>, 陈之遥<sup>2</sup>, 马寅姣<sup>1,2</sup>, 徐澍<sup>1,2</sup>, 周国华<sup>1,2</sup>

1 中国药科大学生命科学与技术学院, 南京 210009

2 华东医学生物技术研究所, 南京 210002

**摘要:** 利用基因工程手段表达了分子量约为 24 kDa 的重组大肠杆菌单链结合蛋白 (r-SSBP), 通过凝胶阻滞电泳与 DNA 熔解温度 ( $T_m$ ) 影响实验表征了 r-SSBP 与单链 DNA (ssDNA) 结合的特性, 结果表明, r-SSBP 可以与 ssDNA 结合, 并且能够降低 DNA 的  $T_m$  值, 同时还能增大含有单个错配碱基的 DNA 与完全匹配的 DNA 的  $T_m$  值差异, 这一特性在提高单核苷酸多态性检测的特异性方面具有潜在的应用价值。此外, 将 r-SSBP 应用于本课题组开发的高灵敏度焦磷酸测序体系中测定已知序列 ssDNA 模板, 结果表明, r-SSBP 能够有效降低非特异信号, 改善信号峰比例, 提高焦磷酸测序的准确度, 为完善高灵敏度焦磷酸测序体系奠定了基础。

**关键词:** 大肠杆菌, 单链结合蛋白, 凝胶阻滞电泳, 焦磷酸测序

## Characterization of recombinant single-stranded DNA-binding protein from *Escherichia coli* and its application in accurate pyrosequencing

Jianping Wang<sup>1,2</sup>, Bingjie Zou<sup>1,2</sup>, Zhiyao Chen<sup>2</sup>, Yinjiao Ma<sup>1,2</sup>, Shu Xu<sup>1,2</sup>, and Guohua Zhou<sup>1,2</sup>

1 School of Life Science and Technology, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China

2 East China Research Institute for Medicine and Biotechnics, Nanjing 210002, China

**Abstract:** We expressed recombinant single-stranded DNA-binding protein (r-SSBP) from *Escherichia coli* with the molecular weight of 24-kDa by using genetic engineering strategy, and demonstrated the single-stranded DNA (ssDNA)-binding activity of r-SSBP by electrophoretic mobility shift assay (EMSA). To further characterize r-SSBP, we studied the effects of r-SSBP on melting temperature ( $T_m$ ) of DNA. The results showed that r-SSBP could bind to ssDNA, and lower the  $T_m$  of DNA, especially for single-base mismatched DNA. Therefore, r-SSBP significantly increased the  $T_m$  difference between single-base mismatched DNA and perfect matched DNA. These results are very beneficial for single-nucleotide polymorphism detection. Moreover, we applied r-SSBP in high

**Received:** February 12, 2011; **Accepted:** May 23, 2011

**Supported by:** National Natural Science Foundation of China (No. 20975113), Key Technology R&D Program of Jiangsu Province (No. BE2010604).

**Corresponding author:** Guohua Zhou. Tel: +86-25-84514223; E-mail: ghzhou@nju.edu.cn

国家自然科学基金 (No. 20975113), 江苏省科技支撑计划 (No. BE2010604) 资助。

sensitive pyrosequencing system developed by our group. The results suggest that the r-SSBP decreased non-specific signals, corrected the proportion of signal peak height and improved the performance of pyrosequencing.

**Keywords:** *Escherichia coli*, single-stranded DNA-binding protein, electrophoretic mobility shift assay, pyrosequencing

大肠杆菌 *Escherichia coli* 单链结合蛋白 (SSBP) 是其体内一种与 DNA 复制相关的蛋白, 它可以结合于 DNA 复制时形成的复制叉中的单链区域, 阻止新形成的单链 DNA (Single-stranded DNA, ssDNA) 重新配对形成双链 DNA (Double-stranded DNA, dsDNA), 并且能够防止 ssDNA 被核酸酶降解<sup>[1]</sup>。通常, *E. coli* SSBP 是以四聚体的形式结合到 ssDNA 上, 使 ssDNA 呈伸展状态, 没有弯曲和结节, 因此, SSBP 具有维持 ssDNA 稳定、减少 ssDNA 二聚体的形成等作用<sup>[2-4]</sup>, 同时, SSBP 还具有促进 DNA 解链的作用<sup>[5-6]</sup>, 但对含单碱基错配 DNA 与完全匹配 DNA 的促解链作用的差异, 尚无文献报道。

