

# 小鼠 Nanog 基因原核表达载体的构建及表达

李 军, 吕长荣, 窦 琳, 窦忠英

(西北农林科技大学国家干细胞工程技术研究中心陕西分中心, 杨凌 712100)

**摘要:**【目的】构建小鼠Nanog基因原核表达载体并进行表达,以期得到大量GST融合蛋白。【方法】根据GeneBank中的Nanog序列及pGEX-KG中的多克隆位点设计引物,以含有Nanog基因片段的pNA992重组质粒为模板,经PCR扩增出918 bp的DNA片段。将所得片段与pGEX-KG载体连接,转化TG I大肠杆菌,筛选阳性克隆,其扩增片段测序结果与原序列一致,表明原核表达载体pGEX-KG-Nanog已构建成功。提取pGEX-KG-Nanog质粒转化到BL21(DE3)表达菌株中,经IPTG诱导后收集菌体进行SDS-PAGE电泳鉴定,并优化其表达条件。【结果】在大肠杆菌中获得Nanog基因融合表达,主要以包涵体形式存在;融合蛋白的分子量为63 kD;以IPTG终浓度为 $0.8 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ,诱导5 h后融合蛋白产量最高。【结论】小鼠Nanog基因在大肠杆菌中获得了高效表达,为今后Nanog蛋白的多克隆抗体制备奠定基础。

**关键词:** Nanog 基因; 原核表达; GST 融合蛋白; 小鼠

## Construction of Prokaryotic Expression Vector of Mouse Nanog Gene and Its Expression

LI Jun, LÜ Chang-rong, DOU Lin, DOU Zhong-ying

(Northwest Sci-Tech University of Agriculture and Forestry, Shaanxi Branch of National Stem Cell Engineering and Technology Center, Yangling 712100)

**Abstract:** 【Objective】Prokaryotic expression vector of mouse Nanog gene was constructed and was expressed to obtain GST fusion protein. 【Method】A pair of primers were designed according to digestion sites in plasmid pGEX-KG and the Nanog gene sequence published by GeneBank. The DNA fragment of 918 bp was amplified by PCR from the pNA992 recombinant plasmid with Nanog gene, then cloned into pGEX-KG and transformed into the host *E.coli* strain TG I, The fragment was conformed to the original sequence. It indicated that fusion expression vector pGEX-KG-Nanog was constructed. The pGEX-KG-Nanog plasmid was taken and transformed into BL21(DE3) for expression. Induced by IPTG at  $37^\circ\text{C}$ , the expression product of Nanog gene was identified by SDS-PAGE, and the expression condition was optimized. 【Result】Nanog fusion protein had been expressed successfully in the form of inclusion bodies. The molecular weight is 63kD. Meanwhile, the optimum condition of Nanog fusion protein expression was induced with  $0.8 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  IPTG for 5h. 【Conclusion】Mouse Nanog gene was successfully expressed in *E.coli*, which was prepared for Nanog polyclone antibody.

**Key words:** Nanog gene; Prokaryotic expression; GST fusion protein; Mouse

## 0 引言

【研究意义】胚胎干细胞(embryonic stem cell, ES细胞)是源于哺乳动物囊胚内细胞团(inner cell mass, ICM),经体外培养形成的永生细胞系<sup>[1,2]</sup>。其

最显著的特点是发育上的全能性和自我更新能力。ES细胞的这些特性使其成为研究胚胎早期发育机理、细胞治疗<sup>[3]</sup>及组织工程<sup>[4]</sup>等领域的重要材料。但是ES细胞的多向分化与自我更新能力的调控机制目前尚不完全清楚。2003年5月,Chambers<sup>[5]</sup>和Mitsui<sup>[6]</sup>的研究

收稿日期:2006-03-27;接受日期:2006-08-31

基金项目:国家“863”项目(2005AA21905)和教育部重大项目(03160)

作者简介:李军(1982-),男,山西大同人,硕士研究生,研究方向为干细胞和分子生物学方面。Tel: 029-87080067; E-mail: lijun185@tom.com。

通讯作者窦忠英(1939-),男,陕西兴平人,教授,研究方向为干细胞与胚胎工程。Tel: 029-87080068; E-mail: douzhongying@china.com

