

吴三桥,赵冠杰,万 健,等. 抗菌肽 SMAP-29 在大肠杆菌中表达条件的优化及纯化研究[J]. 江苏农业科学,2018,46(9):44-47.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2018.09.008

抗菌肽 SMAP-29 在大肠杆菌中表达条件的优化及纯化研究

吴三桥, 赵冠杰, 万 健, 陈 琛

(陕西理工大学生物科学与工程学院/中德天然产物研究所,陕西汉中 723000)

摘要:将前期构建的含有 pSUMO-SMAP-29 的重组质粒转入宿主菌 *Escherichia coli* BL21,对表达菌株的表达条件进行优化,考察诱导剂 IPTG 浓度、诱导温度和诱导时间对融合蛋白 SUMO-SMAP-29 表达的影响,用 SDS-PAGE 电泳、Quantity One 及 SPSS 软件进行分析,并将融合蛋白通过 Ni 柱进行亲和纯化。研究表明,IPTG 终浓度为 0.50 mmol/L、诱导温度为 30 ℃、诱导表达时间为 3 h 时融合蛋白的表达量最高,占菌体总蛋白的 11.35%。确定重组融合蛋白 SUMO-SMAP-29 的最优表达条件并纯化得到融合蛋白 SUMO-SMAP-29。

关键词:抗菌肽;SMAP-29;pSUMO;大肠杆菌;原核表达

中图分类号: S188;Q786 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2018)09-0044-03

近年来,抗生素的长期使用所带来的负面效应已越来越引起全社会的高度关注,药物残留和细菌耐药性等问题日渐严重,特别是 2010 年出现的“超级细菌”^[1]事件再一次将滥用抗生素引发的日益严重的耐药菌株等问题摆在了公众面前,长期滥用抗生素所引起的食品安全、人类健康、环境污染等问题也受到了公众的广泛关注。因此,研制安全、高效、环保型抗生素替代品已迫在眉睫。

抗菌肽(antibacterial peptides)是生物体特定基因编码产生的一类小分子多肽,具有抵抗外界微生物侵害的作用,是生物天然免疫系统中的一个重要组成部分,与传统抗生素相比,抗菌肽具有热稳定好、水溶性好、强碱性、广谱抗菌和作用机制独特等特点^[2-3]。

抗菌肽 SMAP-29 (sheep myeloid antibacterial peptides-29)是 1995 年 Bagella 等从绵羊 Cathelicidins 前体蛋白的羧基端截取的 29 个氨基酸残基序列,具有两亲性 α -螺旋结构域,分子量约为 3.2 ku,有很强的抗细菌、真菌、病毒等生物学功能^[4-11]。抗菌肽 SMAP-29 天然含量非常低,化学合成成本较高,因此通过基因工程表达具有较好的前景。抗菌肽 SMAP-29 基因工程表达已有大量研究报道,但是未见采用小分子泛素样修饰蛋白 (small ubiquitin-related modifier, SUMO) 融合表达报道。

收稿日期:2016-12-06

基金项目:国家高端外国专家项目(编号:GDW20146100228);陕西省科技统筹创新工程计划(编号:2015KTTSSF01-03、2015HBGC-18);陕西省科技研究发展计划(编号:2015NY070、2016NY-161);陕西省协同创新计划(编号:2016XT-13);陕南秦巴山区生物资源综合开发协同创新中心资助项目[编号:QBXT-Z(P)-15-21]。

作者简介:吴三桥(1962—),男,湖北郧县人,教授,主要从事生物化学与分子生物学研究。E-mail:wsq800318@126.com。

通信作者:陈琛,副教授,主要从事蛋白质与多肽生物化学研究。E-mail:cchen2008@yahoo.com。

本试验以抗菌肽 SMAP-29 为研究对象,通过已构建的表达载体 pSUMO-SMAP-29 在大肠杆菌中诱导表达融合蛋白 SUMO-SMAP-29,优化了融合蛋白 SUMO-SMAP-29 在大肠杆菌中的表达条件,并通过 Ni 柱亲和层析纯化了目的蛋白,旨在为其生物活性以及产业化开发奠定基础。

