

# 乳糖替代 IPTG 诱导脱色酶 TpmD 基因 在大肠杆菌中的高效表达

陈亮<sup>1,2,3</sup> 任随周<sup>2,3\*</sup> 许玫英<sup>2,3</sup> 孙国萍<sup>2,3</sup>

- (1. 中国科学院武汉病毒研究所 湖北 武汉 430071)  
(2. 广东省微生物研究所 广东 广州 510070)  
(3. 广东省菌种保藏与应用重点实验室 广东 广州 510070)

**摘要:** 本文考察了乳糖代替IPTG诱导三苯基甲烷类染料脱色酶TpmD在大肠杆菌BL21(DE3)中表达的可行性, 分别对用乳糖作为诱导剂时的诱导时机、乳糖浓度、诱导持续时间和添加方式进行优化并与IPTG诱导的差异等方面进行了比较分析, 确定了乳糖诱导的最佳条件。结果表明, 在工程菌对数生长期( $OD_{600}$ 约为0.8)添加终浓度为0.4 mmol/L的乳糖诱导6 h的条件下能获得大量的目的蛋白和菌体量。由于乳糖可以作为碳源被菌体利用, 分批添加乳糖效果优于一次性添加。乳糖诱导条件下目的蛋白表达量占总蛋白的35.62%, 与IPTG诱导条件下的35.03%无明显差异。乳糖诱导后外源蛋白的表达时间有所滞后, 但收获的菌体量高于IPTG诱导, 显示了乳糖同样是一种T7启动子的廉价高效诱导剂, 可以代替昂贵的IPTG用于脱色酶TpmD的规模化发酵, 同时也为其他重组蛋白的生产提供了有益的参考和借鉴。

**关键词:** 乳糖诱导, IPTG, TpmD, T7 启动子

## Over-expression of Highly Active Triphenylmethane Dyes Decolorization Enzyme (TpmD) Induced by Lactose Instead of IPTG in *Escherichia coli* BL21 (DE3)

CHEN Liang<sup>1,2,3</sup> REN Sui-Zhou<sup>2,3\*</sup> XU Mei-Ying<sup>2,3</sup> SUN Guo-Ping<sup>2,3</sup>

- (1. Wuhan institute of Virology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan, Hubei 430071, China)  
(2. Guangdong Institute of Microbiology, Guangzhou, Guangdong 510070, China)  
(3. Guangdong Provincial Key Laboratory of Microbial Culture Collection and Application, Guangzhou, Guangdong 510070, China)

**Abstract:** The feasibility of expression of TpmD in recombinant *E. coli* BL21(DE3) induced by lactose instead of IPTG was investigated. The factors affecting the induction of target gene expression such as the optimal time point for induction, the concentration and addition mode of the inducer (lactose) and the induction time were determined. It is established that the optimal induction method is to add 0.4 mmol/L (final concentration) lactose at the mid-log-phase of cell growth, ( $OD_{600}$ ≈0.8) and incubate at

基金项目: 国家 863 计划项目(No. 2006AA06Z322); 国家自然科学基金项目(No. 30800031); 广东省科技攻关项目(No. 2007A020300007);  
广东省科技计划项目(No. 2007A020903001); 广东省科学院人才基金项目(No. 200601)

\* 通讯作者: Tel: 86-20-87684471; 邮箱: rensz@163.com

收稿日期: 2009-02-12; 接受日期: 2009-02-16

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

37°C for 6 h. It would be better to add the lactose in 4 batches (0.1 mmol/L per batch), because lactose can be used as a carbon source by *E. coli* BL21(DE3). The production of TpmD enzyme induced by lactose was about 35.62% of the bacterial total protein which was no significantly different from that induced by IPTG( $\approx$ 35.03%), and the expression of TpmD was a little slower than that induced by IPTG. However, the final biomass induced by lactose was higher than that induced by IPTG. These results suggested that the lactose is as effective as IPTG for T7 promoter induction and should be easily scaled up for industrial production of recombinant protein with lower cost.

