

集胞藻 PCC6803 中 S2P 同源蛋白 Slr0643 及 Sll0862 金属蛋白酶活性的体外鉴定

秦春燕, 张旭, 陈谷*

华南理工大学轻工与食品学院, 广州 510640

摘要: 【目的】金属蛋白酶 S2P 在细菌中通过在膜切割转录调控因子、释放 δ 因子参与胁迫响应是跨膜信号转导的保守机制, 但蓝细菌中 S2P 的功能还未被鉴定, 故我们考察集胞藻 PCC6803 中的 S2P 同源蛋白 Slr0643 及 Sll0862 的金属蛋白酶活性。【方法】以 pET-30b (+) 为载体, 分别构建重组质粒 pF0643 和 pF0862, 在大肠杆菌 BL21 (CE3) 中诱导表达并纯化 Slr0643 及 Sll0862 蛋白, 以 β -酪蛋白为底物检测重组蛋白的酶活性。【结果】体外酶活实验显示重组表达的 Slr0643 及 Sll0862 蛋白有内切蛋白酶活性, 且其活性受金属螯合剂 *o*-phenanthroline 的抑制。体外酶活的鉴定结果为进一步研究 Slr0643 和 Sll0862 的体内酶活和生物学功能奠定了基础。【结论】集胞藻 PCC6803 中的 S2P 同源蛋白 Slr0643 及 Sll0862 具有金属蛋白酶活性。

关键词: 集胞藻 PCC6803, S2P 金属蛋白酶, Slr0643, Sll0862, 原核表达, 纯化, 体外酶活鉴定

中图分类号: Q936 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2012) 01-0130-06

细菌中有一类保守的跨膜信号转导机制, 它通过控制胞外功能 Sigma 因子 (extracytoplasmic function sigma factor, ECF δ) 的自由度、应对胞外胁迫。ECF δ 因子负责识别特定的启动子, 聚合具有催化活力的核心酶组成 RNA 聚合酶全酶, 启动基因转录。通常 ECF δ 因子受跨膜的反 δ 因子的束缚抑制, 胞外刺激引发反 δ 因子被 S1P (site-1 protease, 第一位点蛋白酶) 和 S2P (site-2 protease, 第二位点蛋白酶) 连续剪切, 最终降解, 从膜上释放 δ 因子去启动基因转录^[1]。以大肠杆菌 ECF σ^E 为例, σ^E 基因下游共转录的 RseA 是跨膜的反 δ 因子, 它紧密地结合 σ^E , 限制其识别启动子以及与 RNA 聚合酶核心酶结合^[2]。在周质空间错误折叠蛋白的诱导

下, RseA 先后被 DegS (S1P) 和 RseP (S2P) 切割, 最终释放 σ^E 到核区启动相关基因的转录^[3-7]。类似的机理在越来越多的细菌中被发现。例如革兰氏阴性菌绿脓杆菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) 中 S2P-MucP 切割反 δ 因子 MucA, 释放 δ 因子 AlgU^[8]; 支气管败血波氏杆菌 (*Bordetella bronchiseptica*) 的 S2P-HurP 切割反 δ 因子 HurR, 释放 δ 因子 HurI^[9]。它们共同之处在于: 由胞外信号触动一连串蛋白水解级联过程、跨膜转导信号、启动胞内基因转录。其中触动信号和第一位点的蛋白酶千差万别, 但是, 第二位点的切割均由金属蛋白酶 S2P 的同源蛋白来完成, 显示其功能的重要和保守^[1]。

蓝细菌中 sigma 因子分为 3 组, 第一组 (Sig A)

基金项目: 国家自然科学基金 (30800609)

