

Bakteriyofaj T4 Lizozim Geninin (Gen e) PCR Amplifikasyonu ile *Escherichia coli*'de Klonlanması ve Ekspresyonu

Ali İrfan GÜZEL

Çukurova Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, Adana – TÜRKİYE

Numan ÖZCAN

Çukurova Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Zootehni Bölümü, Biyometri ve Genetik Anabilim Dalı, Adana - TÜRKİYE

Halil KASAP

Çukurova Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, Adana – TÜRKİYE

Geliş Tarihi: 30.10.2000

Özet: Lizozim (EC 3.2.1.17), prokaryotik hücre duvarlarının peptidoglikan heteropolimerlerinde bulunan N-asetilglukozamin (NAG) ve N-asetilmuramik asit (NAM) arasındaki $\beta(1\rightarrow4)$ glikosidik bağlarının hidrolize olmasını katalizleyen bir enzimdir.

Bu çalışmada, bakteriyofaj T4 lizozim geninin (gen e) PCR ile amplifiye edilerek, pUC18 ve pRS416 vektörleriyle *Escherichia coli*'de klonlanması ve ekspresyonu amaçlanmıştır. PCR amplifikasyonu, 5' uçlarına *Bam* HI endonükleaz tanıma dizileri ilave edilmiş primerler kullanılarak gerçekleştirildi. Vektörlerin ve PCR ürününün *Bam* HI endonükleaz ile kesiminden sonra ligasyon reaksiyonu ile iki rekombinant plazmid oluşturuldu ve sırasıyla pUC18L ve pRS416L olarak isimlendirildi. Bu plazmidleri taşıyan rekombinant *E. coli* hücrelerinin gen e'yi eksprese ettiği yani lizozim E olarak adlandırılan aktif T4 lizozimini besi ortamına salgıladığı tespit edildi. Aynı zamanda lizozim E'yi üreten *E. coli* klonlarının L ve LB besi ortamlarında lize olmaksızın ürettiği, distile su veya 10 mM'lık Tris pH 8,0 gibi hipotonik bir ortama alındıklarında ise kolayca patladığı görüldü. Rekombinant *E. coli*'nin hücre duvarının, üretilen lizozim E'nin etkisi ile zayıflatılmış olabileceği fakat besi ortamındaki tuz konsantrasyonu ile dengelenen ozmotik basıncın ise duvarı zarar görmüş hücreleri lize olmaktan korumuş olabileceği düşünülmektedir.

Bu sonuçlar, gen e'yi taşıyan her hangi bir *E. coli* plazmid vektörünün, EDTA, lizozim ve SDS gibi hücre duvarı ve hücre zarını parçalayıcı ajanlar kullanılmaksızın, plazmid veya kromozomal DNA izolasyonlarını kolaylaştırabileceğini göstermektedir. pUC18L (*E. coli*) ve pRS416L (*E. coli* - *Saccharomyces cerevisiae* mekik vektörü) bu amaca yönelik olarak geliştirilmiş prototip vektörlerdir.

Anahtar Sözcükler: Gen klonlama, *Escherichia coli*, PCR, Plazmid vektörler, T4 Lizozim geni (gen e)

Cloning and Expression of Bacteriophage T4 Lysozyme Gene (Gene e) in *Escherichia coli* via PCR Amplification

Abstract: Lysozyme (EC 3.2.1.17) is an enzyme that catalyzes the hydrolysis of $\beta(1\rightarrow4)$ glycosidic bonds between N-acetylglucosamine (NAG) and N-acetylmuramic acid (NAM), which are present in peptidoglycan heteropolymers of the prokaryotic cell wall.

