

文章编号: 1000- 0615(2003)03- 0239- 06

# 中华鲟半胱氨酸蛋白酶抑制剂 C 基因的原核表达

马冬梅<sup>1,2</sup>, 白俊杰<sup>1</sup>, 劳海华<sup>1</sup>, 简清<sup>1</sup>, 叶星<sup>1</sup>, 罗建仁<sup>1</sup>

(1. 中国水产科学研究院珠江水产研究所 农业部热带亚热带鱼类选育与养殖重点开放实验室, 广东 广州 510380;  
2. 湛江海洋大学水产学院, 广东 湛江 520425)

**摘要:** 为了研究鱼类半胱氨酸蛋白酶抑制剂(cystatin)的功能并探索其在水产品加工和病害防治中的应用潜力, 将改造后的中华鲟(*Acipenser sinensis*) cystatin C cDNA 亚克隆到原核表达载体 pBV 220, 构建表达 cystatin C 的大肠杆菌基因工程菌。该工程菌经温度诱导、SDS PAGE 检测, 在约 12.4 kD 处有一特异蛋白带, 该特异蛋白的含量约为菌体总蛋白的 25%。重组半胱氨酸蛋白酶抑制剂经洗涤、溶解、透析、复性后纯度为 85%, 实现了中华鲟 cystatin C 在大肠杆菌中的高效表达。木瓜蛋白酶活性抑制实验结果表明该重组 cystatin C 具有明显的酶活抑制作用。

**关键词:** 中华鲟; 半胱氨酸蛋白酶抑制剂; 原核表达; 蛋白酶抑制活性

**中图分类号:** S917.4      **文献标识码:** A

## Expression of *Acipenser sinensis* cystatin C in prokaryote

MA Dong-mei<sup>1,2</sup>, BAI Jur-jie<sup>1</sup>, LAO Hai-hua<sup>1</sup>, JIAN Qing<sup>1</sup>, YE Xing<sup>1</sup>, LUO Jian-ren<sup>1</sup>

(1. Key Laboratory of Tropical & Subtropical Fish Breeding & Cultivation Certificated by the Ministry of Agriculture, Pearl River Fishery Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou 510380, China  
2. Zhanjiang Ocean University, Zhanjiang 520425, China)

**Abstract:** In order to explore the functions of fish cystatin and the potential values in the fish disease prevention and cure, as well as seafood process industry, polymerase chain reaction (PCR) technique was used to modify the cDNA of Chinese sturgeon (*Acipenser sinensis*) cystatin mature peptide. The cDNA was subcloned into expression vector pBV 220, then a cystatin recombinant expression bacteria was constructed. After temperature inducement and SDS-PAGE analysis, the recombinant expression bacteria produced a special protein about 12.4 kD in molecular weight. The proportion of recombinant protein in total bacterial protein was about 25%. The purity of the recombinant cystatin, which was washed, dissolved, dialysed and renatured, was about 85%. The inhibitory activity of recombinant cystatin could be measured by inhibiting the protease activity of papain. The inhibitory activity of recombinant cystatin was  $48\text{U} \cdot \mu\text{g}^{-1}$ .

**Key words:** *Acipenser sinensis*; cystatin; prokaryotic expression; protease inhibitory activity

广泛存在于动植物组织和体液中的半胱氨酸蛋白酶抑制剂能与木瓜蛋白酶、组织蛋白酶等半胱氨

收稿日期: 2002-09-20

资助项目: 中国水产科学研究院基金项目(01-08-02), 广东省自然科学基金项目(021642)

作者简介: 马冬梅(1978-), 女, 辽宁抚顺人, 硕士, 从事鱼类生物技术。Tel: 020-81616127, E-mail: ma\_dong\_mei@sina.com

