

文章编号: 1000-5013(2009)06 0668-05

重组大鼠细胞球蛋白的制备、纯化与活性

张亭亭, 李招发, 许瑞安

(华侨大学 分子药理学研究所, 福建 泉州 362021)

摘要: 通过聚合酶链式反应(PCR) 克隆鼠源细胞球蛋白(Cytoglobin, CYGB) 基因, 构建原核表达载体 pET22b-Cygb, 转入 *E. coli* BL21(DE3) 经乳糖诱导表达 CYGB, 发现 CYGB 主要以可溶形式存在, 其表达量占可溶性总蛋白的 35% 以上. 通过 DEAE 阴离子交换柱层析和 Sephacryl S 100 凝胶过滤层析, CYGB 纯度可超过 95%. 重组表达的可溶性 CYGB 不但具有过氧化物酶活性, 其活性为 $(3.23 \pm 0.12) \text{ mkat} \cdot (\text{g} \cdot \text{min})^{-1}$, 还能保护胎鼠原代皮肤成纤维细胞减轻氧化应激损伤(H_2O_2 模型) .

关键词: 重组细胞球蛋白; 高效可溶表达; 分离纯化; 鉴定; 活性检测

中图分类号: Q 512⁺ .2; Q 503

文献标识码: A

细胞球蛋白(Cytoglobin, CYGB) 是近几年来在脊椎动物中发现的球蛋白超家族中的新成员. 它是六配位结构, 配体结合方式明显不同于传统的五配位球蛋白(如血红蛋白、肌红蛋白) . CYGB 在哺乳动物、两栖类、鸟类、硬骨鱼类等多个物种中都有广泛表达, 其生理功能已逐渐成为国内外研究的焦点. 已有研究表明, CYGB 具有过氧化物酶活性及氧自由基清除剂的作用, 在多种细胞(HSC, BEAS-2B, HeLa, N2a) 和组织(肝、脑和心) 中, CYGB 能被氧化应激诱导表达, 并能在缺氧状态下发挥保护神经细胞的作用^[1-4]. 另外, 由于 Cygb 最初是在纤维化大鼠的 HSC 中发现, 其与肝脏纤维化的关系一直是研究的热点. 文[5-6] 利用重组腺相关病毒作为 CYGB 表达载体(rAAV/Cygb) , 在体外(原代大鼠肝星状细胞铁过载模型) 和体内(四氯化碳(CCl_4) 模型和胆管结扎模型) 均证明 Cygb 基因能显著抑制肝纤维化. 最近的研究表明, Cygb 基因还可能是一种潜在的抑癌基因^[7-8], Cygb 基因的启动子甲基化及杂合性缺失与包括非小细胞肺癌、头颈癌和卵巢癌在内的几种肿瘤发生有关, 体外转染肺癌细胞能显著抑制肿瘤细胞的克隆形成能力. 文[9] 已成功克隆 Cygb 基因, 并采用 pDAB/g III A, B, C 载体系统表达 CYGB. 文[10] 首次证明 CYGB 可用于促进皮肤等上皮组织的生长, 有减缓衰老、抗氧化和抗炎功能, 但采用该方法生产的 CYGB 只占上清总蛋白的 10% 以上, 表达量有待进一步提高. 本研究通过构建基因工程菌 pET22b-Cygb/*E. coli* BL21(DE3) 诱导表达 CYGB, CYGB 表达量达可溶性总蛋白的 35% 以上.

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 质粒与载体和菌株 rAAV-Cygb 质粒、pET22b 质粒、*E. coli* DH5 α 和 *E. coli* BL21(DE3) 均为华侨大学分子药理学研究所保存.

1.1.2 主要试剂 限制性内切酶 EcoRI, NdeI 和 TaqDNA 聚合酶购自大连宝生物工程有限公司; Yeast Extract 与 Trypton 购自英国 Oxoid 公司; 一抗: 兔抗 CYGB 由 Kawada 博士惠赠; 二抗: 羊抗兔 HRP-IgG 抗体购自美国 Santa Cruz, MTT 为北京索莱宝公司产品; IPTG 购自美国 Sigma 公司; T4

收稿日期: 2008-12-27

通信作者: 许瑞安(1948-), 男, 教授, 博士生导师, 主要从事基因工程及蛋白药物的研究. E-mail: ruianxu@hqu.edu.cn.

