

基于基因组的 TEV 蛋白酶的高表达

李 玲, 凌 文, 石牡丹, 尚广东

(南京师范大学生命科学学院, 江苏省微生物工程技术研究中心, 江苏省微生物与功能基因组学重点实验室, 江苏 南京 210023)

[摘要] TEV 蛋白酶由于其高酶切活性、酶切位点的专一性和酶切条件的宽容性而在蛋白分离和蛋白质组学研究等领域有着广泛的应用。目前获得 TEV 蛋白酶的方法是将克隆在质粒上的 TEV 基因在大肠杆菌表达菌株 BL21(DE3) 中实现过表达。但该方法有一定缺点, 如需使用抗生素, 这就可能在后续的纯化中引入杂质, 菌株群体中不均一性而降低产量等。本研究通过重组工程方法将受 T7 强启动子驱动的, 与麦芽糖结合蛋白 MBP 融合的 TEV 蛋白酶基因整合至 BL21(DE3) 的基因组上进行过表达。MBP-TEV 在细胞内自剪切获得分离的 TEV。Ni-NTA 亲和层析得到纯化的 TEV, 产量可达 4.2 mg/L。所分离的 TEV 表达出良好的酶切活性。本菌株有着以之大规模获得 TEV 的潜力, 所建立的通过重组工程将外源基因整合至 BL21(DE3) 基因组的进行表达的方法也可成为通用的平台技术。

[关键词] 基于基因组, 重组工程, TEV, 蛋白表达

[中图分类号] Q819 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1001-4616(2014)03-0095-05

Chromosome-based TEV Protease Overexpression

Li Ling, Ling Wen, Shi Mudan, Shang Guangdong

(School of Life Sciences, Nanjing Normal University, Jiangsu Engineering and Technology Research Center for Microbiology, Jiangsu Key Laboratory for Microbes and Functional Genomics, Nanjing 210023, China)

Abstract: Due to its high proteinase cleavage activity, specificity and effective in a wide range of conditions, Tobacco etch virus protease (TEV) has many applications, ranging from protein isolation to proteomics study. Currently, TEV is produced by plasmid-based overexpression in *Escherichia coli* BL21 (DE3). Yet, the method has inherent disadvantages, for example, it needs antibiotic to maintain the plasmid which may bring impurities during the protein purification; and non-homogeneity of the strain population which may reduce the yield. Herein, we report the recombineering mediated integration of MBP fused TEV gene under the strong T7 promoter into *E. coli* BL21 (DE3) chromosome. Intracellular digestion of chromosomal based overexpression of MBP-TEV released TEV which was subsequently isolated though Ni-NTA affinity purification, the yield of TEV was up to 4.2 mg/L. Purified TEV shows fine protease activity. The engineered strain has the potential to be used for large scale TEV purification, the established recombineering method can be a platform for the genome engineering and heterologous gene expression in *E. coli* BL21 (DE3).

Key words: chromosome-based, recombineering, TEV, protein expression

异源蛋白在大肠杆菌中大量表达是研究基因和蛋白功能的重要手段。异源蛋白由于来源广泛, 其所使用的密码子常常与大肠杆菌有着显著的不同, 因而不能分泌至细胞间质, 即不能以可溶性蛋白而仅能以包涵体的形式表现出来, 这一点在表达真核生物基因时尤为明显。解决异源蛋白可溶性的手段之一是将目的基因和融合标签进行融合表达。常用的融合标签有麦芽糖结合蛋白 (MBP)、泛素样修饰蛋白 (SUMO)、氮源利用物质 A (NusA) 和谷胱甘肽转移酶 (GST) 等。融合标签也有可能增加目的蛋白的产量^[1]。常在融合标签和目的蛋白之间设计蛋白酶的酶切位点以通过蛋白酶的酶切将二者分开。常用的蛋白酶包括 TEV 蛋白酶、凝血酶、肠激酶等, 其中以 TEV 蛋白酶最为重要^[2]。

TEV 蛋白酶来源于烟草蚀纹病毒的 NIa(核包含蛋白基因), 其作用位点为 ENLYFQ↓G(↓表示酶切

收稿日期: 2013-11-09.

