

骨形态发生蛋白 10 及其突变体在 CHO 细胞中的表达

段珂¹, 段作营¹, 金坚^{*2}

(1. 江南大学 生物工程学院, 江苏 无锡 214122; 2. 江南大学 生命科学与健康工程学院, 江苏 无锡 214122)

摘要: 为了解决骨形态发生蛋白 10(bone morphogenetic protein 10, BMP10)前体蛋白 proBMP10 在中国仓鼠卵巢 (CHO) 细胞中由于 Furin 导致的表达产物不均一问题, 构建了 proBMP10 在 Furin 酶切识别位点处的突变体 proBMP10-1(R313K)和 proBMP10-2(R316K), 并分别将目的基因定点整合进 CHO-K1-*BAK*⁻/*BAX*⁻基因组, 成功构建了稳定表达目标蛋白质的重组 CHO 细胞株。结果表明, proBMP10-2 (R316K) 不再被 Furin 切割, 且具有生物活性, 而 proBMP10-1 (R313K) 仍然会被 Furin 切割。

关键词: 骨形态发生蛋白 10; 突变体; 定点整合

中图分类号: Q 291 文章编号: 1673-1689(2024)01-0106-07 DOI: 10.12441/spyswjs.20210927002

Expression of Bone Morphogenetic Protein 10 and Its Mutants in CHO Cells

DUAN Ke¹, DUAN Zuoying¹, JIN Jian^{*2}

(1. School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. School of Life Sciences and Health Engineering, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: To address the issue of heterogeneous expression products derived from proBMP10 (the precursor protein of bone morphogenetic protein 10, BMP10) in Chinese hamster ovary (CHO) cells caused by Furin, the mutations of proBMP10 at its Furin recognition sites, proBMP10-1 (R313K) and proBMP10-2 (R316K), were constructed and site-directedly integrated into the genome of CHO-K1-*BAK*⁻/*BAX*⁻ respectively. The recombinant CHO cell lines stably expressing the target proteins were successfully established. The results showed that the proBMP10-2 (R316K) was no longer cleaved by Furin and retained biological activity, while proBMP10-1 (R313K) continued to be cleaved by Furin.

Keywords: bone morphogenetic protein 10, mutant, site-specific integration

骨形态发生蛋白(bone morphogenetic proteins, BMPs)家族属于 TGF- β 超家族, 是一类调节细胞生长和分化的细胞外信号多肽, 可诱导骨髓充质干细胞成骨分化^[1]。骨形态发生蛋白 10 是 BMPs 家族中的一员, 其表达被限制在心肌细胞中, 在胚胎心脏发育和心肌修复过程中发挥重要作用^[2], 在临床上具有治疗心力衰竭和降低肿瘤治疗药物造成的心

脏毒性的潜力^[3-4]。

天然 BMP10 分子由 424 个氨基酸残基组成, 全长单体蛋白质由信号肽(signal peptide)、前导肽(propeptide)和成熟肽(mature chain)3 部分组成^[5]。1~21 位氨基酸为信号肽, 22~316 位氨基酸为前导肽, 317~424 位氨基酸为成熟肽, 在前导肽与成熟肽连接处 313~316 位氨基酸处有一个 Furin 特异性识

收稿日期: 2021-09-27 修回日期: 2021-11-08

* 通信作者: 金 坚(1960—), 男, 博士, 教授, 博士研究生导师, 主要从事长效重组药物设计, 心脑血管和糖尿病药物、肿瘤药物抵抗研究。E-mail: jinjian31@126.com

别位点 RIRR¹³¹⁶,在 67 位和 131 位氨基酸处存在两个蛋白质糖基化位点^[6]。

作者所在研究团队前期在 CHO 细胞中随机整合并成功表达 BMP10,发现 BMP10 前体蛋白 proBMP10 (含前导肽和成熟肽) 而不是成熟肽 rhBMP10 可能在药物应用方面更有优势^[7]。但由于 Furin 的存在,造成表达产物不均一,给后续成药造成一定困难。据文献报道,在 Furin 的特异性识别位点 (313~316 位氨基酸,RIRR¹³¹⁶) 中,313 位与 316 位的精氨酸是发生切割的必要氨基酸^[8]。为了得到不被 Furin 切割的单一形态的 proBMP10,并在尽可能不改变蛋白质性质的情况下,考虑用同为碱性氨基酸的赖氨酸在这两个位点对 proBMP10 进行突变,突变体 1(proBMP10-1)将 313 位的精氨酸突变为赖氨酸(R313K),突变体 2(proBMP10-2)将 316 位的精氨酸突变为赖氨酸(R316K)。

