

DOI:CNKI:61-1390/S.20111021.1707.015

网络出版时间:2011-10-21 17:07

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/61.1390.S.20111021.1707.015.html>

# 大肠杆菌 *cysE* 和 *cysM* 基因的克隆、原核表达及多克隆抗体的制备

方 堃,白丁平,陈玉林

(西北农林科技大学 动物科技学院,陕西 杨凌 712100)

**【摘 要】 【目的】**克隆大肠杆菌半胱氨酸合成酶(包括丝氨酸乙酰转移酶(*cysE*)和 O-乙酰丝氨酸硫化氢解酶(*cysM*))的基因,对其进行原核表达,并制备相应蛋白的抗体。**【方法】**用 PCR 方法从大肠杆菌 BL21(DE3)中扩增 *cysE* 和 *cysM* 基因,构建其原核表达载体 pET32a(+)-*cysE* 和 pET32a(+)-*cysM*,对其进行 *Bam*H I 和 *Sac* I 双酶切鉴定和测序验证后转入大肠杆菌中进行诱导表达,对表达产物进行 SDS-PAGE 和 Western blot(以 His 抗体作为一抗)检测。用纯化的 *cysE* 和 *cysM* 蛋白作为抗原免疫新西兰大白兔,制备多克隆抗体,并通过酶联免疫吸附试验(ELISA)检测抗体效价。**【结果】**PCR 获得了 822 bp 的 *cysE* 基因和 912 bp 的 *cysM* 基因。原核表达质粒 pET32a(+)-*cysE* 和 pET32a(+)-*cysM* 构建成功,并可在大肠杆菌 BL21(DE3)中诱导表达,表达的 *cysE* 和 *cysM* 重组蛋白分子质量分别为 56 和 58 ku。制备的多克隆抗体具有较强的免疫结合活性,抗体滴度均达到 1:102 400。**【结论】**成功克隆了大肠杆菌 *cysE* 和 *cysM* 基因,并实现了原核表达,同时制备出了相应的多克隆抗体。

**【关键词】** 大肠杆菌;丝氨酸乙酰转移酶基因;O-乙酰丝氨酸硫化氢解酶基因;基因克隆

**【中图分类号】** S813.3

**【文献标识码】** A

**【文章编号】** 1671-9387(2011)11-0035-06

## Cloning, prokaryotic expression of *Escherichia coli cysE*, *cysM* and preparation of their antibodies

FANG Kun, BAI Ding-ping, CHEN Yu-lin

(College of Animal Science, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

**Abstract: 【Objective】** Cloning of *cysE* and *cysM* gene which encoded cysteine synthetase, prokaryotic expressing the enzymes and preparing their antibodies are preliminary work for the production of transgenic cashmere goat. **【Method】** *cysE* and *cysM* gene were amplified by PCR. Two recombinant prokaryotic expression vectors pET32a(+)-*cysE* and pET32a(+)-*cysM* were constructed by using molecular technique, and then they were transferred into *Escherichia coli* BL21 (DE3) to induce protein expression with IPTG. An anti-His antibody was used as the first antibody in Western blot. The purified recombinant proteins were used as antigens to immunize rabbits for preparation of polyclonal antibodies. The titers of *cysE* and *cysM* antibodies were detected by ELISA. **【Result】** The *cysE* and *cysM* genes are amplified by PCR. The *cysE* gene is 822 bp, and *cysM* gene is 912 bp. Prokaryotic expression vectors pET32a(+)-*cysE* and pET32a(+)-*cysM* are successfully constructed, and highly expressed in *Escherichia coli* BL21 (DE3) induced with IPTG, the molecular weights of recombinant *cysE* and *cysM* proteins are 56 and 58 ku. The expressed products are correctly identified by SDS-PAGE and Western blot. Two high titer antibodies (both

\* [收稿日期] 2011-05-04

[基金项目] 农业部转基因生物新品种培育重大专项(2008ZX08008-002)

