

大肠杆菌热休克或冷休克启动子调控的基因表达载体

邵蔚蓝 郭星星 沙冲*

(江苏大学环境与安全工程学院生物质能源研究所 江苏 镇江 212013)

摘要: 基因重组技术已经成为获得各种酶和生物活性蛋白的主要手段。虽然很多基因已在大肠杆菌中得到高效表达,但是当人们认定某种蛋白对科学研究或生产应用极为重要时,却常常因为其基因表达水平很低或产生包涵体而感到束手无策。表达载体 pHsh 和 pEXC 通过激活热休克或冷休克转录调控机制提高分子伴侣的表达水平,从而降低目标蛋白的细胞毒性并减少包涵体形成。应用于生物合成、分子修饰或生物降解的高温酶可以通过 pHsh 系统表达获得高产,而科研和诊疗所需要的来源于动植物和常温微生物的基因可以通过 pEXC 系统获得高效表达。这些新载体的发展为重组蛋白的小规模制备和大规模生产提供了新策略和有效途径。

关键词: 生物活性蛋白, 分子伴侣, 新型表达载体, 可溶性表达, 高温酶

The vectors using heat or cold shock promoter in *Escherichia coli* to control gene expression

SHAO Wei-Lan GUO Xing-Xing SHA Chong*

(Biofuels Institute, School of the Environment and Safety Engineering, Jiangsu University, Zhenjiang, Jiangsu 212013, China)

Abstract: Gene recombination technology has become a main route to produce proteins in laboratory and industry. Though many proteins have been efficiently expressed in *Escherichia coli*, people have difficulties when target genes express at a very low level or produce inclusion body, especially for the proteins important for research and production. The expression level of molecular chaperones can be enhanced by the transcription factors of a heat shock or cold shock system in vectors pHsh and pEXC, which could reduce cytotoxicity of target proteins and formation of inclusion body. Thermostable enzymes used in biosynthesis, molecular modification or biodegradation could be overexpressed in pHsh expression system, while the genes from animals, plants and mesophilic microorganisms can be effectively expressed by using vector pEXC. The development of these novel

Foundation item: National Natural Science Foundation of China (No. 30970062); The Key Project of Science and Technology Program of Jiangsu Province (No. BE2016353); Natural Science Foundation of Jiangsu Province (Youth Fund) (No. BK20160502); Advanced Talent Research Fund Project of Jiangsu University (No. 10JDG117, 16JDG031)

*Corresponding author: Tel: 86-511-88796122; E-mail: jnshachong@163.com

Received: September 08, 2016; **Accepted:** December 02, 2016; **Published online** (www.cnki.net): December 05, 2016
基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 30970062); 江苏省重点研发计划(现代农业)项目(No. BE2016353); 江苏省自然科学基金青年基金项目(No. BK20160502); 江苏大学高级人才科研启动基金项目(No. 10JDG117, 16JDG031)

*通讯作者: Tel: 86-511-88796122; E-mail: jnshachong@163.com

收稿日期: 2016-09-08; **接受日期:** 2016-12-02; **优先数字出版日期**(www.cnki.net): 2016-12-05

vectors supply new strategies and effective approaches for small-scale preparation and industrial production of enzymes and bioactive proteins.

Keywords: Bioactive proteins, Chaperones, Novel expression vectors, Soluble expression, Thermostable enzymes

越来越多的酶和生物活性蛋白质被应用于科学研究、工业加工或疾病诊断医疗领域。现代生物技术中, 基因重组表达已经成为获得酶和生物活性蛋白的主要方法。大肠杆菌具有培育简单、生长快速、易于转化等优点, 并且已建立了多种表达载体。因此, 大肠杆菌表达技术通常是制备重组蛋白的首选。通过降低重组蛋白对宿主细胞的不利影响, 可调控型启动子的使用在提高外源基因的表达水平方面起到至关重要的作用。控制外源基因表达的启动子的种类决定了大肠杆菌的基因表达载体的性质。目前国际上应用最广的载体含有 *lac* 启动子和杂合型 *tacltrc* 启动子, λ 噬菌体的 P_L 启动子和 T7 启动子, 它们分别被称为 *lac*、*tacltrc*、 P_L 和 T7 系统。这些表达系统已被广泛用于重组蛋白的制备。

