

基因与细胞治疗

DOI: 10.13406/j.cnki.cyx.000156

利用蛋白导入法沉默线粒体分裂调节蛋白 Drp1 的表达

韩小建¹, 万玉英², 杨章坚¹, 张剑锋¹, 危永芳¹, 赖启南¹

(1. 南昌大学转化医学研究院心血管实验室, 南昌 330031; 2. 南昌大学第二附属医院内感染科, 南昌 330006)

【摘要】目的:表达和纯化 3 转录反式激活因子-RNA 结合结构域(3 Trans-Activator of Transcription-RNA binding domain, 3TAT-RBD)重组蛋白, 并利用蛋白导入法将 siRNA 运输到细胞中进行基因沉默实验。**方法:**将双链 RNA 激活蛋白激酶 PKR 的 RNA 结合域(Motif1)与细胞穿膜多肽 TAT 融合构建 3TAT-RBD, 并通过原核表达体系进行目的蛋白的表达和纯化。获取重组 3TAT-RBD 蛋白后, 利用非变性胶电泳检测 3TAT-RBD 与荧光标示 Cy3-dsRNA 的结合能力。利用蛋白导入法和荧光显微镜观察 3TAT-RBD 将 Cy3-dsRNA 导入胶质瘤细胞的效率。在细胞水平检测和比较 3TAT-RBD 和 Lipofectimine 2000 将 Cy3-dsRNA 导入细胞的效率以及对沉默线粒体分裂蛋白动力蛋白相关蛋白 1(dynamin-related protein 1, Drp1)的效果。**结果:**通过原核表达体系获得 3TAT-RBD 重组蛋白, 体外结合实验证实 3TAT-RBD 与双链 dsRNA 具有良好的结合能力。荧光显微镜观察也发现 3TAT-RBD 与 Lipofectimine 2000 均能将 Cy3-dsRNA 导入 gli36 胶质细胞。在 RNA 干扰实验中发现, 3TAT-RBD 和 Lipofectimine 2000 均能有效地抑制 Drp1 的表达, Lipo+siRNA 和 3TAT-RBD+siRNA 组 Drp1 的表达水平分别为对照组的 36% 和 42%。**结论:**本研究中构建的 3TAT-RBD 利用了细胞穿膜多肽和 RBD 与 dsRNA 结合特性, 有效地将 siRNA 导入细胞进行基因沉默实验, 这将为今后 RNA 干扰实验提供新的工具。

【关键词】穿膜多肽; 双链 RNA 激活蛋白激酶; 蛋白运输法; RNA 干扰; 基因沉默

【中图分类号】R329.2*8

【文献标志码】A

【收稿日期】2013-10-09

Delivery of siRNA into cells by protein transduction for Drp1 gene silencing

Han Xiaojian¹, Wan Yuying², Yang Zhangjian¹, Zhang Jianfeng¹, Wei Yongfang¹, Lai Qinan¹

(1. Department of Cardiovascular Research, Institute of Translational Medicine, Nanchang University;

2. Department of Hospital Infection, the Second Affiliated Hospital of Nanchang University)

【Abstract】Objective: To examine the ability of purified 3 Trans-Activator of Transcription-RNA binding domain (3TAT-RBD) in the delivery of siRNA into cells and to evaluate its effect on gene silencing. **Methods:** The RNA binding domain (Motif1) of double-stranded RNA-activated protein kinase (PKR) was fused with cell-penetrating peptide HIV-TAT to construct 3TAT-RBD by molecular cloning technique. The recombinant 3TAT-RBD protein was expressed in BL21 bacteria and was further purified with GST purification system. The binding affinity of 3TAT-RBD with Cy3-dsRNA was examined after nondenaturing gel electrophoresis. Fluorescence microscopy was used to examine the efficiency of 3TAT-RBD and Lipofectimine 2000 in the delivery of dsRNA into gli36 cells. Moreover, the silencing effect of 3TAT-RBD and Lipofectimine 2000 on expression of Drp1 (a protein regulating mitochondrial fission) in gli36 cells was compared. **Results:** 3TAT-RBD protein was successfully expressed and purified. In vitro binding experiments showed that 3TAT-RBD had high binding affinity with Cy3-siRNA. Both 3TAT-RBD and Lipofectimine 2000 delivered Cy3-siRNA into gli36 cells with similar efficiency. In RNAi experiments, siRNA delivered into gli36 cells by 3TAT-RBD effectively silenced Drp1 expression, and its silencing efficiency was similar to that of Lipofectamine 2000. The expression level of Drp1 in 3TAT-RBD and Lipofectamine 2000 group was respectively 42% and 36% of control. **Conclusions:** Advantage of cell-penetrating peptide HIV-TAT and dsRNA binding feature of Motif1 in PKR is used and a novel tool protein 3TAT-RBD is constructed to effectively deliver siRNA into cells for gene silencing.

