

文章编号 1006-8147(2023)01-0083-05

论 著

Bre1 与 Rad6 形成的复合物的表达、纯化和结晶

赵佳奇,石萌,向嵩

(天津医科大学基础医学院生物化学与分子生物学系,天津 300070)

摘要 目的:建立 Bre1 及 Rad6 的表达和纯化方法,构建 Bre1-Rad6 的复合物,寻找复合物的结晶条件,为使用 X 射线晶体学的方法解析复合物的结构奠定基础。方法:使用大肠杆菌表达系统表达蛋白质;使用共纯化的方法组装复合物;使用气象扩散的方法结晶复合物。结果:建立了来源于 *Lodderomyces elongisporus* 的 Bre1(LeBre1)氮端与 Rad6 相互作用的区域(RBD)和 Rad6(LeRad6)在大肠杆菌中大量表达的方法;通过使用共纯化的方法,成功组装了 LeBre1 RBD-Rad6 复合物,并进一步通过两步凝胶过滤层析纯化的方法精细纯化,获得了纯度超过 95% 的蛋白复合物;使用气象扩散的方法结晶复合物,在 18℃ 通过对 1 000 多个结晶条件的筛选,确定了复合物的两种结晶条件,进一步对该条件优化,获得了质量相对较好的晶体。结论:成功的构建了 LeBre1 RBD-Rad6 复合物的表达、纯化和结晶的方法,为使用 X 射线晶体学方法解析复合物的结构奠定了基础。

关键词 Bre1;Rad6;泛素化修饰;蛋白质纯化;蛋白质结晶

中图分类号 Q71

文献标志码 A

Expression, purification and crystallization of Bre1-Rad6 complex

ZHAO Jia-qi, SHI Meng, XIANG Song

(Department of Biochemistry and Molecular Biology, School of Basic Medical Sciences, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China)

Abstract **Objective:** To establish the expression, and purification protocol for the Bre1-Rad6 complex, construct the Bre1-Rad6 complex; search for its crystallization condition to provide a starting point for structure determination of the complex with X-ray crystallography. **Methods:** The *Escherichia coli* host was used for the recombinant expression of protein, the complex was assembled by co-purification, the vapor diffusion method was used for complex crystallization. **Results:** The *Lodderomyces elongisporus* Bre1 (LeBre1) N-terminal Rad6 binding domain (RBD) and Rad6 (LeRad6) can be expressed separately in large amounts in *Escherichia coli* cells. The LeBre1 RBD-Rad6 complex was assembled with affinity co-purification. The complex was further purified to more than 95% purity with two-step gel filtration chromatography. The compound was crystallized by the method of meteorological diffusion. More than 1 000 crystallization conditions were screened at 18℃, two crystallization conditions for the complex were identified. After optimizing the crystallization condition, relatively good quality crystals were obtained. **Conclusion:** The expression, purification and crystallization protocol for the LeBre1 RBD-Rad6 complex is established. Such protocol provides a starting point for future structural determination of the complex with X ray crystallography.

Key words Bre1; Rad6; ubiquitination; protein purification; protein crystallization

真核生物中,遗传物质 DNA 缠绕在核小体蛋白核心上,构成染色质的基本单元核小体。核小体蛋白核心通常由两个拷贝的核小体蛋白 H2A、H2B、H3 和 H4 构成^[1]。核小体蛋白质的翻译后修饰在基因表达、DNA 损伤应对等重要机制中发挥关键功能^[2-3]。核小体蛋白的泛素化修饰是一种常见的翻译后修饰^[4]。核小体泛素化修饰是发生在 H2B 蛋白的一个保守的 Lys 位点(酿酒酵母 H2B 的 Lys120 位点,人源 H2B 的 Lys123 位点)上的单泛素修饰(H2Bmono-ubiquitination, H2Bub1)^[5-6]。H2Bub1 在

基因转录的起始和延伸、DNA 复制、DNA 损伤修复、减数分裂等重要过程的调控中发挥重要功能^[5-10]。与它的重要功能一致,人体中 H2Bub1 的紊乱与包括肿瘤在内的多种疾病密切相关^[10-13]。