发现, Nanog基因在维持ES细胞自我更新和多向分化潜能中具有非常重要的作用<sup>[7]</sup>。小鼠Nanog基因是DNA结合转录因子同源异型框家族的一员<sup>[8,9]</sup>, 序列全长7.1 kb, 包含4个外显子, 外显子和内含子间的剪接位点符合GTAG规则, 同源框序列位于第2和第3外显子<sup>[10]</sup>。Nanog的cDNA序列由2 184碱基组成, 含有一个开放阅读框, 编码305个氨基酸组成的多肽<sup>[11]</sup>。Nanog基因在ICM、ES和EG中表达可以独立于LIF-STAT3信号途径来维持其多能性<sup>[11]</sup>。缺失Nanog引起ESCs向体壁和内脏方向的内胚层分化<sup>[12]</sup>。它是维持ES细胞多能性及自我更新能力的重要转录因子之一。【前人研究进展】2005年, 林艳丽<sup>[13]</sup>等在大肠杆菌中表达了相对分子量为37 kD的Nanog蛋白。【本研究切入点】关于Nanog原核表达的研究报道很少<sup>[13]</sup>, 本研究利用pGEX-KG表达载体高效表达Nanog融合蛋白。【拟解决的关键问题】以小鼠Nanog基因为目的基因, 构建原核表达载体; 利用BL21表达菌株获得Nanog融合蛋白; 对其表达条件进行优化。为今后Nanog融合蛋白多克隆抗体制备及其基因表达调控机理的功能研究打下了基础。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

1.1.1 菌种与载体 大肠杆菌工程菌TG I、BL21 (DE3)均为国家干细胞工程技术研究中心陕西分中心分子生物学实验室保存, pNA992重组质粒也为该实验室保存, 原核表达载体pGEX-KG为上海药物研究所侯永泰教授惠赠。

1.1.2 工具酶及主要试剂 PCR反应所用试剂和胶回收试剂盒均为北京天为时代产品, 蛋白Marker为上海生化研究所产品, 引物合成由上海生工生物工程公司完成, BamH I和HindIII限制性内切酶、T<sub>4</sub>DNA连接酶、DNA Marker均购自大连Takara公司, 质粒提取试剂盒购自Promega公司, 其它试剂均为国产分析纯。

### 1.2 方 法

1.2.1 Nanog基因的亚克隆 据GenBank数据库中小鼠Nanog的序列及质粒pGEX-KG的载体图谱, 设计PCR引物, 上游引物加入BamH I酶切位点: 5'-TAGGATCCATGAGTGTGGTCTT-3', 下游引物加入HindIII酶切位点: 5'-GCAAGCTTTCATATTTCTCCTGG-3', 加粗部分即为引入的酶切序列。PCR反应条件为: 94℃预变性4 min, 94℃变性30s, 53℃退火30s, 72℃延伸1 min, 共30个循环, 然后, 72℃

再延伸10 min。取5 μl PCR产物进行1%琼脂糖凝胶电泳分析。

1.2.2 Nanog基因的纯化与回收 按照DNA胶回收试剂盒操作说明, 从琼脂糖电泳中将目的条带切下, 用胶回收试剂盒回收纯化PCR产物。

1.2.3 原核表达载体的构建 将纯化的PCR产物和载体pGEX-KG分别用BamHI和HindIII双酶切后, 回收酶切产物, 在T<sub>4</sub>DNA连接酶作用下将Nanog基因酶切片段与pGEX-KG酶切产物16℃连接过夜, 构建重组质粒pGEX-KG-Nanog, 以连接产物转化入感受态大肠杆菌TG I。将转化的菌液涂布于含有100 mg·L<sup>-1</sup>氨苄青霉素(Amp<sup>r</sup>)的LB琼脂平板上, 37℃培养过夜。在平板上挑取单个菌落, 接种于含Amp<sup>r</sup>的LB培养基中, 37℃摇床培养过夜, 进行菌落PCR鉴定<sup>[14]</sup>, 同时用Promega公司质粒提取试剂盒小量制备质粒, BamHI和HindIII双酶切后, 1%琼脂糖电泳进行鉴定, 经酶切与PCR鉴定正确后, 送大连宝生物工程公司进行测序, 测序结果用NCBI中的Blast软件分析。

