

文章编号: 1673-1689(2011)02-0255-06

# 乳糖诱导葡萄球菌肠毒素 A 基因在大肠杆菌中的表达

丁岚, 侯晓彦, 王小红\*, 陈福生, 张永霞

(华中农业大学 食品科技学院, 湖北武汉 430070)

**摘要:** 以乳糖作为诱导剂代替传统方法中的 IPTG, 分别从菌龄、诱导剂浓度、诱导时间及诱导剂的添加方式等方面, 对乳糖诱导金黄色葡萄球菌肠毒素 A (staphylococcal enterotoxins A, SEA) 基因在大肠杆菌 BL21(DE3) 中的表达进行了研究。结果表明, 重组大肠杆菌表达 SEA 的优化条件为: 在对数生长期 ( $OD_{600}$  约为 0.6), 一次性添加终浓度为 0.5 mmol/L 的乳糖诱导 6 h。目标蛋白的表达量占菌体总蛋白质的 36.9%, 略低于以 IPTG 为诱导剂时 38.1% 的表达量。乳糖价格仅为 IPTG 的 1% 左右, 因此, 在 SEA 的大规模制备中, 使用乳糖作为诱导剂可以大大节约成本。

**关键词:** 金黄色葡萄球菌; 金黄色葡萄球菌肠毒素 A; 乳糖; 异丙基- $\beta$ -D 巯基半乳糖苷; 基因工程  
**中图分类号:** Q 815 **文献标识码:** A

## Lactose-Induced Expression of *Staphylococcus aureus* Enterotoxin A in *Escherichia coli* BL21(DE3)

DING Lan, HOU Xiao-yan, WANG Xiao-hong\*, CHEN Fu-sheng, ZHANG Yong-xia  
(School of Food Science and Technology, Huazhong Agriculture University, Wuhan 430070, China)

**Abstract:** Expression of staphylococcus aureus enterotoxin A in *Escherichia coli* BL21(DE3) using lactose as inducer instead of IPTG was investigated. Effect of inducing conditions, including cell age of recombinant, concentration of lactose, inducing time and adding model of the lactose on the expression level were detailed studied and analyzed. The optimal inducing conditions listed as followed: 0.5 mmol/L (final concentration) lactose by one-time method at the mid phase of cell growth ( $OD_{600} = 0.6$ ) and then cultured bacteria at 37 °C, 180 r/min for 6 h. The yield of recombinant staphylococcal enterotoxin A induced by lactose was about 36.9% of the total cell solution protein. It was just a little below of that induced by IPTG (38.1%). The price of lactose is only 1% of that of IPTG. All of these suggested that the lactose is available to be effective inducer with lower cost in the process of large-scale production of recombinant protein.

**Key words:** *Staphylococcus aureus*, staphylococcal enterotoxins A (SEA), lactose, Isopropyl beta-D thiogalactopyranoside (IPTG), genetic engineering

收稿日期: 2010-02-28

基金项目: 上海市科委重大科技攻关项目(07dz19508)。

\* 通信作者: 王小红(1970-), 女, 湖北武汉人, 农学博士, 副教授, 主要从事食品微生物和食品安全方面的研究。

Email: wxh@mail.hzau.edu.cn

金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)是引起食品污染的一种重要细菌,广泛存在于空气、水、灰尘及人和动物的排泄物中<sup>[1]</sup>。美国疾病控制中心报告中,由金黄色葡萄球菌引起的食物中毒居第二位,占整个细菌性食物中毒的33%。每年中国此类中毒事件也时有发生<sup>[2]</sup>。金黄色葡萄球菌的致病力主要取决于其所产生的金黄色葡萄球菌肠毒素(staphylococcal enterotoxins, SEs)。SEs是一组结构相关、毒力相近、抗原性不同胞外蛋白质,其相对分子质量为24 000~32 000,且具有超抗原(Superantigen, SA g)活性<sup>[3]</sup>。SEs可致食物中毒,其典型症状为恶心、呕吐<sup>[4]</sup>。目前,免疫学方法是检测SEs的常用方法之一,具有快速、灵敏、操作简便等优点<sup>[5-6]</sup>。免疫学检测SEs的前提是获得较纯的SEs并制备相应的抗体,但是直接用产毒菌株制备SEs,产量极低且容易失活,所以目前一般采用基因工程菌来制备SEs<sup>[7]</sup>。

