

SAP18和Sufu蛋白质复合物的表达纯化研究

安影 吴更*

(上海交通大学生命科学技术学院, 上海 200240)

摘要 通过分子克隆技术将Sufu和SAP18构建到原核载体, 在原核表达系统进行外源表达, 采用亲和层析和分子筛层析对Sufu和SAP18及其复合物进行纯化。同时利用非变性胶的方法进一步确定该蛋白之间的相互作用及结合比例。结果表明, 原核表达系统中Sufu和SAP18蛋白表达量高, 可以纯化到高纯度的蛋白质。Sufu和SAP18结合的摩尔比为1:1, 按摩尔比1:2混合、纯化可以得到高纯度、稳定的蛋白复合物, 从而为进一步复合物的结构生物学研究奠定基础。

关键词 SAP18; Sufu; 表达; 纯化; 相互作用

Expression and Purification of Suppressor of Fused in Complex with Sin3-Associated Polypeptide of 18 kDa

An Ying, Wu Geng*

(School of Life Sciences and Biotechnology, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China)

Abstract Molecular cloning, prokaryotic expression and protein purification technology were used to obtain human SAP18, human Sufu and human SAP18-Sufu protein complex. The native PAGE method was used to identify the interaction and the ratio between SAP18 and Sufu proteins. The result demonstrated that SAP18 and Sufu proteins were highly expressed in the prokaryotic expression system. SAP18 interacted with Sufu by a molar ratio of 1:1. The high purity and stability of the SAP18-Sufu complex were obtained after the co-purification. These results laid a solid foundation for the future structural biology research on the protein complex.

Key words SAP18; Sufu; expression; purification; interaction

Hedgehog(Hh)信号通路在生物发育中起着重要的调控作用, 该通路的异常会导致多种先天缺陷和癌症的发生^[1-3]。Hh信号通路通过一条复杂的信号级联转导反应来发挥其生物学功能, 通路的活性最终通过Gli锌指转录因子家族进行调控。在没有Hh配体时, Hh通路抑制涉及细胞生长和分化等下游基因的表达。该抑制作用部分是通过招募Sin3-组蛋白去乙酰化酶(Sin3-histone deacetylase, HDAC)复合物来实现。HDAC复合物的基因特异性招募被认为是基因表达的主要调控机制^[4-5]。HDAC复合物促使DNA包装成浓缩染色质形式, 从而导致转录机器无

法接近DNA而抑制其转录。Gli-依赖性的HDAC招募和功能发挥需要许多辅助蛋白的参与, 其中包括Sin3相关的18 kDa多肽(Sin3-associated polypeptide of 18 kDa, SAP18)^[6]。

在Sin3相关蛋白的免疫共沉淀实验中首次鉴定出了SAP18。研究发现, SAP18参与形成Sin3-HDAC复合物, 并且能够增强Sin3介导的转录抑制^[7]。人的SAP18全长153个氨基酸, 含有一个半胱氨酸。SAP18在较高等真核细胞中趋向高度保守, 其中人与鼠、黑腹果蝇和秀丽隐杆线虫SAP18的蛋白序列同源性分别约为98%、60%和54%。另外, 在裂殖酵母基因组中也检测到了SAP18^[8]。然而, 蛋白序列比对显示SAP18中不存在明显的结构域, 因此没有匹配的已知折叠的基序^[9]。

报道称, SAP18能够结合一系列转录因子^[6,10-11]。虽然SAP18的功能目前还不清楚, 但研究显示, Gli

收稿日期: 2013-09-12 接受日期: 2013-11-06

*通讯作者。Tel: 021-34205914, E-mail: geng.wu@sjtu.edu.cn

Received: September 12, 2013 Accepted: November 6, 2013

*Corresponding author. Tel: +86-21-34205914, E-mail: geng.wu@sjtu.edu.cn

网络出版时间: 2014-01-15 14:03

URL: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.11844/cjcb.2014.02.0296.html>

