

抗 A 型流感病毒聚合酶碱性蛋白 1 多克隆抗体的制备和鉴定

秦玉洁, 张廷虹, 叶昕

中国科学院微生物研究所, 北京 100101

秦玉洁, 张廷虹, 叶昕. 抗 A 型流感病毒聚合酶碱性蛋白 1 多克隆抗体的制备和鉴定. 生物工程学报, 2016, 32(1): 105-113.

Qin YJ, Zhang TH, Ye X. Preparation and detection of anti-influenza A virus polymerase basic protein 1 polyclonal antibody. Chin J Biotech, 2016, 32(1): 105-113.

摘要: 流感病毒属于正黏病毒科, 为有包膜包裹的单股负链 RNA 病毒。它的 8 个基因片段编码至少 16 种病毒蛋白, 其中 3 个蛋白组成流感病毒的聚合酶复合体。流感病毒聚合酶碱性蛋白 1 (PB1) 是该复合体的组分之一, 在病毒的转录、复制及重配中发挥重要的作用。为研究其功能, 构建 His-PB1 (aa 550-755) 融合蛋白原核表达质粒, IPTG 诱导融合蛋白表达, 通过镍柱亲和将其纯化, 然后作为抗原免疫家兔。对抗血清进行间接 ELISA 检测, 表明抗体效价可达 1:100 000。兔源 PB1 蛋白抗血清经亲和纯化后, 用于免疫印迹检测流感病毒 WSN 毒株 PB1 蛋白以及外源转染的 FLAG-PB1 蛋白, 结果表明该 PB1 抗体具有良好的特异性, 同时也能特异性识别其他亚型的 A 型流感病毒的 PB1 蛋白, 为进一步研究流感病毒 PB1 蛋白的功能奠定了基础。

关键词: 流感病毒, PB1, 多克隆抗体, 亲和纯化

Received: March 7, 2015; **Accepted:** May 4, 2015

Supported by: National Basic Research and Development Program of China (973 Program) (No. 2011CB504705), Key Projects in the National Science and Technology Pillar Program (No. 2013ZX10004611).

Corresponding author: Xin Ye. Tel: +86-10-64807508; E-mail: yex@im.ac.cn

国家重点基础研究发展计划 (973 计划) (No. 2011CB504705), 国家科技重大专项 (No. 2013ZX10004611) 资助。

Preparation and detection of anti-influenza A virus polymerase basic protein 1 polyclonal antibody

Yujie Qin, Tinghong Zhang, and Xin Ye

Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China

Abstract: Influenza A virus is an enveloped virus that belongs to the Orthomyxoviridae family. It has 8 negative RNA segments that encode 16 viral proteins. The viral polymerase consists of 3 proteins (PB1, PB2 and PA) which plays an important role in the transcription and replication of the influenza A virus. Polymerase basic protein 1 (PB1) is a critical member of viral polymerase complex. In order to further study the function of PB1, we need to prepare the PB1 antibody with good quality. Therefore, we amplified PB1 conserved region (nt1648–2265) by PCR and cloned it into pET-30a vector, and transformed into *Escherichia coli* BL21. The expression of His tagged PB1 protein was induced by IPTG, and His-PB1 proteins were purified by Ni-NTA resin. For preparation of PB1 protein antiserum, rabbits were immunized with His-PB1 fusion protein 3 times. Then the titer of PB1 polyclonal antibody was measured by indirect ELISA. The antibody was purified by membrane affinity purification and subjected to immunoblotting analysis. Data showed that PB1 antibody can recognize PB1 protein from WSN virus infected or pCMV FLAG-PB1 transfected cells. Meanwhile, PB1 antibody can also recognize specifically other subtype strains of influenza A virus such as H9N2 and H3N2. PB1 polyclonal antibody we generated will be a useful tool to study the biological function of PB1.