1.2.4 表达菌株的获得 将鉴定正确的重组质粒转化感受态大肠杆菌BL21 (DE3), 获得阳性表达菌株, 方法同1.2.3。

1.2.5 重组质粒在大肠杆菌中的诱导表达 分别将含有pGEX-KG-Nanog和pGEX-KG的BL21在LB (Amp<sup>r</sup>)培养液中37℃振荡培养过夜, 将此培养物按1%体积比接种于LB (Amp<sup>r</sup>)培养液中, 37℃培养3~4 h, 加入异丙基硫代β-D-半乳糖苷(IPTG)至终浓度1 mmol·L<sup>-1</sup>, 继续诱导培养3 h, 离心收集菌体, 加入100 μl上样缓冲液, 煮沸5 min, 取15 μl进行12% SDS-PAGE电泳分析。

1.2.6 表达条件的优化 将含pGEX-KG-Nanog的BL21以1%的体积比接种于含Amp的LB培养液中, 37℃培养3~4 h, 分别加入IPTG至终浓度0、0.4、0.6、0.8、1.0、1.5 mmol·L<sup>-1</sup>分别诱导, 在添加IPTG后继续诱导的0、2、3、4、5、6 h内分别取样处理, 12%SDS-PAGE电泳分析。

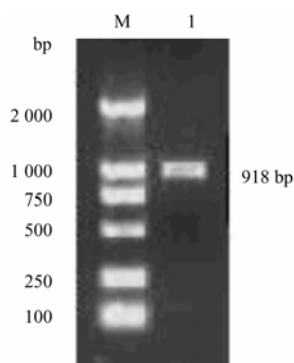
1.2.7 融合蛋白表达形式的鉴定<sup>[15]</sup> 取菌液10 ml, 10 000 mmol·L<sup>-1</sup>离心5 min, 以1/10菌液体积的PBS重悬沉淀, 冰浴下超声波破碎菌体, 离心收集上清和沉淀, 分别进行12%SDS-PAGE分析。

1.2.8 SDS-PAGE分析 按文献[16]方法进行, 浓缩胶浓度为5%, 分离胶浓度为12%, 考马斯亮蓝R250染色, 甲醇-冰醋酸脱色液脱色, 观察结果。

## 2 结果与分析

### 2.1 PCR 扩增

将质粒 pNA992 内的 Nanog 基因经过 PCR 扩增后,产物经 1%琼脂糖凝胶电泳,在 918 bp 处出现特异性扩增条带,如图 1 所示。



M. DNA marker DL2 000; 1. Nanog 基因的 PCR 产物  
M. DNA marker DL2 000; 1. PCR product of Nanog gene

图 1 PCR 扩增结果

Fig. 1 Nanog gene amplified by PCR

### 2.2 重组表达质粒鉴定

重组表达质粒 pGEX-KG-Nanog 经 *Bam*H I 和 *Hind* III 双酶切鉴定结果如图 2,其中 5 000bp 为酶切载体大小,918 bp 为 DNA 目的片段。

以单菌落为模板,经菌落 PCR 鉴定,结果显示在 918 bp 处有一条明显特异条带,如图 3 所示。

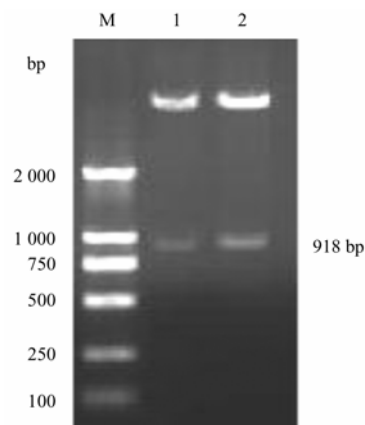
重组 pGEX-KG-Nanog 表达质粒测序表明,序列有较好的完整性,并且与 pNA992 质粒中的原序列完全一致。与 GenBank 中的小鼠 Nanog 基因比对,其同源性达到了 99.7%。鉴定结果表明目的片段已正确插入 pGEX-KG 表达载体。

