

乳糖诱导对虾白斑病毒囊膜蛋白 VP28 基因 在重组大肠杆菌中的表达

郭 瑞¹, 潘荣昌², 周宇兵², 胡文锋²

(1. 内蒙古河套大学农牧科学系, 内蒙古 巴彦淖尔市 015000; 2. 华南农业大学食品学院, 广东 广州 510642)

摘要: 以含对虾白斑综合症病毒 (white spot syndrome virus, WSSV) 囊膜蛋白 VP28 编码基因质粒的重组大肠杆菌 *Escherichia coli* BL21 作为研究对象, 研究了乳糖或乳清粉代替 IPTG 作为诱导剂诱导重组囊膜蛋白 VP28 的表达。结果表明, 乳糖不仅能够作为诱导剂诱导重组大肠杆菌进行外源蛋白的表达, 而且能作为碳源促进菌体的生长。通过对诱导条件的优化, 乳糖在发酵培养基的添加量为 $8 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, 发酵时间为 12 h 时可以获得最高的目的蛋白表达量, 为 $97.36 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。试验亦使用乳清粉作为发酵培养基的碳源和诱导工程菌表达的诱导剂。结果表明, 在发酵培养基中添加乳清粉作为碳源和诱导剂, 使其乳糖终浓度为 $10 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, 发酵时间为 13 h 时可以获得最高的目的蛋白表达量, 为 $86.24 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

关键词: 白斑综合症病毒; 囊膜蛋白 VP28; 重组大肠杆菌; 诱导表达

中图分类号: Q78

文献标识码: A

文章编号: 1673-2227-(2008)05-0016-07

Lactose-induced expression of envelope protein VP28 gene of white spot syndrome virus (WSSV) in recombinant *Escherichia coli* BL21

GUO Rui¹, PAN Rongchang², ZHOU Yubin², HU Wenfeng²

(1. Agricultural & Animal Husbandry Sciences Academy, Hetao University, Inner Mongolia Bayannaoer 015000, China;

2. College of Food Science, South China Agriculture University, Guangzhou 510642, China)

Abstract: This paper reported the expression of envelope protein VP28 of white spot syndrome virus (WSSV) in recombinant *Escherichia coli* BL21 by using lactose as inducer. The results indicated that lactose could induce foreign protein expression and enhance cell growth during the induction period. The study showed that expression of VP28 fusion protein was up to $97.36 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ with the lactose concentration of $8 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ and the optimal fermentation condition of 12 hours. In order to reduce the cultivation cost, the whey was used as alternative to lactose as carbon source and inducer for VP28 expression. The results showed that expression of VP28 fusion protein was up to $86.24 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ with the whey concentration of $10 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ and the optimal fermentation condition of 13 hours.

Key words: white spot syndrome virus (WSSV); envelope protein VP28; recombinant *Escherichia coli*; induced expression

白斑综合症是全球对虾养殖业所面临的危害性最大的病害之一, 由对虾白斑综合症病毒 (white spot syndrome virus, WSSV) 感染所致。该病自 20

世纪 90 年代初首先在中国台湾地区养殖水域发生以来, 已席卷了世界各国的对虾养殖地区, 造成了巨大的经济损失, 同时也给海洋生态平衡带来了一

收稿日期: 2008-03-16; 修回日期: 2008-05-01

资助项目: 广州市佰沃生物科技有限公司及生物源生物技术(深圳)有限公司资助项目

作者简介: 郭 瑞 (1980-), 女, 硕士, 讲师, 从事分子生物学及发酵工程研究。E-mail: guorui7381@126.com

通讯作者: 胡文锋, E-mail: wfhu@scau.edu.cn

定的威胁。van HULTEN 等^[1]和许雅香^[2]先后通过试验证明了 WSSV 囊膜蛋白 VP28 的特异性抗体能中和病毒感染, 显示 VP28 在病毒感染过程中起到非常重要的作用。

