

## 大肠杆菌外膜蛋白酶基因 *OmpT* 的克隆及表达

董世雷<sup>1,2</sup>, 刘伟<sup>2</sup>, 朱立颖<sup>2</sup>, 王学琴<sup>3</sup>, 于宏伟<sup>4</sup>, 王欣<sup>2</sup>

(1. 浙江师范大学化学与生命科学学院, 浙江 金华 321004; 2. 浙江省农业科学院植物保护与微生物研究所, 杭州 310021; 3. 内蒙古工业大学化工学院, 呼和浩特 010051; 4. 马歇尔大学微生物学与免疫学院, 亨廷顿 25755, 美国)

**摘要:** *OmpT* (Outer-membrane proteases T) 是革兰氏阴性细菌分泌到细胞表面具有丝氨酸蛋白酶活性的一种重要蛋白。利用大肠杆菌 *OmpT* 降解抗菌肽特性来筛选和改造新型抗菌肽, 可以为开发抗 *OmpT* 蛋白酶水解新抗菌肽序列提供新的思路和创造条件。根据大肠杆菌外膜蛋白酶 *OmpT* 的基因序列设计一对引物, 应用聚合酶链式反应 (PCR) 方法, 从大肠杆菌 K12 基因组中扩增获得一段为 954 bp 的序列, 测序结果显示此序列与已公布序列同源性达 99.99%。将其序列定向克隆到原核表达载体 pET28a 上构建重组表达质粒 pET28a-*OmpT*。经 IPTG 诱导后, 在表达宿主菌中特异性的表达出分子量约为 36 kDa 且具有生物活性的 *OmpT* 蛋白。生长曲线试验显示, 抗菌肽 LL37 对带重组表达质粒 pET28a-*OmpT* 的大肠杆菌生长没有影响, 而对对照组的生长明显受到抗菌肽的抑制作用。

**关键词:** *OmpT*; 克隆与表达; 外膜蛋白酶; 抗菌肽

**doi:** 10.3969/j.issn.1008-0864.2011.02.08

**中图分类号:** Q786 **文献标识码:** A **文章编号:** 1008-0864(2011)02-0053-06

## Cloning and Expression of *Escherichia coli* Outer Membrane Proteases Gene *OmpT*

DONG Shi-lei<sup>1,2</sup>, LIU Wei<sup>2</sup>, ZHU Li-ying<sup>2</sup>, WANG Xue-qin<sup>3</sup>,  
YU Hong-wei<sup>4</sup>, WANG Xin<sup>1</sup>

(1. College of Chemistry and life Science of Zhejiang Normal Univeristy, Zhejiang Jinhua 321004;  
2. Institute of Plant Protection and Microbiology, Zhejiang Academy of Agricultural Sciences, Hangzhou 310021;  
3. Chemical Engineering College, Inner Mongolia Technology University, Hohhot 010051, China;  
4. School of Microbiology and Immunology, Marshall University, Huntington 25755, USA)

**Abstract:** The outer membrane proteases T (*OmpT*) of *Escherichia coli* is a surface membrane protein with serine protease activity. When *OmpT* could degrade antimicrobial peptide, it was used to screen and reconstruct novel antimicrobial peptide, which provided new idea for developing antimicrobial peptides of *OmpT*. In this paper, a pair of primers was designed according to *OmpT* sequence of *E. coli*, and a 954 bp sequence was obtained by PCR from *E. coli* K12 genome, which had 99.99% similarity with the opened sequence. Then the gene was cloned into the prokaryotic expression vector pET28a to construct the recombinant expression plasmid pET28a-*OmpT*. A specific molecular weight of about 36 kDa of *OmpT* protein that has biological activity was expressed in *E. coli* BL21 after induced by IPTG. With the present of antimicrobial peptide (AMP) LL37, growth of *E. coli* pET28a was inhibited, while the growth of *E. coli* pET28a-*OmpT* was not affected after *OmpT* protein was induced. Current results indicated that *OmpT* could increase the resistance of *E. coli* to the AMP.