1 材料与方法

1.1 菌株、试剂

含有 pSUMO-SMAP-29 表达质粒的 *Escherichia coli* BL21(DE3)菌种由笔者所在实验室保存。

Protein Marker、IPTG、卡那霉素购自生工生物工程(上海)股份有限公司;Ni Sepharose 柱购自美国 GE Healthcare 公司;其余试剂均为国产分析纯。

1.2 融合蛋白 SUMO-SMAP-29 表达条件的优化

1.2.1 细菌培养 将含重组质粒 pSUMO-SMAP-29 的 *E. coli* BL21 菌种接种于 LB(50 μ g/mL 卡那霉素)固体培养基,37 ℃ 过夜培养。挑取新鲜单克隆接种于 5 mL LB(50 μ g/mL 卡那霉素)液体培养基中,37 ℃、200 r/min 振荡培养过夜。

1.2.2 不同浓度 IPTG 对目的蛋白表达量的影响 细菌培养方法同“1.2.1”节,然后按体积比 1:100 的转接量将过夜培养的菌液接种于 50 mL 新鲜 LB(50 μ g/mL 卡那霉素)液体培养基中,37 ℃、200 r/min 振荡培养。当 $D_{600\text{nm}}$ 约 0.6 时加 IPTG 至终浓度为 0.25、0.50、1.00、2.00 mmol/L,在 37 ℃ 诱导 1 h 后各取样 1 mL 进行 SDS-PAGE 电泳分析。通过 Quantity One 和 SPSS 软件,分析融合蛋白 SUMO-SMAP-29 的相对表达量,以及 IPTG 浓度梯度各组之间是否有统计学差异。

1.2.3 不同诱导温度对目的蛋白表达量的影响 细菌培养方法同“1.2.1”节,然后按体积比 1:100 的转接量将过夜培养的菌液接种于 50 mL 新鲜 LB(50 μ g/mL 卡那霉素)液体培养基中,37 ℃、200 r/min 振荡培养。当 $D_{600\text{nm}}$ 约 0.6 时加 IPTG 至终浓度为 0.50 mmol/L,分别在 25、30、37、42 ℃ 诱导,

1 h 后各取样 1 mL,进行 SDS - PAGE 电泳分析。通过 Quantity One 和 SPSS 软件分析融合蛋白 SUMO - SMAP - 29 的相对表达量,以及诱导温度梯度各组之间是否有统计学差异。

1.2.4 不同诱导时间对目的蛋白表达量的影响 细菌培养方法同“1.2.1”节,然后按体积比 1 : 100 的转接量将过夜培养的菌液接种于 50 mL 新鲜 LB(50 μg/mL 卡那霉素)液体培养基中,37 ℃、200 r/min 振荡培养。在培养至 $D_{600\text{ nm}}$ 约 0.6 时,加 0.50 mmol/L IPTG,在 30 ℃ 条件下诱导,分别于 0、1、3、5、7 h 取样 1 mL,进行 SDS - PAGE 电泳分析。通过 Quantity One 和 SPSS 软件分析融合蛋白 SUMO - SMAP - 29 的相对表达量,以及诱导时间梯度各组之间是否有统计学差异。

1.3 融合蛋白 SUMO - SMAP - 29 的分离纯化

取诱导表达后的菌液离心收集菌体,用 Binding Buffer (20 mmol/L Tris,500 mmol/L NaCl,10 mmol/L 咪唑,pH 值 8.0)重悬菌体,冰浴超声破菌,离心收集上清。将含目的蛋白的细菌破碎液上样于 Ni - NTA 纯化柱,调整流速 ($\leq 1.5\text{ mL/min}$) 后,用 Wash Buffer (20 mmol/L Tris,500 mmol/L NaCl,20 mmol/L 咪唑,pH 值 8.0)洗去杂蛋白,再用 Elution Buffer (20 mmol/L Tris,500 mmol/L NaCl,250 mmol/L 咪唑,pH 值 8.0)洗脱,收集洗脱液,SDS - PAGE 分析,其余样品用 PBS 于 4 ℃ 过夜透析,透析液冷冻干燥后存于 -80 ℃ 超低温冰箱。