和Bicoid需要通过SAP18招募Sin3-HDAC复合物来抑制其下游基因的转录^[6,12]。Cheng和Bishop^[6]的研究显示, SAP18作为蛋白-蛋白的接头来介导转录因子Gli、转录抑制子Suppressor of fused(Sufu)和Sin3-HDAC复合物的相互联系。利用含有Gli结合位点的生物素化DNA寡核苷酸作为诱饵, 通过pull down实验发现, Sin3-HDAC复合物的结合需要Gli、SAP18和Sufu的存在。另外, 体外实验和酵母双杂交分析显示, SAP18和Sufu能够特异性的直接结合。细胞实验也证实, 在没有Hh刺激时, SAP18和Sufu通过与Gli共同协作招募组蛋白去乙酰化酶复合物来抑制Hh通路的下游基因转录^[6,13]。

虽然人的SAP18的结构已经得到解析, 但SAP18-Sufu复合物的结构未见报道^[8,14]。基于SAP18和SAP18-Sufu的结构以及结构-功能之间的联系, SAP18作为大分子组装的蛋白接头模型, 尤其在Hh信号通路中与Sufu-Gli的作用机理及在Sin3-HDAC复合物对基因表达调控中作用机制将更为明晰。

本研究利用分子克隆技术构建了Sufu和SAP18的原核表达载体, 通过原核表达系统进行外源表达, 采用亲和层析和分子筛层析对Sufu和SAP18蛋白质及其复合物进行纯化。同时, 采用非变性胶的方法对复合物及其结合比进行鉴定, 而且获得了高纯度、稳定的Sufu-SAP18蛋白复合物, 为进一步的复合物结构研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 供试材料

质粒为pET28a, 宿主菌株为*E.coli* DH5 α 和BL21(DE3), 均为本实验室保存。KOD酶、DNA Ligation Kit均购自TaKaRa公司。限制性内切酶购自NEB公司。质粒小量制备试剂盒、回收试剂盒均购自QIAGEN公司。引物合成由上海生工生物工程有限公司提供。测序由上海美吉生物科技有限公司提供。化学药品均为分析纯。

1.2 引物设计、PCR反应与产物回收

采用Primer Premier 5设计、合成引物, 以human Sufu和SAP18全长基因cDNA为模板, 利用高保真的KOD-Neo-plus DNA聚合酶扩增Sufu(残基1-484)、SAP18(残基1-153)、SAP18(残基27-143)、Sufu(残基252-484, Δ 286-345), 按以下程序进行PCR: 94 °C 5 min, 1个循环; 94 °C 30 s, 55 °C 30 s, 68 °C 1 min, 35个循

环; 68 °C 10 min。

将PCR产物进行1%或1.5%琼脂糖凝胶电泳, 切下含有目的DNA的琼脂糖胶, 采用QIAGEN凝胶回收试剂盒进行回收, 具体回收步骤参照试剂盒说明书。

1.3 原核表达载体的构建

将回收的PCR产物和pET28a质粒空载用限制性内切酶进行双酶切。分别取适量二者的酶切产物, 采用TaKaRa的Ligation Kit Ver.2.0在16 °C连接过夜。将连接产物利用热激转化法导入大肠杆菌DH5 α 菌株的感受态细胞, 经卡那霉素抗性筛选, 挑取单菌落于液体LB培养基中摇培, 利用QIAGEN Miniprep Kit抽提其质粒, 并采用双酶切鉴定, 挑取正确的克隆送测序公司进行测序。

1.4 融合蛋白的诱导表达

将测序通过的重组质粒转化大肠杆菌BL21(DE3)感受态细胞, 经卡那霉素抗性筛选, 挑取单菌落到含有抗生素的2 mL液体LB培养基中摇培。菌培养至对数生长中后期时, 取500 μ L菌液加入蛋白表达的诱导剂IPTG, 至其终浓度为0.1 mmol/L, 诱导融合蛋白的表达; 另取500 μ L菌液不加诱导物IPTG, 作为阴性对照。二者继续37 °C摇培3 h后分别离心收集菌体, 并将菌体悬浮于Tris(pH8.0)缓冲液。用15% SDS-PAGE检测蛋白表达情况。将正确表达融合蛋白的菌株按同样的方法大量表达。

