

DOI: 10.13652/j.issn.1003-5788.2020.05.003

β -伴大豆球蛋白 α -亚基核心区的 基因克隆、表达及纯化

Cloning, expression and purification of β -conglycin in α -subunit core region

李珪熹 袁艳秋 巨倩 高梦楠

LI Yao-xi YUAN Yan-qiu JU Qian GAO Meng-nan

周树义 胡亚云 栾广忠

ZHOU Shu-yi HU Ya-yun LUAN Guang-zhong

(西北农林科技大学食品学院, 陕西 杨凌 712100)

(College of Food Science & Engineering, Northwest A & F University, Yangling, Shannxi 712100, China)

摘要:利用 RT-PCR 技术获得了齐黄 34 大豆种子的全长 cDNA, 采用自行设计的引物对目的基因 α_c 进行扩增, 并将目的基因与载体连接, 构建了重组克隆载体 pGEM- α_c 。重组克隆载体经 Xho I/EcoR I 双限制酶酶切鉴定后, 与载体 pET-28a 连接构建重组质粒 pET-28a- α_c , 经菌落 PCR、双限制酶酶切及测序判定准确, 将其转入到感受态细胞 *E. coli* BL21(DE3) 中, 当诱导温度为 37 °C、菌液 $OD_{600\text{ nm}}$ 值为 0.8、诱导剂 (IPTG) 浓度为 0.2 mmol/L, 诱导时间为 9 h 时, 重组 α -亚基核心区蛋白分子质量为 50 kU; 工程菌 pET-28a- α_c -BL21 经超声破裂、低温离心后, 上清液利用镍离子亲和层析色谱柱经 AKTA 蛋白纯化系统纯化可以获得较高纯度的目的蛋白。

关键词: β -伴大豆球蛋白; α -亚基; 重组蛋白; 克隆; 分离纯化

Abstract: The full-length cDNA of the soybean seeds was obtained by RT-PCR, and amplified by self-designed primers to obtain the target gene α_c . The target gene was linked to the vector to construct a recombinant cloning vector pGEM- α_c , which was identified by double digestion with Xho I/EcoR I and ligated with vector pET-28a to construct a recombinant plasmid pET-28a- α_c . After correctly transferred into competent cells *E. coli* BL21 (DE3), the recombinant protein of α -subunit core region was expressed by inducing with the $OD_{600\text{ nm}}$ value 0.8, iso-

propylthiogalactoside (IPTG) 0.2 mmol/L at 37 °C for 9 h, and the molecular weight of the protein was about 50 kV. The cell of engineering bacteria pET-28a- α_c -BL21 was ultrasonically broken and centrifuged at low temperature. Target protein in the supernatant was purified with AKTA protein purification system using nickel ion affinity chromatography column.

Keywords: β -conglycin; α -subunit; recombinant protein; cloning; isolation and purification

大豆贮藏蛋白的主要成分为 β -Conglycin(7S 大豆球蛋白), 是一种由 α' 、 α 、 β 3 种不同亚基构成的三聚体^[1-2], 占大豆蛋白的 30%, 其对大豆蛋白的结构功能特性影响显著。研究^[3-5]表明, α' 及 α 亚基的结构可分为核心区 (core region) 和延展区 (extension region), 且均含有两个 *N*-连接糖基; β -亚基则不具备延展区, 只有一个 *N*-连接糖基。Maruyama 等^[6-7] 研究发现, 在 *N*-连接糖基及延展区缺失后, 原核宿主的核心区仍能自组装成三聚体。阻碍 7S 大豆球蛋白凝集的原因可能在于其糖基具有较强的亲水性^[8-9], 因此提高 7S 大豆球蛋白的凝胶能力的关键或许在于去除糖基。目前, 重组蛋白纯化领域中起重要作用的是亲和标签, 其中最普遍使用的是 His 标签。许妍妍等^[10-11] 采用基因克隆技术、基因重组技术以及蛋白分离纯化技术成功制备了缺失 *N*-连接糖基的重组 α' -亚基。试验拟选取品种为齐黄 34 的大豆种子提取大豆总 RNA, 使用大肠杆菌作为原核宿主对 β -伴大豆球蛋白的 α -亚基核心区进行克隆与表达, 并利用 AKTA 蛋白纯化系统通过镍离子亲和层析柱对其进一步纯化, 为后期重组大豆蛋白分散体系的构建提供依据。

基金项目: 陕西省重点研发计划 (编号: 2018NY-122)

作者简介: 李珪熹, 女, 西北农林科技大学在读硕士研究生。

通信作者: 栾广忠 (1968—), 男, 西北农林科技大学副教授, 博士。

E-mail: qlgz@nwsuaf.edu.cn

收稿日期: 2020-04-21

1 材料与amp;方法

1.1 原料、载体与菌种

大豆:齐黄 34,山东省农科院;