在生物科学相关研究或科技开发中, 达到预期目标的关键往往在于能否成功获得关键基因的表达产物。目标基因的表达水平不仅影响蛋白的产生量, 也会影响目标蛋白的纯化。然而, 大多数高活性的热稳定酶的基因在大肠杆菌中的表达水平很低。由动物、植物或常温微生物来源的基因所编码的蛋白质在大肠杆菌的正常生长温度下几个小时内就变性, 还有一些目标蛋白对宿主细胞具有毒性, 难以得到有效表达。因此, 人们有必要研究和发新型大肠杆菌基因表达系统及其应用技术, 以克服重组蛋白毒性、易变性及产生包涵体等问题。

分子伴侣(Chaperones)是细胞中辅助肽链以非共价键折叠、转运与装配的一类蛋白质^[1-2]。大肠杆菌具有一系列分子伴侣基因, 当细胞遭遇热休克、冷休克或营养匮乏等生存压力时, 这组基因被激活表达并发挥分子伴侣功能。研究发现, 将大肠杆菌热休克分子伴侣基因克隆到载体上并与目标基因共表达, 可以提高重组蛋白的可溶性。近年发展起来的 pHsh 表达系统运用热休克蛋白启动子控制外

源基因的表达, 在通过热激诱导表达时, 胞内的分子伴侣也得到了激活^[3]。宿主的一个细胞内出现数百个拷贝的热休克启动子, 使 σ^{32} 的含量大幅度提高, 这不仅增强了大肠杆菌热激蛋白基因和目标基因的表达, 而且有利于避免目标蛋白形成包涵体^[4]。使用编码冷休克基因的启动子构建的冷激诱导表达系统 pEXC, 在稳定性较差的重组蛋白的表达中也收到了类似的效果^[5]。

1 利用热休克和冷休克系统的启动子构建表达载体

1.1 大肠杆菌热休克系统与热休克表达载体 pHsh

大肠杆菌细胞正常生长所需要的基因都是持家基因, 由持家基因 Sigma 因子 σ^{70} 识别和启动表达。 σ^{32} 是一种应对热激等环境胁迫的不同的 Sigma 因子, 由基因 *rpoH* 编码。当生长中的大肠杆菌细胞遇到急速升温或其他因素引起的环境胁迫, 由 σ^{32} 控制的一组热休克蛋白基因立即被启动表达。热休克蛋白的表达强度在 6 min 内达到高峰, 然后逐渐下降达到一个新的平衡, 由 σ^{32} 识别的热激蛋白启动子的 DNA 序列不同于 σ^{70} 识别的启动子序列。虽然大肠杆菌中热休克系统的生理功能和调节机制早在几十年前就研究清楚, 但是直至近几年, 人们才发现热休克蛋白启动子应用于控制外源基因的高效表达的有益效果和作用机制^[3-4]。

以表达载体 pHsh 为代表的 Hsh 表达系统的特点是含有一个能够被 σ^{32} 识别调控的人工合成的启动子和一个来自 pUC18/19 的复制原点。有趣的是, 不含质粒的大肠杆菌细胞在热激诱导之后, 天然热休克基因的表达在 6 min 内达到高峰, 然后迅速下降, 而含有 pHsh 重组质粒的细胞中热激启动子的控制下基因表达能够持续 7 h 至 10 h。这可能是因

