

拟南芥 WUSCHEL 蛋白的原核表达、亲和纯化和多克隆抗体制备

王增^{1*}, 代茹^{1*}, 张江巍², 陈尚武², 张文¹, 马会勤¹

1. 中国农业大学农学与生物技术学院, 北京 100193

2. 中国农业大学食品科学与营养工程学院, 北京 100083

摘要: 本研究构建了带有 His 标签的拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)WUSCHEL 基因原核表达载体 pET-31b(+)-WUS-His₍₆₎, 优化了大肠杆菌(*Escherichia coli*)诱导表达体系, 将亲和层析纯化后的 WUS 融合蛋白, 经尿素梯度透析复性溶解, 免疫新西兰大白兔, 成功制备了 WUS 蛋白多克隆抗体。通过琼脂糖免疫扩散检测确定了抗血清效价和特异性, 并以斑点杂交和 Western blotting 检验其灵敏性。结果表明, 成功构建的拟南芥 WUS 原核表达载体, 在 *E. coli* 中以 0.5 mmol/L 异丙基-β-D-硫代半乳糖苷 (IPTG) 28°C 诱导表达 10 h 后, 融合蛋白得到高水平表达, 亲和纯化后目标蛋白纯度达 96% 以上, 所制备的多克隆抗体具有较高特异性和灵敏性, 可用于检测纳克级蛋白抗原。

关键词: 拟南芥, WUSCHEL, 蛋白质, 亲和纯化, 抗体

Induced expression of *Arabidopsis thaliana* WUSCHEL in *Escherichia coli*, affinity protein purification and polyclonal antibody preparation

Zeng Wang^{1*}, Ru Dai^{1*}, Jiangwei Zhang², Shangwu Chen², Wen Zhang¹, and Huiqin Ma¹

1. College of Agriculture and Biotechnology, China Agricultural University, Beijing 100193, China

2. College of Food Science and Nutritional Engineering, China Agricultural University, Beijing 100083, China

Abstract: We constructed a His-tagged prokaryotic expression vector of WUSCHEL gene of *Arabidopsis thaliana*, pET-31b(+)-WUS-His₍₆₎. The induction condition of the fusion protein expression in *Escherichia coli* was optimized. After purified by affinity chromatography, the recombinant WUS protein was resolved by renaturation of gradient urea dialysis, then used as antigen to immune rabbit to prepare polyclonal antibody. The rabbit anti-WUS antibody titer and specificity were analyzed and confirmed by agarose immunodiffusion testing; the antiserum sensitivity was assayed by dot blot and Western blotting. The results showed that the *A. thaliana* WUS prokaryotic expression vector was successfully constructed, and the optimized protein expression induction condition in *E. coli* was 0.5 mmol/L IPTG (isopropyl-β-D-thiogalactoside) at 28°C for 10 hours. The purity of the affinity purified protein was higher than 96%, and the prepared polyclonal antibody was with high specificity and sensitivity, it was able to

Received: May 3, 2009; **Accepted:** July 13, 2009

Supported by: National Natural Science Foundation of China (Nos. 30471212, 30500347).

Corresponding author: Huiqin Ma. Tel/Fax: +86-10-62731390; E-mail: hqma@cau.edu.cn

* These authors contributed equally to this work.

国家自然科学基金项目(Nos. 30471212, 30500347)资助。

detect protein antigen at ng level.

Keywords: *Arabidopsis thaliana*, WUSCHEL, protein, affinity purification, antibody

WUSCHEL(WUS)基因被认为是重要的植物干细胞调控基因, 编码 291 个氨基酸^[1]。WUS 是一个假定的同源结构域转录因子家族——WOX 基因家族的成员^[2], 在植物干细胞组织中心表达, 决定干细胞的存在。

近年来, 对 WUS 基因的研究逐渐深入。WUS 蛋白在执行干细胞调控功能时, 其表达具有高度的时空性, 通过与干细胞标志基因 *CLAVATA3* 精确的反馈调节环控制着分生组织中干细胞的数目、决定干细胞群的大小^[3-5]。WUS 也和其他基因和蛋白调控有关, 如与 HAN^[6]、ULT1^[7]、STIP^[8]、AG^[9-10]、BARD1^[11]及亮氨酸拉链转录因子, 如 CORONA (CNA)、PHABULOSA(PHB)和 PHAVOLUTA(PHV)等协同作用, 通过精确的调控, 使周围细胞具有干细胞的特征^[12-14]。Mayer 等^[1]将 WUS::GUS 导入洋葱表皮细胞中表达, 表明 WUS 定位在细胞核内, 进一步证实了其转录因子功能。

WUS 对植物干细胞的调控在植物的基础和應用研究中具有重要的意义, 与生长、分支、成花、扦插生根、体细胞胚的诱导形成和发育等都具有直接的关系^[15]。例如, 在拟南芥 *wus* 突变体中, 茎尖分生组织和花分生组织都不能正常形成, 异位表达 WUS 可形成异位的分生组织和突起, 而过量表达 WUS 会引起种子在土壤中严重致死, 成活的植株也表型异常^[3,9,16-17]。WUS 基因被证实在不添加任何外源激素的情况下, 可以诱导体细胞胚发生^[18]。