1.5 Ni柱亲和层析

将所收集的菌体按25:1重悬于细菌裂解缓冲液(25 mmol/L Tris, 300 mmol/L NaCl, pH8.0), 加入1/1 000的100 mg/mL溶菌酶、100 mg/mL Leupeptin、100 mg/mL Aprotinin和1/200的50 mg/mL PMSF, 冰上放置30 min后超声破碎(工作3 s, 间歇5 s, 共20 min), 14 000 \times g离心30 min。将上清过Ni-NTA His·Bind层析柱, 用50 \times 柱体积的洗涤缓冲液(25 mmol/L Tris, 300 mmol/L NaCl, 20 mmol/L 咪唑, pH8.0)洗涤His层析柱后, 用5 mL洗脱缓冲液(25 mmol/L Tris; 300 mmol/L NaCl, 80, 110, 200, 300 mmol/L咪唑; pH8.0)依此洗脱目的蛋白。最后将上清、沉淀、流穿液、洗脱液进行15% SDS-PAGE电泳分析。

1.6 分子筛层析

分子筛层析需要配合FPLC仪器使用。首先, 用两个柱体积的去离子水冲洗柱子中的20%乙醇, 然后用分子筛层析平衡缓冲液平衡(流速0.5 mL/min,

压强上限1 MPa)至电导曲线平直,然后用注射器将样品从上样环注入,上样后将上样环由装载状态转换为注入状态,然后用一个柱体积的平衡液洗脱,洗脱期间按每管0.5 mL接收洗脱液。分子筛纯化结束后,将洗脱液分别取样进行15% SDS-PAGE,分析纯化效果。

1.7 Native-PAGE分析

操作过程基本同SDS-PAGE,样品制备时使用Native-PAGE专用样品缓冲液并且无需煮沸,电泳于4 °C冷室或冰浴进行,电压150 V,时间大约为90 min。

2 结果

2.1 目的基因的PCR扩增及原核表达载体的构建

经PCR扩增后,扩增产物由1.0%和1.5%琼脂糖凝胶电泳检测(图1)。结果显示,扩增片段特异性强、无杂带,大小分别位于1 500, 400, 700 bp处,与已知序列大小相符,可初步确定这些扩增片段为目的片段。经胶回收和双酶切后将其相连接到pET28a载体上,重组pET28a-Sufu(1-484 Δ 284-345)、pET28a-Sufu(252-484 Δ 284-345)、pET28a-SAP18(1-153)和pET28a-SAP18(27-143)质粒经*Nde* I/*Not* I或*Nde* I/*Xho* I双酶切(图2),分别切出两条大小分别为5 000, 1 500, 400, 700 bp的片段,与目的片段和载体片段大小相符。测序后经比对,序列100%正确。然后,采用突变引物通过PCR突变技术构建pET28a-Sufu(1-484, Δ 284-345)、pET28a-Sufu(252-484, Δ 284-345)原核表达载体。

2.2 重组蛋白的表达与纯化

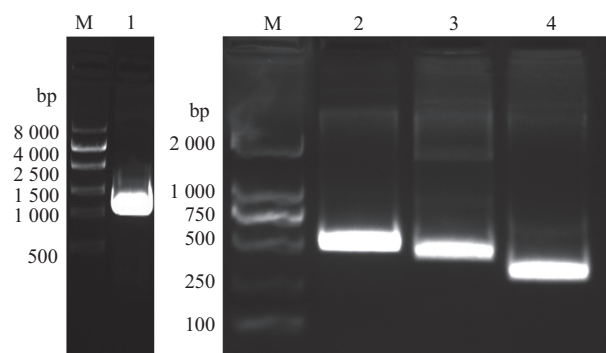
根据氨基酸序列计算, Sufu(1-484, Δ 284-345)、Sufu(252-484, Δ 284-345)、SAP18(1-153)和SAP18(27-143)蛋白的分子量分别为53 963.4 Da、26 251.0 Da、17 558.0 Da和13 362.9 Da,所以原核表达的融合蛋白的分子量分别为56 126.3 Da、28 414.0 Da、19 720.9 Da和15 525.8 Da。诱导蛋白的小量表达, SDS-PAGE检测结果显示,经IPTG诱导处理的在分子量50 kDa、25 kDa、20 kDa处有明显蛋白条带,而阴性对照在相应的位置无明显蛋白条带,说明Sufu(1-484, Δ 284-345)、Sufu(252-484, Δ 284-345)、SAP18(1-153)在细菌中获得过量表达。虽然SAP18(27-143)的小量表达检测有明显目的蛋白条带,但是经大量诱导表达未纯化到可溶蛋白(图3B)。

