

牛 *GDF9* 和 *BMP15* 基因遗传变异与双胎性状的关系研究

张路培¹, 张小辉², 许尚忠^{1, 2*}, 高雪¹, 任红艳¹, 陈金宝¹

(1. 中国农业科学院北京畜牧兽医研究所, 北京 100094;

2. 西北农林科技大学动物科技学院, 杨凌 712100)

摘要: 以生长分化因子 9 (Growth differentiation factor 9, *GDF9*) 基因和骨形态发生蛋白 15 (Bone morphogenetic protein 15, *BMP15*) 基因作为牛双胎性状的候选基因, 研究了它们在鲁西牛、秦川牛、南阳牛和中国荷斯坦牛 4 个品种中的遗传变异, 并在鲁西牛群体中研究了其多态位点与双胎性状的关系。结果表明: 在鲁西牛中 *GDF9* 基因的 3'UTR 发现缺失突变, 而其它 3 个品种中没有发现该突变。对鲁西牛群体中该多态位点与单、双胎性状之间进行卡方显著性检验表明, 单胎牛群体与双胎牛群体基因型分布有极显著的差异 ($P=0.006$), 双胎牛群体的 B 等位基因频率明显大于单胎牛群体。通过生物信息学分析表明, 突变体 mRNA 的二级结构与野生型相比总自由能值差异不大, 但突变体 mRNA 翻译起始位点的二级结构稳定性明显大于野生型。在鲁西牛、南阳牛和秦川牛的 *BMP15* 基因中发现编码区第 759~762 位有 GAAA 4 个碱基存在缺失突变, 但没有检测到突变纯合个体, 中国荷斯坦牛中没有检测到该突变。卡方显著性检验表明单胎牛群体和双胎牛群体在该位点基因型组成差异不显著 ($P=0.947$)。

关键词: 牛; 生长分化因子 9 基因; 骨形态发生蛋白 15 基因; 双胎; 翻译起始位点; RNA 二级结构

中图分类号: S823.2

文献标识码: A

文章编号: 0366-6964(2007)08-0800-06

Genetic Variation in *GDF9* and *BMP15* Genes and Their Relationships with Twinning Trait in Cattle

ZHANG Lu-pei¹, ZHANG Xiao-hui², XU Shang-zhong^{1, 2*}, GAO Xue¹,

REN Hong-yan¹, CHEN Jin-bao¹

(1. Institute of Animal Science, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100094, China; 2. College of Animal Science and Technology, Northwest A & F University, Yangling 712100, China)

Abstract: Growth differentiation factor 9 (*GDF9*) gene and bone morphogenetic protein 15 (*BMP15*) gene were studied as candidate genes on the twinning trait in cattle. Genetic variation of *GDF9* and *BMP15* genes in Luxi cattle, Qinchuan cattle, Nanyang cattle and Chinese Holstein cattle was analyzed. The relationship between genetic polymorphisms and twinning trait was studied in Luxi cattle. The results showed that the 2-base deletion at 3'UTR of *GDF9* gene was only detected in Luxi cattle. The χ^2 test of association between genotypic distribution and twinning or monotocous trait in Luxi cattle showed significant difference ($P=0.006$). Frequency of B allele in Luxi twinning cows was higher than that in Luxi monotocous cows. According to bioinformatics analysis, the total free energy of the secondary structure of the mutation type mRNA was almost the same as the wild type mRNA. But the stability of the secondary structure in

收稿日期: 2006-08-21

基金项目: 国家农业科技跨越计划(2004 跨 20); 国家高技术研究发展计划 863 项目(2002AA242011)

作者简介: 张路培(1982-), 男, 河北石家庄人, 博士生, 主要从事生物技术与家畜育种研究, E-mail: zhanglupei500@163.com

* 通讯作者: 许尚忠, 研究员, 博导, 主要从事分子数量遗传与家畜育种研究, Tel: 010-62890940, E-mail: simmenta@vip.sina.com

translation initiation region (TIR) of mutation type mRNA was significantly higher than that of wild type mRNA. 4-base deletion in coding sequence of *BMP15* gene was detected in Luxi, Nan-yang and Qinchuan cattle. Homozygous mutation was not detected in these groups. The χ^2 test of association between genotypic distribution and twinning or monotocous trait in Luxi cattle showed no significant difference ($P=0.947$).