The purpose of this study was the cloning and expression of the bacteriophage T4 lysozyme gene (gene e) via PCR amplification in *Escherichia coli* using the pUC18 and pRS416 vectors. PCR amplification is carried out by using the primers having *Bam* HI recognition sites at their 5' ends. After digesting the vectors and PCR product with *Bam* HI endonuclease, two recombinant plasmids were constructed by ligation reaction and named pUC18L and pRS416L respectively. Recombinant *E. coli* cells harboring these plasmids expressed the gene e, that is, they secreted the active T4 lysozyme (called lysozyme E) into the culture medium. At the same time it was observed that *E. coli* clones producing lysozyme E were grown in L and LB medium without lysis, but burst out easily in a hypotonic environment such as distilled water or 10 mM Tris-HCl pH 8.0. It is suggested that the cell wall of *E. coli* may be weakened by the action of the lysozyme E, but the osmotic pressure balanced by the NaCl concentration in the medium may protect the damaged cells from lysis.

These results show that any *E. coli* plasmid vectors bearing gene e may facilitate the isolation of plasmid or chromosomal DNA without using cell wall and cell membrane disruptive agents such as EDTA, lysozyme and SDS. For this purpose, pUC18L (*E. coli*) and pRS416L (*E. coli* - *Saccharomyces cerevisiae* shuttle vector) are constructed as prototype vectors.

Key Words: Gene Cloning, *Escherichia coli*, PCR, Plasmid vectors, T4 Lysozyme gene (gene e)

Giriş

Gram pozitif bakterilerde plazma zarının üzerinde, gram negatiflerde ise plazma zarı ile dış zar arasında peptidoglikan (mürein) tabakası olarak da adlandırılan hücre duvarı yer alır. Peptidoglikan, birbirlerine glikosidik bağlarla bağlı N-acetylglucosamine (NAG) ve N-acetylmuramic acid (NAM) ile bunlara bağlı 4'er amino asitlik (aa) yan zincirlerden oluşmuştur. Doğal bir antimikrobiyal ajan olan lizozim, NAM ve NAG arasındaki $\beta(1\rightarrow4)$ bağlarını hidrolize ederek peptidoglikan tabakasının parçalanmasını sağlar (1).

Lizozim bir çok canlının antibakteriyel savunma mekanizmasında yer alan önemli bir enzimdir. Bakteriyofajların genomunda bulunan lizozim ise litik döngüde hücre duvarını eritir ve bakterilerin parçalanarak faj partiküllerinin serbest kalmasını sağlar (2, 3). Bakteriyofaj T4 lizozimi globular monomerik bir protein olup 164 amino asitten oluşmaktadır. Konakçı hücrenin peptidoglikan tabakasını muhtemelen stoplazmik taraftan bozarak hücrenin patlamasını ve virüs partiküllerinin serbest kalmasını sağlar (4).

Lizozim, tripsin, kimotripsin ve pepsinden etkilenmez. Bu özelliğinden dolayı ülser, multiple sklerozis, bazı deri hastalıkları ve ameliyat sonrası enfeksiyonların tedavisinde kullanılabileceği tavsiye edilmektedir. Ayrıca, analjezik, antitümör, antimetastatik ve antiinflamator aktiviteleri olduğu da yapılan çeşitli çalışmalarla gösterilmiştir (5, 6, 7, 8, 9).

Lizozim, *Listeria monocytogenes* gibi gıda bozulması ve bunlara bağlı hastalıklara sebep olan bakterilere de oldukça etkilidir. Peynirde *Clostridium* kökenli butirik asit fermentasyonunu kontrolde lizozimin potansiyeli 1966' larda gösterilmiş ve daha sonra da bir çok peynir çeşitlerinde gaz birikimini önlemek ve tat arttırmak için uygulamalar geliştirilmiştir (10).

Bu çalışmada, bakteriyofaj T4 lizozim geninin, faj genomundan PCR ile izole edilerek pUC18 ve pRS416 plazmid vektörleriyle *Escherichia coli*'de klonlanması ve ekspresyonu amaçlanmıştır.