Keywords: influenza A virus, PB1, polyclonal antibody, affinity purification

流感病毒属于正黏病毒科，为有包膜包裹的单股负链 RNA 病毒^[1]。流感病毒 8 个基因片段编码 16 种蛋白^[2-3]。每个基因片段都被核蛋白 (NP) 以及 RNA 依赖的 RNA 聚合酶包裹，形成病毒核糖核蛋白复合体^[4]。其中，RNA 依赖的 RNA 聚合酶复合体由聚合酶碱性蛋白 1 (PB1)、聚合酶碱性蛋白 2 (PB2)、聚合酶酸性蛋白 (PA) 3 种组分构成。病毒感染宿主细胞之后，聚合酶复合体入核，完成病毒的转录及复制。PB1 在流感病毒聚合酶复合体中作为骨架起支撑作用且具有聚合酶活性，在 RNA 链延伸过程中起催化作用^[4-7]。此外 PB1 还含有病毒 RNA (vRNA) 及 cRNA 的结合域^[8-9]，与病毒的转录及复制密切相关。在流感病毒的重配中，PB1 蛋白及病毒表面糖蛋白经常发生重排，研究人员认为这

些重排能通过提高流感病毒的适应性使其在自然选择中占据优势^[10]，而且已经证明 PB1 蛋白与流感病毒的种间传递及适应有关^[10]。PB1 还与多种宿主因子如 CES1、CHAF1A、DDX54、EEF1A1 等存在相互作用^[4]。通过序列重排及突变分析表明 PB1 的活性位点位于其中部区域 S-D-D 基序^[11]。由此可见，流感病毒的 PB1 蛋白在病毒的发生发展中发挥着重要的作用，目前虽然有一些商品化的 PB1 的抗体，但是其特异性、灵敏度并不十分好。这为 PB1 蛋白的研究工作造成了不便。为了进一步研究流感病毒 PB1 蛋白与病毒组分及宿主细胞因子的相互作用，通过对 PB1 蛋白进行抗原表位分析以及同源比对，首次选取了流感病毒 PB1 蛋白 550–755 位氨基酸作为免疫原免疫家兔。同源比对结果

表明,该段区域在不同亚型的 A 型流感病毒 PB1 蛋白高度保守,例如:与 A/Puerto Rico/8/1934 (H1N1) 亚型有 98% 的同源性,与 A/Philippines/2/1982 (H3N2)、A/chicken/Vietnam/949B/2004 (H5N1)、A/Anhui/1-DEWH 730/2013 (H7N9) 的同源性分别为 84%、84% 和 83%。并得到了兔源的 PB1 蛋白多克隆抗体。利用抗原抗体的亲和纯化得到了效价及特异性都较好的抗 PB1 蛋白的多克隆抗体,为进一步研究该蛋白的功能特性奠定了基础。

1 材料与方 法

1.1 材料

1.1.1 材料

引物由博尚公司、华大基因合成;pET-30a 原核表达载体及 pHH21-PB1 重组质粒均由本实验室保存,大肠杆菌 *Escherichia coli* Top 10、BL21 感受态细胞由本实验室制备。WSN 病毒由本实验室制备,H3N2 以及 H9N2 亚型流感病毒由中国科学院微生物研究所严景华研究员惠赠。

1.1.2 试剂

rTaq DNA 聚合酶,10×PCR 缓冲液,*EcoR* I/*Hind* III,1 mol/L 缓冲液,T4 DNA 连接酶,T4 DNA 连接酶缓冲液均购自宝生物工程(大连)有限公司;胶回收试剂盒和镍柱购自 Qiagen 公司;质粒提取试剂盒、BCA protein Assay kit、显色用 A/B 液购自 Vigorous 公司;IPTG 购自 Merck 公司。

1.1.3 仪器

PCR 仪为 Bio-Rad 产品;摇床购自上海博彩生物科技有限公司;37 °C 温箱购自上海一恒科技有限公司;离心机购自 Eppendorf 公司;超

声破碎仪 JY92-2D 购自宁波新芝公司;核酸电泳仪购自北京君益东方电泳设备有限公司;蛋白电泳仪及凝胶成像仪购自上海天能公司;摄影暗匣购自广东粤华医疗器械厂有限公司。

