

# Barnase 在大肠杆菌中的分泌表达和诱导条件优化

林中叶<sup>a</sup>, 谢友坪<sup>a</sup>, 敬科举<sup>a</sup>, 凌雪萍<sup>a</sup>, 卢英华<sup>a,b\*</sup>

( 厦门大学 化学化工学院 a. 化学工程与生物工程学系; b. 福建省化学生物学重点实验室, 中国福建 厦门 361005)

**摘要:** 从解淀粉芽孢杆菌中 PCR 分别扩增解淀粉芽孢杆菌核糖核酸酶 barnase 基因及其抑制剂 barstar 基因, 采用将 barnase 基因置于 barstar 基因保护下的克隆策略, 以 pET-22b (+) 质粒为基础, 构建大肠杆菌分泌型表达质粒. IPTG 诱导表达目的蛋白后将培养基蛋白进行 SDS-PAGE 分析并从诱导温度、IPTG 诱导浓度和诱导时间三方面初步优化诱导表达条件.

**关键词:** barnase 基因; barstar 基因; 大肠杆菌; 分泌表达

中图分类号: Q939.97

文献标识码: A

文章编号: 1007-7847(2008)03-0242-05

## Secretive Expression and Optimized Inducement of Barnase

LIN Zhong-ye<sup>a</sup>, XIE You-ping<sup>a</sup>, JING Ke-ju<sup>a</sup>, LING Xue-ping<sup>a</sup>, LU Ying-hua<sup>a,b\*</sup>

( a. Department of Chemical and Biochemical Engineering; b. The Key Laboratory for Chemical Biology of Fujian Province, College of Chemistry and Chemical Engineering, Xiamen University, Xiamen 361005, Fujian, China)

**Abstract:** Using PCR method to amplify *Bacillus amyloliquefaciens* ribonuclease barnase gene and its inhibitor barstar gene from *Bacillus amyloliquefaciens*. The secretive expression vector is constructed by the strategy of protective clone from plasmid pET-22b (+). After induced by IPTG, a 12 kD target barnase protein can be detected from medium protein by SDS-PAGE analysis. Inducing conditions of temperature, IPTG concentration and inducing time have also been optimized.

**Key words:** barnase; barstar; *E.coli*; secretive expression

( Life Science Research, 2008, 12(3): 242-246)

解淀粉芽孢杆菌核糖核酸酶 barnase ( 又称 RNase Ba) 是解淀粉芽孢杆菌 (*Bacillus amyloliquefaciens*) 产生的一种 12 kD 的胞外小分子 RNA 酶 ( Ribonuclease, RNase). 同时在解淀粉芽孢杆菌基因组中含有 barnase 基因的特异性抑制剂 barstar 基因, 其产物 barstar ( 10 kD) 能与 barnase 以 1:1 的比例特异性结合, 形成高度稳定的复合物, 从而使细菌表达的 barnase 在胞内失去酶活性<sup>[1]</sup>. Barnase 可降解细胞中的 RNA, 具有强烈的毒性, 因此它在特异细胞中的表达将造成细胞的死亡. 通过 barnase 或它的抑制剂 barstar 的表达在杂交优势育种中实现了植物的

雄性不育、雌性可育和育性恢复系, 以及植物抗病性的提高<sup>[2,3]</sup>. 近年来的一系列研究表明, barnase 及 barstar 还具有其它许多重要的生物学功能, 如控制肿瘤血管生成, 杀灭肿瘤细胞及抑制病毒 ( 包括 HIV 21 病毒) 的复制等, 引起人们的广泛关注<sup>[4]</sup>. 利用 barnase 具有裂解 RNA 的活性, 可将其与抗体连接构成具有显著的靶向性及人源化的免疫毒素, 用来杀伤癌细胞及其它异常增殖细胞, 有可能成为抑制病毒或杀灭癌细胞的药用蛋白<sup>[5]</sup>. 此外, 由于 barnase 和 barstar 均为小分子蛋白质, 特别适用于作为模型系统研究蛋白折叠、蛋白识别、蛋白质-蛋白质之间的相互作