Materyal ve Metot

Materyal

Primerler İyontek'den (Bursa), vektör molekülleri ve konakçı bakteri (*Escherichia coli* XL1 Blue MRF) Stratagene'den, restriksiyon endonükleazlar, agaroz

arıtma kiti ve *Taq* DNA polimeraz Boehringer Mannheim (Roche)'dan, besi ortamları Merck'den, T4 DNA (*Escherichia coli* B, ATCC 11303 kaynaklı), Lamda faj DNA (*Escherichia coli* W3110 kaynaklı), PCR optimizasyon kiti ve kullanılan diğer kimyasalların çoğu Sigma'dan satın alınmıştır.

Metot

a) Primer Seçimi ve PCR

T4 lizozim genine ait DNA dizi analizi (11) "Restriction Mate" (12) programı ile taranarak gen içinde tanıma dizisi olan restriksiyon endonükleazlar tespit edildi. Gen bölgesine ait dizi analizi incelenerek amplifikasyon için uygun primer dizileri belirlendi. Amplifikasyon sonrasında vektör molekülüne ile kolay ve istenen bir şekilde ligasyon olabilmesi için bu dizilerinin 5' uçlarına gen içinde kesim bölgesi olmayan endonükleazlardan birine (*Bam* HI) ait tanıma dizisi (GGATCC) ilave edildi (hazırlanan primer dizileri aşağıda verilmiştir).

Primer A: ^{5'}CGGATCCCTTCTATAAATACTTA^{3'}

Primer B: ^{5'}CGGATCCAAGAGAAAAGTAAACA^{3'}

PCR amplifikasyonu, Tablo'da verilen protokol ve programa göre gerçekleştirildi. Primerlere ilave edilen *Bam* HI tanıma dizisinin kalıp DNA üzerinde komplementeri olmadığı için sarkık uçlar oluşacağından annealing sıcaklığı ilk iki döngüde 40°C, diğer döngülerde ise 59°C olarak alındı.

b) Ligasyon, Transformasyon ve Koloni Seçimi

PCR ürünü %1'lik agaroz jelde elektroforeze tabi tutuldu ve T4 lizozim genine ait 552 baz çift (bp)'lik amplikon (PCR ile amplifiye edilen DNA parçası) jelden alınarak "Agarose Gel DNA Extraction Kit" ile agarozdan arıtıldı. PCR amplikonu ve klonlama vektörleri (pUC18 ve pRS416) *Bam* HI endonükleaz ile kesildikten sonra 500 ng vektör molekülüne, 100 ng amplikon ile 15 °C'de ~ 10 saat süreyle ligasyona bırakıldı. Ligasyon sıvılarından 5'er μ l alınarak CaCl₂ ile kompetent hale getirilen *E. coli* XL-1 Blue MRF suşuna transforme edildi (13) ve LB/amp-X-gal plaklarına ekilerek 37 °C'de bir gece inkübasyona bırakıldı. Plaklarda oluşan beyaz renkli koloniler (rekombinantlar) aynı özelliklerdeki katı besi yerlerine pasajlandı. Burada da beyaz renkli olarak gelişen kolonilerden plazmid izolasyonları yapıldı (14) ve *Bam* HI (lizozim insörtünü çıkartmak için) ve *Hind* III (lineer hale getirmek için) endonükleazlar ile kesilerek karakterize

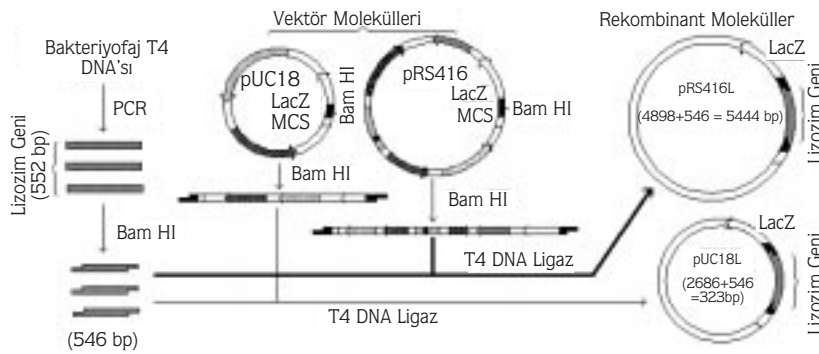
Tablo : PCR protokolü ve Termal Cykler programı.