经大量表达与纯化,将Ni柱亲和层析(图3A、

3C和3D)和分子筛层析纯化(图4)后的样品进行15% SDS-PAGE蛋白电泳检测。结果显示,经两步纯化后在20 kDa、50 kDa、25 kDa处有单一蛋白条带。该结果说明经过原核表达与纯化可以获得SAP18(1-153)、Sufu(1-484, Δ 284-345)和Sufu(252-484, Δ 284-345)的可溶性融合蛋白。

2.3 Sufu与SAP18的结合验证及复合物的纯化

首先将SAP18(1-153)分别与Sufu(1-484, Δ 284-345)和Sufu(252-484, Δ 284-345)以2:1的摩尔比进行非变性胶凝胶电泳(图5B)。结果显示, Sufu(1-484, Δ 284-345)和Sufu(252-484, Δ 284-345)都能够与

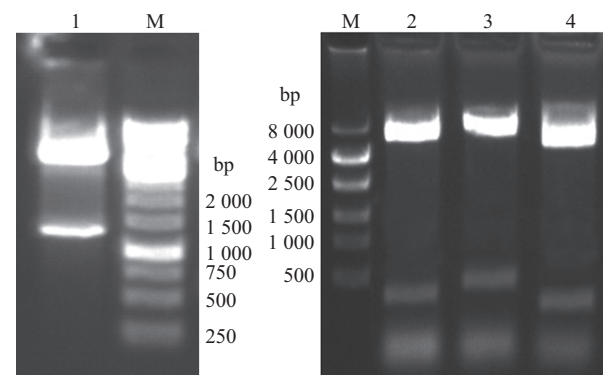


M: marker; 1~4: 分别为Sufu(1-484, Δ 284-345)、Sufu(252-484, Δ 284-345)、SAP18(1-153)和SAP18(27-143) PCR扩增产物。

M: marker; 1~4: PCR products of Sufu(1-484, Δ 284-345), Sufu(252-484, Δ 284-345), SAP18(1-153) and SAP18(27-143).

图1 目的基因PCR片段

Fig.1 PCR fragments of target genes

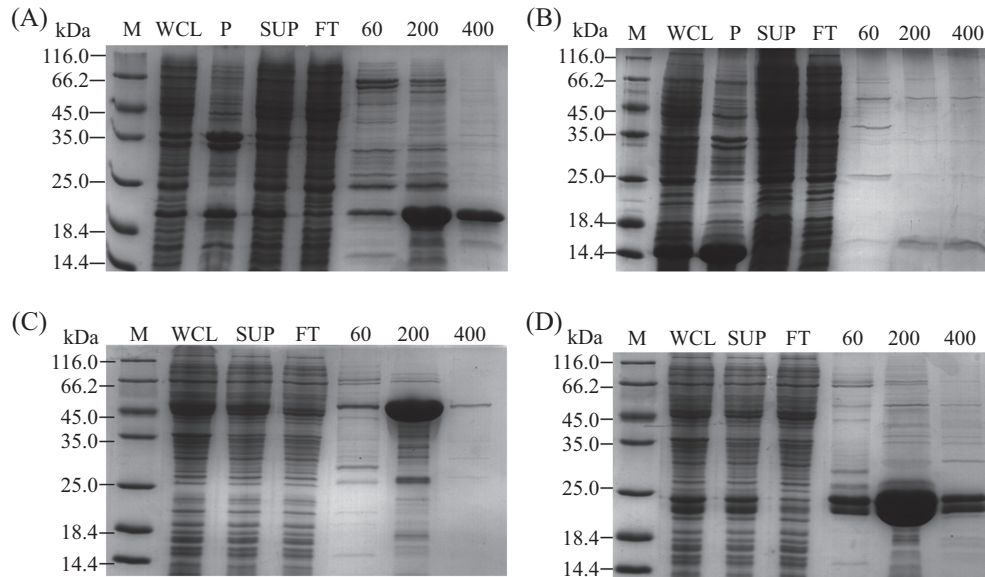


M: marker; 1,3: 分别为*Nde* I/*Not* I双酶切重组质粒pET28a-Sufu(1-484, Δ 284-345)、pET28a-Sufu(252-484, Δ 284-345)载体; 2,4: 分别为*Nde* I/*Xho* I双酶切重组质粒pET28a-SAP18(1-153)、pET28a-SAP18(27-143)。

M: marker; 1,3: pET28a-Sufu(1-484, Δ 284-345) and pET28a-Sufu(252-484, Δ 284-345) digested by *Nde* I and *Not* I; 2,4: pET28a-SAP18(1-153) and pET28a-SAP18(27-143) digested by *Nde* I and *Xho* I.