基金项目: 国家自然科学基金(NSFC81273412).

通讯联系人: 尚广东, 副教授, 研究方向: 微生物药物的研发. E-mail: shanggd@hotmail.com

位点). 由于 TEV 蛋白酶有着很好的酶切活性、氨基酸酶切位点的专一性以及酶切条件的宽容性(即可在多种高盐和高咪唑浓度等条件下均可表现出很好的活性), 因而广泛应用于融合蛋白的分离、基因组学和蛋白质组学中特定蛋白的标记和分离等研究^[3,4].

目前获得 TEV 蛋白酶的方法是将其基因克隆至表达载体中, 继而在大肠杆菌(*Escherichia coli*) 宿主菌中, 经诱导表达后再进行分离纯化. 尽管此基于质粒的表达体系被广泛采用也行之有效, 但存在一些固有的不足, 如: 需质粒转化、需使用抗生素(而抗生素可能作为纯化时的杂质)、含有质粒的菌株有着群体不均一性、基因的活性在长时间使用后会降低等等. 而将目的基因整合至基因组上的表达方式, 由于基因的转录和基因组的转录同步, 则可避免上述问题.

本研究采用重组工程手段将 T7 启动子驱动的、与 MBP 融合的 TEV 基因整合至大肠杆菌表达菌株 BL21(DE3) 的基因组, 构建了一株基于基因组的 TEV 表达菌株. 此菌株经 IPTG(异丙基- β -D-硫代半乳糖苷) 诱导表达后, MBP-TEV 过表达并发生细胞内自剪切而获得分离的 TEV. TEV 的 N-端与 6 个组氨酸标签融合, 可以通过 Ni-NTA 亲和层析柱分离纯化, 纯化的 TEV 表现出良好的体外酶切活性.

重组工程是基于 λ 噬菌体的 *red α* , *red β* 和 *red γ* 3 个基因所编码的重组酶催化短核苷酸之间同源重组而进行 DNA 克隆和修饰的分子生物学技术. 自 20 世纪末发展以来, 以其对 DNA 操纵的高效、便捷、不受靶分子的大小和位点等限制等诸多优点已经逐渐成为大肠杆菌及许多其他微生物基因组工程的重要手段^[5-7].

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株与质粒

E. coli MG1655, *E. coli* DH10B, *E. coli* BL21(DE3), *E. coli* BW25141 为本实验室保存. 原绿球藻 *Prochlorococcus marinus* MIT9313 基因组 DNA 由美国麻省理工学院 Sallie Chisholm 教授惠赠, pMOD4 RT-G 由美国 Pittsburgh 大学 Alfred Fisher 教授惠赠. pTKRed^[8] 由美国 Princeton 大学 Thomas Kuhlman 博士惠赠. pBluescript II KS(-), pET30a(+), pKD4, pBAD322C, pLS972, pLS1128^[9] 为本实验室保存. pMD18T-simple 购自大连宝生物公司.

1.1.2 试剂和仪器

DNA 限制性内切酶、DNA T4 连接酶、IPTG、X-Gal、质粒提取试剂盒、胶回收试剂盒和 DNA 分子量标准均购自大连宝生物公司; PCR 引物、*pfu* 聚合酶、40% 丙烯酰胺溶液、蛋白质分子量标准和抗生素等购自上海生工公司; Ni-NTA 树脂购自德国 QIAGEN 公司. 其余试剂均为国产分析纯. PCR 仪为 Bio-Rad 公司的 S1000, 电转化仪为 Bio-Rad 公司的 Gene Pulser^{II}.

1.1.3 DNA 测序

由南京赛因斯生物科技有限公司完成.

1.2 方法

1.2.1 分子生物学常规操作

大肠杆菌电转化感受态细胞的制备和 DNA 转化、PCR 扩增、质粒提取和酶切鉴定以及 SDS-PAGE(十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳) 等常规实验按分子克隆手册^[10] 进行. Ni-NTA 纯化蛋白按 QIAGEN 公司的说明书进行. 本研究所使用的寡核苷酸引物见表 1.