【Key words】 cell-penetrating peptides; double-stranded RNA-activated protein kinase; protein transduction; RNA interfere; gene silencing

作者介绍: 韩小建, Email: hanxiaojian@hotmail.com,

研究方向: 信号转导、分子诊断及治疗。

基金项目: 教育部高等学校博士学科点专项科研基金资助项目-青年

教师类(编号: 20123601120001); 江西省教育厅科研基金

资助项目(编号: GJJ13162)。

优先出版: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.13406/j.cnki.cyx.000156.html>

RNA 干扰 (RNA interfere, RNAi) 是沉默特定基因, 以研究基因相应功能的常用手段之一。进行 RNAi 实验时, 通常人工合成与靶基因 mRNA 同源互补的双链 RNA (dsRNA), 并利用磷酸钙法、阳离子脂质体法、显微注射法和电穿孔等方法将 dsRNA 导入细胞。导入细胞的 dsRNA 继而诱导内源靶基因 mRNA 降解, 从而特异性地阻止靶基因的表达。但上述将 dsRNA 转染到细胞中的方法具有以下缺点: 不适用于原代细胞、毒性大、操作困难、转染效率低下等, 从而在一定程度上影响在基因沉默实验的实际应用及其干扰效果。在本实验中, 将细胞穿膜多肽人类免疫缺陷病毒-转录反式激活因子 (human immunodeficiency virus-Trans-Activator of Transcription, HIV-TAT) 和 PKR 的 dsRNA 结合域 Motif1 融合以构建 3TAT-RNA 结合结构域 (RNA binding domain, RBD)。其中, HIV-TAT 穿膜多肽能将其连接的分子 (如蛋白质、核酸等) 导入细胞中, 这也被称为蛋白导入法^[1]。因有文献报道 RBD 与 dsRNA 具有很好的亲和力^[2], 故本研究将检测 3TAT-RBD 能否保持与 dsRNA 的结合能力, 并通过 HIV-TAT 多肽将所结合的 dsRNA 导入细胞中, 从而对特定的基因进行 RNA 干扰。

1 材料与方法

1.1 材料

pET-TAT-HA 质粒由美国加利福尼亚大学圣地亚哥分校的 Steven Dowdy 教授提供。GFP-PKR 质粒和 Cy3-dsRNA 由日本冈山大学 Hideki Matsui 教授提供。RBD 通过 PCR 从 GFP-PKR 进行扩增用引物 DNA 系列、动力蛋白相关蛋白 1 (dynamin-related protein 1, Drp1) 干扰用 siRNA 系列和 BCA 蛋白定量试剂盒 (上海生工生物技术公司)。PCR 试剂, DNA 和蛋白 marker (TaKaRa 生物有限公司)。考马斯亮蓝 G250 (索莱宝生物), Gold View Nucleic Acid Stain (北京赛百盛基因技术公司)。pGEX-6p-1 载体、谷胱甘肽琼脂糖凝胶、前切割蛋白酶 (GE Healthcare)。Lipofectamine 2000, Opti-MEM (Invitrogen)。细胞培养试剂: 杜尔伯科改良伊格尔培养基 (Dulbecco modified eagle medium, DMEM), 胎牛血清, 青链霉素 (Gibico)。Western blot 试剂: 鼠抗 Drp1 (BD Bioscience)、 β -actin 一抗 (Santa Cruz) 和辣根过氧化物酶标记的山羊抗鼠二抗 (北京康为世纪生物科技有限公司), 化学发光试剂盒 (北京天根生化科技有限公司) 等。