在模式生物酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*, Sc)中,H2Bub1 是由泛素连接酶(E3 酶)Bre1 和泛素结合酶(E2 酶)Rad6 共同催化的^[14-15]。Bre1 和 Rad6 在真核生物中高度保守。在人体中,有两个 Rad6 的同源蛋白质,Rad6A 和 Rad6B;以及两个 Bre1 的同源蛋白质,RNF20 和 RNF40^[16-17]。Bre1、RNF20 和 RNF40 属于 RING 家族的 E3 酶,它们的 C 末端含有一个 RING 结构域。在泛素化反应的过程中,

作者简介 赵佳奇(1995-),女,硕士在读,研究方向:结构生物学;通信作者:向嵩,E-mail:xiangsong@tmu.edu.cn。

RING 结构域诱导泛素~E2 酶复合物的活性构象,促进泛素向底物的转移^[18]。除了 RING 结构域之外,Bre1 的 N 端还含有一个 Rad6 结合结构域(Rad6 binding domain,RBD)^[19-20]。该结构域不仅介导与 Rad6 的相互作用,也促进 Rad6 的 E2 酶活性^[20]。到目前为止,由于缺乏结构的信息,Bre1 的 RBD 与 Rad6 相互作用并促进其活性的分子机制还不清楚。本研究建立了真菌 *Lodderomyces elongisporus* 来源的 Bre1(LeBre1)RBD 与 Rad6(LeRad6)形成的复合物的表达、纯化和结晶的方法。这样的工作为使用 X 射线晶体学的方法解析该复合物的结构奠定了基础。复合物的结构将促进对 Bre1 RBD 的功能的理解。

1 材料和方法

1.1 复合物的表达和纯化 LeBre1 RBD(氨基酸残基1-220)和 LeRad6 对应的基因片段从 *Lodderomyces elongisporus* 基因组中通过聚合酶链式反应扩增得到,分别插入载体 pET-26b(+)(Novagen)和 pET-28a(+)(Novagen)中。重组的 LeBre1 RBD 不含标签,而 LeRad6 的 N 端含有一个组氨酸标签(表 1)。

为表达 LeBre1 RBD 和 LeRad6,构建的 LeBre1 RBD 及 Le Rad6 的质粒通过热击的方法转入大肠杆菌 BL21 Rosetta(DE3)菌株的感受态细胞中(天根生化科技有限公司)。其步骤如下:冰上融化 50 μ L 感受态细胞并加入 2 μ L 重组质粒,轻轻混匀;冰上静置 20 min 后,在 42℃热激 60 s;随后在冰上继续静置 3 min,加入 600 μ L LB 培养基于 37℃轻微震荡培养 60 min;通过离心(5 000 r/min,离心 1 min)收集细胞,将细胞重悬于 100 μ L LB 培养基中,均匀涂在含有 34 mg/L 的卡那霉素及 25 mg/L 的氯霉素的 LB-agar 平板上;37℃过夜培养。随后,挑取两种细胞平板上的单克隆,在含有 34 mg/L 的

卡那霉素及 25 mg/L 的氯霉素的 LB 培养基中分别培养,培养温度为 37℃。当细胞培养液在 600 nm 的吸光度到达 1.0 之后,在培养液中加入 0.25 mmol/L 异丙基 β -D-1-硫代半乳糖苷(美仑生物)诱导蛋白表达。细胞继续在 16℃培养 12 h 后,离心收集(4 000 r/min,离心 30 min)。

为纯化复合物,表达 LeBre1 RBD 和 LeRad6 的细胞按约为 3:2 的比例在含有 20 mmol/L Tris(pH7.5)、300 mmol/L 氯化钠和 10 mmol/L β -巯基乙醇的缓冲液中重悬混合,通过 AH-2010 高压裂胞仪(ATS Engineering)裂解(压强 1 000 bar,重悬液通过 3 次)。裂胞液经过 16 000 \times g 离心 45 min 后,上清中的 LeBre1 RBD-Rad6 复合物通过镍-氨基三乙酸琼脂糖(Smart Lifesciences)亲和纯化。LeBre1 RBD-Rad6 复合物进一步通过两步凝胶过滤柱精细纯化,第一步和第二步分别使用了 superdex 100 10/300(GE Healthcare)和 superdex 75 10/300(GE Healthcare)凝胶过滤层析柱。纯化后的复合物浓缩至 10 g/L,置于含有 20 mmol/L Tris(pH7.5)、200 mmol/L 氯化钠和 2 mmol/L 二硫苏糖醇的缓冲液中,在液氮中速冻,保存于-80℃。