1.2 方 法

1.2.1 pET-30a-PB1 (aa 550-755) 原核表达质粒的构建和鉴定

通过 Lasergene 软件预测 PB1 较为高效的抗原表位:分别采用 protean 中的 Chou-Fasman 方案和 Garnier 法对 PB1 蛋白的二级结构进行预测;通过 Hopp-woods 分析 PB1 蛋白的亲疏水性;通过 Emini 分析 PB1 蛋白的溶剂可及性;通过 Karplus-Schulz 方法分析 PB1 蛋白的可塑性;通过 Jameson-Wolf 预测 PB1 蛋白潜在的抗原表位,最终选取 PB1 蛋白的 550-755aa 段作为抗原区段^[12]。根据 PB1 蛋白的碱基序列及 pET-30a 载体多克隆位点序列设计扩增引物,上游引物:5'-CGGAATTCATGCTGTTTCATCAAAGATTA C-3',下游引物:5'-CCCAAGCTTCTACCGT CTGAGCTCTTCAAT-3'。引物两端分别引入了 *EcoR* I、*Hind* III 酶切位点,扩增片段为 618 bp。PCR 体系:rTaq DNA 聚合酶 0.25 μL;10×PCR 缓冲液 5 μL;dNTPs 4 μL;pHH21-PB1 质粒 0.25 μL;上游引物 1 μL;下游引物 1 μL;H₂O 38.5 μL。PCR 的条件为:95 °C 5 min;94 °C 30 s,50 °C 30 s,72 °C 40 s;72 °C 10 min,共设 30 个循环。PCR 产物全部进行 TAE 电泳后用胶回收试剂盒进行回收。PCR 产物纯化按说明书进行。将其经 *EcoR* I 和 *Hind* III 双酶切后,克隆于 pET-30a 中,并将连接产物转化 *E. coli* Top 10 感受态细胞。挑取转化子提质粒分别进行酶切及 PCR 验证。

1.2.2 His-PB1 (aa 550-755) 融合蛋白的原核表达及纯化

将测序正确的重组质粒转化 *E. coli* BL21 感受态细胞, 待菌液 OD_{600} 值至 0.4-0.6 时, 经终浓度 0.8 mmol/L 的异丙基- β -D-硫代半乳糖苷 (IPTG) 诱导表达, 采用 SDS-PAGE 进行蛋白表达分析。重组蛋白在 8 mol/L 尿素存在的变性条件下镍柱亲和纯化蛋白。BCA 试剂盒测定蛋白浓度。

1.2.3 His-PB1 (aa 550-755) 融合蛋白多克隆抗体的制备及纯化

将纯化后的 His-PB1 (aa 550-755) 融合蛋白与等体积的弗氏完全佐剂混合乳化并对成年雄性家兔颈背部皮下进行多点注射, 每次注射蛋白用量为 0.5 mg; 每隔两周免疫 1 次, 免疫 3 次后从家兔耳源静脉采血, 间接 ELISA 法检测抗血清效价; 最终收集免疫后的家兔血清加入 0.01% 的叠氮化钠于 -20°C 保存。将得到的抗血清进行亲和纯化。

将 PB1 融合蛋白抗原蛋白质电泳后转 PVDF 膜 (150 mA, 40 min), 5% 脱脂奶粉封闭 2 h, 丽春红染液染色, TBST 脱色后将膜上显示目的蛋白的条带剪碎加至 15 mL 离心管中, 加入 9 mL PBS、900 μL 抗血清及 100 μL 1 mol/L Tris (pH 9.0), 4°C 过夜。TBST 洗脱 (10 min \times 3 次)。向离心管中加入 200 μL 10 mmol/L 的甘氨酸 (pH 2.7), 室温孵育 1 h, 将溶液吸出转到另一个柱子中, 加入 8 μL 1.5 mol/L Tris (pH 8.8) 调节 pH, 稳定抗体。

1.2.4 ELISA 检测抗体效价

96 孔板每孔加入 100 μL 蛋白稀释液。免疫家兔后的抗血清梯度稀释后按每孔 100 μL 的量加至蛋白稀释液。封板, 4°C 冰箱静置过夜,

PBST (含有 0.5% Tween 的 PBS) 洗 3 遍, 每孔加入 100 μL 2.5% 脱脂奶粉静置封闭 1 h, PBST 洗 3 遍, 每孔加入 100 μL 抗兔二抗, 室温静置 1 h, PBST 洗 3 遍, 每孔加入 100 μL 显色液, 37°C 静置 30 min, 每孔加入 50 μL H_2SO_4 终止反应, 测定波长 450 nm 处 OD 值。

1.2.5 Western blotting 检测 PB1 抗体灵敏度及特异性

293T 细胞感染 MOI=0.5 的流感病毒或者转染 FLAG-PB1 真核表达质粒, 细胞裂解液处理之后进行蛋白质电泳, 结束后转膜 (湿法转膜) 200 mA 恒流转 50 min, 5% 的脱脂奶粉封闭 1 h, 将抗体稀释后与膜室温共孵育 2 h, TBST 洗膜 10 min \times 3 次, 抗兔的二抗室温孵育膜 1 h, 弃二抗, TBST 洗膜 10 min \times 3 次, 显色。

