

# 分子伴侣协助下抗肿瘤抗生素美达霉素生物合成中的糖基转移酶 Med-ORF8 的原核表达

万娟<sup>1</sup> 邓会群<sup>1</sup> 张碧乾<sup>1</sup> 王蔚<sup>1</sup> 蔡晓凤<sup>1</sup> 李爱英<sup>1,2\*</sup>

(1. 华中师范大学生命科学学院 湖北 武汉 430079)

(2. 华中师范大学农药与化学生物学教育部重点实验室 湖北 武汉 430079)

**摘要:** 糖基转移酶在天然产物的糖基化修饰过程中起关键作用。目前链霉菌源抗肿瘤抗生素美达霉素(Medermycin)生物合成途径中的糖基转移酶 Med-ORF8 的原核表达及酶学性质还未有研究。首先通过结构模拟确定 Med-ORF8 的端部加上 His-标签不会影响其三维结构的正确折叠, 然后利用 2 种 pET 原核表达载体来进行 Med-ORF8 的原核表达, 发现以 pET-28a (+) 为载体进行表达时, 目的蛋白产量非常高, 但是以不可溶的包涵体形式为主。当分子伴侣基因(编码大肠杆菌触发因子)与 Med-ORF8 的编码基因共表达时, 在优化诱导条件的情况下, 可以有效减少包涵体的形成, 提高了 Med-ORF8 的可溶性表达效率, 为 Med-ORF8 的酶学分析打下基础。

**关键词:** 糖基化, 美达霉素, 糖基转移酶, 原核表达, 分子伴侣

## Prokaryotic expression of a glycosyltransferase Med-ORF8 involved in an antitumor antibiotic medermycin biosynthesis aided by the molecular chaperone

WAN Juan<sup>1</sup> DENG Hui-Qun<sup>1</sup> ZHANG Bi-Qian<sup>1</sup> WANG Wei<sup>1</sup> CAI Xiao-Feng<sup>1</sup>  
LI Ai-Ying<sup>1,2\*</sup>

(1. College of Life Sciences, Central China Normal University, Wuhan, Hubei 430079, China)

(2. Key Laboratory of Pesticide and Chemical Biology, Ministry of Education, Central China Normal University, Wuhan, Hubei 430079, China)

**Abstract:** Glycosyltransferases play central roles in the glycosylation of biosynthetic pathways of many antibiotics. The prokaryotic expression and enzymatic features of Med-ORF8, a glycosyltransferase involved in the biosynthesis of medermycin with strong antitumor activity, still remains obscure. Here, firstly, we performed the computer modeling of the 3-D structure of Med-ORF8 to prove that the presence of 6\*His-tag at the terminals of Med-ORF8 had no effect on its 3-D structure. Subsequently, we

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 30770036); 教育部高等学校博士学科点专项科研基金项目(No. 20070511004)

\* 通讯作者: Tel: 86-27-67862431; ✉: ayli@mail.ccnu.edu.cn

收稿日期: 2010-08-12; 接受日期: 2010-11-30

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

established two prokaryotic expression systems with pET vectors to express Med-ORF8, and found that pET-28a (+) could gain a higher yield of the target protein than pET-23a (+), but mostly in an insoluble form. Finally, we introduced a molecular chaperone gene into the system with pET-28a (+) and found that the co-expression of the molecular chaperone with Med-ORF8 could efficiently decrease the formation of the inclusion body and increase the accumulation of soluble Med-ORF8.

**Keywords:** Glycosylation, Medermycin, Glycosyltransferase, Prokaryotic expression, Molecular chaperone

糖基化不仅在细胞正常生理、病理等过程中发挥着重要作用,在许多天然产物生物合成过程中也广泛存在,大大增加了这些天然产物的结构多样性和生物学活性的多样性<sup>[1-2]</sup>。

在这些天然产物糖基化过程中,负责糖苷键形成的糖基转移酶(Glycosyltransferase, GT)则是糖基化过程中的关键酶。根据催化形成糖苷键的类型不同,糖基转移酶可分为 O-糖基转移酶、C-糖基转移酶以及 N-糖基转移酶,分别催化 C-O-C、C-C 和 N-C 3 类糖苷键的形成<sup>[3]</sup>。

