

APPENDIX C: Nucleotide sequence of single-plasmid system (pCGT-AsBD) and primers binding site.

Small and capital letters represents original nucleotide sequence of plasmid pET-29(a) and recombinant genes sequence (*hlyD*, *hlyB*, *hlyAs₆₁* and *cgt*) inserted, respectively. **Bold** letters represent the C-terminal 61 codons of HlyA. Primers binding site and restriction enzymes recognition site for epPCR were **shaded** and underlined, respectively. Arrow indicates the direction of PCR amplification. Please note that the recombinant protein coding sequences are in the reverse strand.

1. Nucleotide sequence of plasmid pCGT-AsBD

```

atccggatatagttcctcctttcagcaaaaaaccctcaagaccggttagaggccccaaggggttatgctagtt
attgctcagcgggtggcagcagccaactcagcttcctttcgggctttgtagcagccggatctcagtggtgggtggt
ggtggtgctcagagtgcggccgcaagcttgcgacggagctcTTAACGCTCATGTAACTTTCTGTTACAGATTCT
TCCAGGGGACTAAGAAGATAACTGATTACGCTTCGCATTCCAGTCTTTATTTCTGCAGTGACAGCCATACCCGAG
CTTAATGGAATGTGCTTATTCCCGGTTGACAAATCATTCTTCAACAGAAACAATGACATTA AAAACGAGTCCC
AGTTTTCTGGTCTTCTATTGCATCTAAATTTATATTTTTTACCTTACCACCAGATAACCATATCGGGTGAAGGA
AAAGCCTCCACTTTAATGATGGCATTCTGCCGACGTTAATAAAACCAATATCTTTATTTGTACCAGAGCAGTA
ACCTCCAGCGTGTATCTTCCGGAACGATGACCATCAGTGTTCGCTGTTGTAACAACCCACCTTCAGTATGA
ACCTTCAGTTGCTGAACTTTCCCGAAACAGGGGCCCTGATTACTGAAGCCTGTTGACGCTCTTCATTTTTCTCT
AACTCCAGAGTTAATAACTCAATGCTGTCTGTTGTTGTCTTAGCTTGTCTAAAATTTCATTTTTAAAAAGCTGC
GTGACAAGCTGATATTCTTCTTTTGACAGACAATATCTCACTCTCAATTTGCTCCAGTTGCGATTTATAAACCCGT
AATTCATTTGCTGCCTCAACATATTTATTCTCCTGCTCAAGTACAGCATGTTTTGCAATTGCCTGTTTATGCAAC
AGGCTCCTGAAATCATCCAGACGGCTTTTTTCAACCCTCGATACATTTTCATAACGTTTTATACGGGCAAGTATT
GTTAATCGCTCTGCTCTTTTCTTATCCAGATTCAGTTCTTTTTGATACTTCTGATTTTGCCATGTGGAAAAGTGT
TCTTTTATCAAAGAAGTTAAACGCAGTACTTCTCTCAGATACATTCTGAAAATAAGGCTCATCAGGAAGTTTC
AGTTCAGGAAGTTTATTTAATTCAATTGACCGGCTCAGAATTTGATACCGAATTTGTTCCAGCCTGGCCTGTAAC
AGTGATGACTGCGTTTTTAAACGTATCAGCTTCAGCTCCAGCGCTGTAAGCTTTAATAACACATCCCCTTTCCGG
ACTGACTCTCCTTCTTTTACGATAATTTCTTTAACTATCGAGTTTTCAATAGGTTTAAATTTCTTTGCTACGCCCA
CTGAGTGTTAATTTCCCATTTGCAGTGGCAACAATTTCCACCTGGCCTAAAACAGATAAAAAGCAATAACC
AGAAACCCCAATAAAAATAAGCAACCAGACGCGCCGTCTGGATACCGGCTTTCAATTAATTCCAGATGAGCG
GGTAAGAATTCATTTTCGTCTTTTACGTACCGGAGTATCTAACTGCTTCCGGATTTTCCATGTTTCACTCCAG
ACAAGTTTATAGCGCAACAGGAACCTCGCTGAACCCATTAAACCATGTTTTCATATTCTTCTGTTCTTTCTGTTAG
TCTGACTGTAAGTATATAAGTAACTGTATAAACTTTCCGGTTCAGAAAGCAGCTCCTTATGTTTACCCTGTTCA