2 结果

2.1 PB1 蛋白抗原表位的生物信息学分析

通过 Protean 软件预测寻找 PB1 蛋白潜在的抗原表位, 最终选择了 550-755 这段氨基酸序列, PB1 的基因序列来源于 NCBI (GI: 194352384)。如图 1 所示, 该序列表达蛋白二级结构多是 β 转角和无规则卷曲, 且氨基酸多为亲水性氨基酸, 可及性与可塑性都较高, 这类结构多处于蛋白表面, 利于与抗体的嵌合^[12-13], 同源比对结果也表明该段序列高度保守。

2.2 pET-30a-PB1 (aa 550-755) 重组质粒的构建及鉴定

以 pHH21-PB1 质粒为模板对 PB1 基因 1 648-2 265 段进行 PCR 扩增。PCR 扩增产物约为 618 bp, 将其克隆于 pET-30a 表达载体中, 测序结果显示扩增片段与目的基因序列完全一致。

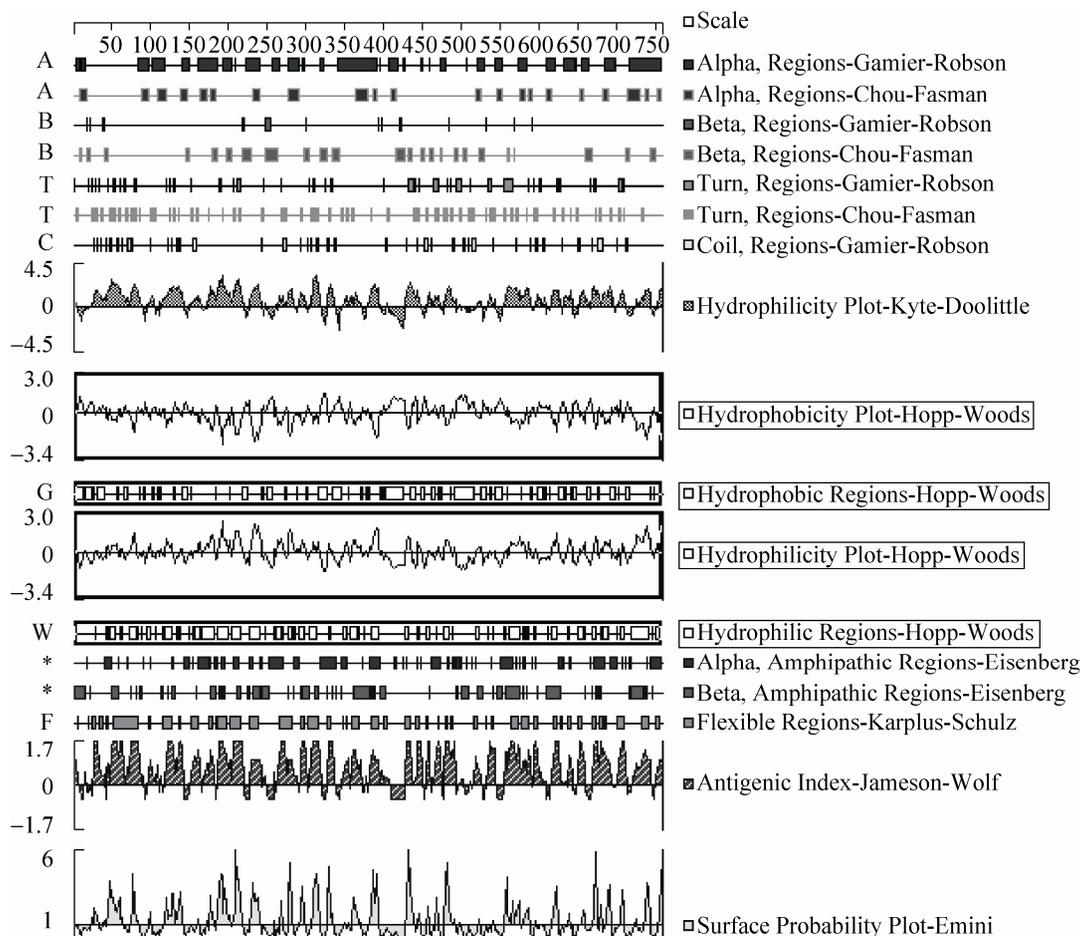


图 1 PB1 蛋白抗原表位的选取

Fig. 1 Selection of the antigenic epitopes of PB1. Chou-Fasman and Garnier were adopted to predict the second structure of PB1 protein. Hopp-woods were adopted to analyse the hydrophilicity of PB1 protein. Emini was adopted to analyse the solvent accessibility of PB1 protein. Karplus-Schulz was adopted to analyse the flexible region of PB1 protein. Jameson-Wolf was adopted to predict the potential antigenic epitopes of PB1 protein.

2.3 重组蛋白的表达及纯化

重组菌经 IPTG 诱导表达融合蛋白, 分子量大小预测为 24 kDa。经 SDS-PAGE 电泳分析, 显示在 24 kDa 处出现特异性的目的条带, 与预期相符。SDS-PAGE 检测发现, IPTG 诱导后 5-8 h 均可见明显大量的表达产物。同时超声结果显示, 重组蛋白主要存在于超声沉淀中, 表明目的蛋

白以包涵体的形式表达。将诱导 8 h 后的菌液离心, 沉淀超声后收取蛋白并进行纯化, SDS-PAGE 电泳结果表明蛋白纯化结果较好, 如图 2 所示。同时将纯化后的 His-PB1 (aa 550-755) 用 His 标签抗体进行 Western blotting 鉴定, 结果表明 (图 3) 抗 His 的 MAbs 与带有 His 标签的融合重组蛋白特异性结合, 也检测到了该蛋白的表达。

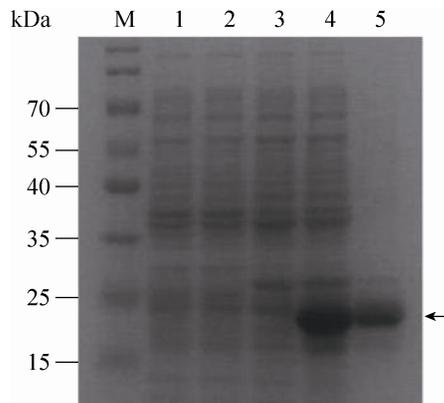


图2 His-PB1 融合蛋白的纯化

