

基于谷胱甘肽-磁性微粒的 GST 融合蛋白纯化体系的建立

朱晶晶¹, 杨柳², 杨磊¹, 陈超^{1,2}, 崔亚丽^{1,2}

1 西北大学生命科学学院, 西安 710069

2 国家微检测系统工程技术研究中心, 西安 710069

摘要: 本研究将还原型谷胱甘肽(GSH)共价结合在异硫氰酸根末端磁性微粒表面, 制备了具有超顺磁性的谷胱甘肽-磁性微粒亲和介质, 以表面修饰有谷胱甘肽的磁性微粒为载体, 建立了谷胱甘肽巯基转移酶(GST)融合蛋白的纯化体系。对 100 μ L 细胞裂解液纯化体系所需磁性微粒用量、谷胱甘肽-磁性微粒与细胞裂解液的孵育时间、清洗条件等进行了优化。以聚丙烯酰胺凝胶电泳对融合蛋白的纯度进行了检测, Bradford 方法对融合蛋白进行了定量测定, 对纯化得到的目的蛋白进行了 Western blotting 分析。结果表明, 每毫克异硫氰酸根末端磁性微粒对 GSH 的固定化容量为 150 μ g, 10 mg 谷胱甘肽-磁性微粒可满足 100 μ L 细胞裂解体系中目的蛋白的纯化, 最佳孵育时间为 40 min, 对 GST 融合蛋白的平均纯化量为 516 μ g。本方法快速、简便, 基于磁性微粒的分离还可实现自动化, 对 GST 融合蛋白的纯化具有很好的应用前景。

关键词: 磁性微粒, 还原型谷胱甘肽, GST 融合蛋白, 亲和纯化

Purification of glutathione-S-transferase fusion protein by glutathione coupled magnetic particles

Jingjing Zhu¹, Liu Yang², Lei Yang¹, Chao Chen^{1,2}, and Yali Cui^{1,2}

1 School of Life Sciences, Northwest University, Xi'an 710069, China

2 National Engineering Research Center of Miniaturized Detection Systems, Xi'an 710069, China

Abstract: We established a purification system for glutathione-S-transferase (GST) fusion protein using glutathione coupled magnetic particle. Glutathione was coupled covalently to the surface of magnetic particles with isothiocyanate functional groups. Cell lysate, containing the fusion protein, was then incubated with these glutathione coupled magnetic particles at room temperature. Unbound and non-specifically bound proteins were removed by wash steps. Subsequently, the GST-fusion protein was eluted from the magnetic particles by the addition of reduced glutathione. The resulting fusion protein was tested for purity using SDS-PAGE and demonstrated by Western blotting. The concentration of the fusion protein was measured by Bradford method. Both the conditions for incubation and washing were optimized. The results showed that 150 μ g glutathione could be bound on 1 mg of particle surface and 10 mg of the glutathione-coupled magnetic particles was suitable for 100 μ L lysate, the optimal incubation time for reaction between particles and lysate was 40 min. The magnetic particles could help purify efficiently GST-fusion protein with a yield of around 516 μ g fusion protein per 10 mg particles. Magnetic particles can be successfully used in a simple, rapid and reliable method for the purification of GST-fusion proteins.

Received: March 5, 2009; **Accepted:** June 23, 2009

Supported by: National High Technology Research and Development Program of China(863 Program) (No. 2006AA020705).

Corresponding author: Yali Cui. Tel: +86-29-88302383; E-mail: yalicui@nwu.edu.cn

国家高技术研究发展计划(863 计划)(No. 2006AA020705)资助。

Keywords: magnetic particles, glutathione, glutathione-S-transferase-fusion protein, affinity purification