ACAATTTCCCTTTTCCATGACAATAATGCGGTCTGCATTTTTTACTGTAGACAGACGATGAGCAATGATTATA
ACCGTTCTGCCCTTACATATTTTGTGCATATTGCGCATGATGACATGCTCCGACTCATAATCCAGAGCACTGGTT
GCTTCATCAAAGATGAGTATTTTAGGGTTGTTACCAGCGCCCTTGCAATTGCGATGCGTTGACGTTGACCTCCG
GATAATCTGCCCCCTGTTCCCCGACAATGGTGTATACCCCTCACGCAATTCAGAAATAAAATCATGAGCACCT
GCTAATTTGCTGCATAAATAACTTTTTGACGGACATGCCAGGATTAGCCAGTGAAATATTATCAATAACTG
CGATTAAGCAGCACATTGCTCTGCAACACAACCCACCTGACGACGTAACCAAGTTAGGATCGGCCAACGCAAGA
TCATGTCCATCAATTAAGACCTGGCCATTTTACGGAATATAAAAACGTTGAATTAATTTAGTTAATGTGCTTTTT
CCTGAACCAAGACGTCGACAATACCAATAACCTCCCCCTGCTTAATACTGAGATTGATATTATCTAAAATAACC
GGAGAGTCAGGCTTATAGCGAAACCGGATATTACGAAAAGTGATATCACCATTAATTTCCGGTAATGCCAGTTTC
CCATGATAACTTTTCAAGTTGAGAGTTAAGCACATACCAAGGCGGTAAGTATACCAACCTGCTGGAATCC
TGCCAGATTTGTGCAAGGCGAATAACCGGTGCAACAATCTGACCTGCAAGCATATTAAGCAATTAAGTACCA
ATACTTAAATCCCCGAAATAACCAAGGTGTGCACCAACCAAGGTTGATGATCATAACAGTCTTTTGTATTAAC

```

TGTATTCCTTGTTGACCAATGGTGGCTAATACTGTCACCTTTAAAGCCTGCAGCAACATATCCTGCCAATTGTTTG
 TCCCATATGTTTCGTCATCTGAGGTGAGACTGCCATAGCTTTTATAGTGTTAATCGCCGTGACTGATTCCACCAGG
 AAAGATTGATTATCCGCATTCCGTGAAACTTATCATCAAGGCGACGTCGCAAAATGGGGCTAATAAAAAACAGAC
 CATGCAGCATAACAGGGCAGCGAAAATAAGATCACCAGAGTAAGCTTTGGGCTGTAATACCACATTACCGCAAAA
 AATATGAATGAAAATAAAGTCCAGAACAGATGTTAATGCCTGTCTGTGAGGAAATTACGGATCTGGTCTAAT
 TCTCTTACCCTGGCAACAGTATCACCAACACGACGACTCTCAAATAAGAGATCGGTAGCGCCAGTAAATGCCGG
 AAGAGTTTGGCACCCAACTCAACATCAATCCGACTTGTACTATGTGCAAAAATGTAAGTCTTAAACCGCTGAGT
 ATAATCTCAAACACCACCACAACAGATAATGCGACAGTAATAACATTAAGGGTTGAAAACCCCTGTGTAATAAT
 ACTTTGTCCATAACCACCTGAAAAAAAAGGGGGTTATTAATGCAAATAATTGTAAAAAACAGATACAACAAGG
 GTTTCATAAATATTTTCTGTATTTTATAATGGCAGGAATAAACCAGGTAAGTCAAATTTTCCAGTTTCCCG
 GTAACAGAAGAACGGGAAGCAATAAGAATAATATGCCCTGATATAACGCCTCAAACCTCAGACTGTTGAGAACA
 CGGGGATTTGCTGTCTCCAGATCAAAAATAAGATATCTGTTGCTTCTTACTGACTTTAGTCAGAATAAAATGA
 CATCCATCCTCTCTCCAGACTAATGCGGGCAGAGAAATAAAGTTTAAATCGGTCAATTGTTTTTTTACCTGTTTT
 ACCTTTAGTTCTAAAGATTTGCGCAGCAAGCAACCATGACGTTAATCCAGACCAGTCCCGTCTGTGTCAAATCTA
 TGTTTAAATTTCTCCGGTTAACAGAGACGTTATGGTATTGGGCTAAAATCTCCAGGGCGTATAACCCATAATCA
 ATTTTATGACAAGAATCCATTATGACTCCAAAAAATAGCAATCTTATGTGGCACAGCCAGTAAGATTGCTATT
 ATTTAAATTAATAAATTTATGCTGATGCTGTCAAAGTTATTGAGTTCGGTCCATATGAAAACTACTGGCATTACC
GGACAACTGCAATAAAGAAGCTGCAGCTCTTCTCTTTAACATCAAATACTCTGCAGCTGAAATGATTTTGCT
GATTTCATTAATTAATGGATTAAGATTACCCTGACTTCCATAGGCTAATGCATCgatccgatcagccatgga
 accgctggcaccaggggtaccCCAATTAATCATAACCGTATCTGTTCCGGTAGTAGGCGACGTATAGGTTGATT
