

Cloning and Comparative Analysis of the Venom Prepromelittin Genes from Four Wasp Species

SHI Wan-Jun, ZHANG Su-Fang, ZHANG Chuan-Xi^①, CHENG Jia-An^①

(Institute of Applied Entomology, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China)

Abstract: The total RNAs were isolated from the venom glands of female *Polistes hebraeus*, *Vespula maculifrons*, *Vespa velutina nigrithorax* and *Vespa magnifica*, respectively. Using the ReverAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit, the first cDNAs were synthesized from the total RNA templates. PCR was carried out for 30 cycles (40s at 94℃, 40s at 52℃ and 1 min at 72℃), with a final extension of 10 min at 72℃. RT-PCR products were examined by electrophoresis in 1.5% agarose gels with ethidium bromide staining. After purification using QIAquick PCR Purification Kit, the PCR products were ligated into pGEM® -T easy vector. Positive clones were identified by double digestion of *Xho* I and *Hind* III and PCR amplification and then were sequenced. The sequencing results showed that the amplified cDNAs containing the open reading frames of prepromelittin, and their lengths were all 213 bp. The ORFs were potential to encode polypeptides of 70 amino acid residues with predicted molecular weight of 7.7 kDa, including a signal peptide of 21 residues and a promelittin of 49 residues. Comparative analysis showed that the prepromelittins from different wasp species shared more than 93% identities in nucleotide sequences and more than 95% identities in amino acid sequences with each other, respectively. The sequences of prepromelittins of *Polistes hebraeus*, *Vespula maculifrons*, *Vespa velutina nigrithorax* and *Vespa magnifica* share 94%, 100%, 94%, 93% homologies in nucleotide sequences, and 95.8%, 100%, 97.2% and 97.2% identities in amino acid sequences with those of the European honey bee, *Apis mellifera*, respectively. There are 67 common amino acid residues among the prepromelittins of the four wasps and two honey bee species, *Apis mellifera* and *Apis cerana*. Phylogenetic relationships based on the prepromelittin nucleotide sequences were also examined using the software DNASTar5.01. The result showed that a closer relationship lied in between *Polistes hebraeus*, *Vespa velutina nigrithorax* and *Vespa magnifica*, while *Vespula maculifrons* had a closer relationship with the honey bees, *Apis mellifera* and *Apis cerana*. In conclusion, the prepromelittins were very conserved in the primary structure and the wasp insects also contain the melittins in their venoms, which are very similar to that of honey bee, although they belong to different superfamilies.

Key words: vespidae; prepromelittin; venom; sequence comparison

4种胡蜂前溶血肽原基因的克隆与序列比较

施婉君, 张素方, 张传溪^①, 程家安^①

(浙江大学应用昆虫学研究所, 杭州 310029)

摘要: 从雌性亚非马蜂、额斑黄胡蜂、墨胸胡蜂、大胡蜂毒腺中抽提总 RNA, 通过 RT-PCR 方法扩增得到 4 种胡蜂蜂毒前溶血肽原的 cDNA, 再将扩增产物克隆到 pGEM® -T easy vector 上。测序结果表明: 扩增得到的片段长度均为 213 bp, 系蜂毒前溶血肽原编码区的 cDNA。经序列比较, 4 种胡蜂蜂毒前溶血肽原之间的氨基酸序列同源性都超过 95%。亚非马蜂、额斑黄胡蜂、墨胸胡蜂、大胡蜂各自与意大利蜜蜂蜂毒前溶血肽原氨基酸序列的同源性分别为 95.8%、100%、97.2%、97.2%。结果表明: 蜂毒前溶血肽原一级结构序列具有很高的保守性, 尽管胡蜂和蜜蜂属于膜翅目不同的总科, 但它们的前溶血肽原基因却非常相似。