[作者简介] 方 堃(1986—),男,陕西西安人,在读硕士,主要从事动物遗传资源研究。E-mail: agentk5586@gmail.com

[通信作者] 陈玉林(1964—),男,河南鄢陵人,教授,主要从事动物遗传资源研究。E-mail: chenylun@nwsuaf.edu.cn

1 : 102 400) are obtained by immunizing rabbit with the purified protein. 【Conclusion】 Cloning, prokaryotic expression and polyclonal antibody preparation methods and techniques of *Escherichia coli cysE* and *cysM* gene are successfully established. *cysE* and *cysM* protein from prokaryotic expression are identified and purified. The preparation of recombinant *cysE*, *cysM* and their polyclonal antibodies has provided reliable tools for the future study in the transgenic sheep of cysteine biosynthesis gene.

**Key words:** *Escherichia coli*; *cysE* gene; *cysM* gene; gene cloning

山羊绒纤维细长、均匀、柔软、弹性好、光泽柔和、强度高,是毛纺工业的高档原料,在国际市场被称作“软黄金”,具有极高的经济价值。山羊绒毛的主要组成成分是角蛋白,角蛋白又由多种氨基酸组成,其中谷氨酸和胱氨酸的含量最高<sup>[1]</sup>,胱氨酸是含硫氨基酸。因此蛋白质营养特别是含硫氨基酸营养对绒毛的生长至关重要。国内外研究表明,在日粮中添加半胱氨酸能够提高山羊绒的产量<sup>[2-5]</sup>。但是,羊等哺乳动物自身不能直接合成半胱氨酸,只能依靠反式硫化蛋氨酸来间接合成半胱氨酸<sup>[6]</sup>,效率和产量均较低。

通过转基因工程,将半胱氨酸合成酶基因转移至绒山羊体内,使得羊体自身能够高效地合成半胱氨酸,则山羊绒的产量和品质会有一个质的飞跃。一般通过生物途径合成半胱氨酸时,首先将丝氨酸和乙酰辅酶 A 在丝氨酸乙酰转移酶(*cysE* 基因编码)的作用下,转化生成 O-乙酰丝氨酸和辅酶 A,前者再经过 O-乙酰丝氨酸硫化氢解酶(*cysM* 基因编码)的作用和硫化氢反应,最终合成半胱氨酸<sup>[7-11]</sup>。可见,*cysE* 和 *cysM* 是半胱氨酸生物合成通路中催化酶的编码基因。

目前,国外对半胱氨酸合成酶基因 *cysE* 和 *cysM* 的研究主要集中在其结构与功能及其编码蛋白的合成通路上。Bawden 等<sup>[6]</sup>从鼠伤寒沙门氏菌(*Salmonella typhimurium*)中克隆出半胱氨酸合成酶基因,将其转至小鼠和绵羊,结果在哺乳动物体内实现了 *cysE* 和 *cysM* 的共表达。Zhao 等<sup>[8]</sup>通过对 *cysM* 的克隆表达和分离纯化,发现了 *cysM* 对非蛋白质氨基酸合成具有广泛的底物特异性。Salsi 等<sup>[12]</sup>利用荧光光谱对 *cysM* 蛋白进行分析,发现 *cysM* 对于反应底物同时具有高灵活性和特异性。目前国内对 *cysE* 和 *cysM* 基因的研究还鲜有报道。本研究通过 PCR 扩增大肠杆菌半胱氨酸合成酶的 *cysE* 和 *cysM* 基因,构建质粒载体进行原核表达,并制备相应的蛋白多克隆抗体,以期对半胱氨酸合成酶转基因绒山羊研究奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材 料

大肠杆菌(*Escherichia coli*) BL21 (DE3) 和 DH5 $\alpha$  株购自天根公司,原核表达载体 pET32a(+) 为 Novagen 公司产品,限制性核酸内切酶 *Bam*H I 和 *Sac* I、*Taq* DNA 聚合酶为 TAKARA 公司产品,T4 DNA 连接酶为 Fermentas 公司产品,His 标签一抗、HRP 标记的羊抗兔 IgG 二抗为沃尔森公司产品,其余化学试剂均为进口或国产分析纯。

