

具有光肩星天牛内切聚葡萄糖酶结合活性短肽的筛选

陈敏^{1,2}, 卢孟柱^{2*}, 王敏杰², 张志毅³

(1 北京林业大学省部共建森林培育与保护教育部重点实验室, 北京 100083; 2 中国林业科学研究院林业研究所, 国家林业局林木培育重点实验室, 北京 100091; 3 北京林业大学教育部林木花卉遗传育种重点实验室, 北京 100083)

摘要: 内切葡聚糖酶 (endoglucanases) 是光肩星天牛幼虫肠道的主要纤维素消化酶。本研究以光肩星天牛内切葡聚糖酶的同工酶 AgEG2 为靶分子, 从随机多肽噬菌体展示库中筛选与 AgEG2 有亲和活性的短肽, 通过 3 轮筛选, 短肽序列 TPHRSPL 出现频率为 33.7%, 而且展示该短肽的噬菌体均对 AgEG2 有很高的结合能力。进一步合成短肽 TPHRSPL, 并对肠道纤维素酶提取液进行了 Western 分析, 结果表明该短肽能特异结合内切葡聚糖酶的同工酶 AgEG1 和 AgEG2, 而与粗酶液中其它蛋白组分均无结合特性。表明筛选获得的短肽 TPHRSPL 对光肩星天牛内切葡聚糖酶具有特异结合亲和性。该短肽为研究光肩星天牛纤维素酶的特性及开发天牛的生物防治剂奠定了基础。

关键词: 光肩星天牛; 内切葡聚糖酶; 随机多肽噬菌体展示库; 短肽; 亲和性

中图分类号: S763.38 文献标识码: A

Selecting and Identification of Binding Peptides of the Endoglucanases from *Anoplophora glabripennis*

CHEN Min^{1,2}, LUMeng-zhu², WANG Min-jie², ZHANG Zhi-yi³

(1 Key Laboratory for Silviculture and Conservation of Ministry of Education, Beijing Forestry University, Beijing 100083, China; 2 Research Institute of Forestry, CAF, Key Laboratory of Tree Breeding and Cultivation, State Forestry Administration, Beijing 100091, China; 3 Key Laboratory of Genetics and Breeding in Trees and Ornamental Plant, Ministry of Education, Beijing Forestry University, Beijing 100083, China)

Abstract Endoglucanases are the main cellulolytic enzymes in the gut of *Anoplophora glabripennis*. In this study, random peptide phage display technology was employed to screen peptides that bound the AgEG2, a member of endoglucanase isozymes. Phage clones displaying peptide TPHRSPL accounted for 33.7% of the selected phage population after three rounds of screening and showed higher phage recovery than the other clones in the binding assay. Peptide TPHRSPL was chemically synthesized and tested for its binding activity to AgEG2. The synthetic peptide exhibited high binding specificity for AgEG1 and AgEG2. This indicated that peptide TPHRSPL had the affinity to the endoglucanase of *A. glabripennis*, which could be used to study the biological role of the enzyme in the gut and had the potential to be developed into biological control agents of *A. glabripennis*.

Key words *Anoplophora glabripennis*; endoglucanases; random peptides; phage display library; binding peptides; affinity

收稿日期: 2006-01-10

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (批准号: 39900116)

作者简介: 陈敏 (1973—), 女, 四川宜宾人, 博士。

通讯作者, Tel: 010-62888862; E-mail: lum@forestry.ac.cn

光肩星天牛 (*Anoplophora glabripennis* (Motsch)) 广泛分布于我国 24 个省市自治区, 危害杨 (*Populus*)、柳 (*Salix*)、榆 (*Ulmus*)、槭 (*Acer*)、槐 (*Sophora*)、桑 (*Morus*) 等多种林木, 是我国杨树最重要的蛀干害虫^[1]。天牛幼虫钻蛀树干隐蔽危害, 世代长且不整齐, 天敌种类少, 因而控制难度极大, 常规的防治方法很难奏效^[2]。我国“三北”防护林生态工程, 许多以杨树为主的林分由于光肩星天牛的猖獗危害, 造成大量树木被迫砍伐, 甚至整个林分被毁灭, 给我国的杨树人工林带来严重威胁^[3]。