通讯作者: 白俊杰(1957-), 男, 研究员, 硕士, 主要从事水产生物技术, E-mail: jjbai@163.net

酸蛋白酶形成紧密的复合物,抑制他们的活性,从而保护蛋白质的二硫键不被半胱氨酸蛋白酶破坏,阻止蛋白的降解<sup>[1]</sup>。进一步研究表明半胱氨酸蛋白酶抑制剂具有很好的生物防御作用。植物半胱氨酸蛋白酶抑制剂可抑制致病真菌,如赤霉菌和稻瘟病菌等的生长,其作用机制可能与半胱氨酸蛋白酶抑制剂抑制了半胱氨酸肽链内切酶的侵害有关<sup>[2]</sup>。当植物受到病虫害侵害时,体内的抑制剂含量会增加,而抑制剂含量高的植株感染病害的几率小<sup>[3]</sup>。人类半胱氨酸蛋白酶抑制剂对肿瘤转移<sup>[4]</sup>、病毒的感染都有抑制作用<sup>[5]</sup>。半胱氨酸蛋白酶抑制剂 C (cystatin C) 在动物胚胎中含量较高,可能对发育着的胚胎有保护作用<sup>[6]</sup>。近来有报道,半胱氨酸蛋白酶抑制剂在细胞程序性死亡中也起重要的调节作用<sup>[7]</sup>。有关鱼类半胱氨酸蛋白酶抑制剂的报道很少,初步研究表明,半胱氨酸蛋白酶抑制剂能抑制杆状病毒所导致的鱼类培养细胞的死亡<sup>[8]</sup>。而把鱼类半胱氨酸蛋白酶抑制剂用于水产品加工过程中,如用于抑制水产品的蛋白酶活性,延长保鲜时间,也已引起关注<sup>[9]</sup>。鉴于鱼类半胱氨酸蛋白酶抑制剂在病害防治和水产品加工中可能存在着巨大的应用前景,本实验室在原有中华鲟 cystatin C 基因克隆的基础上,构建大肠杆菌基因工程菌,成功获得具有生物活性的重组 cystatin C,可为半胱氨酸蛋白酶抑制剂在水产病害防治研究和水产品加工保鲜应用研究提供基本材料。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

中华鲟 cystatin C cDNA 质粒由本实验室克隆和构建<sup>[10]</sup>,原核表达载体 pBV220 来自中国预防医学科学院病毒所,大肠杆菌 DH5 $\alpha$  由本实验室保存。限制性内切酶、T<sub>4</sub>DNA 连接酶、Pfu DNA 聚合酶及其它主要试剂购自 Promega 公司或上海生工生物工程公司。DNA Gel Extraction Kit 为 Roche 公司产品。木瓜蛋白酶(USP/6000/mg)为 Merck 公司产品。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 中华鲟 cystatin C 基因改造及原核表达工程菌的构建

中华鲟 cystatin C 表达质粒的构建图见图 1。用于改造中华鲟 cystatin C cDNA 的引物 P1、P2 由上海生工生物工程公司合成,合成产物经 SDS-PAGE 纯化。以含有中华鲟 cystatin C cDNA 的质粒为模板,以 P<sub>1</sub>、P<sub>2</sub> 为引物,用 Pfu DNA 聚合酶 PCR 扩增和改造 cystatin C cDNA。PCR 反应模板浓度 10ng,引物浓度 25pmol·L<sup>-1</sup>,反应条件为变性 94℃,30s;退火 50℃,30s;延伸 72℃,30s;30 个循环后,72℃延伸 7min。经 DNA Gel Extraction Kit 纯化后,将该 PCR 产物和 pBV220 载体分别用 EcoR I 酶切,T<sub>4</sub>DNA 连接酶连接过夜,转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$ 。重组质粒用 EcoR I 和 Pst I 酶切鉴定。具体方法见文献[11]。DNA 测序在 ABI PRISM<sup>TM</sup> 377 全自动荧光测序仪上进行,用 DNA 分析软件 Vector NTI Suit 6.0 分析测序结果。

#### 1.2.2 诱导表达和 SDS-PAGE 分析

参照文献[12]的方法,重组菌 30℃培养至 OD<sub>600</sub> 为 0.4~0.5 时,快速升温至 42℃诱导表达,在 0.5h、1h、2h、3h、4h、5h、6h、7h 各取菌 1mL,离心弃上清,加 100 $\mu$ L 无菌水重悬菌体,用 15% SDS-PAGE、考马斯亮蓝染色检测重组蛋白。选择合适的诱导时间,用薄层扫描测定重组蛋白占总蛋白的百分比。把诱导后的重组菌超声波破碎,12000r·min<sup>-1</sup>离心 10min,分别取上清和沉淀,电泳检测表达产物的存在形式。