* 通信作者。 Fax: +86-20-87113849; E-mail: chengu@scut.edu.cn

作者简介: 秦春燕 (1988 -) 女, 河南人, 硕士研究生, 主要从事蓝细菌分子生物学研究。

收稿日期: 2011-08-23; 修回日期: 2011-11-02

是蓝细菌看家基因即正常生长所必须的, 不能被敲除^[10]; 第二组包括 Sig B-E, 第 3 组包括 Sig F-I^[10]。当蓝细菌受到外界条件刺激时, 第二组 sigma 因子在核区的含量会有所改变并启动相关基因的表达。以 Sig E 因子为例: 蓝细菌的 Sig E 因子与糖代谢途径相关^[11], 当蓝细菌从正常光照转入黑暗条件后, 光合作用和相关的糖代谢受抑制时, 胞内 Sig E 因子含量会上升而反 Sig E 因子 (ChIH) 的含量则下降^[12]。胞内 Sig B 的含量则与蓝细菌生长的温度有关, 当蓝细菌受到热击 (40℃, 30min) 时, Sig B 含量与正常生长条件 (30℃) 相比, 上升 12.7 倍^[10]。

金属蛋白酶 S2P 在细菌中通过在膜切割转录调控因子、释放 δ 因子参与胁迫响应是跨膜信号转导的保守机制, 但蓝细菌中 S2P 的功能还未被鉴定。单细胞蓝细菌-集胞藻 PCC6803 (*Synechocystis* sp. PCC6803) 是最早被完全测序的光合生物^[13], 其蛋白 Slr0643 及 Sll0862 经生物信息学分析为 S2P 同源蛋白^[14], 它们是否通过反 δ 因子和 δ 因子传递跨膜信号参与胁迫响应是有趣的问题, 故我们设计实验, 重组表达 Slr0643 及 Sll0862, 在体外考察它们的蛋白酶活性, 为进一步研究其体内酶活性和生物学功能奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒: 集胞藻 PCC6803 (*Synechocystis*

sp. PCC6803) 购于 ATCC, 大肠杆菌 (*Escherichia coli*) DH10B 及 BL21 (CE3) 购于 TaKaRa 公司。pET-30b (+) 质粒购于 Novagen 公司。

1.1.2 主要试剂和仪器: 限制性内切酶 *Nde*I 和 *Hind*III、T4 DNA 连接酶、Pfu DNA 聚合酶、DNA marker、蛋白质 marker、质粒 DNA 提取试剂盒及胶回收试剂盒均购自 TaKaRa 公司。Ni-NTA 蛋白纯化树脂购自 Novagen 公司。去污剂 BRIJ-35 购自 Sigma 公司。PCR 仪 iCycle 及电泳装置 (美国 BIO-RAD 公司)。紫外分光光度计 UV2300 (上海天美科学仪器有限公司)。胰蛋白胨、酵母粉、IPTG、丙烯酰胺、甲叉双丙烯酰胺和四甲基二乙胺均购自北京普博欣公司。其余试剂均为国产分析纯或生化试剂。

1.2 培养方法

集胞藻 PCC6803 培养于 BG11 培养基, 置于 30℃, 20 $\mu\text{E}/\text{m}^2 \cdot \text{s}$ 连续光照 140 r/min 摇瓶培养。

大肠杆菌 DH10B 及 BL21 (CE3) 培养于 LB 培养基, 置于 37℃, 200 r/min 摇瓶培养。根据实验需要加入 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 卡那霉素筛选重组菌落。平板培养补加 1.5% 的细菌琼脂粉。

1.3 重组质粒的构建

1.3.1 引物: 在 Cyanobase 数据库中 (<http://genome.kazusa.or.jp/cyanobase/Synechocystis>) 获取 slr0643 及 sll0862 基因序列, 采用 Primer 5 软件设计引物 (表 1)。引物由上海英骏生物技术有限公司广州分公司合成。

表 1 PCR 扩增所用的引物

Table 1 PCR primers used for DNA amplification

Primers	Primers sequence (5' → 3')	Size/bp	Restriction site
0643A	GGGAATTCATATGGTGGCTTCTTTTGCTCATCC	34	<i>Nde</i> I
0643B	CCCAAGCTTGATATTTCCCAACCACTGGGC	30	<i>Hind</i> III
0862A	GGGAATTCATATGGCCCACTACCCTAGACCAG	33	<i>Nde</i> I
0862B	CCCAAGCTTGTAACCGCCAATGCCTAGCCTC	31	<i>Hind</i> III