目前有关 WUS 的表达定位研究主要是 RNA 原位杂交及利用报告基因检测等手段^[1,3-4]。为了方便地研究 WUS 蛋白在发挥干细胞调控作用时在植物组织中的定位和定量, 以及与其他相关因子相互作用的内在机制, 设计了针对拟南芥 WUS 基因的特异性引物, 通过 PCR 的方法克隆入原核表达载体, 使其在宿主细胞中高效表达, 蛋白纯化后免疫新西兰大白兔, 制备多克隆抗体, 为 WUS 蛋白的检测、定量和进一步研究奠定了基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒

pBKB-WUS 质粒由中国科学院植物研究所康研究员惠赠^[17]。大肠杆菌 (*Escherichia coli*) DH5 α , BL21(DE3)感受态细胞为商业菌株 (Tiangen 公司, 北京), 工具质粒为 pMD-19-simple-T 载体试剂盒 (TaKaRa, 大连) 和原核表达载体 pET-31b (+) (Novagen 公司, 美国)。

1.1.2 主要试剂

限制性内切酶、DNA 连接酶和 DNA 分子量 Marker 等 (TaKaRa, 大连); Ni Sepharose 6 fast flow 纯化介质、NC 膜 (Hybond C Extra)、胰蛋白酶 (GE Healthcare 公司, 上海); 弗氏完全佐剂、不完全佐剂和 HRP 标记的羊抗兔抗体 (Sigma 公司, 美国); Bradford 蛋白质定量试剂盒、HRP-DAB 显色试剂盒、蛋白分子量 Marker 和预染蛋白 Marker (TIANGEN 公司, 北京)。其他试剂均为国产分析纯试剂。

1.1.3 实验动物

新西兰大白兔 2 只, 体重 1.5~2.0 kg, 由中国农业大学实验种兔场提供。

1.2 方法

1.2.1 pET-31b (+)-WUS-His₍₆₎原核表达载体的构建

为了从 pBKB-WUS 质粒中扩增目的片段, 设计带有 *Nde* I 和 *Xho* I 酶切位点(下划线部分)的引物。正向引物 Primer-F: 5'-TATACATATGGAGCCTCCACAGCAT-3'; 反向引物 Primer-R: 5'-TAATTCTCGAGGTTCAGACGTAGCT-3'。

通过 PCR 从 pBKB-WUS 质粒中扩增目的片段, 连接至 pMD-19-simple-T 载体扩增后, 用 *Nde* I 和 *Xho* I 双酶切回收不带终止密码的 WUS 基因片段, 与同样双酶切后的表达质粒 pET-31b(+)定向连接, 用 CaCl₂ 化学法通过热击转化 *E. coli* DH5 α 菌株, 涂板后挑取单菌落于 Luria-Bertani(LB)液体培养基(含

100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 氨苄青霉素)中培养过夜, 碱裂解法提取质粒, 进行 PCR 和 *Nde* I、*Xho* I 双酶切验证。

1.2.2 pET-31b (+)-WUS-His₆融合蛋白的诱导表达及鉴定

经验证正确的质粒 pET-31b(+)-WUS-His 转化至大肠杆菌 BL21(DE3), 涂板后挑取单菌落进行菌落 PCR 验证。将带有正确质粒的菌落接种于 LB 液体培养基(含 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 氨苄青霉素)过夜培养, 再按 1:100 放大培养至 OD_{600} 为 0.6~0.8 时, 加入异丙基- β -D-硫代半乳糖苷(IPTG)诱导 WUS 重组基因的表达。收集菌体, 悬浮于蛋白质上样缓冲液(20 mmol/L Tris-HCl, 0.4% SDS, 5%甘油, 1% β -巯基乙醇, 0.02% 溴酚兰, pH 6.8)中, 煮沸裂解 5 min, 离心(13 000 \times g, 5 min), 取上清进行 15% SDS-PAGE(SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳)检测, Blue Silver 染色^[19]检测重组蛋白的表达。

蛋白鉴定参照 Zhang 等^[20]的方法, 切取目的条带, 经水洗、脱色、脱水、真空干燥后, 用 15 ng/ μL 的胰蛋白酶液消化, 抽真空离心, 干燥肽段提取液。用 2 μL 0.5%三氟乙酸充分溶解沉淀, 用于基质辅助激光解析电离飞行时间质谱(MALDI-TOF-MS)分析。所得肽段用 MASCOT 软件分析, 进行数据搜索、比对。