关键词: 胡蜂; 蜂毒; 前溶血肽原; 序列比较

中图分类号: Q953 文献标识码: A 文章编号: 0379-4172(2003)06-0555-05

收稿日期: 2002-10-11; 修回日期: 2002-12-30

基金项目: 国家自然科学基金项目 (编号: 30271008) 资助 [Supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 30271008)]

作者简介: 施婉君 (1975-), 女, 博士, 浙江黄岩人, 研究方向: 昆虫分子生物学。E-mail: shiwanjun@yahoo.com

① 通讯作者: 程家安, E-mail: jacheng@zju.edu.cn; 张传溪, E-mail: chxzhang@zju.edu.cn

蜂毒是一种应用很广的天然药物,有着多方面的医用价值,如抗炎、抗辐射、抑菌、抗癌、镇静、脱敏、降血压及免疫抑制等作用,可有效治疗类风湿性关节炎、神经炎等多种疾病^[1]。蜂毒本身是一种成分复杂的混合物,主要含有蛋白质多肽类、酶类、生物胺类等。蜂毒溶血肽(Melittin)则属于蜂毒蛋白质多肽类,具有27个氨基酸,位于蜂毒前溶血肽原(Prepromelittin)的COOH-端(第44~70位残基),为蜂毒前溶血肽原mRNA翻译后经加工的终产物。它是蜂毒的最主要成分,约占蜂毒的40%~50%,具有很强的生物活性,可引起红细胞裂解,脂质体释放标记离子以及肥大细胞释放组胺^[2],同时它对细胞膜 also 具有很强的表面活性,其透过卵磷脂膜和混合脂膜的速度为任何表面活性剂所不及^[3]。因而,它是目前医药、生物工程及农业上家畜疾病的治疗和植物保护方面研究的重要原料。

从20世纪70年代以来,欧美学者已对意大利蜜蜂(*Apis mellifera*)蜂毒溶血肽作了卓有成效的研究,不仅了解了其氨基酸序列,还进行了详细的分子生物学和功能的研究^[4~7],但尚未见有关胡蜂蜂毒溶血肽的研究报道。胡蜂和蜜蜂属于膜翅目不同的总科,具有不同的生物学特性,并且胡蜂的毒液和蜜蜂的毒液在功能上也不尽相同。蜜蜂的毒液主要用于防御,而胡蜂的毒液不仅用于防御,更用于捕食昆虫等猎物时攻击和麻痹猎物。溶血肽是蜜蜂蜂毒的最主要成分,胡蜂中是不是也存在溶血肽?其分子结构与蜜蜂的溶血肽有何不同?目前都未见报道。本研究应用分子生物学方法,克隆了亚非马蜂(*Polistes hebraeus*)、额斑黄胡蜂(*Vespula maculifrons*)、墨胸胡蜂(*Vespa velutina nigrithorax*)、大胡蜂(*Vespa magnifica*)4种胡蜂总科昆虫的蜂毒前溶血肽原的cDNA,测定了其核苷酸序列,并对不同的溶血肽进行了比较分析,为膜翅目蜂毒的功能研究和分子进化提供数据,也为进一步研究和开发利用胡蜂蜂毒资源提供必要的基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 虫体、菌株与载体

亚非马蜂、额斑黄胡蜂、墨胸胡蜂采自浙江省杭州市,大胡蜂采自云南省昆明市,胡蜂的种类由浙江

大学膜翅目分类专家陈学新和何俊华教授鉴定。菌株 *E. coli* JM109 由浙江大学昆虫分子生物学实验室保存;pGEM[®]-T easy vector 购自 Promega 公司。

1.1.2 酶和试剂

限制性内切酶(*Xho* I、*Hind* III)、X-gal、IPTG、DNA Marker DL 2000、DNA Marker DL 2 000 + 15 000 购自 TaKaRa 公司;RevertAid[™] First Strand cDNA Synthesis Kit 购自 MBI Fermentas 公司;Taq Plus DNA 聚合酶、DEPC 购自 Sangon 公司;Trizol 购自 GIBCO 公司;QIAquick PCR Purification Kit 购自 QIAGEN 公司。其他试剂均为国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 PCR 引物设计