#### 1.2.3 重组菌表达产物的初步纯化和复性

参照文献[12]的方法,将诱导后的重组菌超声波破碎,12000r·min<sup>-1</sup>离心 10min 收集沉淀物,将其分成 4 等份,分别用 0.05mol·L<sup>-1</sup> Tris HCl(pH8.5)、2mol·L<sup>-1</sup> 尿素、4mol·L<sup>-1</sup> 尿素和 0.05mol·L<sup>-1</sup> PBS (pH8.5) 洗涤 3~5 次,8mol·L<sup>-1</sup> 尿素溶解包涵体,用含有氧化型谷胱甘肽和还原型谷胱甘肽的 0.05mol·L<sup>-1</sup> Tris HCl(pH8.5) 进行透析和复性。Bradford 法测定蛋白浓度<sup>[13]</sup>。

### 1.2.4 重组 cystatin C 活性测定

在每支试管中加入 50 $\mu$ L 酪蛋白(5.0mg $\cdot$ mL $^{-1}$ ), 37 $^{\circ}$ C 保温 10min 后, 加入 30 $\mu$ L 木瓜蛋白酶(1mg $\cdot$ mL $^{-1}$ ) 和适量复性后的表达产物, 再加缓冲液(50mmol $\cdot$ L $^{-1}$  pH7.6 Tris- HCl, 2mmol $\cdot$ L $^{-1}$  半胱氨酸盐酸盐, 0.1mmol $\cdot$ L $^{-1}$  EDTA) 至终体积 300 $\mu$ L, 37 $^{\circ}$ C 保温 20 min 后, 加入 3 mL 考马斯亮蓝溶液, 混均, 室温放置 20 min, 测定 OD<sub>595</sub>, 抑制活性由下列公式反映:

$$\Delta OD_{595} = OD_{595} - OD_{595}'$$

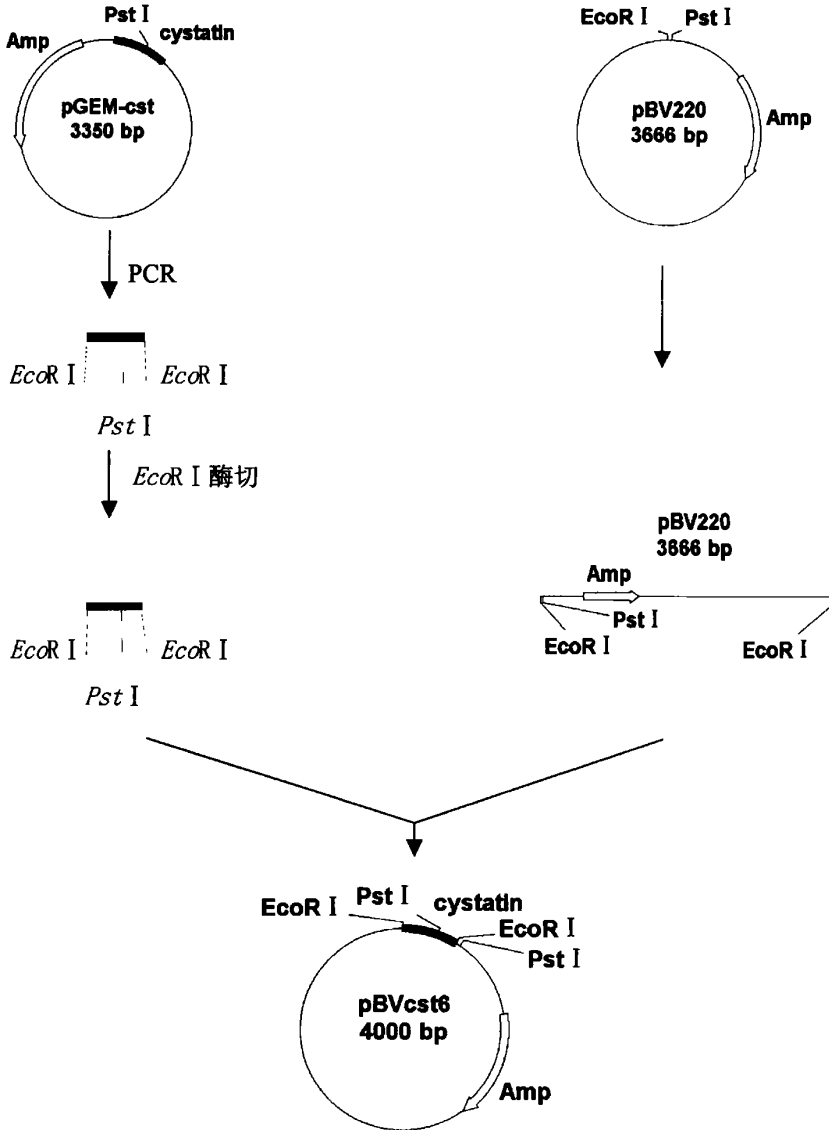


图 1 中华鲟 cystatin C 表达质粒构建图

Fig. 1 The construction of cystatin C expression plasmid pBVcst

其中,  $\Delta OD_{595}$  表示加入重组 cystatin C 与不加重组 cystatin C 的两个反应吸光度的变化值,  $OD_{595}$  表示加入适量重组 cystatin C, 反应 20min 后的吸光度,  $OD_{595}'$  表示不加重组 cystatin C, 木瓜蛋白酶将酪蛋白完全分解时 595nm 的吸光度。每一数据测定 3 次, 取平均值。此外还分别以不加木瓜蛋白酶、只加酪蛋白的管作对照。木瓜蛋白酶的活力单位定义为 37 $^{\circ}$ C, 1h 水解 1mg 酪蛋白所需的酶量。抑制活力单位定义

为 37℃, 反应 1h, 抑制剂抑制木瓜蛋白酶活力一半时, 降低 1 个木瓜蛋白酶活力单位所需的抑制剂量。抑制比活力定义为每毫克抑制剂有多少抑制活力单位数。

## 2 结果

### 2.1 中华鲟 cystatin C 表达质粒的构建和鉴定

为了使鲟鱼 cystatin C cDNA 适合在原核表达载体 pBV220 中表达, 设计并合成了 1 对 PCR 扩增引物对该基因进行改造:

P<sub>1</sub> 为 5'- CG GAA TTC ATG GGT TTG GTC GGA GGC CCC- 3'

P<sub>2</sub> 为 5'- CG GAA TTC TTA AGT GCA GGT ATT TT- 3'

P<sub>1</sub> 是 5 端引物, 从中华鲟 cystatin C 成熟肽编码序列的第一个碱基开始扩增, 并加入了 1 个起始密码子 ATG 和 1 个 *EcoR* I 酶切位点; P<sub>2</sub> 为 3 端引物, 从中华鲟 cystatin C 成熟肽编码序列的终止码开始反向扩增, 另外还加入了 1 个 *EcoR* I 酶切位点便于基因亚克隆。以含有中华鲟 cystatin C cDNA 的克隆质粒为模板, P<sub>1</sub>、P<sub>2</sub> 为引物, PCR 扩增得到约 350bp 的 DNA 片段, 将该片段插入原核表达载体 pBV220 的多克隆位点中, 转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$  后, 筛选得到 3 个重组子。经 *EcoR* I 酶切, 3 个重组子均有约 350bp 的片段插入, 分别命名为 pBVcst6、pBVcst9、pBVcst10。由于外源基因是非定向插入到表达载体的, 利用在外源基因后部和载体多克隆位点上均有 1 个 *Pst* I 酶切位点, 可用 *Pst* I 酶切来判断重组子外源基因的插入方向, 结果 pBVcst9、pBVcst10 经 *Pst* I 酶切得到大小约 230bp 和 3700bp 两片段, 断定为反向插入的重组子; pBVcst6 经 *Pst* I 酶切, 得大小为约 160bp 和 3800bp 两个片段, 是插入方向正确的重组子(图 2)。为进一步检测 pBVcst6 质粒中外源基因的改造结果是否正确, 是否有突变发生, 对插入部分进行了序列测定, 测序结果表明改造后的基因与预期设计的序列完全一致, 扩增和构建中没有发生基因突变(测序图未显示)。