乳糖是一种天然的lac启动子的诱导物,目前用乳糖替代传统IPTG作为诱导物的报导已有很多<sup>[8]</sup>,但用乳糖诱导SEA基因在大肠杆菌内的表达的未见报导。因此,作者在实验室构建含有SEA基因重组表达菌株的基础上,以乳糖作为诱导剂替代IPTG,对其在重组表达菌株中诱导表达SEA的表达条件进行优化,以大量制备SEA样品,为后续制备SEA单抗、诊断试剂盒,用于快速检测食品中的金黄色葡萄球菌提供基础。此外,以乳糖替代IPTG在表达菌株大肠杆菌BL21(DE3)中的研究,对于乳糖在原核表达系统中进行重组蛋白质的大规模生产,也具有一定的应用价值。

## 1 材料与方 法

### 1.1 主要仪器与试剂

5415R台式高速冷冻离心机:上海力康发展有限公司制造;102C超声波破碎仪:美国Sonic and Materials公司制造;24DN垂直板电泳型凝胶电泳仪:北京六一仪器厂制造。

乳糖(Lactose):购于上海试剂二厂;IPTG:购于Sigma公司;蛋白质相对分子质量Marker:购于Fermentas公司;其余均为国产分析纯试剂。

### 1.2 菌种与培养基

宿主菌BL21(DE3):由华中农业大学植物科学技术学院提供;重组表达质粒pET28a:由北京军事医学科学院提供;工程菌BL21(DE3)、pET28a-SEA:由作者所在实验室构建并保存;LB培养基。

### 1.3 方 法

#### 1.3.1 培养条件及重组蛋白质表达量的测定方法

按体积分数2%接种pET28a-SEA菌株于LB培养基中,37℃、180 r/min离心10 h后,再于2 g/dL LB中扩大再培养至OD<sub>600</sub>为0.6左右,进行二次扩大再培养。

在250 mL摇瓶中加入100 mL LB培养基,将预先培养的种子培养液加入该培养基中,放入37℃摇床振荡培养,当菌体OD<sub>600</sub>值达到0.6时,用终浓度为0.5 mmol/L的IPTG诱导,继续培养6 h。取10 mL培养液,放入离心管中,5 000 r/min离心10 min。用1 mL 0.02 mol/L pH 7.4 PBS缓冲液重悬菌体沉淀,超声波破碎,12 000 r/min离心20 min,取上清液,用考马斯亮蓝法测上清液中总蛋白质质量浓度<sup>[9]</sup>。上清液进行SDS-PAGE电泳,用Bandscan 5.0软件分析SDS-PAGE电泳条带中的目的蛋白质在菌体总蛋白质中的比例,从而计算出目的蛋白质即重组SEA(recombinant SEA,简称rSEA)的质量浓度。

**1.3.2 不同时间段加入乳糖对目的蛋白质表达量的影响** 在pET28a-SEA菌株生长1、2、3、4、5、6 h后,向培养液中加入终浓度为0.5 mmol/L的乳糖<sup>[10]</sup>,37℃、180 r/min诱导6 h,取样冰浴超声,离心后取上清液SDS-PAGE电泳,并测细菌总蛋白质。

**1.3.3 乳糖诱导后培养时间对目的蛋白质表达量的影响** 在pET28a-SEA菌株生长3 h后,向培养液中加入终浓度为0.5 mmol/L的乳糖,37℃、180 r/min分别诱导1、2、3、4、5、6、7 h,取样冰浴超声,离心后取上清液SDS-PAGE电泳,并测细菌总蛋白质<sup>[10]</sup>。

**1.3.4 乳糖浓度对目的蛋白质表达量的影响** 在pET28a-SEA菌株生长3 h后,向培养液中分别加入终浓度为0.25、0.5、1、5 mmol/L的乳糖,37℃、180 r/min诱导6 h,取样冰浴超声,离心后取上清液进行SDS-PAGE电泳,并测细菌总蛋白质。