纤维素酶是天牛幼虫肠道的主要消化酶类, 是研究天牛的生物学特性及开发抗天牛生物制剂的靶标之一。作者对光肩星天牛幼虫肠道内的纤维素酶体系进行研究表明, 光肩星天牛幼虫肠道内具有完整的纤维素酶体系, 其中内切- β -1, 4-葡聚糖酶活性最高, 且具有广泛适宜的 pH 值和温度范围及较高的热稳定性等特性。通过酶活性化学显色反应, 分离出内切- β -1, 4-葡聚糖酶的两种同工酶, 分别命名为 AgEG1 (26kD) 和 AgEG2 (39kD)^[4]。借鉴蛋白酶抑制剂在害虫控制方面的成功经验, 开发天牛纤维素酶的专性抑制剂或提高天牛杀虫剂的效果是一个重要策略。但目前对天牛纤维素酶的研究主要集中在纤维素酶的来源、组成及其特性等方面^[5-9]。仅吴明等^[10]报道了 Cu^{2+} 对松墨天牛 (*Monochamus alternatus* Hope) 纤维素酶的抑制作用。

近年来, 噬菌体展示技术 (phage display) 的迅速发展, 已成为分子间相互作用研究的有力工具, 也为筛选生物活性肽、蛋白质、受体以及开发新型药物建立了新的方法^[11-16]。运用噬菌体展示技术筛选出天牛纤维素酶的结合短肽, 可为天牛纤维素酶的生物学特性研究及其抑制剂、杀虫剂的开发提供基础。

本研究首次利用噬菌体展示技术进行了天牛纤维素酶结合短肽筛选的尝试。以 AgEG2 作为靶分子对随机七肽噬菌体库进行筛选, 获得特异结合光肩星天牛内切葡聚糖酶的短肽序列, 并对其结合特性进行了研究。本文还对该短肽用于天牛纤维素酶特性的研究及其抑制剂的开发前景进行了讨论。

1 材料和方法

1.1 噬菌体展示库

随机七肽噬菌体展示库 Ph.D.-7TM 试剂盒购自

New England Biolabs (NEB)。该噬菌体展示库以 M13 噬菌体为载体, 将编码随机 7 肽的 DNA 序列插入 M13 噬菌体的 pIII 基因, 外源随机 7 肽展示于外壳蛋白 PIII 的 N 端。文库容量为 2×10^{12} Pfu (plaque forming unit)。

1.2 光肩星天牛幼虫

光肩星天牛幼虫采自天津地区的杨树被害木, 室内采用柳树 (*Salix* sp.) 和糖槭 (*Acer saccharum* Marsh.) 等枝条人工饲养, 备用。挑选生长健康、3 龄以上的幼虫作为实验材料。

1.3 AgEG2 的分离和纯化

按照作者介绍的方法进行 AgEG2 的分离纯化^[4]。从非变性聚丙烯酰胺凝胶的相应 AgEG2 位置切取胶块, 加适量 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ NaHCO}_3$ (pH 值 8.6) 溶液洗脱 3 次, 每次 30 min, 最终酶液浓度稀释到 $100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 备用。回收酶液进行 SDS-PAGE (12%) 分析检验其纯度, 并用蛋白分子量标准估计分子量。同时制备筛选过程中的对照洗脱液: 进行 AgEG2 分离纯化时, 留出两个泳道不加样, 电泳后切取与酶带相同大小的空白凝胶, 用 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ NaHCO}_3$ 洗脱, 方法同酶液的制备。