最近研究报道证明甲壳类动物具有类似脊椎动物的干扰素系统^[3]和类获得性免疫反应, 并且有记忆特性^[4]。这一发现推翻了长期以来人们一直认为的甲壳类动物是没有获得性免疫功能的观念, 也为有效预防 WSSV 的感染提供了新的思路。

此研究正是基于以上事实及研究结果, 旨在通过优化含重组 WSSV 囊膜蛋白 VP28 编码基因质粒的重组大肠杆菌 BL21 发酵工艺, 从而大规模表达目的蛋白, 免疫对虾, 有效提高对虾抵抗 WSSV 感染的能力。

一般情况下, 利用重组大肠杆菌 BL21 表达外源蛋白都使用 IPTG (异丙基硫代- β -D-半乳糖苷) 作为诱导剂, 但是因其高成本和对人和动物的毒性, 因而不能直接被动物采食, 更不能进入食物链, 因此, 限制了基因工程产品的产业化发展^[5]。为了解决这一问题, 使用廉价、无毒的乳糖替代 IPTG 作为诱导剂诱导重组蛋白的表达, 已成为目前研究的热点。同时, 葡萄糖作为重组菌高密度发酵的碳源, 也存在一定的局限性。笔者尝试将乳糖也作为碳源使用并优化其发酵工艺, 亦取得了良好的效果。

1 材料与方法

1.1 基因工程菌

重组对虾白斑病毒囊膜蛋白 VP28 工程菌由自身实验室构建, 宿主菌为 *Escherichia coli* BL21, 即大肠杆菌 pET-32a-VP28-BL21。

1.2 培养基

种子培养基用 LA 培养基, 配方为胰蛋白胨 $10 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, 酵母浸膏 $5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, NaCl $10 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, 氨苄青霉素终浓度 $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, pH 值为 6.5。

发酵培养基为牛肉浸膏 $5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, 酵母浸膏 $5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, NaCl $10 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, 蛋白胨 $10 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

1.3 培养方法

1.3.1 菌种活化 20 μL 重组大肠杆菌 BL21 甘油种转接到 3~4 mL 种子培养基中, 30°C , $120 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 摇床培养 24 h。之后取菌液划平板, 30°C 培

养, 24 h 后挑单菌落至装有 50 mL 种子培养基的 250 mL 三角瓶中, 转速 $120 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$, 37°C 恒温摇床培养, 作为种子备用。

1.3.2 发酵 将培养好的种子液以 5% 的接种量接种到装有 50 mL 发酵培养基的 250 mL 三角瓶中, $120 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$, 37°C 恒温摇床培养 14 h。

1.3.3 不同诱导剂的诱导表达 为比较 IPTG 和乳糖对表达 VP28 的影响, 于发酵 6 h 后分别添加 IPTG 和乳糖诱导表达, 使 IPTG 终浓度为 $1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, 乳糖终浓度为 $0.68 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。至发酵结束, 分别取样进行 SDS-PAGE 电泳检测。

1.3.4 不同碳源对诱导表达的影响 在发酵培养基中分别添加葡萄糖、甘油、乳糖作为碳源 (表 1), 发酵 6 h 后分别向 1~5 组添加终浓度为 $0.68 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 乳糖诱导表达, 至发酵结束, 以乳糖为诱导剂, 比较其对表达 VP28 囊膜蛋白的影响。由于第 6、7 组是以乳糖为碳源, 所以不再添加乳糖。

表 1 添加不同碳源的发酵培养基

Tab. 1 Cultural media with different carbon sources

组别 test group	培养基配方 culture media
1	发酵培养基
2	发酵培养基 + $5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 葡萄糖
3	发酵培养基 + $10 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 葡萄糖
4	发酵培养基 + $5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 甘油
5	发酵培养基 + $10 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 甘油
6	发酵培养基 + $5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 乳糖
7	发酵培养基 + $10 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 乳糖

1.3.5 乳糖作为碳源及诱导剂其添加量对诱导表达的影响 在发酵培养基中分别添加 6、8、10、12 和 $14 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 乳糖作为碳源及诱导剂, 比较其对表达 VP28 囊膜蛋白的影响。