**Keywords:** Lactose introduction, IPTG, TpmD, T7 promoter

三苯基甲烷类染料是用量最大的三大类染料之一,被广泛应用在纺织、印刷、食品、化妆品、医药、皮革、涂料、油墨等多个行业。这类染料结构稳定,很难被生物分解。其中孔雀石绿和结晶紫因在鱼体内和环境中残留时间长,并有致突变、致畸和致癌的危险,美国及欧盟已经禁止将孔雀绿和结晶紫作为人用和兽用药品<sup>[1]</sup>,我国也为此制定了检测水产品中孔雀石绿和结晶紫残留量的国家标准<sup>[2]</sup>。2005年引起社会高度关注的“孔雀绿污染水产品”事件,对水产养殖各方面都造成了严重的影响。孔雀石绿作为杀菌剂被国家禁用后,仍然屡屡发生水产品孔雀石绿污染事件,一个重要的原因是养殖水体和底泥中残留的孔雀石绿未能得到彻底净化,从而造成二次污染。针对孔雀石绿造成的污染养殖水体的生物修复是一个与食品安全密切相关的新课题,而获得高效净化此类污染物的微生物资源则是开发孔雀石绿污染生物修复技术和产品的前提条件和关键环节。

嗜水气单胞菌DN322是任随周等<sup>[3]</sup>从活性污泥中分离到的一株广谱脱色菌,能够高效降解结晶紫、碱性品红、灿烂绿及孔雀绿等多种三苯基甲烷类染料;其降解酶(命名为TpmD)能够裂解三苯基甲烷类染料骨架结构,是一种新发现的细菌氧化酶<sup>[4,5]</sup>。该菌株对三苯基甲烷类染料高效脱色的功能对于染料和染色废水处理工程中脱色难题的解决具有很高的应用价值,但由于嗜水气单胞菌对鱼类、蛙类具有潜在的致病性,从而限制了该菌株在环境生物修复中的广泛应用。因此有必要探寻既能有效利用TpmD氧化酶的独特脱色降解功能、又能避开嗜水气单胞菌的潜在致病性的应用技术新途径。本实验室在前期工作中利用表达载体pET22b(+)已成功构建了可以高效表达脱色酶TpmD的工程菌,具

有良好的开发潜力。

IPTG(异丙基- $\beta$ -D 巯基半乳糖苷)是一种非常高效的乳糖启动子诱导剂,但由于其具有潜在的毒性<sup>[6]</sup>,对菌体生长具有一定的抑制作用,并且价格昂贵,因而不适宜在发酵罐中进行基因工程产品的规模化生产。乳糖是一种二糖,没有毒性,天然具有诱导乳糖操纵子的作用,且价廉易得,因而有可能成为替代IPTG的诱导剂。但乳糖本身作为一种碳源可以被菌体代谢利用,因而对于菌体的生理及代谢也有一定程度的影响。乳糖作为诱导剂,其诱导的机制不同于IPTG。IPTG可以直接进入大肠杆菌细胞内部而发挥诱导作用,且它是一种非代谢性的诱导物,不会被菌体所消耗,只需极少量的存在就能稳定地诱导乳糖启动子的转录;乳糖则需要借助于乳糖透过酶(Permease)的作用进入细胞,然后经过 $\beta$ -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>[7,8]</sup>。同IPTG相比,乳糖作为诱导剂对于乳糖操纵子的诱导调控过程更为复杂。但乳糖所具有的价廉易得,无毒高效的特点,使得利用乳糖代替IPTG作为诱导剂的研究,对于各种利用原核表达系统进行重组蛋白的大规模生产,具有十分重要的现实意义和应用价值。

本研究是在前文(投稿中)将 *Aeromonas hydrophila* DN322 的脱色酶基因(*tpmD*)克隆在表达载体上做异源表达,以IPTG诱导获得大量高活性可溶酶蛋白的基础上,发展用廉价的乳糖代替IPTG诱导T7启动子获得高效表达的相关参数,如添加乳糖的时机、浓度范围及诱导时间跨度等关键因素进行比较分析,确定最佳可操作的诱导条件,以期为三苯基甲烷类染料脱色酶TpmD的规模化发酵和基因工程重组蛋白的工业化生产提供有益参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