A : PCR Protokolü: Karışımın;

Cinsi	Stok Kon.	Alınan Miktar
Su (saf ve steril)	-	39,5 µl
T4 DNA (kalıp)	200 ng/µl	1 µl
Primer A	200 ng/µl	1 µl
Primer B	200 ng/µl	1 µl
dNTP karışımı	10 mM	1 µl
Üniversal Tampon	50X	1 µl
Reaksiyon tamponu	10X	5 µl
Taq DNA polimeraz	5 U/µl	0,5 µl
Toplam		50 ml

B : Termal Cykler Programı:

	Sıcaklıklar	Süre	Döngü Sayısı
Ön Denatürasyon	95 °C	35 saniye	1
Denatürasyon	94 °C	1 dakika	
Annealing	40 °C	1 dakika	2
Sentez	72 °C	1 dakika	
	94 °C	1 dakika	
	59 °C	1 dakika	25
	72 °C	1 dakika	
	72 °C	7 dakika	1
	4 °C	Bekleme	1



Şekil 1. Lizozim geninin PCR ile amplifikasyonu ve klonlama stratejisi.

edildi. Jeller, "UVI Doc Gel Documentation System (UVitec Limited, U.K.)" ile görüntüldü. Genin vektöre entegre olduğunu doğrulamak için rekombinant plazmidler kalıp olarak kullanılarak aynı primerlerle kontrol amplifikasyonu da yapıldı. Uygulanan yöntemlerin bazıları Şekil 1'de şematize edilmiştir.

c) Ekspresyon Çalışmaları

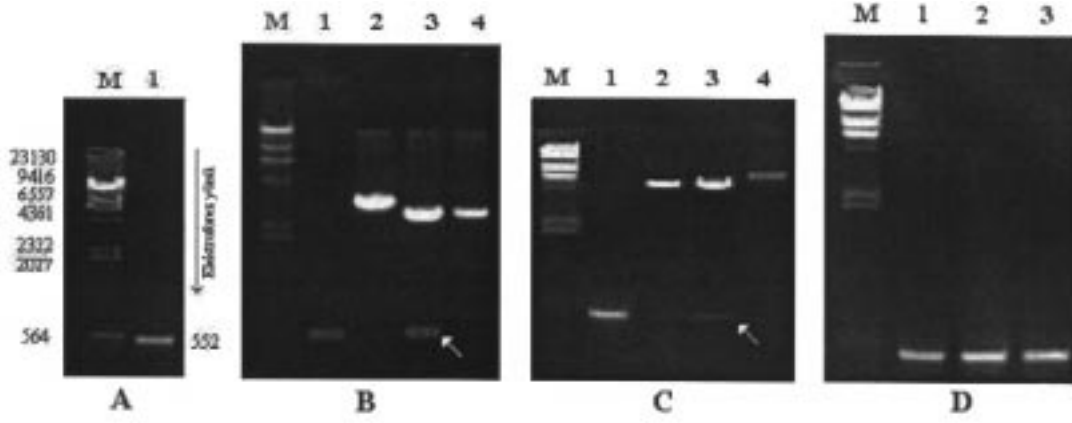
Klonlanan genin aktivitesinin belirlenmesi amacıyla yumuşak agar (%0,45 w/v) içine homojen bir şekilde yayılarak ekilmiş olan *Micrococcus luteus* üzerine rekombinant ve non-rekombinant *E. coli* hücrelerine ait üreme ortamları damlatıldı ve 37 °C'de bir gece inkübe edildi. *M. luteus*'un üremesinin engellenip engellenmediği kontrol edildi.