Key words: bovine; growth differentiation factor 9 gene; bone morphogenetic protein 15 gene; twinning trait; translation initiation region; RNA secondary structure

牛属于单胎动物,一般一胎只产一犊,极大地限制了养牛业的发展。一般来说,家畜的繁殖性状是受多基因控制遗传力很低的数量性状,其中,双卵率遗传力为 0.07,双胎率遗传力为 0.03^[1]。另外,牛的世代间隔较其它家畜长。因此,一般认为利用常规遗传选择法提高牛的双胎率很缓慢。

近些年研究发现,卵母细胞分泌的 2 种细胞因子—生长分化因子 9 (Growth differentiation factor 9, *GDF9*) 和骨形态发生蛋白 15 (Bone morphogenetic protein 15, *BMP15*) 对卵泡早期的生长和分化具有重要的调节功能^[2~8]。编码 *GDF9* 和 *BMP15* 的基因发生突变,是 Belclare 和 Cambrige 等绵羊品种高繁殖力的原因。*BMP15* 基因的 B2 突变(C718T)和 B4 突变(G1100T)以及 *GDF9* 基因的 G8 突变(C1184T)的杂合母羊排卵数增加,而纯合母羊不育^[9]。在中国本地高繁殖力绵羊品种小尾寒羊中也发现 *BMP15* 基因的 B2 突变^[10]。

牛 *GDF9* 基因和 *BMP15* 基因与双胎性状的关系研究尚未见报道。本研究以牛 *GDF9* 基因和 *BMP15* 基因为研究对象,期望找到与双胎性状有关的标记位点,为培育高繁殖力的肉牛品系提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 试验材料

51 头产过双胎的鲁西黄牛母牛和 128 头未产过双胎的鲁西黄牛母牛血样采自山东省鄄城县鲁西黄牛原种场、山东省梁山县科龙公司和山东省菏泽市牡丹区;31 头中国荷斯坦牛母牛血样采自西安草滩奶牛场;34 头秦川牛母牛血样采自陕西秦川牛良种繁育中心;36 头南阳牛母牛血样采自河南省南阳牛原种场。用常规的酚-氯仿抽提法从血样中提取基因组 DNA。

1.2 主要试剂

Taq DNA 聚合酶、dNTPs 混合物和 DNA 凝胶

回收试剂盒均购自北京天为时代公司; *EcoR* V 限制性内切酶购自大连宝生物工程有限公司。

1.3 引物设计及 PCR 扩增

引物由北京赛百盛基因技术有限公司合成,超纯水溶解, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。

1.3.1 *GDF9* 基因引物设计和 PCR 扩增 根据 GenBank 上公布的牛 *GDF9* 基因的 mRNA 序列 (NM_174681) 与牛的基因组比对结果,设计引物,分段扩增全部编码区及 5' 和 3' 非翻译区 (3' Untranslated region, 3' UTR)。扩增片段送北京华大基因研究中心进行测序,发现在 3' UTR 存在 2 碱基缺失突变。由于没有合适的酶切位点,根据测序结果,设计引物创造酶切位点 (Created restriction site, CRS),上游引物 G1 为: 5' CCATGAGGAAG-GCAGCTGAT 3', 下游引物 G2 为: 5' AAAAC-CGTGAGTGTCTCCTGGC 3'。下划线标示的碱基为引入的错配碱基。PCR 反应条件: $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 5 min; $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 30 s, $54.5\text{ }^{\circ}\text{C}$ 30 s, $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 30 s, 34 个循环; $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 10 min; $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。