### 2.3 Nanog 基因的诱导表达

含有 pGEX-KG-Nanog 和 pGEX-KG 的 BL21 菌体经 IPTG 诱导后收集菌体,加上样缓冲液煮沸 8 min,经 12%SDS-PAGE 电泳分析,诱导的 pGEX-KG 菌体有一处不同于未诱导菌的特异蛋白条带,即 GST 蛋白的大小为 26 kD。而 pGEX-KG-Nanog 菌体表达 63 kD 大小的特异条带,即 GST 与 Nanog 的融合蛋白。表明 Nanog 蛋白相对分子量为 37 kD。如图 4 所示。

### 2.4 Nanog 蛋白表达量与表达条件的关系

随着 IPTG 浓度不断增加,表达量先增大,当其

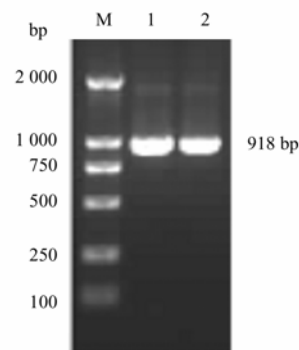


M. DNA marker DL2 000; 1. Nanog 基因的 PCR 产物; 2, 3. *Bam*H I+*Hind*III 的双酶切

M. DNA marker DL2 000; 1. PCR product of Nanog gene; 2, 3. Digestion with *Bam*H I+*Hind*III

图 2 酶切鉴定琼脂糖电泳结果

Fig. 2 Restriction enzyme digestion analysis of pGEX-KG-Nanog



M. DNA marker DL2 000; 1, 2. 菌落 PCR 鉴定

M. DNA marker DL2 000; 1, 2. Identification of colony PCR

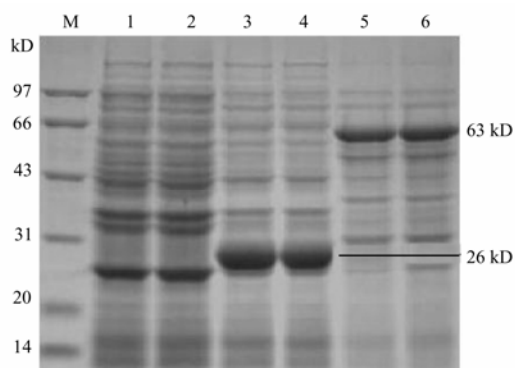
图 3 PCR 鉴定结果

Fig. 3 The result of PCR identification

终浓度为  $0.8 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  时,融合蛋白表达量最大,IPTG 浓度继续增加,蛋白的表达量突然降低,如图 5 所示。随诱导时间越来越长,蛋白表达量越来越大,当其在诱导后 5 h 时,融合蛋白表达量最大,而后表达量随时间的延长没有明显变化,如图 6 所示。本试验独立重复 3 次,结果一致。

### 2.5 融合蛋白表达形式

对菌体进行超声破碎后,分别收集上清和沉淀,

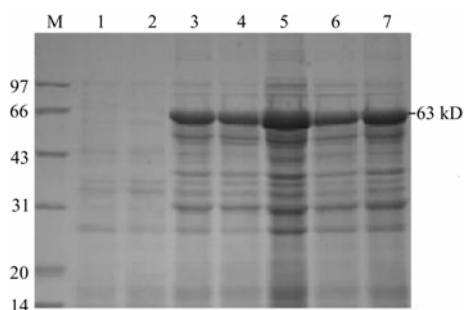


M. 蛋白marker; 1. BL21菌体; 2. 未诱导的含pGEX-KG的BL21菌体; 3, 4. IPTG诱导的含pGEX-KG的BL21菌体; 5, 6: IPTG诱导的含pGEX-KG-Nanog的BL21菌体

M. Protein marker; 1. BL21 (DE3) 2. pGEX-KG-transformed BL21 without IPTG induction; 3, 4. pGEX-KG-transformed BL21 with IPTG induction; 5, 6. pGEX-KG-Nanog-transformed BL21 with IPTG induction