1.3.6 乳清粉作为碳源及诱导剂其添加量对诱导表达的影响 将乳清粉 (乳糖含量为 74%) 用温水充分溶解, $3000 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$, 离心 10 min, 取上清液。配制成乳糖浓度为 $100 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的母液。在发酵培养基中添加乳清粉母液, 使其乳糖终浓度分别为 6、8、10 和 $12 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$; 在发酵培养基中添加 6 g

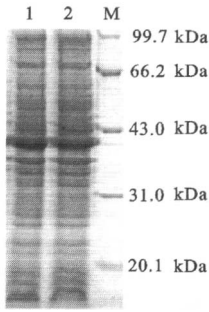


图1 不同诱导剂诱导表达的 SDS-PAGE 分析结果

M. 底分子量蛋白 marker; 1. IPTG 诱导; 2. 乳糖诱导

Fig. 1 SDS-PAGE analysis of VP28 envelop protein from recombinant *E. coli* induced with IPTG and lactose, respectively

M. protein ladder; 1. IPTG induced; 2. lactose induced

·L⁻¹乳糖。比较其对表达 VP28 囊膜蛋白的影响。

1.4 分析方法

测定培养菌液光密度 OD₆₀₀ 的值, 作为菌体生物量的指示; 采用 Bradford 法测定菌体总蛋白质含量; 重组产物占菌体总蛋白百分含量的测定, 采用将诱导后菌体的全菌总蛋白经 SDS-PAGE 电泳后通过 Bio-RaGelDoc2000 凝胶成像系统确定。

2 结果与分析

2.1 不同诱导剂的诱导表达

分别添加 1 mmol·L⁻¹ IPTG 和 2 mmol·L⁻¹ 乳糖在相同的培养条件下诱导重组蛋白的表达, 并于发酵 12 h 取样进行 SDS-PAGE 电泳分析, 结果见图 1, 乳糖作为诱导剂诱导表达重组蛋白的表达效果与 IPTG 相似。

2.2 不同碳源对诱导表达的影响

分别在发酵培养基中添加不同量的葡萄糖、甘油、乳糖作为碳源, 在乳糖的诱导下, 分别对其取

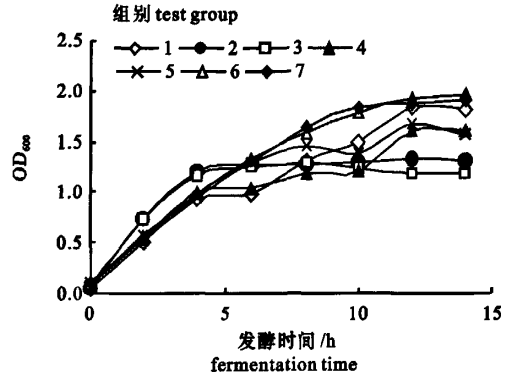


图2 不同碳源的培养基重组大肠杆菌的生长情况

Fig. 2 Effect of different carbon sources on the growth of recombinant *E. coli*

样进行分析。由试验结果 (图 2、表 2) 可知, 工程菌 pET-32a-VP28-BL21 在添加 5 g·L⁻¹ 乳糖 (第 6 组) 和添加 10 g·L⁻¹ 乳糖 (第 7 组) 的培养基中有较高的比生长速率, 分别为 0.1736 和 0.1794 h⁻¹, 其中第 7 组培养基中的比生长速率为最高。而添加葡萄糖作为碳源的 2 组在发酵 6 h 后, 菌体生长缓慢。由图 3 可知, 乳糖作为碳源及诱导剂处理组, 其诱导表达重组 VP28 蛋白的表达量明显高于乳糖仅作为诱导剂, 葡萄糖、甘油作为碳源处理组和不添加碳源组, 且以添加 10 g·L⁻¹ 乳糖作为碳源处理组为最高。而甘油作为碳源又比葡萄糖作为碳源更利于目的蛋白的表达。因此, 选择以乳糖作为碳源的发酵培养基。同时, 通过计算可知 (图 4), 在不同的培养基中, 乳糖作为碳源的发酵培养基中 VP28 蛋白得率系数也要高于其它处理组。结合图 2 和图 4 可以推断, 不同碳源的发酵培养基中目的蛋白表达量的增高是由菌体数量的增加和 VP28 蛋白得率系数即单位菌体表达量的增加共同作用的结果。因此, 选用乳糖作为发酵培养基的初始碳源及诱导目的蛋白表达的诱导剂。