感受态细胞 *E.coli* DH 5 α 、*E.coli* BL21(DE3)、质粒 pET-28a;西安热默尔生物科技有限公司;

质粒 pGEM-T Easy;普洛麦格(北京)生物技术有限公司。

1.2 试剂与仪器

MiniBEST Plant RNA Extraction Kit、PrimeScript™ II 1st Strand cDNA Synthesis Kit、DNA 纯化试剂盒、质粒提取试剂盒、蛋白质分子量 Marker (3597Q)、rTaq DNA 聚合酶、DL 2000 DNA Marker、DL 5000 DNA Marker、Quick Cut 限制性内切酶 EcoR I、Xho I;宝生物工程(大连)有限公司;

T4-DNA 连接酶:普洛麦格(北京)生物技术有限公司;

琼脂粉、 β -巯基乙醇、异丙基硫代- β -D-半乳糖苷(IPTG)、丙烯酰胺、十二烷基硫酸钠(SDS);北京索莱宝有限公司;

其余试剂为国产分析纯;

PCR 扩增仪:Hema 9700 型,珠海黑马医学仪器有限公司;

微量紫外—可见分光光度计:NanoPro 2010 型,北京鼎昊源科技有限公司;

冷冻离心机:Neofuge 15R 型,上海力申科学仪器有限公司;

通风橱:CAV1000 型,肯尼亚 F&S Scientific 公司;

超声波细胞破碎仪:VC130 型,美国 Sonics & Materials 公司;

蛋白纯化系统:ClearFirst-3000 型,上海闪谱生物科技有限公司。

1.3 试验方法

1.3.1 引物的设计与合成 在 NCBI(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)中查找 7S 大豆球蛋白 α -亚基的基因序列,GB 编号为 NM_001249927.2 (Glycine max beta-conglycinin alpha-subunit [CG-3], mRNA),依据编码核心区基因序列设计一对特异性引物,即上游引物 F1:5'-CCGACGACGACGACAAGGATTCTGAGTTACGAAGA-3',下游引物 R1:5'-CCGCTCGAGTTCAGTAAAAGCCC-3'。考虑到蛋白纯化后 N-端标签的处理,设计上游引物时引入了肠激酶酶切位点(加粗部分)及其保护碱基;为方便后续克隆,在下游引物中引入了内切酶 Xho I 酶切位点(加粗部分)、终止密码子(斜体部分)及相应的保护碱基,理论上扩增所得的基因片段大小为 1 300 bp 左右,引物合成由宝生物工程(大连)有限公司

完成。

1.3.2 目的基因的扩增 将齐黄 34 大豆种子使用液氮研磨成粉末,取 300 mg 冻干粉提取总 RNA,而后以此为模板运用试剂盒自带的 Random 6 mers 构建 cDNA 单链。具体操作步骤:42 °C 逆转录 1 h,70 °C 保温 15 min,4 °C 恒温保存。以 cDNA 单链为模板利用自行设计的引物 F1/R1 对目的基因 α_c 进行扩增,选用 10 mg/mL 的琼脂糖凝胶电泳对目的基因进行检测并回收,PCR 反应体系参考 Maruyama 等^[6]的方法修改如下:PrimeSTAR Max Premix (2 \times) 25 μ L, F1 (20 μ mol/L) 0.5 μ L, R1 (20 μ mol/L) 0.5 μ L, 反转录反应液 4 μ L, 无菌纯水补加至 50 μ L。PCR 反应条件为 98 °C 变性 10 s, 66 °C 退火 5 s, 72 °C 延伸 30 s, 35 个循环,最后 72 °C 延伸 7 min。

1.3.3 重组克隆载体的构建、筛选及鉴定 参照许妍妍等^[10-11]的方法并修改。通过 T4-DNA 连接酶将目的基因片段 α_c 与选用的克隆载体 pGEM-T Easy 相连接,将连接体系于 16 °C 反应 1 h, 导入感受态细胞 *E.coli* DH 5 α 中。在含有氨苄青霉素的 LB 固体培养基中随机挑取 4~5 个独立的白色菌落用于菌落 PCR 筛选。菌落 PCR 反应体系:聚合酶 rTaq mix 26 μ L, 单克隆菌株菌液 2 μ L, F1/M47 (20 μ mol/L) 2 μ L, F2/M48 (20 μ mol/L) 2 μ L, 添加去离子水至 50 μ L。使用氨苄青霉素浓度为 100 μ g/mL 的液体 LB 培养基对筛选出的阳性克隆菌株进行培养 14 h, 提取质粒, 选用 10 mg/mL 的琼脂糖凝胶电泳及 Xho I /EcoR I 双酶切对所提质粒进行鉴定。首先通过 Xho I 内切酶酶切重组质粒 5 min, 再加入 EcoR I 内切酶继续酶切 15 min。将鉴定结果与预期相符的质粒进行外送测序(由西安热默尔生物科技有限公司完成), 将测序结果与 NCBI 的 α -亚基核心区的基因编码区进行序列比对^[12], 将测序符合预期的构建成功的重组克隆载体命名为 pGEM- α_c , 将阳性克隆菌株于 37 °C 进行增菌培养后, 于 -80 °C 保存菌种。