图4 融合蛋白表达的SDS-PAGE

Fig. 4 SDS-PAGE of the expression of pGEX-KG-Nanog



M. 蛋白marker; 1, 2. 0 mmol·L<sup>-1</sup> IPTG诱导的含pGEX-KG-Nanog的BL21菌体; 3-7.不同IPTG浓度诱导的含pGEX-KG-Nanog的BL21菌体 (0.4、0.6、0.8、1.0、1.5 mmol·L<sup>-1</sup>)

M. Protein marker; 1,2. pGEX-KG-Nanog-transformed BL21 with 0 mmol·L<sup>-1</sup> IPTG induction; 3-7. pGEX-KG-Nanog-transformed BL21 with different IPTG induction (0.4, 0.6, 0.8, 1.0, 1.5 mmol·L<sup>-1</sup>)

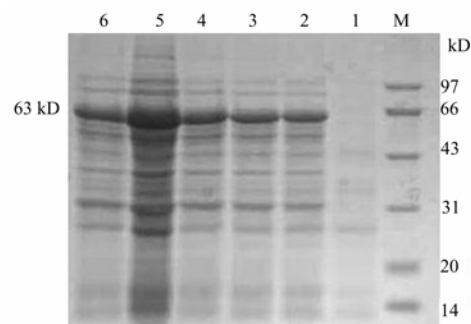
图5 不同IPTG浓度诱导表达结果

Fig. 5 Induced expression results with different IPTG concentrations

SDS-PAGE分析后, 沉淀中有明显的重组蛋白特异条带, 上清中无特异条带, 如图7, 表明重组蛋白主要以包涵体的形式存在于沉淀中。

### 3 讨论

关于Nanog基因在原核细胞中表达, 国内外研究报道较少。2005年, 林艳丽<sup>[13]</sup>等把Nanog基因插入pET-28b质粒中, 构建了pET-28b-Nanog, 在大肠杆

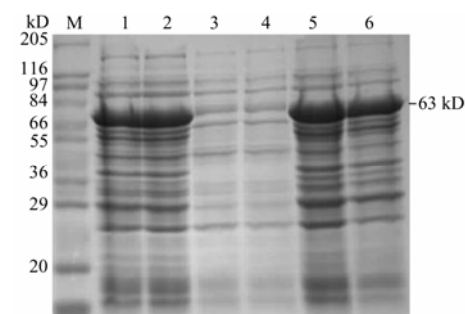


M. 蛋白Marker; 1-6. IPTG分别诱导不同时间的含pGEX-KG-Nanog的BL21菌体 (0、2、3、4、5、6h)

M. Protein marker; 1-6. pGEX-KG-Nanog transformed BL21 with IPTG induction for 0, 2, 3, 4, 5, 6h

图6 不同时间内诱导表达结果

Fig. 6 Induced expression results for different time



M. 蛋白marker; 1, 2. 含pGEX-KG-Nanog的BL21诱导后的总蛋白; 3, 4. 含pGEX-KG-Nanog的BL21诱导后上清; 5, 6. 含pGEX-KG-Nanog的BL21诱导后沉淀

M. Protein marker; 1, 2. Total protein from BL21 with pGEX-KG-Nanog after induction; 3, 4. Supernatant of BL21 with pGEX-KG-Nanog after induction; 5, 6. Pellet of BL21 with pGEX-KG-Nanog after induction

图7 融合蛋白的表达形式

Fig. 7 The type of fusion protein expression

菌中表达相对分子量约为37 kD的Nanog蛋白。本研究选用pGEX-KG作为表达载体, 成功表达了带有GST标签的Nanog融合蛋白。

pGEX-KG表达载体的优点<sup>[17]</sup>如下: 首先, 它是由pGEX-2T改造而成的, 在244位有核糖体识别位点(SD序列), 与起始密码子的距离为10 bp, 可与核糖体16SrRNA特异配对, 利于转录的mRNA模板与核糖体的结合, 从而提高了蛋白质的表达水平, 在原酶切位点EcoRI处插入一段58 bp的寡聚核苷酸, 增加了可利用的酶切位点的数量。其次, pGEX-KG能在Ptac启动子控制下表达GST, 将Nanog基因与GST基因融合, 转

