

芍药 Actin 基因在大肠杆菌中的高效表达

徐杰¹, 高水平², 张文婷¹, 史国安¹, 范丙友^{1*}

1. 河南科技大学农学院, 河南 洛阳 471003

2. 河南科技大学林学院, 河南 洛阳 471003

摘要: **目的** 构建芍药 *Paeonia lactiflora* Actin (PIActin) 基因原核表达载体, 优化 PIActin 基因在大肠杆菌中的高效表达体系。**方法** 基于 PIActin 基因 cDNA 序列及原核表达载体 pET-32a (+) 多克隆位点序列, 设计一对 5' 末端分别插入 BamH I 和 Hind III 酶切位点的特异性 PCR 引物, 基于 RT-PCR 技术亚克隆 PIActin 基因; 用 BamH I 和 Hind III 双酶切重组质粒 pMD18-T-PIActin 和原核表达载体 pET-32a (+), 胶回收纯化目的基因和空载体, 连接、转化后应用菌落 PCR、质粒 PCR 和双酶切鉴定出重组子 pET-32a (+)-PIActin, 转化 BL21 (DE3) 菌株获得基因表达工程菌; 分别设置诱导剂异丙基- β -D-硫代半乳糖苷 (IPTG) 浓度梯度、诱导的菌体起始密度梯度及表达时间梯度, 诱导 PIActin 基因在大肠杆菌中表达, SDS-PAGE 电泳、考马斯亮蓝 R250 染色后制备干胶并比较重组 Actin 蛋白的表达量。**结果** 亚克隆测序结果表明 PIActin 与目的序列完全一致, 且其编码区序列 (CDS) 上下游成功插入了 BamH I 和 Hind III 酶切位点; 成功构建了芍药原核表达载体 pET-32a (+)-PIActin; 诱导剂 IPTG 的最佳浓度为 0.1 mmol/L, 诱导的菌体起始密度 (A_{600}) 为 0.4~0.6, 最佳表达时间为 4 h。**结论** 构建了 PIActin 基因原核表达载体 pET-32a (+)-PIActin, 建立了 PIActin 基因在大肠杆菌中的高效表达体系。

关键词: 芍药; Actin; 大肠杆菌; SDS-PAGE 电泳; 高效表达

中图分类号: R282.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2015)11-1661-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2015.11.019

High-level expression of Actin of *Paeonia lactiflora* in *Escherichia coli*

XU Jie¹, GAO Shui-ping², ZHANG Wen-ting¹, SHI Guo-an¹, FAN Bing-you¹

1. College of Agriculture, Henan University of Science and Technology, Luoyang 471003, China

2. College of Forestry, Henan University of Science and Technology, Luoyang 471003, China

Abstract: Objective To construct the prokaryotic expression vector of Actin gene and to establish the high-level expression of Actin of *Paeonia lactiflora* in *Escherichia coli*. **Methods** Based on cDNA sequence of Actin of *P. lactiflora* and the polyclonal sites on the prokaryotic expression vector pET-32a (+), a pair of PCR primers whose 5' end was inserted with BamH I and Hind III, respectively were designed. Subcloning of Actin was carried out using RT-PCR technique. The recombinant plasmid pMD18-T-PIActin and the prokaryotic expression vector pET-32a (+) was digested by BamH I and Hind III and the objective gene and the empty vector were purified. After ligation and transformation, the recombinant pET-32a (+)-PIActin, which was characterized by colony PCR, plasmid PCR, and double enzyme digestion, was transformed into BL21 (DE3), and the engineering expression strain was obtained. The expression of recombinant Actin protein in *E. coli* was induced at different concentration of inducer IPTG, different bacteria density, and different expression time. After SDS-PAGE and Coomassie brilliant blue R250 staining, the dry gel was prepared and the expression level of recombinant Actin protein was analyzed. **Results** Subcloning sequencing result showed that the sequence of PIActin was exactly same with the objective sequence and the 5' and 3' ends were successfully inserted with BamH I and Hind III sites. The prokaryotic expression vector of Actin gene pET-32a (+)-PIActin was constructed successfully. The best concentration of IPTG was 0.1 mmol/L and the bacteria density A_{600} was 0.4 to 0.6. The optimal expression time was 4 h. **Conclusion** The prokaryotic expression vector of Actin gene pET-32a (+)-PIActin is constructed and the high-level expression of Actin of *P. lactiflora* in *E. coli* is established.