**Key words:** *OmpT*; cloning and expression; outer membrane proteases; antimicrobial peptide

*OmpT* (outer-membrane proteases T) 是革兰氏阴性细菌尤其是大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 的一

种重要防御性分子<sup>[1]</sup>, 属于 Omptin 家族。Omptin 家族<sup>[2]</sup> 是一类广泛存在于不同革兰氏阴性肠道

收稿日期: 2010-11-29; 接受日期: 2011-01-26

基金项目: 国际科技合作项目 (2008DFA32080) 资助。

作者简介: 董世雷, 硕士研究生, 主要从事微生物与分子生物学研究。E-mail: dsl166@126.com。通讯作者: 王欣, 研究员, 博士, 主要从事微生物生态与免疫方面的研究。Tel: 0571-86415126; E-mail: xxww101@sina.com

细菌表面蛋白和细菌细胞表面配基的蛋白质家族<sup>[3]</sup>,很多致病菌中都含有该家族蛋白,如 *E. coli* 中的 OmpT 和 OmpP 蛋白<sup>[4]</sup>,肠道沙门氏菌(*Salmonella enterica*)中的 PgtE 蛋白<sup>[5]</sup>,鼠疫耶尔森菌(*Yersinia pestis*)中的 Pla 蛋白<sup>[6]</sup>,亚洲梨火疫病病菌(*Erwinia pyrifoliae*)中的 PlaA 蛋白以及弗氏志贺菌(*Shigella flexneri*)中的 SopA 蛋白<sup>[7]</sup>。OmpT 蛋白参与泌尿道疾患<sup>[8]</sup>、DNA 剪切修复<sup>[9]</sup>、抗菌肽降解等生理过程<sup>[8,10]</sup>,在体外还能使纤溶酶原转化为纤溶酶<sup>[11,12]</sup>。

OmpT 具有特异性切割肽链某些位点的能力,可以将某类蛋白(或多肽)切割成多个肽段使得这类蛋白(或多肽)失活或者被降解成一种新的具有一定生物活性的多肽<sup>[13,14]</sup>。因此, OmpT 蛋白可用于生产生物多肽。但是,大部分抗菌肽在微生物中直接表达时会由于其本身的毒性造成宿主微生物的自杀,因此难以获得高产量的表达产物<sup>[15]</sup>。这已经成为目前微生物抗菌肽基因工程研究与应用的瓶颈。为解决这一难题,许多科研工作者选择了抗菌肽的融合表达;另外,由于某些重要生物多肽片段太小不便于微生物表达及后续纯化,也可以通过融合蛋白的表达来解决<sup>[15]</sup>。利用 *OmpT* 基因缺陷型表达宿主菌株可以人为控制此类融合蛋白的降解,同时间接解决由于片段小造成的表达难的问题。因此有必要对 OmpT 蛋白酶进行克隆和表达以进一步研究其功能,为这些抗菌肽(或其他生物多肽)的研究及生产奠定良好的基础。本实验拟利用 *E. coli* OmpT 降解抗菌肽特异筛选和改造新型抗菌肽,以期开发新型抗菌肽序列提供新的思路。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 酶、载体、引物和主要试剂** Taq DNA 聚合酶、dNTPs、限制性内切酶 *EcoR* I 和 *Xho* I、DNA Marker、5-溴-4-氯-3-吡啶半乳糖苷(X-gal)、异丙基-β-D-硫代半乳糖苷(IPTG)、氨苄青霉素(Amp)均购自 TakaRa 公司;RNaseA、二硫苏糖醇(DTT)、十二烷基硫酸钠(SDS)、苯甲基磺酰氟(PMSF)、甲叉双丙烯酰胺、TEMED、三羟甲氨基甲烷(Tris)购自 Promega 公司;克隆载体 pEASY-T1 Simple、质粒小量快速提取试剂盒、琼脂糖凝

胶 DNA 纯化回收试剂盒、T4 DNA 连接酶均购自北京全式金公司(Transgene);丙烯酰胺、过硫酸铵、甘氨酸、乙二胺、四乙酸(EDTA)、冰乙酸和甲醇等均为国产分析纯试剂;表达载体 pET28a 为本实验室保存;引物合成和核苷酸测序由上海生物工程公司完成。

