

利用冰核蛋白N-端结构域在大肠杆菌 表面展示人存活蛋白

罗砚曦¹ 蒋依俐² 阎 辉^{1*}

(¹浙江省医学科学院药物所, 杭州 310013; ²杭州师范大学医学院, 杭州 310013)

摘要 存活蛋白(survivin)是高度特异的广谱肿瘤相关抗原, 利用冰核蛋白(ice nucleation protein, INP)表面展示系统研究在大肠杆菌细胞表面展示人存活蛋白的可行性。将人存活蛋白基因片段和报告基因*Cherry*融合到冰核蛋白N-端, 构建表面展示载体pET-INP-CHY-SUV并转化大肠杆菌BL21(DE3)。重组菌经IPTG诱导后可检测到红荧光, 荧光强度在胰蛋白酶的作用下降低, 完整细胞ELISA实验及免疫荧光实验可检测和观察到绿荧光, 表明人存活蛋白在重组菌中得到表达, 并且成功展示于细胞表面, 为进一步研制新型的肿瘤DNA疫苗奠定基础。

关键词 冰核蛋白; 存活蛋白; 表面展示; DNA疫苗

Display of Human Survivin on Surface of *Escherichia coli* Using N-terminal Domain of Ice Nucleation Protein

Luo Yanxi¹, Jiang Yili², Yan Hui^{1*}

(¹Institute of Material Medical, Zhejiang Academy of Medical Sciences, Hangzhou 310013, China;

²Medical School, Hangzhou Normal University, Hangzhou 310013, China)

Abstract Survivin is a highly specific broad-spectrum tumor-associated antigens. The feasibility of displaying human survivin protein on the surface of *Escherichia coli* (*E. coli*) cells was studied using an ice nucleation protein (INP) surface display system. The *survivin* gene fragment and the *Cherry* reporter gene were fused to the N-terminus of *INP*, and the surface displayed vector pET-INP-CHY-SUV was constructed and transformed into *E. coli* BL21 (DE3). Red fluorescence of recombinant bacteria can be detected after being induced by IPTG, and the intensity decreased by digestion of trypsin. The whole-cell ELISA and immune fluorescence assay showed the green fluorescence. The above results suggested that human survivin was expressed in recombinant bacteria and successfully displayed on the cell surface and lay the foundation for further development of new tumor DNA vaccine.

Keywords INP; survivin; surface display; DNA vaccine

细菌表面展示技术是利用细菌细胞表面的一些锚定蛋白, 将外源多肽或蛋白质以融合蛋白的形式展示在宿主细胞表面, 是继噬菌体表面展示之后

发展起来的一种微生物表面展示技术。由于被展示的蛋白质能够保持原有的构象和生物活性, 其产物的提取纯化过程也得到了简化, 因此该技术被广泛应用于多个领域, 如疫苗开发^[1]、蛋白质工程^[2]、生物催化^[3]及环境修复^[4]等。目前已开发出多种锚定基序适用于不同的展示系统, 如外膜蛋白^[5]、脂蛋白^[6]等用于革兰氏阴性菌展示系统; 葡萄球菌蛋白质A可用于革兰氏阳性菌展示系统^[7]; 而古细菌可选择S-层蛋白^[8]。

冰核蛋白(ice nucleation protein, INP)是一种分泌

收稿日期: 2017-07-14 接受日期: 2017-09-18

浙江省医药卫生科研项目(批准号: 2014KYA041)资助的课题

*通讯作者。Tel: 0571-88215439, E-mail: jipei2006@163.com

Received: July 14, 2017 Accepted: September 18, 2017

This work was supported by the Zhejiang Province Medical and Health Research Projects (Grant No. 2014KYA041)

*Corresponding author. Tel: +86-571-88215439; E-mail: jipei2006@163.com

网络出版时间: 2017-12-04 16:45:13

URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20171204.1645.032.html>

型外膜蛋白, 广泛分布于丁香假单胞菌(*Pseudomonas syringae*)、荧光假单胞菌(*P. fluorescens*)和欧文氏菌(*Erwinia* sp.)等革兰氏阴性菌中^[9]。它由N-端、C-端和中央重复区3个结构域组成^[10]。研究表明, INP全长序列、N-端和C-端结构域的嵌合体及单独的N-端均可作为有效的锚定基序用于革兰氏阴性菌展示系统。因其可展示较大分子量的蛋白质^[11], 能稳定地在宿主细胞表面表达而不影响细胞膜的完整性, 不易被细胞蛋白酶降解以及安全和检测方便等特性, 故而是一种理想的锚定蛋白, 近年来引起了不少科研工作者的关注。