1.1.1 菌株和质粒: 含 pET22-TpmD 重组质粒的表达菌株 *E. coli* BL21(DE3) 由本实验室构建和保存。

1.1.2 酶和试剂: 胰化蛋白胨(Tryptone)和酵母提取物(Yeast Extract) 购自英国 OXOID 公司; 乳糖(Lactose)、IPTG 购自 Sigma 公司; Taq 酶、质粒提取试剂盒和 Bradford 蛋白质定量试剂盒购自天根生化科技有限公司。其余试剂均为国产分析纯。

### 1.2 实验方法

1.2.1 菌体生长及目的蛋白表达量的测定方法: 摇瓶 LB 培养基配方参照文献[9]; 菌体生长量以  $OD_{600}$  值表示; SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)参照文献[10]。

诱导后离心收集的菌体总蛋白经变性预处理后进行 SDS-PAGE 电泳, 采用 GE ImageQuant 350 凝胶成像系统中的 ImageQuant TL 软件分析表达的蛋白占总蛋白的比例。

1.2.2 菌株最佳诱导起始生长量的确定: 分别在重组菌生长 0 h、1 h、2 h、3 h、4 h 后, 向培养液中加入乳糖至浓度 0.4 mmol/L, 37°C 继续诱导 4 h, 取样电泳后测定 TpmD 的表达量, 并检测最终菌体生长量。

1.2.3 乳糖诱导最佳浓度的确定: 分别向处于对数生长期的菌体培养液中加入不同量的乳糖, 使其终浓度分别为 0.1 mmol/L、0.25 mmol/L、0.5 mmol/L、1.0 mmol/L、2.0 mmol/L、4.0 mmol/L、8.0 mmol/L, 37°C 继续诱导 6 h。收集菌体后电泳检测 TpmD 基因的表达量, 并测定菌体的最终生长量。

1.2.4 乳糖最佳诱导浓度的表达动力学研究: 根据上述实验结果, 以最佳浓度向培养液中加入乳糖后, 37°C 持续诱导, 在 1 h、2 h、4 h、6 h 和 8 h 测定菌体生长量并留样进行 SDS-PAGE 电泳。同时以终浓度为 0.2 mmol/L 的 IPTG 诱导作为对照。

1.2.5 乳糖添加方式对目的蛋白表达量的影响: 当菌体生长量达到最佳诱导点时, 每隔 1 h 添加 1 次乳糖, 使其浓度为 0.1 mmol/L。经过 4 次添加后, 继续诱导 3 h。另外, 以一次性加入的方式添加乳糖至终浓度 0.4 mmol/L (最适浓度), 经相同时间(7 h)诱导后, 分别收集不同添加方式诱导的菌体, 取样电泳检测 TpmD 的表达量。同时以 1 h 为间隔检测菌

体生长量。

1.2.6 粗酶液的制备及酶活力的测定: 取经乳糖诱导表达后的菌液, 离心收集菌体, 用磷酸缓冲液(PBS)重悬, 使用 SONICS VC505 超声波细胞破碎仪(功率 500 W, 振幅 35%, 每个循环超声 3 s, 冷却 2 s, 180 次)超声破碎菌体。经破碎后的菌液于 4°C、13000 r/min 离心 15 min, 收集上清即为粗酶液。

酶活测定在 30°C 条件下进行, 反应总体积为 108  $\mu$ L。100  $\mu$ L 的 50  $\mu$ mol/L 结晶紫染料溶液与 5  $\mu$ L 的酶混合后, 加入 3  $\mu$ L 25 mmol/L 的 NADH, 立即置于分光光度计上连续测定染料在最大吸收波长处 OD 值随时间的变化。以 100°C、30 min 灭活酶液的反应混合液为对照, 以 30°C 条件下每分钟催化 1 nmol 染料所需要的酶量为 1 个酶活单位(U)。