收稿日期: 2008-03-24; 修回日期: 2008-05-18

基金项目: 福建省高等学校新世纪优秀人才支持计划资助项目

作者简介: 林中叶 (1985-), 女, 湖南长沙人, 硕士研究生, 主要从事基因克隆蛋白表达研究; \* 通讯作者: 卢英华 (1970-), 男, 福建宁德人, 厦门大学教授, 博士, 主要从事分子克隆发酵培养研究. Tel: 0592-2186038, E-mail: ylu@xmu.edu.cn

用, 国外学者对两者之间的折叠途径、折叠和去折叠的热力学和动力学、barnase-barstar 复合物的三维结构、电荷相互作用、构象变化等也进行了大量研究<sup>[6-8]</sup>。

目前, 实现 barnase 基因的克隆有两种不同的途径。一是采用 PCR 方法, 根据 barnase 编码区序列设计引物, 实现 barnase 基因的单克隆, 但由于 barnase 致命的 RNA 降解毒性使宿主菌大肠杆菌无法忍受, 而通过某种方式造成 barnase 发生相应突变, 往往得不到有活性的 barnase<sup>[9]</sup>; 二是保护性克隆, 即将 barnase 基因置于 barstar 基因的保护下进行克隆和遗传操作, 可得到 barnase 非突变形式的正确克隆<sup>[10]</sup>。

大肠杆菌是最常用的表达系统。大肠杆菌有两个显著的优点, 即基因操作简易和能在廉价培养基中迅速生长, 使其适用做表达多种蛋白的理想宿主菌。但是, 大肠杆菌具有内膜和外膜结构, 本身分泌能力很弱, 合成的异源蛋白质通常以不溶性的包涵体形式存在于细胞内, 只能通过菌体破碎(溶解)、离心收集以及清洗三大步骤分离包涵体, 然后溶解在高浓度的变性剂中, 再通过小心的复性步骤重新获得活性异源蛋白, 操作难度和费用很高。因此, 重组蛋白在大肠杆菌中的高效分泌表达一直是生物学和蛋白质化学的研究前沿。研究人员构建了各种分泌盒( secretion cassette), 使大肠杆菌表达的重组蛋白分泌到培养基或细胞周质中。其中 kil 基因转录的 BP 蛋白( bacteriocin release protein, 大肠杆菌素释放蛋白), 可激活定位于内膜上的磷酸脂酶 A, 导致细胞内膜和外膜的通透性大大增加, 从而将细胞内和细胞周质中的蛋白分泌到培养基中, 可高效地分泌表达重组蛋白质<sup>[11, 12]</sup>。

Barnase 催化水解 RNA 的机制与牛血清 RNase A 类似<sup>[13]</sup>。因此, 开发微生物来源的 RNase Ba, 实现其在大肠杆菌中的分泌表达, 无疑具有十分重要的意义。本文采用将 barnase 基因置于 barstar 基因保护下的克隆策略, 以 pET 质粒为基础, 利用 Kil-Km 分泌盒构建分泌表达载体, 实现 barnase 在重组大肠杆菌中的分泌表达并初步优化诱导表达条件。

## 1 材料和方法

### 1.1 菌株和质粒

解淀粉芽孢杆菌菌株, 购自中国科学院微生物

研究所菌种保藏中心。E.coli BL21 ( DE3) 菌株、克隆载体和表达载体 pET-22b( +) ( 含氨苄青霉素抗性标记和 pBR322 复制位点, 并含有 T<sub>7</sub>-lacI 启动子和 T<sub>7</sub> 终止子, 可进行 IPTG 诱导) 购自 Novagen 公司。E.coli DH5 菌株为本实验室保存。重组质粒 pLF3 ( 在大肠杆菌中过量分泌表达 -1, 3-1, 4-葡聚糖酶基因的重组质粒) 由德国 Bielefeld 大学技术系 Erwin Flaschel 教授课题组赠送。

### 1.2 工具酶与试剂

蛋白酶 K、溶菌酶、RNase A、DNA Marker、各种限制性内切酶、T<sub>4</sub> DNA 连接酶、Taq 酶、碱性磷酸酶、klenow 片段等购自 MBI 公司。琼脂糖 DNA 纯化试剂盒、质粒小量纯化试剂盒购自申能博彩生物科技有限公司。其余试剂均为市售分析纯。

