

重组人肿瘤坏死因子(hTNF- α)在大肠埃希菌 [*E. coli* BL21(DE3)]中表达条件的优化*

靳占奎^{1a}, 王 曦², 杨 乐³, 徐翠香^{1b}, 张丽洁^{1c}

(1. 陕西省人民医院 a. 骨科; b. 陕西省临床检验中心; c. 血液病研究室, 西安 710068;

2. 西安市红会医院骨科, 西安 710054; 3. 西安市儿童医院, 西安 710003)

摘要:目的 构建人肿瘤坏死因子(hTNF- α)表达质粒, 并对其鉴定, 优化 hTNF- α 蛋白表达条件使之在大肠埃希菌中实现高效表达。方法 应用 PCR 扩增技术获得 hTNF- α 基因片段并进行相应的鉴定, 将鉴定后的 hTNF- α 基因克隆到 pET24a 载体中, 获得 pET24a-hTNF- α 表达质粒。将此质粒转化入大肠埃希菌 BL21(DE3) 中, 并对其表达条件进行优化。结果 成功构建了 pET24a-hTNF- α 质粒, PCR 和酶切技术进行鉴定, 结果显示与目的片段一致。将此质粒转入大肠埃希菌 BL21(DE3) 中, 得到最佳表达条件为: M9+LB 培养基, 37℃, 0.5 mmol/L IPTG, pH 值=7.5, 诱导时间为 5 h。优化后的菌体干重增高了 2.56 倍, hTNF- α 产率增加 3.68 倍, hTNF- α 表达率从 9.38% 增加到 32.74%, 增高了 3.49 倍。结论 优化了 pET24a-hTNF- α 质粒在大肠埃希菌 BL21(DE3) 中的表达条件, 使 hTNF- α 蛋白得到高效表达。

关键词: 人肿瘤坏死因子 α ; 质粒; 大肠埃希菌; 基因克隆

中图分类号: R378.21; Q784 文献标志码: A 文章编号: 1671-7414(2017)05-100-05

doi: 10.3969/j.issn.1671-7414.2017.05.027

Optimization of Expression of Recombinant Human Tumor Necrosis Factor(hTNF- α) in *Escherichia coli*[*E. coli* BL21 (DE3)]

JIN Zhan-kui^{1a}, WANG Xi², YANG Le³, XU Cui-xiang^{1b}, ZHANG Li-Jie^{1c}

(1a. Department of Orthopedics; 1b. Shaanxi Provincial Clinical Laboratory Center; 1c. Hematology Research Laboratory, Shaanxi Provincial People's Hospital, Xi'an 710068, China; 2. Xi'an Honghui Hospital, Xi'an 710054, China; 3. Xi'an Children's Hospital, Xi'an 710003, China)

Abstract: Objective To construct a human tumor necrosis factor (hTNF- α) plasmid and identify it to optimize the fermentation conditions of hTNF- α protein so as to achieve high expression in *Escherichia coli*. **Methods** The gene of hTNF- α was cloned into pET24a vector to obtain the pET24a-hTNF- α expression plasmid that was transformed into *Escherichia coli* BL21(DE3), and the expression conditions of BL21(DE3) were optimized. **Results** The plasmid of pET24a-hTNF- α was successfully constructed and identified by PCR and digestion, which was consistent with the target fragment hTNF- α . The plasmid was transformed into *Escherichia coli* BL21(DE3), the best induced expression conditions of *Escherichia coli* BL21(DE3) were as follows: M9+LB medium, 37℃, 0.5 mmol/L IPTG, pH=7.5, and induction time was 5 h. The results showed that dry weight of the cells and the rate of TNF were increased by 2.56 times and 3.68 times, respectively, and the expression rate of hTNF- α was increased by 3.49 times from 9.38% to 32.74%. **Conclusion** The optimal conditions for the expression of plasmid pET24a-hTNF- α in *Escherichia coli* were determined.