2 结果与分析

2.1 融合蛋白 SUMO - SMAP - 29 诱导表达条件的优化

2.1.1 不同 IPTG 浓度对大肠杆菌表达融合蛋白 SUMO - SMAP - 29 的影响 SUMO 标签蛋白分子量为 14 ku,但是实际表现为 18 ku,可能与其特殊的三级结构有关^[12]。抗菌肽 SMAP - 29 的分子量为 3.2 ku,因此,融合蛋白的分子量表现为 21 ku 左右。SDS - PAGE 电泳结果(图 1)表明,在 21 ku 处可以明显看到融合蛋白 SUMO - SMAP - 29 得到表达。0.25、0.50、1.00、2.00 mmol/L 浓度的 IPTG 均能诱导大肠杆菌表达融合蛋白 SUMO - SMAP - 29。

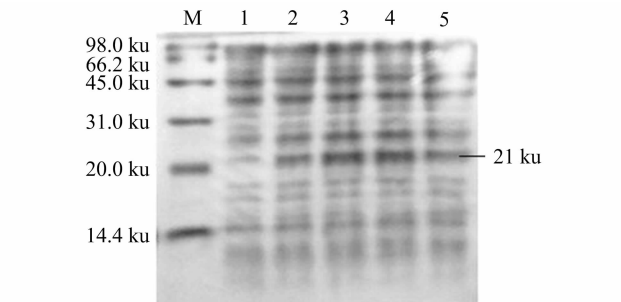


图1 不同 IPTG 浓度对融合蛋白 SUMO - SMAP - 29 表达量的影响

通过 Quantity One 和 SPSS 软件,对不同 IPTG 浓度诱导情况下融合蛋白 SUMO - SMAP - 29 的相对表达量进行分析,结果如表 1 和图 2 所示。诱导前,大肠杆菌本底水平表达了微量的融合蛋白,约占总蛋白的 0.5%,当 IPTG 浓度为 0.50、1.00 mmol/L 时融合蛋白 SUMO - SMAP - 29 的表达量相对较高,分别占菌体总蛋白的 9.99%、10.02%,统计学分析显

示两者差异不显著。因此,IPTG 浓度在 0.50 ~ 1.00 mmol/L 之间均能相对高效地诱导融合蛋白 SUMO - SMAP - 29 的表达,出于节约成本考虑,在后续试验中选择 0.50 mmol/L IPTG 为诱导浓度。

表 1 不同 IPTG 浓度融合蛋白 SUMO - SMAP - 29 的相对表达量

IPTG 浓度 (mmol/L)	表达量 (%)			
	重复 1	重复 2	重复 3	$\bar{x} \pm s$
0	0.51	0.52	0.47	0.50 ± 0.021a
0.25	7.44	7.52	7.42	7.46 ± 0.043b
0.50	9.76	9.87	10.33	9.99 ± 0.247c
1.00	9.59	9.65	10.82	10.02 ± 0.566c
2.00	7.88	7.44	7.41	7.57 ± 0.214b