SSBP 在分子生物学研究中有很多应用, 如毛细管电泳<sup>[7]</sup>、PCR<sup>[8]</sup>、焦磷酸测序<sup>[9-10]</sup>等。焦磷酸测序 (Pyrosequencing) 技术<sup>[11-12]</sup>是在 DNA 聚合酶、三磷酸腺苷硫酸化酶、荧光素酶和三磷酸腺苷双磷酸酶四种酶的协同作用下, 测定测序引物延着待测模板延伸产生的焦磷酸盐 (PPi) 的生物发光测序技术。本实验室在先前的研究工作中, 已经成功表达了用于焦磷酸测序的 ATP 硫酸化酶<sup>[13-14]</sup>、荧光素酶<sup>[15]</sup>、丙酮酸磷酸双激酶<sup>[16]</sup>等关键酶, 初步建立了高灵敏度的焦磷酸测序体系<sup>[17]</sup>, 并将其应用于 DNA 检测<sup>[18]</sup>、基因表达量测定<sup>[19]</sup>等方面。但是对于一些具有复杂结构的测序 DNA 模板, 往往得不到准确的测序结果。有文献报道将 SSBP 应用在焦磷酸测序中, 能够显著降低测序过程中的非特异信号, 提高测序的准确性<sup>[9-10]</sup>。

本研究利用基因工程手段, 表达了带有组氨酸标签的重组 *E. coli* SSBP (Recombinant SSBP, r-SSBP), 在利用凝胶阻滞电泳验证 r-SSBP 具有 ssDNA 结合活性后, 通过测定 DNA 的  $T_m$  值, 表征了对含单碱

基错配 DNA 与完全匹配 DNA 促解链作用的差异, 最后将 r-SSBP 应用于本实验室开发的高灵敏度焦磷酸测序体系中, 用来提高焦磷酸测序准确性。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 质粒与菌株

表达载体 pET28a(+), 宿主菌 ArcticExpress™ 均为实验室保存。

#### 1.1.2 引物与探针序列

引物与探针序列见表 1。

#### 1.1.3 主要仪器与试剂

EDC-810 型基因扩增仪 (中国, 东胜创新生物科技有限公司), PowerPac 1000 高压电源 (美国, BIO-RAD 公司), GenGenius 凝胶电泳成像仪 (美国, Syngene 公司), Gene Spe III 7A0-0038 型紫外可见分光光度计 (日本, NaKa Instruments 公司), Beckman 21R 型冷冻离心机 (美国, 贝克曼库尔特有限公司), 小型生物发光分析仪 (日本, 日立公司)。

限制性内切酶、*Taq* DNA 聚合酶、*Hind* III 和 *Bam* H I 限制性内切酶均自大连 TaKaRa 公司; T4 DNA 连接酶、蛋白质分子质量标准、PCR 产物纯化试剂盒等购自 TaKaRa 公司; 蛋白胨等购自 Oxoid 公司; 异丙基- $\beta$ -D-硫代半乳糖苷 (IPTG) 等购自 Amresco 公司; 链霉亲和素修饰磁珠 (Dynabeads M-280 streptavidin) 购自 Invitrogen 公司;  $\alpha$ -硫化脱氧三磷酸腺苷 (dATPaS)、dGTP、二硫苏糖醇和 dCTP 购自 Amersham Pharmacia, Biotech 公司。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 pET28a(+)-ssb 重组质粒构建与 SSBP 融合表达

酚-氯仿法提取大肠杆菌基因组 DNA<sup>[20]</sup>, 并以

此作为模板，PCR 扩增 *ssb* 基因，引物为 *ssb*-1 和 *ssb*-2 (表 1)，热循环条件为：94 ℃ 预变性 5 min；94 ℃ 10 s，55 ℃ 30 s，72 ℃ 45 s，35 个循环；最后 72 ℃ 延伸 5 min。PCR 产物经纯化试剂盒纯化，用 *Hind*Ⅲ 和 *Bam*H I 限制性内切酶进行双酶切，插入到经同样双酶切的 pET28a(+) 质粒中，转化进入宿主菌 ArcticExpress™ 中，重组菌送上海华大公司测序，筛选得到阳性重组菌。

将过夜活化的阳性重组菌按 1% 接种量接种于 100 mL 的 LB (Kan<sup>+</sup>, 30 mg/L) 液体培养基中，37 ℃、150 r/min 振荡培养至 A<sub>600</sub> 达 0.6~0.7，加入 IPTG 至终浓度 0.01 mmol/L，30 ℃、160 r/min 诱导表达 4 h，离心收集菌体，用磷酸缓冲液洗涤后，重悬于 1×结合缓冲液 (0.5 mol/L NaCl, 20 mmol/L Tris-HCl, 5 mmol/L 咪唑, pH 7.9) 中，加入溶菌酶至 100 mg/L，超声破菌。4 ℃、12 000×g 离心 20 min，收集上清，采用 Ni<sup>+</sup>柱亲和层析法纯化，十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 分析。