为 pHsh 启用了来自 pUC18/19 的复制原点,其他专一的基因表达系统都没有能够应用这个决定质粒超高拷贝数量的复制原点。研究发现,由质粒携带的超高拷贝数量的热休克蛋白启动子大幅度提高了细胞中的 σ^{32} 蛋白浓度^[4]。推测其机理,细胞通过 σ^{32} 被蛋白酶迅速水解来控制热休克系统的激活和平息,重组细胞在含数百拷贝质粒的同时也获得了数百拷贝的热休克蛋白启动子,这些启动子与 σ^{32} 蛋白之间的结合可能保护它不被 σ^{32} 蛋白酶水解。

国际通用的大肠杆菌表达系统都是直接或间接地通过阻抑蛋白调控外源基因的表达,Hsh 系统是通过不同的 Sigma 因子对外源基因进行表达调控的^[3]。虽然 Hsh 启动子的转录强度不如噬菌体 T7 启动子,但是 Hsh 启动子使宿主细胞能够承受 pUC18/19 的复制原点所介导的质粒拷贝数。超高拷贝的质粒提高了目标基因剂量,可以弥补基因转录强度的不足。同时,Hsh 启动子介导的 σ^{32} 蛋白浓度的提高,既能够加强目标基因的高水平表达也可以增加分子伴侣的产生^[4]。因此,许多难以表达和易产生包涵体的基因能够在 Hsh 表达系统的载体中得以实现超量表达^[3-5]。

1.2 用大肠杆菌冷休克系统构建冷激调控表达的载体

在常规温度下进行基因的重组表达,动植物和常温微生物的基因产物通常只有 0.5 h 半衰期,可能在数小时内变性沉淀,还有一些重组蛋白对宿主具有细胞毒性,难以得到有效的克隆和表达。因此,

有必要研究大肠杆菌的冷休克系统对基因重组表达的作用。大肠杆菌冷休克蛋白及其对冷休克的相应机制已经得到深入的研究^[2]。1996 年人们开始应用冷激启动子控制重组蛋白质在低温下的表达^[6-7]。与使用 T7 或其它表达系统在低温下的基因表达不同,冷激启动子控制的异源基因表达有显著优点:(1) 目标基因冷激诱导表达之前,细菌可在 37 °C 快速生长;(2) 大肠杆菌冷激系统的分子伴侣基因的表达被激活从而能够对目标蛋白发挥保护作用。

从启动子结构上看,没有特别的 Sigma 因子参与大肠杆菌的冷休克反应,冷休克蛋白基因表达的激活必需依靠一系列复杂的转录调控基因来完成。研究发现,快速降温(如从 37 °C 降至 10 °C)可诱导一系列蛋白如 CspA 等蛋白的表达水平瞬时提高^[2-3]。因此,以 *cspA* 基因的冷激启动子被应用于表达载体(如 pCold 等),在低温下控制基因的重组表达^[4]。冷休克蛋白基因 *cspA* 的表达调控区的基本结构具有冷休克蛋白的共同特征(图 1)。它们都有一个 AT 富集区位于持家基因 Sigma 因子 σ^{70} 的上游、一个冷框(Cold box)和一个上游框(UB)位于非编码区(Untranslated region),还有一个下游框(DB)位于起始密码子之后的功能基因编码区内。研究表明,冷框缺失时,合成 CspA 的 mRNA 的半衰期显著下降,上游框能够促进翻译复合体的形成并提高冷激蛋白的翻译效率。AT 富集区和下游框的功能目前还不清楚。