## 2 结果和分析

### 2.1 培养过程中最佳诱导起始点的确定

在重组菌生长的不同时间添加浓度 0.4 mmol/L 的乳糖, 诱导 4 h 后测定目标蛋白的表达情况(图 1)。

结果表明, 在菌体生长的各个阶段加入乳糖, 均可以诱导目的蛋白的表达。在工程菌生长 3 h 后开始诱导( $OD_{600}$  约为 0.8), 蛋白表达量最高, 约占总蛋白的 30.37%(图 2)。由于乳糖转运是一个主动运输的过程, 需要一系列酶的参与, 因而需要一定的

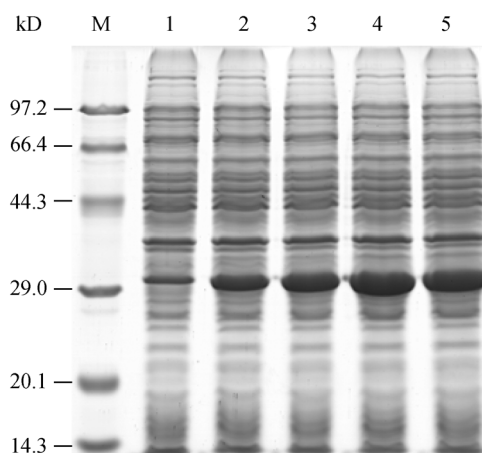


图 1 不同诱导时机表达总蛋白 SDS-PAGE 电泳

Fig. 1 Optimal point for initiating induction by lactose

M: Low molecular protein markers; 1: Total protein 4 h after induction with lactose added at the same time with inoculation; 2: Total protein 4 h after lactose induction with lactose added 1 h after inoculation; 3: With lactose added 2 h after inoculation; 4: With lactose added 3 h after inoculation; 5: With lactose added 4 h after inoculation.

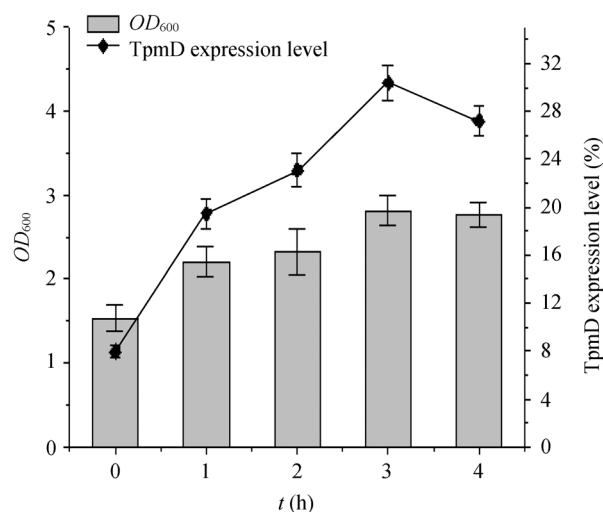


图2 不同起始诱导时间的菌体生长及蛋白表达量

Fig. 2 Biomass and target protein expression offered by different initialing induction time with lactose

生物量和透过酶的表达作为目的蛋白诱导表达的基础。相对而言,在菌体的对数生长中期添加乳糖诱导比较理想,既可以实现产物的高效表达,又可以获得较高的菌体密度,有利于重组产物的规模化生产。

## 2.2 乳糖诱导最佳浓度的确定

实验结果显示浓度为 0.1 mmol/L 的乳糖即可诱导目的蛋白的表达,当乳糖浓度达到 0.25 mmol/L 以上时即可获得 30% 以上的蛋白表达量(图 3),说明工程菌对乳糖的诱导效应是十分敏感的,极低的浓度即能启动目的基因高效表达。