存活蛋白(survivin)是凋亡抑制蛋白(inhibitor of apoptosis protein, IAP)家族的成员之一, 它广泛表达于几乎所有的肿瘤细胞, 而在大多数正常细胞未见表达^[12], 是一高度特异的广谱肿瘤相关抗原。近年来研究证明, 存活素可激发机体产生抗肿瘤抗体反应^[13]和细胞毒T细胞(cytotoxic lymphocyte, CTL)反应^[14], 是设计治疗性肿瘤疫苗的较为理想的抗原。存活蛋白作为抗原最吸引人的优点是, 它所诱导的抗肿瘤免疫反应具有广谱性, 即可对多种类型的肿瘤细胞产生抗肿瘤免疫反应。Schmidt等^[14]采用存活蛋白衍生的肽和树突状细胞体外诱导产生CTL, 发现这样的存活蛋白特异性CTL能分别裂解内源表达存活蛋白的许多不同的肿瘤细胞系, 包括肾细胞癌、乳腺癌、结肠癌、黑色素瘤、多发性骨髓瘤以及源自不同类型白血病患者的原代肿瘤细胞。本研究以大肠杆菌BL21为宿主菌, 利用冰核蛋白将存活蛋白展示于细菌表面, 为广谱的抗肿瘤DNA疫苗研究奠定了基础, 具有很好的应用前景。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒 大肠杆菌(*Escherichia coli*) BL21、载体pET30a和红荧光质粒pCBMCZ为本实验室保存, 含有INP片段的质粒PMPL003由兰州大学医学院病原所窦建林老师惠赠^[15], 含有报告基因Cherry的质粒Lego-c/Zeo为德国汉堡大学Boris Fehse教授惠赠^[16]。

1.1.2 培养基 大肠杆菌LB培养基购自生工生物工程(上海)股份有限公司。

1.1.3 主要仪器和试剂 限制性内切酶、T4 DNA连接酶购自NEB公司。PCR引物、PCR试剂盒购自

生工生物工程(上海)股份有限公司。Trans2K Plus DNA marker购自北京全式金生物技术有限公司。存活蛋白抗体(小鼠抗人)、羊抗小鼠IgG-FITC购自武汉博士德生物工程有限公司。其他化学试剂均为国产或进口分析纯试剂。荧光显微镜为上海光学仪器六厂产品。核酸电泳装置为上海天能科技有限公司产品。荧光检测仪器(cytation3)是美国伯腾仪器有限公司产品。

1.2 方法

1.2.1 重组质粒pET-INP-CHY-SUV的构建 以质粒PMPL003为模板, 以Nde-inp为上游引物, 以XhoI-Nd2为下游引物PCR扩增得到INP片段, 长度为570 bp(表1)。纯化后以Nde I和Xho I双酶切并回收酶切产物, 与同样双酶切并回收大片段的pET30a载体相连接, 得到重组质粒pET-INP-mcs。以质粒Lego-c/Zeo为模板, 以bg-cherry2为上游引物, 以zeo-speI为下游引物PCR扩增得到Cherry-Zeo片段, 长度为1 100 bp(表1)。以p3.1-SUV为模板, 以Suv-Eco为上游引物, 以Suv-lap为下游引物PCR扩增得到人存活蛋白SUV片段, 长度为440 bp。将Cherry-Zeo片段和SUV片段分别纯化后用Spe I酶切, 产物回收后进行连接, 16 °C 4 h, 然后以连接产物为模板, 以bg-cherry2、Suv-Eco为引物, PCR扩增得到Cherry-Zeo-SUV片段, 长度为1 600 bp(表1)。纯化后以Bgl II和EcoR I双酶切并回收酶切产物, 与同样双酶切并回收大片段的pET-INP-mcs相连接, 得到重组质粒pET-INP-CHY-SUV(图1), 构建好的质粒经酶切和测序验证, 以保证编码框正确。

1.2.2 融合蛋白的诱导表达 方法参照参考文献[17-18]。重组质粒pET-INP-CHY-SUV转化于大肠杆菌BL21(DE3)中用于表达分析, 大肠杆菌感受态的制备和转化按照分子克隆常规方法进行。将鉴定正确的重组菌按1:100接种到新鲜的含50 mg/L卡那霉素和50 mg/L博来霉素的LB液体培养基中, 振荡培养至D值为0.4~0.6时, 加入异丙基-β-D-硫代半乳糖苷(IPTG)使其终浓度为0.2 mmol/L, 摇床25 °C、200 r/min诱导24 h, 分别在第0、2、4、6、8、24 h取1 mL菌液离心, 弃上清后用PBS洗涤2次, 最后用200 μL PBS重悬菌体测荧光强度(RFU/D)。