### 1.2 方 法

1.2.1 pET32a(+)-*cysE* 和 pET32a(+)-*cysM* 重组表达质粒的构建与鉴定 根据 GenBank 公布的大肠杆菌 REL606 株 *cysE* 和 *cysM* DNA 序列(GenBank 号分别为 8177668 和 8176794),设计引物:*cysE* 上游引物:5'-CCG GGATCCGTGAGTAC ATTAGAA-3',下游引物 5'-AAT GAGCTCTTAA ATCCCCGCC-3';*cysM* 上游引物:5'-ACA GGAT CCATGTCGTGTGAAGAA-3',下游引物:5'-ATA GAGCTCTTAGATCCCATCCCCA-3'。上、下游引物中下划线碱基分别为引入的 *Bam*H I 和 *Sac* I 酶切位点。引物由南京金斯瑞公司合成。

以大肠杆菌基因组 cDNA 为模板,PCR 扩增 *cysE* 和 *cysM* 基因。PCR 反应总体积为 25.0  $\mu$ L,其中上、下游引物(10 mmol/L)各 1.0  $\mu$ L,cDNA 模板(10 mmol/L) 2.0  $\mu$ L,PCR Mix 12.5  $\mu$ L,补 ddH<sub>2</sub>O 至 25.0  $\mu$ L。PCR 扩增条件为:94  $^{\circ}$ C 预变性 5 min;94  $^{\circ}$ C 变性 30 s,58  $^{\circ}$ C 退火 45 s,72  $^{\circ}$ C 延伸 1.5 min,进行 35 个循环;最后延伸 10 min。取扩增产物,进行 20 g/L 琼脂糖凝胶电泳并切胶回收。

用 *Bam*H I、*Sac* I 对 PCR 产物和原核表达载体 pET32a(+) 分别进行双酶切,回收目的片段,在 T4 连接酶的作用下连接,构建 pET32a(+)-*cysE* 和 pET32a(+)-*cysM* 重组质粒,将连接产物转入大肠杆菌 DH5 $\alpha$  中培养,取单克隆进行 *Bam*H I 和 *Sac* I 双酶切鉴定后送南京金斯瑞公司进行测序。

1.2.2 *cysE* 和 *cysM* 蛋白的原核表达与纯化 将

重组质粒 pET32a(+)-*cysE* 和 pET32a(+)-*cysM* 转入宿主菌 BL21 (DE3) 中,于 37 ℃ 下,用 1 mmol/L IPTG 诱导表达,分别于 2,4,6 h 取样备检。取上述收集的样品,4 ℃ 恒温、12 000 r/min 离心 5 min,收集菌体,用 PBS 洗涤 3 次,重悬于 PBS 中,4 ℃ 下超声波破碎。取超声波破碎后的样品,4 ℃ 恒温、12 000 r/min 离心 15 min,取上清液,进行 SDS-PAGE 电泳,用考马斯亮蓝 R-250 染色,鉴定目的蛋白的相对分子质量和表达产量。

由于重组蛋白含有组氨酸标签(His-Tag),故用 Ni-Agrose 亲和层析柱对其进行纯化,收集目的蛋白备用。

1.2.3 *cysE* 和 *cysM* 蛋白的 Western blot 检测  
将纯化的 *cysE* 和 *cysM* 蛋白进行 SDS-PAGE 电泳,电泳后的产物转移至 PVDF 膜上,以免抗 His 单克隆抗体为一抗,HRP 标记的羊抗兔 IgG 为二抗,进行 Western blot 检测,显色后进行曝光,记录图像结果。

1.2.4 *cysE* 和 *cysM* 蛋白多克隆抗体的制备  
取 4 只新西兰大耳白兔,采血 1~5 mL,分离血清,作为抗体效价检测时的阴性对照。将纯化的 *cysE* 和 *cysM* 蛋白分别与等体积弗氏完全佐剂混匀并充分乳化后,于试兔腹部两侧多点皮内注射,进行首次免疫,剂量为 500 μg/只,10 d 后,进行增强免疫(免疫佐剂改为弗氏不完全佐剂),增强免疫共进行 4 次,每次间隔 7 d,38 d 后心脏采血,分离兔血清。