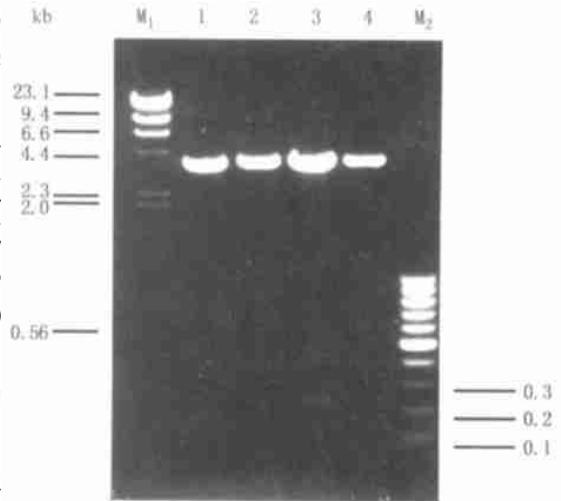


图 2 *Pst* I 酶切判断重组基因方向

Fig. 2 The *Pst* I restriction mapping analysis

M1.  $\lambda$  DNA/Hind III; M2. 100bp DNA 标准; 1. pBV220; 2. 3. 反向插入; 4. 正向插入; M1.  $\lambda$  DNA/Hind III; M2. 100bp marker; 1. pBV220; 2. pBVcst10; 3. pBVcst9; 4. pBVcst6

### 2.2 重组菌的表达与 SDS-PAGE

诱导后的重组菌经 SDS-PAGE 检测, 结果表明在分子量约 12.4kD 处有 1 条特异蛋白带出现, 与预期推测一致。诱导开始后 0.5h 即有表达产物出现, 在 7h 的诱导期间, 其表达量随时间的增加而增加。薄层扫描检测分析表明: 经 4h 诱导表达的特异蛋白约占菌体总蛋白的 25%。诱导后的重组菌经超声波破碎、离心, 分别取上清和沉淀进行 SDS-PAGE 分析, 结果显示特异蛋白带主要出现在沉淀中, 而上清液中基本无此特异带出现(图 3), 说明表达产物主要是以包涵体的形式存在的。

### 2.3 表达产物的纯化与复性

在初步纯化重组 cystatin C 时, 分别采用了 4 种溶液洗涤包涵体, 即 0.05mol·L<sup>-1</sup> Tris-HCl(pH8.5)、2mol·L<sup>-1</sup> 尿素、4mol·L<sup>-1</sup> 尿素和 0.05mol·L<sup>-1</sup> PBS (pH8.5), 结果 0.05 mol·L<sup>-1</sup> Tris-HCl(pH8.5) 和 2 mol·L<sup>-1</sup> 尿素洗涤效果较好, 0.05 mol·L<sup>-1</sup> PBS (pH8.5) 的洗涤效果较差, 用 4 mol·L<sup>-1</sup> 尿素洗涤包涵

体虽然也有较好的洗涤效果,但在洗涤杂蛋白的同时也溶解了部分包涵体,最终选择用  $2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的尿素来洗涤粗制包涵体。包涵体经洗涤、溶解、透析、复性后,目标蛋白量约占总蛋白量的 85%。用 Bradford 法测定蛋白浓度,重组 cystatin C 的表达产量为每升培养基 33.3mg 重组 cystatin C。

## 2.4 重组 cystatin C 活性测定

以加入抑制剂的量为横坐标,  $\Delta\text{OD}_{595}$  为纵坐标,制作重组 cystatin C 对木瓜蛋白酶的抑制活性曲线(图 4)。抑制作用曲线分析表明:抑制剂的量在  $10\mu\text{g}$  以内,随 cystatin C 含量增加,抑制活力也成比例增强,显示很好的线性关系,曲线方程为  $y = 0.0777x$  ( $R^2 = 0.97$ )。当抑制剂的量大于  $10\mu\text{g}$  时,曲线就不符合上述方程,可能是由于竞争性抑制作用,此时木瓜蛋白酶已经完全被抑制,再增加抑制剂的量,抑制活力也不会再增加。按抑制比活性的定义计算出重组 cystatin C 的比活力为每毫克 48 个抑制活力单位。

## 3 讨论

中华鲟 cystatin C 是单链多肽,由 112 个氨基酸组成,无糖基化修饰,只有两个二硫键。由于其分子量适中,二级结构简单容易复性,比较适合在大肠杆菌表达系统中表达。在设计引物和构建表达质粒时,去掉了 cDNA 3' 端的非编码区,由于中华鲟 cystatin C 基因的终止子 TAA 正是大肠杆菌的强终止子,能有效避免翻译时的通读,而达到高效表达。本实验采用的含  $P_{\text{RPL}}$  启动子的高效原核表达载体,经温度 ( $42^\circ\text{C}$ ) 诱导,使温度敏感抑制物  $\text{Cit}857$  失活,启动子即可开始转录。该表达系统具有诱导方法简单、快速、节省费用的优点,适合较大规模生产。开始升温诱导后,重组菌经 SDS-PAGE 检测,在 0.5h 时就有表达产物出现,在 7h 内表达量随诱导时间延长而增加,前 4h 内表达量增加最快,4h 之后虽然表达产物仍在增加,但增加速度减慢,考虑成本的关系,认为诱导时间 4~5h 较合适。