基金项目: 国家高新技术研究发展(863) 计划项目(2005216060, 2008AA022135); 福建省自然科学基金资助项目(2007J0105); 福建省科技厅重点项目(2008Y0084)

DNA Ligase, BCA 蛋白浓度测定试剂盒和质粒小量提取试剂盒购自上海碧云天生物技术公司; 引物由大连宝生物工程有限公司合成, 上游引物序列: 5'-AGA CAT ATG GAG AAA GTG CCG GGC GAG-3', 下游引物序列: 5'-AGA GAA TTC TTA TGG CCC TGA AGA GGG CAG TG-3'; DNA 测序由大连宝生物工程有限公司完成; DMEM 培养基为美国 Gibco 公司产品, 胎牛血清购自美国 Hyclone 公司, 妊娠期 KM 小白鼠由福州吴氏实验动物提供。

1.2 载体构建与表达和纯化

(1) 载体构建. 以 rAAV-Cygb 质粒为模版进行 PCR, 94 °C 预变性 5 min. 然后, 于 94 °C, 30 s; 52 °C, 30 s; 72 °C, 30 s, 35 个循环. 最后, 于 72 °C 延伸 5 min^[6]. 回收 PCR 产物酶切后插入到经同样酶切的原核表达载体 pET22b 之间, 并转化 *E. coli* DH5 α 感受态细胞获得重组质粒 pET22b-Cygb. 挑取单个菌落, 用质粒提取试剂盒制备上述表达质粒载体 pET22b-Cygb, 经酶切及测序鉴定, 转化 *E. coli* BL21(DE3), 获得基因工程菌。

(2) CYGB 的诱导表达. 挑取单克隆接种于含 25 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 氨苄青霉素(Amp)的乳糖(0.73 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$) 诱导培养液摇瓶中诱导表达 12~16 h, 于 11 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5 min 收集菌体, 通过 SDS-PAGE 电泳鉴定表达量, 筛选出高表达工程菌株。

(3) pET22b-Cygb/*E. coli* BL21 表达工程菌的诱导表达. 取 pET22b-Cygb/*E. coli* BL21 高表达工程菌株接种到含 25 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ Amp 的 LB 液体培养基中, 于 37 °C, 238 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 摇床过夜培养. 转接至含 Amp 的乳糖诱导培养基中, 于 37 °C, 238 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 摇床继续诱导培养 12~16 h。

(4) 表达产物的纯化. 将诱导表达后的菌液, 于 4 °C, 11 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 下离心 5 min, 收集沉淀并于 -20 °C 和 4 °C 下反复冻融 2~3 次. 然后, 将反复冻融后的菌体沉淀用 10 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 Tris-HCl 缓冲液(pH=8.0)重悬 20~30 min. 最后, 于 4 °C, 11 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 下离心 5 min, 保留上清液。

1.3 分析方法

(1) DEAE-Sephadex A-50 离子交换层析分析. 上清液上样后, 用 10 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 Tris-HCl 缓冲液洗脱到 D(280) 基线. 然后, 分别用含 30, 100 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl 的 10 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tris-HCl 缓冲液洗脱, 于 280 nm 紫外光下检测吸光度值 D(280). 通过 SDS-PAGE 电泳收集纯度高的部分, 稀释上样到 DEAE-Sephadex A-50 柱, 并将流速调整为 2~3 $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$. 然后, 用含 0.5 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl 的 10 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tris-HCl 高盐缓冲液慢速洗脱, 洗脱体积尽量减小以浓缩样品。

(2) Sephacryl S-100 凝胶过滤层析分析. 柱子平衡后, 将浓缩后的样品稀释上样, 用含 0.15 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl 的 10 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tris-HCl 缓冲液(pH=8.0)洗脱, 15% 的 SDS-PAGE 检测纯化产物。

(3) Western Blot 分析. 纯化后的 CYGB 经 SDS-PAGE 电转移到甲醇浸泡过的 PVDF 膜上, PVDF 膜于封闭液中封闭过夜, 分别与一抗室温孵育 1.5 h, HRP 标记的 goat anti rabbit 二抗室温孵育 1.5 h, DAB 显色液显色。