1.2.3 WUS-His₆融合蛋白的纯化和复性溶解

表达有 WUS-His₆融合蛋白的菌体悬浮于 20 mmol/L PBS(pH 8.0)中, 加入溶菌酶(1 mg/mL)、PMSF(1 mmol/L)作用 30 min 后, 超声波破碎, 离心(4 $^{\circ}\text{C}$, 5000 \times g, 15 min), 取上清再次离心(4 $^{\circ}\text{C}$, 10 000 \times g, 15 min), 参照 Lin 等^[21]的方法收集包涵体, 重悬于洗涤缓冲液(0.02 mol/L Na_2HPO_4 , 0.02 mol/L NaH_2PO_4 , 0.05 mol/L NaCl, 4 mol/L 尿素, pH 7.4)中, 反复洗涤 3 次, 再重悬于裂解缓冲液(0.02 mol/L Na_2HPO_4 , 0.02 mol/L NaH_2PO_4 , 0.05 mol/L NaCl, 8 mol/L 尿素, 40 mmol/L 咪唑, 0.1% β -巯基乙醇, pH 7.4)中, 室温溶解 2 h, 离心(15 000 \times g, 15 min)收集上清, 0.45 μm 膜过滤, 缓慢加入到预先平衡的 Ni Sepharose 6 fast flow 纯化柱上, 分别用 5 倍柱体积的平衡缓冲液、洗脱缓冲液洗脱、收集组分, 15% SDS-PAGE 检测。

合并洗脱组分中含有目的蛋白的样品, 先用含 4 mol/L 尿素的 PBS 缓冲液透析过夜, 然后分别用含 2、1、0.5、0.2 mol/L 尿素的 PBS 缓冲液梯度透析各 2 h, 最后用 PBS 缓冲液透析 4 h。

1.2.4 多克隆抗体的制备

取 1.5 mg 经复性溶解的重组蛋白与 2 mL 弗氏完全佐剂混合, 无菌研钵中充分研磨至乳化完全, 免疫新西兰大白兔。10 d 后加强免疫, 每周 1 次。第 4 次加强免疫后, 直接注射 1 mL 蛋白抗原溶液于左右耳缘静脉, 隔 3 d 注射 1 次, 共 3 次。最后一次注射 5 d 后从耳缘静脉少量取血, 琼脂糖免疫扩散检测抗血清效价。效价合格后, 颈动脉放血, 4 $^{\circ}\text{C}$ 放置过夜, 收集血清, 参照 Page 等^[22]的方法用硫酸铵分级沉淀纯化抗体, 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜透析除盐, 然后加入 50%甘油、0.05%叠氮钠, 分装冻存。以斑点杂交和 Western blotting 对抗体进行检测。

2 结果与分析

2.1 pET-31b (+)-WUS-His₆表达载体构建

为了获得 3'-末端携带 6 个 His 标签的 WUS 融合蛋白基因, 构建 pET-31b(+)-WUS-His₆表达载体, 携来自 pBKB-WUS 质粒的 WUS 基因的 cDNA。以提取的 pET-31b(+)-WUS-His₆质粒为模板做 WUS 基因 PCR 验证和重组质粒 *Nde* I 和 *Xho* I 双酶切验证, 获得条带大小约为 880 bp 左右的片段, 与预期结果一致(图 1), 由图 1 可见 PCR 产物片段大小(图 1A)与质粒经双酶切后切下的片段条带(图 1B)大小一致, 说明表达载体构建成功, 表达质粒结构是正确的。

2.2 WUS-His₆融合蛋白的诱导表达

在 IPTG 诱导下, 带有 pET-31b(+)-WUS-His₆质粒的大肠杆菌 BL21(DE3)菌株, 经蛋白质提取、电泳、染色, 在约 37 kD 处的蛋白表达量显著增加。该蛋白的表达量与诱导和表达条件相关。在诱导温度为 28 $^{\circ}\text{C}$ 条件下, IPTG 的最佳诱导浓度为 0.5 mmol/L(表 1)。

在 0.5 mmol/L IPTG、28 $^{\circ}\text{C}$ 条件下, 大肠杆菌 BL21(DE3)菌株中诱导蛋白质的表达量随诱导时间而增加(图 2A), 在 8 h 后诱导蛋白的表达量增加变

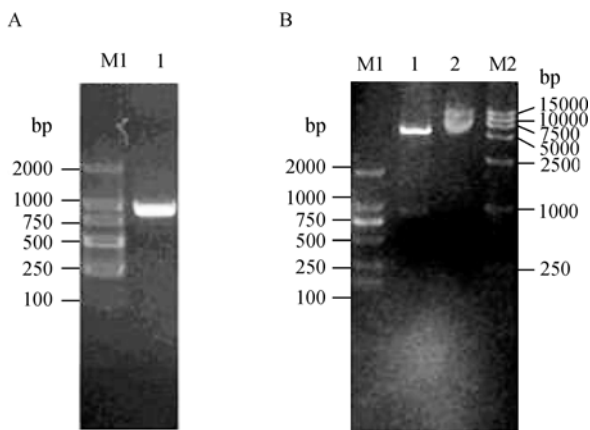


图1 pET-31b(+)-WUS-His₆的PCR和酶切验证

Fig. 1 Identification of plasmid pET-31b(+)-WUS-His₆ by PCR (A) and enzyme digestion (B). (A) PCR verification of plasmid pET-31b(+)-WUS-His₆. M1: DL2000 marker; 1: PCR products of WUS gene. (B) Restriction digestion verification of plasmid pET-31b(+)-WUS-His₆. M1: DL2000 marker; 1: the plasmid pET-31b(+)-WUS-His₆ digested with Nde I and Xho I; 2: plasmid pET-31b(+)-WUS-His₆; M2: DL15000 marker.