图2 原核表达载体的鉴定

Fig.2 Confirmation of the successful cloning of Sufu and SAP18 fragments into the prokaryotic expression vectors

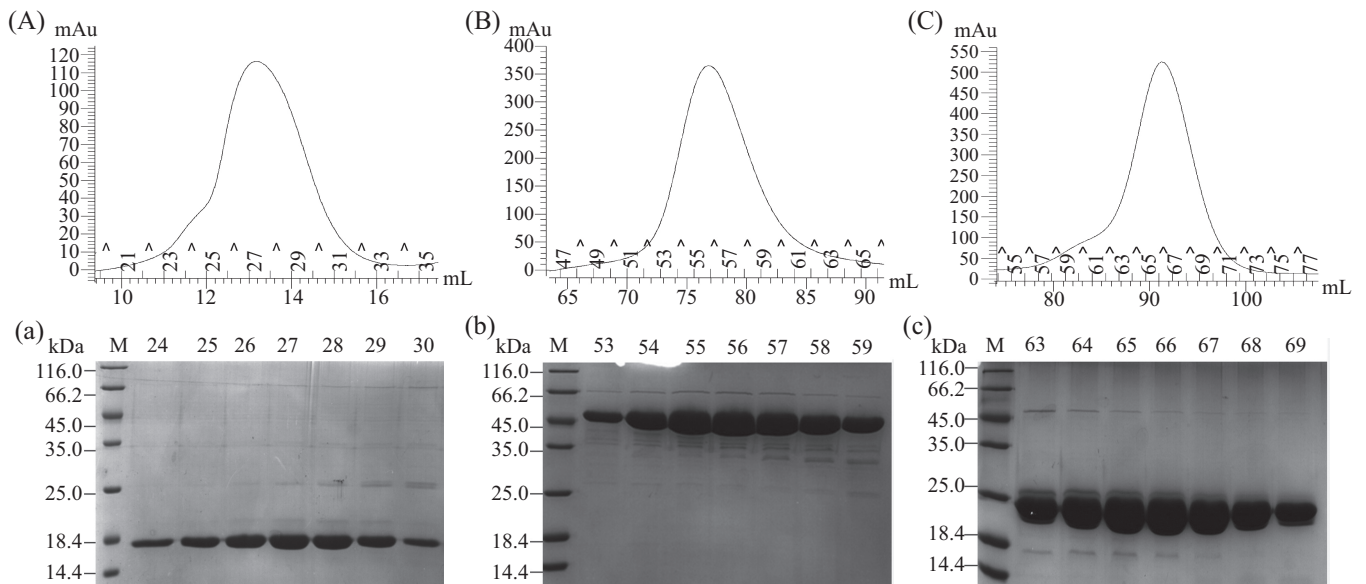


A~D: 分别为SAP18(1-153)、SAP18(27-143)、Sufu(1-484, Δ 284-345)和Sufu(252-484, Δ 284-345)镍柱纯化结果SDS-PAGE胶图。M: marker; WCL: 全菌裂解液; P: 沉淀; SUP: 上清; FT: 流穿液; 60、200、400: 咪唑浓度(mmol/L)。

A~D: the SDS-PAGE of expressed proteins: SAP18(1-153), SAP18(27-143), Sufu(1-484, Δ 284-345) and Sufu(252-484, Δ 284-345). M: marker; WCL: whole cell lysis solution; P: precipitate; SUP: supernatant; FT: follow through; 60, 200, 400: the concentration of imidazole (mmol/L).

图3 融合蛋白的Ni²⁺柱纯化结果图

Fig.3 Ni²⁺ affinity chromatography of recombinant protein



A、B、C: 分别为SAP18(1-153)、Sufu(1-484, Δ 284-345)和Sufu(252-484, Δ 284-345)分子筛纯化曲线图。a、b、c: 分别对应于A~C的SDS-PAGE图; M: marker; 24-30、53-59和63-69: 蛋白洗脱峰位置的管数。

A,B,C: the curves of gel filtration chromatography of protein SAP18(1-153), Sufu(1-484, Δ 284-345) and Sufu(252-484, Δ 284-345). a,b,c: the SDS-PAGE in accordance with the figure A, B,C, respectively. M: marker; 24-30, 53-59 and 63-69: the tube's number of the peaks in the figures of A, B and C, respectively.