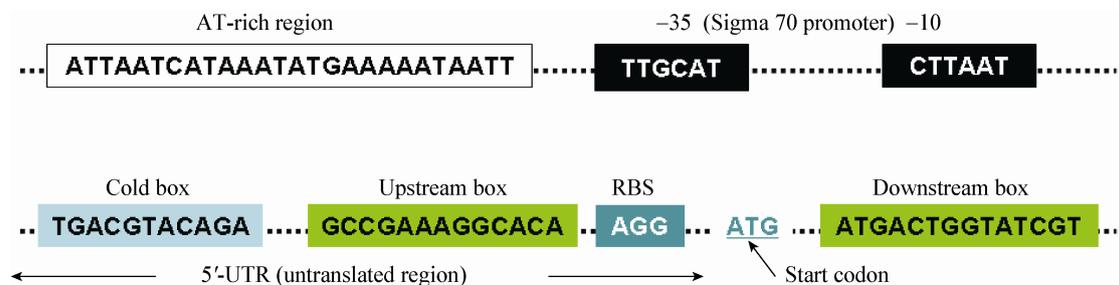


图 1 大肠杆菌冷休克蛋白基因共有的应对冷激诱导条件的调控元件^[2]

Figure 1 The common regulatory elements of cold-shock genes responded to cold shock induced conditions^[2]

为了更有效地提高外源基因的表达水平,在质粒 pHsh 的基础上构建的冷激载体,可以在实现冷激启动子控制目标基因表达的同时兼有拷贝数高和分子量小的优势。He 等使用大肠杆菌的冷激系统的调控元件取代 pHsh 中热激启动子构建了冷激载体 pEXC,成功获得低温诱导的目标基因高效表达^[8-9]。

1.3 热激和冷激调控的表达技术与 TA 克隆技术的结合

TA 克隆技术利用 *Taq* DNA 聚合酶在 PCR 扩增过程中会在 DNA 片段的两个 3'端加上 A,可以直接与两端带有 T 的载体 DNA 连接^[10]。这不仅缩减了限制性内切酶的选择和操作步骤,而且可以避免目标基因的相互连接和载体的自身环化,从而大大提高基因克隆的成功率。为了减少克隆到基因表达载体的步骤,研究人员将 pHsh 和 pEXC 进一步构建成 T 载体,即 pHsh-T 和 pEXC-T (图 2)^[9,11]。这些 T 载体结合 TA 克隆功能和基因表达功能,适用于基因组文库、cDNA 文库和基因突变文库的构建和同步平板筛选。同时,在基因表达与调控单元的分子结构上,表达型 T 载体能够保持目标基因的上游和下游具有经过优化的碱基序列。

2 基因操作与表达调控技术

2.1 进行可调控型基因重组表达的基本条件

众所周知,外源基因的存在和本底表达对宿主细胞产生巨大的压力,表达质粒在细胞生长过程中也面临着被突变或修饰的危险。目标基因的突变或载体的修饰等变异可能降低质粒对细胞的生存压力,反之,含有变异质粒的细胞会因此比携带正常质粒的细胞遭遇较小的生存压力而获得生长优势。即使在 $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存菌种,构建成功的基因表达质粒都不应当贮存在转化子细胞中,因为经过长时间存放,处于维持状态的微弱生命活动也能导致质粒变异。因此,高效表达的质粒构建成功后,应当从新鲜细胞中提取出来并溶解于 TE 缓冲液(10 mmol/L Tris-HCl, 1 mmol/L EDTA)以便于长期保存^[5]。保存的表达质粒用于重新转化大肠杆菌感受态细胞,使用新鲜转化子能够使基因重组表达达到最佳效果。

含有表达质粒的重组细胞在培养过程中,目标蛋白的表达对细胞的生长具有胁迫性,使细胞不能健康生长,并且容易让含有变异质粒的细胞成长为主要群体。因此,人们利用可调控型启动子控制外