1.2.2 质粒构建

1.2.2.1 融合蛋白重组克隆的构建

以 *P. marinus* MIT9313 基因组 DNA 为模板, MTS1-MTS2 扩增得到 1.0 kb 神经氨酸合成酶基因 PMT0106, 1.0 kb PMT0106 以 *EcoR* I-*Not* I 酶切后克隆至 pKS(-) 的相同位点, 获得重组克隆 pLS1104, 随之以 *Nco* I-*Not* I 酶切分离, 其插入片段克隆至启动因子融合表达载体 pLS1128 的相同位点^[10], 获得融合表达载体 pLS1134.

表 1 本研究所使用的寡核苷酸引物
Table 1 Oligonucleotides used in this study

名称	序列(5'-3')	酶切位点
MTS1	GAAGAATTC CCATGGGGATGACTAATCTCTTGATTTTAATATC	<i>Bam</i> H I, <i>Nco</i> I
MTS2	GAAGCGGCCGCTCAGTCTGACTACCATATCAAATGAAAG	<i>Not</i> I
R6K1	GGGTCTAGAGCTCTCGAGATATCTATGGACAGCAAGCGAACCGG	<i>Xba</i> I
R6K2	GGGAATTCGGATCCGGTACCACTAGTTCAGAAGAAGCTCGTCAAGAAG	<i>Eco</i> R I
R1061	GAATC CGACTCTTGAAATAAGATCACTACCG	<i>Xho</i> I
R1062	GAATC CGACTTACGCCCCGCCCTGCCACTC	<i>Xho</i> I
R1067	GGGGTACCGCTTGCCAGGAGCGATCTAAC	<i>Kpn</i> I
R1068	GGGTACGTATGCTGTGAAATGCCGGATGCCG	<i>Sna</i> B I
R1069	GGGTACGTAGAATGGCCGTAATGTGGAGATG	<i>Sna</i> B I
R1070	GGGTCCGACGGGGATAGAGCCGTAAGACTG	<i>Sal</i> I
R1071	CCATACCCACGCCGAAACAAG	
R1072	AAGGGGTTATGCTAGTTATTG	
R1073	GAGCGCCAGTTGCCACTCATC	
R1074	ACGCGTTGGTTAATCACCTC	
R1075	AGTCTCGCGCTCTTTCAGGGCTTC	

注:引物中所引入的酶切位点以下划线表示。

1.2.2.2 TEV 蛋白酶基因整合质粒的构建

以 pKD4 为模版,R6K1-R6K2 PCR 扩增得到 1.1 kb 卡那霉素抗性基因片段,1.1 kb 以 *Xba* I -*Eco*R I 酶切后克隆至 pKS(-)的相同位点,获得重组克隆 pLS1913,随之以 *Xba* I -*Eco*R I 酶切,其插入片段和 pMOD4 RT-G 以 *Xba* I -*Eco*R I 酶切分离的 2.1 kb 连接,转化大肠杆菌 BW25141,以 30 μ g/mL 的卡那霉素和 50 μ g/mL 的氨苄青霉素进行筛选,获得重组克隆 pR6KMCS。pR6KMCS 为 R6K 质粒骨架,其卡那霉素抗性基因两侧的多克隆位点可用于克隆外源片段。

MBP-TEV 融合表达载体 pLS972^[10] 以 *Cla* I -*Pvu* II 酶切分离的 4.7 kb 片段和 pR6KMCS 以 *Cla* I -*Hinc* II 酶切分离的 2.0 kb 连接,转化 BW25141,筛选得到 pLS1919。以 pBAD322C 为模版,R1061-R1062 PCR 扩增得到 0.7 kb 的 *cat*(氯霉素抗性基因)以 *Xho* I 酶切后克隆至 pLS1919 的 *Xho* I 酶切位点,获得重组克隆 pLS1928。

以 BL21(DE3)基因组 DNA 为模板,分别以 R1067-R1068 以及 R1069-R1070 为引物 PCR 扩增得到 *malE* 基因上游和下游各 0.5 kb 片段。2 个 0.5 kb 片段各克隆至 pMD18-T Simple 获得重组质粒 pLS1937 和 pLS1938。pLS1937 以 *Kpn* I -*Sna*B I 酶切分离的 0.5 kb 和 pLS1938 以 *Sna*B I -*Sal* I 酶切分离的 0.5 kb 通过三片段连接,克隆至 pKS(-)的 *Kpn* I -*Sal* I 位点获得重组克隆 pLS2429。