除去纯化过程中损失的部分,在摇床培养条件下重组中华鲟 cystatin C 表达产量仍能达到每升培养基 33.3mg。与 Li 等<sup>[6]</sup>报道的虹鳟 cystatin C 在大肠杆菌中的表达量为 3~5mg 每升培养基相比高了近 10 倍。在抑制活性方面,我们将重组中华鲟 cystatin C 的抑制比活力与邓俊林等<sup>[2]</sup>所测得的玉米巯基蛋白酶抑制剂的活力进行了比较,玉米巯基蛋白酶抑制剂  $1\mu\text{g}$  约能抑制  $0.278\mu\text{g}$  木瓜蛋白酶,而  $1\mu\text{g}$  重组中华鲟 cystatin C 约能抑制  $3\mu\text{g}$  木瓜蛋白酶。重组中华鲟 cystatin C 的抑制活力较强可能与中华鲟 cystatin C 的特殊结构有关,在水产品加工中,鲟鱼肉质结构好,肌肉不易软化,易于保存,这也暗示中华

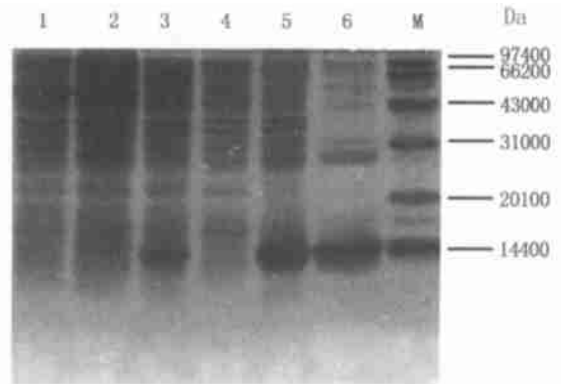


图 3 SDS PAGE 检测表达产物

Fig. 3 SDS PAGE analysis of the expression products

1. 诱导前的重组菌; 2. 诱导 4h 的 DH5 $\alpha$  (pBV220); 3. 诱导 4h 的重组菌; 4. 诱导 4h 重组菌离心后上清; 5. DH5 $\alpha$  (pBV<sub>cst6</sub>) 包涵体; 6. 纯化后的包涵体; M. 低分子量标准蛋白

1. DH5 $\alpha$  (pBVcst6) before inducing; 2. DH5 $\alpha$  (pBV220) 4h after inducing; 3. DH5 $\alpha$  (pBVcst6) 4h after inducing; 4. Supernatant of DH5 $\alpha$  (pBVcst6) 4h after inducing; 5. Inclusion body of DH5 $\alpha$  (pBVcst6) 4h after inducing; 6. Inclusion body after purification; M. LMW protein marker

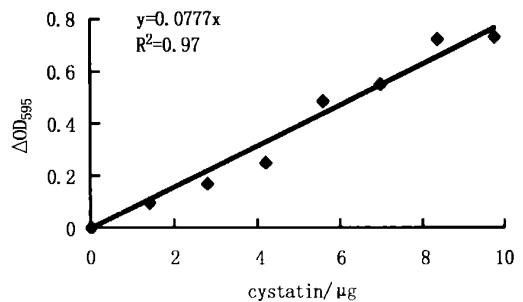


图 4 重组 cystatin C 抑制活性曲线

Fig. 4 The curve of cystatinC inhibitory activity

底物: 木瓜蛋白酶; 反应时间: 20min; 反应温度:  $37^\circ\text{C}$

缓冲液:  $50\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  pH7.6 Tris-HCl,  $2\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  半胱氨酸盐酸盐,  $0.1\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  EDTA

Substrate: papain; Reaction period: 20min;

Reaction temperature:  $37^\circ\text{C}$

Buffer:  $50\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  pH7.6 Tris-HCl,  $2\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  Cys-HCl,