融合标签技术是一种基于报告基因的重组 DNA 技术, 其主要过程是利用重组 DNA 技术在靶蛋白编码基因的 3'端或 5'端融合某种标签的编码基因, 通过适宜的宿主来表达重组蛋白质^[1-5]。表达的重组蛋白质可以通过其融合的标签与包被在固相基质上的特异配基结合而使重组蛋白质得以纯化^[6]。谷胱甘肽巯基转移酶(GST)融合标签就是其中的一种且是目前应用最为广泛的亲和标签之一^[7]。GST 融合蛋白的亲纯化法最早由 Smith 和 Johnson 于 1988 年提出^[8]。目前, 国内外纯化 GST 融合蛋白主要是用亲和柱层析法^[9-13], 但这种方法较为耗时, 且成本较高。磁性微球技术的发展, 提供了一种新的分离系统。磁性微球具有超顺磁性, 在外加磁场的的作用下, 其能够快速地从悬液系统中分离出来。撤去外加磁场后, 又能够重新分散至悬液系统。根据 GSH 对 GST 融合蛋白的亲性质, 以磁性微粒为载体, 借助外加磁场, 可以实现从细胞裂解液中快速纯化 GST 融合蛋白的目的。目前, 国外已有公司研制了用于纯化 GST 融合蛋白的磁性微粒并得到了实际应用^[14-16]。但国内利用 GSH 和磁性微粒系统进行 GST 融合蛋白的纯化方法方面的研究较少。表面带有巯基活性功能基团的磁性微粒可快速、高效地固定生物分子^[17]。本研究以苯二巯基偶联剂为双功能偶联试剂, 将还原型谷胱甘肽固定在磁性微粒表面, 通过磁性微粒表面 GSH 与融合蛋白的亲合作用, 借助外加磁场, 系统开展了对融合蛋白纯化的研究, 并对纯化结果进行了分析鉴定。最终建立了一种简便、快速、高效的纯化 GST 融合蛋白的体系。

1 材料和方法

1.1 主要材料、试剂与仪器

含 pGEX-RBP-J 重组质粒的大肠杆菌 BL21(DE3)由第四军医大学遗传与发育教研室惠赠, 巯基偶联剂末端磁性微粒购自陕西北美基因股份有限公司, 还原型谷胱甘肽(GSH)购自上海鼎国生物有限公司, DTNB 试剂购自 Sino-American Biotechnology, 抗 GST 标签单抗购自 Genescript, 氨

苄青霉素和 IPTG 购于 Sigma, 乙醇胺及 Bradford 试剂购自 Sigma, SuperSignal® West Femto Maximum Substrate Trial Kit 购自 Pierce。

ZHWY-2102C 型恒温振荡器(上海智城分析仪器制造有限公司)、8453 型紫外分光光度计(Agilent)、5451D 型离心机(Eppendorf)、磁性分离器-8 孔(陕西北美基因股份有限公司)、ELX 800UV 型酶标仪(Bio-TEK)、凝胶成像系统(UVP)、DYCZ-24D 型双垂直电泳槽(北京六一仪器厂)。

1.2 方法

1.2.1 评价方法的建立

1)巯基偶联剂末端磁性微粒表面还原型谷胱甘肽定量检测方法的建立: GSH 是属于含有巯基的、小分子肽类物质, 是由谷氨酸、半胱氨酸和甘氨酸结合而成的三肽, 半胱氨酸上的巯基为其活性基团。5,5-二硫代双(2-硝基苯甲酸)(DTNB)即 Ellman 试剂, 与巯基反应后置换出硫硝基苯甲酸, 简称 TNB, 微碱性条件下, 在 412 nm 处呈强吸收峰^[18]。根据此原理, 在 GSH 与巯基偶联剂末端磁性微粒孵育后, 磁性分离, 利用紫外-可见光分光光度计测定上清液在 412 nm 处的光吸收值, 计算出未结合到微粒表面的 GSH。并根据以下公式得出偶联于巯基偶联剂末端磁性微粒表面的 GSH 量:

磁性微粒表面 GSH 固定量=加入的 GSH 质量-上清中剩余 GSH 的质量

2) GST 融合蛋白定性及定量检测方法的建立: 采用聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE), 考马斯亮蓝染色对融合蛋白的纯度进行了分析。小牛血清白蛋白(BSA)作为标准蛋白, 利用 Bradford 法^[19]对纯化结果做了定量分析。

1.2.2 谷胱甘肽-磁性微粒的制备及巯基偶联剂末端磁性微粒与 GSH 孵育时间的确定

取 1 mg 巯基偶联剂末端磁性微粒置于 2 mL 离心管中。将离心管置于磁性分离器上磁性分离, 弃去未磁性结合的上清(此后简称上清), 加入 300 μ L 偶联缓冲液(50 mmol/L PBS, pH 7.0)及 200 μ L GSH 溶液(1 mg/mL, 溶于偶联缓冲液)。37 $^{\circ}$ C、180 r/min 摇床中孵育, 将各离心管置于磁性分离架上磁性分