1.4 噬菌体展示库的筛选

以 AgEG2 作为靶分子对随机七肽噬菌体展示库进行淘选, 筛选程序参照试剂盒说明书进行, 略有改动。将 $150 \mu\text{L}$ AgEG2 的 NaHCO_3 溶液加入酶标板微孔中, 4°C 包被过夜, 同时包被空白胶的 NaHCO_3 洗脱液作为对照。倒掉包被液, 微孔中加满封闭液 ($0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ NaHCO}_3$, $5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1} \text{ BSA}$, $0.02\% \text{ NaN}_3$), 4°C 孵育至少 1 h。采用酶液洗脱方法制备空白聚丙烯酰胺凝胶的 TBS ($50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ TrisHCl}$ (pH 值 7.5), $150 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ NaCl}$) 洗脱液。取该洗脱液 $100 \mu\text{L}$ 稀释 $10 \mu\text{L}$ 噬菌体原库 (约 2×10^{11} Pfu), 并在 4°C 孵育 2 h 以吸附原肽库中与聚丙烯酰胺凝胶洗脱液特异结合的噬菌体。倒掉酶标板中的封闭液, 用 TBST (TBS + 0.1% Tween-20) 洗 6 次后, 加入上述与聚丙烯酰胺凝胶洗脱液吸附过的噬菌体七肽库, 4°C 缓慢振荡 4 h 用 TBST 洗 10 次, 特异结合的噬菌体用 $100 \mu\text{L}$ 洗脱缓冲液 ($0.2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ GlycineHCl}$, pH 值 2.2, $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1} \text{ BSA}$) 洗脱 3 次, 每次 10 min, 洗脱液立即用 $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ TrisHCl}$ 缓冲液 (pH 值 9.1) 中和。取少许洗脱液 (约 $1 \mu\text{L}$) 感染大肠杆菌 (*Escherichia coli* (Migula) Castellani and Chermers), ER2738 测定噬菌体效价,

以噬菌斑形成单位 (Pfu) 表示, 其余噬菌体通过感染宿主菌扩增后进入下一轮筛选。重复以上筛选程序 2 轮, 从第二轮开始将 TBS 中的吐温浓度增加为 0.5%。测定每轮筛选获得的噬菌斑数 (产出量) 以计算噬菌体的回收比。噬菌体的回收比 = 噬菌体的产出量 / 噬菌体的投入量。噬菌体的扩增、纯化和定量按照试剂盒的使用手册进行。

1.5 多肽序列分析

随机挑取第 3 轮筛选获得的噬菌体克隆, 按照试剂盒介绍的方法制备 DNA 测序模板。用 310 型 DNA 自动测序仪 (美国 ABI) 进行了 DNA 序列分析。推导展示短肽的氨基酸序列。

1.6 单克隆噬菌体与 AgEG2 结合活性测定

以上噬菌体单克隆分别进行扩增后, 按照上述筛选方法测定与 AgEG2 的结合能力。 10^{11} Pfu 新扩增的单克隆噬菌体加入包被 AgEG2 的酶标板中, 按筛选程序进行结合和洗涤, 洗涤条件同第三轮筛选。测定洗脱液中噬菌体效价 (噬菌体的产出量)。每个噬菌体克隆设三个重复, 以相同投入量的随机七肽噬菌体展示库作为对照。计算噬菌体的回收比。

1.7 合成短肽与 AgEG2 的结合分析

由赛百胜公司合成上述短肽 THRSPL (命名为 P2), 并在短肽 N 端标记生物素 (biotin) 以便于检测。短肽用去离子灭菌水溶解后于 -20°C 分装保存。按梁国栋报道的方法^[17], 以短肽 P2 作为探针与光肩星天牛幼虫的纤维素酶提取液进行 Western 分析, 检测该短肽的结合特性。光肩星天牛幼虫粗酶液进行非变性 PAGE (12%) 分离后, 立即将酶带电转印到尼龙膜 (Hybond-N+, Amersham pharmacia 产品) 上, 为保持酶的活性, 缓冲液中不加甲醇, 转印条件为: 恒流 100 mA, 1 h。转移结束后取出尼龙膜, 用 TBS 漂洗 1~5 min, 用 10 mL 以 TBS 10 倍稀释的封闭液 I (购自 Roche 公司) 于室温封闭 1 h 用 TBS 漂洗 2~5 min 后, 加入用 10 mL 封闭液稀释的 P2 探针 ($1\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), 4°C 缓慢振荡 2 h 用 TBS 洗膜并用碱性磷酸酶缓冲液 ($100\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}\ \text{NaCl}$, $100\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}\ \text{Tris}$, $5\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}\ \text{MgCl}_2$, pH 值 9.5) 平衡后, 将膜放入用封闭液按 1:5 000 稀释的链霉素标记的碱性磷酸酶溶液 (SP-AP, Promega), 室温缓慢振荡 1 h 后, 用适量 BCIP/NBT (Roche) 溶液于黑暗中进行显色反应, 直到出现清晰的条带为止。用无菌水冲洗后进行拍照、保存。