由传统的随机整合方法所得到的重组 CHO 细胞,由于基因组的固有不稳定性、整合位点的不稳定性及细胞凋亡等因素的影响会造成外源蛋白质表达的不稳定性^[9-10]。因此,本研究中采用作者所在研究团队构建的抗凋亡 IE3 细胞株(CHO-K1-BAK/BAX-双敲除细胞),并采用 CRISPR/Cas9 技术^[11-12],在作者所在研究团队筛选并已验证可稳定表达外源蛋白质的特定位点^[13],定点整合 proBMP10 及其突变体 proBMP10-1 和 proBMP10-2 的基因,以期得到表达产物单一、表达稳定、有活性的 proBMP10。

1 材料与方法

1.1 质粒与细胞

大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞、EGFP 质粒、IE3 细胞株(CHO-K1-BAK/BAX-双敲除细胞)由作者所在研究团队构建并保存;pUC57/proBMP10、pUC57/proBMP10-1、pUC57/proBMP10-2 由南京金斯瑞公司合成;Psk-U6-gRNA 和 Cas9-DTU 质粒由复旦大学卢大儒教授惠赠;proBMP10 活性测定细胞 P19 由中国医学科学院阜外医院心血管病国家重点实验室惠赠。

1.2 主要试剂

限制性内切酶(*Kpn* I、*Sma* I)和 T4 DNA 连接酶:赛默飞公司;DMEM-F12 培养基和胎牛血清(FBS):美国 Gibco 公司;质粒小量提取试剂盒、PCR 产物纯化试剂盒:上海生工生物工程有限公司;引物合成和测序由金唯智公司完成;anti-BMP10 propeptide 抗体、rhBMP10 标准品:R&D 公司;其余试剂为国产或进口分析纯产品。

1.3 proBMP10 及其突变体重组 IE3 细胞株的构建

1.3.1 设计思路 重组 IE3 细胞株采用定点整合的方法进行构建,整合位点是 CHO 细胞基因组中 NW_003626341.1 内第 1 689 碱基(上下游 1 614~1 763 碱基内)处^[13]。位于同源臂内的 EGFP 和 Puro 为正选标记,mCherry 为反选标记,发生定点整合的细胞株在含嘌呤霉素的压筛培养基中表现为只发绿光^[13]。供体片段定点整合方法如图 1 所示。

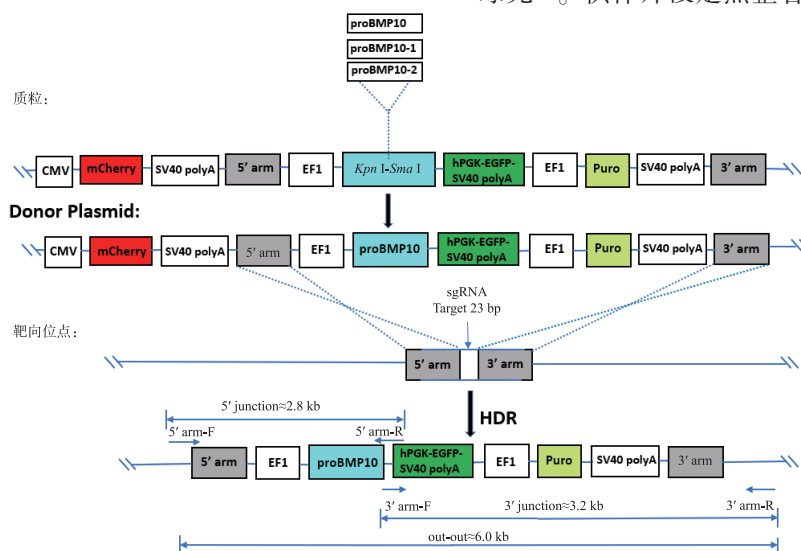


图 1 供体片段定点整合方法示意图

Fig. 1 Illustration of donor fragment site-specific integration

1.3.2 引物设计及合成 proBMP10 及其突变体 PCR 引物序列见表 1。其中:FL-5'和 FL-3'的下划波浪线部分为 *Kpn* I 和 *Sma* I 的酶切位点;MID-5'和 MID-3'为 his-tag 和肠激酶识别位点引物,下划