1.2.3 胰蛋白酶消化实验 将重组菌按照1.2.2中的方法处理, 振荡培养过夜(约14 h)后按1:100接种到新鲜的含50 mg/L卡那霉素和50 mg/L博来霉素

表1 PCR引物序列
Table 1 Primer sequence used for PCR

基因名称 Gene	引物序列 Primer
<i>INP</i>	Nde-inp (5'-GGA ATT CCA TAT GGA TAT CGG ATC CAT GGC TCT CGA CAA GGC GT-3') XhoI-Nd2 (5'-CCG CTC GAG ATT AGA ATT CAC TAG TAG ATC TCG GGC CTT TGC TGC CGT GAT TGT CGC CAC TCA ACG-3')
<i>Cherry-Zeo</i>	bg-cherry2 (5'-GGA AGA TCT GCT AGC TCT AGA ATG GTG AGC AAG GGC GAG GAG-3') zeo-speI (5'-CCG GAA TTC ATT AAA GCT TCT CGA GAT GCA TCA TAT GAC TAG TGT CCT GCT CCT CGG CCA CGA AG-3')
<i>SUV</i>	Suv-Eco (5'-TAT CAG AAT TCT TAG TGA TGG TGG TGG TGA TGA TCC ATG GCA GCC AGC TGC-3') Suv-lap (5'-AAG ATA CTA GTG GTG CCC CGA CGT TGC-3')

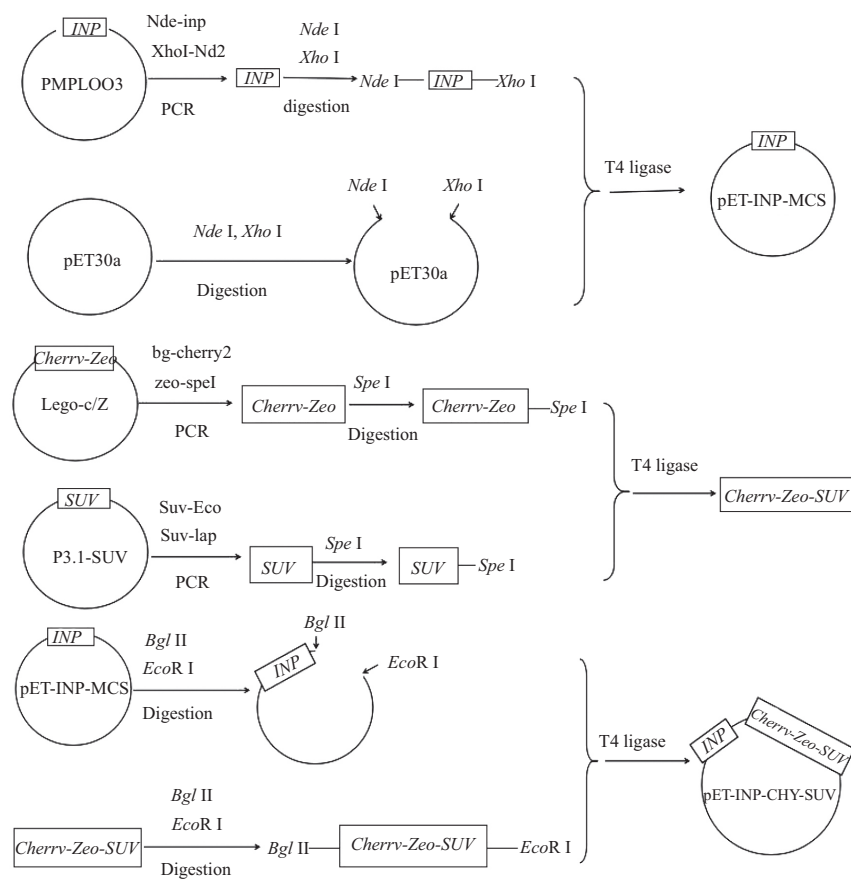


图1 重组质粒pET-INP-CHY-SUV构建流程

Fig.1 Recombinant plasmid construction process

的LB液体培养基中, 振荡培养至 D 值为0.4~0.6时, 加入IPTG使其终浓度为0.2 mmol/L, 摇床25 °C、200 r/min诱导8 h后取菌液500 μ L, 7 500 r/min离心5 min, 弃上清, 用1 mL PBS洗涤2次, 得到的菌体沉淀用500 μ L含0.2% EDTA的胰蛋白酶重悬, 37 °C反应0~5 min, 反应后立即插入冰中并加入500 μ L含10%新生牛血清(FCS)的DMEM培养液终止消化, 然后用PBS将菌体洗涤2次, 8 000 r/min离心3 min, 沉淀用100 μ L的PBS重悬, 放入酶标板测荧光强度, 无