 GTTGCCACTTTGCCAGACAACGTTACCGTCTGATCTTTTTTAATGTATTTGTATTCAAGTTTTTTCCGGCAGG
 AACGCTAATATCATAGTACCATGTTGGGTATTGGTACATCACTTGGTTAAACATAGGTCCAATTGCTTTATCAGC
 ATCCCAATTTCCAGCTCGCTCACATTCCCAACGATATATAAATTGGTCCCTGGGCTCGTTGTGGCATTGTTAAC
 ACCAAGCGGACACTGACTTGATTGCCTGACAATACTTCAAACCTTTGTAAGTAGGGCTTTTTAAGTTTGTCTGC
 AGTTACGACGGATAGATCATAATAACCGCTGCTACATTAGGCACCTTACGCTTATTTCTGTATTTGACCAAGA
 AATAATTTCAGAAGAGGTTGAATCAAAGAGAACGCTTCTCTCATCACCAATCCTTACCCTTACTGTTAT
 GGTATTTCCGGACTTACCATCATAGGACCACTTGGCCGATTAGAGGAGACGTAGAGGGGTTGCTTACTTGCCA
 AACCGCTACGCTATTTGCTCGTAATTGAAAGGAATTTACGGCTCCATTGGCGTTAACAGTAATCGTGTTCATC
 TAAACGTTGCTGTAGTTCATCTGTATAGTTCCTTGGAGTAAAGAGGTGTTAAATTAGTGATCGTCTGTTACT
 ATTACTGCTATTTACAGCAGTTAATACAATACTATTGCCAACGTTCTTTTATAAATAAATGTCTTCTGTTACAG
 CCAACGTTGATTGTAGTGCCATAGCCTAAGGCGGAATTTGTTGGCGTAGTGAAGCAAGTTTACTGATGATTTG
 ATAGGAGTTGGTAGACCGATCAAATGTTTTCAATGGTTTGCATTTTCCAGGGTCTTCCACCTGTTACATACTG
 CTCTGTCCCGTAGTAAATCGTTGGTACACCACGAGAAGTAAAGCAAGACAGCTAGGGCCATATCTGTCTGACGGT
 TGAAGATGATCCTACCGAAAAACGACTCATGTCTGATTATCAATAAAGGTTACTTGATCAATGACCTCGTTATA
 CTCTTTTTCTGTACTGGTAATCATTTTATTAAATCATACCAGTTGCTTGTGCGATCTTTTAAAGACGTTACGAAT
 GGTTTGACCGAATTGAAAATCTAATAAACTCATACCCTTTCATTAGCGAAGTATGATTTTGGGGATCAACTTC
 TCCTGATCCTAAAAACCTTCTCAAATGTGAAAACAGGTTTATGCGAATAGATTTGCTCATTAAAGAGGTTTG
 CCACCCTTCTGACATATGCTTAAACGGCATCTACTCGAATGCCATCAATCCCTTTATCTAACAGAACTTAATCGA
 CTCTTTTAAATATTGATCCATGACTGTGTTGTTTAAATCATAGTCTGCCAGATCATATAAGTTTCTGTAATGCT
 ATCTTCATATGAAGAGAAATCTGTTCCGCCATTGTGGTGAAGAGGTTTTGTTGATCATTTGAATAGTTACCTAA
 TAATGTGCCATTATCATATATCGCCCATTTTCAACATAGTTAGGGTTCGTTTCAAGTGCCGGTATGAATGATT
 TGGCGTGAAATCCATGATTACCTTTATCCATTGCTATGTGCGGTAATTAACGATCAAAGTATCAAATTT
 CCCATAGTAAGGGTTTTGCTTTTTGTAATCTCGAGCCCAATATCCATGGTAGGAGGTATAGCCGTTGGGTGTAG
 GGCATAAACGTTTTGACTGGCTGAGAAATCCATAGTCCGTAATGCCTAAATCAGTTAAGTAAACCGTATTGAT
 TTTGTCTATAATCCCTTCCAGTCCCACCACAATACTTATGAAGATCTATACAGTTTTGACTAAAGATAGCGCC
 TGAAGGATTGTTGCCAGGATTCCCGTCCAGAGAAATCGATCGGTAACAACCTGGTAAATCACATCTTTTGGATAAT
 GACTTTGTTGTTACGTCggtaccagatctgggctgtccatgtgctggcgttcgaatttagcagcagcggtttc
 tttcatatgtatatctccttcttaaagttaacaaaattatttctagaggggaattgttatccgctcacaattcc
 cctatagtgagtcgtattaatttcgcgggatcgagatcgatctcgatcctctacgccggacgcatcggtggccggc
 atcaccggcgccacaggtcggttgctggcgcttatatcgccgacatcaccgatggggaagatcgggctcgccac
 ttcgggctcatgagcgttgtttcggcgtgggtatgggtggcagggcccgtggccgggggactgttgggctggccac
