

网络出版时间:2016-08-09 09:40 DOI:10.13207/j.cnki.jnwafu.2016.09.003
网络出版地址:http://www.cnki.net/kcms/detail/61.1390.S.20160809.0940.006.html

新疆多浪羊 *IL-1 β* 基因原核表达载体的构建与表达

曾国航^{1a}, 徐宏伟^{1a}, 李莲瑞^{1b,2}

(1 塔里木大学 a 生命科学学院, b 动物科学学院, 新疆 阿拉尔 843300; 2 新疆兵团塔里木畜牧科技重点实验室, 新疆 阿拉尔 843300)

【摘要】【目的】构建新疆多浪羊 *IL-1 β* 基因编码区的原核表达载体, 在大肠杆菌中进行诱导表达, 为进一步研究 *IL-1 β* 蛋白的结构功能奠定基础。【方法】从含质粒 pMD-18T-*IL-1 β* 的大肠杆菌 DH5 α 中获取 *IL-1 β* 基因, 与 pET-28b 质粒 DNA 连接, 构建原核表达载体 pET-28b-*IL-1 β* 。先将其转化到克隆载体 *E. coli* DH5 α 感受态细胞中大量拷贝, 经菌液 PCR 和 *EcoR* I、*Xho* I 双酶切鉴定后, 提取 pET-28b-*IL-1 β* 质粒转化到表达载体 *E. coli* BL21(DE3) 中, 再次进行菌液 PCR 和 *EcoR* I、*Xho* I 双酶切鉴定。将阳性单克隆接种于 LB 液体培养基, 以终浓度为 1 mmol/L IPTG 进行诱导, 用 SDS-PAGE 电泳检测 *IL-1 β* 蛋白的表达及存在形式, 通过 Western blotting 验证表达产物是否为目的蛋白。【结果】成功构建了新疆多浪羊 *IL-1 β* 基因的原核表达载体 pET-28b-*IL-1 β* , 该载体经诱导后表达出融合蛋白, 分子质量为 32.4 ku, 主要以包涵体的形式表达; 经 Western blotting 检测, 带有 6 $\times$ His 标签的融合蛋白有很好的反应原性。【结论】成功构建了新疆多浪羊 *IL-1 β* 基因的原核表达载体 pET-28b-*IL-1 β* , 其在大肠杆菌 BL21(DE3) 中经诱导后表达出分子质量约为 32.4 ku 的 *IL-1 β* 融合蛋白。

【关键词】 多浪羊; *IL-1 β* 基因; 原核表达

【中图分类号】 S826

【文献标志码】 A

【文章编号】 1671-9387(2016)09-0017-05

Construction and expression of prokaryotic expression vector of *IL-1 β* from Duolang sheep in Xinjiang

ZENG Guohang^{1a}, XU Hongwei^{1a}, LI Lianrui^{1b,2}

(1 a College of Life Science, b College of Animal Science, Tarim University, Alaer, Xinjiang 843300, China; 2 Key Laboratory of Tarim Husbandry Science and Technology, Xinjiang Production & Construction Group, Alaer, Xinjiang 843300, China)

Abstract: 【Objective】The prokaryotic expression vector of *IL-1 β* gene encoding area of Xinjiang Duolang sheep was constructed and induced to express in *E. coli* to lay foundation for further study on its structure and function. 【Method】The prokaryotic expression vector pET-28b-*IL-1 β* was constructed by connecting *IL-1 β* gene from plasmid pMD-18T-*IL-1 β* of *E. coli* DH5 α and pET-28b of *E. coli* BL21(DE3). Large copies of competent cells were obtained by transforming it into cloning vector *E. coli* DH5 α . After identification using bacteria PCR and double enzyme digestion with *EcoR* I and *Xho* I, pET-28b-*IL-1 β* plasmid was extracted and transformed into *E. coli* BL21(DE3) expression vector. Then, it was identified again using PCR and double enzyme digestion. The positive monoclonal antibody was inoculated into LB culture medium. With a final concentration of 1 mmol/L IPTG induction, the *IL-1 β* protein expression and its form was detected by electrophoresis SDS-PAGE and checked by Western blotting test. 【Result】The recombinant prokaryotic expression vector pET-28b-*IL-1 β* of Xinjiang Duolang sheep was constructed suc-