Key words: *Paeonia lactiflora* Pall.; Actin; *Escherichia coli* (Migula) Castellani et Chalmers; SDS-PAGE electrophoresis; high-level expression

收稿日期: 2015-01-02

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (U1204323); 河南省科技厅国际合作项目 (134300510052)

作者简介: 徐杰 (1987—), 男, 河南沈丘县人, 硕士生, 从事植物分子学研究。E-mail: comdisc@163.com

*通信作者 范丙友 (1974—), 男, 河南伊川人, 博士, 教授, 从事植物分子生物学研究。E-mail: fanbingyou2005@163.com

芍药 *Paeonia lactiflora* Pall. 为芍药科 (Paeoniaceae) 芍药属 *Paeonia* Pall. 芍药组 (Sect. *Paeonia*) 多年生宿根草本植物; 除观赏价值外, 芍药还具有重要的药用价值^[1]。芍药富含芍药苷、丹皮酚、鞣质、萜类、黄芪苷、没食子酸、除虫菊素、丹皮花苷等药用成分, 具有免疫调节、镇痛、镇静、解痉、保肝、扩张血管和抗炎等作用^[2]。Actin 是首先在肌肉细胞中发现的一种重要的收缩蛋白, 其后的许多研究表明该蛋白也存在于非肌细胞中^[3]。肌动蛋白 (Actin) 是高度保守的古老蛋白之一, 由 375 个氨基酸残基组成; 不同物种 Actin 氨基酸序列的同源性可高达 70%~100%^[4]。Actin 主要存在于细胞质中, 是细胞骨架微丝的主要组成成分, 参与细胞分裂、细胞运动、细胞迁移、细胞形态维持、细胞生长、内吞和外排作用以及其他重要生理事件^[5]。低等真核生物 Actin 常由单基因编码, 高等真核生物 Actin 则多由 Actin 基因家族编码^[6], 从而产生多种 Actin 异型体, 其结构上的多样性反映了其功能的多样性。研究表明植物 Actin 基因的表达也具有组织和器官的特异性^[7]。本课题组克隆了 PlActin 基因 cDNA 序列^[8]和基因组 DNA 序列^[9], 为进一步开展芍药 Actin (PlActin) 基因的功能奠定了一定基础。由于 Actin 异型体之间同源序列的存在, 很难从植物中直接获取大量特异的 Actin 异型体^[10]。通过体外研究某一种蛋白的理化特性进而推测其在体内的理化过程以及生理功能是一种常用的研究手段^[11]。由于大肠杆菌的遗传学、生物化学和分子生物学方面的知识已被人们逐步了解, 又由于其具有低成本、高效率、易操作等特点, 因此成为外源基因表达的首选系统^[12]。因此, 构建了 PlActin 基因原核表达载体并对 PlActin 蛋白在大肠杆菌中的高效表达体系进行了优化, 为下一步 PlActin 蛋白的功能研究奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

样品采自洛阳神州牡丹园, 经神州牡丹园总园艺师付正林鉴定为芍药 *Paeonia lactiflora* Pall.。DNase I kit、Primer Script II 1st strand cDNA synthesis kit、DNA 凝胶回收试剂盒、克隆载体 pMD18-T、DNA Ligation Kit Ver.2.1、限制性内切酶 BamH I 和 Hind III、DL 2000 DNA Marker、蛋白质 Marker、异丙基- β -D-硫代半乳糖苷 (IPTG) 均购自宝生物工程 (大连) 有限公司; 高保真 KOD-Plus DNA 聚合酶为日本 TOYOBO 公司产品; 大肠杆菌菌株 DH5 α 和 BL21 (DE3) 及