### 1.3 解淀粉芽孢杆菌总 DNA 的提取

取 2 mL 过夜培养的解淀粉芽孢杆菌菌液, 12 000 r/min 离心 2 min 收集菌体。菌体沉淀物加入 1 mL TES 缓冲液, 混匀, 加入 5 μL 溶菌酶溶液( 50 g/L), 混匀, 37 °C 温育 10 min。加入 200 μL 10% SDS 缓冲液和 5 μL 蛋白酶 K( 20 g/L), 混匀, 65 °C 温育 10 min。加入等体积酚 氯仿 异戊醇( 25:24:1), 上下颠倒混匀, 12 000 r/min 离心 5 min, 上清转移至一新离心管中。加入 5 μL RNase A( 20 g/L), 37 °C 温育 10 min。加入等体积酚 氯仿 异戊醇( 25:24:1) 抽提一次, 取上清, 加入 0.1 倍体积的 3 mol/L NaAc( pH 5.2) 和 2 倍体积无水乙醇, 12 000 r/min 离心 10 min, 去上清液。沉淀用 70% 乙醇洗涤两次脱盐。DNA 在 95% 乙醇溶液中脱水风干。加入 100 μL TE 缓冲液溶解, -20 °C 保存备用。

### 1.4 barnase 及 barstar 基因 PCR 引物设计及扩增

#### 1.4.1 引物设计

基于 barstar 的保护性克隆策略, 在克隆 barnase 基因之前, 应先将 barstar 基因克隆于载体上。根据已发表的 barnase 基因序列<sup>[9]</sup>和 barstar 基因序列<sup>[10]</sup>, 设计两对引物用于目的基因的 PCR 扩增。比较 pET-22b( +) 质粒的限制性酶切图谱, 在引物序列的 5 端加入酶切位点。

barstar 正向引物:

5'-CG GGA TCC T TAG GTC CAA TCT GCA GCC GTC-3( 划线处为 BamH I 酶切位点)

barstar 反向引物:

5 -G GAA TTC CAT CTC CCA TTG ATC GTA  
TTA AG-3( 划线处为 EcoR I 酶切位点)

barnase 正向引物:

5 -CATG CCA TGG CA GCA CAG GTT ATC  
AAC AC-3( 划线处为 Nco I 酶切位点)

barnase 反向引物:

5 -CG GGA TCC CG TTA TCT GAT TTT TGT  
AAA GG-3( 划线处为 BamH I 酶切位点)

#### 1.4.2 PCR 反应条件

一般退火温度范围较宽, 故退火温度分别从 50 开始进行实验. 最终确定 barnase 基因 PCR 反应条件为: 30 个 PCR 循环: 95 变性 45 s, 54 退火 45 s, 75 延伸 1 min; barstar 基因 PCR 反应条件为: 30 个 PCR 循环, 95 变性 45 s, 57 退火 45 s, 75 延伸 1 min.

#### 1.5 重组质粒 pBB 的构建与鉴定

包含 barstar 和 barnase 重组质粒 pBB 的构建和鉴定根据基因克隆手册描述的标准实验方法进行<sup>[14]</sup>. 用琼脂糖 DNA 纯化试剂盒回收 PCR 电泳产物中约 433 bp 的 barstar 和约 355 bp 的 barnase 基因片段. 先将扩增到的 barstar 基因与 pET-22b(+) 分别用 BamH I / EcoR I 双酶切后连接, 获得 pB 重组质粒, 转化 E.coli DH5 感受态细胞, LB 培养基 (含氨苄青霉素) 培养 16~20 h, 酶切鉴定筛选重组质粒 pB 并提取正确连接的重组质粒. 再将扩增到的 barnase 基因序列与 pB 分别用 BamH I / Nco I 双酶切后连接, 构建重组载体 pBB. 将正确连接的重组质粒 pBB 转化 E.coli BL21 (DE3) 感受态细胞.