1.3.2 PCR 扩增: 采用改进的 CTAB 法提取集胞藻 PCC6803 基因组 DNA, 以其为模板进行 PCR 扩增。反应体系: 0.3 μL 高保真酶, 6 μL PCR 缓冲液 (Mg^{2+} plus), 2.4 μL dNTP, 1 μL 基因组 DNA 模板, 上下游引物各 1 μL , ddH₂O 补足体积至 30 μL 。反应条件: 94℃ / 3 min, 98℃ / 10s, 58℃ / 15s, 72℃ / 2 min, 72℃ / 5 min。取 5 μL PCR 产物, 经 1% 琼脂糖凝胶电泳进行鉴定。

1.3.3 构建重组质粒: 将 PCR 产物和 pET-30b (+) 载体分别用 *Nde*I 和 *Hind*III 双酶切 2h, 回收目的基因和载体片段, 经 T4 DNA 连接酶 16℃ 连接过夜, 取连接产物, 转化感受态 *E. coli* DH10B。次日挑取单克隆, 利用快速筛选法、PCR 验证、质粒双酶切鉴定筛选阳性克隆, 并送上海英骏生物技术有限公司广州分公司进行 DNA 测序, 鉴定正确的质粒分别命名为 pF0643 和 pF0862。

1.4 Slr0643 及 Sll0862 的诱导表达和表达产物的分离纯化

1.4.1 Slr0643 及 Sll0862 诱导表达:将鉴定正确的重组质粒 pF0643 和 pF0862 均转化感受态 *E. coli* BL21 (CE3), 铺至含卡那霉素 (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 的 LB 培养皿上, 次日, 挑选单菌落, 接种至 5-10 mL 含有相应抗生素的 LB 液体培养基中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养过夜。按照 1% 接种量将过夜培养的菌液接种至 10 mL 含相应抗生素的新鲜 LB 培养基中, 待菌液生长至 A_{600} 至 1.0 左右时, 加入 IPTG 至终浓度为 0.4 mmol/L, 22 $^{\circ}\text{C}$ 诱导表达过夜。取样进行 SDS-PAGE 分析, 以诱导前的菌液作为对照, 进行同样操作。收集 100 mL 诱导表达的菌体, 加入 10 mL 结合缓冲液 (0.5 mol/L NaCl, 20 mmol/L Tris-HCl, 5 mmol/L 咪唑, pH7.9), 冰浴超声裂解细胞 (工作 3 s, 间隔 3 s, 功率 250 W), 收集菌体 3300 \times g, 4 $^{\circ}\text{C}$, 离心 10 min, 取上清加入 2% BRIJ-35, 200 r/min, 冰浴 60 min。4 $^{\circ}\text{C}$, 16100 \times g 离心 20 min, 收集上清经 0.45 μm 滤膜过滤, 调节 pH 至 7.9。

1.4.2 重组蛋白的分离纯化:用 His-trap Ni affinity column 直接纯化上清中的目的蛋白, 0-1 mol/L 咪唑溶液设 7 个梯度进行洗脱, SDS-PAGE 检测纯化产物的浓度和分子量。纯化蛋白样品保存于 -80 $^{\circ}\text{C}$ 备用。

1.5 重组 Slr0643 及 Sll0862 蛋白的体外酶活性鉴定

将融合蛋白 Slr0643 及 Sll0862 分别与 2.5 μg 底物 β -酪蛋白混合, 在含 50 mmol/L 的 Tris acetate, 80 mmol/L 氯化钠, 5 mmol/L 醋酸镁, 1.4 mmol/L β -巯基乙醇的缓冲液 (pH8.0) 中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 温育, 同时以加入金属蛋白酶抑制剂 *o*-phenanthroline 及丝氨酸蛋白酶和半胱氨酸蛋白酶抑制剂 Complete EDTA-free 的组分为对照, 进行 SDS-PAGE 分析, 经考马斯亮蓝染色后, 用软件 Image J 定量 β -酪蛋白的量, 对比底物的酶解情况。