荧光表达的pET30a和表达红荧光蛋白的pCBMCZ作为对照。

1.2.4 完整细胞ELISA 方法参照参考文献[19]。重组菌经IPTG诱导过夜(12~16 h), 调整菌液 $D_{600}=0.8$ 。离心收集菌体, 并用PBS洗涤2次, 得到的菌体沉淀用1 mL 4%多聚甲醛重悬, 室温下反应30 min, 反应完成后用PBS洗涤2次, 8 000 r/min离心3 min, 弃上清。加入1:200稀释的一抗(存活蛋白抗体), 混匀后室温下反应1 h, 反应完成后用PBS洗涤2次, 8 000 r/min

离心3 min, 弃上清。加入1:200稀释的二抗(羊抗小鼠IgG-FITC), 混匀后室温下反应1 h, 反应完成后用PBS洗涤5次, 最后用100 μ L PBS重悬菌体, 525 nm处测荧光强度, pET30a作为阴性对照。

1.2.5 免疫荧光显微镜观察 方法参照参考文献[20-21]。将重组菌IPTG诱导12 h, 离心收集菌体, 并将菌体重悬于含10 g/L牛血清白蛋白的PBS中, 调整 D_{600} 为1.0, 于室温放置30 min, 加入1:200稀释的一抗, 室温放置1.5 h, 阴性对照不加一抗。PBS洗涤菌体后, 加入1:200稀释的二抗, 室温下放置1.5 h, 最后将菌体用PBS洗涤5次, 在荧光倒置显微镜下观察。

2 结果

2.1 重组质粒的构建

将人工合成的570 bp编码冰核蛋白N-端结构域的DNA序列插入pET30a载体的*Nde* I和*Xho* I酶

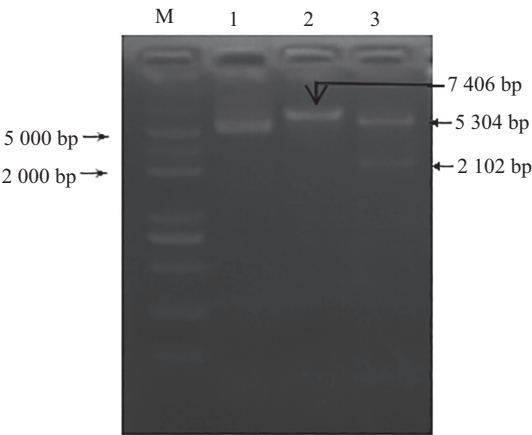
切位点, 得到大肠杆菌表面展示载体pET-INP-mcs。再分别以Lego-c/Zeo、p3.1-SUV为模板, 扩增得到*Cherry-Zeo*片段(1 100 bp)和*SUV*片段(440 bp)并将二者融合, 然后插入到pET-INP-mcs载体的*Bgl* II(图1)和*Eco*R I酶切位点, 得到重组质粒pET-INP-CHY-SUV。经酶切鉴定(图2)和测序证实构建成功。

2.2 融合蛋白的诱导表达

菌液中加入IPTG使其终浓度为0.2 mmol/L, 25 $^{\circ}$ C、200 r/min, 诱导24 h, 分别在第0、2、4、6、8、24 h取1 mL菌液洗涤后用200 μ L PBS重悬测荧光强度(图3)。由于融合基因中的*Cherry*可表达红荧光蛋白, 因此通过融合蛋白的荧光检测可证明目的蛋白的表达, 且荧光强度随着诱导时间的增加而增强。

2.3 胰蛋白酶消化实验

展示在菌体表面的存活蛋白融合蛋白(pET-INP-CHY-SUV)经胰蛋白酶消化后结构发生改变, 导



M: DNA ladder; 1: 质粒pET-INP-CHY-SUV; 2: 用*Xho* I酶切质粒pET-INP-CHY-SUV, 条带符合预期; 3: 用*Afl* III酶切质粒pET-INP-CHY-SUV, 条带符合预期。

M: DNA ladder; 1: pET-INP-CHY-SUV plasmid; 2: pET-INP-CHY-SUV digested with *Xho* I, the bands are in line with expectations; 3: pET-INP-CHY-SUV digested with *Afl* III, the bands are in line with expectations.