**1.1.2 培养基** 本实验所用培养基为 LB 液体培养基:酵母抽提物 5 g/L,胰蛋白胨 10 g/L,NaCl 10 g/L,pH 7.0。其中加入 13 g/L 琼脂粉即为 LB 固体培养基。

### 1.2 方法

**1.2.1 引物设计** 从大肠杆菌基因组数据库 EcoGene(<http://ecogene.org/>)中查询得到 *OmpT* 基因的序列,并利用 Vector NTI Advance<sup>TM</sup> 11 设计特异引物:

上游引物(5'→3') P1: GAATTCATGCG-GCCGAAACTTCTG(下划线处为 *EcoR* I 酶切位点);

下游引物(5'→3') P2: CTCGAGGGCGTTCT-TAAAATGTGT(下划线处为 *Xho* I 酶切位点)。

**1.2.2 大肠杆菌基因组总 DNA 的提取** 取 1.5 mL 菌体(DH5α)培养物于一灭菌 EP 管中,12 000 r/min,离心 1 min,弃上清,收集菌体。

加入 400 μL 裂解液(40 mmol/L Tris-醋酸,20 mmol/L 醋酸钠,1 mmol/L EDTA,1% SDS pH 7.8)混匀,置于 37℃ 水浴 1 h。加入 200 μL 5 mol/L NaCl 溶液,混匀后,13 000 r/min 离心 15 min。取上清液,用苯酚抽提两次,氯仿抽提一次。加两倍体积无水乙醇、1/10 体积醋酸钾(3 mol/L,pH 8.0),-20℃ 保存 1h 后 13 000 r/min 离心 15 min,弃上清,沉淀用 70% 乙醇洗两次,置于室温干燥后,溶于 20 μL 水中保存。

**1.2.3 目的基因的获取、克隆及测序** 用大肠杆菌基因组为模板,以 P1/P2 引物扩增 *OmpT* 片段。反应体系(20 μL)如下:ddH<sub>2</sub>O 15.4 μL,模板 0.3 μL,P1 和 P2(20 pmol/L)各 0.5 μL,dNTPs(2.5 mmol/L,含 Mg<sup>2+</sup>)1.0 μL,10 × PCR buffer 2.0 μL,Taq DNA 聚合酶(5 U/L)0.3 μL。反应条件为:95℃ 5 min;94℃ 30 s,55℃ 30 s,72℃ 1 min,30 个循环;72℃ 延伸 10 min;4℃ 保存。PCR 产物于 1% 琼脂糖凝胶中电泳。

PCR 产物用 DNA 凝胶回收试剂盒回收,连接于克隆载体,构建 pEASY-T1 Simple-OmpT 质粒,

并转化 *E. coli* DH5 $\alpha$ , 在抗性平板上进行蓝白斑筛选, 挑取阳性克隆测序。

**1.2.4 原核表达载体的构建** 用 *EcoRI* 和 *XhoI* 双酶切 pEASY-T1 Simple-*OmpT* 质粒, 将目的片段回收后克隆到原核表达载体 pET28a 的 *EcoRI* 和 *XhoI* 位点之间, 构建重组表达质粒 pET28a-*OmpT*, 转化 *E. coli* BL21 (DE3) 感受态细胞, 经质粒电泳及 PCR、双酶切鉴定后送上海生工测序。

**1.2.5 重组菌的诱导表达** 将测序正确的重组表达质粒 pET28a-*OmpT* 和空载体 pET28a 分别转化表达宿主菌 *E. coli* BL21 (DE3) 感受态细胞, 挑取单个转化子接种于含 50 mg/L 卡那霉素 (Kan) 的 LB 液体培养基中, 37 $^{\circ}\text{C}$  振荡培养至 OD<sub>600</sub> 为 0.6~0.8, 加入 IPTG 至终浓度为 0.6 mmol/L, 继续培养 4 h 后, 取 1 mL 菌液, 13 000 r/min 离心 2 min, 弃上清, 以 30  $\mu\text{L}$  双蒸水重新悬浮菌体, 加入等体积的 2 $\times$  Buffer, 沸水浴 5 min, 并迅速置冰浴 5 min 后, 进行 12.5% SDS-PAGE 分析。