1.2.5 抗体效价的检测  
首先采用方阵滴定法确定 *cysE* 和 *cysM* 融合蛋白抗原包被的质量浓度以及血清最佳稀释度。用包被液将重组蛋白稀释为 20,10,5,2.5 mg/L,包被酶标板(0.10 mL/孔,每个质量浓度重复 3 孔),37 ℃ 孵育 1 h 后于 4 ℃ 作用过夜。同时,用稀释液将阳性血清(一抗)作 1:100~1:400 的倍比稀释,组成方阵,进行间接 ELISA。选择阳性血清  $OD_{450}$  值在 1 左右、 $P/N$  值( $P/N$ =阳性对照孔  $OD_{450}$  均值/阴性对照孔  $OD_{450}$  均值)最大时的抗原包被质量浓度和一抗稀释度为最佳稀释度。

采用间接 ELISA 法检测抗体效价。分别以纯化的重组 *cysE* 和 *cysM* 蛋白(质量浓度 10 mg/L)作为包被抗原包被酶标板(0.10 mL/孔),4 ℃ 过夜,次日弃去孔内溶液,用洗涤缓冲液洗涤 3 次。于上述已包被的反应孔中加入按一定比例(体积比 1:400,1:800,1:1 600,1:3 200,1:6 400,1:

12 800,1:25 600,1:51 200,1:102 400)稀释的待检血清 0.10 mL,置 37 ℃ 孵育 1 h,洗涤;加入 0.10 mL 二抗(HRP 标记的羊抗兔 IgG,工作浓度为 1:4 000),37 ℃ 孵育 1 h,用洗涤缓冲液洗 2 次,用双蒸水洗涤 1 次,晾干;向各反应孔中加入现配的 TMB 显色液 0.10 mL,于 37 ℃ 下显色 10~30 min,加入 2 mol/L 硫酸 0.05 mL 终止反应;反应孔内的颜色越深说明其阳性程度越高,用空白孔调零,使用酶标仪于紫外线 450 nm 处测定各孔的  $OD_{450}$  值,若反应孔  $OD_{450}$  值大于阴性对照孔  $OD_{450}$  值的 2.1 倍则判为阳性。

## 2 结果与分析

### 2.1 大肠杆菌 *cysE* 和 *cysM* 基因的克隆及重组质粒的构建与鉴定

根据 GenBank 公布的资料,*cysE* 序列全长 822 bp,*cysM* 序列全长 912 bp。本试验 *cysE* 和 *cysM* 基因经 PCR 扩增后,电泳结果表明获得了与预期长度相近的片段(图 1)。重组质粒 pET32a(+)-*cysE* 和 pET32a(+)-*cysM* 经 *Bam*H I 和 *Sac* I 双酶切鉴定,分别出现了 822 和 912 bp 的片段(图 2),与预期结果一致。阳性质粒的测序结果与 GenBank 报道的基因序列完全相符。结果表明获得了正确的 *cysE* 和 *cysM* 基因序列,并且成功构建了试验所需的原核表达载体。

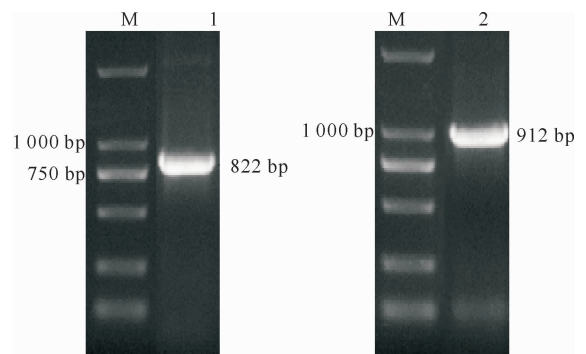


图 1 大肠杆菌 *cysE* 和 *cysM* 基因 PCR 产物的电泳检测

M. DL2000 Marker;1. *cysE* 基因 PCR 产物;  
2. *cysM* 基因 PCR 产物

Fig.1 Analysis of PCR products of *cysE* and *cysM* by agarose gel electrophoresis