1.3.2 *BMP15* 基因引物设计和 PCR 扩增 根据 GenBank 上公布的牛 *BMP15* 基因的 mRNA 序列 (XM_869059) 与牛的基因组比对结果,设计引物分段扩增全部编码区及 5' 和 3' UTR。扩增片段送北京华大基因研究中心进行测序,发现编码区存在 4 碱基缺失突变。为减小扩增产物长度,便于扩增产物直接进行基因型检测,重新设计上游引物 B1 为: 5' TCAGAGTGTTCAGAAGACCAA 3', 下游引物 B2 为: 5' ATACTGCCTGCTTGACGAG 3'。PCR 反应条件: $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 5 min; $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 30 s, $57\text{ }^{\circ}\text{C}$ 30 s, $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 20 s, 34 个循环; $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 10 min; $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。PCR 产物用 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳检测。

1.4 基因分型

GDF9 基因 G1 和 G2 引物扩增产物用 *EcoR* V 内切酶进行酶切。酶切的总体积 $10\text{ }\mu\text{L}$; PCR 产物 $7\text{ }\mu\text{L}$, *EcoR* V 内切酶 $0.4\text{ }\mu\text{L}$, $10\times$ Buffer $1\text{ }\mu\text{L}$, 超

纯水 1.6 μL, 37 °C 消化过夜, 于 12 % 聚丙烯酰胺凝胶电泳检测, 统计基因型。

BMP15 基因 B1 和 B2 引物扩增产物直接用 20 % 聚丙烯酰胺凝胶电泳检测, 统计基因型。

1.5 GDF9 基因 3'UTR 缺失突变的生物信息学分析

利用 RNA 二级结构预测软件 RNAdraw V1.1 对野生型和突变型 mRNA 二级结构进行分析预测。软件对 RNA 二级结构的预测按照最小自由能原理。

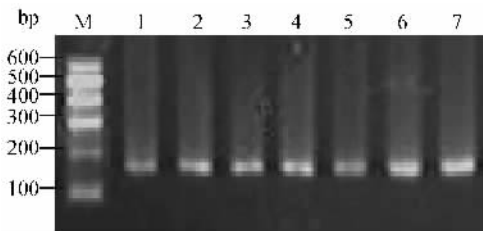
1.6 数据统计

运用 SAS(Statistical Analysis System)6.12 软件对数据进行分析, 对标记基因型与双胎性状进行卡方差异显著性检验。

2 结果与分析

2.1 扩增产物及序列测定

2.1.1 GDF9 基因突变位点扩增产物和测序 将测序结果与 GenBank 中牛 GDF9 基因 mRNA 序列比对, 确定第 1 576 和第 1 577 位的 TA 碱基发生缺失突变, 该位点位于 3'UTR。以基因组 DNA 为模板, 用引物 G1 和 G2 进行扩增, 得到约 182 bp 的特异性片段, 见图 1。



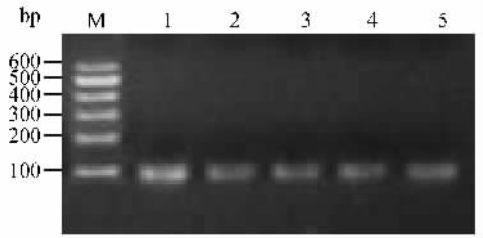
1~4. 鲁西牛母牛的 PCR 产物; 5. 中国荷斯坦牛母牛的 PCR 产物; 6. 秦川牛母牛的 PCR 产物; 7. 南阳牛母牛的 PCR 产物; M. 100 bp marker

1~4. PCR product of Luxi cattle; 5. PCR product of Chinese Holstein; 6. PCR product of Qinchuan cattle; 7. PCR product of Nanyang cattle; M. 100 bp marker

图 1 GDF9 基因 3'UTR 突变位点的扩增

Fig. 1 The CRS-PCR products of 3'UTR mutation of GDF9 gene

2.1.2 BMP15 基因突变位点扩增产物和测序 将测序结果与 GenBank 中牛 BMP15 基因 mRNA 序列比对, 确定编码区第 759~762 位的 GAAA 4 个碱基发生缺失突变, 该位点位于第 2 外显子。以基因组 DNA 为模板, 用引物 B1 和 B2 进行扩增, 得到约 100 bp 的特异性片段, 见图 2。