原核表达载体 pET-32a (+) 由本实验室保存; 其余试剂均为国产或进口分析纯。

1.2 引物设计

根据本课题组克隆的 PlActin cDNA 序列 (JX310002) 及原核表达载体 pET-32a (+) 的多克隆位点序列, 应用 Primer Premier 5.0 软件设计一对特异性 PCR 引物用于扩增 PlActin 基因的编码区序列 (coding sequences, CDS), 其中上下游引物分别插入了 BamH I 和 Hind III 酶切位点, 引物 5'-CGCGGATCCATGGCCGATGCTGAGGATATCC-3' 和 5'-CCCAAGCTTTTAAAGCACTTCCTGTGG-ACA-3' 由北京华大基因研究中心合成。

1.3 PlActin 基因的 RT-PCR 扩增、克隆及测序

芍药花瓣总 RNA 提取、纯化及 cDNA 合成参照文献方法进行^[9]。RT-PCR 扩增总体积为 50 μ L, 含 5 μ L 10 $\times$ 缓冲液、5 μ L 2.0 mmol/L each dNTP、4 μ L 25 mmol/L MgCl₂、10 pmol/ μ L 上下游引物各 1.5 μ L、5 μ L cDNA、1 μ L KOD-plus DNA 聚合酶、27 μ L ddH₂O。PCR 扩增程序为 94 $^{\circ}$ C 预变性 2 min, 随后 98 $^{\circ}$ C、10 s, 54 $^{\circ}$ C、30 s, 68 $^{\circ}$ C、40 s, 共 35 个循环, 后进行 72 $^{\circ}$ C、7 min 延伸; 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 扩增产物。

目的基因经纯化后与 pMD18-T 载体连接并转化大肠杆菌 DH5 α , 应用菌落 PCR、质粒 PCR 及 BamH I 和 Hind III 双酶切鉴定出阳性重组子, 并进一步进行序列测定验证。

1.4 PlActin 基因原核表达载体的构建

应用限制性内切酶 BamH I 和 Hind III 对阳性重组子 pMD18-T-PlActin 和原核表达空载体 pET-32a (+) 进行双酶切, 琼脂糖凝胶电泳后用凝胶回收试剂盒纯化目的基因 PlActin 和原核表达空载体 pET-32a (+), 然后将二者用连接试剂盒连接并转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞, 涂布在含有 100 μ g/mL 氨苄青霉素 (Amp) 试剂的固体 LB 平板上进行过夜培养。经菌落 PCR 初步检测后, 挑取阳性单菌落过夜培养, 提取质粒进行质粒 PCR 检测, 再进一步用 BamH I 和 Hind III 双酶切鉴定, 鉴定出的阳性重组子 pET-32a (+)-PlActin 转化 DE3 菌株感受态细胞, 获得基因表达工程菌。

1.5 PlActin 重组蛋白的原核表达、电泳检测及干胶制备

挑取 1 个基因表达工程菌的单菌落, 接种在 5 mL 含 100 μ g/mL Amp 的 LB 培养基中, 37 $^{\circ}$ C 过夜培养; 吸取 1 mL 过夜培养的表达工程菌菌液, 加

入 49 mL 含 100 $\mu\text{g/mL}$ Amp 的 LB 培养基中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养至菌体密度 (以 600 nm 处吸光度表示, A_{600}) 达 0.6, 在 LB 培养基中加入 IPTG, 使其终浓度为 0.6 mmol/L。继续培养 4 h, 取 1.5 mL 菌液, 10 000 r/min 离心 2 min, 收获菌体用于 SDS-PAGE 电泳检测。

用 200 μL 2 $\times$ SDS 上样缓冲液悬浮菌体细胞, 100 $^{\circ}\text{C}$ 煮沸 5 min; 取 10 μL 用于电泳检测。SDS-PAGE 电泳的浓缩胶为 4%、分离胶为 10%, 上样后 60 mA 恒流 1 h。电泳完毕后剥胶, 在 60 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中用考马斯亮蓝 R250 染色 30 min; 60 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中脱色 3 h, 待完全脱色后制备干胶。将 SDS-PAGE 电泳凝胶和 2 张比电泳玻璃板略大的玻璃纸置于含微量甘油的去离子水中浸泡约 5 min, 然后取一张玻璃纸置于玻璃板上, 赶尽气泡, 将 SDS-PAGE 电泳凝胶置于玻璃纸上, 其上再放置一张玻璃纸, 赶尽气泡, 将玻璃纸的多余部分包裹在玻璃板放置凝胶的背面, 置于室温下阴干 3~5 d, 待胶完全干燥后扫描干胶并永久保存。