2 结果

2.1 AgEG2 的分离和纯化

从非变性聚丙烯酰胺凝胶中洗脱回收的 AgEG2 酶液, 以羧甲基纤维素作为底物进行酶活性测定, 仍保持内切葡聚糖酶活性, 且分离的酶液在 SDS-PAGE 分析中呈单一酶带, 经蛋白分子量标准估计分子量约为 39 kD (图 1)。以此分离纯化的酶液作为靶分子, 进行噬菌体随机多肽库的筛选。

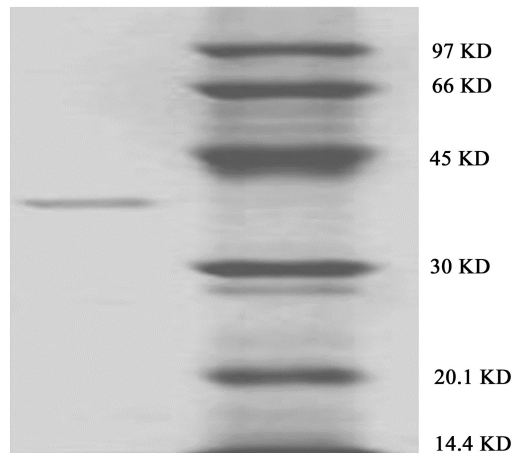


图 1 SDS-PAGE 分析纯化的 AgEG2 (A: AgEG2, M: 蛋白分子量标准, 从上到下分别为 97kD, 66kD, 45kD, 30kD, 20.1kD 和 14.4kD)

2.2 噬菌体展示库的淘选

从随机七肽噬菌体展示库中取 2×10^{11} Pfu 噬菌体 (约包含 2.8×10^9 不同短肽的噬菌体克隆) 进行筛选, 并采取空白胶预吸附的方法去除噬菌体肽库中与聚丙烯酰胺结合的噬菌体。从表 1 可见, 三轮筛选中噬菌体回收比不断增高, 由第 1 轮的 6.5×10^{-6} 升至第三轮的 3.9×10^{-3} , 升高了 600 倍, 表明筛选的富集效果是显著的, 有专一结合的噬菌体存在。而对照每轮筛选的噬菌体回收比保持在 $10^{-5}\sim 10^{-6}$ 左右, 说明没有噬菌体富集现象。

表 1 每轮筛选的噬菌体的回收比

轮数	靶分子	投入量 / Pfu	产出量 / Pfu	回收比
I	AgEG2	2×10^{11}	1.3×10^4	6.5×10^{-6}
	对照 (CK)	2×10^{11}	1.0×10^4	5.0×10^{-6}
II	AgEG2	2×10^{11}	8.2×10^5	4.1×10^{-4}
	对照 (CK)	2×10^{11}	2.0×10^4	1.0×10^{-5}
III	AgEG2	2×10^{11}	7.8×10^6	3.9×10^{-3}
	对照 (CK)	2×10^{11}	1.2×10^4	6.0×10^{-6}