【收稿日期】 2015-01-28

【基金项目】 国家自然科学基金项目“棉酚对新疆多浪羊白细胞介素表达的影响研究”(30960277); 创新群体项目“南疆地区羊标准化养殖的群发病防控及预警响应机制研究”(TDZKCX201401)

【作者简介】 曾国航(1989—), 男, 新疆乌鲁木齐人, 在读硕士, 主要从事动物基因工程研究。E-mail: 540745294@qq.com

【通信作者】 李莲瑞(1968—), 女, 新疆库尔勒人, 教授, 博士, 硕士生导师, 主要从事分子免疫学研究。E-mail: lilianrui51@163.com

cessfully. After induction, fusion protein was expressed with molecular weight of 32.4 ku. It mainly expressed in the form of inclusion body. Western blotting detection found that the fusion protein with 6×His tag had good immunogenicity. 【Conclusion】 The prokaryotic expression vector pET-28b-IL-1 β of *IL-1 β* gene from Xinjiang Duolang sheep was successfully constructed and the obtained fusion protein in *Escherichia coli* BL21(DE3) had molecular weight of 32.4 ku.

Key words: Duolang sheep; *IL-1 β* gene; prokaryotic expression

新疆多浪羊是新疆南疆特色肉羊品种,其个体大、增重快,适合农区饲养,羔羊可当年育肥并屠宰,并具有耐干旱、耐热、耐低营养水平及抗逆、抗病、适应性强等优良性状,对荒漠化、半荒漠化等恶劣生态环境有较高的适应性。

白细胞介素(Interleukin, IL)是重要的细胞因子之一,IL-1 有 2 种形式,分别为白细胞介素-1 α (interleukin-1 α , IL-1 α)和白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β),二者有一定程度的局部同源性和相同的结构域^[1],其都能与 IL-1 的功能受体结合,从而发挥生理作用^[2-5]。IL-1 β 在机体的免疫反应中,能激活与调节免疫细胞,介导 T、B 淋巴细胞的活化、增殖与分化,还在炎症反应中起重要作用^[6-7]。IL-1 β 是最早被研究的细胞因子之一,其在免疫活动中处于细胞因子网络的中心地位,几乎所有的有核细胞都能产生 IL-1 β ^[8-10]。IL-1 β 是一种多效的促炎细胞因子,能够引发一系列的炎症调节,也可影响机体的生理代谢、造血和免疫功能等^[11]生命活动。目前,IL-1 β 因子虽然在医学领域未被广泛应用,但其在免疫方面的特殊作用使它在临床方面具有诱人的应用前景。

本试验构建了新疆多浪羊 *IL-1 β* 基因的原核表达载体,并进行了诱导表达,获得了带有组氨酸标签的融合蛋白,旨在为进一步获取新疆多浪羊 IL-1 β 目的蛋白并用其制作单克隆抗体奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株 含质粒 pMD-18T-IL-1 β 的大肠杆菌 DH5 α 、含质粒 pET-28b 的大肠杆菌 BL21(DE3)菌液,均由塔里木大学畜牧科技兵团重点实验室于-70℃保存。

1.1.2 主要试剂 DL2000 DNA Marker、低分子蛋白 Marker、T₄ DNA 连接酶、限制性内切酶 *EcoR* I 和 *Xho* I,均购自大连宝生物工程有限公司;IPTG,购自 Biotopped 公司;一抗(带组氨酸 6×(His)标签的鼠源单克隆抗体)、二抗(辣根过氧化物

酶标记的羊抗鼠多克隆标记)、辣根过氧化物酶标记(HRP Conjugate)、质粒提取试剂盒、琼脂糖回收试剂盒,均购自全式金公司。

1.1.3 引物设计与合成 根据 GenBank 上的 *IL-1 β* 基因序列(GenBank 号:NM_001009465.2),用 primer premier 5.0 软件设计特异性引物,由上海生物工程技术有限公司合成。上游引物为(PF):5'-GGCGAATTCCTTCATTGCCAGGT-TTC-3',下游引物为(PR):5'-GGCCTCGAGCT-GCGTATGGCTTCTTTA-3'。其中 GGC 为保护性碱基,PF 中 GAATTC 为 *EcoR* I 酶切位点,PR 中 CTCGAG 为 *Xho* I 酶切位点。