线部分为 his-tag 和肠激酶碱基序列。5'arm-F 和 5'arm-R 用来验证 5'arm 的定点整合,3'arm-F 和 3'arm-R 引物用来验证 3'arm 的定点整合。引物均由金唯智公司合成。

表 1 proBMP10 及其突变体 PCR 引物
Table 1 Primers for amplification of proBMP10 protein and its mutants by PCR

引物名称	序列
FL-5'	GGGGTACCCCATGGGCTCTCTGGTCCTGACAC
FL-3'	TCCCCCGGGGCTATCTACAGCCACATTCGGAGACG
MID-5'	CATCACCACCACCATCAGCAGCAGCAGACAAGAGCCCCATCATGAACCTAGAGCAGTCT
MID-3'	CTTGTCGTCGTCGTCGTGATGGTGGTGGTATGGCCAGAAACCAAGTAAGCTGC
5'arm-F	CACCTTTAATCTCGGCACTCAGG
5'arm-R	CAGCTTGCCGGTGGTGAGATGAA
3'arm-F	CCGCCTGGATACGAAGCCTATGAA
3'arm-R	TACATGGAAAAGGGCAGGAGAG

1.3.3 供体质粒的构建 以 pUC57/proBMP10、pUC57/proBMP10-1、pUC57/proBMP10-2 质粒为模板,分别以 FL-5'和 MID-3'、FL-3'和 MID-5'为引物,进行 PCR 扩增^[14]。割胶回收后再以回收液为模板,FL-3'和 FL-5'为引物,再次进行 PCR 扩增^[14]。回收液和 EGFP 质粒分别用 *Kpn* I 和 *Sma* I 进行酶切,割胶回收后加入 T4 DNA 连接酶进行连接,然后转化至感受态 *E.coli* DH5 α ,涂布于含 100 μ g/mL 氨苄青霉素的 LB 固体培养平板上,37 $^{\circ}$ C 过夜培养,第 2 天挑取单菌落,进行菌落 PCR 鉴定,并送金唯智公司进行测序。

1.3.4 细胞转染 将上述得到的 3 个供体质粒分别与 Psk-U6-gRNA 质粒及 Cas9-DTU 质粒共转染 IE3 细胞株(供体质粒、Psk-U6-gRNA 质粒、Cas9-DTU 质粒的质量比为 1.8:1.8:1.0)^[13]。转染之后的 10 d 内,压筛扩培抗药细胞。

1.4 细胞克隆的筛选

待细胞池中细胞长到合适状态时,用流式细胞仪挑选只发绿光不发红光的单克隆细胞至 96 孔板中,用含体积分数 10%胎牛血清的 DMEM-F12 培养基培养 10 d,扩培至 24 孔板中,等到细胞汇合度达到 80% 时更换无血清培养基培养 48 h,取上清液进行 Dot blot 检测。选取表达目的蛋白质的阳性孔提取基因组,分别以 5'arm-F 和 5'arm-R、3'arm-F 和 3'arm-R 为引物,进行 PCR 定点整合验证,并选取相对分子质量正确的条带测序验证^[13]。选取 Dot blot 验证和 PCR 验证都正确的单克隆,取上清液进

行 Western blot 检测。具体方法为:经 120 g/L SDS-PAGE 分离蛋白质,转移至 NC 膜上,以 50 g/L 脱脂奶粉室温封闭 2 h;TBST 漂洗 3 次,加入 anti-BMP10 propeptide 抗体(1:1 000 稀释),室温孵育 4 h;TBST 漂洗 3 次,加入山羊抗小鼠二抗(1:2 000 稀释),室温孵育 2 h;ECL 显色成像^[14]。

将筛选出的高表达克隆株扩培至 6 孔板中,用含体积分数 10%胎牛血清的 DMEM-F12 培养基培养 2 d 后,用 PBS 清洗扩培至 T25 培养瓶中,待到细胞汇合度达到 90% 时扩培细胞至 T75 培养瓶中,最后进行悬浮驯化,挑选表达量最高的细胞株,分别命名为 IE3-proBMP10、IE3-proBMP10-1、IE3-proBMP10-2。