1.2.2 凝胶阻滞电泳

于 10 μL r-SSBP 储存缓冲液 (6 mmol/L Tris-HCl, 150 mmol/L NaCl, 0.3 mmol/L EDTA, 0.3 mmol/L 二硫苏糖醇) 中，分别加入 r-SSBP 使终浓度分别为 0、2.5、7.5、12.5、25 μmol/L，然后加入 ssDNA S-1 (表 1) 使终浓度为 1 μmol/L，室温孵育 10 min，加入等体积 2×上样缓冲液 (0.08% 溴酚蓝，13% 蔗糖) 混匀，进行 10% 的核酸聚丙烯酰胺凝胶电泳 (110 V, 40 min)，银染色<sup>[20]</sup>，与不加 ssDNA S-1 (表 1) 的反应产物作对比。

1.2.3 T<sub>m</sub> 值的测定

于 25 μL T<sub>m</sub> 测定反应液 (7.2 mmol/L Tris-HCl, 180 mmol/L NaCl, 0.36 mmol/L EDTA, 0.36 mmol/L 二硫苏糖醇, 1.2 μmol/L T-1 (表 1), 2 μL 1×SYBR Green I) 中，分别加入 T-2、T-3、T-4、T-5 (表 1) 使终浓度为 1.2 μmol/L，然后加入 r-SSBP 使终浓度分别为 0、7.5、22.5、30、37.5 μmol/L，90 ℃ 30 s，室温放置 10 min，利用实时荧光 PCR 仪测定 T<sub>m</sub> 值。

表 1 引物与探针序列  
Table 1 Oligonucleotides sequences used in this study

No.	Sequences (5'–3')	Description
<i>ssb</i> -1	GCGCGGATCCATGGCCAGCAGAGGCGTAAACAA	Upstream primer for amplifying the <i>ssb</i> gene
<i>ssb</i> -2	GCGCAAGCTTTCAGAACGGAATGTCATCATCAAA	Downstream primer for amplifying the <i>ssb</i> gene
S-1	AGGCAAATACGCTCGCGGTATTCTGGCGAACTACGGCATT GAACGATC	The oligonucleotide used for electrophoretic mobility shift assay
T-1	CTATTGCACCAGGCCAGATGAGAGAACCAAGGGGAAGT GACAT	The template used for the detection of T <sub>m</sub>
T-2	ATGTCACCTTCCCCCTTGGTTCTCTC	The matched probe used for the detection of T <sub>m</sub>
T-3	ATGTCACCTTCCCGTTGGTTCTCTC	The G/G mismatched probe used for the detection of T <sub>m</sub>
T-4	ATGTCACCTTCCCtTTGGTTCTCTC	The T/G mismatched probe used for the detection of T <sub>m</sub>
T-5	ATGTCACCTTCCCaTTGGTTCTCTC	The A/G mismatched probe used for the detection of T <sub>m</sub>
35s-1	bio-TGATGTGATATCTCCACTGACG	Upstream primer for amplifying fragment of 35s gene
35s-2	ACAACATGGCACAAGGGATACA	Downstream primer for amplifying fragment of 35s gene
35s-3	TGATGTGATATCTCCACTGACG	Sequencing primer of the 35s gene fragment
H-1	bio-TATGCATACAAAATTGTCAAG	Upstream primer for amplifying fragment of HA gene
H-2	ACCTGCTATAGCTCCAAATAG	Downstream primer for amplifying fragment of HA gene
H-3	CTATTTGGAGCTATAGCAGGT	Sequencing primer of the HA gene fragment

The sequences of *GGATCC* and *AAGCTT* in italic characters are the restriction sites of *Bam*H I and *Hind* III, respectively; T-2 is a probe complementary to the 3' end of T-1; T-3, T-4, T-5 have one different base (marked with lowercase letter) from T-2 at the same position. All oligonucleotides were synthesized by Invitrogen (Shanghai).