注:同列数据后不同小写字母表示组间差异显著 ($P < 0.05$)。下表同。

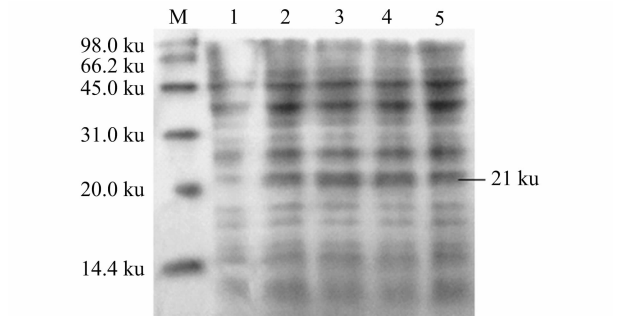


图2 不同诱导温度对融合蛋白 SUMO - SMAP - 29 表达量的影响

2.1.2 不同诱导温度对大肠杆菌表达融合蛋白 SUMO - SMAP - 29 的影响 由图 2 可知,在诱导温度为 25、30、37、42 ℃ 时,均能诱导大肠杆菌表达融合蛋白 SUMO - SMAP - 29。通过 Quantity One 软件对融合蛋白 SUMO - SMAP - 29 的相对表达量进行分析,结果如表 2 和图 2 所示,当诱导温度为 30、37 ℃ 时表达量相对较高,分别占菌体总蛋白的 10.10%、9.95%,两者间差异不显著,因此 30 ~ 37 ℃ 均能相对高效地诱导融合蛋白 SUMO - SMAP - 29 的表达,为了降低对恒温培养箱的损耗,后续试验选择低一点的温度 30 ℃ 作为诱导温度。

表 2 不同诱导温度融合蛋白 SUMO - SMAP - 29 的相对表达量

温度 (℃)	表达量 (%)			
	重复 1	重复 2	重复 3	$\bar{x} \pm s$
25	7.43	7.22	7.08	7.23 ± 0.144a
30	10.06	9.86	10.39	10.10 ± 0.219b
37	9.89	9.94	10.02	9.95 ± 0.054b
42	7.16	7.12	7.28	7.19 ± 0.068a

2.1.3 不同诱导时间对大肠杆菌表达融合蛋白 SUMO - SMAP - 29 的影响 通过 Quantity One 和 SPSS 软件对融合蛋白 SUMO - SMAP - 29 的相对表达量进行分析,结果如图 3 和表 3 所示,诱导表达后,融合蛋白 SUMO - SMAP - 29 表达量 0 ~ 3 h 不断升高,在 5 h 处表达量达到相对较高的水平,占菌体总蛋白的 11.35%;5 h 后,融合蛋白 SUMO - SMAP - 29 的表达量反而有所减少。统计学分析显示,诱导 3、5 h 的相对表达量差异不显著,出于节约时间的考虑,选取 3 h 作为诱导时间。

2.2 融合蛋白 SUMO - SMAP - 29 的分离纯化

在诱导剂 IPTG 终浓度为 0.50 mmol/L、诱导温度为

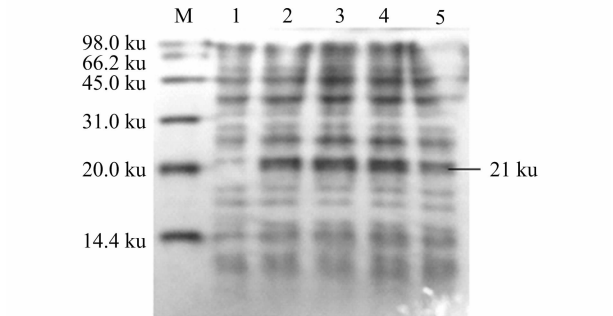


图3 不同诱导时间对融合蛋白 SUMO-SMAP-29 表达量的影响

表3 不同诱导时间对融合蛋白 SUMO-SMAP-29 的相对表达量

时间 (h)	表达量(%)			
	重复 1	重复 2	重复 3	$\bar{x} \pm s$
1	10.01	10.18	10.12	10.10 ± 0.070a
3	11.12	11.22	11.12	11.15 ± 0.047b
5	11.31	11.42	11.32	11.35 ± 0.050b
7	8.63	8.15	8.36	8.38 ± 0.196c

30 ℃、诱导 3 h 后收集菌液离心。经 Ni 柱亲和层析纯化后,分别取样品、样品流出液、清洗液以及洗脱液用 SDS-PAGE 电泳分析(图 4),电泳结果显示获得了融合蛋白 SUMO-SMAP-29。