Keywords: human tumor necrosis factor α ; plasmid; *Escherichia coli*; gene cloning

人肿瘤坏死因子 α (human tumor necrosis factor- α , hTNF- α) 是由 157 个氨基酸组成的可溶性多肽, 在体内以三聚体结构形式存在, 体内多种细胞 (如单核细胞、巨噬细胞、淋巴细胞、平滑肌细胞、成纤维细胞等) 都能够产生和释放 hTNF- α 。hTNF- α 是迄今发现抗肿瘤活性最强的细胞因子, 它不仅能够通过激活免疫系统抑制肿瘤细胞的生长, 而且还能够直接杀伤肿瘤细胞。目前研究证实重组 hTNF- α 在体外具有直接杀伤肿瘤细胞和抑制其增殖的作用, 在体内可引起肿瘤病灶出血坏死, 使肿瘤

体积缩小甚至消退^[1]。基因工程技术是 hTNF- α 蛋白制备的主要方法, 大多是通过基因克隆方法将 hTNF- α 转入到大肠埃希菌中, 通过表达、纯化、复性等一系列步骤来提取 hTNF- α 纯蛋白以制备针剂或者口服剂。通过基因工程技术制备 hTNF- α 的文献报道比较多, 如 2001 年中国科学院植物研究所张芑芑等^[2] 将 pMD-489-TNF- α 表达载体转入到蓝藻中制备了 TNF- α 口服剂, 当时 pMD-489-TNF- α 在大肠埃希菌中的表达量只有约 3%。后来李丹等^[3] 人对此方法的培养条件进行了优化,

* 作者简介: 靳占奎 (1982-), 男, 博士, 主治医师, E-mail: zhankui999@163.com。

通讯作者: 徐翠香 (1980-), 女, 在读博士, 主治医师, 主要从事免疫学研究, E-mail: xucuixiang1129@163.com。

TNF- α 的表达量和产率均有所提高。2009 年徐翠香等^[4]曾报道了 SA-hTNF- α 融合基因在大肠埃希菌[E. coli BL21 (DE3)]中表达、纯化、复性的一系列相关研究结果。然而,这些研究结果的蛋白表达量、产率和活性都不太理想。本实验在徐翠香等^[4]的研究基础上对 pET24a-hTNF- α 在大肠埃希菌[E. coli BL21 (DE3)]中的表达条件[包括培养基配制成分的选择、异丙基硫代半乳糖苷(iso-propyl β -D-1-thiogalactoside, IPTG)浓度、培养扩增温度、培养基 pH 值等一系列条件]^[5]进行优化选择,现报道如下。

1 材料与方法

1.1 主要实验材料 菌株 E. coli BL21 (DE3), E. coli DH5 α , pET24a 原核表达质粒。

1.2 主要试剂与仪器 限制性内切酶 EcoRI, XhoI, BamHI, T4 DNA 连接酶、Platinum Pfx DNA 聚合酶、琼脂糖(美国 Promega 公司), Sulfo-NHS-LC-LC-Biotin(美国 Pierce 公司), 胰蛋白酶、酵母提取物(英国 Oxoid 公司), 卡那霉素与 IPTG(上海生工), 2 000 bp DNA Marker(日本 Takara 公司), 胶回收试剂、PCR 纯化试剂盒、质粒提取试剂盒(美国 Omega 公司), PCR 引物由 IDT 公司合成, 培养基 LB(1 L): 10 g 蛋白胨, 10 g NaCl, 5 g 酵母提取物, pH 值调至 7.0; M9 培养基(1 L): 64 g Na₂HPO₄, 2.5 g NaCl, 15 g KH₂PO₄, 5 g NH₄Cl, 2 ml 1 mol/L MgSO₄ 溶液, 20 ml 20 g/dl 葡萄糖溶液, 0.1 ml 1 mol/L CaCl₂ 溶液, pH 值调至 7.0; M9+LB 培养基(1 L): 10 g 胰蛋白酶, 5 g 酵母提取物, 5 g NaCl, 12 g Na₂HPO₄, 3 g KH₂PO₄, 1 g NH₄Cl, 1 ml 1 mol/L MgSO₄ 溶液, 10 ml 20 g/dl 葡萄糖溶液, pH 值 7.0。微量高速低温离心机、核酸蛋白分析仪(美国 Beckman 公司), PCR 仪(美国 GE 公司)。