缓(图 2B)。因此, 可将 28°C 下 0.5 mmol/L IPTG 诱导 10 h 作为 WUS 重组质粒表达的优选条件。

切取目标条带, 酶解肽段后进行 MALDI-TOF-MS, 结合 MASCOT 软件分析, 搜索匹配结果见图 3, 确定优化诱导表达的蛋白为拟南芥 WUSCHEL 蛋白。

2.3 WUS 蛋白的纯化

以上述优化诱导条件实现 WUS 蛋白的大量表

表 1 不同 IPTG 浓度对 WUS-His₆融合蛋白表达量的影响
Table 1 Expression of WUS-His₆ fusion protein induced with different IPTG concentrations

IPTG concentration (mmol/L)	Percentage of the recombinant protein in host strain (%)
0.1	31.5
0.3	36.9
0.5	40.0
0.8	37.3
1.0	34.6
1.5	36.7
2.0	32.8

达, 收集菌体, 超声波破碎后差速离心(4°C, 5000~10 000 × g, 15 min), 分别取上清和洗涤后的沉淀, 电泳检测上清和沉淀蛋白, 发现目的蛋白在低速离心后的沉淀中(图 4), 证实 WUS 蛋白在大肠杆菌中主要为包涵体表达形式。

包涵体经洗涤、溶解后即可得到纯度较高的目的蛋白^[23]。因此, 将低速离心收集到的包涵体组分重悬于洗涤缓冲液中洗涤, 以除去细胞碎片其他杂质蛋白, 再将其重悬于裂解缓冲液中, 溶解变性后过镍柱纯化, 得到纯度较高的目的蛋白, 含量在 96%以上(图 5)。纯化的蛋白透析 24 h 后定量, 含量为 1.5 mg/mL。

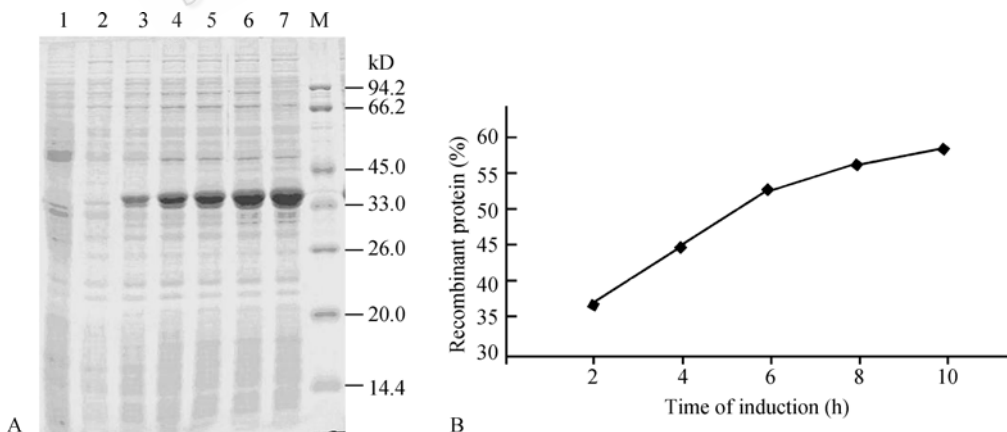


图 2 重组表达载体 pET-31b(+)-WUS-His₆在 *E. coli* BL21(DE3)中的表达

Fig.2 Expression of recombinant expression vector pET-31b(+)-WUS-His₆ in *E. coli* BL21(DE3). (A) 1: *E. coli* BL21/ pET-31b (+) vector control; 2: *E. coli* BL21/ pET-31b (+)-WUS culture without IPTG induction; 3-7: *E. coli* BL21/ pET-31b (+)-WUS culture induced with IPTG for 2, 4, 6, 8 and 10 h, respectively; M: protein molecular weight markers. (B) Percentage of the recombinant protein in host strain.