1.2 方法

1.2.1 目的片段的获得 取-70℃保存的含质粒 pMD-18T-IL-1 β 的大肠杆菌 DH5 α 和含质粒 pET-28b 的大肠杆菌 BL21(DE3)菌液各 1 μ L,分别加入 5 mL LB 液体培养基(含氨苄青霉素 50 μ g/mL)中,振荡培养过夜。根据全式金质粒提取试剂盒说明,分别提取 pMD-18T-IL-1 β 和 pET-28b 质粒,进行 *EcoR* I 和 *Xho* I 双酶切,获得目的片段 *IL-1 β* 和具有粘性末端的线性质粒 pET-28b,酶切体系为:pMD-18T-IL-1 β 或 pET-28b 质粒 16 μ L, *EcoR* I 1 μ L, *Xho* I 1 μ L, 10× Buffer 2 μ L。酶切产物于 65℃水浴 15 min 灭活酶活性,经 0.8% 琼脂糖凝胶电泳后,用全式金琼脂糖回收试剂盒分别回收 *IL-1 β* 和 pET-28b 酶切目的片段,并用核酸蛋白仪测定 *IL-1 β* 和 pET-28b 片段浓度,调节 *IL-1 β* 与 pET-28b 片段浓度比为 3:1,备用。

1.2.2 pET-28b-IL-1 β 原核表达载体的构建与鉴定 将 *IL-1 β* 和 pET-28b 在 T₄ DNA 连接酶作用下连接,构建原核表达载体 pET-28b-IL-1 β 。连接反应体系如下:*IL-1 β* DNA 6 μ L, pET-28b 载体 2 μ L, T₄ DNA 连接酶 1 μ L;连接条件为 16℃下反应 16 h。将连接产物加入到 100 μ L 大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞中,先在冰上放置 30 min,再 42℃作用 90 s,然后于冰上放 1 min,最后加入 890 μ L SOC 培养基,170 r/min 振荡 1 h 后,7 500 r/min 离心 10

min,沉淀用 100 μ L SOC 培养基悬浮,涂布于含 50 μ g/mL 卡那霉素的 LB 固体培养基上,培养过夜。

挑取重组单克隆菌接种至 5 mL LB 培养基中,37 $^{\circ}$ C 下 170 r/min 振荡培养过夜,进行菌液 PCR 鉴定,PCR 反应体系:10 $\times$ PCR buffer 2 μ L,dNTP 1.6 μ L,*Taq* DNA 聚合酶 0.4 μ L,PF 0.5 μ L,PR 0.5 μ L,模板 DNA 0.5 μ L,ddH₂O 14.5 μ L。用全式金质粒提取试剂盒提取 pET-28b-IL-1 β 载体质粒,进行 *Eco*R I 和 *Xho* I 双酶切鉴定,挑选阳性克隆菌保存备用。

1.2.3 融合蛋白的诱导表达 用全式金质粒提取试剂盒提取 pET-28b-IL-1 β 质粒,转化到 BL21(DE3)中,步骤同 1.2.2。将菌液 PCR 和双酶切鉴定正确的 pET-28b-IL-1 β 阳性克隆菌接种于含 50 μ g/mL 卡那霉素的 LB 培养基中,37 $^{\circ}$ C 下 180 r/min 振荡培养至 OD₆₀₀ 为 0.6~0.8 时,加入 IPTG 至其终浓度为 1 mmol/L,37 $^{\circ}$ C 下 200 r/min 振荡培养,进行诱导,于诱导后 1,2,3,4 h 各取样 1 次,每次 2 mL。试验同时设 pET-28b 转化的 BL21(DE3)对照,分别在诱导 0 和 4 h 取样 2 mL。样品经 12 000 r/min 离心 2 min,收集菌体,分别加 100 μ L 2 $\times$ SDS 上样缓冲液、10 μ L DTT,充分混匀,沸水浴 5 min 后,12 000 r/min 离心 2 min,利用 SDS-PAGE 电泳检测 pET-28b-IL-1 β 是否表达。