1.3 方法

1.3.1 hTNF- α 的制备: 抽取人外周血, 试剂盒提取总 RNA, 以其为模板用 PCR 技术制备 hTNF- α , 1 g/dl 琼脂糖凝胶电泳鉴定。引物为: P1: 5'-GGAATTCATGGTTCGTTCTTCTTCTCGTAC TCC-3' (33 nt), P2: 5'-CCCAAGCTTTTACAGAGCGATAATACCGAAGTATAC-3' (36 nt)。

1.3.2 pET-24a 载体制备及质粒构建: 将 pET24a 质粒进行酶切, pET-24a (30 μ l), 10 \times K buffer (4 μ l), EcoR I (1.5 μ l), BamH I (1.5 μ l), ddH₂O (3 μ l) 37 $^{\circ}$ C 水浴 2 h。1 g/dl 琼脂糖凝胶电泳鉴定后将 pET24a 质粒与 hTNF- α 基因片段按 1:3 (v/v), 在 4 $^{\circ}$ C 过夜。

1.3.3 细菌的克隆选择及鉴定: 将构建好的重组

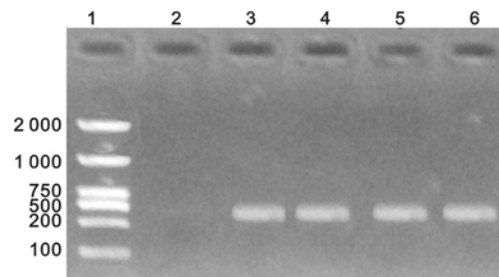
质粒 pET24a-hTNF- α 转入 DH5 α 感受态细胞中, 在卡那霉素固体培养基上划线, 37 $^{\circ}$ C 培养 20 h 后以 P1 与 P2 为引物, 挑选卡那霉素固体培养基上的单个菌落作为模板, 进行 PCR 扩增, 1 g/dl 琼脂糖凝胶电泳鉴定。

1.3.4 质粒提取及转化: 按照试剂盒说明书进行质粒抽提, 1 g/dl 琼脂糖凝胶电泳鉴定后将 pET24a-hTNF- α 质粒转入感受态 E. coli BL21 (DE3) 中, 挑选转化后的单个菌落在 LB 培养基中培养(作为种子液)。

1.3.5 培养条件选择及表达鉴定: 将大肠埃希菌[E. coli BL21 (DE3)]分别在不同培养基、温度、诱导剂浓度、诱导时间和 pH 值条件下进行试验, 选择最优化组合扩增大肠埃希菌后收集低温超声破碎其包涵体并洗涤, 用 100 g/L 的十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳鉴定。

2 结果

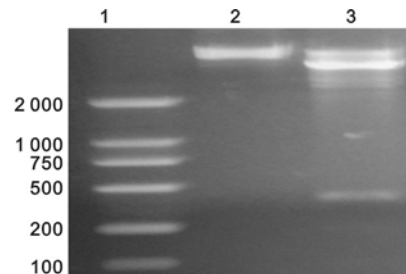
2.1 目的基因片段的鉴定 RT-PCR 法得到的 hTNF- α 目的基因片段在 496 bp, 见图 1。



1: Marker; 2: 阴性对照; 3, 4, 5, 6 均为目的片段

图 1 1 g/dl 琼脂糖凝胶电泳鉴定 RT-PCR 产物

2.2 酶切鉴定 将重组质粒 pET24a-hTNF- α 用 XhoI 和 EcoRI 进行酶切, 获得的目的基因片段见图 2。



1: Mr. DL 2000 DNA Marker; 2: 酶切前的质粒; 3: 酶切后的质粒

图 2 1 g/dl 琼脂糖凝胶电泳鉴定 pET24a-hTNF- α 酶切产物

2.3 不同培养基对大肠埃希菌生长及 hTNF- α 表达的影响 200 ml 摇瓶内分别装 M9, LB, LB+M9 培养液各 50 ml, 温度 37 $^{\circ}$ C, 初始 pH 值为 7.0, 摇床转速 200 r/min, 每 50 ml 接种量为 500 μ l, 每隔 1 h 取发酵培养液, 测其细胞悬液值(波长 A_{600nm})。结果显示大肠埃希菌在 LB 和 LB+M9