化到 BL21 宿主大肠杆菌中, 诱导表达后, 经 SDS-PAGE 鉴定, 在 63 kD 处有明显的特异蛋白条带, 其中 GST 标签为 26 kD, 表明 Nanog 蛋白为 37 kD。这与前人报道的 Nanog 蛋白分子量约 37 kD 相一致<sup>[13]</sup>。最后, pGEX-KG 载体在 GST 基因后插入 5~6 个甘氨酸, 这一片段能增强蛋白酶的水解能力, 提高蛋白酶切割融合产物的效率, 方便于纯化目的蛋白。为后续 Nanog 蛋白的生物活性及其多克隆抗体制备等方面研究奠定了基础。

影响外源基因表达的因素很多, 为了提高表达产量, 本试验主要探索了诱导表达时 IPTG 的浓度和诱导时间两个因素。经过 3 次重复试验探索的 IPTG 诱导 5 h, 而不同于以往的诱导 3 h 的报道<sup>[18]</sup>。IPTG 浓度对表达量的影响与表达载体和宿主菌种有关。目前一般报道认为浓度为 0.1~1.0 mmol·L<sup>-1</sup> <sup>[19,20]</sup>, 3 次重复试验结果表明, pGEX-KG 载体转化大肠杆菌 BL21, IPTG 终浓度为 0.8 mmol·L<sup>-1</sup> 时, 蛋白的表达量最大。总的来说, 影响原核表达量的因素很多, 要提高表达产量需要进一步优化其它相关的因素, 如诱导温度、起始菌体浓度等等。

对融合蛋白的表达形式分析后, 结果表明, 所表达的 Nanog 与 GST 融合蛋白主要以不溶性的包涵体形式存在。同时包涵体的形成是宿主细胞对外源性有害蛋白得到高效表达的一种保护机制, 而且包涵体便于表达产物的纯化。包涵体<sup>[21,22]</sup>形成后的缺点是需经变性、复性等复杂处理过程后才能得到可溶性融合蛋白质。

## 4 结论

成功构建 Nanog 基因原核表达载体 pGEX-KG-Nanog, 并在大肠杆菌中表达; 对其表达条件优化后提高了融合蛋白的表达产量, 得到了足够量的 GST 与 Nanog 融合蛋白。为今后 Nanog 蛋白纯化及其多克隆抗体制备奠定基础, 也有利于进一步深入研究维持胚胎干细胞多能性和自我更新的作用机理。

## References

[1] Evans M J, Kaufman M H. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature*, 1981, 29 (5819): 154-156.

[2] Martin G R. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)*, 1981, 78: 7634-7638.

[3] Nir S G, David R, Zaruba M, Franz W M, Itskovitz-Eldor J. Human embryonic stem cells for cardiovascular repair. *Cardiovascular Research*, 2003, 58: 313-323.

[4] Kropp B P, Cheng E A. Bioengineering organs using small intestinal submucosa. *Journal of Endourology*, 2000, 1: 59-62.

[5] Chambers I, Colby D, Robertson M, Nichols J, Lee S, Tweedie S, Smith A. Functional expression cloning of nanog, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cell. *Cell*, 2003, 113: 643-655.

[6] Mitsui K, Tokuzawa Y, Itoh H, Segawa K, Murakami M, Takahashi K, Maruyama M, Maeda M, Yamanaka S. The homeoprotein Nanog is required for maintenance of pluripotency in mouse epiblast and ES cells. *Cell*, 2003, 113: 631-642.

[7] Hatano SY, Tada M, Kimura H. Pluripotential competence of cells associated with Nanog activity. *Mechanisms of Development*, 2005, 122: 67-69.

[8] Hart A H, Hartley L, Ibrahim M, Robb L. Identification, cloning and expression analysis of the pluripotency promoting Nanog genes in mouse and human. *Developmental Dynamics*, 2004, 230(1): 187-198.

[9] Calalieri F, Scholer H R. Nanog: a new recruit to the embryonic stem cell orchestra. *Cell*, 2003, 113: 551-552.

[10] Wang S H, Tsai M S, Chiang M F, Li H F. A novel NK type homeobox gene, ENK (early embryo specific NK), preferentially expressed in embryonic stem cells. *Gene Expression Patterns*, 2003, 3(1): 99-103.