Mascot search results**A Protein view:**

Match to: gi|4090200 Score: 67 Expect: 0.012. WUSCHEL protein [*Arabidopsis thaliana*]

Nominal mass (M_r): 33041; Calculated pI value: 7.82

NCBI BLAST search of gi|4090200 against nr

Cleavage by Trypsin: cuts C-term side of KR unless next residue is P

Number of mass values searched: 28

Number of mass values matched: 6

Sequence Coverage: 20%

1 MEPPQHQQHHH HQADQESGNN NNKSGSGGYT CRQTSTRWTP TTEQIKILKE

51 LYNNNAIRSP TADQIQKITA RLRQFGKIEG KNVFYWFQNH KARERQKKRF

101 NGTNMTTPSS SPNSVMMMAAN DHYHPLLHHH HGVPMQRPAN SVNVKLNQDH

151 HLYHHNKYPY SFNNGNLNHA SSGTECGVVN ASNGYMSSHV YGSMEQDCSM

201 NYNNVGGGWA NMDHHYSSAP YNFFDRAKPL FGLEGHQDEE ECGGDAYLEH

251 RRTLPLFPMH GEDHINGGSG AIWKYQSEV RPCASLELRL N

B Probability based mowse score:

*Top score: 67 for gi|4090200, WUSCHEL protein [*Arabidopsis thaliana*]

*Protein score is $-10 \cdot \log(P)$, where P is the probability that the observed match is a random event.

*Protein scores greater than 60 are significant ($P < 0.05$).

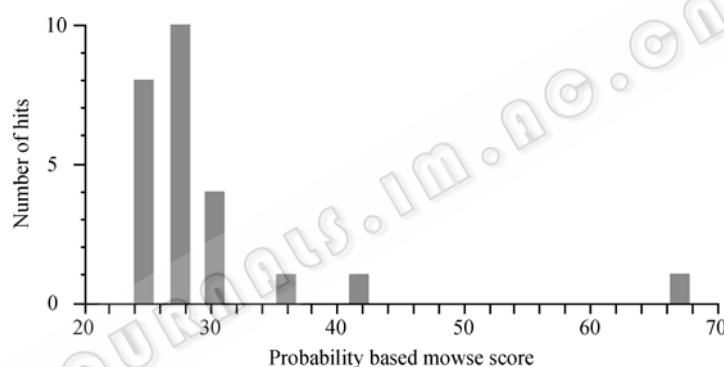


图 3 MALDI-TOF-MS 鉴定 pET-31b (+)-WUS-His₆ 菌株表达产物

Fig. 3 MALDI-TOF-MS identification of expressed pET-31b (+)-WUS-His₆ host strain. (A) The matched peptides from the trypsin digested protein band by Mascot search. (B) The map protein scores is 67 for gi 4090200, WUSCHEL protein.

2.4 抗血清灵敏性和特异性检测

2.4.1 琼脂糖免疫扩散

用纯化得到的 WUS 蛋白免疫新西兰大白兔, 经耳缘静脉少量采血, 4°C 过夜, 获得析出血清, 以琼脂糖免疫扩散法测定抗血清效价。以 0.05 μg/μL WUS 蛋白为中心孔抗原, 周围孔分别为不同稀释倍数的兔血清, 湿盒中室温扩散 24 h 以上, 生理盐水漂洗 24 h, 0.5%氨基黑染色 2 min, 脱色至背景清亮。结果如图 6, 证明所制备的抗血清效价合格, 达 1:16 以上。沉淀线为单一、不同孔可融合的弧线, 表明抗体具有很好的抗原特异性。

2.4.2 免疫斑点杂交与 Western blotting

将纯化的 WUS-His₆ 融合蛋白系列稀释为 0.1、0.01、0.001、0.0001 μg/μL, 分别取 1 μL 点到 NC 膜上, 60°C 烘烤 1 h, 5%脱脂奶粉(用 TBST 溶液配制) 4°C 封闭过夜, 依次用一抗(用封闭液稀释 1000 倍)和二抗(用封闭液稀释 1000 倍)孵育后显色。结果表明, 所制备的多克隆抗体灵敏性高, 1000 倍稀释后仍可检测出 1 ng 抗原蛋白(图 7)。

诱导表达 WUS 蛋白的大肠杆菌菌液和纯化的 WUS 蛋白经 15% SDS-PAGE 后, 转移到 NC 膜上。5%脱脂奶粉(用 TBST 溶液配制)4°C 封闭过夜, 一抗

(1 : 1000, 用封闭液稀释) 孵育 1 h, TBST 漂洗, 二抗 (1 : 1000, 用封闭液稀释) 孵育, TBST 漂洗后显色。结果如图 8, 抗血清能够与约 37 kD 处的 WUS 蛋白特异结合, 证明所制备的多克隆抗体具有较好的特异性, 可与免疫原特异结合。

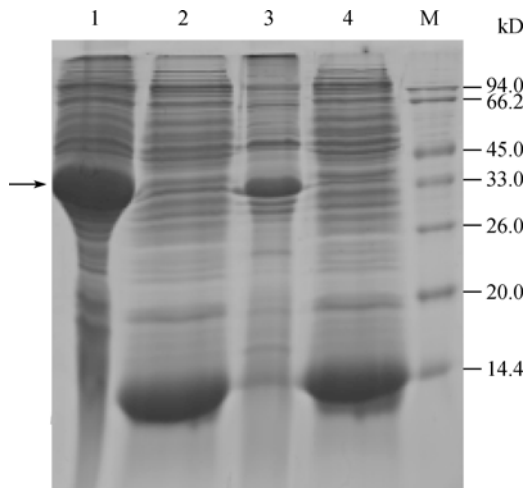


图 4 WUS-His₆重组蛋白的 SDS-PAGE 检测
 Fig. 4 SDS-PAGE analysis of the recombinant WUS-His₆ protein. 1, 2: the sediment and soluble protein extracts after centrifuging at 5000 × g for 15 min, respectively; 3, 4: the sediment and soluble protein extracts after centrifuging at 10 000 × g of the soluble fraction after 5000 × g, respectively. Arrow indicates the WUS-His₆ recombinant protein.