两种培养液中生长较好,且菌体生长情况类似,见图3。培养12 h后收菌,冰浴超声破碎包涵体,离心取上清,分别用酚试剂法和酶联免疫法测可溶性蛋白和hTNF- α 的含量。结果表明LB与M9+LB所收的菌体干重大于M9,冰浴超声法破碎包涵体后,测得的蛋白浓度依次为LB,M9+LB,M9,目的hTNF- α 的表达率M9+LB>M9>LB,见表1。因此本实验选择M9+LB作为此菌的培养液。

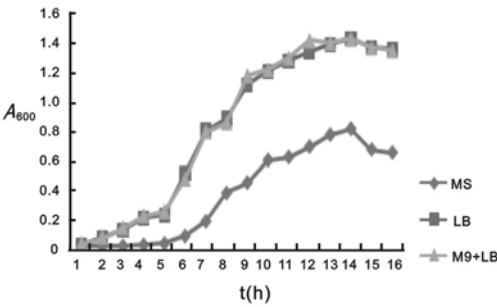


图3 三种培养液中大肠埃希菌生长趋势

表1 不同培养基对大肠埃希菌生长及hTNF- α 表达的影响

培养液	菌体干重(g/L)	hTNF- α 产率(g/L)	hTNF- α 表达率(%)
M9	0.325	0.058	4.02
LB	0.642	0.249	3.68
LB+M9	0.746	0.164	5.91

2.4 不同诱导剂IPTG浓度对大肠埃希菌生长的影响 选用M9+LB培养液,pH为7.0,培养至A_{600nm}约等于0.6时,加入诱导剂IPTG,分别使其终浓度为0,0.3,0.4,0.5,0.6,0.7 mmol/L,培养6 h。测菌体干重和hTNF- α 的表达率,结果表明IPTG浓度为0.5 mmol/L时hTNF- α 的表达率最高,见图4。

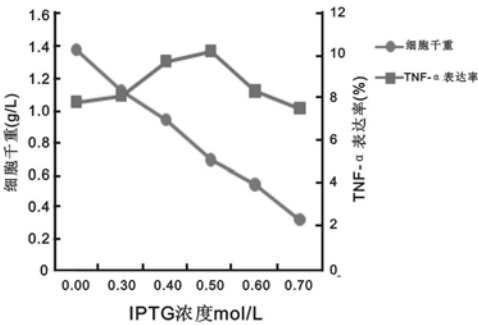


图4 IPTG浓度对菌体量及hTNF- α 表达率的影响

2.5 不同诱导时间对hTNF- α 在大肠埃希菌中表达的影响 细菌在pH值为7.0的M9+LB培养液中当A_{600 nm}约等于0.6时,加入0.5 mmol/L的IPTG,每隔1h取样检测hTNF- α 的表达量,连续检测7 h。在诱导5 h时测得hTNF- α 的表达率最高,为14.68%,见表2。

表2 诱导时间对hTNF- α 表达率的影响

诱导时间(h)	1	2	3	4	5	6	7
TNF- α 产率(g/L)	0.305	0.346	0.401	0.523	0.608	0.518	0.406
TNF- α 表达率(%)	7.01	8.45	10.02	12.46	14.68	11.38	10.33

2.6 不同温度对大肠埃希菌生长及hTNF- α 表达的影响 选用M9+LB培养液,pH值为7.0,IPTG浓度为0.5 mmol/L的培养条件,分别在30℃,37℃,42℃下培养12 h。结果显示37℃为培养大肠埃希菌的最适温度,见表3。