离 5 min, 保留上清并标为 Pre。加入 500 μL 清洗液吹吸混匀, 磁性分离, 保留上清并标为 Wash1; 重复清洗 2 次, 2 次清洗的上清分别标为 Wash2、Wash3。根据 1.2.1 中 1) 的定量方法对 Pre、Wash1、Wash2 及 Wash3 溶液中的 GSH 进行定量。并进一步根据公式 1 对磁性微粒表面结合的 GSH 进行定量。制备好的包被有 GSH 的异硫氰酸根末端磁性微粒(谷胱甘肽-磁性微粒)用乙醇胺进行封闭反应 2 h, PBS 清洗 3 次。封闭后的磁粒用于后续纯化实验。为确定 GSH 与异硫氰酸根末端磁性微粒的孵育时间, 分别取 1 mg 的异硫氰酸根末端磁性微粒于 10 支离心管中, 各加入偶联缓冲液 300 μL 及 GSH(1 mg/mL, 溶于偶联缓冲液)200 μL , 37 $^{\circ}\text{C}$ 、180 r/min 摇床中孵育 2、4、6、8、10、12、14、16、18、20 h, 清洗步骤同上, 磁性分离, 收集上清, 根据 1.2.1 1) 中的定量方法对磁性微粒表面结合的 GSH 进行定量。

1.2.3 GST 融合蛋白的诱导表达及细胞裂解液的制备

将经过 GST 融合蛋白质转化的大肠杆菌涂布于含氨苄青霉素的 LB 平板上, 从平板上挑取单个菌落于 3 mL 新鲜 LB 培养基中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 、180 r/min 摇床中过夜培养。然后将其以 1:100 的接种量接种于含氨苄青霉素(1:1000)的 LB 液体培养基中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 、200 r/min 摇床中培养 2 h 左右, 当其在 600 nm 处的吸收值 OD_{600} 为 0.6~0.8 时, 加入 IPTG 至终浓度为 0.1 mmol/L, 25 $^{\circ}\text{C}$ 、200 r/min 摇床中过夜培养, 诱导融合蛋白的表达。离心收获菌体, 加入细胞裂解液(50 mmol/L Tris-HCl, pH 7.9, 0.5 mmol/L EDTA, 50 mmol/L NaCl, 5% 甘油)^[7]重悬, 反复冻融 2 次, 超声波破碎至清亮, 离心收集上清。SDS-PAGE 分析其融合蛋白的表达形式。

1.2.4 GST 融合蛋白纯化条件的优化

GST 融合蛋白纯化的原理主要在于 GST 与 GSH 之间酶和底物的特异性的作用力^[8]。根据此原理使用谷胱甘肽-磁性微粒与细胞裂解液及结合液(50 mmol/L PBS, 200 mmol/L NaCl, 5%甘油, pH 7.0), 25 $^{\circ}\text{C}$ 、150 r/min 摇床中孵育后, 清洗液洗去杂蛋白, 用洗脱液(50 mmol/L Tris, 10 mmol/L GSH, pH 8.0)^[6]竞争性洗脱 GST 融合蛋白, SDS-PAGE 对纯化结果进行分析。

1)不同磁粒用量对蛋白纯化量的影响: 分别取 4、5、6、7、8、9、10、11 mg 的谷胱甘肽-磁性微粒于 8 支离心管中, 各加入结合液 400 μL 和含 GST 融合蛋白的细胞裂解液 100 μL , 25 $^{\circ}\text{C}$ 、150 r/min 摇床中孵育 40 min。将各离心管置于磁性分离架上磁性分离 5 min, 弃去上清。加入 500 μL 清洗液吹吸混匀, 磁性分离, 弃上清; 重复清洗 2 次。清洗完后加入 200 μL 洗脱液, 25 $^{\circ}\text{C}$ 、150 r/min 摇床中洗脱 15 min; 重复洗脱 1 次。最后收集并合并洗脱液用 Bradford 法测定洗脱液中蛋白含量。

2)不同结合时间对蛋白纯化量的影响: 分别取 10 mg 的谷胱甘肽-磁性微粒于 6 支离心管中, 各加入结合液 400 μL 和含 GST 融合蛋白的细胞裂解液 100 μL , 25 $^{\circ}\text{C}$ 、150 r/min 摇床中孵育 10、20、30、40、50、60 min, 清洗和洗脱步骤同上。Bradford 法测定洗脱液中蛋白含量。