芳香聚酮抗生素美达霉素(Medermycin)由链霉菌产生,能抗多种肿瘤,高效抑制肿瘤细胞中高水平持续表达的丝氨酸/赖氨酸激酶(AKT)的活性<sup>[4-5]</sup>,其化学结构中存在稀有的 C-C 糖苷键。研究数据表明美达霉素生物合成基因簇中的糖基转移酶基因 *med-ORF8* 参与美达霉素糖基化的过程<sup>[6]</sup>。但目前还没有关于 *med-ORF8* 原核表达以及酶学分析相关的研究报道。

本文首先进行三维结构模拟,确定利用 pET 载体进行目的蛋白 Med-ORF8 融合表达的可行性,然后以 pET 载体为基础构建了 2 种进行 *med-ORF8* 原核表达的系统,发现两种系统在目的蛋白 Med-ORF8 表达量上有显著差异。通过与分子伴侣(大肠杆菌触发因子 Trigger factor, TF)的共表达,一定程度解决了目的蛋白不可溶积累的问题,能够有效地减少包涵体的形成,使更多目的蛋白以可溶形式存在于细胞中,为目的蛋白的纯化和酶学分析提供了便利。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌株和质粒

大肠杆菌 *E. coli* BL21 (DE3)在此作为原核表达

宿主(购自 Invitrogen 公司);大肠杆菌 *E. coli* DH5 $\alpha$  作为基因克隆宿主细胞。

pET-23a (+)和 pET-28a (+)用作原核表达载体(购自 Novagen 公司);pIK340 提供 *med-ORF8* 扩增的模板<sup>[7]</sup>;pTf16 是含有分子伴侣基因的表达质粒(购自 TaKaRa 公司)。

### 1.2 培养基和试剂

培养大肠杆菌是用普通 LB 培养基中加入相应抗生素(购自 Sigma 公司)(氨苄青霉素浓度为 100 mg/L,卡那霉素浓度为 25 mg/L,氯霉素浓度为 25 mg/L)。IPTG 购自 BioSHARP 公司,L-阿拉伯糖购自 Solarbio 公司,抗 His-标签的鼠单克隆抗体和抗 HRP 标记的羊抗鼠 IgG 购自 Promoter 公司。

### 1.3 目的蛋白 Med-ORF8 的三维结构模拟

利用台湾国立交通大学生物科技学院的 MBC (Molecular Bioinformatics Center)所提供的 (PS)<sup>2</sup> (Protein Structure Prediction Server)软件在线模拟了 Med-ORF8 和 Med-ORF8-6\*His-标签 2 种蛋白质的三维结构。

### 1.4 目的基因 *med-ORF8* 的 PCR 扩增

以质粒 pIK340 (包含美达霉素生物合成基因簇的质粒)为模板,用 Med8-F 和 Med8-R 分别作为上游引物和下游引物,通过 PCR 扩增获得目的基因 *med-ORF8*,所得片段大小约 1.13 kb。

Med8-F: 5'-GGAATTCCATATGAGGATCCTCTTC-3' (下划线为 *Nde* I 酶切位点,黑体为起始密码子); Med8-R: 5'-CCCAAGCTTGGCGGCCAGCCGCTC-3' (下划线为 *Hind* III 酶切位点)。

扩增过程使用 KOD-Plus 聚合酶(购自 Toyobo 公司),反应程序为: 94 °C 3 min; 94 °C 1 min, 63 °C 45 s, 68 °C 90 s, 25 个循环; 68 °C 10 min; 4 °C 保存。

**1.5 含目的基因 *med-ORF8* 原核表达质粒的构建**  
首先将获得的 PCR 产物经 *Nde* I 和 *Hind* III 双酶切, 分别插入到原核表达载体 pET-23a (+) 和 pET-28a (+) 上, 转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$ , 获得转化子并提取质粒, 酶切及测序验证获得正确的重组表达质粒, 将其分别命名为 pHSL51 和 pHSL52。

**1.6 基因 *med-ORF8* 的原核诱导表达和蛋白检测**  
将重组质粒 pHSL51 和 pHSL52 分别转化大肠杆菌表达宿主 BL21 (DE3), 选取验证正确的转化子, 在含卡那霉素的 LB 液体培养基中 37 °C 过夜培养, 然后按照 1:100 的比例扩大培养, 37 °C 培养至  $OD_{600}$  约为 0.4–0.6 时, 加入 IPTG 诱导目的蛋白表达, 12 000 r/min 离心 3 min 收集菌体, 超声破碎(工作 25 s, 间歇 10 s, 700 W, 10 次), 8 000 r/min 离心 10 min, 分别收集沉淀和上清, SDS-PAGE 检测目的蛋白表达。