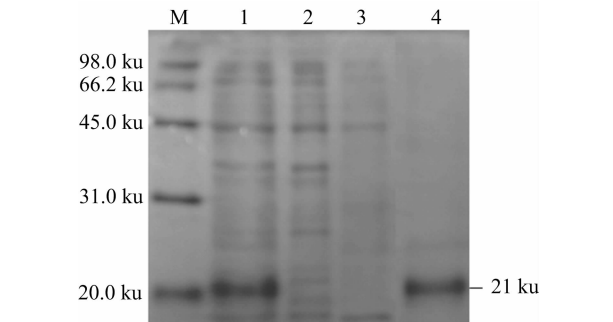


图4 SUMO-SMAP-29 的分离纯化

3 讨论

大肠杆菌具有培养条件简单、生长繁殖快、安全性好、可高效表达外源基因等优点,是目前抗菌肽表达采用最多的表达系统。抗菌肽 SMAP-29 因本身具有抗菌活性,对宿主菌具有杀伤作用,直接表达较困难。另外,因分子量小和阳离子特性容易被细胞中的蛋白酶降解,目前表达抗菌肽时常采用融合表达。融合表达模拟了抗菌肽在生物机体内合成时的前体结构^[13],分子伴侣的作用类似于天然抗菌肽的前体部分。SUMO 标签蛋白能促进目的蛋白的可溶性表达和正确折叠^[14];对热和蛋白酶有很强的抗性,有利于保持目的蛋白的稳定性;SUMO 分子量较小,表达融合蛋白中目的蛋白占比例较大,提高目的蛋白得率。

外界条件如 IPTG 浓度、诱导温度、诱导时间等对大肠杆菌表达外源蛋白有着十分重要的影响。研究发现,通过优化上述条件能够获得更高的表达量,但因表达菌株、质粒和外源蛋白的差异,最佳的表达条件也各不相同。

诱导剂 IPTG 浓度过低时,启动子没有完全启动,大肠杆菌无法最大化分泌外源蛋白;但 IPTG 浓度过高可能会对大肠杆菌有抑制作用,且 IPTG 一般价格不便宜,会造成试验经费上的浪费。本试验通过研究不同 IPTG 浓度对大肠杆菌表达 SUMO-SMAP-29 的影响发现,随着 IPTG 浓度的升高,融合蛋白 SUMO-SMAP-29 表达量增加,当 IPTG 浓度为 0.50、1.00 mmol/L 时融合蛋白 SUMO-SMAP-29 表达量相对较高,统计分析显示表达量差异不显著;但 IPTG 浓度为 2.00 mmol/L 时,表达量反而下降,这可能与高浓度的 IPTG 对大肠杆菌有抑制作用相关,出于成本考虑,在本试验选择 0.50 mmol/L IPTG 作为诱导浓度。

温度不仅影响大肠杆菌的生长,也对外源蛋白的稳定性有着一定的影响。在温度相对偏低时,菌体生长速率缓慢,代谢速率较低,外源蛋白表达量偏低。但在另一方面,低温有助于维持稳定外源蛋白的结构,高温可能会破坏外源蛋白的结构,研究发现温度过高(如 42 ℃)时,融合蛋白 SUMO-SMAP-29 的表达量有所降低。本试验中发现诱导温度为 30、37 ℃ 时,融合蛋白 SUMO-SMAP-29 表达量相对较高,统计分析显示 30、37 ℃ 诱导时融合蛋白 SUMO-SMAP-29 相对表达量之间差异不显著,为了降低对恒温培养箱的损耗,本试验选择低一点的温度(30 ℃)作为诱导温度。

诱导表达时间的优化影响着外源蛋白的最终产量。从外源蛋白开始被大肠杆菌表达至培养基中养分耗尽的过程中,外源蛋白的表达是一个不断变化的过程。因为随着诱导时间的延长,表达的外源蛋白越来越多,但是,外源蛋白也不断被蛋白酶降解。在本试验中,大肠杆菌在 0~5 h 这段时间大量表达融合蛋白 SUMO-SMAP-29;5 h 后,由于大肠杆菌表达 SUMO-SMAP-29 的速率下降,低于 SUMO-SMAP-29 被降解的速率,所以 SUMO-SMAP-29 开始减少。统计学分析显示,诱导 3、5 h 的相对表达量差异不显著,出于节约时间的考虑,选取 3 h 作为诱导时间。