1.4 胎鼠原代皮肤成纤维细胞分离与培养

采用颈椎脱位法处死妊娠期 KM 小白鼠, 于 75% 酒精中灭菌 1 min, 放进无菌生物安全柜. 用剪刀从小鼠腹部中央剪开皮肤, 剖腹取出子宫, 放入无菌 D-Hank's 液中漂洗后取出胎鼠, 无菌 D-Hank's 液漂洗去血细胞, 剪下胎鼠皮肤, 加 DMEM 液漂洗 3 次. 然后, 加入 0.5 mL 培养液(DMEM+20% 胎牛血清), 剪碎成约 1 mm^3 的组织小块, 均匀地平铺到培养瓶底, 翻转培养瓶, 向非细胞培养面加入 2~3 mL 培养液, 将有组织块的一面朝上, 放入 37 °C, 5% CO_2 , 在饱和湿度条件下培养 8 h; 轻轻翻转培养瓶以使培养液浸没组织块, 于 37 °C, 5% CO_2 , 饱和湿度条件下继续培养, 1~2 d 内不要摇动培养瓶, 每隔 2~3 d 换液一次. 当细胞基本铺满瓶底后, 加入 0.5 mL 0.25% 胰酶(含 0.02% EDTA)消化传代。

1.5 测定方法

(1) CYGB 蛋白浓度测定. 利用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒测定蛋白浓度。

(2) CYGB 过氧化物酶活性测定. 采用愈创木酚法测定 CYGB 的过氧化物酶活性, 于 470 nm 处测定光吸收值变化. 取 50 mL, 10 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tris-HCl 缓冲液(含 0.15 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl), 加入 28 μL 愈创木酚, 磁力搅拌器加热搅拌至全部溶解后, 加入 19 μL , 30% 的 H_2O_2 混匀, 即可配制反应混合液. 500 μL 反应体系, 包括 484 μL 反应混合液和 16 μL CYGB, 重复 3 次, 用缓冲液代替 CYGB 作为对照。

(3) 细胞抗氧化测定. 取对数期胎鼠成纤维细胞接种于 96 孔板, 每孔 8 000 个, 待细胞完全贴壁后分组处理. 实验分对照组、模型组、实验组和阳性对照组, 每组和每个浓度设 6 个平行孔, 用 $25\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 维生素 E 预处理作为阳性对照. 模型组终浓度 $700\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}\text{H}_2\text{O}_2$ 处理, 实验组加入终浓度 $2.4\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ CYGB 后, 同样用终浓度 $700\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}\text{H}_2\text{O}_2$ 处理, 并于 $37\text{ }^\circ\text{C}$, $5\%\text{CO}_2$ 培养 3 h 后, 每孔加入 $20\text{ }\mu\text{L}$ 的 MTT (终浓度为 $0.5\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$); 3 h 后, 每孔加入 $100\text{ }\mu\text{L}$ DMSO, 缓慢振荡 8~10 min, 于酶标仪 492 nm 测定 D 值.

1.6 统计分析方法

实验数据经 Student *t*-Test 统计学处理, 以 $\bar{x}\pm\text{SD}$ 表示.

2 结果与分析

2.1 CYGB 原核表达载体的构建

质粒 PCR 和菌落 PCR 后, 琼脂糖凝胶电泳均在 600 bp 左右有特异性条带, 初步证明所构建的 CYGB 原核表达载体正确. 双酶切鉴定后, 在约 600 bp 处同样发现存在目的片段(图 1), 且 DNA 测序也证实质粒确实含有目的基因, 进一步确定表达载体构建正确. 图 1 中, M 为 DNA Marker; 1 为以 rAAV-CYGB 质粒为模板 PCR 产物; 2 为 pET22b-Cygb 质粒; 3 为 pET22b-Cygb 经 EcoRI /NdeI 双酶切产物; 4 为含 rAAV-Cygb 质粒的 *E. coli* BL21 菌落 PCR 产物.

2.2 CYGB 的诱导表达及纯化

pET22b-Cygb 转化表达宿主菌 *E. coli* BL21 经乳糖诱导表达, 15% 的 SDS-PAGE 可见, 在相对分子质量约 21 ku 处有明显的蛋白条带, 且主要以可溶形式存在, 含量大于可溶性总蛋白的 35%, 如图 2 所示. 图 2 中, M 为蛋白质 Marker, 1 为纯的 CYGB; 2 为经过 DEAE 离子交换层析的 CYGB; 3 为含 pET22b-Cygb 菌株诱导表达后菌体总上清; 4 为含 pET22b-Cygb 菌株诱导表达后菌体的沉淀; 5、6 分别为含 pET22b-Cygb 菌株诱导表达后菌体总蛋白, 以及 pET22b 空载体细菌全裂解液.