图2 重组质粒pET-INP-CHY-SUV的酶切鉴定

Fig.2 Identification of plasmid pET-INP-CHY-SUV

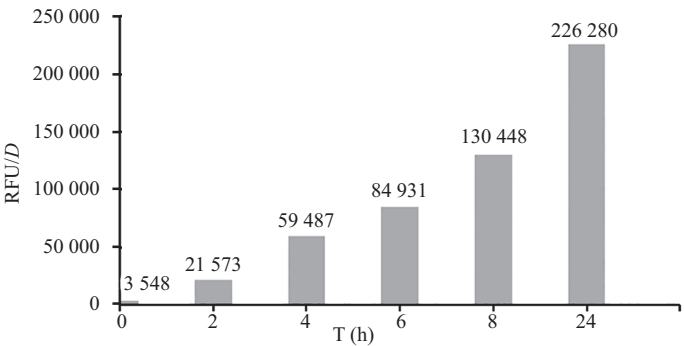


图3 异丙基- β -D-硫代半乳糖苷诱导重组蛋白的表达随时间的变化

Fig.3 The expression of recombinant protein induced by IPTG over time

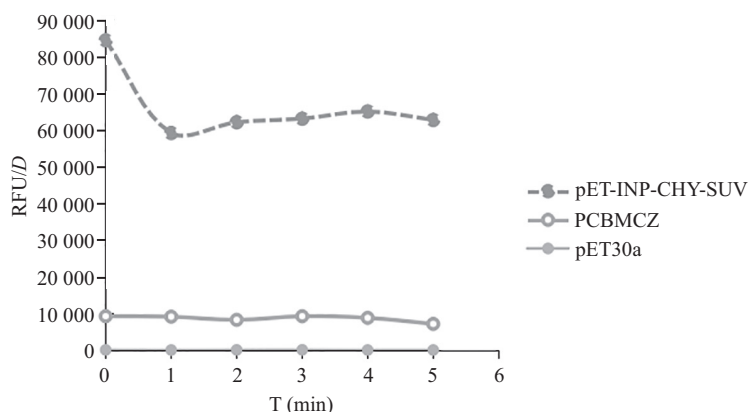


图4 胰蛋白酶对重组蛋白荧光强度的影响随时间的变化

Fig.4 Variety about fluorescence intensity over time after trypsin digestion

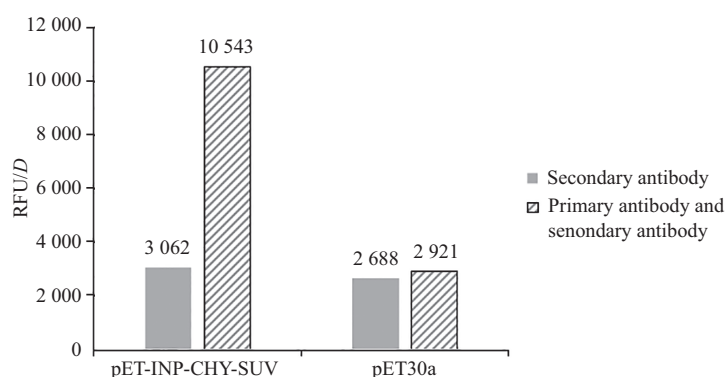


图5 完整细胞ELISA实验结果

Fig.5 Bacterial in whole-cell ELISA results

致荧光强度随之发生变化,而未展示到菌体表面的荧光蛋白(PCBM CZ)以及无报告基因*Cherry*的菌体(pET30a)不会受到胰蛋白酶的影响,从而证明存活蛋白融合蛋白在菌体内表达并且在细菌表面展示成功(图4)。

2.4 存活蛋白融合蛋白在大肠杆菌表面的展示

完整细胞ELISA用于对细胞表面展示蛋白情况进行鉴定。将含pET30a、pET-INP-CHY-SUV质粒的BL21诱导表达后收集菌体,用一抗存活蛋白抗体和二抗羊抗小鼠IgG-FITC分别孵育,于525 nm处测荧光强度。结果显示,含pET-INP-CHY-SUV质粒的重组菌经一抗二抗孵育后荧光强度明显增强,是pET30a重组菌及抽离一抗的pET-INP-CHY-SUV重组菌的3倍多(图5)。由于使用的是未经破碎的诱导后完整的重组菌进行包被,只有表面展示人存活蛋白抗原的重组菌才可被存活蛋白抗体识别,进而与二抗羊抗小鼠IgG-FITC结合,说明我们构建的重组