#### 1.6 分泌表达重组质粒的构建

利用限制性内切酶 Hind III / Apa I 双酶切重组质粒 pLF3, 回收 2.5 kb 由稳定期启动子 fic 基因控制下的卡那霉素抗性基因、大肠杆菌 pColE1 的 kil 基因, 以及包含中断转录和翻译活性的中止序列以防止 kil 基因失控表达的插入子 (-Cm) 组成的 Kil-Km 分泌盒 (secretion cassette)<sup>[11]</sup>. 另外, 用限制性内切酶 Bst1107 I 和 PshA I 对 pBB 重组质粒 DNA 进行双酶切消化后, 将反应混合物进行电泳, 得到两个 DNA 片段, 回收大小约为 5.7 kb 的载体 DNA 片段, 用 CIP 碱性磷酸酶去磷酸化. 利用 klenow 片段把分泌盒表达基因 Kil-Km DNA 片段的 3 突出端转化为平末端, 与线性磷酸化 pBB 载体片段 22 连接过夜. 将连接产物 pBBK 重组分泌型载体转化到 E.coli

BL21 (DE3) 中表达, 用含卡那霉素的 LB 琼脂培养基筛选阳性克隆. 在表达载体中, pBB 和 pBBK 的 barnase 基因的转录由 T<sub>7</sub> RNA 聚合酶启动子和 lacI 启动子控制.

#### 1.7 IPTG 诱导重组质粒表达目的蛋白

##### 1.7.1 诱导温度优化

在 500 mL 摇瓶中加入 50 mL 含 50 mg/L 氨苄青霉素的 TB 培养基, 37 、150 r/min 摇床分别培养含有重组质粒 pBB 和 pBBK 的 E.coli BL21 (DE3) 至 OD<sub>600</sub> 达到 0.6 (大约 3 h 后). 在培养基中加入 IPTG 至终浓度 1 mmol/L, 将重组菌株 pBB 于 37 , pBBK 分别于 22, 25, 28, 30, 37 继续培养 6 h, 收获细胞.

##### 1.7.2 IPTG 诱导浓度优化

在 500 mL 摇瓶中加入 50 mL 含 50 mg/L 氨苄青霉素的 TB 培养基, 37 、150 r/min 摇床培养含有重组质粒 pBBK 的 E.coli BL21 (DE3) 至 OD<sub>600</sub> 达到 0.6 (大约 3 h 后). 在培养基中加入 IPTG 至终浓度分别为 0.1、0.25、0.5、0.75、1、1.5 mmol/L, 于最佳诱导温度继续培养 6 h, 收获细胞.

##### 1.7.3 诱导时间优化

在 500 mL 摇瓶中加入 50 mL 含 50 mg/L 氨苄青霉素的 TB 培养基, 37 、150 r/min 摇床培养含有重组质粒 pBBK 的 E.coli BL21 (DE3) 至 OD<sub>600</sub> 达到 0.6 (大约 3 h 后). 在培养基中加入 IPTG 至终浓度为最佳诱导浓度, 于最佳诱导温度分别继续培养 3~8 h, 收获细胞.

#### 1.8 重组菌液培养基蛋白的提取

取 40 mL 培养液, 4 、10 000 g 离心 10 min 富集菌体并取培养基上清. 通过 TCA 沉淀来收集培养基中的蛋白质样品.

## 2 结果与讨论

### 2.1 重组质粒 pB 的酶切鉴定

重组质粒 pB 经 BamH I 单酶切和 EcoR I / BamH I 双酶切鉴定, 单酶切后, 线性化质粒大小约为 5.9 kb, 为 pET-22b(+) (5.5 kb) 与插入的片段 barstar 基因大小 (433 bp) 之和, 双酶切后小片段大小与 barstar 基因大小一致 (图 1A).

### 2.2 重组质粒 pBB 的 PCR 鉴定

分别以 pBB 重组质粒、解淀粉芽孢杆菌 DNA、pB 重组质粒、pET-22b(+) 质粒为模板, barnase 正向引物和反向引物为引物进行 PCR



结果显示,以重组质粒 pBB 为模板和以解淀粉芽孢杆菌 DNA 为模板的第 1、2 泳道可见一大小约为 355 bp 的 DNA 条带,与目的基因 barnase 的