Rekombinant ve non-rekombinant bakteri kültürlerinde normal şartlarda hiçbir fark gözlenmemesine rağmen, üretilen lizozimden dolayı rekombinant bakterilerin hücre duvarının zayıflatılmış olması ve hipotonik bir ortama (saf su veya 10 mM tris,

pH 8,0) alındıklarında lize olmaları beklenmektedir. Bu amaçla bir gece üretilmiş olan bakteri kültürlerinin (*E. coli*+pRS416 ve *E. coli*+pRS416L) 600 nm'deki optik densiteleri tespit edilip, orantılı olarak ~5'er ml alındı ve 4500 rpm'de santrifüjlenerek bakteriler çöktürüldü. Bakteri peletleri üzerine 10 mM'lık Tris'den (pH 8,0) 500 µl ilave edilip pipetlendikten sonra 15000 rpm'de 10 dakika santrifüjlendi ve sıvı faz başka bir tüpe alındı. Lize olan bakterilerden ortama geçen nükleik asitleri göstermek amacıyla bu sıvılardan 25'er µl alınarak %1'lik agaroz jelde elektroforez yapıldı.

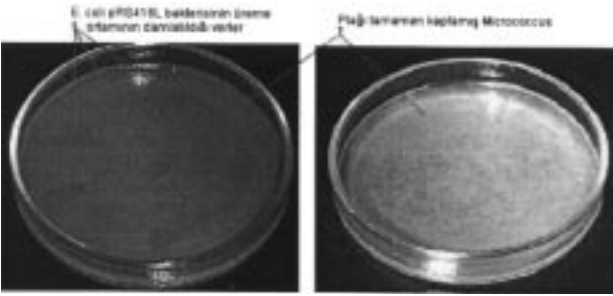
Bulgular

Lizozim geninin (gen e) amplifikasyonu için bakteriyofaj T4 DNA'sının kalıp olarak kullanıldığı PCR çalışmasına ait agaroz jel elektroforezi Şekil 2 A'da görülmektedir. Bu reaksiyonla lizozim genini içeren 552 bp'lik DNA fragmenti elde edilmiştir.



Şekil 2. Lizozim geninin amplifikasyonu için yapılan PCR çalışmaları ve lizozim genini taşıyan vektör moleküllerine ait agaroz jel görüntüleri. Jellerin hepsinde marker (M) olarak Lamda DNA/*Hind* III kesimi kullanılmıştır.

- A) M: Marker, 1: T4 DNA'nın kalıp olarak kullanılmasıyla elde edilen, lizozim gene (*gen e*) ait 552 baz çifti (bp) büyüklüğündeki PCR amplikonu.
 B) M: Marker, 1: Lizozim geni PCR amplikonu (kontrol), 2: Rekombinant koloniden izole edilen pUC18L plazmid DNA/*Hind* III kesimi, 3: Rekombinant pUC18L plazmid DNA/*Bam* HI kesimi (pUC18 ve lizozim insörtü bantları), 4: pUC18 DNA/*Hind* III kesimi (kontrol).
 C) M: Marker, 1: Lizozim geni PCR amplikonu (kontrol), 2: pRS416 plazmid DNA/*Hind* III kesimi (kontrol) 3: Rekombinant pRS416L plazmid DNA/*Bam* HI kesimi (pRS416 ve lizozim insörtü bantları), 4: pRS416L plazmid DNA/*Hind* III kesimi.
 D) M: Marker, 1: Lizozim geni PCR amplikonu (kontrol), 2: pUC18L plazmid DNA'sının kalıp olarak kullanıldığı PCR amplifikasyonu, 3: pRS416L plazmid DNA'sının kalıp olarak kullanıldığı PCR amplifikasyonu.



Şekil 3. Lizozim aktivitesinin *M. luteus* üzerinde denemesi.

- A) Yumuşak agar içine ekili *M. luteus* üzerine rekombinant *E. coli* pRS416L'nin üreme ortamı damlatılmış plak.
 B) Yumuşak agar içine ekili *M. luteus* üzerine *E. coli* pRS416'nin üreme ortamı damlatılmış plak (kontrol).

Rekombinant kolonilerden izole edilen plazmidlerin (pUC18L ve pRS416L) *Bam* HI endonükleazla kesimi sonucu ortaya çıkan lizozim gene ait insört bantları (jel üzerinde oklarla işaretli) gözlenmiştir (Şekil 2 B ve C).