### 1.2.4 焦磷酸测序

利用植物基因组 DNA 提取试剂盒 (Qiagen) 提取得到的转基因大豆基因组 DNA 以及全基因合成的禽流感病毒 HA 基因片段 (上海英骏生物技术有限公司合成) 作为模板, 35s-1、35s-2 以及 H-1、H-2 (表 1) 作为引物, 分别扩增转基因大豆 35s 基因及禽流感病毒 HA 基因部分片段, 热循环条件为: 94 °C 预变性 5 min; 94 °C 10 s, 55 °C 30 s, 72 °C 45 s, 35 个循环; 最后 72 °C 延伸 5 min。PCR 产物经纯化试剂盒纯化, 用磁珠制备 ssDNA, 然后分别加入 2 μL 退火引物 35s-3 以及 H-3 (表 1), 95 °C 30 s, 55 °C 3 min 退火, 取 1 μL 制备的 ssDNA 样品加入到 50 μL 焦测序反应液 (0.7 mol/L Tris-HAc, 0.35 mmol/L EDTA, 0.35 mmol/L Mg(Ac)<sub>2</sub>, 0.28 mg/mL PVP, 1 mmol/L 二硫苏糖醇, 0.02% 牛血清蛋白, 0.4 mmol/L 荧光素, 0.16 U/mL 三磷酸腺苷双磷酸酶, 0.1 μL 自制 Klenow (exo<sup>-</sup>) 酶, 2 μmol/L 腺苷酰硫酸, 22.4 μg/mL 荧光素酶, 1.5 μL 自制三磷酸腺苷硫酸化酶) 中, 加入 r-SSBP (6 μmol/L) 进行焦磷酸测序, 与不加 r-SSBP 的结果进行对比。

## 2 结果与分析

### 2.1 r-SSBP 的表达与纯化

将利用基因工程手段构建筛选得到的含有 pET28a(+)-ssb 重组质粒的阳性重组菌进行培养, 经 IPTG 诱导后, 收集菌体, 超声破菌, 上清利用镍亲和层析进行纯化。将破菌上清与纯化后的蛋白进行 SDS-PAGE 分析, 同时与不含重组质粒的宿主菌及未诱导的重组菌的裂解液进行比较, 结果如图 1 所示。经 IPTG 诱导的重组菌与宿主菌自身及未经诱导的重组菌裂解液电泳条带相比, 在 24 kDa 左右有明显的 r-SSBP 条带 (图 1, 泳道 3~5), 破菌上清中 r-SSBP 条带亮度与裂解液总蛋白 (图 1, 泳道 3) 中的 r-SSBP 条带亮度相当, 表明 r-SSBP 大多以可溶形式表达, 经镍亲和层析纯化后, 能够得到电泳纯

级的 r-SSBP (图 1, 泳道 1)。

### 2.2 r-SSBP 与 ssDNA 结合的活性表征

为了验证所表达的 r-SSBP 是否具有结合 ssDNA 的活性, 采用凝胶阻滞电泳分析不同量的 r-SSBP 与 ssDNA 结合后电泳条带的变化, 结果见图 2。随着 r-SSBP 浓度增加, r-SSBP 结合 ssDNA 复合物的条带逐渐加深, 同时游离的 ssDNA 的条带逐渐变浅, 说明 r-SSBP 具有活性, 能够与 ssDNA 结合。

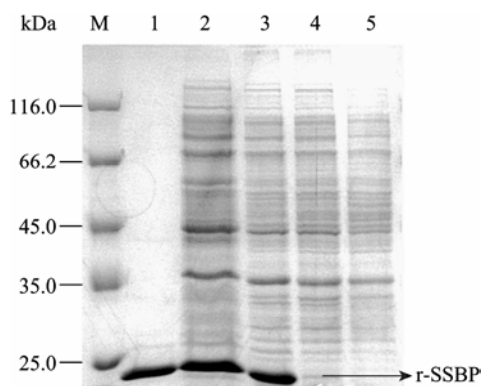


图 1 SDS-PAGE 分析 r-SSBP 在宿主菌 ArcticExpress™ 中重组表达

Fig. 1 SDS-PAGE electrophoretograms of r-SSBP expressed in recombinant ArcticExpress™. M: protein marker; 1: purified recombinant SSBP; 2: supernatant of the lysate of ArcticExpress™ transformed with pET28a(+)-ssb; 3: total protein of the lysate of ArcticExpress™ transformed with pET28a(+)-ssb; 4: total protein of the lysate of ArcticExpress™ transformed with pET28a(+)-ssb without IPTG induction; 5: total protein of the lysate of ArcticExpress™.