以 pLS1928 为模板,R1071-R1072 PCR 扩增得到 3.0 kb 片段,钝端克隆至 pLS2429 的 *Sna*B I 位点,获得重组克隆 pLS2430。pLS2430 以 *Kpn* I -*Sal* I 酶切分离的 4.0 kb 片段和 pR6KMCS 以 *Kpn* I -*Sal* I 酶切分离的 2.0 kb 连接,转化宿主菌为 BW25141,筛选得到最终的重组克隆 pLS2431。

1.2.3 IPTG 诱导重组酶表达的菌株电转化感受态细胞的制备和电转化

首先按常规方法将质粒 pTKRed 转化至大肠杆菌 BL21(DE3),以 100 μ g/mL 大观霉素,在 30 $^{\circ}$ C 下进行筛选。所得菌株的单菌落转接至 3 mL 含 100 μ g/mL 大观霉素的 LB 液体培养液中,30 $^{\circ}$ C 培养过夜,1 mL 转接至 100 mL 同样培养基,30 $^{\circ}$ C 振荡培养至 OD 600 约 0.2 时,加入 2 mmol/L IPTG,培养至 OD 600 约 0.4 时,将菌液倒入预冷的离心管,冰浴 10 min,4 $^{\circ}$ C,7 000 r/min 离心 5 min,弃上清。以冰冷的 10% 甘油洗涤菌体 3 次,最后以 200 μ L 冰冷的 10% 甘油悬浮,50 μ L 分装并用于一次电转化。

pLS2431 以 *Kpn* I -*Sal* I 酶切分离的 4.0 kb 片段,溶解于 ddH₂O,1 μ g DNA 加至上述表达重组酶的电转化 50 μ L 的感受态细胞,轻弹混匀。将混合液转移至冰上预冷的 1 mm 电转杯中,电击转化。电转化条件:1.8 kV,200 Ω 。电转化后,以 1 mL LB 培养基悬浮,转至 1.5 mL 聚丙烯离心管,37 $^{\circ}$ C 振荡培养 2 h,涂布至含 25 μ g/mL 氯霉素的 LB 平板,筛选得到重组菌株。

2 结果与分析

2.1 整合型基因工程菌株的构建

本研究通过重组工程法构建基因工程菌株、IPTG 诱导过表达 MBP-TEV、自剪切获得 TEV 并通过 Ni-

NTA 亲和层析进行分离纯化的策略如图 1 所示. IPTG 诱导 pTKRed 表达重组酶, 含同源臂的受 T7 驱动的 *malE-TEV-cat* 在源于 λ 噬菌体的重组酶催化之下, 与基因组上的同源片段发生同源重组, 在氯霉素抗性筛选之下, *malE-TEV-cat* 整合至大肠杆菌 BL21(DE3) 的基因组, 基因组上的 *malE* 基因部分同时被敲除. 通过菌落 PCR 来鉴定菌株的基因型, 正确菌株的 PCR 结果如图 2 所示, 将所得菌株命名为 LS2401. LS2401 已保藏在中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心, 编号为 CGMCC No. 7482. LS2401 在 IPTG 诱导之下表达 MBP-TEV 融合蛋白, 随之融合蛋白发生自剪切, TEV 蛋白酶与 MBP 标签分离并通过亲和层析纯化.

M1 和 M2 分别为 DL2000 和 λ /Hind III DNA 分子量标准; 以原株 BL21 (DE3) 基因组为模板, R1073-R1074 PCR 扩增的是 2.4 kb 片段(泳道 1); 分别以 LS2401 基因组为模板, R1073-R1075 扩增得到上游整合位点至插入片段之间的 1.9 kb 片段(泳道 2), R1061-R1074 扩增得到插入片段至下游位点之间的 1.5 kb 片段(泳道 3), R1073-R1074 扩增得到 4.1 kb 的全长片段(泳道 4).