Rekombinant plazmidlerle yapılan klonlamayı destekleyici PCR çalışmasında ise, kontrolle (T4 DNA'sından elde edilen amplikon) aynı büyüklükte PCR amplikonları elde edilmiştir (Şekil 2 D).

Rekombinant bakterilere ait kültür süpernatantı *M. luteus* ekili plaklara damlatılarak, üretilen lizozimin aktivitesi test edilmiştir. Rekombinantlara ait kültür

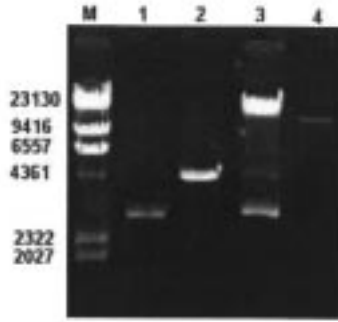
sıvılarının damlatıldığı yerlerde *M. luteus*'un üremediği (zon oluştuğu), dolayısıyla eksprese edilen lizozimin (Lizozim E) aktif olduğu, non-rekombinant bakterilere ait kültür sıvılarının damlatıldığı yerlerde ise herhangi bir değişim olmadığı gözlenmiştir (Şekil 3).

Hipotonik ortam ilave edilen rekombinant bakterilerin hemen lize olduğu (viskos bir yapı oluştuğu), non-rekombinantlarda 1 gün bekletildiği halde hiçbir değişim olmadığı gözlenmiştir. Rekombinant bakterilere ait lizat sıvısının agaroz jelde elektroforeze tabi tutulması ile elde edilen sonuç Şekil 4'de gösterilmiştir. Şekil incelendiğinde *E. coli* pRS416L bakterilerine ait lizatta hem kromozomal DNA (3. sütun 1. bant) hem de plazmid DNA (3. sütun 2. bant) bantları gözlenirken *E. coli* pRS416 sıvısında da böyle bir sonuç gözlenmemiştir (4. Sütun)*.

Tartışma

Yapılan bu çalışma ile T4 lizozim geni (*gen e*) faj DNA'sından PCR ile izole edilerek hem pUC18 hem de pRS416 plazmid vektörlerine aktarılmış ve konakçı hücrenin (*E. coli* XL-1 blue MRF) ilgili genden aktif bir şekilde lizozim sentezlediği gösterilmiştir.

Escherichia coli T4 bakteriyofajına ait lizozim geni (*gen e*) daha önce klonlanarak restriksiyon enzim haritası çıkarılmış (15, 16) ve *gen e*'ye ait DNA baz dizileri de



Şekil 4. *E. coli* pRS416L (rekombinant) ve *E. coli* pRS416 bakterilerinin hipotonik ortama alındıktan sonra oluşan sıvının %1'lik agaroz jeldeki elektroforez sonucu.

M: Lamda DNA/*Hind* III. 1: kesilmemiş pRS416L (kontrol), 2: pRS416L/*Hind* III (kontrol), 3: hipotonik ortama alınan *E. coli* pRS416L bakterisine ait lizat sıvısı (1. Kromozomal, 2. plazmid DNA bantlarıdır), 4: hipotonik ortama alınan *E. coli* pRS416 bakterisine ait sıvı.

* Görülen zayıf DNA bandı muhtemelen doğal yolla lize olmuş bakterilere ait artifaktır.

okunarak yayınlanmıştır (11). Bu nedenle, gen e'nin T4 faj genomundan restriksiyon endonükleazlar yardımı ile doğrudan klonlanması yerine, bunun PCR ile direk amplifikasyonunun daha uygun olacağı düşünülmüştür. T4 bakteriyofaj lizozim genini (gen e) içinde taşıyan 552 bp'lik DNA parçası uygun primerler seçilerek PCR ile ilk kez bu çalışmada çoğaltılmıştır. PCR ile amplifikasyonu yapılan DNA parçası pUC18 ve pRS416 vektörlerine klonlanmasını kolaylaştırmak amacıyla gen e içerisinde kesim noktası bulunmayan bir endonükleaza (Bam HI) ait tanıma dizileri, seçilen primer dizilerinin 5' uçlarına ilave edilmiştir. Böylece PCR ile amplifiye edilen lizozim geni, Bam HI enzimiyle kesilerek yapışkan uçlar elde edilebilmiş ve aynı enzimle kesilen vektörlere kolayca kaynatılabilmektedir.