蛋白成功展示在细胞表面。

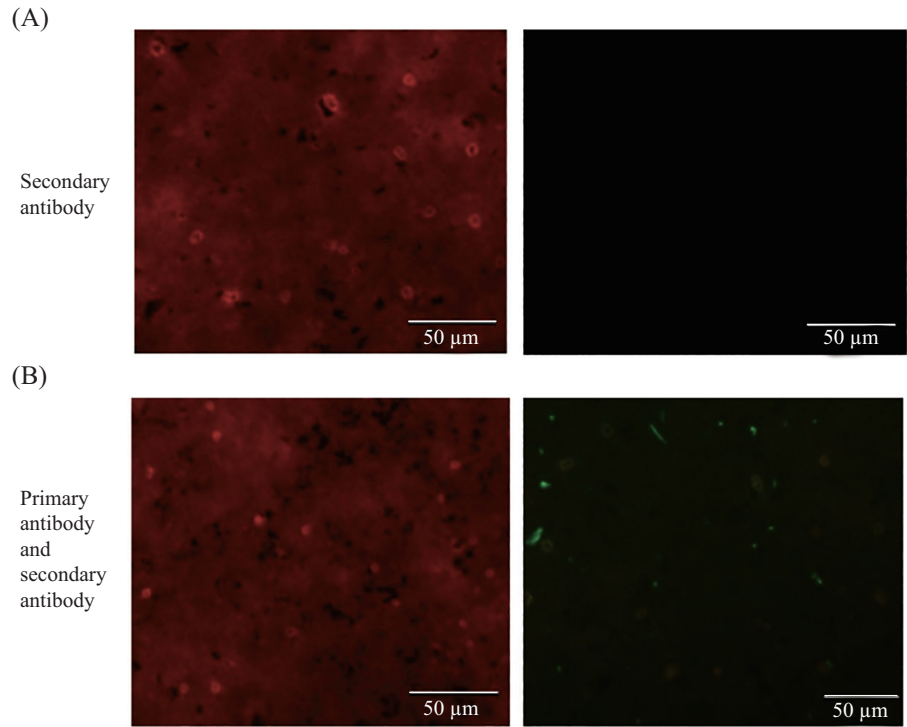
2.5 存活蛋白融合蛋白在大肠杆菌中的荧光结果

荧光倒置显微镜观察结果显示,导入pET-INP-CHY-SUV的重组菌经过一抗和二抗孵育后,展示在细菌表面的存活蛋白融合蛋白与FITC标记的二抗结合,可观察到绿荧光,而阴性对照仅能观察到细菌本身所发出的红荧光,说明重组蛋白展示成功(图6)。

3 讨论

在活细菌表面展示外源蛋白质在分子生物学、免疫学和微生物学方面有重要的应用价值。在细菌表面展示外源抗原有利于免疫系统识别抗原,间接起到免疫佐剂的作用。

本研究将INP基因与人存活蛋白基因融合后插入pET30a载体,转化进大肠杆菌BL21后,经IPTG诱导成功展示在细菌表面。在细菌表面展示技术中,宿主菌、锚定蛋白和外源靶蛋白是3个关键因素。



A: 重组菌仅用二抗孵育后分别在荧光显微镜的红荧光波长和绿荧光波长下观察; B: 重组菌用一抗和二抗孵育后分别在荧光显微镜的红荧光波长和绿荧光波长下观察。

A: the recombinant bacteria with secondary antibody were observed under the fluorescence microscope at the red fluorescence wavelength and the green fluorescence wavelength; B: the recombinant bacteria with primary antibody and secondary antibody were observed under the fluorescence microscope at the red fluorescence wavelength and the green fluorescence wavelength.

图6 免疫荧光法观察重组蛋白在细菌细胞表面的展示

Fig.6 Immunofluorescence analysis of recombinant protein expression

目前常用的宿主中, 大肠杆菌遗传背景清楚, 突变菌株种类丰富, 外源蛋白质表达量高, 因此本研究选择大肠杆菌作为宿主菌。而INP作为锚定蛋白结构特点也具有明显优势^[22]: INP包含3个结构域, 即N-端结构域、中央重复区、C-端结构域。N-端由175或179个氨基酸组成, 通过糖基磷脂酰肌醇(glucosyl phosphatidylinositol, GPI)锚定到外膜上, 从而利于大分子蛋白质的表面展示^[23]。C-端富含碱性氨基酸、高度亲水、定位于细胞外。圆柱状中央区富含Ala、Ser、Thr等亲水性氨基酸残基, 在冰晶形成过程中起催化作用。此外, 由于全长INP分子量较大, 再融合并定位一定长度的外源蛋白质有一定的困难, 因此不少研究人员尝试用截断的N-端或C-端(保留不同数目的重复单元)作为锚定单元并获得成功^[24-26]。本研究中我们将外源蛋白插入到截断的N-端区, 初步实验显示该展示系统构建成功。