1.5 目的蛋白质的初步纯化与 Furin 酶切验证

由于在构建 proBMP10 及其突变体时,在全长单体蛋白质的信号肽与前导肽之间,即 proBMP10 分子的 N 端,添加了 his-tag 和肠激酶识别位点,因此,采用镍柱对目的蛋白质进行初步纯化。

高表达细胞株 IE3-proBMP10、IE3-proBMP10-1、IE3-proBMP10-2 分别经 3 L 摇瓶流加表达 8 d,收集培养液。经 1 000 g 离心 10 min 后保留上清液,上清液经 8 000 g 离心 40 min 后先经 0.45 μ m 滤膜再经 0.22 μ m 滤膜抽滤,过镍柱纯化。以 A 液(500 mmol/L Tris-HCl、300 mmol/L NaCl、25 mmol/L 咪唑,pH 8.0)平衡柱子,收集流穿液;用上一步抽滤液上样,最后直接以 B 液(500 mmol/L Tris-HCl、300 mmol/L NaCl、200 mmol/L 咪唑,pH 8.0)洗脱,收集

洗脱峰处洗脱液,经SDS-PAGE和Western blot检测,取蛋白质液加入肠激酶,于37℃酶切12 h后加入Furin酶切1 h,进行Western blot检测。

1.6 目的蛋白质的活性检测

BMP10与受体结合后,会使细胞内的Smad 6基因表达水平上升,因此采用qPCR法检测Smad 6表达情况作为proBMP10-2活性的指标^[15]。采用不添加任何因子的培养基作为阴性对照,rhBMP10标准品为阳性对照,考虑到rhBMP10和proBMP10-2分子大小的差异(后者相对分子质量 5.8×10^4 约为前者 1.3×10^4 的4.5倍),为保证反应体系中具有比较一致的物质的量浓度,在测定时,rhBMP10的质

量浓度为100 μg/L,proBMP10-2质量浓度为450 μg/L。

2 结果与分析

2.1 重组表达质粒的鉴定

在含100 μg/mL氨苄青霉素的3个LB固体培养平板上各随机挑选10个克隆,经菌落PCR鉴定,EGFP-proBMP10的7、8、10号克隆,EGFP-proBMP10-1的8、9、10号克隆,EGFP-proBMP10-2的11、13、14、15号克隆在约1 300 bp处可见阳性条带(见图2)。

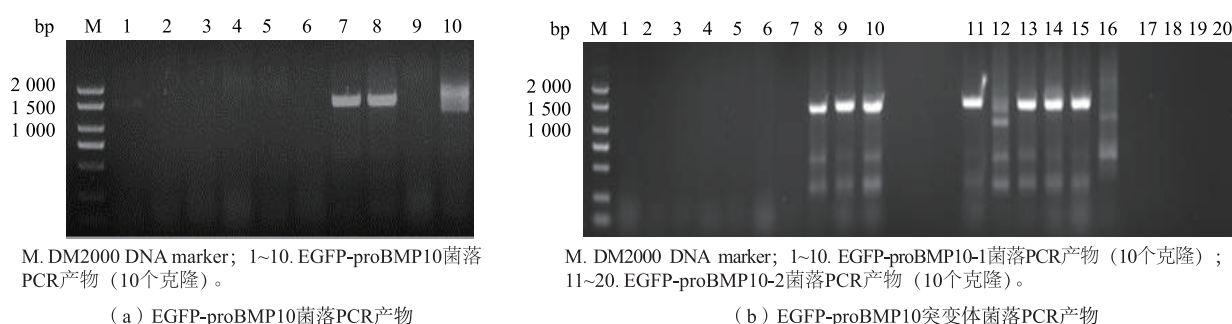
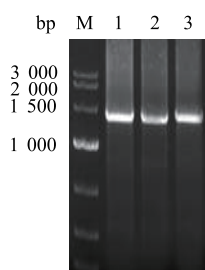