从图 2 可以看出, 带有 pET22b 空载体和带有 pET22b-Cygb 载体的菌株诱导表达后相比较, 后者在相对分子质量约 21 ku 处有明显的蛋白条带, 而前者没有. 同时, 两者的其他蛋白的表达量没有明显区别, 说明 CYGB 在宿主菌 *E. coli* BL21(DE3) 中的表达量很高.

比较泳道 3、4 和 5, 可以发现, 经过重悬离心后, 21 ku 左右的蛋白大部分溶解于缓冲液中, 沉淀中目的蛋白量较小. 比较泳道 3、2 和 1 发现, 上清经过 DEAE-Sephadex A-50 离子交换层析和浓缩并经 Sephacryl S-100 分子筛纯化后, 15% 的 SDS-PAGE 电泳发现杂蛋白基本被去除, 凝胶成像系统扫描分析可知, CYGB 的纯度大于 95%.

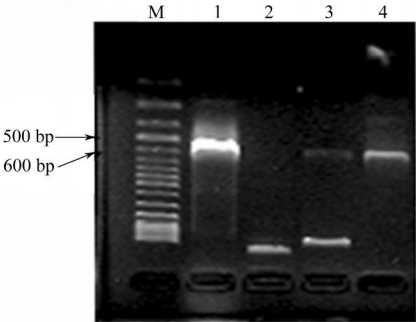


图 1 PCR 扩增基因和重组质粒酶切图谱

Fig. 1 Amplification of Cygb gene and the enzyme digestion analysis of plasmid pET22b-Cygb

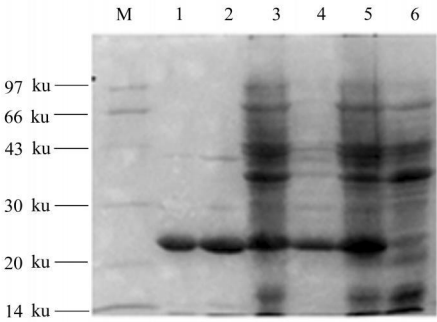


图 2 载体表达及 CYGB 的纯化

Fig. 2 Analysis of expression and purification of CYGB

2.3 纯化 CYGB 的 Western Blot 鉴定

15% 的 SDS-PAGE 电泳后转 PVDF 膜做 Western Blot 鉴定, 结果如图 3 所示. 与预染 Marker 相比较, 上面一条相对细的条带相对分子质量小于 49 ku, 和 CYGB 二聚体的相对分子质量基本一致; 而下面一条染色深的带的相对分子质量约为 21 ku, 大小和 CYGB 单体的相对分子质量吻合.

2.4 重组 CYGB 的过氧化物酶活性测定

利用愈创木酚法测定重组 CYGB 的过氧化物酶活性, 于 470 nm 波长, 每 30 s 测一次, 连续 5 min, 测得吸光度 A_{470} 变化, 实验重复 3 次. 纯化的重组 CYGB 过氧化物酶活性为 $(3.23 \pm 0.12) \text{ mkat} \cdot (\text{g} \cdot \text{min})^{-1}$, BCA 法测定纯化的 CYGB 浓度为 $560 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$.

2.5 细胞抗氧化活性测定

细胞抗氧化活性测定结果, 如图 4 所示. 图 4 中, 实验组 A, B, C 分别经 $700 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{H}_2\text{O}_2$, $2.4 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{CYGB}$ 和 $25 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 维生素 E 预处理. 从图 4 中可以看到, $700 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{H}_2\text{O}_2$ 处理 3 h 后, 导致胎鼠原代皮肤成纤维细胞产生明显毒性, 相对增殖率 (r_{RG}) 下降至 $(62.28 \pm 3.27) \%$; $2.4 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{CYGB}$ 预处理能显著降低 H_2O_2 对细胞的毒性, 其 r_{RG} 值为 $(88.15 \pm 9.27) \%$, $25 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 维生素 E 也能发挥抗氧化作用 ($P < 0.01$), 但其保护作用不如 $2.4 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{CYGB}$ ($P < 0.001$). 因此, 可以证明 CYGB 预处理能够明显减轻细胞的氧化损伤.