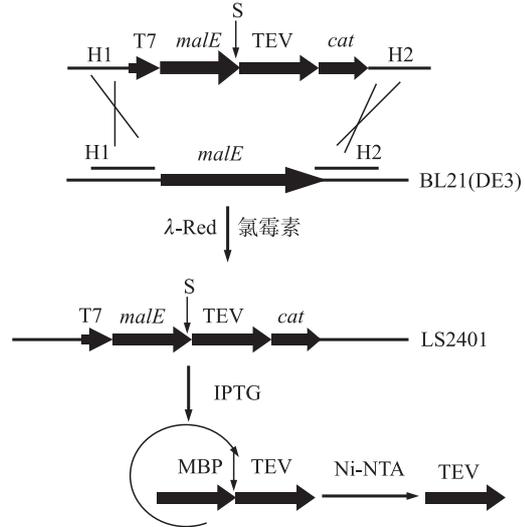
2.2 基于基因组的 TEV 蛋白酶的表达和纯化

IPTG 诱导 MBP-TEV 融合蛋白表达后, 于 MBP 和 TEV 之间的 TEV 酶切位点切割此融合蛋白(即发生细胞内剪切)而释放 TEV. LS2401 表达的 MBP-TEV 总蛋白为 69.6×10^3 Da, 由于细胞内自剪切而得到 41.0×10^3 Da 的 MBP 和 28.6×10^3 Da 的 His-TEV. SDS-PAGE(图 3)显示与预期大小相符, 结果中还可可见约 50% 的蛋白是以可溶性蛋白的形式存在. 一步 Ni-NTA 树脂亲和层析可将 TEV 纯化至 95% 以上的纯度, 以 Bradford 法测定纯化的蛋白含量, 经计算得到 TEV 的产量为 4.2 mg/L.

2.3 TEV 酶切融合蛋白

将含组氨酸标签、伴侣蛋白 TIG 和 PMT0106 的融合表达蛋白通过 Ni-NTA 亲和层析纯化后, 以上述纯化的 TEV 蛋白酶进行酶切. 酶切体系: 20 μ g 蛋白, 0.5 μ g TEV, 缓冲液为 50 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0, 0.5 mmol/L EDTA, 1 mmol/L DTT. 总体积为 150 μ L, 30 $^{\circ}$ C 酶切 3 h. 结果如图 4 所示.

由图可见, TEV 蛋白酶可作用于融合标签和目的蛋白之间的酶切位点而将二者有效地分离. 未能酶切完全, 可能是由于酶切条件并非最佳. 注意到 PMT0106 在 SDS-PAGE 上的迁移较预期的稍快, 这是由于糖蛋白本身的性质所造成的^[11,12]. 所分离的目的蛋白可进一步通过柱层析和含 His-tag 的标签蛋白及 TEV 蛋白分开. 因此, 基于基因组的 TEV 蛋白酶表达系统可用于高效地分离纯化具高活性的 TEV 蛋白酶, MBP-TEV 在表达细胞内的自剪切也证明了 TEV 蛋白酶的高活性.



H1 和 H2:同源片段;T7:T7 启动子;malE:麦芽糖结合蛋白基因;TEV:TEV 蛋白酶基因;cat:氯霉素抗性基因;S:TEV 酶切位点;Ni-NTA:亲和层析;箭头表示 TEV 酶切位点,MBP-TEV 融合蛋白作用位点将 MBP 和 TEV 分离; λ -Red:重组酶介导的重组工程

图 1 整合型基因工程菌株构建和 TEV 的表达及纯化示意图
Fig.1 Schematic shown the recombinering mediated construction of chromosomal TEV overexpression strain, TEV expression and Ni-NTA mediated TEV affinity purification