大小一致;而以 pET-22b(+) 空质粒和 pB 重组质粒为模板的第 3、4 泳道未见明显条带(图 1B)。

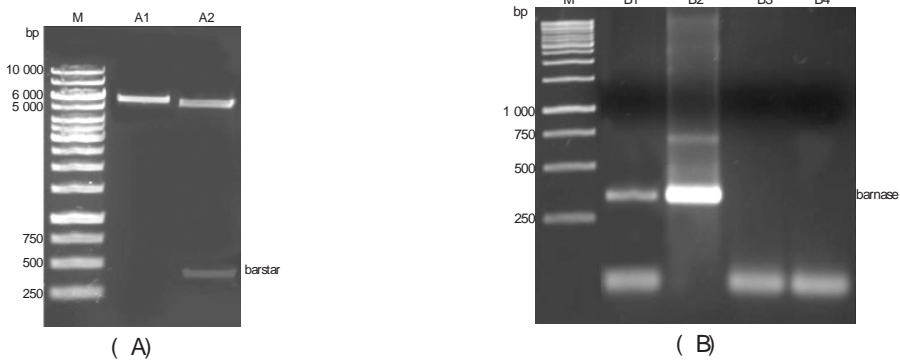


图1 重组质粒 pB、pBB 电泳鉴定

M: DNA 分子质量标记; A1: BamH I 酶切过后的重组质粒 pB; A2: EcoR I / BamH I 双酶切过后的重组质粒 pB; B1: 以重组质粒 pBB 为模板的 PCR 产物; B2: 以解淀粉芽孢杆菌为模板的 PCR 产物; B3: 以重组质粒 pB 为模板的 PCR 产物; B4: 以载体 pET-22b(+) 为模板的 PCR 产物。

Fig.1 Electrophoresis analysis of the expression vector pB and pBB

Lane M: DNA Marker ( bp ); Lane A1: Recombinant plasmid pB cut by BamH I; Lane A2: Recombinant plasmid pB cut by EcoR I / BamH I; Lane B1: PCR product of recombinant plasmid pBB; Lane B2: PCR product of *Bacillus amyloliquefaciens* DNA; Lane B3: PCR product of recombinant plasmid pB; Lane B4: PCR product of plasmid pET-22b(+) .

根据 pBB 重组质粒的测序结果,插入序列与解淀粉芽孢杆菌 barnase 和 barstar 基因都有 100% 的同源性,说明重组质粒 pBB 已成功构建。

### 2.3 重组质粒 pBBK 的鉴定

pET-22b(+) 质粒仅带有氨苄青霉素抗性基因,重组质粒 pBB 也只能在含有氨苄青霉素的培养基中生长。而 kil-Km 分泌盒带有卡那霉素抗性基因,所以能在含卡那霉素的培养基中生长的重组菌即为成功连接上分泌盒的重组 pBBK 菌株。

从以上分析可知,表达载体 pBB 和 pBBK 也已成功地转入表达菌株 *E.coli* BL21( DE3) 中。

### 2.4 barnase 基因的分泌表达和诱导条件优化

为了检测胞外 barnase 基因的表达,利用 TB 培养基分别摇瓶培养含重组质粒 pBB 和 pBBK 的重组大肠杆菌。显然,barstar 基因的共表达抑制了 barnase 的毒性,实验中未观察到细胞生长的迟滞现象。分别将包含重组质粒 pBB 和 pBBK 的 *E.coli* BL21( DE3) IPTG 诱导后表达的培养基蛋白质进行 SDS-PAGE 分析。

#### 2.4.1 分泌表达重组质粒 pBBK 的诱导温度优化

从图 2 可以看出, lane 1, lane 2 所示的 pBB 表达的培养基产物和 pBBK 未经 IPTG 诱导的培养基产物在 12 kD 处有痕量表达,因此 lane 1 所示的没有插入分泌表达盒的 pBB 产物只有少量的渗透性目标表达产物位于培养基中。而 lane 3~7 所示的 pBBK 分别于 22、25、28、30、37 经