1.3.4 重组表达载体的构建、筛选及鉴定 使用限制性内切酶 Xho I /EcoR I 对重组克隆载体 pGEM- α_c 和选用的表达载体 pET-28a 进行双酶切, 酶切反应体系:待酶切载体 10 μ L, 内切酶 Xho I /EcoR I 各 1 μ L, 10 \times Quick Cut Green Buffer 缓冲液 5 μ L, 添加去离子水至 50 μ L。将二者的双酶切体系于 37 °C 反应 15 min 后回收产物, 通过 10 mg/mL 的琼脂糖凝胶电泳对产物进行鉴定并回收具有双黏性末端的目的片段。

将上述两种目的片段回收后, 在 T4-DNA 连接酶作用下于 16 °C 连接 1 h, 连接体系 (20 μ L): pGEM- α_c 双酶切产物 5 μ L, pET-28a 双酶切产物 10 μ L, 50% PEG 2 μ L, T4-DNA 连接酶 1 μ L, T4-DNA 连接酶 10 \times Buffer 2 μ L。将连接成功的产物导入到感受态细胞 *E.coli* BL21(DE3) 中, 选用卡那霉素浓度为 50 μ g/mL 的固体 LB 培养基对转化菌

液进行培养,同时设置阳性与空白对照,37℃培养14h。随机挑取若干独立的单克隆菌落,利用特异性上游引物F1和通用下游引物T7_{er}对其进行菌落PCR筛选。将筛选出的阳性菌株接种于卡那霉素浓度为50μg/mL的液体LB培养基中培养14h,提取质粒,使用10mg/mL琼脂糖凝胶电泳及Xho I/EcoR I单、双内切酶酶切对质粒进行鉴定,将鉴定结果与预期相符的质粒外送测序。以pET-28a-α_c为测序结果正确的重组表达载体,以pET-28a-α_c-BL21为阳性菌株,挑选单菌落的阳性菌株于37℃下进行增菌培养,菌种置于-80℃保存^[13-14]。

1.3.5 重组蛋白的提取 将pET-28a-α_c-BL21的菌液培养6h,以体积分数为1%的接种量接种至含有卡那霉素50μg/mL的液体LB培养基中,继续培养至菌液浓度OD_{600nm}值为0.8时,加入0.2mmol/L的诱导剂IPTG进行诱导表达,于37℃持续培养9h,取1mL诱导菌液用于SDS-PAGE电泳检测(分离胶体积分数12%,浓缩胶体积分数5%),通过Quantity One软件分析目的蛋白表达量^[15-17]。其余菌液于4℃,5000r/min离心15min,收集菌体,使用磷酸盐缓冲液PBS(25mmol/L磷酸钠缓冲液,500mmol/L NaCl,1mmol/L EDTA,1mmol/L PMSF,0.02% NaN₃,pH 7.4)对菌体重悬后通过冰浴超声破碎菌体^[8],超声条件:振幅25,6s/4s,30min。超声4~5个循环后取出,取1mL全菌液用于后续SDS-PAGE分析,其余破碎菌体于4℃,8500r/min离心45min,收集上清液即为目的蛋白α-亚基核心区的粗蛋白液,于4℃保存,将收集的全菌液、上清液和沉淀进行SDS-PAGE分析^[18-19]。

1.3.6 重组蛋白α-亚基核心区的纯化 使用AKTA蛋白纯化系统对重组α-亚基核心区的粗蛋白液进行纯化,将制备好的100mL粗蛋白溶液通过孔径为0.45μm的水性滤膜过滤后,于4℃储藏,使用自动上样泵上样到预先用磷酸盐缓冲液平衡好的His Trap HP预装柱上,先使用5~10倍柱体积的磷酸盐缓冲液洗脱未与镍离子柱结合的杂蛋白,于280nm下检测并收集各蛋白峰直至峰值达到基线,使用20%,50%,80%,100%的含有500mmol/L咪唑的磷酸盐缓冲液对样品进行洗脱并收集对应的蛋白峰。将收集到的所有蛋白峰通过SDS-PAGE电泳进行分析鉴定^[20-22]。