Fig. 2 Purification of the His-PB1 fusion protein. *E. coli* BL21 bacteria were transformed with pET-30a (lane 1, 2) or pET-30a-PB1 (lane 3, 4) and harvested at 8 h after IPTG induction (lane 2, 4). Lane 5 indicates the purified His-PB1 protein. The expression of protein was analysed by SDS-PAGE and stained by CBB. Arrow shows the expression of His-PB1 fusion protein. M: protein marker.

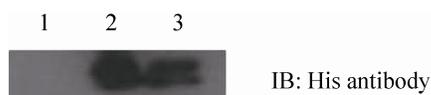


图3 His-PB1 融合蛋白的 Western blotting 鉴定

Fig. 3 Identification of the His-PB1 fusion protein by Western blotting. *E. coli* BL21 bacteria were transformed with pET-30a (lane 1) or pET-30a-PB1 (lane 2) and harvested at 8 h after IPTG induction. Lane 3 indicates the purified His-PB1 protein. The expression of protein was analysed by Western blotting and immunoblotted with anti-His tag antibody.

2.4 ELISA 检测抗体效价

纯化后蛋白经 BCA 试剂盒测得浓度为 0.58 g/L。将所得抗原免疫家兔，取免疫前血清，二次免疫后血清进行 ELISA 实验检测抗体效价。ELISA 结果表明所得兔源 PB1 多克隆抗体效价至少为 1 100 000 (图 4)。

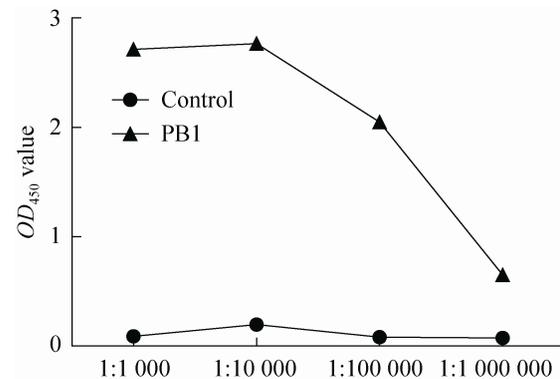


图4 ELISA 检测兔源 PB1 多克隆抗体效价

Fig. 4 Detection of the polyclonal antibody titer of PB1 by indirect ELISA. Serum from rabbit immunized with PB1 fusion protein was added to the PB1 protein in dilution of 1:1 000, 1:10 000, 1:100 000 and 1:1 000 000. Serum from rabbit before immunization was added as negative control. The OD_{450} was then detected.