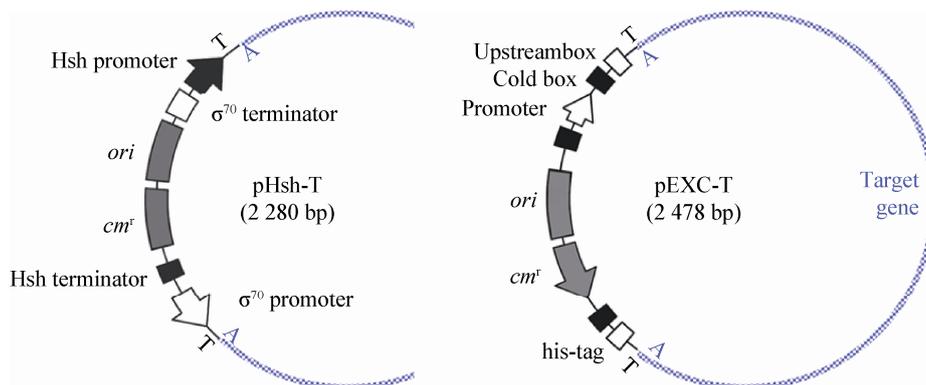


图 2 pHsh 系统和 pEXC 系统的 T 表达载体示意图^[9,11]

Figure 2 The sketch map of T expression vectors for pHsh and pEXC system^[9,11]

注: pHsh-T 载体不仅包括了一对热激启动子和终止子,还拥有一对激活逆向转录表达的 σ^{70} 启动子和终止子以用于筛选文库构建。

Note: A couple of heat-shock promoter and terminator was included in the vector pHsh-T, which also include a pair of reverse transcription expressing σ^{70} promoter and terminator for screening library constructed.

源基因的表达,以便在不需基因表达的细胞培养阶段能够抑制重组蛋白的产生。但是,阻遏蛋白介导的可调控型启动子通常不是非常严紧,在没有实施表达诱导的条件下培养,目标基因也会产生少量蛋白,这被称为“本底表达”或“泄漏表达”。一个基因的潜在表达水平越高,本底表达越严重,细胞生长越少。

2.2 温度调控型表达载体的应用技术

温度调控型的表达载体包括热诱导型的载体 pHsh 和温度敏感阻遏蛋白控制的 P_L 系统的质粒,以及冷诱导型表达载体如 pCold 和 pEXC-T 等。在应用温度调控型的表达载体时,细胞的培养温度是影响基因表达水平的重要因素。使用热诱导型的载体时,在不需诱导基因表达的培养过程,如重组细胞在进行分子克隆、序列优化、基因转化和接种放大等过程中,培养温度都不应该高于 30 °C。虽然急剧升温可以比温度缓慢上升能够更有效地诱导基因表达,但是研究结果表明,含 pHsh 表达质粒的重组细胞在诱导外源基因表达之前,生长温度越高外源基因的本底表达越强,在 30 °C 以下生长的细胞中,本底表达可以得到严紧的控制^[5]。因此,在 30 °C 或更低的温度下生长有利于降低目标基因的本底表达和维持重组细胞的健康生长,并且避免目标基因或表达载体发生碱基突变。与之相反,用 pEXC 构建的表达质粒在正式实施低温诱导表达之前,重组细胞都应该置于 37 °C 培养,以便控制本底表达。

表达载体 pHsh-T 和 pEXC-T 为获得目标基因的超量表达提供了技术平台和潜力。但是,大多数天然基因在表达质粒中并不能显著表达,特别是一些对科研和工业应用具有重要价值的蛋白,达不到一定的表达水平就很难进行纯化定性或规模化生产。对于在温度调控型表达载体中表达水平太低的基因,人们可以通过定点突变和随机诱变来修饰基因序列,从而提高表达水平或酶的产量。pHsh-T 和 pEXC-T 是分子最小的高效表达载体,这个特性为进行原位点突变和随机诱变带来了很大的方便。例

如,嗜热栖热菌(*Thermus thermophilus*)的基因 *lcs* 编码具有巨大应用潜力的极端高温漆酶,但是其天然基因在大肠杆菌系统中很难表达。研究人员采用定点突变的方法优化 *lcs* 基因,通过消除稀有密码子、减少 mRNA 的 5'发卡结构、优化启动子序列等途径提高酶的表达水平。最后,研究人员还采用原位易错 PCR^[12-13]对 *lcs* 开放阅读框中的碱基进行随机突变,进一步提高了 *lcs* 基因的表达水平(图 3)。这个实例表明,许多天然基因即使在 pHsh-T 或 pEXC-T 中也不能得到有效表达,但是通过一系列的序列优化,不易表达的基因可以实现超量表达。