治疗性DNA疫苗在肿瘤生物治疗方案中是一项新颖有效的策略^[27], 然而, DNA疫苗普遍存在免疫

原性低和免疫效能差的缺点。因此, 如何增强DNA疫苗的效能, 成为亟待解决的问题。此外, 现有的抗肿瘤DNA疫苗均存在抗癌谱单一的局限性, 即疫苗只对某一特定类型的肿瘤产生免疫应答, 而对其他肿瘤无反应。如果能够设计出广谱抗癌疫苗, 即疫苗对多种类型的肿瘤具有免疫效能, 那将在临床应用中独具优势。存活蛋白是高度特异的广谱肿瘤相关抗原, 但免疫原性较弱, 本研究将细菌表面展示技术与其相结合, 使存活蛋白成功展示于细菌表面, 这有利于免疫系统识别抗原, 间接起到免疫佐剂的作用。由于T7表达系统是非常成熟的原核表达系统, 我们在对构建的表面展示系统进行验证后, 将进一步构建表面展示存活蛋白的减毒鼠伤寒沙门菌, 为肿瘤DNA疫苗的研究奠定基础。

参考文献 (References)

1 Zhao Y, Liu Q, Wang XH, Zhou LY, Wang QY, Zhang YX. Surface display of *Aeromonas hydrophila* gapdh in attenuated *Vibrio anguillarum* to develop a novel multivalent vector vaccine. Mar Biotechnol 2011; 13(5): 963-70.