3)清洗缓冲液的选择: 分别取 10 mg 的谷胱甘肽-磁性微粒于 2 支离心管中, 各加入结合液 400 μL 和含 GST 融合蛋白的细胞裂解液 100 μL , 25 $^{\circ}\text{C}$ 、150 r/min 摇床中孵育 40 min, 分别用清洗液 1(PBS)和清洗液 2(PBST)清洗 3 次, 然后洗脱(步骤同上)。收集洗脱液, 用 SDS-PAGE 分析比较其清洗效果。

1.2.5 纯化体系的验证

1)Western blotting 鉴定纯化产物: 纯化产物经 SDS-PAGE 分离后, 转印到 PVDF 膜上, 加入 5%的脱脂牛奶进行封闭, 封闭并清洗后加入标记有辣根过氧化物酶(HRP)的抗 GST 标签单抗 25 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 4 h, 清洗, 显色, 暗室中曝光。

2)GST 融合蛋白纯化体系的稳定性验证: 使用优选条件重复纯化 5 次, 用以检测此体系的重复性。SDS-PAGE 分析其纯化纯度并用 Bradford 法进行定量。

2 结果

2.1 异硫氰酸根末端磁性微粒表面偶联的 GSH 的量

通过 1.2.1 1)的方法测定 GSH 在磁性微粒表面的偶联效率, 偶联量随反应时间的变化如图 1 所示, 1 mg 异硫氰酸根磁性微粒最多可偶联 GSH 的量为

150 μg , 在 10 h 内磁性微粒表面固定 GSH 量与偶联时间呈正相关, 10 h 反应固定的 GSH(149 μg)比 8 h 的固定量(134.5 μg)略有增加。但还原型谷胱甘肽 GSH 性质活泼, 在空气中即可产生一定程度的氧化^[20], 形成的氧化型谷胱甘肽 GSSG 不具有与 GST 融合蛋白结合的性能。8 h 和 10 h 偶联反应制备得到的磁性复合微粒对融合蛋白的纯化量无显著差别(图 2)。因此, 从磁性微粒表面 GSH 偶联量和偶联过程对 GSH 活性变化 2 方面考虑, 本实验选择了 8 h 作为磁性微粒和 GSH 的偶联制备时间。

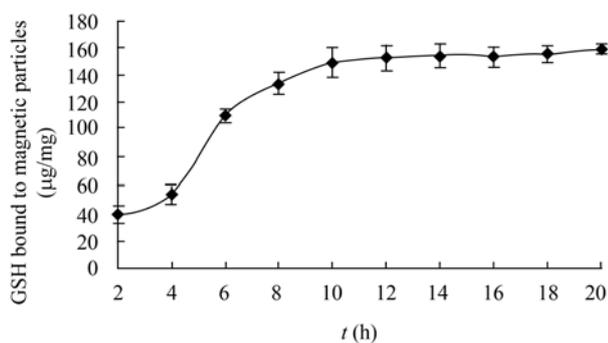


图 1 不同孵育时间与谷胱甘肽-磁性微粒结合 GSH 的量的关系

Fig. 1 Relation of different incubation time and the binding amount of GSH to magnetic particles.

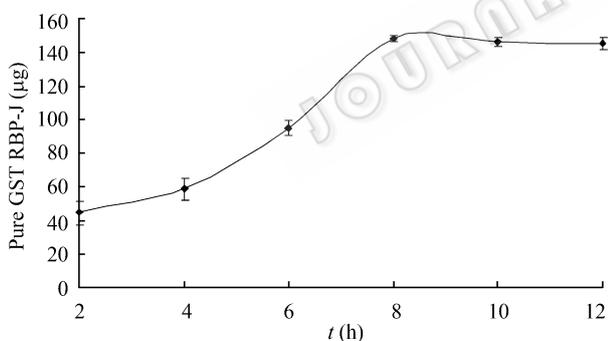


图 2 不同偶联时间制备谷胱甘肽-磁性微粒与融合蛋白纯化量的关系

Fig. 2 Relation of glutathione coupled magnetic particles with different coupling time and quantity of the GST-fusion protein purified by these magnetic particles.