表3 不同温度对大肠埃希菌生长及hTNF- α 表达的影响

温度(℃)	32℃	37℃	42℃
菌体干重(g/L)	1.028	1.365	1.065
hTNF- α 产率(g/L)	0.206	0.305	0.208
hTNF- α 表达率(%)	6.02	9.31	6.24

2.7 不同pH值对大肠埃希菌生长及hTNF- α 表达的影响 将M9+LB培养液的pH值分别调整为6.0,6.5,7.0,7.5,8.0,IPTG浓度为0.5 mmol/L,培养温度为37℃,诱导培养5 h,分别检测hTNF- α 的表达量。结果显示pH值为7.5时hTNF- α 的表达量最高,见表4。

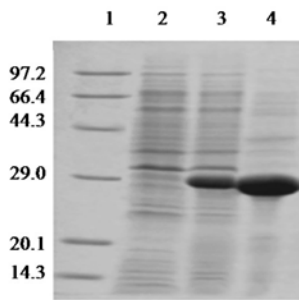
表4 不同pH值对大肠埃希菌生长及hTNF- α 表达的影响

pH	6.0	6.5	7.0	7.5	8.0
菌体量(g/L)	0.948	1.306	1.405	1.368	1.294
hTNF- α 产率(g/L)	0.256	0.274	0.301	0.298	0.274
hTNF- α 表达率(%)	6.06	7.32	9.08	8.29	7.45

2.8 常规条件与优化条件的比较 见表5。选择优化条件,M9+LB培养液,37℃,0.5 mmol/L IPTG,pH值=7.5,诱导5 h。收集菌体,裂解变性后经100g/L的SDS-PAGE凝胶电泳分离,考马斯亮蓝染色。结果见图5。在marker29.0~44.3 kDa处出现目的条带,与未优化的常规条件(LB培养基,37℃,0.5 mmol/L IPTG,pH=7.0,诱导4 h)比较,优化后目的蛋白表达量明显增高。菌体干重增高了2.56倍,hTNF- α 产率增加3.68倍,hTNF- α 表达率从9.38%增加到32.74%,增高了3.49倍。

表5 常规条件与优化条件的比较

检测指标	常规诱导条件	优化诱导条件
菌体干重(g/L)	1.261	3.228
hTNF- α 产率(g/L)	0.403	1.483
hTNF- α 表达率(%)	9.38	46.71



1: Low Mr marker, 2: 诱导前, 3: 常规诱导条件, 4: 优化诱导条件。

图5 100 g/L的十二烷基磺酸钠 SDS-PAGE凝胶电泳

3 讨论 自从1975年 Carswell 发现 hTNF- α 以来, hTNF- α 的结构、生物学功能, 以及与其它各种疾病的关系就得到了广泛关注。研究表明 hTNF- α 不仅具有抗肿瘤细胞的作用, 同时还可以诱导其它抗肿瘤细胞因子的产生, 它在肿瘤病灶的局部应用可以专一的杀伤肿瘤细胞, 同时不伤害正常的细胞^[6,7]。随着学者们对 hTNF- α 的研究, 它与原发性高血压、重症肝炎、感染性疾病、类风湿性关节炎、缺氧缺血性脑病患儿脑损伤程度、急性肺栓塞、糖尿病视网膜病变^[8,9]等疾病的关系得到进一步的了解。因此 hTNF- α 不仅能够成为极有前景的抗癌药, 而且在其它相关性疾病中也具有广泛应用前景。