图2 EGFP-proBMP10及其突变体的菌落PCR产物电泳图

Fig. 2 Electrophoresis diagram of EGFP-proBMP10 and its mutant colony PCR

分别从EGFP-proBMP10的7号克隆、EGFP-proBMP10-1的9号克隆、EGFP-proBMP10-2的11号克隆提取质粒,并进行酶切鉴定,在约1 300 bp处均可见特异性条带(见图3)。对这3个质粒进一步测序验证,结果与设计的基因序列比对结果一致,表明3种重组表达质粒构建成功。



M. DM3000 DNA marker; 1. EGFP-proBMP10的7号克隆; 2. EGFP-proBMP10-1的9号克隆; 3. EGFP-proBMP10-2的11号克隆。

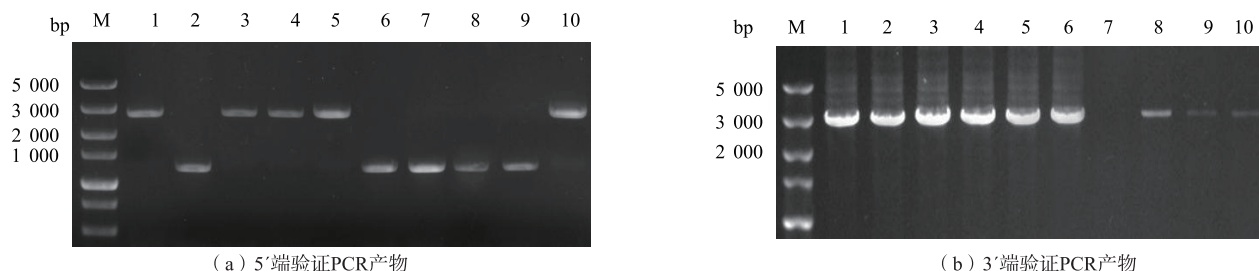
图3 质粒EGFP-proBMP10及其突变体酶切鉴定电泳图

Fig. 3 Electrophoresis diagram of plasmid EGFP-proBMP10 and its mutants by restriction digestion

2.2 细胞克隆的筛选

根据敲入整合策略,收集转染后的细胞用流式细胞仪分选只发绿光的细胞,培养10 d后转移至24孔板,取不含血清的细胞培养上清液经Dot blot筛选出proBMP10及其突变体的表达株,提取单克隆细胞基因组进行PCR验证,结果如图4所示。结果显示,proBMP10的1号和3号克隆、proBMP10-1的4号和5号克隆以及proBMP10-2的10号克隆的5'端PCR产物和3'端PCR产物都同时出现了大小符合预期(5'端约2 800 bp;3'端约3 200 bp)的DNA条带。通常当5'端和3'端引物同时扩增出大小符合预期的片段,就基本可以认为目的基因定点整合成功。对这5株单克隆细胞株PCR验证产物进行测序,结果表明在NW_003626341.1内第1 689碱基处成功敲入了含proBMP10及其突变体编码基因的DNA片段,得到了定点整合的表达proBMP10及其突变体的重组CHO-K1-IE3工程细胞株。

取这5株重组细胞克隆株的无血清贴壁培养上清液进行Western blot分析,在相对分子质量约



M. DM5000 DNA marker; 1~3. proBMP10(3 个克隆); 4~6. proBMP10-1(3 个克隆); 7~10. proBMP10-2(4 个克隆)。

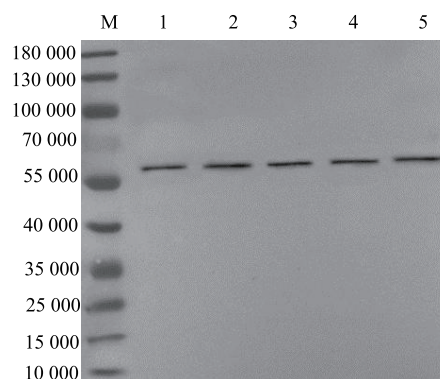
图4 proBMP10 及其突变体基因定点整合验证结果

Fig. 4 Verification of site-specific integration of proBMP10 and its mutant genes