参照已发表欧洲意大利蜜蜂的蜂毒前溶血肽原基因序列^[4]设计 PCR 扩增引物,FP1 为 5' 端引物序列:GCTCGAGATGAAATTCCTTAGTCAACGTT;RP2 为 3' 端引物序列:GAAGCTTCTAACCCTGTTGCCTCTT。为便于克隆和表达,两个引物分别引入了 *Xho* I 和 *Hind* III 酶切位点。

1.2.2 蜂毒总 RNA 提取

从活体雌性胡蜂中取出毒腺,按 Trizol 法提取总 RNA。

1.2.3 RT-PCR 扩增目的基因片段

用 RevertAid[™] First Strand cDNA Synthesis Kit 将蜂毒总 RNA 反转录成 cDNA 第一链,再用 FP1、RP2 引物和 Taq Plus DNA 聚合酶,经 PCR 从 cDNA 中扩增出目的基因。PCR 扩增条件:94℃变性 40 s,54℃复性 40 s,72℃延伸 60 s;30 个循环,最后 72℃延伸 10 min。RT-PCR 扩增产物用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳进行鉴定。

1.2.4 PCR 产物的克隆

PCR 扩增产物经 QIAquick PCR Purification Kit 纯化后,与 pGEM[®]-T easy vector 连接,转化 JM109 感受态细胞,接种含 Ampicillin、X-gal、IPTG 的 LB 平板培养基培养后,挑选白斑作单菌落培养,按碱法抽提质粒,经酶切鉴定和 PCR 扩增检查插入片段的大小,筛选出重组克隆。

1.2.5 DNA 测序及序列分析

重组克隆由 Sangon 公司进行 DNA 测序,测序结果采用 Gentyx4.0 软件进行 DNA 序列比较,用 DNA Club 软件进行氨基酸序列推导,用 Internet 网的 Blast 软件进行同源性序列检索,并用 DNASTar5.01 软件



将4种蜂毒前溶血肽原的氨基酸序列进行同源性比较和分子进化分析。

2 结 果

2.1 RT-PCR 扩增蜂毒前溶血肽原基因

用 Trizol 溶液提取雌性亚非马蜂、额斑黄胡蜂、墨胸胡蜂、大胡蜂毒腺的总 RNA,以 Oligo(dT)₁₈为引物分别逆转录成 cDNA,再以此 cDNAs 为模板,经 PCR 扩增出的4种胡蜂产物大小相似,约 200 bp(图 1),与已报道的蜜蜂的前溶血肽原基因大小一致。

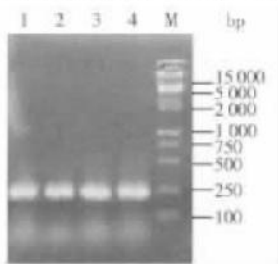


图 1 4 种胡蜂蜂毒前溶血肽原基因 RT-PCR 产物电泳图

1: 亚非马蜂; 2: 额斑黄胡蜂; 3: 墨胸胡蜂; 4: 大胡蜂; M: DNA marker.

Fig.1 Agarose electrophoresis of the RT-PCR products of Prepromelittin gene from 4 wasp species 1: *Polistes hebraeus*; 2: *Vespa maculifrons*; 3: *Vespa velutina nigrithorax*; 4: *Vespa magnifica*; M: DNA marker.