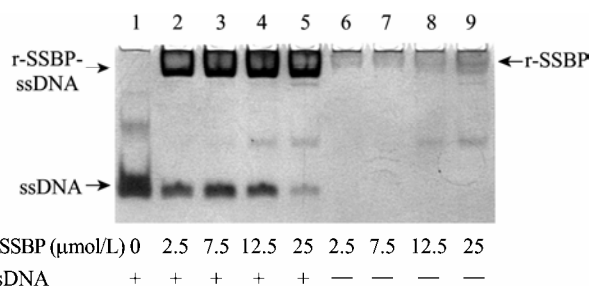


图 2 非变性凝胶阻滞电泳分析 r-SSBP 与 ssDNA 相互作用

Fig. 2 Native gel electrophoretograms of the reaction mixtures of r-SSBP and ssDNA. 1: ssDNA for reference; 2-5: ssDNA with different concentrations of r-SSBP; 6-9: different concentrations of r-SSBP.

### 2.3 r-SSBP 对 DNA 的 $T_m$ 值的影响

为了研究 r-SSBP 对 DNA  $T_m$  值影响, 分别向含有 ssDNA 模板 (表 1 中的 T-1) 的反应体系中加入在同一位置有不同单个碱基错配的 DNA 探针 (表 1 中的 T-3、T-4、T-5), 同时加入不同量的 r-SSBP, 利用实时荧光 PCR 仪测定 DNA 的  $T_m$  值, 与加入完全匹配 DNA 探针 (表 1 中的 T-2) 进行比较, 结果如图 3 所示。与不加入 r-SSBP 的反应相比, 在加入 r-SSBP 后, 完全匹配及含有错配 DNA 的  $T_m$  值均有所降低, 并且随着加入的 r-SSBP 的增加, 序列完全匹配 DNA (C/G) 与单碱基错配 DNA (G/G、T/G、A/G) 的  $T_m$  值之间差异增大, 这与 r-SSBP 结合 ssDNA 时的特性有关, 大肠杆菌 SSBP 可以通过与 DNA 解链部分结合, 促进解链部分稳定, 使解链部分处于伸展状态, 从而避免了解链部分再次形成二级结构, 同时结合到 DNA 单链部分上的 SSBP 分子也会促进其他 SSBP 分子结合到该 DNA 单链部分上, 从而会促进 DNA 解链, 降低 DNA 的  $T_m$  值<sup>[5-6]</sup>。由于含错配碱基 DNA 在低温条件下就容易有部分解链, 更有利于 SSBP 的结合, 使得 SSBP 对含错配碱基 DNA 的  $T_m$  值影响更大, 这种影响作用在 SSBP 相对过量的情况下尤为明显, 而不同碱基错配类型的 DNA 之间的  $T_m$  值降低的差异不大, 这可能与 SSBP 与 ssDNA 结合没有碱基序列特异性相关。r-SSBP 能够增大完全匹配 DNA 与含有单个碱基错配的 DNA 的  $T_m$  值差异的特性, 在提高单碱基错配检测的特异性方面具有潜在的应用价值。

### 2.4 r-SSBP 应用于焦磷酸测序改善测序结果

为了验证 r-SSBP 在焦磷酸测序中的作用, 在进行焦磷酸测序时向反应体系中加入一定量的 r-SSBP 测定制备转基因大豆 35s 基因 ssDNA 片段及禽流感病毒 H5N1 的 HA 基因 ssDNA 片段, 与不加 r-SSBP 的测序结果相对比, 结果见图 4 与图 5。从图 4 中可以看出, 与不加 r-SSBP 的结果相比,

含有 r-SSBP 的焦磷酸测序体系测定的转基因大豆 35s 基因片段的结果中非特异性信号 (图 4 中箭头表示) 明显被去除或减弱, 同时, r-SSBP 的加入也使信号比例更加准确。这主要是由于 35s 在测序引物下游形成了复杂的二级结构, 使引物错粘, 从而导致碱基错误延伸, 使得测序时出现非特异性信号, 而 r-SSBP 存在的情况下, r-SSBP 与其 ssDNA 部分结合从而减少了二级结构的形成, 从而在一定程度上避免了引物错粘, 避免了非特异性信号的出现<sup>[9-10]</sup>。

对禽流感病毒 H5N1 的 HA 基因片段测序结果 (图 5) 显示, 没有加入 r-SSBP 时, 测序结果碱基信号峰高比分别为 T : T : 5T : 2T = 0.49 : 0.75 : 2.76 : 2.00, 2C : C : C : C = 1.37 : 1.25 : 1.13 : 1.00, 而加入 r-SSBP 后测序结果碱基信号峰高比为 T : T : 5T : 2T = 1.09 : 1.32 : 4.74 : 2.00, 2C : C : C : C = 2.32 : 1.38 : 1.21 : 1.00。显然, 在加入 r-SSBP 后, 峰高比例更接近理论值, 同质区的延伸也更充分, 测序结果更加准确。通过对 HA 基因和其测序引物进行二级结构分析发现, 测序序列的 3'端与 HA 基因片段的 5'端形成了复杂的环形结构, 阻碍