1, 2. 鲁西牛母牛的 PCR 产物; 3. 中国荷斯坦牛母牛的 PCR 产物; 4. 秦川牛母牛的 PCR 产物; 5. 南阳牛母牛的 PCR 产物; M. 100 bp marker

1, 2. PCR product of Luxi cattle; 3. PCR product of Chinese Holstein; 4. PCR product of Qinchuan cattle; 5. PCR product of Nanyang cattle; M. 100 bp marker

图 2 BMP15 基因第 2 外显子突变位点的扩增

Fig. 2 The PCR products of exon2 mutation of BMP15 gene

用 DNASTAR 软件对野生型和突变型的阅读框进行翻译, 由于在编码区缺失 4 个碱基, 导致阅读框改变, BMP15 前体蛋白由第 254 位氨基酸开始发生改变, 第 264 位氨基酸产生终止密码子。

2.2 基因分型结果

2.2.1 GDF9 基因分型结果 扩增产物经 EcoR V 酶切, 12 % 聚丙烯酰胺凝胶电泳分析发现 3 种带型, 见图 3。结合测序结果确定其片段大小分别为: 162 bp/20 bp, 180 bp 和 180 bp/162 bp/20 bp, 分别命名为 AA、BB、AB。

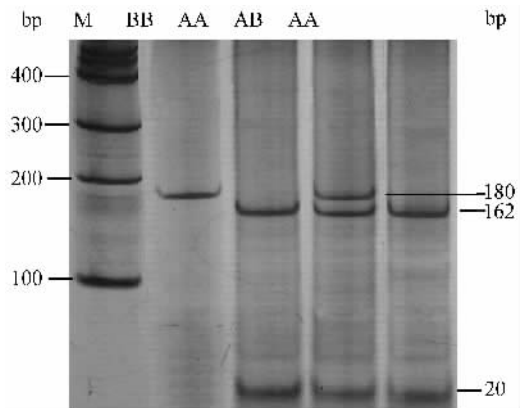


图 3 GDF9 基因 3'UTR 突变扩增产物 EcoR V 酶切

Fig. 3 Digested CRS-PCR products of 3'UTR mutation of GDF9 gene with EcoR V

2.2.2 BMP15 基因分型结果 扩增产物直接于 20 % 聚丙烯酰胺凝胶电泳分析只发现 2 种带型, 见图 4。结合测序结果确定其片段大小分别为: 102

bp, 102 bp/98 bp, 分别命名为 CC 和 CD。

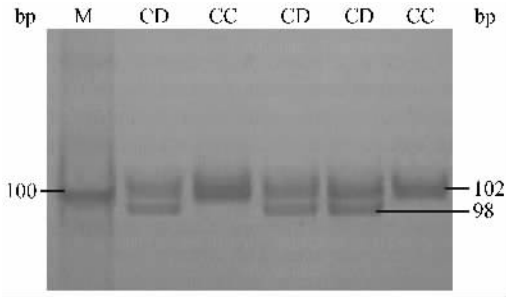


图 4 *BMP15* 基因第 2 外显子突变扩增产物电泳分型

Fig. 4 Direct electrophoresis with PCR products of exon2 mutation of *BMP15* gene

2.3 基因型频率和基因频率统计

2.3.1 *GDF9* 基因型频率和基因频率 *GDF9* 基

表 1 *GDF9* 3'UTR CRS-PCR 产物 RFLP-*EcoR* V 的基因型频率和等位基因频率

Table 1 Genotype frequency and allele frequency of *GDF9* 3'UTR CRS-PCR products digested with *EcoR* V

| 群体 Groups | 个体数/头 Number | 基因型频率 Genotype frequency | | | 等位基因频率 Allele frequency | |
|-----------------------------|-----------------|-----------------------------|-------------|------------|----------------------------|---------|
| | | AA | AB | BB | A | B |
| 鲁西牛双胎牛 Luxi twinning cows | 51 | 0.529 4(27) | 0.411 8(21) | 0.058 8(3) | 0.735 | 0.265 |
| 鲁西牛单胎牛 Luxi monotocous cows | 128 | 0.765 6(98) | 0.218 8(28) | 0.015 6(2) | 0.875 | 0.125 |
| 中国荷斯坦牛 Chinese Holstein | 31 | 1.000 0 | 0.000 0 | 0.000 0 | 1.000 0 | 0.000 0 |
| 秦川牛 Qinchuan cows | 34 | 0.000 0 | 0.000 0 | 0.000 0 | 1.000 0 | 0.000 0 |
| 南阳牛 Nanyang cows | 36 | 0.000 0 | 0.000 0 | 0.000 0 | 1.000 0 | 0.000 0 |