M. DL2000 marker;1. *cysE* gene;2. *cysM* gene

### 2.2 大肠杆菌 *cysE* 和 *cysM* 重组蛋白的表达、纯化与鉴定

本试验采用 pET32a(+)-表达系统,将带有外源

基因的载体转入大肠杆菌 BL21(DE3)中高效表达，表达的目的蛋白连接在 6 个 His-Tag 之后，可与前面的 Trx-tag 和 S-tag(分子质量约为 26 ku)形成融合蛋白，便于纯化与分离。cysE 蛋白的分子质量约为 30 ku((822-3)/3×128)，cysM 蛋白的分子质量约为 32 ku((912-3)/3×128)。由此推测 cysE 和 cysM 重组融合蛋白的分子质量分别为 56 和 58 ku。本试验 SDS-PAGE 结果显示，在约 50 ku 处出现了目的蛋白条带(图 3)，与理论值一致。凝胶扫描分析结果显示，重组蛋白表达量超过了全菌蛋白表达量的 25%，表明 pET32a(+)-cysE 和 pET32a(+)-cysM 可在 BL21(DE3)中高效表达。

从 Western blot 测定结果(图 4)可见，使用按 1：1 000 比例稀释的兔抗血清作为一抗，可在蛋白 Marker 分子质量约 55 ku 处检测到目的融合蛋白的条带，说明本试验所制备的兔抗血清对 cysE 和 cysM 融合蛋白具有良好的特异性，可与抗原发生特

异性免疫结合。

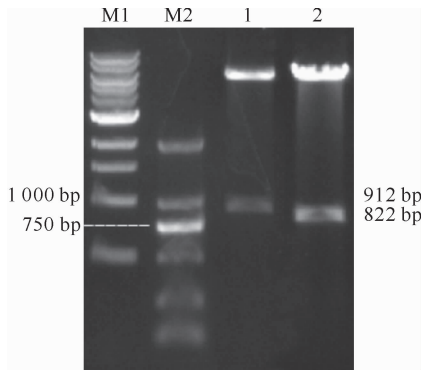


图 2 pET32a(+)-cysE 和 pET32a(+)-cysM 的 *Bam*H I 和 *Sac* I 双酶切鉴定结果  
M1. 1 kb Marker; M2. DL2000 Marker;  
1. pET32a(+)-cysM; 2. pET32a(+)-cysE

Fig. 2 Analysis of restriction enzymes analysis by agarose gel electrophoresis

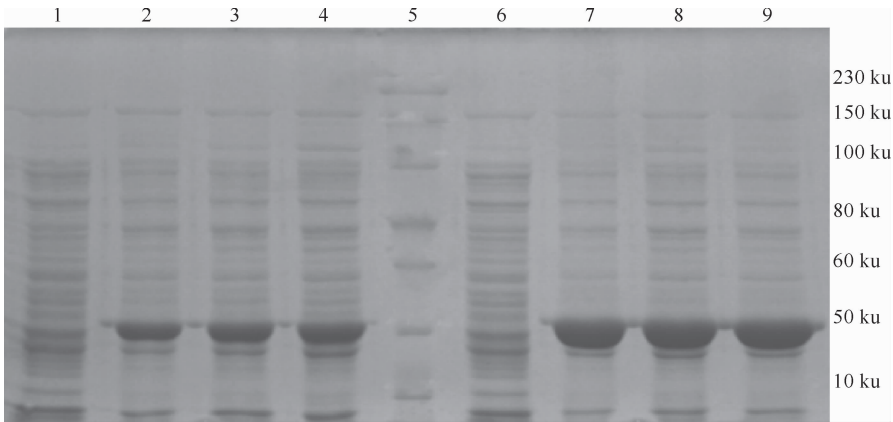


图 3 pET32a(+)-cysE 和 pET32a(+)-cysM 诱导表达产物的 SDS-PAGE 电泳分析

1, 6. 空白对照蛋白; 2~4. pET32a(+)-cysE 经 IPTG 诱导 2, 4, 6 h; 5. 蛋白 Marker;  
7~9. pET32a(+)-cysM 经 IPTG 诱导 2, 4, 6 h