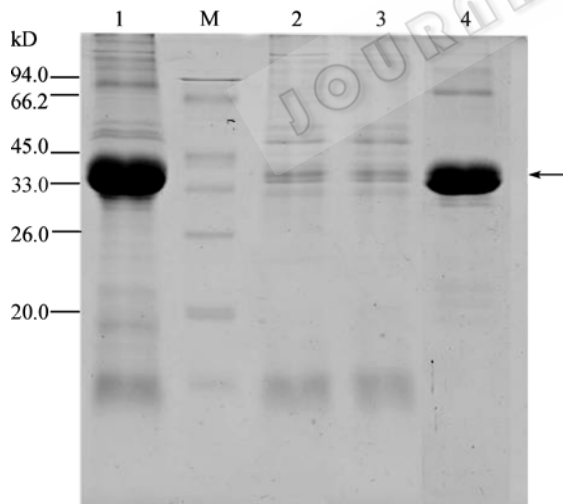


图 5 经 Ni Sepharose 6 fast flow 纯化后 WUS-His₆重组蛋白的 SDS-PAGE 检测
 Fig. 5 SDS-PAGE analysis of purified recombinant WUS-His₆ protein. 1: sample before adding to the Ni Sepharose 6 fast flow column; 2: the flow-through fraction; 3: the non-specific combined fraction eluted by binding buffer; 4: WUS-His₆ recombinant protein eluted by elution buffer; M: protein marker. Arrow indicates the recombinant WUS-His₆ protein.

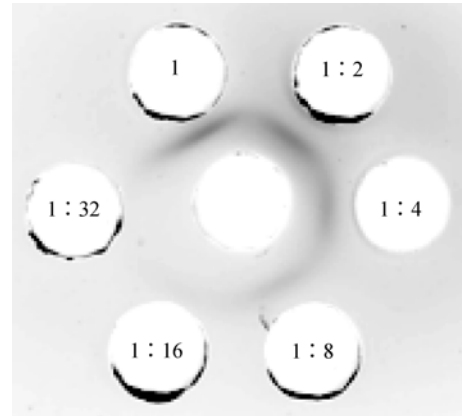


图 6 琼脂糖免疫扩散检测抗血清效价
 Fig. 6 Detecting the antibody titer by agarose immunodiffusion testing. 1: the rabbit serum without dilution; 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32 represent the serial two-fold dilution of the rabbit serum, respectively.

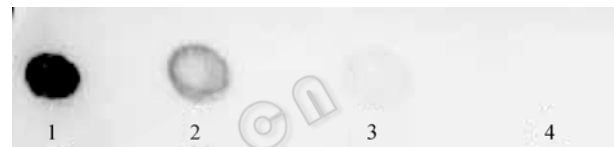


图 7 免疫斑点杂交检测抗体灵敏度
 Fig. 7 Detecting the antibody sensitivity by dot blot. 1, 2, 3, 4: 0.1, 0.01, 0.001, 0.0001 μg purified WUS-His₆ fusion protein, respectively.

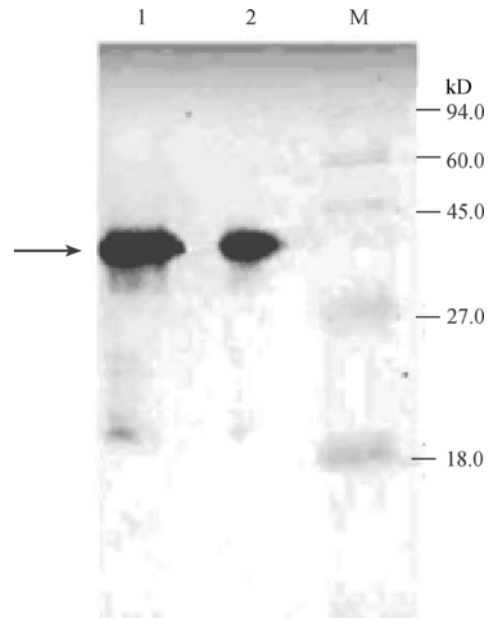


图 8 Western blotting 验证抗体特异性
 Fig. 8 Detecting the antibody specificity by Western blotting. 1: total protein extracts of *E. coli* BL21/ pET-31b (+)-WUS-His₆ culture induced with IPTG; 2: the purified WUS-His₆ protein; M: prestained protein markers. Arrow indicates the detected WUS-His₆ recombinant protein.