#### 1.3.5 乳糖添加方式对目的蛋白质表达量的影响

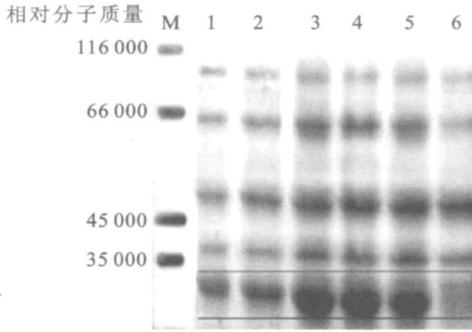
在pET28a-SEA菌株生长3 h后,采用两种方式添加乳糖。其中一种是向100 mL培养液中一次性加入终浓度为0.5 mmol/L的乳糖,另一种则每隔1 h分4次等量加入0.125 mmol/L的乳糖,37℃、180 r/min诱导6 h,取样冰浴超声,离心后取上清液SDS-PAGE电泳,并测细菌总蛋白质质量浓度。

## 2 结果与分析

### 2.1 最佳菌龄的确定

在菌株生长的不同时间段添加乳糖,具体方法

参考 1.3.1 及 1.3.2。在重组菌生长 3 h 后 (OD<sub>600</sub> 约为 0.6) 开始诱导, rSEA 表达量较高, 约占总蛋白的 36.9% (Bandscan 5.0 分析), 见图 1 及表 1。推测可能与在对数生长的前中期, 菌体的各种代谢酶系统活性最佳有关, 有利于重组质粒的表达<sup>[11]</sup>。因此, 在菌体对数生长期添加诱导剂效果较为理想, 可以达到在适宜菌体密度的条件下, 收获较多的目的蛋白质的效果。



M: Mr 标准; 1~6: 分别代表菌株生长 1~6 h 添加乳糖诱导后的 rSEA 表达量

图 1 不同生长时期加入乳糖时 rSEA 表达的 SDS PAGE 图

Fig. 1 SDS PAGE of rSEA induced by lactose at different growth period

表 1 不同生长时期加入乳糖对 rSEA 表达的影响

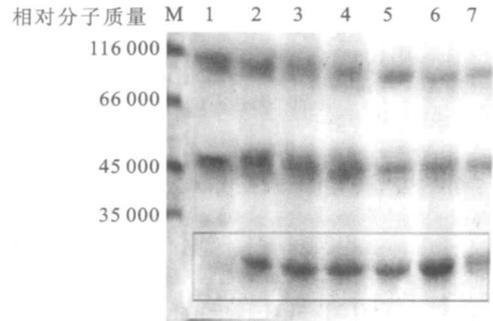
Tab. 1 Effect of lactose on the expression of soluble rSEA at different growth period

泳道	可溶性蛋白质 质量浓度/ (mg/L)	可溶性 rSEA 质量浓度/ (mg/L)	可溶性 rSEA 占 可溶性蛋白质的 百分比/%
1	220.2	0	0
2	140.3	42.8	30.5
3	168.5	62.2	36.9
4	168.4	52.9	31.4
5	169.7	50.7	29.9
6	171.8	31.6	18.4
7	180.3	9.0	5.0

## 2.2 乳糖添加后最佳培养时间的确定

乳糖添加后在不同时间段收获菌体, 具体方法参考 1.3.1 及 1.3.3, SDS-PAGE 电泳见图 2 及表 2。乳糖添加 2 h 后, 重组菌就开始表达 rSEA, 且在 2~6 h 诱导过程中, 表达量逐渐增多, 但在 6 h 后达到 63.4 mg/L, 且表达量不再上升。分析原因可能是诱导一定时间后, 由于外源蛋白质的表达, 代谢副产物的累积、细菌的衰老等原因, 细菌会停止生