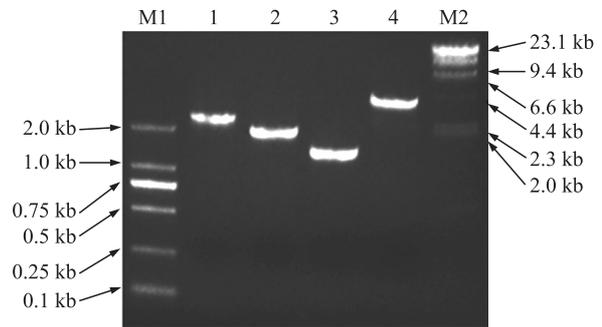
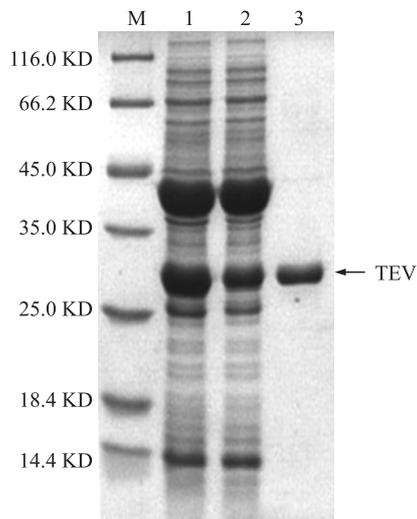
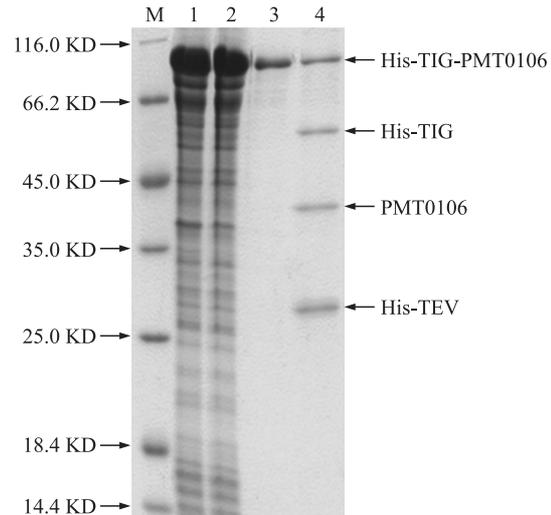


图 2 整合型基因工程菌株的基因型分析
Fig.2 Genotype analysis of the chromosomal integrated TEV strain



M: 蛋白质分子量标准; 1: LS2401 表达的总蛋白;
2: LS2401 表达的可溶性蛋白; 3: Ni-NTA 纯化的 TEV

图 3 基因工程菌 LS2401 诱导表达 TEV 及 TEV 的纯化
Fig. 3 LS2401 induced TEV expression and Ni-NTA
affinity mediated TEV purification



M: 蛋白质分子量标准; 1: BL21 (DE3)/pLS1134 表达的 88.9×10^3 Da His-TIG-PMT0106 融合蛋白; 2: BL21 (DE3)/pLS1134 表达的可溶性蛋白; 3: Ni-NTA 纯化得到的 His-TIG-PMT0106 融合蛋白; 4: TEV 酶切后, 得到 49.9×10^3 Da 的 His-TIG 和 39.0×10^3 Da 的 PMT0106

图 4 融合蛋白 His-TIG-PMT0106 的表达、纯化以及 TEV 酶切
Fig. 4 Expression, purification and TEV digestion of
His-TIG-PMT0106 fusion protein

3 讨论

异源基因在大肠杆菌内过表达并分离纯化目的蛋白是研究基因和蛋白功能的基础. 常规的蛋白表达是将基因克隆至表达质粒上, 但此方法有着需要增加抗生素来维持菌株扩增以及菌株群体不均一等问题. 此外, 某些基因在高拷贝的质粒上进行表达时, 可表现出对菌株的毒性. 这些均制约了基于质粒的蛋白表达方式. 相对应的, 将外源基因整合至宿主菌的基因组上的蛋白表达策略, 由于基因随着基因组的复制而复制且表现为单拷贝, 就避免了基于质粒系统的不足.

本研究将最为常用的 TEV 蛋白酶基因整合至大肠杆菌表达宿主菌 BL21 (DE3) 的基因组上, 实现了 TEV 的高效表达. TEV 表达量约为基于质粒的表达体系的 80%, 其产量已可用于 TEV 的纯化. 而且鉴于其无需转化、无需抗性培养, 以及简便直观等特点, 可成为表达 TEV 的优良体系.