1.3.7 数据处理 使用NCBI官网的Blast(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)功能对测序结果进行对比分析;使用UniProt官网(<http://www.uniprot.org/blast/>)查找7S大豆球蛋白α-亚基核心区的氨基酸序列并使用Blast功能进行比对;使用DNA MAN软件分析重组表达载体的碱基序列及编码氨基酸;使用软件Snap Gene分析重组表达载体的测序结果;使用软件Quantity One分析目的蛋白α-亚基核心区的表达量;使用Image Lab分析核酸电泳凝胶图。

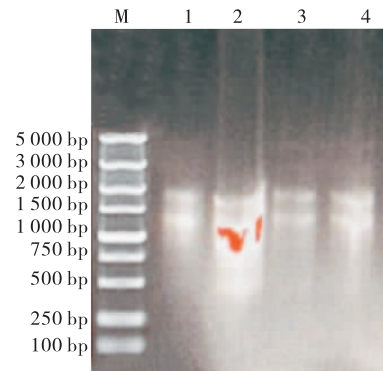
2 结果与分析

2.1 大豆总RNA的提取

由图1可知,1、3泳道的两个条带较为清晰,分别为28S和18S,证明提取的RNA并未被大量降解;而2、4泳道中的两个条带稍显模糊,尤其是2泳道中的条带弥散比较明显,说明所提取的RNA可能存在大部分被降解的情况,因此使用超微量紫外—可见光分光光度计进行进一步测定。1~4泳道的RNA样品浓度分别为96.65,35.22,85.94,53.95ng/μL,各样品的A_{260nm}/A_{280nm}分别为2.04,1.75,1.97,1.95。综上,2、4泳道中提取的RNA样品质量不高,因此选取1、3泳道提取的大豆总RNA用于后续的RT-PCR试验。

2.2 目的基因的扩增

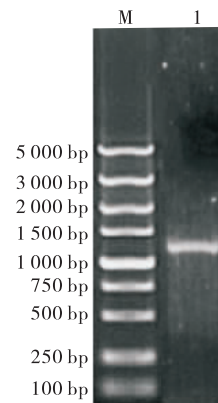
由图2可知,所得基因片段位置为1000~1500bp,长度约为1300bp,与α-亚基核心区基因的理论值(1265bp)一致,证明α-亚基核心区基因片段扩增成功。



M. DL 5000 DNA Maker 1~4. 大豆总RNA

图1 大豆总RNA提取电泳图

Figure 1 Soybean total RNA extraction electropherogram



M. DL 5000 DNA Maker 1. α-亚基核心区基因片段

图2 目的基因片段α-亚基核心区的扩增结果

Figure 2 Amplification of target gene α-subunit core region by RT-PCR

2.3 重组克隆载体的构建、筛选及鉴定

由图 3 可知,采用自行设计的特异性引物 F1/R1 对随机选取的 5 个菌株扩增得到的片段长度均为 1 300 bp 左右,与目的基因的理论值相一致;而使用通用引物 M47/M48 扩增得到的片段长度为 2 000 bp 左右,是因为特异性引物与通用引物的位点中间有一定的片段大小,因此该结果也与理论值相符。理论上而言,重组克隆载体经单酶切后应形成清晰而单一的条带,但 pGEM- α_c 经 EcoR I 单酶切后形成两个清晰条带,其大小分别与克隆载体和目的基因的理论值相符,是因为选用的克隆载体 pGEM-T Easy 上带有 EcoR I 酶切位点;重组克隆载体经 Xho I 单酶切后能形成单一条带,证实重组克隆载体构建成功;而经双酶切后重组克隆载体被切成两个较为清晰的条带,且大小分别为 3 000 bp 与 1 300 bp 左右,与载体 pGEM-T Easy(3 015 bp)和目的基因 α -亚基核心区的