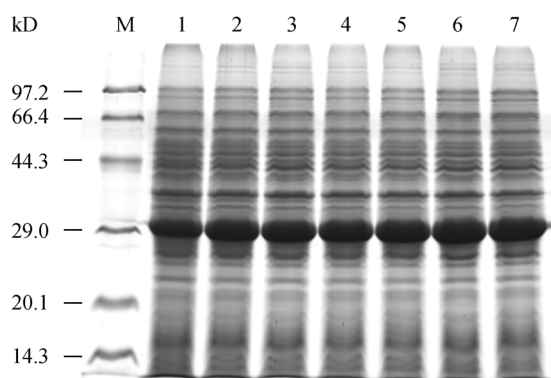


图3 不同乳糖浓度诱导的蛋白表达

Fig. 3 SDS-PAGE of the target protein expression induced by lactose at different concentration

M: Low molecular protein markers; 1: Total protein with 0.1 mmol/L lactose induction; 2: With 0.25 mmol/L lactose induction; 3: With 0.5 mmol/L lactose induction; 4: With 1.0 mmol/L lactose induction; 5: With 2.0 mmol/L lactose induction; 6: With 4.0 mmol/L lactose induction; 7: With 8.0 mmol/L lactose induction.

## 2.3 乳糖最佳诱导浓度的表达动力学及同 IPTG 诱导效果比较

从图 4 和图 5 可以看出,终浓度为 0.2 mmol/L 的 IPTG 诱导 1 h 后就显示目的蛋白得到表达,并随着时间的延长表达量逐渐增多,到 4 h 以后蛋白表达量达到最高(约占总蛋白的 35.03%)并趋于稳定,6 h 菌体量达到最大。以 0.4 mmol/L 终浓度的乳糖诱导目的蛋白表达时,2 h 以后才出现目的蛋白的明显表达带(图 5、图 6),到 6 h 蛋白表达量和菌体量均达到最大(约占总蛋白的 35.62%)。由于乳糖在细胞内发挥诱导作用需要一个转运以及转化的过程,相对于 IPTG 的快速诱导,以乳糖作为诱导剂的表达时间过程具有一定的滞后,这与文献[11]报道的

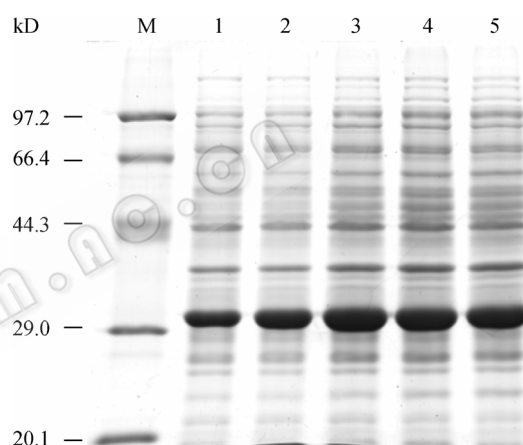


图4 IPTG 诱导不同时间表达蛋白的 SDS-PAGE 电泳

Fig. 4 SDS-PAGE of IPTG as the inducer

M: Low molecular protein markers; 1: Total protein 1 h after 0.2 mmol/L IPTG induction; 2: 2 h after induction; 3: 4 h after induction; 4: 6 h after induction; 5: 8 h after induction.