1.6 IPTG 浓度对 PIActin 重组蛋白表达量的影响

当扩大培养的 50 mL 基因工程菌菌体密度达 0.6 时, 添加 IPTG 至终浓度分别达 0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9 mmol/L。37 $^{\circ}\text{C}$ 诱导表达 4 h, 取出 1.5 mL 菌液用于 SDS-PAGE 电泳, 分析基因工程菌总蛋白中重组 Actin 蛋白的表达量。

1.7 菌体密度对 PIActin 重组蛋白表达量的影响

当扩大培养的 50 mL 基因工程菌菌体密度达 0.1~1.1 时添加 IPTG 至终浓度为 0.4 mmol/L, 37 $^{\circ}\text{C}$ 诱导表达 4 h, 取出 1.5 mL 菌液用于 SDS-PAGE 电泳, 分析基因工程菌总蛋白中重组 Actin 蛋白的表达量。

1.8 诱导时间对 PIActin 重组蛋白表达量的影响

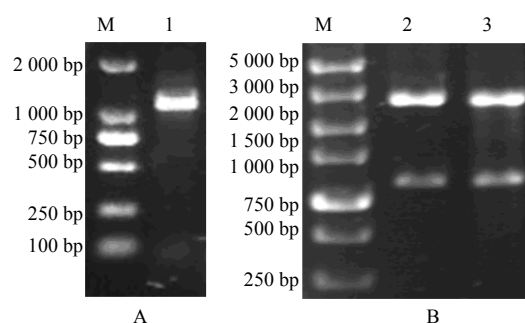
当扩大培养的 50 mL 基因工程菌菌体密度达 0.6 时, 加入 IPTG 至终浓度为 0.4 mmol/L 诱导, 分别在 2、5、10、20、40 min 及 1、2、4 h 时各取出 1.5 mL 菌液用于 SDS-PAGE 电泳, 分析基因工程菌总蛋白中重组 Actin 蛋白的表达量。

2 结果与分析

2.1 PIActin 基因的亚克隆及测序

应用 RT-PCR 技术成功扩增出了 PIActin 基因 PCR 产物 (图 1-A), PCR 产物大小与预期值一致, 命名为 PIActin。PCR 产物经纯化后与克隆载体 pMD18-T 连接, 经菌落 PCR 和质粒 PCR 初筛后的阳性重组子 pMD18-T-PIActin 进一步用 BamH I 和 Hind III 双酶切鉴定, 双酶切电泳结果与预期结果完全一致

(图 1-B), 表明成功亚克隆了 PIActin 基因。测序结果表明 PIActin 与 PIActin cDNA 序列 (JX310002) 完全一致, 且 CDS 上下游成功插入了 BamH I (GGATCC) 和 Hind III (AAGCTT) 酶切位点, 能够用于下一步 PIActin 基因原核表达载体的构建。



1-PIActin 的 RT-PCR 扩增 2~3-阳性重组子 pMD18-T-PIActin/BamH I+Hind III 双酶切鉴定 M-Marker

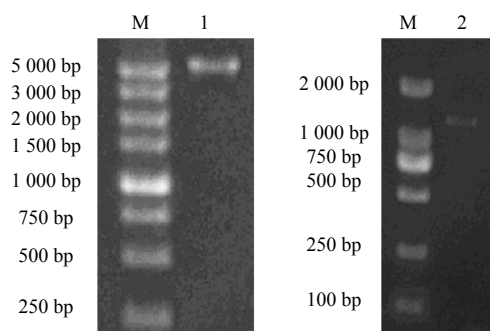
1-RT-PCR amplification of PIActin 2~3-characterization of positive recombinant by BamH I and Hind III M-Marker

图 1 PIActin 的 RT-PCR 扩增 (A) 及阳性重组子 pMD18-T-PIActin/BamH I+Hind III 双酶切鉴定 (B)