1.2 复合物的结晶 LeBre1 RBD-Rad6 复合物采用气相扩散坐滴法结晶,使用 48 孔的结晶板(博亚捷晶科技有限公司)。在结晶条件初筛时,结晶液滴包括 0.5 μ L 的蛋白溶液和 0.5 μ L 的结晶溶液,结晶液滴与 70 μ L 的结晶溶液封闭在一个密闭的结晶孔中。在优化结晶条件时,结晶液滴包括 1 μ L 的蛋白溶液和 1 μ L 的结晶溶液,结晶液滴与 100 μ L 的结晶溶液封闭在一个密闭的结晶孔中。

2 结果

2.1 复合物的表达和纯化 本实验初期尝试了 ScBre1 RBD 与 Rad6 形成的复合物的结晶,但是没

表 1 LeBre1 RBD 与 LeRad6 的表达质粒构建

Tab 1 Expression plasmid construction of LeBre1 RBD and LeRad6

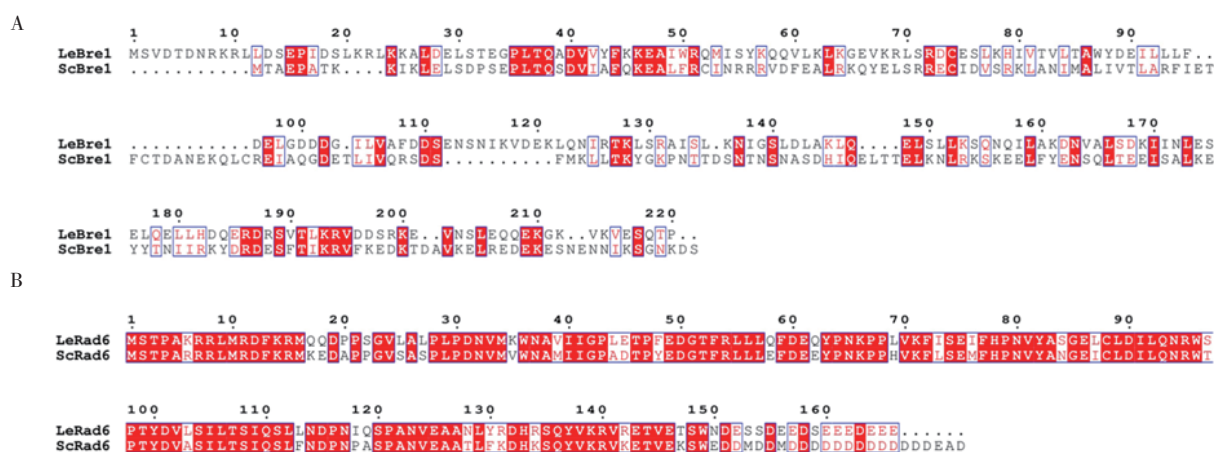
	LeBre1 RBD	LeRad6
物种	<i>Lodderomyces elongisporus</i>	<i>Lodderomyces elongisporus</i>
DNA 模版来源	<i>Lodderomyces elongisporus</i> genomic DNA	<i>Lodderomyces elongisporus</i> genomic DNA
5'端引物	GAAGGAGATATACATATGATGAGTGTGGATACTGACAAC	CGCGGCAGCCATATGATGTCTACACCGCCAAACGC
3'端引物	GTGGTGCTGCTCGAGTTATGGCGTCTGGGACTCGACTTT	GTGGTGCTGCTCGAGTTATTCCTCCTCGTCTCCTC
表达载体	pET-26b(+)	pET-28a(+)
表达宿主	BL21 (DE3) Rosetta	BL21 (DE3) Rosetta
重组蛋白的氨基酸残基序列	MSVDTDNRKRLDSEPIDSLKRLKKALDELSTEGPLTQADVVF KKEAIWRQMISYKQVVLKLGKVRKSRDCESLKHIVTLTAW YDEILLFDELGDDGILVAFDDSENSNIKVEKLQNIKTLSRA ISLKNIGSLDLAKLQELSLKSQNQLAKDNVALSDKIINLESELQ ELLHDQERDRSVTLKRVDDSRKEVNSLEQKEGKVKVQESQTP	MGSSHHHHHHSSGLVPRGSHMSTPAKRRLMRDFKRM QQDPPSGVLALPLPDNVMKWNAVHICPLETFEDGTFRLL LLQFDEQYPNKPPLVKFISEIFHPNVYASGELCLDILQNR WSPTYDVLSILTSIQSLNDPNIQSPANVEAANLYDRHRS QYVKRVRETVETSWNDESSDEEDSEEEDEEE