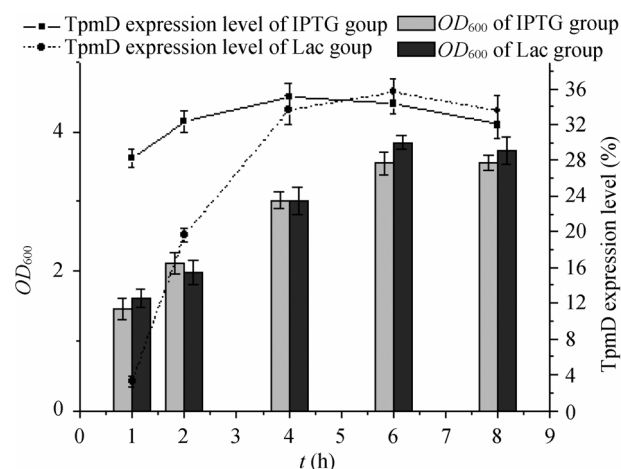


图5 IPTG 与乳糖的菌体量和蛋白表达量

Fig. 5 The growth and expression level of IPTG and lactose induction

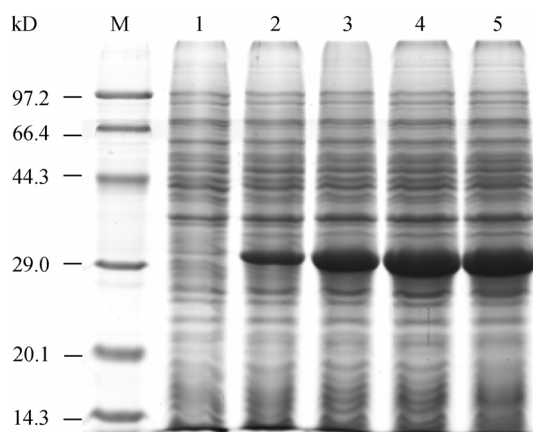


图 6 乳糖诱导不同时间表达蛋白的 SDS-PAGE 电泳

Fig. 6 SDS-PAGE of Lactose as the inducer

M: Low molecular protein markers; 1: Total protein 1 h after 0.4 mmol/L lactose induction; 2: 2 h after induction; 3: 4 h after induction; 4: 6 h after induction; 5: 8 h after induction.

结果一致。但由于乳糖本身也可以作为菌体的碳源能源供其生长代谢, 所以最终的菌体量和目的蛋白表达量均略高于 IPTG 诱导。

#### 2.4 乳糖添加方式对目的蛋白表达量的影响

如图 7 所示, 批式添加乳糖与一次性添加乳糖方式的目的蛋白表达量相当, 均可达到总蛋白的 30% 以上, 但批式添加乳糖可以提高最终收获的菌体量(图 8)。由于乳糖转运是一个主动运输的过程, 这一过程会造成细菌质子推动力的暂时消耗<sup>[12]</sup>, 竞争性利用了菌体能量<sup>[13]</sup>, 一次性加入大量乳糖会加大主动运输的负荷, 造成细胞能量的分流, 可能因此导致菌体生长放缓。

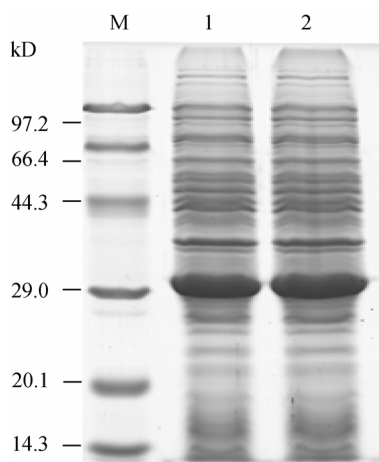


图 7 不同乳糖添加方式表达蛋白的 SDS-PAGE 电泳

Fig. 7 SDS-PAGE of different lactose dosing method

M: Low molecular protein markers; 1: Total protein with lactose (0.4 mmol/L) added by once; 2: Lactose added in 4 batches (0.1 mmol/L each).

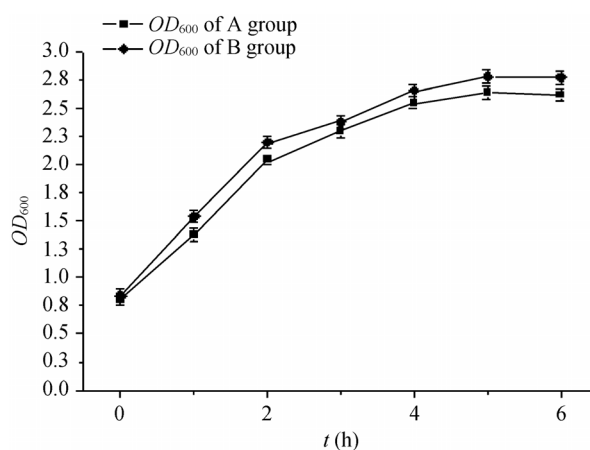


图 8 不同乳糖添加方式的菌体量

Fig. 8 The biomass with different lactose dosing method

A: Lactose (0.4 mmol/L) added at once; B: Lactose added in 4 batches (0.1 mmol/L each).