表 2 *BMP15* PCR 产物直接经聚丙烯酰胺凝胶分型的基因型频率和等位基因频率

Table 2 Genotype frequency and allele frequency of *BMP15* PCR products determined by direct electrophoresis

| 群体 Groups | 个体数/头 Number | 基因型频率 Genotype frequency | | | 等位基因频率 Allele frequency | |
|-----------------------------|-----------------|-----------------------------|-------------|---------|----------------------------|---------|
| | | CC | CD | DD | C | D |
| 鲁西牛双胎牛 Luxi twinning cows | 51 | 0.333 3(17) | 0.666 7(34) | 0.000 0 | 0.666 7 | 0.333 3 |
| 鲁西牛单胎牛 Luxi monotocous cows | 128 | 0.328 1(42) | 0.671 9(86) | 0.000 0 | 0.664 1 | 0.335 9 |
| 中国荷斯坦牛 Chinese Holstein | 31 | 1.000 0 | 0.000 0 | 0.000 0 | 1.000 0 | 0.000 0 |
| 秦川牛 Qinchuan cows | 34 | 0.677 1(22) | 0.322 9(12) | 0.000 0 | 0.823 5 | 0.176 5 |
| 南阳牛 Nanyang cows | 36 | 0.388 9(14) | 0.611 1(22) | 0.000 0 | 0.694 4 | 0.305 6 |

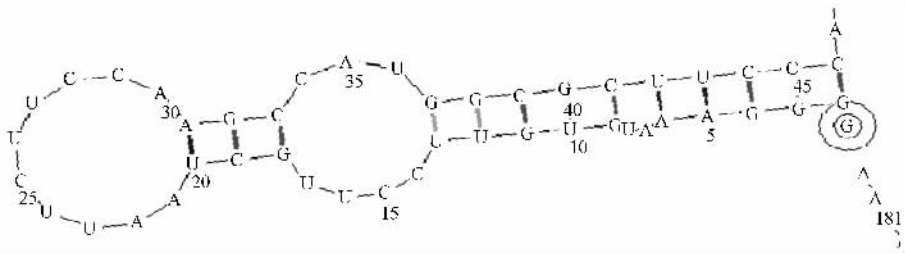
2.4 *GDF9* 基因 3'UTR 缺失突变的生物信息学分析

利用 RNA 二级结构预测软件 RNAdraw V1.1 对 *GDF9* 基因 mRNA 二级结构进行分析预测, 结果见图 5 和 6。分别将野生型和突变型的 mRNA 序列输入软件, 设定在 37 °C 条件下对序列进行折叠。折叠后野生型的能值为 -1.561 MJ/mol, 突变

因 3'UTR CRS-PCR 产物经 *EcoR* V 酶切分型, 基因型频率和等位基因频率见表 1。由表 1 可以看出, 在鲁西牛双胎牛和单胎牛中, A 基因为优势等位基因, AA 基因型频率最高, 其次是 AB 基因型和 BB 基因型。在中国荷斯坦、秦川牛和南阳牛中没有发现该突变。

2.3.2 *BMP15* 基因型频率和基因频率 *BMP15* 基因 PCR 产物经聚丙烯酰胺凝胶电泳直接分型, 基因型频率和等位基因频率见表 2。由表 2 可以看出, 中国荷斯坦牛群体中只有 CC 基因型, 而鲁西牛、秦川牛和南阳牛群体中只发现 CC 和 CD 两种基因型, 并且 C 为优势等位基因。鲁西牛和南阳牛群体中 CD 基因型频率最高, 而秦川牛群体中 CC 基因型频率最高。