2.3 结合短肽的序列分析

从第三轮筛选的洗脱液中随机挑取了 11 个噬菌

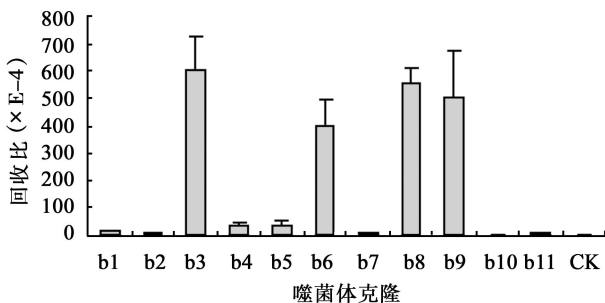
体单克隆 (b1~ b11), 分别进行扩增后, 对每个单克隆进行 DNA 序列测定。根据试剂盒使用说明书提供的外源序列插入位点, 从噬菌体 DNA 序列中查找出随机七肽的基因序列, 推导出七肽的氨基酸序列 (表 2)。b3 b6 b8和 b9四个噬菌体克隆含有完全相同的短肽 TPHRSP序列, 出现频率为 36%, 此外, b5也包含 PHR同源序列。以上结果表明经过 3 轮筛选, 特异结合的克隆得到了富集。从表 2 还可看出, b6 克隆所插入的外源基因序列与 b3 b8和 b9不同, 但它们表达相同的短肽序列, 表明结合作用取决于短肽的氨基酸序列而不依赖于噬菌体本身。

表 2 短肽的 DNA 序列和氨基酸序列

克隆	DNA 序列	氨基酸序列
b1	5-CA TTTG CTTATT CCTCAT CCT- 3'	H LLI HHP
b2	5-GCTTTGG CTCAG AAGGCTCTT- 3'	ALA QKGL
b3	5- ACTCCGCATCGTTCTCCTCTG -3'	TPHRSP
b4	5-CCGAGTCA TCTT CATCTTAT- 3'	PSHLHLY
b5	5-A GTTA TGAT CCTCCTCATCGT- 3'	SYDPHR
b6	5- ACTCCTCATCGGTCTCCTCTT -3'	TPHRSP
b7	5-A CTGCTAATA CG CA TAGGA CT- 3'	TANTHRT
b8	5- ACTCCGCATCGTTCTCCTCTG -3'	TPHRSP
b9	5- ACTCCGCATCGTTCTCCTCTG -3'	TPHRSP
b10	5-TGGATGGCTTTTCA GAATA CG- 3'	WMA FQNT
b11	5-CTTCATTTGCCGACTCCTGCG- 3'	LH LPTPA

2.4 筛选出的噬菌体与 AgEG2 的亲合力分析

上述挑取的 11 个克隆 (b1~ b11) 进行扩增后分别与靶分子进行结合筛选, 检测富集噬菌体与靶分子的结合能力, 以相同投入量的噬菌体肽库作为对照, 结果如图 2。b3 b6 b8和 b9 克隆的回收比为 $4 \sim 6 \times 10^{-2}$, 而其余克隆及对照的噬菌体回收比约 $10^{-4} \sim 10^{-6}$, 前者是后者的 400~ 40 000 倍, 表明富集的噬菌体克隆与 AgEG2 的亲合力显著高于其它克隆。



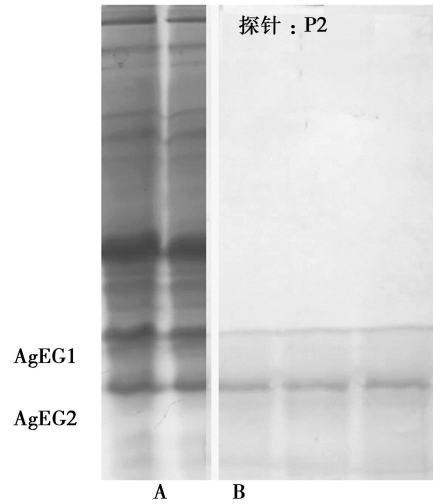
b1~ b11 为噬菌体克隆, CK 为未筛选的噬菌体肽库。

结果为 3 次实验的平均值 (示标准差)

图 2 筛选出的噬菌体克隆对 AgEG2 的结合回收比

2.5 P2 与内切葡聚糖酶的结合作用

为进一步验证短肽 P2 的结合特性, 合成了该短肽序列并进行了 Western 分析 (图 3)。从图 3 B 可以看出, 短肽 P2 仅与尼龙膜上的 AgEG1 和 AgEG2 两条蛋白带有结合作用, 而对纤维素酶提取液中的其它蛋白组分没有吸附作用, 表明短肽对光肩星天牛的内切葡聚糖酶有特异结合作用。由图 3A 可见, 光肩星天牛粗酶液中 AgEG1 的含量大于 AgEG2 而图 3 B 中, 短肽 P2 对 AgEG1 的杂交信号反而比 AgEG2 弱, 表明该短肽与 AgEG2 的结合能力比对 AgEG1 的结合能力更强。