#### 2.5 酶活力的测定结果

离心收集 *Aeromonas hydrophila* DN322 菌体及乳糖诱导表达的 pET22-TPMD/ BL21(DE3) 菌体, 超声处理, 制备粗酶液, 进行蛋白定量。调整到相同蛋白浓度 0.5 mg/mL 后, 以结晶紫为受试底物, 分别对原始菌株和重组菌株的粗酶液的脱色活性进行测定。

DN322 粗酶液的比活力为 48.2 U/mg, pET22-TPMD/BL21(DE3) 粗酶液的比活力为 578.4 U/mg。较之野生型菌株 DN322, 工程菌 pET22-TPMD/BL21(DE3) 的粗酶液比活力提高了约 12 倍, 这一数据同前期工作中采用 IPTG 作为诱导剂得出的结论相符, 证实了采用乳糖诱导表达出的重组酶是以有活性的可溶蛋白的形式存在于细胞内, 没有形成包涵体。

### 3 讨论

乳糖操纵子作为一种可诱导的负调控型操纵子, 是目前研究的最为详尽的基因操纵子, 已被广泛应用于大肠杆菌工程菌株的构建中<sup>[14]</sup>。异丙基-β-D 硫基半乳糖苷(IPTG)作为乳糖的结构类似物是常用的高效诱导剂。IPTG 诱导条件简单, 在大肠杆菌中不被代谢和降解, 效果持久稳定。但 IPTG 具有潜在的毒性, 各国药典均不提倡使用, 而且价格昂贵, 因而只作为实验室少量蛋白表达时的诱导剂。乳糖作为原核细胞的常用碳源, 是乳糖操纵子控制的细菌自身系列酶的天然底物, 对乳糖操纵子具有天然的诱导作用, 且价廉易得、无毒无害; 但由于乳糖可以被细胞作为碳源代谢利用, 其浓度是动态变化的, 转运及转化涉及多个酶的参与, 诱导机制比 IPTG

更为复杂,诱导条件不易掌握,需要对菌体生长及诱导条件进行更为精细的研究及优化<sup>[15-18]</sup>。比较而言,乳糖所具备的无毒和价廉的优点,使其在重组蛋白的大规模发酵生产中仍具有优于IPTG的价值和优势<sup>[19]</sup>。

pET系统是目前应用十分广泛的、在*E. coli*中高效表达外源基因的原核表达系统<sup>[20]</sup>,目前大多数研究主要是利用pET系统在实验室水平小规模表达一些重组蛋白。菌株pET22-TpmD是本实验室利用原核表达载体pET22b(+)构建的、能够高效表达脱色酶TpmD的重组基因工程菌。为了满足大规模发酵及降低成本的需要,我们研究了以乳糖作为诱导剂时,诱导剂浓度、诱导时机、诱导时间和添加方式等因素对菌株生长和目的产物表达的影响,从中分析并寻找适合工程菌株生长和目的蛋白表达的最佳条件。结果表明,使用极低剂量的乳糖即可实现有活性的目的蛋白的高效表达,成本不足IPTG诱导的1%。在工程菌对数生长期( $OD_{600}$ 约0.8),以分批添加的方式添加终浓度为0.4 mmol/L的乳糖诱导6 h对目的蛋白的表达最为有利。由于乳糖本身可作为碳源被菌体利用而消耗,分批添加的效果优于一次添加,可获得更大的菌体量。乳糖的诱导效果与IPTG诱导效果相当,但加入乳糖后蛋白表达时间有所滞后,推测是因为乳糖诱导机制较为复杂,需要进入细胞并在 $\beta$ -半乳糖苷酶的作用下转化为异乳糖后才能发挥作用。过早或过快的蛋白表达会导致菌株生长受到额外负荷的拖累,影响菌体的收获量进而影响目的蛋白的产量。本论文的实验结果证实了这一推测,乳糖诱导组的最终菌体量高于IPTG诱导组,显示出乳糖作为诱导剂的优势。这些数据证明乳糖完全可以作为诱导剂应用于TpmD酶蛋白的工业化生产,同时也为其他由lac操纵子调控的重组蛋白的规模化发酵生产提供了有益的参考和借鉴。