Fig. 1 RT-PCR amplification of PIActin (A) and characterization of positive recombinant by BamH I and Hind III (B)

2.2 原核表达载体 pET-32a (+)-PIActin 的构建

pMD18-T-PIActin 和 pET-32a (+) 经 BamH I 和 Hind III 双酶切后, 回收目的基因 PIActin 和空载体, 纯度及浓度 (图 2-A、B) 达到连接的要求, 可以用于下一步的连接反应。二者的连接产物转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞, 经菌落 PCR 初筛后, 提取质粒进行质粒 PCR 检测 (图 3-A), 再进一步用

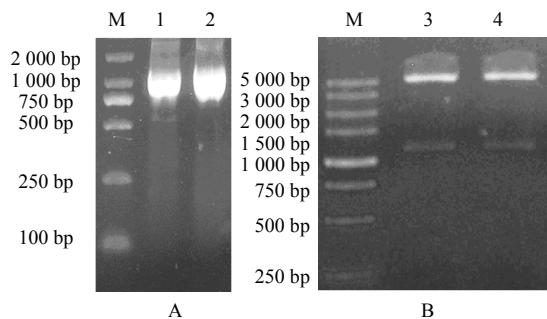


1-原核表达空载体的纯化回收 2-目的基因 PIActin 的纯化回收
1-purification of empty prokaryotic expression vector 2-purification of objective gene PIActin

图 2 原核表达空载体及目的基因的纯化回收

Fig. 2 Purification of empty prokaryotic expression vector and objective gene PIActin

BamH I 和 Hind III 双酶切鉴定 (图 3-B), 电泳结果表明相对分子质量较大的酶切产物与原核表达载体大小一致, 相对分子质量较小的酶切产物与目的基因 PIActin 的大小一致, 表明原核表达载体 pET-32a (+)-PIActin 构建成功。



1~2-原核表达载体的质粒 PCR 鉴定 3~4-原核表达载体的 BamH I 和 Hind III 双酶切鉴定

1—2-plasmid PCR characterization of prokaryotic expression vector

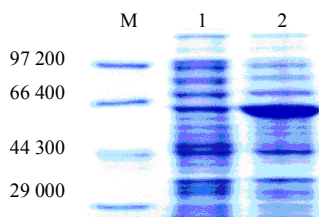
3—4-double enzymes digestion of prokaryotic expression vector by BamH I + Hind III

图 3 原核表达载体的质粒 PCR (A) 及 BamH I 和 Hind III 双酶切鉴定 (B)

Fig. 3 Plasmid PCR characterization (A) and double enzymes digestion of prokaryotic expression vector (B)

2.3 PIActin 基因在大肠杆菌中的诱导表达

鉴定出的阳性重组子 pET-32a (+)-PIActin 转化 DE3 菌株感受态细胞, 获得基因表达工程菌。挑取 1 个表达工程菌单菌落, 37 °C 过夜培养后按 2% 体积比扩大培养, 待菌体密度达 0.6, 在 LB 培养基中加入 IPTG, 使其终浓度为 0.6 mmol/L。继续培养 4 h, SDS-PAGE 电泳检测诱导结果。由图 4 可以看出, 与未诱导的阴性对照相比, 诱导的工程菌总蛋白中增加了一个相对分子质量约为 60 000 的新蛋白, 表明 PIActin 重组蛋白诱导表达成功。

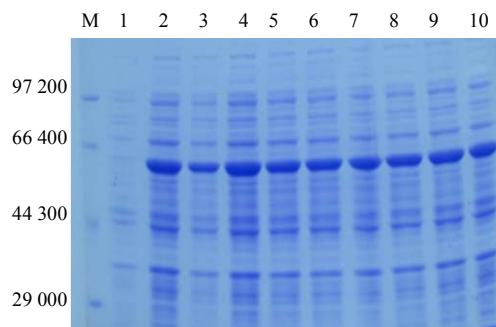


1-阴性对照 2-IPTG 诱导
1-not induced 2-IPTG induced

图 4 SDS-PAGE 电泳检测 PIActin 基因在大肠杆菌中的表达
Fig. 4 Expression of PIActin in *E. coli* detected by SDS-PAGE