2.5 抗 PB1 重组蛋白多克隆抗体特异性鉴定及效价分析

Western blotting 鉴定纯化的抗 PB1 多克隆抗体与 FLAG-PB1 及病毒 PB1 蛋白结合的特异性，SDS-PAGE 检测结果如图 5A 所示。结果表明纯化后的抗体与过表达的 FLAG-PB1 以及流感病毒 WSN 毒株的 PB1 蛋白均能发生特异性反应，且条带单一，表明特异性较好。同时该 PB1 抗体也可以与其他亚型如 H3N2、H9N2 流感病毒的 PB1 蛋白发生特异性反应，结果如图 5B 所示。将制备的 PB1 多克隆抗体与购自 Santa 的 PB1 抗体进行比较，结果显示 PB1 多克隆抗体的灵敏度显著高于商业化 PB1 抗体 (Santa I0303) (图 6)。

3 讨论

流感病毒 PB1 蛋白是流感病毒聚合酶复合体的组分之一，在流感病毒的转录、复制等过

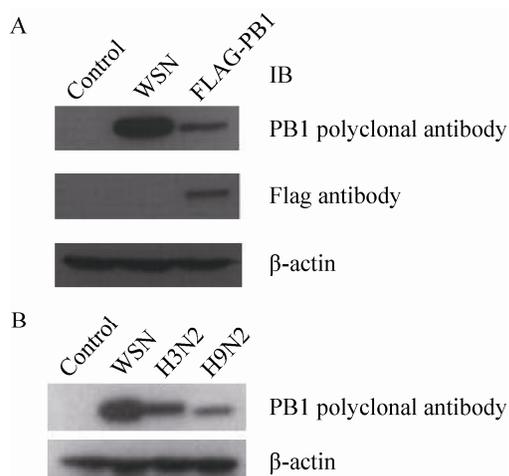


图 5 Western blotting 检测 PB1 多克隆抗体的特异性
 Fig. 5 Detection of the specificity of the PB1 polyclonal antibody. (A) 293T cells were infected with WSN influenza virus at MOI of 0.5 or transfected with FLAG-PB1 expressing plasmid and harvested 14 h after infection or 24 h after transfection. Total cell extracts were prepared for immunoblotting with indicated antibodies. 293T cells without any treatment were used as negative control. (B) 293T cells were infected separately with WSN, H3N2, H9N2 influenza virus at MOI of 0.5 and harvested 14 h after infection. Total cell extracts were prepared for immunoblotting with indicated antibodies. 293T cells without any treatment were used as negative control.

程中发挥非常重要的作用。为更好地研究 PB1 蛋白的功能及其与宿主细胞因子的相互作用，本实验制备了灵敏度及特异性都较好的抗 PB1 多克隆抗体。我们首次选取了 PB1 蛋白 550-755 段氨基酸序列作为抗原免疫家兔，该段亲水性、可塑性、可及性都较好，是较为理想的抗原表位。同源比对结果表明该段蛋白区域在不同亚型 A 型流感病毒毒株中高度保守。免疫家兔获得了高效价的兔源的 PB1 蛋白多克隆抗体。获得的多克隆抗血清经膜亲和纯化后实验检测表明效价及特异性都较好，其灵敏度显著高于购