有获得晶体。通过序列对比发现,LeBre1 RBD 与 ScBre1 RBD 之间有 44% 的序列同源性(图 1A), LeRad6 与 ScRad6 之间有 91% 的序列同源性(图 1B)。因此,尝试了 LeBre1 RBD-Rad6 复合物的表达、纯化。

通过基因克隆技术构建了 LeBre1 RBD 和 LeRad6 的表达质粒,在 LeRad6 的氮端引入了一个组氨酸标签以便于对复合物的亲和纯化。使用大肠杆菌 BL21 Rosetta(DE3)细胞分别表达 LeBre1 RBD 和 LeRad6。使用共纯化的方法组装复合物,通过混合表达 LeBre1 RBD 和 LeRad6 的细胞裂解液,利用融合在 LeRad6 氮端组氨酸标签与镍-氨基三乙酸

琼脂糖之间的相互作用,从细胞裂解液中纯化 Le-Bre1 RBD-Rad6 的复合物。结果表明 LeBre1 RBD 和 LeRad6 可以在大肠杆菌 BL21 Rosetta(DE3)细胞中高度表达,并可通过共纯化的方法组装复合物、去除大部分大肠杆菌中的无关蛋白质。复合物通过进一步的两次分子筛纯化,达到了 95% 以上的纯度(图 2A)。复合物在最后一个凝胶过滤层析柱的洗脱峰较为对称,提示它在溶液中的构象均一(图 2B)。通过该方法,可以从 10 L 的大肠杆菌培养液中获得 5 mg 高纯度的 LeBre1 RBD-Rad6 复合物。

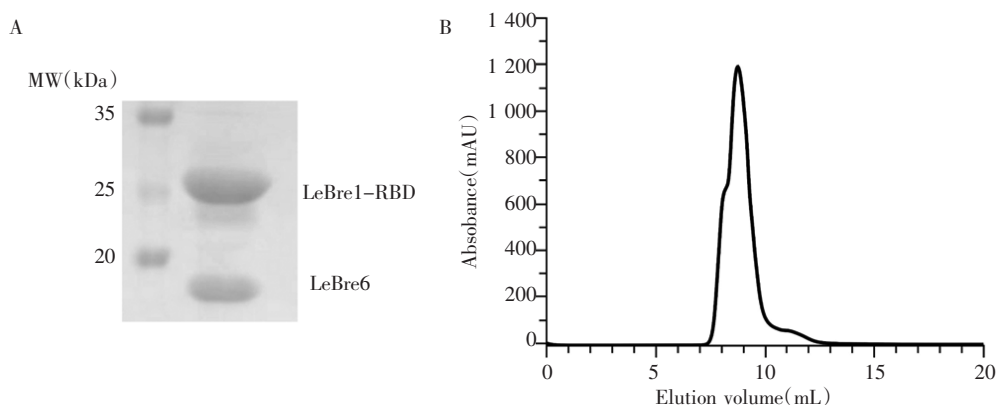
2.2 复合物的结晶 由上述方法获得的 LeBre1 RBD-Rad6 复合物的纯度及它在溶液中的均一性



注:A:LeBre1 RBD 与 ScBre1 RBD 的序列比对;B:LeRad6 与 ScRad6 的序列比对

图 1 LeBre1 RBD、LeRad6 与 ScBre1 RBD、ScRad6 的序列比对

Fig 1 Sequence alignment of Bre1 RBD and Rad6 from *Lodderomyces elongisporus* and *Saccharomyces cerevisiae*