长, 蛋白质的合成也会停止<sup>[12]</sup>, 所以应在适宜的时机 (乳糖加入后 6 h 左右) 停止培养, 以避免菌体自溶导致目的蛋白质变性。



M: Mr 标准; 1: 空白对照; 2~7: 分别代表乳糖诱导 1~6 h 后 rSEA 表达量

图 2 乳糖添加后不同诱导时间 rSEA 表达的 SDS PAGE 图

Fig. 2 SDS PAGE of rSEA induced by lactose at different inducing time

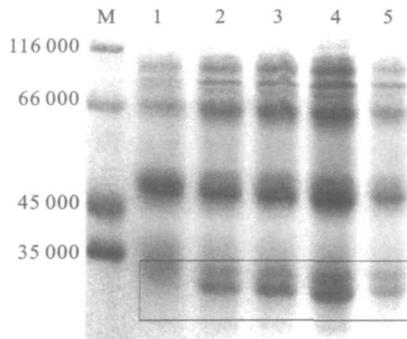
表 2 乳糖添加后不同诱导时间对 rSEA 表达的影响

Tab. 2 Effect of lactose on the expression of soluble rSEA at different inducing time

泳道	可溶性蛋白质 质量浓度/ (mg/L)	可溶性 rSEA 质量浓度/ (mg/L)	可溶性 rSEA 占 可溶性蛋白质的 百分比/%
1	218.3	0	0
2	169.1	25.0	14.8
3	171.5	43.9	25.6
4	185.7	38.4	20.7
5	190.1	40.5	21.3
6	192.2	63.4	33.0
7	189.8	52.0	27.4

## 2.3 乳糖诱导最佳浓度的确定

设定不同乳糖浓度, 按照 1.3.1 及 1.3.4 方法所述, 其对 rSEA 表达的影响见图 3 及表 3。乳糖浓度在 0.25~5 mol/L 时, rSEA 均有所表达, 但当乳糖浓度达到 0.5 mmol/L 时, 即可获得 32.7% 的 rSEA, 说明重组菌对乳糖的诱导效应是较为敏感的, 即低浓度的乳糖 (菌液中乳糖终浓度为 0.25 mmol/L) 即可启动目的基因的表达。这种现象产生的原因可能是由于乳糖从胞外转移至胞内需要 β-半乳糖苷透过酶的作用, 这是一种主动运输的过程, 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<sup>[8]</sup>。



M: Mr 标准; 1: 空白对照; 2~5: 用 0.25、0.5、1、5 mmol/L 乳糖诱导后 rSEA 表达量

图3 不同浓度乳糖对 rSEA 表达影响的 SDS PAGE 图

Fig. 3 SDS PAGE of rSEA induced by lactose at different concentration

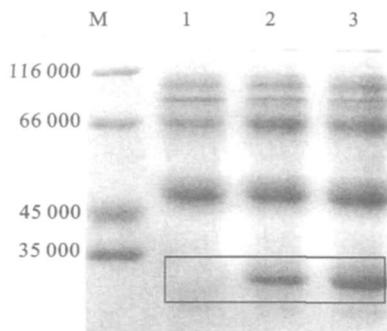
表3 不同浓度乳糖诱导对 rSEA 表达的影响

Tab. 3 Effect of lactose on the expression of soluble rSEA at different concentration

泳道	可溶性蛋白质 质量浓度/ (mg/L)	可溶性 rSEA 占 可溶性蛋白质的 百分比/%	可溶性 rSEA 质量浓度/ (mg/L)
1	218.1	0	0
2	178.3	30.6	53.6
3	182.4	32.7	59.6
4	181.8	15.1	27.5
5	182.1	14.4	26.2

## 2.4 乳糖添加方式的确定

采用不同方式添加乳糖, 具体方法参考 1.3.1 及 1.3.5 所述, 其对 rSEA 表达的影响见图 4 和表 4。



M: Mr 标准; 1: 空白对照; 2: 一次性加入乳糖 (0.5 mmol/L) 诱导后 rSEA 表达量; 3: 分 4 次加入乳糖诱导后 rSEA 表达量(每次 0.125 mmol/L)

图4 乳糖加入方式对 rSEA 表达的影响

Fig. 4 SDS PAGE of rSEA induced by lactose at different dosing method

实验结果表明, 一次性添加乳糖较分次添加乳

糖的蛋白质表达量要高, 可达到 52.6 mg/L。由于乳糖转运是一个主动运输的过程, 这一过程需要消耗一定的菌体能量, 一次性加入大批量的乳糖会加大主动运输的负荷, 从而对菌体的生长有一定的影响。而分次加入少量乳糖, 则对菌体生长影响较小, 但菌体生长过旺反过来会影响目的蛋白的表达<sup>[13]</sup>。