1.2.4 融合蛋白表达形式的检测 将重组质粒 pET-28b-IL-1 β 表达菌接种于含有 50 μ g/mL 卡那霉素的 LB 培养基中,培养至 OD₆₀₀ 为 0.6~0.8 时,加入 IPTG 至其终浓度为 1 mmol/L,37 $^{\circ}$ C 下 180 r/min 振荡培养,诱导 4 h。试验同时设 pET-28b 转化的 BL21(DE3)对照,分别在诱导 0 和 4 h 取样 2 mL。诱导培养菌液于 4 $^{\circ}$ C 下 7 000 r/min 离心 10 min,收集菌体,用 1 $\times$ TE buffer 充分悬浮菌体,涡旋后反复冻融 3~5 次,冰浴超声破碎菌体 30 次(超声 3 s,间隔 3 s,温度 37 $^{\circ}$ C,功率 200 W)。超声后,分装到 1.5 mL 离心管中,12 000 r/min 离心 2 min,将上清和沉淀分开,分别加 2 mol/L 尿素 1 mL,4 $^{\circ}$ C 重悬 5 min,12 000 r/min 离心 2 min,重复上述步骤,每管再加 8 mol/L 尿素 200 μ L,12 000 r/min 离心 5 min,将上清和沉淀分开备用,用 SDS-PAGE 电泳检测融合蛋白的存在形式。

1.2.5 重组蛋白的 Western blotting 分析 转移:将 IPTG 诱导 4 h 的含 pET-28b-IL-1 β 和含 pET-28b 质粒(空白对照)的 BL21(DE3)分别进行点样,SDS-PAGE 电泳结束后,将上述电泳所得胶放入转

移缓冲液中平衡 30 min。用铅笔标记 Hybond 转移膜的边角,放入转移缓冲液中平衡 10~15 min。最后将 SDS-PAGE 凝胶与湿润的 Hybond 膜正确放入转移盒^[12],接通电源,将整个电泳槽放置 4 $^{\circ}$ C 冰箱中,30 mA 转移 8 h。封闭:用蒸馏水洗净转移好的膜表面的电泳液,随后放在封闭液中,室温封闭 2 h。一抗孵育:将一抗用封闭液做 1:5 000 倍的稀释,将转移膜放置于一抗稀释液中 4 $^{\circ}$ C 过夜孵育。洗膜:用 TBS-T 洗膜 3 次,每次 10 min。二抗孵育:用辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠 IgG 与封闭液做 1:5 000 倍的稀释,室温振荡孵育 2 h。洗膜:用 TBS-T 洗膜 3 次,每次 10 min。显色:将膜放入显色液中,3~5 min 后显色。

2 结果与分析

2.1 目的片段 *IL-1 β* 与载体 pET-28b 的获得

对提取的 pMD-18T-IL-1 β 、pET-28b 质粒分别进行 *Eco*R I 和 *Xho* I 双酶切,结果如图 1 所示。由图 1 可知,*Eco*R I 和 *Xho* I 双酶切的 pET-28b 质粒与未酶切的 pET-28b 质粒差异比较明显,未酶切的质粒为超螺旋结构,其迁移率要比双酶切后的线性结构质粒快;pMD-18T-IL-1 β 质粒经双酶切后,获得了 862 bp 的目的基因片段 *IL-1 β* 和 2 692 bp 的载体片段。

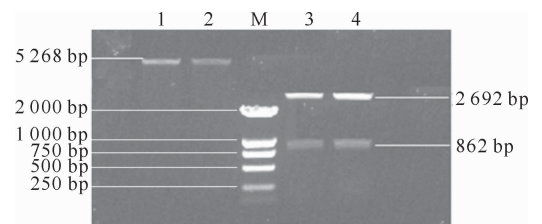


图 1 pMD-18T-IL-1 β 、pET-28b 的 *Eco*R I 和 *Xho* I 双酶切结果

1~2. 双酶切后的 pET-28b 质粒;M. DL2000 DNA Marker;
3~4. 双酶切后的 pMD-18T-IL-1 β 质粒

Fig. 1 Double digestion of pMD-18T-IL-1 β and pET-28b plasmid by *Eco*R I and *Xho* I

1—2. Double enzyme digestion of pET-28b plasmid;
M. DL2000 DNA Marker; 3—4. Double enzyme digestion of pMD-18T-IL-1 β plasmid