表 2 重组大肠杆菌 pET-32a-VP28-BL21 在不同培养基的比生长速率

Tab. 2 Specific growth rate of recombinant *E. coli* in different cultural media

培养基组别 test group	1	2	3	4	5	6	7
比生长速率 μ (h ⁻¹) specific growth rate	0.1253	0.0907	0.0872	0.1196	0.1579	0.1736	0.1794

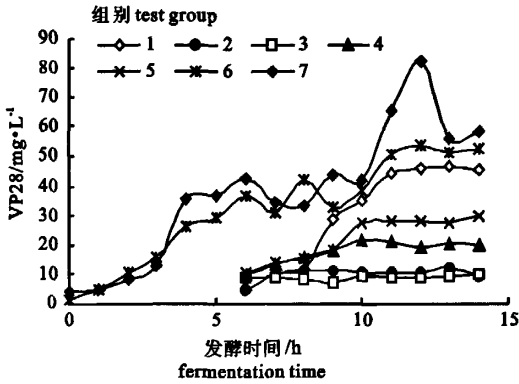


图3 不同碳源对 VP28 蛋白表达量的影响

Fig. 3 Expression of VP28 from recombinant *E. coli* by using different carbon sources

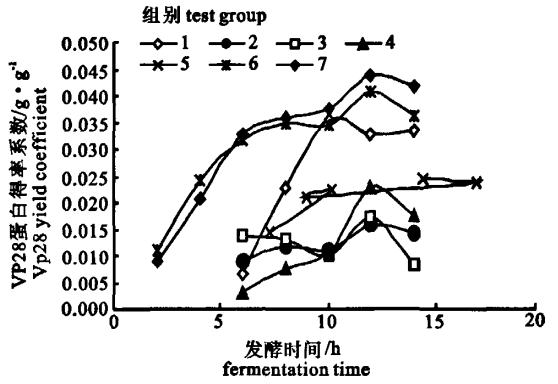


图4 不同碳源的培养基中 VP28 蛋白得率系数

Fig. 4 VP28 yield coefficient of recombinant *E. coli* by using different carbon sources

表3 重组大肠杆菌 pET-32a-VP28-BL21 在不同乳糖浓度的培养基中的比生长速率

Tab. 3 Specific growth rate of recombinant *E. coli* with different lactose concentration in media

培养基乳糖浓度/ $g \cdot L^{-1}$ lactose concentration	6	8	10	12	14
比生长速率 μ (h^{-1}) specific growth rate	0.1809	0.1913	0.2035	0.1798	0.1744