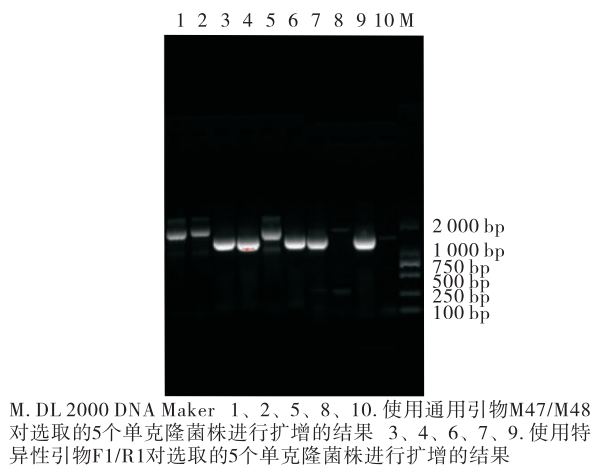
理论值(1 265 bp)相符。

2.4 重组表达载体的构建、筛选及鉴定

由图 4 可知,4、5、6、12 泳道扩增所得产物条带大小为 1 000~2 000 bp,约为 1 300 bp,与目的基因理论长度相符,而其余泳道未出现目的条带,可能是因为挑选的菌落为假阳性。考虑到条带的清晰度、弥散程度和亮度,选用 4、12 泳道进行后续试验。pET-28a- α_c 被限制性核酸内切酶 Xho I、EcoR I 分别单酶切后均可得到与理论值大小相符的单一条带;而被限制性核酸内切酶 Xho I、EcoR I 双酶切后则得到两个条带,片段大小分别为 1 300、5 000 bp 左右,与 α -亚基核心区(1 265 bp)和载体 pET-28a(5 369 bp)的大小相符。通过测序比对可知,该序列与 UniProt 中编号为 P0D015 的氨基酸序列相似度达到 100%,未出现碱基移码和错配的现象,证明重组表达载体构建成功。

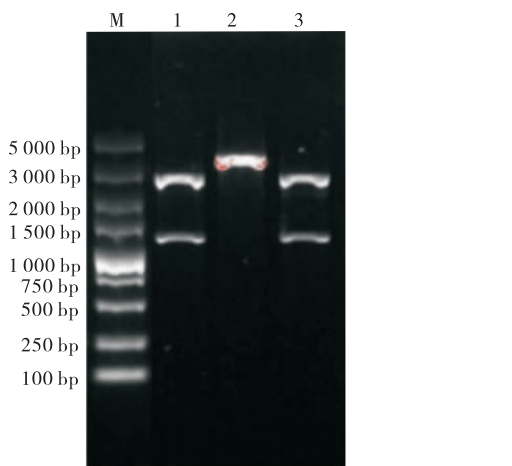
2.5 重组蛋白的存在形式

由图 5 可知,未添加诱导剂的工程菌 pET-28a- α_c -BL21 经超声破碎后,其全菌液、上清液和沉淀中(1~3 泳道)均未在 50 kU 附近出现目的蛋白条带;而 37 °C 下诱导培养的菌体经超声后的全菌液、上清液和沉淀中(4~6 泳道)均于 50 kU 处出现目的蛋白条带,由于上清液中所



M. DL 2000 DNA Maker 1、2、5、8、10. 使用通用引物 M47/M48 对选取的 5 个单克隆菌株进行扩增的结果 3、4、6、7、9. 使用特异性引物 F1/R1 对选取的 5 个单克隆菌株进行扩增的结果

(a) pGEM- α_c 菌落 PCR 鉴定结果

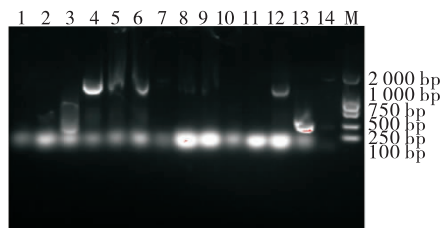


M. DL 5000 DNA Marker 1. 经 EcoR I /Xho I 双酶切的 pGEM- α_c 2. 经 Xho I 单酶切的 pGEM- α_c 3. 经 EcoR I 单酶切的 pGEM- α_c

(b) pGEM- α_c 酶切鉴定

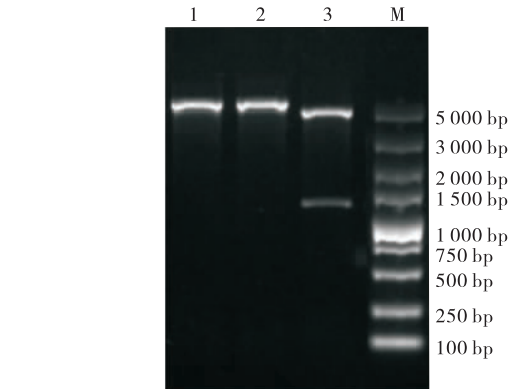
图 3 重组克隆载体 pGEM- α_c 的鉴定及筛选

Figure 3 Identification and screening of recombinant cloning vector pGEM- α_c



M. DL 2000 DNA Maker 1~12. 使用特异性上游引物 F1 和通用引物 T7er 对随机选取的 12 个单克隆菌株进行扩增的结果 13、14. 阴性对照结果

(a) pGEM-28a- α_c 的菌落 PCR 鉴定

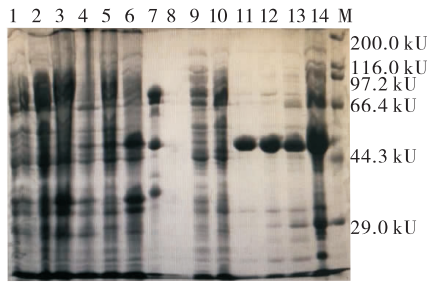


M. DL 5000 DNA Marker 1. 经 Xho I 单酶切的 pGEM- α_c 2. 经 EcoR I 单酶切的 pGEM- α_c 3. 经 EcoR I /Xho I 双酶切的 pGEM- α_c

(b) pGEM-28a- α_c 的酶切鉴定

图 4 重组表达载体 pGEM-28a- α_c 的鉴定及筛选

Figure 4 Identification and screening of recombinant cloning vector pGEM-28a- α_c