2.2 重组质粒 pET-28b-IL-1 β 的鉴定

以单克隆菌液为模板,进行菌液 PCR,结果(图 2)显示,获得了 862 bp 的 *IL-1 β* 片段。pET-28b-IL-1 β 质粒经 *Eco*R I 和 *Xho* I 双酶切后,获得了 5 368 bp 的线性质粒 pET-28b 和 862 bp 的 *IL-1 β* 片段(图 3)。

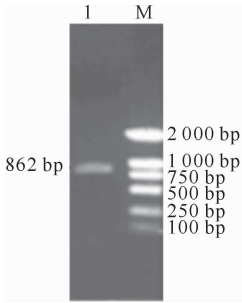


图 2 pET-28b-IL-1 β 的 PCR 鉴定
1. 菌液 PCR 产物;M. DL2000 DNA Marker
Fig. 2 PCR identification of pET-28b-IL-1 β
1. PCR products;M. DL2000 DNA Marker

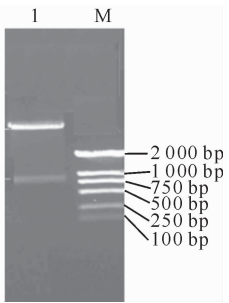


图 3 pET-28b-IL-1 β 的 *EcoR* I 和 *Xho* I 双酶切鉴定
1. *IL-1 β* 和 pET-28b 片段;M. DL2000 DNA Marker
Fig. 3 Double digestion of pET-28b-IL-1 β plasmid by *EcoR* I and *Xho* I
1. Fragments of *IL-1 β* and pET-28b;M. DL2000 DNA Marker

2.3 融合蛋白 pET-28b-IL-1 β 基因在大肠杆菌 BL21(DE3)中的诱导表达

将原核表达质粒 pET-28b-IL-1 β 转化到宿主菌 BL21(DE3)中,并用 IPTG 进行诱导,结果见图 4。由图 4 可知,诱导后原核表达质粒 pET-28b-IL-1 β 产生了分子质量约为 32.4 ku 的特异性蛋白,而对照组 pET-28b 不表达该蛋白,与预期结果一致。由图 4 还可知,随着诱导时间增加,该蛋白的表达量增

加,4 h 达到最大。

2.4 融合蛋白 pET-28b-IL-1 β 表达形式的确定

表达菌经反复冻融超声后,分别吸取上清和沉淀,用 SDS-PAGE 电泳检测融合蛋白 pET-28b-IL-1 β 的表达形式,结果如图 5 所示。由图 5 可知,融合蛋白主要以包涵体的形式表达,上清中也有表达,但表达量远低于包涵体。

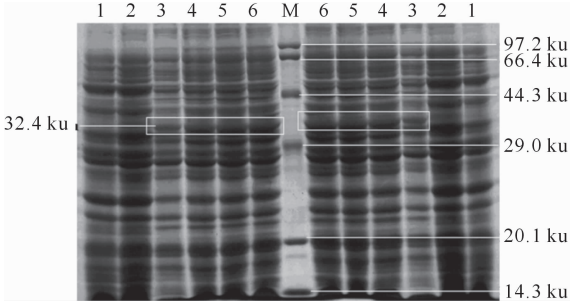


图 4 融合蛋白 pET-28b-IL-1 β 的 SDS-PAGE 分析
1. 空白对照诱导 0 h;2. 空白对照诱导 4 h;3~6. 分别为诱导 1,2,3,4 h 的融合蛋白;M. 低分子蛋白 Marker
Fig. 4 SDS-PAGE analysis of the fusion protein of pET-28b-IL-1 β
1. Blank control induced for 0 h;2. Blank control of induced for 4 h;
3—6. Fusion proteins induced for 1,2,3 and 4 h;
M. Protein molecular weight standard (low) Marker