### 1.7 分子伴侣辅助目的基因的表达

将含有分子伴侣基因的表达质粒 pTf16 导入上述转化子大肠杆菌 BL21 (DE3)/pHSL52 中, 检测正确后, 获得的菌株命名为 BL21 (DE3)/(pHSL52+pTf16)。将 BL21 (DE3)/(pHSL52+pTf16) 过夜培养物转接到新鲜培养基中, 在培养基中加入 L-阿拉伯糖进行第 1 步诱导, 以诱导分子伴侣 TF 基因的表达。培养至对数期( $OD_{600}$  约为 0.4–0.6)时, 再用 IPTG 进行第 2 步诱导, 以诱导目的基因的表达; 细胞超声波破碎后, 分别收集离心后的沉淀和上清, 用 SDS-PAGE 检测目的蛋白可溶性表达的变化, 用软件 Gel-Pro analyzer 4 分析目的蛋白在总蛋白中的比例。

利用 Western blot 检测目的蛋白: 将 SDS-PAGE 胶上的蛋白质转移到硝酸纤维素膜上, 分别用鼠抗 6\*His-标签的一抗和抗 HRP 标记的羊抗鼠二抗孵育, 最后用 DAB 溶液显色, 观察结果。

## 2 结果

### 2.1 目的蛋白 Med-ORF8 的三维结构模拟

首先利用软件(PS)<sup>2</sup>进行了目的蛋白 Med-ORF8 的三维结构模拟。因为目前 Med-ORF8 的同源蛋白 UrdGT2 (Urdamycin 生物合成途径中的 C-糖基转移

酶) 三维结构已经得到测定<sup>[8]</sup>, 所以此软件以 UrdGT2 为模板(结构图略)模拟 Med-ORF8 的立体结构, 如图 1A (与 UrdGT2 结构相似)。为了确定下面原核表达中目的蛋白末端的 6\*His-标签是否会影响目的蛋白的折叠, 在 Med-ORF8 序列末端加上 6\*His-标签, 再进行三维结构模拟, 如图 1B。结果表明 6\*His-标签的存在不会影响到其三维结构的正确折叠。

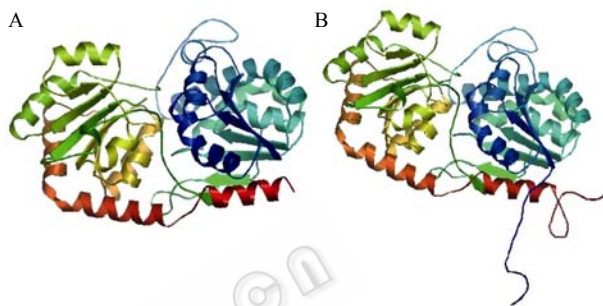


图 1 蛋白 Med-ORF8 的三维结构模拟

Fig. 1 Modeling of the 3-D structure of Med-ORF8

Note: A: 3-D structure of Med-ORF8; B: 3-D structure of Med-ORF8 tagged with 6\*His both at C- and N- terminals.

### 2.2 Med-ORF8 表达质粒的构建

以 pIK340 为模板, PCR 扩增基因 *med-ORF8* (约 1.13 kb), 用 *Nde* I 和 *Hind* III 酶切, 再插入到 2 个表达载体 pET-23a (+)(约 3.67 kb) 和 pET-28a (+)(约 5.36 kb) 上, 获得 2 种原核表达重组质粒 pHSL51 和 pHSL52。图 2A 和图 2B 分别是 pHSL51 和 pHSL52 进行 *Nde* I 和 *Hind* III 的不完全酶切验证的结果, 初步表明构建正确, 后经测序验证也正确。

### 2.3 Med-ORF8 的诱导表达

将质粒 pHSL51 和 pHSL52 分别导入宿主细胞大肠杆菌 BL21 (DE3) 中, 添加 IPTG 诱导目的基因表达。

初步诱导表达结果表明, 以 pET-23a (+) 为原核表达载体, 所表达的融合蛋白大小约 43 kD, 表达量极低(图 3A), 即便进一步优化诱导条件(改变诱导温度、诱导时间和诱导剂浓度)也没有明显提高目的蛋白表达量(图略); 而以 pET-28a (+) 为原核表达载体时, 表达的融合蛋白约 44.2 kD (因其两端都含有 6\*His-标签), 表达量明显提高(图 3B), 且诱导剂的