A: 光肩星天牛幼虫纤维素酶粗酶液 native-PAGE;

B: 短肽 P2 作为探针与纤维素酶提取液印迹膜进行 Western 分析

图 3 合成肽 (P2) 与内切葡聚糖酶的特异结合作用

3 讨论

本研究利用噬菌体展示技术进行了筛选天牛纤维素酶特异结合活性短肽的尝试。由于对天牛内切葡聚糖酶的结构特性缺乏了解, 因此研究选用了库容量较大的随机七肽噬菌体库。

纤维素酶是由多种组分构成的复合酶系^[18], 组成复杂, 因此纯化困难, 通常的蛋白纯化方法易导致酶分子的天然构象发生改变而失去活性。本研究以非变性聚丙烯酰胺凝胶中洗脱回收的内切葡聚糖酶作为靶分子, 既简便易行, 又能很好地保持其原来的构型和酶活性。但酶液中残留的大量聚丙烯酰胺凝胶短链分子会吸附肽库中与其特异结合的噬菌体, 造成了前期筛选所获的富集噬菌体, 经检测均对聚丙烯酰胺特异结合, 而与酶无结合作用。为避免酶液中短链聚丙烯酰胺分子影响筛选结果, 对筛选程序进行了改进, 将噬菌体展示原库以及每轮筛选的

噬菌体首先与空白聚丙烯酰胺凝胶的洗脱液吸附, 以去除噬菌体展示库中与聚丙烯酰胺分子特异结合的噬菌体, 然后再与靶分子进行吸附, 确保所筛选出的结合序列是酶分子的特异结合序列。每轮筛选的噬菌体回收比、最后一轮筛选的单克隆噬菌体结合力分析均表明, 改进的筛选方法能成功去除噬菌体库中与聚丙烯酰胺分子特异结合的噬菌体克隆, 所筛选出的富集噬菌体是通过与酶分子的特异结合而获得, 这证明以上改进是有效的, 与靶分子特异结合的噬菌体得到了有效富集。

为证明所获短肽 TPHRSP 可特异结合光肩星天牛内切葡聚糖酶, 合成了短肽 P2。通过 Western 分析, 发现 P2 不但结合 AgEG2 而且和 AgEG1 也有亲和结合作用, 而对粗酶液中的其它酶和蛋白却没有结合作用。这证明了该短肽本身对内切葡聚糖酶有较强的结合作用, 同时也表明 AgEG1 和 AgEG2 为同工酶甚至为同位酶, 它们可能会有较高的氨基酸序列同源性及类似的结构。许多研究表明, 同一物种的内切葡聚糖酶同工酶往往有高度的序列同源性, 例如马铃薯线虫 *Globodera rostochiensis* (Wollenweber) 的两个内切葡聚糖酶同工酶 G₁EG1 和 G₂EG2 的分子量分别为 49.7KD 和 42KD, 而其 cDNA 在 5' 端有 95% 的同源性^[19]。同样, 黄胸散白蚁 *Reticulitermes speratus* (Kolbe) 的两个内切葡聚糖酶同工酶 R₁EG1 和 R₂EG2 的氨基酸序列有 98% 的同源性^[20]。

初步测定了 P2 与 AgEG1 和 AgEG2 结合后对其活性的影响, 结果酶活性没有明显的改变。原因可能是短肽与酶分子的结合位点不是其活性作用的关键部位, 不至于影响其催化功能。虽然对酶活性没有明显抑制作用, 但这些都与 AgEG1 和 AgEG2 特异结合的短肽同样具研究和运用前景: (1) 短肽可作为标记, 研究天牛内切葡聚糖酶的诱导效应及在肠道的分布特性, 从而揭示天牛的消化和食性的机理, 为开发天牛消化酶抑制剂奠定生物学基础; (2) 短肽可作为“向导”, 与能抑制纤维素酶活性的物质相连, 使之更有效地找到靶部位, 增强对酶的抑制作用, 或结合能杀天牛的毒蛋白^[21], 避免由于天牛食性强、食物滞留时间短而造成毒蛋白在肠道中发挥作用不充分; (3) 短肽与其它大分子物质相连, 与纤维素酶分子结合后形成物理障碍, 影响纤维素酶的催化活性。因此特异结合短肽的获得为开发杀天牛生物制剂或增加其杀虫效果奠定了基础。