2 结果

2.1 构建重组质粒 pF0643 和 pF0862

以 0643A 和 0643B, 0862A 和 0862B 为引物从集胞藻 PCC6803 基因组 DNA 中分别扩增得到 slr0643 和 sll0862 的编码基因并连接到 pET-30b (+) 质粒连接, 构建流程图见图 1。用快速筛选法筛选阳性菌落并进行 PCR 及酶切鉴定, 经 1% 琼脂糖凝胶电泳分析, 在约 1500 bp 处可见与目的基因大小一致的特异性条带 (图 2)。质粒测序结果与 Cyanobase 中公布的 slr0643 及 sll0862 基因序列一致, 表明目的片段已正确插入 pET-30b (+) 载体中。

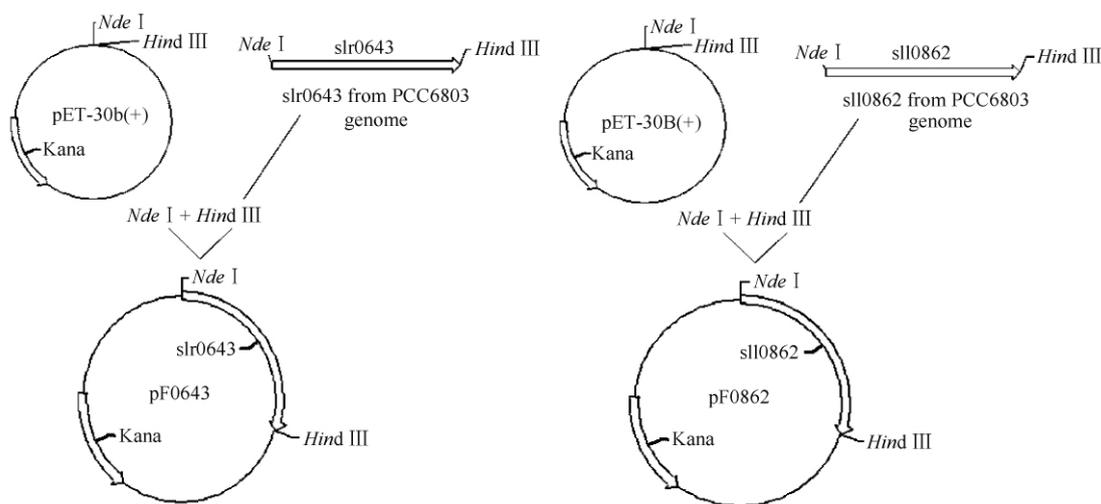


图 1 质粒 pF0643 和 pF0862 构建流程图

Fig.1 Flow chart showing the construction process of pF0643 and pF0862. Construction of pF0643 are showing in left and pF0862 in right.

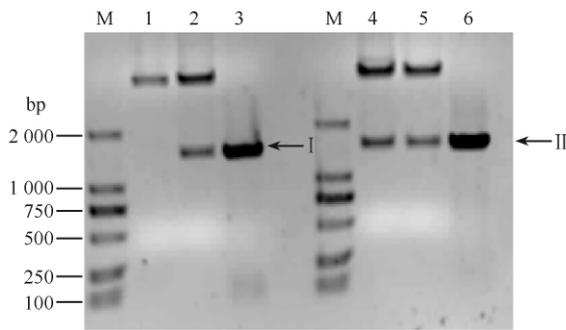


图2 重组质粒 pF0643 和 pF0862 酶切鉴定图

Fig. 2 Restriction identification of pF0643 and pF0862 plasmids. Lane 1: plasmid pET-30b (+) double digestion by *Nde*I and *Hind*III showed as a control; lane 2: pF0643 double digestion by *Nde*I and *Hind*III; lane 3: PCR product of *slr0643*; lane 4 and 5: pF0862 double digestion by *Nde*I and *Hind*III; lane 6: PCR product of *sll0862*; I showed the specific stripe of *slr0643*; II showed the specific stripe of *sll0862*.