**1.2.6 表达蛋白的可溶性研究** 分别用不同的 IPTG 剂量 (0.05 mmol/L、0.15 mmol/L、0.3 mmol/L、0.4 mmol/L、0.6 mmol/L)、培养基 pH (5.0、6.0、7.0、8.0、9.0) 和诱导表达温度 (15 $^{\circ}\text{C}$ 、25 $^{\circ}\text{C}$ 、30 $^{\circ}\text{C}$ 、37 $^{\circ}\text{C}$ ) 进行蛋白可溶性表达条件的优化。收集诱导表达的细菌, 超声破碎后, 于 4 $^{\circ}\text{C}$  15 000 r/min 离心 30 min, 取破碎液上清和沉淀, 处理后对其进行 12.5% SDS-PAGE 分析, 研究表达蛋白的可溶性。

**1.2.7 诱导表达的蛋白活性的研究** LL37 (APD ID: AP00310) 为公认的具有较强杀菌作用的人源阳离子抗菌肽<sup>[16]</sup>, 其序列为: LLGDFFRK-SKEKIGKEFKRIVQRIKDFLRNLVPRTEs, 其杀菌机制复杂, 可能对不同的病原菌存在不同的作用机制, 至今尚未研究透彻<sup>[17-19]</sup>。*OmpT* 蛋白酶能够切断 LL37 中的 RK 位点, 使之失去杀菌活性, 因此可以借助 *OmpT* 蛋白酶与 LL37 的相互作用来检测大肠杆菌所表达的 *OmpT* 的生物活性。

含有重组质粒 pET28a-*OmpT* 的 *E. coli* BL21 在适量 IPTG 的诱导下将会表达 *OmpT* 蛋白酶, 当向已经表达 *OmpT* 蛋白酶的菌液中加入足量的 LL37 后, 若大肠杆菌生长不受影响则说明菌液中存在具有活性的 *OmpT* 蛋白酶, 并将 LL37 中的 RK 切断, LL37 失去杀菌活性; 若大肠杆菌生长受到抑制则说明菌液中存在的是无活性的 *OmpT* 蛋

白酶, 没有全部将 LL37 中的 RK 切断, 菌液中仍存在有杀菌活性的 LL37。

## 2 结果

### 2.1 *OmpT* 基因的 PCR 扩增

PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳, 得到大小约 950 bp 左右的片段, 与预计的 *OmpT* 大小 (954 bp) 一致 (图 1)。

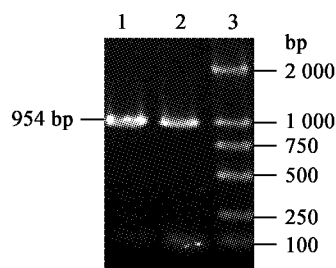


图 1 *OmpT* 基因的 PCR 扩增电泳结果

Fig.1 Electrophoretic result of PCR products.

1~2: PCR 产物; 3: DNA marker DL2000.

1~2: PCR product; 3: DNA marker DL2000.

### 2.2 目的基因的序列测定

将 PCR 产物回收后连接于克隆载体 pEASY-T1 Simple 中, 转化 *E. coli* DH5 $\alpha$ , 经 PCR 和酶切鉴定后测序。结果表明: 所扩增的 *OmpT* 基因片段全长为 954 bp, 编码 317 个氨基酸, 并且含有起始密码子和终止密码子, 与大肠杆菌基因组数据库 EcoGene 中查询得到的 *OmpT* 基因的核苷酸序列具有 99.9% 的同源性, 有 1 个核苷酸突变, 相应的造成一个氨基酸的突变。

### 2.3 重组表达质粒的鉴定

将测序正确的 pEASY-T1 Simple-*OmpT* 质粒经 *EcoRI* 和 *XhoI* 双酶切后克隆至原核表达载体 pET28a 上, 构建重组表达质粒 pET28a-*OmpT*, 转化 *E. coli* BL21 (DE3) 感受态细胞, 经质粒电泳及 PCR 和酶切鉴定筛选得到阳性克隆 (图 2, 图 3)。

### 2.4 表达产物的检测

表达产物经 12.5% SDS-PAGE 检测, 可明显看到在 36 kDa 左右处有一明显蛋白带, 利用 Quantity One 软件分析得知此蛋白表达量约占细菌总蛋白量的 24.6%, 大小与预期结果相符, 而含有空质粒的细菌及未诱导细菌没有明显特征条带, 说明该目的基因成功表达 (图 4)。

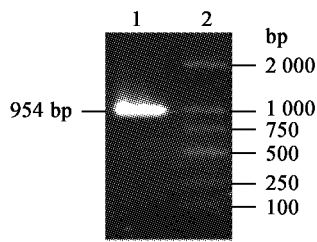


图2 pET28a-OmpT 的 PCR 鉴定结果

Fig.2 PCR product of *OmpT* from pET28a-OmpT.