 tccttgatgcaccattccttgcggcggtgctcaacggcctcaacctaactactgggctgcttctaattgacg

gagtcgcataagggagagcgtcgagatcccggacaccatcgaatggcgcaaaaccttctcgcggtatggcatgata
gcgcccgaagagagatcaattcaggggtggtgaatgtgaaaccagtaacggtatatacgatgtcgagagatgccgg
tgtctcttatcagaccgttcccgcgtggtgaaccaggccagccagtttctgcgaaaacgcggaagaaagtga
agcggcgatggcggagctgaattacattccaaccgctggcacaacaactggcgggcaaacagctggtgctgat
tggcgttgccacctcagctggtgcccctgcacgcgctcgcaaatgtcgcgcggtatataatctcgcgccgatca
actgggtgccagcgtggtggtgctgatggtagaacgaagcggcgtcgaagcctgtaaagcggcgggtgcacaatct
tctcgcgcaacgcgtcagtggtgatcattaactatccgctggatgaccaggatgccattgctgtggaagctgc
ctgactaatgttccggcgttatttcttgatgtctctgaccagacacccatcaacagtattatttctcccatga
agacggtacgcgactggcgtggagcatctggtcgcattgggtcaccagcaaatcgcgctgttagcgggcccatt
aagttctgtctcggcgcgtctgcgtctggtcggctggcataaatatctcactcgcaatcaaatcagccgatagc
ggaacgggaaggcactggagtgcatgtccggttttcaacaacccatgcaaatgctgaatgagggcatcgttcc
cactgcatgctggttgccaacgatcagatggcgtggcgcaatgcgcgccattaccgagtcggggtgctgctg
tgggtcggacatctcggtagtgggatacgcgataccgaagacagctcatgttatatcccgcgttaaccacat
caaacaggattttcgcctgctggggcaaacagcgtggaccgcttgctgcaactctctcagggccaggcggtgaa
gggcaatcagctgttcccgtctcactggtgaaaagaaaaaccacctggcgccaatagcgaacccgctctcc
ccgcgcttggccgattcattaatgcagctggcagcaggtttcccgactggaaagcgggagtgagcgaacg
caattaatgtaagttagctcactcattagcaccgggatctcgaccgatgcccttgagagccttcaaccagtca
gctcctccgggtgggcgcgggcatgactatcgctcgccgacttatgactgtcttctttatcatgcaactcgtag
gacagggtccggcagcgtctgggtcatttccggcgaggaccgcttctcgctggagcgcgacgatgatccggcctgt
cgcttgcggtattcggaaatctgacgcccctgctcaagcctctgctcactgggtcccgccaccaaacgttccggcg
agaagcaggccattatcgccggcatggcggccccacgggtgctgcatgatcgtgctcctgtcgttgaggaccggc
taggctggcggggttgccttactgggttagcagaatgaatcaccgatacgcgagcgaacgtgaaagcactgctgct
gcaaacgtctgcgacctgagcaacaacatgaatggtcttcgggttccggttctcgtaaagctggaaacgcgga
agtcagcgcctgcaccattatgttccggatctgcatcgaggatgctgctggctaccctgtggaacacctacat
ctgtattaacgaagcgtggcattgacctgagtgattttctctggtcccgcgcatccataccgccagttggt
taccctcaaacgttccagtaaccgggcatgttcatcatcagtaaccctgatcgtgagcatcctctctcgtttca
tcggtatcattacccccatgaacagaaatcccccttacacggaggcatcagtgaccaaacaggaaaaaccgccc
ttaacatggcccgtttatcagaagccagacattaacgcttctggagaaactcaacgagctggacgaggatgaac
aggcagacatctgtgaatcgcttcacgaccacgctgatgagctttaccgagctgcctcgcgcttccgggtgatg
acgggtgaaaacctctgacacatgcagctcccggagacggtcacagcttgtctgtaagcggatgccgggagcagac
aagcccgtcagggcgcgtcagcgggtgttggcgggtgtcggggcagccatgaccagtcacgtagcagatagcg