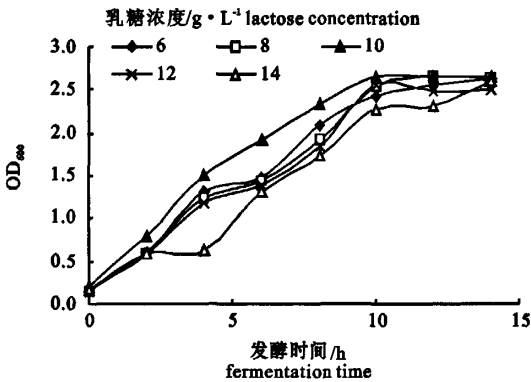


图5 不同乳糖浓度对重组大肠杆菌生长的影响

Fig. 5 Growth of recombinant *E. coli* with different lactose concentration

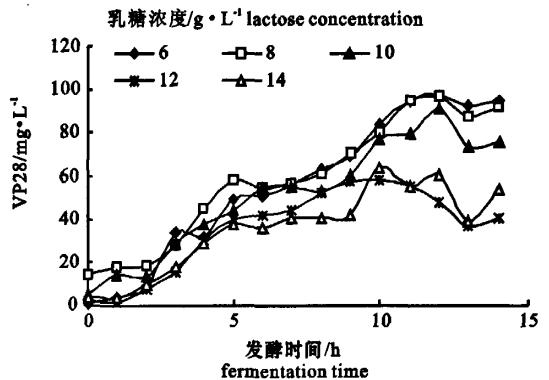


图6 不同乳糖浓度对 VP28 蛋白表达量的影响

Fig. 6 Expressions of VP28 by recombinant *E. coli* with different lactose concentrations

2.3 乳糖作为碳源及诱导剂其添加量对诱导表达的影响

分别在发酵培养基中添加不同浓度的乳糖作为碳源和诱导剂, 从发酵开始分别对其取样分析。由表3可知, 重组大肠杆菌 pET-32a-VP28-BL21 在乳糖作为碳源的培养基中均有较高的比生长速率, 其中乳糖浓度为 $10 g \cdot L^{-1}$ 的发酵培养基中的比生长速

率最高, 达到 $0.2035 h^{-1}$ 。由图5、图6、图7可以看出, 菌体生长在发酵开始 10 h 后进入稳定期, 而其目的蛋白表达量和 VP28 蛋白得率系数却在发酵开始 12 h 时达到最高, 因此, 可以认为在发酵 10 h 后, 发酵液中目的蛋白量的增加主要以单个菌体的表达量增加为主。由图6可知, 乳糖浓度为 12 和 $14 g \cdot L^{-1}$ 时所获得的目的蛋白量最低, 而且

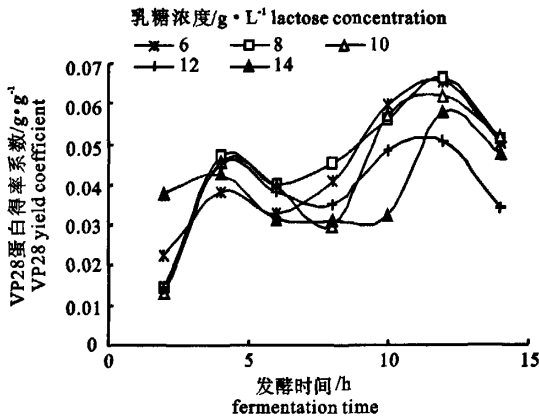


图7 培养基中不同乳糖浓度的VP28蛋白得率系数

Fig. 7 The VP28 yield coefficient of recombinant *E. coli* under different lactose concentrations

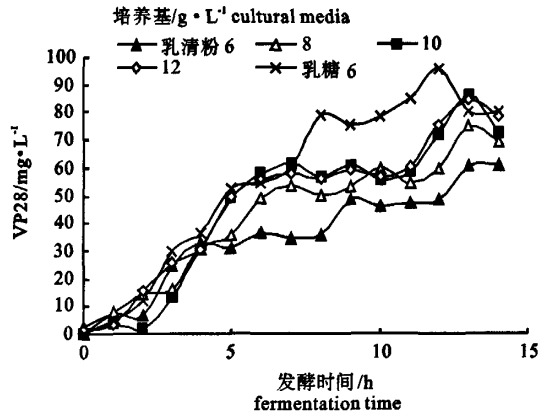


图9 以乳糖和乳清粉为碳源对VP28蛋白表达量的影响

Fig. 9 Expressions of VP28 with lactose and whey as carbon sources

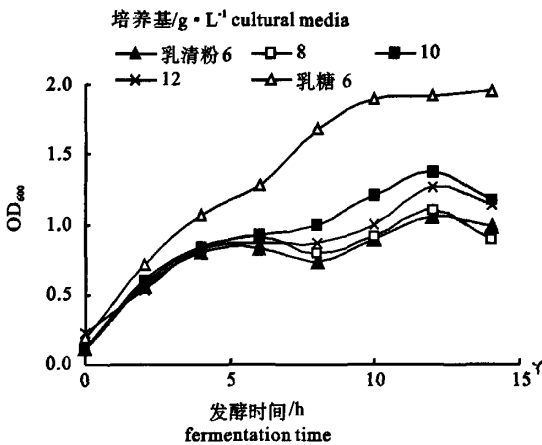


图8 以乳糖和乳清粉为碳源重组大肠杆菌的生长曲线

Fig. 8 Growth curves of recombinant *E. coli* with lactose and whey as carbon sources