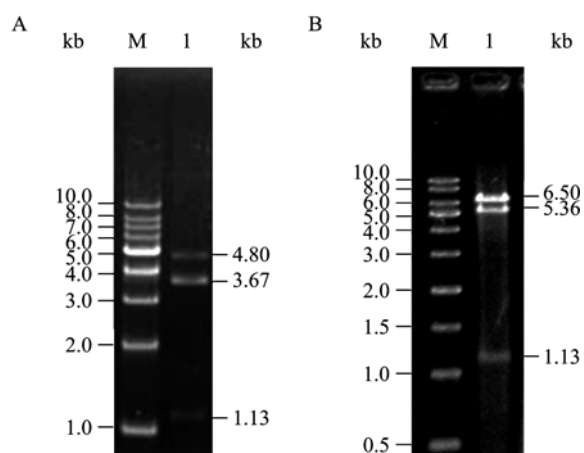


图2 重组质粒 pHSL51 和 pHSL52 的酶切验证

Fig. 2 Restriction enzyme digestion of the recombinant plasmids pHSL51 and pHSL52

Note: A: M: DNA marker; 1: pHSL51 digested by *Nde* I and *Hind* III.

B: M: DNA marker; 1: pHSL52 digested by *Nde* I and *Hind* III.

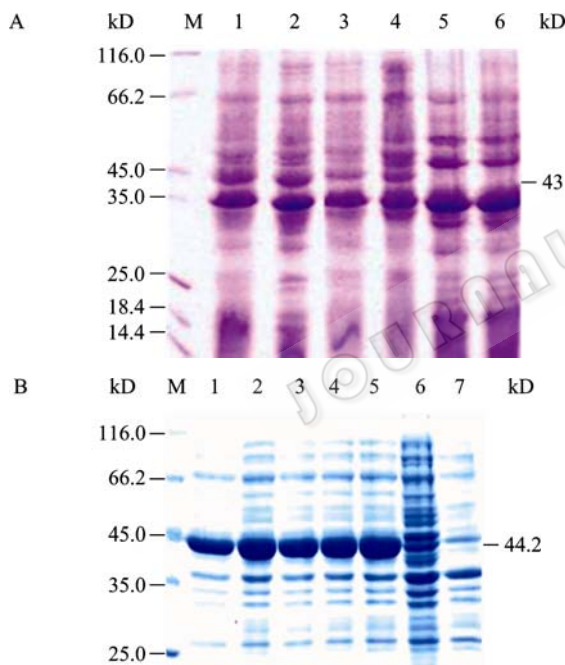


图3 两种系统下 Med-ORF8 的表达检测

Fig. 3 The expression level of Med-ORF8 in two systems by SDS-PAGE analysis

Note: A: Total proteins of BL21 (DE3)/pHSL51 after induction under different conditions. M: protein marker; 1: 37 °C, 0.8 mmol/L IPTG and 5 h for induction temperatures, concentrations of IPTG and induction duration, respectively; 2: 37 °C, 0.8 mmol/L IPTG, 8 h; 3: 30 °C, 0.8 mmol/L IPTG, 5 h; 4: 30 °C, 0.8 mmol/L IPTG, 8 h; 5: 37 °C, no IPTG, 5 h; 6: 37 °C, 0.8 mmol/L IPTG, 8 h [BL21 (DE3)/pET-23a as negative control]. B: Total proteins of BL21 (DE3)/pHSL52 after induction at different concentrations of IPTG and 20 °C for 20 h. M: protein marker; 1-5: 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 and 1.0 mmol/L IPTG, respectively; 6: No IPTG; 7: 0.4 mmol/L IPTG [BL21 (DE3)/pET-28a (+) as negative control].