1.2 方法

1.2.1 质粒构建和重组蛋白的纯化 PKR 的 RNA 结合域 (RBD) 通过 PCR 从 GFP-PKR 中扩增获得, 引物为正义链: 5'-CCCGGGTGGTGACCTGTCTCGGGCTTC-3', 反义链 5'-CTCGAGTCATGCGGCCGCTTCTTTTCC-3', 划线部分为限制性酶切位点。3TAT-HA 系列从 pET-TAT-HA 质粒中通过 PCR 扩增, 相应的引物是正义链: 5'-GAATTCATGGGCAGGAA-

GAAGCGTCGAC-3', 反义链: 5'-CCCGGGTCCCCACGACG-CCGTGCGCAG-3'。利用相应的限制性内切酶位点将 3TAT-HA 和 RBD 分别亚克隆到 pGEX-6p-1 载体以构建 pGEX-3TAT-RBD 表达质粒。重组蛋白表达时, pGEX-3TAT-RBD 质粒通过电转化到 BL21 大肠杆菌中。转化后 BL21 大肠杆菌先在 1 L 的 LB 培养基中 37 °C 培养, 波长 600 nm 时吸光度 (absorbance, A) 值为 0.6~0.8 时加入 0.2 μ mol/L 异丙基硫代- β -D-半乳糖苷 (isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside, IPTG) 并在 28 °C 下继续培养 4~6 h 以诱导目的蛋白表达。细菌经超声破碎后用谷胱甘肽琼脂糖凝胶亲和层析纯化, 获得的谷胱甘肽转移酶 (glutathione S-transferase, GST) 融合蛋白再利用前切割蛋白酶将切断后以获得完整的 3TAT-RBD 蛋白。纯化的重组蛋白经磷酸缓冲盐溶液 (phosphate buffer saline, PBS) 透析和 0.2 μ mol/L 过滤后, 先用考马斯亮兰染色进行确定, 蛋白浓度测定后于 -80 °C 保存备用。

1.2.2 3TAT-RBD 与 Cy3-dsRNA 的结合实验 dsRNA 的正义系列是 5'-CUACAACAGCCACAACGUCdTdT-3', 反义系列 5'-GACGUUGUGGCUGUUGUAGdTdT-3'。0.5 nmol Cy3-dsRNA 分别与 0.5、10、20、30 μ l 的 3TAT-RBD (1.0 μ g/ μ l) 混合后, 于室温下孵育 20 min。孵育后的反应体系经 12% 的非变性胶 25 mA 恒电流电泳分离后, 通过考马斯亮兰染色以确定目的蛋白条带。然后, 利用激光扫描成像仪 FLA7000 检测和分析结合在 3TAT-RBD 上 Cy3-dsRNA 的量。

1.2.3 检测 3TAT-RBD 将 Cy3-dsRNA 导入细胞的效果 胶质瘤细胞系 gli36 用于本实验。gli36 细胞培养于含 10% 胎牛血清及 1% 青链霉素的 DMEM 中。检测 3TAT-RBD 将 Cy3-dsRNA 导入细胞效率时, 先 2×10^4 个 gli36 细胞接种于 35 mm 培养皿中。24 h 后将 Cy3-dsRNA 或结合有 Cy3-dsRNA 的 3TAT-RBD 蛋白混合液分别加入培养液。CO₂ 孵箱孵育 2 h 后, 用无血清 DMEM 洗 3 次后, 继续在生长培养基中培养 1 h。然后, 利用共聚焦显微镜检测导入到 gli36 细胞中 Cy3-dsRNA 的量。