其菌体生长也较缓慢；乳糖浓度为 $8 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的发酵培养基中获得的蛋白量最高，为 $97.36 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ；

乳糖浓度为 $6 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的发酵培养基中蛋白表达量略低于 $8 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ，为 $96.99 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。考虑发酵成本，乳糖在发酵培养基中的添加量以 $6 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 为宜。

2.4 乳清粉作为碳源及诱导剂对诱导表达的影响

在发酵培养基中添加乳糖，使其终浓度为 $6 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ；在发酵培养基中添加乳清粉（乳糖含量为74%），使其乳糖的终浓度分别为 6 、 8 、 10 和 $12 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。从发酵开始分别对其取样分析。由表4和图8可以看出添加乳糖的发酵培养基中菌体的生长较快，比生长速率高于添加乳清粉的几组。由图9可知，乳清粉也可以诱导重组蛋白的表达，但是表达量低于乳糖，且在发酵13 h时才达到最高表达量，比乳糖诱导推迟1 h。在添加乳清粉的几组中，乳糖终浓度为 $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 时获得最高表达量，为 $86.24 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

3 讨论与结论

3.1 不同诱导剂的诱导表达

乳糖是乳糖操纵子控制的细菌自身系列酶的底

表4 重组大肠杆菌 pET-32a-VP28-BL21 在不同培养基中的比生长速率

Tab. 4 Specific growth rate of recombinant *E. coli* in different cultural media

培养基 cultural media	乳糖/ $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ lactose		乳清粉（乳糖含量74%）/ $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ whey			
	6	8	6	8	10	12
比生长速率 μ (h^{-1}) specific growth rate	0.1495	0.1018	0.1058	0.1124	0.1184	0.1184

物,对乳糖操纵子具有诱导作用^[6],试验结果证明其诱导结果与 IPTG 相似,与其他学者的试验结果相同^[7-8]。

3.2 培养基不同碳源对目的蛋白表达的影响

葡萄糖是快速的碳源,已被广泛用作重组菌高密度发酵的碳源,但是其代谢产物乙酸会抑制细胞的生长,影响重组产物的表达。而且高浓度葡萄糖和有机酸的积累会促进丢失质粒细胞的生长,降低质粒的稳定性^[9-10];同时,含有 lac 启动子的表达载体都需要 cAMP 激活蛋白的参与,才能最大程度诱导 lac 启动子,而细胞在含有葡萄糖的培养基中生长时,cAMP 活性会受到抑制^[11]。在此试验中可以看到,以葡萄糖作为碳源的培养基中菌体生长缓慢,目的蛋白表达量也低于产酸量较少的甘油作为碳源的处理组。而直接使用乳糖作为发酵培养基的碳源及诱导表达的诱导剂时,所获得的表达量则明显高于甘油作为碳源的处理组。因此,选用乳糖作为碳源更利于重组蛋白的表达。

3.3 乳糖作为碳源及诱导剂其添加量对目的蛋白表达的影响

在发酵培养基中分别添加不同浓度的乳糖作为碳源及诱导剂,笔者发现在一定范围内,乳糖浓度越高,重组蛋白的表达量越高,但是随着乳糖浓度的增加,其表达量有所下降。这说明乳糖的加入量有一个最佳范围,乳糖添加过多,非但不能使诱导更充分,反而可能对菌体生长和产物的表达产生抑制。