[11] Liu N, Lu M. The signal transduction pathways and molecules for ES cells self-renewal. *Chinese Science Bulletin*, 2005, 50: 721-726.

[12] Constantinescu S. Stemnes, fusion and renewal of hematopoietic and embryonic stem cells. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 2003, 7(2): 103-112.

[13] 林艳丽, 曹立雪, 吴晓洁, 阎新龙, 邓继先. 小鼠 Nanog 基因的克隆及其在大肠杆菌中的表达. *中国生物工程杂志*, 2005: 257-259.

Lin Y L, Cao L X, Wu X J, Yan X L, Deng J X. Cloning of mouse nanog gene and its expression in *E.coli*. *Chinese Biotechnology*, 2005: 257-259. (in Chinese)

[14] Joseph S, David W R. *Molecular Cloning, a Laboratory Manual*. (The third edition). New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.

[15] 徐璐, 范学政, 王琴, 蒋春燕, 宁宜宝, 王泰健. 猪瘟病毒石门株 E2 基因 4 个抗原结构域的原核表达. *中国农业科学*, 2006, 39: 814-818.

Xu L, Fan X Z, Wang Q, Jiang C Y, Ning Y B, Wang T J. Study on the construction and expression of SM strain of classical swine fever virus E2 gene in *E.coli*. *Scientia Agricultura Sinica*, 2006, 39:

- 814-818. (in Chinese)
- [16] J 萨姆布鲁克, D W 拉塞尔. 分子克隆实验指南(第三版). 北京: 科学出版社, 2002.
- Sambrook J, Russell D W. *Molecular Cloning, a Laboratory Manual* (The Third Edition). Beijing: Science Press, 2002. (in Chinese)
- [17] 吴绍强, 蒋金书, 刘 群, 朱引洁. 柔嫩艾美耳球虫 BJ 株 TA4 基因的表达及电泳分析. 中国农业科学, 2004, 37: 1217-1221.
- Wu S Q, Jiang J S, Liu Q, Zhu Y J. Expression and electrophoretic analysis of the TA4 protein of eimeria tenella BJ strain. *Scientia Agricultura Sinica*, 2004, 37: 1217-1221. (in Chinese)
- [18] 郑增忍, 王海霞, 龚振华, 张彦明, 李 葳, 刘俊辉. 水疱性口炎病毒 N 基因原核表达载体的构建及表达. 西北农林科技大学学报, 2004, 32(5): 5-8.
- Zheng Z R, Wang H X, Gong Zh H, Zhang Y M, Li W, Liu J H. Construction and expression of vesicular stomatitis virus N gene in prokaryotic vector. *Journal of Northwest Sci-Tech University of Agriculture and Forest*, 2004, 32(5):5-8. (in Chinese)
- [19] 谢芝勋, 邓显文, 刘加波, 庞耀珊, 唐小飞, 廖 敏. 禽呼肠孤病毒广西分离株 $\delta_3$ 基因的克隆和表达. 中国防兽医学报, 2005, 27(3): 167-170.
- Xie Z X, Deng X W, Liu J B, Pang Y S, Tang X F, Liao M. Cloning and expression of  $\delta_3$  gene of avian reovirus guangxi strain. *Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine*, 2005, 7(3): 167-170. (in Chinese)
- [20] 狄 旭, 刘长征, 陈松森, 张艳丽, 邓艳春, 孙 兰, 杨 京. 人甲状旁腺素(1~34)衍生物在大肠杆菌中表达、纯化及其生物学活性. 中国生物化学与分子生物学报, 2005, 21: 227-233.
- Di X, Liu C Z, Chen S L, Zhang Y L, Deng Y C, Song L, Yang J. Expression, purification and biological activity of a recombinant human parathyroid hormone (1-34) analogue in *E.coli*. *Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 2005, 21: 227-233. (in Chinese)
- [21] Tsumoto K, Ejima D, Kumagai I, Arakawa T. Practical considerations in refolding proteins from inclusion bodies. *Protein Expression and Purification*, 2003, 28(1): 1-8.
- [22] Clark E B. Protein refolding for industrial processes. *Current Opinion in Biotechnology*, 2001, 12: 202-207.

(责任编辑 高 雨)