2.3 热激和冷激调控的表达载体应用实例

从极端微生物中获取的热稳定酶是催化生物合成和药用化学品修饰的有用工具,如 β -葡萄糖苷酸酶、 α -阿拉伯糖苷酶和 *S*-腺苷同型半胱氨酸水解酶(SAHase)^[14-16]。以 *S*-腺苷同型半胱氨酸水解酶为例,说明用于生物制药相关的极端高温酶的研发过程。*S*-腺苷同型半胱氨酸是人体自然存在的有机物,

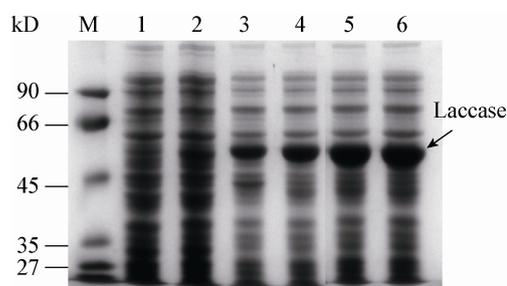


图3 来源于 *Thermus thermophilus* 的漆酶在大肠杆菌中的蛋白表达 SDS-PAGE 电泳图^[13]

Figure 3 SDS-PAGE of laccase from *Thermus thermophilus* expressed in *E. coli* ^[13]

注: M: 蛋白质分子量标记(kD); 1: 野生型漆酶; 2: 密码子优化的漆酶; 3: mRNA 二级结构优化的漆酶; 4: N 端融合短肽的漆酶; 5: 表达漆酶的启动子的序列优化; 6: 原位易错 PCR 优化漆酶。

Note: M: Protein marker (kD); 1: Wildtype for laccase; 2: Expressed laccase by optimization of codon; 3: Expressed laccase by optimization of mRNA secondary structure; 4: Expressed laccase by N terminus fused oligopeptide; 5: Expressed laccase by sequence optimization of expression promoter; 6: Optimization of laccase by ep-PCR *in situ*.

当人体受到病毒侵染或发生其他异常时,体内的 *S*-腺苷同型半胱氨酸发生水解。研究发现, *S*-腺苷同型半胱氨酸不仅是人体健康状况的检测指标,而且是良好的催眠剂和镇静剂,也是潜在的抗病毒药物。但是由于合成技术的限制,目前市场上并没有相关产品的销售。我们对极端高温菌产生的能够合成 *S*-腺苷同型半胱氨酸的酶 SAHase 展开深入的研究,解决了酶的超量表达问题,并发现它是 NAD 依赖型的酶,与乳酸脱氢酶联用,其催化活性可提高 90 倍^[16]。为了避免在严苛的极端条件下培养野生型产酶微生物, pHsh 载体及相应的基因诱变技术适用于极端微生物中高温酶基因的重组表达,使重要的工业酶,包括用于生物制药的高温酶在大肠杆菌中实现超量表达(图 4A)。

在基因超量表达时,许多重组蛋白以不可溶状态出现在沉淀物中。在解决包涵体的形成问题时,研究者发现许多重组蛋白形成沉淀的主要原因是它们在异源基因表达或纯化过程中发生了变性。pEXC-T 同时具备 TA 克隆的便捷和 pHsh、pCold

表达载体的优势。在 pEXC-T 中,肺炎支原体 (*Mycoplasma pneumoniae*) 基因编码的 P1 蛋白,以及化脓性链球菌 (*Streptococcus pyogenes*) 的溶血素 Streptolysin O (SLO) 得到了高水平可溶性表达和成功纯化(图 4B)^[9]。