目前基因工程技术已成为大多数细胞因子蛋白来源的主要手段, 大肠埃希菌的表达体系具有经济、稳定、操作简单、耗时短、表达广泛等优点, 因而成为最常用工程菌。例如结核分枝杆菌、高迁移率族蛋白 1^[10] 等都可以在大肠埃希菌中得到高效表达, 使原来无法大量获得的重组蛋白得到批量生产^[11]。hTNF- α 蛋白也是通过将目的基因转入到大肠埃希菌中培养、扩增、纯化等一系列相关实验制备得到^[12~14]。但是有研究显示 hTNF- α 蛋白在大肠埃希菌中表达往往会聚集为无活性、不溶解的包涵体, 此包涵体洗涤、纯化后所得蛋白活性较低, 医用价值不大。因此通过各种方式使大肠埃希菌表达体系优化, 得到高活性、高产量的蛋白是目前研究的主要目的^[15]。本实验将 ET24a-hTNF- α 重组质粒转入到大肠埃希菌 [E. coli BL21 (DE3)] 中, 首先对培养液进行了选择, 由以前的 LB 培养液变为了 M9+LB 培养液。研究显示虽然大肠埃希菌在 LB 培养液中生长速度较 M9 培养液中快, 然而 hTNF- α 的表达率在 LB 培养液中低于 M9 培养液。因为 M9 培养基中虽然缺少了大肠埃希菌生长需要的主要营养物质(酵母提取物和胰蛋白胨), 但是 M9 培养液所含的大量无机盐致使冻融破碎包涵体时溶液结冰速度缓慢, 从而降低了冻融破碎效率, 使 hTNF- α 的表达率明显升高。因此本

试验选择 M9+LB 培养液, 这种联合应用的方法兼顾了大肠埃希菌的生长和 hTNF- α 外源基因的表达。有实验研究显示增高 IPTG 浓度可提高 hTNF- α 的表达率, 但同时会对大肠埃希菌的生长有一定抑制作用。因为高浓度的 IPTG 不仅抑制大肠埃希菌对营养元素吸收, 同时还会产生细胞毒性, 严重抑制 hTNF- α 外源基因的表达率和大肠埃希菌的生长, 因此 IPTG 浓度的选择非常关键。另外, 温度也是影响大肠埃希菌生长速率、代谢途径以及质粒稳定性的关键因素之一。在较低温度中大肠埃希菌生长速率缓慢或不能生长。高温虽然不影响生长速度, 但会导致发酵体系不稳定, 表达受到抑制。因此, 培养温度一般选择在 30℃~42℃之间。在 pH 值选择方面, 培养液偏酸或偏碱均不利于大肠埃希菌的生长和外源基因的表达, 尤其培养液偏酸不仅影响了细菌的生长, 同时还抑制 hTNF- α 蛋白的合成与表达。

综上所述, 本研究建立了可溶性表达载体, 通过优化表达条件, 使 hTNF- α 蛋白在大肠埃希菌 [E. coli BL21 (DE3)] 中达到高效表达, 为 hTNF- α 蛋白的纯化和复性奠定了基础。

参考文献:

- [1] 吕志敢, 郭政. 肿瘤坏死因子的研究进展[J]. 山西医科大学学报, 2006, 37(3): 311-314.
Lu ZG, Guo Z. Research progress of tumor necrosis factor[J]. J Shanxi Med Univ, 2006, 2003, 37(3): 311-314.
- [2] 张芃芃. TNF- α 在鱼腥藻 7120 中的高效表达和对宿主光合作用的影响[D]. 北京: 中国科学院植物研究所, 2001: 37-40.
Zhang PP. Effective expression of human tumor necrosis factor- α in Anabaena sp. PCC 7120 and its influence on photosynthesis of the host[D]. Beijing: Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, 2001: 37-40.
- [3] 李丹, 韩睿, 李轩, 等. 转 TNF- α 基因大肠杆菌培养条件的优化[J]. 生物技术, 2008, 18(2): 60-64.
Li D, Han R, Li X, et al. Optimization for cultivation conditions of transgenic *Escherichia coli* harboring TNF- α gene[J]. Biotechnology, 2008, 18(2): 60-64.
- [4] 徐翠香, 胡志明, 李金龙, 等. SA-TNF- α 融合蛋白高效表达、纯化及复性研究[J]. 南方医科大学学报, 2009, 29(3): 412-415.
Xu CX, Hu ZM, Li JL, et al. Expression, purification and refolding of streptavidin-tagged human tumor necrosis factor- α fusion protein[J]. South Med Univ, 2009, 29(3): 412-415.
- [5] Rabhi-Essafi I, Sadok A, Khalaf N. A strategy for high-level expression of soluble and functional human interferon(alpha) as a GST-fusion protein in *E. coli* [J]. Protein Eng Des Sel, 2007, 20(5): 201-209.
- [6] Yang L, Froio RM, Sciuto TE, et al. ICAM-1 regulates neutrophil adhesion and (下转 107 页)