型的能值为 -1.563 MJ/mol。按照郑仲承^[11]的方法, 计算出野生型和突变型起始密码子上下游各 35 nt^[12] 翻译起始位点 (Translation initiation region, TIR) 的能值分别为 -51.9 kJ/mol 和 -148.1 kJ/mol。当 TIR 区的能值大于 -125.5 kJ/mol 时, 核糖体的移动会受到阻碍, 进而影响翻译起始的效率^[13]。



位于两个同心圆中心的 G 碱基是 mRNA 5' 端第一个碱基; 数字表示从 5' 端计算的碱基位置; 起始密码子第一个碱基位于第 35 nt

G base in the concentric circles is the first base of mRNA at the 5' end; The number shows the position from the 5' end; ORF starts from the 35th base

图 5 GDF9 基因野生型 mRNA 5' 端序列的二级结构

Fig. 5 The secondary structure of 5' end of wild type mRNA of GDF9 gene

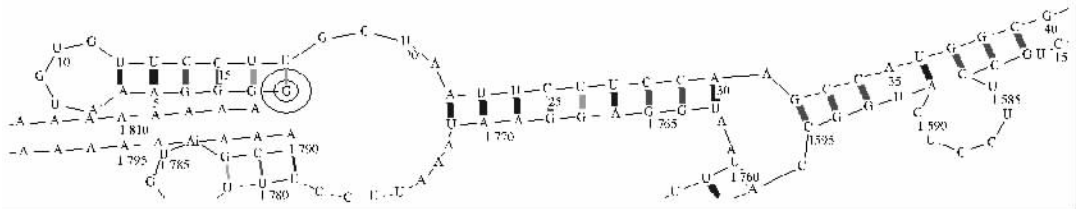


图 6 GDF9 基因突变型 mRNA 5' 端序列的二级结构

Fig. 6 The secondary structure of 5' end of mutation type mRNA of GDF9 gene

2.5 GDF9 和 BMP15 基因多态位点多态性与单、双胎性状之间的关联分析

用 SAS6.12 软件分别对 GDF9 和 BMP15 两个基因多态位点的基因型和单、双胎性状进行卡方独立性检验。双胎牛群体与单胎牛群体中 GDF9 基因多态位点的基因型组成有极显著的差异 ($P=0.006$), 双胎牛群体的 B 基因频率明显大于单胎牛群体。而 BMP15 基因多态位点的基因型组成在单胎牛和双胎牛两个群体中差异不显著 ($P=0.947$)。

3 讨论

本研究在牛 GDF9 基因发现的两碱基缺失突变位于 mRNA 的 3'UTR。该区域的突变虽然对蛋白质的一级结构没有影响, 但现有的研究表明, 翻译的起始效率主要取决于转录起始位点二级结构的稳定程度, 较高的稳定性会引起表达效率的下降^[14]。在真核生物细胞中, 核糖体与 mRNA 5' 端的核糖体进入位点结合后通过一种扫描机制向起始密码子移动来起始翻译过程^[13]。5' 端二级结构越稳定, 核糖体移动所需要的能量就越高, 进而引起翻译效率降低^[15]。通过生物信息学软件分析发现, 突变型 TIR 所形成的二级结构的稳定性明显大于野生型。因

此, GDF9 基因 3'UTR 的缺失突变很有可能是通过引起 mRNA 5' 区二级结构的稳定性增加, 导致翻译起始效率下降, 表达量下降。在绵羊中, GDF9 的 G8 突变杂合体由于表达量的降低, 引起卵巢排卵数的增加^[9]。因此推测, 如果该突变能引起 GDF9 的表达量降低, 很有可能引起母牛卵巢排卵数的增加, 导致产双胎。由于绵羊中 GDF9 基因的 G8 突变位于编码区, 属于功能缺失型突变, 而本研究发现的多态位点位于 3'UTR, 这有可能是在牛上突变引起双胎现象的效应不如绵羊上高的原因之一。