注:A:纯化的 LeBre1 RBD-Rad6 复合物的变性凝胶电泳分析;B:LeBre1 RBD-Rad6 复合物在纯化最终步骤分子筛柱上的洗脱图

图 2 LeBre1 RBD-Rad6 复合物的纯化

Fig 2 Purification of the LeBre1 RBD-Rad6 complex

表明它适用于结晶实验。通过使用 Hampton Research(包括结晶初筛试剂盒 crystal screen I/II、crystal screen Lite/Cryo/PEG/Ion Screen 和 PEG/Ion 2 Screen、Index、SaltRx、Natrix)、Emerald BioSystems(包括结晶初筛试剂盒 Wizard I/II/III/IV)、

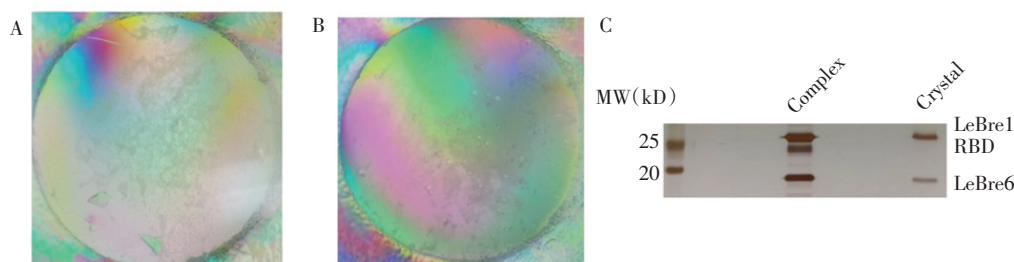
Molecular Dimensions(包括结晶初筛试剂盒 JCSG-plus)、QIAGEN 公司(包括结晶初筛试剂盒 Nextal-Tubes ProComplex Suite)的结晶初筛试剂盒,在 18℃ 的结晶温度筛选了超过 1 000 个结晶条件,获得了两个复合物的结晶条件。这两个条件分别为:

(1) PEG/Ion2 试剂盒的第 19 号条件(结晶温度为 18℃), 结晶溶液包括 0.1 M succinic acid (pH 7.0) 和 12% w/v polyethylene glycol 3350。(2) Index 试剂盒的第 62 号条件(结晶温度为 18℃), 结晶溶液包括 0.1 mol/L Tris (pH 8.5)、0.2 mol/L Trimethylamine N-oxide dihydrate 和 20% w/v polyethylene glycol monomethyl ether 2000。

由结晶粗筛试剂盒得到的晶体较小。为获得较大的晶体用于 X 射线晶体学的研究, 系统的尝试了改变结晶条件的温度及溶液的浓度, 筛选可产生较好的晶体的结晶条件。通过这样的优化, 获得了质量较好的两种晶体。这两种晶体形状相似, 均为钻石状。其中, 条件 1 得到的晶体较大, 最长的维度约为 100 μm (图 3A)。条件 1 的结晶溶液配方为: 0.1 M succinic acid (pH 6.7)、13% polyethylene glycol

3350; 结晶温度为 4℃。条件 2 得到的晶体较小, 最大的维度为 30 μm (图 3B)。条件 2 的结晶溶液配方为: 0.1 mol/L Tris (pH 8.5)、0.2 mol/L Trimethylamine N-oxide dihydrate、12% w/v polyethylene glycol monomethyl ether 2000; 结晶温度为 18℃。这两种晶体均在设置好结晶实验后 2~3 d 后出现, 在 7~10 d 内长到最大状态。

为确定晶体中含有 LeBre1 RBD-Rad6 复合物, 运用变性凝胶电泳分析了晶体的组分。捞取了条件 1 的 3 个较大晶体, 用结晶溶液清洗并将其溶于水中, 通过变性凝胶电泳分析晶体的溶解液。电泳实验表明, 溶液中含有明显的 LeBre1 RBD 和 LeRad6 的组分, 表明晶体由 LeBre1 RBD-Rad6 复合物构成 (图 3C)。条件 2 产生的晶体较小, 晶体捞取较为困难, 未能完成类似的分析。



注: A: 结晶条件 1 产生的晶体; B: 结晶条件 2 产生的晶体; C: 结晶条件 1 产生的晶体的变性凝胶电泳分析(分析中包括了纯化的复合物作为对照)