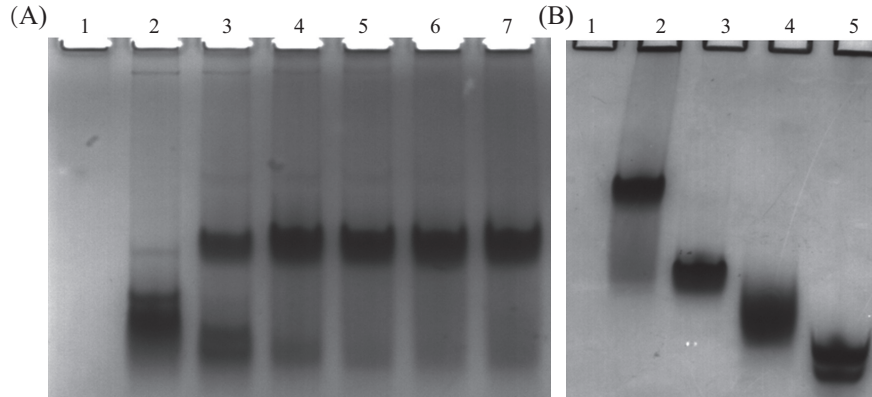
图4 融合蛋白的分子筛纯化结果图

Fig.4 Gel filtration chromatography of recombinant protein

SAP18(1-153)结合, 说明SAP18与Sufu的结合位点位于Sufu的C端结构域, 且缺失286-345区段并不影响二者的结合。

然后将Sufu(1-484, Δ 284-345)和SAP18(1-153)

按摩尔比0:3、3:0、3:2、3:3、3:6、3:9和3:12进行非变性胶凝胶电泳, 结果如图5A所示。可以看出, 二者比例为3:2时没有完全结合, Sufu(1-484, Δ 284-345)过剩。当二者摩尔比为3:3时恰好完全结合, 因

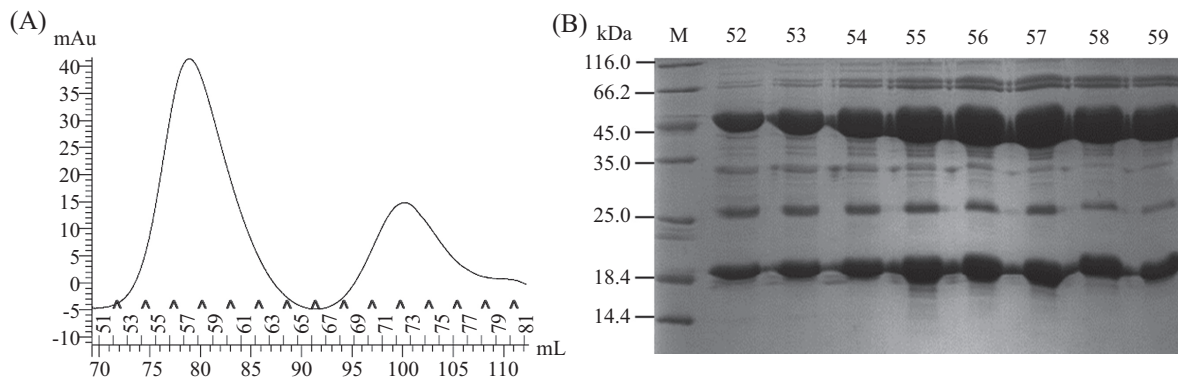


A: Sufu-SAP18结合比分析, 1~7分别为Sufu(1-484, Δ 284-345)/SAP18(1-153)摩尔比依次0:3、3:0、3:2、3:3、3:6、3:9和3:12; B: Sufu与SAP18的结合验证, 1~5分别为SAP18、Sufu(1-484, Δ 284-345)+SAP18、Sufu(1-484, Δ 284-345)、Sufu(252-484, Δ 284-345)+SAP18和Sufu(252-484, Δ 284-345)。