Fig. 3 cysE, cysM proteins expression identified with SDS-PAGE

1, 6. Control protein; 2-4. Induced by IPTG of pET32a(+)-cysE about 2, 4, 6 h; 5. Protein Marker;  
7-9. Induced by IPTG of pET32a(+)-cysM about 2, 4, 6 h

### 2.3 大肠杆菌 cysE 和 cysM 蛋白多克隆抗体效价的测定

利用纯化后重组表达的 cysE 和 cysM 蛋白免疫新西兰兔，通过方阵滴定法，在阳性血清  $OD_{450}$  值接近 1.0、P/N 值最大(为  $9.934 \pm 1.474$ )时，确定包被抗原的最佳质量浓度为 10 mg/L，抗体最佳的稀释度为 1：400。

采用间接 ELISA 测定抗体血清效价，结果见表 1。由表 1 可知，与阴性对照相比，cysE 和 cysM 有

效抗体滴度均达到了 1：102 400，表明制备的抗体具有较强的免疫结合活性。

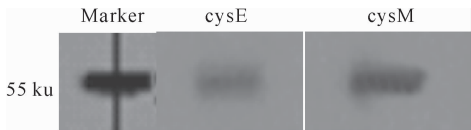


图 4 cysE 和 cysM 重组蛋白的 Western blot 鉴定

Fig. 4 Identification of recombinant cysE, cysM protein by Western blot

表 1 *cysE* 和 *cysM* 抗体血清效价的 ELISA 法检测  
Table 1 Detection of *cysE*,*cysM* antibody (rabbit serum) with ELISA

| 抗体<br>Antibody                         | 不同稀释度的 <i>OD</i> <sub>450</sub> 值<br><i>OD</i> <sub>450</sub> value of different dilutions |         |           |           |           |            |            |            |             | 阴性对照<br><i>OD</i> <sub>450</sub><br>Contrast |
|----------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------|---------|-----------|-----------|-----------|------------|------------|------------|-------------|----------------------------------------------|
|                                        | 1 : 400                                                                                    | 1 : 800 | 1 : 1 600 | 1 : 3 200 | 1 : 6 400 | 1 : 12 800 | 1 : 25 600 | 1 : 51 200 | 1 : 102 400 |                                              |
| <i>cysM</i> 抗体<br><i>cysM</i> antibody | 3. 057                                                                                     | 2. 960  | 2. 841    | 2. 770    | 2. 292    | 1. 931     | 1. 258     | 0. 736     | 0. 480      | 0. 045                                       |
| <i>cysE</i> 抗体<br><i>cysE</i> antibody | 2. 893                                                                                     | 2. 833  | 2. 758    | 2. 690    | 2. 524    | 2. 419     | 2. 229     | 1. 604     | 0. 944      | 0. 065                                       |

3 讨 论

*cysE* 和 *cysM* 是半胱氨酸生物合成通路催化酶的编码基因。半胱氨酸对于蛋白质、次生代谢产物、辅酶和相关化合物的合成至关重要<sup>[13]</sup>。同时,胱氨酸又是羊绒纤维的重要组成部分,与羊绒产量和羊绒品质有着直接联系<sup>[14-15]</sup>。在日粮中添加半胱胺,可以明显改善山羊绒毛的品质<sup>[16]</sup>。

本试验采用 pET32a(+)原核载体,该载体可编码用于检测和纯化的 His-Tag,所以目的蛋白对 Ni 离子有很强的亲和力,可利用 Ni-Agrose 层析柱来纯化目的蛋白。选用溶原菌 BL21(DE3)作为外源蛋白的表达菌株,有利于高效表达目的蛋白。由于目的蛋白来自原核生物,所以在表达时一般不会产生包涵体。以纯化的 *cysE* 和 *cysM* 蛋白分别免疫 4 只新西兰大耳白兔,制备出具有特异性的多克隆抗体,经过 ELISA 检测,制备的抗体对抗原具有高效的免疫结合能力。