1: *OmpT*; 2: DNA marker DL2000.

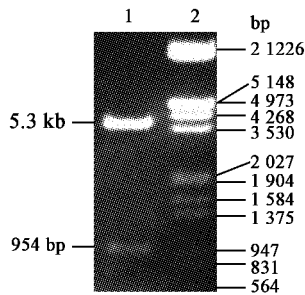


图3 pET28a-OmpT 的酶切鉴定结果

Fig.3 Identification of pET28a-OmpT by restriction enzyme digestion.

1: pET28a-OmpT 质粒经 *EcoR* I / *Xho* I 双酶切; 2:  $\lambda$ DNA/*Hind* III + *EcoR* I Marker.

1: Plasmid pET28a-OmpT digested by *EcoR* I / *Xho* I; 2:  $\lambda$ DNA/*Hind* III + *EcoR* I Marker.

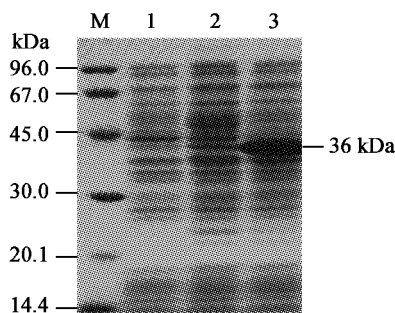


图4 OmpT 蛋白的诱导表达

Fig.4 Expression of *OmpT* from recombinant plasmid pET28a-OmpT.

M: 低分子量标准蛋白质; 1: pET28a/*E. coli* BL21 (DE3) 菌株, 诱导; 2: pET28a-OmpT/*E. coli* BL21 (DE3) 菌株, 未诱导; 3: pET28a-OmpT/*E. coli* BL21 (DE3) 菌株, 诱导

M: Protein marker; 1: Strain pET28a/*E. coli* BL21 (DE3), induced; 2: Strain pET28a-OmpT/*E. coli* BL21 (DE3), uninduced; 3: Strain pET28a-OmpT/*E. coli* BL21 (DE3), induced.

## 2.5 表达产物的可溶性研究及生物活性的检测

分别用不同的 IPTG 剂量、培养基 pH 和诱导表达温度进行蛋白可溶性表达条件的优化,但是

*OmpT* 蛋白绝大部分仍然以包涵体形式存在。

pET28a/*E. coli* BL21 (DE3) 菌株为对照菌株, 是 *OmpT* 基因缺陷型菌株。如图 5A 所示, 在其生长过程中添加 IPTG 与否均不影响细菌的正常生长。而且无论在接种的同时添加浓度为 50  $\mu$ g/mL 的 LL37 还是在生长 2 h 后添加 LL37 (如图中箭头所示), 其生长均受到较为明显的抑制。

pET28a-OmpT/*E. coli* BL21 (DE3) 菌株在一定的条件下可表达一定量的 *OmpT* 蛋白酶。如图 5B 所示, 该菌株无论在接种的同时添加 LL37 还是在生长 2 h 后添加 LL37 (如图中箭头所示), 其生长均不受到影响。