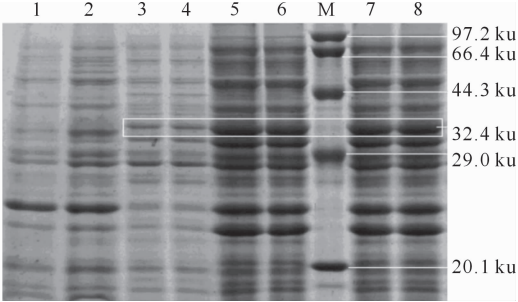


图 5 融合蛋白 pET-28b-IL-1 β 的表达形式
1~2. 分别为空白对照诱导 0 和 4 h 的产物;3~4. 菌液上清;
5~8. 菌液沉淀;M. 低分子蛋白 Marker
Fig. 5 Expression forms of fusion protein pET-28b-IL-1 β
1—2. Products of blank control induced for 0 h and 4 h;
3—4. Bacteria liquid;5—8. Bacteria liquid precipitation;
M. Protein molecular weight standard (low) Marker

2.5 目的蛋白的 Western blotting 检测

Western blotting 结果(图 6)表明,诱导表达融合蛋白 IL-1 β 能够从凝胶中转移到 Hybond 膜上,且在膜上 IL-1 β 融合蛋白的相应位置处有显色条带,在空白对照处不出现条带。

3 讨 论

常用的外源蛋白表达系统分为原核表达系统和

真核表达系统^[13],在原核表达系统中,大肠杆菌表达系统最为常用,其具有遗传背景稳定、表达量高、表达产物容易纯化、价格低廉等优点^[14]。在大肠杆菌表达系统中,表达外源基因水平远远高于其他基因的表达水平。pET 系统是在大肠杆菌中克隆和表达重组蛋白的最强大的系统,可以从自身基因中产生大量蛋白,优化靶蛋白的表达^[15]。本研究将新疆多浪羊 *IL-1 β* 基因通过酶切连接在 pET-28b 载体

上,构建 pET-28b-IL-1 β 原核表达质粒,再转化到大肠杆菌 BL21 (DE3) 中进行诱导表达,通过 SDS-PAGE 电泳在 32.4 ku 处可见表达出的目的蛋白。

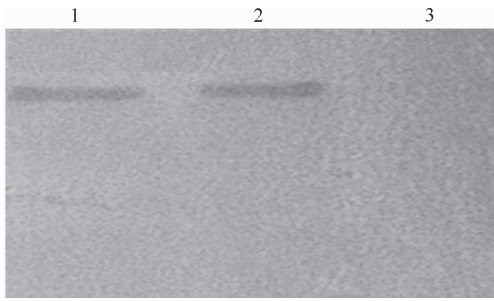


图 6 IL-1 β 融合蛋白的 Western blotting 鉴定
1~2. IPTG 诱导 4 h 的蛋白;3. 空白对照诱导 4 h 的蛋白
Fig. 6 Identification of target protein using Western blotting
1—2. Protein induced for 4 h by IPTG;
3. Protein in blank control induced for 4 h

试验目的蛋白的表达为融合表达方式,这种方式能增强目的蛋白的可溶性,不但能使其正确折叠,而且目的蛋白的活性也较高^[16]。经可溶性分析发现,本试验中的 IL-1 β 融合蛋白主要以包涵体形式存在,虽然上清中也有表达,但是其表达量较低。新合成的肽链在折叠过程中部分折叠而形成的中间体称为包涵体,其中包括了大量的目的蛋白,它的优势在于能包裹目的蛋白,不被水降解,可以通过离心等方式获得目的蛋白^[17]。本试验表达的带有 His-标签的融合蛋白 IL-1 β ,可以在天然或变性条件下用 NTA His-Bind 树脂或 IDA His-Bind 树脂进行纯化^[18-19],为后续融合蛋白的纯化奠定了一定的基础。

[参考文献]

- [1] Sousa E L, Martinho F C, Leite F R, et al. Macrophage cell activation with acute apical abscess contents determined by Interleukin-1 Beta and tumor necrosis factor Alpha production [J]. Journal of Endodontics, 2014, 9(14): 576-577.
- [2] Guo L, Wei G, Zhu J, et al. IL-1 family members and STAT activators induce cytokine production by Th2, Th17, and Th1 cells [J]. Proc Nat Acad Sci USA, 2009, 10(6): 3463-3468.
- [3] Sakuma S, Tokuhara D, Otsubo H, et al. Dynamic change in cells expressing IL-1 β in rat hippocampus after status epilepticus [J]. Journal of Neuroinflammation, 2014, 8(5): 25-32.
- [4] Kobayashi M, Squire G R, Mousa A, et al. Role of interleukin-1 and tumor necrosis factor alpha in matrix degradation of human osteoarthritic cartilage [J]. Arthritis Rheum, 2005, 52(1): 128-135.
- [5] Largo R, Alvarez-Soria M A, Diez-Ortego I, et al. Glucosamine inhibits IL-1 beta-induced NFkappaB activation in human osteoarthritic chondrocytes [J]. Osteoarthritis Cartilage, 2003, 11