IPTG 诱导培养的培养基产物在 12 kD 处有明显的条带,符合目标蛋白 barnase 的分子质量大小。其中 lane 5 所示的于 28 诱导的效果最好。

#### 2.4.2 分泌表达重组质粒 pBBK 的 IPTG 诱导浓度优化

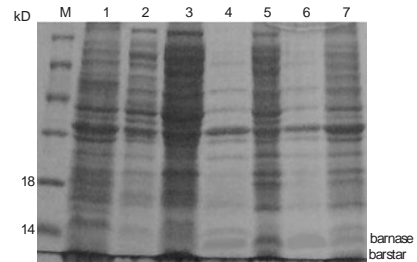


图2 SDS-PAGE 分析重组质粒 pBB、pBBK 诱导表达培养基蛋白及诱导温度优化

M: 蛋白质分子质量标记; 1: 重组质粒 pBB 在大肠杆菌 BL21( DE3) 中诱导表达的培养基产物; 2: 重组质粒 pBBK 在大肠杆菌 BL21( DE3) 中表达的未经 IPTG 诱导的培养基产物; 3~7: 重组质粒 pBBK 在大肠杆菌 BL21( DE3) 中分别于 22、25、28、30、37 诱导所表达的培养基产物。

Fig.2 SDS-PAGE analysis of extracellular proteins expressed by recombinant *E.coli* BL21 ( DE3) cells containing either the expression vector pBB or pBBK after induction by IPTG and the optimization of inducing temperature

Lane M: Molecular size marker; Lane 1: Crude extracellular proteins expressed by recombinant *E.coli* BL21 ( DE3) containing the expression vector pBB after induction; Lane 2: Crude extracellular proteins expressed by recombinant *E. coli* BL21 ( DE3) containing the expression vector pBBK without induction; Lane 3~7: Crude extracellular proteins expressed by recombinant *E. coli* BL21 ( DE3) cells containing the expression vector pBBK after induction respectively at 22, 25, 28, 30, 37 .

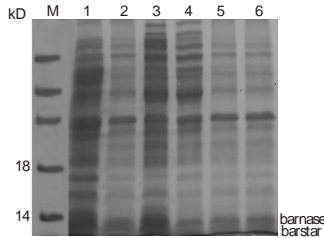


图3 pBBK 的 IPTG 诱导浓度优化

M: 蛋白质分子质量标记; 1~6: 重组质粒 pBBK 在大肠杆菌 BL21 (DE3) 中分别用 0.1、0.25、0.5、0.75、1、1.5 mmol/L IPTG 诱导所表达的培养基产物。

Fig.3 The optimization of IPTG inducing concentration  
Lane M: Molecular size marker; Lane 1~6: Crude extracellular proteins expressed by recombinant *E. coli* BL21 (DE3) cells containing the expression vector pBBK induced respectively by 0.1, 0.25, 0.5, 0.75, 1, 1.5 mmol/L IPTG.

从图3可以看出, lane 1~6 所示的是重组表达质粒 pBBK 于最佳诱导温度 28 分别在 IPTG 终浓度 0.1、0.25、0.5、0.75、1、1.5 mmol/L 诱导 5 h 后的培养基产物。其中 lane 3 所示的于 IPTG 终浓度为 0.5 mmol/L 的时候诱导效果最好。

#### 2.4.3 分泌表达重组质粒 pBBK 的诱导时间优化

图4中 lane 1~6 所示的是重组表达质粒 pBBK 加入最适 IPTG 浓度 0.5 mmol/L 于最佳诱导温度 28 分别诱导 3、4、5、6、7、8 h 后的培养基产物。可以看出诱导时间对培养基蛋白的表达量影响不大。

由以上分析可知, 分泌表达重组质粒 pBBK 的最佳诱导条件为: 37、150 r/min 培养至 OD<sub>600</sub> 达到到 0.6 (大约 3 h 后)。在培养基中加入 IPTG 至终浓度 0.5 mmol/L, 28 继续培养 5 h, 收获细胞。

### 3 结论

pET-22b(+) 带有 T<sub>7</sub> 启动子和 lacI 启动子, 具有较强的启动能力, 适用于表达毒性极大的基因。而载体中自带的 pelB 蛋白可以运输重组蛋白到细胞间质中, 有利于配合分泌盒将重组蛋白分泌到胞外。利用 pET 载体构建可分泌表达的重组质粒, 可以获得最大产量的可溶、有活性、正确折叠及可分泌到培养基中的 barnase 蛋白, 从而简化后续分离提纯工艺, 对低成本生产微生物来源的 RNase Ba 具有重要意义, 而且可为利用重组大肠杆菌生产分泌型重组异源蛋白提供进一步的技术措施。