- 2 Binder U, Matschiner G, Theobald I, Skerra A. High-throughput sorting of an anticalin library via esp-p-mediated functional display on the *Escherichia coli* cell surface. *J Mol Biol* 2010; 400(4): 783-802.
- 3 Jung HC, Kwon SJ, Pan JG. Display of a thermostable lipase on the surface of a solvent-resistant bacterium, *Pseudomonas putida* gm730, and its applications in whole-cell biocatalysis. *BMC Biotechnol* 2006; 6: 23-31.
- 4 Saleem M, Brim H, Hussain S, Arshad M, Leigh MB, Zia-ul-hassan B. Perspectives on microbial cell surface display in bioremediation. *Biotechnol Adv* 2008; 26(2): 151-61.
- 5 Mejare M, Ljung S, Bulow L. Selection of cadmium specific hexapeptides and their expression as ompa fusion proteins in *Escherichia coli*. *Protein Eng* 1998; 11(6): 489-94.
- 6 Francisco JA, Campbell R, Iverson BL, Georgiou G. Production and fluorescence-activated cell sorting of *Escherichia coli* expressing a functional antibody fragment on the external surface. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90(22): 10444-8.
- 7 Hansson M, Ståhl S, Nguyen TN, Bächli T, Robert A, Binz H, et al. Expression of recombinant proteins on the surface of the coagulase-negative bacterium *Staphylococcus xylosus*. *J Bacteriol* 1992; 174(13): 4239-45.
- 8 Sleytr UB, Sara M. Bacterial and archaeal s-layer proteins: structure-function relationships and their biotechnological applications. *Trends Biotechnol* 1997; 15(1): 20-6.
- 9 Kawahara H. The structure and functions of ice crystalcontrolling proteins from bacteria. *Biosci Bioeng* 2002; 94(6): 492-6.
- 10 Schmid D, Pridmore D, Capitani G, Battistutta R, Neeser JR, Jann A. Molecular organization of the ice nucleation protein InaV from *Pseudomonas syringae*. *FEBS Lett* 1997; 414: 590-4.
- 11 Li L, Kang DG, Cha HJ. Functional display of foreign protein on surface of *Escherichia coli* using N-terminal domain of ice nucleation protein. *Biotechnol Bioeng* 2004; 85(2): 214-21.
- 12 Andersen MH, Svane IM, Becker JC, Straten PT. The universal character of the tumor-associated antigen survivin. *Clin Cancer Res* 2007; 13(20): 5991-4.
- 13 Rohayem J, Diestelkoetter P, Weigle B, Oehmichen A, Schmitz M, Mehlhorn J, Conrad K, Rieber EP. Antibody response to the tumor-associated inhibitor of apoptosis protein survivin in cancer patients. *Cancer Res* 2000; 60(7): 1815-7.
- 14 Schmidt SM, Schag K, Müller MR, Weck MM, Appel S, Kanz L, et al. Survivin is a shared tumor-associated antigen expressed in a broad variety of malignancies and recognized by specific cytotoxic T cells. *Blood* 2003; 102(2): 571-6.
- 15 Dou J, Daly J, Yuan Z, Jing T, Solomon T. Bacterial cell surface display: a method for studying Japanese encephalitis virus pathogenicity. *Jpn J Infect Dis* 2009; 62(5): 402-8.
- 16 Weber K, Mock U, Petrowitz B, Bartsch U, Fehse B. Lentiviral gene ontology (LeGO) vectors equipped with novel drug-selectable fluorescent proteins: new building blocks for cell marking and multi-gene analysis. *Gene Ther* 2010; 17: 511-20.
- 17 陶站华, 张 搏. 利用冰核蛋白N-末端结构域在大肠杆菌表面展示粘质沙雷氏菌脂肪酶. *微生物学通报* (Tao Zhanhua, Zhang Bo. Display of serratia marcesens lipase on surface of *Escherichia coli* using N-terminal domain of ice nucleation protein. *Microbiology*) 2012; 39(3): 318-25.
- 18 付 玮, 李友国, 李一星. 基于黄单胞菌冰核蛋白N端的表面展示体系建立. *应用与环境生物学报* (Fu Wei, Li Youguo, Li Yixing. Establishment of cell surface display system based on N-domain of ice nucleation protein of *Xanthomonas*. *Chin J Appl Environ Biol*) 2014; 20(3): 351-6.
- 19 郭 恒, 刘 娟, 李慧萍, 王学林, 孙树民, 张茂林, 等. 基于冰核蛋白的狂犬病毒糖蛋白细菌表面展示. *动物医学进展* (Guo Heng, Liu Juan, Li Huiping, Wang Xuelin, Sun Shumin, Zhang Maolin, et al. Rabbit virus glycoprotein bacteria surface display based on ice nucleoprotein. *Progress In Veterinary*) 2010; 31(S): 51-4.
- 20 张秋香, 侯慧丽, 芦 颖, 陈 卫, 钟 瑾. 基于冰核蛋白的乳酸菌表面展示系统的构建. *微生物学报* (Zhang Qiuxiang, Hou Huilin, Lu Ying, Chen Wei, Zhong Jin. Construction of cell surface display system in lactic acid bacteria by using ice nucleation protein. *Acta Microbiologica Sinica*) 2013; 53(4): 397-402.
- 21 姚文娟, 范文俊, 许小乐, 张 伟, 邓小昭. 基于谷氨酸棒杆菌 NCgl1221蛋白的新型细菌表面展示系统. *微生物学报* (Yao Wenjuan, Fan Wenjun, Xu Xiaole, Zhang Wei, Deng Xiaozhao. A novel bacterial cell-surface display system based on NCgl1221 from corynebacterium glutamicum. *Acta Microbiologica Sinica*) 2012; 52(2): 177-83.
- 22 李明亚, 林陈水. 冰晶核蛋白及其在细菌表面展示技术中的应用. *氨基酸和生物资源* (Li Mingya, Lin Chenshui. Ice nucleation protein and its application in bacterial cell-surface display technology. *Amino Acids & Biotic Resources*) 2016; 38(2): 7-11.
- 23 Jung HC, Lebeault JM, Pan JG. Surface display of Zymomonas mobilis levansucrase by using the ice nucleation protein of *Pseudomonas syringae*. *Nat Biotechnol* 1998; 16(6): 576-80.
- 24 Fan LH, Liu N, Yu MR, Yang ST, Chen HL. Cell surface display of carbonic anhydrase on *Escherichia coli* using ice nucleation protein for CO₂ sequestration. *Biotechnol Bioeng* 2011; 108(12): 2853-64.
- 25 Wu ML, Tsai CY, Chen TH. Cell surface display of Chi92 on *Escherichia coli* using ice nucleation protein for improved catalytic and antifungal activity. *FEMS Microbiol Lett* 2006; 256(1): 119-25.
- 26 Yang C, Cai N, Dong M, Jiang H, Li J, Qiao C, et al. Surface display of MPH on *Pseudomonas putida* JS444 using ice nucleation protein and its application in detoxification of organophosphates. *Biotechnol Bioeng* 2008; 99(1): 30-7.
- 27 Saade F, Petrovsky N. Technologies for enhanced efficacy of DNA vaccines. *Expert Rev Vaccines* 2012; 11(2): 189-209.