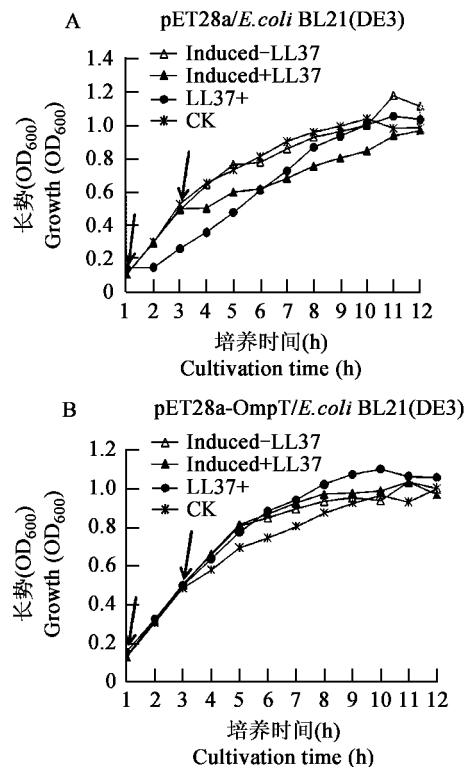


图5 LL37 对菌株 pET28a/*E. coli* BL21 (DE3) 和 pET28a-OmpT/*E. coli* BL21 (DE3) 生长的影响

Fig.5 Effects of LL37 on the growth of pET28a/*E. coli* BL21 (DE3) and pET28a-OmpT/*E. coli* BL21 (DE3).

LL37 + : 在接种之后, 直接加入 LL37 (50  $\mu$ g/mL); CK: 对菌株不做任何处理, 即不加 IPTG 诱导剂, 不加 LL37; Induced-LL37: 在大肠杆菌生长 1 h 后添加 IPTG 诱导剂 (0.1 mmol/L), 不加 LL37; Induced + LL37: 在大肠杆菌生长 1 h 后添加 IPTG 诱导剂 (0.1 mmol/L), 诱导 1 h 后再加入 LL37 (50  $\mu$ g/mL); LL37 + : Add LL37 (50  $\mu$ g/mL) immediately after inoculating; CK: Didn't add IPTG, didn't add LL37; Induced-LL37: Add IPTG (0.1 mmol/L) when *E. coli* BL21 (DE3) grew 1 h, didn't add LL37; Induced + LL37: Add IPTG (0.1 mmol/L) when *E. coli* BL21 (DE3) grew 1 h, add LL37 (50  $\mu$ g/mL) when *E. coli* BL21 (DE3) was induced 1 h.

因此,可推测出 pET28a-*OmpT*/*E. coli* BL21 (DE3) 产生了具有生物活性的 *OmpT* 蛋白酶,在此蛋白酶的作用下抗菌肽 LL37 失去了杀菌作用,大肠杆菌仍能够保持正常生长状态。另外由于 pET28a-*OmpT*/*E. coli* BL21 (DE3) 在没有 IPTG 存在的情况下,也会因存在重组质粒的本底表达现象而表达少量的 *OmpT* 蛋白酶,故不加 IPTG 但加 LL37 的菌株 pET28a-*OmpT*/*E. coli* BL21 (DE3) 的生长并未受到抑制。

### 3 讨论

本研究体外克隆得到了 *OmpT* 基因的全长序列,与大肠杆菌基因组数据库 EcoGene 中 *OmpT* 基因的核苷酸序列具有 99.9% 的同源性。进一步构建表达载体 pET28a-*OmpT*, 转化至 *E. coli* BL21 (DE3) 中进行诱导表达。并通过体外添加抗菌肽 LL37 的方法,证实其具有蛋白酶的生物活性。

*OmpT* 蛋白剪切位点与 Omptin 家族其他蛋白相似,对肽链断裂处向左第一个氨基酸有严格的限制,必须是 Arg (R),高度保守,而对肽链断裂处向右第一个氨基酸的严谨性低,可以为 Lys (K), Gly (G) 或者 Val (V)<sup>[3,20]</sup>。因此 *OmpT* 蛋白可以特异性的切割带有此类酶切位点的蛋白,如 T7RNA 聚合酶<sup>[11]</sup>。同时还可以降解带有此类酶切位点的抗菌肽,如鱼精蛋白<sup>[10]</sup>。Stefan 等发现 *OmpT* 可以在低或者高浓度的  $Mg^{2+}$  环境中降解鱼精蛋白,但在高离子强度下分解速度会降低,这表明 *OmpT* 降解抗菌肽的功能是在 *E. coli* 的胞外直接作用相对应的氨基酸位点进行的<sup>[21]</sup>。*OmpT* 蛋白对抗菌肽 LL37 的降解作用至今未见详细报道,但是 Galva'n 等<sup>[22]</sup> 以及 Guina 等<sup>[23]</sup> 发现与 *OmpT* 同一家族的 PgtE 和 Pla 蛋白均能够降解抗菌肽 LL37。