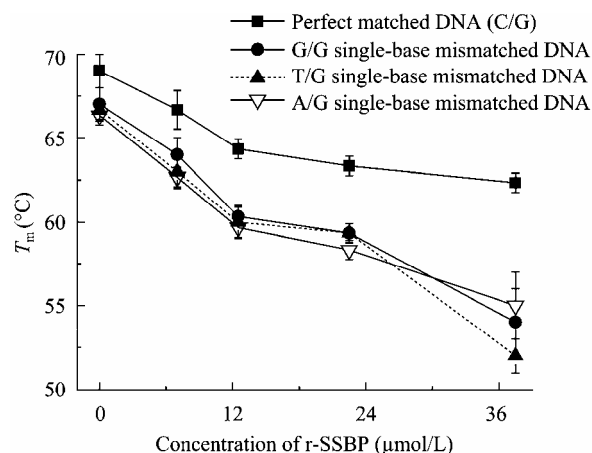


图 3 不同浓度的 r-SSBP 对 DNA 的  $T_m$  值影响

Fig. 3 Effects of r-SSBP with different concentrations on  $T_m$  of DNA.

了 Klenow (exo<sup>-</sup>) 酶的结合和 dNTPs 的掺入。在体系不含 SSBP 时, 由于二级结构的存在, 第 1 个 T 碱基未能充分延伸, 信号峰较低, 而当第 2 个碱基延伸时, 由于第一个没有充分延伸的 T 碱基进一步延伸, 使得信号累加, 信号峰偏高。依次信号的累

计, 使得序列信号不成比例, 无法对序列进行正确判读。而加入 SSBP 后, 由于 SSBP 可以结合 ssDNA, 并促进二级结构的解链, 使 ssDNA 始终处于伸展状态, 每个碱基都能充分延伸, 从而使得测序的信号峰比例正常, 序列可以准确判读。

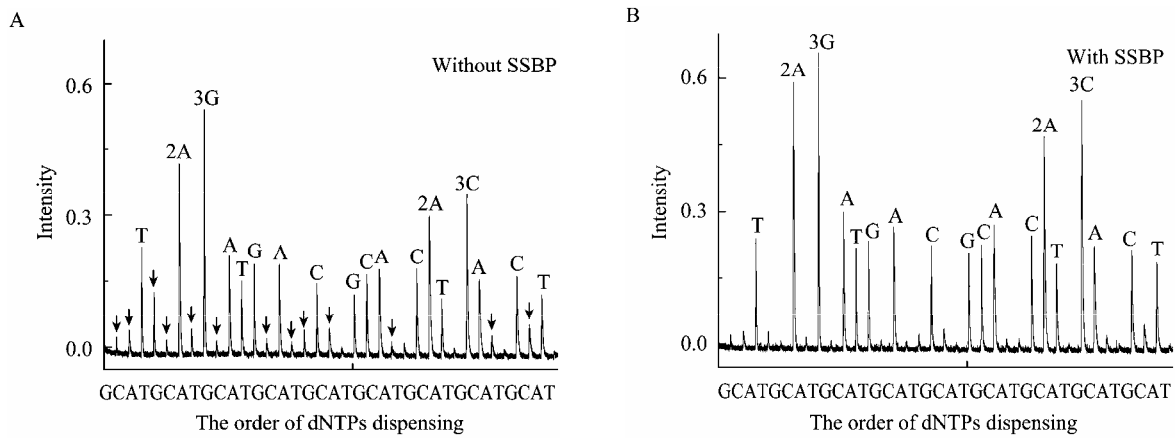


图 4 r-SSBP 对转基因大豆 35s 基因部分片段焦磷酸测序的影响

Fig. 4 Pyrograms of the fragment of 35s gene from transgenic plant using high sensitive pyrosequencing system with and without r-SSBP. The order of dNTP dispensing was GCATG, the sequence of the template was 5'-TAAGGGATGACGCACAATCCCACT-3'. The arrows indicate the nonspecific signals.