1.2.4 比较 3TAT-RBD 与 Lipofectamine 2000 将 Cy3-dsRNA 导入细胞的效率以及在 RNA 干扰实验中的效果 比较 3TAT-RBD 与 Lipofectamine 2000 将 Cy3-dsRNA 导入细胞的效率时, 10^4 gli36 细胞培养于 35 mm 培养皿中。24 h 后将 0.4 nmol Cy3-dsRNA 与 20 μ g 3TAT-RBD 或 3 μ l Lipofectamine 2000 混合孵育后分别加入培养液。转染后, 用无血清 DMEM 洗 3 次后, 细胞继续在生长培养基中培养 1 h。然后, 利用共聚焦显微镜检测和比较导入 gli36 细胞中 Cy3-dsRNA 的量。RNA 干扰实验时, gli36 细胞接种于不含抗生素培养基中, 待细胞汇合度达 50% 后进行 siRNA 转染实验。siRNA 正义系列 5'-AAGCAGAAGAAUGGGGUAAAdTdT-3', 反义系列 5'-UUUACCCCAUUCUUCUGCUUdTdT-3', 退火 siRNA 以形成 dsRNA。siRNA 转染步骤参照 lipofectamine 2000 的说明书。在进行 siRNA 转染时, 将 0.4 nmol siRNA 在转染前与 3 μ l Lipofectamine 2000 混合于 100 μ l Opti-MEM, 于室温下孵育 20 min。3TAT-RBD 蛋白导入法将 dsRNA 导入细胞的方法与 Lipofectamine 2000 类似, 0.4 nmol siRNA 先与 20 μ g 3TAT-RBD 混合于 100 μ l Opti-MEM, 室温孵育 20 min 后进行蛋白导入实验。孵育后的 siRNA 和 Lipofectamine 2000/3TAT-RBD 混合液分别加入无抗生素培养基中, 转染 6 h 后更换生

长培养基。37℃继续培养 48 h 后利用 Western blot 检测 Drp1 的表达水平。

1.2.5 蛋白印迹实验和定量分析 RNA 干扰实验后,细胞用 PBS 洗 3 遍,于冰上进行细胞裂解。细胞裂解液加入 4× 加样缓冲液,于 100℃煮 5~6 min 后利用 8% SDS-PAGE 胶电泳。半干法电转膜后,将电转印好的膜用鼠抗 Drp1 和 β -actin 一抗以及相应 HRP-二抗杂交,并进行化学发光显像检测分析 Drp1 蛋白的表达水平。通过凝胶图像处理系统将结果扫描成电子图像,并以条带分析软件 Quantity One 分析计算出各条带的 $A_{600\text{nm}}$ 值。用 Drp1 条带与相应内参照 β -actin 的光密度比值作为 Drp1 蛋白的相对表达量。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 13.0 统计软件对实验数据进行统计处理。所有计量数据采用均值 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,2 组间差异比较采用两独立样本 t 检验。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 3TAT-RBD 重组蛋白表达质粒的构建

PKR 蛋白结构中有 2 个 Motif 能与 dsRNA 结合,如图 1A 所示,Motif1 主要是与短 dsRNA 结合,而与长 dsRNA 的结合则需要 Motif1 和 Motif2 的共同参与^[2]。由于 RNA 干扰时使用短 dsRNA,故本研究将 PKR 蛋白中 Motif1 通过 PCR 克隆出来,并在其 N-端与 3 个穿膜多肽 TAT 和 HA 融合,如图 1B 所示。其中 HA 为流感病毒血凝素-2 亚基的 N-端多肽系列,此系列有利于穿膜多肽及所携带分子进入细胞后从内涵体释放到胞浆以发挥其生物活性^[3]。3TAT-RBD 构建于 pGEX-6p-1 载体中(图 1C),以便利用 GST 系统来纯化 3TAT-RBD 蛋白。所构建的质粒经 DNA 测序,合格后用于蛋白表达。