本研究应用体外添加抗菌肽 LL37 的方法,通过比较细菌的生长曲线来推断抗菌肽是否被降解,进而判断目标菌株表达的 *OmpT* 蛋白是否具有生物活性。实验结果显示 *OmpT* 对抗菌肽 LL37 具有降解作用。如果这一系列反应发生在致病菌中时,就是表现出了致病菌对抗菌肽的耐药性。所以,*OmpT* 对多肽链的特异性剪切很有可能是致病菌对抗菌肽产生耐药性的原因之一。

本实验利用 *OmpT* 基因突变株成功的在大肠杆菌中高效表达了具有生物活性的 *OmpT* 蛋白酶。进一步还可以利用该蛋白酶剪切位点的特异性,切断某些融合蛋白来获得生物活性多肽,为今后研究开发融合型抗菌肽,或某些常规方法难以生产的生物活性小肽奠定良好的基础。尽管本试验摸索了一系列蛋白诱导表达条件如培养基 pH、诱导温度、诱导剂浓度等,但是表达的蛋白绝大部分仍然以包涵体形式存在。下一步将继续进行包涵体的纯化和复性,以期体外获得大量具有生物活性的 *OmpT* 蛋白酶,最大化的发挥 *OmpT* 在生物多肽生产方面的重要作用。

### 参 考 文 献

- [1] Brandenburg K, Garidel P, Schromm A B, et al. Investigation into the interaction of the bacterial protease *OmpT* with outer membrane lipids and biological activity of *OmpT*: lipopolysaccharide complexes[J]. Eur. Biophys. J., 2005, 34(1): 28-41.
- [2] Rawlings N D, Barrett A J. Families of serine peptidases[J]. Meth. Enzymol., 1994, 244: 19-61.
- [3] Hritonenko V, Stathopoulos C. Omptin proteins: an expanding family of outer membrane proteases in Gram-negative Enterobacteriaceae[J]. Mol. Membr. Biol., 2007, 24(5-6): 395-406.
- [4] Kaufmann A, Stierhof Y D, Henning U. New outer membrane-associated protease of *Escherichia coli* K-12[J]. J. Bacteriol., 1994, 176(2): 359-367.
- [5] Yu G Q, Hong J S. Identification and nucleotide sequence of the activator gene of the externally induced phosphoglycerate transport system of *Salmonella typhimurium*[J]. Gene, 1986, 45(1): 51-57.
- [6] Sodeinde O A, Goguen J D. Nucleotide sequence of the plasminogen activator gene of *Yersinia pestis*: relationship to *ompT* of *Escherichia coli* and gene E of *Salmonella typhimurium*[J]. Infect. Immun., 1989, 57(5): 1517-1523.
- [7] Egile C, d'Hauteville H, Parsot C, et al. SopA, the outer membrane protease responsible for polar localization of IcsA in *Shigella flexneri*[J]. Mol. Microbiol., 1997, 23(5): 1063-1073.
- [8] Hui C Y, Guo Y, He Q S, et al. *Escherichia coli* outer membrane protease *OmpT* confers resistance to urinary cationic peptides[J]. Microbiol. Immunol., 2010, 54(8): 452-459.
- [9] Sedláčková M, Masek F, Slezáříková V, et al. The effect of the *OmpT* protease on excision repair in UV-irradiated *Escherichia coli*[J]. J. Photochem. Photobiol. B, 1997, 41(3): 245-248.
- [10] Stumpe S, Schmid R, Stephens D L, et al. Identification of *OmpT* as the protease that hydrolyzes the antimicrobial peptide protamine before it enters growing cells of *Escherichia coli*[J].