2.4 IPTG 浓度对 PIActin 重组蛋白表达量的影响

从图 5 可以看出, 设置的所有 IPTG 浓度均能有效诱导 PIActin 重组蛋白的表达。从节约成本的角度选择诱导剂 IPTG 的浓度为 0.1 mmol/L。



1-阴性对照 2~10-IPTG 浓度分别为 0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9 mmol/L

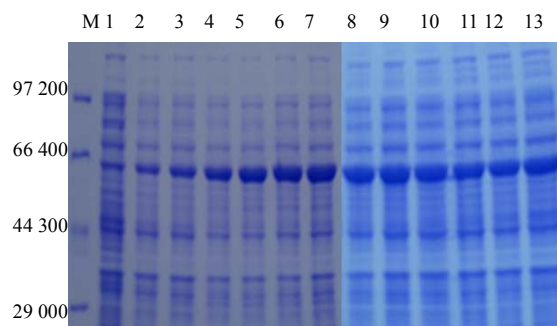
1-not induced 2—10-IPTG at concentration of 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, and 0.9 mmol/L

图 5 IPTG 浓度对 PIActin 重组蛋白表达量的影响

Fig. 5 IPTG concentration on effect of expression level of recombinant Actin

2.5 诱导起始菌体密度对 PIActin 重组蛋白表达量的影响

从图 6 可以看出, 当诱导时宿主菌菌体密度在 0.1~1.1 时, PIActin 重组蛋白均可高效表达, 当宿主菌菌体密度值从 0.1 增加至 0.4 时, 重组 Actin 蛋白的表达量也相应增加, 当宿主菌菌体密度从 0.4 增加至 1.2 时, Actin 蛋白表达量基本保持恒定。因此, 优化的诱导起始菌体密度为 0.4~0.6。



1-阴性对照 2~13-A₆₀₀ 值分别为 0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1.0、1.1、1.2

1-negative control 2—13-A₆₀₀ 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9, 1.0, 1.1, and 1.2

图 6 诱导起始菌体密度对 PIActin 重组蛋白表达量的影响

Fig. 6 Bacteria density on effect of expression level of recombinant Actin

2.6 诱导时间对 PIActin 重组蛋白表达量的影响

从图 7 可以看出, 加入 IPTG 诱导 2 min 后, PIActin 重组蛋白即高效表达; 在检测的 2 min 至 4 h 内, 其表达量占宿主菌总蛋白的比例基本保持一致。但由于培养时间越长, 收获的宿主菌相对更多, 因此优化的诱导表达时间为 4 h。由于 PIActin 重组蛋白在 2 min 内即高效表达, 推测该重组蛋白的主要形式为包涵体。

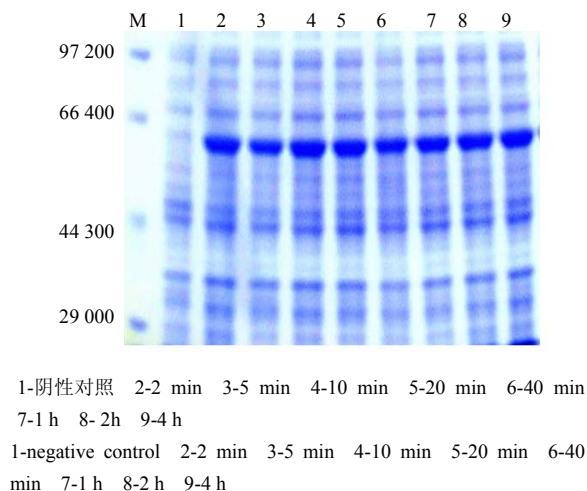


图 7 诱导时间对 PIActin 重组蛋白表达量的影响

Fig. 7 Induced time on effect of expression level of recombinant Actin

3 讨论

当蛋白质在细菌中高效表达时, 经常会形成包涵体。不溶性包涵体的形成虽然为后续的分选纯化带来方便, 但通常要采用强变性剂才能溶解包涵体, 溶解后还需复性才能回收正确折叠的重组蛋白。通常先用尿素、Triton X-100、EDTA 等洗去包涵体中的杂质, 再用尿素等变性剂溶解包涵体。在变性剂溶液中, 溶解的蛋白质呈变性状态^[13]。一般来说, 包涵体中含有超过 50% 的重组蛋白, 在优化条件下重组蛋白可占包涵体的 90% 以上^[14]。溶解的包涵体复性的第 1 步是透析或稀释除去变性剂。为了降低蛋白质重折叠的进程, 复性通常在低浓度蛋白条件下进行^[13]。