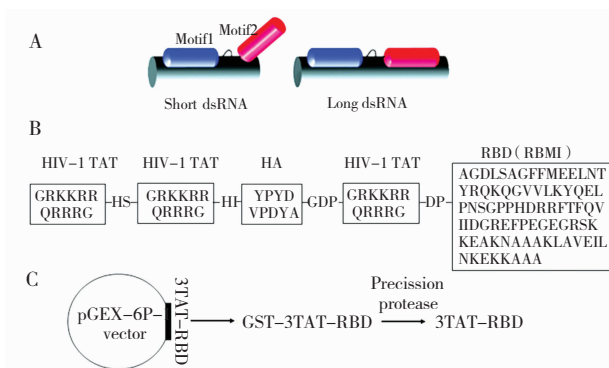


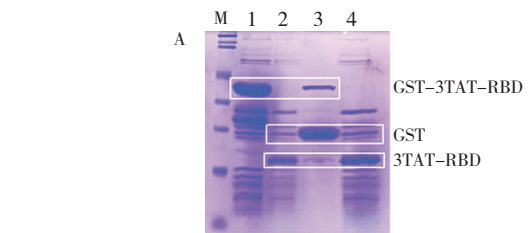
图 1 3TAT-RBD 质粒构建和蛋白纯化示意图

Fig.1 Diagram of plasmid construction and protein purification for 3TAT-RBD

2.2 3TAT-RBD 蛋白的表达纯化及其与 dsRNA 的结合能力

蛋白表达质粒通过电转化到 BL21 大肠杆菌,于 LB 培养基 37℃培养至 A 值达 0.6~0.8 时加入 0.2 $\mu\text{mol/L}$ IPTG 刺激目的蛋白表达。超声破碎后用谷胱甘肽琼脂糖凝胶亲和层析纯化,以获得 GST 融合蛋白。再利用前切割蛋白酶将 GST 切断以获得完整的 3TAT-RBD 蛋白,流程如图 1C。前切割蛋白酶处理前后及蛋白浓缩后考马斯亮兰染色结果见图 2A。非变性胶电泳和 FLA7000 激光扫描成像显示,随着加入

3TAT-RBD 量的增加,与其结合的 Cy3-dsRNA 量也逐渐增加,见图 2B。这说明通过大肠杆菌表达和纯化的 3TAT-RBD 依然保持 Motif1 与短 dsRNA 相互结合的生物活性。



M 为蛋白 Marker,1~4 分别为纯化后的 GST-3TAT-RBD、前切割蛋白酶切后获得的 3TAT-RBD、酶切后谷胱甘肽琼脂糖凝胶上结合的 GST 及未彻底酶切的 GST-3TAT-RBD、酶切后浓缩的 3TAT-RBD

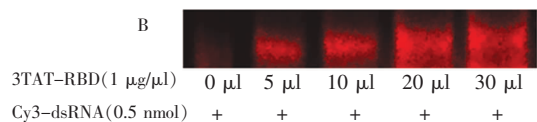


图 2 3TAT-RBD 蛋白的纯化及其与 dsRNA 结合能力

Fig.2 Purified recombinant 3TAT-RBD and its binding affinity with dsRNA

2.3 3TAT-RBD 通过蛋白导入法将 dsRNA 运输到细胞内

为检测 3TAT-RBD 能否将 dsRNA 导入胶质瘤 gli36 细胞,实验分 Cy3-dsRNA 和 3TAT-RBD+Cy3-dsRNA 处理组。细胞经过 2 h 孵育后,荧光共聚焦显微镜检测发现 3TAT-RBD+Cy3-dsRNA 处理组中,导入细胞内 Cy3-dsRNA 的量明显比对照组多,且导入的 Cy3-dsRNA 主要分布在胞浆中(图 3)。