2.2 GST 融合蛋白的诱导表达及裂解结果

诱导前菌液、诱导后菌液、诱导后细胞裂解液及纯化结果经 12% SDS-PAGE 凝胶电泳的结果分析, 如图 3 所示, 诱导前菌液中, 融合蛋白几乎没有表达(泳道 1), 而经 IPTG 诱导后的菌液中有融合蛋白

表达(泳道 2)。冻融处理的菌体上清中没有目标蛋白条带(泳道 3), 但将冻融后菌体经超声破碎后得到的细胞裂解液进行离心后的上清中有明显目的蛋白条带(泳道 4), 表明超声破碎后可作为菌体细胞裂解的主要方法。以谷胱甘肽-磁性微粒可从该裂解液中纯化得到目的条带(泳道 5~7)。

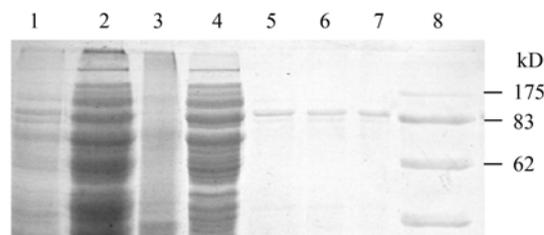


图 3 GST 融合蛋白在大肠杆菌中的 IPTG 诱导表达及纯化

Fig. 3 Expression of the GST fusion protein in *E. coli* and the purification using glutathione coupled magnetic particles. 1: before induction; 2: after induction; 3: proteins obtained after freeze-thawing of the induced bacterial suspension; 4: proteins obtained after freeze-thawing and ultrasonication of the induced bacterial suspension; 5-7: purified GST fusion protein; 8: protein markers.

2.3 GST 融合蛋白纯化条件的优化

2.3.1 不同谷胱甘肽-磁性微粒用量对蛋白纯化量的影响

为确定纯化 100 μL 细胞裂解液中 GST 融合蛋白所需的谷胱甘肽-磁性微粒的最适量, 分别用 4~11 mg 的谷胱甘肽-磁性微粒与 100 μL 细胞裂解液进行孵育纯化。Bradford 法定量可见(图 4), 当加入的磁粒量大于 10 mg 时, 对靶蛋白的纯化量达到饱和。10 mg 磁粒的纯化量大约为 500 μg 。

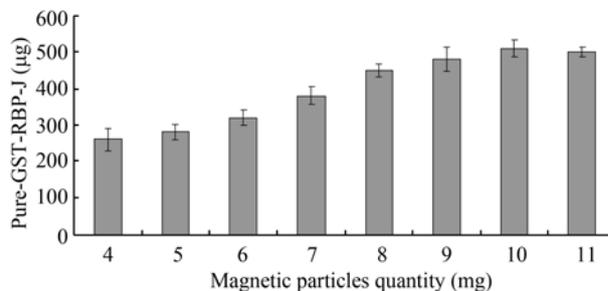


图 4 谷胱甘肽-磁性微粒用量与融合蛋白纯化量的关系
Fig. 4 Relation of different amount of glutathione coupled magnetic particles and the quantity of the GST fusion protein purified by these magnetic particles.

2.3.2 不同纯化时间对蛋白纯化量的影响

为了确定谷胱甘肽-磁性微粒与 GST 融合蛋白的结合时间, 取 10 mg 谷胱甘肽磁性微粒与细胞裂解液分别孵育 10~60 min, 对纯化后经清洗洗脱所得的洗脱液用 Bradford 法进行定量。由图 5 可知, 40 min 以后纯化量不再增加, 可知在 40 min 时纯化量已经达到饱和, 故本试验中优选的孵育时间为 40 min。

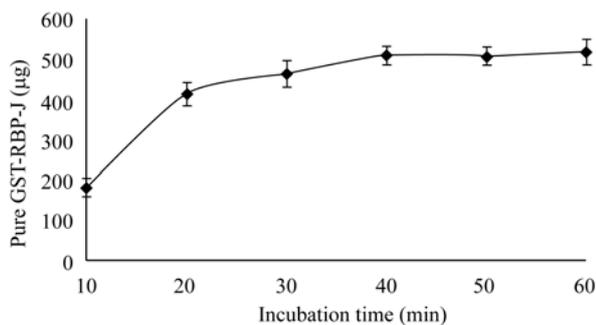


图 5 不同孵育时间与融合蛋白纯化量的关系

Fig. 5 Relation of the incubation time and the amount of protein purified by these magnetic particles.