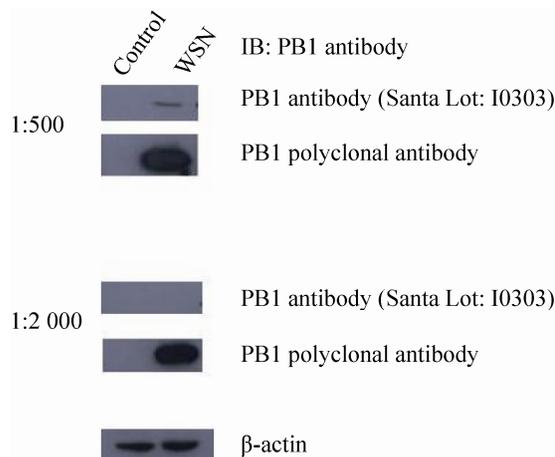


图 6 PB1 多克隆抗体与商业化 PB1 抗体灵敏度及特异性比较

Fig. 6 Comparison of the specificity and sensitivity between anti-PB1 polyclonal antibody and commercial PB1 antibody. 293T cells were infected with WSN influenza virus at MOI of 0.5 and harvested 14 h after infection. Total cell extracts were prepared for immunoblotting with indicated antibodies. 293T cells without any treatment were used as negative control.

买的 PB1 抗体 (Santa I0303)，且能够与不同亚型的 A 型流感病毒 PB1 蛋白特异性结合，为人们研究流感病毒聚合酶或制备 PB1 抗体提供了思路。

本实验原核表达的抗原蛋白以包涵体的形式存在于原核表达菌株中。一般而言，包涵体的形成主要有两方面的因素：一方面是因为蛋白表达效率太高，使得表达的蛋白无法正常折叠而发生聚集，另一方面可能是因为所含有的半胱氨酸残基形成了链间的二硫键，影响了蛋白质的正确折叠^[14-15]。通常情况下会通过采用利用分子伴侣共表达、降低 IPTG 诱导浓度或者降低蛋白表达温度等手段得到可溶性表达的蛋白^[16-17]。实验中虽然采用不同 IPTG 诱导浓度，不同的诱导温度 (4 °C、16 °C、20 °C、37 °C)，蛋白仍以包涵体的形式表达。故选择在变性条

件下镍柱亲和纯化包涵体蛋白,达到了较好的纯化效果。

本文中作为抗原免疫家兔的蛋白为变性后的蛋白,未经复性处理。变性蛋白作为抗原免疫家兔时,抗原中含有 8 mol/L 的尿素,可能使家兔产生一定的免疫反应。同时由于变性蛋白做抗原获得的抗体识别的是蛋白的线性表位,故而抗体可以用于 Western blotting 实验,但是只有当该段抗原同时位于处于天然状态下的蛋白表面时,该抗体才可以识别对应的天然蛋白,即可用于免疫共沉淀、免疫荧光等实验。免疫荧光实验证明该段抗体不能应用于该类实验,可能正是因为 PB1 蛋白的 550–775 段的氨基酸位于天然构象的 PB1 蛋白的内部,故以其为抗原制备的抗体不能够识别天然状态下的 PB1 蛋白,但是可以用于 Western blotting 实验。实验也证明该抗体在 Western blotting 实验中的灵敏度及特异性都较好。

免疫家兔得到的抗血清成分比较复杂,使用时会产生较多的非特异性信号,需要纯化才可用于实验。实验室一般采用的抗体纯化方法有分级沉淀、柱纯化以及膜纯化等^[14]。在柱纯化中,抗原与微珠以氢键、疏水堆积等作用力相结合,而抗原与抗体特异性结合的作用力也是如此,因此抗体洗脱步骤格外重要,洗脱条件太剧烈会导致抗原一同被洗脱下来,太温和洗脱下的抗体量将大大减少^[18],因此抗体的纯化质量不能够保证。本实验采用的膜纯化方法是利用抗原抗体的特异性结合特性,进而通过低 pH 的甘氨酸洗脱,虽然得到的抗体的量相对柱纯化较少,但是纯度更好,且操作简单易行^[19]。经 ELISA 及 Western blotting 实验检测,纯化得到的抗体的效价达到 100 000 且特异性较