- (4): 290-298.
- [6] Homandberg G A, Umadi V, Kang H, et al. High molecular weight hyaluronan promotes repair of IL-1beta-damaged cartilage explants from both young and old bovines [J]. Osteoarthritis Cartilage, 2003, 11(3): 177-186.
- [7] Auron P E, Webb A C. Interleukin-1: a gene expression system regulated at multiple levels [J]. Eur Cytokine Netw, 1994, 4(5): 573-592.
- [8] Zhang X, Mao Z, Yu C. Suppression of early experimental osteoarthritis by gene transfer of interleukin-1 receptor antagonist and in interleukin-10 [J]. J Orthop Res, 2004, 22(4): 742-750.
- [9] Fan Z, Yang H, Bau B, et al. Role of mitogen-activated protein kinases and NF-kappaB on IL-1beta-induced effects on collagen type II, MMP-1 and 13 mRNA expression in normal articular human chondrocytes [J]. Rheumatol Int, 2006, 26(10): 900-903.
- [10] Chuang Y T, Lin Y C, Lin K H, et al. Tumor suppressor death-associated protein kinase is required for full IL-1beta production [J]. Blood, 2011, 117(3): 960-970.
- [11] Sims J E, Gayle M A, Slack J L, et al. Interleukin 1 signaling occurs exclusively via the type I receptor [J]. Proc Natl Acad Sci, 1993, 9(4): 6155-6159.
- [12] 高玲美, 牛钟相, 丁淑燕. 动物细胞因子研究进展 [J]. 动物医学进展, 2003, 24(4): 46-48.
Gao L M, Niu Z X, Ding S Y. The advancement in the research of animal cytokines [J]. Progress in Veterinary Medicine, 2003, 24(4): 46-48.
- [13] 贺艳艳. 新疆卡拉库尔羊 TNF- α 基因的克隆、原核表达及抗原性分析 [D]. 新疆阿拉尔: 塔里木大学, 2012.
He Y Y. Cloning and prokaryotic expression of Xinjiang karakul sheep TNF- α gene and the analysis of its antigenicity [D]. Alaer, Xinjiang: Tarim University, 2012.
- [14] Nuc P, Nuc K. Recombinant protein production in *Escherichia coli* [J]. Postepy Biochem, 2006, 52(4): 448-456.
- [15] 解庭波. 大肠杆菌表达系统的研究进展 [J]. 长江大学学报 (自然科学版) 医学卷, 2008, 5(3): 77-82.
Xie T B. Research progression *E. coli* expression system [J]. Journal of Yangtze University (Nat Sci Ed) Medicine V, 2008, 5(3): 77-82.
- [16] 潘 辉. 新疆卡拉库尔羊 Fas 基因的克隆、原核表达及抗原性分析 [D]. 新疆阿拉尔: 塔里木大学, 2012.
Pan H. Cloning and prokaryotic expression of Xinjiang karakul sheep Fas gene and the analysis of its antigenicity [D]. Alaer, Xinjiang: Tarim University, 2012.
- [17] 夏启玉, 肖苏生, 邓柳红, 等. 包涵体蛋白的复性研究进展 [J]. 安徽农业科学, 2008, 36(14): 5801-5803.
Xia Q Y, Xiao S S, Deng L H, et al. Research progress in renaturation of inclusion body protein [J]. Journal of Anhui Agri Sci, 2008, 36(14): 5801-5803.