2.3.3 清洗缓冲液的选择

GST 融合蛋白的亲纯化试验一般选用 PBS 进行清洗, 本实验根据所用的异硫氰酸根末端磁性微粒的性质, 以 PBS 及 PBST 分别为清洗缓冲液, 对与细胞裂解液孵育后的谷胱甘肽-磁性微粒进行清洗, 洗脱后用 SDS-PAGE 评价清洗效果, 结果如图 6 所示。用 PBS 清洗后的洗脱液中仍有部分杂蛋白条带, PBST 清洗效果较好。故本实验选择 PBST 作为清洗缓冲液。

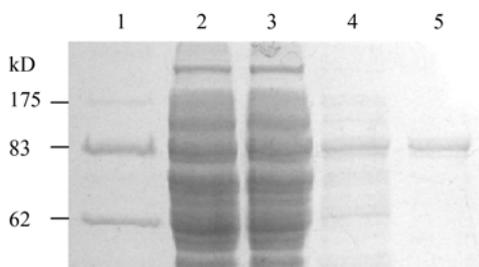


图 6 不同清洗液对谷胱甘肽-磁性微粒清洗效果的 SDS-PAGE 分析

Fig. 6 SDS-PAGE analysis of GST fusion protein purified by processes using different washing buffer. 1: protein markers; 2-3: the crude bacterial lysate; 4: proteins eluted from the glutathione coupled magnetic particles washed with phosphate buffered saline (PBS); 5: proteins eluted from the glutathione coupled magnetic particles washed with phosphate buffered saline and Tween-20 (PBST).

2.4 纯化体系的验证

2.4.1 纯化产物的 Western blotting 分析

为确定纯化产物确为目的 GST 融合蛋白, 本试验采用 Western blotting 对纯化结果进行了鉴定评价, 所用一抗为 HRP(辣根过氧化物酶)标记的抗 GST 标签单抗, 由于已有 HRP 标记, 故试验过程中无需做常规二抗孵育。由图 7 可以看出在菌体裂解液和洗脱液中的目标蛋白处有清晰的 Western blotting 条带, 而在清洗液的泳道中未见目标条带, 可知所纯化蛋白为带有 GST 融合标签的 GST 融合蛋白。

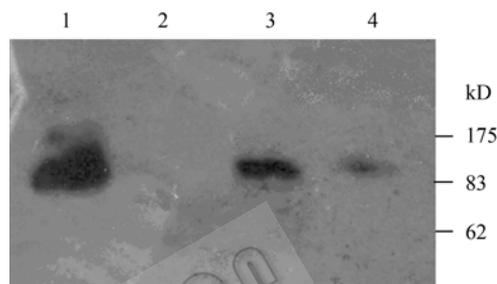


图 7 Western blotting 鉴定结果

Fig. 7 Demonstration using Western blotting, which the purified fusion protein reacts with an anti-GST antibody. 1: the crude bacterial lysate; 2: the supernatant of the wash step using phosphate buffered saline and Tween-20 (PBST); 3: proteins eluted from the glutathione coupled magnetic particles, the first eluate; 4: proteins eluted from the glutathione coupled magnetic particles, the second eluate.

2.4.2 GST 融合蛋白优选纯化系统的重复性

经过优化实验最终确定的优化条件为: 对 100 µL 细胞裂解液纯化体系, 谷胱甘肽-磁性微粒的优选量为 10 mg, 最佳孵育时间为 40 min, 最佳清洗缓冲液为 PBST。应用此优选条件重复用谷胱甘肽-磁性微粒纯化 GST 融合蛋白 5 次, SDS-PAGE 对纯化产物分析可见图 8, 5 次纯化所得的 GST 融合蛋白均有较高纯度。Bradford 法对纯化产物定量可见图 9, 5 次纯化所得的 GST 融合蛋白量均能达到 500 µg

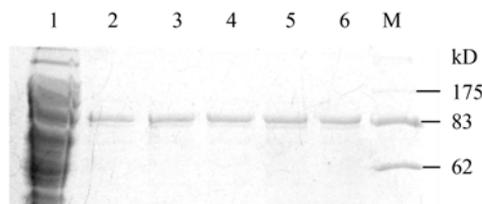


图 8 SDS-PAGE 对 5 次纯化结果进行分析

Fig. 8 SDS-PAGE analysis of the purified fusion proteins.