高浓度乳糖导致表达量下降可能是由于2种因素造成的:(1)添加的乳糖一部分被分解为葡萄糖与半乳糖,作为碳源供给细菌生长;另一部分乳糖进一步异构化为异乳糖,诱导外源蛋白的合成^[12]。因此,高浓度乳糖分解会产生较多的葡萄糖和半乳糖,葡萄糖的降解物阻遏效应便表现出来,lac 阻遏蛋白抑制了乳糖操纵子的启动,导致重组基因不表达^[13]。(2)由乳糖操纵元的表达调控机理可知,由于乳糖透过酶的转运作用,乳糖得以进入细菌,从而诱导更多的 β -半乳糖苷酶以及乳糖透过酶的产生。乳糖的转运以及酶的合成都是耗能的过程。因此,高浓度的乳糖会造成菌体质子推动力的消耗,从而“分散”了菌体的能量,影响了细菌的生长^[7-14]。因此,乳糖的添加量并非

越高越好。

在试验中笔者也发现,当目的蛋白表达量达到最高之后,如果继续发酵,目的蛋白的表达量反而会降低。造成这种现象的因素有2个:(1)单位菌体的表达量也开始下降(图4、图7);(2)因为发酵后期一些菌体自溶释放出大量蛋白酶会使一部分蛋白被降解,从而导致目的蛋白产量降低^[15-16]。因此,发酵时间不宜过长,应在培养13 h后结束发酵。

3.4 乳清粉作为碳源对目的蛋白表达的影响

乳清粉是生产干酪或干酪素时,用酶或酸把牛奶中的酪蛋白凝固分离后剩下的副产品。乳清粉中的主要成分是乳糖,以及少量的乳清蛋白和灰分^[17]。为了降低发酵成本,笔者希望可以使用的乳清粉代替乳糖作为发酵培养基的碳源和诱导剂。由于乳清粉含有少量蛋白质,会影响对重组蛋白的检测和计算,因此,将乳清粉充分溶于温水后,采用高速离心的方法将蛋白质除去。

试验证实,乳清粉可以作为碳源并且可以诱导重组蛋白表达。但是其菌体比生长速率明显低于乳糖作为碳源的对照组。目的蛋白表达量也低于乳糖作为诱导剂的对照组,且达到最高表达量的时间比乳糖作为诱导剂推迟了1 h。同时可以看到,乳清粉的添加量在一定范围内,乳糖浓度越高,重组蛋白的表达量越高,但是随着乳糖浓度的增加,其表达量也有所下降。

致谢:此项目研究期间得到了华南农业大学动物科学学院谢青梅老师的细心指导和帮助;生命科学学院的2002级本科生黄巧韵和刘健平同学参加了重组大肠杆菌构建的大部分工作,谨此致谢!

参考文献:

- [1] van HULTEN M C W, HULTEN V, WITTEVELDT J, et al. White spot syndrome virus envelope protein VP28 is involved in the systemic infection of shrimp [J]. *Virol*, 2001, 285 (10): 228 - 233.
- [2] 许雅香, 许梓荣, 杜华华, 等. 对虾白斑综合征病毒 VP19 基因的克隆和序列分析 [J]. *科技通报*, 2003, 19 (6): 473 - 476.
- [3] ROBALINO J, BROWDY C L, PRIOR S, et al. Induction of antiviral immunity by double-stranded RNA in a marine invertebrate [J]. *Virol*, 2004, 321 (10): 442 - 448.
- [4] NAMIKOSHI A, WU J L, YAMASHITA T, et al. Vaccination