- 淹逆境的生殖响应 [J]. 西南师范大学学报(自然科学版), 2005, 30(2): 325-328.
- Fu T F, Zeng B, Ye X Q, et al. The reproductive responses of *Arundinella hirta* individual to flooding [J]. Journal of South-west China Normal University (Natural Science), 2005, 30(2): 325-328.
- [29] 朱志红, 王 刚, 赵松岭. 不同放牧强度下矮嵩草克隆分株种群的动力与调节 [J]. 生态学报, 1994, 14(1): 40-45.
- Zhu Z H, Wang G, Zhao S L. Dynamics and regulation of clonal ramet population in *Komresia humilis* under different stocking intensities [J]. Acta Ecologica Sinica, 1994, 14(1): 40-45.
- [30] 杨利民, 韩 梅, 李建东. 中国东北样带草地群落放牧干扰植物多样性的变化 [J]. 植物生态学报, 2001, 25(1): 110-114.
- Yang L M, Han M, Li J D. Plant diversity change in grassland communities along a grazing disturbance in the northeast China transect [J]. Acta Phytocologica Sinica, 2001, 25(1): 110-114.
- [31] 王洪义, 王正文, 李凌浩, 等. 不同生境中克隆植物的繁殖倾向 [J]. 生态学杂志, 2005, 24(6): 670-676.
- Wang H Y, Wang Z W, Li L H, et al. Reproductive tendency of clonal plants in various habitats [J]. Chinese Journal of Ecology, 2005, 24(6): 670-676.

(上接第 21 页)

- [18] 宋翠翠, 曹国宪, 张 莉, 等. 大肠杆菌表达 GST-A β 42 融合蛋白的纯化条件及鉴定 [J]. 现代生物医学进展, 2008, 8(12): 2453-2456.
- Song C C, Cao G X, Zhang L, et al. Optimal purification condition and identification of GST-A β 42 expression in *Escherichia coli* [J]. Progress in Modern Biomedicine, 2008, 8(12): 2453-2456.
- [19] 车 婧, 韩金祥, 王世立. 促进包涵体蛋白复性的几种有效添加剂 [J]. 医学分子生物学杂志, 2004, 1(2): 122-125.
- Che J, Han J X, Wang S L. Several additives that effectively improve protein refolding [J]. J Med Mol Biol, 2004, 1(2): 122-125.

(上接第 26 页)

- [8] Gall L, Chene N, Dahirel M, et al. Expression of epidermal growth factor receptor in the goat cumulus-oocyte complex [J]. Molecular Reproduction and Development, 2004, 67: 439-445.
- [9] Gall L, Boulesteix C, Ruffini S, et al. EGF-induced EGF-receptor and MAP kinase phosphorylation in goat cumulus cells during *in vitro* maturation [J]. Molecular Reproduction and Development, 2005, 71(4): 489-494.
- [10] Quinn J A, Graeber C T, Frackelton A R, et al. Coordinate regulation of estrogen-mediated fibronectin matrix assembly and epidermal growth factor receptor transactivation by the G protein-coupled receptor, GPR30 [J]. Journal of Molecular Endocrinology, 2009, 23: 1052-1064.
- [11] Peyton C, Thomas P. Involvement of epidermal growth factor receptor signaling in estrogen inhibition of oocyte maturation mediated through the G protein-coupled estrogen receptor (Gper) in zebrafish (*Danio rerio*) [J]. Biology of Reproduction, 2011, 85: 42-50.
- [12] Ge C, Yu M, Zhang C. G protein-coupled receptor 30 mediates estrogen induced proliferation of primordial germ cells via EGFR/Akt/-catenin signaling pathway [J]. Endocrinology, 2012, 153: 3504-3516.
- [13] Bologa C G. Virtual and biomolecular screening converge on a selective agonist for GPR30 [J]. Nature Chemical Biology, 2006, 2: 207-212.
- [14] Dennis M K, Burai R, Ramesh C, et al. *In vivo* effects of a GPR30 antagonist [J]. Nature Chemical Biology, 2009, 5(6): 421-427.
- [15] Pandey D P, Lappano R, Albanito L, et al. Estrogenic GPR30 signalling induces proliferation and migration of breast cancer cells through cTGF [J]. Embo Journal, 2009, 28: 523-532.
- [16] Filardo E J, Thomas P. GPR30: a seven-transmembrane-spanning estrogen receptor that triggers EGF release [J]. Trends in Endocrinology and Metabolism, 2005, 16: 362-367.
- [17] Albanito L, Lappano R, Madeo A, et al. G-protein-coupled receptor 30 and estrogen receptor are involved in the proliferative effects induced by atrazine in ovarian cancer cells [J]. Environmental Health Perspectives, 2008, 116: 1648-1655.