## 参 考 文 献

- [1] 李 宁. 孔雀石绿对健康的影响. 国外医学卫生学分册, 2005, **32** (5): 262-264.
- [2] 水产品中孔雀石绿和结晶紫残留量的测定. 中华人民共和国国家标准(GB/T19857-2005), 2005.
- [3] Ren SZ, Guo J, Zeng GQ, *et al.* Decolorization of triphenylmethane, azo, and anthraquinone dyes by a newly isolated *Aeromonas hydrophila* strain. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2006, **72**(6): 1316-1321.
- [4] 任随周, 郭 俊, 王亚丽, 等. 细菌脱色酶 TpmD 对三苯基甲烷类染料脱色的酶学特性研究. 微生物学报, 2006, **46**(3): 385-389.
- [5] 任随周, 郭 俊, 岑英华, 等. 细菌脱色酶 TpmD 的酶学特性研究. 微生物学报, 2006, **46**(5): 823-826.
- [6] 金 奇. 医学分子病毒学. 北京: 科学出版社, 2001.
- [7] Jobe A, Bourgeois S. Lac repressor-operator interaction: VI. The natural inducer of the lac operon. *J Mol Biol*, 1972, **69**(3): 397-404.
- [8] Muller-Hill B, Rickenberg HV, Wallenfels K. Specificity of the induction of the enzymes of the lac operon in *Escherichia coli*. *J Mol Biol*, 1964, **10**: 303-318.
- [9] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- [10] Ausubel FM. Short Protocols in Molecular Biology. 3rd ed. John Wiley & Sons Inc, 1995.
- [11] Neubauer P, Hofmann K, Holst O, *et al.* Maximizing the expression of a recombinant gene in *Escherichia coli* by manipulation of induction time using lactose as inducer. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 1992, **36**(6): 739-744.
- [12] Ahmed S, Booth IR. The effect of beta-galactosides on the protonmotive force and growth of *Escherichia coli*. *Journal of General Microbiology*, 1983, **129**(Aug): 2521-2529.
- [13] Straight JV, Ramkrishna D, Parulekar SJ, *et al.* Bacterial-growth on lactose - an experimental investigation. *Biotechnology and Bioengineering*, 1989, **34**(5): 705-716.
- [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. *FEMS Microbiology Reviews*, 1994, **14**(1): 99-102.
- [15] Woyski D, Cupp-Vickery JR. Enhanced expression of cytochrome P450s from lac-based plasmids using lactose as the inducer. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2001, **388**(2): 276-280.
- [16] Monteiro RA, Souza EM, Yates MG, *et al.* Use of lactose to induce expression of soluble NifA protein domains of *Herbaspirillum seropedicae* in *Escherichia coli*. *Canadian Journal of Microbiology*, 2000, **46**(11): 1087-1090.
- [17] Lin LL, Hsu WH. Lactose-induced expression of *Bacillus* sp. TS-23 amylase gene in *Escherichia coli* regulated by a T7 promoter. *Letters in Applied Microbiology*, 1997, **24**(5): 365-368.
- [18] Gombert AK, Kilikian BV. Recombinant gene expression in *Escherichia coli* cultivation using lactose as inducer. *Journal of Biotechnology*, 1998, **60**(1-2): 47-54.
- [19] 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. 南京师大学报(自然科学版), 2002, **25**(1): 89-93.
- [20] pET System Manual. 11th ed. 2006.