$0.1\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  EDTA

鲟 cystatin C 可能有其特殊的结构。在大肠杆菌中表达的中华鲟 cystatin C 虽然活性较高,但与毕赤酵母表达的重组中华鲟 cystatin C 相比,大肠杆菌表达的 cystatin C 的比活力只有毕赤酵母表达的重组中华鲟 cystatin C 抑制比活力的 20%,其原因除了在毕赤酵母中表达的重组 cystatin C 纯度高以外,可能与原核表达的重组 cystatin C 在复性过程中不能完全正确的折叠,只有部分表达产物能够正确折叠成为具有活性的蛋白有关。Li 等<sup>[9]</sup>曾报道,大肠杆菌表达的虹鳟 cystatin C 只有 20% 的表达产物能够正确折叠。这也是原核表达系统的缺陷之一。

#### 参考文献:

- [ 1 ] Barrett A J, Rwlings N D, Davies M E, et al. Proteinase inhibitors[M]. London: Academic Press, 1986. 515- 569.
- [ 2 ] Deng J L, Zeng Z K. Purification and characterization of a com cysteine proteinase inhibitor[J]. J Sichuan Univ( Natural Science Edition), 1998, 35( 1): 107- 111. [ 邓俊林, 曾仲奎. 玉米巯基蛋白酶抑制剂的纯化及部分性质[J]. 四川大学学报( 自然科学版), 1998, 35( 1): 107- 111].
- [ 3 ] Zeng Z K, Bao J K, Zhou H, et al. The molecular modification of cysteine proteinase inhibitor from wheat seed and its activity [J]. Scientia Agricultura Sinica, 1997, 30( 1): 38- 43. [ 曾仲奎, 鲍锦库, 周 红, 等. 小麦巯基蛋白酶抑制剂的分子修饰与其生理活性研究[J]. 中国农业科学, 1997, 30( 1): 38- 43. ]
- [ 4 ] Sexton P S, Cox J L. Inhibition of motility and invasion of B16 melanoma bu the overexpression of cystatin C[J]. Melanoma Res, 1997, 7: 97- 101.
- [ 5 ] Argos P, Kamer G, Nicklin M J H, et al. Similarity in gene organization and homology between proteins of animal picorviruses and a plant comovirus suggest common ancestry of these virus families[J]. Nucleic Acid Res, 1984, 12: 7251- 7267.
- [ 6 ] Li F, An H, Seymour T A, et al. Molecular cloning, sequence analysis and expression distribution of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) cystatin C [J]. Comparative Biochemistry and Physiology, Part B, 1998, 121: 135- 143.
- [ 7 ] Marianne S. Purification and characterization of two cysteine proteinase inhibitors from the shin of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) [J]. Comparative Biochemistry and Physiology, Part B, 1998, 121: 257- 264.
- [ 8 ] BjÖklund H V, Johansson T R, Rinne A. Rhabdovirus- induced apoptosis in a fish cell line is inhibited by a human endogenous acid cysteine proteinase inhibitor[J]. J Virol, 1997, 71: 5658- 5662.
- [ 9 ] Li F, An H, Seymour T A, et al. Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) cystatin C: expression in *Escherichia coli* and properties of the recombinant protease inhibitor[J]. Comparative Biochemistry and Physiology, Part B, 2000, 125: 493- 502.
- [ 10 ] Bai J J, Lao H H, Ye X, et al. Molecular cloning and sequence analysis of cystatin mature peptide cDNAs from two species of sturgeons [J]. Acta Zool Sin, 2002, 48( 4): 540- 543. [ 白俊杰, 劳海华, 叶 星, 等. 两种鲟半胱氨酸蛋白酶抑制剂成熟肽 cDNA 的克隆与分析[J]. 动物学报, 2002, 48( 4): 570- 573. ]
- [ 11 ] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular cloning, a laboratory manual (2nd ed) [M]. Beijing: Science Press, 1993. 34- 70. Sambrook [J]. Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. 分子克隆实验指南(第二版)[M]. 北京: 科学出版社, 1993. 34- 70. ]
- [ 12 ] Bai J J, Ma J, Jian Q, et al. Cloning of cDNA for common carp GH and its expression in prokaryocyte[J]. Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology, 1999, 15( 3): 409- 412. [ 白俊杰, 马 进, 简 清, 等. 鲤鱼(*Cyprinus carpio*) 生长激素基因克隆及原核表达[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 1999, 15( 3): 409- 412 ]
- [ 13 ] Wang J Z, Fan M. Protein technological manual[M]. Beijing: Science Press, 2002. 42- 47. [ 汪家政, 范 明. 蛋白质技术手册[M]. 北京: 科学出版社, 2002. 42- 47. ]