2.2 重组 Slr0643 及 Sll0862 蛋白的表达纯化与体外酶活性鉴定

收集纯化重组蛋白 Slr0643 及 Sll0862。以 β -酪蛋白为底物,检测重组蛋白的酶活性。

当 Slr0643 蛋白与 β -酪蛋白温育(图3),6 h 后约 65.4% 的 β -酪蛋白被剪切,12 h 后约 99.3% 的 β -酪蛋白被剪切,*o*-phenanthroline 抑制了 β -酪蛋白的剪切过程,而 Complete EDTA-free 不影响 β -酪蛋白的剪切。为了排除 β -酪蛋白的剪切活性来自于大肠杆菌中与 Slr0643 同时被纯化的蛋白酶,我们将 β -酪蛋白与经同样重组表达及纯化过程的另一个集胞藻蛋白片段 P 进行 12 h 的温育,结果仅有少量(约 18.5%)的 β -酪蛋白被剪切,证实绝大部分剪切 β -酪蛋白的金属蛋白酶活性确实来源于体外重组表达的 Slr0643。

类似的,Sll0862 蛋白的体外酶活实验也证实了 Sll0862 蛋白具有金属蛋白酶活性(图3)。温育6 h,约 55.3% 的 β -酪蛋白被剪切,而 12 h 的温育体系中约 97.1% 的 β -酪蛋白被剪切,*o*-phenanthroline 同样抑制了 β -酪蛋白的剪切过程,而 Complete EDTA-free 则不影响 β -酪蛋白的剪切。同样,以重组表达的集胞藻蛋白片段 P 为对照,经过 12 h 的温育,仅有约 10.2% 的 β -酪蛋白被剪切,证实绝大部分剪切 β -酪蛋白的金属酶活性来自于体外重组表达的 Sll0862。

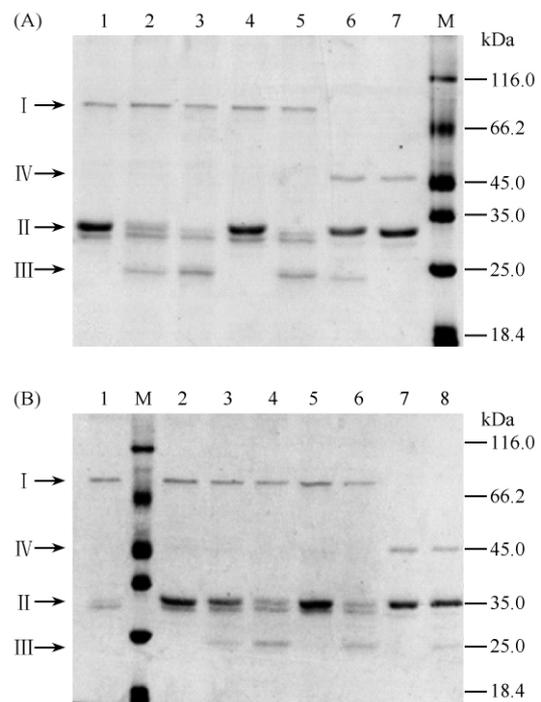


图3 重组 Slr0643 (A) 和 Sll0862 (B) 蛋白的体外酶活性鉴定

Fig. 3 Protease activity of Slr0643 (A) and Sll0862 (B) *in vitro*. Similar results were obtained from three independent experiments and here shown is the representative one. A: M, protein marker. Lane 1: the reaction mixture prior to incubation; lane 2: the reaction mixture after 6 h incubation with Slr0643; lane 3: the reaction mixture after 12 h incubation with Slr0643; lane 4 and 5: the reaction mixture plus 10 mmol/L *o*-phenanthroline (a metalloprotease inhibitor) and Complete EDTA-Free (a cocktail of serine and cysteine protease inhibitors), respectively; lane 6: the reaction mixture after 12 h incubation with the recombinant protein P; lane 7: the reaction mixture with P prior to incubation. The protein sample was subjected to SDS-PAGE and stained with Coomassie brilliant blue. I indicates the recombinant protein of Slr0643; II indicates the substrate (β -casein); III indicates the cleaved fragment of β -casein; IV indicates the recombinant protein P. The asterisks indicate the partially degraded fragments during purification. B: M, protein marker. Lane 1: the reaction mixture in the absence of β -casein; lane 2: the reaction mixture prior to incubation; lane 3: the reaction mixture after 6 h incubation with Sll0862; lane 4: the reaction mixture after 12 h incubation with Sll0862; lane 5 and 6: the reaction mixture plus 10 mmol/L *o*-phenanthroline (a metalloprotease inhibitor) and Complete EDTA-Free (a cocktail of serine and cysteine protease inhibitors), respectively; lane 7: the reaction mixture with recombinant protein P prior to incubation; lane 8: the reaction mixture after 12 h incubation with P; The protein sample was subjected to SDS-PAGE and stained with Coomassie brilliant blue. I indicates the recombinant protein of Sll0862; II indicates the substrate (β -casein); III indicates the cleaved fragment of β -casein; IV indicates the recombinant protein P. The asterisks indicate the partially degraded fragments during purification.