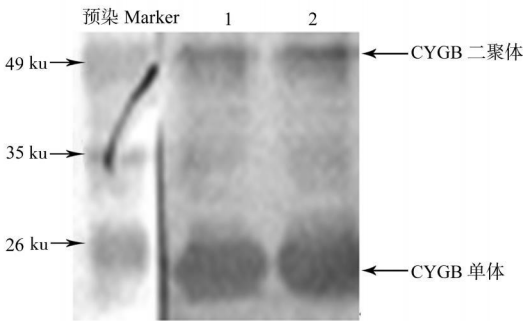


图 3 重组 CYGB 的 Western Blot 鉴定

Fig. 3 Identification of purified recombinant CYGB by Western Blot

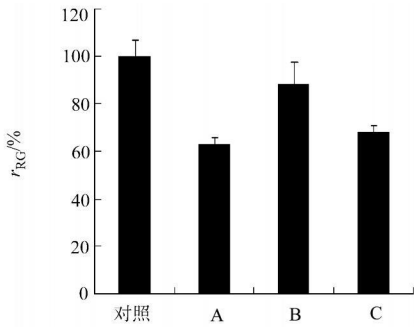


图 4 MTT 法测定 CYGB 的抗氧化功能

Fig. 4 Anti oxidation activity assay of CYGB by MTT

3 讨论

CYGB 最早发现在硫代乙酰胺诱导的鼠纤维化肝脏的星状细胞中表达上调, 因而被命名为星状细胞活化相关蛋白 (STAP)^[11]. 经科学家深入研究证明, CYGB 在哺乳动物组织和细胞中广泛表达, 且存在很高的同源性, 鼠和人的 CYGB 仅 4% 的残基有差异. 近几年, 对 CYGB 了解越来越深刻, 但其功能和作用机理还有待于深入阐述^[7, 12-13].

在实验室已有基础上, 通过构建 pET22b-Cygb/*E. coli* BL21 (DE3) 表达工程菌, 粗分离蛋白后经 DEAE-Sephadex A-50 离子交换层析和 Sephacryl S-100 凝胶过滤层析, 经 SDS-PAGE 和 Western blot 验证了实验结果; 凝胶成像系统扫描分析得出, 诱导表达后可溶性 CYGB 含量大于可溶性总蛋白含量的 35%. 纯化的 CYGB 存在单体和二聚体两种结构, 但二聚体含量很少, 二经高效液相色谱分析得知, 单体的含量达蛋白总量的 95% 以上.

CYGB 蛋白中含有 2 个半胱氨酸残基, 二聚体可能以形成分子间二硫键的形式产生^[14-15]. 生理状态下 CYGB 蛋白主要以单体形式存在, 因此推测单体生理活性较高, 有关单体与二聚体各项功能、性质的系统性研究正在进行中.

通过分离胎鼠皮肤原代成纤维细胞证明, 重组 CYGB 能够对抗 H_2O_2 诱导的细胞氧化应激, 同时采用愈创木酚法测定 CYGB 的过氧化物酶活性为 $(3.23 \pm 0.12) \text{ mkat} \cdot (\text{g} \cdot \text{min})^{-1}$, 高于文[16] 中的报道, 进一步验证了本实验方法的优越性. 研究不仅克服了 CYGB 在动物和人体内表达量低的问题, 而且对 CYGB 在抗炎症和抗氧化领域的深入发展奠定基础.

参考文献:

[1] HODGES N J, INNOCENT N, DHANDA S, et al. Cellular protection from oxidative DNA damage by over expression of the novel globin cytoglobin *in vitro* [J]. Mutagenesis, 2008, 23(4): 293-298.