M. 蛋白质 Marker 1~3. 未诱导工程菌的全菌、上清液和沉淀 4~6. 诱导的全菌、上清液和沉淀 7. 天然 7S 8. 蛋白纯化峰浓缩后的滤液 9~10. 蛋白纯化的穿透峰及浓缩液 11、13. 蛋白纯化洗脱峰 12、14. 蛋白纯化洗脱峰的浓缩液

图 5 重组α'-亚基核心区的提取及纯化电泳图

Figure 5 Electrophoresis of the extraction and purification of the recombinant α'-subunit core region

含的重组蛋白未形成包涵体,具有较好的溶解性,可收集用于进一步的分离纯化^[13,23];蛋白纯化的穿透峰及洗脱峰浓缩后的滤液(8泳道)、诱导培养的菌体超声后的上清液经蛋白纯化的穿透峰及其浓缩液(9~10泳道)中无目的蛋白条带,与期望相符的,证明在使用低浓度咪唑洗脱杂蛋白时并没有目的蛋白被洗脱下来;而添加诱导剂的菌体超声后的上清液经蛋白纯化的洗脱峰及其浓缩液(11~14泳道)中有目的蛋白的单一一条带,证明洗脱峰中目的蛋白含量较高,且目的蛋白含量为80%左右。

3 结论

从齐黄34品种的大豆种子中提取总RNA,通过自行设计的特异性引物F1/R1经RT-PCR对7S大豆球蛋白α'-亚基核心区的基因进行扩增,成功构建了经Xho I/EcoR I双酶切鉴定、菌落PCR鉴定以及碱基测序均正确重组克隆载体pGEM-α'和重组表达载体pET-28a-α'。将重组表达载体pET-28a-α'导入到感受态细胞*E. coli* BL21(DE3)中,经IPTG诱导表达获得分子量约为50 kU的重组α'-亚基核心区蛋白,其表达条件为:OD_{600 nm}值为0.8、IPTG浓度为0.2 mmol/L、诱导温度为37℃、诱导时间为9 h,此条件下重组α'-亚基核心区蛋白可以得到大量表达,其纯度为87%以上。如何提高α'-亚基核心区蛋白制备效率及纯度还需进一步研究。

参考文献

[1] DERCY S E, WRIGHT D B, BLOULTER L. Storage protein of legume seeds[J]. *Phytochemistry*, 1976, 15(1): 3-24.
[2] NAKAI Shuryo. Structure-function relationships of food proteins: With an emphasis on the importance of protein hydrophobicity[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1983, 31(4): 676-683.