2.2 克隆与鉴定

将各蜂的 RT-PCR 产物经 QIAquick PCR Purification Kit 纯化后克隆入 pGEM[®]-T easy vector 中。用碱法提取质粒 DNA,经 *Xho* I、*Hind* III 双酶切及 PCR 扩增鉴定,证明其插入片段大小正确(图 2)。

2.3 序列分析

对所筛选出的含有各蜂蜂毒前溶血肽原基因的重组克隆作 DNA 测序,结果见图 3。DNA 序列分析表明:亚非马蜂、额斑黄胡蜂、墨胸胡蜂、大胡蜂蜂毒前溶血肽原基因的编码区序列均为 213 bp,与意大利蜜蜂蜂毒前溶血肽原 cDNA 序列(GenBank 登录号:X02007)相比,同源性分别为 94%、100%、94%、93%。大胡蜂前溶血肽原基因序列跟亚非马蜂、额斑黄胡蜂、墨胸胡蜂的同源性分别为 98%、93%和 99%;亚非马蜂序列则与额斑黄胡蜂的同源性为

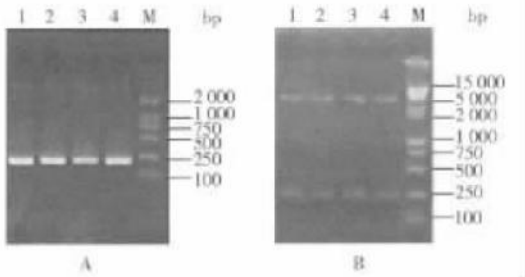


图 2 4 种胡蜂蜂毒前溶血肽原基因重组质粒的 PCR 和酶切电泳图谱
A: 重组质粒 PCR 检测; B: 重组质粒 *Xho* I、*Hind* III 双酶切电泳图谱。1: 亚非马蜂; 2: 额斑黄胡蜂; 3: 墨胸胡蜂; 4: 大胡蜂; M: DNA marker.

Fig.2 PCR identification and restriction enzyme digestion of the recombinant plasmids containing prepromelittin gene from 4 wasp species
A: PCR identification of the recombinant plasmids; B: Restriction enzyme digestion of the recombinant plasmids. 1: *Polistes hebraeus*; 2: *Vespa maculifrons*; 3: *Vespa velutina nigrithorax*; 4: *Vespa magnifica*; M: DNA marker.

93%,但与大胡蜂、墨胸胡蜂同源性都为 98%;而额斑黄胡蜂则跟亚非马蜂、大胡蜂、墨胸胡蜂的同源性都为 93%。

同时将从 4 种胡蜂蜂毒前溶血肽原 cDNA 推导出的氨基酸序列与东方蜜蜂印度亚种蜂毒前溶血肽原氨基酸序列(GenBank 登录号: P01501)、意大利蜜蜂蜂毒前溶血肽原氨基酸序列(GenBank 登录号: CAA26038)进行联配比较,结果列于图 4。从图 4 可见,6 种蜂毒前溶血肽原氨基酸序列间氨基酸残基完全相同的有 67 个,占 95.8%,大胡蜂的氨基酸序列跟亚非马蜂、额斑黄胡蜂、墨胸胡蜂的同源性分别为 98%、93%和 99%;亚非马蜂的氨基酸序列则跟额斑黄胡蜂的同源性为 93%,但与大胡蜂、墨胸胡蜂同源性都为 98%;而额斑黄胡蜂的氨基酸序列则跟亚非马蜂、大胡蜂、墨胸胡蜂的同源性都为 93%。但亚非马蜂、额斑黄胡蜂、墨胸胡蜂、大胡蜂各自与意大利蜜蜂和东方蜜蜂印度亚种蜂毒前溶血肽原氨基酸序列的同源性分别为 95.8%、100%、97.2%、97.2%。6 种蜂毒前溶血肽原都具有 70 个氨基酸。由蜜蜂蜂毒前溶血肽原结构可知,70 个氨基酸包括了由 21 个氨基酸组成的信号肽和 49 个氨基酸组成的前肽,溶血肽位于其 COOH 端(第 44~70 残基)(图 4)。除亚非马蜂的第 53 位为丙氨酸(A)取代了其他蜂的苏氨酸(T)外,额斑黄胡蜂、墨胸胡蜂、大胡蜂、意大利蜜蜂和东方蜜蜂印度亚种蜂毒的前溶