3 讨论

通过原核表达获得大量的抗原蛋白, 可用于特异性抗体制备、蛋白质性质与功能、蛋白质的相互作用和多种生化功能研究^[24]。将 WUS 基因克隆到 pET 原核表达载体上, 其表达受噬菌体 T7 强转录及翻译信号控制, 以 0.5 mmol/L IPTG 诱导可实现融合蛋白的表达, 诱导 2 h 后表达量达到菌体总蛋白的 30% 以上, 8 h 即可接近饱和的最高表达量, 表明该体系可以实现 WUS 融合蛋白的高效表达。

为了实现重组蛋白的可溶性表达, 通常是降低诱导物浓度和诱导温度, 以及利用分子伴侣共表达等方式^[21,25]。本研究将 IPTG 浓度降低到 0.1 mmol/L, 采用 20°C 低温诱导等手段, 但均没有达到理想效果。另外, 在包涵体洗涤和溶解的实验中发现, 能够溶解大多数包涵体蛋白的 8 mol/L 尿素的条件, 对含 WUS 蛋白的包涵体作用甚微, 而只有同时加入浓度大于 0.05% 的 β -巯基乙醇才将其彻底溶解。因此判断, 在原核表达中, WUS 容易形成包涵体, 一方面是由于表达效率高, 难以正确折叠而导致蛋白质聚集^[23]; 另一方面 WUS 蛋白中所包含的 5 个半胱氨酸残基除了形成蛋白质内的二硫键外, 单数的半胱氨酸残基很容易形成蛋白质间的二硫键, 从而促进了聚集态包涵体的形成。

带有 6 个 His 标签的融合蛋白通过金属螯合色谱能够达到很好的纯化效果, 是目前常用的亲和纯化方法^[21,23]。通过该亲和层析方法, 纯化得到高纯度的融合蛋白, 并制备出 WUS 蛋白的特异性多克隆抗体, 对进一步研究 WUS 蛋白在植物不同生长发育期中的表达模式, 及 WUS 转基因植株乃至 *wus* 突变体的研究都具有重要意义, 可进行直接的蛋白质组织学与细胞学定位和定量分析检测。

REFERENCES

- [1] Mayer K, Schoof H, Haecker A, *et al.* Role of WUSCHEL in regulating stem cell fate in the *Arabidopsis* shoot meristem. *Cell*, 1998, **95**: 805–815.
- [2] Haecker A, Groß-Hardt R, Geiges B, *et al.* Expression dynamics of *WOX* genes mark cell fate decisions during early embryonic patterning in *Arabidopsis thaliana*. *Development*, 2004, **131**(3): 657–668.
- [3] Schoof H, Lenhard M, Haecker A, *et al.* The stem cell population of *Arabidopsis* shoot meristems is maintained by a regulatory loop between the *CLAVATA* and *WUSCHEL* genes. *Cell*, 2000, **100**(6): 635–644.
- [4] Brand U, Fletcher J, Hobe M, *et al.* Dependence of stem cell fate in *Arabidopsis* on a feedback loop regulated by CLV3 activity. *Science*, 2000, **289**: 617–619.
- [5] Müller R, Borghi L, Kwiatkowska D, *et al.* Dynamic and compensatory responses of *Arabidopsis* shoot and floral meristems to CLV3 signaling. *Plant Cell*, 2006, **18**(5): 1188–1198.
- [6] Zhao Y, Medrano L, Ohashi K, *et al.* HANABA TARANU is a GATA transcription factor that regulates shoot apical meristem and flower development in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 2004, **16**(10): 2586–2600.
- [7] Carles C, Choffnes-Inada D, Reville K, *et al.* ULTRAPETALA1 encodes a SAND domain putative transcriptional regulator that controls shoot and floral meristem activity in *Arabidopsis*. *Development*, 2005, **132**: 897–911.
- [8] Wu X, Dabi T, Weigel D. Requirement of homeobox gene STIMPY/WOX9 for *Arabidopsis* meristem growth and maintenance. *Curr Biol*, 2005, **15**(5): 436–440.
- [9] Lenhard M, Bohnert A, Jürgens G, *et al.* Termination of stem cell maintenance in *Arabidopsis* floral meristems by interactions between WUSCHEL and AGAMOUS. *Cell*, 2001, **105**: 805–814.
- [10] Lohmann J, Hong R, Hobe M, *et al.* A molecular link between stem cell regulation and floral patterning in *Arabidopsis*. *Cell*, 2001, **105**: 793–803.
- [11] Han P, Li Q, Zhu Y. Mutation of *Arabidopsis* BARD1 causes meristem defects by failing to confine WUSCHEL expression to the organizing center. *Plant Cell*, 2008, **20**(6): 1482–1493.
- [12] Green K, Prigge M, Katzman R, *et al.* CORONA, a member of the class III homeodomain leucine zipper gene family in *Arabidopsis*, regulates stem cell specification and organogenesis. *Plant Cell*, 2005, **17**(3): 691–704.
- [13] Bowman J, Baum S, Eshed Y. Establishment of polarity in angiosperm lateral organs. *Trends Genet*, 2002, **18**(3): 134–141.
- [14] Prigge M, Otsuga D, Alonso J, *et al.* Class III homeodomain-leucine zipper gene family members have overlapping, antagonistic, and distinct roles in *Arabidopsis* development. *Plant Cell*, 2005, **17**: 61–76.
- [15] Xu YY, Chong K. Progress in research on plant stem cell organizer gene WUSCHEL. *J Plant Physiol Mol Biol*, 2005, **31**(5): 461–468.
徐云远, 种康. 植物干细胞决定基因 WUS 的研究进展. *植物生理与分子生物学学报*, 2005, **31**: 461–468.
- [16] Gallois J, Nora F, Mizukami Y, *et al.* WUSCHEL induces shoot stem cell activity and developmental plasticity in the