通过体外研究某一种蛋白的理化特性进而推测其在体内的理化过程以及生理功能是一种常用的研究手段^[11]。本研究亚克隆了 PIActin 基因, 在其 CDS 上下游成功插入了 BamH I (GGATCC) 和 Hind III (AAGCTT) 酶切位点; 基于鉴定的重组子 pMD18-T-PIActin 构建了 PIActin 原核表达载体 pET-32a (+)-PIActin 并转化 DE3 受体细胞获得了基

因表达工程菌; 获得的 PIActin 基因原核高效表达体系为最优 IPTG 浓度为 0.1 mmol/L、菌体诱导起始密度为 0.4~0.6、诱导表达 4 h。pET-32a (+) 载体上含有 Trx (硫氧还蛋白) 标签、S (RNase S 前 15 个氨基酸) 标签和 His 标签, 已经建立的 PIActin 原核高效表达体系为下一步基于变复性和亲和色谱技术纯化 PIActin 重组蛋白及其理化性质的鉴定奠定了一定基础。

参考文献

- [1] 李嘉珏. 中国牡丹与芍药 [M]. 北京: 中国林业出版社, 1999.
- [2] 康晓飞, 郭先锋, 许世磊, 等. 三个观赏芍药芍药苷含量的动态变化研究 [J]. 北方园艺, 2011(5): 85-87.
- [3] 陈 婷, 黄百渠. 核内 Actin 的研究进展 [J]. 东北师范大学学报: 自然科学版, 2001, 33(3): 96-100.
- [4] 陈 明, 李爱媛. Actin、Actin 结合蛋白质和细胞运动的研究进展 [J]. 生命科学, 1997, 9(1): 1-5.
- [5] 刘 曦, 张少斌, 汪 澈. 植物 Actin 功能的研究进展 [J]. 生物技术通报, 2010(3): 13-16.
- [6] Meagher R B, Mchinnery E C, Kandasamy M K. Isovariant dynamics expand and buffer the responses of complex systems: The diverse plant Actin family [J]. Plant Cell, 1999, 11(6): 995-1005.
- [7] Huang S, An Y, Mcdowell J M, et al. The Arabidopsis ACT11 actin gene is strongly expressed in tissues of the emerging inflorescence, pollen, and developing ovules [J]. Plant Mol Biol, 1997, 33(1): 125-139.
- [8] 范丙友, 李 芳, 张文婷, 等. 芍药 Actin 基因的克隆及表达分析 [J]. 中草药, 2013, 43(15): 2136-2142.
- [9] 范丙友, 张文婷, 徐 杰, 等. 芍药 Actin 基因组 DNA 的克隆及分析 [J]. 中草药, 2014, 45(14): 2069-2074.
- [10] Diaz-camino C, Villanueva M A. Purification of multiple functional leaf-actin isoforms from Phaseolus vulgaris L. [J]. Biochem J, 1999, 343: 597-602.
- [11] 张少斌, 任东涛, 徐小静, 等. 豌豆 Actin 异型体 (PEAc1) 与绿色荧光蛋白融合基因的原核表达与特性分析 [J]. 科学通报, 2004, 49(4): 563-569.
- [12] 范丙友, 胡诗宇, 陆 海, 等. 毛白杨 4-香豆酸: 辅酶 A 连接酶可溶性原核表达及活性检测 [J]. 北京林业大学学报, 2006, 28(2): 1-8.
- [13] 范丙友. 毛白杨 4-香豆酸: 辅酶 A 连接酶 (4CL1) 调控转基因植物木质素生物合成及其酶学特性研究 [D]. 北京: 北京林业大学, 2005.
- [14] Clark E D B. Refolding of recombinant proteins [J]. Curr Opin Biotechnol, 1998, 9: 157-163.