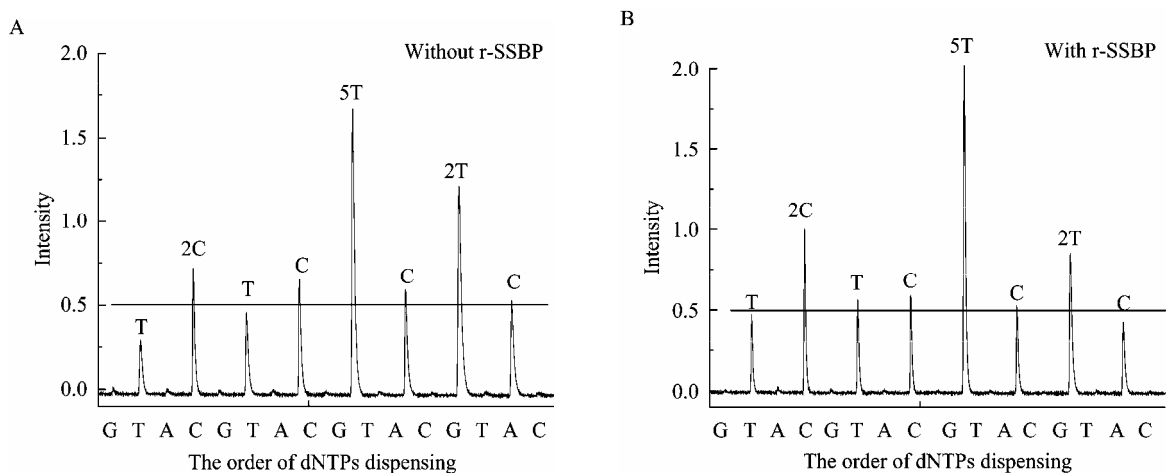


图 5 r-SSBP 对 H5N1 禽流感病毒 HA 基因部分片段焦磷酸测序的影响

Fig. 5 Pyrograms of the fragment of HA gene from the H5N1 bird flu virus using high sensitive pyrosequencing system with r-SSBP and without r-SSBP. The dNTPs dispensing order was GTACG, the sequence of the template was 5'-TCCTCTTTTCTTC-3'.

### 3 结论

本研究成功表达并纯化了大肠杆菌 SSBP, 并用凝胶阻滞电泳的方法验证了 r-SSBP 具有与 ssDNA 结合的活性, 同时还研究了 r-SSBP 对 DNA 的  $T_m$  值的影响, 结果表明, r-SSBP 不仅可以降低 DNA 的  $T_m$  值, 还可以显著增加含单碱基错配的 DNA 与完全匹配的 DNA 的  $T_m$  值差异, 这一性质在一些基于  $T_m$  值差异的检测技术, 如高分辨溶解曲线技术<sup>[21]</sup>、COLD-PCR<sup>[22]</sup>、变性梯度胶凝电泳<sup>[23-24]</sup>等方法中具有一定的应用价值。在高灵敏度的焦磷酸测序体系中加入 r-SSBP 对转基因大豆 35s 基因片段以及禽流感病毒 H5N1 的 HA 基因片段的测序结果表明, r-SSBP 的使用能够去除或降低焦测序中的非特异性信号、改善信号峰比例, 从而提高焦测序的准确度, 这为完善本实验室开发的高灵敏度焦磷酸测序平台提供了保障。