表4 乳糖加入方式对 rSEA 表达的影响

Tab. 4 Effect of lactose on the expression of soluble rSEA at different dosing method

泳道	可溶性蛋白质 质量浓度/ (mg/L)	可溶性 rSEA 占 可溶性蛋白质的 百分比/%	可溶性 rSEA 质量浓度/ (mg/L)
1	212.2	0	0
2	185.9	28.3	52.6
3	184.1	26.5	48.8

## 2.5 乳糖与 IPTG 诱导效果的比较

参照 1.3.1 培养方法, 用乳糖与 IPTG 优化后的条件进行诱导表达, 以未优化前为对照, 比较两者对 rSEA 表达的影响, 两者表达 rSEA 的 SDS-PAGE 电泳图经 Bandscan5.0 分析结果见图 5。结果表明, 诱导条件优化后目的蛋白质表达量均较优化前有所提高, 其中 IPTG 诱导 rSEA 表达量为 64.2 mg/L (占总菌体总蛋白质的 36.9%), 略高于乳糖诱导 rSEA 表达量 62.0 mg/L (占菌体总蛋白的 38.1%), 可溶性菌体总蛋白质量近乎持平。但从成本的角度考虑, 乳糖不及 IPTG 的 1%, 因此可用乳糖替代 IPTG 作为诱导剂用于重组蛋白质的大规模生产, 以节约生产成本。

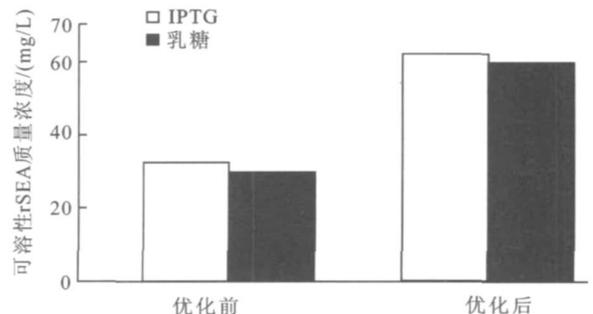


图5 乳糖和 IPTG 作为诱导剂对 rSEA 表达影响的比较

Fig. 5 Comparison of lactose and IPTG as inducer on the expression of soluble rSEA

## 3 结语

乳糖操纵子 (lac) 是目前研究较为详尽、应用较为广泛的一种可诱导的负调控型操纵子<sup>[14]</sup>。传统诱导剂 IPTG (异丙基-β-D 巯基半乳糖苷, Isopropyl

beta-D-thiogalactopyranoside) 是一种高效的乳糖启动子诱导剂。IPTG 可以直接进入大肠杆菌细胞内发挥诱导作用, 是一种非代谢性的诱导物, 不被菌体所消耗, 只需极少量的存在就能稳定地诱导乳糖启动子的转录; 但其具有潜在的毒性<sup>[15]</sup>, 对菌体生长有一定抑制作用, 且价格昂贵, 不宜用于大规模生产。乳糖是一种天然的 lac 启动子的诱导物, 相比传统的 IPTG 而言, 具有无毒、价廉、可以作为碳源、氮源被利用等优点, 且成本不足 IPTG 的 1%<sup>[16]</sup>, 乳糖则需要借助乳糖透酶(Permease)的作用进入细胞, 经  $\beta$ -半乳糖苷酶的作用转化为异乳糖(Allolactose) 才能起到诱导剂的作用<sup>[17]</sup>。因而有可能成为替代 IPTG 的诱导剂。然而由于乳糖的转运和转化比 IPTG 复杂, 且作为一种碳源可以被菌体代谢利用, 对于菌体的生理及代谢也有一定程度的影响。因此在采用乳糖作为诱导剂时, 有必要对菌体生长及诱导条件进行更为精细的研究和优化。

作者在前期表达质粒菌株(BL21(DE3)-pET28a/SEA) 构建成功的基础上, 用乳糖作为诱导剂替代 IPTG 表达 rSEA。外源基因的表达水平除了涉及到宿主、载体和外源基因三者之间关系的影响, 而且受到所处环境影响也较大<sup>[18]</sup>。对于各种影响因素的优化组合, 可以通过每次改变一个单因素或同时改变几个参数来进行。本次实验主要固定其它参数, 而对单个因素分别加以优化, 从而获得整体的优化。