5.8×10^4 处均可见明显条带(见图5),表明定点敲入的 proBMP10 及其突变体基因成功表达。目的蛋白质相对分子质量理论值为 4.8×10^4 ,但电泳条带显示位置在相对分子质量 5.8×10^4 ,这与天然合成的 proBMP10 电泳时呈现的分子大小是一致的^[8]。由于 proBMP10 在 67 位和 131 位氨基酸处存在两个蛋白质糖基化位点,推测它们在 CHO 细胞中表达时可能发生了糖基化。此外,从图5中可以看出,在贴壁培养条件下,无论 proBMP10 还是其突变体,在 Western blot 鉴定时都只在相对分子质量 5.8×10^4 处存在单一条带,未观察到 Furin 酶切所形成的条带。

2.3 proBMP10 及其突变体的初步纯化及 Furin 酶切鉴定

经过悬浮驯化筛选出 3 株高表达细胞株,分别命名为 IE3-proBMP10、IE3-proBMP10-1、IE3-proBMP10-2。在 CD 培养基中流加表达 8 d,取发酵上清液进行镍柱纯化,将发酵上清液、流穿液、洗脱液分别进行 SDS-PAGE 分析,结果见图6。结果显示,3 株细胞株的发酵上清液过镍柱后基本实现了纯化。IE3-proBMP10 和 IE3-proBMP10-1 的镍柱洗

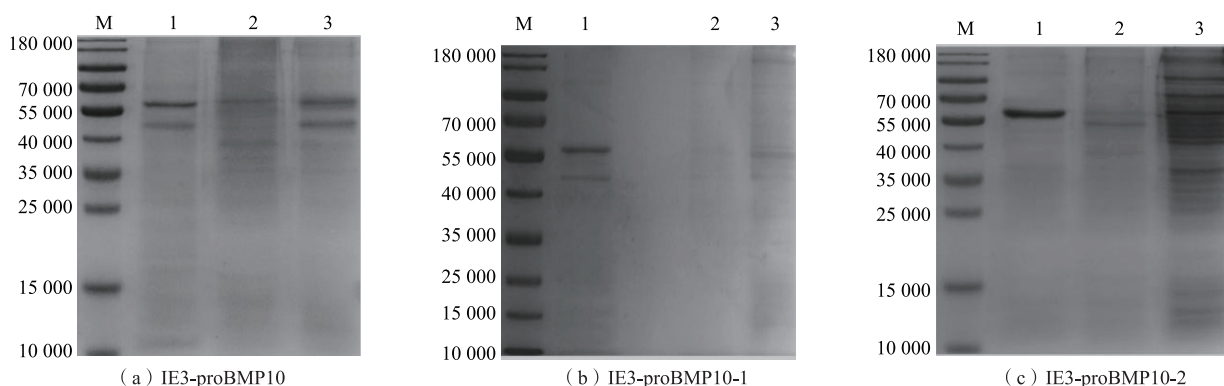


M. 蛋白质 marker; 1~2. IE3-proBMP10; 3~4. IE3-proBMP10-1; 5. IE3-proBMP10-2。

图5 重组 CHO 单克隆细胞株贴壁培养上清液的 Western blot 鉴定

Fig. 5 Western blot identification of adherent culture supernatant of recombined CHO cells

脱液除了在相对分子质量 5.8×10^4 处出现了明显条带之外,在相对分子质量 4.5×10^4 处也出现了可见条带,而 IE3-proBMP10-2 只在相对分子质量 5.8×10^4 处有可见条带。

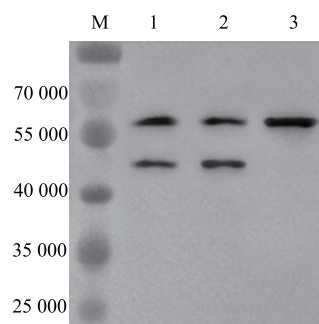


M. 蛋白质 marker; 1. 洗脱液; 2. 流穿液; 3. 发酵上清液。

图6 重组细胞流加培养液镍柱纯化的 SDS-PAGE 分析

Fig. 6 SDS-PAGE analysis of recombinant cells with added culture medium purified by nickel column chromatography

对上述电泳结果同时进行 Western blot 鉴定,结果如图 7 所示。可以看出,IE3-proBMP10、IE3-proBMP10-1 目的蛋白质镍柱纯化产物分别在相对分子质量 5.8×10^4 和 4.5×10^4 处可见 2 个条带,而 IE3-proBMP10-2 目的蛋白质镍柱纯化产物在相对分子质量 5.8×10^4 可见单一条带。表明 IE3-proBMP10 和 IE3-proBMP10-1 所表达的目的蛋白质有可能被 Furin 酶切,而 IE3-proBMP10-2 突变株表达的目的蛋白质则可能不再被 Furin 酶切。