参考文献:

- [1] 张星耀, 骆有庆. 中国森林重大生物灾害 [M]. 北京: 中国林业出版社, 2003. 30~32
- [2] 骆有庆, 李建光. 杨树灾害控制的应用技术和基础研究策略 [J]. 北京林业大学学报, 1999. 21(4): 6~12
- [3] 骆有庆, 刘荣光, 许志春, 等. 防护林杨树天牛灾害的生态调控理论与技术 [J]. 北京林业大学学报, 2002. 24(5): 160~164
- [4] Chen M in, Lu M engzhu, Zhang zhiyi. Characteristics of cellulases from *Anoplophora glabripennis* Motsch (Coleoptera: Cerambycidae) [J]. Forestry Studies in China. 2002, 4(2): 43~47
- [5] 李庆. 天牛消化纤维素的机制研究 [J]. 林业科学, 1991, 27(4): 417~424
- [6] 殷幼平, 程金秋, 蒋书楠. 桑粒肩天牛纤维素酶的性质研究 [J]. 林业科学, 1996. 32(5): 454~459
- [7] 蒋书楠, 殷幼平, 王中康. 几种天牛纤维素酶的来源 [J]. 林业科学, 1996. 32(5): 441~446
- [8] 索风梅, 林长春, 王浩杰, 等. 松墨天牛纤维素酶的研究 I 纤维素酶性质研究 [J]. 林业科学研究, 2004, 17(5): 583~589
- [9] 殷幼平, 曹月青, 何正波, 等. 桑粒肩天牛 3 种纤维素消化酶的分布 [J]. 林业科学, 2000. 36(6): 82~85
- [10] 吴明, 丁中文. 纤维素酶抑制剂对松墨天牛消化生理的影响 [J]. 浙江林业科技, 2003, 23(1): 1~4
- [11] Devlin J J, Panganiban LC, Devlin P E. Random peptide libraries: a source of specific binding molecules [J]. Science. 1990. 249: 404~405
- [12] McGregor D. Selection of protein and peptides from libraries displayed on filamentous bacteriophage [J]. Molecular Biotechnology, 1996. 6: 155~162
- [13] Smith G P, Petrenko V A. Phage display [J]. Chem Rev. 1997. 97(2): 391~410
- [14] Wang C J, Yang Q, Crak C S. Isolation of a high inhibitor of urokinase-type plasminogen activator by phage display of ecotin [J]. J Biol Chem, 1995. 270: 12250~12256
- [15] Willits W G T. Phage display: Practicalities and prospects [J]. Plant Molecular Biology. 2002. 50: 837~854
- [16] Wilson D R, Finlay B B. Phage display: applications, innovations and issues in phage and host biology [J]. Can J Microbiol. 1998. 44: 313~329
- [17] 梁国栋. 最新分子生物学实验技术 [M]. 北京: 科学出版社, 2001
- [18] Bayar E A. Properties of cellulytic enzyme [J]. Biochem Soc Trans. 1985. 13: 407~410
- [19] Snant G, Stokkeman J, Yan Y, et al. Endogenous cellulases in animals: isolation of Br1, 4-endoglucanase genes from two species of plant parasitic cyst nematodes [J]. Proc Natl Acad Sci U S A. 1998. 95: 4096~4911
- [20] Tokuda G, Lo N, Watanabe H, et al. Metazoan cellulase genes from termites: intron/exon structures and sites of expression [J]. Biochim Biophys Acta. 1999. 1447: 146~159
- [21] Chen Jun, Dai Lian-Yun, Wang Xue-Pin, et al. The cry3A gene of *Bacillus thuringiensis* B886 encodes a toxin against longhorned beetles [J]. Appl Microbiol Biotechnol. 2005. 67: 351~356