推广短信

广告推广平台

户外宣传栏

云呼叫中心

信息流广告

电梯广告

网上申报

558	遗 传 学 报	30 卷					
<i>Vespa magnifica</i>	ATGAAATTCT	TAGTCAACGT	TGCCCTTGTT	TTTATGGITG	TATACATTTC	TTTCATCTAT	60
<i>Vespula maculifrons</i>				C.	.G.....	..A.....	60
<i>V. velutina nigrithorax</i>							60
<i>Polistes hebraeus</i>							60
<i>Apis mellifera</i>				C.	.G.....	..A.....	60
<i>Vespa magnifica</i>	GCGGCCCTTG	AACCAGAACC	GGCACC GGAG	GCAGAGGCAG	AGGCAGACGC	GGAGGCAGAT	120
<i>Vespula maculifrons</i>		...G.....	A...	C.....G.			120
<i>V. velutina nigrithorax</i>							120
<i>Polistes hebraeus</i>							120
<i>Apis mellifera</i>		...G.....	A...	C.....G.			120
<i>Vespa magnifica</i>	CCGGAAGCAG	GGATTGGAGC	AGTTCTCAAA	GTATTAACCA	CAGGATTGCC	TGCCCTTATA	180
<i>Vespula maculifrons</i>	G.	.A.....	G..G			C.....C...	180
<i>V. velutina nigrithorax</i>		.A.....					180
<i>Polistes hebraeus</i>			G..G	G..			180
<i>Apis mellifera</i>	G.	.A.....	G..G			C.....C...	180
<i>Vespa magnifica</i>	AGTTGGATTA	AACGTAAGAG	GCAACAGGGT	TAG			213
<i>Vespula maculifrons</i>							213
<i>V. velutina nigrithorax</i>							213
<i>Polistes hebraeus</i>							213
<i>Apis mellifera</i>							213

图 3 4 种胡蜂和意大利蜜蜂毒前溶血肽原 cDNA 的序列比较
图中圆点表示该核苷酸与大胡蜂相应的核苷酸相同。

Fig.3 Comparison of nucleotide sequences of the prepromelittin genes from 4 wasp species and *Apis mellifera*
Dot indicates a base pair identical to that of *Vespa magnifica*.

<i>Vespa magnifica</i>	MKFLVNVALVFMVVYISFIYA	APEPEPAPEAEAEADAEADPEA
<i>Vespula maculifrons</i>	Y...	P.....
<i>V. velutina nigrithorax</i>		
<i>Polistes hebraeus</i>		
<i>Apis mellifera</i>	Y...	P.....
<i>A. cerana</i>	Y...	P.....
	信号肽 (Signal peptide)	前区肽 (Proregion)
<i>Vespa magnifica</i>	GIGAVLKVLT TGLPALISWIKRKRQQG	70
<i>Vespula maculifrons</i>		70
<i>V. velutina nigrithorax</i>		70
<i>Polistes hebraeus</i>	A.....	70
<i>Apis mellifera</i>		70
<i>A. cerana</i>		70
	成熟肽 (Matured peptide)	

图 4 4 种胡蜂和意大利蜜蜂、东方蜜蜂印度亚种蜂毒前溶血肽原蛋白氨基酸序列比较
图中圆点表示该氨基酸残基与大胡蜂相应的氨基酸残基相同。

Fig.4 Comparison of deduced amino acid sequences of the prepromelittin gene from 4 wasp species, *Apis mellifera* and *Apis cerana indica*
Dot indicates an amino acid residue identical to that of *Vespa magnifica*.