[3] WOLF W J, BABCOCK G E, SMITH A K. Ultracentrifugal differences in soybean protein composition[J]. *Nature*, 1961, 191(4 796): 1 395-1 396.
[4] CONSONNI A, LOVATI M R, PAROLAR A, et al. Heterologous expression and purification of the soybean 7S globulin α' subunit extension region: In vitro evidence of its involvement in cell cholesterol homeostasis[J]. *Protein Expression & Purification*, 2011, 80(1): 125-129.
[5] 苗钟化, 辛宜聪, 曾瑞琪, 等. 羧甲基纤维素钠对大豆蛋白凝胶特性的影响[J]. *食品与机械*, 2017, 33(4): 61-65, 85.
[6] MARUYAMA N, KATSUBE T, WADA Y, et al. The roles of the N-linked glycans and extension regions of soybean β-conglycinin in folding, assembly and structural features[J]. *European Journal of Biochemistry*, 1998, 258(2): 854-862.
[7] MARUYAMA N, SATOH R, WADA Y, et al. Structure-physicochemical function relationships of soybean β-conglycinin constituent subunits[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1999, 47: 5 278-5 284.
[8] DURANTI M, LOVATI M R, DANI V, et al. The α' subunit from soybean 7S globulin lowers plasma lipids and upregulates liver β-VLDL receptors in rats fed a hypercholesterolemic diet[J]. *Journal of Nutrition*, 2004, 134(6): 1 334-1 339.
[9] 栾广忠. 碱性蛋白酶 Alcalase 凝固豆浆机理的研究[D]. 北京: 中国农业大学, 2005: 56-62.
[10] 许妍妍, 董宇, 王新, 等. β-伴大豆球蛋白α'-亚基的基因克隆及原核表达[J]. *西北农业学报*, 2017, 26(2): 304-310.
[11] 许妍妍. 7S大豆球蛋白α'-亚基的原核表达及纯化[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2016: 12-40.
[12] 吴云华, 吴亚婷, 李勇. 水稻脱落酸受体PYL2与mNeonGreen融合蛋白的原核表达及纯化[J]. *中南民族大学学报: 自然科学版*, 2019(2): 179-183.
[13] 李剑, 李丕龙. 重组MBP-SUV39H1在大肠杆菌中表达与纯化[J]. *生物技术*, 2019, 29(1): 11-15, 22.
[14] 王盼, 费永涛, 刘冬梅, 等. 植物乳杆菌DMDL9010中亚硝酸盐还原酶的基因克隆、表达和纯化[J]. *现代食品科技*, 2015(6): 157-162, 278.
[15] 李旺, 史敦胜, 丁轲, 等. 黄曲霉毒素分解酶基因克隆及其在大肠杆菌中的融合表达[J]. *食品与机械*, 2019, 35(7): 26-30, 50.
[16] 余少璟, 许妍妍, 袁艳秋, 等. 重组大豆7S球蛋白α'-亚基的分离纯化[J]. *西北农业学报*, 2017, 26(12): 1 853-1 859.
[17] DOJIMA T, NISHINA T, KATO T, et al. Comparison of the N-linked glycosylation of human β1, 3-N-acetylglucosaminyltransferase 2 expressed in insect cells and silkworm larvae[J]. *Journal of Biotechnology*, 2009, 143(1): 27-33.
[18] LAEMMLI U K. Cleavage of structural proteins during as

- [4] 蔡旭冉, 顾正彪, 洪雁, 等. 盐对马铃薯淀粉及马铃薯淀粉—黄原胶复配体系特性的影响[J]. 食品科学, 2012, 33(9): 1-5.
- [5] 陈学玲, 关键, 梅新, 等. 氯化钠、蔗糖和碳酸钠对芡实淀粉糊化特性的影响[J]. 食品科学, 2017, 38(17): 60-65.
- [6] 程东, 洪雁, 顾正彪, 等. 柠檬酸和 NaCl 对变性淀粉糊化性质的影响[J]. 食品与生物技术学报, 2017, 36(10): 1 047-1 053.
- [7] 薛婷. pH、盐、糖、酸对马铃薯淀粉黏度特性的影响[D]. 西安: 陕西科技大学, 2014: 37-38.
- [8] 李莎. 盐糖复合对淀粉功能性质的影响[D]. 天津: 天津科技大学, 2017: 16-17.
- [9] LUO Jia-qiang, CAI Wei-xi, WU Tong, et al. Phytochemical distribution in hull and cotyledon of adzuki bean (*Vigna angularis* L.) and mung bean (*Vigna radiate* L.), and their contribution to antioxidant, anti-inflammatory and anti-diabetic activities[J]. Food Chemistry, 2016, 201: 350-360.
- [10] ZHANG Du-qin, MU Tai-hua, SUN Hong-nan. Effects of starch from five different botanical sources on the rheological and structural properties of starch-gluten model doughs[J]. Food Research International, 2018, 103: 156-162.
- [11] CRAIG A S, MANINGAT C C, SEIB P A, et al. Starch paste clarity[J]. Cereal Chemistry, 1989, 66(3): 173-182.
- [12] LIU Ming, WU Na-na, YU Guo-ping, et al. Physicochemical, structural properties and in vitro digestibility of pea starch treated with high hydrostatic pressure[J]. Starch-Strke, 2017, DOI: 10.1002/star.201700082.
- [13] 王立东, 肖志刚, 齐鹏志. 气流粉碎对高直链玉米淀粉颗粒形态及性质的影响[J]. 东北农业大学学报, 2017, 48(12): 221-228.
- [14] NARA S, KOMIYA T. Studies on the relationship between water-saturated state and crystallinity by the diffraction method for moistened potato starch[J]. Starch-Stärke, 1983, 35(12): 407-410.
- [15] 袁美兰, 鲁战会, 程永强, 等. 自然发酵对米粉 RVA 黏度性质及米粉拉伸性质的影响[J]. 中国粮油学报, 2008, 23(1): 6-9.
- [16] 罗舜菁, 李燕, 杨榕, 等. 氨基酸对大米淀粉糊化和流变性质的影响[J]. 食品科学, 2017, 38(15): 178-182.
- [17] TENG L Y, CHIN N L, YUSOFY A. Rheological and textural studies of fresh and freeze-thawed native sago starch-sugar gels II; Comparisons with other starch sources and reheating effects[J]. Food Hydrocolloids, 2013, 31(2): 156-165.
- [18] 吕振磊, 李国强, 陈海华. 马铃薯淀粉糊化及凝胶特性研究[J]. 食品与机械, 2010, 26(3): 22-27.
- [19] 葛云飞, 康子悦, 沈蒙, 等. 高粱自然发酵对淀粉分子结构及老化性质的影响[J]. 食品科学, 2019, 40(18): 35-40.
- [20] 刘佳男, 于雷, 王婷, 等. 微波处理对白高粱淀粉理化特性的影响[J]. 食品科学, 2017, 38(5): 186-190.
- [21] 王志伟, 闫凤霞, 徐嘉良, 等. 3 种高粱品种淀粉特性和酿造黄酒的风味品质分析[J]. 食品科学, 2019, 40(13): 45-51.
- [22] 张涛, 缪铭, 江波. 不同品种鹰嘴豆淀粉糊与凝胶特性研究[J]. 食品与发酵工业, 2007(9): 6-10.
- [23] 葛云飞, 康子悦, 沈蒙, 等. 自然发酵对高粱淀粉理化性质的影响[J]. 中国粮油学报, 2018(7): 51-56.
- [24] 刘淑婷, 王颖, 余铁军, 等. 黑龙江地区不同品种芸豆淀粉的物化特性研究[J]. 农产品加工, 2018(19): 16-19, 22.