- J. Bacteriol. ,1998,180(15):4002-4006.
- [11] Grodberg J, Dunn J J. OmpT encodes the *Escherichia coli* outer membrane protease that cleaves T7 RNA polymerase during purification[J]. J. Bacteriol. ,1988,170(3):1245-1253.
- [12] Leytus S P, Bowles L K, Konisky J, et al. . Activation of plasminogen to plasmin by a protease associated with the outer membrane of *Escherichia coli* [J]. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1981,78(3):1485-1489.
- [13] Baaden M, Sansom M S. OmpT: molecular dynamics simulations of an outer membrane enzyme[J]. Biophys. J. ,2004,87(5):2942-2953.
- [14] Vandeputte-Rutten L, Kramer R A, Kroon J, et al. . Crystal structure of the outer membrane protease OmpT from *Escherichia coli* suggests a novel catalytic site[J]. EMBO. J. ,2001,20(18):5033-5039.
- [15] 林承德,彭鸿娟,王衍海. 抗菌肽的应用及存在的问题[J]. 热带医学杂志,2007,7(1):86-90.
- [16] Durr U H, Sudheendra U S, Ramamoorthy A. LL-37, the only human member of the cathelicidin family of antimicrobial peptides[J]. Biochim. Biophys. Acta, 2006,1758(9):1408-1425.
- [17] 张蔚,孙丰南,费建文. 内源性抗菌肽 CAP18/LL37 的研究进展[J]. 国际呼吸杂志,2006,26(9):701-712.
- [18] 王辉,杨桂文,吴敬涛,等. 抗菌肽作用机制的研究进展[J]. 济南大学学报(自然科学版),2007,21(1):48-52.
- [19] 王永东. 抗菌肽 LL-37 的研究进展[J]. 国际免疫学杂志,2007,30(1):47-51.
- [20] McCarter J D, Stephens D, Shoemaker K, et al. . Substrate specificity of the *Escherichia coli* outer membrane protease OmpT[J]. J. Bacteriol. , 2004,186(17):5919-5925.
- [21] 陈福,罗玉萍,龚熹,等. 抗菌肽耐药性研究进展[J]. 微生物学通报,2008,35(11):1786-1790.
- [22] Galvaún E M, Lasaro M A, Schifferli D M. Capsular antigen fraction 1 and Pla modulate the susceptibility of *Yersinia pestis* to pulmonary antimicrobial peptides such as cathelicidin[J]. Infect. Immun. , 2008,76(4):1456-1464.
- [23] Guina T, Yi E C, Wang H, et al. . A PhoP-Regulated outer membrane protease of *Salmonella enterica* serovar typhimurium promotes resistance to alpha-Helical antimicrobial peptides[J]. J. Bacteriol. 2000,182(14):4077-4086.

## 2011 可再生与环境材料国际会议

由中国能源学会和上海理工大学主办,澳洲大学技术协作网(ATN)协办的“2011 可再生资源与环境材料国际会议”定于2011年5月20~22日在上海召开,会议将就可再生能源发展和环境治理方面的国际性热点和难点问题展开讨论。会议得到了国家科技部、中国科学院、中国工程院有关专家的指导,并得到清华大学、北京科技大学、华中科技大学、北京理工大学、大连理工大学、哈尔滨工业大学等高校的支持。佐治亚理工学院纳米中心主任、中国科学院外籍院士王中林教授、佛罗里达州立大学先进材料研究院院长 Ben Wang 教授、澳大利亚皇家墨尔本理工大学原副校长 Furlong 教授等国际著名专家将与会并做主题报告。欢迎海内外广大科研人员、高校师生以及产业界管理和研发人员踊跃参加会议。

### 一、会议组织:

主办单位:中国能源学会;上海理工大学  
 协办单位:澳洲大学技术协作网(ATN)

承办单位:中能学(北京)信息咨询中心

### 二、会议时间、地点:

2011年5月20~22日,上海杨浦区

### 三、会议议程:

包括:大会特邀主题报告,分会特邀报告,分会口头报告和墙报等。

### 四、会议主题:

太阳能、生物质能及风能相关材料;可再生资源转换材料;储能材料,电池和超级电容器;光催化和固态照明材料;节能和环保再生材料;煤的清洁利用

### 四、联系方式:

联系人:尹丽  
 电话:010-51524620  
 传真:010-88624216  
 邮箱:nengyuan669@163.com  
 地址:北京市海淀区田村路43号