图 3 LeBre1 RBD-Rad6 复合物的结晶

Fig 3 Crystallization of the LeBre1 RBD-Rad6 complex

3 讨论

生物大分子的结构决定它们的功能。解析生物大分子的结构是理解它们行使功能机制的重要步骤。生物大分子的结构研究有 3 种常用的手段: X 射线晶体学、核磁共振和冷冻电镜。到目前为止, 据蛋白质数据库 (www.rcsb.org) 统计, X 射线晶体学贡献了解析的生物大分子结构约 86% 以上, 是一种成熟且被广泛使用的生物大分子的结构研究手段。使用 X 射线晶体学的方法解析生物大分子的结构研究通常有两个瓶颈: 获得高纯度且大量的生物大分子用于结构研究; 获得这些生物大分子的晶体^[21]。一般而言, 突破这两个瓶颈后, 研究会顺利进行。

模式生物酿酒酵母的泛素连接酶 Bre1 和泛素结合酶 Rad6 介导的核小体蛋白 H2B 的单泛素修饰在多个重要生命通路中发挥重要功能^[5-10]。Bre1

是一个多结构域的复杂蛋白质, 除了其 C 端的催化 RING 结构域之外, Bre1 的 N 端 RBD 与 Rad6 结合并调节其活性^[19-20]。因此, 理解 Bre1 的 RBD 与 Rad6 结合并调控其活性的机制是理解 Bre1-Rad6 相关通路的重要方面。通过晶体学的方法解析 Bre1 RBD 与 Rad6 形成的复合物的结构, 可为理解这些机制提供非常有用的线索。这样的研究也将促进对人体中 Bre1 的同源蛋白质 RNF20/RNF40 如何与 Rad6 的同源蛋白质 Rad6A/B 催化 H2B 单泛素反应的认识, 以及对相关疾病的理解。本研究力图解决 Bre1 RBD-Rad6 复合物的结构研究中的两个瓶颈: 复合物的纯化以及复合物的结晶。

虽然已报道 ScBre1 RBD-Rad6 的表达和纯化方法^[20], 但是本课题组大量的结晶实验表明, 该复合物非常难以结晶。由于 Bre1 和 Rad6 在真核生物中高度保守, 研究其他物种的 Bre1 RBD-Rad6 复合物

的结构也可有助于对酿酒酵母 Bre1/Rad6 及它们的人体同源蛋白质 RNF20/40 和 Rad6A/B 的结构和功能理解。序列分析表明,LeBre1 RBD 及 LeRad6 与 ScBre1RBD 和 Rad6 有非常高的同源性,提示它们可作为一个很好的研究 Bre1 RBD-Rad6 复合物的模型。本研究通过使用大肠杆菌表达系统,亲和纯化、凝胶过滤层析,获得了较大量高纯度的 LeBre1 RBD-Rad6 复合物;通过气相扩散法,得到了两种晶体。结晶溶液中含有较高浓度的盐、高分子化合物等成分,可能会导致复合物的解离。因此,有必要分析晶体中是否含有完整的复合物或仅含有它的组分之一。变性凝胶电泳分析表明,结晶条件 1 产生的晶体中含有 LeBre1 RBD 和 LeRad6,提示它含有 LeBre1 RBD-Rad6 复合物。由于结晶条件 2 产生的晶体较小,未能收集这些晶体作类似的分析。但是,复合物纯化实验表明 LeBre1 RBD 可以和 LeRad6 形成稳定的复合物;而且,结晶条件 2 产生的晶体与结晶条件 1 产生的晶体形状较为相似。这些数据提示条件 2 产生的晶体很可能也含有 LeBre1 RBD-Rad6 的复合物。

综上所述,本研究成功建立了一种真菌来源的 Bre1 RBD-Rad6 复合物的表达和纯化的方法,并获得了该复合物较好的晶体。该晶体将为接下来使用 X 射线晶体学的方法解析其结构奠定基础。另外,复合物的表达和纯化也可为接下来对它的生物化学/生物物理研究奠定基础。因此,本研究为理解 Bre1 RBD 与 Rad6 相互作用并调控其功能的机制铺垫了道路。

参考文献:

- [1] LUGER K, MDER A W, RICHMOND R K, et al. Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution[J]. *Nature*, 1997, 389(6648): 251–260.
- [2] STRAHL B D, ALLIS C D. The language of covalent histone modifications[J]. *Nature*, 2000, 403(6765): 41–45.
- [3] KOUZARIDES T. Chromatin modifications and their function[J]. *Cell*, 2007, 128(4): 693–705.
- [4] TWEEDIE-CULLEN R Y, RECK J M, MANSUY I M. Comprehensive mapping of post-translational modifications on synaptic, nuclear, and histone proteins in the adult mouse brain[J]. *J Proteome Res*, 2009, 8(11): 4966–4982.
- [5] DENG Z H, AI H S, LU C P, et al. The Bre1/Rad6 machinery: writing the central histone ubiquitin mark on H2B and beyond [J]. *Chromosome Res*, 2020, 28(3/4): 247–258.
- [6] FUCHS G, OREN M. Writing and reading H2B monoubiquitylation[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2014, 1839(8): 694–701.
- [7] KATO A, KOMATSU K. RNF20–SNF2H Pathway of chromatin relaxation in DNA double-strand break repair[J]. *Genes (Basel)*, 2015, 6(3): 592–606.
- [8] UCKELMANN M, SIXMA T K. Histone ubiquitination in the DNA damage response[J]. *DNA Repair (Amst)*, 2017, 56: 92–101.
- [9] WANG L, CAO C, WANG F, et al. H2B ubiquitination: conserved molecular mechanism, diverse physiologic functions of the E3 ligase during meiosis[J]. *Nucleus*, 2017, 8(5): 461–468.
- [10] SERRANO-QUÍLEZ J, ROIG-SOUCASE S, RODRIGUEZ-NAVARRO S. Sharing marks: H3K4 methylation and H2B ubiquitination as features of meiotic recombination and transcription[J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(12): 4510.
- [11] MARSH D J, MA Y, DICKSON K A. Histone monoubiquitination in chromatin remodelling: focus on the histone H2B interactome and cancer[J]. *Cancers (Basel)*, 2020, 12(11): 3462.
- [12] MARSH D J, DICKSON K A. Writing histone monoubiquitination in human malignancy—the role of RING finger E3 ubiquitin ligases[J]. *Genes (Basel)*, 2019, 10(1): 67.
- [13] ZHOU S, CAI Y, LIU X, et al. Role of H2B mono-ubiquitination in the initiation and progression of cancer[J]. *Bull Cancer*, 2021, 108(4): 385–398.
- [14] HWANG W W, VENKATASUBRAHMANYAM S, IANCULESCU A G, et al. A conserved RING finger protein required for histone H2B monoubiquitination and cell size control[J]. *Mol Cell*, 2003, 11(1): 261–266.
- [15] WOOD A, KROGAN N J, DOVER J, et al. Bre1, an E3 ubiquitin ligase required for recruitment and substrate selection of Rad6 at a promoter[J]. *Mol Cell*, 2003, 11(1): 267–274.
- [16] KIM J, HAKE S B, ROEDER R G. The human homolog of yeast BRE1 functions as a transcriptional coactivator through direct activator interactions[J]. *Mol Cell*, 2005, 20(5): 759–770.
- [17] ZHU B, ZHENG Y, PHAM A D, et al. Monoubiquitination of human histone H2B: the factors involved and their roles in HOX gene regulation[J]. *Mol Cell*, 2005, 20(4): 601–611.
- [18] ZHENG N, SHABEK N. Ubiquitin ligases: structure, function, and regulation[J]. *Annu Rev Biochem*, 2017, 86: 129–157.
- [19] KIM J, ROEDER R G. Direct Bre1–Paf1 complex interactions and RING finger-independent Bre1–Rad6 interactions mediate histone H2B ubiquitylation in yeast[J]. *J Biol Chem*, 2009, 284(31): 20582–20592.
- [20] TURCO E, GALLEGÓ L D, SCHNEIDER M, et al. Monoubiquitination of histone H2B is intrinsic to the Bre1 RING domain–Rad6 interaction and augmented by a second Rad6-binding site on Bre1[J]. *J Biol Chem*, 2015, 290(9): 5298–5310.
- [21] CHAYEN N E, SARIDAKIS E. Protein crystallization: from purified protein to diffraction-quality crystal[J]. *Nat Methods*, 2008, 5(2): 147–153.

(2022-05-29 收稿)