(上接第 33 页)

- [9] 张喻, 章丽琳, 曾嵘, 等. 凉薯淀粉的理化性质研究[J]. 粮食与油脂, 2016, 29(9): 19-22.
- [10] 刘灿灿, 黄群, 孙潇鹏, 等. 槟榔芋淀粉与其球磨酯化淀粉理化性质比较[J]. 食品与机械, 2018, 34(5): 44-48.
- [11] SHEN Xin-yu. Amylopectin fine structure: Mechanism of the long chain function[D]. Indiana: Purdue University, 2010: 3-5.
- [12] HUANG Han-han, JIANG Qian-qian, CHEN Yu-ling, et al. Preparation, physico-chemical characterization and biological activities of two modified starches from Yam (*Dioscorea Opposita* Thunb.) [J]. Food Hydrocolloids, 2015, 55(9): 244-253.
- [13] 欧阳梦云, 王燕, 赵传文. RS₃ 型籼米抗性淀粉制备方法对其结构和理化性质的影响[J]. 食品与机械, 2017, 33(8): 14-18.
- [14] 赵小梅, 李清明, 苏小军, 等. 桂淮系列淮山淀粉性质的测定[J]. 食品科学, 2018, 39(1): 48-53.
- [15] 吴会琴, 杨秋歌, 黄梦迪, 等. 白芸豆淀粉与小利马豆淀粉理化性质的比较研究[J]. 中国粮油学报, 2019, 34(9): 3-4.
- [16] 侯蕾, 韩小贤, 郑学玲, 等. 不同种类淀粉理化性质的比较[J]. 粮食加工, 2015, 40(2): 32-37.
- [17] 赵神彳, 王辉, 康辉, 等. 不同品种来源的大麦淀粉理化和功能特性的研究[J]. 食品研究与开发, 2019, 40(20): 1-8.

(上接第 19 页)

- sembly of head of bacteriophage-T4[J]. Nature, 1970, 227(5 259): 680-685.
- [19] 严萍, 朱喜梅, 李璐, 等. Mincle 受体蛋白克隆、原核表达与纯化[J]. 现代食品科技, 2015(3): 77-83, 76.
- [20] 杨旭, 谢盈. 茶渣硒蛋白的分离纯化及其性质研究[J]. 食品与机械, 2018, 34(11): 152-156.
- [21] LEVARSKI Z, ŠOLTÝŠOVA A, KRAHULEC J, et al. High-level expression and purification of recombinant human growth hormone produced in soluble form in *Escherichia coli* [J]. Protein Expression and Purification, 2014, 100: 40-47.
- [22] LIU Yang, REN Li-mei, GE Ling-miao, et al. A strategy for fusion expression and preparation of functional glucagon-like peptide-1 (GLP-1) analogue by introducing an enterokinase cleavage site [J]. Biotechnology Letters, 2014, 36(8): 1 675-1 680.
- [23] 杨宁, 赵凌侠, 唐克轩. 重组人胰岛素类似物蛋白在大肠杆菌中克隆、表达与纯化[J]. 武汉大学学报: 医学版, 2010, 31(3): 281-287.