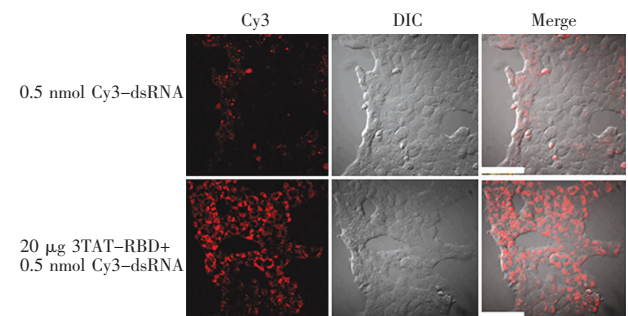


图 3 3TAT-RBD 将 dsRNA 导入 gli36 细胞

Fig.3 Delivery of dsRNA into gli36 cells by 3TAT-RBD

2.4 3TAT-RBD 将 siRNA 导入 gli36 细胞对线粒体分裂蛋白 Drp1 的干扰效果

通过共聚焦荧光显微镜对导入每个 gli36 细胞内 Cy3-dsRNA 的荧光强度进行定量分析,其中以 Lipofectamine 2000 的导入平均荧光强度为 100%进行计算。实验结果如图 4A 显示,20 μg 3TAT-RBD 导入 Cy3-dsRNA 的荧光强度为 95.33 ± 9.61 ;3 μl Lipofectamine 2000 导入 Cy3-dsRNA 的荧光强度为 99.67 ± 8.50 。统计分析显示,20 μg 3TAT-RBD 和 3 μl Lipofectamine 2000 在将 Cy3-dsRNA 导入 gli36 细胞的效率上差异无统计学意义 ($t=0.587, P=0.717$)。为进一步检测 3TAT-RBD 在 RNA 干扰实验中的效果,实验分阴性对照组、

Lipo+siRNA 组和 3TAT-RBD+siRNA 组。蛋白印迹试验结果通过 Quantity one 软件对条带进行灰度值分析。每组 Drp1 条带的灰度均与相应内参的灰度进行标化,且以阴性对照组标化后的 Drp1 灰度为 100% 计算 Lipo+siRNA 和 3TAT-RBD+siRNA 组 Drp1 的相对灰度值。结果如图 4B 所示,Lipo+siRNA 和 3TAT-RBD+siRNA 组均能有效抑制线粒体分裂蛋白 Drp1 的表达。蛋白条带灰度定量分析结果显示,Lipo+siRNA 和 3TAT-RBD+siRNA 组 Drp1 表达水平分别为对照组的 $(36.21 \pm 13.96)\%$ 和 $(42.13 \pm 10.78)\%$;且 Lipo+siRNA 和 3TAT-RBD+siRNA 组在抑制 Drp1 蛋白表达效果上差异无统计学意义 ($t=0.445, P=0.70$),这说明 3TAT-RBD 在 RNA 干扰效果上与目前常用的试剂 Lipofectamine 2000 相仿。

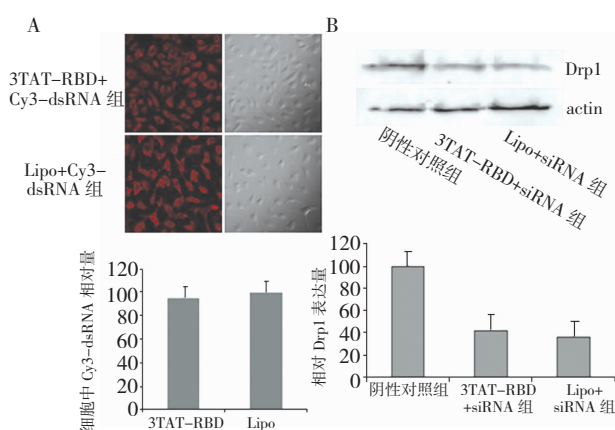


图 4 3TAT-RBD 将 siRNA 导入 gli36 细胞以干扰的 Drp1 表达

Fig.4 Silencing Drp1 expression by 3TAT-RBD-mediated siRNA delivery in gli36 cells

3 讨论

1988 年 Green 和 Loewenstein^[4]、Frankel 和 Pabo^[5] 分别从人类免疫缺陷病毒中发现 HIV-TAT 能以不依赖受体方式穿透细胞膜,并把这种特殊的多肽称为穿膜多肽 (cell-penetrating peptide, CPP)。在此后的研究中,陆续发现了多种不同的 CPP^[6-7]。有研究报道, CPP 在离体和整体实验中均有良好的穿膜效应,已将其成功地应用于多种不同的生物活性分子,如蛋白、多肽、核酸、脂质体等导入细胞以进行治疗^[8-10],这也被称为蛋白导入疗法。