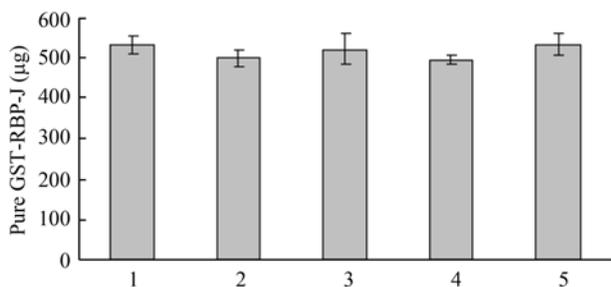


图 9 对 5 次纯化得到融合蛋白量的测定结果

Fig. 9 Quantity of the purified GST fusion protein measured by Bradford method. 1–5: GST fusion protein purified in 5 repeats.

左右, 平均纯化量为 516 μg 。表明本优化体系用于纯化 GST 融合蛋白具有良好的重复性及稳定性。

3 讨论

本试验以异硫氰酸根磁性微粒为载体, 在其表面修饰了还原型谷胱甘肽, 并以此为亲和介质建立了 GST 融合蛋白的亲纯化系统。偶联有还原型谷胱甘肽的异硫氰酸根末端磁性微粒用于 GST 融合蛋白的纯化具有良好的吸附性能及特异性, 每 10 mg 磁粒可纯化出大约 516 μg 的 GST 融合蛋白, 通过对该体系的可重复性验证表明, 该体系可以稳定地用于纯化 GST 融合蛋白。与常用柱纯化方法比, 本实验纯化时间较短, 整个纯化过程可以在 1 h 内完成; 且无需离心步骤, 借助外加磁场, 建立的纯化方法可在一个离心管中完成; 可控的小体积洗脱还可保证融合蛋白的高浓度。此外, 鉴于磁性微粒所具有的超顺磁性, 本方法为 GST-融合蛋白的自动化纯化研究奠定了基础。

REFERENCES

[1] Nilsson J, Ståhl S, Lundeberg J, *et al.* Affinity fusion strategies for detection, purification, and immobilization of recombinant proteins. *Protein Expr Purif*, 1997, **11**(1): 1–16.

[2] Chao H, Bautista DL, Litowski J, *et al.* Use of a heterodimeric coiled-coil system for biosensor application and affinity purification. *J Chromatogr B*, 1998, **715**(1): 307–329.

[3] Flaschel E, Friehs K. Improvement of downstream processing of recombinant proteins by means of genetic engineering methods. *Biotechnol Adv*, 1993, **11**(1): 31–77.

[4] Ford CF, Suominen I, Glatz CE. Fusion tails for the

recovery and purification of recombinant proteins. *Protein Expr Purif*, 1991, **2**(2–3): 95–107.

- [5] LaVallie ER, McCoy JM. Gene fusion expression systems in *Escherichia coli*. *Curr Opin Biotechnol*, 1995, **6** (5): 501–506.
- [6] Li YJ, Chen YY, Bi LJ. Fusion tags technology and their applications. *Chin J Biotech*, 2006, **22**(4): 523–527.
李永进, 陈媛媛, 毕利军. 融合标签技术及其应用. *生物工程学报*, 2006, **22**(4): 523–527.
- [7] Yuan W, Sun W, Yang S, *et al.* Effect of different tags on pulldown assays implemented by LMO2 fusion protein. *Chin J Biotech*, 2008, **24**(5): 887–891.
袁伟, 孙伟, 杨爽, 等. 不同蛋白标签对 LMO2 融合蛋白沉淀实验的影响. *生物工程学报*, 2008, **24**(5): 887–891.
- [8] Smith DB, Johnson KS. Single-step purification of polypeptides expressed in *Escherichia coli* as fusions with glutathione S-transferase. *Gene*, 1988, **67**(1): 31–40.
- [9] Lei RY, Qiao YH, Yan JD, *et al.* Soluble expression of recombinant human BMP6 in *Escherichia coli* and its purification and bioassay *in vitro*. *Chin J Biotech*, 2008, **24**(3): 452–459.
雷荣悦, 乔玉欢, 闫继东, 等. 重组人 BMP6 在大肠杆菌中可溶表达、纯化及活性分析. *生物工程学报*, 2008, **24**(3): 452–459.
- [10] Li X, Liang WB, Sun BC, *et al.* The expression, purification and preliminary use of human Survivin protein. *Acta Univ Med Nanjing*, 2008, **28**(10): 1267–1271.
李焯, 梁文飏, 孙倍成, 等. 人 Survivin 蛋白的表达、纯化及初步应用. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2008, **28**(10): 1267–1271.
- [11] Xu YL, Zhang L, Yao WF, *et al.* Bioprocess development for production, purification, and structural characterization of recombinant hCD83ext as a potential therapeutic protein. *Protein Expr Purif*, 2009, **65**(1): 92–99.
- [12] Schädlich L, Senger T, Kirschning CJ, *et al.* Refining HPV 16 L1 purification from *E. coli*: reducing endotoxin contaminations and their impact on immunogenicity. *Vaccine*, 2009, **27**(10): 1511–1522.
- [13] Hoppmann S, Haase C, Richter S, *et al.* Expression, purification and fluorine-18 radiolabeling of recombinant S100 proteins-potential probes for molecular imaging of receptor for advanced glycation endproducts (RAGE) *in vivo*. *Protein Expr Purif*, 2008, **57**(2): 143–152.
- [14] MagneGST™ protein purification system technical manual #TM240. Promega corporation. <http://www.promega.com/tbs/tm240/tm240.pdf>.
- [15] Li T, Hu JF, Qiu X, *et al.* CTCF regulates allelic expression of *Igf2* by orchestrating a promoter-polycomb repressive complex 2 intrachromosomal loop. *Mol Cell*