本试验 SDS-PAGE 结果显示,相同体积菌液在相同质量浓度 IPTG 的诱导下,*cysM* 蛋白的表达量大约是 *cysE* 蛋白表达量的 2 倍。表明 *cysE* 和 *cysM* 蛋白的最优表达条件不同,下一步的研究可对 *cysE* 蛋白的最佳表达条件进行摸索。后续试验可利用已获得的目的基因,构建真核表达载体,转染细胞进行真核表达,对表达条件进行优化,并用已获得的兔抗血清进行 Western blot,检测抗体的特异性。

4 结 论

成功克隆到大肠杆菌 *cysE* 和 *cysM* 基因,构建了其原核表达质粒 pET32a(+)-*cysE* 和 pET32a(+)-*cysM*,并在大肠杆菌 BL21(DE3)中实现了高效诱导表达,得到的 *cysE* 和 *cysM* 蛋白经 SDS-PAGE 和 Western blot 鉴定正确,制备的多克隆抗体具有较强的免疫结合活性,抗体滴度均达到 1 : 102 400。建立了大肠杆菌 *cysE* 和 *cysM* 基因的克隆、原核表达及多克隆抗体制备方法,为进一步研究半胱氨酸合成酶转基因羊奠定了技术基础。

[参考文献]

[1] 达文致,达文政. 山羊绒毛与绵羊奶化学成分研究 [J]. 现代农业科技,2009(5):208-209.  
Da W Z, Da W Z. Analyze chemical composition of cashmere wool and sheep milk [J]. Modern Agricultural Sciences and Technology, 2009(5):208-209. (in Chinese)

[2] 刘海斌,胡 锐,蔡凤坤,等. 蛋白水平对舍饲辽宁绒山羊产绒性能及消化代谢的影响 [J]. 吉林农业大学学报,2010,32(1): 89-94.  
Liu H B, Hu R, Cai F K, et al. Effects of protein level on production performance of cashmere and digestion and metabolism in feed-lot Liaoning cashmere goats [J]. Journal of Jilin Agricultural University, 2010, 32(1):89-94. (in Chinese)

[3] 程善燕,张英杰. 山羊绒生长机理及营养调控的研究进展 [J]. 中国草食动物,2010,30(1):63-65.  
Cheng S Y, Zhang Y J. Research in growth mechanism and nutritional regulation of cashmere [J]. China Herbivores, 2010, 30(1):63-65. (in Chinese)

[4] 涂吉华,贾志海,那仁巴图,等. 补饲不同蛋白质水平精料对放牧绒山羊生产性能的影响 [J]. 草食家畜,2008(2):33-37.  
Tu J H, Jia Z H, Naren B T, et al. Effects of different protein levels of mixed concentration on performance of grazing cashmere goats [J]. Grass-Feeding Livestock, 2008(2):33-37. (in Chinese)

[5] Galbraith H. Protein and sulphur amino acid nutrition of hair fibre-producing angora and cashmere goats [J]. Livestock Production Science, 2000, 64(1):81-93.

[6] Bawden C S, Sivaprasad A V, Verma P J, et al. Expression of bacterial cysteine biosynthesis genes in transgenic mice and sheep-toward a new *in-vivo* amino-acid biosynthesis pathway and improved wool growth [J]. Transgenic Research, 1995, 4(2):87-104.

[7] Turnbull A L, Surette M G. Cysteine biosynthesis, oxidative stress and antibiotic resistance in salmonella typhimurium [J]. Research in Microbiology, 2010, 161(8):643-650.

[8] Zhao C, Kumada Y, Imanaka H, et al. Cloning, overexpression, purification, and characterization of o-acetylserine sulfhydrylase-b from *Escherichia coli* [J]. Protein Expression and Purification, 2006, 47(2):607-613.

[9] Garvis S G, Tipton S L, Konkell M E. Identification of a functional homolog of the *Escherichia coli* and salmonella typhimurium *cysM* gene encoding o-acetylserine sulfhydrylase b in campylobacter jejuni [J]. Gene, 1997, 185(1):63-67.

- ## 关于加入“论文网上优先数字出版”的重要启事

2011 年 6 月 8 日