浓度对表达量的影响不是很大。鉴于 IPTG 有一定细胞毒性,下面实验中诱导目的基因表达时使用较低的 IPTG 浓度。

## 2.4 目的蛋白 Med-ORF8 存在形式的检测

为了确定在细菌总蛋白中,目的蛋白 Med-ORF8 是以可溶(离心后在上清中)还是不可溶(包涵体,离心后在沉淀中)的形式存在,将不同浓度 IPTG 诱导后的表达菌株 BL21 (DE3)/pHSL52 经超声破碎,离心后分离上清和包涵体沉淀,SDS-PAGE 检测(图 4,同一样品离心后的沉淀和上清对应编号用下划线连接)。结果表明:以 pET-28a (+)为原核表达载体时,绝大多数目的蛋白 Med-ORF8 是以不可溶的包涵体形式存在(即便 IPTG 浓度降低到 0.1 mmol/L 以下,诱导温度在 10 °C 下)。

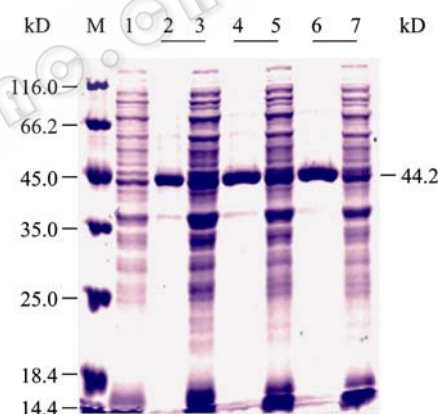


图4 目的蛋白 Med-ORF8 存在形式的检测

Fig. 4 Analysis of the soluble form of protein Med-ORF8

Note: Proteins of BL21 (DE3)/pHSL52 after induction at different concentrations of IPTG and 20 °C for 20 h. M: protein marker; 1: Total proteins, no IPTG induction; 3,5 and 7: The supernatants, induced by 0.1, 0.2 and 0.4 mmol/L IPTG, respectively; 2,4 and 6: The precipitates, induced by 0.1, 0.2 and 0.4 mmol/L IPTG, respectively.

## 2.5 分子伴侣辅助表达 Med-ORF8

将含有分子伴侣 TF 的表达质粒 pTf16 导入到表达菌株 BL21 (DE3)/pHSL52 中,提取重组菌株 BL21 (DE3)/(pHSL52+pTf16)的质粒,将提取得到的质粒和质粒 pTf16 分别用 *Hind* III 进行单酶切验证。图 5 表明:两个质粒 pTf16 和 pHSL52 共存于重组菌株 BL21 (DE3)中。

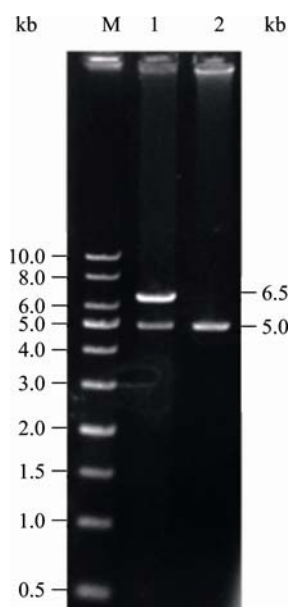


图5 共表达系统 BL21 (DE3)/(pHSL52+pTf16)的验证  
Fig. 5 Restriction enzyme digestion of plasmids isolated from the co-expression system BL21 (DE3)/(pHSL52+pTf16)  
Note: M: DNA marker; 1: Plasmids isolated from BL21 (DE3)/(pHSL52+pTf16) and digested with *Hind* III; 2: Plasmid pTf16 digested with *Hind* III.

然后进行两步诱导: 设置不同的第 1 步诱导温度(图 6A 为 37 °C, 图 6B 为 30 °C), 以及不同的 L-阿拉伯糖浓度(1 g/L 和 3 g/L)诱导分子伴侣 TF 表达直到对数期; 设置第 2 步诱导温度(25 °C 和 30 °C), IPTG 浓度为 0.2 mmol/L, 诱导目的蛋白表达。

诱导结果(图 6, 同一样品离心后的沉淀和上清对应编号用下划线连接)表明: 同图 4 相比, 在分子伴侣 TF 辅助下, 目的蛋白 Med-ORF8 的包涵体(沉淀中)的形成明显减少, 可溶性表达比例(上清中)明显增加, 尽管目的蛋白的表达总量(沉淀与上清中的 Med-ORF8 表达合计量)没有明显提高(图略)。