## 参考文献(References):

- [1] 王小红, 谢笔钧, 史贤明, 等. 金黄色葡萄球菌 B 型肠毒素的培养产毒与柱层析纯化[J]. 食品科学, 2005, 26(5): 88-91.  
WANG Xiaohong, XIE Bijiun, SHI Mingxian, et al. Studies on the production of staphylococcal enterotoxin B[J]. **Food Science**, 2005, 26(5): 88-91. (in Chinese)
- [2] Leloir Y, Baron F, Gautier M. *Staphylococcus aureus* and food poisoning[J]. **Genet Mol Res**, 2003, 2(1): 63-76.
- [3] Balaban N, Rasooly A. Staphylococcal enterotoxins[J]. **Food Microbio**, 2000, 61(1): 1-10.
- [4] Jorgensen H J, Mork T, Hogasen H R, et al. Enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in bulk milk in Norway[J]. **Applied Microbiology**, 2005, 99:158-166.
- [5] 吴斌, 秦成, 轶君, 等. 食品中金黄色葡萄球菌肠毒素快速检测方法[J]. 微生物学通报, 2004, 30(5): 93-95.  
WU Bin, QIN Cheng, YI Jun, et al. Rapid detection on staphylococcal enterotoxin of food[J]. **Microbiology**, 2004, 30(5): 93-95. (in Chinese)
- [6] 王正祥, 诸葛健. 单克隆抗体在食品科学中的应用及其前景[J]. 无锡轻工业学院学报, 1989, 8(1): 83-89.  
WANG Zhengxiang, ZHU GE Jian. Application and foreground of monoclonal antibody in food science[J]. **Wuxi Institute of Light Industry**, 1989, 8(1): 83-89. (in Chinese)
- [7] 姜永强, 宁保安, 郑玉玲, 等. 重组葡萄球菌 B 型肠毒素超抗原的制备及抗肿瘤活性分析[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2002, 7118(4): 323-326.  
JIANG Yongqiang, NING Baoran, ZHENG Yuling, et al. Study on expression, purification and antitumor activity of staphylococcal enterotoxin B[J]. **Journal of Cellular and Molecular Immunology**, 2002, 7118(4): 323-326. (in Chinese)

该实验中, SDS-PAGE 电泳及菌体可溶性总蛋白质的测定所取样均来自超声后上清液(可溶性蛋白质)。菌体在超声后分为上清液和沉淀两大部分。其中上清液为可溶性蛋白质, 沉淀中主要是破碎的菌体残壁、目的蛋白的包涵体及其它不溶杂蛋白等物质, 考虑到后期纯化的可行性操作, 实验只考虑可溶性蛋白质的表达量。

实验结果表明, 不同菌龄加入诱导剂对菌体总量与外源可溶性蛋白的表达量有着双重影响。诱导过早, 会减少菌体总量与外源蛋白质的表达量; 过晚虽可以提高菌体的产量, 但却减少了外源基因的表达时间。实验发现在细菌生长的对数期(OD<sub>600</sub>为 0.6) 时目的蛋白质表达量最大, 定为最适值。乳糖的用量亦影响着目的蛋白质的表达量。实验显示, 在乳糖终浓度为 0.5~1.0 mmol/L 时, 蛋白质的产量最大, 为了降低成本, 实验最终选择 0.5 mmol/L 的乳糖终浓度。诱导时间是蛋白质表达与降解的一个平衡点, 诱导剂加入后, 细菌生长受到一定的影响。一定时期内蛋白质表达达到高峰后, 表达量通常不再增加, 却会因不断降解而降低。本试验显示, 乳糖添加 6 h 为最佳菌体收获时间。

通过采用优化后的表达参数对菌液进行诱导表达, 发现 IPTG 和乳糖两种诱导剂对目的蛋白质的诱导表达量相当, 且经一步亲和层析纯化后可以得到较高纯度的重组蛋白质。