3 小结

虽然有很多外源基因在大肠杆菌中得到了高效表达,但是大多数自然基因的表达水平很低,或形成不具有生物活性的包涵体。因此,基因表达问题常常成为科学研究中的一个瓶颈,或者成为重要目标蛋白开发应用的障碍。最新研制的表达载体 pHsh 和 pEXC,能够在诱导目标基因表达的同时激活热休克或冷休克系统的分子伴侣的表达,从而在提高表达水平和减少包涵体形成等方面表现出显著优势。应用于生物合成、分子修饰或生物降解的高温酶可以通过 pHsh 系统表达获得高产,而科研和诊疗所需要的来源于动植物和常温微生物的基因可以通过 pEXC 系统获得高效表达。此外, pHsh-T 和 pEXC-T 是拷贝数超高的小分子表达型 T 载体,

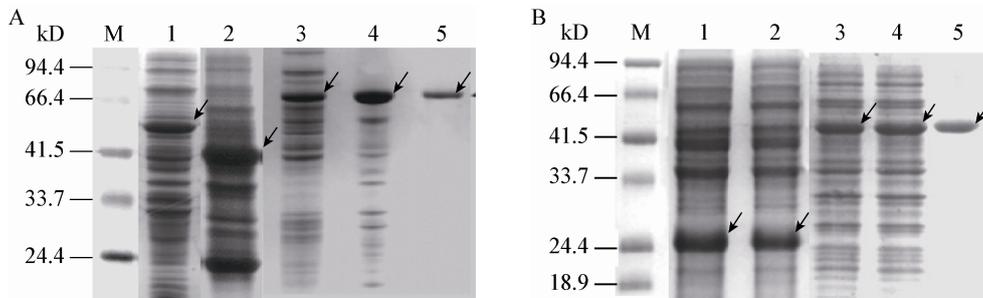


图 4 制药酶基因和抗原蛋白基因在 pHsh 和 pEXC 载体中进行高效表达 SDS-PAGE 电泳图^[9,14-16]

Figure 4 SDS-PAGE of pharmaceutical enzymes and antigenic proteins expressed using vectors pHsh and pEXC^[9,14-16]

注: M: 蛋白质分子量标记(kD)。A: 以热激载体 pHsh 表达用于制药的高温酶; 1 和 2: 分别为 α -阿拉伯糖苷酶和 *S*-腺苷高半胱氨酸水解酶的表达; 3-5: β -葡萄糖醛酸酶的表达与纯化。B: 肺炎支原体 P1 蛋白和链球菌溶血素 PLO 在 pEXC 载体中的低温诱导表达; 1 和 2: 为表达 P1 蛋白的大肠杆菌全细胞蛋白和可溶性蛋白; 3 和 4: 为表达 PLO 蛋白的大肠杆菌全细胞蛋白和可溶性蛋白; 5: 纯化的 PLO 蛋白。

Note: M: Protein marker (kD). A: Thermostability enzymes used for drug industry; 1-2: α -arabinosidase and *S*-Adenosylhomocysteine hydrolase expressed in *E. coli*; 3-5: Expression and purification of β -glucuronidase. B: *Mycoplasma pneumoniae* protein P1 and streptococcolysin PLO expressed using vector pEXC at low temperature; 1-2: The whole cell protein and the soluble protein of *E. coli* expressing P1; 3-4: The whole cell protein and the soluble protein of *E. coli* expressing PLO; 5: Purified PLO protein.

不仅能够一步构成表达质粒、提高转化率,而且有利于通过反向 PCR 进行定点突变和基因改建。新型载体 pHsh-T 和 pEXC-T 的发展为重组蛋白的小规模制备和大规模生产提供了新策略和有效途径。