- transcellular migration of TNF- α -activated vascular endothelium under flow[J]. Blood, 2005, 106(2): 584-592.
- [7] Smith KA, Tam VL, Wong RM, et al. Enhancing DN-A vaccination by sequential injection of lymph nodes with plasmid vectors and peptides[J]. Vaccine, 2009, 27(19): 2603-2615.
- [8] 周 骞, 段吾磊, 唐路军, 等. TNF- α 与原发性高血压的相关性及中医药干预研究进展[J]. 中国循证心血管医学杂志, 2017, 9(2): 240-242.
Zhou Q, Duan WL, Tang LJ, et al. Relationship between TNF- α and essential hypertension and the progress of TCM intervention[J]. Chinese Journal of Evidence-Based Cardiovascular Medicine, 2017, 9(2): 240-242.
- [9] 王瑞萍. 类风湿关节炎患者血清中抗 CCP 抗体和 TNF- α 表达的临床意义[J]. 重庆医学, 2017, 46(12): 1624-1625, 1628.
Wang RP. Clinical significance of serum anti-CCP antibody and TNF- α expression in patients with rheumatoid arthritis [J]. Chongqing Medicine, 2017, 46(12): 1624-1625, 1628.
- [10] 姜南艳, 张 伟, 任君萍, 等. 高迁移率族蛋白 1 在大肠埃希菌中的高效表达以及纯化[J]. 现代检验医学杂志, 2007, 22(3): 26-28.
Jiang NY, Zhang W, Ren JP, et al. Highly efficient expression and purification of human HMGB1 gene in *E. coli*[J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2007, 22(3): 26-28.
- [11] Shiloach J, Fass R, Growing E. *coli* to high cell density-A historical perspective on method development [J]. Biotechnol Adv, 2005, 23(5): 345-357.
- [12] 丛春水, 邓继先, 苏志国. 利用 pH 电极流加葡萄糖培养重组大肠杆菌生产人 α -肿瘤坏死因子的研究 [J]. 生物工程学报, 1999, 15(1): 87-92.
Cong CS, Deng JX, Su ZG. Study on fed-batch culture of recombinant *E. coli* for human tumor necrosis factor- α with pH electrode[J]. Chinese Journal of Bioengineering, 1999, 15(1): 87-92.
- [13] 刘婷隽, 洪泽辉, 胡安康. GST-CBX2-1 融合蛋白表达载体的构建及其在原核细胞中的表达[J]. 黑龙江医药科学, 2017, 40(3): 118-120.
Liu TJ, Hong ZH, Hu AK. Construction of GST-CBX2-1 fusion protein expression vector and its expression in prokaryotic cells[J]. Heilongjiang Medicine And Pharmacy, 2017, 40(3): 118-120.
- [14] 何生美. 重组人白细胞介素-7 原核表达、纯化与理化性质鉴定[J]. 海峡药学, 2017, 29(6): 261-263.
He SM. Expression and purification of recombinant human interleukin-7 and identification of its physicochemical properties [J]. Strait Pharmaceutical Journal, 2017, 29(6): 261-263.
- [15] 苏 鹏, 龚国利. 优化大肠杆菌表达外源蛋白的研究进展[J]. 生物技术通报, 2017, 33(2): 16-23.
Su P, Gong GL. Research progress on optimizing the expression of exogenous proteins in *Escherichia coli* [J]. Biotechnology Bulletin, 2017, 33(2): 16-23.

收稿日期: 2017-07-12

修回日期: 2017-08-21