- trails with *Penaeus japonicus* to induce resistance to white spot syndrome virus [J]. *Aquac*, 2004, 229 (2): 25-35.
- [5] DONOVAN R S, ROBINSON C W, GLICK B R. Review: optimizing inducer and culture conditions for expression of foreign proteins under the control of the lac promoter [J]. *Microbiol*, 1996, 16 (4): 145-154.
- [6] 马新锋, 胡勤学, 崔天益, 等. 可溶性 DC-SIGN 的表达、纯化及其生物学活性分析 [J]. *中华微生物学和免疫学杂志*, 2004, 26 (1): 67-71.
- [7] 余永恒, 李清雄, 王革非, 等. 乳糖诱导重组人睫状神经营养因子在大肠杆菌中的可溶性表达 [J]. *中国生物制品学杂志*, 2007, 20 (1): 43-46.
- [8] 刘俊红, 刘顺直, 殷志敏. 乳糖诱导大肠杆菌中重组谷氨酰胺合成酶的表达 [J]. *南京师大学报: 自然科学版*, 2006, 29 (3): 66-70.
- [9] 段明瑞. 重组类人胶原蛋白基因工程菌发酵及动力学研究 [D]. 西安: 西北大学, 2002.
- [10] NEUBAUER P, LIN H Y, MATHISZIK B. Metabolic load of recombinant protein production; inhibition of cellular capacities for glucose uptake and respiration after induction of a heterologous gene in *Escherichia coli* [J]. *Biotechnol*, 2003, 83 (2): 53-64.
- [11] 王延华, 李官成, ZHOU Xinfu. 抗体理论与技术 [M]. 北京: 科学出版社, 2005: 171-172.
- [12] 李兆鹏, 张翔, 徐斌, 等. 重组大肠杆菌高密度发酵中乳糖诱导表达 hBLyS [J]. *过程工程学报*, 2005, 5 (4): 446-449.
- [13] 李环, 陈悦, 朱孝霖, 等. 乳糖对产木聚糖酶基因工程菌 1020 的诱导作用及碳氮源优化 [J]. *氨基酸和生物资源*, 2005, 27 (3): 22-26.
- [14] 张毅, 屈贤铭, 杨胜利. 乳糖作为诱导剂对重组目的蛋白表达的影响 [J]. *生物工程学报*, 2000, 16 (4): 464-468.
- [15] 党红艳. 重组大肠杆菌生产肿瘤血管生长抑制因子 kringles5 发酵条件的优化及纯化 [D]. 西安: 西北大学, 2005.
- [16] 储炬, 李友荣. 现代工业发酵调控学 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2002: 286-287.
- [17] 韩光烈. 谈谈扩大乳清粉利用范围及其现实意义 [J]. *中国乳品工业*, 1995, 23 (1): 43-47.

欢迎订阅 2009 年《齐鲁渔业》

《齐鲁渔业》1984 年创刊, 为海洋与水产科技期刊, 邮发代号 24-78。中国标准连续出版物号: ISSN 1001-151X CN 37-1017/S。办刊宗旨: 面向科技, 面向生产, 面向海洋与水产养殖及渔船民。指导海洋与渔业工作, 促进海洋与渔业科技进步, 为振兴海洋与渔业科技服务, 为“海上山东”建设和全国渔业生产服务。携手海洋与水产界同仁共筑致富金桥。主要栏目有专家讲座、名特优水产、无公害养殖、海淡水养殖、苗种培育、病害防治、饲料肥料、捕捞技术、保鲜加工、渔船渔机、资源环境、科技推广、渔业经济、发展探讨、信息集粹等。

《齐鲁渔业》既发表海洋与水产学科前沿课题报告, 注重首报性, 又报道最新实用养殖技术, 注重实用性。先后荣获山东省十佳期刊, 全国水产优秀报刊一等奖, 全国优秀期刊三等奖, 华东地区优秀期刊, 中国期刊方阵“双效”期刊。《齐鲁渔业》是中国水产类核心期刊, 是联合国水科学和渔业情报系统 (ASFIS) 和《水科学与渔业文摘》(ASFA) 长期固定收录刊物, 并被国内数家检索性期刊收录。

《齐鲁渔业》为月刊, 大 16 开, 64 页, 每期定价 4.00 元, 全年定价 48.00 元。国内外公开发行, 欢迎到当地邮局订阅 (邮局服务热线 11185)。也可向本社直接订阅。

地址: 烟台市经济技术开发区长江路 216 号山东海洋科技大厦 10 楼 邮编: 264006

电话: (0535) 6958905 传真: (0535) 6958900

电子信箱: qiluyue@126.com

联系人: 陈建涛