同时表明: 较低的第 1 步诱导温度(30 °C, 图 6B)更有利于可溶性目的蛋白的积累; 较低的 L-阿拉伯糖诱导浓度利于减少包涵体的形成。1 g/L 的 L-阿拉伯糖在 30 °C 进行第 1 次诱导、0.2 mmol/L 的 IPTG 在 30 °C 进行第 2 次诱导表达, 此条件下包涵体(沉淀中)形成最少, 可溶目的蛋白的量占目的蛋白总量的比例最高, 为 46.7%(图 6B 中 6 和 7, 此

条件下 48 kD 的分子伴侣表达较为明显), 而转入分子伴侣表达质粒前的体系中(图 4), 可溶目的蛋白量只占目的蛋白总量的约 16.9% (但图 6B 中 8 和 9 条件下目的蛋白占细胞中总蛋白含量要更高一些, 所以要在 2 种条件基础上进一步优化诱导条件)。

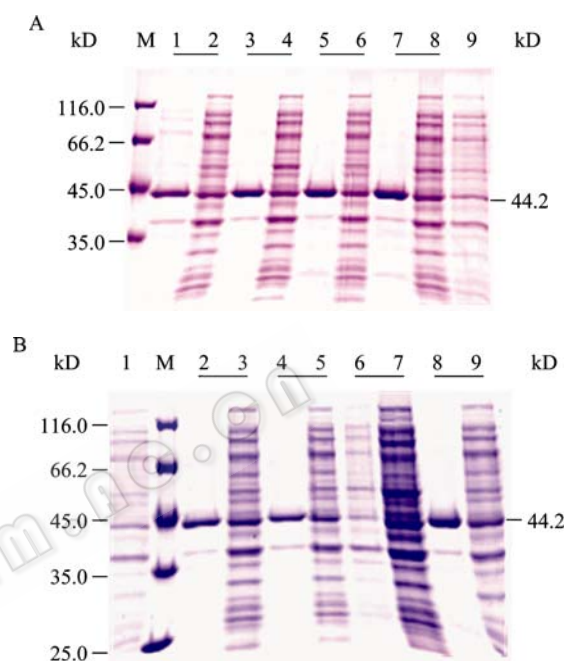


图6 分子伴侣辅助目的蛋白 Med-ORF8 的表达检测  
Fig. 6 The expression level of the target protein Med-ORF8 aided by the molecular chaperone

Note: A: Proteins of BL21 (DE3)/(pHSL52+pTf16) after two-step induction at different concentrations of L-Arabinose and 37 °C for first step, then at 0.2 mmol/L IPTG and different temperatures for 2 h for second step. M: Protein marker; 1-2: 1 g/L L-Arabinose for first step and 25 °C for second step; 3-4: 3 g/L and 25 °C; 5-6: 1 g/L and 30 °C; 7-8: 3 g/L and 30 °C; 9: 3 g/L L-Arabinose at 37 °C, 0 mmol/L IPTG at 30 °C for 2 h; 1,3,5 and 7: The precipitates; 2,4,6 and 8: The supernatants; 9: Total proteins. B: Proteins of BL21 (DE3)/(pHSL52+pTf16) after two-step induction at different concentrations of L-Arabinose and 30 °C for first step, then at 0.2 mmol/L IPTG and different temperatures for 2 h for second step. M: Protein marker; 1: 3 g/L L-Arabinose at 30 °C, 0 mmol/L IPTG at 30 °C for 2 h; 2-3: 1 g/L and 25 °C; 4-5: 3 g/L and 25 °C; 6-7: 1 g/L and 30 °C; 8-9: 3 g/L and 30 °C; 1: Total proteins; 2,4,6 and 8: the precipitates; 3,5,7 and 9: The supernatants.

随后对共表达系统中可溶性目的蛋白 Med-ORF8 进行 Western blot 检测。结果(图 7)表明所表达的蛋白含有 His-标签, 为预期的目的蛋白。

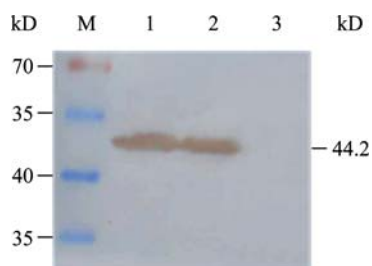


图 7 共表达系统中的目的蛋白 Med-ORF8 的 Western blot 分析

Fig. 7 Western blot analysis of the protein Med-ORF8 expressed in the co-expression system

Note: The supernatants of BL21 (DE3)/(pHSL52+pTf16) after two-step induction at 30 °C with 1 g/L L-Arabinose till logarithmic phase for first step, then at 30 °C with 0.2 mmol/L IPTG for different induction duration for second step. M: Pre-stained protein marker; 1: 4 h; 2: 8 h; 3: 8 h [BL21 (DE3)/pET-23a (+) as negative control].