A: Sufu-SAP18 binding ratio analysis. The molar ratio of Sufu(1-484, Δ 284-345)/SAP18(1-153) is 0:3 (Lane 1), 3:0 (Lane 2), 3:2 (Lane 3), 3:3 (Lane 4), 3:6 (Lane 5), 3:9 (Lane 6) and 3:12 (Lane 7). B: the confirmation of interaction of Sufu-SAP18: SAP18(Lane 1), Sufu(1-484, Δ 284-345)+SAP18 (Lane 2), Sufu(1-484, Δ 284-345) (Lane 3), Sufu(252-484, Δ 284-345)+SAP18 (Lane 4) and Sufu(252-484, Δ 284-345) (Lane 5).

图5 非变性胶图

Fig.5 Native-PAGE analysis of Sufu-SAP18



A: Sufu(1-484, Δ 284-345)-SAP18(1-153)的分子筛纯化曲线; B: 对应于A的SDS-PAGE图。M: marker; 52~59: 对应于A第一个峰的管数。

A: the curves of Sufu(1-484, Δ 284-345)-SAP18(1-153)' molecular sieve chromatography; B: the SDS-PAGE is accordance with the figure A; M: marker; 52-59: the tube's number of the first peak in the figure A.

图6 Sufu(1-484, Δ 284-345)-SAP18(1-153)的分子筛纯化结果图

Fig.6 Molecular sieve chromatography of Sufu(1-484, Δ 284-345)-SAP18(1-153) complex

此之后的结晶实验将选择二者的摩尔比为1:1进行。同时, 将Sufu(1-484, Δ 284-345)和SAP18(1-153)按1:2摩尔比混合进行分子筛纯化[保证SAP18(1-153)蛋白过量], 结果显示, 洗脱曲线相对于Sufu(1-484, Δ 284-345)单独纯化的洗脱峰提前(图6A), 说明二者形成复合物, 且第二个峰表示有单独蛋白SAP18(1-153)存在。SDS-PAGE显示(图6B), 经分子筛纯化后可得到高纯度的复合物蛋白, 为后续结晶实验奠定了基础。

3 讨论

利用原核表达系统过量表达外源蛋白时, 目标

蛋白往往因为自身的理化性质、表达速率过快、二硫键不能氧化折叠等原因而聚集形成包涵体^[15-16], 难以获得可溶性蛋白, 所以难以进行蛋白的性质及结构的研究。本研究成功在大肠杆菌中大量表达了外源基因Sufu和SAP18, 并获得了可溶性蛋白。一方面原因是选择了合适的蛋白表达系统。pET28a蛋白表达载体分子量小易于操作, 含有很强的T7启动子, 是外源蛋白以His融合蛋白的形式表达, 易于蛋白的纯化^[17]。另外, 研究所用的宿主菌株*E.coli* BL21 (DE3)是一个广泛用于表达外源蛋白的宿主菌, 它属于lon和omp T蛋白酶缺陷型, 其胞内和胞间周质蛋

白酶均已失活, 这样当进行外源蛋白的可溶性表达时, 不易被宿主菌的蛋白酶水解而稳定存在; 而且, *E. coli* BL21(DE3)也是一类T7启动子表达菌株, 其染色体上携带一拷贝由lacUV5控制的T7 RNA聚合酶基因, T7 RNA聚合酶的选择性和活性保证了T7启动子对外源蛋白表达的高效性和转移性, 使得几乎所有细胞资源用于目标基因的表达^[18-19]。另一方面是基于前期的蛋白诱导表达条件优化实验。通过研究发现, 包涵体量的多少与蛋白诱导表达时菌液摇培的温度和转速有一定的相关性。通过降低蛋白诱导表达时的菌液摇培的温度和转速可以减少蛋白包涵体的量, 获得更多的可溶性蛋白。

在蛋白纯化过程中发现, SAP18容易发生聚合、沉淀, 通过在缓冲液体系中加入10%的甘油有助于改善这种情况, 从而提高SAP18在溶液中的稳定性。而且SAP18的截短片27-153的表达全部为包涵体, 可能是由于第26位Cys的删除使得SAP18蛋白间不能形成二硫键而发生异常聚集, 最终在表达过程中形成包涵体。