#### 参考文献 (References):

[1] HARTLEY R W. Barnase and barstar, two small proteins that

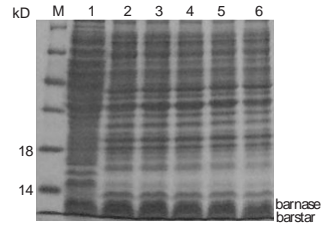


图4 pBBK 的诱导时间优化

M: 蛋白质分子质量标记; 1~6: 重组质粒 pBBK 在大肠杆菌 BL21 (DE3) 中分别诱导 3、4、5、6、7、8 h 所表达的培养基产物。

Fig.4 The optimization of inducing time

Lane M: Molecular size marker; Lane 1~6: Crude extracellular proteins expressed by recombinant *E. coli* BL21 (DE3) cells containing the expression vector pBBK induced respectively for 3, 4, 5, 6, 7, 8 h.

- fold and fit together[J]. *Trends Biochem Sci*, 1989, 14: 450-454.
- [2] MARIANI C, GOSSELE V, de BEUCKELEER M, et al. A chimaeric ribonuclease-inhibitor gene restores fertility to male sterile plants[J]. *Nature*, 1992, 357: 384-387.
- [3] 彭仁旺, 周雪荣, 王峻岭, 等. 表达 barstar 基因及 bar 基因的转基因油菜的研究[J]. *遗传学报* (PENG Ren-wang, ZHOU Xue-rong, WNAG Jun-ling, et al. Transgenic oilseed rape plants expressing barstar gene and bar gene[J]. *Journal of Genetics and Genomics*), 1998, 25(1): 74-79.
- [4] LEUCHTENBERGER S, PERZ A, GATZ C, et al. Conditional cell ablation by stringent tetracycline-dependent regulation of barnase in mammalian cells[J]. *Nucleic Acids Res*, 2001, 29(16): 76-81.
- [5] AGARWAL S, NIKOLAI B, YAMAGUCHI T, et al. Construction and use of retroviral vectors encoding the toxic gene barnase[J]. *Molecular Therapy*, 2006, 14: 555-563.
- [6] KHAN F, CHUANG J I, GIANNI S, et al. The kinetic pathway of folding of Barnase[J]. *J Mol Biol*, 2003, 333: 169-186.
- [7] GRIKO Y V, MAKHATADZE G I, PRIVALOV P L, et al. Thermodynamics of barnase unfolding[J]. *Protein Sci*, 1994, 3: 669-676.
- [8] COVELL D G, WALLQVIST A. Analysis of protein-protein interactions and the effects of amino acid mutations on their energetics: the importance of water molecules in the binding epitope[J]. *J Mol Biol*, 1997, 269: 281-297.
- [9] PADDON C J, HARTLEY R W. Expression of *Bacillus amyloliquefaciens* extracellular ribonuclease (barnase) in *Escherichia coli* following an inactivating mutation[J]. *Gene*, 1987, 53: 11-19.
- [10] HARTLEY R W. Barnase and barstar expression of its cloned inhibitor permits expression of a cloned ribonuclease[J]. *J Mol Biol*, 1988, 202: 913-915.
- [11] MIKSCH G, NEITZEL R, FIEDLER E, et al. Extracellular production of a hybrid  $\alpha$ -glucanase from *Bacillus* by *Escherichia coli* under different cultivation conditions in shaking cultures and bioreactors[J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1997, 47: 120-126.
- [12] MIKSCH G, KLEIST S, FRIEHS, K, et al. Overexpression of the phytase from *Escherichia coli* and its extracellular production in bioreactors[J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2002, 59: 685-694.
- [13] MOSSAKOWSKA D E, NYBERG K, FERSHT A R. Kinetic characterization of the recombinant ribonuclease from *Bacillus amyloliquefaciens* (barnase) and investigation of key residues in catalysis by site-directed mutagenesis[J]. *J Biochem*, 1989, 28: 3843-3850.
- [14] SAMBROCK J, FRITSCH E F, MANIATIS T. *Molecular Cloning. A Laboratory Manual* 2nd ed[M]. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.