Gen e'nin pUC18 vektörüne takılması ile *E. coli*'de T4 lizozim enziminin (lizozim E) üretimi amaçlanırken, pRS416 vektörüne takılması ile de genin ilerde *S. cerevisiae*'de eksprese edilmesi hedeflenmiştir. Bilindiği üzere pRS416 *E. coli* ve *S. cerevisiae*'de replike olabilen bir mekik (shuttle) vektördür.

Gen e'yi taşıyan rekombinant plazmidler (pUC18L ve pRS416L) *E. coli* bakterilerine transforme edilmişler ve rekombinant *E. coli* klonlarının L ve LB besi ortamlarında üremeleri normal olarak seyretmiştir.

Gen e'nin kodladığı lizozimin *E. coli* hücrelerine toksik bir etki göstermediği, hatta lac promotörü ardında IPTG maddesiyle uyarılarak enzim sentezinin artırılması durumunda bile bakterilerin lize olmadan normal şekilde üredikleri görülmüştür (15). Aynı durum *E. coli* bakterilerini konakçı olarak kullanan T7 fajına ait lizozim geninin pBR322 plazmidinde phi 10 promotörü ardında güçlü bir şekilde sentezlenmesi sonucunda da gözlenmiştir (17). Bu açıklamalardan T4 ve T7 lizozim genlerinin bakteriyel hücre duvarlarını parçalamada tek başına yeterli olmadıkları görülmektedir. Fajların *E. coli*'yi enfeksiyonunun son aşamasında söz konusu lizozim enzimleri dışında bazı moleküllerin de görev aldığı anlaşılmaktadır. T4 fajının, gen e'nin kodladığı lizozim dışında birisi de gen 5 tarafından kodlanan iki farklı lizozime sahip olduğu bildirilmiştir (18). Kanımızca, lizozim E peptidoglikan yapısındaki hücre duvarını zayıflatmakta ancak zayıflamış hücre duvarı, hücre zarı ve dış membranın da desteği ile L ve LB besi yerlerindeki tuz sayesinde ortamdaki ozmotik basınca karşı mukavemet edebilmektedir. Bilindiği üzere L ve LB besi yerleri sırasıyla %0.5 ve %1 (w/v) NaCl içermektedir. Hipotezimizi test etmek amacıyla rekombinant bakteriler önce L ve LB ortamlarında üretilmiş, sonra da santrifüjlenerek bakteriler çöktürülmüş ve besi ortamı uzaklaştırılıp pelet üzerine hipotonik ortam (saf su veya 10mM tris pH: 8,0) ilave edilerek hücre lizisi gözlenmiştir. Hücrelerin lize oldukları ise ortamda nükleik asitlerin belirlenmesi ile tespit edilmiştir.

T4 ve T7 fajlarından lizozim genlerini daha önce *E. coli*'de klonlayan araştırmacılar ortamda bulunan tuzun bakteriler üzerine önemli izotonik bir etkide bulunduğunu fark edememişler dolayısıyla hücreleri dondurup çözerek veya kloroform kullanarak lize etmişlerdir (15, 17). Bu çalışmada ilk kez lizozim E'nin hipotonik ortamda tek başına *E. coli* hücrelerini lize etmede yeterli olduğu gösterilmiştir. Hipotonik ortam olarak kullanılan 10 mM tris'in, saf suya oranla santrifüj sonrasında daha berrak bir lizat oluşturduğu da tespit edilmiştir. Öte yandan lizozim E'nin izotonik ortamda *M. luteus*'u lize etmeye tek başına yeterli olduğu da gösterilmiştir. Bu durum söz konusu mikroorganizmanın hücre duvarının lizozime son derece hassas olmasının doğal bir sonucudur. Çünkü *M. luteus* ATCC 4698 suşu lizozim aktivitesinin ölçülmesinde genellikle standart olarak kullanılmaktadır (19).