相对于表达载体的构建和蛋白的诱导表达,外源蛋白的纯化更加困难和繁琐。Ni 柱亲和层析是通过蛋白质暴露在表面的一些氨基酸残基(如组氨酸)和树脂上的金属离子之间的特异性结合进行纯化目的蛋白的,具有配体简单、吸附性强、分离条件适宜以及不影响蛋白质自身的生物活性等优点。融合标签 SUMO 自身带有 6×His 标签,因此本试验利用 Ni 柱亲和层析纯化重组融合蛋白 SUMO-SMAP-29,且纯化效率较好。

本试验结果表明,融合蛋白 SUMO-SMAP-29 相对最优的诱导表达条件为 IPTG 终浓度 0.50 mmol/L、诱导温度 30 ℃、诱导表达时间 3 h。这为进一步研究抗菌肽 SMAP-29 的生物学活性及产业化开发奠定了必要的基础。

参考文献:

[1] Yong D, Toleman M A, Giske C G, et al. Characterization of a new metallo-β-lactamase gene, blaNDM-1, and a novel erythromycin esterase gene carried on a unique genetic structure in *Klebsiella pneumoniae* sequence type 14 from India[J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2009, 53(12): 5046-5054.

[2] Zasloff M. Antimicrobial peptides of multicellular organisms[J]. Nature, 2002, 415(6870): 389-395.

朱佳慧,徐秋芳,袁平平,等. 水稻幼苗酵母双杂交 cDNA 文库的构建及鉴定[J]. 江苏农业科学,2018,46(9):47-50.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2018.09.009

水稻幼苗酵母双杂交 cDNA 文库的构建及鉴定

朱佳慧^{1,2}, 徐秋芳², 袁平平^{1,3}, 倪海平², 周益军², 蒋选利³, 杜何为¹

(1. 长江大学生命科学学院,湖北荆州 434025; 2. 江苏省农业科学院植物保护研究所,江苏南京 210014;

3. 贵州大学农学院,贵州贵阳 550025)

摘要:为解析水稻黑条矮缩病毒(RBSDV)与寄主水稻的互作机制,筛选水稻中与病毒互作的蛋白,以易感 RBSDV 的水稻品种日本晴 3~4 叶期的组织样品为材料,通过提取总 RNA 后分离获得 mRNA,合成 cDNA 双链后连入 pDONR222 载体,获得初级文库。初级文库的滴度为 6.6×10^6 CFU/mL,库容为 1.9×10^7 CFU,重组率 >95%,插入片段平均长度 >1 kb。提取初级文库质粒,通过重组反应将水稻 cDNA 文库转移至 pGADT7-DEST 载体,构建获得水稻幼苗的酵母双杂交 cDNA 文库,文库的滴度为 4.5×10^6 CFU/mL,库容为 1.3×10^7 CFU,重组率 >95%,cDNA 插入片段平均长度 >1 kb。采用 RBSDV 候选基因进行文库筛选,结果表明所构建的酵母文库可用于筛选病毒互作蛋白。

关键词:水稻;幼苗 cDNA 文库;酵母双杂交;水稻黑条矮缩病毒;滴度;库容;重组率

中图分类号: S435.111.4⁺9; Q943.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2018)09-0047-04

水稻黑条矮缩病是一种重要的水稻病毒病害,病原为水稻黑条矮缩病毒(rice black streaked dwarf virus, RBSDV),主要通过介体灰飞虱以持久增殖型方式传播。水稻感染 RBSDV 后的典型症状为病株矮缩、叶色浓绿、叶片僵直,茎秆、叶背和叶鞘处出现瘤状突起。该病害自 20 世纪 60 年代和 90 年代在我国流行危害后,曾一度销声匿迹,2006 年以来