Biol, 2008, **28**(20): 6473–6482.

[16] Yoshida K, Wakamatsu S, Sakuta M. Characterization of SBZ1, a soybean bZIP protein that binds to the chalcone synthase gene promoter. *Plant Biotechnol*, 2008, **25**: 131–140.

[17] Zhang ZF, Zhu HL, Tang YT, *et al*. Preparation and application of streptavidin magnetic particles. *Sci China Ser B-Chem*, 2007, **50**(1): 127–134.

[18] Su J, Hui WL, Wang LY, *et al*. Synthesis of silanized magnetic particle and determination of the thiol group on its surface. *J Northwest Univ*, 2006, **36**(1): 59–62.

苏婧, 惠文利, 王兰英, 等. 功能化磁性微粒的合成及表面巯基的测定. *西北大学学报(自然科学版)*, 2006, **36**(1): 59–62.

[19] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 1976, **72**(1-2): 248–254.

[20] Lin SK, Tsai SM, Huang JC. Effects of storage time and temperature on the stability of glutathione in deproteinized blood sample. *J Food Drug Anal*, 2006, **14**(2): 141–146.

2009年《生物工程学报》栏目设置

栏目中文名称	栏目英文名称	具体涵盖内容
综述	Reviews	内容要求新颖丰富, 观点明确, 论述恰当, 必须包含作者自己的工作内容和见解
小综述	Mini-review	能尽快反映生物学领域的最新进展的小型综述
科学进展/名家论坛	Perspective	邀请生物领域专家对最新生物技术科研成果进行评述
动物及兽医生物技术	Animal and Veterinary Biotechnology	转基因动物; 动物生物反应器; 动物疾病控制、免疫生物技术
海洋生物技术	Marine Biotechnology	海洋生物资源; 海洋生物基因组学、蛋白质组学和代谢组学; 海水养殖生物技术; 藻类生物技术; 海洋天然产物; 海洋生物产品、生物材料和生物能源
环境生物技术	Environmental Biotechnology	微生物多样性; 分子生物学方法及应用; 环境过程的生物监测; 污染控制新工艺; 生物修复
工业生物技术	Industrial Biotechnology	工业酶和微生物; 代谢工程与应用; 生物催化剂与生物转化; 工业生物原料、生物燃料、生物能源和生物基化学品; 生物过程工程; 生物工程控制及优化
农业生物技术	Agricultural Biotechnology	农业功能基因组; 植物生物反应器; 转基因作物; 转基因产品的生物安全及转化; 农业重组微生物
食品生物技术	Food Biotechnology	食品微生物及功能性食品; 转基因食品; 食品安全及公众健康
系统生物技术	Systems Biotechnology	系统生物学理论在工业、医药、环境、农业生物技术领域的应用
医学与免疫生物技术	Medical and Immunological Biotechnology	基因治疗和干细胞治疗 RNAi 技术及应用; 生物标记与诊断; 单克隆抗体; 工程蛋白和疫苗
组织工程与细胞培养	Tissue Engineering and Cell Cultivation	细胞发育与生物材料; 干细胞工程; 细胞培养工程
生物技术与方法	Methods in Biotechnology	生物技术各个领域中的方法学