- root meristem. *Gene Dev*, 2004, **18**: 375-380.
- [17] Li J, Xu Y, Chong K. Analysis of transgenic tobacco with overexpression of the *Arabidopsis WUSCHEL* gene. *Acta Bot Sin*, 2004, **46**: 224-229.
- [18] Zuo J, Niu Q, Frugis G, *et al.* The *WUSCHEL* gene promotes vegetative-to-embryonic transition in *Arabidopsis*. *Plant J*, 2002, **30**(3): 349-359.
- [19] Candiano G, Bruschi M, Musante L, *et al.* Blue silver: a very sensitive colloidal Coomassie G-250 staining for proteome analysis. *Electrophoresis*, 2004, **25**(9): 1327-1333.
- [20] Zhang J, Ma H, Feng J, *et al.* Grape berry plasma membrane proteome analysis and its differential expression during ripening. *J Exp Bot*, 2008, **59**(11): 2979-2990.
- [21] Lin G, Lian Y, Ryu J, *et al.* Expression and purification of His-tagged flavonol synthase of *Camellia sinensis* from *Escherichia coli*. *Protein Expres Purif*, 2007, **55**(2): 287-292.
- [22] Page M, Thorpe R. Purification of IgG by precipitation with sodium sulfate or ammonium sulfate // Walker JM ed. *The Protein Protocols Handbook*. 2nd ed. New Jersey: Humana Press, 2002: 983-984.
- [23] Wang Z, Ma HQ, Zhang W, *et al.* The progress of inclusion body isolation and chromatographic refolding, purification methods. *China Biotechnol*, 2009, **29**(7): 102-107.
- 王增, 马会勤, 张文, 等. 包涵体蛋白的分离和色谱法体外复性纯化研究进展. *中国生物工程杂志*, 2009, **29**(7): 102-107.
- [24] Zhang P, Xing WJ, Bao XH, *et al.* Cloning and prokaryotic expression of rat RVLG and preparation of mouse anti-RVLG polyclonal antibody. *Chin J Biotech*, 2008, **24**(11): 1981-1987.
- 张平, 邢万金, 包晓红, 等. 大鼠 RVLG cDNA 的克隆、原核表达和小鼠抗 RVLG 蛋白多克隆抗体的制备. *生物工程学报*, 2008, **24**(11): 1981-1987.
- [25] Swietnicki W. Folding aggregated proteins into functionally active forms. *Curr Opin Biotechnol*, 2006, **17**(4): 367-372.

科学出版社科学出版中心生命科学分社新书推介

乳酸菌与乳品发酵剂

孟祥晨 杜鹏 李艾黎 等编著

978-7-03-025192-3 ¥ 78.00 2009年8月出版

内容简介

乳酸菌是广泛应用于食品、医药和饲料等行业的一类重要工业微生物，它可以作为细胞工厂生产某些有价值的产物或产品，亦是开发生物质能源的重要菌种。乳品发酵剂是乳酸菌在乳制品中成功应用的一个实例，是生产优良发酵乳制品的关键。本书首先围绕乳酸菌的遗传、代谢和应用等方面分别阐述了组成乳酸菌的主要菌属，乳酸菌的代谢、遗传、噬菌体，以及乳酸菌的有益作用，还总结了乳酸菌的安全性以及相关的法规规定。其次，阐述了乳品发酵剂的历史、分类和生产，着重介绍了发酵剂在酸奶生产和干酪成熟中的作用，以及乳酸菌在非乳食品中的应用。最后，作者根据国内外的研发状况，论述了乳酸菌的基础研究趋势和应用前景。

本书可供从事乳品科学、微生物等领域研究的科研技术人员参考，也可作为相关学科的研究生教材。

欢迎各界人士邮购科学出版社各类图书(免邮费)

邮购地址：北京东黄城根北街16号 科学出版社 科学出版中心 生命科学分社 邮编：100717

联系人：周文宇 联系电话：010-64031535

更多精彩图书请登陆网站 <http://www.lifescience.com.cn>, 欢迎致电索要书目