- [ 8 ] 吴一凡, 张双全, 高秀玉, 等. 乳糖诱导 pET 载体表达重组蛋白的研究[J]. 南京师大学报, 2002, 25(1): 89- 93.  
WU Yi fan, ZHANG Shuang quan, Gao Xiu yu, et al. Expression of B lymphocyte stimulator ( blys) from pET plasmid using lactose as inducer[J]. **Journal of Nanjing Normal University**, 2002, 25( 1): 89- 93. ( in Chinese)
- [ 9 ] 郭颖娜, 孙卫. 蛋白质含量测定方法的比较[J]. 河北化工, 2008, 31( 4): 36- 37.  
GUO Ying na, SUN Wei. Method comparison of the determination of protein[J]. **Hebei Chemical Engineering and Industry**, 2008, 31(4): 36- 37. ( in Chinese)
- [ 10 ] 李永仙, 郑云飞, 李崎, 等. 重组大肠杆菌 BL21( DE3)- pET28a( + )- bgl 诱导表达  $\beta$ - 葡聚糖酶的条件优化[J]. 食品与生物技术学报, 2009, 28(2): 250- 255.  
LI Yong xian, ZHENG Yur fei, LI QI, et al. Optimization of fermentation conditions of recombinant *E. coli* BL21( DE3)- pET 28a( + )- bgl producing  $\beta$  glucanase[ J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2009, 28( 2): 250- 255. ( in Chinese)
- [ 11 ] 许艳, 万敏, 程岩, 等. 重组人白细胞介素 4 融合蛋白在大肠杆菌中诱导表达的影响因素[ J]. 中国生物学杂志, 2004, 17( 2): 391- 392.  
XU Yan, WAN Min, CHENGYan, et al. Effects of recombinant human interleukin 4 fusion protein on induced expression in *E. coli*[ J]. **Chin J Biologicals**, 2004, 17(2): 391- 392. ( in Chinese)
- [ 12 ] 杨海麟, 王长城, 张玲, 等. 产胆固醇氧化酶重组大肠杆菌的发酵培养基和诱导条件的优化[ J]. 食品与生物技术学报, 2009, 28( 5): 1673- 1689.  
YANG Hai lin, WANG Chang cheng, ZHANG Ling, et al. Optimization of culture conditions for production of cholesterol oxidase using recombinant *E. coli*[ J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2009, 28( 5): 1673- 1689. ( in Chinese)
- [ 13 ] 陈亮, 任随周, 许玫英, 等. 乳糖替代 IPTG 诱导脱色酶 TpmD 基因在大肠杆菌中的高效表达[ J]. 微生物学通报, 2009, 36( 4): 551- 556.  
CHEN Liang, REN Suir zhou, XU Zheng ying, et al. Over expression of highly active triphenylmethane dyes decolorization enzyme ( tpmD) induced by lactose instead of IPTG in *Escherichia coli* BL21( DE3) [ J]. **Microbiology**, 2009, 36(4): 551- 556. ( in Chinese)
- [ 14 ] Neubauer P, Hofmann K. Efficient use of lactose for the lac promoter controlled overexpression of the main antigenic protein of the Foot and Mouth Disease Virus in *Escherichia coli* under Fed Batch fermentation conditions[ J]. **FEMS Microbiology Reviews**, 1994, 14( 1): 99- 102.
- [ 15 ] 金奇. 医学分子病毒学[M]. 北京: 科学出版社, 2001.
- [ 16 ] 卫红飞, 万敏, 杨世杰, 等. 不同诱导剂对工程菌发酵及重组蛋白表达的影响[ J]. 中国生物制品学杂志, 2005, 18( 6): 518- 525.  
WEI Hong fei, WAN Min, YANG Shi jie, et al. Influence of various inducers on expression of recombinant protein by fermentation[ J]. **Chin J Biologicals**, 2005, 18( 6): 518- 525. ( in Chinese)
- [ 17 ] Jobe A, Bourgeois S. Lac repressor operator interaction: VI. The natural inducer of the lac operon[ J]. **Mol Biol**, 1972, 69( 3): 397- 404.
- [ 18 ] Luo Q, Shen Y L, Wei D Z, et al. Optimization of culture on the overproduction of TRAIL in high cell density culture by recombinant *Escherichia coli*[ J]. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 2006, 71( 2): 184- 191.