由于灰飞虱虫量上升和带毒率提高,水稻黑条矮缩病在江苏、浙江、安徽等地麦轮作区的水稻上普遍发生,2009 年仅江苏省的发病面积达 3.33×10^5 hm²,造成巨大的经济损失^[1-2]。当前生产上栽培的水稻品种对黑条矮缩病的抗性较差,大部分为感病品种,尚未鉴定到高抗品种^[3-4]。

水稻不同生育期对 RBSDV 的敏感性存在差异,3~4 叶期幼苗最易感病^[5]。苗期感病后,植株矮小、心叶短小而僵直,不能抽穗,严重的则出现枯死现象。分蘖期和抽穗期发病,出现包穗,部分分蘖能抽穗,但穗小或包穗,结实差^[6]。水稻感染黑条矮缩病毒后细胞壁结构发生改变^[7],病毒感染后引起的矮缩症状可能与纤维素合成酶及类纤维素合成酶基因及木质素相关基因表达有关^[8-9],病毒影响水稻育性可能是由于病毒的 P7-1 蛋白的表达抑制了花药中木质素合成,

收稿日期:2018-01-08

基金项目:国家自然科学基金(编号:31471768);江苏省农业科技自主创新资金[编号: CX(15)1053]。

作者简介:朱佳慧(1992—),女,湖北孝昌人,硕士研究生,从事植物病毒学研究。E-mail:942336014@qq.com。

通信作者:杜何为,博士,教授,从事玉米耐渍性形成分子机制的研究。E-mail:duhewei666@163.com。

[3] Silva N C, Sarmiento B, Pintado M. The importance of antimicrobial peptides and their potential for therapeutic use in ophthalmology[J]. International Journal of Antimicrobial Agents, 2013, 41(1): 5-10.

[4] Bagella L, Scocchi M, Zanetti M. cDNA sequences of three sheep myeloid cathelicidins[J]. FEBS Letters, 1995, 376(3): 225-228.

[5] Lee D G, Kim P I, Park Y, et al. Antifungal mechanism of SMAP-29 (1-18) isolated from sheep myeloid mRNA against *Trichosporon beigelii*[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2002, 295(3): 591-596.

[6] Arzese A, Skerlavaj B, Tomasinsig L, et al. Antimicrobial activity of SMAP-29 against the *Bacteroides fragilis* group and clostridia[J]. The Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2003, 52(3): 375-381.

[7] Giacometti A, Cironi O, Ghiselli R, et al. Cathelicidin peptide sheep myeloid antimicrobial peptide-29 prevents endotoxin-induced mortality in rat models of septic shock[J]. American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine, 2004, 169(2): 187-194.

[8] Skerlavaj B, Benincasa M, Risso A, et al. SMAP-29: a potent antibacterial and antifungal peptide from sheep leukocytes[J]. FEBS Letters, 1999, 463(1/2): 58-62.

[9] Anderson R C, Hancock R E, Yu P L. Antimicrobial activity and bacterial-membrane interaction of ovine-derived cathelicidins[J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2004, 48(2): 673-676.

[10] 陈琛, 吴三桥, 李新生, 等. 抗菌肽 SMAP-29 结构功能及分子设计策略[J]. 生物工程学报, 2011, 27(6): 846-859.

[11] 栾超. 利用 SUMO 融合技术在枯草芽孢杆菌中重组表达抗菌肽 cathelicidin-BF 及其生物活性研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2014.

[12] Vassilevski A A, Kozlov S A, Grishin E V. Antimicrobial peptide precursor structures suggest effective production strategies[J]. Recent Patents on Inflammation & Allergy Drug Discovery, 2008, 2(1): 58-63.

[13] Malakhov M P, Mattern M R, Malakhova O A, et al. SUMO fusions and SUMO-specific protease for efficient expression and purification of proteins[J]. Journal of Structural and Functional Genomics, 2004, 5(1/2): 75-86.

[14] Butt T R, Edavettal S C, Hall J P, et al. SUMO fusion technology for difficult-to-express proteins[J]. Protein Expression and Purification, 2005, 43(1): 1-9.