好,为进一步研究流感病毒 PB1 蛋白与病毒各组分以及宿主细胞因子的相互作用奠定了基础。

REFERENCES

- [1] Samji T. Understanding the viral life cycle. *Yale J Biol Med*, 2009, 82(4): 153–159.
- [2] Wu Y, Wu Y, Tefsen B, et al. Bat-derived influenza-like viruses H17N10 and H18N11. *Trends Microbiol*, 2014, 22(4): 183–191.
- [3] Muramoto Y, Noda T, Kawakami E, et al. Identification of novel influenza A virus proteins translated from PA mRNA. *J Virol*, 2012, 87(5): 2455–2462.
- [4] Tafforeau L, Chantier T, Pradezynski F, et al. Generation and comprehensive analysis of an influenza virus polymerase cellular interaction network. *J Virol*, 2011, 85(24): 13010–13018.
- [5] Poch O, Sauvaget I, Delarue M, et al. Identification of four conserved motifs among the RNA-dependent polymerase encoding elements. *EMBO J*, 1989, 8(12): 3867–3874.
- [6] Asano Y, Ishihama A. Identification of two nucleotide-binding domains on the PB1 subunit of influenza virus RNA polymerase. *J Biochem*, 1997, 122(3): 627–634.
- [7] González S, Zürcher T, Ortín J. Identification of two separate domains in the influenza virus PB1 protein involved in the interaction with the PB2 and PA subunits a model for the viral RNA polymerase structure. *Nucleic Acids Res*, 1996, 24(22): 4456–4463.
- [8] González S, Ortín J. Distinct regions of influenza virus PB1 polymerase subunit recognize vRNA and cRNA templates. *EMBO J*, 1999, 18(13): 3767–3775.
- [9] Jung TE, Brownlee GG. A new promoter-binding site in the PB1 subunit of the influenza A virus polymerase. *J Gen Virol*, 2006, 87(3): 679–688.
- [10] Gíria M, de Andrade HR. Genetic evolution of PB1 in the zoonotic transmission of influenza A (H1) virus. *Infect Genet Evol*, 2014, 27: 234–243.

- [11] Biswas SK, Nayak DP. Mutational analysis of the conserved motifs of influenza A virus polymerase basic protein 1. *J Virol*, 1994, 68(3): 1819–1826.
- [12] Yang QH, Wang XW, Jin Y, et al. Prediction of the B cell epitope for MUC1 antigen. *Med Militaris Tertiae*, 2005, 27(5): 406–409 (in Chinese).
杨清浩, 王祥卫, 金燕, 等. MUC1 抗原的 B 细胞表位预测. *第三军医大学学报*, 2005, 27(5): 406–409.
- [13] Apostolopoulos V, Yu M, Corper AL, et al. Crystal structure of a non-canonical low-affinity peptide complexed with MHC class I: a new approach for vaccine design. *J Mol Biol*, 2002, 318(5): 1293–1305.
- [14] Wang Z, Dai R, Zhang JW, et al. Induced expression of *Arabidopsis thaliana* WUSCHEL in *Escherichia coli*, affinity protein purification and polyclonal antibody preparation. *Chin J Biotech*, 2009, 25(9): 1409–1416 (in Chinese).
王增, 代茹, 张江巍, 等. 拟南芥 WUSCHEL 蛋白的原核表达、亲和纯化和多克隆抗体制备. *生物工程学报*, 2009, 25(9): 1409–1416.
- [15] Wang Z, Ma HQ, Zhang W, et al. The progress of inclusion body isolation and chromatographic refolding, purification methods. *China Biotechnol*, 2009, 29(7): 102–107 (in Chinese).
王增, 马会勤, 张文, 等. 包涵体蛋白的分离和色谱法体外复性纯化研究进展. *中国生物工程杂志*, 2009, 29(7): 102–107.
- [16] Swietnicki W. Folding aggregated proteins into functionally active forms. *Curr Opin Biotechnol*, 2006, 17(4): 367–372.
- [17] Lin GZ, Lian YJ, Ryu JH, et al. Expression and purification of His-tagged flavonol synthase of *Camellia sinensis* from *Escherichia coli*. *Protein Expr Purif*, 2007, 55(2): 287–292.
- [18] Shu W, Li FH, Deng M, et al. Preparation, purification the antibody and immunofluorescence analyse of ANKRD17. *Lett Biotechnol*, 2007, 18(5): 771–773 (in Chinese).
舒伟, 李发慧, 邓敏, 等. ANKRD17 蛋白抗体的制备、纯化及检测. *生物技术通讯*, 2007, 18(5): 771–773.
- [19] Cai R, Ye X. Preparation, purification and identification of the polyclonal antibody of PHD finger protein 8. *Chin J Biotech*, 2010, 26(3): 393–397 (in Chinese).
蔡荣, 叶昕. PHD finger protein 8 蛋白多克隆抗体的制备、纯化与检测. *生物工程学报*, 2010, 26(3): 393–397.

(本文责编 陈宏宇)