以上结果说明: pTf16 表达的分子伴侣 TF 能够帮助目的蛋白 Med-ORF8 进行正确的折叠, 大大减少包涵体的形成, 增加了目的蛋白的可溶性表达, 利于下一步目的蛋白的纯化。

### 3 讨论

在抗生素生物合成中鉴定的 C-糖基转移酶相对于 O-糖基转移酶而言, 数量较少, 关于 C-糖基转移酶的分子水平的研究报道更少, 目前仅 Urdamycin 合成途径中的 UrdGT2 有过体内遗传学研究和三维结构测定的报道<sup>[8]</sup>。本文中研究的 Med-ORF8 属于 C-糖基转移酶家族, 其蛋白表达、纯化和酶学分析将为这类新的糖基转移酶家族的深入的性质研究奠定基础, 对于强抗肿瘤抗生素美达霉素的生物合成研究也具有促进作用。

Med-ORF8 的编码基因(*med-ORF8*)是典型的链霉菌基因, 含有很高的 G+C% (高达 76.75%), 在原核表达体系中遇到了表达水平低及不可溶表达两个问题, 这也是链霉菌基因在原核表达中最常见的两个难题。链霉菌基因 G+C%是已知的生物基因中最高的<sup>[9]</sup>, 而大肠杆菌基因 G+C%在 50%左右, 二者的同义 tRNA 丰度差别很大<sup>[10]</sup>。链霉菌基因中存在大量的稀有密码子, 可能会抑制目的蛋白在大肠杆菌中的表达或引起移码突变, 或降低 mRNA 的翻译

效率和稳定性, 甚至会造成翻译的提前终止<sup>[11-12]</sup>。本文中我们通过更换表达载体和优化诱导条件解决了表达水平低的问题。本实验中考查了两种 pET 载体[pET-23a (+)和 pET-28a (+)]上目的基因的表达, 发现载体不同, 表达量差异很大。二者除了抗性和 6\*His 标签的数量和位置不同外, 最大差别就是启动子的差异, 这可能是决定它们表达效率差异的根本原因。

对于 Med-ORF8 不可溶表达的问题, 采用常规方法却得不到解决。包涵体的形成目前认为主要与蛋白表达过快过高(会导致包括分子伴侣在内的折叠辅助因子不足而使得目的蛋白出现不正确折叠)<sup>[13-14]</sup>、目的蛋白质中疏水氨基酸含量过高<sup>[15]</sup>以及蛋白或多肽结构在动力学和热力学上失衡<sup>[14]</sup>等有关。我们试图降低诱导温度(降低到 8 °C-10 °C)和 IPTG 浓度(0.05 mmol/L)来减缓蛋白质的形成以减少包涵体的量, 但是收效不大(图略)。而使用了分子伴侣协助表达的办法则有效提高了目的蛋白可溶表达的水平, 减少了包涵体的形成。

分子伴侣在蛋白质正确折叠的过程中起着重要作用, 它能够识别并稳定已经部分折叠的蛋白质多肽链, 帮助其正确折叠、装配、转运, 并介导错误折叠的蛋白质进行降解。辅助蛋白质折叠的分子伴侣主要有 3 种: GroEL、DnaK 和触发因子(Trigger factor, TF)<sup>[16]</sup>。pTf16 上的 *tig* 基因编码的 TF 是一个大小约为 48 kD 的蛋白质, 它既具有肽酰-脯氨酰顺反异构酶的活性, 又具有类似分子伴侣的功能<sup>[17-18]</sup>, 并且参与大多数细胞质中新生多肽的早期翻译<sup>[18-20]</sup>。在我们实验中发现这种分子伴侣的共表达确实提高了目的蛋白的正确折叠。

### 参考文献

- [1] 代焕琴, 王浩鑫, 沈月毛. 抗生素糖基转移酶研究进展[J]. 中国抗生素杂志, 2007, 32(5): 257-262.
- [2] Luzhetskyy A, Weiss H, Charge A, et al. A strategy for cloning glycosyltransferase genes involved in natural product biosynthesis[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2007, 75(6): 1367-1375.
- [3] 邓会群, 王惠利, 杨红, 等. 天然产物的 C-糖基化研究