Kaynaklar

1. Nicklin, J., Graeme-Cook, K., Paget, T., Killington, R. Instant Notes in Microbiology. Bios Scientific Publishers Ltd. Oxford, UK, 1999: 76-80
2. Tsugita, A., Inouye, M., Terzaghi, E., Streisinger G. Purification of bacteriophage T4 lysozyme. J Biol Chem, 1968; 243: 391-397.
3. Tsugita, A. Phage lysozyme and other lytic enzymes. The Enzymes. Academic Press, New York, 1971: 344-411.
4. Weaver, L.H., Matthews, B.W. Structure of bacteriophage T4 lysozyme refined at 1.7Å resolution. J Mol Biol, 1987; 193: 189-199.
5. Bailey, J.E., Ollis, D.F. Biochemical Engineering Fundamentals. 2nd Ed. Singapore, 1986: 178.
6. Bianchi, C. Is Flemming's Lysozyme an Analgesic Agent? Eur J Pharmacol, 1981; 71: 211.
7. Sava, G., Benetti, A., Ceshia, V., Pacor, S. Lysozyme and Cancer: Role of Exogeneous Lysozyme as Anticancer Agent (Review). Anticancer Research, 1989; 9: 583-592.
8. Sava, G., Benetti, A., Ceshia, V., Pacor, S., Zabucchi, G. Observation on the Antimetastatic Action of Lysozyme in Mice Bearing Lewis Lung Carcinoma. Anticancer Research, 1991; 11: 1109-1114.
9. Gordon, L.I., Douglas, S.D., Kay, N.E., Yamada, O., Osseman, E.F., Jacob, H.S. Modulation of neutrophil function by lysozyme. Potential negative feedback system of inflammation. J Clin Invest, 1979; 64: 226-232.
10. Fox, P.F. Exogenous enzymes in dairy technology. Journal of Food Biochemistry, 1992; 17: 173-179.
11. Owen, J.E., Schultz, D.W., Taylor, A., Smith, G.R. Nucleotide sequence of the lysozyme gene of bacteriophage T4: analysis of mutations involving repeated sequences. J Mol Biol, 1983; 16: 229-248.
12. The restriction mate v1.0, copyright 1994-1995 Microsoft Corporation. Dr. B.J. Murray and Dr C. Schaefer, Designed and Written for Boehringer Mannheim GmbH.
13. Hanahan, D. Studies on Transformation of *E. coli* with Plasmids. J Mol Biol, 1983; 166:557-580.
14. Birnboim, H.C., Doly, J. Nucl Acid Res, 1979; 7: 1513-1523.
15. Perry, L.J., Heyneker, H.L., Wetzel, R. Non-toxic expression in *E. coli* of a plasmid-encoded gene for phage T4 lysozyme. Gene, 1985; 38: 259-264.
16. O'Farrel, P.H., Kutter, E., Nakanishi, M. A restriction map of the bacteriophage T4 genome. Mol Gen Genet, 1980; 179: 421-435.
17. Cui, D.S., Lian, Y.N., Xu, Y.R., Li, D.J., Song, L.Z. Cloning of the bacteriophage T7 lysozyme gene. Chin J Biotechnol, 1990; 6: 87-93.
18. Mosig, G., Lin, G.W., Franklin, J., Fan, W.H. Functional relationships and structural determinants of two bacteriophage T4 lysozymes: a soluble (gene e) and a baseplate-associated (gene 5) protein. New Biol, 1989; 1(2): 171-179.
19. Tsuchiya, K., Tada, S., Gomi, K., Kitamoto, K., Jigami, J. High level expression of the human lysozyme gene in *A. oryzae*. Appl Microbiol Biotechnol, 1992; 38:109-114.