血肽原的后加工终产物-溶血肽的氨基酸序列完全一样。但亚非马蜂、墨胸胡蜂、大胡蜂蜂毒前溶血肽原信号肽跟意大利蜜蜂、东方蜜蜂印度亚种及额斑黄胡蜂的蜂毒前溶血肽原相比,第 18 位氨基酸“苯丙氨酸(F)”取代了后 3 者的“酪氨酸(Y)”,溶血肽原的第 10 位氨基酸“丙氨酸(A)”取代了后 3 者的“脯氨酸(P)”数据

2.4 聚类分析

根据核苷酸序列用 DNASTar5.01 软件绘制的亚非马蜂、额斑黄胡蜂、墨胸胡蜂、大胡蜂、东方蜜蜂印度亚种及意大利蜜蜂 6 种蜂毒前溶血肽原基因的分子进化树见图 5。由图 5 可见,意大利蜜蜂、东方蜜蜂印度亚种、额斑黄胡蜂蜂毒前溶血肽原处于一分

枝,大胡蜂、亚非马蜂及墨胸胡蜂蜂毒前溶血肽原则处于另一分枝。

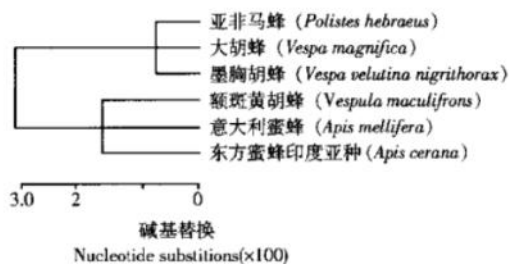


图5 蜂毒前溶血肽原分子进化图

Fig.5 Phylogenetic tree of prepromelittin

3 讨论

蜜蜂在毒腺细胞中将前溶血肽原基因 mRNA 翻译成前溶血肽原 (pre promelittin), 并进一步加工成溶血肽原 (promelittin)。溶血肽原是蜂毒溶血肽 (melittin) 的天然融合蛋白, 无活性, 由 52 个氨基酸组成, 在毒腺细胞中经二肽酶 IV 水解最终生成溶血肽, 贮存于毒囊中。以前体蛋白溶血肽原形式分泌蜂毒溶血肽, 可能是蜂类保护自身毒腺细胞免受溶血肽的伤害一种机制。胡蜂总科昆虫前溶血肽原也可能存在类似的翻译后加工过程。

本研究结果表明, 尽管胡蜂和蜜蜂属于膜翅目不同的总科, 有很大不同的生物学特性, 两者毒液在功能上也有不同, 但却存在同样的前溶血肽原基因。序列比较结果表明, 亚非马蜂、额斑黄胡蜂、墨胸胡蜂、大胡蜂与意大利蜜蜂和东方蜜蜂印度亚种蜂毒前溶血肽原氨基酸序列之间的同源性均大于 95%, 后 3 种胡蜂蜂毒前溶血肽原的后加工终产物——溶血肽的氨基酸序列与蜜蜂的完全一样, 因此可以认为蜂毒前溶血肽原一级结构序列的保守性很高。这可能是由于有些蜂毒液成份如溶血肽主要生物学功能可能是用于防御, 攻击鸟和哺乳动物等天敌。由于蜜蜂和胡蜂有类似的这两类天敌, 因此, 两类溶血肽在长期的进化过程中保留了其结构上的高度保守性。这种一级结构的保守性是其发挥功能所必需的。两者蜂毒功能的不同可能跟它们的成分相关, 蜘蛛和蝎的毒液中都存在对昆虫专一性的神经性毒肽, 胡蜂毒液中亦是否存在其他类似多肽有待进一步研究。