gagtgatactggcttaactatgcggcatcagagcagattgtactgagagtgaccataatagcgggtgtaata
ccgacagatgcgtaaggagaaaaataccgcatcaggcgtcttccgcttctcgtcactgactcgtgctgctcg
gtcgttccgctgctgagcggatcagctcactcaaaggcggtaatacgggttatccacagaatcaggggataac
gcaggaaagaacatgtgagcaaaaggccagcaaaaggccaggaaacgtaaaaaggccgctgtgctggcgttttct
cataggctccgccccctgacgagcatcacaanaatcgacgctcaagtcagaggtggcgaacccgcagaggacta
taaagataccaggcgttccccctggaagctccctcgtgctcctctgttccgacctgcccgttaccggatac
ctgtccgcttctccctcgggaagcgtggcgttttctcatagctcacgctgtaggtatctcagttcgggtgatg
gtcgttctcctcaagctgggtgtgtgacgaacccccgttcagcccagcgtgctccttatccggtaactat
cgtcttgagccaacccgtaagacagacttatcgccactggcagcagccactggtaacaggattagcagagcgcg
aggatgtaggagggtgctacagagttcttgaagtgggtggcctaactacggctacactagaaggacagatattggt
atctgcgctctgctgaagccagttaccttcggaaaaagagtggtagctcttgatccggcaaacaaaccaccgct
ggtagcgggtggtttttgtttgcaagcagcagattacgcgcagaaaaaaaggatctcaagaagatcctttgatc
tttctacggggtctgacgctcagtggaacgaaaactcacgttaagggttttgggtcatgaacaataaaaactgtc
tgcttacataaacagtaatacaaggggtgttatgagccatattcaacgggaaacgtcttctgcttaggcccgcgatt
aaattccaacatggatgctgatttatatgggtataaatgggtcgcgataatgtcgggcaatcaggtgcgacaat
ctatcgattgtatgggaagcccgatgcccagagttgttctgaaacatggcaaggtagcgttgccaatgatgt
tacagatgagatggtcagactaaactggctgacggaatttatgctcttccgaccatcaagcattttatccgtac
tctgatgatgcatggttactcaccactgcgatccccgggaaaaacagcattccagggtattagaagaatattcctga
ttcagggtgaaaatattgttgatgctgctggcagtgctcctgctgcccgggttgattcagattcctgtttgtaattgtcc
tttaacagcgtatcgcgtatttctgctcgtcagggcgaatcacgaatgaataacgggttgggtgatgagagtg
ttttgatgacgagcgaatggctggcctgttgaacaagtctggaaagaaatgcataaacttttgcattctcacc

ggattcagtcgctcactcatggtgatttctcacttgataaccttatttttgacgaggggaaattaataggttgat
tgatgttgacgagtcggaatcgagaccgataaccaggatcttgccatcctatggaactgcctcggtagttttc
tccttcattacagaaacggctttttcaaaaataggtattgataatcctgatatgaataaattgcagtttcattt
gatgctcgatgagtttttctaagaattaattcatgagcggatacatatttgaatgtatttagaaaaataacaaa
taggggttccgcgcacatttccccgaaaagtgccacctgaaattgtaaacttaataattttgttaaaattcgcgt
taaattttgttaaatcagctcatttttaaccaataggccgaaatcggcaaaatcccttataaatcaaaagaat
agaccgagatagggttgagtgttccagtttgaacaagagtcactattaagaacgtggactccaacgtca
aaggcgaaaaaccgtctatcagggcgatggcccactacgtgaaccatcacctaatacaagtttttggggtcga
gggtccgtaaagcactaaatcggaaccctaaagggagccccgatttagagcttgacggggaaagccggcgaacg
tggcgagaaaggaaggaagaaagcgaaggagcggcgctagggcgctggcaagtgtagcggtcacgctgcgcg
taaccaccacaccgcccgcgttaatgcgcgctacagggcgcgtcccattcgcca