本研究同时建立了 BL21 (DE3) 的重组工程方法. 实验过程中, 我们发现最为常用的基于 pSC101 质粒骨架的、以 L-阿拉伯糖诱导表达重组酶的体系 (如 pKD46) 不能在 BL21 (DE3) 中有效地使用. 最初敲入尝试以 50 bp 同源臂进行同源重组也未获成功, 故改为本文报道的 500 bp 同源臂. 基于基因组的表达体系也可用于其他功能基因整合和表达的平台.

[参考文献]

- [1] Waugh D S. Making the most of affinity tags[J]. Trends Biotechnol, 2005, 23(6): 316-320.
- [2] Kapust R B, Tozser J, Fox J D, et al. Tobacco etch virus protease: mechanism of autolysis and rational design of stable mutants with wild-type catalytic proficiency[J]. Protein Eng, 2001, 14(12): 993-1000.
- [3] Babu M, Krogan N J, Awrey D E, et al. Systematic characterization of the protein interaction network and protein complexes in *Saccharomyces cerevisiae* using tandem affinity purification and mass spectrometry[J]. Methods Mol Biol, 2009, 548: 187-207.
- [4] Chen I, Dorr B M, Liu D R. A general strategy for the evolution of bond-forming enzymes using yeast display[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2011, 108(28): 113399-113404.

(下转第 105 页)

-
- [10] 鄂征. 组织培养和分子细胞学技术[M]. 北京:北京出版社,2001:164-169.
- [11] Yunis J J. Human Chromosome Methodology[M]. New York:Academic Press,1974:59-61.
- [12] Franklin E,William F,Blazak. Horse, ass, and mule chromosomes[J]. Journal of Heredity,1976,67:361-367.
- [13] 良宋平. 生物化学与分子生物学实验教程[M]. 北京:高等教育出版社,2003:35-41.
- [14] 管卫,齐静,沈永明,等. 1例儿童血清乳酸脱氢酶同工酶异常区带的分析[J]. 临床检验杂志,2010,28(1):75-76.
- [15] 周向梅,马月辉,关伟军,等. 北京油鸡胚胎成纤维细胞系建立与生物学特性研究[J]. 畜牧兽医学报,2005,36(3):209-215.
- [16] Drexel H G,Dirks W G,Macl E R, et al. Sensitivity hematopoietic cell lines; cross-contaminations and misinterpretations[J]. Keukemia,1999,13:602-606.
- [17] 何申. ATCC 美国所属培养的细胞库[M]. 北京:中国学术期刊电子杂志社,2006:52-56.

[责任编辑:黄敏]

(上接第99页)

- [5] Datsenko K A, Wanner B L. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products[J]. Proc Natl Acad Sci USA,2000,97(12):6 640-6 645.
- [6] Isaacs F J, Carr P A, Wang H H, et al. Precise manipulation of chromosomes in vivo enables genome-wide codon replacement [J]. Science,2011,333(6 040):348-353.
- [7] Wang H H, Kim H, Cong L, et al. Genome-scale promoter engineering by coselection MAGE[J]. Nat Methods,2012,9(6):591-593.
- [8] Kuhlman T E, Cox E C. Site-specific chromosomal integration of large synthetic constructs[J]. Nucleic Acids Res,2010,38(6):e92.
- [9] 张飞飞,王瑞青,朱宇鹏,等. 大肠杆菌系列融合表达载体的构建[J]. 南京师大学报:自然科学版,2013,36(3):97-102.
- [10] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual[M]. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- [11] Jere P S, Richard L J. Molecular weight determination of glycoproteins by polyacrylamide gel electrophoresis in sodium dodecyl sulfate[J]. Meth Enzymol,1972,28:54-63.
- [12] Takahashi S, Ohsawa T, Miura R, et al. Purification of high molecular weight(HMW) renin from porcine kidney and direct evidence that the HMW renin is a complex of renin with renin binding protein(RnBP) [J]. J Biochem,1983,93(1):265-274.

[责任编辑:黄敏]