在本研究中,利用 HIV-TAT 与 PKR 中和短 dsRNA 有结合能力的 Motif1 相互融合以构建 3TAT-RBD。通过 HIV-TAT 将 siRNA 导入细胞,并对线粒体分裂蛋白 Drp1 进行干扰。实验结果发现,3TAT-RBD 在对 Drp1 表达的干扰效果上与目前常用的 Lipofectamine 2000 很相近。由于穿膜多肽 TAT 对细胞无明显的选择性,故可用于原代细胞的 RNA 干扰。另外,目前尚无报道 TAT 对细胞具有明显毒

性^[11-12]。故 3TAT-RBD 在将来很有可能成为 RNA 干扰实验的新工具蛋白。当然,目前 3TAT-RBD 依然有尚需要优化的地方。从纯化蛋白考马斯亮兰染色的结果可以看出,目的蛋白的纯度依然不够,故 3TAT-RBD 的纯化有待进一步改善,如利用快速蛋白液相色谱 (fast protein liquid chromatography, FPLC) 技术进一步提高目的蛋白的纯度。其次,在本研究中只检测了 3TAT-RBD 对线粒体分裂蛋白 Drp1 的干扰效果。为实现将来的广泛应用,3TAT-RBD 对其他基因的 RNA 干扰实验的效果,尤其是一些致病基因,有必要进一步探讨。第三,虽然 3TAT-RBD 的分子量很小,约 15 kD,但如果在整体实验中使用的話,其免疫原性也有必要进一步确定。总之,3TAT-RBD 虽然目前有需要进行优化的地方,但其在 RNA 干扰实验中的应用前景依然很乐观。

参 考 文 献

- [1] Inoue M, Tomizawa K, Matsushita M, et al. p53 protein transduction therapy: successful targeting and inhibition of the growth of the bladder cancer cells[J]. Eur Urol, 2006, 49(1): 161-168.
- [2] Ucci JW, Kobayashi Y, Choi G, et al. Mechanism of interaction of the double-stranded RNA (dsRNA) binding domain of protein Kinase R with short dsRNA sequences[J]. Biochemistry, 2007, 46(1): 55-65.
- [3] Wadia JS, Stan RV, Dowdy SF. Transducible TAT-HA fusogenic peptide enhances escape of TAT-fusion proteins after lipid raft macropinocytosis[J]. Nat Med, 2004, 10(3): 310-315.
- [4] Green M, Loewenstein PM. Autonomous functional domains of chemically synthesized human immunodeficiency virus tat trans-activator protein[J]. Cell, 1988, 55(6): 1179-1188.
- [5] Frankel AD, Pabo CO. cellular uptake of the tat protein from human immunodeficiency virus[J]. Cell, 1988, 55(6): 1189-1193.
- [6] Elliott G, O'Hare P. Intracellular trafficking and protein delivery by a herpesvirus structural protein[J]. Cell, 1997, 88(2): 223-233.
- [7] Futaki S. Oligoarginine vectors for intracellular delivery: design and cellular-uptake mechanisms[J]. Biopolymers, 2006, 84(3): 241-249.
- [8] Kim D, Kim CH, Moon JI, et al. Generation of human induced pluripotent stem cells by direct delivery of reprogramming proteins[J]. Cell Stem Cell, 2009, 4(6): 472-476.
- [9] Michiue H, Tomizawa K, Wei FY, et al. The NH2 terminus of influenza virus hemagglutinin-2 subunit peptides enhances the antitumor potency of polyarginine-mediated p53 protein transduction[J]. J Biol Chem, 2005, 280(9): 8285-8289.
- [10] Snyder EL, Meade BR, Saenz CC, et al. Treatment of terminal peritoneal carcinomatosis by a transducible p53-activating peptide[J]. PLoS Biol, 2004, 2(2): 186-193.
- [11] 熊维德, 王攀, 张迎庆. 穿膜肽的研究进展[J]. 海峡药学, 2008, 9: 1-4.
- [12] 王桂华, 孙黎, 邓豫, 等. TAT-N24 穿膜融合多肽的表达与鉴定[J]. 华中科技大学学报(医学版), 2010, 39(2): 175-178.

(责任编辑: 冉明会)