3 讨论

迄今为止,我们搜索到集胞藻 PCC 6803 中有 4 个 S2P 同源蛋白: Sll0862、Slr0643、Sll0528 和 Slr1821,它们均含有多个跨膜区域(4 到 10 个不等)。保守的酶活性位点:金属螯合基序 HE_{xx}H 位于近氨基酸的一个跨膜区内,而另一保守基序 NP_{xx}G 位于近羧基端的另一跨膜区边缘,两个基序均靠近膜的同一侧,而所在的两个跨膜区中间有另一个跨膜区存在。这些特征符合 S2P 的普遍规律,提示其保守的催化机制^[1]。Slr0643 及 Sll0862 的跨膜结构域分析结果显示它们含多跨膜疏水区域结构,使其表达纯化具有一定的困难^[15]。我们尝试了多种优化表达及纯化的条件,包括不同的诱导温度, IPTG 浓度,诱导时间、诱导菌株等,而后选用 *E. coli* BL21 (CE3) 菌株,在 22℃, 0.4 mmol/L IPTG 浓度下进行诱导表达;同时纯化过程中加入 BRIJ-35 去污剂,增加目的蛋白的溶解性,最终获得具有金属蛋白酶活性的重组蛋白 Slr0643 和 Sll0862,为寻找其内源底物奠定了基础。

在下一步试验中我们将进一步重组表达 Slr0643 和 Sll0862 可能的内源底物,例如反 δ 因子(anti- σ factor),进行体外酶切实验,考察酶与底物的对应关系,在此基础上进一步通过在 S2P 缺失突变体^[14]体内敲除反 δ 因子或过量表达 δ 因子、观察回复突变,验证体内的酶与底物关系,进而探索 S2P 级联信号转导在集胞藻 PCC6803 和其他光合蓝细菌中的生物学功能和机理。

参考文献

- [1] Chen G, Zhang X. New insights into S2P signaling cascades: regulation, variation, and conservation. *Protein Science*, 2010, 19(11): 2015-2030.
- [2] Campbell EA, Tupy JL, Gruber TM, Wang S, Sharp MM, Gross CA, Darst SA. Crystal structure of *Escherichia coli* sigma E with the cytoplasmic domain of its anti-sigma RseA. *Molecular Cell*, 2003, 11(4): 1067-1078.
- [3] Alba BM, Leeds JA, Onufryk C, Lu CZ, Gross CA. DegS and YaeL participate sequentially in the cleavage of RseA to activate the sigma (E)-dependent extracytoplasmic stress response. *Genes Development*, 2002, 16(16): 2156-2168.
- [4] Kanehara K, Ito K, Akiyama Y. YaeL (EcfE) activates the sigma (E) pathway of stress response through a site-2 cleavage of anti-sigma (E), RseA. *Genes Development*, 2002, 16(16): 2147-2155.
- [5] Dartigalongue C, Loferer H, Raina S. EcfE, a new essential inner membrane protease: its role in the regulation of heat shock response in *Escherichia coli*. *The EMBO Journal*, 2001, 20(21): 5908-5918.
- [6] Mecsas J, Rouviere PE, Erickson JW, Donohue TJ, Gross CA. The activity of sigma E, an *Escherichia coli* heat-inducible sigma-factor, is modulated by expression of outer membrane proteins. *Genes Development*, 1993, 7(12B): 2618-2628.
- [7] Erickson JW, Gross CA. Identification of the sigma E subunit of *Escherichia coli* RNA polymerase: a second alternate sigma factor involved in high-temperature gene expression. *Genes Development*, 1989, 3(9): 1462-1471.
- [8] Qiu D, Eisinger VM, Rowen DW, Yu HD. Regulated proteolysis controls mucoid conversion in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proceeding of the National Academy of Sciences U S A*, 2007, 104(19): 8107-8112.
- [9] King-Lyons ND, Smith KF, Connell TD. Expression of hurP, a gene encoding a prospective site 2 protease, is essential for heme-dependent induction of bhuR in *Bordetella bronchiseptica*. *Journal Of Bacteriology*, 2007, 189(17): 6266-6275.
- [10] Imamura S, Asayama M. Sigma Factors for Cyanobacterial Transcription. *Gene Regulation and Systems Biology*, 2009(3): 65-87.
- [11] Osanai T, Kanesaki Y, Nakano T, Takahashi H, Asayama M, Shirai M, Kanehisa M, Suzuki I, Murata N, Tanaka K. Positive Regulation of Sugar Catabolic Pathways in the Cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 by the Group 2 sigma Factor SigE. *The Journal of Biological Chemistry*, 2005, 280(35): 30653-30659.
- [12] Osanai T, Imashimizu M, Seki A, Sato S, Tabata S, Imamura S, Asayama M, Ikeuchi M, Tanaka K. ChlH, the H subunit of the Mg-chelatase, is an anti-sigma factor for SigE in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Proceeding of the National Academy of Sciences U S A*, 2009, 106(16): 6860-6865.
- [13] Kaneko T, Sato S, Kotani H, Tanaka A, Asamizu E, Nakamura Y, Miyajima N, Hirose M, Sugiura M, Sasamoto S, Kimura T, Hosouchi T, Matsuno A, Muraki A, Nakazaki N, Naruo K, Okumura S, Shimpo S,