参 考 文 献

- [1] Skelly S, Coleman T, Fu CF, et al. Correlation between the 32-kDa α factor levels and *in vitro* expression of *Escherichia coli* heat shock genes[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1987, 84(23): 8365-8369
- [2] Phadtare S, Alsina J, Inouye M. Cold-shock response and cold-shock proteins[J]. Current Opinion in Microbiology, 1999, 2(2): 175-180
- [3] Wu HW, Pei JJ, Jiang Y, et al. pHsh vectors, a novel expression system of *Escherichia coli* for the large-scale production of recombinant enzymes[J]. Biotechnology Letters, 2010, 32(6): 795-801
- [4] Le YL, Peng JJ, Wu HW, et al. A approach to the production of soluble protein from a fungal gene encoding an aggregation-prone xylanase in *Escherichia coli*[J]. PLoS One, 2011, 6(4): e18489
- [5] Shao WL. Cloning, mutation and over-expression of lignocellulase genes In: Sun JZ, Ding SY, Peterson JD, eds. Biological Conversion of Biomass for Fuels and Chemicals: Explorations from Natural Utilization Systems[M]. Cambridge (UK): The Royal Society of Chemistry, 2014: 298-317
- [6] Vasina JA, Baneyx F. Recombinant protein expression at low temperatures under the transcriptional control of the major *Escherichia coli* cold shock promoter *cspA*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1996, 62(4): 1444-1447
- [7] Qing GL, Ma LC, Khorchid A, et al. Cold-shock induced high-yield protein production in *Escherichia coli*[J]. Nature Biotechnology, 2004, 22(7): 877-882
- [8] Yamanaka K, Fang L, Inouye M. The CspA family in *Escherichia coli*: multiple gene duplication for stress adaptation[J]. Molecular Microbiology, 1998, 27(2): 247-255
- [9] He YB, Qi YK, Huang LT, et al. An expression T-vector and its application at low temperatures[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2015, 31(12): 1773-1783 (in Chinese)
何燕斌, 齐亚坤, 黄霖霖, 等. 一种低温表达型 T 载体及其应用[J]. 生物工程学报, 2015, 31(12): 1773-1783
- [10] Holton TA, Graham MW. A simple and efficient method for direct cloning of PCR products using ddT-tailed vectors[J]. Nucleic Acids Research, 1991, 19(5): 1156
- [11] Zhou R. Construction and application of an expression T-vector, pHsh-T[D]. Nanjing: Master's Thesis of Nanjing Normal University, 2015 (in Chinese)
周蓉. 新型表达型 T 载体 pHsh-T 的构建于应用[D]. 南京: 南京师范大学硕士学位论文, 2015
- [12] Le YL, Chen HY, Zagursky R, et al. Thermostable DNA ligase-mediated PCR production of circular plasmid (PPCP) and its application in directed evolution via *in situ* error-prone PCR[J]. DNA Research, 2013, 20(4): 375-382
- [13] Zhang YC. High-level expression of extremely thermostable laccase and xylanase and application in biobleaching of wheat straw pulp[D]. Nanjing: Doctoral Dissertation of Nanjing Normal University, 2014 (in Chinese)
张永昌. 极耐热性漆酶和木聚糖酶的超量表达及其在麦草浆漂白中的应用[D]. 南京: 南京师范大学博士学位论文, 2014
- [14] Wang Z, Pei JJ, Li HZ, et al. Expression, characterization and application of thermostable β -glucuronidase from *Thermotoga maritima*[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2008, 24(8): 1407-1412 (in Chinese)
王卓, 裴建军, 李华钟, 等. 极耐热性 β -葡萄糖醛酸酶的高效表达和酶学性质及其应用[J]. 生物工程学报, 2008, 24(8): 1407-1412
- [15] Pei JJ, Shao WL. Purification and characterization of an extracellular α -L-arabinosidase from a novel isolate *Bacillus pumilus* ARA and its over-expression in *Escherichia coli*[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2008, 78: 115-121
- [16] Qian GJ, Chen CP, Zhou R, et al. A thermostable *S*-adenosylhomocysteine hydrolase from *Thermotoga maritima*: Properties and its application on *S*-adenosylhomocysteine production with enzymatic cofactor regeneration[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2014, 64-65: 33-37