M. 蛋白质 marker; 1. IE3-proBMP10 目的蛋白质镍柱纯化产物; 2. IE3-proBMP10-1 目的蛋白质镍柱纯化产物; 3. IE3-proBMP10-2 目的蛋白质镍柱纯化产物。

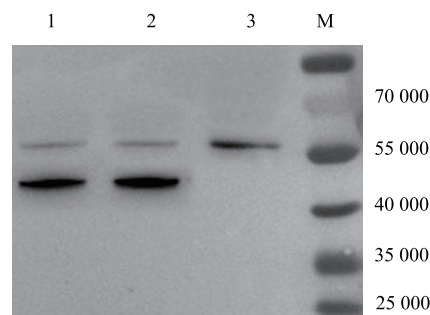
图 7 目的蛋白质镍柱纯化产物的 Western blot 分析

Fig. 7 Western blot analysis of purified target proteins by nickel column

为了进一步验证,进行了 Furin 体外酶切实验,结果如图 8 所示。Furin 酶切后,anti-BMP10 propeptide 抗体的杂交结果显示,proBMP10 和 proBMP10-1 在相对分子质量 5.8×10^4 的条带基本消失,而在相对分子质量 4.5×10^4 处的条带得到了加强。表明 proBMP10-1 的确和 proBMP10 一样,仍可以被 Furin 酶切,proBMP10 分子上 313 位的精氨酸不是 Furin 酶切必需的,将其替代为赖氨酸并不能阻止切割的发生。而 proBMP10-2 仍在相对分子质量 5.8×10^4 处出现单一条带,未在相对分子质量 4.5×10^4 处出现 Furin 切割典型条带,表明 proBMP10-2 突变体不再被 Furin 识别和切割,proBMP10 分子上 316 位的精氨酸是 Furin 酶切必需的。

2.4 目的蛋白质的活性

为了验证不能被 Furin 酶切的 proBMP10-2 突变体是否仍具有生物活性,采用 qPCR 检测 Smad 6 相对表达量,结果如图 9 所示。结果表明,proBMP10-2 经肠激酶酶切前后,都具有一定的活性,Smad 6 表



M. 蛋白质 marker; 1. proBMP10; 2. proBMP10-1; 3. proBMP10-2。

图 8 目的蛋白质酶切后的 Western blot 分析

Fig. 8 Western blot analysis of target proteins after digestion

达量分别为阴性对照的 6.3 倍和 6.2 倍,与相同浓度下的 rhBMP10 标准品活性相当。表明 proBMP10-2 具有生物活性,且 his-tag-DDDDK 标签的存在对其活性无明显影响。

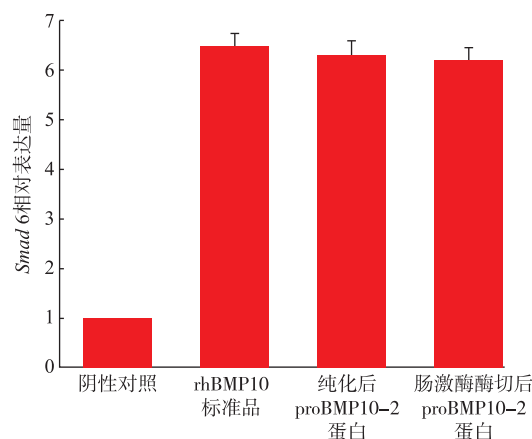


图 9 proBMP10-2 的活性检测

Fig. 9 Determination of activity of proBMP10-2

3 结语

本研究中构建了 proBMP10 Furin 酶切位点的突变体 proBMP10-1 (R313K) 和 proBMP10-2 (R316K)。实验结果表明,将 proBMP10 分子中 313 位精氨酸突变为赖氨酸并不能阻止 Furin 对 proBMP10 的酶切,而将 proBMP10 分子中 316 位精氨酸突变为赖氨酸则可以阻止 Furin 对 proBMP10 的酶切。活性测定结果表明,改造后的 proBMP10-2 仍具有生物活性,这有效避免了 proBMP10 表达产物不均一的问题,为其成药提供了一条新思路。