蜂毒是一类具有药用和生物学价值的昆虫毒素资源。国内外学者已对意大利蜜蜂蜂毒溶血肽基因

进行了一系列研究^[4~10], 但都尚未见对胡蜂相关基因的研究报道。另外, 据我们调查, 约从 1993 年开始, 杭州市墨胸胡蜂数量逐年增多, 墨胸胡蜂蛰伤人、畜事件也屡屡发生, 但目前除了用蛇药来治疗外并无其他合适的药品, 因此开发合适的抗体和其他药物已日显重要。本研究结果为相关的进一步研究提供了必要的基础。进一步的基因表达及生物活性研究在进行中。

参考文献 (References):

- [1] FANG Zhu, YANG Yu-Lin, ZHOU Bang-Xun. The study and usage of bee venom. Beijing: Science Press, 1988, 128 ~ 144.
房柱, 杨毓麟, 周邦训. 毒素的研究和利用. 北京: 科学出版社, 1988, 128 ~ 144.
- [2] ZHU Wei, WANG Ben-Xiang, ZHU Xun. The progress in the study of melittin. J N Bethune Univ Med Sci, 2001, 27(2): 212 ~ 214.
朱伟, 王本祥, 朱迅. 蜂毒素的研究进展. 白求恩医科大学学报, 2001, 27(2): 212 ~ 214.
- [3] ZHOU Shu-Ping, LI Ying. The progress in the study of honey bee melittin. Study of biochimica et biophysica, 1986, 4(1): 31 ~ 36.
周淑平, 李英. 蜜蜂溶血肽 (melittin) 的研究进展. 生物化学和生物物理进展, 1986, 4(1): 31 ~ 36.
- [4] Vlasak R, Ungen U C, Gunther K, Anna-Maria F. Nucleotide sequence of cloned cDNA coding for honeybee prepromelittin. Eur J Biochem, 1983, 135(1): 123 ~ 126.
- [5] Matsuzaki K, Yoneyama S, Miyajima K. Pore formation and translocation of melittin. Biophysical Journal, 1997, 73(2): 831 ~ 838.
- [6] Liu P, Davis P, Liu H, Krishnan T R. Evaluation of cytotoxicity and absorption enhancing effects of melittin-a novel absorption enhancer. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 1999, 48(1): 85 ~ 87.
- [7] Lazarev V N, Parfenova T M, Gularyan S K, Misyurina O Yu, Akopian T A, Govorun V M. Induced expression of melittin, an antimicrobial peptide, inhibits infection by Chlamydia trachomatis and Mycoplasma hominis in a HeLa cell line. International Journal of Antimicrobial Agents, 2002, 19(2): 133 ~ 137.
- [8] LI Ji-Zhou, CHEN Zhong-Bing, CAI Qing-Nian, ZHANG Qing-Wen. Cloning of melittin cDNA from honey bees. Journal of Agricultural Biotechnology, 1997, 5(2): 162 ~ 167.
李继周, 陈仲兵, 蔡青年, 张青文. 蜂毒溶血肽 (melittin) 的 cDNA 克隆. 农业生物技术学报, 1997, 5(2): 162 ~ 167.
- [9] WANG Guan-Lin, LI Da-Li, FANG Hong-Jun. Site-directed mutagenesis of melittin gene and its expression in Escherichia coli. Acta Genetica Sinica, 2000, 27(2): 176 ~ 182.
王关林, 李大力, 方宏筠. 蜂毒溶血肽的定点诱变及其在大肠杆菌中的表达. 遗传学报, 2000, 27(2): 176 ~ 182.
- [10] WANG Guan-Lin, LI Da-Li, FANG Hong-Jun. Cloning of promelittin cDNA and its expression in Escherichia coli. Acta Microbiologica Sinica, 2001, 41(2): 181 ~ 185.
王关林, 李大力, 方宏筠. 蜂毒溶血肽前体蛋白 cDNA 的克隆及其融合蛋白的表达. 微生物学报, 2001, 41(2): 181 ~ 185.

(责任编辑: 陈晓芳)



发短信的平台



英语培训机构哪家



高中一对一英语



在线短信发送



营销短信



电脑群发短信



雅思培训辅导



APP