- [2] FORDEL E, THIJS L, MARTINET W, et al. Neuroglobin and cytoglobin overexpression protects human SH-SY5Y neuroblastoma cells against oxidative stress induced cell death[J]. Neuroscience Letters, 2006, 410(2): 146-151.
- [3] FORDEL E, THIJS L, MARTINET W, et al. Anoxia or oxygen and glucose deprivation in SH-SY5Y cells: A step closer to the unraveling of neuroglobin and cytoglobin functions[J]. Gene, 2007, 398(1/2): 114-122.
- [4] LI D, CHEN X Q, LI W J, et al. Cytoglobin up-regulated by hydrogen peroxide plays a protective role in oxidative stress[J]. Neurochem Res, 2007, 32(8): 1375-1380.
- [5] XU R, HARRISON P M, CHEN M, et al. Cytoglobin overexpression protects against damage induced fibrosis[J]. Mol Ther, 2006, 13(6): 1093-1100.
- [6] 李欣燕, 许瑞安, 王广基, 等. 大鼠星状细胞激活相关蛋白基因的克隆及其重组腺相关病毒载体的构建[J]. 药物生物技术, 2005, 12(6): 351-353.
- [7] LÜ Y, WANG Q, DIAO Y, et al. Cytoglobin: A novel potential gene medicine for fibrosis and cancer therapy[J]. Curr Gene Ther, 2008, 8(4): 287-294.
- [8] SHIVAPURKAR N, STASTNY V, OKUMURA N, et al. Cytoglobin, the newest member of the globin family, functions as a tumor suppressor gene[J]. Cancer Res, 2008, 68(18): 15.
- [9] 李欣燕, 许瑞安, 王广基, 等. 重组副腺病毒介导的大鼠星状细胞激活相关蛋白基因转染对大鼠星状细胞表达间质胶原酶 mRNA 的影响[J]. 中国临床药理学与治疗学, 2004, 9(11): 1236-1238.
- [10] 许瑞安, 王广基, 刁 勇. 重组细胞球蛋白(Cytoglobin)的生产方法及其用途: 中国, ZL 200510094205[P]. 2008-02-13.
- [11] KAWADA N, KRISTENSEN D B, ASAHINA K, et al. Characterization of a stellate cell activation associated protein (STAP) with peroxidase activity found in rat hepatic stellate cells[J]. J Biol Chem, 2001, 276(27): 25318-25323.
- [12] PRESNEAU N, DEWAR K, FORGETTA V, et al. Loss of heterozygosity and transcriptome analyses of a 1.2 Mb candidate ovarian cancer tumor suppressor locus region at 17q25.1-q25.2[J]. Mol Carcinog, 2005, 43(3): 141-154.
- [13] 许瑞安, 陈 凌, 肖卫东. 分子基因药理学[M]. 北京: 北京大学医学出版社, 北京大学出版社, 2008: 272-301.
- [14] MAKINO M, SUGIMOTO H, SAWAI H, et al. High resolution structure of human cytoglobin: Identification of extra N and C termini and a new dimerization mode[J]. Acta Cryst, 2006, 62(6): 671-677.
- [15] HAMDANE D, KIGER L, DEWILDE S, et al. The redox state of the cell regulates the ligand binding affinity of human neuroglobin and cytoglobin[J]. J Biol Chem, 2003, 278(51): 51713-51721.
- [16] 魏 威, 吴梧桐. 重组人源肝星状细胞激活相关蛋白体外生物活性的研究[J]. 药物生物技术, 2007, 14(6): 401-405.

Preparation, Purification and Activity of Recombinant Rat Cytoglobin

ZHANG Ting-ting, LI Zhao-fa, XU Ru-an

(Institute of Molecular Medicine, Huaqiao University, Quanzhou 362021, China)

Abstract: Rat Cygb cDNA was cloned through PCR with rAAV-Cygb as template and inserted into a prokaryotic expression vector to construct a recombinant plasmid, pET22b-Cygb. Then the recombinant plasmid pET22b-Cygb was transformed into *E. coli* BL21(DE3) and expressed by lactose induction. The CYGB protein accounted for more than 35% of total soluble protein. The purified CYGB protein was achieved through DEAE anion exchange chromatography and Sephacryl S 100 gel filtration chromatography, respectively. Eventually, the purity of CYGB protein was over 95%. After purification, its antioxidation activity was measured through its protection effect to primary skin fibroblast of fetal rat resulted from hydrogen peroxide damage, and its peroxidase activity unit was $(3.23 \pm 0.12) \text{ mkat} \cdot (\text{g} \cdot \text{min})^{-1}$.

Keywords: recombinant CYGB; soluble high expression; isolation and purification; identification; activity analysis

(责任编辑: 黄晓楠 英文审校: 陈国华)