Takeuchi C, Wada T, Watanabe A, Yamada M, Yasuda M, Tabata S. Sequence analysis of the genome of the unicellular cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC6803. II. Sequence determination of the entire genome and assignment of potential protein-coding regions. *Dna Research*, 1996, 3 (3) : 109-136.

[14] 钟罗宝, 陈谷, 任丹丹. 集胞藻 PCC6803 EGY 同源基

因破坏突变体的构建及表型分析 [J]. 微生物学报 (*Acta Microbiologica Sinica*), 2009, 49 (11) : 1470-1476.

[15] Feng L, Yan H, Wu Z, Yan N, Wang Z, Jeffrey PD, Shi YG. Structure of a site-2 protease family intramembrane metalloprotease. *Science*, 2007, 318 (5856) : 1608-1612.

Characterization of metalloprotease of Slr0643 and Sll0862, the S2P homologs from *Synechocystis* sp. PCC6803

Chunyan Qin, Xu Zhang, Gu Chen*

College of Light Industry and Food Science, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China

Abstract: [Objective] It is a conserved mechanism in bacteria that metalloprotease site-2 protease (S2P) cleaves transmembrane anti-sigma factor to release sequestered sigma factor in response to extracytoplasmic stress. However, the function of site-2 protease homologs in cyanobacteria remains elusive, so we investigated the metalloprotease activity of Slr0643 and Sll0862, the site-2 protease homologs from *Synechocystis* sp. PCC6803. [Methods] Recombinant Slr0643 and Sll0862 were constructed and overexpressed in *Escherichia coli* BL21 (CE3). Their protease activities were tested against β -casein and then resolved on SDS-PAGE. [Results] Results from caseinolytic assay indicated that Slr0643 and Sll0862 have proteolytic activity which is blocked by *o*-phenanthroline, a metalloprotease inhibitor. These metalloprotease activity of Slr0643 and Sll0862 *in vitro* provide the foundation for further analysis of their substrates *in vivo*. [Conclusion] The site-2 protease homologs in *Synechocystis* sp. PCC6803 have metalloprotease activity.

Keywords: *Synechocystis* sp. PCC6803, S2P metalloprotease, Slr0643, Sll0862, prokaryotic expression, purification, metalloprotease activity assay *in vitro*

(本文责编:王晋芳)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (30800609)

* Corresponding author. Fax : + 86-20-87113849 ; E-mail : chengu@scut.edu.cn

Received: 23 August 2011 / Revised: 2 November 2011