本研究成功构建了Sufu和SAP18不同片段的原核表达载体, 在大肠杆菌中进行表达, 并对其表达条件优化, 经纯化后得到大量的融合蛋白。同时, 采用非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳确定了Sufu和SAP18的结合比例及其相互作用的位置。纯化产物SDS-PAGE电泳结果显示, 纯化产物浓度高、且条带单一清晰, 这为今后的Sufu和SAP18及其复合物的结晶实验及其结构的解析奠定了坚实的基础。

参考文献 (References)

- Ingham PW, McMahon AP. Hedgehog signaling in animal development: Paradigms and principles. *Genes Dev* 2001; 15(23): 3059-87.
- Jiang J, Hui CC. Hedgehog signaling in development and cancer. *Dev Cell* 2008; 15(6): 801-12.
- Pospisilik JA, Schramek D, Schnidar H, Cronin SJ, Nehme NT, Zhang X, *et al.* *Drosophila* genome-wide obesity screen reveals hedgehog as a determinant of brown versus white adipose cell fate. *Cell* 2010; 140(1): 148-60.
- Kingston RE, Bunker CA, Imbalzano AN. Repression and activation by multiprotein complexes that alter chromatin structure. *Genes Dev* 1996; 10(7): 905-20.
- de Ruijter AJ, van Gennip AH, Caron HN, Kemp S, van Kuilenburg AB. Histone deacetylases (HDACs): Characterization of the classical HDAC family. *Biochem J* 2003; 370(Pt 3): 737-49.
- Cheng SY, Bishop JM. Suppressor of fused represses Gli-mediated transcription by recruiting the SAP18-mSin3 corepressor complex. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99(8): 5442-7.
- Zhang Y, Iratni R, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Reinberg D. Histone deacetylases and SAP18, a novel polypeptide, are components of a human Sin3 complex. *Cell* 1997; 89(3): 357-64.
- McCallum SA, Bazan JF, Merchant M, Yin JP, Pan B, de Sauvage FJ, *et al.* Structure of SAP18: A ubiquitin Fold in Histone Deacetylase Complex Assembly. *Biochemistry* 2006; 45(39): 11974-82.
- Boehmelt G, Antonio L, Iscove NN. Cloning of the murine transcriptional corepressor component SAP18 and differential expression of its mRNA in the hematopoietic hierarchy. *Gene* 1998; 207(2): 267-75.
- Zhu W, Hanes SD. Identification of *Drosophila* bicoid-interacting proteins using a custom two-hybrid selection. *Gene* 2000; 245(2): 329-39.
- Espinosa ML, Canudas S, Fanti L, Pimpinelli S, Casanova J, Azorin F. The GAGA factor of *Drosophila* interacts with SAP18, a Sin3-associated polypeptide. *EMBO Rep* 2000; 1(7): 253-9.
- Singh N, Zhu W, Hanes SD. SAP18 is required for the maternal gene bicoid to direct anterior patterning in *Drosophila melanogaster*. *Dev Biol* 2005; 278(1): 242-54.
- Paces-Fessy M, Boucher D, Petit E, Paute-Briand S, Blanchet-Tournier MF. The negative regulator of Gli, suppressor of fused (Sufu), interacts with SAP18, Galectin3 and other nuclear proteins. *Biochem J* 2004; 378(1): 353-62.
- Murachelli AG, Ebert J, Basquin C, Hir HL, Conti E. The structure of the ASAP core complex reveals the existence of a Pinin-containing PSAP complex. *Nat Struct Mol Biol* 2012; 19(4): 378-86.
- Asmig G, Makrides SC. Strategies for optimizing heterologous protein expression in *Escherichia coli*. *Trends Biotechnol* 1998; 16(2): 54-60.
- Essette PH, Aslund F, Beckwith J, Georgiou G. Efficient folding of proteins with multiple disulfide bonds in the *Escherichia coli* cytoplasm. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96(24): 13703-8.
- Minth DB, Johnson KS. Single-step purification of polypeptides in *Escherichia coli* as fusions with glutathione S-transferase. *Gene* 1988; 67(1): 31-40.
- Davanloo P, Rosenberg AH, Dunn JJ, Studier FW. Cloning and expression of the gene for bacteriophage T7 RNA polymerase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1984; 81(7): 2035-9.
- Studier WF, Rosenberg AH, Dunn JJ, Dubendorff JW. Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes. *Methods Enzymol* 1990; 185: 60-89.