应用作者所在研究团队建立的 CHO 定点整合表达体系,在抗凋亡的 IE3 细胞株 (CHO-K1-BAK7/

BAX-双敲除细胞)中,筛选得到了目的蛋白质的稳定表达细胞株 IE3-BMP10、IE3-BMP10-1 和 IE3-

BMP10-2,缩短了重组细胞株的构建流程,验证了作者所在研究团队建立的定点整合体系的有效性。

参考文献:

- [1] CONSTAM D B,ROBERTSON E J. Regulation of bone morphogenetic protein activity by pro domains and proprotein convertases[J]. **The Journal of Cell Biology**,1999,144(1):139-149.
- [2] CHEN H Y,SHI S,ACOSTA L,et al. BMP10 is essential for maintaining cardiac growth during murine cardiogenesis[J]. **Development**,2004,131(9):2219-2231.
- [3] NAKANO N,HORI H,ABE M,et al. Interaction of BMP10 with Tcap may modulate the course of hypertensive cardiac hypertrophy[J]. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**,2007,293(6):3396-3403.
- [4] SUN L J,YU J,QI S,et al. Bone morphogenetic protein 10 induces cardiomyocyte proliferation and improves cardiac function after myocardial infarction[J]. **Journal of Cellular Biochemistry**,2014,115(11):1868-1876.
- [5] CARREIRA A C,ALVES G G,ZAMBUZZI W F,et al. Bone morphogenetic proteins: structure, biological function and therapeutic applications[J]. **Archives of Biochemistry and Biophysics**,2014,561:64-73.
- [6] JIANG H,SALMON R M,UPTON P D,et al. The prodomain-bound form of bone morphogenetic protein 10 is biologically active on endothelial cells[J]. **The Journal of Biological Chemistry**,2016,291(6):2954-2966.
- [7] 王若璋,金坚. 重组人骨形态发生蛋白 10 的表达纯化及其心脏保护功能[J]. 实用临床医药杂志,2019,23(21):1-6.
WANG R Z,JIN J. Expression and purification of recombinant human bone morphogenetic protein 10 and its cardiac protection effect[J]. **Journal of Clinical Medicine in Practice**,2019,23(21):1-6. (in Chinese)
- [8] SUSAN-RESIGA D,ESSALMANI R,HAMELIN J,et al. Furin is the major processing enzyme of the cardiac-specific growth factor bone morphogenetic protein 10[J]. **The Journal of Biological Chemistry**,2011,286(26):22785-22794.
- [9] WURM F M. Production of recombinant protein therapeutics in cultivated mammalian cells[J]. **Nature Biotechnology**,2004,22(11):1393-1398.
- [10] HELLER-HARRISON R,CROWE K,COOLEY C,et al. Managing cell line instability and its impact during cell line development[J]. **Biopharm International**,2009(4):18-20.
- [11] LEE J S,GRAV L M,PEDERSEN L E,et al. Accelerated homology-directed targeted integration of transgenes in Chinese hamster ovary cells via CRISPR/Cas9 and fluorescent enrichment[J]. **Biotechnology and Bioengineering**,2016,113(11):2518-2523.
- [12] PAROLA C,MASON D M,ZINGG A,et al. Genome engineering of hybridomas to generate stable cell lines for antibody expression[J]. **Methods in Molecular Biology**,2018,1850:79-111.
- [13] 杨蕾. 在 CHO-K1 细胞基因组内定点整合表达人血清白蛋白的研究[D]. 无锡:江南大学,2020.
- [14] 王若璋. 重组人骨形态发生蛋白 10(rhBMP10)的表达纯化和活性评价[D]. 无锡:江南大学,2019.
- [15] 李文军,郑雄飞,龚笑海,等. 骨形成蛋白 10 成熟肽在大肠杆菌中的表达纯化及活性分析[J]. 生物技术通讯,2016,27(4):488-491.
LI W J,ZHENG X F,GONG X H,et al. Expression and purification of mature bone morphogenetic protein 10 in *Escherichia coli* and its activity analysis[J]. **Letters in Biotechnology**,2016,27(4):488-491. (in Chinese)