2004 年证实 X 染色体上的 BMP15 基因的两个突变是高繁殖力绵羊品种 Belclare 和 Cambridge 杂合体母羊高排卵数和纯合体不育的原因之一^[9]。在 BMP15 缺失的纯合小鼠中, 对卵泡生长和胚胎发育没有明显的影响, 但受精存在一定缺陷; 在 BMP15 缺失的杂合小鼠中, 没有发现排卵率有异常^[6]。本研究在牛 BMP15 基因中发现的四碱基缺失突变位于第 2 外显子, 改变了阅读框, 提前形成终止密码子, 推测其蛋白质合成提前终止, 无法形成成熟蛋白质。虽然该突变的性质与绵羊上 BMP15 基因的 B2 突变同为功能缺失型突变, 但是对基因型与牛单、双胎性状进行卡方独立性检测发现二者并

无相关,突变杂合体并不能像绵羊中的突变杂合个体可以引起排卵数的增加^[5]。并且在群体中没有检测到突变型的纯合子,推测纯合突变个体有可能在胚胎时期死亡,或者群体较少没有检测到。

参考文献:

- [1] Van Vleck L D, Gregory K E. Selection for twinning in cattle[J]. *J Anim Sci*,1996,3:522~528.
- [2] Dong J, Albertini D F, Nishimori K, *et al.* Growth differentiation factor-9 is required during early ovarian folliculogenesis[J]. *Nature*,1996,383(6 600):531~535.
- [3] Dube J L, Wang P, Elvin J, *et al.* The bone morphogenetic protein 15 gene is x-linked and expressed in oocytes[J]. *J Mol Endocrinol*,1998,12(12):1 809~1 817.
- [4] Bodensteiner K J, Clay C M, Moeller C L, *et al.* Molecular cloning of the ovine growth/differentiation factor-9 gene and expression of growth/differentiation factor-9 in ovine and bovine ovaries[J]. *Biol Reprod*,1999,60(2):381~386.
- [5] Galloway S M, McNatty K P, Cambridge L M, *et al.* Mutations in an oocyte-derived growth factor gene (*BMP15*) cause increased ovulation rate and infertility in a dosage-sensitive manner[J]. *Nat Genet*,2000,25(3): 279~283.
- [6] Yan C N, Wang P, DeMayo J, *et al.* Synergistic roles of bone morphogenetic protein 15 and growth differentiation factor 9 in ovarian function[J]. *Mol Endocrinol*,2001,15(6):854~866.
- [7] Juengel J L, Hudson N L, Heath D A, *et al.* Growth differentiation factor 9 and bone morphogenetic protein 15 are essential for ovarian follicular development in sheep[J]. *Biol Reprod*,2002,67(6): 1 777~1 789.
- [8] Juengel J L, Hudson N L, Whiting L, *et al.* Effects of immunization against bone morphogenetic protein 15 and growth differentiation factor 9 on ovulation rate, fertilization, and pregnancy in ewes[J]. *Biol Reprod*,70(3):557~561.
- [9] Hanrahan J P, Gregan S M, Mulsant P, *et al.* Mutations in the genes for oocyte-derived *GDF9* and *BMP15* are associated with both increased ovulation rate and sterility in Cambridge and Belclare sheep (*Ovis aries*) [J]. *Biol Reprod*,2004,70(4):900~909.
- [10] 储明星,桑林华,王金玉,等. 小尾寒羊高繁殖力候选基因 *BMP15* 和 *GDF9* 的研究[J]. *遗传学报*,2005,32(1):38~45.
- [11] 郑仲承. mRNA 5'端二级结构的预测法[J]. *生命的化学*,2000,20(4):176~178.
- [12] Ganoza M C, Kofoed E C, Marliere P, *et al.* Potential secondary structure at translation-initiation sites [J]. *Nucleic Acids Res*,1987,15(1):345~360.
- [13] Benjamin L. *Gene VIII* [M]. New York: Oxford University,2004.
- [14] Desmit M H, Van D J. Control of translation by mRNA secondary structure in *Escherichia coli*. A quantitative analysis of literature data[J]. *J Mol Biol*,1994,244(2):144~155.
- [15] Makrides S C. Components of vectors for gene transfer and expression in mammalian cell[J]. *Protein Expr Purif*,1999,17(2):183~202.