- 进展[J]. 生物技术通报, 2009(5): 27-30.
- [4] Toral-Barza L, Zhang WG, Huang XY, et al. Discovery of lactoquinomycin and related pyranonaphthoquinones as potent and allosteric inhibitors of AKT/PKB: mechanistic involvement of AKT catalytic activation loop cysteines[J]. Mol Cancer Ther, 2007, 6(11): 3028-3038.
- [5] Salaski EJ, Krishnamurthy G, Ding WD, et al. Pyranonaphthoquinone lactones: a new class of AKT selective kinase inhibitors alkylate a regulatory loop cysteine[J]. J Med Chem, 2009, 52(8): 2181-2184.
- [6] 蔡晓凤. 芳香聚酮抗生素美达霉素生物合成基因的功能研究[D]. 华中师范大学硕士学位论文, 2009.
- [7] Ichinose K, Ozawa M, Itou K, et al. Cloning, sequencing and heterologous expression of the medermycin biosynthetic gene cluster of *Streptomyces* sp. AM-7161: towards comparative analysis of the benzoisochromanonequinone gene clusters[J]. Microbiology, 2003, 149(7): 1633-1645.
- [8] Mittler M, Bechthold A, Schulz GE. Structure and action of the C-C bond-forming glycosyltransferase UrdGT2 involved in the biosynthesis of the antibiotic urdamycin[J]. J Mol Biol, 2007, 372(1): 67-76.
- [9] Goodfellow M. Researching the unions[J]. Contemp Adm Long Term Care, 1984, 7(12): 40-42.
- [10] 刘庆坡, 冯英, 董辉. 20 个物种同义密码子偏性的比较分析[J]. 西北农林科技大学学报: 自然科学版, 2004, 32(7): 67-71.
- [11] 郑彬琼. 大肠杆菌同义密码子偏好性概述[J]. 硅谷, 2009(1): 3-4.
- [12] Spanjaard RA, Chen K, Walker JR, et al. Frameshift suppression at tandem AGA and AGG codons by cloned tRNA genes: assigning a codon to *argU* tRNA and T4 tRNA<sup>Arg</sup>[J]. Nucl Acids Res, 1990, 18(17): 5031-5036.
- [13] Hoffmann F, van den Heuvel J, Zidek N, et al. Minimizing inclusion body formation during recombinant protein production in *Escherichia coli* at bench and pilot plant scale[J]. Enzyme Microbiol Technol, 2004, 34(1/2): 235-241.
- [14] Carrió MM, Villaverde A. Construction and deconstruction of bacterial inclusion bodies[J]. J Biotechnol, 2002, 96(1): 3-12.
- [15] 罗惠霞, 李敏, 王玉炯. 包涵体蛋白复性的几种方法[J]. 生物技术通报, 2007(5): 96-98.
- [16] Hartl FU, Hayer-Hartl M. Molecular chaperones in the cytosol: from nascent chain to folded protein[J]. Science, 2002, 295(5561): 1852-1858.
- [17] Crooke E, Wickner W. Trigger factor: a soluble protein that folds pro-OmpA into a membrane-assembly-competent form[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1987(84): 5216-5220.
- [18] Hestekamp T, Hauser S, Lütcke H, et al. *Escherichia coli* trigger factor is a prolyl isomerase that associates with nascent polypeptide chains[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1996, 93(9): 4437-4441.
- [19] Valent QA, Kendall DA, High S, et al. Early events in preprotein recognition in *E. coli*: interaction of SRP and trigger factor with nascent polypeptides[J]. EMBO J, 1995, 14(22): 5494-5505.
- [20] Patzelt H, Rüdiger S, Brehmer D, et al. Binding specificity of *Escherichia coli* trigger factor[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2001, 98(25): 14244-14249.

## 编辑部公告

### 《微生物学通报》英文刊名变更

《微生物学通报》之前使用的英文刊名“Microbiology”因在国际上有重名,造成了本刊在被国内外作者引用以及国外数据库收录时英文刊名的混乱,这大大影响了本刊在国际上的传播,也不利于对我刊引用数据的统计。经本届编委会讨论,以及主办单位批准,本刊英文刊名自2010年起变更为“Microbiology China”,请各位作者、读者和数据库引用时注意使用。

《微生物学通报》编辑部

2009-12-25