### REFERENCES

- [1] Meyer RR, Laine PS. The single-stranded DNA-binding protein of *Escherichia coli*. Microbiol Mol Biol Rev, 1990, 54(4): 342–380.
- [2] Bobst EV, Bobst AM, Ferrino FW, et al. Variability in the nucleic acid binding site size and the amount of single-stranded DNA-binding protein in *Escherichia coli*. FEBS Lett, 1985, 181(1): 133–137.
- [3] Qiao HL, Chen YY, Wen ZZ, et al. Cloning, high expression of single-stranded DNA-binding protein and its interaction with ssDNA. China Biotechnol, 2007, 27(4): 12–17.  
乔惠丽, 陈媛媛, 文祯中, 等. SSB 蛋白的高效表达及其与 ssDNA 的相互作用. 中国生物工程杂志, 2007, 27(4): 12–17.
- [4] Qiao HL, Chen YY, Wen ZZ, et al. Kinetic assay and visualization of single-stranded DNA-binding protein with its substrate. Acta Biophys Sin, 2007, 2(32): 145–150.  
乔惠丽, 陈媛媛, 文祯中, 等. SSB 蛋白与 ssDNA 相互作用的动力学和可视化研究. 生物物理学报, 2007, 2(32): 145–150.
- [5] Sigal N, Delius H, Kornberg T, et al. A DNA-unwinding protein isolated from *Escherichia coli*: its interaction with DNA and with DNA polymerases. Proc Natl Acad Sci USA, 1972, 69(12): 3537–3541.
- [6] Witte G, Urbanke C, Curth U. Single-stranded DNA-binding protein of *Deinococcus radiodurans*: a biophysical characterization. Nucl Acids Res, 2005, 33(5): 1662–1670.
- [7] Drabovich A, Krylov SN. Single-stranded DNA-binding protein facilitates gel-free analysis of polymerase chain reaction products in capillary electrophoresis. J Chromatog A, 2004, 1051(1/2): 171–175.
- [8] Awomir S, Browksi D, Kur J. Cloning, overexpression, and purification of the recombinant his-tagged SSB protein of *Escherichia coli* and use in polymerase chain reaction amplification. Protein Expr Purif, 1999, 16(1): 96–102.
- [9] Ronaghi M. Improved performance of pyrosequencing using single-stranded DNA-binding protein. Anal Biochem, 2000, 286(2): 282–288.
- [10] Nordström T, Alderborn A, Nyrén P. Method for one-step preparation of double-stranded DNA template applicable for use with pyrosequencing<sup>TM</sup> technology. Biochem Biophys Methods, 2002, 52(2): 71–82.
- [11] Ronaghi M. Pyrosequencing sheds light on DNA sequencing. Genome Res, 2001, 11(1): 3–11.
- [12] Zhou GH, Kajiyama T, Gotou M, et al. Enzyme system for improving the detection limit in pyrosequencing. Anal Chem, 2006, 78(13): 4482–4489.
- [13] Luo J, Wu WJ, Zou BJ, et al. Expression and purification of ATP sulfurylase from *Saccharomyces cerevisias* in *Escherichia coli* and its application pyrosequencing. Chin J Biotech, 2007, 23(4): 623–627.  
罗娟, 吴文娟, 邹秉杰, 等. 酿酒酵母 ATP 硫酸化酶在大肠杆菌中的表达纯化及其在焦测序中的应用. 生物工程学报, 2007, 23(4): 623–627.
- [14] Zou BJ, Luo J, Zhou GH, et al. Expression, immobilization and application of biotinylated ATP sulfurylase. Prog Biochem Biophys, 2009, 36(7): 923–928.  
邹秉杰, 罗娟, 周国华, 等. 生物素化 ATP 硫酸化酶的表达、固定化与应用. 生物化学与生物物理进展, 2009, 36(7): 923–928.
- [15] Zhu SH, Zou BJ, Wu HP, et al. Preparation of thermalstable biotinlyted firefly luciferase and its application to pyrosequencing. Chinese J Anal Chem, 2010, 38(4): 458–463.

- 朱术会, 邹秉杰, 武海萍, 等. 热稳定生物素化荧光素酶的制备及其在焦测序中的应用. 分析化学, 2010, 38(4): 458-463.
- [16] Zou BJ, Chen ZY, Zhou GH, Expression of PPK from *Microbispora rosea* subsp. *aerata* in *Escherichia coli* and its application in pyrosequencing. Chin J Biotech, 2008, 24(4): 679-683.
- 邹秉杰, 陈之遥, 周国华. 热玫瑰小双孢菌来源的丙酮酸磷酸双激酶的表达及应用. 生物工程学报, 2008, 24(4): 679-683.
- [17] Liu XQ, Zhu SH, Zou BJ, et al. Development of 3-enzyme pyrosequencing system and its application in rapid diagnosis of Down's syndrome. Hereditas, 2010, 32(5): 517-523.
- 刘夕群, 朱术会, 邹秉杰, 等. 三酶焦测序体系的建立及其在唐氏综合征快速诊断中的应用. 遗传, 2010, 32(5): 517-523.
- [18] Zhou GH, Kamahori M, Okano K, et al. Miniaturized pyrosequencer for DNA analysis with capillaries to deliver deoxynucleotides. Electrophoresis, 2001, 22(16): 3497-3504.
- [19] Song QX, Jing H, Wu HP, et al. Gene expression analysis on a photodiode array-based bioluminescence analyzer by using sensitivity-improved SRPP. Analyst, 2010, 135(6): 1315-1319.
- [20] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 3rd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.
- [21] Gundry CN, Dobrowolski SF, Martin YR, et al. Base-pair neutral homozygotes can be discriminated by calibrated high resolution melting of small amplicons. Nucl Acids Res, 2008, 36(10): 3401-3408.
- [22] Zuo Z, Chen SS, Chandra PK, et al. Application of COLD-PCR for improved detection of *KRAS* mutations in clinical samples. Mod Pathol, 2009, 22(8): 1023-1031.
- [23] Muyzer G, Smalla K. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. Anton Leeuw, 1997, 73(1): 127-141.
- [24] Satokari RM, Vaughan EE, Akkermans ADL, et al. Bifidobacterial diversity in human feces detected by genus-specific PCR and denaturing gradient gel electrophoresis. Appl Environ Microbiol, 2001, 67(2): 504-513.